

(S5-A) Continuous Production of Palatinose
by Immobilized Cells of *Erwinia* sp.

전 영 중
제일제당 종합연구소

1. 서론

Palatinose (Isomaltulose)는 설탕에 효소(α -glucosyltransferase)를 작용시켜 만드는 이당류 자연감미료로서 glucose와 fructose가 결합된 설탕의 구조적 이성질체이다. 감미도는 설탕의 40% 정도이고 감미의 질과 물리적, 화학적 성질은 설탕과 유사하다(1). Palatinose는 특히 저충치유발성 및 항충치유발성의 특징이 있고 (2,3) 인체내에서 분해 흡수가 서서히 이루어지는 기능을 가진 건강 감미료이다(4). 따라서 Palatinose는 충치를 생기지 않게 하기 위한 제과류, 음료류 및 당뇨병식의 감미료로서 이용되며 저칼로리 감미료인 isomaltitol의 중간원료가 되기도 한다(5).

Palatinose는 *Leuconostoc mesenteroides*의 부산물로서 처음 발견되었으며 (6) 그후에 몇가지 미생물에서의 Palatinose 생성이 보고 되었다(7-11). Cheetham 등은 *Erwinia rhapontici*를 고정화하여 고수율로 연속적인 Palatinose의 생산을 가능케 하였으며 (12-13) 일본의 미쓰이 제당은 *Protaminobacter rubrum*의 고정화 세포를 이용하여 Palatinose를 생산하여 1985년부터 시판 하고 있다. (14)

본 연구는 *Erwinia* sp.를 배양하여 Alginate에 세포를 고정화한 다음 PBR (Packed-bed reactor) type의 Bioreactor를 사용하여 Palatinose를 연속적으로 생산하는 기술에 관한 것으로 1) 효소생산 균주 개발 및 배양조건의 최적화연구 2) 효소반응 및 고정화 연구 3) 효소정제 및 특성연구 4) 제품정제 및 회수연구 등의 내용을 포함한다.

2. 실험방법

1) 배양 : 효소 α -glucosyltransferase를 생산하는 균주로 자체 개발한 *Erwinia* sp.를 사용하였다. 4% sucrose, 0.4% beef extract, 1% peptone을 함유한 1.5% agar slant에 보관한 균주를 250ml의 액체배양배지 (sucrose 50 g/l, yeast extract 10 g/l, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l)를 포함한 플라스크에 접종하여 25 °C로 24시간 배양한후 5-100L 크기의 main fermentor에 이식하여 배양하였다.

2) Cell 고정화 : 배양완료된 Cell을 원심분리하여 회수한 다음 탈이온수로 1-2회 세척하고 wet cell을 20%(w/v) 농도가 되게 탈이온수로 현탁하였다. 준비된 3%(w/v) sodium alginate 수용액과 1:2의 비율로 충분히 혼합하고 이 혼합액을 1%(w/v) CaCl_2 수용액에 적하시켜 calcium alginate bead형태의 고정화 세포를 얻었다.

3) Bioreactor 운전 : double-jacket 형태의 column에 고정화세포를 충전시키고 circulator로 일정온도를 유지하면서 설탕용액을 정해진 유속으로 up-flow시켜 반응을 실시하였다.

4) 효소의 정제 : 배양된 cell을 원심분리하여 회수하고 세척한 후 생물학적 계면활성제 및 lysozyme으로 처리하며 삼투성 충격을 가하는 복합적인 추출방법을 사용하여 효소 추출액을 얻었다. 효소 추출액으로부터 황산암모늄 분획 침전을 얻고 침전을 용해하여 겔여과법, 음이온교환 크로마토그래피, 양이온교환 크로마토그래피 등의 과정을 거쳐서 α -glucosyltransferase를 순수하게 정제하였다.

5) 효소 활성도 : 효소활성은 30 °C에서 1분동안 1 μM 의 설탕을 팔라티노스로 전이시키는 효소량을 1unit로 정의 했으며, 팔라티노스 및 반응생성물의 농도는 HPLC에 의해 분석 하였다.

