

Bacillus cereus IAM1072에 의한 올리고당 생산의 최적조건

이명열[†] · 정만재* · 이신영** · 강태수** · 이용수 · 민윤식

충주산업대학교 식품공학과

*충북대학교 식품공학과

**강원대학교 발효공학과

Optimum Production Condition of Oligosaccharide by *Bacillus cereus* IAM1072

Myong-Yul Lee[†], Man-Jae Chung*, Shin-Young Lee**, Tae-Su Kang**, Ung-Soo Lee and Yun-Sik Min

Dept. of Food Engineering, Chungju National University, Chungju 380-702, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

**Dept. of Fermentation Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

This study was carried out to produce the oligosaccharides (G₂-G₇) directly from the culture broth of *Bacillus cereus* IAM1072. The maximal production of oligosaccharides was obtained after cultivation at 30° C for 24hrs in the mixture of 12% soluble starch, 1.5% peptone and 0.25% K₂HPO₄ adjusted to pH 7.0. Among the oligosaccharides produced G₅ oligosaccharide was purified. After methylation, the result of GC analysis was suggested to be oligosaccharide consisting of 5 glucose unit with α -1,4-glucosidic bond.

Key words : oligosaccharides (G₂-G₇), optimum medium composition, G₅ of composition and structure

서 론

식품공업에서 종래의 당질은 주로 설탕으로 감미원, 영양원, 보형제로서 널리 사용되었다. 그러나 설탕의 과잉섭취시 비만, 충치, 당뇨병 등의 장애가 생겨 대체 당질의 필요성이 높아졌다. 이러한 측면에서 전분유래의 glucose가 2~10개 결합한 당(1)인 올리고당의 연구가 활발히 진행중이다. 이들 올리고당은 용해도가 크고 소화흡수가 되기 쉬운 점, 흡습성, 보수성이 뛰어난 점 등의 특징을 가지고 있어 식품 개량제, 식품소재, 화장품 개량제로의 용도개척이 진행중이고, 의약품으로는 혈중 amylase의 측정용 기질로서 이용되고 있다. 또한 올리고당은 유아나 노인의 영양원으로서도 잠재적으로 이용될 수 있는 당으로 전망되고 있다. 전분에 작용하여 특이적으로 올리고당을 생성하는 미생물 기원의 효소가 1971년 발견된 이후(2) 각종의 고순도 올리고당이 생산되고 있으나 주로 glucose가 4개 결합된

G₄가 생산되고 있다. G₃를 생성하는 효소로는 *Streptomyces griseus*(3), *Bacillus subtilis*(4)가 있고, G₅를 생성하는 효소로는 *Bacillus licheniformis*(5), *Bacillus cereus*(6-10), *Pseudomonas sp.*(11), *Bacillus circulans*(12) 유래의 효소 등이 알려져 있다. 그러나 효소에 의한 올리고당의 생성시는 올리고당을 생성하는 효소의 가격이 고가이므로 미생물의 당대사를 이용하여 배양액 중에서 직접 올리고당을 생산하는 연구의 검토 필요성이 높다. 따라서 본 연구에서는 *Bacillus cereus* IAM1072에 의하여 배양액으로부터 직접 올리고당을 생산하였고 생성 올리고당을 분리 정제하여 구조를 밝혔다.

재료 및 방법

균주 및 균주의 보존

본 실험에 사용한 균주는 *Bacillus cereus* IAM1072로 일본 동경대학 미생물 연구소로부터 제공받아 사용하였다. 균주는 Table 1의 한천사면배지(pH 7.0)에서 배양한 후, 4° C에서 보존하였으며, 4주 마다 계대배양

[†]To whom all correspondence should be addressed

Table 1. Medium composition of seed culture

Ingredient	Concentration (% w/v)
Soluble starch	2.5
Peptone	1.5
NaCl	0.25

pH of the medium was 7.0

Table 2. Medium composition for oligosaccharide production

ingredient	Concentration (% w/v)
Soluble starch	4.0
Peptone	1.5
NaCl	0.25

pH of the medium was 7.0

하면서 실험에 사용하였다.

배지조성 및 조제

올리고당 생산을 위한 배지조성은 Table 2와 같으며, 121°C에서 20분간 가압살균하여 사용하였다.

배양 방법

전배양은 전배양용 배지 20ml를 100ml 삼각 플라스크에 넣고 121°C에서 15분간 가압살균한 후, 4°C에서 Table 1의 한천사면 배지에서 보존하였던 균주를 백금이로 1회 접종하여 30°C에서 12시간 진탕배양(100rpm)하였다.

