

고정화 세포에 의한 Fructo-oligosaccharides 생산 반응메카니즘에서 물질전달 영향에 대한 수학적 모델

윤 종 원 · 전 영 중* · 이 민 규** · 송 승 구

부산대학교 화학공학과

*제일제당(주) 종합연구소

**제주대학교 화학공학과

Modeling the effect of mass transfer on the kinetics of fructo-oligosaccharide production by immobilized cells

Jong Won Yun, Yeong Joong Jeon,* Min Gyu Lee** and Seung Koo Song

Department of Chemical Engineering, Pusan National University
Pusan 609-735, Korea

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

**Department of Chemical Engineering, Cheju National University
Cheju 690-120, Korea

ABSTRACT

The effective diffusion coefficients of glucose, sucrose, and fructo-oligosaccharides in Ca-alginate gel beads at high concentration of sucrose solutions were investigated at 50°C. A mathematical model for the kinetics of fructo-oligosaccharide production using immobilized cells was proposed and compared with experimental results varying the bead size, the substrate concentration and the bead ratio. Very low values of diffusion coefficients ranging $1.2-7.6 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{sec}$ were obtained, and the predicted results were in good agreement with experimental ones in all cases tested.

서 론

고정화 효소 또는 미생물을 이용한 생물반응기의 설계나 운전에서 물질전달 현상은 매우 중요한 문제가 된다(1, 2). 외부물질전달이나 내부물질전달 모두 총괄 반응속도에 영향을 미치지만 일반적으로 후자가 더 심각하여(3) 고정화 세포 내에서의 물질 전달에 관한 많은 연구가 행하여져 왔고 특히 확산 효과에 대해 많은 문헌이 보고된 바 있다(4-8). 그러나 대부분의 연구가 저농도 수용액 중에서 여러

가지 기질 또는 반응물에 대한 유효 확산계수를 구하는 방법에 관한 것이고 고농도 당(sugar)용액에서의 확산계수를 실측한 보고는 거의 없고 특히 그 결과를 반응 특성규명이나 반응기 설계 등에 직접 적용한 예는 많지 않다.

지금까지 새로운 감미료의 일종인 fructo-oligosaccharides 생산을 위한 효소 fructosyltransferase에 관한 최적 생산조건, 효소 반응메카니즘 및 고정화 세포를 이용한 fructo-oligosaccharides 생산공정 등이 보고된 바 있으나(9-12), 고정화 세포

내의 물질전달 현상을 규명한 보고는 없다. 물질전달 현상에 따른 수학적 모델은 생산조건 변화에 의한 fructo-oligosac의 생산을 예측하고 효율적으로 제어할 수가 있는 기본 요소이다.

본 연구에서는 고농도 당용액에서 Ca-alginate bead에 고정화된 *Aureobasidium pullulans* cell 내에서의 포도당, sucrose, fructo-oligosaccharides (GF₂, GF₃, GF₄)에 대한 유효확산계수를 구하고 그 결과를 이용하여 고정화 세포에 의한 fructo-oligosaccharides 생산 메카니즘에 관한 수학적 모델을 제시하였다.

재료 및 방법

시약

고정화 재료로 사용된 sodium alginate는 일본 Hayashi Pure Chemical Ind., Ltd. 제품을 사용하였고, sucrose 및 fructo-oligosaccharides는 제일제당(주)에서 생산된 상용제품을 사용하였으며 그 외의 시약들은 특급시약을 사용하였다.

고정화 cell의 제조

전보(12)에서의 방법과 동일하게 *Aureobasidium pullulans* KFCC 10245를 3% sodium alginate에 고정화시켰다. 단, 유효확산계수를 구하는 실험에서는 고정화 전에 세포를 완전히 실했시켰다.

분석방법

모든 반응물은 전보(10)에서와 동일한 방법으로 HPLC를 사용하여 분석하였다.

