

*Aureobasidium pullulans*에 의한 Mannitol의 생산

윤 종 원 · *이 경 희 · 송 승 구
부산대학교 화학공학과, *약학과

Mannitol Production by *Aureobasidium pullulans*

Jong Won Yun, *Kyung Hee Lee and Seung Koo Song

Department of Chemical Engineering, *Department of Pharmacy,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT

Aureobasidium pullulans produced high concentration of polyols extracellularly in the media of sucrose, glucose and mannose as sole carbon source. Mannitol was the main polyol produced during the late exponential and stationary phases of growth together with small quantities of glycerol. Sucrose and glucose were rather rapidly metabolized to mannitol among carbon sources examined where the initial glucose concentration showed no difference in the amount of mannitol. In contrast, 20% (w/v) of sucrose was the most appropriate concentration tested. However, the yield of mannitol based on substrate used ($Y_{P/S}$) was independent on the initial concentration, and the mean value of mannitol yield in 10% glucose and sucrose media was 0.144 and 0.188, respectively. Mannitol production was reduced in response to an elevated water stress imposed by salts within the range from 0.25 to 1M of NaCl or KCl as stress solutes. However, glycerol contents and its ratio to mannitol were increased at the conditions of high salinity. Based on the results, extracellular mannitol produced by *A. pullulans* probably resulted partly from osmoregulation (in case of glycerol) and mainly from, as known to occur in most of fungi, enzymatic reduction of the corresponding hexoses through phosphate pathway.

서 론

Glycerol, mannitol, erythritol 등을 비롯한 polyhydric alcohol (polyol)은 일반적으로 halophilic bacteria, sugar-tolerant 또는 salt-tolerant yeast, 그리고 xerophilic fungi 등이 수분활성 (water activity)이 낮은 환경에서 균체내에 축적하여 삼투압 조절 (osmoregulation)을 수행하기 위해 대사과정 중에 생성되는 발효산물인 것으로 잘 알려져 있다(1-5). Polyol의 축적은 미생물의 종류나 배양환경에 따라 상당히 큰 차이를 나타내기 때문에, 실제로 지금까지 보고된 문헌에서는 각기 서로 다른 종류의

polyol에 관해 많이 발표되어 있고 미생물종과 생산되는 polyol과의 관계를 체계적으로 다루고 있지 못한 상태이다. 즉, 미생물의 종류에 따라, 그리고 수분활성 및 호기, 혐기조건 등의 배양환경에 따라 생산되는 polyol의 종류는 매우 다양한 편이다.

최근 polyol에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 이유는 erythritol, mannitol, sorbitol 등을 중심으로 한 몇 가지 제품들이 칼로리가 낮고, 당뇨에 안정한 물질로 알려지는 등(6, 7) 그 유용성이 밝혀짐으로써 대체감미료 또는 여러 가지 의약적 용도로서의 응용가능성이 크기 때문이다. 그중 erythritol의 경우는 실제로 미생물 전환법 (microbial transfor-

mation)에 의해 공업적으로 생산되고 있고, 다른 기능성 감미료들과 함께 상당한 시장을 형성하고 있는 것으로 알려져 있다(8-10).

Mannitol은 erythritol, sorbitol 등과 함께 우수한 식품소재로서 냉음미(cool taste)를 나타내고, 보습성이 있으며, 당뇨병자에 안전하여 대용 감미료(감미도는 설탕의 45%)로 인정되는 등의 장점이 있는 대표적인 당알코올(sugar alcohol)류의 하나이다(11). Mannitol은 여러 가지 식물에 광범위하게 존재하고 있지만, 그 양은 매우 미량이어서 sorbitol의 경우처럼 ketose를 분해환원시켜 생산되고 있고 미생물 전환법에 의한 생산방법이 보고된 예도 있다(12). 이 생산방법이 경제성을 갖기 위해서는 설탕이나 포도당 등의 값싼 탄소원을 기질로 이용할 수 있어야 하는 동시에, 고농도의 탄소원에 잘 적응(osmotolerant)할 수 있어야 하며 수율이 높은 미생물을 개발하는 것이다.

