

## Xylooligosaccharides 제조를 위한 한외여과 처리

박윤제 · 오화균 · 이지완 · 이창승 · 이운택 · 류보경 · 양창근 · 윤세왕  
대한제당(주) 중앙연구소

### Effects of Ultrafiltration on the Production of Xylooligosaccharides

Youn-Je Park, Hwa-Gyun Oh, Ji-Wan Lee, Chang-Seung Lee, Un-Taek Lee,  
Bo-Kyoung Rhew, Chang-Kun Yang and Se-Wang Yoon  
Department of Fermentation, Research and Development Center, TS Corporation

#### Abstract

Crude xylooligosaccharides(XO) were separated with a cellulose membrane (10,000 molecular weight cut-off). Flux variation was measured at transmembrane pressures of 5, 10, 20 and 30 psi, while flow rates were maintained at 100, 200, 300 and 400 ml/min and temperatures at 10, 20, 23-25 and 30°C. Optimal conditions were found at the transmembrane pressure of 20 psi, the flow rate of 300 ml/min and the temperature of 23-25°C, where the flux was decreasing with time by 62% after 200 min. Total sugar, total solid and ash contents were rather independent of ultrafiltration but protein was removed up to 55% from crude XO. Especially, the use of ultrafiltration was very effective for decolorization (84%) of crude XO. These results suggest that ultrafiltration is a useful method for the primary purification of XO.

Key words: xylooligosaccharides, ultrafiltration, purification, decolorization

#### 서 론

올리고당은 2-10개의 당으로 구성된 탄수화물로 수용성이며 식품의 물성을 변화시키지 않으며 여러 가지 기능성을 부여해주는 물질이다. 많은 상업적인 올리고당들은 전분, 설탕, 유당 등에서 효소를 이용하여 생산하고 있으며 현재 국내에서 시판하고 있는 올리고당의 거의 대부분도 효소를 이용하여 생산하고 있다.

Xylooligosaccharides 역시 효소를 이용하여 생산하는데, 이것은 식물체 hemicellulose의 주된 구성성분인 xylan을 효소로 분해하여 얻은 올리고당으로 주된 구성성분은 xylose 두개가  $\beta$ -1,4 결합한 xylobiose와 세개 결합한 xylotriose이다<sup>(13)</sup>.

Xylooligosaccharides는 그 감미도가 설탕의 약 40% 정도로 알려져 있으며 열과 pH에서도 안정하여 식품 첨가에 매우 유용한 올리고당이다. 또한 다른 올리고당과 같이 장내 유해미생물의 생육억제 및 bifidus균의

증식인자<sup>(8)</sup>, 장내균총 개선, 변성 개선 등의 기능성이 확인된 바 있다.

Xylooligosaccharides를 제조하기 위해서는 전술한 바와 같이 원료인 xylan과 이를 분해할 수 있는 xylanase를 반응시켜 반응된 물질을 회수하고 정제 및 농축과정을 거친다<sup>(9)</sup>. 하지만 xylooligosaccharides의 상업화는 일본내에서만 국한되어 있고 생산기술 및 know-how도 공개된 바가 없기 때문에 반응된 crude xylooligosaccharides의 정제과정에 많은 기술적인 어려움이 있다. 이에 본 연구에서는 반응 후 crude xylooligosaccharides를 효과적으로 탈색,정제할 수 있는 기술을 연구하고자 한외여과 방법을 도입하여 본 연구를 실시하였다.

#### 재료 및 방법

##### 재료

본 연구에 사용한 한외여과 전의 crude xylooligosaccharides는 5% corn cob xylan(w/v)에<sup>(15)</sup> 10unit의 *Clostridium thermocellum* 유래의 재조합 xylanase를<sup>(7)</sup> pH 5.4, 55°C에서 4시간 진탕반응시킨 후 반응물을 원심분리하고(8,000 rpm, 15 min) 상정액을 취하여 냉장

Corresponding author : Youn-Je Park, Department of Fermentation, Research and Development Center, TS Corporation, 6-14, 1Ka, Boksung-Dong, Chung-Ku, Incheon 400-201, Korea  
Tel : 82-32-770-1442  
Fax : 82-32-770-1603  
E-mail : tsbio1@soback.kornet.net

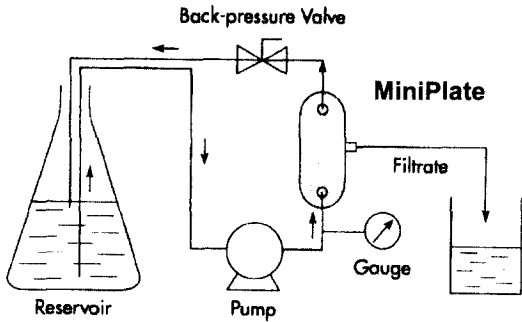


Fig. 1. Schematic diagram of ultrafiltration experimental system.

