

한천올리고당의 생산을 위한 한천분해효소의 고정화

임동중 · 김봉조 · 배승권 · 김종덕¹ · 공재열*
부경대학교 생물공학과, ¹여수대학교 생물공학과

Immobilization of Agarase for the Agarooligosaccharide Production. Lim, Dong-Jung, Bong-Jo Kim, Seung-Kwon Bae, Jong-Deog Kim¹, and Jai-Yul Kong*. Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea, ¹Division of Biotechnology and Chemical Engineering, Yosu National University, Cheon Nam 550-250, Korea - The condition for immobilization of the partially purified agarase from *Bacillus cereus* ASK202 and the properties of the immobilized enzyme have been investigated. Agarase was immobilized on various supports by entrapment method. The enzyme immobilized on Na-alginate bead showed the highest activity among those studied. The optimal reaction conditions of the immobilized agarase were obtained in 3%(w/v) Na-alginate for the matrix, bead diameter of 2.5 mm, 1 unit of agarase solution and 1.0% (w/v) calcium chloride solution. The optimum pH and temperature of the immobilized agarase were pH 7.0 and 40 °C, respectively. K_m and V_{max} values were 0.5 mg/ml and 4.4 mg/ml · min, respectively. The immobilized agarase converted agar to agarobiose and agarotetraose, and their total conversion ratio under the optimal condition was 89%.

Key word : agarase, agarooligosaccharides, immobilization, gel bead, Na-alginate

한천은 대표적인 해조류 유래 다당으로 국내의 경우, 해마다 그 생산량이 약 3,600ton(약 50억원 상당)에 이르고 있는 비교적 풍부한 수산자원의 하나이다. 그러나, 실제 이용면에 있어서는 전체생산량의 약 6.5%정도만이 단순가공 처리되어 값싼 원료로 사용되어질 뿐이며 그 나머지는 대부분 방치되고 있어 부존자원량에 비해 부가가치가 매우 낮은 실정이다[11]. 따라서, 풍부한 국내 한천의 새로운 용도개발과 부가가치 향상에 관한 연구가 크게 요구되고 있는 실정이다.

한편, 한천은 가수분해에 의해 한천올리고당이 생성되는데 이때 생성되는 한천올리고당은 기능성 식품소재로서의 이용이 가능하기 때문에 높은 부가가치를 지니고 있는 식품소재이다. 일반적으로 올리고당은 소화효소에 의해서는 분해가 어렵고 체내 흡수가 잘 이루어 지지 않기 때문에 저칼로리 감미성분으로서 사용될 수 있을 뿐만 아니라 장내 유해세균의 성장 및 이로 인한 병원성 물질의 체내흡수를 억제하고 변비를 개선하는 효과를 지니고 있다. 그 밖에도 혈중 콜레스테롤의 저하, 정균작용, 당뇨병, 고혈압등에 뛰어난 효과가 있음이 알려져 있다[12]. 특히 한천올리고당은 기존의 다른 올리고당에 비하여 전분노화의 억제작용이 강할 뿐만 아니라[12]기존의 상업적으로 생산되고 각종 올리고당 제품에 비하여 체내흡수가 가능한 단당류의 함량이 가장 낮은 올리고당임이 확인된 바 있다[19]. 이러한 기능성 한천올리고당의 생산을 위해서는 대표적으로 한천

의 산가수분해법과 효소가수분해법 등이 있으나 산가수분해법의 경우에는 반응 후 부산물의 생성과 중화과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있다. 이에 비해 효소가수분해법의 경우 다당체의 특정부위에 특이적으로 작용함으로써 목적으로 하는 올리고당을 손쉽게 얻을 수 있는 장점이 있다. 그러나 이러한 효소가수분해법의 경우에는 고효성을 지닌 한천분해효소의 개발이 우선적으로 이루어질 필요성이 있다.

이에 지금까지 본 연구자들은 국내 남해안 지역을 중심으로 고효성 한천분해효소를 생산하는 해양세균의 탐색 결과, 뛰어난 한천분해능을 지닌 새로운 해양세균의 분리에 성공하였다[13]. *Bacillus cereus* ASK202로 명명된 본 균주는 배양과정 중에 고효성을 지닌 한천분해효소를 생산하였으며, 그 생산량에 있어서도 기존에 보고된 균주들 보다 뛰어난 것으로 확인되었다[13]. 또한 *Bacillus cereus* ASK202가 생산하는 한천분해효소는 기질인 한천으로부터 중합도 2, 4, 6의 agarobiose, agarotetraose, agarohexaose를 생성함을 확인하였다[10]. 따라서, 본 연구에서는 지금까지의 연구성과를 배경으로 기능성 한천올리고당의 생산성 증대를 위한 한천분해효소의 고정화를 시도하고 고정화 한천분해효소의 반응 특성에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

