

## *Leuconostoc* sp. KY-002의 Mannitol 생산 특성

†류 병 호 · \*김 동 현 · \*윤 중 원  
경성대학교 식품공학과, \*대구대학교 생물공학과

### Characteristics of Mannitol Production by *Leuconostoc* sp. KY-002

Beung Ho Ryu<sup>†</sup>, Dong Hyun Kim<sup>\*</sup>, and Jong Won Yun<sup>\*</sup>

Dept. of Food Science and Microbiology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

<sup>\*</sup>Dept. of Biotechnology, Taegu University, Taegu 712-714, Korea

#### ABSTRACT

The production of extracellular mannitol by a new mannitol-producing bacterium, *Leuconostoc* sp. KY-002 was studied in shake flask cultures. The new isolate has a capability of utilizing fructose and sucrose for mannitol formation. Maximum mannitol production was obtained with fructose as the sole carbon source. Under the optimal culture conditions, within 70 hours of incubation, a final concentration of 26 g/L of mannitol from 50 g/L fructose was obtained with an indicated yield of 52% based on fructose consumed. However, higher concentrations of fructose ranging from 100 to 250 g/L 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 the best nitrogen source and high levels of inorganic phosphate up to 10 g/L promoted mannitol formation. Any mineral ions and salts did not play important role in both cell growth and mannitol production. Nicotinic acid enhanced mannitol production by 16%. The optimum culture temperature and initial pH were 35°C and 6, respectively.

#### 서 론

Mannitol은 여러 종류의 해조류, 과일 등에 천연으로 존재하는 hexitol의 일종으로(1-3), 설탕의 사용이 제한되는 식품제조에서 대용감미료로 사용되고 있다. 특히 수용액 중에서 흡열반응을 일으키므로 냉음미(cooling taste)가 강하고, 저흡습성(low hygroscopicity) 등의 우수한 물리화학적 특성으로 인해 잼, 캔디 등의 제과류의 첨가제로 많이 응용되고 있다(4). 최근 mannitol, xylitol, erythritol을

비롯한 당알콜류의 개발에 대한 관심이 증가되기 시작하여, 몇몇 제품의 경우, 미생물 전환법(microbial transformation)에 의해 공업적으로 대량생산하는데 성공하여 화학합성공정을 대체하기에 이르렀다. 생물공학적 방법에 의한 mannitol 생산공정은 아직 산업화단계는 아니지만 일본, 미국, 벨기에 등의 선진 국가를 중심으로 활발히 연구가 진행 중에 있다(5-6). 현재 mannitol의 제조공정은 과당, 이성화당, 또는 설탕을 원료로 sorbitol과 함께 화학합성법에 의해 생산되고 있는데, 합성법에 의한 제조공정은 sorbitol을 부산물로 생산하여 이를 분리하기 위한 별도의 정제공정이 필요할 뿐 아니라 수율이 낮

† Corresponding Author

은 단점을 안고 있다. 따라서 생물공학적인 방법에 의한 제조공정의 대체가 절실히 필요해 왔는데(4), 이에 대한 노력은 1980년대 말에 이르러 비로소 시작되어, 현재 일본의 쓰미토모 중공업(Sumitomo Heavy Industries, Ltd.)과 아지노모토(Ajinomoto Co.)사의 연구그룹에서 가장 활발히 연구를 수행중인 것으로 알려져 있으나(5, 7), 국내의 경우는 이에 대한 연구가 많지 않은 편이다.

미생물에 의한 mannitol의 생합성은 yeast 또는 fungi의 경우, 주로 삼투압 조절을 위한 compatible solute로서 생성되나 그 양은 대체로 미량이고, 주로 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*속 등의 젖산균들이 heterofermentation 대사과정을 통해 고농도로 생산한다(5, 7-9).

