

Erwinia rhapontici 고정화에 의한 Palatinose의 생산

윤 중 원·오 광 근·김 정 환·*전 영 중·이 재 흥
제일제당(주) 종합연구소

Production of Palatinose by Immobilized Cells of *Erwinia rhapontici*

Jong Won Yun, Kwang Keun Oh, Jeong Hwan Kim,
Yeong Joong Jeon, and Jae Heung Lee

R & D Center, Cheil Foods and Chemicals Inc.,
Kyunggi-Do 467-810, Korea

ABSTRACT

The characteristics of *Erwinia rhapontici* cells with α -glucosyltransferase activity immobilized in Ca-alginate beads and the performance of two different types of reactor-stirred tank reactor(STR) and packed bed reactor(PBR)-charged with these immobilized cells to produce palatinose from sucrose were investigated. The optimal pH(5.5-6.0) and temperature(30-35°C) showed no appreciable difference between free and immobilized cells. The apparent Km value of the immobilized cells(0.28M) was approximately two times higher than that of free cells(0.13M) at 30°C. The half life of the immobilized cells was found to be 380 h with STR while much greater operational stability was achieved with PBR. Continuous operation of PBR at a space velocity of 0.2h⁻¹ for 30 days showed only 5% loss of initial activity.

서 론

최근 건강식품에 대한 관심이 고조되면서 Fructo-oligosaccharides(1, 2), Isomalto-oligosaccharides(3) 등의 올리고당류 및 Palatinose 등의 기능성 감미료 개발이 활기를 띠고 있다. 이들은 설탕이 갖고있는 뛰어난 감미질은 그대로 살리는 동시에 충치유발 등의 단점을 극복해 주는 등 우수한 기능성(4, 5)으로, 그 수요가 지속적으로 증가하고 있고 향후 대체감미료로서 상당한 위치를 차지할 것으로 기대되고 있다.

Palatinose (Isomaltulose, Lylose)는 Sucrose에 α -glucosyltransferase를 작용시켜 생성되는 이당류이며 Sucrose의 이성질체로 밝혀진 새로운 감미료로서 Sucrose와 물성이 유사하나 감미도는 Sucrose의 40% 정도이다.

Palatinose는 *Leuconostoc mesenteroids*의 부산물

로 처음 발견(6)되어 그 후 다른 몇 가지 미생물에서도 생성된다는 사실이 보고되었으나(7-10), 공업적으로 이용가능한 것은 *Erwinia rhapontici* (11), *Protaminobacter rubrum*(12) 정도로 밝혀져 있다.

Palatinose의 대량생산 방법은 크게 발효에 의한 직접생산법(12)과 Whole cell 고정화에 의한 Bioreactor 기술(13)로 대별되는데 후자가 경제적인 방법으로 알려져 있다. 고정화 세포에 의한 Palatinose 생산방법은 저분자인 설탕을 원료로 사용하므로 고정화 세포 내의 효소반응에서 물질전달이 효과적이며, 고농도 설탕을 사용함으로써 반응기 운전중에 오염원을 줄일 수 있는 등의 장점을 지니고 있다.

본 연구에서는 *Erwinia rhapontici*를 Ca-alginate에 고정화시켜 고정화 세포의 반응특성을 고찰하고 Stirred tank reactor(STR)와 Packed bed reactor(PBR)를 이용한 Palatinose의 생산을 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

반응기질로 사용한 Sucrose는 순도 99% 이상의 상용제품을 사용하였고 Sodium alginate는 식품첨가물 등급의 일본 Hayashi사 제품을 사용하였으며, 그 이외의 시약들은 모두 특급시약을 사용하였다. HPLC 분석을 위해 표준물질로 사용된 Palatinose는 Sigma사 제품을 사용하였고, Trehalulose는 Taniguchi 등(14)의 방법에 따라 분리정제하여 사용하였다.

세포배양 및 고정화

4% Sucrose, 0.4% Beef extract, 1% Peptone을 함유한 1.5% Agar slant에서 보관된 *Erwinia rhapsontici* ATCC 29283 변이주를 액체배양배지(Sucrose 5%, Yeast extract 1%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 0.5%)를 포함한 Flask에 접종하여 25°C에서 24시간 배양한 후 100L의 발효조에서 본배양하였다.

