연 구 동 향

Fructooligosaccharide의 미생물에 의한 생산, 분석, 응용에 관한 최신동향

김 왕 준

식품안전성연구본부

Ⅰ. 서론

본문은 FOS분야의 최근 발전단계에 초점을 맞춰 미생물에 의한 생산, 기능적 특성 및 응용과 FTase의 활력을 검사하는 다양한 분석 방법에 관한 내용을 다루고 있다. 다양한 미생물 유래의 FTase와 이것이 생산하는 1-ketose, 6-ketose, neoketose, 초기 sucrose 농도에 따른 수율 등에 관한 문헌을 종합하여 기술 되었다. FOS의 생산을 위한 다양한 발효방법이 사용되었다. Solid state fermentation (SSF) 은 FOS를 이용하여 고 부가가치의 농업산업제품 (agroindustrial byproducts)을 생산하는데 사용되어 왔다. 배지의 영양성분과 배양에 관한 요소가 최적화 되면 FOS 생산의 수율과 생산성은 증가할 것이다. 효소와 세포를 고정화(immobilization)하는 방법은 FOS의 대량생산을 위하여 효과적이며 경제적인 방법이다. Forced flow membrane reactor system, 미세여과 system이 장착된 생 촉매 system 등이 반응계로부터 유리된 포도당과 반응되지 않은 sucrose를 제거하여 약 98%의 수율로 FOS를 생산하게 한다. Fructosyltransferase와 glucose oxidase나 glucose dehydrogenase를 복합적으로 사용하여 매우 농축된 FOS를 약 90-98% 수율로 제조할 수 있다. 포도당의 제거를 위해 nano-여과를 하면 FOS를 약 90%의 수율로 제조 가능하다. 정제된 효소는 GF5나 GF6을 생산하는 crude 효소와는 달리 ketose와 nystose를 생산한다. 이 효소의 kinetic 특성 (Vm, Km, Ki)은 glucose의 첨가 또는 무첨가 시 다양한 기질의 농도에서 transfructosylation 반응속도를 구하여 결정 되었다. Polar-bonded phase와 resin-based HPLC column에 refractive index detector와 pulsed amperometric detector를 사용한 HPLC방법이 oligosaccharide의 분리에 주로 사용이 되고 annular size exclusion chromatography가 대량 및 연속적 분리에 사용된다. GLC나 TLC, NMR, mass spectrometry 등의 기술은 구조분석연구에 사용된다. Prebiotics,

dietary fiber, 흡착기능, 면역 기능, 당뇨병에서 지질대사의 조절 등의 기능성 등이 기술되어 있다. 식품배합 시 응용에 대해서도 토의되었다.

식품은 맛, 모양, 비용과 소비자들의 편의성에 따라 제조된다. 소비자의 건강상 이점에 초점을 맞춰 식품을 디자인하는 것은 비교적 최근의 경향이며 질병의 예방 및 조절을 위한 음식, well-being 등에 건강식품이 중요한 역할을 한다는 사실을 인식하기 시작하였다. 이러한 것이 식품을 디자인하는 태도를 변화시켰고 이로 인해 여러 단체와 산업체에서 건강상 이점이 있는 식품을 배합하는 새로운 산업을 발전시켰다. 건강상 이점이 있는 식품을 배합하기 위한 concept는 빠르게 인기를 더하고 있다. “기능성 식품” 시장에 있어 매우 중요한 동력은 소비자의 요구, 즉 소비자가 식품을 통하여 건강을 최고조로 유지하기 위한 요구이다. 소비자들은 식품이 직/간접적으로 그들의 건강에 기여한다고 믿고 있다. 이러한 과학적인 영역에서 소비자들의 인식의 성장은 식품업계에 건강식품의 개발에 몇 가지 concept를 설정하도록 만들었다. 기능성식품의 개발은 전통적인 식품의 개발보다 좀 더 과학적인 기준과 복잡성에 직면하게 된다. 지금까지 연구들은 주로 건강, 영양 그리고 식품 제조과정에서 과학적 기초를 마련하는데 주안점을 두어왔다. 그 이유가 무엇이 되었든 간에 시장에서 성공은 그 제품이 소비자들의 요구를 충족시킬 수 있는가에 달려있다. 성공적인 기능성식품의 개발을 위해 소비자들의 요구와 기회는 매우 중요하다 (Van Kleef, Van Trijp, Luning, & Jongen, 2002).

우리가 섭취하고 있는 식품과 우리의 건강과의 관계가 매우 밀접한 관계가 있다는 것이 확연해지고 있다. 특정질병의 예방에 다양한 식품성분 (영양소)이 유익한 작용을 한다는 과학적인 지식이 매우 빠르게 축적되고 있다. Functional food, designer food, pharma food, 그리고 nutraceutical food는 질병의 예방과 처치에 관한한 동의어이다. 일반적으로 functional food는 “개개인의 건강, 육체적 운동 혹은 정신적 상태에 긍정적인 영향을 미치는 어떠한 식품”으로 정의될 수 있다. 이런 식품의 기본적인 영양학적 내용이나 자연성 (natural being)에 더하여 기능성식품은 인간의 삶을 증진하는데 도움이 되는 요소(질병의 예방과 처치)를 포함하고 있다 (Goldberg, 1994).

Ⅱ. Functional food의 세계시장

세계시장에서 functional food의 규모는 3천억불에 달한다. 미국에서 health claim을 할 수 있는 기능성식품의 판매액은 5억불이며 health claim을 할 수 없는 경우는 천오백억불에 달한다. 일본은 또 하나의 중요한 기능성식품 시장이며 FOSHU (Foods of Specified Health Use)로 분류된다. 이 FOSHU로 label된 식품의 예상 시장규모는 2000년에 20억불이며 약 15억불의 판매고를 보여주었다. 유럽은 약 4-80억불이며 이것은 전체 식품과 음료의 1% 이하를 차지하고 있다. Europe국가 중 Germany, France, UK, Netherlands는 이들 식품의 주요 시장이다 (Menrad, 2003).

지금까지 다양한 형태의 functional food가 시장에 이미 진입하였다. 이들 중 많은 것들이 특징적인 기능성을 함유하고 있으며 이들은 dietary fiber, oligosaccharide, sugar alcohol, peptide, protein, prebiotics, probiotics, phytochemical, antioxidant, polyunsaturated fatty acid 등이다 (Stark & Madar, 1994).

그 중 dietary fiber, oligosaccharide, 특히 fructooligosaccharide (FOS)에 많은 관심이 집중되어 있다. 이것의 섭취에 따른 건강증진 효과는 식품원료로서 명성을 증가시켰으며 이들은 당뇨환자의 대체감미제로서 사용이 증가하고 있

다. FOS의 일일 평균 섭취량은 미국의 경우 1-4 g 이며 유럽은 3-11 g이다. FOS는 대부분 밀, 꿀, 양파, 마늘, banana로부터 얻어 진다 (Flamm, Glinsmann, Kritchevsky, Prosky, & Roberfroid, 2001). Table 1은 자연에서 FOS의 source를 나타낸다. 과거 20년간 FOS의 생산, 특성, 분석방법, 영양학적 이점 등에 관한 연구가 진행되어 왔다. 많은 review article이 식품에서 FOS의 존재, 제조, 특성, 응용에 대해 논하여왔다(Crittenden & Playne, 1996; Yun, 1996; Slavin, 1999). Flamm 등 (2001)은 FOS의 원료와 조성, 섭취 후 생리적 효과, 그리고 식이섬유와의 관계 등에 대해 좋은 비평을 하였다.

Table 1. Concentration of FOS in natural foods

Source	% FOS
Barley	0.15
Tomato	0.15
Onion	0.23
Banana	0.30
Brown sugar	0.30
Rye	0.50
Garlic	0.60
Honey	0.75

Fructosyltransferase (FTase)는 미생물이 생산하는 FOS합성 효소이다. FTase는 sucrose (GF)로부터 FOS (GFn)를 반비례적으로 생산하며 1-ketose (GF2)를 초기에 생산하다가 1-nystose (GF3)을 그리고 마지막에 1-fructofuranosyl nystose (GF4)을 생산한다. 이 반응방법은 이미 설명되어있다 (Yun, 1996). 미생물유래 FTase는 세균 및 곰팡이다. FTase를 분비하는 미생물이 탐색되었다 (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2003a).

Ⅲ. FOS의 생산

1. 세균유래 FTase

Inulinase를 분비하는 세균은 보고되어 있으나 FTase를 생산하는 세균의 보고는 매우 드물다. Sucrose로부터 FOS를 생산하는 transfrutosylase는 *Bacillus macerans* EG-6 로부터 보고되었으며 이것은 다른 FTase와 달리 GF5와 GF6을 선택적으로 생산한다. FOS의 최종수율은 50%의 sucrose가 기질로 사용되었을 경우 33%이다 (Park, Oh, & Yun, 2001).

Ethanol을 생산하는 세균인 Zymomonas mobilis는 FOS와 levan을 생산하는 levansucrase를 생산한다. Ethanol로 배양액을 침전했을 때 levan과 함께 세포 밖으로 침전되는 levansucrase가 sugar syrup에서 FOS생산을 위한 촉매로 사용되었다. 이때 수율은 약 24-32%였으며, 대산산물은 1-ketose, 6-ketose, neoketose, nystose의 혼합물이었다. Glucose의 양은 24시간 전역에 걸쳐 증가하였다. Sucrose syrup 중 ethanol이 존재 (7.0%)할 때 효소형성은 약 발효 24시간에 걸쳐 24%였다. Levan-levansucrase 침전물을 촉매로 사용하여 sucrose로부터 fructan syrup을 생산하여 만족할 만한 맛과 energy의 절감을 기한 보고가 있으며 생산물을 prebiotics로 사용할 수도 있다는 보고가 있다 (Becker et al., 2002).

Lactobacillus reuteri strain 121은 sucrose를 함유한 배지에서 배양하여 원심 분리한 supernatant에서 약 10 g/L (95% ketose와 5% nystose)의 수율로 FOS을 생산한다는 보고가 있다. 그 strain을 sucrose와 함께 배양했을 때 생산된 FTase는 FOS와 함께 inulin을 생산했다. Sucrose를 기질로 배양한 후 17시간 만에 5.1 g/L의 FOS와 0.8 g/L의 inulin이 합성되었다 (Van Hijum, Van Geel-Schutten, Rahouri, van deer Maarel, & Dijkhuizen, 2002). 기능성식품시장에서 FOS의 수요가 증가함에 따라 우수한 FTase를 생산하는 미생물을 탐색하려는 시도가 진행되고 있다.

