

한천의 산 당화에 의한 Furan화합물의 생성 및 제거

김나현¹ · 이재원¹ · 서영범² · 윤민호^{1*}

Formation of Furans during the Acid Hydrolysis of Agar and Their Removal by Treatments of Lime, Steam-stripping and Hydrophobic Resins

Na-Hyun Kim¹ · Jae-Won Lee¹ · Yung-Bum Seo² · Min-Ho Yoon^{1*}

ABSTRACT

The ratio of saccharification and formation of furans during the acid hydrolysis of agar with oxalic acid and sulfuric acid were examined base on the contents of the agar and acids. The ratio of saccharification in oxalic acid appeared to be 51~59% somewhat higher than 49~61% of sulfuric acid. Formation of the furans during the acid hydrolysis increased proportional to the contents of agar and acid. The relative formation ratio was high 10~47% for furfural (FUR) and 15~29% for hydroxy-methyl furfural (HMF) in 0.5~1.25% sulfuric acid rather than those of oxalic acid. When comparing the removal efficiency of the furans using an alkali treatment, steam stripping and hydrophobic resins, FUR was eliminated 60% by the alkali treatment, 62~90% by steam stripping and 71~75% by Amberlite XAD4 and 7HP, while HMF was removed to low levels of 10.5%, 4~17% and 13~25%, respectively. The loss of reducing sugar was also observed

2009년 10월 15일. 접수: 2009년 11월 12일. 수정: 2009년 12월 08일 채택

이 논문은 한국해양기술진흥원에서 시행한 해양과학기술개발사업(2009) 연구결과의 일부임.

¹ 충남대학교 농업생명과학대학 응용생물화학식품학부 생물환경화학전공

² 충남대학교 농업생명과학대학 환경임산자원학부 임산공학전공

* 교신저자: 윤민호(E-mail: mhyoon@cnu.ac.kr, Tel: +82-42-821-6733)

in process of the removal of furans, and the loss rate was the level of 2~4% in alkali treatment, 11~16% in steam stripping and 7~9% in Amberlite resins.

Key words : Acid hydrolysis of agar, Formation and elimination of FUR · HMF

I. 서론

해조류는 대부분 다당류를 주성분으로 함유하고 있으며, 갈조류(brown algae, 갈조식물문 Phaeophyta)에는 alginic acid, laminarin, mannitol 그리고 fucoidin 등이 있고, 홍조류(red algae, 홍조식물문 Rhodophyta)에는 한천(agar-agar), carrageenan 그리고 porphyran 등이 알려져 있다.

한천은 홍조류 추출물로부터 제조되며 미생물배양 및 조직배양 배지의 응고제 등의 실험용으로 (Tao, 2009), 또는 식품안정제인 점도증가제(gum)의 용도(Liu, 2005)로 사용되고 있으며, 최근에는 석유의 대체 에너지 자원으로 홍조류를 이용한 당화효소연구(Cha, 2009), 바이오 에탄올 생성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(김, 2007). 김(2008)은 홍조류(*Gelidiales*목) 추출물이 D-/L-galactose 93.5%, glucose 3.9%, fucose 1.5% 및 xylose 1.2%로 구성되어 있으며 그 가수분해물은 D-/L-galactose 67.6%, glucose 4%, fucose 24.2% 및 xylose 4.3%로 구성됨을 밝히고, 산분해 과정에서 생성되는 2-furaldehyde [furfural, FUR]와 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde [5-(hydroxymethyl)-2-furfural, HMF]가 효모 *Saccharomyces cerevisiae* 균주의 생육저해에 관하여 보고한 바 있다.

산분해 과정에서 생성되는 이들 furan 물질을 제거하기 위하여 다수의 연구가 이루어져 왔다

(Farone, 1997; Mansilla, 1998; Demirbas, 2006; 조순영, 1998). Warner 등 (2008)은 corn stover를 sulfuric acid로 분해하였을 때 생성되는 furan에 대하여, 알칼리처리에 의하여 FUR 67%, HMF 63%, Amberlite XAD4에 의하여 FUR 67%, HMF 22% 각각 제거되었다고 보고하였다.

