

한천 분해균 *Cytophaga* sp. ACLJ-18의 분리 및 효소 생산 조건 최적화

*조순영 · 주동식 · *최용석 · *김옥선 · 송해미 · †이용호

*강릉대학교 식품과학과, 부경대학교 식품공학과

Isolation of Agar Degrading Bacteria, *Cytophaga* sp. ACLJ-18 and Optimization of Enzyme Production

Soon-Young Cho*, Dong-Sik Joo, Yong-Seok Choi*, Ok-Seon Kim*,
Hae-Mee Song, and Eung-Ho Lee †

Department of Food Science and Technology, National
Pukyong University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Food Science, Kangnung National University, Kangnung 200-701, Korea

ABSTRACT

The strain which produces agar degrading enzyme was isolated from chiton (*Liolophura japonica*). The strain was identified as *Cytophaga* sp. through its morphological, physiological, and biological characteristics. For the production of agar degrading enzyme, 0.3% nutrient broth, 0.2% yeast extract and 0.5% agar was used as nitrogen and carbon source, respectively. The optimal initial pH, NaCl and temperature for the agar degrading activity of *Cytophaga* sp. were 7.0, 2.0% and $30 \pm 2^\circ\text{C}$, respectively. Agar degrading activity of enzyme obtained from *Cytophaga* sp. was increased until the incubation of 96hrs, but after 96hrs, the activity was decreased.

서 론

한천은 우뚝가사리나 지누아리 등과 같은 홍조류의 세포벽 구성성분으로서 agarose와 agaropectin으로 이루어진 hetero형 해조 다당류이다. 일반적으로 알려져 있는 것처럼 한천은 강한 겔형성성과 가역성겔을 형성하는 특징을 갖고 있어서 식품, 공업, 의약, 미생물 연구 등의 분야에 대부분이 이용되고 있으며, 이러한 이용성 때문에 한천의 효율적인 추출 및 정제 방법, 한천의 겔 형성기구, 구조 및 합성 등에 대한 많은 연구가 이루어져 있다(1-6). 그러

나, 국내에서 생산되는 홍조류를 이용한 한천 제조 및 정제에 관한 연구는 이와 배(7) 및 박 등(8)의 연구가 있을 뿐이다.

한편, 최근에는 한천의 물리적 성질의 이용 범위를 벗어나 한천을 적절하게 분해시켜 hetero형의 올리고당을 제조하여 올리고당이 갖는 기능성을 식품 등에 이용하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 이와 관련하여 한천, 분해균에 대한 연구가 이루어져 *Actinomyces cocicolor*에 의한 한천의 분해(9), van Hofsten 등(10) 및 몇몇 보고가 있으며(11-13), 한천 분해 효소에 대한 연구로는 *Cytophaga flevensis*가 생산하는 agarase에 대한 연구(14), *Pseudomonas atlantica*가 생산하는 neoagarote-

† Corresponding Author

traose hydrolase에 대한 Groleau 등의 보고(15), *Pseudomonas atlantica*의 β -agarase I, II(16), *Vibrio* sp. AP-2가 생산하는 β -agarase의 정제와 특성(17), *Alteromonas*속의 균체의 agarase에 대한 연구(18), Yasushi 등(19)이 보고한 *Vibrio* 속의 새로운 agarase에 대한 연구 등이 있다. 또한 효소로 분해시킨 분해물의 TLC, NMR 분석에 대한 보고(20, 21) 등 한천 분해산물 또는 올리고당에 대한 몇몇 연구보고가 있으나(22), 국내에서는 이와 관련한 보고는 거의 없는 실정이고, 최근에 이와 관련하여 몇몇 연구가 진행중이다.

