

## 자일로올리고당이 장내 세균에 미치는 영향

류보경 · 이지완 · 이창승 · 현승일 · 박윤제\* · 안준배 · 양창근 · 윤세왕  
대한제당(주) 중앙연구소

**Effects of Xylooligosaccharides on the Growth of Intestinal Microflora.** Rhew, Bo-Kyoung, Ji-Wan Lee, Chang-Seung Lee, Seung-II Hyun, Youn-Je Park\*, Jun-Bae Ahn, Chang-Kun Yang, and Sewang Yoon. Department of Biotechnology, R&D Center, TS Corporation, Incheon, Korea – To investigate the effects of xylooligosaccharides on the *in vitro* growth of intestinal bacteria, various species were cultivated individually on the m-PYF medium containing a carbon source (0.5% w/v) such as xylooligosaccharides, isomaltooligosaccharides, fructooligosaccharides and sucrose, respectively. The health-promoting microorganisms such as *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* grew more effectively by xylooligosaccharides than by other carbon source, though xylooligosaccharides inhibited the growth of *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium*. At the mixed culture xylooligosaccharides exerted a preferential stimulatory effects on numbers of the health-promoting microorganisms, while xylooligosaccharides inhibited populations of potential pathogens at relatively low level. Xylooligosaccharides also maintained the acidity of culture with *Streptococcus mutans*, caries-inducing bacteria, over pH 5.0. These results suggest that xylooligosaccharides selectively promote the growth of the health-promoting microorganisms in human intestine and prevent caries by inhibiting acid production from *Streptococcus mutans*.

**Key words:** Xylooligosaccharides, intestinal microflora, health-promoting microorganisms, *Streptococcus mutans*

자일로올리고당은 그 특성이 다른 올리고당보다 뛰어나다고 알려진 기능성 감미료로서[11], 지금까지 일본에서만 생산되어 고가로 시판되어 오다가 국내에서 최근 대한제당(주) 중앙연구소에서 개발을 완료하여 시제품을 생산하는 단계에 있는 기능성 올리고당이다[20]. 국내 개발된 자일로올리고당은 한국화학연구원과 공동으로 유전독성과 급성독성을 평가한 결과 이들이 복귀돌연변이를 유발하지 않고[19] LD<sub>50</sub>값도 암수 모두 10000 mg/kg을 상회하는 것으로 보고한 바 있다[24]. 또한, 랫트에 13주간 반복 경구투여한 아급성 독성 시험에서도 최대 무작용량이 3000 mg/kg 이상으로 나타나 설탕이나 포도당과 유사한 안전성이 확보됨으로써[27], 이를 근거로 자일로올리고당을 1998년 11월에 식품공전에 등재하여 현재 식품으로 이용중이다. 자일로올리고당은 corncob와 같은 천연식물체로부터 얻은 xylan을 원료로 하여[12] 효소분해에 의해 생산되는데[29], 주요 성분으로는 xylose 두 개가 β-1,4 결합한 xylobiose와 3개 결합한 xylotriose로 알려져 있다[26]. 자일로올리고당의 감미도는 설탕의 약 40%

정도로서, 변성 개선, 난소화성 및 담즙산 흡수 지연 효과[10] 등의 기능성 뿐 아니라, 장내 미생물 균총 개선과 유익균의 활성 증진효과가 뛰어나 건강증진에 효과적이라고 알려져 왔다.

실제 사람의 장관 내에는 400여종 이상의 세균과 1000여종 이상의 아종이 존재하고 있고[5], 그 중 대표적 유익균인 *Bifidobacteria*가 성인 장관 내에서 상주하는 균총의 약 25% 정도를 차지하고 있으나[17], 나이가 들어감에 따라 그 수가 점차 감소하고 상대적으로 *Clostridium*이나 coliforms 균주가 증가하는 경향을 보인다[3]. 일반적으로 유산균으로 알려진 *Lactobacillus*와 1899년에 Tisser가 영아 분변에서 처음 분리한 *Bifidobacteria*와 같은 장내 유익균은 아미노산 생산[16], 장수와 면역력 증강에 관여하여[1] 인체가 질병에 걸리는 것을 방지하고 건강을 유지하는데 필수적이라고 알려져 왔다[18]. 이에 반해 *Clostridia*와 *Bacteroides*, coliforms 등의 균주들은 장내에서 증식하는 동안 각종 독소 또는 부패성 물질 등을 생산하여 장관 내 괴사성 염증을 유발하거나 암 발생, 그리고 면역력 감퇴 등의 원인이 되며, 사람의 나이가 들어감에 따라 현저히 수가 증가하는 것으로 보아 인간의 노화에도 관여하고 있는 것으로 추측되고 있다[18]. 이러한 여러 가지 이유로 인해 인체내의 여러 장내세균 중 *Bifidobacteria*가 인간의 건강에 대한 지표종으로 사용되어 왔다.

\*Corresponding author  
Tel. 032-770-1442, Fax. 032-770-1603  
E-mail: tsbio1@soback.kornet.net

따라서, 인체 장관 내 유해균을 감소시키고 유익균인 비피더스균을 증가시키기 위한 여러 가지 시도가 있어 왔는데, lactulose, 펙타이드, 비타민, 올리고당 등과 같은 *Bifidobacteria* 성장촉진물질을 bifidus factor[7]라고 하여 이에 대한 많은 연구가 진행되었고, 특히 bifidus factor로 작용할 수 있는 새로운 식이 소재를 찾는 연구도 활발히 진행되어 왔다[23]. 그 중 기능성 올리고당에 대한 연구가 집중되어 1995년에 미국에서 5%에 불과하던 올리고당에 관한 연구가 1999년에 14%로 증가하였고, 올리고당이 *Bifidobacteria*의 성장에 중요한 역할을 한다는 연구결과가 많이 발표되었는데[1,4,6,22,28], 이러한 결과에 의해 일본에서는 1998년 1년간 개발된 신제품 중 올리고당이 60건이나 되었다[31].

