

**Leuconostoc mesenteroides sp. strain JFY 균주에 의한 만니톨 발효 조건의 최적화**유선균\* · 허상선 · 송석환<sup>1</sup> · 김경민<sup>2</sup> · 황경숙<sup>3</sup>중부대학교 공과대학 한방 건강 식품학과, <sup>1</sup>중부대학교 환경 보건학과, <sup>2</sup>경북대학교 유전공학 연구소, <sup>3</sup>목원대학교 생명산업학부

Received March 31, 2005 / Accepted May 10, 2005

**Optimization of Mannitol Fermentation by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY.** Sun Kyun Yoo\*, Sang Sun Hur, Suckhwan Song<sup>1</sup>, Kyung Min Kim<sup>2</sup> and Kyung Sook Whang<sup>3</sup>. Department of Oriental Medicine and Food Biotechnology, College of Engineering, Joongbu University, Geumsan-Gun, Choobu-Myun, Chungnam, 312-702, Korea, <sup>1</sup>Department of Environmental Health, College of Engineering, Joongbu University, Geumsan-Gun, Choobu-Myun, Chungnam, 312-702, Korea, <sup>2</sup>Institute of Genetic Engineering, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea, <sup>3</sup>Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon, 302-729, Korea – The production of functional foods providing health benefit is one of the fast growing fields in the food industry. Mannitol as GRAS (generally recognized as safe) is a functional food. Mannitol is about 70% as sweet as sucrose and slowly and incompletely absorbed from the intestine, supplying only about one-half energy value of glucose. Commercially, the mannitol is synthesized by catalytic or electrochemical reduction of glucose. However, as strong demand for natural products increased, biological techniques have been developed for mannitol production. The object of this study was to determine the optimum conditions of mannitol fermentation by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY isolated from fermented vegetables. The processes parameters such as pH, temperature, yeast extract concentration, and fructose concentration were optimized. The chosen ranges were 4.5 to 7.5 for pH, 22 to 34°C for temperature, 0.05 to 2.0% for yeast extract, and 5 to 350 g/L for fructose. The mineral medium used consisted of 3.0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 g FeSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.01 g MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.2 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.01 g NaCl, and 0.05 g CaCl<sub>2</sub> per 1 liter of deionized water. The optimum values of pH, temperature, yeast extract, and fructose concentration were obtained at about pH 6.5, temperature 28°C, yeast extract 0.5% and fructose 30 g/L. At optimum condition, the production of mannitol amounted to 31.6 g/l. We hope that these findings are of particular importance for industrial application of mannitol production.

**Key words** – *Leuconostoc mesenteroides*, mannitol, processes optimization, functional foods.

최근 전통적인 영양의 개념을 뛰어넘어 건강을 증진시키고 궁극적으로는 질병을 치료하는 데 기여를 할 수 있는 기능성 식품에 대한 수요가 급격히 증가하고 있다[9]. 기능성 식품첨가물 중에서 당알코올은 최근 그들의 탁월한 기능성이 알려지면서 수요가 증가하고 있다. 당알코올 중에서, 만니톨은 인체에 독성이 없어 미국 FDA에 의하여 GRAS (Generally Recognized As Safe)로 승인이 되어 식품, 화장품, 제약 산업 등에 매우 광범위하게 이용되고 있다[5]. 현재까지 대부분의 만니톨은 포도당로부터 촉매나 전기화학적 합성공정에 의해 주로 생산되어 왔으나, 화학적 방법은 포도당과 만니톨의 분리 정제가 어렵고 고온 고압의 반응이므로 촉매물질 사용에 의한 위험성과 폐기물 처리의 단점이 있다[10]. 또한 최근에 인공 합성 방법으로 제조된 물질에 대한 소비자의 기피 현상과 더불어 상대적으로 천연 원료에 대한 선호도가 급증하여 왔다. 실제로 FDA와 The Code of Federal Regulations (21 CFR 101.22.a.3)의 규정에 따라 생물체나 생물체의 구성성분을 이용하여 생산되어 지거나 전환된 물질 (bioconversion

products)에 대하여 “natural” 이라는 표기 (label)를 할 수 있도록 명시할 수 있다.

만니톨은 정제용 (tablets)이나 주사용 제제에 이노성을 촉진시키는 첨가제로서 사용되어 오고 있으며, 만니톨과 deferoxamine의 혼합물은 신장기능 저하 문제로 인한 myohemoglobinuric acute에 대하여 보호를 하며, 관상동맥을 지나 피부이식 수술을 수행시 우려되는 혈장의 hydrogen peroxide free radical 발생을 현저하게 감소시킨다[21,25]. 만니톨은 자일리톨 처럼 대표적인 충치유발균인 *S. mutans*의 성장을 억제함으로써 프라그 치면 세균막 내에서의 산 생성을 감소시켜 프라그 형성을 감소시키기 때문에 치약의 제조시 첨가물로써 사용할 수 있다. 이외에 만니톨은 고급 생체용 플라스틱 제조시 가소제로서 사용하기도 한다[19].

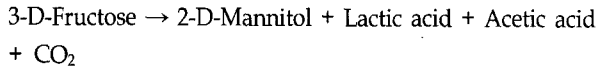
이러한 다양한 기능을 가진 만니톨의 생물학적 생산의 시도는 극히 최근의 일이다. 미생물활동에 의한 만니톨의 존재는 주로 젖산균으로부터 시작을 하였는데, 초기의 연구자들인 Fred, Peterson과 Fred (1920)에 따르면 *Lactobacillus*는 발효특성에 따라 크게 두 그룹으로 분류하였다[13]. 동형발효균들은 과당으로부터 락토오스와 약간의 다른 유기산 등을 생산하는 반면에 이형 발효에서는 상당량의 만니톨, 이산화

**\*Corresponding author**

Tel : +82-41-750-6206, Fax : +82-750-6573

E-mail : skyoo@joongbu.ac.kr

탄소와 아세테이트를 생산한다. 이런 형태의 발효를 수행하는 젖산균의 발효 수지식은 다음과 같다[1,3,4,11].



