

Pseudomonas alcaligenes JCL-43 유래 Carrageenase를 이용한 카라기난 올리고당의 제조 및 기능 특성

주동식 · 조순영[†] · 이응호* · 양승택**

강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터

*부경대학교 식품공학과,

**경성대학교 식품공학과

Preparation of Carrageenan Oligosaccharides Using Carrageenase from *Pseudomonas alcaligenes* JCL-43 and Its Functional Properties

Dong-Sik Joo, Soon-Yeong Cho[†], Eung-Ho Lee* and Seung-Taek Yang**

East Coastal Marine Bioresources Research Center, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

*Department of Food Science and Technology Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

**Department of Food Science and Technology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

Abstract

Carrageenan oligosaccharides prepared from κ -carrageenan by carrageenase from *Pseudomonas alcaligenes*. The oligosaccharides showed three spots on TLC and the degree of polymerization of the C1, C2 and C3 spot were each 9.0 ± 1.0 , 6.0 ± 1.5 and 2.5 ± 1.5 , respectively. Each hydrolysates and spots-C1, C2, C3-were tested the several functionalities such as antimicrobial activity, anticavity activity and anticoagulant activity. The antimicrobial and anticavity activity of carrageenan hydrolysates and oligosaccharide fractions were very low, but the anticoagulant activity was identified in all samples.

Key words – Carrageenan, Oligosaccharide, Functionality, Polymerization

서 론

올리고당(oligosaccharide)은 단당류가 2-13개 결합된 당 질로서 여러 가지 생리적 기능이 밝혀지면서 높은 관심의 대상이 되어 각종 올리고당에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[16]. 최근에는 올리고당이 bifidus factor 및 장

내 세균군의 개선[14,22], 항콜레스테롤 효과[17], 급만성 독성 및 변이원성에 대한 영향, 생체 조절인자 등의 역할 [19]이 알려지면서 커다란 주목의 대상이 되어 있고, 기능성 물질 및 식품으로 분류되기도 한다[12,23]. 또한 대개 올리고당류는 기능성으로 체내에서 대사가 되지 않아 칼로리로 되지 않는 저칼로리, 충치 방지능, 저감미, 비발효

[†] Corresponding author

성, 보습성, 비흡수성, 수분활성 저하작용, 변색 방지 등의 기능을 가지고 있으며, 올리고당은 비슷한 기능을 가진식이섬유와는 물성면에서 크게 다르고 고분자 물질이 아니기 때문에 식품에 첨가하더라도 텍스처와 물성에 크게 변화를 주지 않는다는 장점이 있다[15]. 현재 생산되고 있는 올리고당의 대부분은 설탕이나 전분 등이 주된 원료로 값싸게 만들어지고 있으며, 특징적인 단맛으로 인해 새로운 식품 소재로 각광을 받고 있다[20].

한편, 국내에서도 최근 프락토올리고당, 말토올리고당, 이소말토올리고당 등이 산업적으로 생산되고 있으며[7,11], 다양한 올리고당에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있는데, 주로 식물성 다당류를 주된 원료로하여 여러 형태의 올리고당을 연구하고 있으며[22], 해조 다당류를 원료로한 올리고당의 제조와 관련된 연구는 국내·외에서 알긴산과 한천에 대한 분해균, 분해효소 및 올리고당에 대한 몇몇 보고되어 있다[2,3,5,6,13]. 그러나 카라기난과 관련된 올리고당의 연구는 전무한 실정인데, 이는 카라기난의 구조나 용도의 측면에서 이런 분야로의 연구 필요성을 가지지 못하는 측면에서도 그 원인을 찾을 수 있으며, 카라기난이 저분자화되었을 때 생체 내에서의 작용에 대한 역할이 확실하지 않은 이유도 있는 것으로 판단된다.

본 연구는 카라기난을 기질로하여 미생물 효소를 이용하여 올리고당 제조를 목적으로 시도되었으며, 전보에서는 카라기난을 분해하는 균의 분리과 생육 특성 그리고 생산효소의 특성에 대해 보고하였다. 본 논문에서는 이 효소를 이용하여 카라기난으로부터 올리고당 형태의 당을 제조하여 이들이 가지는 몇가지 기능적 특성을 확인하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

효소 및 카라기난

사용된 효소는 전보[4]에서 보고한 *Pseudomonas alcaligenes* JCL-43이 생산하는 두 종류의 효소를 동일량으로 혼합한 복합효소를 이용하였는데, 이 효소는 부분정제한 효소였으며, 단백질 농도는 225 μ g/ml이었고, 소형 플라스틱 튜브에 5ml씩 분주하여 급속동결하여 두고 실험시에 급속해동하여 사용하였다. 올리고당 제조 기질은 시판하기 위해 생산되는 카라기난을 직접 생산 회사(명신(주))에서 구입하

여 사용하였는데, κ -type이 주된 성분인 카라기난이었다.

