

工學碩士 學位論文

Microbacterium laevaniformans ATCC 15953가
생산하는 levan의 가수분해물 제조

이 論文을 學位論文으로 提出함.



2003年 2月

釜慶大學交 大學院

食 品 工 學 科

李 獻

李獻의 工學碩士 學位論文을 認准함

2002年 12月 26日

主 審 理學博士 張 東 錫



委 員 農學博士 李 養 鳳



委 員 農學博士 梁 志 榮



목 차

Abstract	1
서 론	3
재 료 및 방 법	7
1. 실험재료	7
1.1 균주 및 배지	7
1.2 시약 및 기기	7
2. Levan 생산	8
2.1. Jar fermentor 배양	8
2.2. Levan의 생산	8
3. Levan의 분자량 측정	8
4. Levanase의 생산	8
5. Levanase 활성측정	13
6. Levan의 산가수분해	13
6.1. Levan의 농도에 따른 가수분해	13
6.2. Buffer의 pH 따른 가수분해	14
6.3. Buffer 농도에 따른 가수분해	14
6.4. 온도에 따른 가수분해	14
6.5. 가열시간에 따른 가수분해	15
7. 효소 가수분해	15

7.1. 효소의 농도에 따른 가수분해	15
7.2. 단일분자량 levan의 분획	15
결 과 및 고 찰	16
1. Levan의 분자량 측정	16
2. Levanase 활성측정	16
3. Levan의 산가수분해	16
3.1. levan의 농도에 따른 가수분해	16
3.2. Buffer의 pH 따른 가수분해	20
3.3. Buffer 농도에 따른 가수분해	20
3.4. 온도에 따른 가수분해	20
3.5. 가열시간에 따른 가수분해	21
4. 효소 가수분해	21
5. 단일분자량 levan의 분획	21
요 약	29
 참 고 문 헌	 31

Production of Levan Hydrolyzate

Produced by *Microbacterium* *laevaniformans* ATCC 15953

Hun Lee

*Department of Food Science and Technology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Levan is a β -2, 6-linked fructose polymer with β -2, 1-linked branched side chains. Levan is also easily produced by several kinds of bacteria during their assimilation of sucrose. Levan produced by microorganisms was mainly studied for interest such as molecular weight, structure analysis and physiological characters. It was reported recently that levan of M.W 20,000 had physiological activity. Therefore, this study was performed to obtain levan of M.W 20,000 by acid hydrolysis and enzyme hydrolysis.

Molecular weights of levan produced by *Microbacterium laevaniformans*

ATCC 15953 were 1,366,000, 92,8000 and 322,000. The optimal conditions of concentration of levan solution to obtain levan of M.W 20,000 was 5% concentrated levan solution. The optimal conditions of pH and buffer concentration of acid hydrolysis to obtain levan of M.W 20,000 were 0.01M phosphate-citrate buffer of pH 3. The optimal conditions of acid hydrolysis time and temperature to obtain levan of M.W 20,000 were held for 70min at 80°C.

The optimal conditions of enzyme hydrolysis to obtain levan of M.W 20,000 were the amount of lavanase of 2U/ml, reaction time 2hr and reaction temperature of 30°C.

서론

다당류(多糖類, polysaccharide)는 2개 이상의 단당류(單糖類, mono-saccharide)가 글리코시드결합에 의해 탈수 축합되어 큰 분자를 만들고 있는 당류의 총칭으로 분자량은 수천에서 100만을 넘는 것으로 생물체의 구성성분이거나 에너지 저장체로서 생물계에 널리 존재하며 종류도 다양하다.

다당류에 대한 연구는 매우 오래 전부터 이루어져 왔으며 식품, 의약품, 화장품 등 여러 산업분야에서 제품화되고 있다. 다당류는 식물, 동물, 해조류 및 미생물로부터 얻어지는데 식물, 동물 및 해조류에서 생산되는 다당류는 물성학적 성질, 순도, 생산량이 일정하지 않아 다량생산의 어려움이 있었다. 그러나 미생물이 생산하는 다당류는 이러한 단점 없이 일정한 물성학적 성질과 높은 생산성을 갖고 있으며 풍부한 부존자원을 이용할 수 있고 연속배양기술에 의한 높은 생산성과 보다 싸고 간편한 기질을 이용할 수 있는 장점이 있다.

최근 생물공학 기술의 발전과 더불어 고분자인 다당류, 특히 미생물에 의해 생성되는 다당류 및 이의 유도체에 대한 많은 연구와 관심이 집중되고 있다. 이러한 미생물 유래 다당류의 공업적 생산과 이용에 관한 연구로서는 1942년 *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 dextran이 혈장증량제로 개발된 이래(Aspinall, 1982), *Xanthomonas campestris*가 생산하는 xantan gum(Flores 등, 1994), *Auerobasidium pullulans*가 생산하는 pullulan(Auer 등, 1990), *Zoogloea ramigera*가 생산하는 zooglan(Noberg 등, 1982) *Pseudomonas aeruginosa* 또는 *Azotobacter vinelandii*가 생산하는 alginate(Skjak 등, 1985), *Acetobacter*속, *Agar-obacterium*속이 생산하는 cellulose(Currie 등, 1962) 및 *Mucorale*속이

생산하는 chitosan 등을 대표적인 예로 들 수 있으며, 그 밖에도 다수의 연구가 보고되어 있다(Cottrell, 1980).

이러한 미생물 유래 다당류는 구성당, 분자량, 구성당의 종류, 결합 순서와 방법에 따라 구조가 다양하고 새로운 물리화학적 성질을 지닌 다당류를 개발할 수 있는 가능성이 있으며 생산조건에 따라서 겔 형성능력, 점착능력, 유화능력 및 필름형성 능력 등의 광범위한 특성을 가지므로 페인트, 섬유공업, 제제, 화장품, 식품 등 각종 질병의 예방 또는 치료 등과 관련되는 생리활성을 갖는 소재로서의 중요성도 더욱 높아지고 있다.

근래에 들어서는 미생물 유래 다당류가 지니는 항암활성이 확인되어 새로운 의약품으로서의 개발 가능성이 기대될 뿐만 아니라(Endo 등, 1983), 생물학적 오수 처리시에 다당류의 중금속 흡착기능을 이용한 환경문제에의 응용연구 역시 보고되고 있다(Noberg 등, 1984).

이와 같이 미생물 유래 다당류가 크게 주목되고 있는 주요한 이유는 이들이 지니는 독특한 기능성과 발효조를 이용한 연속배양에 의한 공업적 대량생산 및 생산된 다당류의 분리 및 회수가 용이하다는 이점을 지니고 있기 때문이다.

