

분비형 Microbial 폴리글루코사민의 활용과 주류의 기능성 향상



Lee Yong-hyun

경북대학교 유전공학과 교수

목차

- I. 서론
- II. 갑각류 및 미생물 세포벽 유래갑 Chitosan의 기능성 및 활용분야
- III. 분비형 Microbial Polyglucosamine의 생산균주, 구조 및 물성
- IV. 분비형 Microbial Polyglucosamine과 주류의 기능성 향상
- V. 결론

I. 서론

Chitin은 갑각류와 곤충류의 껍질 및 균류의 세포벽의 주성분으로, cellulose 다음으로 풍부하게

존재하는 재생 생물자원이며 연간 생합성량은 1109 톤 정도로 추정되고 있다. Chitosan은 위의 chitin을 탈단백, 탈아세틸화하여 제조하며, 반응성이 높은 아민기를 함유하고 있어 chitin에 비해 산용해성이 증가되고 분자량에 따라 다양한 생리활성을 나타낸다. 1980년대 이후 일본을 비롯한 세계 각국에서 chitosan의 기능성을 활용하기 위한 연구가 활발히 진행되어 현재 식품, 의료, 화장품 및 농업소재로서 그 가능성이 입증되고 있다.

그러나 기존의 상품화된 chitosan의 제조는 갑각류의 껍질을 회수하고 화학적 정제공정을 거쳐 대량으로 생산하는 기반생산기술이 확립되어 있는 하나, 원료수급 불안, 제조 과정 중 다량의 화학약품 처리로 인한 환경오염 유발 및 품질저하

등의 문제점을 수반하고 있다. 따라서 국내에서 생산되는 chitosan은 대부분 폐수처리용 저급 chitosan으로 가공되어 주로 외국으로 수출하고 있는 실정이다.

최근 chitosan을 미생물로부터 얻고자 하는 시도로 미생물의 세포벽 성분인 chitosan 및 chitosan 유도체를 다량 함유하고 있는 미생물의 선별, 기초배양, 그리고 세포벽 생합성 및 형성기작에 관한 연구들이 이루어지고 있으나, 균체 내 함량이 높지 않고 또한 분리정제에 한계가 있다. 이와 같은 갑각류 유래 chitosan의 자원 한계성과 미생물 세포벽 성분 chitosan 생산의 문제점을 대체/보완하기 위하여 본 연구실에서는 미생물이 chitosan 유사 다당류를 균체 외로 분비하는 분비형 microbial polyglucosamine의 개발과 기능성 신소재로서의 생산 및 활용에 관한 연구를 수행하고 있다.

본 논문에서는 갑각류 및 세포벽 유래 chitosan의 활용 현황과 이를 대체/보완할 수 있는 분비형 microbial polyglucosamine의 구조, 물성 및 생산에 대하여 본 연구실에서 수행한 연구결과를 소개하고자 하며, 생산된 분비형 microbial polyglucosamine을 주류의 기능성 향상을 위하여 활용할 수 있는 가능성 대해 기술하고자 한다.

II. 갑각류 및 미생물 세포벽 유래 Chitosan의 기능성 및 활용분야

Fig. 1과 같이 chitosan의 분자구조는 D-

glucosamine이 $\beta(1\rightarrow4)$ 로 연결되어 있으며 [16], 6탄당인 glucose의 두 번째 탄소에 아민기가 결합된 아미노당으로 구성된 분자량 100만 전후의 다당류로써 구성당과 branch 결합의 종류에 따라 무수한 형태를 이룰 뿐 아니라 분자량에 따라 다양한 물성 및 기능성을 나타내게 된다 [9].

