

고정화균체 반응기에서 L-Sorbose 연속생산

신혜원 · 신봉수 · 신철수*

연세대학교 식품생물공학과 및 생물산업소재연구센터

Continuous L-Sorbose Production in Immobilized Cell Reactors. Hye-Won Shin, Bong-Soo Shin and Chul Soo Shin*. Department of Food and Biotechnology, College of Engineering, and Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul, 120-749, Korea - The conversion of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* was analyzed, and continuous production of L-sorbose was carried out in immobilized cell reactors. L-Sorbose production by high densities of resting cells was more effective than by conventional batch fermentations. Sorbitol dehydrogenase, an enzyme converting D-sorbitol to L-sorbose, did not suffer from substrate inhibition, but from product inhibition. When L-sorbose production was carried out with Ca-alginate-immobilized cells, about 60 g/l of L-sorbose was obtained. On the other hand, when the corn steep liquor (CSL) concentration of medium was reduced to 0.08%, 80 g/l of L-sorbose was obtained. Outgrowth inside the immobilized carriers was thought to block the pores of the carriers so that substrate could not easily diffuse through the carriers. Continuous production of L-sorbose was well accomplished in a bubble column reactor, and 6.5 g/l.h of productivity and 81.2% of yield were obtained at a substrate feeding rate of 0.08 h⁻¹ under the optimum conditions with carrier volume of 55% and aeration rate of 3 vvm.

비타민C는 인간이나 동물에 있어서 중요한 필수 영양소로서 L-ascorbic acid라고도 하며 의약품 및 항산화제, 향갈색제 등의 식품 첨가제로 널리 이용되어 왔다. 이 물질은 점차 그 용도와 기능이 확대되어 수요 또한 증가 추세에 있으며 전세계적으로 연간 4만여 톤이 생산 판매되고 있다. 그러나, 국내에서의 소비는 외국으로부터의 수입에 의존하고 있어 이 물질의 국내생산이 시급한 실정이다. 비타민C는 5, 6가지의 합성법으로 생산될 수 있으나, 산업적 생산은 주로 Reichstein-Grüssner 합성법에 의해 이루어져 왔다. D-Sorbitol가 L-sorbose로 전환되는 반응은 이 합성법의 여러 중간단계중에서 유일한 생물학적 전환이며, 나머지 4, 5단계는 화학적 전환에 속한다(1). 지금까지 비타민C의 산업적 생산은 화학적 및 생물학적인 전환공정을 병용해 왔으나 미래에는 환경공해를 유발하지 않으며 효소의 기질특이성을 이용할 수 있어서 생산물의 광학 이성질체를 각각 분리하는 공정이 필요 없고 비용이 절감되는 등의 장점을 가지는 생물전환공정으로 모두 대체될 전망이다. 따라서, D-sorbitol을 L-sorbose로 전환시키는 반응은 비타민C 생산에서 가장 오랫동안 연구되어온 생물전환반응으로서의 그 의의가 크다.

한편, Reichstein-Grüssner합성법 외에도 비타민C 생

산 주요단계인 2,5-diketo-D-gluconate(2,5-DKG)로부터 2-keto-L-gulonic acid(2-KLG)를 생산하는 생물전환 단계를 Pfizer사(2), Shionogi사(3)가 특허출원 하였으며, Takeda사(4)는 1990년 L-sorbose로부터 2-KLG를 생산하는 생물전환공정을, Shionogi사(5)는 1987년 D-glucose로부터 2-KLG 발효생산에 대한 세계적 특허를 획득하였다. 이들 방법들을 포함하여 대략 5~6가지의 생물전환기술이 보고되었다(6-9). 국내에서는 1982년 제일제당(주)이 미생물에 의한 L-sorbose제조방법을 특허출원한 바 있으나 이 물질 생산에 관한 전반적인 연구는 미미한 실정이며, 국내에 특허 출원한 외국회사로는 일본의 Shionogi사가 2-KLG와 2,5-DKG 제조방법을 특허출원했다(10, 11).

비타민C의 효과적인 생물전환공정을 개발하기 위해서 그 합성법 중의 한 단계인 D-sorbitol → L-sorbose전환의 생산성 향상이 중요하다고 할 수 있다. 그 동안 L-sorbose발효는 *Acetobacter*속과 *Gluconobacter*속의 균주를 이용하여 표면배양법과 심부배양법으로 이루어져 왔으며, 최근에는 fed-batch배양법, 연속배양법, 균체고정화에 의한 배양법과 휴지균체 배양법 등이 시도되고 있다(12-15). 지금까지 L-sorbose생산에 있어 고정화를 도입한 예로는 sorbose의 생산균주인 *Gluconobacter suboxydans*를 polyacrylamide gel에 포괄하여 회분배양 또는 연속 배양한 예(12), *Gluconobacter suboxydans*를 toluene으로 처리한 후 Ca-alginate로 고정화하여 air-lift reactor로 반응시킨 예(13) 등이 있었다. 또한, *Gluc-*

*Corresponding author

Tel. 82-2-361-2866, Fax. 82-2-362-7265

E-mail: csshin@santtus.yonsei.ac.kr

Key words: L-Sorbose, *Gluconobacter suboxydans*, Immobilization, Bubble column reactor

*nobacter oxydans*를 이용한 경우로는, polyacrylamide gel, chitosan, k-carrageenan, Ca-alginate, zosterin 등으로 고정화하여 비교한 예(14)와 polyacrylamide를 부분적으로 acylhydrazide groups으로 치환해 만든 polyacrylamidehydrazide와 Na-alginate를 균체와 혼합한 후 crosslinking agent를 첨가한 고정화방법(15) 등이 보고되어 왔다.

따라서, 본 연구에서는 보다 효과적인 L-sorbose로의 전환반응을 위해 효소반응체계 및 조절기작을 분석하고, 이를 바탕으로 효과적인 고정화균체 연속생산공정을 개발하고자 하였다. 고정화 균체는 휴지균체와 비슷한 상태로 담체내에 존재하므로 휴지균체 반응특성을 분석하여 고정화균체 반응에 응용하였으며, 전환반응에서 산소 공급은 매우 중요하므로(16-19) 이러한 점을 고려하여 호기성 발효에 주로 사용되는 bubble column reactor와 airlift reactor에서 L-sorbose 연속생산을 비교하였다. 또한, 연속생산에 중요한 균체의 장기 안정성을 유지하기 위한 효과적인 방법을 찾고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 *Gluconobacter suboxydans* KFCC 21182로 D-sorbitol을 L-sorbose로 전환시키는 활성을 지니고 있다.

발효배지

L-Sorbose생산에 사용한 배지 조성은 D-sorbitol 10%, corn steep liquor(CSL) 0.8%이며, 전배양과 본배양의 배지 조성은 동일하다(20).

균주 배양

전배양은 5 ml 기본배지를 넣은 시험관에 plate로부터 균체를 백금으로 취하여 접종한 후, 30°C에서 48시간동안 180 rpm의 속도로 rotary shaker에서 배양하였으며, 본배양은 50 ml 배지를 함유한 500 ml flask에 전배양과 동일조건으로 전배양액을 5% 접종하여 수행하였다. 고농도 균체를 얻기 위해 5 l jar fermenter에서 배양하는 경우 working volume 3 l, agitation은 600 rpm, 공기공급속도 1.5 vvm, 30°C의 조건하에서 수행하였다.

