

*Leuconostoc mesenteroides*의 화학적 돌연변이를 통한 만니톨 생산능 향상: 고속 대량 선별 기술 개발

이형로, 안지은, 한남수*

Chemical Mutation of *Leuconostoc mesenteroides* for Improved Mannitol Production: Development of a High-throughput Screening Strategy

Hyeong Rho Lee, Ji Eun Ahn, and Nam Soo Han*

접수: 2013년 2월 12일 / 게재승인: 2013년 4월 22일
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: A high-throughput screening strategy was developed to simplify the selection process for improved mannitol producing strain after chemical mutagenesis. Ethylmethyl sulfonate (EMS) was used as a chemical mutagen to alter the fructokinase-I gene which is an essential enzyme to metabolize fructose for growth. *Leuconostoc mesenteroides* treated with EMS were plated on the modified MRS solid medium containing fructose as a sole carbon source. Strains showing inhibited growth were primarily selected to evaluate the mannitol producing ability. By applying this strategy, *L. mesenteroides* ATCC 8293 M1, *L. mesenteroides* ATCC 9135 M3 and *L. mesenteroides* D1 M3 showed improvement in mannitol production.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides*, Mannitol, Ethylmethyl sulfonate (EMS), High-throughput screening

1. 서론

만니톨(D-mannitol)은 육탄당의 당알코올로 다양한 채소, 과일 및 버섯에 소량으로 존재한다 [1,2]. 만니톨은 자당에 비해 50%의 당도를 갖고 혈중 포도당 농도를 증가시키지 않아 대체 감미료로 사용되며 삼투성 이노제의 역할을 하여 식품, 제약, 의약 및 화학산업에서 널리 이용되고 있다. 만니톨은 Raney nickel을 촉매제로 이용한 포도당과 과당의 촉매 수소화 반응을 통해 산업적으로 생산되고 있다. 하지만 본 방법은 과당의 절반만 만니톨로 전환시키며 솔비톨을 부산물로 생성하여 순도가 높은 만니톨을 생성하는데 어려움을 주고 있다 [3,4]. 그러므로 미생물 발효를 통한 만니톨 생산 기술은 화학적 공정의 유망한 대안이라 할 수 있다 [5-7]. 만니톨 생산 균주로는 효모, 곰팡이, 젖산균이 있으며 최근 젖산균을 이용한 만니톨 생산기술이 활발히 진행되고 있다. 젖산균 중 *Leuconostoc* 속, *Oenococcus* 속 그리고 *Lactobacillus* 속에 속하는 이상발효 젖산균은 과당으로부터 만니톨을 고효율로 생산하는 것으로 알려져 있다. 이는 세포 내 redox balance를 유지하기 위해 과당이 mannitol dehydrogenase (MDH)에 의해 환원되는 반응에서 외부 전자 수용체의 역할을 하기 때문이다 [8]. 또한 세포 내로 유입된 과당은 경쟁적으로 fructokinase 효소에 의해 fructose 6-phosphate로 전환되어 phosphotolase (PK) 경로를 통해 세포 성장에 이용된다.

본 연구에서는 이상발효 젖산균의 만니톨 생산능을 향상시키기 위해 과당을 PK경로로 유도하는 fructokinase (EC 2.7.2.4) 유전자에 화학적 돌연변이를 적용하여 효소 활성이 억제된 돌연변이 균주를 선별하는 방법을 개발하고자 하였다.

충북대학교 식품공학과
Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea
Tel: +82-43-261-2567, Fax: +82-43-271-4412
e-mail: namssoo@cbnu.ac.kr

이를 위해 3종의 *L. mesenteroides*에 변이 유도 효율이 높은 ethylmethyl sulfonate (EMS)를 처리한 후, 과당을 유일한 탄소원으로 포함하는 MRS 배지에서 느린 성장속도를 보이는 콜로니를 선별하여 이들의 만니톨 생성능을 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 균주 및 배양 조건

