

Lactobacillus sp. KY-107에 의한 Mannitol의 생산

†윤 종 원 · 강 선 철 · *류 병 호 · **송 승 구
대구대학교 생물공학과 · *경성대학교 식품공학과 · **부산대학교 화학공학과

Production of Mannitol by *Lactobacillus* sp. KY-107

Jong Won Yun[†], Sun Chul Kang, Byung Ho Ryu*, and Seung Koo Song**

Dept. of Biotechnology, Taegu University, Kyungsan, Kyungbuk 713-714, Korea

*Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

**Dept. of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT

The production of extracellular mannitol by an efficient mannitol-producing bacterium, *Lactobacillus* sp. KY-107 was studied in shake flask culture using the modified MRS medium. Maximum mannitol production was obtained with fructose as the sole carbon source. Within 95 hours of incubation, a final concentration of 70g/L of mannitol from 100g/L fructose was obtained with an indicated yield of 86% based on fructose consumed. However, higher concentrations of fructose could not effectively be transformed to mannitol due to a lack of osmotolerance. The strain produced no other polyols such as glycerol and sorbitol as by-products. Yeast extract was best nitrogen source and high levels of inorganic phosphate up to 10g/L did not show any detrimental effect for mannitol formation. Manganese ion played important role in both cell growth and mannitol production. The optimum culture temperature and initial pH were 35°C and 6-8, respectively.

서 론

Mannitol은 버섯, 해조류, 과일 등에 광범위하게 존재하는 6탄소 당알콜(pentitol)의 일종이다(1-3). Mannitol은 설탕의 30~40% 정도의 감미도를 가지고 있어 설탕의 사용이 제한되는 식품제조에서 대용감미료로 사용되고 있을 뿐 아니라, 냉음미 (cooling taste), 저흡습성 (low hygroscopicity) 등의 우수한 특성을 갖고 있으므로 껌, 캔디 등의 제과류의 첨가제로 많이 응용되고 있다. 또한 저혈압 치료제의 중간물질로 사용되는 등 의약품체제의 제조공

정에서 diluent 또는 filler로 광범위하게 이용되고 있어, 식품 및 의약품 산업에서 중요한 위치를 차지하고 있는 물질이다(4). Mannitol과 더불어 sorbitol, erythritol, xylitol 등의 당알콜류는 이상에서 설명한 특성 이외에 칼로리가 낮고, 당뇨에 안전한 물질로 알려지는 등의 유용성 (기능성)이 밝혀짐으로써 대용감미료로서의 응용가능성 또한 높다. 그 중 erythritol의 경우는 일본에서 미생물 전환법 (microbial transformation)에 의해 공업적으로 대량생산하는데 성공하여 화학합성공정을 대체하기 시작했으나, 다른 제품의 경우는 생산성이 높은 미생물이 개발되지 않아 아직 산업화단계는 아니지만 일본, 미국, 벨기에 등의 선진 국가를 중심으로 활발한 연

† Corresponding Author

구가 진행 중에 있다(5-6). 현재 mannitol의 제조 공정은 fructose, fructose와 glucose의 혼합용액, 또는 sucrose를 원료로 화학합성법에 의해 생산하고 있는데, 합성법에 의한 제조공정은 sorbitol을 부산물로 생산하여 이를 분리하기 위한 별도의 정제공정이 필요할 뿐 아니라 수율이 낮은 단점을 안고 있다. 특히, 주로 식품 또는 의약품 산업에서 이용되고 있는데도 불구하고, 합성법에 의해 생산되는 mannitol 중에는 반응촉매로 사용되는 Cu 또는 Pt 등의 중금속이 미량 함유되어 있기 때문에, 생물공정에 의한 제조공정의 대체가 절실히 필요해 왔다(4). 생물학적 공정에 의해 mannitol을 제조하려는 노력은 1980년대 말에 이르러 비로소 시작되어, 현재 일본의 쓰미모토 중공업 (Sumitomo Heavy Industries, Ltd.)과 아지노모토 (Ajinomoto Co.)가 가장 활발하게 연구를 수행중인 것으로 알려져 있으나(5, 7), 국내의 경우는 이에 대한 연구가 거의 전무한 실정이다.

