

메밀껍질의 효소분해에 의한 기능성 올리고당의 생산 및 특성

임희진 · 김춘영 · 윤경영*
영남대학교 식품영양학과

Production and Characteristics of Cello- and Xylo-oligosaccharides by Enzymatic Hydrolysis of Buckwheat Hulls

Hee Jin Im, Choon Young Kim, and Kyung Young Yoon*
Department of Food and Nutrition, Yeungnam University

Abstract This study was conducted to produce oligosaccharides from buckwheat hull by using commercial enzymes. Yields of oligosaccharides obtained by enzymatic hydrolysis of the cellulose and hemicellulose fractions were 132.37 and 393.04 g/kg, respectively. Xylose, glucose, fructose, xylobiose, xylotriose, cellobiose, and cellotriose were detected in the hydrolysate produced from buckwheat hull. Antioxidant activity of oligosaccharide from cellulose fraction (OSC) reduced with increasing hydrolysis time; however, the antioxidant activity of oligosaccharide from hemicellulose fraction (OSF) increased as the hydrolysis time was prolonged. OSF and OSC showed higher increase in viable counts compared to the control. As a result, oligosaccharides produced from buckwheat hull by enzymatic hydrolysis showed antioxidant activity and prebiotic effects. It is suggested that utilization of oligosaccharides produced from buckwheat hull as functional food materials may be improved when hydrolysis time and conditions are controlled for this purpose.

Keywords: buckwheat, oligosaccharides, antioxidant activity, prebiotics, enzymatic hydrolysis

서 론

식물조직의 세포벽은 셀룰로스와 헤미셀룰로스, 펙틴 등의 식이섬유, 소량의 당단백질 및 미량의 페놀계 물질로 구성되어 있으며, 이들은 복잡한 사슬로 연결되어 있다(1). 농작물의 수확 또는 식품가공 시 발생하는 짚, 껍질, 박, 잎, 씨 등의 부산물은 대부분 세포벽으로 이루어져 있고 자체의 천연 생리활성 물질을 함유하고 있어, 이들을 기능성 소재로서 활용할 수 있는 가능성이 크다(2). 최근 연구에 의하면 식물 가공부산물은 올리고당을 비롯한 기능성 당의 우수한 소재일뿐만 아니라, 값이 저렴하고 대량 이용이 가능하여 기능성 소재로 주목을 받고 있다(3-6).

국내의 농산부산물은 연간 630만톤 이상 발생한다(7). 특히 메밀껍질의 발생량은 약 1000톤으로 메밀의 40% 정도이며, 이는 다른 곡류의 부산물 발생비율에 비해 높은 수준이다(8,9). 메밀(Buckwheat; *Fagopyrum esculentum*)은 마디풀과에 속하는 일년초로서 탄수화물, 단백질, 필수아미노산, 불포화지방산 및 무기물과 비타민을 함유하고 있다(10). 또한 건강식품으로써 루틴(rutin)을 비롯하여 다양한 페놀화합물을 함유하고 있어 동맥경화 예방, 혈압강하 및 당뇨병 치료에 유효한 것으로 인정되고 있다(11). 메밀의 생리활성기능과 영양학적 가치가 알려지면서 이의 수요가

증가하고 있으나(12), 대부분 메밀알곡 형태로 소비되고 있다. 메밀껍질은 메밀씨앗보다 총 플라보이드 함량이 4배정도 높으며, 메밀껍질로부터 분리한 플라보노이드의 라디칼 소거능이 우수하다고 보고되었다(13,14). 이외에도 메밀껍질은 산화적 스트레스에 대한 효과가 있을 뿐만 아니라, 암세포의 종류에 따라 다소 차이는 있지만 항암효과도 있다고 보고되었다(15). 이와 같이 메밀껍질이 다양한 생리활성을 가지고 있음에도 불구하고 대부분의 메밀껍질이 폐기되고 있어 이를 활용할 수 있는 다양한 방법의 모색이 필요하다.

식물 가공부산물을 활용하려면 이들의 주요 성분인 셀룰로스, 헤미셀룰로스와 같은 고분자 화합물들을 저분자로 전환하기 위한 가수분해과정이 필요한데, 물리적, 화학적 방법의 가수분해 공정은 2차 오염, 에너지 소모와 시설비가 크다는 단점이 있어 최근에는 생물학적인 방법인 효소가수분해가 많이 이용되고 있다(16). 효소분해는 효소가 특정한 기질에만 촉매반응을 하고 화학적 처리방법에 비해 분해생성물 및 부산물이 적어 환경오염을 방지하며 반응되지 않은 물질은 배출되어 다른 용도로 사용할 수 있으며, 시설비가 적게 들어 경제적으로 용이하다는 장점이 있다(17). 또한 적은 양으로도 반응이 가능하고, 효소의 종류나 효소 활성에 영향을 주는 온도, pH, 반응시간, 기질의 농도 등에 의해 원하는 물질을 생산할 수 있다. 이에 관한 연구로는 옥수수 대, 오렌지 껍질 등의 부산물을 효소처리하여 에탄올과 올리고당 등을 생산하였으며(18,19), 셀룰로스의 바이오매스를 효과적으로 분해하기 위한 전처리 방법 및 복합효소 모델이 제시되었다(20). 또한 밀겨와 짚으로부터 올리고당 생산(21)과 파인애플 줄기와 부산물로부터 자일로올리고당(xylo-oligosaccharide)을 생산한 연구(22) 등이 있다. 이와 같이 농산 부산물을 이용한 기능성 물질을 생산하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으나 메밀껍질의 효

*Corresponding author: Kyungyoung Yoon, Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan, Gyeongbuk 38541, Korea
Tel: +82-53-810-2878
Fax: +82-53-810-4768
E-mail: yoonky2441@ynu.ac.kr
Received March 3, 2016; revised April 29, 2016; accepted April 29, 2016

소분해에 의한 기능성 물질의 생산 연구는 매우 부족하다.

