

## *Zymomonas mobilis*와 *Gluconobacter suboxydans*를 이용한 돼지감자로부터 D-sorbitol 및 L-sorbose 생성에 관한 연구

전역한·김원극·\*조동욱·김인철·\*\*이상기  
경희대학교 산업대학 식품가공학과, \*한국식품개발연구원  
\*\*한국과학기술연구원 유전공학연구소 대사공학연구실

### Production of D-sorbitol and L-sorbose from Jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* and *Gluconobacter suboxydans*

Uck Han Chun, Won Keuk Kim, \*Dong Wook Cho, In Chul Kim and \*\*Sang Ki Rhee

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

\*Korea Food Research Institute

\*\*Lab. of Metabolic Engineering, Genetic Engineering Research Institute, Taejon 305-606, Korea

#### ABSTRACT

The use of Jerusalem artichoke containing  $\beta$ -1, 2-fructose oligomer for the production of D-sorbitol and L-sorbose has been studied. The employment of inulinase(0.398%, v/v) for the hydrolysis of 40% (v/w) Jerusalem artichoke juice resulted in 36.7g/1 of glucose and 85.3g/1 of fructose at 50°C. These sugars were utilized as substrates for D-sorbitol and L-sorbose production. Coimmobilization of inulinase and permeabilized cells of *Zymomonas mobilis* in the mixture of chitin(5%, w/v) and  $\kappa$ -carrageenan(4%, w/v) resulted in the production of 30.2g/1 of D-sorbitol by using inulin as a substrate. The process of L-sorbose production from D-sorbitol by *Gluconobacter suboxydans* was optimized with respect to the substrate concentration, level of dissolved oxygen and gluconic acid concentration. Gluconic acid produced by *Zymomonas mobilis* from glucose was found to inhibit *Gluconobacter suboxydans* in conversion of D-sorbitol to L-sorbose. In view of removing such inhibitory effect by gluconic acid, mutants were selected by the NTG(N-methyl-N'-N' nitro-N-nitrosoguanidine) treated method. Mutants selected by NTG mutagenesis showed no inhibitory effects of gluconic acid against L-sorbose production when its concentration increased up to 100g/1. A mutant produced 40.1g/ℓ of L-sorbose in the medium containing 100g/ℓ D-sorbitol and 100g/ℓ gluconic acid. This result is considerable when compared with L-sorbose concentration(21.7g/1) obtained from the fermentation with wild type strain of *Gluconobacter suboxydans*.

#### 서론

D-sorbitol과 L-sorbose는 Vitamin C의 생성에

있어서 중요한 중간물질일 뿐만 아니라 식품첨가물로서 많이 이용되어 이들 물질의 생물학적 생산공정 개발이 시급한 실정이다.

*Zymomonas mobilis* 세포는 glucose와 fructose를 기질로 이용하여 glucose-fructose oxidoreductase 효소에 의해서 D-sorbitol과 gluconic acid를 거의 동량 생성한다(1).

한편 돼지감자(Jerusalem artichoke)는  $\beta$ -1, 2-fructose oligomer인 inulin을 약 12.1% (w/w) 정도 함유하고 있으며, 작물의 수율이 높고(10,000-13,000lb/acre/year), 서리와 병충해에 강한 장점을 지니고 있다(2, 3). 또한 inulin을 산(4, 5) 또는 효소(6, 7)로 가수분해 하면 glucose와 fructose가 생성되며 이렇게 생성된 fructose는 *Zymomonas mobilis*에 의해서 D-sorbitol 생성의 기질로 이용될 수 있다.

*Zymomonas mobilis* 세포와 inulinase 효소를 chitin (5%, w/v)과  $\alpha$ -carrageenan (4%, w/v)에 동시 고정화하여 D-sorbitol을 생성하면 하나의 반응기 내에서 가수분해가 진행됨과 동시에 D-sorbitol이 생성되므로 전체공정을 간소화 시킬 수 있다.