3. 결과 및 고찰

팔라티노스의 생산공정은 다음과 같다(Fig.1). 효소생산 균주를 최적배양 조건에서 배양하여 균체를 회수하고, 균체를 alginate bead에 고정화시킨후 고정화 세포를 bioreactor에 충전시킨다. 기질인 설탕을 연속적으로 bioreactor에 투입하여 일정시간 반응이 진행되면 product로 팔라티노스 반

응 완료액을 얻는다. 반응 완료액 (팔라티노스 뿐만 아니라 trehalulose, glucose, fructose 및 미반응 설탕이 존재)을 농축하고 결정을 석출시켜 원심분리에 의해 회수된 결정을 건조하여 팔라티노스를 얻는다.

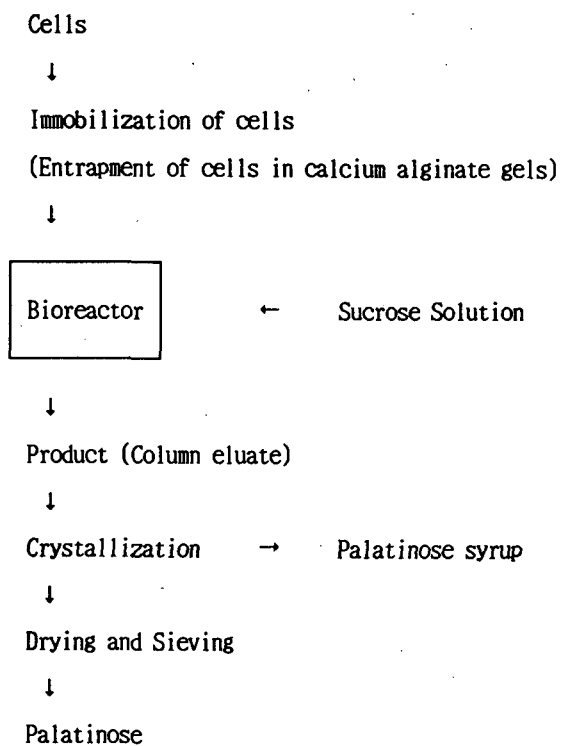


Fig.1 Schematic diagram of palatinose production process.

Stirred tank형 Bioreactor에서 고정화 세포에 의하여 팔라티노스를 생산하는 전형적인 반응양상은 Fig.2와 같다. 효소반응에 의하여 설탕이 팔라티노스와 trehalulose로 전이되며 그때의 Palatinose/Trehalulose (P/T) 생성 비율을 보면 반응초기부터 일정하게 유지되며 장시간 반응해도 그 비율은 거의 변하지 않는다. 따라서 sucrose로부터 palatinose와 trehalulose가 생성되는 반응은 series reaction 이 아니라 parallel reaction인 것으로 추정된다. 충전탑형 Bioreactor에서 Feed 유속에 따른 반응성을 실험한 결과 Fig.3에서 보는바와 같이 SV가 0.2 h^{-1} 이하일때 95% 이상의 sucrose conversion을 얻었으며 palatinose yield는 SV 0.15 h^{-1} 일때 최고치를 보였다.

즉 SV가 0.15 h^{-1} 이하일 경우에는 sucrose conversion은 거의 100%이나 byproduct인 Trehalulose의 생성량이 많았고 0.15 h^{-1} 이상일 경우에는 sucrose conversion 자체가 낮아 palatinose yield가 감소하였다.