최근에 들어서는 유전공학적 기법을 이용한 고생산성 변이균주 및 새로운 기능을 지닌 다당류의 개발에 관한 연구가 보고되고 있는 등 고부가가치를 지닌 새로운 바이오 소재로서의 기능 및 용도 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Aspinall, 1982).

한편, 미생물 유래의 단순다당류 중 과당으로 구성된 다당류를 fructan으로 총칭하며 이 중 대표적인 levan(poly-D-fructans)은 1981년에 levulan이란 이름으로 처음 보고되었다. Greig-Smith(Greig-Smith, 1901)는 *Bacillus*속 균주가 sucrose에서 배양할 때 dextran과 유사하게 fructan을 생성함을 발견하여 levan이라 명명하였다.

Levan의 구조는 β -2,6 결합한 D-fructose로 환원말단에는 glucose가 결합하고 있으며 점성이 낮고 물에 잘 녹으나 acetone, ethyl alcohol 등의 유기용매에는 녹지 않으며 산에 의해 쉽게 가수분해 되는(Pontis 등, 1985) 특징을 이용하여 식품첨가물 및 기타 공업용 부원료로서 개발 가능하게 여겨진다. Levan의 높은 용해성은 β -2,6 결합에 따른 것으로 생각되어지며 branching은 단지 지지요소로 작용하며 교차 결합된 levan은 gel filtration을 위해 분자체로 사용될 수 있으며 또한 유화제, 안정제, 조밀제, 향을 운반하는 운반체, surface finishing agent, 혈장대용제 등으로 이용할 수 있다.

그리고 levan을 생성하는 *Pseudomonas*속과 *Xanthomonas*속, *Bacillus laevaniformans*, *Streptococcus salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Aerobacter levanicum*, *Alcaligenes viscosus* 등은 sucrose를 대사하여 levan을 생성한다. 이것은 sucrose-6-fructosyltransferase(levansucrase, EC 2.4.1.10)로 불리는 효소가 sucrose를 직접 fructose 공여체로 하여 2 $\rightarrow$ 6 결합으로 fructosepolymer를 합성하기 때문이다.

또한 levan은 식물에서는 단자엽식물, 특히 벼과의 잎이나 줄기에서 발견되고 대표적인 것으로 호밀풀(*Lolium perenne*)이나 오리새(*Dactylis glomerata*)에 함유되어 있고(한국과학기술한림원, 1998), 반면 inulin은 쌍자엽식물에서 발견된다. 식물체에 퍼져 있는 levan은 잎에는 소량 포함되나 뿌리, 구조, 덩이줄기 및 성숙한 과실에 많고 저장 탄수화물로 추위나 건조에 대해 저항성을 갖도록 해주며(Shiomi 등, 1976) 식물성 levan은 세균성 levan보다 중합도 400 정도로 분자량이 작다(Pontis 등, 1985).

미생물에 의한 levan의 생산은 탄소원의 농도, 당 종류에 따른 저해, 질소원의 농도, salt의 영양등 영양적 요인과 배양온도, 압력, pH 등의 환경적 요인 등 여러 가지 요인에 의해 영향을 받는다. 이렇게 제조된

levan은 여러 연구자들에 의해 levan의 일반적특성, 분자량, 구조분석, 구성당, 결합방식 등이 조사되어 왔다. Levan의 분자량과 생리적 작용과의 관계를 본 결과 분자량 20,000대에서 생리적 효과가 있음이 보고되었다.(Yukiko 등, 1999)

따라서 본 연구에서는 *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953에 의해 생산된 levan으로부터 분자량 20,000대를 얻기 위하여 산가수분해와 효소가수분해의 조건을 알아보았다.

재 료 및 방 법

1.1 균주 및 사용 배지

본 실험에 사용된 균주는 한국생명공학연구원 유전자원센터 유전자은행(KCTC)에서 구입한 표준균주인 *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953를 사용하였고, 1% sucrose가 함유된 평판배지에 37°C, 24hr 배양후 4°C 냉장 보관하였다. 보관균주는 2주일에 1번씩 계대배양을 실시하였다.

종균배양 및 jar fermentor(KOREA) 배양시 사용한 Bacto peptone, yeast extract, agar는 Difco사(U.S.A.)의 제품을 sucrose, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 Junsei chemical co.(Japan)의 제품을 사용하였고, K_2HPO_4 는 Shinyo pure chemical co.(Japan)의 제품을 사용하였다.

클론된 *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953의 levM을 발현시키기 위하여 발현백터인 pLEV-2N을 대장균인 *Escherichia coli* BL21(DE3)에 형질전환시킨 것을 부산대학교 미생물학과로부터 분양받아 Luria-Bertain(LB)배지에 kanamycin($30\mu g/ml$)를 첨가하여 배양하였다.

1.2 시약 및 기기

Levan의 분자량을 측정하기 위하여 Gel Permeation Chromatography를 사용하였으며, 가수분해된 levan을 분리·정제하기 위하여 투석막, gel chromatography(Bio-gel, A-5m, USA)를 사용하였다.

2. Levan 생산

2.1. Jar fermentor 배양

Table 1의 배지를 3L 조제하여 5L Jar fermentor에 첨가하여 배양온도 37℃, pH 7.0, 250rpm에서 24시간 배양하였다.

2.2. Levan의 생산

Microbacterium laevaniformans ATCC 15953가 생산한 levan을 얻기 위하여 원심분리(4℃, 30min, 7,000rpm)한 뒤 균체를 제거하고 상등액을 취해 실온의 ethanol 원액(95%)을 3배수(v/v)되게 혼합하여 하룻밤 냉장보관(4℃)후 원심분리(4℃, 30min, 7,000rpm)한 뒤 얻어진 levan에 증류수를 적당량 첨가하여 재용해하고 다시 ethanol 처리하는 방식으로 3회 반복하여 회수한 levan을 증류수에 재용해한 후 투석 tube(MW 14,000)에 담아 2일간 증류수에 대하여 투석시킨 후 72시간 동결건조하였다.(Fig.1).

3. Levan의 분자량 측정

Microbacterium laevaniformans ATCC 15953가 생산한 levan의 평균 분자량을 알아보기 위하여 GPC를 이용하여 분자량을 측정하였다.

