

반응표면분석에 의한 *Bacillus cereus* IAM 1072의 말토올리고당 생산 및 특성

이명열[†] · 강태수*

충주산업대학교 식품공학과

*강원도 농촌진흥원

Production and Property of Maltooligosaccharide by *Bacillus cereus* IAM 1072 with Response Surface Methodology

Myong-Yul Lee[†] and Tae-Su Kang*

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

*Kangwon Provincial Rural Development Administration, Chuncheon 200-150, Korea

Abstract

This study was carried out to produce the maltooligosaccharides directly from the culture medium containing high concentration of soluble starch as carbohydrate source by *Bacillus cereus* IAM 1072. Optimum conditions for the production of maltopentaose and maltooligosaccharides were predicted as 10.62 and 10.92 in C/N ratio, 115.74 and 116.51 rpm in agitation speed, 30.19 and 30.90°C, respectively. And at these conditions, products of maltopentaose and maltooligosaccharides were 23.23 and 50.33g/L, respectively. From the results of continuous culture for maltopentaose, the productivity increased up to 6.9 times, showing 6.6g/L/hr compared with 0.96g/L/hr batch culture. Maltopentaose showed lower sweetness at 3% concentration representing 1/5 of that sugar. Also, swelling power of maltooligosaccharides was reached to the same point with sugar after fermentation.

Key words: continuous production and property of maltooligosaccharides, response surface analysis

서 론

식품공업의 주당질인 설탕은 과잉섭취시 비만, 충치, 당뇨병 등의 원인이 되어 대체당질의 필요성이 높아지고 있다. 이를 보완하기 위한 측면에서 전분 분해 효소에 의해 glucose가 2~10개 결합한(1) 말토올리고당의 연구가 활발히 진행중이다. 이들 말토올리고당의 용도는 body감을 필요로 하는 아이스크림, 제과, 제빵의 감미료, 고농도의 알콜올에 용해시켰을 경우 백색침전을 형성하지 않는 불성(2)을 가지고 있어 이를 이용한 기호성 알코올 음료 및 식품첨가물 소재로써 널리 이용될 전망이다. 1971년 Robyt와 Ackerman(3)이 전분에 작용하여 특이적으로 maltotetraose를 생성하는 미생물 기원의 효소를 발견한 이후 각종의 고순도 말토올리고당이 생산되고 있으나 glucose가 4개 결합된 maltotetraose가 주로 생산되고 있다. 지금까지 maltotriose

를 생성하는 *Streptomyces griseus*(4), *Bacillus subtilis* (5)의 amylase가 있고, maltotetraose를 생성하는 효소로는 *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas saccharophila*(6), *Bacillus circulans*(7)의 amylase, maltopentaose를 생성하는 효소로는 *Bacillus licheniformis*(8, 9), *Bacillus cereus*(10,11), *Pseudomonas* sp.(12), 유래의 amylase 등이 알려져 있다. 그러나 아직까지 각각의 말토올리고당에 대한 용도가 다 밝혀지지 않았고 미분해 dextrin을 포함한 여러 말토올리고당을 식품소재로 한 결과가 거의 없는 실정이므로 미생물의 당대사를 이용하여 배양액 중에서 각각의 말토올리고당을 함유하는 연속배양의 연구 필요성이 높다. 따라서 본 연구에서는 전보 *Bacillus cereus* IAM 1072(13)에 의거해 배양액으로부터 직접 말토올리고당을 생산하기 위하여 반응표면분석에 의한 말토올리고당 생산의 최적화와 연속생산에 의한 대량생산 조건 및 그 특성을 검

*To whom all correspondence should be addressed

한편, 정상점(stationary point)은 2차 회귀식에 의해 산출한 상수값(BE)으로부터 반응식을 얻은 후 이식을 미분하여 산출하였고, 이때 독립변수와 종속변수의 상관관계는 분산분석으로 검정하였다.

말토올리고당의 이화학적 특성

감미도

설탕과 maltoooligosaccharides의 농도를 각각 3% 용액으로 조제하여 폐널요원에게 두개의 검사물을 제시하고 단맛 특성에 대해 어떤 검사물의 강도가 더 큰지를 선택하도록 하는 이점검사(16)에 의해 설탕을 기준으로 maltoooligosaccharides의 상대당도를 결정하였다.

결과분석은 전체 응답수에 대한 응답수 확률에 의해 Roessler의 통계표를 이용하여 χ^2 검정을 하였다.

발효팽창력

Table 2의 배합비에 의해 배합기로 제빵원료를 혼합, 반죽하였다. 이 반죽을 100g 취하여 팽창관에 넣고 일정 시간마다 발효팽창력을 상법(17,18)에 따라 조사하였다. 이때 발효조건은 27~29°C, 습도가 75~80% 이었다.

