

Actinoplanes missouriensis KCTC 1780의 응집 균체에 의한 과당생산

조정일

고려대학교 농화학과

Production of High Fructose Syrup by Flocculated *Actinoplanes missouriensis* KCTC 1780

Jung-II Cho

Dept. of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea

Abstract

The whole cells of *Actinoplanes missouriensis* KCTC 1780 which produce glucose isomerase was immobilized by flocculation method for the effective production of high fructose syrup using packed-bed bioreactor system. Among the flocculation methods used in this study, the glucose isomerase activity of flocculated cells using 5% polyethylenimine and 0.2% glutaraldehyde was the highest as 46.3 unit, and the flocculant was 10.3g(wet weight) per 100ml of broth, and the residual activity was 92.5%. In the batch operation of glucose isomerization using the flocculated cells, the optimum pH, temperature and isomerization ratio were 7.0, 75°C and 31%, respectively. The optimum concentration of Mg^{2+} which was activator on the glucose isomerization of flocculated cells was 0.1M, and glucose isomerase activity was increased by about 40% compared to none of Mg^{2+} . In the packed-bed bioreactor system with 1.2 hour of residence time at 70°C, the reaction stability maintained until 96 hour without loss of activity, and the equilibrium was kept up to 120 hours of the operation.

Key words : *Actinoplanes missouriensis*, immobilization, glucose isomerase, fructose production, bioreactor

서론

포도당을 과당으로 이성화 시키는 glucose isomerase에 관한 연구는 1957년 Marshall과 Kooi¹⁾가 *Pseudomonas hydrophobia*의 xylose isomerase [EC 5.3.1.5, D-xylose ketolisomerase]가 D-glucose를 D-fructose로 이성화함으로써 밝혀졌다.

본 실험에서 사용한 포도당 이성화 효소는 열에 안정하여, 80~90°C에서 10분간 열처리한 후에도 상당한 정도의 glucose isomerase 활성을 유지하는 것으로서, 여기에는 *Streptomyces* sp.²⁾, *Arthobacter* sp.³⁾, *Bacillus* sp.⁴⁾, *Actinoplanes* sp.^{5~8)} 등이 있다. 이 중

에서 *Actinoplanes* sp.는 일찍이 산업적으로 이용되었고, 배지 중에 xylose나 xylan이 없어도 glucose isomerase 활성이 있으며, 80~90°C의 고온에서도 높은 열안정성을 보이는데, 특히 *Actinoplanes missouriensis* KCTC 1780의 glucose isomerase 활성이 가장 높은것으로 알려졌다.

미생물이 생산하는 glucose isomerase를 이용하여 glucose로부터 fructose를 생산하는 효소학적 방법은 생물공학의 진보와 함께 미생물에 의한 glucose isomerase의 대량 생산 및 그 이용이 가능하게 되어 효소학적 이성화 반응을 이용함으로써 설탕보다 높은 감미도와 낮은 점도를 갖는 high fructose syrup(고과당시럽)을 공업적으로 생산하게 되었다.

최근에는 우리나라에서도 설탕의 대체 감미료로서 과당의 수요가 증가하여, 포도당의 이성화 효소를 이

용하려는 연구가 활발하였으나¹³⁾, 아직도 필요로 하는 glucose isomerase를 싼값으로 전량 수입하여 fructose생산에 이용하고 있는 실정이다.

본 연구는 이러한 연구 추세를 감안하여 포도당 이성화 효소 활성이 높은 *Actinoplanes missouriensis* KCTC 1780를 선정하여 균체 고정화 방법중에서 응집에 의해 균체를 고정화하고, 포도당 이성화 반응을 효율적으로 수행할 수 있는 packed-bed bioreactor에 도입하여 이의 공업적 이용 가능성에 대해서 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 사용균주

본 실험의 glucose isomerase 효소원으로 사용한 균주는 *Actinoplanes missouriensis* KCTC 1780로서¹⁴⁾ Korean Collection for Type Culture(KCTC)에서 분양받았다.