4. Levanase의 생산

클론된 *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953의 levM을 발현시키기 위하여 발현벡터인 pLEV-2N을 대장균인 *Escherichia coli* BL21(DE3)에 형질전환시킨 것을 부산대학교 미생물학과로부터 분양받아 이 균주를 안정화하고 30μg/ml의 kanamycin이 들어있는 LB배지에

**Table 1. Composition of medium for polysaccharide production
by *Microbacterium laevaniformans* KCTC 9732.**

	Seed basal medium	Jar fermentor basal medium
Sucrose	1.0 %	10.0 %
Bacto peptone	0.25%	0.1 %
Yeast extrat	0.25%	0.1 %
MgSO₄ · 7H₂O	0.025%	0.05%
K₂HPO₄	0.1 %	0.1 %
	pH 7.0	pH 7.0

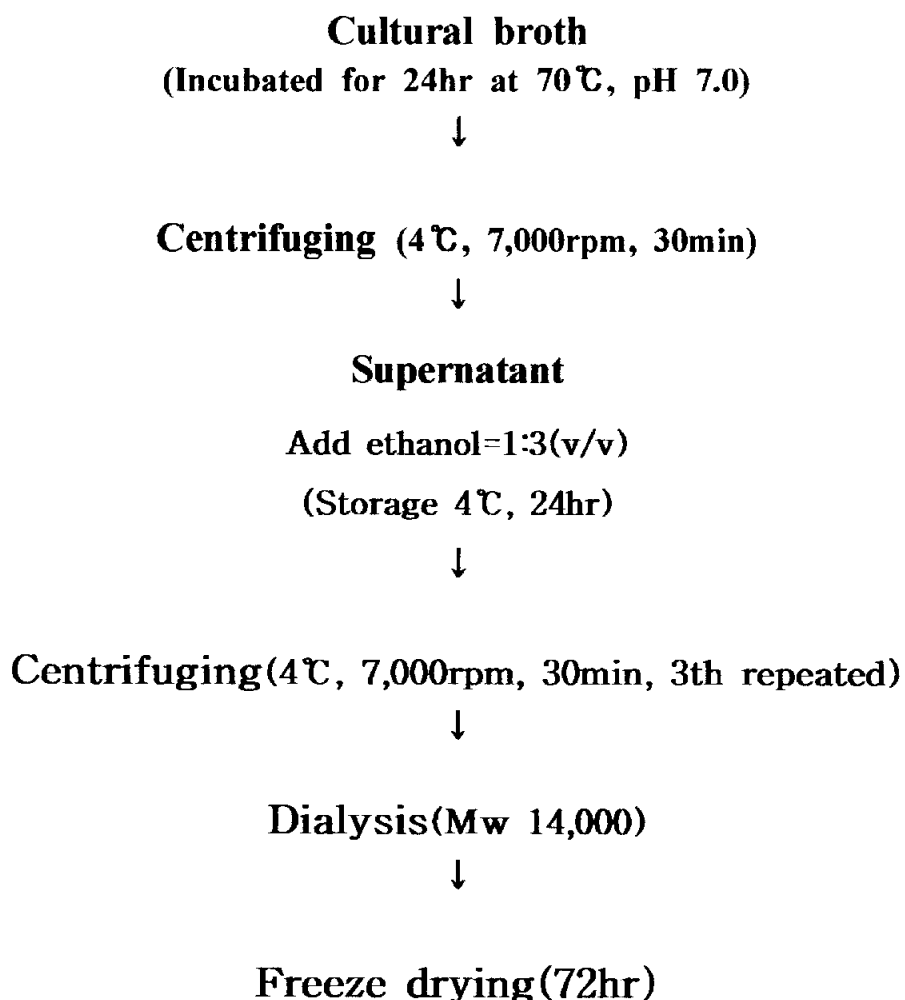


Fig. 1. Procedure for production of levan by *microbacterium laevaniformans* ATCC 15953

