

L-Ascorbic Acid 생산에 관한 연구; *Gluconobacter* spp.의 L-sorbitol,
L-sorbose, 포도당 대사물에 관한 연구

김 공 환 · *정 종 경 · *구 양 모
아주대학교 생물공학과, *서울대학교 약학과

Studies on the Production of L-Ascorbic Acid; Examination of the Metabolites
Produced by *Gluconobacter* spp. from L-Sorbitol, L-Sorbose or D-Glucose

Kong Hwan Kim, Jong Kyong Chung* and Yang Mo Goo*
Department of Biotechnology, Ajou University, Suwon 440-749 and
*Department of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

ABSTRACT

G. Melanogenus metabolized D-sorbitol to L-sorbose, and to 2-keto-L-gulonic acid. *G. cerinus* oxidized D-glucose to accumulate 2-keto-D-gluconic acid, 5-keto-D-gluconic acid and 2,5-diketo-D-gluconic acid. 2,5-Diketo-D-gluconic acid was confirmed to be the further oxidized product of 2-keto-D-gluconic acid. The amount of calcium carbonate added to the culture broth increased the relative amount of 5-keto-D-gluconate. When, instead of calcium carbonate, other bases were employed to neutralize the oxidized products, 2-keto-D-gluconate was produced only.

서 론

Vitamin C인 L-ascorbic acid는 2-keto-L-gulonic acid에 산을 처리하여 lactone화 시키면 쉽게 얻어진다. L-ascorbic acid는 1940년대에서부터 Reichstein 방법(1)에 의하여 D-glucose에서부터 생성되고 있다. D-glucose를 먼저 D-sorbitol로 촉매환원 시키고, D-sorbitol을 미생물로 산화 시키어 L-sorbose를 얻어, sorbose의 2,3,4,6-diacetonoid를 형성하고 C-1 위치의 제1급 알콜기를 산화시키어 2-keto-L-gulonic acid의 diacetonoid를 얻은 후에 acetonide를 가수분해하여 2-keto-L-gulonic acid를 얻고 이를 lactone화하면 vitamin C가 생성된다. Vitamin C는 최근에 수요가 폭발적으로 증가하였고, L-ascorbic acid를 경제적으로 생산시키기 위한 발효학적인 연구가 요청되었다(2).

포도당을 2-keto-L-gulonic acid와 비교하여 보면 Fig. 1에 주어진 바와 같이 두가지 경로에 의하여 포도당은 2-keto-L-gulonic acid로 변형될 수 있음을 알 수 있다.

Route I에서는 포도당의 2급 알콜을 ketone기로, 그리고 1급 알콜은 산으로 선택적으로 산화시키는 과정이 포함되어 있다. 유기화학적으로 알데하이드기를 촉매환원시키어 얻어지는 sorbitol을 *Gluconobacter* spp.를 이용하여 2급 알콜을 ketone기로 산화시켜 준다(3,4). 그리고 나머지 hydroxyl기를 acetonoid 형태로 보호시킨 후에 1급 알콜을 산으로 산화시키는 Reichstein의 유기화학적인 vitamin C 생성방법이 여기에 속한다.

미생물을 이용하여 L-sorbitol, L-sorbose 또는 포도당을 2-keto-L-gulonic acid로 변형시키는 발효 연구가 많이 수행되었다. 1960년 초반에 Okazaki등은 미생물을 사용하여 D-sorbitol 또는 L-sorbose를 약 10~15%의 수득률로 2-keto-L-gulonic acid로 전환시킬 수 있다고 보고 하였다. Pelman과 Hoffman La Roche 연구소의 연구원들도 미생물을 사용하여 D-sorbitol에서 vitamin C를 생성하는 방법에 대해 연구하였지만 (6,7), 실용성이 Reichstein방법보다 뒤떨어지는 것으로 보고하였다.

Route II를 거쳐서도 포도당을 2-keto-L-gulonic acid

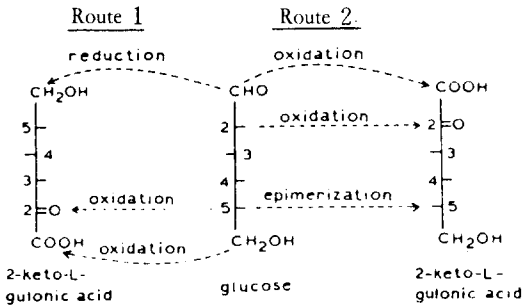


Fig. 1. Conversion of D-glucose to 2-keto-L-gulonic acid.

로 변형시키는 연구도 수행되었다. 1982년에 Sonovama 등(8)은 *Erwinia* spp.를 사용하면 포도당을 2,5-diketo-D-gluconate를 산화시킬 수 있고 이 화합물을 다시 *Corynebacterium* spp.를 사용하여 환원시켜 주면 85%의 수득률로 2-keto-L-gulonate를 얻을 수 있다고 보고 하였다.

