

효소합성법에 의한 프락토 올리고당의 생산

윤 종 원 · 송 승 구

부산대학교 화학공학과
(1994년 4월 30일 접수)

Enzymatic Synthesis of Fructooligosaccharides

Jong Won Yun and Seung Koo Song

Dept. of Chem. Eng., Pusan Nat'l Univ.,
Pusan 609-735, Korea
(Received April 30, 1994)

1. 서 론

최근 건강지향의 식생활 경향에 따라 인체 내에서 여러 가지 기능성을 나타내는 새로운 감미료의 개발이 활발하다[1, 2]. Palatinose[3, 4] 또는 fructo-[5-10], malto- [11], isomalto- [12-15], soybean-oligosaccharides[16] 등의 올리고당류는 기존의 감미료인 설탕의 단점들을 극복할 수 있게 하는 동시에, 인체 내에서 유용세균인 비피두스균(Bifidobacteria)의 증식인자로 작용하고[17, 18], 다른 여러 가지 생리활성 작용을 나타내는 등[19]의 뛰어난 장점을 지니고 있어 멀지않아 감미료 시장에서 매우 중요한 위치를 차지할 것으로 예측된다. 특히 프락토 올리고당은 설탕으로부터 생산되므로 그 감미질이 우수하고 공업적으로 대량생산하는 방법이 간단하여 다른 올리고당류에 비해 빠른 속도로 수요가 증가하고 있으며 응용범위도 확대되고 있다.

프락토 올리고당의 생합성은 이미 오래 전에 아스파라거스[20, 21], 사탕무우[22], 상추[23], 양파[24], agave[25, 26], Jerusalem artichoke[27, 28] 등을 비롯한 여러 가지 식물에서부터 발견되었고, 추출된 효소(fructosyltransferase)를 이용하여 실험실에서 생합성되기도 하였다[29, 30].

프락토 올리고당의 명칭은 fructan, glucofrutosan, inulin-type oligosaccharides 등의 glucose 1분자에 fructose 여러 분자가 결합되어 있는 oligomer들의 통칭으로 사용되어 오다가, 최근에는 설탕에 fructosyl unit가 β 2-1 위치에 결합되어 있는 올리고당류 [$1^F(1-\beta$ -D-fructofuranosyl) $_{n-1}$ sucrose, $n=2-10$]에 한정하여 명명하고, 다른 계열(6-kestose, neokestose series)의 fructose oligomer 또는 중합도 20 이상인 것은 제외하는 것이 일반적이다[5-10, 31, 32].

프락토 올리고당은 일본의 Meiji Seika에서 1984년에 *Aspergillus niger* 기원의 효소를 사용하여 세계 최초로 공업화에 성공하여 대량생산하기 시작하였고 여러 가지 기능성을 입증하기 위한 체계적인 연구 결과를 발표한 바 있다[19]. 그 후 이 제품이 건강지향의 식생활 추세에 따라 그 시장규모가 점점 증가하기 시작하자 국내의 식품회사에서도 이 제품의 개발을 경쟁적으로 시작하게 되었다.

프락토 올리고당의 제조공정은 초기에는 미생물을 배양하여 세포내 효소(intracellular enzyme)를 추출한 다음 회분식 공정(batch process)에 의한 생산방법에 의존하였으나, 이 공정은 생산성이 낮고 최종 제품 중에 효소가 잔존하는 등의 문제점 때문에 최근

에는 효소 고정화에 의한 연속 제조 공정의 개발에 관심이 집중되고 있다. Yun 등[33]은 calcium alginate gel에 *Aureobasidium pullulans*를 고정화한 교반형 반응기 상에서 반회분식(semibatch)공정에 의해 60일까지 안정하게 프락토 올리고당을 생산하였는데, 이 공정은 회분식에 비해 생산성은 다소 증가하였으나 연속 운전 중에 교반기에 의해 고정화 세포가 서서히 파쇄됨으로써 결국 산업화 과정에서 만족할 만한 결과를 나타내지 못하였다. 그후 Yun 등[34]은 고정화 세포가 충전된 반응기(packed bed reactor)를 이용한 연속 제조 공정을 개발하여 산업화에 성공함으로써 생산성을 크게 증가시킨 바 있는데, 이 때 고정화 세포의 안정성은 3개월 이상인 것으로 보고되었다. Calcium alginate와 같은 gel에 효소를 고정화하여 공업적 규모의 대용량 반응시스템에 적용할 경우, 고정화 효소의 대량 제조가 용이하지 못한 편이고 실활된 후 고정화 효소의 폐기문제 등은 심각한 문제를 야기하는 경우가 많은데 이러한 단점을 극복하기 위하여 흡착성 물질 등의 지지체에 효소를 고정화하는 방법이 오랫동안 연구되어 왔고 실제로 aminoacylase, glucose isomerase 등의 효소 고정화법 등이 산업화되어 있다[35, 36]. 지금까지 프락토 올리고당 생산공정에 이러한 방법을 적용한 예는 Hayashi 등[6, 7]이 화산재의 일종인 다공성 지지체에 fructosyltransferase를 고정화시켜 실험실 규모의 연구를 수행한 외에 이렇다 할 연구가 수행되지 않고 있다.

1950년대 초부터 지금까지 프락토 올리고당에 관한 연구가 오랫동안 이루어져왔음에도 불구하고, 1968년 Edelman과 Jefford[28]가 Jerusalem artichoke 기원의 fructosyltransferase로부터 inulin oligomer 및 polymer의 생합성에 대해 체계적인 연구결과를 발표한 이후 fructosyltransferase 또는 그 합성산물에 관한 총설은 아직까지 보고되지 않고 있다.

본고에서는 미생물 기원의 프락토 올리고당을 중심으로 효소반응 메카니즘, 생산방법 및 제품의 응용분야, 최근 연구동향 등을 체계적으로 정리하였다.

2. 프락토 올리고당 생산효소

2.1. 효소의 분류

프락토 올리고당 생산 효소에 대한 명칭은 연구자들에 따라 여러 가지 이름으로 불리워져 오고 있는

데, 그중 하나는 이 효소가 fructosyl unit를 전이(transfer)시킴으로써 프락토 올리고당을 합성하는 것에 주시하여 명명된 fructosyltransferase이다. 효소명명법[37]에 따르면, transferase는 특정 group을 전이시키는 효소로써 “donor: acceptor group transferase” 형태로 명명하는 것을 원칙으로 하므로 이 효소의 정확한 이름은 “sucrose: 1^F- β -D-fructofuranosyl transferase”가 된다. 이 효소의 또 다른 명칭은 EC. 3.2.1.26으로 분류되어 있는 β -D-fructofuranosidase인데, 이 효소명의 sub-class 명에서 볼 수 있듯이 이것은 전이효소가 아닌 가수분해효소의 한 종류로 본 분류법이다. 가수분해효소(hydrolase)는 분류법상 C-O, C-N, C-C 등의 결합을 가수분해시킬 뿐 아니라 분해된 group을 적당한 acceptor에 전이시키는 효소로 정의되어 있으므로 후자의 명명법도 타당한 것으로 볼 수 있다. 그러나 β -D-fructofuranosidase는 이미 오래 전부터 대표적인 가수분해 효소인 invertase의 별칭으로 사용되어 왔으므로[38-40], 저자들을 비롯한 많은 연구자들은 지금까지 fructosyl unit를 전이시켜 fructose oligomer 또는 polymer를 합성하는 효소를 통칭하여 fructosyltransferase로 명명해 왔는데, 가수분해 효소군에 포함시키지 않고 전이효소군에 분류시키는 것이 보다 타당하다고 볼 수 있다. 이 효소의 분류에서 또 한가지 중요한 점의 하나는 아직도 많은 연구자들이 이 효소의 분류번호로 EC. 2.4.1.9.를 사용하고 있다는 점인데[41, 42], EC. 2.4.1.9.는 이미 프락토 올리고당 합성효소와는 상이한 inulosucrase에 부여된 것으로서[37] 오류로 판단된다.

