Food Engineering Progress
Vol. 9, No. 4. pp. 320~324 (2005.11)

Biocellulose의 *In-vitro* 포도당 및 담즙산 흡수지연 효과

백진홍 · 양영국* · 이신영
강원대학교 바이오산업공학부, 바이오 에프엔씨

In Vitro Glucose and Bile Acid Retardation Effect of Biocellulose

Jin-Hong Back, Young-Kuk Yang* and Shin-Young Lee
School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University,
**Bio FNC Co.*

Abstract

Biocellulose from static cuture of *Acetobacter xylinum* was prepared by hot air drying(AD) or freeze drying(FD), and physiological functionality such as *in-vitro* glucose and bile acid retarding effects were investigated. The glucose and bile acid retarding index of biocellulose powders during *in vitro* dialysis experiment for 2 hours exhibited 28.57~38.26% and 7.86~16.74%, respectively. Especially, freeze dried biocellulose FD showed the 1.5~2 times higher effect on *in-vitro* glucose and bile acid retardation than that of commercial α-cellulose as standard sample. These relatively good retarding effects on glucose and bile acid diffusion suggest the preventing from diabetes and arteriosclerosis of some extent.

Key words : Biocellulose, *Acetobacter xylinum*, *in-vitro* glucose and bile acid retarding effect

서 론

β-1,4-D-glucopyranose 단위로 이루어지는 4C1 형태의 선형 고분자인 셀룰로오스는 식물 세포벽의 골격구조를 형성하는 주요 성분이다(Marchessault and Sundararajan, 1983).

이 셀룰로오스는 살아있는 식물에 가장 풍부하게 존재하지만 *Acetobacter xylinum*을 주로 하는 몇몇 세균도 셀룰로오스를 생산하며(biocellulose or bacterial cellulose)(Yang *et al.*, 1998; Son *et al.*, 2001, Cheng *et al.*, 2002), 최근에 와서 이의 산업적 생산체제도 확대되고 있는 실정이다.

이는 이들 세균의 biocellulose가 식물 셀룰로오스와 같은 구조를 갖지만 물리적 3차 구조는 식물 셀룰로오스와는 달리, 복잡하게 가교된 섬유 그물구조를 가지며, 현탁액 등에도 엉길 수 있어, 식품, 제약, 화장품, 섬유, 제지 등 많은 분야에서 새로운 용도로서의 가능성이 알려지고 있기 때문이다(Brown, 2002). 특히, *Acetobacter*의 몇몇 균주의 biocellulose는 지난 10년 간 초 미세섬유, 탁월한 기계적 강도, 생분해성, 높은 수분 보유능 및 높은 결정성과 같은 독특한 구조와 성질 때문에 큰 관심을 받아왔으며, 식품, 화장품 및 의료에서 원료소재로서의 이용을 비롯한 각종 산업에서의 용도가 주목되어 왔다(Chao *et al.*, 2000; 2001; Son *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2002).

Trowell(1972, 1976)은 심장계 질환, 장 질환을 비롯한 비만증, 당뇨병, 담석 등의 질병들이 식이섬유의 부족과 관련이 있다고 보고하였으며, 이후 이의 생리적 역할에 대한 연구와 관심은 크게 고조되었다(Schneeman, 1986, 1989; Reiser, 1987).

일반적으로 셀룰로오스는 불용성 섬유의 비칼로리 물질로 인체에 의해 소화되지 않고 따라서 영양원으로 취급되지 않았지만(冲增 哲, 金谷昭子. 1983), biocellulose의 경우, 총 식이섬유 함량는 99%나 되어 식이섬유로서의 특성이 크게 기대된다. 하지만 그동안 식이섬유로서의 biocellulose에 대한 특성은

Corresponding author: Shin-Young Lee, School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
Phone: 033-250-6273, Fax: 033-250-6273
E-mail: leesy@kangwon.ac.kr

보고되지 않아 검토의 필요성이 매우 높다.

저자 등은 최근 산업적 생산체제가 점차 확대되고 있는 미생물 셀룰로오스의 기능성 식품 소재나 성분으로의 잠재성을 조사하고자 하는 연구의 일환으로, *Acetobacter xylinum*의 물성기능 특성을 보고한 바 있다(Lee *et al.*, 2005).

