creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000264796

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2015년 02월

박사학위논문

재조합 glutamate decarboxyalse 를 이용한 γ-Aminiobutyric acid (GABA) 생산공정 최적화

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

김 의 진

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

재조합 glutamate decarboxyalse 를 이용한 γ-Aminiobutyric acid (GABA) 생산공정 최적화

Optimization of GABA production process using recombinant glutamate decarboxylase

2015 년 02 월 25 일

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

김 의 진

II

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

재조합 glutamate decarboxyalse 를 이용한 γ-Aminiobutyric acid (GABA) 생산공정 최적화

Optimization of GABA production process using recombinant glutamate decarboxylase

지도교수 이 중 헌

이 논문을 공학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2014 년 12 월

조선대학교 대학원

화 학 공 학 과

김 의 진

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

김의진의 박사학위논문을 인준함

위원장 김 정 규 (인)

위 원 이 재 욱 (인)

위 원 신 현 재 (인)

위 원 염 승 호 (인)

위 원 이 중 헌 (인)

2014 년 12 월

조선대학교 대학원

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

목차

List of Figures IX
List of Table XIII
ABSTRACT XV
제 Ⅰ 장 Glutamate decarboxylase의 생산공정 개발 1
Ⅰ－1 장 서론 1
1. 이론적 배경 1
1.1. Gamma－Aminiobutyric acid(GABA) 1
1.2. Glutamate decarboxylase(GAD) 3
1.3. 회분식 배양 7
1.4. 미생물 성장 및 대사산물 생산속도론 11
1.5. 비생장속도(Specific growth rate)와 비활성(Specific activity) 13
Ⅰ－2 장 실험 재료 및 방법 14
1. 시약 및 기기 14
2. 배양조건 14
2.1. 균주 및 보존 14
2.2. 배지조성 14
3. 실험방법 16
3.1. 배양방법 16
3.2. Glutamate decarboxylase(GAD) 분리 16
4. 분석방법 17
4.1. 건조 균체량과 질소원, 탄소원 농도측정 17
4.2. GAD activity 측정 19
4.3. Glutamate 와 GABA 농도측정 20

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

4.4. 배양 조건에 따른 반응 표면 분석 22
Ⅰ－3 장 실험결과 23
1. 배양 조건 23
1.1. Ammonium sulfate 농도의 영향 23
1.2. Magnesium sulfate 농도의 영향 28
1.3. Monosodium glutamate(MSG)농도의 영향 32
1.4. Glucose농도의 영향 35
1.5. pH의 영향 39
1.6. 배양조건에 따른 반응표면 분석 43
Ⅰ－4 장 결론 45
제 Ⅱ 장 GABA 생산공정 개발 46
Ⅱ－1 서론 46
1. 이론적 배경 46
1.1. 생체고분자(Biopolymer) 46
1.2. 효소반응 속도론 47
1.3. 효소 반응기 50
2. 국내외 연구동향 54
Ⅱ－2 실험 재료 및 방법 56
1. 시약 및 기기 56
2. 효소 반응기 56
2.1. pH 조절이 가능한 반응기 56
2.2. 기포탑 반응기(Bubble column reactor) 58
Ⅱ－3 실험결과 60
1. GAD 반응 특성 60
1.1. MSG 농도 변화에 따른 GABA 생산특성 60

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.2. Cofactor 농도 변화에 따른 GABA 생산 62
1.3. 효소반응 pH 변화에 따른 GABA 생산 특성 66
1.4. 결정형 GABA의 생산 69
1.5. 연속식 pH제어 반응기의 반응조건확립 72
1.6. 연속식 pH제어 반응기의 반응표면분석 82
2. GABA의 생산을 위한 반응기 scale-up 86
2.1. 분사형태의 영향 86
2.2. 반응기 교반형태의 영향 93
2.3. Bubble column reactor의 효소반응 속도론 96
Ⅱ - 4 결론 99
제 Ⅲ 장 GABA를 이용한 Nylon 4 합성공정개발 100
Ⅲ - 1 서론 100
1. 이론적 배경 100
1.1. 나일론(Nylon) 100
1.2. 나일론 4(Nylon 4) 102
1.3. 2-Pyrrolidone 103
1.4. 음이온 개환중합(Anionic ring-opening polymerization) 105
Ⅲ - 2 실험 재료 및 방법 106
1. 2-Pyrrolidone 분석 106
2. 2-Pyrrolidone 합성 107
3. Nylon 4 합성 108
Ⅲ - 3 실험결과 109
1. 2-Pyrrolidone 합성 109
2. Nylon 4 합성 118
Ⅲ - 4 결론 126

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌 128

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

List of Figures

Figure 1. Schematic diagram of γ-aminobutyric acid(GABA) conversion from glutamate by glutamate decarboxylase(GAD). 2

Figure 2. Schematic diagrams of the role of cofactor in pyridoxal-5'-phosphate-dependent glutamate decarboxylase. 4

Figure 3. The standard curve based for the determination dry cell weight of recombinant *E. coli*. 17

Figure 4. The standard curve for the determination of ammonium ion concentration. 18

Figure 5. The standard curve for the determination of glucose concentration. 18

Figure 6. The standard curve for determination of GABA. 19

Figure 7.The derivatization of glutamate and GABA with 1-fluoro-2,4-dinitribenzene(DNFB). 20

Figure 8. The chromatographic separation and standard curve for the determination of GABA concentration. 21

Figure 9. Effect of ammonium sulfate on the growth of recombinant *E. coli*: (A)2 g/L, (B)4 g/L, (C)6 g/L. 25

Figure 10. Effect of ammonium sulfate on total and specific activity of GAD:(A)2 g/L, (B)4 g/L, (C)6 g/L. 26

Figure 11. Effect of magnesium sulfate on the growth of recombinant *E. coli*: (A)0.2 g/L, (B)0.4 g/L. 29

Figure 12. Effect of magnesium sulfate on total and specific activity of GAD: (A)0.2 g/L, (B)0.4 g/L. 30

Figure 13. Time course of growth and GAD activity of recombinant *E. coli*: MSG concentration was 20 g/L. 33

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Figure 14. Effect of glucose on the growth of recombinant *E. coli*; (A) 10 g/L, (B) 40 g/L (C) 60 g/L. 36

Figure 15. Effect of glucose on the total and specific activity of GAD: (A) 10 g/L, (B) 40 g/L, (C) 60 g/L..... 37

Figure 16. Effect of pH on the growth of recombinant *E. coli*: (a) pH 5.5 (b) pH 7.0. 40

Figure 17. Effect of pH on the total and specific activity of GAD: (a) pH 5.5 (b) 7.0. 41

Figure 18. Response surface graph of GAD activity of recombinant *E. coli* with ammonium sulfate and glucose concentration..... 44

Figure 19. Schematic representation and photograph of continuous control pH system used for GAD reaction. 57

Figure 20. Schematic representation and photograph of bubble column reactor used for GAD reaction. 59

Figure 21. UV-vis spectra of pyridoxal-5'-phosphate, and standard curve in buffer solution (pH 7) 63

Figure 22. UV-vis spectra of PLP according to pH..... 63

Figure 23. UV-vis spectra of the GAD reaction with time. 65

Figure 24. Effect of rising to conversion according to increasing PLP concentration on GABA production (pH 7, 37℃). 65

Figure 25. Effect of HCl, PLP and MSG on GABA production. Inoculation volume was 20 % of reaction volume. Inoculation materials were used 2 M HCl, 5 mM PLP, 100 mM MSG. 68

Figure 26. Effect of additives on GAD reaction products: (A) pyridoxal-5'-phosphate and HCl, (B) HCl, (C) monosodium glutamate and HCl..... 71

Figure 27. Scale up test of GAD reaction; (A) 50 ml, (B) 100 ml. 73

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Figure 28. Effect of pH on GABA production. 76

Figure 29. Effect of agitation speed on GABA production in a stirred tank reactor. 78

Figure 30. Effect of HCl on GABA production in a stirred tank reactor. 78

Figure 31. Result of scale-up of GAD reaction at initial concentration of 1 M MSG;(controlled pH 6, 170 rpm). 80

Figure 32. Result of scale-up of GAD reaction at initial concentration of 2 M MSG;(controlled pH 6, 170 rpm). 81

Figure 33. Response surface graph of GABA concentration with pH and HCl concentration. 83

Figure 34. Response surface graph of GABA concentration with HCl concentration and agitation speed. 84

Figure 35. Response surface graph of GABA concentration with pH and agitation speed. 85

Figure 36. Result of scale-up of GAD reaction on the 2 L reaction volume;(1 M MSG, controlled pH 6). 88

Figure 37. Alternative flow fields and the various impeller. 91

Figure 38. GABA production and reactor volume ratio using parallel type acid inlet. 92

Figure 39. Flow patterns vertical upward flow in bubble column. . 94

Figure 40. Effect of bubble and stirring on GABA production and conversion. 95

Figure 41. The Lineweaver-Burk plot of the enzyme reactions in the bubble column reactor(2 L) and stirred reactor(50 ml). .. 97

Figure 42. Synthesis route for formation of 2-pyrrolidone..... 104

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Figure 43. Standard curve of 2-pyrrolidone using HPLC. 106

Figure 44. High pressure reactor used for the synthesis of 2-pyrrolidone from GABA solution. 107

Figure 45. Reaction scheme of Nylon 4 synthesis from 2-pyrrolidone. 108

Figure 46. HPLC chromatogram of 2-pyrrolidone with methanol ratio and catalyst in high pressure reactor. 110

Figure 47.Effect of on the precipitation of GABA and MSG mixture:(up : initial states, down : after pH shift). 114

Figure 48. Diagram of 2-pyrrolidone synthesis process from enzyme reaction solutions. 116

Figure 49. NMR spectra of synthesized 2-pyrrolidone from enzyme reaction solution. 117

Figure 50. FT-IR spectra of Nylon 4 synthesized by different catalyst and initiator;(a) sodium, silicon chloride, (b) potassium tert-butoxide, benzoyl chloride, (c) potassium hydroxide, silicon chloride, (d) potassium hydroxide, benzoyl chloride. 122

Figure 51. NMR spectra of Nylon 4 synthesized by different catalyst and initiator;(a) sodium, silicon chloride, (b) potassium tert-butoxide, benzoyl chloride, (c) potassium hydroxide, silicon chloride, (d) potassium hydroxide, benzoyl chloride. 123

Figure 52. The overall process diagram of synthesis of Nylon 4 from monosodium glutamate. 125

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

List of Table

Table 1. Media composition of recombinant *E. coli*..... 15

Table 2. Cell mass, GAD activity and specific GAD activity according to different ammonium sulfate concentration 27

Table 3. Cell mass, GAD activity and specific GAD activity, according to the magnesium sulfate concentration..... 31

Table 4. Effect of MSG addition on the total and specific activity of GAD..... 34

Table 5. Effect of glucose concentration on the total and specific activity of GAD..... 38

Table 6. Effect of pH on dry cell weight, and total and specific activity of GAD..... 42

Table 7. ANOVA results of GAD activity with ammonium sulfate and glucose concentration..... 44

Table 8. Effect of additives on the freeze-drying weight: (A)added HCl with PLP, (B)added HCl, (C)added HCl, PLP and MSG.... 69

Table 9. ANOVA results of GABA production with pH and HCl concentration..... 83

Table 10. ANOVA results of GABA production with agitation speed and HCl concentration 84

Table 11. ANOVA results of GABA production concentration with pH and agitation speed 85

Table 12. Values of K_m and V_m for glutamate decarboxylation on bubble column reactor(2 L) and stirred reactor(50 ml) 98

Table 13. Typical properties of Nylon 6, 6-6, 6-10, 6-12 101

Table 14. Yield of synthesized 2-pyrrolidone according to

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

methanol ratio in high pressure reactor 111

Table 15. Precipitations of MSG and GABA using pH shift method. 113

Table 16. Inhibition effects of residual sodium chloride on the synthesis of Nylon 4 119

Table 17. Effect of pH conditions on the synthesis of Nylon 4 ... 119

Table 18. Synthesis yields of Nylon 4 according to different catalysts and initiators. 121

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

ABSTRACT

Optimization of GABA production process using recombinant glutamate decarboxylase

Kim, Eui Jin
Supervised by Professor Lee, Jung–Heon, ph. D.
Department of Chemical Engineering
Graduate School of Chosun University

Recently, bio-based fuels and polymers from renewable biomass have drawn much attention due to the increasing environmental concerns and concern over the limited nature of fossil resources. For example, polylactic acid(PLA) made from corn has been considered as a good alternative to petroleum-based plastic and has widely been employed for general purpose plastics because of several desirable properties such as biodegradability, biocompatibility, compostability, and low toxicity to humans. However, most biopolymers cannot be applied in high-value-added areas such as automobile manufacture and electronic devices because the mechanical and thermal properties of biopolymers are not able to meet high performance requirements of such applications.

Nylon 4 is four-carbon polyamide suitable for application as an engineering plastic due to its superior thermal and mechanical properties. Contrary to other nylon polymers, nylon 4 is heat-resistant, biodegradable, biocompatible and compostable. Nylon 4 is

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

synthesized by ring-opening polymerization of petroleum-derived 2-pyrrolidone. Because 2-pyrrolidone can be prepared from gamma-aminobutyric acid(GABA), GABA produced from renewable resources such as L-glutamic acid, which is eventually used as the monomer for the synthesis of nylon 4, could broaden the industrial applications of GABA.

In this study, we have demonstrated the hybrid process composed of biological and chemical processes, in which biomass-derived 2-pyrrolidone was used for the synthesis of nylon 4. High concentration of GABA was synthesized from MSG with recombinant *E. coli* expressing glutamate decarboxylase and then GABA was converted into 2-pyrrolidone that was finally used for the synthesis of nylon 4.

The fermentation process was developed to improve the GAD production using recombinant *E. coli*(BL21). The effects of ammonium sulfate, magnesium sulfate, glucose concentration, three different feeding methods and pH on the production GAD were investigated. Results showed that the production of GAD was the highest and reached 830.5 units when glucose 40 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 6 g/L, KH_2PO_4, 3 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, yeast extract 1 g/L and 350 rpm, 7 vvm, and pH 5.5.

pH controlled batch reactor and bubble column reactors have been developed in this research. They were used to produce high concentration of GABA and to determine optimal pH for GABA production. Glutamate decarboxylase (GAD) was isolated from recombinant *E. coli* and used for GABA production from monosodium glutamate (MSG). pH control was inevitable because the pH increased with MSG consumption. GAD showed highest activity at acidic conditions at pH 5.5 but the optimal pH for GABA production was pH 6.0. When 1.5 mole of MSG was used as reactant, the 1.05 mole of GABA was produced after 10 hrs batch reaction. Using bubble column reactors, 80 % of MSG was converted to GABA for 6 hrs reaction and 1.2 mole of GABA was produced.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2-Pyrrolidone was synthesis with high pressure reactor using produced GABA. The sodium chloride in the GABA solution was removed using acetone precipitation to improve 2-pyrrolidone synthesis. The bulk polymerization process using 2-pyrrolidone has been developed for the production of Nylon 4. The NMR results confirmed that the produced polymer was Nylon 4.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 Ⅰ 장 Glutamate decarboxylase의 생산공정 개발

Ⅰ－1 장 서론

1. 이론적 배경

1.1. Gamma－Aminiobutyric acid(GABA)

γ－Aminobutyric acid(GABA)는 자연계에 널리 분포하는 비단백질 구성 아미노산으로 뇌기능을 촉진시키는 등의 생리작용을 하는 중추신경계(CNS, Central Nervous System)에서 중요한 억제성 신경전달물질 이다. GABA는 glutamatedecarboxylase(GAD)의 L－glutamate의 탈 탄산 반응에 의해 CO_2와 함께 생성되며 pyrodoxal－5'－phosphate dependent 경로로 합성되는 것으로 알려져 있다[1－3].

GABA는 신경전달물질 중 아미노산 계 신경전달물질의 대표적 물질이다. 척추에 존재하는 신경전달물질로 뇌 혈류를 개선하며 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사촉진 및 뇌 기억을 증진 시키는 뇌의 영양제로 알려져 신경전달물질 조절을 통해 뇌 혈류개선, 산소공급증가, 뇌세포 대사 촉진으로 인한 신경안정작용 등의 효능을 가진다고 알려져 있으며 이외에도 스트레스해소, 우울증 완화작용, 기억력증진, 불면, 비만, 중풍과 치매 예방에 효과가 있다[4－8]. 그 외에도 GABA는 성장호르몬의 분비조절, 통증완화, 정신신경 안전작용, 혈압강하작용, ACE 저해 활성 등이 있어 생리학적으로 매우 유익한 물질이다. 이러한 기능들 때문에 GABA는 식품소재, 건강보조식품, 기능성 식품, 약, 음료, 드링크, 김치 등 식품관련 분야에서 많이 적용되고 있다[9－11].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

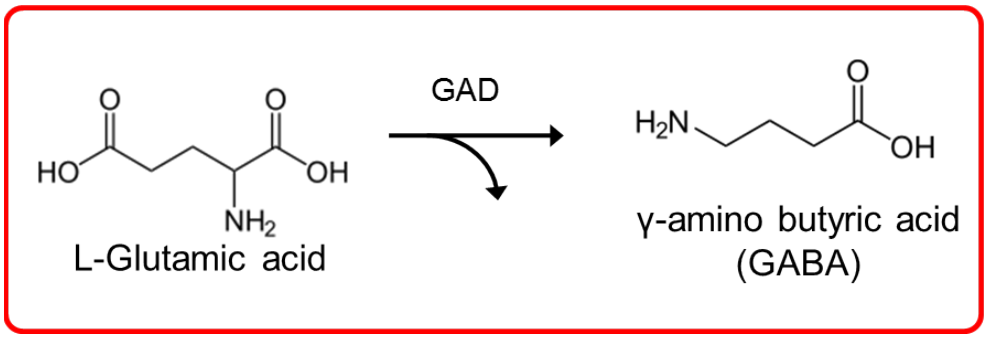


Figure 1. Schematic diagram of γ −aminobutyric acid(GABA) conversion from glutamate by glutamate decarboxylase(GAD).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

1.2. Glutamate decarboxylase(GAD)

Glutamate decarboxylase 는 pyridoxal -5' -phosphate dependent 효소로서 박테리아, 포유동물, 식물과 같이 자연계에서 널리 발견되고 있다. GABA 의 생성기작은 세포내막에서 glutamic acid 가 GAD 의 효소에 의하여 비가역적으로 탈탄산이 이루어지면서 glutamic acid 가 antiporter 에 의하여 세포안으로 쉽게 들어가게 되며 결과적으로 GABA 가 세포 밖으로 유출되어 나온다[12-14].

GAD 의 구조는 monomer unit 이 3 개의 domain 으로 구성되어 있다. 3 개의 domain 은 각각 N-terminal, PLP-binging, C-terminal domain 으로 불린다. 먼저 N-terminal domain 은 두개의 평형한 α-helices 구조를 가지고 있다. PLP-binding domain 은 하나의 β-sheet 에 아홉개의 α-helices 가 β-sheet 에 평형하게 꼬인형태로 존재한다. C-terminal domain 은 3 개의 α-helices 형태가 4 개의 평형하지 않는 β-sheet 와 함께 구성되어 있다. Monomer uint 이 두개로 결합된 형태에서 GAD 의 활성부위는 PLP-binding domain 의 가운데 부분에 위치한다. 각각 두개의 활성부위는 PLP 와 Schiff base 결합을 하고 활성부위의 lysine 에 의해 지지된다[15-17].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

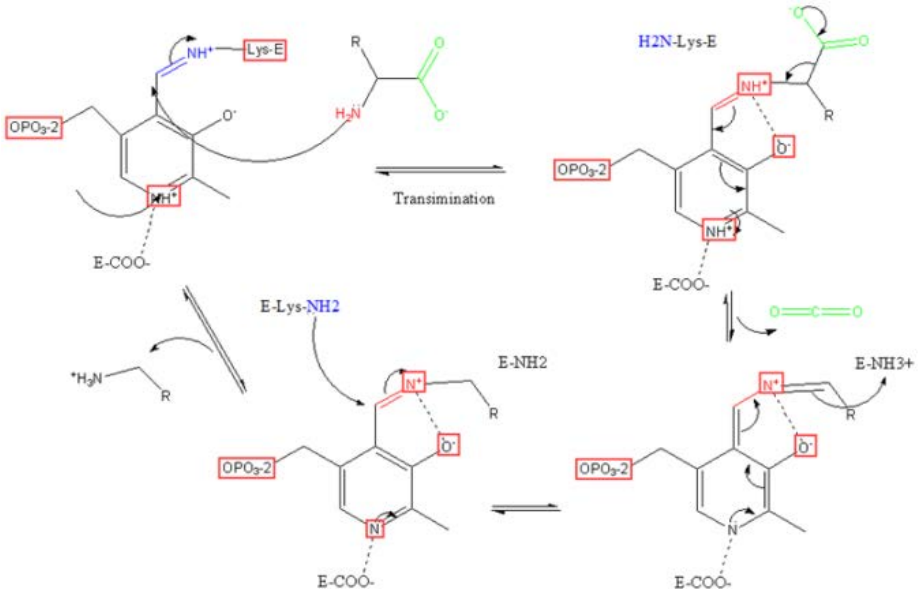


Figure 2. Schematic diagrams of the role of cofactor in pyridoxal-5' -phosphate-dependent glutamate decarboxylase.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

GABA의 합성이 필요할 때 cofactor에 의하여 불활성 GAD가 활성화 된다고 알려져 있다. 효소학적 연구에 의하면 GAD 상태에서 apoenzyme과 holoenzyme의 상호전환은 GAD의 촉매작용에 의한 연쇄반응에 의하여 일어나며 매우 잘 조절되고 있으며 여러 group에서 GAD는 뇌조직에서 multiple form으로 존재하고 있다고 밝혀졌다. 보고된 GAD의 분자량은 대개 group마다 다르지만 뇌 조직에서는 적어도 59-67 kDa정도의 2가지 형태가 존재한다고 알려져 있다.

GAD의 효소반응은 효소의 active site에 존재하는 lysine 끝 단락의 amine 그룹과 PLP의 carboxyl 그룹이 결합하여 holoenzyme이 형성된다. 이렇게 형성된 holoenzyme은 PLP의 carboxyl그룹과 monosodium glutamate(MSG)의 amine그룹이 결합한 뒤 전자가 이동하게 되고 전자의 이동에 의해 decarboxylation이 일어나게 되면서 이산화탄소가 발생하게 되면서 GABA를 생산하게 된다. 이러한 반응이 진행되는 동안 H^+ 를 소비하게 되고 효소반응의 pH는 증가하게 된다[18-20].

GABA의 생리학적, 신경학적 기능을 이용한 연구 외에도 최근에는 GABA의 아미노기와 카르복실기 사이의 3개의 메틸렌 그룹에 의한 구조적 유연성을 이용한 연구 역시 활발히 진행 중이며 이는 GABA가 쉽게 ring-formation 반응에 의해 링 구조를 가진 2-Pyrrolidone을 형성할 수 있으며, 이 2-pyrrolidone은 특정조건하에서 ring opening 반응에 의해 Nylon 4의 단량체로 변환이 가능하다. Nylon 4는 Nylon 6, Nylon 66와 물리적 특성이 유사하고 면에 가까운 성질 때문에 GABA의 산업적 이용가능성은 매우 높다고 할 수 있다. 그러나 식물을 원재료로 하거나 균의 발효를 통한 GABA의 생산에는 한계가 있으므로 대량 생산하기 위해서는 GABA를 직접적으로 전환하는 효소를 이용하는 연구가 요구된다[2, 21-23]. 따라서 본 연구에서는 MSG를 첨가하여 고농도의 GAD생산을 위한 적정 배양조건을 확립시켜 GABA 생산의 증가효과를 연구 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

본 연구에서 사용한 *E. coli*는 선택적으로 GAD 생산을 할 수 있도록 재조합된 균으로 GABA를 생산할 수 있다. 대량 배양을 위해서는 배지의 조성과 발효조의 조건이 중요함으로 효율적으로 GAD를 얻기 위해 대량 배양의 조건을 확립하고자 한다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

1.3. 회분식 배양

회분식 반응기(batch fermenter)란 배양이 완전히 끝난 후 다시 새로운 배지로 교체하는 방식이다. 초기에 한번 배지를 채운 후 배양이 끝날 때까지 더 이상 영양물질을 공급하거나 제거하지 않는 배양기이다. 현재 공업적으로 실시되고 있는 미생물 반응공정은 대부분 회분식 또는 반회분식으로 이루어지고 있다. 산업적으로 회분식, 반회분식이 주로 이용되고 있는 이유는 미생물의 유전적 변화 가능성이 존재하고, 생합성활성을 유지하기가 힘들어 연속조작이 어렵기 때문이다. 미생물배양은 대부분 순수배양을 목표한다. 그러나 연속공정의 경우 잡균오염의 방지가 쉽지 않다. 또한 연속공정에서 잡균오염을 방지하고자 하면, 더 많은 장치비용이 소비되기 때문에 산업적으로는 회분식 반응기가 주로 사용되고 있다[24-26].

회분식 반응공정은 주배양조(main fermenter), 종균배양조(seed fermenter)로 나뉜다. 종균배양조는 주배양도의 1/10 크기이다. 배양중에 온도, pH를 제어하고 호기성 균주의 경우 교반과 공기량으로 물질전달계수(K_La)를 조정한다.

물질전달계수는 Gassing-in liquid method 식에 의해 구할 수 있다.

기상과 액상이 둘 다 완전히 혼합되어 있는 상태로서 미생물이 없다고 가정하면 공기중에서 액상에 전달되는 산소량은 다음과 같다.

$$N_A = K_L A(C^* - C_L) = \frac{dC_L}{dt} V_L$$

여기서 V_L은 발효조의 부피이다. 발효조 단위 부피당 산소전달량은

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a(C^* - C_L)$$

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

질소를 발효조에 산소농도가 0 이 될 때까지 불어 넣은 다음 공기를 다시 불어 넣어 액상의 산소농도가 시간에 따라 증가하는 곡선을 얻은 다음 식을 적분하면 다음과 같다.

$$K_L a = \frac{1}{t - t_0} \ln \left(\frac{C^* - C_{L0}}{C^* - C_L} \right)$$

위 식을 직선의 방정식으로 전환하면

$$\ln \left(\frac{C^* - C_{L0}}{C^* - C_L} \right) = K_L a \cdot \triangle t$$

즉 직선의 방정식을 구한 뒤 기울기 값이 $K_L a$값이 된다. 이 모델에서 문제가 되는 것은 기상의 산소농도가 일정하다고 가정하고 있는 것이다. 실제적으로 아주 큰 발효조의 경우는 입구의 산소농도와 출구의 산소농도는 같지 않다. Heineken(1970)은 발효조내 기체의 산소농도는 일정하나 입구의 산소농도와 다르다고 가정하고 기상에서 없어진 산소 양만큼 액상의 산소농도가 증가했다고 가정했다[27-29].

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C_L^* - C_L)$$

$$V_L \frac{dC_L}{dt} = Q[(P_1 - P_2)/P_t]$$

여기서 Q는 공기의 무게로 표시된 유량이며 P_t는 전체압력, P_1과 P_2는 입구와 출구에서 산소의 분압이다. C_L^*와 C_L^0는 각각

$$C_L^* = P_2/H, \quad C_L^0 = P_1/H$$

여기서 H 는 Henry constant 로 25℃ 에서 0.0299 atm · L/mg 의 값을 갖는다. 두 개의 식을 정리하면,

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

$$\left(\frac{1}{K_L a}+\frac{V_L P_t}{QH}\right)\frac{dC_L}{dt}=C_L^*-C_L,\quad t=0,\ C_L=0$$

다음을 적분하면,

$$C_L=C_L^0(1-e^{-\beta t})$$

여기서

$$\beta=\frac{K_L a\frac{QH}{V_L P_t}}{K_L a+\frac{QH}{V_L P_t}}$$

여기서 $K_La >> QH/V_LP_t$이면 $\beta \rightarrow QH/V_LP_t$를 나타내고,

$K_La << QH/V_LP_t$이면 β는 K_La를 나타낸다. K_La는 0.01~0.1 /s정도이고 시간으로는 36~360/h정도 이다. QH/V_LP_t를 다른단위로 바꾸면,

$\rho H/VVM\ P_t$가 되어 통기량 1 vvm이고, $\rho=1.28\times10^3$/L, H=0.0260 L atm/mg 이면 QH/V_LP_t는 1997/h로 36~360 보다 훨씬 커서 β는 K_La를 대표한다고 할 수 있다. 따라서 통기량이 아주 적던지 K_La가 아주 크지 않으면 β에서 QH/V_LP_t항을 무시해도 문제가 없으며, 그렇게 되면 입구의 산소농도와 출구의 산소농도는 같지 않다는 문제는 무시할만하다는 식에 도달하게 된다.

회분식 배양에서 세포의 생장곡선은 여섯단계로 구분한다. 지연기, 또는 유도기(lag phase)라 불리는 기간에는 세포가 새로운 배지에서 생장하는데 필요한 효소를 합성하는 등의 준비 작업을 하는 기간으로 세포수는 증가하지 않는다. 가속 생장기(accelerating growth phase)를 거쳐 지수 성장기(exponential growth phase)가 시작되면 세포의 수는 지수적으로 급속히 증가한다. 감속 생장기(decelerating growth phase)를 거쳐 세포의 수가 더 이상 증가하지 않는 정지기(stationary phase)로 들어간다. 정지기는 어느

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

특정 기질의 농도가 생장을 저해할 만큼 감소하거나 생성된 2 차산물이 세포 생장을 저해할 만큼 증가한 시간이다. 마지막 단계로 세포가 사멸하는 쇠퇴기(death phase)로 한 사이클을 마친다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

1.4. 미생물 성장 및 대사산물 생산속도론

미생물성장에 대한 간단한 모델은 기질을 이용한 미생물 성장에서 간단한 Monod 속도식에 의해 표현된다. 세포질량과 기질에 대해서 Monod 속도식을 이용하면 아래와 같은 두 반응식으로 나타난다.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = \frac{\mu_{max} SX}{K_s + S}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{max} SX}{K_s + S}$$

이 두 반응식은 수득율 $Y_{(X/S)}$에 의해 아래와 같은 식으로 표현된다.

$$\frac{d(X + Y_{X/S}S)}{dt} = 0, \quad X + Y_{X/S}S = X_0 + Y_{X/S}S_0$$

위 방정식에서 S 에 대한 X 의 표현은 치환되어 다음과 같은 식으로 표현된다.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu_{max}}{Y_{X/S}} \frac{(X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)S)}{(K_S + S)}$$

위 식을 적분하면 아래의 식이 된다. 기질의 감소 및 세포의 생성량은 아래식을 통하여 계산할 수 있다.

$$[X_0 + Y_{X/S}(S_0 + K_s)]\ln\frac{X_0 + Y_{X/S}(S_0 - S)}{X_0} - K_s Y_{X/S}\ln\frac{S}{S_0} = \mu_{max}(X_0 + Y_{X/S}S_0)t$$

세포가 생성물을 생산하는 경우에는 세포의 성장과 관련된 생성물의 생산 및 성장과 관련 없이 생산하는 두 가지 경우를 가정할 수 있으며, 아래의 식과 같이 표현할 수 있다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{\mu_{max} SX}{K_s + S} + \beta X$$

기질에 대한 물질수지는 생산물전환의 기질전환을 고려하여 변형하면 생성물을 고려한 기질의 변화를 알 수 있는 미분방정식을 만들 수 있다.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{\mu_{max} SX}{K_s + S} - \frac{1}{Y_{P/S}} (\alpha \frac{\mu_{max} SX}{K_s + S} + \beta X)$$

회분식 반응에서 세포의 사멸에 관련된 모델의 개발은 세포가 생명체로써 영양소가 없을 때 죽기 때문에 일어나는 현상이다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

1.5. 비생장속도(Specific growth rate)와 비활성(Specific activity)

시간에 따른 건조균체량 X 의 변화율, 즉 미소시간 dt 동안에 증식하는 건조균체량 dX는 그 시점에 존재하는 건조균체량 X에 정비례하며, 그 비례상수를 μ라 하면 다음 식으로 표시된다.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X\ ,\ \ \mu = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt}$$

여기서 μ를 비증식속도(h^{-1})라 하며 세포의 생장속도를 나타낸다. 예를 들어, 비증식속도(μ)가 0.1 h^{-1}이면 시간당 10% 증식함을 의미하며, 비증식속도 값이 클수록 증식속도가 크다. 이러한 비생장속도라는 단위가 나온 원인에는 세포의 증식방법에 원인이 있다. 보통 대개의 단세포 생물은 이분법으로 증식한다. 이러한 이분법은 모체로 있는 세포의 농도에 기인하게 되는데, 세포가 성장하는 동안 이러한 모체의 농도에 따라서 균체량은 변화를 받게 된다. 이러한 이유로 세포의 활성을 확인하기 위해 위의 식이 만들어지게 되었다. 위의 식은 단위균체량당 얼마나 많은 균체를 형성하는가 라는 속도론적인 의미를 내포하고 있다. 이러한 개념을 도입하여 균체에서 생성한 효소의 활성에 도입했다. 효소의 전환은 이론적으로는 양에 무관하게 시간이 경과하게 되면 평형에 도달하게 되어 최종 형성물의 농도는 동일하게 된다. 하지만 현실에서는 시간의 경과는 효소의 구조적인 붕괴를 유발하게 되므로 최종 산물의 농도에 직접적인 연관이 있게 된다. 이러한 문제점을 해결하고 단위시간당 생성물의 생성효율을 증진시키기 위하여 비활성의 단위를 본 연구에 도입하게 되었다. 비활성을 다음과 같은 식을 이용하여 구하게 된다.

$$Specific\ \ activity = \frac{1}{X}\frac{dP}{dt}$$

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ－2 장 실험 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 실험에서는 탄소원으로 glucose와 질소원으로 $(NH_4)_2SO_4$, 인산염 으로는 KH_2PO_4, K_2HPO_4를 사용하였고 미량원소로는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$를 사용 하였으며 기타 성분으로는 monosodium glutamate(MSG), yeast extract와 ampicillin을 이용하였다. 소포제로 anti-form을 사용하였다. 본 배양액을 2 L 제조하여 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 발효조로는 5 L (Biotron Co.)를 사용하였다.

2. 배양조건

2.1. 균주 및 보존

본 연구에 사용된 균주는 Glutamate decarboxylase(GAD)를 생성하는 *E.coli* BL-21 변이주로 공동연구 중인 광운대학교에서 분양을 받아 사용하였다[30]. 사용된 재조합 균은 300 ml 플라스크에 100 ml 배양액을 만든 후 37℃ 에서 6시간 정도 배양 후 50% glycerol 과 동일한 비로 잘 섞은 후 -70℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

2.2. 배지조성

본 연구에서 사용된 종배양 배지 조성은 tryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L, yeast extract 5 g/L 로 LB 배지를 사용하였으며, 본 배양 배지 조성은 glucose 40 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 6 g/L, KH_2PO_4, 3 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L, yeast extract 1 g/L, MSG

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

20 g/L 로 배양액을 만들었다. 배지는 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였으며 pH 조절은 3 N NaCl, 1 N HCl을 사용하였다.

