

기능성 신소재 이소말트 생산기술개발 연구  
Process Development of New Functional Ingredient,  
Isomalt

(주)보락

과학기술부

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성 신소재 이소말트 생산기술개발에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2000. 2. 22

주관연구기관명 : (주)보락

주관연구책임자 : 김 상 용

연 구 원 : 곽 일 환

“ : 정 익 수

“ : 강 훈 석

“ : 박 진 규

“ : 황 선 원

# 요 약 문

## I. 제목

기능성 신소재 이소말트의 생산기술개발 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

일본, 유럽, 미국의 경우 전체적인 올리고당 시장은 정체 내지는 감소추세인데 반하여 당알코올 시장은 지속적인 증가 추세에 있고, 특히 이소말트의 경우 매년 15% 이상씩 그 시장규모가 증가하고 있다. 이소말트는 현재 독일 Sudzucker사에서 만 독점 생산하고 있으며 이소말트의 응용범위가 음료, 제과, 제빵 등 각 분야로 확대됨에 따라서 국내의 경우 약 1,000톤 규모의 시장을 형성하며 전량 수입에 의존하고 있다. 따라서 조기에 국내기술을 확보하고 생산에 착수하여 수입대체를 도모하고자 한다. 이와 함께 kg당 공급가격이 75% 수준으로 가능할 것으로 전망되므로 선진국으로의 역수출까지 기대할 수 있다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

이소말트의 생산을 위하여는 초기 물질인 설탕을 이소말톨로스로 전환하고 이렇게 전환된 이소말톨로스를 다시 수소첨가 반응에 의해 이소말트로 전환하는 2단계 공정이 요구되는데, 이소말톨로스 전환수율을 향상시키기 위한 방법으로는 변이 처리에 의한 역가 증가, bio-reactor법의 공정 최적화, 2단계 전환공정 개발, 분리·정제방법 개발을 수행하였고, 이소말트 전환수율을 향상시키기 위한 방법으로 수소첨가 반응의 생산성 증가, 결정방법공정 개발, 물성연구, 제품특성연구 등의 내용을 수행하였다.

#### IV. 연구개발 결과

Nitrosoguanidine을 이용한 번이처리를 통해 균주개량을 수행한 결과 이소말톨로스 전환수율이 모균주 85%에서 90%로 5% 증가하였고 기타 다른 당(과당, 포도당, 트레할로스)의 비율은 상대적으로 감소하였다. 또한  $\alpha$ -glucosyltransferase의 해당 유전자 염기서열을 규명하여 cloning을 시도한 결과 전환율이 91%로 증가하였다. Bio-reactor법 공정 최적화를 통하여 이소말톨로스 생산성이 124~148 g/L/h로 향상되었고 최종 90%에 달하는 이소말톨로스 전환수율을 확보하였다. 이소말톨로스 정제는 냉각결정법에 의한 2차 결정에서 85%, 크로마토그래피법을 통하여 최종 95% 수율을 확보하였다.

이소말톨로스로부터 이소말트의 수소첨가 반응은 40%의 고형분 함량에서 120°C, 50 kg/cm<sup>2</sup>의 압력, pH 6.5~7.0 조건에서 ruthenium 촉매를 사용하여 2시간 반응시켰을 때 전환수율이 98% 이상이었고, 이때 GPM(glucopyranosyl-mannitol)과 GPS(glucopyranosyl-sorbitol)의 구성비율은 동량이었다. 이소말트 정제는 용해결정법을 통하여 98% 이상의 수율을 확보하였고, GPM과 GPS는 1 : 1 비율이었다.

이소말톨로스는 호상 요구르트 제조에, 이소말트는 캔디 제조에 이용한 결과 두 가지 모두 제품 품질 안정성에 기여하는 것으로 나타났다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

이소말트의 연구결과는 산업화에 우선적인 목표를 두고 활용할 계획이므로, 먼저 설탕에서 이소말톨로스로의 전환 과정에서 설탕보다 가격이 싼 기질을 찾으려고 한다. 전환수율은 90% 이상을 달성하여 제조원가를 세계적인 경쟁력을 갖추게 하며, 이소말톨로스 제조과정에서 나온 모액을 이용하는 방안을 찾아야 할 것이다. 이소말톨로스의 정제기술과 이소말트의 수소첨가 기술은 세계적인 수준과 경쟁할 수 있고, 단지 응용분야에 대한 연구가 추후 계속되어야 한다. 현재 세계적으로 이소말트의 공급가격은 \$ 2.5~3.0/kg 규모이고 추정제조원가는 \$ 1.5/kg 부근인 것으로 유추되어지므로 연구개발결과를 토대로 제조원가 \$ 1.0/kg 이하인 기술개발을 목표로 해야 한다.

# SUMMARY

## I. Title

Process Development of New Functional Ingredient, Isomalt

## II. Objectives and Needs of the Research

In recent years, market of oligosaccharides has been steady state or slightly decreased whereas that of sugar alcohols has continuously increased, especially the use of isomalt has increased over 15 percent. The only monopolized company of isomalt production and sales is Sudzucker GmbH in German. As the application of isomalt magnified in drink, confectionary, and baked product, the market size of isomalt in Korea increased about 1,000 ton per year. Acquiring the production technology of isomalt can make it possible to substitute import of isomalt.

## III. Contents and Scope of the Research

To produce isomalt, two steps are required as following. First step is a conversion of sucrose to isomaltulose, and second step is a hydrogenation of isomaltulose to isomalt. To improve conversion yield of isomaltulose, mutagenic methods, optimization of bio-reactor process, development of two step conversion process and improvement of purification process were studied. To improve conversion yield of isomalt, optimization of hydrogenation process and development of crystallization process were studied. And physical characteristics and applications of isomaltulose and isomalt were also studied.

#### IV. Results of the Research

The conversion yield of isomaltulose using *Erwinia rhapsodica* mutant increased 85% to 90% and other by-products such as fructose, glucose and trehalulose were decreased. Conversion yield of isomaltulose was increased 91% by studying nucleotide sequence of  $\alpha$ -glucosyltransferase and gene cloning. Productivity of isomaltulose increased to 124~148 g/L/h by optimization of bio-reactor process. The yield of isomaltulose purification was 85% and 95% by cooling crystallization and chromatography, respectively.

The hydrogenation process of isomaltulose to isomalt was optimized. Solid content of isomaltulose solution was 40%. Temperature, pressure, pH and reaction time were 120°C, 50 kg/cm<sup>2</sup>, 6.5~7.0 and 2 hours, respectively. Ruthenium was used as a catalyst. Then, the hydrogenation yield of isomalt was over 98% and ratio of GPM to GPS was almost 1 : 1. The yield of isomalt purification was over 98% by melt crystallization and the ratio of GPM to GPS was 1 : 1, too.

Applications of isomaltulose to yogurt and isomalt to hard candy contributed to extend shelf-life of product.

#### V. Suggestions

The main target of isomalt research is a commercial production and sales. Therefore, we plan to substitute sucrose for cheaper materials in isomaltulose production. To increase conversion yield of isomaltulose over 90 percent, further study will be carried out. Also another use of mother liquor in purification process of isomaltulose will be investigated. Purification technology of isomaltulose and hydrogenation process of isomalt in this study can compete with those of world major companies. And application study must be continuously carried out in future.

Recently, sales price of isomalt in world market is \$ 2.5~3.0/kg and manufacturing cost is presumed about \$ 1.5/kg. Therefore, it will be targeted to produce isomalt of which manufacturing cost is under \$ 1.0/kg on the basis of this research.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction

Chapter 2. State of Technology

Chapter 3. Contents and Results of the research

Section 1. Improvement of Conversion Yield of Isomaltulose

1. Mutagenic Methods
2. Gene Cloning
3. Development of Two Step Conversion Process
4. Optimization of Bio-reactor Process
  - (1) pH and Temperature
  - (2) Flow Rate
  - (3) Effect of L/D of Bio-reactor
  - (4) Scale up

Section 2. Improvement of Purification Process of Isomaltulose

- (1) Crystallization
- (2) Chromatography Method

Section 3. Improvement of Conversion Yield of Isomalt

Section 4. Development of Purification Process of Isomalt

Section 5. Study of Physical Characteristics and Development of Application

1. Isomaltulose
2. Isomalt



## Chapter 4. Achievement and Contribution of the Research

### Section 1. Achievement of the Research

### Section 2. Contribution of the Research

## Chapter 5. Suggestions

## Chapter 6. References

# 목 차

## 제 1 장 서론

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 이소말톨로스 전환수율 향상

1. 변이처리에 의한 역가증가
2. Gene Cloning
3. 2단계 전환공정 개발
4. Bio-reactor법 공정 최적화  
가. 반응 pH 및 반응온도  
나. 운전유속  
다. Bio-reactor의 L/D 영향  
라. Scale-up 생산