여러 종류의 fungi에 의한 mannitol 생산은 Fig. 1에서 도시한 바와 같이 주로 두 가지 경로에 의존하는 것으로 알려져 있다(13). 첫째, NADH 또는 NADPH 존재하에서 mannitol dehydrogenase(EC 1.1.1.67)에 의해 fructose를 직접 환원시켜 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.

한편 대부분의 연구자들은 균체외로 투과되어 나온 polyol에 대해서는 관심을 갖지 않은 편인데, 균체의 polyol의 양이 많을수록 분리정제 비용을 절감할 수 있어 유리하다. 대부분의 내삼투성 미생물이 생산하는 polyol들은 균체내의 삼투압조절 목적으로 polyol을 축적하고 그 농도도 낮기 때문에 대량생산에 적용하는데는 한계가 있었다(1, 3, 14). 대부분의 내삼투성 미생물의 경우 수분활성의 감소에 따라 polyol의 생성량이 증가하는 것으로 관찰되었고, 수분활성의 변화에 따른 polyol의 생성형태에 관한 보고는 많으나(1, 20), 탄소원의 종류에 따른 polyol의 생산특성에 관한 문헌은 지금까지 체계적으로 보고되지 않았다.

*Aureobasidium pullulans*는 지금까지 설탕을 주 탄소원으로 하는 배양조건에서 프락토올리고당을 합성하는 미생물로 잘 알려져 왔을 뿐 아니라(15, 16), 최근 저자들은 맥아당을 주 탄소원으로 하는 배지에서는 이소말토올리고당의 합성능을 갖는다는

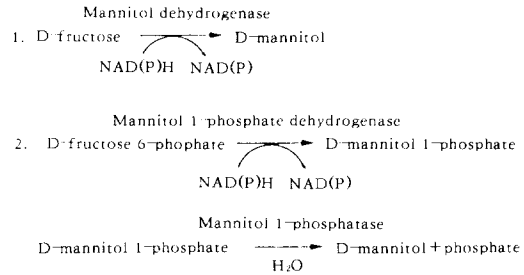


Fig 1. Two pathways for mannitol formation in fungi(ref. 13).

점을 발견한 바 있다(16). 이들 올리고당류의 생산 조건을 검토하던 중에, 맥아당배지에서는 발견되지 않고 특이하게 설탕배지에서 상당한 농도의 polyol, 특히 mannitol이 소량의 glycerol과 함께 발효과정 중에 균체외로 생산되는 사실을 관찰하였다. 지금까지 *Aureobasidium* 속의 미생물이 주로 생산하는 polyol 중 보고된 것은 erythritol이 거의 대부분이고(9, 18), 다른 polyol에 관한 보고는 거의 없다.

본 연구에서는 이 미생물이 생산하는 두 종류의 polyol, 즉 mannitol과 glycerol의 생산특성을 고찰할 목적으로 여러 가지 탄소원의 영향과 수분활성 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

시약

기질로 사용한 설탕, 포도당, 과당 등을 포함한 모든 당류 및 기타 시약들은 모두 시약등급을 사용하였다.

미생물 배양

Aureobasidium pullulans KFCC 10245를 10% (w/v) sucrose, 1% yeast extract, 0.5% K_2HPO_4 , 0.05% MgSO_4 , 1% NaNO_3 의 종균배지 30ml가 함유된 250ml flask를 이용하여 30°C 에서 48시간 동안 배양한 다음, 여러 가지 탄소원을 사용한 본 배양배지(탄소원 및 수분활성 영향실험에서 첨가된 염의 농도를 제외한 다른 배지조성은 종균배지와 동일) 60ml에 2ml를 접종한 후 동일조건하(pH 6.0, 200rpm)에서 5~10일간 배양하였다.