한편 *Gluconobacter suboxydans*의 세포막 측면에 membrane bound 형태로 존재하는 sorbitol dehydrogenase 효소는 D-sorbitol을 L-sorbose로 전환한다(8). 그러나 sorbitol dehydrogenase는 20% 이상의 D-sorbitol 농도에서는 기질저해가 일어나며, *G. suboxydans*는 gluconic acid의 농도가 40g/l 이상에서는 성장과 L-sorbose 생성능력이 저해된다. 따라서 본 연구에서는 gluconic acid에 내성이 있는 *G. suboxydans* 돌연변이주를 선발하여 돼지감자를 원료로 한 L-sorbose의 생성을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지 조성

본 실험에 이용된 균주는 *Zymomonas mobilis* ZM4(KCTC 31821)와, *Gluconobacter suboxydans* (KTCC 2111)이며, 배지로서 100g/l glucose, 1g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  그리고 10g/l yeast extract를 *Z. mobilis*의 배양에 이용하였고, *G. suboxydans* 세포를 배양하기 위해서 50g/l D-sorbitol, 10g/l peptone 그리고 5g/l의 yeast extract를 사용하였으며 배양온도 30°C, pH 5.0의 조건에서 rotary shaker를 250rpm의 속도로 교반하여 진탕배양하였다.

### 세포의 투과성 증진

배양된 *Z. mobilis* 세포를 원심분리하여 얻어진 세포를 0.2% CTAB(Cetyltrimethylammoniumbro-

mide)로 처리한 뒤 4°C에서 10분간 방치한 후 다시 원심분리하여 상등액을 제거한 세포를 0.3% glutaraldehyde 용액으로 처리한 뒤 4°C에서 10분간 방치 후 0.1M Kpi buffer 및 증류수로 세척하여 세포의 투과성을 향상시켰다.

### 돼지감자즙의 제조 및 가수분해

돼지감자를 수세하고 얇게 자른 뒤 적당량의 증류수를 첨가하여 즙을 만들었다. 1.2기압 121°C에서 15분간 살균한 뒤 filter paper(Advanced 5A)를 사용하여 filtration한 후 살균하였다. 생성된 돼지감자즙에 진한황산을 첨가하여 pH를 2.0으로 맞추어 반응시킨 뒤 2N KOH를 이용하여 pH 6.0으로 조절하였다. 효소에 의한 가수분해는 inulinase를 0.2ml (0.398%, v/v) 첨가하여 50°C에서 24시간 동안 반응시켰다.

### 효소와 세포의 동시 고정화

Hsu와 Lockwood(9)의 방법에 따라서 chitin을 6N HCl로 처리한 뒤 0.1M acetate buffer(pH 5)로 수세하여 HCl을 제거하였다. 3% glutaraldehyde로 처리한 뒤 inulinase를 혼합하여 1시간 동안 실온에서 방치한 뒤 4°C에서 24시간 보존한 후 사용하였다. 이를 투과성이 증가된 *Zymomonas mobilis* 세포와 혼합한 뒤, 증류수에 용해된  $\alpha$ -carrageenan과 혼합하였다. 10ml 주사기를 사용하여 20g/l KCl과 0.15g/l  $\text{CaCl}_2$ 의 혼합 용액에 떨어뜨려서 bead를 만든 후 1시간 동안 교반한 뒤 0.1M Kpi buffer로 수세하였다.

### UV조사에 의한 돌연변이 선발

고체배지에 *G. suboxydans* 세포를 배양하여 생성된 colony에 단파장의 UV trans eluminator를 사용하여 15분에서 1시간까지 변화시켜 조사한 뒤, 성장한 세포를 150g/l의 gluconic acid가 포함되어 있는 고체배지에 도말한 후 성장한 세포를 돌연변이 균체로서 L-sorbose 생성에 사용하였다.

### NTG처리에 의한 돌연변이 선발

Goodman 등(10)의 방법에 의해서 *G. suboxydans*의 돌연변이 균체를 선발하였다. NTG의 농도를 25-200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 변화시키면서 실험하였으며, 대수 증식기 상태의 *G. suboxydans*에 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 NTG를 첨가하여 30분간 배양한 뒤 원심분리하였다. Pellet을 액체배지로 3회 세척한 뒤 gluconic acid

가 함유되어 있는 고체배지에 도달한 후 성장한 세포를 선별하였다.

