

*Aureobasidium pullulans*가 생산하는 과당 및 포도당 전이효소에 의한 올리고당류의 생산

윤 중 원 · *윤 태 경 · *한 성 범 · 송 승 구
부산대학교 화학공학과
*동의대학교 화학공학과

Oligosaccharide Formation and Production of Transfructosylase and Transglucosylase by *Aureobasidium pullulans*

Jong-Won Yun, *Tae-Kyung Yoon, *Sung-Bum Han and Seung-Koo Song

Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Department of Chemical Engineering, Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

ABSTRACT

Oligosaccharide formation and the production of transfructosylase and transglucosylase by *Aureobasidium pullulans* were studied in sucrose or maltose media, respectively. The initial uptake rates of substrate in sucrose-rich media were faster than that in maltose-rich media, also most parts of oligosaccharides formed and other monosaccharides released were utilized progressively as substrate during the cultivation periods. However, when the initial amount of sucrose was raised to 100g/ℓ, high concentration of monosaccharides were liberated, consequently high-level fructose was accumulated unused during fermentation. The biggest molecule of oligosaccharide synthesized was hexasaccharide in all cultivation media examined, of which the organism could not utilize isomalto-oligosaccharide of DP6 synthesized in a maltose-rich medium. The maximum amount of oligosaccharides produced was 58g/ℓ when 100g/ℓ of sucrose and 5g/ℓ of maltose were used as initial substrate. From the early stage of growth, both fructooligosaccharides and isomalto-oligosaccharides were synthesized and progressively utilized as substrates during the fermentation. Based on the experimental results, it was suggested that maltose could induce both transfructosylase and transglucosylase, whereas sucrose was unable to stimulate transglucosylase formation.

서 론

*Aureobasidium pullulans*는 주로 다당류인 pullulan을 생산하는 미생물로 알려져 왔으나, glucoamylase를 생산하는 미생물종이 발견되기도 하였고(1), 최근에는 프락토올리고당(fructooligosaccharides)을 생산하는 미생물종이 발견되어 현재 산업균

주목까지 개발되어 있다. 프락토올리고당을 생산하는 두 종류의 산업균주, 즉 *Aspergillus niger*(2)와 *A. pullulans*(3, 4) 중에서 후자가 배양이 보다 용이하고 효소활성의 선택성(가수분해활성에 대한 올리고당 합성활성의 비율)이 높아서 관심이 더 집중되어 있는 편이다(5-12). *Aureobasidium* 속으로부터 프락토올리고당 생산효소인 fructosyltransferase의

최적 생산 조건은 몇몇 연구자들에 의해 보고된 바 있는데(3, 12), 설탕을 탄소원으로 배양했을 경우 미생물 성장속도와 효소활성이 가장 좋은 것으로 알려져 있다. 올리고당류를 합성하는 미생물에 대한 연구는 주로 효소 생산 또는 효소반응에 집중되어 있고 미생물 배양과정의 올리고당의 합성 또는 기질 이용 특성에 관한 연구는 많지 않다. Gupta 등(13)은 *Fusarium oxysporum*을 설탕을 탄소원으로 하는 배지에서 9일 동안 배양하는 과정에서 여러 가지 당류를 정량적으로 분석하였는데, 배양 초기부터 올리고당(glucosylfructosan)이 합성되었고 설탕이 제한되는 시점에서 유리된 포도당(free glucose) 또는 과당보다 올리고당이 더 선택적으로 기질로 이용된다고 보고하였다. Hayashi 등(14)은 *Aureobasidium* sp. ATCC 20524의 배양 중 유리되는 포도당과 과당을 정량하였는데, 설탕이 제한될 때 포도당이 과당에 비해 더 빨리 기질로 이용됨을 보고하였으나 합성되는 올리고당은 정량하지 않았다. 한편 Yun 등(4)은 100리터 규모의 발효조를 이용하여 *A. pullulans*를 20% 설탕배지를 사용하여 배양하는 과정에서 발효액 중의 당류를 분석한 결과, 배양 초기부터 GF₂(1-kestose)에서 GF₁(1^F-fructofuranosyl nystose)까지의 프락토올리고당류가 합성되었고 이들이 분자량이 작은 올리고당류부터 순서대로 다시 기질로 이용되어 배양 말기에는 거의 모든 당류가 기질로 이용되었다고 보고한 바 있다. Jung 등(3)과 Hayashi 등(14)이 사용한 미생물은 동일한 미생물속에도 불구하고 검토된 여러 가지 탄소원에 대한 이용성에서 서로 차이를 보인다. 예를 들면 Jung 등은 젓당(lactose)과 수용성 전분(soluble starch)은 이 미생물이 전혀 이용하지 못한다고 보고한데 비해 Hayashi 등은 이 두 기질을 이용하여 상당량의 세포외 효소를 생산할 수 있었다고 보고하였다. 그러나 최적 배지조성 및 배양시간에 따른 세포내 효소와 세포외 효소의 생산 비율 등은 거의 동일한 결과를 보였다. 특히 Jung 등은 맥아당배지에서 미생물 성장속도는 설탕배지와 동일하였으나 fructosyltransferase의 생산에는 부적합하다는 결론을 얻었다. 최근 Yun과 Song 등(15)은 *A. pullulans*를 맥아당을 주 탄소원으로 하여 낮은 온도에서 배양했을 때, 포도당전이활성(transglucosylation activity)에 의한 이소말토올리고당(isomalto-oligosaccharides)을 생산한다는 사실을 보고한 바 있다. 그러나 올리고당의 합성능이 있는 미생물에 대하여 탄소원의 종류에 따른 배양과정 중의 올리고당류의 기질 이용성 또는 효소활

