한국생물공학회지 제17권 제2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 17, No. 2, 137-141(2002)

산가수 분해법에 의한 레반 올리고당의 제조 및 유산균 생육촉진 효과 연구

강 태 호 · 정 성 제 · [1]강 순 아 · †[1]장 기 효 · [2]장 은 경 · [2]김 승 환 · [2]김 인 환 · [2,3]김 철 호 · [3]이 상 기 · 전 억 한
경희대학교 생명과학부 식품공학전공, [1]경희대학교 동서의학대학원, [2]한국생명공학연구원 ㈜리얼바이오텍,
[3]한국생명공학연구원 생물공정연구실
(접수 : 2002. 1. 29., 게재승인 : 2002. 3. 30.)

Preparation of Levan Oligosaccharides by Acid Hydrolysis and Its Application in Growth of Lactic Acid-producing Bacteria

Tae Ho Kang, Sung-Je Jung, Soon Ah Kang[1], Ki-Hyo Jang[1]†, Eun-Kyung Jang[2], Seung-Hwan Kim[2], In-Hwan Kim[2], Chul Ho Kim[2,3], Sang-Ki Rhee[3], and Uck-Han Chun
Department of Food Science and Technology, Institute of Life Science, Kyung Hee University, Suwon 449-701
[1]Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Hoeki-Dong 1, Dongdaemoon-Ku, Seoul 130-701
[2]RealBioTech Co. Ltd, #202, BVC, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), 52 Oun-dong, Yusong, Daejon 305-333
[3]Biotechnology Research Division, KRIBB, 52 Oun-dong, Yusong, Daejon 305-333
(Received : 2002. 1. 29., Accepted : 2002. 3. 30.)

Levan oligosaccharides and low molecular weight levan were produced from levan by acid hydrolysis and following column chromatography. Levan hydrolysis was progressed proportionally as increased incubation time. In terms of levan hdrolysis reaction, no differences were found from the sources of levan. Optimum hydrolysis conditions for the formation of levan oligosaccharides were, 0.38 M H_2SO_4; and incubation at 95°C for 4 min. The purified products were determined as the mixture of oligosaccharides (degree of polymerization (DP) of 3-6). Two of lactic acid-producing bacteria, Lactobacillus plantarum KCTC 3104 and Pediococcus pentosaceus KCTC 3507, were studied in vitro for their ability to metabolize levan oligosaccharides. Apparently, the growth of both cells were increased by levan oligosaccharide diet, compared with those of levan diets, suggesting that levan oligosaccharides may be beneficial in selectively growth of lactic acid-producing bacteria.

Key Words : lactic acid-producing bacteria, levan, levan oligosaccharides

서 론

현재 기능성 식품에 대한 중요성은 점차 확산되고 있으며, 이러한 기능성 식품의 범주에는 다당류와 이들의 올리고당이 포함된다. 대부분의 당질은 소화효소에 의해 단당으로 분해되어 흡수되는데 반하여, 일부 올리고당은 소화효소에 의하여 분해되지 않고 대장에 도달하여 장내유산균에 의하여 발효된다. 이 결과 생성된 젖산, 초산 등의 유기산은 장내 pH를 산성화하여 유해미생물의 생육을 억제한다(1). 이와 같은 영양학적인 측면 이외에도, 이들 올리고당의 특성 중에는 낮은 점성, 빙점을 낮추고, 낮은 수분 함유력으로 미생물의 생육을 억제함으로써 식품의 저장기간을 연장시키는 특성을 부여한다(2). 현재 국내외에서 식품소재로 사용되고 있는 주요 올리고당에는 이눌린 유래의 프락토올리고당, 갈락토올리고당, 이소말토올리고당, 대두올리고당 등이 있다.

프락토즈로 이루어진 폴리머로는 이눌린과 레반이 있으며, 이들 폴럭토즈 폴리머는 공통적으로, 결합구조에 있어서 한쪽 끝에는 포도당 분자로 구성되며 과당 분자가 직렬 또는 가지 구조로 형성되어 있다(3). 하지만, 차이점으로는 레반의 결합구조는 주로 β-2,6으로 이루어져 있는 반면에 이눌린의 결합구조는 β-2,1으로 이루어져 있다. 따라서, 레반 유래의 올리고당은 이눌린 유래의 올리고당과는 다른 물리적, 생리적 기능이 기대된다. 지금까지 프락토올리고당에 대한 연구는 주로 이눌린 올리고당에 국한된 실정이다. 이는 상대적으로 레반 올리고당을 손쉽게 생산할 수 있는 방법이 없었기 때문이다. 최근, 재조합균주를 이용한 레반의 대량생산이 가

