

## Optimization of Medium Components using Response Surface Methodology for Cost-effective Mannitol Production by *Leuconostoc mesenteroides* SRCM201425

Gwangsu Ha<sup>1†</sup>, Su-Jin Shin<sup>2†</sup>, Seong-Yeop Jeong<sup>1</sup>, HoYeon Yang<sup>1</sup>, Sua Im<sup>1</sup>, JuHee Heo<sup>1</sup>, Hee-Jong Yang<sup>1</sup> and Do-Youn Jeong<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Korea

<sup>2</sup>Korean culture center of microorganisms (KCCM), Sunchang 56048, Korea

Received July 15, 2019 / Revised August 7, 2019 / Accepted August 8, 2019

This study was undertaken to establish optimum medium compositions for cost-effective mannitol production by *Leuconostoc mesenteroides* SRCM201425 isolated from kimchi. *L. mesenteroides* SRCM201425 from kimchi was selected for efficient mannitol production based on fructose analysis and identified by its 16S rRNA gene sequence, as well as by carbohydrate fermentation pattern analysis. To enhance mannitol production by *L. mesenteroides* SRCM201425, the effects of carbon, nitrogen, and mineral sources on mannitol production were first determined using Plackett-Burman design (PBD). The effects of 11 variables on mannitol production were investigated of which three variables, fructose, sucrose, and peptone, were selected. In the second step, each concentration of fructose, sucrose, and peptone was optimized using a central composite design (CCD) and response surface analysis. The predicted concentrations of fructose, sucrose, and peptone were 38.68 g/l, 30 g/l, and 39.67 g/l, respectively. The mathematical response model was reliable, with a coefficient of determination of  $R^2 = 0.9185$ . Mannitol production increased 20-fold as compared with the MRS medium, corresponding to a mannitol yield 97.46% when compared to MRS supplemented with 100 g/l of fructose in flask system. Furthermore, the production in the optimized medium was cost-effective. The findings of this study can be expected to be useful in biological production for catalytic hydrogenation causing by-product and additional production costs.

**Key words** : Industrial application, *Leuconostoc mesenteroides*, mannitol, medium optimization, response surface methodology

### 서 론

만니톨은 다양한 채소와 과일 및 버섯에 소량으로 존재하는 육탄당의 알코올로 sucrose에 비해 50%의 당도를 가지며, 혈중 glucose의 농도를 증가시키지 않아 고혈압 환자를 위한 대체 감미료로 사용되고 있으며[9], 미국 Food and Drug Administration (FDA)에 의해 Generally Recognized as Safe (GRAS)로 승인되어 식품, 제약, 화학, 화장품 등 매우 광범위한 산업에 활용되고 있다[11, 16]. 통상 만니톨은 설탕 등을 가수분해하여 과당을 분리하고 이 과당을 고온고압하의 촉매 하에서 화학적으로 수소첨가하여 생산하고 있으며, 이러한 방법은 부

산물로 술비톨을 생성하여 순도 높은 만니톨의 생산이 어려우며, 술비톨과의 분리 정제 공정이 필요하여 생산 단가가 높다는 한계를 가지고 있다[17]. 또한 최근 소비자의 화학합성 물질에 대한 기피현상과 천연물질에 대한 선호도가 높아지는 경향이 나타나고 있어, 이를 대체할 수 있는 미생물을 통한 만니톨 생산은 화학 합성생산법의 대안으로 연구되고 있다[11]. 만니톨을 생산하는 미생물로는 일부 곰팡이, 효모, 유산균이 알려져 있으며, 곰팡이와 효모의 경우 만니톨은 주로 삼투압을 조절하기 위한 삼투압 조절 물질(compatible solute)로 생산되어 그 양이 미량으로 알려져 있으나[12], *Lactobacillus* 속, *Leuconostoc* 속, *Oenococcus* 속에 속하는 이형발효균(heterofermentative)은 mannitol dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.67)에 의해 fructose가 환원되는 반응에서 전자 수용체로서의 역할을 하여 fructose로부터 고효율로 만니톨을 생산하는 것으로 알려져 있다[3, 9].

