

## Levan으로부터 Levanbiose를 생산하는 미생물의 분리 및 배양

강은정 · 강수경 · 이태호<sup>†</sup>

부산대학교 미생물학과

### Isolation and Cultivation of Microorganism Producing Levanbiose from Levan

Eun-Jung Kang, Soo-Kyung Kang and Tae-Ho Lee<sup>†</sup>

Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

#### Abstract

A bacterial strain No. 43 was isolated from soil samples as a levan-assimilating microorganism producing an extracellular levanase and hydrolyzing levan to levanbiose. According to the taxonomic characteristics of its morphological and physiological properties, the strain was identified as *Pseudomonas* sp. No. 43. The optimum cultural medium was composed of 10g levan, 5g(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3g NH<sub>4</sub>Cl, 3g polypepton, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, and 0.2g MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O per liter. The cultivation for levanase was carried out in pH 7.0 at 40°C for 28 hr. The reaction product was a kind of oligosaccharide and it was purified by chilled ethanol precipitation and gel filtration for evaluation of degree of polymerization (DP). The purified product was determined as levanbiose of MW 342 and DP2 by HPLC and FAB-MS.

**Key words:** F2, levanase, levanbiose, levanoligosaccharide

#### 서 론

*Bifidobacterium*속을 비롯한 유산균은 장내에 서식하면서 병원성 및 부패성 세균의 증식을 억제하고, 항암성 및 혈압강화 등에 기여하는 것으로 알려져 있다(1). 이러한 유산균의 생육이 fructooligosaccharide 및 galactooligosaccharide, lactulose, raffinose 등의 난소화성 oligo당에 의해 촉진되는 등의 기능적 특징이 최근 밝혀짐에 따라(2) 현재 국내외에서 유용 oligo당에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

일반적으로 oligo당은 자연계에 유리된 상태로 존재하는 것이 아니라 각종 천연 다당으로부터 화학적, 효소적으로 생성되는 물질로, 다당의 종류에 따라 생성되는 oligo당의 종류도 달라질 수 있다. 자연계에 널리 분포하는 다당으로는 식물 유래의 starch, cellulose, chitin, xylan, inulin, levan 등과 미생물 유래의 dextran, levan 등을 들 수 있다. 지금까지 다당은 생체의 구성 성분으로서 또는 에너지원으로서, 세포 상호간의 인식 및 분화 그리고 면역기능의 역할 등으로 주로 주목을 받아왔다. 그러나 근래에 와서는 이들로부터 효소작용에 의

해 생성되는 oligo당이 영양학적 및 생리학적 측면에서 연구의 대상이 되어 많은 관심을 끌기 시작하고 있다.

기능성을 가진 oligo당의 개발은 1980년대에 와서 급속히 발전하였는데 이러한 기능성 oligo당의 제조에는 다음의 2가지 방법이 그 주류를 이루고 있다. 하나는 미생물 유래의 효소(3-5)를 이용하여 단당 혹은 oligo당을 기질로 해서 다른 oligo당을 합성하는 방법이고 또 하나는 미생물 유래의 가수분해 효소를 이용하여 천연 다당을 기질로 해서 oligo당을 유리시키는 방법(6,7)이다. 전자의 경우에는 많은 연구가 진행되어 현재 이 방법에 의해 합성되는 oligo당이 시판되고 있는 실정이다. 최근의 연구는 천연 다당으로부터 식물, 미생물 유래의 가수분해 효소에 의해 유리되는 fructooligosaccharide, galactooligosaccharide, isomaltulose 등이 그 주류를 이루고 있으며 특히, fructooligosaccharide는 설탕과 물리적인 특성과 감미도가 유사하여 대체감미료로서 각종 식품에 첨가되고 있다. 또한 이들은 장내 microflora의 개선 및 면역기능의 강화 뿐만 아니라 식품소재로서 흡습성, 수분활성 저하 등의 물리적인 특성도 갖추고 있어 기능성 식품으로서도 각광을 받고 있다.