1985년에는 Genetech사의 연구원들은 유전자 재조합법을 사용하여 위의 두 미생물 특성을 모두 가진 새로운 미생물을 개발하여 포도당을 2-keto-L-gulonate로 변형시킬 수 있음을 보고 하였다(9). 유전자 재조합을 이용한 미생물 개발은 *Corynebacterium* spp.가 소유한 2,5-diketo-D-gluconate reductase를 수록하고 있는 유전인자를 *Erwinia* spp.내에 plasmid 형태로 넣어 주어 발현시킴으로써 이루었다.

최근에 본 연구원들은 Reichstein 방법을 개선하여 유기화학적으로 포도당을 vitamin C로 70% 이상의 수득률로 변형시키는 방법을 개발하여 보고하였다(10).

본 논문에서는 D-sorbitol의 미생물 발효 metabolite들에 대하여 수행한 연구 결과와 *Gluconobacter* spp.와 *P. denitrificans*의 포도당 대사물에 대한 연구 결과를 보고하고 있다.

재료 및 방법

균주방법

Gluconobacter suboxydans IFO 3172, *G. melanogenus* IFO 3292, *G. rubinogenus* IFO 3243, *G. cerinus* IFO 3263는 mannitol-agar(0.5g yeast extract, 0.3g peptone, 2.5g mannitol, 1.5g agar, 100ml 증류수) 사면배지에, *Paracoccus denitrificans*는 영양 agar(Nutrient agar, Difco 23g, 증류수 1l) 사면배지에 배양하여 5°C에 보관하였다.

당의 발색

배양액에 생성된 당의 대사물들은 aniline-oxalic acid 용액(0.45g oxalic acid, 100ml 증류수, 0.9ml aniline), 1.0% *p*-anisidine-HCl 용액(1.0g *p*-anisidine-HCl, 10ml methanol, 100ml *n*-butanol, 25ml NaHSO₃), 2.0% *o*-phenylenediamine 용액(2.0g *o*-phenylenediamine, 100ml 80% ethanol), bromophenol blue 용액(40mg bromophenol blue, 100ml ethanol, pH 10) 또는 과망간산칼리 용액(0.5g 과망간산칼리, 100ml 1N NaOH 용액)의 발색시약들을 사용하여서 확인하였다.

Gluconobacter spp.의 D-sorbitol 대사에 관한 조사

*G. melanogenus*와 *G. rubinogenus*는 D-sorbitol(20.0g/l), 포도당(5.0g/l), 그리고 yeast extract(5.0g/l)를 함유하는 종균배지 10ml에 균을 접종한 후에 28°C에서 30시간 배양했다. 이 배양액을 100ml의 D-sorbitol(50.0g/l), 포도당(5.0g/l), yeast extract(5.0g/l), 그리고 CaCO₃(20.0g/l)를 함유하는 대사물조사배지에 부여준 후 균주의 배양을 계속했다. 24, 48, 72, 120, 168, 216 그리고 312시간 교반한 후에 배양액 10ml를 취하여 3700 rpm으로 원심 분리하였다. 상등액에 동량의 Amberite IR-120(H⁺) 양이온 교환수지를 처리한 후에 이 용액 10μl를 취하여서 Whatman No. 1 여지위에 점적한 후 phenol-물(88:12)로 전개하였다. 이 여지에 aniline-oxalic acid 용액을 분무한 후에 가열하여서 발색시켰다.

2-Keto-L-gulonic acid의 분리

*G. melanogenus*의 sorbitol 배양액(168시간)을 이온교환 수지로 처리한 후에 Whatman No. 1 여지위에 한줄로 점적하여 동일한 전개용매로 전개하여 R_f값이 0.12인 화합물을 증류수로 추출하여 21mg을 얻었다.

*G. melanogenus*의 성장곡선 결정

배양액을 원심분리하여 얻은 침전물은 0.9%의 NaCl 용액 4ml를 넣고 300 rpm으로 원심분리하여 CaCO₃만을 침전시켰다. 상등액 0.5ml를 취하여서 10ml의 시험관에 담고 0.9%의 NaCl 용액 3ml를 넣은 후 610 nm에서 흡광도를 측정하였다.

*P. denitrificans*와 *G. cerinus*의 D-sorbitol의 대사 조사

*P. denitrificans*는 D-sorbitol(25.0g/l), yeast extract(5.0g/l), 그리고 CaCO₃(10.0g/l)를 함유하는, 그리고 *G. cerinus*는 D-sorbitol(20.0g/l), corn steep

liquor(5.0 g / 1), KH_2PO_4 (5.0 g / 1), K_2HPO_4 (0.5 g / 1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g / 1) 그리고 CaCO_3 (7.0 g / 1)를 함유하는 배지 10ml에 접종한 후에 168시간 동안 배양하고, 원심분리한 후에 같은 방법으로 D-sorbitol의 대사물을 확인했다.