### 제 2 절 이소말톨로스 정제수율 향상

1. 결정화
2. 크로마토그래피법으로 분리 후 결정화

### 제 3 절 이소말트 전환수율 향상

### 제 4 절 이소말트 정제수율 향상

### 제 5 절 특성연구 및 용도개발

1. 이소말톨로스
2. 이소말트

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발목표 달성도

제 2 절 연구개발의 대외기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌

## 제 1 장 서론

설탕, 포도당, 과당 등 기존의 일반당류와는 달리 감미, 칼로리 이외의 제3의 기능을 가진 기능성 당류로는 각종 올리고당류와 당알코올류를 들 수 있고, 최근 건강식품에 대한 관심이 고조되면서 이들의 개발이 활기를 띠고 있다(1,2). 이들은 설탕이 갖고 있는 뛰어난 감미질을 그대로 살리는 동시에 충치유발 등의 단점을 극복해주는 등 우수한 기능성(3)으로 그 수요가 지속적으로 증가하고 있고 향후 대체감미료로서 상당한 위치를 차지할 것으로 기대되고 있다. 최근 일본, 유럽, 미국의 경우 전체적인 올리고당 시장은 정체 내지는 감소추세인데 반하여 당알코올 시장은 계속 증가추세에 있고, 특히 이소말트(Isomalt, isomaltitol, palatinit)의 경우 매년 15% 이상씩 그 시장의 규모가 증가하고 있다.

이소말트는 저칼로리(2.4 kcal/g) 및 비충치성의 신건강감미료(4)로서 감미도는 설탕의 50% 수준이고, 다른 당알코올과 달리 흡습성이 적고 향기의 발현성이 우수(5, 6)하여 캔디, 껌 등의 신규 당알코올 시장에서 상당한 시장을 형성하고 있다. 일명 상품명 파라티니트로 불리기도 하는 이소말트는 설탕과 물리적 특성이 비슷하여 bulking agent로 사용되고 다른 당알코올에서처럼 cooling effect를 형성하지는 않으나 설탕보다 산, 알칼리, 효소에 안정한 특성을 가지고 있다(6, 7)

이소말트는 이소말톨로스를 환원시켜 얻은 당알코올로 그 반응기작은 Fig. 1과 같다. 이소말트의 생성을 위해서는 2단계 공정을 거치게 되는데, 첫 번째 단계는 설탕( $\alpha$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranoside)을 효소적 변환( $\alpha$ -glucosyltransferase)에 의해 이소말톨로스( $\alpha$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)fructose, isomaltulose, 일명 palatinose)로 전환하고, 두 번째 단계는 이렇게 생성된 이소말톨로스를 수소첨가 반응에 의해 환원시킨다. 이때 수소가 첨가되는 위치에 따라  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1,6-sorbitol(GPS)과  $\alpha$ -D-glucopyranosyl-1,1-mannitol(GPM)의 두 가지 이성체가 형성되므로 이소말트는 이 두 이성질체의 동량 혼합물 상태이다. 이소말톨로스의 대량생산 방법은 크게 발효에 의한 직접생산법(8, 9)과 whole cell 고정화에 의한 bio-reactor기술(10)로 대별되는데, 후자의 경우가 반응효율이 높



고 정제비용, 폐기물처리비용 등을 감안할 때 더 경제적이며 환경친화적 기술이라 할 수 있다. 이소말트의 대량생산법으로는 수소첨가 반응(9, 11)이외에는 보고된 것이 없으며 아직까지 자연에 존재하는 어떠한 미생물에 의해서도 발효에 의해 생산된 적이 없다고 보고되었다(7).

이소말트는 현재 독일의 Sudzucker사에서만 독점 생산하고 있고, 생산능력은 연간 35,000톤 규모이며 판매가는 \$ 2.5/kg 수준으로 전세계 시장은 약 \$ 70,000,000의 규모이다. 이소말트의 응용범위가 음료, 제과, 제빵 등 각 분야로 확대됨에 따라서 국내 이소말트 시장은 약 1,000톤 규모의 시장을 형성하고 있으며 전량 수입에 의존하고 있고 이는 연간 약 \$ 3,000,000 정도의 수입에 해당한다. 따라서 조기에 국내기술을 확보하고 생산에 착수하여 수입대체를 도모함과 동시에 낮은 공급가격으로 선진국으로의 역수출까지 기대하고자 한다.

본 연구에서는 설탕을 이소말톨로스로 전환하는 1단계 공정에서 변이처리에 의한 역가 증가, bio-reactor법 공정최적화, 2단계 전환공정 개발, 분리·정제방법 개발을 수행하고, 이소말톨로스를 이소말트로 환원하는 2단계 공정에서 수소첨가 반응의 생산성 증가, 결정방법 공정 개발, 물성연구, 제품 특성연구를 통하여 제품 적용가능 기술까지 확보하고자 한다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

설탕으로부터 이소말트까지 생산하는 상업적 생산기술은 1974년 독일의 Sudzucker사, Bayer사에서 공동으로 연구, 최초로 기술개발 완료하여 이미 지난 20여년간 전세계 30,000톤 규모의 시장을 독점하고 있는 상태이다. 최초의 상업적 생산기술은 이소말톨로스를 *Protaminobacter rubrum*에 의해 직접발효법(9)으로 생산하였는데 직접발효 시는 사용 발효기질농도에 한계(설탕 20-25%)가 있으므로 생산성이 높지 않았다. Whole cell 고정화에 의한 이소말톨로스의 상업적 생산방법은 1980년 Tate & Lyle사(10)에 의해 최초로 시도되었고, 이는 사용기질농도가 높고 (55%) 반응속도가 빨라지므로 결국 생산성이 향상되는 결과를 가져오게 되어 현재 까지 보편적으로 이용되고 있다.

한편, 이소말트 시장의 지속적인 성장에 기인하여 유럽의 다국적 회사인 Cerestar, Cultor 등에서도 2001년 생산을 목표로 하여 기술개발 중에 있으나 발효 및 고정화기술, 정제기술, 수소첨가 기술 등 고도의 복합적 기술을 포함하고 있어 그 개발이 지연되고 있다.

우리나라에서는 1992년 제일제당에서 설탕으로부터 이소말톨로스까지의 생산기술을 개발하여 1997년 상업적으로 생산된바 있으나 현재는 생산이 중단된 상태이며, 이소말트까지의 생산기술은 한 번도 시도된 적이 없다. 따라서 자사에서 개발한 설탕으로부터 이소말트까지 전환하는 생산기술은 규모면, 기술적 측면에서 모두 국내 최초로 확립된 기술이며 전세계적으로도 세계 두 번째의 기술확보라 할 수 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 이소말톨로스 전환수율 향상

#### 1. 변이처리에 의한 역가증가

본 연구에서는 *Erwinia rhapontici* ATCC29283을 이용하여 발효 후 생성된  $\alpha$ -glucosyltransferase를 균체 고정화하여 설당을 기질로 이소말톨로스로 전환시키는 공정을 수행하였다.

$\alpha$ -glucosyltransferase는 균체내 효소로 설당 수용액 중에서 75~85%의 설당을 이소말톨로스로 전이시키며 나머지 15~25%는 트레할룰로스(trehalulose) 및 미량의 포도당, 과당으로 전이시키는 특성이 있다(12). 그러나 이와 같은 야생 균주의 경우 기타 다른 당의 생성비율이 상대적으로 높아 분리, 정제가 어려울 뿐만 아니라 이소말톨로스 전환수율에도 한계가 있어 결국은 제조원가가 높아지게 되므로 경쟁력이 떨어지게 된다.

자외선 처리, nitrosoguanidine(NTG)로 변이 처리하여 1,000여개의 colony를 선별하였고 HPLC로 정량분석하여 이소말톨로스 전환수율이 높고 기질 소비능이 우수한 4개의 변이주를 선별하였다. 4개의 변이주 중 야생균주에 비해 최종 이소말톨로스 전환이 약 1.1배 증가된 변이주 P2210을 이소말톨로스 생산 변이주로 선택하였다(Table 1).



