

Biphasic system에 의한 생난황으로부터 시알산 함유 올리고당의 제조

김 상 진 · 임 한 진 · 안 병 용 · 최 동 성
한림환경기술연구소, ¹우석대학교 기초 및 자연과학연구소, ²우석대학교 생명공학부
(접수 : 2000. 1. 12., 게재승인 : 2000. 2. 21.)

Preparation of Sialyloligosaccharide from Raw Egg Yolk in Biphasic System

Sang-Jin Kim, Han-Jin Lim, Byung-Young Ahn¹, and Dong-Seong Choi^{†2}
Hanlim Environmental Technology & Research, Kuro, Seoul 152-082, Korea
¹Institute of Basic and Natural Science, ²Division of Bioscience and Biotechnology,
Woosuk University, Jeonbuk 565-701, Korea
(Received : 2000. 1. 12., Accepted : 2000. 2. 21.)

Protease-catalyzed liberation of sialyloligosaccharide from raw egg yolk was investigated in biphasic system, water-immiscible hexane system. Biphasic system I, in which water was the continuous phase, was better than the opposite biphasic system II in sialyloligosaccharide liberation. The optimal conditions of temperature, water content and reaction time were 30°C, 20% and 12 hours, respectively. Protease activity was strongly influenced by the amount of water present in the reaction mixture. The liberation of sialyloligosaccharide was accelerated by protease pre-treatment at 30°C in 0.2 M NaCl solution, prior to addition of hexane (Biphasic system I).

Key Words : sialyloligosaccharide, raw egg yolk, protease, biphasic system, water-immiscible hexane

서 론

시알산(sialic acid)은 neuraminic acid의 아실 유도체의 총칭으로 현재 동물계에 20여종 이상이 알려져 있으며(1), 바이러스에 대한 리셉터 작용, 독소의 중화, 세포와 분자의 면역학적 인식 사이트, 세포접착, 암의 전이 등 중요한 생리기능에 관여하고 있는 산성당으로서(2), 대사과정에서 일시적으로 유리형으로 존재할 뿐, 대부분 당쇄의 비환원 말단에 글리코시드로 결합되어 올리고당의 형태로 존재한다(1). 한편 모유에는 130 종류 이상의 올리고당이 존재하지만, 그 중에서 sialyllactose와 sialyllacto-N-tetraose 만이 시알산을 함유하고 있다(1).

시알산 함유 올리고당으로서는 당단백질 분자중에 존재하는 올리고당쇄, ganglioside에 존재하는 올리고당쇄, 당단백질 및 ganglioside로부터 유래하여 존재하는 올리고당 펩타이드와 올리고당쇄 등이 있다. 당단백질에 존재하는 시알산 함유 올리고당은 항염증작용, 바이러스 감염의 예방 및 학습기능의 향상 등을 목표로 한 의약품 및 기능성 식품의 소재로 수요가 증가되고 있어(3), 시알산 함유 올리고당의 대량 생산과 안정적인 공급이 과

제가 되고 있다. 종래에는 조류의 난황으로부터 시알산 함유 올리고당을 제조하기 위하여 겔여과, 음이온 교환 크로마토그래피법을 이용하였으나 제조공정이 복잡하며, 공업적 규모로 제조하기에는 문제점을 안고 있었다(3).

시알산 함유 올리고당 제조공정 개선에 관한 연구로는 탈지난황의 수용성 분획을 hydrazine 분해-제아세틸화해서 제조하는 방법(4)과 탈지난황을 직접 protease로 분해, 수용화시켜 제조하는 방법(5)이 보고되었으나, 전자는 고가의 시약을 사용하므로 대량 조제가 어렵고, 후자는 탈지난황 모두를 수용화시키기 위해 다량의 protease를 필요로 하고 잔류 단백질의 재활용이 어렵다는 문제점 등이 있다. Yamamoto(3)는 꿀 또는 염 용액으로 탈지난황을 추출하여 수용성 단백질만을 얻은 후, 이 추출 여액에 protease를 처리하는 방법으로 추출 잔사에 남아있는 불용성 단백질의 재활용성을 높였으나, 탈지난황을 얻기 위해서는 유기용매로 처리해야 한다는 단점이 있다. 한편 생난황에 직접 protease를 처리하는 것도 지질에 의한 유화로 인해 제조공정에 문제점을 주고 있다.