Gluconobacter spp.의 L-sorbose 대사에 관한 조사

D-sorbitol 대신에 L-sorbose를 첨가한 배지에 *Gluconobacter* spp.를 배양하여 동일한 방법으로 대사물을 조사하고 성장곡선을 구했다.

Gluconobacter spp.의 포도당 대사에 관한 조사

G. melanogenus, *G. rubinogenus*, *P. denitrificans*, *G. cerinus*를 D-sorbitol 대신에 포도당을 동량 넣어준 배지에서 배양하면서 포도당의 대사물을 조사하였다.

5-Keto-D-gluconate와 2-keto-D-gluconate의 분리

*G. cerinus*의 배양액을 정지하여 두어 5-keto-D-gluconate를 흰색의 결정으로 분리하였다. 결정을 분리한 후에 남은 배양액을 종이 크로마토그래피하여 5-keto-D-gluconate와 함께 2-keto-D-gluconate를 분리하였다.

*G. melanogenus*의 포도당, D-sorbitol, 그리고 L-sorbose의 대사물의 전기영동

168시간 동안 배양시킨 *G. melanogenus*의 배양액을 200 μ l씩 종이(49×20cm)에 점적한 후 0.1 M 개미산(pH=3)에 직선 상태로 5.4KV(26mA)의 전압을 걸어 1시간 동안 전기영동을 하였다.

배지에 첨가되는 중화제의 변화가 *G. cerinus*의 포도당 대사에 미치는 영향조사

2.5%의 포도당을 포함하는 *G. cerinus* 배양액(포도당 25 g, KH_2PO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, CaCO_3 7.0 g, corn steep liquor 5.0 g, 증류수 1 l)에서 탄산칼슘 대신에 K_2CO_3 (96mg), NaCO_3 (74mg), CaO(39mg) 또는 KHCO_3 (140mg)를 넣어 주었다. *G. cerinus*를 4일간 배양한 후 얻어진 배양액을 동일한 방법으로 처리하여 대사물을 조사하였다.

G. cerinus 배양에서 CaCO_3 양이 미치는 영향

*G. cerinus*의 배양용 배지에서 CaCO_3 양을, 가해준 포도당 양에 상대적으로 0에서 3당량까지 증가시키면서 CaCO_3 양의 변화에 대한 포도당 대사물의 생성 변화를

확인했다. 50ml 삼각플라스크에 10ml의 배지를 각각 담고서 *G. cerinus*를 4일 동안 배양한 후에 배지를 원심 분리하여서 CaCO_3 양의 변화에 따른 배양액에 누적된 대사물을 서로 비교하였다.

결과 및 고찰

종이 크로마토그램 상에서의 당의 발색

본 실험에서 종이 크로마토그램 상에 분리된 당들에 대해 aniline-oxalic acid, 1.0% *p*-anisidine-HCl, 2.0% *o*-phenylenediamine, bromophenol blue와 과망간산칼리 용액으로 발색시켜 얻은 결과가 Table 1에 요약되어 있다. 본 실험에 사용된 모든 발색제는 당의 농도 5 μ g까지 종이 크로마토그램에서 확인이 가능하였으며, 특히 aniline-oxalic acid 용액을 사용하는 경우에는 당마다 독특한 색깔을 나타내었다. 실험의 진행과정에서 나타난 여러 당들을 종이 위에 점적한 후에 phenol-물(88:12, V/V) 용액으로 전개한 후 얻어지는 Rf 값과 이들을 aniline-oxalic acid로 분무하여 발색시킨 결과가 Table 2에 요약되어 있다.

Gluconobacter spp.의 D-sorbitol 대사

D-sorbitol 배지에 *G. melanogenus*를 배양할 때 610 nm에서 흡광도를 측정하여 얻은 성장곡선이 Fig. 2에 보이고 있다. *G. rubinogenus*의 경우에는 D-sorbitol 배지에서 성장이 거의 확인되지 않았다. *G. melanogenus*와 *G. cerinus* 그리고 *P. denitrificans*를 D-sorbitol 배지에서 키웠을 때 배지에 누적된 대사물들을 종이 크로마토그래피를 한 결과가 Fig. 3에 주어지 있다. 이 크로마토그램을 보면 24시간 배양한 후부터는 D-sorbitol은 대부분 사라지고 L-sorbose가 나타났으며 2-keto-D-gluconic acid와 비슷한 Rf 값(0.21)을 가지는 분홍색 물질이 소량 생겨나는 것을 관찰할 수 있다.

