

Pullulanase의 Reverse Reaction을 이용한 Maltosyl- β -Cyclodextrin의 합성

한일근 · 이용현*

경북대학교 자연과학대학 유전공학과

Synthesis of Maltosyl- β -Cyclodextrin through the Reverse Reaction of Pullulanase

Han, Il-Keun and Yong-Hyun Lee*

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences,
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — Synthesis of maltosyl- β -cyclodextrin using maltose (G_2) and β -cyclodextrin (β -CD) as substrates through the reverse reaction of pullulanase was investigated. The optimal conditions for the condensation reaction were as below: mixing ratio of maltose to β -CD of 12.7, mixed substrate concentration of 70% (w/w, 70 g/100 ml H_2O), and amount of pullulanase of 350 units/100 ml. The concentration of synthesized maltosyl- β -CD concentration was reached up to 2.31 g/100 ml at above reaction conditions, which corresponded the conversion yield of 43% (w/w, g of branched-CD/g of CD). The synthesis of maltosyl- α -, β -, γ -CD was also attempted, and conversion yield was in the order of $\alpha > \gamma > \beta$ -CDs. Condensation reaction between various maltooligosaccharides ($G_1 \sim G_6$) showed that maltose was the most effective oligomer for condensation reaction with β -CD. To increase the conversion yield various alcohols were added into the reaction mixture, amyl alcohol was found to be the most acceptable alcohol for increasement of convesion yield which increased from 43.0 to 83.0% upon addition of same volume of amyl alcohol into the reaction mixture.

Branched-cyclodextrin (branched-CD)이란 하나 이상의 glucose 분자로 구성되는 각종 malto-oligo당이 cyclodextrin (CD)의 glucosyl residue(s)의 C-6 position에 α -1,6 glucosidic bond로 결합되어 있는 분지환상결합체이다. 이는 debranching enzyme인 pullulanase (EC 3.2.1.68; glycogen 6 glucano hydrolase)나 iso-amylase의 역반응(reverse reaction)을 통한 중합반응(condensation reaction)에 의해 생성된다(1-5). 이와 같은 branched-CD는 원래의 CD에 비해 용해도가 10배 이상 증가되며, 또한 포집능이 CD보다 향상되어, 물성의 개선과 기능성을 증대시킬 수 있어, 의약, 농약, 식품, 그리고 화장품 등에 응용시 그 범위가 확대된다(6).

현재까지 몇가지 branched-CD 합성법이 알려져 있는데, Kobayashi 등(7)은 waxy corn starch에 *B. macerans* 유래의 cyclodextrin glucanotransferase의 효소반응시 sodium dodesyl sulfate를 첨가하여, 주 산물로 여러 종류의 branched-CD와 부산물로써 α 및 β -CD를 합성하였고, Abe 등(8, 9)은 *Pseudomonas* 유래의 isoamylase를, Yoshiyuki 등(2)은 *B. acidopullulyticus* 유래의 pullulanase의 중합반응을 이용하여 malto-oligo당($G_1 \sim G_n$)과 CD으로부터 branched-CD를 합성하였다. Yoshimura 등(3, 10, 11)은 pullulanase와 isoamylase를 적정비로 혼합사용하여 α -maltosylfluoride와 CD로부터 특이적이고 효율적인 branched-CD 합성법을 보고하고 있다. 또한 Kobayashi 등(5)은 고가의 pullulanase와 CD를 효율적으로 사용하기 위해 ceramic carrier에 pullulanase를 silane coupling method로 고정화한 효소반응기를 이용하여

Key words: Maltosyl- β -cyclodextrin, reverse reaction, condensation reaction, pullulanase, amyl alcohol

*Corresponding author

고수율로 multiple branched-CD를 합성하고 있다. Branched-CD는 결합하는 glucose 분자수에 따라 G_1 부터 G_n -CD에 이르기까지 그 분포가 다양하지만 공업적으로는 Taka-amylase 및 glucoamylase로 다시 처리하는 방법 등(3, 7, 12)을 이용하여 G_1 및 G_2 -CD로 변환시킨 후 chromatography 등의 각종 회수 공정을 거쳐 생산된다.

본 연구실에서는 고생산성 alkalophilic cyclodextrin glucanotransferase 생산균주를 screen과 변이주 유발법으로 개발하였고(13), 효율적인 CD생산공정의 개발을 위해 고정화 효소반응기의 특성 및 조작조건을 검색한 바 있고(14-16), 분쇄마찰효소반응계를 이용하여 생전분에서 직접 CD를 생산하는 공정에 관한 연구를 수행한 바 있다(17).

본 연구에서는 *Bacillus* sp. 유래의 pullulanase의 역반응을 통한 중합반응을 이용한 maltosyl- β -CD의 합성을 목표로 최적 반응조건을 확립하였고, β -CD와 각종 malto-oligo당($G_1 \sim G_6$) 그리고 maltose와 각종 CD(α -, β -, 그리고 γ -CD)간의 중합반응을 통한 각종 branched-CD로의 전환수율을 비교하였다. 또한 alcohol류가 pullulanase의 중합효소반응에 미치는 영향도 검토하였다.