한편, 올리고당의 생성실험은 Table 2의 본배양용 배지 40ml를 200ml 삼각플라스크에 넣고 121°C에서 15분간 가압살균한 후, 전배양액 3% (v/v)를 접종하고 30°C에서 24시간 진탕배양(100rpm)하였다.

올리고당의 생성조건의 검토

배양조건

접종비의 영향은 기본배지에 전배양액의 접종량을 1~4%로 변화시켜 30°C에서 24시간 진탕배양하여 조사하였고, 배지액량의 영향은 200ml 삼각플라스크에 접종비를 3%로 하여 배지액량을 20~100ml로 달리하여 30°C에서 24시간 진탕배양하고 조사하였다. pH의 영향은 0.1N HCl과 0.1N NaOH로 기본 배지를 pH 4~11범위의 각 단계 pH로 조절하여 24시간 진탕배양하고, 온도의 영향은 25~40°C의 여러 단계 온도에서 24시간 진탕배양한 후 각각 생육 및 생성 올리고당을 측정하여 조사하였다. 한편, 배양시간의 영향은 기본 배지를 사용하여 앞에서 검토한 배지액량, pH 및 온도의

조건을 이용하고 42시간 배양하면서 기질소비, 균체 증식 및 올리고당의 생산에 대한 경시변화를 측정하여 조사하였다.

배지조성

탄소원의 영향은 Table 2의 기본배지에서 soluble starch 대신 amylose, amylopectin을 각각 4% (w/v)의 농도로 조사한 후, soluble starch의 농도별 영향을 조사하였으며, 질소원의 영향은 soluble starch 12% (w/v)를 넣은 기본배지에 peptone 대신 tryptone, yeast extract, malt extract 등의 유기 질소원을 각각 1.5% (w/v)되게 첨가하여 pH를 7.0으로 조절한 후 30°C에서 24시간 진탕배양하고 각 배지에서의 생육 및 생성 올리고당을 측정하여 조사하였다. 한편, 무기염류의 영향은 soluble starch 12%, peptone 1.5%를 첨가한 배지에 기본배지의 NaCl 대신 K₂HPO₄, KH₂PO₄, CaCl₂, MgSO₄ · 7H₂O, MnCl₂를 각각 0.25% 농도로 첨가하고 pH를 7.0으로 조절하여 30°C에서 24시간 진탕배양한 후 생육 및 생성 올리고당을 정량하여 조사하였다.

분석

전분의 정량 (13)

배양액 5ml와 0.05 N-H₂SO₄ 2ml를 넣고 100°C로 유지한 수조에서 30분간 중탕한 후 신속히 100ml 삼각 flask에 넣었다. 여기에 냉각한 증류수 20ml를 첨가하여 20°C에서 25분 방치한 후 KI-I₂용액 0.2ml를 넣고 교반하였다. 30분 후에 520nm에서의 흡광도를 측정하고 표준곡선으로부터 전분량을 구하였다.

당의 분석

배양액 중의 전당은 phenol-sulfuric acid법 (14), 배양액 중에 생성된 올리고당의 양은 HPLC로 정량하였으며 분석조건은 Table 3과 같다. 생성된 올리고당의 수율은 다음 식으로 구하였다.

$$\text{올리고당의 수율 (\%)} = (A/B) \times 100$$

A : 생성된 올리고당의 양

B : 배양 후 전당의 양

올리고당의 정제

배양액 중의 올리고당을 정제하기 위하여 小林 등 (15) 및 具沼(16)의 방법에 의해 column chromatography를 실시하였다. Column의 제조는 charcoal과 celite 545 (1 : 1, 50g : 50g)를 혼합하고 0.1N HCl로 현탁하

Table 3. Conditions of HPLC for the analysis of sugar

Instrument	Waters 402 high performance liquid chromatography (U.S.A)
Column	Carbohydrate analysis (3.9mm ID×300mm)
Mobile phase	CH ₃ CN : H ₂ O (65 : 35, v/v)
Flow rate	1.5ml/min
Detector	Refractive Index Detector (RI)
Chart speed	0.5cm/min.
Injection volume	20μl

여 일정시간 방치하고 carbon의 불활성화와 산가용성 성분을 제거하였다. 이 조작을 3회 반복하고 Büchner 여두상에 옮겨 증류수로 산이 완전히 제거될 때까지 세척하였다. 이것을 chromatography용 column에 충전하고 다량의 5% n-butyl alcohol (column 체적 100ml당 약 5L)을 통과시킨 다음 증류수로 n-butyl alcohol이 완전히 제거될 때까지 세척하였다. 여기에 60°C에서 감압 농축한 배양액 중 올리고당 200mg에 상당하는 양을 가하여 chromatography를 실시하였다.