분석

전문의 정량(19)

배양액 5ml와 0.05 N-H₂SO₄ 2ml를 넣고 100°C로 유지한 수조에서 30분간 증탕한 후 신속히 100ml 삼각 flask에 넣었다. 여기에 냉각한 종류수 20ml를 첨가하여 20°C에서 25분 방치한 후 KI-I₂ 용액 0.2ml를 넣고 교반하였다. 30분 후에 520nm에서의 흡광도를 측정하고 표준곡선으로부터 전분량을 구하였다.

당의 분석

배양액 중의 전당은 phenol-sulfuric acid법(20), 배양액 중에 생성된 maltooligosaccharides의 양은 HPLC로 정량하였며 분석조건은 전보(13)와 같다.

생성된 maltooligosaccharides의 수율은 다음 식(7)로 구하였다.

Table 2. Conditions of swelling power

Material	Concentration(%)
Wheat flour	70
Yeast	2
Y. Food # 11 ¹⁾	0.1
Sugar or maltooligosaccharides	3
Water	41

¹⁾ NH₄Cl 25.6%, CaSO₄ 10.4%, Amylase 1.2%, Starch 62.8%

A: 생성된 maltooligosaccharides의 양

B: 배양 후 전당의 양

결과 및 고찰

말토올리고당 생성의 경시변화

최적배지 조성을 12% soluble starch, 1.5% peptone, 0.25% K₂HPO₄로 하여 30°C에서 42시간 진탕배양하여 균체생육 및 maltooligosaccharides의 생성 경시변화를 검토한 결과는 Fig. 1과 같다.

본 연구는 배양개시 18시간부터 정상기에 도달하였으며, maltopentaose를 제외한 다른 maltooligosaccharides 생성은 생육 정상기 초기에 최대이었고, 이후부터는 생육곡선과 일치하는 경향을 보였다. Maltopentaose는 24시간 배양하였을 때 생성량이 대당수율 28.8%로 최대값에 도달하였다. 이 외에 maltotriose와 mal-

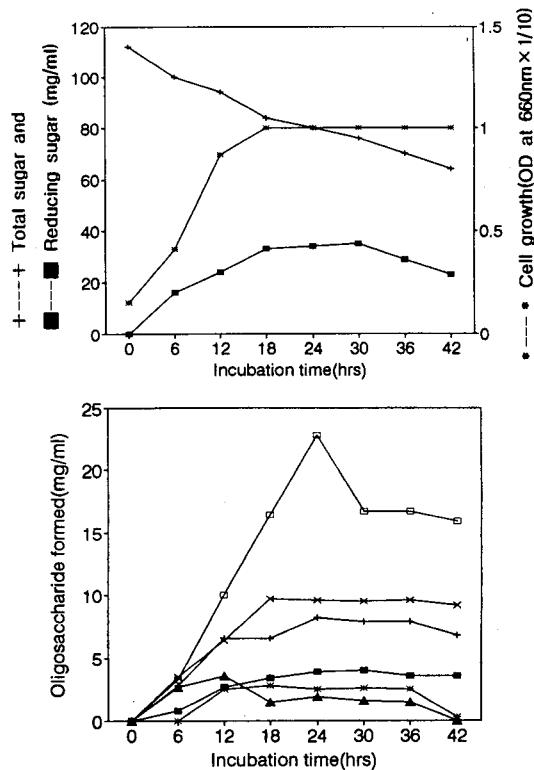


Fig. 1. Time course of maltooligosaccharides production

by optimum medium.

topentaose의 생성량도 대당수율로 각각 10.1% 및 11.9%의 생성량을 보였다. 그러므로 본 균주에 의하여 배양액으로부터 직접 생성되는 maltooligosaccharides는 현재 생산되고 있는 맥아 물엿이나 효소당화 물엿의 glucose가 3~10%, maltose가 45~55%, 기타의 당이 45~55%(21-23)인 당조성을 갖는 것과 비교하면 G₃이상의 maltooligosaccharides가 약 56%, 기타의 당이 약 44%로 기존의 효소당화 물엿 등과는 달리 식품의 기능성 측면에서 저감미, 보수성, 보습성 및 전분의 노화방지에 효과가 높은 maltooligosaccharides의 함유율이 매우 높음을 알 수 있었다. 아울러 이러한 결과는 *Pseudomonas sp.* KO-8940의 maltopentaose 생성 amylase가 여러 pH에서 10% 가용성 전분을 기질로 45°C에서 8시간 반응시켜 생성한 maltooligosaccharides 조성을 검토한 高橋 등(12)의 결과와 비교할 때, 본 균주에 의한 maltooligosaccharides 및 maltopentaose 생성은 *Pseudomonas sp.* KO-8940(24)보다 우수하였다.