오래 전부터 외국에서는 포도주 생산을 위한 발효 공정상에서 일부 젖산균이 당을 만니톨로 전환시켜 제품의 품질을 떨어뜨리는 현상에 주목해왔다. 이후 이와 같은 젖산균 중에서 *Lactobacillus brevis*와 *Leuconostoc mesenteroides*로부터 mannitol dehydrogenase가 정제되었는데, 반응 조건에 따라 효소 반응을 시험한 결과 과당에서 만니톨의 전환이 가역적임을 알아냈다[12,16]. 또한 혐기상태에서 젖산균들이 유기산 또는 알코올을 생산할 때처럼 이 효소는 NADH나 NADPH와 같은 조효소들이 반응에 필수적으로 참여해야 한다는 사실이 밝혀졌다[14,15,20]. 만니톨을 식품, 플라스틱 제조, 의약품 원료로 사용하기 위하여 상업적 관점에서의 연구가 최근에 시도되었는데 *Zygosaccharomyces rouxi*를 이용하여 농축 포도당으로부터 ethanol, glycerol, arabitol, mannitol의 혼합물을 생산하였다[8]. 최종 생산물 분리를 위하여 사용된 이온교환수지는 arabitol과 mannitol을 분리하지 못하였을 뿐만 아니라 200 g/l의 포도당 초기농도로부터 비교적 낮은 수율인 50 g/l를 얻었다. 국내에선 젖산균 또는 효모를 이용하여 만니톨을 포함한 당알코올을 최대 수율 23% 정도 생산하는 것을 보고하였다[17,23,24]. 위의 이러한 방법들은 순수한 당알코올을 정제하는데 어려움과 고비용이 수반될 것으로 보여진다. 한편 전 연구들[19,20]에서 순수하게 정제된 mannitol dehydrogenase에 의한 과당으로부터 만니톨 전환율이 90%로 매우 높게 보고 되었지만 산업화하기엔 NADH와 같은 고가의 조효소를 별도로 외부로부터 공급하여야 하므로 필연적으로 생산 가격의 상승 때문에 경제성이 문제가 될 수 있다.

*Leuconostoc mesenteroides* B-742 균을 이용하여 설탕으로부터 텍스트란과 만니톨, 올리고당과 만니톨을 생산하는 방법이 최근 보고되었는데 mannitol dehydrogenase는 과당의 과당이 존재하는 경우에 대분의 과당이 전자 수용체(electron acceptor) 역할을 하여 만니톨로 환원되는 현상이 관찰되었다[2,6,7,18,22]. 기질로서 과당만이 존재하는 경우에 과당의 일부를 에너지와 균체 성장에 이용하고 나머지 대부분은 만니톨로 전환함을 발견되었다[22]. 본 연구에서는 만니톨 생산 균주들 중에서 우수한 균주를 선별하고 온도, pH, yeast extract, 과당의 농도에 대한 최적 발효 조건을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리 및 배양

만니톨 발효 젖산균을 배추, 무우, 파 김치등에서 직접 배양법(enrichment culture technique)으로 분리하였다. 김치가

들어 있는 용기의 바닥부근에 액체 broth에서 한 백금이를 취하여 MRS (Difco, NJ, USA)평판 배지에 옮겨 30°C에서 48시간 배양 하였다. 전형적으로 유산균으로 보이는 콜로니들 중에 *Leuconostoc* 속 미생물을 분리하기위하여 설탕을 5% 함유한 TSA (Difco, NJ, USA)에 옮겨 24시간 배양 하였다. 분리된 텍스트란 생산 *Leuconostoc* 속들 중에서 우수한 만니톨 생성능력을 보인 균을 *Leuconostoc* sp. strain JFY라고 잠정적으로 명명하였다

실험에 사용된 모든 균주는 염배지 (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/l; FeSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.01g/l; MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.01 g/l; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l; NaCl 0.01 g/l; CaCl<sub>2</sub> 0.05 g/l)를 이용하여 배양하고 보관 하였는데, 한천 배지는 염배지에 1.5% 한천을 넣어 제조 하였다. 실험하기 전까지 균주는 2% 과당과 0.5% 효모 추출물을 포함하고 있는 MMA배지를 20×125 mm 시험관에 사면배지를 만들어 5°C에서 보관 하였다. 실험 균주는 사면배지에서 한 백금이에 해당하는 균체량을 2% 과당과 0.5% 효모 추출물을 포함하고 있는 10 ml 염배지가 들어 있는 25×150 mm 시험관에 옮기고 30°C, 200 rpm에서 24 시간 배양 후 사용하였다.

### 만니톨 생산을 위한 발효조건 최적화

만니톨 발효에 대한 최적 온도를 알기 위해서 2.5% 과당, 0.5% 효모 추출물을 포함하고 있는 50 ml MM를 250 ml 플라스크에 넣고 pH 6.0 으로 40% NaOH를 이용하여 보정하였다. 배양 플라스크들은 진탕기(shaker)에서 배양되었는데, 진탕기 배양 온도 조건을 각각 22, 25, 28, 31, 34°C으로 보정 후 수행하였다. 만니톨 발효에 대한 최적 pH를 알아보기 위해서 2.5% 과당, 0.5% 효모 추출물을 포함하고 있는 50 ml 염배지를 250 ml 플라스크에 넣고 pH를 각각 4.6, 5.2, 6.1, 6.5, 7.5로 40% NaOH를 이용하여 보정하였다. 배양 온도는 전 실험에서 최적 온도로 정해진 28°C에 고정을 하고 교반속도는 200 rpm로 유지하였다. 만니톨 발효에 대한 최적 효모 추출물의 농도를 알기 위해서 2.5% 과당을 포함하고 있는 50 ml 염배지를 250 ml 플라스크에 넣고 효모 추출물의 농도를 각각 0.05, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0% (w/v)으로 맞춘후 최적 pH 6.5와 최적 배양온도 28°C에서 발효를 수행하였다. 만니톨 발효에 대한 최적 과당의 농도를 알기 위해서 0.5% 효모 추출물을 포함하고 있는 50 ml 염배지를 250 ml 플라스크에 넣고 과당의 농도를 5.0, 30, 100, 250, 350 (w/v)으로 보정하였다. 각각의 배양 플라스크들은 증기 멸균기를 이용하여 살균 후에 24 시간 배양된 배양액을 2% (v/v)점중을 하였다. 배양 시간은 균체 성장이 정지기(stationary phase)에 도달 하여 평형을 이룰 때 까지 수행하였다.