특히, 자일로올리고당은 유럽위원회기금연구사업(ENDO project)의 과제에 포함된 올리고당으로[15]으로서 현재 시판되고 있는 올리고당 중에서 가장 소량으로도 비피더스균의 활성을 증가시키고 열과 산에도 안정한 것으로 알려져 있다[13]. 국외에서는 이러한 우수한 특성을 지닌 자일로올리고당의 특성과 기능성에 대한 여러 연구 결과들이 다수 발표되고 있지만[2,9,21], 국내에서는 자일로올리고당의 기능성에 대한 연구가 거의 없는 상황이다.

이에 본 연구에서는 대한제당(주)에서 생산한 자일로올리고당이 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus* 같은 장내 유익균과 *Clostridium perfringens*를 비롯한 유해균, 그리고 충치의 원인균인 *Streptococcus mutans* 등의 성장에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다.

## 재료 및 방법

### 올리고당 준비

본 연구에 이용한 탄소원으로는 박 등[25]에서와 동일한 방법으로 제조한 자일로올리고당(대한제당; xylose 17.4%, xylobiose 38.8%, xylotriose 39.2%, xyloetraose 이상 4.6%), 이소말토올리고당(대상; 단당류 38.7%, 이당류 29.2%, 삼당류 18.6%, 사당류 8.8%, 오당류 이상 4.7%), 프럭토올리고당(제일제당; 단당류 26.2%, 이당류 16.7%, 삼당류 30.6%, 사당류 23.1%, 오당류 이상 3.4%), sucrose(Sigma)를 사용하였다.

### 균주

본 연구에 사용된 장내세균은 *Bifidobacterium longum* KCTC 3466, *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3202, *Lactobacillus casei* KCTC 3165, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3111, *Clostridium perfringens* KCTC 5014, *Bacteroides fragilis* KCTC 3688, *Escherichia coli* KCTC 1039, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Salmonella typhimurium* KCTC 1925, *Streptococcus mutans* KCTC 3065였으며, 한국생명공학연구소 유전자은행에서 분양받아 사용하였다.

### 균주의 계대 및 배양

각 균주는 BL 한천 배지(Bifido, Korea)에 계대배양 하였으며 seed는 0.05% L-cysteine·HCl이 포함된 MRS(Difco) 액체배지에서 37°C로 24시간 동안 정치배양하여 준비하였다.

탄소원 이용능을 알아보기 위한 당이용능검색배지로는 PYF를 변형한 modified-Petone-Yeast-Filds medium(m-PYF, Table 1)을 이용하였고, 100 ml serum bottle에 80 ml 씩 분주한 다음 산소를 제거한 질소가스로 headspace를 치환한 뒤 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다[22].

혼합배양 후 장내세균의 생균수 측정을 위한 선택배지로는 *bifidobacteria*는 BS medium[22], *clostridia*는 NN medium, 그리고 *bacteroides*는 VA medium[1]을 이용하였고, vacuum desiccator를 이용한 steel wool법[30]으로 혐기배양하였다.

### 장내세균에 의한 *in vitro* 상에서의 탄소원 이용능

액체배지에서 배양한 장내세균들의 탄소원 이용능을 조사하기 위해 m-PYF medium에 seed용 균주를 2.5%가 되도록 접종하여 37°C에서 72시간 동안 정치배양 하였다. 각각의 탄소원(자일로올리고당, 이소말토올리고당, 프럭토올리고당, sucrose)은 0.22  $\mu$ m membrane filter(Adventec MFS, Inc)로 멸균한 뒤 0.5%(w/v) 첨가하였다. 각 균주들의 성장 정도를 알아보기 위해 정치배양동안 주사기로 시료를 채취해 spectrophotometer(UV-260, Shimadzu)를 이용하여 600 nm에서 일정 시간 별로 흡광도를 측정하였다.

### 장내세균의 혼합배양시 *in vitro* 상에서의 탄소원 이용능

*B. longum* KCTC 3466, *B. bifidum* KCTC 3202, *C. perfringens* KCTC 5014, *B. fragilis* KCTC 3688 네 균주를 37°C에서 24시간 배양한 뒤 멸균된 MRS 액체배지로 적당량 희석하여 600 nm에서 흡광도가 0.5가 되도록 조정하였다. 앞에서 언급한 방법과 동일한 방법으로 100 ml serum bottle에 m-PYF medium을 80 ml씩 주입하여 미리 준비한

Table 1. Composition of modified-PYF medium.

Component	Amount
Yeast extract	10 g
Proteose peptone No.3 (Difco)	5 g
L-cysteine HCl	0.5 g
Tryptone	5 g
D.W.	1000 ml
Salt solution	40 ml
CaCl <sub>2</sub>	0.2 g
NaHCO <sub>3</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g
NaCl	2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
D.W.	1000 ml

다음, 위 4종의 균주를 동일양 혼합하여 2.5%(w/v)가 되도록 접종하고 37°C에서 72시간 동안 정치배양 하였다. 배양 중 시간별(8, 12, 24, 48시간)로 주사기를 이용해 채취한 시료를 anaerobic dilution solution(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.0 g, L-lysine · HCl 0.5 g, Bacto agar 0.5 g, D.W 1 L)으로 적당량 희석하여 BS, NN, VA 선택배지에 배양한 뒤 생균수를 측정하였다.

**HPLC로 자일로올리고당 이용능 분석**

각각의 균주들이 자일로올리고당을 탄소원으로 이용할 수 있는지를 좀더 정확히 알아보기 위하여 HPLC 분석을 시행하였다. 배양전과 배양후의 시료를 0.22 μm membrane filter로 제균한 뒤 sucrose, 자일로올리고당 표준물질(xylose-xylopentaose)과 함께 injection하여 각각의 함량을 정량하였다. HPLC는 Waters system과 RI detector(R401)를 사용하였고, column은 Sugar-PAK column(300 mm×6.5 mm)을 사용하여 70°C 온도를 유지하며 0.1 mM Ca-EDTA water solution을 이동상으로 하여 0.4 ml/min의 유속으로 분석하였다.