한편, maltotetraose는 *Bifidobacterium* 등과 같은 장내 유용균의 증식효과 뿐만 아니라 장내 부패균인 *Clostridium perfringens*의 생육을 특이적으로 억제하고(25), 식물병원균의 일종인 *Erwinia carotovora*의 생육억제 작용을 가진다(26,27). 또 maltopentaose는 병자, 고령자, 유아의 자양식으로서 이용이 검토되고 있으며, 특히 신장병환자의 칼로리원으로의 이용에도 효과가 있음이 보고되고 있다(28). 따라서 maltotriose 이상의 종합도를 갖는 maltooligosaccharides를 많이 함유하는 본 실험 결과는 앞으로 기능성 식품소재로서의 사용 가능성

이 매우 높은 것으로 판단하였다.

반응표면분석에 의한 말토올리고당 생산의 최적화

Maltooligosaccharides 생산의 최적화를 위하여 maltooligosaccharides 생산의 중요한 변수인 C/N비, 교반 속도(rpm) 및 온도를 독립변수로, 그리고 maltooligosaccharides 및 maltopentaose 생산량을 종속변수로 하여 maltooligosaccharides 생산의 최적값을 반응표면분석법에 의하여 조사하였으며, 그 결과를 Table 3~5 및 Fig. 2~7에 나타내었다.

Table 3의 입력 자료인 총 maltooligosaccharides 및 maltopentaose 생산량의 각 실험값[Y(1)] 및 [Y(2)]으로부터 최소자승법에 의하여 이들의 추정값 [YE(1)] 및 [YE(2)]을 각각 구하고 [Y(1)], [Y(2)]와 [YE(1)], [YE(2)]의 잔차를 산출한 결과이다.

독립변수의 입력자료와 Table 4의 추정값을 이용하여 다중회귀분석을 행한 결과는 Table 5와 같다. 정상점의 C/N 비는 10.92와 10.60, 교반속도는 116.51와 115.74 rpm, 그리고 온도는 30.90°C와 30.19°C이었으며, 이때 추정값은 50.33g/L 및 23.23g/L이었다. 이를 회귀식으로 나타내면 각각 다음과 같다.

$$\begin{aligned} Y_{t.o} = & 48.593 + 2.831X_1 + 7.419X_2 + 1.256X_3 - 7.927X_1^2 \\ & + 10563X_1X_2 - 10237X_1X_3 - 6.114X_2^2 + 10662X_2X_3 - 5.727X_3^2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Y_{g(2)} = & 22.286 + 0.080X_1 + 3.520X_2 + 1.345X_3 - 2.446X_1^2 \\ & + 10165X_1X_2 - 1.935X_1X_3 - 2.891X_2^2 - 10365X_2X_3 - 2.516X_3^2 \end{aligned}$$

Table 3. Least-square estimation of response and error table

No	Y ₁ ¹⁾	Y ₁ ²⁾	Y ₁ -Expected	Y ₂ -Expected	Error ₁	Error ₂
1	22.0	10.2	19.31	7.33	2.6929	2.8670
2	22.6	7.38	24.32	9.03	-1.7196	-1.6530
3	35.0	17.4	27.69	14.77	7.3054	2.6270
4	14.9	18.4	20.97	16.62	-6.0696	1.7770
5	45.4	19.2	38.96	21.13	6.4429	-1.9330
6	14.1	7.8	21.03	10.58	-6.9321	-2.7830
7	38.1	20.1	36.01	18.60	2.0929	1.4970
8	40.0	14.2	42.32	17.22	-2.3196	-3.0230
9	25.0	17.2	22.55	12.58	2.4508	4.6180
10	8.4	7.8	11.22	12.26	-2.8242	-4.4620
11	32.4	18.1	38.97	17.76	-6.5742	0.3380
12	15.5	3.5	9.30	3.68	6.2008	-0.1820
13	35.0	16.1	28.20	14.91	6.8008	1.1880
14	16.0	8.5	23.17	9.53	-7.1742	-1.0320
15	48.0	22.3	48.59	22.29	-0.5933	0.0140
16	48.7	22.4	48.59	22.29	0.1067	0.1140
17	48.5	22.5	48.59	22.29	-0.0933	0.2140
18	48.8	22.1	48.59	22.29	0.2607	-0.1860