미생물이 생산하는 대사산물의 생산 효율은 다양한 물리적인 조건이나 배양 성분 및 농도, 배양시간 등에 의해 향상될 수 있으므로 미생물의 배양조건 확립이 필수적이다[5]. 배지 최적화를 위해 사용되었던 고전적 방법인 일원배치법(one

† Authors contributed equally.

\*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2000, Fax : +82-63-650-9590

E-mail : [jdy2534@korea.kr](mailto:jdy2534@korea.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

factor at a time method)는 다른 변수의 농도는 일정하게 하고, 오직 하나의 변수 농도변화를 이용하기 때문에 연구에 오랜 시간이 소비되고 다양한 변수간의 상호작용을 파악하기 어려우며, 많은 비용이 필요하다는 한계를 가지고 있다[2]. 최근에는 이런 단점을 보완하기 위해 미생물 배양 및 배지 조성에 관하여 최적조건을 확립할 때 적은 실험 횟수로 결과를 쉽게 얻을 수 있는 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)을 사용한다[7, 8]. 반응표면분석법은 각 요인의 상호작용에 의한 결과의 최대치와 최소치를 예상할 수 있으며, 실험경비를 절약할 수 있다는 장점을 가지고 있어 생물공학에서 최적조건을 확립하는데 널리 사용되고 있다[5, 15].

본 연구에서는 전통발효식품인 김치로부터 만니톨 생산을 위한 균주를 선별하였으며, 만니톨을 포함한 polyhydric alcohol의 생산은 미생물의 종류나 배양조건에 따라 큰 차이를 나타내는 것으로 알려져 있으므로[19], 대량 생산시 생산비용 절감을 위해 최종 선별된 *Leuconostoc mesenteroides* SRCM201425 균주에서 만니톨을 생산하기 위한 통계학적 기법인 반응표면 분석법을 이용하여 산업용 최적 배지조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 미생물 분리 및 배양

전국에서 미생물 분리를 위한 시료로 김치 40종을 수집하였으며, 수집한 김치 시료 1 g을 0.85% NaCl 용액 9 ml에 현탁하여 단계별로 희석하고, 희석액 100  $\mu$ l을 MRS (Difco, Sparks, MD, USA) 배지에 도말하여 30°C 배양기에서 48시간 배양하였다. 균주를 순수분리 하기 위해 배지 위에 형성된 광택을 띄는 백색 집락의 형태학적 차이를 이용하여 선별한 후 MRS 배지에 획선도말하여 다시 순수 분리하여 보관하였다.

### 만니톨 생산을 위한 균주 선별

*Leuconostoc* 속 균주는 fructose가 과량으로 존재하는 조건에서 MDH에 의해 fructose가 전자 수용체 역할을 하여 만니톨이 생산되는 것으로 알려져[11] 있으므로, 분리주 10종의 만니톨 생산성을 분석하기 위해 각 균주 전배양액을 100 g/l의 fructose가 포함된 MRS 액체배지 100 ml에 접종한 후 30°C, 150 rpm에서 30시간 배양하였다. 배양이 종료된 각 균주 배양액을 회수하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 0.45  $\mu$ m syringe filter (Whatman, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 제균한 상등액을 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다.

### 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석

균주 배양액 내에 존재하는 glucose와 fructose, 만니톨을 HPLC (Agilent, Santa Clara, USA)를 이용하여 분석하였다.

분석을 위한 column은 ZORBAX carbohydrate column (4.6×150 mm, Agilent, USA)을 사용하였으며, column 온도는 30°C로 설정하였다. 이동상으로는 75% acetonitrile (Fisher Scientific Korea Ltd., Seoul, Korea)을 유속 1.4 ml/min으로 흘려주었으며, 모든 성분들은 시차굴절 검출기(Agilent, Agilent 1260 Infinity Refractive Index Detector)를 사용하여 분석하였다.