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

Levan은 fructose가 중합된 물질로  $\beta$ -2,6-linkage의 backbone에  $\beta$ -2,1-linkage가 branching되어 있는 fructan으로서 단자엽 식물의 일부와 일부 미생물에 의해 생산되며 그 유래에 따라 branching정도가 각기 다른 특징이 있다(8). 현재까지 이들 levan을 분해하는 효소에 대해서는 많은 보고(9-12)가 있으나 levan으로부터 단일종의 oligo당을 효율적으로 생산하는 효소는 별로 알려져 있지 않다. 즉, levan의 가수분해에 의해 생산되는 oligo당은 크게 DFAIV(di-D-fructose 2,6':2',6 dianhydrous)와 linear fructooligosaccharide로 나눌 수 있는데 대개는 main product 이외에 여러 종류의 중합도(degree of polymerization, DP)를 가진 oligo당들이 동시에 얻어지고 있다.

본 연구는 미활용 다당인 levan으로부터 fructooligosaccharide를 유리하는 효소를 개발하기 위해 시도 되었으며, 여기에서는 일차적으로 levan으로부터 단일종의 oligosaccharide를 생성하는 균주를 선별하고 동정하며 동시에 levanase 생성 최적 조건을 설정하여 생성 oligo당의 중합도를 결정하고자 한다.

## 재료 및 방법

### Levan의 합성

기질로 사용되는 levan은 Dawes와 Ribbons(13)의 방법에 의해 다음과 같이 제조하였다. Levansucrase 생산배지(1.0% yeast extract, 2.0% glucose, 1.0% sucrose, 0.1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.1%  $(NH_4)_2SO_4$ , pH 5.0~5.6)에 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988를 접종하여 30°C에서 18시간 정지배양한 후 원심분리하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 이 조효소액을 10%의 sucrose를 함유하는 인산완충액(0.1 M, pH 6.8)에 첨가하여 4°C에서 7일간 반응시킨 후 ethanol 2 volume를 첨가하여 합성된 levan을 침전시켜 회수하였다. 회수한 levan은 다시 용해하여 잔존 sucrose를 제거하기 위해 증류수에 철저히 투석한 후 동결건조하여 배지의 탄소원 및 효소의 기질로 사용하였다.

### Levanase 생산균주의 screening

Levanase를 생산하는 균주를 분리하기 위해 부산교 및 경남일대 등에서 채취한 토양 약 0.2g을 5ml의 분리용 배지(Table 1)에 현탁한 뒤 30°C에서 24시간 배양하였다. 다시 배양액 0.5ml를 5ml의 분리용 배지에 접종하고 같은 온도에서 배양을 2~3번 반복하는 집적배양을 행한 뒤 배양액 일정량을 1.5% agar가 첨가된 분리용 배지에 희석평판하여 colony를 형성시켰다. 일정

시간 배양후 colony주위에 투명환이 형성된 균주를 유망균주로 분리하여 액체 배양에 의해 levanase 생성 여부를 확인하였다. 즉 순수분리한 균주를 분리용 배지 10 ml에 24시간 액체 배양한 뒤 배양상등액을 조효소액으로 사용하여 1% levan(0.1 M phosphate buffer, pH 6.8) 용액과 40°C에서 반응시켜 반응산물을 TLC로 확인하였다. 이때 TLC 상에서 한종류의 fructooligo당을 생성하는 균주를 선별하였다. TLC용 전개용매로는 1-butanol : methanol : water=2 : 1 : 1(v/v/v) 을 사용하였다.

### 배양

최적배지 및 배양조건 검토와 효소생성을 위한 배양은 500ml 용량의 shaking flask에 배지 100ml를 분주하여 110°C에서 10분간 가압 멸균한 후 미리 전배양한 종균을 1% 비율로 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양(120 Rev.  $\times$  6cm stroke)하였다. 전배양은 동일한 배지 100ml를 넣은 500ml용 flask에 보관용 slant로부터 1백금이 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양하여 사용하였다. 배양한 배양액은 4°C, 10,000 rpm, 20분간 냉동원심분리하여 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 미생물의 생육정도는 건조균체량으로 표시하였다.

