

## 건조 고정화 *Zymomonas mobilis*에 의한 sorbitol 생산

박 철 진·장 기 효·전 억 한  
경희대학교 산업대학 식품가공학과

### Production of Sorbitol Using Dried and Immobilized *Zymomonas mobilis*

Chul Jin Park, Ki Hyo Jang and Uck Han Chun

Department of Food Technology and Science, College of Industry, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

#### ABSTRACT

The purpose of this study is to develop a continuous process for sorbitol production using dried *Zymomonas mobilis* immobilized in K-carrageenan. The methods of glutaraldehyde cross-linking of enzymes in CTAB(cetyltrimethylammoniumbromide) treated cells immobilized in K-carrageenan showed a stability for the production of sorbitol for 30 days of operation. K-carrageenan beads entrapping permeabilized cells were dried to improve bead rigidity and storage stability. A semi-batch process with dry beads was carried out and only a small loss of enzyme activity(less than 8%) was observed during 72h. The value of  $V_{max}$  for the dry K-carrageenan beads was found to be one half of that for free cells. It was shown that the productivities of the continuous process with wet K-carrageenan beads and dry beads at a dilution rate  $0.1h^{-1}$  were  $3.4g/L-h$  and  $2.88h/L-h$ , respectively.

#### 서 론

*Zymomonas mobilis*는 sucrose나 glucose와 fructose의 혼합용액을 기질로 이용하여 sorbitol과 gluconic acid를 생산할 수 있다(1, 2). *Zymomonas mobilis*에서의 sorbitol 생성은 glucose-fructose oxidoreductase에 의하여 일어나며, 효소는 cofactor인 NADP와 강하게 결합되어 있다(3). 또한, 이 효소는 glucose와 fructose가 같은 양으로 존재할 때 각각 최대치의 gluconic acid와 sorbitol이 생성된다(3). 정상적인 대사작용이 일어나는 *Z. mobilis*에서는 소량의 sorbitol과 gluconic acid를 생성하고, 생성된 gluconic acid는 gluconate kinase에 의하여 인산화가 일어나며 Enter-Doudoroff pathway를 거쳐 ethanol로 전환된다(4). 최근에, toluene이나 cetyltrimethylammoniumbromide(CTAB) 등으로 *Zymomonas mobilis*를 처리하였을 때, sorbitol과 gluconic acid의 생성이 증가되었음이 본 저자들에게 의해 보고되었다(5, 6). *Zymomonas mobilis*에서의 oxidoreductase활성에는 cofactor인 NADP의 재생

이 요구되나, oxidoreductase와 NADP가 아주 강하게 결합되어 있으므로 세포막의 투과성이 증가되어도 NADP의 유실이 없으며 따라서 oxidoreductase의 활성을 나타낸다. 실제로 투과성이 증가된 *Zymomonas mobilis*에서는 ethanol이 거의 생성되지 않는다. 일반적으로 고정화 효소반응에서는 gel에 의한 물질전달의 제한으로 free cell보다 낮은 kinetic parameter를 나타낸다. 그러나 본 실험실에서 세포를 K-carrageenan에 고정화 하여서 enzyme activity를 비교해 본 결과 free cell과 유사한 결과를 나타냈다(6). 이는 K-carrageenan을 이용한 immobilized system에서 거의 물질 전달의 제한이 없음을 의미하는 것이다. CSTR(continuous stirred tank reactor)과 packed bed반응기에서 25일 이상의 효소의 안정성을 나타내었다.

본 연구에서는 효소 고정화법에 의한 sorbitol 생산의 안정성을 증가시키고 고정화된 담체를 장기간 보존하기 위하여, 균체를 K-carrageenan에 고정화한 후 건조시킨 beads의 sorbitol 생산에 대하여 실험하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

본 실험에서 사용한 균주는 *Zymomonas mobilis* ZM4(ATCC 31821)를 사용하였다. 이 균주의 배양에 사용된 배지는 100g/L glucose, 1g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 그리고 5g/L yeast extract(Sigma)를 사용하였다. 균의 배양은 2L용량의 발효기를 이용하였으며, 온도 30°C pH5.0의 혐기적인 조건에서 배양하였다. 비록 균체의 성장을 위해서 사용은 되었지만, 인산화된 중간 대사산물의 생성을 억제하기 위하여 기질용액에는 phosphate의 첨가를 제한하였다.