카라기난 올리고당 제조

올리고당 제조를 위한 효소와 카라기난의 반응은 0.6% 카라기난 용액 1000ml에 대해 조효소액을 1%(v/v) 수준으로 첨가하여, 40 $^{\circ}$ C에서 분해를 행하였다. 분해는 40시간까지 지속적으로 행하였으며, 5시간마다 시료의 일부를 취하여 전당 및 환원당 함량을 측정하여 분해율을 계산하였고, 분해율의 증가가 없는 시점에서 0.5% 수준의 조효소액을 추가하여 계속 분해를 행하였으며, 각 시간별로 취한 시료의 일부는 TLC를 행하여 올리고당 생성 여부를 확인하였다.

환원당, 전당 및 분해율 측정

효소와 기질의 반응으로 생성되는 환원당 함량은 Somogyi-Nelson 법[10]에 따라 측정하였으며, 이 때 표준 검량선은 glucose를 이용하여 작성하였다.

전당은 phenol-sulfuric acid 법[21]에 따라 시료 용액 1ml를 test tube에 취하고, 5% phenol 용액 1ml를 가한 후 혼합하고, 진한 황산 5ml를 반응액에 직하하여 가능한한 발열시키면서 잘 혼합하였다. 이 반응액을 실온에서 20-30분간 방치한 후 470nm에서 흡광도를 측정하여 glucose를 이용하여 작성한 표준 검량선으로부터 구하였다.

반응시간에 따른 분해율은 반응액의 전당 함량에 대해 생성된 환원당의 비로써 나타내었다.

Thin layer chromatography(TLC)

TLC aluminum plate(Kieselgel 60, Art No. 5553, 20 \times 20 cm)를 105 $^{\circ}$ C에서 1시간 전처리하여 데시케이터 중에 방냉하였다. 이 plate에 시료액을 10-15 μ l spotting한 후, 사용 1시간전에 제조한 n-butanol, acetic acid, H₂O 혼합액(2:1:1)에서 전개하였다. 전개 후 60 $^{\circ}$ C에서 건조하여 발색제(aniline, diphenylamine, acetone, phosphoric acid 혼합액)를 분무하여 105 $^{\circ}$ C에서 1시간 발색하였다.

중합도 측정

올리고당 획분의 중합도는 Hirst 등[1]이 보고한 방법에 따라 측정하였다. 즉, 시료 용액의 당 농도를 3.4mg/25ml로 조절하고 이 시료 용액 1ml에 1% sodium borohy-

dride 1ml을 가하였다. 대조 실험으로는 1N 황산 용액으로 만든 1% sodium borohydride (inactivated borohydride)를 1ml 가하였다. 이것을 상온에서 1시간 방치한 후 4% phenol 용액 1ml를 첨가한 다음 진한 황산 5ml를 가하고 다시 상온에서 30분간 방치한 후 470nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 공식은 시료 용액 대신에 증류수를 취하였다. O.D. 값으로부터 다음 식에 의해 중합도를 계산하였다.

$$DP = Q / (Q - 1),$$

여기서, Q는 reduced oligosaccharide의 O.D값/non-reduced oligosaccharide의 O.D. 값

카라기난 올리고당의 항균성 및 항충치성

반응 시간에 따라 얻어진 카라기난 분해물 및 올리고당획분의 항균성 및 항충치성은 paper disk 법[9]을 이용하여 측정하였다. 멸균 petri dish에 Mueller Hinton agar 배지를 20ml 씩 부어 평판을 만들고 시험 균주들을 37°C에서 12시간 배양시킨 균액을 면봉을 이용하여 petri dish 상에 도말하여 접종하고, 25°C에서 2시간 전배양시킨 후 paper disk(8mm, Advance Toyo, Japan)를 평판위에 올려 놓고 그 위에 0.45µm membrane filter로 여과한 분해물 및 올리고당 획분 50µl를 마이크로 피펫으로 가한 후, 37°C로 조절된 배양기에서 배양하였다. 배양 12시간과 24시간 경과후 disk paper 주위의 투명화생성 여부로 항균성 유무를 판별하였다. 본 실험에 사용한 균주는 그람 양성 세균으로 *B. cereus*, *B. subtilis*, *St. aureus*를 그람 음성 세균으로 *E. coli*, *Enter. aerogenes*를 이용하였다. 항충치성균으로는 *Streptococcus intermedius*를 이용하여 항균성 실험과 동일한 방법으로 행하였다.