따라서 본 연구에서는 농산 부산물인 메밀껍질에서 기능성이 우수한 셀로 및 자일로올리고당을 생산하기 위해 효소 선정 및 효소의 최적 분해조건을 설정하였다. 또한 생산된 올리고당의 특성을 평가하기 위해 구성당 분석, 산화방지 활성과 프리바이오틱스(prebiotics)로서의 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 메밀껍질은 경북 봉화에서 구입한 것으로 크기와 외관이 균일한 것을 사용하였다. 구입한 메밀껍질은 이물질 제거 및 세척 후 냉동 건조하고, 마쇄 후 체질하여 -40°C 냉동고(deep freezer, MDF-435, Sanyo, Tokyo, Japan)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

올리고당 생산의 최대 가수분해 반응을 가지는 효소를 선정하기 위해 Celluclast 1.5L, Viscozyme L, Shearzyme plus와 Pectinex Ultra SP-L (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)을 사용하였다. 셀룰로스 가수분해효소(cellulase)와 자일란가수분해효소(xylanase) 활성은 카복시메틸셀룰로스(carboxymethylcellulose, CMC, Sigma, St. Louis, MO, USA)와 자일란(xylan, Sigma)을 기질로 하여 생산된 환원당량을 DNS법(23)으로 측정하여 나타내었다. 즉 셀룰로스가 가수분해효소의 활성단위는 1분 동안 pH 5.0, 50°C 에서 CMC로부터 포도당 $1\ \mu\text{mol}$ 을 분해하는 효소량을 1 unit으로 하였으며, 자일란가수분해효소의 활성은 pH 5, 40°C 에서 1분 동안 자일란으로부터 자일로스(xylose) $1\ \mu\text{mol}$ 을 분해하는 효소량을 1 unit으로 나타내었다.

셀룰로스 및 헤미셀룰로스의 분획

식물 세포벽에서 셀룰로스를 제외한 다당류를 총칭하는 헤미셀룰로스는 강한 알칼리에 용해되는 특성을 가진다. 따라서 Im과 Yoon(24)의 방법을 이용하여 메밀껍질로부터 헤미셀룰로스를 분리하였다. 즉, 메밀껍질 30g당 300 mL의 1 M 수산화소듐(NaOH)을 가하여 균질기(homogenizer, AM-1, Nissei, Japan)로 180 rpm으로 3분간 균질화한 후, 1M의 NaOH 100 mL를 첨가하고 진탕 배양기(shaking incubator, KMC-8480SF, Vision scientific Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 25°C 에서 200 rpm으로 3시간 동안 교반하였다. 반응액은 원심분리하여 상층액과 잔사로 분리하여 상층액은 1 M 염산(HCl)으로 중화(pH 7.0)하였고, 잔사는 증류수로 pH 7.0이 될 때까지 증류수로 세척하였다. 이 때, 상층액은 헤미셀룰로스 분획으로 -40°C 냉동고(MDF-415, Sanyo, Tokyo, Japan)에 보관하고, 잔사는 셀룰로스 분획으로 냉동 건조하여 -40°C 에 냉동고(MDF-435, Sanyo) 보관하여 기능성 올리고당 생산을 위한 효소분해에 사용하였다.

분획물의 가수분해를 위한 효소 선정

셀룰로스 및 헤미셀룰로스 분획물에 대해 가장 높은 분해력을 가지는 효소를 선정하기 위해 임의의 pH, 온도, 효소량 및 기질 농도를 정하여 실험하였다. 셀룰로스 분획의 경우 pH는 5.0, 온도는 50°C , 기질농도는 4%로 하였고, 헤미셀룰로스 분획은 pH 5.0, 50°C , 25 unit로 하여 효소분해 반응을 하였다. 그 후, 효소 반응물 각각의 포도당(glucose)과 자일로스의 함량을 DNS법으로 비교하여 셀룰로스 및 헤미셀룰로스 분획을 가장 많이 분해하는 효소를 각각 결정하였다.

셀룰로스 및 헤미셀룰로스 분획의 최적 가수분해 조건 설정

메밀껍질의 셀룰로스 분획을 가수분해하기 위한 최적 분해조건을 설정하기 위해 Celluclast 1.5L를 이용하여 pH(3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0), 온도($30, 40, 50, 60^{\circ}\text{C}$), 기질농도(1, 2, 3, 4, 5%)를 변화시키면서 실험하였고, 가수분해물인 포도당 생성량을 DNS법으로 비교하였다. 각 pH는 시트르산 완충용액(citrate buffer, pH 3.0), 아세트산소듐 완충용액(sodium acetate buffer, pH 4.0-5.0), sodium phosphate buffer (pH 6.0-7.0)를 이용하여 조절하였다. 분해율은 반응에 사용된 셀룰로스 분획의 증량에 대한 효소분해 후 생성된 포도당의 양으로 하였다.

Viscozyme L을 사용하여 메밀껍질의 헤미셀룰로스 분획을 분해하기 위한 효소의 최적 분해 조건을 설정하기 위해 pH, 온도, 효소농도를 변화시키면서 실험하였다. pH는 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0로, 온도는 $30, 40, 50, 60^{\circ}\text{C}$ 로, 효소농도는 15, 20, 25, 30, 35 unit으로 변화시키면서 효소 반응 후 DNS법을 이용해 자일로스의 생성량을 측정하였다. pH는 헤미셀룰로스 분획 20 mL에 염산을 첨가해 각각의 pH를 조절한 후 25 mL 메스플라스크에 증류수로 정용하여 실험에 사용하였다. 분해율은 반응한 헤미셀룰로스 분획 1 L 중 효소 반응 후 생성된 자일로스 함량으로 하였다.

기능성 올리고당 생산을 위한 효소분해

메밀껍질로부터 기능성 올리고당을 제조하기 위해 효소 가수분해를 실시하였고, 셀룰로스 분획과 헤미셀룰로스 분획의 최적 분해조건을 이용하여 72시간 동안 효소분해하였다. 즉, 셀룰로스 분획은 pH 5.0인 50 mM 아세트산소듐 완충용액 350 mL에 셀룰로스 분획 14 g을 가한 후 진탕배양기에서 24시간 동안 swelling 하였다. 그 후, Celluclast 1.5 L을 첨가하여 40°C 에서 150 rpm으로 0, 24, 48, 72시간 동안 효소분해하였다. 헤미셀룰로스 분획은 pH 5.0으로 조절한 헤미셀룰로스 분획 250 mL를 최적 분해 온도에서 1시간 동안 진탕배양기에서 배양한 후, Viscozyme L을 첨가하여 효소분해(0, 24, 48, 72시간) 하였다. 효소 반응을 끝낸 분해액은 90°C 의 water bath (WD-06, Han Yang Scientific Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화시킨 후, 원심분리하여 얻은 상층액을 냉동건조하여 기능성 올리고당 생산을 위한 시료로 사용하였다.