미생물에 의한 mannitol의 생합성경로는 사용되는 탄소원과 미생물의 종류에 따라 서로 다르다는 사실이 알려져 있을 뿐, 각 미생물에 대한 정확한 생합성경로는 지금까지 정확하게 규명되어 있지 않다. Fungi에 의한 mannitol의 생산은 거의 공통적으로 두가지 경로에 의존하는 것으로 알려져 있다(8-11). 첫째, NADH 또는 NADPH 존재하에서 mannitol dehydrogenase (EC 1.1.1.67)에 의해 fructose를 직접 탈수소화 (direct dehydrogenation)시켜 생성되는 경우이고, 두번째 경로는 mannitol-1-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.17)에 의해 전구체인 mannitol-1-phosphate를 생성한 후 mannitol 1-phosphatase (EC 3.1.3.22)에 의해 mannitol이 생성되는 것이다.

본 연구에서는 저자들이 개발한 비교적 고수율의 mannitol 생산균주인 *Lactobacillus* sp. KY-107을 이용하여 (12) mannitol의 대량생산기술을 개발하기 위한 기초연구로써 mannitol생산의 최적조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 시약

균주는 농산폐기물에서 분리한 *Lactobacillus* sp. KY-107을 사용하였고 (12), HPLC 분석에 사용된 시약을 제외한 모든 시약들은 시약등급을 사용하였다.

발효실험

Lactobacillus sp. KY-107 균주를 glucose를 제외한 MRS배지 (proteose peptone 10g, beef extract 10g, yeast extract 5g, ammonium citrate 2g, sodium acetate 5g, magnesium sulfate 0.5g, manganese sulfate 0.25 g, dipotassium phosphate 2g, tween 80 1.0mL/L 증류수) 와 적정농도의 탄소원을 포함하는 100mL 배지를 250mL 플라스크에 넣고 교반배양기를 이용하여 발효실험을 수행하였다. 미생물의 성장은 600 nm에서 흡광도 (Cecil Instruments, 영국)를 측정하여 관찰하였다. 특별한 설명이 없는 한, MRS배지에 100 g/L fructose를 별살하여 첨가한 배지를 표준배지로 사용하여 30°C에서 200 rpm으로 배양하였다.

분석방법

균체의 mannitol을 정량하기 위하여 Eppendorf tube에 배양액 1mL를 취하여 5000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 HPLC로 분석하였다. mannitol 및 잔류당류의 분석은 Aminex HPX-42C (300×7.8mm, Bio-rad, USA) 또는 HPX-87C (250×4mm)컬럼이 장착된 HPLC (Varian, USA)를 사용하여 정량하였다. 검출기는 refractive index detector (RI-4, Varian, USA)를 사용하였고, 이동상으로 초순수 (18 megaohm·cm)를 사용 (0.6mL/min)하였으며 컬럼 온도는 85°C로 유지해 주었다. TLC분석은 aluminium sheet (Kiesel-gel 60 F₂₅₄, Merck)상에 시료 10μL를 흡착시켜 methyl ethyl ketone-acetic acid-water (9:1:1 v/v) 용액 중에서 전개시킨후 silver nitrate를 이용하여 발색시켰다(13).

결과 및 고찰

탄소원의 영향

대표적인 젖산균인 *Lactobacillus*속과 *Leuconostoc*속 미생물들이 mannitol을 생성하는 방법은 발효중에 glucose를 electron donor로써 이용하여 2M의 fructose를 기질로 heterofermentation (glucose + 2 fructose → 2 mannitol + acetic acid + lactic acid + CO₂)을 수행한 결과로 추정되고 있다(5, 6). 여기서 electron donor로서 사용되는 glucose는 일부는 mannitol 합성에 직접 관여하지만, 대부분은 미생물의 성장에 이용되고 되는 것으로 알려져 있다. 따라서 mannitol을 경제적인 방법으로 생산하기

Table 1. Effect of various carbon sources on mannitol production by *Lactobacillus* sp. KY-107^{a)}.

