

Packed-Bed 반응기를 이용한 한천올리고당의 연속생산

임 동 중 · 김 종 덕 · 강 양 순 · 공 재 열

부경대학교 식품생명공학부

여수대학교 생물 · 화학공학부¹, 국립수산진흥원 남해수산연구소 통영분소²

(접수 : 2001. 7. 28., 게재승인 : 2001. 8. 24.)

Continuous Production of Agarooligosaccharides Using Packed-Bed Reactor

Dong-Jung Lim, Jong-Deog Kim¹, Yang-Soon Kang², and Jai-Yul Kong[†]

Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University

¹Dept. of Biotechnology, Yosu National University, ²Tongyeong Laboratory, South Sea Fisheries Research Institute

(Received : 2001. 7. 28., Accepted : 2001. 8. 24.)

Enzymatic hydrolysis of agar was carried out continuously to produce agarooligosaccharides by immobilized agarase in Packed-Bed Reactor. The reactor was constructed using a acryl tube with an internal diameter of 10 mm and a useful height of 140 mm. The Packed-Bed Reactor was 11 mL reactor volume as its length : diameter ratio was 14 : 1. The operation condition of reaction was performed with an 1 g/L agar concentration at 40°C, 10 mM MOPS buffer(pH 7.0) and with the flow rate 3 mL~48 mL/h at a dilution rate of 1.09~5.45 h⁻¹. The hydrolysis products was identified DP6, DP4 and DP2 by HPLC. The conversion rate of agar was about 80% and amount of total agarooligosaccharide was 0.88 mg/mL at Packed-Bed Reactor.

Key Words : agarooligosaccharide, immobilized enzyme, packed-bed reactor

서 론

기능성 식품첨가소재로 현재 널리 각광 받고 있는 올리고당류는 합성 또는 산가수분해법으로 대량생산되어지고 있으나 제품중 당당 함유량이 높고 반응 후 생성되는 부산물의 처리와 중화과정 등의 문제가 제시되고 있다. 또한 육상의 소재에 대해 국한적으로 행해왔던 기존 연구, 생산방법에서 탈피하여 신소재의 개발이 절실히 요구되므로, 풍부한 천연 해양자원을 이용하여 고기능성 올리고당류의 개발을 시도하게 되었다. 해양에 널리 존재하는 한천을 가수분해하여 얻어지는 한천올리고당은 기능성 식품소재로서 체내 소화효소에 의해서는 분해가 되지 않고 저칼로리 식품, 감미성분으로서 사용될 수 있을 뿐만아니라 장내 유용세균의 증식을 촉진시켜 병원성 세균의 성장억제, 변비개선효과 및 혈중 콜레스테롤의 저하, 정균작용, 당뇨병, 고혈압에 뛰어난 효과가 있는 것으로 알려져 있다(1). 본 연구자 등이 연구한 결과에 의하면 한천올리고당은 시판중인 각종 올리고당에 비해 체내흡수

가 가능한 당당류의 함량이 가장 낮고, 올리고당의 함량이 높은 것으로 밝혀졌으며(2), 특히 면역활성의 우수한 기능성을 가지는 것으로 확인된 바 있다(3). 뿐만 아니라 전분식품 부패균인 *Bacillus subtilis*에 대한 강한 항균효과(4), 우수한 항돌연변이원성 소재 등이 밝혀진 바 있다(5).

따라서 본 연구자 등은 한천올리고당의 생산을 위하여 해양 세균으로부터 고효율 한천분해효소를 분리해 내었고(6), 이를 이용, 한천으로부터 중합도 2, 4, 6의 한천올리고당의 생성을 확인하였으며(7), 이를 Na-alginate 담체에 고정화 방법을 사용하여 한천올리고당의 고 생산을 보고한 바 있다(8).

