

고정화 Cyclodextrin Glucanotransferase에 의한 당전이 스테비오사이드의 연속생산

인만진 · 채희정 · 김민홍
(주)미원 중앙연구소

Continuous Production of Transglucosylated Steviosides Using Immobilized Cyclodextrin Glucanotransferase

Man-Jin In, Hee Jeong Chae and Min-Hong Kim
R & D Center, Miwon Co., Ltd.

Abstract

In order to produce transglucosylated steviosides continuously, some types of bioreactors were investigated with cyclodextrin glucanotransferase immobilized on a high porous anion exchange resin, Diaion HPA75. Among the bioreactors, the packed-bed reactor (PBR) showed the highest specific productivity. The effect of linear velocity in a PBR on the stevioside conversion was not significant in the range of 10~60 cm/hr at the same space velocity of 1.2 hr⁻¹. When the space velocity of bioreactor was varied from 0.2 to 1.1 hr⁻¹, the optimal velocity of substrate solution was determined as 0.7 hr⁻¹. The stevioside conversion of more than 70% was maintained during 20 days in the continuous operation, if about 20% of immobilized enzyme was replaced in the top of reactor after two weeks operation as the one of the control methods in bioreactor. The specific production, which refers to as the amount of commercially valuable transglucosylated steviosides produced by a unit amount of immobilized cyclodextrin glucanotransferase, was found to be ca. 150 g product/g immobilized enzyme.

Key words: transglucosylated steviosides, continuous production, packed-bed reactor, immobilized cyclodextrin glucanotransferase

서 론

스테비오사이드(C13-O-β-sophorosyl-C19-O-β-D-glucosylsteviol)는 국화과 식물인 *Stevia rebaudiana* BERTONI에서 유래하는 배당체로 난소화성이며 열에 강한 고감미(감미도가 설탕의 약 150~200배)의 천연감미료이나 쓴맛, 떫은 맛 그리고 뒷맛이 산뜻하지 못한 단점이 있어 이를 개선하고 동시에 감미도를 향상시키려는 많은 연구가 진행되고 있다¹⁾. 당전이 활성이 있는 효소를 이용하여 스테비오사이드에 당을 결합시키는 효소공학적인 방법이 가장 활발히 연구되고 있다^{2,3)}. 특히 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase)는 포도당 4번 탄소의 -OH기에 선택성이 뛰어나 1,4-α-transglucosylation 반응을 효율적으로 촉매하는 것이 알려져

있으므로⁴⁾ 가용성 전분을 당공여체로하여 반응시키면 스테비오사이드가 13번 탄소에 결합된 포도당 잔기에 포도당 1~3분자를 전이시켜 감미질과 감미도가 개선된 당전이 스테비오사이드를 생성하는 것으로 보고되어 있다⁵⁾. 산업적으로 당전이 스테비오사이드는 유리의 CGTase를 사용하여 회분식으로 제조되고 있으나, 효소가격, 조업의 간편성 등을 고려하면 고정화 CGTase와 생물반응기를 이용하여 연속적으로 당전이 스테비오사이드를 제조하는 방법이 요망된다. 그러나 고정화 CGTase에 관한 연구는 주로 전분으로부터 cyclodextrin을 합성하는 것에 관련된 것이 보고되어 있을 뿐^{6,7)} 생물반응기에서 연속적으로 스테비오사이드에 포도당을 전이시키는 연구는 미미한 실정이다.

전보에서 본 연구자들은 먼저 CGTase의 고정화와 당전이 스테비오사이드를 제조에 관련된 고정화 효소의 반응특성에 관한 연구를 보고하였다⁸⁾. 본 연구에서는 고정화 CGTase로 당전이 스테비오사이드를 연속

Corresponding author: Man-Jin In, R & D Center, Miwon Co., Ltd., 125-8 Pyokyo-ri, Majang-myun, Ichon. Kyounggi-do 467-810, Korea

제조함에 있어 적절한 생물반응기를 선별하였으며, 이를 이용하여 연속제조를 실시하였다.

재료 및 방법

재료

Cyclodextrin glucanotransferase는 *Bacillus macerans* 유래의 산업용으로 Amano사(Nagoya, Japan)에서, 고정화 담체로 사용한 음이온 교환수지인 Diaion™ HPA 75는 Mitsubishi Kasei사(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 당전이 효소반응의 당공여체와 수용체는 Roquette사(Lille Cedex, France)의 산업용 텍스트린(GLUCIDEX™ 9)과 태평양(주)(서울, 한국)의 스테비오사이드 혼합물(stevioside 90%, rebaudioside A 10% 함유)을 각각 사용하였다.

