

## Inulinase와 투과성이 향상된 *Zymomonas mobilis*를 이용한 Jerusalem artichoke로부터의 sorbitol생산

김 인 철 · 전 억 한  
경희대학교 산업대학 식품가공학과

### Sorbitol production from Jerusalem artichoke by inulinase and permeabilized *Zymomonas mobilis*

In-Chul Kim, Uck-Han Chun

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

#### ABSTRACT

The use of Jerusalem artichoke containing  $\beta$ -1, 2-fructose oligomer in the production of sorbitol that is used as food additives and precursor for the L-sorbose has been studied. Coimmobilization of both inulinase and oxidoreductase was considered for the simultaneous reaction for hydrolysis of inulin and conversion of glucose and fructose liberated from inulin to sorbitol. Both inulinase and oxidoreductase were immobilized in chitin(5%, w/v) and K-carrageenan(4%, w/v). The activity of oxidoreductase was specified by permeabilization of *Zymomonas mobilis* cell with 0.2% CTAB(Cetyltrimethylammoniumbromide). The use of inulinase for hydrolysis of inulin resulted in 36.65 g/l of glucose and 85.32 g/l of fructose respectively. These are valuable substrates for sorbitol production. Using these hydrolyzates, accumulation of 35.64 g/l for sorbitol occurred at 38°C and pH6.2. When permeabilized cells and inulinase were coimmobilized, sorbitol produced at 30.15 g/l although it is low compared with 35.64 g/l in separated reactor system.

#### 서 론

*Zymomonas mobilis* cell은 glucose와 fructose를 기질로 이용하여 glucose-fructose oxidoreductase enzyme에 의해서 sorbitol과 gluconic acid를 생성한다.

Chun과 Rogers등(1)은 60% total sugar solution(300 g/l glucose and 300 g/l fructose)을 이용하여, 290 g/l의 sorbitol과 283 g/l의 gluconic acid를 생성하였다. Rehr(2), Viikari(3) 그리고 Barrow등(4)도 *Zymomonas mobilis* cell을 이용하여 sorbitol을 생산 하였고, Choi등(5)은 calcium alginate에 고정화하여서 7.5g/l-h(dilution rate 0.18h<sup>-1</sup>)의 sorbitol을 생산 하였다. Jerusalem artichoke는  $\beta$ -1, 2-fructose oligomer인 inulin을 12.1%(w/w)정도 함유하고 있으며, 작물의 높은 수율(10,

000-13,000lb/acre/year), 서리와 병충해에 강하며, 비료및 퇴비등의 시비가 거의 필요없고, 황무지에서 성장도 잘 되는 등의 장점을 지니고 있어서 중요한 작물로 관심의 대상이 되고있다(6-10). 또한 inulin은 acid화(11-15) inulinase에 의해서(16-19) glucose와 fructose로 가수분해된다. 가수분해된 Jerusalem artichoke로부터 *Zymomonas mobilis*에 의해서 sorbitol이 생산 될 수 있으며, 이때의 metabolic pathway를 Fig. 1에 나타내었다.

세포와 효소를 동시에 고정화 하여서 sorbitol생성에 관한 실험을 하였다. 이것은 하나의 반응기내에서 가수분해가 진행됨과 동시에 sorbitol이 생성되므로 공정을 간소화 시킬수 있다.

생성물을 *Acetobacter suboxydans*등의 균주를 이용하여서 L-sorbose로 전환할 수 있으며 이는 Vitamin C의 선구물질로 이용되어지고 있다.