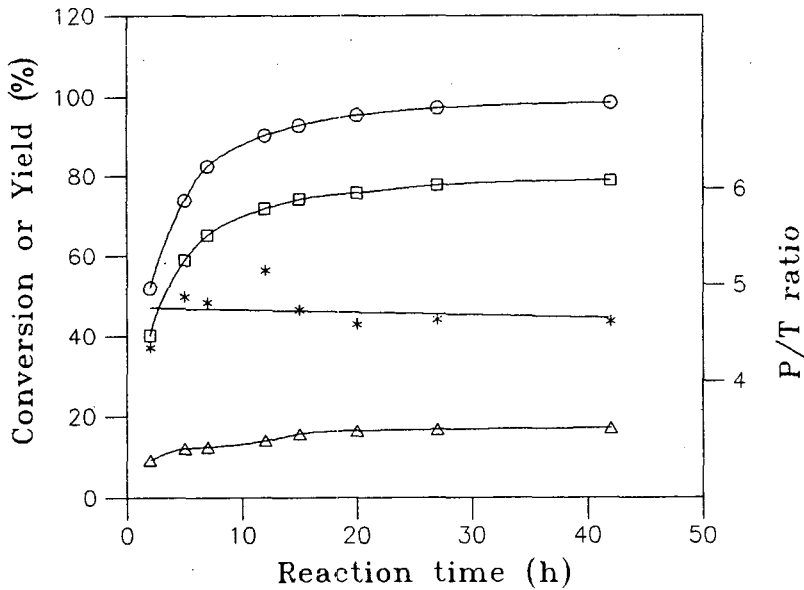


Fig. 2 Batch reaction profile. (Temp.= 30°C , Feed = 45% (w/w), Enzyme=40U/g sucrose)
 ○,sucrose; □,palatinose; Δ,trehalulose;
 *,P/T ratio.

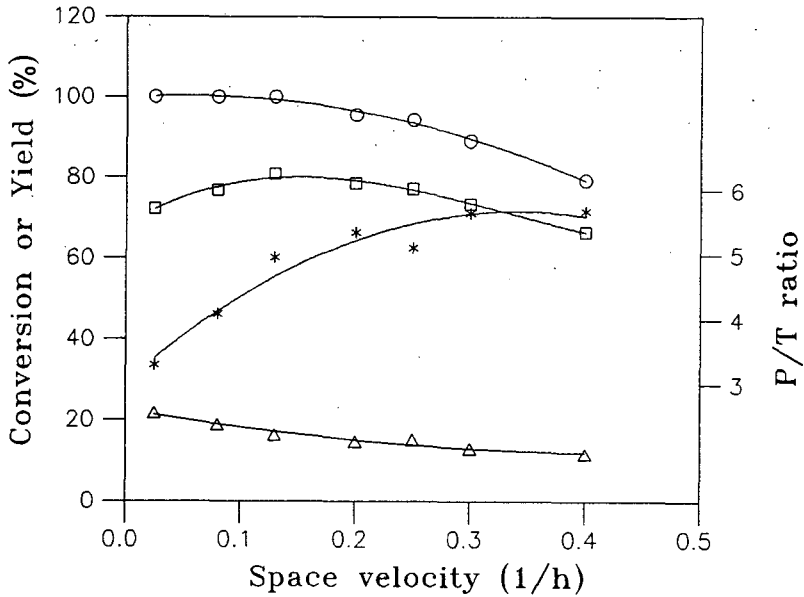


Fig. 3 Effect of feed rate on the reaction.
 (Feed=50 (w/w), Enzyme=40U/g sucrose,
 Temp.=30°C) ○,sucrose; □,palatinose;
 △, trehalulose; *,P/T ratio.

고정화세포를 이용한 반응에서 나타나는 이같은 현상을 좀더 확실히 규명해 보고자 팔라티노스 생산에 관여하는 효소인 α -glucosyltransferase를 순수정제 하였으며 그것의 반응 특성을 연구하였다. 정제 과정 중 gel filtration 및 ion-exchange chromatography의 elution profile을 Fig.4에 나타내었다.

다음 Table 1은 정제 효소의 특성을 요약한 것이다. palatinose 생산효소 α -glucosyltransferase는 monomer이며 SDS-PAGE에 의해 분자량이 62,700으로 확인되었다. 등전점은 pH 7.7이고 최적 pH 및 온도는 각각 6.0, 30°C이며 반응의 Activation energy는 4.18Kcal/mol 이었다. 한편 이 효소는 기질로 설탕만을 이용하는 특성을 가지고 있으며 반응 생성물로 palatinose와 trehalulose를 동시에 생성한다 (각각의 세부 실험 결과는 생략하였음).