기질 및 생성물 분석

발효액으로 부터 1 ml를 취해 원심분리(10000 rpm, 10분)하여 얻은 상등액의 D-sorbitol 및 L-sorbose 정량을 HPLC로 수행하였다. HPLC column은 Aminex HPX-87H 300×7.8(Bio-rad), pump는 영인 910 pump, detector는 R.I. detector(Waters 410)를 이용하였다.

상온에서 이동상으로 0.01 M H₂SO₄용액을 0.5 ml/min의 속도로 유출시켰다(21).

균체농도 측정

균체농도는 배양액을 희석하여 spectrophotometer를 이용해 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

휴지균체 반응 분석

휴지균체에 의한 L-sorbose 전환반응은 48시간 배양한 생육휴지기 균체를 취하여 7500 rpm에서 10분간 원심분리 후 Na-acetate buffer(0.002 M, pH 6)로 세척하여 원심분리한 균체 pellet을 이용하거나, 이들 균체를 30초간 sonication하여 그 여액을 조효소액으로 사용하였다. 반응액 조성은 Na-acetate buffer(0.002 M, pH 6) 30 ml, AlCl₃ 1 mM, p-aminobenzoic acid 0.5 mM에 D-sorbitol 농도를 달리하며 조제하였다.

효소반응에 대한 기질 저해효과를 분석하는데 위 조효소액을 sorbitol dehydrogenase 용액으로 사용하였으며, 반응액중의 D-sorbitol 농도를 5, 10, 15, 20, 25, 30%로 각각 변화시켜 기질농도에 따른 L-sorbose 전환반응에 미치는 영향을 초기 반응속도로 나타내었다.

생성물인 L-sorbose에 의한 효소반응 저해는 반응기 질액에 L-sorbose농도를 0, 10, 15, 20, 25%로 각각 첨가한 후 반응을 진행하여 초기 10시간 동안의 L-sorbose 생산속도로 그 영향을 나타내었다.

균체 고정화

균체 고정화는 L-sorbose 생산균주를 Table 1과 같은 발효배지를 함유한 5 l jar fermentor에서 48시간 배양한 후 배양액을 원심 분리하여 얻은 균체를 sodium acetate buffer(pH6.0)나 살균증류수에 현탁하여 만든 균체 용액과 살균된 4% alginate 용액을 1:1로 혼합하고, 주사기를 통하여 0.1 M CaCl₂용액에 혼합액을 적하하여 직경이 5 mm인 구형의 고정화 담체를 제조한 후, 4°C에서 20시간 이상 저장하고 sodium acetate buffer(pH6.0)로 세척하여 반응에 이용하였다. 이때, buffer는 Ca-alginate bead의 안정성을 고려하여 0.002 M Na-acetate buffer(pH6.0)를 사용하였다.

휴지균체 및 고정화균체 회분식 반응

휴지균체 반응은 반응기내의 균체농도가 대략 4.0 g/l 되게 휴지기 균체를 non-growth medium(Table 1의 N-0)에서 반응시키고, 고정화균체 반응은 반응기내의 고정화 균체를 21.6 g/l되게 조정하여 질소원을 첨가하지 않거나 1/10배 희석하여 첨가한 발효배지(Table 1의 N-0, N-0.08)에서 반응시켜 L-sorbose 전환율과 수율을 측정하였다.

Table 1. The composition of reaction media

Medium	Component	Content
Growth medium	Sorbitol	10% (w/v)
	Corn steep liquor	0.8% (w/v)
	Distilled water	50 ml
Non-growth medium	Potassium phosphate buffer (0.02M)	50 ml
	N-0 ^a (or 0.002M Na-acetate buffer, pH 6)	
	Sorbitol	10% (w/v)
	CaCl ₂	1 mM
	N-0.08 ^b ρ -aminobenzoic acid	0.5 mM
	Corn steep liquor	χ % (w/v)

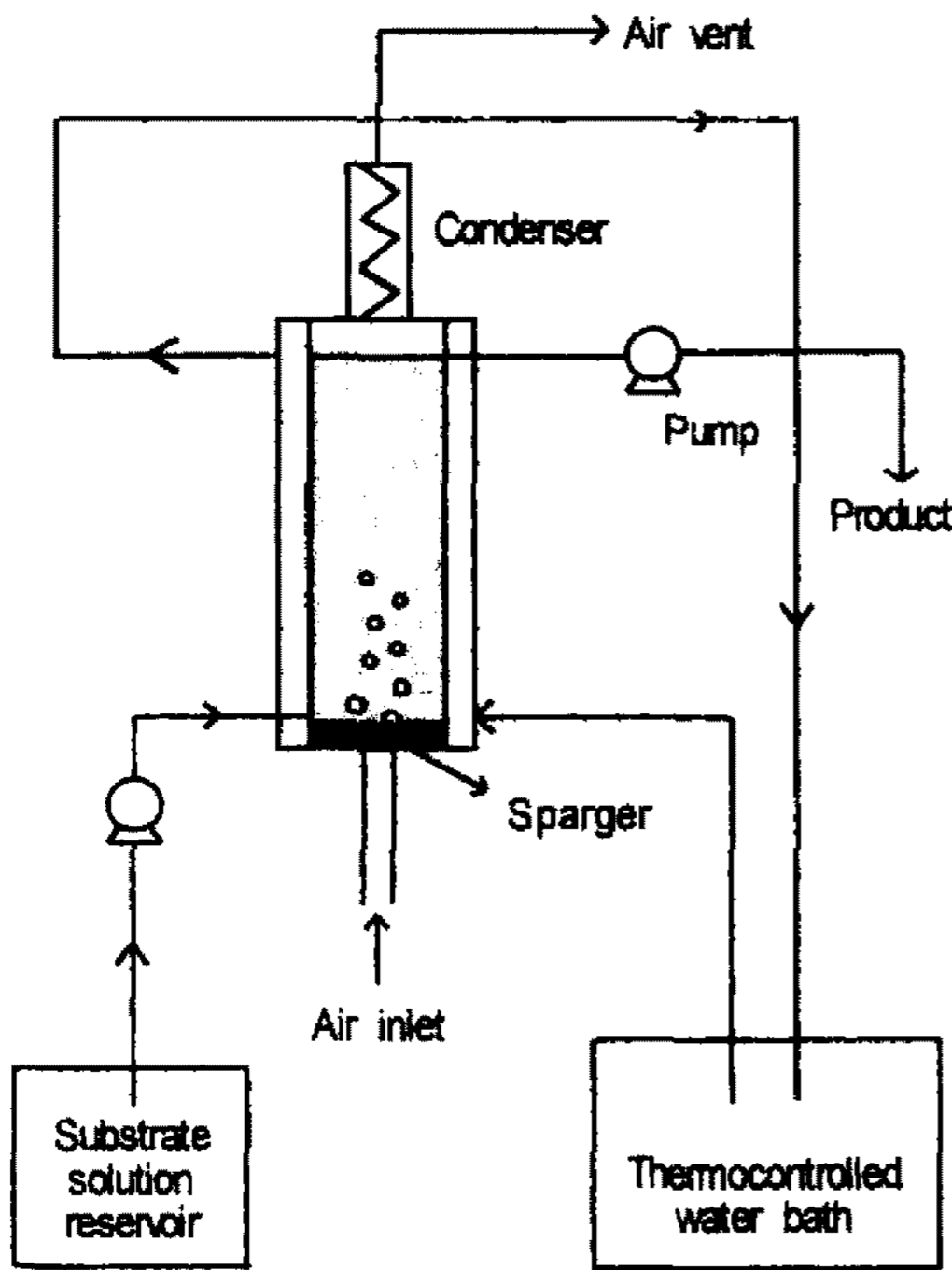
a: $\chi=0$, b: $\chi=0.08$ 

Fig. 1. A schematic diagram of bubble column reactor.