조효소의 제조

한국 남해안에서 분리하여 뛰어난 한천분해능을 지닌 것으로 확인된 해양세균 *Bacillus cereus* ASK202[13]를 사용

*Corresponding author
Tel. 82-51-620-6181, Fax. 82-51-620-6181
E-mail: kongjy@dolphin.pknu.ac.kr

하여 그 배양액으로부터 균체를 제거한 후 배양 상층액만을 회수하였다. 회수된 배양상층액은 Millipore Co.(Massachusetts, USA)의 한외여과장치(PREP/Scale™-TFF cartridge, 30kDa)를 이용하여 부분 정제하였으며, 부분정제된 한천분해효소는 10 mM MOPS 완충용액(3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid, pH 7.0)으로 투석하여 동결건조를 행하였다. 이후 동결건조된 조효소는 한천올리고당을 생산하기 위한 한천분해효소의 고정화에 사용하였다.

효소활성의 측정

고정화된 한천분해효소의 반응산물인 환원당의 측정은 Somogyi-Nelson법[18]으로 행하였다. 0.1%(w/v) agar가 첨가된 10 mM MOPS 완충용액(pH 7.0)을 중탕가열하고 40 °C 까지 서서히 냉각시킨 후에 고정화된 한천분해효소를 첨가하여 30분간 반응시켰다. 효소반응에 의해 생성되는 환원당량은 Somogyi시약을 첨가하여 10분간 끓이고 실온으로 냉각시킨 후, Nelson시약을 첨가하여 12,000 rpm에서 2분간 원심분리한 반응상층액의 환원당 값을 510 nm에서 측정함으로써 구하였다. 한편, 고정화된 한천분해효소의 활성에 대해서는 1분당 1 μmol의 galactose를 생산할 수 있는 효소의 양을 1unit로 정의하였다[12].

고정화 효소의 제조

적절한 지지체 선정을 위해 천연고분자인 Na-alginate, chitosan(Sigma Chemical Co., USA), 합성고분자인 PVA (polyvinylalcohol, Sigma Chemical Co., USA)를 사용하여 각각 비드 형태의 고정화 효소를 제조하였다.

Na-Alginate 3%(w/v) Na-alginate 용액 5 ml에 agarase용

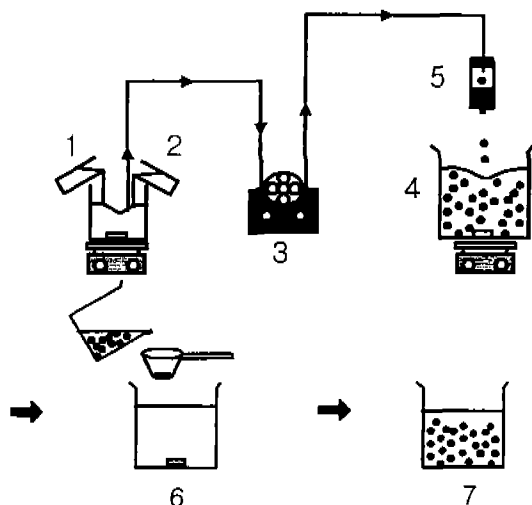


Fig. 1. Schematic diagram of a process for calcium-alginate bead preparation.

1. Enzyme solution; 2. Na-alginate solution; 3. Peristaltic pump; 4. Calcium chloride solution; 5. Syringe; 6. Washing with distilled buffer; 7. Storage in buffer solution.

액 5 ml (1 unit)를 첨가하여 혼합시킨 후, 이 혼합액을 1.0 %(w/v) CaCl₂용액 100 ml에 syringe(2.4G×1")를 사용하여 적하시켜 고정화 비드를 제조하였다. 제조된 고정화 효소를 280 nm에서 흡광도가 0이 될 때까지 세척하여 4 °C에 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 1).

Chitosan Chitosan 0.3 g을 0.5%(w/v) glutamic acid, 10ml에 넣고 용해시킨 후, agarase 용액 5 ml(1 unit)와 혼합한 후 이를 2N NaOH에 적하하여 고정화 agarase를 제조하였다.

PVA MOPS buffer 5 ml에 PVA 0.6 g을 첨가하여 가열, 냉각시킨 후, agarase 용액 5 ml(1 unit)를 혼합하였다. 혼합용액을 성형관(실리콘 튜브, 직경 2 mm)에 넣어 -20 °C에서 동결시킨 다음, 24시간 후에 해동시켰으며, 동결과 해동과정을 재차 반복한 후에 고정화 agarase를 제조하였다. 이를 일정한 크기로 절단하여 본 실험에 사용하였다.

고정화 비드의 크기별 제조

고정화 비드를 다양한 크기별로 제조하기 위하여 Fig. 2와 같은 장치를 사용하였다. Na-alginate와 조효소용액의 혼합액을 peristaltic pump를 이용하여 제작된 고정화 장치내로 공급시키면서 측면으로부터 0.5~4.0 kgf/cm² 범위의 공기압에 의해 빠른 속도로 공기를 유출시킴으로서 needle 끝 부분에 방울형태로 형성된 지지체와 효소의 혼합액을 강제사출시켜 CaCl₂ 용액에 적하시켰다. 이때에 형성되는 비드 크기는 공급 공기압에 반비례하게 되며, 형성된 50개의 비드를 추출하여 Vernier caliper(Fowler, China)에 의해 평균직경을 측정하였다.