본 연구에서는 식이섬유로서의 생리 기능성에 대한 정량적인 기초자료를 마련하고자 biocellulose의 열풍 및 동결건조 분말제품을 시료로 *in-vitro* glucose 및 bile acid 흡수지연효과 등의 생리 기능성을 표준시료(α-cellulose)와 비교하면서 조사하였으며, 이로부터 혈당강하나 콜레스테롤 저하 소재로서의 가능성을 탐색하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용한 biocellulose는 *Acetobacter xylinum*의 정치배양에 의해 생산된 것이었다. 열풍(biocellulose AD) 및 동결건조(biocellulose FD)한 100 mesh 분말을 사용하였으며, (주) 엔바이오테크놀로지로부터 제공 받았다. 비교 시료로 사용한 α-cellulose는 Sigma-Aldrich사의 제품(product no. C8002, USA)을 사용하였고, 각 재료는 4°C의 냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

생리 기능성 분석

Biocellulose의 식이섬유로서의 특성을 알아보기 위해 식이섬유가 투석막을 빠져나오는 glucose 및 bile acid의 투과를 지연하는 원리를 이용한 Adiotomre 등(1990)의 반투막 투과 실험법으로 각각 다음과 같이 glucose 및 bile acid의 흡수지연효과를 측정하였다.

1) *In-vitro* 법에 의한 glucose 흡수 지연효과

Glucose 흡수 지연효과는 유리상태의 glucose는 투석막을 그대로 통과하지만 고분자 물질에 흡착된 glucose는 투석막을 통과하지 못하므로 투석 외액의 glucose 농도를 분석하여 측정하였다. 넓이 3.2 cm^2, 길이 10 cm의 투석막(Sigma D7884 : M.W. cut-off <1200)을 0.1% sodium azide 용액에 하룻밤 담근후 사용하였다. 투석막의 한쪽 끝을 목면실로 단단하게 묶은 후 투석막 내부에 시료 0.2 g을 넣고, 여기에 glucose 36 mg을 용해시킨 0.1% sodium azide 용액 6 ml를 넣었다. 반대편의 투석막 끝도 단단히 묶은 후 150 ml 용량의 용기에 넣고 14시간 동안 수화시켰으며, 이 때 대조구의 경우는 시료만을 제외하여 마찬가지 방법으로 실시하였다. 수화 종료 후 용기에 0.1% sodium azide 용액 100 ml를 첨가하였으며, 이를 37°C로 유지한 진탕 항온조에서 100 rpm으로 24시간 동안 투과실험을 실시하였다. 일정시간(30분~24시간) 간격으로 투석외액 1 ml씩을 취하여 glucose 함량을 측정하였으며, 흡수 지연 효과를 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Glucose retardation index}(\%) = 100 - \frac{\text{Total glucose diffused from sack containing fiber}}{\text{Total glucose diffused from sack without fiber}} \times 100$$

이 때, glucose 함량은 DNS 또는 ABTS 법(White와 Kennedy, 1981)에 따라 측정하였다. ABTS 법에서는 0.1% sodium azide 용액에 용해시킨 시료 및 표준 glucose 용액 1 ml에 ABTS 시약(glucose oxidase 60 mg, peroxidase 6 mg 및 ABTS 50 mg을 0.12M phosphate buffer 용액 250 ml에 용해한 것) 5 ml를 첨가한 후, 실온에서 30~40분간 방치하였고, 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