### Levanase 활성측정법

Levanase의 활성측정은 100mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)에 levan을 1%의 농도로 녹인 기질용액, 0.2ml에 효소액 0.1ml를 첨가하여 40°C에서 30분간 반응시킨 뒤 생성된 환원당의 양을 정량하였다. Blank로는 기질용액 대신 100mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 사용하였다. 효소활성의 1 unit는 1분에 1  $\mu$ mol의 fructose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

### 균주의 동정

분리균주의 분류학상의 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 생리학적, 생화학적 제반 특성을 검토하였으며, 이들 결과를 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(14)와 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 제9판(15)을 참고로 하여 동정하였다.

### 사용시약 및 기기

배지의 탄소원으로 사용되는 levan은 *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 유래의 levansucrase로 직접 합성하여 사용하였으며 효소의 기질로 주로 사용한 *Serratia* sp. 유래의 levan은 Wako(Japan)사로부터 구입

하였다. 생성 oligo당의 확인을 위한 TLC plate는 Kieselgel 60 F<sub>254</sub>(Merk, USA)를 사용하였고, oligo당의 중합도를 확인하기 위해서는 HPLC(Waters, USA)를 사용하였다. Column은 carbohydrate analysis(Waters, USA)를, elution을 위한 solvent system은 80/20(v/v)의 acetonitrile/water를 사용하였다. Detector는 Waters 410 differential refractometer를, oligo당의 분자량 측정에는 FAB-MS(V.G. Quattro, England)가 사용되었다.

### 결과 및 고찰

#### 공시균주의 분리 및 분류

토양시료를 분리원으로 하여 Table 1에 표시한 배지에 집적배양과 평판배양을 반복한 후 colony 주위에 levan의 투명환을 형성하는 균주를 우선 선발하였다. 분리된 균주는 액체배지 10ml에 30°C, 48시간 진탕배양하여 배양상등액의 효소활성을 측정함과 동시에 생성 oligo당을 TLC로 확인하였다. 그 결과 단일 oligo당을 생성하는 1균주를 levanase 생산균주로 선정하였으며 이때의 생성 oligo당은 중합도(degree of polymerization, DP)가 비교적 작은 것으로 판단되었으며, 한 종류 이외의 다른 oligo당은 물론 fructose도 전혀 생성되지 않아 목적에 부합하는 균주로 판단되어 분리균주로 선정하고 동정하였다.

분리균주는 그람 음성의 운동성이 있는 간균으로 관찰되었으며 colony는 둥근형으로 wetty하고 중앙부가 볼록한 convex형이었다. 탄수화물의 이용성에 있어서는 Table 2에 나타난 바와 같이 glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnase, raffinose, arabinose, mannose, maltose, fructose, trehalose, galactose 등은 양성이었으며, cellobiose, salicin에 대해서는 음성을 나타냈다. 한편 생화학적 특성을 검토한 결과는 Table 2에 보는 바와 같이 catalase, oxidase test, citrate production, arginine dehydrolase, lysine decarboxylase, gelatin liquefaction test 등에 대해서는 양성반응을, urease test

Table 1. Basal medium for the isolation of microorganisms producing levan-degrading enzyme

Components	g/L
Levan	10.0
NaNO <sub>3</sub>	3.0
Yeast Extract	3.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.2

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of strain No. 43

Characteristics	Strain No. 43
Gram stain	- <sup>1)</sup>
Morphology	rod
Catalase	+
Oxidase	+
Urease	-
Citrate production	+
Nitrate reduction	-
Arginine dehydrolase	+
Lysine decarboxylase	+
Gelatine liquefaction	+
Starch hydrolysis	-
Growth on 12% NaCl	-
Utilization of	
glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnase, raffinose, arabinose, mannose, maltose, fructose, trehalose, galactose	+
cellobiose, salicin	-

<sup>1)</sup> +: Positive, -: Negative

및 starch hydrolysis test에서는 음성반응을 나타내었다. 이상의 결과를 토대로 하여 분리균주를 *Pseudomonas* sp. No. 43으로 분류, 명명하였다.