본 연구에서는 이러한 연구를 배경으로 기능성 한천올리고당의 연속 생산을 위해 고정화된 한천분해효소에 적합한 효소반응기를 제작, 운영하고 그 반응성을 조사하여, 기능성 한천올리고당의 대량생산을 위한 기초자료를 제시함으로써 대부분 사용되지 않고 방치되어 있는 수산자원인 한천을 고부가가치의 기능성 식품소재로써 대체할 수 있는 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용된 한천(agar-agar)은 (주) MSC(구 명신화성, 경남 양산시)에서 구입하였고, 한천올리고당의 표준물질로

[†]Corresponding Author : Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, 599-1, Deayeon-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-737, Korea
Tel : +82-51-620-6181, Fax : +82-51-620-6181
E-mail : kongjy@pknu.ac.kr

Sigma Chemical co.(St. Louis, USA)의 agarobiose, agarotetraose, agarohexaose는 분석용 특급시약을 사용하였다.

효소의 활성 측정

한천분해효소의 효소활성은 생성된 환원당량을 Somogyi-Nelson방법(9)을 이용하여 측정하였다. Somogyi 시약을 첨가하고 10분간 끓인 후, 실온으로 냉각시켜 Nelson 시약을 일정량 첨가하고 반응물과 잘 혼합하여 14,000 rpm, 2분간 원심분리한 후, 상층액의 흡광도 값을 UV-spectrophotometer (Ultra-spec 3000, Pharmacia Co., England)로 510 nm에서 측정하였다. 이때 표준 당으로는 galactose 용액을 사용하였다. 효소 1 unit는 40℃에서 1분간 1 μmol의 galactose를 생산하는 효소의 양으로 정의하였다(6).

전환율 측정

기질과 효소와의 반응액으로부터 생성된 한천올리고당의 분리는 효소반응액을 채취하여 5분간 끓인 후, 14,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후, 그 상층액으로부터 생성된 한천올리고당을 아래와 같은 식을 이용하여 전환율을 계산하였다(8). 한천의 전환율(conversion rate) Xc 는

$$X_c (\%) = 100 \cdot F(C_n - C_{ni}) / (C_{Ai} - C_{ni} \cdot F)$$

C_{Ai} : Initial agar concentration(mg/mL)

C_n : Agarooligosaccharides concentration(mg/mL)

C_{ni} : Initial agarooligosaccharides concentration(mg/mL)

F : F-ratio of molecular weight for the anhydrogalactose unit in the agar molecule and galactose, $F = (180-18)/180 = 0.9$

고정화 효소 반응기

실험에 사용된 고정화 효소 반응기인 Packed-Bed 반응기(PBR) 모식도를 Figure 1에 나타내었다.

Packed-Bed 효소반응기는 두께 3 mm인 아크릴관을 사용, 제작하였으며 peristaltic pump MP3(EYELA Co., Japan)를 이용하여 반응기내에 기질을 공급하고 반응된 효소생성물은 Fraction collector를 이용하여 시간별로 분리하였다. 또한 반응기내 온도를 일정하게 유지시키기 위해 water jacket형 이중관 형태로 설계하고 이때 반응기내에는 2 unit (1 U/5 mL)의 고정화된 β-agarase(9)를 충전하였다.

고정화효소 반응기내에서의 한천기질의 농도와 공급속도에 따른 영향을 살펴보기 위해서 기질의 농도별로 1, 2 g/L 각각을 3, 5, 10, 25, 35, 48 mL/h의 속도로 공급하면서 기질전환율을 살펴보았다.

한천올리고당의 성분 분석

한천올리고당의 성분은 TLC(Thin-Layer Chromatography)를 이용하여 분석하였다(7). 전개판은 Kieselgel 60 plate, F254 (Merck Co., Germany)를 사용하였으며, 전개용매는 n-butanol, acetic acid, water(2:1:1,v/v) 혼합한 것을 사용하였다. 시료를 전개시킨 후 검출시약으로 EtOH, H₂SO₄(11.5:3)을 처리, 건조시킨 후, ethanol에 녹인 0.2%(w/v) naphthoresorcinol solution을 분사하여 110℃에서 5분간 가열한 후 나타나는 spot으로 한천올리고당을 분석하였다. 효소반응생성물의 정량분석은 Aminex HPX-42A(7.8 mm×300 mm, Bio-rad, USA) column