Bubble column reactor와 airlift reactor에서 L-sorbose 연속생산

산화반응에 필수적인 산소를 원활하게 공급하기 위해 Fig. 1 및 Fig. 2와 같은 bubble column reactor와 airlift reactor에서 반응을 수행하였다. 이때, 공기공급속도는 3 vvm, 기질용액의 질소원은 발효배지의 질소원에 비해 1/10배 희석된 0.08%를(Table 1의 N-0.08) 첨가하여 사용하였으며, 고정화 담체의 안정성을 위해 기질용액속에 1 mM되게 CaCl₂를 첨가하였다. 고정화 담체는 반응기 부피에 대해 bubble column reactor에서 52, 55, 60%가 되게 각각 충전하였으며, airlift reactor에서는 16, 40, 52%로 각각 변화시켜 생산성을 비교하였다. 한편, 기질용액 공급속도를 변화시켜 희석율에 따른 생산성을 비교하였다.

L-Sorbose 연속생산에 대한 산소효과를 분석하기 위하여 bubble column reactor에 공기공급속도를 1, 2, 3

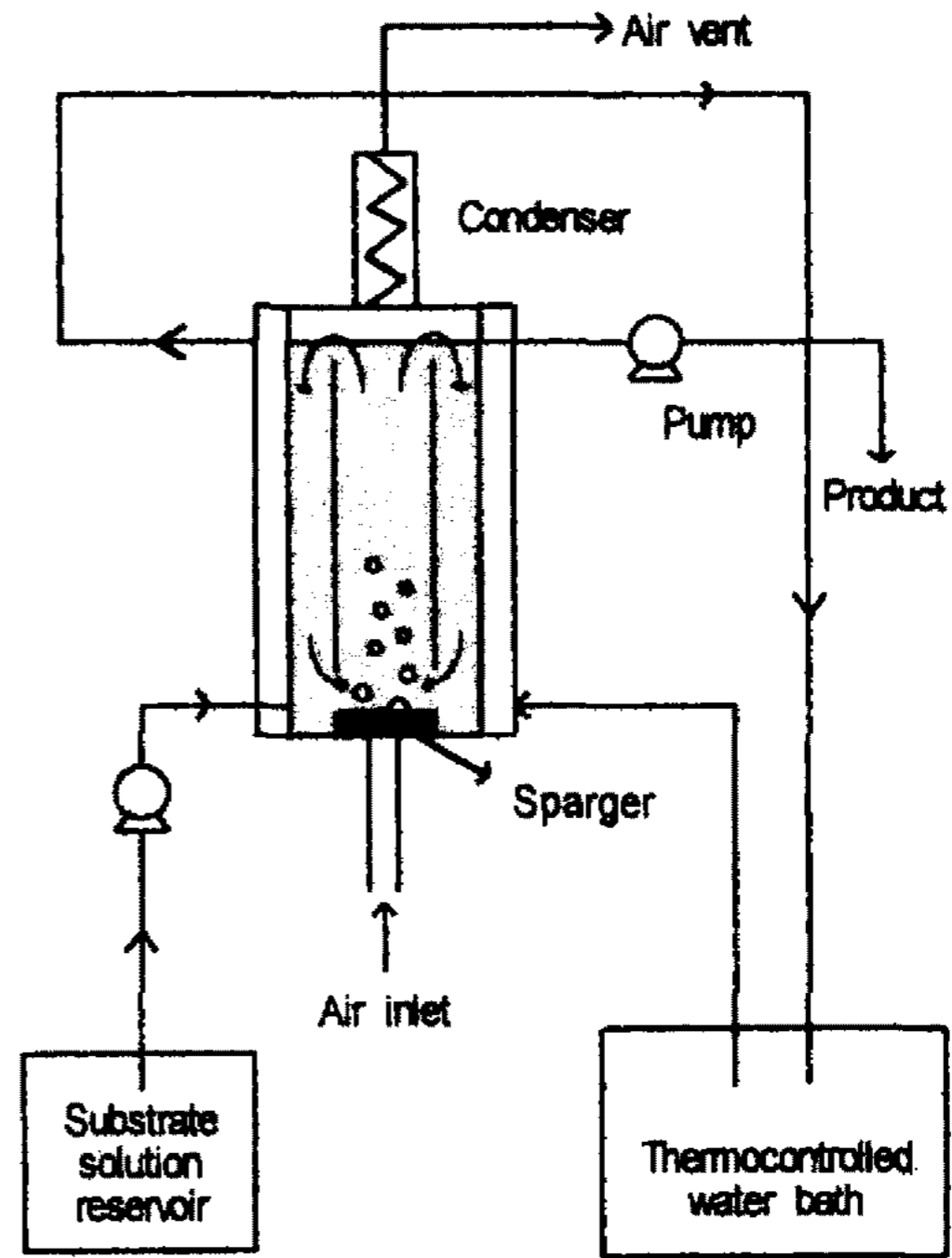


Fig. 2. A schematic diagram of airlift reactor.

vvm으로 변화시켜 L-sorbose 생산성을 관찰하였다.

결과 및 고찰

L-Sorbose 발효 및 휴지균체 반응 특성

고정화균체 반응기에 의한 L-sorbose 연속생산공정에 필요한 기초자료로 이용하기 위하여 회분식 발효와 휴지균체 반응을 이용한 L-sorbose 생산의 특성을 분석하였다. 배지중의 sorbitol 초기농도를 5, 10, 15, 20%로 각각 변화시켜 Erlenmeyer flask에서 균체를 배양하였을 때 기질농도가 균체생육에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 3에서 보는 바와같이 기질농도가 높을수록 균체생육이 느려져 균체생육에 대한 기질저해가 심하게 나타났다. Sorbitol농도가 5%일 때 생육속도는 빠르나 얻어지는 최종균체량이 적었으며, 10% sorbitol에서 균체생육속도는 감소되나 최종균체농도가 높으므로 10%가 적절한 기질농도로 사료되어 이후의 실험에서는 10% sorbitol농도를 사용하였다.