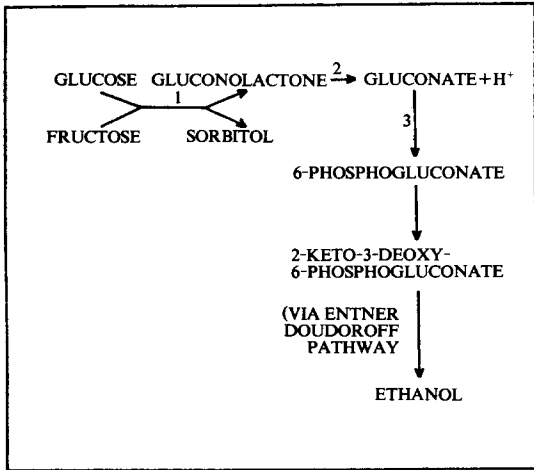


Fig. 1. Mechanism of sorbitol/gluconic acid production by CTAB-treated cell of *Z. mobilis*. The pathway from gluconate to ethanol is not functional if cells are fully permeabilized. The enzymes are 1; glucose-fructose oxido-reductase, 2; gluconolactonase, 3; gluconokinase.

재료 및 방법

균주 및 배지조성

본 실험에 이용된 균주는 *Zymomonas mobilis* ZM4(ATTC 31821)이며, 배지로서 100 g/l glucose, 1 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/l MgSO<sub>4</sub>, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 그리고 10 g/l yeast extract를 이용하였다. 배양온도는 32°C, pH 5.0이었다.

세포의 투과성 증진

배양된 세포를 원심분리하여 얻어진 세포를 0.2% CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromide)로 처리한 뒤 4°C에서 10분간 방치한후 다시 원심분리한후 상등액을 제거한 세포를 0.3% glutaraldehyde 용액으로 처리한 뒤 4°C에서 10분간 방치후 0.1M Kpi buffer 및 증류수로 세척하여 세포의 투과성을 향상시켰다. Glutaraldehyde는 enzyme 상호간의 cross-linking을 목적으로 이용하였다.

Jerusalem artichoke juice의 제조

Jerusalem artichoke를 수세하고 얇게 자른뒤 적

당량의 증류수를 첨가하여 juice를 만들었다. 1.2기압 121°C에서 15분간 살균한 뒤 filter paper(Advanced 5A)를 이용하여 filtration하고 살균하였다. 이를 냉동보관하여 저장하였으며 매 사용시 용해시켜 사용하였다.

Jerusalem artichoke의 가수분해

진황산을 이용하여 pH를 2.0으로 맞추어 반응시킨뒤 2N NaOH를 이용하여 pH 6.0으로 조절하였다. Enzyme에 의한 가수분해는 inulinase를 0.398% (v/v) 첨가하여 50°C에서 24시간 동안 반응시켰다.

Cell과 enzyme의 동시고정화

Hsu등(20)의 방법에 따라서 chitin을 6N HCl로 처리하여 4°C에서 하루동안 방치한뒤 0.1M acetate buffer(pH 5)로 수세하였다. 3% glutaraldehyde로 처리하고 25°C에서 하루동안 방치하여 acetate buffer로 수세하였다. Inulinase를 glutaraldehyde로 처리된 chitin에 혼합하여 1시간 동안 실온에서 방치한 뒤 4°C에서 24시간 보존한뒤 사용하였다. 이를 투과성이 증가된 세포와 혼합 한뒤 증류수에 용해된 K-carrageenan과 혼합하였으며 K-carrageenan이 굳는것을 방지 하기 위하여 40°C를 유지하였다. 10ml주사기를 이용하여 20 g/l KCl과 0.5 g/l CaCl<sub>2</sub>의 혼합 용액에 떨어뜨려서 beads를 만든후 1시간 동안 교반한뒤 Kpi buffer로 수세하였다. 이용된 세포는 6g, chitin 5g, K-carrageenan 3g, inulinase 3ml 이었으며, beads의 직경은 약 3-4mm이었고, KCl과 CaCl<sub>2</sub> 용액은 beads의 견고성을 증대 시키기 위하여 이용하였다.

분석 방법

Paper chromatography, HPLC, sorbitol test kit (Boehringer-Mannheim)를 이용하여 sorbitol의 농도를 분석하였다. paper chromatography에 사용된 전개용매는 ethylacetate, pyridine, 증류수를 12:5:4의 비율로 혼합하여 제조하였고 발색시약으로 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>가 함유된 1% KMnO<sub>4</sub>를 이용하였다. HPLC의 model은 Waters R401이었고, column은 Bio-Rad Carbohydrate HPX-87C를 사용하였으며 85°C의 온도를 유지하였다. Solvent의 유속은 0.6ml/min이었다.