2. 배지 및 시약

종배양 배지는 다음과 같다(pH 7.0) : tryptone 1.7%, soytone 0.3%, glucose 0.25%, KH_2PO_4 0.25%, 균체 생산용 배지는 다음과 같다(pH 7.1) : beet molasses 3%, corn steep liquor 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.078%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, K_2HPO_4 0.1%, KCl 0.025%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001%.

Beet molasses와 corn steep liquor는 (주)미원 중앙연구소에서 제공받아 사용하였으며, 균체 응집제인 polyethylenimine(PEI)은 Sigma사 (USA) 제품을, 가교제(cross-linking agent)인 glutaraldehyde(GA)는 Kanto사 (Japan) 제품을, 이외의 시약은 1급 이상의 일반 분석용 시약을 사용하였다.

3. 균체 배양

균체의 배양은 30℃에서 24시간 종배양한 후, 이것을 균체 생산용 배지에 접종하여 30℃, 36시간 배양하였으며, 5,000rpm, 15분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 균체 증식 정도는 spectrophotometer (Beckman DU-64)를 사용하여 640nm에서 흡광도를 측정하였다. 회수한 균체는 0.85%(w/v)의 생리식염

수로 2회 세척하고 0.1M phosphate buffer (pH 7.0)로 1회 세척하여 다시 원심분리하여 집균한 후, -70℃에서 냉동 보관하면서 사용하였다.

4. 응집에 의한 균체 고정화

A. *missouriensis* KCTC 1780의 균체 배양액을 Lantero¹¹⁾의 방법에 따라 다음과 같이 응집을 실시하였다.

첫번째 방법으로 배양액 100ml를 2N HCl로 pH 7.0으로 하여 10% glutaraldehyde 용액을 0.5%가 되도록 조절하였다. 1시간 후에 증류수 200ml를 첨가하고 5% polyethylenimine 용액을 최고 응집이 일어날 때까지 천천히 가한다. 균체는 1,000rpm으로 20분간 원심분리하여 집균하고, pellet은 Buchner funnel로 여과한 후, 증류수로 깨끗이 씻어 실온에서 24시간 방치하여 말린 다음 -70℃에서 보관하였다. 다른 방법으로서 배양액 100ml를 pH 7.0으로 조절하고 10% glutaraldehyde 1.5ml를 가한 후, 증류수 100ml를 넣고 균체의 최대 응집을 위하여 5% polyethylenimine 4.6ml를 가한다. 1시간 방치한 다음, 증류수 100ml를 넣고 1.5시간 방치 후 집균하였다. 세번째 방법으로는 배양액 100ml를 pH 7.0으로 조절하여 증류수 200ml를 가하고 5% polyethylenimine 1.6ml를 넣고 pH를 7.0으로 조절한 후, 10% glutaraldehyde 6ml를 넣어서 1.5시간이 지난 후, pH 7.2로 조절하여 5% polyethylenimine 3ml를 넣고 1시간 후에 집균하였다. 네번째 방법으로 배양액 100ml를 얼음 수조에서 pH 7.0으로 조절한 후, 10% glutaraldehyde 2ml과 증류수 300ml를 넣고 polyethylenimine 2ml를 가하여 1시간 후에 집균하였다. 상기 4가지 방법으로 균체를 응집시킨 후, 응집 균체량과 glucose isomerase 효소 활성을 측정하였다.

5. 생균체의 열처리가 응집시 glucose isomerase 안정화에 미치는 영향

열처리 방법에 의해 균체내에 있는, 열에 불안정한 효소계를 불활성화 시키고 glucose isomerase를 세포막에 고착시키기 위하여 열처리한 생균체를 응집시켰다. 즉 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) 10ml에 습균체 2g을 현탁시킨 시험관 8개를 60℃ 진탕수조에서

10분에서 80분까지 10분 간격으로 열처리한 후, 각 시험관을 냉수로 냉각시켰다. 열처리를 끝낸 균체 현탁액을 glutaraldehyde와 polyethyleneimine로 응집시킨 후, 증류수로 깨끗이 세척하여 glucose isomerase 활성을 측정하였다.