그런데, hetero형 다당류로부터 제조된 올리고당의 기능이 여러 가지로 밝혀지고 있고, 특히 한천 올리고당(neoagarooligosaccharide)은 전분의 노화방지 기능, 정균작용, 비소화성, 비피더스균 증식인자, 항충치성 등의 기능을 갖고 있어서 식품의 기능성 향상의 측면에서도 매우 중요하게 인식되고 있다(23). 아울러 선진 여러 국가에서 한천 올리고당의 생산을 위해 많은 연구가 되고 있고 앞으로도 지속적으로 연구될 것으로 생각되며 이를 이용한 건강보조식품, 스포츠음료, 특수유제품 등의 다양한 고부가가치 식품이 개발될 것으로 판단된다. 아울러 국내에서는 거의 연구가 이루어져 있지 않은 한천의 기능을 최대화하기 위해 특정 미생물이 생산하는 효소를 이용하여 올리고당을 제조하고자 하며, 그러한 연구의 처음 단계로 한천 분해균을 검색하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

한천 분해균 분리시료

토양 15종, 해양토양 및 갯벌 20여종, 해수 4종, 홍조류를 포함한 해조류 7종, 고동류 6종, 조개류 6종, 극피 또는 연체동물 6종 등 총 57종을 여러번 반복하여 필요할 때마다 채취 또는 수집하여 한천 분해균 분리 시료로 사용하였다.

분리 배지

한천 분해균 분리 배지는 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0002% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5-2.5% NaCl, 0.1% KCl, 0.1% $CaCl_2$, 1.5% agar, pH 7.5의 고체 배지와 0.15% agar, 0.0005% peptone, 0.0005% yeast extract, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0002% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5-2.5% NaCl, 0.005% $CaCl_2$, pH 7.5의 액체배지를 이용하였다.

한천 분해균의 분리

한천 분해균의 분리는 상기 고체배지로 평판을 만든 후, 단계별로 희석한 시료를 0.1mL씩 평판에 취하고 conradi stick으로 도말하여 $30 \pm 2^\circ C$ 에서 5-7일간 배양하면서 평판을 함몰시킨 colony를 분리하였다. 분리된 colony를 상기의 액체배지에 접종하여 $30 \pm 2^\circ C$ 에서 배양하면서 배양액중의 환원당을 측정하여 그 값으로부터 한천 분해능을 판단하였다.

환원당 측정

환원당 측정은 Somogyi-Nelson법(24)으로 행하였다. 즉 시료용액 1mL와 동(銅)시약 1mL를 시험관에 각각 취하고, water bath에서 20분간 가열하여 산화제1동(Cu_2O)을 생성시켰다. 여기에 몰리브덴 용액 1mL를 가하여 발색된 몰리브덴 청을 520nm에서 흡광도를 측정하여, galactose를 표준물질로 하여 구한 표준 검량선으로부터 환원당을 정량하였다.

배양 조건에 따른 효소의 한천 분해 활성 측정

상기 액체배지를 기본배지로 하고 탄소원 농도, 질소원의 종류 및 농도, NaCl 농도, 초기 pH, 배양 온도, 무기염 종류 및 농도, 배양 시간 등을 달리하면서 약 4일간 배양하였다. 이를 원심분리하여(12,000 \times g, 10min) 상층액을 조효소액으로 하고, 0.15% agar(30mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, 2.0% NaCl) 4.0mL와 조효소액 1.0mL를 $37^\circ C$ 항온수조에서 90분간 반응시킨 후 그 중에서 1mL를 취하여 Somogyi-Nelson법으로 환원당을 측정하여 효소 최대 활성 조건을 결정하였다.

분리균의 동정

분리된 한천 분해균의 동정은 각종 생리, 생화학적 특성을 실험하고, 추가로 ID 32 GN 시스템(BioMerieux Co., France)을 이용하여 당, 산의 이용성 등을 조사하였고, 얻어진 실험 결과들을 토대로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(25)과 비교하여 동정을 행하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리

57종의 각종 분리원으로부터 총 500여 균을 분리하였는데, 해조류에서 100여 균주, 연체 및 극피동물에서 150여 균주, 토양 및 갯벌에서 100여 균주,

조개류와 고동류에서 150여 균주가 분리되었다. 일반 육상 토양에서는 거의 분리되지 않았고, 해양동식물 및 해양환경에서 주로 분리된 균주는 대개 고체 평판을 함몰시키는 특성은 갖고 있으나, 일부 분리균은 액체배지상에서는 전혀 환원당을 생성하지 않는 균주도 상당히 많았는데, 이는 액체배지의 배지 조성이 균의 성장과 효소생산에 맞지 않았거나, 환원당의 형태로 분해되지 않았기 때문인 것으로 판단되었다.