Carbon sources (100g/L)	Mannitol concentration(g/L)	Growth ^{b)}
Glucose	0	++
Fructose	73	+++
Galactose	0	-
Maltose	0	+
Sucrose	38	++
Sorbitol	0	+
Mannitol	-	++
Glycerol	0	-
Xylitol	0	-

a) Fermentation was carried out at 30°C for 80 hours.

b) (+++) Very good, (++) Good, (+) Little, (-) No growth.

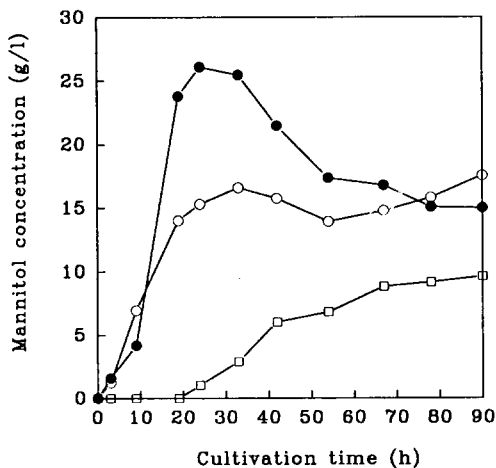


Fig. 1. Effect of carbon sources on mannitol production by *Lactobacillus* sp. KY-107: (●) 50g/L fructose, (○) 25g/L glucose plus 25g/L fructose, (□) 50g/L sucrose.

위해서는 사용된 탄소원이 단일조성이어야 하고, 미생물 성장보다는 mannitol의 합성에 대부분이 이용되는 것이 바람직할 것이다. 본 연구에서 사용한 *Lactobacillus* sp. KY-107 균주의 경우, Table 1에서 보여주는 바와 같이 fructose와 sucrose를 제외하면 검토된 대부분의 당류들이 탄소원으로 전혀 이용되지 않은 동시에 mannitol이 생성되지도 않았고, glucose와 maltose의 경우, 탄소원으로 일부 이용되

었으나, mannitol은 전혀 생성되지 않았다. mannitol을 포함한 당알콜류는 일부 yeast의 경우 lipid 구성성분으로 생합성되기도 하고, 일부 bacteria의 경우는 cell wall 구성성분으로, 또 일부 fungi의 경우에는 구조상 (structural) 또는 저장성다당류 (storage polysaccharides)로서의 기능을 위해서 생합성된다고 알려져 있는 등(1), 각 미생물이 당알콜류를 생성하는 방법은 매우 다양한데, 특히 탄소원의 종류에 따라 생성되는 당알콜류의 종류가 다른 것이 가장 중요한 특징이다.

Lactobacillus sp. KY-107의 경우 mannitol 생산에 가장 효과적인 fructose를 탄소원으로 배양하였을 때, 발효 30시간에서 약 55%의 전환율을 나타내었다(Fig. 1). 이 시점에서 fructose는 완전히 고갈되었고 이후 생성된 mannitol이 다시 탄소원으로 이용되기 시작하였다. 한편 sucrose의 경우, 발효 90시간에서 약 38%의 수율을 보였다. Sucrose를 기질로 이용할 경우 glucose가 발효시작 20시간후 비로소 mannitol이 생성되기 시작하였는데, 이것은 sucrose phosphorylase에 의해 sucrose가 분해되어 fructose가 배양액 중에 유리된 후 mannitol dehydrogenase가 induction 되는데 걸리는 시간 때문인 것으로 추정된다. Glucose가 mannitol로 직접 전환되지는 않았으나, electron donor로 작용하여 fructose가 mannitol로 전환되는 반응에서 반응수율을 증가시킬 수 있는가를 고찰하기 위하여 glucose와 fructose 각각 25 g/L를 탄소원으로 사용하여 실험한 결과, 수율은 68%로서 fructose만을 사용한 경우에 비해 수율이 13% 증가되었다. 따라서 일부 mannitol 생성균주의 경우와 유사하게 glucose는 fructose가 mannitol로 전환되는 반응에서 electron donor로 작용되는 것으로 볼 수 있다(5).

