

특집 : 미생물 자원을 이용한 신소재 개발 및 응용

Microbial Xylanase를 이용한 자일로올리고당의 생산

이오석^{*} · 이인구

경북대학교 농화학과

The Production of Xylooligosaccharides with Microbial Xylanase

Oh-Seuk Lee^{*} and In-Koo Rhee

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

서 론

식품의 기능에는 생명의 유지기능에 해당하는 영양학적 기능인 1차 기능과 맛과 향기 등 기호성을 반영하는 2차 기능이 있으며, 생체방어, 신체리듬조절, 노화억제, 질환방지 및 질병회복 등 생체에 대한 식품의 조절기능인 3차 기능이 있다. 이 가운데 3차 기능은 1차, 2차 기능과는 다른 의미에서 생체의 생리기능 조절이나 생체의 항상성 유지에 관여하고 있는 것으로 식품이 갖는 새로운 기능이라고 할 수 있다(1). 탄수화물은 감미도, 점도, 흡습성 및 수분활성도를 조절하며, 식품의 물리화학적 특성에 영향을 미쳐 식품의 제품적 특성 및 식품의 보장력을 변화시키는 역할과 함께 소화관내에서 소화속도의 조절 및 독소인자의 배출기능, 장내 면역을 강화하는 작용, 장내 미생물을 정상적인 형태로 유지시키는 정장작용 및 충치 예방 감미료 등 새로운 기능성이 발견되고 있다. 또한 탄수화물 신소재는 겔 형성능, 유화안정성, 표면장력의 조절, 물 흡수능, 결합능, 점착능, 윤활능 및 필름형성능 등의 광범위한 기능적 특성으로 식품, 화장품, 석유 및 제지산업 등의 중요소재로 이용될 수 있고, 물질분리, 농축소재 및 화학에너지의 역학에너지로의 변환을 위한 mechanochemical 소재 개발 등의 화학공학 분야, 선박의 난류억제 및 대규모 직접회로나 초전도 복합소재에서의 광저항성을 이용한 기계, 전자공업 분야 및 상처, 암 및 각종 세균성 질병의 진단 또는 예방, 치료에 사용되는 생물활성을 지닌 의약품 소재로 이용될 수 있다.

통계청 자료에 의하면 국내 사망원인중 성별 사망률 및 사인 순위를 보면 뇌혈관 질환, 심장 질환, 운수사고, 간 질환, 위암, 당뇨병 등의 주요 사인으로 나타나 있다(통계청, 인구분석과 99년 사망원인통계). 이는 식생활의 서구

화 및 고령화로 인한 성인병의 증가하는 추세를 반영하는 것으로 건강에 미치는 식생활의 중요성을 알 수 있다.

인간의 대장에는 100여종의 세균들이 서식하고 있으며 대장 내용물의 약 1/3을 차지하면서 숙주인 인간의 건강유지, 질병 또는 노화 등에 큰 영향을 미치고 있는 것으로 알려져 있다(2). 이러한 장내 세균 중에서 *Bifidobacterium*은 생체에 대하여 감염방어, 면역기능의 증강, 유해균 및 유해물질의 억제, 비타민 생산, 정장 작용, 항 종양 등 여러 가지 유용한 역할을 하고 있다고 보고되어 장내의 미생물 균총을 *Bifidobacterium*의 비율을 우수하게 유지하는 것이 건강유지에 바람직한 것으로 알려져 있다(3).