올리고당의 구조적 특성

구성당의 결정

올리고당의 구성당은 Toba 등 (17)의 방법으로 가수분해시키고 Brobst와 Lott (18)의 방법으로 유도체를 만들어 확인하였다. Charcoal column chromatography로 최종 정제된 G₅ 올리고당용액을 동결건조하였다. G₅ 분말 0.5mg에 2N trifluoroacetic acid (TFA) 1ml를 첨가하고 질소가스를 충전하여 105°C에서 6시간 동안 가수분해시킨 후 감압농축하여 산을 제거하였다. 여기에 pyridine 50μl hexamethyldisilazane (HMDS) 45μl 및 TFA 5μl를 첨가하여 trimethylsilyl (TMS) 유도체를 만든 후 Table 4와 같은 조건으로 GC 분석을 하였다.

Methylation (19)

G₅ oligosaccharide 5mg에 methylsulphinyl methyl sodium 0.4ml를 첨가하여 25°C에서 20분간 sonication하고 여기에 0.3ml의 methyl iodide를 가하고 25°C에서 15분간 sonication을 하여 실온에서 6시간 방치한 후 methylsulphinyl methyl sodium을 중화하기 위해 소량의 물을 가하였다. 4ml의 chloroform으로 methylation된 oligosaccharide를 추출하고 3ml의 물을 첨가하여 3회 chloroform층을 세척하고 40°C에서 질소가스 충전하에 감압농축한 후 chloroform을 제거하였다. 이것을 0.15M H₂SO₄로 105°C에서 12시간 동안 가수분해를 행하였다. 이어서 methylation된 단당류에 1mg의 sodi-

Table 4. Conditions of GC for the analysis of sugar

Instrument	Hewlett Packard 5890 Series II Gas chromatography
Detector	Flame Ionization Detector (F.I.D.)
Column	Ultra 2 capillary column, cross-linked 5% phenyl methyl silicone, 25ml×0.25 mm ID×0.17μm filmthickness
Temperature	
Column oven	200°C
Injection port	200°C
Detector block	250°C
Flow rate	
Carrier (N ₂)	1ml/min
Hydrogen (H ₂)	30ml/min
Air	400ml/min
Split	100 : 1
Injection volume	1μl

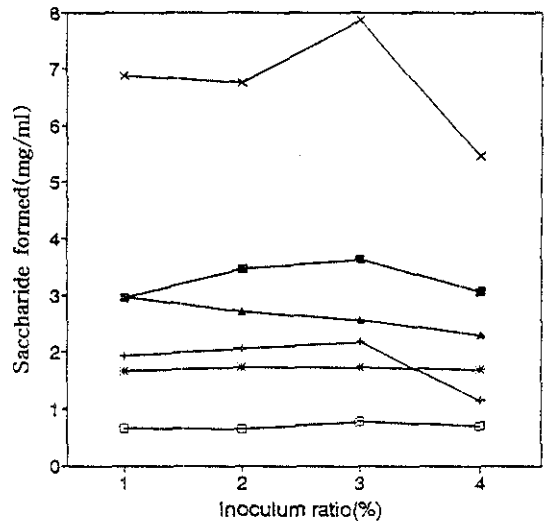


Fig. 1. Effect of inoculum ratio on the production of saccharides.

■ : G₁ + : G₂ * : G₃
 □ : G₄ × : G₅ ▲ : G₆

um borohydride를 가하여 실온에서 12시간 동안 환원하였다. 이 환원물을 acetylation 하고 Table 4와 같은 조건으로 GC 분석을 하였다.

결과 및 고찰

올리고당 생성의 배양조건

올리고당(G₂~G₇)의 생성에 미치는 접종량의 영향을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다.

G₅를 제외한 G₂~G₇의 올리고당은 접종량에 큰 차이를 보이지 않았으나 주생성물인 G₅의 생성은 접종비 3%에서 가장 높았다.

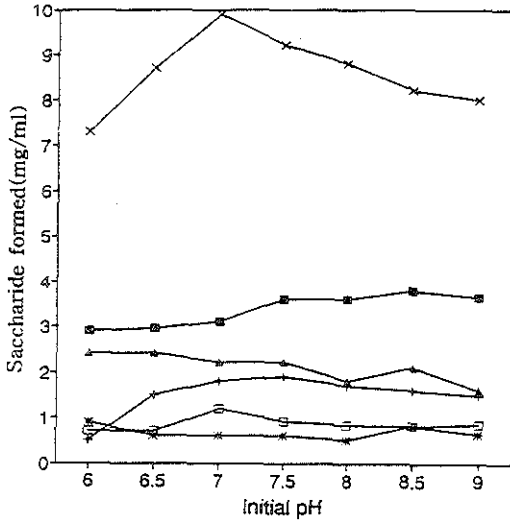


Fig. 2. Effect of initial pH on the production of saccharides.