Fructose 농도의 영향

Mannitol 생성에 가장 효과적인 기질인 fructose를 50-250g/L의 농도범위로 각각 첨가하여 발효를 수행한 결과, Fig. 2의 결과에서 보여주는 바와 같이 50, 100g/L의 경우는 수율이 80시간 발효에서 70% 수준으로 거의 동일하였으나, 그 이상의 농도 범위 (180, 250g/L) 에서는 수율이 낮은 편이었다. 따라서 *Lactobacillus* sp. KY-107 균주에 의한 mannitol 생산에서의 최적 fructose 농도는 100 g/L 이었다. 당알콜의 생산공정에서 가장 중요한 인자의 하나는 고농도당을 미생물이 직접 기질로 이용할 수 있어야 하는 것인데, 이런 관점에서 *Lactobacillus*

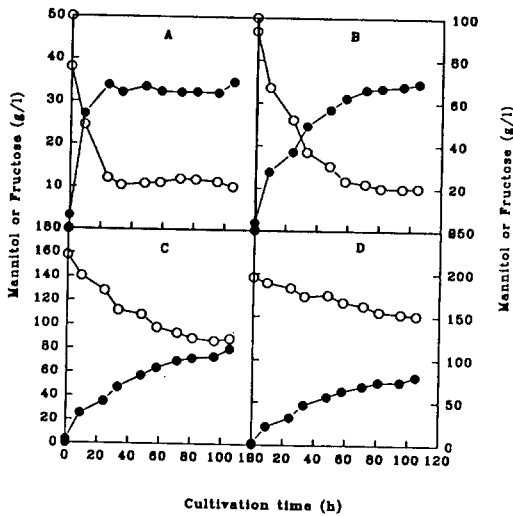


Fig. 2. Effect of initial concentrations of fructose on mannitol production by *Lactobacillus* sp. KY-107: (A) 50g/L, (B) 100g/L, (C) 180g/L, (D) 250g/L; (●) mannitol, (○) residual fructose.

sp. KY-107은 현재 지니고 있는 mannitol 생성 활성만으로도 어느 정도 만족할만한 수준으로 mannitol을 생산할 수도 있었으나, 균주의 개량을 통해서 내삼투압성 (osmotolerance)을 증가시킬 경우 보다 효과적으로 mannitol을 생산할 수 있을 것으로 판단된다.

질소원의 영향

탄소원과 더불어 당알콜류의 생산에 중요한 영향을 미치는 인자는 질소원인데, 미생물이 이용하는 질소원의 종류에 따라 생합성경로가 조금씩 달라 생성되는 당알콜류의 종류와 양이 달라지는 경우가 있다(14, 15). Table 2의 결과에서 보여주는 것처럼, 대표적인 10종류의 질소원 중에서 yeast extract를 사용한 경우 mannitol 생성량이 가장 높게 나타났고, urea를 사용한 경우가 mannitol 생성능이 가장 낮게 나타났으나 그 이외의 질소원에 대해서는 mannitol 생성량에 큰 차이를 보이지 않았다. 또한 사용된 모든 질소원에 대하여 mannitol 이외의 당알콜은 생성되지 않은 것으로 보아 다른 mannitol 생성균주와는 달리 질소원이 생합성경로에 미치는 영향은 없는 것으로 볼 수 있다.

Table 2. Effect of various nitrogen sources on mannitol production by *Lactobacillus* sp. KY-107^{a)}.

Nitrogen sources(10g/L)	Mannitol concentration (g/L) ^{b)}
(NH ₄) ₂ SO ₄	32.1
NH ₄ NO ₃	25.0
NH ₄ H ₂ PO ₄	34.2
Urea	21.9
NaNO ₃	28.1
NH ₄ Cl	32.5
KNO ₃	27.7
Asparagine	34.3
Glycine	31.1
Yeast Extract	54.4

a) Fermentation was carried out at 30°C for 63 hours.

Table 3. Effect of inorganic phosphate on mannitol production by *Lactobacillus* sp. KY-107.^{a)}

Dipotassium phosphate(g/L)	Cell growth (A ₆₀₀)	Mannitol concentration(g/L)
1	0.657	22.7
2	0.625	23.4
5	0.610	24.0
10	0.610	26.6

a) Fermentation was carried out at 30°C for 20 hours.