따라서 *Bifidobacterium*의 증식인자로 작용하는 것으로 보고된 각종 올리고당에 대한 중요성은 점차 높아지고 있으며, 국내에서 생산, 시판되고 있는 올리고당으로는 프락토 올리고당, 이소말토 올리고당, 말토 올리고당, 갈락토 올리고당 등이 있다. 말토 올리고당과 이소말토 올리고당은 소화성으로 소장 내에서 분해되어 *Bifidus*균 증식 촉진인자로서의 효과가 감소되며, 프락토 올리고당은 비소화성이지만 fructose transferase의 작용에 의해 설탕으로 전환되기 쉬우며, 액체상태로 장기보관시 포도당, 과당, 설탕 등으로 분해되어 *Bifidobacterium*의 증식인자로서의 효과가 감소된다. 또한 이들 올리고당은 기능성을 발휘할 수 있는 유효량을 첨가할 경우 그 첨가량이 많아서 식품이 가지고 있는 고유한 맛의 균형을 깨트려 단맛만을 강조시킬 가능성이 있다. 그러나 자일로올리고당은 식품의 pH가 산성이거나 가열처리 공정시에도 다른 올리고당보다 분해되는 정도가 낮아서 내열성이 있으며, pH 안정성 및 보존성이 우수한 특징을 가지고 있고, *Bifidobacterium*의 증식인자로 작용하는 유효첨가량이 1일 0.7g으로 소량으로 식품 풍미에 큰 영향을 미치지 않고도 기능성을 발휘

^{*}Corresponding author. E-mail: los25@hanmail.net
Phone: 82-53-580-5946, Fax: 82-53-580-5164

할 수 있다(4). 따라서 이러한 특성을 지니고 있는 자일로 올리고당의 생산에 관하여 살펴보고자 한다.

원료물질인 Xylan의 특징

자연계에 존재하는 식물체의 세포벽은 cellulose, hemicellulose, lignin이 주성분으로 구성되어 있다. 이 구성성분 중에서 가장 많이 존재하는 것은 cellulose이고, 그 다음으로는 hemicellulose로서 이 두가지 성분은 전체 biomass의 절반을 차지한다(5). Cellulose는 구성단위 물질이 glucose만으로 구성되어 있는 homopolysaccharide로서 불용성의 β -1,4-glucan fiber 형태로 존재하고 있으며, hemicellulose는 glucan, mannan, xylan 등이 혼재하고 있는 heteropolysaccharide이다. Hemicellulose는 D-xylan, L-arabinan, L-arabino-D-xylan, D-mannan, glucomannan, galactomannan, L-arabinan, D-galactan, arabinogalactan 및 β -glucan 등으로 분류되며, D-xylan은 자일로 올리고당을 생산할 수 있는 소재로서 주목을 받고 있다. D-xylan은 식물의 목질화된 세포에 존재하며, 1년생 초본 건물중의 약 30%, 활엽수 건물 중의 20~25%, 침엽수 건물중의 7~12% 정도 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.

아프리카 락나부(espato grass), 타마린드(tamarind) 종자, 목면각지, tobacco 등의 xylan은 β -1,4-glycosidic linkage로 연결된 상태로 존재하지만, 대부분의 xylan은 xylose 주골격에 arabinose, glucuronic acid, acetate 등을 side chain으로 가지고 있다. 이러한 side chain의 종류와 branch정도는 xylan을 추출하는 식물체의 종류에 따라서 다르며 용해도와 물리적 구조 및 효소의 반응성에 큰 영향을 미친다(6). Xylan을 완전히 분해하기 위해서는 β -1,4-xylanase(1,4- β -D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8), β -xylosidase(1,4- β -D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37), α -L-glucuronidase(EC 3.2.1)와 α -L-arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) 및 acetylxylan esterase (EC 3.1.1.6)가 작용할 때 가능하다. Xylanase는 β -1,4D-xylopyranoside의 주골격에 작용하여 xylan의 β -1,4D-xylopyranosyl linkage를 절단하여 자일로 올리고당을 생산하며, 이 자일로 올리고당은 β -xylosidase에 의해 최종 분해산물인 xylose로 가수분해된다. 주골격외의 side group은 α -L-glucuronidase와 α -L-arabinofuranosidase에 의해서 분해되며, esterase는 acetyl기, coumaryl기와 feruloyl기 등의 치환체를 분해한다. 따라서 xylan을 완전히 가수분해하기 위해서는 이들 효소를 함께 사용해야 가능하다(5).