Table 1. Comparison of *Erwinia rhapontici* ATCC29283 wild to mutants in yield of isomaltulose and residual sucrose concentration

Strain	Yield of isomaltulose (%)	Residual sucrose concentration(g/L)
Wild	85.0	-
P710	87.4	-
P1178	88.2	-
P2210	90.0	-

## 2. Gene cloning

이소말톨로스 전환수율을 향상시키기 위한 또 다른 방법으로 기존에 알려진  $\alpha$ -glucosyltransferase 1.3 kb의 유전자 염기서열을 바탕으로 효소의 해당유전자 전체 염기서열을 규명한 후 PCR로  $\alpha$ -glucosyltransferase 유전자를 대량으로 얻고, vector를 이용해서 원균주에 유전자를 삽입하는 방법을 시도하였다(Fig. 2). 알려진 1.3 kb의 sequence 상에 절단 부위가 존재하지 않는 제한 효소인 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sal*I, *Xba*I를 이용하여 완전히 절단하였다. 앞서 얻은 PCR 결과를 radio labeled probe로 만들었고 이를 이용하여 southern hybridization으로 찾고자 하는 gene을 screening하였다. 절단한 genomic DNA 조각들을 pUC19에 ligation시키고 (pUC-pal이라고 명명) colony hybridization으로 확인하였다. *Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I의 경우에 있어서는 southern blot의 결과 나타난 signal의 크기가 약 20~23 kb 정도 되어 너무 큰 관계로 이용하지 못했고, 2.5 kb 정도의 *Eco*RI으로 잘린 조각과 약 5.5 kb 정도의 *Sal*I으로 잘린 조각을 이용하였다. 약 1,500개의 colony 중에서 colony hybridization으로 16개의 colony를 얻었다. 그리고 알려진 1.3 kb 크기의 sequence 내의 primer를 이용해 PCR로 확인하여 *Eco*RI으로 자른 조각이 insertion된 plasmid를 지닌 colony 하나와 *Sal*I으로 자른 조각이 insertion된 plasmid를 지닌 colony 2개를 선택하였다. 그 결과 전환수율이 91%로 증가하였으나 반응시간이 7시간으로 변이주 P2210보다 3시간 느린 반응속도를 나타내었다(Table 2).

이소말톨로스 전환수율을 감안하면 cloning한 균주를 사용해야 할 것이나 1% 수율 차이에 의한 생산성 향상 효과보다는 3시간 반응시간 단축에 의한 효과가 큰 변이주 P2210을 본 생산에서 사용하였다.

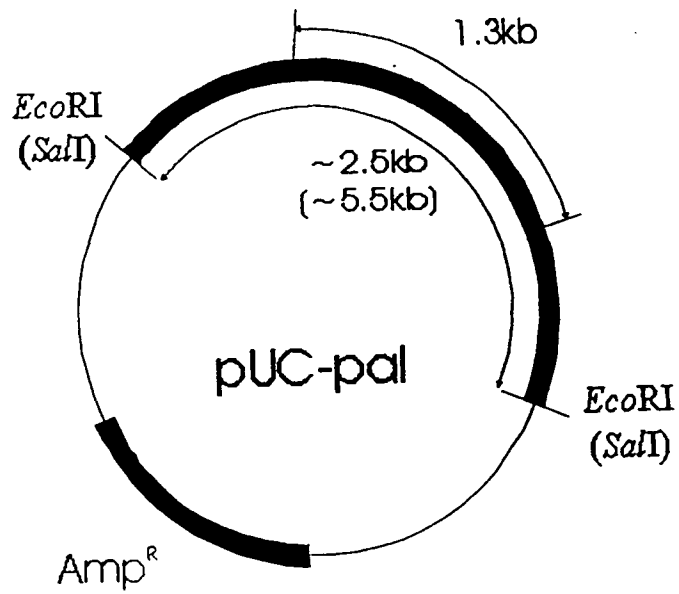


Fig. 2. Fine Restriction Map of the 1.3 kb insert DNA(pUC-pal)

Table 2. Comparison of *Erwinia rhapontici* ATCC29283 wild to mutants and cloning in reaction time and yield of isomaltulose

Strain	Reaction time(hours)	Yield of isomaltulose(%)
Wild	10	85
P2210	4	90
Cloning	7	91

### 3. 2단계 전환공정 개발

이소말톨로스 전환 시 부산물로 생성되는 트레할룰로스( $\alpha$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 1)fructose)를 미생물을 이용하여 다시 이소말톨로스로 전환시키는 2단계 전환 공정을 수행하였다. 그러나 트레할룰로스 자체가 열역학적으로 가장 안정(13)하므로 screening한 균 중 우수한 전환율을 보이는 것이 2%로 극히 미약하였으며 변이처리에 의해 트레할룰로스 생성비율이 5~6%로 감소한 점, 공정상의 편의 등을 고려하여 2단계 전환공정은 생산단계에서 시도하지 않았다.

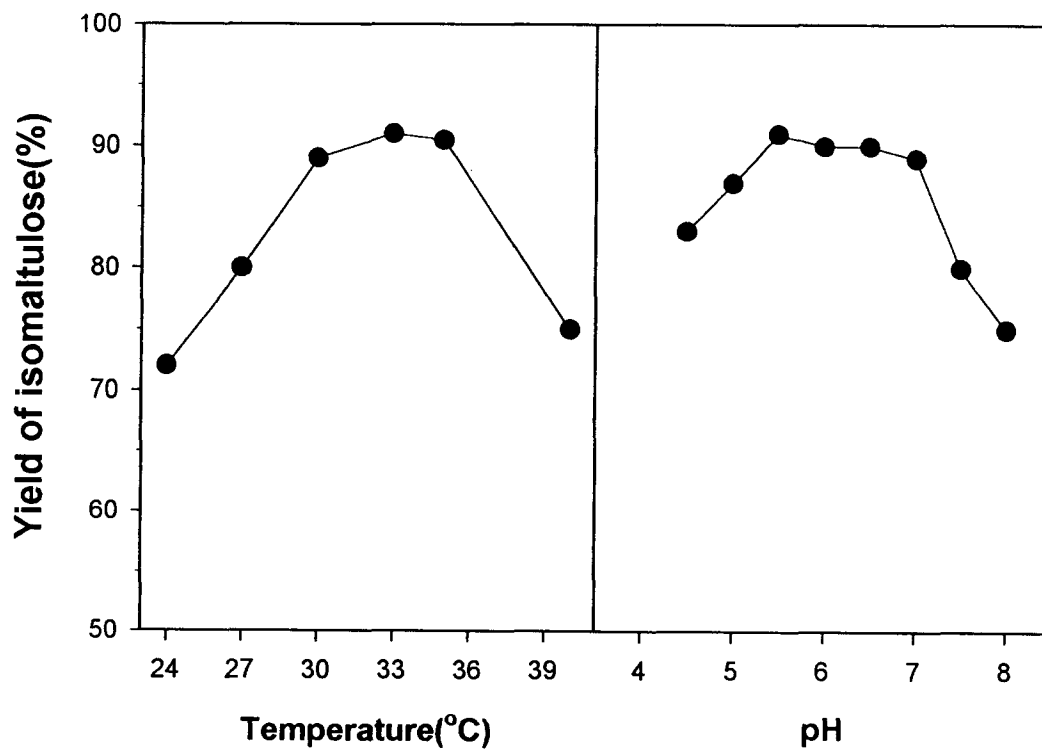
### 4. Bio-reactor법 공정 최적화

$\alpha$ -glucosyltransferase는 세포 원형질 주변공간에 존재(14, 15)하므로 효소를 추출할 필요 없이 바로 고정화하여도 무방한 장점이 있어 효소를 추출, 정제하고 고정화하는데 막대한 노력을 기울일 필요가 없다. 세포를 고정화하는 방법은 가장 보편적으로 이용되고 있는 포괄법을 이용하였고 고정물질로는 calcium alginate를 사용하였다. Bio-reactor는 stirred tank reactor(STR) 방식과 packed bed reactor(PBR) 방식이 있는데, 교반에 의해 고정화된 세포가 유실되는 것을 방지하기 위하여 PBR 방식을 선택하여 최적화를 수행하였다.