확산계수의 결정

50°C로 유지된 실린더형 반응조에 770과 860 g/ℓ sucrose용액 500ml를 각각 넣고, 770 g/ℓ sucrose 용액중에서의 유효확산계수 측정의 경우는 초기농도를 알고 있는 포도당, sucrose, fructo-oligosaccharides 혼합용액중에서 포화시킨 다음 고정화 세포(직경 2.34mm) 250g을 여과, 건조시킨 후 100% sucrose 용액중에 순간적으로 투입하였다. 한편 860 g/ℓ sucrose 용액중에서의 유효확산계수 측정의 경우는 100% sucrose 용액(860 g/ℓ) 중에서 포화시킨 다음 포도당, sucrose, fructo-oligosaccharides 혼합용액중에 순간적으로 투입함으로써 전자의 경우 Ca-alginate gel로부터 sucrose 용액중으로, 후자의 경우는 포도당, sucrose, fructo-oli-

gosaccharides 혼합용액으로부터 Ca-alginate gel 내로의 확산 속도를 구하고자 하였다. 이때 교반속도에 따라 유효확산계수가 변할 수 있으므로 예비 실험결과 영향이 없는 영역으로 확인된 400 rpm에서 실험을 수행하였다. 유효확산계수의 측정은 고정화 세포를 현탁시킨 뒤 1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30분 후 고정화 세포내부에서 sucrose 용액중으로 확산되어 나오거나 들어간 포도당, sucrose, fructo-oligosaccharides 등의 농도를 각각 정량함으로써 구하였다. 한편 Tanaka 등(4)과 Scott 등(6)의 보고에서와 같이 고정화 bead 내부에서 외부, 또는 그 반대로의 확산계수는 동일한 것으로 가정하였다.

모델의 적용실험

고정화 세포에 의한 fructo-oligosaccharides의 생성 반응은 특별한 설명이 없는 한, 770 또는 860 g/ℓ sucrose용액 50ml과 20 또는 40%(w/v)의 고정화 세포를 함유한 250ml Erlenmer flask를 이용하여 50°C에서 24시간 동안 반응시켰고 외부물질전달 저항을 최소화하기 위해서 400 rpm으로 격렬하게 교반해 주었다.

이론적 배경

확산계수를 구하는 방법은 지금까지 많이 보고되어 있지만(14), 유효확산계수를 구하는 일반적인 방법으로는 nonsteady-state method(4)와 diffusion cell method(7)가 알려져 있다. 본 연구에서는 전자의 방법을 사용하였다. 세포와 확산물질이 bead 내에서 균일하게 분포되어 있고 bead의 크기가 일정하다고 가정하면 bead 내에서의 물질수지식으로부터 다음의 식 (1)을 얻을 수 있고;

$$D_e \left(\frac{d^2C}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC}{dr} \right) = \frac{dC}{dt} \quad (1)$$

초기 및 경계조건은 아래의 식 (2), (3), (4)로 표현된다.

$$t=0, 0 \leq r \leq R, C=C_0 \quad (2)$$

$$t \geq 0, r=0, \frac{dC}{dr} = 0 \quad (3)$$

$$t=0, r=R, C=C_{L0} \quad (4)$$

식 (1)은 용질에 대한 다음의 total material balance와 함께 수치해석적으로 풀 수 있다.

$$V_s C_{avg} + V_L C_L = V_s C_0 + V_L C_{L0} \quad (5)$$

$$\text{여기서 } C_{\text{avg}} = \frac{\int C dV}{V_s}$$

식(5)는 다음의 식 (6)으로 다시 쓸 수 있다.

$$C_{L0} = C_L + \alpha(C_{\text{avg}} - C_0) \quad (6)$$

여기서 α 는 bead 첨가비율 V_s/V_L 으로 정의되고, 유효확산계수 D_e 를 구하기 위한 알고리즘은 다음과 같다.

- 1) D_e 를 적절한 범위($10^{-4} \sim 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$) 내의 값으로 가정한다.
- 2) 시간에 따른 이론적 C_L 을 구한다.
- 3) C_L 실험치와 이론치를 비교한다.
- 4) 새로운 D_e 를 가정한다.
- 5) C_L 실험치와 이론치의 차이가 최소가 될 때까지 1)-4)를 반복한다.

위의 식들의 연립해를 위한 computer program은 BASIC language를 사용하였다.

