

# Vitamin C의 발효 생산에 관한 연구(Ⅱ)

1990. 5

연구책임자 : 고영희 (미생물자원연구실)

연구원 : 서영배 (미생물자원연구실)

한동초 (미생물자원연구실)

김성숙 (미생물자원연구실)

한국과학기술연구원  
부설 유전공학센터



## 배 포 선

사 분 번 호	부 수	배 포 처
1/12 ~ 2/12	2	유전공학센터 연구관리과 영구보존용
3/12	1	유전공학센터 연구관리과 참 고 용
4/2 ~ 5/12	2	유전공학센터 연구관리과 보 관 용
6/12 ~ 7/2	2	유전공학센터 미생물 자원연구실
8/12 ~ 12/12	5	조선비료공업주식회사



# 제 출 문

조선비료공업주식회사 귀하

본 보고서를 “Vitamin C의 발효 생산에 관한 연구” 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1990. 5.

한국과학기술연구원 부설 유전공학센터  
소장 한 문 희



## 머 리 말

본 연구는 의약품 뿐만아니라 식품보존제 또는 식품첨가제로서 매년 그 수요가 증가하고 있는 Vitamin C를 발효생산하기 위하여 sorbitol 및 sorbose로부터 ascorbic acid의 중간대사물인 2-keto-L-gulonic acid(2KLG)의 발효에 관한 연구를 수행한 것이다. 현재 Vitamin C는 glucose에서 sorbitol 및 sorbose를 거쳐 화학합성적 방법으로 생산하고 있으나 근래에는 미생물 발효방법으로 glucose에서 2KLG를 생산하거나 sorbose로부터 2KLG를 생산하여 ascorbic acid로 전환시키기 위한 연구가 거의 실용화단계에 이르렀으며 본 연구실에서도 이 연구의 2년차를 수행하여 실용화 연구를 위한 기초연구를 성공리에 수행하였다. 현재 우리나라는 Vitamin C의 전량을 외국으로부터 도입하고 있으며 앞으로도 원료의약품 뿐만아니라 청량음료의 수요량이 늘어나면서 그의 수요량이 증가할 것으로 보여 하루속히 Vitamin C의 국내생산이 이루어지도록 하여야 할 것이다.

본 연구를 지원해 주신 (주)조선비료와 관계자 여러분께 감사를 드린다.

미 생 물 자 원 연 구 실  
실 장 고 영 희





# 목 차

제 1 장 서 론 .....	7
제 2 장 실험 재료 및 방법 .....	13
제 1 절 실험 재료 .....	13
1. 사용균주 .....	13
2. 실험 재료 .....	13
제 2 절 실험 방법 .....	13
1. Sorbitol로부터 L-Sorbose를 생산하는 미생물의 분리 및 동정 .....	13
2. L-Sorbose로부터 2-Keto-L-gulonic acid를 생산하는 미생물의 분리 및 동정 .....	15
3. 대사 산물의 검출 및 확인 .....	17
4. 2-Keto-L-gulonic acid의 생산 .....	17
제 3 장 실험 결과 및 고찰 .....	18
1. Sorbitol로부터 L-Sorbose를 생산할 수 있는 미생물의 선별 및, 선정된 균주에 의한 L-Sorbose 생산 .....	18
2. L-Sorbose로부터 2-Keto-L-gulonic acid를 생산할 수 있는 미생물의 선정 .....	20
3. 선정된 미생물에 의한 2-Keto-L-gulonic acid의 생산...	20
참 고 문 헌 .....	28



# 제 1 장 서 론

Vitamin C 는 ascorbic acid의 통상명이며, 거의 대부분의 동식물은 ascorbic acid를 합성할 수 있으나 사람과 몇몇 동물들은 L-gulonolactone oxidase의 결여에 의해 합성할 수 없어, 외부로부터 공급이 필요한 수용성 필수 vitamin이다 (1). L-Gulonic acid로부터 유도된 백색 결정성 물질인 L-ascorbic acid는 D-glucose로부터 생물학적 혹은 화학적으로 합성되어질 수 있다.

L-Ascorbic acid의 화학적 특성은 산화된 형태인 dehydroascorbic acid와 redox system을 이루는 것으로 이 system이 ascorbic acid로 하여금 생체내 활성을 갖도록 한다고 보고되었다(2).

Ascorbic acid의 물리적 성질은 Table 1에 나타나 있다.

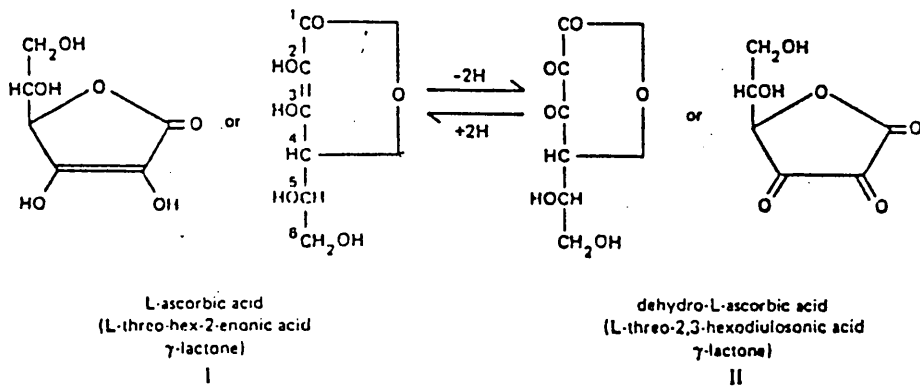


Table 1. Physical properties of L-Ascorbic Acid.