#### Levan 농도의 영향

Levanase 생산을 위한 탄소원의 농도를 결정하기 위해 Table 1의 levan 농도를 0.5%에서 3%까지로 변화시켜 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 생육도와 효소활성을 측정하였다. 그 결과 Table 3에 나타난 것과 같이 1%의 levan-농도에서 levanase는 최대 활성을 나타내었으며 이 이상의 농도에서는 levanase 생산이 오히려 억제되었다. 일반적으로 levanase는 유도효소(16)로 알려져 있어 levan의 농도가 증가하면 일정 농도까지는 효소의 생산도 증가할 것으로 기대되나 본 실험에서는 1% 이상의 levan 농도에서 효소생산이 오히려 억제되었다. 이와같은 억제 현상은 levanase의 경우에는 아직 잘 알려져 있지 않은 현상이다. 이하의 배지에는 1%의 levan을 첨가하여 배양하였다.

Table 3. Effect of levan concentration on levanase production

Levan concentration (%)	Final pH	Levanase activity (unit/ml)	Growth (mg/100ml)
0.5	7.3	51.2	0.97
1.0	7.8	84.5	1.31
1.5	7.6	66.3	1.22
2.0	7.8	63.9	1.32
2.5	7.5	61.1	1.27
3.0	7.2	69.8	1.42

### 질소원의 영향

Levanase 생산을 위한 질소원의 영향을 검토하기 위해 Table 1의 기본배지의 질소원 대신 각종 유기 및 무기질소원을 0.3%씩 첨가하여 30°C에서 48시간 진탕 배양하여 전술한 측정법에 따라 균의 생육도와 효소활성을 측정하였다. 그 결과 Table 4에 나타난 것과 같이 유기질소원으로 polypeptone이 우수하였으며 무기질소원으로는 NH<sub>4</sub>Cl가 효소생산에 적합한 것으로 나타났다. 이하의 levanase 생산을 위한 배지에는 polypeptone과 NH<sub>4</sub>Cl를 동시에 첨가하기로 하였다.

### 무기염류의 영향

Levanase 생산을 위해 각종 무기염류의 영향을 검토하기 위해 현재까지 결정된 기본배지에 각종염류를 농도별로 혹은 조합별로 첨가하여 30°C에서 48시간 배양한 후 균체의 생육도와 효소활성을 측정하였다. 그 결과 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.02% MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O를 동시에 첨가한 배지에서 효소활성이 비교적 높게 나타나 이후의 배지에 이를 첨가하여 사용하였다.

### 초기 pH의 영향

Levanase 생산을 위한 초기 pH의 영향은 1% levan, 0.3% polypeptone, 0.3% NH<sub>4</sub>Cl, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.02% MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O를 함유하는 배지를 각 pH로 조정하여 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 효소활성을 측정하였다. Table 5에 나타난 것과 같이 균의 생육은 중성부근의 pH에서는 비교적 양호하였으나 효소의 생산성은 pH 8에서 가장 우수하였다.

Table 4. Effect of nitrogen sources on levanase production

Nitrogen source	Final pH	Levanase activity (unit/ml)	Growth (mg/100ml)
None	7.6	49.4	0.78
Yeast extract	7.8	59.2	1.23
Polypeptone	7.8	98.3	1.33
Bactopeptone	7.6	73.2	1.24
Beef extract	7.8	57.4	1.36
Malt extract	6.2	58.3	1.43
NaNO <sub>3</sub>	7.8	84.9	1.46
KNO <sub>3</sub>	7.8	68.4	1.27
NH <sub>4</sub> Cl	8.0	100.2	1.39
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7.8	88.8	1.32
Polypeptone + NH <sub>4</sub> Cl	7.7	112.7	1.37
Polypeptone + NaNO <sub>3</sub>	7.6	95.6	1.24
Polypeptone + NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7.9	103.4	1.35

Table 5. Effect of initial pH of medium on levanase production

Initial pH	Final pH	Levanase activity (unit/ml)	Growth (mg/100ml)
5.0	6.2	71.5	1.28
6.0	7.0	90.8	1.25
7.0	8.0	95.2	1.38
8.0	8.2	116.5	1.98
9.0	9.0	81.5	1.43
10.0	9.8	42.0	0.23

### 배양시간 경과에 따른 균의 증식 및 효소의 생산성

Table 6에 표시한 최적배지 100ml를 분주한 500ml shaking flask에 전배양한 종균을 1% 접종하여 30°C에서 경시적으로 배양한 후 그 때의 효소활성 및 pH 변화 그리고 균체의 생육도를 측정하여 Fig. 1에 나타내었다.