고정화 효소의 제조

CGTase의 고정화는 전보의 결과에 준하여 실시하였다⁽⁹⁾. 구입한 조효소액에 10배의 증류수를 가하여 한외여과막(MWCO 10,000)으로 diafiltration하여 고정화에 사용하였다. 약 50 mg protein/g resin의 단백질 부하로 조효소액을 가하고 2시간 교반하여 고정화 효소를 제조하였다.

효소 활성측정 및 분석

CGTase의 활성 측정과 효소반응으로 생성된 당전이 스테비오사이드의 분석은 전보와 동일한 방법으로 수행하였다⁽⁹⁾.

연속생산

당전이 스테비오사이드의 연속생산을 위한 생물반응기로는 2단 연속반응기[2-stage continuous stirred tank reactor (CSTR)], 2단 재순환반응기[2-stage recirculation reactor (RCR)], 충전형 반응기[packed-bed

reactor (PBR)]를 사용하였다. 이때, 반응온도는 온수를 순환시키거나, 히터를 이용하여 47°C로 유지하였다. 2-단 CSTR은 기질 500 mL와 고정화 효소를 각각 25 g을 넣은 생물반응기 2대를 연결하여 150 rpm으로 교반하고 기질의 체류시간을 100시간으로 유지하면서 연속생산하였다. 2-단 RCR은 2-단 PBR의 형태(각 단에 100 mL 기질과 고정화 효소 30 g을 넣음)로 각 단마다 순환펌프로 기질이 빠른속도로 재순환되도록(선속도 1.8 m/hr) 설계하여 사용하였으며 기질의 체류시간은 24시간을 유지하였다. PBR은 water jacket이 부착된 유리컬럼(직경, 1.5 cm; 길이, 21 cm)에 고정화 효소 20 g을 충전하여 운전하였다. 생물반응기에 사용한 기질은 텍스트린(D.E.≒9)과 스테비오사이드 혼합물을 각각 15%로 용해한 후 pH를 6.0으로 조정하여 사용하였다.

결과 및 고찰

생물반응기 비교

음이온 교환수지(Diaion™ HPA75)에 고정화한 CGTase를 이용하여 당전이 스테비오사이드를 연속적으로 제조하기 위하여 몇 가지 생물반응기를 설계, 제작하여 적용 가능성을 조사하였다. 특히 CGTase의 스테비오사이드에 대한 전이반응은 기질저해(substrate inhibition) 현상이 관찰되었기에⁽¹⁰⁾ 이를 완화할 수 있는 2-단 반응기를 중심으로 설계하였다. 증자액화전분을 당공여체로 사용한 경우 24시간 반응 후 스테비오사이드의 전환수율이 71% 라는 보고⁽¹¹⁾를 참고하여 스테비오사이드의 전환률이 70% 이상 되도록 기질의 유속을 정한 후 동일조건에서 연속운전하였으며, 이때 반응조건은 전보의 결과에 준하여⁽⁹⁾ 30% 기질용액으로 47°C에서 반응시켰다(Table 1). 2-단 CSTR은 장기운전시 교반(150 rpm)에 의하여 고정화 담체가 파손되며, 미생물이 번식하여 효소활성이 급격하게 감소

Table 1. Comparison of the performance for various bioreactor types in transglucosylated steviosides production

	Specific productivity (g product/hr-g immobilized enzyme)	Continuous conversion ¹⁾ (day)	Specific production ²⁾ (g product/g immobilized enzyme)
Batch reactor with immobilized enzyme ³⁾	0.83	not tested	not tested
2-Stage continuous stirred tank reactor	0.08	10	19.0
2-Stage recirculation reactor	0.16	7	26.9
Packed-bed reactor	0.40	20	153.6

¹⁾Operational period maintaining the conversion more than 70%.

²⁾Total amounts of commercially valuable transglucosylated steviosides produced by 1 g immobilized cyclodextrin glucanotransferase.

³⁾Specific productivity of soluble enzyme was 2 g product/hr-ml soluble enzyme.