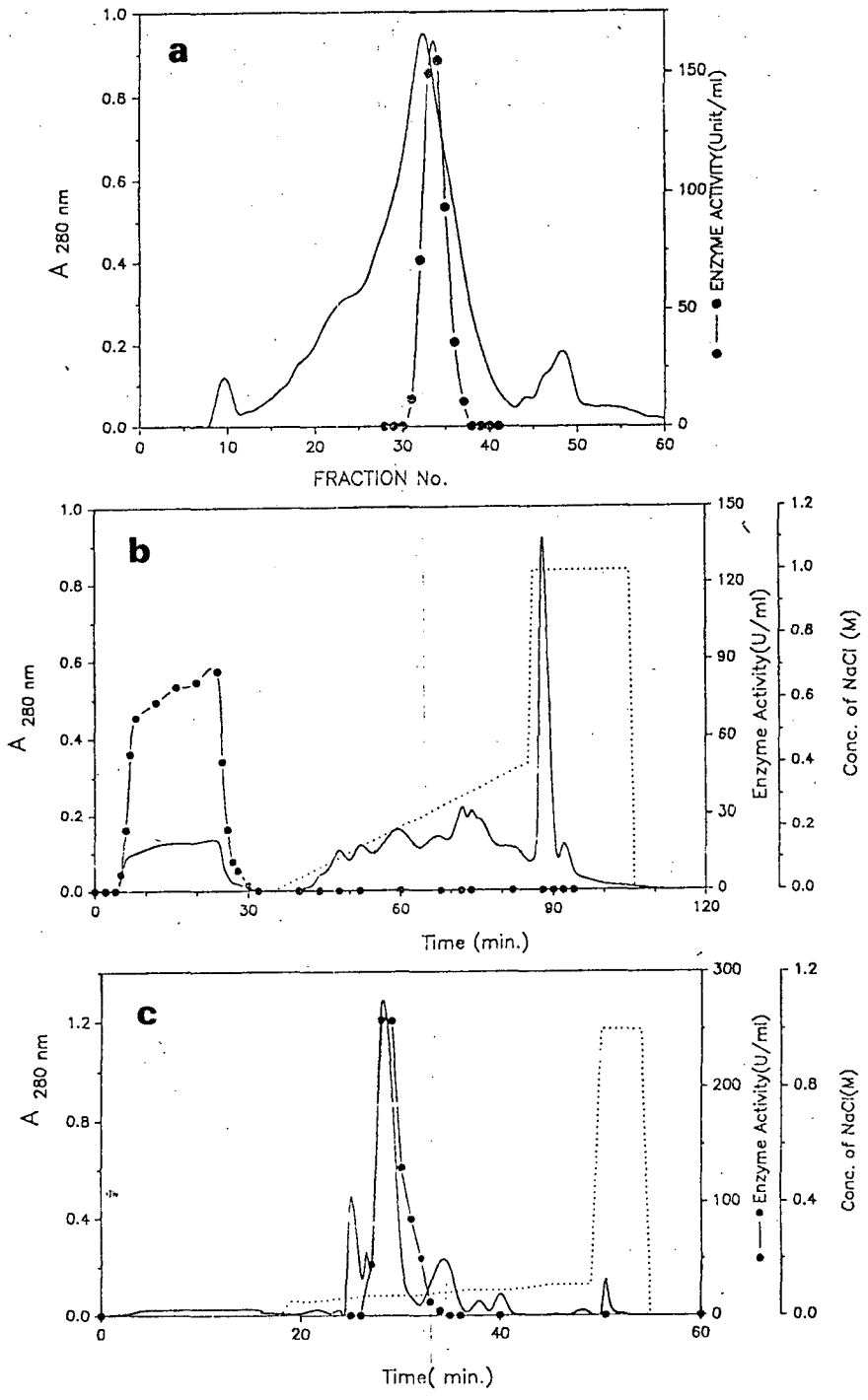


Fig. 4 Elution profiles of α -glucosyltransferase on
 a) Superose 6, b) Mono Q, and c) Mono S columns.

Table 1. Characteristics of the purified α -glucosyl transferase.