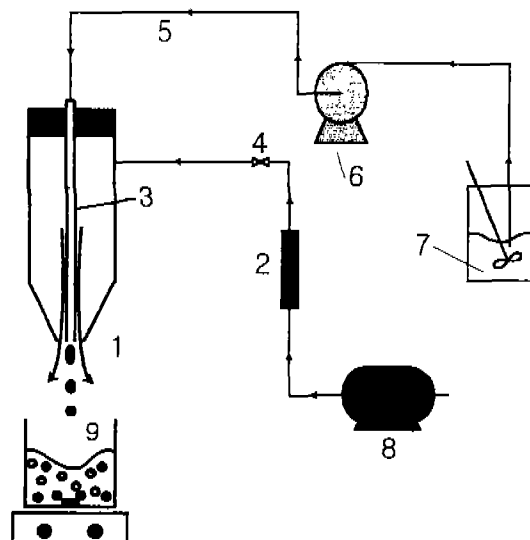


Fig. 2. Schematic diagram of the bead formation setup with the dropping method.

1. Air outlet; 2. Air flow meter; 3. Syringe; 4. Control cock; 5. Silicon tube (φ 1 mm); 6. Peristaltic pump; 7. Mixed solution; 8. Air compressor; 9. Gelling solution.

고정화 효소 비드의 강도 측정

Rheometer (Sun Scientific Co., LTD., Model: COMPAC-100, Japan)를 사용하여 고정화 효소 비드의 겔 강도를 측정하였다. 평판위에 겔 비드를 놓고 설치된 adaptor를 이용하여 table을 이동, 압축시켜 겔 강도를 측정하였다. 이때 sample size $\phi 0.25 \text{ cm} \times 0.25 \text{ cm}$, table speed 60 mm/min, chart speed 20 min/min, load range 10 kg, 1 bite, plunger $\phi 0.1 \text{ cm}$ 로 실험을 행하였다.

$$\text{Jelly strength (g} \cdot \text{cm)} = \text{hardness (breaking stress, g)} \times \text{breaking strain (cm)}$$

전환율의 측정

한천올리고당에 대한 전환율(Conversion rate) Xc는 Gisella 식[5]을 이용하여 계산하였다.

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

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, $F = (180 - 18) / 180 = 0.9$

반응 생성물의 분석

고정화효소의 반응생성물인 한천올리고당의 분석에는 Aminex HPX-42A(7.8 mm \times 300 mm, Bio-rad, USA) column이 장착된 HPLC(Pharmacia, LKB, Sweden)를 이용하였으며 RI-4(Refractive index, HP1047A, Germany) detector를 사용하여 분석하였다. 이때 column온도는 80 $^{\circ}\text{C}$, 이동상으로 초순수(18 megaohm \cdot cm)를 사용하고 유속은 0.8 ml/min으로 하였다. 생성된 한천올리고당의 분석을 위한 표준올리고당으로는 agarobiose, agarotetraose, agarohexaose(Sigma Chemical Co., USA)를 사용하였다.

전당량의 측정

전당은 phenol-sulfuric acid법[4]에 따라 시료 용액 0.2 ml를 test tube에 취하고, 5%(v/v) phenol 용액 0.2 ml를 가한 후 혼합하고, 진한 황산 1.0 ml를 반응액에 서서히 직하하여 느린속도로 발열반응을 진행시키면서 혼합하였다. 이 반응액을 20~30분간 실온에서 방치한 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 전당량을 계산하였다.

결과 및 고찰

고정화 지지체의 선정 및 최적농도

한천분해효소의 고정화를 위한 지지체의 선정에 있어서는

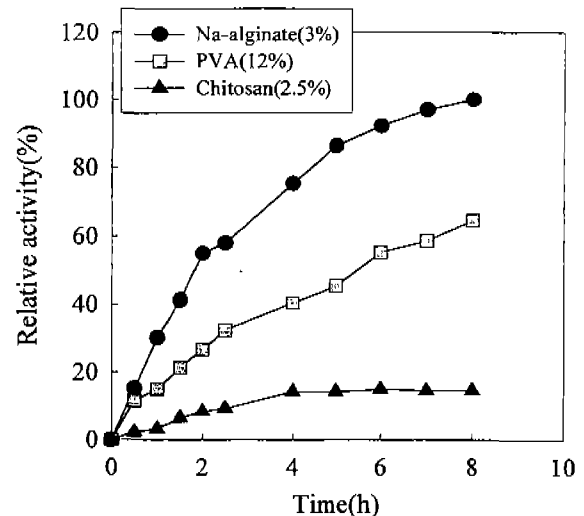


Fig. 3. Comparison of the relative activity of immobilized agarase on various matrix of Na-alginate, PVA and chitosan.

