

Leuconostoc mesenteroides CBI-110에 의한 Alternan의 생산

정호권* · 김광년 · 이흥석¹ · 정선호²

(주)참존 부설 생물소재연구소, ¹식품위생연구원 식품위생연구부,
²건국대학교 미생물공학과

Production of Alternan by *Leuconostoc mesenteroides* CBI-110. Jung, Ho-Kwon, Kwang-Nyun Kim, Hong-Seok Lee¹, and Sun-Ho Jung. #302 Hankang Building, 184-11 Kwangjang-Dong, Kwangjin-Gu, Seoul, Korea., ¹Food Hygiene Research Department, Kroea Institute of Food Hygiene, 57-1, Noryang-Dong, Dongjak-Gu, Seoul, Korea, ²Department of Microbial Engineering, Kon-Kuk University, 93-1, Mojin-Dong, Kwangjin-Gu, Seoul, Korea - Alternan known as a kind of dextran is a linear and cyclic polysaccharide which is synthesized with sucrose by alternansucrase (EC 2.4.1.140) of *Leuconostoc mesenteroides*. But this polysaccharide is different from dextran in its structure and other properties. For the purpose of applying alternan for the food, cosmetic, and pharmaceutical industries, we isolated an excellent alternan-producing strain, *Leu. mesenteroides* CBI-110. The optimum culture conditions were studied to improve the yield, and the activity of alternansucrase was increased up to 33U/mL in the optimum culture media. The concentrations of Mn²⁺ and Cu²⁺ ions were 0.01% and 0.03%, respectively, for the effective production of alternan. Finally, we obtained 25.6 g/L of alternan.

Key words: *Leuconostoc mesenteroides*, alternansucrase, alternan

일반적으로 알려진 dextran은 glycosyltransferase 중 한 종류의 효소인 dextranase(E.C 2.4.1.5)에 의하여 생산되는 물질로서 여러 산업에서 크게 이용되고 있다. Dextran은 glucose가 α -1,6, α -1,4 결합으로 연결된 구조를 이루고 있는 반면에 alternan은 *Leuconostoc* 속의 균주가 생산하는 glycosyltransferases 중 또 다른 종류인 alternansucrase(E.C 2.4.1.140)에 의하여 생산되며, α -1,6과 α -1,3이 번갈아 연결된 구조를 이루고 있어서 dextran과 다른 여러 가지 특성을 갖는다[9, 10, 14, 16]. 그 특성은 α -1,6 결합을 분해할 수 있는 dextranase에 분해되지 않는다는 것이며, 이러한 구조로 인하여 용해도 및 점도 등에서 많은 차이점을 나타낸다[9, 14]. *Leuconostoc* 속 균주의 배양액 중에 존재하는 dextranase는 약 30°C에서 최대 활성을 나타내며 45°C, 30분간의 열처리에 실활되나, 함께 존재하는 alternansucrase는 40°C에서 최대활성을 나타내며 45°C에서의 열처리에 도 거의 실활되지 않으므로 열처리 방법으로 alternansucrase 효소액을 얻을 수 있다[9, 10, 14, 16].

Alternan에 관한 연구는 저 칼로리 식품 첨가제, 증량제, 안정제 등[9]의 분야에서 그 생산가치를 인정받기 시작하여 저 칼로리 감미료 등으로 연구가 진행되었으며,

현재는 의약산업에 이용될 수 있는 drug vector나 화학적 변형을 통한 유도체 합성에 응용되어 연구되어지고 있다[5, 12, 17, 18]. 이에 따라 alternan의 대량 생산에 관한 연구가 점차 많아지고 있다.

Alternan은 산업적으로 수요가 증가할 것으로 보이지만 자연계에는 alternan만을 생산하는 *Leuconostoc mesenteroides* 균주는 발견되지 않았다[9]. 이에 Raemaekers M., Timothy D. Leathers[9, 13]를 비롯하여 많은 연구자들은 균주의 변이를 통하여 alternan을 대량 생산하기 위하여 노력하였으며, Ahlgren J. A.와 Cote G. L. 등은 western blotting 방법[1, 6]을 이용하여 alternan: dextran의 비율을 높이고자 하였다. 그러나 국내에서 alternan에 관한 연구는 거의 없었다. 본 연구에서는 alternan을 대량 생산할 수 있는 균주를 김치류에서 분리하여, 그 생산조건을 최적화하고, alternan을 대량으로 생산하고자 하였으며, 효소적 생산의 가능성을 조사하고자 효소를 부분 정제하여 alternansucrase의 최적 온도 및 최적 pH에 관하여 연구하였다.