저자들은 김치발효 과정중에 mannitol이 상당량 축적된다는 점을 관찰한 바 있으며(10), 이로부터 mannitol 생성능이 있는 미생물을 분리하였고(11-13), 본 연구에서는 그중 비교적 mannitol 생산능이 높은 *Leuconostoc* sp. KY-002에 대해서 mannitol 생산특성을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 시약

사용균주는 김치발효과정 중에 본 연구실에서 직접 분리한 *Leuconostoc* sp. KY-002를 사용하였고, HPLC 분석에 사용된 시약을 제외한 모든 시약들은 시약등급을 사용하였다.

### 발효실험

*Leuconostoc* sp. KY-001 균주를 glucose를 제외한 MRS배지(proteose peptone 10 g, beef extract 10 g, yeast extract 5 g, ammonium citrate 2 g, sodium acetate 5 g, magnesium sulfate 0.5 g, manganese sulfate 0.25 g, dipotassium phosphate 2 g, tween 80 1.0 mL/l 증류수)를 표준배지로 사용하여, 적정농도의 탄소원을 포함하는 100 mL 배지를 250 mL 플라스크에 넣고 교반배양기를 이용하여 발효실험을 수행하였다. 미생물의 성장은 600 nm에서 흡광도(Cecil Instruments, 영국)를 측정하여 관찰하였다. 특별한 설명이 없는한, MRS배지에 50 g/L fructose를 별도로 살균하여 첨가한 배지를 표준배지로 사용하여 35°C에서 200 rpm으로 70시간 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 사용하였으며(0.6 mL/min) 컬럼 온도는 85°C로 유지해 주었다. TLC분석은 aluminium sheet(Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck)상에 시료 10μL를 흡착시켜 methylethylketone-acetic acid-water(9:1:1 v/v) 용액 중에서 전개시킨 다음 silver nitrate를 이용하여 발색시켰다.

## 결과 및 고찰

### 탄소원의 영향

대표적인 젖산균인 *Lactobacillus*속과 *Leuconostoc*속 미생물들이 mannitol을 생합성하는 경로는 포도당을 전자공여체로 이용하여 2M의 과당을 기질로 heterofermentation(glucose+2 fructose→2 mannitol+acetic acid+lactic acid+CO<sub>2</sub>)을 수행한 결과로 알려져 있다(5, 6). 본 연구에서 사용한 *Leuconostoc* sp. KY-002 균주의 경우, Table 1에서 보여주는 바와 같이 fructose와 sucrose를 제외하면 검토된 다른 당류들은 mannitol로 전환시키지 못하였다. 한편 glycerol, sorbitol, xylitol 등의 당알콜류 배지를 제외하고는 검토된 모든 탄소원배지에서 미생물성장은 대체로 좋았으나 mannitol은 생성하지 않았다. 따라서 mannitol 생산에 가장 효과적인 50 g/L fructose를 탄소원으로 배양하였을 때, 발효 70시간에서 초기 사용된 fructose 기준으로 약 52%의 수율을 나타내었다(Fig. 1). 발효시작 70시간 전후에서 fructose는 37g/L 이용되었으며 생성된 mannitol은 다시 탄소원으로 이용되지 않았다. 이 결과는 저자들이 분리한 다른 젖산균인 *Lactobacillus*속 세균과는 다른 특성인데, 즉 *Lactobacillus* sp. KY-107의 경우(11), 초기 탄소원이 고갈된 후 생성된 mannitol이 다시 기질로 이용되므로 세심한 발효공정의 제어가 필요하다는 점과 비교되는 점이다. 한편 sucrose 배지에서는 발효초기부터 mannitol이 생성되기 시작하여 발효 30시간에서 약

Table 1. Effect of carbon sources on mannitol production by *Leuconostoc* sp. KY-002.