분리균의 한천 분해능

액체 배지에서 생성된 환원당을 측정하여 분리된 균의 한천 분해능을 측정된 결과, 500여 균주중 조금이라도 활성이 있는 균으로 확인된 것이 약 350여 종이었고, 그 중에서 활성이 상대적으로 높았던 균을 Table 1에 나타내었다. 대체적으로 환원당량으로만 보면, 분리 균주들의 한천 분해활성이 다소 낮은 것으로 나타났으나, 이는 활성 측정용 액체 배지의 여러 조건에 문제가 있을 것으로 판단되어, 분리된 균주중에서 군부(*Chiton*, *Liolophura japonica*)에서 분리되어 환원당 생성능이 가장 높았던 No.18 균주를 실험 균주로 선발하였다. 한편, 일반적으로 한천 분해균은 사면배지에서 한천 분해로 배지의 pH를 저하시켜 보존중에 변이가 잘 일어나는 것으로 알려져 있어, 탄산칼슘이 첨가된 사면배지에 균주를 보존하면서 실험에 이용하였다. Fig. 1에는 본 실험 균주의 전자현미경 사진을 나타내었다.

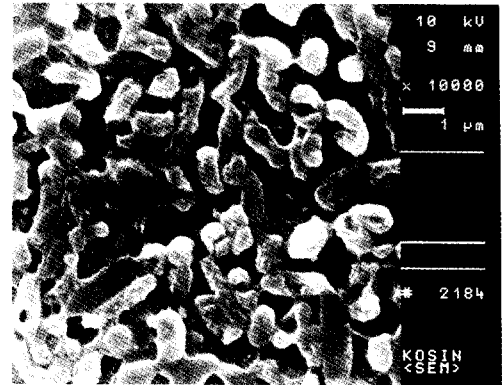


Fig. 1. Scanning electron micrograph of strain No. 18 cultured in liquid medium at 30±2 °C for 4 days.

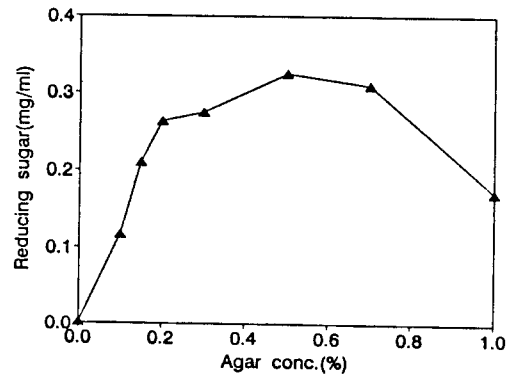


Fig. 2. Effect of agar concentration on the production of agar degrading enzyme.

Medium composition and growth condition: 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 2.0% NaCl, 0.1% MgSO₄ · 7H₂O, 0.1% KCl, 0.1% CaCl₂, pH 7.0, 30±2°C.

생육조건에 따른 조효소의 한천 분해 활성 탄소원의 농도

본 실험 균주는 한천 분해 효소 생산에 탄소원으로 반드시 한천을 필요로 하는 유도효소를 생산하는 균주였고, 한천 농도에 따른 효소의 활성을 Fig. 2에 나타내었다. 한천 무침가 구간은 활성이 없는 것으로 확인되었고, 한천 농도 0.5%까지는 활성이 크게 증가하였다가 그 이상의 농도에서는 활성이 오히려 감소함을 알 수 있었고, 실제 한천 0.5%보다 높은 농도에서는 배양 배지가 완전히 고체화되어 중균

Table 1. Reducing sugar formation ability of various isolated strains.

Strain No.	Reducing sugar (mg/mL)	Strain No.	Reducing sugar (mg/mL)
4	0.155	240	0.149
18	0.277	244	0.163
20	0.184	287	0.177
90	0.197	364	0.208
113	0.131	379	0.209
115	0.219	413	0.147
129	0.234	473	0.135
153	0.181	477	0.163
179	0.202	480	0.196
194	0.142		

Table 2. Effect of nitrogen source and its concentration on activity of the crude enzyme.