### 분석 방법

건조 균체량은 80°C에서 24시간 동안 건조 후에 측정된

건조 균체량과 이에 해당하는 흡광도 값을 이용하여 표준 곡선을 만들어 측정 하였다. 발효 공정 중의 당 분석은 HPLC (Waters, Millipore, MA, USA)와 refractometer (Millipore, MA, USA)가 사용되었다. 컬럼은 Sugar-Pak ion exchange/size exclusion (Millipore, MA, USA)가 사용되었고, 사용 중 칼럼의 온도는 90℃로 고정하였다. 이동상(mobile phase)은 deionized water가 사용되었고 이동상의 속도는 0.5 mL/min 이었다.

### 결과 및 고찰

#### 만니톨 생산을 위한 배양 온도의 영향

*L. mesenteroides* sp. strain JFY의 성장의 온도에 대한 영향을 실험하기 위하여 다른 배양 조건들을 고정하고 균체의 성장이 뚜렷이 정지기를 보일 때까지 배양하였다. 22℃~28℃ 온도 범위 내에서는 초기에 약 5시간 정도의 유도기를 지나 급격히 성장을 하는 양상을 보여 주었고 이 온도 이상에서는 유도기가 길어졌고 성장 속도가 현저하게 감소하였다(Fig. 1A). 정지기에 도달하는 시간은 실험 온도 범위 내에서는 비슷한 양상을 보였는데, 최대 균체량은 28℃에서 나타났다. 만니톨 발효중 만니톨의 생산과 과당의 소비는 배양온도에 따라서 뚜렷이 차이가 있었다 (Fig. 1B). 배양온도가 22℃에서 28℃까지는 만니톨의 생산량이 계속 증가함을 보여 주었고, 이 온도 이상에서는 급격히 생산량이 감소함을 나타내었다. 이러한 경향은 과당의 소비량 변화와도 밀접하게 연관이 되어 25℃와 28℃에서는 약 95% 이상의 과당이 소비되었으나 31℃에서는 약 40%, 34℃에서는 약 30% 정도가 소비되었다. 위의 결과로 만니톨 생산에 대한 최적온도는 28℃ 부근에서 결정되었다.

일반적으로 균체의 생산량은 균체를 이용한 생물 전환 공정에서 얻고자하는 최종 생산물의 양과 상관관계가 있는 것으로 알려져 왔다[19]. 이를 확인하기 위하여 *L. mesenteroides* sp. strain JFY의 균체의 생산과 과당으로부터 만니톨의 생물 전환율에 대한 관계를 관찰하고, 온도의 영향에 대하여 연구 하였다(Fig. 2A). 균체량에 대한 온도의 영향은 Fig. 2A에서 보이는 것처럼 과당의 소비량과 동일한 경향을 보였으며, 최대 균체량은 28℃에서 약 2.6 g/l가 생산되었다. 이 온도에서 역시 최대 만니톨의 수율 및 비수율이 결정된 것으로 보아, 생산된 균체량은 직접적으로 만니톨생산 수율에 영향을 미치는 것으로 보인다. 측정 최대 온도인 34℃에서 만니톨의 수율(0.32)은 28℃(0.84)에서 약 2.8배 낮았고, 반면에 비수율은 1.9 배정도 낮은 것으로 보아 높은 온도에서는 균체 당 만니톨 생산 효율이 높다고 볼 수 있다. 만니톨의 생산속도와 비생산 속도는 직접적으로 생산 공정에서의 최종 생산량에 영향을 미치므로, 최적 생산 속도를 결정하는 것은 생물 공정에서 최고의 관심 중의 하나이다[19,24]. 온도의 변화에 대한 만니톨의 생산속도와 비생산 속도의 변화는 대체로 일치

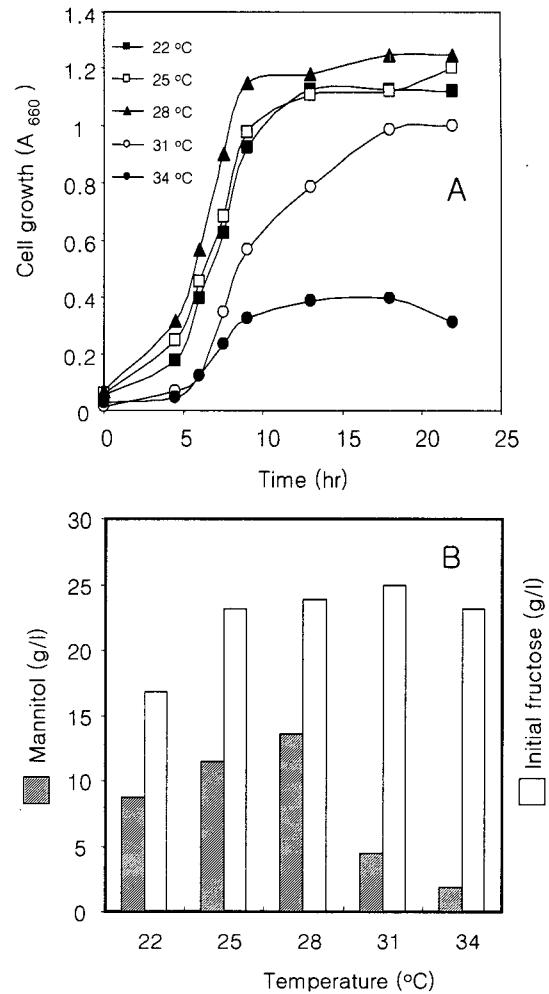


Fig. 1. Effect of culture temperature on cell growth (A) and mannitol production (B) by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY.