2) *In-vitro* 법에 의한 bile acid의 흡수 지연효과

Bile acid 흡수 지연효과는 glucose의 경우와 마찬가지로, 유리상태의 bile acid가 투석막을 빠져나오므로 투석막 내부에 시료 0.2g을 넣고 0.1% sodium azide 용액으로 조제한 0.05M phosphate brffer(pH 7.0)에 1L당 15mmole taurocholic acid (Sigma T-4009)를 녹인 용액 6 ml를 넣어 투석막 끝을 단단히 묶었다. 이를 150 ml 용량의 용기에 넣어 14시간 동안 수화시켰으며, 대조구의 경우는 시료만을 제외하여 마찬가지로 실시하였다. 여기에 0.1% sodium azide 용액으로 조제한 0.05M-phosphate buffer(pH 7.0) 100 ml를 첨가한 후 37°C의 항온수조에서 100rpm으로 72시간 동안 진탕하였다. 일정시간 간격으로 1 ml씩을 취하여 bile acid 함량을 측정하였으며, bile acid 흡수 지연 효과는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Bile acid retardation index}(\%) = 100 - \left(\frac{\text{Total bile acid diffused from sack containing fiber}}{\text{Total bile acid difused from sack without fiber}} \times 100\right)$$

이 때, bile acid 함량은 Boyd 등의 방법(1966)에

따라 측정하였다. 즉 bile acid(Sigma B-8756) 용액 1 ml에 70% H_2SO_4 용액 5 ml를 넣고 5분 후에 0.25% furfural 용액 1 ml를 각각 첨가하였다. 60분간 방치하여 분홍색이 최대로 발색된 후의 최대 흡수 파장인 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Glucose의 흡수 지연효과

식이섬유의 가둠효과(Schneeman; 1987)를 이용하여 투석막을 통해 투석되는 glucose의 양을 측정하는 *in-vitro*법에 의한 glucose 흡수 지연 효과는 *in-vivo* 혈당강하 실험과 매우 높은 상관성을 갖는 것으로 잘 알려져 있다(Adiotomre *et al*: 1990). 따라서 일정 농도의 glucose 용액이 들어있는 투석막내에 biocellulose 시료(AD, FD)를 넣고 투석막을 통해 투석되는 glucose의 양을 24시간 동안 일정시간 간격으로 측정하였으며, 그 결과를 glucose 투과율(%)의 경시변화로서 Fig. 1에 나타내었다.

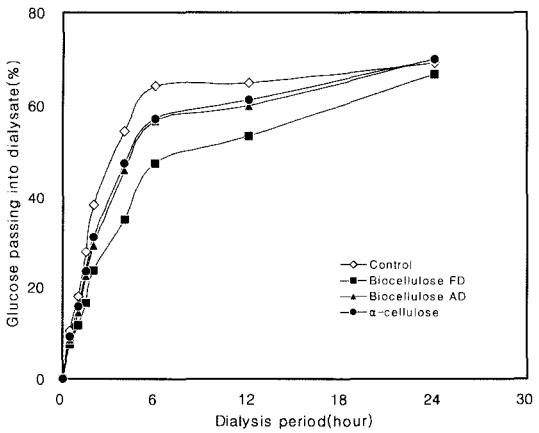

Fig. 1. Glucose movement across dialysis bag in the presence of biocelluloses (AD, FD) and α-cellulose.

대조구의 glucose 투과율은 투석 초기 6시간에 급격히 증가하여 약 64.2%에 달하였고, 이후 미미하게 증가하여 24시간 후에 약 70%를 나타내었다. 반면, Biocellulose AD, FD 및 α-cellulose의 셀룰로오스 첨가구는 시료간의 큰 차이 없이 대조구와 비슷한 경향을 나타내었으나 각 대응시간에서 대조구보다 glucose의 투과율이 낮았으며, 그 값은 6시간 후에 약 47.5~57.2%이었다. 하지만 24시간 후에는 대조구와 마찬가지로 약 70%의 glucose 투과율을 보여 glucose 투과의 저해효과는 초기에 더욱 유효한 것으로 나타났다.

따라서 투석 6시간 이내에 셀룰로오스 시료들이 glucose의 투과를 지연시킴을 알 수 있는데, 이는 Schneeman(1987)에 의하면 식이섬유가 그 구조내에 glucose를 가두어 두는 효과(entrapping effect)에 기인한다.

한편, 투석 초기의 glucose retardation index(%)는 glucose의 흡수 지연 효과를 판단하는 지표로 이용되므로, 초기 30, 60 및 120분에서의 glucose 흡수 억제 지수를 구하였으며, 그 결과는 Table 1과 같다.