***Streptococcus mutans* 배양액의 pH 변화에 대한 올리고당의 영향**

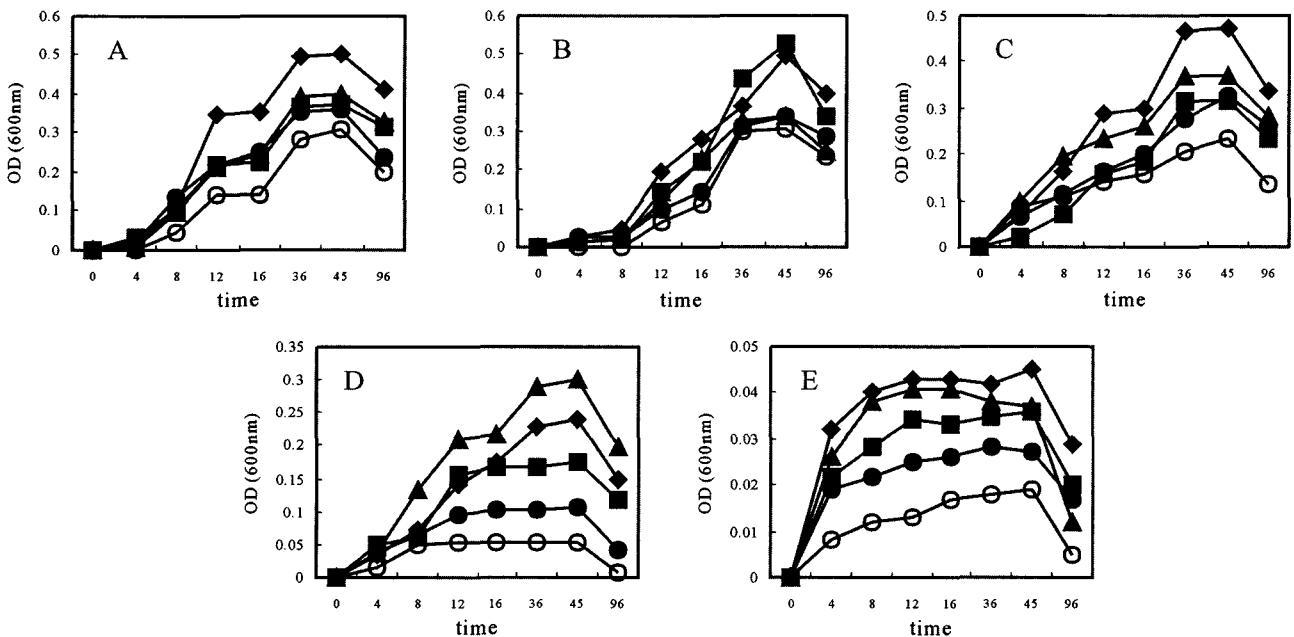
충치를 유발하는 요인중의 하나인 *S. mutans*의 증식을 자일로올리고당이 억제하는지 여부를 알아보기 위해 m-PYF 당이용능검색배지에 0.5%(w/v)의 자일로올리고당을 첨가한 뒤 *S. mutans*를 배양하였다. 그 외 비교대상으로는 sucrose

와 이소말토올리고당, 프럭토올리고당을 사용하였다. 균주는 Brain Heart Infusion(Difco) 액체배지에서 12시간 배양하여 준비한 seed를 m-PYF medium에 5%가 되게 접종하였고, 이를 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 시간별로 pH의 변화를 알아보았다.

**결과 및 고찰**

**장내세균의 탄소원 이용능**

m-PYF medium에 자일로올리고당, 이소말토올리고당, 프럭토올리고당, sucrose 등의 탄소원을 0.5% 첨가한 뒤 대표적인 장내세균들을 각각 접종해 37°C에서 96시간동안 배양하였고 시간별로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균체의 성장곡선을 작성하였다. Fig. 1에서는 *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *L. acidophilus*, 그리고 *L. casei*와 같은 인체 유익균의 성장곡선그래프를 표시하였다. *B. bifidum*의 경우 초기 균체 생장률은 sucrose 첨가군이 우수하였지만 배양 8시간째 이후부터는 자일로올리고당 첨가군의 증식이 빠르게 진행되었다. 또한, 배양 후 36시간이 경과하였을 때를 비교하였을 때 sucrose 첨가군의 흡광도 수치가 0.364인데 반해 자일로올리고당 첨가군의 흡광도 수치는 30% 가량 더 높은 0.501까지 증가하였다. 이소말토올리고당과 프럭토올리고당을 첨가한 배지에서도 흡광도가 각각 0.371과 0.398로 나타나 sucrose에 비해서는 높게 나왔으나 자일로올리고당 첨가군보다는 떨어지는 것을 알 수 있었다. *B. longum*, *B. infantis* 두 균주 모두 비슷한 형태의 성장곡선을 보여주었는



**Fig. 1. Effects of different carbon sources on the *in vitro* growth of various intestinal beneficial microorganisms. A: *B. bifidum*, B: *B. infantis*, C: *B. longum*, D: *L. casei*, E: *L. acidophilus*. ◆ : xylooligosaccharides, ■ : isomaltoligosaccharides, ▲ : fructooligosaccharides, ● : sucrose, ○ : control.**

케, 유아기에 많이 발견되는 *B. infantis*의 경우엔 이소말토올리고당과 자일로올리고당의 성장촉진 효과가 비슷한 것으로 나타났다. 인체 내의 대표적 유산균인 *L. acidophilus*와 *L. casei*의 경우에도 초기에는 sucrose 함유 배지와 자일로올리고당 함유 배지에서의 생장이 비슷하다가 12시간 이후부터는 자일로올리고당 함유 배지에서의 흡광도가 sucrose가 첨가되어 있는 배지에 비해 45%나 높게 나와 생장을 잘 하였음을 보여주었다.