Carbon sources (50g/L)	Mannitol conc. (g/L)	Cell growth ( $A_{600}$ )
Glucose	0	0.990
Fructose	26.1	1.485
Galactose	0	0.675
Maltose	0	1.026
Sucrose	12.3	1.266
Mannose	2.2	1.140
Sorbitol	0	0.534
Mannitol	0	0.332
Glycerol	0	0.339
Xylitol	0	0.420

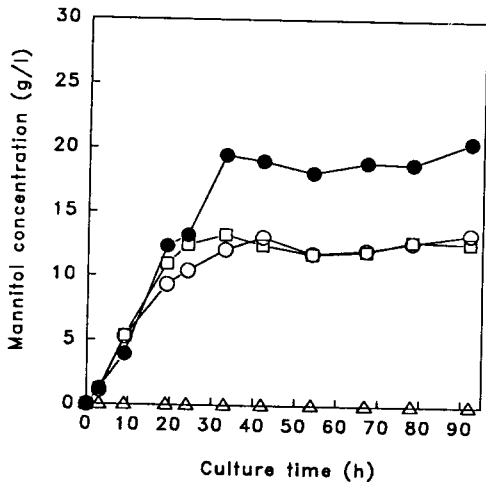


Fig. 1. Effect of carbon sources on mannitol production by *Leuconostoc* sp. KY-002: (●) 50 g/L fructose, (○) 25 g/L glucose plus 25 g/L fructose, (□) 50 g/L sucrose, (△) 50 g/L glucose.

26%의 수율을 보였다. 이 결과는 *Lactobacillus* sp. KY-107 균주의 경우와 매우 다른 발효양상인데, *Lactobacillus* sp. KY-107의 경우, sucrose 배지에서는 발효시작 20시간이 경과한 후 비로소 mannitol이 생성되기 시작하였는데, 이것은 sucrose phosphorylase에 의해 sucrose가 분해되어 fructose가 배양액 중에 유리된 후 mannitol dehydrogenase가 induction 됨으로서 일정시간이 경과한 후 mannitol이 생산된다는 사실을 보고한 바 있다(13). 또한 포

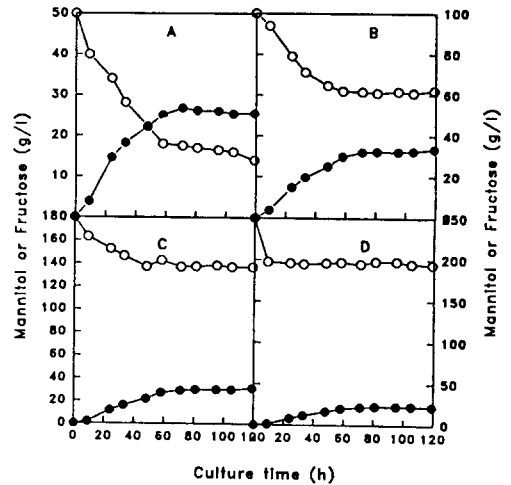


Fig. 2. Effect of initial concentrations of fructose on mannitol production by *Leuconostoc* sp. KY-002: (A) 50 g/L, (B) 100 g/L, (C) 180 g/L, (D) 250 g/L; (●) mannitol, (○) residual fructose.

도당과 과당을 각각 12.5 g/L씩 첨가하여 다른 젖산균들의 경우처럼 mannitol 생성에 포도당이 어떤 영향을 미치는가를 조사한 결과, Fig. 1의 결과에서 보여주는 바와 같이, sucrose 배지에서와 동일한 발효결과를 얻음으로써 포도당 첨가효과는 없으므로 나타났다. 따라서 이 세균의 mannitol 생성메카니즘(Glucose + 2 Fructose → 2 Mannitol + Acetate + Lactate + CO<sub>2</sub>)은 일반 젖산균들과는 carbon balance에서 다소 차이가 나는 것으로 추정된다.