¹⁾Maltooligosaccharides, ²⁾Maltopentaose

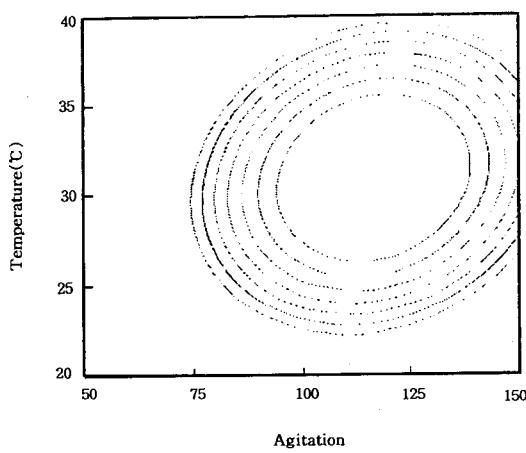


Fig. 2. Contour plot of agitation speed versus temperature at different maltooligosaccharides concentrations(g/L).

Con M=8

Y01=48.59 Y02=46.57 Y03=44.57 Y04=42.52
Y05=40.49 Y06=38.47 Y07=36.45 Y08=34.42

한편 Table 5는 종속변수와 독립변수들의 다중상관계수와 잔차를 요인으로 하여 이식의 종속변수 변량에 대한 독립변수의 영향을 검토한 분산분석의 결과이다. 다중상관계수(REGRE)의 제곱합은 2912.96과 561.95^o였고 잔차(RESI)의 제곱합은 393.53 및 87.83이었다. 또

유의수준을 검정하는 F-값도 양호한 값(6.58, 5.69; p>0.99)을 나타내어 종속변수와 독립변수의 상관관계가 뛰어난 것으로 나타났으며, 따라서 위에서 얻은 2차 회귀식의 각 변수들 사이에는 유의성이 매우 높음을 알 수 있었다.

또한 각 요인들 사이의 interaction이 총 maltooligosaccharides와 maltopentaose 생산에 미치는 영향을 검토한 결과에서는 Fig. 3~6에서 보는 바와 같이 C/N비의 경우는 실험계획에서 설정한 중앙값인 10:1.5보다 약간 위에서 최고의 생산을 나타내었고, 교반속도와

Table 5. Analysis of variance table for the maltooligosaccharides(A) and maltopentaose(B) production

(A)

Factor	Square Sum	Deg. Free.	Square Mean	F _o
Regression	2912.96	9	323.662	6.58**
Error	393.53	8	49.191	
Total	3306.49	17		

(B)

Factor	Square Sum	Deg. Free.	Square Mean	F _o
Regression	561.95	9	62.439	5.69**
Error	87.83	8	10.978	
Total	649.77	17		

Table 4. Values of regression coefficients calculated for the maltooligosaccharides(A) and maltopentaose(B) production

(A)

Regression	Coeff.	Std. err.	T-value	Stationary points
Beta0	48.593	3.388	14.343**	
Beta1	2.831	1.753	1.615	Xo1 0.230 10.92
Beta2	7.419	1.753	4.231**	Xo2 0.661 116.51
Beta3	1.256	1.753	0.716	Xo3 0.181 30.90
Beta11	-7.927	1.502	-5.279	
Beta12	1.563	2.480	0.630	
Beta13	-1.237	2.480	-0.499	
Beta22	-6.114	1.502	-4.072	
Beta23	1.662	2.480	0.670	
Beta33	-5.727	1.502	-3.814	

Expected Y value=50.33

(B)

Regression	Coeff.	Std. err.	T-value	Stationary points
Beta0	22.286	1.600	13.924**	
Beta1	0.080	0.828	0.097	Xo1 0.150 10.60
Beta2	3.520	0.828	4.250**	Xo2 0.630 115.74
Beta3	1.345	0.828	1.624	Xo3 0.039 30.19
Beta11	-2.466	0.709	-3.476	
Beta12	1.165	1.171	0.995	
Beta13	-1.935	1.171	-1.652	
Beta22	-2.891	0.709	-4.076	
Beta23	-1.365	1.171	-1.165	
Beta33	-2.516	0.709	-3.547	

Expected Y value=23.23

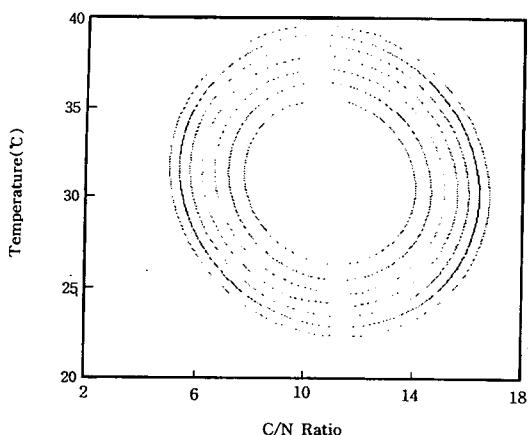


Fig. 3. Contour plot of C/N ratio versus temperature at different maltooligosaccharides concentrations (g/L).