재료 및 방법

사용효소 및 효소활성측정

사용효소는 *Bacillus* sp. 배양액을 농축한 산업용 pullulanase(Promozyme 2001; Novo Co.)였다. 1.0% (w/v) pullulan 용액(20 mM maleic acid-tris-NaOH buffer; pH 6.0) 5.0 ml에 pullulanase 0.1 ml를 첨가하여 50°C에서 10분 반응시킨 후 생성된 maltotriose의 양을 HPLC로 정량하여, 분당 1 μ mole의 maltotriose equivalent를 생성시키는 효소의 양을 pullulanase 1 unit으로 하였다. 사용효소의 specific activity는 4.4 units/mg, 최적 pH 및 온도는 4.9와 60°C였고, pH와 온도안정성은 각각 4.3~7.0과 60°C까지였다.

효소반응기질 및 Branched-cyclodextrin 표준물질

기질인 α -, β - 및 γ -CD 및 각종 malto-oligo당($G_1 \sim G_6$)은 Sigma Co.에서 구입하였고, 각종 branched-CDs의 표준물질(glucosyl- α -, β - and γ -CD, maltosyl-

α -, β and γ -CD)은 Ensuiiko Sugar Refining Co.의 것을 사용하였다.

Maltosyl- β -cyclodextrin의 합성

Maltose/ β -CD의 비율이 12.7이 되도록 혼합한 기질 70 g을 50 mM sodium acetate buffer(pH 4.9) 100 ml에 현탁하고 pullulanase 농축액 2.3 ml(350 units)를 첨가하여 60°C에서 반응시켰다. 경우에 따라 상기 반응조건을 변화시키면서 실험하였다.

Alcohol류 존재하에서의 Maltosyl- β -cyclodextrin 합성

Maltosyl- β -cyclodextrin의 합성에 미치는 alcohol류의 영향을 검토하기 위하여 각종 alcohol류를 상기 반응액의 0.1~1.2배(v/v, 10~120 ml alcohol/100 ml H₂O) 첨가하여 100 rpm으로 교반하면서 반응시켰다.

Branched-cyclodextrin의 분석

각종 branched-CD의 정량은 high pressure liquid chromatography(HPLC, Model-305, Gilson)로 행하였고, column은 μ Bondapack-NH₂ column(Waters Co.), 용출용매는 acetonitril과 H₂O(65 : 35)의 혼합용액, 용출속도는 1.0 ml/min이었고, RI detector로 검정하였다.

결과 및 고찰

Maltosyl- β -cyclodextrin 합성조건에 대한 검토

Maltose와 β -Cyclodextrins의 적정혼합비 : Fig. 1은 사용효소인 pullulanase의 양은 350 units/100 ml H₂O로 고정하고 단지 maltose와 β -CD의 혼합비(maltose/ β -CD ratio, w/w)를 2.0에서 18.0로 변화시켜 중합반응시켰을 경우의 혼합비에 따른 24시간 경과 후의 maltosyl- β -cyclodextrin(G_2 - β -CD)의 생성량과 전환율을 나타내고 있다. 이때 maltose와 β -CD의 혼합기질의 농도는 70%(w/w, 70 g of mixed substrate/100 ml H₂O)로 고정하여 실험하였다. Maltose와 β -CD의 혼합비가 증가함에 따라 G_2 - β -CD의 전환율은 증가하였고, 혼합비가 12.7(64.6 g of maltose + 5.4 g of β -CD/100 ml H₂O)일 때 전환율이 최대인 43% (w/w, branched-CD 2.31 g/CD 5.40 g)에 이르렀고, 이보다 높은 혼합비율에서는 다시 급속히 감소하는

