

고정화 균체를 이용한 2,5-Diketo-Gluconic Acid 발효생산

신봉수 · 신철수*

연세대학교 공과대학 식품생물공학과 및 생물산업소재연구센터

Production of 2,5-Diketo-Gluconic Acid in Immobilized Cell Reactors. 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 – For the efficient production of 2,5-diketo-gluconic acid (2,5-DKG) by the immobilized cells of *Erwinia herbicola*, basic characteristics of 2,5-DKG fermentation were analyzed and a process employing immobilized cell reactor was developed. The immobilized cells appeared to have diffusion limitation, and a maximum production of 2,5-DKG was accomplished with 2 mm diameters of immobilized beads. Long-term stabilities of the immobilized cells could be maintained by addition of 1.75% (w/v) polypeptone. Repeated batch fermentations with about 80 mol% of 2,5-DKG yields were carried out six times in the fluidized bubble column reactors filled with immobilized cells at an aeration rate of 6 vvm.

인간이나 동물의 생체 내에서 중요한 필수 영양소로 작용하는 비타민C(L-ascorbic acid)는 의약품과 산화방지제, 향갈색제 등의 식품첨가제 및 화장품 등에 널리 이용되고 있다. 이러한 용도와 기능으로 인하여 이 물질에 대한 수요는 확대되어 가고 있으며, 지금까지 산업적인 생산은 주로 Reichstein-Grüssner 합성 공정을 통하여 이루어지고 있다. 이러한 비타민C 합성의 주요 중간체인 2-keto-L-gulonic acid(2-KLG)는 D-glucose → 2,5-diketo-gluconic acid(2,5-DKG) → 2-KLG의 생물학적 전환에 의해 생산이 가능하다(1). 이중 D-glucose에서 2,5-DKG로의 반응 단계는 기존의 생물학적 전환 단계 중 D-sorbitol → L-sorbose의 전환 단계를 대체할 수 있으며, 보다 효과적인 생물전환을 위해서는 D-glucose → 2,5-DKG 전환 단계의 생산성 증진에 관한 연구가 요구된다고 할 수 있다. D-glucose에서 2,5-DKG로의 전환은 3단계 반응으로 각 반응에 작용하는 효소는 membrane bound dehydrogenase로 알려져 있다(1). 미생물을 이용한 2,5-DKG의 생산은 Katzenelsen 등(2)이 처음으로 발효를 통하여 분리, 제조한 후 *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Erwinia*속 균주를 이용한 생산이 보고되었다(3,4). Qazi 등(5-10)은 *Gluconobacter*, *Erwinia*속 균주를 이용한 2,5-DKG 생산에 있어서 용존산소의 영향을, Lazarus 등(11)은 발효에 의하여 생산된 2,5-DKG의 분석법을 보고하였다. Sonoyama 등(12)은 2,5-DKG를 생산하는 *Erwinia*속 균주의 특성에 대하여 연구하였으며, 2단계 발효를 이용하여 D-glucose에서 2-KLG를 생산하였다(13).

이와 같이 지금까지의 연구는 주로 높은 수율과 발효 시간이 짧은 균주의 탐색과 생산 분석 쪽으로 진행되어

왔으며, 고정화 시스템을 이용한 생산 공정은 아직 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 2,5-DKG 생산에 있어 효율적인 균체 고정화 방법의 적용과 이를 통한 반응공정 개발에 관한 연구를 진행하였다. 이를 위하여 기본적인 발효특성을 분석하였고, Ca-alginate를 이용하여 균체를 고정화한 후 고정화 담체내로의 기질의 투과와 관련한 분석을 시도하였다. 또한 D-glucose에서 2,5-DKG 생산은 dehydrogenase에 의한 산화 반응으로 산소의 공급이 필수적이었다. 따라서 보다 효율적인 2,5-DKG 생산을 위하여 호기적 발효에 주로 적용되는 fluidized bubble column 반응기를 이용한 repeated batch fermentation을 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 발효배지

2,5-DKG 생산 균주인 *Erwinia herbicola* ATCC 21998을 본 실험에 사용하였다. 전배양 배지조성은 100 ml의 증류수에 0.2 g glucose, 0.5 g polypeptone, 0.1 g yeast extract, 0.1 g KH_2PO_4 , 0.05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를, 발효배지의 조성은 100 ml의 증류수에 5 g glucose, 0.6 g polypeptone, 0.2 g yeast extract, 0.1 g KH_2PO_4 , 0.02 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.75 g CaCO_3 를 첨가하여 조제하였으며, 각 배지의 pH는 살균전 7.0으로 조절하였다. 고정화 균체를 이용한 반응에서는 발효배지 조성 중 glucose, polypeptone, CaCO_3 만을 첨가하여 반응에 이용하였다.

균주 배양 및 발효 특성

전배양은 500 ml 삼각 flask에 배지를 100 ml 분주하여 121°C에서 15분간 멸균한 후 사면배지에서 균체를 취하여 접종하였다. 배양은 30°C에서 240 rpm으로 15시간 회전 진탕 배양하였다. 본 배양은 500 ml 삼각

*Corresponding author.

Key words: 2,5-Diketo-gluconic acid, *Erwinia herbicola*, immobilization, bubble column reactor.

flask에 배지를 100 ml 분주하여 멸균한 후 전배양액을 10%(v/v) 접종하여 전배양과 같은 조건으로 배양하였다. 한편 발효조를 이용한 배양에서는 5 l jar fermentor에 발효배지 3 l, 교반속도 600 rpm, 공기공급속도 1 vvm, 30°C의 조건으로 수행하였다.

발효중 on-line pH 조절은 발효배지 성분 중 pH 완충제인 CaCO_3 를 첨가하지 않은 배지를 이용하였고, 3 l jar fermentor에서 6 N NaOH를 첨가하여 수행하였다. 기질농도에 따른 2,5-DKG 생산에서는 발효배지 중의 glucose 농도를 5, 10 및 15%로 변화시켜 배양하였다.

기질 및 생성물 분석

발효액 1 ml를 취하여 원심분리(Hanil Union 55R, 10,000 rpm, 10분)한 후 상등액을 분석하였다. 반응생성물질 중 2-keto-gluconic acid(2-KG)와 2,5-DKG는 HPLC를 이용하여 정량하였다. HPLC의 column은 Aminex HPX-87H 300×7.8(Bio-rad), pump는 영인 910, detector는 R.I.(Waters 410)를 이용하였다. 상온에서 이동상으로는 0.02 N H_2SO_4 를 0.5 ml/min의 속도로 유출시켰다.

Glucose 분석은 glucose oxidase-O-dianisidine method로 enzyme kit(영동제약)를 사용하였고, gluconic acid 정량도 enzyme kit(Boehringer Mannheim)를 사용하였다.

균체 고정화 및 발효 생산

Ca-alginate를 이용한 균체의 고정화는 발효배지에서 10시간 동안 배양한 발효액을 원심분리하여(8000 rpm, 10 min) 균체를 취한 후, 이를 동량의 0.1 M Tris buffer를 첨가하여 재원심분리하여 균체를 얻었다. 이들 균체를 0.1 M Tris buffer로 최종 40 g/l 농도의 균체 현탁액을 제조하고 3% Na-alginate solution(0.1 M Tris-buffer)과 1:1의 비율로 혼합한 후, 주사기를 사용하여 0.05 M CaCl_2 (0.1 M Tris-buffer)용액에 적하시켜 구형의 고정화균체 담체를 제조하였다. Ca-alginate 고정화 담체의 지름을 바늘 크기가 다른 주사기를 이용하여 2, 3 및 4 mm로 각각 제조하여 반응에 이용하였다.