하였으므로 연속운전에 부적합하였다. 미생물에 의한 영향을 줄이기 위하여 기질을 살균하여 사용하면서 효소의 잔존활성을 조사한 결과 효소의 반감기는 약 3일이었으며, 살균하지 않은 경우는 반감기가 약 2일로 미생물에 의한 활성감소보다는 교반에 의한 영향이 큰 것으로 판단되었다(교반속도를 100 rpm 정도로 낮추어도 고정화 담체는 파손되었다). 기계적인 교반과 유사하게 혼합의 효과를 낼 수 있는 반응기로 고안한 2단 RCR은 2단 PBR의 형태를 가지고 빠른 선속도를 유지하기 위하여 각 단마다 recycle stream을 두었으나 PBR에 비하여 생산성이 절반 이하로 낮았다. PBR의 생산성(specific productivity)은 0.4 g product/hr-g immobilized enzyme로 회분식 반응기 생산성(0.83 g product/hr-g immobilized enzyme)의 50% 수준으로 낮으나 회분식에 비하여 연속생산이 가능하고, 다른 연속형 생물반응기에 비하여 생산성이 높고, 장치가 간단하므로 연속생산의 반응기로 적합하였다. 고정화하지 않은 CGTase의 생산성이 높아(2 g product/hr-ml soluble enzyme) 당전이 스테비오사이드의 제조에 적합한 것으로 보이나, 효소 가격과 재사용을 고려하면 고정화 효소로 생물반응기에서 당전이 스테비오사이드를 연속적으로 제조하는 것이 유리하였다.

연속운전

PBR에서 고정화 효소의 외부 물질전달 저항(external mass transfer resistance)과 밀접한 관계가 있는 선속도(linear velocity)의 영향을 조사하였다. 반응기의 지름이 다양한 4개(1.11, 1.22, 2.05, 2.72 cm)의 PBR에 고정화 효소를 20 g씩 충전하고 반응기 내에서의 체류시간을 동일하게 하기 위하여 유속을 공간속도(space velocity) 1.2 hr⁻¹로 동일하게 한 후 반응액을 분석하여 스테비오사이드의 전환률로 비교하였다(Fig. 1). 선속도 10~60 cm/hr의 범위내에서 고정화 CGTase에 의한 당전이 스테비오사이드의 생성은 선속도의 영향을 크게 받지 않았으며, 따라서 외부 물질전달 저항은 무시할 만 하였다. 이것은 포괄법에 의한 고정화에서 외부 물질전달 저항은 효소의 활성에 중요한 인자이나 다공성 담체에 이온결합, 공유결합, 흡착법 등과 같은 방법으로 고정화된 효소는 외부 물질전달 저항의 영향이 미비하다는 보고와 일치하는 결과이다⁽¹¹⁾.

PBR(직경, 1.5 cm; 길이, 21 cm)에 활성이 170 U/g resin인 고정화 효소 20 g을 충전하고 기질의 유속이 스테비오사이드의 전환률에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2). 공간속도 0.7 hr⁻¹ 이상에서는 전환률이

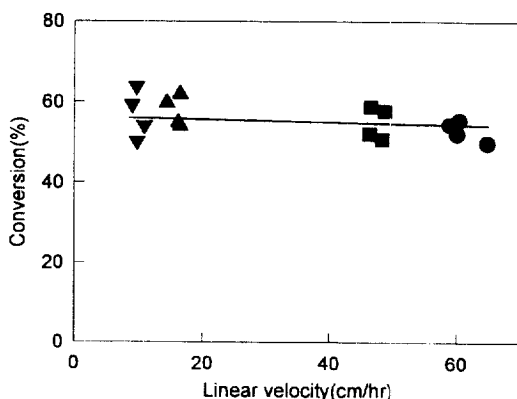


Fig. 1. Effect of linear velocity on the conversion of stevioside in a packed-bed reactor. The substrate solution was passed through columns of various diameters at a space velocity of 1.2 hr⁻¹. The diameters of reactors were 1.11 cm (▼), 1.22 cm (▲), 2.05 cm (■) and 2.72 cm (●), respectively.