**분석 방법**

Glucose, Fructose, D-sorbitol, L-sorbose를 HPLC(model, Waters R401)로 분석하였으며, 이때 사용한 column은 Bio-Rad Carbohydrate HPX-87C였으며 85°C의 온도를 유지하여 주었다. Solvent의 유속은 0.6ml/min이었다. 균체농도는 건조균체량으로 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**돼지감자즙의 가수분해**

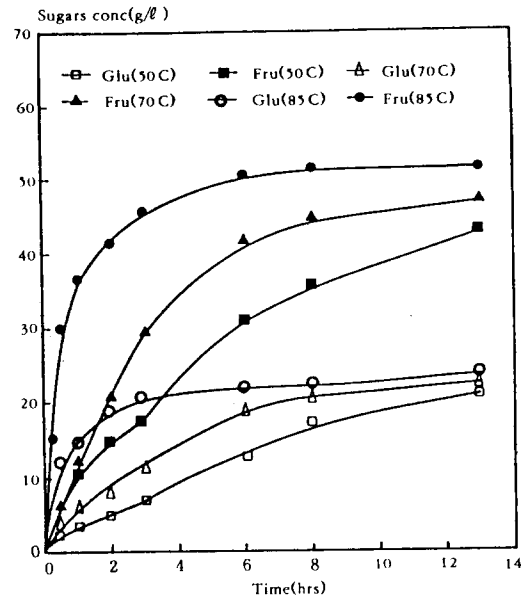
산 또는 inulinase를 이용하여서 돼지감자즙을 가수분해하였다. 희석 농도에 따른 산 가수분해도를 측정하기 위하여 40% (v/w, water/Jerusalem artichoke tubers), 50% (v/w), 70% (v/w) 및 100% (v/w)의 돼지감자즙을 만든 후 각각의 즙의 pH를 2.0으로 고정하여 가수분해를 하였다. 그 결과 40%의 경우에 glucose와 fructose의 수율이 각각 17.3, 37.7로서 최대치를 나타냈다.

온도에 따른 돼지감자즙의 산 가수분해도를 측정하기 위하여 40% (v/w)의 돼지감자즙을 50°C, 70°C, 85°C에서 각각 가수분해 하였다. 그 결과 Fig. 1에 나타냈듯이 85°C에서 가수분해가 가장 빠르게 일어났다.

산과 inulinase에 의한 가수분해도를 비교하기 위하여 40% (v/w)의 돼지감자즙을 사용하여 inulinase에 의한 가수분해 실험을 행한 결과 0.2ml(0.398%, v/v)의 inulinase를 첨가하여 50°C에서 24시간 반응시켰을때 가수분해도가 가장 높았다(Table 1). 산

**Table 1. Hydrolysis of Jerusalem artichoke juice(40%, v/w) by inulinase. Reaction was carried out for 24h at 50°C. 50ml of juice was used for enzyme hydrolysis.**

Inulinase loaded(ml)	Concentration of liberated sugars(g/l)		
	Glucose	Fructose	Total carbohydrate
0.20	36.7	85.3	122.0
0.48	33.8	78.3	112.1
0.75	30.9	85.8	116.7
1.00	31.0	79.0	110.0



**Fig. 1. Liberation of sugars by acid hydrolysis from 50ml of 40% (v/w, water/Jerusalem artichoke tubers) Jerusalem artichoke juice at various temperatures.**

에 의한 가수분해에 비하여 inulinase에 의한 가수분해시 total sugar생성이 약 1.6배 높았으며 최대 122.0g/l의 total carbohydrate가 생성되었다. 이때의 glucose와 fructose의 생성비율은 약 3:7이었다.

**D-Sorbitol 생산조건의 최적화**

*Aspergillus ficuum*으로부터 추출한 inulinase의 최적 반응 온도는 60-65°C이고(11), fructose를 D-sorbitol로 전환하는 glucose-fructose oxidoreductase의 최적온도와 pH는 각각 38°C, 6.2로서(12) 서로 상이하므로 두 물질의 동시고정화를 위해서 새로운 최적조건이 요구되었다. 40% (v/w)의 돼지감자즙 50ml에 0.2ml의 inulinase와 3g의 투과성이 향상된 *Z. mobilis*세포를 첨가시키고, 온도를 32°C에서 41°C까지 변화시키면서 D-sorbitol의 생성량을 조사한 결과 반응 온도 38°C에서 최대 15.2g/l의 D-sorbitol이 생성되었고 pH를 5.5에서 7.0까지 변화시킨 반응에서는 pH 6.2에서 최대 25g/l의 D-sorbitol이 생성되었다.