성 질	특 성
1. 형 태	백색 무취의 결정성 고체
2. 분 자 식	$C_6H_8O_6$ , 분자량 176.13
3. 녹 는 점	190-192°C (decomposition)
4. 밀 도	1.65
5. 편 광 회 절	$[\alpha]_D^{25} +20.5^\circ \sim 21.5^\circ$ (C=1, H <sub>2</sub> O) $[\alpha]_D^{23} +48^\circ$ (C=1, MeOH)
6. pH	3(5mg/ml); 2(50mg/ml)
7. pH <sub>1</sub>	4.17
8. pH <sub>2</sub>	11.57
9. 산화환원전위	First stage; E <sub>0</sub> +0.166V (pH 4)
10. 용 해 도	1) 3ml H <sub>2</sub> O, 30ml 의 95% Ethanol, 50ml 의 absolute Ethanol, 100ml 의 glycerol, 혹은 20ml 의 propylene glycol 에 Ascorbic acid 1g 녹음 2) Ether, Chloroform, Benzene, Petroleum ether, Oils, Fats, fat solvents 에 녹지않음

Ascorbic acid 의 괴혈병 예방, 치료 및 다른 생리활성에 대한 분자 구조 수준에서 연구는 진행되고 있으며 그 예는 다음과 같다. Ascorbic acid 는 동식물에서의 세포내 호흡, 탄수화물의 생합성 및 식물체에서의 수소전달, 피부 연결조직의 주요성분인 collagen 합성시 이에 관계되는 hydroxylase 의 보호, Steroid, Drug, Lipid 초기대사에 관련된 hydroxylase 의 보호, 심장, 근육, 간 등의 성분인 Carnitine 의 합성시 Lysine 및 Methionine 의 hydroxylase 보호, 뇌 및 신경조직에서의 L-tyrosine 의 대사, 금속이온의 환원, chelating 에 의한 흡수, 분배에 관여하며, 산소로부터 유래된 독성이 있는 free radical 의 제거, 백혈구의 면역작용 및

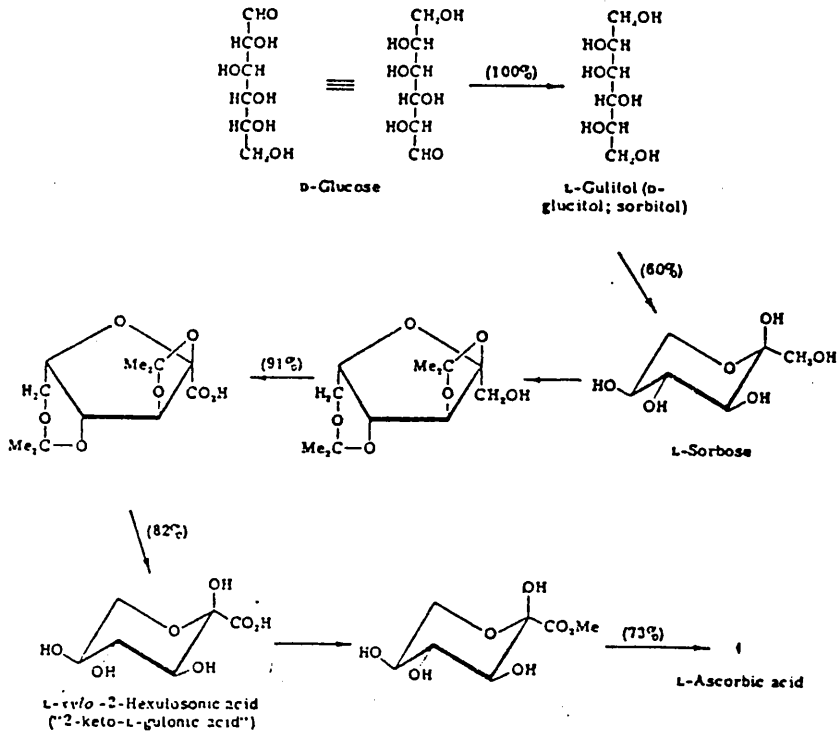
항균작용 등에 관여되는 것으로 보고되었다(1).

이러한 ascorbic acid에 대한 연구는 고대 이집트, 그리스, 로마인의 ascorbic acid 결핍에 의한 괴혈병의 병원인학, 치료, 예방에 의해 시작되었으며, 괴혈병 치료의 가능성은 새로운 대륙의 인디안들에 의해 발견된 것으로 전해지며 그들은 동절기에 괴혈병을 예방하기 위해 상록수 잎의 추출물을 사용하였다. 그후 Zilva 등은 1910년부터 1921년 사이의 레몬으로부터 crude vitamin을 정제하였으며(3), 이것은 쉽게 산화되고 2,6-dichloro-indophenol을 환원시키는 “reducing factor”로 항괴혈병 물질과 관련이 있는 것으로 추정하였다.

순수한 ascorbic acid의 정제는 Szent-Gyorgi에 의해 이루어졌으며, 이것이 항괴혈병 물질인 “reducing factor”라는 것을 밝혔다(4). Haworth와 Szent-Gyorgi는 이 “reducing factor”를 항괴혈성을 의미하는 ascorbic acid라 명명하였으며 1937년 ascorbic acid에 대한 연구업적으로 Nobel prize를 수상하였다.

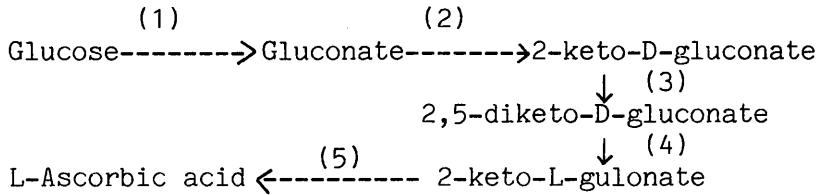
Ascorbic acid를 최초로 합성한 사람은 Reichstein(5) 등과 Haworth(6) 등으로 각각 독자적으로 1937년에 연구가 이루어졌다. Ascorbic acid의 화학적 제조방법은 Reichstein의 방법이 주종을 이루는 바 반응식을 약술하면 다음과 같다.

반응식의 공정중 D-sorbitol로부터 L-sorbose를 만드는 방법에 있어서 sorbose 이외의 다른 부산물이 얻어지는 화학적 산화법보다는 미생물 발효에 의한 방법이 유리하여 현재 발효에 의해 수행되고 있다. 그리고 L-sorbose로부터 Ascorbic acid까지의 합성은 발효에 의한 생물학적 방법보다는 Reichstein법에 의한 화학적 방법이 보고된 이래로, 이 방법에 수정을 가한 보문들이 많이 보고되고 있으며, 현재 까지도 이를 공업적인 방법으로 사용하고 있다.



이 과정에서 ascorbic acid 합성의 중요한 중간체인 2-keto-L-gulonic acid를 미생물에 의해 D-glucose로부터 혹은 L-sorbose로부터 합성하려는 연구도 활발히 진행되고 있다.

T. Sonoyama 등이 보고한 two stage 발효법은 D-glucose를 미생물에 의해 2,5-diketo-D-gluconate로 전환한 후 또 다른 미생물에 의해 2-keto-L-gulonic acid까지 전환하는 방법(10)으로 이들 방법을 반응식으로 표시하면 다음과 같다.