하였는데, 22℃~28℃ 사이에서는 두 값은 증가 하였으며 28℃ 이상 34℃ 까지 급격히 감소하는 양상을 나타내었다(Fig. 2B). 28℃에서 최대 생산 속도(30.2 g/l-h)는 주변의 온도인 25℃에서 보다 약 1.2 배 증가하였고, 31℃와 비교할때 약 4.3 배 증가함을 보였다. 28℃에서 비생산속도 역시 최대(11.6 g/g-hr) 를 보였는데 주변온도인 25℃ 와 31℃에서 보다 각각 약 1.1 배, 2배 정도 증가함을 보였다.

#### 만니톨 생산을 위한 배양 pH의 영향

최적온도 28℃에서 배양 pH를 4.6~7.5로 변화시키면서 균체 성장과 만니톨 생산을 고찰하였다. 비교적 낮은 pH 인 4.5~5.2에서는 세포의 성장속도가 pH 6.1 이상에서 보다 현저하게 낮았다(Fig. 3A). 과당으로부터 만니톨로의 생물 전환 공정에서 최종 만니톨의 농도는 발효공정 전체에 대한 평가를 의미하기 때문에, 균체의 성장이 정지기에 도달 할 때까지 배양 pH가 최종 만니톨의 생산과 탄소원인 과당의 소비

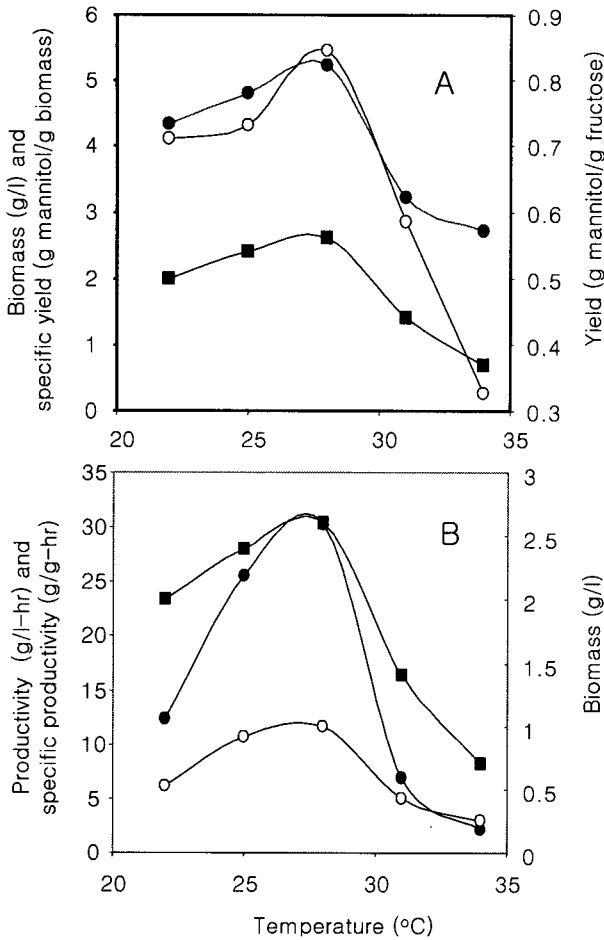


Fig. 2. Effect of temperature on mannitol yield and productivity produced by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY. (A) Biomass (■), yield (○), and specific yield (●). (B) Biomass (■), specific productivity (○), and productivity (●).

에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험을 수행하였다. 그 결과, 발효 진행중 만니톨의 생산과 과당의 소비는 배양 pH에 따라서 뚜렷한 차이가 있었다(Fig. 3B).

배양 pH가 4.6에서 6.5까지는 만니톨 생산량이 계속 증가함을 보여 주었고, pH 6.5 이상에서는 생산량이 서서히 감소함을 나타내었다. 최대 만니톨 생산은 pH 6.5에서 13.68 g/l로 결정되었는데, 이는 소비된 과당의 약 55%가 만니톨로 전환되었음을 보여 주는 것이다. 과당의 소비는 pH 5.2에서 7.5까지 5%이내의 차이를 보인 반면 만니톨생산에 pH가 미치는 경향과는 다르게 나타났다. 생산된 균체량은 초기 배양 pH 7.5에서 낮아질수록 큰 차이는 없었지만 서서히 감소하였다(Fig. 4A). 최대량 2.7 g/l은 pH 7.5에서 결정되었고, pH 6.5에서 5.2까지는 2.2에서 2.4 g/l으로 비교적 큰 차이가 없었지만, pH 4.5에서도 비교적 성장을 하여 최종 균체량은 약 1.7 g/l 이었다. 배양 pH의 만니톨 발효 수율에 미치는 영향은 균체량의 생산에 미치는 영향과는 달리 최대 만니톨 수율은 pH 6.5에서 0.81로 결정이 되었고, pH 7.5에서는 0.74,

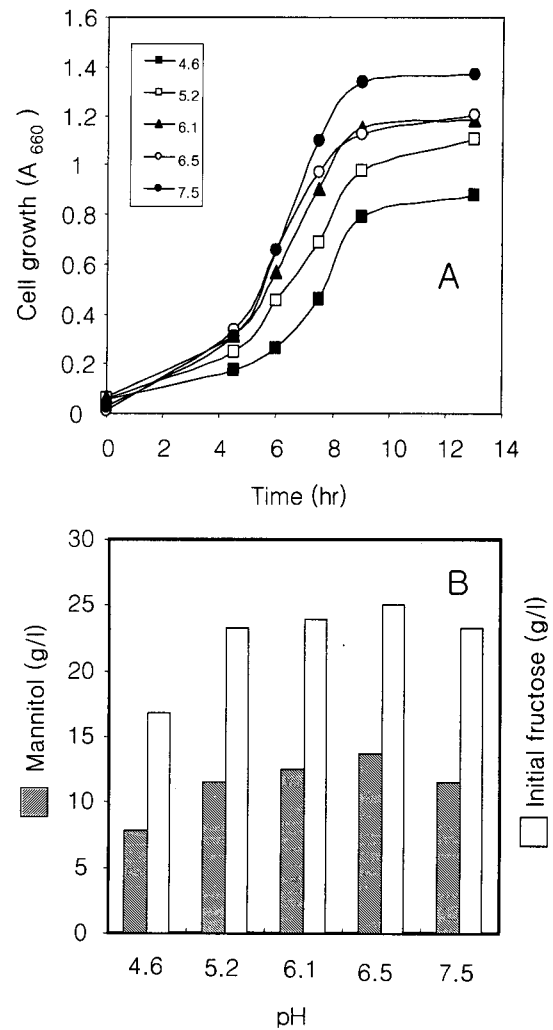


Fig. 3. Effect of culture pH on cell growth (A) and mannitol production (B) by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY.