가수분해물로부터 올리고당의 분리

효소분해에 의해 얻은 가수분해물로부터 올리고당의 분리는 Seo와 Yoon(25)의 방법을 이용하였다. 즉, 최적 조건으로 효소분해한 후 동결 건조한 셀룰로스 분획과 헤미셀룰로스 분획에 분획의 20배에 해당하는 60°C 의 80% 에탄올(ethanol)을 가해 용해시킨 후 알코올에 용해되지 않는 고분자의 다당류를 제거하였다. 이때 셀룰로스 및 헤미셀룰로스 분획으로부터 얻은 올리고당을 각각 OSC (oligosaccharide from cellulose fraction) 및 OSH (oligosaccharide from hemicellulose fraction)로 하였다. 또한 각 분획물로부터 얻어진 올리고당 함유 가수분해물의 수율은 메밀껍질의 건조 중량(kg)당 효소 반응 후 생성된 분해물의 건조 중량(g)으로 나타내었다.

구성당 함량 측정

효소의 분해로 생성된 가수분해물에 함유된 올리고당(OSC, OSH)의 함량은 Carbohydrate analysis column ($3.9\times 300\ \text{mm}$, Waters Co., Milford, MA, USA)을 이용하여 HPLC (Waters 2695, Waters Co., Milford, MA, USA)로 측정하였다. 이때 일정량의 시

료를 증류수에 용해시킨 후 0.45 µm membrane filter (Milipore Co., Billeria, MA, USA)로 여과하여 사용하였다.

산화방지 활성 측정

메밀껍질로부터 생성된 기능성 올리고당의 산화방지 활성은 전자공여능, ABTS⁺ 라디칼 소거능, Fe²⁺ 킬레이팅 활성을 시료 농도별로 측정된 뒤, 각 시험에서 라디칼을 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도인 IC₅₀ (50% inhibition concentration)으로 나타내었다.

전자공여능은 Blois(26)의 방법으로 측정하였다. 안정한 자유 (free) 라디칼인 1,1-다이페닐-2-피크릴 하이드라질(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH, Sigma)에 대한 시료 용액과의 전자공여 효과로써 이 반응에 의해 DPPH 라디칼이 감소하는 정도를 분광광도계(spectrophotometer, U-2900, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 각 식이섭유를 농도별로 제조하여 시험관에 0.5 mL 취하고, 0.1 mM DPPH 용액 1 mL를 가하여 10초간 혼합하였다. 이를 37°C water bath에서 30분간 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 전자공여능을 산출하였다.

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) 소거활성은 Re 등(27)의 방법을 일부 변형하여 실험하였다. ABTS 7 mM과 과황산포타슘(potassium persulfate) 2.45 mM을 증류수에 용해하여 12-16시간 동안 암소에 방치하여 ABTS cation 라디칼 (ABTS⁺)을 형성시킨 다음 80% 에탄올을 이용하여 이 용액이 734 nm에서 0.700±0.002의 흡광도 값을 갖도록 희석하였다. 증류수에 희석한 50 µL의 시료를 시험관에 가하고 희석된 ABTS⁺ 용액 3 mL를 첨가하여 실온에서 6분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS⁺ 라디칼 소거능(%)을 산출하였다.

Fe²⁺ 킬레이팅 활성은 Dinish 등(28)의 방법을 수정하여 측정하였다. 시료를 증류수에 녹여 농도별로 1 mL 취한 뒤, 2 mM 염화철(II)(FeCl₂)과 5 mM Ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4"-disulfonic acid; Sigma)을 각각 25 µL 첨가하고 vortex mixing 하였다. 이를 10분간 실온에 방치 한 다음 562 nm에서 흡광도를 측정하여 Fe²⁺ 킬레이팅 활성(%)을 측정하였다.

장내 유익균의 생육에 미치는 영향

실험에 사용된 균주는 *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014, *L. casei* ATCC 393, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *L. acidophilus* ATCC 832로 총 4종을 한국미생물 보존센터(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용했다. 균주를 백금루프로 *Lactobacillus* MRS Broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 접종하여 37°C incubator (IB-600M, Jeio Tech, Daejeon, Korea)에서 24시간 배양 후, 단일 콜로니를 취해 3회 계대 배양하여 사용하였다.

장내 유익균의 생육에 미치는 영향은 broth microdilution method (29)을 응용하여 측정하였다. 즉, 시험균주 4가지를 초기 균수가 4 log CFU/mL가 되도록 0.1% 살균 펩톤수(Bacto™ Peptone, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 희석하여 사용하였다. 살균된 MRS broth 8.5 mL에 시험균액 0.5 mL를 접종하고, 30% 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO, Junsei, Tokyo, Japan) 용액에 50 mg/mL 농도로 제조한 올리고당 1 mL를 첨가한 다음 37°C incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 1 mL씩 취하여 0.1% 멸균 펩톤수 9 mL에 희석하여 pour plate 하고 24시간 배양 후 집락을 계수하였다. OSC의 대조군으로는 시료 대신 1 mL의 30% DMSO를 첨가하여 동일한 방법으로 측정하였다. 또한 OSH의 과당(fructose) 함량이 높아 이에 의한 젖

산세균 생육 촉진 효과를 배제하기 위하여 과당을 첨가하여 동일한 방법으로 측정된 것은 OSH의 대조군으로 사용하였다. 즉, 과당을 14.40 mg/mL 농도로 제조한 후 1 mL를 30% DMSO에 올리고당 대신 첨가하여 젖산세균의 생육정도를 측정하여 OSH 첨가군과 생육정도를 비교하였다.