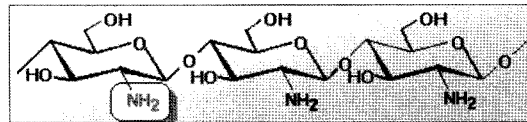


Fig. 1. 갑각류 유래 chitosan의 구조

갑각류 유래 chitosan의 주성분은 glucosamine으로 기능성 및 활용분야를 정리하여 Table 1에 나타내었다. Chitosan은 유산균 증식촉진, 혈중 콜레스테롤 조절, 혈당 저하, 혈중 지질조절, 항암 및 혈액응고 방지효과 등 인체에 다양한 생리활성을 나타내고 있어 현재 건강기능식품 첨가제로 가장 널리 활용되고 있다 [5,17]. 또한 항균성, 토양 개량 효과, 식물생장 촉진작용 등 다양한 기능성으로 인해 바이오 농업 및 임업분야의 기능성 생물소재로 대두하고 있으며, 무독성, 생분해성 고분자로 수술용 봉합사, 인공 생체막 제조 등 의료 산업 소재로 활용분야를 넓히고 있다 [1]. 그 외에도 의류, 폐수 처리 및 화장품 분야 등 산업 전반에 걸쳐 다양한 용도로 사용되고 있다 [17].

이와 같은 갑각류 유래 chitosan은 1970년대 말 수산폐기물 재활용의 개념으로 산업화가 추진된

Table 1. 갑각류 유래 chitosan의 활용분야 및 기능성

활용분야	기능성
건강기능식품소재	콜레스테롤 저하, 혈당과 체중조절, 항암 치료제 등
산업기본소재	섬유, 화장품, 생활용품 폐수(중금속)처리, 사진용 필름, 염료, 제지 등
의료산업소재	인공피부, 수술용봉합사, 인공투석막 등 치료 보조용
일반식품 첨가제 소재	가공식품(두부, 황태, 간장, 음료 등에 첨가) 기타 기능성 식품첨가제
농업 생물소재	식물생육촉진제, 무공해 농약, 토양개량제, 비료첨가물
기타	방사능 오염제거, 액정, 약기제조, 이온교환막 등 어류 건조 보조제, 양어 사료, 관상어, 가축사료 등

이래, 고농도의 HCl과 NaOH를 처리하는 화학적 제조 및 정제방법이 대량생산 기술로 확립되어 있다. 그러나 수산자원인 갑각류의 수확변동에 따른 원료수급 불안 외에도, 제조 과정 중 다량의 화학약품 처리로 인한 환경오염 유발 및 품질저하 등의 생산과정상의 여러 문제를 야기하고 있다. 이런 화학적 처리방법을 대체하기 위하여 chitin deacetylase 및 chitolytic enzyme 등의 효소를 이용한 생물학적 방법으로 chitosan을 생산하려는 연구가 활발히 진행되어 20여년이 경과하였으나 [11,12], 갑각류 유래 chitosan의 결정화도가 높고 분자량이 큰 물성으로 인해 생물학적 방법으로 가공하기 어려워 생산현장에 직접 적용되지 못하고 있으며, 여전히 화학적 처리 및 정제방법에 의존하고 있는 실정이다 [1]. 이와 더불어 미생물 세포벽 성분인 polyglucosamine 유도체를 함유하고 있는 미생물을 배양함으로써 polyglucosamine을 생산하기 위한 미생물 기초배양, 세포벽 생합성 및 형성기작에 관한 연구들이 이루어지고 있으나 생산량이 많지 않고 처리, 가공하기 위해서는 갑

각류 유래의 chitosan과 유사한 화학적 정제방법을 따르게 되는 어려움이 있다 [7,13]. 따라서 이와 같은 갑각류 유래 chitosan의 자원의 한계성과 미생물 세포벽으로부터 추출하는 방법의 제한성을 대체/보완하기 위한 새로운 시도가 요망되며, 본 연구실에서 수행한 미생물이 세포벽 밖으로 분비생산하는 분비형 microbial polyglucosamine이 그 대안이 될 수 있다.

III. 분비형 Microbial Polyglucosamine의 생산균주, 구조 및 물성

분비형 microbial polyglucosamine에 관한 연구는 본 연구진과 일본 Fujita 그룹의 결과만이 보고되어 있다. Fujita 등은 미생물이 세포외로 분비생산하는 bioflocculant의 개발에 관심을 갖고 다당류를 분비하는 미생물을 탐색하던 중 응집활성이 높은 hexosamine 함유 다당류를 분비하는 Citrobacter 속 박테리아를 선별하였다 [2]. 또한

세포의 다당류의 대량생산을 위한 배양공학적 연구를 수행한 결과, crude polymer의 초기 생산량을 0.2 g/L에서 최대 12.8 g/L까지 생산량을 높이는 성과를 얻고 있다 [3,6]. 그러나 crude polymer를 분리정제하여 얻은 biopolymer 중의 hexosamine 함량은 30% 내외로 비교적 낮았다.