Table 6. The optimum culture condition for levanase production

Medium(g/L)	Levan	10.0
	NH <sub>4</sub> Cl	3.0
	Polypeptone	3.0
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.2
	pH	8.0
Other conditions	Temperature	30°C
	Culture time	20hr
	Agitation	120 rev. × 6cm stroke

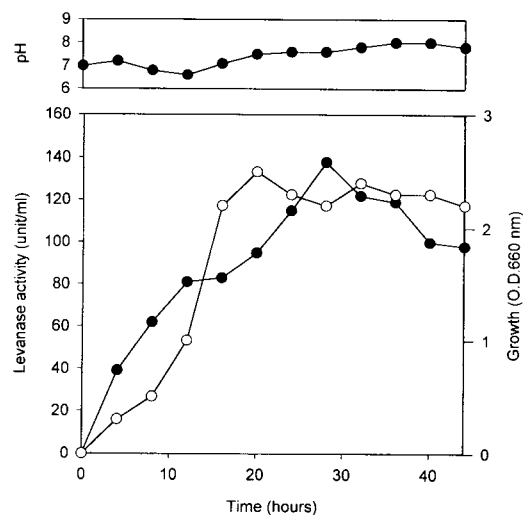


Fig. 1. Time course of levanase production and cell growth on the optimum condition by *Pseudomonas* sp. No. 43.

○—○: Levanase activity, ●—●: Growth

다. 효소활성은 배양 20시간 정도에서 최대가 되었으며 그 이후에도 거의 일정하게 유지되었다. 균 증식은 효소 생성량과 비례하여 증가하다가 28시간 근방에서 최대가 되었다. 이와같은 조건에 의해 생산된 효소량은 초기의 분리용 배지에 비해 약 2배 이상 증가된 양에 해당되며 이후에도 재현성 있는 생산성을 보여 주었다. 배양액의 최종 pH는 배양기간 중에 거의 일정하게 유지되었다.

반응 product 확인

분리균주에 의해 생산되는 levanase는 *Zymomonas mobilis* 및 *Serratia* sp. 유래의 levan에 동시에 높은 효소활성을 나타내었다. 그러나 *Serratia* sp. 유래의 levan이 brach가 거의 없는 직쇄상이기 때문에 효소의 작용이 용이할 것으로 기대되며, 실제 *Zymomonas* 유래의 levan보다 효소활성이 높은 것으로 확인되었다.

효소를 두 종류의 levan에 작용시켰을 때 levan에 대한 작용양식 및 생성 oligo당의 종류를 확인하기 위해 1%의 levan(0.1M sodium phosphate buffer, pH 8.0) 용액에 효소액 1 unit를 첨가하여 30°C에서 24시간 동안 철저히 분해하였다. 분해액 일정액을 TLC로 확인한 결과 한 종류의 spot만 검출되어 본 levanase는 levan으로부터 단일종의 oligo당을 생성하는 것으로 판단되었다. 그러나 전개가 어려운 큰 중합도를 가진 oligo당의 존재 가능성도 배제할 수 없어 HPLC(Carbohydrate analysis column)로 다시 확인하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 것과 같이 두 종류의 levan으로부터 각각 한 종류만의 oligo당이 검출되었다. 한편 중합도가 큰 oligo당부터 용출되는 Sugar pak column을 사용한 경우에도 한 종류의 oligo당만 검출되어 상기 결과를 뒷받침 하였다.

생성 oligo당의 정제 및 중합도의 확인

Levanase의 작용에 의해 생성되는 fructooligosaccharide의 중합도를 결정하기 위해 효소 반응액으로부터 oligo당을 정제하였다. 즉, *Serratia* sp. 유래의 1% levan 용액(0.1M 인산완충액, pH 8.0)에 효소를 첨가하여 30°C에서 24시간 반응시킨 후, 잔존하는 미분해의 levan을 제거하기 위해 2 volume의 냉각 ethanol을 첨가하여 원심분리(10,000 rpm, 20 min)하였다. 그 상등액은 evaporator로 농축하여 Sephadex G-25 columne에서 gel filtration 하였다. 이렇게 정제한 oligo당은 중합도를 결정하기 위해 HPLC를 행하여 그 profile을 Fig. 3에 나타내었다. 즉, *Serratia* sp. 유래의 levan을 부분