70% 이하로 급격히 감소하였으며, 현실적으로 상업적 가치가 있는 당전이 스테비오사이드를 연속으로 제조하기 위한 기질의 유속은 공간속도로서 0.5~0.7 hr⁻¹이 적당하였다. 공간속도는 고정화 효소의 활성에 따라 변하는 조건이나, 전보에서 확립한 일정한 조건으로⁽¹⁰⁾ 고정화 효소를 제조하므로 공간속도는 큰 영향을 받지 않았다. 일정한 양의 고정화 효소로 전환률이 70% 이상되는 당전이 스테비오사이드를 많이 생산하기 위하여는 생물반응기에서 연속운전중 효소의 활성 감소를 예측하고, 이에 따른 생물반응기의 control방법이

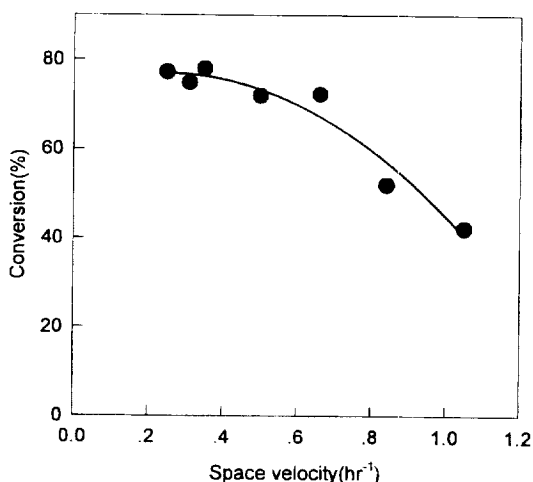


Fig. 2. Effect of space velocity on the conversion of stevioside in a packed-bed reactor. The substrate solution was passed through the column at the various flow rates.

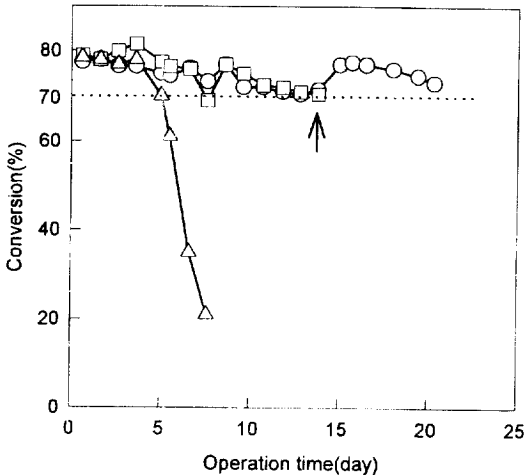


Fig. 3. Effect of Ca^{2+} ion on the operational stability of immobilized enzyme in packed-bed reactor. Reactors were operated at a space velocity of 0.7 hr^{-1} . The substrate solution contained 1 mM CaCl_2 (Δ) and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (\square) additionally and without Ca^{2+} ion (\circ). The arrow indicated the enzyme replacement of 20% in the top of reactor.

필요한 분야로 추가적인 연구가 진행 중이다.

PBR에서 연속운전시 고정화 효소의 운전 안전성 (operational stability)을 향상시키기 위하여 유리 효소의 열안정성 향상에 효과가 있는 것으로 알려진⁽¹²⁾ Ca^{2+} 이온의 영향을 조사하였다(Fig. 3). 30% 기질용액(pH 6.0)에 CaCl_2 와 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 1 mM 로 각각 첨가하여 47°C 에서 공간속도 0.7 hr^{-1} 로 연속운전한 결과, 고정화 CGTase의 당전이 반응에 대하여 Ca^{2+} 이온은 안전성 향상에 효과가 없었다. 유리 효소의 경우 Mg^{2+} , Ca^{2+} 과 같은 2가 양이온들은 수용액상에서 음전하를 갖는 단백질 잔기와 상호작용하여 단백질의 conformation 유지에 기여함으로써 열안정성을 향상시키는 효과를 나타내나, 음이온 교환수지에 고정화한 CGTase는 단백질 음이온 잔기의 많은 부분이 고정화 담체와 결합하였으므로 Ca^{2+} 이온의 효과가 미미한 것으로 사료된다. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 에 비하여 CaCl_2 를 사용한 경우 5일 이후 전환률이 급격히 감소하는 것은 Cl^- 이온에 의한 효소의 탈착에 기인하는 것으로 판단된다.