Table 1. Media composition of recombinant *E. coli*

Component	Concentration (g/L)
Glucose	40
$(NH_4)_2SO_4$	6
KH_2PO_4	3
K_2HPO_4	3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
MSG	20
Yeast extract	1

Monosodium glutamate(MSG)

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. 실험방법

3.1. 배양방법

본 발효의 5%에 해당하는 플라스크 배지 (LB media)를 100 ml 만들어 진탕 배양기에서 4시간 배양한 후에 1.9 L 본 배지에 접종 하였다. 배양온도 37℃로 하였으며 교반속도는 조건에 따라 200-400 rpm, aeration rate은 3~7 vvm, pH 는 7.0 과 5.5로 조절 하였다.

3.2. Glutamate decarboxylase(GAD) 분리

본 배양이 끝난 후 배양액을 모두 모아 원심분리기(Mega 17R, Han-il Inc., England)를 이용해 8000 rpm 10분간 원심분리 하였다. 침전된 균체를 pH 5.0 sodium citrate buffer, 또는 효소전환공정에 사용되는 pH와 동일한 조건으로 초음파 파쇄를 수행하였다. 초음파 파쇄공정은 amplitude 20%조건에서 pulse 1:1, 0℃ 조건에서 20분간 초음파 파쇄를 하여 균을 파쇄하고 원심분리기를 이용해 8000 rpm 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상등액을 취하여 -70 ℃에서 보관하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4. 분석방법

4.1. 건조 균체량과 질소원, 탄소원 농도측정

건조 균체량은 원심분리기를 이용해 8000 rpm 에서 10 분동안 원심분리하여 침전된 균체를 증류수로 세척한 후 60℃ dry oven 에서 24시간 건조시켜 건조 중량을 측정하여 standard curve를 만들어 사용 하였다. 암모늄 이온은 Indophenol 방법[31]으로 분석하였으며, glucose 농도는 dinitrosalicylic acid(DNS)방법[32]을 이용하여 분광광도계(Ultraspec 2100 pro, Biochrom Inc., England) 를 이용하여 측정하였다.

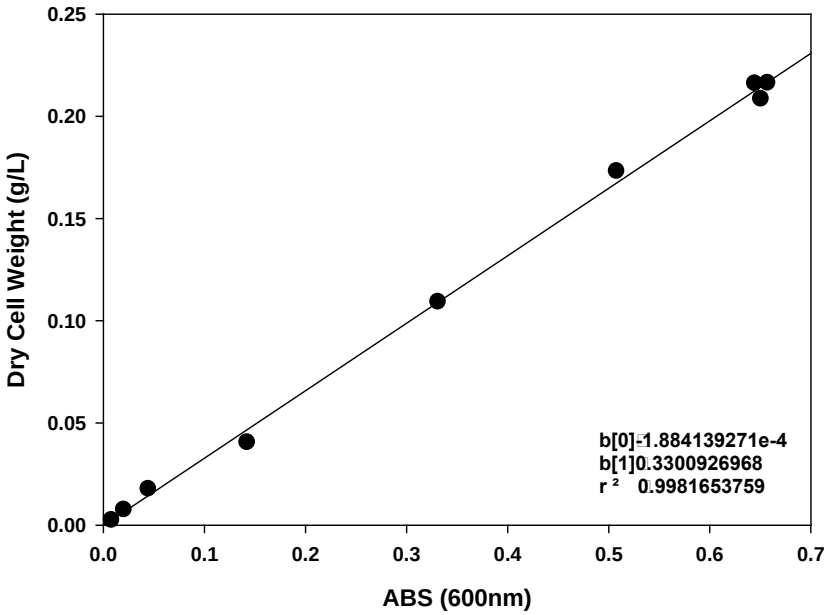


Figure 3. The standard curve based for the determination dry cell weight of recombinant *E. coli*.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

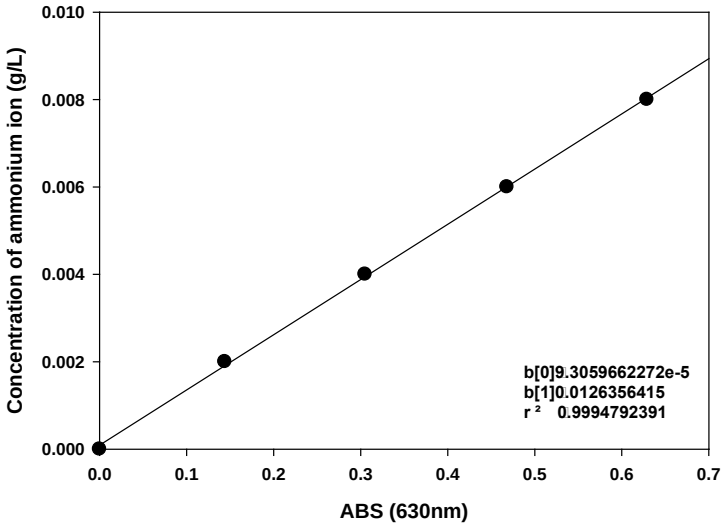


Figure 4. The standard curve for the determination of ammonium ion concentration.

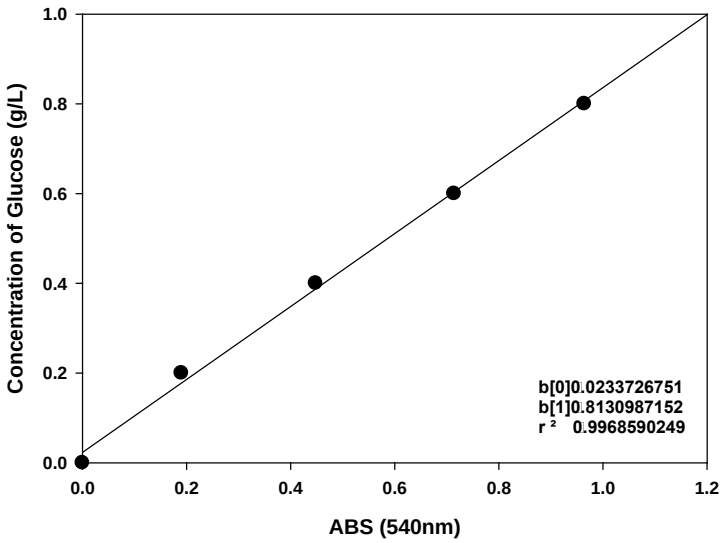


Figure 5. The standard curve for the determination of glucose concentration.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4.2. GAD activity 측정

추출된 효소를 이용해 GABA로 전환을 시키기 위해 GAD 반응을 먼저 한다. 0.1 M monosodium glutamate (MSG)를 0.4 ml, 조효소인 0.5 mM PLP 를 0.1 ml, 추출한 GAD 효소를 0.5 ml 로 30분 동안 37℃ 로 반응 시켰다. 분석은 Gabase법[1, 33, 34]으로 60분간 25℃로 반응시킨 후 생성된 NADPH의 농도를 분석하였으며, 생성된 NADPH의 농도를 통해서 GABA농도를 확인하였고, 생성된 GABA의 양을 이용해서 GAD의 activity를 분석하였다. 이때 GAD activity는 분당 생성된 GABA의 μM (μM/min)을 1 unit 으로 정의하였으며 specific GAD activity는 분당 생성된 GABA의 양을 균체량 으로 나누어 주었다(unit/cell mass).

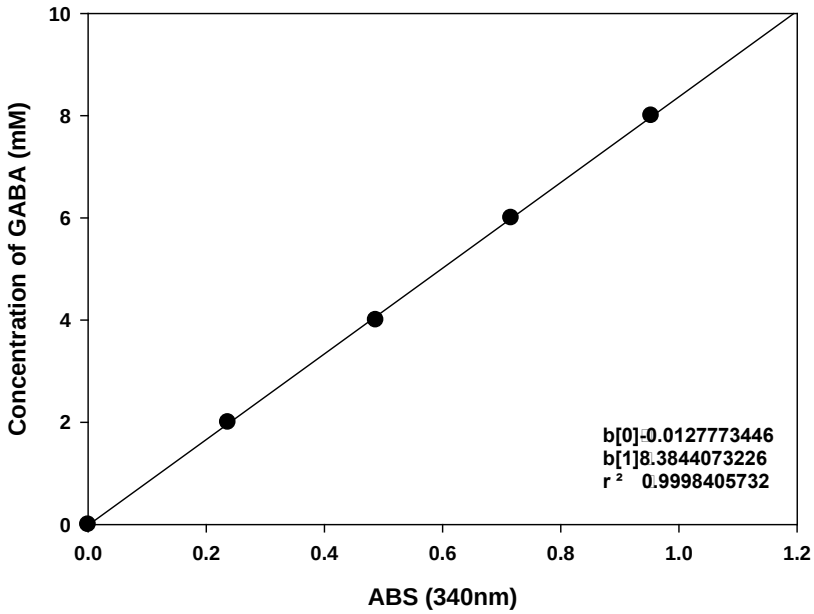


Figure 6. The standard curve for determination of GABA.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4.3. Glutamate 와 GABA 농도측정

GAD 반응을 한 후 생성된 GABA에 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzen(DNFB) 로 발색을 시킨 후 HPLC로 측정한다. 이동상은 (A) 0.05 % TFA /water 이고 (B) 0.05% TFA /CAN 이다. 분석용 컬럼은 XRerra RP18 (5 ㎕, 4.6 x 100 mm)을 사용하고 UV-detection 400 nm 에서 분석 하였다. 이때, flow rate는 0.7 ml/min 이며 GABA의 표준물질을 만들어 peak의 면적을 이용해 standard curve를 만들었다[35-37].

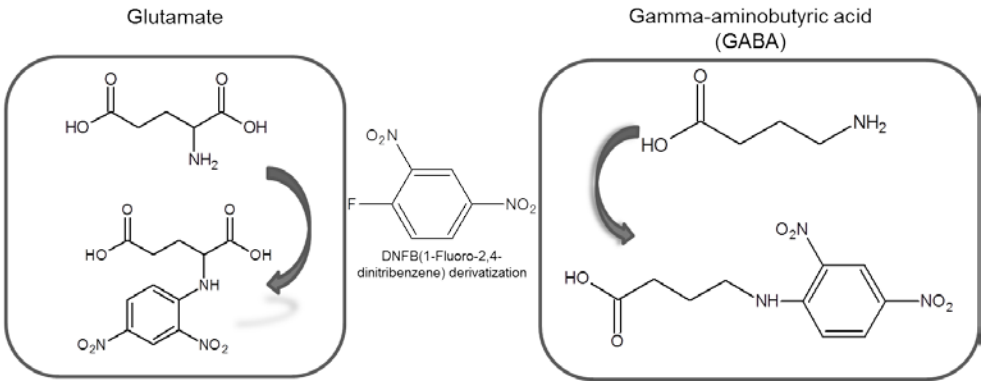
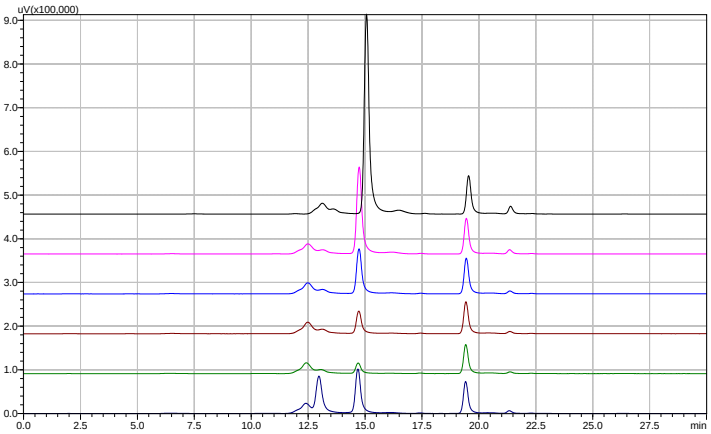


Figure 7.The derivatization of glutamate and GABA with 1-fluoro-2,4-dinitribenzene(DNFB).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



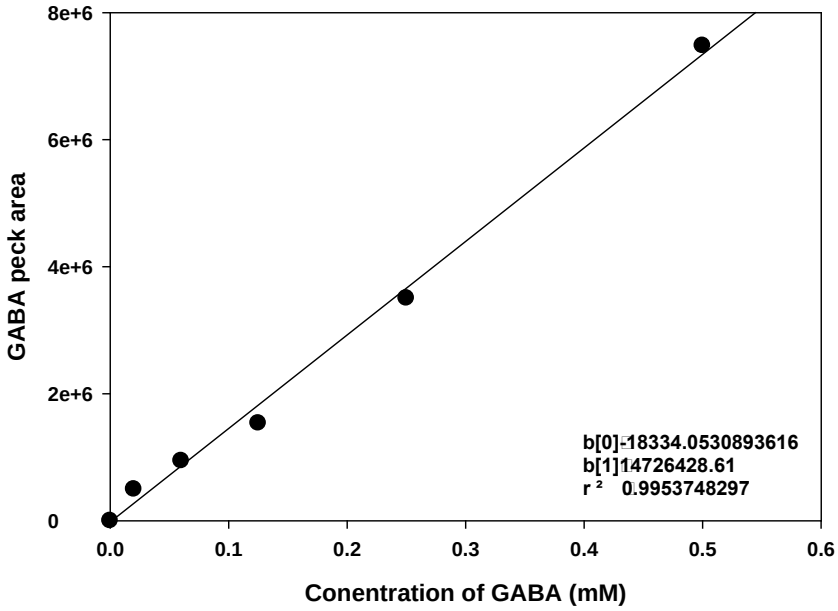


Figure 8. The chromatographic separation and standard curve for the determination of GABA concentration.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

4.4. 배양 조건에 따른 반응 표면 분석

반응표면분석법(Response surface method)은 여러 가지 실험 인자들, 즉 독립 변수의 상호작용에 따른 종속 변수의 변화에 대하여 최대 반응치를 나타내는 최적 조건을 찾아내기 위해 이용되는 통계적인 분석방법이다. 따라서 각 실험의 주된 요인을 찾아내고, 요인들 간의 상호 작용이 있는가를 살펴보면서 반응 값에 미치는 요인들 가운데 어떠한 조합이 최대 반응치를 나타내는 가를 알아내기 위해서는 요인의 수준을 변경하면서 차례로 실험을 반복해야한다. RSM 을 통하여 독립변수들과 종속변수 사이의 함수관계를 데이터로부터 추정하여 독립변수들 값의 변화에 따른 반응량이 변화를 예측할 수 있고, 반응량의 최고치도 예측할 수 있다.

질소원과 탄소원 최적 농도를 추정하기 위해 질소원의 농도와 탄소원의 농도를 독립변수 (X1, X2)로 설정하고 배양 결과 생산되는 GAD activity를 종속변수 (Y)로 하였으며, 식 반응 다항 2차 모형으로 적합하여 Y 값이 달라지는 값을 예측하였다[38-40].

$$Y=Y_0+aX_1+by_2+cX_1^2+dY_2^2+eXY$$

발효 조건 중 교반속도, 통기량등의 기계적인 변수는 반응기의 scale-up 및 기기의 변경에 따른 변수를 감안하여 반응 표면 분석법은 수행하지 않았으며, pH, 발효 온도는 재조합 균주의 특성을 고려하여 변수에 포함하지 않았다. 본 반응표면 분석은 동일한 조건에서 배지의 조성에 따른 균체량과 activity만을 고려하여 분석을 수행하였다. 실험 결과는 Sigma plot을 이용하여 통계적으로 분석하였으며, 분석결과는 각 반응의 조건 별로 실험 결과를 도출하여 예상 실험 조건을 찾았다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ－3 장 실험결과

1. 배양 조건

1.1. Ammonium sulfate 농도의 영향

살아있는 세포는 그 속에서 다양한 생화학 반응이 독립적으로 일어나고 있는 반응기와 같다. 이러한 반응은 효소반응에 의해 중계되며, 대사반응들은 metabolic pathway란 경로를 통해 조직화 되어 있다. 생물들은 대사과정을 통하여 주변으로부터 에너지가 풍부한 영양분을 분해하여 화학에너지(ATP, NADPH)를 얻거나 영양분을 분해하여 세포에 필요한 생체고분자의 기초 화학물질로 전환하게 된다. 이러한 기초 화학물질로부터 단백질, 핵산, 지방질, 다당류 등 기타 세포 성분을 만들어내고 세포의 특수한 역할에 필요한 생체물질의 분해와 생성을 진행하기도 한다. 세포의 대사(metabolism)는 탄수화물, 지방질, 단백질의 분해과정의 catabolism과 생체가 필요로 하는 단백질, 다당류, 지방질, 핵산을 합성하는 anabolism으로 구분된다. 본 연구에서는 재조합 대장균의 anabolism을 증진시키기 위하여 ammonium sulfate의 농도에 따른 GAD activity를 확인하였다.

2 L 발효조 에서 ammonium sulfate$(NH_4)_2SO_4$ 농도에 따른 발효 결과는 Figure 11 과 같다. $(NH_4)_2SO_4$의 농도는 2, 4, 6 g/L로 나누어 실험을 하였고 나머지 조건은 온도 37℃, 200 rpm, 유속은 3 vvm, pH는 7로 한 후 배양 하였다. 그 결과 $(NH_4)_2SO_4$를 2, 4, 6 g/L 넣어 배양한지 24 시간 만에 건조 균체량은 2.1, 2.1, 2.3 g/L 로 $(NH_4)_2SO_4$를 6 g/L로 넣어 주었을 때, 건조 균체량이 가장 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 6 g/L 이상의 조건에서는 균체량의 증가, activity의 변화가 나타나지 않아 실험군에서 배제하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

$(NH_4)_2SO_4$를 2, 4, 6 g/L 넣어 배양한 조건의 최대 GAD activity의 값은 각각 159.5, 272.1, 274.8 unit 으로 4 와 6 g/L의 $(NH_4)_2SO_4$에서 비슷하게 나타났고, specific GAD activity는 각각 2.3, 3.7, 3.8 로 4 g/L와 6 g/L의 $(NH_4)_2SO_4$에서 비슷하게 측정되었다. 이 실험을 바탕으로 4 g/L와 6 g/L 에서 GAD activity나 specific activity가 비슷하게 나왔지만 균체량은 6 g/L에서 좀더 높게 생산되어 6 g/L 의 ammonium sulfate 농도가 GAD의 생산에 적합할 것으로 판단되어 나머지 실험을 동일한 농도로 진행 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

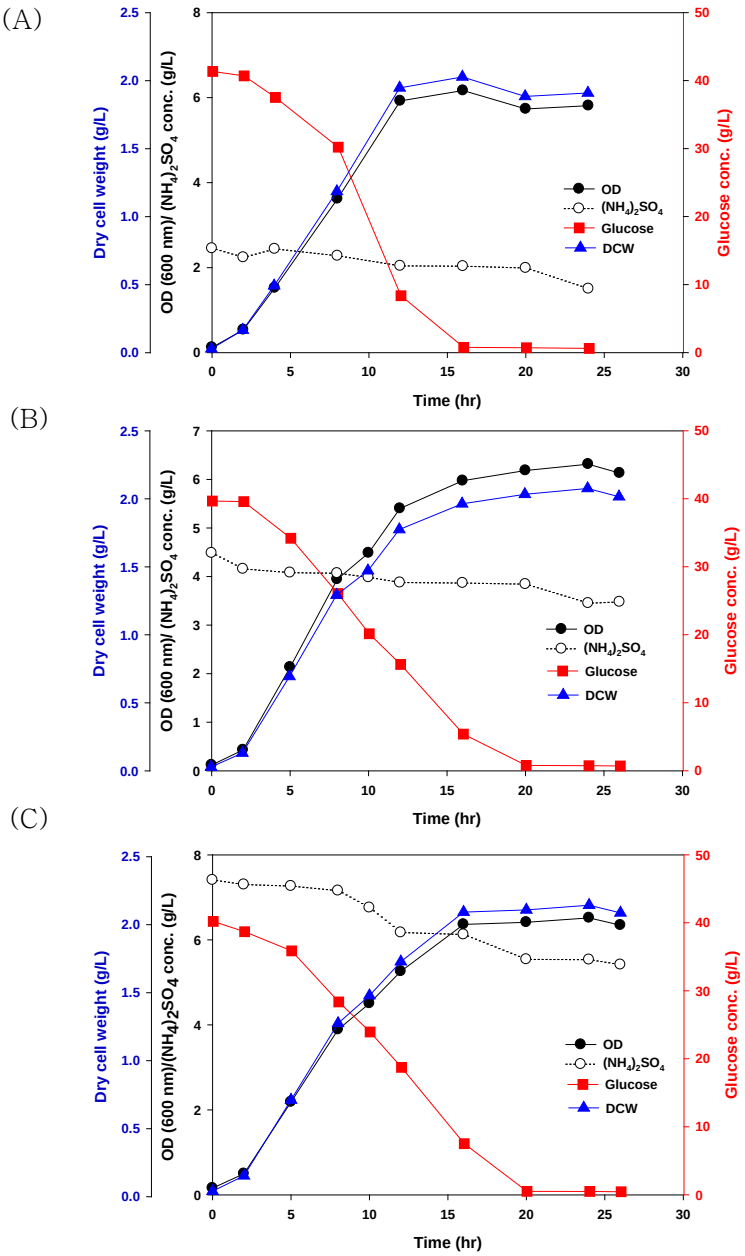


Figure 9. Effect of ammonium sulfate on the growth of recombinant *E. coli*: (A) 2 g/L, (B) 4 g/L, (C) 6 g/L.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

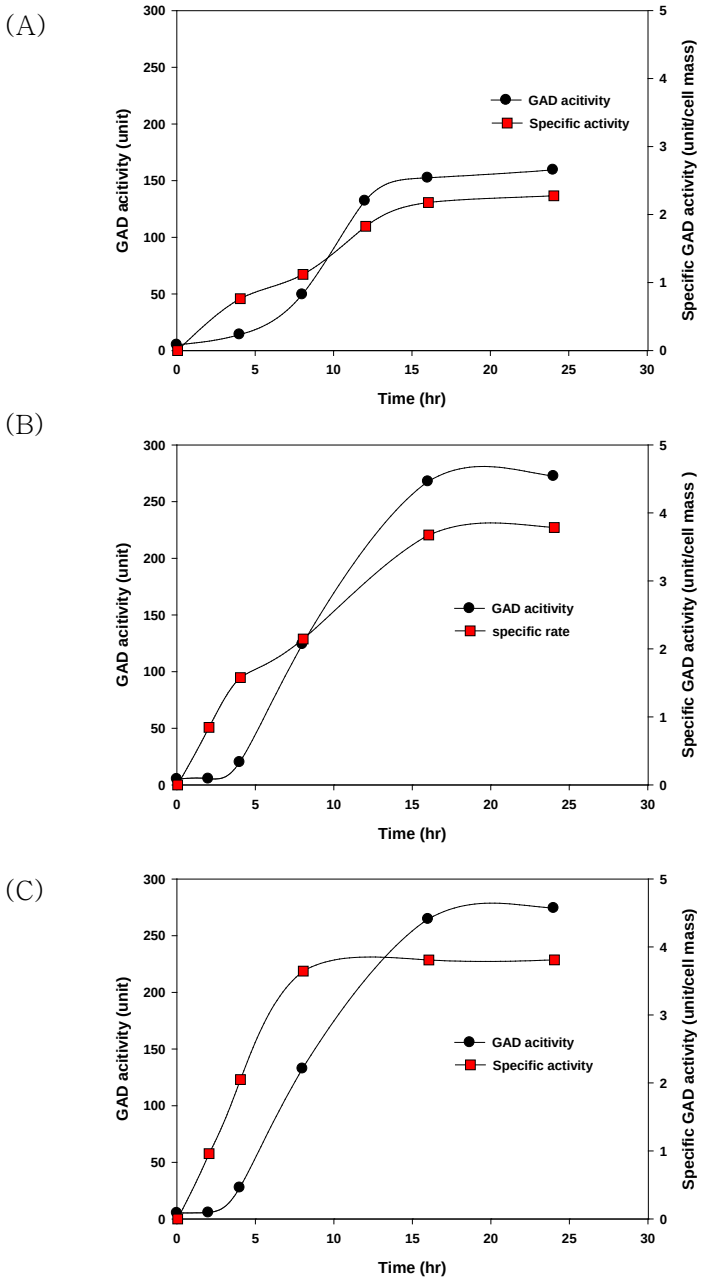


Figure 10. Effect of ammonium sulfate on total and specific activity of GAD: (A) 2 g/L, (B) 4 g/L, (C) 6 g/L.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 2. Cell mass, GAD activity and specific GAD activity according to different ammonium sulfate concentration

Ammonium sulfate (g/L)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
2	2.1	159.5	2.3
4	2.1	272.1	3.7
6	2.3	274.8	3.8

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

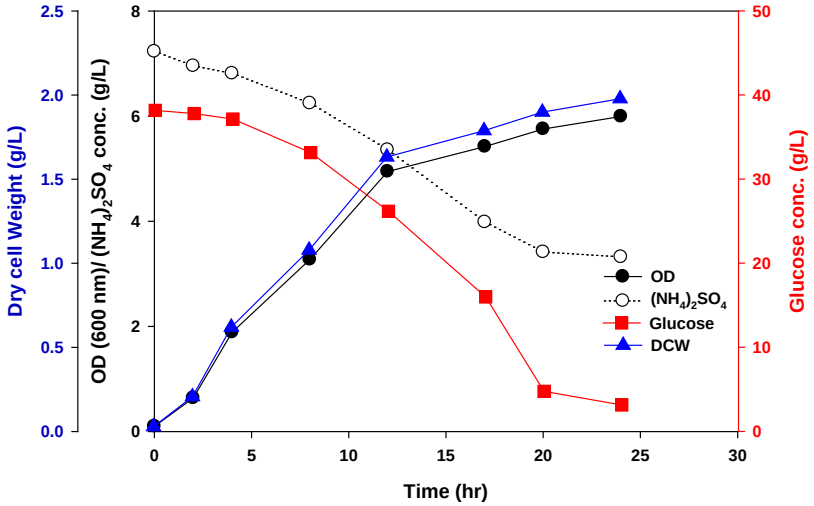
1.2. Magnesium sulfate 농도의 영향

미생물의 성장에서 미량원소는 철, 망간, 아연, 코발트, 니켈, 구리 등이 있으며, 이러한 미량원소는 효소의 활성화 인자로 작용하는 경우가 대부분이다. 이러한 효소의 활성이 높아지면 미생물이 필요로 하는 영양소의 전환 및 생성이 증가되고 이러한 이유로 균체량의 증가 또는 특정 목적의 효소의 대량발현등의 결과를 도출할 수 있다. 본 연구에서는 2 L 교반 발효조 에서 미량원소에 따른 발효 결과를 Fig. 13에 나타냈다. Magnesium sulfate의 농도는 0.2, 0.4 g/L 로 나누어 실험을 하였고 나머지 조건은 온도 37 ℃, 200 rpm, 유속은 3 vvm, pH 7로 고정한 후 배양 하였다. 그 결과 magnesium sulfate를 0.2, 0.4g/L 넣어 배양한지 24 시간 만에 건조 균체량은 2.1 g/L, 1.9 g/L 로 magnesium sulfate를 0.2 g/L로 넣어 주었을 때, 건조 균체량이 좀 더 높게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. Magnesium sulfate의 농도가 각각 0.2, 0.4 g/L 넣어 배양한지 24시간 동안의 GAD activity의 값은 각각 274.1, 291.4 unit 으로 나타났으며, specific GAD activity는 각각 3.8, 3.9 로 0.2, 0.4 g/L 의 magnesium sulfate의 초기 농도의 영향은 비슷한 확인 할 수 있었다. 재조합 균주로부터 생산된 GAD는 균이 배출하는 효소의 형태가 균의 내부에(endo) 존재하기 때문에 균체량의 증가는 GAD의 증가로 이어질 수 있다. 그러나 균체량의 증가는 magnesium sulfate의 농도에 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다. 이 실험을 바탕으로 magnesium sulfate의 초기 배지 농도를 0.2 g/L 로 고정한 후 나머지 실험을 진행 하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(A)



(B)

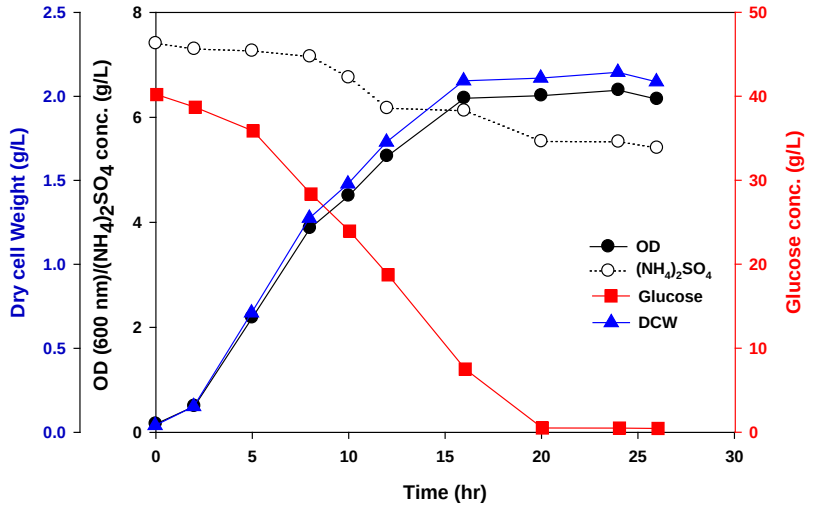
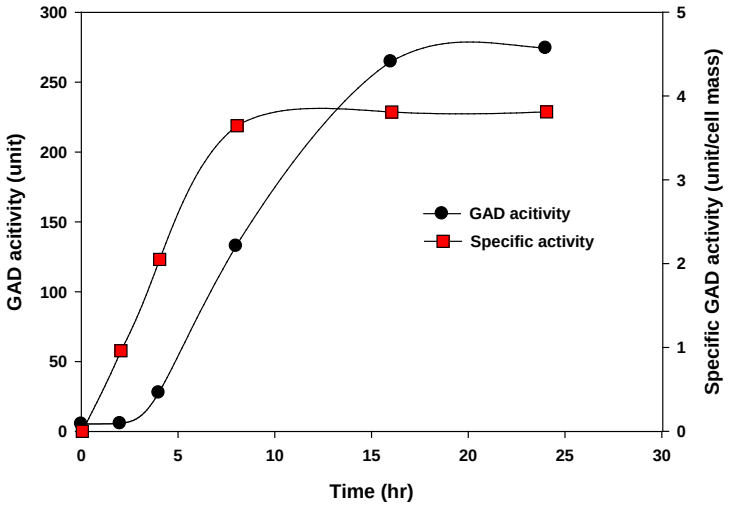


Figure 11. Effect of magnesium sulfate on the growth of recombinant *E. coli*: (A) 0.2 g/L, (B) 0.4 g/L.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(A)



(B)

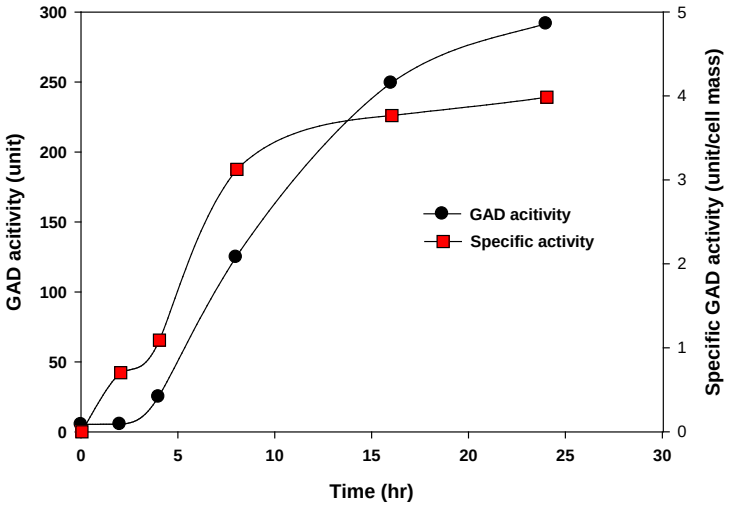


Figure 12. Effect of magnesium sulfate on total and specific activity of GAD: (A) 0.2 g/L, (B) 0.4 g/L.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 3. Cell mass, GAD activity and specific GAD activity, according to the magnesium sulfate concentration.

Magnesium sulfate (g/L)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
0.2	2.1	274.1	3.8
0.4	1.9	291.4	3.9

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

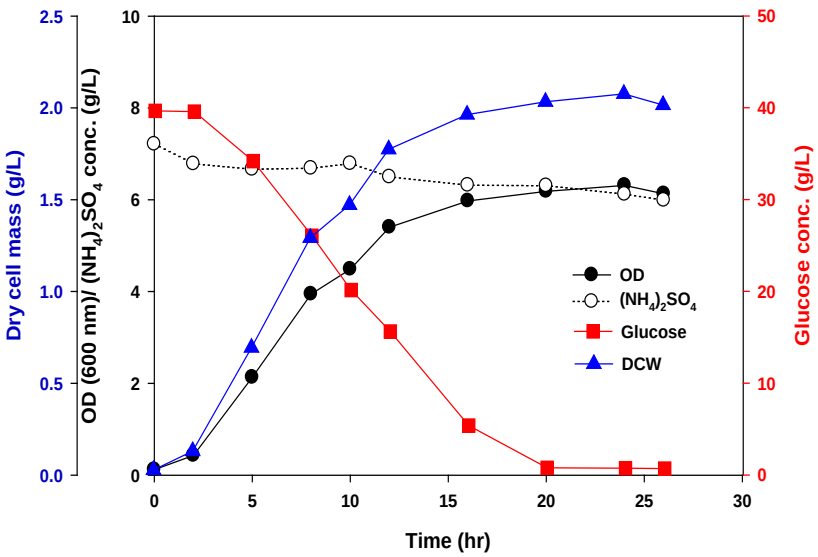
1.3. Monosodium glutamate(MSG)농도의 영향

GABA 생산의 전구체인 MSG를 첨가하여 GAD 발현을 유도하기 위해 배지에 MSG를 첨가하여 생성된 GAD의 activity를 비교하였다. 먼저 플라스크 상태에서 2 L 조건의 배양 배지 상태로 MSG 농도를 0, 10, 20, 50 g/L 로 변화를 주어 37℃에서 12시간 배양 시켰다. 플라스크 상태에서 12시간 배양한 배양액을 원심분리 후 각각의 GAD activity를 확인하였다. 그 결과 각각의 MSG농도별 GAD activity는 236.66, 243.33, 630.00, 250.00 unit의 결과를 확인하였다. 20 g/L의 MSG를 포함한 배양액의 발효조건에서 12시간 발효한 재조합균의 GAD activity가 630.00 unit으로 가장 높았으며, 50 g/L의 MSG를 포함한 조건에서는 250.00 unit으로 control군과 비슷한 활성이 나타났다.