성에 관한 체계적인 연구결과는 지금까지 전혀 보고된 바 없다.

본 연구에서는 *A. pullulans*을 설탕 및 맥아당배지 또는 이 두 탄소원이 적정 비율로 혼합된 배지에서 각각 배양하였을 때, 이 미생물의 배양 중 올리고당 합성능 및 기질 이용성을 상세히 고찰하고, 과당전이효소(transfructosylase)와 포도당전이효소(transglucosylase)의 생산 특성에 관하여 고찰하고자 하였다.

재료 및 방법

시약

배지로 사용한 설탕은 식품용 등급을, 맥아당은 Sigma Chemical Co.(USA)에서 생산된 grade II 제품을 사용하였다. HPLC 분석에서 표준물질로 사용된 맥아당, isomaltose, maltotriose, isomaltotriose, panose 등은 Sigma Chemical Co.의 특급 시약을 사용하였다. 그 이외의 시약들은 일반 시약급 제품을 사용하였다.

미생물 배양

Aureobasidium pullulans KFCC 10245를 서로 다른 6종류의 배지(Table 1)를 이용하여 25℃에서 48시간 배양한 다음, 본 배양배지 50ml가 함유된 250ml flask에 접종(1%, v/v)하여 25℃에서 120시간 동안 본배양하였다.

효소활성의 측정

과당전이활성 측정의 경우, 발효액 1ml를 Eppendorf tube에 취하여 5000×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액은 세포외 효소의 활성 측정에 이용하였고, 분리된 균체를 다시 탈이온수(deionized water)로 2회 세척하여(5000g, 10분간 원심분리) 500g/l 설탕용액 1ml를 가한 다음 55℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액을 HPLC로 분석하여 생성된 1-kestose의 양을 정량하고 1분간 1μmol의 1-kestose를 생성하는데 필요한 효소량을 세포내 효소활성 1unit로 정의하였다. 세포외 효소의 경우, 전술한 상등액 0.5ml에 500g/l 설탕용액 0.5ml를 가하여 동일조건에서 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 한편 포도당전이활성의 경우도 전술한 방법과 동일한 방법으로 측정하였는데, 이때 반응기질로는 500g/l 맥아당용액을 사용하였고 반응물 중 초기 반응산물인 panose(DP3)의 양을 HPLC로 정량

하여 1분간 1 μmol의 panose를 생성하는데 필요한 효소량을 1unit로 정의하였다.

