

자당으로부터 프럭토올리고당의 효소적 생산 연구

¹신형태·¹백순용·¹이수원·²서동상·²권석태·¹김종남·³임유범·[†]이재흥
성균관대학교 생명공학연구소, ^{1,2}성균관대학교 생명공학부, ³(주)넬 바이오텍
(접수 : 2002. 11. 22., 게재승인 : 2002. 12. 20.)

Enzymatic Production of Fructo-oligosaccharides from Sucrose

Hyung Tai Shin¹, Soon Young Baig¹, Soo Won Lee¹, Dong Sang Suh², Suk Tae Kwon², Jong Nam Kim¹,
Yoo Beam Lim³, and Jae Heung Lee[†]

Institute of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

¹Department of Food and Life Science, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

²Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

³NEL Biotech Co., Ltd, 808-15 Duksan-ri, Samjuk-myon, Ansong 456-882, Korea

(Received : 2002. 11. 22., Accepted : 2002. 12. 20.)

Three different strains of *Aureobasidium pullulans* were grown in batch cultures to compare their abilities of enzyme production. It was found that specific enzyme activity was the highest with strain ATCC 9348 and the enzyme production was closely coupled to growth. Studies on morphology during the growth of *A. pullulans* revealed that mycelia cells were dominant at the initial stages of growth. However, yeast-like cells and chlamydo spores were dominant in the latter stages of batch culture. The pattern of morphological changes during the growth period was not affected by pH. However, it appears that the ratio of intra- to extracellular enzyme activity tended to increase with fermentation time irrespective of the pH employed, suggesting that the secretion efficiency of intracellular enzyme to broth likely depends on cell morphology. Using molasses as a cheap source of sucrose, enzymatic production of fructo-oligosaccharides as a feed additive with *A. pullulans* cells could be achieved successfully at 55°C and pH 5.5.

Key Words : *Aureobasidium pullulans*, feed additive, fructo-oligosaccharides, molasses, prebiotics

서론

Prebiotics란 사람을 포함한 동물 장내 세균의 성장이나 활성을 선택적으로 높여줘서 숙주의 건강을 이롭게 해주는 비소화성첨가물(nondigestible food ingredients)이다(1). 이러한 비소화성첨가물로서 fructo-oligosaccharides(2,3)과 isomalto-oligosaccharides(4,5) 등이 prebiotics에 해당된다. 프럭토올리고당의 화학구조는 자당(sucrose)의 β -2,1 위치에 과당(fructose)이 1-3개 정도 결합되어 각각 1-kestose (GF₂), nystose (GF₃) 그리고 fructofuranosyl nystose (GF₄)로 명명된다. 프럭토올리고당은 장내 유익세균인 bifidobacteria의 growth factor로 잘 알려져 있어서 현재 식품첨가물로 광범위하게 사용되고 있다. 한편 근래 들어서 프럭토올리고당은 돼지 등 여러 동물의 사

료첨가제로도 사용이 증가되고 있는 추세인데, 이는 사료효율이 증대되고, 설사가 개선되며, 특히 애완동물 배설분의 냄새가 감소되기 때문이다(2,3,6).

식품첨가물로서의 프럭토올리고당은 공업적으로 순수 설탕이나 원당을 원료로 하여 *Aspergillus*(7,8) 또는 *Aureobasidium*(9,10)의 세포 또는 균체내의 효소를 회수하여 제조되고 있다. 그러나 사료첨가제로서 프럭토올리고당이 광범위하게 사용되려면 제조원가를 더욱 낮출 필요가 있다. 이러한 목적을 달성하기 위하여는 균주를 개량하여 효소의 생산성을 높이는 연구(11,12)와 더불어 공정 개선연구가 필요하다. 본 연구에서는 *A. pullulans* 세포를 사용하여 sucrose source로서 고가인 설탕 대신에 값싼 당밀(molasses)로부터 feed additive 목적의 프럭토올리고당을 생산하고자 생산 공정에 관련된 여러 조건을 검토하였다.

