최 종
연구보고서

농산 및 임산 폐자원의 Xylan을 이용한 기능성 물질 생산

Production of Functional Material from the Xylan of Agricultural and Forest Wastes

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

협 동 연 구 기 관
대구효성가톨릭대학교

농 림 부

최 종
연구보고서

농산 및 임산 폐자원의 Xylan을 이용한 기능성 물질 생산

Production of Functional Material from the Xylan of Agricultural and Forest Wastes

주 관 연 구 기 관
경 북 대 학 교

협 동 연 구 기 관
대구효성가톨릭대학교

농 림 부

최 종 보 고 서

1999년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 **농산 및 임산 폐자원의 Xylan을 이용한 기능성 물질 생산**에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1999년 10월 31일

주 관 연 구 기 관 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 이인구 (인)

주관연구기관장 :

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 **"농산 및 임산 폐자원의 xylan을 이용한 기능성 물질 생산"** 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

1999년 10월 31일

주관연구기관명: 경 북 대 학 교
총괄연구책임자: 이 인 구
연 구 원: 박 희 동
연 구 원: 주 길 재
연 구 원: 허 상 선
연 구 원: 이 오 석
연 구 원: 신 재 호
연 구 원: 최 준 호
세부과제책임자: 이 종 윤
연 구 원: 임 부 국
협동연구기관명: 대구효성가톨릭대학교
협동연구책임자: 이 순 재
연 구 원: 김 성 옥
연 구 원: 최 정 화

요 약 문

Ⅰ. 제목 : 농산 및 임산 폐자원의 xylan을 이용한 기능성 물질 생산

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

헤미셀룰로스는 지구상에서 셀룰로스 다음으로 풍부한 탄수화물로 연간 약 450억톤이 생산되고 있는데 이 양은 사람 일인당 약 23 kg에 상당하는 양이 1일에 생산되는 셈이다. 헤미셀룰로스는 식물 세포벽의 격자구조물을 이루는 비셀룰로스계 다당류로써 목재의 20 25%를 차지하며 농산 폐자원인 보릿짚, 볏짚, 옥수수 속 등에도 약 20% 정도 함유되어 있다. 헤미셀룰로스는 셀룰로스와 같이 단일 중합체(homopolymer)로 구성되어 있는 것이 아니고 각종 단당류가 복합적으로 구성되어 있다.

헤미셀룰로스의 주성분을 이루는 xylan 및 xylan 유도체의 함량은 침엽수材에는 20 45%, 활엽수材에는 80 90%, 밀, 보리, 벼 등의 짚에는 68 78% 정도로 식물체의 종류에 따라 다양하다. Xylan은 xylopyranose가 β-(1,4)결합으로 중합된 주쇄를 공통적으로 가지고 있지만 식물의 種에 따라 다양한 구조를 가지고 있다.

최근 xylan의 부분 가수분해물인 xylooligo 糖은 난소화성 oligo 糖으로 유익한 장내세균으로 알려진 *Bifidus* 균의 선택적 증식촉진, 부패균의 증식억제 등의 기능이 있다. 또 xylooligo 糖은 다른 oligo 糖보다 열이나 산에 대해 더욱 안정하고 加水活性低下 효과를 가지고 있어서 식품의 부패방지 및 보존효과를 가지고 있으므로 여러가지 식품의 가공에 널리 이용될 수 있다. 국내에서 생산, 시판되고 있는 말토 올리고糖과 이소말토 올리고糖은 소화성이므로 소장내에서 분해되어 *Bifidus* 균 증식 촉진인자로서의 효과가 감소된다. 지금까지

알려진 기능성 올리고糖 중에서 모든 면에서 xylooligo 糖이 가장 우수하다는 것이 알려져 있으며, 日本에서의 판매가격 또한 타 올리고糖의 2배 내지 5배 비싸다. 현재까지 국내에서 xylooligo 糖은 전혀 생산되지 못하고 있으며 이에 관한 연구조차 이루어지지 않고 있다. 그러므로 산업적으로나 경제적으로나 xylooligo 糖의 생산 및 그 기술개발이 시급히 요구된다.

활엽수材의 xylan에 많이 함유되어 있는 4-O-methyl glucuronic acid는 酸 가수분해하여 xylose를 생산하는 과정에서 쉽게 유론산 유도체의 형태로 분리될 수 있다. 일찍부터 유론산 유도체는 해독작용, 스테로이드 분비에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Xylan으로부터 酸 가수분해에 의해 xylose를 생산하는 과정에서 얻어지는 유론산 유도체도 동일한 기능성을 나타낼 수 있는지 조사하는 한편 xylooligo 糖의 새로운 기능성을 검색함으로써 xylan 가수분해물의 이용성을 증대시키고 농산 및 임산 폐자원의 부가가치 증대에 기여할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 농산 및 임산 폐자원으로부터 이들의 부가가치를 향상시켜 농가소득을 증대시키고 국민보건에 기여할 목적으로 xylan의 단리기술과 xylooligo 糖 및 유론산 유도체 등의 생산기술을 확립함과 아울러 이들의 새로운 기능성을 검색하여 그 효율을 증대하고자 본 연구를 수행하였다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

본 과제는 Xylan의 효소분해에 의한 기능성 xylooligo 당 생산과 xylan의 단리 및 화학분해에 의한 신기능성 물질 생산의 2개의 세부과제와 xylan 가수분해물의 신기능성 검정의 1개의 협동과제로 구성되어 있으며, 수행한 주요 연구내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

제 1 세부과제 : Xylan의 효소 분해에 의한 기능성 xylooligo 당 생산

연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1 년차 : Xylooligo 당의 생성능이 우수한 xylanase 생산 미생물의 개발	1. Xylanase 생산 미생물의 분리 및 미생물학적 특성 조사 2. 각종의 xylanase에 의한 xylooligo 당의 생성여부 조사 3. Xylooligo 당의 생성능이 우수한 xylanase 생산 균주의 선발 및 발현 특성조사
2 년차 : 분리된 xylanase의 효소학적 특성 조사 및 xylooligo당의 생산	1. Xylooligo 당의 생성능이 우수한 xylanase의 정제 및 효소학적 특성조사 2. Xylanase 처리에 의한 xylooligo 당의 조제 및 조성분석 3. Xylooligo 당의 생산조건 확립 4. Xylanase 유전자의 분리 및 클로닝 준비
3 년차 : Xylanase유전자의 클로닝 및 증폭생산	1. Xylanase 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석 2. 재조합 DNA 기술에 의한 xylanase의 증폭생산 3. 배양조건을 달리한 xylanase의 생산조건 검토 4. 발효조에서 xylanase의 대량생산 조건 검토 5. 증폭생산된 효소에 의한 xylooligo 당의 생산조건 확립

제 2 세부과제 : Xylan의 단리 및 화학분해에 의한 신기능성 물질 생산

연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1 년차 : Xylan 추출을 위한 농산 및 임산 폐자원의 전처리 기술 확립	1. 농산 및 임산 폐자원의 수집 2. 농산 폐자원(보릿짚)의 전처리 조건 확립 3. 활엽수 폐잔재의 chipping 처리 4. 폭쇄전처리 최적조건의 확립
2 년차 : Xylan의 단리 정제 기술 확립 및 각종 기능성 물질 제조 적성 검사	1. Xylan의 단리 및 최적 단리조건 확립 2. 단리 xylan의 구성성분 분석 3. Xylan의 정제 4. 정제된 xylan의 구성당 분석
3 년차 : Xylan의 화학분해로 유론산 유도체 및 xylose의 분리	1. 화학처리에 의한 xylan의 가수분해 2. 가수분해물로부터 유론산 유도체의 분리 3. Xylan의 가수분해 조건확립 4. Xylan 단리 부산물중 cellulose의 분리

제 3 협동과제 : Xylan 가수분해물의 신기능성 검정

연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1 년차 : Xylooligo 당 소화성의 in vitro 조사 및 혈중 지질대사 개선효과 조사	1. 타액, 췌장 및 소장 점액 효소에 의한 xylooligo 당의 분해여부 조사 2. 혈중의 triglyceride (TG) 함량조사 3. 혈중 총콜레스테롤, LDL- 및 HDL-콜레스테롤 함량 조사
2 년차 : Xylooligo 당의 콜레스테롤 대사 개선작용의 in vivo 조사	1. 간의 HMG-Co A의 환원 효소 활성 조사 2. 간의 TG 및 콜레스테롤 함량 3. 조직중의 지질 과산화물 축적상태 관찰 4. 간조직의 병리·조직학적 검사 5. 당뇨병유발 흰쥐에서 혈당저하작용조사
3 년차 : Xylooligo 당 및 xylan 가수분해물의 기능성 검정	1. 장기능 측정(통변시간) 2. 대변중 담즙산 함량측정 3. 대변등의 cholesterol함량 측정 4. 조직중 독성 래디칼 생성 및 해독작용조사

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

제 1 절 연구개발 결과

농산 및 임산폐자원의 xylan으로부터 기능성물질을 생산하기 위하여 먼저 xylan의 최적 단리기술 및 xylan의 최적 정제방법을 확립하였다. 이 xylan으로부터 기능성 xylooligo 당 생산 및 유론산 유도체 생산 조건을 확립하였으며 xylan 단리과정에서 나오는 부산물을 이용하여 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체를 제조하여 그 효율을 증대시켰다. 또 우수한 xylanase 생산 균주선발, 생산조건확립, 이 효소를 생산하는 2종의 유전자의 클로닝 및 효소의 증폭생산기술을 확립하여 효소분해에 의한 xylooligo 당 생산기술을 확립하였다. 생산된 기능성 xylooligo 당 및 유론산 유도체를 사용하여 지질대사 개선효과, 항산화적 해독, 당뇨쥐의 혈당강화 및 운동후 피로회복 등의 새로운 기능성을 밝히어 농산 및 임산 폐자원의 이용효율의 제고를 기하였다. 이상의 결과를 과제별로 요약하면 다음과 같다.

가. 제 1 세부과제 : Xylan의 효소분해에 의한 기능성 xylooligo당 생산과 관련된 연구개발 결과

1) Xylan으로부터 xylooligo 당을 생산하기 위하여 내열성 xylanase를 강하게 생산하는 내열성 방성균인 *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* M-049를 선발하였다.
2) 이 균주의 xylanase 생산조건을 플라스크배양과 jar-fermentor 배양에 검토하여 최적조건을 확립하였으며 이때 효소생산량은 배양액 ㎖당 14.2 unit였다.
3) *S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 4종의 xylanase중 3종은 순수하게

정제하여 SDS-PAGE로 분자량을 측정하였고 1종은 조정제하였다.

4) 정제된 xylanase N1, B1, B2 및 B3의 최적 pH는 5.0 5.5 부근이고 pH 4.5 10.5 사이에서 안정하였다.

5) 정제효소인 xylanase N1, B2 및 B3의 최적온도는 65℃이며, B1은 70℃이며, N1은 65℃, B1, B2 및 B3는 55℃에서 1 시간 처리에도 안정하였다.

6) 정제 xylanase N1, B1, B2 및 B3의 Km값은 각각 10.92, 2.15, 11.80 및 2.62 ㎎/㎖이었으며, Vmax는 3.02, 0.71, 4.52 및 1.10 μmol/min이었다.

7) 정제 xylanase N1, B2 및 B3는 불용성 xylan에 잘 결합하였으나 B1은 낮은 결합력을 보였다. xylanase N1은 Avicel에도 잘 결합하였으나 B1, B2 및 B3는 잘 결합하지 않았다.

8) Xylooligo 당(X_2 X_5)의 분해력을 조사한 결과 정제 xylanase N1, B1, B2 및 B3은 X_2를 분해하지 못하고, N1은 X_3를 전혀 분해하지 못하였으나 B1, B2 및 B3는 약하게 분해하였다. 또 N1은 X_4도 분해하지 못하며 B1, B2 및 B3는 X_4를 X_2로 잘 분해하였다. N1은 X_5를 약하게 분해하였고 B1, B2 및 B3는 X_5를 분해하여 주로 X_2를 생산하고 소량의 X_1과 X_3를 생성하였다.

9) 정제 xylanase N1과 B3의 아미노 말단의 아미노산 서열을 분석한 결과 각각 DTITSNQTGTHNGYF와 AESTLGAAAA이었다.

10) 정제 효소중 xylanase N1(XynB)와 B3(XynA)를 각각 생산하는 유전자 *xyn*B 및 *xyn*A를 클로닝하여 염기서열을 분석하였다.

11) 클로닝한 *xyn*A 및 *xyn*B 유전자를 고발현 벡터에 서브클로닝하여 대장균에 2종의 xylanase의 증폭생산에 성공하였다.

12) 재조합 대장균이 생산한 XynA 및 XynB 효소는 *S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanase B3 및 N1과 효소학적 성질이 각각 동일하였다.

13) *xyn*A 유전자를 가진 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144 및 *xyn*B 유전자를 가진 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10에서 각각의 xylanase인

XynA(xylanase B3)와 XynB(xylanase N1)의 생산조건을 확립하여 XynA는 배양액 ㎖당 128 unit, XynB는 ㎖당 142 unit의 효소를 생산하였다. 이것은 *S. thermocyaneoviolaceus* 보다 9 10배의 높은 효소생산성을 나타내는 것이다.

14) *S. thermocyaneoviolaceus*의 복합 xylanase, 재조합 대장균이 생산한 XynA 및 XynB의 xylanase를 사용하여 10% xylan으로 xylooligo 당생산을 위한 최적조건을 검토한 결과 복합 xylanase로 58.8 g/ℓ, XynA와 XynB로 65.0 g/ℓ의 xylooligo 당을 생산할 수 있었다.

나. 제 2 세부과제 : Xylan의 단리 및 화학분해에 의한 신기능성 물질생산과 관련된 연구개발 결과

1) 40 80 mesh로 분쇄시킨 농산 및 임산 폐자원의 화학적 조성을 분석한 결과, 볏짚과 보릿짚의 냉수 및 열수 추출물함량과 무기물함량이 신갈나무에 비해 월등히 높은 것을 알 수가 있었다.
2) 농산 및 임산 폐자원은 20 ㎏f/㎠의 압력에서 3-6분의 조건으로 폭쇄 처리를 행하였다. 폭쇄 처리된 시료의 lignin 함량은 폭쇄 처리전 시료보다 약 10% 정도 높게 나타남을 알 수가 있었다. 粗xylan의 수율을 폭쇄 처리시 압력에 영향을 받으므로 높은 폭쇄 압력에서 더 높은 수율을 나타내었다.
3) 폭쇄 처리된 시료로부터 온수 및 0.5% 수산화칼륨 용액 추출로 粗xylan을 단리하였다. 粗xylan의 당형태 분석 결과, 온수 추출에 의해 단리된 粗xylan이 알카리 추출에 의해 단리된 粗xylan보다 oligomer 형태로 더욱 많이 용출된다는 것을 알 수 있었다. 농산 및 임산폐자원으로부터 xylan을 단리하기 위해서 20 ㎏f/㎠, 3 분동안 폭쇄 처리하여 온수추출을 행하는 것이 최적의 단리조건이었다.
4) 粗xylan을 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법으로 정제하였다. 정제된

xylan의 xylose 함량은 약 85% 이상을 나타내었고, 정제과정을 통해서도 다른 당 잔기들을 완전히 제거하지 못하였다.

5) 정제된 xylan을 1.0N 황산으로 90분 동안 가수분해시켜 유론산 유도체를 단리하였다. 단리된 유론산 유도체는 HPLC 분석 결과, 볏짚과 보릿짚에서는 glucuronic acid만이 xylose 잔기에 대해 약 15 20 : 1의 몰비로 존재함을 알 수 있었고. 신갈나무에서는 glucuronic acid가 xylose 잔기에 대해 약 15 : 1의 몰비로 존재하고, glucuronic acid와 galacturonic acid는 약 7 8 : 1로 존재함을 확인할 수 있었다.

6) 단리된 유론산 유도체의 13C-NMR 분석 결과, 볏짚과 보릿짚으로부터 단리된 유론산 유도체는 4-O-methyl-D-glucuronic acid만이 단당의 형태로 존재함을 확인할 수 있었다. 신갈나무로부터 단리된 유론산 유도체는 4-O-methyl-D-glucuronic acid, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, 2-O-(4-O-methyl-α-D-glucuronic acid)-D-xylose, 4-O-(β-D-galacturonic acid)-D-xylose, β-(1, 4) 결합된 (4-O-methyl-α-D-glucuronic acid)-D-xylobiose의 형태로 각각 존재하고 있음을 확인할 수 있었다.

7) Xylan 단리 부산물로부터 아염소산나트륨법과 산소-알카리 펄프화법으로 셀룰로오스를 제조하였다. 제조된 셀룰로오스를 이용하여 셀룰로오스 아세테이트, 카르복시메틸셀룰로오스라는 두 종류의 셀룰로오스 유도체를 제조하였다. 제조된 셀룰로오스 아세테이트는 치환도가 약 2.1 2.5 정도였고, FT-IR 분석결과 1,200 ㎝-1과 1,750 ㎝-1에서 carbonyl기의 ester 결합에 기인하는 피크가 현저하게 증가하는 것을 알 수가 있었다. 제조된 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)의 치환도는 0.7 0.9 정도였다.

다. 협동과제 : Xylan 가수분해물의 신기능성 검정과 관련된 연구개발 결과

1) Xylooligo 당의 난소화성 : Xylooligo 당은 여러 체내 소화액에 의해 전혀

분해되지 않았으며 또 담즙산 흡수를 지연시키므로 저칼로리 기능식품으로서 우수성이 규명되었다.

2) Xylooligo 당의 지질대사 개선효과 : ㉠ 고콜레스테롤 식이 흰쥐에서 xylooligo 당 첨가로 장 통과 시간이 단축되므로서 변비개선 효과가 인정되었다. ㉡ Xylooligo 당은 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 LDL-cholesterol 농도를 현저하게 감소시키는 반면 HDL-cholesterol 농도를 상승시키므로써 동맥경화지수(atherogenic index)를 낮추었다. ㉢ Xylooligo 당의 첨가로 대변중의 bilic acid, cholesterol 및 중성 sterol인 coprostanol과 coprostanone등의 배설량이 증가되어 xylooligo 당의 지질대사 개선효과가 규명되었다. ㉣ 간조직중의 콜레스테롤 합성 율속효소인 간조직중의 HMG-CoA reductase 활성을 관찰한 결과 고콜레스테롤 식이군에서는 현저하게 저하되었으나 xylooligo 당 투여군에서는 정상군 수준이었다. 또 xylooligo 당은 간조직중의 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시키고 인지질 함량은 증가시키는 효과가 다른 oligo당에 비해 현저함을 알 수 있었다. ㉤ 혈당은 콜레스테롤군에 비해 xylooligo 당 공급군에서 유의적으로 감소되었다.

3) Xylooligo 당의 항산화적 해독기능 : ㉠ 고콜레스테롤 식이로 인한 간조직의 손상과 xylooligo 당에 의한 조직손상 완화작용를 관찰한 결과 간조직중의 SOD, GSHpx 및 GST활성이 고콜레스테롤 식이군에서 26%, 41% 및 49%씩 각각 감소되었으나 xylooligo 당 공급으로 이러한 항산화 해독효소들의 활성이 증가되었으며 또 환원형 glutathione 함량을 증가시켰다. ㉡ 따라서 고콜레스테롤 식이군에서는 정상군에 비해 지질과산화물 값이 211%나 증가되었으나 xylooligo 당 투여로 현저하게 감소되었다. ㉢ 이러한 항산화적 해독기능은 xylooligo 당 농도가 식이 중 10%일때 가장 효과적이었다. ㉣ 간조직의 광학 현미경적 소견 또한 다른 oligo 당 공급군에 비해 10% xylooligo 당을 공급한 군에서 세포질내의 지방구의 크기와 숫자가 줄어졌다는 소견을 나타내었다. ㉤ 이러한 xylooligo

당의 생리적 기능은 시판된 Suntory사의 xylooligo 당간에 효과가 비슷함이 관찰되었다.

4) 당뇨병에서의 xylooligo 당의 혈당 강하 효과 : Xylooligo 당의 혈당저하 효과를 관찰하기위해 당뇨쥐에서의 경구 당부하 검사나 혈당저하 실험에서 xylooligo 당은 공복 혈당수준과 식후 느린 혈당상승 등 내당능의 개선 효과와 혈당 강하 효과도 관찰되었다.

5) 유론산 유도체의 운동후 피로회복효과 : 조제한 산성당분획의 유론산 유도체는 운동후 축적되는 혈중 젖산(lactic acid)농도를 감소시키고 간조직의 glycogen함량을 증가시키므로서 운동후 피로회복을 촉진시켜주었다. 또한 운동후 항산화계를 다소 강화시켜 주었다.

제 2 절 활용에 대한 건의

본 연구에서는 농산 및 임산 폐자원의 xylan을 이용하여 기능성 물질을 생산하기 위해서 원료가 되는 xylan의 단리방법을 확립하였고, 산가수분해에 의해 유론산 유도체를 단리하였으며 xylan 단리 부산물로부터 셀룰로오스를 제조하였다. 또 이 셀룰로스를 이용하여 셀룰로스 아세테이트 및 카르복시 셀룰로스를 제조하여 농림 폐자원의 이용성을 증대시켰다. Xylan으로부터 기능성 식품소재인 xylooligo 당을 대량 생산할 수 있는 내열성 xylanases를 분비하는 균주인 *Streptomyces thermocyaneoviolaceus*를 선발하여 그 유전자를 클로닝하여 발현을 증폭시킴으로써 효소를 값싸게 대량생산할 수 있도록 하였으며, 이들(방선균 및 재조합 대장균) 균주가 생산하는 효소를 이용하여 xylooligo당의 생산조건을 확립하였다. 본 연구에서 제조·생산한 기능성 물질인 xylooligo당과 유론산 유도체를 이용하여 xylooligo당의 장 기능 개선효과, 지질대사 개선효과, 항산화적 해독기능, 당뇨병에서의 혈당 강하 효과 및 유론산 유도체의 운동 후 피로회복 효과 등의 새로운 기능성을 확인하였다. 따라서 본 과제에서 획득한 xylan 단리

기술, xylooligo당 및 유론산 유도체 생산기술, 부산물 이용 기술 등을 보다 효율적으로 활용하여 효과를 극대화시키기 위한 방안 및 활용 가능성은 다음과 같다.

1. 연구결과보고서를 관련기관 또는 관련 제당업계 및 개인에게 배부하고 적극적으로 홍보한다.
2. 제당산업 및 식품산업과 관련된 기업과의 유상 및 무상으로 기술이전을 도모하여 그 연구결과를 최대한 활용한다.
3. 관련분야 국내외의 학술지에 연구결과를 발표하고 각종 학술회의에 발표하여 연구내용을 검증받고 홍보한다.
4. 본 연구에서 밝혀진 xylooligo당 및 유론산 유도체의 장 기능개선, 지질대사 개선효과, 항산화적 해독기능, 당뇨병에서의 혈당 강하 효과 및 유론산 유도체의 운동 후 피로회복 효과 등의 결과를 홍보하여 제약 및 식음료에 기능성 물질의 사용을 적극 권장한다.
5. 본 연구에서 획득한 신갈나무로부터의 xylan 단리기술은 시약급의 xylan 제조에 이용이 가능할 뿐만 아니라 이를 통하여 농가의 수입증대 효과를 가져올 수 있는 만큼 xylan의 위탁생산이나 관련기술의 전수 및 이전이 필요하다.
6. 본 과제에서 설정된 xylan 추출, xylooligo당 및 유론산 유도체 생산관련 기술을 plant 규모로 확대하기 위해서는 연속 반응공정 및 생산물의 분리공정 개발이 뒤따라야 할 것으로 생각되며 이를 위해서는 지속적인 연구와 투자가 추가되어야 할 것으로 생각된다.
7. Xylan 단리 부산물에서 얻어진 셀룰로스와 이 셀룰로스로부터 만든 유도체인 셀룰로스 아세테이트 및 카르복시메칠셀룰로스의 생산 가능성 검토는 xylan으로부터 신기능성 물질 생산 부산물을 효율적으로 이용할 수 있으므로 생산단가를 절감할 수 있을 것으로 본다.
8. 기능성 물질인 xylooligo당을 생산하여 식·음료에 감미제로 사용함으로써

충치의 발생을 억제하고 *Bifidobaterium* 증식효과를 유발하여 정장작용 및 부패 미생물의 생육억제를 통한 장 기능을 개선함으로써 국민 보건에 이바지 하도록 한다.

9. 본 연구에서 획득한 재조합 대장균은 방선균의 xylanase를 대부분 배지중으로 분비하고 있다. 이는 아주 희귀한 결과로서 분비 메카니즘 및 단백질의 3차 구조 등을 연구할 수 있는 좋은 연구재료가 될 수 있다.
10. 연구수행중 획득한 첨단기술은 국내 탄수화물 관련분야(제당분야) 정보의 database로 활용할 수 있으며, 본 연구에서 획득한 유전자는 생물자원으로서 중요한 가치를 지닌다.

제 3 절 본 과제와 관련된 발표실적

3. 현재까지 본 과제와 관련된 발표실적

가. 국내외 전문 학술지

1) 주길재, 이인구. 1996. 12. 30. 방선균 *Streptomyces* sp. J-59 xylanase의 정제 및 자일로올리고당의 생산. 경북대농학지. 14:111-122.
2) 주길재, 이인구, 김성옥, 이순재. 1998. 식이 Xylooligo당의 난소화성과 담즙산 흡수 지연효과. 한국식품영양과학회. 27(4):705-711.
3) 김성옥, 이순재, 이인구, 주길재, 하현팔. 1998. 고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐에서 Xylooligo당의 혈중 지질개선 효과. 한국식품영양과학회지. 27(5):945 951.
4) 최준호, 권달호, 이오석, 주길재, 박희동, 이인구. 1998. *Streptomyces thermocyaneoviolaceus*의 Xylanase 생산조건 및 Xylooligo당의 생산. 경북대농학지. 16:45-54.

5) 이종윤, 장준복, 양재경, 임부국, 변지혜. 투고 예정. 농산 및 임산폐자원의 xylan을 이용한 기능성 물질생산(Ⅰ). Xylan의 단리 및 정제. 한국목재공학회.
6) 이종윤, 장준복, 양재경, 임부국, 변지혜. 투고 예정. 농산 및 임산폐자원의 xylan을 이용한 기능성 물질생산(Ⅱ). Uronic acid의 단리 및 성상분석. 한국목재공학회.
7) 이종윤, 장준복, 양재경, 임부국, 변지혜. 투고 예정. 농산 및 임산폐자원의 xyan을 이용한 기능성 물질생산(Ⅲ). Xylan 단리 부산물의 이용. 한국목재공학회.

나. 학술회의 Proceding

1) Effects of Dietary Xyooligosaccharide on Level of Serum Lipid in Rats Fed High Cholesterol Diet. The 2nd International symposium on Aging and Neurodegenerative Diseases. 83. 1997
2) 김성옥외 4인. 1997. 식이 Xylooligo당의 난소화성과 담즙산 흡수지연 효과. 한국영양학회 추계학술대회. 1304-1305.
3) 이종윤, 양재경, 임부국, 변지혜. 1997. 10. 농산 및 임산 폐자원으로부터 xylan의 단리. 한국목재공학회 추계발표 요지집.
4) Gil-jae Joo, Oh-seuk Lee, Han-soo Chang, In-koo Rhee. 1997. 4. Production of xylooligo-saccharides by *Streptomyces chibaensis* xylanase. Proceedings of the international Symposium and 1997 Spring Meeting of the Korean society for Applied Microbiology. 248:25-26.
5) 정향기, 이오석, 최충식, 권달호, 이인구. 1997. 5. 31. Xylooligo당 생산을 위한 Endoxylanase를 분비하는 세균의 분리 및 효소 생산 조건. 한국농화학회·한국식품과학회. 220.
6) 정향기, 이오석, 주길재, 최충식, 이인구. 1997. 10. 18. *Cellulomanas* sp.

R-11이 생산하는 Xylanase의 정제 및 특성. 한국농화학회 추계 학술발표 초록집. 23.

7) Dal-ho Kwon, Gil-jae Joo, Oh-seuk Lee, Heui-Dong Park and In-Koo Rhee. 1997. 10. 25. Production conditions and enzymetic properties of xylanase produced by thermotolerant *Streptomyces* sp. M049. Proceedings of the international symposition and 1997 fall scientific meeting of the Korean society for applied microbiology. 380.

8) 최준호, 이오석, 권달호, 이인구. 1998. 4. 25. *Streptomyces* sp. M049가 생산하는 Xylanase의 정제 및 그 특성.

9) 김성옥, 이순재, 이인구. 1998. Effect of Oligosaccharide on the hepatic HMG-CoA reductase activity and liver lipid composition in rat feed high cholesterol diet. The 2nd Asian Congress of Dietetics.

10) 김성옥, 이순재, 이인구. 1998. 식이 Xylooligo당이 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직중의 지질조성과 병리조직학적 관찰, 한국영양학회 추계학술대회. 82.

11) 김성옥, 이순재, 이인구. 1998. Xylooligo당이 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직중의 HMG-CoA reductase 활성과 지질조성에 미치는 영향, 한국식품영양학회 춘계학술대회. 201.

12) 김성옥, 이순재, 이인구. 1998. 식이 Xylooligo당이 흰쥐 간조직중의 Cholesterol과 Triglyceride 함량에 미치는 영향, 대한가정학회. 44.

13) 이종윤, 양재경, 임부국, 변지혜. 1998. 10. 폭쇄전처리된 Cellulose계 자원으로부터 xylan의 단리 및 정제에 관한 연구. 한국목재공학회 추계발표 요지집.

14) 이오석, 권달호, 최준호, 박희동, 이인구. 1998. 5. 29. *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* M049가 생산하는 xylanase에 의한 xylooligo당의 생산조건 확립. 한국농화학회 1998년도 춘계총회 및 합동 학술대회 특별강연 및 발표 논문초록집. 117.

15) Jun-ho Choi, Dal-ho Kwon. Oh-seuk Lee, Hei-dong Park, In-Koo Rhee. 1998. 10. 23. Purification and properities of endoxylanase B2 in *Streptomyces thermocyaneoviolaceus*. 382.

16) **김성옥**, **이인구**, **이순재**. 1999. Effects of Dietary Xylooligosaccharide on Fecal Lipid Levels in in Rat Fed High Cholesterol Diet, 6th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology. 134.

17) **김성옥**, **이순재**, **이인구**. 1999. **식이** Xylooligo**당이 고콜레스테롤 식이 흰쥐 분변중 중성** Sterol**과 무기질 함량에 미치는 영향**, **한국영양학회**. 64.

18) **이종윤**, **양재경**, **임부국**, **변지혜**. 1999. 4. **폭쇄전처리된 신갈나무로부터** uronic acid **단리에 관한 연구**. **한국목재공학회 춘계발표 요지집**.

19) **이종윤**, **장준복**, **양재경**, **임부국**, **변지혜**. 1999.9. Cellulose**계 자원으로부터 단리된** uronic acid**의 성상분석**. **한국목재공학회 추계발표 요지집**.

20) Jae-ho Shin, Dal-ho Kwon, Jun-ho Choi, Gun-young Heo, Heui-dong Park, In-koo Rhee. 1999. 4. 23-24. Cloning and expression of *S. thermocyaneoviolaceus* thermostable xylanase genes in *E. coli*. Proceedings of '99 KSAM International symposium and spring meeting. 198.

21) Jae-ho Shin, Yun-young Kwak, Jun-ho Choi, Oh-seuk Lee, Gil-jae Joo, In-koo Rhee. 1999. 4. 23-24. Overexpression of a thermostable xylanase of *S. thermocyaneoviolaceus* in *E. coli*. Proceedings of '99 KSAM International symposium and spring meeting. 199.

22) Oh-seuk Lee, Jun-ho Choi, Ju-ock Nam, Gil-jae Joo, In-koo Rhee. 1999. 4. 23-24. Changes of xylooligosccharides depending on conditions for the hydrolysis of xylan by thermostable xylanases. Proceedings of '99 KSAM International symposium and spring meeting 238.

23) **이오석**, **신재호**, **최준호**, **장한수**, **이인구**, 1999. 5. 20. *Streptomyces thermocyaneoviolaceus***의** *xyn*B **유전자를 클로닝한 재조합 대장균이 생**

산하는 xylanase에 의한 xylooligo당의 생산. 한국농화학회 1999년 임시 총회 및 춘계학술발표회 초록집. 98.

24) 이오석, 최준호, 신재호, 허건영, 장한수, 이인구. 1999. 10. 29. *Streptomyces thermocyaneoviolaceus*의 *xyn*A 유전자를 클로닝한 재조합 대장균의 효소생산 최적조건 및 효소학적 성질. 한국농화학회 정기총회 및 추계학술발표회 발표논문초록집. 54.

25) 최준호, 이오석, 박희동, 이인구. 1999. 10. 30. Purification and properties of xylanase B1, B2, B3 in *Streptomyces thermocyaneoviolaceus*. 한국산업미생물학회 추계학술대회.

SUMMARY

Ⅰ. TITLE

Production of Functional Material from Xylan of Agricultural and Forest Wastes

Ⅱ. OBJECTIVE AND NECESSITY

One of the most abundant and inexpensive biomass is hemicellulose especially in agricultural and forest wastes. Hemicellulose accounts for up to 20 25% of the total dry weight of higher land plants, and about 20% of agricultural waste such as rice straw or wheat straw. The xylan, a group of heteropolysaccharides, are the major components of the hemicellulose fractions of many terrestrial plants. For example, xylan occupies 20-40% portion of softwood hemicellulose, 80 90% portion of hardwood hemicellulose, 68 78% portion of agricultural residues hemicellulose such as rice straw and wheat straw. The composition and structure of xylans vary according to their sources, but all xylans are composed of a backbone chain consisting of xylopyranose polymer linked with $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidic bond.

The xylooligosaccharides is a major intemediates of xylan hydrolysis with xylanase and has received increasing attention as a growth promoting factor for *Bifidus* in the large intestine. More specially, the xylooligosacchride can be renewed and utilized as new functional food additives in dietary industries. So far the study on the production of xylooligosaccharide has been poorly investigated, even though the hydrolysis of xylan is extensively studied for the production of xylose monomer. The xylooligosaccaride has not produced in our country. The

xylooligosaccharide production and its technical development are becoming more and more important for industrial aspect of functional food. The uronic acid derivatives, one of xylan hydrolysates, play an important role in detoxification of oxidative radical and metabolism of steroids. We investigated effective methods for the isolation of xylan, and established the optimal condition for the production of xylooligosaccharide and glucuronic acid derivatives. Development of new function in uronic acid derivatives and xylooligosaccharides will promote the additive value of agricultural and forest wasts.

Ⅲ. SCOPES OF THE STUDY

The project consists of two subject and a joint subject. The formers are production of functional xylooligosaccharides by enzymatic hydrolysis of xylan and manufacture of new functional materials by isolation and chemical hydrolysis of xylan. The latter is development of new function in hydrolysates of xylan. The major contents and scope of this project can be summarized as follows :

1. Production of functional xylooligosaccharides by enzymatic hydrolysis of xylan

1) Development of microorganism produced xylanase which has excellent productivity of xylooligosaccharides from xylan

① Isolation of microorganism produced xylanase and investigation of its microbiological characteristics

② Xylooligosaccharide production by various xylanases of isolated strains

③ Selection of microorganism produced xylanase which has excellent xylooligosaccharides productivity and investigation for production of xylanase

2) Enzymological characterization of xylanases and production of xylooligosaccharides

① Purification and enzymological characterization of xylanase which has excellent xylooligosaccharides productivity

② Production of xylooligosaccharides by xylanases and compositional analysis of xylooligosaccharides

③ Establishment of condition for xylooligosaccharide production

④ Preliminary test for cloning and isolation of xylanase gene

3) Cloning and overexpression of xylanase gene

① Cloning and sequencing of xylanase gene

② Overexpression of xylanase by recombinant DNA technique

③ Xylanase production according to culture condition

④ Xylanase production in jar-fermentor scale

⑤ Optimal production condition of xylooligosaccharides by the overproduced xylanase

2. Manufacture of new functional materials by isolation and chemical hydrolysis of xylan

1) Pretreatment technique of agricultural and forest residues for xylan extraction

① Collection of agricultural and forest residues

② Establishment of pretreatment condition of agricultural residues

③ Chipping treatment of forest residues from oak wood

④ Optimal condition of steam-explosion pretreatment

2) Establishment of purification and isolation technique of xylan and possibility for application of various functional product

① Establishment and optimal condition for xylan extraction

② Compositional analysis of xylan

③ Purification of xylan

④ Compositional analysis of purified xylan

3) Isolation of uronic acid derivatives and xylose from xylan by chemical hydrolysis

① Hydrolysis of xylan by chemical treatment

② Isolation of uronic acid derivatives from hydrolysates

③ Establishment of hydrolysis condition from xylan

④ Isolation of cellulose from xylan extraction residues

3. Development of new function in hydrolysates of xylan

1) In vitro investigation of digestibility of xylooligosaccharides and improvement of lipid metabolism in blood

① Degradation of xylooligosaccharides by saliva, pancreas and small intestinal muscus enzymes

② Investigation of triglyceride contents in blood

③ Investigation of LDL, HDL and total cholesterol contents in blood

2) In vivo investigation of improvement effect of cholesterol metabolism by xylooligosaccharides

① Hepatic HMG-CoA reductase activity

② Contents of hepatic triglyceride and cholesterol

③ Accumulation of lipid peroxides in tissue

④ Pathological investigation of hepatic tissues

⑤ Reduction of blood glucose level in diabetic rat

3) Development of new function of xylooligosaccharides and xylan hydrolysates.

① Determination of gastrointestinal transit time

② Determination of fecal bile acids contents

③ Determination of fecal cholesterol contents

④ Detoxification of toxic oxidative radicals in tissues

Ⅳ. RESULT AND APPLICATIONS

1. Result of this study

In order to produce of functional material from xylan in agricultural and forest wastes, we established optimal extraction technique and purification method of xylan. Production of functional xylooligosaccharides from xylan and production condition of uronic acid derivatives was also established. Cellulose and cellulose derivatives was manufactured from by-product in xylan extraction step. Xylooligosaccharide production system by enzymatic hydrolysis was established by the selection of microorganism produced the excellent xylanase, cloning and overexpression of the xylanase gene.

Utilization efficiency of agricultural and forest wastes will be elevated by the production of functional xylooligosaccharides and uronic acid derivatives from xylan, which were determined to improve effect of lipid and cholesterol metabolism, antioxidative detoxification and glucose level in blood of rat. The results can be summerized as follows :

1) Results on 「**Production of funtional xylooligosaccharides from xylan by enzymatic hydrolysis**」

① Thermotolerant *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* M-049 which produced excellent thermostable xylanase, was selected for the xylooligosaccharides production from xylan.

② The optimal production condition of xylanase of this bacteria was investigated in flask and jar-fermentor sclae. The bacteria produced 14.2 unit/ml of xylanase in the optimal condition.

③ Three xylanases(N1, B2 and B3) of four xylanases produced by *S. thermocyaneoviolaceus* were purified to be homogeneous and estimated molecular weight on SDS-PAGE and the other xylanase(B1) was purified partially.

④ The optimal pH of purified xylanase N1, B1, B2 and B3 was pH 5.0 5.5. These enzymes were stable at the range from pH 4.5 10.5.

⑤ The optimal temperature of purified xylanase N1, B2 and B3 was 6 5℃ and that of B1 was 70℃. Xylnase N1 was stable at 65℃ and xylanase B1, B2 and B3 were stable at 55℃ for 1 hour.

⑥ Km values of purified xylanase N1, B1, B2 and B3 were determined to be 10.92, 2.15, 11.80 and 2.62mg/ml, respectively. Vmax of these enzymes were 3.02, 0.71, 4.52 and 1.10 μmol/min, respectively.

⑦ The purified xylanase N1, B2 and B3 were bound to unsoluble xylan,

but xylanase B1 had a low affinity in the insoluble xylan. Xylanase N1 was bound to Avicell, but B1, B2 and B3 were not.

⑧ Purified xylanase N1, B1, B2 and B3 could not hydrolyzed X2. Xylanase N1 could not hydrolyzed X3, but B1, B2 and B3 weakly hydrolyzed X3. Xylanase N1 could not hydrolyzed X4, but B1, B2 and B3 hydrolyzed X4 to X2. Xylanase N1 weakly hydrolyzed X5 and B1, B2 and B3 hydrolyzed X5 to X1, X2 and X3.

⑨ Amino acid sequence of N-terminus of purified xylanase N1 and B3 were DTITSNQTGTHNGYF and AESTLGAAAA, respectively.

⑩ *xynB* and *xynA* genes, for xylanase N1(XynB) and xylanase(XynA), were cloned in *E. coli*. The nucleotide sequences of both genes were analyzed.

⑪ Cloned *xynA* and *xynB* were subcloned in overexpression vector and XynA and XynB were overproduced in *E. coli*.

⑫ Characteristics of recombinant XynA and XynB were the same as xylanase B3 and N1, produced by *S. thermocyaneoviolaceus*, respectively.

⑬ Recombinant *E. coli* BLR(DE3)/pEMA144, containing *xynA* gene, was produced XynA(xylanase B3) up to 128 unit/ml and recombinant *E. coli* BLR(DE3)/pEMB10, containing *xynB* gene, was produced XynB(xylanase N1) up to 142 unit/ml in jar-fermentor. These enzyme productivities were 9 to 10 times higher than *S. thermocyaneoviolaceus*.

⑭ The xylanases complex of *S. thermocyaneoviolaceus* and recombinant xylanases(XynA, XynB) were produced xylooligosaccharides to 58.8 g/ℓ and 65.0 g/ℓ using 10% xylan in optimal production condition, respectively.

2) Results on 「**Manufacture of functional materials by isolaton and chemical hydrolysis of xylan**」

① In the chemical composition, we found that the contents of water-extractives and ash of rice straw and barley straw were more than those of oak wood.

⑤ Oak wood(*Quercus mongolica*), rice straw(*Oryza sativa*) and barley straw(*Hordeum vulgare*) were treated with three types of steam-explosion(20kg/cm2-3 6 min, 15 kg/cm2-10 min, and 15(30) kg/cm2-10(0.5) min.). The content of lignin in steam-exploded materials was higher than that of non-treated materials. In the yield of crude xylan isolated from steam exploded materials, amount of crude xylan were influenced by the steam pressure in steam explosion treatment. In higher steam pressure, amount of crude xylan were higher than those of low steam pressure.

③ The crude xylan was extracted from steam-exploded materials with hot-water and 0.5% potassium hydroxide solution. In the sugar type of crude xylan extracted with hot water and 0.5% potassium hydroxide solution, the oligomer content of crude xylan extracted with hot water was much more than that of crude xylan extracted with 0.5% potassium hydroxide solution. So, the most effective steam explosion condition of agricultural and forest residues for isolation of xylan was 20 kg/cm2 pressure for 3 minutes. And the most effective method of isolation was hot water extract.

⑦ The crude xylan was purified with 5% barium hydroxide solution and ethanol precipitation procedure. The content of xylose of purified xylan was over 85%, but other sugar resides were not removed completely.

㉡ The optimal acid hydolysis condition for the isolation of uronic acid derivatives in xylan was a treatment with 1.0 N sulfuric acid solution for 90 min. The isolated uronic acid was analyzed using HPLC and 13C-NMR techniques. In the result of HPLC analysis of the isolated uronic acids, oak wood had glucuronic acid and galacturonic acid and exist approximately 15 : 1 molar ratio against the xylose residue. Rice straw and barley straw had glucuronic acid only, and exist appoximately 15-20 : 1 molar ratio against the xylose residue.

㉢ In the result of 13C-NMR analysis of the isolated uronic acid, we can be assumed the existed sructure as follows;

Ⓐ The isolated uronic acid in rice and barley straw existed D-glucurouronic acid residue with monomer type.

Ⓑ The isolated uronic acid in oak wood existed 6 types with 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, 2-O-(4-O-methyl-α-D-glucuronic acid)-D-xylose, 4-O-(β-D-galacutornic acid)-D-xylose, and β-1, 4 linked (4-O-methyl-α-D-glucuronic acid)-D-xylobiose.

㉣ The preparation of cellulose from waste residues after hot-water extract were carried out by sodium chlorite and oxygen-alkali bleaching. Cellulosic derivatives; cellulose acetate and carboxymethyl cellulose, were prepared with these cellulose. The degree of substitution of acetate was 2.1 2.5. FT-IR spectra of prepared cellulose acetate were found that peaks at around 1,200cm-1 and 1,750cm-1 increase markedly, due to ester carbonyl group. The degree of substitution of carboxymethyl cellulose(CMC) was 0.7 0.9.

3) Result on 「**Development of new function in hydrolysates of xylan**」

① The digestibility of xylooligisaccharides : The xylooligisaccharide were not digested with the digestive enzymes and examined to be the low calorie functional food delaying absorption of bile acid in the intestinal tract by their administration.

⑤ The effect of improvement on lipid metabolism of xylooligisaccharides : The gastrointestinal transit time were decreased by xylooligosaccharide supplementation in high cholesterol diet rat. Thus the xylooligosaccharides supplementation determined to be effective in the improvement of constipation. Xylooligosacchareide diet decreased the plasma triglyceride, total-cholesterol and LDL-cholesterol while increased the HDL-cholesterol, so reduced the atherogenic index. The levels of excretion of fecal bile acid, cholesterol, coprostanol and coprostanone were increased in xylooligosaccharide supplementation. Thus, xylooligosaccharide supplementation determined to be effective in the improvement on cholesterol metabolism. The activity of hepatic HMG-Co A reductase, a rate limiting enzyme in cholesterol biosynthesis was significantly increased in high cholesterol diet, but it was recovered to the level of normal group by xylooligosaccharide supplementation. Xylooligosaccharide diet reduced the hepatic cholesterol and triglyceride but increased the phospholipid. Blood glucose level in xyloolygosaccharide supplementation group was significantly lower than that of high cholesterol diet group.

③ The antioxidative detoxification of xylooligosaccharide : Hepatic superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-px) and glutathione S-transferase(GST) activities in high cholesterol diet group were decreased by 21%, 41% and 49%, respectively. but those

were increased by xylooligosaccharide supplementation and the reduced glutathione contents were increased. Thus, the level of hepatic thiobarbituric acid reacting substances(TBARS) in high cholesterol diet group was increased by 211%, compared to that of normal group but it was significantly reduced by xylooligosaccharide supplementation. Light micrographs of hepatic tissue slice revealed that hepatocyte fat size and number were decreased in 10% xylooligosaccharide supplementaion groups, compared with the other oligosaccharide groups.

① The effect of blood glucose reduction in diabetes : To observe the blood glucose level lowering effect of xylooligosaccharide, we have checked oral glucose tolerance and glucose level lowering effect in diabetic rat. By showing reduction of glucose level and retardation of postprandial glucose level elevation, the xylooligosaccharide improved the glucose tolerance capacity and reduced blood glucose level.

② The effect of uronic acid derivatives on fatigue recovery after exercise : The contents of lactic acid were reduced and hepatic glycogen contents were increased by supplementation of glucuronic acid derivatives. So administration of glucuronic acid derivatives promoted the fatigue recovery and strengthen antioxidative system after exercise.

2. Option for application

Isolation method of xylan was established to produce functional materials using xylan of agricultural and forest wastes. Optimal production condition of xylooligosaccharides from xylan was established using complex xylanases of *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* and recombinant xylanases from *E. coli*. We discovered that xylooligosaccharides and uronic acid derivatives, which were produced in this project, had new functions such as improvement of lipid metabolism and gastrointestinal function, antioxidative detoxification and reduction of glucose level in blood, etc. So, we suggest our options for the application of those functional materials.

1) The report of this project should be distributed and advertised to the related organizations and sugar manufacturers.
2) The developed technology should be transferred to manufacturer and company which were related to food industry.
3) The results of this project should give a presentation at academic meeting and publics.
4) New function of xylooligosaccharides and uronic acid derivatives should be advertised and encouraged its application to pharmaceutical and food industry.
5) Recombinant *E. coli* having *streptomycete* xylanase gene on plasmid DNA secreted the xylanase into culture broth. This result will be helpful to elucidate secretion and protein folding mechanism.
6) Isolation method of xylan from oak can be used in commercial process to produce xylan as reagent grade.
7) For the scale up to produce xylan, xylooligosaccharides and uronic acid

derivatives, continuous reaction system and product isolation processes should be studied furthermore and supported more grants.

8) By-products of new functional material production process, such as cellulose, cellulose acetate and carboxymethylcellulose, can be used for the utilization efficiency and economic benefit of agricultural and forest wastes.
9) Xylooligosaccharides and uronic acid derivatives, which had a lot of new function, will be contributed for public health.
10) Advanced technology achieved during this project can be used as a database of carbohydrate related field. Two xylanase genes isolated in this project are valuable in application of biotechnology as a bio-resource.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성

헤미셀룰로스는 지구상에서 셀룰로스 다음으로 풍부한 탄수화물로 년간 약 450억톤이 생산되고 있는데 이 양은 사람 일인당 약 23kg에 상당하는 양이 1일에 생산되는 셈이다. 헤미셀룰로스는 식물 세포벽의 격자구조물을 이루는 비셀룰로스계 다당류로써 목재의 20 25%를 차지하며 농산 폐자원인 보릿짚, 볏짚, 옥수수 속 등에도 약 20% 정도 함유되어 있다.

헤미셀룰로스중 xylan 및 xylan 유도체의 함량은 침엽수材에는 20 45%, 활엽수材에는 80 90%, 밀, 보리, 벼 등의 짚에는 68 78% 정도로 식물체의 종류에 따라 다양하다. 침엽수材의 xylan은 4-O-methyl glucuronoxylan과 4-O-methyl glucuronoarabinoxylan으로 구성되어 있으며 arabinose 잔기가 존재하고 acetyl기는 존재하지 않으며 유론산 잔기가 xylose 잔기 4 9개당 1개를 가지고 있으며 중합도(DP)는 100 정도이다. 활엽수材의 xylan은 4-O-methylglucuronoxylan 만으로 구성되어 있으며 arabinose 잔기가 존재하지 않고 acetyl기가 존재하며 유론산 잔기는 xylose 잔기 5 15개당 1개를 가지고 있으며 중합도(DP)는 200정도이다. 볏짚, 보릿짚 등의 농산물폐자원의 xylan은 4-O-methyl glucuronoarabinoxylan으로 arabinose잔기가 xylose잔기 약 5 개당 1 개정도(α-1,3 결합)로 arabinose가 많이 결합되어 있는 특징이 있다.

일찍부터 xylan의 가수분해 산물인 xylose는 그대로 사용하지 않고 환원시켜 xylitol로 만들어서 사용하고 있다. Xylose를 고압하에서 수소첨가 환원반응에 의해 생산된 xylitol은 감미도가 설탕과 비슷할 뿐 아니라 청량감이 강하고 비충치유발성 및 당뇨병 대용糖으로 인정되어 식품, 화장품 및 의약품으로 널리 사용되고 있다. 그러나 국내에서는 현재까지 전혀 생산되지 않고 있으며 일부기업에서 사용하고 있는 것도 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다.

Xylooligo 糖은 다른 oligo 糖보다 열이나 산에 대해 더욱 안정하고 加水活性低下 효과를 가지고 있어서 식품의 부패방지 및 보존효과를 가지고 있으므로 여러가지 식품의 가공에 널리 이용될 수 있다. 국내에서 생산, 시판되고 있는 올리고糖으로는 프룩토 올리고糖, 이소말토 올리고糖, 말토 올리고糖, 갈락토 올리고糖 등이 있다. 말토 올리고糖과 이소말토 올리고糖은 소화성이므로 소장내에서 분해되어 *Bifidus* 균 증식 촉진인자로서의 효과가 감소된다. 프룩토 올리고糖은 비소화성이지만 fructose transferase의 작용에 의해 설탕으로 전환되기 쉽고 액체상태로 장기보관시 포도당, 과당, 설탕 등으로 분해되어 *Bifidus* 균 증식 촉진인자로써 효과가 감소된다. 지금까지 알려진 기능성 올리고糖 중에서 모든 면에서 xylooligo 糖이 가장 우수하다는 것이 알려져 있으며, 日本에서 판매가격 또한 타 올리고糖의 2배 내지 5배 비싸다. 현재까지 국내에서 xylooligo 糖은 전혀 생산되지 못하고 있으며 이에 관한 연구조차 이루어지지 않고 있다. 그러므로 산업적으로나 경제적으로나 xylooligo 糖의 생산 및 그 기술개발이 시급히 요구된다.

활엽수材의 xylan에 많이 함유되어 있는 4-O-methyl glucouronic acid는 酸 가수분해하여 xylose를 생산하는 과정에서 쉽게 유론산 유도체의 형태로 분리될 수 있다. 일찍부터 유론산 유도체는 해독작용 및 스테로이드 분비에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. Xylan 으로 부터 酸 가수분해에 의해 xylose를 생산하는 과정에서 얻어지는 유론산 유도체도 동일한 기능성을 나타낼 수 있는지 조사하는 한편 xylooligo 당의 새로운 기능성을 검색함으로써 xylan 가수분해물의 이용성을 증대시키고 농산 및 임산 폐자원의 부가가치 증대에 기여할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 농산 및 임산 폐자원으로 부터 이들의 부가가치를 향상시켜 농가소득을 증대시키고 국민보건에 기여할 목적으로 xylan의 단리기술과 xylooligo 糖 및 유론산 유도체 등의 생산기술을 확립함과 아울러 이들의 새로운기능성을 검색하여 그 효율을 증대하고자 본 연구를 진행하였다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

본 과제는 xylan의 효소분해에 의한 기능성 xylooligo당 생산과 xylan의 단리 및 화학분해에 의한 신기능성 물질 생산의 2개의 세부과제와 xylan 가수분해물의 신기능성 검정의 1개의 협동과제로 구성되어 있으며, 연차별 개발목표, 수행한 주요 연구내용 및 범위를 요약하면 다음과 같다.

제 1 세부과제 : Xylan의 효소 분해에 의한 기능성 xylooligo 당 생산

연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1 년차 : Xylooligo 당의 생성능이 우수한 xylanase 생산 미생물의 개발	1. Xylanase 생산 미생물의 분리 및 미생물학적 특성 조사 2. 각종의 xylanase에 의한 xylooligo 당의 생성여부 조사 3. Xylooligo 당의 생성능이 우수한 xylanase 생산 균주의 선발 및 발현 특성조사
2 년차 : 분리된 xylanase의 효소학적 특성 조사 및 xylooligo당의 생산	1. Xylooligo 당의 생성능이 우수한 xylanase의 정제 및 효소학적 특성조사 2. Xylanase 처리에 의한 xylooligo 당의 조제 및 조성분석 3. Xylooligo 당의 생산조건 확립 4. Xylanase 유전자의 분리 및 클로닝 준비
3 년차 : Xylanase유전자의 클로닝 및 증폭생산	1. Xylanase 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석 2. 재조합 DNA 기술에 의한 xylanase의 증폭생산 3. 배양조건을 달리한 xylanase의 생산조건 검토 4. 발효조에서 xylanase의 대량생산 조건 검토 5. 증폭생산된 효소에 의한 xylooligo 당의 생산조건 확립

제 2 세부과제 : Xylan의 단리 및 화학분해에 의한 신기능성 물질 생산

연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1 년차 : Xylan 추출을 위한 농산 및 임산 폐자원의 전처리 기술 확립	1. 농산 및 임산 폐자원의 수집 2. 농산 폐자원(보릿짚)의 전처리 조건 확립 3. 활엽수 폐잔재의 chipping 처리 4. 폭쇄전처리 최적조건의 확립
2 년차 : Xylan의 단리 정제 기술 확립 및 각종 기능성 물질 제조 적성 검사	1. Xylan의 단리 및 최적 단리조건 확립 2. 단리 xylan의 구성성분 분석 3. Xylan의 정제 4. 정제된 xylan의 구성당 분석
3 년차 : Xylan의 화학분해로 유론산 유도체 및 xylose의 분리	1. 화학처리에 의한 xylan의 가수분해 2. 가수분해물로부터 유론산 유도체의 분리 3. Xylan의 가수분해 조건확립 4. Xylan 단리 부산물중 cellulose의 분리

제 3 협동과제 : Xylan 가수분해물의 신기능성 검정

연구개발목표	연구개발내용 및 범위
1 년차 : Xylooligo 당 소화성의 in vitro 조사 및 혈중 지질대사 개선효과 조사	1. 타액, 췌장 및 소장 점액 효소에 의한 xylooligo 당의 분해여부 조사 2. 혈중의 triglyceride (TG) 함량조사 3. 혈중 총콜레스테롤, LDL- 및 HDL-콜레스테롤 함량 조사
2 년차 : Xylooligo 당의 콜레스테롤 대사 개선작용의 in vivo 조사	1. 간의 HMG-Co A의 환원 효소 활성 조사 2. 간의 TG 및 콜레스테롤 함량 3. 조직중의 지질 과산화물 축적상태 관찰 4. 간조직의 병리·조직학적 검사 5. 당뇨병유발 흰쥐에서 혈당저하작용조사
3 년차 : Xylooligo 당 및 xylan 가수분해물의 기능성 검정	1. 장기능 측정(통변시간) 2. 대변중 담즙산 함량측정 3. 대변등의 cholesterol함량 측정 4. 조직중 독성 래디칼 생성 및 해독작용조사

제 2 장 Xylan의 효소분해에 의한 기능성 xylooligo당 생산

제 1 절 서 설

식물 세포벽의 격자구조물을 이루는 비셀룰로스계 다당류인 헤미셀룰로스는 목재의 20 25%를 차지하며 농산 폐자원인 보릿짚, 볏짚, 옥수수속 등에도 약 20% 정도 함유되어 있다. 헤미셀룰로스중 xylan 및 xylan 유도체의 함량은 침엽수材에는 20 45%, 활엽수材에는 80 90%, 밀, 보리, 벼 등의 짚에는 68 78% 정도로 식물체의 종류에 따라 다양하다. 이러한 xylan은 xylopyranose가 β-(1,4)결합으로 중합된 주쇄를 공통적으로 가지고 있지만 식물의 種에 따라 다양한 구조를 가지고 있다. 헤미셀룰로스의 주성분인 xylan의 부분 가수분해물인 xylooligo 糖은 난소화성 올리고 糖으로 유익한 장내세균으로 알려진 *Bifidus* 균의 선택적 증식촉진, 부패균의 증식억제 등의 기능이 있다. 따라서 大腸內 환경을 개선하여 변비를 방지하고 대장내 유해산물의 발생을 억제함으로써 건강에 기여할 수 있는 기능성 물질로 알려져 있다.

Xylan으로부터 xylooligo 糖을 생산하는 방법으로 산가수분해와 효소가수분해법이 있다. 효소가수분해법은 전환율이 높고 온화한 조건에서 이루어지기 때문에 공해물질의 배출을 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다(Brisaria, 1981). 따라서 xylooligo 糖의 생산을 위해서는 먼저 xylan을 가수분해하여 xylooligo 糖을 효율적으로 생성할 수 있는 xylanase를 생산하는 미생물을 분리하여야 한다. 또한 이 미생물의 효소생산 최적조건의 검토, xylanase 유전자의 클로닝에 의한 효소의 증폭생산 기술의 개발이 이루어져야 하며 또한 재조합 균주에 의한 효소의 대량생산 조건이 확립되어야 한다. 또한 이 효소에 의한 xylooligo 糖 생산조건의 최적화 및 산업화기술을 개발하여야 한다. 지금까지 xylanase에 관한 연구는 xylooligo 糖을 생산하기 위한 것이 아니고 xylan을 xylose로 당화시켜 xylose를 이용하는데 집중적으로 연구되어 왔을 뿐

xylooligo 糖의 생산에 관해서는 거의 연구가 수행되지 못하였다.

본 연구에서는 효소분해에 의한 기능성 xylooligo 糖을 생산하는데 주안점을 두고 내열성이 우수한 xylanase를 생산하는 방선균 *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* M-049를 선발하고 이 균의 효소생산조건, 이 균이 생산하는 4종의 xylanase를 정제하여 그 특성을 밝혔다. 이 특성을 근거로 xylooligo 糖의 생산에 적합하다고 생각되는 2종의 xylanase(xylobiose와 xylotriose를 주로 생산하는 효소와 xylotriose 이상의 xylooligo 糖을 주로 생산하는 효소)의 유전자를 대장균에 클로닝하고 염기서열을 분석하였다. 이 유전자를 고발현 벡터에 subcloning하여 대장균에서 이 효소를 증폭생산하는 조건을 확립하였다. 방선균이 생산한 복합 xylanase 및 재조합 대장균에서 증폭생산한 2종의 xylanase를 각각 이용하여 xylan으로부터 xylooligo 糖의 생산조건을 조사한 것을 보고하고자 한다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양방법

가. 사용 균주

본 실험에 사용한 균주는 부엽토, 임산물 퇴적장 및 퇴비 등으로부터 분리한 xylan 분해력이 강한 균주 235주와 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행(KCTC) 및 한국종균협회부설 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 내열성 세균 및 방선균류 34주를 xylanase 생산력과 xylan 분해산물의 조사에 사용하였으며, xylanase의 생산력과 특성을 고려하여 *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* KCCM40049를 최종 선발하여 본 연구에 사용하였다. 유전자 조작에 사용된 균주로는 형질전환용 숙주로 대장균 DH5α, 고발현 벡터용 숙주로 BLR(DE3)를 사용하였다.

나. 균의 배양

사용균은 XM배지(1.0% xylan, 0.1% yeast extract, 0.1% bactopeptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 및 0.2% K_2HPO_4) 50 ㎖에 XM한천배지(1.0% xylan, 0.1% yeast extract, 0.1% bacto peptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4, 0.2% K_2HPO_4 및 1.5% agar)상의 포자 1 백금이를 접종하여 50℃에서 24 시간 진탕배양(200 rpm, rotary shaking incubator)하여 종배양액으로 사용하였다. 본배양에서는 XM배지 200 ㎖를 500-㎖용 baffled flask에 넣고 121℃에서 15 분간 고압증기 살균한 다음 종배양액을 2% 접종하여 동일 조건으로 배양하였다. 위의 XM배지를 기본으로 하여서 효소 생산력이 우수한 배지조성을 검토하여 0.8% 밀기울, 0.06% yeast extract, 0.06% bactopeptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 및 0.2% K_2HPO_4로 구성된 배지를 개발하여 효소생산을 위한 배지(WB배지)로 사용하였으며, 이때 효소 생산을 위한 배양조건은 위와 동일 조건으로 배양하였다. 균의 보존은 XM한천사면배지에 접종하여 50℃에서 24 시간 배양 후 4℃에서 보존하였다. 보존균주는 1 개월에 한번씩 계대배양하였다.

2. Xylanase의 활성측정

Xylanase[β-1,4-D-xylan-xylanohydrolase(E.C.3.2.1.8)]의 활성을 측정하기 위하여 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) 0.2 ㎖에 효소액(또는 배양상징액) 0.2 ㎖와 1.0% xylan 현탁액(birchwood xylan 1.0 g에 증류수 80 ㎖를 가한 후 121℃에서 15 분간 처리한 후 실온으로 냉각하여 증류수로 100 ㎖로 만듬) 0.4 ㎖를 잘 혼합하여 65℃에서 20 분간 반응시킨 후 DNS(dinitrosalicylic acid, Miller 등, 1959) 용액 0.8 ㎖를 가하여 효소반응을 정지시키고 생성된 환원당을 정량하였다. 즉 DNS 용액을 가한 상기 반응액을

boiling water bath에서 10 분간 반응시킨 후 급냉하고 재증류수 2.4 ㎖를 첨가하여 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 단위는 위의 조건에서 1 분간에 1 μmol의 xylose에 상당하는 환원당을 생산하는데 필요한 효소의 양으로 나타내었다. 효소의 정제 과정중에는 실험의 편의상 50℃에서 30 분간 반응시켜서 xylanase 활성을 측정하였다.

3. 단백질 정량

단백질은 소의 혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)을 표준단백질로 하여 Bradford법(Bradford, 1964)에 따라 595 nm에서 비색정량하거나, UV 280 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

4. 당의 분석

가. 환원당 정량

환원당의 정량은 효소 활성 측정시와 같이 DNS법(Miller 등, 1959)으로 환원당을 정량하였다. 적당히 희석한 시료용액 0.8 ㎖에 DNS 용액 0.8 ㎖를 가하여 boiling water bath에서 10 분간 가열시킨 후 급냉하고 재증류수 2.4 ㎖를 첨가하여 546 nm에서 흡광도를 측정하였다. 당의 정량은 Xylose를 표품으로 하여 농도별로 상기의 방법으로 작성한 표준곡선으로부터 환산하였다.

나. TLC(thin layer chromatography)에 의한 xyooligo 당의 분석

Xylan의 가수분해물로부터 xylooligo 당은 thin layer chromatography(TLC ; Silica gel 60 F254, Merck사)로 분석하였다. 전개용매는 1-buthanol : 2-propanol : water : acetate : acetonitrile(7 : 5 : 4 : 10 : 2, V/V/V/V/V)를 사

용하였고, 발색시약으로 orcinol : sulfuric acid : methanol(0.2 : 10 : 90, W/V/V)에 담근 후 풍건하여 95℃에서 5 분간 발색시켜 확인하였다.

다. HPLC(high performance liquid chromatography)에 의한 xylooligo 당 분석

Xylan을 가수분해한 후, 생성된 xylooligo 당은 Sugar-Pak I column(Φ 6.5× 300 ㎜, Water社)이 장착된 HPLC(Water Model 600E)를 이용하여 측정하였다. 이때 검출기는 Refractive Index Detector(Water Model 410)이었고, 이동상으로는 Ca-EDTA 용액(50 mg Ca-EDTA/ℓ 초순수)을 사용하였고, column의 온도는 85℃이고, 유속은 분당 0.5 ㎖로 하고, 주입량은 20 ㎕로 하였다. Xylooligo 당의 정량은 Megazyme社(영국)로부터 표준품(X2 X6)을 구입하여 integrator(영인과학 모델 D520B)를 사용하여 내표준 정량법에 의해서 측정하였다. 이때 내표준 물질은 같은 오탄당이면서 분석에 영향을 미치지 않는 ribose를 최종농도 10.0 ㎎/㎖로 사용하였다.

5. Polyacrylamide gel 전기영동

SDS-PAGE(sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)는 Laemmli의 방법(1970)에 따라 10% polyacrylamide gel에서 전기영동하였다. 전기영동 용매는 SDS-tris-glycine buffer[0.025 M tris(hydroxymethyl) amino-methane, 0.192 M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3]을 사용하였으며 bromophenol blue를 tracking dye로 하여 ㎝당 15 mA의 전류로 4 시간 전기영동 하였으며 전기영동후 coomassie brilliant blue R-250으로 4 시간 이상 염색하였다. 탈색은 50% methanol과 10% acetic acid를 함유하는 1차 탈색용액으로 1 시간 탈색후 5% methanol과 7% acetic acid를 함유하는 2차 탈색용액으로 12 시간 이상 탈색하였다.

6. 분자량 측정

정제된 효소의 분자량은 Laemmli의 방법(1970)에 의한 SDS-PAGE에 의해 측정하였다. SDS-PAGE의 표준단백질로서는 bovine serium albumin(66 kDa), ovalbumin(45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa), carbonic anhydrase(29 kDa), trypsinogen(24 kDa), trypsin inhibitor(20 kDa)가 혼합되어 있는 Sigma社의 low range molecular calibration kit(catalog no, M3913)를 사용하였다.

7. Xylanase binding assay

정제된 효소를 사용하여 불용성의 xylan 및 Avicell(Fluka Chemie AG, PH-101)에 대한 binding assay를 실시하였다. 불용성 xylan은 Irwin 등(1994)의 방법을 약간 수정하여 조제하였다. 즉, birchwood xylan(Sigma社) 2 g를 40 ㎖의 증류수에 현탁한 다음 1 N NaOH를 사용하여 pH 10.0으로 조정한 후 실온에서 magnetic bar로 서서히 60 분간 교반한 후 3000 x g 의 속도로 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 증류수로 2 회 세척하고 50 mM sodium acetate buffer(pH 5.0)으로 한번 더 세척한 후 10 ㎖의 95% 에탄올에 현탁하였다. 이 현탁액을 여과지(Toyo no. 5A)로 여과한 다음 고형물을 데시케이터 속에서 건조하였다. 이 건조물을 막자사발로 부드럽게 갈아서 불용성 xylan을 제조하였다. 최종적으로 얻은 불용성 xylan은 0.9 g이었다. Binding assay를 위하여 1.0 ㎖의 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 5.5)에 일정량(1 100 ㎎)의 불용성 xylan 혹은 Avicell과 1.0 unit의 정제효소를 함유한 혼합액을 1.5-㎖ Eppendorf tube에 넣고 50℃에서 1 시간 처리시켰다. 처리중 20 분에 3 초씩 vortex 믹서로 혼합하였다. 결합한 효소의 양은 15,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 얻은 상징액에 남아있는 xylanase의 잔존활성을 측정하여 불용성 xylan 혹은 Avicell를 첨가하지 않은 대조구의 효소활성과의 차이로 나타내었다.

제 3 절 균주의 선발

Xylanase 생산능이 우수한 미생물을 분리하기 위하여 부엽토, 임산물 퇴적장 및 퇴비 등으로부터 700여점의 시료를 채취하여 congo-red 염색법으로 xylan 분해력이 우수한 균주 235주를 1차 선발하였다. 선발 균주들 중 효소활성을 측정하여 효소활성이 우수한 51주를 2차 선발하였다. Xylan에서 xylooligo 당을 생산하기 위해서는 xylanase 활성이 높을 뿐만 아니라 생성된 xylooligo 당이 monomer인 xylose로 분해되는 것을 막기 위해서 β-xylosidase를 균체밖으로 분비하지 않고 배양여액에 β-xylosidase 활성이 없는 균주를 선발해야 한다.