Con M=8

Y01=48.59 Y02=46.57 Y03=44.54 Y04=42.52
Y05=40.49 Y06=38.42 Y07=36.45 Y08=34.42

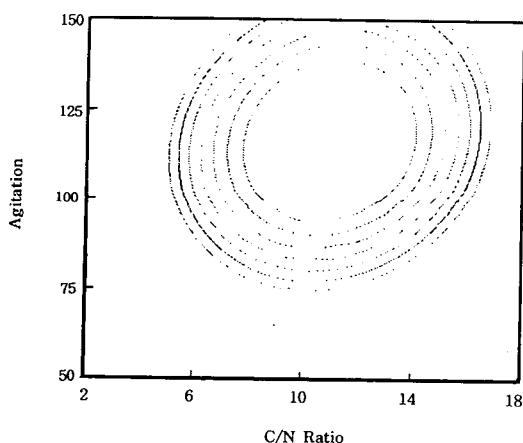


Fig. 4. Counter plot of C/N Ratio versus agitation speed at different maltooligosaccharides concentrations(g/L).

Con M=8

Y01=48.59 Y02=46.57 Y03=44.54 Y04=42.52
Y05=40.49 Y06=38.47 Y07=36.45 Y08=34.42

온도도 중앙값인 100rpm 및 30°C보다 약간 위에서 최대 생산을 보였다.

따라서 총 maltooligosaccharides 및 maltopentaose 생산은 C/N비와 교반속도의 상호작용에 큰 영향을 받았으며, 온도도 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다.

연속배양

Maltooligosaccharides를 대량으로 생산하여 maltopentaose를 다양 분리하기 위한 최적 배지 및 회분배양 조건을 이용하여 연속배양을 행한 결과는 다음과 같다.

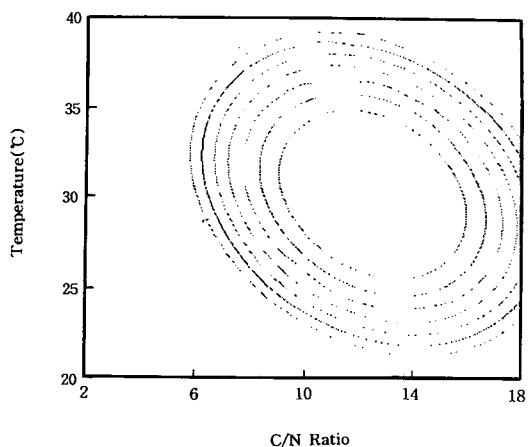


Fig. 5. Contour plot of C/N ratio versus temperature at different maltopentaose concentrations(g/L).

Con M=8

Y01=22.29 Y02=21.36 Y03=20.43 Y04=19.50
Y05=18.57 Y06=17.64 Y07=16.71 Y08=15.79

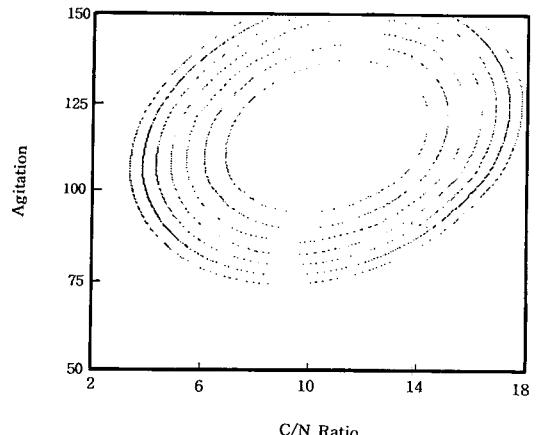


Fig. 6. Contour plot of C/N ratio versus agitation speed at different maltopentaose concentrations(g/L).

Con M=8

Y01=22.29 Y02=21.36 Y03=20.43 Y04=19.50
Y05=18.57 Y06=17.64 Y07=16.71 Y08=15.79

회석율

회석율의 변화에 따른 균체량, 잔존당, maltopentaose의 생성량, maltopentaose의 생산성은 Fig. 8과 같이 회석율이 증가함에 따라 maltopentaose의 생성량은 감소하는 경향이었으며, 0.35 h^{-1} 에서는 wash out이 일어났다. 회석율 0.25 h^{-1} 에서 maltopentaose의 생산성은 1.1 g/L/hr 로 최대를 나타내었으며, 이때 잔존당은 21.6 g/L 로 가장 적었고 균체의 증식은 가장 좋았다.