[†] Corresponding Author : Institute of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon 440-746, Korea
Tel : +82-31-290-7893, Fax : +82-31-290-7884
E-mail : jaehung@skku.ac.kr

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 균주는 *Aureobasidium pullulans* ATCC

9348, ATCC 15233 그리고 ATCC 12539 등 이었으며, 한국 미생물보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms) 및 유전자원센터 유전자은행 (Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology)에서 구입하여 사용하였다. 균주 보존 배지는 증류수 1 L에 sucrose 50 g, yeast extract 2 g을 넣고 pH 5.5로 조정된 후 한천 고체배지에서 격주로 배양하고 4°C에서 보관하였다.

시약 및 당밀

본 실험에 사용된 프럭토올리고당 표준시료(GF₂, GF₃, GF₄)는 Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan)으로부터 구입하여 사용하였고, molasses는 CJ Corporation (Seoul, Korea)으로부터 입수하였다.

배양조건 및 방법

종균배양배지 (1% sucrose, 0.2% yeast extract)에 28°C 조건에서 2일간 배양한 inoculum 5 mL을 본배양배지 (10% sucrose, 1% yeast extract, 0.5% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 1.5% NaNO₃)의 45 mL에 식균(250-mL flasks 사용)하여 28°C에서 3일간 진탕 배양하였다. 한편 배양 pH의 영향을 조사하기 위하여는 2.5-L jar fermentor (KoBiotech, Korea)를 사용하였다. 배양과정 중에 5 mL의 발효액을 취하여 탁상용 원심분리기로 10 분간 분리한 후 상등액은 균체의효소의 역가분석에 사용하였다. 한편 원심분리후에 얻어진 세포는 0.85% NaCl용액으로 5 mL까지 재현탁 시킨 후 균체내효소 역가 측정에 사용하였다. 건조균체량(Dry Cell Weights: DCW)는 통상의 방법으로 105°C에서 20시간 건조시켜 측정하였다. 배양과정 중 *A. pullulans*의 형태학적 특성변화는 현미경 (Olympus BX-50, Japan)을 사용하여 관찰하였다.

분석조건

포도당 농도분석은 glucose kit (Sigma catalog number 315-100)을 사용하여 spectrophotometer (Hewlett Packard 8453, Germany)로 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. molasses 중의 환원당은 dinitrosalicylic acid method (13)로 측정하였고, 당밀중의 sucrose 농도는 산 가수분해 전·후의 환원당을 측정된 후 그 차에 0.95를 곱하여 계산하였다. 인산염(K₂HPO₄) 분석은 Taussky 와 Shorr 방법(14)을 사용하였다. TLC (Thin Layer Chromatography)분석은 효소반응액 시료 3 µL를 Silica gel F₂₅₄ (Merck, Germany)에 집적하여 전개용매 (water: nitromethane: n-propyl alcohol = 3 : 4 : 10)로 전개(15)하고 건조시킨 후 0.3% phenol용액 (3 g의 phenol을 진한황산 5 mL과 ethanol 95 mL에 혼합)을 분무하여 100°C에서 5분간 발색시켜 프럭토올리고당의 성분을 확인하였다. 효소 반응 생성물인 프럭토올리고당의 정량분석은 Kromasil 100-10 NH₂ (250×4.6 mm) column (Eka Chemicals, Sweden)을 사용하여 HPLC (Hitachi L-6200, RI detector)로 분석하였다. Acetonitrile/water (7:3, v/v) 혼합액을 mobile phase 로 사용하였고 유속은 1 mL/min 이었으며 column온도는 40°C이었다.

효소의 역가분석

효소 fructosyltransferase(EC 2.4.1.9)의 역가측정은 기 보고

된 방법(16)을 사용하였다. 즉, 80%(w/v) sucrose 7.5 mL 에 0.1 M citrate buffer (pH 5.5) 2.3 mL을 넣고 효소액 0.2 mL을 첨가하여 55°C에서 1시간 반응시킨 후, 100°C에서 15분간 열처리 하고 생성된 glucose의 양으로부터 계산하였다. 위 반응조건에서 1분당 1 µmole glucose 가 생성되는 효소량을 1 unit로 정의하였다.