2. 곰팡이 유래 FTase

몇몇 곰팡이, 특히 Aspergillus 속의 곰팡이, 중 세포외 (extracellular) 혹은 세포내 (intracellular) FTase를 생산한다고 알려져 있다. Aspergillus niger AS 0023은 50%의 sucrose를 기질로 사용했을 때 54%의 수율로 FTase를 생산한다는 보고가 있다 (L′ Hocine, Wang, Jiang, & Xu, 2000). Penicillium citrinum 으로부터 fructosyltransferase를 분리/정제하여 70%의 sucrose를 기질로 한 반응 액에 첨가하여 약 55% 이상의 FTase 효율과 함께 neofructoologosaccharide를 생산했다는 한 보고가 있다 (L′ Hocine et al., 2000). 이때 생산물은 1-ketose (22%), nystose (14%), neoketose (11%)의 혼합물이었다 (Hayashi, Yoshiyama, Fuji, & Shinohara, 2000).

2001년 Chien, Lee, Lin 등은 Aspergillus japonicus를 gluten에 고정화하여 이들 균주가 생산하는 β-D-fructofuranosidase (FTase)를 촉매로 이용하여 FOS를 생산하였다고 보고하였다. 20% (W/W)의 균사체를 함유하는 고정화된 균사체 1 gram은 100 ml의 sucrose용액에서 400 g/L의 FOS를 생산하였다. 5시간의 반응 후 FOS 수율은 전체 당 용량 중 61%에 달하였다. 반응속도는 gluten matrix의 cell 농도가 높을수록 증가하였고 최대치는 세포농도가 20% (W/W)일 때 가장 높았다.

Aspergillus oryzae의 extracellular FTase를 우수한 효소원으로 이용한 저자들이 있다 (Sangeetha et al., 2003a). 배양조건 및 여러 요소를 최적화하여 FOS의 수율을 58%까지 올렸다 (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2002). 배양액, 세포, A. oryzae CFR 202 와 A. pullulans CFR77을 분쇄한 배양액을 반응시켜 FOS를 약 60%수율로 생산하였다 (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2004a). fig 1은 이들의 공정도를 나타낸다.

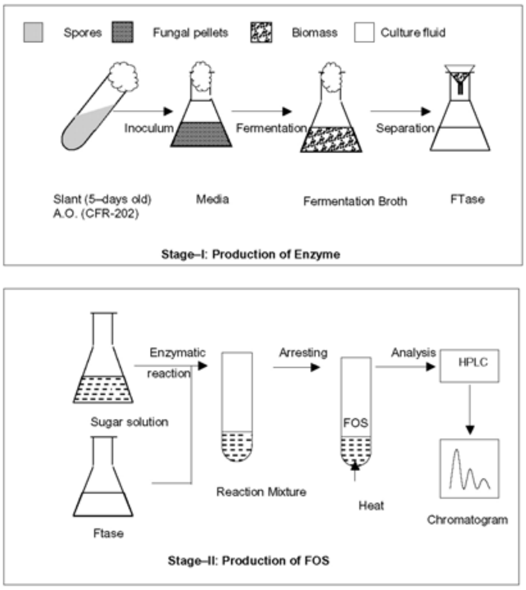

Fig. 1. Flow chart for producing FOS.

3. FTase의 생산을 위한 세포의 재사용

A. oryzae CFR 202의 pellet을 사용하여 FTase를 연속적으로 생산하는 system이 개발되었다. 이것은 고정화 효소나 고정화 세포를 사용하는 것 보다 가격 면에서 경제적이며 기존의 발효방법보다 몇 배 더 FTase나 FOS를 생산할 수 있다(Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, in press).

4. 미생물에 의한 FOS의 생산

다양한 미생물에 의해 FOS와 6-ketose, 6-ketose와 neoketose를 생산하는 보고가 있다. 미생물에 의한 oligosaccharide의 생산은 Prapulla, Subhaprada, Karanth (2000) 등에 의해 자세하게 review되었다. *Aspergillus phoenicis, A. japonicus, A. niger, Fusarium oxysporium, Scopulariopsis brevicaulis, Penicillium frequentens, P. rugulosum, Aureobasidium pullulans, Arthrobacter* sp. 등의 미생물로부터 유래한 효소가 sucrose로부터 FOS를 생산한다고 보

고되어 있다. *Scopulariopsis brevicaulis*는 오직 1-ketose를 생산한다. Table 2는 FTase 효소를 생산하는 미생물의 리스트이다.

Table 2. Microbial and plant sources of FOS synthesizing enzymes

	Reference
Fungal source	
Aureobasidium pullulans	Yun (1996)
Aureobasidium sp.	Yun (1996)
Aspergillus japonicus	Yun (1996)
Aspergillus niger	Yun (1996)
	Yun (1996)
Aspergillus sydowi	Yun (1996)
Calviceps purpurea	Yun (1996)
Fusarium oxysporum	Yun (1996)
Penicillium frequentans	Yun (1996)
Penicillium spinulosum	Yun (1996)
Phytophthora parasitica	Yun (1996)
Scopulariopsis brevicaulis	Yun (1996)
Saccharomyces cerevisiae	Yun (1996)
Wang&Rakshit, 2000	Wang and Rakshit (2000)
Penicillium citrinum	Hayashi *et al.* (2000)
Saccharomyces cerevisiae	Yun (1996)
Aspergillus foetidus	Wang and Rakshit (2000)
Penicillium citrinum	Hayashi *et al.* (2000)
Plant source	
Agave Americana	Yun (1996)
Agave vera cruz	Yun (1996)
Asparagus officinalis	Yun (1996)
Allium cepa	Yun (1996)
Cichorium intybus	Yun (1996)
Crinum longifolium	Yun (1996)
Sugar beet leaves	Yun (1996)
Helianthus tuberosus	Yun (1996)
Lactuca sativa	Yun (1996)
Lycoris radiata	Yun (1996)
Taraxacum officinale	Yun (1996)
Bacterial source	
Arthrobacter sps.	Yun (1996)
Bacillus macerans	Park *et al.* (2001)

배양액에 mineral salt는 미생물에 의한 FOS 생산을 증가시킨다는 보고가 있다. 이것의 효과는 Vigants, Laukevics, Toma, Rapoports, Zikmanis 등 (2000)에 의해 연구되었다. 10% sucrose 용액에 0.6M NaCl의 첨가는 *Zymomonas mobilis* 113S에 의해 FOS 생산을 약 3-5배 증가시킨다. 이때 sorbitol이 부산물로 함께 생산된다. 동결 건조된 *Zymomonas mobilis* 113S를 사용하여 고농도의 sucrose 용액 (65%, w/w)에서 발효했을 때 salt는 FOS생산에 저해효과를 가져왔다. FOS의 생산증가와 orbital의 형성은 균주에 삼투압보호작용 (osmoprotective role)을 하는 것으로 생각된다. 표 3은 문헌에 보고된 FOS 수율에 관한 내용이다.

5. 발효를 이용한 미생물에 의한 FOS의 생산방법

FOS를 생산하는 발효법은 submerged fermentation (SmF) 및 solid state fermentation (SSF) 등 두 가지 방법이 있다. SSF에 의한 효소생산은 운전의 단순성, 높은 수율, 낮은 오염, 최종 산물의 고농도 농축 면에서 SmF에 비해 장점이 있다. SSF는 적은 공간과 운전비용, 단순장치, 그리고 제조공정이 SmF보다 용이하다. 또한 잔여 농산물을 기질로 사용하여 높은 상품성을 지닌 제품을 제조할 수 있게 한다. 다양한 미생물을 사용하여 SmF로 FOS를 생산한 보고가 있다(Table 3). Prapulla 등은 (2000) SmF에 의한 FOS 생산에 대해 자세하게 논하였다. 그러나, SSF에 의한 시도는 사과박을 기질로 이용한 보고 외에는 찾아볼 수 없다 (Hang, Woodams, & Jang, 1995).

몇몇 연구자들은 cereal bran (Prapulla, Sangeetha, & Ramesh, 2002a), 옥수수제품 (Prapulla, Sangeetha,

Table 3. FOS yields obtained using FTase from various microorganisms

Source	Substrate (g/L sucrose)	Yield (%)	Reference
Aspergillus niger AS 0023	500	54	L'Hocine *et al.* (2000)
Penicillium citrinum	700	55	Hayashi *et al.* (2000)
Aspergillus japonicus	400	61	Chien *et al.* 2001
Aspergillus oryzae CFR 202	600	58	Sangeetha *et al.* (2002)
Aureobasidium pullulans CFR 77	550	60	Sangeetha *et al.* (2004a)
Bacillus macerans EG-6	500	33	Park *et al.* (2001)
Zymomonas mobilis	500–600	24–32	Beker *et al.* (2002)

& Ramesh, 2002b), coffee 및 tea 제조과정의 부산물 (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2003b), *A. oryzae*에 의한 사탕수수 및 cassava 폐기물 등의 기질을 이용하여(Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2004b) FTase를 생산 하였다는 보고를 하였다. 추가로, sucrose를 대체하여 정제하지 않은 설탕, 사탕수수즙 등에 *A. oryzae*를 접종하고 SSF법으로 FTase를 생산한 보고도 있다 (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2003c). 이 방법은 농산물 폐기물을 이용하여 FOS와 같은 고부가가치 산물을 생산한 좋은 예이다.

6. FOS 생산조건의 최적화

Plackett Burman design을 이용하여 FOS 수율을 높이려는 시도가 있었다. 이 연구는 FTase와 FOS의 생산에 영향을 미치는 변수를 single experimental design을 이용하여 구하였다. 발효액의 KH_2PO_4와 sucrose 농도와 발효시간이 FTase 생산에 영향을 미치는 것으로 나타났다. pH와 반응시간은 FOS 생산에 가장 큰 영향을 미쳤다 (Sangeetha et al., 2002). FOS 수율은 Shell Design에 의한 Response Surface Methodology (RSM)방법으로 향상시킬 수 있었다. FOS 생산의 최적화를 위하여 상기의 5 변수의 조합에 의한 상승을 Doehlert Experimental Shell Design 방법으로 구하였다. FOS생산에 미치는 중요한 변수를 구하기 위해 RSM을 사용하였다. 반응시간과 발효시간은 FOS 생산에 지대한 영향을 미쳤다. FOS 생산을 위한 최적 조건은 발효시간 90시간, KH_2PO_4농도 0.9%, 반응시간 18h 및 반응 액의 pH는 5.15 이었다.

7. FOS의 연속생산

고정화된 *Aureobasidium pullans*를 이용하고 sucrose를 기질로 하여 fructooligosaccharide를 semi-batch 방법으로 생산한 보고가 있다 (Yun et al., 1990). 그들은 고정화된 세포를 이용하여 FOS 를 stirred tank reactor (STR) 에서 연속배양을 시도하였다. 그들은 STR에서는 semi-batch system이 continuous system보다 우수하다고 하였다. 그 이유는 STR에서 생성된 glucose의 product inhibition에 인한다고 하였다. 이런 관점에서 볼 때, 연속발효는 연속배양은 batch나 semi-batch보다 더 많은 장점이 있다고 할 수 있다. 그러므로 Yun 등 (1992)은 효과적인 packed bed reactor를 이용한 FOS의 연속배양에 대해 발표하였다. 그들은 최적 조건에서 FOS가 180 g/L 정도 생산된다고 하였다. 그들은 또한 초기 활성이 100일 이상 지속되며 배양기를 100 L로 scale up 하였다.