배양완료된 발효액으로부터 세포를 원심분리하여 회수하고 탈이온수로 2회 세척한 뒤, 20% (w/v) 농도로 현탁시켰다. 세포 현탁액을 3% (w/v) Sodium alginate 수용액과 1:2의 부피비로 충분히 혼합한 다음 1% (w/v) CaCl_2 수용액에 적하시켜 Ca-alginate bead 형태의 고정화 세포를 제조하였다.

반응특성 실험

Free cell 및 고정화 세포의 반응특성 실험은 특별한 설명이 없는한, pH 5.5로 조정된 50% (w/v) Sucrose 50ml, 고정화 세포 10g 또는 Free cell 40unit/g sucrose를 함유한 250ml Erlenmeyer 플라스크를 이용하여 30°C에서 반응을 수행하였다.

효소활성 측정

α -glucosyltransferase의 활성은 30°C에서 1분간 1 μmol 의 설당을 Palatinose로 전이시키는데 필요한 효소량을 1 Unit로 정의하였다. 활성의 측정은 78.57% Sucrose 7ml, 10mM Acetate buffer (pH 5.5) 2.5ml, 20% Cell 현탁액 0.5ml의 반응혼합물을 30°C에서 1시간 반응시킨 후 100°C 끓는물에서 10분간 실활시킨 다음, DNS법(15)에 의해 Palatinose 농도를 정량하여 효소역가를 결정하였다.

분석

모든 반응물은 HPLC로 분석하였고 분석조건은 전보(2)와 동일한 방법을 사용하였다.

PBR 운전

Jacket이 부착된 Glass column에 일정량의 고정화 세포를 충전시키고 온도를 30-35°C로 일정하게 유지시킨 다음, 550-650g/l의 Sucrose 용액을 Up-flow로 통과시키면서 연속반응을 수행하였다. 특별한 설명이 없을 경우, 610g/l Sucrose (pH 5.5-6)를 반응기질로 사용하였고 30°C에서 유속 SV (Space velocity) 0.2 h^{-1} 로 반응을 운전하였다.

결과 및 고찰

고정화 세포의 반응특성

Free cell과 고정화 세포의 최적반응온도 및 pH는 각각 30-35°C, 5.5-6.0으로 동일하였으나, 고정화에 의해 온도 및 pH에 대한 Sensitivity가 낮아지는 경향을 보여주었다(Fig. 1). 한편 고정화 세포를 이용하여 여러 온도에서 반응시켰을 때 생성물인 Palatinose(P)와 부산물로 생산되는 Trehalulose(T)의 거동을 고찰한 결과, 고정화 세포의 상대활성, Palatinose와 P/T 비율은 30-35°C에서 최고 전환율을 나타내는 Bell-shape 형태의 반응양상을 나타내었으나, 특이하게 Trehalulose는 온도의 영향을 크게 받지 않고 거의 일정비율로 생성되었다(Fig. 2). 이것은 두 산물의 반응에 있어서 Trehalulose에 대한 활성화 에너지가 Palatinose에 비해 매우 낮기 때문인 것으로 생각된다.

고정화 세포의 속도인자

pH 5.5, 온도 30°C에서 여러 Sucrose 농도에 대해 Batch 반응을 행한 후 Fig. 3의 Lineweaver-Burk plot을 통해 Free cell 및 고정화 세포의 속도

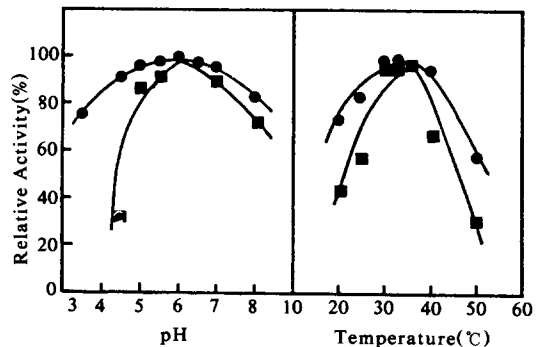


Fig 1. Effect of pH and temperature on the activity of free and immobilized cells: (■); free cells, (●); immobilized cells

