

Levanoligosaccharide의 장내미생물의 생육에 미치는 생리효과

강수경 · 박수제 · 이재동 · 이태호[†]

부신대학교 미생물학과

Physiological Effects of Levanoligosaccharide on Growth of Intestinal Microflora

Soo-Kyung Kang, Soo-Je Park, Jae-Dong Lee and Tae-Ho Lee[†]

Dept of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

The effect of levanheptaose produced by levanase from *Streptomyces* sp. 366L on principle intestinal microflora was investigated. The reaction product, levanheptaose, was used as a carbon source for various intestinal microflora. As a results, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Eubacterium limosum* grew effectively in the *in vitro* experiment, whereas *Clostridium perfringens*, *E. coli*, and *Staphylococcus aureus* did not. Therefore levanheptaose seems to promote selectively the growth of *B. adolescentis* and *L. acidophilus*. In the *in vivo* experiment, the effect of levanheptaose on the growth of intestinal microflora, β -fructosidase activity, pH, and butyrate concentration were examined in rats. Apparently, the number of fecal *Bifidobacteria*, the amount of butyrate, and β -fructosidase activity were increased, whereas total aerobes and pH were reduced in rats fed by levanheptaose diets, compared with those of control diets. We concluded that those effects may be beneficial in improving gastrointestinal health.

Key words: levanheptaose, *Bifidobacteria*, β -fructosidase, levanoligosaccharide

서 론

포유동물의 장내에는 각종 세균류가 공존하면서 숙주의 면역능력을 자극하거나 감염을 방어하고, 또 비타민을 합성하여 숙주에 공급함으로써 숙주의 노화방지 및 건강 유지에 기여한다고 알려져 있다. 이와 동시에 장내 부패를 일으키거나 독소, 발암물질 등을 생성해서 숙주의 노화 촉진 및 발암 등에 관여하여 유해하게 작용하는 종류도 존재한다(1). 이들 장내세균 중 특히 *Bifidobacteria*는 lactic acid와 acetic acid 등을 분비하여 유해균의 증식을 억제하고 발암억제 및 혈압강하 등에 기여하는 대표적인 균주로서, 이의 생육에는 fructooligosaccharide, inulin, 치커리 및 fructose 중합체 등이 중요한 growth factor로 작용한다는 것이 밝혀져 있다(2,3). Fructooligosaccharide 등의 식이섬유류는 포유동물의 장내에서는 소화되지 않고 *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* 등의 젖산균에 의해 선택적으로 대사되어 이들의 증식을 촉진하는 인자로서 작용한다고 알려져 있으며 특히 대사산물인 butyrate, acetate, lactate 등과 같은 SCFA (short chain fatty acid)는 장내 apoptosis를 증가시켜 암세포의 증식을 억제한다고

보고되고 있다(4,5).

일반적으로 올리고당은 자연계에 유리된 상태로 존재하는 것이 아니라 각종 천연다당류로부터 화학적 또는 효소적 작용으로 생성되는 물질이다. 그러므로 다당류의 종류에 따라 생성되는 올리고당의 종류도 달라질 수 있다. 자연계에 보편적으로 분포하는 다당류로는 동식물 유래의 starch, cellulose, chitin, xylan, inulin 등과 미생물 유래의 dextran, levan 등을 들 수 있으며 이들로부터 여러 종류의 올리고당이 효소적 혹은 화학적 방법으로 생산되고 있다. 이 중에서도 inulin과 levan은 fructose가 중합된 다당류로서 이들로부터 단일종의 올리고당을 생성하는 효소뿐만 아니라 여러 종류의 중합도(degree of polymerization, DP)를 가지는 올리고당을 생성하는 효소에 대해서도 연구가 활발히 진행되고 있다(6,7). 특히 그 중에서도 미생물에 의해 대량 생산 가능한 levan이 fructooligosaccharide 생산에 있어서 주목을 받고 있으며, 이들의 가수분해에 의해 생산되는 올리고당은 크게 DFAIV (di-D-fructose 2,6'-2',6 dianhydride)와 linear fructooligosaccharide로 나눌 수가 있는데, 대개의 경우에는 주 생성물 이외에 여러 종류의 중합도를 가진 올리고당들이 공존