FOS 생산을 최대화하기 위한 2단계 연속발효법에 대한 논문이 있다 (Sangeetha, Ramesh, & Prapulla, 2005). 고정화 효소와 세포를 이용하여 scale up된 FOS 생산을 할 수 있었다. 이 방법은 효소의 안정성을 제고하여 FOS를 연속적으로 생산케 하였다. 최적조건은 scale up 되어 특별히 제작된 발효 tank에서 15 L의 FTase를 그리고 10 L의 FOS를 생산할 수 있었다. 이 결과는 shake flask level의 연구결과와 일치하였다. 2단계 연속발효를 최대화하기 위해 개발된 program의 가능성이 증명되었다. 이것은 FOS의 산업적 생산에 기여할 수 있을 것이다.

FOS의 연속생산을 위해 Chien 등은 gluten 입자에 고정화시킨 균사체를 원통형의 반응기에 넣어 연구하였다 (2001). FOS 수율은 173 g/h/L 이며 이때 flow rate는 0.8 ml/min 이었다. FOS의 mass fraction은 flow rate가 1에서 0.1 ml/min로 감소함에 따라 0.2에서 0.54 (w/w)로 증가하였으며 이것은 residence time이 0.35에서 3.5시간으로 증가한 것에 해당한다. Gluten으로 고정화하는 방법은 장기간 발효에서도 안정한 것으로 판명되었다. 그러나 효소의 반감기는 34일이었다.

Transfrutosylation을 위하여 다른 pore size를 갖는 ceramic forced membrane reactor system이 Nishizawa, Nakajima, Nabetani (2000)에 의해 연구되었다. *A. niger* ATCC 20611의 β-fructo-furanosidase 가 화학적인 방법으로 고정화되어 silane coupling agent로 활성화된 ceramic membrane의 inner surface에 결합되었다. Cross filtration방법으로 sucrose 용액이 membrane을 강제로 통과될 때 transfructosylation이 일어났으며 FOS수율은 batch system으로 생산한 것보다 560배 높았다. 고정화된 효소의 반감기는 35일로 장기간 운전에 적합하였다.

Sheu 등은 (2002) FOS의 대량생산을 위하여 microfiltration (MF) module이 장착된 생물반응기에 복잡한 촉매를 사용하여 batch system으로 시작된 연속배양방법에 적용하였다. 이때 사용된 균주는 β-fructofuranosidase 활성을 가진 *A. japonicus* CCRC 93007, *A. pullans* ATCC 9348과 glucose dehydrogenase 활성을 가진 *Gluconobacter oxydans* ATCC 23771이었다. Calcium carbonate slurry가 pH를 5.5로 유지하기 위해 사용되었고 gluconic acid는 calcium gluconate로 침전시켰다. Sucrose 용액의 최적농도인 30% (w/v)으로 주입되어 고농도의 FOS가 MF로부터 연속적으로 생산되었다. 반응은 30 ℃, 호기조건 (5 vvm)이었으며, 수율은 80% FOS에 잔류 glucose은 5-7%, 8-10% sucrose, 약간의 calcium gluconate 이었다. 이 반응은 7일간 연속적으로 지속되었으며 160 g/h/L의 FOS가 생산되었다. 이와 같이 β-fructofuranosidase와 glucose dehydrogenase효소를 사용하는 복합방법은 효소 2가지를 쓰는 것만큼 아주 효과적인 것으로 판명되었다. 효소의 활력이 6일까지 지속되어 위의 방법이 two-enzyme system보다 경제적이였다 (Sheu 등, 2002).

8. 고농도의 FOS 생산

고농도의 FOS는 반응하지 않은 glucose와 sucrose를 반응 여액으로부터 제거하여 약 98%의 농도로 제조할 수 있다. FOS의 산업적 생산은 미생물유래 FTase를 사용하면 초기 sucrose 농도에 따라 이론상 최대치인 약 55-60%까지 가능하다. 이 이상은 불가능한데 그 이유는 효소반응 중 유리된 glucose가 경쟁적 저해제 (competitive inhibitor)로 작용하기 때문이다 (Yun, 1996). 유리된 glucose를 제거하여 발효 수율은 높이기 위한 방법으로 복합효소의 사용이 많이 연구되었다.

고농도 FOS의 생산을 위하여 복합효소에 관한 연구가 진행 되었는데, 이들은 주로 산업적으로 많이 쓰이는 glucose oxidase, catalase, β-fructo furanosidase 활성을 가진 *A. japonicus* CCRC 93007나 *A. niger* ATCC 2061 균사체 들 이다. 반응은 공기를 넣어주고 pH를 $CaCO_3$ 첨가하여 5.5로, β-fructofuranosidase의 inhibitor인 glucose를 glucose oxidase를 사용하여 gluconic acid로 전환한 후 calcium gluconate로 침전하여 제거하는 방법이다. 이때 FOS는 90% (w/w)의 수율로 얻어지며 잔여물질은 glucose, sucrose와 소량의 calcium gluconate 이다 (Sheu, Lio, Chen, Lin, & Duan, 2001).

Nishizawa 등(2001)은 반응 액의 glucose만 걸러지며, 동시에 sucrose나 FOS는 통과하는 nano-filtration 방법을 사용하여 고농도의 FOS를 생산하였다. 이로 인해 FOS는 약 90%의 수율로 생산되며 이는 기존의 batch system (55-60%) 보다 훨씬 높은 수율이다.

Crittenden과 Playne은 고정화된 *Z. mobilis*를 사용하여 food grade oligosaccharide로부터 glucose, sucrose를 제거하기 위한 연구를 하였다 (2002). 전체 당의 약 300 g/L 중 정제되지 않은 fructo, malto, isomalto, genito, inulin oligosaccharide를 고정화된

Z. mobilis 100 ml batch system에 첨가하였다. pH 조절이나 영양소의 공급 없이도 glucose, fructose, sucrose은 12시간 만에 완전히 발효되었다. 발효산물은 ethanol, CO_2 이며 oligosaccharide는 분해되지 않았으며 소량의 sorbitol이 생성되었다. 이렇게 복합효소와 복합균주를 사용하는 방법은 잔여 sucrose와 효소의 inhibitor인 glucose를 제거하여 FOS의 수율을 높이는 좋은 방법이다.

고농도의 FOS 생산을 위해 fructosyltransferase와 glucose oxidase의 혼합효소를 이용하는 방법은 Yun 과 Song (1993)에 의해 연구되었다. *Aureobasidium pullans* KFCC 10524 (Jung, Lim, Yoo, Lee, Yoo, 1987) 로부터 유래된 10 unit의 fructosyltransferase와 10 unit의 *A. niger* 유래 glucose oxidase (E.C. 1.1.3.4)를 사용하여 25,000 unit/g/gram of sucrose의 수율로 고농도의 FOS (순도 90%)를 얻었다.

Yun과 Lee (1994)는 β-fructofuranosidase와 glucose oxidase 복합 효소를 이용하여 고농도의 FOS를 생산하였다. 최적조건에서 98% 순도의 FOS를 얻었다. 유리된 glucose와 반응하지 않은 sucrose를 완벽하게 제거하여 얻은 결과이다. 그들은 이 방법은 fructosyltransferase/furanosidase system을 사용했을 경우와 비교하여 FOS의 sugar 조성에 큰 차이가 있다고 하였다. 전자의 경우 nystose의 함량은 높았다. Barthemeuf와 Pourrat (1995)는 신종인 *Penicillium rigulosum* 으로부터 crude fructosyltransferase을 실험실에서 분리하여 고농도 FOS 생산에 응용하였다. 이 균주는 fructosyltransferase와 glycosidase의 multi enzyme을 생산하는 균주였다. 최적조건에서 80%의 FOS 수율을 얻었으며 생성물은 fructofuranosyl nystose다.

상업적으로 판매되는 품질인 glucose oxidase, catalase와 β-fructofuranosidase 활성을 가진 *A. japonicus* CCRC 93007 및 *A. niger* ATCC 2061 균사체를 이용하여 고 농도의 FOS를 생산한 보고도 있다. 반응조건은 통기교반 tank, $CaCO_3$ slurry를 이용한 pH 5.5 이었다. β-fructofuranosidase의 inhibitor인 glucose는 glucose oxidase에 의해 gluconic acid로 변환되었고 최종적으로 calcium gluconate 침전으로 제거되었다. 순도는 90% (w/w)이며 잔류당은 glucose, sucrose 및 소량의 calcium gluconate 이었다 (Sheu et al., 2001).

Nishizawa 등 (2001) 나노-여과기를 사용한 glucose의 동시제거기술로 고농도의 FOS를 생산하였다. FOS의 순도는 90%이며 이는 batch system (55-60%)보다 높았다.

Crittenden과 Playne (2002)은 고정화된 *Z. mobilis*를 이용하여 food grade의 oligosaccharide로부터 glucose, fructose, sucrose를 제거하기 위한 연구를 하였다. 정제되지 않은 fructo, malto, isomalto, gentio, inulin oligosaccharide를 총당량 300 g/L인 100 ml batch 반응기에 넣고 반응한 결과 glucose와 fructose, sucrose는 12시간 만에 완벽하게 제거되었고 pH 조절이나 영양소의 추가 공급은 필요하지 않았다. 최종산물은 ethanol과 CO_2 그리고 oligosaccharide의 분해는 발생하지 않았다. 소량의 sorbitol이 부산물로 생성되었다. 이와 같이 복합효소를 사용은 잔류되는 sucrose와 효소의 inhibitor인 glucose 제거하여 고 순도의 FOS를 생산하기 쉽게 하여 주었다.

Fernandez, Maresma, Juarez, martinez (2004)는 토양으로부터 분리한 *Aspergillus* sp. 27H 균 전체를 이용한 FOS 생산을 보고하였다. 균주는 가수분해효소와 transfructosylating 효소활성을 모두 가지고 있었다. 최적조건에서 최대 376 d/m^3의 FOS를 생산하였으며 이것은 6시간 배양으로 얻은 600-620 g/kg의 FOS에 해당한다.

반응기에 복합효소와 microfiltration, β-fructofuranosidase 활성을 가진 곰팡이, 그리고 dehydrogenase 활성을 가진 세균을 이용한 보고도 있다 (Duan et al., 2003).

9. Fructosyltransferase의 정제와 특성

효소의 정제는 이들의 작요기작을 이해하는데 필수적인 단계다. 많은 연구가 다양한 source로부터 FTase의 분리 및 정제에 대해 이루어졌다. FTase는 분리원에 따라 분자량 및 특성이 각각 다르다. Park 등 (2001)은 *Bacillus macerans* EG-6 로부터 FTase를 ammonium sulfate 침전, CM Sepharose CL 6B, FPLC 방법 등으로 정제하였다. 정제효소의 분자량은 66kDa이었으며 ph 5-7범위에서 안정하고 최적 pH와 온도는 각각 5와 50 ℃이었다. 이 효소의 중요한 특징은 정제단계별로 생성된 각각의 효소에 의해 생성된 oligosaccharide의 조성이 현저하게 달랐다. 정제된 효소는 GF_5와 GF_6을 생산하는 crude enzyme과는 달리 ketose와 nystose를 생산하였다.