### 고정화균체

*Z. mobilis* ZM4를 고정화하기 위하여 20시간 성장시킨 배양액을 채취하여 원심분리 하였다(4000 rpm). 배양액 1L에 0.2%(v/v) CTAB용액(0.1M potassium phosphate buffer, pH6.2) 41mL를 첨가 후 4°C에서 10분간 방치한 후 원심분리 하였다. 여기에 다시 0.25%(v/v) glutaraldehyde 용액(0.1M potassium phosphate buffer, pH6.2) 10ml를 첨가 후 4°C에서 10분간 방치한 후 원심분리 하였으며, 0.1M potassium phosphate buffer로 2회 세척하였다. 이러한 과정으로 투과성이 증가된 농축된 균체 13-14g(wet weight)을 100mL의 K-carrageenan용액(3.2%(v/v)과 혼합한 후, bead를 응고하기 위하여 20g/L KCl과 0.15g/L  $\text{CaCl}_2$  혼합용액(0.1M potassium phosphate buffer) 500mL에 주사기를 사용하여 떨어뜨림으로 응고된 bead를 얻었다. 상온에서 30분간 열판교반기와 자석막대를 사용하여 용액을 저였으며 응고용액을 제거 후 실험에 사용하였다. 이 때 wet bead의 직경은 2.7-3.3mm였다. 건조된 bead를 만들기 위하여 같은 양의 wet bead를 통풍이 되는 실내에서 1주일, 2주일 간격으로 항온건조 하였다. 이 때의 온도는 20°C였고 상대습도는 60%였다. 건조 전과 후의 bead의 크기와 부피변화를 측정하였으며, 건조 중의 중량감소는 104°C에서 24시간 건조했을 때의 중량을 기준으로 수분의 함량변화를 측정하였다. 건조중량을 기준으로 한 수분함량은 아래와 같은 식으로 구하였다.

건조수분함량(%) =

$$\frac{\text{건조 중의 bead에서 증발된 수분의 양}}{\text{건조 후 수분이 제거된 bead의 고체중량}} \times 100$$

### 반응기

고정화하지 않은 free cell과 고정화된 균체(wet bead, dry bead)의 실험에 사용된 반응기는 회분식 공정에서는 250, 500mL용기를, 연속공정에서는 CSTR(continuous stirred tank reactor)과 packed bed반응기를 사용하였으며, 기질 용액으로는 50g/L glucose와 50g/L fructose 혼합용액에 bead의 건조성을 증가시키기 위하여 0.4%  $\text{CaCl}_2$ 를 첨가하여 사용하였다. 기질용액은 100, 200mL를 사용하였고, pH조절을 위하여 2N KOH를 사용하여 pH를 6.2로 유지하였다. 반응액의 온도는 열판교반기로 39°C를 유지하였으며, 연속공정에서의 회색속도는 0.1h<sup>-1</sup>을 유지하였다. Packed bed반응기에서의 기질의 재순환 속도는 펌프를 이용하여 1000mL/h로 유지하였다. Column의 온도는 water-jacket를 이용하여 최적 반응온도인 39°C를 유지하였다.

### 반응속도상수 측정

회분식 반응기에서의 free cell, wet bead, dry bead에 의한 sorbitol 생성시의 최대반응속도( $V_{max}$ )와 반응상수( $K_m$ )를 측정하기 위하여 기질 용액 100mL의 농도를 20, 30, 50g/L(동량의 glucose+동량의 fructose+0.4%  $\text{CaCl}_2$ )으로 변화하면서 시간 동안에 따른 sorbitol 생성 곡선을 측정하였으며, 생성물의 시간에 따른 변화 기울기가 직선으로 변하는 점을 구하였고, product formation rate(g/L-min)값들과 기질농도 변화와의 관계를 Lineweaver-Burk plot하였다. 반응액은 pH6.2를 유지하였다.

### 건조 bead의 수화(rehydration)

회분식공정에서 건조 bead의 수화온도(20, 30, 40°C)변화에 따른 효소의 활성도를 측정하기 위하여, 2주일 동안 건조한 bead 4.2mL를(균 배양액 1L를 고정화하였다) 200mL 기질 용액에 첨가한 후 자석막대를 이용하여 교반하였으며, 30분 동안의 교반 후에 반응 온도를 39°C로 올린 후 24시간에 따른 sorbitol생성을 측정하였다. 반응액은 pH6.2를 유지하였다.