### 선별균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 및 당 이용성 분석

최종선발된 *Leuconostoc mesenteroides* SRCM201425 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하기 위한 서열 증폭을 위해 universal primer인 27F primer (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R primer (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 이용하였다. National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 nucleotide BLAST를 통해 서열의 일치도가 높은 균주들의 16S rRNA 유전자 서열을 얻었으며, 서열간의 상호 비교분석을 위해 Clustal W 2.0 (EMBL-EBI, Hinxton, Cambridgeshire, UK)를 사용하였다. 계통도 분석에는 Mega 7.0.26 program을 이용한 근린결합법(neighbor-joining method)[13]을 사용하였으며, bootstrap 분석을 1,000회 시행하여 계통수의 신뢰도를 확보하였다. 또한 SRCM201425 균주의 당 이용성 패턴은 API 50 CHL kit (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하여 분석하였다.

### 배양시간에 따른 균주 성장 및 만니톨 생산 조사

SRCM201425의 배양시간에 따른 균주 성장 및 만니톨 생산량을 조사하기 위해 각 MRS 액체 배지 와 100 g/l의 fructose가 첨가된 MRS 액체배지 100 ml에 전배양액 1%를 접종한 후 30시간 동안 30°C, 150 rpm에서 배양하였으며, 3시간 간격으로 배양액을 회수하여 생균수와 만니톨 생산량을 측정하였다. 회수한 배양액 1 ml을 0.85% NaCl 용액 9 ml에 단계별로 희석한 후 희석액 100  $\mu$ l를 MRS 배지에 도말하여 생균수를 측정하였으며, 배양 시간에 따른 만니톨 생산량은 HPLC를 이용하여 분석하였다.

### 만니톨 생산을 위한 배지 성분의 선별

만니톨 생산에 영향을 주는 배지 성분을 선별하기 위해 통계학적 방법으로 Plackett-Burman Design (PBD)을 설계하였다. 미생물의 성장 또는 *Leuconostoc mesenteroides* 균주의 만니톨 생산에 영향을 주는 것[9, 12, 16, 17]으로 알려진 변수는 탄소원 4종(glucose, fructose, sucrose, molasses), 질소원 4종(yeast extract, peptone, tryptone, beef extract), 무기질 3종(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O)으로 구성하였으며, 만니톨 생산에 주요한 효과가 있는 3개의 변수를 선별하기 위해 3개의 중심점을 포함한 15개의 실험구를 구성하였다. PBD 실험계획법에 따라 각 변수의 수준을 -1, 0, +1로 부호화하였으며, 종속 변수로는 만니톨 생산량(Y, g/l)을 설정하였다(Table 1). 모든

Table 1. Variables showing medium components used in Plackett-Burman design and design matrix with the observed response (mannitol, g/l)

Factors	Symbol (unit)	Coded variable levels		
		-1	0	+1
Glucose	X <sub>1</sub> (g/l)			
Fructose	X <sub>2</sub> (g/l)	2	5	8
Sucrose	X <sub>3</sub> (g/l)			
Molasses	X <sub>4</sub> (g/l)			
Yeast extract	X <sub>5</sub> (g/l)			
Peptone	X <sub>6</sub> (g/l)	1	3	5
Tryptone	X <sub>7</sub> (g/l)			
Beef extract	X <sub>8</sub> (g/l)			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	X <sub>9</sub> (g/l)			
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	X <sub>10</sub> (g/l)	0.2	0.6	1.0
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	X <sub>11</sub> (g/l)			

Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	Y (g/l)
1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	8.2244
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.0774
3	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	10.2020
4	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2.2582
5	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	10.7389
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	3.8713
7	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	8.2713
8	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	3.7488
9	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	10.4062
10	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	7.7413
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.3268
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9.1982
13	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	5.0975
14	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	9.9373
15	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	9.0821

X<sub>1</sub>-X<sub>11</sub> represent different assigned factors. -1 is for low level of factors and +1 is for high level of factors. Y: Response values (produced mannitol, g/l).