따라서 배양여액에 β-xylosidase 활성이 검출되지 않고, 배양여액을 효소액으로하여 xylan을 가수 분해시킨후 생성된 xylooligo 당을 TLC로 조사하여 xylooligo 당(X2 X6)의 생성능이 우수한 R-11, R-81, C-144, C-270, C-506, J-20, J-59 7주를 3차 선발하였다(데이타 생략). Xylanase를 산업적으로 이용하기 위해서 효소의 안정성이 높아야하므로 50℃에서 2 시간 열처리하여도 효소 활성이 감소되지 않고 xylooligo 당의 생성능이 우수한 R-11, C-270 및 J-59 3주를 4차로 분리 선발하였다.

그리고 50℃ 이상에서 호기적으로 생육할 수 있는 호기성 고온세균으로부터 내열성이 높고 xylooligo 당의 생성이 우수한 xylanase를 생산하는 균주를 선발하기 위하여 한국종균협회부설 한국미생물보존센터(KCCM)로부터 15주, 한국과학기술연구원 생명공학연구센터 유전자은행(KCTC)으로부터 19주의 호기성 고온 세균을 분양받아 그 중에서 xylanase 활성이 높은 4주의 균주를 선발하였다.

앞에서 선발된 3주(R-11, C-270 및 J-59)와 4주의 내열성균의 xylanase 활성과 xylooligo 당 생성을 조사한 결과는 표 2-1과 같다. 선발된 7주에 대해서 미생물학적 특성, 효소생산 및 유도, 정제 성질 및 생산 xylooligo 당에 대해

Table 2-1. Xylanase production of the selected strains and reaction products of their xylanases

Strains	Culture temperature(℃)			
	40℃		50℃	
	Enzyme activitya (unit/㎖)	Products	Enzyme activitya (unit/㎖)	Products
No. R-11	0.96	X2, X3, X4, X5	-	(no growth)
C-270	0.84	X4, X5, X6	-	(no growth)
J-59	0.85	X2, X3, X4, X5	-	(no growth)
B. stearothermophillus (KCCM 11238)	0.70	X1, X2, X3	0.47	X1, X2, X3, X4
B. stearothermophillus (KCTC 1830)	0.34	X1	0.31	X1, X4
S. thermocyaneoviolaceus (M-049)	0.81	X2, X3, X4	0.56	X2, X3, X4, X5
Thermomonospora fusca (KCTC 9052)	0.35	X2, X3	0.47	X1, X2

X1, xylose; X2, xylobiose; X3, xylotriose; X4, xylotetraose; X5, xylopentaose; X6, xylohexaose. a, Enzyme activity was assayed at 50℃ for 30 min.

조사하였다(데이타 생략). 이중에서 배양여액에 β-xylosidase 활성이 검출되지 않고, 55℃에서 3 시간 열처리에도 전혀 실활되지 않으며 xylooligo 당 생성능이 우수한 xylanase를 생산하는 *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* KCCM40049(이하 M-049라 약함)를 최종 선발하였다.

S. thermocyaneoviolaceus M-049는 Bergy's manuals of systematic bacteriology에도 등재되어있지 않은 고온성 방선균으로 포자사슬은 spiral형이며 포자는 타원형(1.2 × 0.4 0.5 ㎛)이고 포자표면은 warty type이다. 본 균의 생육온도를 조사한 결과 28 60℃ 범위에서 생육할 수 있었고 50℃ 부근이 생육 최적온도이며 65℃에서는 생육이 불가능하였다. 본 균은 자색색소를 강하게 생산하며 D-glucose, D-xylose, D-fructose 및 L-rhamnose, inositol을 이용할 수 없었다. 본 균은 내열성의 xylanase를 생산하기에 적합한 균으로 생각되었다. 또한 *S. thermocyaneoviolaceus*는 최소 4 종의 xylanase를 생산하였으며, 이들 xylanase는 각기 birchwood xylan에 작용하여 특이적인 작용양상을 나타내었다.

제 4 절 효소 생산조건

1. 플라스크 배양

가. 배양초기 pH의 영향

선발된 *S. thermocyaneoviolaceus* M-049의 효소생산에 미치는 배양초기 pH의 영향을 조사하기 위해서 XM배지에서 배지초기 pH를 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH로 pH 4.0 10.0으로 조정한 후 500-㎖용 baffled flask에 200 ㎖의 배지를 넣어서 24 시간 진탕배양한 결과, 그림 2-1과 같다. pH 7.0에서 가장 높은 생산성을 나타내었고, pH 6이하와 pH 8이상에서는 효소생산이 68% 이하로 낮아짐을 알 수 있었다.

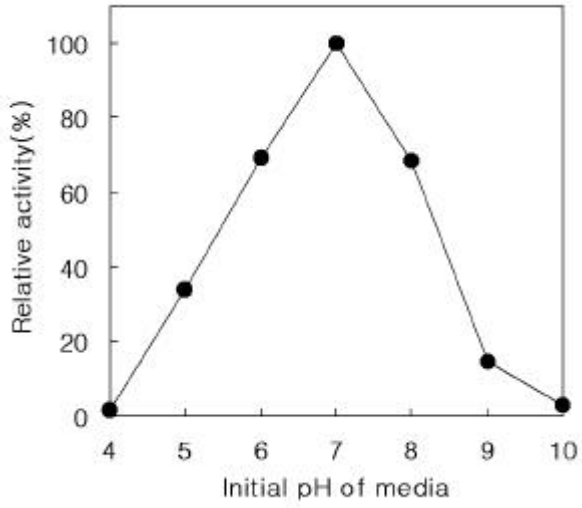

Fig. 2-1. Effect of the initial pH of medium on the xylanase production. The medium was composed of 1.0% birchwood xylan, 0.1% yeast extract, 0.1% bactopeptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4, and 0.2% K_2HPO_4. The pH was adjusted with 0.1 N HCl or 0.1 N NaOH.

나. 기질 종류별 영향

XM배지의 xylan 대신에 경제성을 고려하여 밀기울, 쌀겨(rice bran), 왕겨(rice hull), glucose 및 sucrose 등 각종 기질이 효소생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 2-2와 같다. 이때 xylanase 생산량은 밀기울을 첨가한 배지에서 XM배지(1.0% birchwood xylan 함유)의 173%로 가장 높게 나타났다. 또한 기본배지의 성분을 첨가하지 않고 1.0% 밀기울만 증류수에 가하여 조제한 배지에서도 XM배지보다 높은 효소 생산성을 나타내었으며, 쌀겨나 왕겨를 첨가한 배지에서도 glucose나 sucrose를 첨가한 배지에 비해서 상대적으로 높은 효소 생산성을 나타내었다. 따라서 본 균에 의한 xylanase 생산에서는 값비싼 xylan 대신에 값싸게 구입할 수 있는 밀기울을 사용함으로서 효소생산 단가를 낮출 수 있게 되었다.

Table 2-2. Effect of carbon source on the xylanase production

Substrate (1.0%)	Xylanase activitya (unit/㎖)	Relative activity (%)
Birchwood xylan	1.43	100b
Oat spelts xylan	0.79	55
Glucose	0.21	15
Sucrose	0.21	15
Rice hull	0.43	30
Rice bran	0.59	41
Wheat bran	2.47	173
Only wheat branc	2.28	159

Basal medium was composed of 0.1% yeast extract, 0.1% bactopeptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4, and 0.2% K_2HPO_4. a, Enzyme activity was assayed at 50℃ for 30 min. b, The activity in the birchwood xylan was taken as 100%. c, The medium contained only 1% wheat bran without basal medium.

다. 밀기울 농도의 영향

밀기울 농도가 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해서 XM배지에 xylan 대신에 밀기울을 농도별로 첨가하여 xylanase 생산성을 조사한 결과는 그림 2-2와 같다. XM배지에 밀기울을 0.8% 이상 첨가했을 때에 가장 높은 효소 생산성을 나타내었다.

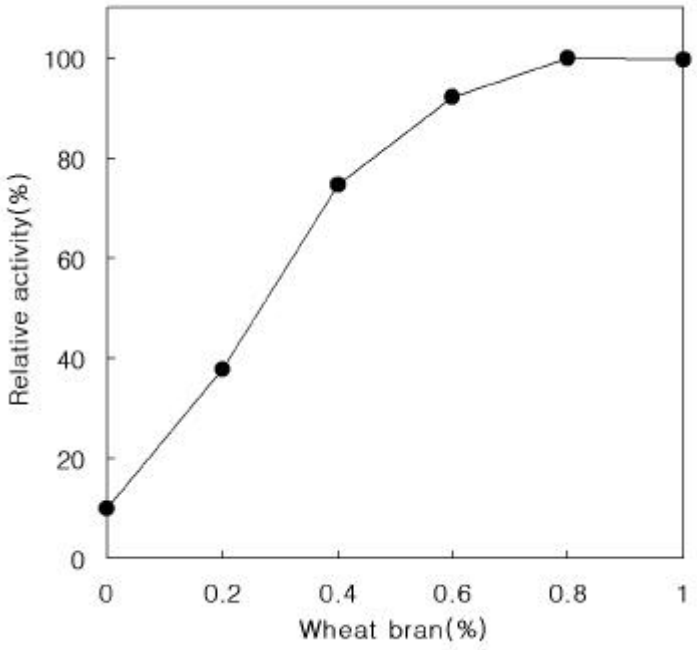

Fig. 2-2. Effect of wheat bran concentration on the xylanase production. Basal medium was composed of 0.1% yeast extract, 0.1% bactopeptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4, and 0.2% K_2HPO_4.

라. Yeast extract **및** peptone **농도의 영향**

Xylanase **생산에 가장 좋은 효과를 나타내었던** 0.8% **밀기울을 첨가한 배지에서** yeast extract **농도가** xylanase **생산에 미치는 영향을 조사하기 위해서** birchwood xylan **대신에** 0.8% **밀기울을 가한** XM**배지에** yeast extract**를 농도별로 첨가하여** xylanase **생산성을 조사한 결과, 그림** 2-3**과 같이** yeast extract**의 농도에 따른 효소 생산성의 영향은 거의 없었으나,** 0.06 0.2% **농도에서 약간 높은 효소생산을 보였고,** 0.3%**이상에서는 오히려 감소하였다.**

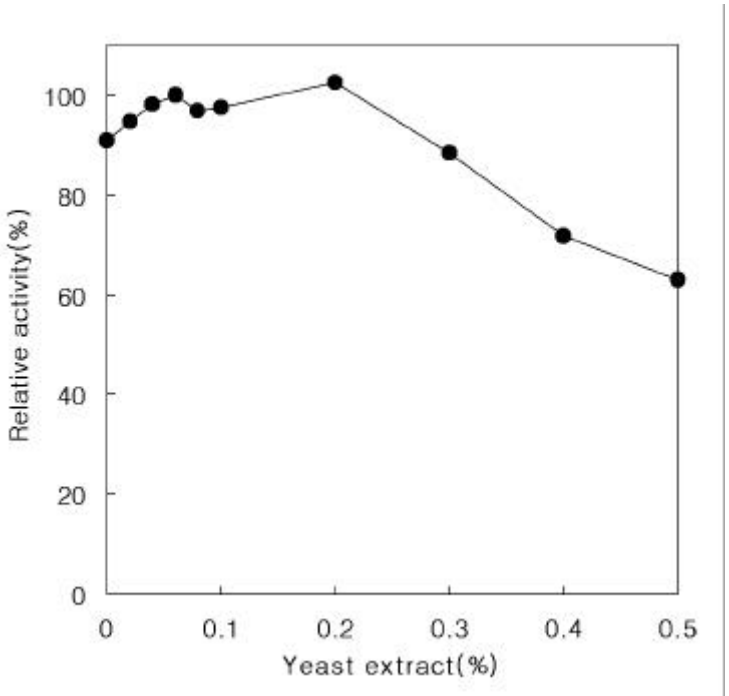

Fig. 2-3. Effect of yeast extract concentration on the xylanase production. Basal medium was composed of 0.8% wheat bran, 0.1% bactopeptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4, and 0.2% K_2HPO_4.

Xylanase 생산에 가장 좋은 효과를 나타내었던 0.8% 밀기울, 0.06% yeast extract를 첨가한 배지에서 peptone 농도가 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해서 bactopeptone을 농도별로 첨가하여 xylanase 생산성을 조사한 결과, 그림 2-4와 같이 bactopeptone의 농도에 따른 효소생산성의 영향은 거의 없었으나, 0.06%정도의 저농도에서 약간 높은 효소 생산을 보였고, 0.2%이상에서는 오히려 감소하였다.

그래서 최종적으로 0.8% 밀기울, 0.06% yeast extract, 0.06% bactopeptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 및 0.2% K_2HPO_4(pH 7.0)로 구성된 효소생산배지(WB배지)를 확립하였다.

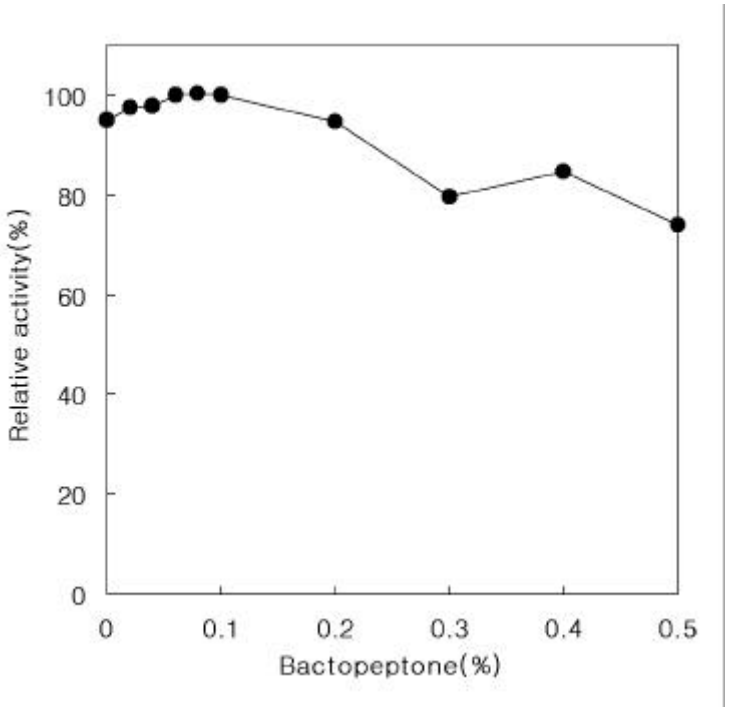

Fig. 2-4. Effect of bactopeptone concentration on the xylanase production. Basal medium was composed of 0.8% wheat bran, 0.06% yeast extract, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4, and 0.2% K_2HPO_4.

2. Jar-fermentor 배양

가. Xylanase 생산에 미치는 aeration 효과

Xylanases 생산에 미치는 통기효과를 조사하기 위하여 250-㎖ baffled flask에 XM배지를 50 ㎖씩 분주하고 121℃에서 15 분간 살균한 후, 한천평판 배지로부터 포자 한 백금이를 접종하여 50℃에서 200 rpm으로 하룻밤 진탕 배양하여 종배양액으로 사용하였다. 2.5-ℓ용 jar-fermentor(한국발효기 주식회사)에 1 ℓ의 WB배지를 넣어 121℃에서 15 분간 살균한 후 종배양액을 1% 접종하여 교반속도를 300 rpm으로 고정하고, 공기 주입량를 1 vvm, 2 vvm 및 3 vvm으로 각기 다르게 주입하며 50℃에서 24 시간 배양한 후 효소 생산에 미치는 aeration 효과를 조사하였다. 그 결과 그림 2-5와 같이 2 vvm의 속도에서 가장 많은 양의 효소를 생산하였다.

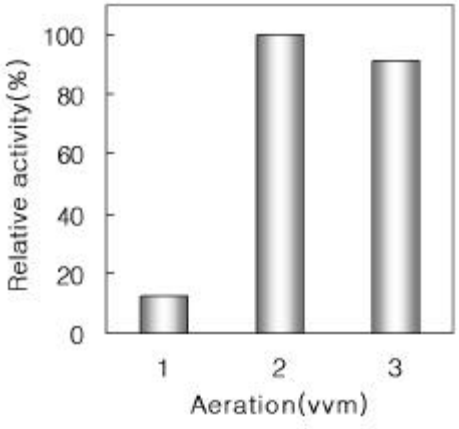

Fig. 2-5. Effect of aeration on the production of xylanase by *S. thermocyaneoviolaceus*. The bacteria were cultivated at 50℃ for 24 h in WB medium which was composed of 1.0% wheat bran, 0.06% yeast extract, 0.06% bactopeptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 and 0.2% K_2HPO_4(pH 7.0).

나. Xylanase 생산에 미치는 교반속도의 영향

Xylanases 생산에 미치는 교반속도의 영향을 조사하기 위하여 같은 방법으로 배양한 종배양액을 1% 접종하여 jar-fermentor의 공기주입량을 2 vvm의 속도로 주입하면서, 교반속도를 각각 300, 400 및 500 rpm으로 조정하여 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 그림 2-6과 같이 400 rpm의 속도로 교반해 주는 것이 가장 좋았다.

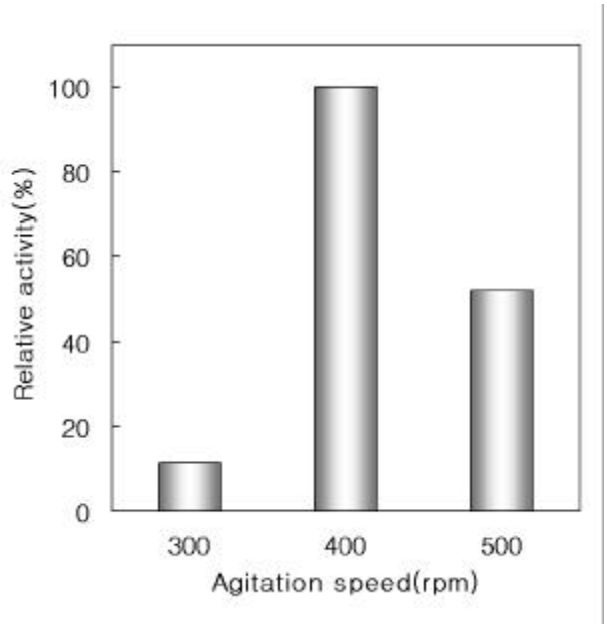

Fig. 2-6. Effect of agitation on the production of xylanase by *S. thermocyaneoviolaceus*. The culture conditions were the same as Fig. 2-5.

다. Xylanase **생산에 미치는 밀기울 농도의 영향**

Jar-fermentor **최적 배양조건에서 효소생산에 미치는 밀기울 농도에 대한 영향을 한번 더 조사하였다. 상기 실험에서 설정된 최적 조건인 통기량** 2 vvm, **교반속도** 400 rpm**에서 밀기울 농도를** 1, 2 **및** 3%**로 조정하여 효소 생산성을 조사하였다. 그 결과 플라스크 배양에서와는 달리** jar-fermentor **배양에서는** 2% **밀기울 농도에서 가장 많은 효소가 생산되었다**(**그림** 2-7).

Fig. 2-7. Effect of wheat bran concentration on the production of xylanases by *S. thermocyaneoviolaceus* at jar-fermentor incubation. The culture conditions were the same as Fig. 2-5 except basal medium which was composed of 0.06% yeast extract, 0.06% bactopeptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 and 0.2% K_2HPO_4(pH 7.0).

라. Xylanase 생산에 미치는 배양시간의 영향

*S. thermocyaneoviolaceus*를 상기 jar-fermentor 실험에서 설정된 효소생산 최적조건인 공기주입량 2 vvm, 교반속도 400 rpm으로 2% 밀기울을 첨가한 배지에서 배양하면서 배양시간에 따른 효소 생산성을 조사하였다. 그 결과 그림 2-8과 같이 24 시간 이상 배양시 배양액 ㎖당 14.2 unit의 효소생산을 보였다.

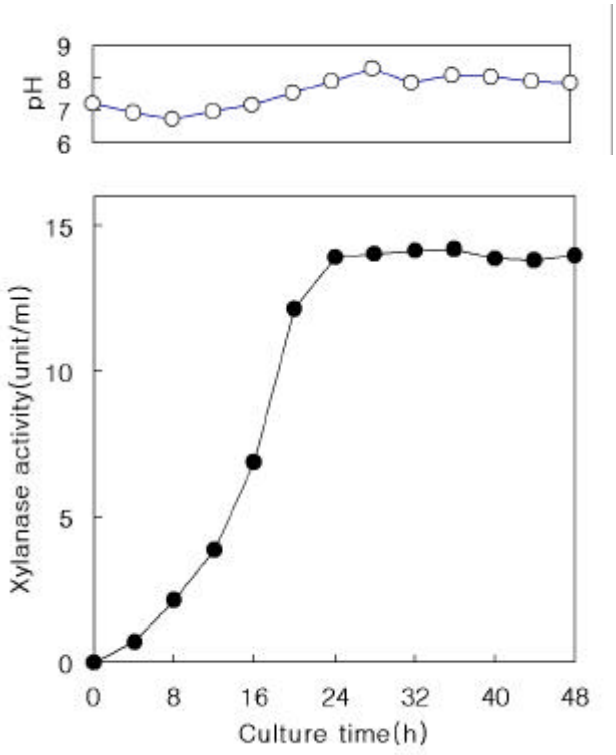

Fig. 2-8. Effect of culture time on the production of xylanase by *S. thermocyaneoviolaceus*. ○—○, pH; ●—●, xylanase activity. The bacteria were cultured at 50℃ for 48 h in WB medium containing 2% wheat bran.

제 5 절 *Streptomyces thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanase의 정제

1. 황산암모니아(ammonium sulfate) 분획침전

배양액 1ℓ를 탈지면으로 여과한 후 원심분리(12,000 rpm, 10 분)하여 얻은 상징액 약 800 ㎖를 황산암모니아로 50%되게 포화시킨 후 8 시간이상 방치하여 염석하였다. 염석용액을 12,000 rpm에서 30 분간 원심분리하여 침전물을 모았다. 이 침전물을 약 30 ㎖의 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.6)에 녹여 동일 완충액으로 2 시간마다 교환하면서 8 시간 이상 투석하여 조효소액으로 사용하였다. 이후 효소정제과정은 4℃에서 행하였으며, 본 균의 xylanase는 4℃에서 용액상태로 1 개월 이상 안정하게 활성을 유지하였다.

2. DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography

황산암모니아에 의한 염석 및 투석에서 얻어진 효소액 약 30 ㎖를 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.6)로 평형화한 DEAE Sephadex A-50 column(Φ 2.8 × 28 ㎝)에 loading하여 동일완충액으로 세척하여 비흡착단백질을 분리한 다음 흡착단백질 부분을 0.2 0.6 M의 NaCl 직선농도기울기로 시간당 40 ㎖의 유속으로 시험관당 10 ㎖씩 분획 용출하였다. 그 결과, 그림 2-9와 같이 흡착되지 않고 활성을 가지는 N1 피크 분획 및 N2 피크 분획과 NaCl 농도기울기로 용출시켰을 때 나오는 B 피크 분획을 얻었다. 이상 3개의 효소활성을 가진 피크 분획을 각각 모아서 -4℃에 보관하고 다음 정제과정에 사용하였다. 이 3 피크 분획의 효소중 N2 피크 분획은 배양시간이 24 시간 이상이면 효소활성이 급격히 감소하는 등 효소생산특성에 문제가 있었다. 그래서 본 실험에서는 배양시간에 관계없이 항상 효소활성이 높은 N1 피크 분획의 xylanase와 B 피크 분획의 xylanases의 정제를 시도하였다.

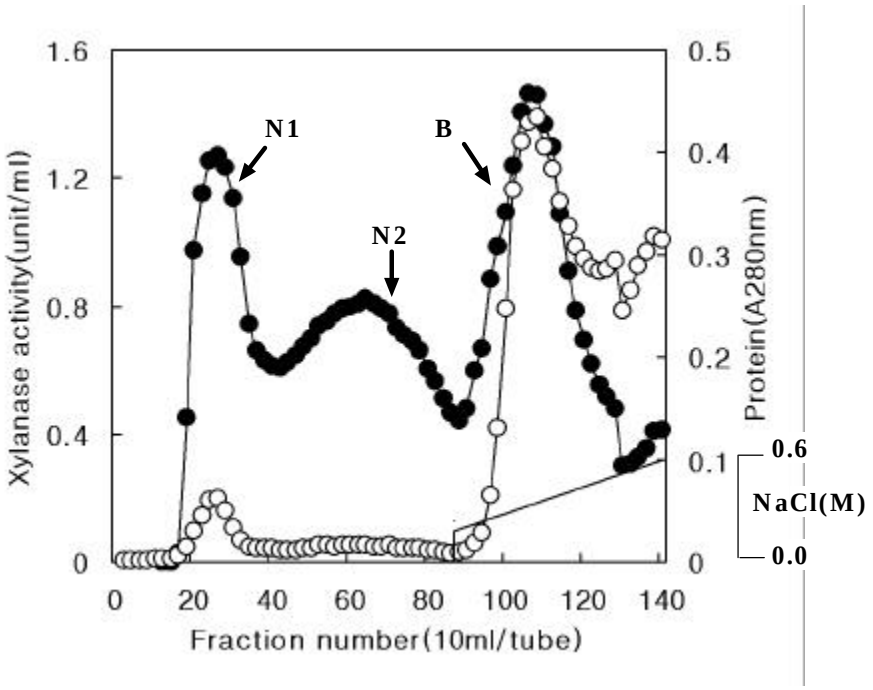

Fig. 2-9. DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography of xylanases in *S. thermocyaneoviolaceus*. DEAE Sephadex A-50 ion exchange column was equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.6). The enzymes were eluted with a linear gradient from 0.2 to 0.6 M NaCl in 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.6) at a flow rate of 40 mℓ/h and 10 mℓ/tube of fraction volume. ○—○, protein; ●—●, xylanase activity; ———, NaCl gradient.

3. Sephacryl S-200 HR gel chromatography

상기 과정(그림 2-9)에서 얻은 B 피크 효소 분획을 한외여과기(YM10 membrane, Amicon社)로 3 ㎖로 농축하여 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화한 Sephacryl S-200 HR column(Φ 1.6 × 80 ㎝)에 loading하여 시간당 10 ㎖의 유속으로 분획하였다. 그 결과, 그림 2-10과 같이 B1, B2 및 B3 피크의 3종의 효소로 분리되었다. 이들 효소를 각각 모아서 -4℃에 보관하고 다음 정제과정에 사용하였다.

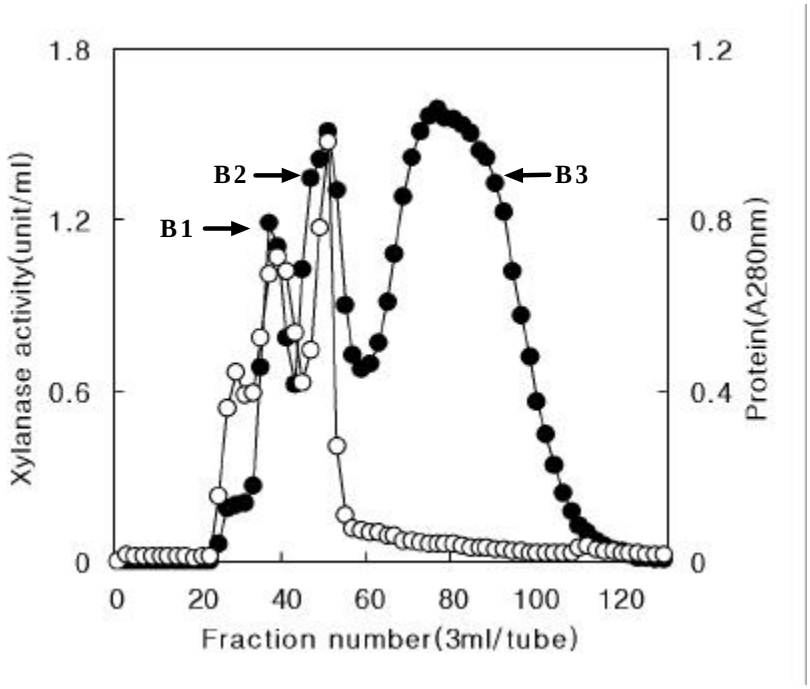

Fig. 2-10. Sephacryl S-200 HR gel chromatography of xylanases (B) in *S. thermocyaneoviolaceus*. Sephacryl S-200 HR gel was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The column was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 10 ㎖/h and 3 ㎖/tube of fraction volume. ○—○, protein; ●—●, xylanase activity.

4. Xylanase N1의 정제

그림 2-9에서 얻은 N1 피크 효소 분획을 한외여과기(YM10 membrane, Amicon社)로 3 ㎖로 농축하여 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화한 Sephacryl S-200 HR column(Φ 1.6 × 80 ㎝)에 loading하고 동일완충액으로 시간당 10 ㎖의 유속으로 분획당 3 ㎖씩 용출하였다. 그 결과, 그림 2-11과 같이 효소활성과 단백질농도가 일치하는 단일 피크를 얻었다. 이것을 SDS-PAGE로 효소순도를 검정하였을 때 단일 단백질로 정제된 것을 확인한 후 xylanase N1 효소의 효소학적 성질조사에 사용하였다.

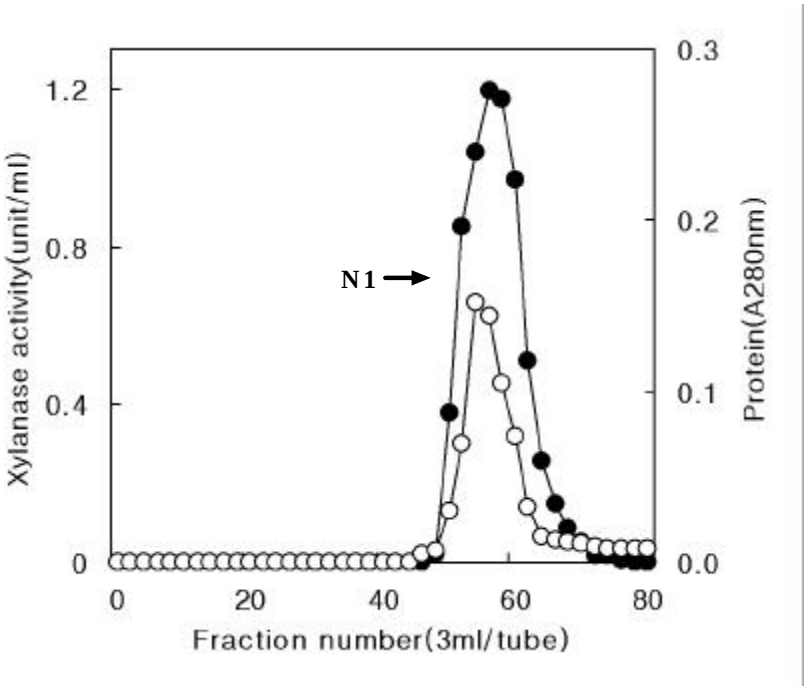

Fig. 2-11. Sephacryl S-200 HR gel chromatography of xylanase N1 in *S. thermocyaneoviolaceus*. Sephacryl S-200 HR gel was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The column was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 10 ㎖/h and 3 ㎖/tube of fraction volume. ○—○, protein; ●—●, xylanase activity.

5. Xylanase B1의 조정제

그림 2-10에서 얻은 B1 효소 분획을 한외여과기(YM10 membrane, Amicon社)로 3 ㎖로 농축하여 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화한 DEAE Sephadex A-50 column(Φ 2 × 35 ㎝)에 loading하여 동일완충액으로 세척하여 비흡착단백질을 분리한 다음 흡착단백질 부분을 NaCl 0 1 M의 직선농도기울기로 시간당 40 ㎖의 유속으로 시험관당 5 ㎖씩 분획 및 용출하였다. 그 결과, 그림 2-12와 같이 흡착되지 않고 용출되며 활성을 가지는 주분획을 모아서 -4℃에 보관하고 다음 정제과정에 사용하였다.

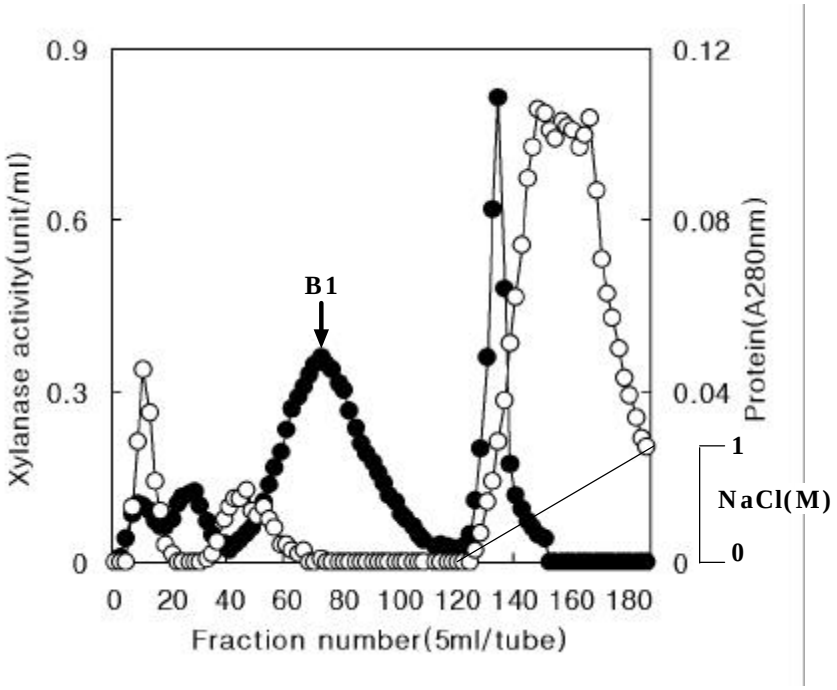

Fig. 2-12. DEAE Sephadex A-50 ion exchange column chromatography of xylanase B1 in *S. thermocyaneoviolaceus*. DEAE Sephadex A-50 ion exchange column was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The column was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 40 ㎖/h and 5 ㎖/tube of fraction volume. ○—○, protein; ●—●, xylanase activity; ———, NaCl gradient.

상기 실험(그림 2-12)에서 얻은 B1 효소 분획을 한외여과기(YM10 membrane, Amicon社)로 3 ㎖로 농축하여 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화한 FPLC(Pharmacia Biotech社)용 Superose 12 HR column에 loading하고 동일완충액으로 분당 0.5 ㎖의 유속으로 분획당 0.5 ㎖씩 용출하였다. 그 결과, 그림 2-13과 같이 단일 피크의 효소활성을 나타내는 단백질 분획을 얻었으나, SDS-PAGE 결과 major band 이외에 2개의 minor band를 가지고 있었다. 이 조효소 분획을 xylanase B1의 효소학적 성질조사에 사용하였다.

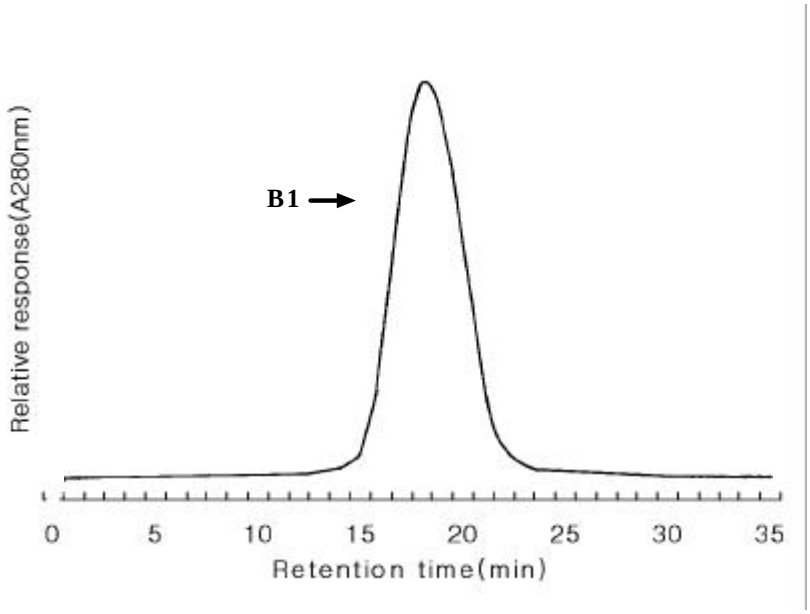

Fig. 2-13. FPLC with Superose 12 HR column of xylanase B1 in *S. thermocyaneoviolaceus*. Superose 12 HR column was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The column was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 0.5 ㎖/min and 0.5 ㎖/tube of fraction volume.

6. Xylanase B2의 정제

그림 2-10에서 얻은 B2 효소 분획을 한외여과기(YM10 membrane, Amicon社)로 3 ㎖로 농축하여 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화한 Sephacryl S-200 HR column(Φ 1.6 × 80 ㎝)에 loading하고 동일완충액으로 시간당 10 ㎖의 유속으로 분획당 2.1 ㎖씩 용출하였다. 그 결과, 그림 2-14와 같이 단일 피크의 효소활성을 나타내는 단백질 분획을 얻었다. 이를 SDS-PAGE로 효소의 순도를 검정하였을 때 단일 단백질로 정제된 것을 확인한 후 xylanase B2 효소의 효소학적 성질조사에 사용하였다.

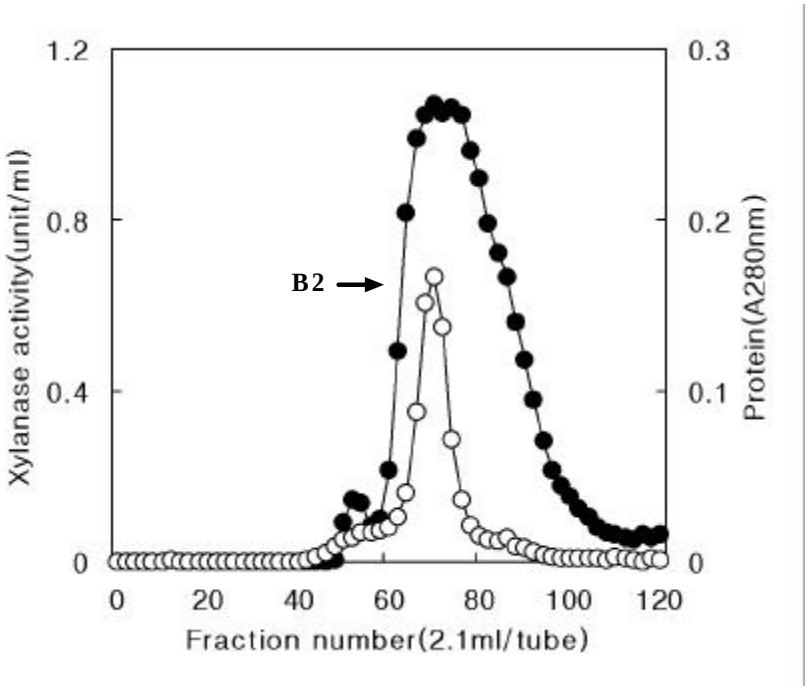

Fig. 2-14. Sephacryl S-200 HR gel chromatography of xylanase B2 in *S. thermocyaneoviolaceus*. Sephacryl S-200 HR gel was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The column was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 10 ㎖/h and 2.1 ㎖/tube of fraction volume. ○—○, protein; ●—●, xylanase activity.

7. Xylanase B3의 정제

그림 2-10에서 얻은 B3 효소 분획을 한외여과기(YM10 membrane, Amicon社)로 3 ㎖로 농축하여 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 평형화한 FPLC(Pharmacia Biotech社)용 Superose 12 HR column에 loading하고 동일완충액으로 분당 0.5 ㎖의 유속으로 분획당 0.5 ㎖씩 용출하였다. 그 결과, 그림 2-15와 같이 2개의 단백질 피크중 효소활성을 나타내는 1개의 단백질 분획을 얻었다. 이것을 SDS-PAGE로 효소순도를 검정하였을 때 단일 단백질로 정제된 것을 확인한 후 xylanase B3 효소의 효소학적 성질조사에 사용하였다.

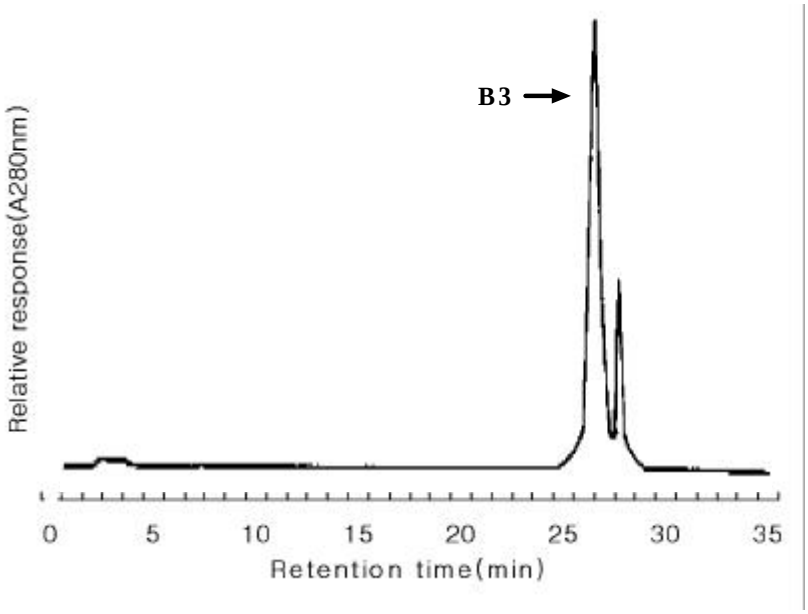

Fig. 2-15. FPLC with Superose 12 HR of xylanase B3 in *S. thermocyaneoviolaceus*. Superose 12 HR column was equilibrated with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0). The column was eluted with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0) at a flow rate of 0.5 ㎖/min and 0.5 ㎖ /tube of fraction volume.

8. 정제효소의 순도검정

상기의 정제과정을 거친 효소단백질이 단일단백질로 정제되었는가를 조사하기 위하여 SDS-PAGE로 확인한 결과, 그림 2-16과 같이 xylanase N1, B2 및 B3는 단일밴드를 형성하였고, xylanase B1은 주밴드와 2개의 작은 밴드를 나타내었다. Xylanase N1, B2 및 B3의 분자량을 표준마커(Sigma社, low range molecular calibration kit. catalog no. M3913)와 비교한 결과 그림 2-17과 같다. Xylanase N1의 분자량은 35 kDa, B2는 25 kDa, B3는 47 kDa으로 추정할 수 있었다.

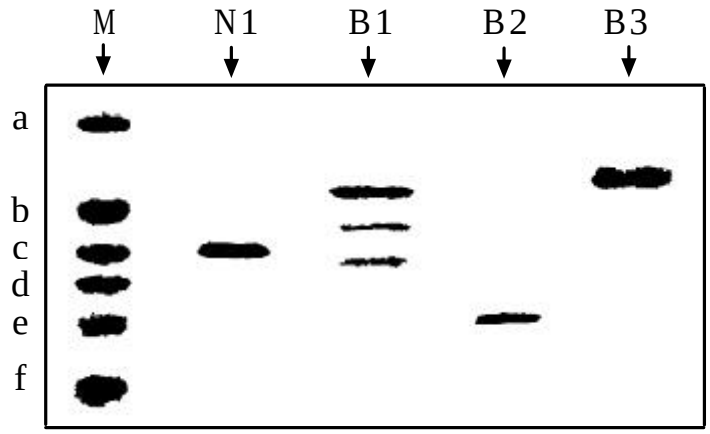

Fig. 2-16. Electrophoresis profile of xylanase N1, B1, B2 and B3 on SDS-PAGE. Protein were resolved on a 10% polyacrylamide gel. Lane M, molecular weight marker; N1, xylanase N1; B1, xylanase B1; B2, xylanase B2; B3, xylanase B3. a, bovine serium albumin(66 kDa); b, ovalbumin(45 kDa); c, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(36 kDa); d, carbonic anhydrase(29 kDa); e, trypsinogen(24 kDa); f, trypsin inhibitor(20 kDa).

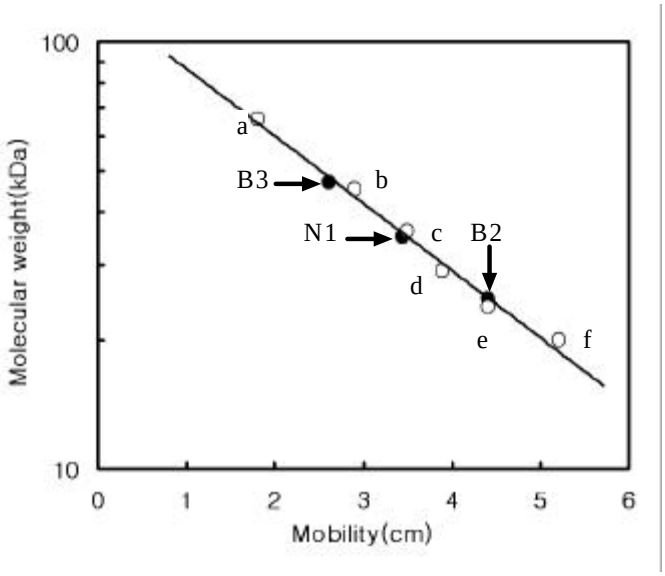

Fig. 2-17. Estimation of molecular weight of xylanase N1, B2 and B3 by SDS-PAGE. Symbols are the same as Fig. 2-16.

제 6 절 정제된 xylanases의 효소학적 성질

1. 효소의 작용 최적 pH

효소활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해서 pH 3.0 7.0은 100 mM citrate-phosphate buffer, pH 6.0 8.0은 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0 9.0은 100 mM Tris-HCl buffer 및 pH 8.5 10.5는 100 mM glycine-NaOH buffer로 pH 3.0에서 pH 10.5사이에서 pH를 조정한 다음 50℃에서 30 분간 반응후 효소활성을 측정하였다. 그 결과, 표 2-3과 같이 *S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase N1의 최적 pH는 100 mM citrate-phosphate buffer 사용영역의 pH 5.0 부근이었으며, B1, B2 및 B3 xylanase의 최적 pH는 각각 pH 5.0, 5.5 및 5.0으로 유사하였다.

2. 효소의 pH 안정성

효소의 pH 안정성을 조사하기 위해서 일정농도의 효소액에 pH 3.0 10.5 사이에서 위와 동일완충액을 첨가하여 각 pH별로 효소를 4℃에서 24 시간 방치한 후 각 효소의 최적 pH에서 50℃에서 30 분 반응후 효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 표 2-3과 같이, xylanase N1은 pH 4.5 10.5 사이에서 80% 이상의 활성을 유지하는 효소였으며, xylanase B1, B2 및 B3의 효소활성은 비교적 넓은 영역의 pH 3.5 10.5 사이에서 90% 이상의 활성을 유지하는 안정한 효소였다.

Table 2-3. Optimal pH and thermal stability of the purified xylanases.

	xylananse N1	xylanase B1	xylanase B2	xylanase B3
Optimal pH1	pH 5.0	pH 5.0	pH 5.5	pH 5.0
pH stability range2	pH 4.5 10.5 (80%)3	pH 3.5 10.5 (94%)3	pH 3.5 10.5 (91%)3	pH 3.5 10.5 (90%)3

1, The enzyme activity was measured in the standard reaction mixture for 30 min at 50℃.

2, The purified enzyme was incubated at 4℃ for 24 h in each pH of buffer solution. After the enzyme solution was adjust to optimal pH, the remaining activity was measured under the standard conditions.

3, The relative remaining activity of the indicated pH range of xylanases after 24 h at 4℃.

The buffers used: pH 3.0 7.0, 100 mM citrate-phosphate buffer; pH 6.0 8.0, 100 mM sodium phosphate buffer; pH 8.0 9.0, 100 mM Tris-HCl buffer; 9.0 10.5, 100 mM glycine-NaOH buffer.

3. 효소작용 최적온도

효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위해서 각 효소의 최적 pH에서 30 85℃ 범위에서 5℃ 간격으로 각 온도에서 30 분 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다. 그 결과, 그림 2-18과 같이 xylanase N1의 반응 최적온도는 65℃ 이었고, 50 70℃ 사이에서도 80% 이상의 효소활성을 나타내었다. Xylanase B1의 최적온도는 70℃이고, B2와 B3의 반응 최적온도는 65℃로 서로 동일하였다. *S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase중에서 B1이 가장 높은 최적온도를 가지고 있었으며, 70℃ 이상에서는 3종 모두 효소활성이 급격히 떨어졌다.

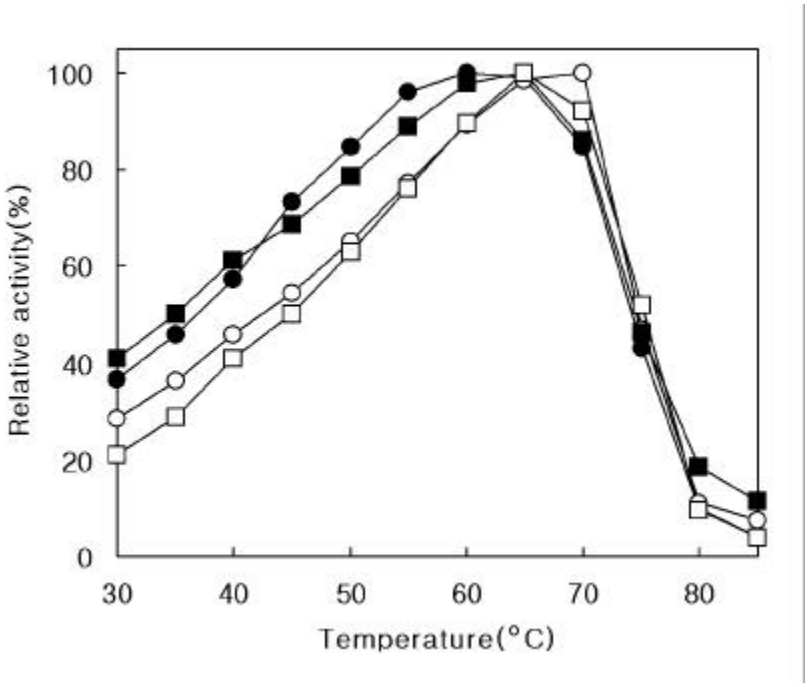

Fig. 2-18. Optimal temperature of purified xylanases. The enzyme activity was measured in the standard reaction mixture of the indicated temperature for 30 min at optimal pH. ●, xylanase N1; ○, xylanase B1; ■, xylanase B2; □, xylanase B3.

4. 효소의 열 안정성

효소의 열 안정성을 조사하기 위해서 각 효소별로 최적 pH의 100 mM citrate-phosphate buffer에서 효소를 녹여 각 온도에서 60 분간 방치한 후 65℃에서 30 분 반응시켜 효소의 잔존 활성을 측정하였다. 그 결과, 그림 2-19와 같이 xylanase N1은 비교적 높은 온도인 65℃까지도 95% 이상의 효소 활성을 유지하며 70℃에서 60 분간 열처리에서도 65% 이상의 활성을 유지하는 내열성 효소였다. Xylanase B1, B2 및 B3는 55℃까지 안정하였으며, 65℃에서 1 시간 처리에도 xylanase B1은 74%, xylanse B2와 B3는 80 %이상의 효소활성을 유지하였다. 그러므로 *S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase들중 내열성이 가장 높은 것은 xylanase N1이었다.

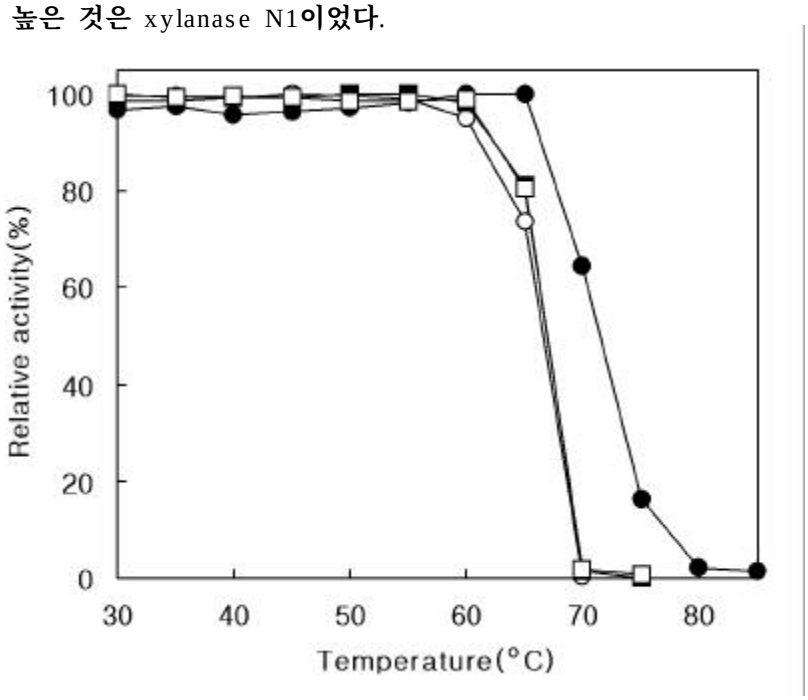

Fig. 2-19. Thermal stability of the purified xylanases. The purified enzymes were incubated in optimal pH of buffer solution for 60 min at each temperature. The remaining activity was measured for 30 min at 65℃. Symbols are the same as Fig. 2-18.

5. 기질농도의 영향

정제된 효소의 Km값은 65℃에서 기질로 birchwood xylan을 농도별로 가하고 각 정제효소 0.8 unit(최종농도)를 가한 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 5.5)를 사용한 반응용액(기질 0.4 ㎖, 효소액 0.2 ㎖, 완충액 0.2 ㎖)에서 측정하였다. Lineweaver-Burk plot한 결과 birchwood xylan에 대한 xylanase N1, B1, B2 및 B3의 Km 값은 각각 10.92, 2.15, 11.80 및 2.62 mg/㎖였으며, Vmax는 3.02, 0.71, 4.52 및 1.10 μmol/min으로 측정되었다(그림 2-20).

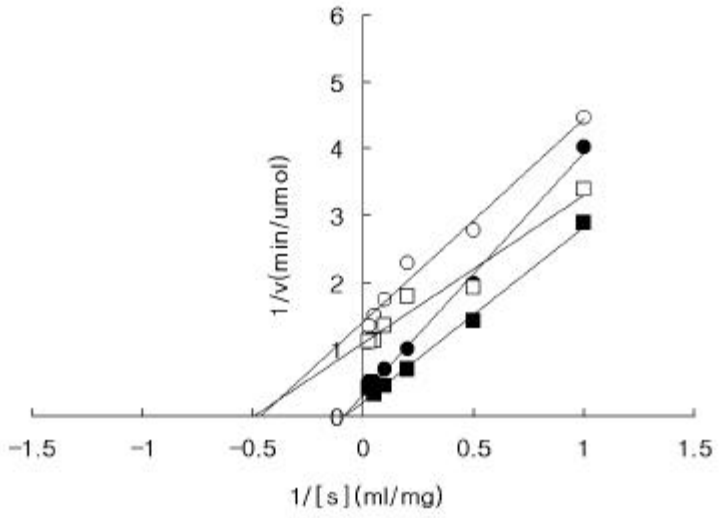

Fig. 2-20. Lineweaver-Burk plot of xylanase from *S. thermocyaneoviolaceus*. Symbols are the same as Fig. 2-18.

6. Xylanase binding assay

정제한 xylanase N1, B1, B2 및 B3를 사용하여 불용성 xylan 및 Avicel에 대한 binding assay를 실시하였다. 그 결과 그림 2-21에서 보는 바와 같이 xylanase N1은 100 ㎎/㎖의 불용성 xylan에 모든 효소가 결합하였으며,

xylanase B1은 50 ㎎/㎖의 불용성 xylan에 대해서 38%의 효소가 결합하는 것이 최대였으며, 불용성 xylan의 농도를 100 ㎎/㎖으로 높여도 더 이상 결합하지 않았다. Xylanase B2는 50 ㎎/㎖의 불용성 xylan에서 83%의 효소가 결합되었으며, 불용성 xylan의 농도를 100 ㎎/㎖로 증가시켜도 더 이상 결합하지 않았다. 또한 Xylanase B3를 사용하였을 때 75% 정도의 효소가 100 ㎎/㎖의 불용성 xylan에 결합하였다. 이와 같이 각각의 xylanase는 불용성 xylan에 대해서 각기 다른 binding 능력을 나타내었다. Avicel에 대한 binding assay를 행한 결과 xylanase N1은 100 ㎎/㎖의 Avicel에서 효소가 전부 결합하였다. Xylanase B3는 20% 정도의 효소가 Avicel에 결합하였으나 xylanase B1과 B2는 10% 이하로 Avicel에 대한 결합력이 아주 낮았다.

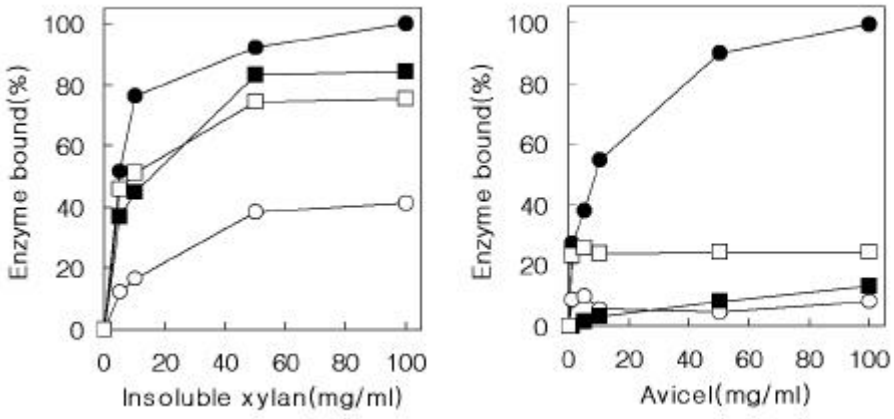

Fig. 2-21. Binding of xylanases to insoluble xylan and Avicel. Binding experiments were run by adding diluted enzyme(final conc. 1 unit/㎖) to the indicated amounts of insoluble xylan or Avicel in 1 ㎖ of 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 5.5) in 1.5 ㎖ Eppendorf tubes. Samples were incubated for 1 h at 60℃ with vortexing for 3 sec every 20 min and then centrifuged at 15,000 rpm for 5 min. The amount of enzyme remaining in the supernatant was determined by a xylanase activity assay. Symbols are the same as Fig. 2-18.

7. 효소작용에 의한 xylan 분해산물의 확인

*S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanase N1, B1, B2 및 B3로 birchwood xylan를 분해시켰을 때 xylooligo 당의 생성양상을 조사하였다. 100 mM citrate-phosphate buffer(pH 5.0)에 녹인 정제된 xylanase N1 용액(5 unit/㎖) 5 ㎖와 1% birchwood xylan용액 5 ㎖를 잘 혼합하여 60℃에서 시간별 반응시킨 후 TLC로 생성된 xylooligo 당을 확인하였다. 그 결과, 그림 2-22와 같이 1 시간 반응후 xylobiose(X2)와 xylotriose(X3)를 주로 생성할 뿐만 아니라 그 이상의 각종 xylooligo 당들도 생성하였다. 반응시간이 지남에 따라 xylan, xylohexaose(X6) 및 그 이상의 xylooligo 당의 양이 감소하면서 xylobiose, xylotriose 및 xylopentaose(X5)의 생성량이 증가함을 확인할 수 있었으며, 비교적 소량의 xylose도 생성됨을 확인할 수 있었다. 또한 HPLC로 분석한 결과 그림 2-23과 같이 TLC에서 확인된 결과와 같은 양상을 나타내었다. 반응 초기에는 xylobiose와 xylotriose를 주로 생성할 뿐만 아니라 소량의 xylose 및 xylotetraose(X4)이상의 xylooligo 당들도 생성하였다. 정제된 xylanase N1에 의해 생성된 xylooligo 당은 xylobiose와 xylotriose가 주생성물이었으며 이때 xylotriose(X3)의 양이 xylobiose(X2)보다 약간 더 많았다. 그러므로 *S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase N1은 분해양상을 보아 endoxylanase로 추정할 수가 있었다. *S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase 중 B1, B2 및 B3를 사용하여 효소별 최적 반응조건에서 birchwood xylan을 가수분해시켜 그 분해산물을 조사한 결과는 그림 2-24와 같다. Xylanase B1과 B3는 X2가 주된 생성물이며 X3를 상당량 함유하는 xylooligo 당을 생산하였으며 xylanase B2는 X3가 주된 생성물이며 X2와 X4를 상당량 함유하는 xylooligo 당을 생산하였다.

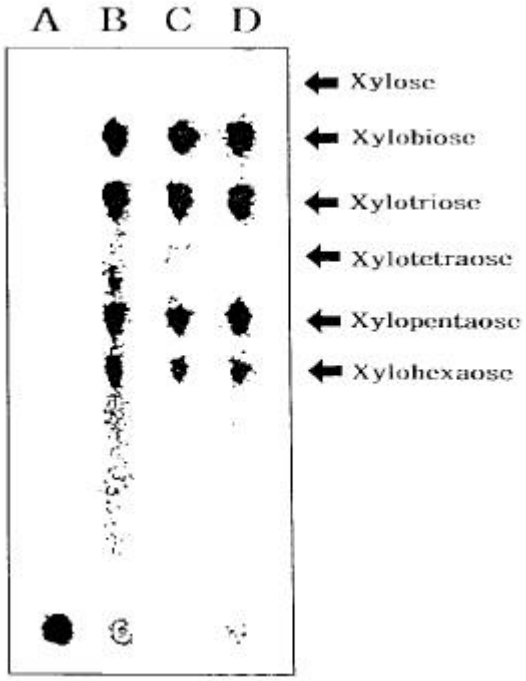

Fig. 2-22. TLC of hydrolyzates produced by the hydrolysis of birchwood xylan with the purified xylanase N1. The developing solvent was composed of 1-butanol : 2-propanol : water : acetate : acetonitrile(7 : 5 : 4 : 10 : 2, V/V/V/V/V). Sugar spots on the plate were detected by orcinol : sulfuric acid : methanol (0.2 : 10 : 90, W/V/V). Hydrolyzates of birchwood xylan were obtained after 0 h(lane A), 1 h(lane B), 4 h(lane C), and 6 h(lane D) incubation.

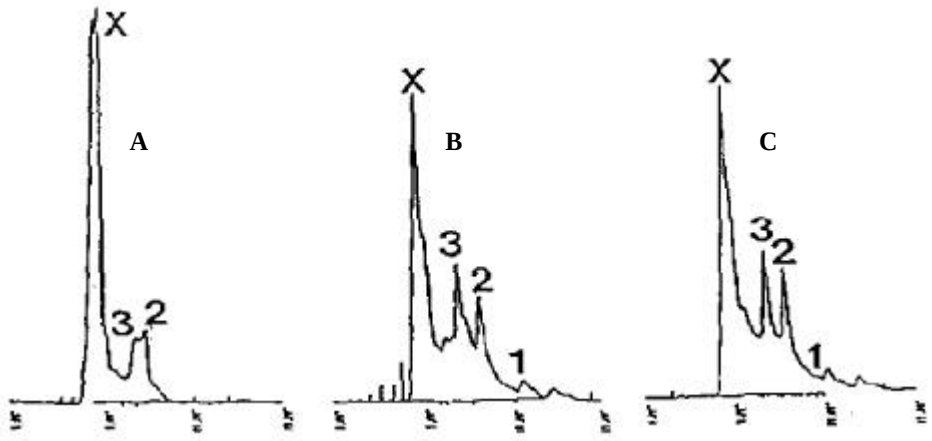

Fig. 2-23. HPLC of xylooligosaccharides produced by hydrolysis of birchwood xylan with the purified xylanase N1. hydrolyzates of birchwod xylan were obtained after 0 h(A), 4 h(B), and 6 h(C) incubation at 60℃. 1, xylose; 2, xylobiose; 3, xylotriose; X, soluble xylan and xylooligomer longer than xylohexaose.

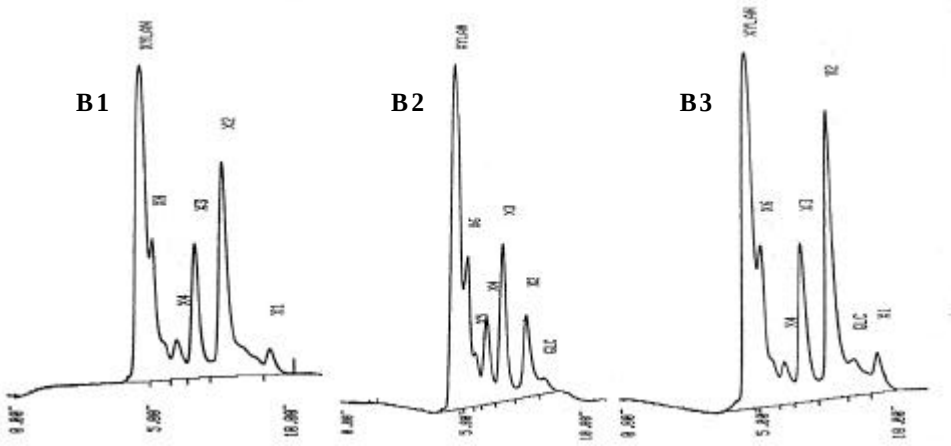

Fig. 2-24. HPLC of xylooligosaccharides produced by hydrolysis of birchwood xylan with the purified xylanase B1, B2 and B3. Birchwood xylan was hydrolyzed at 65℃ for 1 h. X1, xylose; X2, xylobiose; X3, xylotriose; XN, xylooligomer longer than xylohexaose.

8. 정제 xylanases에 의한 xylooligo 당의 분해특성

*S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanase N1, B1, B2 및 B3의 각종 xylooligo 당(X2 X6)에 대한 작용양상을 조사하였다. 이때 사용한 xylooligo 당은 Megazyme社로부터 구입하여 사용하였으며, 1% xylooligo 당 용액(50 mM citrate-phosphate buffer, pH 5.5) 10 ㎕에 xylanase의 최종농도가 1 unit/㎖ 되게 효소액를 가하여 최종반응액을 100 ㎕로 하여 60℃에서 12 시간 반응시키고 생성된 당을 TLC를 이용하여 분석하였다. 그 결과 그림 2-25와 같이 xylanase N1, B1, B2 및 B3는 xylobiose를 기질로 사용하였을 때 전혀 분해하지 못하였는데 이는 β-xylosidase의 활성이 없음을 의미한다. 또한 xylotriose(X3)를 기질로 사용하였을 때, xylanase N1은 전혀 분해하지 못하였으며, xylanase B1, B2와 B3는 약하게 작용하여 소량의 xylose와 xylobiose(X2)를 생성하고 많은 양의 X3를 남겼다. Xylotetraose(X4)를 기질로 반응을 시켰을 때 xylanase N1은 거의 분해하지 못하였으며, xylanase B1, B2 및 B3는 대부분의 X4를 분해하여 X2를 주된 분해산물로 생성하고, 미량의 xylose와 X3를 생성하였다. Xylopentaose(X5)를 기질로 사용하였을 경우에는 xylanase N1은 X2, X3를 소량 생성하였고 다량의 미분해 X5와 특이하게 X5보다 더 긴 올리고당을 소량 생성하였다. Xylanase B1, B2 및 B3는 X5를 분해하여 주된 산물로 X2를 생성하였으며 소량의 xylose와 xylotriose를 생성하였다. 이상의 결과를 종합하면 표 2-4와 같다.

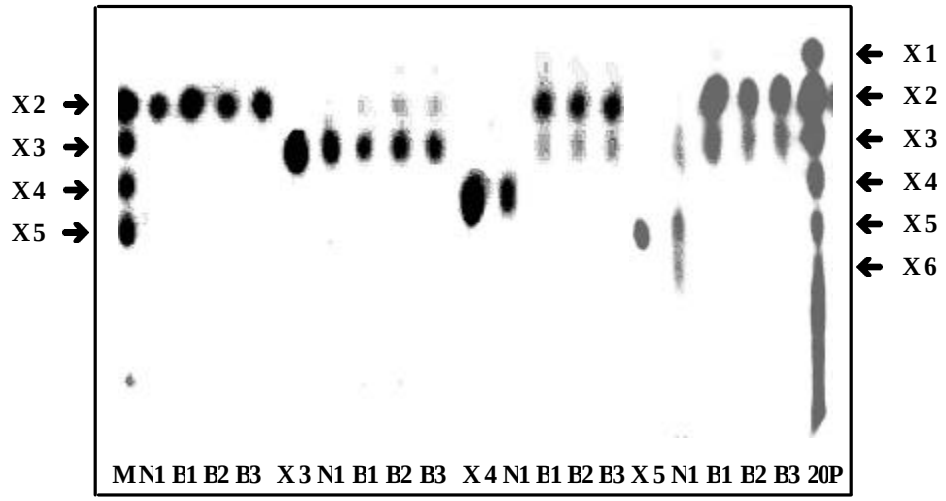

Fig. 2-25. TLC analysis of hydrolyzates of xylooligosaccharides(X2 X5) by the purified xylanases of *S. thermocyaneoviolaceus*. The reaction mixture was consist of 10 μℓ of 1% xylooligosaccharides and 90 μℓ of enzyme solution(final 1 unit/mℓ) in 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 5.5). The reaction mixture were incubated at 60℃ for 12 h. Symbol; M, marker of Megazyme; N1, xylanase N1; B1, xylanase B1; B2, xylanase B2, B3, xylanase B3, 20P, Suntory xylooligosaccharides(20P). X3, X4 and X5 mean reaction mixtures without enzyme.