Xylanase를 생성하는 미생물

Xylanase는 곰팡이와 세균과 같은 미생물뿐만 아니라 거의 모든 식물체 및 곤충과 원생동물과 같은 동물체내

분포되어 있음이 알려져 있다. Xylanase를 분비하는 곰팡이로서는 *Aspergillus*속, *Schizophyllum*속, *Sclerotium*속, *Ceratocystis*속, *Chaetomium*속, *Dictyoglomus*속, *Fusarium*속, *Glilocladium*속, *Neocallumastix*속 등이 생산하는 것으로 보고되어 있으며, 세균으로는 *Aureobasidium*속, *Bacillus*속, *Cellulomonas*속, *Clostridium*속, *Pseudomonas*속 등에 의해서 xylanase가 분비된다는 연구결과가 있으며, 효모로서는 *Candida*속, *Cryptococcus*속이 생산하는 xylanase에 대한 보고가 있다. 또한 방선균은 *Streptomyces*속, *Thermomonospora*속 등에서 xylanase를 분비하는 것으로 알려져 있다(7). Xylanase는 특히 곰팡이에서 생성되는 효소에 대해서 많은 연구가 진행되어 있다. 대부분의 세균과 곰팡이는 xylanase를 세포의 효소로 생성하지만 일부의 미생물은 세포내 효소를 생성하기도 한다. Xylanase는 대부분 유도효소의 특성을 가졌으나 구성효소의 형태로도 생산되는 것으로 보고되어 있다.

Xylanase 생합성 경로

Xylanase는 배지중에 있는 탄소원의 종류에 따라서 효소의 생산량과 효율이 좌우되기 때문에 유도물질의 선정이 매우 중요하다. 현재까지 보고된 유용한 유도물질로는 값비싼 xylan이외에 corncob, wheat bran, rice bran, rice straw, corn stalk, baggage 등 값싼 hemicellulose계 기질이 많이 사용된다. Xylanase의 생산수율에 영향을 미치는 요인은 탄소원 이외에도 배지의 초기 pH, 배양온도, 교반속도 및 통기속도 등이다.

Xylanase의 생합성은 그림 1과 같은 모델, 즉 세포에는 구성적으로 발현되는 아주 적은 양의 xylanase 작용으로

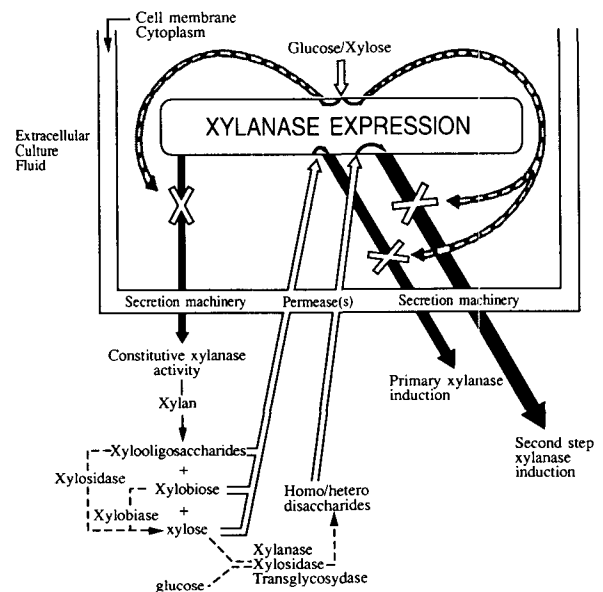


그림 1. Hypothetical model of xylanases biosynthesis.

xylan이 가수분해되고, 이 분해산물이 세포내로 이송되어 유도형 xylanase 유전자의 발현을 유도하게 된다. 생합성되어 분비된 xylanase는 보다 효율적으로 xylan을 가수분해하여 자일로올리고당과 xylose를 생산하게 된다. 이 xylanase 생합성도 다른 효소의 경우와 마찬가지로 최종 분해 산물에 의해 feed-back inhibition을 받게 되는데, 즉 xylose나 glucose에 의해서 유전자의 발현이 억제되는 catabolite repression을 일으키는 것 같다. 이외에도 전사의 조절, mRNA 안정성, 번역의 시작과 신장, 단백질의 folding, 세포내 이송, processing 및 분비된 후의 배양액중의 단백질 분해효소의 활성 등에 의해 분비된 xylanase의 최종적인 생산수율에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(9).