6. Glucose isomerase 효소 활성 측정

생균체 및 응집균체의 효소 활성은 Takasaki 방법¹⁵⁾으로 측정하였으며, 이 때 생성된 fructose는 resorcinol법¹⁶⁾으로 정량하였다.

Glucose isomerase 활성은 1unit를 60℃에서 1분 동안에 1μmole의 fructose를 생성할 수 있는 효소의 양으로 정하였고, 효소의 비활성은 단백질 1mg당 효소 단위로 정하였다. 그리고 응집 균체의 glucose isomerase 활성은 0.5M fructose 1ml를 기질 용액으로 하여, 0.1M phosphat buffer(pH 7.0) 1ml에 생균체 0.1g에 해당하는 응집 균체를 녹여 잘 현탁시킨 용액을 섞어 60℃ 진탕 수조에서 1시간 반응시킨 후, 0.5M HClO₄ 용액 2ml을 얼음 수조 상에서 첨가시켜 효소 반응을 중지시키고, 여기에 증류수 6ml을 넣고 섞어서 2,800rpm에서 15분간 원심분리하여 생성된 fructose량을 resorcinol법으로 정량하였다.

7. Glucose의 정량

잔존 glucose 양은 DNS(dinitrosalicylic acid)법¹⁷⁾에 의해 측정하였으며, 흡광도는 640nm에서 측정하여 표준곡선으로부터 환산하였다.

8. 단백질 정량

단백질량은 Lowry 등¹⁸⁾의 방법으로 측정하였으며, 흡광도는 표준물질로서 bovine serum albumin을 사용하여 750nm에서 측정하였다.

9. 응집 균체의 batch culture에 의한 과당 생산

300ml 용량의 Erlenmeyer flask에 0.1M Mg²⁺을 포함한 1M glucose 기질 용액 (pH 7.0) 50ml에 생균체 1.0g에 해당하는 응집균체를 넣어 70℃ 수조에서 진탕시키면서 1시간동안 반응시킨 후, 생성된 fructose량을 정량하였다.

10. Packed-bed bioreactor에 의한 과당 연속생산

응집균체를 이용하여 glucose로부터 fructose를 연속 생산하기 위하여, Fig. 1과 같은 packed-bed bioreactor를 설계 제작하였다. 온도 조절을 위해 reactor 외부에 water-jacket을 만들어 주어 circulator pump로써 온도를 조절하였으며, 기질은 peristaltic pump를 이용하여 bioreactor 내부로 유입되도록 하였다. 장시간 반응시키기 위해서는, 반응전 reactor내부의 오염이 문제가 된다. 따라서 반응기 내부를 멸균하기 위해서 bioreactor system을 구성한 다음, 소독제로서 0.1% peroxyacetic acid를 5시간 동안 계속 흘려보낸 다음 멸균 증류수를 흘려보내고 이때에 bioreactor system의 밀착 상태를 점검하였다¹⁹⁾.

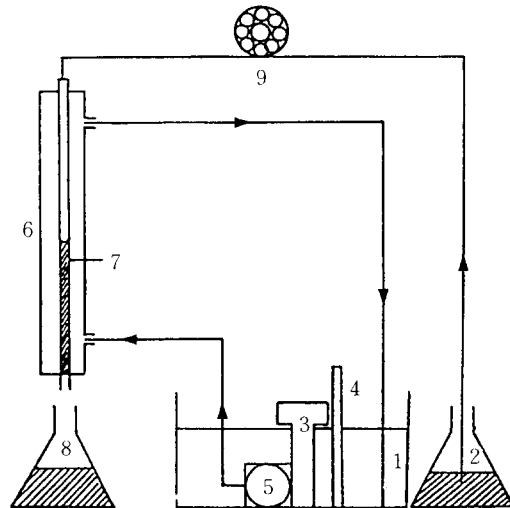


Fig. 1. Schematic diagram of the packed-bed bioreactor for the glucose isomerization

- 1. constant temperature water bath
- 2. substrate solution
- 3. thermostat
- 4. thermometer
- 5. circulation pump
- 6. bioreactor
- 7. flocculated cells
- 8. product solution
- 9. peristaltic pump

결과 및 고찰

1. 균체 생산

A. missouriensis KCTC 1780의 생육은 균을 접종한

후 6시간이 경과하면서 왕성하게 자라기 시작하여 24 시간 경과 후 정지기에 이르렀다.