A. niger AS 0023의 crude extract로부터 DEAE Sephadex A-25, Sepharose 6B, Sephacryl S-200, concanavalin A-Sepharose 4B column으로 정제된 FTase 의 특성은 L' Hocine 등에 의해 연구되었다 (2000). FOS 수율은 정제된 효소를 사용했을 경우 8% 증가하였다. Native와 SDS-PAGE에서 band는 분산되고 넓은 양상을 보여주었다. 이것은 효소가 전형적인 당단백질임을 시사한다. Native PAGE에서는 두개의 band가 보여주었는데 분자량은 600 kDa과 다른 하나는 193-425 kDa이었다. SDS PAGE 상에서 이 두 band의 분자량은 81에서 168 kDa 이었다. 최적 pH와 온도는 각각 5.8과 50℃ 이었다. 이 효소는 1 mM Hg 와 Ag에 의해 완벽하게 저해되었다.

Wang과 Rakshit (2000)은 *A. foetidus* NRRL337의 transferase 활성을 보이는 4개의 fraction의 특성을 보고하였다. Ammonium sulfate 침전과 DEAE cellulose column chromatography 후에 각각 fraction의 정제 도는 각각 64, 25, 29, 43배 증가하였다. 최적온도는 60℃, pH 안정범위는 4-6이었다. 그러나 각각 band의 최적 pH, 열안정성, kinetic parameter는 서로 달랐다. 복합 형태를 가진 이 transferase의 기질 및 product 특이성, kinetic 특성도 기술되었다.

A. niger ATCC 2061 로부터 β-fructofuranosidase가 76% 회수율로 정제되었다 (Nishizawa 등, 2001). 다양한 기질에 대한 transfructosylation rate에 대한 kinetic 특성 (V_m, K_m, K_i)이 glucose의 첨가/무첨가 경우를 비교하여 얻어졌다. Transfructos-ylation 반응에 glucose는 non-competitive inhibitor로 작용하였다.

Gorrec, Christelle, Guibert, Uribelarrea, Combes (2002)는 *Bacillus subtilis* NCIMB 11871과 11872의 extracellular FTase, sucrase, polymerase의 특성을 보고하였다. 이들 효소의 생산과 분해활성은 균의 성장과 밀접하게 연관되어 있었다. 왜냐하면 ammonium sulfate 침전, ultrafiltration, 다른 여타 방법으로도 이들 활성을 얻을 수 없었다. 따라서 이 효소는 levansucrase로 판단되었다. Table 4는 다양한 원료로부터 분리, 정제된 효소의 특성이다.

10. 재조합 효소를 이용한 FOS 생산

재조합 DNA 기술의 발전으로 생물 및 미생물 효소 생산에 큰 영향을 미쳤으며 FTase도 예외는 아니다. Levan sucrase 활성을 가진 재조합 yeast인 *Pichia pastoris*는 50%의 sucrose 용액에서 43% 수율로 1-ketose를 생산하였다. Levan sucrase 활성은 cells 내부 중 periplasmic space (81%), supernatant (18%)에서 나타났다 (Trujillo et al., 2001).

Van Hijum 등은 (2002) Lactobacillus reuteri의 fructosyl transferase (FTF)유전자를 *Escherichia coli*에 cloning하여 발현시켰다. Sucrose와 함께 발효시켰을 때 정제된 FTF 효소는 다량의 FOS와 고분자량의 fructan polymer (inulin)를 생산하였

Table 4. Characteristics of FTase purified from various microbial sources

Source of FTase	Purification fold	Molecular weight (kDa)	Optimum		Stability		References
			pH	Temperature	PH	Temperature	
Bacillus macerans EG-6	63.5	66	5.0	50 ℃	5.0–7.0	20–50 ℃	Park *et al*, 2001
Arthrobacter oxydans J17-21	95.5	54	6.5	45 ℃	5.0–11.0	20–40℃	Jang *et al*, 2003
Microbacterium laevaniformans ATCC 15953	45.6	64	6.0	30 ℃	5.0–7.0		Park *et al*, 2003
Aspergillus niger ATCC 20611	51.6	340	5.0–6.0	50–60 ℃	4.5–10.0	Up to 60 ℃	Hirayama *et al.* (1989)
Arthrobacter sp. K-1	405.3	52	6.5–6.8	55 ℃	5.5–10.0	Up to 40 ℃	Fujita *et al.* (1990, 1994)
Streptococcus salivarius ATCC 25975	34.5	125.4	6.0–7.0	37–40 ℃	–	–	Song and Jacques, 1999
Microbacterium sp. AL-210	98.8	46	7.0	40 ℃	7.0–8.0	Up to 40℃	Cha *et al*, 2001
Aspergillus niger AS0023	78.5	81–168	5.8	50 ℃	4.5–11.0	30–50 ℃	L'Hocine *et al.* (2000)
Aspergillus foetidus	25	–	4.5	60 ℃	4.0–6.0	Up to 40℃	Wang & Rakshit, 2000

다. 이 재조합 단백질의 amino acid 서열과 유전자의 염기 서열이 밝혀졌다.

11. FOS의 가수분해

FOS 구조의 β-2,1 결합은 소화효소의 작용에 저항하여 dietary fiber로 효과가 있다. 그러나 최근에 FOS의 가수분해에 미치는 pH와 온도의 영향에 대해 보고가 있다 (L' Homme et al., 2003). 80, 90, 100, 120℃의 용액에서 pH를 buffer 용액으로 4.0, 7.0, 9.0으로 조절하여 kinetics를 연구하였다. 각각 조건하에서 반응물과 가수분해 산물의 양을 조사한 결과 FOS의 분해는 pseudo-first-order kinetics 양상을 따르는 것으로 밝혀졌다. 즉 FOS의 가수분해는 pH가 증가함에 따라 감소하고 온도의 증가에 따라 증가하였다. 세 가지 oligomer들은 주로 산성조건 및 최고온도 (120℃)에서 분해되며 신속하며 완전한 각각 FOS의 산분해가 관찰 되었다. Arrhenius 공식을 사용하여 반응상수, 반감기, 활성 energy가 구해져 같은 조건에서 sucrose를 사용하여 얻은 결과와 비교하였다. 그 결과 FOS의 가수분해는 중성이나 염기성 pH보다 산성에서 훨씬 빨리 진행됨이 밝혀졌다. 이 세 가지 fructooligosaccharide (1-ketose, nystose, frutofuranosyl nystose)를 분석하기 위해 HPLC에 HPAEC-PAD를 결합하여 실험하였다 (L'Homme, Arbelot, Puigserver, & Biagini, 2003).

식품원료 및 상업적으로 사용되는 5가지 oligofructose의 산 분해 kinetics (건조물 농도, 반응 pH, 온도)가 Blecker, Fouguies, Van Herck, Chevalier와 Paquot에 의해 연구되었다. 초기 fructose 유리속도는 평균 중합도의 역치 (inverse rate)와 비례하였다. Pseudo-first-order kinetics가 fructosyl chain과 proton의 농도와 관련하여 관찰되었다. 비교적 넓은 범위의 온도 (7-130℃)가 Arrhenius 공식에 들어맞음이 관찰 되었다 (Blecker 등, 2002). 온도와 pH의 연구는 식품가공 중 FOS의 양상을 연구함에 도움이 될 것이다.

Ⅳ. FOS의 분석

1. HPLC

이 방법의 FOS의 분석에 가장 많이 사용되는

방법이다. 극성결합 (polar-bonded) phase와 resin 결합(resin-based) HPLC column이 refractive index detector (RID)와 함께 다양한 중합도 (degree of polymerization, DP)를 가진 FOS의 분리에 많이 사용된다 (Prapulla et al., 2000). Polar- bonded phase가 효과적이다.

분석 조건은 NH_2 column과 같은 polar-bonded phase column, 30℃, mobile phase로 acetonitrile : water (75:25) 혼합액, flow rate 1 혹은 1.5 ml/min 이다 (Vigants et al., 2000; Nishizawa et al., 2000; L'Hocine et al., 2000; Sheu et al., 2001; Chien et al., 2001). Gorrect 등 (1972)은 resin based ion exchange K^+ column Aminex HPX-97K column을 65 ℃에서 물을 mobile phase로 0.6 mL/min의 속도로 분석하였고, Kim, Sinah, Park, Lee (2001)과 Park 등 (2001) 같은 조건에서 Aminex HPX42 column, 85℃로 분석하였다. Trujillo 등 (2001)은 Aminex HP 42C column을 같은 조건에서 10mM Na_2SO_4를 mobile phase로 0.5 ml/min의속도로 분석하였다. 또 다른 resin based column Aminex HPX 87C도 물을 mobile phase로 하여 많이 사용되고 있다 (Crittenden & Playne, 2002).

High Performance Anion Exchange Chromatography에 Pulsed Amperometric Detector (HPAEC-PAD)를 결합한 방법이 FOS의 분석에 많이 사용된다. L'Homme 등 (2003)은 Carbopac PA100 anion exchange column에 20min linear gradient를 0에서 40%로 한 80mM NaOH-500mM sodium acetate를 사용하였고 Finke 등 (2002)은 Dionex DX-300 chromatograph에 pulsed electrochemical detector와 integrated amperometry mode를 사용한 gold electrode를 부착하여 분석하였다. Chicory 뿌리로부터 추출된 fructan이 continuous annular and fixed bed conventional gel chromatography에 의해 분리되었다. 위의 두 column은 Toyopearl HW40로 packing되었고 deionized water로 elute 되었다. Multicomponent fractionation이 저분자량 (90 monosaccharide unit)의 단일 oligosaccharide를 분리하기 위해 마련되었다. Continuous annular size exclusion chromatography (40 cm bed height)의 생산성과 성능이 fixed bed 방법 (2 x 100cm bed height)과 비교되었다. Elute된 fraction이 high pH anion exchange chromatography-Pulsed Amperometric Detector (HPAEC-PAD)를 결합한 방법으로 분석되었다. Annular system은 conventional system 보다 수율이 25배 높았다. 따라서, annular chromatography가 oligomeric과 polymeric oligosaccharide의 대단위 fractionation에 powerful한 system임이 밝혀졌다 (Finke 등, 2002).