†Corresponding Author : Department of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Hoeki-Dong 1, Dongdaemoon-Ku, Seoul 130-701
Tel : +82-2-961-0506, Fax : +82-2-961-9214
E-mail : kihyojang@hotmail.com

능하게 되었으며(4), 레반을 이용한 다양한 생리적 효능 연구가 진행되고 있다. 현재 밝혀진 레반의 효능로는 덱스트란과 물리화학적 특성이 유사하여 혈장대용제나 폴리에틸렌글리콜/레반의 수상이상분계 형성을 이용한 단백질 분리(5) 등 덱스트란을 대신하는 분야와, 유화제, 안정화제, 화장품, 제약분야, 캡슐화 시약 등의 분야에 응용될 수 있다(3,6). 하지만, 레반의 응용성을 제한하는 요인 중의 하나는 레반의 낮은 용해도에 있다. 즉, 낮은 농도에서는 쉽게 레반용액을 만들 수 있으나, 7%(w/v) 이상에서는 겔 상태를 형성하므로, 고농도의 레반 수용액을 만들 수 없다. 상대적으로 저분자량의 레반 올리고당(중합도 5이하)에서는 50% 이상의 고농도의 수용성 레반 올리고당 제조가 가능하다. 효소법에 의하여 생성되는 레반 올리고당은 중합도가 최대 7 또는 7 이하로, 중합도 7 이상 되는 저분자의 레반 폴리머에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다(7). 이눌린과 달리 레반은 분자량이 매우 큰 고분자량 물질임으로, 레반의 산업적인 적용을 위해서는 분자량을 조절할 수 있는 방법이 필요하다.

따라서, 본 연구에서는 산분해법에 의하여 저분자량의 레반과 레반 올리고당을 생성하는 공정의 최적화를 위하여 산 가수분해 조건과 분리공정에 대한 연구를 수행하였다. 또한, 생산된 레반 올리고당을 유산균 배양 실험을 통하여 유산균 생육 촉진 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

본 실험에 사용한 레반은 *Zymomonas mobilis* 혹은 *Pseudomonas aurantiaca* S-4380 유래의 levansucrase을 이용하여 생산하였으며, (주)리얼바이오텍 (한국생명공학연구원내 소재, 대전)에서 제공 받아 사용하였다. 염산과 황산은 특급시료를 사용하였다. Fructooligosaccharides는 Wako사 제품을 사용하였고 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

산 가수분해

산종류에 따른 산 가수 분해 효과를 비교하기 위하여, 세 가지의 산을 사용하였으며, 이들 산 용액의 pH는 1.6-2.0으로 조절하였다. 산 가수분해 반응은 5% 레반 수용액에 0.03 M HCl(pH 1.8), 0.38 M H_2SO_4(pH 1.6), 또는 0.5% oxalic acid(pH 2.0)를 가한 후, 90℃에서 5분간 방치하였다. 반응을 정지시키기 위하여 50 mM NaOH로 pH를 중성화 시킨 후에 TLC 법으로 분석하였다. 환원당 및 총당의 함량은 DNS법 및 Anthrone법으로 측정하였다.

저분자량 레반과 레반올리고당의 제조

레반수용액 5%를 제조 후에 산을 첨가하여 산 가수분해하였다. 5% 레반 수용액을 0.38 M 황산 용액에서 95℃에서 4분간 반응한 후, 5배의 에탄올을 첨가한 후, 원심분리법에(5,000 rpm, 10분) 의하여 침전물(저분자량레반)과 상층액(레반올리고당)으로 분리하였다. 저분자량의 레반을 제조하기 위하여, 침전물을 동결건조 하였다. 한편, 레반 올리고당을 제조하기 위해서, 원심분리 후에 회수된 상층액을 60℃로 설정된 회전식 증발기로 농축시킨 후에, 칼럼 크로마토그라피법을 사용하였다. 이를 위하여 Silica gel을 유리칼럼 (3×50 cm)에 충진시킨 후, 전용량에 대해 1-5%의 시료액을 용출, 분획하였다. 용출액은 클로르포름-에탄올-물 (3-3-2)으로 하였고, 분취된 획분은 동결건조하여 중합도 3-6의 올리고당을 얻었다. 인공위액을 이용한 산 가수분해 실험에서는 0.4 mL의 5% 레반수용액에 0.2 mL의 인공위액(2 g of NaCl, 7 mL concentrated HCl, per 1 liter)을 첨가하고 37℃에서 0-16시간 동안 저어준 다음, NaOH를 첨가하였다. 반응시간, 반응온도에 따른 레반의 분해율은 반응액의 전체당에 대해 분해되어 생성된 과당의 비로서 나타내었다.