한편, glucose isomerase의 활성은 균체가 활발히 자라기 시작하는 6시간 경과 후 부터 생산되기 시작하여 36~48시간에 최대 활성을 나타내었다. 따라서, 집중 후 36시간 배양한 균체를 회수하였으며 이 때의 균체량은 25g / 1 (wet weight)였다.

2. 균체의 응집

본 실험에서는 polyelectrolytes로서 polyethylenimine을 corss linking agent로 glutaraldehyde를 선정하여 *A. missouriensis* KCTC 1780을 응집시킨 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

최적 응집방법을 선정하기 위하여 생성된 응집균체량과 glucose isomerase 활성을 측정하였다(Table 1). 먼저 polyethylenimine 농도에 따른 효과를 살펴보면 농도를 1%에서 9%까지 변화시켜 균체 응집을 실시한 결과 polyethylenimine 농도가 5%에서 최대의 응집이 일어났으며, 효소활성도 43.3 unit로 최대에 달하였다. 또한 glutaraldehyde 농도에 따른 효과는 polyethylenimine 농도가 5%이고 glutaraldehyde 농도가 0.2%일 때 glucose isomerase 활성은 46.3 unit로 가장 높았으며, 이 때 생성된 응집균체량은 배양액 100ml당 10.3g (wet weight)이었고, 잔여활성은 92.5%로 가장높게 나타났다. 따라서 최적응

집 방법으로는 glucose isomerase 활성이 높고 응집 균체량도 많은 방법 Ⅲ 즉, 5% polyethylenimine, 0.2% glutaraldehyde를 처리하는 응집방법을 선택하였다.

3. 응집균체의 효소학적 특성

pH의 영향 : 응집균체의 최적 pH는 6.5~7.5이며, pH 7.0에서 가장 높은 glucose isomerase 활성을 나타냈으며, 생균체의 경우는 최적 pH가 7.0~8.0으로 나타나 균체를 응집함으로써 최적 pH가 산성쪽으로 약간 옮겨가 안정화된 것을 알 수 있었다(Fig. 2)

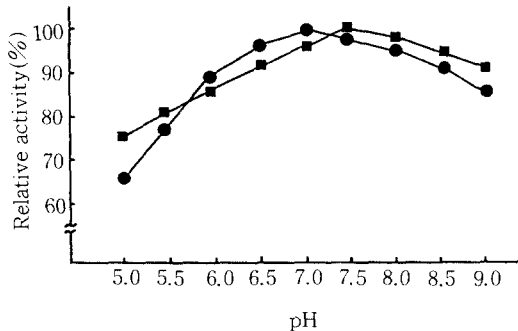


Fig. 2. Effect of pH on glucose isomerase activity of the intact cells and the flocculated cells

Intact cell : ■—■ Flocculated cell : ●—●

Table 1. Selection of optimal flocculation method

Flocculation method	Amount of flocculated cell (g / 100ml broth)	GI activity		Residual activity(%)***
		Unit*	Specific activity**	
I. 0.5% GA, PEI	3.8	41.6	32.0	83.1
II. 0.15% GA, PEI, 0.05% GA	2.4	39.9	30.7	79.8
III. PEI, 0.2% GA, PEI	10.3	46.3	35.6	92.5
IV. 0, 0.2% GA, PEI	1.0	26.8	20.6	53.4
Intact cell	—	50.1	38.5	—

* One unit of GI is that catalyzes the formation of 1 mole of D-fructose per minute under pH 7.0, 60°C, 0.5M D-glucose, 0.1M Mg²⁺