본 연구실의 Son 등 [5]은 분비형 polyglucosamine을 세포의 다당류의 형태로 분비하는 신규 *Enterobacter* 속 박테리아를 확보한 바 있다 (Fig. 2). 신규 *Enterobacter* sp.가 생산하는 microbial polyglucosamine은 화학적 혹은 효소적 방법으로 탈단백 과정을 거친 후 동결건조 하여 분말형태로 회수할 수 있다. 확보한 microbial polyglucosamine의 평균분자량은 105 kDa으로 chitosan에 비해 저분자 다당체임을 확인했고, 구성당은 95% 이상이 D-glucosamine으로 chitosan과 주요 구성당이 일치하였다.

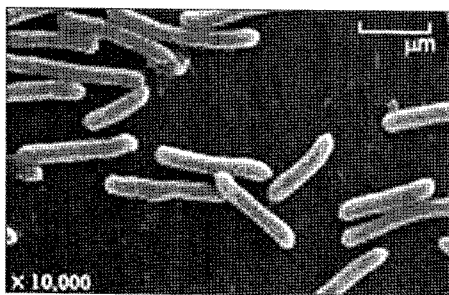


Fig. 2. 신규 분리한 *Enterobacter* sp.의 전자현미경(SEM) 사진

또한 microbial polyglucosamine의 일반적 특성을 감각류 유래 chitosan과 비교해 본 결과, 양이온성 고분자 다당체인 chitosan은 산성 용액에 서만 용해되나, microbial polyglucosamine은 수

용성이며 산용해도도 우수했고, 점도가 낮고 보존성이 높았으며, 화학적 정제과정의 축소로 환경부담이 낮았다. 또한, microbial polyglucosamine의 관능기 분석을 위해 FT-IR spectrum을 비교해 본 결과 chitosan과 매우 유사한 패턴을 나타냄을 확인하였다 (Fig. 3).

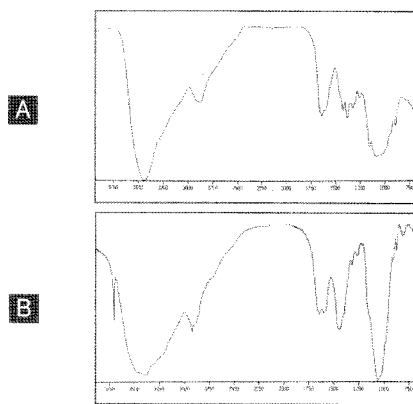


Fig. 3. Chitosan (Sigma, U.S.A.) (A) 및 *Enterobacter* sp.의 biopolymer (B)의 FT-IR spectrum 비교

그리고 Microbial polyglucosamine의 ¹³C NMR 결과, 감각류 유래 chitosan과 같은 D-glucosamine 단량체로 구성되어 있으며, (1,4)-결합으로 연결되어 있음을 확인하였다 (Fig. 4).

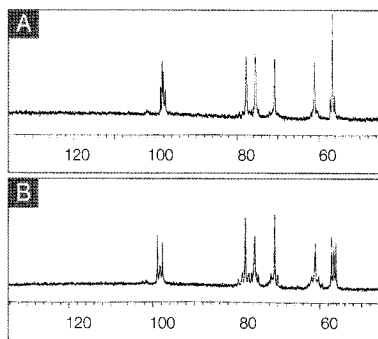


Fig. 4. Chitosan (Sigma, U.S.A.) (A) 및 *Enterobacter* sp.가 분비하는 biopolymer(B)의 ¹³C-NMR Spectrum의 비교

IV. Microbial Polyglucosamine의 분비생산과 대사공학

이와 같은 chitosan과 구조가 유사한 고기능성 생리활성 biopolymer인 분비형 microbial polyglucosamine을 미생물로부터 대량생산하기 위해서는 배양공학적 기법과 생합성 및 대사과정을 조절하는 대사공학의 활용이 요망된다. 확보된 *Enterobacter* 속 박테리아는 acetate를 탄소원으로 첨가하였을 때 polyglucosamine을 세포외로 분비하는 특성을 지녔으며, 배양공학적 특성을 고려하여 pH를 8.0으로 유지하며 5L 발효조에서 fed-batch 방법으로 72시간 동안 배양하여 때 최대 1.53 g/L의 crude biopolymer를 생산하였다.