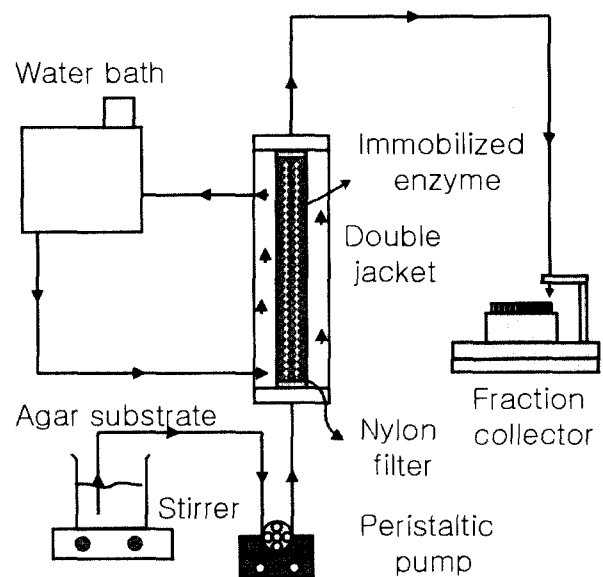


Figure 1. Schematic diagram of the packed-bed reactor.

이 장착된 HPLC(Pharmacia, LKB, Sweden)를 이용하였으며, detector는 RI-4(Refractive Index, HP1047A, Germany)를 사용하였다(3). 이때 column 온도는 80℃을 유지, 이동상으로는 초순수 증류수(18megaohm·cm)를 사용하였고, 유속은 0.8 mL/min을 유지하였다.

한천올리고당의 분석을 위한 표준시약으로는 galactose, agarobiose, agaro-tetraose, agarohexaose(Sigma Co., USA)를 사용하였다.

한천올리고당의 전당량 측정

기질용액 및 반응용액중의 전당량은 Phenol-sulfuric acid 방법(10)으로 측정하였다. 즉, 시료 용액 0.2 mL를 test tube에 취하여 5%(v/v) phenol 용액 0.2 mL를 첨가한 후, 황산 1.0 mL를 반응액에 서서히 직하하여 느린 속도로 발열반응을 진행시키면서 혼합하였다. 이 반응액을 20-30분간 실온에서 방치한 후, 490 nm에서 흡광도를 측정하여 galactose 용액의 검량곡선과 비교하여 전당량을 계산하였다.

결과 및 고찰

PBR 반응기의 특성

PBR반응기는 반응기 내부에 단위면적당 최대한 많은 양의 효소를 충전하여 빈 공간을 최소화 시킴으로서 반응기 부피당 생산성이 최대인 특징이 있으며 연속혼합탱크형 반응기에 비하여 생산물 저해를 원활히 해결할 수 있다. 따라서 한천올리고당을 대량생산하기 위한 가장 효과적인 생물반응기라고 사료되어 Packed-Bed Reactor를 본 실험에 이용하였으며, PBR반응기의 효과적인 H/D비에 대한 생산수율을 조사하였다. 그 결과, Table 1에서 보여주는 바와 같이 반응기의 bed volumn를 고정한 상태에서 H/D 비를 변화시켰을 때, H/D비가 증가함에 따라 반응산물이 점차 증가하는 경향을 보였으며, 반응기의 H/D 비가 14일 때 생산성이 18.1 mg/h로서 가장 효율이 좋은 것으로 나타났다. 이는 반응기내에 충전된 고정

Table 1. The effect of reactor sizes for the continuous production of agarooligosaccharides.

Reactor size (H/D, cm)		Bed volume (mL)	Height-to-diameter ratio	Productivity* (mg/h)
Height	Diameter			
14.0	1.0	11.0	14.0	18.1
7.0	1.4		5.0	16.1
4.8	1.7		2.8	12.1
3.2	2.1		1.5	7.3

* The reaction condition was 24 mL/h, 40°C, 2 unit immobilized enzyme.

