

## Density Gradient를 이용한 식품소재 커들란의 분리공정개발

김 봉 영 · †이 중 현  
조선대학교 공과대학, 화학 · 고분자공학부  
(접수 : 2001. 9. 21., 게재승인 : 2001. 10. 25.)

### Development of Curdlan Separation Process with Density Gradient Centrifugation

Bongyoung Kim and Jung Heon Lee†  
Department of Chemical Engineering, Chosun Univ., Gwangju 501-759, Korea  
(Received : 2001. 9. 21., Accepted : 2001. 10. 25.)

Curdlan is one of biopolymer composed of  $\beta$ -1,3-glucan and dissolved in a alkali solution but formed salt under neutral or acid condition. It was produced by *Agrobacterium species* and the separation process is necessary to make pure curdlan from the culture broth. The pH swing separation method was a feasible separation process using solubility changes with the pH difference. however, this method requires a lot of acid and alkali solution also produces a lot of waste. Therefore, an efficient process which could save energy and minimize toxic waste was developed. A density gradient separation process was developed in this research. High density sucrose solution was used as a separation agent. Curdlan was separated from the culture broth when the density of the sucrose solution was 1.15 g/L. Since the curdlan was produced on the surface of cell wall, the pre-treatment of culture broth was necessary. Curdlan recovery yield was increased up to 83% with the homogenization of the culture broth and further increased up to 87% with the treatment of alkali-acid solution.

**Key Words** : curdlan, separation process, density gradient

#### 서 론

커들란은 *Agrobacterium sp.*에서 세포외로 생산되는  $\beta$ -1,3-glucan의 구조를 가진 생물고분자로 물에 불용성이며 알칼리용액에는 녹아 점성을 띄고 액체 상태로 존재한다. 대부분의 생물고분자 다당류의 경우에는 높은 온도에서 용액에 녹아 있다가 낮은 온도에서 젤이 되는 agar와 비슷한 성질을 가지나 커들란은 이와 반대로 높은 온도에서 젤이 되는 성질을 보유하고 있어 식품의 응결제 및 결속제로 효용성이 있다(1,2). 또한, 커들란은 식품용도 뿐만 아니라 의약품 방출 지연제로도 연구가 활발히 진행되고 있다(3). 커들란의 생산에 관한 연구는 Lee 등(4)이 연구하여 회분식 배양을 통하여 커들란의 생산을 120시간에 60 g/L로 올린 바 있고 유가식 배양을 통하여 150시간만에 90 g/L로 올린 경우가 있어 생산성에 관한 연구는 다양하게 진행되어 왔다(5).

미생물을 이용하여 생산된 커들란을 식품용도로의 활용을

위해서는 커들란을 분리하는 공정의 개발이 필요하며 커들란의 분리에 관한 연구의 보고는 많지 않으나 일반적으로 커들란이 높은 pH에서 용액에 녹고 낮은 pH에서 용액에 녹지 않는 성질을 이용하였다(6). 이러한 pH swing 분리 방법은 원심분리를 수 차례 반복해야되기 때문에 에너지 비용이 많이 들고 염기 및 산 처리에 의한 오염발생 원인이 되고 있다. Kim 등(6)은 커들란 분리에 NaOH를 첨가하여 pH를 높여 커들란의 용해도를 증가시킨 후 원심분리를 통하여 세포를 분리한 후 HCl을 첨가하여 커들란의 용해도를 떨어뜨려 원심분리를 통해서 커들란을 회수한다. 이때 산염기 반응에 의해 생성된 NaCl을 제거하기 위하여 수 차례 세척과정을 거쳐 원심분리를 해야하는 단점이 있다. 점도가 높고 액상에서 선형으로 존재하는 커들란의 특성 때문에 필터를 이용한 공정의 경우 clogging 및 fouling 문제 때문에 적용하기 힘들다.

본 연구에서는 커들란의 분리공정에 필요한 에너지를 절감시키고 산 염기 처리에 의해 발생하는 폐수를 줄일 수 있는 장점을 보유한 밀도 차에 의해 커들란을 분리하는 새로운 개념의 분리공정을 개발하고자 한다.

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Chosun Univ., Gwangju 501-759, Korea  
Tel : +82-62-230-7159, Fax : +82-62-230-7866  
E-mail : leejh@mail.chosun.ac.kr

## 재료 및 방법

본 실험에 사용된 배양액은 *Agrobacterium species*를 사용하여 종배양 배지에서 30°C에서 120시간 동안 배양한 배양액을 사용하였다. 여기서 생산되는 다당은 curdlan이며, 액체의 밀도차를 이용하기 위해 사용한 액체는 설탕물이다. 설탕은 대한설탕의 가는 정백당을 사용하였으며, 원심분리를 위한 원심분리기는 vision 과학의 VS-15CF를 사용하였다.