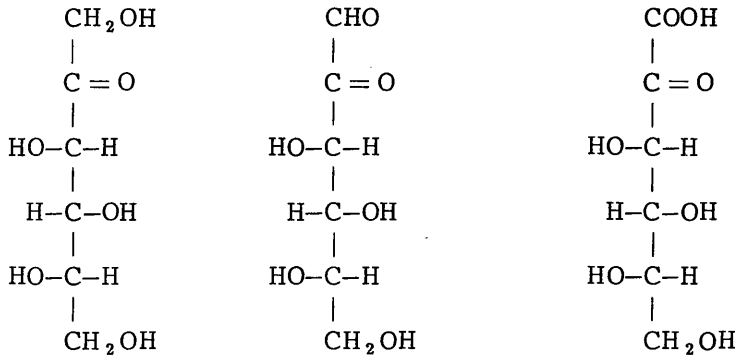
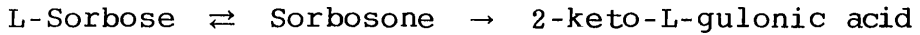
- (1), (2), (3) : Oxidation by *Erwinia* sp.  
 (4) : Reduction by *Corynebacterium* sp.  
 (5) : Lactonization by Chemical process.

D-glucose를 2,5-diketo-D-gluconic acid로의 전환능력이 있는 미생물로는 *Acetobacter*, *Erwinia*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas* 등이 있으며(11,12) 2,5-diketo-D-gluconic acid를 2-keto-L-gulonic acid로 환원시킬 수 있는 미생물로는 *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* 등이 있다(13). 그러나 최근에는 유전공학이 발달되면서 유전자 조작 기술에 의하여 2 단계의 미생물 배양을 한 미생물 시스템에서 이루어지게 함으로써 더욱 간단한 생산방법이 실용화를 위해 추진되고 있다. Anderson 등은(13) *Corynebacteria*의 2,5-diketo-D-gluconate reductase 유전자를 *Erwinia herbicola* 세포내로 도입하여 glucose로부터 한단계 발효에 의한 2-keto-L-gulonic acid 생산을 시도하였으며 Grindley 등은(14) *Corynebacteria*의 2,5-diketo-D-gluconate reductase 유전자를 *Erwinia citreus* 세포내로 도입하여, glucose로부터 2-keto-L-gulonic acid로의 전환율이 높은 새로운 균주 육종에 성공하였다.

그러나 이 균주는 ascorbic acid 합성의 중간 물질인 2-keto-L-gulonic acid를 산업적으로 생산하기에는 전환율이 충분하지 못하다.

현재 가장 높은 전환율을 가지고 있는 균주는 일본 Takeda company에서 개발한 미생물로서, 이 균주(*Pseudogluconobacter saccharoketogenes*)는 L-sorbose로부터 2-keto-L-gulonic acid를 160 mg/ml의 수율로 생산한다(15).

이 균주는 L-sorbose의 알콜기를 알데하이드를 거쳐 산으로 직접 산화시키는 sorbosone pathway를 갖고 있다고 보고되었다.



L-Sorbose를 L-sorbosone으로 전환되는 반응은 가역반응으로 *Pseudomonas putida* ATCC21812의 경우 soluble fraction에 효소가 존재한다고 보고되었으며, L-sorbosone이 2-keto-L-gulonic acid로의 전환반응은 *Glucomobacter melanogenus* IFO3293 및 *Pseudomonas putida* 균주의 particulate enzyme에 의해 촉매된다고 보고되었으며 전체 반응의 속도는 L-sorbosone 생성 속도에 의해 결정된다고 보고되었다(16,17).

본 연구에서는 D-sorbitol을 L-sorbose로의 전환 및 L-sorbose를 2-keto-L-gulonic acid로 전환시킬 능력이 있는 새로운 미생물의 분리 및 선정, 선정된 미생물에 의한 ascorbic acid의 전구체인 2-keto-L-gulonic acid의 생산을 시도하였다.



## 제 2 장 실험 재료 및 방법

### 제 1 절 실험 재료

#### 1. 사용 균주

Sorbitol을 L-sorbose 로 전환시키는 미생물 및 L-sorbose 를 2-keto-L-gulonic acid로 전환시키는 미생물들을 토양 sample, flowers, fruits, bees 등으로부터 분리하여 사용하였다.

#### 2. 실험 재료

실험에 사용된 무기염류, 용매 등은 시약특급을 사용하였으며, 균주의 배양에 사용된 배지들은 Difco 제품을, 분리용 수지는 Amberlite 를, TLC plate 는 Sigma Company 제품을 사용하였다.

### 제 2 절 실험 방법

#### 1. Sorbitol로부터 L-Sorbose 를 생산하는 미생물의 분리 및 동정

미생물 배양을 위한 완전 배지로는 Nutrient broth 배지(Nutrient broth dehydrated 8 g/ 증류수 1 l)를 사용하였다. 평판 고체 배지를 사용할 때는 agar를 1.5% 첨가하여 사용하였다.

L-Sorbose 생산 미생물의 screening 을 위한 배지(Sorbitol 배지)는 5 g의 sorbitol, 0.2 g의 yeast extract, 0.3 g의 peptone, 0.05 g의  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05 g의  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05 g의  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  및 2 g의 agar를 증류수 100 ml에 넣고 pH를 7.0으로 조정후 사용하였으며 균 분리 procedure는 그림 1에 도식화 하였다.

분리된 균주는 sorbitol 배지에서 3일간 배양하여 생성된 L-sorbose 에 의한 TLC에서의 발색 반응 및 환원력 측정 등을 통해 가장 전환율이