본 연구에서는 이러한 전처리를 생략하고 시알산 함유 올리고당을 생난황으로부터 직접 제조하는 biphasic system, 즉 생난황중에 존재하는 당과 단백질의 결합형태로 존재하는 올리고당쇄는 protease를 처리하여 단백질 부분을 여별하고, 동시에 당과 지질과의 결합형태로 존재하는 올리고당쇄는 유기용매로 처리하

[†] Corresponding Author : Division of Bioscience and Biotechnology, Woosuk University, Samrye, Jeonbuk 565-701, Korea
Tel : 0652-290-1430. Fax : 0652-291-9312
E-mail : dschoi@core.woosuk.ac.kr

여 지질 부분을 oil상으로 용출시킬 수 있는 biphasic system의 최적조건을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 효소

시중에서 구입한 달걀로부터 난황을 제조하여 사용하였고, 탈지난황은 난황분말을 3배량의 에탄올로 균질화한 다음 여과하여 제조하였다. Protease는 Protcase A(Amano), Sumyzyme LP50 (Shin Nihon Chemical), Denazyme AP(Nagase), Corolase PN-L (Huls), Protease N(Amano), Corolase N(Huls), Corolase 7089 (Huls), Alcalase 0.6L(Novo), Neutrase 0.5L(Novo), papain (Nagase) 등 10종을 구입하여 사용하였다

시약 및 기구

N-acetylneuraminic acid, resorcinol, periodic acid, casein, Folin & Ciocal's phenol reagent는 Sigma사에서 구입하여 사용하였고, *n*-헥산은 1급 시약을 증류하여 사용하였다. 분광광도계는 Shimadzu UV-1601PC, 진탕교반기는 Uni thermoshaker NTS-1300(Eyela 사), Diaflo 한외여과막(M.W. 30,000)은 Amicon사, Ultrafree MC filter (NMWL 5000)는 Millipore사의 제품을 사용하였다.

효소활성 및 시알산의 분석

Protease의 활성은 Anson 법(6)을 변형하여 측정하였다. 즉, 0.5% milk casein 용액 20 mL [0.02 M Na₂HPO₄ (pH 7.0 at 30 °C)에 용해]에 효소 0.5 mg을 첨가하고, 50°C에서 16시간 동안 반응시킨 다음, 반응액 2.0 mL를 취해 0.1 M trichloroacetic acid 2.0 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액을 여과하고, 여액 1 mL에 0.4 M Na₂CO₃ 5 mL와 5배 희석된 phenol reagent 1 mL를 혼합한 다음 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, 효소활성은 1분당 milk casein으로부터 1 μg의 tyrosine을 유리하는 양을 1 protease unit(PU)로 하여 정하였다. 시알산은 periodate-resorcinol 법(7)으로 분석하였다. 즉 시료 0.2 mL에 DW 0.3 mL, 0.04 M periodic acid 0.1 mL를 첨가하여 4°C에서 20분간 방치한 다음, 0.6% resorcinol reagent (28% HCl 60 mL, H₂O 40 mL, CuSO₄ 25 μmole을 함유하는 용액)를 1.25 mL 첨가하여 다시 4°C에서 5분간 방치하였다. 다음에 100°C에서 15분간 반응시키고 3분 동안 tap water로 냉각한 다음, 95% *tert*-butanol 1.25 mL를 첨가하여 두 반응액이 완전히 섞일 때까지 vortex하고 37°C에서 3분간 발색시약을 안정화시킨 후, 실온에서 15분간 냉각시켰으며, 이 반응액의 흡광도를 630 nm에서 측정하고 유리되는 시알산의 양을 *N*-acetylneuraminic acid로 정량하여 시알산 함유 올리고당으로 하였다.

Biphasic system

난황으로부터 시알산 함유 올리고당을 제조하기 위한 biphasic system (water-immiscible organic solvent system)에서의 반응 및 정제방법은 Yamamoto(3)와 Morita 등(8)의 방법에 준하여 행하였다. 즉 생난황 10 g에 0.2 M NaCl 40 mL를 첨가하여 30분간 교반한 다음 protease 100 mg을 첨가하고, 30분간 교반한 다음 헥산 160 mL를 첨가하여 교반하였다(Biphasic system I, BSI).