(Fig. 5)

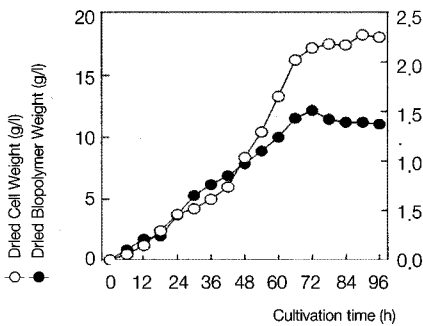


Fig. 5. *Enterobacter* sp. 생장에 따른 분비형 microbial polyglucosamine의 생산

또한 미생물 대사과정 중 polyglucosamine의 기본단위인 glucosamine을 합성하는 hexosamine pathway 관련 대사산물 및 작용효소는 Fig. 6과 같다 [4]. 세균인 *Enterobacter* sp.는 분비형 microbial polyglucosamine 생합성

을 위해 이와 유사한 대사경로를 가질 것으로 유추된다. Hexosamine pathway는 중성당인 fructose-6-phosphate가 glutamine의 아민기를 수용하면서 아미노당인 glucosamine-1-phosphate로 전환되면서 시작되며, 이 반응을 촉매하는 효소인 glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase가 hexosamine pathway의 첫 번째 단계의 효소인 동시에 효모, 곰팡이의 세포벽 유래 chitin의 생합성을 조절하는 주요 효소로 알려져 있다 [10,14].

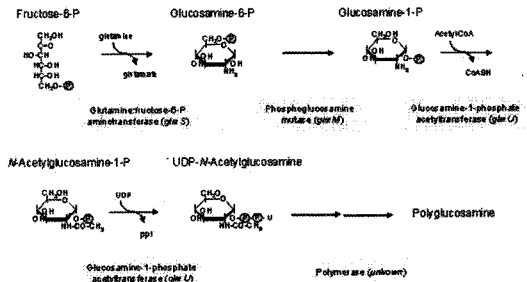


Fig. 6. Biosynthesis pathway of hexosamine

따라서 hexosamine pathway의 주요 효소를 생산하는 glmS, glmU, 그리고 glmM 등의 유전자를 클로닝하여 모균주에서 그 발현을 조절함으로써 polyglucosamine 생합성 경로를 변화시킬 수 있고, 이와 같이 대사 재설계된 형질전환 균주를 구축함으로써 polyglucosamine 생합성 대사의 흐름을 조절할 수 있을 것으로 사료되며, 이러한 대사공학적인 접근으로 기능성 microbial polyglucosamine의 생산량 증대를 꾀할 수 있을 것이다.

IV. 분비형 Microbial Polyglucosamine과 주류의 기능성 향상

전 세계적으로 웰빙을 위한 기능성 식품 및 친 환경 소재에 대한 관심 고조됨에 따라 2000년대 초반부터 국내 주류업계에서도 기능성 강화를 차별화 전략으로 내세우고 있다. 특히 웰빙에 민감한 20-30대의 술 소비량이 증대되고 여성 음주 인구가 증가함에 따라, 전통주 뿐 아니라 맥주 및 소주에 기능성을 가미하여 다양한 형태의 주류를 개발하고 있다.

2001년 이후「주류산업」지의 신제품 개발동향 자료에 의하면 [18,19,20], 국내에서도 숙취해소 효과가 있는 녹차 성분의 소주와 전통 약주를 비롯해 동맥 경화와 비만 방지 등에 효과가 있는 유기산과 폴리페놀 성분을 강화한 건강 와인이 출시되었다. 또한 14가지의 한약재를 가미한 전통 약주가 선보였고, 신세대 음주층을 겨냥한 알코올 도수 5.6도짜리의 기능성 맥주가 판매되었다. 그리고 메밀과 뽕잎을 첨가한 기능성 약주, 술 해독 기능이 뛰어난 헛개나무열매 추출액을 첨가하여 숙취를 줄여주는 기능성 증류주 등도 출시되었다.