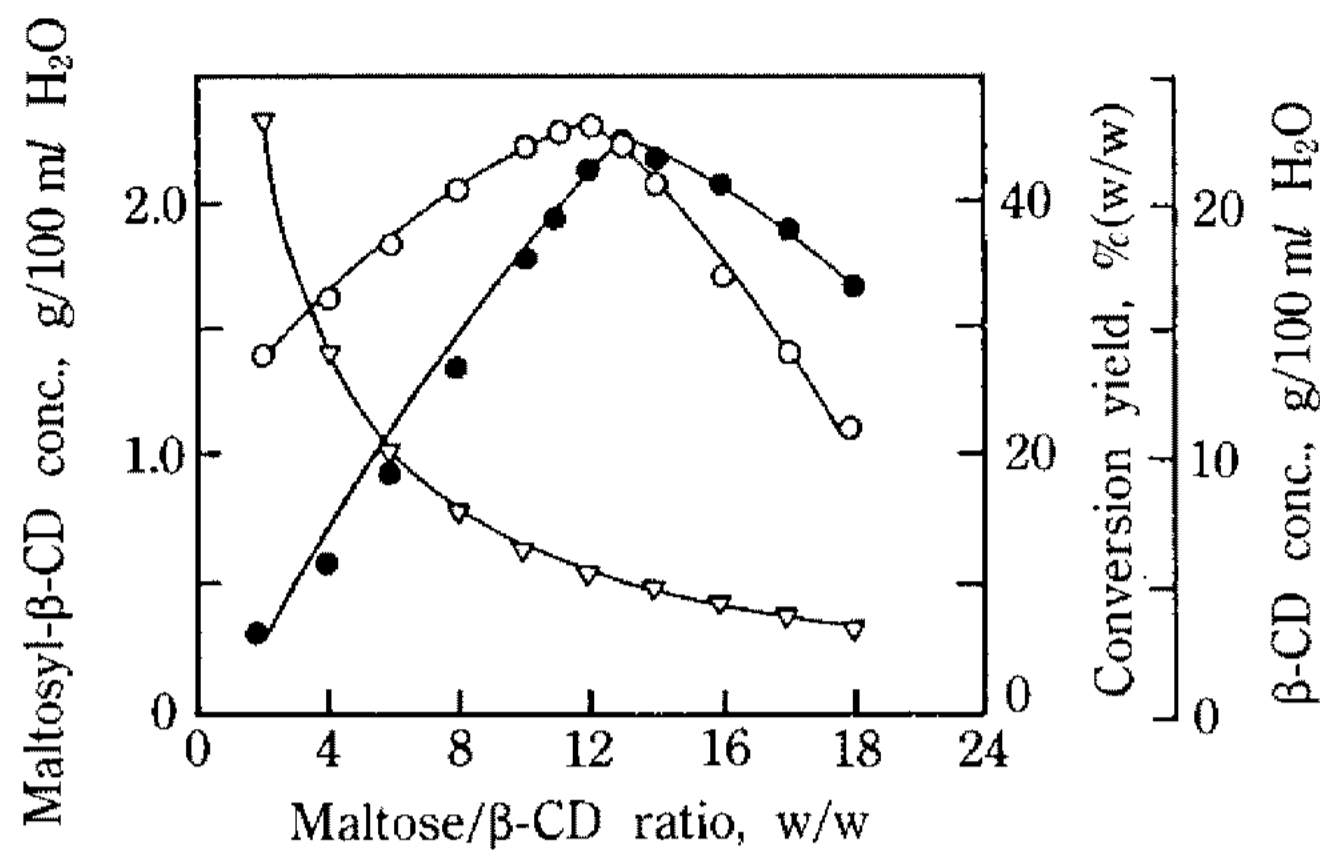


Fig. 1. Effect of mixing ratio of maltose and β -CD on maltosyl- β -CD production.

○: maltosyl- β -CD, ●: conversion yield, ▽: β -CD
Mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, after 24 hr.