자당 또는 당밀로부터 프럭토올리고당의 제조

자당 또는 당밀을 기질로 하여 온도 55°C 그리고 pH 5.5 조건에서 24시간 동안 효소 반응시켰다. 효소는 기질 g당 (당밀의 경우는 당밀에 함유된 sucrose양을 정량) 10 units를 사용하였으며, 반응액을 100°C에서 15분간 가열하여 효소반응을 중지시킨 후 HPLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

균주별 효소 생산 능력 비교

여러 *Aureobasidium pullulans* 균주들에 대한 효소생산능력을 비교하기 위하여 3일동안 회분식 배양실험으로부터 건조균체량, 균체내 및 균체외효소의 활성을 측정하였으며 그 결과를 Figure 1에 나타내었다. 세 균주 모두 균체성장과 효소 생산간에는 대체적으로 선형적인 관계가 있음을 알 수 있었고 비슷한 결과가 *P. frequentans*(17)과 *Aureobasidium* sp. ATCC 20524(18)에 대하여도 보고된 바가 있다. 그러나 *Aureobasidium* sp. ATCC 20524의 경우 균체의 효소생성 패턴(즉, 균체의 효소생산은 배양 1일 이후부터 이루어 짐)이 본 실험결과와는 상이하게 나타났는데, 이는 배지 조성의 차이에 따라 다르게 나타난 결과로 사료된다(19). 한편 효소생산 능력은 Figure 1에서 알 수 있듯이 균주별로 많은 차이가 있었다. 즉 ATCC 12539와 비교하면 ATCC 9348과 ATCC 15233가 효소생산능력이 훨씬 높았고, ATCC 9348과 ATCC 15233을 비교해보면 ATCC 9348의 건조균체량이 훨씬 적어서 결국 균체내 specific enzyme activity는 ATCC 9348이 2.4 units/mg·DCW로 1.0 unit/mg·DCW인 ATCC 15233 보다 훨씬 높게 나타났다. 따라서 본 연구에서는 ATCC 9348을 우수균주로 선택하여 향후의 프럭토올리고당 생산연구를 진행하였다.

배양과정 중 *A. pullulans*의 형태학적 특성변화

*A. pullulans*는 배양조건에 따라 yeast-like cells, chlamydo spores 및 mycelia 등 여러형태의 상이한 morphology를 나타내는 것으로 알려져 있다(20). Yeast-like cells는 single cell로서 5-10 µm이며, 이보다 큰 chlamydo spores는 구형으로서 보통 쌍(pairs)으로 나타나며, mycelia는 long chain 형태로 존재하는데, *A. pullulans* ATCC 9348의 전형적인 fermentation population의 현미경 사진을 Figure 2에 나타내었다. 배양초기(10-20 시간)에는 대부분 mycelia cells 형태로 나타나며, 배양이 진행되면서 점차 mycelia가 줄어들고 주로 yeast-like cells와 chlamydo spores 형태로 변화되었다. 그러나 Lee 등(21)은 *A. pullulans* ATCC 42023에 의한 pullulan 발효에서 본 연구결과와는 다르게 배양 pH에 의해서 morphology가 결정(즉, pH 2.5에서는 mycelial cells 그리고 pH 4.5에서는 yeast-like