분석

모든 당류의 분석은 Aminex HPX-42C(300mm×7.8mm, Bio-rad, USA)컬럼이 장착된 HPLC(Varian, USA)를 사용하여 정량하였다. 검출기는 RI-4 refractive index detector(Varian, USA)를 사용하였고, 이동상으로 초순수(18 megaohm.cm)를 사용(1ml/min)하였으며 컬럼 온도는 85℃로 일정하게 유지해 주었다. 설탕을 주탄소원으로 하는 배지에서 합성된 올리고당류의 대부분은 1-kestose(GF₂: G, glucose; F, fructose), nystose(GF₃), 1^F-fructofuranosyl nystose(GF₄), 1^F-(fructofuranosyl)₂ nystose(GF₅) 등이고, 맥아당을 주탄소원으로 하는 배지에서 합성된 올리고당류는 panose(DP3)를 비롯한 DP4-6까지의 이소말토올리고당류가 대부분이었다.

결과 및 고찰

배지조성에 따른 올리고당의 합성 및 기질 이용성 설탕 및 맥아당을 각각 주탄소원으로 A. pullulans를 배양할 경우, 배양 중의 올리고당의 합성 및 기질 이용성을 고찰하기 위하여, 먼저 Table 1의 No. 1, 2와 같이 설탕 또는 맥아당 각 50g/ℓ 이 첨가된 배지에서 배양하면서 배양기간 동안 발효액 중의 당류의 조성변화를 고찰하였다. Fig. 1(C, D)에서 보여주는 바와 같이, 배양기간 중에 합성되는 올리고당의 종류, 생성량, 기질 이용성은 매우 상이하게 나타났다. 설탕만을 탄소원으로 사용하였을 경우 (Fig. 1C), 최초 기질의 소비속도는 맥아당배지에 비해 매우 빨랐으며 배양 70시간 전후에서 완전히 고갈되었고, 프락토올리고당은 DP6(GF₅)까지 합성되었는데, 배양 20시간에서 최대량이 생성된 후 모든 올리고당 성분이 기질로 서서히 이용되어 배양 말기에서는 거의 완전히 소모되었다. 이에 비해 맥아당 배지에서는 합성된 최대 분자 올리고당류는 역시 DP6의 이소말토올리고당이었고 그 최대 생성량은 설탕배지에서의 프락토올리고당의 농도와 거의 유사하였으나, 기질이용속도는 프락토올리고당에 비해 매우 낮아서 합성된 올리고당의 75%가 배양말기까지 잔존하였다. 특히 DP5까지의 올리고당류가 서서히 기질로 이용되는데 비해 DP6 올리고당은 전혀 이용되지 않아서 배양말기에 전체 잔당(residual

Table 1. Composition of growth medium used in this study.

Components(% w/v)	Medium No.					
	1	2	3	4	5	6
Sucrose	5	0	5	0.5	10	0.5
Maltose	0	5	0.5	5	0.5	10
Yeast extract	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
K ₂ HPO ₄	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
KCl	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

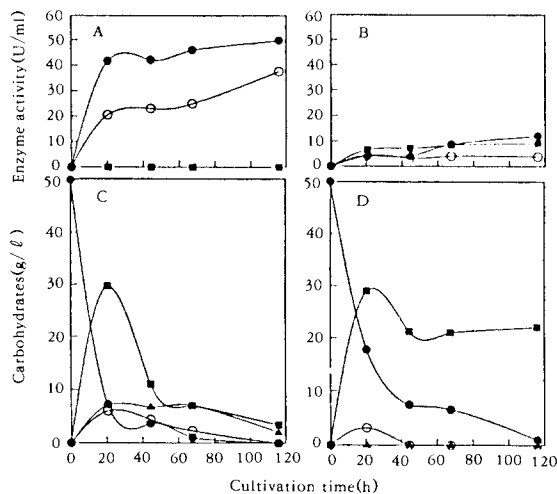


Fig. 1. Changes in enzyme activities and concentrations of carbohydrates in the 50g/ℓ of sucrose and 50g/ℓ of maltose medium, respectively.

A, B : enzyme activities in sucrose medium and maltose medium, respectively; (●) intracellular activity of transfructosylase, (○) extracellular activity of transfructosylase, (■) intracellular activity of transglucosylase.

C, D : carbohydrate concentrations; (●) sucrose or maltose, (▲) fructose, (○) glucose, (■) total oligosaccharides.

sugars)중에서 약 95%(w/w)를 차지하였다(Fig. 1D). 이 결과는 Fig. 2에 각각의 당류에 대한 농도로 상세히 나타내었다. 배양 20시간 전후에서 초기 기질로부터 DP3 올리고당(panose)이 최대로 합성

Table 2. Dry cell weight and final pH of culture broth in each medium.