실험구는 3회 반복하여 측정된 평균값을 산출하였으며, 실험 계획과 결과 분석에는 Design expert 11 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) program을 사용하였다.

**만니톨 생산에 영향을주는 배지성분의 농도 최적화**

PBD에 의해 설계된 실험결과를 통해 만니톨 생산에 주효과가 있는 것으로 나타난 3개 성분의 최적 농도를 설정하기 위해 통계학적 방법인 central composite design (CCD)을 설계하였으며, 만니톨 생산을 위해 선별된 3개의 각 독립변수인 fructose (X<sub>1</sub>), sucrose (X<sub>2</sub>), peptone (X<sub>3</sub>)을 -2, -1, 0, +1, +2의 5개 수준으로 설정하여 실험계획을 수립하였다. 또한 1% 전배양액을 각 실험구에 접종하여 배양한 후 각 배양액의 만니톨 함량을 측정하여 반응값(Y)으로 사용하였으며, 결과를 회귀분석에 사용하였다. 3개의 중심점을 포함한 모든 시험구는 3회 반복 시험하여 평균값을 회귀분석에 이용하였으며, 독립변수

와 종속변수간의 2차 회귀 모형식은 다음과 같다.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

Y는 종속변수, X<sub>i</sub>는 각 독립변수, β<sub>0</sub>는 상수계수를 나타내며, β<sub>i</sub>, β<sub>ii</sub>, β<sub>ij</sub>는 각 독립변수간의 교호작용 계수를 나타낸다 [14]. 회귀분석에 의한 모델식은 Design expert 11 program을 이용하여 예측하였고, 회귀분석에 의한 결과를 바탕으로 임계점 및 만니톨 생산을 위해 선별된 3개의 독립변수인 fructose, sucrose, peptone의 최적 농도를 예측하였으며, analysis of variance (ANOVA) 분석을 통하여 통계적 유의성을 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**만니톨 생산을 위한 균주 선발**

유산균 중 이형발효균은 세포 내 산화-환원 균형(redox balance)을 유지하기 위해 fructose가 MDH에 의한 환원반응에서 전자 수용체의 역할을 하고, 세포 내부로 유입된 fructose는 fructokinase (EC 2.7.1.4)에 의해 경쟁적으로 fructose 6-phosphate로 전환되어 phosphoketolase (EC 4.1.2.9)경로를 통해 성장에 이용되어 만니톨을 고생산하는 것으로 알려져 있다[9]. 수집한 40개의 김치시료로부터 이형발효균 중 10주의 *Leuconostoc* 속 균주를 분리하였으며, 분리균주의 fructose가 100 g/l의 농도로 포함된 MRS 배지에서 30°C, 150 rpm으로 30시간 배양하여 만니톨 생산량과, fructose로부터의 수율, 균주 성장에 따른 만니톨 생산량을 분석하였다(Table 2). 그 결과 균주마다 만니톨의 생산량과 fructose로부터의 전환율에 차이가 나타났으며, 분리한 *Leuconostoc* 속의 10 균주 중 *Leuconostoc mesenteroides* SRCM201425 균주가 만니톨의 생산량, 전환율 및 세포성장 대비 생산량에서 가장 우수한 것으로 나타났다. Otgonbayar의 연구결과[10]에 의하면 40 g/l의 fructose가 첨가된 MRS 배지에서 *Leuconostoc* 속의 만니톨 생산량은 23.5-30.4 g/l로, 본 연구결과와 유사한 것으로 나타났으나 fructose로부터의 전환율은 다소 차이가 있었다. 이는 균주 특성에 의한 것으로 만니톨 생산에 영향을 미치는 요인과 농도에 따라 생산량 및 전환율이 크게 달라질 수 있으므로[9, 11, 17] 만니톨 생산을 위한 요인들의 농도 최적화가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