Nitrogen source*	Reducing sugar (mg/mL)	Nitrogen source*	Reducing sugar (mg/mL)
1	0.093	7	0.347
2	0.235	8	0.342
3	0.318	9	0.345
4	0.314	10	0.305
5	0.185	11	0.293
6	0.312	12	0.308

* 1:peptone 0.05%, yeast extract 0.05%

2:peptone 0.25%, yeast extract 0.25%

3:peptone 0.5%, yeast extract 0.5%

4:peptone 0.7%, yeast extract 0.7%

5:nutrient agar 0.5%

6:nutrient agar 1.0%

7:nutrient broth 0.3%, yeast extract 0.2%

8:nutrient broth 0.3%, yeast extract 0.5%

9:nutrient broth 0.5%, yeast extract 0.5%

10:nutrient broth 0.3%, peptone 0.2%

11:nutrient broth 0.3%, peptone 0.5%

12:nutrient broth 0.5%, peptone 0.5%

** Composition of medium:agar 0.5%(no agar addition to nitrogen sources 5 and 6) NaCl 2.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, KCl 0.1%, $CaCl_2$ 0.1%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0001%, pH 7.0

의 접종시에도 배지를 과쇄해야 할 정도로 단단해지기 때문에 문제가 있는 것으로 판단되었다. 따라서 한천 분해 효소 생산에서의 탄소원은 한천 0.5%로 결정하였다.

질소원 및 질소원의 농도

질소원의 종류와 농도를 달리하여 실험 균주의 한천 분해 효소 생산능에 대해 검토한 결과(Table 2), 초기 분리 배지에 첨가했던 peptone과 yeast extract는 0.5% 농도까지 활성의 증대를 가져왔으며, 그 이상의 농도에서는 활성의 증대를 확인할 수 없었고, 한천을 달리 첨가하지 않고 nutrient agar를 1.0%까지 첨가할 경우 환원당 생성능이 0.318mg/mL로 peptone과 yeast extract는 0.5% 첨가시와 비슷한 결과를 나타내었다. 아울러 nutrient broth와 yeast extract, peptone의 농도를 각각 달리하여 첨가한 결과, nutrient broth 0.3%와 yeast ex-

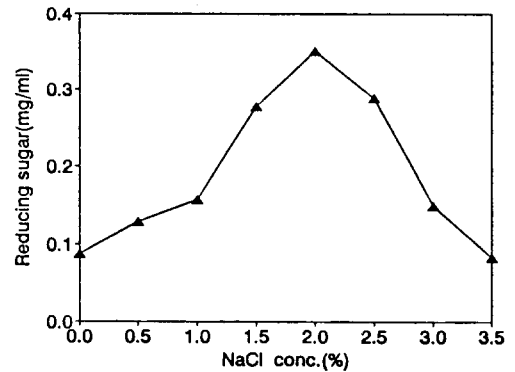


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the production of agar degrading enzyme.

Medium composition and growth condition:0.5% agar, 0.3% nutrient broth, 0.2% yeast extract, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% KCl, 0.1% $CaCl_2$, pH 7.0, $30 \pm 2^\circ C$.

tract 0.2% 첨가시에 가장 높은 효소활성을 나타내어 이 조건을 효소생산 질소원 및 농도로 하여 실험하였다.

NaCl의 농도 및 초기 pH

NaCl 농도를 달리 하면서 효소활성을 측정한 결과(Fig. 3), 다른 해양성 미생물과는 달리 NaCl이 첨가되지 않은 조건에서도 균의 성장과 효소의 약한 활성을 확인할 수 있었으나, NaCl 농도가 증가할수록 대체로 활성이 증가하는 것으로 확인되었고, NaCl 2.0% 농도에서 환원당 0.351mg/mL로 효소의 최대 활성을 보였다가 그 이상의 농도에서는 활성이 크게 감소하였고, 3.5% 농도에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 이는 해양 유래 미생물이 특정한 특성을 발현하는 데는 적절한 농도의 NaCl이 필요하다고 보고된 바 있으며(26), 과도한 NaCl 농도에서는 균의 성장이 억제되는 것으로 확인되었다. 한편, 초기 pH를 달리하면서 효소활성의 변화를 실험한 결과(Fig. 4), pH 6.5에서 pH 7.5의 범위로 조절한 조건에서는 커다란 차이를 나타내지 않았고, 중성 영역과 약한 알칼리성 영역에서 비교적 활성이 높음을 알 수 있었고, 초기 pH 조건은 7.0-7.5로 결정하였다.