### 분석방법

Sorbitol, fructose, glucose의 정량을 위하여 HPLC에 의한 분석방법을 사용하였다. HPLC(model Waters R301)에 BioRad(Richmond, Calif., USA) Aminex HPX-87C column을 사용하였고, 분석을 위하여 다음과 같은 전처리를 하였다. 반응

액 10mL을 원심분리(4000rpm)하여 상층액을 취한 다음 활성탄을 첨가한 후 물증탕에서 80℃ 이상으로 30분간 방치하였다. 상층액을 다시 취한 후 활성화된 이온교환수지(SK1B:WA30=1:2)를 첨가하여 vortex로 혼합 후에 여과(0.2µm millipore filter)하였다. 당도계로 brix를 측정후 HPLC용 물을 이용하여 2 brix이하로 희석하여 분석하였다. HPLC 분석은 85℃의 용매를 0.6mL/min의 속도로 공급하였다. Kinetic parameter는 beads의 부피를 제외한 반응 용액의 부피를 기준으로 계산하였다. Free cell의 균체농도의 측정은 건조기에서 104℃로 24시간 동안 건조 후 측정하였다.

결과 및 고찰

Bead의 건조

Bead를 건조하였을 경우 수분함량이 감소하였으며 또한 bead의 견고성이 증가하였다(Fig. 1). 2주 일 동안 20℃에서 건조시킨 bead에서는 wet bead와 비교하여 90%의 중량감소와 약 88%의 부피감소가 관찰되었다. 2주일 동안 건조시킨 bead의 수분함량은 건조중량을 기준으로 11%의 수분을 함유하고 있었다. 건조 bead를 이용하여 24시간 동안 3회 반복한 회분공정에서 72시간 후의 bead 크기는 1.8-2mm로, 반응 전의 건조된 bead(1.2-1.3mm)와 비교시 약간의 증가가 있었다(Table 1). Wet bead에서의 기질전환율은 92%였고, 건조 bead에서는 반응 후 24, 72시간 후에 각각 85%와 78%의 기질전환율을 보였다.

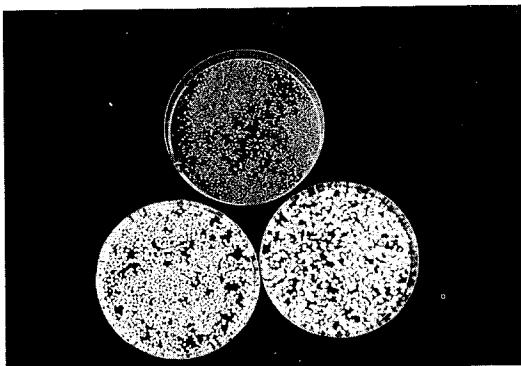


Fig. 1. Photograph of the wet beads, dry beads(0h and 72h).

Table 1. Comparison of physical states wet and dry beads.

Parameters	Wet beads		Dry beads	
	24h reaction	24h reaction	72h reaction	72h reaction
Beads size (diameter:mm)	2.7-3.2	1.8-2.0	1.9-2.1	
Total bead volume(mL)	35	14	15	
Dry bead/Wet bead (v/v)	1	0.4	0.428	

열판 교반기를 이용하여 자석막대로 교반시 dry bead의 반응에서는 wet bead와 비교하여 bead의 파괴가 상대적으로 적었다. 건조 bead를 이용한 회분 공정에서 24시간 반응 후 반응액을 제거하고 새로운 기질을 공급하였을 때, specific initial production rate는 1회, 2회, 3회에서 각각 1.82, 1.41, 1.19(g<sub>sorbitol</sub>/g<sub>cell</sub>-h)였으며, fructose의 sorbitol로의 전환율로 측정된 효소의 활성은 3회 반복(72시간) 후에는 22%의 감소를 나타내었다(Fig. 2). 이것은 wet bead를 이용한 반회분식 공정에 의한 3회 반복 실험에서 효소의 활성이 71%감소한 결과(7)와 비교해 볼 때, dry bead를 이용한 결과 더 높은 안정성을 나타내었다. 이러한 결과는 dry bead를 이용한 반응에서는, bead의 견고성이 증가하고 비교적 적은 bead팽윤으로 효소의 유출이 적었음을 의미한다.