본 실험에서는 시약용 한천을 oxalic acid와 sulfuric acid로 가수분해하는 경우에 산의 농도에 따라 환원당이 얼마나 생성되는지를 조사하기 위하여 당화율을 측정·비교하고 동시에 분해과정에서 부수적으로 생성되는 furan화합물의 함량을 분석하였다. 또한 이들 불순물을 어떻게 제거할 수 있는지 알칼리 처리, 수증기 취입, 소수성 수지처리 등의 방법을 적용하여 각각의 제거효율을 비교하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

한천의 가수분해 및 분해산물의 분석을 위해 사용한 시약은 일급 또는 특급 시약을 사용하였다. 한천은 국내 시판품(Samchun Pure Chemical Co., Ltd) 일급제품을 사용하였고, 산 분해산물 제거를 위한 수지는 Amberlite XAD-4 및 XAD-7HP (Rohm & Haas Co./Sigma-Aldrich)을 사용하였다.

2. 산가수분해

한천분말을 증류수에 3, 5.5 및 8%로 각각 현탁시키고 여기에 oxalic acid 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5%를 각각 첨가하여 충분히 혼합한 다음 121°C에서 60분간 분해시켰다. Sulfuric acid를 사용하는 경우에는 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25%가 되도록 각각 첨가한 다음 같은 방법으로 가수분해하였다.

3. Furan화합물의 제거

1) 생석회 처리

가수분해물에 calcium oxide (CaO) 분말을 첨가하여 pH 10으로 조정하고 60분간 정치한 다음, phosphoric acid를 가하여 pH를 6.0으로 내리고 Whatman No. 2 여지로 여과하여 침전물을 제거하였다.

2) 수증기 취입

가수분해물 60 ml를 유리관 (25mmφ × 20cmH)에 넣고 수조에서 95°C 이상으로 예열한 다음 10분 또는 30분간 수증기를 취입하였다.

3) 소수성 수지 처리

가수분해물 50 ml에 5 g의 Amberlite XAD-4 및 XAD-7HP를 각각 첨가하고 실온에서 60분간 평형화시킨 다음, 이를 Whatman No. 2 여지로 여과하였다.

4. 분석방법

1) 환원당 정량

Dinitrosalicylic acid (DNS)법으로 환원당을 정량하였다(Breuil, 1985). 시험관에 시료 1 ml를 넣고 여기에 DNS시약 3 ml를 첨가한 후 5분간 끓이고 냉각시킨 다음 분광광도계(Shimadzu

UV-1240)로 흡광도(A₅₅₀)를 측정하였다. 표준물질로 galactose를 사용하였다.

2) FUR 및 HMF 정량

FUR 및 HMF의 분석은 Hiroshi 등(1985)의 변형된 방법을 통해 시료를 적정농도로 희석하여 그 10 μl를 HPLC(Jasco, PU-975)에 주입하여 분석하였다. Phenomenex Luna 5μ C18 컬럼(250 × 4.60 mm i.d.)과 UV검출기를 장착하였으며, 컬럼온도 40°C에서 물과 MeOH 9 : 1 혼액을 사용하여 0.9 ml/min의 유속으로 용출하면서 285nm에서 검출하였다. FUR, 2-furaldehyde(Sigma 185914-5ML) 및 HMF, 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde(Sigma H40807-1G)를 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

III. 결과 및 고찰

한천을 oxalic acid 또는 sulfuric acid로 가수분해하여 당화시키는 경우에 적절한 산의 농도를 알아보기 위하여, 한천 3, 5.5 및 8% 용액에 대하여 각각 0.25~1.5%의 범위에서 산의 첨가량을 달리하여 실험하였다. 이때 한천의 농도는 점성을 고려하여 취급할 수 있는 범위에서 정한 것이며, 가수분해물에 대하여는 환원당을 정량하여 원료에 대한 당화율을 계산하고 동시에 furan 물질을 정량하여 조건에 따른 FUR과 HMF의 생성율을 비교하였다.