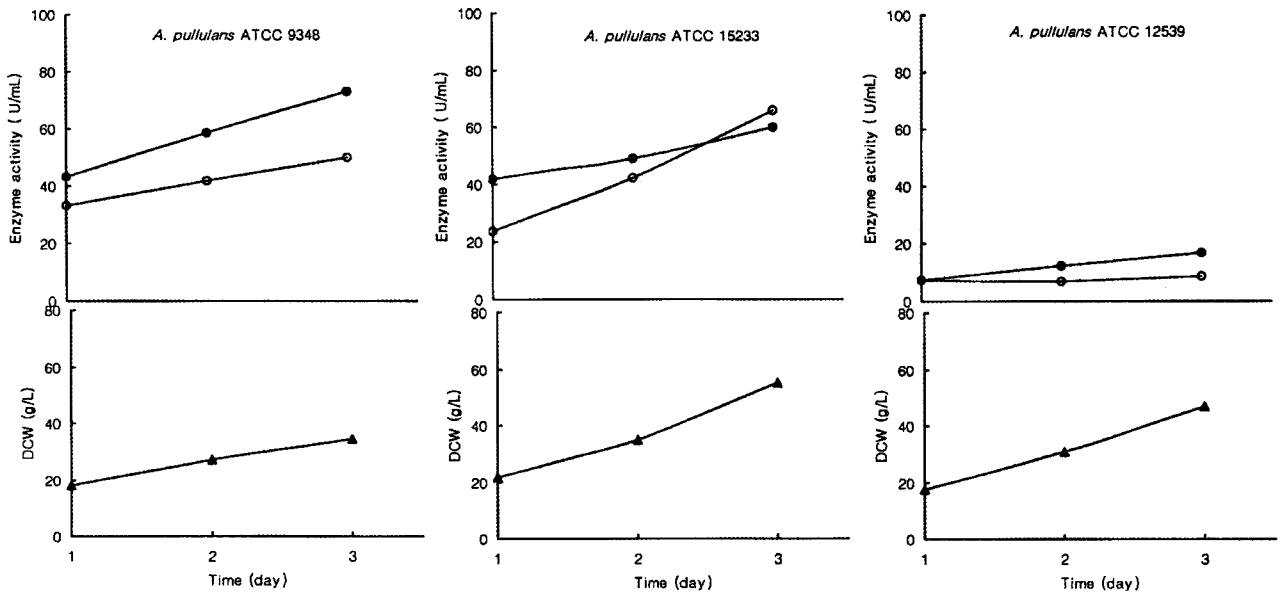


Figure 1. Comparison of enzyme production by different *Aureobasidium pullulans* strains. (●) intracellular enzyme activity; (○) extracellular enzyme activity; (▲) dry cell weight.

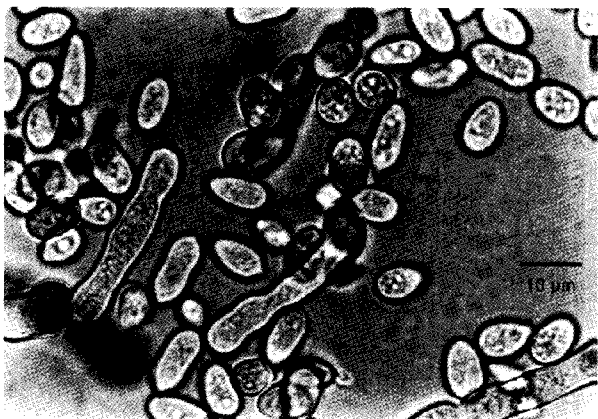


Figure 2. A typical micrograph of *Aureobasidium pullulans* cells illustrating different morphologies.

cells)되는 것으로 보고 하였는데, 이는 균주와 배지의 조성에 따른 결과로 사료된다. Cell morphology와 효소(균체내 및 균체외) 생성 패턴과의 상관관계가 있는지를 조사하기 위하여 pH 4.0 - 8.0 범위에서 batch fermentation kinetics 연구를 진행하였다. 배양은 2.5-L jar fermentor를 사용하였고 배양 pH는 4N NaOH 또는 4N H₂SO₄ 용액으로 자동조절하였다. 배양시간에 따른 균체내효소와 균체외효소의 활성비율을 Figure 3에 나타내었다. Figure 3에서 보면 배양시간이 10시간 이후 24시간까지 진행되면서 절대값의 차이는 있었지만 배양 pH와 관계없이 이 비율이 증가되는 경향을 보여주었고 24시간 이후는 이 비율의 변화가 거의 없었다. 배양초기(10-15 시간)에는 균의 형태가 대부분 mycelia 이며 이런 상태하에서 균체외효소에 대한 균체내효소의 활성비율은 매우 적었으나, 24시간 이후에는 균의 형태가 대부분 yeast-like cells과 chlamydo-spores로 변화되면서 균체내효소가 균체외에 배출 효율이 낮아 이 비율이 증가되는 것으로 해석된다. 배양 pH가 높을 때(pH 8.0)와 낮은 경우(pH 4.0)에는 그 비