미생물실험

실험에 사용한 균주로는 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104와 *Pediococcus pentosaceus* KCTC 3507였으며, 균주의 배양을 위하여 변형된 PYF 배지를 사용하였다. 변형된 PYF 배지조성은 1 리터당 Yeast Extract 10 g, Peptone 5 g, Tryptone 5 g, L-cystein hydrochloride hydrate 0.5 g, salt solution 40 mL였고, pH는 7.5로 조절하였다. Salt solution의 조성은 1 리터당 $CaCl_2.2H_2O$ 0.2 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g, K_2HPO_4 1 g, KH_2PO_4 1 g, $NaHCO_3$ 10 g, NaCl 2 g였다. 가압살균된 배지용액을 냉각 후에 필터로 여과된 당용액들을 최종농도 0.5%(w/v)로 첨가하였다. 배양실험을 위하여, 전날 계대 배양된 신선한 배양액을 변형된 PYF 배지에 접종하였으며, 37℃에서 20-25시간 배양하였으며, 흡광도 600 nm에서 균체의 농도를 측정하였다.

레반 올리고당의 분석

레반 올리고당의 조성 분석은 반응액을 0.45 m 여과막으로 여과한 다음, 여액 50 L를 고속액체크로마토그라피 (HPLC, Backman, USA)에 주입하여 정량하였다. HPLC 분석조건은 50℃로 유지시킨 칼럼(Ionpak KS-802, Shodex사 제품)을 이용하여 증류수를 0.4 mL/min의 속도로 흘려 주었고, 굴절율(refractive index)에 의해 검출하였다. 필요에 따라서, Sugar Pak I(6.5×300 mm) 칼럼을 사용하여 이동상을 물로 유속을 0.2 mL/min으로 하여 실온에서 굴절율에 의해 시료를 분석하였다. 과당, 포도당, 서당, 프락토-올리고당 등 각 표준당을 각 농도별로 20 L loop에 주입하여 검출하였으며, 각 농도별에 따른 peak 면적을 이용하여 표준곡선을 작성하였다.

TLC분석은 시료 1 L 취하여 Silica gel 60 F254(Merck) TLC plate에 집적하여 전개 용매(1-propanol: ethyl acetate : water = 45 : 35 : 20)로 두 번 전개하고 건조한 후 urea-phosphoric acid 발색 시약으로 프락토 올리고당의 성분을 확인 하였다.

결과 및 고찰

레반의 레올리지적 특성

저분자량 및, 레반 올리고당 생산을 위해 사용된 레반은 *Z. mobilis* 유래의 levansucrase를 이용하여 생합성되었으며, 레반의 평균 중합도는 6×10^6 이상으로, 완전히 분해시에는 과당과 극소량의 포도당으로만 이루어져 있었다. 본 실험에 사용한 레반의 구성성분은 식품개발연구원에서 분석하였으며, 탄수화물 95.6%, 회분 0.2%, 수분 4.2%으로 구성되었다. 레반

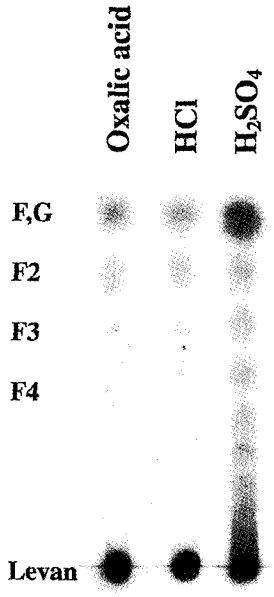

Figure 1. Thin-layer chromatogram of levan hydrolyzed with various acids. G, glucose; F, fructose.