결과 및 고찰

포도당, sucrose 및 fructo-oligosaccharides에 대한 유효확산계수

많은 연구자들이 물 또는 저농도 수용액중에서 Ca-alginate 고정화 계에 대한 포도당 및 sucrose의 유효확산계수를 구하였는데(4-8), 그 값은 $4.0 \sim 7.0 \times 10^{-6} \text{cm}^2/\text{s}$ 인 것으로 보고되고 있다. 그러나 고농도 당용액에서의 이들에 대한 확산계수는 보고된 바 없고, 특히 fructo-oligosaccharides의 확산계수는 전혀 보고된 바 없다.

포도당, sucrose 및 fructo-oligosaccharides의 유효확산계수를 측정하기 위하여 전술한 방법에 의해 실험을 수행하고 초기 30분 동안의 각 당의 조성변화를 측정하여 수치해석 결과와 비교하여 Fig. 1, 2에 각각 나타내었고 이들 결과로부터 각각에 대한 유효확산 계수를 구하여 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보여주는 바와 같이 770 g/l 이상의 고농도 설탕용액에서 포도당, sucrose, fructo-oligosaccharides의 유효확산계수는 $1.2 \sim 7.6 \times 10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$ 범위로서 매우 낮은 값을 나타내었고, 860 g/l에서의 값이 770 g/l에서 보다 약 2배 정도 낮게 나타났다. Hannoun 등(7)은 2~100 g/l 범위 내에서의 저농도 포도당 용액농도에서는 확산계수가 일정하다고 보고한 바 있는데, 이들의 실험조건에 비해 본 연구에서 사용된 당농도는 점도가 매우 높은 영역이다. 한편 Tanaka 등(4)은 분자량이 2×10^4

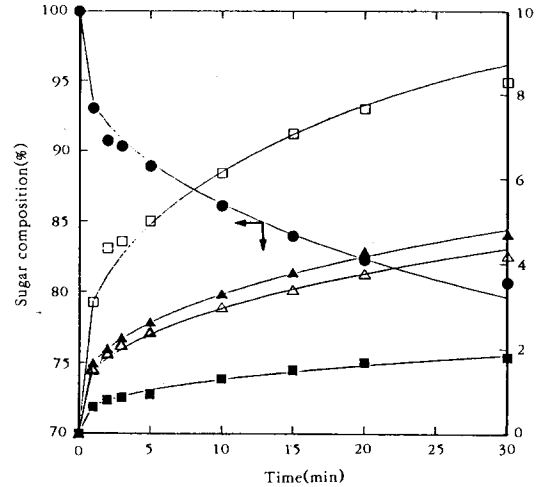


Fig. 1. Diffusion of glucose, sucrose, fructo-oligosaccharides from Ca-alginate gel bead into 770 g/l of sucrose solution: (●) sucrose, (□) sucrose, (▲) glucose, (△) GF₃, (■) GF₃, (—) GF₄; model predictions.

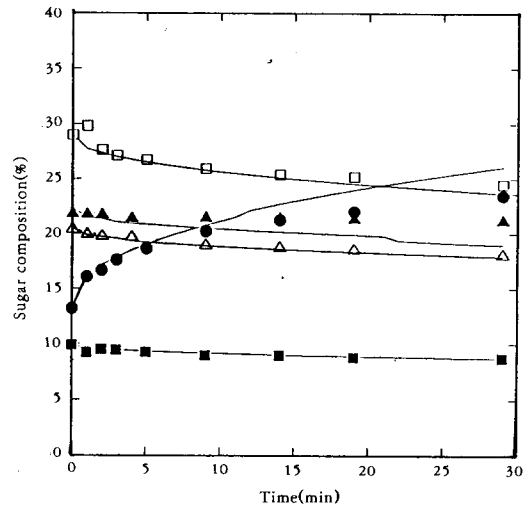


Fig. 2. Diffusion of glucose, sucrose, fructo-oligosaccharides from 860 g/l of mixed sugar solution into Ca-alginate gel bead: (●) sucrose, (□) sucrose, (▲) glucose, (△) GF₃, (■) GF₃, (—) GF₄; model predictions.

dalton 이하의 용질에 대해서는 Ca-alginate gel bead의 수용액에 대한 유효확산계수의 차이가 없다

고 보고한 바 있으나 본 연구에서와 같이 매우 높은 고농도 당용액에서는 분자량이 작을수록 유효확산 계수의 값이 다소 큰 것으로 나타났다(Table 1).