실험방법

균주의 분리

Alternan 생산 균주 분리원으로 여러 가지 김치류를 수집하여 glucose를 sucrose로 대체한 MRS agar 배지

*Corresponding author
Tel. 82-2-453-8660, Fax. 82-2-453-8665
E-mail: biomater@thrunet.com

에 접종하고 30℃에서 배양하여 생성된 집락이 크고 점성을 갖는 균주를 1차 선별하였다. 동일한 액체배지에 접종하여 진탕 배양한 다음 원심분리하여 상등액을 회수하였다. Dextranucrase를 실험시키기 위하여 상등액을 45℃에서 30분간 열처리하고[10, 16], 10% sucrose buffer solution(50 mM, pH 5.2, sodium acetate/acetic acid buffer)에서 반응시킨 후 DNS법[4]으로 환원당량을 측정하여 환원당이 가장 많이 생성되는 우수 균주를 선별하여 본 연구에 사용하였다[9-10].

발효 조건

Jar fermentation에서 균주의 alternan 생산은 생산조건을 최적화하여 얻어진 배지 조성(1 L의 증류수 당 sucrose 20 g, peptone 1 g, beef extract 1 g, yeast extract 1 g, K₂HPO₄ 0.1 g, sodium nitrate 0.2 g, sodium acetate 0.5 g, MnSO₄ · 5H₂O 0.01 g, CuSO₄ · 5H₂O 0.03 g, tween 80 1 mL, pH 7.5)으로 온도 28℃에서 배양하였다.

Alternansucrase 효소액의 제조 및 활성 측정

Alternan을 생산하는 효소인 alternansucrase(EC.2.4.1.140)는 dextranucrase(EC.2.4.1.5)보다 열에 대해 안정성을 갖고 있으므로 균체를 제거한 배양액의 상등액을 45℃에서 30분간 열처리하여 dextranucrase를 실험시킨 후 MWCO 30K 막으로 한외여과(Sartcon Micro, Sartorius Co. Ltd.)하면서 50 mM, pH 5.2 sodium acetate/acetic acid buffer로 세척하여 부분 정제된 효소액을 제조하였다[7]. 효소액 0.3 mL과 10% sucrose buffer solution(50 mM, pH 5.2, sodium acetate/acetic acid buffer) 3.0 mL을 혼합하고 40℃에서 30분 동안 반응시켜 생성되는 환원당량을 정량하여 alternansucrase의 활성으로 표시하였다[9-10].

Alternansucrase의 활성은 buffer에 첨가된 sucrose에 작용하여 1분 동안 생성되는 fructose 1 μmol을 1 unit로 정하였다[10-12]. (1 unit=1 μmol/min)

Alternan의 분리 및 분자량 결정

Jar fermenter(Korea Fermenter Co. Ltd., 5 L)에서 발효된 배양액을 증류수로 5배 희석하고 9,000×g로 20분간 원심 분리하여 균체를 제거하였다. 상등액에 total 70% ethanol 농도가 되도록 95% ethanol을 가해서 얻은 침전물을 3회 세척한 후, 불용성 다당류를 제거하기 위하여 12,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 그 상등액을 0.44 M TCA로 처리하고 12,000×g에서 10분간 재 원심 분리하여 단백질을 침전시키는 과정을 5회 반복하였다. 이를 95% ethanol로 다시 침전하여 alternan을 회수하였고 동결 건조하여 본 연구에 사용하였다. 또 0.5% al-

ternan 용액이 되도록 증류수에 녹여서 Sepharose 4B gel(Sigma Co. Ltd.) column(2×80 cm)에 loading하고 20 mL/hr의 유속으로 5 mL씩 분취하여 phenol-sulfuric acid 법[4]으로 총당량을 정량하였으며, 표준 분자량 물질로서 MW 2,000K, 170K, 73K, 17K, 20K(Sigma Co. Ltd.)를 사용하여 동일 조건에서 gel filtration한 후 alternan의 fraction과 비교하여 alternan의 분자량을 예측하였다.