이를 바탕으로 2 L 발효조에 적용하여 실험 하였다. 그 결과 MSG를 첨가하지 않았던 실험군과 동일하게 탄소원인 glucose는 완전히 소모되는데 20시간이 소요되었으며, 균체량도 동일한 결과를 나타냈다. 하지만, GAD activity의 값은 274.8 unit 에서 283.4 unit로 증가 하였고 specific GAD activity 또한 3.8에서 4.1로 증가 함을 알 수 있었다. 균체량은 증가하지 않았지만 activity가 증가한 결과는 배지에 존재하는 MSG를 성장원으로 이용하기 위하여 GAD가 더 많이 발현이 되어 나타난 결과이다. 그러나 상대적으로 glucose가 MSG보다 균체내에서 소비하는 경로가 간단하고, 용의하기 때문에 MSG에 의한 균체량의 증가는 나타나지 않을 것으로 여겨진다. 이 실험을 토대로 MSG를 첨가 함으로써 재조합 *E. coli*의 GAD 발현을 유도 하였음을 확인 하였으며, 이 후의 실험은 MSG의 농도를 20 g/L로 고정하여 실험을 진행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



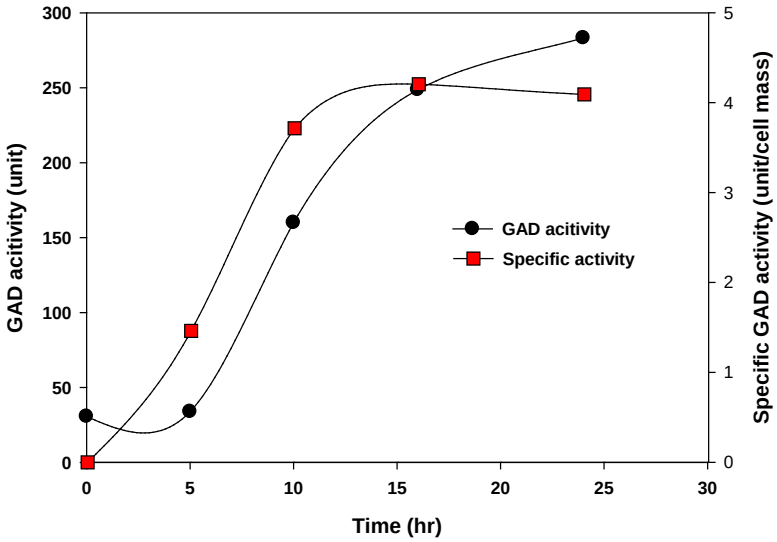


Figure 13. Time course of growth and GAD activity of recombinant *E. coli*: MSG concentration was 20 g/L.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 4. Effect of MSG addition on the total and specific activity of GAD

MSG (g/L)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
0	2.1	274.1	3.8
20	2.1	291.4	4.1

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.4. Glucose농도의 영향

Glucose는 균의 성장에 필요한 필수원소중 탄소원을 공급하기 위한 영양소로 균의 성장에 절대적으로 필요한 원소이다. 이러한 탄소원은 과량으로 존재할 경우 균의 성장을 저해하기도 한다. 또한 균의 종류 및 상태에 따라서 소모되는 경향도 상의하게 변할 수 있다. 본 연구에서 glucose는 기본적으로 *E. coli*의 성장에 사용되는 농도 범위에서 적용되었다. Glucose의 농도는 10, 40, 60 g/L 로 나누어 실험을 하였고 나머지 조건은 온도 37 ℃, 200 rpm, 유속은 3 vvm, pH는 7 고정하여 정체 배양 하였다. 발효시간은 glucose를 모두소비 하는 시점에서 발효를 정지 하고 균을 분리하여 효소를 추출하였다. 그 결과 10 g/L시 8시간때 모든 glucose를 소비하며 정체기에 이르렀고 건조 균체량은 1.4 g/L 였다. 40 g/L에서는 20 시간에 glucose를 모두 소비 하였고 균체량은 2.1 g/L 였다. 이는 탄소원의 증가에 비하여 균체량의 증가가 현저히 떨어지는 결과로 배양액의 성분을 분석한 결과 유기산의 농도가 증가한 것을 확인하였다. 균의 성장이 GAD의 생산, 또는 균체의 증가에 집중하지 않고 유기산의 생산으로 이어진 결과로 예측된다. 마지막으로 60 g/L 에서는 28 시간에 glucose를 거의 소모 하였고 정체기에 접어들어 발효를 중지 하였다. 60 g/L 에서 균체량이 증가 할 것으로 예상 하였으나 초기 고농도의 기질 첨가로 성장 저해 현상이 나타나 건조 균체량은 40 g/L와 같은 2.1 g/L였다. 이때의 activity를 살펴 보면 GAD activity는 각각 76.2, 248.6, 220.0 unit 으로 40 g/L 가 가장 높고 specific GAD activity 또한 1.8, 4.2, 3.0으로 40 g/L에서 가장 높게 나타났다. 본 연구에서는 glucose 농도를 40 g/L 로 선정하여 다음실험을 수행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

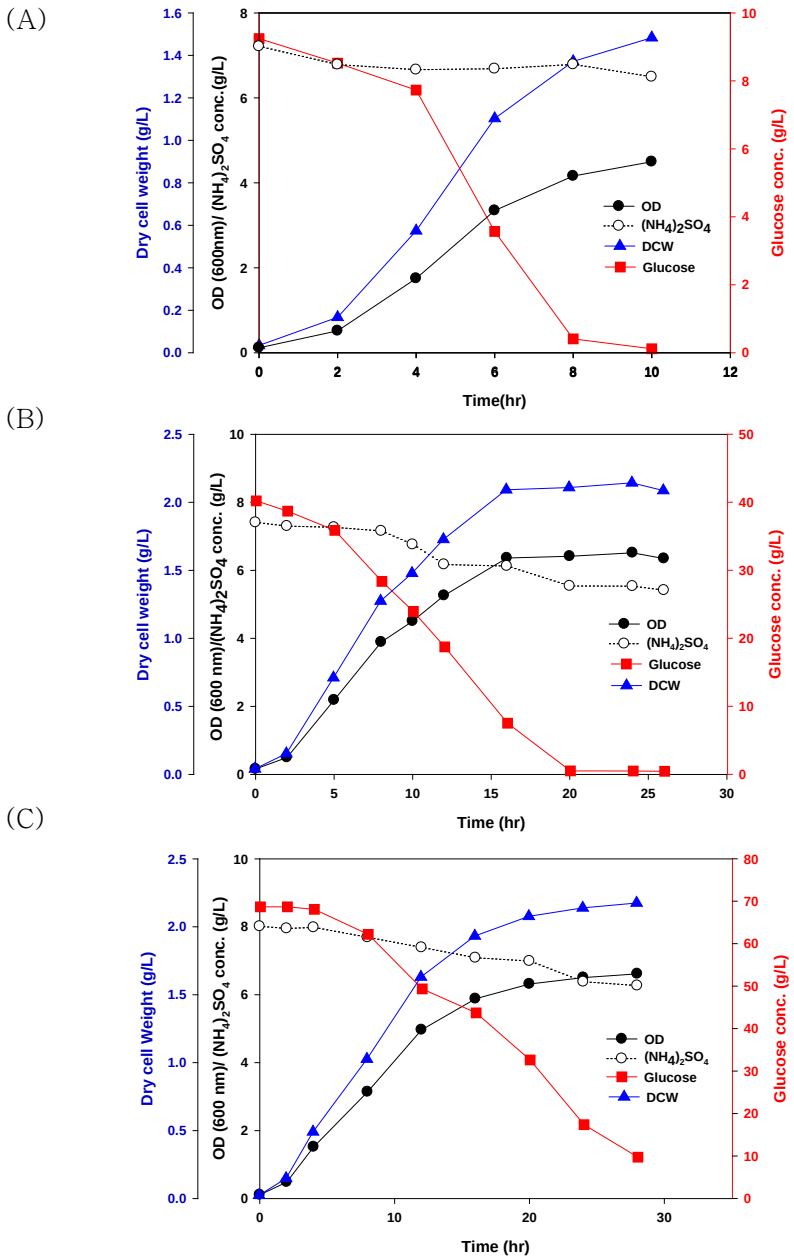


Figure 14. Effect of glucose on the growth of recombinant *E. coli*; (A) 10 g/L, (B) 40 g/L (C) 60 g/L.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

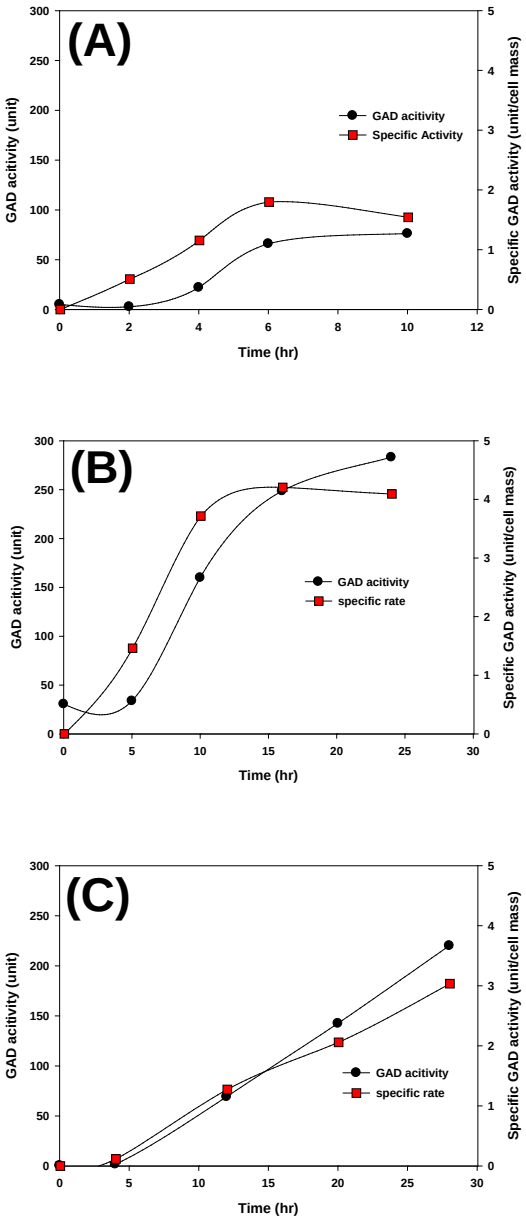


Figure 15. Effect of glucose on the total and specific activity of GAD: (A) 10 g/L, (B) 40 g/L, (C) 60 g/L.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 5. Effect of glucose concentration on the total and specific activity of GAD.

Glucose (g/L)	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
10	1.4	76.2	1.8
40	2.1	248.6	4.2
60	2.1	220.0	3.0

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.5. pH의 영향

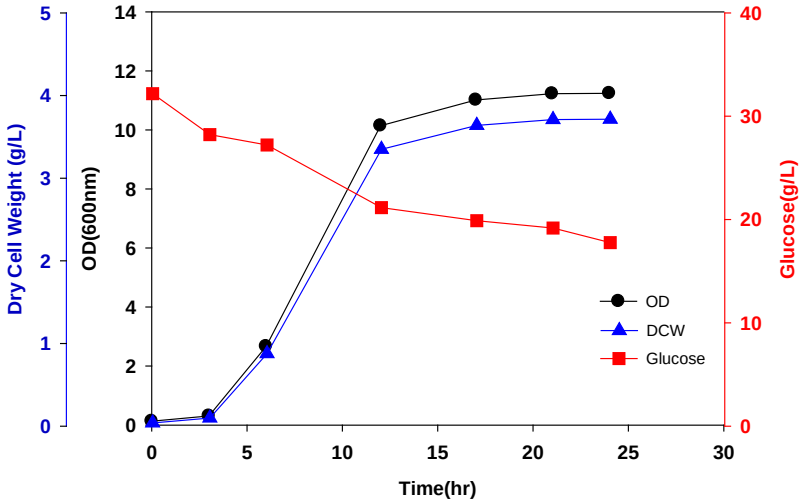
재조합 *E. coli*는 대부분 pH 7 조건에서 성장이 활발하며, 균체량 증가도 높다. 하지만 생성된 GAD의 안정성 및 최적의 pH는 5.5로 알려져 있다. 이러한 조건을 확인하기 위하여 배양 pH에 따른 균체량의 변화와 생성된 GAD의 활성분석이 필요하다.

GAD의 최적 pH 는 5.5로 *E. coli* 에서 GAD 발현을 유도하기 위해 발효조의 초기 pH를 5.5로 하였다. 온도는 37 ℃, 교반 속도는 300 rpm, aeration rate은 7 vvm으로 하였고 20시간 동안 배양 하였다. 그 결과 초기 pH를 5.5로 배양했을 때 건조 균체량은 3.7 g/L로 앞의 실험과 비슷하였으나 균체량 대비 GAD activity 와 specific GAD activity는 834.7unit 과 6.6로 aeration rate 조건 7 vvm 보다 2배 가량 증가 함으로써 pH 변화로 *E. coli* 내에서 GAD 발현이 유도 되었음을 알 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(a)



(b)

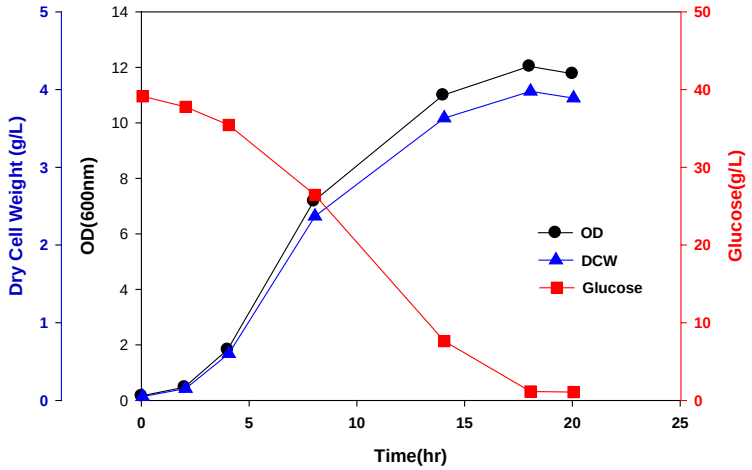
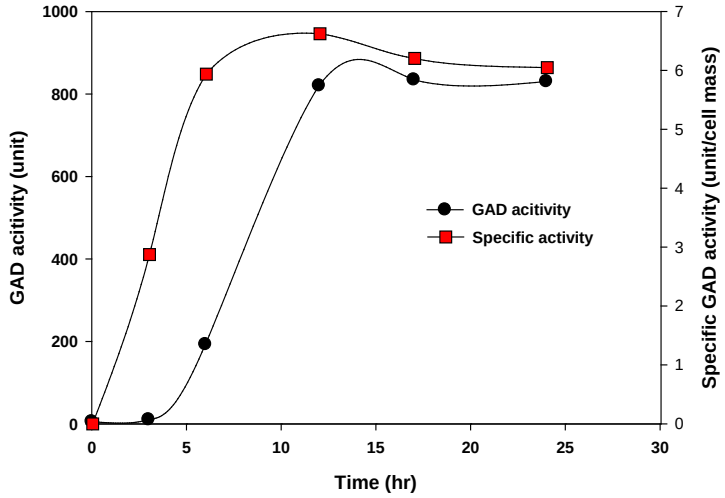


Figure 16. Effect of pH on the growth of recombinant *E. coli*: (a) pH 5.5 (b) pH 7.0.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(a)



(b)

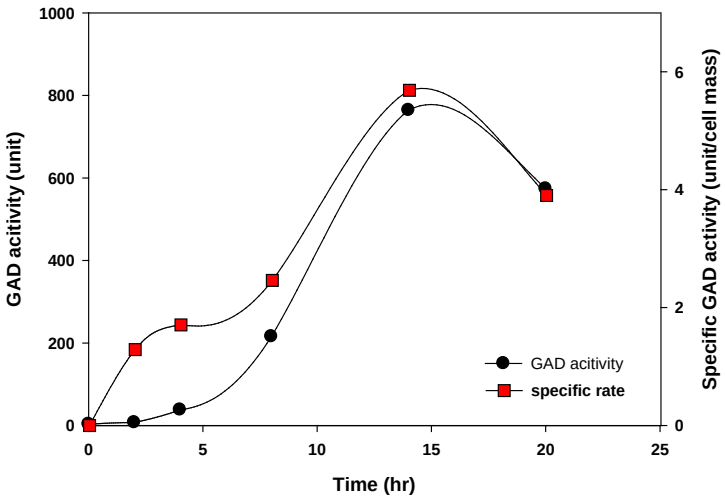


Figure 17. Effect of pH on the total and specific activity of GAD: (a) pH 5.5 (b) 7.0.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 6. Effect of pH on dry cell weight, and total and specific activity of GAD

Fermentation pH	DCW (g/L)	GAD activity (unit)	Specific GAD activity (unit /cell mass)
5.5	3.7	834.7	6.6
7	3.9	764.3	5.7

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.6. 배양조건에 따른 반응표면 분석

본 연구에서 배지의 조성중의 ammonium sulfate 와 glucose 대하여 GAD activity를 능선분석을 수행하여 반응표면을 살펴 보았다. Glucose의 경우 농도를 증가시킬수록 균체량이 증가하는 경향을 나타냈으며, ammonium sulfate의 경우 specific activity가 증가하는 경향을 나타냈다. 본 연구에서는 활성이 높은 GAD를 다량으로 생성하는 것이 목적이기에 GAD specific activity를 목적으로 하여 ammonium sulfate 와 glucose의 농도에 따른 GAD activity의 반응표면분석을 수행하였다 그 결과 GAD specific activity는 ammonium sulfate와 glucose의 농도가 증가함에 따라 점차 증가하다가 glucose 40 g/L 에서 약간 감소하였다.

독립변수는 GAD의 활성도에 영향을 주는 ammonium sulfate(X)와 glucose(Y) 2개의 요인으로 설정하였으며, 반응변수는 GAD activity로 설정하여 반응표면분석(response surface methodology, RSM)을 이용하여 분석하였다. 분석 결과값의 t-statistic에 근거하여 독립변수의 유의성을 확인한 결과 독립변수 ammonium sulfate(X)는 유의성이 인정되지 않았으나($p<0.05$), glucose(Y)의 경우 유의성이 인정되었다($p>0.05$).

본 실험값으로 얻어진 반응표면분석(RSM)을 통해 실험실 조건으로 최적의 배양 상태를 고정하여 균의 성장률과 높은 GAD activity를 얻기 위한 실험을 시행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 7. ANOVA results of GAD activity with ammonium sulfate and glucose concentration.

$$f = Y_0 + aX + bY + cX^2 + dY^2$$

	Coefficient	Std. Error	t−value	P−value
Y_0	−407.4300	28.8597	−14.1176	0.0450
a	136.3775	15.1448	9.0049	0.0704
b	16.4325	0.7346	22.3683	0.0284
c	−13.3213	1.8366	7.2533	0.0872
d	−0.1936	0.0105	−18.3633	0.0346

X(ammonium sulfate), Y(glucose)

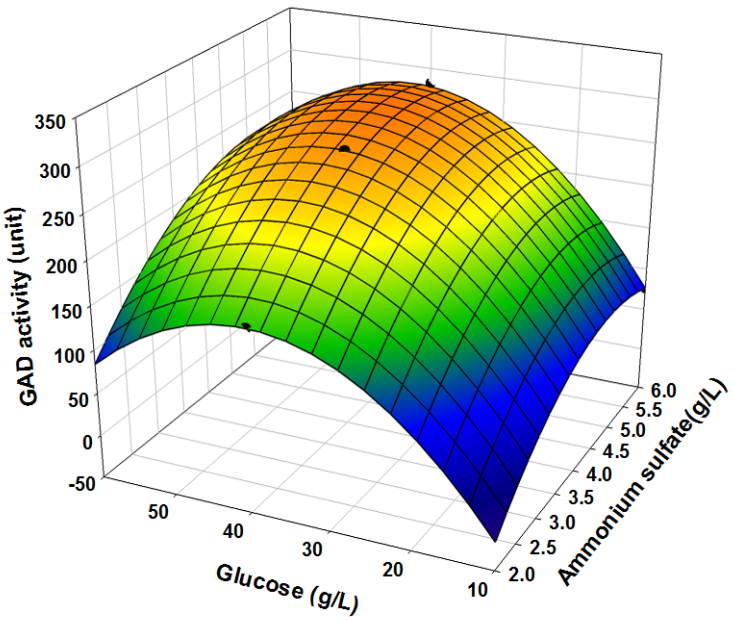


Figure 18. Response surface graph of GAD activity of recombinant *E. coli* with ammonium sulfate and glucose concentration.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅰ－4 장 결론

본 연구에서는 재조합 대장균을 이용하여 GAD 효소를 최대로 생산을 하기 위해 성장 조건을 연구하는 실험을 진행하였다. 건조 균체량이 높고 GAD activity 가 높은 균주를 생산하기 위해서는 배양에 영향을 미칠 수 있는 인자로서 질소원, 탄소원, pH 와 같은 것 들이 발효의 중요한 요인들이다. 이와 같은 요소들을 조절하여 재조합된 *E. coli* 를 배양하여 GAD 의 활성을 비교분석 하였다.

배지의 조성은glucose 40 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 6 g/L, KH_2PO_4, 3 g/L, K_2HPO_4 3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L, yeast extract 1 g/L, MSG 20 g/L 사용하였을 때 가장 건조 균체량은 2.1 g/L, GAD activity는 248.6 unit, specific GAD activity는 4.2 로 가장 높은 값을 나타내었다.

유가식 배양은 지수성장기, 정지기, 연속유가 배양을 각각 비교실험 하였다. 지수성장기, 정지기에 glucose 를 접종한 결과 비연속 발효공정보다 낮은 균체량과 GAD activity, specific GAD activity 값을 확인 하였다. 연속유가 배양의 경우 균체량, GAD activity, specific GAD activity 결과가 각각 3.7 g/L 24 hr, 337.3 unit, 6.6 으로 확인되었다.

GAD 의 최적 pH 5.5 로 *E. coli* 에서 GAD 발현을 유도하기 위해 발효조의 초기 pH 5.5 로 선정 하였다. 그 결과 건조 균체량은 위의 실험들과 비슷한 3.7 g/L 로 나타났지만 GAD activity 와 specific GAD activity 는 834.7 unit 과 6.6 으로 가장 높게 생성됨을 알 수 있었다. 이를 통해 pH 를 최적 조건으로 맞춰 주게 됨으로써 재조합 *E. coli* 안에서 GAD 가 좀더 선택적으로 생산되는 것 을 확인 할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 Ⅱ 장 GABA 생산공정 개발

Ⅱ－1 서론

1. 이론적 배경

1.1. 생체고분자(Biopolymer)

전세계적으로 높은 가격의 석유를 대신할 만한 저가 대체재 찾기에 한창이다. 대부분의 polymer 는 석유로부터 만들어내는 전구체(Precursor)를 다양한 촉매와 개시제(Initiator)를 이용한 중합반응을 통하여 만들어내고 있다[41]. 석유의 가격이 높아지고 현재 고갈의 위험이 있는 상황에서 많은 연구자들은 석유로부터 만들어내던 전구체를 만들어낼 수 있는 다양한 방법을 연구 중이다. 그 중 가장먼저 고려된 것이 천연가스나 석탄이다. 천연가스나 석탄은 가격 측면에서 매력적인 석유대체 원료이다. 하지만 석유와 마찬가지로 재생 불가능한 한정된 자원이라는 한계와 환경 문제 논란에서 벗어나기 어렵다. 물론 청정공정기술의 발전으로 환경오염 문제를 어느 정도 완화시킬 수 있으나, 궁극적으로 당면하고 있는 에너지/환경 문제에 대하여 근본적인 해결책이 되기는 어렵다[42-45]. 이에 반해 biomass 는 재생 가능할 뿐만 아니라 환경친화적이라는 두 가지 측면에서 중요한 의미를 갖는 석유대체재라고 할 수 있다. Biopolymer 란 biomass 에서 만들어진 전구체를 이용하여 만들어지는 biopolymer 로 그린플라스틱, 바이오플라스틱 이라고 불리기도 한다. Biopolymer 는 100% biomass 를 이용하여 만들어진 전구체를 이용하거나 석유화학기반의 플라스틱이 혼합된 형태도 biopolymer 라 총칭한다[46].

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

1.2. 효소반응 속도론

효소는 생명체내에서 촉매의 역할을 수행함으로써 복잡한 생명현상을 가능하게 하는 생체촉매 이다. 생명체의 유전자에서 발현되어 특정기능을 수행함으로써 생명유지를 가능하게 할 뿐만 아니라 여러 생명현상에 기여함으로써 생명활동의 근본이 되는 물질이라고 할 수 있다. 화학공학에서 촉매를 이용하는 반응의 가장 중요한 관심사가 반응속도의 평가인 것과 마찬가지로 생물공정에서 생체촉매를 이용한 반응속도의 측정도 생물공정에서 중요한 척도가 된다. 생체촉매의 속도상수 값들은 반응속도에 관한 정보 및 기질과의 친화력에 관한 정보를 제공한다[47-49].

$$S \xrightarrow{enzyme} P$$

$$S + E \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} (ES) \xrightarrow{k_2} P + E$$

S: 기질

E: 효소

P: 생성물

(ES): 효소 기질 복합체, ES 복합체

효소가 기질을 생성물로 전환시키는 반응은 효소와 기질이 만나서 순간적으로 결합을 하게 되는데 이를 효소기질복합체라고 한다. 효소기질복합체와 효소와 기질 사이는 가역적인 반응이다. 효소기질복합체를 형성한 뒤 효소가 기질의 구조를 바꾸거나 형태를 변형 시키는 등의 작업을 통하여 생성물을 형성해내고 또 다른 기질과 효소기질 복합체를 형성하는 반응을 반복적으로 수행하게 된다. 이러한 반응을 생성물의 생성 속도식으로 표현하면 다음과 같다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES]$$

여기서 ES 복합체의 시간에 따른 변화속도는 다음과 같다.

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]$$

이 식은 E 와 S 의 반응에 의한 ES 복합체의 생성, ES 의 분해에 의한 E 와 S 로의 역반응 및 ES 의 분해에 의한 E 와 P 의 생성속도를 고려한 식이다. 효소에 대한 보존식은 다음과 같다.

$$[E] = [E_0] - [ES]$$

효소 보존식에서 복합체 $[ES]$의 농도를 측정하는 것은 매우 어렵기 때문에 빠른 평형을 가정하여 $[ES]$를 대신할 표현식을 만든다. 빠른 평형 가정은 효소와 기질이 반응하여 ES 복합체를 형성하는 과정이 빠르게 도달한다는 가정이다. 정반응 속도와 역반응 속도가 동일하다고 가정하면,

$$K'_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

여기에서 $K_m{}'$ 은 Michaelis-Menten 속도상수이다.

효소가 보존된다면, $[E] = [E_0] - [ES]$이므로 위 식에 대입하면

$$[ES] = \frac{[E_0][S]}{K_m{}' + [S]}$$

위 식에 생성 속도식을 대입하게 되면,

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \frac{[E_0][S]}{K_m{}' + [S]}$$

$$V = \frac{V_m[S]}{K_m{}' + [S]} \quad , \quad V_m = k_2[E_0]$$

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

$K_m{}'$ 은 최대 반응속도의 1/2 의 속도에 해당하는 기질의 농도로써 기질과 효소의 친화도를 나타내고, $K_m{}'$ 이 작다는 것은 효소의 기질에 대한 친화도가 높다는 것을 나타낸다[50].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.3. 효소 반응기

생물체에 대한 지식이 축적되어 감에 따라 이들 생물체를 인류에 유용한 방법으로 전환 조작시키려는 노력이 급증하고 있다. 한 생물체의 유전자를 다루거나, 빨리 자라는 다른 생물체로 옮겨 발현시키는 유전자 조작기술의 발달은 이제 단순한 유전자 재조합차원을 떠나 분자생물학적 접근으로 더욱 안정하고, 활성이 강하고, 분리정제가 용이한 신 물질을 창출하는 단계에 도달하였다. 생물반응기(Bioreactor)는 생물반응기내의 세포가 탈수, 산화, 수산화, 아민화, 이성질체화 등의 반응을 일으키는 효소를 이용하여 한 물질을 다른 물질로 변환시켜 원하는 물질을 만들어 내게 된다. 이러한 생물변환은 화학적 변환 공정에 비하여 훨씬 낮은 온도에서 행하여질 수 있고 특이성이 높기 때문에 유리하다. 생산 공정에 이용되려면 많은 양의 효소가 필요하며, 효소의 반감기를 늘이기 위하여 대개 효소를 고정화시켜 사용한다. 생물반응기를 통하여 생산된 효소만을 이용하여 생물반응기 내에서 일어나는 현상을 재현하여 원하는 물질을 만들어내는 반응기가 효소반응기(Enzyme reactor)이다[51, 52].

효소반응기의 경우 효소가 세포 내에 존재할 경우 많이 이용하게 된다. 효소반응기는 세포의 성장이 모두 진행된 후 효소를 분리하여 반응을 시작하기 때문에 세포의 성장에 필요한 성분을 넣어주지 않아도 되는 장점이 있으며, 이러한 장점은 전환된 물질의 순도를 높일 수 있다. 생체내의 모든 반응이 효소에 의해 이루어지지만 공업적으로 효소법과 발효법을 선택하는 기준은 반응의 복잡성에 있다. 반응이 한, 두단계면 효소법이 쉽고 그보다 많은 반응단계가 필요하면 발효법이 일반적이다. 효소법은 반응이 간단하더라도 경우에 따라 원료가 비싼 경우에는 같은 물질을 만들어 내는데 불리한 경우가 있다. 예를 들면 페닐알라닌을 상업적으로 생산하는 경우 cinnamic aicd 에서 효소법으로 생산하는 것보다 포도당에서 발효하는 것이 경제적이다. 효소법과 발효법이 서로 경쟁하는 경우도 있지만 대부분의 경우 발효법

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

은 대사 과정을 중지시키기가 어려우므로 제품이 발효법의 최종제품이 아닌 경우는 효소만을 추출하여 효소법을 이용하는 것이 유리하다[53, 54].

효소는 한번만 사용하고 버린다면 비경제적이므로 고정화법으로 공정의 경제성을 높이는 경우가 많이 있다. 고정화를 고려하는 경우는 우선 고정화 효소가 작용을 할 수 있는 지 없는지를 먼저 판단해야 한다. 불용성기질인 starch, cellulose, pectin, protein 등 기질이 고분자인 경우 효소가 담체내에 고정화되면 기질의 크기가 커서 효소가 담지 되어 있는 세공속으로 확산되기 어렵기 때문에 반응의 효율은 많이 나빠질 것이다. 또한 효소의 가격, 안정성, 고정화 비용 등이 고려대상이 되는데 효소가 고가일수록, 안정성이 좋을수록, 고정화 비용 등이 적게 들수록 고정화가 유리하다. 고정화에 있어 고려해야만 하는 문제가 있는데, 균체에서 효소를 정제하여 고정화할지, 정제를 하지 않는다면, 부반응의 유무, 효소의 안정성에 영향이 있는지 등의 문제를 고려하여야 한다[53-55].

효소의 고정화는 일반적으로 효소의 안정성을 증가시키고, 반응생성물의 농도가 높고 품질이 일정하게 된다. 반응생성물에 의한 효소반응의 저해가 적어지는 장점이 있으며, 효소반응 공정의 관리가 쉽고 반응조건이 일정하게 유지된다. 고정화를 적절하게 하면 K_m, pH등을 유리하게 조절할 수 있다. 또한 균체를 그대로 사용하는 경우에 비해 부반응이 적으며, 고정화 효소의 회수가 용이하여 재사용이 가능하다.

효소반응기는 효소의 반응에 따라 반응기를 선정하는 기준이 있다. 효소의 반응은 (1)산소등 기체를 요구하는 효소반응, (2)조효소를 요구하는 반응, (3)불용성기질, 고분자기질 효소반응, (4)산,알카리를 생성하는 효소반응, (5)생성물, 기질저해가 있는 효소반응, (7)비수계 효소반응으로 나눌 수 있다[56-59].

(1)산소등 기체를 요구하는 효소반응의 경우는 glucose oxidase를 예로 들 수 있다. Glucose oxidase에 의 한 포도당의 산화는 포도당의 물에

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

대한 용해도가 아주 큰데 비해 공기중의 산소의 용해도는 불과 8 mg/L에 불과하고 포도당 1 M에 대해 산소가 0.5 M이나 필요하기 때문에 산소의 공급이 문제가 된다. 효소를 고정화 하는 경우에는 고정화된 입자내에 산소가 전달되어야 하기 때문에 반응효율이 더욱 더 나빠진다. 산소를 이용하는 산화반응의 경우 H_2O_2가 발생해 효소의 안정성을 저해하므로 catalase와 함께 반응시키는 것이 좋다. 용액상에 그대로 사용하거나 한외여과막에 free enzyme상태로서 사용하는 것이 산소의 전달측면에서 유리하다. 탱크형 반응기, 회전원반 반응기, 유동층 반응기, 막형 반응기 등이 이용될 수 있다.

(2)조효소를 요구하는 효소반응의 경우 ATP, NADH 등이 고가이므로 이들을 반응 후 회수하는 반응장치가 필요하다. 또 다른 방법은 효소, 기질, 조효소의 셋 중에 최소한 둘은 용액상태에 있어야 한다는 것이다. ATP, NADH, 기질은 효소에 비해 분자량이 크지 않기 때문에 한외여과막을 이용하여 고정화하더라고 ATP, NADH는 빠져나가므로 고분자사슬을 붙여서 분자량을 늘려 빠져나가지 못하도록 하고 있다. 한외여과용 막반응기나 포괄법에 의한 고정화 방법을 사용하여 유동층 반응기나 충전탑을 이용할 수가 있을 것이다.

(3)불용성기질, 고분자기질 효소반응은 기질이 불용성이거나 분자량이 아주 클 경우 고정화 하는 것은 별로 의미가 없고 효소와 기질을 반응시킨 후 연속적 혹은 회분식으로 효소만 또는 효소와 기질을 회수하는 방식이 사용된다. 연속식으로 저분자 생성물만 제거하는 것은 이론적으로는 가능하지만 한외여과막의 투과량이 농도분극현상에 의해 감소하므로 실질적으로는 크게 의미가 없다.