통계처리

본 실험결과는 3반복으로 수행된 평균값과 표준편차로 나타냈고, 각 실험결과에 대한 통계분석은 SPSS (Ver. 21, Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 p<0.05 수준에서 일원배치 분산 분석법을 시행하였으며, 각 실험군 평균치간의 유의적 차이는 던컨시험(Duncan's multiple range test)으로 검증하였다. 또한 프리 바이오틱 효과 측정을 위한 대조군(control)과 실험군 간의 유의적 차이는 p<0.05 수준에서 t-test로 검증하였다.

결과 및 고찰

메밀껍질 분획물의 가수분해를 위한 효소 결정

메밀껍질로부터 얻은 분획물로부터 기능성 올리고당을 생산하기 위한 효소를 결정하기 위해 Celluclast 1.5L, Shearzyme plus, Viscozyme L 및 Pectinex Ultra SP-L을 이용하여 셀룰로스 분획물과 헤미셀룰로스 분획을 각각 24시간 동안 효소분해를 하였고, 분해물의 환원당량을 측정하여 Table 1에 나타내었다. 셀룰로스 분획은 Celluclast 1.5L로 분해한 분해물의 환원당량이 9.55 mg/mL로 유의적으로 가장 높았고, 헤미셀룰로스 분획은 Viscozyme L에 의한 분해물의 환원당량이 4.87 mg/mL로 유의적으로 가장 높아 이들 효소를 각각 분획물의 가수분해를 위한 효소로 결정하였다.

분획물의 최적 가수분해 조건

기능성 올리고당 생산을 위한 Celluclast 1.5L의 최적 분해조건을 설정하기 위해 pH, 온도, 기질농도에 따라 셀룰로스 분획을 24시간 동안 효소분해하였고, 기질이 분해되는 비율을 측정하여 Table 2에 나타내었다. pH 5.0과 pH 6.0에서 효소분해된 가수분해물의 분해율이 각각 17.80, 16.46%로 다른 pH 보다 높은 분해율을 나타냈고, pH 5.0에서 유의적으로 가장 높은 분해율을 나타내었다. Gibbins 등(30)은 효소를 이용한 잎꽃기름의 최적 추출조건 연구에서 Celluclast 1.5L가 pH 4.84에서 가장 높은 효소 활성을 나타냈다고 보고하여 본 연구와 유사하였다. 따라서 셀룰로스 분획을 분해하기 위한 최적 pH는 5.0으로 설정하였다.

최적 pH 5.0에서 온도에 따른 분해율을 측정하였다. 40°C에서 가장 높은 분해율을 보였고, 그 다음으로는 30°C로 나타났다. 60°C에서는 가장 낮은 분해율을 보였는데, 이는 효소 단백질의 변성으로 효소활성이 현저히 감소된 것으로 판단된다. 본 연구 결과

Table 1. Effect of enzymes on enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose fractions

Enzyme	Sugar content (mg/mL)	
	Cellulose fraction	Hemicellulose fraction
Celluclast 1.5L	9.55±0.08 ^a	2.18±0.01 ^b
Shearzyme plus	8.23±0.03 ^b	2.03±0.01 ^b
Viscozyme L	6.97±0.08 ^c	4.87±0.01 ^a
Pectinex Ultra SP-L	3.71±0.02 ^d	1.99±0.02 ^b

Mean±SD (n=3). Values with different letters in the column are significantly different p<0.05.

Table 2. Effect of pH, temperature, substrate concentration and enzyme concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose fraction

Hydrolysis conditions	Cellulose fraction	Hemicellulose fraction	
	Hydrolysis rate (%)	Sugar contents (mg/mL)	
pH	3	8.41±0.34 ^e	3.48±0.06 ^e
	4	14.94±0.45 ^c	4.73±0.10 ^b
	5	17.80±0.07 ^a	6.27±0.05 ^a
	6	16.46±0.36 ^b	2.71±0.19 ^d
	7	10.29±0.36 ^d	1.82±0.03 ^e
Temperature (°C)	30	20.79±0.13 ^b	7.65±0.01 ^b
	40	23.01±0.08 ^a	8.43±0.08 ^a
	50	16.47±0.09 ^c	7.27±0.05 ^c
	60	5.91±0.06 ^d	7.20±0.17 ^d
Substrate concentration (%)	1	10.01±0.20 ^c	
	2	15.67±0.08 ^d	
	3	20.11±0.23 ^c	
	4	22.14±0.05 ^a	
	5	21.51±0.17 ^b	
Enzyme concentration (unit)	15		5.30±0.13 ^d
	20		6.05±0.04 ^e
	25		6.31±0.10 ^b
	30		6.92±0.02 ^a
	35		6.45±0.08 ^b

Mean±SD (n=3).

Values with different superscript letters in the column are significantly different at $p < 0.05$.

는 50°C에서 가장 높은 활성을 나타냈다고 보고한 Woo 등(31)의 연구 결과와 다르게 나타났는데, 이는 기질의 종류에 따라 효소의 최적 분해조건이 달라지기 때문인 것으로 판단된다. 따라서 셀룰로스 분해를 분해하기 위한 효소의 최적 온도는 40°C로 선정하였다.

pH 5.0, 40°C에서 기질농도에 따른 기질의 분해율을 측정된 결과, 4%의 기질농도까지 기질농도가 높아질수록 분해율이 증가하였으며, 기질농도 4%에서 22.14%로 유의적으로 가장 높게 나타났다. 반면, 기질농도 5%에서는 21.51%로 감소하였는데, 이는 효소가 반응할 수 있는 기질의 양이 부족했기 때문이라 판단된다. Gomez-Tovar 등(32)은 메탄 생산을 위해 귀리짚을 화학적 그리고 효소적으로 전처리한 결과, Celluclast 1.5L의 최적 기질 농도는 4%으로 보고하여, 본 연구 결과와 유사하였다. 따라서 셀룰로스 분해를 분해하기 위한 최적 기질농도는 4%로 결정하였다.

헤미셀룰로스 분해물로부터 기능성 올리고당을 생산하기 위한 최적 조건을 설정하기 위하여 pH, 온도와 효소농도에 따른 분해물의 환원당 함량을 측정된 결과(Table 2), 반응물의 환원당량은 pH 5.0에서 6.27 mg/mL로 유의적으로 가장 높은 함량을 나타냈고, pH 7.0에서 1.82 mg/mL로 가장 낮은 함량을 나타내었다. Liu 등(2008)의 연구에서 Viscozyme L에 의한 pH에 따른 추출수율을 측정된 결과, 효소 처리로 인한 추출 수율이 pH 4.6에서 가장 높아 본 연구 결과와 유사하였다. 따라서 헤미셀룰로스 분해물로부터의 올리고당 생산을 위한 Viscozyme L의 최적 pH는 5.0으로 결정하였다.