■ : G1 + : G2 * : G3
 □ : G4 x : G5 ▲ : G6

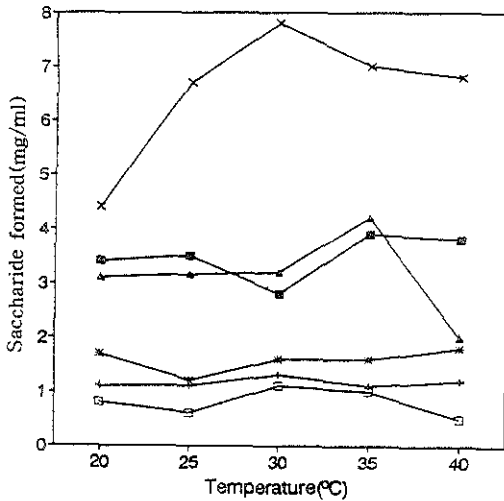


Fig. 3. Effect of temperature on the production of saccharides.

■ : G1 + : G2 * : G3
 □ : G4 x : G5 ▲ : G6

올리고당 생성에 미치는 초기 pH의 영향을 검토한 결과에서는 Fig. 2에서와 같이 pH 5.0~10.0 까지의 넓은 pH 범위에서 올리고당의 생성이 양호하였으며, pH 7.0에서 G5 생성이 가장 높았다.

그리고 올리고당 생성에 대한 배양온도의 영향을 살펴본 결과 Fig. 3에서와 같이 대부분 각종 올리고당의 생성량은 35°C에서 최대값을 나타내었다. 그러나 G5의 생성량은 30°C에서 최대값을 나타내었고, 이의 전

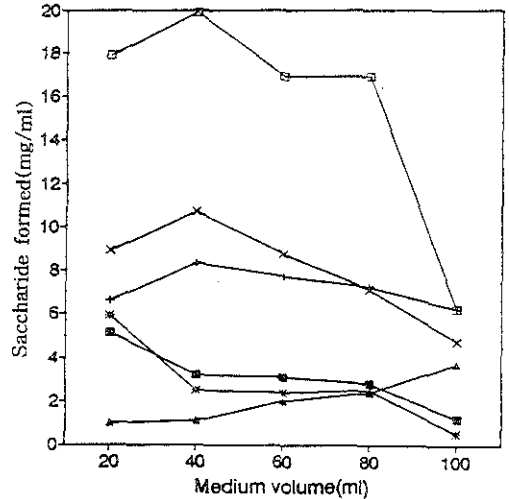


Fig. 4. Effect of aeration on the production of saccharides.

▲ : G1 ■ : G2 + : G3
 * : G4 □ : G5 x : G6

후 온도에서도 약 55~85%의 생성량을 보였다.

또 산소 공급조건이 올리고당 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배지액량을 서로 달리 조절하여 배양한 결과는 Fig. 4와 같다.

40ml 배양구에서 G5의 생성이 각각 가장 높았고 균체생육도 가장 양호하였다. 80ml 배양구까지는 올리고당의 생성이 대체로 양호하였으나 100ml 배양구에서는 올리고당의 생성이 급격히 저하하여 균의 올리고당 생성과 균체생육에는 호기조건이 큰 영향을 미침을 보였다.

대부분의 생물고분자 생산균주는 호기성 및 통성 혐기성균으로 혐기적 조건하에서는 낮은 에너지 생산효율 때문에 산소가 재환되지 않을 때 생물고분자의 생성이 높은 것으로 보고되어 있다(20). 통성 혐기성 균주인 본 균주도 다른 생물고분자의 생성균주와 마찬가지로 올리고당 생성에 비교적 높은 산소공급이 필요한 것으로 판단되었다.

따라서 이상의 결과로부터 접종비 3%, 배지액량 40 ml, 배양시간 24시간, 배양액의 pH 7.0 및 배양온도 30°C를 진탕배양의 기본조건으로 설정하여 이하의 최적 배지조성의 검토조건으로 하였다.

올리고당 생성의 배지조성

올리고당(G2~G7) 생성에 미치는 각종 탄소원의 영향을 검토한 결과는 Table 5와 같다.