결과 및 고찰

Jerusalem artichoke juice의 가수분해

Acid 또는 inulinase를 이용하여서 Jerusalem artichoke juice를 가수분해 하였다. 희석농도에 따른 산 가수분해도를 측정 하기 위하여 40% (v/w, water/J. artichoke tubers), 50% (v/w), 70% (v/w) 및 100% (v/w)의 juice를 만든후 각각의 juice의 pH를 2.0으로 고정 하여 가수분해를 하였다. Jerusalem artichoke juice 100g당 glucose와 fructose의 yield를 Fig. 2에 나타내었다.

온도에 따른 Jerusalem artichoke juice의 산 가수분해도를 측정 하기 위하여 40% (v/w) Jerusalem artichoke를 50℃, 70℃, 85℃에서 각각 가수분해 하였으며 Fig. 3에 나타냈듯이 85℃에서 가수분해가 빠르게 일어났다. Total carbohydrate의 생성에 있어서 Allais등(16)은 43% (v/w)의 물이 첨가 되었을때 최적으로 보고한바 있다.

산과 inulinase에 의한 가수분해도를 비교하기 위하여 40% (v/w)의 Jerusalem artichoke juice를 사용하여 inulinase에 의한 가수분해 실험을 행하였으며, 0.2ml(0.389%, v/v)를 첨가하여 50℃에서 24시간 반응시킨 결과 최대 가수분해도를 나타내었다(Table 1). Acid에 의한 가수분해에 비하여 inulinase에 의한 가수분해시 total sugar생성이 약 1.6 배 높았으며 121.97 g/l의 total carbohydrate가 생성 되었다. 이는 Allias등(16)이나 Marchal등(21)의 가수분해 결과(110 g/l)와 비교하여 높은 값이다. glucose와 fructose의 생성 비율은 약 30:70이었다.

Sorbitol 생산조건을 최적화

*Aspergillus ficuum*으로 부터 추출한 inulinase의 최적 반응 온도는 60-65℃이고(22), fructose를 sorbitol으로 전환하는 glucose-fructose oxidoreductase의 최적온도와 pH는 각각 38℃, 6.2로 보고 되었다(23). 따라서 동시고정화를 위해서 새로운 최적조건이 요구된다. 40% (v/w), 50% (v/w), 70% (v/w)의 Jerusalem artichoke 50ml를 32℃, 35℃, 38℃ 그리고 41℃에서 0.2ml의 inulinase 및 3g의 투과성이 증대된 *Zymomonas mobilis*와 함께 sorbitol생성에 관한 실험을 행하였다. Table 2에 나타냈듯이 sorbitol생산에 필요한 glucose-fructose oxidoreductase의 최적온도인 38℃에서 40% (v/w)의

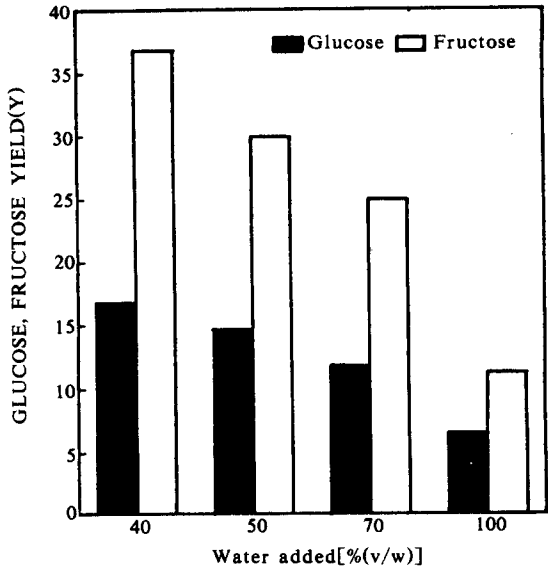


Fig 2. Sugars fromed by acid hydrolysis at 85°C. The yield was calculated on the basis of sugars(glucose+fructose)formed/100g of artichoke juice.