Medium No. ^{a)}	Dry cell weight(g/ℓ) ^{b)}	Final pH ^{c)}
1	19.8	6.62
2	19.4	4.47
3	15.6	6.25
4	20.2	6.35
5	13.4	6.20
6	19.0	5.79

- a) Medium numbers are the same as in Table 1.
- b) Dry cell weight was estimated by drying the wet cells at 105°C for 12hrs.
- c) Initial pHs were adjusted to 6.0 before sterilization.

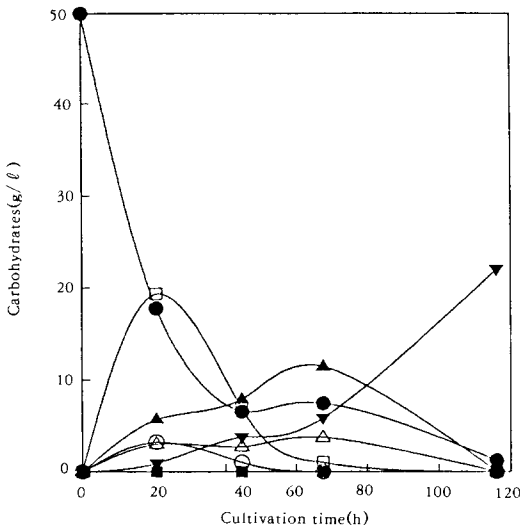


Fig 2. Changes in the concentration of carbohydrates in the 50g/ℓ of maltose medium: Symbols: (●) maltose, (■) fructose, (○) glucose, (□) oligosaccharide of DP3, (▲) oligosaccharide of DP4, (△) oligosaccharide of DP5, (▼) oligosaccharide of DP6.

되고 이후 빠른 속도로 panose가 다시 기질로 이용되어 DP4 올리고당을 합성하는 메카니즘에 의해 DP6까지의 올리고당류를 합성하였다. DP6 올리고당이 기질로 이용되지 않은 이유는 맥아당배지에서 생산되는 포도당전이효소의 활성자리(active site)에서 DP6 이상의 올리고당류의 분자 크기가 acceptor로 작용하는데 제한을 받았을 가능성으로 추측된다.

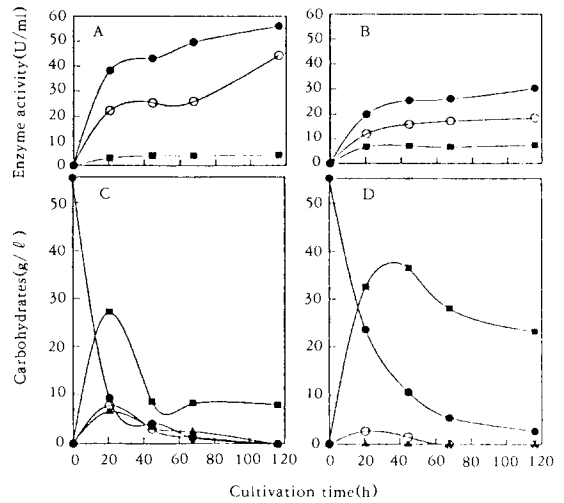


Fig 3. Changes in enzyme activities and concentrations of carbohydrates in the 50g/ℓ of sucrose medium supplemented with 5g/ℓ maltose and 50g/ℓ of maltose medium supplemented with 5g/ℓ of sucrose, respectively. A, B: enzyme activities in sucrose-rich medium and maltose-rich medium, respectively; C, D: carbohydrate concentrations. Symbols are the same as in Fig 1.

Table 2는 각 배지에서의 건조 균체중량(dry cell weight) 및 최종 발효액의 pH를 나타낸 것으로서, 균체성장은 두 탄소원의 조성비율과 큰 영향이 없는 것으로 나타났고, pH는 맥아당비율이 높은 배지에서 낮은 경향을 보였으며 특히 맥아당만의 배지에서 가장 낮았는데, 이것은 대사산물의 하나인 유기산의 종류 또는 농도의 차이에서 비롯된 것으로 보인다.