48시간 배양한 후에는 이 물질(Rf 값 = 0.21)은 최대의 농도에 달하였다가 배양시간이 경과됨에 따라서 서서히 소실되었다. 72시간 배양 후에는 배양액에 2-keto-L-gulonate 존재(Rf 값 = 0.12)가 뚜렷이 관찰되었다. 312시간 동안 배양한 후에는 배양액에 2-keto-L-gulonate와 L-sorbose(Rf 값 = 0.44)만이 확인되었는데 L-sorbose의 양은 48시간 배양한 이후로는 전혀 변화가 없었다. 즉 *G. melanogenus*를 D-sorbitol 배지에 배양시켰을 때 D-sorbitol은 전혀 관찰되지 않고 L-sorbose가 주로 관찰되어 D-sorbitol이 L-sorbose로 산화된 것이 분명하고 생성된 L-sorbose의 극히 일부분만이 2-keto-L-gulonic acid로 전환되었다. 대량으로

Table 1. Colorization of the spots of various saccharides on the paper chromatogram with various reagents*

saccharide	Colorization Reagent**				
	A	B	C	D	E
D-sorbitol	-	-	-	-	yellow
L-sorbose	yellow	yellow	yellow	-	yellow
D-glucose	light brown	yellow	yellow	-	yellow
2-keto-D-gluconic acid	pink	yellow	red-brown	yellow	yellow
5-keto-D-gluconic acid	yellow	red-brown	light brown	yellow	yellow
glucuronic acid	deep pink	grey brown	brown	yellow	yellow
glucuronolactone	brown	deep blue	red-brown	yellow	yellow

* The paper chromatogram was sprayed with the colorization reagent and heated in an oven at 110°C for 5 min. When bromophenol was sprayed, the paper chromatogram was dried with hot air to get the results.

**The spray reagents used were aniline-oxalic acid (A), 1.0% *p*-anisidine - HCl (B), 2.0% *o*-phenylenediamine (C), bromophenol blue (D), and KMnO₄ solution (E). The negative sign (-) means that no distinguishable color was noticed. When bromophenol was sprayed, yellow color was shown on the blue background, but in case of the permanganate solution, on the brown background.

Table 2. The results of paper chromatography of the saccharides

Saccharides	R _f	Color of the spot*
D-sorbitol	0.48	yellow
D-glucose	0.36	light brown
L-sorbose	0.44	yellow
L-idonic acid	0.19	pink
2-keto-L-gulonic acid	0.12	pink
2-keto-D-gluconic acid	0.21	pink
5-keto-D-gluconic acid	0.25	yellow
2,5-diketo-D-gluconic acid	0.08	pink

* The chromatogram was obtained by developing the paper with phenol-water (88:12) and colored with aniline-oxalic acid. But in case of D-sorbitol, permanganate solution was sprayed.

종이 크로마토그래피를 하여서 배양액에 존재하는 2-keto-L-gulonic acid를 분리하였을 때 배양액에 넣어 준 D-sorbitol 양의 10%에 해당하는 양이 2-keto-L-gulonic acid로 분리되었는데 이 화합물의 IR 스펙트럼은 3400, 1635, 1400, 1200-1000 cm⁻¹에서 흡수띠를 보였는데 이는 표준품 및 문헌치의 값과 일치하였다(11). 또한 2-keto-D-gluconic acid와 유사한 R_f값(0.21)을 갖는 물질이 48시간 배양액에서 관찰되었으며, 이 물질

은 Okazaki등(12)의 보고와 Markover의 보고를 검토하여 본 결과 L-sorbosone으로 생각되었는데, 종이 크로마토그래피 상의 R_f값도 문헌에서 보고된 값과 일치하였다(13).

*P. denitrificans*를 D-sorbitol 배지에 배양하면 7일 후에는 소량의 L-sorbose가 생성되는 것이 확인되었으나 D-sorbitol 대부분은 그대로 남아 있었다.

*G. cerinus*의 경우에는 동일한 배양조건 하에서

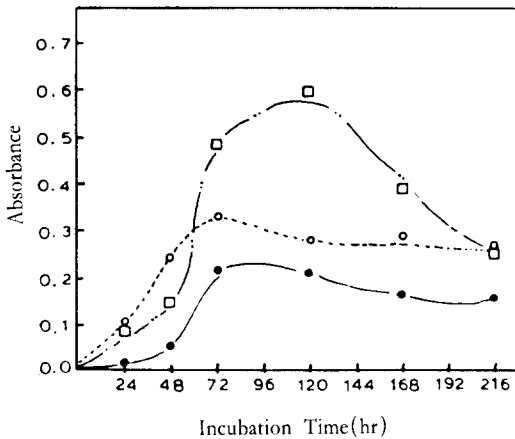


Fig. 2. Growth characteristics of *G. melanogenus* in media added with D-glucose (●-●), D-sorbitol (□-□), and L-sorbitose (○-○)