pH가 낮아질수록 역시 수율은 낮아져 pH 5.2에서는 0.72로 감소하였다. 균체량에 대한 pH의 영향은 소비량과 같은 경향을 보였으며, pH 6.5에서 역시 최대 만니톨의 수율 및 비수율이 결정된 것으로 보아, 생산된 균체량은 직접적으로 만니톨생산 수율에 영향을 미치는 것으로 보인다. 배양 pH의 변환에 대한 만니톨의 생산속도와 비생산 속도의 변화는 대체로 일치하였는데, 낮은 배양 pH 4.6에서부터 생산속도가 증가하여 pH 6.5에서 최고(36.5 g/l-hr)에 도달한 후, 감소하기 시작하여 pH 7.5에서는 25.6 g/l-hr가 되었다(Fig 4B). pH 6.5에서의 생산 속도는 pH 4.6보다 2배, 6.1보다는 1.4배정도 증가하였는데, 이러한 경향은 비생산 속도의 경향과 일치 하였다.

**만니톨 생산을 위한 효모추출물의 영향**

최적온도 28°C, pH 6.5조건에서 효모 추출물 농도를 0.05~2% (w/v)로 변화 시키면서 균체 성장 및 만니톨 생산성을 고찰하였다. 전체적으로 균체의 성장은 약 4시간 정도의 유

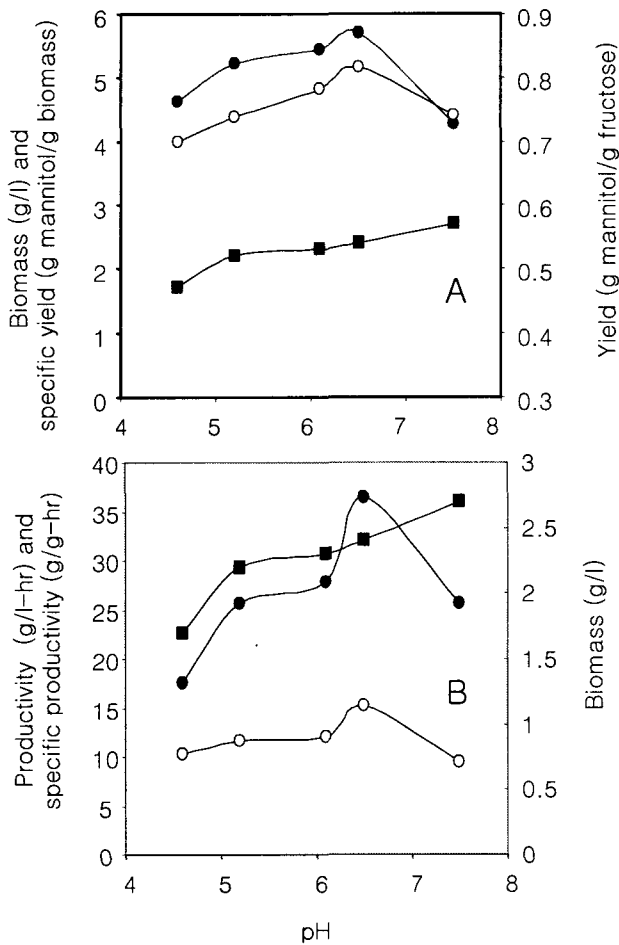


Fig. 4. Effect of culture pH on mannitol yield and productivity produced by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY. (A) biomass (■), yield (○), and specific yield (●). (B) biomass (■), specific productivity (○), and productivity (●).

도기를 지나 급격히 대수기에 접어드는 양상을 보여 주었는데, 농도 0.05%에서 세포의 성장속도가 그 이상의 농도에 비하여 현저하게 낮은 것으로 나타났다(Fig 5A). 균체의 성장이 정지기에 도달 할 때까지 효모 추출물의 농도가 최종 만니톨의 생산량과 탄소원인 과당의 소비에 미치는 영향을 고찰한 결과, 발효 진행중 만니톨의 생산과 과당의 소비는 효모 추출물의 농도에 따라서 뚜렷한 차이를 보였다(Fig. 5B). 효모 추출물의 농도가 0.05%에서 0.5% 까지 만니톨의 생산량은 계속 증가하였고, 0.5% 이상에서는 생산량이 서서히 감소하였다. 최대 만니톨의 생산은 0.5% 에서 13.5 g/l 이었는데, 흥미롭게도 2%에서는 만니톨의 양이 0.79 g/l로 나타나 만니톨의 생산과 균체의 성장과는 비례하지 않음을 보여주었다. 또한 0.05%의 낮은 농도에서도 질소원 대부분이 균체의 성장에 사용되었기 때문에 결과적으로 낮은 만니톨의 생산량을 보여준 것으로 보인다.