[†]To whom all correspondence should be addressed

하여 생성되는 경우가 대부분이다. 이러한 기능성 올리고당에 대한 연구는 1980년대 이후에 급격히 발전하여 현재 두 종류의 방법에 의해 생성되고 있다. 즉, 미생물 유래 효소의 transglycosylation 반응을 이용하여 단당 또는 올리고당으로부터 기능성 올리고당을 합성하는 방법과, 미생물 유래의 가수분해 효소를 이용하여 다당류로부터 직접 유리시키는 방법이 있다. 전자의 경우, 이미 많은 연구가 수행되어 현재는 이 방법에 의해 합성된 올리고당이 산업적으로 활용되고 있는 실정에 있고, 최근에 와서는 천연 다당류로부터 식물 혹은 미생물 유래의 가수분해 효소를 이용하여 천연 다당류로부터 생성된 galactooligosaccharide, fructooligosaccharide, glucooligosaccharide, isomaltulose 등의 기능성 올리고당에 대한 연구가 주목을 받고 있다(6,8).

본 연구진은 비소화성 다당류인 levan으로부터 기능성 올리고당의 생성을 목적으로 levanheptaose와 levan-octaose만을 특이적으로 생성하는 levanase를 미생물로부터 분리 정제하여 그 생화학적인 특성을 이미 보고한 바 있다(9,10) 본 연구에서는 levan으로부터 levanase에 의해 생성되는 levanheptaose를 정제하여 각종 장내세균에 미치는 생육인자로서의 특성을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통해 밝힌 결과를 기술하고자 한다.

재료 및 방법

배지, 시약 및 기기

Levanase 생산을 위한 *Streptomyces* sp. 366L의 배양 배지로는 본 연구실에서 최적화한 배지를 사용하였는데 그 구성성분은 0.5% levan, 0.3% yeast extract, 0.3% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% NaCl(pH 8.0)이다 각종 장내 미생물의 배양배지로는 EG 액체배지를 사용하였으며 *Bifidobacteria*의 선택배지는 Beerens의 방법(11)에 따라 조제하였다. *In vivo* 실험에서 control 및 test diet의 구성성분은 modified AIN 76-A (Dyets Inc.) diet(3)에 준하여 조제하였다(Table 1).

Levanheptaose의 정성분석을 위한 TLC plate는 kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, USA)를 사용하였다. 정제확인을 위해서는 HPLC (Waters, USA)를 사용하였으며, 이때 Carbohydrate analysis (Waters, USA) column을, detector로는 Waters 410 Differential Refractometer를 사용하였다.

사용균주

Levanheptaose의 생육인자로서의 효과를 검토하기 위해서 사용한 대표적인 장내 미생물은 한국유전자은행(KCTC)과 미국중균협회(ATCC)에서 분양받았다. 이 중 *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3151, *Lactobacillus*

Table 1. Composition of control and test diet

Composition	Content (g/kg feed)	
	Control diet	Test diet
Casein	250	250
D,L-Methionine	3	3
L-Cystein	3	3
Dextrose	652	632
Soybean oil	50	50
Choline bitartrate	2	2
Vitamin mixture ¹⁾	10	10
Mineral mixture ²⁾	30	30
Levanheptaose	0	30

¹⁾Vitamin contribution to diet (mg/kg): thiamine, 5; riboflavin, 6; pyridoxine, 6; nicotinic acid, 30; pantothenate, 15; folic acid, 2; phylloquinone, 0.75; biotin, 0.2; cyanocobalamin, 0.025; all-trans-retinyl palmitate (500,000 IU/g), 8; all-rac- α -tocopheryl acetate (500 IU/g), 150; and cholecalciferol (400,000 IU/g), 2.5

²⁾Mineral contribution to diet (mg/kg): Ca, 5000; P, 1561; K, 3600; Na, 1019; Cl, 1571; S, 300; I, 0.2; Fe, 3.5; Mg, 507; Zn, 30; Cu, 6; Mn, 10; Mo, 0.15; Se, 0.15; Cr, 1; Si, 5; F, 1; Ni, 0.5; B, 0.5; Li, 0.1; and V, 0.1

acidophilus KCTC 3151, *Eubacterium limosum* ATCC 8481, *Bacteroid fragilis* ATCC 25285 등은 장내 유익균으로, *Clostridium perfringens* ATCC 25780, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Escherichia coli* KCTC 1039 등은 유해균으로 분류하여 취급하였다. Levan으로부터 levanheptaose를 생성하는 levanase 생산균주는 본 연구실에서 분리한 *Streptomyces* sp. 366L를 사용하였다.