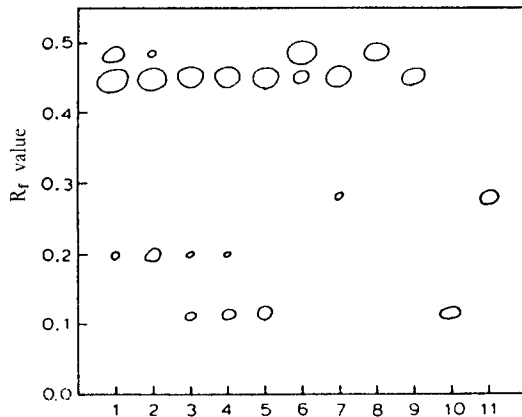


Fig. 3. The paper chromatogram of the broth of *G. melanogenus* cultured for 24 (1), 48(2), 72(3), 120(4), and 312 hours (5), and the broths of *P. denitrificans* (6) and *G. cerinus* (7) after 168 hr's culture. The authentic D-sorbitol, L-sorbitose, 2-keto-L-gulonic acid, and 2-keto-D-gluconic acid are spotted on 8, 9, 10 and 11, respectively.

D sorbitol 을 L. sorbitose로 완전히 전환시켰으나 2 keto D-gluconic acid의 생성은 가하여준 D-sorbitol양의 5% 미만이었다.

Gluconobacter spp.의 L-sorbitose 대사

이미 수행한 D-sorbitol을 2-keto-L-gulonic acid로 산화시키는 과정에서 D-sorbitol이 L-sorbitose로 변형된 후에는 일정한 소량만 2-keto-L-gulonic acid로 산화되고 더 이상 대사가 관찰되지 않아서, D-sorbitol 대신에 L-sorbitose를 가해준 배지에서 *G. melanogenus*를 같은 방법으로 배양시키면서 미생물 성장에 따른 흡광도 값을 측정 한 결과가 Fig. 2에 주어져 있다. 대사산물을 종이 크로마토그래피를 하여 확인하였을 때에 L-sorbitose의 경우에도 D-sorbitol과 거의 동일한 대사 특징을 보여 L-sorbitose이 72시간 배양할 때까지 관찰되다가 소실되고 72시간 후에는 2-keto-L-gulonic acid의 분홍빛 반점이 종이 크로마토그램 상에 확인되었다. 216시간 배양한 후에 최대량의 2-keto-L-gulonic acid의 생성이 이뤄졌으며, 이때 5-keto-D-gluconate와 유사한 물질(Rf값 = 0.26)의 생성이 관찰되었다. 대부분(90%)의 L-sorbitose는 배지에 그대로 대사되지 못한 채 남아있으며, 생성된 2-keto-L-gulonic acid의 양은 가하여 준 L-sorbitose 양의 약 10%이었다. *P. denitrificans*는 L-sorbitose를 다른 환원당이나 α-keto산들도 전혀 전환시키지 못했으며, *G. cerinus*의 경우에도 넣어준 L-sorbitose양의 5% 정도만이 2-keto-D-gluconate로 전환되었다.

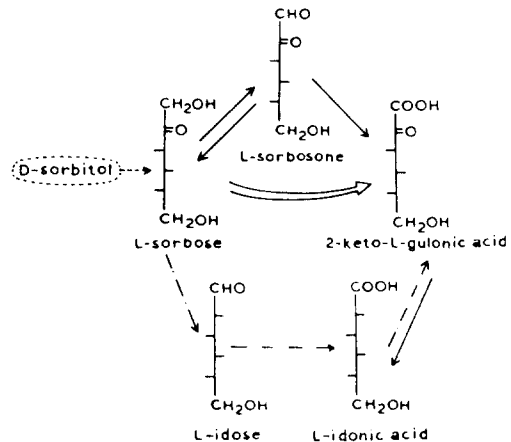


Fig. 4. The possible pathways for the oxidation of L-sorbitose to 2-keto-L-gulonic acid.

지금까지 보고된 실험의 결과를 종합하여 보면 L-sorbitose는 Fig. 4에 주어진 3가지 경로를 통해서 2 keto-L-gulonate로 전환되는 것으로 생각되고 있다.

Pelman은 L-sorbitose가 직접 2 keto-L-gulonic acid로

산화된다고 제안 하였고 (12), Okazaki는(12) L-sorbose가 L-idonic acid를 경유하고, 그리고 Makover(7)는 L-sorbose를 중간체로 하여 2-keto-L-gulonic acid로 산화 된다고 발표하였는데, 본 연구의 결과로는 *G. melanogenus*의 경우 L-sorbose를 거쳐서 2-keto-L-gulonic acid가 생성되는 것으로 사료된다.