** Specific activity is the number of enzyme units per milligram of protein (1.3mg of protein per g of dry cells)

*** Residual activity (%) = unit of sample × 100 unit of intact cells

GA : Glutaraldehyde PEI : Polyethylenimine GI = Glucose isomerase

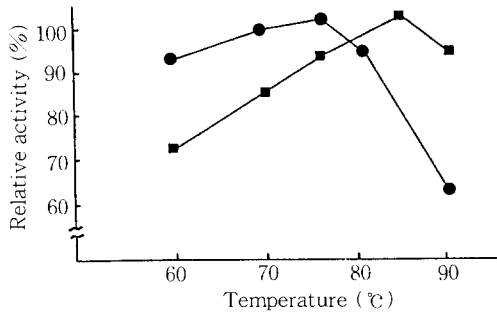


Fig. 3. Effect of temperature on glucose isomerase activity of the intact cells and the flocculated cells

Intact cell : ■ Flocculated cell : ●

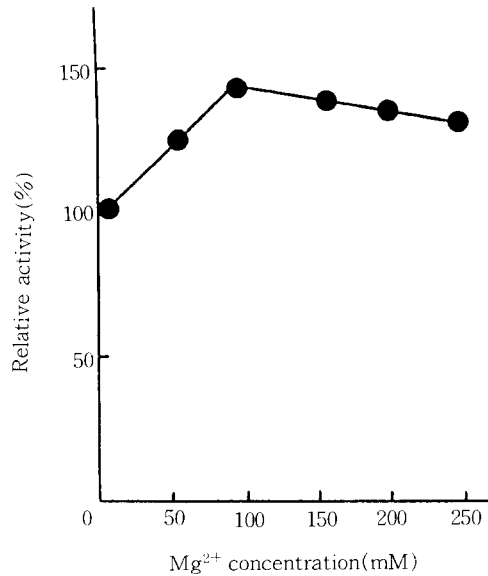
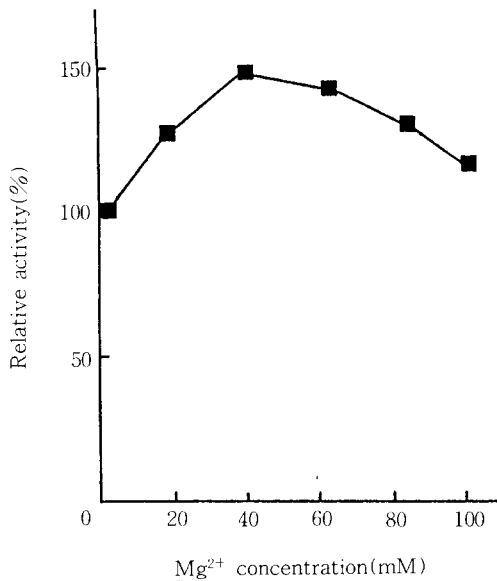


Fig. 4. Effect of Mg²⁺ concentration on glucose isomerase activity of the intact cells and the flocculated cells

Intact cell : ■ Flocculated cell : ●

4. 회분식 배양에 의한 과당생산

응집균체를 batch culture 한 결과 과당의 생산량은 2.6 (kg/kg dry flocculated cells weight/hr/liter working volume)이었으며, glucose에서 fructose로의 이성화율은 최적 조건하에서 31%에 달하였

온도의 영향 : 생균체의 경우에는 85°C에서 효소 활성이 가장 높은 반면 응집균체는 75°C에서 가장 높은 활성을 나타냈다(Fig. 3).

Mg²⁺ 이온의 영향 : 응집균체의 glucose isomerase에 대한 Mg²⁺의 최적 농도는 0.1M 이었으며, 이 때 glucose isomerase 활성은 Mg²⁺를 첨가하지 않았을 때보다 약 40% 증가하였다. 또, 생균체의 경우에는 40mM의 Mg²⁺을 첨가함으로써 약 45%의 효소 활성 증가를 보였다(Fig. 4).

생균체의 열처리가 응집균체의 glucose isomerase 안정화에 미치는 영향 : 생균체를 60°C에서 10분간 열처리한 경우가 열처리하지 않는 균체를 응집시켰을 때보다 glucose isomerase 활성이 4% 정도 증가한 것으로 나타났다(Fig. 5).