Chitosan 및 그 유도체들은 현재 다양한 식품 첨가제로 개발되어 기능성 식음료 및 건강보조식품 산업분야의 시장 점유율이 꾸준히 증가하고 있다. Chitosan의 2001년 기준 시장규모는 350억 원에 달하며 이는 국내 기능성 식품 시장의 22%에 해당되었다 [8]. 따라서 분비형 microbial polyglucosamine을 기능성 소재로써 주류산업에

활용하는 것은 웰빙과 기능성을 추구하는 시대적 흐름에 매우 적합한 주류개발 사례가 될 수 있으리라 사료된다.

Polyglucosamine은 chitosan과 마찬가지로 분자량에 따라 그 기능성이 다양할 것으로 사료되며, 갑각류 외피에서 추출되어 정제되는 chitosan의 경우 물성이 견고하고 용해도가 낮아 생물학적 방법으로 가공하기 어려운 반면 분비형 polyglucosamine은 수용성이며 산용해도가 우수할 뿐 아니라 분자량도 비교적 작기 때문에 다양한 분해효소에 의해 저분자화가 가능할 것으로 보인다.

또한 서울대 이계호 교수는 국제주류심포지움에서 주류의 chitooligosaccharide 함량을 증가시키기 위해 발효시 chitolytic 효소 또는 이를 분비하는 균주와의 혼합배양 및 저장 숙성에 의해 발효균주 세포벽의 chitooligosaccharide로의 분해에 관한 연구 필요성을 제기하였으며 [21], 본 연구실에서도 발효 후 chitooligosaccharide를 첨가하여 기능성을 향상시킨 건강 주류 생산에 대한 연구방법에 대한 가능성을 제기한 바 있다 [22]. 앞으로 분비형 microbial polyglucosamine 뿐만 아니라 분해효소를 이용한 polyglucosamine 올리고당 생산 및 활용에 대한 연구가 병행된다면 다양한 기능성 주류 첨가 소재로써 개발이 가능할 것이다.

V. 결론

앞서 기술한 바와 같이 chitosan과 구조적으로 유사한 microbial polyglucosamine은 다양한 기능성을 갖추어 의약, 식품, 주류산업, 농업, 의류, 폐수처리 및 화장품 등 산업분야에 많이 활용될 가능성이 크다. 또한 생체 의학적으로도 무독성, 수용성 그리고 생분해성이라는 장점이 있어 기능성 생물소재로서의 가치가 높다.

또한 polyglucosamine과 이에서 유래되는 화합물들의 기능성을 유용하게 활용하기 위한 연구와 함께 polyglucosamine 유래의 기능성 화합물을 보다 효율적으로 생산하기 위한 미생물 배양공학 및 대사공학적인 연구가 수반될 필요가 있다. 특히 각종 분해 효소를 활용해 생물학적으로 polyglucosamine을 가공하고 저분자화 하는 등의 물성 개발에 대해서는 많은 가능성에도 불구하고 연구된 바가 적어 후속 연구가 수행되어야 할 것이다. 그리고 polyglucosamine 분해효소의 탐색 및 기능에 대한 검토와 우수한 생성능을 지닌 균주의 확보, 그리고 적절한 효소반응계에 관한 연구가 요망된다.

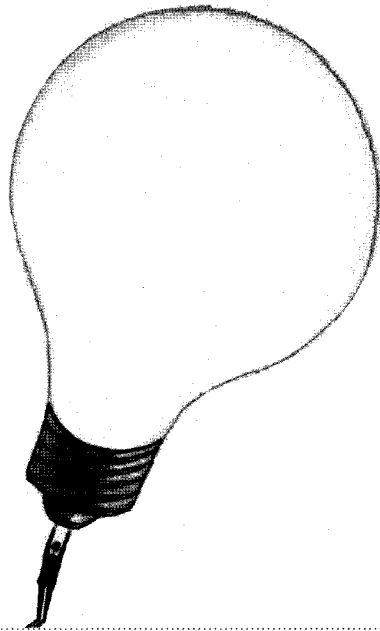
주류산업에서 chitosan 또는 microbial polyglucosamine을 기능성 소재로 이용한 예는 별로 없다. 따라서 주류 제조과정 중 microbial polyglucosamine 및 그 유도체를 첨가하여 기능성을 대폭 향상시킨 건강 주류의 생산을 추구하는 것은 경쟁력 있는 새로운 개념의 주류를 개발하는 추세에 부합하는 것이며, 이를 신중히 검토하고자 제안하는 바이다.