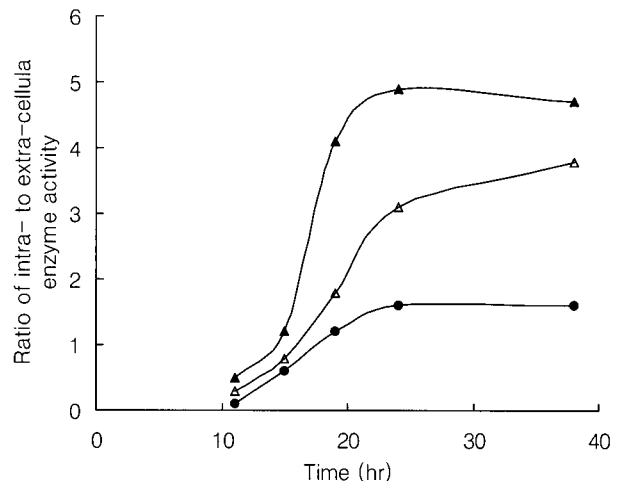


Figure 3. The ratio of intra-to extracellular enzyme activity with fermentation time at various pH values. (△) pH4.0; (●) pH 6.0; (▲) pH 8.0.

율이 pH 6의 경우보다 상대적으로 크게 나타나는 것으로 보아 이러한 극단적인 pH에서는 균체내효소가 균체외에로의 배출이 잘 일어나지 않는데 따른 결과로 생각된다.

배양 pH와 phosphate 농도가 효소생산에 미치는 영향

배양 pH가 효소생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 여러 pH 조건하에서 38 시간 회분배양 완료 후 균체내 및 균체외효소의 활성을 분석하였다(Figure 4). 그 결과 pH 4.0 또는 pH 8.0 에서 균체외효소 활성은 pH 6.0-7.0 에서의 경우보다 현저히 낮게 나타났고 따라서 균체내 및 균체외효소를 모두 활용하는 경우를 감안할 때 효소생산의 최적 배양 pH는 7.0으로 판단된다. 한편 인산염농도가 효소생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양초기에 1-5 g/L 범위의 phosphate (K₂HPO₄)를 250-mL의 플라스크에 첨가하여 growth와 enzyme

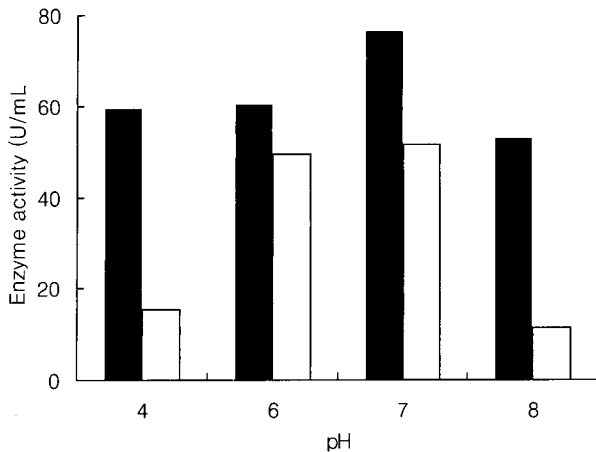


Figure 4. Effect of pH on intra- and extracellular enzyme production. (■) intracellular enzyme activity; (□) extracellular enzyme activity.

production을 조사하였다. 인산염이 1 g/L 수준에서는 배양중에 phosphate가 고갈 (limitation)되었고, 그 결과 고갈되지 않았을 경우보다 효소생산이 20% 저하되었다. 그러나 2 g/L 이상 첨가했을 경우 인산염의 고갈은 일어나지 않았지만 4 g/L 첨가시(전 배양과정 중 2-3 g/L의 잉여 인산염의 농도가 유지됨) 최대의 효소생산이 이루어졌다(data not shown).