다.

5. Bioreactor에 의한 과당의 연속생산

Residence time : 기질 용액의 잔류시간에 따른 포도당 이성화 반응율은 잔류시간 0.4시간과 1.6시간 사

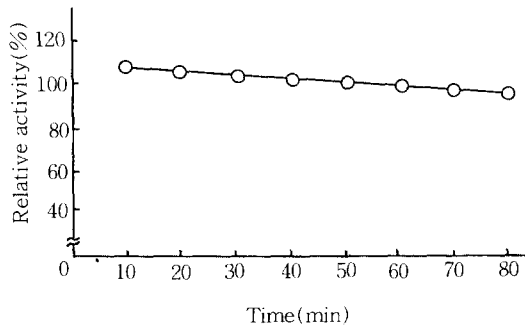


Fig. 5. Effect of heat treating time of the *Actinoplanes missouriensis* on glucose isomerase activity before flocculation

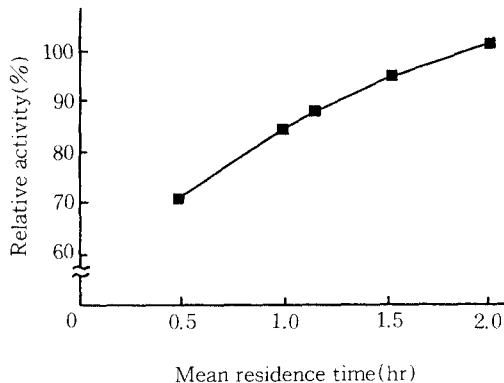


Fig. 6. Relationship between residence time and the formation of fructose in the packed-bed bioreactor system using flocculated *Actinoplanes missouriensis*

이에 약 31%의 차이를 나타내었으며, 반응 평형은 1.2 시간 동안 bioreactor를 빠져나가는 residence time 까지 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 6).

반응 안정성 : 70℃에서 건조균체 1.0g에 해당하는 응집균체를 11.0g으로 채워진 1 × 50cm의 packed-bed bioreactor를 사용하여 잔류시간 1.2시간으로 0.1M Mg²⁺를 포함한 1.0M glucose 기질 용액 (pH

0)을 통과시켰다. 반응 후 96시간까지는 과당으로의 이성화율이 큰변화가 없었으나, 120시간 경과 이후에는 반응 안정성이 저하하기 시작하여 192시간 이후에는 초기 이성화율의 50% 정도로 떨어지는 것으로 나타났다. 한편, 생균체의 경우에는 70℃에서의 반응 안정성은 약 60시간 정도 유지되는 것으로 보아, 균체를 응집시킴으로써 균체의 온도에 대한 안정성을 증대시킬 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 7).

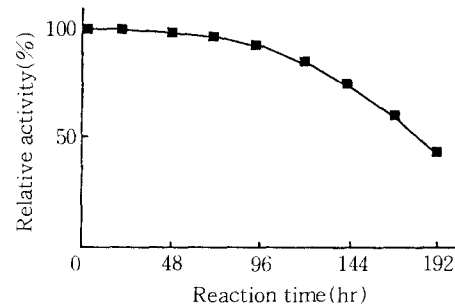


Fig. 7. Stability of glucose isomerase activity of the flocculated *Actinoplanes missouriensis* in the packed-bed bioreactor system

최대 이성화율 : 반응 안정성 실험과 동일한 조건의 bioreactor system을 이용하여 pH 7.0, 70℃에서 반응을 시킨결과, fructose의 생산량은 3.5 (kg/kg dry flocculated cells weight/hr/liter working volume) 이었으며, glucose로부터 fructose로의 최대 이성화율은 최적 조건하에서 약 40%에 달하였다.