Fig. 3은 설탕 50g/ℓ의 배지에 맥아당을 5g/ℓ 추가하거나(Fig. 3C) 맥아당 50g/ℓ에 설탕 5g/ℓ을 추가하여(Fig. 3D) 배양하였을 때 각각에 대한 기질 이용성의 변화를 고찰한 것이다. 전자의 경우는 맥아당을 첨가하지 않은 경우(Fig. 1C)에 비해 초기 기질 소비속도와 올리고당의 합성 정도는 거의 유사하였으나, 유리된 단당류의 소비속도가 더 빠르고 배양말기에 잔존한 올리고당의 양이 다소 높게 나타났다. 이것은 첨가된 맥아당이 과당 전이효소뿐만 아니라 포도당전이효소를 동시에 induction시키는 과정에서 발생된 기질 선택성의 차이 때문인 것

Table 3. The ratios of oligosaccharides to the other sugars during the fermentation(% w/w).

Medium No. ^{a)}	Incubation periods(h)			
	20.5	44.5	67.5	116
1	59.5	28.5	14.3	24.9
2	58.1	71.0	68.4	94.9
3	52.9	33.3	18.9	98.0
4	52.2	57.3	56.1	41.2
5	53.9	36.2	29.0	11.8
6	30.0	58.1	58.8	54.2

a) Medium numbers are the same as in Table 1.

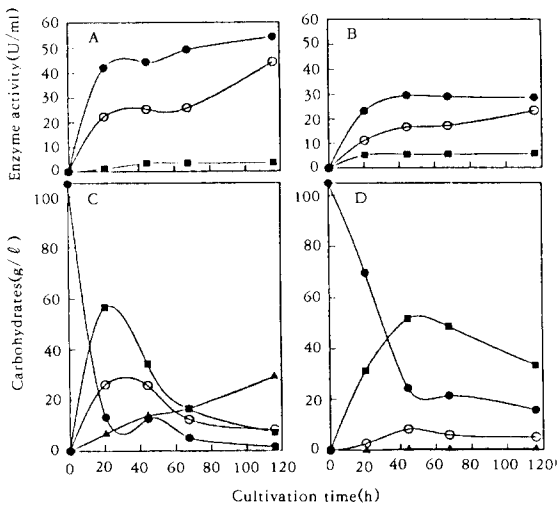


Fig 4. Changes in enzyme activities and concentrations of carbohydrates in the 100g/l of sucrose medium supplemented with 5g/l maltose and 100g/l of maltose medium supplemented with 5g/l of sucrose, respectively.

A, B: enzyme activities in sucrose-rich medium and maltose-rich medium, respectively; C, D: carbohydrate concentrations. Symbols are the same as in Fig 1.

으로 보인다. 이에 비해 후자의 경우는 설당을 첨가하지 않은 경우(Fig. 1D)와 거의 유사한 결과를 보였다.

Fig. 4는 설당 100g/l의 배지에 맥아당을 5g/l 추가하거나(Fig. 4C), 맥아당 100g/l에 설당 5g/l

을 추가하여(Fig. 4D) 배양하였을 때 각각에 대한 기질 이용성의 변화를 고찰한 것이다. 먼저 전자의 경우, 올리고당은 최대 58g/l 까지 합성된 후 초기 기질이 고갈되는 시점에서 기질로 이용되기 시작하였으며, 유리된 단당류의 양이 특이하게 많았고, 그 중 포도당은 기질로 이용된데 비해 과당은 배양 중에 계속 축적되었다. 이것은 프락토올리고당이 유리된 과당보다 더 선택적으로 기질로 이용되었음을 보여주는 것이다. 이 결과는 *F. oxysporum*으로부터 프락토올리고당이 합성될 때 유리된 단당류보다 올리고당이 선택적으로 이용된 경우와 유사하다(13).

Table 3은 각 배지조건에서 배양액을 시간별로 분석하여 전체 당류 중에서 올리고당의 비율변화를 정리한 것이다. 설당을 주 탄소원으로 배양한 경우(Medium No. 1, 3, 5), 배양 초기에 올리고당의 비율이 높게 유지된 후 시간에 따라 점점 감소하는 경향을 보여주고 있는데 비해 맥아당을 주 탄소원으로 배양한 경우(No. 2, 4, 6)는 배양기간 동안 그 비율이 거의 일정하거나 다소 증가한 것으로 나타났다. 이것은 설당배지에서 합성된 프락토올리고당류가 맥아당배지에서 합성된 이소말토올리고당에 비해 기질 이용속도가 매우 크다는 사실을 잘 설명해 주고 있다.