Table 2-4. Hydrolysis of xylooligosaccharides from X2 to X5 by the purified xylanase N1, B1, B2 and B3.

	X2	X3	X4	X5
Xylanase N1	−	−	−	+
Xylanase B1	−	+	++	++
Xylanase B2	−	+	++	++
Xylanase B3	−	+	++	++

The data were estimated from the result of Fig. 2-25. −, no hydrolysis; +, weak hydrolysis; ++, active hydrolysis.

9. 정제효소의 아미노말단 아미노산 서열결정

정제된 효소 xylanase N1과 B3의 아미노말단 아미노산 서열은 최종적으로 정제된 효소액을 초순수로 투석하여 기초과학지원연구소 부산분소에 의뢰하여 분석하였다. Protein sequence 476(ABI社)을 사용하였으며 HPLC는 dual microbe syringe system을 이용하여서 deuterium lamp로 190 370 nm에서 분석하였으며, 이때 column은 PTH analysis column(Φ 2.1 ×220 ㎜)을 사용하였다. 아미노산 서열은 Hunkapiller와 Hood의 방법(1983)에 따라 gradient elution하여 결정하였다. 정제된 xylanase N1과 B3의 아미노 말단으로부터 아미노산 잔기의 서열을 분석해 본 결과는 각각 그림 2-26과 그림 2-27과 같았다. Xylanase N1은 아미노 말단이 aspartic acid 잔기이고, 아미노 말단으로부터 15개 아미노산 잔기의 서열(DTITSNQTGTHNGYF)을 밝혔으며, xylanase B3는 아미노 말단이 alanine 잔기이고, 아미노 말단으로부터 10개 아미노산 잔기의 서열(AESTLGAAAA)을 밝힐 수 있었다. EMBL(European Molecular Biology Laboratory)의 protein peptide databases에서 peptide search program(Fasta3)으로 지금까지 밝혀진 xylanase와 상동성을 비교해 본 결과, *S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanase N1은 *S. thermoviloaceus*가 생산하는 xylanase인 StxⅡ와 100%, *Clostridium thermocellum*이 생산하는 xylanase인 XynA와 92%, *Cellulomonas fimi*가 생산하는 xylanase인 XynD와 77%, *Bacillus* sp.가 생산하는 xylanase인 XynY와 75%, *Chaetomium gracile*이 생산하는 xylanase인 CgxB와 71%의 상동성을 나타내었다. *S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanase B3는 *S. thermoviloaceus*가 생산하는 xylanase인 StxⅠ, *S. coelicolor*가 생산하는 xylanase인 XlnA, *S. lividans*가 생산하는 xylanase인 XlnA, *S. avermitilis*가 생산하는 xylanase인 Xyl30 및 *Actinomadura* sp.가 생산하는 xylanase인 XylⅡ와 모두 100% 상동성을 나타내었다.

xylanase N1	D T I T S N Q T G T H N G Y F
Stx II	D T I T S N Q T G T H N G Y F
XynA	V V I T S N Q T G T H G G Y N
XynD	A A V T S N T T G T H D G Y F
XynY	A A I T S N E I G T H D G Y F
CgxB	Q T L T S S Q T G T N N G Y F

Fig. 2-26. Amino terminal amino acid sequence of xylanase N1. Xylanase N1, xylanase N1 of *S. thermocyaneoviolaceus*; Stx II, xylanase Stx II of *S. thermoviloaceus*; XynA, xylanase XynA of *Clostridium thermocellum*; XynD, xylanase XynD of *Cellulomonas fimi* ; XynY, xylanase XynY of *Bacillus* sp.; CgxB, xylanase CgxB of *Chaetomium gracile*.

xylanase B3	A E S T L G A A A A
Stx I	A E S T L G A A A A
XlnA	A E S T L G A A A A
XlnA'	A E S T L G A A A A
Xyl30	A E S T L G A A A A
Xyl II	A E S T L G A A A A

Fig. 2-27. Amino terminal amino acid sequence of xylanase B3. B3, xylanase B3 of *S. thermocyaneoviolaceus*; Stx I, xylanase Stx I of *S. thermoviloaceus*; XlnA, xylanase XlnA of *S. coelicolor*; XlnA', xylanase XlnA of *S. lividans*; XylL30, xylanase Xyl30 of *S. avermitilis*; Xyl II, xylanase Xyl II of *Actinomadura* sp..

제 7 절 Xylanase 유전자의 클로닝 및 증폭생산

1. Xylanase 유전자의 클로닝

가. *S. thermocyaneoviolaceus* genomic DNA library의 제작

*S. thermocyaneoviolaceus*로부터 xylanase 유전자를 클로닝하기 위해서 먼저 genomic DNA를 분리하였다. 배양된 세포를 집균하여 TEG buffer(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM glucose)에 현탁한 후 lysozyme 처리를 하고 70℃에서 60 분간 10% SDS를 가하여 lysis시킨 후, PCI, RNase, Proteinase K 등으로 정제하여 최종적으로 TE buffer(25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM EDTA)에 현탁하여 순도검정후 실험에 사용하였다. 분리된 genomic DNA는 제한효소 Sau3AⅠ으로 부분분해하여 이중에서 12 20 kb에 해당하는 부분을 sucrose density gradient 법으로 분획하였다. 분획된 DNA를 λBlueSTAR BamHⅠ digested, dephosphorylated arms(Novagen. catalogue no. 69245-3)에 연결하고, 연결된 DNA를 in vitro packaging하여 titer를 확인한 후, 확인된 genomic DNA library를 증폭하여 -70℃에 보관하며 사용하였다.

나. 방선균 xylanase 유전자의 보존적 부위를 이용한 PCR primer의 설계 및 PCR을 통한 probe DNA의 제작

*S. thermocyaneoviolaceus*로부터 정제한 xylanase의 유전자를 클로닝할 목적으로 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 probe DNA를 제작하였다. DEAE Sephadex A-50 ion exchanger, Sephacryl S-200 HR gel chromatography 및 Superose 12HR column을 이용한 FPLC로 정제한 xylanase B3 효소의 유전자(본연구에서 이 유전자를 *xyn*A로 명명함)의

primer 합성을 위하여 이미 발표된 문헌에서 유사한 성질을 가지는 xylanase의 유전자에 상당하는 *S. lividans*의 *xln*A 및 *S. thermoviolaceus*의 *stx* Ⅰ의 염기서열을 비교하여 consensus 부위를 중심으로 primer를 합성하였다(그림 2-28). DEAE Sephadex A-50 ion exchanger 및 Sephacryl S-200 HR gel chromatography를 이용하여 정제한 xylanase N1(본연구에서 이 유전자를 *xyn*B라고 명명함)의 효소특성을 조사한 결과 S. *lividans*의 *xln*B 및 *S. thermoviolaceus*의 *stx*Ⅱ의 xylanase와 유사한 성질을 가지는 것으로 확인되어 이들의 염기서열을 상호 비교하여 consensus 부위를 바탕으로 primer를 합성하였다(그림 2-29). 이들 *xyn*A와 *xyn*B 유전자에서의 4가지 primer들을 조합하여 PCR을 행하였을 때 예상되는 PCR 단편의 크기는 표 2-5와 같다. PCR은 template DNA로 *S. thermocyaneoviolaceus* genomic DNA 10 ng을 사용하였고 각각 100 pmol의 forward primer(primer U, IU 및 G1, G3)와 reverse primer(primer D, ID 및 G2, G4)를 사용하여 total volume을 100 μℓ로 하여 PCR을 행하였다. 반응은 denaturation을 위하여 96℃에서 12 분, annealing을 위하여 55℃에서 5 분간 처리하고, 이 때 5 unit의 Taq polymerase를 첨가하고 extention을 위하여 72℃에서 2 분간으로 1 cycle을 마친 다음 94℃ 2 분, 55℃ 2 분, 72℃ 2 분간의 반응을 30 cycle 실시하였다. 각 유전자에 대하여 4가지의 조합된 primer로 증폭한 결과 *xyn*A 유전자에 대한 PCR에서 예상한 크기의 band들을 agarose gel상에서 확인할 수 있었으며(그림 2-30A), *xyn*B 유전자에 대한 PCR에서도 예상한 크기의 PCR product들을 얻을 수 있었다(그림 2-30B). 이러한 결과는 방선균 xylanase 유전자들 간의 높은 상동성을 가지는 것으로 생각되어, 이들 PCR product를 클로닝을 위한 probe로 사용하였다.

StxI-St MGSHALPRPALRQRIRGGCGRGRGVLGLGAT-LSTPPTAHAAESTLGAAAAQSGRYFGTA
XlnA-Sl MGSYALPRSGVRRSIRVLLLALVVGVLGTATALIAPPGAHAAESTLGAAAAQSGRYFGTA

IAAGRLSDSTYTSIASREFNMVTAENEMKIDATEPQRGQFDFSAGDRVYNWAVQNGKEVR
IASGRLSDSTYTSIAGREFNMVTAENEMKIDATEPQRGQFNFSSADRVYNWAVQNGKQVR
pri-U pri-IU
GHTLAWHSQQPYWMQSLSGSDLRQAMIDHINGVMNHYKGKIAQWDVVNEAFEDGNSGARR
GHTLAWHSQQPGWMQSLSGSALRQAMIDHINGVMAHYKGKIVQWDVVNEAFADGSSGARR

DSNLQRTGNDWIEVAFRTARAADPSAKLCYNDYNIENWTWAKTQAVYNMVRDFKQRGVPI
DSNLQRSGNDWIEVAFRTARAADPSAKLCYNDYNVENWTWAKTQAMYNMVRDFKQRGVPI

DCVGFQSHFNSGSPYDSNFRTTLQSFAALGVDVAITELDIQGASPTTYANVVNDCLAVSR
DCVGFQSHFNSGSPYNSNFRTTLQNFAALGVDVAITELDIQGAPASTYANVTNDCLAVSR
pri-ID
CLGITVWGVRDTDSWRSGDTPLLFNGDGSKKPAYSAVLDALNGGSSGEPPEDGGSGQIKN
CLGITVWGVRDSDSWRSEQTPLLFNNDGSKKAAYTAVLDALNGGDSSEPPADGG--QIKG
pri-D
AASGRCLDVSGAGTADGTAVQLYDCHGGTNQQWTYTDAGEFRVYGNKCLDAGGTGNGTRV
VGSGRCLDVPDASTSDGTQLQLWDCHSGTNQQWAATDAGELRVYGDKCLDAAGTSNGSKV

QIYSCWGGDNQKWRVNSDGTIVGVQSGLCLDAA--GTGNSTPVQLYTCSYADNQRWTVS
QIYSCWGGDNQKWRLNSDGSVVGVQSGLCLDAVGNGTANGTLIQLYTCSNGSNQRWTRT

Primers	Sequence(5'→3')
Forward primers	
pri-U(30mer)	GGAATTCAGCGACTCGACGTACACGTCGAT
pri-IU(20mer)	AGAACGAGATGAAGATCGAC
Reverse primers	
pri-D(30mer)	GGAATTCTTGCTGCCGTCGCCGTTGAACAG
pri-ID(20mer)	TGCAGGGTGGTGCGGAAGTT

Fig. 2-28 . Oligonucleotide primers for *xyn*A gene isolation deduced from amino acid sequence of *Streptomyces* xylanase. StxI-St, *S. thermoviolaceus*(Tsujibo *et al*); XlnA-Sl, *S. lividans*(Shareck *et al*).

StxII-St MNTLVHPQGRAGGLR-LLVRAAWALALAALAAMMFGGTARADTI-TSNQTIGTHNGYFYSF
XlnB-Sl MNLLVQPRRRRRRGPVILLVRSAWAVALAALAALMLPGTAQADTVVTTNQEGTNNGYYYSF

pri-G1

WIDAPGTVTMNTGAGGNYSTQWSNTGNFVAGKGWATGGRRTVTYSGTFNPSGNAYLALYG
WIDSQGTVSMNMGSGGQYSTSWRNTGNFVAGKGWANGGRRTVQYSGSFNPSGNAYLALYG

pri-G3

WSQNPLVEYYIVENWGTYRPTGTYKGTVYSDGGTYDIYMTTRYNAPSIEGTKTFNQYWSV
WTSNPLVEYYIVENWGTYRPTGEYKGTVTSDGGTYDIYKTTRVNKPSVEGTRTFDQYWSV

RQNKRTGGTITTGNHFDAWAAHGMPLGTFN-YMILATEGYQSSG-SSNITVGDSGGDNGG
RQSKRTGGTITTGNHFDAWARAGMPLGNFSYYMIMATEGYQSSGTSSINVGGTGGGDSGG

pri-G4

GGGGGGGGGNTGGCTATLSAGEQWSDRYNLNVSVSGSDNWTVTMRVPAPEKVMATWNVTA
GDNGGGG----GGCTATVSAGQKWGDRYNLDVSVSGASDWTVTMNVPSPAKVLSNWNVNA

SYPDAQTLVARPNGNGNNWGVTIQKNGSTTWPTVSCSVG
SYPSAQTLTARLNGSGNNWGATIQANANWTWPSVSCSAG

pri-G2

Primers	Sequence (5'→3')
Forward primers	
pri-G1(30mer)	GGAATTCACAACGGCTACTTCTACTCGTTC
pri-G3(27mer)	GGAATTCAGCAACACCGGCAACTTCGT
Reverse primers	
pri-G2(30mer)	GGAATTCCCCCAGTTGTTGCCGTTGCCGTT
pri-G4(27mer)	GAATTCCTGCTCTGGTAGCCCTCGGT

Fig. 2-29 . Oligonucleotide primers for *xyn*B gene isolation deduced from amino acid sequence of *Streptomyces* xylanase. StxII-St, *S. thermoviolaceus*(Tsujibo *et al*); XlnB-Sl, *S. lividans*(Shareck *et al*).

Table 2-5. Expected size of PCR products synthetized from *xyn*A and *xyn*B genes by using the primers

Gene	Primers combination	Expected size of PCR fragments*
xynA	primer U - D	786
	primer U - ID	595
	primer IU - ID	538
	primer IU - D	739
xynB	primer G1 - G2	726
	primer G1 - G4	429
	primer G3 - G4	333
	primer G3 - G2	630

*, Estimated from *stx* **I** (*xln*A) and *stx* **II** (*xln*B) genes of *S. thermoviolaceus*(*S. lividans)*

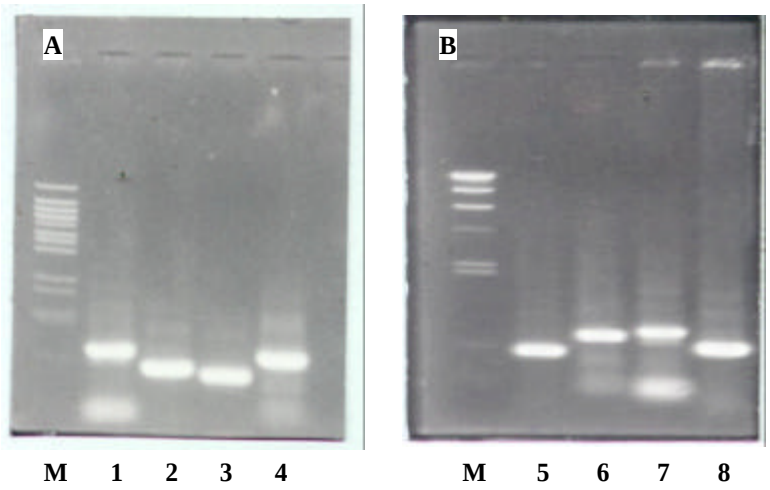

Fig. 2-30. PCR products of *S. thermocyaneoviolaceus xyn*A(A) and *xyn*B(B) gene using the primers. A: Lane M, λDNA/BstE**II**; lane 1, PCR product from primer U and D; lane 2, primer U and ID; lane 3, primer IU and ID; lane 4, primer IU and D; B: Lane M, λDNA/Hind**III**; lane 5, primer G3 and G4; lane 6, primer G1 and G4; lane 7, primer G1 and G2; lane 8, primer G1 and G4.

다. Plaque hybridization을 통한 *S. thermocyaneoviolaceus xyn*A 및 *xyn*B 유전자의 클로닝

앞서 제작한 *S. thermocyaneoviolaceus* genomic DNA library로부터 bacteriophage를 plate당 1만 plaque 이상이 되게 plating하여 *xyn*A와 *xyn*B 유전자를 함유하는 클론을 선별하고자 plaque hybridization하였다. Probe DNA로는 각각 *xyn*A 및 *xyn*B primer set로부터 증폭한 PCR product를 사용하였다. *xyn*A primer(primer U-D)로부터 증폭한 PCR 단편을 probe로 사용하였을 때 3개의 signal을 나타내는 클론을 얻었다(그림 2-31A). 또 동일한 plate로 행한 *xyn*B probe(primer G1-G2)에 대해서도 7개의 signal이 발견되었으나(그림 2-31B), *xyn*A 및 *xyn*B의 signal이 서로 겹치지는 않았다. Signal을 나타낸 11개의 plaque들은 각각 2차 증폭하여 plaque hybridization함으로써 순수 클론들을 분리하였고, 이들이 함유하고 있는 insert DNA를 λBlueSTAR의 *cre-lox*P mediated auto-subcloning system을 이용하여 plasmid 형태로 subcloning하였다. 이 subcloning된 재조합 플라스미드들은 숙주인 BM25.8내에서 복제가 비효율적으로 진행되므로 이 재조합 플라스미드를 추출하여 대장균 DH5α에 다시 형질전환시켰다. 이 대장균 DH5α를 host로한 11종의 plasmid들의 xylanase 발현 여부를 알기 위하여 RBB-xylan plate(0.1% remazol brilliant blue R D-xylan을 함유한 XM agar plate)에서 xylan 분해환의 형성을 조사하여, 뚜렷한 분해환을 나타내는 2종의 클론을 선별하고, 이들 중 *xyn*A probe에 대하여 signal을 보이는 insert DNA가 들어있는 재조합 플라스미드를 pSMA4(그림 2-34)로, *xyn*B probe에 대하여 signal을 보이는 insert DNA가 들어있는 재조합 플라스미드를 pSMB8(그림 2-35)으로 명명하고 insert DNA의 크기를 확인한 결과 각각 15 kb 및 12 kb로 나타났으며, 이들을 *S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase 유전자의 클론으로 추정하고 다음 실험에 사용하였다.

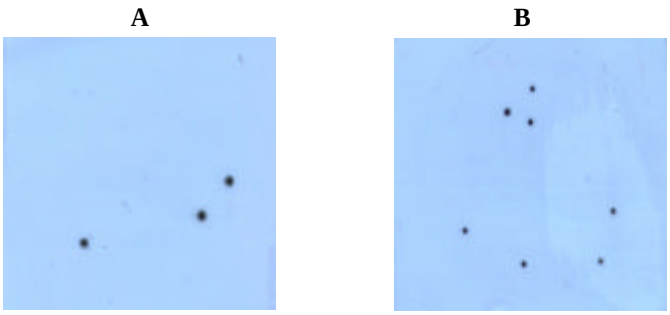

Fig. 2-31. Plaque hybridization of *S. thermocyaneoviolaceus* genomic DNA library with PCR fragment of *xyn*A(A) and *xyn*B(B) gene as a probe DNA.

라. Southern hybridization**을 이용한** subcloning

클로닝된 pSMA4(*xyn*A) **및** pSMB8(*xyn*B)**을 각종 제한효소로 절단하여** plaque hybridization**에 사용한 동일한** probe DNA**를 가지고** southern hybridization**을 수행한 결과** *xyn*A PCR probe**에 대해서** pSMA4(*xyn*A)**를 제한효소** Sph Ⅰ**으로 절단하였을 경우** 2.7 kb **크기의** band**에서 단일** signal**이 확인되었다(그림** 2-32**의** lane f). **이 단편에** *xyn*A **전체 유전자가 온전히 들어있는 지를 알아보기 위하여** pUC119**에** 2.7 kb **크기의** Sph Ⅰ **단편을** subcloning**하여** pUMA2(**그림** 2-34)**라고 명명하고** RBB-xylan plate**에서 발현여부를 조사한 결과 뚜렷한 분해환을 형성하였으므로** 2.7 kb **단편안에는** *xyn*A **유전자가 모두 들어있는 것으로 추정되었다**.

*xyn*B **유전자의 클론인** pSMB8**도 역시 같은 방법으로 각종 제한효소로 절단하여** 1% agarose **젤 전기영동후** *xyn*B PCR probe**로** Southern hybridization**한 결과, 제한효소** BamH Ⅰ**으로 절단한 실험구에서** 3.3 kb **크기의** band**에서 단일** signal**이 확인되었다(그림** 2-33**의** lane a). **이** 3.3 kb **크기의** BamH Ⅰ **단편을** pWHM3**에** subcloning**하여** pWMB81**이라고 명명하고(그림** 2-35), RBB-xylan plate**에서 발현여부를 조사한 결과 뚜렷한 분해환을 형성하였으므로** pUMA2**의 경우와 같이** 3.3 kb **크기의** BamH Ⅰ **단편에는** *xyn*B **유전자가 온전하게 들어있는 것으로 추정되었다. 이와 같이 방선균의** *xyn*A **및** *xyn*B **유전자는 대장균의 전사 및 번역 메카니즘을 이용하여 정상발현함을 알 수 있었다**.

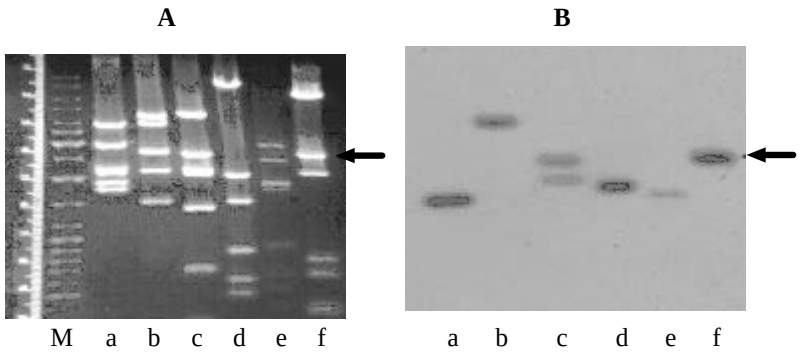

Fig. 2-32. Southern blot analysis for subcloning of *xyn*A. pSMA4 was digested with various restriction enzymes and hybridized with ^{32}P-labelled *xyn*A probe. A: 1.0% agarose gel electrophoresis of enzyme digested pSMA4; lane M, DNA marker; lane a, 1 μg of BamH I digested pSMA4; lane b, Nco I; lane c, Pst I; lane d, Pvu II; lane e, Sma I; lane f, Sph I. B: Hybridization analysis of the southern transfer from the gel A

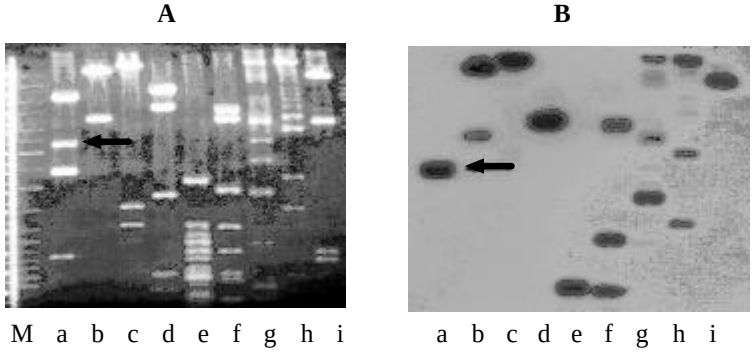

Fig. 2-33. Southern blot analysis for subcloning of *xyn*B. pSMB8 was digested with various restriction enzymes and hybridized with ^{32}P-labelled *xyn*B probe. A: 1.0% agarose gel electrophoresis of enzyme digested pSMB8; lane M, DNA marker; lane a, 1 μg of BamH I digested pSMB8; lane b, Bgl II; lane c, Kpn I; lane d, Pst I; lane e, Sac II; lane f, Sal I; lane g, Sma I; lane h, Sph I; lane i, Xho I. B: Hybridization analysis of the southern transfer from the gel A

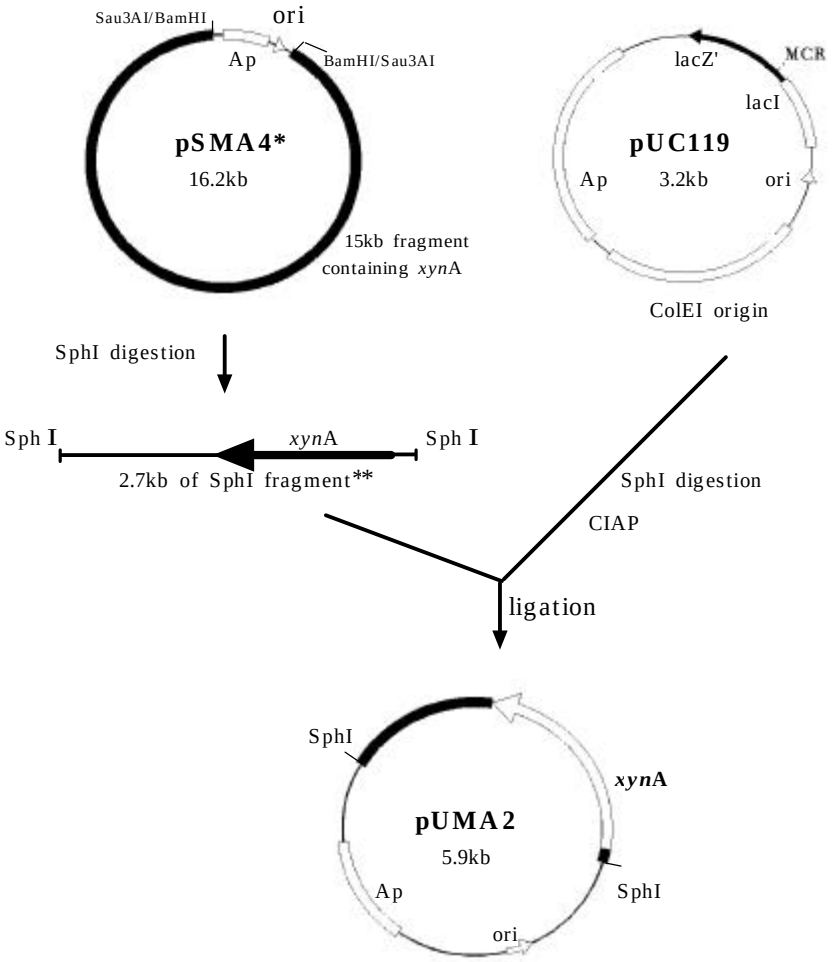

Fig. 2-34. Construction of pUMA2. *, pSMA4 was created by *cre-lox*P mediated auto-subcloning system from λBlueSTAR containing *xyn*A gene in 15 kb fragment. **, 2.7 kb of SphI fragment had a signal of *xyn*A probe in southern hybridization.

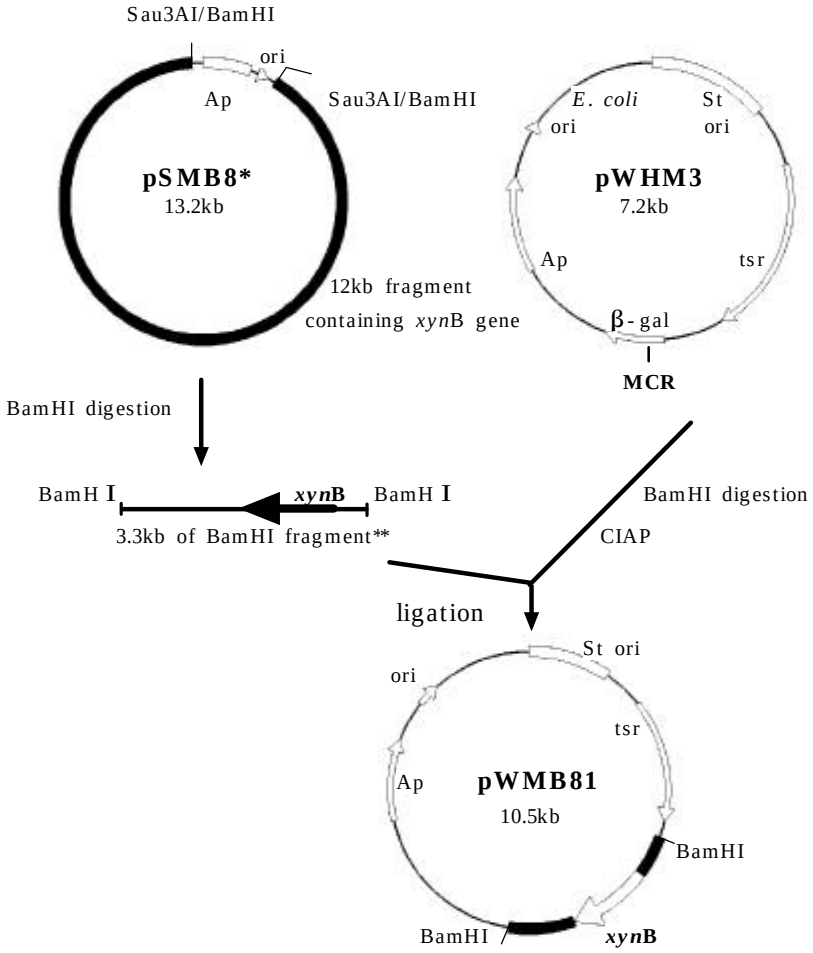

Fig. 2-35. Construction of pWMB81. *, pSMB8 was created by *cre-lox*P mediated auto-subcloning system from λBlueSTAR containing *xyn*B gene in 12 kb fragment. **, 3.3 kb of BamHI fragment had a signal of *xyn*B probe in southern hybridization

마. *S. thermocyaneoviolaceus xyn*A **및** *xyn*B gene**의 염기서열분석**.

클로닝된 *S. thermocyaneoviolaceus xyn*A **유전자의 염기서열분석을 위하여** pUMA2(**그림** 2-34)**에 함유된** 2.7 kb **크기의** Sph Ⅰ **단편을 또다시 약** 500 bp **내외의 짧은 단편으로 절단하여** pUC119**에** subcloning(**그림** 2-36)**하고** DNA **염기서열자동분석기**(Pharmacia Biotech; ALFexpress DNA sequencer)**로 양방향으로** sequencing**하였다**.

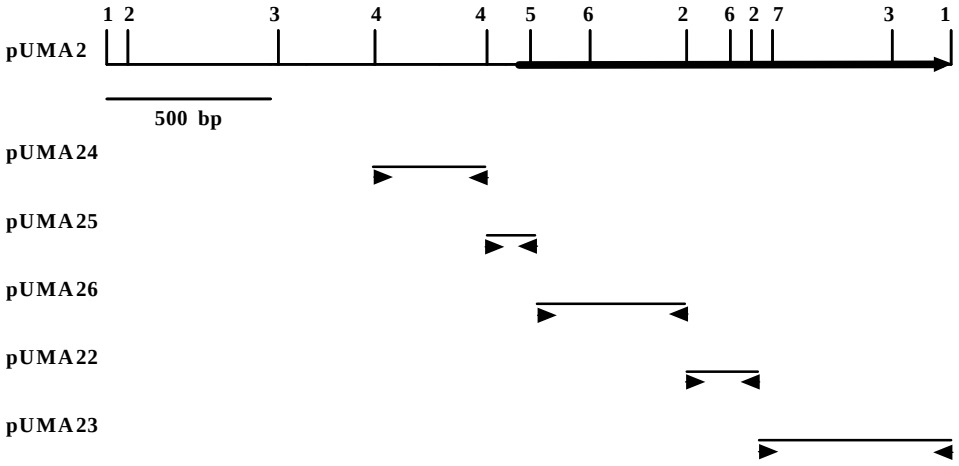

Fig. 2-36. DNA sequencing strategy of *S. thermocyaneoviolaceus xyn*A gene in pUMA2(2.7 kb Sph Ⅰ fragment containing the *xyn*A gene). The arrow heads show the sequencing direction. Bold line represents the coding sequence of *S. thermocyaneoviolaceus xyn*A gene. 1, Sph Ⅰ; 2, Pst Ⅰ; 3, Pvu Ⅱ; 4, Sma Ⅰ; 5, BamH Ⅰ, 6, Pvu Ⅰ, 7, Sal Ⅰ.

동일한 방법으로 클로닝된 *S. thermocyaneoviolaceus xynB* 유전자의 염기서열분석을 위하여 pWMB81(그림 2-35)에 함유된 3.3 kb 크기의 BamH Ⅰ 단편을 다시 약 500 bp 내외의 짧은 단편으로 절단하여 pUC119에 subcloning (그림 2-37)하고 DNA 염기서열자동분석기(Pharmacia Biotech; ALFexpress DNA sequencer)로 전과 같이 양방향으로 sequencing하였다.

즉, *S. thermocyaneoviolaceus xyn*A 유전자(1918 bp)의 염기서열분석 결과는 그림 2-38과 같다. 이 염기서열을 GenBank의 nucleotide sequence databases에 등록하였으며 accession no.는 AF194024이다. 개시 codon인 ATG로 부터 종지 codon인 TGA까지를 포함해서 1431 bp(No. 478 1908)이었으며, 476개의 아미노산 잔기로 구성되어 있었다. 이것을 정제 xylanase B3의 아미노

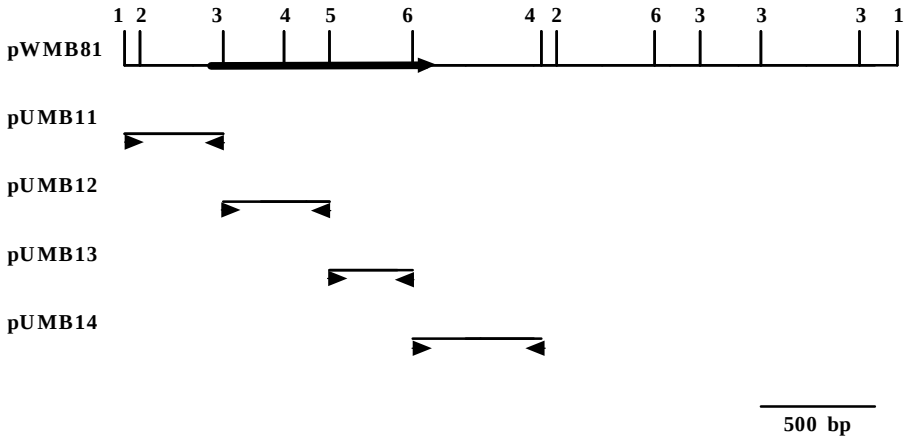

Fig. 2-37. DNA sequencing strategy of *S. thermocyaneoviolaceus xyn*B gene in pUMB1(3.3 kb BamH Ⅰ fragment containig the *xyn*B gene). The arrow heads show the sequencing direction. Bold line box represents the coding sequence of *S. thermocyaneoviolaceus xyn*B gene. 1, BamH Ⅰ; 2, Pvu Ⅰ; 3, Sma Ⅰ; 4, Sal Ⅰ; 5, Sph Ⅰ; 6, Pvu Ⅱ.

말단 아미노산 서열과 비교해 보면 *xyn*A leader sequence가 개시 codon인 ATG로부터 120 bp(No. 478 597)로 signal peptide가 40 잔기의 아미노산으로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다. DNA 및 protein의 상동성 검색프로그램인 Blast(National Center for Biotechnology Information의 nucleotide search program)를 이용하여 상동성을 가지는 유전자들을 조사하여 본 결과, 본연구에 사용한 *S. thermocyaneoviolaceus*의 *xyn*A 유전자는 *S. thermoviolaceus*가 생산하는 xylanase 유전자인 *stx*Ⅰ과 99%, *S. lividans*가 생산하는 xylanase 유전자인 *xln*A와 91%, *S. halstedii*가 생산하는 xylanase 유전자인 *xys*A와 91%, *S. avermitilis*가 생산하는 xylanase 유전자인 *xyl*30과 88%, *Actinomadura* sp. FC7이 생산하는 xylanase 유전자인 xylanaseⅡ와 90%의 상동성을 나타내었다.

또 *S. thermocyaneoviolaceus xyn*B 유전자(1794 bp)의 염기서열분석 결과는 그림 2-39와 같다. 이 염기서열의 coding region을 GenBank의 nucleotide sequence databases에 등록하였으며 accession no.는 AF194025이다. 개시 codon인 ATG로 부터 종지 codon인 TGA까지를 포함해서 1008 bp(No. 261 1268)이었으며, 335개의 아미노산 잔기로 구성되어 있었다. 이것을 정제 xylanase N1의 아미노말단 아미노산 서열과 비교해 보면 *xyn*B leader sequence가 개시 codon인 ATG로부터 120 bp(No. 261 380)로 signal peptide가 40 잔기의 아미노산으로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다. *xyn*A와 동일한 방법으로 DNA 및 protein의 상동성 검색프로그램인 Blast를 이용하여 상동성을 가지는 유전자들을 조사하여 본 결과, 본연구에 사용한 *S. thermocyaneoviolaceus*의 *xyn*B 유전자는 *S. thermoviolaceus*가 생산하는 xylanase 유전자인 *stx*Ⅱ와 99%, *S. lividans*가 생산하는 xylanase 유전자인 *xln*B와 86%, *Cellulomonas fimi*가 생산하는 xylanase 유전자인 *xyn*D와 87%, *Cellulomonas pachnodae*가 생산하는 xylanase 유전자인 *xyn*11A와 83%의 상동성을 나타내었다.

```
   1  cccgggagtc ggcgagcgaa ccaagtcggc ctgaacgcgg tgttgacagg ggattcggca
  61  ggagaccttt cctgtcctcg tccgtcttcg gccctgtctc gccgggagcg ccgcggctgc
 121  gcgacgtacc gcctcggcag aaatgatctt cgaaagtttc gaaagaaaac cggaaagatt
 181  ctccgtccag cgggttgacg agacaccgtc aagtctcaat catcctgtcg gggaaaccga
 241  tcctgcaccg agccgcgcaa ccatgtcggt cccgagcacc cgtgccgcac gacagagccg
 301  cgtacgaagc acccgcgtca tgccgtggta cgtcagtgag gtccacacca cggcagtggc
 361  cggtgcgcat gtgcagcccg gggtccgggg ccgacccgtc cgtccgcccg tggaagcgga
 421  cggtgtctcc cccctgcgcc tcgctcgttc cgtgacgtct accttggagg cagacccatg
 481  ggctctcacg cccttcccag accggctctc cgccaaagga tccgcggcgg ctgtgggcgt
 541  ggccgcggcg tcctcggtct gggcgccacg ctgagcacac cgccgaccgc gcacgccgcc
 601  gagagcacgc tcggtgcggc cgcggctcag agcggccgtt acttcggcac cgccatcgcc
 661  gcgggcaggc tgagcgactc gacgtacacg tcgatcgcca gccgcgagtt caacatggtg
 721  acggccgaga acgagatgaa gatcgacgcc accgaaccgc agcgcgggca gttcgacttc
 781  tccgccggcg accgcgtcta caactgggcg gtgcagaacg gcaaagaggt gcgcggccac
 841  accctggcct ggcactccca gcagccgtac tggatgcaga gcctgagcgg cagtgacctg
 901  cgccaggcga tgatcgacca catcaacggc gtgatgaacc actacaaggg caagatcgcc
 961  cagtgggacg tcgtgaacga ggccttcgag gacgggaact cgggagcccg gcgcgactcc
1021  aacctgcagc gcaccggcaa cgactggatc gaggtcgcct tccgcaccgc gcgcgccgcc
1081  gacccgtccg ccaagctctg ctacaacgac tacaacatcg agaactggac ctgggccaag
1141  acccaggccg tgtacaacat ggtccgcgac ttcaagcagc gcggcgtacc gatcgactgc
1201  gtcggcttcc agtcgcactt caacagcggc agcccgtacg acagcaactt ccgcaccacc
1261  ctgcagagct tcgcggcgct cggtgtcgac gtggccatca ccgaactcga catccagggt
1321  gcctcgccca cgacgtacgc caacgtggtc aacgactgcc tggccgtctc gcgctgcctg
1381  ggcatcaccg tctggggtgt gcgcgacacc gactcctggc ggtcgggtga caccccgctg
1441  ctgttcaacg gcgacggcag caagaagcct gcctactccg ccgttctcga cgcgctcaac
1501  ggcggctcct ccggcgaacc tccggaggac ggcgggtccg gacagatcaa gaacgccgcg
1561  tcgggccggt gcctcgacgt ctccggtgcc ggcaccgccg acggcacagc agtccagctc
1621  tatgactgcc acggcggcac caaccagcag tggacctaca ccgacgccgg cgagttcagg
1681  gtctacggca acaagtgcct ggacgccggc ggcaccggaa atggaacgcg tgttcaaatt
1741  tacagctgct ggggcggcga caaccagaag tggcgcgtga actccgacgg caccatcgtc
1801  ggtgtccagt cgggcctgtg cctggacgcc gccggcacgg gcaacagcac cccggtccag
1861  ctctacacct gctcgtacgc cgacaaccag cgctggaccg tctcctgaca cggcatgc
```

Fig. 2-38. DNA sequence of *S. thermocyaneoviolaceus xyn*A gene. The coding sequence was located in 1431 bp from position 478 to position 1908. 120 bp of upstream sequence from ATG codon(underlined sequence) coded 40 amino acid residues of signal peptide which was deduced from amino acid sequence analysis. The start and stop codon for *xyn*A gene were shown in the shaded box. The nucleotide sequence of *xyn*A in *S. thermocyaneoviolaceus* was assigned accession no. AF194024 and KS102744 in GenBank and GenNuri, respectively.

```
   1  ggatcccatg accctcgatc ggtgtcgaaa ctttcgggga tcggacgcct cgccttgatc
  61  gcaatttcat gatgagtgga tgcgggtcgc agtgctggta gtactgcaaa gctcttgagc
 121  tgcgactagc cagccccaga gggcttcttt tgttacgcga acctttcgaa ataattaccg
 181  aaaccattga cagttgtcag ggtcaggcca acactcacgt cgtcaccctc acgcacgcgc
 241  agcgaggagg aagcacgtcc atgaacacgc tcgtccatcc gcagggccgc gcaggcggtc
 301  tgcggctgct cgtcagagcc gcgtgggcgc tggccctggc cgccctggcc gcgatgatgt
 361  tcgggggcac cgcccgggcg gacacgatca cctcgaacca gaccggcacc cacaacggct
 421  acttctactc gttctggacc gacgcccccg gcaccgtcac catgaacacc ggcgccggcg
 481  gaaactacag cacccagtgg agcaacaccg gcaacttcgt ggcgggcaag ggctgggcca
 541  ccggcggccg ccgcaccgtg acctactcgg gcacgttcaa cccgtccggc aacgcctacc
 601  tggcgctgta cggctggtcc cagaacccgc tcgtcgagta ctacatcgtc gacaactggg
 661  gcacctaccg gcccaccggc acctacaagg gcaccgtcta cagcgacggc ggcacgtacg
 721  acatctacat gaccacccgc tacaacgccc cctccatcga gggcaccaag accttcaacc
 781  agtactggag cgtccggcag aacaagcgca ccggcggaac catcaccacc ggcaaccact
 841  tcgacgcctg ggccgcgcac ggcatgccgc tcggcacctt caactacatg atcctcgcca
 901  ccgagggcta ccagagcagc ggcagctcca acatcacggt cggtgactcc ggcggcgaca
 961  acggcggcgg tggtggcggt ggcggcggcg gtggcaacac cggtggctgc accgcgacgc
1021  tgtccgcggg tgagcagtgg agcgaccgct acaacctgaa cgtgtcggtg agcgggtcgg
1081  acaactggac ggtgacgatg cgggttcccg cgccggagaa ggtcatggcg acctggaacg
1141  tcaccgcgag ttatccggat gcgcagacgc tggtggccag gccgaacggc aacggcaaca
1201  actggggtgt gaccatccag aagaacggca gcaccacctg gcccacggtc agctgctccg
1261  tcggctgagc ggcgtacgga caacgaaagg aggacaccgc acatgcgcat cccgtcacgc
1321  cggccgctgc gctcgctgct cgccggcctg gccggcggcg ctgctggcca ccgcgggtgt
1381  ctgtaccgtg gacgccggca ccgcacacgc cgcggcctgc accggctacg tcggcctgac
1441  cttcgacgac ggcccgtcca acgaccacac ccccgccctg ctgaacgcgc tgaagcagaa
1501  cgggctgcgg gccaccatgt tcaacgaggg tcagttcgcc gccgcctacc cggcccaggt
1561  gaaggcccag gtggacgccg gcatgtgggt cggcaaccac agctacaccc acccgcacct
1621  gacccagcag agccaggcgc agatcgactc cgagatctcc cgcacccagc aggccatcgc
1681  gaacgcgggc ggcggcacac ccacgctgtt ccgtccgcct acggcgagac caacgccacc
1741  gtgcagtcgg tcgaggccaa gtacgggctg aaggagatca tctgggacgt cgac
```

Fig. 2-39. DNA sequence of *S. thermocyaneoviolaceus xyn*B gene. The coding sequence was located in 1008 bp from position 261 to position 1268. 120 bp of upstream sequence from ATG codon(underlined sequence) coded 40 amino acid residues of signal peptide which was deduced from amino acid sequence analysis. The start and stop codon for *xyn*B gene were shown in the shaded box. The nucleotide sequence of *xyn*B in *S. thermocyaneoviolaceus* was assigned accession no. AF194025 and KS102745 in GenBank and GenNuri, respectively.

2. 재조합 DNA 기술에 의한 xylanase의 증폭생산

가. *S. thermocyaneoviolaceus* xylanases 유전자의 고발현 벡터제작

*S. thermocyaneoviolaceus*로부터 클로닝한 xylanase 유전자들중 특히 *xyn*B는 xylooligo당 생산이 뛰어난 것으로 밝혀진 효소인 xylanase N1에 해당하는 유전자이므로, 이 유전자를 이용하여 xylanase N1을 대장균에서 overexpression시키기로 하였다. 먼저 *xyn*B 유전자의 DNA 염기서열로 부터 개시 codon에 Nde Ⅰ site를 도입한 PCR primer(MBU 5'-CGGGATCCATATGAACACGCTCGTCCATCC-3')와 종지 codon에 EcoR Ⅰ site를 도입한 PCR primer(MBD 5'-CGGAATTCAGCCGACGGAGCAGCTGA-3')를 설계하여 합성하였다. 이 primer를 사용하여 *xyn*B가 cloning되어있는 pSMB8을 주형으로 PCR 증폭한 다음 이 단편을 그림 2-40과 같이 대장균 expression vector인 pET21a(+)(Novagen社)의 Nde Ⅰ-EcoR Ⅰ 절단부위에 삽입하여 대장균 T7-expression system의 발현숙주인 BLR(DE3)에 형질전환하였다. 이때 형질전환된 클론들이 RBB-xylan-IPTG plate에서 xylan 분해환을 형성하는지를 조사하였다. 뚜렷한 분해환을 형성하는 클론을 선발하고 플라스미드를 추출하여 insert의 유무를 확인하였다. 그 결과 약 1.0 kb의 *xyn*B 단편을 함유한 클론을 선발하였고 이 벡터를 pEMB10으로 명명하였다.

*S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase B3에 상당하는 유전자 *xyn*A에 대해서도 같은 방법으로 overexpression 벡터를 제작하였다. pUMA2의 DNA 염기서열로부터 *xyn*A 유전자의 개시 codon에 Nde Ⅰ site를 도입한 PCR primer(MAU 5'-GGGGTACCATATGGGCTCTCACGCCCTTCC-3')와 종지 codon에 EcoR Ⅰ site를 도입한 PCR primer(MAD 5'-CGGAATTCAGGAGACGGTCCAGCGC-3')를 합성하였다. 이 primer를 사용하여 *xyn*A 유전자를 함유한 pSMA4를 주형으로 PCR 증폭한 단편을 pET21a(+)의 Nde Ⅰ-EcoR Ⅰ 절단부위에 삽입하여 BLR(DE3)에 형질전환시켰다(그림 2-40). 여기서 얻은 형질전환주가 RBB-xylan-IPTG plate에서 xylan 분해환을 형성하는지를 조사하였다. 그 결과 뚜렷한 분해환을 형성하는 클론을 선발하여 플라스미드를 추출하여 insert의 유무를 확인하였다. 여기서 1.4 kb의 *xyl*B 단편을 함유한 클론을 선발하고 이 벡터를 pEMA144로 명명하였다.

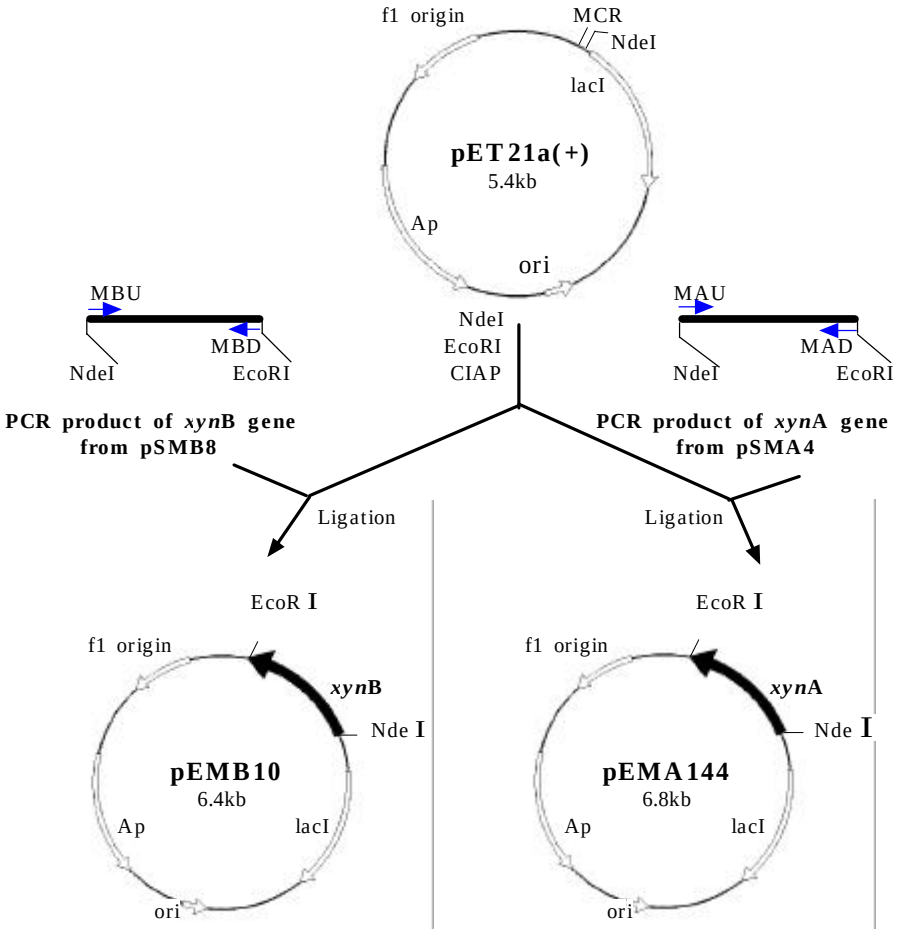

Fig. 2-40. Construction of overexpression vectors. PCR products of *xyn*A and *xyn*B were digested with NdeI and EcoRI before ligating to pET21a(+).

나. 재조합 대장균으로부터 xylanase의 증폭생산확인

*xyn*B 유전자 고발현 벡터를 가진 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10으로부터 xylanase(정제효소 xylanase N1에 해당됨.)의 생산을 확인하기 위하여 RBB-xylan-IPTG plate에서 다른 대조 실험구들과 함께 분해환의 형성을 관찰하였다. 그 결과, 그림 2-41에서 보는 바와 같이 *xyn*B 유전자를 고발현 벡터에 subcloning한 재조합 플라스미드 pEMB10을 함유한 대장균 BLR(DE3)가 모균주인 *S. thermocyaneoviolaceus*보다 훨씬 더 선명하고 넓은 분해환을 형성하는 것을 관찰할 수 있었다. *xyn*A 유전자 고발현 벡터를 가진 BLR(DE3)/pEMA144에서도 같은 결과를 얻었다. 또한 재조합 대장균에 의한 xylanase 발현량을 알아보기 위하여 각종 배지를 사용하여 배양 상징액의 xylanase activity를 측정하였다. 표 2-6에서 보는 바와 같이 재조합 균주 BLR(DE3)/pEMB10은 TB배지에서 IPTG로 유도하였을 때 ㎖당 최대 52 unit의 xylanase를 생산하였으며, BLR(DE3)/pEMA144는 TB배지에서 ㎖당 63 unit의 xylanase를 생산하였다. 이러한 생산량은 모균주인 *S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase 생산 최적 배지인 WB배지에서 생산되는 ㎖당 12 unit보다 *xyn*B의 경우 4.3배 이상 높은 52 unit를, *xyn*A의 경우 5.2배 이상 높은 63 unit를 생산하였다.

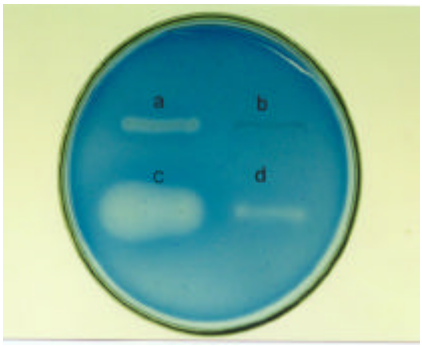

Fig. 2-41. RBB-xylan clearance assay with *S. thermocyaneoviolaceus* and recombinant *E. coli*. a, *S. thermocyaneoviolaceus*; b, *E. coli* BLR(DE3)/pET21a(+); c, *E. coli* BLR(DE3)/pEMB10; d, *E. coli* DH5α/pSMB8.

Table. 2-6. Production of xylanases in recombinant strains on different media.

Strains	Media	Activity(unit/㎖)
S. thermocyaneoviolaceus	WB(wheat bran)	12
BLR(DE3)/pET21a(+)	LB	0
BLR(DE3)/pEMB10	LB	20
	TB	52
BLR(DE3)/pEMA144	LB	17
	TB	63

S. thermocyaneoviolaceus was grown at 50℃ for 24 h. The xylanase of *E. coli* BLR(DE3) containing recombinant plasmid was induced at 37℃ for 12 h after growth at 37℃ for 3 h. TB media were composed of 1.2% yeast extract, 2.4% tryptone, 0.4% glycerol, 0.231% KH_2PO_4 and 1.254% K_2HPO_4.

다. 재조합 대장균 xylanase의 국재성

상기 실험에서 overexpression된 xylanase가 재조합 대장균내에 존재하는지 세포밖으로 분비하는지 그 양상을 조사하기 위하여 37℃에서 3 시간 배양하여 IPTG를 1 mM이 되게 첨가한 후 3 시간 추가배양한 대수증식기의 재조합 대장균을 Osmotic shock法(Nossal과 Heepel, 1966)으로 분획하였다(그림 2-42). 그 결과 *xyn*A 유전자가 클로닝된 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144의 xylanase 경우 28%가 분비되고, 67.6%가 periplasm, 4.4%가 cytoplasm에 존재하였으나(그림 2-43A), 배양이 정지기에 들어갔을 때에는 69%의 효소가 배지내로 분비되었고 23.4%가 periplasm, 8%가 세포질에 존재하였다(데이터 생략). 또한 *xyn*B 유전자가 클로닝된 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10의 xylanase 경우 대수증식기에 65.9%에 상당하는 xylanase가 배지내로 분비되었고 16.8%가 periplasm, 17.3%가 세포질에 존재하는 양상를 보였다(그림 2-43B). 이와 같이 대부분의 효소가 세포밖으로 분비되므로 방선균의 신호배열이 대장균에서도 정상적으로 작용하는 것으로 생각된다.

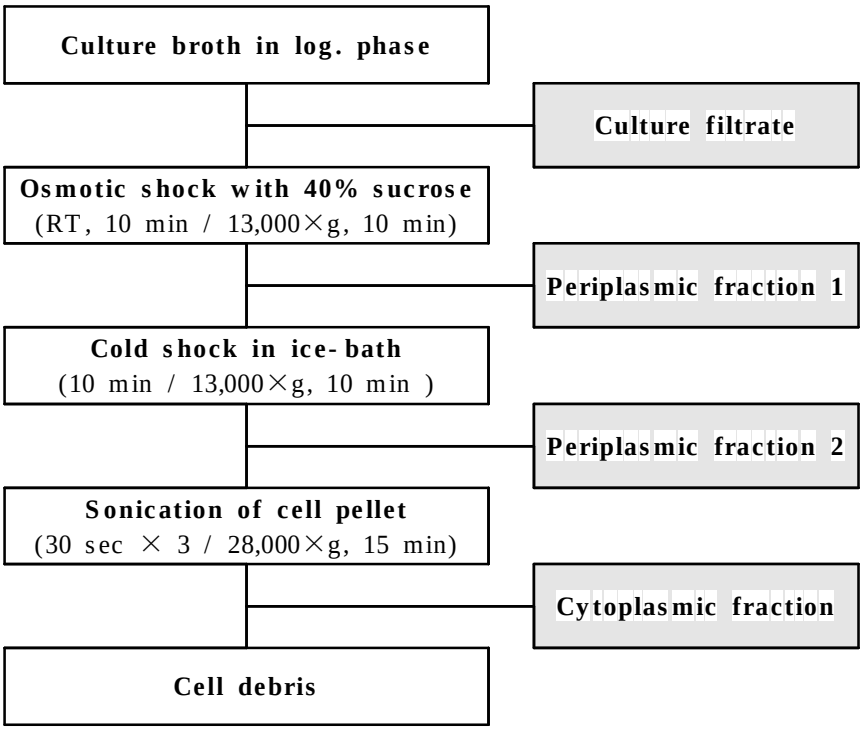

Fig 2-42. Flow sheet for the extraction of xylanases by the osmotic shock.

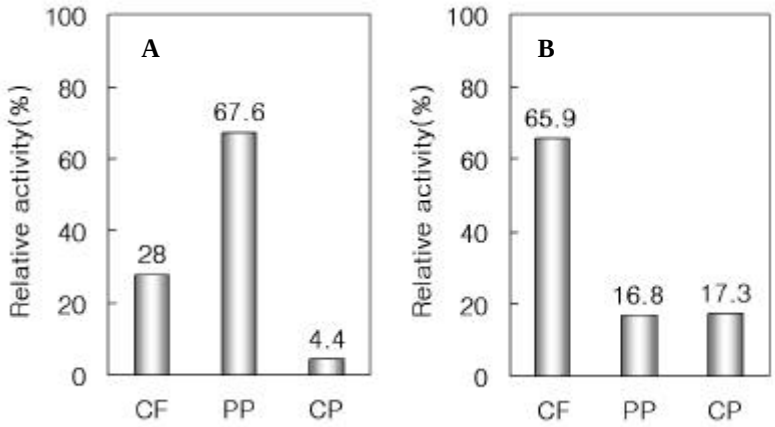

Fig. 2-43. The localization of recombinant xylanase in strain BLR(DE3)/pEMA144(A) and BLR(DE3)/pEMB10(B). CF, culture filtrate; PP, periplasm(1 and 2 fraction in Fig. 2-42); CP, cytoplasm.

3. 재조합 대장균 xylanase와 *S. thermocyaneoviolaceus* xylanases 특성 비교

가. 재조합 대장균 xylanase(XynA)와 정제 xylanase B3의 특성 비교

S. thermocyaneoviolaceus M-049로부터 정제된 xylanase B3는 작용 최적 온도가 65℃이며, 최적 pH는 5.0 부근으로 내열성을 지니는 xylanase이다. *xyn*A 유전자를 cloning한 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144에서 생산한 xylanase인 XynA도 이러한 성질이 나타나는지를 확인하기 위해서 정제 xylanase B3와 상호비교하였다. 그 결과 그림 2-44에서 보는 바와 같이 *S. thermocyaneoviolaceus*의 정제 xylanase B3와 별 차이가 없었다.

나. 재조합 대장균 xylanase(XynB)와 정제 xylanase N1의 특성 비교

S. thermocyaneoviolaceus M-049로부터 분리, 정제된 xylanase N1은 작용 최적 온도가 60℃이고 최적 pH는 5.5 부근으로 내열성을 지니는 xylanase이다. 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10에서 만들어진 재조합 xylanase인 XynB도 이러한 성질을 그대로 가지는지를 알아보기 위하여 정제 xylanase N1과 재조합 xylanase인 XynB를 가지고 최적온도, 최적 pH, 열안정성, pH 안정성 등을 조사하였다. 그림 2-45에서 보는 바와 같이 *S. thermocyaneoviolaceus*의 정제 xylanase N1과 별 차이가 없었다. 따라서 재조합 DNA 기술에 의해 생산된 xylanase는 xylooligo당 생산에 크게 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

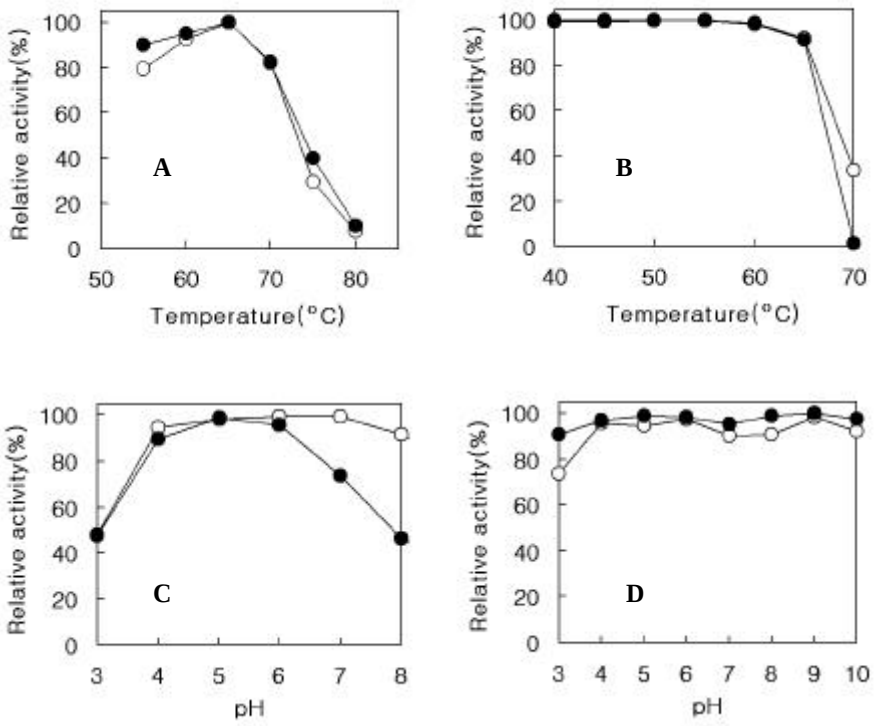

Fig. 2-44. Comparison of properties between purified xylanase B3 from *S. thermocyaneoviolaceus*(●—●) and xylanase of recombinant *E. coli* BLR(DE3)/pEMA144(○—○). A, optimal temperature; B, thermal stability; C, optimal pH; D, pH stability.

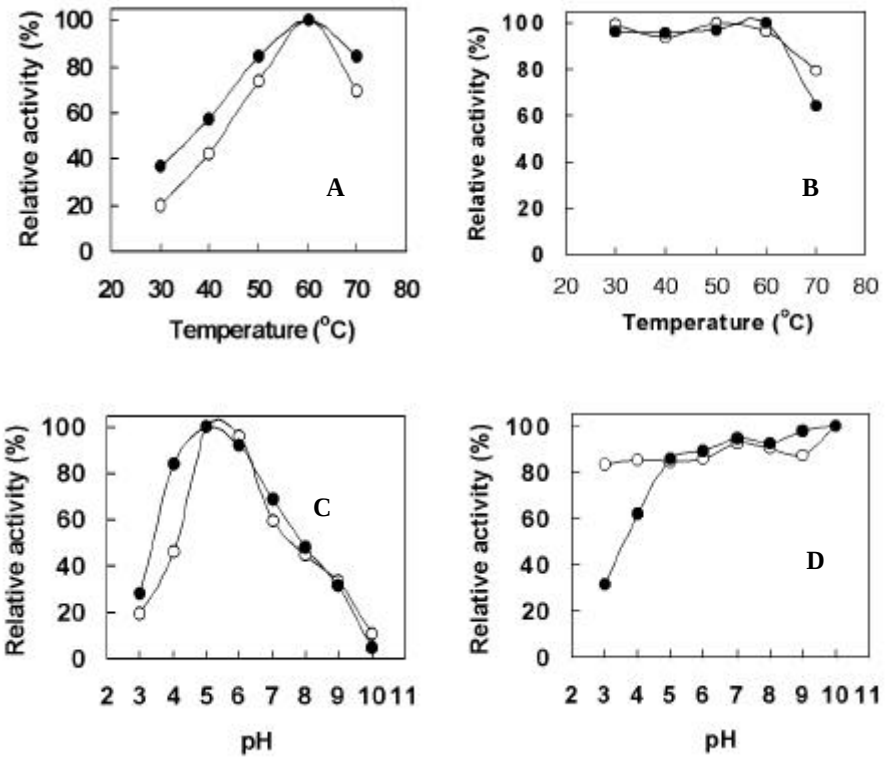

Fig. 2-45. Comparison of properties between purified xylanase N1 from *S. thermocyaneoviolaceus*(●—●) and xylanase of recombinant *E. coli* BLR(DE3)/pEMB10(○—○). A, optimal temperature; B, thermal stability; C, optimal pH; D, pH stability.

4. 재조합 대장균 xylanase 생산조건

가. 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144에 의한 xylanase 생산조건

1) Xylanase 생산에 미치는 질소원의 영향

재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144에 의한 xylanase(XynA) 생산에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향을 조사한 결과 LB배지를 기본배지로 하였을 때 탄소원에 대해서는 큰 영향이 없었고, 질소원으로 0.5% casamino acid를 첨가하였을 때 효소생산량이 플라스크배양에서 550% 증가하였다(표 2-7). 또한 monosodium glutamate(MSG)를 0.2% 첨가하였을 때 효소활성이 약간 더 증가하여 재조합 대장균의 효소생산배지는 0.5% yeast extract, 1.0% tryptone, 1.0% NaCl, 0.5% casamino acid, 0.2% MSG로 최종 결정하였다.

2) Xylanase 생산에 미치는 aeration 효과

재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144의 xylanases 생산에 미치는 aeration효과를 조사하기 위하여 100-㎖ 삼각플라스크에 TB배지를 10 ㎖씩 분주하고 121℃에서 15 분간 살균한 후, 한천평판배지로부터 한 백금이를 접종하여 37℃에서 200 rpm으로 12 시간 진탕배양한 후 종배양액으로 사용하였다. 2.5-ℓ용 jar-fermentor에 상기 실험에서 설정된 효소생산용 배지를 1ℓ 넣어 121℃에서 15 분간 살균한 후 종배양액을 1% 접종하여 교반속도를 400 rpm으로 고정하고, 공기 주입량를 1 vvm, 2 vvm 및 3 vvm으로 각기 다르게 주입하여 37℃에서 배양 3 시간째 1 mM IPTG(최종농도)를 가하여 같은 조건에서 9 시간 더 배양한 후 배양여액의 효소활성을 조사하였다. 그 결과 2 vvm의 속도로 aeration하는 것이 ㎖당 110 unit로 가장 좋았다(그림 2-46).

Table. 2-7. Effect of organic and inorganic nitrogen sources on the xylanase production of *E. coli* BLR(DE3)/pEMA144

Nitrogen source	Growth (A600)	Xylanase activity (unit/ ㎖)	Relative activity (%)
LB*	4.8	16.7	100a
TB	10.3	63.3	379
1% Yeast extract	6.2	45.7	274
1% Peptone	4.5	11.6	69
1% Tryptone	5.3	11.4	68
1% Polypeptone	4.4	14.7	88
0.5% Casamino acid	4.5	91.9	550
1% Malt extract	8.8	10.4	62
0.5% NH_4NO_3(0.5)	3.9	6.0	62
0.5% $(NH_4)_2SO_4$(0.5)	4.5	30.1	180
0.5% NH_4Cl(0.5)	3.7	6.0	36

*, Basal medium(LB) was composed of 0.5% yeast extract, 1.0% tryptone and 1.0% NaCl. Bacteria were grown at 37℃ for 12 h. 1.0 mM IPTG was added to the media for the enzyme induction after 3 h incubation. a, The activity in LB were taken as 100%.

3) Xylanase 생산에 미치는 교반속도의 영향

재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144의 xylanases 생산에 미치는 교반속도의 영향을 조사하기 위하여 jar-fermentor의 공기주입량을 2 vvm의 속도로 주입하면서, 교반속도를 200, 300, 400 및 500 rpm으로 조정하여 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 300 rpm의 속도로 교반하였을 때 ㎖당 120 unit로 가장 많은 효소생산량을 나타내었다(그림 2-47).

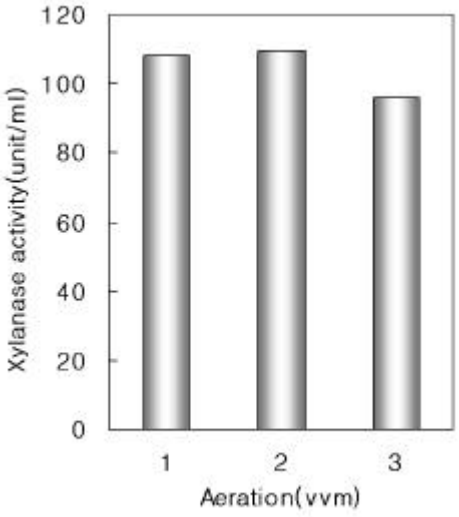

Fig. 2-46. Effect of aeration on the production of xylanase by BLR(DE3)/pEMA144.