### 실험방법 :

여러 가지 밀도의 용액을 만들기 위해 설탕의 농도를 300 g/L, 400 g/L, 500 g/L, 600 g/L로 변화시켜 각 용액의 밀도를 측정하였다. 두 비이커에 broth를 나누어 담아 하나는 5 min, 다른 하나는 10 min 동안 homogenizer(균질화) 시킨 후 균질화된 두 비이커의 용액을 각각 세개의 falcon tube에 15 mL씩 나누어 담는다. 실험 조건에 따라 균질화된 tube에 1N NaOH 20 mL씩 넣어 혼합한 후 다시 1N HCl을 15 mL씩 넣어 중화 시킨다. 다른 원심 분리관에 설탕용액을 농도에 따라 나누어 담은 다음 중화된 tube의 물질을 10 mL씩 넣어 원심분리기에서 원심분리 (5000 rpm × 10 min) 한다.

## 결과 및 고찰

원심 분리공정이나 필터를 사용하는 공정을 사용하여 분리 실험을 한 결과 커들란 분리성능이 우수하고 경제적인 공정을 개발하지 못하여 커들란과 세포의 밀도가 다른 점에 착안하여 원심 분리공정을 이용한 공정을 개발하였다.

### 분리용매의 위치 및 mixing에 따른 효과

배양액(curdlan + cell)과 설탕의 농도는 100 g/L, 200 g/L, 300 g/L, 400 g/L, 및 500 g/L를 사용하여 다음의 3가지 경우로 하여 분리 실험을 하였다.

Case 1. 배양액(curdlan + cell) 50%와 설탕 100g/L 50%을 같은 양을 설탕물을 먼저 넣은 뒤 배양액을 넣고 5000 rpm × 10 min에서 원심분리 하였다.

Case 2. 배양액(curdlan + cell) 50%와 설탕 100g/L 50%을 같은 양으로 섞은 뒤에 vortex 하여 5000 rpm × 15 min에서 원심분리 하였다.

Case 3. 배양액(curdlan + cell) 50%와 설탕 100 g/L 50%을 같은 양을 배양액을 먼저 넣은 뒤 설탕물을 넣고 5000 rpm × 10 min에서 원심분리 하였다.

실험결과 커들란을 포함하는 배양액은 밀도가 1.12 g/mL 이상에서는 cell층과 커들란 층이 분리되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 층의 분리가 현저하게 일어나는 밀도는 적어도 1.15 g/mL 이상 되어야 한다. 또한 특이한 점은 설탕물을 먼저 넣고 원심분리를 할 때에는 층이 나누어지는 것을 관찰할 수 있으나, 배양액을 먼저 넣거나, 혼합한 후에 원심분리했을 경우에는 층이 나누어지는 것을 관찰할 수 없었다. 이는 짙은 농도의 설탕이 배양액과 섞이어 분리에 필요한 밀도인 1.12 g/mL 보다 작기 때문이다. 설탕물에 의한 (curdlan + cell)의 분리는 설탕물의 농도가 400 g/L에서 확실히 관찰할 수 있었다. 즉, 농도가 400 g/L인 설탕물을 원심 분리관에 먼

Table 1. Density of sucrose solution and curdlan separation

Concentration of Sugar (g/L)	Density (g/mL)	Curdlan separation		
		Case 1	Case 2	Case 3
100	1.04	×	×	×
200	1.08	×	×	×
300	1.12	○	×	×
400	1.15	○	×	×
500	1.19	○	×	×

Table 2. Effect of base-acid treatment and homogenization of mixture on curdlan separation

Case	Alkali-acid Treatment	Homogenization	Curdlan Recovery (%)
1	×	10 min	83
2	×	×	53
3	○	×	69
4	○	5 min	79
5	○	10 min	87

저 넣고 그 위에 (curdlan + cell)을 넣고 5000 rpm × 10 min에서 원심분리 했을 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 설탕물을 먼저 넣었을 경우 용액 층이 안정된 상태에서 원심분리가 일어나 설탕물이 높은 밀도를 유지하는 것이 가능하기 때문이다.

### Treatment with Base-acid solution and Homogenizer

용액의 밀도가 1.15 g/mL인 경우 커들란과 세포의 분리가 우수함을 관찰할 수 있었다. 커들란은 세포의 다당류로 세포벽에서 생성되기 때문에 많은 양의 커들란이 세포벽에 붙어 있을 것을 예상하고 산-염기 처리 또는 Homogenizer를 이용하여 세포벽에 붙어있는 다당류를 분리하는 전처리 과정을 도입하였다. 전처리 과정은 산-염기 처리와(또는) homogenizer를 이용한 homogenization의 두 가지 조합을 하였으며 homogenization 시간을 조절하였다.