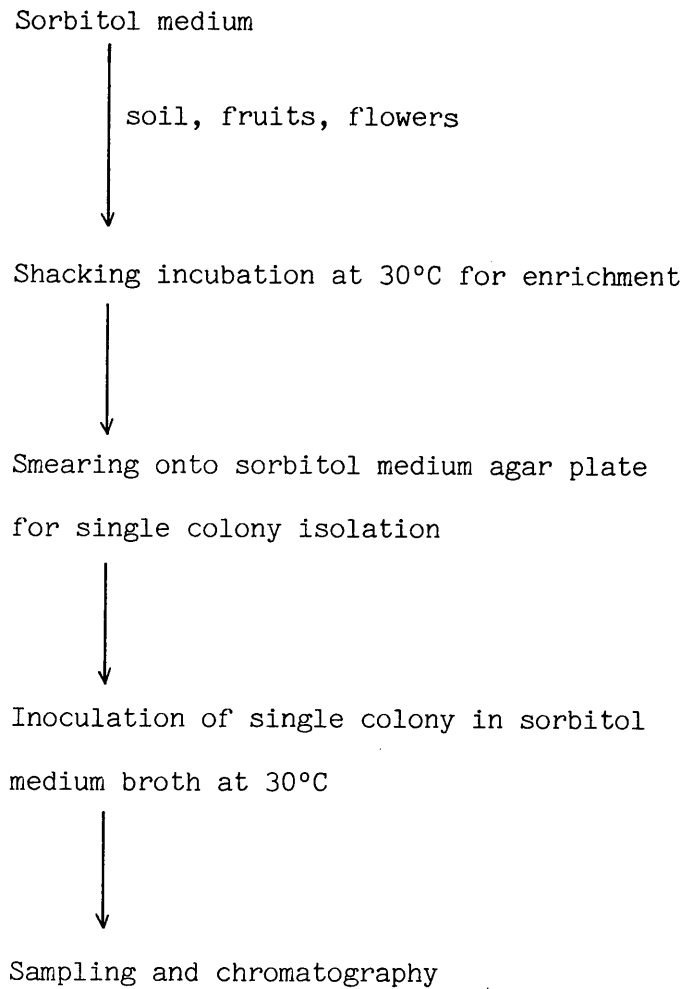


Fig.1. Schematic presentation for the isolation of L-sorbose producing bacteria.

높은 균주를 선별하였다. 분리된 균주의 동정은 Gram staining, 당이용성 조사 및 api kit를 이용하였다.

## 2. L-Sorbose로부터 2-keto-L-gulonic acid를 생산하는 미생물의 분리 및 동정

L-Sorbose로부터 2-keto-L-gulonic acid를 생산할 수 있는 미생물 분리를 위하여 soil, flowers, fruits, bees 등의 sample로부터 L-sorbose를 이용할 수 있는 미생물들을 enrichment 하였다. 이때 L-sorbose를 이용할 수 있을 뿐만아니라 acid를 생성하는 culture로부터 CaCO<sub>3</sub>가 첨가된 고체 평판 배지를 이용하여 단일 colony를 분리하여 실험에 사용하였다.

분리된 미생물들은 일차로 L-sorbose가 첨가된 배지에서 배양하여 acid 생성 유무를 확인한 후, 배양액을 Amberlite IR-120H 수지를 처리하여 free acid 상태로 전환한 후에 chromatography를 행하여 대사 산물을 확인하였다.

Chromatograph에서 2-keto-L-gulonic acid와 동일한 위치에 pink spot을 나타내는 미생물을 발효배지에서 배양한 후 조정제하여 HPLC로 확인하여 2-keto-L-gulonic acid 생산 균주를 선별하여 실험에 사용하였다.

2-keto-L-gulonic acid 생산 균주 enrichment 배지(L-sorbose 배지)는 1g의 L-sorbose, 0.2g의 yeast extract, 0.3g의 peptone, 0.05g의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05g의 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05g의 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O를 증류수 100 ml에 녹여 사용하였으며 고체 배지의 경우 agar를 1.5% 첨가하여 사용하였다. acid 생성 균주 분리용 배지는 3g의 L-sorbose, 1.5g의 peptone, 0.1g의 CaCO<sub>3</sub>에 agar 2g을 첨가하여 사용하였다.

2-keto-L-gulonic acid 생산 미생물의 분리과정은 그림 2에 도식화 하였다.

분리된 균주의 동정은 Gram staining, 당 이용성 조사 및 api kit를 이용하였다.

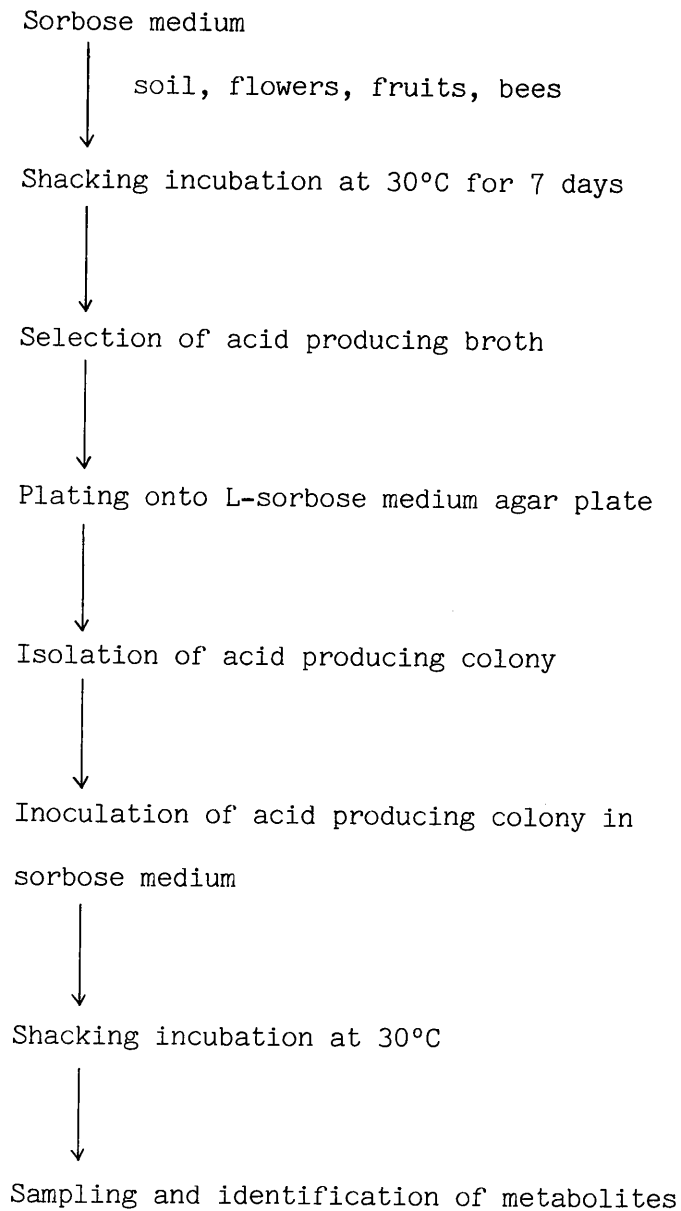


Fig.2. Schematic presentation for the isolation of 2-keto-L-gulonic acid producing bacteria.