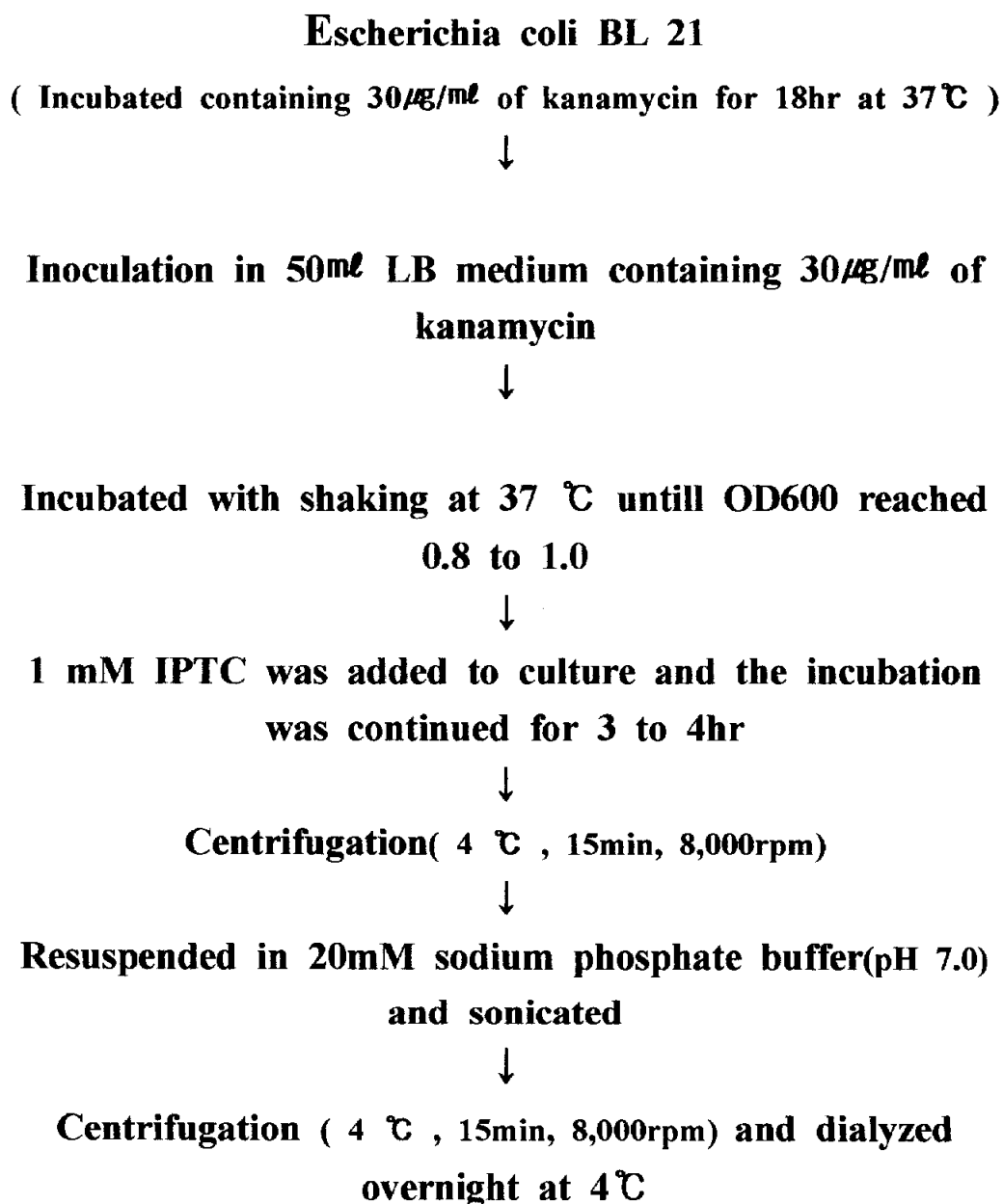


Fig. 2. Procedure for production of levanase

**0.2ml of 1%(w/v) levan in 10mM sodium phosphate
buffer(pH 6.0)**

and 0.1ml of the enzyme solution



The reaction was carried out at 30 °C for 30min



**The enzyme reaction was stopped by adding 3 ml of
3,5-dinitrosalicylic acid reagent**



Heating at 100 °C for 5min



Cooling in running water



Measured at 575nm using a spectrophotometer

Fig. 3. Procedure for activity of levanase

서 18시간 동안 배양하였다.

이 배양시킨 균주를 50ml의 새로운 LB배지에 접종하여 OD₆₀₀의 측정값이 0.8~1이 될 때까지 배양하고 효소의 발현을 위하여 1mM IPTG 용액을 첨가하여 3~4시간 더 배양하였다. 이 배양액을 원심분리((4℃, 15min, 8,000rpm)하고, 상등액을 제거한 후, 20mM sodium phosphate buffer에 균체를 현탁한후 sonicator를 이용하여 균체를 파쇄하고 그 균체 추출액을 80%의 ammonium sulfate으로 침전시켰다. 하룻밤 방치 후, 원심분리하여 상등액을 모으고 20mM sodium phosphate buffer로 하룻밤 투석하고 효소 활성 측정을 위한 효소액으로 정하였다.(Fig. 2).

5. Levanase의 활성측정

Levanase의 활성은 DNS방법(Miller, 1959)으로 측정하였다. 10mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 *M. laevaniformans* ATCC 15953이 생산한 levan(1% w/v)을 0.2ml 녹여 0.1ml의 효소액과 30℃에서 30분간 반응시킨 후 3ml의 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS 시약)을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응을 정지시킨 후 색을 발현하기 위하여 100℃에서 5분간 가열한 후 색을 안정시키기 위하여 급냉시킨 후 575 nm에서 측정하였다.(Fig. 3).

6. Levan의 산가수분해

6.1. Levan의 농도에 따른 가수분해

Microbacterium laevaniformans KCTC 9732가 생산한 levan을 0.1%, 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%의 농도로 하여 20ml의 pH 3, 0.1M citric acid buffer에 첨가하여 70℃에서 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0,

0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정하였다.

6.2. Buffer의 pH에 따른 가수분해

5%의 levan을 pH 2, 3, 4, 5의 0.1M citric acid buffer에 각각 첨가하여 70℃에서 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정하였다.

6.3. Buffer의 농도에 따른 가수분해

5%의 levan을 pH 3의 0.1M, 0.3M, 0.5M, 0.7M, 1M의 citric acid buffer에 각각 첨가하여 70℃에서 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, phosphate buffer(0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1M)로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정하였다.

6.4. 온도에 따른 가수분해

5%의 levan을 pH 3의 0.1M citric acid buffer에 첨가하여 60, 70, 80, 90, 100℃에서 각각 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정하였다.

6.5 시간에 따른 가수분해

5%의 levan을 pH 3의 0.1M citric acid buffer에 첨가하여 80℃에서 60, 70, 80, 90, 100분간 각각 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정하였다.

7..효소 가수분해

7.1. 효소농도에 따른 가수분해

Levanase의 농도를 달리하여 가수분해를 실시하였다. levanase의 농도를 5, 2, 1, 0.5, 0.2U로 각각 달리하여 30℃에서 15분, 30분 1시간, 2시간, 3시간 반응시킨 후 시료를 취하여 GPC를 이용하여 분자량을 측정하였다.

7.2. 단일분자량 levan의 분획

산가수분해와 효소가수분해를 통하여 가수분해된 levan을 단일분자량으로 얻기 위하여 0.01M phosphate buffer(pH 7.0)로 평형된 Bio-gel A-5m(BioRad, USA) column(1.6×75cm)을 이용하여 분획하였다. levan 시료를 20% 농도로 하여 1ml씩 loading하고 5ml씩 분취하였으며 총 탄수화물의 양은 페놀황산법으로 측정하였다. 표준물질로서는 분자량 66,700, 39,100, 11,000인 dextran을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. Levan의 분자량 측정

Microbacterium laevaniformans ATCC 15953이 생산한 levan을 1%의 수용액으로 만들어 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 분자량 중량 평균(Mw)은 1,366,000, 928,000, 322,000으로 각각 나타났다(Fig. 4).

2. Levanase의 활성 측정

levanase의 활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 대부분의 효소활성은 균체 추출액에서 나타났다.

3. Levan의 산가수분해

3.1 Levan의 농도에 따른 가수분해

Microbacterium laevaniformans KCTC 9732가 생산한 levan을 0.1%, 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%의 농도로 하여 20ml의 pH 3, 0.1M citric acid buffer에 첨가하여 70℃에서 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 levan의 농도를 5%로 하였을 때 분자량 중량 평균(Mw) 20,000 대의 면적이 102,776으로 가장 많았으며, 0.1%의 농도였을 때 면적이 11,522로 가장 작았다.(Fig. 5).

Table 2. Levanase activity of *E.coli* BL21(DE3)

Levanase activity (U/ml)
<i>E.coli</i> BL21(DE3)/pLEV-2N
Cell- free extract
0.6

Levanase activity was expressed by the enzyme unit per ml of culture broth. One unit of activity was defined as the amount of enzyme required to liberate 1 μ mol of fructose per min