1. Oxalic acid에 의한 한천의 가수분해 및 분해물의 성상

한천분말 3, 5.5 및 8%의 현탁액 300 ml에 oxalic acid 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5%를 각각 첨가

하여 충분히 혼합한 다음 121℃에서 60분간 분해 시켰으며, 여기에서 얻은 분해물은 알칼리처리 과정을 거쳐 여분의 산 및 불순물을 제거하였다. 이와 같은 알칼리처리 과정 전후에 각각 시료를 채취하여 환원당, FUR, HMF를 정량하여 각 조건에서의 당화율과 furan 생성량을 구하였으며, 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1에서 보는 바와 같이 oxalic acid에 의한 당화율은 51~59%의 수준을 나타내었으며, 이 범위에서 당화율은 산의 농도에 비례하여 증가하

였다. 알칼리 처리후의 환원당 함량은 처리 전보다 2~4% 감소함으로써 calcium carbonate 처리 후 침전물의 여과과정에서 소량의 환원당이 소실 되는 것을 알 수 있었다.

Oxalic acid에 의한 가수분해 과정에서 furan 물질이 생성되었으며 그 생성량은 원료 agar의 농도가 3%일 때 FUR 37~43 ppm, HMF 782~830 ppm 이었으며, agar 5.5%일 때 FUR 41~76 ppm, HMF 1,004~1,046 ppm, agar 8%일 때 FUR 72~87 ppm, HMF 1,181~1,262 ppm 이었

Table 1. Hydrolysis of agar by oxalic acid

Agar (%)	Oxalic acid (%)	Alkali treatment	Reducing sugar/ Rate of saccharification (%)	FUR (ppm)	HMF (ppm)
3	0.5	before	1.52/50.7	37	782
		after	1.43/47.7	20	652
	0.75	before	1.61/53.6	46	786
		after	1.47/49	18	720
	1.0	before	1.73/57.6	43	830
		after	1.62/54	20	751
5.5	0.75	before	2.81/51.1	41	1,004
		after	2.59/47	11	884
	1.0	before	2.89/52.5	48	1,046
		after	2.73/49.6	27	952
	1.25	before	3.15/57.3	76	1,015
		after	2.97/54	42	855
8	0.75	before	4.49/56.1	85	1,184
		after	4.09/51.1	41	1,039
	1.0	before	4.58/57.3	72	1,181
		after	4.28/53.5	28	1,020
	1.25	before	4.64/58	82	1,205
		after	4.74/56.4	41	1,112
	1.5	before	4.75/59.4	87	1,262
		after	4.54/56.8	51	1,137

Suspensions of agar, 300 ml, were hydrolyzed by various concentration of oxalic acid for 60 min at 121℃. The hydrolysates were treated by alkali that is, their pH were adjusted to 10~10.5 and stand for 60 min, and then filtered through Whatman No. 2 filter paper. The hydrolysates before and after were analysed for their contents of reducing sugar and furan compounds by spectrophotometer and HPLC.

다. Furan의 생성량은 원료의 농도가 높을수록, 그리고 산의 농도가 높을수록 다소 증가하는 경향을 나타내었다.

2. Sulfuric acid에 의한 한천의 가수분해 및 분해물의 성상

한천분말 3, 5.5 및 8%의 현탁액 300 ml에 sulfuric acid 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25%를 각각 첨가하여 충분히 혼합한 다음 전향의 oxalic acid에서와 같은 방법으로 처리하여 분석하였으며, 그 결과를 표 2에 나타내었다.