자일로올리고당의 구조와 생산방법

Xylan의 효소적 가수분해 산물인 자일로올리고당은 그림 2와 같이 D-xylopyranose 2분자가 β-1,4 glycoside 결합으로 결합한 xylobiose가 주성분이며 3분자가 결합한 xylotriose 및 중합도(DP)가 6분자까지 결합한 올리고당이 함유된 혼합물이다(4).

자일로올리고당의 제조에는 xylan을 다량 함유하고 있는 농산 및 임산 부산물인 옥수수속삭(corn cob), 바가제(bagasse), 목화씨(cotton seeds), 주박(brewer's cake), 볏짚(rice straw), 백자작나무(white birchwood), 낙엽송(larchwood), 참나무(oak) 등을 이용할 수 있다. 이들 원료에서 xylan을 추출한 다음 xylanase를 작용시켜 당화시킨다. 당

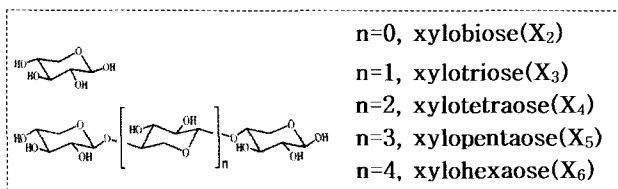


그림 2. Chemical structure of xylooligosaccharides.

표 1. 올리고당의 응용식품

분 류	종 류	사 용 예
음 료	우유음료	올리고당 5%, 우유 95%
	유산균음료	올리고당 10%, 탈지분유 5%, 설탕 4%, 물
	커피음료	올리고당 10%, 설탕 6%, 우유 15%, 커피엑기스
	과즙음료	올리고당 6%, 1/5 농축오렌지, 생과즙 10%, 설탕, 구연산, 향료, 물
과 자	비스킷	올리고당 20%, 소맥분 41%, 쇼팅 21%, 계란 9%, 기타
	치즈케이크 버터볼	올리고당 15%, 계란흰자 25%, 크림치즈 15%, 버터, 생크림, 소맥분 올리고당 92%, 버터, 마가린, 레시틴, 식염
빙 과	아이스크림	올리고당 12%, 우유 32%, 생크림 27%, 전지우유 24%, 젤라틴, 향료
	샤베트	올리고당 15%, 과즙, 설탕, 기타
빵	식빵	올리고당 10%, 소맥분 50%, 분유, 기타
젬	질드젬	올리고당 60%, 팥기푸레, 기타
스프렛	쵸코렛퍼스	올리고당 50%, 스위트쵸코렛 30%, 마가린 19%, 기타
기 타	건강식품	올리고당 90%, 식물섬유 10%, 비피더스균, 기타

화액은 활성탄과 규조토를 사용하여 탈색·여과한 다음 이온교환수지를 이용하여 탈염하고, 다시 활성탄과 규조토를 사용하여 재차 탈색한 다음 감압·농축하여 시럽형태의 제품을 생산하거나 dextrin과 같은 증량제를 첨가한 다음 분무·건조하여 분말형태의 제품을 생산할 수 있다(4).