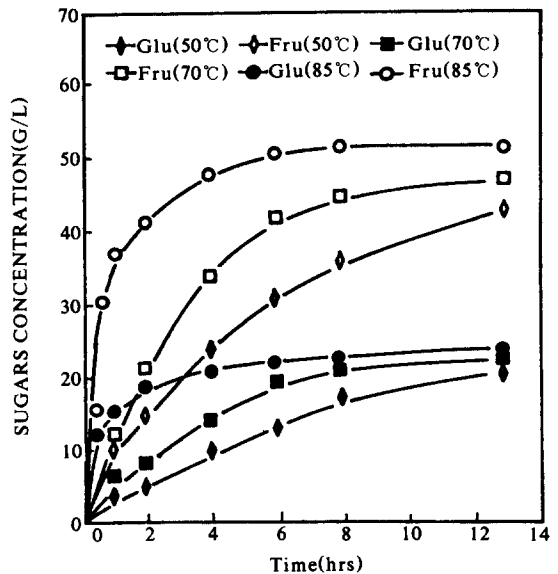


Fig 3. Liberation of sugars from 40% (v/w) J. artichoke juice by acid hydrolysis.

Jerusalem artichoke juice로 부터 최대치의 sorbitol을 얻었다.

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

Inulinase loaded(ml)	Liberated sugars		
	Glucose conc.(g/l)	Fructose conc.(g/l)	Total (conc.(g/l))
0.2	36.65	85.32	121.97
0.48	33.80	78.30	112.10
0.75	30.94	85.80	116.74
1.00	30.95	79.00	109.95

Table 2. Sorbitol formation from 40%(v/w) Jerusalem artichoke juice with both inulinase and permeabilized cells for 16hrs at 32°C, 35°C, 38°C and 41°C. Inulinase used was 0.2ml and pH was not controlld.

Reaction temp.(°C)	Glucose conc.(g/l)	Fructose conc.(g/l)	Sorbitol conc.(g/l)	Conversion eff.(%)
32	—	48.5	9.5	16.38
35	—	57.5	8.6	13.01
38	—	57.0	15.2	21.05
41	—	40.4	13.1	24.48

Sorbitol생성에 있어서 최적 pH는 Fig. 4에 나타낸것과 같이 6.2이었으며, 이때의 반응온도는 38°C 이었다. 즉 이는 oxidoreductase에 의한 반응이 limiting step이라고 사료된다.

Chun과 Rogers(1), Leigh(24), 그리고 Viikari (25)등이 *Zymomonas mobilis*를 이용한 fructose로부터 sorbitol의 생성에 대한 mechanism을 보고 하였다(Fig. 1). 정상적인 *Zymomonas mobilis* cell은 glucose에서 gluconolactone을 생성하고 Entner-Doudoroff pathway를 거쳐서 ethanol을 생성하며 sorbitol은 부산물로서 생성 된다. 그러나 cell의 투과성을 향상시키면 조효소등이 유실 되므로 ED pathway의 정상적인 대사가 이루어 지지 못하며, 따라서 sorbitol이 주로 생성 된다. Sorbitol은 fructose로부터 glucose-fructose oxidoreductase에 의한 환원 작용으로 생성 되므로 전자 공여체로서 glucose가 필요하며 glucose와 fructose의 양이 동일할때 최대의 sorbitol을 얻을수 있다. Glucose가 glu-conolactone으로 전환될때 이탈된 수소가 fructose를 sorbitol로 환원시키며, 따라서 산화 환원반응이 일어난다. Jerusalem artichoke juice의 가수분해시 glucose와 fructose의 생성 농도가 상이 하므로 추가적으로 glucose를 첨가 하였으며 첨가한 glucose의 농도를 35 g/l에서 65 g/l까지 변화시켜서 실험한 결과 glucose의 농도가 55 g/l일때 41.25%의 conversion efficiency를 얻었다(Table 3).

Table 3. Sorbitol formation from 50ml of Jerusalem artichoke juice(40%, v/w) containing additional glucose at 38°C, pH 6.2. Reaction time= 15h. Inulinase loaded was 0.2ml.