효모 추출물의 초기 농도가 균체의 생산량과 과당으로부터 만니톨의 생물 전환율에 대한 영향을 관찰하고, *L. mesen-*

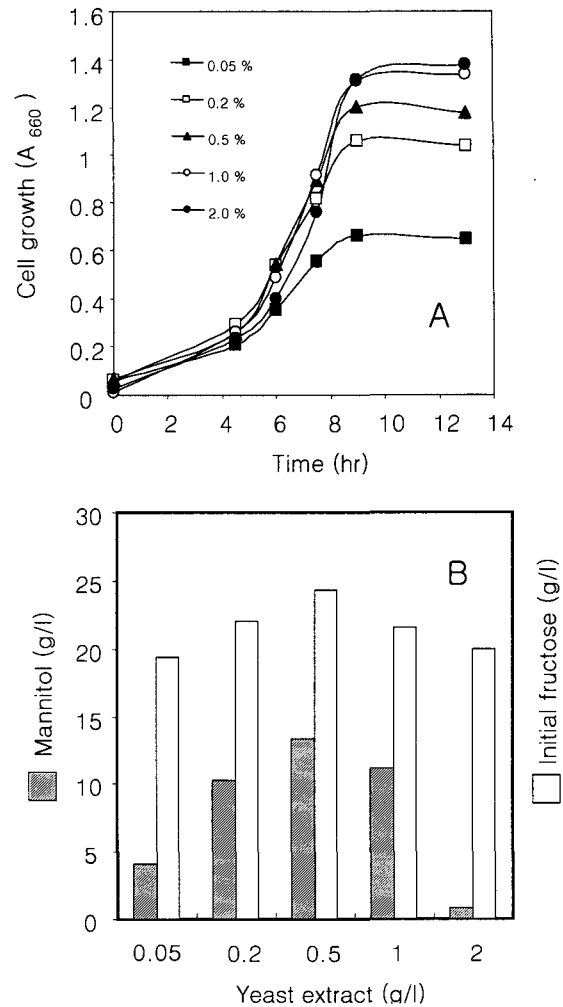


Fig. 5. Effect of yeast extract concentrations on growth (A) and mannitol production (B) by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY.

*teroides* sp. strain JFY 균체에 의한 만니톨 발효 효율성을 평가하였다. 균체 생산은 만니톨 생산 수율과는 전혀 다른 경향을 보여 주었는데, 효모 추출물의 농도가 높을수록 균체 생산은 계속 증가하였다(Fig. 6A). 이결과는 고농도의 효모 추출물이 젖산균 대사를 촉진시켜 주로 미생물의 에너지원과 buliding blocks의 증가에 영향을 준 반면, 과당의 만니톨로의 전환은 억제 된 결과로 추정된다[18,22,23]. 최고의 만니톨 수율은 효모 추출물 0.5%에서 결정되었는데, 이때 수율은 0.82로써 0.2% 보다는 1.2배, 1.0% 보다는 1.1 배정도 높았는데, 2%에 비해서는 무려 13.8배 높았다. 일반적으로 만니톨의 생산속도와 비생산 속도는 직접적으로 발효 생산 공정에서의 최종 생산량에 영향을 미치게되므로, 최적 생산 속도를 결정하는 것은 생물 공정에서 매우 중요하다. 효모 추출물 농도에 대한 만니톨 생산속도 값은 추출물의 농도 0.5%, 1%에서 차이가 없었는데, 만니톨 수율 경향과 비슷하게 2%의 농도에서는 현저히 감소하였다(Fig. 6B).

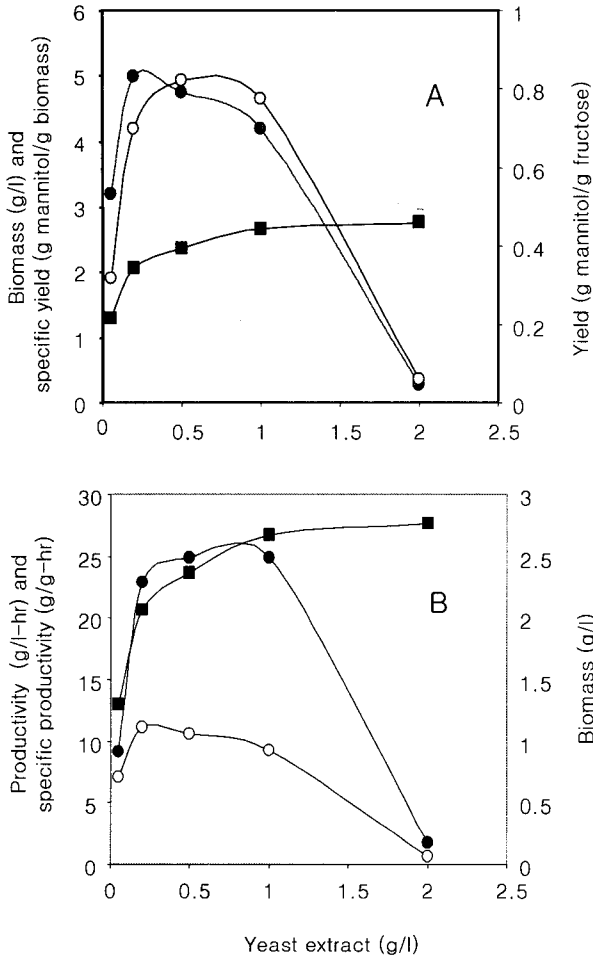


Fig. 6. Effect of yeast extract on mannitol yield and productivity produced by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY. (A) Biomass (■), yield (○), and specific yield (●). (B) Biomass (■), specific productivity (○), and productivity (●).

**과당 농도가 만니톨 생산에 미치는 영향**

과당 농도가 균체 성장 및 만니톨 생산에 미치는 영향을 실험하기 위하여 앞에서 결정된 최적 조건에서 젖산균을 배양하였다. 0.5%의 과당 농도에서는 균체의 성장이 기질농도의 부족으로 6 시간 정도의 유도기를 보였으나, 3% 이상에서 10%까지는 짧은 유도기를 지나 급격히 성장하였다(Fig. 7A). 그러나 25% 이상의 과당 농도에서는 균체 성장이 급격히 둔화되었다. 고농도의 과당에서 균의 성장 억제 현상은 아마 삼투압으로 인하여 균의 대사가 저해되었기 때문이라고 판단된다[17,22]. 만니톨 생산과 과당 소비와의 상관관계는 과당의 농도에 따라서 뚜렷한 차이를 보였다 (Fig. 7B). 과당의 농도가 증가 할수록 만니톨 생산이 증가하였지만 25% 이상의 과당 농도에서는 과당의 소비에 비하여 만니톨의 생산은 현저히 감소하였다. 최고 만니톨 생산은 10%의 과당의 농도에서 31.5 g/l 이었는데, 이 값은 25% 과당 농도에서보다 약 2.5배, 3% 농도에서 보다 약 두 배 정도 증가된 양이다. 만니