Ion chromatography와 integrated amperometry를 사용한 당정량법이 보고되었다. 시료를 단순히 물로 섞은 다음 10,000Da의 filter를 통과하여 gradient elution chromatography에 injection하고 peak의 면적을 standard solution의 curve와 비교 하였다. 선택된 시료는 효율을 검정하기 위해 spiking한 것과 그렇지 않은 것으로 준비하였다. 분석된 채소 중 artichoke 의 FOS 함량이 가장 높았고 다음으로 양파, banana의 순이었다. 방법은 단순하고 경제적이며 비교적 빨랐다 (Holgarth, Hunter, Jacob, Galeb, & Wolf, 2000).

Paper chromatography, TLC, GLC, NMR, Mass Spectrometry 등 다른 몇몇 방법이 문헌에 나와 있다 (Prapulla 등, 2000).

2. Thin Layer Chromatography (TLC)

Park 등 (2001)은 isopropyl alcohol: ethyl acetate: water (2:2:1)를 함유한 solvent system과 TLC를 사용하여 FOS의 정량분석을 시도하였다. Phenol sulfuric acid를 분무한 후 plate를 가열하

여 관찰하였다. 사탕수수 molasses와 다른 몇몇 원료의 FOS를 정량분석하기 위한 방법은 Vaccari, Lodi, Tamburini, Bernardi, Tosi (2000)에 의해 제안되었다. Diol HPLC plate가 사용되었으며 acetonitrile과 acetone 같은 solvent로 전개되었다. 2 solvent system을 Camag Automated Multiple Development apparatus로 섞어 9 단계 gradient를 거쳤다. 각 spot의 차별화를 위해 4-aminobenzoic acid, glacial acetic acid, water, 85% phosphoric acid, acetone 등의 solvent가 사용되었다. 전개된 plate를 115℃에서 15 분간 가열하여 황색/갈색을 띤 FOS spot을 관찰하였다 (Vaccari 등, 2000).

3. Gas chromatography-mass specrometry (GC-MS)

Hayashi 등 (2000)은 methyl iodide로 시료를 methylation하고 1 M H_2SO_4로 1시간 분해한 후 FOS를 분석하였다. 시료에 $NaBD_4$를 가하여 환원한 후 acetic anhydride를 첨가하여 alditol acetylate 한 후 110℃에서 3시간 반응시켰다. GC-MS (Hitachi M-2000 AM)에 OB 225 silicone column, 170-200℃, He carrier gas, 1 ℃/min 조건으로 분석했다.

4. Nuclear magnetic resonance (NMR)

*P. citrinum*과 sucrose 로부터 생산된 FOS를 Hiyashi 등 (2000)이 ^{13}C NMR로 분석한 결과 1-ketose, nystose, neoketose를 분석할 수 있었다.

5. Fructan 분석을 위한 AOAC 방법

비록 HPLC 각 FOS의 분석을 위해 가장 많이 사용되는 방법이지만 순수 standard를 얻기가 어려운 단점이 있다. AOAC에서는 효소법이 기술되어있다. 이는 inulinase를 사용하는 방법이다. 끓는 물로 시료로부터 inulin과 oligosaccharide를 추출한다. 한 부분 (aliquot)을 처리하지 않고 두어 처음 시료로 한다. 다른 시료를 amyloglucosidase로 처리한다. 이 분해물을 두 번째 시료로 한 후 나머지를 inulinase (Fructozyme SP230)로 처리한다. 세 시료의 Glucose, fructose, sucrose는 capillary GC, HPLC, HP Anion Exchange chromatography-pulsed amperometric detection을 사용하여 정량한다. 다음 세 번째 시료로부터 첫 번째, 두 번째 시료의 당을 빼어 inulin의 함량을 계산한다. Oligosaccharide는 AOAC-TDF (Total Dietary Fiber)로부터 회수되지 않으며 오직 소량의 inulin만 AOAC-TDF로부터 회수되기 때문에 inulin을 위하여 수정이 가해지며 두 번 계산된다. 한편에는 inulinase가 TDF 방법의 효소복합체에 첨가된다. 이로 인해 시료로부터 모든 fructan이 제거된다. 다른 접근방법은 TDF의 fructan 침전을 구하고 이 양만큼을 TDF로부터 빼는 방법이 있다 (Flamm 등, 2001).

V. FOS의 기능성

FOS는 많은 기능성을 갖고 있어 중요한 식품첨가물로 이용된다. FOS의 영양학적 그리고 건강에 대한 유익성은 최근 많은 연구의 대상이 되어 왔다 (Flamm 등, 2001). Flickinger, Loo와 Fahey (2003)은 가축사료 중 inulin과 oligofructose의 영양학적 연구에 대한 보고가 많았다.

1. Prebiotics로서 FOS의 기능

Prebiotics란 소화가 되지 않고 선택적으로 사람의 건강을 증진시키는 잠재력을 가진 장내미생물의 성장을 촉진하는 식품원료이다. FOS는 인간의 장관소화효소에 의해 분해되지 않으므로 대장에서 발효되어 유익한 미생물의 성장을 촉진한다. 이것은 결국에는 인체에 해로운 대장에 서식하는 부패

미생물의 성장을 막거나 늦춰 건강한 대장환경을 마련해준다. FOS는 *in vivo* 및 *in vitro* 실험을 통해 인간에 유익한 prebiotics임이 밝혀졌다. Durieux, Fougnies, Jacob, Simon (2001)은 *Bifidobacterium longum*, *B. infantis*, *B. angulatum*에 의해 대사되는 두 가지의 chicory fructooligosaccharide (Fibruline Instant와 Fibrulose F97)의 prebiotics 효과를 연구함으로 FOS의 prebiotics 효과를 규명하였다. 발효를 120시간 한 후 chromatography로 분석한 결과 상업적인 chicory FOS 중 fructose oligomer가 미생물에 의해 완벽하게 소비된 것을 발견하였다. 최대 biomass 생산은 *B. infantis* 이었으며 이것은 FOS가 prebiotics로 사용될 수 있음을 시사한다. (Durieux 등, 2001).

Prebiotic로서 각각 oligosacchride의 발효특성은 Rycroft, Jones, Gibson, Rastall (2001)에 의해 연구되었다. 우점종인 장내미생물 group이 fluorescent in-situ hybridization으로 24시간의 batch culture에 걸쳐 모니터되었다. 단쇄 지방산과 gas 생산도 함께 측정되었다. 모든 prebiotics는 모든 bifidobacterium의 수를 증가시켰고 clostridium의 수는 감소시켰다. 각각 oligosaccharide의 발효양상은 달랐고 fructooligosaccharide는 lactobacilli의 수를 가장 많이 증가시키면서 gas 생성에 의한 복부팽창은 적었다.

Perrin 등 (2001)은 반 합성 (semi-synthetic) oligofructose에서 *B. infantis* ATCC 15697을 배양(regulated and non-regulated batch system) 하면서 이들의 생리적 반응을 연구하였다. 당의 이용에 대한 양상이 달랐다. Glucose가 성장과 biomass 생산을 위하여 가장 좋아하는 당이었고 fructose는 lactate와 acetate 생산을 위한 가장 우수한 당이었다. Sucrose의 biomass 생산은 glucose의 수준에 도달하였고 FOS와 fructose는 보다 많은 대사산물이 생성되었다. FOS와 혼합물에서 단쇄 saccharide가 먼저 이용되었고 fructose가 배지로부터 유리되었다 (Perrin 등, 2001).

농도를 달리한 (0, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0%, w/v) FOS를 함유한 nonfat dry milk (NDM)배지에 두 가지 상업적 균주인 *Bifidobacterium* Bf-1과 Bf-2를 접종하고 37℃에서 48시간 혐기적으로 발효한 후 균주의 성장과 활력을 비교하였다. 각 균주의 활력(viability)을 4℃에서 4주간 관찰하였다. 두 균주 모두 성장촉진, 활력증진, 활력보전은 FOS를 첨가한 group에서 관찰되었다. FOS 첨가효과는 FOS를 증가함에 따라 증진되었고 최고 첨가량은 5% (w/v)이었다 (Shin, Lee, Pestka, & Ustunol, 2000).

소량의 FOS (5g/day)와 placebo-sucrose의 섭취가 건강한 성인의 분변 중 미생물, 특히 bifidobacteria에 미치는 효과에 대해 비교 분석한 결과가 있다 (Rao, 2001). 약을 복용하지 않는 건강한 성인에게 placebo-sucrose를 급여한 후 곧바로 분변을 수거하여 bifidobacteria, bacteroides, coliform, 총 혐기성균을 계수하였다. 이와 마찬가지로 FOS를 급여(5g/일, 3주)한 후 군으로부터 분변을 수거하여 균수를 측정하였다. 그 결과 sucrose투여군 (5g/일)은 미생물 flora의 변화가 없었으나 FOS 급여군(5g/일)은 11일째 되었을 때 bifidobacteria가 약 1 log 증가되었다. 10일 더 급여한 경우는 증가가 없었다. FOS 급여를 중단한 후 2주에 bifidobacteria의 수는 급여전의 수준으로 돌아갔다. Bacteroides와 총 혐기성균의 수는 증가하였으나, 호기성균은 증가하지 않았다.

Kaplan과 Hutkins (2000)는 28종의 lactic acid bacteria (LAB)와 bifidobacteria를 가지고 MRS배지에서 FOS의 발효양상을 비교하였다. 16 lactobacilli 중 12균주와 8종의 bifidobacteria는 기질을 발효할 수 있었다. 따라서 glucose와 마찬가지로 FOS역시 균의 성장을 촉진하는 기질임을 알 수 있었다.

GF_2, GF_3, GF_4와 같은 당을 각각 사용하였을 때 각 당의 이용은 가장 낮았으며 pH 감소 역시 6.0이었으며 균주 모두 GF_4는 이용하지 못하였다. 분변의 bifidobacteria의 성장을 현저히 촉진하는데 필요한 FOS의 허용량과 그 한계량을 측정하였으며 복부팽창과 같은 부작용을 일으키지 않는 최적 dose은 10 g/일인 것으로 밝혀졌다. FOS를 부가적으로 첨가하면 혐기성균의 변화 없이 2주 후 젖산균의 증가를 보여주었다. 젖산균은 직/간접적으로 소화기의 면역조절능력과 systemic defense system에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 이점을 고려할 때 식이에 FOS를 보조적으로 첨가함은 젖산균의 밀도와 대사정도를 증가시켜 인체의 면역방어기능을 증진시키며 건강을 위협하는 물질에 대한 방어를 높여주고 소화 장애 후 회복을 빨리 해주는 효과가 있다 (Kolida, Tuohy, & Gibson, 2002).