교반속도

회석율을 0.25 h^{-1} 로 고정하고 교반속도를 100~600

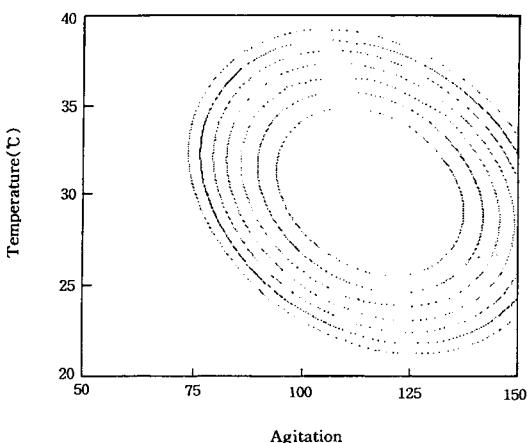


Fig. 7. Counter plot of agitation speed versus temperature at different maltopentaose concentrations (g/L).

Con M=8
 Y01=22.29 Y02=21.36 Y03=20.43 Y04=19.50
 Y05=18.57 Y06=17.64 Y07=16.71 Y08=15.79

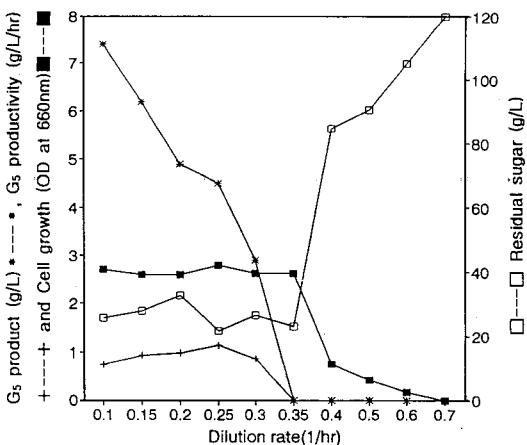


Fig. 8. Continuous culture for the maltopentaose production at various dilution rates.

■: Cell growth +: Maltpentaose productivity □: Residual sugar *: Maltpentaose product

rpm으로 조절하여 maltopentaose 생성량 및 균체량을 검토한 결과는 Fig. 9와 같다. 교반속도가 증가하면서 maltopentaose 생성량은 증가하여 교반속도 400rpm에서 3.8g/L/hr의 생산성을 보였으며, 균체량도 660nm에서 0.7이 증가하였다. 이 결과로 볼 때 본 균은 maltopentaose 생성에 비교적 높은 산소의 공급이 필요함을 알 수 있었다.

통기속도

회식율 0.25 h^{-1} , 교반속도 400rpm으로 고정하고 통

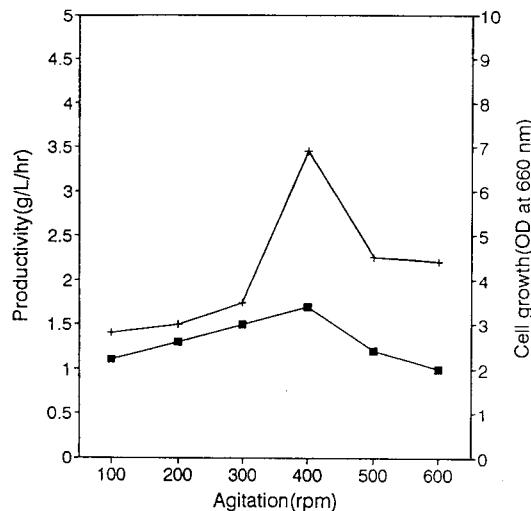


Fig. 9. Results of continuos culture for the maltopentaose production at various agitation speed.

■: Cell growth, +: Maltpentaose productivity

기속도를 0.5~7vvm으로 조절하여 maltopentaose의 생산성을 검토한 결과는 Fig. 10과 같다.

통기속도가 증가하면서 maltopentaose의 생산은 증가하여 5vvm에서 maltopentaose의 생산성 6.6g/L/hr로 회분배양의 0.96g/L/hr보다 약 6.9배의 증가를 보였으며, 이 조건에서 생성수율 Y_p/s 는 5.5%이었다. 그러므로 작업용량 1L의 연속배양조에서 이 조건으로 회분 배양과 같이 3~4일 배양할 경우는 118.75~158.25g/L의 maltopentaose를 얻을 수 있다.