요 약

Actinoplanes missouriensis KCTC 1780를 packed-bed bioreactor system에 이용하여 고과당 시럽 (high fructose syrup)을 효과적으로 생산하기 위하여 응집방법에 의해 균체를 고정화하였다. 먼저, 응집제로 사용되는 polyethylenimine의 농도는 5%, 가교제인 glutaraldehyde의 농도는 0.2%가 적합하였다. 이 때의 응집균체량은 배양액 100ml당 10.3g(wet weight)이었고, 응집균체의 최적 pH는 7.0, 최적 온도는 75℃ 이었다. 포도당 이성화 반응에 activator로 작용하는 Mg²⁺의 최적 농도는 0.1M이었고, 이 때의 glucose isomerase 활성은 약 40% 증가하였다. 회분

식 배양에 있어서의 이성화율은 31%에 달했으며, packed-bed bioreactor의 최적 조건하에서 glucose로 부터 fructose로의 최대 이성화율은 약 40%에 달하였다.

참고문헌

1. Marshall, R.O. and Kooi, E.R. : Enzymatic conversion of D-glucose to D-fructose, *Science*, 125, 648-649(1957)
2. Tsumura, N. and Sato, T. : Enzyme conversion of D-glucose to D-fructose : Part V. Partial purification and properties of the enzyme from *Aerobacter cloacae*, *Agr. Biol. Chem.*, 29, 1123-1128(1965)
3. Lee, C.K., Hyaes, L.E. and Long, M.E. : Process of preparing glucose isomerase, *US Patent*, 3645848(1972)
4. Outrup, H. : Production of glucose isomerase by *Bacillus coagulans*, *US Patent*, 3979261 (1972)
5. Gong, C.S., Chen L.F. and Taso, G.T. : Purification and properties of glucose isomerase of *Actinoplanes missouriensis*, *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 833-845(1980)
6. Shieh, K.K. : H.A. Lee and B.J. Donnelly : Method of making glucose isomerase and using some to convert glucose to fructose, *US Patent*, 3834988(1974)
7. Shieh, K.K. : Media containing molasses and corn steep liquor for production glucose isomerase from *Actinoplanes* and method, *US Patent*, 3992262(1976)
8. Shieh, K.K. : Media containing molasses and soy flour for production glucose isomerase from *Actinoplanes* and method, *US Patent*, 4003793(1977)
9. Ahn, B.Y. and Byun, S.M. : Studies on whole cell immobilized glucose isomerase : II. Operational studies on the batchwise and continuous isomeration of D-glucose, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 11, 249-257(1979)
10. Rhee, I.K. and Seu, J.H. : Identification of bacterium which produced D-glucose isomerase and partial purification on the enzyme, *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 8, 125-133(1980)
11. Park, Y.H., Chung, T.W. and Han, M.H. : Studies on microbial glucose isomerase : 4. Characteristics of immobilized whole-cell glucose isomerase from *Streptomyces* sp., *Enzyme Micro. Technol.*, 2, 277-283(1980)
12. Lim, B.S. : Study on the immobilized glucose isomerase for industrial production of high fructose corn syrup, Thesis for the degree of master, dept. of agricultural chemistry graduate school, Korea University(1980).
13. Kim, T.H. : Studies on the cell immobilization of *Arthrobacter* sp. KCTC 1877 for the glucose isomerization, Thesis for the degree of master, Dept. of Food Engineering, Graduate School of Food and Agriculture, Korea University(1987)
14. Lantero, G.J. : Glutaraldehyde /polyethylenimine immobilization of whole microbial cells. *US Patent*, 4355105(1982)
15. Takasaki, Y. and Kanbayashi, A. : Enzymatic method for manufacture of fructose from glucose, *US Patent*, 3715267(1973)
16. Ashwell, G. : Enzyme of carbohydrate metabolism, in *Methods in Enzymology*, Vol 3, pp.208-211(1957)
17. Miller, G.L., Blum, R. Glunnon, W.E. and Burton, A.L. : Measurement of carboxymethylcellulose activity, *Anal. Biochem*, 2, 129-132(1960)
18. Lowry, D.H. : Production measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275(1951)
19. Schmidt, H.L. and Grenner, G. : Coenzyme

Properties of NAD⁺ Bound to Different Matrices Through the Amino Group in the 6-position, *Eur. J. Biochem.*, Vol. 67, p. 295-302(1976)

(1993년 10월 20일 수리)