Total sucrose와 alternansucrase에 의해 생산된 다당류의 구조 비교

가열처리 후에 부분 정제된 alternansucrase용액과 상등액을 열처리를 하지 않은 total sucrose 용액을 각각 10% sucrose buffer solution(50 mM, pH 5.2, sodium acetate/acetic acid buffer)에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응산물을 95% ethanol로 회수하여 세척하고, 각 종류의 다당류를 얻은 다음, 50 mM, pH 5.2, sodium acetate/acetic acid buffer에 녹인 후, dextranase(Sigma Co. Ltd.) 30 unit/mL와 glucoamylase 3 unit/mL을 가하고, 3시간 동안 반응시키면서 60분 간격으로 DNS법[4]으로 각각의 환원당량을 측정하여 분해효소에 대한 저항성을 비교·측정하였다[9, 10, 14, 16].

결과 및 고찰

균주의 동정 및 생육

분리된 균주를 Bergey's manual of systematic bacteriology[3]과 A laboratory manual for Microbiology[15]에 준하여 동정하였다. 균주의 형태학적, 생화학적 특성을 조사해본 결과, *Leuconostoc mesenteroides*로 판정되었으므로, *Leuconostoc mesenteroides* CBI-110이라 명명하였다. 본 균주는 탄소원으로 sucrose를 첨가했을 경우에만 다당류를 생산할 수 있었으며, 균의 증식에 따른 total sucrose(비 열처리군: dextranucrase와 alternansucrase가 존재)의 활성과 alternansucrase(열처리군)의 활성의 변화를 비교한 결과는 Fig. 1과 같았다. 균주는 매우 짧은 세대를 갖는 것으로 생각되었으며, total sucrose 활성은 균의 대수증식기와 거의 일치하는 형태로 증가하지만 alternansucrase의 활성은 균 생육의 정지기에서 최대의 활성을 나타내는 것을 볼 수 있었다. 또한 정지기에서 dextranucrase의 활성은 급감하지만 alternansucrase의 활성은 비교적 완만한 감소를 보였다. 또한 alternansucrase의 활성은 Lopez-Munguia A. 등[10]의 보고에 비하여 볼 때 10배 이상 높은 결과이었다.

C/N ratio

미생물 배양에서 고분자 물질이 생산되는 경우에는 C/

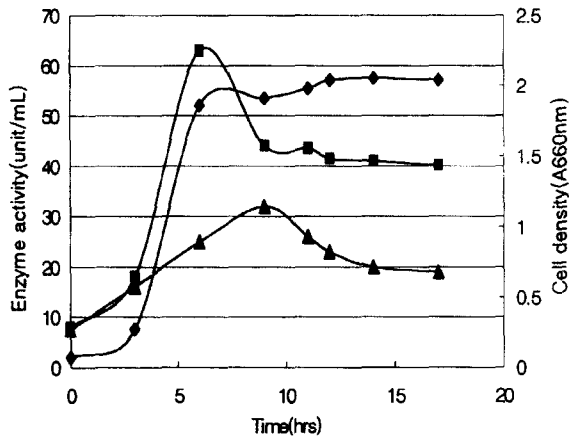


Fig. 1. Comparison of total sucrose and alternansucrase activity.
 Symbols: ▲, alternansucrase; ■, total sucrose; ◆, cell density.

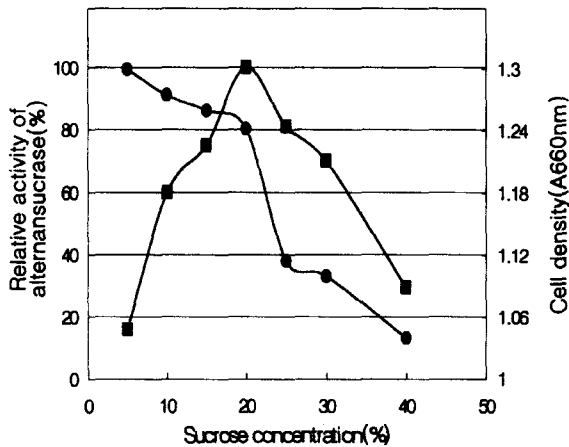


Fig. 2. Effect of various concentrations of sucrose on cell growth and alternansucrase activity.
 Symbols: ■, alternansucrase ; ●, cell density.