본 연구에서는 *L. mesenteroides* ATCC 8293, *L. mesenteroides* ATCC 9135 그리고 *L. mesenteroides* D1 (연구실 보유 균주)을 화학적 돌연변이 및 만니톨 발효실험의 대조군으로 이용하였다. 균주들은 15% 글리세롤이 첨가된 MRS 배지 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)에서 -70°C 로 보관하였다. 1% (w/v)의 포도당이 함유된 MRS 배지 또는 1% 과당이 함유된 modified MRS 배지 (5 g/L yeast extract, 5 g/L peptone, 20 g/L K_2HPO_4 , 10 mL/L salt solution comprising 20 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L NaCl , 2 g/L FeSO_4 , 14 g/L MnSO_4 , 13 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)를 액체 배지 또는 고체배지로 이용하였다. 당원은 배지성분과는 독립적으로 멸균하여 첨가하였다. 보관된 균주들은 MRS 고체배지에서 활성화하여 MRS 액체배지에 전배양하였다. 만니톨 생성능 확인에 사용한 균주들은 3% 과당이 함유된 100 mL의 modified MRS 배지에 전배양액을 접종하여 30°C 에서 정치 배양하였다.

2.2. EMS 처리를 위한 조건 결정

EMS를 처리하기에 앞서 EMS 돌연변이를 위한 최적의 조건을 결정하였다. 먼저, *L. mesenteroides*를 배양하여 지수기 (exponential phase)에 이르는 시점을 분석하였다. 이후, 지수기에 이른 세포에 EMS를 처리하여 시간 별 생존률을 측정하였다. 본 실험에서 돌연변이 처리 시점은 EMS처리 후 생존률이 30~50%가 되는 구간 (처리 후 30분)으로 결정하였다.

2.3. 화학적 돌연변이

L. mesenteroides 균주들을 100 mL의 MRS broth에서 6시간 배양하여 지수기에 도달하였을 때 (OD at 600 nm = 0.5) 세포를 취하여 pH 5.5 시트르산 완충용액에 2번 세척하였다. 그 다음 30°C 에서 30분간 EMS를 처리하여 앞서 사용한 완충용액으로 3번 세척 후 0.85% NaCl 용액에 단계적으로 희석하였다. 희석된 1%의 포도당이 함유된 MRS 고체배지 또는 1% 과당이 함유된 modified MRS 고체배지에 각각 도말하여 37°C 에서 24시간 동안 배양하였다.

2.4. 신규 고속 대량 선별 전략

Fructokinase 활성이 억제된 돌연변이를 선별하기 위한 새로운 스크리닝 기술을 적용하였다. 1% 과당이 함유된 modified MRS 고체배지에서 생성된 콜로니(colony)들의 크기를 비교하여 비교적 작은 크기의 콜로니들을 1차 선별하였다. 이후 작은 크기의 콜로니들을 1% 과당이 함유된 modified MRS

배지와 1% 포도당이 함유된 MRS 배지에 계대 배양하였다. 이는 포도당 배지에서도 생육하지 못하거나 (돌연변이로 인한 성장 저해) 1% 과당이 함유된 배지에서 다시 잘 생육하는 경향을 보이는 (복귀 돌연변이) 콜로니들은 배제하였다. 이후, fructokinase 불활성 균주로 판별된 돌연변이들로 만니톨 생성능을 확인하기 위한 발효실험을 수행하였다.

2.5. 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)분석

돌연변이 균주들을 발효한 후 배지 내에 존재하는 당과 만니톨을 HPLC (YOUNG-LIN, Acme 9000, South Korea)를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 Shodex Asahipak NH2P-50 4E column (Tokyo, Japan)을 이용하였고 이동상으로는 아세토니트릴과 물 [72:25 (v/v)]을 유속 1.0 mL/min으로 흘려주었다. 모든 성분들은 시차굴절 검출기(refractive index detector) (YOUNG-LIN)를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 만니톨 생산을 위한 후보 돌연변이 균주 선별