Polyol의 정량

균체의 polyol을 정량하기 위하여 Eppendorf tube에 배양액 1ml를 취하여 5000×g에서 30분간

원심분리한 후 상등액을 HPLC로 분석하였다. 균체 내 polyol의 정량은 다음과 같은 방법을 사용하였다. 1) 발효액 3ml를 취하여 5000×g에서 30분간 원심 분리하여 균체를 회수한다. 2) 탈이온수(deionized water)로 2회 세척한다. 3) 탈이온수 3ml를 가하여 균체를 현탁한다. 4) 0.2g의 세포벽용해효소 Kitalase(Kumiai-kagaku, Japan)를 첨가하여 45℃에서 90분간 반응시킨다. 5) 원심분리하여 상등액 중의 polyol을 HPLC를 이용하여 분석한다. 이 방법은 끓는 수조에서 10분간 또는 80%(v/v) 에틸알코올을 첨가하여 85℃에서 30분간 추출하는 방법(18)에 비해 효과적이었는데, 균체내에 축적되어 있는 polyol의 양은 대수증식 초기를 제외하면 전체 발효과정 중에는 무시할 정도로 적어서 polyol 총량의 산출시 제외하였다.

분석

Mannitol, glycerol 및 당류의 분석은 Aminex HPX-42C (300mm×7.8mm, Bio-rad, USA) 컬럼이 장착된 HPLC(Varian, USA)를 사용하여 정량하였다. 검출기는 RI-4 refractive index detector(Varian, USA)를 사용하였고, 이동상으로 초순수(18 megaohm.cm)를 사용(0.7ml/min)하였으며 컬럼 온도는 85℃로 유지해 주었다. Glycerol은 16.5분대에서, mannitol은 17.6분대에서 각각 검출되었다. TLC분석은 aluminium sheet(Kieselgel 60 F254,

Merck)상에 시료 10 μ l를 흡착시켜 methyl ethyl ketone-acetic acid-water(9:1:1 v/v) 용액 중에서 전개시킨 후 silver nitrate를 이용하여 발색시켰다.

결과 및 고찰

Polyol 생산에 미치는 탄소원의 영향

일반적으로 polyol 생산에서 가장 중요한 인자는 탄소원의 종류와 수분활성을 들 수 있는데(19, 20), *A. pullulans*의 경우는, Table 1에서 보여주는 바와 같이, arabinose, ribose, xylose 등의 오탄당류와 lactose는 탄소원으로 전혀 이용되지 못하였고, maltose와 galactose는 우수한 탄소원이었으나 polyol 생성량은 극히 적었다. 검토된 12종의 탄소원 중에서 sucrose, glucose, fructose 및 mannose를 탄소원으로 사용하였을 경우 glycerol과 mannitol이 생산되었고, 그 중 sucrose의 경우가 생성량이 가장 높았다(Fig. 2). 특히 fructose를 탄소원으로 이용했을 경우, glycerol, mannitol 이외에 매우 낮은 농도였지만 sorbitol을 생산하였다(data는 보이지 않았음). 검토된 모든 배양조건에서 균체내 polyol(intracellular polyols)은 대수증식 초기에 소량 축적되었다가, 이후 거의 모두가 균체외로 투과되었다. Fig. 2에서 보여주는 바와 같이, 균체외로 투과된 mannitol은 glucose배지의 경우처럼 초기 탄소원이 완전히 고갈될 경우 다시 기질로 이용되었다. 균체

Table 1. Effect of carbon source on the polyol production.

Carbon source(100g/ℓ)	Total polyols(g/ℓ culture)	Culture time(h) ^{a)}
Pentoses		
Arabinose	0	
Ribose	0	
Xylose	0	
Hexoses		
Glucose	18.14	48
Fructose	16.03	189
Glucose(50g/ℓ) + Fructose(50g/ℓ)	17.73	92
Mannose	23.74	189
Galactose	0	
Disaccharides		
Sucrose	24.06	92
Maltose	8.79	189
Cellobiose	0	
Lactose	0	

a) Culture time reaching the maximum accumulation of polyols

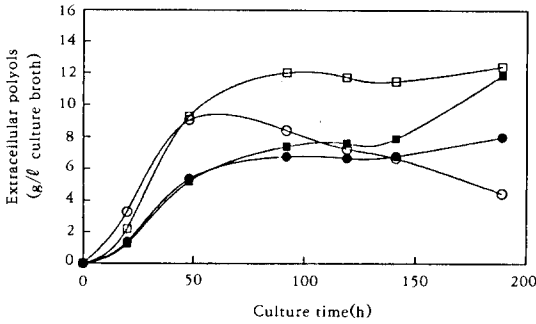


Fig. 2. Effect of carbon source(100g/l) on the extracellular polyol production: (○) glucose, (●) fructose, (□) sucrose, (■) mannose.