#### 가. 반응 pH 및 반응온도

55%(w/v) 설탕수용액을 기질로 반응 pH와 온도의 최적화 조건을 batch 반응으로 수행한 결과는 Fig. 3과 같다. 그림에서 보듯 반응 pH 5.5, 온도 33 $^{\circ}$ C에서 최고 전환율을 나타냈으나 전환율 차이가 크지 않아 pH 5.5~6.5, 온도 30~35 $^{\circ}$ C에서 최적이라 할 수 있다. 이를 PBR 방식으로 적용한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3에서 보면 batch 반응과는 다른 양상으로 나타났는데, pH와 온도에 따른 이소말톨로스 전환수율에는 차이를 나타내지 않았고 장기운전 안정성에 있어서 반응 pH 7.0, 온도 30 $^{\circ}$ C에서 60일간 효소활성이 유지되었다. 효소활성의 유지는 고정화에 소요되는 비용절감, 생산력 증가 등 경제적 이유로 매우 중요하다. 실제 제일제당의 경우 30일(16), 일본 Mitsui Sugar에서는 *Serratia plymutica*를 이용하여 23



**Fig. 3. Effect of temperature and pH on the yield of isomaltulose**

Table 3. Effect of pH and temperature on yield of isomaltulose and half-life of immobilized cell in PBR

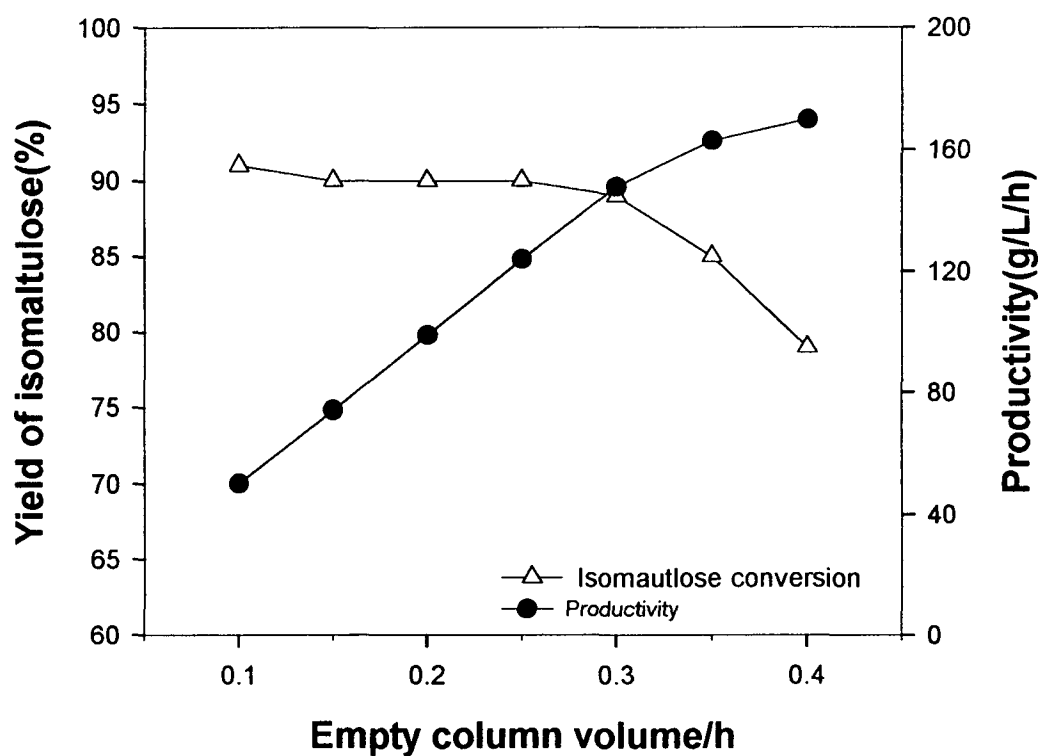
pH	30°C		33°C	
	Temp.		Temp.	
	Yield of isomaltulose(%)	Half-life (days)	Yield of isomaltulose(%)	Half-life (days)
5.5	90	30	90	30
6.0	90	41	90	33
6.5	90	52	90	40
7.0	90	60	90	45

일, *Protaminobacter rubrum*을 이용하여 73일(17)동안 효소활성이 유지되었으며 Tate & Lyle사에서는 360일간(10, 18) 유지되었는데, 이 경우 단위시간당 생산성이 0.04 empty column volume per hour(ecv/h)로 자사의 0.25~0.3 ecv/h에 비해 6.25 7.5배 느린 경우에 해당한다. Batch 반응과 PBR 반응에 있어서 최적 pH와 온도에 차이가 생기는 이유는  $\alpha$ -glucosyltransferase의 최적 pH는 5.5~6.5이나 장기적으로 반응이 진행되면서 세포에 의해  $\alpha$ -keto acid들이 생성(13)되어 반응후기 pH가 4.0~4.5로 감소하여 적정 pH 범위에서 벗어나게 되므로 반응 pH를 적정 pH보다 높여주는 것이 바람직하기 때문이다. 또한 온도가 높은 경우 고정화 균체의 유실율이 높아질 수 있고, 장기 운영상 utility 비용이 증가하게 되므로 30℃로 유지하는 것이 좋다. PBR 방식을 적용한 경우 pH, 온도에 따른 이소말톨로스 전환율에 차이를 나타내지 않았는데, 이는 90% 전환이 이루어지기 위한 충분한 반응시간이 주어졌기 때문으로 볼 수 있으며, feed distribution이 batch 방식에서 보다 원활히 이루어지 않을 수 있으므로 주의할 기울여야 한다.

#### 나. 운전유속

PBR 방식 적용에 있어서 유속은 전환율 및 생산성을 결정하는 가장 중요한 요인이다. 유속은 기질이 시간당 reactor의 빈 공간을 지나는 속도(empty column volume per hour, ecv/h)로 나타내고, 유속을 빨리 하면 전환율이 감소하고 유속을 느리게 하면 전환율은 증가하지만 단위시간당 생성속도가 감소하게 되므로 전환율과 생산성을 상호 보완할 수 있는 적절 유속을 설정해야 한다. 55%(w/v) 설탕수용액, pH 7.0, 30℃에서 비교한 운전유속과 이소말톨로스 전환율, 생산성 관계는 Fig.4와 같다. 여기에서 보면 유속 0.25 ecv/h, 0.3 ecv/h에서 90%, 89%의 전환율, 124 g/L/h, 148 g/L/h의 생산성을 각각 나타내었고 이는 4시간, 3.3시간의 반응기 체류시간에 해당한다. Fig. 4에서 보듯이 반응시간이 증가한다고 하여 이소말톨로스 전환율이 90% 이상 증가하는 것은 아니며 나머지 9~10%는 트레할로스 및 기타 과당, 포도당으로 전환되었고, 최초 사용된 설탕 기준 99% 전환율에 해당한다. 0.35 ecv/h 이상에서는 이소말톨로스 전환율과 생산성이 급격히 감소하였다.





**Fig. 4. Effect of flow rate on the yield and productivity of isomaltulose in PBR.**

#### 다. Bio-reactor의 L/D 영향

PBR 방식에서 feed distribution은 전환율을 결정하는 주요 요인인데, bio-reactor의 L/D 비율에 따라 distribution 양상이 달라질 수 있으므로 설계에 있어서 주의를 기울여야 한다. 55%(w/v) 설탕용액, pH 7.0, 30°C, 유속 0.25 ecv/h에서 L/D 별로 이소말톨로스 전환율에 미치는 영향을 조사하여 Table 4에 나타내었다. 여기에서 보면 L/D 4 : 1의 비율에서 99% 설탕이 전환, 90% 이소말톨로스가 생성되어 최적으로 나타나 bio-reactor 제작 시 적용하였다.

#### 라. Scale-up 생산

앞에서 실행한 최적화 조건을 바탕으로 scale-up 생산을 시도하였는데 운전 유속은 초반 30일까지는 0.3 ecv/h로, 그 후 60일까지는 0.25 ecv/h로 조절하여 생산하였고, 55%(w/v) 설탕용액, pH 7.0, 30°C에서 반응하여 그 결과를 Table 5에 나타내었다. 50 L 규모의 PBR 방식까지 89~90% 이소말톨로스 전환수율을 나타내었고 55~60일까지 효소활성이 유지되어 안정한 생산성을 보여주었다.

## 제 2 절 이소말톨로스 정제수율 향상

이소말톨로스 정제는 결정화 공정만 수행한 경우와 크로마토그래피법을 거쳐 결정화를 진행한 경우의 두 가지 방법으로 나누어 진행하였다.

### 1. 결정화

이소말톨로스 반응액은 이소말톨로스 외 9~11% 정도의 트레할로스, 포도당, 과당, 반응하지 않고 남은 설탕의 혼합액 상태로 존재하므로 냉각법에 의한 1차 결정에서 순수한 이소말톨로스를 분리하기가 어렵다. 따라서 1차 결정에서 92~96% 순도의 이소말톨로스를 얻고 이를 다시 용해, 농축, 2차 결정하여 순수 이소말톨로스를 얻는 공정을 택하였다. 반응액(35 brix)을 60°C, 감압하에서 70 brix로 농축하

Table 4. Effect of L/D of bio-reactor on sucrose conversion and yield of isomaltulose

L/D	Sucrose conversion(%)	Yield of isomaltulose(%)
3 : 1	99	89
4 : 1	99	90
5 : 1	96	85

Table 5. Scale-up results of PBR for continuous production of isomaltulose

Reactor volume(L)	Yield of isomaltulose(%)	Half-life(days)
0.5	90	60
50	89~90	55~60

고 이를 20℃로 서서히 냉각하여 생성된 결정을 원심분리기로 회수하였다. 이렇게 회수된 1차 결정을 45 brix로 다시 녹여 60℃, 감압하에서 64 brix로 농축하고 서서히 저으면서 20℃로 냉각하여 2차 결정을 회수하였다. 2차 결정시 약 0.1% 가량의 이소말톨로스 결정을 seed로 사용하면 결정생성이 촉진되기도 하나 seed량이 과다하거나 첨가시기가 적절치 않을 경우 오히려 분말화를 초래하여 결정형성을 방해할 수 있으므로 주의하여야 한다. 이소말톨로스는 결정형성 시 한 분자의 수분을 함유하는 1수화물 결정체를 형성하게 되는데(이소말톨로스 분자량 기준 5%에 해당), 이 수분함량을 제외한 최종 결정의 순도는 99%이상으로 측정되었으며 결정회수율을 68%이다.