만니톨 생성능이 향상된 돌연변이를 선별하는 과정을 간소화하기 위해 EMS 처리된 균주들을 1% 과당이 함유된 modified MRS 고체배지에 도말하여 작은 크기의 콜로니들을 1차적으로 선별하였다. 이 방법은 EMS처리에 의해 fructokinase 유전자가 변이되면, 과당은 만니톨 대사경로에 이용되고 세포 성장은 저해될 것이라는 가설을 바탕으로 한다 (Fig. 1). 이

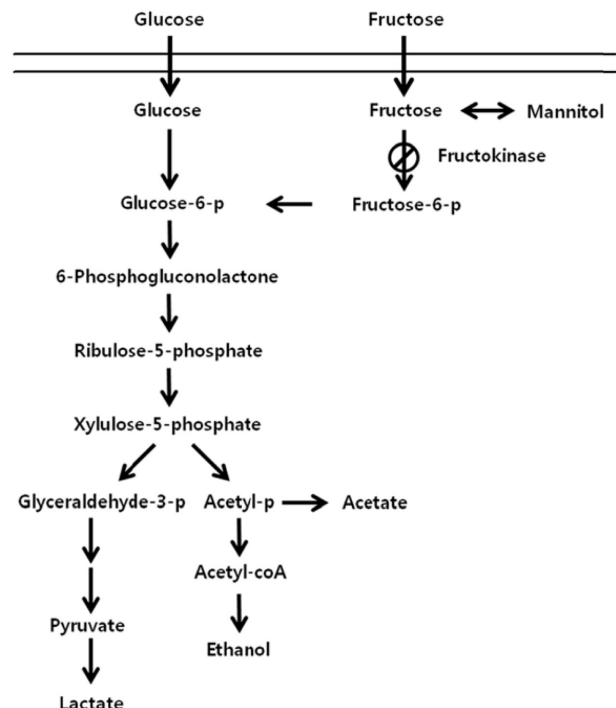


Fig. 1. Strategy for mutation of *L. mesenteroides* with improved mannitol production.

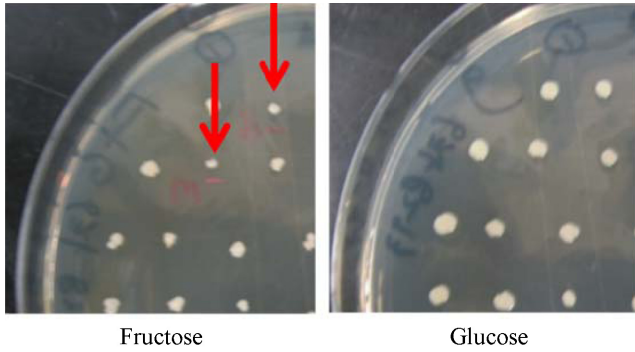


Fig. 2. Selection of *L. mesenteroides* mutant strains showing poor growth on fructose medium but not on glucose medium. Arrows indicate the possible mutants with inhibited fructokinase activities.

Table 1. Mannitol production by *L. mesenteroides* strains in 100 mL medium supplemented with 3% fructose

Strains		Mannitol (g/L)	OD ₆₀₀
<i>L. mesenteroides</i>	Wild type	1.511	1.484
ATCC 8293	Mutant M1	1.869	1.481
<i>L. mesenteroides</i>	Wild type	1.762	1.519
ATCC 9135	Mutant M3	2.030	1.372
<i>L. mesenteroides</i>	Wild type	1.901	1.621
D1	Mutant M3	1.970	1.691

선별법을 이용함으로써 목적 돌연변이를 첫 번째 과정에서 빠르게 선별할 수 있으며 이는 돌연변이 처리 후 포도당이 함유된 배지에 도달하는 기존의 실험방법에 비해 경제적이다. 2차 선별과정에서는 포도당이 함유된 배지에서 성장하나 과당이 함유된 배지에서 성장이 저해되는 콜로니들을 만니톨 생산을 위한 후보 균주로 선정하였다 (Fig. 2). 그러나 세포 성장이 저해되어 포도당 또는 과당이 함유된 배지에서 모두 자라지 못하는 균주 또는 fructokinase 활성이 회복되어 다시 과당을 이용하여 성장하는 균주 (복귀 돌연변이)들은 배제되었다. 이후 선택된 후보 균주들로 만니톨 생산능을 확인하기 위한 발효실험을 수행하였다.