N ratio가 큰 영향을 주는 바, 본 실험에서 다당류를 생산할 수 있는 탄소원인 sucrose를 탄소원으로 하였고, 질소원으로는 peptone, yeast extract 그리고 beef extract를 사용하여 C/N ratio에 관하여 조사하였다. Peptone, yeast extract 그리고 beef extract를 각각 1.0% 첨가하여 총 3% 질소원으로 하고 sucrose의 농도를 달리하여 세포증식과 alternansucrase의 활성 변화를 측정 한 결과는 Fig. 2와 같았다. 균체의 농도가 가장 높았던 5%로부터 20%까지 균체의 농도는 다소 감소했으나 효소의 활성은 급격히 증가하였다. 그러나 20%이상부터는 고농도의 sucrose가 삼투압 등 균의 생육을 저해하는 요인이 됨으로 균체의 농도가 급격히 감소하며, 이로 인하여 효소의 활성 역시 급격히 감소하는 것을 볼 수 있었다. 따라서 alternan 생산에 있어서의 최대 sucrose 농도를 20%로 결정하였다. 또한 본 균주는 일반적인 세균에 비하여 20% 이상의 sucrose에서도 생육이 가능한 특이

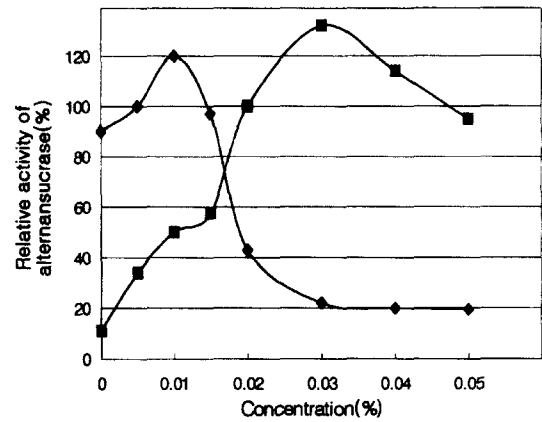


Fig. 3. Effect of various concentrations of Mn²⁺ and Cu²⁺ on alternansucrase activity.
 Symbols: ■, Cu²⁺; ◆, Mn²⁺.

적인 세균이라는 것을 알 수 있었다.

Metal ions의 영향

MRS가 복합배지이므로 본 균주는 아미노산 등 미량 성분의 농도 및 종류에 의해 거의 영향을 받지 않았으나, 금속 이온의 종류와 농도에 의해 영향을 받았다. 여러 금속 이온을 달리하며 배양액 중의 alternansucrase의 활성을 측정 한 결과 Mn²⁺과 Cu²⁺는 alternansucrase의 활성을 증가시켰기에 Mn²⁺과 Cu²⁺이온 농도에 따른 alternansucrase의 활성의 변화에 관하여 조사하였고, 그 결과는 Fig. 3과 같았다. Mn²⁺에 대한 alternansucrase의 활성은 0.01%에서 최대값을 나타냈으며, 이 이상의 농도에서는 심한 저해를 받는 것으로 나타났다. 또 Cu²⁺에 대한 효소의 활성은 0.03%에서 최대값을 나타내었으나 고농도에서도 Mn²⁺와 같은 심한 저해 양상은 나타나지 않았다. 또 Mn²⁺과 Cu²⁺를 각각 0.01%, 0.03%첨가한 배지에서 약 35%정도 증가된 효소 활성을 나타내었다.