D-sorbitol은 fructose로부터 glucose-fructose oxidoreductase에 의한 환원작용으로 생성되므로 이때 전자 공여체로서 glucose가 필요하며 glucose와

Table 2. D-sorbitol formation from 50ml of Jerusalem artichoke juice(40%, v/w) containing additional glucose.

Glucose added (g/l)	Sorbitol conc. (g/l)	Conversion (%)
35	28.0	39.0
45	33.0	40.4
55	35.6	41.3
65	36.1	39.4

\* Reactions were carried out with 0.2ml each of inulinase and *Z. mobilis* cells at 38°C and pH 6.2. Samples were taken after 15h reaction.

fructose의 양이 동일할때 최대량의 D-sorbitol을 얻을 수 있다(1). 그러나 돼지감자즙의 가수분해시 glucose와 fructose의 생성농도가 상이하므로 추가적으로 glucose를 첨가하였으며 이때 첨가한 glucose의 농도를 35g/l에서 65g/l까지 변화시켜서 실험한 결과 glucose의 농도가 55g/l일때 41.3%의 전환율을 얻을 수 있었다(Table 2).

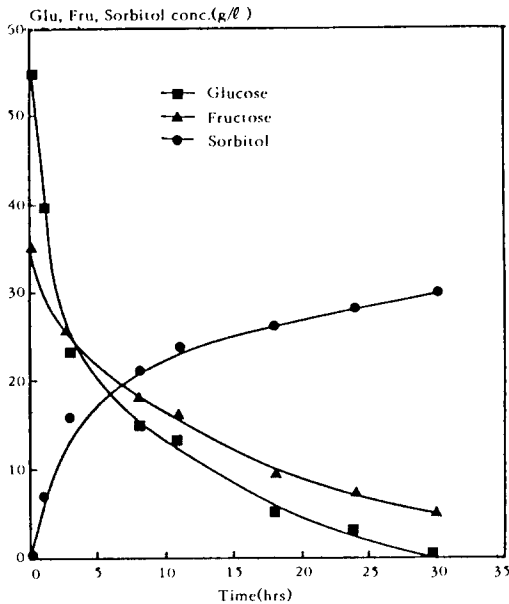


Fig. 2. D-sorbitol formation by coimmobilized inulinase and permeabilized *Z. mobilis* at 38°C and pH 6.2. Inulinase and glucose loaded were 3.0ml and 55g/l, respectively, in 80ml of Jerusalem artichoke juice[40%(v/w)].

Zymomonas mobilis 세포와 inulinase의 동시 고정화

돼지감자즙의 가수분해와 이때 생성된 fructose로부터 *Z. mobilis*에 의한 D-sorbitol의 생성을 1단계에서 일어나게 하기 위해서 inulinase와 투과성이 향상된 *Zymomonas mobilis*를 동시 고정화 하였다. 반응기로서는 회분식 반응기를 사용하였으며 pH와 온도는 각각 6.2, 38°C로 고정하였다. 반응기내의 돼지감자즙의 양은 80ml이었으며 반응결과 30.2g/l의 D-sorbitol을 생성하였다(Fig. 2). 이때의 전환율은 total fructose를 기준으로 계산하여 32.9%이었다.

L-sorbose의 생성에 미치는 용존산소의 영향

Sorbitol dehydrogenase는 세포막 측면 즉 membrane bound 형태로 존재하며 세포막의 전자전달계와 연계되어 있어, D-sorbitol의 L-sorbose로의 전환은 궁극적으로 산소에 의한 산화작용으로 볼 수 있으므로 용존 산소농도가 L-sorbose 생성 효율에 미치는 영향을 조사하였다. 1.5g/l 내외의 균체를 사용하여 반응조에 용존산소의 포화도를 10-40%까지 변화시키면서 실험한 결과 Fig. 3에 나타냈듯이 용존산소 농도가 40%일때 최대치의 L-sorbose 농도를 나타내어 D-sorbitol의 L-sorbose로의 전환은 산소 요구량이 높은 반응임을 확인할 수 있었다.