Enzyme reaction was carried out in 0.1%(w/v) agar and 10 mM MOPS buffer, pH 7.0 at 40 $^{\circ}\text{C}$.

대표적으로 널리 이용되고 있는 Na-alginate, chitosan, PVA를 대상으로 검토하였다. 서로 다른 농도의 Na-alginate (1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%), chitosan(1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%), PVA(8%, 10%, 12%, 14%)를 이용하여 겔 비드형태의 고정화 효소를 제조한 후, 각각의 고정화 효소가 나타내는 상대효소 활성을 조사하였다. 그 결과, 본문중에는 나타내지 않았으나 예비실험 결과로부터 Na-alginate, chitosan, PVA는 각각 3%, 2.5%, 12%의 농도에서 가장 높은 상대효소 활성을 확인하였다. 또한, 각 지지체의 최적농도에서 고정화 효소의 활성을 비교·검토한 결과, 3%(w/v) Na-alginate를 지지체로 이용하였을 때에 다른 지지체보다 높은 효소 활성을 나타낼 수 있었다(Fig. 3). 따라서, 이후 실험에서는 3%(w/v) Na-alginate를 이용하여 고정화 효소 비드를 제조하였다.

고정화 비드의 크기별 전환율

고정화 비드의 크기에 따른 전환율을 조사하기 위하여 비교적 간단한 고정화 비드 제조장치를 실험실에서 제작하였으며(Fig. 2), 이를 이용하여 공기의 유출속도를 달리 함에 따라 서로 다른 크기(0.8~2.4 mm)의 비드를 제조하였다. Fig. 4는 비드 제조장치로 공급되는 공기압과 그 때에 형성되는 비드의 크기를 조사한 결과이다. 공기압의 증가에 의한 공기의 유출속도가 빨라짐에 따라 형성되는 비드의 크기는 감소하였으며, 4 kgf/cm²의 압력으로 공기를 공급하였을 때 약 0.8 mm의 직경을 지닌 비드가 형성되었다. 아울러 4 kgf/cm²이상의 조건에서 0.6 mm의 비드로 제조는 되었으나, 강한 공기압으로 인하여 구형의 겔이 형성되지 않고 고정화효소 반응시에 쉽게 파손되었으므로 실험에 사용하기에는 부적절한 것으로 확인되었다. 한편, 이

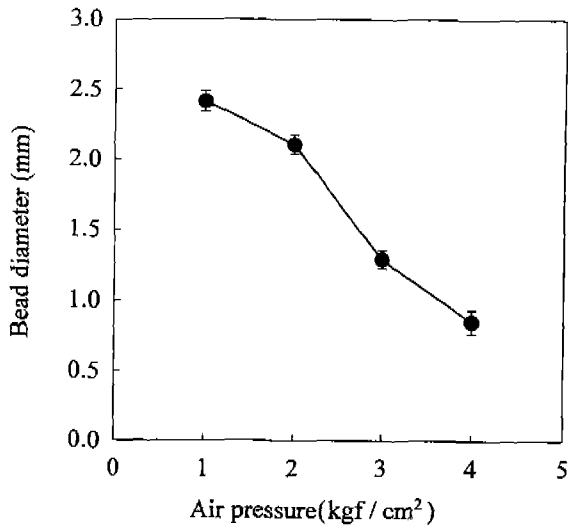


Fig. 4. Effect of air pressure on the bead size.
The formation condition was carried out in 3%(w/v) Na-alginate and 1%(w/v) CaCl₂ at 4 °C.

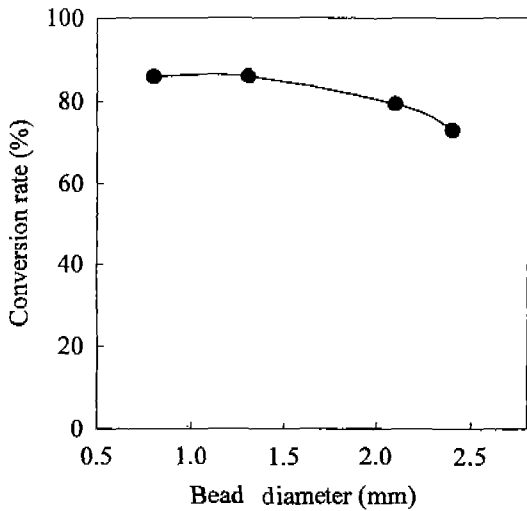


Fig. 5. Effect of bead sizes on the conversion rate of immobilized agarase.
Conversion rate was measured at 40 °C for 40 min in 1%(w/v) agar substrate containing 10 mM MOPS buffer, pH 7.0.