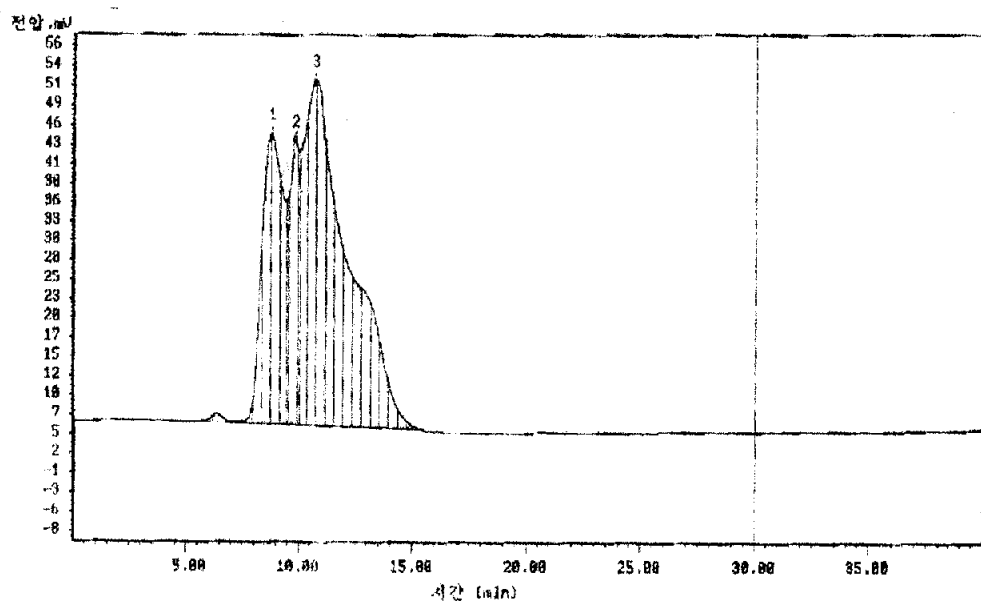


Fig. 4 GPC utilization of levan molecular weight

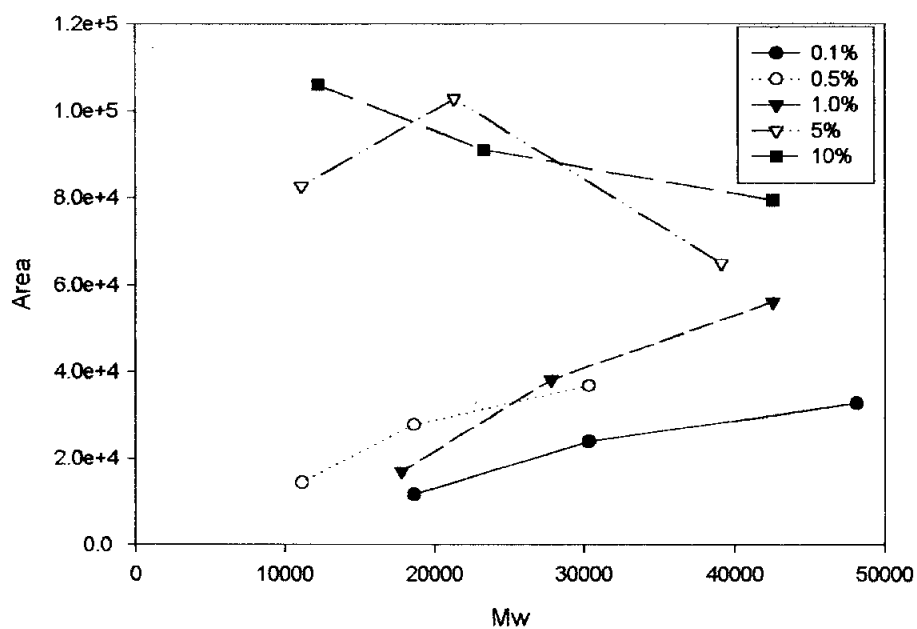


Fig. 5. GPC utilization of levan molecular weight for changes of levan concentration

3.2 Buffer의 pH에 따른 가수분해

5%의 levan을 pH 2, 3, 4, 5의 0.1M citric acid buffer에 각각 첨가하여 70℃에서 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 levan의 농도를 5%로 하고 pH를 3으로 조절하였을 때 분자량 중량평균(Mw) 20,000 대의 면적이 가장 많았으며, pH 2로 조절하였을 때 면적이 가장 작았으며, 단당류인 fructose로 완전히 가수분해된 면적도 많았다.(Fig. 6).

3.3. Buffer의 농도에 따른 가수분해

5%의 levan을 pH 3의 0.1M, 0.3M, 0.5M, 0.7M, 1M의 citric acid buffer에 각각 첨가하여 70℃에서 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, phosphate buffer(0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1M)로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 buffer의 농도가 0.1%이었을 때 Mw 20,000대의 면적이 가장 넓었다.(Fig. 7).

3.4. 온도에 따른 가수분해

5%의 levan을 pH 3의 0.1M citric acid buffer에 첨가하여 60, 70, 80, 90, 100℃에서 각각 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 80℃에서 Mw 20,000대의 면적이 114756가장 넓었으며 70℃, 60℃, 90℃, 100℃ 순이었다.(Fig. 8).

3.5 시간에 따른 가수분해

5%의 levan을 pH 3의 0.1M citric acid buffer에 첨가하여 80℃에서 60, 70, 80, 90, 100분간 각각 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 70min 가수분해한 시료가 Mw 20,000대의 면적이 114756가장 넓었으며 100분간 가수분해한 시료는 거의 가수분해가 이루어져 단당류인 fructose의 면적이 넓었다.(Fig. 9).

4.1. 효소농도에 따른 가수분해

Levanase의 농도를 달리하여 가수분해를 실시하였다. levanase의 농도를 5, 2, 1, 0.5, 0.2U로 각각 달리하여 30℃에서 15분, 30분 1시간, 2시간, 3시간 반응시킨 후 시료를 취하여 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 2U으로 2시간 반응시킨 시료가 분자량 중량평균(Mw) 20,000대의 면적이 가장 넓었다.(Fig. 10).

5. Levan의 분자량별 분획

Levan을 단일 분자량별로 정제하기 위하여 standard인 dextran을 Bio-gel 용출시킨 결과는 Fig. 8에서 보는 바와 같다. 이 standard curve를 가지고 분자량 70,000, 40,000, 20,000의 levan을 획득하였다 (Fig. 11).