<참고문헌>

1. Coh BY, Lee JW, Kim ES, Park YS (2003) Industry analysis : chitosan, *J. Chitin Chitosan* 8: 127-133
2. Fujita M, Ike M, Tachibana S, Kitada G, Kim MS, Inoue Z (2000) Characterization of a bioflocculant produced by *Citrobacter* sp. TKF04 from acetic and propionic acids, *J. Biosci. Bioeng.* 89: 40-46.
3. Fujita M, Jang JH, Kim MS, Hirao T(2001) Bioflocculation production from lower-m strategy for utilization of sludge digestion liquor, *Water Science and Technology* 44: 237-243
4. Gerhard G. (1986) Bacterial Metabolism, 2nd edition. *Springer-Verlag New York Inc.* p38-93
5. Hirano S (1996) Chitin biotechnology applications, *Biotechnol. Annu. Rev.* 2: 237-258
6. Jang JH, Hia HC, Ike M, Inoue C, Fujita M, Yoshida T (2005) Acid hydrolysis and quantitative determination of total hexosamines of an exopolysaccharides produced by *Citrobacter* sp., *Biotechnol. Lett.* 27: 13-18
7. Ji JH, Yang JS, Hur JH (2003) Some cultural conditions for production of fungal

- chitosan using fermenter by *Absidia coerulea* IFO5301, *J. Chitin Chitosan* 8: 81-84
8. Kim ES, Lee JW, Yoo J, Park YS (2004) The business opportunities of chitosan market, *J. Chitin Chitosan* 9: 99-107
 9. Kurita K (1987) Industrial Poly-saccharides, *Elsevier* p377-386
 10. Lagoce A, Berre-Anton VL, Aguilar-Uscanga B, Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, Francois J (2002) Involvement of *GFAI*, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem*, 269: 1697-1707
 11. Martinou A, Kafetzopoulos D, and Bouriotis V (1995) Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes, *Carbohydr. Res.* 273: 235-242
 12. Pichyangkura R, Kudan S, Kuttiyawong K, Sukwattanasinitt M, Aiba S (2002) Quantitative production of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose from crystalline chitin by bacterial chitinase, *Carbohydr. Res.* 337: 557-55
 13. Pochanavanich P, Suntornsuk W (2002) Fungal chitosan production and its characterization, *Lett. Appl. Microbiol.* 35: 17-21
 14. Ram AFJ, Arentshorst M, Damveld RA, van Kuyk PA, Klis FM, van den Hondel CAMJJ (2004) The cell wall stress response in *Aspergillus niger* involves increased expression of the glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase-encoding gene (*gfaA*) and increased deposition of chitin in the cell wall, *Microbiology* 150: 3315-3326
 15. Son MK, Shin HD, Huh TL, Jang JH, Lee YH (2005) Novel cationic microbial polyglucosamine biopolymer from New *Enterobacter* sp. BL-2 and its bioflocculation efficacy, *J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 626-632
 16. Stanford PA, Hunchings GP (1987) Industrial Polysaccharides, *Elsevier* p363-376
 17. Synowiecki J, Al-Khateeb NA (2003) Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43: 145-171
 18. 2002년도 1/4분기 주류 신제품 (2002) 주류산업 22: 61-63
 19. 2003년도 3/4분기 주류 신제품 (2003)

- 주류산업 23: 56
20. 2004년도 2/4분기 주류 신제품 (2004)
주류산업 24: 68-70
21. 이계호 (1994) 주류산업의 현황과 신기술개발,
한국산업미생물학회, 서울, p49-74
22. 이용현, 정의준 (1994) Chitin/Chitosan
유도체의 구조, 분해효소, 이용 및 주류산업
에의 활용, 주류공업 14: 73-85



The man who makes no mistakes does not usually make anything.

실수를 저지르지 않는 사람은 통상 아무것도 이루지 못한다.

- Edward John Phelps -