그럼에도 불구하고 많은 연구자들이 프락토 올리고당 생산효소의 명칭으로 β -D-fructofuranosidase를 사용하고 있는 것은 미생물로부터 최초로 프락토 올리고당의 생합성이 발견된 것이 invertase 실험중에 우연히 관찰되었기 때문인 것으로 보인다[39, 40].

2.2. 효소의 기원

많은 종류의 미생물들이 성장중에, 특히 설탕을 주 탄소원으로 하는 배지에서 올리고당류를 합성하는 이유는 이미 몇몇 문헌에서 보고된 바 있는데[41, 42], 주로 다음과 같은 두 가지를 들 수 있다. 첫째, 설탕으로부터 유리된 fructose는 미생물 성장중에 저해현상을 유발하는 경우가 있어 미생물 자신이 이를 해결하기 위해 fructose를 이용하여 올리고당을 합성하게

되고, 둘째 합성한 올리고당을 탄소원이 고갈되었을 때 기질로 이용할 수 있기 때문이다. 이것은 많은 식물 중에서 올리고당 또는 다당류가 생합성되는 원인과도 상당히 밀접한데, 식물의 경우, 조직 중에 존재하는 탄수화물의 삼투압 조절에 의해 극한 추위나 더위를 극복하게 되며 이런 이유로 계절이나 서식 장소에 따라 합성된 올리고당 및 다당류의 조성은 현저하게 달라진다고 보고되어 있다[43]. 그러나 아직까지 그 완전한 이유는 밝혀지지 않고 있다. Bealing 과 Bacon[38]은 mould invertase를 이용하여 설탕의 가수분해 연구를 수행하던 중 이 효소를 고농도 설탕에 작용시켰을 때 fructose 잔기가 acceptor인 설탕에 결합되어 oligofructoside를 합성한다는 사실을 발견하였으나 합성된 올리고당의 구조는 규명하지 못했다. Pazur[39]는 *Aspergillus oryzae* 기원의 fructosyltransferase를 이용하여 설탕(GF: G, glucose; F, fructose)으로부터 GF₂, GF₃ 등의 프락토 올리고당류를 합성하여 그 명칭을 잠정적으로 1-inulobiosyl-D-glucose, 1-inulotriosyl-D-glucose으로 각각 명명하였는데 이것은 각각 1-kestose 및 nystose인 것으로 보인다. Dickerson[41]은 *Claviceps purpurea* 기원의 효소로부터 생산된 올리고당은 neokestose 계열이 주성분이고 1-kestose 계열도 함께 생산된다는 사실을 밝혔으며 효소반응 메카니즘을 규명하였다.

Fusarium oxysporum 역시 invertase을 생산하는 중요한 미생물 중의 하나로 알려져 있다. Maruyama 와 Onodera[44]는 이 미생물이 생산하는 효소를 정제한 결과, 두 종류의 효소가 존재한다는 사실을 밝히고 두 효소 모두에서 올리고당 합성능을 발견하였으나 이를 정량화하지는 못했다. Gupta와 Bhatia [42, 45]는 이 미생물을 설탕을 주 탄소원으로 배양하였을 때 GF₄까지의 프락토 올리고당이 생합성된다는 사실을 발견하고 효소를 분리하여 *in vitro*에서 합성하기도 하였다. 그외 Table 1에서 보여주는 바와 같이 *Penicillium* sp.[38, 46], *Aspergillus oryzae*[38, 39, 47] 등에서도 프락토 올리고당의 합성능을 지닌 효소가 발견되기도 하였으나 효소활성이 매우 낮아 올리고당의 대량생산에 직접 적용하기에는 어려운 경우이다.

지금까지 실제 산업화에 성공하였거나, 산업화 가능성이 높은 프락토 올리고당 효소를 생산하는 미생물로는 *Aspergillus niger*[5, 8, 32], *Aureobasidium* sp.[6, 7, 9, 10, 31, 33, 34], *Aspergillus phoenicis*

Table 1. Fructooligosaccharide-Producing Microorganisms

Microorganisms	Authors
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Jung et al.(1987, 1989), Yun et al.(1990, 1992, 1993a, b, c, d); Smith et al.(1980)
<i>Aureobasidium</i> sp.	Hayashi et al.(1989, 1990, 1991a, 1991b)
<i>Arthrobacter</i> sp.	Fujita et al.(1990)
<i>Aspergillus niger</i>	Hidaka et al.(1988,1989); Bealing and Bacon(1953)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Pazur(1952) Kida et al(1988); Bealing and Bacon(1953)
<i>Aspergillus phoenicis</i>	Balken et al.(1991)
<i>Aspergillus sydowi</i>	Muramatsu et al.(1988)
<i>Claviceps purpurea</i>	Dickerson(1972); Arcamone et al.(1970)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Gupta et al.(1982); Maruyama et al.(1979)
<i>Penicillium frequentans</i>	Usami et al.(1991)
<i>Penicillium spiculosum</i>	Bealing and Bacon(1953)
<i>Phytophthora parasitica</i>	Hankin and Meintype(1977)

[48] 등을 들 수 있는데, 최초로 프락토 올리고당을 공업적으로 생산한 일본의 Meiji Seika사는 *A. niger*를 이용하여 제품을 생산하고있다. Balcon 등[48]은 *A. phoenicis*를 이용하여 fructosyltransferase를 생산한 바 있는데, 이 효소를 이용하여 다른 산업균주와 거의 동일한 수준의 프락토 올리고당의 합성수율(60%)을 얻었다고 보고하였다.

식물에서 합성된 프락토 올리고당은 최대 중합도가 3에서 20 이상까지로 높는데 비해 미생물 기원의 효소로부터 합성된 것은 일반적으로 중합도가 5(GF₄) 전후인 것이 많다[32, 33]. 그러나 Muramatsu 등[49]은 *A. sydowi*로부터 중합도 13까지의 프락토 올리고당을 합성하고 각각의 구조를 확인하였다.