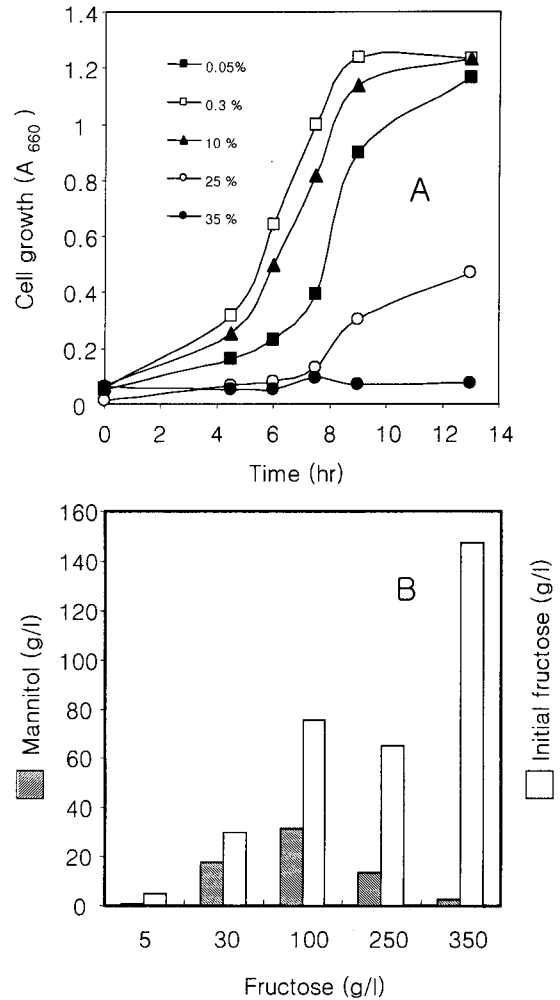


Fig. 7. Effect of fructose concentrations on growth (A) and mannitol production (B) by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY.

톨 생산에 대한 탄소원으로서 과당 농도는 만니톨 생산량에 직접 영향을 미치므로 최적 농도를 찾는 것은 중요하다. 일반적으로 당을 이용한 발효공정에서 원하고자 하는 대사산물이 일차 대사산물이라면 비록 적은 농도에서 높은 수율을 나타낸다 하더라도 최종 생산물의 양을 최대화 하는 것이 발효의 목적이기 때문에 최적 생산 속도를 기준으로 공정을 수행하여야 한다. 하지만 수율은 균체의 생물전환에 대한 효율성을 나타내는 지표이기 때문에, 일반적으로 균체 생산량은 균체를 이용한 생물 전환 공정에서 얻고자 하는 최종 생산물의 양과 상관관계가 있는 것으로 알려져 있다. 이를 확인하기 위하여 *L. mesenteroides* sp. strain JFY 균체의 생산과 과당으로부터 만니톨로의 생물 전환율에 대한 관계를 관찰하고, 과당 농도 영향에 대하여 연구를 수행하였다(Fig. 8A). 과당 농도 0.05%에서 만니톨 수율은 3%에서보다 2.5배 정도 낮았는데, 이는 낮은 농도의 과당이 주로 균체 성장에 이용된 것으로 보인다. 최고 수율이 3%에서 0.87이었고 이후 과당 농

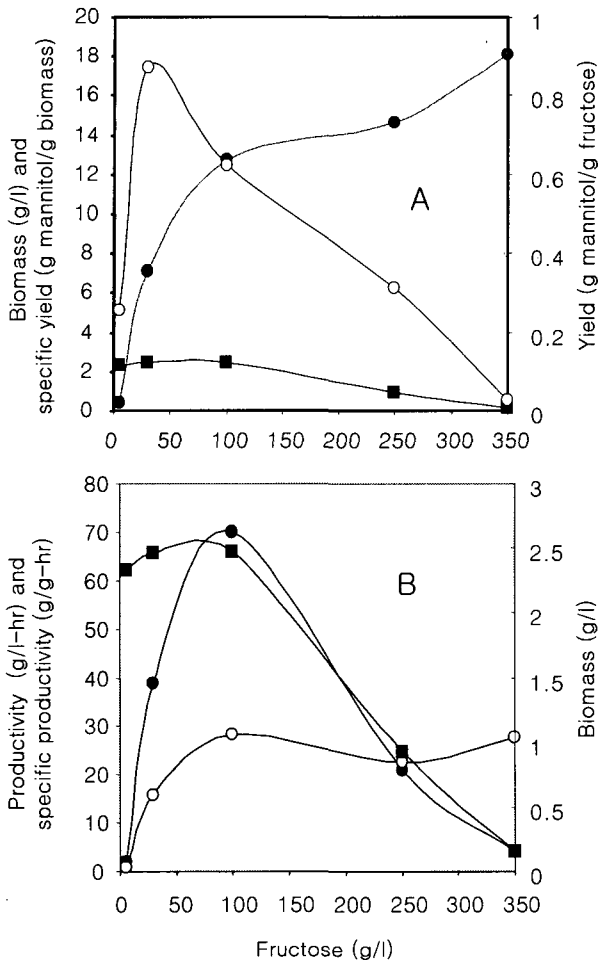


Fig. 8. Effect of fructose concentrations on mannitol yield and productivity produced by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY. (A) Biomass (■), yield (○), and specific yield (●). (B) Biomass (■), specific productivity (○), and productivity (●).

도가 증가 할수록 만니톨 생산 수율은 급격히 떨어지기 시작하여 35% 과당 농도에서는 0.03정도로 감소하였다. 그러나 이 농도에서 균체 생산 역시 최소가 되어 실제 만니톨 생산의 균체 효율성은 최대였다(18.1 g/g-hr). 만니톨 생산 속도는 과당 농도에 따라 상당히 차이가 나는 경향을 보였다(Fig. 8B). 만니톨의 최대 수율은 과당 농도 3%에서 결정된 반면에 최대 생산속도는 10%에서 결정되었다. 이후 역시 감소하기 시작하여 25%, 35%의 과당 농도에서 각각 3배, 15배 정도의 차이를 보였다. 비 수율과 마찬가지로 고농도에서 높은 비생산 속도를 나타내었는데, 최대 비생산 속도는 역시 10% 과당 농도에서 결정되었다.