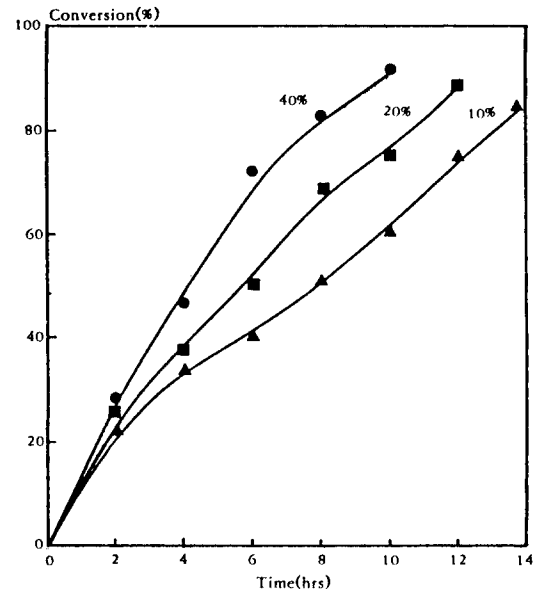


Fig. 3. Conversion of D-sorbitol to L-sorbose at different levels of dissolved oxygen concentration. Reactions were made with 1.5g cell/l and D-sorbitol/l.

**L-sorbose 생성에 미치는 D-sorbitol 및 gluconic acid의 영향**

*Z. mobilis*내에 존재하는 Glucose-fructose oxidoreductase에 의해서 glucose는 gluconic acid로 fructose는 D-sorbitol로 전환되며 D-sorbitol과 gluconic acid는 거의 동량 생성된다. 이와같이 생성된 생성물중 D-sorbitol은 *Gluconobacter suboxydans* 세포에 의해서 L-sorbose로 전환될 수 있다. D-sorbitol의 농도 변화에 따라서 세포의 성장 및 L-sorbose생성에 저해를 일으키는지 알아보기 위하여 D-sorbitol의 농도를 5%에서 30% 사이에서 변화시키면서 발효시켜 L-sorbose 생성에 미치는 D-sorbitol 농도의 영향을 조사하였다(Table 3). 각 농도에 있어서 10%까지는 100% 가까운 전환율에 도달하고 있으나 20%와 30%의 경우 전환율이 약 40% 정도에 불과하였다. 따라서 20%이상의 D-sorbitol 농도에서는 기질에 대한 저해가 일어나 L-sorbose생성이 억제됨을 알 수 있었다.

Gluconic acid가 D-sorbose 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 gluconic acid의 농도를 0-140g/l 까지 변화시키면서 *Gluconobacter suboxydans*의 L-sorbose발효를 행하였다. 반응기내의 pH를 5.0으로 조절하였을때 gluconic acid 40g/l까지는 균체의 성장이 잘 되었으며 60g/l의 L-sorbose가 생성되었다. 그러나 gluconic acid의 농도가 40g/l

이상에서는 세포의 성장 및 L-sorbose생성이 저해되었다(Fig. 4, Table 4). 첨가한 Gluconic acid의 농도가 증가함에 따라서, L-sorbose의 양과 dry cell weight가 각각 78g/l에서 28g/l로 2.5g/l에서 0.9g/l로 감소하였으며, 비증식속도( $\mu$ )값은 0.020에서 0.012까지 그리고  $Y_{ps}$ 와 전환율은 각각 0.700에서 0.389, 100%에서 39.88%로 감소하였다.

Gluconic acid에 대한 free cell과 resting cell과의 저해효과를 비교하기 위하여 0-5% 까지 gluconic

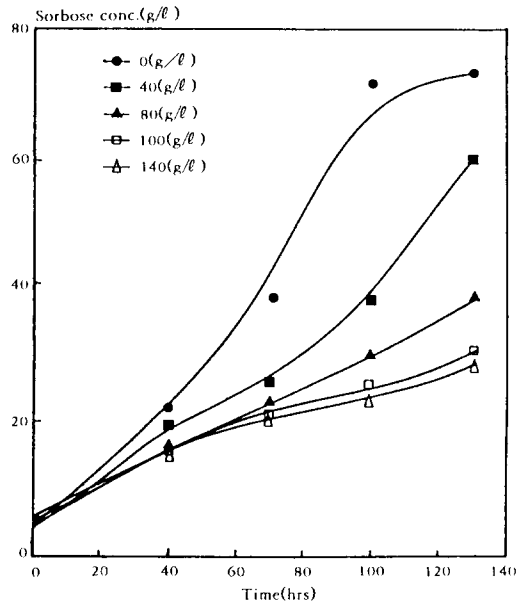


Fig. 4. L-sorbose formation with various gluconic acid concentrations(g/l) at 30°C and pH 5.0.