항혈액 응고능 측정

혈장은 정맥혈 4.5ml를 채취하여 0.5ml의 sodium citrate (3.8%)용액과 혼합한 다음 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장은 -20°C에 저장해두고 실험에 사용하였다[3]. 활성 트롬보플라스틴 시간 측정(APTT, activated partial thromboplastin time)은 혈장 10µl를 넣고 교반한 후 37°C 항온수조에서 2시간 가온하였다. 여기에 100µl actin을 첨가한 후 다시 37°C 항온수조에서 3분간 가온하였다. 3분이 되는 순간 미리 37°C로 가열하여

둔 0.025M CaCl₂ 용액 100µl를 넣음과 동시에 응고시간을 측정하였다. 프로트롬빈 시간 측정(PT, prothrombin time)은 37°C 항온수조에서 1분이상 미리 가온하여둔 thromboplastin C 200µl에 37°C에서 미리 5분 이상 가온하여둔 혈장과 시료 용액 혼합액(혈장:시료 용액 = 10:1) 100µl를 가함과 동시에 응고 시간을 측정하였다.

결과 및 고찰

카라기난의 분해율

반응 시간에 따른 카라기난의 분해율을 확인한 결과 (Fig. 1), 초기 반응은 매우 느려 반응 5시간에 약 4.5% 정도만 분해되었으나, 이후 반응 시간이 경과함에 따라 급격히 분해율이 증가하여 반응 10시간에 약 18%의 분해율을 보였으며, 분해 15 및 20시간에는 각각 23.5%와 32%의 분해율을 나타내었으며, 이후 30시간 이후로는 커다란 분해율의 증가없이 33% 정도를 나타내었다. 초기 분해율이 낮은 것은 기질인 카라기난의 강한 점도로 인해 초기 기질과 효소의 반응이 크게 저해를 받는 것으로 판단되었으며, 일단 어느 정도 점도의 저하가 진행된 다음부터는 일정 분해율까지 급격히 분해된다는 것을 알 수 있었다. 한편, 20시간 분해 반응 시점에서 5ml의 효소를 재첨가하여 반응시켰지만 역시 커다란 분해율의 변화는 없었는데, 이러

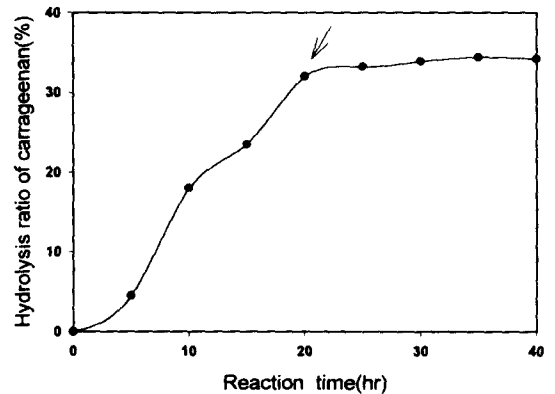


Fig. 1. Hydrolysis ratio of carrageenan for reaction time with the carrageenase.

Degradation ratio is (reducing sugar/total sugar)×100. The arrow indicates the addition time of 5ml carrageenase.

한 분해의 한계는 분해되지 않고 잔존하는 당질을 회수하여 재분해시켰을 때 분해 증가율이 미미한 것으로 볼 때, 카라기난 기질의 구조에서 유래하는 것으로 판단되어지며, 확실한 이유는 얻어진 올리고당의 형태와 효소의 작용 특이성의 연구가 더 진행되어야 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

분해물의 TLC 패턴 및 중합도

카라기난 분해물을 TLC한 결과는 Fig. 2와 같다. 반응 15시간에 3-4개의 spot가 나타났고, 반응 30시간에도 거의 유사한 패턴의 TLC 결과를 얻을 수 있었는데, TLC 패턴으로는 반응시간에 따른 생성 당질의 차이점은 없는 것으로 나타나 본 실험에 사용한 효소의 특이성을 어느 정도 나타내는 결과였으며, 분해율과 비교해 볼 때 더욱 특이성을 가지는 효소인 것으로 판단되었다. 한편, 각 획분별 농도는 정확하게 측정할 수는 없었지만 고분자 획분(이동도가 작음)의 농도가 감소하는 것으로 확인되었으나 비례적으로 저분자 획분(이동도가 큼)의 농도가 증가하지는 않았다. 본 효소를 이용하여 카라기난을 분해할 경우 최소한 3