저당 또는 당밀로부터 프럭토올리고당의 생산

저가의 사료첨가용 프럭토올리고당을 생산하기 위하여는 값싼 원료의 선택이 매우 중요하다. 저렴한 sucrose원료인 molasses를 사용하여 프럭토올리고당 생산이 가능한지를 조사하기 위하여 비교목적으로 순수 sucrose로부터 프럭토올리고당의 생산연구를 병행하였다. 효소는 sucrose(molasses의 경우는 molasses에 함유된 sucrose의 양을 정량하였슴) g당 10 units를 사용하였고, 효소 반응은 55°C 그리고 pH 5.5 조건에서 24시간 동안 진행하였다. 통상 molasses에는 sucrose외에도 환원당으로서 glucose와 fructose가 소량 함유되어 있다. 50% sucrose 및 45% molasses(sucrose로서 28%)를 기질로 사용하여 반응시간에 따른 효소반응액의 TLC chromatograms을 Figure 5에 나타내었다. Figure 5에서 알 수 있듯이 GF, GF₂, GF₃, GF₄가 명확하게 TLC plate 상에서 분리되었고 R_f 값은 각각 0.51, 0.38, 0.31, 0.24이었다. 반응 8시간 후에는 상당량의 GF₂와 약간의 GF₃가 생성되었지만, 반응 18-24시간에서는 오히려 GF₂는 약간 감소되고 상당량의 GF₃와 GF₄가 생성되었다. 비슷한 결과가 *A. niger* (7), *A. japonicus* (22), *A. pullulans* (23)의 효소를 사용한 반응에서도 얻어졌다. 실제로 sucrose를 출발물질로 하여 생성되는 프럭토올리고당은 우선 GF₂, 다음에 GF₃, 그 다음에 GF₄ 등으로 단계적 효소반응스텝을 거쳐서 생성되는 것으로 알려져 있다(16). 환원당으로 45% 당밀 (sucrose로서 28%)을 기질로 하여 프럭토올리고당을 생산(Figure 5 B)했을 경우와 순수 sucrose를 사용했을 때 (Figure 5 A)를 비교해 볼 때 GF₂, GF₃, GF₄ 등의 생성패턴은 거의 동일하게 나타났다.

고농도의 당밀 (58% reducing sugars, 36% as sucrose equivalent)을 사용하여 프럭토올리고당 생성반응속도를 조사하여 그 결과를 Figure 6에 나타내었다. 36% sucrose기질로부

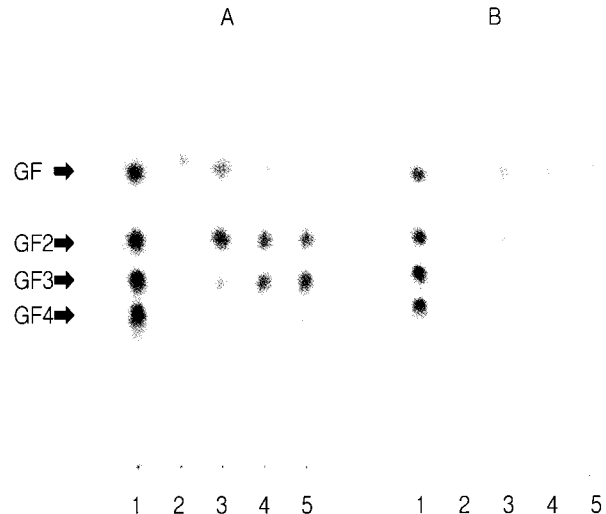


Figure 5. Thin layer chromatograms of time-course enzyme reaction products obtained using *A. pullulans* cells at 55°C and pH 5.5. (A) 50% sucrose; (B) 45% molasses. Lane 1, standard mixture of GF, GF₂, GF₃ and GF₄; Lane 2, glucose standard; Lane 3, 8 hr; Lane 4, 18 hr; Lane 5, 24 hr.