Soluble starch가 총 올리고당이나 G5 생산에 가장 효과적이었다. 또 soluble starch 농도의 영향을 살펴 본

Table 5. Effect of carbon sources on the production of oligosaccharides

(unit : mg/ml)

Carbon sources	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆
Soluble starch	2.8	1.3	1.6	1.1	7.8	3.3
Amylose	3.2	1.8	0.1	N.D.	N.D.	N.D.
Amylopectin	2.7	1.3	1.0	1.2	6.4	3.2

N.D. : Not detected

Table 6. Effect of nitrogen sources on the production of oligosaccharides

(unit : mg/ml)

Nitrogen sources	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆	G ₇
Tryptone	1.3	2.3	1.2	0.7	5.2	2.4	N.D.
Yeast extract	1.7	4.2	N.D.	N.D.	0.7	0.9	N.D.
Peptone	3.9	3.4	5.7	2.7	18.1	11.4	2.6
Malt extract	3.5	1.7	1.8	1.2	1.3	N.D.	N.D.

N.D. : Not detected

Table 7. Effect of inorganic salts on the production of oligosaccharides

(unit : mg/ml)

Inorganic salts	G ₁	G ₂	G ₃	G ₄	G ₅	G ₆	G ₇
KH ₂ PO ₄	0.4	4.9	9.7	2.5	20.7	11.9	1.8
K ₂ HPO ₄	N.D.	3.4	9.1	2.6	23.0	11.5	1.9
CaCl ₂	1.3	3.8	6.6	3.1	20.7	11.7	1.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.9	4.1	7.5	2.1	18.5	11.6	1.8
MnCl ₂ · 7H ₂ O	0.9	N.D.	0.7	N.D.	1.2	N.D.	N.D.

N.D. : Not detected

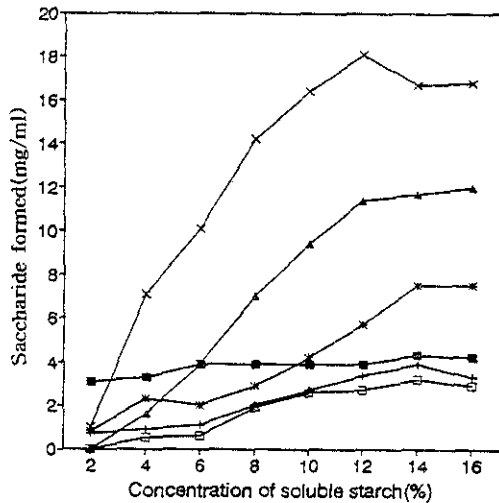


Fig. 5. Effect of soluble starch concentration on the production of saccharides.

■ : G₁ + : G₂ * : G₃
 □ : G₄ x : G₅ ▲ : G₆

결과에서는 Fig. 5에서와 같이 주 생성물인 G₅는 대당 수율면에서는 soluble starch 4%에서 가장 좋았으나 12%의 농도일 때 최대의 생성량을 보였다. 따라서 본 균주는 고농도의 탄소원을 함유하는 배지에서도 생육이 양

호하며 올리고당을 효과적으로 생성하는 특징을 보이는 것으로 판단하였다.

올리고당 생성에 미치는 질소원의 영향을 검토한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같이, 주 생성물인 G₅ 생성에 가장 효과적인 질소원은 peptone이었다. Tryptone이나 yeast extract도 대체로 양호하였으나 malt extract는 G₅ 생성이 아주 미약하였다.

또 올리고당 생성에 가장 효과적이었던 질소원인 peptone의 농도가 올리고당 생성에 미치는 영향을 검토한 결과에서는 그림으로 나타내지는 않았으나 peptone 농도 2.5~3.0%에서 G₅의 생성이 양호하였다. 하지만 glucose와 maltose의 생성이 증가하여 G₅생성에 가장 효과적인 peptone의 농도는 1.5%로 하였다.

올리고당 생성에 가장 효과적인 무기염류를 검토한 결과는 Table 7과 같다.

K₂HPO₄가 G₅ 생성에 가장 효과적이었고 KH₂PO₄, CaCl₂ 및 MgSO₄는 NaCl과 비슷하였으나, MnCl₂는 올리고당 및 G₅ 생성에 매우 미약하였고, 생육도 좋지 않았다. 또 K₂HPO₄의 농도를 0~1.5%로 조절하여 올리고당 생성에 미치는 영향을 검토한 결과는 역시 그림으로 나타내지는 않았으나 0.25%가 올리고당 및 G₅ 생성에 가장 효과적이었으며, 무첨가구에서도 이들 생

성이 대체로 양호하였다. 그러나 1.0%에서 1.5%까지의 농도에서는 maltose의 생성이 증가하여 올리고당 생성은 상대적으로 낮았다.

이상의 최적 진탕배양조건 및 배지조성의 검토 결과로부터 12% soluble starch, 1.5% peptone, 0.25% K₂H-PO₄를 함유하는 최적 배지를 30°C에서 42시간 진탕 배양하여 균체생육 및 올리고당의 생성 경시변화를 검토하였으며, 그 결과는 Fig. 6과 같다.