고정화 균체를 이용하는 생물반응에서 일반적으로 초기 균체농도는 높게 유지되므로 균체생육은 크게 이루어지지 않고 활성이 유지되는 것이 중요하다. 균체 생육이 활발한 경우 담체내의 pore가 막혀 기질이 담체내로 이동하는데 어려워 반응속도가 감소하게 된다. 고정화균체 상태는 휴지균체와 매우 유사하므로 휴지균체의 특성을 분석하여 균체의 활성을 높게 유지하는 방법이 개발되면 고정화균체 반응에서 응용될 수 있을 것이다. *Gluconobacter suboxydans*의 생육이 최대인 48~50시간이 되는 시점에서 배양액을 원심분리하여 균체를 취하고 Table 1

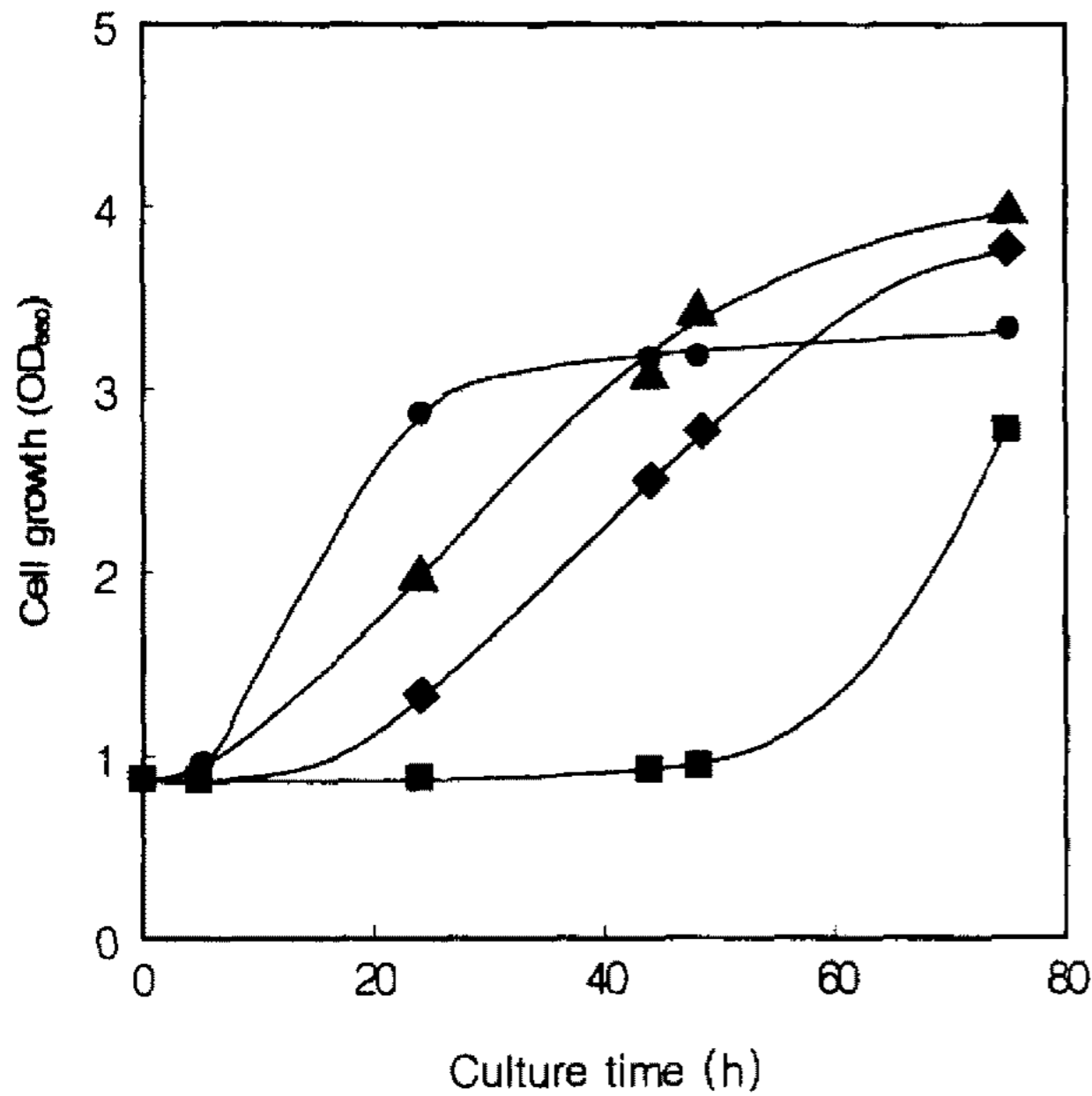


Fig. 3. Effect of sorbitol concentration on cell growth. Initial sorbitol conc.: ●, 5%; ▲, 10%; ◆, 15%; ■, 20%.

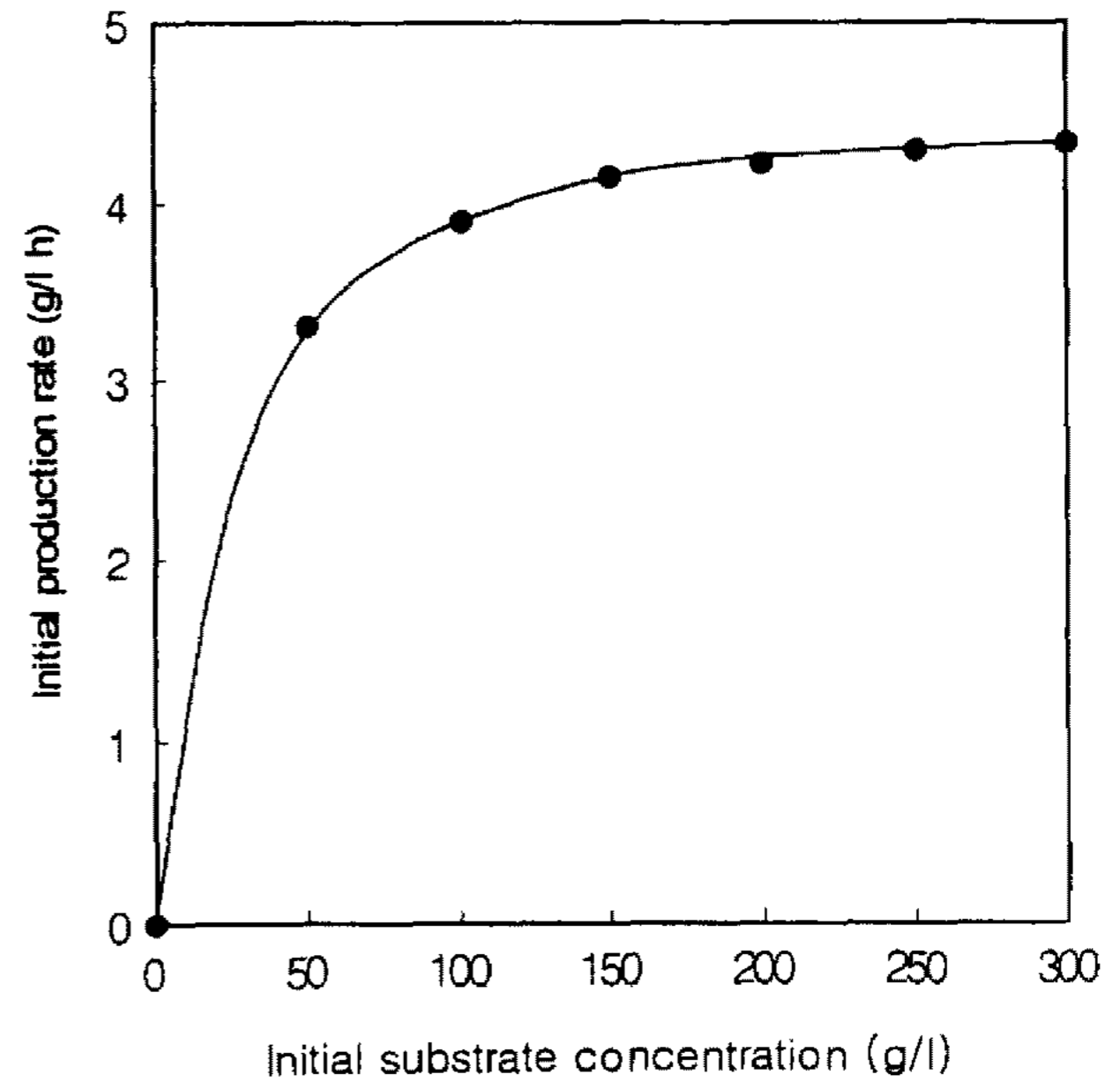


Fig. 5. Initial production rate of L-sorbose depending on varying substrate concentrations.