표에서 보는 바와 같이, 투석 30~120분 경과시 biocellulose AD의 glucose 흡수 억제지수값은 18.25%에서 23.47%로 증가하였으나 biocellulose FD는 28.57에서 38.26% 수준을 유지하여 FD가 AD보다 glucose의 흡수 지연효과가 더 우수함을 알 수 있었다. 또 이 값은 같은 기간 중 glucose 흡수 억제지수가 11.64-18.89% 수준을 유지한 α-cellulose보다는 매우 높았다. α-cellulose의 실험값은 투석 30분 경과시 불용성 식이섬유인 시판용 α-cellulose의 glucose 흡수지연효과는 10.5%라고 한 이와 이(1996)의 보고와 비교적 일치하였다.

일반적으로 보수력과 점성이 높은 수용성 식이섬유에서 glucose 흡수 억제지수가 높은 것으로 알려지고 있는데(Schneeman, 1987), biocellulose FD의

Table 1. Retarding effects of biocelluloses and α-cellulose on glucose movement

Samples	Dialysis for 30 min		Dialysis for 60 min		Dialysis for 120 min	
	Glucose in dialyzate (mg/dl)	GDRI(%)[2)]	Glucose in dialyzate (mg/dl)	GDRI(%)	Glucose in dialyzate (mg/dl)	GDRI(%)
Control	3.78±0.35[1)]	0.00	6.45±0.47	0.00	13.80±1.11	0.00
Biocellulose FD	2.70±0.17	28.57	4.20±0.40	34.90	8.52±0.90	38.26
Biocellulose AD	3.09±0.36	18.25	5.25±0.39	18.62	10.56±0.98	23.47
α-cellulose	3.33±0.29	11.90	5.70±0.53	11.64	11.19±0.86	18.91

[1)]Mean±S.D.
[2)]Glucose dialysis retardation index.

높은 glucose 흡수 억제효과는 전보(Lee *et al.*; 2005)에서 보고한 바와 같이 biocellulose FD의 높은 보수력이나 점성에 기인하는 것으로 생각된다. 아울러, biocellulose FD와 AD의 차이도 이러한 보수력의 차이로 보이는데, 전보(Lee *et al.*; 2005)에서 보고한 바와 같이, biocellulose FD는 낮은 결정화도와 높은 표면의 다공성으로 biocellulose AD나 α-cellulose보다 더 높은 보수력을 나타내었다.

현재 시판용 식이섬유중 수용성 식이섬유인 alginic acid, guar gum, CM-cellulose 및 citrus pectin의 투석 30분 경과시 glucose 흡수 억제지수는 약 30% 수준이다. 따라서 biocellulose FD(28.57~38.26% 수준)는 이들 이상의 값 범위로, 비교적 매우 높은 glucose 흡수지연 효과가 있음을 보여주는 결과로, 이들 glucose 흡수지연 억제에 의한 항 당뇨효과가 기대된다.

Bile acid의 흡수 지연 효과

*In-vitro*법에 의한 bile acid 흡수 지연 효과를 알아보기 위하여 glucose에서와 마찬가지 방법으로 투석막을 통해 투석되는 bile acid의 양을 60시간 동안 경시적으로 측정하여 조사한 결과는 Fig. 2와 같다.

대조구의 bile acid 투과율은 초기 12시간까지 비교적 급격히 증가하다가 이후 60시간까지 서서히 증가하여 60시간 후에 거의 60%이상 투과하였다. 이러한 경향은 glucose 투과와 비슷하였으나, glucose의 경우보다는 비교적 서서히 이루어졌는데, 이는 bile acid의 분자량(Mw= 538)이 glucose의 분자량(Mw=180)보다 크기 때문인 것으로 생각되었다(이경숙과 이서래, 1996).