Table 3 Kinetic parameters for L-sorbose formation with different level of D-sorbitol concentrations.

Parameters	D-sorbitol concentration(g/l)			
	50	* 100	200	300
Residual				
D-sorbitol conc.(g/l)	0.00	7.10	106.10	140.20
L-sorbose conc.(g/l)	43.59	74.85	82.35	72.24
D. C. W.(g/l)	2.47	2.24	2.48	2.10
O. D. at 660nm	1.32	1.04	1.08	1.11
Conversion eff.(%)	100.00	93.82	43.70	33.99
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.043	0.019	0.019	0.015
$Y_{vs}$	0.049	0.023	0.023	0.020
$Y_{ps}$	0.849	0.732	0.795	0.640
$q_s$	0.169	0.315	0.315	0.555
$q_p$	0.147	0.335	0.227	0.287

\* Reaction was made at 30°C and pH 5.0 for 90h. Otherwise, samples were taken after 120h of reaction.

Table 4. L-sorbose formation at various gluconic acid concentrations.

Kinetic parameters	Gluconic acid loaded(g/l)				
	0	40	80	100	140
$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	0.020	0.015	0.018	0.012	0.015
$Y_{vs}$	0.022	0.015	0.016	0.016	0.015
$Y_{ps}$	0.700	0.560	0.489	0.396	0.389
Conversion efficiency	100.0	82.08	56.62	42.87	39.88

\* Reaction was made at 30°C and pH 5.0 for 130h and used the flask culture method. 50g/l of D-sorbitol was added to media.

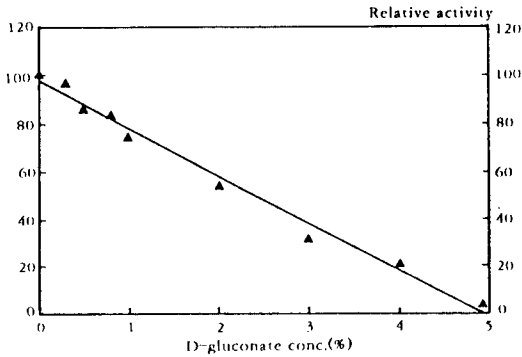


Fig. 5. Effect of gluconic acid on the conversion of D-sorbitol to L-sorbose by *Glucondocter suboxydans* resting cell.

ic acid의 농도를 변화시키면서 실험한 경우 free cell에 비하여 gluconic acid에 의한 저해 효과가 더 컸으며 5% 농도에서는 L-sorbose로의 전환이 완전히 저해되었다(Fig. 5).

**Gluconic acid 내성 돌연변이주 선발**

*G. suboxydans*에 의한 D-sorbitol의 L-sorbose로의 전환반응 효율을 높이기 위해 gluconic acid내성 변이주의 선발을 시도하였다. 우선 NTG의 최적 농도를 정하기 위해서 25-200 µg/ml까지 변화시켜 실험한 결과 100 µg/ml 이상이 되면 세포가 대부분 사멸하였고 25 µg/ml의 NTG첨가시 세포의 성장 및 돌연변이율이 높음이 확인되었다. NTG로 세포를 처리한 뒤 100g/l의 gluconic acid가 함유된 선택 배지에 도달하여 성장된 세포를 다시 NTG(25 µg/ml)로 처리하여 150g/l의 gluconic acid가 함유되어 있는 선택배지에 도달하여 성장한 세포를 돌연변이 균체로 선발하였다. 선택배지에서 성장한 돌연변이 균체를 100g/l의 gluconic acid와 100g/l의 D-sorbitol이 첨가된 발효조에서 배양온도 30°C, pH 5.0 교반속도 250rpm 공기 주입속도 3vvm의 조건에서 110시간 배양한 후 40.1g/l의 L-sorbose가 생성되어 49.2%의 전환율을 나타내었다(Fig. 6). 이는 wild type의 21.8%에 비하여 2.25배 높은 값이었고,  $\mu$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/s}$ ,  $q_s$ , 그리고  $q_p$  값은 각각 0.017, 0.012, 0.713, 0.654h<sup>-1</sup>, 그리고 0.467h<sup>-1</sup>이었다. *G. suboxydans*의 경우 U. V 조사에 의한 돌연변이 균체에 비해 NTG 처리에 의한 돌연변이 균체가 L-sorbose생성에 더 효과적이었다.