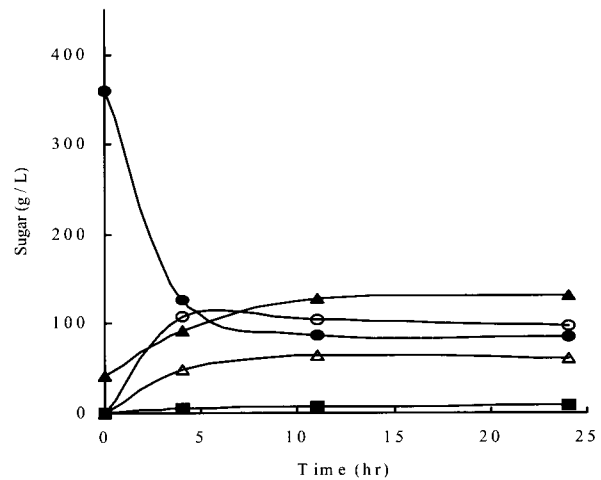


Figure 6. Batch enzyme kinetics with molasses (36% as sucrose equivalent) at 55°C and pH 5.5. (▲) glucose; (●) GF; (○) GF₂; (△) GF₃; (■) GF₄.

터 24시간 효소반응 완료 후에 생성된 총 프럭토올리고당 (GF₂+GF₃+GF₄)은 16.6%로서 프럭토올리고당 수율은 0.46이었다. 이 수율은 순수한 sucrose를 기질로 사용하였을 때(10)와 비교하면 84%수준으로, 이는 통상 당밀 중에 포도당과 과당이 10-15% 함유되어 있기 때문에 이러한 환원당이 효소반응의 저해제로 작용했기 때문으로(16) 사료된다. 한편 molasses는 그 자체로도 동물사료첨가제로 사용되고 있기 때문에 당밀을 기질로 하여 생산된 프럭토올리고당을 별도로 정제 회수할 필요 없이 효소반응액을 직접 사료첨가제로 사용할 수 있다. 비록 프럭토올리고당 수율은 순수 sucrose를 기질로 하였을 때보다 약간 저하되지만, 본 연구 결과로부터 *A. pullulans* 세포를 사용하여 feed additive로서의 프럭토올리고당을 값싼 당밀로부터 생산이 가능하다는 결론을 얻을 수 있었다.

요 약

프럭토올리고당 합성효소의 생산능력이 우수한 균주를 선 발하기 위하여 *Aureobasidium pullulans* 3종을 배양하여 비교 해본 결과 ATCC 9348이 비효소활성 측면에서 가장 우수했 으며, 세 균주 모두 균체성장과 효소생산패턴과는 대체적으 로 선형적인 관계가 있었다. 균의 형태학적 측면에서 볼 때 배양초기에는 대부분 mycelia cells 형태이었으나 배양이 점 차 진행되면서 yeast-like cells 및 chlamydo spores 형태로 바 꾸어졌고, 이러한 형태변화와 더불어 균체의효소에 대한 균체 내효소의 활성비율도 변화됨을 알 수 있었다. 2.5-L 발효조를 사용하여 pH 영향을 조사해본 결과 pH 7.0 범위에서 효소생 산이 최대로 나타났고 pH 4.0 또는 pH 8.0 조건에서는 균체 의효소에 대한 균체내효소 활성이 높게 나타나는 것으로 보 아 배양조건에 따라 효소의 배출효율이 달라지는 것을 알 수 있었다. 또한 값싼 원료인 당밀로부터 *A. pullulans* 효소를 사 용하여 사료첨가제로서의 프럭토올리고당 생산이 가능함을 확인하였다.

감 사

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 연구되었음 (KRF-2001-005-G00005).