한편, 1차 결정, 2차 결정에서 결정분리 후 남은 모액을 다시 농축, 냉각하여 1차 재결정, 2차 재결정 공정을 같은 방법으로 수행하여 99% 순도의 이소말톨로스 결정을 회수하였고, 이 때 결정회수율은 52%이다. 이는 초기 이소말톨로스 반응액 기준으로 최종 결정회수율은 85%에 해당하며 변이주 P2210의 사용으로 인해 기타 다른 당의 생성비율이 상대적으로 감소하였기 때문에 가능하였다. 결정화 공정을 Fig. 5에 나타내었다.

## 2. 크로마토그래피법으로 분리 후 결정화

Flash 컬럼 크로마토그래피법으로 반응액을 분리한 후 결정화를 수행하였다. 사용된 정지상은 silica gel(0.063~0.200 mm, Merck)이고, 이동상은 acetonitrile과 water이며 stepwise gradient를 가하여 98% 이소말톨로스를 분리, 회수되었다. 이것을 60℃, 감압하에서 64 brix로 농축한 후 서서히 냉각하여 결정을 형성시켰는데 1차 결정에서 90%의 회수율을 보였다. 같은 방법으로 모액의 재결정 과정을 포함하면 최종 이소말톨로스 정제수율은 95%에 해당한다.

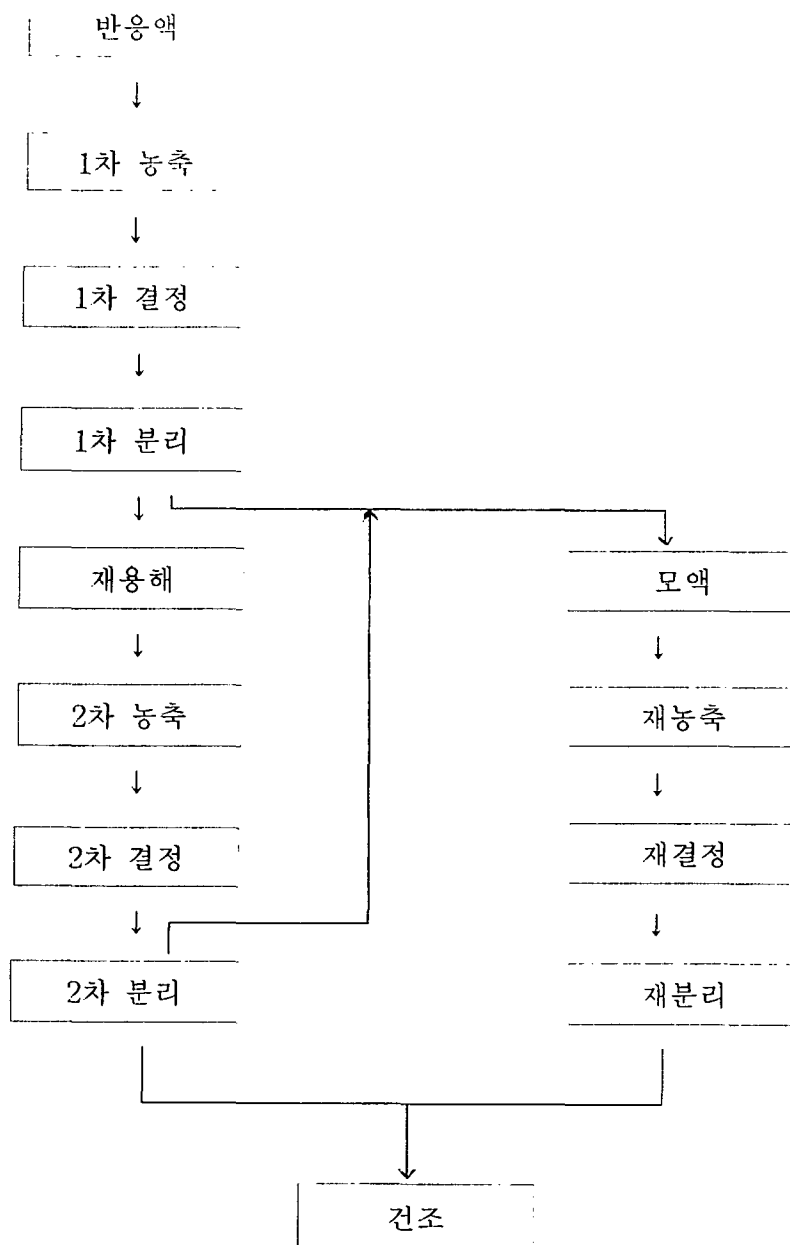


Fig. 5. Crystallization Process of Isomaltulose.

### 제 3 절 이소말트 전환수율 향상

이소말톨로스를 수소첨가 반응하여 이소말트로 환원시키는 작업은 백광산업(주)와 연계하여 진행하였다. 기존 솔비톨 생산 시 축적된 수소첨가 기술을 바탕으로 Fig. 6와 같은 방법에서 98% 수율의 기술을 확보하였다.

수소첨가 반응에 의하여 생성된 이소말트의 구성분은 GPM과 GPS가 Fig. 7에서 보듯이 거의 1 : 1의 비율이었으며, 정상적으로 운전되는 pH 6.5~7.0의 조건에서는 그 비율이 일정하였다.

### 제 4 절 이소말트 정제수율

수소첨가 반응이 끝난 후의 isomalt 용액은 40% 내외의 고형분 함량을 가진 투과도가 420 nm에서 99%인 맑은 수용액으로서 회분식 형태의 농축기에서 60 brix 까지 높인 후(농축도 1.5배) 일반적인 냉각법에 의해서는 균일한 결정을 얻기가 어려워 60 brix의 고형분을 82 brix까지 2단계 농축한 후 용해결정법(melt crystallization)에 의하여 1단계에서 53%, 2단계에서 21%의 결정을 얻었다. 남은 모액은 다시 농축단계로 recycle되어서 다시 결정화 단계로 투입되었고 6회 recycle시의 결정정제수율은 98%이었다(Fig. 8). 이때, GPM과 GPS 이외의 다른 polyol들은 생성되지 않았으며, 온도의 경우는 Fig. 9에서 보면 120℃의 경우에는 98% 이상의 전환수율이 얻어졌으나 그 이상의 고온에서는 caramelization에 의한 갈변화가 나타났다.