초기 과당농도의 영향

Mannitol 생성에 가장 효과적인 기질인 fructose를 50-250 g/L의 농도범위로 각각 첨가하여 발효를 수행한 결과, Fig. 2의 결과에서 보여주는 바와 같이 50 g/L의 경우는 수율이 70시간 발효에서 52% 수준으로 비교적 높게 나타났으나, 그 이상의 농도에서는 전환률이 낮아서 100, 180, 250 g/L에서의 최대 수율은 각각 33, 18, 8%에 불과하였다. 당알콜의 생산공정에서 가장 중요한 인자의 하나는 고농도당을 미생물이 직접 기질로 이용할 수 있어야 하는 것인데, 이런 관점에서 *Leuconostoc* sp. KY-002 균주는 내삼투압성(osmotolerance)이 낮아서 효과적인 mannitol 생산공정에 직접 응용하기 위해서는 별도의 균주개량 연구가 필요할 것으로 판단된다.

Table 3. Effect of nitrogen sources on mannitol production by *Leuconastoc* sp. KY-002.

Carbon sources (50g/L)	Mannitol conc. (g/L)	Cell growth (A <sub>600</sub> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.3	1.672
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	18.7	1.702
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18.8	1.724
Urea	17.3	1.612
NaNO <sub>3</sub>	18.6	1.642
NH <sub>4</sub> Cl	16.8	1.572
KNO <sub>3</sub>	18.4	1.652
Asparagine	14.5	1.042
Glycine	13.7	0.933
Yeast extract	26.7	1.786

Table 3. Effect of inorganic phosphate on mannitol production by *Leuconastoc* sp. KY-002.

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> conc. (g/L)	Cell growth (A <sub>600</sub> )	Mannitol conc. (g/L)
0	1.640	22.4
1	1.659	23.0
2	1.663	24.3
5	1.673	25.7
10	1.733	25.7

#### 질소원의 영향

탄소원과 더불어 당알콜류의 생산에 중요한 영향을 미치는 인자는 질소원인데, 미생물이 이용하는 질소원의 종류에 따라 생합성경로가 조금씩 차이가 나서, 생성되는 당알콜류의 종류와 양이 달라지는 경우가 있다(14, 15). Table 2의 결과에서 보여주는 것처럼, 검토된 대표적인 질소원들 중에서 yeast extract를 사용한 경우 mannitol 생성량이 가장 높게 나타났고, glycine을 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 있었다.

#### Phosphate 농도의 영향

몇몇 yeast의 경우, 과다하게 첨가된 phosphate

Table 4. Effect of various mineral sources on mannitol production by *Leuconastoc* sp. KY-002.

Minerals (2 mM)	Cell growth (A <sub>600</sub> )	Mannitol conc. (g/L)
No mineral	1.532	25.4
Mg	1.069	20.1
Mn	1.058	21.4
Mg+Mn	0.987	19.7
Zn	1.101	20.8
Cu	0.267	0
Co	1.100	20.3
K	0.992	23.1
Fe	1.113	22.1
Ni	1.127	23.6

는 당알콜류의 생산을 저해한다는 보고가 있고(16, 17), 무기인산염이 NAD 또는 NADP가 결합된 산화환원효소계(oxidoreductase)에서 중요한 역할을 담당할 것으로 판단되어, 발효배지 중에 phosphate 농도를 각각 1-10 g/L 첨가하여 그 영향을 고찰하였다. Table 3의 결과에서 처럼 실험농도 범위내에서 phosphate 농도가 증가할수록 mannitol 농도가 증가하였고, 미생물의 성장은 phosphate 첨가농도에 큰 영향을 받지 않았다.

#### 금속이온의 영향

Mannitol dehydrogenase 반응에서 금속이온의 영향은 지금까지 잘 알려져 있지 않은 편인데, 본 연구에서 사용한 균주의 경우 여러 가지 금속이온들을 첨가하여 미생물 성장과 mannitol 생성에 미치는 영향을 고찰하고자 하였다. Table 4에서 보여주는 바와 같이, 표준배지로 사용한 MRS배지 중에 포함되어 있는 Mg 또는 Mn 이온이 각각 첨가된 배지가 금속이온을 첨가하지 않은 경우에 비해 미생물 성장과 mannitol 생성량 모두 불리한 결과를 나타내었다. 한편 Cu를 첨가한 배지에서는 미생물 성장이 크게 저해되어 mannitol 이 전혀 생산되지 않았다.