### 3. 대사 산물의 검출 및 확인

미생물 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액에 Amberlite IR-120H 수지를 처리하여 유기산을 free acid 상태로 전환한 후 chromatography 를 행하였다. 전개 용매는 H<sub>2</sub>O saturated phenol, 발색시약은 p-Anisidium HCl 을 사용하였다.

Chromatography 로 검출된 metabolites 는 HPLC 로 확인하였다.

HPLC 에 사용된 용매는 0.2 N Ammonium formate, pH 3.0 를 사용하였으며, 분석용 column 은 Aminex A-27 resin 을 4.6 × 250 mm column 에 충전하여 사용하였으며 Refractive index detector 를 사용하였다.

### 4. 2-Keto-L-gulonic acid의 생산

2-Keto-L-gulonic acid 생산균주는 slant 상태로 보관하였으며, 사용하기 전에 activation 하여 사용하였다. slant 배지 조성은 2.5 g의 D-sorbitol, 1 g의 peptone, 1 g의 yeast extract, 0.2 g의 CaCO<sub>3</sub> 및 2 g의 agar 를 100 ml의 증류수에 녹여 pH 7.0 으로 조정하여 사용하였다. slant에서 한 백금니를 따서 종균 배지에 접종하여 activation 시킨 후 종균액으로 사용하였다.

종균 배지의 조성은 2 g의 glucose, 1 g의 peptone, 1 g의 yeast extract, 2 g의 CaCO<sub>3</sub> 를 증류수 100 ml에 녹여 사용하였다.

2-Keto-L-gulonic acid 생산은 발효 배지 25 ml에 종균액 1.5 ml 을 접종하여 30 °C에서 3일간 진탕 배양하였다. 발효 배지의 조성은 2 g의 C.S.L., 0.5 g의 yeast extract, 0.3 g의 ammonium sulfate, 0.05 g의 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.1 g의 FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.005 g의 CeSO<sub>4</sub>, 3.5 g의 CaCO<sub>3</sub> 및 10 g의 L-Sorbose 를 100 ml의 증류수에 첨가하여 사용하였다. 이때 L-sorbose 는 따로 멸균한 후 첨가하였다.

### 제 3 장 실험결과 및 고찰

#### 1. Sorbitol로부터 L-sorbose를 생산할 수 있는 미생물의 선별 및 선정된 균주에 의한 생산

서울 근교지역에서 채취한 sample을 sorbitol medinm에서 enrichment 및 screening을 거쳐 1차로 33 균주를 선별하였다.

분리된 균주를 sorbitol 발효배지에서 3일간 배양하여 생산된 L-sorbose에 의한 환원력을 측정하여 전환율이 가장 높은 균주를 선정하여 동정하였다. 선정된 ST-6 균주의 L-sorbose 생성은 chromatography 및 Nelson reagent에 의한 환원력 측정에 의해 90% 이상의 전환율을 나타내었다.

균주 ST-6의 특성은 Table 2에 나타내었으며 *citrobacter freundii*로 동정되었다. *citrobacter freundii* ST-6의 현미경 사진은 그림 3에 나타내었다.

Table 2. Characteristics of *Citrobacter freundii* ST-6.

Character	Result
ONPG (o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside)	-
ADH (arginine dihydrolase)	-
LDC (lysine decarboxylase)	-
ODC (ornithine decarboxylase)	-
Cit (citrate utilization)	-
H <sub>2</sub> S (H <sub>2</sub> S production)	-
URE (urease)	-
TDA (tryptophane desaminase)	-
IND (indole production)	-

Table 2. (continued)

Character	Result
VP (acetoin production)	-
GEL (gelatinase)	-
INO (inositol)	-
Sor (sorbitol)	+
AMY (amygdalin)	-
Oxidase (cytochrome oxidase)	-
Glu (glucose)	+
Man (mannitol)	+
Rha (rhamnose)	+
Sac (sucrose)	+
Mel (melibiose)	+
Ara (arabinose)	+
Gram staining	-



Fig.3. Micrograph of *Citrobacter freundii* ST-6.

## 2. L-Sorbose로부터 2-keto-L-gulonic acid를 생산할 수 있는 미생물의 선정

서울 근교지역에서 채취한 시료로부터 L-sorbose 배지에서 enrichment 및 CaCO<sub>3</sub> 첨가 plate 위에서 산 생성에 따른 clear zone 형성을 이용하여 약 15 균주를 일차로 선별하였다.

분리된 균주를 L-sorbose 발효배지에서 5일간 배양하여 배양액을 조정제하여 HPLC를 이용하여 2-keto-L-gulonic acid를 생산하는 2개의 균주를 선정하였다. 선정된 2개의 균주를 Gram Staining, 당 이용성 및 api kit반응 결과를 이용하여 동정한 결과 *Pseudomonas aeruginosa* B-8 및 *Serratia* sp. R로 나타났으며, 이들의 특성은 표3 및 표4에 표시하였다. 또 이들 균주의 현미경 사진은 그림 4 및 그림 5에 나타내었다.

## 3. 선정된 미생물에 의한 2-keto-L-gulonic acid의 생산

Sorbitol이 첨가된 slant에서 보관중인 *serratia* R 균주를 2g의 glucose, 1g의 peptone, 1g의 yeast extract, 2g의 CaCO<sub>3</sub>가 첨가된 종균배지에 한 백금니 접종하여 30℃에서 3일간 배양하여 배양액을 본 발효의 종균액으로 사용하였다. 본 발효는 종균액 1.5 ml을 20ml의 발효배지에 접종하여 30℃에서 3일간 배양하였다. *Serratia* sp. R 균주의 2-Keto-L-gulonic acid 생성 전환율은 약 2%로서 배양액내의 2-keto-L-gulonic acid의 농도는 2 mg/ml이었다.

Sorbitol이 첨가된 slant에 보관중인 *Pseudomonas aeruginosa* B-8 균주를 종균배지에 한 백금니 접종하여 30℃에서 3일간 배양하여 배양액을 본 발효의 종균액으로 사용하였다. 본 발효는 종균액 1.5 ml을 20ml의 발효배지에 접종하여 30℃에서 3일간 배양하였다. *Pseudomonas aeruginosa* B-8 균주의 2-keto-L-gulonic acid 생성전환율은 약 4%로 배양액내의 2-keto-L-gulonic acid 농도는 4 mg/ml이었다.

