

Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1149를 이용한 Mannitol 생산.

김찰용, 조갑수¹, 류화자², 이광욱, 이진하³, 김도원⁴, 김도만^{3,4}
전남대학교 물질생물화학공학과, 분자생물공학협동과정¹, 정밀화학공학과²,
화학공학부³, 강릉대학교 동해안해양생물자원연구센터⁴
전화(062)530-0874, Fax (062)530-1849

Abstract

The process for the production of mannitol with fructose (5% to 25%) using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 was investigated. Optimization study for mannitol production was carried out in 8 liter batch or fed-batch cultures at 28°C, pH 5.0, without aeration. When 5% fructose was used in a batch culture fermentation, the yield of mannitol was 78% of theoretical. As the concentration of fructose was increased to 10% in a batch culture, the yield was reduced to 59.6% of theoretical. Using a fed-batch fermentation with 10% fructose, the yield was increased to 81.9%. When 15% fructose was used for a fed batch fermentation 5% fructose was initially added and the last 10% fructose was supplied continuously. The final yield of mannitol was 83.71% of theoretical. When 20% fructose was used, the yield was more higher, 89.48%.

Introduction

Mannitol은 버섯, 해조류, 과일 등에 광범위하게 존재하는 6탄소 당알콜^{1,2)}의 일종으로 설탕의 30~40% 정도의 감미도를 가지고 있어 설탕의 사용이 제한되는 식품 제조에서 대용 감미료로 사용되고 있고, 냉음미(cooling taste), 저흡습성 (low hygroscopicity) 등의 특성을 갖고 있으므로 껌, 캔디 등의 제과류의 첨가제로 많이 이용되고 있다. 또한 저혈압 치료제의 중간물질로 사용되는 등 의약품 제제의 제조 공정에서 희석액 또는 충전제로 광범위하게 이용되고 있어, 식품 및 의약품 산업에서 중요한 위치를 차지하고 있는 물질이다³⁾. 미생물에 의한 mannitol의 생합성 경로는 사용되는 탄소원과 미생물의 종류에 따라 서로 다른 것으로 보고 되고 있으며, Fungi에서의 mannitol 생합성 경로는, NADH 또는 NADPH 존재하에서 mannitol dehydrogenase (EC 1.1.1.67)에 의해 fructose를 직접 탈수소화(direct dehydrogenation)시키는 것으로 알려져 있다.

Materials and methods

사용균주는 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149이었으며, LWS 고체배지

lyeast extract 5g/L, peptone 5g/L, agar 15g/L, sucrose 20g/L, K_2HPO_4 20g/L, mineral solution 10ml/L (mineral solution : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20g/L, NaCl 1g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 1g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1.3g/L)에 계대배양 하여 사용하였으며, 종배양으로는 120ml의 배지가 들어 있는 삼각 플라스크에 접종하여 1일간 배양한 후 이를 생산배지(300g의 fructose를 1L의 플라스크에 600ml의 증류수로 녹이고, 8L의 발효조에 yeast extract 30g, K_2HPO_4 또는 KH_2PO_4 를 30g 녹였으며 mineral solution을 20ml 첨가하여 갈색화 반응 때문에 각각 $121^\circ C$: $1.5 kgf/cm^2$ 조건에서 40분간 멸균, $40^\circ C$ 까지 냉각하여 무균상태에서 혼합한 배지)에 접종하였다. 접종시 생산배지의 pH는 5.0 또는 7.0 이었으며, 온도는 $28^\circ C$ 그리고 공기 주입 없이 150rpm 으로 교반하여 배양하였다.

균체외의 mannitol의 양을 정량하기 위하여 배양액 1ml을 취하여 12,000 rpm에서 3분간 원심분리한 후 상등액을 TLC로 분석하였다. TLC 분석은 aluminium TLC sheet(Silica gel 60 F₂₅₄, Merck)위에 시료 1 μ l를 흡착시켜 acetonitrile : ethyl acetate : 1-propanol : water (85 : 20 : 20 : 15)조성의 용액으로 전개하였으며, <AgNO₃-Acetone : 5분, Alkaline-MeOH : 2분, Na₂S₂O₃(1.5M)+Na₂SO₃(0.08M)+NaHSO₃(0.25M) : 2초 >의 시약을 사용하여 발색시켰다. TLC상의 성분에 대한 정량분석은 NIH Image Program을 사용하였다.

Results and Discussions

5%의 fructose를 이용 회분식 배양을 했을 경우 22시간 경과 후에 fructose가 모두 사용되어 이론수율의 78%를 보였고, 단위시간당, L당 mannitol의 증가량은 2.91 g이었다. Fructose의 양을 10%로 늘렸을 경우 fructose가 모두 소비되는데 걸리는 시간은 42시간으로 길어 졌으며 수율은 이론수율의 59.6%였고, mannitol의 증가량은 1.88 g/L/hr로 fructose의 농도가 커짐에 따라 기질 저해가 있었음을 확인 할 수 있었다. 10%의 fructose를 5%, 5%씩 나누어 반회분식으로 배양했을 경우 배양시간은 42시간이었으며, 수율은 이론수율의 81.8%이었다. 그리고 mannitol의 증가량은 각각의 5% fructose 공급에서 2.54 g/L/hr, 3.61 g/L/hr로 5%의 fructose를 이용하여 균이 충분히 성장하고, 이후 공급한 5%의 fructose는 이론수율의 95%가 mannitol로 전환되었음을 확인하였다. Fructose의 양이 10%로 같을 때 회분식 보다는 반회분식의 방식이 수율이 좋았다. 5%의 fructose를 이용 하여 균을 성장시킨 후 10%의 fructose와 15%의 fructose를 공급해 주었을 때 배양종료 시간은 각각 74시간과 76시간 이었으며, fructose의 양이 15% 일 때 수율은 83.71% 그리고 20%일 때의 수율은 이론수율의 89.48% 였다. 균이 충분히 성장한 이후 공급한 fructose의 농도가 10%일 때에는 mannitol의 증가율은 1.69 g/L/hr 이었고 15%일 때에는 2.5 g/L/hr로 5%일 때 보다 낮은 값을 나타냈다. 전체 fructose의 양을 25%로 늘리고

초기 pH를 7.0으로 하여 배양하였으나, 수율은 64.84%로 크게 낮아 졌으며 fructose가 모두 소비되는데 100시간 이상이 걸렸다. 단위 시간당, L당 mannitol의 증가량이 가장 큰 10% fructose를 이용한 반회분식배양의 경우와 89.48%의 수율을 나타낸 20% fructose를 이용한 반회분식 배양을 비교했을 때 20%의 fructose를 이용한 반회분식 배양이 *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149균주를 이용한 mannitol 생산에 최적의 조건임을 확인 할 수 있었다.

Reference

1. 노봉수, 김상용, "당알코올의 특성과 응용"(2000), 92-101.
2. B. Wong, J. R. Perfect, S. Beggs, and K. A. Wright "Production of the hexitol D-mannitol by *Cryptococcus neoformans* in vitro and in rabbits with experimental meningitis" (1990), *Infection and Immunity*, vol(58), 1664
3. M. Makkee, A. P. G. Kieboom, and H. Van Bekkum "Combined action of an enzyme and a metal catalyst on the conversion of D-glucose /D-fructose mixtures into D-mannitol" (1985), *Carbohydrate Research*, vol(138), 237.