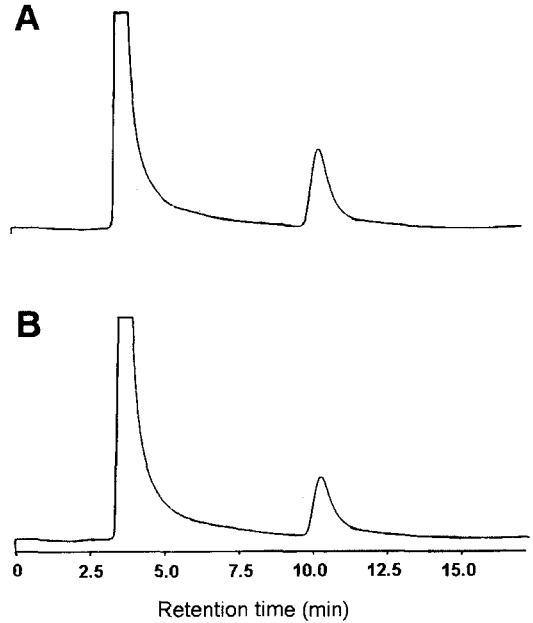


Fig. 2. HPLC profiles of the reaction products from levan by levanase. A : *Serratia* sp. levan, B : *Zymomonas mobilis* levan

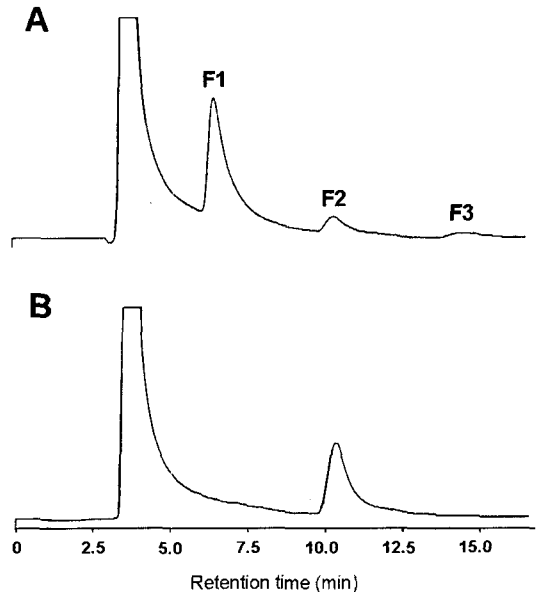


Fig. 3. Degree of polymerization of the reaction product from levan by levanase. A: standard, B: reaction product from levanase F1: fructose, F2: levanbiose, F3: levantriose.

산 가수분해하여 fructooligosaccharide의 standard를 얻고 이 standard와 정제된 product를 동시에 HPLC하여 그 retention time을 비교함으로써 일차적으로 oligo

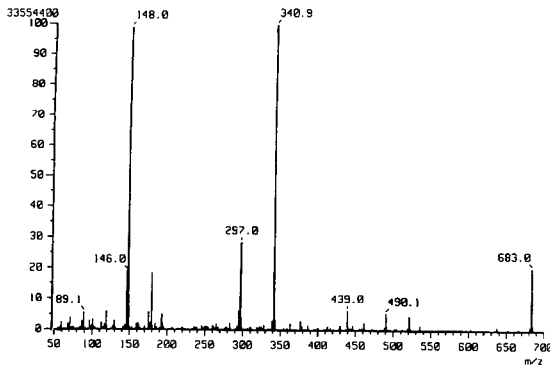


Fig. 4. FAB-MS spectrum of the purified oligosaccharide from levan hydrolysate.

당의 중합도를 결정하였다. 그 결과 생성 oligo당은 중합도가 2인 levanbiose(F2)로 추정되었다. 그러나 HPLC의 retention time만을 보고 중합도를 확정하는 것은 불충분하기 때문에 이를 더욱 확실하기 위해 정제된 oligo당을 FAB-MS로 그 분자량을 측정하였다. Fig. 4에 나타난 결과와 같이 fructooligosaccharides의 분자량이 342로 나와 본 물질이 levanbiose(F2)임이 확인되었다.