무기질 종류 및 농도

일반적으로 해수세균의 성장에 필요한 무기질로 분류되는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl, $CaCl_2$ 등의 농도와

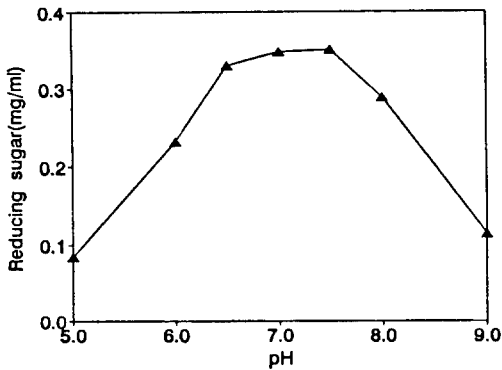


Fig. 4. Effect of initial pH on the production of agar degrading enzyme. Medium composition and growth condition : 0.5% agar, 0.3% nutrient broth, 0.2% yeast extract, 2.0% NaCl, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% KCl, 0.1% $CaCl_2$, $30 \pm 2^\circ C$.

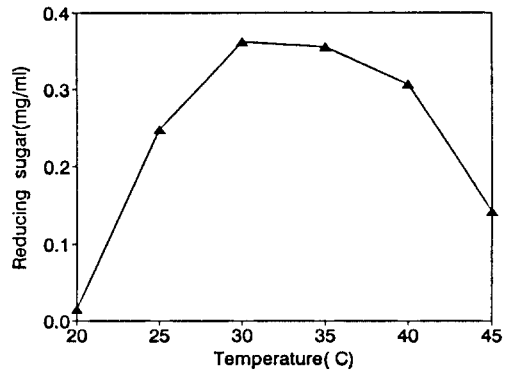


Fig. 5. Effect of temperature on the production of agar degrading enzyme. Medium composition and growth condition : 0.5% agar, 0.3% nutrient broth, 0.2% yeast extract, 2.0% NaCl, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% KCl, 0.1% $CaCl_2$, pH 7.0.

Table 3. Effect of mineral source and its concentration on activity of the crude enzyme.

Mineral source*	Reducing sugar (mg/mL)	Mineral source*	Reducing sugar (mg/mL)
1	0.202	6	0.362
2	0.205	7	0.326
3	0.125	8	0.321
4	0.333	9	0.310
5	0.241		

* 1: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, 2: KCl 0.1%

3: $CaCl_2$ 0.1%, 4: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, KCl 0.1%

5: KCl 0.1%, $CaCl_2$ 0.1%

6: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1%, KCl 0.1%, $CaCl_2$ 0.1%

7: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%

8: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5%, KCl 0.5%, $CaCl_2$ 0.5%

9: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0%, KCl 1.0%, $CaCl_2$ 1.0%

** Composition of medium: nutrient broth 0.3%, yeast extract 0.2%, agar 0.5%, NaCl 2.0%, pH 7.5

혼합비를 달리하면서 조효소액의 활성을 측정한 결과 (Table 3), 무기질 중에서도 주로 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 KCl이 효소 생산에 영향을 미치는 것으로 나타났고, 이들의 단독으로 첨가할 경우보다 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, KCl, $CaCl_2$ 를 혼합하여 첨가할 때 효소의 생산량이 크게 증가함을 확인할 수 있었다. $MgSO_4 \cdot$