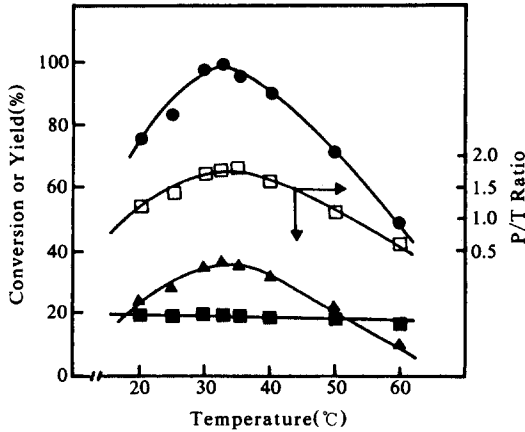


Fig 2. Effect of temperature on the conversion of products with immobilized cells:(●); relative activity, (▲); palatinose, (■); trehalulose, (□); P/T ratio

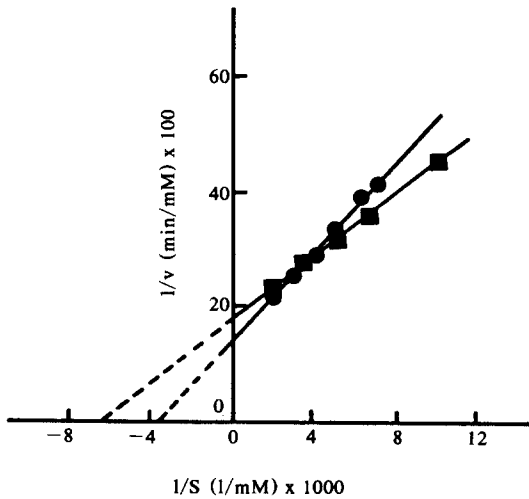


Fig 3. Lineweaver-Burk plots for the determination of Km of free and immobilized cells:(■); free cells, (●); immobilized cells

인자를 구하였다. 그 결과 Free cell의 겉보기 Km 은 0.13M, 고정화 세포는 0.28M이었다. 이 결과는 Nakajima 등(12)이 *Protaminobacter rubrum*을 이용해 pH 5.5, 25°C에서 얻어진 0.12, 0.14와는 차이가 있다.

Stirred-Tank Reactor(STR)을 이용한 Palatinose의 반연속생산

30°C로 유지된 2L STR(Biostat M, B. Braun, Germany)에 고정화 세포 200g을 투입하고, 610g/l Sucrose 1L(pH 6.0)을 이용하여 Batch reaction을 행하였다. 그 결과 반응 20시간 후 Sucrose가 98% 이상 전환되었고 Palatinose와 Trehalulose가 반응 초기부터 동시에 생성되었으며, 반응 20시간에서의 전환율은 각각 78%, 20% 였다(Fig. 4). 이 조건으로 Semibatch 형태(16)로 STR을 운전했을 때 고정화 세포의 반감기는 약 380시간으로 저조하였는데, 이것은 고정화 세포가 교반기에 의해 점진적으로 파쇄된 데도 원인이 있고 반응 후기의 pH(4-4.5)가 최적반응 pH(5.5-6)에서 벗어나 장기 운전됨으로써 안정성이 낮게 나타난 것으로 보인다. Cheetham 등(17)은 본 연구에서 사용한 동일 기원의 균주를 유사한 방법으로 고정화한 세포를 이용하여 STR을 연속운전했을 때 고정화 세포의 반감기가 341시간인 것으로 보고한 바 있다.

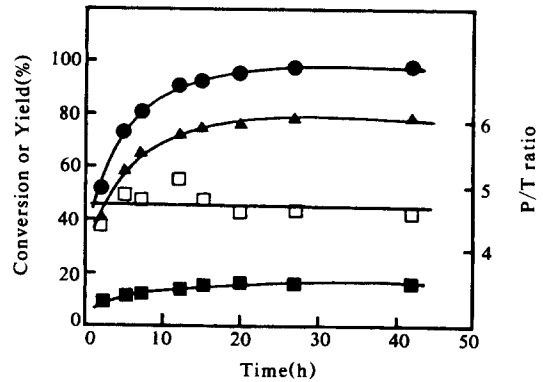


Fig 4. Typical reaction profiles of palatinose with immobilized cells in STR:(●); sucrose, (▲); palatinose, (■); trehalulose, (□); P/T ratio