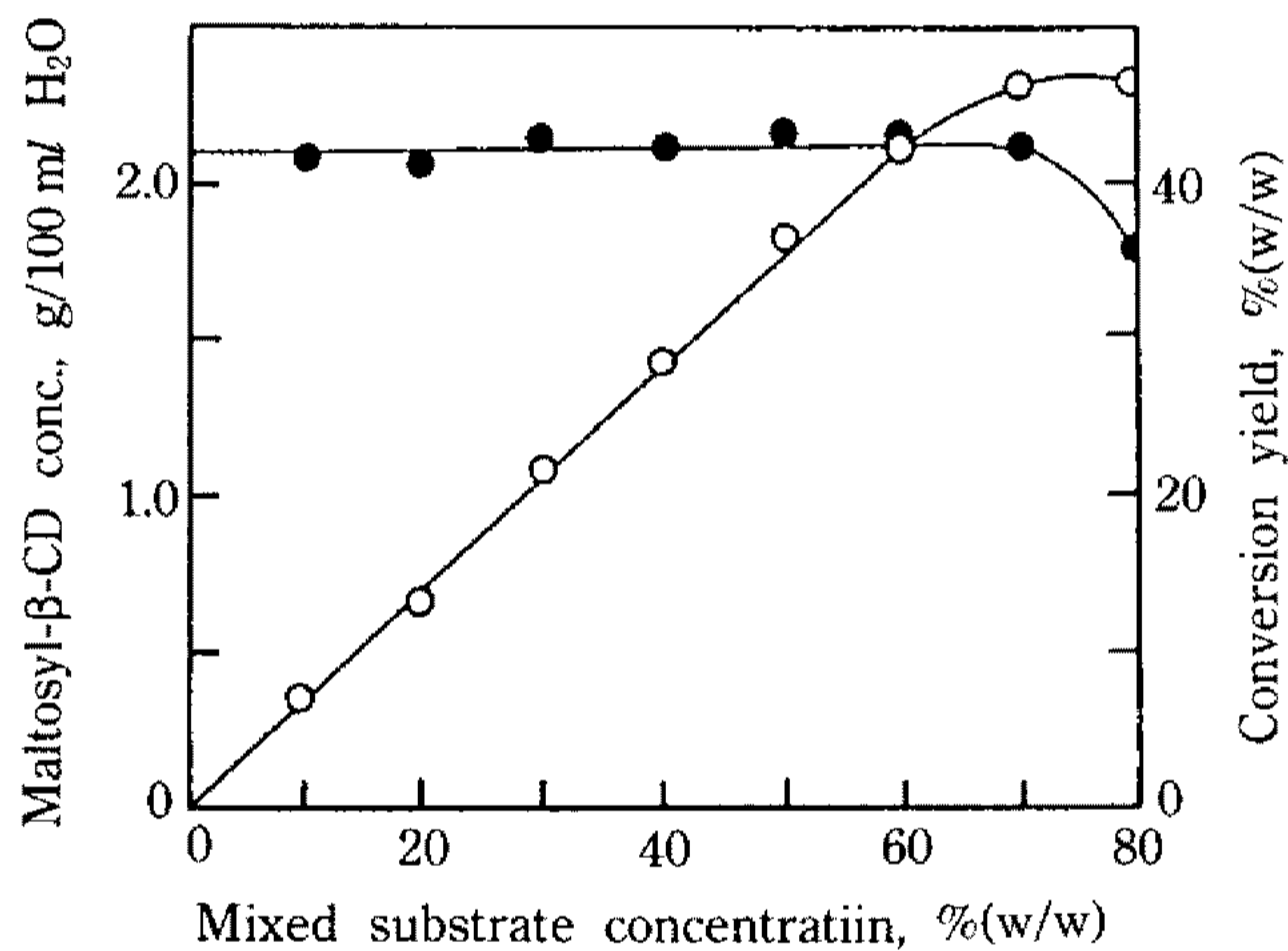


Fig. 2. Effect of substrate concentration on maltosyl- β -CD production.

○: maltosyl- β -CD, ●: conversion yield
Maltose/ β -CD=12.7, 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, after 24 hr

경향을 보였다. 이는 pullulanase의 역반응을 이용한 중합반응을 원활히 수행하기 위해서는 maltose를 β -CD에 비하여 상대적으로 다량 사용하여야 하며, 또한 효소반응 중에서 그 비율을 일정하게 유지하는 것이 필요함을 알 수 있다. 그리고 maltose와 β -CD의 혼합비가 14 이상일 때에는 전환율이 급속히 감소하였는데 이에 대한 규명이 필요하다.

혼합기질의 적정사용량: Fig. 2는 maltose/ β -CD의 혼합비를 위에서 얻은 최적치인 12.7로 고정하고 단지 혼합기질농도를 10~80%(w/w)로 변화시키면서 이에 따른 G_2 - β -CD 생성량과 전환율을 나타낸 것이다. G_2 - β -CD 생성량은 기질의 첨가량이 증가함에 따라 증