수학적 모델의 전개

정상상태에서 bead 내에서의 성분 i에 대한 반응 속도식과 확산식을 동시에 적용하면 다음의 식 (7) 이 되고

$$D_{ei} \left(\frac{d^2 C_i}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{dC_i}{dr} \right) = r_i \quad (7)$$

경계조건은 다음과 같다.

$$\begin{aligned} r=R, \quad C_i &= C_{Li} \\ r=0, \quad \frac{dC_i}{dr} &= 0 \end{aligned}$$

여기서 r_i 즉, 포도당, sucrose, fructo-oligosaccharides에 대한 각각의 반응속도식은 전보(10)에서 전개된 식들을 그대로 적용하였고(Table 2), 수치해석시 Ca-alginate gel bead 내에서 각각의 r_i 는 동일한 것으로 가정하였다.

미분방정식(7)은 각 성분들의 농도 C_i 를 계산하는 tridiagonal coefficient matrix 형태의 선형 미분방정식으로서 수치해석적 해가 가능하다. 해를 구하는데 필요한 K_m, V_{max} 등의 속도상수는 전보(10)에서 구한 값들을 적용하였다.

Bead 크기가 고정화 cell kinetics에 미치는 영향 물질전달에 대한 외부저항을 무시하고 bead 내부

에서 각 성분의 확산속도가 일정하다고 가정하면, 저분자 물질의 bead 내에서의 확산계수는 동일하다고 볼 수 있다(6). 따라서 본 연구에서도 bead 크기가 확산계수에 미치는 영향을 무시하였다. 서로 다른 4 종류 크기(직경 2.01, 2.61, 3.34, 3.80mm)의 bead에 대하여 sucrose 농도(770, 860g/l)와 bead 첨가비율($\alpha=0.2, 0.4$)을 변화시키면서 실험치와 모델식으로부터 구한 값을 비교한 결과, 모든 경우(16 Cases)에서 각 당의 농도 profile이 실험치와 모델값이 서로 잘 일치하였다(Fig. 3, 4).

Sucrose농도가 고정화 cell kinetics에 미치는 영향

Fructo-oligosaccharides 생산에 효과적인 두 가지 설탕농도(11, 12) 즉, 660, 860g/l에 대하여 부피비 20%($\alpha=0.2$)의 bead를 첨가하여 모델확인 실험을 수행한 결과, Fig. 3에서와 같이 실험치와 모델식이 대체로 잘 일치하였다.

Bead 첨가비율이 고정화 cell kinetics에 미치는 영향

Fig. 4에서 보여주는 바와 같이 770g/l 설탕용액에 대하여 고정화 세포의 첨가비율을 20%에서 40%로 변화시키면서 모델식을 확인해 본 결과, 실험치와 대체로 잘 일치하였다. 효소 농도가 증가하면 반응속도가 증가함과 같이 고정화 세포의 첨가비율을 2배로 증가시킴으로써 반응시간을 2배 단축할 수 있는 결과를 나타내었다.

Table 1. Effective diffusion coefficients of glucose, sucrose, and fructo-oligosaccharides in Ca-alginate gel beads at 50°C.

sugars	diffusion coefficients $\times 10^7$ (cm ² /s)	
	770g/l ^{a)}	860g/l ^{b)}
glucose	7.6	3.7
sucrose	4.2	2.1
GF ₂	3.3	1.5
GF ₃	2.9	1.4
GF ₄	2.4	1.2

a) from Ca-alginate gel bead into 770g/l sucrose solution.

b) from 860g/l mixed sugar solution into Ca-alginate gel bead.