Levanheptaose의 조제

Streptomyces sp. 366L 균주를 30°C 항온배양기에서 54시간 배양하여 그 상등액을 50~80% 황산암모늄으로 분획한후 DEAE-Toyopearl column chromatography하여 용출된 levanase 활성부분을 levanheptaose의 생산을 위한 조효소액으로 사용하였다(10) 효소반응은 조효소액(50 units/mL)을 1% levan용액에 첨가하여 40°C, 48시간 효소반응시킨 후 반응액에 ethanol을 첨가하여 고분자 물질을 침전시켜 제거하고 그 상등액을 감압농축하여 올리고당의 정제조작의 시료로 하였다. 감압농축물은 Sephadex G-10 column chromatography를 행하여 levanheptaose를 순수하게 정제하여 HPLC로 확인하였으며 실험에는 동결건조품을 사용하였다.

*In vitro*에서의 생리효과

각종 장내세균들은 modified EG broth에서 37°C, 10시간 전배양한 후 glucose 및 levanheptaose가 0.5%(w/v) 함유된 EG broth에 1% 접종하여 37°C, 24시간 배양하였다. *B. adolescentis* KCTC 3151, *L. acidophilus* KCTC 3151, *S. aureus* ATCC 12600, *E. coli* KCTC 1039는 정치배양하였고 *C. perfringens* ATCC 25780은 anaerobic jar를

이용한 혐기적 조건에 따라 배양하였다. 이때 배양시간의 경과에 따라 각 배양액을 일정량 취한 후 spectrophotometer를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 각 미생물의 생육도를 결정하였다.

*In vivo*에서의 생리효과

생후 5주된 쥐를 이용하여 일반적인 식이요법인 control diet와 levanheptaose가 탄소원의 일부로 함유된 test diet를 실시하면서 통풍이 잘 되는 실온에서 사육하였다. 이때 쥐를 이용한 *in vivo* 실험과정은 control diet를 먹이는 1주간의 preingestion period와 test diet를 실시하는 2주간의 ingestion period, 그리고 test diet를 중단하고 다시 control diet를 실시하는 1주간의 postingestion period로 나누어 수행하였다. 이때 각 기간의 fecal sample을 격일제로 채집하여 *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* 및 total aerobes의 균수를 측정하고 아울러 β -fructosidase, pH 및 butyrate의 변화에 대해서도 검토하였다.

Fecal analysis

각 기간별 격일제로 채집한 모든 분변시료를 실온에서 24시간 건조한 후 1 g을 균질화하여 식염수에 일정배수로 희석해서 분석시료로 사용하였다. 분변내에 존재하는 *Bifidobacteria*의 총균수는 paromomycin sulfate, neomycin sulfate를 함유하는 BS selective agar 평판배지에서 희석시료를 37°C, 48시간 배양한 후 CFU (colony forming unit)를 측정하여 결정하였다. *Lactobacillus*의 경우에는 CaCO₃을 포함하는 MRS 한천배지에 37°C, 24~36시간 배양한 후 clear zone을 나타내는 colony수를 계측하였다. 한편 총호기성 균수의 측정에는 EG agar 평판배지에서 37°C, 48시간 배양한 후 CFU로 계측하였다. 그리고 β -fructosidase 활성은 Somogyi-Nelson 방법(12)에 준하여 생성된 환원당의 양을 효소량(units)으로 환산하여 결정하였고, butyrate의 정성 및 정량분석은 gas chromatography (GC)를 이용하여 실시하였다. 이때 GC는 Hewlett-packard (Wilmington, DE) 5890A series II gas chromatography와 100 g/SP-1200/10 g/LH₃PO₄가 부착된 80/100 mesh chromosorb WAW, glass column을 사용하였다. 작동조건은 질소를 carrier gas로 사용하였고 flow rate는 75 mL/min이며 oven temperature는 125°C, detector temperature는 175°C, injector temperature는 180°C로 하였다.