Mn²⁺와 Cu²⁺ 금속 이온이 어떤 경로를 통하여 alternansucrase의 활성을 높이는 것인지에 관하여 조사하고자, alternansucrase를 부분 정제하고 다른 금속 이온에 대한 효과를 제거한 후 직접적으로 이들 금속 이온을 첨가한 buffer에서 효소 반응을 시킨 결과는 Table 1과 같았다. 균체 배양에 첨가된 경우에 비하여 볼 때 큰 차

Table 1. Effect of metal ion on alternansucrase activity

Metal ions	Relative activity of alternansucrase (%)
Blank	100
Mg ²⁺	96
Ba ²⁺	108
Zn ²⁺	110
Co ²⁺	112
Cu ²⁺	116
Mn ²⁺	120

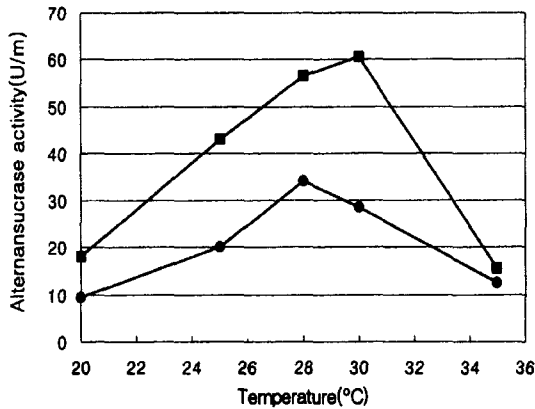


Fig. 4. Changes of alternansucrase activity at various temperatures of cultivation.
 Symbols: ●, alternansucrase; ■, total sucrose.

이를 나타내지는 않았다. 따라서 Mn^{2+} 와 Cu^{2+} 이온에 의한 alternansucrase 활성의 증가는 이들 금속 이온이 직접적으로 효소의 활성기에 작용하기 때문이 아니라 균체의 alternansucrase 생산에 관여하기 때문에 더욱 큰 차이가 나타났다고 생각되었다.

배양 온도와 alternansucrase의 활성에 대한 온도와 pH의 영향

균체 배양에 첨가된 경우 *Leuconostoc mesenteroides* CBI-110이 생산하는 total sucrose와 alternansucrase의 최대 활성은 균의 생육 온도에 따라 다르다는 Lopez-Munguia A. 등의 보고[10]가 있었는데, 배양 온도에 따른 total sucrose와 alternansucrase의 활성의 변화를 측정하였고, Fig. 4와 같은 결과를 나타내었다. 본 균주의 alternansucrase의 활성은 28°C에서 약 33 unit/mL로서 최대 활성을 나타내었으나 total sucrose의 활성은 30°C에서 약 62 unit/mL로서 최대 활성을 나타냈다. Total sucrose의 활성은 alternansucrase와 dextransucrase의 활성의 합인 것을 고려할 때, 각 온도에서의 total suc-

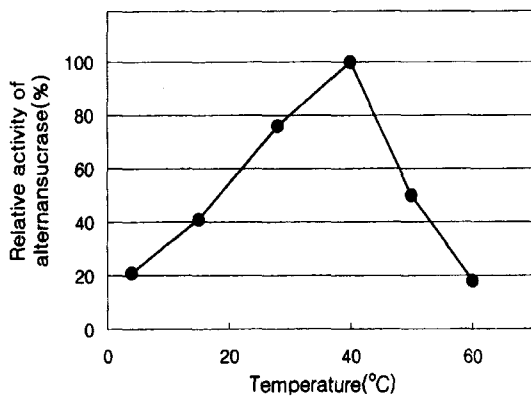


Fig. 5. Effect of temperature on alternansucrase activity.

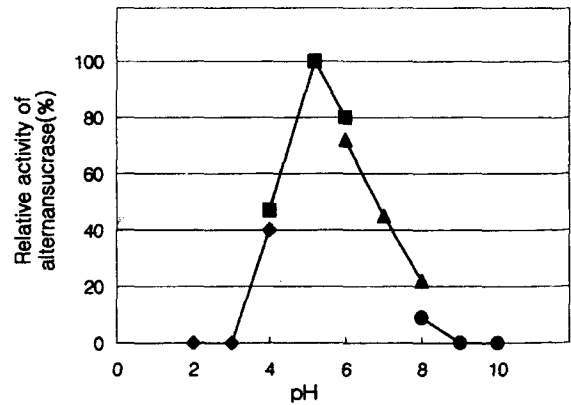


Fig. 6. Effect of pH on alternansucrase activity
 Symbols: ◆, citrate buffer; ■, acetate buffer; ▲, phosphate buffer; ●, borate buffer