와 같은 장치에 의해 제조된 고정화 효소 비드를 이용하여, 동일한 반응조건하에서의 기질에 대한 전환율을 조사하였다(Fig. 5). 그 결과, 기질의 전환율은 비드의 크기가 증가할수록 감소하였으며, 비드의 크기가 가장 작은(0.8 mm) 경우에 전환율이 가장 높은 것으로 나타났다. 그러나, 실제로 이러한 다양한 크기의 비드를 반응기내에 충전하여 사용할 경우에는 비드의 크기가 작을수록 반응기내의 공극을 감소로 인한 반응기내 압력이 증가하고 비드가 쉽게 파괴되는 등 장기 운전에는 부적절함을 확인하였다. 따라서, 전환율은 다소 낮지만 앞으로의 고정화 효소의 연속 반응을 위한 반응기의 운전, 효율성 등을 고려하여 이후 실험

에서는 2.4 mm 크기의 고정화 효소 비드를 선정하여 각종 실험을 행하였다.

고정화 비드의 강도 측정

고정화 효소를 사용하여 연속생산공정에 응용할 경우, 비드의 기계적 강도는 반응기의 장시간 운전에 크게 영향을 미치기 때문에 산업적 대량생산에는 고정화 비드의 강도가 중요한 역할을 한다. 따라서, Na-alginate 농도 변화에 따른 고정화 비드의 젤강도를 조사하였다(Fig. 6). Na-alginate의 농도가 증가함에 따라 비드의 강도가 비례적으

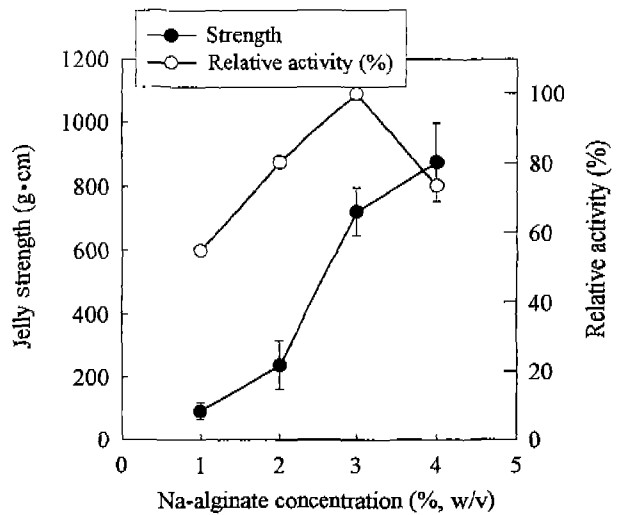


Fig. 6. Effect of matrix concentrations on jelly strength and enzyme activity.
The used bead was formed in 1%(w/v) CaCl₂ and 10 mM MOPS buffer, pH 7.0 at 4 °C.

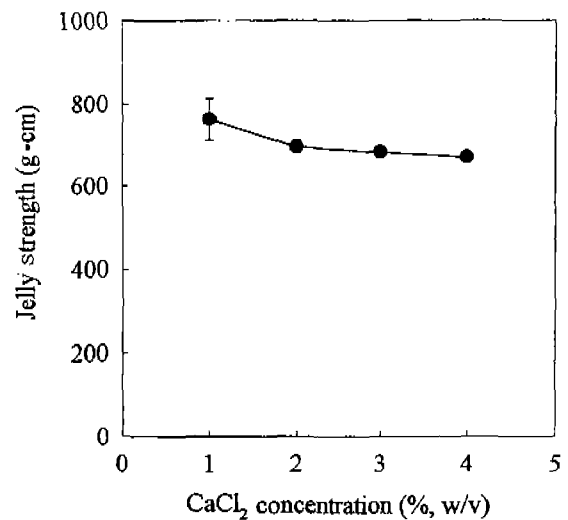


Fig. 7. Effect of CaCl₂ concentrations on jelly strength.
The used bead was formed in 3%(w/v) Na-alginate and 10 mM MOPS buffer, pH 7.0 at 4 °C.

로 증가되었으며, 4%(w/v) Na-alginate에서 최대값을 나타내었다. 본문중에는 나타내지 않았으나 4%(w/v)이상의 농도에서는 지지체의 높은 점성으로 인하여 구형의 비드가 형성되지 않았고 반응용액 중에서는 교반에 의해 쉽게 파괴되는 결과를 나타내었다. 한편, 각 농도별 비드의 겔강도와 고정화 효소의 전환율을 비교·검토한 결과, 겔강도에 있어서는 다소 낮은 값을 보였으나 3%(w/v)농도에서 가장 높은 상대 효소활성값을 나타내었다. 따라서, 비드의 강도 및 효소활성을 고려하여 이후의 실험에는 3%(w/v)농도의 Na-alginate를 이용한 고정화 효소 비드를 비교하여 실험에 사용하였다. 또한, 효소와 지지체의 혼합액을 CaCl₂ 용액에 적하시켜 겔 비드를 제조하는 과정에서 겔화 용액의 농도에 따른 비드의 강도 변화에 대해서도 조사하였다(Fig. 7). 그 결과, 초기 농도인 1%(w/v)에서 가장 높은 강도를 보였으며 CaCl₂의 농도가 증가할수록 오히려 겔의 강도가 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고, 1%(w/v)이하의 농도에서는 구형의 겔 비드가 형성되지 않음을 예비실험을 통하여 확인하였다.