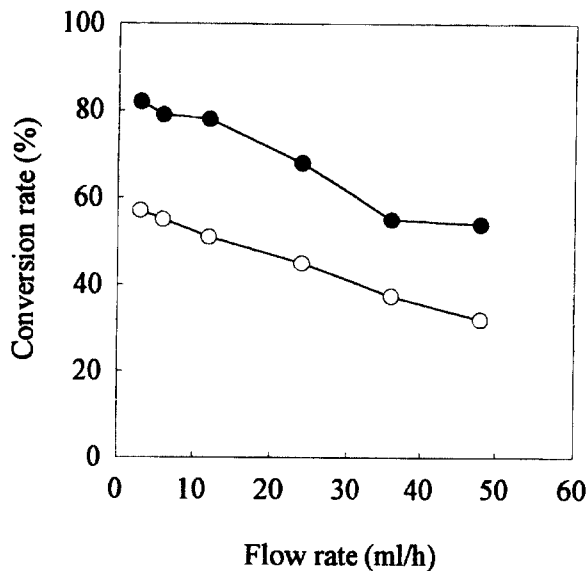


Figure 2. Effect of flow rate and substrate concentration on the continuous production of agarooligosaccharides. ●, 1 g/L agar substrate; ○, 2 g/L agar substrate. The reaction was performed with 10 mM MOPS buffer pH 7.0 at 40°C.

화 효소에 공급되는 기질용액이 효소와 접촉할 수 있는 체류 시간이 길수록 반응기의 반응율이 높아 생산성이 비례적으로 증가한 것으로 판단된다(11).

기질의 농도 및 공급속도 변화에 따른 영향

고정화 효소 반응기의 운전에서 중요변수에는 기질 공급속도, 기질 농도, pH 및 운전온도 등이 있으며, 기질 공급속도와 기질 농도는 제품의 생산성에 직접적인 영향을 주는 변수들이고, pH 및 온도는 고정화 효소의 안정성에 결정적인 영향을 미치는 변수들이다(12).

이들 변수중 직접적인 영향을 주는 기질공급속도와 기질농도의 변화에 따른 기질전환율을 살펴보았다. 2.5 g/L 이상의 한천 기질농도에서는 부분적인 겔화현상으로 반응기를 운전하기에 부적합하였으므로 기질 농도를 1 g/L와 2 g/L의 조건에서 기질 공급속도를 달리하여 전환율을 구한 결과 Figure 2와 같았다. 1 g/L의 한천을 기질로 하여 사용하였을 때, 2 g/L에 비해 전환율이 높은 것으로 나타났으며, 이는 반응중 기질의 농도에 따른 확산율의 차이에 의해 나타난 결과로 사료된다. 또한 공급속도가 3 mL/h에서 48 mL/h로 점차 증가함에 따라 고정화효소와 기질과의 접촉시간의 감소로 인해

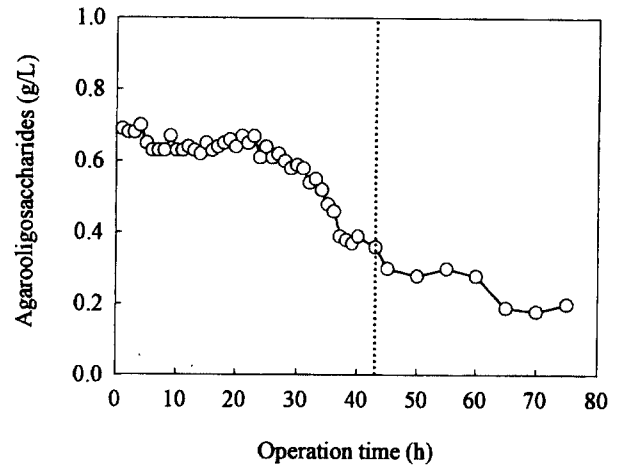


Figure 3. Continuous production of the immobilized agarase. The reactor was operated at flow rate of 24 mL/hr, 40°C using 1 g/L agar solution.

전환율이 비례적으로 감소되는 것으로 나타났다.