2. 식이섬유로서 FOS

식이섬유 (dietary fiber)는 인체의 소화 효소에 잘 분해되지 않고 남아있어 인체에 광범위한 생리적 유익을 미치는 특성을 지닌 가식성 (edible)인 식품유래 고분자탄수화물(polysaccharide)를 말한다. FOS는 다양한 채소, 과일, 전곡류 (whole grain) 등의 저장탄수화물이다. 이들은 소화와 위장 및 소장에서 흡수가 잘 되지 않아 ileum까지 도달하여도 거의 남아있다. 이것은 대장에 도달하여 발효되어 호흡으로 배설되는 수소의 양을 증가시킨다. FOS를 급여한 쥐의 대장 및 분변에 lactate가 증가한 보고가 있다. 인간의 경우 발효는 완전히 진행되어 분변에서 발견되지 않는다. 이는 또한 변비를 완화한다. 팽창률 (bulking capacity)은 1.2 – 2.1 g stool/g 섭취량으로 주로 대장에서 미생물 수의 증가를 야기한다. 또한, 그들의 발효로 인해 장의 상피세포에 영향을 미쳐 점막면역을 증진하고 소화기질병을 줄여준다. 그러므로 FOS는 dietary fiber로서 훌륭한 자질을 가지고 있다 (Cherbut, 2002).

3. FOS와 광물질의 흡수

FOS가 colon에서 발효되면 pH가 낮아지고 장에서 광물질 (주로 Ca 와 Mg)의 흡수를 도와준다. 따라서 뼈의 건강을 도와준다. 5%의 FOS를 1%의 식이 calcium과 함께 급여하면 대퇴부와 요추의 손실을 현저하게 막아준다. 0.5% calcium, 10%의 oligosaccharide는 뼈의 mineralization을 현저히 증진한다고 한다. 그 이유는 장 상피세포에서 광물질의 passive/active transportation을 돕고, 장내미생물의 특정대사산물의 증가와 함께 ph의 저하인 것으로 알려져 있다 (Ahrens, Schrezenmeyer, 2002).

FOS의 단백질대사와 광물질 흡수에 미치는 영향은 Gudieal-Urabano 와 Goni (2002)에 의해 연구되었다. 쥐에게 5 g/kg FOS, 5 g/kg cellulose/FOS (1:1) 혹은 cellulose 만을 급여하였다. cellulose/FOS의 급여나 FOS 급여는 일일 사료섭취를 현저하게 변화시키지 않았으나 FOS 급여군은 cellulose 급여 군과 달리 현저한 체중증가의 감소를 보여주었다. 분변을 통한 분비는 FOS 급여 군에서 현저하게 낮았으나 cellulose 급여군은 변화가 없었다. FOS의 섭취는 맹장의 내용물 양을 증가시키며 맹장막을 확장시킨다. 이러한 trophic 효과는 장내미생물이 FOS를 혐기 발효하여 생성된 단쇄지방산 (short chain fatty acid, SCFA)에 의한 것으로 알려져 있다. Cellulose/FOS는 Ca, Mg, Zn, Fe의 흡수, 유지를 증진한다. FOS를 급여한 쥐는 cellulose 급여 군에 비해 Mg의 흡수와 유지가 증가했다. FOS를 최소량만 급여해도 쥐에서 광물질에 대한 바람직한 효과를 볼 수 있다 (Gudieal-Urabano & Goni, 2002).

4. 방어기능에서 FOS의 역할

FOS는 장내에서 인체에 유익한 미생물의 성장을 촉진하여 병원성세균의 장내정착을 방지한다. FOS가 대장에서 발효되면 pH가 낮아지고 인체에 유익한 미생물이 항생물질과 유사한 물질을 분비한다. Chicken, 돼지, 쥐에 oligofructose와 다른 Non-Digestible oligosaccharide (NDO)를 급여하면 장내에서 *Salmonella*의 밀도를 줄인다고 한다(Letllier 등, 2000). 생쥐에 inulin과 oligofructose를 함께 급여하면 7일 후 소장에서 *Candida*의 밀도를 낮춘다는 보고가 있다. *Listeria monocytogenes*와 *Salmonella typhimurium*을 감염시킨 생쥐에게 inulin과 oligofructose (100 g/kg) 급여하면 cellulose를 유일하게 급여한 생쥐보다 치사율이 낮아졌다(Buddington 등, 2002). FOS는 cellulose와 다른 NDO들 보다 mucosa를 증가시키지 않으면서 colonocyte를 증가시킨다. 생쥐에게 inulin과 oligofructose를 함께 급여하면 cellulose는 급여했으나 oligosaccharide는 급여하지 않은 생쥐보다 natural killer cell, phagocyte, T-lymphocyte의 활력을 증진된다. 이러한 결과는 *L. monocytogenes*와 *Salmonella*의 sytematic infection에 대한 저항, 발암물질 주사후 종양세포로 증식억제, *Lactobacillus*와 다른 젖산균들에 의한 innate, 획득 immune 기능과 일치한다. FOS를 식품에 첨가하면 short chain fatty acid의 증가 (특히 butyrate)와 mucosal immune defense를 증진시켜 건강을 향상시킨다.

5. FOS와 지질대사

FOS가 GI tract에 미치는 영향 외에 실험동물에서 간의 지질대사에 영향을 미친다 (Delzenne 등, 2002). 대장에서 FOS가 대사되면 SCFA가 생성되고 이것은 인간의 지질대사에 영향을 준다. Wistar 쥐 수컷에게 10%의 FOS와 탄수화물이 많은 사료를 급여하면 현저하게 혈중 triacylglycerol (TAG)와 phospholipid의 양을 감소시킨다. FOS에 의한 낮은 hepatic lipogenesis, 낮은 mRNA와 지질생성 효소는 very low density lipoprotein (VLDL) TAG의 감소와 함께 일어나는 대표적인 양상이다. FOS는 triglyceride 대사 장애를 극복한다. FOS는 post-prandial triglyceridemia를 50% 감소시키며 고 지질 음식으로 사육된 실험동물의 혈중 유리 cholesterol의 증가를 방지한다. FOS는 쥐나 Zucker fa/fa rat에서 fructose에 의해 유도된 steatosis (간에서 TAG의 축적)를 방지한다. 수컷 Wistar 쥐에게 10%의 FOS를 30일간 급여한 쥐는 postprandial insulinemia를 26% 줄여준다. 그러나 공복후 포도당 부하실험 중 glycemic 반응은 control, FOS 급여군 모두 같았다 (Daubiol 등, 2000). Streptozotocin을 처리한 당뇨쥐의 경우 20% FOS를 2달 동안 급여하면 saccharose나 maltose 부하에 대한 glycemic/insulinemia을 변화시키지 않아도 postprandial glycemia를 감소시켰다.

Inulin과 FOS가 혈중 지질에 미치는 영향을 연구한 9개 논문 중 셋은 혈중 cholesterol과 TAG에 영향이 없다고 했고 셋은 TAG가 현저히 감소했다고 했으며 나머지는 total과 LDL cholesterol이 감소했다고 하였다 (Williams, Jackson, 2002). 동물실험 결과 FOS가 지방산의 *de novo* 합성을 억제함으로 TAG rich VLDL의 분비를 줄인다는 보고가 있다. 식품으로부터 섭취되는 지방은 간에서 TAG를 생산하기 위해 필요한 모든 지방을 공급하기 때문에 간에서 지방산의 *de novo* 합성이 매우 낮다 (Parks, 2002). FOS가 지방산의 esterification을 막아 TAG가 생산됨을 방지한다는 보고가 있으나 이는 실험동물에서 inulin과 oligofructose가 fatty acid synthase를 저해한다는 것에 비해 비교적 약하다. 비록 지질함량을 낮추는 효과가 동물실험에서 얻어졌으나, 이 data는 고농도를 급여한

결과이며 이 농도는 15g/일 이상 섭취하면 장에 부작용이 발생한다는 사실이 밝혀져 사람에게 적용될 순 없다. 쥐에게 10% FOS를 급여하면 혈중 triglyceride와 phospholipid를 감소시키나 유리지방산은 변화시키지 못한다. SCFA는 insulin 비의존성 당뇨환자의 혈중 total 및 LDL cholesterol의 함량을 낮추나 건강한 사람에게는 효과가 없다 (Roberfroid와 Slavin, 2000).

6. FOS의 항암효과

Inulin과 FOS는 화학물질에 의한 비정상 crypt의 유도와 대장암을 예방한다는 보고가 있다. Pool-Zobel, van Loo, Rowland와 Roberfroid 등 (2002)에 의하면 쥐에서 FOS의 prebiotic 효과는 bifidobacteria를 선택적으로 증식시켜 lactate와 acetate의 생산으로 항암작용이 있다고 한다.

실험동물 (Sprague Dawley rat)에게 기초사료로 inulin/oligofructose를 15% 급여하면 (a) methylnitrsourea에 의해 유도된 mammary tumor를 감소시키며 (b) 전이될 가능성이 있는 악성종양의 증식을 저해하며 (c) 생쥐에게 intramuscularly inject된 악성 폐종양의 metastase의 발현을 감소시킨다. 식이로 급여된 FOS/inulin은 주로 사람의 암 치료에 사용되는 항암제의 효과를 증진시킨다고 한다 (Taper,& Roberfroid, 2002).

7. 당뇨환자에게 FOS의 효과

건강한 사람이 매일 20g의 FOS를 섭취하면 insulin에 의해 상승되는 glucose 대사에 영향을 주지 않고 간에서 glucose 생산을 감소 시킨다 (Luo 등, 2000). 제2형 당뇨환자에게 FOS를 장기간 투여하면 공복시 혈장 포도당, insulin 농도, 기초 간 포도당 (basal hepatic glucose production) 생산을 변화시키지 않는다. 또한 혈중 TAG, total 및 HDL cholesterol, 유리지방산, apolipoprotein A1과 B의 농도는 변하지 않았다.

혼합물로부터 glucose와 sucrose를 제거하면 당뇨병환자를 위한 식품으로서 상품성이 증가할 것이다. 제 2형 당뇨환자를 위한 처방 중 하나는 식이요법으로 hyperglycemia와 insulin 저항성을 조절하는 것이다. 이런 관점에서 저 calory의 FOS는 혈중 glucose를 낮추는 측면에서 중요성이 있다. FOS는 아마도 발효에 의해 생성되는 단쇄 지방산의 영향으로 공복시 glycemia와 혈중 총 cholesterol의 양을 낮추는 것으로 사료된다. Jerusalem Artichoke은 좋은 inulin (자연에 존재하는 fructan) 원료이다. Roberfroid 와 Delzenne (1998)는 inulin 형태의 fructan은 insulin 비의존성 당뇨환자에게 도움을 준다고 하였다. Yamachita 등 (1984)은 fructooligosaccharide를 급여하여 당뇨환자의 혈중 cholesterol 저하에 효과를 보았다. Levrat 등 (1991)은 비록 낮은 농도의 inulin도 쥐의 혈중 cholesterol을 감소시킨다고 하였다. 제2형 당뇨환자에게 20일 동안 FOS를 급여하여도 혈중 포도당, 지질, acetate에 영향을 주지 않는다고 하였다. 이는 당뇨환자 (diabetes mellitus)에게 효과적일 것이다 (Kaufhold 등, 2000).