개 이상의 올리고당 획분이 생성된다는 것은 확인되었으나, 표준품이 없는 물질이기 때문에 어느 정도 크기의 올리고당인지 TLC로는 측정할 수 없기 때문에 동일한 조건에 전개하여 얻어진 몇 개의 plate에서 이동도별로 spot을 모아서 증류수에 용해하여 그 중합도(Table 1)를 측정함으로써 올리고당의 크기를 확인하였다. TLC 상에서 spot을 3개로 분리하였는데, 이동도에 따른 중합도의 차이는 확실하였으며, C1은 8.0-10.0, C2는 5.5-7.5, C3는 1.0-4.0 정도의 중합도를 나타내었다. 실험 오차가 매우 커서 정확한 중합도를 측정하기는 어려웠으나 spot 별로의 차이는 명확하였고, 각 획분별 농도는 C2와 C3 획분이 대부분을 차지하였으며, spot한 부분은 미분해 획분인 것으로 판단되었으며, 상기 획분들의 정확한 중합도나 분자량은 기기분석이나 구조분석을 통해 확인해야 할 것으로 여겨진다.

항균성 및 항충치성

카라기난을 15시간 이상 분해시킨 전당 함량이 6mg/ml인 한천 분해물과 TLC 상에서 획득한 올리고당류는 카라기난을 25시간 분해시킨 시료로 전당 함량이 0.5 mg/ml이 되도록 각 획분을 조절하여 항균성 및 항충치성 실험을 행한 결과는 Table 2와 같다.

카라기난 분해물의 경우 전체적으로 병원성 미생물에 대해 강한 항균 활성은 나타내지 못했으나, *St.aureus*, *B.cereus* 및 *B.subtilis*에 대해서는 항균활성을 나타내었으며, 특히 20시간 이상 분해 시킨 분해물에서는 대개 그 활성이 나타났다. 25시간 분해시킨 분해물로 TLC하여 얻어진 올리고당 획분의 경우도 *St.aureus*, *B.cereus* 및 *B.subtilis*에 대해서 특이적인 활성을 보였다. 그러나 충치균인 *Str.intermedius* 균에 대해서는 활성을 거의 확인하지 못했는데, 이러한 결과는 올리고당이 일반적으로 항충치능을 갖

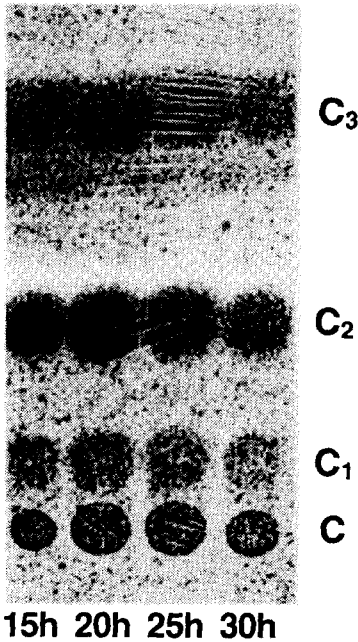


Fig. 2. Thin layer chromatography of the carrageenan hydrolysis products by carrageenase.

Table 1. Degree of polymerization(DP) of oligosaccharide fractions separated from TLC plate

Spot No ¹⁾	Degree of polymerization
C1	9.0±1.0 ²⁾
C2	6.0±1.5
C3	2.5±1.5

¹⁾obtained from TLC plate(Fig.1)

²⁾Mean ± S.D.(n=3)

Table 2. Antimicrobial and anticavity activities of carrageenan hydrolysates and oligosaccharide fractions obtained from TLC

Sample	<i>E.coli</i>		<i>St.aureus</i>		<i>Ent.aerogenes</i>		<i>B.cereus</i>		<i>B.subtilis</i>		<i>Str.intermedius</i>	
	12 ⁴	24	12	24	12	24	12	24	12	24	12	24
Control ¹	± ⁵	-	-	-	-	-	±	±	±	±	±	-
C-15 ²	-	-	±	-	-	-	±	-	±	-	-	-
C-20	-	-	+	+	±	-	+	±	+	±	±	-
C-25	±	-	+	+	±	-	+	±	+	±	±	-
C-30	±	-	+	+	-	-	-	-	-	-	±	-
C1 ³	±	-	+	±	±	-	+	+	+	+	±	-
C2	±	-	+	±	+	±	+	+	+	+	±	-
C3	±	-	±	-	+	±	+	+	+	+	±	-