한편, 기질농도와 공급속도는 반응기 단위부피당 생산성에 영향을 주는 인자로서 기질농도가 높고 기질공급 속도가 빠를수록 생산물이 증가되고, 한천과 같이 기질농도가 높은 고점성 다당의 경우 반응공정중 오염을 줄일 수 있고 제품화 과정까지의 농축비용을 절감할 수 있다는 장점이 있지만, 반응기 내부에서의 물질전달현상 저해 또는 기질의 반응기 내부로의 pumping에 어려움이 있다(12). 그러므로 한천의 특징인 저온에서의 겔화, 고점성의 문제가 해결된다면, 고농도의 한천기질을 사용함으로써 반응수율 증대와 대량의 기능성 한천올리고당을 생산할 수 있을 것으로 사료된다.

PBR 반응기의 운전 안정성

고정화 효소의 효소반응기내에서 장기운전 안정성에 대한 효소활성의 반감기를 조사하였다. 고정화 효소 반응기의 장기운전 안정성에 따른 결과는 Figure 3에 나타내었다. 반응초기부터 반응경과 30시간까지 일정량의 한천올리고당이 안정적으로 생산됨을 알 수 있었으며, 효소활성반감기는 약 42시간으로 나타났다. 이 결과로 미루어 보아 한천분해효소는 고정화하지 않고 사용할 때 보다 고정화된 한천분해효소를 반응기에서 운전함에 따라 장시간 사용할 수 있다는 결과를 얻을 수 있었다.

한천올리고당의 성분 분석

한천을 기질로 하여 생산된 한천올리고당의 조성성분 및

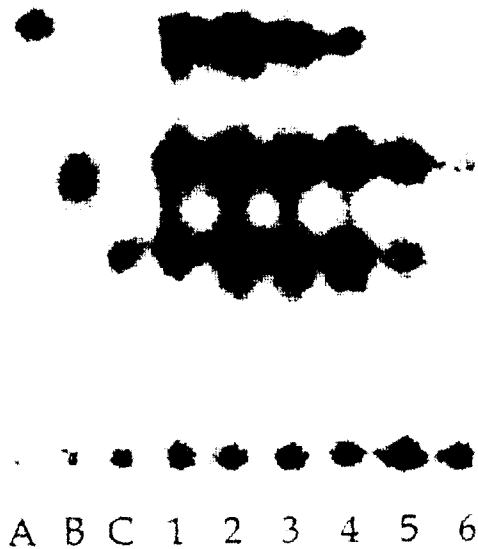


Figure 4. TLC analysis of enzymatic hydrolytes from agar. A, agarobiose; B, agarotetraose; C, neoagarohexaose; 1, 2 h; 2, 4 h; 3, 8 h; 4, 12 h; 5, 16 h; 6, 20 h reaction. Operating condition were performed with an initial agar substrate concentration of 1 g/L at 4 0°C and 10 mM MOPS buffer, pH 7.0.

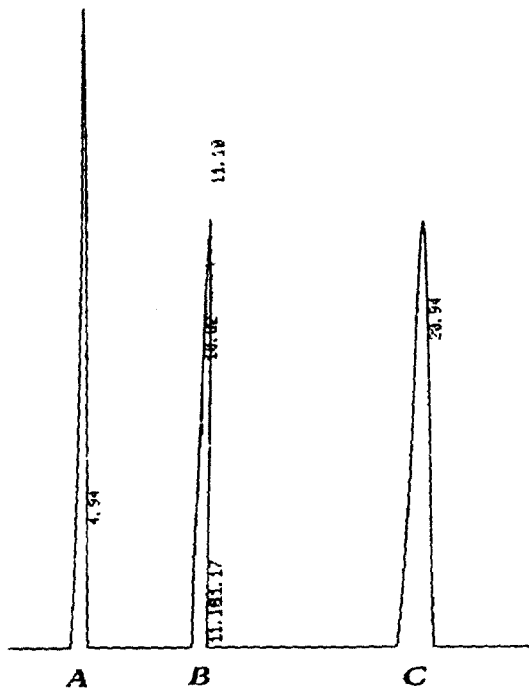


Figure 5. HPLC pattern of the agarooligosaccharides produced by the enzymatic hydrolysis of agar. A, DP 6; B, DP 4; C, DP 2; DPs refer to degrees of polymerization of the products.