Gluconobacter spp.의 포도당 대사

*G. melanogenus*를 포도당 배지에서 배양시킬 때 배양 시간에 따른 성장 곡선이 Fig. 2에 주어져 있다. 또한 일정한 시간 동안 배양시킨 후에 배양액을 종이 크로마토그래피와 종이 전기영동을 통해 얻은 결과가 Fig. 5에 주어져 있다.

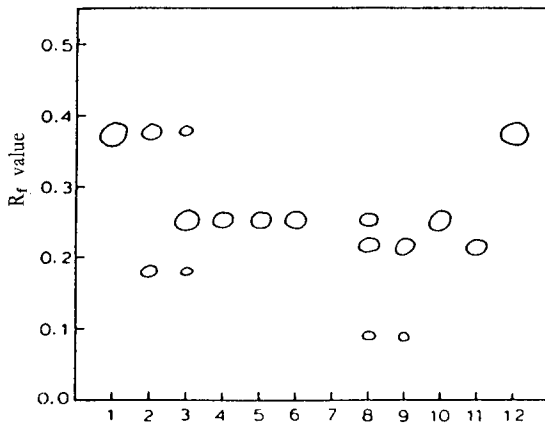


Fig. 5. The paper chromatogram of the cultured broth of *G. melanogenus* for 24(1), 48(2), 72(3), 120(4), 216(5) and 312 hours (6), and those of *P. denitrificans* (7), *G. cerinus* (8), and II-53-B (9) isolated by us for 168 hours. The spots of 5-keto-D-gluconic acid (10), 2-keto-D-gluconic acid (11), and glucose (12) are shown.

이 결과에서 보면 *G. melanogenus*는 포도당을 대사하여 5-keto-gluconic acid와 동일한 물질 (R_f 값 = 0.25)이 종이 크로마토그래피와 종이 전기영동의 결과에서 관찰되었다. 그러나 이 물질은 aniline-oxalic acid로 발색시켰을 때 5-keto-D-gluconic acid의 표준품과는 다른 색깔로 발색되는 것으로 미루어서 5-keto-D-gluconic acid와 유사한 케토산으로 생각되었다. 그래서 이 물질을 대량으로 종이 크로마토그래피를 하여 분리한 뒤 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 구하려 했으나 성공하지 못했다.

*G. cerinus*를 포도당 배지에 배양할 때 포도당은 2,5-diketo-D-gluconic acid로 정상적으로 산화된다고 보고되었으나 [14], 실제 본 연구의 결과로는 포도당이 완전히 소모되어 2-keto-D-gluconic acid와 5-keto-D-gluconic acid가 배양액에 누적되었다. 즉 포도당은 거의 정상적으로 이 두 물질로 전환되는 것으로 사료된다.

이 두 물질의 크로마토그램의 R_f 값과 IR, ^{13}C -NMR 스펙트럼들을 조사하였을 때 그 결과들은 표준품의 값과 완전히 일치되었다. 그리고 이들 케토산에 비해 낮은 R_f 값(0.08)을 가지는 aniline-oxalic acid 용액에 분홍색으로 발색되는 소량의 물질이 있어 종이 크로마토그래피로 분리하여 IR 스펙트럼을 측정된 결과, 문헌상에 보고된 2,5-diketo-D-gluconate의 IR 스펙트럼과 서로 일치하였다.

*P. denitrificans*를 포도당 배지에서 동일한 조건으로 키운 뒤 그 배양액을 가지고 종이 크로마토그래피를 하였을 때, 포도당은 완전히 소모되었는데도 다른 환원당의 생성은 전혀 검색되지 않았다.

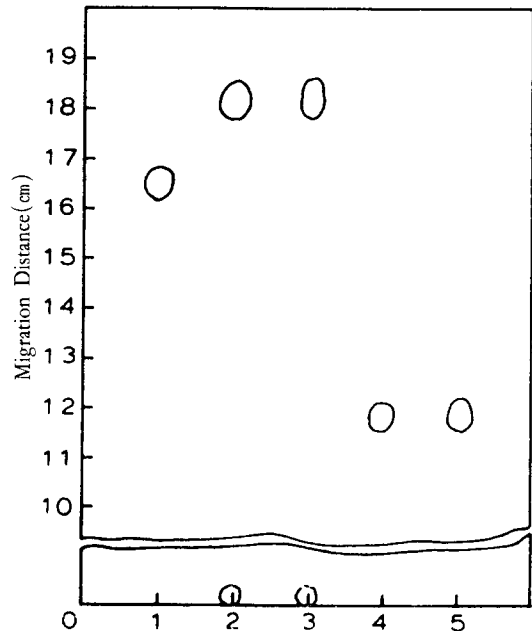


Fig. 6. The paper chromatogram obtained by electrophoresis of the media supplemented with D-sorbitol (2), L-sorbose (3), and D-glucose (4). The authentic 2-keto-D-gluconic acid and 5-keto-D-gluconic acid were spotted at 1 and 5 positions, respectively.