최적 pH 5.0에서 온도에 따른 분해물의 환원당 함량을 측정된 결과, 40°C에서 8.43 mg/mL로 가장 높은 값을 나타냈고, 60°C에서 7.20 mg/mL로 가장 낮은 값을 나타내었다. Ismail 등(33)은 감

Table 3. Yields of oligosaccharides produced from cellulose and hemicellulose fractions by enzymatic hydrolysis

Hydrolysis time (h)	(g/kg dry matter)		
	OSC	OSH	Total yield
0	68.04±1.80 ^d	196.74±6.38 ^d	264.78±0.74 ^d
24	103.92±3.93 ^c	222.67±3.36 ^c	326.59±0.73 ^c
48	114.92±3.51 ^b	240.00±10.02 ^b	354.92±1.35 ^b
72	126.33±1.04 ^a	269.33±12.28 ^a	395.66±1.27 ^a

Mean±SD (n=3)

Values with different superscript letters in the column are significantly different at $p < 0.05$.

OSC, oligosaccharides produced from cellulose fraction by enzymatic hydrolysis; OSH, oligosaccharides produced from hemicellulose fraction by enzymatic hydrolysis.

귤류 과일 껍질을 Viscozyme L로 효소분해한 결과, 49°C보다 43°C에서 높은 분해율을 나타냈다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 따라서 헤미셀룰로스 분해물로부터의 올리고당 생산을 위한 Viscozyme L의 최적 온도는 40°C로 선정하였다.

pH 5.0, 40°C에서 효소 농도를 다르게 하여 가수분해하였으며, 생성된 분해물의 환원당량을 측정하였다. 효소농도가 증가할수록 환원당 함량도 증가하였고, 30 unit에서 6.92 mg/mL로 가장 높은 함량을 나타냈으나 35 unit에서는 오히려 감소하였다. 이는 셀룰로스 분해의 분해실험과 동일하게 효소와 반응할 수 있는 기질의 양이 부족한 것으로 판단된다. Guand와 Yao(34)의 Viscozyme L을 이용한 귀리껍질 단백질의 최적 추출 조건 연구에 따르면 최적 효소농도가 30 unit임을 확인하였고, 효소분해 시 단백질 추출이 약 4배정도 증가한 것으로 보고하였다. 따라서 Viscozyme L의 최적 분해조건 중 효소농도는 30 unit으로 결정하였다.

수율

최적 분해 조건 하에서 셀룰로스와 헤미셀룰로스 분해를 72시간 동안 효소분해한 후 얻은 올리고당의 생산량을 측정된 결과는 Table 3과 같다. 셀룰로스 분해물의 효소처리 전 올리고당의 함량은 68.04 g/kg이었으며, 효소분해 24시간 후 올리고당의 생산량은 103.92 g/kg로 급격히 증가하였고, 분해시간이 증가함에 따라 생산량도 증가하여 72시간 후 생산량이 126.33 g/kg로 측정되었다. 이는 효소의 작용에 의해 셀룰로스가 분해되어 포도당 및 셀룰로올리고당(cello-oligosaccharides)의 생성이 증가한 것으로 판단된다.

Viscozyme L로 효소분해한 헤미셀룰로스 분해물로부터 생산된 올리고당의 생산량을 측정된 결과, 효소처리 전 올리고당의 생산량은 196.74 g/kg로 측정되어 셀룰로스 분해보다 헤미셀룰로스 분해의 올리고당 함량이 더 많은 것으로 나타났다. 효소분해시간이 지날수록 올리고당의 생산량은 증가하였고, 72시간에서 올리고당의 생산량은 269.33 g/kg로 나타났다. 이는 Viscozyme L의 작용으로 인해 자일로스, 포도당, 과당 등 단당류와 자일로올리고당 등의 올리고당이 생성되었기 때문으로 판단된다.

메밀껍질의 셀룰로스 분해와 헤미셀룰로스 분해물로부터 생산된 총 올리고당의 수율을 측정된 결과, 효소분해 전 총 올리고당의 함량은 264.78 g/kg으로 나타났다. 또한 분해 시간이 증가함에 따라 올리고당의 수율도 유의적으로 증가하여, 72시간 효소분해 후 395.66 g/kg의 수율을 보였다.

구성당 함량

Table 4. Sugar contents of oligosaccharides produced from cellulose fraction by enzymatic hydrolysis

Hydrolysis time (h)	Sugars contents (mg/100 mg)			
	Xylose	Glucose	Cellobiose	Celotriose
0	0.18±0.01 ^d	2.34±0.07 ^d	0.53±0.05 ^c	0.47±0.01 ^a
24	1.24±0.02 ^c	3.08±0.04 ^c	0.85±0.01 ^a	0.48±0.00 ^a
48	1.40±0.01 ^b	3.45±0.03 ^b	0.65±0.00 ^b	0.47±0.01 ^a
72	1.54±0.02 ^a	3.71±0.02 ^a	0.62±0.00 ^c	0.47±0.00 ^a

Mean±SD (n=3)
Values with different superscript letters in the column are significantly different at p<0.05.

Table 5. Sugar contents of oligosaccharides produced from hemicellulose fraction by enzymatic hydrolysis

Hydrolysis time (h)	Sugars contents (mg/100 mg)			
	Xylose	Fructose	Xylobiose	Xylotriose
0	0.02±0.02 ^b	12.63±0.31 ^b	0.82±0.02 ^b	0.11±0.01 ^{ab}
24	0.05±0.01 ^b	12.73±0.06 ^b	1.02±0.13 ^b	0.12±0.02 ^b
48	0.12±0.01 ^a	12.77±0.47 ^b	1.43±0.15 ^a	0.13±0.01 ^a
72	0.13±0.01 ^a	14.40±0.67 ^a	0.84±0.03 ^b	0.09±0.01 ^b

Mean±SD (n=3)
Values with different superscript letters in the column are significantly different at p<0.05.