(4)산, 알칼리를 생성하는 효소반응에서는 glucose oxidase, penicillin acylase 를 예로 들 수 있다. 이 효소들은 반응중 산을 생산하는데, 생성된 산은 용액의 pH 를 떨어트려 효소의 활성은 물론 안정성을 저해한다. 이런 경우는 반응기 내의 농도, 생성물의 구배가 없거나 아주 적은 반응기를 사용

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

해야 한다. 탱크형 반응기, 재순한 반응기, 고정층 반응기를 사용하는 경우는 여러 개를 평행연결하여 중간에 pH 를 조절할 수 있도록 하며 고정층 반응기를 제외한 모든 반응기를 사용할 수 있다.

(5)생성물, 기질저해 효소반응은 기질의 농도를 낮게 하는 탱크형 완전 혼합조가 유리하다. 혹은 충전탑을 사용하는 경우에는 생성물을 재순환하여 사용한다. 생성물이 효소반응을 저해하는 경우에는 생성물이 반응하여 생기는 대로 가능한 빠르게 제거하여 반응계의 생성물의 농도를 낮추어 주어야 한다.

(6)비수계의 효소반응은 물에 불용성인 기질, 즉 지방질의 lipase 에 의한 분해반응등이 있다. 이 반응은 지방질이 잘 녹는 용매를 사용하는 데 reverse micelle 을 이용하거나 막반응기를 사용한다[56, 60-64].

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 국내외 연구동향

국내외의 많은 연구자들은 biopolymer 의 생산을 위한 연구를 진행하고 있다. 연구자들은 재생 가능한 식물자원으로부터 여러 산업재를 생산하는 기술을 개발하기 위하여 많은 연구를 진행 중이다. 재생 가능한 원재료는 영양적인 목적 이외에 사용되는 농업 및 임업분야에서 유도된 제품으로 정의된다. 탄수화물로 구성되는 바이오매스는 보통 석유, 천연가스나 탄화수소로 제조되는 제품의 생산에 사용될 수 있다. 재생 가능 원재료로 사용될 수 있다. 재생 가능 원재료로 사용된 수 있는 바이오매스 재료에는 농산잔여물, 바이오매스용으로 특별히 재배된 작물, 종이, 목재폐기물 등이 포함된다. 이러한 바이오매스 원료는 그 성분을 고려하여 전분[65, 66], 리그노셀룰로스 바이오매스[67-69], 식물유[70-72]와 단백질[73-75]로 분류할 수 있다.

재생 가능 원재료는 polymer 또는 monomer 및 폴리머 합성에 유용한 화합물로 전환된다. 이러한 연구는 다음과 같이 진행되고 있다. 옥수수는 폴리머 제조에 상업적으로 처음 사용된 작물이며, 이 공정은 Cargil Dow 에 의해 상업화 된 것으로 “NatureWorks”라는 상표로 옥수수에서 PLA 를 제조하였다. 제조 방법은 수확된 옥수수를 분쇄한 뒤 수증기로 122℃에서 30~40 시간 가열하여 팽윤, 연화시킨다. 옥수수 혼합물을 기계 연마 후에 여과하여 전분을 분리한 후 사탕으로 전환시킨다. 사탕은 미생물 발효를 통해 젖산으로 전환되며 젖산분자는 결합하여 락티드 모노머로 불리는 고리화합물을 형성한다. 락티드 고리는 개환되고 결합하여 폴리젖산 폴리머의 긴 사슬을 형성한다. 이 플라스틱은 펠릿으로 만들어 포장 및 섬유 들을 포함하는 여러 제품제조에 사용된다.

Starch 의 1,3-propanediol 의 전환은 생화학 경로의 대사기술을 사용하는 발효기술에 의해 생성된 전분과 전분 바이오매스로부터 나오는 당을 사용하여 1,3-propanediol 을 생산하는 미생물이 설계되었다. 이 방법에서는 탄소기재와 접촉하는 탈수효소가 포함된 미생물을 첨가하며, 1,3-

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

propanediol 은 성장매체에서 분리한다. 1,3-Propanediol 은 terephthalic acid 와 함께 PTT 의 생산에 사용된다. PTT 는 신축성 회복의 특수 성질을 가진 폴리머로 의류, 커버, 특수수지등에 사용된다. 헤미셀룰로스에서 furfural 생산은 furfural 과 그 유도체의 생산은 헤미셀룰로스를 강산을 이용하여 pentose 로 가수분해 후 furfural 로 고리화 된다. 고압의 수증기로 온도를 조정하면, furfural 은 수증기로 증류하여 분리할 수 있다. 이렇게 분리된 furfural 을 이용하여 furan derivatives 를 제조하여 biopolymer 를 제조한다. Ethylene 은 가장 중요한 석유화학에서 얻어지는 화합물이다. 바이오매스로부터 생산되는 에탄올을 사용하여 ethylene 을 생산할 수 있으나, 아직은 석유로부터 얻어지는 ethylene 에 비해 가격 경쟁력은 없다. 리그닌에서 방향족 생산에 이용되는 저분자량(LMW)리그닌은 새로운 원료로 가능성이 있다. LMW 리그닌은 에탄올, 아세톤 등의 일반 유기용제에 가용성이므로, 쉽게 구조적인 변환이 가능하다. 피마자유를 기반으로 하는 생분해성 폴리우레탄은 식물유 중에서 피마자유가 값이 싸고 독성이 적다는 특징에서 접근하여 이루어진 연구이다. 피마자유의 주성분인 ricinoleic acid 는 수산기 함유 유지산으로 추가수식없이 폴리우레탄 제조용 원료로 직접 사용될 수 있다. 미생물로부터 PHB 를 생산하는 기술은 Alcaligenes eutrophus 와 같은 종의 특성을 이용한 것으로 전체세포 질량의 90%를 PHB 로 이루어진 세포로 PHB 는 2 차 대사산물로 세포가 생성하는 것으로 세포내에 축적하는 특징을 가진다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ－2 실험 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

본 실험에 사용한 HCl, PLP(Pyridoxal-5'-phosphate), MSG(Monosodium glutamate)은 Sigma 사로부터 구입하여 사용하였으며, GAD(glutamate decarboxylase)는 공동연구를 진행한 광운대학교에서 분양 받은 recombinant *E. coli* 로부터 분리하여 실험을 수행하였다.

2. 효소 반응기

본 실험에서는 biopolymer 생산에 적합한 단량체를 생산하기 위하여 반응기를 제작하였다. 반응기는 유리재질로 이중자켓 반응조의 형태를 취하고 있으며, 온도조절은 항온순환조를 이용하여 조절하였다. 반응기의 교반은 막대자석을 이용하여 교반하였다.

2.1. pH 조절이 가능한 반응기

본 실험에서는 pH 조절이 가능한 반응기를 제작하였다. 반응기의 반응조는 유리재질로 이루어진 이중 자켓구조를 가지고 있으며, pH 의 측정은 pH sensor 를 이용하여 측정하였다. 측정된 pH 는 pH control box 로 결과를 입력하고 설정된 pH 값보다 높아지면 정량펌프의 전원이 작동하도록 설계하였다. 정량펌프는 acid bottle 과 연결되어 전원이 들어오면 일정시간동안 acid bottle 로부터 enzyme reactor 에 일정농도의 acid 를 주입하도록 설계하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

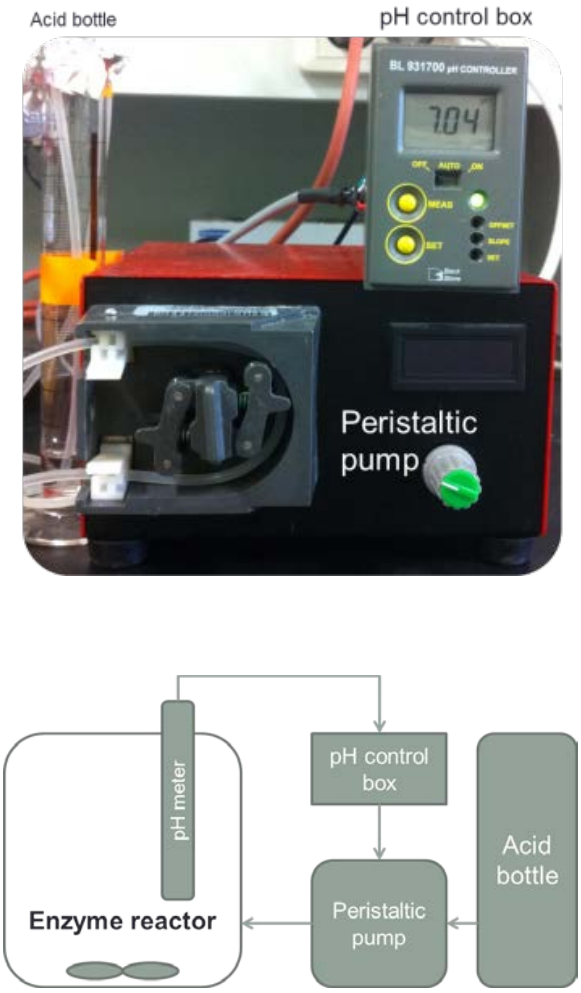


Figure 19. Schematic representation and photograph of continuous control pH system used for GAD reaction.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.2. 기포탑 반응기(Bubble column reactor)

본 실험에서는 biopolymer 생산에 적합한 단량체를 생산하기 위하여 bubble column reactor 를 제작하였다. Bubble column reactor 는 반응기 부피 2L 의 유리재질의 bottle 을 이용하였으며, 반응기의 dead zone 을 줄이기 위하여 하단을 곡선으로 처리하였으며, 반응기의 교반은 air circulation 을 이용하였다. 온도 조절은 반응기 내부에 안정적인 온도조절을 위하여 water circulator 를 이용하여 온도조절을 하였다. pH 조절을 위한 HCl 의 주입은 반응기 내부의 교반을 위한 aeration 주입에 정량펌프를 이용하여 주입하였다. pH 의 control 은 설정 pH 값보다 반응계의 pH 가 높아질 경우에 정량펌프를 작동하여 acid 를 주입하고 설정값 이하로 떨어지면 정량펌프의 작동을 정지하는 방법을 선택하여 반응계를 설정값 이하로 반응할 수 있도록 디자인 하였다. Air circulation 의 속도는 반응기의 pH 를 제어하기 위하여 사용되는 HCl 의 확산에 적합하고 반응기내의 효소 stress 를 줄일 수 있는 bubbly flow 가 형성되는 범위에서 실험을 수행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

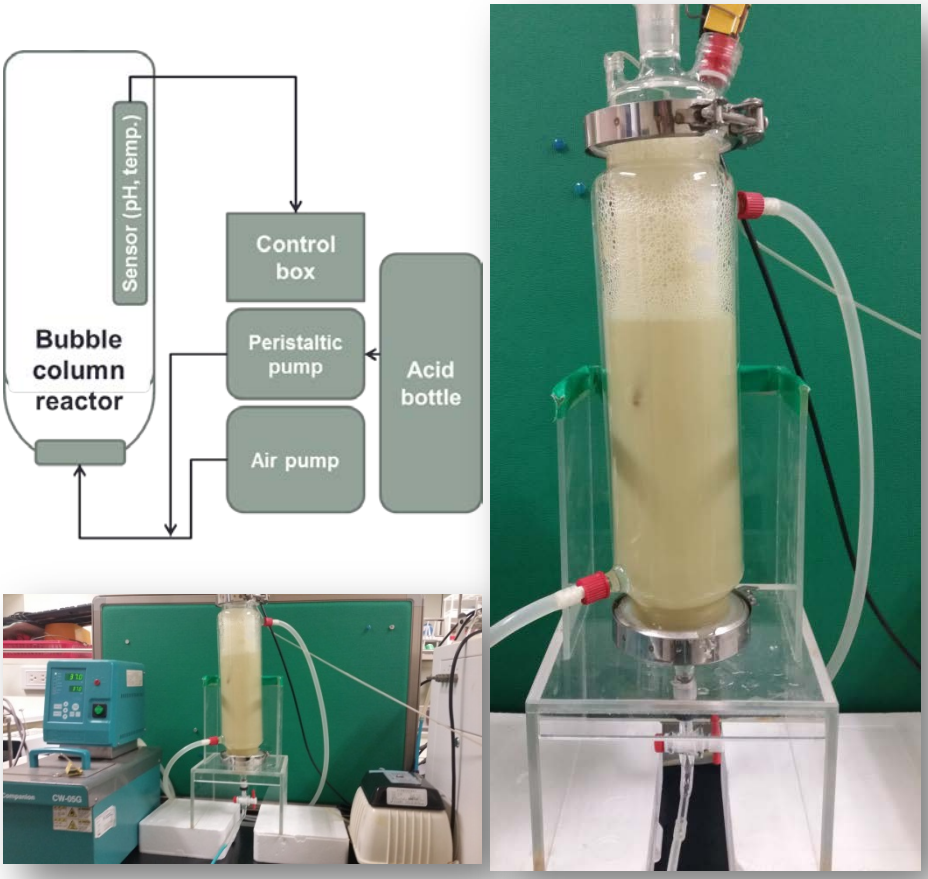


Figure 20. Schematic representation and photograph of bubble column reactor used for GAD reaction.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ－3 실험결과

1. GAD 반응 특성

1.1. MSG 농도 변화에 따른 GABA 생산특성

효소전환반응은 기질의 농도, pH, 온도에 따라 활성의 차이가 크다. 기질의 농도가 과도하게 높을 경우 기질저해로 인하여 생성물이 생성되는 시간이 길어지며, 생성된 생성물의 농도도 현저하게 낮아진다. 단위시간당 생성물의 생성을 극대화하기 위해서는 효소반응에 적합한 기질의 농도를 선정하여야만 한다. 본 연구에서는 단위시간당 생성물(GABA)의 생산량을 높이기 위하여 수용액에 용해도가 높은 MSG 를 기질로 선정하였다. L-Glutamate 의 경우 수용액에 용해도가 25℃ 에서 8.64 g/L 인데 비해 MSG 는 740 g/L 로 80 배 이상 용해도가 높다. MSG 의 용해도는 몰농도로 전환했을 경우 4 M 에 육박하는 농도로 매우 고농도이다. MSG 와 GAD 의 기질저해를 확인하기 위하여 초기 MSG 의 농도에 따라 생성되는 GABA 의 농도를 확인하였다. 그 결과 초기농도가 100 mM 일 때 30 시간에 16 mM 의 GABA 가 생성되었으며, 100 mM 이상의 농도에서는 기질저해로 인하여 현저하게 생성되는 GABA 의 농도가 낮아짐을 확인할 수 있었다. 초기의 반응은 PLP 에 의해서 반응계의 색이 밝은 노란색이지만, 반응이 종결된 이후에는 반응계의 색이 변하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 반응계의 pH 역시 buffer solution 에서 반응이 진행되었음에도 불구하고 pH 7 이상으로 상승한 것을 확인할 수 있었다.

GAD의 전환반응은 PLP를 cofactor로 glutamate를 decarboxylation시켜서 GABA를 생성하는 반응 decarboxylation반응은 H^+이온을 소비하는 반응으로 알려져 있다. Decarboxylation이 진행되는 동안 H^+이온을 소비하기 때문에 반응이 진행되는 반응 계의 pH가 변하게 되고 이에 따라서 효소

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

의 활성이 저해를 받게 된다. 또한 pH의 변화에 의해 cofactor로 이용되는 PLP도 변형을 나타내서 일어나는 결과인 것으로 예측된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.2. Cofactor 농도 변화에 따른 GABA 생산

반응 계의 pH 변화에 따른 PLP 의 변화를 확인하기 위하여 UV-vis spectrophotometer 를 이용하여 PLP 의 spectra 를 확인하였다. 그 결과 389 nm 에서 최대 흡광도값을 나타내는 spectrum 을 확인하였으며, 농도에 따른 spectrum 을 측정한 결과 389 nm 에서 정량이 가능함을 확인할 수 있었다.

효소반응이 진행되면서 반응 계의 pH 가 변화함에 따른 PLP 의 변화를 확인하기 위하여 PLP 의 pH 에 따른 spectrum 을 비교하였다. 반응에서 고려할 수 있는 범위인 pH 4 에서 pH 10 의 PLP 변화를 비교해본 결과 pH 가 상승함에 따라서 PLP 의 최대 흡광도값을 나타내는 389 nm 의 peak 이 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 상승하는 PLP 의 peak 은 350 nm 에서 교차점을 이루면서 330 nm 근처에 존재하는 peak 이 사라지는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 pH 에 의해 PLP 의 상태가 변한다는 것을 확인할 수 있는 간접적인 결과이다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

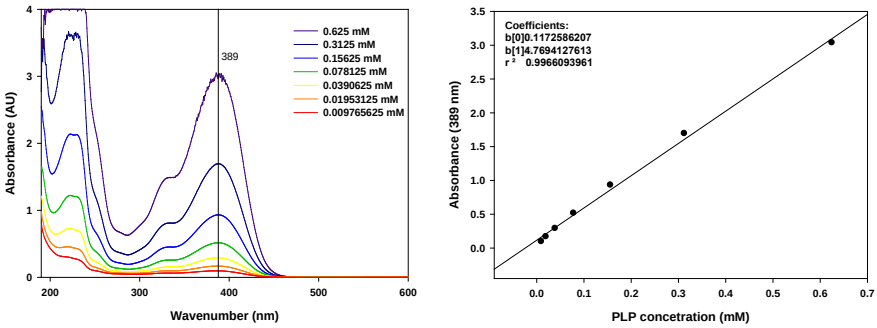


Figure 21. UV-vis spectra of pyridoxal-5' -phosphate, and standard curve in buffer solution(pH 7).

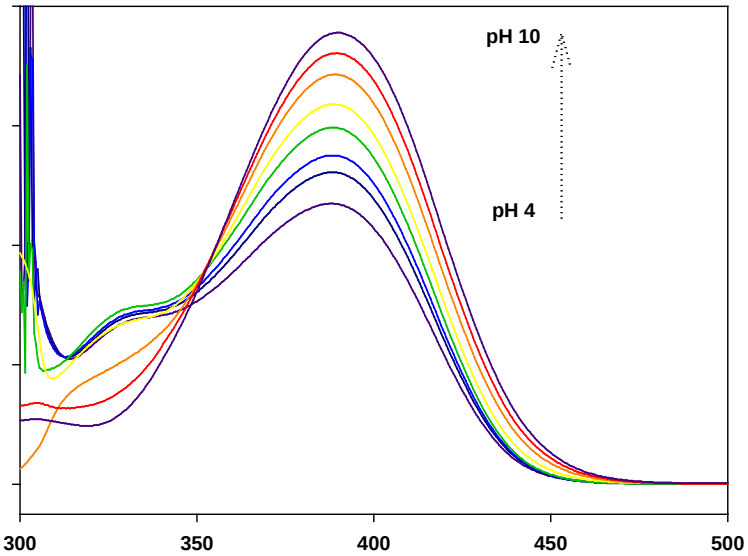


Figure 22. UV-vis spectra of PLP according to pH.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

효소반응 계 내에서 PLP 의 변화를 확인하기 위하여 반응액을 시간에 따라서 비교분석 하였다. 그 결과 효소반응액의 최대흡광도값을 나타내는 파장은 410 nm 로 나타났다. 이는 PLP 와 효소와의 결합에 의한 peak shift 로 시간이 지남에 따라 peak 이 점차 감소하는 현상을 확인하였다. 그러나 이와는 반대로 330 nm 근처의 peak 은 반응이 진행되는 8 시간동안 상승하다가 19 시간이 지난 후에는 조금씩 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 현상으로 볼 때 PLP 가 반응이 진행되는 8 시간동안은 pH 변화에 의해 상태가 변화하는 것으로 생각된다. 형태가 변한 PLP 가 GAD 의 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 PLP 의 농도에 따라서 반응을 진행하며 반응시간에 따른 GABA 의 농도를 정량 하였다. PLP 의 농도가 높으면 pH 에 의한 상태 변화가 상대적으로 느리게 진행되며, 농도에 따른 결과로 상태가 변한 PLP 와 GAD 의 활성을 간접적으로 유추해볼 수 있다. PLP 의 농도는 10 mM 부터 2 배씩 희석하여 0.625 mM 까지 비교하였다. 그 결과 반응 초기 15 시간까지는 PLP 농도에 따른 상승효과는 크게 나타나지 않았지만 15 시간 이 경과한 뒤에는 PLP 의 농도가 증가함에 따라 생성되는 GABA 의 농도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 GAD 반응에 cofactor 로 사용되는 PLP 는 pH 에 의해 상태가 변화하며, 상태가 변화한 PLP 는 GAD 반응에 관여하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 15 시간 이전에 상승효과가 크게 나타나지 않는 이유는 PLP 의 농도가 GAD 의 activity 에는 관여하지 않고, 일정량의 이상의 존재만이 필요하기 때문인 것으로 여겨진다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

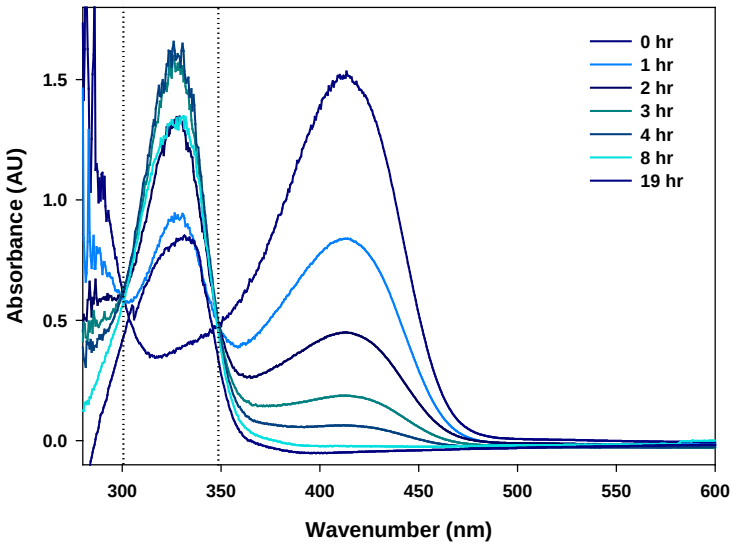


Figure 23. UV-vis spectra of the GAD reaction with time.

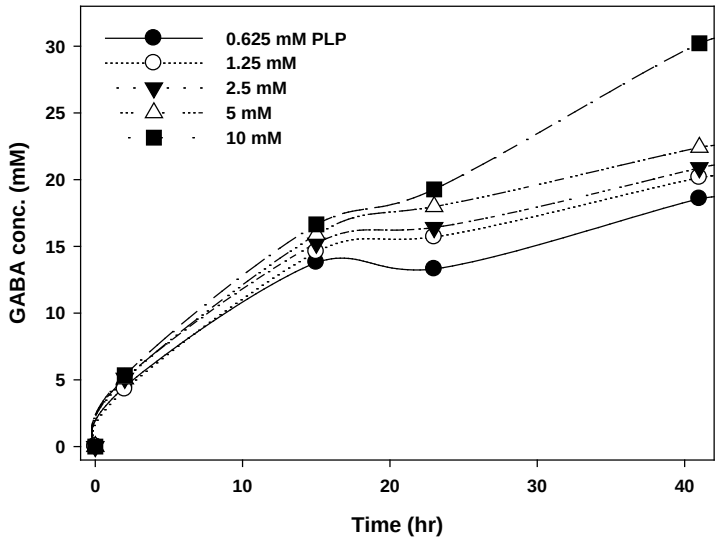


Figure 24. Effect of rising to conversion according to increasing PLP concentration on GABA production(pH 7, 37℃).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

1.3. 효소반응 pH 변화에 따른 GABA 생산 특성

단위시간당 높은 농도의 GABA를 생산하기 위하여 GAD반응의 pH를 조절하기 위하여 실험을 수행하였다. 대부분의 효소반응이 buffer solution 상태에서 진행되는 이유는 buffer solution이 pH변화에 대응할 수 있기 때문에 사용된다. 그러나 본 연구에서 실험하는 반응 계는 buffer solution의 buffer작용의 허용범위를 넘어서기 때문에 GAD의 최적 pH범위를 유지하기 위해서는 외부로부터 H^+의 도입이 필요하다. 본 연구에서는 H^+이온을 반응계에 도입하기 위하여 가장 많이 이용되는 hydrogen chloride를 이용하였다. 강산의 경우 효소의 구조붕괴를 일으키기 때문에 산의 농도를 반응에 적합하게 희석하여 실험을 수행하였으며, pH상승되어 GAD의 활성이 떨어지는 시점에서 hydrogen chloride를 넣어주었다. 대조군으로 PLP를 넣어서 반응을 진행하였으며, hydrogen chloride에 PLP를 녹여서 hydrogen chloride와 PLP의 중첩효과에 대해서도 조사하였다.

그 결과 3 시간에 1 ml 의 전체부피에 2 M 의 HCl 을 0.2 ml 넣어주었을 때, 넣어주지 않은 대조군에 비하여 생성된 GABA 의 농도가 반응시간이 10 시간이 지났을 때 3 배 높은 600 mM 로 분석되었다. PLP 와 HCl 을 동시에 넣어준 반응기의 경우 10 시간에 780 mM 의 GABA 가 분석되었다. 3 시간 까지의 각각 반응기의 농도는 큰 차이가 없이 비슷하였으나, 3 시간 이후부터 반응기간의 GABA 농도의 차이가 커지기 시작했다. 반응기에 PLP 만 넣어준 반응기는 control 군보다 조금 높은 210 mM 이 전환되었으며, control 군은 195 mM 의 GABA 가 분석되었다. 초기 MSG 의 농도가 1 M 임을 감안한다면, 최대 전환률이 80%에 도달한 결과이며, PLP 와 pH 의 상태가 GAD 의 전환공정에 관여하는 바가 크다는 것을 입증한 실험결과이다.

GABA 전환률의 증진을 위하여 3 시간 간격으로 HCl 과 PLP 를 추가적으로 넣어주었으며, 최종 GABA 의 농도를 높이기 위하여 HCl, PLP 그리고 MSG 를 동시에 넣어주며 반응기의 시간에 따른 GABA 의 농도를 분석하였

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

다. 그 결과 14 시간이 지난 후에 HCl 과 PLP 를 넣어준 반응기에서 90%이상의 전환률을 확인하였다. MSG 를 함께 첨가해준 반응기에서는 초기에 생성된 GABA 의 농도는 높았으나, 시간이 지남에 따른 생성속도가 현저하게 줄어들면서 14 시간째 990 mM 의 GABA 를 전환시켰다. MSG 를 추가적으로 넣어준 반응기가 HCl 과 PLP 만 넣어준 반응기보다 전환된 GABA 의 농도는 높았으나, 반응기내에 미 반응한 MSG 의 농도가 높기 때문에 순도 높은 GABA 를 생성하는 공정에는 적합하지 않다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

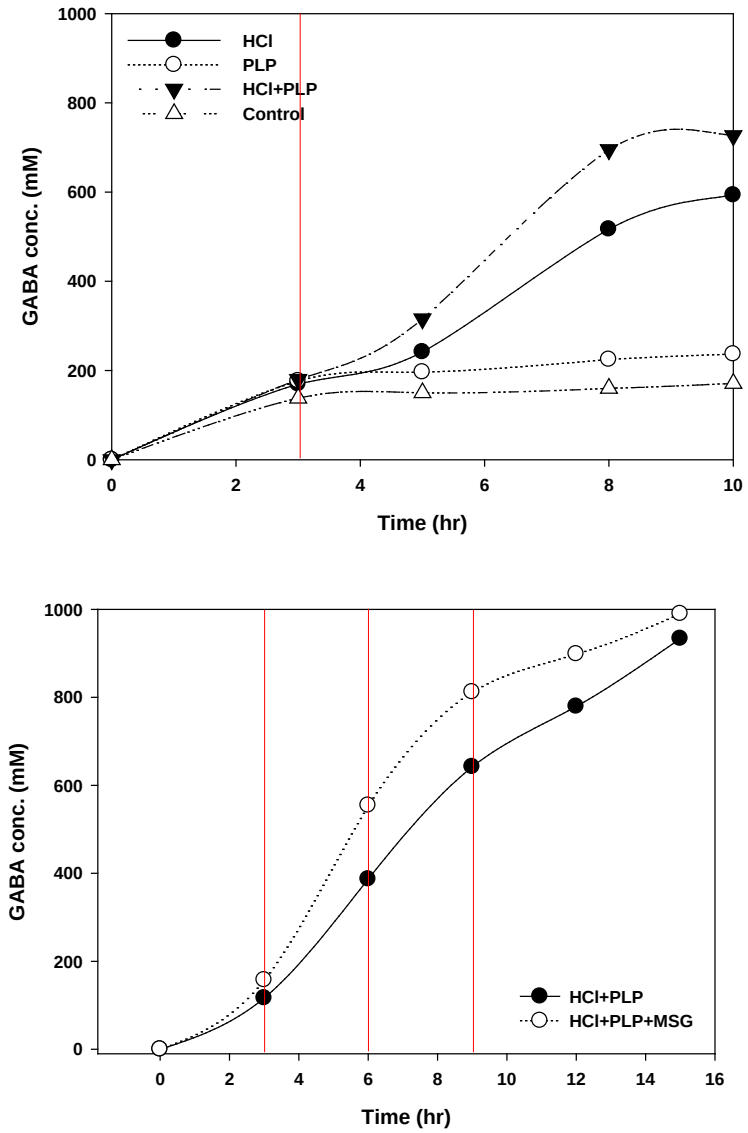


Figure 25. Effect of HCl, PLP and MSG on GABA production. Inoculation volume was 20 % of reaction volume. Inoculation materials were used 2 M HCl, 5 mM PLP, 100 mM MSG.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

1.4. 결정형 GABA의 생산

GAD 반응을 통하여 생성된 GABA 를 회수하기 위하여 효소액을 동결건조 하여 분말을 얻었다. 동결건조는 총 반응시간 15 시간동안 3 시간에 한번씩 HCl 과 PLP 를 첨가해준 (A) 반응과 3 시간에 한번씩 HCl 만 첨가한 (B) 반응 그리고 마지막으로 HCl, PLP, MSG 를 첨가한 (C)반응을 각각 동결 건조하여 결정형 GABA 를 얻었다. (A),(B),(C), 반응의 최종 GABA 의 농도는 각각 0.9, 0.8, 1.0 M 로 분석되었으며, MSG 의 농도는 0.1, 0.2, 1.0 M 로 분석되었다. 반응이 종결된 각각의 (A), (B), (C)는 100℃에서 10 분간 가열하여 효소 및 불필요한 단백질은 불활성화 시키고, 원심분리 하여 불순물을 제거한 뒤 동결건조 하였다. 최종 MSG 와 GABA 의 농도로 미루어 동결건조 분말의 무게를 예측하여본 결과 (A), (B), (C)각각의 이론적 무게는, 0.108, 0.112, 0.250 g 으로 예측되었다. 실제 동결건조된 분말의 무게를 측정한 결과 예측값 보다 모두 높게 나왔다. 이는 효소의 안정성을 높이기 위하여 사용한 buffer 로부터 형성된 염에 의한 결과로 예측된다.

Table 8. Effect of additives on the freeze-drying weight: (A)added HCl with PLP, (B)added HCl, (C)added HCl, PLP and MSG

	(A)	(B)	(C)
Theoretical weight (mg)	107.521	111.922	250.25
Actual weight (mg)	127.00	135.20	281.40

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

동결건조 결과 각기 다른 첨가제를 이용한 (A), (B), (C)반응 모두 buffer solution 에 의한 염으로 이론적인 무게보다 더 많은 분말을 얻었다. 각기 다른 첨가제를 넣은 반응의 동결건조 결과물은 가시적으로도 확연히 다른 성향이 나타났다. (A) 반응의 경우 노란색의 점성이 있는 분말을 얻었으며, (B) 반응의 경우 흰색의 점성 분말을 얻을 수 있었다. (C) 반응은 흰색의 점성이 없는 분말이 동결건조의 결과물로 나타났다. (A) 반응의 경우 첨가제가 HCl 과 PLP 로 전환반응은 거의 90%에 달하는 높은 전환율이 나타난 반응이다. 분말의 성분도 GABA 가 90% 이상을 차지하였다. 그러나 분말이 노란색을 나타내는데 이는 PLP 가 과량으로 들어가서 분말에 PLP 가 나타나는 것으로 생각된다. 분말의 점성은 GABA 의 특징으로 상온에서 약간의 점성을 띄는 GABA 의 특징과 일치하는 결과이다. (B)는 HCl 만을 넣어주었기 때문에 전환률은 대략 80%로 PLP 를 과량으로 넣어준 반응기보다 전환률은 다소 낮았지만, HCl 만을 이용하여 pH 를 조정하였기 때문에 백색의 약간의 점성이 있는 분말을 얻을 수 있었다. (C) 반응은 최종 반응물에 존재하는 GABA 의 농도는 1 M 로 가장 높았으나, 미 반응 MSG 도 1 M 이 존재하기 때문에 건조된 무게도 가장 높았으며, 점성을 띄지 않는 백색의 분말을 얻을 수 있었다.