고정화 효소의 활성에 미치는 온도의 영향

3.0%(w/v) Na-alginate 비드에 고정화된 효소의 활성에 미치는 반응온도의 영향을 free enzyme과 비교 검토하였다(Fig. 8). 그 결과, 고정화 효소와 free enzyme의 최적온도는 40°C로 동일한 값을 나타내었다. 그러나, 천연효소의 경우에는 45°C이상의 온도에서 급격한 효소활성의 감소를 보여, 60°C에서는 효소 활성을 거의 상실한 반면, 고정화 효소는 50°C까지 완만한 감소를 보였으며 이때의 효소활성

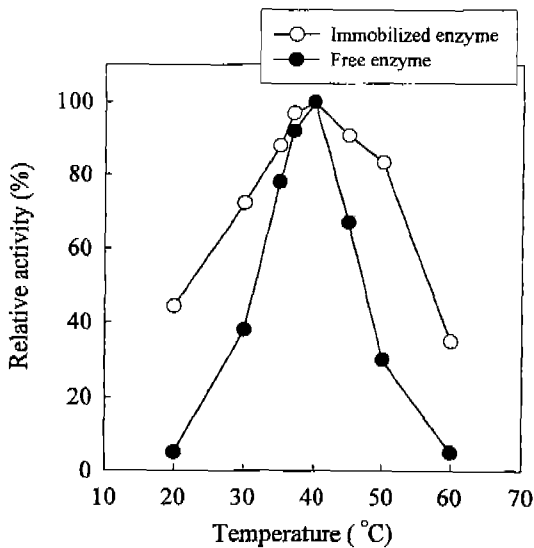


Fig. 8. Effect of temperature on the free and immobilized agarase activity. Enzyme reaction solution in 10 mM MOPS buffer, pH 7.0, was incubated for 30min at various temperatures.

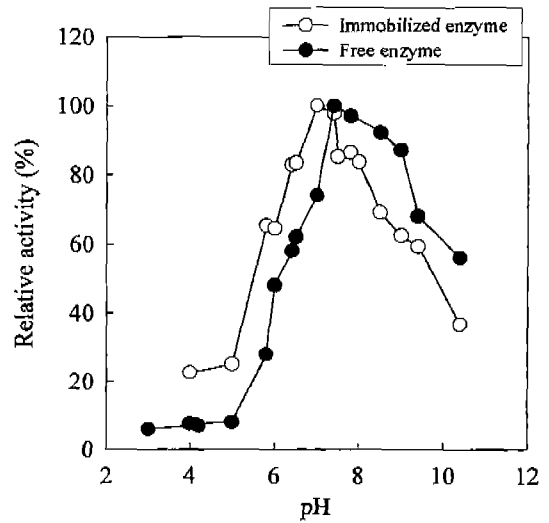


Fig. 9. Effect of pH on the free and immobilized agarase activity.

Free and immobilized agarase was incubated at 4°C for 30 min and then the relative activity was measured.

은 최고활성의 약 80% 이상을 유지하였다. 또한, 최적온도 이하에서도 고정화 효소의 경우가 free enzyme에 비하여 효소활성의 안정성이 상대적으로 높게 나타났다. 따라서, 이와 같은 결과를 미루어 보아 한천분해효소를 Na-alginate에 고정화 시킴으로서 free enzyme에 비하여 열안정성이 향상됨과 동시에 free enzyme에 비해 비교적 넓은 온도 영역에서 효소활성이 유지됨을 확인하였다.

고정화 효소의 활성에 미치는 pH의 영향

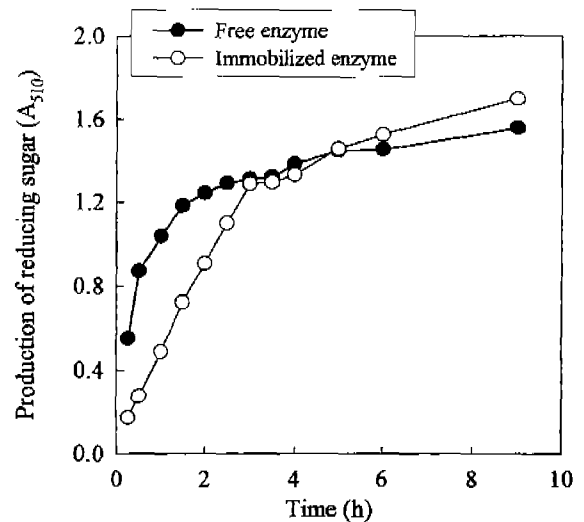


Fig. 10. Comparison of the reducing sugar production between free enzyme and immobilized agarase.

Enzyme reaction was carried out in 10 mM MOPS buffer, pH 7.0 and 0.1%(w/v) agar at 40°C.