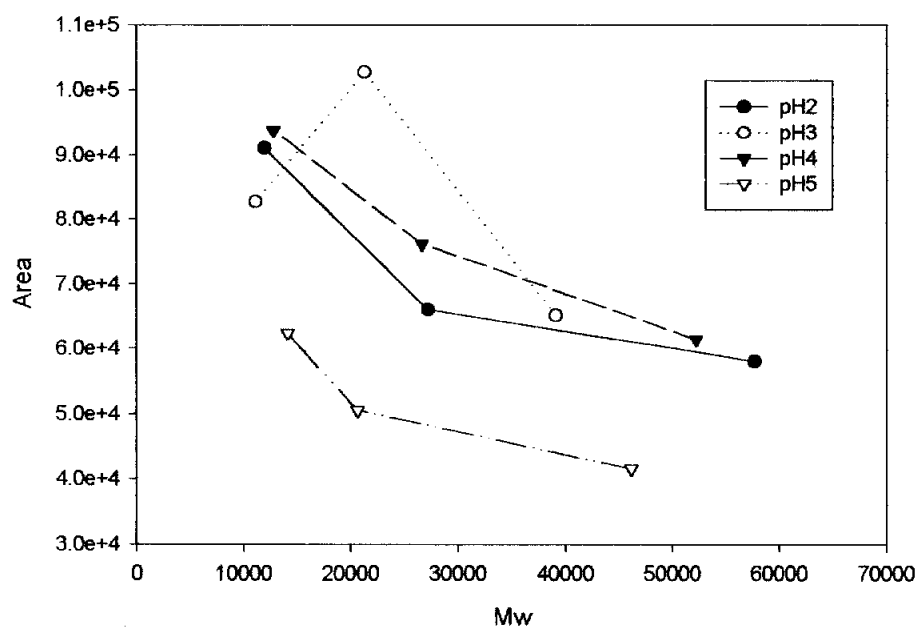


Fig. 6. GPC utilization of levan molecular weight for changes of pH

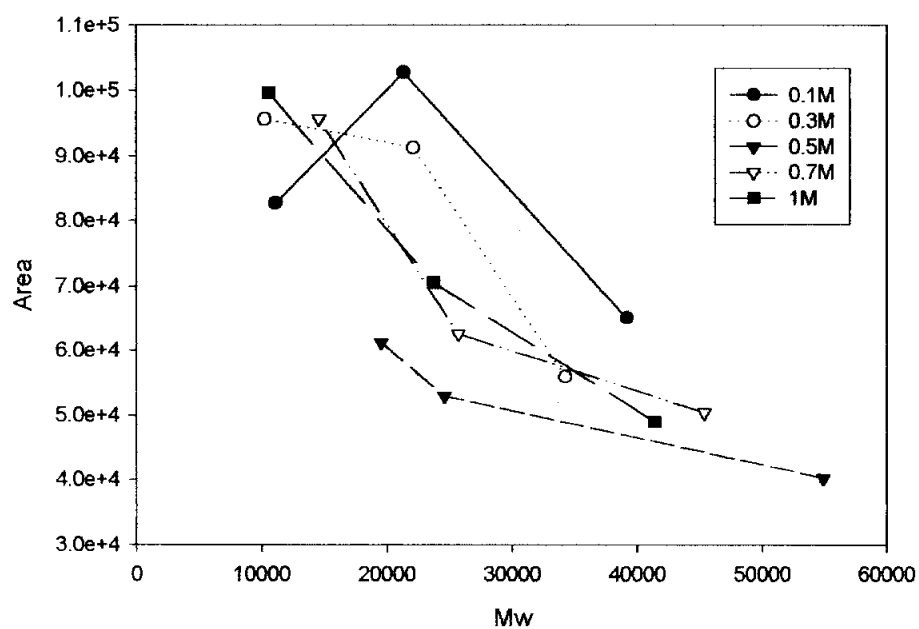


Fig. 7. GPC utilization of levan molecular weight for changes of buffer concentration