보관하며 실험에 사용하였다.

한외여과

한외여과(ultrafiltration, UF) 시스템은 Fig. 1에서 보여주고 있으며(MiniPlate-10, Amicon, USA) UF막은 한계분자량(molecular weight cut-off) 10,000, 막표면적 108 cm<sup>2</sup>, 최대허용압력 60 psi, 재질 cellulose 등으로 구성되어 있다. 시스템 사용 후 세척은 0.1 N NaOH 용액을 이용하여 15분간 2회 실시하였다.

최적 운전조건을 확인하기 위하여 막 횡단 압력(transmembrane pressure) 5, 10, 20, 30 psi에서 유속(100, 200, 300, 400 ml/min) 및 온도(10, 20, 23-25 °C, 30°C)를 변화시키며 실험을 실시하였고 시간에 따른 flux의 변화를 관찰하였다. 시간의 경과에 따른 flux의 변화 및 시간의 경과에 따른 색도의 변화를 측정하기 위하여 한외여과기의 운전은 투입 시료의 초기 양을 1 L로 하고 용적농축비(volume concentration ratio, VCR)가 10.0이 될 때까지 여과하였다<sup>(13)</sup>.

이화학적 특성

시료의 색도는 한외여과 전, 후의 xylooligosaccharides를 spectrophotometer(UV-260, Shimadzu, Japan)를 이용하여 420 nm에서 흡광도의 측정으로 결정하였다. 고형분 함량과 회분은 각각 105°C 건조법 및 550°C 회화법으로 측정하였고 당농도는 brix

Table 1. Analytical conditions for xylooligosaccharides by HPLC

System	Waters HPLC system (Model 510)
Column	Carbohydrate analysis column (4.6×250mm, Waters)
Detector	RI detector (R401)
Mobile phase	75% Acetonitrile (Fisher, Co.)
Flow rate	1.4 ml/min
Injection volume	10 µl

meter(RA-120, 東都電子, Japan)로, 총당은 DNS법<sup>(7)</sup>, 단백질 정량은 Bradford법으로<sup>(1)</sup> 측정하였다.

올리고당 분석

한외여과 전 시료와 한외여과 후 투과액(permeate)의 올리고당 함량은 HPLC(Waters, USA)로 분석하였으며 HPLC 분석조건은 Table 1에 나타내었다.

결과 및 고찰

유속에 따른 flux 변화

막 투과도를 확인하기 위해 상온인 23-25°C에서 막 횡단 압력에 변화를 주며 flux를 측정하였다(Fig. 2). 모든 유속에서 압력이 증가함에 따라 flux의 증가가 관찰되었는데 가장 높은 flux를 나타낸 유속은 최고 유속(400 ml/min)이 아닌 300 ml/min 유속이었다. 이러한 결과에서 300 ml/min 이하의 유속에서는 원료 투입 속도가 증가하면 flux 역시 증가한다는 일반적인 이론과<sup>(6)</sup> 부합되는 것으로 사료된다. 그러나 유속이 300 ml/min 이상에서는 이러한 현상이 뚜렷하게 나타나지 않고 있어 일정 유속 이상에서는 유속과 flux간에 상관 관계가 성립되지 않는 것으로 보여지며 압력이 낮은 상태에서 시료 농도가 낮고 유속이 빠를 때는 유속과 flux간에 비례관계가 성립하지 않는다는 보고도 있다<sup>(2)</sup>.