$7H_2O$ 의 경우 농도가 높아짐에 따라 효소 생산량이 훨씬 증가하는 것으로 나타났으나, 다른 무기질과 함께 혼합 사용시에는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 농도의 증가가 크게 활성의 증가에 영향을 미치지 않았다. 특히 상기의 무기염의 첨가 농도를 모두 증가시킬 때 오히려 과도한 무기염에 의해 균의 성장과 효소 생산을 저해하는 것으로 판단되었다. 이상의 결과로, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 실험농도보다 다소 높은 0.2%로 결정하였고, KCl, $CaCl_2$ 는 각각 0.1%를 첨가 농도로 하였다. 아울러 흔히 해양 세균의 배양에 첨가되는 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 도 0.0001%를 첨가하여 최종 효소 생산 배지를 결정하였다.

배양 온도 및 배양 시간

배양 온도의 경우 (Fig. 5), 해양 세균의 일반적인 특징처럼 다소 낮은 온도인 30°C에서 0.362mg/mL로 최대 활성을 보였으며, 온도가 높아져 45°C에서는 효소 생산량이 급격히 저하되었고, 20°C 부근에서는 균의 성장이 크게 둔화되었다. 배양시간은 약 92시간 배양했을 때 최대 효소 활성을 나타내었다 (Fig. 6).

균주의 동정

균부에서 분리한 No.18 균주를 생리, 생화학적 시험을 한 결과, Table 4에 나타낸 것처럼, 그람 음성 간균으로 oxidase, catalase를 생성하는 호기성균

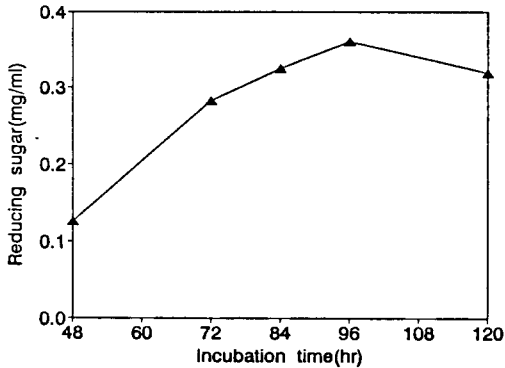


Fig. 6. Effect of incubation time on the production of agar degrading enzyme.

Medium composition and growth condition : 0.5% agar, 0.3% nutrient broth, 0.2% yeast extract, 2.0% NaCl, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1% KCl, 0.1% $CaCl_2$, pH 7.0, $30 \pm 2^\circ C$.

Table 4. Physiological and biochemical characteristics of isolated strain No.18 from chiton.

Gram staining	-	Cell shape & color	short-rod, gold-yellow
Opt. temp.	$30^\circ C$	Motility	+
Oxidase	+	Catalase	+
Utilization of Citrate	+	D, L-Lactate	+
Malonate	+	Acetate	+
Propionate	-	Itaconate	+
2-ketoglutarate	+	5-ketoglutarate	+
o-hydroxybutyrate	+	m-hydroxybutyrate	+
Salicine	+	L-proline	+
Histidine	+	Serine	+
L-alanine	+	Maltose	+
Rhamnose	+	Ribose	+
Xylose	+	D-glucose	+
Sucrose	+	Arabiose	+
D-sorbose	+	L-fucose	+
Melibiose	+	Mannose	+
N-acetyl glucosamine	+	Glycogen	+
Casein	+	Chitin	+
Histidine	+	Serine	+
Gelatin	+	Casein	+
Agar	+	Glycerol	-
Production of Indole	-	H ₂ S	-

으로 운동성이 있고, 황금색의 colony를 형성하는 균이었다. Citrate, acetate, lactate를 이용하고, glycogen, chitin을 분해하고, gelatin을 액화하였다. H₂S 및 indole 비생성, glucose, sucrose, melibiose, mannose를 이용하는 균으로 확인되었다. 그 외의 여러 가지 생리, 생화학적 특징으로부터 본 실험 균주를 *Cytophaga* sp.로 동정할 수 있었다.