배지조성에 따른 과당 및 포도당전이효소의 생산 특성

올리고당 합성능이 있는 미생물에 대한 배양과정 중의 효소활성에 대한 고찰은 많이 이루어지지 않았다. Gupta 등(13)은 *Fusarium oxysporum*을 설당을 탄소원으로 하는 배지에서 배양하여 올리고당(glucosfructosan)의 합성을 고찰하였는데, 배양 초기에는 과당전이효소(fructosyltransferase)와 가수분해효소(invertase)가 동시에 선형적으로 증가하면서 생산되다가 배양시간이 매우 길 경우에는 과당전이효소의 생산이 중지되고 반면에 invertase의 생산이 크게 촉진된다고 하였다. 또한 Hayashi 등(14)은 *Aureobasidium* sp. ATCC 20524를 설당배지에서 배양했을 때, 배양 초기부터 세포내 및 세포외의 효소 모두 선형적으로 증가하여 세포내 효소의 경우 배양 2일째 최고 활성을 나타내었다가 이후 감소하고 세포외효소 활성은 계속 증가하였다고 보고한 바 있다.

설당 및 맥아당을 각각 주 탄소원으로 *A. pullulans*를 배양할 경우, 배양 중에 생산되는 두 가지 중요한 효소, 즉 과당전이효소 및 포도당전이효소의 생산특성을 고찰하기 위하여, 먼저 Table 1의 No.

Table 4. The ratios of progressive intracellular transfructosylase activity to transglucosylase activity in the various culture media.

Medium No. ^{a)}	Cultivation periods(h)			
	20.5	44.5	67.5	116
1	17.08	9.18	9.72	10.42
2	0.87	1.23	2.13	3.05
3	12.25	10.66	12.57	13.03
4	2.98	3.58	3.92	4.09
5	31.81	12.91	14.02	15.66
6	3.98	5.46	6.60	5.07

a) Medium numbers are the same as in Table 1.

1, 2와 같이 설탕 또는 맥아당 각 50g/l가 첨가된 배지를 대조배지로 이용하여 배양하면서 배양기간 동안 두 효소의 활성을 각각 측정하였다. Fig. 1A에서 보여주는 바와 같이, 50g/l 설탕만을 탄소원으로 사용했을 경우 포도당전이효소는 전혀 생산되지 않았는데 비해 맥아당 50g/l 배지에서는 균체내에 과당전이효소의 활성과 거의 유사한 정도의 포도당전이효소가 생산되었다. 한편 50g/l 설탕 배지에 맥아당을 5g/l 첨가한 결과(Fig. 3A), 낮은 활성이었지만 포도당전이효소가 생산되었고, 맥아당 50g/l 배지에 설탕을 미량(5g/l) 첨가했을 경우(Fig. 3B) 맥아당을 첨가하지 않은 경우에 비해 3배 이상 과당 전이효소 활성이 증가한 것으로 나타났다. 이 결과로부터 설탕은 포도당전이효소의 inducer가 아닌데 비해, 맥아당은 과당 및 포도당전이효소 생산에 있어서 공통적인 inducer로 작용하였음을 알 수 있다. 또한 설탕 및 맥아당의 혼합배지에서 두 효소가 배양 초기부터 동시에 생산된 것으로 보아서 과당전이효소와 포도당전이효소는 coordinate induction에 의해 분비되는 것으로 판단된다. 한편 실험에 사용된 모든 배지에서 균체의 포도당전이효소의 활성은 무시할 정도로 극히 낮았는데, 이것은 과당전이효소의 경우 균체의 활성이 균체내 효소에 대해 일정비율로 생산된 것과 비교하면 서로 다른 결과이다.