Fig. 2에서는 *C. perfringens*, *B. fragilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*와 같은 인체유해균의 성장곡선그래프를 표시하였다. *C. perfringens*의 경우 sucrose 첨가군에서는 배양 12시간째에 흡광도 0.68을 기록하여 동일 시간대의 자일로올리고당 첨가군의 흡광도 0.33보다 약 2배 가량 높은 수치를 나타내었고, 다른 올리고당 첨가군에서도 자일로올리고당 첨가군보다 높은 흡광도를 나타내었다. 그러나, 자일로올리고당이 첨가된 배지에서는 탄소원이 없는 대조군과 흡광도가 거의 비슷하게 나와 생장이 저해됨을 알 수 있었다. *B. fragilis*는 16시간까지는 모든 탄소원에서 비슷한 균체 생장을 하다가 그 이후로 자일로올리고당 첨가군은 흡광도 0.299까지, sucrose 첨가군의 경우 흡광도가 2.4배 가량 높은 0.575까지 증가함을 알 수 있었고, 이소말토올리고당과 프럭토올리고당 첨가군에서도 흡광도가 각각 0.35과 0.43까지 증가하여 자일로올리고당이 다른 올리고당보다 생장억제 효과가 큰 것을 알 수 있었다. *E. coli*와 *S. aureus*, *S. typhimurium* 등에서는 자일로올리고당이 첨가된 배지에서의 흡광도가 sucrose를 탄소원으로 이용하는 배지에 비해 각각

약 1.3배, 2배, 1.8배 가량 낮았을 뿐 아니라, 탄소원이 전혀 첨가되지 않은 대조군보다도 훨씬 낮은 값을 나타내어 생장이 강하게 저지됨을 알 수 있었다.

위와 같은 결과를 볼 때 인체 장내에서 서식하고 있는 여러 장내세균들 중 유익균으로 알려진 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*속의 균주들은 탄소원의 이용 경향에 있어 sucrose는 배양 초기부터 잘 이용하나 성장촉진 효과가 크지 않은 반면에 자일로올리고당은 배양 후 일정시간 후부터 성장촉진 효과가 나타나 시간이 지남면서 점차 강한 성장촉진 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한, *Clostridium*, *Bacteroides*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* 등과 같은 장내 유해균들은 자일로올리고당을 탄소원으로 이용하지 못하며 탄소원이 첨가되지 않은 대조군에 비해서도 흡광도가 낮게 나오는 것으로 보아 자일로올리고당이 장내 유해균의 생장을 강하게 억제한다는 것을 알 수 있었다. 특히, 자일로올리고당을 이소말토올리고당과 프럭토올리고당 등의 시중에 판매되고 있는 다른 종류의 올리고당과 비교해 볼 때 bifidobacteria의 생장을 촉진하는 bifidogenic effect가 더 좋은 것으로 나타나 기존의 보고[13]와 비슷한 결과를 나타내었고, 실제 이용시에 상대적으로 소량만 사용하여도 장내 유익균의 증식촉진에 좋은 효과를 나타낼 것으로 생각된다.

#### 장내세균의 혼합배양

대표적인 장내 유익균인 *B. bifidum*, *B. longum*과 유해균인 *C. perfringens*, *B. fragilis*가 장내의 탄소원에 대하여 어떤 경쟁 관계를 형성하는지 알아보기 위하여 m-PYF 배지에

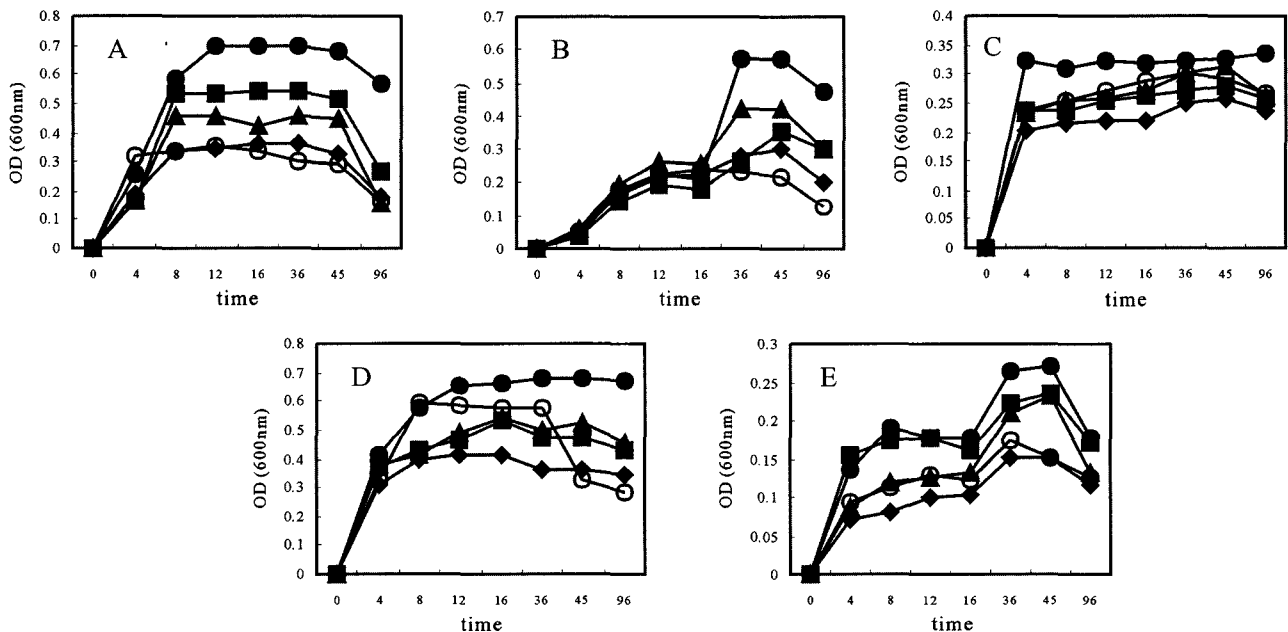


Fig. 2. Effects of different carbon sources on the in vitro growth of various intestinal harmful microorganisms. A: *B. bifidum*, B: *B. infantis*, C: *B. longum*, D: *L. casei*, E: *L. acidophilus*. ◆: xylooligosaccharides, ■: isomaltoligosaccharides, ▲: fructooligosaccharides, ●: sucrose, ○: control.