Phosphate 농도의 영향

몇몇 yeast의 경우, 과다하게 첨가된 phosphate는 당알콜류의 생산을 저해한다는 보고가 있고(16, 17), 무기인산염이 NAD 또는 NADP-linked 산화 환원효소계(oxidoreductase)에서 중요한 역할을 담당할 것으로 판단되어, 발효배지 중에 phosphate 농도를 각각 1-10g/L 첨가하여 그 영향을 고찰하였다. Table 3의 결과에서 처럼 실험농도 범위내에서 phosphate 농도가 증가할수록 mannitol 농도가 증가하였고, 미생물의 성장은 큰 영향이 없는 것으로 나타났다.

금속이온의 영향

Mannitol dehydrogenase 반응에서 금속이온의 영향은 지금까지 잘 알려져 있지 않은 편인데, 본 연구에서 사용한 균주의 경우 여러가지 금속이온들을

Table 4. Effect of various mineral sources on mannitol production by *Lactobacillus* sp. KY-107^{a)}.

Mineral sources(2mM)	Cell growth (A_{600})	Mannitol concentration(g/L) ^{b)}
No mineral	2.32	43.7
Mg	2.52	46.7
Mn	2.65	52.6
Mg+Mn ^{b)}	2.81	52.7
Zn	2.31	36.4
Cu	No growth	0
Co	2.34	42.1
K	2.43	44.7
Fe	2.35	45.6
Ni	2.37	42.4

a) Fermentation was carried out at 30°C for 75 hours.

b) 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ plus 1mM $MnSO_4 \cdot 5H_2O$.

Table 5. Effect of temperature on mannitol production by *Lactobacillus* sp. KY-107^{a)}.

Temperature(°C)	Cell growth(A_{600})	Mannitol concentration(g/L) ^{b)}
20	2.55	30.2
25	2.64	37.6
30	2.70	44.4
35	2.70	47.2

a) Fermentation was carried out for 72 hours.

첨가하여 미생물 성장과 mannitol 생성에 미치는 영향을 고찰하고자 하였다. Table 4에서 보여주는 바와 같이 standard medium인 MRS배지 중에 포함되어 있는 Mg와 Mn을 동시에 첨가한 경우와 Mn만을 첨가한 경우를 비교해 본 결과, 미생물 성장은 두 이온을 동시에 첨가한 경우가 더 우수하였으나 mannitol 생성량은 동일한 결과를 나타내었다. 따라서 Mg 이온은 mannitol 생성반응을 촉매하는 mannitol dehydrogenase의 활성화에 영향을 미치지 않는 것으로 평가할 수 있고, Mn이 중요한 역할을 담당하는 것으로 판단되었다. 한편 Cu를 첨가한 배지에서는 미생물이 전혀 성장하지 않았으며 그 이외의 금속이온들은 금속이온을 전혀 첨가하지 않은 경우와 비교해 볼 때, 미생물 성장과 mannitol 생성량이 거의 동일한 결과를 나타내었다.

Table 6. Effect of initial pH on mannitol production by *Lactobacillus* sp. KY-107^{a)}.

Initial pH	Final pH	Cell growth (A_{600})	Mannitol concentration(g/L)
4.00	3.68	2.10	14.6
5.00	3.88	2.55	27.5
6.00	3.76	2.70	44.5
7.00	3.73	2.79	50.9
8.00	3.76	2.69	51.9
9.00	6.40	0.45	trace

a) Fermentation was carried out at 30°C for 72 hours.

배양온도의 영향

Mannitol생성을 위한 최적배양온도를 결정하기 위하여 20~35°C의 온도범위에서 배양실험을 수행한 결과, 실험범위내에서 배양온도가 높을수록 미생물성장과 mannitol생성이 동시에 유리하였고(Table 5), 이것은 *Lactobacillus*속 미생물 대부분이 35°C 전후의 온도범위에서 성장이 잘된다는 보고와 일치하는 결과이다(18).