본 균주는 배양개시 18시간 부터 정상기에 도달하였으며, G₅를 제외한 다른 올리고당의 생성은 생육 정상기 초기에 최대이었고, 이후 G₅ 생성량은 24시간 배양하였을 때 대당수율 28.8%로 최대값에 도달하였다. 이외에 G₃와 G₆의 생성량도 대당수율로 각각 10.1%, 11.9%의 생성량을 보여서 maltose를 제외한 총 G₂~G₆에 이르는 올리고당의 총 생성량은 약 56.1%이었다.

특히 maltose 생성은 미약하였고, G₃ 이상의 올리고당 생성이 많았으며 나머지 약 43.9%의 당은 limit dextrin으로 남아서, 생성된 올리고당 중 주로 G₅를 효과적으로 축적하였다.

그러므로 본 균주에 의해 배양액으로부터 직접 생성

되는 올리고당은 현재 생산되고 있는 맥아 물엿이나 효소당화 물엿의 glucose가 3~10%, maltose가 45~55%, 기타의 당이 45~55% (21,22)인 당조성을 갖는 것과 비교하면 G₃ 이상의 올리고당이 약 56%, 기타의 당이 약 44%로 기존의 효소당화 물엿 등과는 달리 식품의 기능성 측면에서 저감미, 보수성, 보습성 및 전분의 노화방지에 효과가 높은 올리고당의 함유율이 매우 높음을 알 수 있었다.

또 이러한 결과는 *Pseudomonas sp.* KO-8940의 maltopentaose 생성 amylase를 사용하여 여러 pH에서 10% 가용성 전분을 기질로 45°C에서 8시간 반응시켜 생성한 말토올리고당 조성을 검토한 高橋 등(11)의 결과보다 우수한 결과이다.

따라서 본 실험의 결과는 G₃ 이상의 중합도를 갖는 올리고당을 많이 함유하므로 배양액 그대로도 기능성 식품소재로서의 사용 가능성이 매우 높은 것으로 판단하였다.

G₅ 올리고당의 정제 및 구조

감압농축한 배양액 200mg/ml를 정제용 column에 loading하고 3% n-butyl alcohol과 증류수로 30°C에서 시간당 40ml의 유속으로 column chromatography 한 결과는 Fig. 7과 같다.

Frac. I ~ III의 3개의 peak를 나타내었으며, 용출당의 용적비는 10.55, 30.38, 12.55mg으로 약 94%의 용출율을 보였고 Frac. II가 주분획이었다. Frac. II는 paper chromatography로 확인한 결과 Fig. 8에서와 같이 G₅이었고 Frac. I과 Frac. III는 G₃ 및 G₆이었다.

한편, 정제된 G₅의 구성당을 알아보기 위하여 G₅를

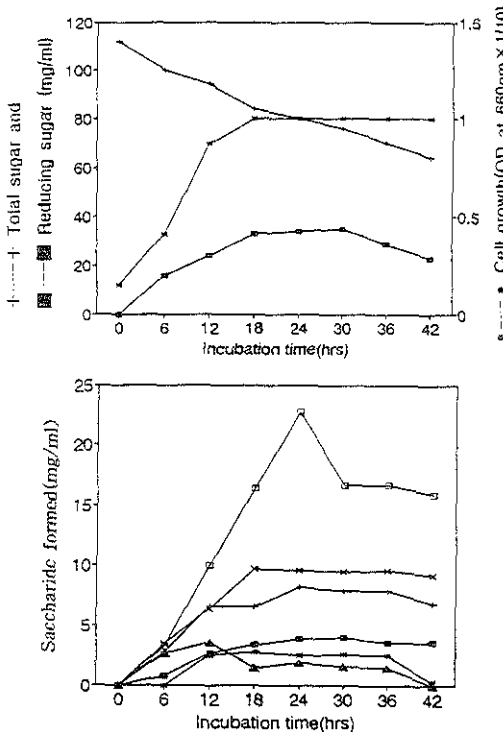


Fig. 6. Time course of saccharides production by optimum medium.

Legend for Figure 6:
 ■ : G₂ + : G₃ * : G₄
 □ : G₅ × : G₆ ▲ : G₇

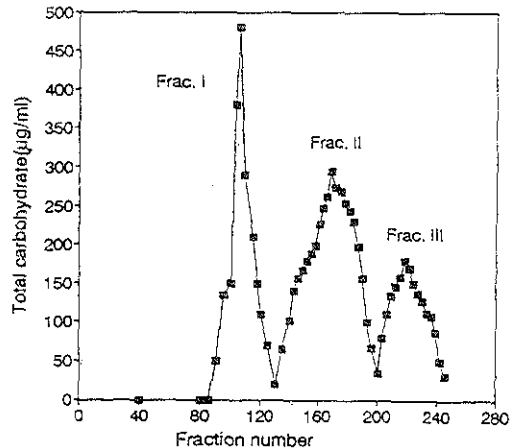


Fig. 7. Elution profile of saccharides by 3% n-butyl alcohol gradient system.