REFERENCES

- Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid (1995), Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics, *J. Nutr.* **125**, 1401-1412.
- Hidaka, H., T. Eida, T. Adachi, and Y. Saitoh (1987), Industrial Production of Fructooligosaccharides and Its Application for Human and Animals, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **61**, 915-923.
- Spiegel, J. E., R. Rose, P. Karabell, V. H. Frankos, and D. F. Schmitt (1994), Safety and Benefits of Fructooligosaccharides as Food Ingredients, *Food Technol.* **48**, 85-89.
- Kohmoto, T., F. Fukui, H. Takaku, Y. Machida, M. Arai, and T. Mitsuoka (1988), Effect of Isomalto-oligosaccharides on Human Fecal Flora, *Bifido. Microflora*, **7**, 61-69.
- Shi, B. M., S. Shan, and J. M. Tong (2001), Influence of Dietary Oligosaccharides on Growth Performance and Intestinal Microbial Populations of Piglets, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **14**, 747-751.
- Best, P. (2000), Starter Pig Feeds: Oligosaccharides, *Feed International*, **21**, 24-28.
- Hidaka, H., M. Hirayama, and N. Sumi (1988), A Fructooligosaccharide-producing Enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611, *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1181-1187.
- Hirayama, M., N. Sumi, and H. Hidaka (1989), Purification and Properties of a Fructooligosaccharide-producing β -Fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611, *Agric. Biol. Chem.* **53**, 667-673.
- Smith, J. A. and S. J. Luenser (1982), Process for the Production of Fructose Transferase Enzyme, US Patent 4,309,505.
- Yun, J. W., K. H. Jung, J. W. Oh, and J. H. Lee (1990), Semibatch Production of Fructo-oligosaccharides from Sucrose by Immobilized Cells of *Aureobasidium pullulans*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**, 299-308.
- Rehm, J., L. Wilimitzer, and A. G. Heyer (1998), Production of 1-Kestose in Transgenic Yeast Expressing a Fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*, *J. Bacteriol.* **180**, 1305-1310.
- Yanai, K., A. Nakane, A. Kawate, and M. Hirayama (2001), Molecular Cloning and Characterization of the Fructooligosaccharide Producing β -Fructofuranosidase Gene from *Aspergillus niger* ATCC 20611, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 766-773.
- Miller, G. L. (1959), Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
- Taussky, H. H. and E. Shorr (1953), A Microcolorimetric Method for the Determination of Inorganic Phosphorus, *J. Biol. Chem.* **202**, 675-685.
- Kim, K. Y., M. D. Kim, N. S. Han, and J. H. Seo (2002), Display of *Bacillus macerans* Cyclodextrin Glucanotransferase on Cell Surface of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 411-416.
- Jung, K. H., J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim, and J. H. Lee (1989), Mathematical Model for Enzymatic Production of Fructo-oligosaccharides from Sucrose, *Enzyme Microb. Technol.* **11**, 491-494.
- Usami, S., T. Ishii, K. Kirimura, K. Uehara, and J. Chen (1991), Production of β -Fructofuranosidase Showing Fructose-transferring Activity by *Penicillium frequentans* (*P. glabrum*), *J. Ferment. Bioeng.* **72**, 303-305.
- Hayashi, S., M. Nonokuchi, K. Imada, and H. Ueno (1990), Production of a Fructosyltransferring Enzyme by *Aureobasidium* sp. ATCC 20524, *J. Indust. Microbiol.* **5**, 395-400.
- Jung, K. H., J. Y. Lim, S. J. Yoo, J. H. Lee, and M. Y. Yoo (1987), Production of Fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulans*, *Biotechnol. Lett.* **9**, 703-708.
- Guterman, H. and Y. Shabtai (1996), A Self-tuning Vision System for Monitoring Biotechnological Processes. I. Application to Production of Pullulan by *Aureobasidium pullulans*, *Biotechnol. Bioeng.* **51**, 501-510.
- Lee, J. H., J. H. Kim, M. R. Kim, S. M. Lim, S. W. Nam, J. W. Lee, and S. K. Kim (2002), Effect of High Molecular Weight Pullulan by *Aureobasidium pullulans*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 1-7.
- Hayashi, S., K. Matsuzaki, Y. Takasaki, H. Ueno, and K. Imada (1992), Purification and Properties of β -Fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 276-279.
- Hayashi, S., M. Nonokuchi, Y. Takasaki, H. Ueno, and K. Imada (1991), Purification and Properties of β -Fructofuranosidase from *Aureobasidium* sp. ATCC 20524, *J. Ind. Microbiol.* **7**, 252-256.