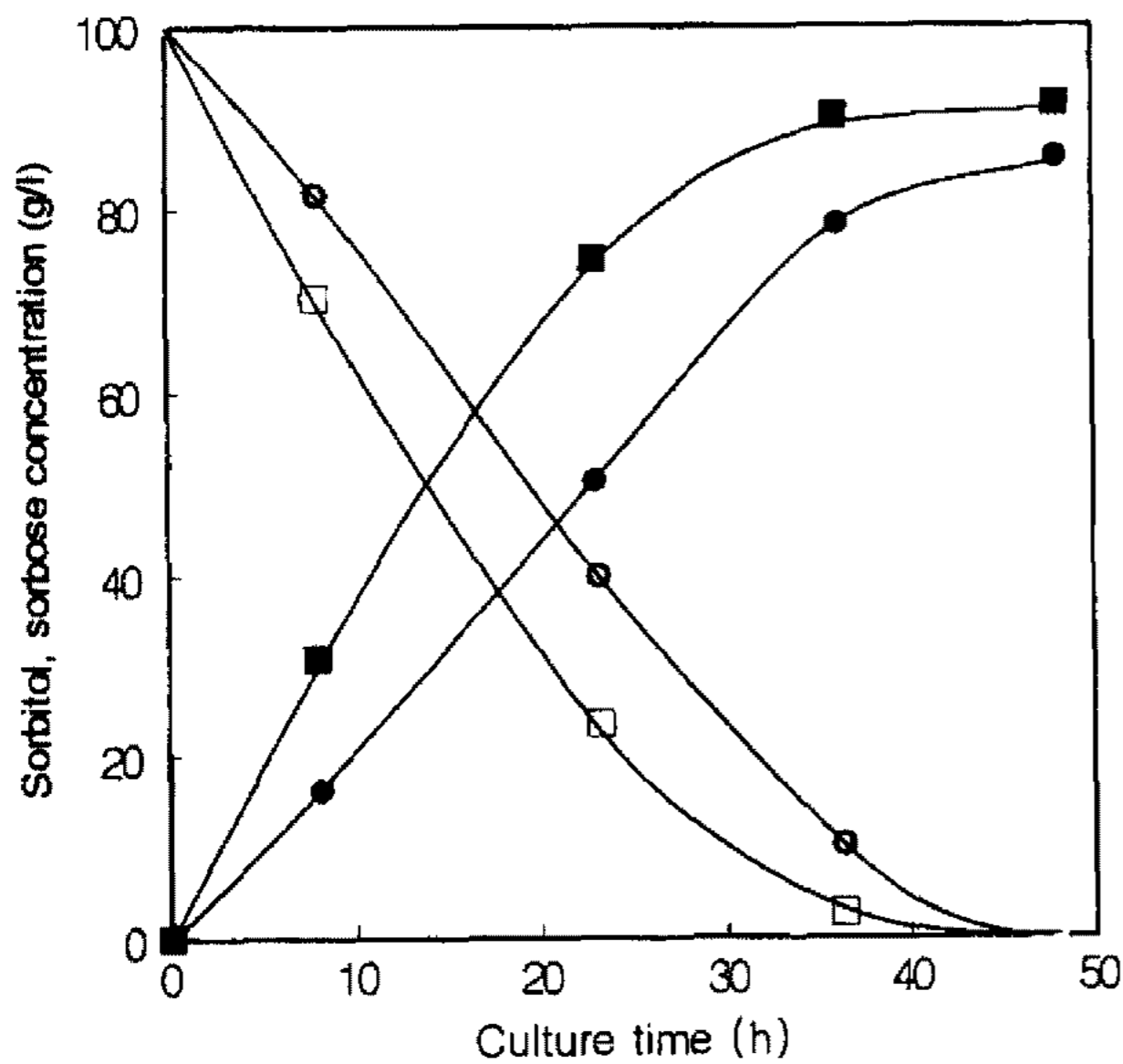


Fig. 4. L-Sorbose production by growing cells and resting cells.

Sorbitol: ○, growing cells; □, resting cells. Sorbose: ●, growing cells; ■, resting cells. Reactions by growing cells indicate the usual fermentation, whereas those by resting cells were performed at a high level of initial cell concentration, 4 g/l.

의 휴지균체용 배지(non-growth medium)에서 반응시켜 생육균체에 의한 L-sorbose 생산과 비교하였다. Fig. 4에서 보는 바와같이 두 경우 동일하게 48~50시간 경과 후에 D-sorbitol 대부분이 소비되었으며, L-sorbose 생산량이 휴지균체의 경우가 생육균체보다 약 7 g/l 증가하였다. 이때 생육균체의 L-sorbose 수율은 약 85%, 휴지균체의 경우는 92%였으며 휴지균체의 경우 균체가 증식하는 데 기질을 소비할 필요가 없으므로 휴지균체의 수율

이 높게 얻어진 것으로 생각된다. 따라서, 휴지균체가 생육균체보다 효율적으로 L-sorbose 전환반응에 이용될 수 있다는 것을 확인하였으며, 이러한 결과는 고정화 균체가 효율적으로 L-sorbose 전환에 이용될 수 있는 가능성을 보여주는 것이다. 조와 마(22)는 휴지균체를 이용하여 L-sorbose 생산을 시도하여 초기 sorbitol 농도가 5, 10% 일때 각각 60, 40%의 L-sorbose 수율을 얻었다. 이들의 결과와 비교할때 본 연구에서 이루어진 전환반응이 더욱 효과적이라 할 수 있다.

D-Sorbitol로부터 L-sorbose 전환에 관여하는 효소 sorbitol dehydrogenase에 대한 기질 및 생성물에 의한 조절작용을 분석하였다. 배양 휴지기의 균체를 sonication에 의해 파쇄한 후 그 여액을 sorbitol dehydrogenase 조효소액으로 이용하여 D-sorbitol로부터 L-sorbose로의 전환반응을 수행하였다. Fig. 5에서 보는 바와같이 반응기질인 sorbitol 초기농도가 증가함에 따라 L-sorbose의 초기 생성속도가 증가하여 전형적인 Michaelis-Menten형 kinetics를 보여줘 기질의 효소반응에 대한 저해는 없는 것으로 나타났다. D-Sorbitol로부터 L-sorbose로의 전환반응에 대한 생성물인 L-sorbose의 저해효과를 분석하였다. 기질인 sorbitol 농도를 10%로 고정하고 생성물인 sorbose를 기질용액에 0, 10, 15, 20, 25%가 되게 첨가한후 효소반응을 진행하였다. Fig. 6에서 보는 바와같이 기질용액에 sorbose가 15% 이내로 존재 할 때 반응에 대한 L-sorbose의 저해현상이 심하지 않았으나, 20% 이상일 때 저해현상이 심하여 sorbose의 초기생산속도는 매우 낮았다. 10시간까지의 기질전환속도를 비교하면 sorbitol이 저농도일때 전환속도가 빠르나