외로의 polyol 투과성은 미생물의 transport system의 구성에 따라, 또는 미생물의 polyol 이용성(utilization)에 따라 달라질 수 있다. Alder 등(21)은 *Debaryomyces hansenii* 변이주는 야생균주에 비해 glycerol의 균체의 투과현상이 현저하게 달라서 야생균주의 경우 glycerol이 배양말기에 모두 기질로 이용되고 발효액 중에서 전혀 관찰되지 않았으나, 변이주의 경우는 고농도의 균체의 glycerol이 발효기간 동안 계속 축적되는 것을 관찰하였다.

고농도 Sucrose 및 Glucose 배지에서의 Polyol 생산 특성

Polyol생산은 내삼투성 미생물의 경우, 일반적으로 수분활성이 낮은 조건에서 유리한데, 이러한 목적으로 배지 중에 염의 농도를 증가시키거나 초기 탄소원의 농도를 높게 유지하여 미생물을 배양함으로써 polyol 생산 특성을 비교하는 경우가 많다(1, 18, 20). Fig. 2와 Table 1의 결과에서 나타난 바와 같이 polyol 생산에 가장 효과적인 두 종류의 탄소원, 즉 sucrose와 glucose에 대해 초기농도를 각각 10-30%(w/v)으로 높게 유지하여 polyol 생산 특성을 고찰한 결과, Fig. 3에서 보여 주는 바와 같이, 전 농도범위에서 glucose보다 sucrose의 경우가 polyol 생산에 효과적이었으며, 특히 glucose의 경우는 초기농도의 영향을 크게 받지 않았으나 sucrose의 경우는 20%가 최적농도인 것으로 나타났다.

저농도 Sucrose 및 Glucose 배지에서의 Polyol 생산 특성

전술한 결과에서 나타난 바와 같이, 초기 탄소원

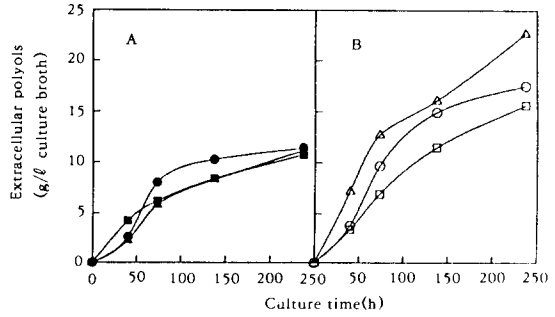


Fig. 3. Extracellular polyol production in high concentrations of glucose(A) and sucrose (B):(○) 100g/l sucrose, (△) 200g/l sucrose, (□) 300g/l sucrose, (●) 100g/l glucose, (▲) 200g/l glucose, (■) 300g/l glucose.

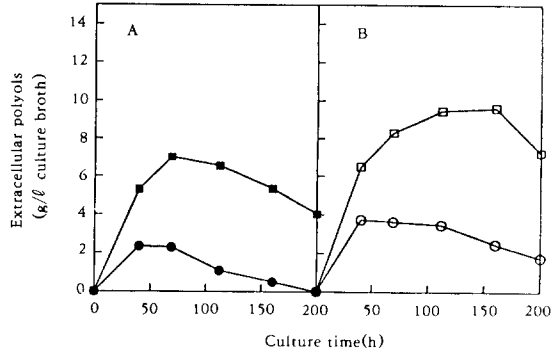


Fig. 4. Extracellular polyol production in low concentrations of glucose(A) and sucrose (B):(○) 20g/l sucrose, (□) 50g/l sucrose, (●) 20g/l glucose, (■) 50g/l glucose.