Table 1. Total reducing-sugar content of levan hydrolysate formed under various conditions

Conditions		Supernatant	Pellet
H_2SO_4 (M)	Temperature (°C)	(mg/mL)	(mg/mL)
0.30	85	0.44	0.15
0.30	90	0.60	0.13
0.30	95	0.61	0.03
0.38	85	0.62	0.09
0.38	90	1.17	0.04
0.38	95	1.24	0.04
0.45	85	0.81	0.08
0.45	90	0.40	0.08
0.45	95	0.65	0.10

의 점도는 온도가 증가함에 따라 점도가 감소하는 일반적인 다당류의 특성을 나타내었으며 온도가 10°C에서 50°C로 증가함에 따라 4% (w/v) 레반수용액의 점도는 약 67% 감소하였다. 하지만, 수용액 상태의 레반은 50°C에서는 점차 가수분해가 일어나 단당류로 분해 되었고, 8% 농도에서는 수화가 되지 않았다.

레반 올리고당의 제조

레반 올리고당을 제조하기 위하여 열처리, 산종류, 산의 농도와 반응시간에 대한 효과를 비교하였다. 레반을 형성하는 β-2,6 결합은 이눌린의 결합구조인 β-2,1 결합구조와 비교시에 열처리와 산처리에 가수분해가 쉽게 진행되므로(3), 산의 종류에 따른 레반의 가수분해 효과를 관찰하고자 pH 2로 조절된 염산, 옥살산, 황산을 사용하여 레반을 산 가수분해 후에 TLC로 분석한 결과를 Figure 1에 나타내었다. 가수분해에 사용한 세가지 산 중에서 황산의 가수분해능이 가장 우수하게 나타났으므로, 가수분해조건을 보다 세분화하기 위하여

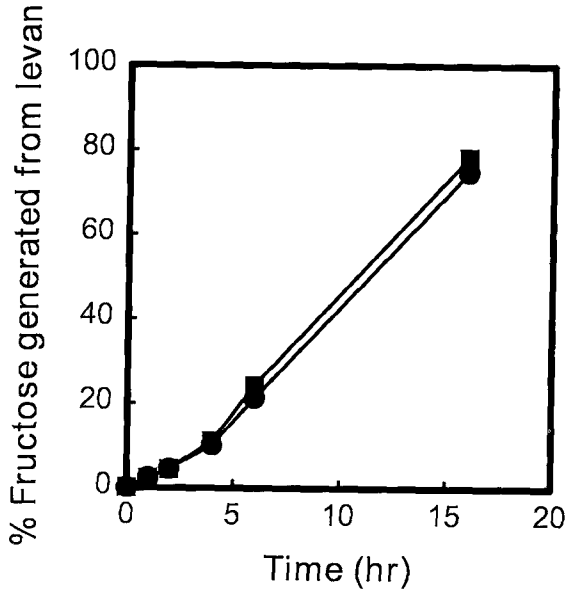

Figure 2. Hydrolysis of levan by acid treatment. ● levan formed by *Z. mobilis* levansucrase; ■ levan formed by *P. aurantiaca* levansucrase. 5% levan solutions were incubated with acid at 37°C for up to 16 hr, then the proportions of fructose were determined using HPLC.

황산을 0.30, 0.38, 0.45 M의 농도에서 미리 온도를 85°C, 90°C, 95°C로 조절된 water-bath에서 4분간 가수분해를 실시하였다. 반응 후 NaOH를 가하여 pH를 중화시켜서, 5배의 알코올을 가한 후 원심분리하여 상층액과 침전물을 분획하여, 상층액에서의 환원당의 양을 측정하였다 (Table 1). 5% 레반 수용액은 불투명한 회색이었으나, 0.38 M 황산을 95°C에서 4분간 가열하였을 때, 물처럼 투명한 특성을 나타내었다. 상층액을 이용한 TLC 분석결과에서는 단당류, 이당류를 포함한 올리고당, 다당류의 혼합형태로 존재하였으며, 황산의 농도를 증가시키거나 반응온도를 증가시에는 올리고당의 함량은 감소되고 상대적으로 단당류의 농도가 증가하였다. 따라서, 산업적으로 널리 사용되는 올리고당인 중합도 3-6의 레반 올리고당을 우선적으로 제조하는 조건은 5% 레반 수용액을 0.38 M 황산으로 95°C 에서 4분으로 결정하였다 (Table 1). 본 실험의 결과로부터 보다 큰 중합도의 레반 올리고당을 제조하기 위해서는 황산의 농도를 감소하거나 반응온도를 조절함으로써 가능하리라 사료된다. 한편, 레반의 크기와 구조에 따른, 산가수 분해율을 비교하기 위하여 두 종류의 미생물(*Z. mobilis* 혹은 *P. aurantiaca*) 유래의 levansucrase 로부터 합성된 레반을 수용액 상태로 만든후에 인공위액을 이용하여 산가수분해 하였다. 두 레반 공히, 산 가수분해 시간에 비례하여 레반의 가수분해가 진행되었다 (Figure 2). 일반적으로, 식물체 유래의 레반은 과당의 결합이 주로 직선상태로 이루어져 있는 반면에, 미생물 유래의 레반은 가지구조로 형성되어 있다(3). 본 실험에 사용한 레반은 *Z. mobilis*와 *P. aurantiaca*에서 유래되었으며, 분자량은 6백만과 70만, 그리고 레반의 가지정도는 각각 12%와 6%로 매우 상이한 구조를 가지고 있다(8). 따라서, 본 연구 결과로부터 레반의 산 가수분해는 레반의 구조와 크기에 큰 영향 없이 진행된다고 결론지었다.