*in vitro*로 혼합배양하여 실험을 하였다. 100 ml serum bottle에서 혐기 상태로 혼합배양한 균주를 anaerobic dilution solution으로 적당량 희석하여 각각의 선택배지에 배양하여 생균수를 측정하였다. Table 2에서 보듯이 배양하기 전에 취한 시료와 48시간 배양 후 취한 시료를 각 균주에 따라 BS, NN, VA 선택배지에서 생균수의 변화를 확인해 본 결과, 세 종류의 올리고당 첨가균에서 모두 유익균의 생균수가 증가하는 비슷한 경향을 나타내었으나, 생균수 변화율은 첨가된 올리고당에 따라 큰 차이를 보였다. 세 종류의 올리고당 모두 *B. bifidum*과 *B. longum*은 배양후에 3배 이상 생균수가 증가하였고 *C. perfringens*와 *B. fragilis*의 생균수는 유지하거나 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나, 자일로올리고당이 첨가된 배지에서는 다른 두 올리고당에 비해서 훨씬 높은 유익균 성장촉진 효과를 보여주었는데 *B. bifidum*은 생균수가  $1.4 \times 10^{10}$ 에서  $11.0 \times 10^{10}$ 로 약 7.8배 이상 생균수가 증가하였고 *B. longum*은  $0.6 \times 10^{10}$ 에서  $2.3 \times 10^{10}$ 으로 4배 가량 증가하였다. 이러한 생균수의 증가는 프럭토올리고당이나 이소말토올리고당에 비해 생균수의 증가율이 2배 이상 높은 값이므로 장내에서의 유익균 성장촉진 효과가 자일로올리고당에 의해 가장 효과적으로 일어난다는 것을 제시한다. 한편, 장내 유해균인 *C. perfringens*와 *B. fragilis*의 생균수는 세 종류의 올리고당 모두 그 변화율이 큰 차이가 없었고, 48시간 배양 후에도 생균수는 거의 증가하지 않은 것을 알 수 있었는데, 이는 혼합배양시 세 종류의 올리고당 모두 유해균에게는 탄소원으로 잘 이용되지 못한다는 것을 보여준다. 한편, sucrose가 첨가된 배지에서 *B. bifidum*의 배양 전후 생균수는 각각  $1.5 \times 10^{10}$ 과  $2.8 \times 10^{10}$ 로서, 탄소원이 들어있지 않은 control 배지에서의 생균수가 배양 후  $1.4 \times 10^{10}$ 에서  $1.9 \times 10^{10}$ 로 증가된 것과 비교해 볼 때 생균수의 증가율이 서로 비슷하다는 것을 알 수 있는데, 이는 sucrose가 *Bifidobacterium*의 성장에 큰 효과가 없다는 것을 보여준다. Sucrose를 탄소원으로 사용할 경우 *B. longum* 역시 *B. bifidum*과 같은 경향을 보였는데, 생균수는 control과 비슷하

게 매우 낮은 증가율을 보였고, 오히려 *C. perfringens*와 *B. fragilis*의 생균수는 각각 약 3.3배와 8.7배 가량으로 급격한 증가를 보였다. 이는 control보다도 높은 증가율로서 혼합배양시 sucrose가 첨가되면 장내 유해균의 생장이 탄소원이 없을 때보다도 촉진되며 sucrose가 유익균보다 유해균의 성장을 촉진한다는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과로 보아 한 영양원을 두고 경쟁하는 장내균주들의 경향을 알 수 있었는데 대표적인 장내유익균인 *B. bifidum*과 *B. longum*은 자일로올리고당을 이용할 때 sucrose나 다른 두 올리고당을 이용할 때보다 더욱 생장이 촉진되었고, 장내 유해균인 *C. perfringens*와 *B. fragilis*의 경우에는 sucrose가 첨가된 배지에서 높은 성장률을 보여준 반면 자일로올리고당은 이용하지 못함을 알 수 있었다. 한편, 선행된 연구와 비교해 볼 때에도 유사한 결과를 보여 주었는데 [21], 이러한 현상은 각 균주를 단독으로 배양할 때와 같은 결과로서 여러 균주의 혼합배양시 탄소원을 경쟁적으로 이용할 때 장내 유익균의 탄소원 이용능에 있어서 자일로올리고당이 가장 효과적으로 작용하고 있음을 알 수 있고, 또한 이로 인해 장내 유해균의 탄소원 이용능도 상대적으로 떨어져 생장이 억제되는 것으로 생각된다.

#### 자일로올리고당의 당이용률 측정

자일로올리고당과 sucrose가 각각 첨가된 배지에서 각 균주들이 어떠한 탄소원을 얼마나 이용하며 성장하는가를 정확히 알아보기 위하여 HPLC를 사용해 각각의 탄소원 소모량을 측정하였다. 배양 전 배지에서의 탄소원을 정량하고 배양 후 배지에 잔존해있는 각각의 탄소원들을 정량하여 소모된 탄소원을 측정해 백분율로 당이용률을 나타내었다.

Fig. 3을 보면 장내유익균들은 대개 자일로올리고당의 이용률이 sucrose 이용률에 비해 높고 유해균들은 sucrose의 이용률이 높았는데, 자일로올리고당의 경우 *B. bifidum*이 72.6%로 가장 높은 이용률을 보여주었고 *B. longum*도 71.5%, *B. infantis*는 61.1%의 자일로올리고당을 이용하였음

Table 2. Growth of intestinal microorganisms\* on the selective medium\*\* before and after mixed culture in the m-PYF.