200 ml/min 이상의 유속에서 유속간의 flux는 압력 20 psi 미만에서는 거의 차이를 보이지 않았으며 20 psi 일 때도 4-10%의 적은 차이를 나타내 xylooligosaccharides의 flux는 유속보다는 막 횡단압력에 더욱더 영향을 받는 것을 확인하였으며 압력 20 psi 이상의 막

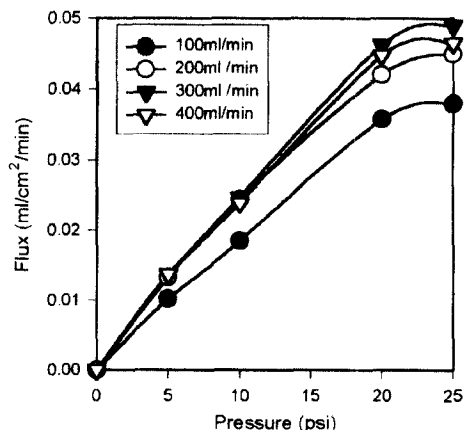


Fig. 2. Effect of average transmembrane pressure and feed flow rate on permeate flux at 23-25°C.

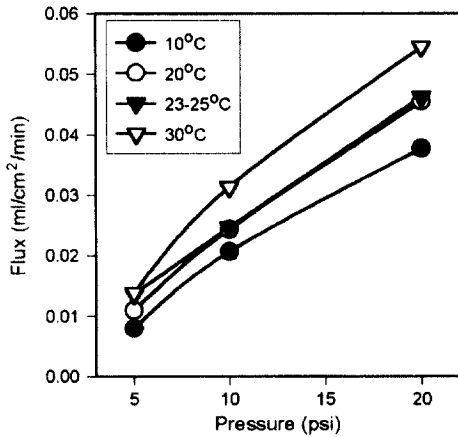


Fig. 3. Effect of average transmembrane pressure and temperature on permeate flux at feed flow rate of 300 ml/min.

횡단압력에서는 막 침착현상으로 flux의 증가율이 상당히 감소하여 이와 우(1998)의<sup>(14)</sup> 연구와 유사한 mass-transfer controlled region을 보였다. 이상의 결과에서 시료의 최적 유속은 300 ml/min, 최적 막 횡단압력은 20 psi이었다.

#### 온도에 따른 flux 변화

시료의 온도 변화에 따른 flux의 변화를 측정하기 위해 온도 및 막 횡단압력을 변화시키며 flux를 관찰하였다(Fig. 3). 적용온도는 올리고당의 물성변화에 영향을 주지않는 30°C이하에서 각 10°C 간격으로 차이를 두어 설정하였고, 실온상태인 23-25°C에서도 실험하였다. 관찰결과 적용 최고온도인 30°C에서 가장 좋은 flux를 보였으며 20°C와 실온인 23-25°C에서는 유사한 양상의 압력 증가에 따른 flux 증가를 관찰할 수 있었다. 온도가 상승함에 따라 유체의 점성 감소<sup>(10)</sup>, 용해도 증가 및 용질의 확산 증가 등으로<sup>(5)</sup> flux가 증가함을 보였으며, 막 횡단압력이 증가할수록 flux의 증가율은, 압력 증가에 따른 막 표면에 거대분자 층의 형성으로 감소하였다<sup>(11)</sup>. 높은 막 횡단 압력에서는 막 표면에서 용질이 gel과 같은 망상구조의 형성을 더욱더 증가시켜 용질에 대한 용해도를 감소시키며 이로인해 flux가 감소한다는 보고가 있다<sup>(2)</sup>. 적용 최저온도인 10°C에서도 level-off 현상은 측정할 수 없었으며 적용된 모든 압력에서도 level-off 현상을 관찰할 수 없어 적용 최대 압력인 20 psi 이상 압력에서도 flux의 증가율은 감소하겠지만 지속적인 flux의 증가는 기대할 수 있었다.

이상의 결과에서 볼 때 막분리현상에서 일반적으로 나타나는 것처럼 온도가 증가할수록 flux가 증가하는

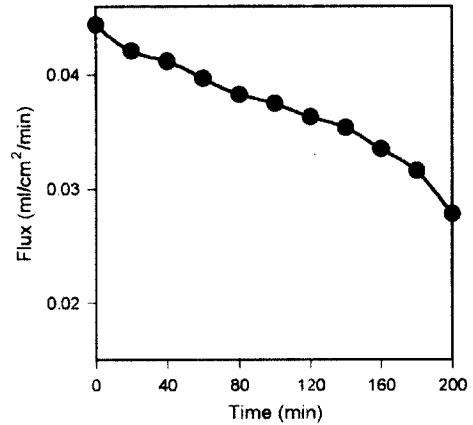


Fig. 4. Change in permeate flux with time at average transmembrane pressure of 20 psi, feed flow rate of 300 ml/min, and temperature of 23-25°C.