2,5-DKG 발효생산에 필요한 산소의 효과적인 공급을 위하여 fluidized bubble column 반응기에 Ca-alginate 고정화 균체를 충전하여 발효를 수행하였다(Fig. 1). 산소공급속도가 2,5-DKG 발효 생산에 미치는 영향의 분석은 고정화균체를 충전한 fluidized bubble column 반응기 내의 공기공급속도를 2, 4 및 6 vvm으로 각각 변화시켜 2,5-DKG 생산성을 비교하였다. 고정화균체 반응에서 질소원의 농도에 따른 효과는 질소원인 polypeptone 농도를 0, 0.2, 0.4 및 0.6%로 각각 변화시켜 2,5-DKG 생산성을 비교하였다.

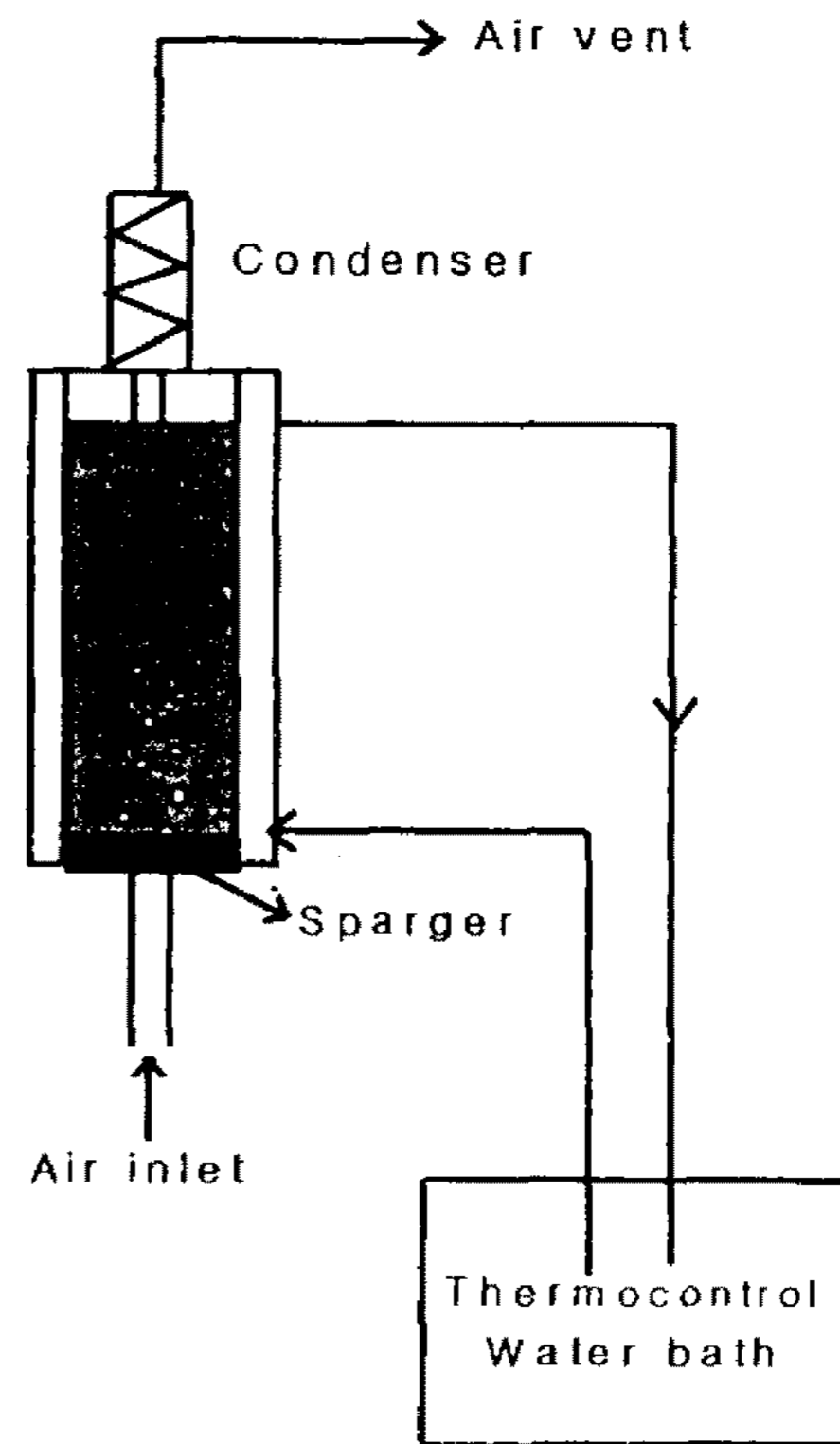


Fig. 1. A schematic diagram of fluidized bubble column reactor.

Repeated batch fermentation에 의한 2,5-DKG 생산은 Ca-alginate 고정화 균체가 충전된 fluidized bubble column 반응기에서 수행하였다. 발효 24시간마다 기존의 발효액을 제거한 후 새로운 발효배지로 교체하여 반응시켰다. 반응기내 고정화 담체의 부피는 반응기 부피의 40%(v/v)가 되게 충전하였으며, 공기공급속도 6 vvm, 30°C의 조건에서 반응시켰다. 시약 일반적인 시약은 Sigma, 덕산, Junsei, Difco, Yakuri 등의 특급 또는 시약급을 사용하였다.

결과 및 고찰

2,5-DKG 발효 특성의 분석

고정화균체 발효공정에서 중요한 특성의 하나는 고정화균체를 장기간 반복 사용할 수 있는 것이다. 이러한 장기간의 발효생산을 위해서 균체 활성 유지가 필수적이며, 고정화시스템을 효율적으로 운용하기 위해 대사 과정, 적정 기질농도, 고정화 담체의 기질투과성 등의 기본적인 분석이 요구된다.

기질인 glucose로부터 2,5-diketo-gluconic acid(2,5-DKG)가 발효 생성되는 단계는 glucose→gluconic acid→2-keto-gluconic acid(2-KG)→2,5-DKG의 대사 경로를 통하여 이루어지는 것으로 관찰되었다(Fig. 2). Fig. 2에서 보는 바와같이 glucose는 발효 시작 후 24시간 내에 모두 소비되었으며, 2,5-DKG는 발효초기부터 생산되어 glucose가 모두 소비된 후에도 생산이 지속되었다. 발효