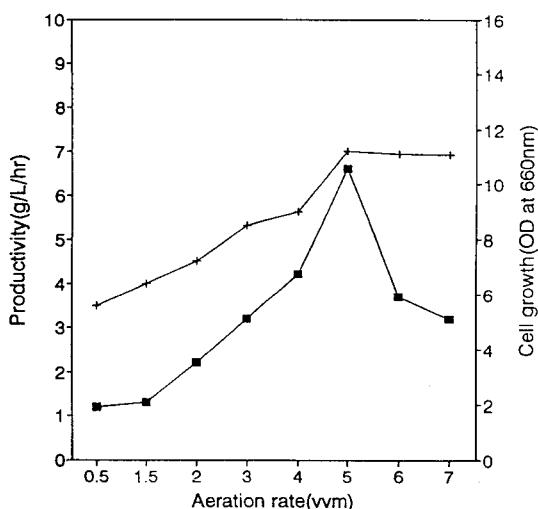


Fig. 10. Continuous culture for the maltopentaose production at various aeration rates.

■: Cell growth, +: Maltpentaose productivity

이는 maltopentaose 생산에 있어 연속배양의 유효성을 입증해 주는 결과로서 장시간에 걸쳐 생산할 때, 연속배양에 의하여 maltopentaose의 대량생산이 가능함을 보여주는 사실이다.

최근, Hasal 등(28)은 whole yeast cell을 biocatalyst로 고정화하여 sucrose의 연속 가수분해를 보고하였고, Yun 등(29)도 *Aureobasidium pullulan*의 whole cell을 이용하여 maltose로부터의 panose의 생성에 대하여 보고하였다.

말토올리고당의 성질

감미도

이점검사에 의하여 3% maltooligosaccharides의 감미도를 측정한 결과는 설탕의 감미도를 100으로 할 경우, 약 23정도의 저감미를 나타내었다. 이는 시판되고 있는 maltotetraose제품의 경우 감미도가 약 20~21정도로 maltose의 약 1/2, 설탕의 1/5의 저감미를 갖는다는岡田(30)의 보고와 잘 일치한다. 이러한 저감미도는 과자류의 감미 저하와 더불어 감미를 부여하지 않고 품질을 개선하는데 효과가 있으므로, 본 maltooligosaccharides도 저감미도의 식품용 당질로 사용될 수 있을 것으로 추측된다.

발효팽창력

원료의 배합을 3% 설탕과 3% maltooligosaccharides로 각각 배합한 후 4시간 동안의 발효 팽창력과 pH 변화를 측정한 결과는 Fig. 11과 같이 발효 초기부터

발효속도는 직선적으로 증가를 보이다가 2시간 30분부터는 완만한 증가를 보여 발효완료 4시간에 두 당의 첨가에 의한 비용적은 거의 같은 결과를 보이고 있다. 또한 pH의 변화도 maltooligosaccharides 첨가구가 약간은 높지만 이는 maltooligosaccharides에 limit dextrin이 함유되어 있기 때문인 것으로 추측된다. 상기의 결과로 볼 때 본 maltooligosaccharides도 빵에 첨가할 때 기능성 식품소재로서의 이용 가능성이 있을 것으로 추측된다.

요약

고농도의 탄소원을 함유한 배지에 균을 접종하여 직접 말토올리고당을 생산하기 위해 회분 및 연속배양조건을 검토하고, 최적화하였다. 반응표면분석에 의한 maltopentaose 및 maltooligosaccharides 생산의 최적화를 행한 결과, C/N비는 10.66 및 10.92, 교반속도는 115.74 및 116.5rpm 그리고 온도는 30.19 및 30.90°C의 정상점에서 최대의 생산을 보였으며, 이때 maltopentaose 및 maltooligosaccharides 생산량은 각각 23.23g/L 및 50.33g/L이었다. 연속배양시 생산된 말토올리고당 중 maltopentaose의 생산성이 6.6g/L/h로 회분배양의 0.96g/L/h와 비교하여 약 6.9배의 증가를 보였다. 말토올리고당의 감미도는 설탕의 약 1/5의 저감미를 나타내었고 밀가루로 행한 발효 팽창력 값은 발효 종료시 설탕과 비슷한 값에 도달하였다.