경향을 보여 30°C에서의 flux가 가장 높게 나타났다. 그러나 상온인 23-25°C에서도 만족할만한 flux를 얻을 수 있었고, 실제 공정적용시에 온도를 일정하게 유지하기 위한 별도의 utility 설치와 운용이 필요없다는 편이성과 비용을 고려하여 볼 때 한외여과공정을 23-25°C에서 실시하는 것이 효과적일 것으로 사료되며, 이에 한외여과 공정 운용온도를 상온(23-25°C)으로 결정하였다.

#### 시간에 따른 flux 변화

이상의 결과에서 얻은 최적 조건인 유속 300 ml/min, 막 횡단 압력 20 psi 및 23-25°C에서 여과액의 flux 변화를 용적농축비(VCR) 10.0이 될 때까지 3회 반복 측정하였다(Fig. 4). 한외여과 초기의 flux는 0.0444 ml/cm²/min로 나타났으나 시간이 경과함에 따라 flux는 지속적으로 감소하여 약 2시간 경과 시에 초기 flux의 80%로, 한외여과 종료시점인 VCR 10.0이 되는 3시간 20분 경과 시에는 초기 flux의 62%로 감소되었다. 이는 일반적인 한외여과 flux가 초기에 어느정도 일정하게 유지되다가 점차 감소하는 것에 비해 처음부터 지속적으로 감소하는 경향을 보이는 것으로 약간의 차이가 있으며, 이러한 flux의 감소는 투입 시료의 막 침착현상, 농도 분극 현상 등에 기인한 것으로<sup>(2)</sup> 농도 분극 현상은 단백질, pectin, cellulose 및 hemicellulose와<sup>(3)</sup> 같은 물질 등에 의해 발생하는데 본 실험에 사용된 시료의 농도 분극 현상의 주된 원인은 xylan에서 유래한 cellulose, hemicellulose 등이며 이들 물질이 막 표면에 gel 층을 형성하는 것으로 추정한다.

Table 2. Effects of ultrafiltration on composition of xylooligosaccharides

	Fraction	Brix	Soluble solids (%)	Total sugar (mg/ml)	Ash(%)	Protein( $\mu$ g/ml)
Before UF	-	3.8	2.73	12.2	0.21	148.6
After UF	Permeate	3.6	2.45	11.2	0.21	66.5

Table 3. Effects of ultrafiltration on oligosaccharide contents of xylooligosaccharides

	Fraction	Xylose (%)	Xylobiose (%)	Xylotriose (%)	>Xylotriose (%)
Before UF	-	7.2	26.5	5.0	0.1
After UF	Permeate	7.2	25.3	4.9	0.1

### 일반성분 및 xylooligosaccharides 함량 변화

Crude xylooligosaccharides를 이상의 결과에서 얻은 최적 조건인 유속 300 ml/min, 막 횡단 압력 20 psi 및 23-25°C에서 용적농축비(VCR) 10.0이 될 때까지 한외여과한 후 여과액을 여과 전 crude xylooligosaccharides와 비교하여 당농도, 고형분, 총당, 회분 및 단백질 성분 등을 측정하였다(Table 2).

여과 전 당농도는(3.8 brix) 용적농축비를 10.0으로 했음에도 불구하고 한외여과 후, 여과액에서 3.6 brix를 나타내 매우 높은 회수율(95%)을 보였다. 회분은 한외여과와 관계없이 여과 전, 후에 차이가 없었으며 고형분 함량도 여과 후 10%정도 감소하였으나 큰 차이를 보이지는 않았다.

단백질 함량은 한외여과 전(148.6  $\mu$ g/ml) 비해 여과 후에 55%(66.5  $\mu$ g/ml)로서 단백질 제거 효과를 보였는데 이는 당액의 탁도에 관여하는 미량의 단백질 성분을 제거하여 투명성을 증진시키는 것으로 사료된다. 총당의 경우에는 한외여과 후 여과액으로 92%의 회수율을 보였는데 나머지 회수하지 못한 당은 분자량이 큰 단백질을 한외여과로 제거할 때 단백질과 견고히 결합하고 있는<sup>(14)</sup> 당으로 존재하기 때문으로 생각한다.