의 농도 증가에 의해 수분활성이 높게 조절된 조건에서의 polyol의 생산량이 크게 증가하지 않았으므로, *A. pullulans*에 의한 polyol의 생산은 내삼투성 (osmotolerant) 미생물 등이 수분활성이 낮은 조건에서 성장에 필요한 compatible solute를 분비하는 경우와 차이가 있을 것으로 예상할 수 있었다. 따라서 저농도의 탄소원에서 배양하였을 때, polyol의 생산 특성을 비교하기 위해 glucose 및 sucrose를 각각 2, 5%(w/v) 첨가하여 배양한 결과, 예상과는 달리 고농도의 경우와 유사한 경향으로 polyol을 생산하였고 (Fig. 4), 대당수율($Y_{p/s}$)이 고농도 배지

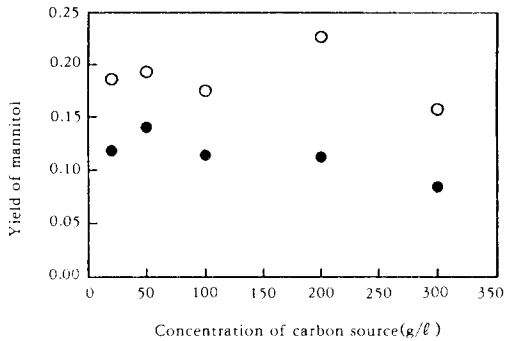


Fig 5. Effect of the concentration of carbon sources on the yields of mannitol based on substrate used : (○) sucrose, (●) glucose.

에서와 거의 유사한 값을 나타내었다(Fig. 5). 따라서 초기에 공급된 탄소원의 농도에 관계없이 일정한 polyol 수율을 나타내었는데, 이 결과는 Nobre 등 (3)이 *Debaryomyces hansenii*를 이용한 arabinitol 생산에서 1% 이상의 glucose 농도에서 초기 농도는 arabinitol 생산량에 무관하게 일정하였다는 결과와 동일하다. 한편 실험에서 사용된 탄소원농도 2~30% (w/v) 범위에서, 5% 이상에서는 polyol이 더 이상 증가하지 않는 수준까지 생산되어도 초기에 공급된 탄소원은 상당량 잔존하였는데, 이 결과로부터 탄소원 제한(carbon limitation)이 polyol 생산의 필요조건은 아닌 것을 알 수 있었다. 또한 Fig. 2, 4에서 보여준 바와 같이 glucose의 경우 초기농도 10%, sucrose의 경우는 5% 이하의 배양조건에서는 배양 말기에 초기 탄소원이 완전히 고갈되었고, 이후부터는 생산된 polyol이 모두 다시 기질로 이용되었다.

수분활성의 영향

전술한 결과로부터 *A. pullulans*의 두 가지 polyol의 생산은 다른 내삼투성 미생물들의 경우와는 달리 수분활성의 영향을 크게 받지 않을 것을 예상할 수 있었는데, 이 가정을 뒷받침하기 위하여 NaCl 및 KCl을 수분활성인자(stress solute)로 선택하여 배지 중에 각각 고농도로 첨가한 후 배양결과를 관찰하였다. 일반적으로 polyol 생산에서 많은 연구자들이 수분활성의 영향을 고농도 NaCl 또는 KCl 등의 염을 배지에 첨가하였을 때의 배양결과를 지표로 삼는 경우가 많았다(17, 18). Fig. 6은 10% sucrose 배지에 NaCl을 각각 0.25, 0.5, 1M 첨가하였을 때

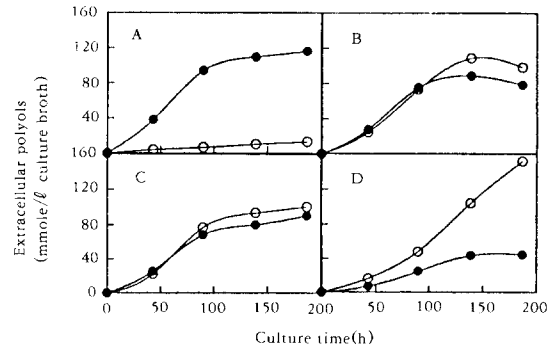


Fig 6. Changes in extracellular polyol production in the 100g/l of sucrose medium in response to changes of external salinity imposed by NaCl: (A) without NaCl, (B) with 0.25M NaCl, (C) with 0.5M NaCl, (D) with 1M NaCl; (○) glycerol, (●) mannitol.