Table 1. Sialyloligosaccharide contents liberated from defatted egg yolk in aqueous system

Protease	Enzyme activity (PU/0.5 mg protease)	Sialic acid (mg)	Recovery yield (%)
Protease A	1,280	1.06	25.6
Sumyzyme LP 50	1,200	0.79	18.1
Denazyme AP	1,240	0.61	14.9
Corolase PN-L	1,060	1.04	23.9
Protease N	1,180	1.45	23.9
Corolase N	1,120	1.02	20.6
Corolase 7089	1,100	1.18	21.6
Alcalase 0.6L	1,140	0.76	18.3
Neutrase 0.5L	1,020	0.98	20.0
Papain	780	0.91	16.7

또 다른 방법으로서 생난황 10 g에 헥산 160 mL를 첨가하여 3시간 교반, 추출하고, 여기에 protease 100 mg을 0.2 M NaCl 40 mL에 용해, 첨가하여 교반하였다(Biphasic system II, BSII). 교반은 200 rpm에서 왕복 진탕하여 행하였다. BS I과 II는 생난황에 NaCl 용액, protease와 헥산을 첨가하는 시기를 각기 달리 한 것이다. 정시적으로 반응액을 0.5 mL씩 eppendorf tube에 채취한 다음, 12,000 rpm으로 원심 분리하여 침전물을 제거하였으며, 그의 상등액 0.3 mL를 취하여 Ultrafree-MC filter(M.W. 5,000)에 넣고 60분간 원심 분리하였다(3,000×g). 한외 여과된 여액 0.2 mL를 취하고 시알산의 양을 *N*-acetylneuraminic acid로 정량하여 시알산 함유 올리고당으로 하였다.

결과 및 고찰

시알산 함유 올리고당 생산에 적합한 효소의 검색

시알산 함유 올리고당의 생산에 적합한 효소를 검색하기 위하여 protease A, sumyzyme LP50, denazyme AP, corolase PN-L, protease N, corolase N, corolase 7089, alcalase 0.6L, neutrase 0.5L, papain 등의 효소를 Yamamoto(3)의 방법인 aqueous system에서 실험하였다. 즉 탈지난황 10 g에 0.2 M NaCl 50 mL를 첨가하고 30°C에서 100 rpm으로 3시간 진탕 교반하여 수용성 당단백질을 추출한 다음, 효소를 각각 50 mg씩 첨가하여 10시간 동안 반응시켰다. 반응액을 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻고 No. 2 여과지로 여과하였다. 얻어진 여과액을 분획분자량 30,000의 한외 여과막을 이용하여 4°C에서 한외여과하고 시알산 함량을 측정하였다. 이 결과는 Table 1에 나타내었다. 10 종류의 효소 중 시알산 함유 올리고당 생산수율이 protease N > corolase 7089 > protease A > corolase PN-L > corolase N > neutrase 0.5L > papain > sumyzyme LP50 > alcalase 0.6L > denazyme AP의 순으로 나타났다. 이 중에서 우수한 효소활성과 시판가를 고려하여 protease A(25.6%, 1.06 mg), corolase 7089(21.6%, 1.18 mg) neutrase 0.5L(20.0%, 0.98 mg) 등의 3종류의 효소를 선택하여 biphasic system에서 생난황으로부터의 시알산 함유 올리고당의 생산수율을 비교하기 위한 실험에 사용하기로 하였다. Yamamoto(3)는 aqueous system에서 protease를 처리하여 탈지난황의 당단백질로부터 시알산 함유 올리고당을 유리시키는 데에는 최적 pH가 7~8인 *Aspergillus*와 *Bacillus* 유래의 endo protease가 적합하다고 보고한 바 있다.

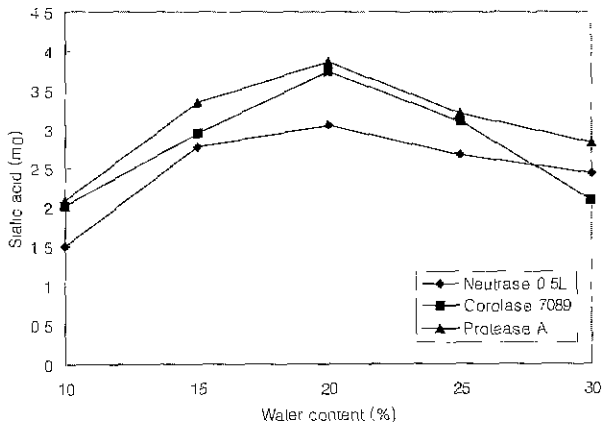


Figure 1. Effect of water content on the sialyloigosaccharide liberation from raw egg yolk in biphasic system I. The concentration of sialic acid was measured by periodate-resorcinol method