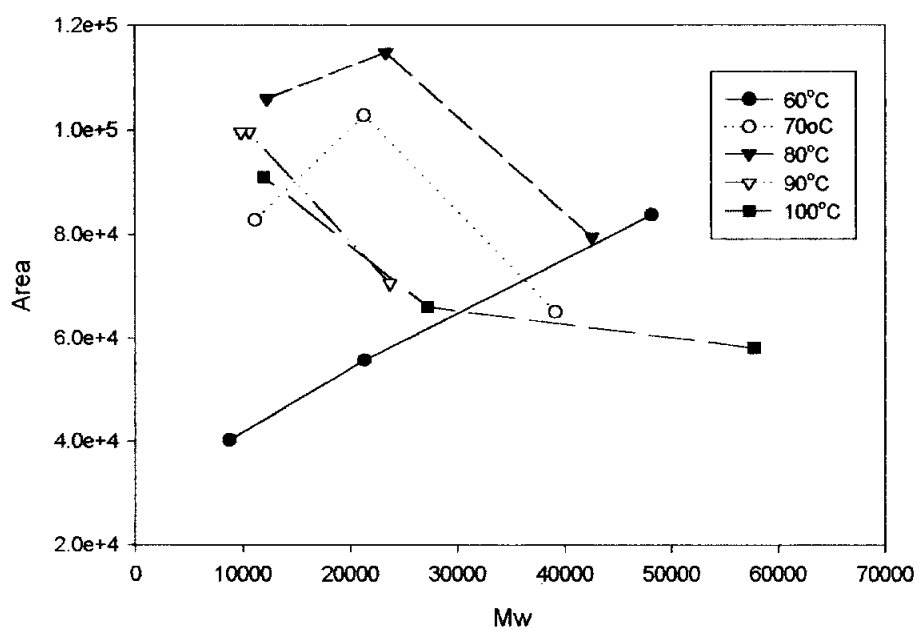


Fig. 8. GPC utilization of levan molecular weight for changes of temperature

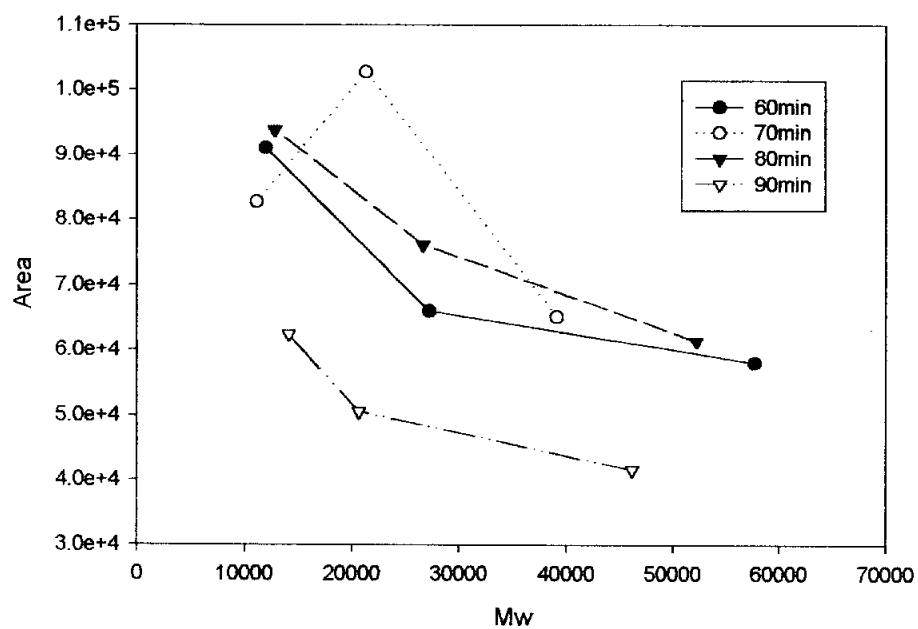


Fig. 9. GPC utilization of levan molecular weight for changes of hydrolysis time

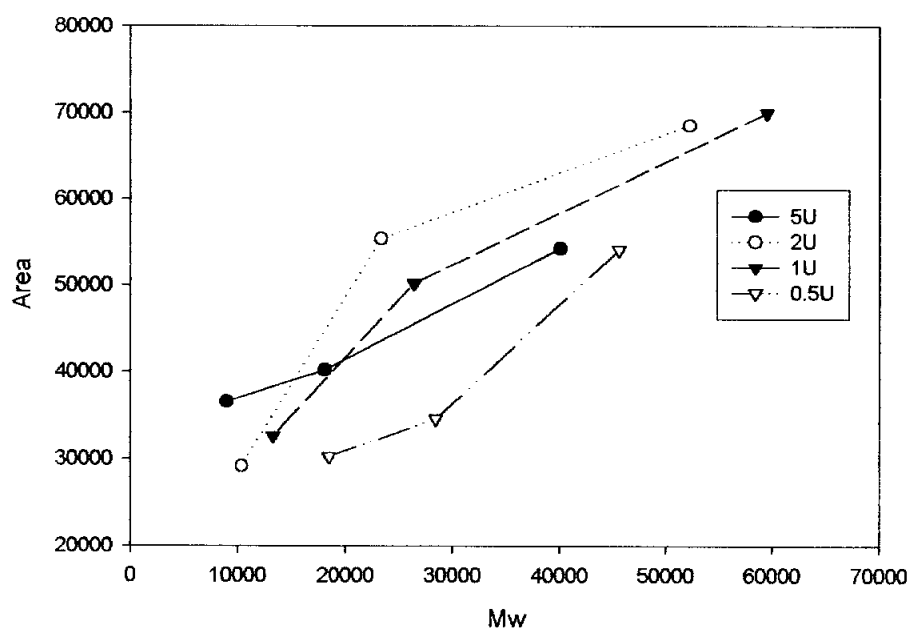


Fig. 10. Levan molecular weight reaction of levanase in different centration

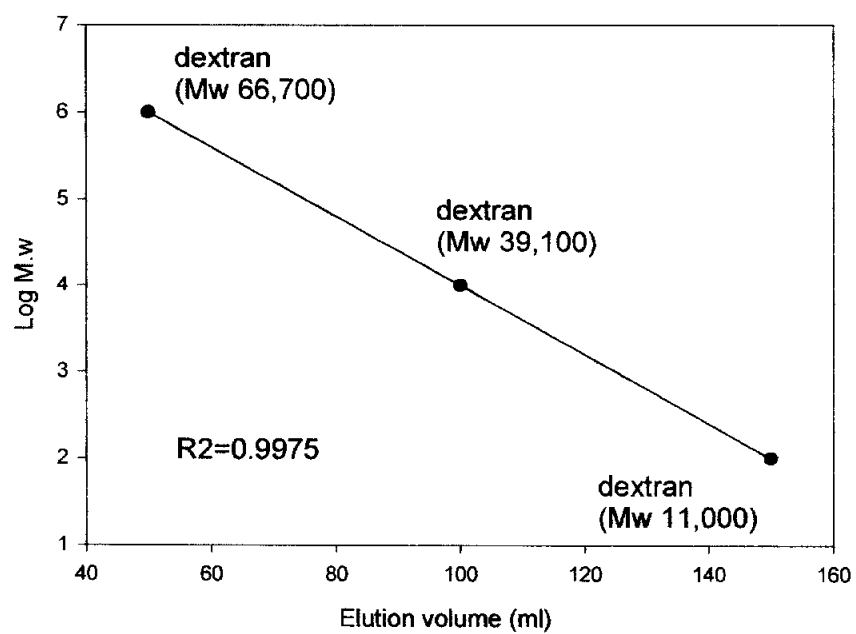


Fig. 11. Molecular weight determination of the levan fraction by Bio-Rad A-5m gel chromatography

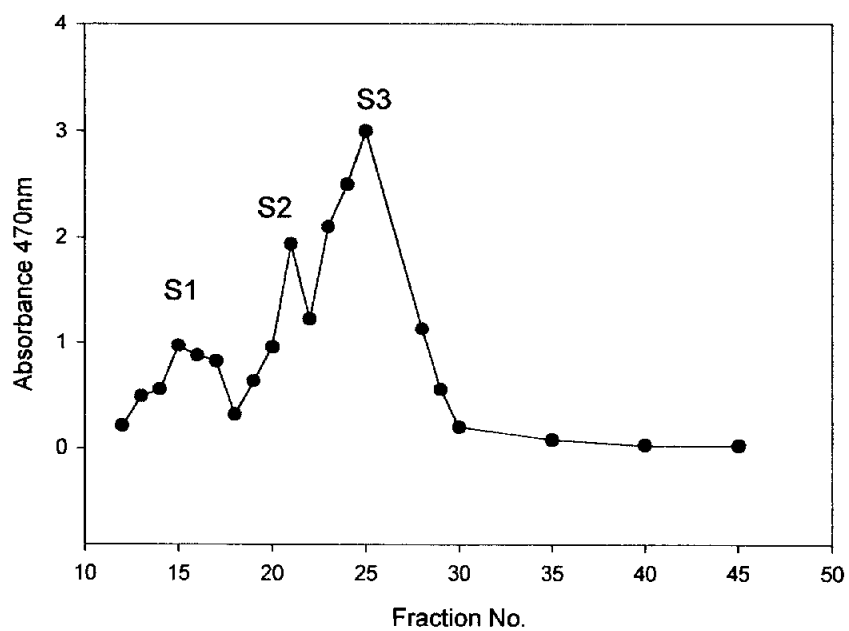


Fig. 12. Elution profile of levan fraction from *Microbacterium laveaniformans* by Bio-Rad A-5m gel chromatography

요 약

1. *Microbacterium laevaniformans* ATCC 15953이 생산한 levan을 1%의 수용액으로 만들어 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 분자량 중량평균(Mw)은 1,366,000, 928,000, 322,000으로 각각 나타났다.

2. *Microbacterium laevaniformans* KCTC 9732가 생산한 levan을 0.1%, 0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%의 농도로 하여 20ml의 pH 3, 0.1M citric acid buffer에 첨가하여 70℃에서 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 levan의 농도를 5%로 하였을 때 분자량 중량평균(Mw) 20,000 대의 면적이 102776으로 가장 많았으며, 0.1%의 농도였을 때 면적이 11522로 가장 작았다.