Fig. 4는 설탕 100g/l의 배지에 맥아당을 5g/l 추가하거나(Fig. 4A), 맥아당 100g/l에 설탕 5g/l을 추가하여(Fig. 4B) 배양하였을 때 각각에 대한 두 효소의 생산특성을 고찰한 것이다. 전자의 경우, 설탕의 양이 50g/l 추가되었음에도 불구하고 두 효소활성의 증가는 관찰되지 않았고 후자의 경우도 마

찬가지로 두 효소활성 변화는 나타나지 않았다.

Table 4는 각 배지조건에서의 균체내 포도당전이효소에 대한 과당전이효소 활성의 비를 시간별로 측정하여 나타낸 것이다. 설탕배지의 경우 배양 초기를 제외하면 배양 중의 두 효소의 활성비는 설탕농도가 높고, 맥아당이 첨가된 배지일수록 그 비율이 높았으나, 시간에 따라서는 일정한 값을 나타내었다. 한편, 맥아당 배지의 경우도 마찬가지로 맥아당 농도가 높을수록, 설탕이 첨가된 배지에서 비율이 높았으나 시간에 따라 그 비율이 점점 증가하는 것으로 나타났다. 이 결과로부터 *A. pullulans*의 배양과정에서 포도당전이효소 활성을 높게 유지하기 위해서 맥아당 농도가 높거나 설탕을 첨가한 배지조건은 불리하지만, 과당전이효소 활성을 높게 유지하기 위해서는 설탕배지에 맥아당을 소량 첨가하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

요 약

*Aureobasidium pullulans*를 설탕 및 맥아당을 주 탄소원으로 하는 배지에서 각각 배양하면서 여러 종류의 올리고당류의 합성, 기질 이용성, 그리고 과당전이효소 및 포도당전이효소의 생산특성에 대해 고찰하였다. 맥아당 배지에 비하여 설탕배지에서 초기 기질의 소비속도가 더 빨랐고 합성된 올리고당류는 두 경우 모두 최대 중합도 6까지의 올리고당류를 생산하였고, 이때 합성된 올리고당류의 최대 농도는 초기 설탕농도 100g/l의 경우에서 58g/l이었다. 이들은 대부분 배양 중에 탄소원으로 다시 이용되었으나 중합도 6의 이소말토올리고당은 기질로 이용되지 않고 배양 말기까지 계속 잔존하였다. 설탕을 주 탄소원으로 하는 배지에서 맥아당은 과당전이효소 및 포도당전이효소의 생산을 촉진시켰으나, 맥아당을 주 탄소원으로 하는 배지에서 설탕은 포도당전이효소의 생산에 전혀 영향을 미치지 않았다.

참고문헌

1. R. O. Federici, F. Federici and M. Petruccioli (1990), *Biotechnol. Lett.*, **12**, 661.
2. H. Hidaka, T. Eida and Y. Saitoh(1987), *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **61**, 915.
3. K. H. Jung, J. Y. Lim, S. J. Yoo, J. H. Lee and M. Y. Yoo(1987), *Biotechnol. Lett.*, **9**, 703.

4. J. W. Yun, K. H. Jung, J. W. Oh and J. H. Lee(1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/25**, 299.
5. J. W. Yun, K. H. Jung, Y. J. Jeon and J. H. Lee(1992), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **2**, 98.
6. S. Hayashi, J. Kinoshita, M. Nonoguchi, Y. Takasaki and K. Imada(1991), *Biotechnol. Lett.*, **13**, 395.
7. S. Hayashi, K. Itho, M. Nonoguchi, Y. Takasaki and K. Imada(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 68.
8. K. H. Jung, J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim and J. H. Lee(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 491.
9. J. W. Yun, M. G. Lee and S. K. Song(1993), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 307.
10. J. W. Yun and S. K. Song(1993), *Biotechnol. Lett.*, **15**, 573.
11. J. W. Yun, M. G. Lee and S. K. Song(1994), *J. Ferment. Bioeng.*, **77**(2), 159.
12. J. A. Smith, D. Grove, S. J. Luenser and L. G. Park(1982), *US Patent*, 4, 309, 505.
13. A. K. Gupta and I. S. Bhatia(1980), *Phytochemistry*, **19**, 2557.
14. S. Hayashi, M. Nonokuchi, K. Imada and H. Ueno(1990), *J. Ind. Microbiol.*, **5**, 395.
15. J. W. Yun, J. S. Noh, J. Y. Song and S. K. Song(1994), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, In Press.