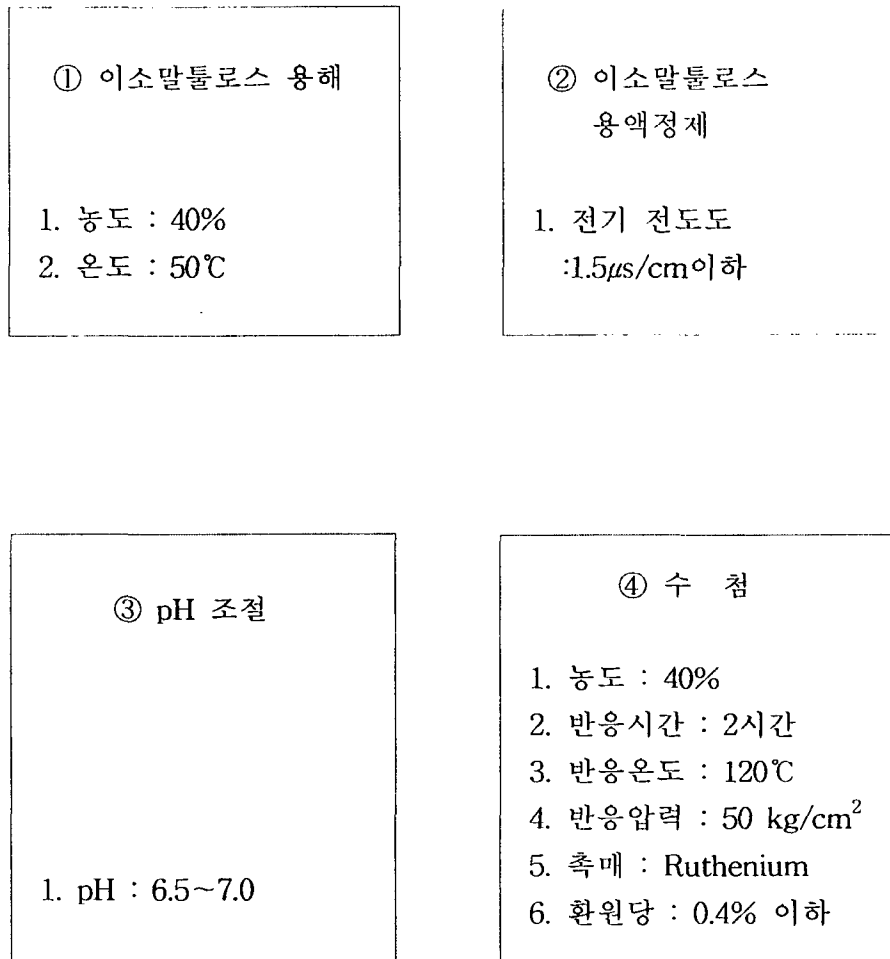


Fig. 6. Production Process of isomalt by hydrogenation of isomaltulose



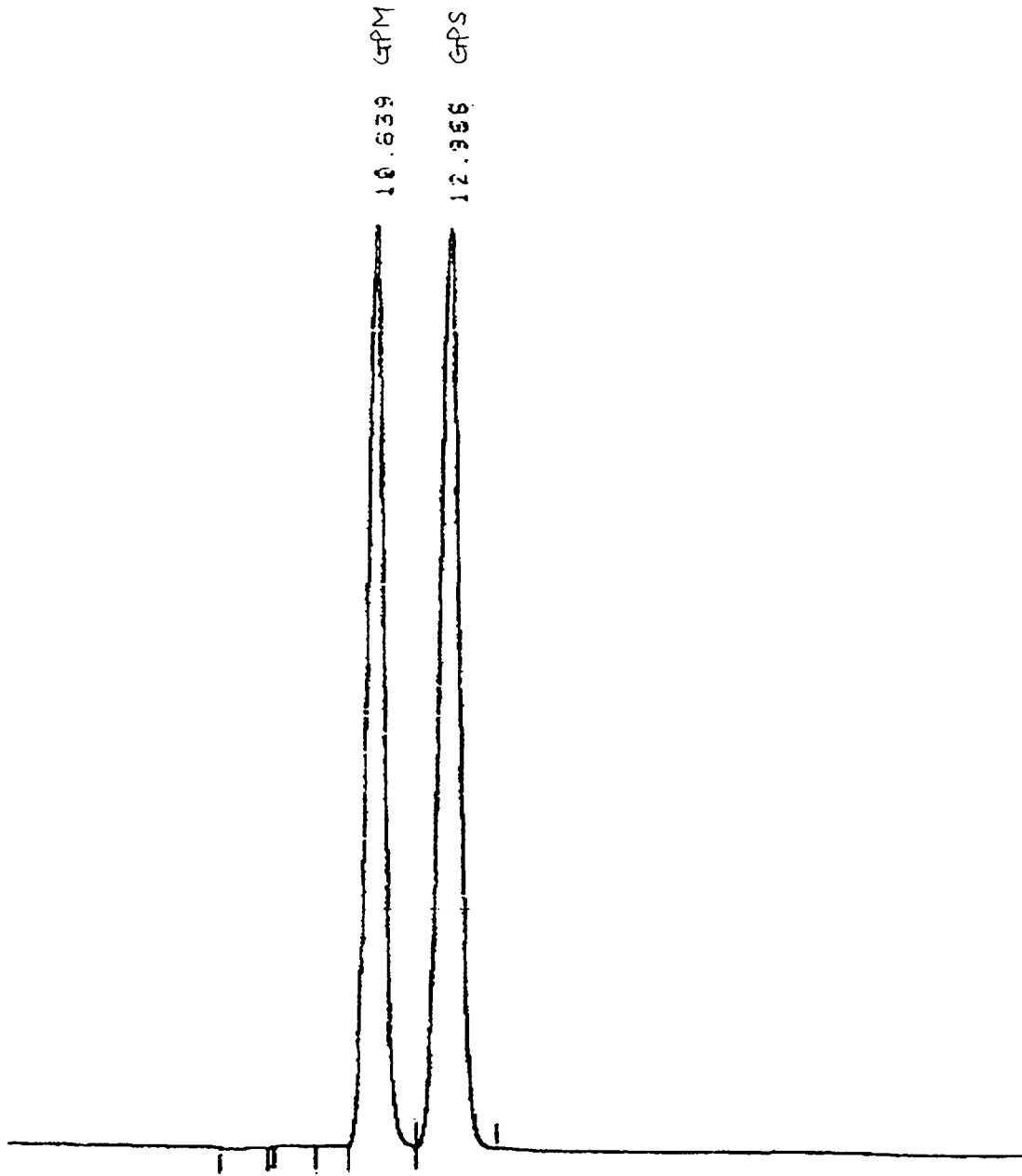


Fig. 7. HPLC Chromatogram of isomalt in hydrogenation process.

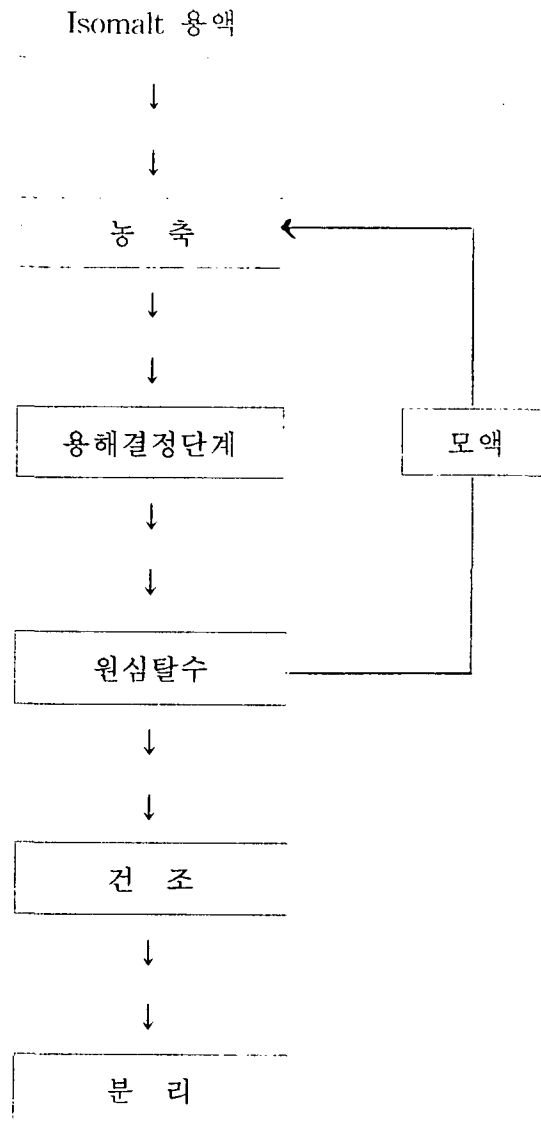
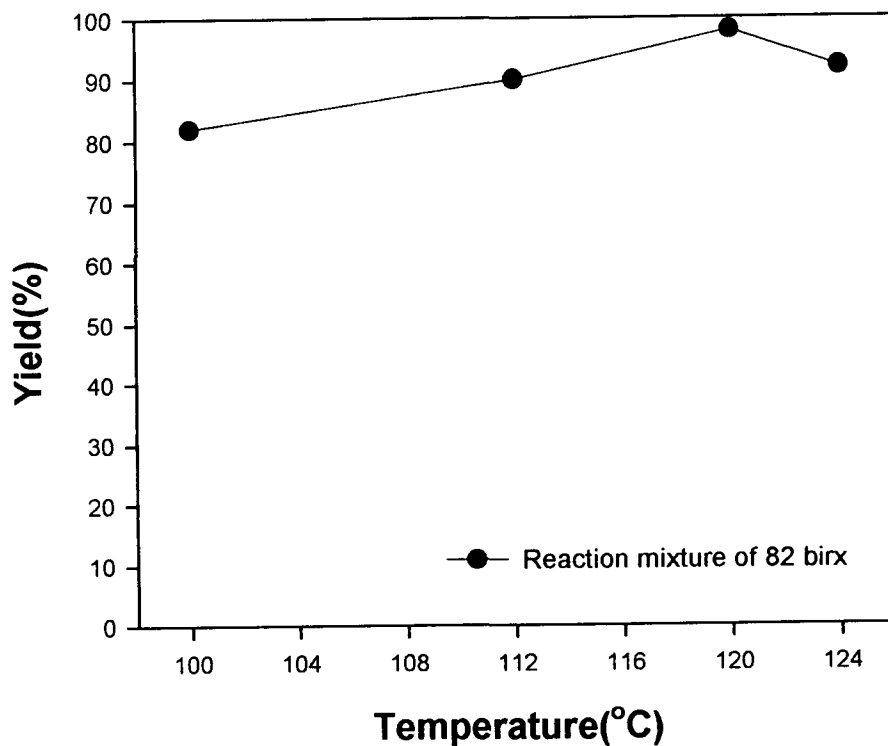