Subunit	Monomer
Molecular weight	62,700
Isoelectric point	7.7
Optimum pH	6.0
Optimum temperature	30°C
Substrate specificity	Sucrose-specific
Product	Reaction-nonspecific (forming palatinose and trehalulose)
Activation energy	4.18 Kcal/mol

Palatinose 생성 반응에 대한 pH에 온도의 영향을 보기 위하여 배양에서 얻어진 whole cell과 그것을 고정화한 Immobilized cell 및 정제효소를 사용하여 실험을 실시하였으며 그 결과는 Fig. 5에 나타내었다.

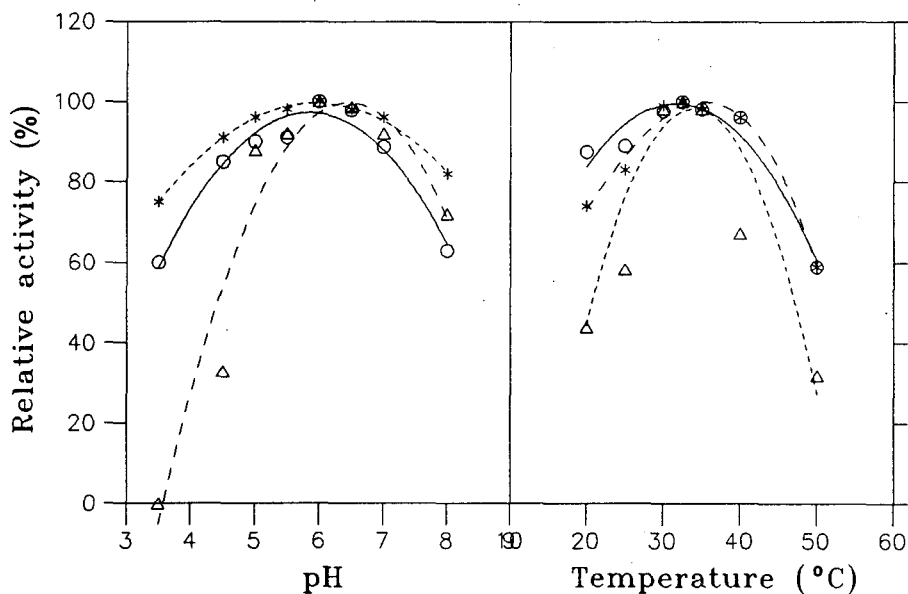


Fig. 5 Effects of pH and temperature on the reaction.
 O, purified enzyme; Δ, whole cell; *, immobilized enzyme.

그림에서 보는것과 같이 whole cell, Immobilized cell 및 purified enzyme 모두 최적 pH와 온도가 각각 6.0와 30°C로 거의 유사한 값을 가짐을 알수있다.

한편 고정화 세포와 정제효소를 여러 온도에서 반응시켰을때 생성물인 palatinose와 trehalulose의 변화양상을 살펴보았다. 그 결과 Fig. 6에서 보는것과 같이 palatinose의 전환은 bell-shape 형태의 반응성을 나타내었으나 trehalulose는 온도의 영향을 거의 받지않고 일정 비율로 생성되거나 약간의 감소를 보였다. 이것은 trehalulose에 대한 Activation energy가 palatinose에 비해 매우 낮기 때문인 것으로 생각된다.

기질인 sucrose의 농도를 변화시키면서 pH5.5, 30°C에서 whole cell, immobilized cell 및 purified enzyme을 사용하여 반응시킨후 그 결과를 그림7의 Lineweaver-Burk plot에 의해 분석한 결과 각각의 k_m 값은 Table 2에 나타낸 바와 같다. whole cell과 purified enzyme은 거의 같은 값을 가졌으며 immobilized cell은 약 2배 정도의 값을 가졌다. 이는 고정화 후에 확산 저해등의 물질전달 현상에 기인된 것으로 해석할수 있다.