올리고당 함량은 한외여과 전의 crude xylooligosaccharides액과 여과 후의 여과액을 HPLC를 이용하여 분석하였으며 그 결과 한외여과가 올리고당의 함량에 영향을 미치지 않는 것으로 생각한다(Table 3). xylooligosaccharides 중 xylobiose의 함량이 가장 높아, 한외여과 전, 후 25-26%를 차지하고 있었으며 나머지 올리고당도 한외여과와 관계없이 변화가 없었다. 올리고당의 경우 시료 내에서 수용상태로 존재하기 때문에 본 실험에 사용한 한계분자량 10,000의 한외여과막이 고분자 물질만을 선택적으로 제거하고 올리고당은 모두 회수한 것으로 사료된다.

### 시간에 따른 색도 변화

일반적으로 올리고당의 탈색공정으로는 활성탄을 주로 사용하고 있으나<sup>(4)</sup> 활성탄의 재생, 활성탄에 흡착된 올리고당의 용출 등의 과정이 필요하며 용출시의 회수율도 높지 않은 단점이 있어 저 농도 올리고당의 탈색에는 적합하지 않다. 이에 본 연구에서는 한외여과를 이용한 탈색효과를 확인하고자 시간에 따른 flux의 변화를 측정하기 위하여 사용한 조건과 동일한 조건에서 시간의 경과에 따른 여과액의 색도 변화를 용적농축비 10.0이 될 때까지 측정하였다(Fig. 5).

한외여과 전 시료의 흡광도(420 nm)는 1.0454였으나 한외여과 초기 0.1159로 급속히 여과 전 색도의 89%가 줄어들었다. 시간이 경과함에 따라 색도 제거율이 약간씩 감소하는 경향이 있었지만 한외여과 종료시점인 용적농축비 10.0이 될 때까지도 색도 제거 효과를 유지할 수 있었으며 종료시점인 여과 후 3시간 20분이 경과하였을 때도 여과 전 색도의 76%를 제거하는 효과가 있었다. 여과 종료 후 여과액의 평균 색도는 0.1684로 여과 전 색도의 84%를 제거하였음을 확인하였다. 한외여과 전 crude xylooligosaccharides의 색깔은

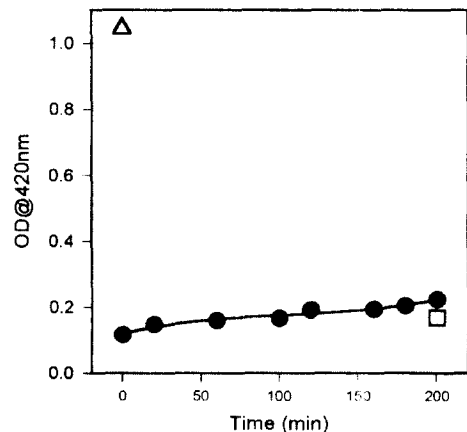


Fig. 5. Changes in color with time at average transmembrane pressure of 20 psi, feed flow rate of 300 ml/min, and temperature of 23-25°C.

올리고당의 원료인 xylan을 옥수수수입(corn cob)으로부터 알칼리 추출과정 중에 hemicellulose인 xylan과 함께 색깔의 주된 원인인 화학적으로 변형된 lignin을<sup>(12)</sup> 동시에 추출하였기 때문이다. 또한 lignin을 포함한 원료 xylan과 xylanase가 반응 시 원료에 있는 lignin을 xylanase로 추출하여<sup>(12)</sup> 이로인해 올리고당내 색도가 더욱더 증가하는 것으로 생각한다.

Xylooligosaccharides의 색도는 올리고당의 상품가치를 매우 저하시키므로 제조과정에서 필수적으로 비용과 효율을 고려한 탈색공정을 거쳐야 하는데 이러한 측면을 고려하면 활성탄을 이용한 탈색, 정제공정에 비하여 이상의 결과에서 얻은 한외여과 방법이 xylooligosaccharides의 탈색, 정제에 매우 효과적인 방법임을 확인할 수 있었다.