ase와 alternansucrase의 활성의 차를 dextransucrase의 활성이라고 간주할 수 있다. 따라서 dextransucrase의 생산은 다소 낮았으나 일차로 정제된 alternansucrase의 활성이 최대로 나타난 28°C는 균주의 alternansucrase 생산에 대한 최적 온도라고 생각되었다.

효소액으로부터 alternansucrase의 특성을 조사한 결과인 Fig. 5를 보면, alternansucrase의 활성을 최대로 유도할 수 있는 온도는 40°C이었으며, 이러한 결과는 Lopez-Munguia A. 등[10-13]의 보고와 유사한 결과이었고 배양시의 온도인 28°C에서 보다 약 25%정도 더 높아졌다는 것을 알 수 있다. 또한 pH에 있어서도 보고된 것[10-13]과 같이 배양 중기의 pH인 pH 5.2에서 최대 활성을 나타냈으나 배양 말기의 pH 4.5에서는 약 50%의 활성이 감소되었다(Fig. 6). 균주의 배양 조건과 alternansucrase의 최대 활성의 조건이 큰 차이가 있었고, alternansucrase는 온도와 pH 조건의 변화에 민감하여 효소의 활성이 크게 달라짐을 알 수 있었다. 따라서 균주

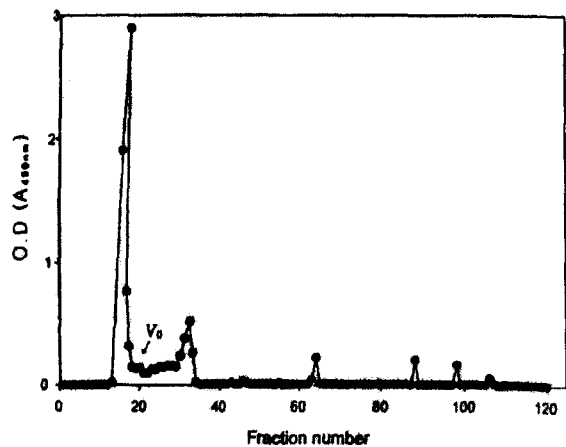


Fig. 7. Separation chromatogram of alternan through Sepharose 4B gel filtration.

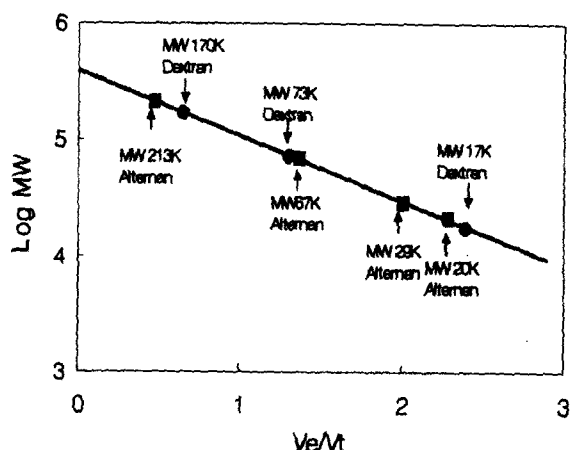


Fig. 8. Determination of molecular weight for alternan(V_e , elution volume; V_t , total volume). Symbols: ●, dextran marker; ■, alternan.

의 최적 배양 조건에서 alternansucrase를 연속적으로 생산하여 효소액을 제조하고, 효소의 최적 반응 조건에 맞춰 alternan을 생산한다면 dextranase 등의 효소 처리 비용 및 처리시간을 줄일 수 있으며, 동량의 sucrose로부터 더 높은 alternan/sucrose 전환율로 alternan을 생산할 수 있다고 생각되었다.