2.3. 효소 생산

프락토 올리고당 합성을 위한 효소반응 특성이나 제조 공정 등에 관해서는 많이 보고되어 있는데 비해 효소 생산에 대한 문헌은 매우 부족한 편이다. Jung 등[10]과 Hayashi 등[50]은 *Aureobasidium* sp.로부터 fructosyltransferase 생산에서 여러 가지 배지성분들이 미생물 성장속도 및 효소활성에 미치는 영향에 대해 보고하였다. 이들이 사용한 미생물은 효소반

용 특성은 서로 유사한데 비해 배양 특성에서 몇 가지 점에서 차이를 나타내고 있는데, 예를 들면 Jung 등은 lactose와 soluble starch는 이 미생물이 전혀 이용하지 못한다고 보고한데 비해 Hayashi 등은 이 두 기질을 이용하여 상당량의 세포외 효소를 생산할 수 있었다고 보고하였다. 최적 배지조성 및 배양시간에 따른 세포내 효소와 세포외 효소의 생산 비율 등은 거의 동일한 결과를 보였다. Jung 등은 특히 Mg 이온의 중요성을 강조하였는데, Mg 이온 농도를 0.05%에서 0.2%로 증가시킨 결과 세포내 효소 활성비율이 크게 증가하는 결과를 얻었다. 이 결과는 세포고정화에 매우 유리하게 되어, 이후 세포 고정화에 의한 프락토 올리고당의 연속 제조 공정 개발로 이어지게 했다[34]. 한편 Hayashi 등[9]은 *Aureobasidium* sp.의 배양중에는 프락토 올리고당 성분이 생합성되지 않았다고 보고하였으나, Yun 등[33]은 *Aureobasidium pullulans* 배양중에 탄소원인 설탕이 소모된 후 GF₂, GF₃, GF₄ 등의 프락토 올리고당이 *in vitro*에서와 거의 유사한 정도의 양이 합성된 것을 관찰하였다(Fig. 1). Smith 등[51]은 *Aureobasidium pullulans* ATCC 9348을 최적 조건에서 배양하였을 때, 전체 효소활성의 80%가 세포외 효소였고 그 배양 조건은 Jung 등이 보고한 것과 상당히 일치하였다.

많은 연구자들이 fructosyltransferase 배양 중에 가수분해 효소활성이 동시에 관찰되었다고 보고한 바 있는데[8, 42], 이를 정량화하여 프락토 올리고당 합성활성(U_i)과 가수분해 활성(U_b)의 비가 높은 미생물을 탐색하거나, 배양조건을 최적화하는데 적용하였다. 일반적으로 저농도의 설탕용액에서 U_i/U_b 비가 낮고 고농도로 갈수록 커서 프락토 올리고당 합성에는 70%(w/v) 이상의 설탕농도가 유리하다[33, 34].

2. 4. 효소반응 메커니즘

식물 기원의 프락토 올리고당의 생합성 경로에 관해서는 어느 정도 체계적인 연구 결과가 보고되어 있으나[28, 52-54], 미생물 기원 효소에 의한 프락토 올리고당의 생성 메커니즘은 잘 알려져 있지 않다. Dickerson[41]은 *C. purpurea* 기원의 효소로부터 올리고당의 생성메커니즘을 규명하였다. 반응 첫 단계는 설탕으로부터 neokestose(6^G-fructofuranosyl sucrose)가 합성되고, neokestose는 다시 기질로 작용

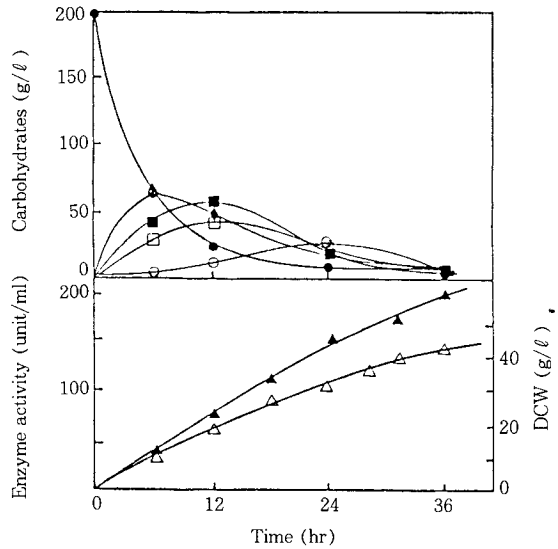
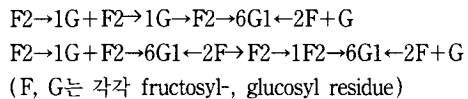
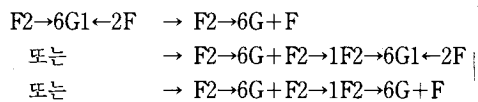


Fig. 1. Batch culture kinetics of *Aureobasidium pullulans* on 20% sucrose medium at 28°C: (●)sucrose, (□)glucose, (◆)1-kestose, (■)nystose, (○) 1^F-fructofuranosyl nystose; (▲)enzyme activity, (△)dry cell weight (Redrawn from ref. 33).

하여 아래식에서와 같이 6^G-(fructofuranosyl)₂ sucrose를 합성한다고 하였다.



이 반응과 함께 아래와 같이 neokestose의 가수분해 반응이 일어나서 분해산물인 F2→6G를 생산하여 이로부터도 neokestose 계열의 올리고당류가 합성된다고 보고하였다.



Jung 등[55]은 *Aureobasidium pullulans*로부터 생산되는 프락토 올리고당의 반응메커니즘을 제안하고 수학적 모델을 통해 증명한 최초의 연구 논문을 발표하였다. 이들에 따르면, 설탕으로부터 반응 첫 단계에서 1-kestose가 생성되고 glucose가 유리되며, 그 후 1-kestose로부터 nystose[1^F-(fructofuranosyl)₂ sucrose]와 설탕이 생성된다고 하였다(Fig. 2):

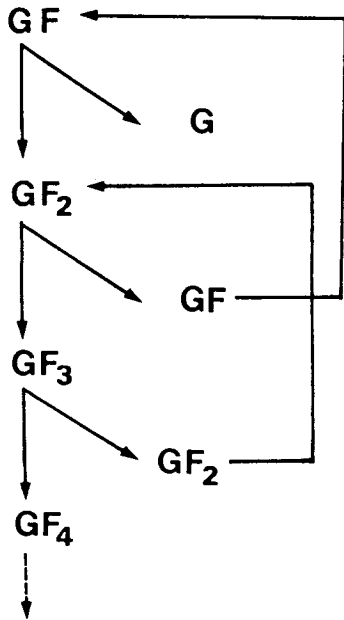
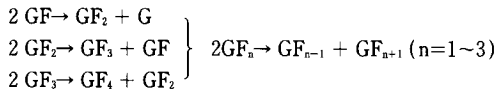


Fig. 2. A proposed reaction mechanism for fructooligosaccharide production catalyzed by fructosyltransferase from *A. pullulans*(Redrawn from ref. 55).