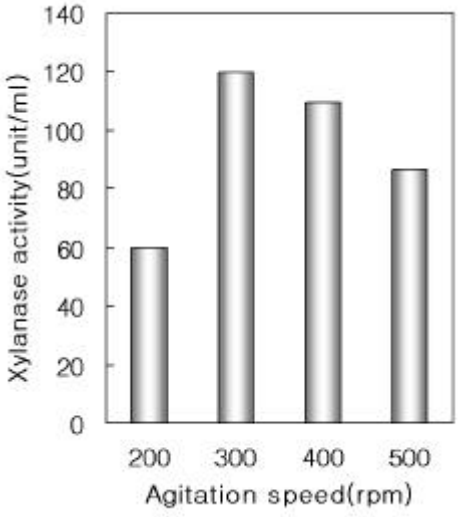

Fig. 2-47. Effect of agitation speed on the production of xylanase by BLR(DE3)/pEMA144.

4) Xylanase 생산에 미치는 배양시간의 영향

상기 실험에서 설정된 효소생산 최적조건(2 vvm, 300 rpm)으로 재조합 대장균 BLR(DE3)를 배양하면서 배양시간에 따른 효소생산성을 조사하였다. 그 결과 그림 2-48과 같이 24 시간 배양할 때 가장 ㎖당 128.5 unit의 xylanase를 생산하였다.

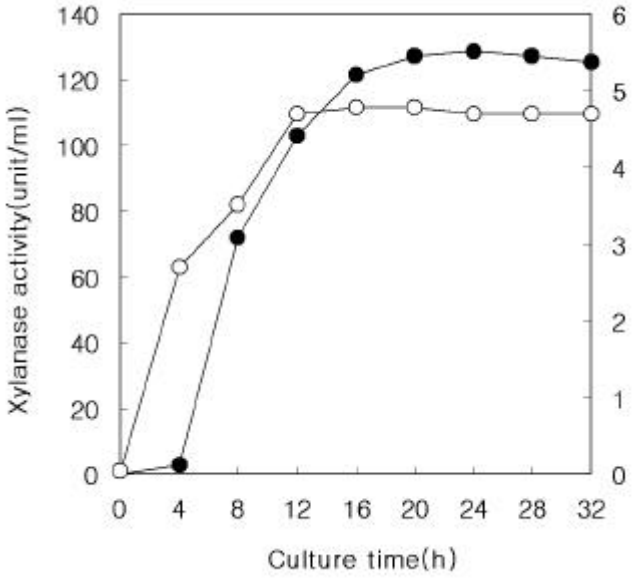

Fig. 2-48. Profile of cell growth and xylanase production by BLR(DE3)/pEMA144 in jar-fermentor. ●—●, xylanase activity; ○—○, cell growth(A600 nm).

나. 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10 xylanase의 생산조건

1) Xylanase 생산에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향

재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10에 의한 xylanase(XynB) 생산에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향을 조사하였다. 그 결과 표 2-8과 같이 LB배지를 기본 배지로 하였을 때 CSL(corn steep liquor)이 가장 좋은 효소생산성을 나타내었고, 농도별로 실험한 결과 0.2% 첨가로 기본배지의 820% 증가를 나타내었다. 다른 질소원을 종류별로 실험한 경우 좋은 결과를 얻지 못하였다(데이타 생략). 따라서 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10의 효소생산용 배지는 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, 1.0% tryptone 및 0.2% CSL로 결정하였다.

Table 2-8. Effect of carbon sources on the xylanase production by BLR(DE3)/pEMB10

Carbon source	Growth (A600)	Xylanase activity (unit/㎖)	Relative activity (%)
LB*	5.4	14.2	100a
TB	8.7	27.4	193
1% Sorbitol	7.7	6.2	44
1% Lactose	6.5	5.8	41
1% Maltose	8.8	2.4	17
1% Fructose	7.1	41.0	290
1% Saccharose	4.6	2.6	18
1% Potatodextrose	11.4	38.8	274
1% Mannitol	10.5	36.3	256
1% Glucose	12.1	2.3	16
1% Wheat bran	8.5	8.1	84
1% Rice bran	10.8	8.1	57
0.2% CSL(0.2)	5.1	116.1	820
0.5% CSL(0.5)	6.0	114.4	808
1.0% CSL(1.0)	9.1	25.7	181

*, Basal medium(LB) was composed of 0.5% yeast extract, 1.0% tryptone and 1.0% NaCl. a, The activity in LB was taken as 100%.

2) Xylanase 생산에 미치는 aeration 효과

재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10 xylanase 생산에 미치는 aeration효과를 조사하기 위하여 100-㎖ 삼각플라스크에 LB배지를 10 ㎖씩 분주하고 121℃에서 15 분간 살균한 후, 한천평판배지로부터 한 백금이를 접종하여 37℃에서 200 rpm으로 12 시간 진탕배양한 후 종배양액으로 사용하였다. 2.5-ℓ용 jar-fermentor에 상기 실험에서 설정된 효소생산용 배지(0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, 1.0% tryptone, 0.2% CSL)를 1ℓ 넣어 121℃에서 15 분간 살균한 후 종배양액을 1% 접종하여 교반속도를 300 rpm으로 고정하고, 공기 주입량를 1 vvm, 2 vvm 및 3 vvm으로 주입하여 37℃에서 12 시간 배양한 후 효소생산에 미치는 aeration 효과를 조사하였다. 그 결과 2 vvm의 속도로 aeration하는 것이 ㎖당 120 unit로 가장 좋았다(그림 2-49).

3) Xylanase 생산에 미치는 교반속도의 영향

재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10의 xylanase 생산에 미치는 교반속도의 영향을 조사하기 위하여 jar-fermentor의 공기주입량을 2 vvm의 속도로 주입하면서, 교반속도를 각각 200, 300 및 400 rpm으로 조정하여 xylanase 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 300 rpm의 속도로 교반하였을 때 ㎖당 122 unit로 가장 많은 효소생산량을 나타내었다(그림 2-50).

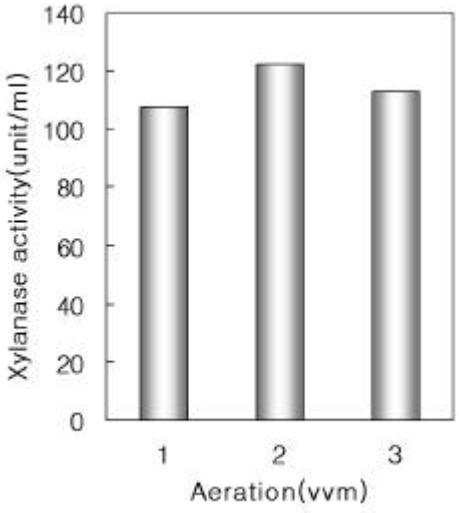

Fig. 2-49. Effect of aeration on the production of xylanase by BLR(DE3)/pEMB10.

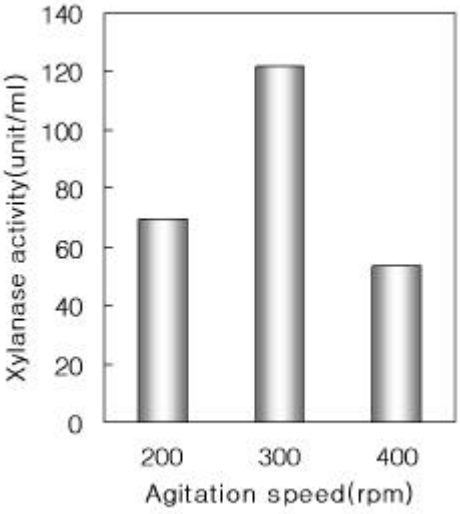

Fig. 2-50. Effect of agitation speed on the production of xylanase by BLR(DE3)/pEMB10.

4) Xylanase 생산에 미치는 배양시간의 영향

상기 실험에서 설정된 효소생산 최적조건(2 vvm, 300 rpm)으로 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10를 배양하면서 배양시간에 따른 효소생산성을 조사하였다. 그 결과 그림 2-51과 같이 12시간 이상 배양할 때 가장 많은 양의 xylanase를 생산하였다.

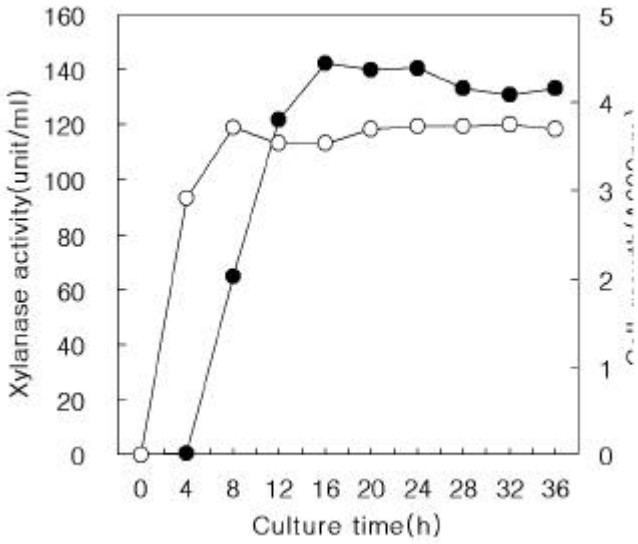

Fig. 2-51. Profile of cell growth and xylanase production by BLR(DE3)/pEMB10 in jar-fermentor. ●—●, xylanase activity; ○—○, cell growth(A600 nm).

제 8 절 Xylooligo당의 생산조건

1. *S. thermocyaneviolaceus* xylanases에 의한 생산

가. 기질에 따른 올리고당의 생산

S. thermocyaneoviolaceus xylanases의 xylan 종류에 따른 분해정도를 조사하기 위하여 2 % birchwood xylan용액 및 2 % oat spelt xylan용액 0.5 ㎖에 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 희석한 각 효소액(5 unit/㎖) 0.5 ㎖를 첨가하여 반응액을 조제하였다. 이 반응액을 50℃에서 4 시간 동안 100 rev/min의 속도로 진탕시키면서 반응시켰다. 효소반응 정지를 위해서 10 분간 boiling하고, 15,000 rpm으로 원심분리하여 고형분을 제거한 후 TLC로 분해생성물을 분석하였다. 그 결과 *S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanase N1, N2 및 B와 투석한 복합 xylanases 모두가 oat spelt 유래의 xylan보다는 birchwood xylan를 더 잘 분해하여 많은 양의 xylooligo당을 생성하였다(그림 2-52).

나. 반응온도에 따른 올리고당의 생산

반응온도에 따른 xylooligo당의 조성변화를 조사하기 위해 10% birchwood xylan 2 ㎖에 100mM citrate-phosphate buffer(pH 5.5) 1 ㎖를 첨가하고 투석한 효소액(10 unit/㎖) 1 ㎖를 첨가하여 50, 60 및 65℃에서 4 시간동안 반응시켰다. 분해 생성물을 HPLC로 분석한 결과, 각 온도에서 비슷한 경향을 보였으나(그림 2-53), 생성물을 정량해서 X2 X6까지의 상대적인 양을 조사한 결과 60℃에서 xylose 함량은 약간 많으나 가용성 xylan 함량이 감소하여 55℃나 65℃보다 60℃가 xylooligo당(X2 X6) 생산에 더 좋았다(그림 2-54).

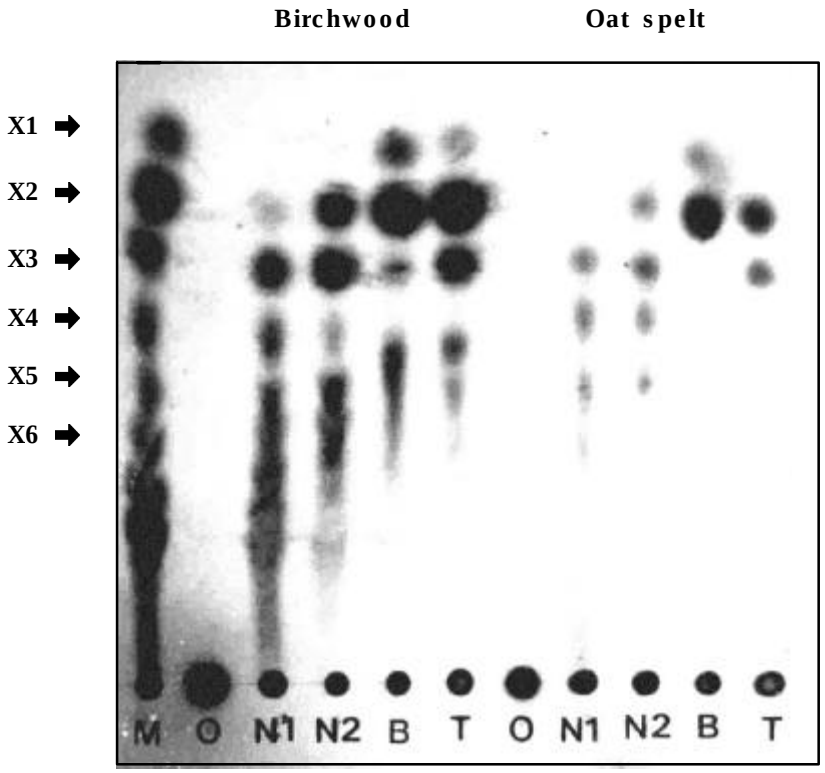

Fig.2-52. Thin layer chromatography of the various xylan hydrolyzates produced by xylanases of *S. thermocyaneoviolaceus*. The reaction mixture consisted of 0.5 ㎖ of xylan and 0.5 ㎖ xylanase solution which were diluted with 50 mM phosphate buffer(pH 7.0). The final enzyme concentration was 2.5 unit/㎖. The reactions were carried out at 50℃ for 4 h and terminated with boiling for 10 min. Symbol: O, enzyme free; N1, xylanase N1; N2, xylanase N2; T, total xylanases dialyzed after ammonium sulfate precipitation; X1, xylose; X2, xylobiose; X3, xylotriose; X4, xylotetraose; X5, xylopentaose; X6, xylohexaose.

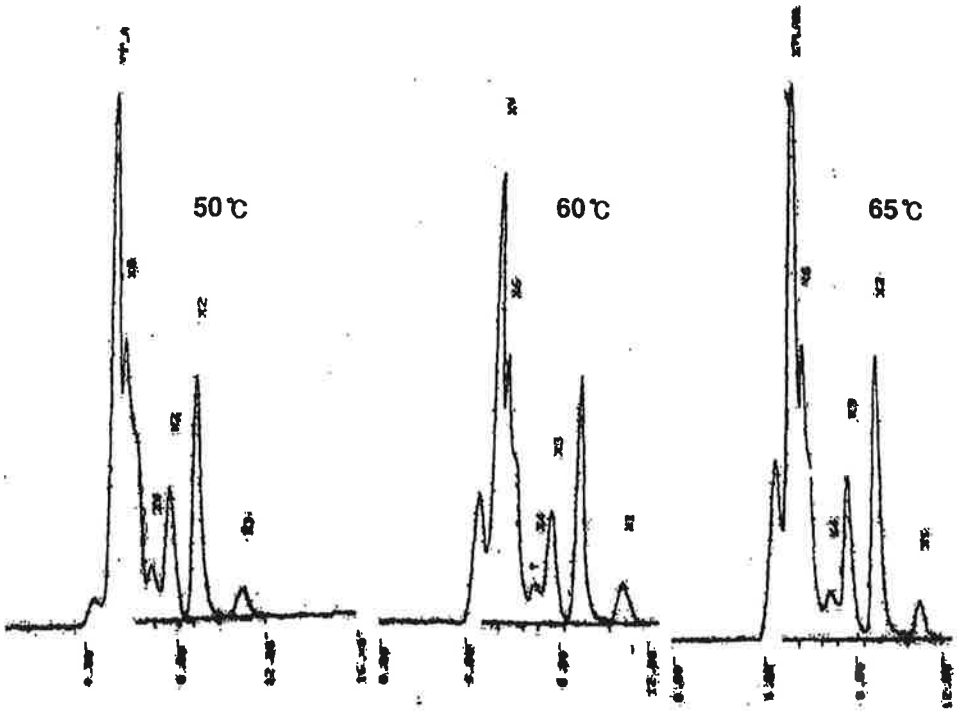

Fig. 2-53. HPLC analysis of the xylan hydrolyzates produced by xylanases of *S. thermocyaneoviolaceus* at various temperature. The reaction mixture consisted of 2 ㎖ of 10% birchwood xylan solution, 1 ㎖ of 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 5.5) and 1 ㎖ of xylanase(10 unit/㎖) were incubated for 4 h. After boiling for 10 min the reaction mixture was centrifuged with 15,000 rpm and then filtrated with 0.45 ㎛ membrane. Symbol: X1, xylose; X2, xylobiose; X3, xylotriose; X4, xylotetraose, X5, xylopentaose; X6, xylohexaose; Xn, xylooligomer longer than X6.

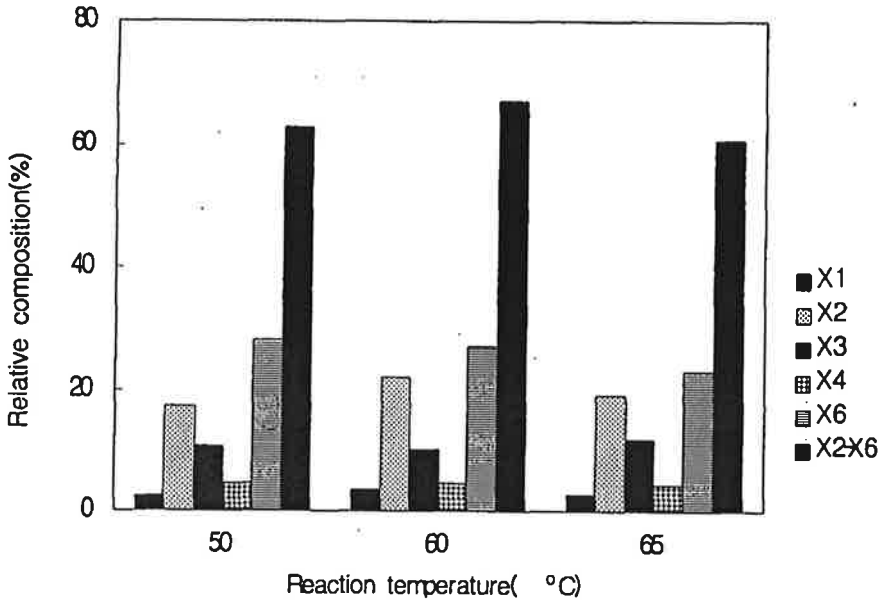

Fig. 2-54. Effect of reaction temperature for the production of xylooligosaccharides. The relative concentration of xylooligosaccharides was calculated from HPLC data of Fig. 2-53 .

다. 효소농도에 따른 xylooligo당의 생산

효소농도에 따른 xylooligo당의 조성 변화를 조사하기 위해서 birchwood xylan 2 g을 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 5.5)로 1, 2, 5, 10, 20 및 40 unit/㎖되게 희석한 투석 xylanases용액 20 ㎖에 현탁하여 60℃에서 12 시간 반응하고 TLC 및 HPLC로 생성물을 분석한 결과는 각각 그림 2-55과 그림 2-56과 같다. 그림 2-56으로부터 X_2~X_6까지의 올리고당 함량을 분석한 결과 최적 효소농도는 10 unit/㎖이었다(그림 2-57). 이보다 더 높은 효소농도에서는 xylose 함량이 현저히 증가하여 올리고당 함량이 감소하는 경향을 보였다. 1, 2 unit/㎖의 저농도의 효소에서는 X_6의 함량이 높고, 고농도 효소(5~20 unit/㎖)에서는 X_2의 함량이 높았다.

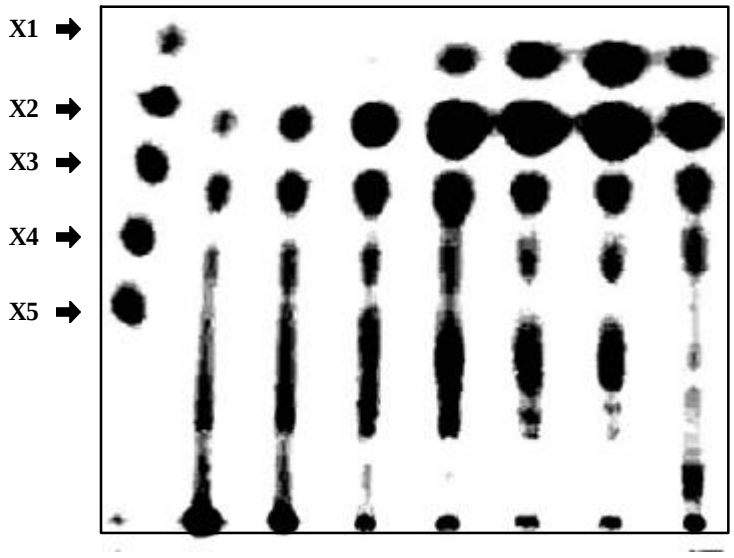

Fig. 2-55. Thin layer chromatography of the xylan hydrolyzates produced by various concentration of xylanases of *S. thermocyaneoviolaceus*. The reaction mixture was consisted of 20 ㎖ of 10% birchwood xylan and xylanases(1 40 unit/㎖) in 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 5.5) and was incubated at 60℃ for 12 h. Symbol: M, marker from Megazyme; 20P, Suntory xylooligomer(20P).

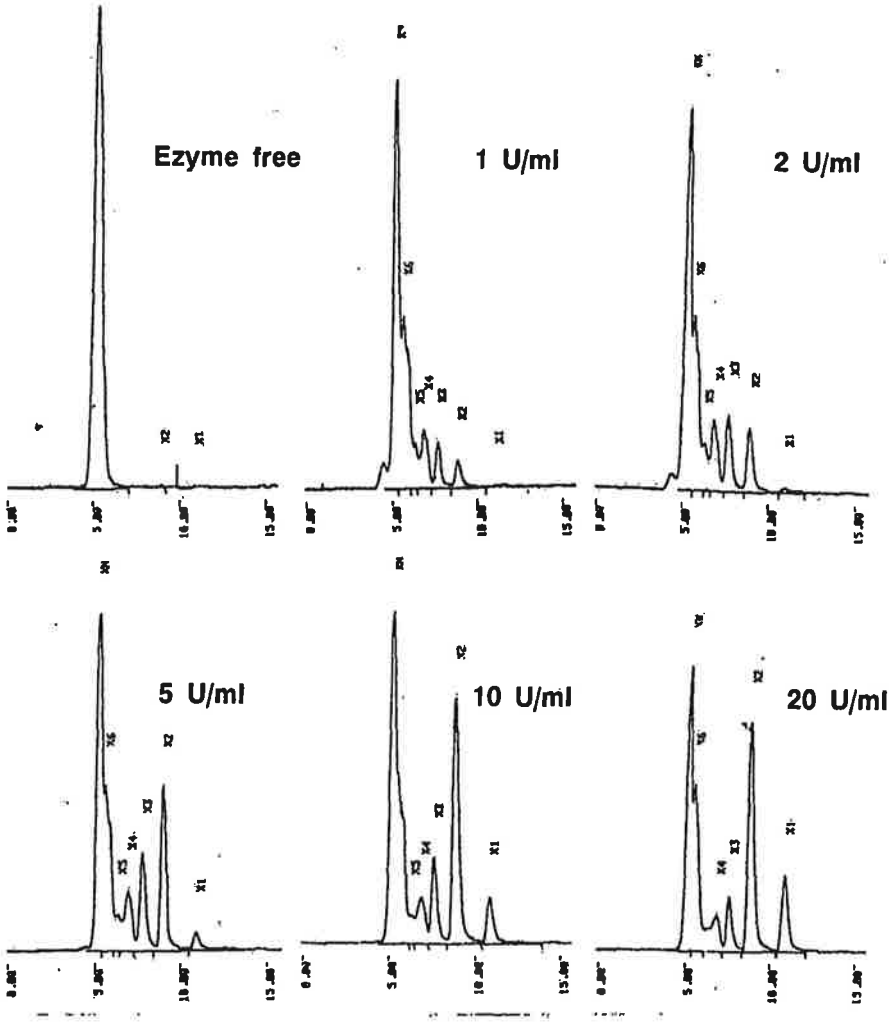

Fig. 2-56. HPLC analysis of the xylan hydrolyzates produced by various concentration of xylanases of *S. thermocyaneoviolaceus*. The reaction conditions were the same as Fig. 2-55.

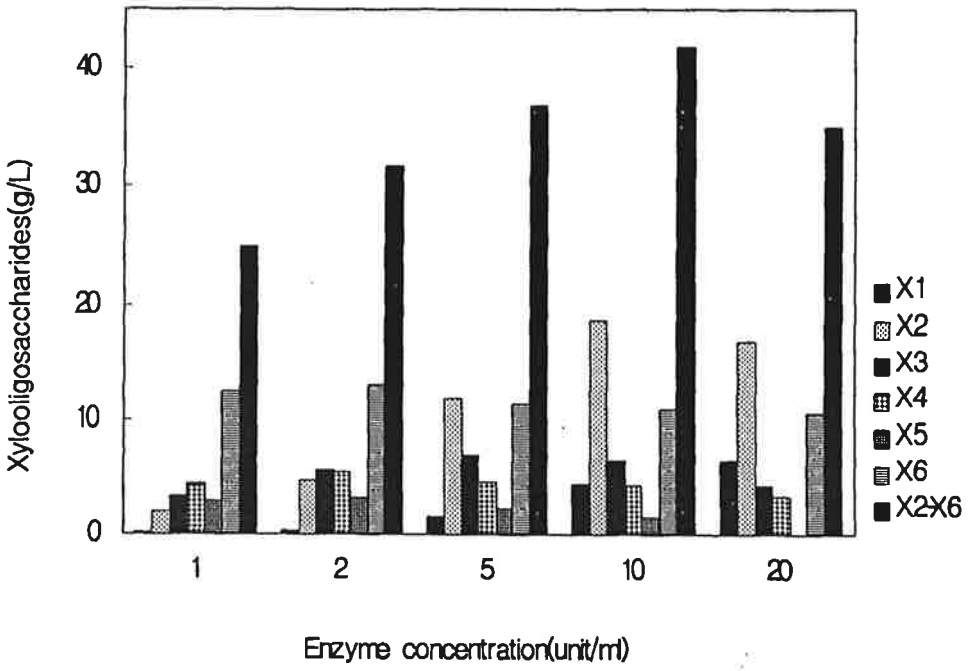

Fig. 2-57. Effect of enzyme concentration for the production of xylooligosaccharides. The concentration of xylooligosaccharides was calculated from HPLC data of Fig. 2-56.

라. 반응 pH에 따른 올리고당의 생산

S. thermocyaneoviolaceus xylanases로 xylan을 가수분해시킬 때 올리고당의 생산성에 미치는 반응 pH의 영향을 조사하기 위해 bichwood xylan 2 g를 20 ㎖의 각종 pH의 완충액으로 희석한 투석 효소액(final conc. 10 unit/㎖)을 첨가하여 잘 혼합한 후 60℃에서 12 시간 반응시켰다. 이 때 사용한 완충액은 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 4.0 5.5), 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6 8) 및 50mM glycine-NaOH buffer(pH 9 10)를 사용하였다. 반응액을 15,000 rpm으로 원심분리하여 얻은 상징액을 TLC 및 HPLC로 분석한 결과는 각각 그림 2-58와 그림 2-59와 같다. pH가 효소활성 최적 pH에 가까울수록 xylan을 가수분해하여 많은 올리고당을 생산하였지만 xylose의 양도 함께 상승하여 올리고당의 감소를 초래하였다(그림 2-60). 그 결과 올리고당의 생산에 최적인 pH는 6.0이었다.

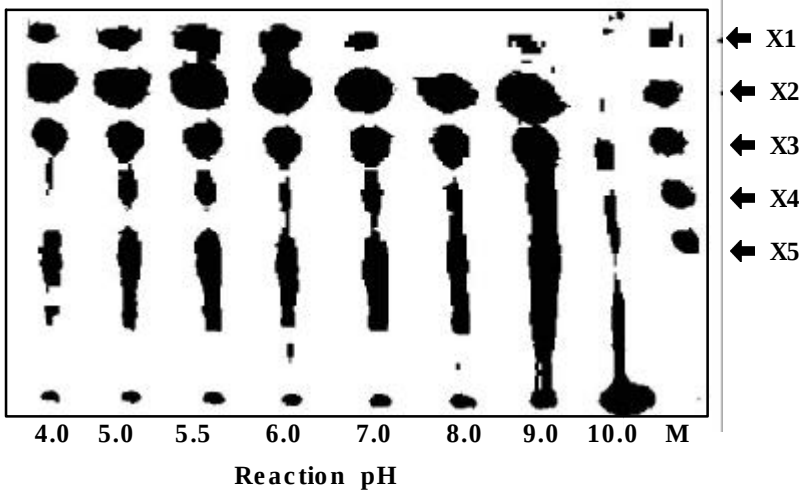

Fig. 2-58. Thin layer chromatography of the xylan hydrolyzates produced by xylanases of *S. thermocyaneoviolaceus* at various pH conditions. The reaction mixture was consisted of 20 ㎖ of 10% birchwood xylan solution and 10 unit/㎖ of xylanase in various pH solution and incubated at 60℃ for 12 h. Symbol: M, marker from Megazyme.

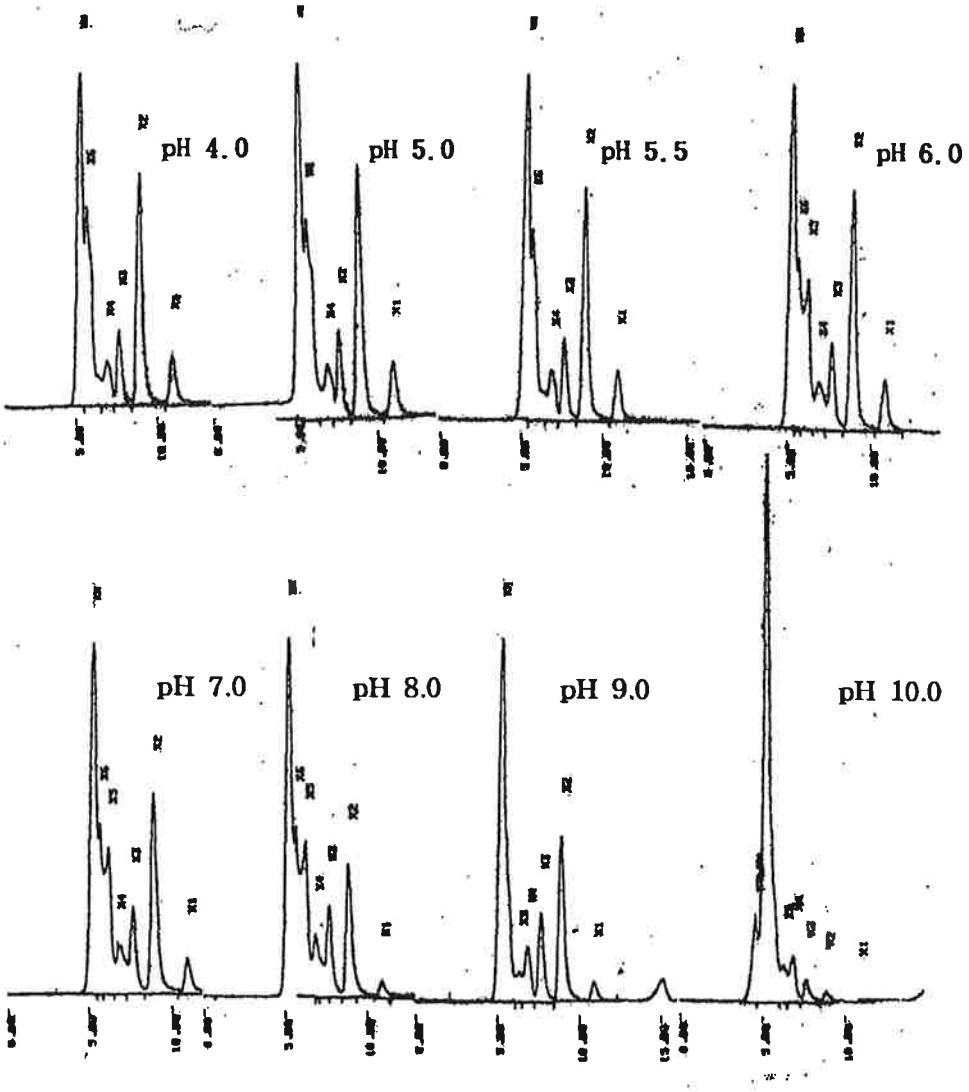

Fig. 2-59. HPLC analysis of the xylan hydrolyzates produced by the xylanases of *S. thermocyaneoviolaceus* at various pH condition. The reaction conditions were same as Fig. 2-58.

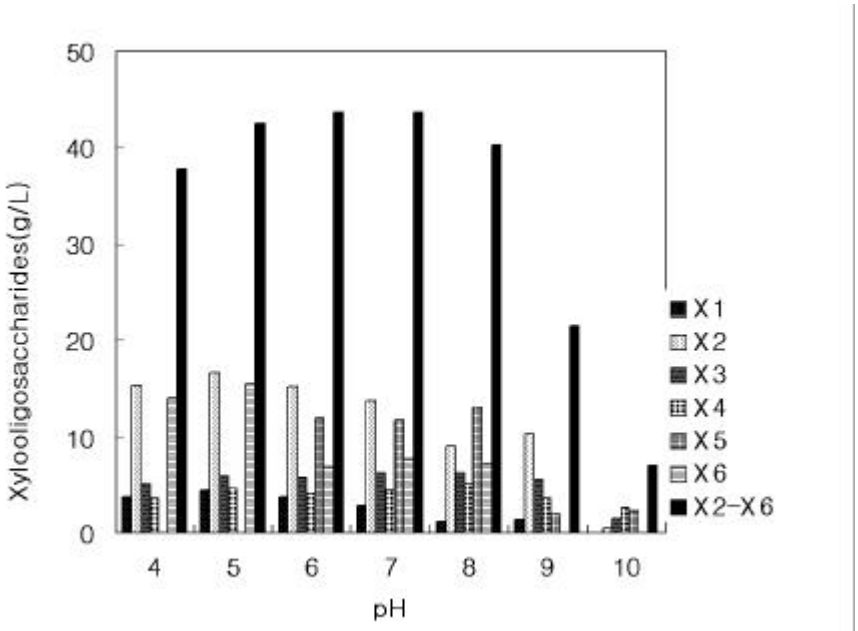

Fig. 2-60. Effect of pH condition for the production of xylooligosaccharides. The concentration of xylooligosaccharides was calculated from HPLC data of Fig. 2-59.

마. 반응시간에 따른 올리고당 생산

위의 실험에서 설정된 조건에서 반응시간에 따라 생성되는 xylooligo당의 조성을 분석하였다. Birchwood xylan 2 g에 20 ㎖의 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)으로 희석한 투석 xylanase용액(final conc. 10 unit/㎖)를 첨가하여 60℃에서 반응시키면서 시간별로 2 ㎖씩 시료를 채취하여 10

분간 boiling하여 효소반응을 정지시켰다. 이 시료를 15,000 rpm으로 원심분리하여 상징액을 얻은 후 TLC 및 HPLC를 이용하여 생성된 xylooligo당을 분석하였다(그림 2-61, 그림 2-62). 그 결과 반응시간별로 생성되는 올리고당(X_2~X_6) 함량이 가장 많은 최적반응 시간은 12 시간이었으며 반응시간이 진행될수록 X_1와 X_2의 함량이 증가하였다(그림 2-63).

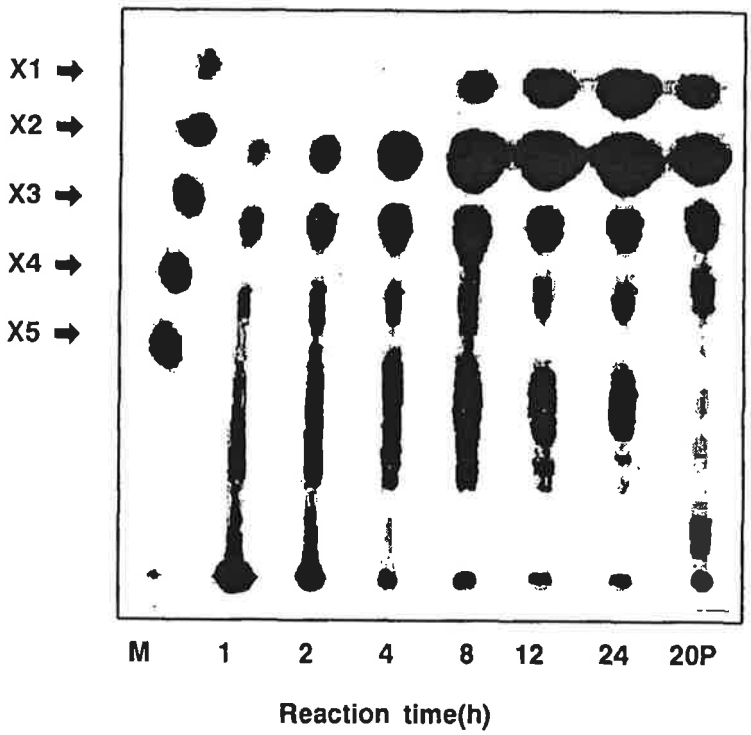

Fig. 2-61. Thin layer chromatography of the xylan hydrolyzates produced by xylanases of *S. thermocyaneoviolaceus* at various reaction time. The reaction mixture consisted of 20 ㎖ of 10% birchwood xylan and 10 unit/㎖ of xylanases in 50 mM phosphate buffer(pH 6.0) and incubated various reaction time at 60℃. The reaction was terminated with boiling for 10 min. Symbol: M, marker from Megazyme; 20P, Suntory xylooligomer(20P).

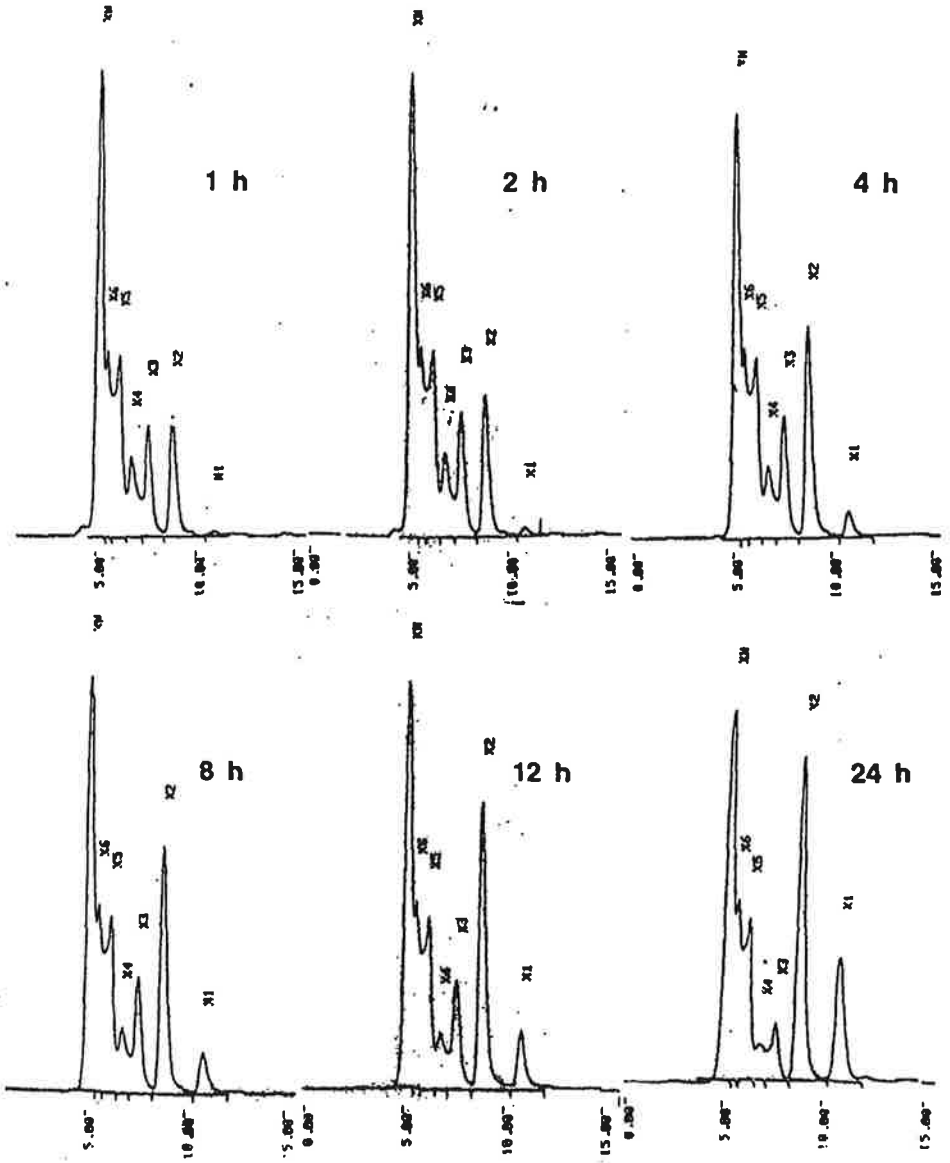

Fig. 2-62. HPLC analysis of the xylan hydrolyzates produced by the xylanases of *S. thermocyaneoviolaceus* at various reaction times.

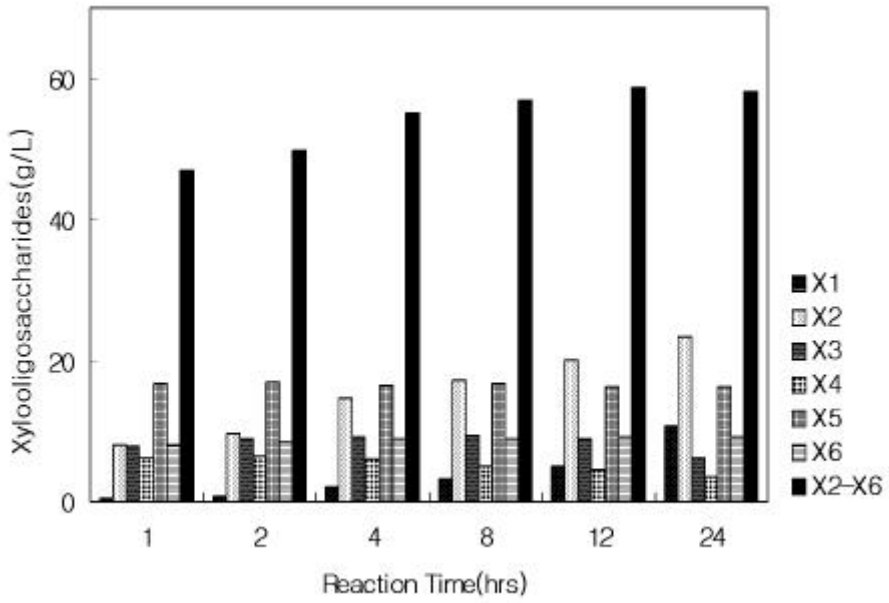

Fig. 2-63. Effect of reaction time to production of xylooligosaccharides. The concentration of xylooligosaccharides was calculated from HPLC data of Fig. 2-62.

위의 실험결과를 종합해 보면 S. *thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanases를 이용하여 올리고당을 생산하기 위한 최적조건은 10% birchwood xylan를 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)의 완충액에 현탁하여 60℃에서 10 unit/㎖ xylanases를 첨가하여 12 시간 반응시키는 것이다. 이러한 최적조건에서 생산할 수 있는 xylooligo당은 xylobiose 20.1 g/ℓ, xylotriose 8.9 g/ℓ, xylotetraose 4.5 g/ℓ, xylopentaose 16.2 g/ℓ, xylohexaose 9.1 g/ℓ으로 총 xylooligo당(X2 X6)은 58.8 g/ℓ를 생산할 수 있었다. 이 때 생성되는 xylose의 양은 5.0 g/ℓ였다.

2. 재조합 균주 BLR(DE3)/pEMA144 xylanase에 의한 올리고당의 생산

가. 효소농도별 올리고당의 생산

재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144의 xylanase(Xyn A; 정제효소 xylanase B3에 상당하는 효소)에 의한 xylan 가수분해시 생성되는 올리고당의 조성에 미치는 효소농도의 영향을 조사하기 위해 birchwood xylan 2 g를 50 mM sodium-phosphate buffer(pH 6.0)로 5, 10, 20 및 40 unit/㎖되게 희석한 효소액 20 ㎖에 현탁하고 60°C에서 12 시간 동안 반응시켰다. 반응생성물을 TLC와 HPLC로 분석한 결과는 각각 그림 2-64와 그림 2-65와 같다. 그림 2-65로부터 xylooligo당 함량을 조사한 결과 효소농도가 10 unit/㎖(최종농도) 이상일 때 거의 비슷한 양의 xylooligo당(X2 X6)을 생성하였으나 효소농도가 높아질수록 xylose 농도가 상승하였다(그림 2-66) 그러나 경제성을 고려할 때 10 unit/㎖로 반응시키는 것이 가장 좋을 것으로 사료된다.

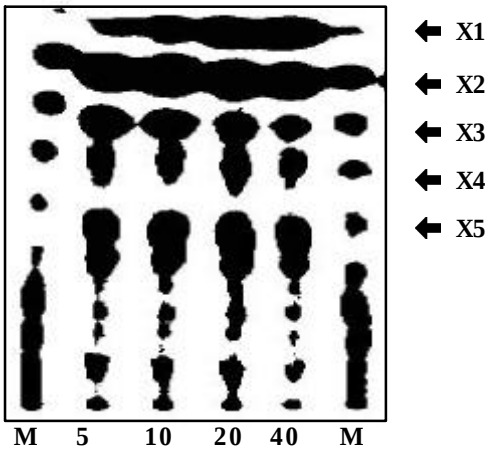

Fig. 2-64. Thin layer chromatography of the xylan hydrolyzates produced by various concentration of xylanase of BLR(DE3)/pEMA144. The reaction mixture was consisted of 20 ㎖ of 10% birchwood xylan and xylanase(final conc. 5 40 unit/㎖) which diluted with 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0) and incubated at 60°C for 12 h. Symbol: M, marker from Suntory xylooligomer(20P);

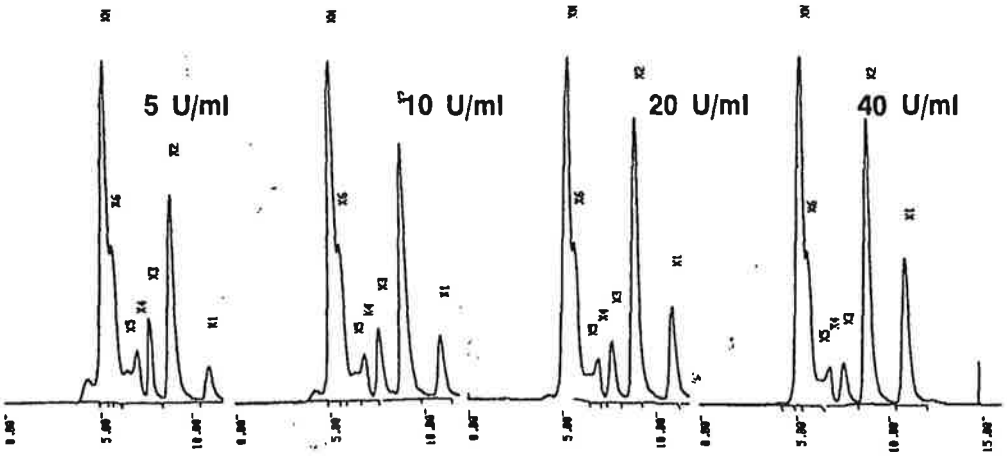

Fig. 2-65. HPLC analysis of the xylan hydrolyzates produced by various concentration of xylanase of BLR(DE3)/pEMA144. The reaction conditions were same as Fig. 2-64.

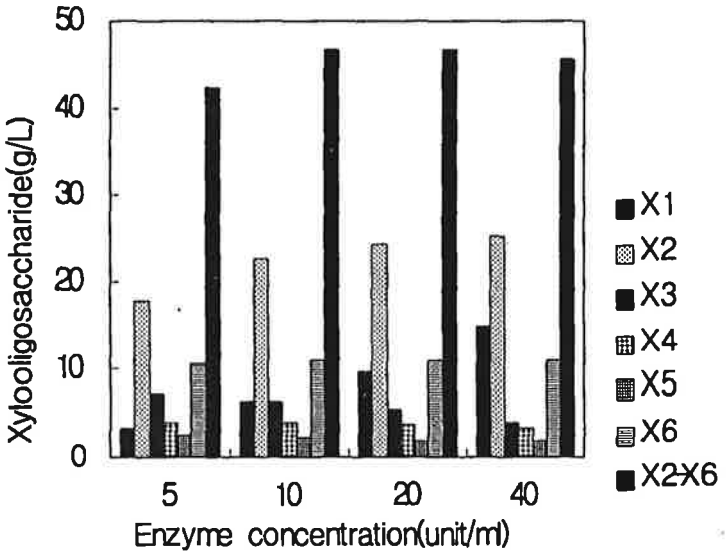

Fig. 2-66. Effect of enzyme concentration to production of xylooligosaccharides. The concentration of xylooligosaccharides was calculated from HPLC data of Fig. 2-65.

나. 반응 pH에 따른 올리고당의 생산

재조합 균주 BLR(DE3)/pEMA144가 생산하는 xylanase(Xyn A)에 의한 xylooligo당 생산에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해서 birchwood xylan 2 g을 20 ㎖의 각종 buffer로 희석한 효소액(final conc. 10 unit/㎖)에 첨가하여 잘 혼합한 후 60℃에서 12 시간 반응시켰다. 이 때 사용한 완충액은 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 4.0 5.5), 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6 8) 및 glycine-NaOH buffer(pH 9 10)를 사용하였다. 생성된 xylooligo당의 조성을 TLC와 HPLC로 분석한 결과 각각 그림 2-67과 그림 2-68과 같다. 그림 2-68로부터 xylooligo당 함량을 조사한 결과 X2와 전체 올리고당(X2 X6) 함량이 xylanase의 효소반응 최적 pH인 5.0 부근에서 가장 높았다(그림 2-69).

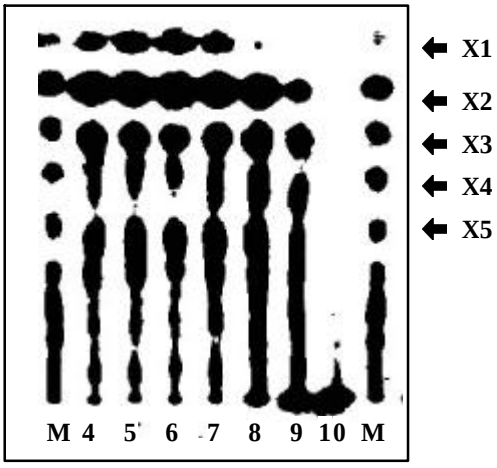

Fig. 2-67. Thin layer chromatography of the xylan hydrolyzates produced by xylanase of BLR(DE3)/pEMA144 at various pH conditions. The reaction mixture was consisted of 20 ㎖ of birchwood xylan and 10 unit/㎖ xylanase in various pH buffers and incubated at 60℃ for 12 h. M, marker from Suntory xylooligomer(20P).

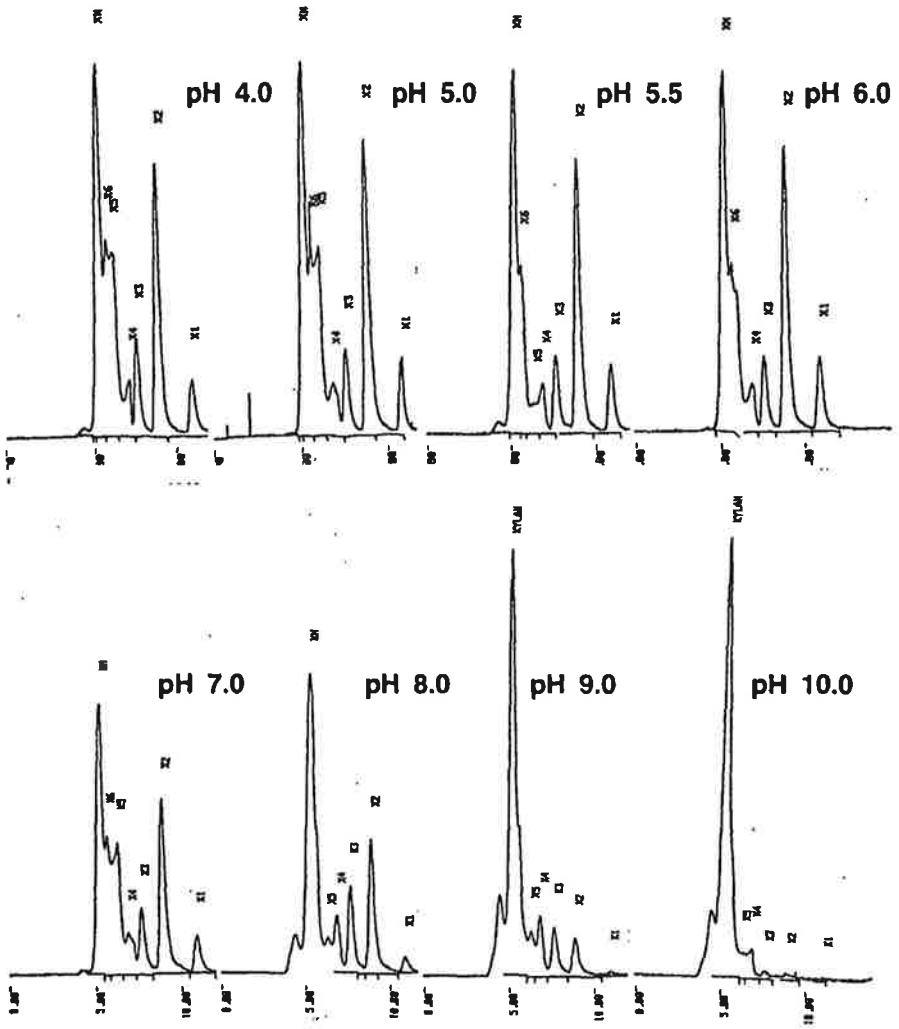

Fig. 2-68. HPLC analysis of xylan hydrolyzates produced by xylanase of BLR(DE3)/pEMA144 at various pH conditions. The reaction conditions were the same as Fig. 2-67.

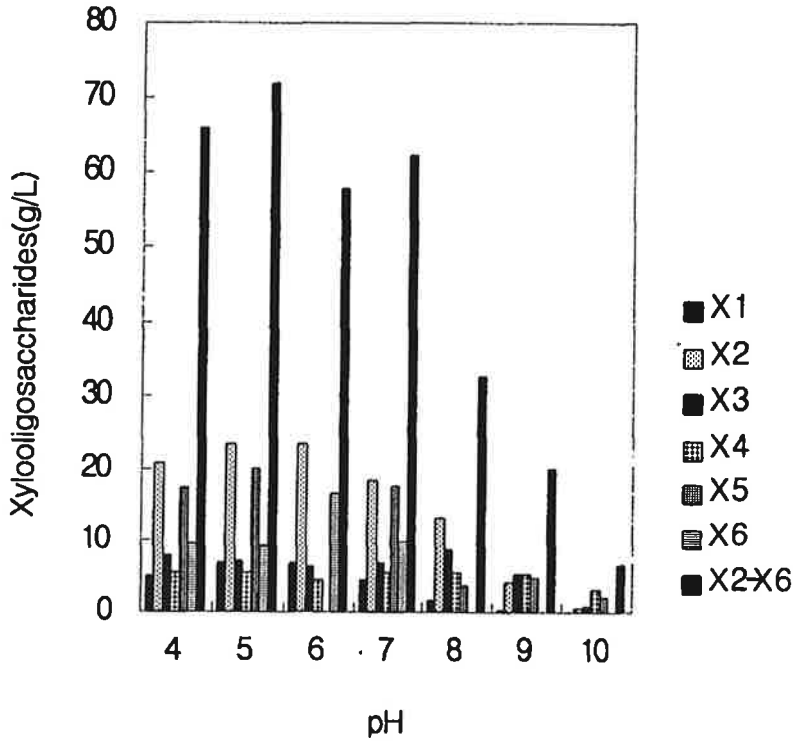

Fig. 2-69. Effect of pH condition to production of xylooligosaccharides. The concentration of xylooligosaccharides was calculated from HPLC data of Fig. 2-68.

다. 반응시간에 따른 올리고당 생산

상기 실험에서 설정된 효소농도와 최적 pH 5.0에서 birchwood xylan 2 g을 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 5.0)로 희석한 효소용액 20 ㎖(final conc. 10 unit/㎖)에 현탁한 후 60℃에서 반응시키면서 반응시간별로 2 ㎖의 시료를 채취하여 10 분간 boiling하여 효소반응을 정지시켰다. 급냉후 4℃ 냉장실에 보관후 15,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 상징액을 TLC 및 HPLC로 반응 시간별 생성되는 xylooligo당의 조성을 분석하였다(그림 2-70 및 그림 2-71). 그림 2-71로부터 xylooligo당(X2 X6)의 함량을 측정한 결과 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144가 생산하는 xylanase(XynA)를 이용한 xylooligo당의 생산을 위해서는 24 시간 정도 반응시키는 것이 가장 좋을 것으로 생각되었다(그림 2-72).

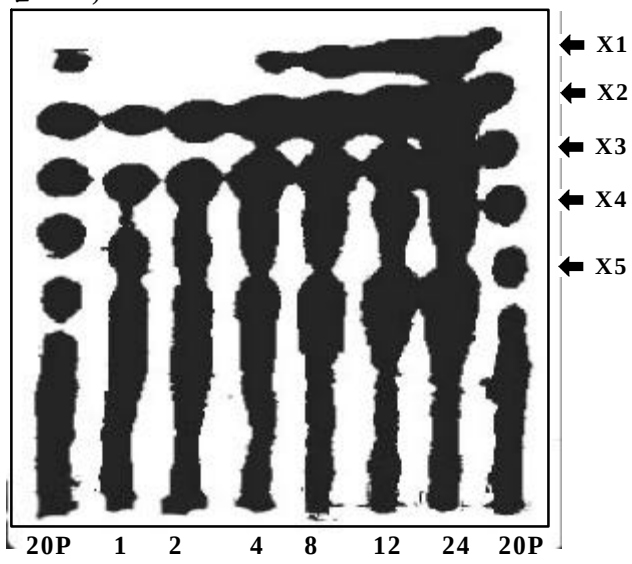

Fig. 2-70. Thin layer chromatography of the xylan hydrolyzates produced by xylanase of BLR(DE3)/pEMA144 at various reaction time. Symbol: 20P, marker of Suntory xylooligomer (20P).

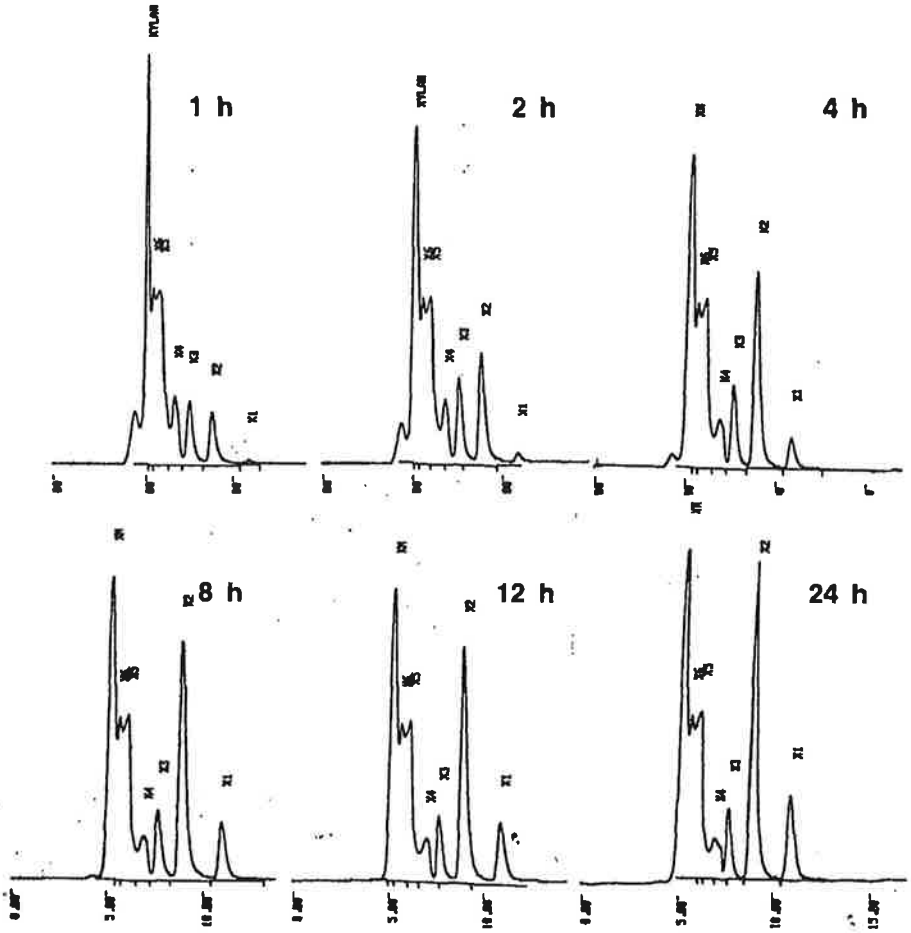

Fig. 2-71. HPLC analysis of the xylan hydrolyzates produced by the xylanase of BLR(DE3)/pEMA144 at various reaction times. The reaction mixture and conditions were the same as Fig. 2-70.

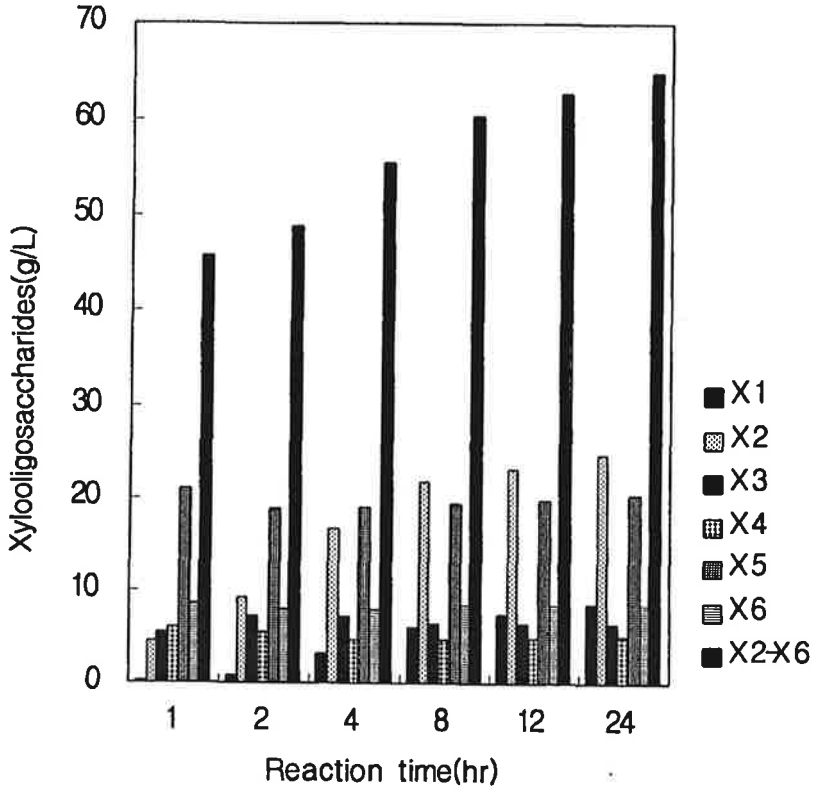

Fig. 2-72. Effect of reaction time for the production of xylooligosaccharides. The concentration of xylooligosaccharides were calculated from HPLC data of Fig. 2-71.

이상의 결과를 종합하면 재조합 대장균 BLR(DE3)/PEMA144가 생산하는 xylanase(XynA)를 이용하여 xylooligo 당을 생산하기 위한 최적조건은 10% birchwood xylan을 50 mM sodium-phosphate buffer(pH 6.0)에 10 unit/㎖의 xylanase(XynA)를 첨가하여 60℃에서 24 시간 반응시키는 것이다. 이러한 최적조건에서 생산된 xylooligo 당의 함량은 10% birchwood xylan을 기질로 사용하였을 때 xylobiose 24.6 g/ℓ, xylotriose 6.5 g/ℓ, xylotetraose 5.1 g/ℓ, xylopentaose 8.5 g/ℓ, xylohexaose 8.5 g/ℓ으로 총 xylooligo당 함량은 65.0 g/ℓ였다. 이때 xylose는 7.4 g/ℓ를 생성하였다.

3. 재조합 균주 BLR(DE3)/pEMB10의 xylanase에 의한 올리고당 생산

가. 효소농도별 올리고당의 생산

재조합 균주인 BLR(DE3)/pEMB10이 생산하는 xylanase(XynB)에 의한 xylooligo당 xylan 가수분해시 생성되는 xylooliogo당의 조성을 분석하기 위하여 birchwood xylan 2 g을 효소의 최종농도 5, 10, 20 및 40 unit/㎖되게 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 희석한 효소액 20 ㎖에 각각 첨가하여 60℃에서 12 시간 효소반응을 시켰다. 이 반응액을 15,000 rpm에서 원심분리하여 그 상징액을 TLC 및 HPLC로 분석한 결과는 각각 그림 2-73과 그림 2-74와 같다. 그림 2-74로부터 xylooligo당 함량을 조사한 결과 40 unit/㎖의 효소농도에서 가장 많은 올리고당을 생산하였으나 20 unit/㎖와 큰 차이가 없으므로 경제성을 고려할 때 20 unit/㎖의 효소를 사용하는 것이 좋을 것으로 생각된다(그림 2-75).

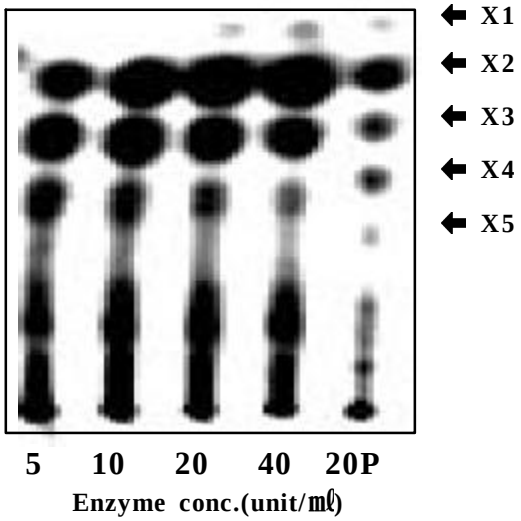

Fig. 2-73. Thin layer chromatography of the xylan hydrolyzates produced by various concentration of xylanase of BLR(DE3)/pEMB10. The reaction mixture was consisted of 20 ㎖ of birchwood xylan and various concentraion of xylanase in 50 mM citrate-phosphate buffer(pH 6.0) and incubated at 60℃ for 12 h. Symbol: M, marker from Suntory xylooligomer(20P).

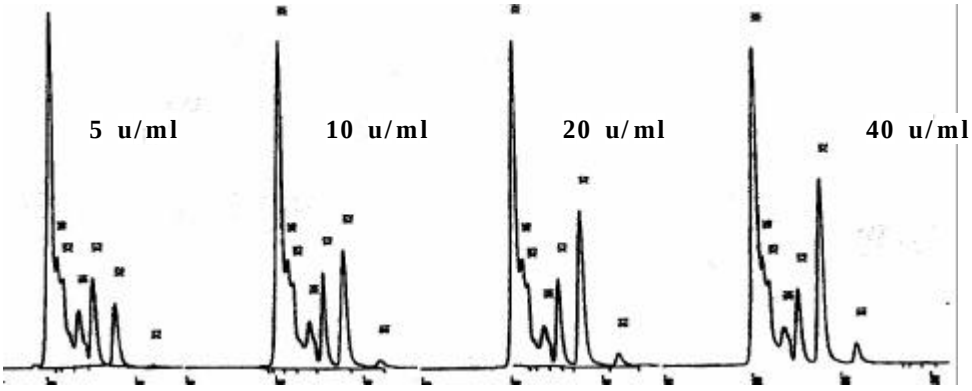

Fig. 2-74. HPLC analysis of the xylan hydrolyzates produced by various concentration of xylanase of BLR(DE3)/pEMB10. The reaction conditions were the same as Fig. 2-73.