(Fig. 6B, C, D), 균체의 glycerol 및 mannitol의 생산량을 첨가하지 않은 경우(Fig. 6A)와 비교한 결과이다. 일반적인 내삼투성 미생물들과는 달리 NaCl의 첨가량이 증가할수록 전체 polyol의 생산량은 감소하는 경향을 나타내었고, glycerol의 양이 mannitol에 비해 상대적으로 증가하여 1M의 경우 mannitol에 대한 glycerol의 몰비가 3 이상이었다(Fig. 6D). 한편 KCl의 경우도 전체 polyol의 생산량은 NaCl의 경우와 마찬가지로 KCl의 농도 증가에 따라 감소하였는데, 그 감소 정도가 NaCl의 경우보다 더 크게 나타났다(Fig. 7). Luxo 등(1)은 *Geotrichum*과 *Endomyces* 속의 미생물들을 이용하여 NaCl을 수분활성 조절인자로 사용하여 polyol의 생산 특성을 고찰한 바 있는데, NaCl의 첨가(0.75M, 1M) 유무에 따라 arabinitol과 mannitol의 생산은 동일 미생물 속에서도 서로 달라서, 어떤 경우는 NaCl의 첨가가 polyol의 생산에 필수적이었고, 어떤 경우는 오히려 첨가하지 않을 경우에서 polyol이 생산되는 사실을 발견하였다. 또한 이들이 사용한 미생물들이 glycerol을 생산하지 않는 점을 볼 때, 일반적인 보고와는 달리 glycerol이 수분활성이 낮은 환경에서 항상 공통된 compatible solute로 작용하는 것은 아닌 것을 알 수 있다.

이러한 결과들로부터 본 연구에서 사용된 *A. pullulans*가 glycerol과 mannitol 등의 polyol을 생산하는 현상은 다음과 같이 해석할 수 있다. 즉,

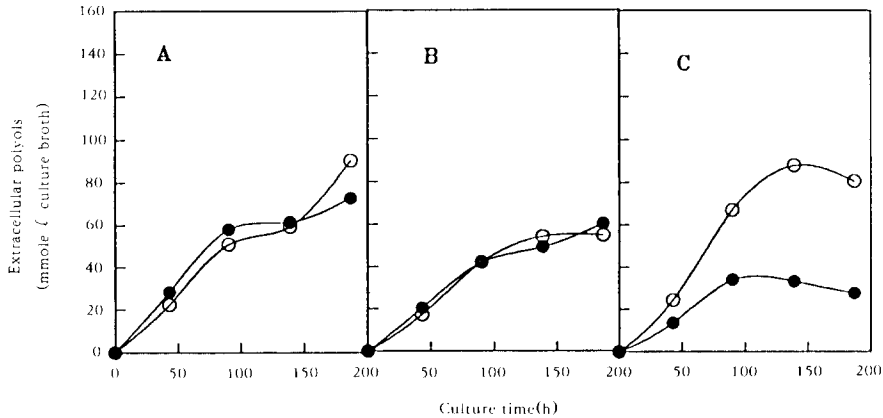


Fig 7. Changes in extracellular polyol production in the 100g/l of sucrose medium in response to changes of external salinity imposed by KCl: (A) with 0.25M KCl, (B) with 0.5M KCl, (C) with 1M KCl; (○) glycerol, (●) mannitol.

glycerol의 경우는 다른 내삼투성 미생물의 경우와 같이 생산하지만, mannitol의 경우는 sucrose, glucose 등의 유용한 탄소원들의 대사과정중에 인산화 경로(phosphate pathway)과 환원효소작용(enzymatic dehydrogenation)을 통해 생성되는 발효산물인 것으로 판단되었다.