Strains	Viable bacterial count ( $\times 10^{10}$ /ml medium)									
	XO <sup>a</sup>		IMO <sup>b</sup>		FO <sup>c</sup>		Sucrose <sup>e</sup>		control <sup>d</sup>	
	Before <sup>e</sup>	After <sup>f</sup>	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
<i>B. bifidum</i>	1.4	11.0	1.1	4.0	1.3	4.4	1.5	2.8	1.4	1.9
<i>B. longum</i>	0.6	2.3	0.4	0.8	0.6	0.8	0.4	0.6	0.4	0.6
<i>C. perfringens</i>	1.7	1.9	1.4	1.5	0.9	1.2	2.1	6.9	1.4	1.5
<i>B. fragilis</i>	0.4	0.5	0.3	0.4	0.6	0.7	0.7	6.0	0.4	0.4

\*culture medium : m-PYF containing a carbon source.

\*\*selective medium : BS medium for *Bifidobacterium* spp., NN medium for *Clostridium perfringens*, VA medium for *Bacteroides fragilis*, BL medium for total colony

<sup>a</sup> xylooligosaccharides, <sup>b</sup> isomaltooligosaccharides, <sup>c</sup> fructooligosaccharides, <sup>d</sup> m-PYF medium without sugar, <sup>e</sup> before culture, <sup>f</sup> culture after 48 hours.

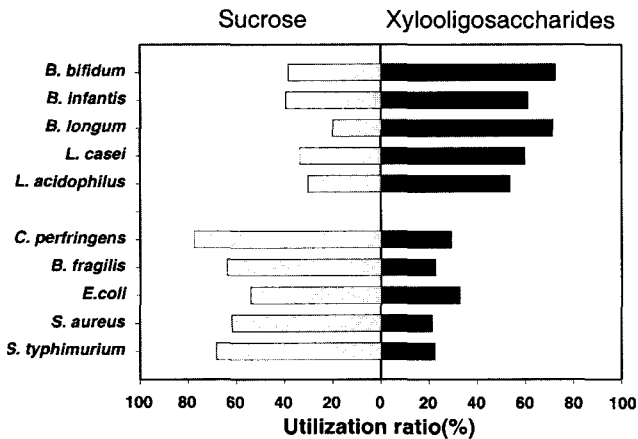


Fig. 3. Utilization ratio of xylooligosaccharides and sugar for various intestinal microorganisms. Utilization ratio = (amounts of sample before culture - amounts of remained sample after culture) / amounts of sample before culture.

을 알 수 있었다. 또한, *L. acidophilus*와 *L. casei*도 각각 53.7%와 60.0%의 자일로올리고당을 이용하였다. 반면 sucrose의 이용에 있어서는 많게는 *B. bifidum*이 39.5%를 적게는 *B. longum*이 20.0%만을 이용하여 이용률이 자일로올리고당에 비해 많이 떨어짐을 알 수 있었다.

한편 장내유해균들의 경우에는 sucrose 이용률이 상대적으로 높았는데 *C. perfringens*는 77.6%, *B. fragilis*는 63.9%, *E. coli*는 54.2%, *S. aureus*는 61.8, 그리고 *S. typhimurium*은 68.3%의 이용률을 나타내었다. 그러나, 자일로올리고당의 이용률은 21.3%에서 32.8% 사이의 이용률을 보여줌으로서 현저하게 떨어짐을 알 수 있었다.

이러한 결과들은 각 균들의 생리적 특성상 장내 유익균들은 sucrose보다 자일로올리고당을 더 잘 이용한다는 것을 의미하며, 반면 유해균들에 있어서는 자일로올리고당을 생장에 이용하기 어렵다는 것을 보여준다. 따라서 이러한 특성으로 인해 혼합배양 중 탄소원 이용능 측정시 자일로올리고당을 첨가하였을 때 유익균들의 생장이 상대적으로 증진되었음을 알 수 있었다.

#### 자일로올리고당이 *Streptococcus mutans* 생장시 산의 생성에 미치는 영향

*S. mutans*는 치아표면에서 집락을 형성하며 충치를 유발시키는 균주로 알려져 있다. 일반적인 충치형성기작을 살펴보면 glucosyltransferase에 의해 sucrose로부터 water insoluble glucan을 형성하는데, *S. mutans*는 치아표면에 서식하면서 인체 내 여러 방어기작으로부터 glucan에 의해 보호를 받으며 산을 형성한다. 이때 pH가 5.0 이하로 떨어지면 치아 에나멜질이 급격히 용해되고 충치가 발생하게 되는데, 특히 0.1%의 sucrose만 구강 내에 존재해도 *S. mutans*의 생장이 가능해 충치의 원인이 된다고 알려져 왔다[8]. 이러한

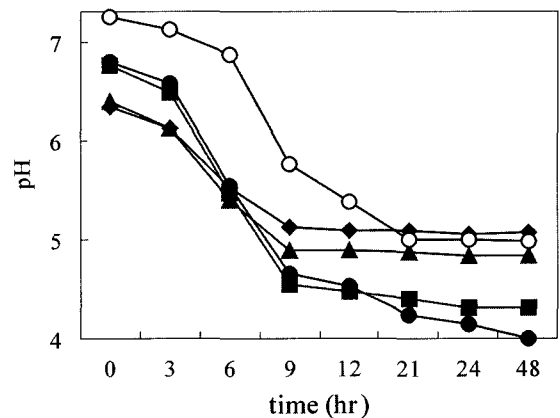


Fig. 4. Changes of pH in the m-PYF media containing different sugar during the growth of *Streptococcus mutans*. ◆: xylooligosaccharides, ■: isomaltooligosaccharides, ▲: fructooligosaccharides, ●: sucrose, ○: BHI media.