현재까지 밝혀진 levanase의 경우 levan으로부터 여러 종류의 oligo당을 생성하는 효소는 많이 알려져 있으나 단일종의 oligo당만을 생산하는 효소의 예는 많지 않다. 본 연구에서 사용한 효소의 경우에는 F2만이 유일한 product로 확인되었으며 반응초기에도 중합도가 큰 oligo당이 전혀 생산되지 않는 것으로 보아 본 효소가 일종의 exo type의 levanase로서 단일종의 oligo당 생산에 적합한 효소인 것으로 판단되었다. 현재는 본 효소의 정제 및 일반적인 성질에 대해 검토중에 있다.

## 요 약

토양으로부터 levan을 분해하여 단일종의 fructooligosaccharide를 생산하는 새로운 미생물을 분리 선별하여 *Pseudomonas* sp. No. 43으로 명하였다. Levanase 생산을 위한 최적 배지 조성은 1% levan, 0.3%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.3% polypepton, 0.1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.02%  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (pH7.0)이었으며, 30°C에서 20시간 배양시켰을 때 효소의 생산이 최대에 도달하였다. Levan으로부터 levanase에 의해 생성되는 product는 단일종의 oligosaccharide임이 확인되었으며 생성 oligo당의 중합도를 확인하기 위해 이를 순수하게 정제하여 HPLC 및 FAB-MASS로 조사한 결과 분자량이 342로 나타나 DP가 2인 levanbiose임이 판명되었다.

## 감사의 글

이 논문은 1997년도 부산대학교 기초과학연구소 간접연구경비 지원에 의하여 부산대학교 기초과학연구소에서 연구 수행되었음(RIBS-PNU-97-411).

## 문 헌

- Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunnaga, T. and Tashiro, Y. : Bifidobacteria. *Microflora*, **5**, 37(1986)
- Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N. : A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181(1986)
- Dung, N. Y., Vetayasuporn, S., Kamio, Y., Abe, N., Kaneko, J. and Izaki, K. : Purification and properties of  $\beta$ -1,4-xylanases 2 and 3 from *Aeromonas caviae* W-61. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1707(1993)
- Ettalibi, M. and Baratti, J. C. : Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinase and endoinulinase of *Aspergillus ficum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 13(1987)
- Xiao, R., Tania, M. and Takao, S. : Purification and some properties of endoinulinase from *Chrysogenum pannorum*. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 244(1989)
- Duan, K. J., Sheu, D. C. and Chen, J. S. : Purification and characterization of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1811(1993)
- Muramatsu, K., Onodera, S., Kikuch, M. and Shiomi, N. : Purification and some properties of  $\beta$ -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1681(1993)
- Freingold, D. S. and Gehatia, M. : The structure and properties of levan, a polymer of D-fructose produced by culture and cell free extracts of *Aerobacter levanicum*. *J. Polymer Science*, **23**, 783(1957)
- Ichiro, K., Saito, T., Iizuka, M., Minamiura, N. and Ono, S. : Characterization of levan produced by *Serratia* sp. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 9(1993)
- Murakami, H., Muroi, H., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K., Nakauo, H. and Kitahata, S. : Purification and some properties of a levanase from *Streptomyces* sp. No.7-3. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2247(1990)
- Murakami, H., Kuramoto, H., Mizutani, K., Nakano, H. and Kitahata, S. : Purification and some properties of a new levanase from *Bacillus* sp. No. 71. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 608(1992)
- Tanaka, K., Kawaguchi, H., Ohno, K. and Shohji, K. : Enzymatic formation of difructose anhydride IV from bacterial levan. *J. Biochem.*, **90**, 15459(1981)
- Dawes, E. A. and Ribbons, D. W. : Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.*, **98**, 804(1966)
- Standely, T. W., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. : *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 4, The William and Wilcans Co., USA(1984)
- John, G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. and William, S. T. : *Bergey's manual of determinative*

bacteriology. 9th ed., The William and Wilkams Co.  
USA(1994)  
16. Yokota, A., Kondo, K., Nakagawa, M., Kojima, I. and

Tomia, F. : Poduction of levanbiose by a levan-deg-  
rading enzyme from *Streptomyces exofoliatus* F3-2.  
*Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 745(1993)

(1998년 2월 2일 접수)