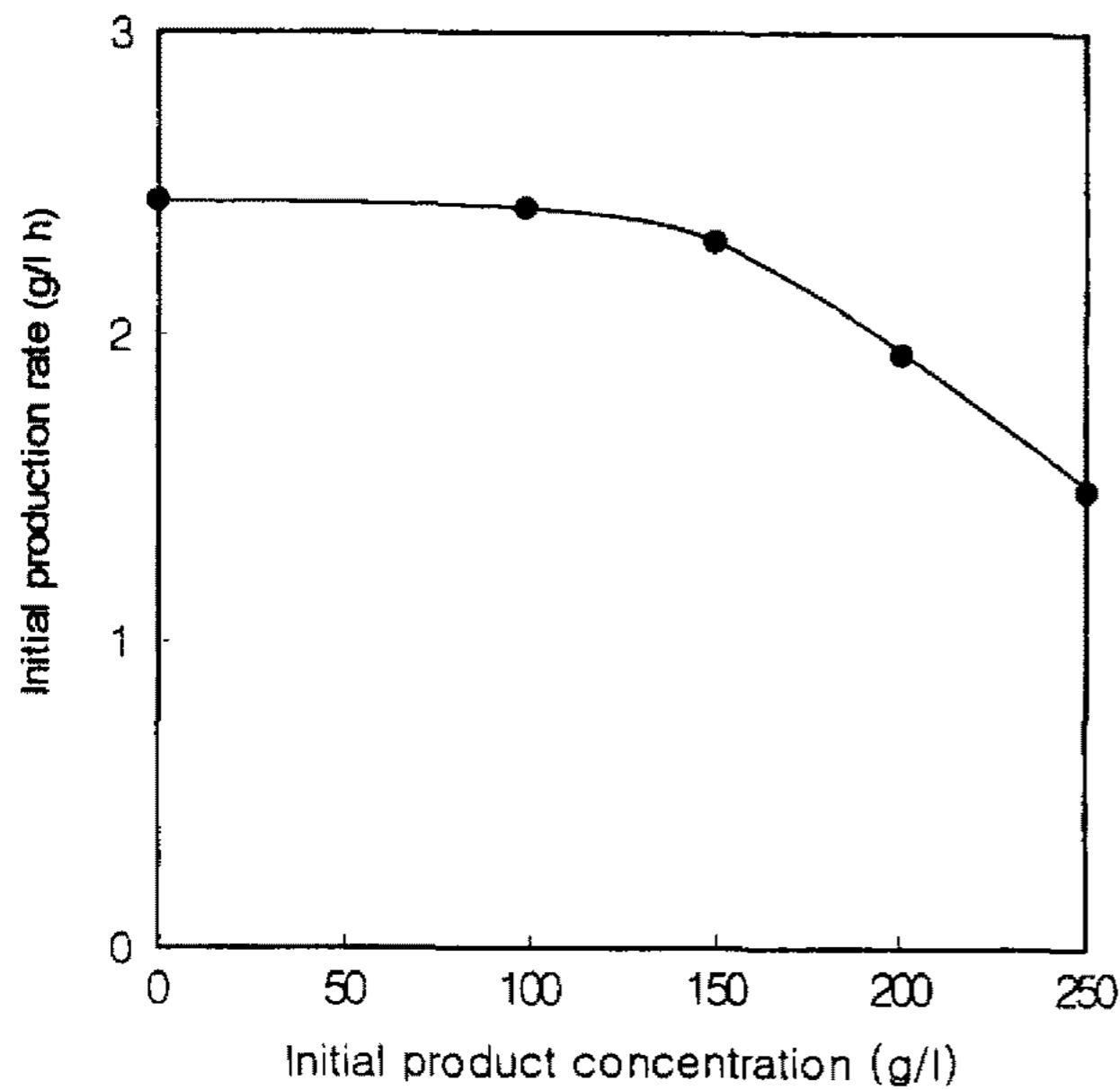


Fig. 6. Inhibitory effect of L-sorbose on the initial production rate of L-sorbose.

효소활성을 잘 유지시켜주면 연속생산시에 25% 이상의 고농도 기질도 완전히 전환시킬 수 있으리라 예상되었다.

고정화 균체를 이용한 L-sorbose 생산

균체를 고정화하는 여러 담체물질 중 구하기 쉽고 값이 싸며 고정화가 용이한 alginate를 선택하여 기초적인 실험을 수행하였다. 배양 휴지기 균체를 Ca-alginate로 고정화하여 반응에 이용하였다. 질소원으로 corn steep liquor(CSL)가 함유된 생육배지와 질소원이 없는 비생육배지(Table 1의 N-0)에 고정화균체를 각각 첨가하여 전환반응을 수행하였다. Fig. 7에서 보는 바와같이 기질에 질소원으로 CSL을 0.08% 첨가한 경우와 CSL을 전혀 첨가하지 않은 비생육배지에서 80 g/l 이상 L-sorbose가 생산되었다. 한편, CSL이 0.8% 함유된 생육배지에서 고정화균체에 의한 반응속도가 낮았는데 이는 담체 내부와 표면에서 균체증식이 많이 이루어져 기질 투과(internal diffusion)가 용이치 못함때 기인하는 것으로 사료되며, 또한 담체 밖에서 균체 증식이 일어나 기질이 균체 증식에 많이 소비되어 수율이 60 g/l 정도로 낮게 얻어졌다. 고정화균체 반응에서 기질용액에 질소원인 CSL을 전혀 첨가하지 않은 것보다 생육배지의 CSL 농도의 1/10 수준인 0.08%를 첨가시킨 경우 높은 생산수율을 나타내었다. 고정화균체 반응기에서 연속생산시에 중요한 점은 장기간 균체활성을 유지하는 것이다. 임과 신(23)에 의해 수행된 고정화균체에 의한 연속알콜생산에서 발효배지의 질소원을 1/10-1/30배로 희석하여 첨가할때 매우 효율적인 장기 안정성을 얻을 수 있다고 보고하였다. 그러나 발효배지를 그대로 이용하는 경우 고정화담체 내