3. 5%의 levan을 pH 2, 3, 4, 5의 0.1M citric acid buffer에 각각 첨가하여 70℃에서 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 levan의 농도를 5%로 하고 pH를 3으로 조절하였을 때 분자량 중량평균(Mw) 20,000 대의 면적이 가장 많았으며, pH 2로 조절하였을 때 면적이 가장 작았다.

4. 5%의 levan을 pH 3의 0.1M, 0.3M, 0.5M, 0.7M, 1M의 citric acid buffer에 각각 첨가하여 70℃에서 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, phosphate buffer(0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1M)로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 buffer의 농도가 0.1M이었을

때 Mw 20,000대의 면적이 가장 넓었다.

5. 5%의 levan을 pH 3의 0.1M citric acid buffer에 첨가하여 60, 70, 80, 90, 100℃에서 각각 70분간 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 80℃에서 Mw 20,000대의 면적이 114756가장 넓었으며 70℃, 60℃, 90℃, 100℃ 순이었다.

6. 5%의 levan을 pH 3의 0.1M citric acid buffer에 첨가하여 80℃에서 60, 70, 80, 90, 100분간 각각 가수분해한 후 20ml의 pH 8.0, 0.1M phosphate buffer로 중화한 후 원심분리하여 상등액에 3배수 ethanol첨가하여 얻어진 침전물을 증류수로 재용해한 후 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 70min 가수분해한 시료가 Mw 20,000대의 면적이 114756가장 넓었으며 100분간 가수분해한 시료는 거의 가수분해가 이루어져 단당류인 fructose의 면적이 넓었다.

7. Levanase의 농도를 달리하여 가수분해를 실시하였다. levanase의 농도를 5, 2, 1, 0.5, 0.2U로 각각 달리하여 30℃에서 15분, 30분 1시간, 2시간, 3시간 반응시킨 후 시료를 취하여 GPC를 이용하여 분자량을 측정한 결과 2U으로 2시간 반응시킨 시료가 분자량 중량평균(Mw) 20,000 대의 면적이 가장 넓었다.

참 고 문 헌

- Ana, C.M., E. Rodriguez, C.M. Abate and F. Sineriz. 2000. Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture condition. *Biotechnology Letters*, 22, 1639~1642.
- Bekers, M., J. Laukevics, A. Karsakevich, E. Ventina, E. Kaminska, D. Upite, I. Vna, R. Linde and R. Scherbaka. 2001. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. *Process Biochemistry*, 36 (10), 979~986.
- Calazans, G.M.T., C.E. Lopes, R.M.O.C. Lima. and F.P. de Franca. 1997. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnology Letters*, 19(1), 19~21.
- Calazans, G.M.T., R.C. Lima, F.P. de Franca and C.E. Lopes. 2000. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 27(4), 245~247.
- Clarke, M.A., E.J. Roberts and P.J. Garegg. 2000. New Compounds from Microbiological Products of Sucrose. *Carbohydrate Polymers*, 34, 425.

- Dias, F. and J.V. Bhat. 1962. A new levan producing bacterium *Corynebacterium laevaniformans* nov. spec. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 63~72.
- Dias, F. and J.V. Bhat. 1964. Nutritional properties of *Corynebacterium laevaniformans*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 30, 176~184.
- Diarmuid, D. 1952. Structure of a levan produced by *Bacillus polymyxa*. *Industrial Utilization Investigations*, 30, 872~878.
- Elisashvili V.I. 1984. Levan synthesis by *Bacillus* sp.. *Appl. Biochem & Microbial.*, 20(1), 82~87.
- Elizabeth, A.B., R.D. Schwartz and A. Catena. 1985. Production and characterization of a polymer from *Arthrobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 629~633.
- Glicia, M.T., R.C. Calazans, F.P. Lima, de Franca and E.L. Carlos. 2000. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis levans*. *International Journal of Biological Macro molecules*, 27, 245~247.
- Gurunathan, S., C.R. Krishnan and P. Gunasekaran. 1999. Elevated temperature and chemical modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas mobilis*.

- Biotechnology Letters, 21, 179~182.
- Han, Y.W. and M.A. Clarke. 1990. Production and characterization of microbial levan. J. Agric. Food Chem., 38, 393~396.
- Hestrin, S., D.S. Feingold and G. Avigad. 1956. The mechanism of polysaccharide production from sucrose. Biochem. J., 64, 340~351.
- James, R.M., E.H. Chester, A.S. Saul, J.V. James and J.J. Marvin. 1955. Bacterial levans of intermediate molecular weight. Appl. Microbiol., 3, 321~333.
- Jang, K.H., K.B. Song, B.S. Park, C.H. Kim, B.H. Chung, W.C. Ryo, K.S. Lee, C. Lee., U.H. Chun and S.K. Rhee. 2001. Levan production by use of the recombinant levansucrase immobilized on titanium-activated magnetite. Process Biochemistry, 37(4), 339~343.
- Kim, M.G., J.W. Seo, K.B. Song, C.H. Kim, B.H. Chung and S.K. Rhee. 1998. Levan and fructosyl derivatives formation by a recombinant levansucrase from *Rahnella aquatilis*. Biotechnology Letters, 20(4), 333~336.
- Masaru, I., H. Yamaguchi, S. Ono and N. Minamiura. 1993. Production and isolation of levan by use of levansucrase immobilized on the ceramic support SM-10. Biosci. Biotech. Biochem., 57(2), 322~324.

- Ramsay, J.A., D.G. Cooper and R.J. Neufeld. 1989. Effect of oil reservoir conditions on the production of water-insoluble levan by *Bacillus licheniformis*. Geomicrobiology Journal, 7, 155~165.
- Simms, P.J., W.J. Boyko and J.R. Edwards. 1990. The structural analysis of a levan produced by *Streptococcus salivarius* SS2. Carbohydrate Research, 208, 193~198.
- Sneath, P.H., E.d.A. and M.D. Baltimore. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, 2.
- Tanaka T., S. Oi and T. Yamamoto. 1979. Synthesis of levan by levansucrase. J. Biochem., 85, 287~293.
- Vna, I., A. Karsakevich and M. Bekers. 2001. Stabilization of anti-leukemic enzyme-asparaginase by immobilization on polysaccharide levan. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11, 551~558.
- Yamamoto, S., M. Iizuka, T. Tanaka and T. Yamamoto. 1985. The mode of synthesis of levan by *Bacillus subtilis* levansucrase. Agric. Biotech. Chem., 49(2), 343~349.
- Yang, J.Y. 1991. Production and Characterization of Levan by *Bacillus polymyxa* D₁. Seoul National University Thesis