PBR을 사용한 결과 상업적으로 가치가 있는 70% 이상의 스테비오사이드 전환률을 유지하는 고정화 CGTase의 운전 안정성은 약 2주일 정도이었다. 그러나 본 연구에서 사용한 것과 동일한 음이온 교환수지에 β -fructofuranosidase를 고정화하여 PBR에서 프락토올리고당을 연속생산하면 반응기 상부에 위치한 고정화 효소의 활성이 먼저 감소하는 것으로 보고되어

있으므로⁽¹³⁾ 고정화 CGTase의 경우에도 PBR 상부의 고정화 효소를 약 20% 교환한 후 연속운전하면 전환률이 다시 회복되어 전체적으로 20일 이상 사용이 가능하였다(Fig. 3). 본 연구에서와 같이 PBR에서 전환율이 감소되는 경우 실활된 효소를 부분적으로 교체하여 공간속도의 변화 없이 생물반응기를 control하는 방법은 현실적으로 유용한 기법이다.

요 약

고정화 CGTase를 이용하여 당전이 스테비오사이드를 연속적으로 제조하기 위하여 몇가지 생물반응기의 적용가능성을 조사하였다. 연속형 반응기로는 packed-bed reactor(PBR)가 적합하였다. 이때 specific productivity는 0.4 g/hr-g immobilized enzyme으로 회분식 반응기의 50% 정도이나 연속생산이 가능한 장점이 있었다. PBR의 운전조건으로 $10\sim 60 \text{ cm/hr}$ 의 선속도 범위내에서 스테비오사이드 전환률 70% 이상을 보이는 기질의 유속은 공간속도로 $0.5\sim 0.7 \text{ hr}^{-1}$ 이었다. 고정화 효소의 운전 안정성은 47°C 에서 30%의 기질로 2주일간 연속 사용이 가능하고, 반응기의 control방법으로 반응기 상부에서 20%의 효소를 교체하면 20일 이상 전환률이 유지되었다.

문 헌

1. 田中 治, 大谷和弘: 스테비올-配糖體의酵素工學的甜味改良. *BIO INDUSTRY*, **7**, 12 (1990)
2. Mizutani, K., Miyata, T., Kasai, R., Tanaka, O., Ogawa, S. and Doi, S.: Study on improvement of sweetness of steviol bisglycosides: selective enzymic transglucosylation of the 13-O-glycosyl moiety. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 395 (1989)
3. Ishikawa, H., Kitahata, S., Ohtani, K., Ikuhara, C. and Tanaka, O.: Production of stevioside and rubusoside derivatives by transglucosylation of β -fructofuranosidase. *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 3137 (1990)
4. 김정렬, 육철: 스테비오사이드 당전이 반응의 최적화. 한국식품과학회지, **29**, 249 (1997)
5. Kobayashi, S., Kainuma K. and Suzuki, S.: Purification and some properties of *Bacillus macerance* cycloamylose(cyclodextrin) glucanotransferase. *Carbohydrate Res.*, **61**, 229 (1978)
6. Fukunaga, Y., Miyata, T., Nakayasu, N., Mizutani, K., Kasai, R. and Tanaka, O.: Enzymic transglucosylation products of stevioside: separation and sweetness-evaluation. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1603 (1989)
7. Hashimoto, H., Hara, K., Kuwahara, N., Sakai, S. and Yamamoto, N.: The continuous reaction of cyclodextrins formation by the column method using the immobilized enzyme on ion exchange resins. *J. Jpn. Soc.*

- Starch Sci.*, **33**, 29 (1986)
8. Su, C. and Yang, C.: A novel method for continuous production of cyclodextrins using an immobilized enzyme system. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **48**, 313 (1990)
 9. 인만진, 김동청, 채희정, 최경석, 김민홍: Cyclodextrin glucanotransferase의 고정화와 당전이 스테비오사이드 제조에 관련된 반응 특성. *산업미생물학회지*, **25**, 305 (1997)
 10. 이용현, 백승걸, 신현동, 박동찬: 분쇄마찰매체 불균일상 효소반응계를 활용한 생전분을 당공여체로 하는 Cyclodextrin Glucanotransferase의 당전이 반응. *산업미생물학회지*, **21**, 461 (1993)
 11. Bailey, J. E. and Ollis, D. F.: Applied enzyme catalysis. In *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., McGraw-Hill Book Co., New York, p.157 (1986)
 12. Huber, R. E., Parfett, C., Woulfe-Flanagan, H. and Thompson, D. J.: Interaction of divalent cations with β -galactosidase (*Escherichia coli*). *Biochemistry*, **18**, 4090 (1975)
 13. Kim, M.-H., In, M.-J., Cha, H.-J. and Yoo, Y.-J.: An empirical rate equation for the fructooligosaccharides-producing reaction catalyzed by β -fructofuranosidase. *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 458 (1996)
-
- (1997년 6월 2일 접수)