결과 및 고찰

Levanheptaose의 분리 및 정제

Streptomyces sp. 366L 유래 levanase를 황산암모늄 침전 및 DEAE-Toyopearl column chromatography 등

의 여러 분리과정을 거쳐 정제하였다(9). 정제된 levanase를 1% levan과 37°C, 48시간 효소반응시킨 후 반응액을 ethanol 침전에 의한 고분자물질의 제거 및 Sephadex G-10 column chromatography 등을 수행하여 순수하게 levanheptaose만을 얻은 후 동결건조하여 이하의 실험에 사용하였다. 이때 단일 물질로 정제된 levanheptaose는 HPLC (high performance liquid chromatography)로 그 순도 및 DP를 확인하였다(Fig. 1)

장내세균에 대한 levanheptaose의 영향

일반적인 장내세균인 *B. adolescentis* KCTC 3151, *E. limosum* ATCC 8481, *L. acidophilus* KCTC 3151, *E. coli* KCTC 1039, *S. aureus* ATCC 12600, *C. perfringens* ATCC 25780에 대해 glucose 및 levanheptaose(0.5%)를 탄소원으로 했을 때 그 생육효과를 조사하였다(Table 2). 그 결과 *B. adolescentis* KCTC 3151, *E. limosum* ATCC 8481, *L. acidophilus* KCTC 3151의 경우에는 levanheptaose의 이용성이 좋아 glucose에 거의 필적하는 것으로 나타났다. 반면 *S. aureus* ATCC 12600, *E. coli* KCTC 1039의 경우에는 glucose에 비해 levanheptaose의 이용성이 다소 떨어짐을 알 수 있었다. *C. perfringens* ATCC 25780의 경우는 탄소원으로 levanheptaose를 전혀 이용하지 못함이 드러났다. 따라서 levanheptaose는 장내 유

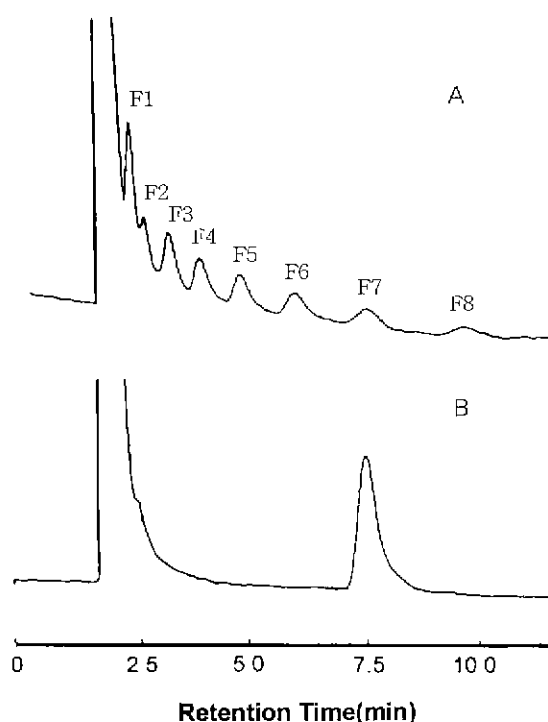


Fig. 1. HPLC profiles of levanoligosaccharide and its degree of polymerization. A, Standard levanoligosaccharides; B, Purified levanoligosaccharide

Table 2. Growth of selected species of intestinal bacteria on the purified levanheptaose (0.5%)

Microorganisms	Degree of growth (DG ¹⁾)	
	Glucose (0.5%)	Levanheptaose (0.5%)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> KCTC 3151	++	++
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC 3151	++	++
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 25780	++	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	++	+
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1039	++	+
<i>Eubacterium limosum</i> ATCC 8481	++	++

+++, DG ≥ 75; ++, 75 ≥ DG ≥ 50; +, 50 ≥ DG ≥ 25; -, DG < 25

$${}^1DG = \frac{OD \text{ for test sugar} - OD \text{ without the sugar}}{OD \text{ for glucose} - OD \text{ without the sugar}} \times 100$$

OD: Optical density at 600 nm (Maximum values of optical density during 2 days cultivation were taken as OD)

익균주인 *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Eubacterium* 등에 있어서만 선택적으로 생육인자로 작용하고 *C. perfringens*, *S. aureus*, *E. coli* 등과 같은 감염세균에 대해서는 탄소원으로 이용성이 낮거나 이용되지 못하는 결과로 나타나, 이들 올리고당이 장내 유익한 균총의 생육을 촉진하여 장의 환경개선에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