**SRCM201425의 16S rRNA 유전자 서열 및 당 이용성 분석**

SRCM201425의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 (1,491bp)를 이용하여 nucleotide BLAST search를 수행하였다. GenBank에 등록된 균주들의 염기서열과 비교한 결과 *Leuconostoc mesenteroides* ATCC8293, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* strain NCFB543 균주와 각각 99.93%, 99.86%의 상동성을 보였다. 계통도 분석을 위한 evolutionary dis-

tance 추론은 근린결합법(neighbor-joining method)을 사용하였으며, bootstrap 분석을 1,000회 수행하여 계통수의 신뢰도를 확보하였다(Fig. 1). 이형발효 특성을 가진 *Leuconostoc mesenteroides*는 5탄당인 xylose와 ribose, fructose를 탄소원으로 이용할 수 있다고 알려져 있으며[1], 당 이용성 분석 결과 SRCM201425 또한 5탄당을 탄소원으로 이용할 수 있는 것으로 나타났다(Table 3). 따라서 계통학적 분석과 생화학적 분석을 통하여 최종 선발 균주를 *L. mesenteroides* SRCM201425로 명명하였다.

**배양시간에 따른 균주 성장 및 만니톨 생산 조사**

배양시간에 따른 SRCM201425 균주의 성장곡선 측정 결과 4시간에서 12시간까지 균주가 급격하게 성장하는 대수기를 보였으며, 15시간 이후 성장이 점차 느려져 24시간 이후 사멸기에 도달한 것으로 나타났다(Fig. 2). MRS 배지와 100 g/l의 fructose 배지에서의 만니톨 생산량을 조사한 결과에서는 fructose가 포함된 배지에서 최대 27.7 g/l까지 생산되는 것으로 나타났으나 단일 탄소원으로 glucose가 포함된 MRS 배지에서는 최대 만니톨 생산량이 1.32 g/l로 거의 생산되지 않아 SRCM201425 균주는 glucose를 탄소원으로 이용한 만니톨 생산량이 미비한 것으로 판단되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 *L. mesenteroides* KCTC13305 균주가 glucose가 단일 탄소원으로 포함된 배지에서는 만니톨을 생산하지 않았으나, fructose를 100 g/l의 농도로 첨가한 배지에서 39.03 g/l의 만니톨을 생산하였다는 보고[11]와 31.5 g/l의 만니톨을 생산하는 것으로 보고된 *L. mesenteroides* sp.JFY 균주[16]의 결과와 유사함을 확인하였다.

**Plackett-Burman design을 이용한 만니톨 생산을 위한 배지성분 선별**

생물자원을 산업분야에 적용하기 위해서는 비용적으로 저렴한 배지조성을 이용하여 높은 수율을 확립하는 것이 중요하다[5]. 이에 따라 SRCM201425의 최대 만니톨을 생산하기 위

Table 2. Results of mannitol production by 10 isolates of *Leuconostoc* species in MRS supplemented with 100 g/l of fructose medium

Microorganisms	MRS supplemented with 100 g/l of fructose		
	Cmtl. (g/l)	Ymtl. %	Y/OD <sub>600</sub>
<i>Leuconostoc citreum</i> SRCM201377	25.13	72.11	33.47
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM201379	26.07	87.83	48.80
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM201383	24.47	87.38	50.08
<i>Leuconostoc citreum</i> SRCM201403	25.55	75.15	40.99
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM201425	27.10	90.58	51.52
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM201456	27.71	89.01	49.94
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM201577	24.59	88.04	49.78
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM201622	23.73	88.89	48.98
<i>Leuconostoc citreum</i> SRCM201649	26.02	70.11	34.51
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM201650	26.16	80.11	49.18

Cmtl.: mannitol concentration accumulated, Ymtl.: mannitol yield from fructose, Y/OD<sub>600</sub>: mannitol concentration per optical density at 600 nm.