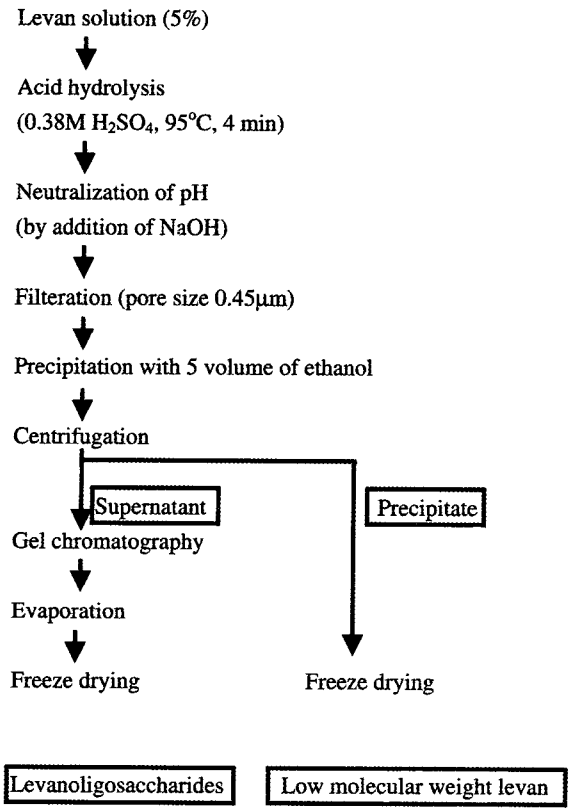

Figure 3. Flow chart for the preparation of levanoligosaccharides and low molecular weight levan from levan.

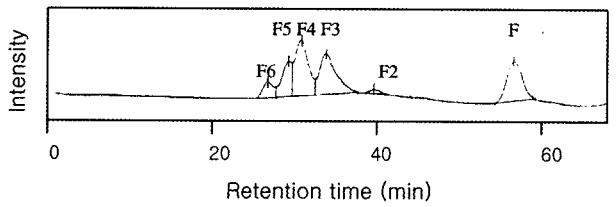

Figure 4. HPLC chromatogram of levan oligosaccharides. G, glucose; F, fructose.

레반 올리고당의 분리

고분자량인 레반은 물에서는 용해성을 나타내지만, 유기용매 즉, 에탄올, 메탄올, 이소프로판올 등에는 거의 녹지 않고 원심분리법에 의하여 쉽게 침전된다. 하지만, 레반 올리고당은 상기의 유기용매 처리와 원심분리법에 의하여 침전되지 않는다. 이러한 용해도 차이의 특성을 이용하여 에탄올을 5배 가한 후에 원심분리법으로 (5,000 rpm, 10분) 레반 올리고당과 저분자량 레반을 선택적으로 분리하였다. 레반 올리고당의 분리공정을 간략하게 Figure 3에 나타내었다. 상기의 공정으로 얻어진 레반 올리고당의 중합도는 3-6였으며 (Figure 4), 50% (w/v) 이상의 높은 농도에서도 쉽게 물에 수화되었다. Marx 등(9)은, 유산균이 탄소원으로 이용 가능한 레반의 중합도는 20이하로 제안하였고, 중합도 2의 레반 올리고당 역시 유산균의 생육을 촉진시킨다고 보고하였다. 또한, 이눌린을 이용한 연구결과에 의하면, 장내유산균은 과당사이의 결합구조인 결합을 효율적으로 분해할 수 있다고 알려져 있는 반면에(10), 유해 장내미생물은 일반적으로 레반 분해능이 결여된 것으로 보고되었다.