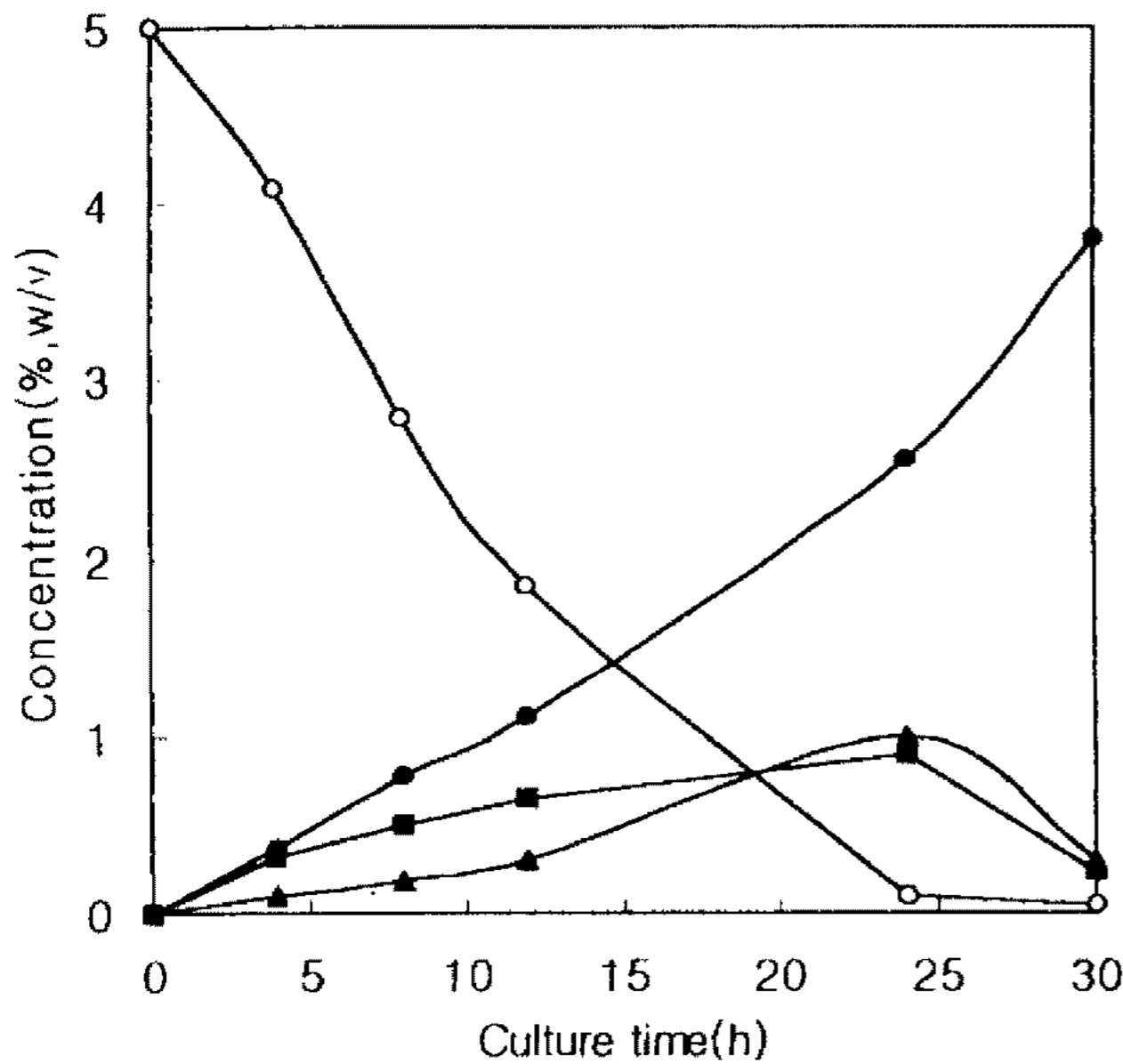


Fig. 2. Patterns of substrate consumption and intermediates and product formation during cultivation.

Cultivations were carried out in 500 ml flasks. ○, glucose; ■, gluconic acid; ▲, 2-keto gluconic acid (2-KG); ●, 2,5-diketo gluconic acid (2,5-DKG).

중간물질인 gluconic acid와 2-KG는 발효중 1% 이하의 낮은 농도로 존재하다가 최종 2,5-DKG로 전환되었고, 2,5-DKG 생산수율은 약 75%(mol/mol)였다. 이는 Sonoyama 등(12)이 *Erwinia*속 균주를 이용하여 얻은 수율과 유사하다.

2,5-DKG 생산에 대한 기질 농도의 영향을 살펴보기 위하여 glucose 농도를 5, 10 및 15%로 각각 변화시켜 반응을 수행하였다. Fig. 3에서 보는 바와같이, 초기 기질 농도가 증가함에 따라 균체생육이 저해되었으며, 2,5-DKG 생산이 현저하게 저해되었다. 또한 초기 glucose 농도가 높을수록 2,5-DKG로의 전환수율이 낮아졌으며, 이는 소비된 glucose가 2,5-DKG로의 전환외에 균체생육과 기타 대사산물로 전환된 것으로 생각된다. 따라서 2,5-DKG의 효율적인 생산을 위하여 적절한 균체생육이 이루어지는 기질 농도를 10% 이하로 조절하여야 될 것으로 생각된다.

반응이 진행됨에 따라 2,5-DKG를 포함한 기타 대사산물에 의하여 pH가 급격히 떨어지며, 발효 종료 시 pH는 초기 7에서 5 이하로 낮아졌다. 문헌상으로는 균체 생육의 최적 pH는 7.0이며 pH 3.0 이하에서는 생육하지 못한다고 보고되었다(14). 따라서 발효시 pH 변화가 균체생육과 관련하여 2,5-DKG 생산에 큰 영향을 미칠 것으로 생각되어 jar fermenter에서 on-line pH 조절하에서 2,5-DKG 생산을 시도하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이, pH를 조절하지 않은 경우는 균체생육의 억제로 인하여 2,5-DKG 농도가 1% 이하로 낮게 얻어졌으며, 균체 생육은 pH 7에서 최적이었으나 pH 6에서 2,5-DKG가 최대로 생산되었다. 그러나 본 연구