종이 전기영동을 이용한 *G. melanogenus* 배양액에 존재하는 당류의 분석

*G. melanogenus*의 168시간 배양액에 존재하는 당류의 확인을 위해 종이 전기영동을 하여 보았을 때 Fig. 6에 주어진 결과가 얻어졌다. 즉 D-sorbitol과 L-sorbose 배지 배양액에서는 원점에서 18.2cm 위치한 곳에 2-keto-L-gulonic acid의 반점이 유일하게 나타났으며 포도당 배지 배양액에서는 5 keto D gluconic acid가 원점에서 11.8cm 떨어진 곳에서 나타났다. 한편 2-keto-D-gluconic acid 표준 물질은 16.6cm 이동되었으며 대사되지 않은 L-sorbose는 원점에 잔류하였다.

당류의 산화대사물을 확인 및 분리하는 방법으로 전기영동법이 뛰어난 것으로 밝혀졌다.

***G. cerinus*를 포도당배지에서 배양할 때 중화제가 대사물의 조성에 미치는 영향**

포도당 배지에서 *G. cerinus*를 배양시킬 때 배지에 CaCO₃ 대신에 K₂CO₃, Na₂CO₃, CaO, KHCO₃를 각각 넣고 배양하는 경우에 생성되는 당류를 종이크로마토그래피로 조사하여 본 결과 CaCO₃ 대신에 다른 중화제를 쓴 경우에는 2-keto-D-gluconate만이 생성되었으며 5-keto-D-gluconate는 배양액내에 전혀 검출되지 않았다. CaCO₃를 넣지 않은 경우에는 5-keto-D-gluconate가 배양액에 전혀 관찰되지 않다가 CaCO₃의 양을 증대시켜서 가해주면 5-keto-D-gluconate가 점점 증가하였다. 포도당에 대해서 가해준 CaCO₃의 양이 0.8 당량이 될 때는 배양액 내에 2-keto-D-gluconate 양과 5-keto-D-gluconate의 양이 거의 동일하였다. CaCO₃의 양이 배지에 가해준 포도당의 양에 대해 1당량이 되자 침전으로 가라앉은 calcium 5-keto-D-gluconate의 양은 가해준 포도당 500mg에 대해서 230mg에 달하였다. Calcium 5-keto-D-gluconate의 물에 대한 용해도는 0.2g / 10ml로 보고되어 있다(13). 이러한 결과로 미루어보면 *G. cerinus*는 포도당을 2 keto D gluconate로 우선적으로 산화시키고 있는 것으로 보이며 CaCO₃의 증가에 따른 5-keto-D-gluconate 생성량의 증가는 calcium 5-keto-D-gluconate의 물에 대한 용해도가 낮음에 기인하는 것으로 보인다.

***G. cerinus*에 5-keto-D-gluconate 또는 2-keto-D-gluconate를 탄소원으로 가해주고 배양시켰을 때 이들의 대사와 그 생성물**

*G. cerinus*를 2 keto-D-gluconate 또는 5 keto D gluconate를 유일한 탄소원으로 배지에 넣고 4일간 배양시킨 후에, 배양액을 종이 크로마토그래피를 한

결과가 Fig. 7에 주어지 있다. 이 결과에서 보면 5 keto-D gluconate가 2-keto D-gluconate로 전환되는 것으로 관찰되었으나 2-keto-D-gluconate를 가하여 준 경우에는 5-keto-D-gluconate는 관찰되지 않고 소량의 2,5-diketo-D-gluconate (R_f 값 = 0.08)가 생성되는 것을 확인하였다. 즉 이 결과에 따르면 포도당은 *G. cerinus*에 의하여 5-keto-D-gluconate 또는 2-keto-D-gluconate로 산화될 수 있으며, 2-keto-D-gluconate는 다시 2,5-diketo-D-gluconate로 산화된다는 것을 설명하여 준다. 5 keto-D-gluconate는 직접 2,5-diketo-D-gluconate로 산화되지 못하고 2-keto-D-gluconate로 변경된 후에 2,5-diketo-D-gluconate로 산화되는 것으로 보인다.