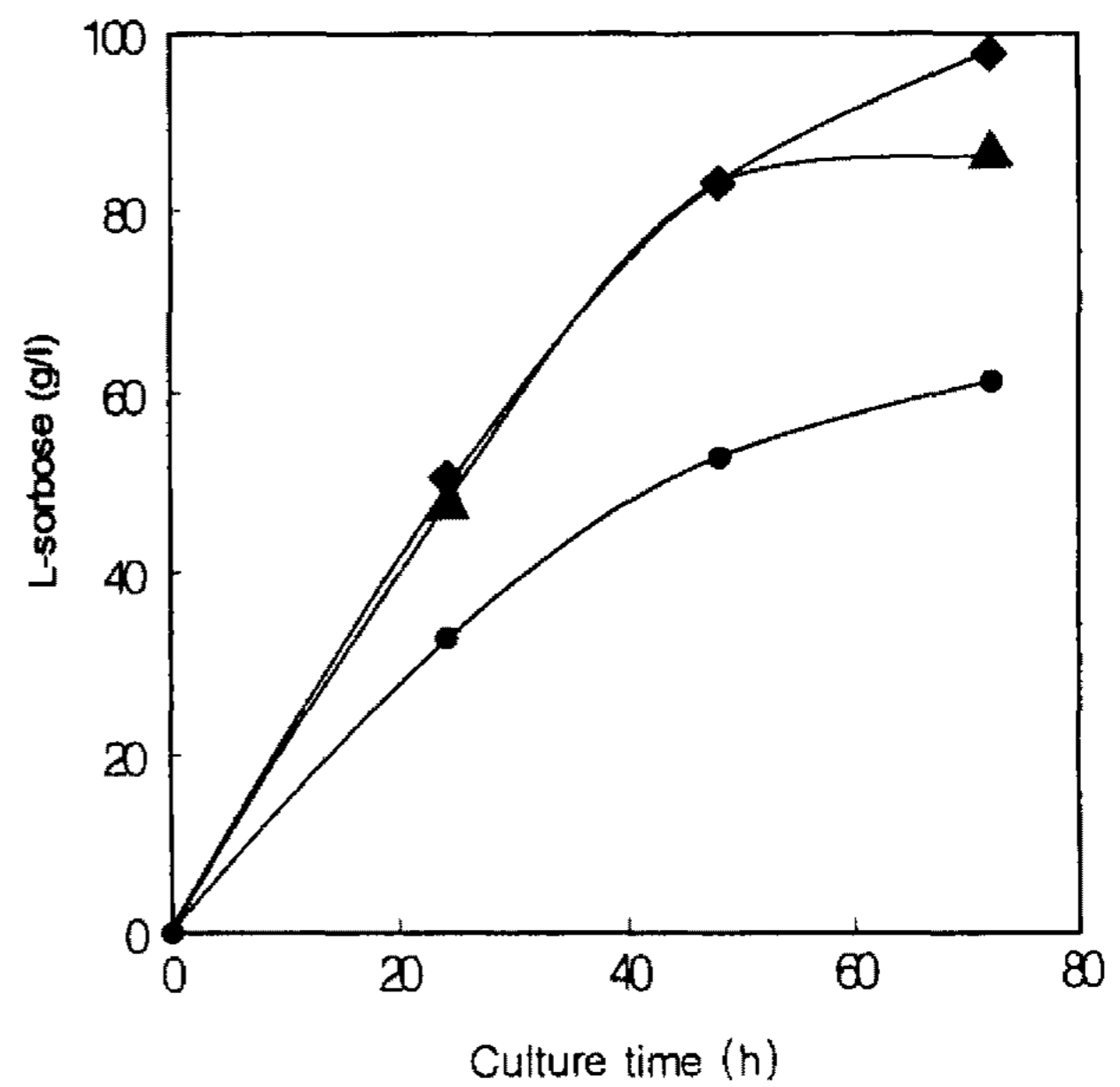


Fig. 7. L-Sorbose production by immobilized cells depending on different CSL concentrations.

●, growth medium; ▲, non-growth medium(N-0); ◆, non-growth medium (N-0.08). Densities of immobilized cells in reactors were about 21.6 g/l.

에서 균체증식이 지나치게 일어나 담체의 pore가 막혀 반응속도가 낮아지며, 질소원을 제거할때 균체활성이 급격히 떨어지는 현상을 보고하고 있다. 따라서, 고정화 균체에 의한 연속반응시에 질소원을 미량 첨가하여 균체를 활발하게 증식시키지 않으면서 효소 활성을 유지시킬 경우 휴지기균체 반응보다 유리할 것으로 전망된다.

L-Sorbose 연속생산

지금까지의 결과에 근거하여, 고정화 담체의 물리적 안정성을 증진시키기 위하여 기질용액에 CaCl_2 을 첨가하여 사용하였으며, 고정화균체를 충전한 반응기(packed bed column reactor)에서 반응을 수행하였다. 그러나, 이러한 반응기의 경우 산소의 공급이 용이치 않은 단점으로 인해 L-sorbose로의 전환반응은 전혀 일어나지 않았다(data not shown). 따라서, L-sorbose 전환과 같은 산화반응에 필수적인 산소를 원활하게 공급하기 위해 bubble column reactor와 airlift reactor에서 반응을 시도하였다. Airlift reactor와 bubble column reactor의 공통점은 산소를 용이하게 공급할 수 있는 반응기라는 점인데, 혼합, 에너지 소비 및 산소전달 면에서 일반적으로 airlift reactor가 bubble column reactor보다 효율적이고 shear stress가 약하면서도 agitation이 효과적이라는 장점이 있다.

앞의 두종류의 반응기에서 반응을 수행할 때, 고정화 담체가 반응기중에 차지하는 부피가 L-sorbose 전환에 미치는 영향을 분석하였다. 공기공급속도는 3 vvm으로 유지하고 반응기에서 고정화담체가 차지하는 부피를 bub-

Table 2. Effect of beads volume on productivity in bubble column reactor and airlift reactor

Reactor Type	Beads volume in reactor (%)	Dilution rate (h^{-1})	Conversion rate of substrate (%)	Product conc. (g/l)	Productivity ($g/l \cdot h$)
Bubble column reactor	52	0.08	77.7	76.2	6.1
	55	0.08	82.9	81.2	6.5
	60	0.08	29.6	30.0	2.4
Airlift reactor	16	0.015	90.4	89.6	1.3
	40	0.08	49.4	48.7	3.9
	52	0.08	32.0	31.5	2.5

Table 3. Effect of aeration rate on productivity in bubble column reactor

Aeration rate (vvm)	Conversion rate of substrate (%)	Product conc. (g/l)	Productivity ($g/l \cdot h$)
1	24.9	24.1	1.9
2	37.4	37.1	3.0
3	82.2	81.5	6.5

*Dilution rate = $0.08 h^{-1}$, beads volume = 55%

ble column reactor에서는 52, 55, 60%로, airlift reactor에서는 16, 40, 52%로 각각 변화시켜 L-sorbose 생산성을 비교하였다. Table 2에서 보는 바와같이 airlift reactor에 비교하여 bubble column reactor의 생산수율이 약 2배정도 높게 얻어졌으며, bubble column reactor에서 $0.08 h^{-1}$ 의 기질희석율에서 담체의 부피가 55%일 때 L-sorbose 생산성은 $6.5 g/l \cdot h$, L-sorbose 농도는 $81.2 g/l$ 가 얻어졌다. 이때 각 반응기의 전체부피는 150ml이었는데 airlift reactor의 경우 담체량을 증가시킬 수 없어 효과적이지 못하였으며, airlift reactor보다는 bubble column reactor가 효율적이었다.