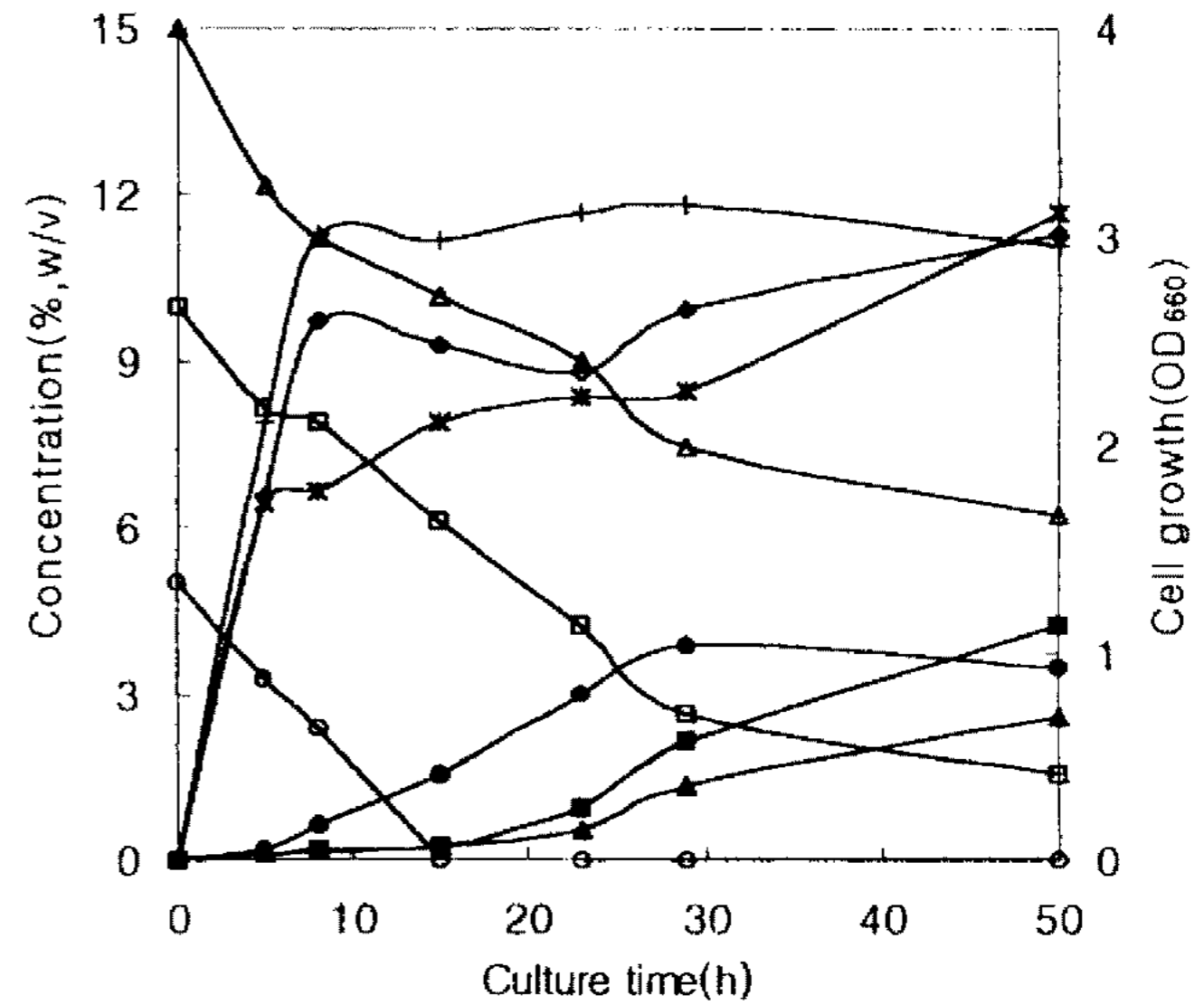


Fig. 3. 2,5-DKG fermentations at various substrate concentrations.

Cultivations were carried out in 500 ml flasks. Glucose conc.: ○, 5%; □, 10%; △, 15%. 2,5-DKG conc.: ●, 5%; ■, 10%; ▲, 15%. Cell growth: *, 5%; ◇, 10%; +, 15%. % values indicate glucose concentrations.

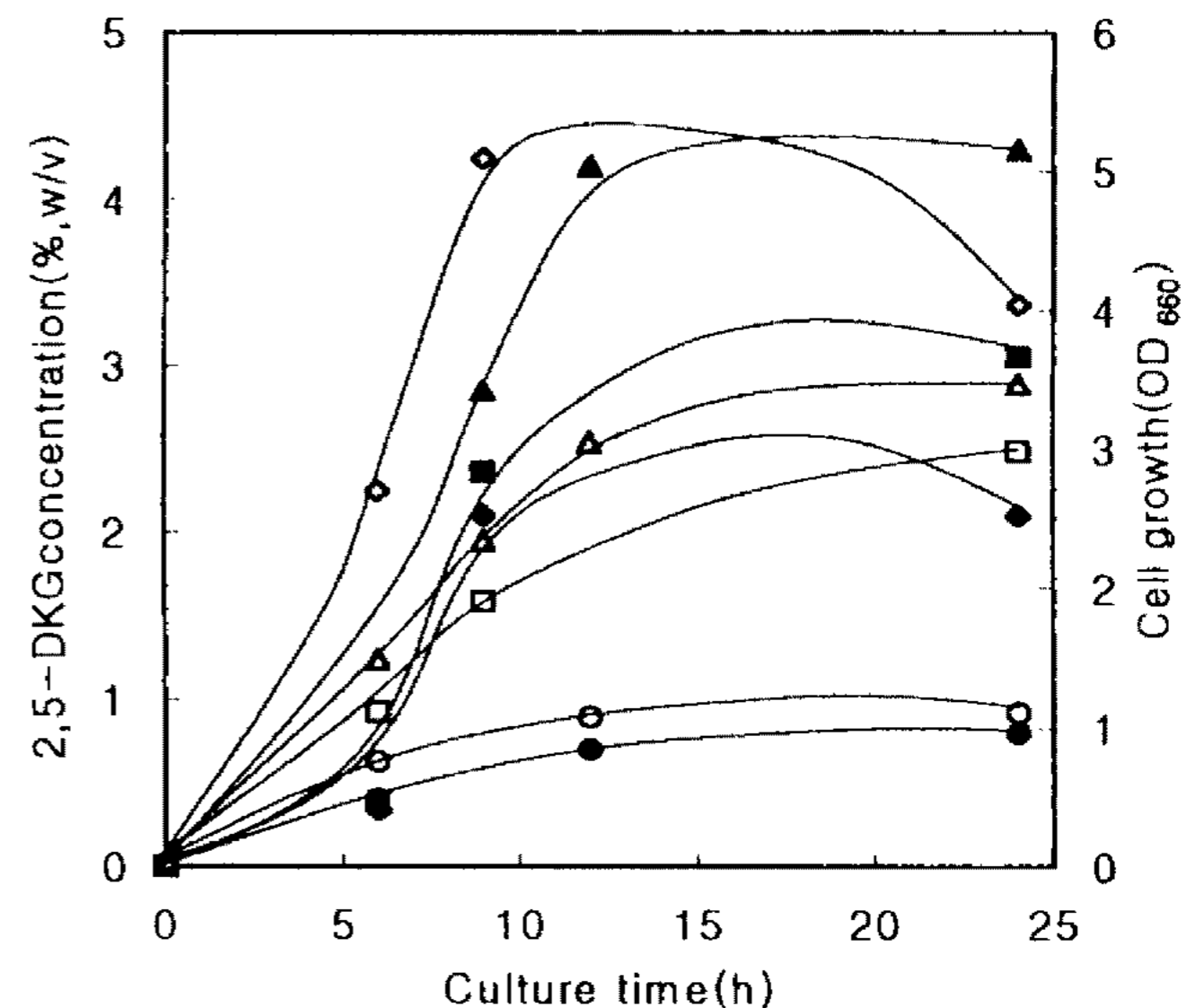


Fig. 4. 2,5-DKG fermentations under pH-stats.

Cultivations were carried out in 3 l jar fermentor. Cell conc.: ○, no control; □, pH 5; △, pH 6; ◇, pH 7. 2,5-DKG: ●, no control; ■, pH 5; ▲, pH 6; ◆, pH 7. The media did not include CaCO_3 , and pHs were controlled with 6 N NaOH.