8. FOS의 다른 효과

건강하거나 신장을 제거한 쥐에게 FOS를 급여 (10%)하면 uremia를 줄인다 (Roberfroid & Slavin, 2000). 식이 FOS는 분변을 통한 질소의 배출을 증가시키며 쥐에서 renal nitrogen excretion을 감소한다. 이는 FOS가 장내미생물의 energy원으로 발효되고 단백질합성을 위한 원료가 되기 때문이다.

9. 식품배합에 사용되는 FOS

Inulin과 oligofructose는 nutrition bar와 같이

다양한 식품에 영양학적 이점과 기능성을 부여한다 (Izzo와 Niness, 2001). 그 예는 다음과 같다.

1. Light jam : 감미제, sucrose와 비교할 때 34% calory 감소. 그러나 organoleptic property는 매우 비슷함. 덜 달고 부드러운 조직을 보여줌.
2. Ice cream : FOS는 inulin과 함께 ice cream의 당을 대체하고 지방함량을 낮추고 입안에서 훌륭한 촉감을 줌. Oligofructose의 빙점강하가 다른 당에 비해 낮아 조직이 단단해짐.
3. 과자류 : 단단한 candy, gum, marshmallow에서 energy value를 감소시킴 (Murphy, 2001).

Ⅵ. 결론

FOS는 기능성시장에서 중요한 자리를 차지한다. FOS를 생산하기 위한 미생물 FTase에 관한 많은 연구가 진행되었다. 곰팡이 유래 FTase는 세균보다 높은 수율로 FOS를 생산하여 새로운 효소의 발견을 위한연구가 진행되고 있다. FOS의 연속생산을 위하여 고정화 효소/ 고정화 세포를 이용한 bioreactor는 경제성이 높아 산업적 생산에 사용된다. 고순도의 FOS를 생산하기 위하여 mono-disaccharide를 제거하는 방법이 많이 연구되었다. 효소의 정제와 특성규명을 통하여 FTase의 특성, kinetic 등을 이해할 수 있었다. 유전공학의 발달로 FTase를 대장균에 cloning하여 대량생산이 가능하게 되었다. FTase의 pH 활성과 온도특이성을 이해하여 가공과정 중 FOS의 변화를 예측할 수 있었다. 여러 분석방법 중 HPLC가 가장 많이 사용된다. FOS의 기능성이 많이 밝혀져 기능성식품 시장에서 우위를 점할 수 있을 것이다.

최근 영양학의 개념에 많은 변화가 있었다. 과거에는 유해한 작용을 하는 식품성분에 많은 연구가 있었으나 현제 well-being, 건강, 안전성을 향상시키는 성분에 많은 연구가 진행되고 있다. 이는 소비자들의 건강에 대한 인식이 제고되고 이로 인해 건강식을 찾게 되었기 때문이다. 기능성식품의 개발은 소비자의 건강과 well-being을 증진시키는데 공헌한다. 최근 식품 중 특이 FOS에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

FOS에 대한 수요를 충족하기 위해 novel FTase를 생산하는 새로운 균주의 screening과 동정에 많은 연구가 지속되어야 하겠다. 저자는 지금까지 보고된 바 없는 FTase를 생산하는 *A. oryzae*를 분리 보고하였다. *A. oryzae*는 지금껏 동양에서 발효식품을 위한 koji 생산에만 이용되어 왔다. *A. oryzae*는 GRAS level이다 (Gomi, 1999).

FOS를 정제하면 최고 FOS 수율을 위해 필요한 시간을 절감한다. Crude enzyme을 사용하면 반응시간이 18시간이나 정제효소를 사용하면 4시간으로 감소한다. 여러 분석방법 (HPLC, NMR, LC-MS)을 통하여 FOS의 특성과 물리화학적 특성이 밝혀졌다. 지금까지 FOS의 특성을 규명하기 위해 LC-MS를 사용한 보고가 없다. GC-MS는 분석을 위해 당을 유도체로 만들어야 하므로 이 방법은 효과적일 것이다. FTase (Ramesh 등, 2003a), FOS (Ramesh 등, 2004)가 허용된 첨가제와 함께 동결건조 되었다. 각각 oligomer를 Biogel P-2 gel permeation chromatography를 이용하여 FOS mixture로부터 정제되었다. LC-MS를 사용하여 삼합체, 4합체, 5합체의 *m/z*는 각각 504, 666, 828로 얻어졌다.

Ⅶ. 참고문헌

1. Ahrens, S. K. E., & Schrezenmeir, J. (2002). Inulin, oligofructose and mineral metabolism-experimental data and mechanism. British Journal of Nutrition, 87, S179 - S186.
2. Barthomeuf, C., & Pourrat, H. (1995). Production of high contwnt fructo-oligosaccharides by an enzymatic system from Pencillium rugulosum. Biotechnology Letters, 17(9), 911 - 916.

3. Beker, M., Laukevics, J., Upite, D., Kaminska, E., Vignats, A., Viesturs, U., et al. (2002). Fructooligosaccharide and levan producing activity of Zymomonas mobilis and extracellular levan sucrase. Process Biochemistry, 38, 701 - 706.
4. Blecker, C., Fouguies, C., Van Herck, J. C., Chevalier, J. P., & Paquot, M. (2002). Kinetic study of the acid hydrolysis of various oligofructose samples. Journal of Agricultural Chemistry, 50, 1602 - 1607.
5. Buddington, R. K., Kelly-Quagliana, K., Buddington, K. K., & Kimura, Y. (2002). Non-digestible oligosaccharides and defense functions: lessons learned from animal models. British Journal of Nutrition, 87, S231 - S239.
6. Cha, J., Park, N. H., Yang, S. J., & Lee, T. H. (2001). Molecular and enzymatic characterization of levan fructotransferase from Microbacterium sp. AL-210. Journal of Biotechnology, 91, 49 - 61.
7. Cherbut, C. (2002). Inulin and oligofructose in the dietary fibre concept. British Journal of Nutrition, 87, S159 - S162.
8. Chien, C. S., Lee, W. C., & Lin, T. J. (2001). Immobilization of Aspergillus japonicus by entrapping cells in gulten for production of FOS. Enzyme and Microbial Technology, 29, 252 - 257.
9. Crittenden, R. G., & Playne, M. J. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. Trends in Food Science and Technology, 7, 353 - 360.
10. Crittenden, R. G., & Playne, M. J. (2002). Purification of food grade oligosaccharides using immobilized cells of Zymomonas mobilis. AppliedMicrobiology and Biotechnology, 58, 297 - 302.
11. Daubiol, C. A., Taper, H. S., DeWispelaere, L. D., & Delzenne, N. M. (2000). Dietary Oligofructose lessens hepaic steatosis but not prevent hyper triglyceridimia in obese Zucker rats. Journal of Nutrition, 130, 1314 - 1319.
12. Delzenne, N. M., Daubioul, C., Neyrinck, A., Lasa, M., & Taper, H. S. (2002). Inulin and oligofructose modulate lipid metabolism in animals: review of biochemical events and future prospects. British Journal of Nutrition, 87, S255 - S259.
13. Duan, G.R., Shin, D.C., Bi, J.L., 2003.
14. Durieux, A., Fougnies, C., Jacobs, H., & Simon, J-P. (2001). Metabolism of chicory fructooligosaccharides by bifidobacteria. Biotechnology Letters, 23, 1523 - 1527.
15. Finke, B., Stahl, B., Pritschet, M., Facius, D.,Wolfgang, J., & Boehm, G. (2002). Preparative continuous annular chromatography (PP. T. Sangeetha et al. / Trends in Food Science & Technology 16 (2005) 442 - 457 455 CAC) enables the large scale fractionation of fructans. Journal of Agricultural Food Chemistry, 50, 4743 - 4748.
16. Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., & Roberfroid, M. (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 41, 353 - 362.
17. Flickinger, E. A., Loo, J. V., & Fahey, G. C. (2003). Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of

domesticated animals. A review. CRC Critical reviews in Food Science and Nutrition, 43, 19 - 60.
18. Fujita, K., Hara, K., Hashimoto, H., & Kitahata, S. (1990). Purification and some properties of (-fructofuranosidase I from Arthrobacter sp. K-1. Agricultural and Biological Chemistry, 54, 913 - 919.
19. Fujita, K., Kuwahara, N., Tanimoto, T., Koizumi, K., Iizuka, M., & Minamiura, N. (1994). Chemical structures of hetero-oligosaccharides produced by Arthrobacter sp. K-1 (-fructofuranosidase. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 58, 239 - 243.
20. Goldberg, I. (1994). In Goldberg (Ed.), Functional foods-designer foods, pharma foods, nutraceuticals. Preface (pp. xv - xvi). New York: Chapman & Hall.
21. Gomi, K. (1999). Aspergillus oryzae. In R. Robinson, C. A. Batt, & P. D. Patel, Encyclopedia of Food Microbiology (vol. 2) (pp. 66 - 71). London: Academic Press.
22. Gorrec, K. L., Christelle, C., Guibert, A., Uribelarrea, J. L., &Combes, D. (1872). Identification of three inducible and extracellular enzymatic activities working on sucrose in Bacillus subtilis NCIMB 11871 and 1 supernatant. Enzyme and Microbial Technology, 31, 44 - 52.
23. Gudieal-Urabano, M., & Goni, I. (2002). Effect of fructooligosaccharides on nutritional parameters and mineral bioavailability in rats. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82, 913 - 917.
24. Hang, Y. D., Woodams, E. E., & Jang, K. Y. (1995). Enzymatic conversion of sucrose to kestose by fungal extracellular fructosyl transferase. Biotechnology Letters, 17, 295 - 298.
25. Hayashi, S., Yoshiyama, T., Fuji, N., & Shinohara, S. (2000). Production of a novel syrup containing neofructooligosaccharides by the cells of Penicillium citrinum. Biotechnology Letters, 22, 1465 - 1469.
26. Hirayama, M., Sumi, N., & Hidaka, H. (1989). Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing fructofuranosidase from Aspergillus niger ATCC 20611. Agricultural and Biological Chemistry, 53, 667 - 673.
27. Hogarth, A. J. C. L., Hunter, D. E., Jacobs, W. A., Garleb, K. A., & Wolf, B. W. (2000). Ion chromatographic determination of three FOS oligomers in prepared and preserved foods. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48(2000), 5326 - 5330.
28. Izzo, M., & Niness, K. (2001). Formulating nutrition bars with inulin and oligofructose. Cereal Foods World, 46, 102 - 106.
29. Jang, K. H., Ryu, E. J., Park, B. S., Song, K. B., Kang, S. A., & Kim, C. H. (2003). Levan Fructotransferase from Arthrobacter oxydans J17-21 catalyzes the formation of the Di-D-Fructose Dianhydride IV from Levan. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 2632 - 2636.
30. Kaplan, H., & Hutkins, R. W. (2000). Fermentation of FOS by lactic acid bacteria and bifidobacteria. Applied and Environmental Microbiology, 66, 2682 - 2684.
31. Kaufhold, J., Hammon, H. M., & Blum, J. W.