셀룰로스 분획으로부터 얻은 올리고당의 주요 구성당을 분석한 결과(Table 4), 포도당 함량은 분해시간이 길어질수록 증가하여 72시간 후 3.71 mg/100 mg으로 측정되었다. 반면, cellobiose의 함량은 24시간 후 분획에서 0.85 mg/100 mg로 가장 높게 나타났으며 48시간 후에는 감소하였고, celotriose는 모든 시간대에서 비슷하게 나타나 유의적인 차이가 없었다. Yoon 등(35)의 당근박의 올리고당의 구성당 함량을 측정된 결과, 효소분해시간이 증가할수록 포도당의 함량은 증가하였고, cellobiose 함량은 효소분해에 따라 증가하다가 감소하여 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

헤미셀룰로스 분획으로부터 얻은 올리고당의 주요 구성당을 분석한 결과는 Table 5와 같다. OSH는 모든 시간대에서 자일로스, 과당, xylobiose, xylotriose가 검출되었다. 구성당 중 과당의 함량이 제일 높았고, 효소 처리 전부터 48시간 후까지는 유의적인 차이가 없었으나 72시간 후에 14.40 mg/100 mg으로 유의적으로 가장 높게 나타났다. 자일로스의 함량은 효소 처리전 0.02 mg/100 g이었으며, 72시간에서 0.13 mg/100 mg으로 증가하였으나 그 함량은 매우 낮았다. 효소분해시간이 증가할수록 xylobiose와 xylotriose의 함량이 증가하여 48시간에서 각각 1.43 mg/100 mg 및 0.13 mg/100 mg으로 가장 높게 나타났으며, 72시간에서는 오히려 감소하였다. 과일에 함유된 줄기와 부산물로부터 효소 처리에 의한 자일로올리고당 생산 연구(22)에서 효소분해 시간이 증가할수록 올리고당의 함량은 증가하나 일정시간이 지나면 고분자의 올리고당의 함량이 감소하는 것으로 나타나 본 연구와 유사하였다. 이와 같은 결과로 OSH는 효소분해 시간이 증가할수록 자일로스와 과당과 같은 단당류의 함량은 높아지나, xylobiose와 xylotriose와 같은 올리고당은 일정 분해시간이 지나면 오히려 감소하는 것으로 나타나 사용목적에 따라 효소 분해시간을 조절할 필요가 있을 것으로 판단된다.

산화방지 활성

메밀껍질로부터 생산된 기능성 올리고당(OSC, OSH)의 산화방

Table 6. Antioxidant activities of oligosaccharides produced from buckwheat hull by enzymatic hydrolysis

Sample	Hydrolysis time (h)	IC ₅₀		
		Electron donating ability (µg/mL)	ABTS [•] radical scavenging ability (mg/mL)	Fe ²⁺ chelating ability (mg/mL)
OSC	0	1020.38±8.80 ^b	19.26±0.09 ^a	7.78±0.05 ^a
	24	961.31±1.30 ^a	24.16±0.06 ^c	9.73±0.12 ^b
	48	1198.13±6.37 ^c	23.59±0.07 ^{bc}	10.06±0.07 ^c
	72	1321.47±3.83 ^d	23.45±0.61 ^b	16.27±0.15 ^d
OSH	0	179.69±10.13 ^a	9.77±0.06 ^c	7.70±0.02 ^d
	24	277.08±4.63 ^c	9.49±0.09 ^b	7.08±0.07 ^c
	48	259.98±4.22 ^b	9.46±0.04 ^b	6.84±0.02 ^b
	72	489.721±1.70 ^d	9.08±0.10 ^a	1.98±0.01 ^a

Mean±SD (n=3)
Values with different superscript letters in the column are significantly different at p<0.05.

OSC, oligosaccharides produced from cellulose fraction by enzymatic hydrolysis; OSH, oligosaccharides produced from hemicellulose fraction by enzymatic hydrolysis

지 활성을 확인하기 위해 전자공여능, ABTS[•] 라디칼 소거능, Fe²⁺ 킬레이팅 효과를 측정하였고, 이들의 IC₅₀을 구하여 Table 6에 나타내었다. OSC와 OSH의 전자공여능은 각각 24시간(961.31 µg/mL) 및 0시간(179.69 µg/mL)에서 유의적으로 가장 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었으며, 72시간 분해 후 전자공여능은 크게 감소하였다. 유리라디칼은 인체 내 각종 질병과 세포의 노화를 일으키는 원인 물질이며, 유리라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 전자공여 작용은 식물 추출물 등에서 산화방지제로 작용하는 물질을 확인할 수 있는 척도로 사용된다(36). 따라서 0-24시간 효소분해 시 전자공여능이 가장 높게 나타났으며, 24시간 이상의 효소분해는 오히려 산화방지 물질을 분해하는 것으로 예상된다.

ABTS[•] 라디칼 소거능 측정 결과, OSC와 OSH에서 각각 0시간(19.26 mg/mL)와 72시간(9.08 mg/mL)에서 유의적으로 가장 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었다. 또한 OSH의 경우 24-48시간 분해 후 라디칼 소거능이 다소 감소하였으나 72시간 분해 후에는 다시 증가하였다. OSH의 경우 분해시간이 증가할수록 낮은 IC₅₀ 값을 나타내어 효소분해를 통해 ABTS[•] 라디칼 소거 물질이 증가함을 알 수 있었다. Zha 등(37)은 다당류의 분자량은 인체 내 생리활성에 중요한 요인이며, 고분자 다당류에 비해 저분자 다당류의 산화방지 활성이 높은 것으로 보고하였다. 이것은 본 연구의 OSC의 결과와는 상반되나 OSH의 결과와는 같았다. 따라서 추후 올리고당의 종류 및 분자량에 따른 라디칼 소거능의 변화에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Fe²⁺ 킬레이팅 효과에서는 OSC의 경우 0시간에서 가장 낮은 IC₅₀ 값(7.78 mg/mL)을 보였으며, 분해시간이 길어질수록 증가하였다. 반면 OSH의 경우 분해시간이 길어질수록 낮은 IC₅₀ 값을 보여 분해 72시간 후 1.98 mg/mL로 유의적으로 가장 낮은 IC₅₀ 값을 나타내었다. Fe²⁺ 세포내 산화물 형성에 관여하는 결정적 물질로 지방질 과산화를 촉진시키며, 이를 적절하게 제거함으로써 지질 과산화를 억제할 수 있다(38).