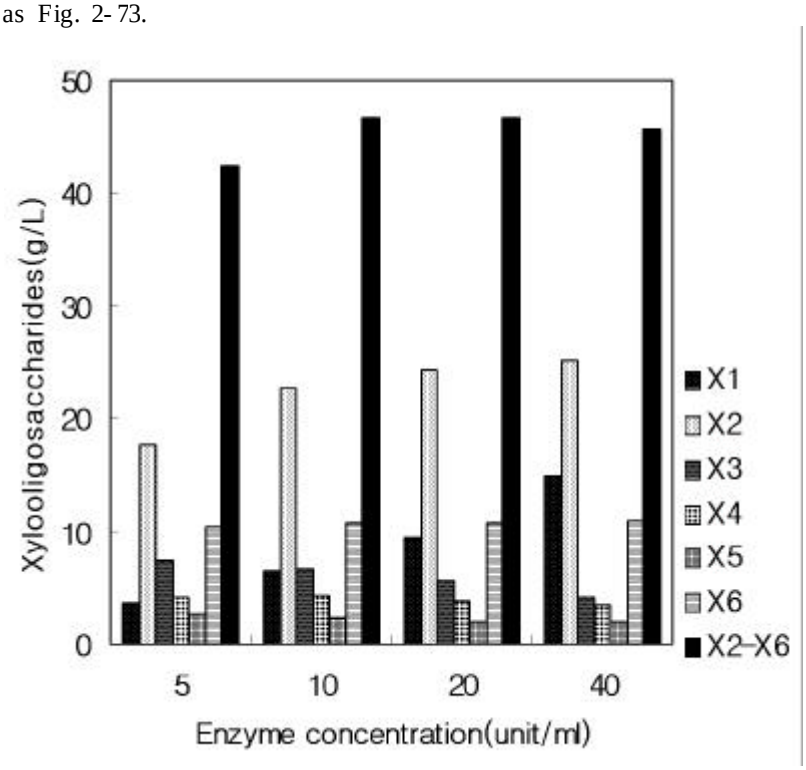

Fig. 2-75. Effect of enzyme concentration to production of xylooligosaccharides. The concentration of xylooligosaccharides was calculated from HPLC data of Fig. 2-74.

나. 반응 pH에 따른 올리고당의 생산

재조합 균주 BLR(DE3)/pEMB10 xylanase(XynB)에 의한 xylooligo 당 생산에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 birchwood xylan 2 g을 각종 완충액으로 희석한 효소액(final conc. 20 unit/㎖)에 넣어 60℃에서 12 시간 반응시킨 후 생성된 xylooligo당의 조성을 TLC 및 HPLC로 분석한 결과는 그림 2-76와 그림 2-77와 같다. 그림 2-77로부터 xylooligo 당 함량을 조사한 결과 이 xylanase는 효소작용 최적 pH보다는 pH 6.0에서 가장 좋은 xylooligo 당 조성을 나타내었다(그림 78).

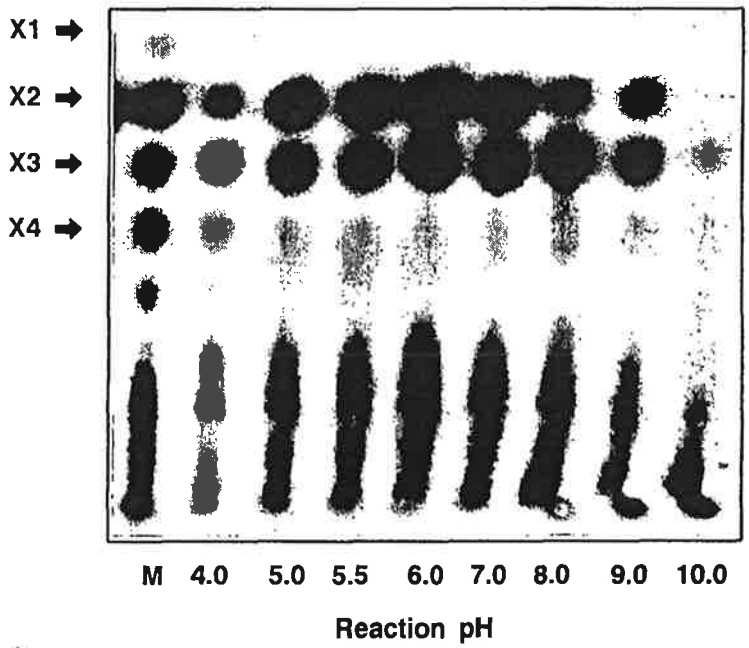

Fig. 2-76. Thin layer chromatography of the xylan hydrolyzates produced by xylanase of BLR(DE3)/pEMB10 at various pH conditions. The reaction mixture was consisted of 20 ㎖ of birchwood xylan and 20 unit/㎖ xylanase(final conc.) in various pH solutions and was incubation at 60℃ for 12 h. Symbol; ; M, marker from Suntory xylooligomer(20P).

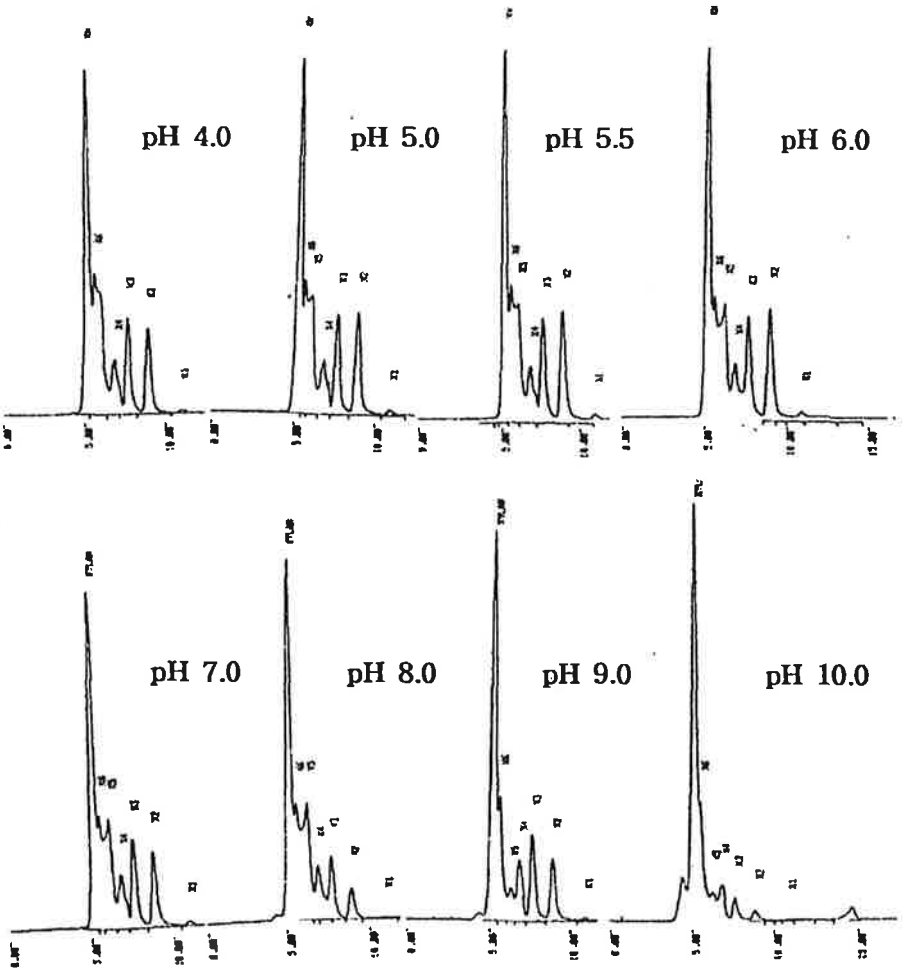

Fig. 2-77. HPLC analysis of the xylan hydrolyzates produced by the xylanase of BLR(DE3)/pEMB10 at various pH conditions. The reaction conditions were the same as Fig. 2-76.

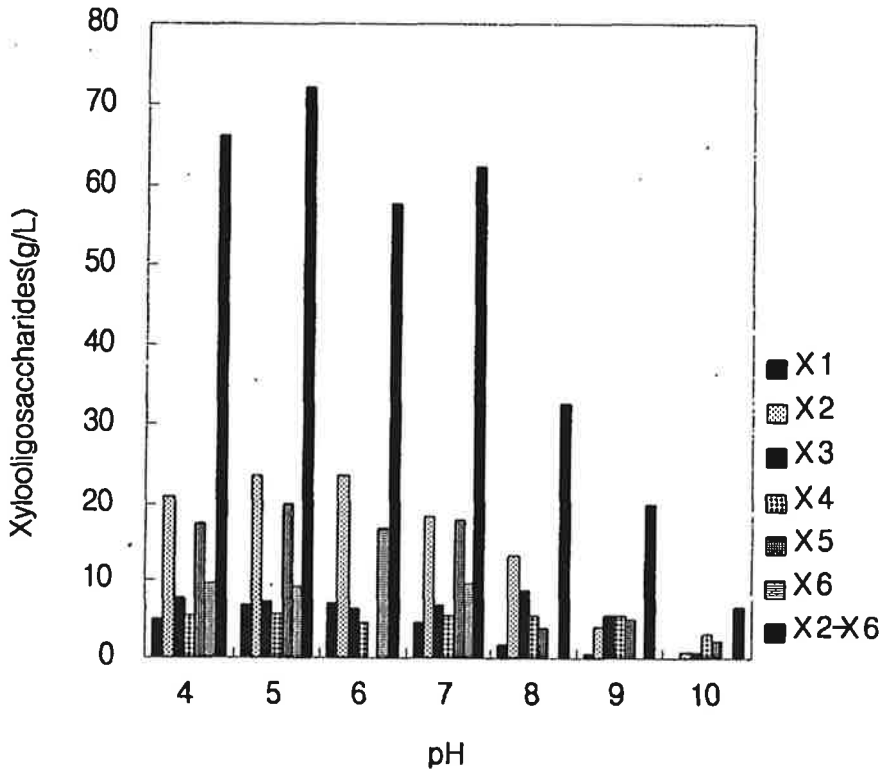

Fig. 2-78. Effect of pH condition to production of xylooligosaccharides. The concentration of xylooligosaccharides was calculated from HPLC data of Fig. 2-77.

다. 반응시간에 따른 올리고당 생산

상기 실험에서 설정된 효소농도와 최적 pH인 6.0에서 반응시간별 생성되는 xylooligo 당의 조성을 분석하기 위해 birchwood xylan 2 g을 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 희석한 효소용액 20 mℓ(최종농도 20 unit/mℓ)를 넣어 잘 혼합한 다음 60℃에서 반응시키면서 각 반응시간별로 2 mℓ의 시료를 채

취하였다. 효소반응 정지시키기 위해서 10 분간 boiling한 후 15,000 rpm으로 원심분리한 후 TLC 및 HPLC로 분석한 결과는 각각 그림 2-79와 그림 2-80과 같다. 그림 2-80으로부터 xylooligo당 함량을 조사한 결과를 보면 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10이 생산하는 xylanase(XynB)를 이용한 xylooligo당 (X2 X6)의 생산을 위해서는 24 시간 정도 반응시키는 것이 가장 좋았다(그림 2-81)

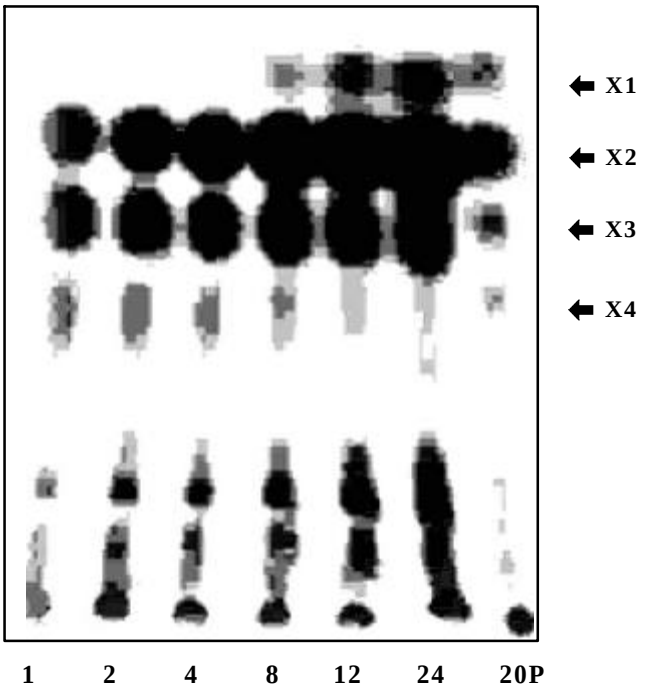

Fig. 2-79. Thin layer chromatography of the xylan hydrolyzates produced by xylanase of BLR(DE3)/pEMB10 at various reaction time. The reaction mixture consisted of 20 ㎖ of birchwood xylan and 20 unit/㎖ of xylanase (final conc.) in 50 mM sodium phosphate buffer(pH 6.0) and incubated at 60℃ and terminated with boiling 10 min. Symbol: 20P, marker of Suntory xylooligomer(20P).

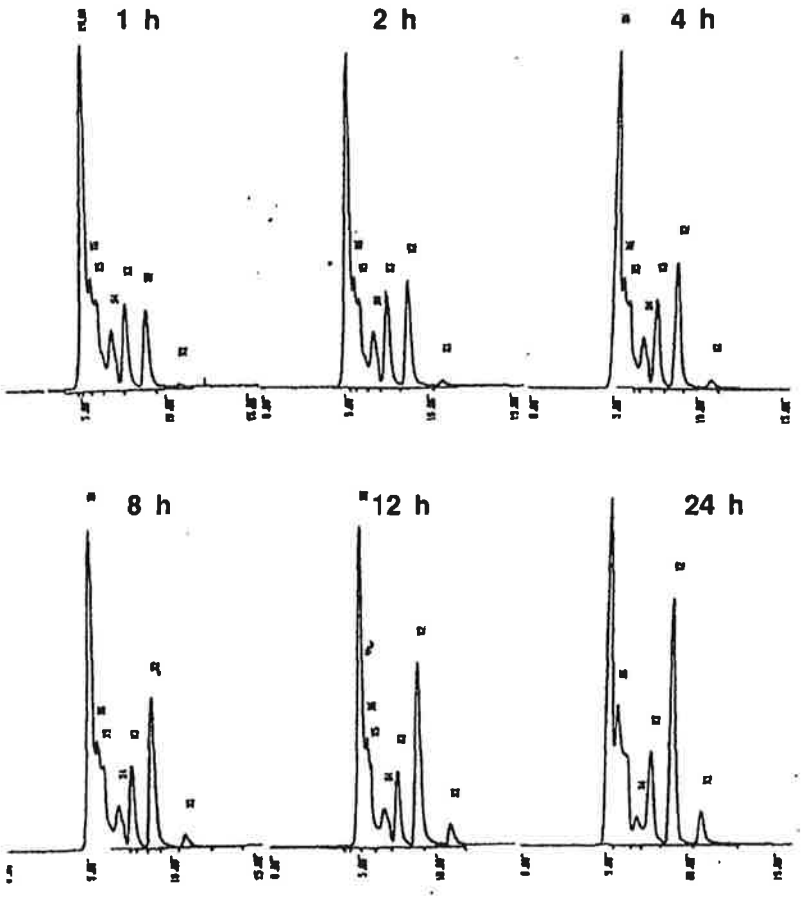

Fig. 2-80 . HPLC analysis of the xylan hydrolyzates produced by the xylanases of BLR(DE3)/pEMB10 at various reaction times.

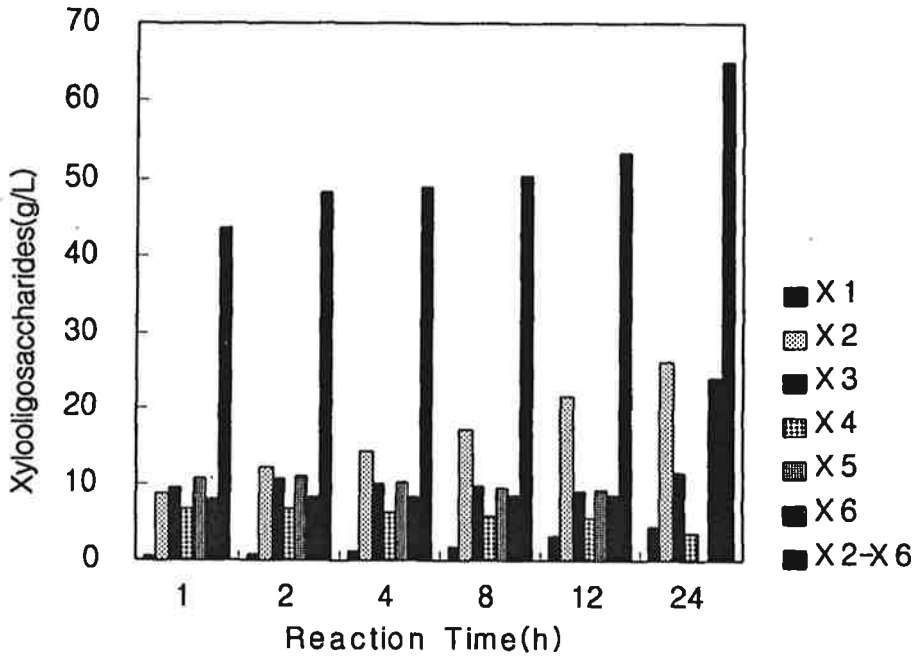

Fig. 2-81. Effect of reaction time for the production of xylooligosaccharides. The concentration of xylooligosaccharides was calculated from HPLC data of Fig. 2-?.

이상의 결과를 종합하면 재조합 대장균 BLR(DE2)/pEMB10이 생산하는 xylanase를 이용하여 xylooligo 당(X_2~X_6)을 생산하기 위한 최적 조건은 10% birchwood xylan(50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0)를 첨가하여 60℃에서 24시간 반응시키는 것이 가장 좋았다. 이때 생성되는 xylooligo 당의 조성은 xylobiose 26.1 g/ℓ, xylotriose 11.4 g/ℓ, xylotetraose 3.6 g/ℓ, xylohexaose 23.9 g/ℓ였으며 xylooligo 당의 양은 65.0 g/ℓ였다. 이 때 생성되는 xylose의 양은 4.3 g/ℓ였다.

제 9 절 결 론

Xylan으로부터 xylooligo 당을 생산할 수 있는 우수한 xylanase를 생산하는 내열성 미생물을 선발하여 이 균의 xylanase 생산조건을 검토하고 이 균이 생산하는 4종의 xylanase를 정제하여 그 특성을 조사하였다. 그 중 효소학적 성질이 우수한 2종의 xylanase 유전자를 대장균에 클로닝하여 DNA 염기서열을 분석하였다. 이 재조합 대장균이 생산하는 xylanase 생산조건을 검토하여 증폭생산에 성공하였다. 선발균주인 *S. thermocyaneoviolaceus* M-049가 생산하는 복합 xylanases와 재조합 대장균이 증폭생산한 2종의 xylanase를 사용하여 xylan으로부터 xylooligo 당의 생산조건을 확립하였다. 이상의 결과를 정리하면 다음과 같다.

1. 부엽토, 임산 퇴적장 및 퇴비 등으로부터 분리한 xylan 분해력이 강한 균주 235주와 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행(KCTC) 및 한국종균협회부설 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 내열성 세균 및 방선균류 34종으로부터 xylanase 생산력과 xylooligo 당의 생산특성을 고려하여 *S. thermocyaneoviolaceus* M-049를 최종 선발하였다.
2. 본 균주의 효소생산 조건을 검토하여 0.8% 밀기울, 0.06% yeast extract, 0.06% bactopeptone, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KH_2PO_4 및 0.2% K_2HPO_4(pH 7.0)로 구성된 효소생산배지(WB배지)를 확립하였다.
3. Jar-fermentor를 이용한 효소 대량 생산 조건은 공기주입량 2 vvm, 교반속도 400 rpm으로 2% 밀기울을 첨가한 WB배지에서 24 시간 이상 배양하는 것이 최적이었으며, 이 때 생산되는 효소량은 배양액 ㎖당 14.2 unit이었다.
4. *S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase를 황산암모니아 염석, DEAE Sephadex A-50 ion exchange chromatography, Sephacryl S-200 HR gel chromatography 및 FPLC(Superose 12 HR column)를 이용하여 xylanase

N1, B2, B3는 단일 단백질로 정제하였으며, B1은 조정제하였다. 이들 xylanase의 분자량을 SDS-PAGE로 측정한 결과 xylanase N1의 분자량은 35 kDa, B2는 25 kDa, B3는 47 kDa으로 추정되었다.

5. 정제된 xylanase의 최적 pH는 xylanase N1, B1, B2 및 B3가 pH 5.0 5.5사이로 유사한 범위를 나타내었고, pH 안정성은 pH 4.5 10.5 사이에서 80% 이상의 활성을 유지하는 안정한 효소였다.
6. 정제된 xylanase의 최적 온도는 xylanase N1은 65℃이었고, Xylanase B1은 70℃이고, B2와 B3는 65℃로 비슷하였다. 효소의 열 안정성은 xylanase N1은 높은 온도인 65℃까지도 95% 이상의 효소 활성을 유지하는 내열성 효소였으며, Xylanase B1, B2 및 B3는 55℃까지 안정하였다. *S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase들중 내열성이 가장 높은 것은 xylanase N1이었다.
7. Birchwood xylan에 대한 정제 xylanase N1, B1, B2 및 B3의 Km값은 각각 10.92, 2.15, 11.80 및 2.62 mg/㎖이었으며, Vmax는 3.02, 0.71, 4.52 및 1.10 μmol/min이었다.
8. 불용성 xylan 및 Avicel에 대한 binding assay를 실시한 결과는 xylanase N1은 불용성 xylan 및 Avicel에 잘 결합하였다. Xylanase B1, B2 및 B3는 50 ㎎/㎖의 불용성 xylan에 대해서 각각 38%, 83% 및 73%의 효소가 결합하였으나, Avicel에 대해서는 xylanase B3는 20%, xylanase B1과 B2는 10% 이하로 결합력이 아주 낮았다.
9. Birchwood xylan를 분해시켰을 때 xylooligo 당의 생성양상은 정제된 xylanase N1에 의해 생성된 xylooligo 당은 X2와 X3가 주생성물이었으며 이때 X3의 양이 X2보다 약간 더 많았다. Xylanase B1과 B3는 X2가 주된 생성물이며 X3를 상당량 함유하는 xylooligo 당을 생산하였으며 xylanase B2는 X3가 주된 생성물이며 X2와 X4를 상당량 함유하는 xylooligo 당을 생산하였다.
10. Xylanase N1, B1, B2 및 B3의 각종 xylooligo 당(X2 X6)에 대한 작용양

상은 X2를 기질로 사용하였을 때 전혀 분해하지 못하였으며, X3를 기질로 사용하였을 때, xylanase N1은 전혀 분해하지 못하였으며, xylanase B1, B2 및 B3는 약하게 작용하여 소량의 xylose와 X2를 생성하고 많은 양의 X3를 남겼다. X4를 기질로 사용하였을 때 xylanase N1은 거의 분해하지 못하였으며, xylanase B1, B2 및 B3는 대부분의 X4를 분해하여 X2를 주된 분해산물로 생성하고, 미량의 xylose와 X3를 생성하였다. X5를 기질로 사용하였을 경우에는 xylanase N1은 X2, X3를 소량 생성하였고 다량의 미분해 X5와 특이하게 X5보다 더 긴 올리고당을 소량 생성하였다. Xylanase B1, B2 및 B3는 X5를 분해하여 주된 산물로 X2를 생성하였으며 소량의 xylose와 X3를 생성하였다.

11. 정제된 효소 xylanase N1과 B3의 아미노 말단 아미노산 서열을 분석한 결과, xylanase N1은 아미노 말단이 aspartic acid 잔기이고, 아미노 말단으로부터 15개 아미노산 잔기의 서열(DTITSNQTGTHNGYF)을 밝혔으며, xylanase B3는 아미노 말단이 alanine 잔기이고, 아미노 말단으로부터 10개 아미노산 잔기의 서열(AESTLGAAAA)을 밝혔다.

12. *S. thermocyaneoviolaceus*로부터 xylanase 유전자를 클로닝하기 위해서 genomic DNA를 분리하여 λBlueSTAR를 사용하여 DNA library를 제작한 다음 PCR로 제작한 probe로 *xyn*A(xylanase B3의 유전자)와 *xyn*B(xylanase N1의 유전자)를 함유하는 클론을 선별하기 위해서 plaque hybridization을 하여 분리된 클론을 λBlueSTAR의 *cre-lox*P mediated auto-subcloning system을 이용하여 plasmid 형태로 subcloning하였다. Subcloning된 재조합 플라스미드들은 플라스미드를 추출하여 대장균 DH5α에 다시 형질전환시켜서 RBB-xylan plate에서 뚜렷한 분해환을 나타내는 2종의 클론을 선발하였다. 이들 중 *xyn*A 및 *xyn*B probe에 대하여 signal을 보이는 재조합 플라스미드를 각각 pSMA4 및 pSMB8으로 명명하고 insert DNA의 크기를 확인한 결과 각각 15 kb 및 12 kb로 나타났으며, 이들을 *S. thermocyaneoviolaceus*의 xylanase 유전자의 클론으로 추정하였다.

13. 클로닝된 pSMA4(*xyn*A) 및 pSMB8(*xyn*B)을 *xyn*A 및 *xyn*B probe로 southern hybridization을 하여 *xyn*A의 경우 2.7 kb 크기의 Sph Ⅰ 단편을 subcloning하고 pUMA2라고 명명하고 *xyn*B 유전자는 3.3 kb 크기의 BamH Ⅰ 단편을 subcloning하고 pWMB81이라고 명명하였으며, 이들은 모두 RBB-xylan plate에서 뚜렷한 분해환을 형성하였다.

14. *S. thermocyaneoviolaceus xyn*A 및 *xyn*B gene의 염기서열을 분석한 결과 *xyn*A 유전자는 개시 codon인 ATG로부터 종지 codon인 TGA까지를 포함해서 1431 bp이었으며, 476개의 아미노산 잔기로 구성되어 있었다. *xyn*B 유전자는 개시 codon인 ATG로부터 종지 codon인 TGA까지를 포함해서 1008 bp이었으며, 335개의 아미노산 잔기로 구성되어 있었다. 이 두 유전자의 xylanase는 아미노 말단으로부터 40개 아미노산 잔기가 signal peptide였다. 이들 유전자의 염기서열들은 GenBank의 nucleotide sequence databases에 등록하였으며 *xyn*A의 gene accession no.는 AF194024이고 *xyn*B는 AF194025이다.

15. 재조합 DNA 기술에 의한 xylanase의 증폭생산을 위해서 *xyn*A 및 *xyn*B의 overexpression 벡터를 제작하였다. 각각 유전자의 DNA 염기서열로부터 개시 codon에 Nde Ⅰ site를 도입한 PCR primer와 종지 codon에 EcoR Ⅰ site를 도입한 PCR primer를 합성하여 *xyn*A 유전자는 pSMA4, *xyn*B 유전자는 pSMB8을 주형으로 PCR 증폭한 다음 이들 단편을 pET21a(+)의 Nde Ⅰ-EcoR Ⅰ 절단부위에 삽입하여 BLR(DE3)에 형질전환시켰다. 약 1.4 kb의 *xyl*A 단편을 함유한 벡터를 pEMA144로 명명하고, 약 1.0 kb의 *xyn*B 단편을 함유한 벡터를 pEMB10으로 명명하였다. 이들 형질전환체는 RBB-xylan 평판에서 분해환을 형성하였으며, 대장균에서 xylanase를 세포밖으로 분비할 수 있었다.

16. *xyn*A 유전자를 cloning한 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144에서 생산한 xylanase인 XynA(정제 xylanase B3에 해당됨)와 *xyn*B 유전자를 cloning한 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10에서 생산한 xylanase인 XynB(정제

xylanase N1에 해당됨)가 *S. thermocyaneoviolaceus* xylanase B3 및 N1과 같은 특성을 가지고 있는지를 조사한 결과 최적온도, 최적 pH, 열안정성, pH 안정성 등에서 별 차이 없이 비슷하였다.

17. 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144에 의한 xylanase(XynA) 생산에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향을 조사한 결과 효소생산배지는 0.5% yeast extract, 1.0% tryptone, 1.0% NaCl, 0.5% casamino acid, 0.2% MSG로 최종 결정하였다. 또한 효소를 대량 생산하기 위한 jar-fermentor 배양최적조건은 2 vvm의 공기주입과 300의 교반속도로 24 시간 이상 배양할 때 가장 많은 양의 xylanase를 생산하였으며, 이 때 생산되는 효소의 양은 ㎖당 128.5 unit였다.

18. 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10에 의한 xylanase(XynB) 생산에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향을 조사한 결과 효소생산용 배지는 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, 1.0% tryptone 및 0.2% CSL로 결정하였다. Jar-fermentor 배양최적조건은 2 vvm의 공기주입과 300 rpm의 교반속도로 16 시간 이상 배양할 때 가장 많은 양의 xylanase를 생산하였으며, 이 때 생산되는 효소의 양은 ㎖당 142 unit였다.

19. S. *thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 복합 xylanases를 이용하여 올리고당을 생산하기 위한 최적조건은 10% birchwood xylan(50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0)에 10 unit/㎖ xylanases를 첨가하여 60℃에서 12 시간 반응시키는 것이다. 이러한 최적조건에서 생산할 수 있는 xylooligo 당은 X2 20.1 g/ℓ, X3 8.9 g/ℓ, X4 4.5 g/ℓ, X5 16.2 g/ℓ, X6 9.1 g/ℓ으로 총 xylooligo당(X2 X6)은 58.8 g/ℓ를 생산할 수 있었다. 즉 본 효소는 X2를 주축으로 하는 xylooligo 당을 주로 생산하였다.

20. 재조합 균주 BLR(DE3)/pEMA144의 xylanase에 의한 올리고당의 생산최적조건은 10% birchwood xylan(50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0)에 10 unit/㎖의 xylanase(XynA)를 첨가하여 60℃에서 24 시간 반응시키는 것이 가장 좋았으며, 이 때 생성되는 xylooligo 당의 조성은 X2 24.6 g/ℓ, X3 6.5

g/ℓ, X4 5.1 g/ℓ, X5 20.3 g/ℓ, X6 8.5 g/ℓ으로 총 xylooligo 당(X2 X6)은 65.0 g/ℓ였다. 즉 본 효소는 X2를 주축으로 하는 X5 이하의 xylooligo 당을 주로 생산하였다.

21. 재조합 대장균 BLR(DE2)/pEMB10에 의한 올리고당의 생산최적조건은 10% birchwood xylan(50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0)에 20 unit/㎖의 xylanase(XynB)를 첨가하여 60℃에서 24 시간 반응시키는 것이 가장 좋았으며, 이 때 생성되는 xylooligo 당의 조성은 X2 26.1 g/ℓ, X3 11.4 g/ℓ, X4 3.6 g/ℓ, X6 23.9 g/ℓ였으며 xylooligo 당(X2 X6)의 양은 65.0 g/ℓ였다. 즉 본 효소는 X2와 X6를 주축으로 하는 xylooligo 당을 생산하였다.

정제한 xylooligo 당을 사용하여 기질특이성을 조사한 결과(10)와 이상(19, 20, 21)과 같이 birchwood xylan을 사용하여 대규모로 올리고당의 생성을 조사한 결과와는 다소 상이한 점이 있다. 이는 불균일한 중합도의 xylan을 사용하기 때문에 오는 결과라고 생각된다.

제 3 장 Xylan의 단리 및 화학분해에 의한 신기능성 물질 생산

제 1 절 서 설

목재자원이 절대적으로 부족한 우리나라는 목재 폐기물의 재활용 방안에 대한 연구가 다각도로 이루어져야 할 실정이다. 현재 발생되고 있는 목재 폐기물은 벌채 현장에서 또는 가공·생산현장에서 발생하며, 대부분 소각에 의해 처리되고 있다. 제재 폐재의 경우 원목에 가까운 양질의 재료로서 수집과 관리를 잘 한다면 원료로 활용할 수 있을 뿐만 아니라 폐목재의 발생억제 등 제반 문제의 해결과 함께 경제적인 이익을 기대할 수 있다. 농산 폐자원의 경우 현재 정확한 발생 현황을 나타내는 통계자료는 없으며, 지역적으로 벼농사, 보리농사 등을 기준으로 농지면적을 기준으로 추정할 수밖에 없는 실정이고, 매년 발생하는 농산 폐자원은 대부분 소각에 의해 처리되고 있다.

이러한 식물자원의 화학 조성분 중 헤미셀룰로오스는 지구상에서 셀룰로오스 다음으로 풍부한 탄수화물로 년간 약 450억톤이 생산되고 있는데 이 양은 사람 일인당 약 23 kg에 상당하는 양이 하루에 생산되는 셈이다. 헤미셀룰로오스는 식물 세포벽의 격자구조물을 이루는 비셀룰로오스계 다당류로써 목재의 20 25%를 차지하며, 농산 폐자원인 보릿짚, 볏짚, 옥수수 속 등에도 약 20% 정도 함유되어 있다. 헤미셀룰로오스 중 xylan 및 xylan 유도체의 함량은 침엽수재에는 20 45%, 활엽수재에는 80 90%, 밀, 보리, 벼 등의 짚에는 68 78% 정도로 식물체의 종류에 따라 다양하게 분포되어 있다. 활엽수재의 xylan은 4-O-methyl-glucuronoxylan만으로 구성되어 있으며 arabinose 잔기가 존재하지 않고 acetyl 기가 존재하며 유론산 잔기는 xylose 잔기 5-15개당 1개

를 가지고 있으며 중합도는 200정도이다. 볏짚, 보릿짚 등의 농산물 폐자원의 xylan은 4-O-methylglucuronoarabinoxylan으로 arabinose 잔기가 xylose 잔기 약 5개당 1개 정도로 arabinose가 많이 결합되어 있는 특징이 있다. 활엽수의 xylan에 많이 함유되어 있는 4-O-methyl-glucuronic acid는 산가수분해하여 xylose를 생산하는 과정에서 쉽게 분리될 수 있다. 일찍부터 uronic acid는 해독작용, 스테로이드 분비 및 bilirubin 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

본 연구는 농산 및 임산 폐자원을 원료로 사용하여 chipping 처리와 폭쇄 전처리를 하였다. 폭쇄 처리된 원료로부터 xylan을 단리하기 위해 온수 및 알카리 추출하여 xylan의 최적 단리조건을 확립하였으며, 단리된 xylan을 정제하기 위해서 이온교환수지 및 활성탄 흡착, 수산화바륨 용액-에탄올 적하법 등의 정제방법을 이용하여 최적 정제방법을 확립하였다. 또한 정제된 xylan으로부터 유론산 유도체를 분리하기 위해서 산가수분해 최적조건을 검토하였으며, 최적 산가수분해조건으로 단리된 유론산 유도체의 구조를 분석하였다. 폭쇄 처리된 원료로부터 xylan을 단리한 후의 잔사를 이용하기 위해서 셀룰로오스 제조 및 셀룰로오스 유도체를 제조하였다.

제 2 절 Xylan 추출을 위한 농산 및 임산 폐자원의 전처리 기술

1. 농산 및 임산 폐자원의 수집

가. 농산 및 임산 폐자원의 발생현황 조사 및 수집

1) 농산 폐자원의 발생 현황 조사

본 연구 과제를 수행함에 있어서 농산 폐자원의 발생 현황을 조사할 목적으로 문헌 조사 및 현장조사를 실시한 결과 현재 농산 폐자원의 정확한 발생 현황을 파악할 수 없었다. 그 이유는 현재 농산 폐자원의 발생 현황을 나타낼 수 있는 통계자료가 없었으며, 따라서 농산 폐자원의 발생 현황을 지역적으로 벼농사, 보리농사를 기준으로 하여 농지 면적을 기준으로 추정할 수밖에 없었다.

한편 본 연구 수행에 사용한 농산 폐자원은 경북 고령군 소재의 농가에서 볏짚을 공급받아 수행하였으며, 보릿짚의 경우 경남 밀양군 소재 작물시험장에서 공급받아 연구를 수행하였다.

2) 임산 폐자원의 발생 현황

임산 폐자원은 간벌 및 갱신 작업에서 발생하는 경우가 많으며, 이러한 폐잔재의 경우 대부분 작업 현장에 버려지는 경우가 많은 것으로 파악된다. 표 3-1은 현재 국내의 연도별 목재 생산 현황을 나타낸 것이다.

표 3-1. 연도별 국내 목재 생산 현황 단위 : 천 m3

년도	목재 생산				합계
	주벌	간벌	종갱신	기타	
1986	965	140	-	-	1,105
1988	447	175	263	309	1,194
1990	309	191	137	440	1,1077
1992	190	109	171	326	796
1994	206	145	141	-	896

표 3-1에서 보면 간벌 및 종 갱신에 의해 생산된 목재는 1994년의 경우 690,000 m3으로 임지 폐잔재의 양을 대략적으로 추정할 수 있다. 한편 목질 폐자원이 발생하는 또 다른 경우는 목재 관련공장에서 발생하는 폐재이며, 이 경

우 제재소에서 발생하는 것과 목재 가공공장에서 발생하는 것으로 구분할 수 있다. 표 3-2는 연도별 국내 폐재 이용량 현황을 나타낸 것이다.

표 3-2. 연도별 국내의 폐재 이용량 현황 단위 : 천 m3

년도	1986	1988	1990	1992	합계
이용량 (연료화 및 기타)	568	760	640	954	1,1213
년간 폐재 이용 비율	8.1%	9.3%	9.0%	10.6%	9.2%

표 3-2에서와 같이 제재 폐재는 각 목재 관련공장에서 연료나 기타 목적으로 대부분 사용되고 있으며, 이렇게 폐잔재의 이용율이 미비한 점을 볼 때 국내 임산자원의 보존을 위해서 폐잔재의 효율적인 이용 방안을 마련하는 것이 대단히 중요한 사항이라고 판단되며, 아울러 이에 대한 연구가 지속적으로 행해져야 한다고 생각된다.

2. 농산 폐자원의 전처리조건 확립

농산 폐자원의 효율적인 이용을 위해서는 먼저 농산 폐자원의 선별 및 일정 크기로 절단하는 작업이 필요하며, 폭쇄 전처리 과정에 임하기 전 반드시 해야 할 작업이다. 따라서 원료로 수집된 농산 폐자원의 뿌리부분과 낟알부분을 제거하고, 6 cm의 길이로 일정하게 절단하였다.

3. 활엽수 폐잔재의 chipping 처리

임산 폐자원의 효율적인 이용을 위해서는 먼저 임산 폐자원의 형상을 적절

한 크기로 절단하는 작업이 우선되어야 하며, 폭쇄 전처리하기 전에 반드시 거쳐야 할 작업이다. 따라서 원료로 수집된 참나무 폐재를 본 연구실에서 주문·제작한 chipper를 이용하여 2×2×0.2 cm의 크기로 chip을 제조하였다.

4. 폭쇄 전처리 최적 조건의 확립

가. 농산 및 임산 폐자원의 화학적 조성 분석

수집된 농산 및 임산 폐자원은 wiley mill로 분쇄하여 40 80 mesh 시료로 만들어 사용하였으며, 일반 분석법에 의해 냉수 추출, 온수 추출, 알카리 추출, 유기용매 추출, 무기물 함량과 Klason법에 의한 lignin를 정량하였으며, alditol-acetate법에 따라 당 조성 분석을 하였다.

표 3-3. 농산 및 임산 폐자원의 화학적 조성분석 단위 : %

Species	Cold water extractives	Hot water extractives	1% NaOH extractives	Ethanol-benzene extractives	Ash	Lignin content
*Oryza sativa**1	15.3	18.5	48.7	5.0	10.5	19.8
*Hordeum vulgare**2	25.6	26.8	52.7	5.1	8.9	15.9
*Quercus mongolica**3	2.0	4.8	24.2	2.6	0.6	20.8

*1 - rice straw, *2 - barley straw, *3 - oak wood

표 3-3은 농산 및 임산 폐자원의 화학조성을 나타낸 것이다. 표 3-3에서 보는 바와 같이 초본류인 볏짚(*Oryza sativa*), 보릿짚(*Hordeum vulgare*)에서는 냉수, 열수 추출물 함량이 높게 나타남을 알 수가 있었다. 이는 볏짚, 보릿

짚이 신갈나무(*Quercus mongolica*)에 비해 수용성 물질이 다량 함유되어 있음을 시사한다. 무기물 함량에 있어서도 볏짚, 보릿짚이 신갈나무에 비해 높은 수치를 나타내었다. 볏짚 등에는 실리카 등과 같은 성분들이 상당량 함유되어 있기 때문으로 판단된다. 농산 및 임산 폐자원의 리그닌 함량을 비교하면 초본류의 리그닌 함량이 신갈나무에 비해 상당히 적다는 것을 알 수 있었다. 신갈나무의 화학적 조성은 기존의 결과와 거의 유사하였다.

표 3-4에는 농산 및 임산 폐자원에 존재하는 당류의 상대적 함량 비율을 나타냈다. Arabinose 잔기의 경우, 볏짚과 보릿짚에서 각각 10.2%, 6.7%로 신갈나무에 비해 높게 나타났다. 이는 볏짚과 보릿짚의 헤미셀룰로오스 주체가 4-O-methyl-glucuronoarabinoxylan으로 구성되어 있으므로 arabinose 잔기가 유래되었다고 판단되었다. 신갈나무의 경우 4-O-methyl-glucuronoxylan으로부터 유래된다고 생각되는 xylose 잔기의 함량이 29.8%로 나타났다.

표 3-4. 농산 및 임산 폐자원의 당 조성 분석결과

Species	Sugar composition (%)					
	Rham.	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glc.
*Oryza sativa**1	T*4	10.2	30.7	5.2	5.7	48.2
*Hordeum vulgare**2	T	6.7	29.6	4.3	3.3	56.1
*Quercus Mongolica**3	T	2.7	29.8	1.6	1.2	64.6

*1 : rice straw *2 : barley straw *3 : oak wood *4 : T-trace, below 0.1%

나. 폭쇄 처리의 개요

농산 및 임산 폐자원으로부터 xylan을 단리하기 위한 전처리 기술로써 폭쇄 처리를 검토하였다.

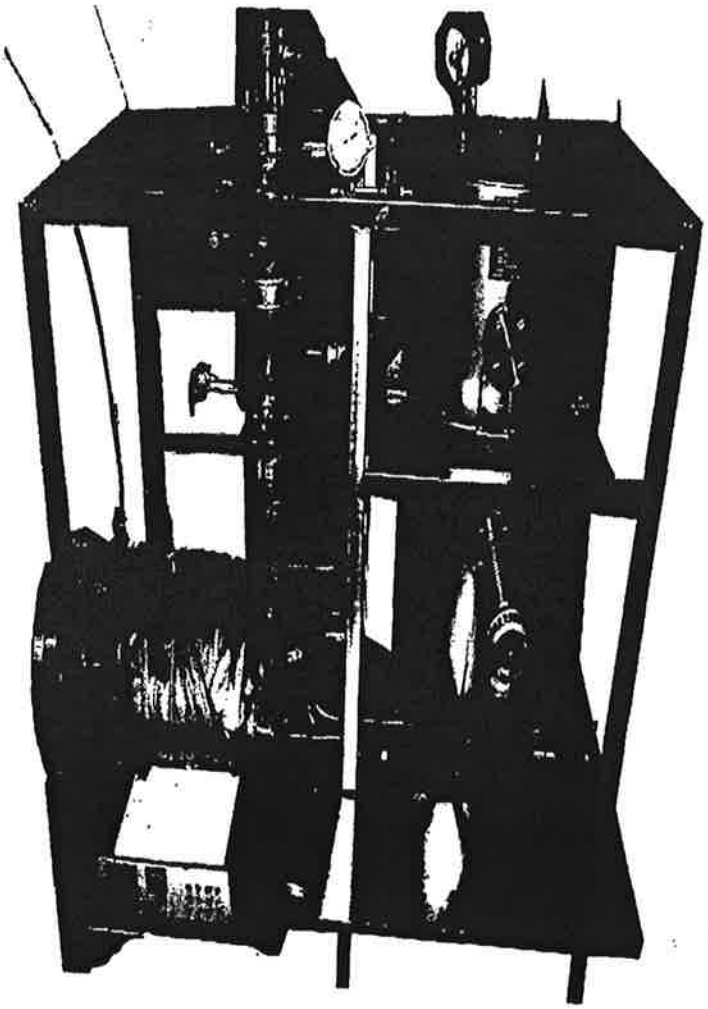

그림 3-1. 본 연구에 사용된 폭쇄 처리장치

폭쇄 처리는 1920년대 파티클보드 제조용으로 개발한 Masonite Process가 그 시초로 목재를 200~250℃의 포화수증기하에서 수분간 처리한 후 대기 중

으로 방출하는 방법으로 비교적 처리효율이 높고, 후처리 및 목재 주요성분의 분리가 용이하며, 처리시간이 매우 짧아 연속화에 의한 대량 처리도 가능하고, 물 이외에 다른 약품을 사용치 않기 때문에 공해유발을 시키지 않는다는 점에서 유망한 전처리법으로 평가되고 있는 방법이다. 그림 3-1은 본 연구 수행중에 사용된 폭쇄 장치로서 본 연구실과 대전 화학연구소에서 공동 설계·제작한 장치이다.

다. 농산 및 임산 폐자원의 폭쇄처리 조건

폭쇄 처리조건은 표 3-5에 나타내었다. 폭쇄 처리된 시료는 함수율을 약 10% 미만으로 건조한 후 분쇄하여 냉장 보관하였다. 폭쇄 처리된 시료는 각각 Klason lignin 정량과 alditol-acetate법으로 구성당 분석을 하였다.

표 3-5. 농산 및 임산 폐자원의 폭쇄처리조건

Species	Materials No.	Steam-exploded conditions	
		Pressure(kgf/cm2)	Time(min.)
Oryza sativa	EO 20-3*1	20	3
	EO 20-6	20	6
Hordeum vulgare	EH 20-3*2	20	3
	EH 20-6	20	6
Quercus mongolica	EQ 15-10*3	15	10
	EQ 15-10(30)	15(30)*4	10(0.5)*4
	EQ 20-3	20	3
	EQ 20-6	20	6

*1 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 볏짚

*2 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 보릿짚

*3 : 15 kgf/cm2, 10분간 폭쇄 처리된 신갈나무

*4 : 신갈나무를 15 kgf/cm2, 10분간 폭쇄 처리한 후 30 kgf/cm2, 30초간 이차 처리

라. 폭쇄 처리된 시료의 구성성분(당 조성 성분)

폭쇄 처리된 시료를 alditol-acetate**법에 따라 당 조성 분석을 행하였다.**

표 3-6. **폭쇄 처리된 농산 및 임산 폐자원의 구성성분 분석**

Materials No.	Klason lignin (%)	Sugar compositions (%)					
		Rham.	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glc.
EO 20-3*1	34.0	T*5	4.9	33.1	3.5	3.0	55.5
EO 20-6	37.1	T	6.2	42.1	2.9	2.6	46.2
EH 20-3*2	32.7	T	4.7	37.6	3.2	3.4	51.2
EH 20-6	37.9	T	4.0	27.0	3.3	2.1	63.5
EQ 15-10*3	21.5	T	0.9	18.0	1.8	T	79.3
EQ 15-10(30)*4	24.6	T	1.3	16.4	1.4	T	80.9
EQ 20-3	23.7	T	4.3	42.0	7.2	3.7	42.9
EQ 20-6	29.3	T	2.5	41.9	5.0	4.4	46.2

*1 : 20 kgf/cm2, 3**분간 폭쇄 처리된 볏짚**

*2 : 20 kgf/cm2, 3**분간 폭쇄 처리된 보릿짚**

*3 : 15 kgf/cm2, 10**분간 폭쇄 처리된 신갈나무**

*4 : **신갈나무를** 15 kgf/cm2, 10**분간 폭쇄 처리한 후** 30 kgf/cm2, 30**초간 이차 처리**

*5 : T-trace, below 0.1%

폭쇄 처리된 볏짚 및 보릿짚의 당 조성을 살펴보면, 볏짚을 20 kgf/cm2, 3**분간 폭쇄 처리했을 때** glucose **다음으로** xylose**의 함량이 높은 것을 알 수 있다.** Xylose **함량을 비교해 보면, 볏짚에서는** 20 kgf/cm2, 6**분의 조건에서, 보릿짚에서는** 20 kgf/cm2, 3**분의 조건에서** xylose**의 함량이 가장 높게 나타났**

다. 신갈나무를 20 kgf/cm2에서 시간을 변화시켜 폭쇄 처리한 것의 당 조성을 살펴보면, 폭쇄 처리시간이 길어질수록 헤미셀룰로오스의 함량이 다소 감소하는 경향을 보이고 있으며, glucose의 경우 오히려 그 함량이 증가하는 경향을 나타내고 있다. 이는 활엽수 중에 존재하는 헤미셀룰로오스가 폭쇄 처리과정 동안 발생한 고온의 수증기로 인해 변질되었기 때문에 상대적으로 glucose의 함량비가 증가된 것으로 생각된다. 리그닌 함량의 경우, 폭쇄 처리전에 비해 함량이 상당히 증가함을 알 수가 있었다. 이는 폭쇄 처리동안 목재중의 헤미셀룰로오스의 glycoside 결합이 가수분해되어 저분자화되었기 때문이거나 폭쇄재 중의 리그닌에 당류가 결합하여 산가수분해에 대한 저항성 증가 및 용출된 리그닌의 탄수화물 코팅으로 인하여 리그닌 정량시 영향을 미친 것으로 추측된다.

제 3 절 Xylan의 단리 정제 기술확립 및 각종 기능성 물질제조 적성 검사

1. 온수 처리에 의한 xylan의 단리 및 최적 단리조건 확립

가. 폭쇄 처리된 시료로부터 xylan의 단리

목재를 고온, 고압의 포화수증기로 단시간 증자하면 헤미셀룰로오스 중에 존재하는 아세틸기가 유리하여 초산을 형성하고 목재 주성분 특히, 헤미셀룰로오스는 초산의 존재하에서 저분자화되어 열수 및 묽은 알카리에 쉽게 가용화되어 단리된다. 따라서 본 연구에서는 폭쇄 처리된 시료를 온수 추출과 0.5% 수산화칼륨 용액 추출로 xylan을 단리하였다.

1) 온수 추출에 의한 xylan의 단리

삼각플라스크에 폭쇄 처리된 시료 4 g과 증류수 96 ml를 넣고, 80℃, shaking water bath에서 100 rpm으로 1시간 교반시킨 후 2G3 glass filter로 여과하여 여과액과 잔사를 분리하였다. 여과액은 감압 농축하여 4배량의 에탄올에 적하하여 침전물을 회수하였다.

2) 알카리 추출에 의한 xylan의 단리

폭쇄 처리된 시료 4 g을 삼각플라스크에 넣고 0.5% 수산화칼륨 용액 96 ml를 첨가한 후, 실온에서 1시간동안 질소기류하에서 100 rpm으로 교반하였다. 반응이 끝난 후, 10% 초산으로 중화(pH 5.5)시켜 2G3 glass filter로 여과액과 잔사를 분리하였다. 여과액은 셀룰로오스 투석막에 넣고 봉한 후 3일간 흐르는 수돗물에서 투석시켰다. 투석액은 감압 농축하여 4 배량의 에탄올에 적하하여 침전물을 회수하였다. 표 3-7은 온수 및 알카리 추출에 의해 단리된 粗xylan의 수율을 나타낸 것이다.

표 3-7의 결과에서 온수 추출의 경우 폭쇄 처리조건에 따라 20 kgf/cm2, 3분 처리가 20 kgf/cm2, 6분 처리에 비해 단리된 粗xylan의 함량이 다소 높은 경향을 나타내고 있으며, 보릿짚 폭쇄재의 粗xylan 함량이 신갈이나 볏짚 폭쇄재의 粗xylan 함량에 비해 높게 나타나고 있다. 그리고 15 kgf/cm2에서 폭쇄 처리된 신갈나무의 경우 20 kgf/cm2으로 폭쇄 처리된 粗xylan의 함량보다 악간 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이것은 폭쇄 처리조건이 강해짐에 따라 헤미셀룰로오스의 아세틸기가 가수분해되고 이것이 초산으로 유리하므로 대기 방출시 유실되거나 혹은 탈수소화하여 소실되었기 때문으로 생각된다.

표 3-7. 온수 및 0.5% 수산화칼륨 용액으로 단리된 粗xylan의 수율

Materials No.	Yield of crude xylan (%)	
	Hot water extract	0.5% KOH solution extract
EO 20-3*1	22.4	25.6
EO 20-6	21.1	34.1
EH 20-3*2	36.7	35.3
EH 20-6	27.8	33.1
EQ 15-10*3	17.8	21.4
EQ 15-10(30)*4	23.6	24.5
EQ 20-3	23.7	27.0
EQ 20-6	24.4	28.9

*1 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 볏짚

*2 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 보릿짚

*3 : 15 kgf/cm2, 10분간 폭쇄 처리된 신갈나무

*4 : 신갈나무를 15 kgf/cm2, 10분간 폭쇄 처리한 후 30 kgf/cm2, 30초간 이차 처리

한편 0.5% 수산화칼륨 용액 추출에 의해 단리된 粗xylan 함량이 온수 추출에 의해 단리된 粗xylan 함량에 비해 높게 나타난 것은 0.5% 수산화칼륨 용액에 의해 다량의 저분자 리그닌이 헤미셀룰로오스와 함께 용출되었기 때문으로 생각된다. 따라서 본 결과를 종합해볼 때, 알카리 추출에 의한 xylan의 단리는 단리 과정 중 발생되는 염을 제거해야 하고 중화과정 등이 추가되어야 한다는 점을 감안한다면 온수 추출이 유리하고, 폭쇄 처리조건은 20 kgf/cm2, 3분 처리가 적합할 것으로 판단된다.

2. GC(gas chromatography) 분석에 의한 단리 xylan의 구성성분 분석

본 연구에서 행해진 온수 추출과 0.5% 수산화칼륨 용액 추출에 의해 얻어진 粗

xylan을 GC(gas chromatography) 분석에 의해 구성당 분석을 하였다. 이 때 분석 조건은 다음과 같다.

- Model : Shimazu GC-14A
- Column : 400×0.4 cm glass column
- Column Packing materials : PEGA(0.2%) + PEGS(0.2%) + Solocone GE XF-1150(0.4%)
- Col. Temp. : 190℃
- Inj. Temp. : 220℃
- Det. Temp. : 250℃
- Detector : FID Carr. Gas : 1.2 kgf/cm3
- Standard material : *myo*-Inositol

가. 온수 추출에 의해 단리된 xylan의 구성성분 분석

온수 추출 후 여과하여 추출액과 잔사를 분리하고 분리된 추출액은 일정수준으로 농축하여 4배량의 에탄올에 적하하여 粗xylan을 얻었다. 이렇게 얻어진 粗xylan을 산가수분해한 것과 산가수분해하지 않은 시료로 구분하여 alditol-acetate법에 의해 GC로 구성당 분석을 행하였다.

표 3-8은 온수 추출에 의해 얻어진 粗xylan의 구성당 분석결과를 나타낸 것으로 산가수분해한 것과 산가수분해하지 않은 시료를 비교하여 粗xylan의 당 형태를 검토하였다. 표 3-8의 결과에서 폭쇄처리 조건에 따른 시료의 당 함량을 비교해 볼 때, 20 kgf/cm2, 3분 처리한 시료의 당 함량이 20 kgf/cm2, 6분 처리한 시료에 비해 전체적으로 높게 나타나는 경향이 있었다.

표 3-8. 온수 추출로 단리된 粗xylan의 당조성 분석

Materials No.	Sugar yield(%)		Sugar composition (%)					
			Rham.	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glc.
EO 20-3*1	Total	28.3	T*4	8.5	54.0	5.3	7.8	24.4
	Oligomer	20.8	T	0.5	60.0	-	8.7	30.8
	Monomer	7.5	T	30.7	37.3	20.0	5.3	6.7
EO 20-6	Total	13.9	T	7.0	47.3	5.8	13.7	25.2
	Oligomer	10.4	T	2.9	51.0	-	16.3	29.8
	Monomer	3.5	T	20.0	37.2	25.7	5.7	11.4
EH 20-3*2	Total	48.1	T	12.2	66.3	10.3	5.4	5.8
	Oligomer	28.2	T	-	91.5	-	6.0	2.5
	Monomer	19.9	T	29.6	30.7	24.6	4.5	10.6
EH 20-6	Total	43.8	T	26.9	48.9	12.8	2.3	9.1
	Oligomer	8.5	T	-	95.3	-	-	4.7
	Monomer	35.3	T	33.4	37.7	15.9	2.8	10.2
EQ 20-3*3	Total	75.6	T	7.5	75.4	6.7	1.5	8.9
	Oligomer	55.4	T	0.7	82.9	4.2	2.0	10.2
	Monomer	20.2	T	26.2	55.0	13.8	T	5.0
EQ 20-6	Total	43.6	T	9.1	58.9	19.5	8.7	3.7
	Oligomer	6.4	T	-	95.3	-	-	4.7
	Monomer	37.2	T	10.8	52.7	22.8	10.2	3.5

*1 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 볏짚

*2 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 보릿짚

*3 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 신갈나무

*4 : T-trace, below 0.1%

이것은 폭쇄 처리조건이 강해질수록 목재성분의 저분자화가 촉진되어 상당량의 당 부분이 용출되었기 때문에 이러한 결과를 초래한 것으로 생각된다. 한편, 粗xylan의 함량은 볏짚 폭쇄재의 경우 약 50%를 나타내고 신갈 폭쇄재의 경우 xylose 잔기의 함량이 75%를 나타내고 있기 때문에 粗xylan을 얻기 위해서는 신갈 폭쇄재가 가장 우수한 것으로 판명되었다. 한편 폭쇄 처리조건이 강해짐에 따라 당의 형태가 oligomer 형태에서 monomer 형태로 전환되는 결과를 나타내고 있어 폭쇄 처리조건이 강해질수록 헤미셀룰로오스에서 유래되는 아세틸기가 많아져 유리초산에 의한 가수분해가 촉진되기 때문으로 생각한다.

나. 알카리 추출에 의해 단리된 粗xylan의 구성성분 분석

폭쇄재를 0.5% KOH로 1시간 동안 교반하여 추출한 후 여과하여 추출액과 잔사를 분리하고, 분리된 추출액은 일정수준으로 농축하여 셀룰로오스 투석막에 넣고 봉한 후 3일간 수돗물로 투석하였다. 투석 후 투석액을 다시 농축하여 4배량의 에탄올에 적하하여 粗xylan을 얻었다. 이렇게 얻어진 粗xylan은 산가수분해한 것과 산가수분해하지 않은 시료로 구분하여 aditol-acetate법에 의해 GC로 구성당 분석을 행하였다.

표 3-9의 결과에서도 표 3-8와 같이 폭쇄 처리조건이 강해질수록 시료의 당 함량은 감소하는 경향을 나타내었으며, 당의 형태는 oligomer 형태에서 monomer 형태로 전환되는 결과를 나타내었다. 이러한 이유는 표 3-4에서 언급한 바와 같이 폭쇄 처리동안 목재 중의 헤미셀룰로오스의 glycoside 결합이 가수분해되어 저분자화되었기 때문인 것으로 생각된다. 한편 온수 추출에 의해 단리된 粗xylan의 당 함량과 알카리 추출에 의해 단리된 粗xylan의 당 함량을 비교해 볼 때 볏짚의 경우만 알카리 추출의 경우가 온수 추출에 의해 단리된 粗xylan에 비해 다소 높게 나타나고, 보릿짚 및 신갈나무 폭쇄재의 경우 온수 추출에 의해 얻어진 粗xylan의 당 함량이 월등히 높게 나타나 粗xylan이

단리에는 온수 추출이 우수한 것으로 판명되었다.

표 3-9. 0.5% 수산화칼륨 용액 추출로 단리된 粗xylan의 당조성 분석

Materials No.	Sugar yield(%)		Sugar composition (%)					
			Rham.	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glc.
EO 20-3*1	Total	36.1	T*4	8.3	60.1	2.8	5.5	23.3
	Oligomer	15.6	T	11.5	60.3	3.2	10.3	14.7
	Monomer	20.5	T	5.8	60.0	2.4	2.0	29.8
EO 20-6	Total	28.2	T	3.9	66.7	2.1	0.7	26.6
	Oligomer	6.7	T	7.5	25.4	-	-	67.1
	Monomer	21.5	T	2.8	79.5	2.8	0.9	14.0
EH 20-3*2	Total	43.7	T	9.6	54.9	4 .6	6.2	24.7
	Oligomer	25.8	T	6.2	65.1	-	8.5	20.2
	Monomer	17.9	T	14.5	40.2	11.2	2.8	31.3
EH 20-6	Total	23.8	T	6.7	61.8	5.0	3.4	23.1
	Oligomer	1.6	T	18.8	-	31.2	31.2	18.8
	Monomer	22.2	T	5.9	66.1	3.2	1.4	23.4
EQ 20-3*3	Total	40.2	T	2.7	50.2	12.7	6.0	28.4
	Oligomer	18.8	T	-	55.3	10.1	1.6	33.0
	Monomer	21.4	T	5.1	45.8	15.0	9.8	24.3
EQ 20-6	Total	44.5	T	11.2	63.4	12.6	2.7	10.1
	Oligomer	25.5	T	12.5	56.5	17.3	1.2	12.5
	Monomer	19.0	T	9.5	72.6	6.3	4.8	6.8

*1 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 볏짚

*2 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 보릿짚

*3 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 신갈나무

*4 : T-trace, below 0.1%

이러한 이유는 알카리 추출시 상당량의 타물질(저분자 리그닌 등)이 용출되어 당 함량이 상대적으로 저조하게 나타나는 것으로 생각된다. 따라서 최종적으로 농산 및 임산 폐자원으로부터 xylan을 단리하는 공정은 열수처리가 알카리처리에 비해 우수하며, 폭쇄 처리조건은 20 kgf/cm2, 3분 처리가 20 kgf/cm2, 6분 처리보다 우수한 것으로 판명되었다.

3. 이온교환수지 또는 활성탄 흡착에 의한 xylan의 정제

본 연구에서 우수한 xylan의 단리 공정으로 판명된 온수 추출에 의해 단리된 粗xylan은 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법, 이온교환 수지에 따른 정제 그리고 활성탄 흡착에 의한 정제 공정을 각각 비교 검토하였다.

가. 5% 수산화바륨용액-에탄올 적하법에 따른 xylan의 정제

폭쇄재를 온수 추출에 의해 추출한 후 여과하여 잔사와 여액으로 분리하였다. 분리된 여액은 일정량으로 감압 농축하여 5% 수산화바륨 용액과 1:1의 비율로 혼합하여 하룻밤동안 방치한 후 생성된 침전물을 여과에 의해 제거하고, 약간량의 에탄올을 주입하여 침전된 hexose계 당류를 여과에 의해 제거하였다. 그 후 여과액을 다시 감압 농축하여 4 배량의 에탄올에 적하시켜 정제xylan을 얻었다. 정제 xylan은 감압 건조기에서 충분히 건조한 후 수율을 측정하였다. 표 3-10은 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법에 의해 얻어진 정제 xylan의 수율을 나타낸 것이다. 표 3-10의 결과에서 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법에 정제된 xylan의 수율은 폭쇄 처리조건이 20 kgf/cm2, 3분 처리가 20 kgf/cm2, 각 시료간의 비교에서 보릿짚 폭쇄재가 88.1%로 가장 높게 나타났으며, 신갈나무 폭쇄재가 57.6%로 약 30% 정도의 수율 차이를 나타내었다. 폭쇄 처리재에 대한 정제xylan의 수율은 10 20% 정도이고 보릿짚의 경우 다른 시료에 비해 약 10% 정도 높게 나타났다.

표 3-10. 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법으로 정제된 xylan의 수율

Materials No.	Yields of purified xylan	
	Based on crude xylan	Based on steam-exploded materials
EO 20-3*1	71.9	16.1
EO 20-6	69.4	14.6
EH 20-3*2	88.1	32.3
EH 20-6	85.4	23.7
EQ 20-3*3	57.6	13.7
EQ 20-6	52.6	12.8

*1 : 20 kg/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 볏짚

*2 : 20 kg/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 보릿짚

*3 : 20 kg/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 신갈나무

나. 이온교환 수지에 따른 xylan의 정제

폭쇄재를 온수 추출에 의해 추출한 후 여과하여 잔사와 여액으로 분리하였다. 분리된 여액은 일정량으로 감압 농축하여 Amberlite IR-120(H^+형)과 Amberlite IRA-68(OH^-형)이 충진된 컬럼을 통과시켜 용출된 용출액을 회수한 후 농축하여 4 배량의 에탄올에 적하시켜 정제 xylan을 얻었다. 얻어진 정제 xylan은 감압 건조하였다.

다. 활성탄 흡착을 이용한 xylan의 정제

폭쇄재를 온수 추출에 의해 추출한 후 여과하여 잔사와 여액으로 분리하였다. 분리된 여액은 일정량으로 감압 농축하여 일정량의 active carbon(Sigma Co.)와 혼합하여 1시간 교반 후 하룻밤동안 방치하였다. 방치 후 여과에 의해

정제 xylan을 얻었다. 그러나 활성탄 흡착에 따른 xylan 정제의 경우 일차적으로 xylan 수용액에서의 탈색이 되지 않는 문제점이 발생하였으며, 여과과정 동안 미세한 활성탄의 분말을 제거하는 공정이 상당히 어렵기 때문에 xylan의 정제 과정으로써 부적절한 것으로 판명되었다. 따라서 본 연구에서는 xylan의 정제 공정의 검토 중 활성탄 흡착에 의한 xylan 정제 공정은 배제하기로 결정하였다.

4. 정제 xylan의 구성당 분석

5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법에 의해 얻어진 정제 xylan을 alditol-acetate법에 의해 GC로 구성당 분석을 행하였다.

표 3-11. 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법으로 정제된 xylan의 당조성 분석

Materials No.	Sugar compositions(%)					
	Rham.	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glc.
EO 20-3*1	T*4	4.3	85.4	3.0	3.5	3.8
EO 20-6	T	3.1	85.0	2.3	4.4	5.2
EH 20-3*2	T	T	88.7	T	5.4	5.9
EH 20-6	T	T	86.9	1.3	3.0	8.8
EQ 20-3*3	T	1.1	87.1	4.2	T	7.6
EQ 20-6	T	1.7	86.6	3.5	1.2	7.0

*1 : 20 kg/cm2, 3분간 폭쇄 처리한 볏짚

*2 : 20 kg/cm2, 3분간 폭쇄 처리한 보릿짚

*3 : 20 kg/cm2, 3분간 폭쇄 처리한 신갈나무

*4 : T-trace, below 0.1%

표 3-11은 정제 xylan의 구성당 분석 결과를 나타낸 것이다. 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법에 의해 얻어진 정제 xylan의 구성당 분석결과를 살펴보면, hexose계 당류 및 arabinose 잔기의 함량이 상당히 감소하였음을 알 수 있었다. 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법에 의한 활엽수 xylan의 정제과정에서 mannan계 당류들이 침전에 의해 제거된다는 연구보고가 있다. 정제과정 중 펜토산의 함량은 감소되지 않을 것이라는 예상과는 달리 arabinose 잔기의 함량이 감소됨을 알 수가 있었다. 이는 粗xylan에서 monomer 형태로 존재하고 있던 상당량의 arabinose 잔기가 에탄올에 용해되어 용출되었을 것으로 판단된다. 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법에 의한 xylan의 정제에 의해 얻어진 정제 xylan의 대부분이 oligomer 형태로 존재하지만, 정제과정동안 탄수화물의 손실 또한 높다는 것을 알 수 있었다.

제 4 절 Xylan의 화학분해로 유론산 유도체 및 xylose의 분리

1. 화학처리에 의한 xylan의 가수분해

화학적 처리에 의한 다당류의 가수분해에는 산에 의한 산가수분해법과 알카리에 의한 알카리가수분해법이 있다. 본 연구에서 사용할 가수분해방법은 xylan의 가수분해물로부터 유론산 유도체와 xylose를 분리하는데 그 목적이 있으므로 그 목적에 부합되게 선정해야 할 필요성이 있다.

활엽수재의 주요 성분중 헤미셀룰로오스인 xylan과 같은 다당은 β-(1, 4) 결합한 당 잔기로 되어 있기 때문에 셀룰로오스와 마찬가지로 알카리 처리에서 peeling 반응과 정지반응을 받게 된다. Xylose 잔기의 C2에 결합한 glucuronic acid기는 xylan 쇄 중의 galacturonic acid기보다도 peeling 반응의

억제에 큰 효과가 있다. 하지만 이러한 효과를 지닌 잔기도 알카리로 처리하는 과정에서 탈리하게 된다. Xylan은 추출하는 과정중에 산소-알카리 처리에 의한 중합도 저하, aldonic acid 형 말단기의 생성, 가용성 유기산의 생성, uronic acid기의 탈리 등의 반응을 받는다. 그리고 xylan 중의 uronic acid기의 uronoside 결합은 알카리에 대하여 주쇄의 xyloside 결합보다 불안정한 것은 잘 알려져 있지만, 산소-알카리 처리의 경우는 이 현상이 보다 현저하게 일어난다.

알카리 처리중 당에 일어나는 반응의 하나로 이성화 반응이 있다. 알카리 처리한 xylan 중에 검출되는 4-O-methyl-iduronic acid 잔기, taluronic acid 잔기는 각각 4-O-methylglucuronic acid 잔기, galaturonic acid 잔기로부터 2차적으로 생성된 것이다. 알카리처리 중 산소 또는 anthraquinone으로 처리한 xylan에는 xylonic acid 이외에 lyxonic acid가 말단기로서 존재하며, 그것들은 xylan의 환원성 말단기의 산화로부터 생긴 xylosone의 benzylic acid 전위에 의해 생성된다. 활엽수재의 xylan에 결합하고 있는 아세틸기가 알카리에 의하여 용이하게 탈리되는 것은 말할 필요도 없다.