Packed-Bed Reactor(PBR)을 이용한 Palatinose의 연속생산

Feed 농도 및 운전유속의 영향: PBR을 이용한 Palatinose의 연속생산에 있어서 중요한 인자중의 하나인 Feed 농도와 운전유속의 영향을 검토하였다. 온도를 30°C로 고정시키고 Feed 농도와 운전유속 (SV 0.025-0.4 h⁻¹)을 변화시키면서 Sucrose, Palatinose, Trehalulose 전환율 및 P/T 생성비율의 거동을 고찰한 결과 Fig. 5에서와 같이 Feed 농도 540g/l에서는 운전유속 SV 0.25 h⁻¹ 이하에서, 610g/l

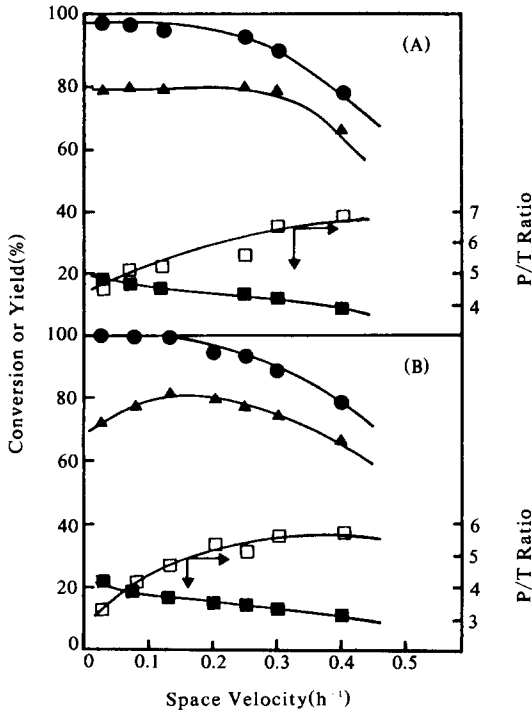


Fig 5. Effect of feed concentration and flow rate on the continuous production of palatinose in PBR : (A); 540 g/l sucrose, (B); 610 g/l sucrose, (●); sucrose, (▲); palatinose, (■); trahalulose, (□); P/T ratio

에서는 0.2 h^{-1} 이하에서 각각 Sucrose가 95% 이상 전환되어 80% 정도의 Palatinose 수율을 나타내었다. 특이한 것은 Sucrose 농도 540 g/l에서는 Sucrose의 전환율이 증가함에 따라 Palatinose 전환율도 이에 비례하였으나 610 g/l에서는 Palatinose 수율이 최고를 나타내는 특정 운전유속($SV 0.15 \text{ h}^{-1}$)이 존재하였다. 한편 운전유속의 증가에 따라 P/T 비율은 Feed 농도에 관계없이 증가하였다.

운전온도의 영향 : Fig. 1에서와 같이 고정화 세포의 반응최적온도는 $30\text{-}35^\circ\text{C}$ 로 나타났지만 반응기를 장기운전할 때는 고정화 세포의 역가 안정성이 최고를 나타내는 최적운전조건이 필요하다(16). 적정한 두 온도범위인 $30, 33^\circ\text{C}$ 에서 장기운전 안정성을 비교해 본 결과, Palatinose 수율 및 고정화 세포의 안정성 모두 거의 동일한 결과를 나타내었는데 30일 후 95%까지 활성이 유지되면서 대체로 안정한 운전이 가능하였고(Fig. 6), 이때 반응기 단위 부피당 생

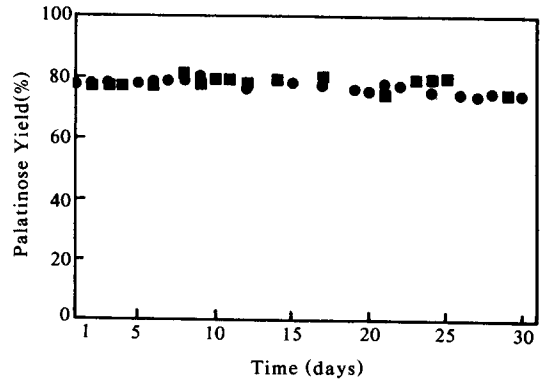


Fig 6. Operational stability for the continuous production of palatinose in PBR : (●); 30°C , (■); 33°C

산성은 약 $120 \text{ g/l} \cdot \text{h}$ 였다. Cheetham 등(17)은 *E. rhapsontici*를 Ca-alginate에 고정화한 PBR 운전에서 고정화 세포의 반감기가 8500 시간인 것으로 보고한 바 있고, Nakajima 등(12, 18)은 서로 다른 두 종류의 미생물 *Serratia plymuthica* NCIB 8285 및 *Protaminobacter rubrum*을 Ca-alginate에 고정화한 PBR 운전에서 반감기는 각각 23일 및 73일 인 것으로 보고하였다.