당화율 즉 환원당 생성율을 계산하여 보면, 표

2에서와 같이 49~61% 이었으며 원료 agar의 농도에 따라서는 별 차이를 나타내지 않았으나, 산의 농도가 높을수록 당화율도 높았다. Oxalic acid에 의한 당화율과 비교해 보면 sulfuric acid를 사용하였을 때 높게 나타났으며, 산농도 0.75%에서 최대 14%, 1%에서 최대 21%, 1.25%에서 최대 9%의 차이를 보였다.

Sulfuric acid 가수분해 과정에서도 furan 물질이 생성되었으며 그 생성량은 원료 agar의 농도가 3%일 때 FUR 63~72 ppm, HMF 1,029~1,102 ppm 이었으며, agar 5.5%일 때 FUR 68~80 ppm, HMF 1,139~1,260 ppm, agar 8%일 때

Table 2. Hydrolysis of agar by sulfuric acid

Agar (%)	Sulfuric acid (%)	Alkali treatment	Reducing sugar/ Rate of saccharification (%)	FUR (ppm)	HMF (ppm)
3	0.25	before	1.79/59.7	63	1,029
		after	1.68/56	21	955
	0.5	before	1.89/63	70	1,056
		after	1.73/57.7	25	973
	0.75	before	1.84/61.2	72	1,102
		after	1.75/58.3	20	994
5.5	0.25	before	2.68/48.8	68	1,139
		after	2.46/44.7	14	1,031
	0.5	before	2.94/53.5	73	1,167
		after	2.71/49.3	20	1,041
	0.75	before	3.28/59.6	77	1,233
		after	3.05/55.5	23	1,115
	1.0	before	3.38/61.4	80	1,260
		after	3.17/57.7	25	1,157
8	0.5	before	4.42/55.3	75	1,302
		after	4.25/53.1	22	1,166
	0.75	before	4.49/56.1	80	1,376
		after	4.36/54.5	29	1,231
	1.0	before	4.66/58.3	86	1,397
		after	4.48/56	32	1,252
	1.25	before	4.88/61	91	1,416
		after	4.75/59.4	35	1,272

Notes refer to Table 1, except oxalic acid is replaced by sulfuric acid.

FUR 74~90 ppm, HMF 1,301~1,415 ppm 이었다. Furan의 생성량은 원료의 농도가 높을수록, 그리고 산의 농도가 높을수록 증가하는 경향을 나타내었다. Oxalic acid의 경우보다 sulfuric acid를 사용하였을 때 furan 물질이 높게 나타났으며, FUR은 산농도 0.5%에서 최대 47%, 0.75%에서 36%, 1%에서 40%, 1.25%에서 10% 높았고, HMF는 산농도 0.5%에서 최대 26%, 0.75%에서 29%, 1%에서 17%, 1.25%에서 15% 높았다. 즉 FUR은 10~47%, HMF는 15~29%의 생성율 차이를 나타내었다. 두 종류의 산 가수분해 실험결과로부터 sulfuric acid는 oxalic acid 보다 당화율은 좋았으나 furan 물질의 생성량이 많은 단점이 있음을 시사하였다.

3. Furan 물질의 제거

표 1 및 2에는 환원당 생성량과 함께 알칼리처리 전후의 FUR 및 HMF의 함량을 표시하였다. 이로부터 calcium oxide 처리에 의한 이들 물질의 제거율을 계산할 수 있으며, FUR의 제거율은 41~73% (평균 60%), HMF는 7~16% (평균 10.5%)이었다. 한편 1항에서 기술한 바와 같이 알

칼리처리 과정에서 환원당도 2~4% 소실되었다.

가수분해물의 품온을 95°C 이상으로 유지하면서 10분 또는 30분간 수증기를 취입시켜 furan 물질의 제거 효과를 시험하는 한편, 소수성 수지 Amberlite XAD4 및 7HP에 의한 흡착효과를 비교하였으며, 그 결과를 표 3에 정리하였다.