Table 2. The model equations for the production of fructo-oligosaccharides from sucrose by fructosyltransferase(Ref. 10).

$$\begin{aligned} \frac{ds}{dt} &= - \frac{V_{ms} \cdot S}{[K_{ms} + S + (K_{ms}/K_{ig})G]} + \frac{2 \times 342}{4 \times 504} \cdot \frac{V_{mk} \cdot K}{(K_{mk} + K)} \\ \frac{dG}{dt} &= \frac{4 \times 180}{8 \times 342} \cdot \frac{V_{ms} \cdot S}{[K_{ms} + S + (K_{ms}/K_{ig})G]} \\ \frac{dK}{dt} &= \frac{4 \times 504}{8 \times 342} \cdot \frac{V_{ms} \cdot S}{[K_{ms} + S + (K_{ms}/K_{ig})G]} \\ &\quad - \frac{V_{mk} \cdot K}{(K_{mk} + K)} + \frac{504}{2 \times 666} \cdot \frac{V_{mn} \cdot N}{(K_{mn} + N)} \\ \frac{dN}{dt} &= \frac{2 \times 666}{4 \times 504} \cdot \frac{V_{mk} \cdot K}{(K_{mk} + K)} - \frac{V_{mn} \cdot N}{K_{mn} + N} \\ \frac{dP}{dt} &= \frac{828}{2 \times 666} \cdot \frac{V_{mn} \cdot N}{(K_{mn} + N)} \end{aligned}$$

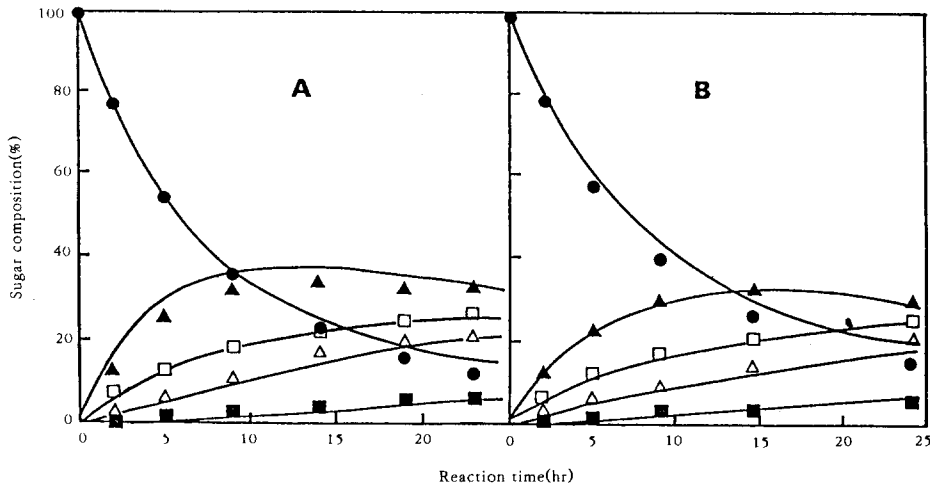


Fig. 3. Effect of sucrose concentration on the kinetics of fructo-oligosaccharides production by immobilized cells: initial concentration of sucrose is (A); 770g/l, (B); 860g/l, bead diameter is 2.01mm, bead ratio(α) is 0.2; (●); sucrose, (□); glucose, (▲) GF₂, (△); GF₃, (■); GF₄, (—); model predictions.

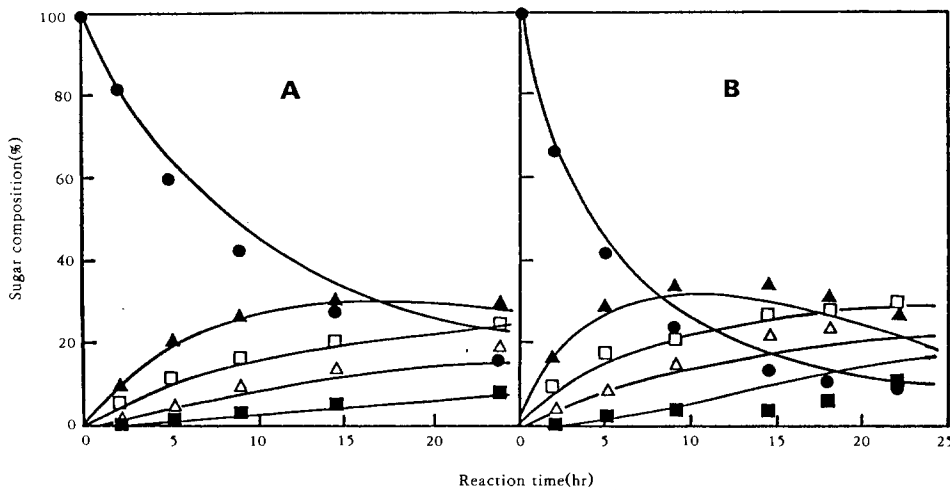


Fig. 4. Effect of bead ratios on the kinetics of fructo-oligosaccharides production by immobilized cells: bead ratio is (A); 0.2, (B); 0.4, initial concentration of sucrose is 770g/l, bead diameter is 2.62mm; (●); sucrose, (□); glucose, (▲); GF₂, (△); GF₃, (■); GF₄, (—); model predictions.