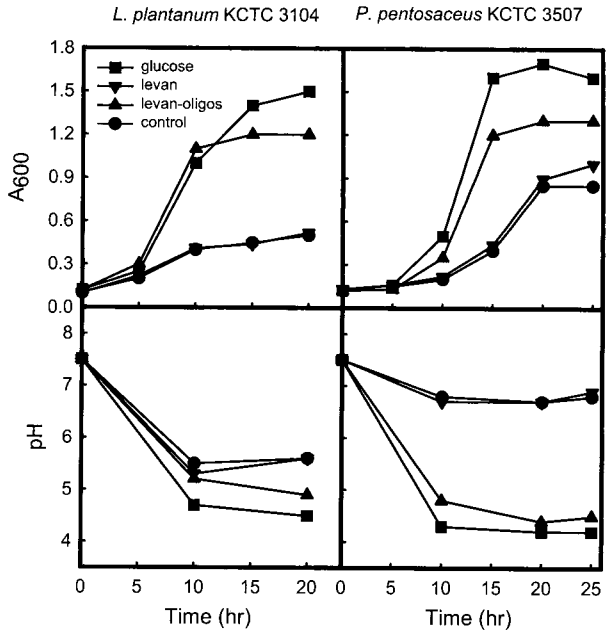

Figure 5. Growth and acidification of two lactic acid-producing bacteria in batch fermentation with levan oligosaccharides and other carbon source.

한편, 원심분리 후 침전물에서 회수된 분획에서는 레반의 분자량 보다는 분자량이 감소된, 그러나 레반올리고당 보다는 분자량이 큰 저분자량 레반이 회수되었다. 최근에 알려진 레반의 효능연구에서는, *Z. mobilis*에 의하여 생성된 레반은 암세포의 증식을 억제하고, 항암효과는 레반의 분자량과 밀접한 상관관계가 있다고 보고되었다. 즉, 다양한 크기의(중합도 380-1600) 레반 중에서 항암효과는 중합도가 증가하면서 효능이 점차 증가 하다가, 중합도 1050에서 가장 높게 나타났으며, 이 이상의 중합도에서는 항암효과가 점차 감소하였다(11). 하지만, 이들의 연구는 중합도 380-1600인 레반에 제한되며, 중합도 380이하 혹은 1600 이상에서의 항암효과는 연구되지 않았다. 따라서, 본 연구에서 제시된 저분자량의 레반 생성 방법과 상업적으로 이용이 가능한 다양한 크기의 막여과 장치를 이용한다면, 레반의 분자량 조절이 가능할 것이다.

레반 올리고당을 이용한 유산균 생육 촉진 효과 실험

본 실험에서 획득된 레반 올리고당의 장내유산균의 생육촉진 효과를 조사하기 위하여 2가지의 유산균의 (*L. plantarum* KCTC 3104와 *P. pentosaceus* KCTC 3507) 생육배지에 탄소원으로 레반 올리고당을 공급하였다. 당 종류에 따른 생육정도를 비교하기 위하여, 물, 레반, 포도당, 레반 올리고당을 탄소원으로 첨가하였다. 배양시간에 따른 미생물의 생육정도와 발효에 따른 pH 변화를 측정한 결과를 Figure 5에 나타내었다. 당 종류에 따른 생육정도를 비교하기 위하여, 물, 레반, 포도당, 레반올리고당을 탄소원으로 첨가하였다. 레반을 탄소원으로 공급시에는 미생물의 생육정도는 당을 첨가하지 않은 군과 비슷한 양상을 보였으며 이는 분자량이 큰 레반은 장내미생물에서 탄소원으로 이용이 제한된다는 다른 연구자의 결

과와 일치된다(12) (Figure 5). 레반 올리고당을 탄소원으로 공급하였을 때는 포도당을 이용한 발효정도 (흡광도 변화와 pH변화)와 매우 유사하게 나타나, 본 실험에서 제조된 레반 올리고당이 유산균의 발효에 이용이 되었다는 것을 보여 주었다. 예를 들면, 장내균총에 많이 존재하는 *L. plantanum*은 레반을 탄소원으로 사용한 경우, control 보다는 월등히 생육속도가 빠르게 나타났으며, 산 생성에 의한 pH저하는 레반 전처리 시료를 첨가한 배지에서 포도당이나 레반을 사용한 배지보다 급격한 pH 변화가 나타났으며 이는 발효 중에 생성된 초산과 젖산의 생성에서 기인한다.