시료 첨가구의 경우는 셀룰로오스 시료 모두 각 대응하는 시간에서 bile acid의 투과를 지연시켰다. 그러나 시료간의 차이를 나타내어 투과는 biocellulose

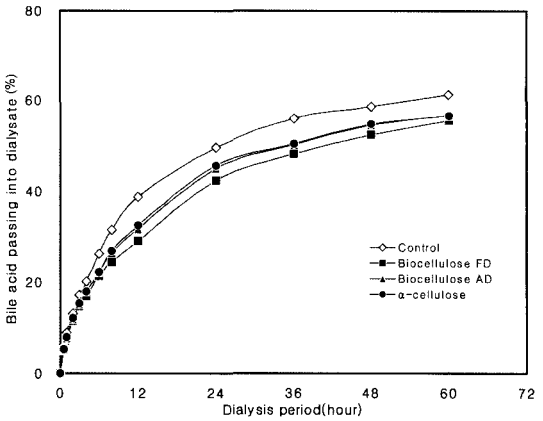

Fig. 2. Bile acid movement across dialysis bag in the presence of biocelluloses(AD, FD) and α-cellulose.

FD>α-cellulose≒biocellulose AD순으로 억제되었다. Bile acid의 흡수 지연효과를 보다 명확히 알아보기 위하여 glucose에서와 마찬가지로 투석 초기 1~4시간 사이의 bile acid 흡수 억제지수(bile acid retardation index, %)를 구하였으며, 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

투석 1~4시간에서 각 시료의 bile acid 억제 지수는 7.86~16.74% 범위 값이었는데, glucose 흡수 지연효과와는 달리, 시간경과에 따른 bile acid 억제지수값은 뚜렷한 증가 경향을 보이지는 않았다. 투석 1시간 후의 bile acid 억제지수를 보면, biocelluose FD가 16.74%, biocellulose AD가 12.88%로 α-cellulose의 10.749%보다 높았다. 이 값은 시판용 불용성 식이섬유인 α-cellulose의 bile acid 흡수 억제지수가 8.9%정도라고 한 이와 이(1996)의 보고와 비교적 일치한다. 또, 이는 시판용 식이섬유중 수용성 식이섬유인 bile acid 흡수 억제지수가 citrus pectin 30.4%, guar gum 22.3%, alginic acid 17.0% 및 apple pectin 13.4%임을 고려할 때(이와 이, 1996), biocellulose의

Table 2. Retarding effects of biocelluloses and α-cellulose on bile acid movement

Samples	Dialysis for 1 hour		Dialysis for 2 hour		Dialysis for 4 hour	
	Bile acid in dialyzate (mmol/L)	BDRI(%)[2)]	Bile acid in dialyzate (mmol/L)	BDRI(%)	Bile acid in dialyzate (mmol/L)	BDRI(%)
Control	1.33±0.02[1)]	0.00	1.96±0.1	0.00	3.04±0.04	0.00
Biocellulose FD	1.11±0.01	16.74	1.72±0.08	12.23	2.54±0.03	16.36
Biocellulose AD	1.16±0.02	12.88	1.80±0.09	8.15	2.70±0.02	11.10
α-cellulose	1.19±0.05	10.74	1.80±0.12	7.86	2.70±0.05	10.92

[1)]Mean±S.D.
[2)]Bile acid dialysis retardation index.

bile acid 억제지수값은 alginic acid나 apple pectin과 비슷한 값으로 비교적 bile acid 흡수 지연효과가 양호함을 보여주는 결과임도 알 수 있다.

Story(1985)는 점질성의 식이섬유는 장에서 당 흡수를 지연시켜 혈중 인슐린값을 감소시킬 뿐만 아니라, bile acid와의 결합에 의해 유리 상태의 bile acid 함량을 감소시켜 재흡수되는 담즙산의 함량에 변화를 줌으로써 궁극적으로 지방대사에 영향을 미치고 cholesterol 합성을 저하시킨다고 하였다.