3.2. 만니톨 생산능 비교

야생형 *L. mesenteroides*와 돌연변이 균주들의 발효 결과는 다음과 같다 (Table 1). *L. mesenteroides* ATCC 8293 M1, *L. mesenteroides* ATCC 9135 M3, *L. mesenteroides* D1 M3의 농도는 야생형 균주에 비해 각각 24%, 15%, 4% 상승하였다. 발효가 진행되는 동안 각 돌연변이 균주의 세포 농도는 감소하였으며 이는 fructokinase가 저해된 돌연변이에서는 세포생장이 저해된다는 가설에 부합하였다.

본 연구에서는 만니톨 생산능이 향상된 돌연변이 균주를 새로운 스크리닝 기술을 통해 선별하였으며 이 방법은 화학적 돌연변이 처리 이후 목적 균주를 선별하는 시간을 줄여준

다는 장점을 갖는다. 이후 변이된 균주의 생리학적, 형태학적 특성 및 fructokinase의 활성 변화, 염기서열 분석을 통한 유전자 서열 변화를 규명하는 연구가 필요할 것이다.

4. 결론

본 연구에서는 화학적 돌연변이 처리 후 만니톨 생산능이 향상된 균주를 선별하는 과정을 간소화 시키기 위한 고속 대량 선별기술을 개발하였다. 과당을 대사하는데 필수적인 fructokinase (EC 2.7.2.4) 유전자에 변이를 가하기 위해 EMS를 돌연변이원으로 이용하였다. EMS를 처리한 *L. mesenteroides*를 과당을 유일한 탄소원으로 첨가한 modified MRS 고체 배지에 도말하였고 성장이 저해된 콜로니들을 선별하여 만니톨 생산능을 평가하였다. 위 전략을 사용함으로써 돌연변이 처리 후 첫 번째 선별과정에서 소모되는 시간과 비용을 절약할 수 있었으며 선별된 *L. mesenteroides* ATCC 8293 M1, *L. mesenteroides* ATCC 9135 M3, *L. mesenteroides* D1 M3에서 만니톨 생산능이 향상됨을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 적용한 대량 고속 선별 기술은 진화적 돌연변이 (evolutionary mutagenesis)를 통한 균주개량에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 기대한다.

REFERENCES

1. Khan, A., A. Bhide, and R. Gadre (2009) Mannitol production from glycerol by resting cells of *Candida magnoliae*. *Bioresour. Technol.* 100: 4911-4913.
2. Von Weymarn, N., M. Hujanen, and M. Leisola (2002) Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. *Process Biochem.* 37: 1207-1213.
3. Soetaert, W., P. T. Vanhooren, and E. J. Vandamme (1999) Production of mannitol by fermentation. *Methods Biotechnol.* 10: 261-275.
4. Song, K. H., J. K. Song, S. G. Hong, H. Baek, S. Y. Kim, and H. H. Hyun (2002) Production of mannitol by a novel strain of *Candida magnoliae*. *Biotechnol. Lett.* 24: 9-12.
5. Wisselink, H., R. A. Weusthuis, G. Eggink, J. Hugenholtz, and G. J. Grobden (2002) Mannitol production by lactic acid bacteria: A review. *Int. Dairy J.* 12: 151-161.
6. Saha, B. C. and F. M. Racine (2010) Effects of pH and corn steep liquor variability on mannitol production by *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 553-560.
7. Helanto, M., J. Aarnikunnas, N. von Weymarn, U. Airaksinen, A. Palva, and M. Leisola (2005) Improved mannitol production by a random mutant of *Leuconostoc pseudomesenteroides*. *J. Biotechnol.* 116: 283-294.
8. Ghoreishi, S. and R.G. Shahrestani (2009) Innovative strategies for engineering mannitol production. *Trends Food Sci. Technol.* 20: 263-270.