Fig. 8. Crystallization and purification process of isomalt



**Fig. 9. Effect of temperature on the yield of isomalt crystallization.**

## 제 5 절 특성연구 및 용도개발

### 1. 이소말톨로스

이소말톨로스는 설탕과 기본구조가 같으므로 감미질이 매우 유사하고 10% 수용액에서 설탕의 50%, 50% 수용액에서 설탕의 70% 정도의 감미도를 보인다. 용액의 점도, 용해도, 비중 등은 모두 설탕과 유사하다. 이소말톨로스는 주로 이소말트 생산을 위한 중간물질로 소비되기 때문에 이소말톨로스 자체를 이용한 용도개발은 활발히 이루어지지 않고 있고, 주로 일본에서 껌, 초코렛, 요구르트에 설탕대용으로 첨가하여 판매하고 있으나 설탕과 물성이 유사하여 설탕대체 감미료로서 잠재적 사용가능성은 충분하다고 할 수 있다. 시장조사를 통하여 수거한 일본 미루미루(ミルミル) 요구르트는 실제로 이소말톨로스 13%만을 첨가하여 제조하였으며 단맛이 부드럽고 충치를 유발하지 않아 유아용 간식으로 인기가 있는 것으로 조사되었다. 자사에서 요구르트에 설탕, 과당, 포도당 대신 이소말톨로스를 첨가하여 한 달간 품질안정성을 시험한 결과는 Table 6과 같다. 이때 총당함량은 17%로 동일하게 하여 호상 요구르트를 제조하여 비교하였다.

Table 6에서 보면 이소말톨로스를 이용한 요구르트는 pH 감소, 총당 감소가 적은 것으로 나타나 유산균의 이용도가 상대적으로 낮았음을 알 수 있다. 또한 초기 pH가 4.8로 다른 당 이용시 보다 높게 측정되었는데, 이는 이소말톨로스 자체의 pH가 0.4정도 높은 것으로 측정되었으므로 이에 기인한 것으로 보이며, pH가 높게 유지되는 것이 충치 생성을 억제할 수 있으므로 바람직하다. 따라서 이소말톨로스를 이용할 경우 저장기간 중 제품 품질변화를 최소화 할 수 있을 것으로 기대되며 품질안정성 향상에 사용 목적을 두고 요구르트 외 다른 제품에도 확대 적용 가능성을 계속 연구진행 중에 있다.

Table 6. Changes of pH and total sugar in yogurt on storage days

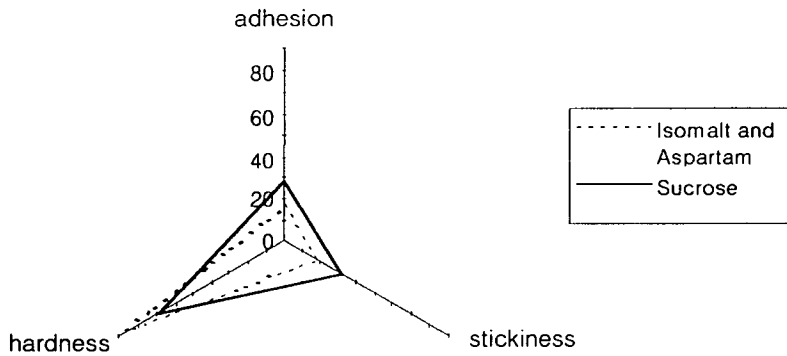
Sugar sources	pH		Total sugar(%)	
	Initial	Final	Initial	Final
Isomaltulose	4.80	4.68	17.0	14.9
Fructose : glucose = 1 : 1	4.33	4.06	17.0	10.3

## 2. 이소말트

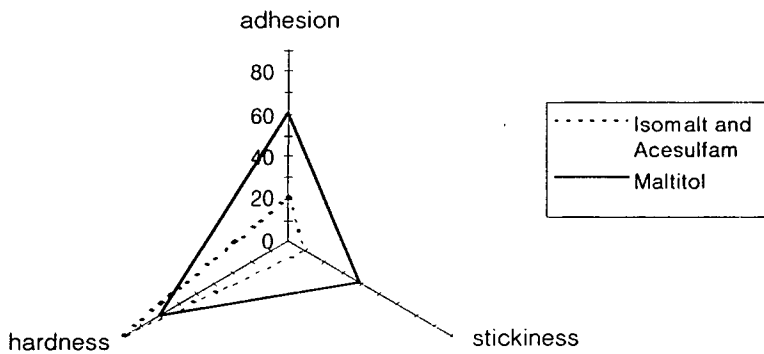
캔디류에 사용되는 설탕대체 감미료 중에 이소말트는 향기 발현성이 우수하고 낮은 흡습성을 나타내므로 저장 중 품질안정성을 위한 포장재의 사용량을 감소할 수 있는 장점이 있다. 한편, 흡습성에 의해 영향을 받는 캔디의 조직감(textural properties)은 제품의 관능특성 면에서 중요한데, 본 연구에서는 이소말트, 설탕, 말티톨을 각각 이용하여 제조된 시판 캔디류를 구입하여 관능검사와 기계적 분석을 병행하였다. 캔디에 사용한 당의 조성은 설탕과 액당, 이소말트와 아스파탐/아세설팜, 그리고 말티톨 시럽을 사용한 3가지 경우를 비교하였다. 관능적 조직감을 비교하기 위하여 adhesion, hardness, stickiness를 15명의 panel을 선정하여 측정하였고, 기계적 조직감은 universal force deformation testing machine(Zwick Ltd., Ulm, Germany)을 이용하여 plate를 0.5 N의 힘으로 캔디 표면에 가한 뒤, 50 mm/min의 속력으로 캔디가 부서질 때까지 행하여 측정하였다.

Fig. 10은 각각 설탕과 이소말트, 말티톨을 이용하여 제조된 캔디의 관능 조직감 분석 결과이다. 설탕과 이소말트를 이용한 캔디를 비교해 보면 이소말트를 이용하여 만든 캔디가 adhesion과 stickiness가 적은 반면 hardness는 강한 것으로 나타났으며, 말티톨을 이용하여 만든 캔디와 비교하여도 동일한 결과를 나타내었다. 일반적으로 설탕은 높은 흡습성을 가지므로 설탕으로 제조한 캔디 표면은 빨리 용해되는 특성이 있고(19), 이소말트는 설탕이나 말티톨에 비하여 상대적으로 낮은 흡습성을 가진다고 보고(20)되었다.

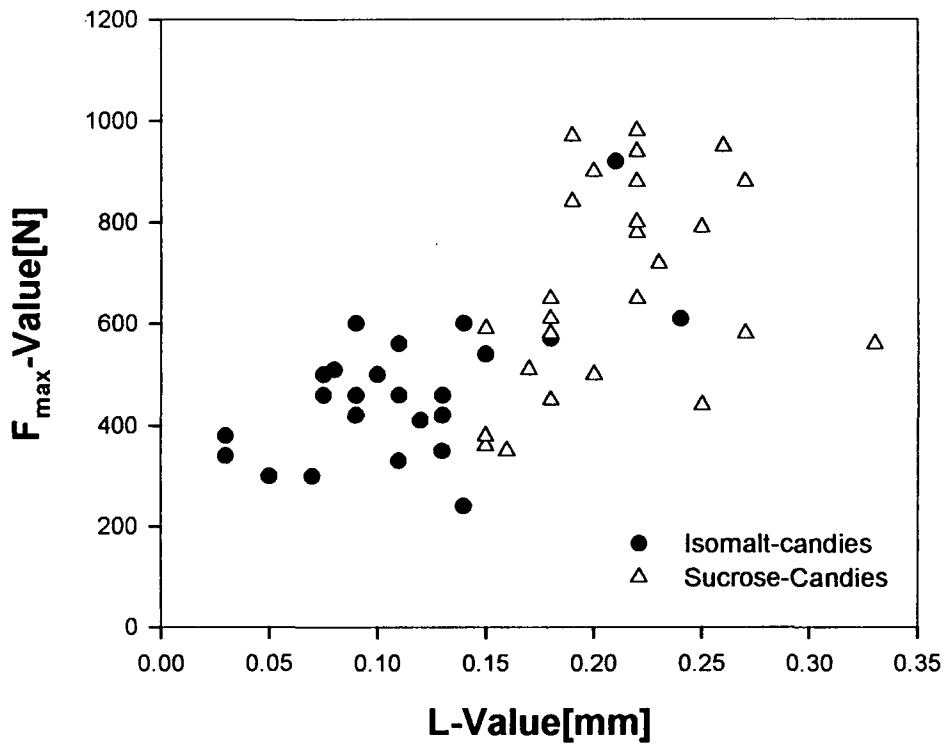
Fig. 11은 관능검사와 비교하기 위해 캔디가 부서질 때까지의 breaking force와 distance를 측정한 결과인데, 설탕으로 제조한 캔디가 breaking force와 distance 수치가 모두 높았다. 이는 설탕으로 제조한 캔디가 높은 흡습도로 인하여 표면층이 연화되었기 때문으로 볼 수 있으며 관능검사 결과와 동일한 결과이다. 이상의 결과로 이소말트를 사용하여 제조한 캔디는 일반적 당으로 제조한 캔디보다 표면이 더 단단하고 끈적임이 적다는 것을 알 수 있다. 이러한 특성은 저장과 유통기간 중 온도와 상대습도의 영향을 적게 받으므로 제품수명과 포장재 선택에 있어서 중요한 가치를 가지게 된다.