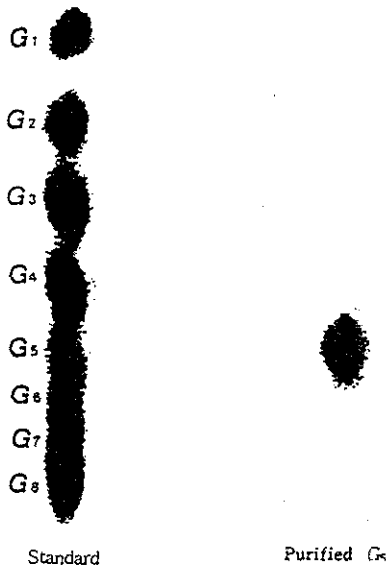


Fig. 8. Paper chromatograms of fraction I, II, III.

산가수분해한 후 표준당인 glucose와 함께 TMS(trimethylsilyl) 유도체를 조제하여 GC분석한 결과는 Fig. 9와 같다.

G5 가수분해물은 단일 peak를 나타내어 단일 당으로 구성되었음을 보였고, 이의 retention time은 glucose의 retention time과 일치하여 G5 구성당은 glucose임을 알 수 있었다. 또 정제한 G5의 구조를 확인하기 위하여 maltopentaose를 표준품으로하여 정제된 G5를 methylation한 후 산가수분해한 후 GC로 분석하였으며, 그 결과는 Table 8과 같다.

GC분석 결과 G5의 가수분해 시료는 A, B 두개의 peak를 보였으며, 이들은 각각 2,3,4,6-tetra-O-glucose 및 2,3,6-tri-O-glucose이었다. 따라서 1,4-glucoside 결합임을 알 수 있었으며, A와 B의 몰비는 1 : 3.7로 5개의 glucose 단위가 α -1,4-glucoside 결합한 올리고당인 것으로 추정되었다.

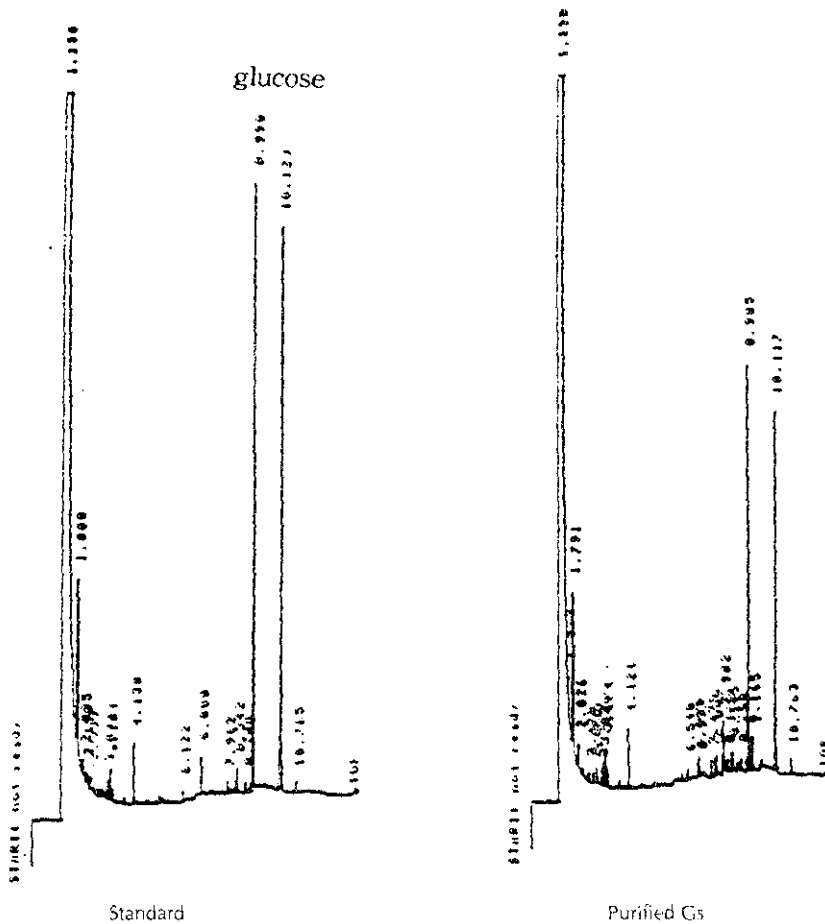


Fig. 9. Gas chromatograms of the TMS derivatives of standard and G5.