결론적으로, 본 연구결과는 레반 올리고당을 이용한 장내 유산균 생육촉진제의 효능을 보여 주었으며, 또한, 다양한 생리기능이 예상되는 저분자량의 레반제조에 유용한 정보를 제공하리라 기대된다.

요 약

산가수분해법과 칼럼크로마토그라피법을 이용하여 레반 올리고당과 저분자량 레반을 생산하였다. 레반에 대한 산가수분해반응은 시간의존적으로 비례적으로 진행되었으며, 다른 미생물 유래의 레반을 사용시에도 동일한 결과를 나타내었다. 레반 올리고당의 제조를 위한 최적화된 조건은 5% 레반을 0.38 M 황산, 95°C, 4분간 처리하였을 때 였으며, 최종생산물로 중합도 3-6의 레반 올리고당을 얻었다. 생성된 레반 올리고당을 탄소원으로 이용하여 두 젖산 생성균주(*Lactobacillus plantarum* KCTC 3104와 *Pediococcus pentosaceus* KCTC 3507)의 생장배지에 첨가하고 레반 자체를 첨가한 배지와 비교시, 뚜렷한 생육촉진효과와 pH 감소효과가 나타났다.

감 사

본 연구는 교육부의 과기부 중점생명공학실용화사업 (과제번호 M10015000009-01A210000912)으로 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Topping, D. and P. M. Clifton (2001), Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides, *Physiological Reviews.* **81**, 1031-1064.
2. Cheong, T. K., T. J. Kim, M. J. Kim, Y. D. Choi, I. C. Kim, J. W. Kim, and K. H. Park (1996), Modulation of *Bacillus amyloytic* enzymes and production of branched oligosaccharides. In *Enzymes for Carbohydrate Engineering*, eds K. H. Park, J Robyt, amd Y. D. Choi, Eds., Elsevier, Amsterdam.
3. Han, Y. W. (1990), Microbial levan, *Adv. Appl. Microbiol.* **35**. 171-194.
4. Song, K. B. and S. K. Rhee (1994), Enzymatic synthesis of levan by *Zymomonas mobilis* levansucrase overexpressed in *Escherichia coli*, *Biotech. Lett.* **16**, 1305-1310.
5. Chung, B. H., W. K. Kim, K. B. Song, C. H. Kim, and S. K. Rhee (1997), Novel polyethylene glycol/levan aqueous two-phase system for protein partitioning, *Biotech. Tech.* **11**, 327-329.
6. Leibovici, J. and Y. Stark (1985), Increase in cell permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. *Cell Mol. Biol.* **31**, 337-341.
7. Kang, S. K., S. J. Park, J. D. Lee, and T. H. Lee (2000), Physiological effects of levan oligosaccharide on growth of intestinal microflora, *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 35-40.
8. Rhee, S. K., K. B. Song, C. H. Kim, B. S. Park, E. K. Jang, and K. H. Jang (2002), Levan, In *Biopolymers. Vol 5*, V. Erick, D. B. Sophie, and S. Alexander, Eds., Wiley-VCH, Germany.
9. Marx, S. P., S. Winkler, and W. Hartmeier (2000), Metabolization of -(2,6)-linked fructose-oligosaccharides by different bifidobacteria, *FEMS Microbiol. Lett.* **182**, 163-169.
10. Campbell, J. M., G. C. Fashey, and B. W. Wolf (1997), Selected indigestible oligosaccharides affect large bowle mass, cecal and fecal short chain fatty acids pH and microflora in rat. *J. Nutr.* **127**, 130-136.
11. Calazans, C. M. T., R. C. Lima, F. P. de Franca, and C. E. Lopes (2000), Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans, *Intern. J. of Biol. Marcromol.* **27**, 245-247.
12. Muramatsu, K., S. Onodera, M. Kikuchi, and N. Shiomi (1994), Substrate specificity and suitable affinities of -fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1642-1645.