Biphasic System에서의 함수율의 영향

Biphasic system에 있어서 난황중의 수용성 당단백질을 추출하기 위해 0.2 M NaCl 용액을 사용하였는데, 0.2 M NaCl의 농도에서 시알산 함유 올리고당의 제조수율이 가장 우수하였다는 보고(3)와 유기용매 중에서 염 용액은 유기용매에 의한 효소의 불활성화를 방지하고 효소의 구조를 유지하는 데에 도움을 준다는 보고(9)를 참고하였다. 그리고 유기용매로서 유지의 추출정제에 사용되는 n-헥산은 사용하였는데, 20β-hydroxysteroid dehydrogenase가 헥산 중에서 안정하다는 보고(10,11), 탄화수소와 같이 소수성이 높은 용매가 효소반응의 매질로 좋다는 보고(12)를 참고하였다.

Biphasic system에서 친수성 효소의 활성 발현을 위해서는 물의 존재가 필수적이고(11), 가수분해물에 water/dodecane율이 영향을 미친다는 보고(8)에 따라 함수율의 영향을 조사하였다. 함수율을 5~50%의 비율로 헥산과 혼합하고(총 반응부피 200 mL), protease A, corolase 7089, neutrase 0.5 L을 각각 100 mg, 생난황 10 g을 첨가하여 30℃, 200 rpm에서 12시간 반응시켰다 (biphasic system I). Figure 1에서와 같이 함수율 20%에서 protease의 가수분해 활성 또는 시알산 함유 올리고당의 유리량이 크게 증가하였다. 20% 이상과 이하의 함수율에서는 효소의 가수분해 활성이 감소된 결과는 소수성 유기 용매인 헥산에 의해 친수성인 protease의 활성이 감소되었음을 시사하며, biphasic system에 있어서 효소의 가수분해 활성에 절대량의 물이 필요함이 시사되었다.

Biphasic system I과 biphasic system II의 비교

기질인 생난황을 첨가한 조건에서 시알산 함유 올리고당을 당단백질로부터 유리시키기 위한 효소의 반응조건을 biphasic system I과 II에서 검토하였다. 실험 결과는 Table 2에 나타내었다. BS I의 경우, 3종류의 효소 모두 50℃에서 보다 30℃에서 시알산 함유 올리고당의 생산 수율이 높았다. 30℃에서는 50℃에 비하여 헥산 첨가 12시간 후에 protease A의 경우 36.5%, corolase 7089의 경우 18.6%, neutrase 0.5L의 경우 27.0%의 생산수율이 증가되었다. 시알산의 양은 반응 12시간까지 증가하였으나 그 이후부터는 거의 증가되지 않았다. 30℃에서 12시간 반응한 결과 protease A의 경우 3.78 mg, corolase 7089의 경우

Table 2. Effects of temperature and time on the sialyloigosaccharide liberation from egg yolk digested by protease A, corolase 7089, and neutrase 0.5 L in biphasic systems, respectively.

Biphasic system	Protease	Temperature	Time (hour)						
			1	3	6	9	12	15	21
I	Protease A	30℃	1.43	2.03	2.92	3.42	3.78	3.81	3.92
		50℃	1.36	2.16	2.37	2.68	2.77	2.84	2.92
	Corolase 7089	30℃	1.15	2.06	3.01	3.58	3.76	3.81	3.86
		50℃	2.23	2.23	3.04	3.12	3.17	3.20	3.35
	Neutrase 0.5L	30℃	1.20	2.20	2.59	2.91	3.06	3.09	3.17
		50℃	0.83	1.28	2.30	2.36	2.41	2.57	2.60
II	Protease A	30℃	0.75	1.51	2.22	2.57	2.75	2.84	2.89
		50℃	0.86	1.44	2.06	2.42	2.65	2.86	2.88
	Corolase 7089	30℃	1.19	1.84	2.05	2.14	2.16	2.50	2.59
		50℃	1.02	1.56	1.88	2.04	2.11	2.22	2.31
	Neutrase 0.5L	30℃	0.64	0.98	1.39	1.88	1.99	2.14	1.99
		50℃	0.71	1.10	1.31	1.87	1.88	2.08	2.21