#### 염(NaCl 및 KCl)의 첨가 영향

당알콜류의 생산은 내삼투성 미생물들의 경우 NaCl 또는 KCl 등의 염의 첨가에 의한 수분활성의 영향을 크게 받아 고농도 염의 첨가에 의해 당알콜류의 생산이 크게 증가되는 예가 많다(18, 19). 따

Table 5. Effect of NaCl and KCl on mannitol production by *Leuconostoc* sp. KY-002.

NaCl or KCl	Conc.(M)	Cell growth ( $A_{600}$ )	Mannitol conc. (g/L)
Control	0	1.712	25.8
NaCl	0.25	1.548	17.6
	0.5	1.526	9.9
	1.0	0.800	8.2
KCl	0.25	1.684	17.5
	0.5	1.382	9.3
	1.0	0.490	trace

Table 6. Effect of vitamins on mannitol production by *Leuconostoc* sp. KY-002.

Vitamins(1 g/L)	Cell growth ( $A_{600}$ )	Mannitol conc. (g/L)
None	1.684	25.2
Biotin	1.704	25.4
Nicotinic acid	1.631	29.2
Thiamine	1.428	22.5
Pantothenic acid	1.672	27.5

라서 본 연구에서도 이에 대한 영향을 고찰하기 위하여 NaCl 및 KCl을 수분활성인자(stress solute)로 선택하여 배지 중에 각각 고농도로 첨가한 후 배양결과를 관찰하였다. 그 결과, Table 5에서 보여주는 바와 같이, NaCl과 KCl의 첨가는 미생물 성장을 크게 저해해서 역효과를 나타내었는데, 1.0 M의 농도에서는 미생물이 거의 성장하지 않았다. 그러나 일반적으로 염농도가 높은 조건에서는 당알콜류의 대사과정이 변하게 되어 glycerol 등의 다른 당알콜류를 함께 생성하는 예가 있는데(20), *Leuconostoc* sp. KY-002의 경우 염의 첨가에 의해서도 다른 당알콜류는 전혀 생성하지 않았다.

#### Vitamin의 첨가 영향

이상의 발효조건 최적화 결과를 기초로, mannitol 발효를 촉진시킬 수 있는 영향인자를 검토할 목적으로 vitamin류들을 첨가하여 발효를 수행하였는데, 그 이유는 몇몇 vitamin은 대부분의 젖산균들에 있어서 중요한 성장인자인 동시에 특정 대사산물의 생산을 촉진시킨 예가 가끔 보고되고 있기 때문이다(21). Table 6에서 그 결과를 나타내었는데, thiamine을 제외하면 첨가한 모든 vitamin류가 mani-

Table 7. Effect of temperature on mannitol production by *Leuconostoc* sp. KY-002.

Temperature(°C)	Cell growth( $A_{600}$ )	Mannitol conc.(g/L)
20	1.502	21.8
25	1.553	22.1
30	1.609	24.9
35	1.621	26.0
40	1.567	23.7

Table 8. Effect of initial pH on mannitol production by *Leuconostoc* sp. KY-002.

Initial pH	Final pH	Cell growth ( $A_{600}$ )	Mannitol conc. (g/L)
4.00	3.90	0.334	trace
5.00	3.94	1.561	20.6
6.00	3.98	1.638	25.7
7.00	4.02	1.631	24.0
8.00	4.97	1.112	trace
9.00	7.90	0.124	ND <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Not Detected

tol 생산을 증가시켰고, 특히 nicotinic acid를 첨가하였을 경우 16% 정도 발효농도가 증가되었다. 이것은 mannitol 생합성에서 mannitol dehydrogenase의 조효소인 NAD(P)H의 전구물질로 nicotinic acid를 이용할 수 있고, 그 결과 발효중에 조효소의 농도를 높게 유지시켜 주었기 때문일 것으로 판단된다.