반응 메카니즘에서 알 수 있듯이 glucose는 계속 축적되어 최종 반응물 중에 30%(w/w) 존재하여 반응 저해제로 작용하게 됨으로써 설탕의 전환율이 85~90%에서 중지되고 결국 최종 반응물 중의 프락토 올리고당의 비율은 55~60% 정도이다(Fig. 3). *A. niger* 또는 다른 *Aureobasidium* 속의 효소로부터 생산된 프락토 올리고당의 수율이 거의 모두 60% 전후라는 점에서 glucose는 프락토 올리고당 생산반응에서 공통적인 저해제로 작용하는 것으로 보인다. 이러한 반응메카니즘은 inulosucrase(EC 2.4.1.9)가 설탕을 기질로 2,1-β-D-fructosyl fructose polymer를 합성하고 유리된 glucose가 반응 중에 계속 축적되는 반응 메카니즘과 유사하다. Balken 등[48]은 *A. phoenicis* 기원의 fructosyltransferase의 경우 glucose 보다는 1-kestose와 nystose에 의한 저해현상을

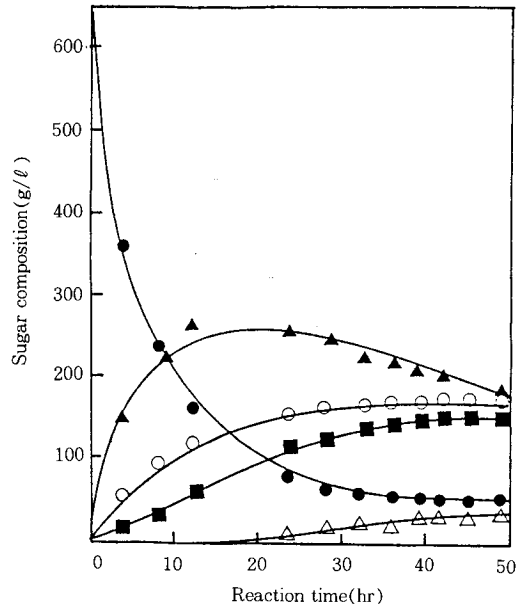
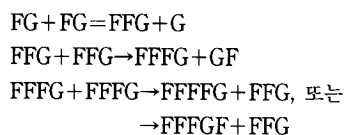


Fig. 3. Typical carbohydrate profiles of the reaction products catalyzed by a fructosyltransferase (Redrawn from ref. 55): (●)sucrose, (○) glucose, (▲)1-kestose, (■)nystose, (△)1^F-fructofuranosyl nystose.

강조하였는데, 효소 반응물 40%를 새로운 기질에 다시 첨가하였을 때 초기 효소활성의 50%가 감소하였다고 보고하였다. 그러나 Jung 등[55]은 *A. pullulans* 효소의 경우 1-kestose에 의한 저해현상은 나타나지 않는다고 보고한 바 있어 Balken 등의 저해현상 실험결과는 glucose에 의한 것인지 올리고당에 의한 것인지는 분명하지 않다. 한 가지 흥미로운 사실은 식물 기원의 fructosyltransferase와 미생물 기원의 그것과는 효소반응 메카니즘에서 상당한 차이를 보이는 것이 일반적이는데, Satyanarayana[30]이 agave 기원의 효소로부터 생성되는 프락토 올리고당의 생성 메카니즘은 Jung 등이 제안한 그것과는 반응 첫 단계가 가역반응이란 점을 제외하면 동일하다는 것인데, Satyanarayana가 제안한 agave 올리고당의 합성메카니즘은 다음과 같다.



Gupta와 Bhatia[42]는 *Fusarium oxysporum* 기원의 fructosyltransferase에 의한 프락토 올리고당의 합성경로를 제안하였는데, 이들은 효소에 두 활성점이 존재하여 어떤 설탕 분자는 donor site에, 다른 분자들은 acceptor site에 결합하고 이 사이에 nucleotide가 존재하여 다리 역할을 한다는 것이다. 즉, donor site로부터 유리된 fructose가 nucleotide에 결합한 후 이것(fructosylated nucleotide)은 다시 fructose 잔기를 acceptor site에 존재하는 설탕 분자에 제공함으로써 GF₂를 합성한다는 이론이다. 그리고 GF₄ 이상의 올리고당류는 acceptor site의 크기에 비해 분자크기가 커서 합성되지 않는 것으로 보았다. 이것은 *Aureobasidium* 또는 *Aspergillus* 속 기원의 효소로부터 생산된 최대 분자 올리고당류가 GF₄ 또는 GF₃라는 점과 비교해 볼 때 유사한 결과지만, *A. sydowi*의 경우처럼[49] 중합도가 높은 프락토 올리고당이 합성되는 예도 있어 이 메카니즘은 모든 미생물 기원의 프락토 올리고당 합성효소에 대해 적용되는 것은 아닌 것으로 판단된다.

2.5. 기질 특이성

프락토 올리고당을 생산하는 대부분의 효소들은 설탕에 대한 기질특이성이 가장 큰 것이 일반적이고 raffinose, xylose 등을 포함한 여러 가지 탄수화물에 대해서도 특이성을 갖는다고 알려져 있다. 특히 합성된 올리고당 역시 거의 모든 효소의 경우 기질로 이용되는 경우가 대부분이다.

Hirayama 등[32]은 *A. niger* 기원의 효소에 대한 기질특이성을 상세히 조사하였는데, raffinose, stachyose, inulobiose, inulotriose 등이 acceptor로 작용될 수 있다고 보고하였다. 설탕에 대한 정제효소의 Michaelis 상수(K_m)는 *Aureobasidium* sp.의 경우 0.47~0.65M, *A. niger*의 경우 0.29M, 그리고 GF₂ 및 GF₃에 대한 값은 각각 0.8M, 0.14M로 보고되었다 [32, 56]. 프락토 올리고당을 생산하는 대부분의 산업균주로부터 생산된 효소는 regiospecificity가 매우 커서 설탕 중의 fructose 잔기를 다른 설탕분자 중의 가능한 세 가지 acceptor group(6-OH of glucoside, 1-OH and 6-OH of furanoside) 중에서 1-OH furanoside 말단기에 매우 선택적으로 전이시켜 1-kestose계열의 프락토 올리고당만을 생산하게 된다 (Fig. 4). 이에 비해 *C. purpurea*를 비롯한 많은 미생물 기원의 효소는 두 가지 이상의 acceptor group

에 친화력을 동시에 나타내는 경우가 많아 1-kestose 뿐만 아니라 neokestose, 6-kestose 계열의 올리고당을 생산한다고 알려져 있다[41, 57].

2.6. 효소반응 촉진제 및 저해제

프락토 올리고당 합성효소들은 효소기능이 동일함에도 불구하고 효소반응 촉진제와 저해제는 효소기원에 따라 다소 다르게 보고되고 있다. Table 2는 *A. niger* 기원 효소의 저해제들을 보여주고 있는데, Hg가 가장 큰 저해제이고 Ag, Mn등이 저해역할을 하는데 비해 *Aureobasidium* sp. 효소의 경우 Hg, Cu, Pb가 대표적인 저해제인 것으로 알려져 있다[56]. 반응 촉진제에 대해서는 지금까지 체계적으로 보고된 바 없으나, PCMB, aniline, oligostatin 등이 효소활성을 다소 증가시키는 것으로 알려져 있지 않다[32].