에서 궁극적으로 고정화시스템을 추구하고 있으므로 고정화균체 반응기의 물리적인 구조상 on-line pH 조절은 다소 문제가 될 수 있다. 따라서 on-line pH 조절대신 pH 조절물질인 CaCO_3 를 발효배지에 첨가하였으며, CaCO_3 의 첨가 농도에 따른 2,5-DKG의 생산을 비교하였다. Fig. 5a에서 보는 바와같이 CaCO_3 를 첨가하지 않은 배지에서는 2,5-DKG로의 전환이 심하게 억제되었으며, 이는 강한 산성을 띠는 발효 산물로 인하여

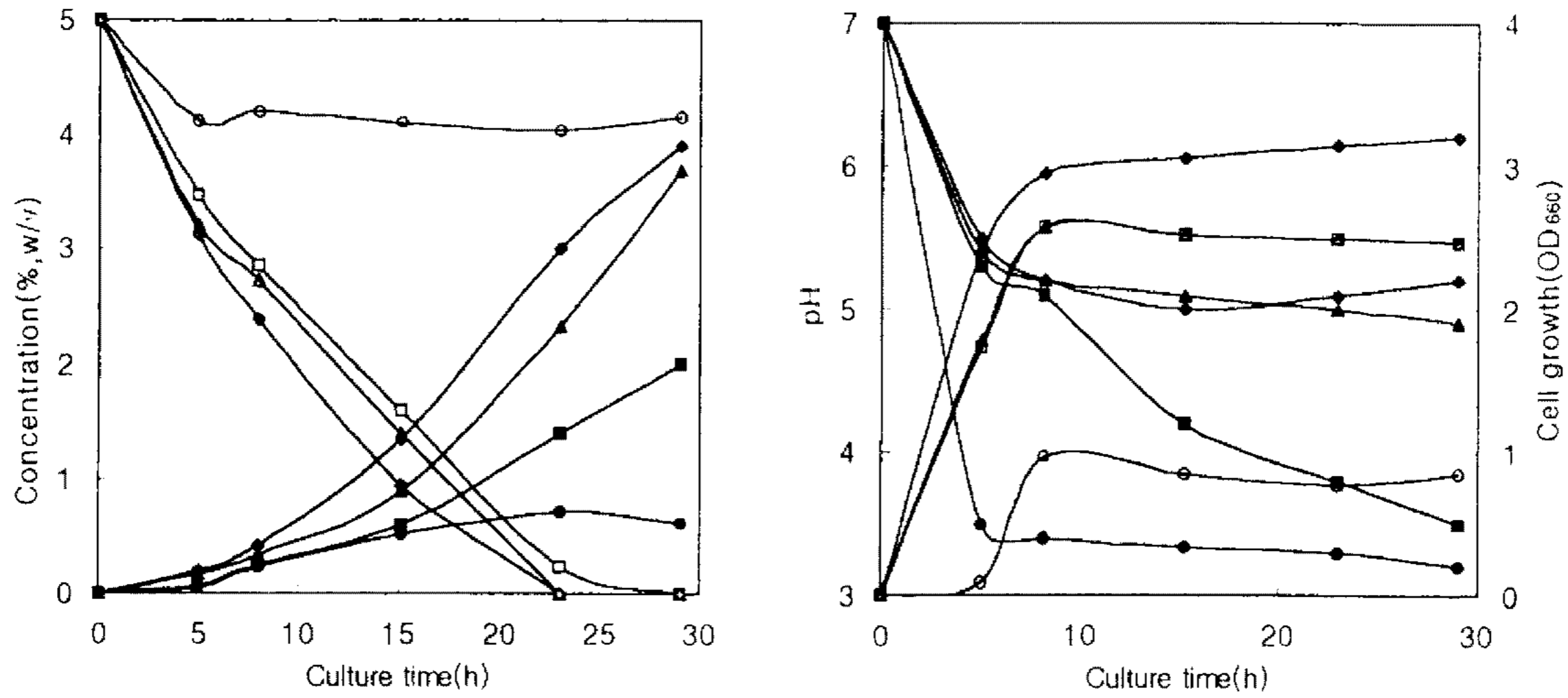


Fig. 5. 2,5-DKG fermentations at various CaCO_3 concentrations.

Cultivations were carried out in 500 ml flasks. Glucose conc. & pHs: ○, none; □, 0.5%; △, 1.0%; ◇, 1.75%. 2,5-DKG conc. & cell growth: ●, none; ■, 0.5%; ▲, 1.0%; ◆, 1.75%.

발효개시 5시간 이내에 pH가 3.3까지 떨어져 균체 생육이 크게 억제되었기 때문이다(Fig. 5b). 반면 CaCO_3 를 첨가한 경우 발효액의 pH가 급격히 떨어지는 것을 방지할 수 있었으며, CaCO_3 를 1.75%(w/v) 되게 첨가한 경우 발효 종료까지 pH 5 이상을 유지할 수 있었고 균체생육이 원만히 이루어졌다. 또한 2,5-DKG 생산도 pH 6으로 on-line 조절한 경우와 비슷하게 이루어졌다. 따라서 효과적인 2,5-DKG 생산을 위해서는 배지성분 중 CaCO_3 를 1.75% 첨가하여 on-line pH 조절을 대체할 수 있는 것으로 생각된다.

Glucose로부터 2,5-DKG 발효생산은 산화반응이므로 산소의 영향이 클 것으로 예상되었으므로 발효중 shaker의 교반속도를 변화시킨 결과, 자료로서 나타내지는 않았지만 교반속도가 증가됨에 따라 2,5-DKG 생산이 증가되는 결과를 보였다. 따라서 2,5-DKG 생산은 산소를 많이 요구하는 반응임을 알 수 있었고, 효과적인 2,5-DKG 생산을 위해서는 산소공급속도를 증가시켜야 될 것으로 생각되었다.

균체 고정화 및 발효공정

2,5-DKG를 효율적으로 생산하기 위하여 Ca-alginate에 균체를 포괄시켜 고정화균체 담체를 제조하였다. 이들 고정화 균체를 packed bed column 형 반응기에 충전하여 2,5-DKG 발효생산을 시도하였다. 일반적으로 이러한 반응기에서 산소의 공급이 원활하지 못한 특징이 있는데, 예상한 바와같이 충분한 산소 공급이 필요한 2,5-DKG 발효에서 2,5-DKG 생산이 거의 이루어지지 않았다. 이와같이 산소 공급이 2,5-DKG 생산에 중요한 영향을 미친다는 결과와 glucose에서 2,5-DKG로의 전환반응은 비교적 산소를 많이 요구하는 반응임이 flask 배양에서 관찰되었으므로, 고정화균체를 이용하여 호기적 발효에 적합한 fluidized bubble column 반응기

에서 산소공급 효과를 분석하였다. 공기공급속도가 6 vvm일 때 최대 2,5-DKG 생산이 이루어졌다.

일반적으로 고정화 균체를 이용한 반응에 있어서 고정화 담체내에서 기질 및 생성물의 투과성이 반응에 중요한 인자로 작용하며, 고정화 담체내로의 물질 투과가 저해받으면 전체 반응속도가 낮아져 효율적인 반응이 이루어지지 못한다. 따라서 고정화 균체를 이용한 2,5-DKG 생산을 위하여 적절한 고정화담체 크기의 결정과 담체 크기에 따른 영향을 살펴보기 위하여 담체의 지름을 2, 3, 4 mm로 제조하여 반응시켰다. Fig. 6에서 보는 바와같이, 고정화 균체를 이용한 반응은 전반적으로 free cell 반응에 비하여 2,5-DKG 생산속도가 낮아지는 것이 관찰되었으며, 2,5-DKG 생산속도는 고정화담체의 크기가 작은 2 mm에서 가장 높았다. 각 고정화담체를 통한 기질의 internal diffusion을 비교하기 위해 고정화균체 반응의 effectiveness factor(η)과 Thiele modulus(ϕ)의 값을 구하였다(15). η 값은 고정화균체에 의한 생산속도와 resting cells에 의한 생산속도의 비율이며, η 와 ϕ 의 관계식으로부터 ϕ 값을 구하였다. Table 1에서 보는 바와같이, 고정화담체의 크기가 증가함에 따라 η 값이 작아지는 경향을 보였으며, 이는 담체의 크기가 증가함에 따라 담체내부의 기질의 internal diffusion 문제가 심각한 것을 보여주는 것이다. 고정화담체 크기의 함수인 ϕ 값 또한 이러한 경향을 반영하였다. 다시말하면 고정화균체에 의한 반응속도가 낮은 이유는 bulk에 존재하는 기질이 균체가 존재하는 담체내로의 diffusion에 어려움이 있기 때문으로 생각되었다. 따라서 반응속도를 증가시키기 위해서는 담체의 크기를 작게 제조하는 것이 요구되며, 향후 실험에서는 지름이 2 mm인 고정화담체를 2,5-DKG 생산에 사용하였다.