요 약

균부에서 분리한 한천 분해 균주의 최적 효소 생산 조건은 질소원으로 nutrient broth, yeast extract를 각각 0.3%, 0.2%였고, 탄소원으로는 agar 0.5%가 가장 적절한 조건이었다. NaCl 농도는 2.0%, pH 7.0, 온도는 $30 \pm 2^\circ C$ 의 조건에서 약 96시간 배양하는 것이 가장 적절한 효소 생산 조건이었다. 분리균주의 생리, 생화학 특성을 조사한 결과, 그람 음성 간균으로 gold-yellow colony를 형성하는 균으로 oxidase, catalase 생성의 호기성균이었다. 각종 유기산류, 아미노산류 및 당류의 이용성 시험에서 citrate, lactate, salicine, histidine, glucose, melibiose, sucrose에 대해 양성을 나타내었고, chitin, casein, gelatin을 분해하고, indole 및 H₂S를 생성하지 않았다. 이상의 결과로부터 본 균주는 *Cytophaga* sp.로 동정되었다.

감사의 말

본 연구는 1994년 한국과학재단 연구비 지원(과제번호:94-0402-07-01-3)으로 수행된 연구 결과의 일부이며 이에 깊이 감사드립니다.

참고 문헌

1. C. L. Araki(1965), In E. G. Young, and J. L. Maclachan(ed.), Proc. Int. Seaweed Symp. 5, Pergamon Press, London.
2. 西澤一俊, 村杉幸子(1991), 海藻の本, 研成社., p. 30.
3. 林金雄, 岡崎彰夫(1970), 寒天ハンドブック, 光琳書院, 東京, p. 3.
4. D. A. Rees(1969), *Adv. Carbohydr. Biochem.*, **24**, 267.
5. M. Duckworth and W. Yaphe(1971), *Carbohydr. Res.*, **16**, 189.

6. K. B. Guiseley(1987), Industrial polysaccharides:genetic engineering, structure/property relationand applications(M. Yalpany ed.), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
7. 이철, 배송환(1984), *한국식품과학회지*, **16**, 78.
8. 박영이, 이철, 양한철(1985), *한국식품과학회지*, **17**, 319.
9. R. Y. Stanier(1942), *J. Bacteriol.*, **44**, 555.
10. B. van Hofsten and M.Malmvist(1975), *J. Gen. Microbiol.*, **87**, 150.
11. M. Duchworth and J. R. Turvey(1969), *Biochem. J.*, **113**, 687.
12. H. J. Meulen, W. Harder, and H. Veldkamp (1974), *Antonie van Leewenhoek J. Microbiol. Serol.*, **40**, 329.
13. J. A. C. Agbo and M. O. Moss(1979), *J. Gen. Microbiol.*, **115**, 355.
14. H. J. Meulen and D. C. Harder(1975), *Antonie van Leewenhoek J. Microbiol.*, **41**, 31.
15. D. Gloleau and W. Yaphe(1977), *Can. J. Microbiol.*, **23**, 672.
16. L. M. Morrice, M. W. McLean, F. B. williamson, and W. F. Long(1983), *Eur. J. Biochem.*, **135**, 553.
17. T. Aoki, T. Araki, and M. Kitamikado(1990), *Eur. J. Biochem.*, **187**, 461.
18. O. Leon, L. quintana, G. Peruzzo, and J. C. Slebe(1992), *App. Environ. Microbiol.*, **58**, 4060.
19. S. Yasushi, Y. I. Terada, M. Arita, M. Noma, and T. Matsumoto(1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1549.
20. M. Duchworth and W. Yaphe(1970), *J. Chromatogr.*, **49**, 482.
21. G. K. Hammer, S. S. Bhattacharjee, and W. Yaphe(1977), *Carbohydr. Res.*, **54**, 7.
22. K. S. Young, S. S. Bhattacharjee, and W. Yaphe(1978), *Carbohydr. Res.*, **66**, 207.
23. 河野敏明(1988), *フードケミカル*, **2**, 40.
24. M. Somogyi and N. Nelson(1952), *J. Biol. Chem.*, **195**, 19.
25. P. Baumann, A. L. Furniss, and J. V. Lee (1984), in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.
26. R. M. Baxter(1959), *Can. J. Microbiol.*, **5**, 47.