고정화 효소 및 천연효소 활성화에 미치는 pH의 영향을 비교·검토하였다(Fig. 9). 그 결과, 각 최적 pH는 각각 7.0 과 7.4로 고정화 효소의 경우에 상대적으로 약간 낮은 pH 값을 나타내었으며, 전체적(pH 3~10.6)으로는 free enzyme 은 알칼리측에서, 그리고 고정화 효소는 산성측에서 상대적으로 높은 효소활성을 나타내었다.

한편, 최적조건하에서 고정화 효소 및 free enzyme에 의한 한천 기질로부터의 반응 생성물의 생성량 변화를 반응 시간별로 비교·검토하였다(Fig. 10). 반응초기에는 고정화 효소가 free enzyme에 비해 반응 생성물의 생성속도가 상대적으로 느리게 진행되었으나, 반응 약 3시간이 경과되면 서부터 free enzyme과 비슷한 값을, 그리고 4시간 경과 이후 부터는 오히려 고정화 효소에 의한 생성물의 양이 증 대됨을 알 수 있었다. 이는 고정화 효소의 경우에 free enzyme 에 비하여 반응은 상대적으로 느리게 진행되지만 지지체 내에 효소가 고정화 됨으로 인하여 효소의 실활속도가 느 리기 때문에 그 활성이 보다 안정적으로 유지됨을 알 수 있었으며, 이러한 특성은 반응기를 이용한 연속생산공정의 운전 에 있어 유리한 것으로 사료된다.

최적반응조건하에서 한천올리고당의 생산

지금까지의 실험결과로부터 선정된 고정화 효소의 최적반 응조건하에서 회분식 반응기를 이용하여 생성되는 올리고당 을 반응시간 별로 분석하였다(Fig. 11). 반응초기에 기질인 한 천은 아주 빠른 속도로 분해됨과 동시에 올리고당이 생산되 었으며 반응시간 약 1.5시간 경과 후 부터는 올리고당의 생 성량이 거의 일정한 양상을 나타내었다. 생성되는 올리고당 의 조성을 HPLC에 분석한 결과, 중합도 2당, 4당의 한천올

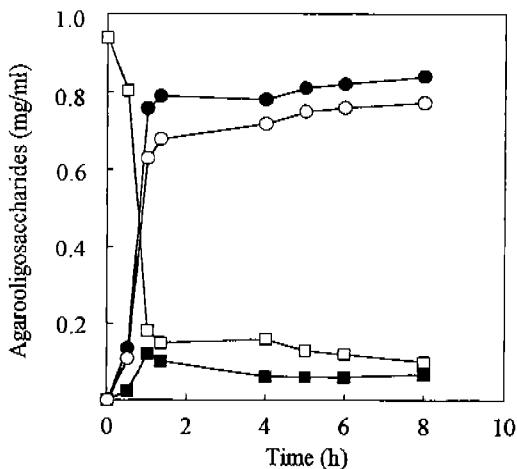


Fig. 11. Production of agarooligosaccharides under the optimal reaction condition in a batch reactor.
Enzyme reaction was carried out at 40 °C in 0.1%(w/v) agar and 10 mM MOPS buffer, pH 7.0.
Symbols: ●, Total agarooligosaccharides; ■, DP4(agarotetraose); ○, DP2(agarobiose); □, Agar.

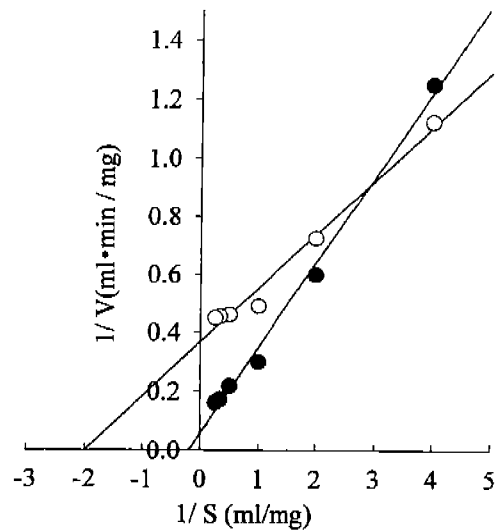


Fig. 12. Lineweaver-Burk plot for determining K_m and V_{max} of the free and immobilized agarase.
Symbols: ●, Free agarase; ○, immobilized agarase

리고당이 주 생성물이었으며 그 이상의 중합도를 지닌 한천 올리고당의 생성은 확인되지 않았다. 이는 빠른 초기 반응속 도로 인하여 반응초기에 생성되고 중합도의 올리고당들이 4 당과 2당의 올리고당으로 전환되었기 때문으로 사료된다. 또 한, 효소 반응 1.5시간후의 기질인 한천으로부터 한천올리고 당의 생성에 대한 전환율을 조사한 결과, 89%의 높은 전환 율을 나타내었다.