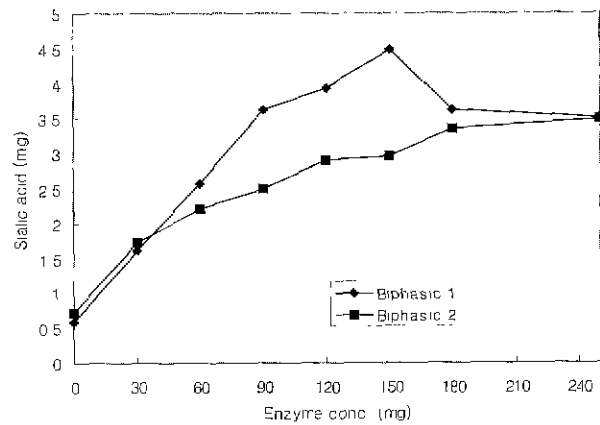


Figure 2. Effect of protease A concentration on the sialyloigosaccharide liberation from raw egg yolk in biphasic system I and biphasic system II. The concentration of sialic acid was measured by periodate-resorcinol method

3.76 mg, neutrase 0.5L의 경우 3.08 mg의 생산량이 얻어졌다. BS II에서는 시알산 함유 올리고당 생산에 대한 반응 온도(30, 50℃)의 영향은 거의 없었다. 헥산을 첨가하여 15시간 반응시켰을 때 최대 생산량을 나타내었으나, 시알산 함유 올리고당의 생산 수율은 BS I에 비하여 보다 감소되었다. 15시간 반응 후 protease A의 경우 2.84~2.86 mg, corolase 7089의 경우 2.22~2.50 mg, neutrase 0.5 L의 경우 2.08~2.14 mg의 시알산이 얻어졌다. 이러한 결과로부터 BS I이 II에 비하여 생산수율이 우수한 반응계임을 알 수 있었다.

두 반응계에서의 최적 효소 농도를 조사하기 위하여 30℃에서 효소를 각각 30, 60, 90, 120, 150, 200, 250 mg을 첨가하여 15시간 반응한 실험 결과는 Figures 2, 3, 4에 나타내었다. BS I에 있어서 protease A의 경우 150 mg의 효소를 첨가했을 때 4.47 mg, corolase 7089의 경우 150 mg의 효소를 첨가했을 때 4.31 mg, neutrase 0.5 L의 경우 200 mg의 효소를 첨가했을 때 3.35

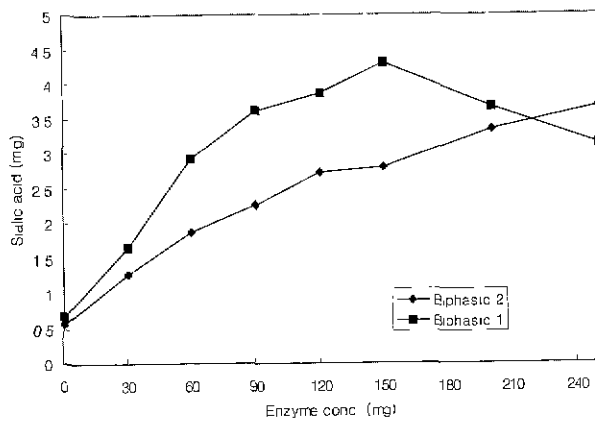


Figure 3. Effect of corolase 7089 concentration on the sialyloligosaccharide liberation from raw egg yolk in biphasic system I and biphasic system II. The concentration of sialic acid was measured by periodate-resorcinol method

mg의 시알산 함유 올리고당이 얻어졌다. BS II에 있어서는 protease A의 경우 250 mg의 효소를 첨가했을 때 3.49 mg, corolase 7089의 경우 250 mg의 효소를 첨가했을 때 3.67 mg, neutrase 0.5L의 경우 250 mg의 효소를 첨가했을 때 2.65 mg의 시알산 함유 올리고당이 얻어졌다. BS I이 BS II에 비하여 더 적은 효소량으로 더 많은 시알산 함유 올리고당을 얻을 수가 있었다. 이러한 결과는 효소의 활성 차이에 기인한 것으로 사료된다 즉 BS I에서는 충분한 microemulsion [small water-in-oil(w/o) type enzyme-substrate particles]이 형성되어 enzyme-substrate interaction이 안정적으로 되어 가수분해율이 높아진 반면, 소수성인 유기 용매가 다량 함유된 곳에 친수성인 효소를 첨가하는 BS II에서는 충분한 microemulsion이 형성되지 않아 활성이 감소된 것으로 사료된다 이상의 결과로부터 시알산 함유 올리고당의 생산을 위한 biphasic system은 BS I이 더 경제적이라 생각되었으며, 앞으로의 실험에서 핵산층에 생리적 활성기능을 갖는 lecithin이나 arachidonic acid와 같은 유용한 물질이 얼마나 추출될 수 있는지를 분석하고, 그의 이용 가능성을 찾아야 할 것으로 사료된다.