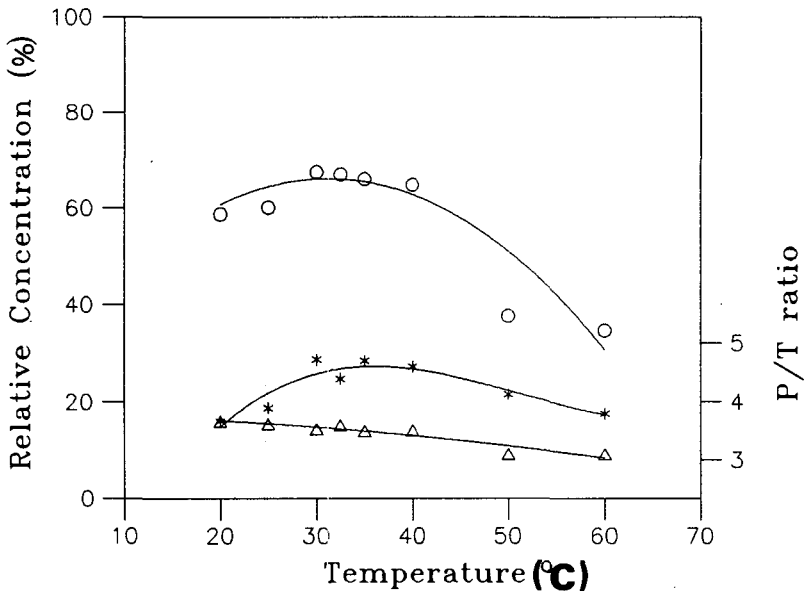


Fig. 6 Effect of temperature on product composition. O, palatinose; Δ , trehalulose; *, P/T ratio.

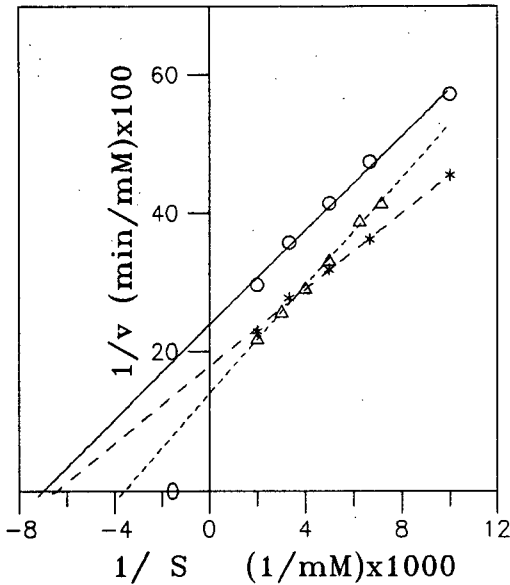


Table 2. Kinetic parameters

Source	Km (M)
Whole cell	0.15
Immobilized cell	0.28
Purified enzyme	0.14

Fig. 7 Lineweaver-Burk plot.
 (*, whole cell; O, purified enzyme;
 Δ, immobilized cell)

이상 검토한 결과를 근거로하여 최적 고정화조건 및 최적 반응 조건을 설정한 후 Bioreactor의 장기운전 안정성을 실험한 결과 Fig.8에서와 같이 30일까지 초기의 반응성이 유지되었으며 60일정도까지 대체로 안정운전이 가능하였다.

반응공정의 Scale-up 실험으로써 Bioreactor의 높이를 일정하게 고정 시키고 내경을 변화 시키면서 반응을 실시한 결과 Fig.9에 나타낸것과 같이 H/D가 3-11인 범위에서는 palatinose의 생성이 일정하게 유지됨을 알수있었다.

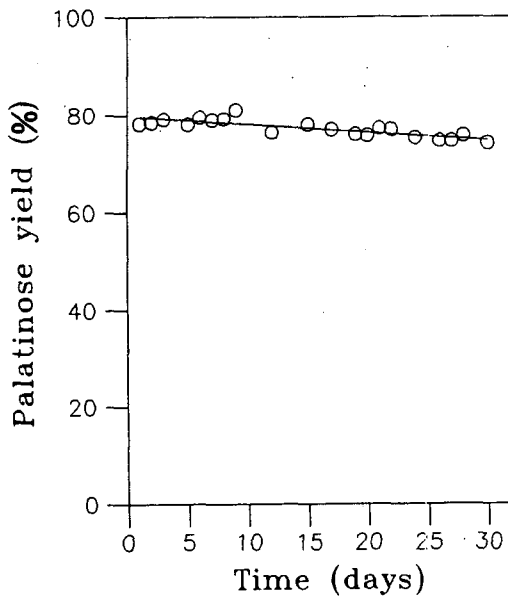


Fig. 8 Long-term stability of the packed bed bioreactor. (30°C, SV=0.2 h⁻¹)