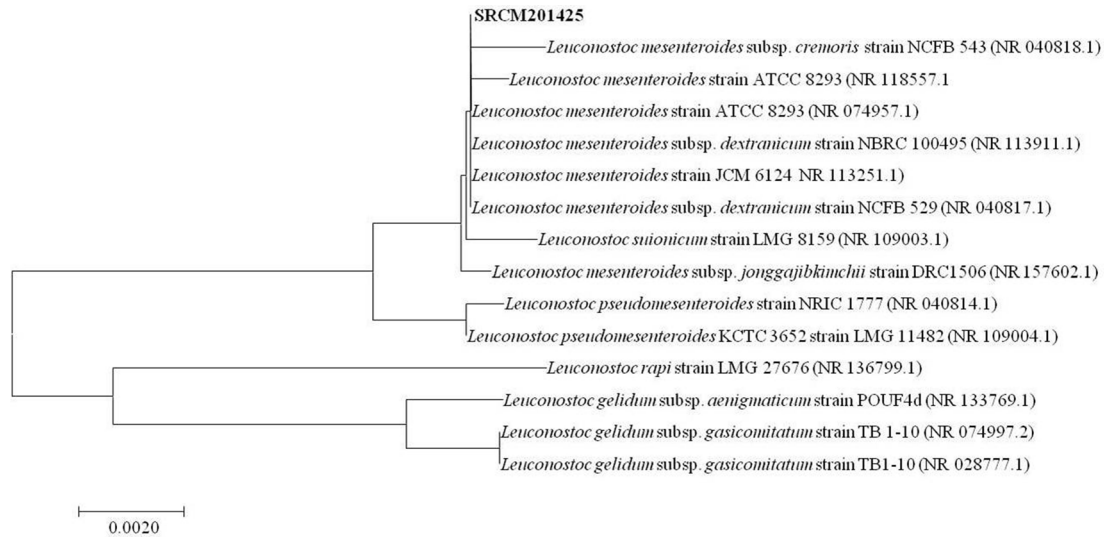


Fig. 1. The neighbor-joining tree derived from *L. mesenteroides* SRCM201425. The bootstrap values were calculated based on 1,000 replications to estimate the topological robustness.

Table 3. Biochemical profile of the API 50 CH of *L. mesenteroides* SRCM201425

Carbohydrates	SRCM 201425	Carbohydrates	SRCM 201425
Control	-	Esculin	-
Glycerol	-	Salicin	(+)
Erythritol	-	D-cellobiose	(+)
D-arabinose	-	D-maltose	+
L-arabinose	+	D-lactose	-
D-ribose	+	D-melibiose	+
D-xylose	+	D-saccharose	+
L-xylose	-	D-trehalose	+
D-adonitol	-	Inulin	-
Methyl-D-xylopyranoside	-	D-melezitose	-
D-galactose	-	D-raffinose	+
D-glucose	+	Starch	-
D-fructose	+	Glycogen	-
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	Gentiobiose	(+)
L-rhamnose	-	D-turanose	+
Dulcitol	-	D-lyxose	-
Inositol	-	D-tagatose	-
D-mannitol	-	D-fucose	-
D-sorbitol	-	L-fucose	-
Methyl-D-mannopyranoside	-	D-arabitol	-
Methyl-D-glucopyranoside	+	L-arabitol	-
N-acetylglucosamine	(+)	Potassium gluconate	(+)
Amygdalin	(+)	Potassium 2-ketogluconate	-
Arbutin	(+)	Potassium 5-ketogluconate	-

해 반응표면분석법을 이용하였다. 미생물의 성장 또는 만니톨 생산에 영향을 주는 것으로 알려진 11개의 배지 성분 중 만니톨 생산에 주효과를 나타내는 3개의 성분을 선별하기 위해 PBD를 설계하였다. 총 11가지의 독립변수 중 4개의 탄소원 변수로 선정된 glucose, fructose, sucrose, molasses는 중심값