요 약

생난황으로부터 시알산 함유 올리고당을 직접 생산하기 위한 biphasic system(water-immiscible hexane system)의 최적 조건을 조사하였다. Biphasic system I은 II보다 생산수율이 높았으며, 온도, 함수율 및 반응 시간의 최적조건은 각각 30°C, 20%, 12시간이었다. Biphasic system I에서, 난황을 가수분해하기 위한 3종류의 효소(protease A, corolase 7089, neutrase 0.5L)의 활성은 함수율과 온도에 강하게 영향을 받았으나, biphasic system II에서는 온도(30°C와 50°C)의 영향을 거의 받지 않았다. 두 종류의 biphasic system에서 반응시간 12시간까지는 시알산 함유 올리고당의 생산량이 증가되었으나, 15시간 이후에는 거의 증가하지 않았다.

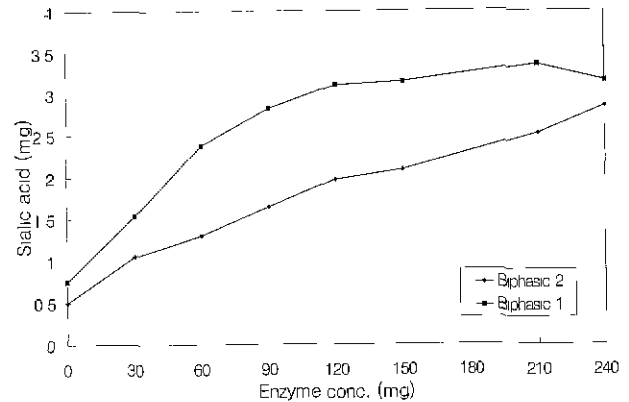


Figure 4. Effect of neutrase 0.5L concentration on the sialyloligosaccharide liberation from raw egg yolk in biphasic system I and biphasic system II. The concentration of sialic acid was measured by periodate-resorcinol method.

감 사

본 연구는 산업자원부(통상산업부) 공업기술개발사업에 의해 지원을 받았으며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hatta, H., L. R. Juneja, and T. Yamamoto (1997), Chemistry and Applied Chemistry of Hen Eggs (in Japanese), *Kagaku to Seibutsu*, **35**(4), 274-281.
- Schauer, R. (1982), Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **40**, 131-234.
- Yamamoto, T. (1996), Method for Preparing Sialyloligosaccharide (in Japanese), JP 08099988(A).
- Koketsu, M., L. R. Juneja, M. Kim, M. Ohta, F. Matsuura and T. Yamamoto (1993), Sialyloligosaccharide of delipidated egg yolk fraction. *J. Food Sci.*, **58**, 743-747.
- Koketsu, M., A. Seko, L. R. Juneja, M. Kim, N. Kashimura and T. Yamamoto (1995), An efficient preparation and structural characterization of sialyloligosaccharides from protease treated egg yolk, *J. Carbohydr. Chem.*, **14**, 833-841.
- Nakadai, T., S. Nasuno, and N. Iguchi (1973), Purification and Properties of Alkaline Proteinase from *Aspergillus oryzae*, *Agri. Biol. Chem.*, **37**, 2685-2694.
- Jourdian, G.W., L. Dean and Roseman, S. (1971), The sialic acids, XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *J. Biol. Chem.*, **246**, 430-435.
- Morita, T., H. J. Lim, and I. Karube (1995), Enzymatic hydrolysis of polysaccharide in water-immiscible organic solvent, biphasic systems. *J. Biotech.*, **38**, 253-261.
- Khmelnitsky, Y. L., S. H. Welch, D. S. Clark, and J. S. Dordick (1994), Salts dramatically enhance activity of enzymes suspended in organic solvents. *J. Am. Chem. Soc.*,

- 116, 2647-2648.
10. Carrea, G. (1984), Biocatalysis in water-organic solvent two-phase system, *Trends in Biotechnology*, **2**, 102-106.
 11. Antonini, E., G. Carrea and P. Cremonesi (1981), Enzyme catalyzed reaction in water-organic solvent two-phase systems, *Enzyme Microb. Technol.* **3**, 291-296.
 12. Rhee, J. S. and D. S. Han(1988), Enzyme Catalysed Reactions in Non Water System (in Korean), *Biochem, Eng.*, **2**(2), 8-13.