Levanheptaose 농도의 영향

Bifidobacteria, *Lactobacillus*의 생장에 필요한 최적 levanheptaose의 농도를 파악하기 위해 각각 0~0.05 g/mL levanheptaose를 탄소원으로 하여 37°C, 24시간 정치 배양한 후 spectrophotometer에 의해 균체량을 측정하였다. 그 결과 *Bifidobacteria*와 *Lactobacillus*에 거의 유사하게 0.01 g/mL levanheptaose에서 가장 효율적인 성장양상을 보였고 그 이상의 농도에서는 오히려 생장이 약간 감소하는 결과를 나타냈다(Fig. 2). 이는 levanheptaose가 세균에 대해 미약한 삼투압 효과를 가져 그 생육을 간접적으로 저해하기 때문인 것으로 추정된다.

젖산균의 생육에 미치는 levanheptaose의 영향

Levanheptaose를 탄소원(0.01 g/mL)으로 하였을 때 *B. adolescentis* 및 *L. acidophilus* 등의 젖산균의 생육에 미치는 영향을 glucose의 경우와 비교하여 검토하였다. *B. adolescentis* 및 *L. acidophilus*를 50시간 동안 배양하면서 5시간마다 그 균체량을 측정하여 생육양상을 조사하였다. 그 결과 Fig. 3에 나타낸 바와 같이, *B. adolescentis*의 경우에는 glucose와 levanheptaose를 탄소원으로 하였을 때 그 종류에 관계없이 거의 동일한 생육양상을 나타내어 levanheptaose도 탄소원으로서 우수함을 보여 주

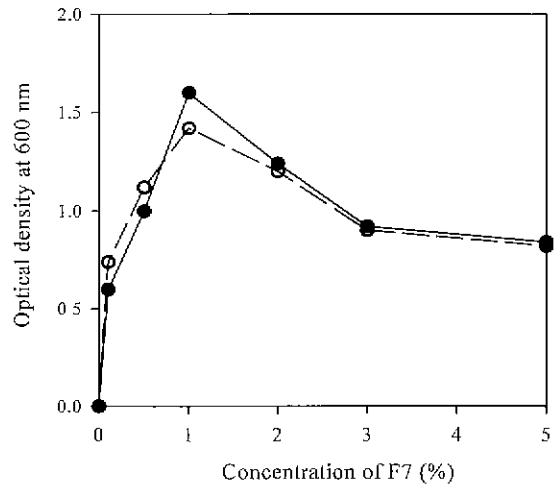


Fig. 2. Effect of levanheptaose (F7) concentration on the growth of *B. adolescentis* and *L. acidophilus*.

●, *B. adolescentis*; ○, *L. acidophilus*

었다(Fig. 3A). 그러나, *L. acidophilus*의 경우에는 glucose와 levanheptaose가 다같이 탄소원으로서 이용되는 양상을 나타내나 탄소원으로서의 이용효율은 glucose에 비해 다소 낮은 결과를 보여주었다(Fig. 3B). 따라서 탄소원으로서의 levanheptaose의 이용성이 *L. acidophilus*에 비해 *B. adolescentis*에서 높게 나타남을 알 수 있었다.

Rat을 이용한 in vivo에서의 생리효과

Levanheptaose를 실험동물에 식이로 투여했을 경우 장내 젖산균의 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 생후 5주 연령의 쥐를 이용하여 levanheptaose를 탄소원으로 일부 포함하는 test diet와 levanheptaose를 포함하지 않고 glucose만을 포함하는 control diet를 식이로 제공한 후, 장내 *Bifidobacteria*와 *Lactobacillus* 및 total aerobes수를 비교해서 levanheptaose의 장내 유익세균들에 대한 생육효과를 조사하였다. 이와 아울러 pH 변화, SCFA (short chain fatty acid)의 일종인 butyrate 함량의 변화 및 β -fructosidase양을 측정하여 장내환경의 변화도 아울러 검토했다. 그 결과 *Bifidobacteria*는 levanheptaose diet를 실시한 후 약 10배 가량 균수가 증가하였고 *Lactobacillus*의 경우는 약간 증가하는데 그쳤다(Fig. 4) 이와 함께 *Bifidobacteria*가 levanheptaose를 가수분해하여 유리되는 fructose를 대사하는데 관여하는 β -fructosidase양을 측정된 결과 control diet (8.4 IU/g)에 비해 levanheptaose diet (11.7 IU/g)의 경우에서 상당량이 증가하는 양상을 보였다. 한편 분변의 pH는 약간의 산성화 현상을 나타내었고, butyrate양이 control diet에서보다 상당량 증가하는 것으로 나타나 유기산의 생성이 분변의 pH를 저하시킴을 알 수 있었다(Table 3). 이러한 연구결과는 장내에서 levanheptaose가 *Bifidobacteria* 및 *Lactobacillus*의 생