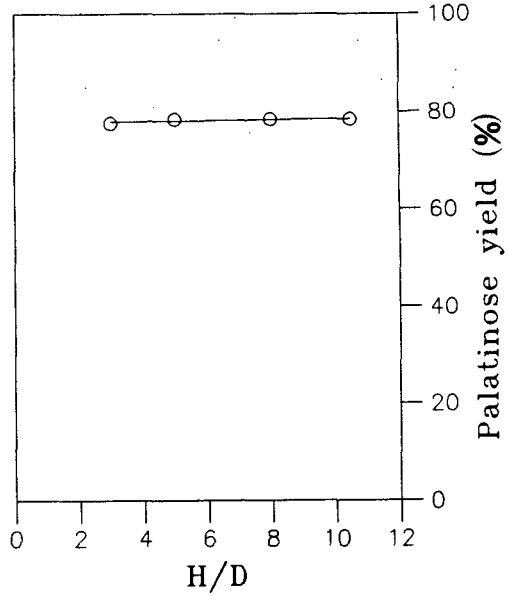


Fig. 9 Effect of Hight-to-diameter ratio of the bioreactor on the palatinose yield. (30°C, SV=0.2 h⁻¹)

4. 결론

설탕을 Palatinose로 전이시키는 효소(α -glucosyltransferase)의 생산 균주인 *Erwinia* sp.를 배양하고 그 균체를 Alginate에 고정화 시킨후 충전 탑형의 Bioreactor를 사용하여 Palatinose를 연속적으로 생산하는 공정을 개발하였다. 고정화 세포의 반응 특성을 Whole cell 및 Purified enzyme과 비교하여 Bioreactor의 최적 운전조건을 확립하였다. 반응의 생성물로 Palatinose와 Trehalulose가 동시에 일정비율로 생성되어지는데 기질의 기질의 농도, 투입되는 유속, 반응 온도등을 조정하여 Palatinose로의 전환율을 최대가 되게하는 Bioreactor의 최적 운전조건을 결정할수 있었다. 장기운전 결과 반응성이 2개월 정도 안정적으로 유지되었으며 기초적인 Scale-up 실험을 실시하였다.

REFERENCES

- (1) Siddiqui, I. R. and Furgala, B. (1967) *J. Apic. Res.*, 6, 139-145
- (2) Ohta, Takazoe (1983) *Bull. Tokyo Dent. Coll.*, 24, 1.
- (3) Roberts, K. R. and Hay, M. C. (1980) *Scand. J. Dent. Res.*, 88, 201-209.
- (4) Kawai, K., Okuda, Y. and Yamashita, K. (1985) *Endocrinol. Japan*, 32(6), 933-936.
- (5) Suzuki, K (1985) *Japan Food Sci.*, 24 (5), 1-9.
- (6) Stodola, F. H., Koepsell, H. J. and Sharpe, E. S. (1952) *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 3202-3203.
- (7) Sharpe, E. S., Stodola, F. H. and Koepsell, H. J. (1954) *Am. Chem. Soc. Abstr.*, 5-
- (8) Bourne, E. J., Hutson, D. H. and Weigel, H. (1961) *Biochem. J.*, 79, 549-553.
- (9) Lund, B. M. and Wyatt, G. M. (1973) *J. Gen. Microbiol.*, 78, 331-336.
- (10) Weidenhagen, R. (1961) *Zucker*, 14, 456-462.
- (11) U.K. Patent Specification 1,429,334 assigned to the South German Sugar Co.
- (12) Cheetham, P. S. J., Imber, C. E. and Isherwood, J. (1982) *Nature(London)*, 299, 628-631.
- (13) Bucke, C. and Cheetham, P. S. J. (1982) U.S. Patent 4,359,531.
- (14) Nakajima, Y. (1984) *Proc. Res. Soc. Jpn. Sugar Refin. Technol.*, 33, 55-63.