#### 배양온도 및 초기 pH의 영향

Mannitol 생성을 위한 최적 배양온도를 결정하기 위하여 20~40°C의 온도범위에서 배양실험을 수행한 결과, 35°C에서 최적이었으며(Table 7), 이는 다른 젖산균들의 최적 성장온도와 유사한 조건이다. 한편 mannitol을 생산하는 젖산균들은 heterofermentation을 수행하여 mannitol을 생산하므로 부산물로 lactic acid 또는 acetic acid를 생성하게 되는데, 이들이 발효과정 중에 배양액의 pH를 크게 낮추게 되고 이 결과 미생물의 성장이나 mannitol 생성에 미치는 영향은 대단히 클 것으로 예상되었다. 따라서 초기 pH가 서로 다른 조건에서 배양하여 그 영향을 간접적으로 고찰하고자 하였다(Table 8). 그 결과, 초기 pH 4 이하, 그리고 8 이상의 조건에서는 미생물의 성장정도에 관계없이 mannitol이 전혀

생성되지 않았고, mannitol 생성량은 초기 pH가 6으로 조정된 경우 가장 좋은 결과를 보여주었다. 이것은 pH가 제어되지 않는 mannitol 발효에서 mannitol dehydrogenase 효소반응이 pH 4~6 정도의 산성조건에서 효과적이기 때문인 것으로 추정된다.

## 요 약

김치발효 중에 분리한 젖산균의 일종인 *Leuconostoc* sp. KY-002를 이용하여 mannitol 생산 특성을 검토하였다. 여러 가지 탄소원 중에서 설탕과 과당만이 mannitol 생성의 기질로 이용되었고, 50 g/L 과당을 기질로 사용할 경우 mannitol 생산성이 가장 좋았으며 이때 최대수율은 초기과당 기준으로 약 52%이었다. 초기 탄소원이 고갈될 경우, 생성된 mannitol이 다시 기질로 이용되지 않았고, 100~250 g/L 이상의 고농도 기질농도에서는 수율이 30% 이하 수준으로 낮았으나, 모든 실험조건에서 다른 당알콜류를 부산물로 생성하지 않았다. Mannitol 생성에 미치는 여러 가지 배양인자들을 검토한 결과, 질소원으로 yeast extract가 가장 우수하였고, 무기인산염은 10 g/L 농도 범위까지 농도가 높을수록 유리하였으며, 금속이온과 NaCl, KCl 등의 염류의 첨가는 mannitol 발효에서 역효과를 나타내었다. 몇 가지 vitamin류의 첨가에 의해 mannitol 생산을 촉진시킬 수 있었는데, 특히 nicotinic acid의 첨가에 의해 발효농도를 16% 증가시킬 수 있었다. 배양환경중 온도는 35℃, 초기 pH는 6이 최적이었다.

## 감 사

이 논문은 1995년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

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), *Proc. of Physiol. Immobilized Cells*, pp. 307-310.
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. J. W. Yun, S. C. Kang, and S. K. Song (1996), *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 279.
11. J. W. Yun, S. C. Kang, and S. K. Song (1996), *Biotechnol. Lett.*, **18**, 35.
12. 강선철, 윤종원, 노태욱(1996), *한국생물공학회지*, **11**, 181.
13. 윤종원, 강선철, 류병호, 송승구(1996), *한국생물공학회지*, **11**, 374.
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. J. W. Yun, M. G. Lee, and S. K. Song(1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 359.
19. K. Tokuoka, T. Ishitani, and W. C. Chung (1992), *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **38**, 35.
20. J. W. Yun and S. K. Song(1994), *Biotechnol. Lett.*, **16**, 949.
21. Z. Kossaczka, E. Machova, and A. Vojtkova-Lepsikova(1991), *Appl. Microbiol., Biotechnol.*, **36**, 375.