충치 원인균의 생장을 억제하는 물질을 찾고자 하는 연구가 많이 시도되어 왔으며[14], 이에 대체 감미료로 사용 가능한 자일로올리고당이 충치를 억제할 수 있는지를 알아보았다. m-PYF medium에 여러 종류의 감미료로 사용되는 탄소원을 첨가해주고 배양하면서 pH의 변화를 살펴보았는데(Fig. 4), 이소말토올리고당과 프럭토올리고당을 첨가하였을 경우에는 배양초기에 pH가 급격히 떨어진 후 배양 48시간째 이후에 pH가 5.0 이하인 pH 4.3과 pH 4.8로 각각 유지되어 충치를 유발할 수 있는 산이 *S. mutans*에 의해 발생되었음을 알 수 있었다. 특히, sucrose가 첨가된 배지에서는 pH가 지속적으로 감소하여 48시간째에는 pH 4.0 이하로 떨어졌는데, 이로써 충치 유발 균주에 의해 지속적으로 산이 분비되고 있음을 알 수 있었다. 한편, 자일로올리고당을 첨가한 배지에서도 역시 pH가 감소하였으나 배양한 지 9시간 이후부터는 pH 5.1의 값을 유지하였다. 이런 결과는 자일로올리고당이 *S. mutans*의 생장시에 산의 생성을 억제하여 pH를 5.0 이상으로 유지시키기 때문인 것으로 생각되며, 따라서 자일로올리고당을 감미료로 사용할 때 충치를 억제하는 효과도 나타낼 것으로 사료된다.

위와 같은 결과들을 종합해보면 자일로올리고당은 장내유익균인 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*의 생장 촉진에 큰 영향을 미치고 다른 시판중인 이소말토올리고당과 프럭토올리고당에 비해서도 생장 촉진 효과가 훨씬 더 크다는 것을 알 수 있었다. 반면 부패성 물질과 발암 물질 또는 노화에 영향을 미치는 물질들을 배출하는 대표적인 장내유해균인 *Clostridium*과 *E. coli*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, 그리고 *Bacteroides* 등은 탄소원으로 sucrose를 잘 이용하며, 자일로올리고당이 탄소원으로 존재할 경우에는 이용률이 현저하게 떨어지고 일부 생장이 억제되는 현상까지 나타내었다. 이는 장내 유익균과 유해균의 자일로올리고당에 대한 이용성 차이에 기인하는데, 유익균이 자일로올리고당을 더 잘 이용할

으로써 경쟁우위를 보여 상대적으로 유해균이 이용하지 못하고 억제되는 것으로 보인다. 또한, *in vitro* 실험 결과 탄소원에 대하여 경쟁적으로 이용할 때 자일로올리고당이 유익균의 성장을 촉진하고 유해균의 성장을 억제하는 것으로 보아 장내에서도 동일한 현상이 일어날 것으로 보이며, 따라서 자일로올리고당이 bifidogenic effect에 의한 장내 유익균층 증가를 통해 건강증진에 기여할 것으로 생각된다. 뿐만 아니라, 자일로올리고당은 충치의 원인균인 *S. mutans*의 성장시에 산 발생을 억제함으로써 감미료 섭취에 따른 충치 발생을 예방하는 효과까지 겸비할 것으로 기대된다.

## 요 약

대한제당(주) 중앙연구소에서 기능성 감미료로서 개발한 자일로올리고당이 장내세균의 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *in vitro* 실험을 하였다. 탄소원 이용능을 알아보기 위하여 당이용능검색배지인 m-PYF medium에 탄소원으로 자일로올리고당과 시판중인 올리고당이 이소말토올리고당과 프럭토올리고당, sucrose를 각각 0.5%(w/v) 첨가한 후 여러 장내 세균을 각각 배양하였다. 장내유익균인 *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus casei* 및 *Lactobacillus acidophilus*는 다른 탄소원보다 자일로올리고당이 첨가된 배지에서 훨씬 더 잘 성장하였으나, *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*와 *Salmonella typhimurium* 등 장내 유해균은 생장이 저해되었다. 또한, 이들 세균을 혼합배양한 경우에도 장내 유익균의 생균수는 증가하였고, 유해균은 상대적으로 낮은 농도로 억제되었다. 충치를 유발하는 원인 균주인 *Streptococcus mutans*를 자일로올리고당이 첨가된 m-PYF medium에서 배양하였을 때 배양액의 pH가 5.0 이상으로 유지되었다. 이러한 결과들을 볼 때 자일로올리고당은 인체의 장내 유익균에만 선택적으로 작용하여 성장을 증진시킬 뿐 아니라, *S. mutans*의 성장시 산 생성을 억제함으로써 충치 발생을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 연구는 과기부 주관 선도기술개발사업(G7 Project #8-3-6, 신규기능성감미료 자일로올리고당의 연속대량생산기술 확립 및 제품개발) 연구비에 의하여 수행된 결과이며, 이에 감사 드립니다.