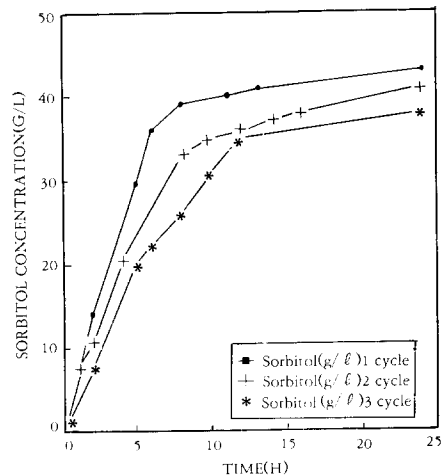


Fig. 2. Production of sorbitol in a batch process with CTAB treated cells of *Z. mobilis*. Three cycles of a batch process were carried out with dry beads at 39℃, pH6.2.

**Table 2. Comparison of kinetic parameters of dry beads at various rehydration temperatures.**

Parameters	Rehydration temperature(°C)		
	20	30	40
Conversion efficiency(%)	64	70	68
Specific initial production rate ( $\frac{S_{max}}{S_{0+1} - S_{0-1}}$ )	0.6	0.62	0.59

Ryu등은 Gel내부로의 물질전달 시 원활한 물질이동은 반응속도상수, 최대반응속도(Vmax), 상대포화상수(Ks)에 결정적인 영향을 주므로, bead의 직경은 1.00-1.15mm 이상이 좋다고 하였다(8). 이러한 기준에서 wet bead(2.7-3.3mm)는 2주일간 건조하여 직경 1.2-1.3mm의 말린 bead를 만들었다.

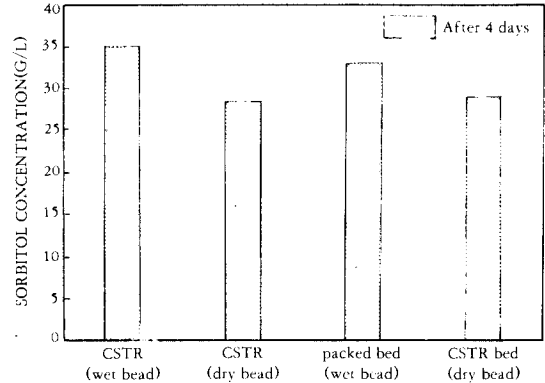
**재수화(rehydration) 온도의 영향**

2주일간 20°C에서 건조한 bead 4.2mL를 10% (v/v) 기질용액(glucose 50g/l+fructose 50g/l)에서 반응 하였다. Bead의 온도에 따른 효소활성을 비교하기 위하여 각각 20, 30, 40°C에서 30분간 교반 하였으며, 이 때의 specific initial production rate와 기질의 전환율을 Table 2에 나타내었다.

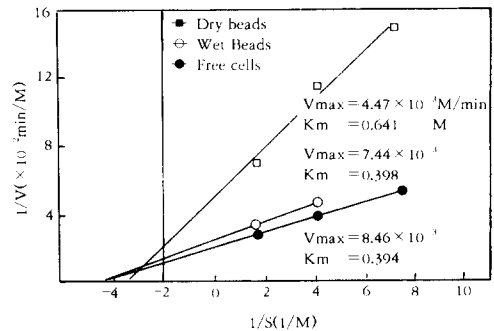
24시간 후의 bead의 부피는 4.3에서 12-13mL로 증가하였고, 중량은 1.87에서 9.5-10.0g으로 증가하였다. 건조 bead의 반응온도는 39°C로 하여 차후 실험하였다.

**Packed bed반응기와 CSTR를 이용한 연속배양**

건조 bead의 연속공정실험은, wet bead를 이용한 연속배양공정 실험에서 glucose-fructose oxidoreductase의 안정성이 30일 이상 유지되고 2일 이후에는 안정된 반응 상태를 유지하므로(6), 7일 이상 관찰하지 않았으며, 임의로 3일째의 결과를 이용하여 생산성을 나타내었다. 회석속도 0.1h<sup>-1</sup>에서 wet bead와 건조 bead의 생산성은 각각 3.4, 2.88g/L-h를 보였다(Fig. 3). 기질 용액 200mL(glucose 50g/L+Fructose 50g/L+0.4% CaCl<sub>2</sub>) 중에서 fructose를 기준으로 할 때 반응에 이용되지 않은 기질 용액은 30-43%(v/v)이었다. 건조 bead를 이용한 sorbitol생산에서는, 일반적으로 CSTR를 이용한 연속 반응에서는 자석막대의 회전에 의한 bead의 파괴로 인하여 효소의 conversion efficiency가 감소되는



**Fig. 3. Production of sorbitol in a continuous process (CSTR, packed bed reactor) with CTAB permeabilized cells of *Zymomonas mobilis* immobilized in K-carrageenan. Permeabilized cells were treated with glutaraldehyde prior to immobilization. Continuous process was performed using wet beads and dry beads in 50g/L each of glucose and fructose at 39°C, pH6.2 and dilution rate 0.1h<sup>-1</sup>.**



**Fig. 4. Lineweaver-Burk plot of data obtained from free cells, wet beads and dry beads in a batch process at pH6.2, 39°C.**

데 반하여, 건조 bead를 이용한 연속식 반응에서는 bead의 파괴가 거의 없었다.