Biopolymer 합성은 polymerization 이 원활하게 일어나기 위해서는 전구체의 순도와 농도가 중요하다. 이러한 이유로 biopolymer 합성을 위한 GAD 의 반응은 저 농도의 buffer solution 을 이용하여 반응을 진행하거나, 염이 배제된 조건에서 HCl 만을 이용하여 pH 를 조절하는 것이 적합하다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

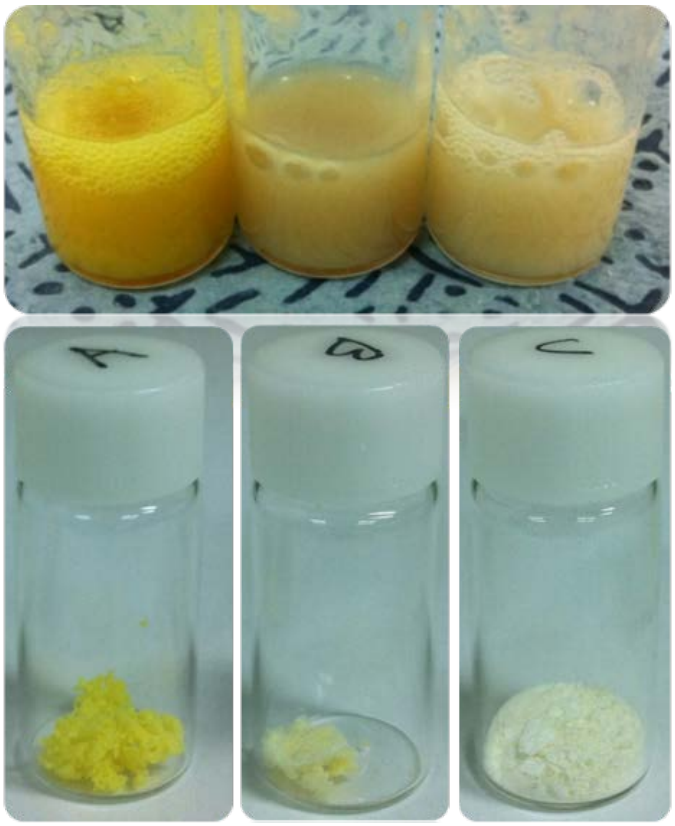


Figure 26. Effect of additives on GAD reaction products: (A) pyridoxal-5' -phosphate and HCl, (B) HCl, (C) monosodium glutamate and HCl.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.5. 연속식 pH제어 반응기의 반응조건확립

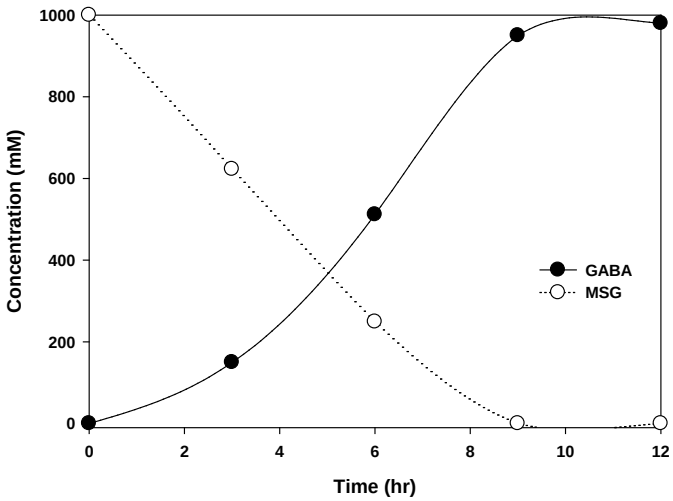
고농도의 GABA 생산을 위한 실험결과 HCl 과 PLP 를 3 시간 간격으로 넣어줌으로써 1 M 의 MSG 를 15 시간에 1 M 의 GABA 로 전환되는 것을 확인하였다. 이러한 실험결과는 현장에서 적용 가능한 범위로 반응크기를 증가시키기 위하여 단계적으로 실험을 수행하였다. 반응 부피를 50 ml, 100 ml 로 순차적으로 증가시켰으며, 기질, 효소, 조효소 및 시간별 첨가한 HCl 과 PLP 의 농도 및 부피는 동일한 비율로 적용하여 실험하였다.

50 ml, 100 ml 로 GAD 의 반응 부피를 증가시켜 반응시키면서 시간에 따른 MSG 와 GABA 의 농도를 확인한 결과 두 반응모두 9 시간에서 MSG 가 모두 GABA 로 전환된 것을 확인할 수 있었다. 반응기의 부피를 증가시켜도 반응이 동일하게 진행됨을 확인하여 산업적인 생산이 가능함을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

(A)



(B)

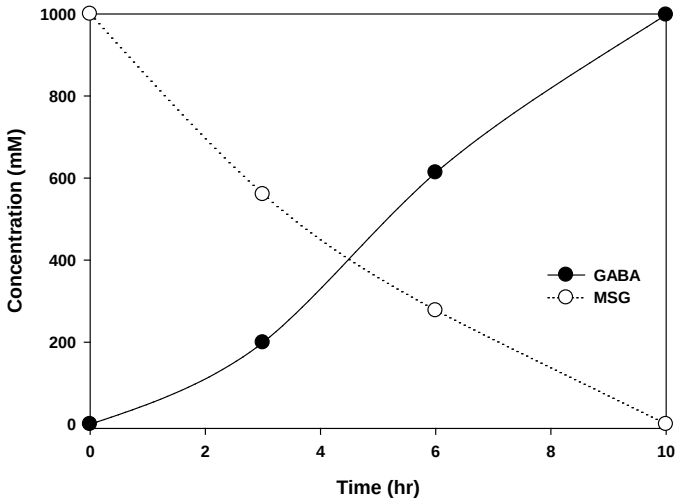


Figure 27. Scale up test of GAD reaction; (A) 50 ml, (B) 100 ml.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

GABA 의 생산 후 동결건조를 통하여 얻어진 분말에는 상당량의 염이 포함되어 있다. 이러한 염은 효소반응에서 필수적으로 사용되는 buffer 에 의해서 생성된다. 효소반응에서 buffer 를 사용하는 이유는 pH 의 변화에 민감한 효소의 안정성을 유지하기 위함이며, GAD 반응처럼 pH 의 조절이 필요한 반응의 경우 buffer 의 농도는 더 높아질 필요성이 있다. 이러한 buffer 농도의 상승은 자연히 염의 증가로 이어진다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 buffer 의 양을 줄이고, pH 조절을 3 시간 간격 HCl 을 첨가해주는 방법 대신에 자동으로 일정농도의 pH 를 유지해주는 자동화 장치를 도입하여 pH 에 따른 GABA 의 생산성을 확인하였다. MSG 가 pH 4.5 이하에서 석출이 일어나는 현상 때문에 pH 의 자동조절 범위는 석출이 일어나지 않는 범위에서 선정하였다. pH 의 자동조절은 pH 4.5, 5.5, 6.0, 6.5 에서 각각 실험하였으며, 동일한 농도의 HCl 을 사용하여 실험하였다. 그 결과 pH 6 이외의 실험군에서 12 시간 이후부터는 GABA 의 생성량이 현저하게 줄어들었으며, 각각의 12 시간 동안 생성된 GABA 의 농도는 최대 90, 110, 380, 50 mM 로 확인되었다. 자동조절 pH 별 실험결과를 비교해볼 때 pH 6.0 에서의 생산량이 가장 뛰어났으며, pH 가 낮아질수록 GABA 의 생성량은 줄어드는 경향성을 나타냈다. GAD 반응의 pH 별 시간당 생산성을 비교하여 보면, 초기 1 시간에서 pH 5 조건이 가장 높은 생산성을 나타냈으며, 이 후 시간이 지나면서 pH 4.5, 5, 6 모두 생산성이 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 반응이 한 시간째 pH 4.5 에서 생산성이 가장 높았으나, 마지막 생성된 GABA 의 양은 pH 6 으로 조정된 반응에서 가장 많은 GABA 가 생산된 것을 확인하였다. GAD 의 기본정보에서도 최적 pH 가 5.5 로 나타나 있으나 pH 6 에서 가장 많은 GABA 가 생성된 이유는 반응계의 부피가 증가함에 따른 결과이다. 반응계가 커졌으나 HCl 의 주입형태는 동일하다. 이러한 결과는 반응계에 주입해준 HCl 이 반응계에 확산되어 homogeneous phase 에 도달하는 시간이 증가하게 된다. 이러한 이유로 HCl 에 노출되는 효소의 양이 증가하

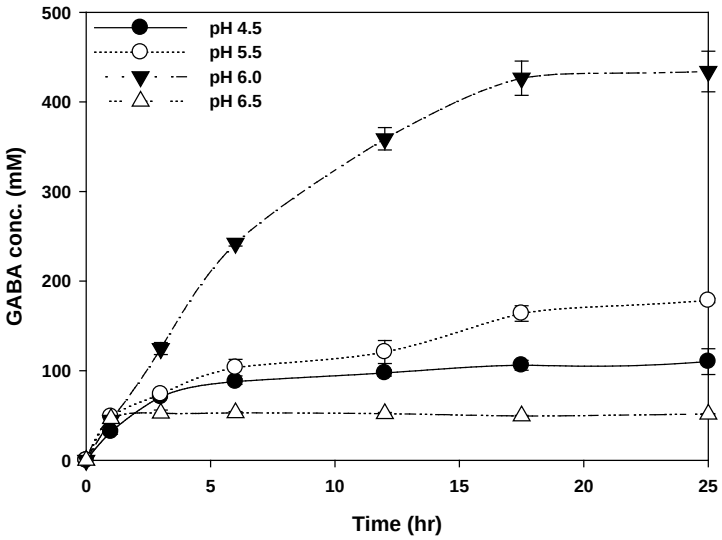
Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

게 되고 효소의 빠른 구조적인 붕괴를 유발한다. 이러한 이유로 시간이 경과함에 따라 생산성이 pH 4.5, 5 보다 감소하는 결과가 나타나게 되었다. pH 6.5 의 반응은 GAD 반응이 2 시간 이후부터 더 이상 진행되지 않은 것으로 생각된다. 본 연구에서는 GABA 의 생산에 적합한 조건을 pH 6 으로 선정하여 다음 실험을 진행하였으며, 제어에 사용한 HCl 농도에 따른 생산성을 확인하는 실험을 수행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



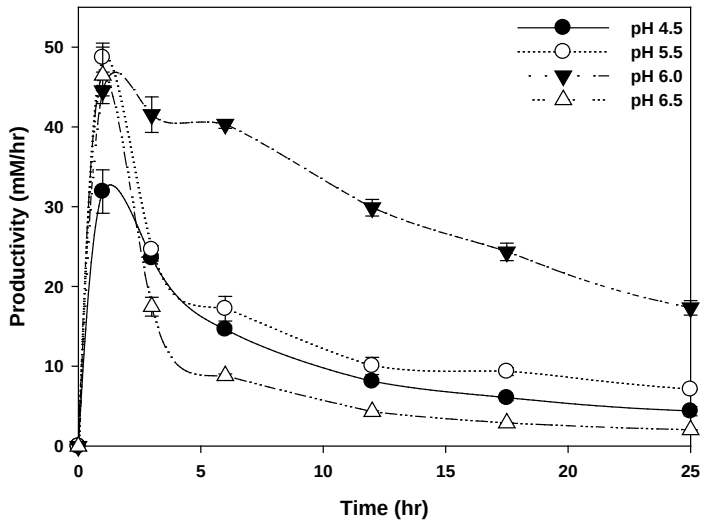


Figure 28. Effect of pH on GABA production.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

저속 교반방법과 고속 교반방법의 비교를 통하여 반응에 적합한 교반속도를 확인하기 위하여 간헐적으로 돌아가는 정도의 160 rpm 과 표면에 소용돌이가 형성되기 시작하는 교반속도인 700 rpm 을 비교하였다. 교반속도의 음성대조군으로 50 rpm 을 선정하였다. 그 결과 초기 1 시간에서는 700 rpm 에서 GABA 의 생성량이 265 mM 로 160 rpm 보다 21 mM 이 더 많이 생성되었다. 1 시간 이후부터는 160 rpm 의 생성량이 더 많이 증가하였으며, 10 시간에서는 160 rpm 이 260 mM 이상의 GABA 가 더 생성된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 초기에는 격렬한 교반속도로 인하여 물질전달이 원활하게 이루어진 결과에 기인한 것이며, 1 시간 이후 생성량이 감소한 것은 격렬한 교반에 의해 물리적인 충격이 수반되어 GAD 의 안정성이 떨어져서 나타난 결과이다. GABA 의 생성에 더 적합한 교반속도는 간헐적으로 교반이 수행되는 160 rpm 정도가 적합한 것을 확인하였다.

자동화 pH 적정 반응에서 염의 생성을 최소화하기 위하여 buffer 의 사용을 줄이게 되면서 pH 제어를 해줄 때 사용하는 HCl 의 농도가 중요하다. HCl 의 농도가 높게 되면 반응기 내의 pH 가 급격하게 변하게 되고 이러한 pH 의 변화는 효소의 구조변화를 유발하게 된다. 이와는 반대로 HCl 의 농도가 낮게 되면 pH 를 제거하기 위해 사용되는 HCl 의 용량이 증가하게 되고 이렇게 증가한 HCl 의 부피는 반응기의 부피증가로 이어지게 된다. 반응기의 부피증가는 반응기 제작에 있어 고려되어야 하는 부분이며, 이렇게 증가되는 부분을 최소화하기 위해서는 HCl 을 반응에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 고농도로 사용하여야 한다.

반응기의 pH 조절을 위하여 사용되는 HCl 의 농도에 따른 생산성을 확인하기 위하여 HCl 의 농도에 따른 실험을 수행하였다. 그 결과 HCl 의 농도가 증가될수록 생성된 GABA 의 양이 줄어드는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 농도가 높은 HCl 이 효소의 안정성을 낮추게 되어 점차 생성된 GABA 의 양이 줄어든 것으로 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

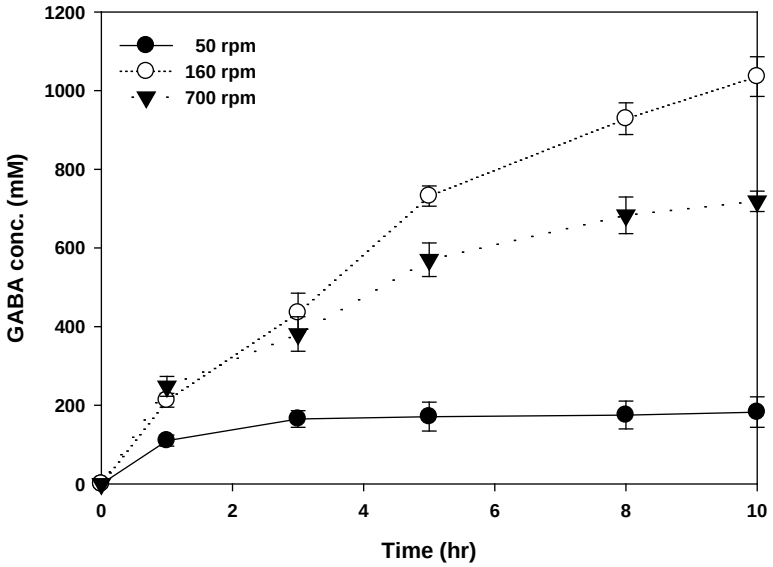


Figure 29. Effect of agitation speed on GABA production in a stirred tank reactor.

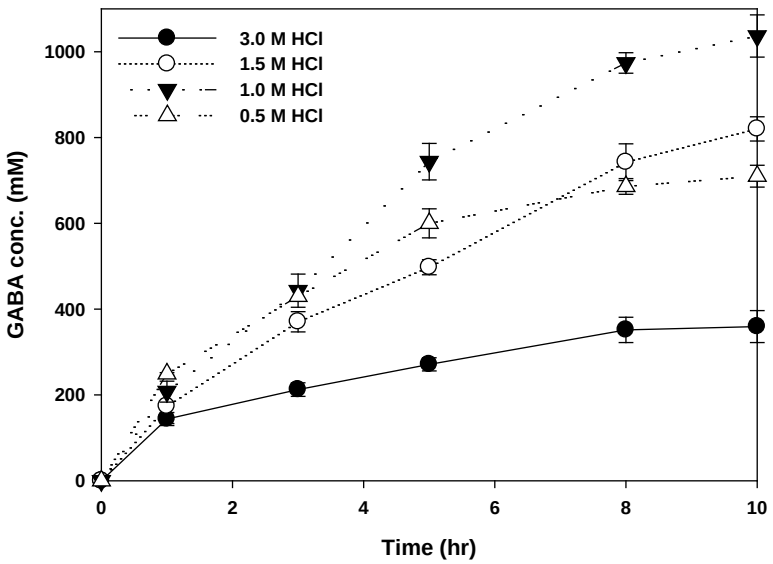


Figure 30. Effect of HCl on GABA production in a stirred tank reactor.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

GAD 반응의 교반속도, pH, HCl 의 농도 등을 고려하여 1 M 의 MSG 를 1 M 의 GABA 로 전환하는 공정을 확립하였다. 이렇게 확립된 공정의 생산성을 높이기 위하여 초기 MSG 의 농도를 2 M 로 높여서 단위시간당 생성된 GABA 를 비교실험 하였다. 대량 생산공정의 도입을 고려하여 반응기 부피변화를 확인하였으며, 시간당 생성된 GABA 를 정량 하여 비교하였다. 그 결과 10 시간의 반응이 진행된 이후 반응기의 부피는 초기 반응기 부피대비 3 을 넘지 않는 범위에서 반응이 종결되었으며, 그 때 생성된 GABA 는 103~110 g/L 로 100% 전환됨을 확인하였다. 초기 MSG 의 농도를 2 M 로 반응을 시작한 결과 46 시간에 85%의 전환률을 나타냈으며, 이때의 반응 부피도 초기반응 부피대비 3 을 넘지 않는 것을 확인하였다. 초기 농도에 따른 생산성을 비교한 결과 반응기의 부피변화는 변화가 없었으며, 2 M 의 MSG 를 85% 전환하는데 성공하였다. 1 M 의 MSG 를 반응하는 경우 10 시간동안 100 g 의 GABA 를 생산할 수 있었으나, 2 M 의 MSG 경우 46 시간동안 170 g 의 GABA 를 생산할 수 있었다. 1 M 과 2 M 의 단위시간당 생산성을 비교하였을 때 각각 10.31, 3.64 g/L hr 로 1 M 의 MSG 가 대량 생산공정에 더 적합하다.

동일한 효소를 사용한 경우 1 M 의 MSG 보다 2 M 의 MSG 를 이용할 경우 더 높은 효율로 GABA 를 생산할 수 있으나 반응이 100% 전환이 되지 않기 때문에 MSG 와 GABA 의 분리 공정의 도입이 필요하다. 현재 대부분의 GABA 생산공정 에서는 column 등의 분리공정을 도입하여 생산된 GABA 를 반응기로부터 분리하여 GABA 를 생산하고 있는 실정이다. 이러한 분리공정은 고가의 장비를 이용하거나 숙련된 작업자가 필요하여 GABA 의 생산성을 저해하는 요인이 되고 있다. 이러한 이유로 본 연구에서는 반응기로부터 MSG 와 GABA 를 손쉽게 분리할 수 있는 공정을 실험하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

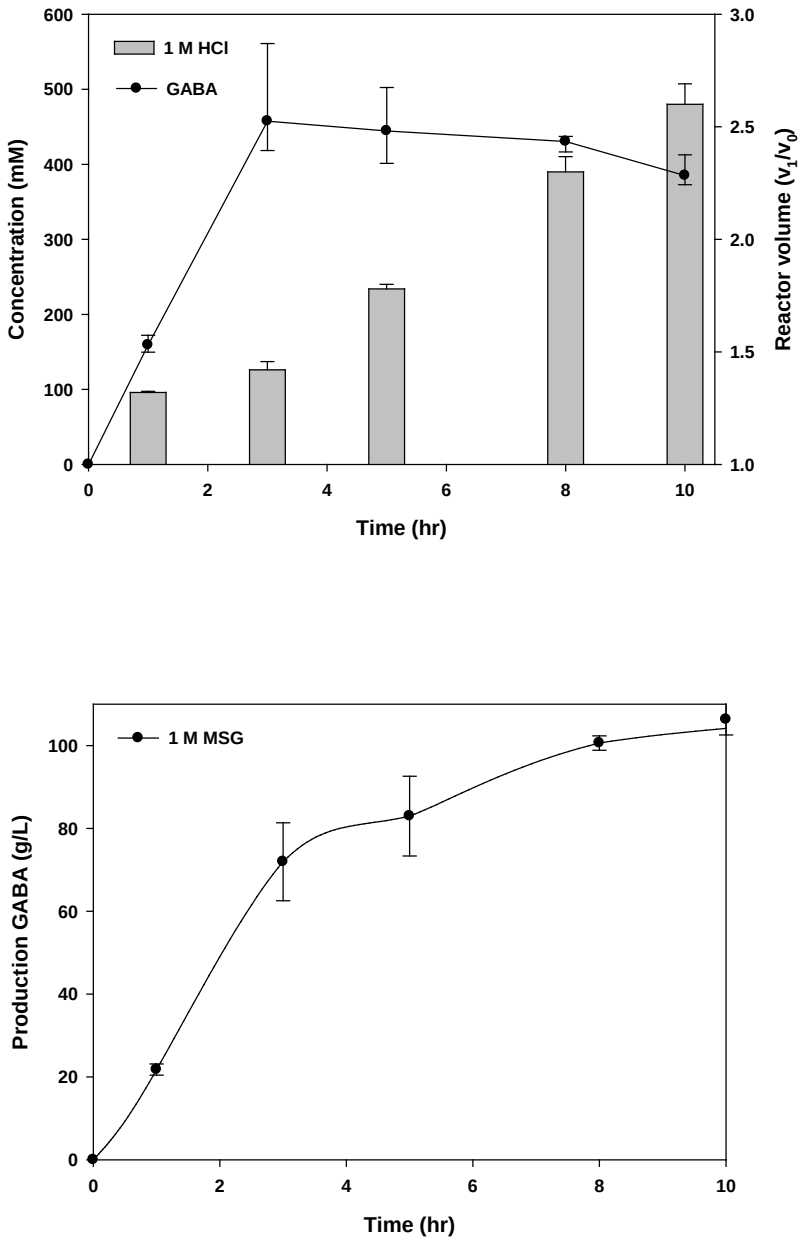
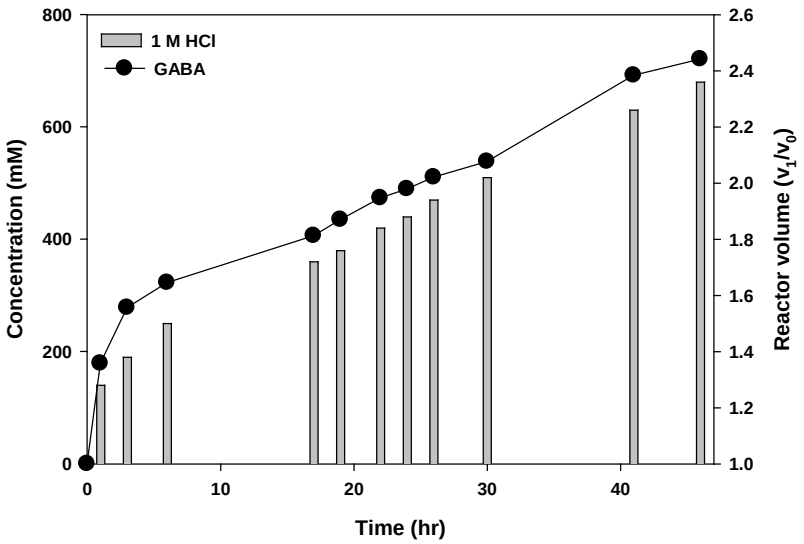


Figure 31. Result of scale-up of GAD reaction at initial concentration of 1 M MSG;(controlled pH 6, 170 rpm).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



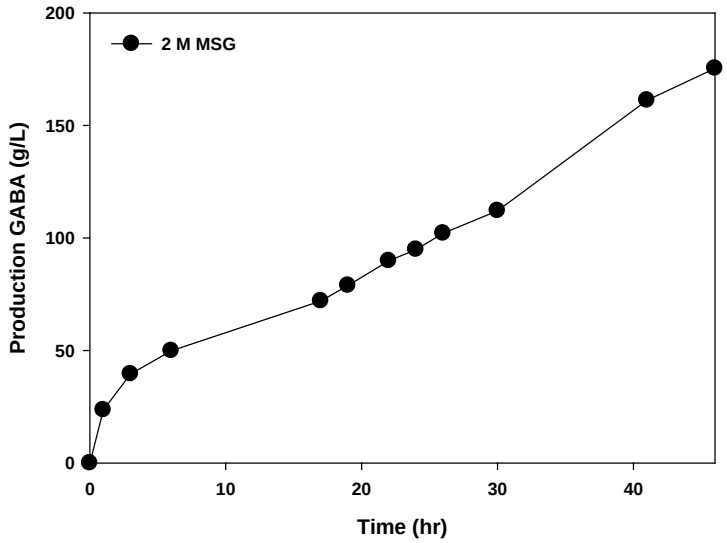


Figure 32. Result of scale-up of GAD reaction at initial concentration of 2 M MSG;(controlled pH 6, 170 rpm).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.6. 연속식 pH제어 반응기의 반응표면분석

GABA 의 생산을 위한 연속식 pH 조절 반응기의 pH 설정값, pH 제어를 위한 HCl 의 농도 및 교반속도가 GABA 의 생산량에 미치는 영향을 알아보고 최적의 생산공정조건을 설정하기 위하여 각각의 변수간의 유의성을 확인하였다. 변수간의 유의성은 pH 설정값, pH 제어에 사용하는 HCl 의 농도, 반응기의 교반속도를 독립변수로 설정하였으며, 전환된 GABA 의 농도(mM)를 종속변수로 설정하였다.

각각의 독립변수간의 상호작용을 비교한 결과 pH 제어에 사용되는 HCl 의 농도와 교반속도의 상호작용, pH 설정값과 pH 제어에 사용되는 HCl 의 농도는 유의성을 나타내는 것을 확인하였다. 그러나 상대적으로 pH 설정값과 교반속도는 상호작용이 거의 없는 것으로 확인되었다. 이러한 결과값은 반응기에 사용되는 HCl 의 확산과 연관된 결과로 교반속도의 증가가 확산계수값을 증가시켜 나타난 결과이다. 그러나 반응기의 교반속도 증가는 효소의 물리적인 손실을 동반하기 때문에 반응기내의 GABA 생산량과 확산계수의 상호적은 고려를 통하여 GABA 의 생산량이 가장 높은 반응기의 운용조건을 확립하였다. 독립변수간의 상호작용을 고려하여 반응기의 운용조건은 pH 6 으로 제어하여 1 M 의 HCl 을 이용하여 170 rpm 에서 운용하는 조건을 확립하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 9. ANOVA results of GABA production with pH and HCl concentration

$$f = Y_0 + aX + bY + cX^2 + dY^2$$

	Coefficient	Std. Error	t−value	P−value
Y_0	−16007.104	7372.9996	−2.1710	0.1621
a	5975.328	2750.0699	2.1728	0.1619
b	205.772	617.0836	0.3335	0.7705
c	−535.988	253.0045	−2.1185	0.1683
d	−88.686	169.1543	−0.5243	0.6524

X(pH), Y(HCl concentration, M)

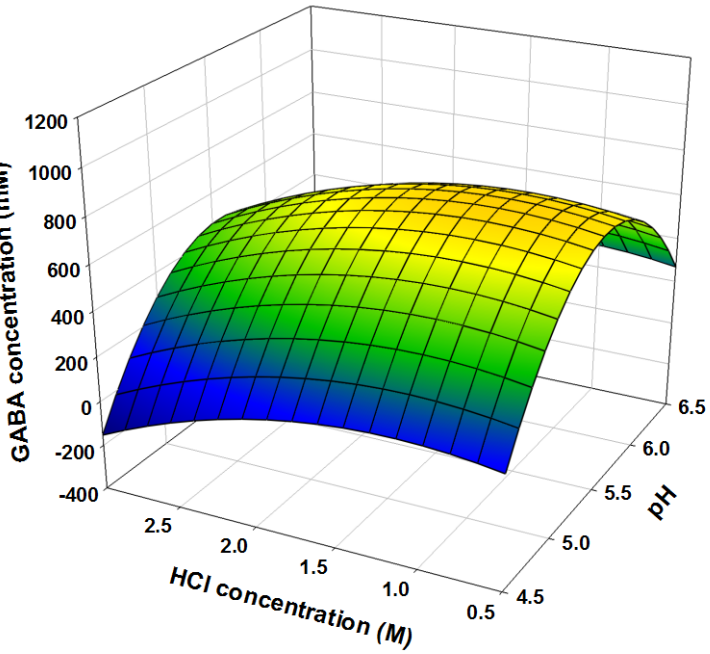


Figure 33. Response surface graph of GABA concentration with pH and HCl concentration.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 10. ANOVA results of GABA production with agitation speed and HCl concentration

$$f = Y_0 + aX + bY + cX^2 + dY^2$$

	Coefficient	Std. Error	t−value	P−value
Y_0	−536.8230	217.8742	−2.4639	0.2454
a	8.2636	1.3301	6.2130	0.1016
b	540.1709	258.9723	2.0858	0.2846
c	−0.0099	0.0017	−5.8890	0.1071
d	−200.6610	71.5817	−2.8032	0.2181

X(agitation speed, rpm), Y(HCl concentration, M)

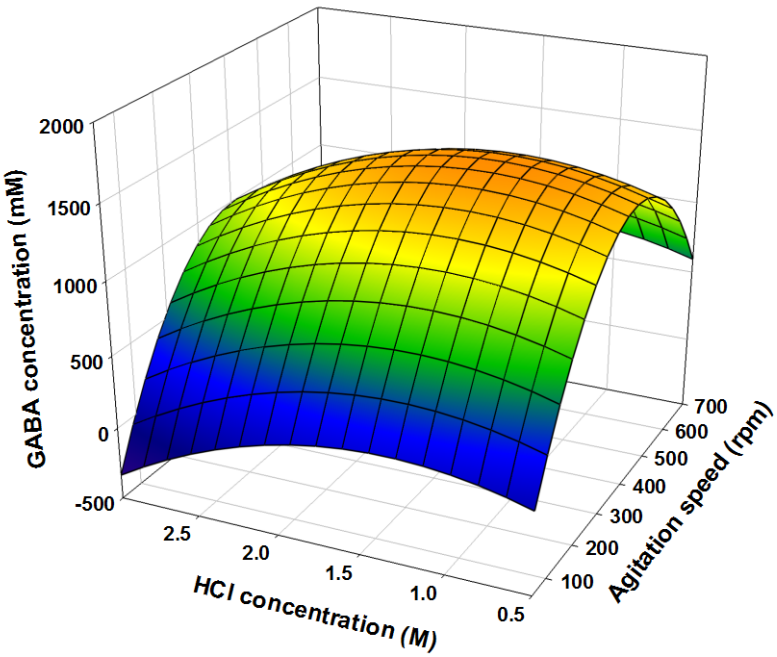


Figure 34. Response surface graph of GABA concentration with HCl concentration and agitation speed.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 11. ANOVA results of GABA production concentration with pH and agitation speed

$$f = Y_0 + aX + bY + cX^2 + dY^2$$

	Coefficient	Std. Error	t−value	P−value
Y_0	−13909.006	11332.2430	−1.2274	0.4352
a	4.493	4.7910	0.9379	0.5204
b	5036.329	4248.0871	1.1856	0.4461
c	−0.004	0.0061	−0.8087	0.5671
d	−453.620	391.9024	−1.1575	0.4536

X(pH), Y(agitation speed, rpm)

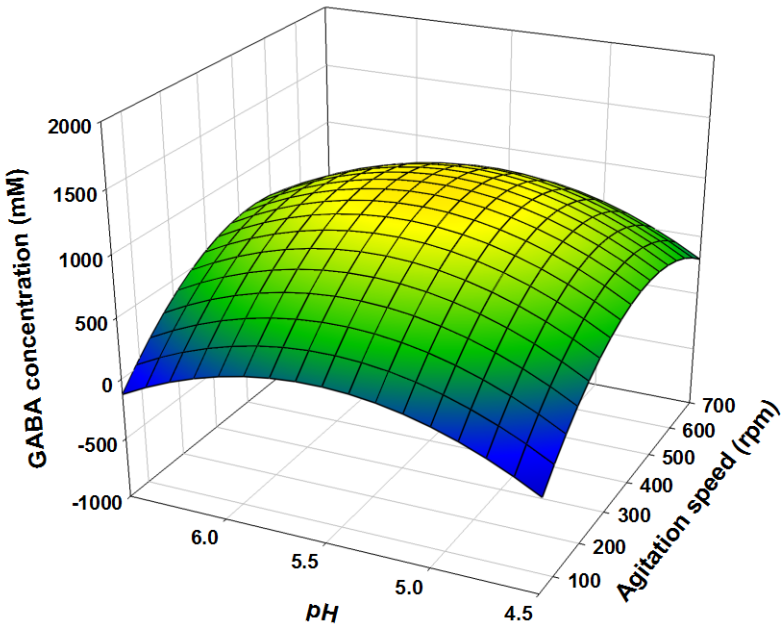


Figure 35. Response surface graph of GABA concentration with pH and agitation speed.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. GABA의 생산을 위한 반응기 scale-up

2.1. 분사형태의 영향

GABA의 대량생산을 위해서는 lab scale의 실험을 pilot scale로 scale-up을 고려해야 한다. 일반적으로 3 L 미만의 반응기에서 실험을 lab scale이라고 명칭하며, pilot scale의 실험은 50~2000 L 크기의 반응기 실험을 명칭한다. Lab scale 에서 pilot scale로 scale-up 할 경우 반응기의 부피가 커짐에 따라 다양한 문제점이 발생하게 된다. Scale-up test시 일반적으로 나타나는 문제점은 시스템 내의 불균일성, 부피 대 표면적 비 변화, 그리고 반응시간의 장기화이다. 이러한 문제점을 고려하기 위하여 scale-up을 할 때 고려하는 사항은 동력의 공급량, 용기내의 일정한 액체순환속도, 임펠러의 펌핑속도, 임펠러 끝에서의 일정한 전단응력속도, Reynolds number, k_La 값, 기질 또는 생성물의 농도등이 있다. 그 중 본 연구에서는 acid의 주입 방법, 교반방법이 반응에 큰 영향을 준다. GAD반응에 관여하는 변수인 pH를 제어하기 위하여 사용하는 HCl의 확산이 반응기의 부피가 커짐에 따라 다양한 문제점을 야기시킬 수 있다. 선행 연구로 미루어 볼 때, 100 ml의 효소반응기 부피에서는 HCl의 확산에 의해 효소 전환을 저해하거나 효소의 안정성을 떨어트리는 부분이 없거나 미비하였다. 따라서 반응기의 크기를 증가시켜서 실험을 수행할 필요가 있다.