2-Ket-L-gulonic acid 생성전환율을 향상시키기 위하여 발효배지에 멸균된 *Bacillus megatererium* 배양액을 첨가하였다.



Table 3. Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* B-8.

Character	Result
Gram staining	-
Mobility	+
Oxidase	+
Catalase	+
Urease	+
Gelatin hydrolysis	-
Esculin hydrolysis	-
Nitrate reduction	+
$\beta$ -galactosidase	-
$\beta$ -galactosidase	-
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Indole production	-
Acetoin production	-
H <sub>2</sub> S production	-
Glucose acidification	-
Utilization of	
{ Glucose, N-acetylglucosamine, Citrate	+
{ Gluconate, Caprate, Adipate, Malate,	
{ Phenylacetate	
{ Arabinose, Mannose, Maltose	-
{ Amygdalin, Mellibiose, Sucrose	
{ Rhamnose, Sorbitol, Inositol	
{ Mannitol	

Table 4. Characteristics of *serratia* sp. R.

Character	Result
Gram staining	-
Mobility	+
Oxidase	+
Catalase	+
Urease	+
Gelatin hydrolysis	-
Esculin hydrolysis	+
Nitrate reduction	-
$\beta$ -glucosidase	-
$\beta$ -galactosidase	-
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Indole production	-
Acetoin production	-
H <sub>2</sub> S production	-
Glucose acidification	-
Utilization of	
• Arabinose, Glucose, Citrate	+
{ Mannose, Gluconate, Caprate	-
{ Malate, Phenylacetate, Mannitol,	
{ N-acetylglucosamine	

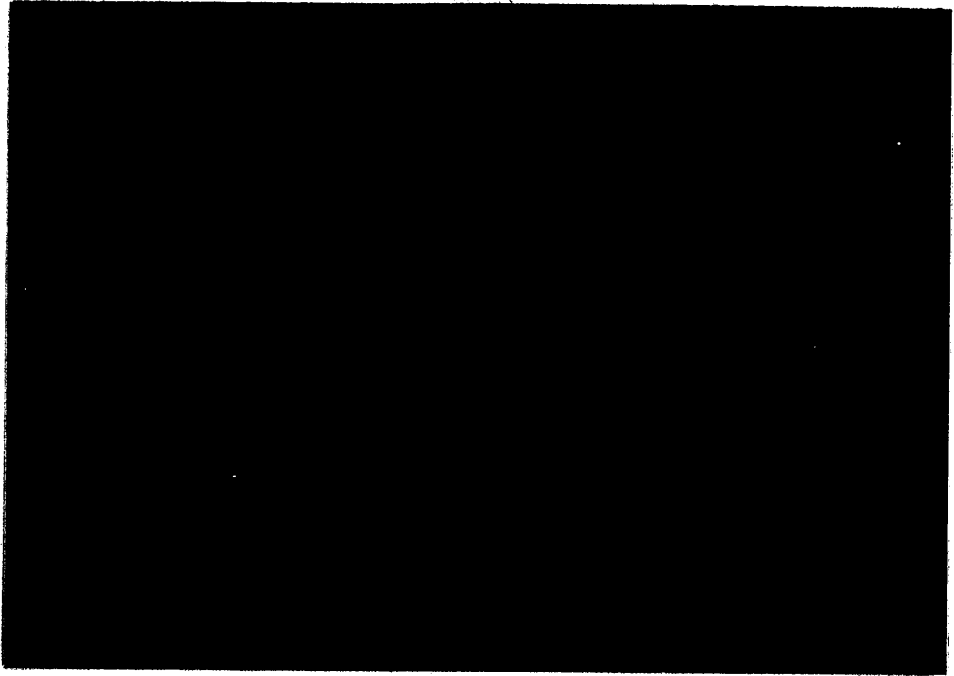


Fig.4. Micrograph of *Pseudomonas aeruginosa* B-8.

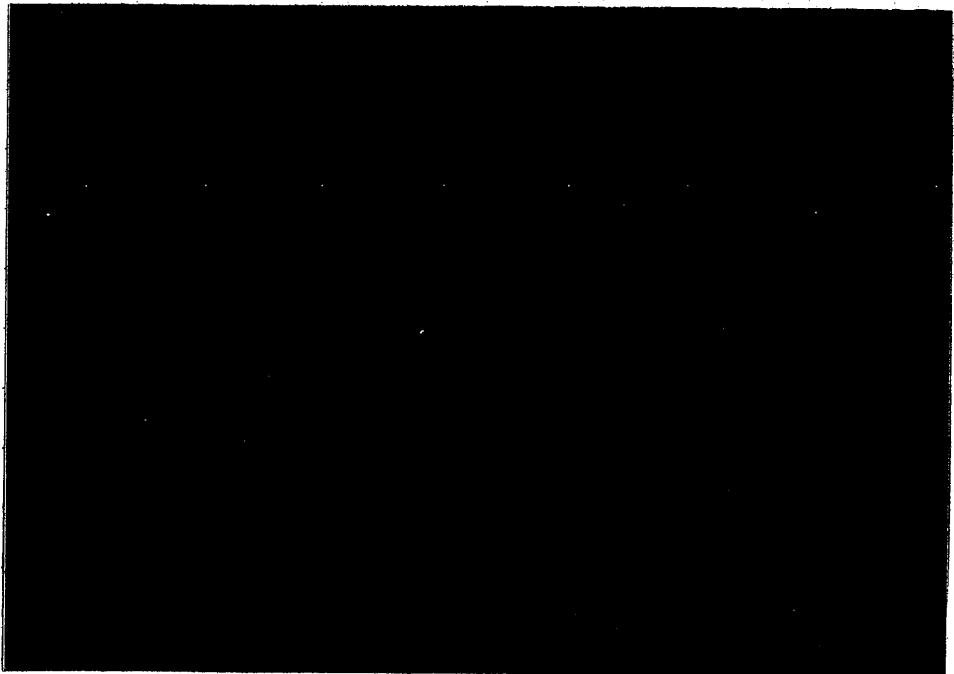


Fig.5. Micrograph of *Serratia* sp. R.