초기 pH의 영향

Mannitol을 생산하는 *Lactobacillus*속 미생물들은 heterofermentation을 수행하기 때문에 부산물로 lactic acid 또는 acetic acid를 생성하는데, 이들이 발효과정중에 배양액의 pH를 크게 낮추어 주게 되고 이 결과 미생물의 성장이나 mannitol생성에 미치는 영향은 대단히 클 것으로 예상되었다. 따라서 초기 pH를 서로 다른 조건에서 배양하여 그 영향을 간접적으로 고찰하고자 하였다(Table 6). pH 9의 경우를 제외하면 모든 pH영역에서 미생물생장이 거의 동일한 결과를 나타내었고, 73시간후 발효가 종료된 시점에서의 pH가 3.7전후로 거의 동일하였으나 mannitol생성량은 초기 pH 6-8에서 가장 높았다. 따라서 mannitol dehydrogenase의 최적활성 pH는 pH 6-8 전후인 것으로 판단되고 발효조를 이용하여 배양중 pH를 잘 조절해 줄 경우 mannitol생성량을 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다.

요 약

Lactobacillus sp. KY-107을 이용하여 fructose로부터 mannitol을 비교적 고수율로 생산하였다. 검토된 여러가지 탄소원 중에서 sucrose와 fructose

만이 mannitol 생성의 기질로 이용되었고 100g/L fructose를 기질로 사용할 경우 mannitol 생산성이 가장 좋았으며 이때 수율은 약 70% 이었다. 초기 탄소원이 고갈될 경우, 생성된 mannitol이 다시 기질로 이용되었고, 180-250g/L 이상의 고농도 기질 농도에서는 수율이 50% 이하 수준으로 낮았으나, 모든 실험조건에서 다른 당알콜류를 부산물로 생성하지 않았다. Mannitol 생성에 미치는 여러가지 배양인자들을 검토한 결과, 질소원으로 yeast extract가 가장 우수하였고, 무기인산염은 10 g/L농도 범위까지 농도가 높을수록 유리하였으며 금속이온중 Mn이 mannitol생성에서 가장 중요한 역할을 담당하는 것으로 나타났다. 배양환경중 온도는 35°C 전후에서, 초기 pH는 6-8 범위에서 mannitol 생성량이 최대였다.

감 사

이 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비 (생물화학공학)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. D. H. Lewis and D. C. Smith(1967), *New Phytol.*, **66**, 143.
2. T. T. Ikawa, T. Watanabe, and K. Nisizawa (1972), *Plant Cell Physiol.*, **13**, 1017.
3. B. Wong, J. R. Perfect, S. Beggs, and K. A. Wright(1990), *Infection and Immunity*, **58**, 1664.
4. M. Makkee, A. P. G. Kieboom, and H. Van Bekkum(1985), *Starch/Staerke*, **37**, 136.
5. Sumitomo Heavy Ind.(1992), European Patent No. EP 486024.
6. W. Soetaert, J. Domen, and E. J. Vandamme (1990), *Physiology of Immobilized Cells*(J. A. M. de Bont, J. Visser, B. Mattasson, and J. Tramper, eds.) p. 307, Elsevier Science Publishers, The Netherlands.
7. Ajinomoto.(1987), Japanese Patent No. JP 62239995.
8. K. L. Smiley, M. C. Cadmus, and P. Liepins (1967), *Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 365.
9. W. H. Lee(1967), *Appl. Microbiol.*, **15**, 1206.
10. K. B. Helle and I. Klungsoyr(1962), *Biochim. Biophys. Acta.*, **65**, 461.
11. J. B. Wolef and N. O. Kaplan(1956), *J. Biol. Chem.*, **218**, 849.
12. J. W. Yun, S. C. Kang, and S.K. Song(1996), *Biotechnol Lett.*, **18**, 35.
13. J. W. Yun and S. K. Song(1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 949.
14. J. Lu, L. B. Tsai, C. S. Gong, and T. Tsao (1995), *Biotechnol. Lett.*, **17**, 167.
15. J. W. Yun, S. C. Kang, and S. K. Song (1996), *J. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 60.
16. W. H. Peterson, W. F. Hendershot, and G. J. Hajny(1958), *Appl. Microbiol.*, **6**, 349.
17. J. F. T. Spencer and P. Shu(1957), *Can. J. Microbiol.*, **3**, 559.
18. W. C. Frazier and D.C. Westhoff(1988), *Food Microbiology*, 4th ed., p.45, McGraw-Hill, New York.