요 약

*A. pullulans*로부터 polyol 생산 특성을 검토하기 위하여 탄소원, 수분활성의 영향을 검토하였다. 생산된 polyol 중에서 mannitol이 주성분이었고 소량의 glycerol이 함께 생산되었다. 검토된 탄소원 중 sucrose, glucose, fructose, mannose를 단일 탄소원으로 사용하였을 때 mannitol을 생산할 수 있었으며, 20% sucrose 배지에서 polyol 생산량이 최대였고 이때 해당 mannitol의 수율($Y_{p/s}$)은 0.227이었다. 두 종류의 유용한 탄소원인 glucose와 sucrose에 대한 초기기질농도에 대한 $Y_{p/s}$ 는 거의 일정한 값을 보여, 일반적인 내삼투성 미생물과는 달리 첨가된 염(NaCl, KCl)의 농도가 증가할수록, 즉 수분활성이 낮은 조건에서는 오히려 mannitol의 생산량이 낮아졌으며, 상대적으로, glycerol의 양은 증가하였다. 실험결과를 종합해 볼 때, *A. pullulans*에 의한 polyol 중, glycerol의 경우는 다른 내삼투성 미생물의 경우와 같이 생산되지만, mannitol의 경우는 sucrose, glucose 등의 유용한 탄소원들의 대사과정 중

에 인산화경로(phosphate pathway)과 환원효소작용(enzymatic dehydrogenation)을 통해 생성되는 발효산물이라는 결론을 얻었다.

참고 문헌

1. C. Luxo, M. F. Nobre and M. S. da Costa (1993), *Can. J. Microbiol.*, **39**, 868.
2. R. H. Reed, J. A. Chudek, R. Foster and G. M. Gadd(1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2119.
3. M. F. Nobre and M. S. da Costa(1985), *Can. J. Microbiol.*, **31**, 467.
4. G. M. Gadd, J. A. Chudek, R. Foster and R. H. Reed(1984), *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 1969.
5. L. Andre, A. Nilsson and L. Adler(1988), *J. Gen. Microbiol.*, **134**, 669.
6. K. Noda and T. Oku(1992), *J. Nutr.* **122**, 1266.
7. H. Roper and J. Goossens(1993), *Starch/Starke*, **45**(11), 400.
8. —(1989), *Food Chemicals*(Japane), **10**, 21.
9. H. Ishizuka, K. Wako, T. Kasumi and T. Sasaki(1989), *J. Ferment. Bioeng.*, **68**(5), 310.
10. M. A. Y. Aoiki, G. M. Pastore and Y. K. Park(1993), *Biotechnol. Lett.*, **15**(4), 383.
11. 吉岡政七, 遠藤克己(1961), *新生化學 Guide*

- Book* (Japan), 15.
12. V. Boonsaeng, P. A. Sullivan and M. G. Shepherd(1976), *Can. J. Microbiol.*, **22**, 808.
 13. D. H. Lewis and D. C. Smith(1967), *New Phytol.*, **66**, 143.
 14. M. F. Nobre and M. S. da Costa(1985), *Can. J. Microbiol.*, **31**, 1061.
 15. J. W. Yun and S. K. Song(1993), *Biotechnol. Lett.*, **15**, 573.
 16. J. W. Yun, M. G. Lee and S. K. Song(1994), *J. Ferment. Bioeng.*, **77**(2), 159.
 17. J. W. Yun, M. G. Lee and S. K. Song(1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 359.
 18. K. Tokuoka, T. Ishitani and W. C. Chung (1992), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **38**, 35.
 19. S. R. C. Warr, R. H. Reed and W. D. P. Stewart(1984), *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 2169.
 20. A. D. Hocking(1986), *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 269.
 21. L. Adler, A. Blomberg and A. Nilsson(1985), *J. Bacteriol.*, **162**, 300.