일반적으로 고정화균체를 이용하는 발효생산에서 담

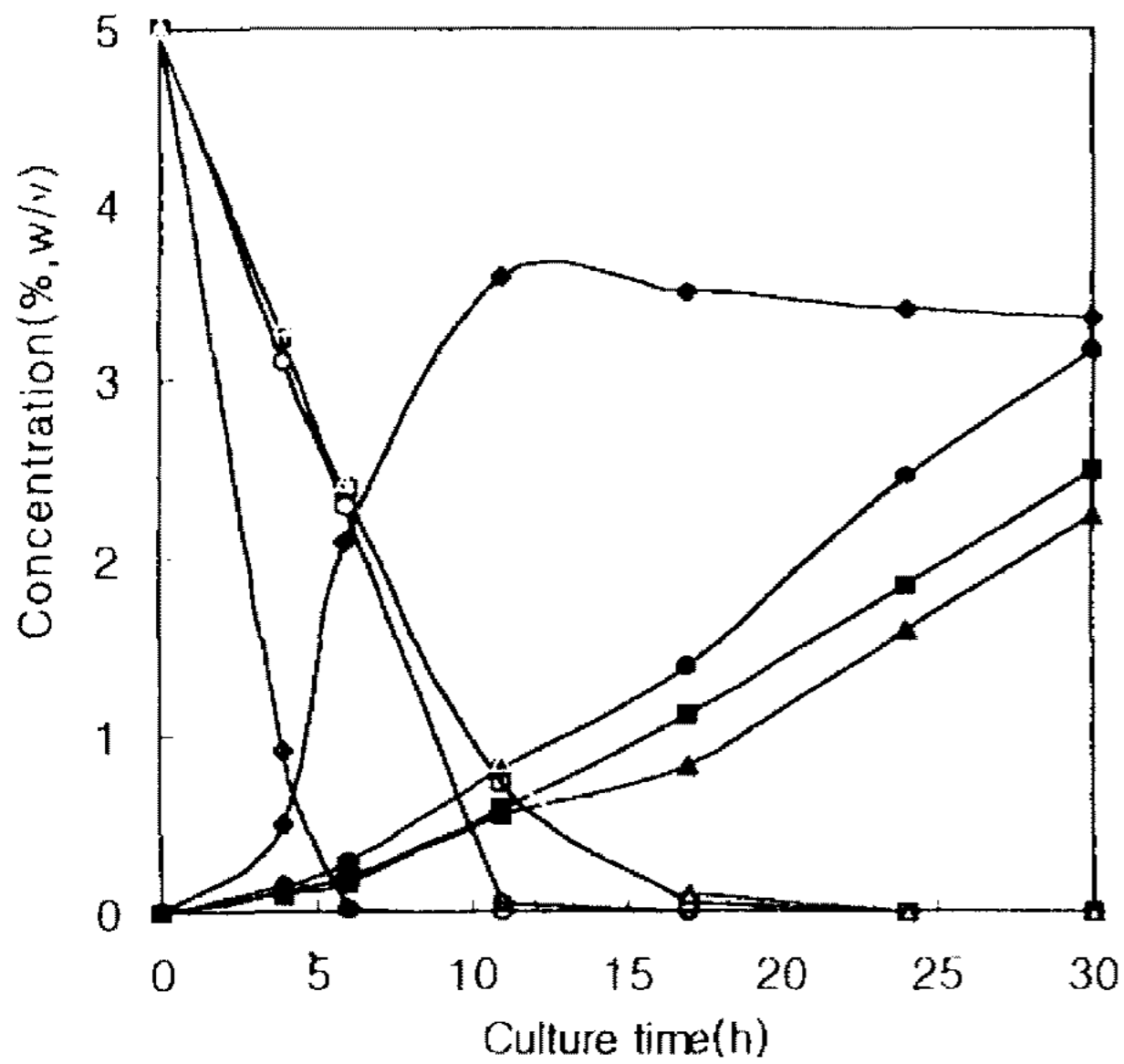


Fig. 6. 2,5-DKG fermentations depending on different diameters of immobilized beads in fluidized bubble column reactors. Glucose conc.: ○, 2 mm; □, 3 mm; △, 4 mm; ◇, resting cells. 2,5-DKG conc.: ●, 2 mm; ■, 3 mm; ▲, 4 mm; ◆, resting cells. The concentrations of immobilized cells and resting cells in reactors were 20 g/l.

Table 1. Estimated values of effectiveness factors (η) and Thiele modulus (ϕ) depending on different diameters in immobilized cell beads in 2,5-DKG production.

Parameter	Bead diameter (mm)		
	2	3	4
η^a	0.40	0.31	0.28
ϕ^b	2.11	2.87	3.21

^a η =effectiveness factor, ^b ϕ =Thiele modulus. $\eta = V_{actual}/V_{kinetic}$, $\eta = 3/\phi[1 - \tanh\phi - 1/\phi]$, $\phi = R/3(v_{max}/K_m \cdot D_{eff})^{1/2}$. $V_{kinetic}$ indicates the values obtained by free resting cells, and D_{eff} is effective diffusivity.

체내에 존재하는 균체의 활성유지(maintenance)는 중요한 요인중의 하나이다(16). 즉 지나친 영양분의 공급은 균체 생육을 촉진하여 담체에 존재하는 pore를 막게 되어 담체내에 존재하는 균체로의 기질이나 산소 등의 공급이 원활치 못하게 되는 반면, 영양분이 불충분하면 균체 생존율과 아울러 균체 활성이 저하된다. 따라서 연속생산이나 repeated fed-batch 등과 같은 장기간의 조업이 요구되는 경우에 균체의 적당한 생육과 활성유지는 매우 중요하다. 고정화균체를 이용한 2,5-DKG 생산에 있어서 효과적인 균체의 활성유지를 위하여 일정 농도의 질소원 공급은 필수적이다. 고정화 균체를 이용한 2,5-DKG 생산에 있어 배지 질소원의 하나인 yeast extract를 이용하는 경우 고정화 담체의 mechanical stability를 약화시켜 담체가 swelling된다는 보고(17)와 마찬가지로 본 실험에서도 비슷하게 담체 외부로 균체가 유출되는 현상이 심하게 나타났다. 반면, 또 다른 질소원인 polypeptone을 이용한 경우 이러한 swelling 현상이 관찰되지 않았다. 따라서 yeast extract를 제외한 polypeptone을 균체의 활성유지를 위한 질소원으로 이용하였으며, fluidized bubble column 반응기에서 polypeptone 농도에 따른 2,5-DKG 생산을 살펴보았다. Fig. 7a에서 보는 바와같이, 질소원이 전혀 첨가되지 않은 경우 2,5-DKG 생산이 현저히 낮았으나, polypeptone 농도가 증가할수록 반응이 원활히 이루어져 0.6%(w/v)에서 최대 생산이 이루어졌다. Fig. 7b에서 보는 바와같이, polypeptone이 0.6%까지 첨가되더라도 고정화담체 내의 균체농도는 별로 증가하지 않아 담체내의 pore가 막혀 발생하는 기질의 internal diffusion 문제는 심각하지 않은 것으로 생각되어 효율적인 균체의 활성유지가 이루어지는 것으로 판단되었다.