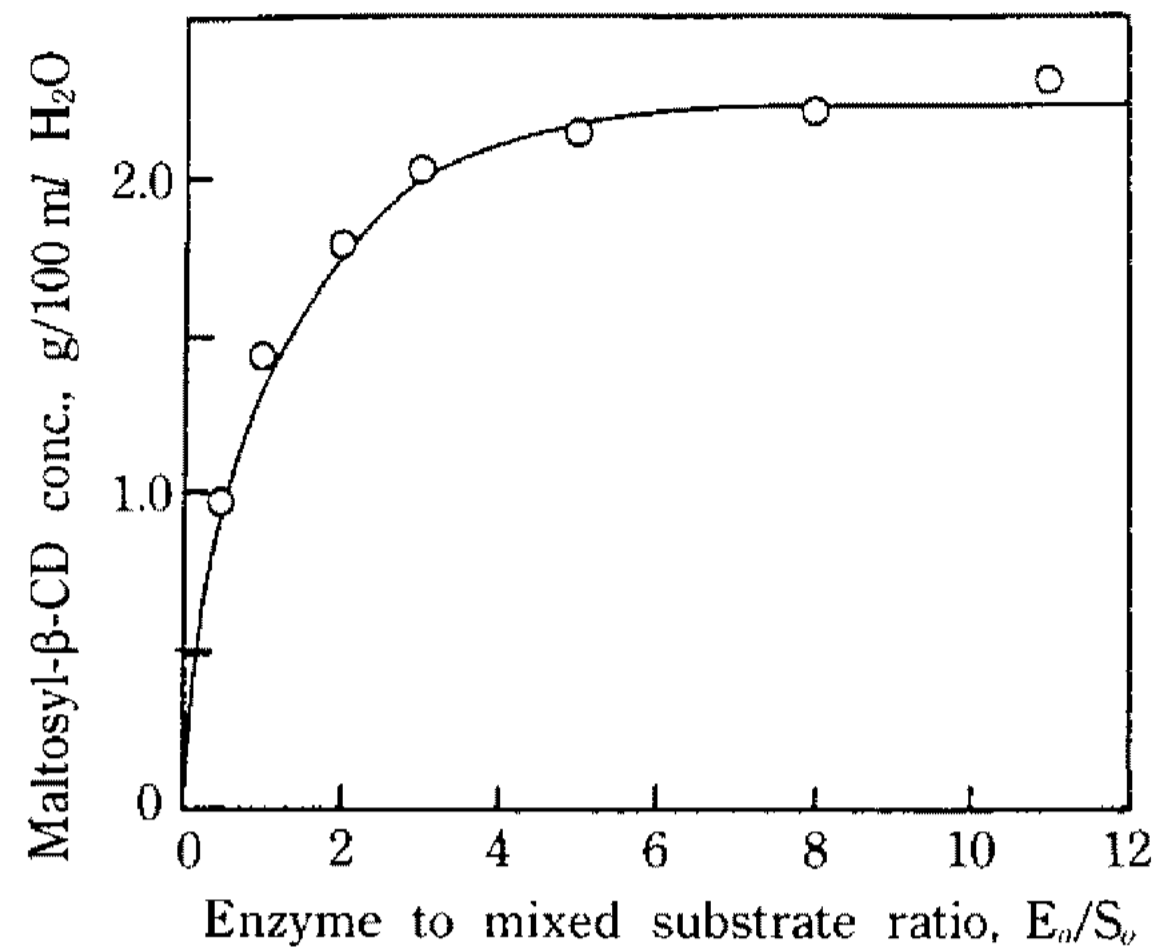


Fig. 3. Effect of the amount of pullulanase on maltosyl- β -CD production.

Maltose/ β -CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), pH 4.9, 60°C, after 24 hr.

가하였으며, 최대생성량인 2.31 g/100 ml은 혼합기질 (maltose + β -CD)의 농도가 70%(w/w)일 때 얻어졌고, 그보다 높은 농도에서는 더이상 증가하지 않았는데, 이는 최적효소반응온도인 60°C에서 혼합기질 중의 β -CD가 용해될 수 있는 한계농도로서 용해성이 제한되어 효소반응이 저해를 받기 때문으로 사료된다. 이로 미루어 G_2 - β -CD로의 전환은 기질농도보다는 기질인 maltose와 β -CD의 혼합비가 보다 중요한 요소임을 알 수 있었다. G_2 - β -CD 전환율은 생성량과는 달리 혼합기질의 첨가량과는 관계없이 거의 일정한 수준인 42~44%를 유지하였다.

Pullulanase 사용량: 효소의 적정사용량을 검토하기 위하여 혼합기질농도를 70%(w/w)로 고정하고, 효소사용량을 변화시키면서 첨가하여 24시간 반응 후의 G_2 - β -CD 생성량을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. 기질에 대한 효소첨가량 비율(E_0/S_0 , units/g of mixed substrate)이 5.0일 때까지는 계속적으로 증가하였으나 5.0 이상에서는 일정하게 유지되었으며 위 수준이 가장 적절한 첨가량으로 판단된다.

(G_1 ~ G_6)- β -cyclodextrin의 합성

Pullulanase의 maltose 이외의 각종 malto-oligo당의 중합반응에 의한 각종 (G_1 ~ G_6)- β -cyclodextrin의 합성능을 검토하기 위하여 첨가당을 glucose(G_1), maltose(G_2), maltotriose(G_3), maltotetraose(G_4), maltopentaose(G_5), 그리고 maltohexaose(G_6)로 대치하여 위에서 얻은 실험조건으로 24시간 반응시킨

Table 1. Condensation reaction of pullulanase for synthesis of branched- β -CD using maltooligosaccharides ($G_1 \sim G_6$) and β -CD

Maltooligosaccharides	Branched ($G_1 \sim G_6$)- β -cyclodextrin	
	Amount (g/100 ml)	Conversion yield, % (w/w)
$G_1 + \beta$ -CD	0	0
$G_2 + \beta$ -CD	2.3	42.6
$G_3 + \beta$ -CD	1.4	25.9
$G_4 + \beta$ -CD	1.0	18.5
$G_5 + \beta$ -CD	0.8	14.8
$G_6 + \beta$ -CD	0.8	14.8

Maltose/ β -CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, after 24 hr.

Table 2. Condensation reaction between α -, β -, γ -CDs and maltose (G_2)

Cyclodextrins with maltose (G_2)	Maltosyl- α -, β -, γ -CDs (G_2 -CDs)	
	Amount (g/100 ml)	Conversion yield, % (w/w)
α -CD + G_2	2.8	51.8
β -CD + G_2	2.3	42.6
γ -CD + G_2	2.6	48.1

Maltose/ α -, β -, γ -CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, after 24 hr.

후 malto-oligo당 종류에 따른 branched- β -CD의 생성량과 전환율을 검토한 결과는 Table 1과 같다. Glucose의 경우에는 branched-CD가 거의 생성되지 않았다. 반면 maltose에서 maltohexaose까지는 첨가 malto-oligo당에 상응하는 branched- β -CD가 생성되었으며, 상응하는 branched-CD의 생성량은 각각 2.3, 1.4, 1.0, 0.8 그리고 0.8 g/100 ml H_2O 로서, 이를 전환율로 환산하면 각각 42.6, 25.9, 18.5, 14.8, 그리고 14.8%였다. Maltose의 경우 branched-CD 생성량과 전환율이 가장 높았으며 malto-oligo당의 쇠상길이가 클수록 생성수율이 감소하였는데 이는 Kobayashi 등 (4)이 관찰한 결과와 유사한 경향이였다.