문헌

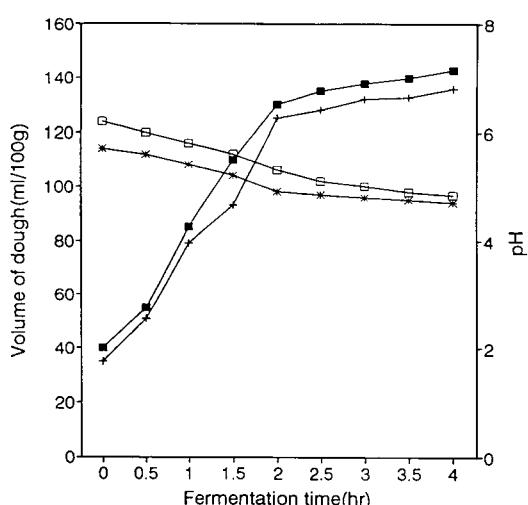


Fig. 11. Change of volume and pH during fermentation using sugar and maltooligosaccharides.
Volume; ■: + : Maltooligosaccharides
pH; □: * : Maltooligosaccharides

- Thoma, J. A.: Chemistry and Technology I. In "Starch" Whistler, R. L. and I'aschall, E. H.(eds.), Academic Press, p.177(1965)
- 齊藤典行: 最近の糖質とその機能. 食品工業, 7, 17(1988)
- Robyt, 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. 濱粉科学, 28, 215(1981)
- Takasaki, Y.: An amylase producing maltotriose from *Bacillus subtilis*. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 1091(1985)
- Kobayashi, S., Okamoto, H., Hara, K., Hashimoto, H. and Yamasato, K.: Preparation and some properties of a novel maltotetraose-forming enzyme of *Pseudomonas saccharophila*. *Denpun Kagaku*, 38, 27(1991)
- 中村道徳, 具沼圭二: 濱粉關聯糖質酵素實驗法. 學會出版セシタ-, p.188(1989)
- Saito, N.: A thermophilic extracellular α -amylase from *Bacillus licheniformis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 155, 290(1973)

9. Chandra, A. K., Medda, S. and Bhadra, A. K. : Production of thermostable α -amylase by *Bacillus licheniformis*. *J. Ferment. Technol.*, **58**, 1(1980)
10. 信太治, 内田一彦, 宮内明, 高木廣明, 門脇清, 高野敏輝, 小林昭一: マルトペントオース生成酵素の生産とその應用. 澱粉科學, **39**, 95(1992)
11. Yoshigi, N. : Studies on production of maltopentaose by *Bacillus cereus* NY-14 and its utilization. *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **35**, 2379(1988)
12. 高橋英樹, 通木尚, 原耕三: マルトペント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)
13. 이명열, 정만재, 이신영, 강대수, 이웅수, 민윤식: *Bacillus cereus* IAM1072에 의한 올리고당 생산의 최적조건. 한국영양식량학회지, **24**, 771(1995)
14. Cochran, W. G. and Cox, G. M. : *Experimental designs*. John Wiley and Sons, Inc, p.343(1957)
15. 박성현: 현대실험계획법. 대영사, p.573(1986)
16. 김광옥, 이영춘: 식품의 관능검사. 학연사, p.257(1993)
17. 日本パン技術研究所: パン試験法. p.52(1981)
18. 松本博: 製パン科學. p.25(1988)
19. Nedeltscheva, M., Stoilkov, G. and Popova, S. : A modified analysis method of starch determination by iodine spectrophotometry. *Starch*, **27**, 298(1975)
20. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. : Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**, 350(1956)
21. 中村敏: オリゴ糖利用の現況と將來性. フードケミカル, **10**, 79(1985)
22. 鈴木男: で粉糖の現状と将來について. フードケミカル, **4**, 23(1987)
23. 酒井重男: オリゴ糖の開発の現状と展望. フードケミカル, **2**, 21(1993)
24. 高橋英樹, 通木尚, 原耕三: マルトペント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)
25. 菅原正義, 竹内正保, 中久喜輝男, 光岡知足: マルトテトラオース含有 シラップのヒト腸内フローラに及ぼす影響. 日本榮養食糧學會誌, **42**, 123(1989)
26. Kondo, H., Honke, T., Hasegawa, R., Shidoma, T. and Nakamura, S. : Isolation of maltotetraose from *Stephaniomyces* as an antibiotic against *Erwinia carotovora*. *J. Antibiotics*, **28**, 157(1975)
27. Kobayashi, S. : Production and application of maltooligosaccharide. *Denpun Kagaku*, **37**, 163(1990)
28. Hasal, P., Cejkova, A. and Vojtisek, V. : Continuous sucrose hydrolysis by an immobilized whole yeast cell biocatalyst. *Enzyme Microbiol. Technol.*, **14**, 1007(1992)
29. Yun, J. W., Lee, M. G. and Song, S. K. : Production of panose from maltose by intact cells of *Aureobasidium pullulans*. *Biotech Lett.*, **16**, 359(1994)
30. 岡田寅: マルトオリゴ糖について. 酵酔と工業, **41**, 500(1983)

(1998년 3월 11일 접수)