이와 같이 xylan의 주쇄에 결합되어 있는 uronic acid 잔기는 알카리에 의한 분해과정 중에서 탈리되어 회수할 방법이 현재까지 알려져 있지 않다. 그러므로 xylan의 가수분해물로부터 xylose 및 유론산 유도체를 분리하기 위한 본 연구의 목적에는 적합한 화학적 처리법이 아니라고 판단된다.

다당류의 산가수분해는 당 조성을 알기 위해서 중요하며, 구조연구에도 응용할 수 있다. 또한 산가수분해에 대한 영향은 구성단당 및 환구조의 종류 및 결합양식 등에 따라 차이가 있다. 그리고 헤미셀룰로오스는 목재 중에 비결정 상태로 존재하기 때문에 셀룰로오스에 비해 산에 대하여 대단히 불안정하다. Arabinofuranoside 및 6-deoxy 당의 glycoside가 산에 대하여 현저하게 불안정한 것, pentoside의 개열 속도가 hexoside보다 큰 것은 이미 잘 알려져 있는 사실이다. Glycoside 결합의 산가수분해에 대한 반응성은 치환기의 입체효과 및 감응효과에 영향을 받는다. 산가수분해에 의한 치환기의 감응효과는 methyl-2-deoxy-α-D-glycoside의 가수분해정도가 methyl-α-D-glycoside보다 2,000배 큰 것과

aldobiouronic acid의 산가수분해에 강한 저항성 등을 들 수 있다. 전자는 C_2의 수산기의 감응효과가 제거되어 proton 산이 생성되는 것으로 생각되고, 후자는 C5에 있는 전자 흡인성의 카르복실기의 감응효과로 설명된다.

Xylan 및 arabinan은 12% 염산과 함께 가열하면 각각 xylose, arabinose를 거쳐 2-furaldehyde(furfural)로 변한다. 이 반응은 목재 및 펄프 중의 펜토산의 정량법으로서 지금도 사용되고 있다. Uronide 결합이 산 가수분해에 대하여 저항성을 나타내는 것은 위에서 언급한 바 있다. 환원성 말단과 비환원성 말단에 각각 중성당 잔기와 우론산 잔기를 가진 이 당은 일반적으로 aldobiouronic acid라고 불리워지며, 그 저항성의 결과로서 얻어진다. 목재 내의 헤미셀룰로오스의 산에 대한 이러한 반응성 때문에 xylan으로부터 xylose 및 유론산 유도체를 분리하는데 있어 산에 의한 가수분해 방법이 알카리에 의한 가수분해 방법보다 훨씬 효과적인 것으로 판단된다.

2. 가수분해물로부터 xylose와 유론산 유도체의 분리

정제 xylan를 산가수분해함으로써 xylose 및 유론산 유도체를 분리하는데 있어서 양이온교환수지 및 음이온교환수지를 이용한 분리방법을 검토하였다.

정제 xylan을 산가수분해한 후, 수산화바륨 포화수용액으로 pH 5.5로 중화한 후 침전물을 제거하였다. 중화액을 양이온교환수지인 Amberlite IR-120(H^+형)이 충진된 column를 사용하여 증류수로 용출시켰다. 이 과정에서 중화액 속에 잔존하는 염을 제거시킬 수 있다. 이 용출액을 음이온교환수지인 Amberlite IRA-68(OH^-형)이 충진된 column에 증류수로 용출시켜 중성당을 우선 용출시키고, 음이온교환수지에 흡착된 산성당을 0.01M 암모니아 수용액으로 재용출함으로써 산성당을 분리하였다. 0.01M 암모니아 수용액으로 용출된 부분을 40℃에서 감압농축하여 암모니아수를 완전히 제거한 후 HPLC로 분석을 하였다.

본 연구에 사용된 HPLC 분석조건은 아래와 같다.

Model : Spectra physics SP 8800

Column : AminexTM HPX-87H, 300mm×7.8mm

Mobile phase : 0.008N H_2SO_4

Flow rate : 0.60ml/min

Pressure/Temp : 62kg/cm2 / 35℃

Detection : UV@210nm

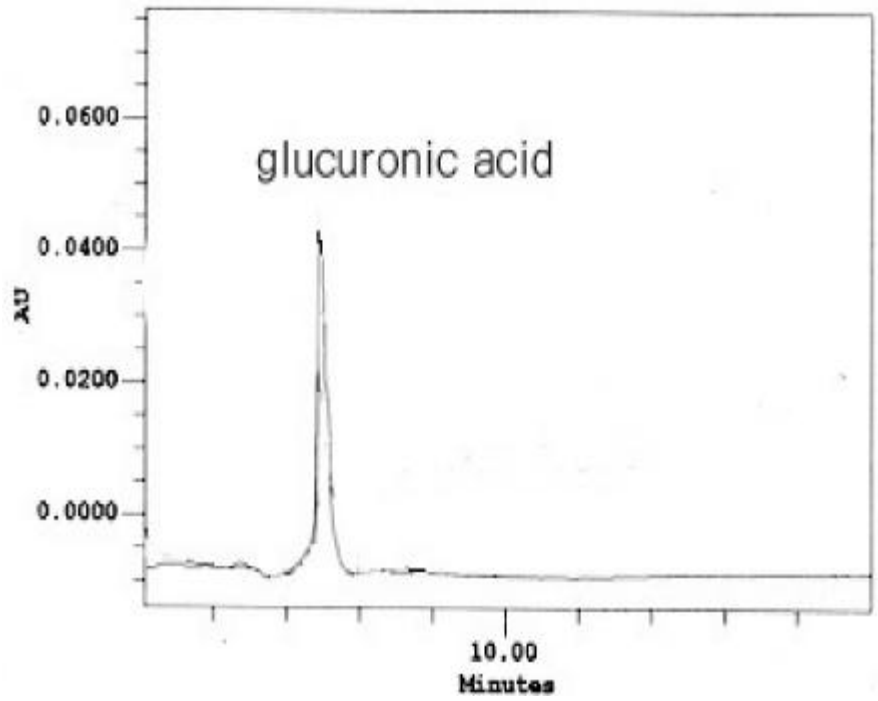

그림 3-2. 볏짚 xylan의 산가수분해물로부터 분리된 유론산 유도체의 HPLC 분석결과

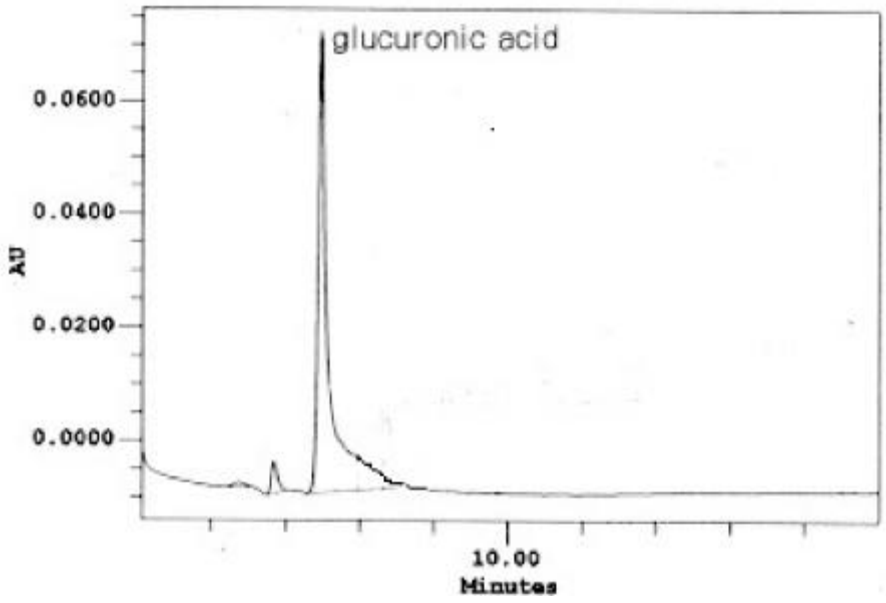

그림 3-3. 보릿짚 xylan의 산가수분해물로부터 분리된 유론산 유도체의 HPLC 분석결과

그림 3-2와 3-3은 볏짚과 보릿짚 xylan의 산가수분해물로부터 단리된 유론산 유도체를 HPLC로 분석한 결과를 나타낸 것이다. 그림 3-4의 신갈나무에서와는 달리 galacturonic acid는 보릿짚, 볏짚의 경우에서는 확인할 수가 없었다. 그리고 보릿짚, 볏짚의 유론산 유도체, 즉 glucuronic acid가 xylose에 대해 약 15 20 : 1의 몰비로 존재하고 있는 것으로 추측할 수 있었다.

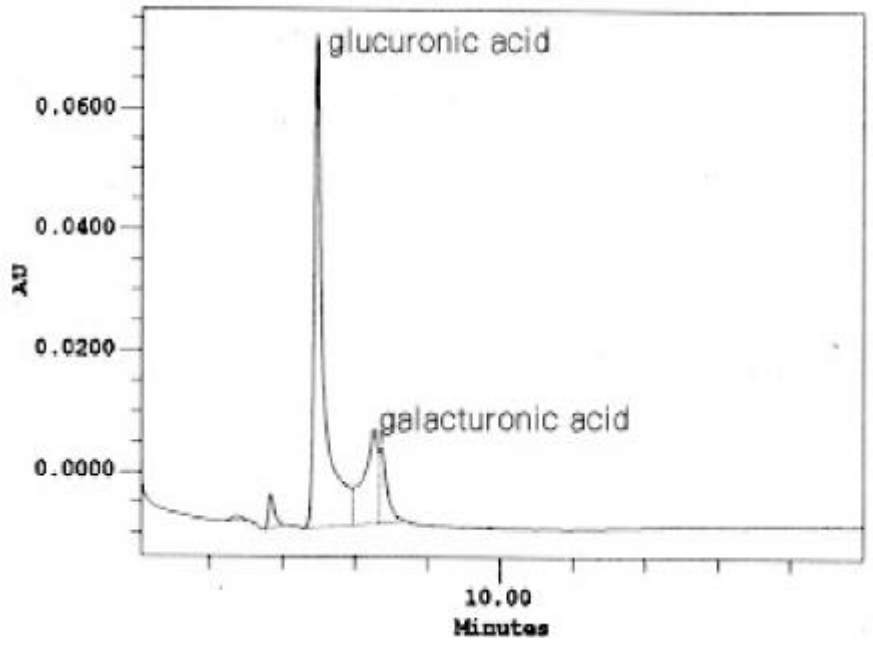

그림 3-4. 신갈나무 Xylan의 산가수분해물로부터 분리된 유론산 유도체의 HPLC 분석 결과

신갈나무 Xylan의 가수분해물로부터 0.01M 암모니아 수용액으로 유론산 유도체를 분리하였을 경우, 그림 3-4에서 보는 바와 같이 활엽수재 xylan에서 주로 발견되어지는 glucuronic acid와 galacturonic acid 잔기의 존재를 뚜렷하게 확인할 수 있었다. Shimizu 등의 연구에서 galalcturonic acid와 glucuronic acid의 함량비가 약 1 : 5 정도로 알려져 있다. 본 연구에서 단리된 유론산 유도체의 경우 그 함량비가 약 1 : 6 정도임을 알 수가 있었다.

Timell 등은 활엽수재 xylan에서 xylose 잔기에 대해 uronic acid가 약 8 11 : 1 정도의 몰비로 분포하고 있음을 보고했다. Xylan 구조에 대한 초기의 연구에서 활엽수 xylan은 glucuronic acid의 단일 측쇄를 가진 직쇄상 분자

로 보고되었다. 그러나 Shimizu 등은 birch wood xylan의 연구에서 glucuronic acid 외에 galacturonic acid가 존재함을 지적하였다. 현재 수행된 유론산 유도체 분리 연구에 있어서 폭쇄 처리된 신갈나무 xylan으로부터 단리된 유론산 유도체는 xylose 잔기에 대해 유론산 잔기가 약 15 : 1 정도로 분포하고 있음을 알 수 있었다.

폭쇄 처리된 농산 및 임산 폐자원으로부터 단리된 유론산 유도체를 ^{13}C-NMR 분석을 행하였다. ^{13}C-NMR 분석은 HPLC 분석을 통해 파악할 수 없는 유론산 유도체의 구조를 확인하고자 하는 수행하였다.

본 연구에서 사용된 ^{13}C-NMR의 분석조건은 다음과 같다.

- Model : Varion Unity Plus 300 (Varion Co. Ltd)
- Magnet : 300 ㎒
- Spectrum width : 100 ㎒
- Sample conc. : 150 mg/2ml
- Solvent : D_2O

다음의 표 3-12는 본 연구 수행 중 사용된 시료의 ^{13}C-NMR 분석에서 data 귀속을 위하여 문헌상에서 기존 탄수화물의 모델화합물에 관한 분석결과를 조사하여 나타낸 것이다.

표 3-12에서 보는 바와 같이 ^{13}C-NMR 분석시 일반적으로 탄수화물의 경우에는 α형이 β형보다 2 3.5 ppm 정도 저자장으로 shift된다고 알려져 있으며, glycoside 결합은 약 10 ppm 정도 저자장으로 shift된다고 알려져 있다. 그리고 glycoside 결합의 인접 탄소는 다소 고자장쪽으로 shift된다고 알려져 있으며, glycoside 결합에 직접 관여하는 탄소는 약 10 ppm 정도 저자장으로 shift된다고 알려져 있다.

한편 glucuronic acid 및 galacturonic acid의 C$_6$위에 존재하는 카르복실기의 탄소는 170 ppm대에 형성되며, 카르복실기에 의해 C$_5$위의 탄소는 약 6.1

ppm 정도 고자장으로 shift된다고 알려져 있다. 탄수화물에 치환된 메틸기는 58 61 ppm대에 형성되며, 치환된 위치에 따라서 chemical shift가 형성된다고 알려져 있다.

표 3-12. 모델화합물의 ^{13}C-NMR chemical shift data

Model Compound	C1	C2	C3	C4	C5	C6	OMe			
							C1	C2	C3	C4
β-D-xylose	97.6	75.1	73.9	70.4	64.0					
Me-β-D-xylopyronoside	105.0	75.1	73.9	70.4	64.0		57.8			
Me-4-O-Me-β-L-xylo-pyranoside	105.0	75.1	73.9	80.2	64.0					59.7
α-D-glucuronic acid	96.9	72.0	73.4	72.4	71.4	172.9				
Me-α-D-glucopyranosyl-uronide	101.0	72.0	73.4	72.4	71.4	172.9	57.1			
Me-4-O-Me-α-D-gluco-pyranosyluronide	101.0	72.0	73.4	83.0	71.4	172.9	57.1			61.6
β-D-galacturonic acid	97.0	68.7	69.5	70.9	70.5	172.6				
Me-β-D-galactopyranosyl-uronide	103.2	68.7	69.5	70.9	70.5	172.6	56.5			

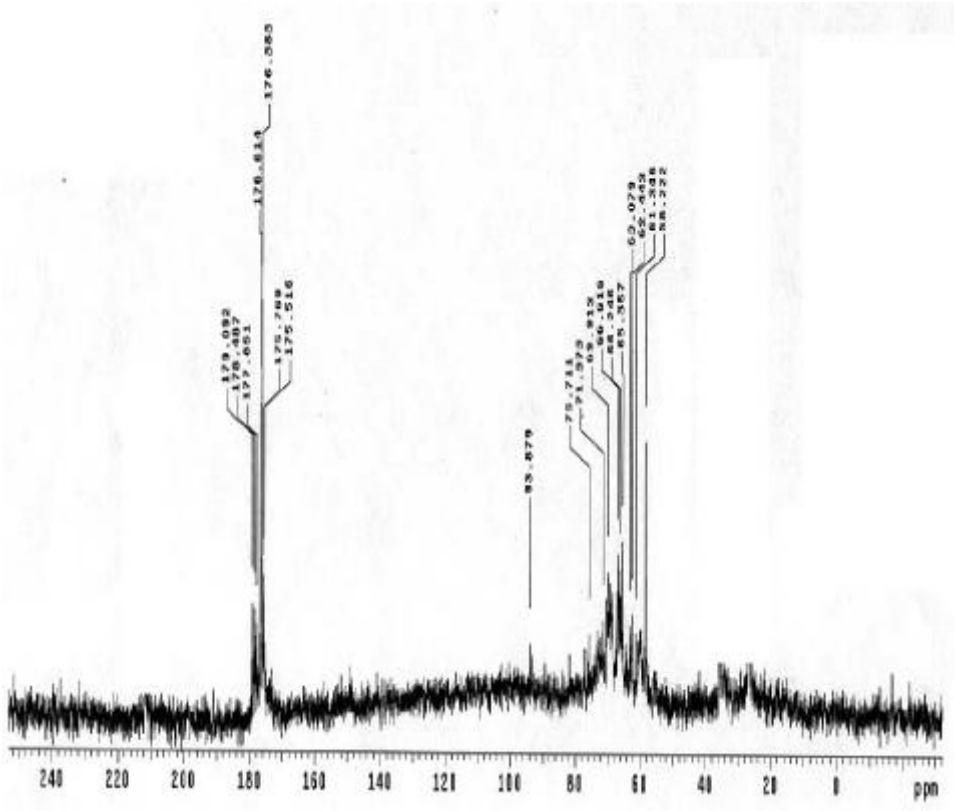

그림 3-5. 벼짚 유론산 유도체의 ^{13}C-NMR 분석결과

그림 3-5는 벼짚 유론산 유도체의 ^{13}C-NMR spectrum을 나타낸 것이다. 170 ppm**대에 형성된 피크는 C6에 카르복실기가 치환되어 있을 때 형성되는 피크로써 이 피크의 존재로 C6에 카르복실기가 치환되어 있는 유론산이 존재하는 것을 알 수 있다.** 90 ppm**대에 형성된 피크는 탄수화물의 구조에 있어서 C1이 glycoside 결합이나 메틸기가 치환되지 않았을 때 형성된다. 그리고** 90 ppm**대의 피크가 한 개만 존재하는 것과 C1이 glycoside 결합을 할 때** 100 ppm**대로 shift를 하는데 반해 그림 3-5에서는** 100 ppm**대에서 피크가 형성되**

지 않은 것으로 보아 유론산이 다른 당과 결합하고 있지 않고 단량체로써 존재하고 있다고 판단할 수 있다. 그림 3-2의 HPLC 분석결과와 비교하여 결론을 내리면 볏짚 xylan으로부터 단리된 유론산 유도체는 산가수분해동안 완전히 가수분해가 일어나 glucuronic acid로 존재하고 있음을 알 수가 있었다. 그리고 glucuronic acid의 C_4에 존재하는 메틸기가 β-탈리 반응에 의해 탈리되어 단독으로 존재하는 것을 60 ppm대에 형성되는 피크의 존재와 C_4에 메틸기가 치환되어 있을 때 형성되는 80 ppm대의 피크가 없는 것으로 추론할 수 있다.

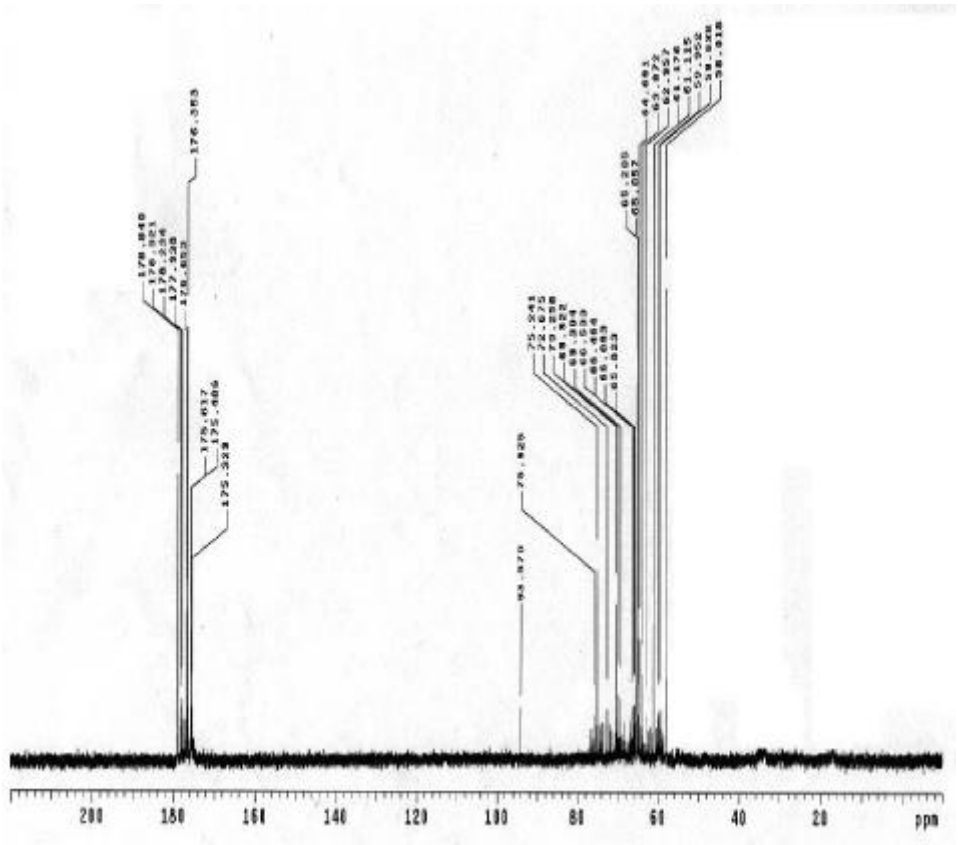

그림 3-6. 보릿짚 유론산 유도체의 ^{13}C-NMR 분석결과

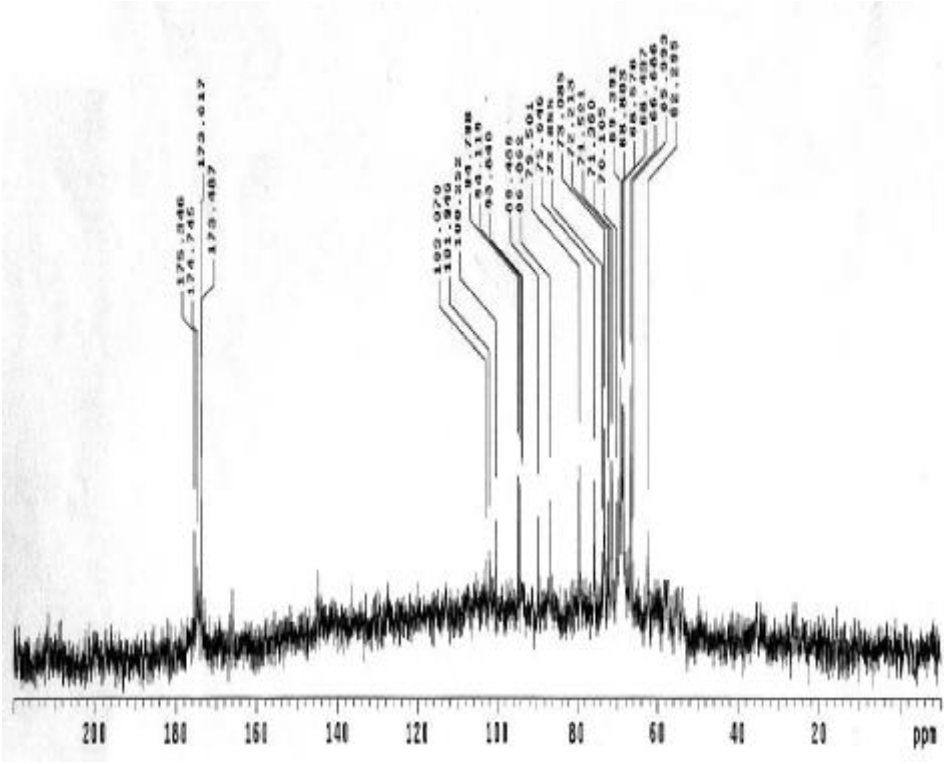

그림 3-7. 신갈나무 유론산 유도체의 ^{13}C-NMR 분석결과

그림 3-7은 ^{13}C-NMR spectrum을 나타낸 것으로써 100 ppm대에 형성된 피크는 탄수화물 C1의 glycoside 결합이나 메틸기가 치환되었을 때 형성되는 피크이며, 80 70 ppm대에 형성된 피크는 탄수화물의 구조에 있어 메틸기의 치환 또는 분지점이 있을 때 형성되는 피크이다. 한편 60 ppm대 부근에 형성된 피크는 탄수화물에 치환된 메틸기로부터 유래되는 피크이다.

표 3-13. **신갈나무 유론산 유도체의** ^{13}C-NMR chemical shift data

Chemical shift of material	Chemical shift of model compound	Assignment*	Difference in chemical shift of model compound
172.9	175.3	GA-C-6	-2.4
172.6	174.7	GalA-C-6	-2.1
105.0	103.1	X-C-1(branch point)	+1.9
103.2	101.9	GalA-C-1(branch point)	+1.3
101.0	100.3	GA-C-1(branch point)	+1.3
97.6	94.8	X-C-1	+2.8
97.0	94.1	GalA-C-1	+2.9
96.9	93.8	GA-C-1	+3.1
83.9	89.5	X-C-2(branch point)	-5.6
83.0	86.9	GA-C-4	-3.9
80.2	79.5	X-C-4-O	+0.7
75.1	75.6	X-C-2	-0.5
73.9	73.7	X-C-3	+0.2
73.4	73.1	GA-C-3	+0.3
72.4	72.2	GA-C-4	+0.2
72.0	71.5	GA-C-2	+0.5
71.4	71.4	GA-C-5	0
70.9	70.1	GalA-C-4	+0.8
70.5	69.4	GalA-C-5	+0.9
70.4	68.8	X-C-4	+1.6
69.5	68.6	GalA-C-3	+0.9
68.7	68.4	GalA-C-2	+0.3
64.0	66.7	X-C-5	-2.7
61.6	62.3	OMe	-0.7

* GA : glucuronic acid residues, GalA : galacturonic acid residues
X : xylose residues, OMe : methyl group

표 3-13은 그림 3-7에서 얻어진 ^{13}C-NMR spectrum을 귀속시킨 결과를 나타낸 것이다. 표 3-13의 결과에서 볼 때 시료의 chemical shift는 모델 화합물에 비해 대체적으로 저자장쪽으로 shift가 이루어져 있었다. 172.9 ppm의 피크는 glucuronic acid 잔기 C6위의 카르복실기로부터 유래된 피크이며, 172.6 ppm의 피키는 galacturnonic acid 잔기의 C6위의 카르복실기로부터 유래된 피크이다. 105.0 ppm의 피크는 xylose 잔기의 C1위에 glycoside 결합이 존재하는 것으로부터 유래된 것이고, 103.2 ppm의 피크는 galacturonic acid 잔기 C1위에 glycoside 결합이 존재하는 것에서부터 유래된 것이고, 101.0 ppm의 피크는 glucuronic acid 잔기 C1위의 glycoside 결합에서 유래된 것이다. 97.6 ppm의 피크는 glycoside 결합을 하지 않는 xylose 잔기의 C1위 탄소에서 유래되었고, 97.0 ppm의 피크는 glycoside 결합을 하지 않는 galacturonic acid 잔기의 C1위 탄소에서 유래되었고, 96.9 ppm의 피크는 glycoside 결합 또는 메틸기로 치환되지 않은 C1위 탄소에서 유래된다. 83.9 ppm의 피크는 xylose 잔기의 C2위에 분지점 또는 메틸기가 치환되었을 때 나타나는 피크이며, xylose 잔기의 C2위에 치환된 메틸기가 관측되지 않았기 때문에 xylose 잔기 C2위에 분지점이 존재하는 것으로 생각된다. 83.0 ppm의 피크는 glucuronic acid 잔기의 C4위에 분지점 또는 메틸기가 치환되었을 때 나타나는 피크이다. 그림 3-7에서 glucuronic acid 잔기의 C4에 치환된 메틸기가 61.6 ppm의 피크로 존재하기 때문에 glucuronic acid 잔기의 C4위에 메틸기가 치환되어 있을 것으로 판단된다. 80.2 ppm의 피크는 xylose 잔기 C4위에 메틸기가 치환되어 있거나 glycoside 결합되었을 때 유래되는 피크이다. 그러나 xylose 잔기의 C4위에 치환된 메틸기가 관측되지 않기 때문에 C4위의 탄소가 glycoside 결합을 하고 있는 것으로 판단된다. 75.1 ppm의 피크는 xylose 잔기의 C2위에 메틸기나 분지점이 존재하지 않는 탄소에서 유래된다. 73.9 ppm의 피크는 glucuronic acid 잔기의 C3위의 탄소에서 유래되고, 72.4 ppm의 피크는 glucuronic acid 잔기의 C4위에서 β-탈리 반응에 의해 메틸기가 탈리된 탄소에서 유래된다고 판단된다. 72.0 ppm의 피크는 glucuronic acid 잔기의 C2위의 탄소에서 유래되

고, 71.4 ppm의 피크는 glucuronic acid 잔기의 C5위의 탄소에서 유래된다. 70.9 ppm의 피크는 galacturonic acid 잔기의 C4위의 탄소에서 유래됨을 알 수 있으며, 70.5 ppm의 피크는 galacturonic acid 잔기의 C5위의 탄소에서 유래된다. 70.4 ppm의 피크는 xylose 잔기 C4위에 메틸기나 glycoside 결합이 존재하지 않을 때 C4위의 탄소에서 유래되며, 69.5 ppm의 피크는 galacturonic acid 잔기 C3위 탄소에서 유래되고, 68.7 ppm의 피크는 galacturonic acid 잔기 C2위 탄소에서 유래되며, 64.0 ppm의 피크는 xylose 잔기 C5위 탄소에서 유래된 것이다. 61.6 ppm의 피크는 glucuronic acid 잔기의 C4위에 치환되어 있는 메틸기에서 유래된 것으로 판단된다. 최종적으로 표 3-13의 결과를 종합해보면, 신갈나무 xylan으로부터 단리된 유론산 유도체는 1 3당류로 혼합되어 있음을 알 수가 있었다. Glucuronic acid와 galacturonic acid의 C6위에 카르복실기가 존재하고, glucuronic acid 잔기 C4위의 탄소는 메틸기가 치환되어 있는 것과 β-탈리에 의해 메틸기가 탈리된 두가지 형태로 glucuronic acid가 단당으로 존재하고 있으며, galacturonic acid도 단당으로 존재하고 있다. 그리고 glucuronic acid 잔기 C1위의 탄소가 xylose 잔기 C2위의 탄소와 α-(1, 2)-glycoside 결합을 형성하는 aldobiouronic acid의 형태가 존재하며, galacturonic acid 잔기 C1위의 탄소가 xylose 잔기 C4의 탄소와 β-(1, 4)-glycoside 결합을 형성하는 이당류의 존재도 있음을 판단할 수 있다. 그리고 두 개의 xylose 잔기가 β-(1, 4)-glycoside 결합으로 연결되어 있고, 이 xylose 잔기 중 하나의 xylose 잔기 C2위 탄소와 glucuronic acid 잔기 C1위 탄소가 α-(1, 2)-glycoside 결합을 이루는 aldotriouronic acid의 삼당류도 존재하고 있는 것으로 판단된다.

3. xylan의 가수분해 조건 확립

정제된 xylan으로부터 uronic acid를 단리하기 위한 최적 산가수분해조건을 검토하기 위해 황산농도를 0.25 1.0N, 가수분해시간을 60 180분으로 변화시켜

산가수분해를 한 후 얻어진 가수분해물은 DNS법으로 환원당량을 측정하였다.

정제 xylan으로부터 uronic acid를 단리하기 위한 산가수분해조건을 황산 농도와 반응 시간에 따른 가수분해율로써 그림 3-8에 나타냈다. 가수분해시간을 일정하게 한 후 황산 농도변화에 따른 가수분해율을 비교해 보면 1.0N 황산으로 가수분해하였을 때 가수분해율이 90% 이상임을 알 수 있었다. 1.0N 황산에 대해서 가수분해시간을 변화시켰을 때의 가수분해율을 비교해보면 가수분해율이 90분 이상에서 level off 되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들로부터 황산 농도가 높아질수록 가수분해율도 증가함을 알 수가 있었고, 1.0N 황산으로 90분간 가수분해시켰을 때 90% 이상의 가수분해율을 나타냄을 알 수 있었다. 그러므로 폭쇄 처리된 농산 및 임산폐자원의 xylan으로부터 uronic acid를 단리하기 위한 최적 산가수분해조건은 황산농도 1.0N, 가수분해시간 90분임을 알 수가 있었다.

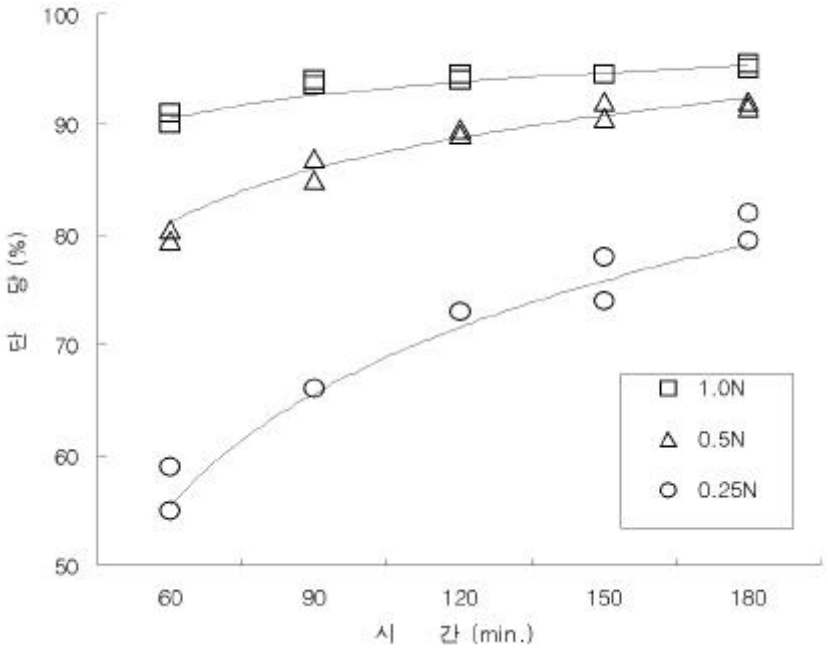

그림 3-8. 황산 농도에 따른 가수분해시간과 단당율의 변화

4. Xylan 단리 부산물 중 셀룰로오스의 분리

일반적으로 목재로부터 순수 셀룰로오스를 제조하기 위해서는 주로 목재를 펄프화하여 제조하게 된다. 이러한 방법으로는 많은 경비가 소요될 뿐 아니라 공정이 복잡하고 제조공정에서 공해를 유발하게 되며, 얻어진 셀룰로오스는 순도가 낮은 등의 문제점이 있는 것이다. 따라서 본 연구 수행 중 발생하는 xylan 단리 부산물을 이용하여 고순도의 셀룰로오스를 제조하였다.

Xylan 단리 부산물의 경우 온수 추출에 의해 상당량의 헤미셀룰로오스가 용출되고 리그닌과 셀룰로오스 이외에 소량의 헤미셀룰로오스가 잔존한다고 판단된다. 이러한 부산물을 염소계 약품에 의한 처리나 산소-알카리 처리를 통해 페놀성 화합물인 리그닌과 소량의 헤미셀룰로오스를 제거시켜 고순도의 셀룰로오스를 단리할 수 있을 것이다. 그리고 이렇게 단리된 순수 셀룰로오스를 이용하여 다양한 셀룰로오스 유도체를 제조할 수 있다.

셀룰로오스를 산화, 치환 및 이 이외의 화학적 처리에 의하여 얻어지는 생성물을 셀룰로오스 유도체라 하며, 생성 중의 시약을 제거하면 용이하게 셀룰로오스가 재생된다. 셀룰로오스에 어떤 기능을 부여함으로써 부가가치가 높은 제품을 제조하려는 연구는 많이 행해지고 있다. 효소의 고정, 이온 교환능의 부여 및 금속 이온의 선택적 흡착성을 부여하는 것 등은 화학반응에 기초한 기능의 부여이며, 또한 전도성이나 감광성을 부여하는 것은 물리적 기능의 부여라고 말할 수 있을 것이다.

이와 같이 재생산이 가능한 자원인 셀룰로오스에 화학반응을 통하여 특정 기능을 부여함으로써 셀룰로오스를 유효하게 이용하려는 가능성은 금후 점차 증대되고 있다. 차후에 기능이라고 부르기에 적절한 새로운 형의 치환기를 셀룰로오스에 도입하는 경우 균일계에서의 반응이 기대될 수 있는 하나의 방향이라고 말할 수 있다. 예로써 종래 조제된 불균일계에서의 벤질 셀룰로오스의 치환도는 최고 2.4정도이지만 균일계에서는 치환도 3.0의 벤질 셀룰로오스가 고수율로 얻어진다. 이를 위해서는 셀룰로오스에 대한 용해도가 높고 회수성

이 우수한 용제를 찾아내는 노력이 더욱 필요하다고 하겠다. 또한 셀룰로오스 유도체의 성상과 관련하여 도입된 치환기의 수나 분포를 용이하게 조정하는 방법을 발견하는 것도 중요하다.

가. Xylan의 단리부산물로부터 셀룰로오스의 제조

1) xylan 단리 부산물의 성분분석

폭쇄 처리된 농산 및 임산 폐자원으로부터 xylan을 단리한 후, 회수된 단리 부산물의 리그닌 함량과 당 조성분석을 행하였다.

표 3-14. xylan 단리 부산물의 리그닌 함량과 당 조성분석 (단위 : %)

Materials No.	Klason lignin	Sugar composition					
		Rham.	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glc.
EO 20-3*1	35.7	T*4	T	7.2	T	T	92.8
EH 20-3*2	39.0	T	1.0	10.4	2.2	T	86.4
EQ 20-3*3	28.9	T	T	13.3	2.8	T	83.9

*1 : 20 kgf/cm2, 3분간 처리된 볏짚

*2 : 20 kgf/cm2, 3분간 처리된 보릿짚

*3 : 20 kgf/cm2, 3분간 처리된 신갈나무

*4 : T-trace, below 0.1%

Xylan 단리 부산물의 당 조성 분석결과를 살펴보면, xylose를 비롯한 대부분의 헤미셀룰로오스가 온수 추출과정동안 용출되었다는 것을 알 수 있었다. 이는 폭쇄 처리동안 어느 정도 가수분해가 진행된 헤미셀룰로오스가 온수에

의해 용이하게 용출될 수 있다는 것을 보여준다. 리그닌 함량의 경우 xylan 단리 전보다 리그닌 함량이 약간 증가했지만 이것은 탄수화물의 용출에 의한 리그닌의 상대량이 증가한 것으로 판단된다.

2) 아염소산나트륨법에 의한 셀룰로오스의 분리

온수 추출잔사 2.5 g을 500 ㎖ 삼각플라스크에 넣고, 증류수 300 ㎖와 아염소산나트륨 1 g, 초산 0.2 ㎖를 가하고 70℃ shaking water bath에서 100 rpm으로 1시간동안 반응시켰다. 다시 냉각시키지 않은 상태에서 아염소산나트륨 1 g, 초산 0.2 ㎖를 첨가하였다. 이 조작을 2 회 반복하였다. 반응 종결 후 2G3 glass filter로 여과하여 증류수, 아세톤 순으로 충분히 세척한 다음 건조시켰다. 아염소산나트륨법으로 처리된 시료는 α-셀룰로오스 함량, Klason법에 의한 lignin 함량, 중합도, 당 조성분석을 하였다.

α-셀룰로오스 함량은 시료 1 g을 200 ㎖ 비이커에 넣고 17.5% 수산화나트륨 용액을 10 ㎖ 첨가한 후, 25℃ water bath에서 4 분간 방치한 후 5분간 유리봉으로 가볍게 교반하였다. 증류수 10 ㎖를 첨가하여 1 분간 혼합한 다음 5 분간 방치 후 2G3 glass filter로 여과하였다. 여과시 여과액을 재사용하여 5 분이내에 여과를 종료하고 증류수 200 ㎖를 사용하여 세척한 후 세척잔사에 10% 초산을 10 ㎖ 첨가하고 5분간 방치한 다음 열수 200 ㎖로 세척하여 건조시킴으로써 α-셀룰로오스 함량을 측정할 수 있다.

시료의 중합도는 CED점도법을 이용하여 측정하였다. 시료 0.05 g을 100 ㎖용 삼각플라스크에 넣고 105±0.5℃ 건조기에서 30분간 건조시킨 후, 증류수 25 ㎖를 첨가하였다. 시료가 충분히 침지되도록 3 시간동안 교반한 다음 1M Cuene 용액 25 ㎖를 첨가하여 1 시간동안 시료가 완전히 용해되도록 교반하였다. 1G3 glass filter로 여과한 후 여과액을 25±0.1℃의 항온 수조속에서 Ostwald 점도계(F-99, IWAKI Co.)에 10 ㎖를 넣고, flow time을 측정한 후 시료를 넣지 않은 용액의 flow time에 대한 비로써 고유점도를 측정하였다. 점도상수

표에서 시료의 고유점도를 알아낸 후 아래의 식에 의해 각 시료의 중합도를 계산하였다.

Degree of Polymerization(D.P.) = (시료의 고유점도 / 0.1) × 190

표 3-15. 아염소산나트륨법으로 처리된 xylan 단리 부산물의 성상분석

Materials No.	Yield(%)	Klason lignin(%)	α-Cell.(%)	D.P.*4
EO 20-3*1	72.9	21.5	67.7	254.6
EH 20-3*2	62.8	11.5	68.9	288.8
EQ 20-3*3	70.5	1.8	83.0	442.7

*1 : 20 kgf/cm2, 3분간 처리된 볏짚

*2 : 20 kgf/cm2, 3분간 처리된 보릿짚

*3 : 20 kgf/cm2, 3분간 처리된 신갈나무

*4 : Degree of Polymerization

표 3-15는 아염소산나트륨법으로 처리된 xylan 단리 부산물의 성상 분석결과이다. 아염소산나트륨은 탈리그닌 효과가 우수하고 비교적 간단하게 시료를 대량으로 처리할 수 있기 때문에 목분에서 홀로셀룰로오스를 제조할 때 많이 사용되고 있다. 볏짚과 보릿짚의 경우, 리그닌 함량이 신갈나무에 비해 월등히 높은 것을 알 수가 있다. 이것은 아염소산나트륨 처리를 통해 초본류의 무기물과 단백질 등이 용출되지 않았기 때문으로 판단된다. 중합도(D.P.)의 경우 아염소산나트륨법에 의한 탈리그닌 과정 중 목본류가 초본류에 비해 탄수화물의 붕괴가 더 적었음을 알 수가 있었다.

표 3-16는 아염소산나트륨법으로 처리된 xylan 단리 부산물의 구성성분 분석 결과이다. 표 3-16의 결과를 살펴보면, xylan 단리 부산물의 당 조성이 아

염소산나트륨으로 처리하기 전보다 glucose 잔기의 함량이 증가하고 헤미셀룰로오스 잔기의 함량이 감소함을 알 수 있었다. 아염소산나트륨처리에 의해 리그닌이 용출되면서 셀룰로오스에 비해 비교적 염소계 약품에 의해 분해되기 쉬운 헤미셀룰로오스계 당류들이 같이 용출된 것으로 판단된다.

표 3-16. 아염소산나트륨법으로 처리된 xylan 단리 부산물의 구성성분

Materials No.	Sugar composition(%)					
	Rham.	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glc.
EO 20-3*1	T*4	1.6	T	0.6	T	97.8
EH 20-3*2	T	T	2.9	0.6	T	96.6
EQ 20-3*3	T	0.9	10.0	5.0	T	84.1

*1 : 20 kg/cm2, 3분간 처리된 볏짚

*2 : 20 kg/cm2, 3분간 처리된 보릿짚

*3 : 20 kg/cm2, 3분간 처리된 신갈나무

*4 : T-trace, below 0.1%

표 3-15과 3-16의 결과를 종합해 보면, 아염소산나트륨법으로 xylan 단리 부산물을 처리했을 때 신갈나무는 중합도가 450정도, α-셀룰로오스 함량이 83% 정도 리그닌 함량이 1.8%로 70.5%의 수율로 셀룰로오스가 분리되었다. 볏짚, 보릿짚은 아염소산나트륨처리 후 분리된 셀룰로오스의 탈색정도는 신갈나무와 육안적으로 비교했을 때 거의 차이가 없었다. 이에 반해 높은 리그닌 함량을 나타내는 것은 초본류에 상당량 포함되어 있는 무기물 등이 아염소산나트륨처리과정 동안 제거되지 않았기 때문으로 판단된다.

아염소산나트륨법으로 단리된 셀룰로오스의 경우에 있어서 처리조건에 따라 고순도의 셀룰로오스를 제조할 수 있다. 그러나 처리조건을 더 강화시킬 경

우 단리 셀룰로오스의 수율이 상대적으로 낮아지기 때문에 본 연구에서는 위의 조건으로 셀룰로오스를 제조하였다. 그리고 아염소산나트륨법으로 제조된 셀룰로오스의 경우에는 탈리그닌처리시 사용된 염소계 약품으로 인해 세정 후에도 염소가 리그닌에 결합하여 잔존하는 문제점이 있다.

나. 산소-알카리 펄프화법에 의한 xylan 단리 부산물로부터 셀룰로오스의 분리

1) 산소-알카리 펄프화법의 개요

유황을 함유하지 않는 증해액을 이용하여 알카리의 부족한 탈리그닌 효과 및 탄수화물의 붕괴 방지를 위한 연구가 활발히 진행되는 가운데 산소-알카리 펄프화법은 1970년경 제안되어 큰 기대와 관심을 끌었다. 대기 중에 다량으로 함유되어 있는 산소를 알카리 존재하에서 리그닌의 제거에 이용하려는 착상은 오래 전부터 알려져 왔으나 이때 산소가 셀룰로오스의 중합도를 현저하게 저하시켜 펄프의 강도를 떨어뜨리기 때문에 산소-알카리 처리에 의한 펄프제조는 실용화에 이르지 못하였다. 그러나 1960년대에 들어와 셀룰로오스 보존제로 마그네슘염의 효과가 알려짐과 동시에 환경오염방지에 대한 여론이 높아져 산소-알카리 증해는 무공해 펄프화법으로 크게 부각되면서 표백 및 펄프화에 산소를 이용하려는 “oxygen based pulping & bleaching process"가 개발되어 염소화합물 및 황화합물을 대체시키게 되었다.

2) 산소-알카리 펄프화법에 의한 셀룰로오스의 분리

표 3-17의 조건과 같이 시료 2 g과 증해액을 Bomb에 넣고 산소를 주입한 다음 oil bath에서 일정시간 반응시켰다. 이렇게 반응된 시료를 2G3 glass filter로 여과하고, 10% 초산으로 중화한 후 증류수로 세정하였다.

표 3-17. 산소-알카리펄프화 처리 조건

Composition	Condition
시료량 (g)	2
NaOH 농도 (%)	6
반응시간 (hr.)	2
반응온도 (℃)	120
초기 산소압 (kgf/cm2)	10

표 3-18. 산소-알카리 펄프화법에 의한 xylan 단리 부산물의 성상분석

Materials No.	Yield(%)	Klason lignin(%)	α-cell.(%)	D.P.*4
EO 20-3*1	40.5	5.3	78.3	271.7
EH 20-3*2	38.9	10.1	74.5	288.8
EQ 20-3*3	59.5	18.5	67.1	604.2

*1 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 볏짚

*2 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 보릿짚

*3 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 신갈나무

*4 : Degree of Polymerization

산소-알카리 펄프화법에 의해 xylan의 단리 부산물을 처리하였을 때, 신갈나무의 경우 아염소산나트륨법에 비해 처리효과가 그다지 좋지 않았다. 리그닌이 거의 대부분 잔존하는 상태에서 중합도가 많이 감소되었으므로 산소-알카리 처리에 의해 탄수화물의 붕괴 및 용출이 상당히 심했다고 판단된다. 그에 비해 볏짚, 보릿짚의 경우 아염소산나트륨처리에서보다 리그닌 함량이 상당히 낮게 나타났음을 알 수가 있었다. 수율적인 측면에서 세 시료 모두 아염소산나트륨법에 의해 제조된 셀룰로오스의 단리 수율보다 상당히 낮은 수율을

나타내었다. 이는 리그닌의 용출 뿐만 아니라 탄수화물의 붕괴 또한 상당히 진전되었기 때문으로 판단된다.

아염소산나트륨처리에 의해 제조된 셀룰로오스와 비교를 해보면, 산소-알카리처리에 있어서 헤미셀룰로오스 함량이 상당히 낮아진 것을 알 수 있었다. 신갈나무의 경우 리그닌 함량이 높음에도 불구하고 96.2%의 glucose 함량을 가진다는 것은 산소-알카리 처리에 의해 탄수화물의 용출 특히 헤미셀룰로오스의 분해가 상당히 발생하였음을 시사한다. 그러나 염소계 탈리그닌 처리에 비해 산소-알카리 처리에 의해 제조된 셀룰로오스는 잔존하는 약품에 의한 유해성은 발생하지 않으므로, 아염소산나트륨법에 의한 탈리그닌 처리법보다는 산소-알카리 처리에 의한 탈리그닌 처리법이 더 우수한 것으로 판단된다.

표 3-19. 산소-알카리 펄프화법에 의한 xylan 단리 부산물의 구성분 분석

Materials No.	Sugar composition(%)					
	Rham.	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glc.
EO 20-3*1	T*4	0.4	2.6	6.1	T	90.9
EH 20-3*2	T	T	1.7	0.9	T	97.4
EQ 20-3*3	T	T	2.6	1.2	T	96.2

*1 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 볏짚

*2 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 보릿짚

*3 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 신갈나무

*4 : T-trace, below 0.1%

다. 셀룰로오스 유도체의 제조

1) 셀룰로오스 아세테이트의 제조

셀룰로오스 아세테이트는 치환도를 변화시킴에 따라 용매에 대한 용해성도 광범위하게 조절할 수 있기 때문에 섬유나 필름 성형물로서 용도가 넓다. 대표적인 제품으로 아세테이트 레이온, 사진용 필름, 도료 등이 있다. 특수한 것으로서는 역침투용의 비대칭 다공막이 있다. 또한 최근에는 셀룰로오스 아세테이트의 유연성과 용제 가용성에 의해 자동차용 도료로 이용되고 있는 실정이다.

셀룰로오스 시료 10 g을 500 ㎖ 비이커에 넣고 시료 1 part에 대하여 초산 80 part, 무수초산 7 part, 황산 0.1 part를 투입하여 40℃에서 3시간 동안 shaking water bath에서 100 rpm의 속도로 반응시켰다. 이렇게 반응시킨 것을 다시 20℃에서 하룻밤동안 교반 하였으며, 반응 후 여과하여 불용성 성분을 제거하였다. 여과액을 100 ㎖까지 농축하여 4 배량의 메탄올에 적하해서 아세테이트를 침전시켰다. 침전물을 다시 여과하여 아세테이트를 회수한 다음, 동결건조로 아세테이트를 건조하여 회수하였다.

제조된 셀룰로오스 아세테이트를 성질에 맞게 이용하기 위해 치환도를 측정하였다. 아세틸화물 1 g을 250 ㎖용 용량의 삼각플라스크에 넣고 75% 메탄올 40 ㎖를 넣어 50 60℃에서 30분 방치한 후 여기에 0.5N NaOH 수용액 40 ㎖를 첨가하고 15분간 반응시킨 후 뚜껑을 밀봉하여 실온에서 48시간 방치하였다. 여기에 소량의 페놀프탈레인 지시약을 넣고 0.5N HCl로 적정하였다. 아세틸기 함량 및 치환도는 다음 식에 의해 구했다.

$$\text{아세틸 (\%)} = [(A-B)Nb - (C-D)Na] \times 4.3 / W$$

A : 시료에 첨가된 NaOH의 ml　　B : Blank에 첨가된 NaOH의 ml

Nb : NaOH 수용액의 규정농도　　C : 시료에 첨가된 HCl의 ml

D : Blank에 첨가된 HCl의 ml　　Na : HCl 수용액의 규정농도

W : 시료의 중량(g)　　4.3 : 상수

표 3-20은 제조된 셀룰로오스 아세테이트의 화학적 성상을 알아보기 위하여 치환도(D.S.)와 중합도(D.P.), 당조성분석을 행한 결과이다.

표 3-20. 셀룰로오스 아세테이트의 화학 성상 분석

Materials No.	Yield(%)	D.P.*1	D.S.*2	Sugar composition(%)				
				Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glc.
EO 20-3*3	88.1	>186	2.1	T*6	0.8	3.2	T	96.0
EH 20-3*4	88.4	>186	2.2	T	1.7	0.9	T	97.4
EQ 20-3*5	151.7	>186	2.5	T	0.7	0.8	T	98.5

*1 : Degree of Polymerization

*2 : Degree of Substitution

*3 : 20 kg/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 볏짚

*4 : 20 kg/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 보릿짚

*5 : 20 kg/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 신갈나무

*6 : T-trace, below 0.1%

각 아세틸화물의 수율을 살펴보면, 신갈나무가 가장 높으며 보릿짚, 볏짚의 순으로 나타났다. 각 시료의 치환도를 살펴보면, 신갈나무가 가장 높으며, 보릿짚, 볏짚의 순으로 나타났다. 이것은 아세틸화시 볏짚, 보릿짚에 존재하는 리그닌과 무기물들에 의해 아세틸화시 탄수화물에 아세틸기의 도입속도 뿐만 아니라 반응 저해인자로 작용하여 이러한 결과가 나타난 것으로 판단된다. 중합도의 경우 무수초산-황산-초산 메카니즘에서 황산에 의해 탄수화물의 붕괴가 일어나 저분자화되어 CED 점도법에 의한 중합도 측정은 불가능하다고 판단되었다. 구성당 분석 결과에서 신갈나무의 헤미셀룰로오스 함량이 2% 미만, 볏짚, 보릿짚에서는 4% 이하를 나타내었다.

제조된 셀룰로오스 아세테이트에서 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스에 아세틸기의 반응유무와 잔존하는 수산기의 함량 그리고 카르보닐기의 유무를 알아보기 위하여 각 시료를 KBr과 함께 미분쇄시킨 후 KBr 펠렛을 만들어서 FT-IR 분석을 행하였다. 이때 FT-IR의 분석 조건은 다음과 같다.

- Model : Mattson Instruments Inc. Galaxy 7020A
- Spectral range : 4000 400 cm-1
- Beam splitter : Coated on KBr
- Detector : DTGS
- Resolution : 0.25 cm-1

그림 3-9, 10, 11은 본 연구에서 사용된 볏짚, 보릿짚, 신갈나무의 아세틸화물의 FT-IR spectrum을 나타낸 것이다. 본 연구에서 사용된 볏짚, 보릿짚, 신갈나무의 아세틸화물의 FT-IR spectrum은 현재 시판되고 있는 셀룰로오스 아세테이트의 FT-IR spectrum과 비슷하였다. 그러나 3,500 cm-1 부근에서의 수산기의 함량이 나타나는 것으로 보아 제조된 셀룰로오스 시료에 존재하는 수산기가 일부 아세틸화되지 않고 잔존하는 것으로 생각된다. 그러나 아세틸화 반응에 의해 나타내는 1,200 cm-1 및 1,750 cm-1 부근에서의 에스테르 카르보닐기의 흡수가 현저히 높으며, 이러한 것은 제조된 셀룰로오스 시료의 아세틸화 반응에 의해 C2, C3, C6에 존재하는 수산기가 대부분 아세틸기로 치환되었음을 알 수 있었다.

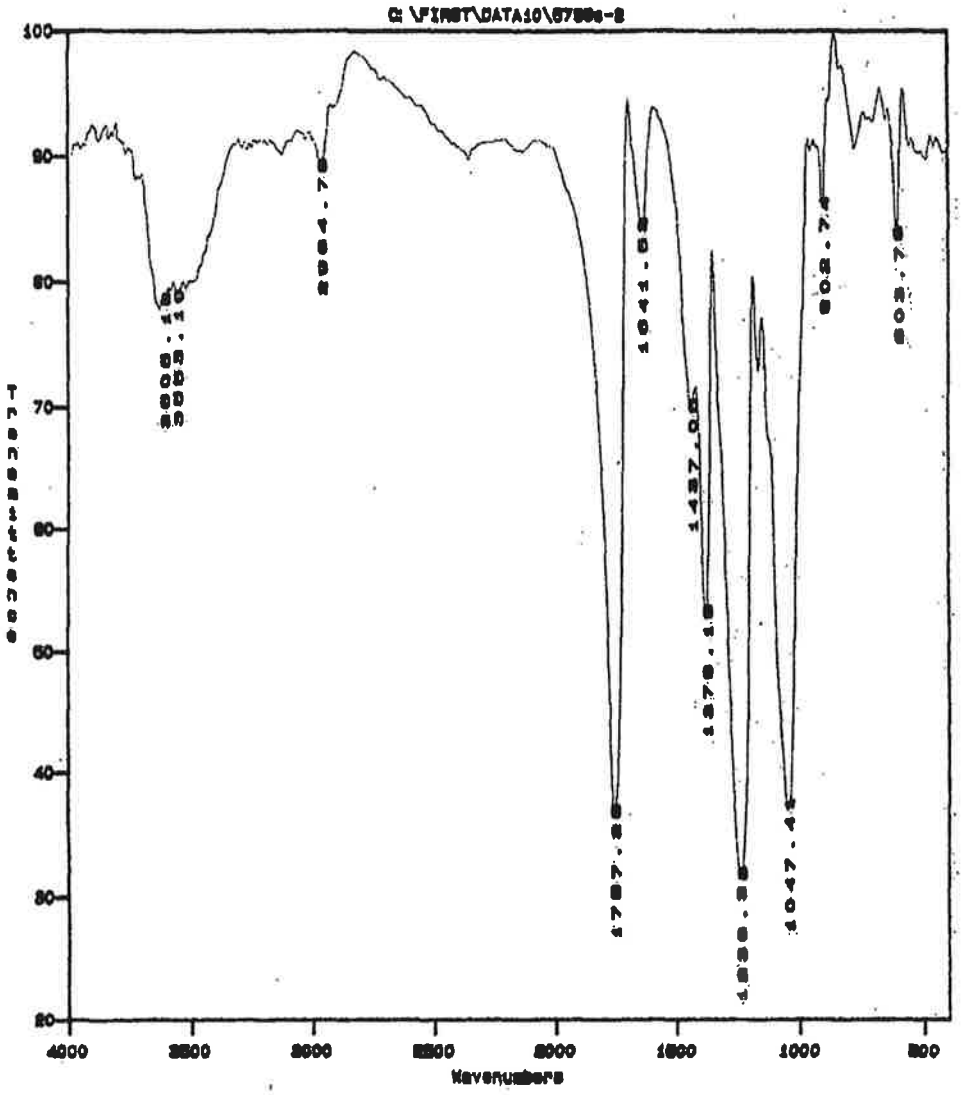

그림 3-9. 볏짚 셀룰로오스 아세테이트의 FT-IR spectrum

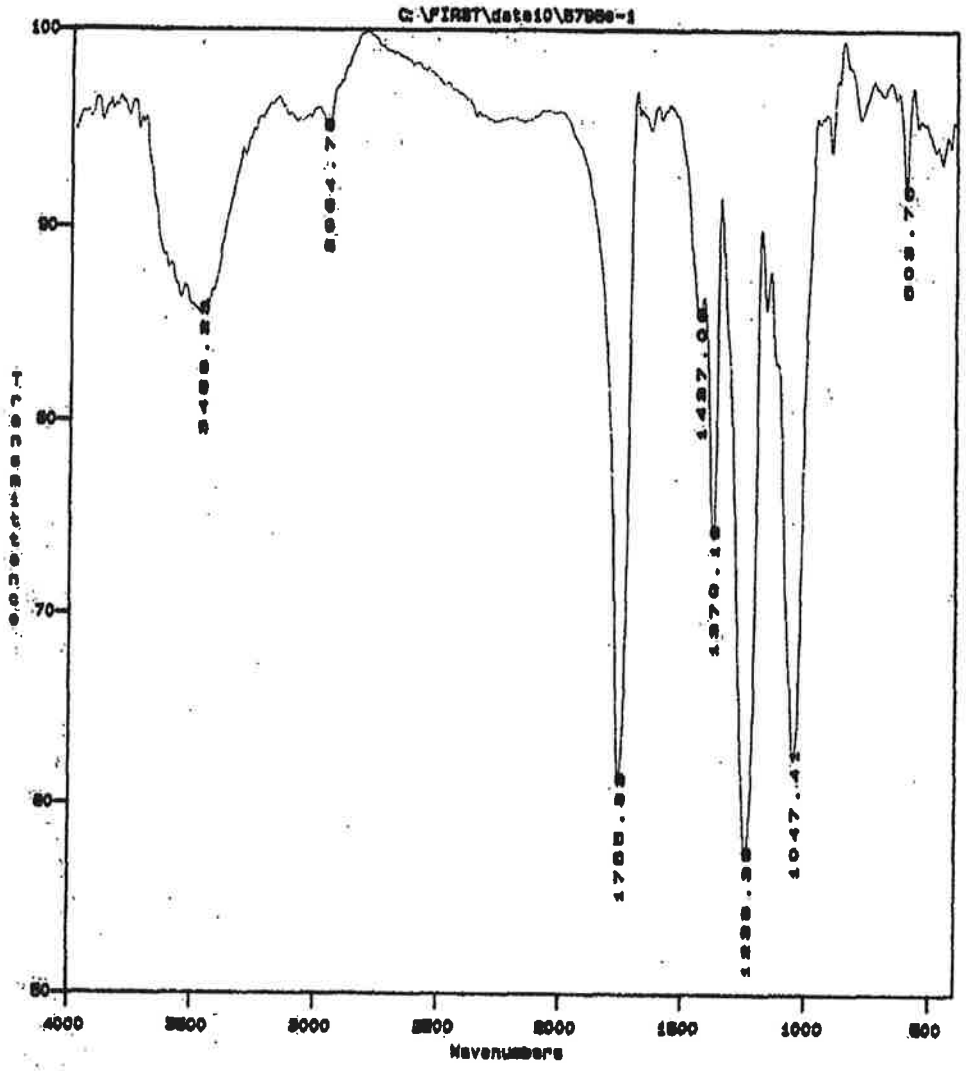

그림 3-10. 보릿짚 셀룰로오스 아세테이트의 FT-IR spectrum

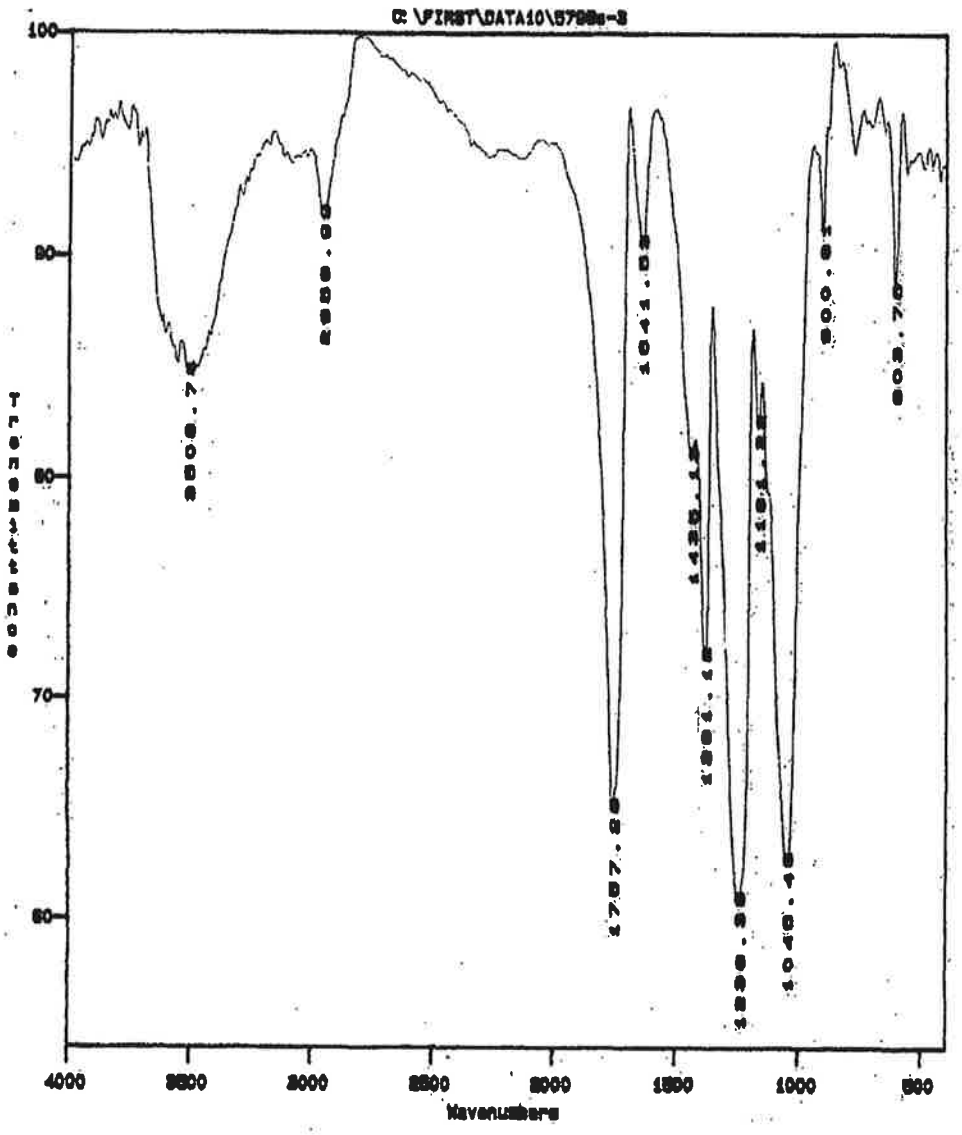

그림 3-11. 신갈나무 셀룰로오스 아세테이트의 FT-IR spectrum

2) 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)의 제조

셀룰로오스 유도체로서 현재 가장 많이 사용되는 CMC는 화학적으로는 sodium carboxymethyl셀룰로오스 또는 sodium 셀룰로오스 glycolate로 부르는 것이 정확하다. CMC는 셀룰로오스의 수산기와 에테르 결합한 카르복시메틸기를 가진 monochloroacetic acid를 반응시켜 제조하며 무미, 무취의 백색분말로 고분자 전해질이며, 물에 쉽게 용해된다. 낮은 치환도(0.2 이하)의 CMC는 물에 불용이며, 양이온 교환체로서 컬럼크로마토그래피 등에서 사용된다. 치환도 0.3 이상의 것은 물에 용해하여 고분자 전해질로 되며, 풀, 점도 조절제, 응집제, 흡수제로서 화학공업, 식품, 의약품 공업에서 광범위하게 이용되고 있다.

시료 10 g을 80% iso-propylalcohol 250 ml에 넣고 충분히 교반한 후 실온에서 30분에 걸쳐 30% NaOH 용액 50 ㎖를 첨가하고 다시 1시간 교반한 다음 monochloroacetic acid 5.5 g을 30분에 걸쳐 첨가하고 반응물을 55℃의 water bath에서 3시간 방치하였다. 냉각 후 반응물을 1G3 glass filter로 여과하고 80% 메탄올 200 ㎖중에 교반하면서 재분산시킨 후 과잉의 알카리를 제거하기 위해 90% 초산을 첨가하여 중화시켰다. 다시 반응물을 80% 메탄올 200 ㎖로 3회 반복 세정한 후 무수 메탄올 200 ㎖로 세정한 다음 생성물을 60℃ 건조기에서 건조시켰다. 이렇게 제조된 CMC를 황산 정제법으로 정제하였다. 제조된 CMC 시료 0.5 g을 20% 황산에 적하시켜 40 50℃의 water bath에서 1시간 교반하여 CMC화물의 나트륨이온을 물에 불용인 산으로 치환시켜 증류수로 충분히 세정하여 글리콜산, NaCl, Na_2SO_4 및 H_2SO_4를 제거하고 원심분리하여 정제 CMC산을 회수하였다. 교반하면서 CMC산에 탄산나트륨 수용액을 가하여 나트륨염 형으로 바꾼다. 이것을 1G3 glass filter로 여과한 다음 60℃ 건조기에서 건조시켰다.

제조된 CMC을 성질에 맞게 사용하기 위해 치환도를 측정하였다. CMC 시료 2 g에 메탄올, 질산 혼합액 100 ㎖(무수 메탄올 1ℓ + 70% 질산 100 ml)

를 첨가하여 실온에서 3 4시간 교반한 후 1G3 glass filter에 여과하고 80% 메탄올로 5회 이상 충분히 세정하고 무수 메탄올로 세정한 다음 105℃ 건조기에서 4시간 건조하였다. 건조된 시료 0.3 g을 100℃에서 1시간 건조하여 수분 함유량을 뺀 후 250 ㎖ 삼각플라스크에 넣고 70% 메탄올 15 ㎖를 첨가하여 혼합시킨 후 30분간 방치한 다음 증류수 200 ㎖, 0.4N NaOH 수용액 3 ㎖를 첨가하여 시료가 용해될 때까지 교반하였다. 이 용액에 소량의 페놀프탈레인 지시약을 넣고 0.4N HCl로 역적정하였다. 치환도를 구하는 식은 다음과 같다.