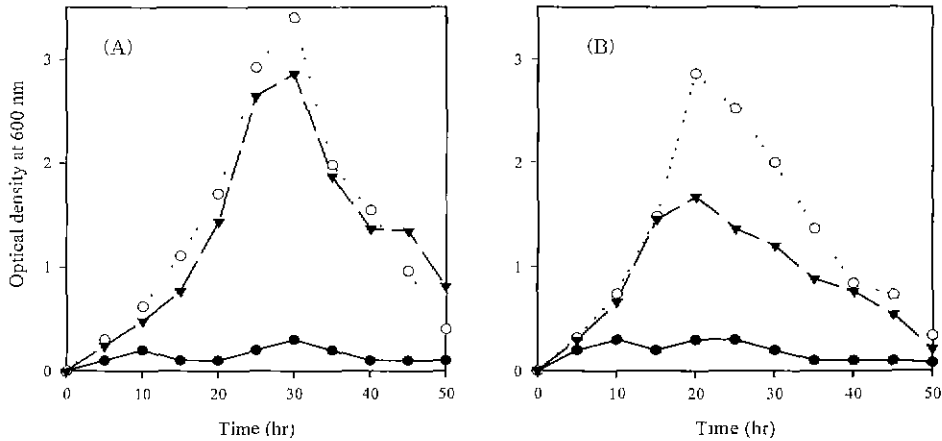


Fig. 3. Growth curve of *B. adolescentis* (A) and *L. acidophilus* (B) on EG broth medium containing levanheptaose (F7) or glucose as a carbon source.
 O, Glucose; ▲, Levanheptaose; ●, None.

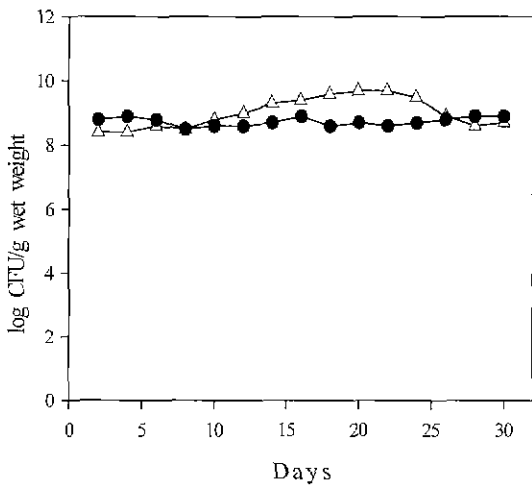


Fig. 4. Ingestion effect of levanheptaose (F7) and control diet on *Bifidobacteria* counts in total fecal.
 △, Levanheptaose; ●, Control.

육을 선택적으로 촉진하는 growth factor로서의 역할을

가진다는 결과와 일치된다(2,3). 최근에 장내 유해세균이 인체의 발암성 질병과 밀접한 관계를 가진다는 사실이 밝혀짐에(2,13) 따라 이들 각종 올리고당이 이런 유해균주의 생육을 억제한다고 하는 사실이 인정되어 앞으로 이 분야의 연구가 더욱 각광받을 것으로 기대된다.