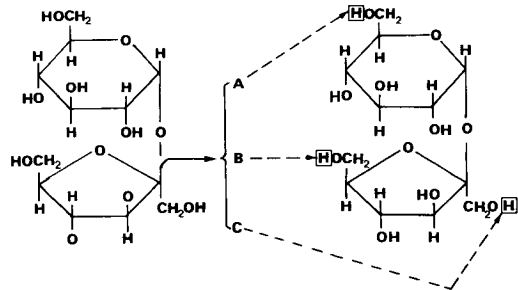


Fig. 4. Three types of trisaccharide formed from fructosyltransferases: A, 6^G-fructofuranosyl sucrose(neokestose); B, 6^F-fructofuranosyl sucrose(6-kestose); C, 1^F-fructofuranosyl sucrose(1-kestose).

Table 2. Enzyme Inhibitors of Fructosyltransferases from *A. niger*(Ref. 32)

Compound	Relative Activity(%)
HgCl ₂	15
AgNO ₃	86
MnSO ₄	88
CuSO ₄	93
CoCl ₂	96
ZnSO ₄	96
MgSO ₄	98
Pb(OAc) ₂	100
AlCl ₃	95
FeCl ₃	100
EDTA	97

2. 7. 효소활성

Fructosyltransferase의 프락토 올리고당 합성능 평가방법을 세분화해 보면 주로 다음과 같은 두 가지 방법으로 나눌 수 있다. 첫째, 활성 측정 조건에서 반응 후 유리된 glucose의 양을 glucose-oxidase법으로 정량하는 방법, 둘째 생성된 1-kestose의 양을 HPLC로 정량하는 방법이다. 전자의 방법은 가수분해 효소활성이 혼존할 경우 프락토 올리고당 합성능과 가수분해활성의 합으로 효소활성이 평가되게 되므로 문제가 될 수 있으나 Jung 등[10]이 사용한 *A. pullulans* 효소의 경우처럼 가수분해활성이 무시할 정도로 매우 작은 경우에는 편리한 방법일 수 있다. 효소 unit에 대한 정의도 유리되는 glucose의 양으로 정의하는 경우가 많으나, 최적반응조건에서 1분간 1 μ mole의 1-kestose를 생성하는데 필요한 효소의 양으로 정의하는 것이 이 효소의 전이활성(transfrucosylating activity)평가에 보다 효과적이다.

미생물 기원인 대부분의 fructosyltransferase들은 pH 5.5, 온도 55°C 전후에서 최고활성을 나타내는데 이러한 성질은 프락토 올리고당의 대량생산을 위한 반응기 운전에서 매우 유리하다. 즉, 반응기 운전온도가 고온이므로 오염원을 줄일 수 있고, 설탕용액을 pH 조정없이 직접 기질로 이용할 수 있기 때문이다 [33, 34]. 한편 *A. phoenicis* 효소의 경우 알칼리 영역(pH 8)에서 효소활성이 최적이라는 것은 특이하다[48].

3. 프락토 올리고당의 제조방법

1984년 일본의 Meiji Seika사에서 *A. niger* 효소를 이용하여 프락토 올리고당의 대량 제조에 성공하게 되었는데(상품명: Neosugar), 초기에 이들이 사용한 공정은 세포고정화에 의한 연속 제조공정으로 알려졌으나 최근에는 부분 정제한 효소에 의한 회분식 공정에 의존하고 있는 것으로 보고되고 있다. 프락토 올리고당이 상업적으로 시판되기 시작하자 이 제품에 대한 관심이 급속도로 증가하게 되었고 그후 많은 식품에 보조제로 첨가되는 등 여러 가지 용도 개발이 활발하게 되었다. 1987년 국내에서도 Jung 등[10]이 fructosyltransferase의 대량생산에 성공하게 됨으로써 공업화의 길을 열게 되었다. 그 후 Yun 등[33]은 alginate gel에 세포를 고정화하고 반복분식

공정을 개발하여 생산성을 증가시키려는 노력이 시작되었고 이 공정은 실제 초기 단계에서 산업화되어 2년여 동안 운전된 바 있다. 그러나 교반형 반응기 내에서 고정화 세포의 안정성이 문제가 되어 그후 충전형 반응기에 의한 연속 제조 공정이 다시 개발되어 현재까지 성공적으로 운전되고 있는 것으로 보고되고 있다[34]. 한편 Hayashi 등[6, 7]은 다공성 지지체에 효소를 부분 정제하여 고정화한 관형 반응기에서 프락토 올리고당을 연속 생산하는 공정을 보고한 바 있는데, 효소를 고정화하기 위한 지지체의 전처리단계가 복잡하고 고정화 수율(35.7%)이 낮아 산업화하기까지는 몇 가지 문제점이 예상된다. 또한 임 등[58]은 여러 종류의 이온교환수지를 효소 고정화 재료로 사용하여 1개월 이상 고정화 효소의 실활없이 프락토 올리고당을 연속생산할 수 있었다고 보고하였다. 최근 Yun과 Song 등[59]은 공업적으로 광범위하게 사용되고 있는 이온교환수지에 정제하지 않은 효소를 고정화시킨 결과, 20일 정도까지 안정하게 프락토 올리고당을 생산하였다. Fujisaki 등[60]은 *A. pullulans*를 alginate에 고정화하여 설탕 제조 공정 중의 폐당밀(sugar beat molasses)로부터 25일까지 안정하게 프락토 올리고당을 연속생산하는 공정을 보고하였는데, 최대 수율이 37.8% 정도로 사용한 원료에 비해 대체로 높은 것으로 나타나, 이 공정은 사료첨가제용 올리고당의 함량이 크게 문제되지 않을 경우의 용도에 적용할 경우 경제성이 있을 것으로 생각된다. 한편 이들은 충전형반응기(수율 31.7%)에서 보다 연속교반조형 반응기에서 더 높은 performance를 보였다고 하였는데, 이 결과는 Yun 등[33]이 연속 교반조형 반응기에서는 프락토 올리고당의 반응성이 낮다는 보고와는 상이한 결과이다.

프락토 올리고당의 상업적제조 공정이 경제성을 충족시키기 위해서는 다음과 같은 점이 고려되어야한다. 1) 전체 효소활성이 높을 뿐 아니라 가수분해활성에 대한 올리고당 합성활성 비가 높은 미생물을 이용해야 하고, 2) 효소(또는 균체) 고정화 방법이 단순하고, 운전안정성이 높으며, 반응기 단위체적당 효소활성(volumetric activity)이 높을 것, 3) 농도 설탕을 기질로 이용할 수 있어야 할 것. Fig. 5는 프락토 올리고당의 공업적 제조공정도를 나타낸 것이고, Table 3에 최근 문헌에 보고된 프락토 올리고당 생산 공정을 요약하였다.