Glucose added. (g/l)	Sorbitol conc. (g/l)	Conversion eff. (%)
35	27.95	39.00
45	33.00	40.41
55	35.64	41.25
65	36.13	39.36

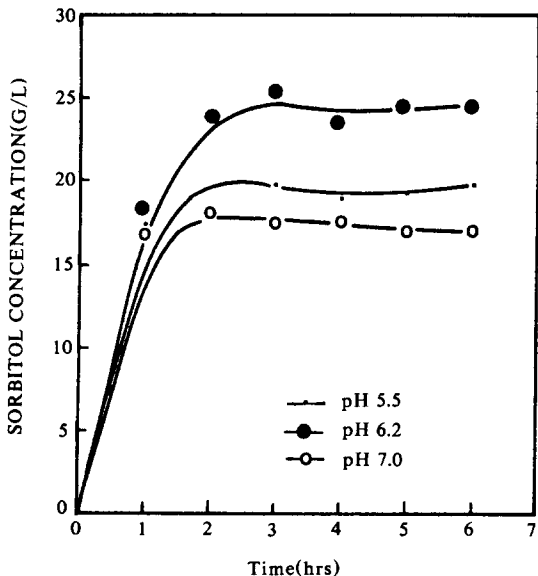


Fig. 4. Optimization of pH for sorbitol formation from 50ml of 40%(v/w) J. artichoke juice at the optimum temperature of 38°C. Inulinase loaded was 0.2ml.

*Zymomonas mobilis* cell과 inulinase의 동시 고정화

Jerusalem artichoke juice로 부터 sorbitol을 생성하기 위해서는 가수분해에 의해서 glucose와 fructose를 생성하고, 이로 부터 sorbitol을 생성하게 된다. 이와같은 2단계의 반응을 1단계로 줄이기 위하여 inulinase와 투과성이 향상된 *Zymomonas mobilis*를 동시에 고정화 하였다. 회분식 반응기를 사용 하

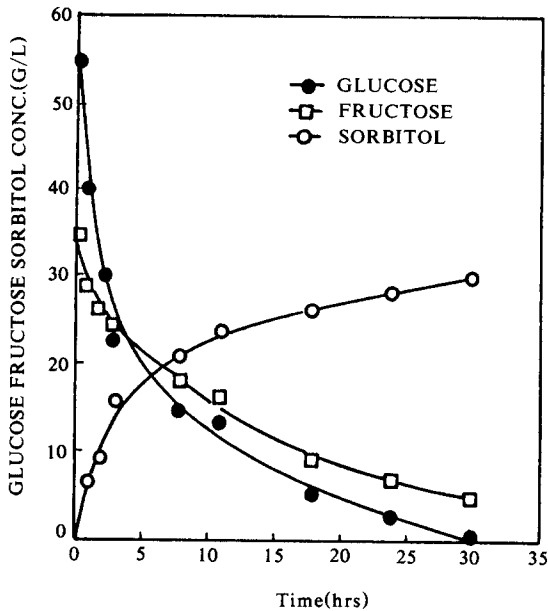


Fig. 5. Sorbitol formation by coimmobilization at 38°C. Inulinase loaded was 3.0ml, Glucose added was 35(g/l).

였으며 pH와 온도는 각각 6.2, 38°C이었다. 반응기 내의 Jerusalem artichoke juice의 양은 80ml이었으며 30.15 g/l의 sorbitol을 생성 하였다(Fig. 5). 이때의 conversion efficiency는 total glucose를 기준으로 계산 하여 32.89%로 나타났다. 이와같은 동시 고정화방법을 이용하여 Kim등은(17) Jerusalem artichoke로 부터 ethanol을 생산 하였다.