Degree of Substitution(D.S.) = 0.162 × A / (1 - 0.058 × A)

A : NaOH 당량 / 시료의 질량

표 3-21. 제조된 CMC의 화학적 성상 분석

Materials No.	Yield(%)	D.P.*1	D.S.*2	Sugar composition(%)				
				Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glc.
EO 20-3*3	80.9	>186	0.70	T*6	1.7	4.1	T	94.2
EH 20-3*4	83.9	>186	0.81	T	1.5	0.6	T	97.9
EQ 20-3*5	84.6	>186	0.88	T	1.0	0.4	T	98.6

*1 : Degree of Polymerization

*2 : Degree of Substitution

*3 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 볏짚

*4 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 보릿짚

*5 : 20 kgf/cm2, 3분간 폭쇄 처리된 신갈나무

*6 : T-trace, below 0.1%

표 3-21는 제조된 CMC의 치환도(D.S.), 중합도(D.P.), 구성당 분석을 행한 결과이다. 제조된 CMC의 수율은 신갈나무가 가장 높았고 보릿짚, 볏짚 순이었다. 치환도의 결과를 살펴보면, 셀룰로오스 아세테이트와 마찬가지로 볏짚과 보릿짚에서 신갈나무에 비해 상대적으로 높은 리그닌 함량과 무기물 함량이 반응 저해인자로 작용하여 치환도가 낮게 나타났다고 판단된다. 황산에 의한 CMC의 정제로 인해 탄수화물의 붕괴가 일어나 점도법을 이용한 중합도의 측정은 불가능하였다.

제 5 절 결 론

본 연구는 폭쇄 처리를 통한 xylan 및 uronic acid 단리 방법을 체계화하여 xylan 및 uronic acid의 이용성을 증대시키고 농산 및 임산 폐자원의 부가가치 증대에 기여할 목적으로 수행되었다. 본 연구에서 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 40 80 mesh로 분쇄시킨 농산 및 임산 폐자원의 화학적 조성을 분석한 결과, 볏짚과 보릿짚의 냉수 및 열수 추출물 함량과 무기물 함량이 신갈나무에 비해 월등히 높은 것을 알 수가 있었다.
2. 농산 및 임산 폐자원은 20 ㎏f/㎠의 압력에서 3-6분의 조건으로 폭쇄 처리를 하였다. 폭쇄 처리된 시료의 lignin 함량은 폭쇄 처리전 시료보다 약 10% 정도 높게 나타남을 알 수가 있었다. 이는 폭쇄 처리된 시료 중의 리그닌에 당류가 결합하여 산가수분해에 대한 저항성 증가 및 용출된 리그닌의 탄수화물 코팅으로 인하여 lignin 정량시 영향을 미친 것으로 추측된다. 폭쇄 처리된 시료의 당조성을 분석한 결과, 폭쇄 처리시간이 길어질수록 헤미셀룰로오스의 함량이 다소 감소하는 경향을 보였으며, glucose의 경우 오히려 그 함량이 증가하는 경향을 나타내었다.

3. 폭쇄 처리된 시료로부터 온수 및 0.5% 수산화칼륨 용액 추출로 粗xylan을 단리하였다. 단리된 粗xylan의 수율은 약 20 35% 정도로 나타났고, 20 ㎏f/㎠에서 3분간 폭쇄 처리한 시료에서 粗xylan의 수율이 약간 더 높게 나타났다. 0.5% 수산화칼륨 용액 추출의 경우, 중화 과정 및 단리 과정 중 발생하는 염을 제거해야 하는 과정이 추가되어야 한다는 점에서 온수 추출이 폭쇄 처리된 시료로부터 xylan을 단리하는데 더욱 유리할 것으로 판단되었다. 粗xylan의 당형태 분석 결과, 온수 추출에 의해 단리된 粗xylan이 알카리 추출에 의해 단리된 粗xylan보다 oligomer 형태로 더욱 많이 용출된다는 것을 알 수 있었다. 그리고 폭쇄 처리시간이 길어질수록 당의 형태가 oligomer 형태에서 monomer 형태로 전환되는 것을 알 수 있었다.
4. 粗xylan을 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법으로 정제하였다. 정제된 xylan의 xylose 함량은 약 85% 이상을 나타내었고, 정제과정을 통해서도 다른 당 잔기들을 완전히 제거하지 못하였다.
5. 정제된 xylan을 1.0N 황산으로 90분 동안 가수분해시켜 양이온교환수지 및 음이온교환수지를 통과시킨 후 0.01M 암모니아 수용액으로 음이온교환수지에 흡착된 유론산 유도체를 용출시킴으로써 유론산 유도체를 단리하였다. 단리된 유론산 유도체는 HPLC 분석 결과, 볏짚과 보릿짚에서는 glucuronic acid만이 xylose 잔기에 대해 약 15 20 : 1의 몰비로 존재함을 알 수 있었고. 신갈나무에서는 glucuronic acid가 xylose 잔기에 대해 약 15 : 1의 몰비로 존재하고, glucuronic acid와 galacturonic acid는 약 7 8 : 1로 존재함을 확인할 수 있었다.
6. 단리된 유론산 유도체의 ^{13}C-NMR 분석 결과, 볏짚과 보릿짚으로부터 단리된 유론산 유도체는 4-O-methyl-D-glucuronic acid만이 단당의 형태로 존재함을 확인할 수 있었다. 신갈나무로부터 단리된 유론산 유도체는 4-O-methyl-D-glucuronic acid, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, 2-O-(4-O-methyl-α-D-glucuronic acid)-D-xylose, 4-O-(β-D-galacturonic acid)-D-xylose, β-(1, 4) 결합된 (4-O-methyl-α

- D- glucuronic acid)- D- xylobiose의 형태로 각각 존재하고 있음을 확인할 수 있었다.

7. Xylan 단리 부산물로부터 아염소산나트륨법과 산소- 알카리 펄프화법으로 셀룰로오스를 제조하였다. 제조된 셀룰로오스를 이용하여 셀룰로오스 아세테이트, 카르복시메틸셀룰로오스라는 두 종류의 셀룰로오스 유도체를 제조하였다. 제조된 셀룰로오스 아세테이트는 치환도가 약 2.1 2.5 정도였고, FT- IR 분석결과 1,200 ㎝-1과 1,750 ㎝-1에서 carbonyl기의 ester 결합에 기인하는 피크가 현저하게 증가하는 것을 알 수가 있었다. 셀룰로오스 아세테이트는 치환도를 변화시킴에 따라 용매에 대한 용해성도 광범위하게 조절할 수 있기 때문에 섬유나 필름 성형물로서 용도가 넓다. 대표적인 제품으로 아세테이트 레이온, 사진용 필름, 도료 등이 있다. 또한 최근에는 셀룰로오스 아세테이트의 유연성과 용제 가용성에 의해 자동차용 도료로 이용되고 있는 실정이다. 또한 셀룰로오스 아세테이트의 치환도가 2.0이상일 때 열용융성을 가지게 되어 고분자 수지와의 브렌딩 제품 또한 기대할 수 있다. 제조된 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)의 치환도는 0.7 0.9 정도였다. CMC의 치환도가 0.2이하일 때 물에 불용이며, 양이온교환체로서 컬럼크로마토그래피 등에서 사용된다. 치환도 0.3 이상의 것은 물에 용해하여 고분자 전해질로 되며 풀, 점도조절제, 응집제, 흡수제로서 화학공업, 식품, 의약품 공업에서 광범위하게 이용할 수 있다.

제 4 장 Xylan 가수분해물의 신기능성 검정

제 1 절 서 설

1. Xylooligo당의 소화성

체내에서 분비되는 여러가지 소화액에 의한 xylooligo당의 소화성을 관찰하기 위하여 *in vitro*에서 타액의 α-amylase, 인공장액, 췌장의 α-amylase, 소장점액, 대장액 등에 의한 xylooligo당 및 isomaltoolio당과 fructooligo당의 분해정도를 서로 비교하므로서 xylooligo당의 난소화성을 관찰하여 xylooligo당의 저칼로리 식품으로서의 우수성을 규명하고자 하였다.

2. Xylooligo당의 지질 대사 개선 및 장기능 개선 효과와 해독작용

본 연구는 폐자원(xylan)을 이용하여 현재 급증하고 있는 심장 순환계 질환의 주요 요인이 되는 고지혈증을 감소시키는데 그 목적이 있다. 따라서 폐자원으로부터 생산된 xylooligo당의 저칼로리원으로서의 기능 및 혈중지질조성 개선작용(1차년도) 및 체내 지질대사 개선작용기전을 규명하고 또 장기능 개선작용과 해독작용 등의 효과를 관찰하고자 하였다. 아울러 xylan 가수분해물중 유론산 유도체의 운동후 피로회복 효과를 규명하고자 하였다.

흰쥐에 고콜레스테롤 식이를 공급하면서 xylooligo당을 농도별로 또 他 oligo당 종류별로 실험군을 나누어 사육한 후 혈중 TG, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 함량 및 atherogenic index (AI: 동맥경화지수)를 관찰하였다. 또 지질대사 이상으로 인한 노화나 암 및 성인병 유발인자인 지질과산화물을 total-POV, HDL-POV, LDL-POV로 나누어 관찰함으로서 동맥경화 유발 억제에 대한 xylooligo당의 효과를 관찰하였고 간조직중의 콜레스테롤 합성효소인 HMG-CoA reductase 활성조사, 간조직중의 triglyceride,

cholesterol 및 phospholipid 함량 등의 지질조성과 지질과산화물의 축적상태 및 간조직의 병리 조직학적 검사를 관찰하여 지질대사 개선 기전을 규명하였다.

장기능 개선과 해독작용등의 효과를 알아보기 위해 조제 xylooligo당을 농도별로 섭취케하고 장내용물의 장통과 시간측정, 대변중의 담즙산 함량을 측정하였고 조직중의 해독기전에 관여하는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSHpx), glutathione S-transferase(GST)활성, glutathione 함량, cytochrome P_{450} 함량과 간조직의 손상을 관찰하기 위하여 간조직의 TBARS 함량, 혈청 GOT 및 GPT 활성을 관찰하였다. 또 한편으로는 xylooligo당의 혈당강하 작용을 관찰하기 위해 당뇨 유발 흰쥐에서 oligo당 종류별로 혈당저하 효과를 비교 조사하였다. 이러한 연구는 제 1 세부과제에서 조제된 xylooligo당과 일본의 Suntory 사에서 구입한 xylooligo당의 생리적 기능성을 비교검토하였다.

3. 조제한 유론산 유도체의 운동후의 피로 회복 효과

현대는 수영이나 등산, 조깅 등의 여러가지 유산소 운동인구가 날로 급증하고 있다. 시판되고 있는 글루크론산제제의 주성분은 glucuronolactone으로 근피로에 대한 효과 보고가 다수 알려져 있지만 산성당(glucuronic acid)의 근피로에 대한 연구보고는 없다.

본 연구에서는 xylan의 효소적 가수분해물인 유론산 유도체의 생리적 기능성을 검정하기 위해 유산소 운동후의 피로 회복에 미치는 산성당의 영향과 그 작용기전을 관찰하였다. 사용된 산성당(glucuronic acid)은 활엽수재에 함유되어 있는 헤미셀룰로스 중 양적으로 많고 가장 중요한 헤미셀룰로스인 xylan (*o*-acetyl-4-*o*-methyl-gucuronoxylan)을 산가수분해하여 $Ba(OH)_2$로 중화시켜 Amberlite IR-120과 IRA-67을 순서대로 통과시킨 후 0.01M 암모니아수로 용출하여 얻었다. 조제한 glucuronic acid의 운동전후의 근피로회복에 미치는 영

향을 관찰하기 위하여 흰쥐에 매일 경구 투여하고 4주간 treadmill을 이용한 운동을 주 5일씩 4주간 시키면서 그 기능성을 살펴보았다.

운동전후의 혈액을 채취하여 근 피로 회복과 운동수행 능력을 관찰하기 위해 혈중 glucose 및 젖산 농도와 간장조직의 glycogen 함량을 측정하였다. 또 산성당의 간장 해독기능을 관찰하기 위하여 간조직중의 항산화계와 혈청중의 GOT, GPT 활성을 관찰하였다. 이러한 연구내용으로부터 유산소 운동후의 근 피로 회복에 미치는 산성당(glucuronic acid)의 효과를 규명하고자 하였다.

제 2 절 재료 및 방법

1. Xylooligo당의 소화성

가. 실험재료

실험에 사용한 xylooligo당은 일본의 Suntory사 제품(Lot No. 91012551)을 사용하였고, fructooligo당 및 isomaltooligo당은 삼양제넥스사 제품(썬올리고 M-50, FO-54)을 사용하였다. 타액 및 췌장액은 병원의 임상실험용을 사용하였고, 인공장액(human sera)은 Sigma사(A3176)의 제품을, 소장점액 및 대장액은 본 실험실에서 사육한 실험쥐로부터 준비하였다.

나. 체내 각종 분비액 (타액의 α-amylase, 인공장액, 췌장액, 소장점액, 대장액)에 의한 올리고당의 분해 양상 관찰

각종 oligo 당의 분해양상을 조사하기 위하여 사람의 타액, 췌장액, 인공장액, 소장점액, 대장액 등의 원액 500 ㎕에 xylooligo당, fructooligo당 및 isomaltooligo당을 각각 10% 농도로 500 ㎕씩 첨가하여 37℃에서 12시간 반응한 후 생성된 당을 HPLC로 분석하였으며 이때 분석조건은 표 4-1과 같다.

Table 4-1. Operating conditions of HPLC for the analysis of oligosaccharides

Items	Conditions
Instrument	Waters Model 600E (USA)
Column	Sugar-pak Ⅰ(30 ㎝ x 3.9 ㎜ i.d.)
Temperature	90℃
Mobile phase	50 ㎎ Ca-EDTA/1 ℓ H_2O
Flow rate	0.5 ㎖/min
Detector	RI
Injection volume	10 ㎕

다. 소장점액에서의 시간별 올리고당의 분해 양상 관찰

소장점액에서의 시간별 올리고당의 분해력을 조사하기 위해 시험관에 각종 올리고당(10%) 1 ㎖와 소장점액(원액) 1 ㎖를 넣고 37℃에서 시간별로 반응시킨 후 생성되는 환원당을 DNS 법으로 측정하였다.

라. 올리고당의 흡수 지연효과 관찰

올리고당의 장간막에 대한 흡수 지연효과를 관찰하기 위하여 Adiotomre 등과 이 등의 방법을 약간 변형하여 xylooligo당, fructooligo당 및 isomaltooligo당의 흡수 지연효과를 조사하였다. 투석막(Sigma D7884 : M.W.cut-off< 1,200)을 자른 후 0.1% sodium azide가 녹아있는 0.05 M phosphate buffer(pH 7.0)(sodium azide phosphate buffer; SAP buffer)에 하룻밤 침지시킨 후 한쪽 끝을 목면실로 묶은 후 1%의 각종 올리고당 3 ㎖와 SAP buffer 3 ㎖를 각각 첨가하여 투석막의 끝을 묶고 뚜껑이 있는 유리관(직경 5 cm x 길이 12 cm)에 넣어 하루밤 시료를 수화시켰다. 대조구의 경우에는 각종 올리고당만 넣고 섬유시료는 제외시켰다. 이 용기에 SAP buffer 100 ㎖를 첨가한 후 37℃ 진탕수조에 용기가 잠기게 하여 100 rpm에서 시간별로 투석하였다. 이때 일정한 시간 간격으로 투석막외로 빠져나오는 당의 함량을 분석하였다.

마. 올리고당에 의한 담즙산의 흡수 지연 효과 관찰

Xylooligo당 및 각종 올리고당의 담즙산 흡수 지연효과를 판정하기 위한 실험도 Adiotomre 등 및 이의 방법을 약간 변형하여 행하였다. 즉 투석막에 SAP buffer로 만든 30 mM bile acid 용액 3 ㎖와 각종 1% 올리고당 3 ㎖를 각각 혼합하여 투석막에 넣고 상기 올리고당의 흡수 지연효과에서와 같이 일정한 시간동안 반응시킨 후 투석막을 빠져나오는 담즙산을 담즙산 진단용

Kit(일본 제일화학약품(주), ZNZABLLE・2)로 정량하였다. 대조구는 담즙산 용액만 넣고 각종 올리고당은 제외시켰다.

2. Xylooligo당의 지질개선 및 장기능 개선 효과와 해독작용

1) Xylooligo당의 제조

원료인 birchwood xylan 100g을 50mM sodium phosphate buffer(pH 6.0) 1ℓ에 현탁한 후 미리 준비한 *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* M049가 생산하는 xylanases를 염석 및 투석한 효소액을 최종농도 10 unit/ml되게 첨가한 후 60℃ shaking water bath에서 100 strokes/min의 속도로 진탕하면서 12시간 반응하였다. 반응종료후 60℃미만으로 가열하면서 회전진공농축기(evaporator)로 최대한 농축하고 그 농축액을 60℃미만의 온도에서 열 건조하여 준비한 xylooligo당을 본 실험에 사용하였다.

2) 실험동물 사육 및 식이

실험동물은 체중 100 g내외의 Sprague-Dawley종 수컷을 대전화학연구소에서 구입하여 실험에 사용하였다. 환경에 적응시키기 위해 일반 배합사료(삼양사 Co.)로 일주일 예비사육후 난괴법(randomized complete block design)에 의해 대조군과 실험군으로 나눈후 실험군을 다시 표 4-2와 같이 식이내 xylooligo당의 농도별 그리고 suntory사 xylooligo당 공급군으로 나누어 각 군마다 10마리씩 4군(1,2차년도) 혹은 5군(3차년도)으로 나누어 4주간 사육하였다. 기본 실험 식이조성은 표 4-2와 같다. 체중은 실험기간동안 매일 측정하고 체중증가율 및 식이효율을 계산하였다. 실험기간중 식이는 4℃에서 보관하였고 매일 일정 시간에 공급하여 자유로이 섭취케 했다. 이때 사육실의 온도는 22±10℃였고, 습도는 50±10% 이었다.

3) **식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율**

식이섭취량 및 체중은 전 실험기간 동안 매일 일정시간에 측정하였다. 식이효율(Food Efficiency Ratio, FER)**은 전 체중증가량을 같은 기간동안의 식이섭취량으로 나누어줌으로써 계산하였다**

$$\text{식이 효율} = \frac{\text{전 체중증가량 (g)}}{\text{전 식이섭취량 (g)}}$$

Table 4-2. Classification of experimental groups according to concentration of xylooligosaccharide

groups / Ingredients	Normal*	C	C+5X	C+10X	C+15X	C+10SX
Casein	18	18	18	18	18	18
Salt mixture	4	4	4	4	4	4
Vitamin mixture	1	1	1	1	1	1
Cellulose	5	5	5	5	5	5
Corn oil	5	5	5	5	5	5
Sucrose	5	5	5	5	5	5
Starch	62	60.75	55.75	50.75	45.75	50.75
Sodium Cholate	-	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Cholesterol	-	1	1	1	1	1
조제 xylooligo**당**1)	-	-	5	10	15	-
Suntory xylooligo**당**2)	-	-	-	-	-	10
Total(%)	100	100	100	100	100	100

* Normal : basal diet
C : basal diet + 1% cholesterol + 0% xylooligosaccharide
C+5X : basal diet + 1% cholesterol + 5% xylooligosaccharide
C+10X : basal diet + 1% cholesterol + 10% xylooligosaccharide
C+15X : basal diet + 1% cholesterol + 15% xylooligosaccharide
+C+10SX : basal diet + 1% cholesterol + 10% xylooligosaccharide(Suntory Co.)
1) **제1세부과제에서 조제한** xylooligosaccharide
2) Suntory**사 제품**(Lot No. 91012551)

4) 혈액 및 장기채취

사육기간 완료 전날 밤 실험동물을 12시간 절식시킨 후 실험 동물을 가벼운 에테르 마취하에서 22 gauge의 주사기로 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하여 실온에서 30분간 방치한 후 1,500×g에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하여 분석시까지 -80℃에서 냉동 보관하였다. 장기들은 액체질소로 급속 동결시켜 -80℃에 보관하였다.

5) 혈당함량 측정

혈당 측정은 아산제약의 enzymatic Kit AM 201K를 사용하여 500 nm에서 비색 정량하였다.

6) 혈청 triglyceride, 총콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량 측정

혈청내 TG측정은 표준 효소비색법에 의한 kit(아산제약)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 혈청 중성지방농도를 계산하였다.

총콜레스테롤 측정은 표준 효소비색법에 의한 kit(아산제약)를 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. HDL-콜레스테롤 측정을 위하여 2% dextron sulfate와 1 M MgCl2 침전액(1:1)을 가하여 그 상층액을 시료로 표준 효소법에 의한 kit(아산제약)를 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDL-콜레스테롤은 Fiedewald식 {Total cholesterol －(HDL-cholesterol ＋ TG/5)} 에 의해 계산하였고 Atherogenic index는 {(Total cholesterol－ HDL-cholesterol) / HDL-cholesterol} 식으로 산출하였다.

7) 혈청중의 과산화지질 함량 측정

과산화지질의 분석은 TBA와 반응하는 물질 즉, TBARS를 n-butanol로 추출하여 excitation 파장 515 nm, emission 파장 533 nm에서 형광을 측정하는 Yagi법을 이용하였고, 이때 표준품은 1,1,3,3-tetra-ethoxy-propane을 사용하였다. 혈청 0.05 ㎖에 1/12 N H_2SO_4 용액 4 ㎖와 10% phosphotungstic acid 용액 0.5 ㎖를 가한 후 실온에서 5분간 반응시켰다. 그 다음 1,100×g에서 10분간 원심분리 하여 상층액은 제거하고 침전물에는 1/12 N H_2SO_4 용액 2 ㎖와 10% phosphotungstic acid 용액 0.3 ㎖를 가하여 다시 반응시킨 다음 1,100×g에서 10분간 원심분리 후 상층액은 제거하고 침전물에 증류수 4 ㎖와 0.67% TBA 용액 1 ㎖를 가하여 95℃ 항온 수조에서 60분간 반응시켰으며, 즉시 냉각하여 n-butanol 5.0 ㎖를 가하여 잘 섞은 다음 1,100×g에서 15분간 원심분리하여 n-butanol 층의 형광도를 측정하였다.

8) 간조직의 triglyceride, cholesterol 및 phospolipid함량 측정

간조직의 지질은 Folch등의 방법에 의해 추출하여 triglyceride과 cholesterol 함량을 혈청에서와 같은 방법으로 분석하였다. 조직지질의 정량에서는 Sale등의 수정된 방법으로 triglyceride와 cholesterol 측정용 효소시약에 유화제로서 0.5% Triton X-100과 3 mM sodium cholate를 혼합하여 발색시 일어나는 탁도(turbidity)를 제거하여 간조직의 triglyceride과 cholesterol 농도를 550 nm와 500 nm에서 각각 흡광도를 측정하였다.

조직중의 인지질은 Takayama등의 방법을 이용하여 정량하였다. Folch법으로 추출한 간조직중의 지질에 BD 용액(butanol : diisopropyl ether, 40:60, v/v)을 가하고 실온에서 1시간 30분 방치후, 1,600×g에서 2분간 원심분리하여 상층액을 취하여 질소 가스로 말린다. 여기에 $CHCl_3$ 0.4 ㎖, chromogen용액 0.1 ㎖를 가하여 2분간 가열하여 발색시킨후, 실온에서 식혀 H_2O 0.5 ㎖,

heptane 2 ㎖를 넣고 1,500×g에서 5분간 원심분리하여 상층액을 채취하여 710 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

9) 간조직의 microsomal HMG-CoA reductase 활성 측정

간으로부터 microsome을 분리한 다음 Hulcher 등의 방법을 수정 보완하여 사용하였다.

10) 조직중의 과산화지질(TBARS) 정량

과산화지질의 정량은 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하는 물질(TBARS)을 측정하는 Satoh법을 이용하였다.

11) 간조직의 광학현미경적 관찰

간장의 조직학적 관찰을 위하여 개복 즉시 간장의 중엽에서 일부 간장 조직을 절취하고 10% neutral formalin 용액에 고정한 다음 수세, 탈수과정을 거친 후 paraffin block은 4-5 ㎛두께로 박절하여 Hematoxylin-Eosin으로 염색하고 200배율로 광학현미경으로 관찰하였다.

12) 장통과시간(Gastrointestinal transit time) 측정

Marker로 사용한 Carmine red(Sigma Chem. Co. C1022)를 0.5% 농도로 각 실험식이에 첨가하여 실험 4주째에 공급하고 매시간 marker의 변 중 배출을 체크하였다. 실험식 급여 시작시간과 marker가 변 중에 처음 나타나기까지의 시간 간격을 장통과 시간으로 하였다.

13) 대변의 bile acid, cholesterol 및 중성스테롤 함량 측정

건조 대변 1g을 시료로 채취하여 곱게 분쇄한 뒤 Cuzubayko등의 방법에 의해 담즙산을 추출한 후 Macdonald등의 방법에 따라 효소법으로 340nm에서 정량하였다.

대변의 cholesterol 함량 측정은 실험전 마지막 3일간 대변의 wet무게를 측정한 후 freeze dryer(-70℃)에서 항량에 도달할때까지 냉동 건조시킨 후 대변의 총지질은 Folch등의 방법에 의해 추출하여 정량하였고, cholesterol 함량을 Sale등에 의해 수정된 방법에 의해 550nm에서 정량하였다.

대변의 중성 스테롤, 즉 coprostanol, coprostanone 양은 Czubayko 등의 방법에 따라 추출하여 GC로 분석하였으며 조건은 표 4-3와 같다.

Table 4-3. GC conditions for fecal sterol analysis

Items	Conditions
Column	Supelco SACTM-5 Capillary column
Detector	Flame ionization detector(FID)
Column temperature	285℃
Detector temperature	300℃
Injector temperature	300℃
Carrier gas(N_2)	28ml/min
Chart speed	1 min/cm
Attenuation	64

14) Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSHpx) 및 Glutathione S-Transferase(GST) 활성 측정

SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund and Marklund의 방법에 따라 측정하여 산화된 pyrogallol의 흡광도를 420nm에서 측정하였다. GSH-Px 활성은 Lawerence 및 Burk의 방법에 따라 340nm에서 측정하였다. 그리고 효소활성의 1단위를 1분간 1 μmol의 산화형 NADPH를 생성하는 효소의 양으로 나타내었다. GST 활성 측정은 2,4-dinitrocholorobenzene(DNCB)과 환원형 glutathione을 기질로 하여 25℃에서 20분간 반응하는 동안 생성된 GSH-DNCB conjugate의 분자 흡광도계수 (EmM/340nm = 9.6 mM-1 cm-1)를 이용하여 효소활성을 산출하는 Habig등의 법에 따라 340 nm에서 측정하였다.

15) 간 조직 Glutathione 농도 측정

Glutathione의 농도 측정은 Bernt와 Bergmeyer의 방법에 따라서 실시하였다. 즉 간조직에 1M perchloric acid 3ml를 가하여 산추출물을 얻고 이 산추출물으로부터 4M K_2CO_3로 중화하여 산화형 glutathione(GSSG)은 glutathione reductase 반응을 이용하였으며, 이 반응에서 소모된 NADPH 양을 340 nm에서 측정하여 정량하였으며, 환원형 glutathione(GSH)은 glyoxalase 반응을 이용하여 생성된 s-lactosyl-GSH를 240 nm에서 측정하여 정량하였다.

16) 간조직의 Cytochrome P450의 함량

간조직의 cytochrome P450 함량을 측정하기 위하여 약 1 g의 간조직을 0.25 M sucrose 용액으로 균질화시킨 후 8,000×g에서 4분간 원심분리 하였다. 이때 얻어진 상층액을 105,000×g에서 1시간 원심 분리하여 cytosol(상층액)과

microsome(침전)으로 하였다.

다시 pellet 층에 4 ㎖의 0.25M sucrose 용액을 가하여 microsome을 부유시킨 후 Omura와 Sato의 방법으로 환원형 일산화탄소 결합물을 450 nm와 490 nm에서 spectrophotometer로 측정하였다. 즉 microsome용액 1 ㎖를 0.1 mM phosphate(pH 7.4) 6 ㎖로 희석시켜 약 1 ㎎/㎖의 단백질 농도로 만든 다음 CO gas로 처리한 희석 용액을 3 5분 지난 후 base line을 측정하였다. Sodium dithionite를 넣고 3분후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 분자흡광계수는 91 mM-1cm-1로 하였다.

17) 혈청 Glutamate Oxaloacetate Transaminase(GOT), Glutamate Pyruvate Transaminase(GPT)의 활성 측정

혈청 GOT와 GPT 활성도는 Reitman과 Frankel의 방법을 응용한 아산제약의 GOT, GPT 측정용 kit를 사용하여 측정하였다.

18) 당뇨유발에 의한 당 부하 검사

실험동물을 희생하기 4일전에 STZ, 55 mg/kg B.W.을 신선한 0.1 M sodium citrate buffer(pH 4.3)에 녹여서 꼬리 정맥을 통하여 주사하여 유발시켰으며 STZ 주사 후 6일째에 혈당농도가 300 mg/dl 이상인 동물만 실험에 사용하였다.

19) 단백질 정량

각 시료의 단백질양은 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하여 각 효소의 단백질 정량은 Lowry법을 이용하여 정량하였다.

20) 통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 표준차이가 있는가를 검증하기 위해 분산분석을 수행하였으며 분산분석결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's HSD test에 의해 분석하였다.

3. 조제한 유론산 유도체의 운동후 피로회복 효과 관찰

가. 산성당 조제

활엽수제를 폭쇄처리하여 열수 추출한 후 여과하고 여과액을 감압 농축하여 Amberlite IR-120과 Amberlite IRA-67을 각각 통과시켜 다시 농축하였다. 여기에. 농축액의 4배량의 ethanol을 첨가하여 crude xylan을 단리하였다. 단리한 xylan으로부터 산가수분해하여 $Ba(OH)_2$로 중화시켜 Amberlite IR-120과 Amberlite IRA-67을 순서대로 통과시킨 후 0.01 M 암모니아수로 용출하여 산성당을 얻었다.

나. 동물, 식이 및 운동부하

실험동물은 체중 100 g 내외의 sprague-Dawley종 수컷을 구입하여 실험에 이용한다. 환경에 적응시키기 위하여 일주일 간 예비사육한 후 난괴법에 의해 표 4-4와 같이 정상군과 실험군으로 나누고 실험군은 다시 트레드밀운동만 부가한 T군(Training group), 운동실험군에 glucuronic acid 공급한 TU군(Training-Glucuronic acid group), glucuronic acid를 2배로 공급한 2TU군(Training-2×Glucuronic acid group)으로 나누며 식이는 실험 전기간을 통하여 국내의 삼양사료로부터 구입한 실험동물용 pellet 사료를 자유 섭취토록 하였다. 본 연구에 사용된 사료의 성분은 표 4-5와 같다. 산성당(glucuronic

acid) 공급은 매일 운동시작 1시간 전에 체중 100 g당 0.1ml(Glucuronic acid 97% + Galacturonic acid 3%)씩 경구투여로 공급하였다.

운동은 국내 제작된 실험 소동물용 전동트레드밀에서 실시하였으며 경사도 7%, 속도 28m/min/30min으로 주당 5일씩 4주간 운동시켰으며 운동조건은 표 4-6과 같다.

Table 4-4. Classification of experimental groups.

Groups	Treadmill	Glucuronic acid
Normal	-	-
T	+	-
TU	+	+
2TU	+	++

Normal : basal diet

T : basal diet + Training

TU : basal diet + Training + Glucuronic acid

2TU : basal diet + Training + 2×Glucuronic acid

Table 4-5. The composition of experimental diet*

Ingredient	Exp. Rat Ⅰ(EP) (% of calorie)
Crude protein	24.6
Crude fat	5.4
Crude carbohydrate	47.7
Crude fiber	3.5
Crude ash	6.5

*Purchased from Samyang oil & feed, Korea

Table 4-6. Training schedule of experimental rats

	Duration(week)			
	1	2	3	4
Speed(m/min)	10	20	25	28
Grade(degree)	7	7	7	7
Time(min)	10	20	25	30
Frequency (days/week)	5	5	5	5

다. 체중증가, 식이섭취, 식이효율

식이섭취량 및 체중은 전 실험기간을 통하여 3일에 한번씩 일정한 시간에 측정하였다. 식이 효율은 전 체중증가량을 같은 기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어서 계산하였다.

라. 혈액채취

실험동물을 실험기간 종료일에 운동시키기 한시간 전에 uronic acid를 경구투여한 후 28m/min/30min의 운동강도로 운동시킨 후 pentobabital로 마취시킨 후 복부대동맥에서 혈액을 채취하고 2,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 혈청을 얻어 실험전까지 냉동보관 하였다..

마. 혈당 측정

혈당측정은 아산제약(한국)의 enzymetic kit AM 201K를 사용하여 500 nm에서 비색정량하였다.

바. 혈중 lactic acid 함량 측정

운동후 즉시 채혈하여 혈액응고를 막기위해 heparin으로 처리한 후 8% perchloric acid로 효소를 불활성화시킨 후 3000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 측정용 시료로 이용하여 cocktail 용액(0.33 M glycin, 0.27 M hydrazine buffer, 0.83 mg of NAD, 5 unit LDH(lactic dehydrogenase)를 가하고 perchloric acid와 lactic acid를 각각 시료에 가한 후 37℃ shaking waterbath에서 45 분간 incubation한 후 340 nm에서 측정하였다.

사. 간조직중의 glycogen 함량 측정

간조직중의 glycogen 측정은 Lo의 방법에 의하여 UV-1201을 이용하여 490 492nm에서 측정하였다.

아. 간조직중의 superoxide dismutase(SOD), Glutathione S-transferase (GST) 함량 측정

SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund and Marklund의 방법에 따라 측정하였다.

간조직중의 GST 활성 측정은 2,4-dinitrocholorobenzene(DNCB)와 환원형 glutathione을 기질로 하여 340 nm에서 측정하였다.

제 3 절 Xylooligo당의 소화성 조사

1. 각종 체내 분비액에 의한 oligo 당의 분해 양상

각종 oligo당의 분해양상을 조사하기 위하여 사람의 타액, 췌장액, 인공장액, 소장점액 및 대장액에 각종 oligo당을 첨가하여 37℃에서 12시간 반응한 후 HPLC로 분석한 결과 그림 4-1과 같다. 즉 타액, 췌장액, 인공장액 및 대장액에서는 xylooligo당, fructooligo당 및 isomaltooligo당 등 모두 분해되지 않았으나 소장점액에서 isomaltooligo당은 완전히 분해되어 단당류(glucose)만 남아 있었고 fructooligo당은 일부 이당류가 분해됨을 확인하였다. 그러나 xylooligo당은 체내 분비액에 의해 분해되지 않았다.

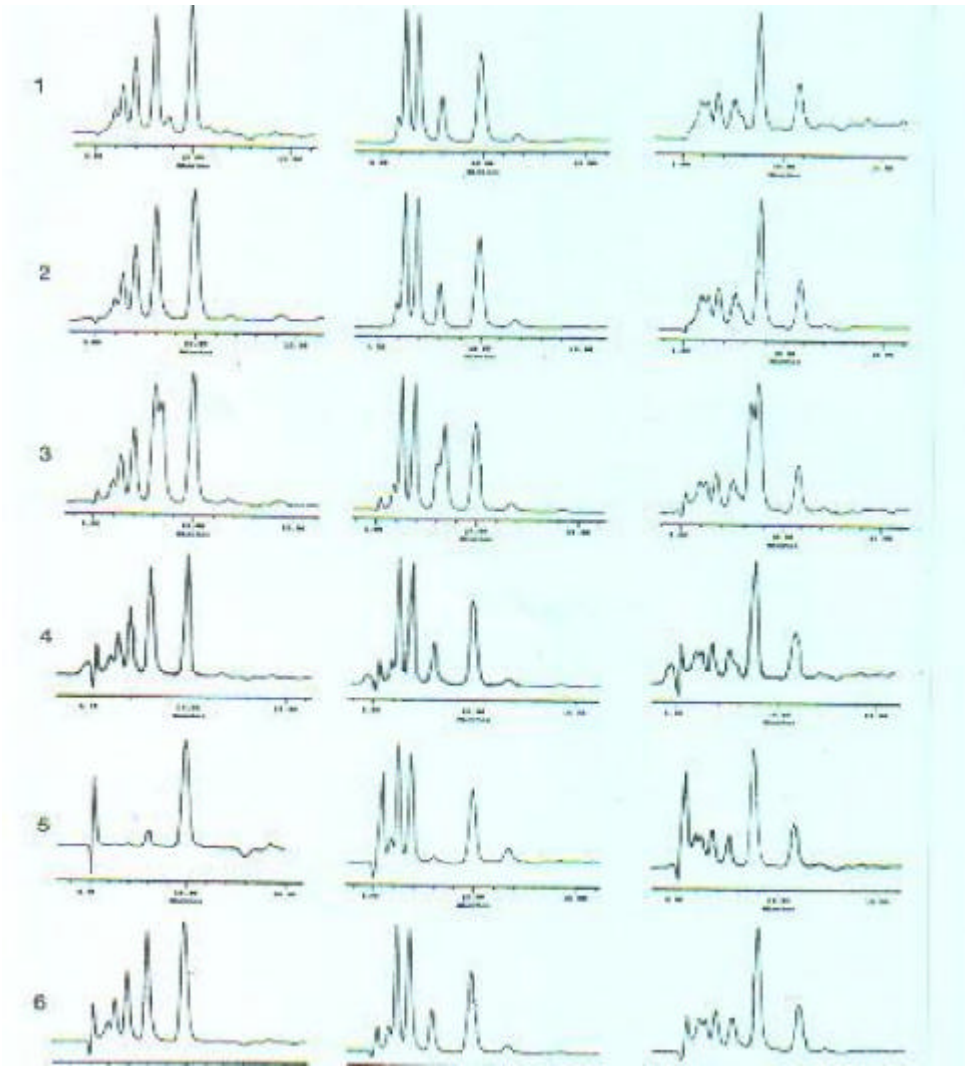

Fig. 4-1. HPLC profile of oligosaccharides degradation by various secretion mucus. 1, Standard oligosaccharides; 2, saliva α-amylase; 3, pancreatic juice α-amylase; 4, human sera; 5, small intestine mucus; 6, large intestine mucus.

2. 소장점액에서의 시간별 oligo당의 분해

소장점액에서의 시간별 oligo당의 분해를 환원당 정량법으로 나타낸 결과 그림 4-2와 같이 isomaltooligo당은 37℃에서 반응 4 시간 이후 대부분 분해(소장점액 ㎖당 9 ㎎)되었으며, fructooilgo당은 극소량(소장점액 ㎖당 0.5 ㎎)이 분해되었으나 xylooligo당은 전혀 분해되지 않았다.

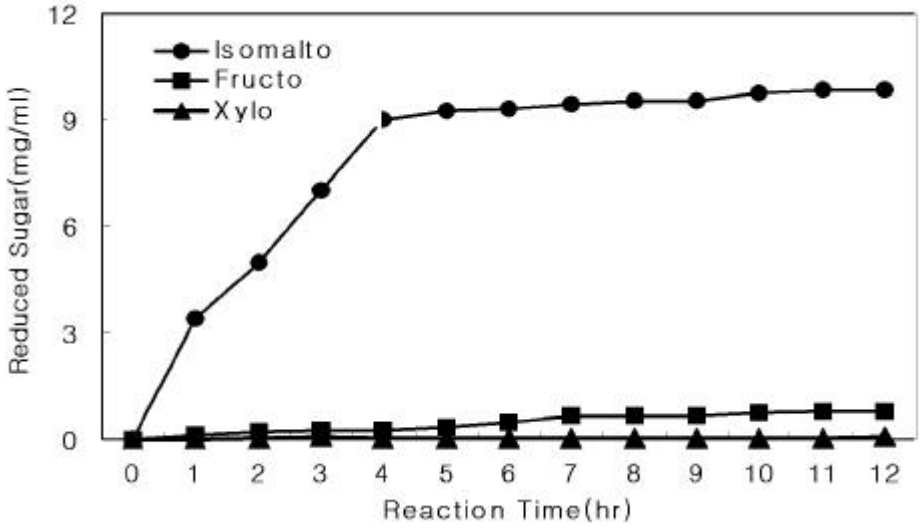

Fig. 4-2. Reducing sugar produced by digestion of oligosaccharides using the small intestinal mucus.

3. Xylooligo당의 담즙산 흡수 지연효과

Xylooligo당 및 각종 oligo당의 담즙산 흡수 지연효과를 Aditomer 등과 이 등의 방법으로 측정한 결과는 그림 4-3과 같다. 식이섬유(guar gum)에 bile acid 용액만 첨가한 대조군에서 빠져나오는 bile acid를 100%로 환산하여 조사한 결과, 2시간 반응후 glucose, fructooligo 및 isomaltooligo당 등이 모두 50% 이상이었으나 xylooligo당은 43%이었으며, 반응시간이 경과하여도 일정하게

다른 실험구에 비해 담즙산의 흡수지연 효과가 높게 나타났다.

이상과 같이 xylooligo당의 난소화성 및 담즙산 흡수 지연효과를 *in vitro*에서 관찰한 결과 여러 가지 체내 분비액에 의해 isomaltooligo당이 대부분 분해되었는데 비해 xylooligo당은 전혀 분해되지 않는 것을 알 수 있고 또한 담즙산의 흡수를 지연시키는 효과가 가장 높음을 알 수 있었다.

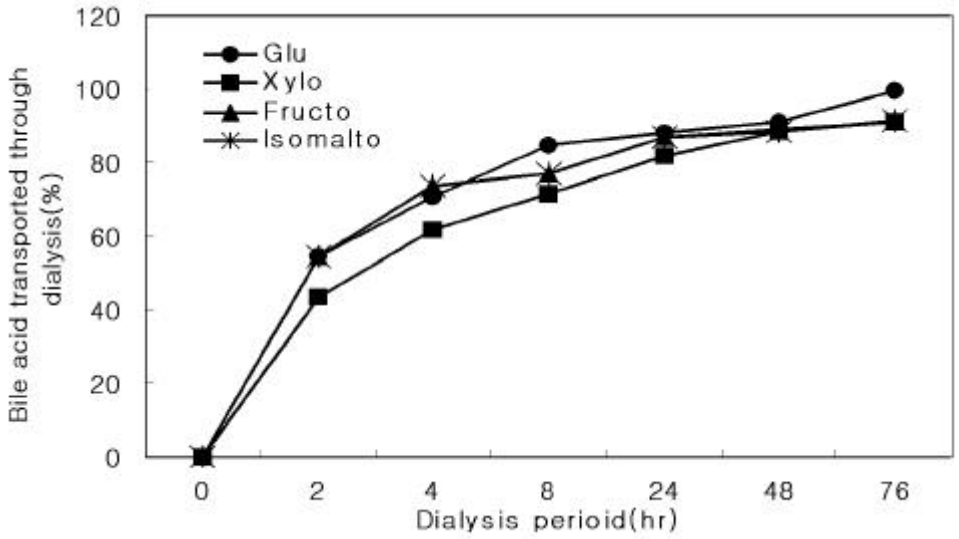

Fig. 4-3. In Vitro passive transport of bile acid in the presence of oligosaccharides through a dialysis membrane.

제 4 절 Xylooligo당의 지질대사 및 장기능개선과 해독

1. 혈중 지질조성 개선효과

가. 실험동물의 체중증가, 식이효율, 장기무게

1) 실험 동물의 체중증가 및 식이효율

4주간 사육한 흰쥐의 식이섭취와 체중증가량, 식이효율은 표 4-7 및 4-8과 같다. 체중 증가량은 고콜레스테롤 식이군중에 10% 및 15% xylooligo당을 공급한 군에서 유의적으로 낮았고 oligo당의 종류에 따른 실험 결과에서는 10% isomaltooligo당 투여군(10M군)만이 대조군에 비해 유의적으로 높았다.

식이 섭취량(food intake)은 xylooligo당의 농도가 높을수록 대조군에 비해 섭취량이 증가하였고 식이효율은 15% xylooligo당 공급군(15X group)에서 유의적으로 낮았다. Oligo당의 종류에 따른 식이 섭취량은 대조군에 비해 모든 군에서 높았고 식이효율은 10% isomaltooligo당 식이군에서만 높았다.

Table 4-7. Effects of dietary xylooligosaccharide on food intake and body weight gain, food efficiency(FER) in rats fed high cholesterol diets

Groups	Food intake (g/days)	Body weight gain (g/day)	FER
Normal	18.13±0.50^{ab}	156.63±8.79^{a}	0.28±0.02^{a}
C	19.67±0.84^{a}	165.10±14.71^{ab}	0.30±0.02^{a}
C+5X	18.06±0.72^{ab}	152.21±9.94^{bd}	0.16±0.02^{b}
C+10X	19.23±0.51^{ab}	96.40±8.60^{c}	0.17±0.02^{b}
C+15X	20.05±0.54^{a}	128.52±9.32^{ce}	0.15±0.02^{c}
C+10SX	19.45±0.39^{b}	107.30±10.07^{de}	0.20±0.01^{a}

All values are mean±SE (n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different each groups at $p<0.05$ by Tukey's test.

Table 4-8. Effect of sources of dietary oligosaccharides on food intake, body weight gains and food efficiency ratio(FER) in rats fed high cholesterol

Groups	Food intake (g/day)	Body weight gain (g/4 weeks)	FER
Normal	23.42±0.67a	205.44±13.26a	0.22±0.01a
C	23.31±0.40a	240.38±8.44bc	0.23±0.01a
Xylo	26.14±0.37b	204.56±10.70a	0.20±0.01a
Isomal	25.80±0.14b	259.89±11.07bc	0.26±0.01b
Fructo	25.12±0.50b	202.67±12.81a	0.20±0.01a

All values are mean±SE (n=10). Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.
Diet groups: Normal, basal diet
C, basal diet + 1% cholesterol
Xylo, basal diet + 1% cholesterol + 10% xylooligosaccharide
Isomal, basal diet+1% cholesterol+10% Isomaltooligosaccharide
Fructo, basal diet + 1% choleste+10% Fructooligosaccharide

2) **실험동물의 장기 무게**

단위 체중당 간장, 신장, 소장 및 맹장의 무게는 표 4-9 및 표 4-10과 같다. 실험동물의 장기무게에서 간장 무게는 정상군에 비해 C군에서 현저하게 증가되었다.

Oligo당 종류별 실험(표 4-9)에서의 간장무게는 C군에 비해 oligo당 투여군 모두가 유의적으로 낮았다. 신장무게는 oligo당 종류별 실험군에서 유의성은 없었다. 소장의 무게는 정상군과 고콜레스테롤 공급군에 비해 xylooligo당 공

급군과 fructooligo당 공급군에서 유의적 증가를 하였다. 맹장 무게는 정상군에 비해 C군과 isomaltooligo당군에서는 유의적 차이가 없었고 fructooligo당과 xylooligo당 공급군에서 높았는데 xylooligo당 공급군이 가장 높았다.

Xylooligo당 농도별 실험(표 4-10)에서 간장의 무게는 콜레스테롤군 모두가 정상군에 비해 높았으며 콜레스테롤만 공급한 군(C group)에 비해서는 C+10X와 C+15X군에서 유의적으로 낮았다. 신장의 무게는 실험군간에서 유의적인 차이가 없었다. 소장의 무게는 정상군에 비해 C군은 차이가 없었으나 xylooligo당 공급군에서 유의적으로 높았으며 xylooligo당의 농도별 차이는 없었다. 맹장의 무게는 정상군에 비해 C군을 제외한 모든 xylooligo당군에서 높았다.

Table 4-9. Organ weights of rats according to different dietary xylooligosaccharide levels. (g/100g Body weight)

Groups	Liver	Kidney	Intestine	Cecum
Normal	2.85±0.20a	0.66±0.02NS	2.02±0.07a	0.58±0.04a
C	7.85±1.70b	0.65±0.02	2.15±0.07a	0.87±0.15a
Xylo	4.55±0.16c	0.67±0.02	2.31±0.13b	2.47±0.12b
Isomal	4.75±0.21bc	0.64±0.01	2.11±0.07a	0.70±0.06a
Fructo	4.68±0.13bc	0.69±0.02	2.38±0.09b	1.67±0.11c

All values are mean±SE (n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test. The diet groups are the same as Table 4-8.

Table 4-10. Organ weights of rats according to different dietary xylooligosaccharide levels (g/100g Body weight)

Group	Liver	Kidney	Intestine	Cecum
Normal	2.85±0.23a	0.66±0.02NS	2.02±0.07a	0.58±0.04a
N+10X	3.30±0.20a	0.73±0.04	2.35±0.09b	1.90±0.17b
C	7.85±1.70b	0.65±0.22	2.15±0.07ab	0.87±0.15a
C+5X	5.06±2.89bc	0.67±0.02	2.29±0.10b	1.55±0.09b
C+10X	4.55±0.16c	0.67±0.02	2.31±0.13b	2.47±0.12c
C+15X	4.36±0.35c	0.64±0.04	2.35±0.11b	2.44±0.24c

All values are mean±SE (n=10). Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.
The diet groups are the same as Table 4-2.

나. 혈당량

혈당을 측정한 결과는 그림 4-4와 같다. 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 23% 증가하였으며 xylooligo당 공급군인 C+5X, C+10X 및 C+15X군에서는 고콜레스테롤 식이군에 비해 14%, 15% 및 18%씩 각각 유의적($p<0.05$)으로 감소하였다.

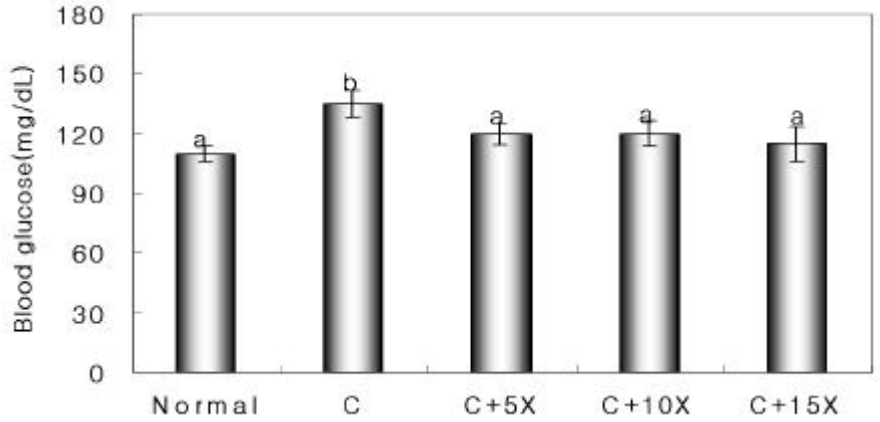

Fig. 4-4. Effects of dietary xylooligosaccharide on blood glucose levels in rats fed high cholesterol diet.

All values are mean±SE (n=10). Bars with different letters are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test. The experimental conditions are the same as Table 4-2.

다. 혈중의 triglyceride, 콜레스테롤, HDL- 및 LDL-콜레스테롤의 함량과 동맥경화지수(Atherogenic index)

혈청 콜레스테롤 농도는 표 4-11과 같다. Xylooligo당 농도별 실험에서 혈청 총 콜레스테롤의 농도는 정상군에 비해 콜레스테롤만 공급한 군(C group)이 32% 높았으며 C군에 비해 xylooligo당을 공급한 모든 식이군에서는 유의적으로 낮았으며 C+10X군은 정상군 수준으로 감소되었다.

Oligo당의 종류에 따른 혈청 총 콜레스테롤의 농도는(그림 4-5) oligo당을 공급한 모든 실험군이 oligo당을 공급하지않고 콜레스테롤만 투여한 군(C group)에 비해 낮은 농도를 나타내었고 그 중에서 10% xylooligo당을 공급한 군이 가장 낮았다.

HDL 콜레스테롤은 콜레스테롤 공급한 군(C군)은 모두에서 정상군에 비해 낮았으며 C군에 비해 xylooligo당을 5%, 10% 투여한 식이군에서 유의적으로

증가되었다. LDL 콜레스테롤은 정상군에 비해 콜레스테롤 공급군 모두 높았으나 xylooligo당을 공급한 모든군에서 유의적으로 감소하였다. 또한 atherogenic index는 콜레스테롤만 공급한 C군은 정상군에 비해 5.0 배나 높았으나 xylooligo당을 공급한 모든군에서 유의적으로 감소되었으며 그중에서도 10% 공급군(10X군)이 가장 감소되었다. 이러한 결과는 oligo당을 투여한 군들이 비투여군에 비해 HDL 콜레스테롤 농도가 높았고 TG나 총 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤이 감소되므로서 동맥경화지수가 낮아졌다고 볼 수 있다. Oligo당 종류별로 비교하였을 때 HDL 콜레스테롤은 oligo당 투여군 모두가 비공급군인 C군에 비해 증가되었고 반면 LDL 콜레스테롤은 감소되었다. 따라서 AI 지수도 현저하게 감소되었으며 이러한 감소 효과는 xylooligo당 > fuctooligo당 > isomaltooligo당 순위였다.

Table 4-11. Serum triglyceride, cholesterol and atherogenic index in cholesterol diet rats according to xylooligosaccharide concentrations

Groups	TG (㎎/㎗)	Total-cholesterol (㎎/㎗)	HDL-cholesterol (㎎/㎗)	LDL-cholesterol (㎎/㎗)	Atherogenic index
Normal	74.40±2.32a	183.1±7.72a	63.60±2.95a	105.10±6.94a	1.88±0.14a
C	109.3±5.60b	260.6±13.14b	25.02±3.16b	210.71±11.59b	9.41±0.15b
5X	103.98±6.30bc	223.6±11.88c	34.01±2.74cd	177.04±14.22c	5.57±0.25c
10X	94.39±4.38cd	201.3±8.45ac	37.27±1.60d	139.30±15.18d	4.40±0.56d
15X	92.30±3.14cd	226.3±12.64c	28.73±2.57bc	173.08±11.84cd	6.87±1.07cd
10SX	89.01±3.48d	212.6±7.74c	35.67±2.17d	158.28±14.71cd	4.96±0.63cd

All values are mean±SE (n=10).
Values within a column with different superscripts are significantly different each groups at $p<0.05$ by Tukey's test.
Foot notes are the same as in Table 4-8.

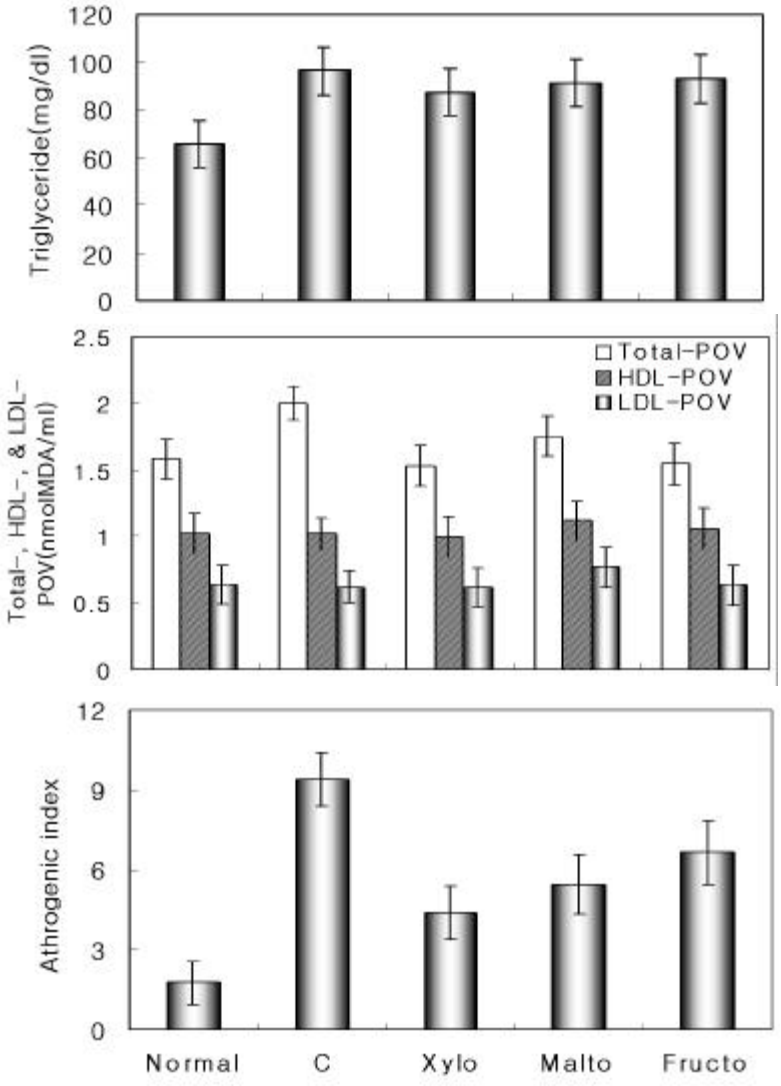

Fig. 4-5. Serum triglyceride(A), cholesterol(B) and atherogenic index(C) in cholesterol diet rats according to various kind of dietary oligosacchrides. Different letters on the top of the line indicates significant difference between groups by tukeys test at $P<0.05$ (n=10).

The experimental conditions are the same as Table 4-8.

라. 혈청 과산화지질 함량

노화나 성인병유발 주요물질인 혈청내 과산화지질 함량을 관찰한 결과(표 4-12)는 정상군에 비해서 고콜레스테롤만 공급한 군(C group)이 다소 높았으나 10% xylooligo당 공급군은 모두 유의적으로 낮았다. Oligo당 종류별로 비교하였을 때(그림 4-6) oligo당 공급군 모두가 비투여군인 콜레스테롤군에 비해 낮았다. LDL-POV는 콜레스테롤만 공급한 C군에서는 정상군에 비해 높았으나 oligo당 공급군은 정상군 수준이었다.

Table 4-12. Serum lipid peroxidase value (POV) in cholesterol diet rats according to xylooligosaccharide concentrations (nmolMDA/ml)

groups	Total POV	HDL POV	LDL POV
Normal	1.579±0.05a	1.02±0.06NS	0.589±0.10a
NX	1.656±0.05a	1.02±0.06	0.570±0.10a
C	2.000±0.12b	1.13±0.11	0.952±0.10b
5X	1.714±0.10ab	1.02±0.09	0.740±0.14ab
10X	1.533±0.04a	0.997±0.10	0.617±0.02a
15X	1.702±0.10ab	1.050±0.13	0.664±0.08a

All values are mean±SE (n=10). Values within a column with different superscripts are significantly different each groups at $p<0.05$ by Tukey's test.

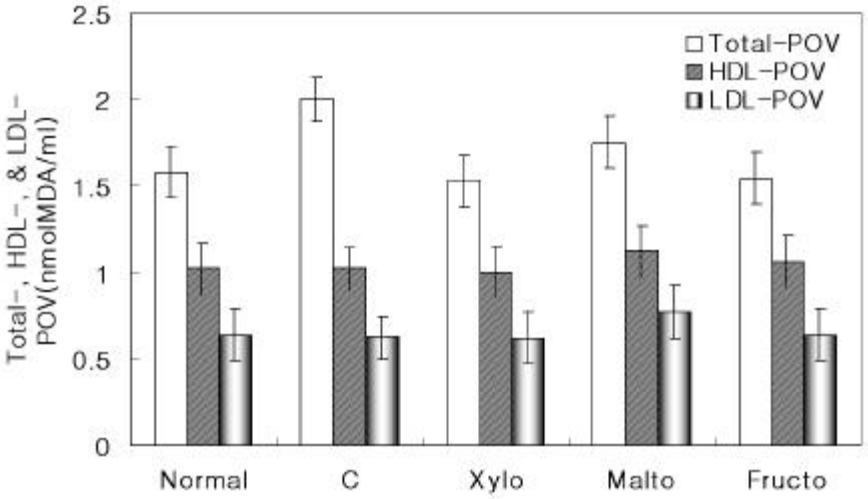

Fig. 4-6. Effects of dietary xylooligosaccharide on disaccharidase activities Serum lipid peroxidase value (POV) of in rats fed high cholesterol diets. The experimental conditions are the same as Table 4-8.

2. 간조직의 지질대사개선 및 장기능 개선작용

가. 간조직중의 triglyceride, cholesterol 및 phospholipid 함량

간조직중의 중성지방과 콜레스테롤 함량은 그림 4-7 및 표 4-13과 같다. 식이 oligo당 종류별에 따른 간조직중의 중성지방 함량은(그림 4-7) oligo당 비투여 고콜레스테롤 식이군(C group)은 정상군에 비해 290%정도 높았다. 그러나 C군에 비해 xylooligo당, isomaltooligo당, fructooligo당 식이군에서 45%, 18% 및 26%씩 각각 감소되었으며 그 중에서 xylooligo당이 가장 효과적이었다.

Xylooligo당의 농도별 실험에서 고콜레스테롤 식이군에 비해 5%, 10% 및 15%씩 xylooligo당을 각각 공급했을 때는 중성지방 함량이 고콜레스테롤군에 비해 각각 26%, 45% 및 23%씩 유의적으로 낮아졌으며 그중에서 10%

xylooligo당을 첨가했을 때 가장 효과적이었다.

간조직에서의 콜레스테롤 함량에 대한 식이 oligo당의 종류별 효과를 관찰한 결과(그림4-7) 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 20배가 증가되었으나 oligo당을 공급하지 않은 고콜레스테롤군(C group)에 비해 xylooligo당, isomaltooligo당, fructooligo당 식이군에서 50%, 33% 및 41%씩 각각 감소되었다. 그 중에서도 xylooligo당 공급군이 다른 oligo당 공급군에 비해 가장 현저하게 감소되었다. Xylooligo당 농도별 영향을 관찰한 결과(표 4-13) 5%, 10%, 15% xylooligo당을 공급했을 때에는 고콜레스테롤 식이군에 비해 43%, 50% 및 37%씩 각각 감소하여 10%의 xylooligo당의 효과가 가장 현저함을 알 수 있었다.

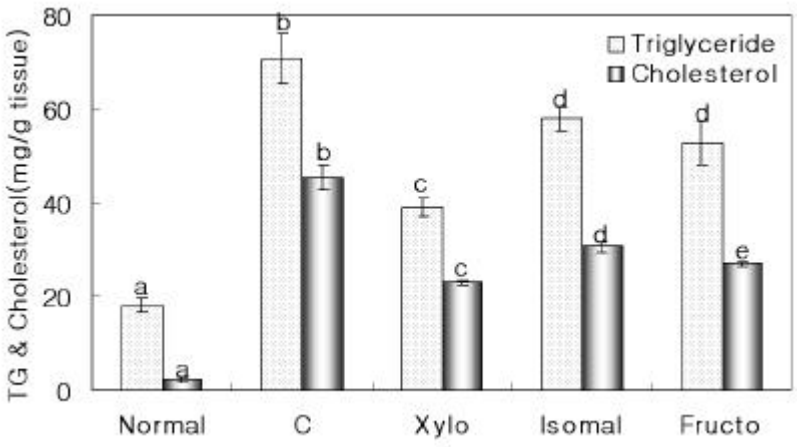

Fig. 4-7. Effect of sources of oligosaccharides on cholesterol and triglyceride concentrations of liver in rat fed high cholesterol diet.
Mean±SE. Bars with different letters(a,b,c,d,e) are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test. The diet groups are the same as Table 4-8.

Table 4-13. Effect of dietary xylooligosaccharide on hepatic triglyceride (TG), cholesterol levels in rats fed high cholesterol diets

Groups	Triglyceride (㎎/g tissue)	Cholesterol (㎎/g tissue)
Normal	18.13±1.50a	2.26±0.19a
C	70.79±5.29b	45.28±2.68b
C+5X	52.28±3.01c	25.60±0.81c
C+10X	39.09±1.97d	22.84±0.42d
C+15X	54.31±3.09c	28.68±0.83e

All values are mean±SE(n=10). Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

간조직중의 인지질 함량은 그림 4-8 및 표 4-14와 같다. 식이 oligo당 종류별로 비교했을 때(그림 4-8) oligo당 비투여 고콜레스테롤 식이군(C group)은 정상군에 비해 37%정도 낮았다. 그러나 C군에 비해 xylooligo당, isomaltooligo당 및 fructooligo당 식이군에서 46%, 20% 및 37%씩 각각 증가되었고 xylooligo당 공급군은 정상군과 유의적인 차이가 없었다. 농도별 실험에서 5%, 10% 및 15%씩 xylooligo당을 각각 공급했을때의 인지질 함량은 xylooligo당을 투여하지 않은 고콜레스테롤군에 비해 6.3%, 46% 및 34%씩 각각 증가되었으며 그 중에서 10% xylooligo당을 첨가했을 때 가장 효과적이었다.

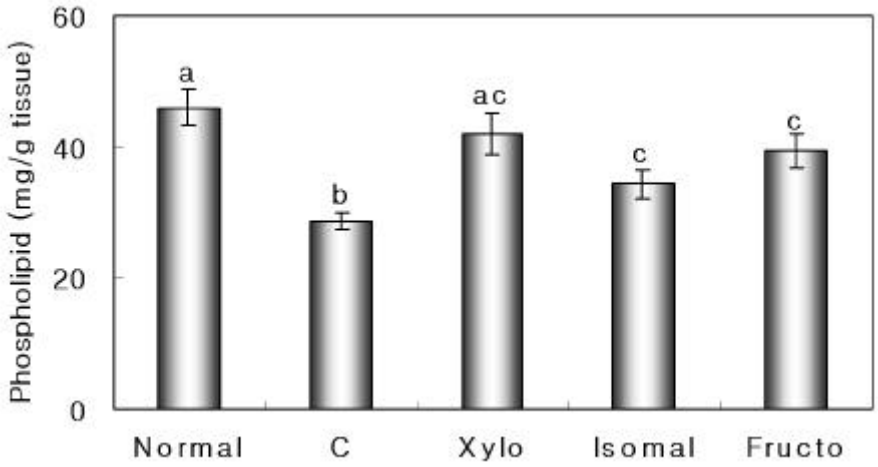

Fig. 4-8. Effect of sources of oligosaccharides on phospholipid concentration of liver in rat fed high cholesterol diet.

Mean±SE. Bars with different letters(a,b,c) are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test. The diet groups are the same as Table 4-8.

Table 4-14. Effects of dietary xylooligosaccharide on hepatic phospholipid levels in rats red high cholesterol diets.

Groups	Phospholipid (㎎/g tissue)
Normal	45.92±2.74a
N+10X	44.43±1.62a
C	28.74±1.38b
C+5X	30.55±1.50b
C+10X	42.09±3.09ac
C+15X	38.36±2.72c

All values are mean±SE(n=10). Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

The diet groups are the same as Table 4-2.

나. 간조직중의 HMG-CoA reductase의 활성도

간조직중의 HMG-CoA reductase의 활성도는 그림 4-9 및 표 4-15와 같다. Oligo당의 종류별로 관찰한 간조직중의 HMG-CoA reductase 활성 결과(그림 4-9) oligo당을 공급하지 않은 고콜레스테롤군만 감소되었으며 oligo당 공급군은 증가되어 정상군과 비슷하였다. Xylooligo당의 농도별 실험에서의 HMG-CoA reductase의 활성도는 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 43%가 감소되었고, xylooligo당을 공급했을 때는 정상군과 유의성이 없었다.

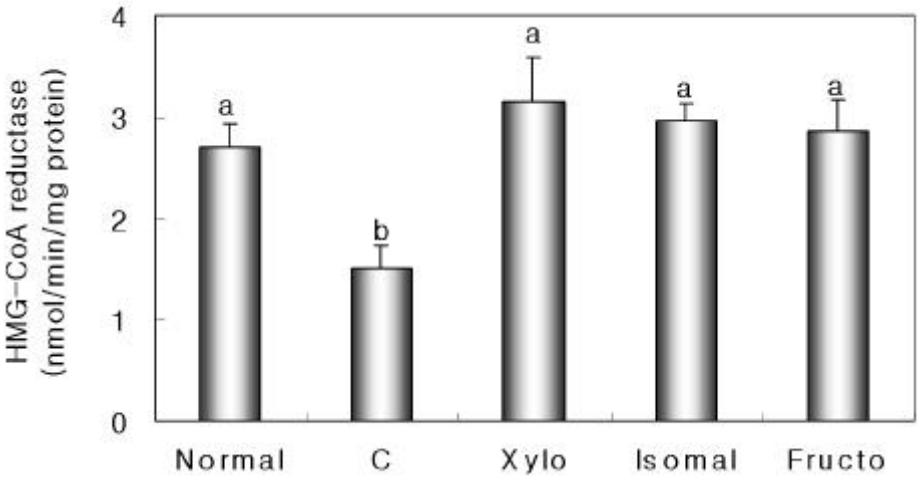

Fig. 4-9. Effect of oligosaccharides sources on hepatic HMG-CoA reductase in rat fed high cholesterol diet.

Mean±SE. Bars with different letters(a,b) are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test. The diet groups are the same as Table 4-8.

Table 4-15. Effect of dietary xylooligosaccharide on hepatic HMG-CoA reductase activities in rats fed high cholesterol diets

Groups	HMG-CoA reductase (nmol/min/mg protein)
Normal	2.703±0.23a
C	1.498±0.23b
C+5X	2.924±0.40a
C+10X	2.419±0.43ab
C+15X	2.062±0.31ab

All values are mean±SE(n=10). Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test. The diet groups are the same as Table 4-2.

다. 간조직중의 지질과산화물(TBARS) 정량

조직의 과산화적 손상의 지표가 되는 간조직중의 지질과산화물 축적에 미치는 oligo당의 영향을 관찰한 결과 그림 4-10 및 표 4-16과 같다. Oligo당 비공급 고콜레스테롤군(C군)은 정상군에 비해 지질과산화물이 211%나 높았으나 xylooligo당, isomaltooligo당 및 fructooligo당 공급군은 고콜레스테롤군(C군)에 비해 각각 50%, 33% 및 45%씩 감소되었다. 또한 xylooligo당을 5%, 10%, 15% 농도별로 공급했을 때(표 4-16) 고콜레스테롤군(C군)에 비해 30%, 50% 및 33%씩 각각 감소하였으며 특히 10% 농도에서 가장 효과적이었다.