요 약

Streptomyces sp. 366L로부터 분리되는 levanase의 반응생성물인 levanheptaose의 각종 장내 미생물들에 대한 생육인자로서의 영향을 조사하였다. Levanase를 부분 정제하여 기질과 반응시킨 뒤 반응산물을 ethanol 침전법에 의해 고분자물질들 제거하고 Sephadex G-10 column chromatography를 거쳐 levanheptaose를 정제하여 탄소원으로 사용하였다. *In vitro* 실험에서 0.5% levanheptaose를 탄소원으로 하여 glucose와 비교 분석한 결과, levanheptaose가 *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Eubacterium limosum*의 생육에 효율적으로

Table 3. Bacterial counts, β -fructosidase activity, and SCFA in fecal contents before, during, and after levanheptaose or control diets

Item	Treatment					
	Control			F7		
	Basal	Ingestion	Postingestion	Basal	Ingestion	Postingestion
Food intake (g/day)	11.7	13.3	12.7	12.7	14.2	12.8
Feces weight (g/day)	2.5	2.6	3.3	3.3	4.0	3.5
pH of feces samples	6.7	6.9	6.9	6.5	5.9	6.6
Microbiota (\log_{10} CFU/g)						
<i>Bifidobacteria</i>	8.8	8.9	8.8	8.5	9.7	8.7
<i>Lactobacillus</i>	7.4	7.3	7.4	7.3	7.4	7.5
Total aerobes	8.6	8.8	8.8	8.7	8.4	8.2
β -Fructosidase activity (IU/g wet weight)	8.3	8.4	8.4	8.6	11.7	9.3
SCFA butyrate (mmol/L)	1.5	1.5	1.4	2.1	3.9	3.7

이용됨을 알 수 있었다. 반면 *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* 등과 같은 유해한 균에는 levanheptaose의 이용효율이 낮게 나타났다 쥐를 이용한 *in vivo* 실험에서는 levanheptaose를 탄소원으로 하였을 때 장내 *Bifidobacteria*의 수와 butyrate의 양 및 β -fructosidase의 활성은 현저하게 증가하여 생육촉진효과가 우수함을 보여주었다

감사의 글

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 연구비에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota-Introducing the concept of probiotics *J. Nutr.*, **125**, 1401-1412 (1995)
- Bouhnik, Y., Flouri, B., Riottot, M., Bisetti, N., Gailing, M.F., Guibert, A., Bornet, F. and Rambaud, J.C. : Effects of fructooligosaccharides ingestion on fecal bifidobacteria and selected metabolic indexes of colon carcinogenesis in healthy humans. *Nutr. Cancer*, **26**, 21-29 (1996)
- Campbell, J.M., Fahey, G.C. and Wolf, B.W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short chain fatty acids pH and microflora in rats. *J. Nutr.*, **127**, 130-136 (1997)
- Calazans, G.M.T., Lopes, C.E., Lima, R.M.O.C. and De-franca, F.P. : Antitumor activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains *Biotechnol. Letters*, **19**, 19-21 (1997)
- Reddy, B.S. and Rivenson, A. : Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* on colon, mammary and liver carcinogenesis induced by 2-Amino-3-methylimidazo (4,5-F) quonoline, a food mutagen *Cancer Research*, **53**, 3914-3918 (1993)
- Cheng, C.Y., Duan, K.J., Sheu, D.C., Lin, C.T. and Li, S.Y. : Production of fructooligosaccharides by immobilized mycelium of *Aspergillus japonicus*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **66**, 135-138 (1996)
- Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N. : A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181-1187 (1998)
- Roberfroid, M., Gibson, G. and Delzanne, N. : The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber : An approach to calculate its caloric value *Nutr. Rev.*, **51**, 137-146 (1993)
- Kang, S.K., Lim, Y.S. and Lee, T.H. : Purification and characterization of a novel levanose-producing levanase from *Pseudomonas* strain K-52 *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **27**, 159-166 (1998)
- Lim, Y.S., Kang, S.K., Lee, S.O. and Lee, T.H. : Purification and characterization of a levanase from *Streptomyces* sp. 366L *J. Biotechnol.*, **61**, 33-41 (1998)
- Beerens, H. An elective and selective medium for *Bifidobacterium* sp. *Lett. Appl. Microbiol.*, **11**, 155-1578 (1990)
- Somogyi, M. : Notes on sugar determination *J. Biol. Chem.*, **195**, 19-23 (1952)
- Taper, H.S., Delzenne, N.M. and Roberford, M.B. : Growth inhibition of transplantable mouse tumors by non-digestible carbohydrates *Int. J. Cancer*, **71**, 1109-1112 (1997)

(1999년 7월 16일 접수)