Maltosyl- α -, β -, 그리고 γ -cyclodextrin의 합성

첨가당은 maltose로 고정하고 사용 CD를 β -CD 대신 α - 및 γ -CD로 대체하여 G_2 - α -, β -, 그리고 γ -CD의 합성효율을 검토하였다. Table 2는 CD의 종

Table 3. Effect of the amount of alcohols on conversion yield of maltosyl- β -cyclodextrin

Alcohols	Alcohols (ml alcohols/100 ml H_2O)						
	10	20	40	60	80	100	120
E·A ^a	44*	37	35	35	35	33	30
1-P ^b	44	43	37	35	33	33	31
2-P ^c	44	43	43	41	35	35	32
A·A ^d	44	44	45	58	69	83	72
B·A ^e	35	35	33	33	33	31	25

^aethyl alcohol, ^bN-propyl alcohol, ^ciso-propyl alcohol, ^damyl alcohol, ^eN-butyl alcohol, *: conversion yield. Maltose/ β -CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, after 24 hr.

류에 따른 G_2 - α -, β -, 그리고 γ -CD의 생성량과 전환율을 나타낸 것이다. 24시간 반응 후 G_2 - α -, β -, 그리고 γ -CD의 생성량은 2.8, 2.3 그리고 2.6 g/100 ml H_2O 였고, 이를 전환율로 환산하면 각각 51.8, 42.6, 그리고 48.1%였다. 최대의 maltosyl-CD 생성량과 전환율은 α -CD를 maltose와의 중합반응에 이용할 경우 얻어졌고, 그 다음은 γ -, β -CD순으로 Yoshiyuki 등(2)이 관찰한 것과 유사한 결과를 얻었다.

Maltosyl- β -cyclodextrin 합성효소반응에 미치는 alcohol류 첨가의 영향

Pullulanase의 condensation reaction에서는 반응 후기에 G_2 - β -CD의 생성속도가 급격히 감소하였는데 이는 hydrolytic reaction에 의해 G_2 - β -CD가 다시 분해되는 것 때문으로 사료되며 이를 방지하기 위해서는 G_2 - β -CD가 용해되는 유기용매를 응용한 two-phase system을 이용하여 효소반응이 일어나는 수용액상에서 생성된 G_2 - β -CD를 유기용매상으로 이동시켜 분리회수하거나, 또한 적당한 유기용매를 첨가해줌으로써 반응액의 water activity를 감소시켜 pullulanase의 hydrolytic reaction을 억제시켜(18) G_2 - β -CD의 생성량을 증가시키는 방법 등의 도입이 필요하다.

Pullulanase 효소중합반응에 alcohol류가 미치는 영향을 검토하기 위해서 각종 alcohol류를 수용액상의 0.1~1.2배(v/v, 10~120 ml alcohol/100 ml H_2O) 첨가하여 24시간 반응시킨 후 G_2 - β -CD로의 전환율을 측정된 결과는 Table 3과 같다. Ethyl alcohol, N-propyl alcohol, 그리고 iso-propyl alcohol을 소량 첨가할 경우 약간의 G_2 - β -CD 전환율의 증가가 관찰되었으나

Table 4. Distribution of β -CD, maltose, and maltosyl- β -CD on aqueous and amyl alcohol predominant phases

Materials	Amount of materials (g/100 ml)	
	Aqueous phase	Amyl-alcohol phase
Maltose (G_2)	39.4	19.7
β -CD	0.5	0.4
G_2 - β -CD	2.3	2.1

Maltose/ β -CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, after 24 hr.

Table 5. Changes of pullulanase activity in aqueous and amyl alcohol predominant phases

Reaction time (hr)	Pullulanase activity (units/100 ml)	
	Aqueous phase	Amyl-alcohol phase
0	320	ND ^a
6	300	ND
12	278	ND
24	257	ND