수증기취입(steam stripping 또는 air floatation) 방법은 휘발성 성분의 제거에 흔히 사용되어 왔으며 이를 furan 물질에 적용한 결과는 표 3에서 보는 바와 같이 FUR의 제거율은 62~90%로 효율적이었으나 HMF는 4~17%로서 높지 않았다. 이때 환원당의 소실율은 11~16%이었다.

Amberlite 수지에 의한 furan 물질의 흡착 제거효과는 FUR의 경우에는 71~75%로 높았으나 HMF는 13~25%로 비교적 낮은 결과를 나타내었다. 환원당은 7~9% 소실되었다.

4. 고찰

산에 의한 당화율은 oxalic acid의 경우 51~59%, sulfuric acid에서 49~61%이었으며 대체적으로 sulfuric acid를 사용할 때 다소 당화율이 높았다. 어느 경우에서나 당화율은 산의 농도에 비

Table 3. Removal of furans in the hydrolysates by steam stripping and hydrophobic resins

Treatments	Reducing sugar/ Rate of RS loss(%)	FUR		HMF	
		Concn. (ppm)	Rate of removal(%)	Concn. (ppm)	Rate of removal(%)
Steam stripping					
Untreated	4.32/ -	45	-	1179	-
After 10 min	3.83/11.3	17	62.2	1135	3.7
After 30 min	3.64/15.7	5	89.9	980	16.9
Amberlite treatment					
Untreated	4.32/ -	45	-	1179	-
XAD-4	4.02/6.8	13	71.3	1027	12.9
XAD-7HP	3.91/9.3	11	75.4	887	24.8

례하여 증가하였다. 한편 furan의 생성량은 원료의 농도가 높을수록, 그리고 산의 농도가 높을수록 증가하는 경향이였다. Oxalic acid의 경우보다 sulfuric acid를 사용하였을 때 furan 물질이 높게 나타났으며, FUR은 산농도 0.5~1.25%에서 10~47% 높았고, HMF는 15~29% 높았다. 이와 같은 결과는 sulfuric acid에 의한 처리는 oxalic acid보다 당화율은 다소 높은 반면에 furan 물질의 생성량이 많은 결점이 있음을 의미하는 것이다.

알칼리처리, 수증기취입, 소수성 수지에 의한 흡착법 등을 적용하여 furan 물질의 제거 효율을 비교하여 보면, FUR의 제거율은 알칼리처리에 의하여 60%, 수증기취입에 의하여 62~90%, Amberlite XAD4 및 7HP에 의하여 71~75%로서 제거효율이 높은 결과를 얻었으나, HMF의 경우 알칼리처리에 의하여 10.5%, 수증기취입에 의하여 4~17%, Amberlite XAD4 및 7HP에 의하여 13~25%로 제거효율이 낮았으며, 본 실험에서 적용한 어느 방법도 HMF의 제거에 효과적이지 못하였다. Furan 물질의 제거과정에서 동시에 환원당도 함께 소실되는 결과를 나타내었으며, 그 소실율은 알칼리처리 과정에서 2~4%, 수증기취입 과정에서 11~16%, Amberlite 수지흡착 과정에서 7~9% 수준이었다.

Warner 등 (2008)의 결과와 비교하면, 이들은 알칼리처리에 의하여 FUR 67% 및 HMF 63%가 제거되었다고 보고하였으나, 본 실험에서는 FUR의 제거율은 비슷한 반면 HMF는 10.5%로서 큰 차이를 나타내었다. 한편 Amberlite XAD4에 의한 제거율은 비슷한 경향이였다.