정량을 하기 위하여 TLC 및 HPLC를 이용하여 분석하였다. 고정화 연속반응기내에서 시간별로 반응된 반응산물을 TLC로 분석한 결과를 Figure 4에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 중합도(degrees of polymerization, DP)가 4인 당이 주생산물이며 6당, 2당 순으로 시간의 경과에 따라 생산되는

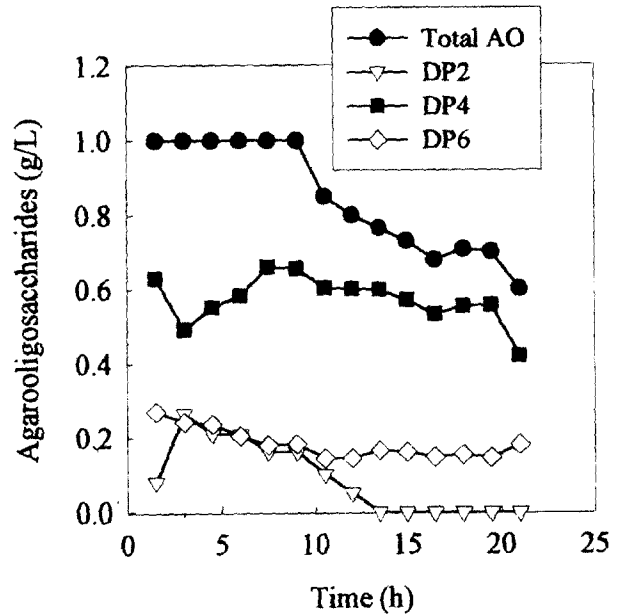


Figure 6. Sugar composition of the agarooligosaccharides produced by Packed-Bed reactor using immobilized agarase. Flow rate 24 mL/h, 1 g agar, 10 mM MOPS buffer pH 7.0 at 40 °C.

당의 조성이 달라짐을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 고정화 효소 반응기내에서 고정화 효소의 반응율이 점차 감소함으로 인해 나타난 결과로 사료되어지며, 반응시간의 조절로 다양한 조성의 한천올리고당을 얻을 수 있다는 가능성을 확인하였다.

본 실험에서 사용한 고정화효소 반응기에서 생산되는 한천올리고당을 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 분석한 결과를 Figure 5에 나타내었다. Agarobiose, agarotetraose, 그리고, agarohexaose가 생산되며 그 외 다른 성분은 검출되지 않았으므로 본 실험에서 사용한 고정화 효소 반응기에서 연속적으로 생산되는 생산물이 순도 높은 한천올리고당임을 확인하였다.

반응시간에 따른 생성올리고당의 조성변화

연속적으로 생산된 한천올리고당을 시간별로 성분분석, 당정량하여 Figure 6에 나타내었다. 반응중에 생산되는 올리고당은 주로 DP4 당이었고 DP6 당, DP2 당도 생성되었으며 반응시간 10 h까지 DP4, 6, 2당 순으로 일정량 생산됨을 알 수 있었다. 13 h 이후에는 DP2당이 검출되지 않았는데 이는 반응기내 고정화효소의 반응율이 다소 감소된 결과로 사료되어진다.

PBR을 이용한 한천올리고당의 생산

한천올리고당을 대량생산하기 위한 기초적인 자료로써 PBR 반응기를 다중으로 연속2개 장착 연결하여 생산되는 반응물의 양을 비교 검토한 결과를 Table 2에 나타내었다. 한천기질의 공급량을 증가시킴에 따른 한천올리고당의 생산량은 비교적 유사한 수준이었으나, 생산물은 단일 고정화효소 연속반응기를 사용하였을 때보다 기질공급량 48 mL/h(D : 4.36 h⁻¹)에서 약 2.3배 가량 증가한 41.7 mg/h의 한천올리고

Table 2. Effect of multi Pack-Bed Reactor setup on production of agarooligosaccharides.

Flow rate (mL/h)	Total agarooligo-saccharides (mg/mL)	Dilution rate (h ⁻¹)	Productivity (mg/h)
12	0.881	1.09	10.6
24	0.879	2.18	21.1
36	0.858	3.27	30.9
48	0.868	4.36	41.7
60	0.696	5.45	41.8

당이 생산됨을 확인하였고, 이는 여러개의 PBR에 장착되는 반응기의 갯수를 증가시킴과 동시에 기질 공급량을 증가시킨다면 한천올리고당의 생산율이 크게 향상될 것으로 사료되는 결과이다(13).