장내 유익균 생육에 미치는 영향

메밀껍질로부터 생산된 기능성 올리고당(OSC와 OSH)의 프리바이오틱(prebiotic) 효과를 확인하기 위해 젯산세균(*L. plantarum*,

Table 7. Effect of oligosaccharides from buckwheat hull on the growth of lactic acid bacteria

Microorganism	CFU/mL			
	Control ¹⁾	OSC	Control ²⁾	OSH
<i>L. plantarum</i>	(5.27±0.21)×10 ⁷ cd	(9.20±0.62)×10 ⁸ bc*	(7.20±0.20)×10 ⁸ d	(8.00±0.20)×10 ⁸ c+
<i>L. casei</i>	(8.57±0.40)×10 ⁸ c	(1.13±0.06)×10 ⁹ bc*	(8.83±0.47)×10 ⁸ c	(9.27±0.25)×10 ⁸ b
<i>L. delbrueckii</i>	(1.11±0.06)×10 ⁹ b	(2.70±0.98)×10 ⁹ a*	(2.17±0.15)×10 ⁹ a	(3.12±0.61)×10 ⁹ a+
<i>L. acidophilus</i>	(1.68±0.04)×10 ⁹ a	(3.15±0.52)×10 ⁹ a*	(1.73±0.06)×10 ⁹ b	(2.46±0.71)×10 ⁹ a

Mean±SD (n=3)

OSC, oligosaccharides produced from cellulose fraction by enzymatic hydrolysis; OSH, oligosaccharides produced from hemicellulose fraction by enzymatic hydrolysis.

*Significant differences control and OSC to the *t*-test ($p<0.05$).

†Significant differences fructose and OSH to the *t*-test ($p<0.05$).

Values with different superscript letters in the column are significantly different at $p<0.05$.

¹⁾DMSO was used as control of OSC.

²⁾Fructose was used as control of OSH.

L. casei, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*)의 증식에 미치는 영향을 측정하였고, 그 결과를 Table 7에 나타내었다. OSC는 올리고당을 첨가하지 않은 대조군에 비해 모든 균주들이 유의적으로 증가하였고 좋은 생육 정도를 나타내었다. 4가지 균주 중, *L. acidophilus*의 생육이 3.15×10⁹ CFU/mL로 가장 좋았으며, *L. plantarum*은 9.20×10⁸ CFU/mL로 control에 비해 10배 이상의 생육증진을 나타냈다. OSH에서는 *L. delbrueckii*에서 3.12×10⁹ CFU/mL로 가장 높은 생육증진을 보였으며, 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 다음 *L. plantarum*에서 2.46×10⁹ CFU/mL의 생육을 보였으나 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 *L. plantarum*과 *L. casei*에서는 각각 8.00×10⁸ CFU/mL과 9.27×10⁸ CFU/mL의 생육을 보였으며, *L. plantarum*은 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 프리바이오틱스란 유해균의 성장을 억제하는 비피더스균의 활성 효과(bifidogenic effect)를 지닌 비분해성 올리고당으로, 사람과 동물의 소장에서 분해되지 않고 사람의 결장과 브로일러의 맹장에 도달할 수 있으며, 비피도박테리아와 일부 젖산세균과 같은 유익한 미생물의 성장을 위한 탄수화물 기질을 제공할 수 있다(39). 따라서 본 연구에서 효소분해에 의해 생성된 자일로스, 포도당, 과당의 단당류와 셀룰로올리고당, 자일로올리고당의 다당류가 프리바이오틱스로 작용하여 젖산세균의 성장에 영향을 미쳤으며, 균주에 따라 생육증식에 영향을 미치는 올리고당의 종류가 다른 것으로 판단된다.

요 약

메밀껍질은 메밀 알곡보다 유효성분이 많음에도 불구하고 식품학적 가치가 떨어져 대부분 폐기되고 있다. 따라서 이를 기능성 식품소재로 활용하기 위해 효소분해하여 기능성 올리고당을 생산하고 이들의 특성을 분석하였다. 올리고당 생산을 위한 최적 가수분해조건은 셀룰로스 분획의 경우 pH 5.0, 40°C, 기질농도 4%로 결정되었으며, 헤미셀룰로스 분획은 pH 5.0, 40°C, 30 unit으로 결정되었다. 최적 분해조건을 이용하여 72시간 효소분해 후 얻은 올리고당의 생산량을 측정하고, 셀룰로스 및 헤미셀룰로스 분획으로부터 얻은 올리고당의 수율은 각각 132.37 g/kg 및 393.04 g/kg이었다. 또한 각 분획의 올리고당 함량을 측정하고, 포도당, 자일로스, xylobiose, xylotriose, cellobiose 및 cellotriose가 검출되었다. 올리고당(OSC, OSH)의 산화방지 활성을 측정하고, OSC는 분해시간이 증가할수록 산화방지 활성은 감소한 반면 OSH는 증가하였다. 또한 메밀껍질로부터 생산된 올리고당 첨가 시, 모든 비피더스 균주의 생육이 control에 비해 증가하여 프리

바이오틱 효과가 있음을 알 수 있었다. 이상의 연구결과, 효소분해에 의해 메밀껍질로부터 올리고당을 생산할 수 있었으며, 산화방지와 프리바이오틱 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 목적에 따라 효소의 처리시간 및 방법을 다양화한다면 기능성식품으로의 활용이 더 높아질 것으로 예상된다.