IV. 결론

한천을 산으로 당화하기 위하여 oxalic acid와 sulfuric acid를 사용하는 경우에 각각 원료의 농도와 산의 농도를 달리하여 당화율과 furan물질의 생성량을 비교하였다. 당화율은 oxalic acid의 경우 51~59%, sulfuric acid에서 49~61%이었으며 oxalic acid보다 sulfuric acid를 사용할 때가 다소 높았다. 이때 당화율은 산의 농도에 비례하여 증가하였다. 산분해 과정 중 furan 물질의 생성량은 원료의 농도가 높을수록, 그리고 산의 농도가 높을수록 증가하는 경향이였다. Sulfuric acid는 oxalic acid에 비하여 많은 양의 furan을 생성하였다. FUR은 산농도 0.5~1.25%에서 10~47%, HMF는 15~29% 많았다.

알칼리처리, 수증기취입, 소수성 수지에 의한 흡착법 등을 적용하여 furan 물질의 제거 효율을 비교하였다. FUR은 알칼리처리에 의하여 60%, 수증기취입에 의하여 62~90%, Amberlite XAD4 및 7HP에 의하여 71~75% 제거되었으나, HMF의 경우 알칼리처리에 의하여 10.5%, 수증기취입에 의하여 4~17%, Amberlite XAD4 및 7HP에 의하여 13~25%로 낮은 제거율을 나타내 HMF의 제거에는 어느 방법도 효과적이지 못하였다. Furan 물질의 제거과정에서 환원당도 함께 소실되었으며, 그 소실율은 알칼리처리 과정에서 2~4%, 수증기취입 과정에서 11~16%, Amberlite 수지흡착 과정에서 7~9% 수준이었다.

참 고 문 헌

1. Breuil C, and Saddler, J.N. 1985. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme and Microbiol Technology*, 7: 327-332.
2. Cha J.A., Kim Y.J., Seo Y.B., and Yoon M.H. 2009. Isolation of an agarolytic bacteria, *Cellvibrio mixtus* SC-22 and the enzymatic properties. *J. Appl. Biol. Chem.*, 52(4): 157-162.
3. Demirbas, A. 2006. Furfural production from fruit shells by acid-catalyzed hydrolysis. *Energy Source*, 28(2): 157-165.
4. Farone, W. A. and Cuzens, J. E. 1997. Method of fermenting sugars resulting from strong acid hydrolysis. US Patent 5,620,877.
5. Hiroshi, T., Sumihiro, H., and Tokuji, I. 1985. Microquantitative analysis of neutral and amino sugars as fluorescent pyridylamino derivatives by high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 145: 245-250.
6. Liu, M., He, W., Chen, S. 2005. Study on the influence of knojac gum, agar and tara gum on soft-serve ice cream quality. *China Dairy Industry*, 33(11): 17-20.
7. Mansilla, H.D., Baeza, J., Urzua, S., Maturana, G., Villasenor, J., and Duran, N. 1998. Acid-catalysed hydrolysis of rice hull: evaluation of furfural production. *Bioresource Technology*, 66(3): 189-193.
8. Tao, Z., Sato, M., Abe, N., Yamaguchi, T., and Nakano, T. 2009. Simple and rapid detection of histamine-forming bacteria by differential agar medium. *Food Control*, 20(10): 903-906.
9. Warner, R.E., Sedlak, M., Ho, N. and Mosier, N.S. 2007. Conditioning and glucose/xylose co-fermentation of pretreated lignocellulosic biomass. Laboratory of Renewable Resources Engineering (LORRE), Department of Agricultural and Biological Engineering, Purdue University, West Lafayette, IN, 47907.
10. 김나래. 2008. Furan화합물에 의한 *Saccharomyces cerevisiae*균주의 생육저해. 충남대학교 생물환경화학과 졸업논문집 제8집.
11. 김주혜. 2007. Galactose를 이용하는 *Saccharomyces cerevisiae*의 에탄올발효 특성. 충남대학교 대학원 석사학위논문.
12. 조순영, 주동식, 강현주, 박신호, 이창호. 1999. 유기산을 촉매로 한 한천의 물리적 가수분해. 수산관련학회 춘계공동학술대회초록집. P. 166~168.