## 요 약

Xylan과 xylanase의 효소반응 후 생성되는 crude xylooligosaccharides를 효과적으로 정제하기 위하여 한외여과를 실시하였다. 한외여과의 최적인 조건을 확인하고자 5, 10, 20, 30 psi의 막 횡단 압력에서 유속(100, 200, 300, 400 ml/min) 및 온도(10, 20, 23-25, 30°C)를 변화시키며 실험을 실시하였고 시간에 따른 flux의 변화를 관찰하였다. 또한 한외여과 효과를 알아보기 위해 한외여과 전, 후의 이화학적 특성 및 올리고당을 분석하였다. 유속과 온도에 따른 flux 변화를 관찰하여 시료의 최적 유속(300 ml/min), 최적 막 횡단 압력(20 psi) 및 운전 온도(23-25°C)를 결정하였다. 최적인 조건에서 시간에 따른 flux 변화는 한외여과 종료시점인 VCR 10.0에서 초기 flux의 62% 수준의 flux를 나타냈다. 한외여과에 따른 일반성분의 변화는 당농도, 고형분, 총당 및 회분에서는 차이를 보이지 않았으나 단백질의 경우에는 여과 후 55%의 제단백 효과가 있었다. 한외여과 전, 후의 xylooligosaccharides 함량 변화는 관찰할 수 없었으며 한외여과 여부가 올리고당 함량에는 영향을 미치지 않는 것으로 생각한다. 시간에 따른 색도의 변화는 한외여과 전 시료 색도(1.0454 at 420 nm)와 한외여과 후 색도를 비교하면 평균 84%(0.1648 at 420 nm) 제거할 수 있는 결과를 얻었으며 한외여과 방법이 crude xylooligosaccharides의 탈색에 매우 효과적인 방법임을 확인할 수 있었다.

## 문 헌

- quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254 (1976)
- Cheryan, M. *Ultrafiltration Handbook*. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, USA (1986)
- Chiang, B.H. and Yu, Z.R. Fouling and flux restoration of ultrafiltration of passion fruit juice. *J. Food Sci.* 52: 369-371 (1987)
- Kang, S.K., Chung, H.K. and Sohn, H.S. Purification of oligosaccharides from soybean using activated charcoal. *Food and Biotech.* 3: 156-159 (1994)
- Kim, J.H., Hur, S.S. and Choi, Y.H. Studies on the efficient clarification process of apple juice with ultrafiltration process. *Food and Biotech.* 4: 79-84 (1995)
- Kirk, D.E., Montgomery, M.W. and Kortekaas, M.G. Clarification of pear juice and grapefruit pulp wash. *J. Food Sci.* 48: 1663-1666 (1983)
- Koo, B.J., Oh, H.G., Cho, K.H., Yang, C.K., Jung, K.H. and Ryu, D.Y. Purification and characterization of *Clostridium thermocellum* xylanase from recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 414-419 (1996)
- Masako, O., Shigeaki, F. and Nobuya, M. Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria. *Bifidobact. Microfl.* 9: 77-86 (1990)
- Oh, H.G., Lee, J.W., Lee, C.S., Park, Y.J., Lee, U.T., Yang, C.K. and Yoon, S.W. Production of xylooligosaccharide from the corn cob 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 (1998)
- Padilla-zakour, O. and Mclellan, M.R. Optimization and modeling of apple juice cross-flow microfiltration with a ceramic membrane. *J. Food Sci.* 58: 369-374 (1993)
- Pouliot, G. and Goulet, J. Hollow fiber ultrafiltration of maple sap: A performance study. *J. Food Sci.* 52: 1394-1396 (1987)
- Visser, J., Beldman G., Kusterws M.A. and Voragen A.G.J. *Xylans and xylanases*. Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1992)
- Ku, K.H., Park, D.J. and Mok, C. Soy-oligosaccharide production from yeast fermented bean cooking water: Effects of ultrafiltration and reverse osmosis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 680-686 (1997)
- Lee, E.Y. and Woo, G.J. Optimization of separation process of bioflavonoids and dietary fibers from tangerine peels using hollow fiber membrane. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 151-160 (1998)
- Lee, J.W., Park, Y.J., Oh, H.G., Lee, C.S., Lee, U.T., Yang, C.K. and Yoon, S.W. Xylan extraction from corn cob. pp. 466-469. In: *Proceedings of KSBB Spring Scientific Meeting*. The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering, Seoul, Korea (1999)

(1999년 7월 12일 접수)