- *1 : commercial κ -carrageenan(Sigma Co.)
- 2 : enzymic hydrolysates of carrageenan on each hydrolysatation time
- 3 : oligosaccharide fractions obtained from TLC plate(Fig. 2)
- 4 : incubation time of each strain
- 5 : antimicrobial and anticavity activity; + - high(15>clearzone diameter>12mm), ± - a little active(clearzone diameter<12mm), - - not active

는다고 하는 것과는 상이한 결과였으며[7], 주 등[3]이 보고한 한천 분해물의 경우와는 완전히 반대되는 결과를 가져왔는데 그 이유는 확실하지 않지만 올리고당이 가지는 구조에서 기인하는 것으로 추측할 뿐이며, 올리고당의 구조나 형태에 대한 연구가 진행된다면 그 원인에 대해서도 확실한 추정이 가능할 것으로 판단된다.

항혈전성

카라기난은 황산기를 함유하는 해조다당으로 카라기난의 종류에 따라 황산기 함유량이 약간씩 차이는 있으며, 본 실험에서 사용한 카라기난은 κ -type으로 카라기난 종류중에서는 황산기 함유량이 적다. 그러나 일반적으로 황산기를 함유하는 당질은 항혈액응고능이 있는 것으로 확인되고 있으며[8], 카라기난 올리고당도 항혈액응고능이 있을 것으로 판단되어 실험을 행한 결과는 Table 3과 같다.

카라기난 및 카라기난 분해물 그리고 올리고당획분 모두 APTT 활성이 확인되었으며, PT는 전혀 관찰되지 않았는데 이는 내인성 경로 인자를 저해하는 작용인 것으로 판단된다[8]. 일반적으로 항혈액응고제제인 헤파린에 비해서는 낮은 값이었으나 한천분해물에 비해서는 그 활성이 높았다. 실제 항혈액응고능은 황산기 함유량과 분자량에 의존하는 특성을 가지는 것으로 알려져 있는데, 본 실험

Table 3. Anticoagulant activity of carrageenan hydrolysates and oligosaccharide fractions obtained from TLC plate

Sample	Clotting time(sec)	
	PT ⁴	APTT
Control ¹	15	47 ± 3
C-15 ²	15	52 ± 2
C-20	15	50 ± 3
C-25	15	56 ± 3
C-30	15	54 ± 3
C1 ³	15	53 ± 3
C2	15	50 ± 3
C3	15	55 ± 3

- 1: commercial κ -carrageenan(Sigma Co.)
- 2: enzymic hydrolysates of carrageenan on each hydrolysatation time
- 3: oligosaccharide fractions obtained from TLC plate(Fig. 2)
- 4: PT - prothrombin time
APTT - activated partial thromboplastin time

험의 결과는 분자량과는 상관성을 가지는 결과를 나타내지 않았다. 분해물이나 올리고당획분에서도 그 활성이 명확하게 구분되지 않았는데, 이러한 결과는 카라기난이나 올리고당의 분자량에서 그 활성이 기인하는 것은 아닌 것으로 추정되었다.