자일로올리고당의 물성적 특성과 활용

자일로올리고당의 특성은 감미도가 설탕의 약 40% 정도이며 감미질은 설탕과 비슷하고 감미의 질은 지극히 상쾌한 감미를 나타내며 후미도 좋은 것으로 알려져 있으며, 열과 pH에 대하여 안정한 것으로 보고되어 있다. 또한 보존성이 뛰어나고 비중이 75% 시럽상태에서 비중이 1.36(25°C)으로 점도가 비교적 낮은 것으로 보고되어 있다(4). 이러한 물성적 특성과 아울러 사람의 타액, 침장액, 인공 장액, 소장점액, 대장액 등의 소화효소에 의해서 분해되지 않는 난소화성임이 보고되어 있다(4,10). 대장내의 세균에 의한 자일로올리고당의 자화성 실험을 한 결과, 자일로올리고당은 *Bifidobacterium arolescentis*, *B. infantis*, *B. longum* 등의 비피더스균은 잘 이용하였지만, 다른 장내세균에 의해서는 거의 분해되지 않는 특성을 나타내었다(4). 또한 다른 탄수화물이 몰당 4 kcal의 열량을 생산하는데 비해 자일로올리고당은 1.5~3.0 kcal의 낮은 에너지를 생성하는 저칼로리성 물질이며, 충치예방 효과와 아울러 비피더스균 증식촉진 및 부패균의 증식억제효과가 알려져 있다(12). 건강한 사람을 대상으로 매일 0.7 g의 자일로올리고당을 2개월 동안 식이할 때 비피더스균의 증식효과가 확인되었다(4). 이러한 물성적 생리학적 특성이 우수한 자일로올리고당은 표 1과 같이 식품의 첨가제 및 보존제 등으로 사용이 가능할 뿐만 아니라 향후 기능성 소재로서 다양하게 활용될 것으로 사료된다.

결 론

최근 효소공학의 눈부신 발전으로 올리고당을 비롯하여 여러 가지 당류를 만드는 것이 가능하게 되어 보다 많은 종류의 기능성 당의 개발이 가능하게 되었다. Xylanase에 의해 생성되는 자일로올리고당은 소량을 섭취하여도 그 기능성을 기대할 수 있을 뿐만 아니라 식품의 물성개선, *bifidus*균 증식촉진 인자로서 저칼로리 및 저충치성 등의 소재로 활용이 가능하여 음료, 조미료, 과자류 등의 식품산업에 많이 이용할 수 있다. 그러나 산업화하기에 적당할 정도로 많은 양의 효소를 생산할 수 있는 우량 균주를 개발하여야 하고, 그 효소학적 특성에 대한 연구는 물론 그 유전자를 클로닝하여 대장균이나 다른 숙주세포에 형질전환시킴으로써 생산효율을 증가시켜야 한다. 현재 많은 연구가 이뤄지고 있으며 기능성 식품소재로서 조만간 산업화가 가능할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. 기능성 식품소재연구회 : 식품중의 생체기능 조절물질 연구법. 한림원, p.1-198 (1996)
2. 신현경 : 장내균총 개선을 위한 신소재 탐색. 식품과학과 산업, **25**, 83-92 (1992)
3. 장국희, 허경택 : 비피더스균과 올리고당. 유한문화사 (1994)
4. 安田 降 : キシロオリゴ糖の加工食品への応用. *New Food Industry*, **35**, 72-79 (1993)
5. Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. : Molecular and biotechnological aspect of xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, **23**, 411-456 (1999)
6. Sunna, A., Puls, J. and Antranikian, G. : Purification and characterization of two thermostable endo-1,4-xylanases from *Thermotoga thermarum*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **24**, 177-185 (1966)
7. Subramaniyan, S. and Prema, P. : Cellulose-free xylanase from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiol.*, **183**, 1-7 (2000)
8. Hrmova, M., Petrakova, E. and Biely, P. : Induction of cellulose and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo and hetero-disaccharides composed of glucose and xylose. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 541-547 (1991)
9. Mackenzie, D.A., Gendron, L.C., Jeenes, D.J. and Archer, D.B. : Physiological optimization of secreted protein production of *Aspergillus niger*. *Enzyme Micro. Technol.*, **16**, 276-280 (1994)
10. 주길재, 이인구, 김성옥, 이순재 : 식이 자일로올리고당의 난소화성과 담즙산 흡수지연효과. 한국식품영양과학회지, **27**, 705-711 (1998)
11. Oku, T. : Special physiological functions of newly developed mono and oligosaccharides. In *Functional Foods*, Goldberg, I. (ed.), Chapman & Hall, New York and London (1994)