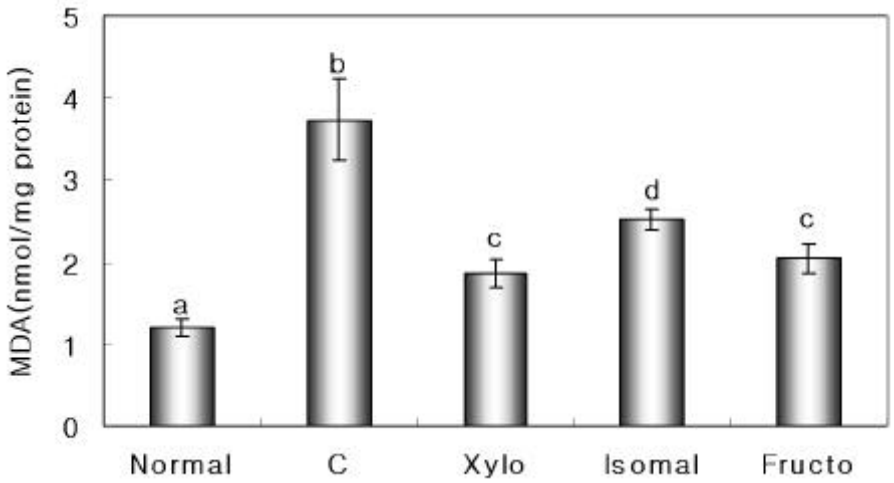

Fig. 4-10. Effect of sources of oligosaccharide on TBARS of liver in rat fed high cholesterol diet.

Mean±SE. Bars with different letters(a,b,c,e) are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test. The diet groups are the same as Table 4-8.

Table 4-16. Effect of dietary xylooligosaccharide on TBARS of liver in rat fed high cholesterol diet (MDA nmol/mg protein)

Groups	TBARS
Normal	1.202±0.106a
C	3.739±0.492b
C+5X	2.629±0.166c
C+10X	1.863±0.188d
C+15X	2.519±0.055c
C+10SX	1.960±0.160d

All values are mean±SE(n=10). Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

The diet groups are the same as Table 4-2.

라. 간조직의 병리조직학적 관찰

육안으로 볼 때 간조직은 정상군에서 적갈색이었으며 그 표면은 평활하고 윤기가 있고 탄력성이 있었으며 1% 고콜레스테롤 공급군은 간조직 표면이 하얗게 보여 매우 심한 지방침착으로 윤기와 탄력성이 정상군에 비해 떨어져 보였다.

Oligo당 종류별 공급군의 간조직에 대해 광학현미경으로 관찰(그림 4-11)하였을 때 정상군의 간세포는 중심 정맥을 향하여 잘 배열되어 있었으며 문맥에도 염증 세포의 침윤들은 없었다. 혈관 세담도에도 이상소견은 없었다. 간세포의 핵은 중심에 위치하여 있고 세포질은 연분홍빛을 띠면서 약간의 파열성을 띠고 있지만 대체적으로 균질하게 보인다. 1% 고콜레스테롤 공급 식이군은 간조직의 지방 입자가 전체적으로 지방구를 형성하여 매우 심한 지방침착을 보여 지방간의 소견을 나타내었다. 10% oligo당을 1% cholesterol 식이와 함께 투여한 군에서도 지방간의 소견이 뚜렷하였으나 간세포의 배열이상이나 염증소견은 없었다. 지방간의 정도는 1% 콜레스테롤 공급군과 유사하였으나 10% xylooligo당을 공급한 군에서 가장 감소된 소견을 보였다. 즉 세포질내의 지방구의 크기와 숫자가 다소 줄었으며 지방간 세포의 분포도 중심동맥 주변에서 사라지는 경향을 보였다. 10% isomaltooligo당 및 fructooligo당 공급군에서 지방간의 현상을 보였으며 그 정도는 1% cholesterol 식이 공급군에 비해 감소되는 경향이었다. 그러나 간조직중의 지방은 다른 oligo당 공급군에 비해 10% xylooligo당 공급군에서 가장 많은 감소를 보였다.

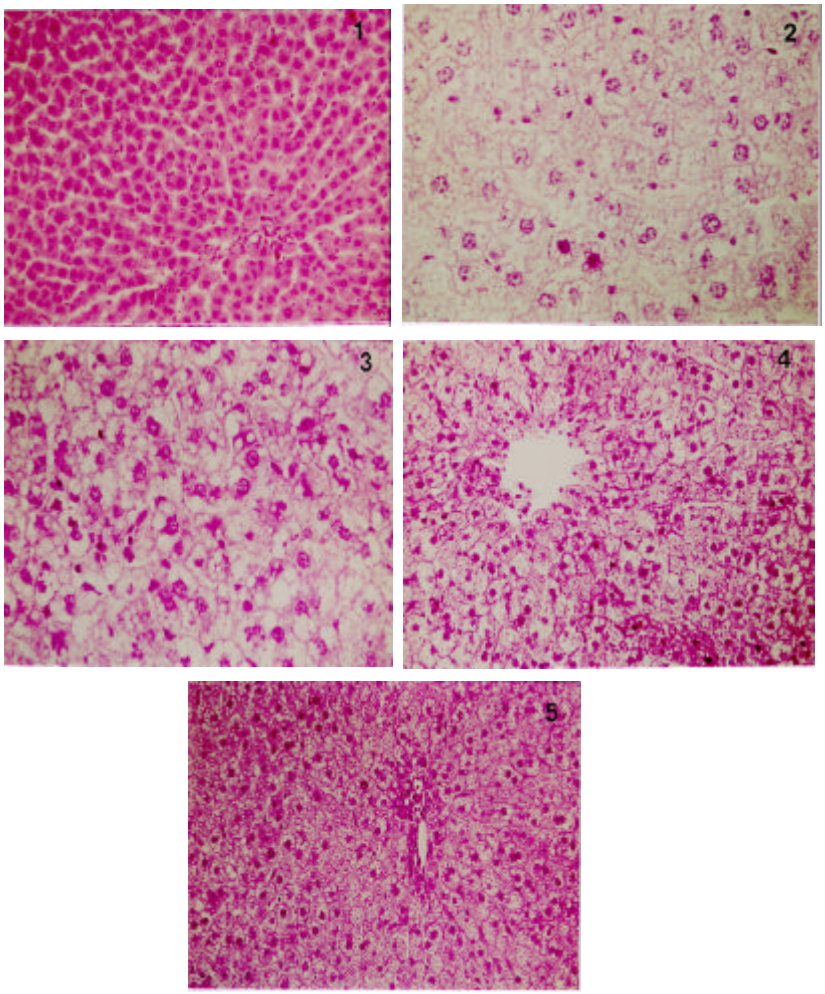

Fig. 4-11. Light micrograph of hepatocytes of rat fed 1% cholesterol diet cholesterol diet without oligosaccharides and different oligosaccharides.
(1) Liver, rat, normal diet. The arrangement of hepatocytes to central vein is regular. There is no fatty change. H&E, ×200. (2) Liver, rat, 1% cholesterol diet. Hepatocytes are vacuolated by fatty changes. Some are looking clear due to large amount of intracytoplasmic fat. H&E, ×400. (3) Liver, rat, 1% cholesterol diet with 10% xylooligosaccharide. Fatty change is quite diminished. H&E, ×400. (4) Liver, rat, 1% cholesterol diet with 10% fructooligosaccharide. Fatty change is quite reduced, compare with cholesterol diet without oligosaccharide group. H&E, ×200. (5) Liver, rat, 1% cholesterol diet with 10% isomaltooligosaccharide. Fatty change is markedly, compare with cholesterol diet without oligosaccharide group. H&E, ×200.

마. 장통과시간 (Gastro intestinal transit time)

장통과 시간을 xylooligo**당의 농도별로 관찰한 결과**(**표** 4-17) **정상군에 비해 고콜레스테롤 공급군 모두가 낮았으며 또** C**군에 비해** xylooligo**당 공급 농도가 높을수록 장통과 시간이 감소하였다. 그리고 조제** xylooligo**당군**(C+10X)**과** Suntory**사의** xylooligo**당군**(C+10SX)**간에는 차이가 없었다.** Oligo**당의 종류별로 비교했을 때**(**그림** 4-12) **모든** oligo**당 투여군에서 장통과 시간이 감소되었으며** oligo**당 식이군간에는 유의적인 차이가 없었다.**

Table 4-17. Effects of dietary xylooligosaccharide on gastrointestinal transit time in rats fed high cholesterol diets

Groups	GI transit time (hrs)
Normal	11.75±0.53a
C	8.70±0.52b
C+5X	7.56±0.40b
C+10X	5.90±0.79c
C+15X	5.52±0.44c
C+10SX	6.20±0.68c

All values are mean±SE (n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different each groups at $p<0.05$ by Tukey's test.

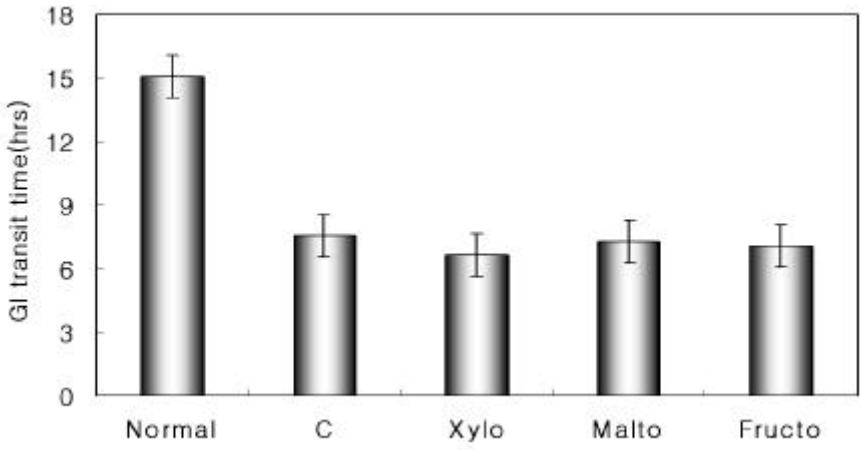

Fig. 4-12. Gastrointestinal transit time in high cholesterol diet rat according to various kind of dietary oligo-saccharides.

Normal : Normal diet group.

C : 1% cholesterol + oligosaccharide free group.

Xylo : 1% cholesterol + 10% xylooligosaccharide group.

Malto : 1% cholesterol + 10% isomaltooligosaccharide group.

Fructo : 1% cholesterol + 10% fructooligosaccharide group.

바. 대변중의 bile acid, cholesterol **함량**

대변의 bile acid **함량은 표** 4-18**과 같다**. Xylooligo**당을 공급하지 않고 고콜레스테롤만 공급한 식이군은 정상군에 비해** 2.3**배 증가하였고**, 5%, 10%, 15% xylooligo**당을 각각 공급 한** C+5X, C+10, C+15X **군에서는** 7.1**배**, 8.4**배 및** 6.5**배 씩 각각 증가하였다**. **특히** 10% xylooligo**당 공급군에서 대변의** bile acid **함량이 가장 높았고 조제** xylooligo**당군과** Suntory**사의** xylooligo**당군**(C+10SX)**은 유의적 차이가 없었다**.

대변의 콜레스테롤 함량은(**표** 4-18) **정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서** 9.5**배가 증가되었다**. **또 고콜레스테롤 식이군에 비해** xylooligo**당을 공급한** C+5X,

C+10, C+15X 군에서는 140%, 144% 및 98%씩 각각 증가 하였다. 그 중에서 10% xylooligo당을 첨가했을 때 가장 높았고 조제 xylooligo당군과 Suntory사 군과는 유의적 차이가 없었다.

Table 4-18. Effect of dietary xylooligosaccharide on fecal bile acid and cholesterol contents in rats fed high cholesterol diets

Groups	Bile acid (mg/day)	Cholesterol (mg/day)
Normal	12.79±4.59a	2.83±0.40a
C	29.73±4.60b	26.84±3.48b
C+5X	90.97±20.59c	64.37±4.67c
C+10X	106.93±19.90c	65.50±3.62c
C+15X	82.69±11.25c	53.22±4.63d
C+10SX	215.74±14.11c	64.95±4.17c

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test. The diet groups are the same as Table 4-2.

사. 대변의 중성스테롤 함량

체내의 콜레스테롤을 체외로 제거하는 수단 즉, 콜레스테롤이 대장내의 박테로이드, 비피더스균 및 클로스트리디움 속의 장내세균에 의해 변환되어 체내의 콜레스테롤 함량에 영향을 주는 중성스테롤류인 coprostanol, coprostanone 함량을 관찰한 결과는 표 4-19와 같다. Coprostanol 함량은 정상군에 비해 고콜레스테롤만 공급한 식이군(C군)은 26% 감소되었고 또 고콜레스테롤 식이군

에 비해 xylooligo당을 각각 공급한 C+5X, C+10, C+15X 군에서는 85%, 108% 및 78%씩 각각 증가하였다. Coprostanone 함량은 정상군에 비해 C군에서 41% 증가 되었고 고콜레스테롤 식이군에 비해 5%, 10%, 15% xylooligo당을 각각 공급 한 C+5X, C+10, C+15X 군에서는 9.1배, 12.1배, 9.0배씩 각각 증가하였다. 그리고 이러한 대변중의 중성스레롤류의 함량 변화는 조제 xylooligo당(C+10X)과 Suntory사의 xylooligo당식이군(C+10SX)간에는 유의적 차이가 없었다

Table 4-19. Effect of xylooligosaccharide on fecal neutral sterol contents in rats fed high cholesterol diet

Groups	Coprostanol (mg/day)	Coprostanone (mg/day)
Normal	1.08±0.17ac	0.56±0.14a
C	0.80±0.18a	0.33±0.05a
C+5X	1.48±0.07b	2.99±0.58b
C+10X	1.66±0.05b	3.98±0.73b
C+15X	1.42±0.11bc	2.96±0.75b
C+10SX	1.59±0.06b	3.40±0.52b

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

3. Xylooligo당의 간조직의 산화적 손상 억제 효과

가. 간조직 Superoxide dismutase(SOD) 활성, Glutathione S-transferase (GST) 활성 및 Glutathione peroxidase(GSHpx) 활성

체내의 해독기전 중에 항산화적 방어계 효소의 하나인 SOD는 superoxide radical을 환원시켜 H_2O_2로 전환시키므로써 산소독으로부터 생체를 보호한다. 본 연구에서(표 4-20) 정상군에 비해 xylooligo당을 공급하지 않은 고콜레스테롤 식이군은 20% 감소되었다. 그러나 고콜레스테롤 식이군에 비해 xylooligo당을 각각 공급한 C+5X, C+10, C+15X 군에서는 13%, 20% 및 13%씩 각각 증가하였다.

Selenium을 함유하는 항산화 효소로 세포막의 손상을 방지하는 GSHpx의 활성을 관찰한 결과는 표 4-20과 같다. 정상군에 비해 고콜레스테롤 식이군에서 29% 감소하였고 고콜레스테롤 식이군에 비해 5%, 10%, 15% xylooligo당을 각각 공급한 C+5X, C+10X, C+15X 군에서는 21%, 37% 및 10%씩 각각 증가하였다. 10% xylooligo당 공급군에서 가장 많이 증가하여 정상군 수준으로 회복되었다.

변이원성 물질, 발암성물질, 독성물질등의 대사 산물, 그리고 내인성 독소중에서 친전자성 물질에 환원형 glutathione을 포함시켜 glutathione thioester 형성 반응을 촉매하는 GST 활성을 측정한 결과는 표 4-20과 같다. 정상군에 비해 xylooligo당을 공급하지 않은 고콜레스테롤 식이군은 33% 감소되었다. 고콜레스테롤 식이군에 비해 5%, 10%, 15% xylooligo당을 각각 공급한 C+5X, C+10, C+15X 군에서는 24%, 37% 및 29%씩 각각 증가하였으며 그중에서도 10% xylooligo당 공급군에서 가장 많이 증가하였다. 그리고 이러한 항산화계 효소 변화는 조제 xylooligo당군(C+10X)과 Suntory사의 xylooligo당군(C+10SX)이 동일하였다.

Table 4-20. Effects of dietary xylooligosaccharide on superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione s-transferase activities in rats fed high cholesterol diets.

Groups	SOD (Unit/mg protein /min)	GSHpx (nmol NADPH/ min/mg protein)	GST (nmol DNCB/mg protein/min)
Normal	3.82±0.11a	176.32±3.78a	183.53±5.04a
C	3.04±0.08b	125.27±6.94b	123.01±6.40b
C+5X	3.42±0.15c	150.96±5.22c	152.72±4.96c
C+10X	3.65±0.23ac	171.70±6.43a	168.50±4.10d
C+15X	3.43±0.10a	138.32±8.65bc	159.21±3.98c
C+10SX	3.60±0.21ac	169.85±4.10a	167.49±3.19d

All values are mean±SE(n=10).
Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

나. 간 조직 glutathione 농도 측정

비효소적 방어기구 중의 하나인 간조직 환원형 glutathione(GSH) 함량은 (표 4-21) 정상군에 비해 xylooligo당 비공급 고콜레스테롤 식이군에서 56% 감소하였다. 고콜레스테롤 식이군에 비해 5%, 10%, 15% xylooligo당을 각각 공급한 C+5X, C+10X, C+15X 군에서는 25%, 71% 및 16%씩 각각 증가하였다.

산화형 glutathione(GSSH) 함량은 정상군에 비해 xylooligo당 비공급 고콜레스테롤 식이군에서 53% 증가하였다. 고콜레스테롤 식이군에 비해 5%, 10%, 15% xylooligo당을 각각 공급 한 C+5X, C+10X, C+15X 군에서는 31%,

43% 및 24%씩 각각 감소하였다.

GSH/GSSG 비율은 xylooligo당 비공급 고콜레스테롤 식이군은 정상군에 비해 72% 감소 되었다. 고콜레스테롤 식이군에 비해 5%, 10%, 15% xylooligo당을 각각 공급한 C+5X, C+10X, C+15X 군에서는 78%, 208% 및 51%씩 각각 증가하였다. 10% xylooligo당 공급 식이군은 정상군과 비슷한 수준이었다. 이러한 간조직의 glutathione 농도 변화는 조제 xylooligo당군(C+15X)과 Suntory 사의 xylooligo당군(C+10SX)이 같았다.

Table 4-21. Effects of dietary xylooligosaccharide on liver glutathione contents in rats fed high cholesterol diets.

Groups	GSH (㎛ol/g wet tissue)	GSSG (㎛ol/g wet tissue)	GSH/GSSG
Normal	5.66±0.34a	0.38±0.03a	15.68±1.72a
C	2.51±0.11b	0.58±0.03b	4.40±0.26b
C+5X	3.13±0.25c	0.40±0.03a	7.85±0.40c
C+10X	4.28±0.29d	0.33±0.03a	13.53±0.89a
C+15X	2.92±0.16c	0.44±0.02ac	6.65±0.33d
C+10SX	4.10±0.12c	0.34±0.03a	12.05±0.50d

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

다. 간 조직 중의 Cytochrome P450 함량

체외에서 들어오는 환경물질을 대사하는 과정은 주로 간 소포체에 있는 cytochrome P450 의존성 mixed function oxidase(MFO)계에서 이루어지며, 이 과정은 superoxide radical이나 H_2O_2를 생성한다. 이 MFO계의 가장 주된 역할을 담당하는 cytochrome P450의 함량은 표 4-22와 같이 정상군에 비해 xylooligo당 비공급 고콜레스테롤 식이군에서 45% 증가하였다. 고콜레스테롤 식이군에 비해 5%, 10% xylooligo당을 각각 공급 한 C+5X, C+10X군에서는 정상군 수준이었고 15% xylooligo당을 공급한 C+15X 군에서는 유의적인 감소가 있었지만 정상군 수준이었다. 그리고 조제 xylooligo당군(C+15X)과 Suntory사의 xylooligo당군(C+10SX)간에는 유의적 차이가 없었다.

Table 4-22. Effects of different levels of xylooligosaccharide on microsomal cytochrome P450 content in liver rat fed high cholesterol

Groups	Cytochrome P450 (nmol/mg protein)
Normal	0.507±0.045a
C	0.737±0.071b
C+5X	0.609±0.048ab
C+10X	0.585±0.040ac
C+15X	0.620±0.043bc
C+10SX	0.569±0.037ac

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

라. 혈청 Glutamate Oxaloacetate Transaminase(GOT), Glutamate Pyruvate Transaminase(GPT)**의 활성 측정**

간조직의 괴사를 반영하는 GOT**와 간조직의 비대화와 간조직의 상태를 반영하는** GPT**의 활성을 측정한 결과는 표** 4-23**과 같다.** GOT **및** GPT **활성 모두 정상군에 비해 고콜레스테롤만 공급한 군**(C**군**)**에서 높았고** xylooligo**당군들은 모두 정상 수준이었다. 그리고 조제** xylooligo**당군**(C+10X)**과** Suntory**사의** xylooligo**당군**(C+10SX)**간에는 유의적 차이가 없었다.**

Table 4-23. Effects of dietary xylooligosaccharide on serum GOT and GPT activities in rats fed high cholesterol

Groups	GOT (IU/ml)	GPT (IU/ml)
Normal	100.56±8.48a	35.89±2.29a
C	117.68±11.84b	53.63±9.30b
C+5X	93.25±8.14a	43.63±4.63a
C+10X	93.89±6.91a	40.44±3.76a
C+15X	95.88±11.47a	49.14±6.58a
C+10SX	93.78±7.51a	40.22±2.78a

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

4. Streptozotocin 유발 당뇨쥐에서 xylooligosaccharide에 의한 혈당강하 효과

가. 경구 당 부하검사

식이중 oligo당류가 당뇨쥐의 내당능에 미치는 영향을 알아보고자 포도당을 경구 투여후 시간별로 꼬리 정맥에서 채혈하여 자동혈당계로 혈당을 측정하여 경구당 부하 검사를 행한 결과는 그림 4-13과 같다. 정상군은 포도당 투여후 60분에서 혈당수치가 146 ㎎/dℓ로 증가하였다가 120분에서 유의적으로 감소하여 공복시 수준으로 되었다. 당뇨 대조군은 30분에 혈당치가 400 ㎎/dℓ로 높았으며 60분에 다소 감소했고 120분에 공복시 혈당수준으로 되었다. Xylooligo당 공급 당뇨군은 60분에서 혈당수치가 313 ㎎/dℓ로 증가하였다가 120분에서 유의적으로 감소하여 공복시 혈당수준으로 되었다. 그러나 정상군보다는 훨씬 높았다. Isomaltooligo당과 fructooligo당을 각각 공급한 당뇨군은 xylooligo당 공급군에 비해 혈당치는 다소 높았지만 혈당 감소 경향은 비슷하였다.

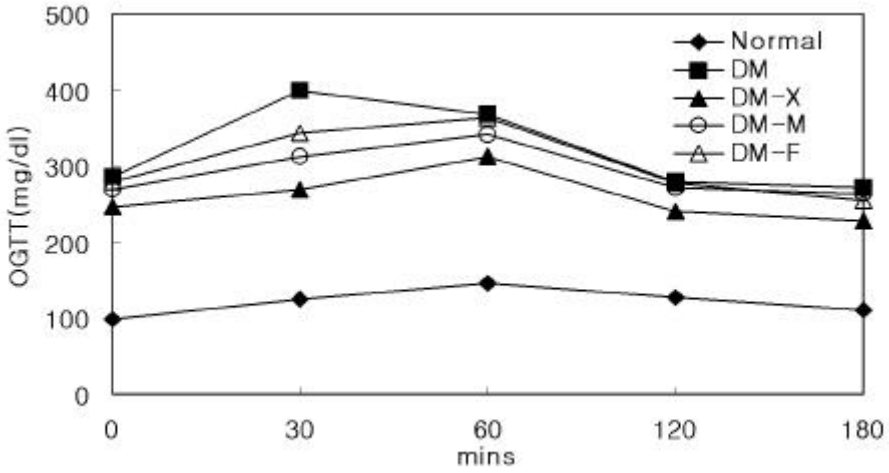

Fig. 4-13. Test of oral glucose tolerance in STZ-induced diabetes rat according to different sources of dietary oligosaccharides.

Diet groups: Normal, basal diet

DM, basal diet + STZ inj.

DM-X basal diet + STZ inj. + 10% xylooligosaccharide

DM-M, basal diet + STZ inj. + 10% isomaltooligosaccharide

DM-F, basal diet + STZ inj. + 10% fructooligosaccharide

나. 당뇨쥐에서의 xylooligosaccharide의 혈당강하 효과

Xylooligo당의 혈당강하 효과를 관찰한 결과(그림 4-14) 정상군에 비해 당뇨군에서 혈청 glucose 농도가 5.9배 높았다. Oligo당 종류별 실험에서는 당뇨대조군에 비해 oligo당 투여군 모두가 유의적으로 낮았고 특히 xylooligo당 공급군(DM-X group)에서 32%가 감소되어 다른 oligo당에 비해 가장 효과적이었다.

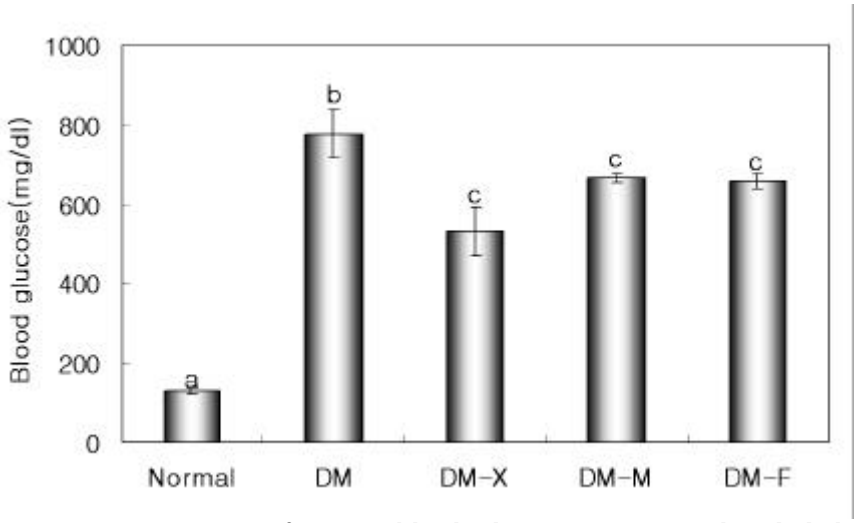

Fig. 4-14. Concentrations of serum blood glucose in STZ induced diabetes rat according to different sources of dietary oligosaccharides.

Mean±SE. Bars with different letters(a,b,c) are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

The diet groups are the same as Fig. 4-13.

제 5 절 유론산의 운동후의 피로 회복 효과 관찰

1. 실험동물의 체중증가 및 식이효율

실험기간 동안 흰쥐의 체중변화는 그림 4-15와 같고 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이효율은 표 4-24와 같다.

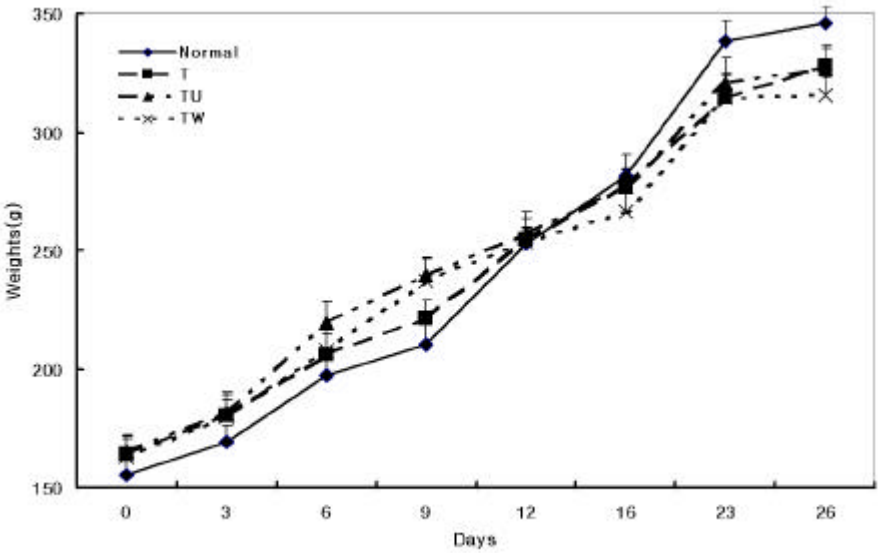

Fig. 4-15. Effects of exercise and/or uronic acid tube feeding on body weight changes in rats.

1)Normal : Basal diet

T : Basal diet + exercise

TU : Basal diet + exercise +uronic acid(1 fold)

2TU : Basal diet + exercise +uronic acid(2 fold)

체중증가량은 정상군에 비해 운동 실험군에서 유의적으로 감소하였으며 실험군간에 유의적 차이는 없었다. 식이 섭취량은 정상군에 비해 모든 실험군에서 22%, 16% 및 14%씩 각각 유의적으로 감소하였다. 식이 효율은 정상군에 비해 T군에서 유의적 차이는 없었고 산성당 공급군인 TU군과 2TU군은 정상군과 T군에 비해 유의적으로 감소하였다.

Table 4-24. Effects of exercise and/or uronic acid tube feeding on body weights gain, food intake and FER in rats

Group	Body weights(g)	Food intake(g)	FER
Normal	395.6±6.01a	24.52±0.80a	0.30±0.01a
T	366.0±8.18b	19.10±0.72b	0.28±0.01a
TU	365.8±8.62b	20.52±0.64c	0.24±0.01b
2TU	357.0±14.49b	21.19±0.58bc	0.25±0.01b

All values are mean±SE(n=10)

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

1)Legend refers to Fig. 4-15.

2. 혈당

유산소 운동의 당질대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈당을 측정한 결과는 표 4-25와 같다. 정상군에 비해 운동을 시킨 군(T군)이나 산성당을 공급한 군(TU군)간에 유의성은 없었다.

Table 4-25. Effects of exercise and/or uronic acid tube feeding on blood glucose levels in rats

Group	Glucose(mg/dℓ)
Normal	115.90±7.67NS
T	102.35±9.90
TU	103.99±11.94
2TU	94.83±13.14

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

1)Legend refers to Fig. 4-15.

3. 간조직중의 glycogen 함량

근육의 에너지원의 정도를 파악하는 지표인 간조직중의 glycogen 함량을 관찰한 결과는 표 4-26과 같다. 정상군에 비해 운동군(T군)에서 유의적으로 감소하였고 T군에 비해 산성당을 공급한 TU군은 정상군 수준으로 증가하는 경향이었다.

Table 4-26. Effects of exercise and/or uronic acid injection on liver glycogen concentrations in rats

Group	Glycogen
Normal	30.84±3.73a
T	22.41±0.93b
TU	24.11±2.63ab
2TU	25.10±4.15ab

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

1)Legend refers to Fig. 4-15.

4. 혈중 lactic acid 함량

근운동시 축적되며 근육의 에너지원이나 피로의 정도를 파악하는 지표인 혈중 lactic acid **함량을 관찰한 결과는 표** 4-27**과 같다. 정상군에 비해 운동군 (T군)에서** 240%**로 유의적으로 높았다. 그러나** T**군에 비해 산성당을 공급한** TU**군과** 2TU**군은 각각** 39%, 35%**씩 유의적으로 감소를 보임으로써 피로물질 제거에 효과적인 결과를 보였다.**

Table 4-27. Effects of exercise and/or uronic acid tube feeding on lactic acid concentration in rats

Group	Lactic acid (mmol/ℓ)
Normal	0.43±0.10a
T	1.46±0.11b
TU	0.89±0.05c
2TU	0.95±0.05c

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

1)Legend refers to Fig. 4-15.

5. 혈청중의 glutamate oxaloacetate transaminase(GOT)와 glutamate pyruvate transaminase(GPT) 활성

간조직의 괴사를 반영하는 GOT와 간조직의 비대화와 간조직의 상태를 반영하는 GPT의 활성을 측정한 결과는 표 4-28과 같다. GOT 및 GPT 활성은 모두 실험군간에 차이가 없었다.

Table 4-28. Effects of exercise and/or uronic acid tube feeding on serum GOT and GPT activities in rats

Group	GOT (IU/ml)	GPT (IU/ml)
Normal	84.660±3.051NS	52.105±1.593NS
T	83.601±1.514	49.109±0.693
TU	81.244±2.404	53.250±1.211
2TU	83.376±2.606	53.169±1.798

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p<0.05$ by Tukey's test.

1)Legend refers to Fig. 4-15.

6. 조직중의 항산화계 효소(SOD, GST) 활성

생체내 항산화 방어기구중 효소계 방어계의 superoxide radical을 환원시켜 H_2O_2로 환원시키므로써 산소 독으로부터 생체를 보호하는 SOD 활성 측정 결과는 표 4-29와 같다. 산성당을 공급하지 않은 운동군에 비해 산성당을 공급한 TU군에서 다소 증가하는 경향이었다.

변이원성 물질, 발암성 물질, 독성물질 등의 대사 산물, 그리고 내인성 독소들 중에서 친전자성 물질에 환원형 glutathione을 포함시켜 glutathione thioester(R-S-G) 형성반응을 촉매하는 GST 활성을 측정한 결과(표 4-29)는 정상군에 비해 산성당을 공급하지 않은 운동군인 T군에서 감소하였고 T군에 비해 산성당을 공급한 군인 TU군과 2TU군에서 다소 증가되는 경향이었다.

Table 4-29. Effects of exercise and/or uronic acid injection on superoxide dismutase(SOD) glutathione s-transferase(GST) activities in rats

Group	SOD (Unit/mg protein/min)	GST
Normal	3.907±0.412NS	319.27±18.708NS
T	4.073±0.357	298.79±14.655
TU	4.458±0.157	304.22±40.515
2TU	4.819±0.312	303.90±10.777

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey,s test.

7. 간조직중의 과산화지질(TBARS)

조직의 산화적 손상의 지표가 되는 간조직 중의 지질과산화물 축적에 미치는 운동과 산성당 실험은 표 4-30과 같다. 정상군에 비해 운동군인 T군은 차이가 없었고 산성당을 공급한 TU와 2TU군에서는 유의적인 감소를 나타내었다.

Table 4-30. Effects of exercise and/or uronic acid injection on hepatic thiobabituric acid reative substances(TBARS) in rats

Group	TBARS (MDA nmol/mg protein)
Normal	1.374±0.054a
T	1.273±0.081ab
TU	1.165±0.087b
2TU	1.115±0.125b

All values are mean±SE(n=10).

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

1)Legend refers to Fig. 4-15.

제 6 절 결 론

본 연구에서는 xylooligo당의 장기능 개선과 체내 지질대사 개선효과 및 그 작용기전을 규명하고 또 유론산 유도체의 운동후 피로회복 효과를 조사하였다.

1. **Xylooligo당의 난소화성** : Xylooligo당은 **여러 체내 소화액에 의해 전혀 분해되지 않았으며 또 담즙산 흡수를 지연시키므로 저칼로리 기능식품으로서 우수성이 규명되었다.**

2. **Xylooligo당의 지질대사 개선효과** : ① **고콜레스테롤 식이 흰쥐에서** xylooligo**당 첨가로 장통과 시간이 단축되므로서 변비개선 효과가 인정되었다.** Ⓢ Xylooligo**당은 혈중 중성지방, 총콜레스테롤 및** LDL-cholesterol

농도를 현저하게 감소시키는 반면 HDL-cholesterol 농도를 상승시키므로서 동맥경화지수(athrogenic index)를 낮추었다. ③ Xylooligo당의 첨가로 대변중의 bilic acid, cholesterol 및 중성 sterol인 coprostanol과 coprostanone 등의 배설량이 증가되어 xylooligo당의 지질대사 개선효과가 규명되었다. ④ 또한 이러한 xylooligo당의 체내 콜레스테롤 개선작용에 대한 기전을 규명하고자 간조직중의 콜레스테롤 합성 율속효소인 간조직중의 HMG-CoA reductase 활성을 관찰한 결과 고콜레스테롤 식이군에서는 현저하게 저하되었으나 xylooligo당 투여군에서는 정상군 수준이었다. 또 xylooligo당은 간조직중의 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시키고 인지질 함량은 증가시키는 효과가 다른 oligo당에 비해 가장 현저함을 알 수 있었다. ② 혈당은 콜레스테롤군에 비해 xylooligo당 공급군에서 유의적으로 감소되었다.

3. Xylooligo당의 항산화적 해독기능 : ① 고콜레스테롤 식이로 인한 간조직의 손상과 xylooligo당에 의한 조직손상 완화작용을 관찰한 결과 간조직중의 SOD, GSHpx 및 GST활성이 고콜레스테롤 식이군에서 26%, 41% 및 49%씩 각각 감소되었으나 xylooligo당 공급으로 이러한 항산화 해독효소들의 활성이 증가되었으며 또 환원형 glutathione 함량을 증가시켰다. ⑤ 따라서 고콜레스테롤 식이군에서는 정상군에 비해 지질과산화물 값이 211%나 증가되었으나 xylooligo당 투여로 현저하게 감소되었다. ③ 이러한 항산화적 해독기능은 xylooligo당 농도가 식이중 10%일때 가장 효과적이었다. ④ 간조직의 광학 현미경적 소견 또한 다른 oligo당 공급군에 비해 10% xylooligo당을 공급한 군에서 세포질내의 지방구의 크기와 숫자가 줄어졌다는 소견을 나타내었다. ② 본 연구결과로 생산된 xylooligo당과 Suntory사의 xylooligo당 간에 생리적 효과가 비슷함이 관찰되었다.

4. 당뇨병에서의 xylooligo당의 혈당 강하 효과 : Xylooligo당의 혈당저하 효과를 관찰하기위해 당뇨쥐에서의 경구 당부하 검사나 혈당저하 실험에서 xylooligo당은 공복 혈당수준과 식후 느린 혈당상승 등 내당능의 개선

효과와 혈당 강하 효과도 관찰되었다.

5. **유론산 유도체의 운동후 피로회복효과** : 조제한 산성당은 운동후 축적되는 혈중 젖산(lactic acid) 농도를 감소시키고 간조직의 glycogen 함량을 증가시키므로서 운동후 피로회복을 촉진시켜주었다. 또한 운동후 항산화계를 다소 강화시켜 주었다.

이상의 결과에서 식이 xylooligo당 공급이 장내용물의 통과시간 단축과 대변의 콜레스테롤, 담즙산(bile acid) 및 중성 스테롤(coprostanol, coprostanone) 류의 배설량을 증가시키는 효과와 장기능의 개선과 체내 콜레스테롤의 수준을 저하시키므로 고콜레스테롤 혈증을 억제시키는 지질 개선 효과가 우수함이 규명되었다. 또한 식이 xylooligo당은 고콜레스테롤 식이로 인해 감소된 간조직의 SOD, GSHpx, GST 활성 및 glutathione 함량 등의 항산화계를 강화시키는 해독기능이 관찰되었다. 또 소장에서의 이당류분해효소 활성 저하 및 난소화성으로 저칼로리 식품으로 규명되었다. 또한 조제한 산성당은 운동후 축적되는 혈중 lactic acid 농도를 감소시키고 간조직의 glycogen 함량을 증가시키므로서 운동후 피로회복을 촉진시켜주며 항산화계를 강화시키는 해독기능도 우수함이 규명되었다. 이러한 생리적 기능은 본 과제에서 생산된 xylooligo당이 Suntory 사의 xylooligo당과 비슷하므로 앞으로 xylan으로부터 효율성있게 생산하여 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 종 합 결 론

농산 및 임산폐자원의 xylan으로부터 기능성물질을 생산하기 위하여 먼저 xylan의 최적 단리기술 및 xylan의 최적 정제방법을 확립하였다. 이 xylan으로부터 기능성 xylooligo 당 생산 및 유론산 유도체 생산 조건을 확립하였으며 xylan 단리과정에서 나오는 부산물을 이용하여 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체를 제조하여 그 효율을 증대시켰다. 또 우수한 xylanase 생산 균주선발, 생산조건확립, 이 효소를 생산하는 2종의 유전자의 클로닝 및 효소의 증폭생산기술을 확립하여 효소분해에 의한 xylooligo 당 생산기술을 확립하였다. 생산된 기능성 xylooligo 당 및 유론산 유도체를 사용하여 지질대사 개선효과, 장기능 개선 효과, 항산화적 해독, 당뇨쥐의 혈당강화 및 운동후 피로회복 등의 새로운 기능성을 밝히어 농산 및 임산 폐자원의 이용효율의 제고를 기하였다. 이상의 결과를 과제별로 정리하면 다음과 같다.

가. 제 1 세부과제 : Xylan의 효소분해에 의한 기능성 xylooligo당 생산과 관련된 연구개발 결과

1) Xylan으로부터 xylooligo 당을 생산하기 위하여 내열성 xylanase를 강하게 생산하는 내열성 방성균인 *Streptomyces thermocyaneoviolaceus* M-049를 선발하였다.
2) 이 균주의 xylanase 생산조건을 플라스크배양과 jar-fermentor 배양에 검토하여 최적조건을 확립하였으며 이때 효소생산량은 배양액 ㎖당 14.2 unit였다.
3) *S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 4종의 xylanase중 3종은 순수하게 정제하여 SDS-PAGE로 분자량을 측정하였고 1종은 조정제하였다.
4) 정제된 xylanase N1, B1, B2 및 B3의 최적 pH는 5.0 5.5 부근이고 pH

4.5 10.5 사이에서 안정하였다.

5) 정제효소인 xylanase N1, B2 및 B3의 최적온도는 65℃이며, B1은 70℃이며, N1은 65℃, B1, B2 및 B3는 55℃에서 1 시간 처리에도 안정하였다.

6) 정제 xylanase N1, B1, B2 및 B3의 Km값은 각각 10.92, 2.15, 11.80 및 2.62 ㎎/㎖이었으며, Vmax는 3.02, 0.71, 4.52 및 1.10 μmol/min이었다.

7) 정제 xylanase N1, B2 및 B3는 불용성 xylan에 잘 결합하였으나 B1은 낮은 결합력을 보였다. xylanase N1은 Avicel에도 잘 결합하였으나 B1, B2 및 B3는 잘 결합하지 않았다.

8) Xylooligo 당(X2 X5)의 분해력을 조사한 결과 정제 xylanase N1, B1, B2 및 B3은 X2를 분해하지 못하고, N1은 X3를 전혀 분해하지 못하였으나 B1, B2 및 B3는 약하게 분해하였다. 또 N1은 X4도 분해하지 못하며 B1, B2 및 B3는 X4를 X2로 잘 분해하였다. N1은 X5를 약하게 분해하였고 B1, B2 및 B3는 X5를 분해하여 주로 X2를 생산하고 소량의 X1과 X3를 생성하였다.

9) 정제 xylanase N1과 B3의 아미노 말단의 아미노산 서열을 분석한 결과 각각 DTITSNQTGTHNGYF와 AESTLGAAAA이었다.

10) 정제 효소중 xylanase N1(XynB)와 B3(XynA)를 각각 생산하는 유전자 *xyn*B 및 *xyn*A를 클로닝하여 염기서열을 분석하였다.

11) 클로닝한 *xyn*A 및 *xyn*B 유전자를 고발현 벡터에 서브클로닝하여 대장균에 2종의 xylanase의 증폭생산에 성공하였다.

12) 재조합 대장균이 생산한 XynA 및 XynB 효소는 *S. thermocyaneoviolaceus*가 생산하는 xylanase B3 및 N1과 효소학적 성질이 각각 동일하였다.

13) *xyn*A 유전자를 가진 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMA144 및 *xyn*B 유전자를 가진 재조합 대장균 BLR(DE3)/pEMB10에서 각각의 xylanase인 XynA(xylanase B3)와 XynB(xylanase N1)의 생산조건을 확립하여 XynA는 배양액 ㎖당 128 unit, XynB는 ㎖당 142 unit의 효소를 생산하

였다. 이것은 *S. thermocyaneoviolaceus* 보다 9 10배의 높은 효소생산성을 나타내는 것이다.

14) *S. thermocyaneoviolaceus*의 복합 xylanase, 재조합 대장균이 생산한 XynA 및 XynB의 xylanase를 사용하여 10% xylan으로 xylooligo 당생산을 위한 최적조건을 검토한 결과 복합 xylanase로 58.8 g/ℓ. XynA와 XynB로 65.0 g/ℓ의 xylooligo 당을 생산할 수 있었다.

이상과 같이 선발균 및 재조합 균주로부터 xylanase를 생산하는 최적 조건을 확립하고 이들 xylanase를 이용하여 xylan으로부터 xylooligo 당을 생산할 수 있는 조건을 확립하였다.

나. 제 2 세부과제 : Xylan의 단리 및 화학분해에 의한 신기능성 물질생산과 관련된 연구개발 결과

1) 40 80 mesh로 분쇄시킨 농산 및 임산 폐자원의 화학적 조성을 분석한 결과, 볏짚과 보릿짚의 냉수 및 열수 추출물함량과 무기물함량이 신갈나무에 비해 월등히 높은 것을 알 수가 있었다.
2) 농산 및 임산 폐자원은 20 ㎏f/㎠의 압력에서 3-6분의 조건으로 폭쇄 처리를 행하였다. 폭쇄 처리된 시료의 lignin 함량은 폭쇄 처리전 시료보다 약 10% 정도 높게 나타남을 알 수가 있었다. 폭쇄 처리된 시료의 당조성 분석 결과, 폭쇄 처리시간이 길어질수록 헤미셀룰로오스의 함량이 다소 감소하는 경향을 보이고 있으며, glucose의 경우 오히려 그 함량이 증가하는 경향을 나타내고 있다.
3) 폭쇄 처리된 시료로부터 온수 및 0.5% 수산화칼륨 용액 추출로 粗xylan을 단리하였다. 단리된 粗xylan의 수율은 약 20 35% 정도로 나타났고, 20 ㎏f/㎠에서 3분간 폭쇄 처리한 시료에서 粗xylan의 수율이 약간 더 높게 나타났다. 0.5% 수산화칼륨 용액 추출의 경우, 중화 과정 및 단

리 과정 중 발생하는 염을 제거해야하는 등의 과정이 추가되어야한다는 점에서 온수 추출이 폭쇄 처리된 시료로부터 xylan을 단리하는데 더욱 유리할 것으로 판단되었다. 粗xylan의 당형태 분석 결과, 온수 추출에 의해 단리된 粗xylan이 알카리 추출에 의해 단리된 粗xylan보다 oligomer 형태로 더욱 많이 용출된다는 것을 알 수 있었다. 그리고 폭쇄 처리시간이 길어질수록 당의 형태가 oligomer 형태에서 monomer 형태로 전환되는 것을 알 수 있었다.

4) 粗xylan을 5% 수산화바륨 용액-에탄올 적하법으로 정제하였다. 정제된 xylan의 xylose 함량은 약 85% 이상을 나타내었고, 정제과정을 통해서도 다른 당 잔기들을 완전히 제거하지 못하였다.

5) 정제된 xylan을 1.0N 황산으로 90분 동안 가수분해시켜 양이온교환수지 및 음이온교환수지를 통과시킨 후 0.01M 암모니아 수용액으로 음이온교환수지에 흡착된 유론산 유도체를 용출시킴으로써 유론산 유도체를 단리하였다. 단리된 유론산 유도체는 HPLC 분석 결과, 볏짚과 보릿짚에서는 glucuronic acid만이 xylose 잔기에 대해 약 15 20 : 1의 몰비로 존재함을 알 수 있었고. 신갈나무에서는 glucuronic acid가 xylose 잔기에 대해 약 15 : 1의 몰비로 존재하고, glucuronic acid와 galacturonic acid는 약 7 8 : 1로 존재함을 확인할 수 있었다.

6) 단리된 유론산 유도체의 ^{13}C-NMR 분석 결과, 볏짚과 보릿짚으로부터 단리된 유론산 유도체는 4-O-methyl-D-glucuronic acid만이 단당의 형태로 존재함을 확인할 수 있었다. 신갈나무로부터 단리된 유론산 유도체는 4-O-methyl-D-glucuronic acid, D-galacturonic acid, D-glucuronic acid, 2-O-(4-O-methyl-α-D-glucuronic acid)-D-xylose, 4-O-(β-D-galacturonic acid)-D-xylose, β-(1, 4) 결합된 (4-O-methyl-α-D-glucuronic acid)-D-xylobiose의 형태로 각각 존재하고 있음을 확인할 수 있었다.

7) Xylan 단리 부산물로부터 아염소산나트륨법과 산소-알카리 펄프화법으로

셀룰로오스를 제조하였다. 제조된 셀룰로오스를 이용하여 셀룰로오스 아세테이트, 카르복시메틸셀룰로오스라는 두 종류의 셀룰로오스 유도체를 제조하였다. 제조된 셀룰로오스 아세테이트는 치환도가 약 2.1 2.5 정도였고, FT-IR 분석결과 1,200 ㎝-1과 1,750 ㎝-1에서 carbonyl기의 ester 결합에 기인하는 피크가 현저하게 증가하는 것을 알 수가 있었다. 셀룰로오스 아세테이트는 치환도를 변화시킴에 따라 용매에 대한 용해성도 광범위하게 조절할 수 있기 때문에 섬유나 필름 성형물로서 용도가 넓다. 제조된 카르복시메틸셀룰로오스(CMC)의 치환도는 0.7 0.9 정도였다.

이상과 같이 xylan의 단리정제 조건을 확립하고 단리된 xylan으로부터 유도산 유도체 생산 조건과 부산물로 나오는 셀룰로스를 이용할 수 있는 방안을 확립하였다.

다. 협동과제 : Xylan 가수분해물의 신기능성 검정과 관련된 연구개발 결과

1) Xylooligo 당의 난소화성 : Xylooligo 당은 여러 체내 소화액에 의해 전혀 분해되지 않았으며 또 담즙산 흡수를 지연시키므로 저칼로리 기능식품으로서 우수성이 규명되었다.
2) Xylooligo 당의 지질대사 개선효과 : ㉠ 고콜레스테롤 식이 흰쥐에서 xylooligo 당 첨가로 장통과 시간이 단축되므로서 변비개선 효과가 인정되었다. ㉡ Xylooligo 당은 혈중 중성지방, 총콜레스테롤 및 LDL-cholesterol 농도를 현저하게 감소시키고 반면 HDL-cholesterol 농도를 상승시키므로서 동맥경화지수(athrogenic index)를 낮추었다. ㉢ Xylooligo 당의 첨가로 대변중의 bilic acid, cholesterol 및 중성 sterol인 coprostanol과 coprostanone등의 배설량이 증가되어 xylooligo 당의 지질대사 개선효과가 규명되었다. ㉣ 또한 이러한 xylooligo 당의 체내 콜레스테롤 개선작용에 대한 기전을 규명하고자 간조직중의 콜레스테롤 합

성 율속효소인 간조직중의 HMG-CoA reductase 활성을 관찰한 결과 고콜레스테롤 식이군에서는 현저하게 저하되었으나 xylooligo 당 투여군에서는 정상군 수준이었다. 또 xylooligo 당은 간조직중의 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시키고 인지질 함량은 증가시키는 효과가 다른 oligo당에 비해 현저함을 알 수 있었다. ② 혈당은 콜레스테롤군에 비해 xylooligo 당 공급군에서 유의적으로 감소되었다.

3) Xylooligo 당의 항산화적 해독기능 : ① 고콜레스테롤 식이로 인한 간조직의 손상과 xylooligo 당에 의한 조직손상 완화작용를 관찰한 결과 간조직중의 SOD, GSHpx 및 GST 활성이 고콜레스 테롤 식이군에서 26%, 41% 및 49%씩 각각 감소되었으나 xylooligo 당 공급으로 이러한 항산화 해독효소들의 활성이 증가되었으며 또 환원형 glutathione 함량을 증가시켰다. ⑤ 따라서 고콜레스테롤 식이군에서는 정상군에 비해 지질과산화물 값이 211%나 증가되었으나 xylooligo 당 투여로 현저하게 감소되었다. ③ 이러한 항산화적 해독기능은 xylooligo 당 농도가 식이 중 10%일때 가장 효과적이었다. ⑦ 간조직의 광학 현미경적 소견 또한 다른 oligo 당 공급군에 비해 10% xylooligo 당을 공급한 군에서 세포질내의 지방구의 크기와 숫자가 줄어졌다는 소견을 나타내었다. ② 이러한 xylooligo 당의 생리적 기능은 시판된 Suntory사의 xylooligo 당간에 효과가 비슷함이 관찰되었다.

4) 당뇨병에서의 xylooligo 당의 혈당 강하 효과 : Xylooligo 당의 혈당저하 효과를 관찰하기위해 당뇨쥐에서의 경구 당부하 검사나 혈당저하 실험에서 xylooligo 당은 공복 혈당수준과 식후 느린 혈당상승 등 내당능의 개선 효과와 혈당 강하 효과도 관찰되었다.

5) 유론산 유도체의 운동후 피로회복효과 : 조제한 산성당 분획의 유론산 유도체는 운동후 축적되는 혈중 젖산(lactic acid)농도를 감소시키고 간직의 glycogen함량을 증가시키므로서 운동후 피로회복을 촉진시켜주었다. 또한 운동후 항산화계를 다소 강화시켜 주었다.

이상의 결과에서 식이 xylooligo당 공급이 장내용물의 통과시간 단축과 대변의 콜레스테롤, 담즙산(bile acid) 및 중성 스테롤(coprostanol, coprostanone) 류의 배설량을 증가시키는 효과와 장기능 기능의 개선과 체내 콜레스테롤의 수준을 저하시키므로 고콜레스테롤 혈증을 억제시키는 지질 개선 효과가 우수함이 규명되었다. 또한 식이 xylooligo당은 고콜레스테롤 식이로 인해 감소된 간조직의 SOD, GSHpx, GST활성 및 glutathione 함량 등의 항산화계를 강화시키는 해독기능이 관찰되었다. 또 소장에서의 이당류분해효소 활성 저하 및 난소화성으로 저칼로리 식품으로서 규명되었다. 또한 조제한 산성당 분획의 유론산 유도체는 운동후 축적되는 혈중 lactic acid농도를 감소시키고 간조직의 glycogen함량을 증가시키므로서 운동후 피로회복을 촉진시켜주며 항산화계를 강화시키는 해독기능도 우수함이 규명되었다. 이러한 생리적 기능으로 볼 때 본 과제에서 생산된 xylooligo및 유론산 유도체 등의 이용은 농산 및 임산폐자원의 이용성을 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Adiotomre, J., M. A. Eastwood, C. A. Edwards, and W. C. Brydon. 1990. Dietary fiber, in vitro methods that anticipate nutrition and metabolic activity in humans. Am. J. Clin. Nutr. 52:128-134.
2. Annual Book of ASTM Standards Designation. D 1795:62.
3. Aspinall, G. O. 1959. Structural Chemistry of Holocellulose. Adv. Carbohydrate Chem. 14:429-469.
4. Aspinall, G. O., E. L. Hirst, and R. S. Mahomed. 1954. The Hemicellulose of Beechwood. J. Chem. Soc. p. 1734-1738.
5. Bernt, E., and H. U. Bergmeyer. 1974. Methods of enzymatic analysis: Glutathione. 2nd English Ed. Academic Press. 444:1641.
6. Bjorndal, H., B. Lindberg, and S. Svensson. 1970. Gas-Liquid Chromatography of Partially Methylated Alditols as their Acetates. Acta. Chemica. Scandinavica. 21(7):1801-1804.
7. Bjorndal, H., C. G. Hellerqvist, B. Lindberg, and S. Svensson. 1970. Gas-Liquid Chromatography and Mass Spectrometry in Methylation Analysis of Polysaccharides. Angew. Chem. Internat. Edit. 9(8):610-619.
8. Bock, K., and C. Pedersen. 1985. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of monosaccharides. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry. 41:27-63.
9. Borchrolt, L. G., and C. V. Piper. 1970. A Gas Chromatographic Method for Carbohydrates as Alditol-Acetates. Tappi. J. 53(2):257-260.
10. Bradford, M. M. 1964. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

11. Brisaria, V. S., and T. K. Ghose. 1981. Enzyme Microbiol. Technol. 3:90-104.

12. Browning, B. L. 1967. Methods of Wood Chemistry. John Wiley & Sons. New York. p. 785-787.

13. Cazemier, A. E., J. C. Verdose, A. J. J. van Ooyen, and H. J. M. Op den Camp. 1999. Molecular and biochemical characterization of two xylanase-encoding genes from *Cellulomonas pachnodae*. Appl. Environ. Microbiol. 65:4099-4107.

14. Conrad, H. E. 1972. Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. **VI**. Academic Press. New York. p. 361.

15. Colson, P., and R. King. 1976. The 13C-NMR Spectra of Disaccharides of D-Glucose, D-Galactose, and L-Rhamnose as Model for Immunological Polysaccharides. Carbohydrate Research. 47:1-13.

16. Czubayko, F., B. Beumers, S. Lammsfass, D. Lutjohann, and K. Bergmann. 1992. Simplified micro-method for quartification of fecal excretion of neutral and acidic sterols for outpatient studies in humans. J. Lipid Res. 32:1861-1867.

17. David, N., S. Hon, and N. Shiraish. 1991. Wood and Cellulosic Chemistry, Dekker. New York. p. 59-88.

18. Fiordaliso, M., N. Kok, K. P. Desager, F. Goethals, and D. Deboyser. 1977. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma. Am. J. Clin. Nutr. 30:171.

19. Friedwald, W. T., R. I. Levy, and D. S. Fedreicson. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without was of the preparative Ultracentrifuge. Clin. Chem. 18:499-506.

20. Folch, J. M., M. Lees, and G. H. S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. J. Biol.

Chem. 226:497-509.

21. Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase: the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249:7130-7139.

22. Hamilton, J. K., and N. S. Thompson. 1959. A Composition of the carbohydrates of Hardwoods and Softwoods. Tappi. J. 42(9):752-760.

23. Harpin, S., G. Grenier, C. Beauleu, R. Brzezinski, and C. V. Dery. Catalytic activity: Endohydrolysis of 1,4-beta-D-xylosidic linkages in xylans. Submitted(APR-1994) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

24. Harpin, S., G. Grenier, C. Beaulieu, R. Brzezinski, and C. V. Dery. A processed xylanase from the thermophilic *Actinomadura* sp. FC7 is overproduced in *Streptomyces lividans* from a cloned truncated gene. Submitted(15-APR-1994) to the NCBI.

25. Hashi, M., F. Teratani, and K. Miyazaki. 1971. Studies on Hemicellulose **III**. J. Japan Wood Res. Soc. 17(9):405-410.

26. Havlick, J., and O. Samuelson. 1972. Chromatography of Oligosaccharides from Xylan by Various Techniques. Carbohydrate Chem. 22:307-316.

27. Hayashi, H., M. Takehara, T. Hattori, T. Kimura, S. Karita, K. Sakka, and K. Ohmiya. Cloning and sequencing of *Clostridium thermocellum* xylanase genes. Submitted(FEB-1998) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

28. Hernandez, A., J. C. Lopez, J. L. Copa-patino, and J. Soliveri. *xyl*30 encodes an endo-1,3-beta-xylanase from *Streptomyces avermutilis* CECT 3339. Submitted(JAN-1999) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.

29. Hromadkova, Z., A. Ebringerova, M. Kacurakova, and J. Alfold. 1996. Interactions of the Beechwood Xylan Component with Other Cell Wall Polymers. J. Wood Chem. & Tech. 16(3):221-234.

30. Hunkapiller, M. W., and L. E. Hood. 1983. Analysis of phenylthiohydrates by ultrasensitive gradient high-performance liquid chromatography. Methods Enzymol. 91:486-493.

31. Hulcher, F. H., and W. H. Oleson. 1973. Simplified spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co A reductase by measurement of coenzyme A. J. Lipid Res. 14:625-631.

32. Irwin, D., E. D. Jung, and D. B. Wilson. 1994. Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. Appl. Environ. Microbiol. 60(3):763-770.

33. Isogai, A., A. Ishizu, and J. Nakano. 1989. Residual Lignin and Hemicellulose in Wood Cellulose. Analysis Using New Permethylation Method. Holzforschung. 43(5):333-338.

34. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227:680-685.

35. Lawrence, R. A., and R. F. Bruk. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71:952-958.

36. Lee, J. Y., A. Ishizu, S. Hosoya, and J. Nakano. 1979. A C13 N.M.R. Spectral Study of Xylan from Red Lauan(Shorea Rubroshorea)Wood. Cellulose Chem. Technol. 13:739-745.

37. Lindberg, B., K. G. Rossel, and S. Sevenson. 1973. Position of O-Acetyl groups in Birch Xylan. Svensk Papperstidn. 76:30-34.

38. Lmmergut, E. H. 1963. The Chemistry of Wood. Willey's. New York. p. 103.

39. Lo's russel, J. C., and A. W. Taylor. 1970. determination of glycogen in small tissues. J. Appl. Physiol. 28:234-236.

40. Macdonald, I. A., and M. J. Crowell. 1980. Enzymic determination of 3α-, 17α-; and 2α-hydroxyl groups of fecal bile salts. Clin. Chem. 26:

298-1300.

41. Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47:469-474.

42. Matsuo, N., S. Yosida, I. Kusakabe, and K. Murakumi. 1991. Chemical Structure of Xylan in Cotten-seed Cake. Agric. Biol. Chem. 55(11):2905-2907.

43. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31:426-428.

44. Millward-sadler, S. J., D. M. Poole, B. Henrissat, G. P. Hazlewood, J. H. Clarke, and H. J. Gilbert. 1994. Evidence for a general role for high-affinity non-catalytic cellulose binding domains in microbial plant cell wall hydrolases. Mol. Microbiol. 11:375-382.

45. Nossal, N. G., L. A. Heepel. 1966. J. Biol. Chem. 241:3055.

46. O'Dwyer, M. H. 1923. The Hemicellulose of American White Oak, Biochem. J. 17:501-509.

47. Omura, T., and R. Sato. 1964. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes **II**. Solubilization, Purification, and properties. J. Biol. Chem. 239:2379-2385.

48. Redenbach, M., H. M. Kieser, D. Denapaite, A. Eichner, J. Cullum, H. Kinashi, and D. A. Hopwood. 1996. A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. Mol. Microbiol. 21:77-96.

49. Ruiz-Arribas, A., P. Sanchez, J. J. Calvete, M. Raida, J. M. Fernandez-Abalos, and R. I. Santamaria. 1997. Analysis of *xys*A, a gene from *Streptomyces halstedii* JM8 that encodes a 45-kilodalton modular xylanase, Xys1. Appl. Environ. Microbiol. 63(8):2983-2988.

50. Sale, F. D., S. Marchesini, P. H. Fishman, and B. Berra. 1984. A sensitive enzymatic assay for determination of cholesterol in lipid extracts. Academic Press Inc. p. 347-350.

51. Satoh, K. 1978. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colormetric method. Clinica. Chemica. Acta. 90:37-43.

52. Shareck, F., C. Roy, M. Yaguchi, R. Morosoli, and D. Kluepfel. 1991. Sequence of three genes specifying xylanases in *Streptomyces lividans*. Gene. 107:75-82.

53. Shareck, F., P. Biely, R. Morsoli, and D. Kluepfel. 1995. Analysis of DNA flanking the *xln*B locus of *Streptomyces lividans* reveals genes encoding acetyl esterase and the RNA component of ribonuclease P. Gene. 153(1):105-109.

54. Shimizu, K. 1976. β-Eliminative Degradation during Methylation of Xylan by Hakomori's method. Mokuzai Gakkaishi. 22(1):51-53.

55. Sjostrom, E. 1981. Wood Chemistry. Academic Press. New York. p. 60-64.

56. Shibuya, N., and A. Misaki. 1978. Structure of Hemicellulose Isolated from Rice Endosperm Cell Wall. Agric. Biol. Chem. 42(12):2267-2274.

57. Takayama, M., S. Itoh, and T. Nagaski. 1977. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. Clin. Chem. Acta. 79:93-98.

58. TAPPI Test Method. T230 om-82.

59. Timell, T. E. 1965. Wood Hemicellulose(Ⅰ). Adv. Carbohydrate Chem. 20:409-483.

60. Timell, T. E. 1964. Wood Holocellulose(Ⅰ). Adv. Carbohydrate Chem. 19:247-302.

61. Timell, T. E. 1964. Wood Holocellulose(II). Adv. Carbohydrate Chem. 19:409-483.

62. Timell, T. E., R. W. Bryant, M. Zinbo, and D. A. I. Goring. 1968. The Polymolecularity of an Aspen Xylan. Cellulose Chem. Technol. 2:269-277.

63. Tsujibo, H., K. Miyamoto, T. Kuda, K. Minami, T. Sakamoto, T. Hasegawa, and Y. Inamori. 1992. Purification and properties, and partial amino acid sequence of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Appl. Environ. Microbiol. 58(1):371-375.

64. Tsujibo, H., T. Ohtsuki, T. Iio, I. Yamazaki, K. Miyamoto, M. Sugiyama, and Y. Inamori. 1997. Cloning and sequencing analysis of genes encoding xylanases and acetyl xylan esterase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520. Appl. Environ. Microbiol. 63(2):661-664.

65. Vidal, T., and J. F. Colm. 1984. Determination of Carbohydrates as Alditol Acetates by Gas Chromatography. Tappi. J. 64(9):132-133.

66. Vincent, P., F. Shareck, C. Dupont, R. Morosoli, and D. Kluepfel. 1997. New alpha-L-arabinofuranosidase produced by *Streptomyces lividans*: cloning and DNA sequence of the *abf*B and characterization of the enzyme. Biochem. J. 322:845-852.

67. Yagi, K. A. 1976. Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. Biochem. Mes. 15:212.

68. Yosida, S., T. Ono, N. Matsuo, and I. Kusakabe. 1994. Structure of Hardwood Xylan and Specificity of *Streptomyces* β-xylanase toward the Xylan. Biosci. Biotech. Biochem. 58(11):2068-2070.

69. Yoshino, S., M. Oishi, R. Moriyama, M. Kato, and N. Tsukagoshi. 1995. Two family G xylanase genes from *Chaetomium gracile* and their expression in *Aspergillus nidulans*. Curr. Genet. 29:73-80.

70. Yu, J. H., Y. S. Park, D. Y. Yum, J. M. Kim, I. S. Kong, and D. H.

Bai. 1993. Nucleotide sequence and analysis of a xylanase gene(*xyn*S) from alkali-tolerant *Bacillus* sp. YA-14 and comparison with other xylanases. J. Microbiol. Biotechnol. 3:139-145.

71. Zinbo, M., and T. E. Timell. 1965. The Degree of Branching of Hardwood Xylans. Svensk Papperstidn. 68:647-662.

72. **민두식, 조남석**. 1990. **목재당화학**. **선진문화사**. p. 149.

73. **양재경**. 1994. **활엽수 폭쇄재의 효소당화를 위한 탈리그닌처리법의 개발**. **경북대박사학위논문**. p. 24-25.

74. **이경숙, 이서래**. 1996. In vitro**법에 의한 식이섬유의 포도당 및 담즙산 흡수지연 효과**. **한국영양학회지**. 29(7):738-746.

75. **이문득**. 1989. **기기분석화학**. **자유아카데미**. p. 191.

76. **이종윤, 김영찬, 도금현, 조남석**. 1984. **한국산 소나무류** Hemicellulose**에 관한 연구** (**Ⅱ**). **한국펄프·종이공학회**. 16(2):3-9.

77. **이종윤, 박상진, 조남석, 정근기**. 1990. **바이오매스전환, 한국과학재단 연구보고서**. p. 12-14.

78. **이종윤, 엄태진**. 1986. **참나무류의** Hemicellulose**중** xylan, **한국 펄프·종이공학회**. 18(1):3-13.

79. **이종윤**. 1977. **열대산 활엽수재** xylan**에 관한 연구**(**Ⅱ**). **한국임학회지**.. 35:24-28.

80. **이종윤, 윤병호, 민두식**. 1981. **목재화학**. **선진출판사**. p. 258.

81. **이종윤, 조남석, 윤병호, 황병호**. 1987. **목재화학**. **영남대출판사**. p. 91-94.

82. **이종윤, 조남석, 윤병호, 황병호**. 1987. **목재화학**. **영남대출판사**. p. 118-122.

83. **口隆昌**. 1969. **樹木生化學**. **共立出版社**. **京都**. p. 31-32.

84. **李鍾潤**. 1977. **熱帶産闊葉樹材キシランに關する研究**. **東京大博士學位論**. p. 107.

85. **日本木材化學會**. 1991. **木質バイオマスの利用技術**. **文永堂**. **東京**. p. 109-124.

86. **李鍾潤, 趙南奭, 石津敦, 中野準三**. 1981. **熱帶産闊葉樹キシランに關する研究**. **日本木材學會誌**. 27(10):745-749.

87. **石井忠, 志水一允**. 1987. **闊葉樹廣放射組織キシランの化學構造, 日本木材學會誌**. 33(12):969- 974.

88. **越島哲夫**. 1963. **アカマツグルコマナンの構造とその結晶性, 日本木材學會誌**. 9(4):132- 138.

89. **前川英一, 越島哲夫**. 1980. **亞鹽素酸鹽法による脫リグニン過程で溶出する多糖(第2報)**. **日本木材學會誌**. 26(9):614- 623.

90. **寺谷文之, 志水一允, 官崎鑑吾**. 1969. **日本カラマツ材から抽出したアラビノガラクタンの精製**. **日本木材學會誌**. 15(6):266- 269.

91. **赤坂一之外** 22**人**. 1975. **高分子の**NMR, **化學同人**. **京都**. p. 203- 206.