요 약

카라기난 분해균인 *Pseudomonas alcaligenes* JCL-43이 생산하는 카라기난 분해효소를 이용하여 카라기난 올리고당 제조를 시도하였고, 올리고당을 TLC를 통해 확인하였으며, TLC로부터 얻어진 각 획분의 중합도를 측정하였다. 효소를 이용한 카라기난 올리고당을 제조하기 위한 효소와 기질과의 반응은 반응 20시간에 32% 정도의 분해율을 나타내었으며, 그 이후 반응시간의 경과에 의해서도 분해율의 증가는 나타나지 않았다. 반응 20시간 이후의 분해물에서는 TLC 상의 획분이 3-4개 나타났으며, TLC로부터 획득한 올리고당의 중합도는 획분에 따라 DP가 1.0 - 10.0 정도를 나타내었다. 카라기난 분해물과 올리고당의 일부는 항균 활성이 확인되었으나, 항충치성은 나타나지 않았다. 분해물과 올리고당 획분에서는 항혈액응고능도 확인되었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 목적기초 연구비 지원(94-0402-07-01)과 한국과학재단 지정 강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터의 지원에 의한 것입니다. 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Hirst, E. L., E. Percival and J. K. 1964. Wold. The structure of alginic acid. Part IV. artial hydrolysis of the reduced polysaccharide. *J. Chem. Soc.*, 8, 493-499.
- Joo, D. S., S. Y. Cho and E. H. Lee. 1993. Isolation of Alginate-degrading Bacteria and production of Alginate degrading activities by the Bacteria. *Kor. J. Micorbiol. Biotechnol.*, 21, 207-211.
- Joo, D. S., S. Y. Cho and E. H. Lee. 1998. Preparation of Agar Hydrolysates by Agarase and Functionality of the Hydrolysates. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 13, 378-382.
- Joo, D. S., S. Y. Cho, S. T. Yang and E. H. Lee. 1999. Purification and characterization of carrageenase from *Pseudomonas alcaligenes* JCL-43. *Korean J. of Life Science, Processing of printing.*
- Joo, D. S., J. S. Lee, J. J. Park, S. Y. Cho, H. K. Kim and E. H. Lee. Preparation of oligosaccharides from alginic acid by enzymic hydrolysis. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 146-151(1996)
- Kim, B. J., S. D. Ha, D. J. Lim, C. H. Song and J. Y. Kong. 1998. Production of agarooligosaccharides using of agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 13, 524-529.
- Kobayshi, S., H. Okemoto, K. Hara and H. Hashimoto. 1990. Preparation and some properties of novel maltopentaose forming enzyme of a *Pseudomonas* species. *gric. Biol. Chem.*, 54, 147-156.
- Koo, J. G., K. S. Jo, J. R. Do and S. J. Woo. 1995. Isolation and purification of fucoidans from *Laminaria religiosa* and *Undaria pinnatifida* in Korea. *J. Korean Fish. Soc.*, 28, 227-236.
- Lorian, V. 1991. Antibiotics laboratory medicine. pp.17-105, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Somogyi, M and N. Nelson. 1952. Notes on Sugar Determination. *J. Biol. Chem.*, 195, 19-23.
- Takasaki, Y., M. Kitajima, T. Tsurata, M. Nonaguchi, S. Hayashi and K. Imada. 1991. Maltotriose producing amylase from *Microbacterium imperiale*. *Agric. Biol. Chem.*, 55, 687-692.
- Urano, H., T. Kawakatsu and H. Nabetani. 1997. Separation properties for oligosaccharides of nanofiltration membranes and its application to a purification process of Jerusalem Artichoke oligosaccharides. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 44, 457-462.
- Yang, S. T., D. S. Joo, J. J. Park, J. S. Lee, M. S. Kim and E. H. Lee. 1996. Isolation and identification of carrageenan degrading bacteria and optimization of enzyme production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 652-656.
- Yoshika, H., K. Fujita, H. Sakata, K. Murano and K. Iseki. 1991. Development of the normal intestinal flora and its clinical significance in infants and children. *Bifidobacteria Microflora*, 10, 11-17.
- 菅野智榮. 1898. イソマルトオリゴ糖の生理機能とその應用. *New Food Industry*, 31, 9-16.
- 菅田房男・横田爲. 1992. 微生物による天然多糖から有用オリゴ糖の生産. *生物と化学*, 30, 170-175.
- 滝沢 登志雄. 1995. オリゴ糖の新しい機能性. *食品と開発*, 28, 21-24.
- 北御門學・西村光弘・山口邦子・曾照煌. 1993. アルギン酸から酵素分解によって調製したオリゴ糖の静菌作用. *日本水産學會誌*, 59, 315-321.
- 李應昊・周東植. 1994. 올리고당의 機能特性. *冷凍・空*

- 調工學, **13**, 155-166.
20. 日高秀昌・榮田利章・足立 暁・齋藤安弘. 1987. フラクトオリゴ糖の工業生産とその利用開發. 日本農藝化學會誌, **61**, 915-923.
21. 日本食品工業學會. 1984. 食品分析法. 光琳, p.189.
22. 劑藤忠夫・中澤勇二. 1988. 含ピフィズス活性オリゴ糖の研究成果とその利用性. *New Food Industry*, **30**, 73-78.
23. 酒井重男. 1993. オリゴ糖の開發の現狀と展望. 月刊フードケミカル, 21-29.