Table 8. Analysis of the Gs oligosaccharide methylated

Peak	Methylated sugar	T*	Molar ratio
A	2,3,4,6-tetra-O-glucose	1.00	1.0
B	2,3,6-tri-O-glucose	2.54	3.7

*Retention time of the corresponding alditol acetates on relative to 1,5-di-acethyl-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-glucitol on a column of 10% OV-17 at 200°C.

요 약

이 연구는 *Bacillus cereus* IAM1072의 배양액에서 직접 올리고당을 생산하기 위해 행하였다. 올리고당 생성 배양조건은 접종비 3%, pH 7.0, 온도 30°C, 배지액량 40ml, 배양시간 24시간이었으며, 올리고당 생성에 가장 효과적인 최적 배지조성은 12% soluble starch, 1.5% peptone, 0.25% K₂HPO₄이었다. 생성된 올리고당 중 Gs 올리고당을 정제하였다. Methylation을 한 후 GC 분석을 한 결과 Gs 올리고당은 glucose 단위가 5개로 구성된 α-1,4-glucoside 결합한 올리고당이었다.

문 헌

- Kainuma, K. : Starch oligosaccharides : Linear, branched and cyclic. In "Starch : chemistry and technology" Whistler, R. L., Bemiller, J. N. and Paschall, E. F. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 1, p.125 (1984)
- Roby, J. F. and Ackerman, R. J. : Isolation purification and characterization of a maltotetraose producing amylase from *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **145**, 105 (1971)
- 若生勝雄 : マルトオリゴ糖生産酵素に関する研究. *澱粉科學*, **28**, 215 (1981)
- Takasaki, Y. : An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1091 (1985)
- Saito, N. : A thermophilic extracellular α-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **155**, 290 (1973)
- Yoshigi, N., Chikano, T. and Kamimura, M. : Production of an extracellular-amylase from *Bacillus cereus* NY-14. *Jpn. Soc. Starch Sci.*, **32**, 217 (1985)
- Yoshigi, N., Chikano, T. and Kamimura, M. : Purification and properties of α-glucosidase I from *Bacillus cereus* NY-14. *Jpn. Soc. Starch Sci.*, **32**, 273 (1985)
- Yoshigi, N., Chikano, T. and Kamimura, M. : Characterization of a maltopentaose-producing bacterium and its cultural conditions. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2379 (1985)
- Yoshigi, N., Chikano, T. and Kamimura, M. : Purification and properties of an amylase from *Bacillus cereus* NY-14. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3369 (1985)
- Yoshigi, N. : Studies on production of maltopentaose by *Bacillus cereus* NY-14 and its utilization. *Jpn. Soc. Starch Sci.*, **35**, 2379 (1988)
- 高橋英樹, 通木 尙, 原 耕三 : マルトペンタオースの生産に關する研究 (第1報) *Pseudomonas* sp. KO-8940 の生産する酵素の反應特性. *精糖技術研究會誌*, **37**, 105 (1989)
- Takasaki, Y. : An amylase producing maltotetraose and maltopentaose from *Bacillus circulans*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2193 (1983)
- Nedeltscheva, M., Stoilkov, G. and Popova, S. : A modified analysis method of starch determination by iodine spectrophotometry. *Starch*, **27**, 298 (1975)
- Dubois, M., Gilles, K. K., Hamilton, A. J., Rebers, P. A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry (USA)*, **28**, 350 (1956)
- 小林昭一, 齊藤敏一, 具沼圭二, 鈴木 男 : 改良カーボンカラムクロマトグラフィーによるオリゴ糖の分離. *精製. 澱粉工業學會誌*, **18**, 10 (1971)
- 具沼圭二 : マルトオリゴ糖の製造, 分割, 分析について. *澱粉科學*, **28**, 92 (1981)
- Toba, T., Yokota, A. and Adachi, S. : Oligosaccharide structures formed during hydrolysis of lactose by *Aspergillus oryzae* β-galactosidase. *Food Chem.*, **16**, 147 (1985)
- Brobst, K. M. and Lott, C. E. : Determination of some component in corn syrup by gas liquid chromatography of the trimethylsilyl derivatives. *Cereal Chem.*, **43**, 35 (1966)
- Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. : Carbohydrate analysis. IRL Press, p.67 (1986)
- Kang, K. S. and Cottrell, I. W. : Polysaccharide. In "Microbial technology" Peppler, H. J. and Perlman, D. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 1, p.417 (1979)
- 中村 敏 : オリゴ糖利用の現況と將來性. *フドケミカル*, **10**, 79 (1985)
- 鈴木 男 : で粉糖の現況と將來について. *フドケミカル*, **4**, 23 (1987)

(1995년 8월 5일 접수)