(2000). Fructooligosaccharide supplementation: effects on metabolic, endocrine and hematological traits in veal calves. Journal of Veterinary Medicine, Animal Physiology, Pathology and Clinical Medicine, 47, 17 - 29.

32. Kim, Y. M., Park, J. P., Sinha, J., Lee, K. H., & Yun, J. W. (2001). Acceptor reactions of a novel transfructosylating enzyme from Bacillus sp. Biotechnology Letters, 23, 13 - 16.

33. Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British Journal of Nutrition, 87, S193 - S197.

34. Letllier, A., Messier, S., Lessard, L., & Quessy, S. (2000). Assessment of various treatments to reduce carriage of Salmonella in swine. Canadian Journal of Veterinary Research, 64, 27 - 31.

35. Levrat, M. A., Remesy, C., & Demigne, C. (1991). High propionic acid fermentations and mineral accumulation in cecum of rats adapted to different levels of inulin. Journal of Nutrition, 121, 1730 - 1737.

36. L'Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B., & Xu, S. (2000). Purification and partial characterization of fructosyl transferase and invertase from Aspergillus niger AS0023. Journal of Biotechnology, 81, 73 - 84.

37. L'Homme, C., Arbelot, M., Puigserver, A., & Biagini, A. (2003). Kinetics of hydrolysis of FOS in mineral buffered aqueous solutions: influence of pH and temperature. Journal of Agricultural Food Chemistry, 51, 224 - 228.

38. Luo, J., Yperselle, M. V., Rizkalla, S. W., Rossi, F., Bornet, F. R. J., & Slama, G. (2000). Chronic consumption of short chain fructooligosaccharides does not affect basal hepatic glucose production or insulin resistance in type 2 diabetics. Journal of Nutrition, 130, 1572 - 1577.

39. Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional foods in Europe. Journal of Food Engineering, 56, 181 - 188.

40. Murphy, O. (2001). Non-polyol low digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. British Journal of Nutrition, 85, S47 - S53.

41. Nishizawa, K., Nakajima, M., & Nabetani, H. (2000). A forced flow membrane reactor for transfructosylation using ceramic membrane. Biotechnology and Bioengineering, 68, 92 - 97.

42. Nizhizawa, K., Nakajima, M., & Nabetani, H. (2001). Kinetic study on transfructosylation by (-fructofuranosidase from Aspergillus niger ATCC 20611 and availability of a membrane reactor for Fructooligosaccharide production. Food Science and Technology Research, 7, 39 - 44.

43. Park, J., Oh, T., & Yun, J.W. (2001). Purification and characterization of a novel transfructosylating enzyme from Bacillus macerans EG-6. Process Biochemistry, 37, 471 - 476.

44. Park, H. E., Park, N. H., Kim, M. J., Lee, T. H, Lee, H. G., & Yang, J. Y. (2003). Enzymatic synthesis of fructosyl oligosaccharides by levansucrase from Microbacterium laevaniformans ATCC 15953. Enzyme and Microbial Technology, 32, 820 - 827.

45. Parks, E. (2002). Dietary carbohydrate's effects

on lipogenesis and the relationship of lipogenesis to blood insulin and glucose concentration. British Journal of Nutrition, 87, S247 - S253.

46. Perrin, S., Warchol, M., Grill, J. P., & Schneider, F. (2001). Fermentations of fructooligosaccharides and their components by Bifidobacterium infantis ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. Journal of Applied Microbiology, 90, 859 - 865.
47. Pool-Zobel, B., van Loo, J., Rowland, I., & Roberfroid, M. B. (2002). Experimental evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. British Journal of Nutrition, 87, S273 - S281.
48. Prapulla, S. G., Subhaprada, V., & Karanth, N. G. (2000). Microbial production of oligosaccharides: A Review. In A. L. Laskin, J. W. Bennet, & G. Gadd, Advances in Applied Microbiology (Vol. 47) (pp. 299 - 337). New York: Academic Press.
49. Prapulla, S. G., Sangeetha, P.T., &, Ramesh M. N., (2002a) A process for the production of Fructooligosaccharides using cereal bran (163/DEL/2002 dated 28-02-2002).
50. Prapulla, S. G., Sangeetha, P. T., & Ramesh, M. N. (2002b) A process for the production of Fructooligosaccharides using corn products (66/DEL/2002 dated 30-1-2002).
51. Prapulla, S. G., Sangeetha, P. T., & Ramesh, M. N. (2000c). A process for the preparation of prebiotic bread spread (344/DEL/2002 dated 27-03-2002).
52. Ramesh, M. N., Shivakumar, M., Sangeetha, P. T., Prapulla, S. G., (2003). Fructosyl Transferase powder, (583/DEL/04).
53. Ramesh, M. N., Shivakumar,M., Sangeetha, P. T., Prapulla, S. G., & Maya Prakash, (2004). Fructooligosaccharides powder, US 2005 069627.
54. Rao, V. A. (2001). The prebiotic properties of FOS at low intake levels. Nutrition Research, 21, 843 - 848.
55. Roberfroid, M. B., & Delzenne, N. M. (1998). Dietary fructans. Annuals Reviews in Nutrition, 18, 117 - 143.
56. Roberfroid, M., & Slavin, J. (2000). Nondigestible oligosaccharides. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40, 461 - 480.
57. Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. Journal of Applied Microbiology, 91, 878 - 887.
58. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2002). Influence of media components and reaction parameters on the production of fructosyl transferase and fructooligosaccharides. Sciences Des Aliments, 22, 277 - 287.
59. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2003a). Microbial production of fructooligosacharides. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences, 5(3), 313 - 318.
60. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2003b). A process for the utilization of coffee and tea processing byproducts for the preparation of fructooligosaccharides

(521/DEL/2003).

61. Sangeetha, P. T., Ramesh, M.N., & Prapulla, S. G. (2003c). A process for the production of fructooligosaccharides using jaggery (87/DEL/03).
62. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2003d). A process for the preparation of honey like product (92/DEL/03).
63. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2004a). Production of fructooligosaccharides by fructosyl transferase from Aspergillus oryzae CFR 202 and Aureobasidium pullulans CFR 77. Process Biochemistry, 39, 753 - 758.
64. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2004b). Production of fructosyl transferase by Aspergillus oryzae CFR 202 in solid-state fermentation using agricultural by-products. Applied Microbiology and Biotechnology, 65, 530 - 537.
65. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G, (2005). Maximization of Fructooligosaccharide production by two stage continuous process and its scale up. Journal of Food engineering (in press).
66. Sangeetha, P. T., Ramesh, M. N., & Prapulla, S. G. (2005). Fructooligosaccharide production using fructosyl transferase obtained from recycling culture of Aspergillus oryzae CFR 202. Process Biochemistry, 40, 1085 - 1088.
67. Sheu, D. C., Lio, P. J., Chen, S. T., Lin, C. T., & Duan, K. J. (2001). Production of fructooligosaccharides in high yields using a mixed enzyme system of (-fructofuranosidase and glucose oxidase. Biotechnology Letters, 23, 1499 - 1503.
68. Sheu, D. C., Duan, K. J., Cheng, C. Y., Bi, J. L., & Chen, J. Y. (2002). Continuous production of high content FOS by a complex cell system. Biotechnology Progress, 18, 1282 - 1286.
69. Shin, H. S., Lee, J. H., Pestka, J. J., & Ustunol, Z. (2000). Growth and viability of commercial Bifidobacterium sp. in Skim milk containing oligosaccharides and inulin. Journal of Food Science, 65, 884 - 887.
70. Slavin, J. L. (1999). Health benefits of oligosaccharides. Journal of Nutraceuticals, functional and Medical Foods, 1, 43-55.
71. Song, D. D., & Jacques, N. A. (1999). Purification and enzymic properties of the fructosyl transferase of Streptococcus salivarius ATCC 25975. Biochemical Journal, 341, 285-291.
72. Stark, A., & Madar, Z. (1994). Health functionality of food components. In I. Goldberg (Ed.), Functional foods-designer foods, pharma foods, nutraceuticals (pp. 183-201). New York: Chapman & Hall.
73. Taper, HS, & Roberfroid, MB (2002). Inulin/Oligofructose and anticancer therapy. British Journal of Nutrition, 87, S283-S286.
74. Trujillo, L. E., Arrieta, J. G., Dafhnis, F., Garcia, J., Valdes, J., Tambara, Y., & Perez, M. (2001). FOS production by the Gluconacetobacter diazotrophicus levansucrase expressed in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Enzyme and Microbial Technology, 28, 139-144.
75. Vaccari, G., Lodi, G., Tamburini, E., Bernardi, T., & Tosi, S. (2000). Detection of oligosaccharides in sugar products using

planar chromatography. Food Chemistry, 74, 99-110.

76. Van Hijum, S., van Geel-Schutten, G. H., Rahouri, H., vander Maarel,M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a novel Fructosyl Transferase from Lactobacillus reutri that synthesizes high molecular weight inulin and inulin oligosaccharides. Applied and Environmental Microbiology, 68, 4390-4398.
77. Van Kleef, E., van Trijp, H. C. M., Luning, P., & Jongen, W. M. F. (2002). Consumer-oriented functinal food development: how well do functional disciplines reflect 'the voice of the consumer'? Trends in Food Science and Technology, 13, 93-101.
78. Vigants, M. B. A., Laukevics, J., Toma, M., Rapoports, A., & Zikmanis, P. (2000). The effect of osmo-induced stress on product formation by Zymomonas mobilis on sucrose. International Journal of Food Microbiology, 55, 147-150.
79. Wang, X. D., & Rakshit, S. K. (2000). Isooligosaccharide production by multiple forms of transferase enzymes from Aspergillus foetidus. Process Biochemistry, 35, 771-775.
80. Williams, C. M., & Jackson, K. G. (2002). Inulin and oligofructose: effects on lipid metabolism from human studies. British Journal of Nutrition, 27, S261-S264.
81. Yamachita, K., Kawai, K., & Itakura, M. (1984). Effect of fructooligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. Nutrition Research, 4, 961-966.
82. Yun, J. W., Jung, K. H., Oh, J. W., & Lee, J. H. (1990). Semi batch production of Fructooligosaccharides from sucrose by immobilized cells of Aureobasidium pullans. Applied Biochemistry and Biotechnology, 24/25, 299-308.
83. Yun, J. W., Jung, K. H., Jeon, Y. J., & Lee, J. H. (1992). Continuous production of fructooligosaccharides by immobilized cells of Aureobasidium pullans. Journal of Microbiology and Biotechnology., 2/2, 573-576.
84. Yun, J. w., & song, S. K. (1993). The production of high contwnt fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. Biotechnogy Letters, 15(6), 573-576.
85. Yun, J.W., Lee, M. G, & Song, S. K. (1994). Batch production of high content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixedenzyme system of (-Fructofuranosidase and glucose oxidase, 77(2): 159-163.
86. Yun, J. W. (1996). Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation and application. Enzyme and Microbial Technology, 19, 107-117.