References

- Park YM, Kim JK. Characterization of the degradation of pear fruit cell wall by pectolytic enzymes and their use in fruit tissue liquefaction. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 38: 255-262 (1997)
- Im HJ, Park BY, Yoon KY. Production of soluble dietary fiber of buckwheat hulls by enzymatic depolymerization and its characteristics. *Korean J. Food Sci. Technol.* 48: 97-103 (2016)
- Chantaro P, Devahastin S, Chiewchan N. Production of antioxidant high dietary fiber powder from carrot peels. *LWT-Food Sci. Technol.* 41: 1987-1994 (2008)
- Wachirasiri P, Julakarangka S, Wanlapa S. The effects of banana peel preparations on the properties of banana peel dietary fibre concentrate. *Songklanakarini J. Sci. Technol.* 31: 605-611 (2009)
- Nawirska A, Kwasniewska M. Dietary fibre fractions from fruit and vegetable processing waste. *Food Chem.* 91: 221-225 (2005)
- Baek JH, Lee SY. Physicochemical properties of fibrous material fraction from by-product of aloe vera gel processing. *Food Eng. Prog.* 14: 118-126 (2010)
- Kang HK, Seo OS, Choi HC, Chae HS, Na JC, Yu DJ, Kang GH, Bang HT, Park SB, Kim MJ, Lee JE, Kim DW, Kim SH. Effects of feed supplementations for fermented apple pomace and cinnamon on egg quality and performance in laying hens. *Korean J. Poult. Sci.* 37: 63-68 (2010)
- Statistics Korea. 2012 Crop Production Statistics. Kangmoon, Daejeon, Korea. pp 62-63 (2013)
- Wang L, Yang X, Qin P, Shan F, Ren G. Flavonoid composition, antibacterial and antioxidant properties of tartary buckwheat bran extract. *Ind. Crop. Prod.* 49: 312-317 (2013)
- Krkošková B, Mrazova Z. Prophylactic components of buckwheat. *Food Res. Int.* 38: 561-568 (2005)
- Lee SY, Shim HH, Ham SS, Rhee HI, Choi YS, Oh SY. The nutritional components of buckwheat flours and physicochemical properties of freeze-dried buckwheat noodles. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20: 354-362 (1991)
- Lee CY, Lee SJ, Oh SS. Recent trends in buckwheat allergen research: A mini review. *Food Eng. Prog.* 16: 314-324 (2012)
- Watanabe M. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. *J. Agr. Food Chem.* 46: 839-845 (1998)
- Watanabe M, Ohshita Y, Tsuchida T. Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls. *J. Agr. Food Chem.* 45: 1039-1044 (1997)

15. Mukoda T, Sun B, Ishiguro A. Antioxidant activities of buckwheat hull extract toward various oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 209-213 (2001)
16. Oh MH, Jang HL, Lim YJ, Yoon KY. Antioxidant activities of *Cedrela sinensis* hydrolysates prepared using various enzymes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 47: 413-418 (2015)
17. Park SJ, Park JW, Lee HS, Kim BY, Baik MY. A study on the changes of insoluble protein and dietary fiber of the rice by-products prepared by mixed enzyme treatment. *Food Eng. Prog.* 16: 157-163 (2012)
18. Aden A, Foust T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol. *Cellulose* 16: 535-545 (2009)
19. Martinez M, Yanez R, Alonso JL, Parajo JC. Chemical production of pectic oligosaccharides from orange peel wastes. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49: 8470-8476 (2010)
20. Chen BY, Chen SW, Wang HT. Use of different alkaline pretreatments and enzyme models to improve low-cost cellulosic biomass conversion. *Biomass Bioenerg.* 39: 182-191 (2012)
21. Lequart C, Nuzillard JM, Kurek B, Debeire P. Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: Production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides. *Carbohydr. Res.* 319: 102-111 (1999)
22. Zhao LC, Wang Y, Lin JF, Guo LQ. Adsorption and kinetic behavior of recombinant multifunctional xylanase in hydrolysis of pineapple stem and bagasse and their hemicellulose for xylo-oligosaccharide production. *Bioresour. Technol.* 110: 343-348 (2012)
23. Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 32: 426-428 (1959)
24. Im HJ, Yoon KY. Production and characterisation of alcohol-insoluble dietary fibre as a potential source for functional carbohydrates produced by enzymatic depolymerisation of buckwheat hulls. *Czech J. Food Sci.* 33: 449-457 (2015)
25. Park SY, Yoon KY. Enzymatic production of soluble dietary fiber from the cellulose fraction of Chinese cabbage waste and potential use as a functional food source. *Food Sci. Biotechnol.* 24: 529-535 (2015)
26. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1200 (1958)
27. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1231-1237 (1999)
28. Dinis TC, Madeira VM, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 161-169 (1994)
29. Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobial in liquid media, antibiotics in laboratory medicine. pp 61-143. In: *Antibiotics in laboratory medicine*. Lorian V. (Ed). Williams and Wilkins. Philadelphia, PA, USA (2005)
30. Gibbins RD, Aksoy HA, Ustun G. Enzymeassisted aqueous extraction of safflower oil: Optimisation by response surface methodology. *Int. J. Food Sci. Technol.* 47: 1055-1062 (2012)
31. Woo CH, Park CH, Yoon HH. Production of acetic acid from cellulosic biomass. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 15: 458-463 (2000)
32. Gomez-Tovar F, Celis LB, Razo-Flores E, Alariste-Mondragón F. Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production. *Bioresour. Technol.* 116: 372-378 (2012)
33. Ismail MA, Chen H, Baldwin EA, Plotto A. Optimizing the use of hydrolytic enzymes to facilitate peeling of citrus fruit. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 118: 400-402 (2005)
34. Guan X, Yao H. Optimization of viscozyme L-assisted extraction of oat bran protein using response surface methodology. *Food Chem.* 106: 345-351 (2008)
35. Yoon KY, Cha MH, Shin SR, Kim KS. Enzymatic production of a soluble-fibre hydrolyzate from carrot pomace and its sugar composition. *Food Chem.* 92: 151-157 (2005)
36. Kim JE, Joo SI, Seo JH, Lee SP. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvents and enzymes. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 989-995 (2009)
37. Zha XQ, Wang JH, Yang XF, Liang H, Zhao LL, Bao SH, Luo JP, Xu YY, Zhou BB. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran. *Carbohydr. Polym.* 78: 570-575 (2009)
38. Huang X, Dai J, Fournier J, Ali AM, Zhang Q, Frenkel K. Ferric ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Rad. Biol. Med.* 32: 84-92 (2002)
39. Flickinger EA, Fahey Jr GC. Pet food and feed applications of inulin, oligofructose and other oligosaccharides. *Brit. J. Nutr.* 87: S297-S300 (2002)