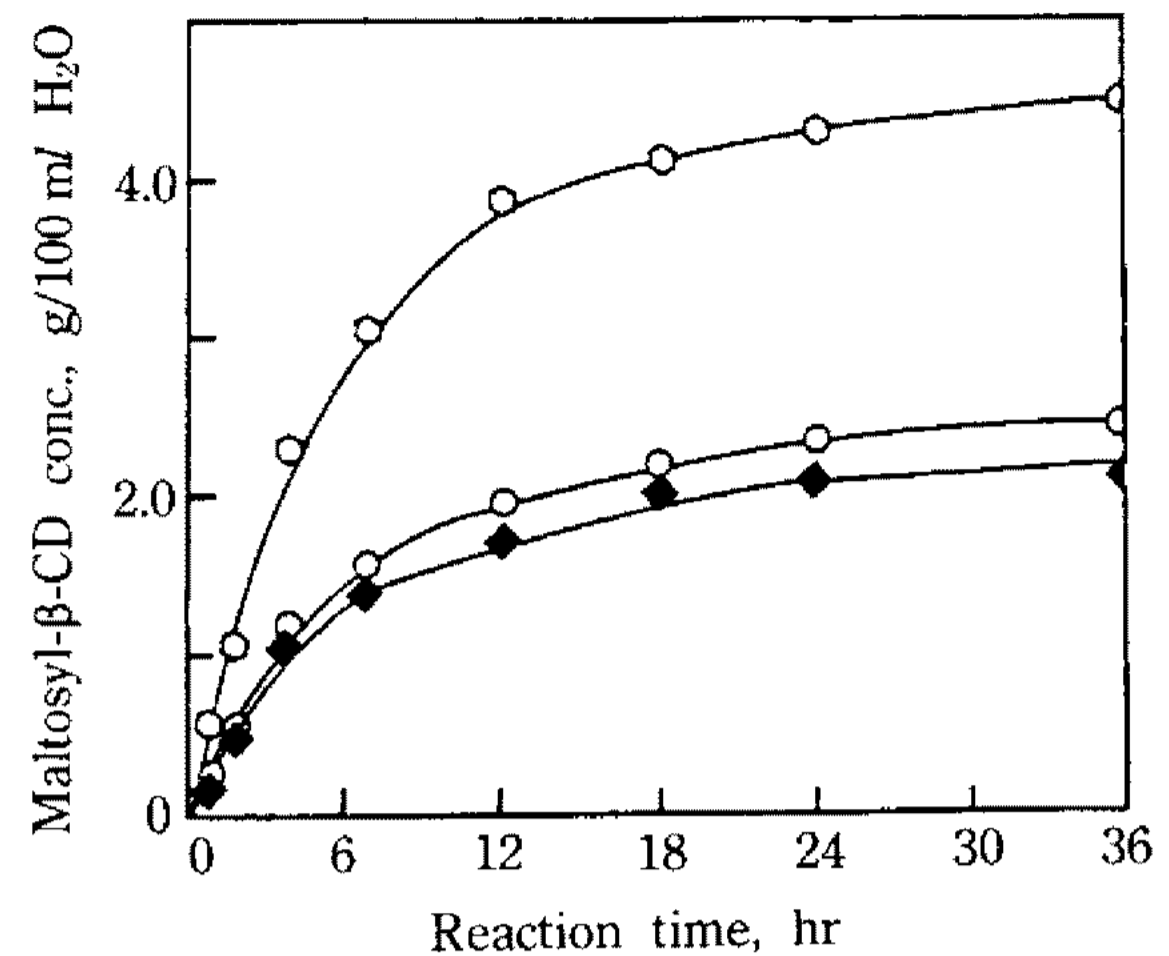
Maltose/ β -CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, after 24 hr.

^anot detected.

그 이상에서는 오히려 감소하였다. 또한 N-butyl alcohol의 첨가는 G_2 - β -CD 생성량과 전환율을 급격히 감소시켰다. 반면 N-amyl alcohol을 첨가할 경우 첨가량이 증가할수록 전환율은 비례하여 현저히 증가하였으며, 특히 amyl alcohol을 효소반응액과 동량인 1.0배 첨가할 때 maltosyl- β -CD로의 전환율은 83%에 이르렀고, 그 이상의 경우에는 다시 점차 감소하였는데 이는 효소활성과 관계되는 것으로 판단된다.

또한 Table 4는 24시간 반응 후의 수용액과 amyl alcohol상에 분포하는 maltose, β -CD, 그리고 G_2 - β -CD의 분포양상을 나타내고 있다. 수용액상에 존재하는 maltose, β -CD, 그리고 maltosyl- β -CD의 양은 39.4, 0.5 그리고 2.3 g/100 ml였고, amyl alcohol상의 양은 각각 19.7, 0.4, 그리고 2.1 g/l로서, β -CD와 G_2 - β -CD는 수용액과 amyl alcohol상에 거의 비슷한 비율로 분포하였다.

위와 같은 amyl alcohol 첨가시 전환율이 증가하는 것은 생성된 G_2 - β -CD가 amyl alcohol상 내에 물분자와 micelle을 형성하여 이동함으로써 pullulanase의 reverse reaction의 equilibrium에 미치는 영향을 감

**Fig. 4. Progress of synthesis of maltosyl- β -CD at two-phase system containing same volume of amyl alcohol and water.**

○: maltosyl- β -CD in aqueous phase, ◆: maltosyl- β -CD in amyl alcohol phase, ◇: total amount of maltosyl- β -CD.

Maltose/ β -CD=12.7, mixed substrate 70% (w/w), 350 units pullulanase/100 ml, pH 4.9, 60°C, after 24 hr.

소시켜 계속적으로 중합반응이 진행되기 때문이거나, 또는 amyl alcohol이 효소반응액의 water activity에 영향을 주거나 혹은 pullulanase의 active site에 영향을 주는 현상(18)도 유추할 수 있으나 이에 대한 후속연구가 필요하다.

Table 5는 amyl alcohol 첨가 반응액 중의 pullulanase activity의 변화를 경시적으로 나타낸 것으로 amyl alcohol상에서는 activity가 검출되지 않고 주로 수용액상에서 검출되었다. Pullulanase는 amyl alcohol 혼합반응액에서도 비교적 안정하였으며 24시간 경과 후에도 80%의 활성을 유지하였다.