고정화 효소의 반응속도 상수

고정화 효소의 반응속도 상수인 K_m 값과 V_{max} 값을 Lineweaver-Burk plot식을 이용하여 구하였다. 그 결과, 고 정화 효소의 K_m 은 0.5 mg/ml였고, V_{max} 값은 4.4 mg/ ml · min임을 확인하였다. 또한, 유리효소의 경우에는 K_m 값은 3.4 mg/ml였고, V_{max} 값은 20.8 mg/ml · min였다(Fig. 12).

요 약

해양미생물 *Bacillus cereus* ASK202 유래 한천분해효소 를 고정화하기 위한 지지체로서 Na-alginate가 가장 적절 하였으며, Na-alginate 농도는 3%(w/v)일 때 상대효소활성 이 가장 높게 나타났다. 고정화 비드 장치를 이용하여 비 드 제조시 비드 직경 0.8 mm~2.4 mm의 다양한 크기를 지 닌 비드를 제조할 수 있었으며, 한천올리고당 생산시 효과 적인 비드 직경은 2.4 mm였다. 지지체 농도에 따른 고정 화 비드 강도는 지지체 농도에 비례하여 증가한 반면, CaCl₂ 농도에 의해서는 영향을 받지 않았다. 고정화 효소의 최적 반응 온도 및 pH는 각각 40 °C, pH 7.0이었다. 한편, 고정 화 효소의 최적반응 조건하에서 0.1%(w/v) 한천기질을 이 용하여 HPLC에 의해 생성 한천올리고당을 분석한 결과,

중합도 2, 4당의 올리고당이 생산됨을 확인하였고 이때의 전환율은 89%였다. 또한 고정화 agarase 의 K_m 및 V_{max} 은 0.5 mg/ml와 4.4 mg/ml · min임을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 1998년도 교육부 지방대 특성화 사업 연구비 지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn, J. W., S. S. Hong, K. W. Park, and J. H. Seo. 1996. Reaction mode of transglucosidase from *Aspergillus niger* for production of isomaltooligosaccharide. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **28**(2): 273-278.
- Akertek, E. and L. Tarhan. 1995. Characterization of immobilized catalases and their application in pasteurization of milk with H_2O_2 . *Appl. Biochem. Biotech.* **50**: 291-303.
- Busto, M. D., N. Ortega, and M. Perez-Mateos. 1997. Effect of immobilization on the stability of bacterial and fungal β -D-glucosidase. *Process Biochem.* **32**(5): 441-449.
- Chaplin, M. F. 1986. Monosaccharides, pp. 2-3 In M. F. Chaplin and J. Kenedy (eds.), *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. IRL press, Oxford.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28**(3): 350-356.
- Gisella, M. Z. and F. D. Moraes. 1995. Stability of immobilized amyloglucosidase in the process of cassava starch saccharification. *Appl. Biochem. Biotech.* **51/52**: 253-262.
- Hayashi, S., J. Kinoshita, M. Nonoguchi, Y. Takasaki, and K. Imada. 1991. Continuous production of 1-ketose by β -fructofuranosidase immobilized on SH-IRASU porous glass. *Biotech. Lett.* **13**(6): 395-398.
- Hwang, S. H., S. D. Ha, J. D. Kim, S. K. Kim, and J. Y. Kong. 1995. Isolation and purification of agarase from marine microorganism (*Pseudomonas* sp. W7). *The 3rd Academic Plaza in International Exhibition '95*, pp. 70-71. Makuhari, Japan.
- Jun, Y. J. 1997. Industrial production of functional sugars by bioconversion. *Food Indust. Nutr.* **2** (1): 10-15.
- Khaled, N., D. Montet, M. Pina, and J. Graille. 1991. Fructose oleate synthesis in a fixed catalyst bed reactor. *Biotech. Lett.* **13**(3): 167-172.
- 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.
- 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.
- 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.
- Lineweaver, J. and D. Burk. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 658-666.
- Mammarella, E. J. and A. C. Rubiolo. 1996. Response surface methodology to optimize β -galactosidase immobilization using a combination of hydrocolloids as the supporting matrix. *Biotechnol. Prog.* **12**: 612-617.
- Nakamura, T., Y. Ogata, A. Shitara, A. Nakamura, and K. Ohta. 1995. Continuous production of fructose syrups from inulin by immobilized inulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *J. Ferment. Bioeng.* **80**(2): 164-169.
- Peter, S. J. C., K. W. Blunt, and C. Bucke. 1979. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. *Biotechnol. Bioeng.* **21**: 2155-2168.
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **195**: 19-23.
- Song, C. M. 1998. Properties of agarooligosaccharides for use of food stuffs. *Pukyong National University*, Master thesis.
- Yun, J. W., D. H. Kim, and S. K. Song. 1997. Enhanced production of fructosyltransferase and gluco-syltransferase by substrate-feeding cultures of *Aureobasidium pullulans*. *J. Ferment. Bioeng.* **84**(3): 261-263.

(Received January 15, 1999)