고정화 담체를 bubble column reactor 부피의 55%되게 충전한 후 공기공급속도를 1, 2, 3 vvm으로 변화시켜 산소공급이 L-sorbose 연속생산에 미치는 영향을 분석하였다. Table 3에서 보는 바와같이 공기공급속도가 1vvm일 때 L-sorbose 생산성을 $1.9 g/l \cdot h$, 2 vvm일 때 $3.0 g/l \cdot h$, 3 vvm일 때는 $6.5 g/l \cdot h$ 얻어 산소공급이 생산성 향상에 매우 중요하게 작용하였다. 공기공급속도가 3 vvm일 때 반응기 내의 기질용액과 고정화담체의 혼합정도는 1, 2 vvm에서의 혼합보다 원활하였으나 완전한 mixed type이라고 볼 수는 없었으며, 3 vvm 이상에서는 channeling현상이 심하게 일어나고 고정화 담체가 부분적으로 반응기 위의 condenser로 이동하는 등 여러가지 문제가 발생하여 최적의 공기공급속도는 3 vvm인 것으로 나타났다. L-Sorbose 생산성을 향상시키는 면에서는 mixed type보다 fixed type의 PFR(plug flow reactor)이 일반적으로 유리하므로 최대한 많은 양의 고정화균체를 충전하여 반응시켜 PFR type에 접근해가는 것이 생산성 향상

에 효과적일 것이라고 생각되나, 공기공급속도를 고려해야 하는 bubble column reactor에서의 flow pattern은 mixed type과 fixed type의 중간형태로 나타났다.

요 약

*Gluconobacter suboxydans*에 의한 D-sorbitol로부터 L-sorbose 전환반응의 특성을 분석하고 고정화균체 반응기에서 L-sorbose 연속생산을 시도하였다. L-Sorbose 생산에서 고농도 휴지균체를 이용한 경우가 일상적인 발효에 비해 약간 증가하였으며, 전환수율이 92, 85%로 휴지균체를 이용하는 것이 효율적이었다. D-Sorbitol로부터 L-sorbose 전환에 관여하는 sorbitol dehydrogenase에 대한 D-sorbitol 저해효과는 거의 존재하지 않았으나 L-sorbose 농도가 20% 이상에서 극심한 저해현상이 일어났다. Ca-alginate로 고정화된 균체를 이용할 시에 질소원으로 corn steep liquor(CSL)를 발효배지의 1/10 배인 0.08% 첨가한 기질용액에서 반응시킬 때 균체의 효소활성이 유지되어 휴지균체와 비슷한 $80 g/l$ 의 수율이 얻어졌다. 그러나 CSL 농도가 0.8% 인 발효배지를 그대로 이용할 때 생산수율이 $60 g/l$ 으로 감소되었는데, 이는 고정화 담체 내에서 균체증식에 의해 담체내의 pore가 막혀 기질투과성이 저하된데 기인하는 것으로 사료된다. 고정화균체를 충전한 packed bed, airlift, bubble column형 반응기에서 L-sorbose 연속 생산을 시도하였을 때 bubble column 반응기가 가장 효율적이며, $0.08 h^{-1}$ 의 기질희석율에서 담체부피가 55% 일때 $6.5 g/l \cdot h$ 의 생산성이 얻어졌고, L-sorbose 전환율은 81.2%이었다. 공기공급속도는 3 vvm이 최적이었으며 그 이상에서는 반응기 운영의 문제점이 발생하였다.

감사의 말

본 연구는 '95 G7 생명공학연구소 위탁과제 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 부분적으로 생물산업소재연구센터의 지원을 받았으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Delic, V., Sunic, D., and Vlastic, D. 1992. Microbial reactions for the synthesis of vitamin C (L-ascorbic acid), P, 299-334. In E.J. Vandamme(ed.), *Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors*, Elsevier Applied Science, London.
- Pfizer Inc. 1981. Preparation of 2-keto-L-gulonic acid. *US Patent* 4,245,049.
- Shionogi and Co., Ltd. 1982. Process for producing 2-keto-L-gulonic acid. *US Patent* Re.30,872.

4. Takeda Chemical Industries, Ltd. 1990. Method for 2-keto-L-gulonic acid. *US Patent* 4,892,823.
5. Shionogi and Co., Ltd. 1987. Process for preparing 2-keto-L-gulonic acid. *US Patent* 4,696,897.
6. Shionogi and Co., Ltd. 1976. Process for preparing 2-keto-L-gulonic acid. *US Patent* 3,998,697.
7. Shionogi and Co., Ltd. 1985. Fermentative or enzymatic production of 2-keto-L-gulonic acid. *US Patent* 4,543,331.
8. Hoffmann-La Roche Inc. 1990. Fermentation process 2-keto-L-gulonic acid. *US Patent* 4,960,695.
9. Hoffmann-La Roche Inc. 1992. Biosynthesis of 2-keto-L-gulonic acid. *US Patent* 5,082,785.
10. 시오노기세이야꾸 가부시끼가이샤. 1990. 2-케토-L-글론산의 제조방법. *KR* 90-9051.
11. 시오노기세이야꾸 가부시끼가이샤. 1990. 2-케토-L-글론산의 제조방법. *KR* 90-9050.
12. Stefanova, S., Kosseva, M., Tepavicharova, I., and Beschkov, V. 1987. L-Sorbose production by cells of the strain *Gluconobacter suboxydans* entrapped in a polyacrylamide gel. *Biotechnol. Lett.* **9**: 475-477.
13. Park, Y. M., Choi, E. S., and Ree, S. K. 1994. Effect of toluene-permeabilization on oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by *Gluconobacter suboxydans* cells immobilized in calcium alginate. *Biotechnol. Lett.* **16**: 345-348.
14. Donova, M. V., Gulevskaya, S. A., and Koshcheyenko, K. A. 1989. Morphological and physiological peculiarities of *Gluconobacter oxydans* cells entrapped in natural and synthetic polymer gels, Pp 517-522. In J.A.M. de Bont, J. Visser, B. Mattiason and J. Tramper (ed.), *Physiology of Immobilized Cells*, Elsevier, New York.
15. Trifonov, A., Stefanova, S., Konstantinov, H., and Tepavicharova, I. 1991. Biochemical oxidation of D-sorbitol to L-sorbose by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **28**: 397-405.
16. Shinagawa, E., Matsushita, K., Adachi, O., and Ameyama, M. 1982. Purification and characterization of D-sorbitol dehydrogenase from membrane of *Gluconobacter suboxydans* var. α . *Agric. Biol. Chem.* **46**: 135-141.
17. Yamada, S., Wada, M., and Chibata, I. 1978. Oxygen transfer in shaken flask cultures and the conversion of sorbitol to sorbose by *Acetobacter suboxydans*. *J. Ferment. Technol.* **56**: 20-28.
18. Yamada, S., Wada, M., and Chibata, I. 1978. Effect of high oxygen partial pressure on the conversion of sorbitol to sorbose by *Acetobacter suboxydans*. *J. Ferment. Technol.* **56**: 29-34.
19. Yamada, S., Wada, M., and Chibata, I. 1979. Oxygen transfer as a parameter of automatic control of the continuous cultivation for the conversion of sorbitol to sorbose by *Acetobacter suboxydans*. *J. Ferment. Technol.* **57**: 210-214.
20. Rosenberg, M., Svitel, J., Rosenbergova, I., and Sturdik, E. 1993. Optimization of sorbose production from sorbitol by *Gluconobacter oxydans*. *Acta Biotechnol.* **35**: 269-274.
21. Churms, S. C. 1982. *CRC Handbook of Chromatography*, Vol.1, CRC Press, Inc., Boca Raton.
22. 조원대, 마상조. 1993. *Acetobacter suboxydans*의 휴지균체에 의한 L-sorbose의 생산. *한국농화학회지* **36**: 481-487.
23. Lim, S. H., and Shin, C. S. 1995. Continuous ethanol production using diluted fermentation media with supplements in an immobilized cell reactor. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **10**: 231-236.

(Received 10 October 1996)