**Fig.10.1. Sensory texture evaluation made of isomalt and sucrose.**



**Fig.10.2. Sensory texture evaluation made of isomalt and maltitol.**



**Fig.11. Breaking force( $F_{\max}$ ) and distance to breaking(L-Value) of 25 samples of sugar and isomalt based candies.**



## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 제 1 절 연구개발목표 달성도

본 연구개발의 목표는 매년 15% 이상씩 성장을 계속하고 있으며 독일의 Sudzucker사에서 독점하고 있는 이소말트에 대하여 상업적 생산기술 확보를 위한 원료공정인 이소말톨로스의 전환기술과 공정개발, 이소말트의 전환기술 및 정제기술개발을 그 내용으로 하는 기술의 개발이며, 이를 통하여 매년 1,000톤의 수입대체와 5,000톤 규모의 수출을 달성하고자 한다.

이소말트의 생산을 위하여는 초기 출발물질인 설탕으로부터 이소말톨로스로 전환하고 이렇게 전환된 이소말톨로스를 수소첨가 반응에 의하여 이소말트로 전환하는 2단계의 관련 기술개발이 요구된다. 첫 번째 단계인 이소말톨로스로의 전환수율은 최종목표 전환수율인 95%에 비하여 90%까지 달성하였는데 이것은 목표대비 95%의 달성율이며 미생물 전환효소의 본질적인 특성상 그 이상의 전환수율은 어려울 것으로 보인다. 결정공정과 회수공정의 개선으로 이소말톨로스의 정제수율은 95%까지 얻을 수 있어서 목표대비 100%의 달성율을 얻었다. 이소말톨로스에서 이소말트로의 수소첨가반응은 98%의 전환수율을 얻어서 목표대비 100%의 달성율을 얻었다. 다음 단계인 이소말트의 정제수율은 2단계 결정방법과 회수공정개발에 의하여 98%의 수율을 얻었으며, 특성연구 및 용도개발 분야에서는 이소말트의 주요 시장 중 하나인 캔디제조와 관련하여 물성 등에 미치는 영향에 대하여 연구하였다.

자사에서 계획한 연구개발최종목표 및 달성도는 다음과 같다.

항목	최종목표	달성도
이소말톨로스 전환수율(%)	95	90
이소말톨로스 정제수율(%)	95	95
이소말트 전환수율(%)	98	98
이소말트 정제수율(%)	95	98
특성연구 및 용도개발	확보	확보

## 제 2 절 연구개발의 대외기여도

전세계적으로 20억 달러 이상의 시장을 형성하고 있는 당알코올은 음료, 제과, 제빵, 주류, 빙과 등의 식품산업과 치약, 화장품 등의 생활용품 그리고 화학재료의 구성재료로서 산업 다방면에 사용되고 있다. 이러한 당알코올들은 Roquette, Cerestar, Amylum, Sudzucker, Cultor, Purac, Towa 등 세계적인 소수의 major들에 의해 시장이 과점되고 있는 실정이다. 본 이소말트의 생산기술연구를 통하여 개발된 기술들은 이러한 당알코올 분야 중 독일회사에 의하여 10여년 이상 독점되어 온 이소말트의 세계적인 두 번째 생산기술 확보라는 면에서 큰 의의가 있다. 국내의 당알코올 산업의 경우 부가가치가 가장 낮은 솔비톨의 생산에만 거의 제한되어 있으며 고부가가치인 이소말트, 만니톨, 에리쓰리톨, 자일리톨 등에 대하여는 소수의 연구만 진행되고 있을 뿐 상업적인 생산 및 응용기술분야에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다. 따라서 이소말트의 본 연구는 이러한 고부가가치의 당알코올의 생산 및 응용기술분야에 대한 국내의 연구수준을 한 단계 끌어올릴 것이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 이소말트의 연구결과는 산업화에 우선적인 목표를 두고 활용할 계획이다. 먼저 설탕에서의 이소말톨로스로의 전환과정에서는 설탕보다 가격이 싼 기질은 찾으려고 한다. 전환수율은 90% 이상을 달성하여 제조원가를 세계적인 경쟁력을 갖추게 하며, 이소말톨로스 제조과정에서 나온 모액을 이용하는 방안을 찾아야 한다. 이소말톨로스의 정제기술과 이소말트의 수소첨가 기술은 세계적인 수준과 경쟁할 수 있고, 단지 응용분야에 대한 연구가 추후 계속되어야 한다. 현재 세계적으로 이소말트의 공급가격은 \$ 2.5~3.0/kg 규모이고 추정제조원가는 \$ 1.5/kg 부근인 것으로 유추되어지므로 연구개발결과를 토대로 제조원가 \$ 1.0/kg 이하인 기술개발을 목표로 해야 한다.

## 제 6 장 참고문헌

1. K. H. Jung, J. Y. Lim, J. H. Lee, and M. Y. Yoo. *Biotechnol. Lett.*, 9(10), 703 (1987)
2. K. H. Jung, J. W. Yun, K. R. Kang, J. Y. Lim, and J. H. Lee. *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 491 (1989)
3. 전영준. 생물변환기술에 의한 기능성 당류의 산업적 생산. *식품산업과 영양*, 2(1), 10~15 (1997)
4. Hiroaki Hamano. Functional Properties of Sugar Alcohols as Low-Calorie Sugar Substitutes. *식품산업과 영양*, 2(1), 1~6 (1997)
5. K. McNutt and A. Sentko. Isomalt offers candymakers new possibilities. *Candy Industry*, June, 46~49 (1996)
6. W. E. Irwin. Isomalt-A Sweet, Reduced-Calorie Bulking Agent. *J. Food Technol.*, 44(6), 128 (1990)
7. P. J. Strater. Palatinit-Technological and Processing Characteristics. Alternative Sweetness. Lyn O'Brien Nabors. Robert. C. Gelardi. Marcel Dekker Inc. 1986
8. UK Patent Application GB 2 082 591
9. South German sugar Co., UK Patent Specification 1,429,334 (1976)
10. UK Patent Application GB 2 063 268
11. US Patent 5,679,781 (1997)
12. Y. K. Park, R. T. Uekane, and A. M. Pupin. Conversion of Sucrose to Isomaltulose by Microbial Glucosyltransferase. *Biotechnol. Lett.*, 14(7), 547~551 (1992)
13. P. S. J. Cheetham. Production of Isomaltulose Using Immobilized Microbial Cells. *Methods in Enzymology*, 136, 432~454 (1987)

14. M. McAllister, C. T. Kelly, E. Doyle and W. M. Fogarty. The Isomaltulose Synthesising Enzyme of *Serratia Plymutica*. *Biotechnol. Lett.*, 12(9), 667~672 (1990)
15. P. S. J. Cheetham. The Extraction and Mechanism of a Novel Isomalulose-Synthesizing Enzyme from *Erwinia rhapontici*. *Biochem. J.* 220, 213~220 (1984)
16. 윤종원, 오광근, 김정환, 전영중, 이재홍. *Erwinia rhapontici* 고정화에 의한 Palatinose의 생산. *한국생물공학회지*, 7(1), 79~83 (1992)
17. Y. Nakajima. Proc. Res. Soc. Jpn. *Sugar Refineries Technol.*, 33, 5 (1984)
18. P. S. J. Cheetham, C. E. Imber, and J. Isherwood. The Formation of Isomaltulose by Immobilized *Erwinia rhapontici*. *Nature*, 229, 628~631 (1982)
19. Hoffmann, H., Mauch, W., Untze, W., *Zucker und Zuckerwaren*, Paul Parey Verlag. Berlin und Hamburg, p135 (1985)
20. Fritzsching, B. Isomalt in hard candy applications. *Manufacturing-Confectioner*, 75, 65~73 (1995)