**회분공정**

회분공정반응에서 기질 농도 변화에 따른 효소의 활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot결과는 Fig. 4와 같다.

Free cell, wet bead, 건조 bead의 Km값은 각각 0.394, 0.398, 0.641M 이었고, 이 때의 Vmax는 8.64×10<sup>-3</sup>, 7.44×10<sup>-3</sup>, 4.47×10<sup>-3</sup> M/min였다. 건조 bead에서의 Km값은 free cell과 비교하여서 약 1.6배 정도 큰 반면, Vmax값은 감소되었다. 이와

Table 3. Comparison of Kinetic parameters for free cells, wet beads and dry beads.

Kinetic parameters	Free cells	Wet beads	Dry beads
K <sub>m</sub> (M)	0.394	0.398	0.641
V <sub>max</sub> (M/min)	$8.64 \times 10^{-3}$	$7.44 \times 10^{-3}$	$4.47 \times 10^{-3}$
V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (Min <sup>-1</sup> )	0.022	0.019	0.007
R <sup>2</sup>	0.99	1	0.95

같은 결과는 효소고정화 중에 일어나는 glucose-fructose oxidoreductase의 불활성, 고정화된 cell에서의 이동저항계수의 증가, bead건조 중의 불활성 등 여러가지 인자에서 기인되는 것으로 판단된다. 반응에서의 Michaelis-Menten상수를 Table 3에 나타내었다. 변수의 적합성을 평가하는 지표로 상관계수의 제곱(R<sup>2</sup>)을 사용하였으며, R<sup>2</sup>의 값이 1에 가까울수록 값의 신뢰도가 증가한다. 반응에 이용한 *Z. mobilis*는 cell broth 1L를 이용하였으며, 이것은 건조균체량 3.2g/L에 해당한다.

V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub>비는 기질에 대한 효소의 친화도의 판단근거가 될 수 있으며 free cell, wet bead, dry bead의 순으로 나타났다.

## 요 약

투과성이 증가된 *Z. mobilis*를 K-carrageenan으로 고정화한 건조 beads를 이용하여 sorbitol연속생성공정의 향상에 관한 실험을 하였다. 투과성을 증가시킨 균체를 K-carrageenan으로 고정화 하여서 연속공정을 실시한 결과 효소의 안정성이 30일 이상

지속되었다. K-carrageenan으로 고정화한 균체를 건조시 bead의 견고성과 저장성이 향상되었다. 건조 bead를 이용한 72시간의 반회분식 공정에서 효소 활성도의 감소는 8%였으며, 건조 bead에서의 V<sub>max</sub> 값은 39°C와 pH6.2에서 free cell의 거의 절반값을 나타내었다. 연속공정에서 회석속도 0.1h<sup>-1</sup>일 때 wet bead와 건조 bead에서의 sorbitol생산성은 각각 3.4, 2.88g/L-h를 나타내었다.

## 참고 문헌

1. L. Viikari(1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 252-255.
2. K. D. Barrow, J. G. Collins, D. A. Leigh, P. L. Rogers and R. G. Warr(1984), *J. Biol. Chem.*, **259**, 5711-5716.
3. M. Zachariou and R. K. Scopes(1986), *J. Bacteriol.*, **167**, 863-869.
4. P. L. Rogers, K. J. Lee and D. E. Tribe(1979), *Biotechnol. Lett.*, **1**, 165-170.
5. U. H. Chun and P. L. Rogers(1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 19-24.
6. K. H. Jang, C. J. Park and U. H. Chun(1991), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **6**(3), 249-254.
7. I. H. Jung, D. J. Choi, C. H. Park and U. H. Chun(1990), *Korean J. Food Sci. Technol.*, **22**(7), 812-816.
8. D. D. Y. Ryu, H. S. Kim and T. Hisaharu (1984), *J. Ferment. Technol.*, **62**, 255-260.