고정화균체를 충전한 fluidized bubble column 반응기에서는 앞에서 얻은 최적조건, 즉 배지조성으로 5%

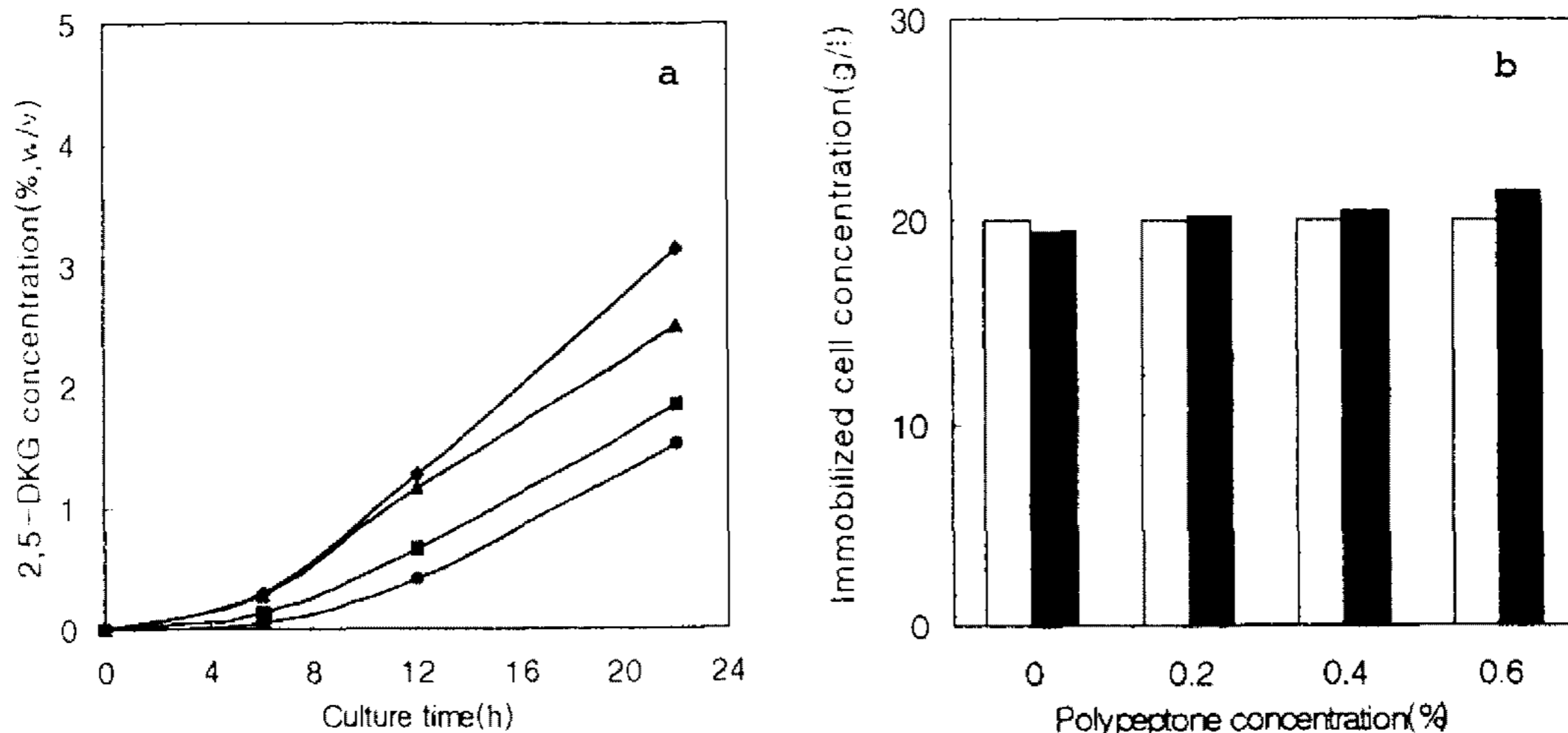


Fig. 7. Effect of polypeptone concentration on 2,5-DKG production and cell growth in fluidized bubble column reactors filled with immobilized cells.

a. Polypeptone conc.: ●, none; ■, 0.2%; ▲, 0.4%; ◆, 0.6%. b. Immobilized cell conc.: □, initial; ■, final.