*Bacillus megaterium* KCTC 2178 을 사용하였으며, 배지로는 4 %의 sucrose, 4 %의 면실박, 0.65 %의  $K_2HPO_4$ , 0.55 %  $KH_2PO_4$ , 0.55 %  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.05 % NaCl, 0.05 %  $MgSO_4$ , 0.05 % Ca-pantothenic acid를 사용하였다. 멸균된 *Bacillus* 배양액의 첨가시기 및 첨가량에 따른 2-keto-L-gulonic acid 생성은 그림 6에 나타내었다.

이 실험에서 멸균된 *Bacillus* 배양액 5 ml를 배양초기에 넣고 4일 배양했을 때 넣지 않은 경우보다 약 29 %의 2-keto-L-gulonic acid 생성 전환율의 증가를 나타내었으며 배양액 내의 농도는 5.2 mg/ml이었다.

Slant 배지에 보관중인 *Serratia* sp. R 균주 및 *Pseudomonas acroginosa* B-8 균주 각각을 glucose가 첨가된 종균배지에서 활성화시킨후 L-sorbose가 첨가된 발효배지에 각각 1.5 ml씩 접종하여 배양하였다. 이때 이들의 2-keto-L-gulonic acid 생성전환율은 3일후에 각각 1 %

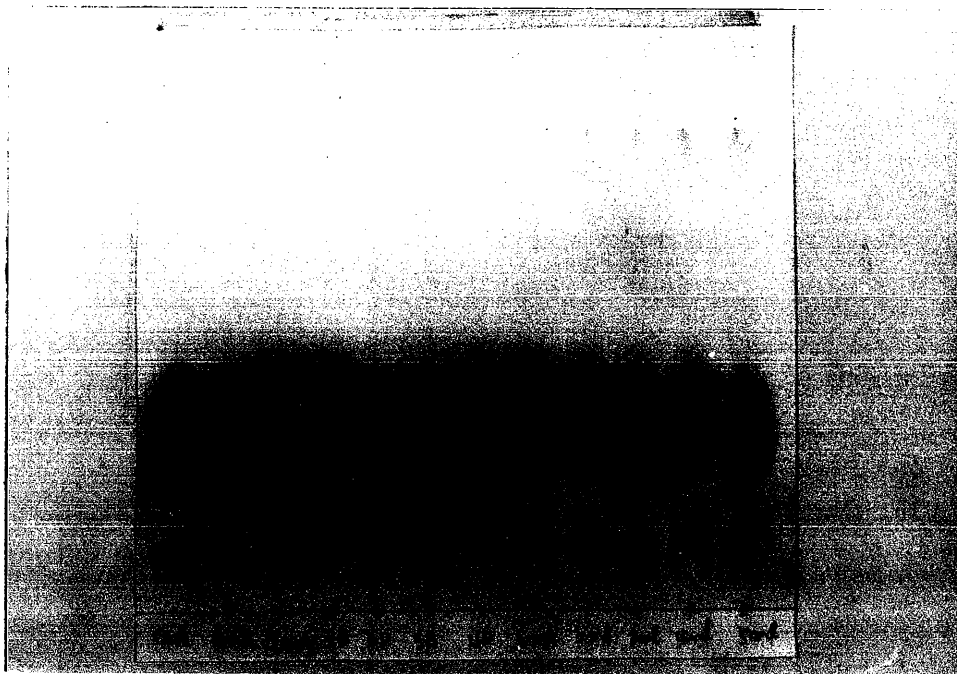


Fig.6. Effect of addition of sterilized *Bacillus* broth on the 2-keto-L-gulonic acid production.

및 2%이었다. 이들 3일씩 배양된 배양액을 한개의 삼각 flask에 옮긴 후 30℃에서 혼합배양하였다. 혼합배양을 2일간 한 후에 이들 두 균주에 의한 2-keto-L-gulonic acid 생성 전환율은 *Pseudomonas aeruginosa* B-8 균주에 비해 약 4배 증가하였으며(그림 7), 배양액내의 2-keto-L-gulonic acid의 농도는 16 mg/ml이었다. 배양액을 filtering한 후 HPLC 하였을 때의 chromatograph는 그림 8에 나타내었다.

이상의 결과로부터 *Serratia* R 균주 및 *Pseudomonas aeruginosa* B-8 균주는 sorbosone pathway를 갖고 있는 것으로 추정되었으며 혼합배양의 경우 각각의 균주는 sorbosone pathway 두단계 반응에 서로 상보적으로 작용하여 2-keto-L-gulonic acid 생산 전환율을 향상시키는 것으로 생각되었다.

따라서 2-keto-L-gulonic acid 생산 전환율의 획기적인 증가를 위해서는 두개의 균주를 fusion하여 한 균주내에서 sorbosone pathway의 두단계가 상보적으로 작용하도록 해야할 것으로 생각된다.