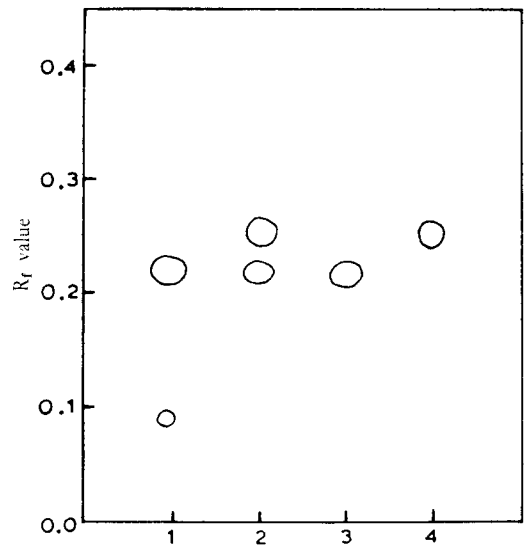


Fig. 7. The metabolites obtained from the media of *G. melanogenus*. The organism was cultured in the medium containing 2-keto-D-gluconate (3) or 5-keto-D-gluconate (4) as the sole carbon source. The authentic 2-keto-D-gluconate and 5-ketogluconate spots are shown at 1 and 2 positions, respectively.

2-Keto-L-gulonic acid 발효

미생물을 이용하여서 D-sorbitol과 L-sorbose, 포도당의 대사를 확인한 *G. melanogenus*의 경우에는 D-sorbitol이나 L-sorbose로부터 2-keto-L-gulonic acid를 소량 생성하여 배지내에 어느정도 축적하고 나면 어떠한 조절기능에 의하여 더 이상의 2-keto-L-gulonic acid가

생성되지 않았다. 따라서 이 조절 기능에 대해서 더 많은 연구가 필요로 한다.

한편 포도당을 2,5-diketo-D-gluconate를 거쳐서 2-keto-L-gulonic acid로 전환 하려는 연구는 이 두 단계의 발효과정을 가장 효율적으로 진행시킬 수 있는 미생물의 개발과 그 미생물의 적절한 배양법을 확립하는 것이 요청되고 있다.

요 약

D-sorbitol을 첨가한 배지에서 *G. melanogenus*를 배양하였을 때에 D-sorbitol은 L-sorbose를 거쳐 2 keto-L-gulonic acid로 전환되었다. *G. cerinus*를 D-sorbitol 대신에 포도당을 첨가하여 준 배지에서 배양하였을 때에 포도당은 2-keto-D-gluconic acid, 5-keto-D-gluconic acid, 2,5 diketo-D-gluconic acid 로 산화되었다. 2,5-diketo-D-gluconic acid는 포도당이 2-keto-D-gluconic acid를 거쳐 생성되는 것으로 확인되었다. 배양액에 첨가하여 준 탄산칼슘의 양을 증가시키면 5-keto-D-gluconate 의 생성이 증가하였고, 탄산칼슘대신에 다른 염기를 배양액에 가하여 주었을 때는 2 keto-D-gluconate 만 생성되었다.

감 사

본 연구는 과학재단의 연구비지원에 의하여 이루어졌으며 이에 대하여 감사의 뜻을 표한다.

참 고 문 헌

1. T. Reichstein and A. Grussner (1934), *Helv. Chim. Acta*, **17**, 311
2. T.C. Crawford and S.A. Crawford (1980), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **37**, 79
3. E.I. Fulmer, J.W. Dunning, J.F. Guymon and I.A. Underkofler (1936), *J. Am. Chem. Soc.*, **58**, 1012
4. M. Kulhanek (1970), *Adv. Appl. Microbiol.*, **12**, 11
5. U.S. Patent 3, 234, 105
6. Y. Tsukada and D. Perlman (1972), *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 1035
7. S. Makover, G.B. Ramsay, F.M. Vane, C.G. Witt and R.B. Wright (1975) *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1485.
8. T. Sonoyama, H. Tani, K. Matsuda, B. Kageyama, M. Tanimoto, K. Kobayashi, S. Yagi, H. Kyotani, and K. Mitsushima (1982), *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1064
9. S. Anderson, C.B. Marks, R. Lazarus, J. Miller, K. Stafford, J. Seymour, D. Light, W. Rastetter, and D. Estell (1985), *Science*, **230**, 144
10. C. Chung, Y.M. Goo, and K.W. Kim (1988), *Yakhak Hoeji*, **32**, 411
11. H. Okazaki, T. Kanazaki, K. Nara, M. Doi, and K. Mocizuki (1968), *Agric. Biol. Chem.*, **32**, 1250
12. H. Okazaki, T. Kanazaki, K. Sasajima, Y. Terada (1969), *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 207
13. J.J. Stubbs, L.B. Lockwood, E.T. Roe, B. Tabenkin and G.E. Ward (1940), *Ind. Eng. Chem.*, **32**, 1626
14. U.S. Patent, 4, 263, 402

(Received December 4, 1989)