본 연구에서는 3 L 크기의 반응기를 이용하여 반응부피 2 L 의 반응을 진행 하였다. 100 ml 의 반응기에서는 10 시간에 1 M 의 MSG 를 100% 전환한 실험조건을 바탕으로 동일한 조건에서 부피를 증가시켜 실험을 수행하였다. 그 결과 30 시간까지 반응을 진행 하였으나, 6 시간 이후로는 반응이 종결된 것으로 보이는 결과를 얻었다. 6 시간 이후의 전환률은 30% 정도 밖에 되지 않았다. 이러한 결과가 나타난 이유는 pH 를 제어하기 위하여 사용한 산의 주입방법에 있다. 산의 주입이 정량펌프를 이용하여 주입하고 pH

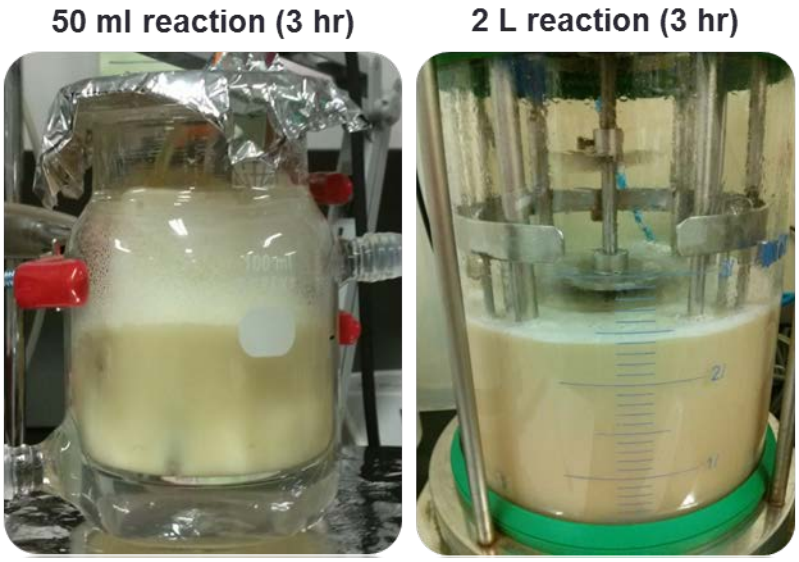
Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

meter 로 pH 를 측정하여 제어를 하게 되는데 산이 주입되고 반응기 전체에 확산되기 까지 소요되는 시간 동안 pH meter 는 감지를 하지 못하기 때문에 산이 설정 pH 에 도달하기에 필요한 정량보다 과량으로 주입되게 된다. 따라서 산의 주입 방법을 병렬로 연결하고 주입되는 관의 크기를 최소화 하여 실험을 수행하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



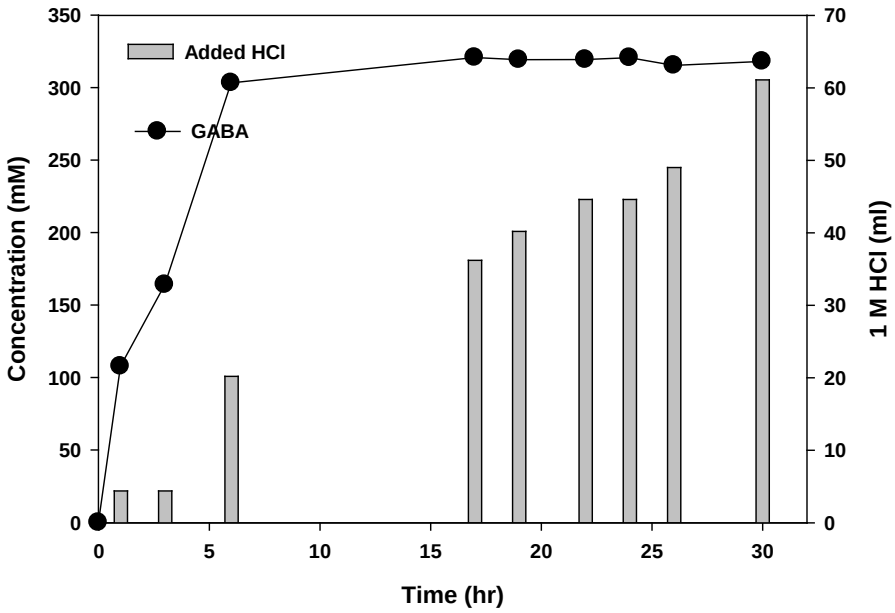


Figure 36. Result of scale-up of GAD reaction on the 2 L reaction volume;(1 M MSG, controlled pH 6).

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

산과 효소반응액이 접촉하게 되는 면적을 최소화하기 위하여 효소반응액의 표면으로 떨어지던 형태의 산의 유입형태를 효소반응액의 내부에서 확산이 되게 바꿔 주었으면 반응기의 내부에서 확산계수값을 상승시키기 위하여 유입되는 관을 4 분할하여 동시다발적으로 효소반응액의 내부에 확산할 수 있도록 반응기를 제작하였다. 산의 효소반응기내에서 확산을 증가를 위한 또 다른 방법은 교반이다. 그러나 물리적인 충돌과 와류 등으로 인하여 효소에 물리적인 충격을 전달 할 수 있는 부분이기도 하다. 교반탱크 반응기(Stirred tank reactor)의 기본형태를 가지고 있는 2 L 의 반응기에는 기체 및 산의 확산을 증가시키기 위하여 임펠러(Impeller)를 사용한다. 임펠러는 반응기에 사용되는 반응의 산소전달, 전단 민감성, 층형성 등의 인자를 고려하여 설계하게 된다. 임펠러의 모양에 따라 반응기내에서 형성되는 교반의 형태가 상이하게 변형된다. Rushton 형태의 impeller 는 점성이 낮은 유체에 적합하며, 방사형의 유체흐름을 유도한다. 대부분의 생물반응기는 Rushton impeller 를 사용하고 있다. Pitched blade impeller 는 tank baffle 이 실효성이 없는 고속의 액체나 고형체의 작업에 적합하며, 유체흐름의 방향은 impeller 날의 기운 방향에 따라 위쪽이나 아래쪽 어디로든 가능하며 기울기는 수평에서 직각까지 다양하다 [76-78]. Hydrofoil impeller 의 경우 blade 형태에서 발전한 impeller 로 축 방향으로 난류의 형성이 적은 특징을 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 효소의 구조적인 안정성을 상승시키기 위하여 임펠러의 영향을 고려하여 난류의 형성이 적은 hydrofoil impeller를 선택하여 GAD 반응을 진행하였으며, HCl의 주입형태도 parallel type으로 디자인하여 GABA 전환률을 비교하였다. 그 결과 초기에 반응기 표면에 형성되는 CO_2의 형태와 유입되는 산의 양으로 볼 때 반응기에 유입되는 산에 의한 반응의 저해는 줄어드는 듯한 현상이 나타났으나, 실제 효소반응을 통한

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

GABA의 전환율은 27.3% 정도로 50 ml 반응기에서 나타났던 100%의 전환률에는 도달하지 못하였다.

반응기의 scale-up 에서 교반에 의한 효소의 손실을 최소화하기 위하여 반응기의 교반형태를 impeller 를 이용한 방법에서 air 를 이용한 bubble column reactor 를 디자인하였다. 통상적으로 air 를 이용한 교반 반응기의 경우 stirred reactor 에 비하여 반응계의 혼합효과는 뛰어나지 않는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 air lift column reactor 를 사용하게 되는데 air lift column reactor 는 반응계에 baffles 등을 이용하여 riser site 와 down comer site 를 이용하여 혼합효과를 상승시킨다. 그러나 이러한 장치는 baffles 을 장치하지 않은 bubble column reactor 에 비하여 상대적으로 빠른 air flow 를 요구한다. Air flow 의 상승은 반응계의 상층부에 도달하였으때 발생하는 물리적이 손실의 증가로 인하여 효소에 데미지를 입히게 된다. 따라서 본 연구에서는 bubble column reactor 를 선정하여 반응기를 제작하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

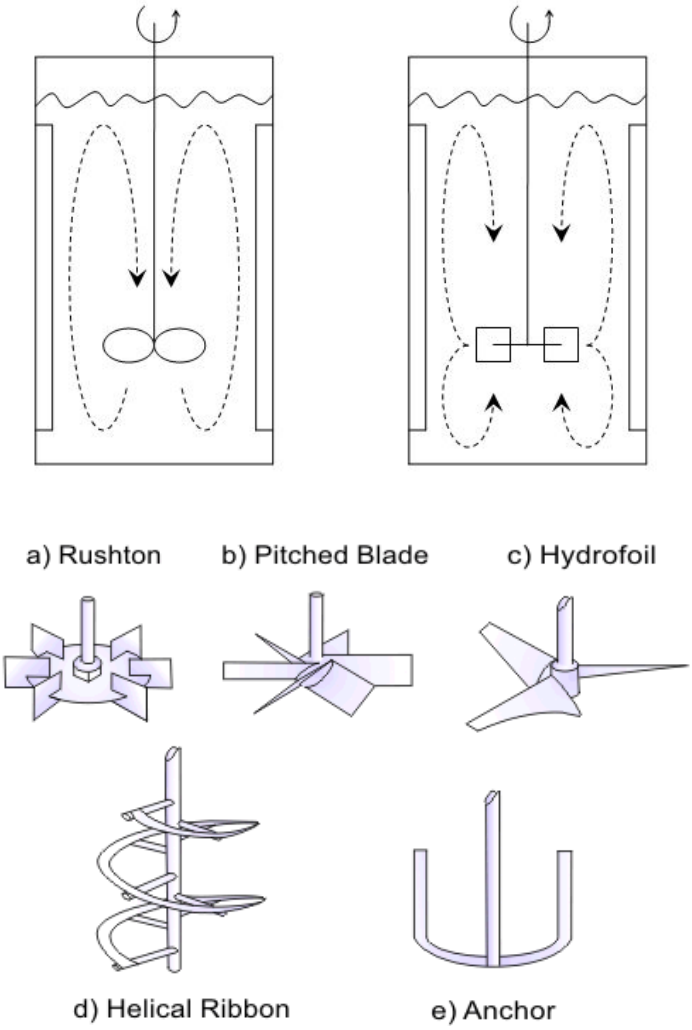
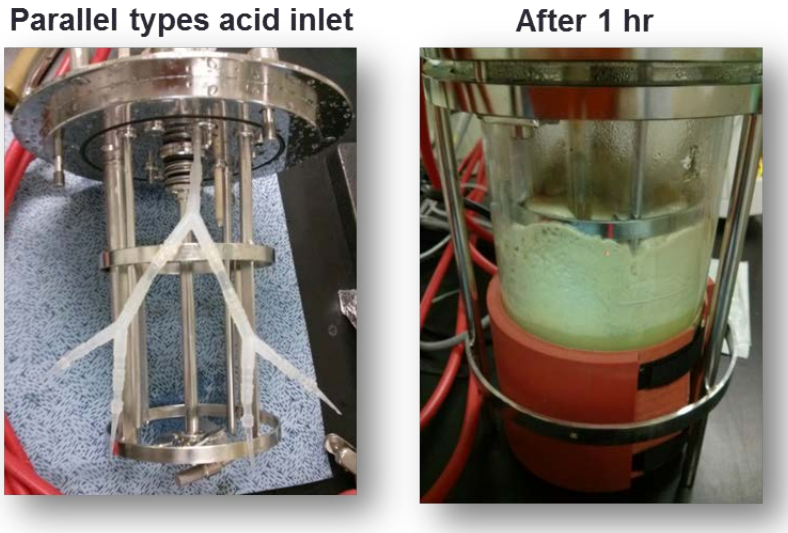


Figure 37. Alternative flow fields and the various impeller.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



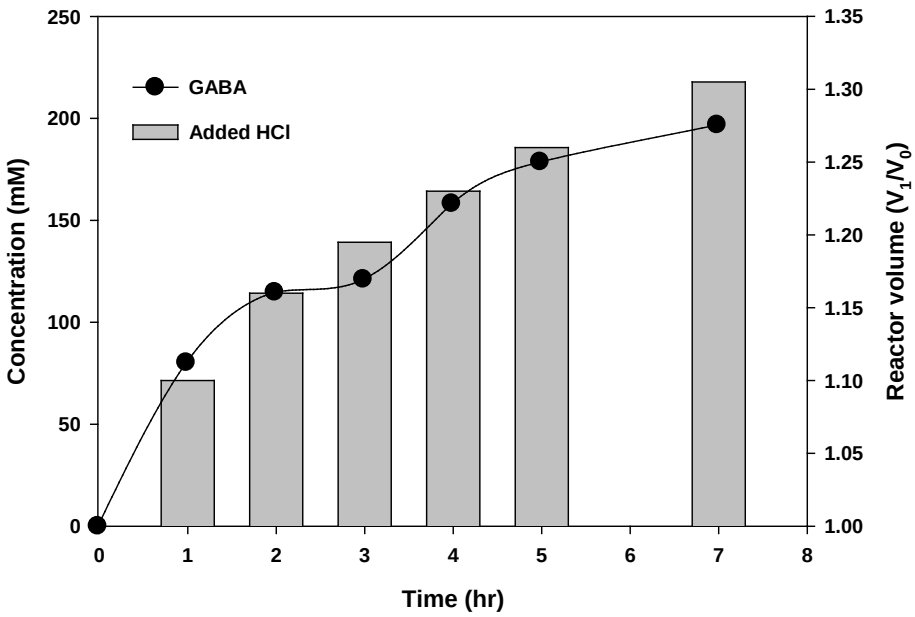


Figure 38. GABA production and reactor volume ratio using parallel type acid inlet.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

2.2. 반응기 교반형태의 영향

기포탑은 교반반응조와 달리 기계적인 교반장치가 없고 기포가 교반을 담당하고 있다. 교반발효조 보다 탑의 높이가 지름에 비해 훨씬 높은 것이 특징이다. 기포탑에는 기포탑의 내부의 형태에 따라서 multi staged, with static mixers, multi tubes, with external back flow tube, with external back flow등으로 구분된다[79-81]. 공기는 분사기를 통하여 분사하게 되는데 단순히 공기만 불어넣는 정분사기(static sparger)와 공기와 액체가 jet 형태로 분사되는 동분사기(dynamic sparger)의 두 가지로 나눌 수 있다[82-84]. 공기의 겉보기속도(superficial gas velocity), u_G가 5 cm/s 이하일 때는 기포의 크기는 균일하고 상승속도도 서로 비슷하다[85-88]. 이 때 유동특성을 bubbly flow라고 한다. 이 유동특성범위 내에서 액체를 기포와 같은 방향으로 흘리면 기포체류량도 줄고 bubbly flow도 안정화된다. 기체의 유량은 계속 증가시키면 단순한 기포탑의 경우 액체가 넘치는 flooding이 일어나는데 이때는 큰 기포가 생겨 churn-turbulent flow가 생긴다[86, 89-91].

효소 반응기내의 혼합만을 고려할 때는 와류를 일으킬 수 있는 churn type 의 flow pattern 이 적합하지만, 이러한 와류와 큰 bubble 은 bubble column 의 최상층면에서 효소의 구조를 붕괴할 가능성이 크다. 따라서 본 연구에서는 bubbly flow 가 가능하도록 bubble column reactor 를 디자인하였으며, 공기의 주입과 HCl 의 주입에 의한 stress 를 줄이기 위하여 동분사기(dynamic sparger)의 형태를 취하였다.

그 결과 bubble 을 이용하여 교반하고 동분사기를 이용하여 산을 주입하는 bubble column reactor 의 경우 반응시간 6 시간에 GABA 의 농도가 400 mM 에 육박하였으며, 이때 산의 유입은 반응기 부피에 2.0 배 이상 이였다. 효소 반응의 부피증가와 GABA 의 농도를 고려할 때, 이 농도는 전환률이 80%에 도달하는 결과이다. Bubble column reactor 와 impeller 를 이

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

용한 반응기를 전환률로 비교하면, 1 시간까지는 동일한 전환률을 나타내지만 1 시간 이후부터 6 시간까지 최대 2 배의 전환률 차이를 확인 하였다. 이러한 결과는 bubble 에 의한 교반이 impeller 에 의한 교반보다 효소에 주는 stress 가 적다는 것을 입증하는 결과이며, 동분사기 형태에 의한 pH 의 제어가 이루어졌음을 확인할 수 있는 결과이다. 6 시간에 2 L 반응기에서 1 M 의 MSG 를 80% 전환한 결과는 6 시간에 1 cycle 의 반응기에서 164.8 g GABA 를 생성할 수 있는 결과이다.

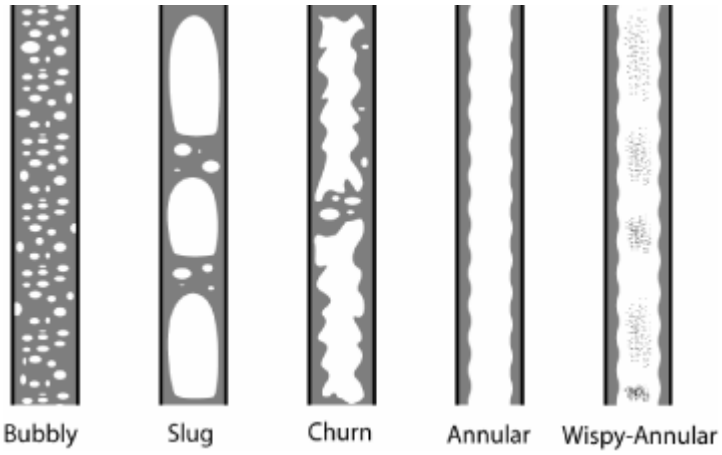
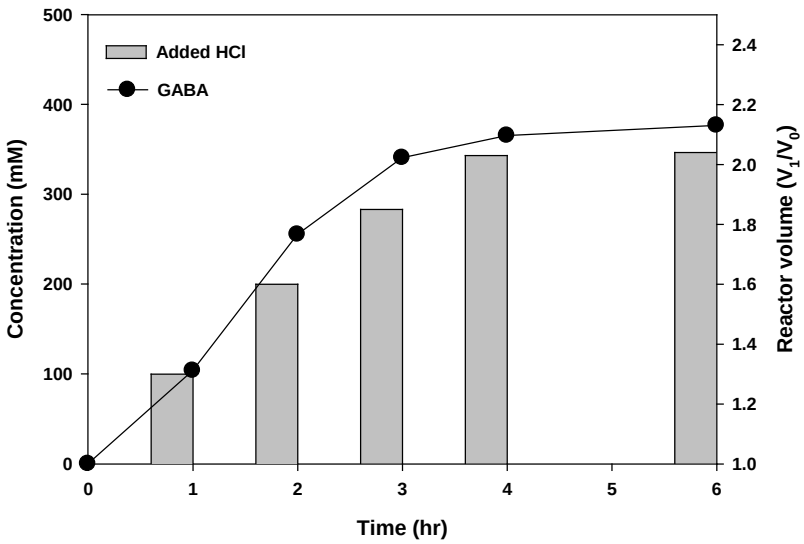


Figure 39. Flow patterns vertical upward flow in bubble column.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



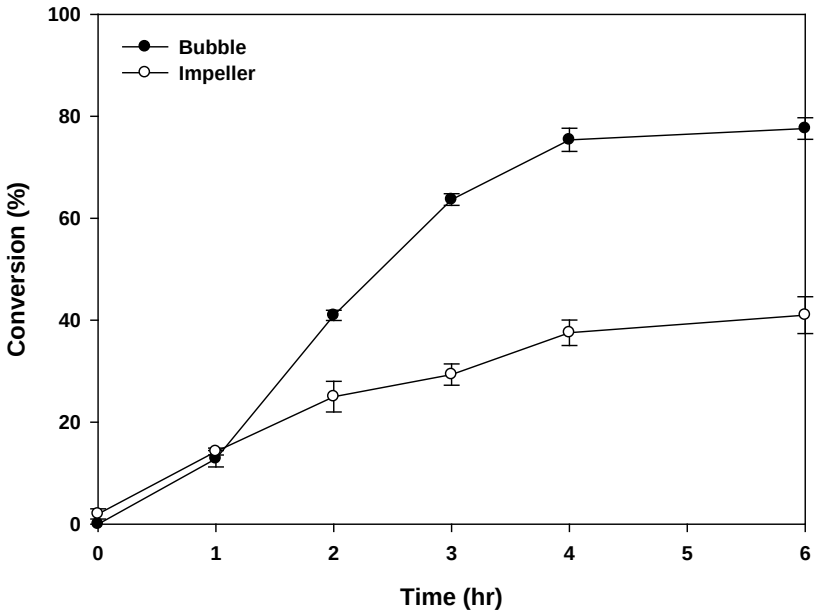


Figure 40. Effect of bubble and stirring on GABA production and conversion.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2.3. Bubble column reactor의 효소반응 속도론

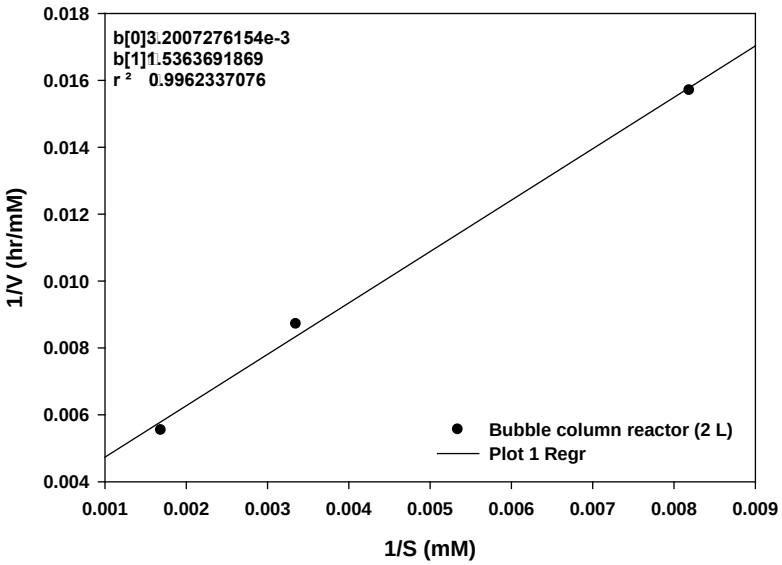
본 연구에서 제작한 bubble column reactor의 성능을 비교하기 위하여 Michaelis-Menten equation에 입각하여 반응기의 scale-up 이전의 반응기(stirred reactor)와 K_m, V_m 값을 비교하였다. 각각의 michaelis constant값은 각 반응기의 반응 결과를 Lineweaver-Burk plotting method에 따라 plotting하였다.

반응기의 scale-up 과정에서 교반에 의한 물리적인 충격으로 효소의 활성이 저하되는 문제점과 HCl의 주입 방법에 따른 효소의 구조적 붕괴에 따른 생산성의 저하를 평가하기 위하여 디자인한 bubble column reactor의 성능을 비교하기 위하여 50 ml 반응기의 michaelis constant를 비교하였다. 50 ml 반응기의 michaelis constnat값은 K_m, V_m값이 각각 277.26 mM, 200.0 mM/hr로 나타났으며, bubble column reactor는 480.125 mM, 312.5 mM/hr로 50 ml 반응기보다 소폭 상승한 결과값을 확인하였다.

K_m의 값은 효소-기질 상호작용의 성질에 대한 서술 값으로 K_m값이 높아진 부분은 bubble에 의한 교반이 반응계내의 혼합에 적합함을 확인할 수 있는 결과이다. V_m값은 효소가 기질로 충분히 포화되었을 때 한 효소가 단위시간당 생성물로 전환시킬 수 있는 기질 분자들의 수를 나타내는 값이 다. V_m값이 상승한 부분은 bubble column reactor 에서의 효소반응이 안정적으로 진행되고 있음을 간접적으로 보여주는 결과값이다. 이러한 결과값을 통하여 GAD의 반응을 위한 bubble column reactor의 scale-up이 성공적으로 이루어짐을 확인하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



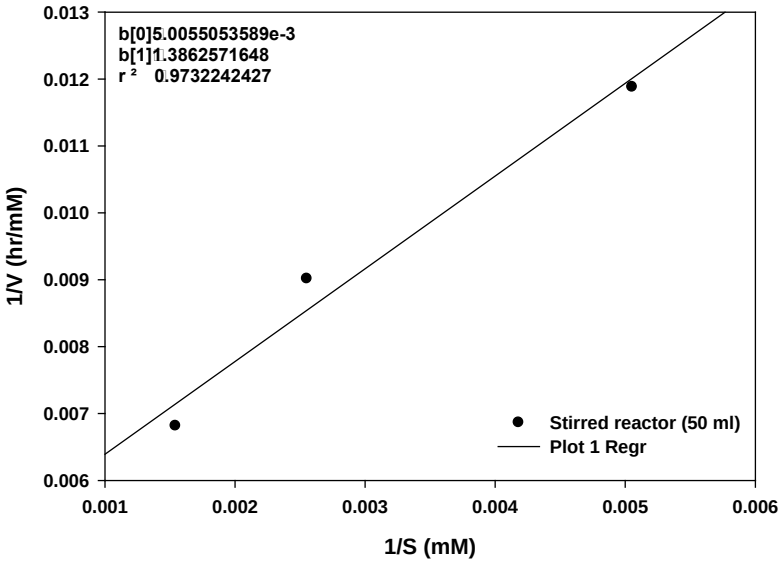


Figure 41. The Lineweaver-Burk plot of the enzyme reactions in the bubble column reactor (2 L) and stirred reactor (50 ml).

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 12. Values of K_m and V_m for glutamate decarboxylation on bubble column reactor (2 L) and stirred reactor (50 ml)

Type	K_m (mM)	V_m (mM/hr)
Bubble	480.125	312.5
Stirred	277.26	200.0

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅱ－4 결론

본 연구에서는 biopolymer 의 합성을 위한 GABA 의 생성 공정을 연구하였다. GABA 의 생성을 위해서는 GAD 를 이용한 효소반응 공정을 이용하였으며, 효소반응 공정을 최적화 한 뒤 pH controller 를 이용한 자동 pH 제어 공정을 확립하였다. 확립된 자동 pH 제어 공정을 반응기 부피 2 L 로 scale-up test 를 수행하였다.

초기 GAD 와 MSG 와의 반응에서 조효소로 이용되는 PLP 의 농도에 따른 GABA 전환률을 확인하였으며, 반응계의 pH 에 따른 전환률을 확인하였다. 반응이 진행되면서 반응계의 pH 가 7 이상이 되면 반응이 종결되어 이를 제어하고자 HCl, PLP 를 사용하여 전환률을 증가시켰으며, 생성물 GABA 의 순도를 높이고자 buffer 를 증류수로 대체하였다. 반응계의 pH 조절을 위하여 연속제어 반응기를 제작하여 효소반응의 생산성을 증가시켰으며, 반응기의 부피를 2 L 까지 증가시켜 반응기를 제작하였다. 반응기의 scale-up 이후 산의 주입방법 및 교반 방법으로 인한 stress 로 인하여 효소의 안정성이 저하되어 전환률이 감소하였다. 이를 보안하기 위하여 bubble column reactor 를 제작하였으며, HCl 의 주입은 교반을 위하여 선택한 air circulation line 을 통한 주입방식인 동분사 방식을 선택하여 디자인 하였다.

그 결과 GAD 를 이용한 효소반응 공정은 초기 MSG 농도는 1 M, 반응온도는 37℃, 1 M 의 HCl 을 이용하여 pH 6 으로 제어하며, 동분사기를 이용하여 HCl 을 반응기에 주입하는 bubble column reactor 의 형태에서 80%의 전환률을 4 시간반응 하여 얻을 수 있었다.

본 연구에서 도입한 공정은 biopolymer 합성에 적합한 공정으로 반응기의 내부에 용액은 buffer 를 사용하지 않았으며, 위의 조건으로 반응을 진행하여 4 시간에 1 cycle 의 반응기에서 164.8 g GABA 를 생성하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

제 Ⅲ 장 GABA를 이용한 Nylon 4 합성공정개발

Ⅲ – 1 서론

1. 이론적 배경

1.1. 나일론(Nylon)

나일론은 최초의 합성섬유로, 1938 년 Dupont 사에서 hexamethylene diamine 과 adipic aicd 의 축합중합(Condensation polymerization)에 의해 합성된 제품이 그 시초로 현재 polyamide 66 또는 nylon 66 으로 명명되고 있다. 이때부터 nylon 이라는 상품명은 합성 polyamide 를 지칭하는 일반용어로 사용되고 있다. 대표적인 nylon 수지로는 caprolactam 을 단량체로 이용하여 합성하는 nylon 6 와 nylon 66 이 있다[92, 93].

폴리아미드(polyamide)는 그 주쇄를 이루는 구조단위가 아미드기에 의해 연결된 합성 고분자를 말하며, 아미드기로 연결된 구조다위가 주로 지방족 단량체로 이루어진 폴리아미드를 나일론 이라고 한다. 나일론의 명명법은 나일론 mn 및 나일론 m 으로 나뉘어 지는데 nylon 66 이 전자, nylon 6 이 후자에 속하는 명명이다. 전자는 dicarboxylic acid 및 diamine 이 반응하여 아미드기를 형성하는 경우로 diamin 에 포함된 탄소의 수를 m, dicarboxylaic acid 에 포함된 탄소의 수를 n 으로 나타낸다. 아미드기는 아민기와 카르복시산기를 동시에 갖는 단량체를 이용하여 형성될 수 있다. 이때 단량체에 포함된 탄소의 수를 m 이라고 하면 폴리아미드는 나일론 m 이라고 명명한다[94–98].

나일론은 단량체의 탄소수와 반복되는 단량체의 종류에 따라 그 특성이 변하게 되는데 산업적으로 대표적인 나일론들의 일반적인 특징을 다음의 table 에 나열하였다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 13. Typical properties of Nylon 6, 6-6, 6-10, 6-12

Properties	Unit	Nylon 6	Nylon 6-6	Nylon 6-10	Nylon 6-12
Specific gravity	-	1.14	1.14	1.09	1.07
Melting point	℃	220	260	213	210
Mold shrinkage	%	0.6~1.6	0.8~1.5	1.2	1.1
Tension	kg/cm^2	740	800	600	620
Expansibility	%	200	60	200	200
Izod impact strength	kg-cm/cm	5.6	4	5.6	5.4
Rockwell hardness	-	R114	R118	R116	R114
Deflection temperature	℃	63	70	57	60
Water adsorption	%	1.8	1.3	0.5	0.4

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.2. 나일론 4(Nylon 4)

Nylon 4는 1953년 2-pyrrolidone을 개환중합법에 의해 개발된 폴리아미드로 Nylon 6와 Nylon 2의 중간에 위치하고 있다. 제전성, 흡습성, 염색성 등은 천연 무명과 흡사한 물성을 가지고 있으며, modulus, 신장강도, 파단신도 등의 물리적 성질은 Nylon 6 와 비슷하다. 1956 년에는 Nylon 4의 합성을 금속칼륨을 촉매로 아실화합물을 촉진제로 사영하여 보다 낮은 온도에서 중합을 성공하였으며, 수산화칼륨 촉매와 아실화합물 촉진제의 조합으로도 합성을 하였다. 또한 수분제거를 통해 수율을 향상시키시 위한 연구도 진행되었다. 계속된 연구로 아세틸기의 카르복실기에 의한 공명효과로 음이온이 안정화되기 때문에 개시반응의 개환반응이 더 빠르게 일어나는 것을 확인하였다[99-102].

이렇게 합성된 Nylon 4는 용융점보다 낮은 열분해 온도를 갖고 있기에 고온에서 Nylon 4가 용융되면서 분해가 동시에 일어나는 단점을 가지고 있다. 또한 단량체인 2-pyrrolidone의 높은 가격 및 수급불안의 문제로 대량생산에 한계를 보였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

1.3. 2-Pyrrolidone

2-Pyrrolidone 은 오각형의 환형아미드(cyclic amide)로 구성된 유기화합물이다. 무색의 액체로 고온에 안정적이며, 비부식성 극성 용매이다. 물, ethanol, diethyl ether, chloloform, benzene, ethyl acetate, carbon disulfide 등의 다양한 용매와 혼합될 수 있는 특징 때문에 산업적으로 널리 이용되고 있다[103, 104].

2-pyrrolidone 의 합성은 상온에서 BF3OEt2(Boron trifluoride diethyl ether complex)존재하에 빠르게 합성된다. 이 때 초기물질로 넣어준 azido alkanoic chlorides 의 탄소수에 따라서 lactam 의 모양이 결정된다. Toluene 용매상태에서 aluminum oxide 를 첨가한 뒤 100℃에서 10 시간동안 반응하게 되면 2-pyrollidine 을 합성할 수 있다. 그러나 이 공정은 다른공정과 비교할 때 합성시간이 길고 수율도 상대적으로 낮으며, 유기용매를 사용하는 단점을 가지고 있다[105-108]. 또 다른 합성방법으로는 감압조건하에서 2-pyrrolidone 을 용매로 사용하여 분말의 GABA 를 사용하여 120℃ 에서 반응시킨다. 반응시간도 빠르고 수율도 높은 편이지만, 분말의 GABA 를 사용하는 단점을 가지고 있다. 본 연구는 MSG 로부터 생성된 GABA 는 수용액 상태에 분포되어 있으며, 2-pyrrolidone 의 합성 이후 nylon 합성공정으로 이어져야 하는 특징을 가지고 있다. 따라서 GABA 용액에 최대한 불순물의 첨가를 배제하고 순도 높은 2-pyrrolidone 을 합성하여야만 한다. 이러한 특징을 고려하여 본 연구에서는 고압반응기에서 methanol 첨가를 통하여 2-pyrrolidone 을 합성하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

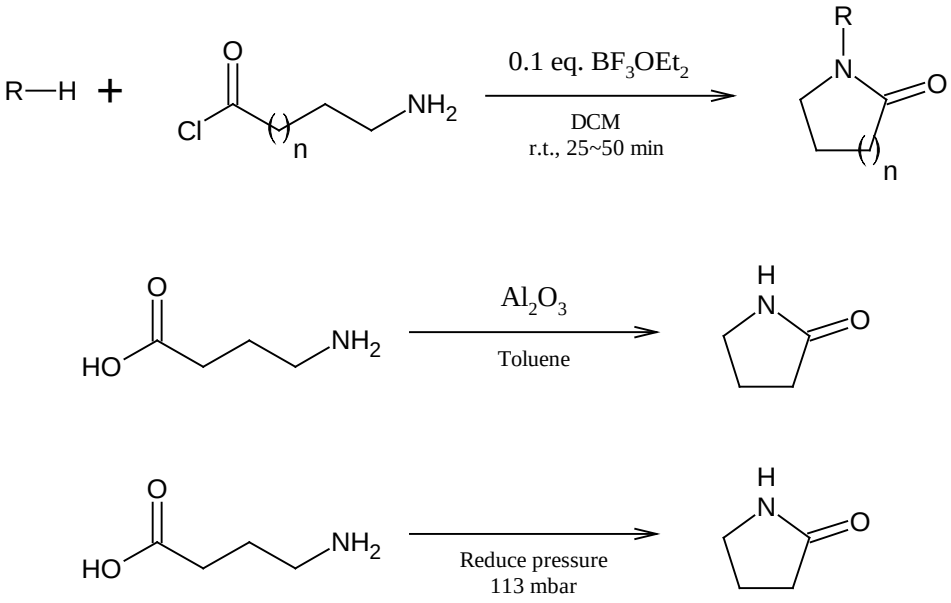


Figure 42. Synthesis route for formation of 2-pyrrolidone.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

1.4. 음이온 개환중합(Anionic ring-opening polymerization)

전자를 잡아당기는 치환기, alkyl, carboxy, nitro, nitrile, vinyl기 등을 가진 불포화화합물은 OH-, NH_2- 또는 carbanion과 같은 음이온에 의하여 중합될 수 있다. 알칼리 금속, alkyl이나 aryl lithium화합물, Grignard 시약, alkyl aluminum, 유기 라디컬 음이온과 금속 amide등이 개시제로 사용된다. 개시제는 활성 수소를 가진 물질에 대해 아주 민감하므로 산, 물, alcohol, mercaptan, amine, acetylene 유도체 등을 세심히 제거하여야 한다. 산소, 이산화탄소, 일산화탄소, carbonyl 화합물, alkylhalide등도 개시제화 반응할 수 있다 [109, 110]. 성장반응에서는 자라는 음이온과 짝이온 사이에 단량체가 삽입되어 중합이 진행된다. 성장사슬 말단이 음이온으로 되어 있으므로 양이온에 의해 사슬정지가 일어난다. 성장사슬의 음이온은 친전자성 시약과 사슬이동반응을 일으킬 수 있다.