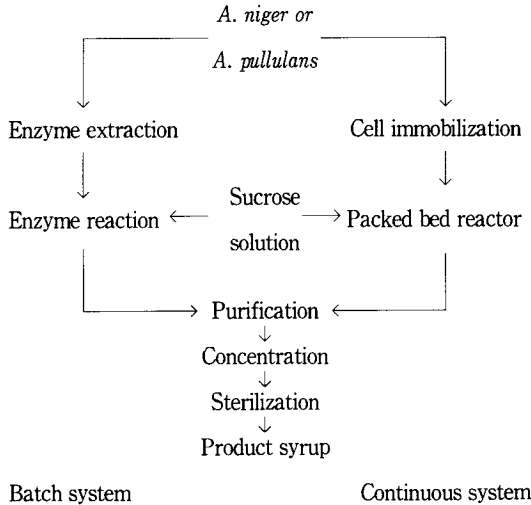


Fig. 5. Process scheme for fructooligosaccharide production.

4. 분석방법

분석기기가 범용화되기 전에는 올리고당류를 비롯한 여러가지 탄수화물의 분석은 주로 PC, TLC 그리고 몇 가지 환원당 분석법 등에 의존하였다. Collins 등[61]은 중합도 20까지의 프락토 올리고당을 분석하기 위한 여러 종류의 TLC 용매계(i-propanol, ethyl acetate, water)를 체계화하였다. 최근에는 주로 HPLC를 이용하고 있는데 대표적인 system을 Table 4에 정리하였다.

5. 프락토 올리고당의 구조 및 특성

5.1. 프락토 올리고당의 구조

프락토 올리고당은 inulin의 경우와 같이 β -fructofuranoside residue(fructosyl unit)가 sucrose분자의

Table 3. Recent Processes for the Production of Fructo-oligosaccharides

Enzyme source	Substrate	Process ^{a)}	Stability	Aurhors
<i>A. pullulans</i>	77% sucrose	semibatch(IC)	60 days>	Yun <i>et al.</i> (1990)
<i>A. pullulans</i>	77% sucrose	continuous(IC)	100 days>	Yun <i>et al.</i> (1992)
<i>A. pullulans</i>	77% sucrose	semibatch(IE)	20 days	Yun <i>et al.</i> (1993)
<i>Aureobasidium</i> sp.	40% sucrose	continuous(IE)	30 days>	Hayashi <i>et al.</i> (1991)
<i>A. phoenicis</i>	75% sucrose	batch(M)	—	Balken <i>et al.</i> (1991)
<i>A. pullulans</i>	sugar beet molasses	continuous(IC)	25 days	Fujisaki <i>et al.</i> (1989)

a) IC, IE, M indicate immobilized cells, immobilized enzyme, and intact mycelium, respectively.

Table 4. HPLC Systems for the Quantitative Analysis of Fructo-oligosaccharides

Column	Mobile Phase	Operation Temp.($^{\circ}$ C) /Flow Rate(ml/min)	Reference
HPX-87C(BioRad, U.S.A)	water	85/0.6	Balken(1991) Fujisaki(1989)
HPX-42C(BioRad, U.S.A)	water	85/1.0	Yun(1993)
PNH ₂ (Shimadzu, Japan)	Acetonitrile-water (75:25, v/v)	Ambient/1.0	Hidaka(1988)
Wakopack WB-T-130E	water	60/0.2	Hayashi(1991)
Amio-5S(BioRad, U.S.A)	Acetonitrile-water (70:30, v/v)	—	Muramatsu(1988)
Sodex RSpak DC-613(Showa Denko, Japan)	Acetonitrile-water (70:30, v/v)	75/0.5	Nagamatsu(1990)
Shim-pack SCR 101C(Shimatsu, Japan)	water	80/0.6	Fujita(1990)
μ Bondapack(Waters, U.S.A)	Acetonitrile-water (75:25, v/v)	Ambient/1.0	Yun(1990)
Inopak KS-801(Showa Denko, Japan)	water	80/1.0	Kida(1988)

1-OH furanoside에 결합되어 있어 일반식은 $1^F\text{-}\beta\text{-D}$ -(fructofuranosyl)_n sucrose로 표현되고, 1 unit가 결합되어 있을 경우를 1-kestose($1^F\text{-}\beta\text{-D}$ -fructofuranosyl sucrose), 2, 3 unit가 결합되어 있을 경우를 각각 nystose [$1^F\text{-}\beta\text{-D}$ -(fructofuranosyl)₂ sucrose], $1^F\text{-}\beta\text{-D}$ -(fructofuranosyl)₃ sucrose로 약칭하는데, 정확한 화학명은 O- $\alpha\text{-D}$ -glucopyranosyl-(1→2)- $\beta\text{-D}$ -fructofuranosyl-(1→2)-[$\beta\text{-D}$ -fructofuranosyl-(1→2)]_n- $\beta\text{-D}$ -fructofuranoside이다(Fig. 6). Gross 등[62]이 세 종류의 keystone, 즉 1-kestose, 6-kestose, 그리고 neokestone의 구조를 밝혔으나, 프락토 올리고당 구성 성분 모두의 구조는 이 제품을 최초로 산업화한 일본의 Meiji 연구 그룹에 의해 소개된 바 있으며, 학술논문을 통해 정식으로 발표된 것은 1988년 Muramatsu 등[49]이 *Aspergillus sydowi*로부터, 그리고 1989년 Hayashi 등[31]이 *Aureobasidium* sp.로부터 각각 생산된 프락토 올리고당의 구조를 연구한 결과가 처음이다. 프락토 올리고당의 구조는 다른 탄수화물의 경우와 같

이 methylation, NMR, GLC, GC-MS 분석 등에 의해 많은 연구자들에 의해 규명되었다[8, 31, 49, 63]. 프락토 올리고당과 구조가 유사한 levan은 levansucrase(EC. 2.4.1.10)에 의해 설탕분자의 6-OH furanoside에 fructose가 결합되어 합성된 다당류로써 levan이 부분 가수분해되어 oligomer를 형성하는 경우가 있는데 이를 levulan이라 부르고[64] 프락토 올리고당과 구별하는 것이 일반적이다.

5.2. 프락토 올리고당의 특성

프락토 올리고당은 초기에 설탕, 고과당 등의 대용감미료로 많이 이용되었는데, 그 감미도는 10% 설탕을 기준으로 1-kestose가 31%, nystose 22%, 그리고 $1^F\text{-}\beta\text{-D}$ -(fructofuranosyl)₃ sucrose는 16%인 것으로 알려져 있다[19]. 지금까지 프락토 올리고당의 물리, 화학적 성질에 대해서는 문헌에 보고된 바가 많지 않고 이미 오래전에 Gross 등[62]이 1-kestose, 6-kestose 및 neokestone 등의 $[\alpha]_D^{20}$ 값과 용융점을 보고하였다. 1-kestose, nystose, $1^F\text{-}\beta\text{-D}$ -(fructofuranosyl)₂ sucrose의 $[\alpha]_D^{20}$ 는 각각 +28.0, +10, -1.6, 그리고 1-kestose와 nystose의 용융점은 각각 179~200°C, 134°C로 밝혀져 있다. 프락토 올리고당의 pH 및 열안정성은 100°C, pH3에서 15분간 가열했을 때 완전히 분해되지만 중성에서는 100°C 이상의 고온에서도 상당히 안정하다. 한편 프락토 올리고당 각각의 성분에 대한 점도, 용해도 등의 기본적인 물성은 아직 체계적으로 보고되어 있지 않지만, 점도와 수분활성은 설탕보다 높은 것으로 보고되어 있다[65].