생산된 alternan의 분자량 결정 및 Total sucrose와 alternansucrase에 의해 생산된 다당류의 비교

5 L jar fermenter를 이용하여 최적화된 조건하에서 생산된 alternan은 25.6 g/L이었으며, 이는 생산 조건의 최적화에 의하여 130% 이상 증가된 결과이었다. 얻어진 alternan을 Sepharose 4B gel(Sigma Co. Ltd.)로 gel filtration하여 얻어진 alternan의 분획을 동일한 조건에서 gel filtration하여 얻어진 표준 dextran(MW 2,000K, 170K, 73K, 17K dextran)의 분획과 비교하여 추정된 결과는 Fig. 7과 8에 나타내었다. 본 균주가 생산한 alternan은 MW 500K 이상의 고분자의 alternan과 약 MW 213K의 alternan이 주된 구성된 물질이며, 67K, 29K, 20K 등의 저분자의 alternan도 존재한다는 것을 알 수 있었다.

Alternan을 생산하는 alternansucrase(EC.2.4.1.140)의 성질을 조사하기 위하여 45°C에서 가열 처리하여 부분 정제한 alternansucrase의 반응 산물과 열처리하지 않은 total sucrose의 반응 산물을 각각 pH 5.2, 50 mM sodium acetate buffer에서 각각 dextranase로 분해시킨 후, 경과 시간에 따라 생성된 환원당 량의 변화를 DNS법[4]으로 분석한 결과는 Fig. 9와 같았다. 동량의 total sucrose 산물의 경우에는 생성된 환원당의 뚜렷한 증가를 볼 수 있었으나 동량의 alternansucrase 산물의 경우에는 변화가 거의 없었다. 결과적으로 미량의 분해

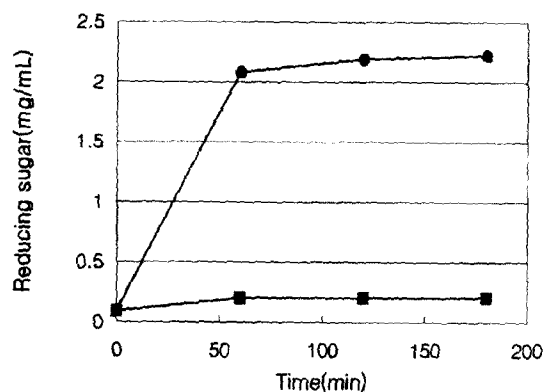


Fig. 9. Decomposition degree of each product by dextranase. Symbols: ●, polysaccharides; ■, alternan.

가 있었으나 이는 효소액에 포함되어 있던 dextran이라고 생각된다.

일반적으로 *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 다당류는 세 가지가 존재한다고 하며, 첫 번째는 일반적인 dextran이며, 두 번째는 alternan이고, 세 번째는 또 하나의 sucrose에 의해 생산되는 불용성 다당류이며, 이러한 불용성 다당류의 생산에는 여러가지 가설이 존재한다 [7, 8, 16]. 그러나 본 실험에 사용된 일차 정제된 효소액은 불용성 다당류를 생산하지 않았고, dextranase에 의해 거의 분해되지 않았으므로 다른 sucrose를 제거시킨 alternansucrase 분획이라 생각되었다. 따라서 부분정제만으로도 효소를 이용한 alternan 생산이 가능하다는 것을 확인하였다.

요 약

본 연구에서는 alternan을 다량 생산하는 균주, *Leuconostoc mesenteroides* CBI-110을 선발하고 alternan 생산을 위한 최적 생산조건을 조사하였다. 선별된 균주를 5% sucrose를 함유한 MRS 배지에서 배양하였을 경우, 배양 상등액의 alternansucrase 활성을 조사한 결과, 보고된 다른 균주들의 것보다 높은 33 U/mL의 활성을 나타내었으며, 최적화되지 않은 생산조건에서는 12 g/L의 alternan을 얻었으나 최적화된 생산조건에서 2배 이상 높은 25.6 g/L의 alternan을 얻을 수 있었다. 본 균주의 생산조건을 최적화 함에 있어서 가장 큰 영향을 주었던 조건은 Mn^{2+} 와 Cu^{2+} ion들이었으며 부분 정제된 효소액을 이용하여 이들 금속 이온이 효소에 직접적으로 영향을 주는가에 관하여 조사한 결과 효소 자체에 영향을 주기보다는 균체가 alternansucrase를 생산하는 것에 더욱 관여한다는 것을 확인할 수 있었다. 생산된 alternan의 분자량은 MW 500K 이상과 MW 213K의 고분자 alternan을 주된 물질로 하여 이루어져 있으며, MW 67K.