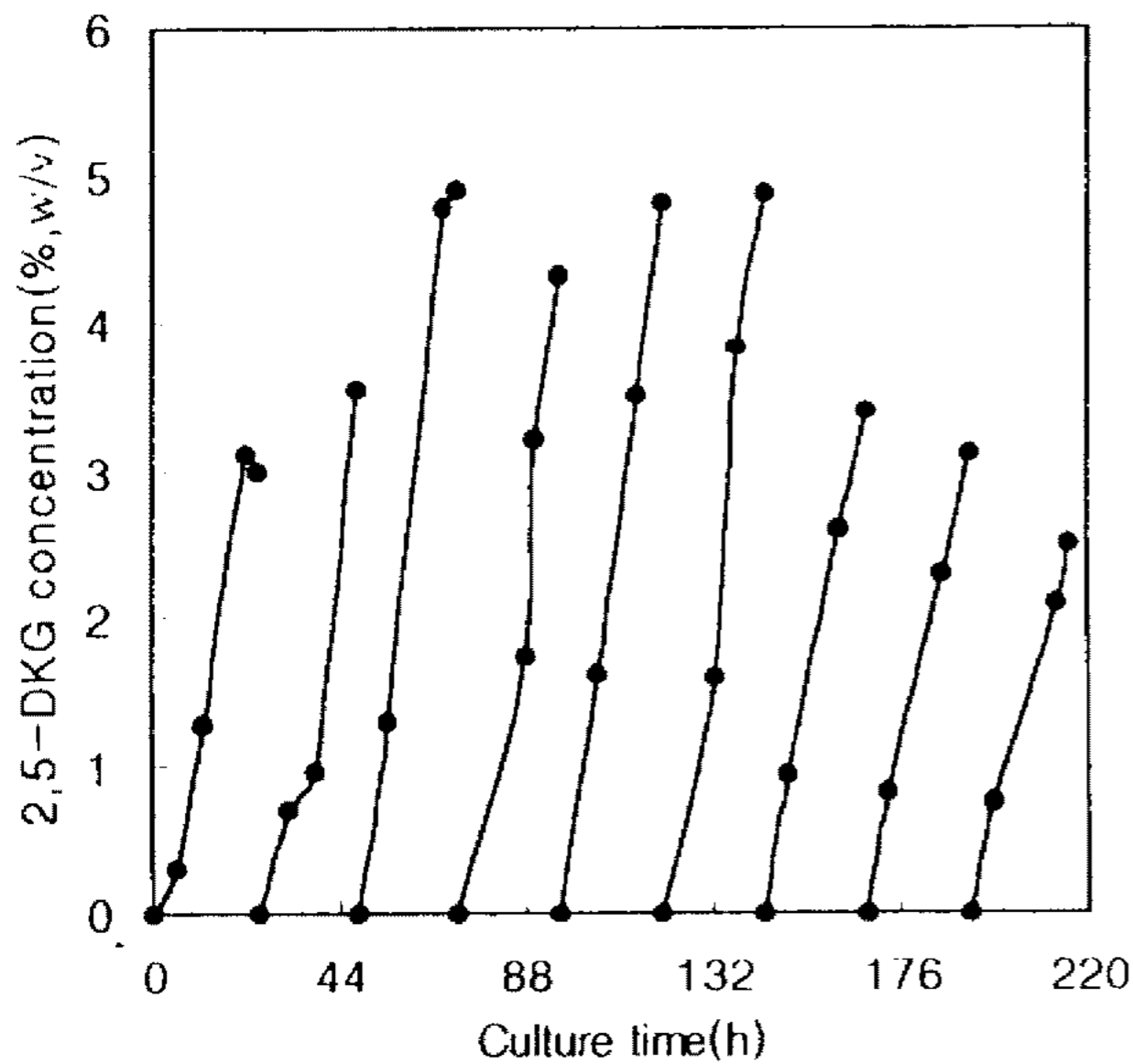


Fig. 8. Repeated batch fermentations of 2,5-DKG in a fluidized bubble column reactor.

The cultivated broth was removed at 24 h intervals and replaced by fresh medium.

glucose, 0.6% polypeptone 및 1.75% CaCO_3 , 공기공급속도 6 vvm으로 repeated batch fermentation을 수행하여 2,5-DKG 반복생산을 시도하였다. Fig. 8에서 보는 바와같이 반응기에서 24시간 동안 2,5-DKG를 발효생산한 후 새로운 배지로 교체하는 과정을 반복하여 약 150 시간에 걸친 6회의 repeated batch fermentation에서도 균체 활성이 유지되었으며, 80%(mol/mol) 이상의 높은 수율로 2,5-DKG가 생산되었다. 이는 기존 free cell 발효의 수율과 비슷한 것으로, 반복적인 발효를 통하여 지속적으로 2,5-DKG를 생산하는 기술은 산업적으로 실제 응용될 수 있는 가능성이 높다고 생각된다. 한편, 균체 고정화에 따른 담체내 기질의 diffusion 문제는 여전히 존재하므로, 앞으로 이를 해결하기 위하여 좀더 효율적인 균체의 고정화방법 개발이 요구될 것이다.

요 약

고정화 균체를 이용하여 비타민C 합성의 주요 중간체인 2,5-diketo-gluconic acid(2,5-DKG)를 효율적으로 생산하기 위하여 glucose로부터 2,5-DKG로의 발효반응 특성의 분석 및 효율적인 고정화균체의 발효공정을 개발하고자 하였다. Ca-alginate로 고정화된 균체를 2,5-DKG 생산에 이용할 때 고정화 담체내로의 기질의 diffusion 저해가 관찰되었고, 이러한 현상은 담체의 지름이 2 mm에서 다소 완화되어 가장 높은 2,5-DKG 수율이 얻어졌다. 고정화 균체의 장기적인 활성 유지는 질소원으로 polypeptone만을 1.75%(w/v) 첨가하여 가능하였다. 고정화균체를 충전한 fluidized bubble column

반응기에서 공기공급속도 6vvm으로 repeated batch fermentation를 6회 반복 수행하여도 균체의 활성이 유지되었으며, 80 mol% 이상의 수율로 2,5-DKG 생산이 가능하였다.

감사의 말

본 연구는 '95 G7 생명공학연구소 위탁과제 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 부분적으로 생물산업소재 연구센터의 지원을 받았으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Anderson, S., C.B. Marks, R. Lazarus, J. Miller, K. Stafford, K. Stafford, J. Seymour, D. Light, W. Rastetter and D. Estell. 1985. Production of 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis by a genetically modified *Erwinia herbicola*. *Science* **230**: 144-149.
- Katznelson, H., S.W. Tanenbaum and E.L. Tatum. 1953. Glucose, gluconate, and 2-keto-gluconate oxidation by *Acetobacter melanogenum*. *J. Biol. Chem.* **204**: 44-59.
- Stroshane, R.M. and D. Perlman. 1977. Fermentation of glucose by *Acetobacter melanogenum*. *Biotech. Bioeng.* **19**: 459-465.
- Weenk, G., W. Olijve and W. Harder. 1984. Ketogluconate formation by *Gluconobacter sp.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 400-405.
- Buse, R., G.N. Qazi, M. Trager and U. Onken. 1990. Influence of dissolved oxygen tension on the production rate of 2,5-diketo-gluconic acid by *Gluconobacter melanogenum*. *Biotechnol. Lett.* **12**: 111-116.
- Qazi, G.N., R. Parshad, V. Verma, C.L. Chopra, R. Buse, M. Trager and U. Onken. 1991. Diketo-gluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**: 504-507.
- Buse, R., G.N. Qazi and U. Onken. 1992. Influence of constant and oscillating dissolved oxygen concentrations on keto acid production by *Gluconobacter oxydans* subsps. *melanogenum*. *J. Biotechnol.* **29**: 231-244.
- Buse, R., U. Onken, G.N. Qazi, N. Sharma, R. Parshad and V. Verma. 1992. Influence of dilution rate and dissolved oxygen concentration on continuous keto acid production by *Gluconobacter oxydans* subsp. *melanogenum*. *Enzyme Microb. Technol.* **14**: 1001-1006.
- Qazi, G.N., N. Sharma and R. Parshad. 1993. Role of dissolved oxygen as a regulator for the direct oxidation of glucose by *Erwinia herbicola* and *Gluconobacter oxydans*. *J. Ferm. Bioeng.* **76**: 336-339.
- Shama, N., and G.N. Qazi. 1994. Inhibition of glucose oxidation in *Erwinia herbicola* by a high concentration of dissolved O_2 . *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 393-395.
- Lazarus, R.A. and J.L. Seymour. 1986. Determination of 2-keto-L-gluconic and other ketoaldonic and aldonic acid produced by ketogenic bacterial fermentation. *Anal. Biochem.* **157**: 360-366.

12. Sonoyama, T., S. Yagi and B.K. Ageyama. 1988. Facultatively anaerobic bacteria showing high productivities of 2,5-diketo-D-gluconate from D-glucose. *Agric. Biol. Chem.* **52**: 667-674.
13. Sonoyama, T., H. Tani, K. Matsuda, B. Kageyama, M. Tanimoto, K. Kobayashi, S. Yagi, H. Kyotani and Kenji. 1982. Production of 2-keto-L-gulonic acid from D-glucose by two-stage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 1064-1069.
14. Shionogi and Co., Ltd. 1976. Process for preparing 2-keto-L-gulonic acid. US Patent 3,998,687.
15. Engasser, J.M. and C. Horvath. 1973. Effect of internal diffusion in heterogeneous enzyme systems: evaluation of true kinetic parameter and substrate diffusivity. *J. Theor. Biol.* **42**: 137-155.
16. Gosmann, B. and H.J. Rehm. 1986. Oxygen uptake of microorganisms entrapped in Ca-alginate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 163-167.
17. de Alteriis, E. and V. Scardi. 1990. Mechanical stability and diffusional resistance of a polymeric gel used for biocatalyst immobilization. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 539-545.

(Received 24 September 1996)