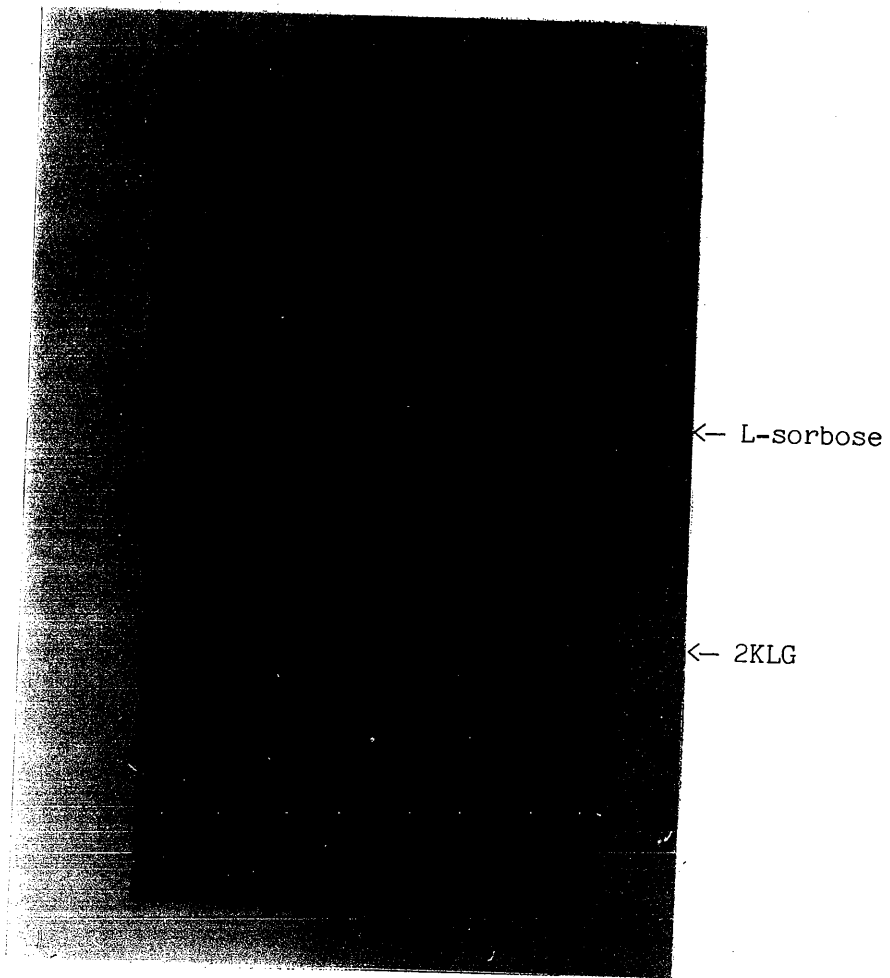


Fig.7. 2-keto-L-gulonic acid production with  
the mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa*  
B-8 and *Serratia* R.

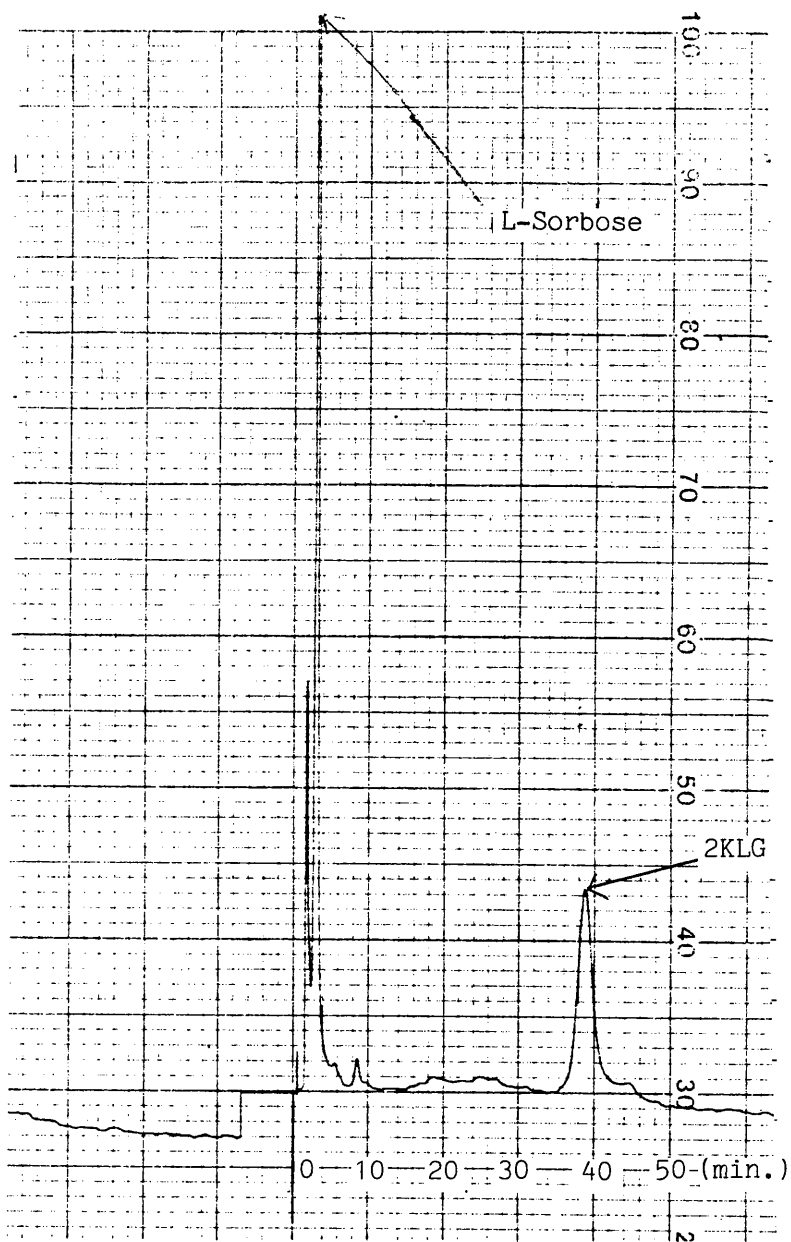


Fig.8. High performance liquid chromatogram of the mixed culture broth.

Mobile phase: 0.2N Ammonium formate, pH3.2

Flow rate : 1ml/min.

Column : Aminex A-27

## 참 고 문 헌

- (1) Hand Book of vitamins; Nutritional, Biochemical and Clinical aspects Edited by Lawrence, J. MaChlin Press, Marcel Dekker, Inc.
- (2) W.N. Haworth, Chem. Ind. (London), **52**, 482 (1933).
- (3) S.S. Zilva, Biochem. J., **21**, 689 (1927).
- (4) J.L. Svirbely and A. Szent-Gyorgyl, Nature (London), **129**, 576 (1932).
- (5) T. Reistein, A. Grussner, and R. Oppenaure, Nature (London), **132**, 280 (1933).
- (6) W.N. Haworth and E.L. Hirst, Chem. Ind. (London), **52**, 645 (1933).
- (7) Masao Isono, *et. al.*, Agr. Biol. Chem., **35**, 424 (1965).
- (8) Hisayoshi Okazaki, *et. al.*, Agr. Biol. Chem., **32**, 1250 (1968).
- (9) Misayoshi Okazaki, *et. al.*, Agr. Biol. Chem., **33**, 207 (1969).
- (10) T. Sonoyama, *et. al.*, App. Env. Microbiol., **43**, 1064 (1982).
- (11) Yoshiharu Wakisaka, Agr. Bio. Chem., **28**, 369 (1964).
- (12) Yoshiharu Wakisaka, Agr. Bio. Chem., **28**, 819 (1964).
- (13) Stephen Anderson, *et. al.*, Science, **230**, 144 (1985).
- (14) J.F. Grindely, *et. al.*, App. Env. Microbiol., **54**, 1770 (1988).
- (15) Takeda Chemical Industries, European Patent Application, 1988, Method for producing 2-keto-L-gulonic acid.
- (16) S. Makover, G.B. Ramsey, *et. al.*, Biotechnology and Bioengineering, **17** (1975).
- (17) C.K.A. Martin and D. Perlman, Biotechnology and Bioengineering, **18** (1976).