요 약

*Acetobacter xylinum*의 정치배양에 의해 생산된 biocellulose를 열풍 또는 동결건조하고 분말화(100 mesh)한 다음, 이들의 *in-vitro* 포도당 및 담즙산 흡수 지연 효과를 조사하였다. Biocellulose는 투석막을 이용한 2시간 동안의 *in-vitro* glucose 및 bile acid 흡수 지연 실험에서 각각 28.57~38.26% 및 7.86~16.74%의 흡수지연효과를 나타내었다. 특히, 동결건조한 biocelluose FD의 glucose 및 bile acid의 흡수 지연 효과는 대조시료로 사용한 시판용 α-cellulose보다 1.5~2배 더 높았다. Biocellulose의 비교적 우수한 이들 glucose 및 bile acid의 흡수지연 효과는 어느 정도 당뇨 및 동맥경화 억제에의 효과를 나타내는 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 (주)엔바이오테크놀러지의 일부 연구비 지원에 의하여 수행된 결과로, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

이경숙, 이서래. 1996. *In Vitro* 법에 의한 식이섬유의 포도당 및 담즙산 흡수 지연 효과. 한국영양학회지, **29**(7): 738-746

冲增 哲, 金谷昭子. 1983. 食品高分子化學. 醫歯藥 出版株式會社. 東京, pp.116-121

Adiotomre, J., Eastwood, M.A., Edwards, C.A., and Brydon, W.G. 1990: Dietary fiber ; *In Vitro* methods that anticipate nutrition and metabolic activity in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **52**: 128-134

Boyd, G.S., Eastwood, M.A., and MacLean, N. 1966. Bile acids in the rat ; Studies in experimental occlusion of the bile duct. *J. Lipid Research* **7**: 83-94

Brown, R J. 2002. POSITION PAPER, Microbial Cellulose: A New Resource for Wood, Paper, Textiles, Food and Specialty Products. http://www. botany. utexas. edu / facstaff/facpages/mbrown/position1.htm

Chao, Y.P., Ishida, T., Sugano, Y. and Shoda, M. 2000. Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L Internal-Loop Airlift Reactor, *Biotechnol. Bioeng.*, **68**: 345-352.

Chao, Y. P., Sugano, Y. and Shoda, M. 2001. Bacterial Cellulose Production under Oxygen-Enriched Air at Different Fructose Concentrations in a 50-L Internal Loop Airlift Reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**: 673-679.

Cheng, H.P., Wang, P.M., Chen, J.W. and Wu, W.T. 2002. Cultivation of *Acetobacter xylinum* for bacterial cellulose production in a modified airlift reactor. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **35**: 125-132

Lee, S.Y., Jeon, J.R., and Yang, Y.K. 2005. Characteristics of the physical function of biocellulose from *Acetobacter xylinum*. *Food Engineering Progress*, **9**(3): 182-191

Marchessault, R. H. and Sundararajan, P.R. 1983. Cellulose. In *The Polysaccharides,* Vol. 2. Aspinall, G.O. Ed., Academic Press, New York, pp.12-95

Reiser, S. 1987. Metabolic effects of dietary pectins related to human health. *Food Technol.* **41**: 91-99

Schneeman, B.O. 1986. Dietary fiber: Physical and chemical properties, methods of analysis, and physiological effects. *Food Technol.* **40**: 104-110

Schneeman, B.O. 1987. Soluble vs. insoluble fiber - Different physiological responses. *Food Tenhnol.* **41**: 81-82

Schneeman, B.O. 1989. Dietary fiber. *Food Technol.* **43**: 133-139

Son, H.J., Heo, M.S., Kim, Y.G., and Lee, S.J. 2001. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **33**: 1-5

Story, J.A. 1985. Dietary fiber and lipid metabolism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,* **180**: 447-452

Trowell, H. 1972. Dietary fiber and coronary heart diseases. *Rev. European Studies Clin. Biol.* **17**: 345-349

Trowell, H. 1976. Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* **29**: 417-427

White, C.A., and Kennedy, J.F. 1981. Manual and automated spectrophoto- metric techniques for the detection and assay of carbohydrates and related molecules. In *Techniques in Carbohydrate Metabolism*(H.L. Kornberg, J.C. Metcalfe, D.H. Northcote, C.I. Pogson, and K.F. Tipton Ed.), Elsevier, New York, B312, pp1-64

Yang, Y. K., Park, S. H., Hwang, J. W., Pyun, Y. R. and Kim, Y. S. 1998. Cellulose production by *Acetobacter xylinum* RBC5 under Agitated condition. *J. Ferment. Bioeng.* **85**: 312-317