요 약

본 연구에서는 고정화된 한천분해효소가 충전된 packed-bed reactor를 이용하여 한천올리고당을 연속생산하였다. Packed-Bed 형 Reactor의 H/D를 조절하여 생산율이 가장 좋은 조건을 살펴 본 결과, H/D=14인 것으로 나타났으며, 한천올리고당의 연속생산시 35 h에서 효소활성반감기를 나타내었다. Packed-Bed Reactor내에서 기질 1 g/L agar, 1unit 고정화효소, 40℃, flow rate 24 mL/min 조건하에서 연속반응 시켰을 때, 중합도 4의 한천올리고당이 주로 생산되었으며 중합도 6당, 2당순으로 생산됨을 알 수 있었다. 또한 다중으로 연결된 반응기를 이용한 결과, 기질 1 g/L agar, 40℃, 48 mL/min의 조건하에서 41.7 mg/h의 한천올리고당이 생산됨으로서 다중으로 연결하지 않은 반응기보다 2.3배 한천올리고당의 생산율이 증가하였음을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Kong, J. Y., S. K. Bae, S. H. Hwang, S. D. Ha, H. T. Kim, and B. J. Kim (1996), Purification of extracellular agarase from marine bacterium (*Pseudomonas* sp. W7) and molecular cloning of the agarase gene, *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **11**, 37-45.
- Song, C. M. (1998), Properties of agarooligosaccharides for use of food stuffs. *Pukyong National University*, Master, thesis. pp. 25.
- Kong, J. Y., D. J. Lim, B. J. Kim, H. J. Kim, S. D. Ha, and S. K. Bae (1999), Functional properties of agarooligosaccharides, The 6th Academic Plaza in international Food Machinery Exhibition 1999, Tokyo, pp108-109.
- Hong, J. H., J. J. Lee, H. S. Choi, S. H. Hur, and J. Y. Kong (2000), Antibacterial activity of agarooligosaccharides produced by β -agarase from *Bacillus cereus* ASK202, *J. Fd Hyg. Safety*, **15**(4), 277-281.
- Hong, J. H., H. K. Youn, M. C. Kang, H. J. Yoon, D. S. Byun, and J. Y. Kong (2000), Antimutagenic activity and Immunologic activity of agarooligosaccharides produced by β -agarase from *Bacillus cereus* ASK202, *J. Fd Hyg. Safety*, **15**(4), 282-286.
- Lee, H. W., B. J. Kim, S. H. Hwang, and J. Y. Kong (1997), Isolation and identification of marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202 and optimal culture condition for the production of agarase, *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **12**(2), 228-235.
- Kim, B. J., S. D. Ha, D. J. Lim, C. M. Song, and J. Y. Kong (1998), Production of agarooligosaccharides using of agarase from marine bacterium *Bacillus cereus* ASK202, *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **13**(5), 524-529.
- Lim, D. J., B. J. Kim, S. K. Bae, J. D. Kim, and J. Y. Kong (1999), Immobilization of Agarase for the Agarooligosaccharides Production, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**(3), 208-214.
- Somogyi, M. (1952), Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**, 19-23.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. (1956), Colormetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**(3), 350-356.
- Kim, J. D. (1991), Studies on characteristics of β -glucosidase immobilized on modified chitin in bioreactor, Ph.D. Dissertation, Dept. of pharmacy, Pusan National University, Pusan.
- Yun, J. W., D. H. Kim, T. B. Uhm, and S. K. Song (1997), Production of high-content inulo-oligosaccharides from inulin by a purified endoinulinase, *Biotech. lett.*, **19**(9), 935-938.
- Shiraishi, F., T. Hasegawa, S. Kasai, and N. Makishita (1996), Characteristic of apparent kinetic parameters in a packed-bed immobilized enzyme reactor, *Chem. Eng. Sci.*, **51**(11), 2847-2852.