6. 프락토 올리고당의 응용

프락토 올리고당이 처음 상업화되었을 때는 주로 요쿠르트 등의 유가공제품, 빵, 과자류 등에 설탕 대신 사용되었으나 그 후 이 제품의 우수한 기능성이 입증되면서 응용범위가 점점 확대되어 갔다. Oku 등[66]은 프락토 올리고당이 일반적인 탄수화물들과는 달리 소화 흡수성이 없으며 에너지원으로 이용되지 않는다고 보고하였고, Hidaka 등[17]은 인체 내의 대표적인 유용 미생물인 *Bifidobacteria*의 증식인자임을 입증하였다. 1984년 일본의 Neosugar 연구회에서 프락토 올리고당의 여러 가지 기능성, 즉 충치예방, 설사 및 변비 방지효과, 당뇨병환자에의 유효성, 지질

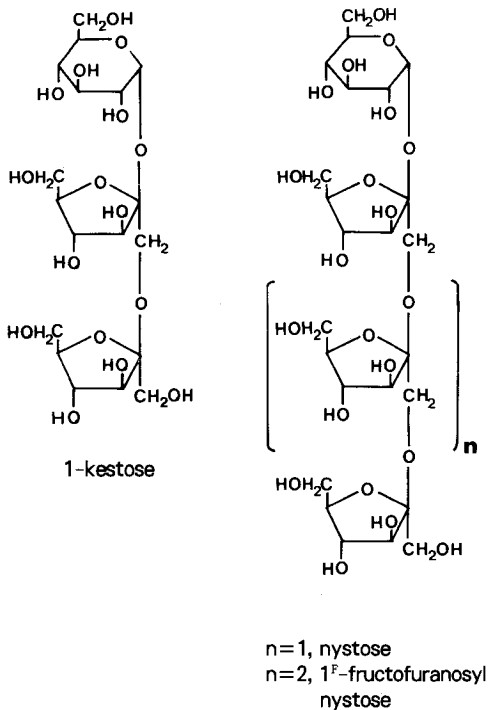


Fig. 6. Structure of fructooligosaccharides.

대사 개선효과 등에 관한 종합적인 연구 결과를 발표함으로써 이 제품에 관한 관심을 크게 불러 일으켰다 [19]. 그후 프락토 올리고당은 음료, 과자류, 스낵, 요쿠르트 등의 여러 가지 식품에 첨가되어 건강감미료로 인정을 받게 되었고, 그외에도 사료첨가제 또는 비피류스제제 등의 용도 개발로 이어져 이 제품의 잠재 수요는 매우 큰 것으로 평가되고 있다. 그러나 지금까지 순수한 프락토 올리고당 제품이 대량생산되고 있지 못한 이유 때문에 이 제품의 다양한 기능성에도 불구하고 그 응용 범위가 제한되어 왔다. 향후 고순도의 제품이 대량생산 되게 되면 전술한 바와 같이 여러가지 의약적 기능을 이용하려는 노력이 활발해지리라 생각된다.

7. 최근 연구동향

산업적으로 현재 시판되고 있는 프락토 올리고당 시럽제품은 효소반응 메카니즘에서 언급한 바와 같이 fructosyltransferase의 효소화학적 성질, 즉 반응 부산물인 포도당에 의해 기질인 설탕의 전환율이 85~90% 수준에서 중지되기 때문에 실제 제품 중의 프락토 올리고당의 함량은 30%(w/w) 정도의 포도당과 10~15%(w/w)의 설탕을 제외한 55~60%(w/w)에 불과하다. 이것은 전술한 이 제품의 기능적 장점들을 순수하게 이용하는데 상당한 제한 요소로 작용되어 왔다. 설탕과 포도당이 제거된 순수한 프락토 올리고당을 얻기 위해서는 chromatography 등의 분리 정제 수단에 의존하는 방법을 생각할 수 있으나, 프락토 올리고당의 각 성분들은 분자량이나 다른 물리화학적 성질이 매우 유사하여 효과적인 분리가 어렵고 회수율도 매우 낮다고 보고된 바 있다[67]. 최근 반응 부산물인 포도당을 효과적으로 제거해 줌으로써 효소의 저해현상을 극복하게 하여 고순도의 제품생산을 생산하고자 하는 연구가 이루어지고 있는데, 산업적으로 널리 사용되고 있는 여러 종류의 포도당 전환 효소를 검색하여 포도당을 완전히 제거시키거나 일부를 다른 물질로 전환시킴으로써 제품 순도 향상효과를 얻고자 하였다[68-70]. 이러한 목적으로 사용된 효소는 glucose oxidase, glucose isomerase 등이고 반응 scheme은 Fig. 7과 같다. 실제로 glucose oxidase와 fructosyltransferase의 혼합 효소계에 의해 설탕과 포도당이 거의 완전히 제거되어 순도 98% 정도의 고순도 제품생산이 가능하였다

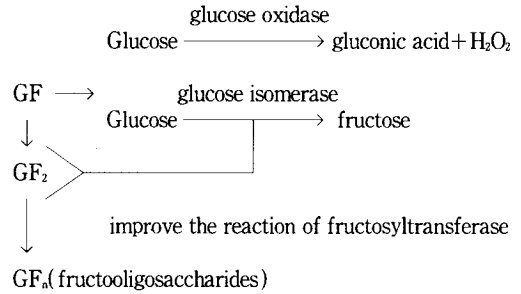


Fig. 7. Proposed schemes of high-content fructooligosaccharide production.

[69]. Glucose isomerase와의 혼합효소계의 경우는 혼합효소계에서 fructosyltransferase의 동력학적 특성이 변하고 glucose에 의해 유리된 fructose는 fructosyltransferase의 acceptor로 이용되지 않기 때문에 프락토 올리고당의 전환율을 크게 증가시킬 수 없다고 보고하였다[70].

참고문헌

1. 편집부, 식품과 개발(일본), **26**, 23(1990).
2. 편집부, *Food Chemicals*(일본), **10**, 10(1989).
3. P. S. J. Cheetham, C. Garrett, and J. Clark, *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 471(1985).
4. J. W. Yun, K. K. Oh, J. H. Kim, Y. J. Jeon, and J. H. Lee, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 79(1992).
5. H. Hidaka, T. Eida, and Y. Saitoh, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **61**, 915(1987).
6. S. Hayashi, J. Kinoshita, M. Nonoguchi, Y. Takasaki, and K. Imada, *Biotechnol. Lett.*, **13**, 395(1991).
7. S. Hayashi, K. Itho, M. Nonoguchi, Y. Takasaki, and K. Imada, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 68(1991).
8. H. Hidaka, M. Hirayama, and N. Sumi, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1181(1988).
9. S. Hayashi, M. Nonokuchi, K. Imada, and H. Ueno, *J. Ind. Microbiol.*, **5**, 395(1990).
10. K. H. Jung, J. Y. Lim, S. J. Yoo, J. H. Lee, and M. Y. Yoo, *Biotechnol. Lett.*, **9**, 703(1987).