단량체가 전부 소모되어도 물 등의 불순물이 없는 한 사슬 말단의 활성은 남아 있다. 이를 living 중합이라고 한다. Living 중합은 반응이 종결된 뒤 또다시 단량체를 넣어주면 계속 중합하여 분자량이 증가하게 된다. Living 중합은 THF, dioxane 등 성장사슬의 음이온과 사슬이동을 할 수 없는 용매를 선정하여야만 한다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ – 2 실험 재료 및 방법

1. 2-Pyrrolidone 분석

2-Pyrroidone은 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용하여 분석하였다. 2-Pyrrolidone의 분석에는 Partisil SAX 10 column을 사용하였으며, 5 mM KH_2PO_4 + 2 % acetonitrile을 mobile phase로 이용하였다. 0.8 ml/min의 유속으로 200 nm의 파장에서 UV-vis detector로 정량 하였다.

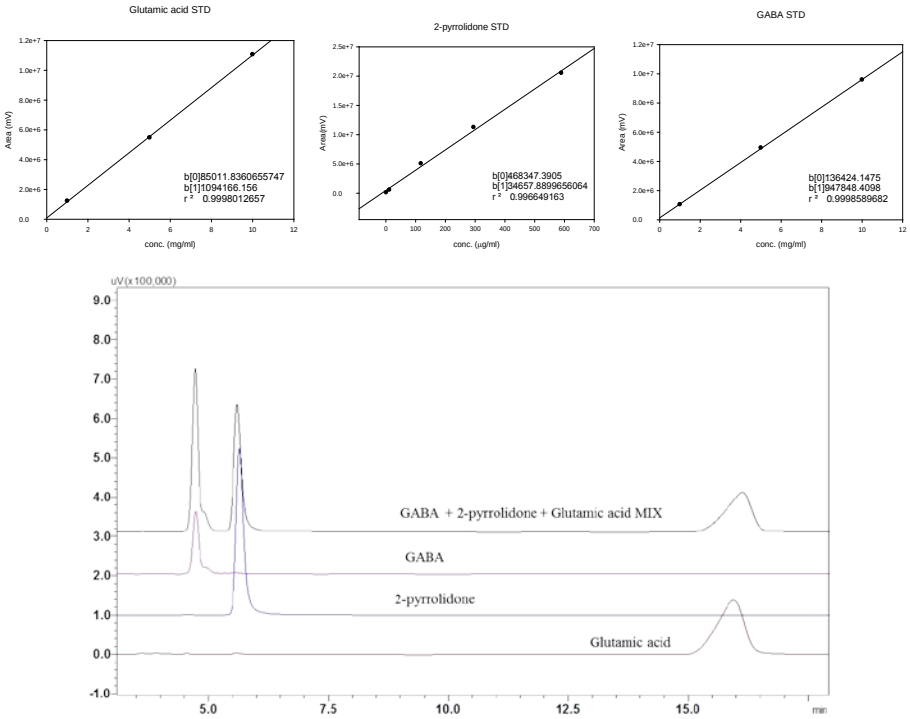


Figure 43. Standard curve of 2-pyrrolidone using HPLC.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. 2-Pyrrolidone 합성

MSG 로부터 GAD 를 이용하여 전환한 GABA 를 2-pyrrolidone 으로 합성을 위하여 고압반응기를 사용하였다. 고압반응기는 Multi pressure bomb reactor(Reaction Engineering, INC.)반응기를 사용하였으며, 온도 유지는 Refrigerated bath Circulator(Lab Companion, RW-0525G)를 사용하여 온도를 제어하였다.

반응기의 압력변화는 LC-20AT(Shimadzu)를 이용하여 압력을 제어하였다. 고압반응기의 압력은 300 psi(2.06 bar, 2068.44 Kpa)로 조정하였으며, methanol 을 첨가하여 2-pyrrolidone 의 합성반응을 촉진시켰다. 본 연구의 특성을 고려하여 2-pyrrolidone 의 촉매의 유무에 따른 합성을 비교하였다.

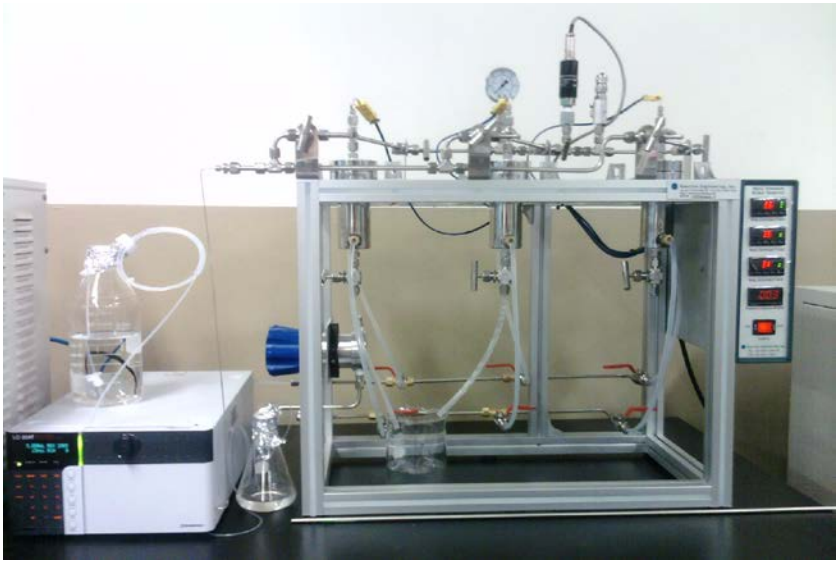


Figure 44. High pressure reactor used for the synthesis of 2-pyrrolidone from GABA solution.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

3. Nylon 4 합성

Nylon 4 의 합성은 2-pyrrolidone에 catalysts와 initiator를 넣고 N2로 충진된 반응기 내에서 24 hr 반응시킨다. 반응이 종결된 반응물은 acetone으로 침전을 시킨 뒤 침전물을 건조하여 분석하였다. 제조된 nylon 4 는 매우 딱딱한 상태의 고체상태로 고체상태의 nylon 4 를 잘게 부순 뒤 0.1% formic acid로 세척하여 미반응 monomer를 제거하였다. 본 실험에서는 catalyst로는 sodium, KOH, potassium tert-butoxide를 이용하였으며, initiator로는 benzoyl chloride, $SiCl_4$를 각각 비교분석 하였다.

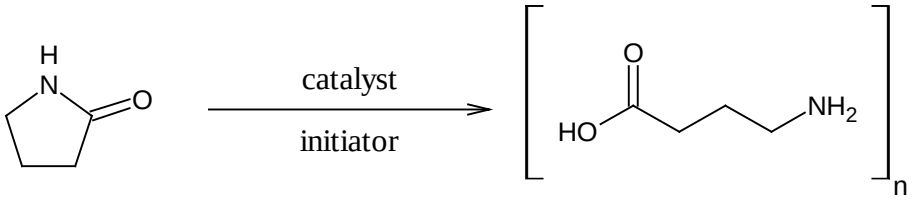


Figure 45. Reaction scheme of Nylon 4 synthesis from 2-pyrrolidone.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ - 3 실험결과

1. 2-Pyrrolidone 합성

고압반응기를 이용한 2-pyrrolidone 의 합성공정의 조건을 확립하기 위하여 methanol 의 농도와 촉매의 유무에 따른 수율을 확인하였다. 2-Pyrrolidone 의 합성은 반응 후 nylon 의 합성으로 진행되기 때문에 반응액에 포함되는 불순물을 최대한 배제할 필요성이 있다. 따라서 촉매에 의한 반응과 촉매를 미포함한 반응을 비교하였다. 이 때 촉매는 ammonium bromide 를 사용하였다. 촉매의 농도는 0.6 mM 을 이용하였다. 12 mM 의 GABA 를 methanol 과 증류수의 비를 2:1 또는 1:1 로 각기 다르게 하여 100℃, 300 psi 조건에서 3 시간 반응시켰다. 반응액내에 존재하는 GABA 와 2-pyrrolidone 은 HPLC 를 이용하여 정량분석 하였다. 그 결과 촉매를 넣어준 실험군에서 methanol 과 증류수의 혼합비가 1:0, 2:1, 1:1 로 넣어준 3 개의 실험군에서 모두 2-pyrrolidone 이 합성된 것을 확인할 수 있었다. 그러나 촉매를 넣어주지 않은 실험군에서 methanol 과 증류수의 혼합비가 1:0, 2:1 인 실험군 에서만 2-pyrrolidone 이 합성된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 촉매를 사용하지 않을 때에는 methanol 의 첨가가 필요하다는 것을 확인하였으며, 첨가하는 양은 용액에 존재하는 증류수보다 높은 양이 첨가되어야 함을 확인하였다.

Methanol 의 첨가에 따른 2-pyrrolidone 의 합성 수율을 확인하기 위하여 methanol 의 혼합비에 따른 반응을 수행하였다. 혼합비는 1:1 에서 합성이 되지 않았던 결과를 참고로 하여 1:2, 1:3 으로 점차 증가하여 합성효율을 확인하였다. 그 결과 1:3 에서 94%의 수율을 확인하였다.

본 실험에서 2-pyrrolidone 의 합성은 1:3 으로 methanol 을 첨가하여 고압반응기에서 100℃, 300 psi 조건에서 촉매의 첨가 없이 3 시간 반응하는 조건으로 확립하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

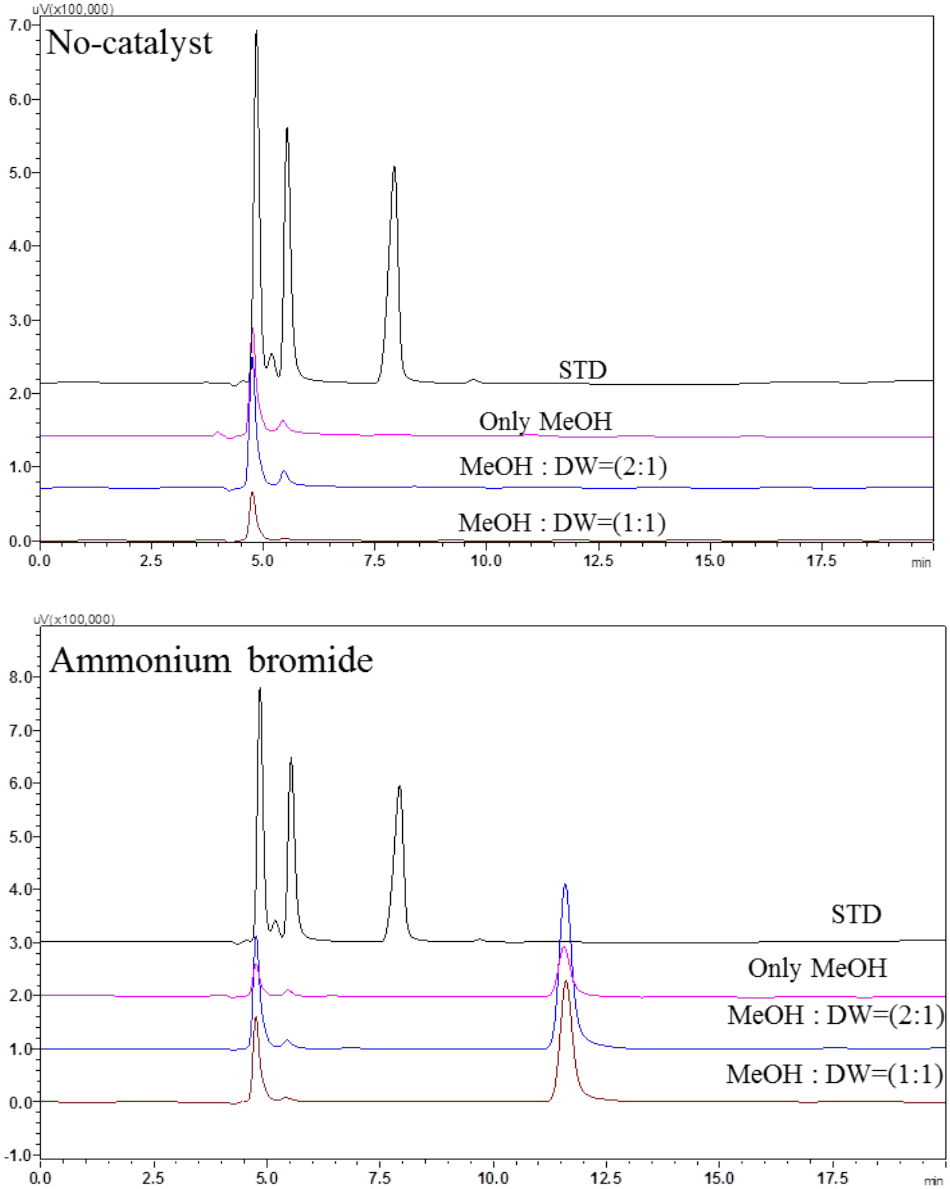


Figure 46. HPLC chromatogram of 2-pyrrolidone with methanol ratio and catalyst in high pressure reactor.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 14. Yield of synthesized 2-pyrrolidone according to methanol ratio in high pressure reactor

GABA (g)	D.W. (g)	Methanol (g)	Methanol ratio (M)	Yield (%)
10.31	50	100	2	89.2
10.31	50	150	3	94.0
10.31	50	200	4	95.7
10.31	50	250	5	94.8

Yield = 2-pyrrolidone(g)/GABA(g)x 100

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

GAD 의 반응을 이용하여 전환된 GABA 는 100% 전환이 되어도 용액 속에 NaCl, cell debris 등의 불순물이 포함되어 있다. 이러한 불순물을 분리하기 위해서는 다양한 방법을 이용할 수 있으나, 본 연구의 특성상 대량생산에 용의한 공정을 설계하기 위해서는 보다 간편하고 저렴한 분리공정이 필요하다. 분리공정중 가장 손쉬운 방법은 pH 변화를 통하여 분리하거나 용해도차이를 이용해서 분리하는 방법이 있다. 본 연구에서는 pH shift 를 이용하여 cell debris 를 제거하였으며, pH shift 에 의한 MSG 와 GABA 의 상관관계도 함께 확인하였다.

1 M 의 GABA 에 각기 다른 농도의 MSG 를 용해시킨 후 용해된 sample 의 pH 를 측정하고 3 M 의 HCl 을 이용해 pH shift 를 수행하였다. pH shift 는 pH 를 3.1 로 적정한 후 원심분리를 하여 침전물과 상등액을 분리하는 방법으로 진행하였다. 그 결과 MSG 의 농도가 높아질수록 초기 pH 는 낮아지는 경향을 나타냈으며, pH shift 이후에는 MSG 의 농도가 높은 sample 에서 침전물이 더 많이 형성되는 것을 확인하였다. 침전물을 원심분리한 뒤 상등액의 GABA 와 MSG 의 농도를 분석한 결과 MSG 의 농도는 50~80 mM 로 분포하였으며, GABA 의 농도는 780~890 mM 로 분포하였다. GABA 의 농도가 1 M 이 되지 않는 이유는 pH shift 를 위한 HCl 의 첨가로 인한 반응계의 부피상승으로 인한 결과이다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 pH shift 에 의해서 MSG 는 80 mM 이하로 존재하게 되며, GABA 는 상대적으로 영향을 받지 않는 것으로 확인되었다. 위의 실험결과를 토대로 효소반응액에 적용한 결과 cell debris 를 제거할 수 있었으며, 미반응된 MSG 도 제거가 가능함을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 15. Precipitations of MSG and GABA using pH shift method.

	Initial pH	After pH shift	MSG concentration (mM)	GABA concentration (mM)
(A)	7.64	3.17	75.6	894.0
(B)	7.68	3.14	81.1	840.1
(C)	7.59	3.17	49.5	868.5
(D)	7.56	3.12	66.1	836.3
(E)	7.51	3.64	62.4	787.2

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Figure 47.Effect of on the precipitation of GABA and MSG mixture:(up : initial states, down : after pH shift).

Collection @ chosun

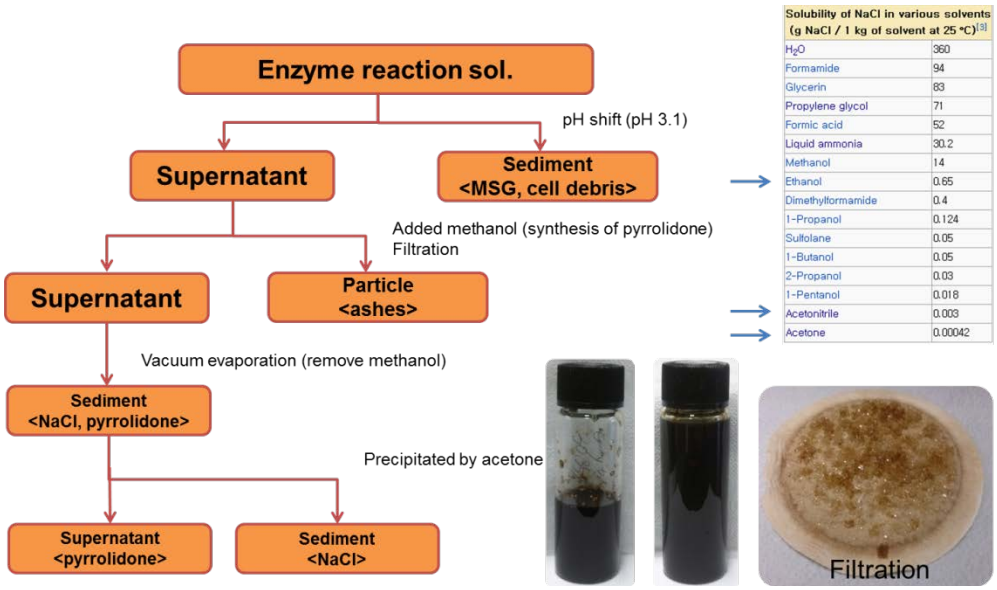
조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

효소반응액을 pH shift를 이용하여 cell debris를 제거하고 high pressure reactor를 이용하여 2-pyrrolidoen을 합성하였다. 100 ℃, 300 psi 조건하에서 3 시간 반응시킨 결과 2-pyrrolidone을 합성하였다. 합성된 반응물에는 다량의 수분을 포함하고 있어서 nylon 4 의 합성을 위해서는 수분을 제거하는 공정이 필요하다. 수분제거는 rotary evaporator를 이용하여 수분을 제거하였다. 이 때 일정 시간이 지난 후 합성한 2-pyrrolidone 수용액에 결정이 형성되는 것이 확인되었다. 이 결정은 초기 MSG를 사용할 때 수용액에 이온상태로 존재하던 Na^+ 이온이 효소반응공정과 pH shift공정에서 유입된 Cl^-이온과 반응하여 형성된 NaCl이다. 수분이 포함되어 있을 때는 이온상태로 존재하다가 수분이 점차 제거되면서 수분의 용해도 이상의 NaCl이 침전된 것으로 이러한 결정은 nylon 4 를 합성하는 공정에 방해가 되는 요소이다. 따라서 NaCl을 제거하기 위하여 NaCl의 제거 공정을 추가적으로 도입하기로 하였다. 문헌조사를 통하여 NaCl의 용해도가 적으면서 제거하기 쉬운 용매로 acetone을 선택하여 NaCl을 제거하였다.

효소반응액으로 부터 2-pyrrolidone 의 합성공정의 다음과 같다. 효소반응이 끝난 용액은 3 M 의 HCl 을 이용하여 pH 3.1 으로 적정하는 pH shift 공정을 거치게 된다. 이 때 침전되는 침전물은 미반응된 MSG 와 반응에 이용된 효소와 cell debris 등이다. 상등액에 존재하는 GABA 는 methanol 첨가 후 고압반응기에서 3 hr, 촉매가 없는 조건하에서 반응하여 2-pyrrolidoe 을 합성하게 된다. 합성된 2-pyrrolidone 은 감압 증발기를 이용하여 methanol 을 제거하고, 남아있는 침전물은 acetone precipitation 을 통하여 NaCl 을 침전 시킨다. 침전물은 filtration 을 통하여 제거하면 효소반응액으로부터 2-pyrrolidone 을 합성하게 된다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY



Solubility of NaCl in various solvents (g NaCl / 1 kg of solvent at 25 °C)[3]	
H_2O	360
Formamide	94
Glycerin	83
Propylene glycol	71
Formic acid	52
Liquid ammonia	30.2
Methanol	14
Ethanol	0.65
Dimethylformamide	0.4
1-Propanol	0.124
Sulfolane	0.05
1-Butanol	0.05
2-Propanol	0.03
1-Pentanol	0.018
Acetonitrile	0.003
Acetone	0.00042

Figure 48. Diagram of 2-pyrrolidone synthesis process from enzyme reaction solutions.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

위의 합성공정을 따라 합성한 2-pyrrolidone 의 구조를 상용화되고 있는 2-pyrrolodone 과 비교분석하기 위하여 NMR 분석을 하였다. 그 결과 상용화되고 있는 2-pyrrolidone 과 동일한 구조를 형성하고 있는 것을 확인하였다.

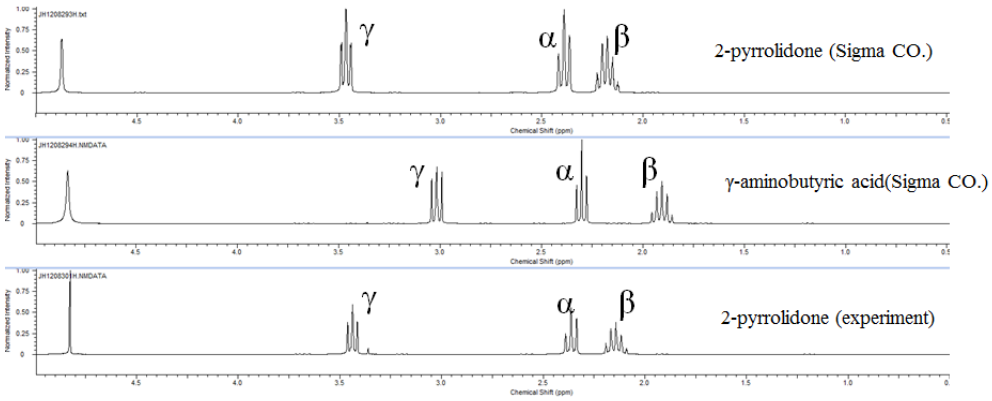


Figure 49. NMR spectra of synthesized 2-pyrrolidone from enzyme reaction solution.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

2. Nylon 4 합성

Nylon 4 의 합성은 다양한 촉매와 개시제를 이용하여 합성이 가능하다. 촉매와 개시제의 종류에 따라서 또는 반응시간, 반응조건에 따라서 Nylon 4 의 중합도, 수율등의 변화가 발생한다. 본 연구에서는 효소반응액으로부터 생성한 GABA 를 이용하여 합성한 2-pyrrolidone 을 이용하여 Nylon 4 가 합성되는 결과를 확인하였다. 합성된 Nylon 4 는 기존에 상용화 되어 있는 Nylon 4 와 FT-IR, NMR 을 이용하여 비교 분석하였으며, 촉매와 개시제는 수율만을 감안하여 실험을 수행하였다.

효소 반응액으로 생성된 2-pyrrolidone 을 이용한 Nylon 4 에서 가장 문제시 되고 있는 부분은 sodium chloride 이다. 음이온 중합반응에 있어서 반응계내에 양이온의 물질이 존재하게 되면 중합반응이 저해를 받게 된다. 효소반응에 사용하는 기질의 고농도 반응을 위하여 선택한 MSG 는 하나의 sodium 을 내포하고 있는 물질로 1 M 의 MSG 을 용매에 용해시킬 경우 반응계 내에는 1 M 의 sodium 이온이 존재할 수 밖에 없다. Acetone 침지를 이용하여 NaCl 을 제거하는 공정이 도입되지만, 합성된 2-pyrrolidone 에 미량의 수분이 남아 있기 때문에 sodium 이온은 존재하게 된다. 따라서 본 연구에서는 Nylon 4 를 합성하기 전에 먼저 sodium chloride 에 의한 합성 저해를 확인하기 위하여 sigma 사에서 판매하는 2-pyrrolidone 을 구매하여 선정된 촉매와 개시제를 이용하여 1%의 sodium chloride 를 포함하고 있는 2-pyrrolidone 과 합성수율을 비교하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

Table 16. Inhibition effects of residual sodium chloride on the synthesis of Nylon 4

Title	Yield (%)
Include 1% sodium chloride	29.5
2-Pyrrolidone	57.6

Table 17. Effect of pH conditions on the synthesis of Nylon 4

Synthesis conditions	Yield (%)
pH 3	21.3
pH 7	57.6
pH 10	-

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

그 결과 1%의 sodium chloride 를 포함한 2-pyrrolidone 의 경우 합성수율이 sodium chloride 를 포함하지 않는 대조군에 비하여 51%의 저해가 일어나는 것을 확인하였다. 효소반응액에 존재하는 cell debris 를 제거하기 위하여 pH shift 공정에서 pH 3.0 으로 적정을 하게 된다. 따라서 pH shift 에 의한 수율을 비교하기 위하여 pH 별로 nylon 4 의 합성을 비교하였다. 그 결과 pH 3 의 조건에서는 51%의 저해가 일어났으며, pH 10 에서는 nylon 4 가 합성되지 않았다. 따라서 효소반응액을 이용한 nylon 4 의 합성공정은 pH shift 공정을 한번 더 도입하여 pH 7 로 조정하는 공정이 nylon 4 의 합성수율을 높일 수 있을 것으로 예상된다.

효소반응액으로 부터 nylon 4 를 합성하기에 적합한 촉매와 개시제를 선정하기 위하여 촉매와 개시제의 농도를 동일하게 고정하고, 동일한 반응조건에서 nylon 4 의 합성수율을 확인하였다. 촉매로는 sodium, potassium tert-butoxide, potassium hydroxide 를 이용하였으며, 개시제는 silicon tetrachloride, benzoyl chloride 를 각각 비교하였다. 그 결과 촉매로는 potassium tert-butoxide 를 개시제로는 benzoyl chloride 를 사용할 때 nylon 4 의 합성수율이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 각기 다른 촉매와 개시제를 이용하여 합성된 nylon 4 의 구조적인 특징을 비교분석하기 위하여 FT-IR 과 NMR 분석을 통하여 비교하였다. 그 결과 수율은 각기 다르지만 구조는 비슷한 nylon 4 가 합성된 것을 확인할 수 있었다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Table 18. Synthesis yields of Nylon 4 according to different catalysts and initiators.

Monomer (1 M)	Catalyst (60 mM)	Initiator (3.7 mM)	Yield (%)
Pyrrolidone	Sodium	$SiCl_4$	8.7
		BnCl	–
	Potassium tert-butoxide	$SiCl_4$	–
		BnCl	57.6
	Potassium hydroxide	$SiCl_4$	1.3
		BnCl	3.2

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

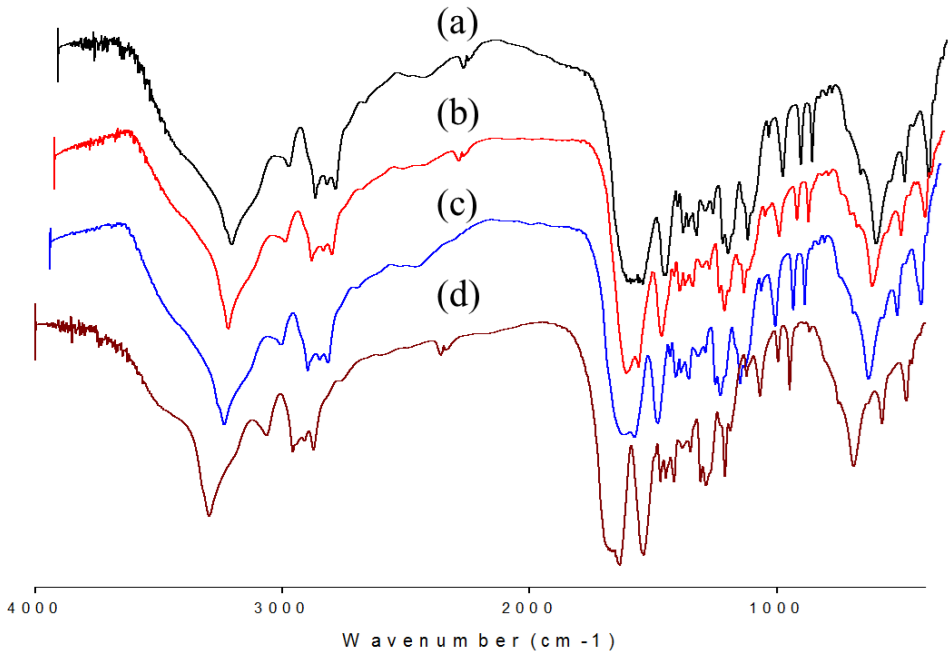


Figure 50. FT-IR spectra of Nylon 4 synthesized by different catalyst and initiator;(a) sodium, silicon chloride, (b) potassium tert-butoxide, benzoyl chloride, (c) potassium hydroxide, silicon chloride, (d) potassium hydroxide, benzoyl chloride.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

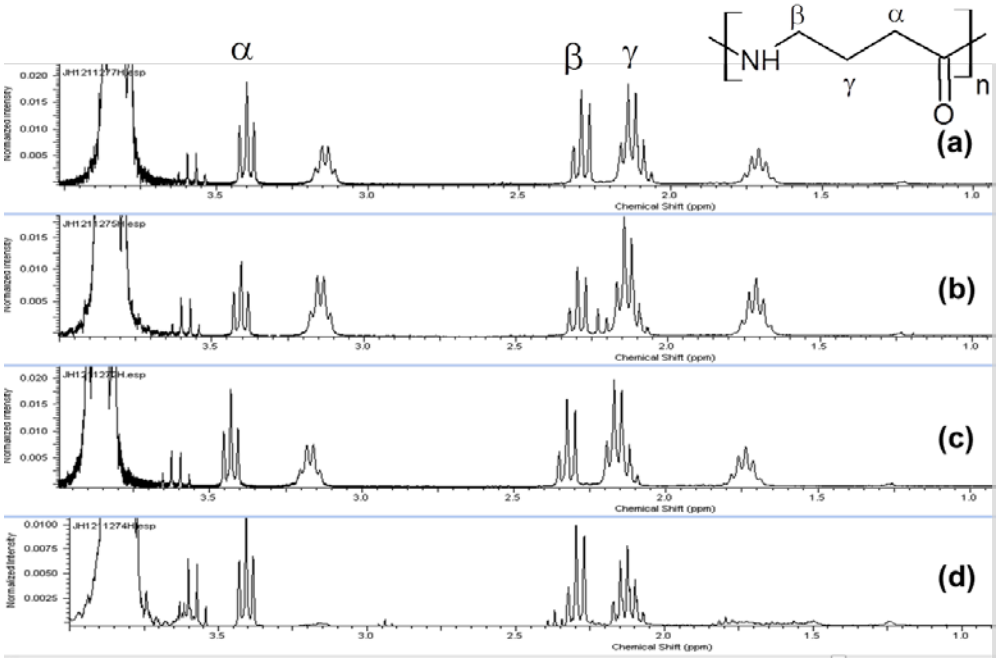


Figure 51. NMR spectra of Nylon 4 synthesized by different catalyst and initiator;(a) sodium, silicon chloride, (b) potassium tert-butoxide, benzoyl chloride, (c) potassium hydroxide, silicon chloride, (d) potassium hydroxide, benzoyl chloride.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

발효를 통해 생산한 GAD 를 이용하여 생성된 GABA 를 biopolymer 인 nylon 4 를 합성하는 공정은 아래의 도표와 같이 간략히 정리할 수 있다. 효소반응액을 이용하여 합성한 2-pyrrolidone 을 이용하여 nylon 4 를 합성하였다. Nylon 4 의 합성에 사용할 2-pyrrolidone 을 효소반응액을 이용하여 합성하기 위하여 pH shift 를 이용하여 cell debris 를 제거하였다. pH shift 는 HCl 을 이용하였으며, 이 때 부가적인 효과로 MSG 가 pH 3 에서 용해도가 급격히 떨어지는 점을 확인하였다. pH 3 에서 GABA 는 상대적으로 거의 침전이 일어나지 않았으며, 이러한 현상을 이용하여 반응이 종결된 반응액에 존재하는 cell debris 와 미반응 MSG 를 제거할 수 있는 공정을 확립하였다.

상등액을 2-pyrrolidone 과 nylon 4 의 합성 수율을 증진시키기 위하여 acetone precipition 을 하여 NaCl 을 제거하였다. 문헌조사를 통해 NaCl 의 acetone 의 용해도가 0.42 mg/kg, 25℃임을 확인하였다. 또한 acetone 은 끓는점이 57℃로 비교적 낮아서 공정에 도입 후 잔여물을 제거하기 쉬운 장점이 있다. NaCl 이 제거된 상등액은 다시 pH 7 로 조정하였다. Nylon 4 의 합성공정에 이용할 2-pyrrolidone 의 경우 pH 에 따라서 가시적인 색이 다르며, 합성수율에도 pH 7 일 때 합성수율이 높은 것을 확인하였다.