29K, 20K의 저분자의 alternan도 존재하고 있음을 알 수 있었다. 부분 정제를 통한 alternansucrase 효소액으로 온도, 시간, 금속 이온의 영향을 조사한 결과 부분 정제를 통해서도 높은 순도의 alternan을 생산할 수 있다고 생각되며, 정제 비용 및 시간의 절약을 가져올 수 있고, 부산물로 약간의 fructose도 얻을 수 있으므로 alternan의 효소적인 합성에 관하여 연구하는 것이 필요하다고 생각된다.

REFERENCES

- Ahlgren, J. A., G. L. Cote, and T. D. Leathers. 1995. Purification and amino-terminal peptide sequence analysis of alternansucrase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Abstr. Pap. Amm. Chem. Soc.* 209.
- Biely, P., G. L. Cote, and A. B. Cassler. 1994. Purification and properties of alternanase, a novel endo- α -1,3- α -1,6-D-glucanase. *Eur. J. Biochem.* **226**: 633–639.
- Cappuccino, J. G. and N. Sherrman. *A Laboratory Manual for Microbiology*, pp 19–179, 3th ed. The Benjamin/Cumming Publishing Company, California.
- Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy. 1987. *Cabohydrate Analysis: A Pactical Approach*, pp. 2–3. IRL Press, Oxford.
- Cote, G. L. and P. Biely. 1994. Enzymatically produced cyclic α -1,3-linked and α -1,6-linked oligosaccharides of D-glucose. *Eur. J. Biochem.* **226**: 641–648.
- Cote, G. L., H. A. Wyckoff, and P. Biely. 1995. Properties and applications of alternanase, a new type of α -D-glucanase. *Abstr. Pap. Amm. Chem. Soc.* 209.
- Kim, D. and J. F. Robyt. 1995. Dextransucrase constitutive mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-1299. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 1050–1056.
- Kim, D. and J. F. Robyt. 1995. Production, selection, and characteristics of mutants of *Leuconostoc mesenteroides* B-742 constitutive for dextransucrases. *Enzyme Microb. Technol.* **17**: 689–695.
- Leather, Y. D. and G. L. Cote. 1995. Rapid screening of *Leuconostoc mesenteroides* mutants for elevated proportions of alternan to dextran. *Curr. Microbiol.* **31**: 19–22.
- Lopez-Munguia A., V. Pelenc, and J. Biton. 1993. Production and purification alternansucrase, a glycosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 for the synthesis of oligoalternans. *Enzyme Microb. Technol.* **15**: 77–85.
- Lopez-Munguia A. and V. Pelenc. 1990. Productiuon and purification of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 alternansucrase. *Ann. NY. Acad. Sci.* **613**: 717–722.
- Pelenc, V. and A. Lopez-Munguia. 1991. Mechanisms of producing oligoalternan. *P. Sci. Alim.* **11**: 465–476.
- Raemaekers, M., J. Marques, and E. Vandamme. 1994. Alternansucrase activity of heat-treated *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355 cells. *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.* **59**: 4–9.
- Smith, M. R., J. Zahnley, and N. Goodman. 1994. Glycosyltransferase mutants of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2723–2731.
- Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* **2**, pp. 1043–1075. The Williams & Willkins, Baltimore.
- Zahnley, J. C. and M. R. Smith. 1995. Insoluble glucan formation by *Leuconostoc mesenteroides* B-1355. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1120–1123.
- Wyckoff, H. A., G. L. Cote, and P. Biely. 1995. Isolation and characterization of microorganism with alternan hydrolytic activity. *Abstr. Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.* 95.
- Wyckoff, H. A., G. L. Cote, and P. Biely. 1996. Alternanase production of *Bacillus* sp. *Curr. Microbiol.* **32**: 343–348.

(Received October 9, 1998)