**요 약**

기능성 식품 첨가물 중에서 당 알코올은 최근 그들의 탁월한 가능성이 알려지면서 수요가 증가하고 있다. 당 알코올

중에서, 만니톨(C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>)은 식품, 화장품, 제약 산업 등에 매우 광범위하게 이용되고 인체에 독성이 없어 미국 FDA에 의하여 GRAS (Generally Recognized As Safe)로 승인이 되어 이에 대한 수요량이 급격히 증가하는 추세이다. 본 연구는 발효 김치에서 분리된 *L. mesenteroides* sp. strain JFY 균주를 이용하여 과당으로부터 만니톨 생산을 위한 최적 생물 전환 조건을 확립하기 위한 것이다. 만니톨 생산을 위한 최적 조건들은 pH 6.5, 배양온도 28℃, 효모 추출물의 농도 0.5%, 과당의 농도는 10%이었고, 이 조건에서 최대 만니톨생산은 31.5 g/l이었다.

**감사의 글**

본 연구에서 2002년도 한국학술진흥재단(KRF-2002-003-F00050)의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

**참 고 문 헌**

1. Arcus, A. C and N.L. Edison. 1956. Polyhydrogenase. The polyol dehydrogenase of *Acetobacter suboxydans* and *Candida utilis*. *Biochem. J.* **64**, 385-393.
2. Berezenko, S and R.J. Sturgeon.1991. The enzymatic determination of D-mannitol with mannitol dehydrogenase from *Agricus bisporus*. *Carbohydr. Res.* **216**, 505-509.
3. Busse, M., K.K.Kindel and M. Gibbs. 1961. The heterolactic fermentation. *J. Biol. Chem.* **236**, 2850-2853.
4. Edmundowicz, J. M and J.C. Wriston.1963. Mannitol dehydrogenase from *Agricus camperstris*. *J. Biol. Chem.* **238**, 3539-3541.
5. Ensminger, A. H., M.E. Ensminger, J.E. Konlande and J.R.K. Robson. 1994. *Food Nutrition Encyclopedia*. 2nd. ed. CRC Press. Boca Raton.
6. Erten, H. 1998. Metabolism of fructose as an electron acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*. *Process Biochem.* **33**, 735-739.
7. Grobgen, G.J., W.P.G. Sjow, W.H. Wouter, R.A. Weusthuis, M. H. Hoefnagel, H. Jeroen and E. Gerrit. 2001. Spontaneous Formation of a Mannitol-Producing Variant of *Leuconostoc mesenteroides* Grown in the Presence of Fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2867-2870.
8. Groleau, D., P. Chevalier and T. H. Yuen. 1995. Production of polyols and ethanols by the osmophilic yeast *Zygosaccharomyces Rouxii*. *Biotechnol. Lett.* **17**, 315-320.
9. Hasler, C. M. 1966. Functional Foods: the western perspective. *Nutr. Rev.* **54**, 6-10.
10. Kulbe, K. D., U. Schwab and W. Gudernatsch. 1987. Enzyme-catalyzed production of mannitol and gluconic Acid, Product Recovery by various procedure. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **506**, 552-568.
11. Maccorkindale, J and N. L. Edison. 1954. Polyol dehydrogenase. The specificity of rat-liver polyol dehydrogenase. *Biochemistry.* **57**, 518-523.

12. Martinez, G., H. A. Barker and B. L. Horecker. 1963. A specific mannitol dehydrogenase from *L. brevis*. *J. Biol. Chem.* **238**, 1598-1603.
13. Peterson, W. H and E. Fred. 1920. Fermentation of fructose by *Lactobacillus pentoaceticus*, *J. Biol. Chem.* **41**, 431-450.
14. Sakai, S and K. Yamanaka. 1968. Crystalline D-mannitol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase from *L. mesenteroides*. *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 684-686.
15. Sakai, S and K. Yamanaka. 1968. Crystalline D-mannitol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase from *L. mesenteroides* Part II. Substrate and Coenzyme sepecificity. *Agr. Biol. Chem.* **32**, 894-899.
16. Show, D. R. D. 1956. Polyol dehydrogenase. Galacitol dehydrogenase and d-idoitol dehydrogenase. *Biochem. J.* **64**, 394-405.
17. Song, K. H., J. K. Lee, J. Y. Song, S. G. Hong, H. S. Beak, S. Y. Kim and H. H. Hyun. 2002. Production of mannitol by a novel strain of *Candida magnoliae*. *Biotechnology Letters.* **24**, 9-12.
18. Weymarn, N. V., M. Hujanen and M. Leisola. 2002. Production of d-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochem.* **37**, 1207-1213.
19. Wisselink, H.W., R.A. Weusthuis, G. Eggink, J. Hugenholtz and G.J. Grobbern. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal* **12**, 151-161.
20. Yamanaka, K. 1975. D-mannitol hydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Methods in Enzymol.* **41**, 138-142.
21. Yang, M. W., C. Y. Lin, H. L. Hung, K. H. Chan, T. Y. Lin and S. H. Chan. 1992. Mannitol reduces plasma hydrogen peroxide free radical in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Ma Tsui Haueh Tsa Chi Anaesthesiological Sinca* **30**, 65-70.
22. Yoo, S. K., D. M. Kim and D. F. Day. 2001. Co-production of dextran and mannitol by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 880-883.
23. Yun, J. W., S. K. Kang and S. K. Song. 1996. Mannitol accumulation during fermentation of *Kimchi*. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 279-280.
24. Yun, J. W and D. H. Kim. 1998. A comparative study of mannitol production by two lactic acid bacteria. *J. Ferment. Bioeng.* **85**, 203-208.
25. Zager, R. A. 1992. Combined mannitol and deferoxamine therapy for myhemoglobinuric renal injury and oxidant tubular stress. *J. Clinical Investigation.* **90**, 711-779.