요 약

Calcium alginate gel에 고정화된 *Aureobasidium*

mullans cell을 이용한 fructo-oligosaccharides 생산 반응메카니즘에 있어서 포도당, sucrose 및 fructo-oligosaccharides의 유효확산계수를 구하고,

반응메카니즘에 대한 수학적 모델을 제안하였다. 770g/ℓ, 860g/ℓ의 고농도 당용액에서 이들의 유효확산계수는 $1.2 \sim 7.6 \times 10^{-7}$ cm²/s 범위로 매우 낮은 값을 보였고, 이 결과를 모델식에서 적용하여 기질농도, bead 크기 및 첨가비율 등을 변화시키면서 실험적으로 검증해 본 결과 실험치와 모델식이 대체로 잘 일치하였다.

사용기호

C : variable concentration in beads(g/ℓ)
 C_{avg} : average concentration of sugars in beads at contact time, t(g/ℓ)
 C_L : variable concentration of sugars in a bulk solution(g/ℓ)
 C₀ : initial concentration of sugars in beads(g/ℓ)
 C_{L*i*} : concentration of component i in a bulk solution(g/ℓ)
 C_{L0} : initial concentration of sugars in a bulk solution(g/ℓ)
 D_{ei} : effective diffusion coefficient of the component i in beads(cm²/s)
 G : glucose concentration(g/ℓ)
 K : l-kestose(GF₂) concentration(g/ℓ)
 K_{ig} : competitive inhibition constant for glucose(g/ℓ)
 K_{mk} : Michaelis constant for l-kestose(g/ℓ)
 K_{mn} : Michaelis constant for nystose(GF₃, g/ℓ)
 K_{ms} : Michaelis constant for sucrose(g/ℓ)
 N : nystose concentration(g/ℓ)
 P : fructofuranosyl nystose(GF₄) concentration(g/ℓ)
 r : variable radius(cm)
 R : bead radius(cm)
 r_i : reaction rate equations for each component i(g/ℓ/h)
 S : sucrose concentration(g/ℓ)
 t : time(h)
 v : variable volume(ℓ)

V_L : total liquid volume excluding the space occupied by the beads(ℓ)
 V_{mk} : maximum velocity for l-kestose(g/ℓ/h)
 V_{mn} : maximum velocity for nystose(g/ℓ/h)
 V_{ms} : maximum velocity for sucrose(g/ℓ/h)
 V_S : total bead volume(ℓ)

참고문헌

1. J. M Radovich(1985). *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 2.
2. Y. Y. Lee and G. T. Tsao (1974), *J. Food Sci.*, **39**, 667.
3. K. Buchholz(1979), *DECHEMA Monographs* Vol. 84, 208.
4. H. Tanaka, M. Matsumura and I. A. Veliky (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 53.
5. A. Axelsson and B. Persson(1988), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **16**, 231.
6. C. D. Scott, C. A. Woodward and J. E. Thompson(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 258.
7. B. J. M. Hannoun and G. Steohanopoulos (1986), *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 829.
8. U. Mehmetoglu(1990), *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 124.
9. K. H. Jung, J. Y. Lim, S. J. Yoo, J. H. Lee and M. Y. Yoo(1987). *Biotechnol. Lett.*, **9**, 703.
10. K. H. Jung, J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim and J. H. Lee(1989), *Enzyme Microb. Technol.*, **11**, 491.
11. J. W. Yun, K. H. Jung, J. W. Oh and J. H. Lee(1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **24/25**, 299.
12. J. W. Yun, K. H. Jung, Y. J. Jeon and J. H. Lee(1992), *J. Microbio. Biotechnol.*, **2**(2), 98.
13. E. L. Cussler(1984), *Diffusion-mass transfer in fluid systems*, P.134, Cambridge University Press.