## REFERENCES

- Ahn, J.-B., J.-K. Hwang, C.-T. Kim, K.-H. Lee, and J.-H. Park. 1997. Bifidogenic effect of glucooligosaccharide prepared from glucose by extrusion process. *J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 174-179.
- Cotta, M. A. 1993. Utilization of xylooligosaccharides by selected ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiology.* 59: 3557-3563.
- Drasar, B. S. and A. K. Roberts. 1990. Control of the large bowel microflora, pp. 87-110. *In Human Microbial Ecology*, CRC Press.
- Dubey, U. K. and V. V. Mistry. 1996. Effect of bifidogenic factors on growth characteristics of bifidobacteria in infant formulas. *J. Dairy Sci.* 79: 1156-1163.
- Finegold, S. M., V. L. Sutter, and G. E. Mathisen. 1983. Normal indigenous intestinal flora, pp. 3-31. *In Human intestinal microflora in health and disease*, Academic Press, New York.
- Gibson, G. R., E. R. Beatty, X. Wang, and J. H. Cummings. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* 108: 975-982.
- György, P., R. F. Norris, and C. S. Rose. 1955. Microbiological studies on growth factor for *L. bifidus* var. *pennsylvanicus*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 90: 219-223.
- Jagtap, A. G. and S. G. Karkera. 2000. Extract of *Juglandaceae regia* inhibition growth, *in-vitro* adherence, acid production and aggregation of *Streptococcus mutans*. *J. Pharm. Pharmacol.* 52: 235-242.
- Jaskari, J., P. Kontula, A. Siitonen, H. Jousimies-Somer, T. Mattila-Sandholm, and K. Poutanen. 1998. Oat  $\beta$ -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 175-181.
- Joo, G.-J., I.-K. Rhee, S.-O. Kim, and S.-J. Rhee. 1998. Effect of dietary xylooligosaccharide on indigestion and retarding effect of bile acid movement across a dialysis membrane. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 705-711.
- Kunimasa, K. and F. Shigeaki. 1991. Xylooligosaccharides. *Japanese Technology Reviews* 3: 131-143.
- Lee, J.-W., Y.-J. Park, H.-G. Oh, C.-S. Lee, U.-T. Lee, C.-K. Yang, and S.-W. Yoon. 1999. Xylan extraction from corn-cob, pp. 466-469. *In Proceedings of KSBB Spring Scientific Meeting*, The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Seoul, Korea.
- Lee, S.-P. 1999. Properties and using of functional sweet food. *酒類産業* 19: 62-72.
- Loimaranta, V., A. Carlen, J. Olsson, J. Tenvuo, E. L. Syvaaja, and H. Korhonen. 1998. Concentrated bovine colostrum whey proteins from *Streptococcus mutans*/*Strep. Sobrius* immunized cows inhibit the adherence of *Strep. mutans* and promote the aggregation of mutans streptococci. *Journal of Dairy Research.* 65: 599-607.
- Loo, J. van., J. Cummings, N. Delzenne, H. Englyst, A. Franck, M. Hopkins, N. Kok, G. Macfarlane, D. Newton, M. Quigley, M. Roberfroid, T. van Vliet, and E. van den Heuvel. 1999. Functional food properties of non-digestible oli-

- gosaccharides : a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition*. **81**: 121-132.
6. Matteuzzi, D., F. Crociani, and O. Emardi. 1978. Amino acid produced by bifidobacteria and some clostridia. *Annales de Microbiologie*. **129B**: 175-181.
  7. Mitsuoka, T. 1986. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobact. Microfl.* **9**: 11-28.
  8. Mitsuoka, T. 1990. Bifidobacteria and their role in human health. *J. Indust. Microbiol.* **6**: 263-268.
  9. Oh, H. G., Y.-J. Park, U. T. Lee, J. W. Lee, C. S. Lee, B. K. Rhew, C. K. Yang, S. W. Yoon, and B. H. Kang. 1999. Bacterial reverse mutation assay of xylooligosaccharide. *J. Food Hyg. Safety* **14**: 259-264.
  10. Oh, H.-G., J.-W. Lee, C.-S. Lee, Y.-J. Park, U.-T. Lee, C.-K. Yang, and S.-W. Yoon. 1998. Production of xylooligosaccharide from the corncob xylan using the *Clostridium thermocellum* xylanase from recombinant *Bacillus subtilis*, p. 332. *In Proceedings of the International Symposium on Probiotic Researches on Lactic Acid Bacteria*, The Korean Society for Applied Microbiology, Seoul, Korea.
  1. Okazaki, M., S. Fujikawa, and N. Matsumoto. 1990. Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria. *Bifidobact. Microflora* **9**: 77-86.
  2. Park, J.-H., J.-Y. Yoo, O.-H. Shin, H.-K. Shin, S.-J. Lee, and K.-H. Park. 1992. Growth effect of branched oligosaccharides on principle intestinal bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 237-242.
  3. Park, J.-H., N.-S. Han, J.-Y. Yoo, H.-K. Shin, and Y.-J. Koo. 1993. Screening of the foodstuffs influencing the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Clostridium perfringens*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **25**: 582-588.
  24. Park, Y.-J., H. G. Oh, U. T. Lee, J. W. Lee, C. S. Lee, B. K. Rhew, C. K. Yang, S. W. Yoon, and B. H. Kang. 1999. Acute oral toxicity of xylooligosaccharide in rats. *J. Food Hyg. Safety* **14**: 255-258.
  25. Park, Y.-J., H.-G. Oh, J.-W. Lee, C.-S. Lee, U.-T. Lee, B.-K. Rhew, C.-K. Yang, and S.-W. Yoon. Effects of ultrafiltration on the production of xylooligosaccharides. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**: 312-316.
  26. Park, Y.-J., J.-W. Lee, C.-S. Lee, B.-K. Rhew, and C.-K. Yang. 2001. Physicochemical properties of xylooligosaccharide as food material. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**: 19-23.
  27. Park, Y.-J., U. T. Lee, J. W. Lee, C. S. Lee, B. K. Rhew, C. K. Yang, S. W. Yoon, and B. H. Kang. 2000. Subacute toxicity of xylooligosaccharide in rats. *J. Food Hyg. Safety* **15**: 151-166.
  28. Roberfoid, M. B. 1997. Health benefits of non-digestible oligosaccharides, pp. 211-219. *In Dietary Fiber in Health and Disease*, Plenum Press.
  29. Visser, J., G. Beldman, M. A. Kusterws, and A. G. J. Voragen. 1992. *Xylans and xylanases*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
  30. 光岡知足. 1984. 腸内菌の世界, 叢文事, 東京.
  31. 藤田哲. 2000. 機能性食品(1): 世界的な廣かがりの状況. *New Food Industry* **42**: 33-38.

(Received June 15, 2002/Accepted Nov. 10, 2002)