이상의 최적화 결과들을 통하여 50 L Scale까지의 PBR에 대해 Scale-up 연구를 수행하였다. 그 결과 10 L까지의 Bench scale 및 50 L의 Pilot scale에서도 안정한 Palatinose 전환율을 보여주었다(Table 1). 그러나 50 L Scale부터는 Channeling 현상의 방지를 위하여 반응기 전체의 균일한 온도유지 및 Feed distribution에 세심한 주의가 필요하였으며, 이러한 문제는 현재 당사에서 유사한 System에 의해 생산되고 있는 Fructo-oligosaccharides 생산용 반응기의 운전경험에 비추어 볼 때 PBR 설계에서 가장 중요한 인자로 판단된다.

Table 1. Scale-up results of PBR for the continuous production of palatinose

Reactor volume(L)	Palatinose yield(%)
0.6	78.7
1.7	78.7
4.5	77.8
10	78.0
50	78.3

요 약

*Erwinia rhapsodica*를 Ca-alginate에 고정화시켜 고정화 세포의 반응특성을 고찰하고, STR, PBR을 이용하여 Palatinose의 생산을 검토하였다. Free cell과 고정화 세포의 반응최적 pH는 5.5-6.0, 반응최적 온도는 30-35℃로 동일하였으나 고정화에 의해 pH 및 온도 범위가 보다 넓어졌고, 이때 Free cell 및 고정화 세포의 겔보기 Km 값은 각각 0.13, 0.28M 이었다. STR을 이용한 Palatinose 생산시 고정화 세포의 반감기는 약 380 시간으로 낮았으나, PBR을 통해 30일까지 안정운전이 가능하였다. PBR 운전시의 운전온도 30, 33℃에서 Palatinose 수율 및 고정화 세포의 안정성은 거의 동일한 결과를 나타내었으며 이때 PBR 생산성은 약 120 g/l·h 이었고, Pilot scale인 50 L까지 성공적으로 Scale-up이 되었다.

감 사

본 논문은 1990-1992년도 과학기술처의 특정 연구개발사업 연구결과 중 일부임.

참고문헌

1. K. H. Jung, J. Y. Lim, J. H. Lee, and M. Y. Yoo(1987), *Biotechnol. Lett.*, **9**(10), 703.
2. K. H. Jung, J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim, and J. H. Lee(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 491.
3. T. Kohmoto, F. Fukui, H. Takaku, and T. Mitsuoka(1991), *Agric. Biol. Chem.*, **55**(8), 2157.
4. K. R. Roberts and M. C. Hey(1980), *Scand. J. Dent. Res.*, **88**, 201.
5. K. Kawai, Y. Okuda, and K. Yamashita (1985), *Endocrinol. Japan*, **32**(6), 933.
6. F. H. Stodola, H. J. Koepsell, and E. S. Sharpe(1952), *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 3202.
7. E. J. Bourne, D. H. Huston, and H. Weigel (1961), *Biochem. J.*, **79**, 549.
8. B. M. Lund and G. M. Wyatt(1973), *J. Gen. Microbiol.*, **78**, 331.
9. R. Weidenhagen(1961), *Zucker*, **14**, 456.
10. M. Mcallister, C. T. Kelly, E. Doyle, and W. M. Fogarty(1990), *Biotechnol. Lett.*, **12**(9), 667.
11. P. S. J. Cheetham, C. E. Imber, and J. Isherwood(1982), *Nature*, **299**, 628.
12. UK Patent Application GB 2 082 591.
13. South Germane sugar Co., (1976), *UK Patent spec.* 1,429, 334.
14. W. Taniguchi and T. Hiramoto(1988), *Proc. Res. Soc. Jpn. Sugar Refineries. Technol.*, **36**, 87.
15. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
16. J. W. Yun, K. H. Jung, J. W. Oh, and J. H. Lee(1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/25**, 299.
17. P. S. J. Cheetham(1987), *Methods in Enzymology*, Vol. **136**, 432.
18. Y. Nakajima(1984) *Proc. Res. Soc. Jpn. Sugar Refineries. Technol.*, **33**, 5.