Cell debris 와 NaCl 을 제거한 반응액에 methanol 을 첨가하여 고압반응기에서 2-pyrrolidone 을 합성하였다. 촉매를 이용할 경우 상온에서 빠르게 2-pyrrolidone 을 합성할 수 있으나, 촉매의 가격이 높으며, nylon 4 합성공정에 적용하였을 때 2 차적인 반응을 제어하기 위하여 촉매의 첨가를 배제하여 실험을 수행하였다. 합성된 2-pyrrolidone 은 촉매로 potassium tert-butoxide 를 개시제로 benzoyl chloride 를 이용하여 nylon 4 를 합성하였다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

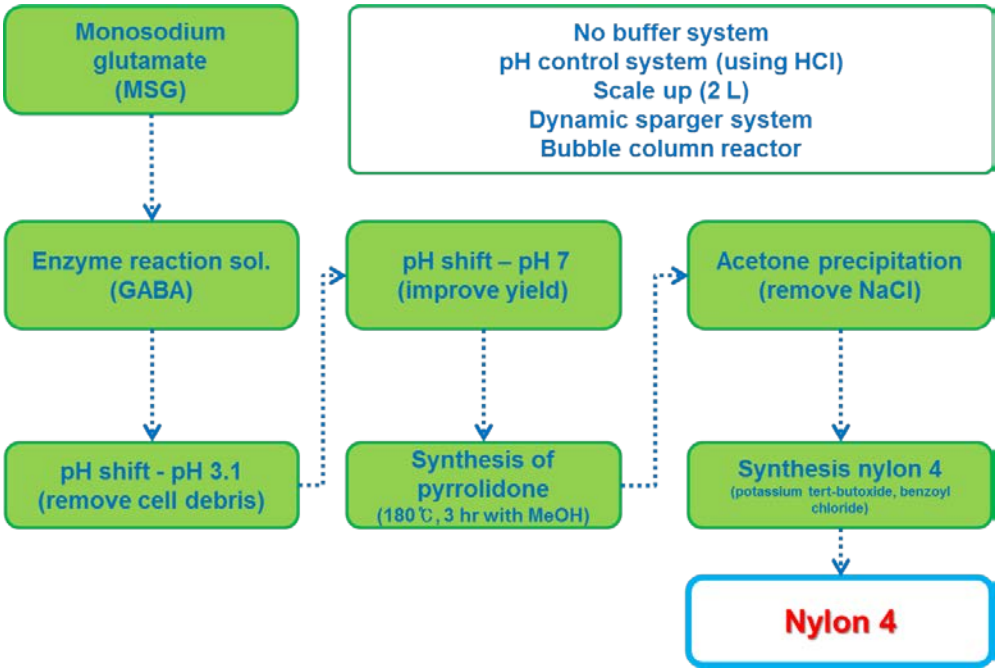


Figure 52. The overall process diagram of synthesis of Nylon 4 from monosodium glutamate.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Ⅲ－4 결론

효소반응액을 이용하여 합성한 2-pyrrolidone 을 이용하여 nylon 4 를 합성하였다. Nylon 4 의 합성에 사용할 2-pyrrolidone 을 효소반응액을 이용하여 합성하기 위하여 pH shift 를 이용하여 cell debris 를 제거하였으며, 상등액을 2-pyrrolidone 과 nylon 4 의 합성 수율을 증진시키기 위하여 acetone precipition 을 하여 NaCl 을 제거하였다. NaCl 이 제거된 상등액은 nylon 4 의 합성수율 증가를 위하여 pH 7 로 조정하였다. Cell debris 와 NaCl 을 제거한 반응액에 methanol 을 첨가하여 고압반응기에서 2-pyrrolidone 을 합성하였다. 합성된 2-pyrrolidone 은 촉매로 potassium tert-butoxide 를 개시제로 benzoyl chloride 를 이용하여 nylon 4 를 합성하였다.

Monosodium glutamate 로부터 nylon 4 를 합성하기 위하여 본 연구에서는 monosodium glutamate 를 gamma amino butyric acid 로 전환시키는 효소를 생산하기 위하여 재조합 균주를 개발하였다. 재조합 균주는 *E.coli* BL-21 균주를 사용하였으며, gene 은 *E. coli* 로부터 추출한 GadB 를 사용하였며. Vector 는 pET-22b(+)(5493 bp), promoter 는 T7 promoter 를 이용하여 GAD 의 발현에 성공하였다. 발현에 성공한 균주는 배지조성 glucose, MSG, yeast extract, ammonium sulfate, magnesium sulfate, monopotassium phosphate, dipotassium phosphate 각각 40, 20, 1, 6, 0.4, 3, 3 g/L 으로 37℃, pH 5.5 로 24 hr 동안 배양하였다. 그 결과 3.7 g/L 의 건조 균체량의 균을 생산하였으며, 생산된 균을 원심분리 후 초음파 파쇄기를 이용하여 세포벽을 파쇄하고 GAD 를 포함하고 있는 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액은 MSG 를 GABA 로 전환하기 위한 반응기에 사용되었다. GABA 를 생산하기 위한 반응기는 반응 부피를 2 L 로 scale-up 하였으며, 반응의 전환률을 높이기 위하여 pH control system 을 적용하였으며, pH control 은 HCl 을 이용하여 제어하였다. 화학 합성공정의 도입을 위하여

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

효소반응계는 buffer 를 배제한 조건에서 수행하였으며, 효소의 구조적 안정성을 증진시키리 위하여 동분사 방식을 이용하여 pH 제어를 수행하는 bubble column reactor 를 제작하였다. 제작된 반응기를 이용하여 1 M 의 MSG 를 2 L 반응 부피에서 4 시간에 80 %전환하는데 성공하였다. 반응이 종결된 반응액은 pH 를 3.1 로 변화시키는 pH shift method 를 이용하여 반응액에 존재하는 cell debris 및 MSG 를 제거하고 nylon 의 합성 수율을 높이기 위하여 pH 7 로 적정 한다. 적정한 반응액에 methanol 을 첨가하여 고압반응기에서 3 시간 반응하여 2-pyrrolidone 을 합성하고 합성된 2-pyrrolidone 은 감압증발기를 이용하여 methanol 을 제거하여 준 뒤 acetone precipitation 을 이용하여 잔존하는 Nacl 을 제거하여 준다. 이렇게 합성된 2-pyrrolidone 은 촉매로 potassium tert-butoxide 를 개시제로 benzoyl chloride 를 이용하여 nylon 4 합성에 성공하였다.

본 연구에서 수행한 실험은 MSG 로부터 GABA 를 생산하는 효소공정과 GABA 를 이용한 2-pyrrolidone 의 합성 및 2-pyrrolidone 을 이용한 nylon 4 의 화학적 합성을 결합한 실험으로 각각의 물질을 분말 또는 단일상으로 분리하는 공정을 배제하여 대량생산 공정의 도입에 필요한 기초적인 연구이다. 각 물질의 합성 또는 생산 공정의 최적화를 통한 가격경쟁력을 갖는다면, 대량생산공정으로 적용이 가능할 것으로 생각된다.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

참고문헌

1. Kang, T.J., N.A.T. Ho, and S.P. Pack, (2013) Buffer-free production of gamma-aminobutyric acid using an engineered glutamate decarboxylase from Escherichia coli. *Enzyme and Microbial Technology*. 53(3): 200-205.
2. Guijin, Z. and A.W. Bown, (1997) The rapid determination of γ-aminobutyric acid. *Phytochemistry*. 44(6): 1007-1009.
3. Lambrecht, R.H.D., G. Slegers, G. Mannens, and A. Claeys, (1987) Immobilization of glutamate decarboxylase and the preparation of an enzyme column for the synthesis of γ-[13N]aminobutyric acid. *Enzyme and Microbial Technology*. 9(4): 221-224.
4. Jow, F., D. Chiu, H.-K. Lim, T. Novak, and S. Lin, (2004) Production of GABA by cultured hippocampal glial cells. *Neurochemistry International*. 45(2-3): 273-283.
5. Palizvan, M.R., K. Sohya, K. Kohara, A. Maruyama, H. Yasuda, F. Kimura, and T. Tsumoto, (2004) Brain-derived neurotrophic factor increases inhibitory synapses, revealed in solitary neurons cultured from rat visual cortex. *Neuroscience*. 126(4): 955-966.
6. Ko, C.Y., H.-T.V. Lin, and G.J. Tsai, (2013) Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by Lactobacillus brevis FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model. *Process Biochemistry*. 48(4): 559-568.
7. El-faramawy, Y.A., M.H. El-banouby, P. Sergeev, A.K. Mortagy, M.S. Amer, and A.M. Abdel-tawab, (2009) Changes in glutamate decarboxylase enzyme activity and tau-protein phosphorylation in the hippocampus of old rats exposed to chronic mild stress: Reversal with the neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 91(3): 339-344.
8. Thornalley, P.J., (1993) The glyoxalase system in health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 14(4): 287-371.
9. Komatsuzaki, N., J. Shima, S. Kawamoto, H. Momose, and T. Kimura, (2005) Production of -aminobutyric acid (GABA) by Lactobacillus paracasei isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology*. 22(6): 497-504.
10. Irigoyen, A., M. Ortigosa, I. Juansaras, M. Oneca, and P. Torre, (2007) Influence of an adjunct culture of Lactobacillus on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewe' s-milk cheese. *Food Chemistry*. 100(1): 71-80.
11. Jeng, K.-C., C.-S. Chen, Y.-P. Fang, R.C.-W. Hou, and Y.-S. Chen,

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(2007) Effect of Microbial Fermentation on Content of Statin, GABA, and Polyphenols in Pu-Erh Tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(21): 8787-8792.

12. Gut, H., P. Dominici, S. Pilati, A. Astegno, M.V. Petoukhov, D.I. Svergun, M.G. Gr□tter, and G. Capitani, (2009) A Common Structural Basis for pH- and Calmodulin-mediated Regulation in Plant Glutamate Decarboxylase. *Journal of Molecular Biology*. 392(2): 334-351.
13. Iimure, T., M. Kihara, N. Hirota, T. Zhou, K. Hayashi, and K. Ito, (2009) A method for production of γ-amino butyric acid (GABA) using barley bran supplemented with glutamate. *Food Research International*. 42(3): 319-323.
14. Le Vo, T., T. Kim, and S. Hong, (2012) Effects of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid (GABA) transporter on the bioconversion of GABA in engineered Escherichia coli. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 35(4): 645-650.
15. Ueno, H., (2000) Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 10(1-3): 67-79.
16. Dkhissi, O., J.-F. Julien, M. Wasowicz, N. Dalil-Thiney, J. Nguyen-Legros, and C. Versaux-Botteri, (2001) Differential expression of GAD65 and GAD67 during the development of the rat retina. *Brain Research*. 919(2): 242-249.
17. Fenalti, G., R.H.P. Law, A.M. Buckle, C. Langendorf, K. Tuck, C.J. Rosado, N.G. Faux, K. Mahmood, C.S. Hampe, J.P. Banga, M. Wilce, J. Schmidberger, J. Rossjohn, O. El-Kabbani, R.N. Pike, A.I. Smith, I.R. Mackay, M.J. Rowley, and J.C. Whisstock, (2007) GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nat Struct Mol Biol*. 14(4): 280-286.
18. Chu, W.C. and D.E. Metzler, (1994) Enzymatically Active Truncated Cat Brain Glutamate Decarboxylase: Expression, Purification, and Absorption Spectrum. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 313(2): 287-295.
19. Jebai, F., N. Hanoun, M. Hamon, J. Thibault, G. Peltre, F. Gros, and M. Krieger, (1997) Expression, Purification, and Characterization of Rat Aromaticl-Amino Acid Decarboxylase inEscherichia coli. *Protein Expression and Purification*. 11(2): 185-194.
20. Szab□, G., Z. Kartarova, B. Hoertnagl, R. Somogyi, and G. Sperk, (2000) Differential regulation of adult and embryonic glutamate decarboxylases in rat dentate granule cells after kainate-induced limbic seizures. *Neuroscience*. 100(2): 287-295.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

21. Caveney, S. and B. Cameron Donly, *Neurotransmitter transporters in the insect nervous system*, in *Advances in Insect Physiology*. 2002, Academic Press. p. 55-149.
22. Lee, B.-J., J.-S. Kim, Y.M. Kang, J.-H. Lim, Y.-M. Kim, M.-S. Lee, M.-H. Jeong, C.-B. Ahn, and J.-Y. Je, (2010) Antioxidant activity and γ-aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by Lactobacillus brevis BJ20 isolated from traditional fermented foods. *Food Chemistry*. 122(1): 271-276.
23. Oh, C.-H. and S.-H. Oh, (2004) Effects of Germinated Brown Rice Extracts with Enhanced Levels of GABA on Cancer Cell Proliferation and Apoptosis. *Journal of Medicinal Food*. 7(1): 19-23.
24. Wu, F.-C., S.-Z. Chou, and I.-L. Shih, (2013) Factors affecting the production and molecular weight of levan of Bacillus subtilis natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 44(6): 846-853.
25. Beba, A. and F.S. Atalay, (1986) Mathematical models for methane production in batch fermenters. *Biomass*. 11(3): 173-184.
26. Bhat, J., M. Chidambaram, and K.P. Madhavan, (1991) Robust control of a batch-fed fermenter. *Journal of Process Control*. 1(3): 146-151.
27. Dussap, C.G. and J.B. Gros, (1984) Interpretation of static and dynamic responses of a dissolved oxygen electrode in viscous broths. *Analytica Chimica Acta*. 163(0): 151-160.
28. Ahmad, M.N., C.R. Holland, and G. McKay, (1994) Mass transfer studies in batch fermentation: Mixing characteristics. *Journal of Food Engineering*. 23(2): 145-158.
29. Lonsane, B.K. and M.V. Ramesh, *Production of Bacterial Thermostable α-Amylase by Solid-State Fermentation: A Potential Tool for Achieving Economy in Enzyme Production and Starch Hydrolysis*, in *Advances in Applied Microbiology*, L.N. Saul and I.L. Allen, Editors. 1990, Academic Press. p. 1-56.
30. Jun, C., J.C. Joo, J.H. Lee, and Y.H. Kim, (2014) Thermostabilization of glutamate decarboxylase B from Escherichia coli by structure-guided design of its pH-responsive N-terminal interdomain. *Journal of Biotechnology*. 174(0): 22-28.
31. Aminot, A., D.S. Kirkwood, and R. K□rouel, (1997) Determination of ammonia in seawater by the indophenol-blue method: Evaluation of the ICES NUTS I/C 5 questionnaire. *Marine Chemistry*. 56(1-2): 59-75.
32. Breuil, C. and J.N. Saddler, (1985) Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme and Microbial Technology*. 7(7): 327-332.

33. Sethi, M.L., (1993) Enzyme inhibition X: Colorimetric method for determining gabase activity and its comparison with a spectrophotometric method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 11(7): 613-617.
34. O'Byrne, C.P., C. Feehily, R. Ham, and K.A.G. Karatzas, (2011) A modified rapid enzymatic microtiter plate assay for the quantification of intracellular γ-aminobutyric acid and succinate semialdehyde in bacterial cells. *Journal of Microbiological Methods*. 84(1): 137-139.
35. Chen, L., Q. Chen, Z. Zhang, and X. Wan, (2009) A novel colorimetric determination of free amino acids content in tea infusions with 2,4-dinitrofluorobenzene. *Journal of Food Composition and Analysis*. 22(2): 137-141.
36. Liu, Z. and L.M. Sayre, (2004) Synthesis of N,N-dimethyl-2,4-dinitro-5-fluorobenzylamine and its reactions with amino acids and peptides. *Tetrahedron*. 60(7): 1601-1610.
37. Bhushan, R. and H. Br□ckner, (2011) Use of Marfey's reagent and analogs for chiral amino acid analysis: Assessment and applications to natural products and biological systems. *Journal of Chromatography B*. 879(29): 3148-3161.
38. Hashemi, M., M. Teymouri, A. Rashidi, and M.M. Khodaei, (2014) Mesoporous catalyst of Co/MWCNTs as an effective catalyst in toluene hydrogenation and data analysis using response surface methodology (RSM). *Materials Letters*. 126(0): 253-258.
39. Bo, R., X. Ma, Y. Feng, Q. Zhu, Y. Huang, Z. Liu, C. Liu, Z. Gao, Y. Hu, and D. Wang, (2015) Optimization on conditions of Lycium barbarum polysaccharides liposome by RSM and its effects on the peritoneal macrophages function. *Carbohydrate Polymers*. 117(0): 215-222.
40. Pezoti Junior, O., A.L. Cazetta, R.C. Gomes, □.O. Bariz□o, I.P.A.F. Souza, A.C. Martins, T. Asefa, and V.C. Almeida, (2014) Synthesis of ZnCl2-activated carbon from macadamia nut endocarp (Macadamia integrifolia) by microwave-assisted pyrolysis: Optimization using RSM and methylene blue adsorption. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 105(0): 166-176.
41. Liu, R., F. Zhao, X. Yu, K. Naito, H. Ding, X. Qu, and Q. Zhang, (2014) Synthesis of biopolymer-grafted nanodiamond by ring-opening polymerization. *Diamond and Related Materials*. 50(0): 26-32.
42. Kundu, D., C. Hazra, A. Chatterjee, A. Chaudhari, and S. Mishra,

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

(2014) Biopolymer and biosurfactant-graft-calcium sulfate/polystyrene nanocomposites: Thermophysical, mechanical and biodegradation studies. *Polymer Degradation and Stability*. 107(0): 37-52.

43. Rahul, R., S. Kumar, U. Jha, and G. Sen, (2015) Cationic inulin: A plant based natural biopolymer for algal biomass harvesting. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72(0): 868-874.
44. Batista, A.P., M.C. Nunes, A. Raymundo, L. Gouveia, I. Sousa, F. Cordob□s, A. Guerrero, and J.M. Franco, (2011) Microalgae biomass interaction in biopolymer gelled systems. *Food Hydrocolloids*. 25(4): 817-825.
45. Lakra, R., R. Saranya, Y. Lukka Thuyavan, S. Sugashini, K.M.M.S. Begum, and G. Arthanareeswaran, (2013) Separation of acetic acid and reducing sugars from biomass derived hydrosylate using biopolymer blend polyethersulfone membrane. *Separation and Purification Technology*. 118(0): 853-861.
46. Zahari, M.A.K.M., H. Ariffin, M.N. Mokhtar, J. Salihon, Y. Shirai, and M.A. Hassan, Case study for a palm biomass biorefinery utilizing renewable non-food sugars from oil palm frond for the production of poly(3-hydroxybutyrate) bioplastic. *Journal of Cleaner Production*.(0).
47. Engelking, L.R., *Chapter 6 - Enzyme Kinetics*, in *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition)*, L.R. Engelking, Editor. 2015, Academic Press: Boston. p. 32-38.
48. Lorsch, J.R., *Chapter One - Practical Steady-State Enzyme Kinetics*, in *Methods in Enzymology*, L. Jon, Editor. 2014, Academic Press. p. 3-15.
49. Nakano, S., M. Dadashipour, and Y. Asano, (2014) Structural and functional analysis of hydroxynitrile lyase from Baliospermum montanum with crystal structure, molecular dynamics and enzyme kinetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1844(12): 2059-2067.
50. Segel, I.H., *Enzyme Kinetics*, in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, W.J.L.D. Lane, Editor. 2013, Academic Press: Waltham. p. 216-220.
51. Sengupta, S., *3.3 - Reaction Kinetics and Reactors*, in *Comprehensive Water Quality and Purification*, S. Ahuja, Editor. 2014, Elsevier: Waltham. p. 30-46.
52. Clarke, K.G., *6 - Enzymes as biocatalysts*, in *Bioprocess Engineering*, K.G. Clarke, Editor. 2013, Woodhead Publishing. p. 75-96.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

53. Sheldon, R.A., *9.15 Industrial Applications of Asymmetric Synthesis using Cross-Linked Enzyme Aggregates*, in *Comprehensive Chirality*, E.M. Carreira and H. Yamamoto, Editors. 2012, Elsevier: Amsterdam. p. 353-366.
54. Markoglou, N. and I. W. Wainer, *Chapter 7 Immobilized enzyme reactors in liquid chromatography: On-line bioreactors for use in synthesis and drug discovery*, in *Handbook of Analytical Separations*, D.W. Ian, Editor. 2003, Elsevier Science B.V. p. 215-234.
55. Zhang, C. and X.H. Xing, *2.23 - Enzyme Bioreactors*, in *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, M. Moo-Young, Editor. 2011, Academic Press: Burlington. p. 319-329.
56. Kula, M.-R. and C. Wandrey, *[2] Continuous enzymatic transformation in an enzyme-membrane reactor with simultaneous NADH regeneration*, in *Methods in Enzymology*, M. Klaus, Editor. 1987, Academic Press. p. 9-21.
57. Nath, A., S. Chakraborty, and C. Bhattacharjee, *20 - Bioreactor and Enzymatic Reactions in Bioremediation*, in *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, S. Das, Editor. 2014, Elsevier: Oxford. p. 457-497.
58. Liu, S., *Chapter 8 - Enzymes*, in *Bioprocess Engineering*, S. Liu, Editor. 2013, Elsevier: Amsterdam. p. 323-390.
59. Doran, P.M., *Chapter 14 - Reactor Engineering*, in *Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)*, P.M. Doran, Editor. 2013, Academic Press: London. p. 761-852.
60. Wells, A., *9.11 Industrial Applications of Biocatalysis: An Overview*, in *Comprehensive Chirality*, E.M. Carreira and H. Yamamoto, Editors. 2012, Elsevier: Amsterdam. p. 253-287.
61. Lilly, M.D. and P. Dunnill, *[49] Immobilized-enzyme reactors*, in *Methods in Enzymology*, M. Klaus, Editor. 1976, Academic Press. p. 717-738.
62. McDuffie, N.G., *Chapter 6 - Enzyme Reactors*, in *Bioreactor Design Fundamentals*, N.G. McDuffie, Editor. 1991, Butterworth-Heinemann. p. 77-92.
63. Jungbauer, A. and R. Hahn, *Chapter 27 - Catalysts and Enzyme Reactors*, in *Journal of Chromatography Library*, T.B.T. František Švec and D. Zdeněk, Editors. 2003, Elsevier. p. 699-724.
64. Vieth, W.R., K. Venkatasubramanian, A. Constantinides, and B. Davidson, *Design and Analysis of Immobilized-Enzyme Flow Reactors*, in *Applied Biochemistry and Bioengineering*, E.K.-K. Lemuel B. Wingard and G. Leon, Editors. 1976, Elsevier. p. 221-

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

327.
65. Collinson, S.R. and W. Thielemans, (2010) The catalytic oxidation of biomass to new materials focusing on starch, cellulose and lignin. *Coordination Chemistry Reviews*. 254(15-16): 1854-1870.
66. Banerjee, C., P. Gupta, S. Mishra, G. Sen, P. Shukla, and R. Bandopadhyay, (2012) Study of polyacrylamide grafted starch based algal flocculation towards applications in algal biomass harvesting. *International Journal of Biological Macromolecules*. 51(4): 456-461.
67. Guragain, Y.N., K.M. Ganesh, S. Bansal, R. Sai Sathish, N. Rao, and P.V. Vadlani, (2014) Low-lignin mutant biomass resources: Effect of compositional changes on ethanol yield. *Industrial Crops and Products*. 61(0): 1-8.
68. Savy, D. and A. Piccolo, (2014) Physical-chemical characteristics of lignins separated from biomasses for second-generation ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 62(0): 58-67.
69. Fu, L., S.A. McCallum, J. Miao, C. Hart, G.J. Tudryn, F. Zhang, and R.J. Linhardt, Rapid and accurate determination of the lignin content of lignocellulosic biomass by solid-state NMR. *Fuel*.(0).
70. Pattiya, A., (2011) Bio-oil production via fast pyrolysis of biomass residues from cassava plants in a fluidised-bed reactor. *Bioresource Technology*. 102(2): 1959-1967.
71. Peterseim, J.H., A. Tadros, U. Hellwig, and S. White, (2014) Increasing the efficiency of parabolic trough plants using thermal oil through external superheating with biomass. *Energy Conversion and Management*. 77(0): 784-793.
72. Tang, Q., Y. Zheng, T. Wang, and J. Wang, (2014) Vacuum pyrolysis of plant oil asphalt for transport fuel production catalyzed by alkali metal compounds. *Fuel Processing Technology*. 126(0): 192-198.
73. Mukherjee, B., B. Bindhani, H. Saha, and M.R. Ray, (2014) Increased oxidative DNA damage and decreased expression of base excision repair proteins in airway epithelial cells of women who cook with biomass fuels. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 38(2): 341-352.
74. Zhang, X., X. Wu, S. Zhang, Y. Xing, R. Wang, and W. Liang, (2014) Organic amendment effects on aggregate-associated organic C, microbial biomass C and glomalin in agricultural soils. *CATENA*. 123(0): 188-194.
75. Maruyama, T., Y. Terashima, S. Takeda, F. Okazaki, and M. Goto, (2014) Selective adsorption and recovery of precious metal ions using protein-rich biomass as efficient adsorbents. *Process*

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Biochemistry. 49(5): 850-857.

76. Cubas, S.A., E. Foresti, J.A.D. Rodrigues, S.M. Ratusznei, and M. Zaiat, (2011) Effect of impeller type and stirring frequency on the behavior of an AnSBBR in the treatment of low-strength wastewater. *Bioresource Technology*. 102(2): 889-893.
77. Shukla, V.B., U. Parasu Veera, P.R. Kulkarni, and A.B. Pandit, (2001) Scale-up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 8(1): 19-29.
78. Campolo, M., F. Sbrizzai, and A. Soldati, (2003) Time-dependent flow structures and Lagrangian mixing in Rushton-impeller baffled-tank reactor. *Chemical Engineering Science*. 58(8): 1615-1629.
79. Salehi, K., S.M. Jokar, J. Shariati, M. Bahmani, M.A. Sedghamiz, and M.R. Rahimpour, (2014) Enhancement of CO conversion in a novel slurry bubble column reactor for methanol synthesis. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*. 21(0): 170-183.
80. Haghtalab, A., M. Nabipoor, and S. Farzad, (2012) Kinetic modeling of the Fischer-Tropsch synthesis in a slurry phase bubble column reactor using Langmuir-Freundlich isotherm. *Fuel Processing Technology*. 104(0): 73-79.
81. Youssef, A.A., M.E. Hamed, M.H. Al-Dahhan, and M.P. Duduković, (2014) A new approach for scale-up of bubble column reactors. *Chemical Engineering Research and Design*. 92(9): 1637-1646.
82. Zhao, B., Y. Su, and Y. Peng, (2013) Effect of reactor geometry on aqueous ammonia-based carbon dioxide capture in bubble column reactors. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. 17(0): 481-487.
83. Xia, L., A.W.-K. Law, and A.G. Fane, (2013) Hydrodynamic effects of air sparging on hollow fiber membranes in a bubble column reactor. *Water Research*. 47(11): 3762-3772.
84. Cheng, L., T. Li, T.C. Keener, and J.Y. Lee, (2013) A mass transfer model of absorption of carbon dioxide in a bubble column reactor by using magnesium hydroxide slurry. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. 17(0): 240-249.
85. Lemoine, R., A. Behkish, L. Sehabiague, Y.J. Heintz, R. Oukaci, and B.I. Morsi, (2008) An algorithm for predicting the hydrodynamic and mass transfer parameters in bubble column and slurry bubble column reactors. *Fuel Processing Technology*. 89(4): 322-343.
86. Behin, J., (2012) Deinking in bubble column and airlift reactors: Influence of wastewater of Merox unit as pulping liquor. *Chemical Engineering Research and Design*. 90(8): 1045-1051.

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

87. Behkish, A., R. Lemoine, L. Sehabiague, R. Oukaci, and B.I. Morsi, (2007) Gas holdup and bubble size behavior in a large-scale slurry bubble column reactor operating with an organic liquid under elevated pressures and temperatures. *Chemical Engineering Journal*. 128(2-3): 69-84.
88. Rahimpour, M.R., S.M. Jokar, and Z. Jamshidnejad, (2012) A novel slurry bubble column membrane reactor concept for Fischer-Tropsch synthesis in GTL technology. *Chemical Engineering Research and Design*. 90(3): 383-396.
89. Sehabiague, L., R. Lemoine, A. Behkish, Y.J. Heintz, M. Sanoja, R. Oukaci, and B.I. Morsi, (2008) Modeling and optimization of a large-scale slurry bubble column reactor for producing 10,000 bbl/day of Fischer-Tropsch liquid hydrocarbons. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*. 39(2): 169-179.
90. Shaikh, A. and M. Al-Dahhan, (2013) A new method for online flow regime monitoring in bubble column reactors via nuclear gauge densitometry. *Chemical Engineering Science*. 89(0): 120-132.
91. Nanou, K., T. Roukas, and E. Papadakis, (2011) Oxidative stress and morphological changes in Blakeslea trispora induced by enhanced aeration during carotene production in a bubble column reactor. *Biochemical Engineering Journal*. 54(3): 172-177.
92. Yuan, X.-X., Q. Zhou, X.-Y. Li, P. Yang, K.-K. Yang, and Y.-Z. Wang, (2014) Degradation of nylon 6 to produce a "pseudo" amino acid ionic liquid. *Polymer Degradation and Stability*. 109(0): 171-174.
93. Abdal-hay, A., A. Salam Hamdy, Y. Morsi, K. Abdelrazek Khalil, and J. Hyun Lim, (2014) Novel bone regeneration matrix for next-generation biomaterial using a vertical array of carbonated hydroxyapatite nanoplates coated onto electrospun nylon 6 nanofibers. *Materials Letters*. 137(0): 378-381.
94. Lockwood, K.T., Y. Zhang, P.J. Bates, and D.L. DuQuesnay, (2014) Effect of temperature on fatigue strength of vibration welded and unwelded glass reinforced nylon 6. *International Journal of Fatigue*. 66(0): 111-117.
95. Yanilmaz, M., M. Dirican, and X. Zhang, (2014) Evaluation of electrospun SiO2/nylon 6,6 nanofiber membranes as a thermally-stable separator for lithium-ion batteries. *Electrochimica Acta*. 133(0): 501-508.
96. Abdal-hay, A., Y.S. Oh, A. Yousef, H.R. Pant, P. Vanegas, and J.K. Lim, (2014) In Vitro Deposition of Ca-P Nanoparticles on Air Jet

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

Spinning Nylon 6 Nanofibers Scaffold For Bone Tissue Engineering. *Applied Surface Science*. 307(0): 69-76.

97. Reyes-Gallardo, E.M., R. Lucena, S. C□rdenas, and M. Valc□rcel, (2014) Magnetic nanoparticles-nylon 6 composite for the dispersive micro solid phase extraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples. *Journal of Chromatography A*. 1345(0): 43-49.

98. Reuvers, N.J.W., H.P. Huinink, H.R. Fischer, and O.C.G. Adan, (2014) Migration of divalent ions in nylon 6 films. *Polymer*. 55(8): 2051-2058.

99. Uecker, J.C., G.C. Tepper, and J. Rosell-Llompart, (2010) Ion-assisted collection of Nylon-4,6 electrospun nanofibers. *Polymer*. 51(22): 5221-5228.

100. Tachibana, K., K. Hashimoto, M. Yoshikawa, and H. Okawa, (2010) Isolation and characterization of microorganisms degrading nylon 4 in the composted soil. *Polymer Degradation and Stability*. 95(6): 912-917.

101. Yamauchi, K., S. Kuroki, and I. Ando, (2002) Structural characterization of nylon 4 in the solid state by high-resolution solid-state 1H NMR spectroscopy. *Polymer*. 43(11): 3331-3333.

102. Brooke, G.M., S. Mohammed, and M.C. Whiting, (1999) The synthesis of oligomers related to nylon 4 6 and nylon 6 6. *Polymer*. 40(3): 773-788.

103. Kavitha, T., T. Vasantha, P. Venkatesu, R.S. Rama Devi, and T. Hofman, (2014) Thermophysical properties for the mixed solvents of N-methyl-2-pyrrolidone with some of the imidazolium-based ionic liquids. *Journal of Molecular Liquids*. 198(0): 11-20.

104. Usula, M., E. Matteoli, F. Leonelli, F. Mocci, F.C. Marincola, L. Gontrani, and S. Porcedda, (2014) Thermo-physical properties of ammonium-based ionic liquid + N-methyl-2-pyrrolidone mixtures at 298.15 K. *Fluid Phase Equilibria*. 383(0): 49-54.

105. Bohloul, M.R., A. Vatani, and S.M. Peyghambarzadeh, (2014) Experimental and theoretical study of CO2 solubility in N-methyl-2-pyrrolidone (NMP). *Fluid Phase Equilibria*. 365(0): 106-111.

106. Nemati-Kande, E. and H. Shekaari, (2013) Salting-out effect of sodium, potassium, carbonate, sulfite, tartrate and thiosulfate ions on aqueous mixtures of acetonitrile or 1-methyl-2-pyrrolidone: A liquid-liquid equilibrium study. *Fluid Phase Equilibria*. 360(0): 357-366.

107. Kimura, F., T. Sugiura, and H. Ogawa, (2013) Solvation of N-

Collection @ chosun

조선대학교 CHOSUN UNIVERSITY

methyl-2-pyrrolidone and N,N-dimethylpropanamide in cyclohexane, heptane, n-alkan-1-ols(C1-C4) and water at 298.15 K. *Thermochimica Acta*. 573(0): 206-212.

108. Kalbasi, R.J. and M. Negahdari, (2014) Synthesis and characterization of mesoporous poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) containing palladium nanoparticles as a novel heterogeneous organocatalyst for Heck reaction. *Journal of Molecular Structure*. 1063(0): 259-268.

109. Brocas, A.-L., C. Mantzaridis, D. Tunc, and S. Carlotti, (2013) Polyether synthesis: From activated or metal-free anionic ring-opening polymerization of epoxides to functionalization. *Progress in Polymer Science*. 38(6): 845-873.

110. Huang, S., C.L. Toh, L. Yang, S. Phua, R. Zhou, A. Dasari, and X. Lu, (2014) Reinforcing nylon 6 via surface-initiated anionic ring-opening polymerization from stacked-cup carbon nanofibers. *Composites Science and Technology*. 93(0): 30-37.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

감사의 글

The journey is the reward

그간 힘든 일도 많았지만, 여정이 보상이라는 말처럼 제 박사 학위 기간 동안 함께한 모든 시간과 사건, 사람들에게 고마움을 전하고 싶습니다. 이제 새로운 출발을 해야만 하는 시점에서 아쉬움도 많고 두려움도 앞서지만, 자신감과 열정으로 두려움을 극복하며 앞으로 전진하겠다는 각오를 다져봅니다.

항상 친정 어머니 같았던 손정선 박사님,

삼촌이자 친구이자 선배님이셨던 최환석 박사님,

아낌없는 사랑을 주신 최문희 박사님,

든든한 버팀목이 되어주신 유승호 박사님,

항상 제 편에 되어주신 김태훈 박사님,

항상 든든한 지원군이 되어주신 최규선, 김성현 선배님 그리고 조정훈,

때로는 사회의 현실을 직시할 수 있도록 도와준 황일룡 선배님,

언제나 커피와 담배의 벗이 되어주신 임남규 선배님,

언제나 저와 함께이고 싶어하는 정진오, 조항, 이창호 후배님,

실험실에서 항상 함께해준 남보미, 김보람, 나혜영 후배님,

박사 학위 기간 동안 가장 오랜 시간을 보낸 조하늘, 김은지 후배님

모두모두 감사합니다.

항상 조선대학교 화학공학과를 생각하시는 김정규, 신현재, 이재욱 교수님 강릉에서 저에게 힘을 전해주신 염승호 교수님, 그리고 4년간 저를 지도해주신 이중헌 교수님과 졸업의 기쁨을 함께하고 싶습니다.

Collection @ chosun

조선대학교
CHOSUN UNIVERSITY

저작물 이용 허락서

학 과	화학공학과	학 번	20117209	과 정	박사
성 명	한글: 김의진 한문: 金義眞 영문: Eui Jin Kim				
주 소	광주광역시 남구 봉선동 라인하이츠 101 동 303 호				
연락처	e-mail : 01096606999@paran.com				
논문제목	재조합 glutamate decarboxylase 를 이용한 γ-Aminobutyric acid(GABA) 생산공정 최적화				
	Optimization of GABA production process using recombinant glutamate decarboxylase				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의( ) 반대(●)

2015년 2월

저 작 자 : 김의진(서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하

Collection @ chosun