Amyl alcohol 첨가반응계에서의 G_2 - β -CD합성양상

Fig. 4는 amyl alcohol을 수용액상과 동량 첨가하여 반응시키면서 수용액상과 amyl alcohol상의 G_2 - β -CD의 양, 그리고 두 상에서 생성된 총량을 경시적으로 비교한 결과이다. G_2 - β -CD합성은 12시간까지 대부분 진행되었으며, 특히 반응 4시간 후에 전체생성량의 반이 합성되었고, 그 이후에는 증가율이 완만하여 미량 증가에 그쳤다. 12시간 경과 후 수용액과 amyl alcohol상의 G_2 - β -CD 생성량은 각각 1.9와 1.7 g/100 ml였고, 24시간 경과 후에는 2.3과 2.1 g/100 ml로써, 전 반응기간 중 수용액과 amyl alcohol상 생성되는 G_2 - β -CD 생성량의 분포비는 1.0 : 0.9로 일정하게 유

지되었다.

요 약

pullulanase의 역반응능을 이용하여 maltose와 β -cyclodextrin으로부터 maltosyl- β -cyclodextrin을 중합 합성하기 위한 최적효소반응조건을 검토하였다. Maltose와 β -CD를 기질로 maltosyl- β -CD를 합성하였을 경우, 기질의 농도 70%(w/w, 70 g/100 ml H₂O), malto-oligo당/ β -CD의 혼합비 12.7, 그리고 사용효소량 350 units/100 ml일 때 최대전환율인 43%(w/w, g branched-CD/g CD)를 얻었고, 생성량은 2.31 g/100 ml였다. Maltosyl- β -CD의 효소합성의 적정 pH 및 온도는 각각 4.9와 60°C였다. 또한 maltose와 α -, β -, 그리고 γ -CD 각각을 기질로하여 maltosyl- α -, β -, 그리고 γ -CD를 합성하였을 경우 전환율은 51.8, 42.6, 그리고 48.1%로써, 생성량은 각각 2.8, 2.3, 그리고 2.6 g/100 ml였다. 한편 각종 malto-oligo당(G₁~G₆)과 β -CD를 기질로 malto-oligo당에 상응하는 branched- β -CD를 합성하였을 경우 전환율은 각각 0, 42.6, 25.9, 18.5, 14.8, 그리고 14.8%로서, 가장 전환율이 높은 malto-oligo당은 maltose(G₂)였다. pullulanase 중합 효소반응에 미치는 alcohol류의 영향을 검토한 결과 amyl alcohol이 가장 우수하였으며, 수용액상과 동량의 amyl alcohol을 첨가반응시킬 경우 maltosyl- β -CD로의 전환율은 83%로 증가하였다. Amyl alcohol 존재하에서의 pullulanase의 중합효소반응 양상에 관하여도 검토하였다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단지원 농업생물신소재 연구센터 1991년 연구비지원에 의한 것으로 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Hizukuri, S., S. Kawano, J. Abe, K. Koizumi and T. Tanimoto: *J. Jpn. Biotechnol. and Applied Biochem.*, **11**, 60 (1989)
2. Shiraish, T., S. Kusano, Y. Tsumuraya and Y. Sakano: *J. Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2181 (1989)
3. Yoshimura, Y., S. Kitahata, S. Okada, Y. Sato-mura and K. Hujita: *J. Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2585 (1989)
4. Kobayashi, S. and K. Kainum: UK Patent Application 2,165,549 (1986)
5. Kobayash, S. and M. Monma, T. Takano: UK Patent Application 2,193,963 (1988)
6. 한국유전공학연구조합: 특허정보자료집-Cyclodextrin(유전공학기술정보 53), 서울, 11 (1988)
7. Kobayashi, S., N. Shibuya, Y. Betty and F. Dexter: *J. Carbohydrate Res.*, **126**, 215 (1984)
8. Abe, J., N. Mizowaki, S. Hizukiri, K. Koizumi and T. Utamura: *J. Carbohydrate Res.*, **154**, 81 (1986)
9. Abe, J., S. Hizukiri, K. Koizumi and T. Utamura: *J. Carbohydrate Res.*, **176**, 87 (1988)
10. Kitahata, S., Y. Yoshimura and S. Okada: *J. Carbohydrate Res.*, **159**, 303 (1987)
11. Yoshimura, Y., S. Kitabata and S. Okada: *J. Carbohydrate Res.*, **168**, 285 (1987)
12. Sakano, Y., M. Sano and T. Kobayashi: *J. Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3391 (1985)
13. 신현동, 이상호, 이용현: 산업미생물학회지, **17**, 370 (1989)
14. Lee, S.H., H.D. Shin and Y.H. Lee: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 54 (1991)
15. Lee, Y.H., S.H. Lee and H.D. Shin: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **1**, 63 (1991)
16. 이용현, 이상호, 한일근: 산업미생물학회지, **19**, 171 (1991)
17. 한일근, 이용현: 산업미생물학회지, **19**, 163 (1991)
18. Chen, J.P. and C.H. Wang: *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 168 (1991)

(Received July 22, 1991)