산-염기 처리 또는(및) Homogenizer를 이용하여 실험한 결과 커들란의 회수율은 함유량의 80% 정도까지 증가하였으며, 산-염기 처리를 하는 경우 커들란의 수율을 더욱 증가시키는 것이 가능하였다. 그러나, 커들란의 농도가 높은 경우 산-염기 처리를 하여 세포벽에 있는 커들란을 분리하는 것은 용액의 점도 증가로 인하여 쉽지 않으므로 homogenizer를 이용한 세포와 커들란의 분리를 돕게 함으로써 커들란의 회수율을 증가시키는 것이 가능하다.

## 결론

본 연구에서는 커들란과 세포의 밀도 차이를 이용한 원심 분리공정을 개발하였다. 커들란이 세포벽에서 합성되기 때문에 생산시 세포벽에 결합되어 있는 커들란을 회수율을 증가시키기 위하여 homogenizer를 이용하거나 산염기 처리를 하였을 때 커들란의 회수율을 실험한 결과 homogenizer 만을 이용했을 경우에도 80% 이상의 회수율을 나타냈으며 산염기

처리를 했을 경우 수율을 90% 정도까지 증가시킬 수 있었다.

본 연구에서 분리하는 방법은 세포를 분쇄하거나 산업기 처리를 하지 않음으로써 세포내의 부산물들이 분해되어 있지 않아 의약품 생산 등에 있어서 약품으로 허가받기 용이한 공정을 개발하였다.

### 감 사

본 연구는 산업기반기술연구지원사업의 지원으로 추진되었습니다. 연구비를 지원해 주신 (주)더멋진 Biotech과 산업자 원부에 감사 드립니다.

### 요 약

커들란은 용액의 pH 7.0에서 salt 상태로 존재하기 때문에 커들란만이 액상에 녹아있는 경우에는 분리공정은 원심분리를 함으로써 분리가 가능하다. 그러나, 세포의 다당류로 생산된 커들란은 세포, 염 등의 무기물이 섞여 있기 때문에 이러한 물질을 제거하는 것이 커들란 분리의 중요한 변수가 되었다. 커들란의 생산을 위한 분리에 관한 보고는 원심분리 방법을 이용한 것으로 알려져 있으며 세포 및 불순물 등을 제거하여 순수한 커들란을 분리하기 위해 pH swing separation (pH가 높은 경우 커들란이 용액에 녹는 성질을 이용)을 이용하였으나 원심분리를 수 차례 반복해야 되기 때문에 소요되는 동력이 많이 필요하여 에너지 절감형 및 오염절감형의 새로운 공정의 개발이 필요하게 되었다. 본 연구에서는 pH

swing separation에서 동력비가 많이 드는 단점을 감소시키기 위하여 커들란의 물리 화학적인 특성을 고려한 분리공정을 개발하였다. 향후 공정 개선을 위한 지속적인 연구가 필요하며 완성시 경제적인 공정을 개발하는 것이 가능할 것이다.

### REFERENCES

1. European Patent 588665. Preparation of a segregation-reducing agent for hydraulic compositions. (1994).
2. Funami, T., Funami, M., Yada, H., and Nakao, Y. (1999), Rheological and thermal studies on gelling characteristics of curdlan. *Food Hydrocolloids*, **13**, 317-324.
3. Kanke, M., Tanabe, E., Katayama, H., Koda, Y., and Yoshitomi, H., (1995), Application of curdlan to controlled drug delivery. III. Drug release from sustained release suppositories in vitro. *Biol. Pharm. Bulletin*, **18**, 1154-1158.
4. Lee, I. Y., Seo, W. T., Kim, G. J., Kim, M. K., Park, C. S., and Park, Y. H. (1997), Prpduction of curdlan using sucrose or sugar cane molasses by two-step fed-batch cultivation of *Agrobacterium* sp., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 156-160.
5. Lee, J. and Lee, I. (2001), Optimization of uracil for curdlan production by *Agrobacterium* sp., *Biotechnology letters*, **23**, 1131-1134.
6. Kim, M. K., Lee, I. Y., Lee, J. H., Kim, K. T., Rhee, Y. H., and Park, Y. H. (2000), Residual phosphate concentration under nitrogen-limiting conditions regulates curdlan production in *Agrobacterium* sp., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 180-183.