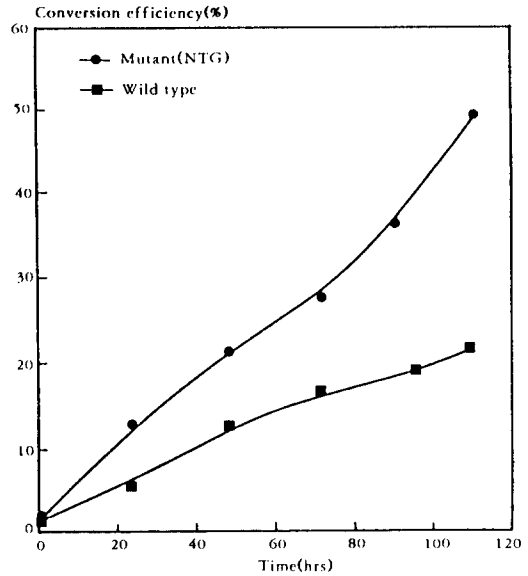


Fig. 6. Conversion efficiency of D-sorbitol to L-sorbose with wild type and the mutant obtained by NTG mutagenesis. 100g/l of gluconic acid was added to media containing 100g/l D-sorbitol.

**요 약**

*Z. mobilis*와 *G. suboxydans* 두 균주를 사용하여 D-sorbitol과 L-sorbose를  $\beta$ -1, 2-fructose oligomer를 함유하고 있는 돼지감자로부터 생산하기 위한 실험을 행하였다. Inulinase(0.398%)에 의해 돼지감자즙(40%, w/v)으로부터 glucose와 fructose가 각각 36.7g/l, 85.3g/l이 생성되었다. 이 생성물은 D-sorbitol과 L-sorbose생성의 기질로 이용하였다.

Inulinase와 투과성이 향상된 *Z. mobilis*를 chitin (5%, w/v)과  $\alpha$ -carrageenan(4%, w/v)을 사용하여 동시 고정화 하였다. 이때 30.2g/l의 D-sorbitol이 생성되었으며, 32.9%의 전환율을 나타냈다. *G. suboxydans*에 의한 D-sorbitol에서 L-sorbose로의 전환에 있어서 기질의 농도, 용존 산소농도 및 gluconic acid 농도의 영향을 조사하였다. D-sorbitol의 농도가 200g/l 이상이 되면 120시간의 반응시간이 경과되어도 43.7%의 전환율을 나타내어 기질의 저해가 일어남을 확인하였다. *Z. mobilis*에 의해서 glucose로부터 생성된 gluconic acid는 *G. suboxydans*의 성장 및 L-sorbose로의 전환을 저해하였다. 이러한 저해작용을 제거하기 위해서 NTG처리에 의한

방법을 사용하여 돌연변이 균체를 선발하였으며, 이 균체를 사용했을때 100g/1의 gluconic acid와 100g/1의 D-sorbitol이 함유되어 있는 발효조에서 40.1g/1의 L-sorbose가 생성되어 49.2%의 전환율을 나타냈고, 이는 wild type의 21.8%에 비해서 2.3배 높은 값이다.

### 참고 문헌

1. U. H. Chun and P. L. Rogers(1988), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 19.
2. S. Joshi and H. Yamazaki(1984), *Biotechnol. Lett.*, **6**, 797.
3. P. Bjpai and A. Margaritis(1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 447.
4. K. Kim and M. K. Handy(1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 138.
5. Z. Duvnjak and D. W. Koren(1987), *Biotechnol. Lett.*, **9**(11), 783.
6. C. H. Kim and S. K. Rhee(1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **23**, 178.
7. C. H. Kim and S. K. Rhee(1989), *Biotechnol. Lett.*, **11**(3), 201.
8. E. Shinagawa, K. Matsushita, O. Adachi and M. Ameyama(1982), *Agric. Biol. Chem.*, **46** (1), 135.
9. S. C. Hsu and J. L. Lockwood(1975), *Appl. Microbiol.*, **29**, 422.
10. A. E. Goodman, P. L. Rogers and M. L. Skotnicki(1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, **44** (2), 496.
11. L. Zittan(1981), *Starch*. **33**, 373.
12. M. Zachariou and R. K. Scopes(1986), *J. Bacteriol.*, **167**(3), 863.