11. B. C. Saha and J. G. Zeikus, *Process Biochem.*, June, 78(1987).
12. T. Kuruki, M. Yanase, H. Takata, Y. Takesada, T. Imanaka, and S. Okada, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 953(1993).
13. T. Kuriki, M. Tsuda, and T. Imanaka, *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 198(1992).
14. T. Kohmoto, K. Tsuji, T. Kaneko, M. Shioya, F. Fikui, H. Takaku, Y. Nakagawa, T. Ichikawa, and S. Kobayashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 937(1992).
15. T. Kohmoto, F. Fukui, H. Takaku, and T. Mitsuoka, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2157(1991).
16. K. Wada, J. Watanabe, J. Mizutani, M. Tomoda, H. Suzuki, and Y. Saitoh, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **66**, 127(1992).
17. H. Hidaka, T. Eida, T. Takizawa, T. Tokunaga, and Y. Tashiro, *Bifidobacteria Microflora.*, **5**, 37(1986).
18. T. Kohmoto, F. Fukui, H. Takaku, and T. Mitsuoka, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2157(1991).
19. 네오슈카연구회, 第2回네오슈카연구회報告書(일본)(1984).
20. N. Shiomi, J. Yamada, and M. Izawa, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 567(1976).
21. N. Shiomi, *Carbohydr. Res.*, **99**, 157(1982).
22. P. J. Allen and J. S. D. Bacon, *Biochem. J.*, **63**, 200(1956).
23. K. R. Chandorkar and F. W. Collins, *Can. J. Bot.*, **50**, 295(1972).
24. B. Darbyshire and R. J. Henry, *New Phytol.*, **81**, 29(1978).
25. I. S. Bhatia and K. S. Nandra, *Phytochemistry*, **18**, 923(1979).
26. M. N. Satyanarayana, *Indian J. Biochem. Biophys.*, **13**, 261(1976).
27. J. Edelman and T. G. Jefford, *Biochem. J.*, **93**, 148(1964).
28. J. Edelman and T. G. Jefford, *New Phytol.*, **67**, 517(1968).
29. N. Shiomi, J. Yamada, and M. Izawa, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2233(1979).
30. M. N. Satyanarayana, *Indian J. Biochem. Biophys.*, **13**, 398(1976).
31. S. Hayashi, K. Imada, Y. Kushima, and H. Ueno, *Curr. Microbiol.*, **19**, 175(1989).
32. M. Hirayama, N. Sumi, and H. Hidaka, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 667(1989).
33. J. W. Yun, K. H. Jung, J. W. Oh, and J. H. Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/25**, 299(1990).
34. J. W. Yun, K. H. Jung, Y. J. Jeon, and J. H. Lee, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 98(1992).
35. I. Chibata, T. Tosa, T. Sato, T. Mori, and Y. Matsuo, "Fermentation Technology Today, Society of Fermentation Technology", 383, Japan (1972).
36. P. J. Reilly, "Applied Biochemistry and Bioengineering(Wingard, L. B. et al., eds)", **2**, 185, Academic Press, Inc., New York(1979).
37. M. Dixon and E. C. Webb, "Enzymes", 3rd. ed, p. 762, Longman Group Ltd., London(1979).
38. F. J. Bealing and J. S. D. Bacon, *Biochem. J.*, **53**, 277(1953).
39. J. H. Pazur, *J. Biol. Chem.*, **199**, 217(1952).
40. F. J. Bearing, *Biochem. J.*, **55**, 93(1953).
41. A. G. Dickerson, *Biochem. J.*, **129**, 263(1972).
42. A. K. Gupta and I. S. Bhatia, *Phytochemistry*, **19**, 2557(1980).
43. J. S. D. Bacon and R. Loxley, *Biochem. J.*, **51**, 208(1952).
44. Y. Maruyama and K. Onodera, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **25**, 361-366(1979).
45. A. K. Gupta and I. S. Bhatia, *Phytochemistry*, **21**, 1249(1982).
46. S. Usami, T. Ishii, K. Kirimura, K. Uehara, and J. Chen, *J. Ferment. Bioeng.*, **72**, 303(1991).
47. M. Kida, T. Yoshikawa, T. Senda, and Y. Yoshihiro, *日本化學會誌*, **11**, 1830(1988).
48. J. A. M. van Balken, Th. J. G. M. van Dooren, W. J. J. van den Tweel, J. Kamphuis, and E. M. Meijer, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 216(1991).
49. M. Muramatsu, S. Kainuma, T. Miwa, and T. Nakakuki, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1303(1988).
50. S. Hayashi, Y. Shimokawa, M. Nogouchi, Y. Tasasaki, H. Ueno, and K. Imada, *World J.*

- Microbiol. Biotechnol.*, **9**, 216(1993).
51. J. A. Smith, D. Grove, S. J. Luenser, and L. G. Park, U. S. Patent 4,309,505(1982).
 52. N. Shiomni and M. Izawa, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 603(1980).
 53. N. Shiomni, *Carbohydr. Res.*, **96**, 281(1981).
 54. N. Shiomni and M. Izawa, *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 603(1980).
 55. K. H. Jung, J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim, and J. H. Lee, *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 491(1989).
 56. S. Hayashi, M. Nonoguchi, Y. Takasaki, H. Ueno, and K. Imada, *Ind. Microbiol.*, **7**, 251(1991).
 57. A. J. J. Straathof, A. P. G. Kieboom, and H. van Bekkum, *Carbohydr. Res.*, **146**, 154(1986).
 58. 임번삼, 김민홍, 최성수, 최인섭, 대한민국 특허 공보 1887호(1990).
 59. J. W. Yun, M. G. Lee, and S. K. Song, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 307(1993).
 60. H. Fujiisaki, T. Muratsubaki, T. Kamada, and K. Sayama, *Proc. Res. Soc. Jpn. Sugar Refineries Technol.*, **37**, 27(1989).
 61. F. W. Collins and K. R. Chandorkar, *J. Chromatography*, **56**, 163(1971).
 62. D. Gross, "Methods in Carbohydrate Chemistry, (R. L. Whistler and M. L. Wolfrom eds)," **1**, 360-364, Academic Press, New York(1962).
 63. H. Yasuda, T. Shitoh, T. Yamano, Y. Itoh, and S. Shimura, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 777(1986).
 64. K. Ohtsuka, S. Hino, T. Fukushima, O. Ozawa, T. Kanematsu, and T. Uchita, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1373(1992).
 65. Meiji Seika, Neosugar Product sheet(1988).
 66. T. Oku, T. Tokunaga, and N. Hosoya, *J. Nutr.*, **114**, 1574(1984).
 67. J. W. Yun, S. K. Song, J. H. Han, Y. J. Cho, and J. H. Lee, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 35(1994).
 68. J. W. Yun and S. K. Song, *Biotechnol. Lett.*, **15**, 573-576(1993).
 69. J. W. Yun, M. G. Lee, and S. K. Song, *J. Ferment. Bioeng.*, **77**, 159(1994).
 70. J. W. Yun, J. S. Noh, M. G. Lee, and S. K. Song, *J. Korean Inst. Chem. Eng.*, **31**, 846(1993).