## 요 약

식품첨가물 등으로 이용 되어지는 sorbitol을  $\beta$ -1, 2-fructose oligomer를 함유하고 있는 Jerusalem artichoke를 이용하여 생산 하였으며, 이는 L-sorbitol 생산에 있어서 전구물질로 이용된다. Inulinase와 oxidoreductase의 동시고정화하여, inulin을 glucose와 fructose로 가수분해함과 동시에 가수분해산물 물을 sorbitol로 전환시켰다. Inulinase와 oxidoreductase는 chitin(5%, w/v)과 K-carrageenan(4%, w/v)으로 고정화 시켰다. 0.2% CTAB (Cetyltri-methylammoniumbromide) 처리에 의해서 투과성이 향상된 *Zymomonas mobilis* 세포내에 함유 되어있는 oxidoreductase의 activity가 향상되었다.

Jerusalem artichoke juice를 acid에 의한 가수분해에 의해서 40% (v/w) juice 100ml당 53.64의 total carbohydrate yield를 얻었고, 온도 변화에 따른 가수분해시 85°C에서 반응이 신속히 일어났다. Inulinase를 이용한 가수분해에 의하여 36.56 g/l의 glucose와 85.32 g/l의 fructose가 생성되었으며, sorbitol 생성에 기질로 이용되었다. Inulinase와 *Z. mobilis* 세포의 동시고정화 반응기에서 30.15 g/l의 sorbitol을 생성 하였으며, 이는 동시고정화를 하지 않았을때의 sorbitol생성 농도(35.64 g/l)보다 낮았다.

## 참고문헌

1. U. H. Chun and P. L. Rogers(1988), Appl. Microbiol. Biotechnol., **29**, 19.
2. B. Rehr, C. Wilhelm and H. Sahm(1991), Appl. Microbiol. Biotechnol., **35**, 144.
3. L. Viikari(1984), Appl. Microbiol. Biotechnol., **20**, 118.
4. K. D. Barrow, J. G. Collins, D. A. Leigh, P. L. Rogers, and R. G. Warr(1984), Appl. Microbiol. Biotechnol., **20**, 225.
5. I. H. Jung, D. J. Choi, U. H. Chun(1990), Korean J. Biotechnol. Bioeng., **5**(3), 223.
6. A. Margaritis and P. Bajpai(1982), Biotechnol. Bioeng., **24**, 1483.
7. A. Margaritis and P. Bajpai(1983), Appl. Environ. Microbiol., **45**, 723.
8. S. Joshi and H. Yamazaki(1984), Biotechnol. Lett., **6**, 797.
9. P. Bojpai and A. Margaritis(1987), Appl. Microbiol. Biotechnol., **26**, 447.
10. I. Efstathiou, G. Reysset and N. Truffaut (1986), Appl. Microbiol. Biotechnol., **25**, 143.
11. Z. Duvnjak, N. Kosaric, and S. Kliza(1982), Biotechnol. Bioeng., **24**, 2297.
12. R. M. Sachs, C. B. Low and G. C. Ziobro (1981), Calif. Agric. **35**, 4.
13. L. A. Willims and G. Ziobro(1982), Biotechnol. Letters., **4**(1), 45.
14. K. Kim and M. K. Handy(1985), Biotechnol. Bioeng., **35**, 138.
15. Z. Duvnjak and D. W. Korean(1987), Biotechnol. Letters., **9**(11), 783.

16. J. J. Allais, E. f. Torres, and J. Baratti (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 778.
17. C. H. Kim and S. K. Rhee(1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **23**, 178.
18. W. R. Gibbons(1989), *J. Ferment. Bioeng.*, **67(4)**, 258.
19. C. H. Kim and S. K. Rhee(1989), *Biotechnol. Letters.*, **11(3)**, 201.
20. S. C. Hsu, and J. L. Lockwood(1975), *Appl. Microbiol.*, **29**, 422.
21. R. Marchal, D. Banchet and J. P. Vandecasteele(1985), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 92.
22. L. Zittan(1981), *Starch.* **33**, 373.
23. I. H. Jung, D. J. Choi and U. H. Chun(1989), *The Kyung Hee J. Genetic Mol. Biol.*, **1**, 35.
24. D. Leigh, R. K. Scopes, and P. L. Rogers (1984), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 413.
25. L. Viikari and M. Korhola(1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 471.