5 g/l로부터 ±3 g/l로, 4개의 질소원으로 선정된 yeast extract, peptone, tryptone, beef extract는 중심값 3 g/l로부터 ±2 g/l로, 미량원소로 선정된 3개의 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O는 중심값 0.6 g/l에서 ±0.4 g/l로 설정하였다. 3개의 중심점을 포함한 15개 실험군에 대한 만니톨 생산량(Y, g/l)을

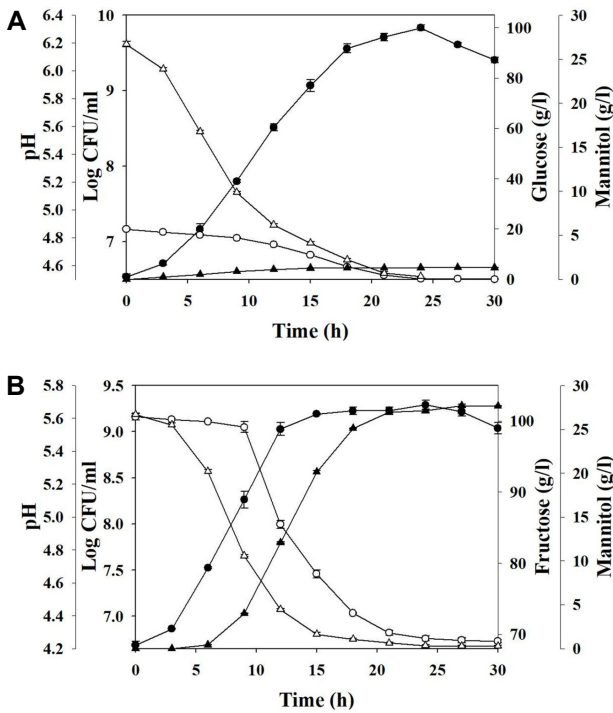


Fig. 2. (A) Time course profile of mannitol production by *L. mesenteroides* SRCM201425 in MRS broth and (B) MRS broth supplemented with 100 g/l of fructose. ●: Log CFU/ml, ○: fructose or glucose (g/l), ▲: Mannitol (g/l), △: pH.

Table 1에 나타내었으며, 각 변수의 수준에 따른 만니톨 생산에 미치는 영향을 나타내는 plot을 Fig. 3에 나타내었다. 설정 범위 내에서 glucose, fructose, sucrose, molasses는 농도가 증가함에 따라 만니톨의 생산량이 증가하였으나 MgSO<sub>4</sub>는 농도가 증가할수록 만니톨의 생산량이 감소하는 것으로 나타났으며, 이전의 연구결과[18]와 동일하게 질소원은 만니톨 생산에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 각 실험구의 반응값

에 대한 독립변수의 영향, 모델 계수와 *F-value*, *p-value*와 같은 통계분석 결과는 Table 4에 나타내었으며, 분석 결과를 바탕으로 신뢰수준이 95% 이상이며, 만니톨 생산에 주효과를 나타내는 독립변수 중 탄소원으로는 fructose (X<sub>2</sub>, 99.98%)와 sucrose (X<sub>3</sub>, 99.92%)를 선정하였으며, 질소원으로는 peptone (X<sub>6</sub>, 96.6%)을 선정하였다. 일반적으로 *Leuconostoc mesenteroides* 균주의 경우 fructose 또는 sucrose 존재 하에 고농도의 만니톨을 생산하는 것으로 알려져 있으며[4, 18, 20], peptone은 *Leuconostoc mesenteroides* 균주의 성장에 큰 영향을 미치는 질소원으로 알려져 있다[6].

**Central Composite design을 이용한 배지성분 농도의 최적화**

PBD 통계분석 결과를 통해 선별한 각 배지 성분인 fructose, sucrose, peptone의 농도 최적화를 수행하기 위한 방법으로 central composite design (CCD)를 설계하였다. 3개의 중심점을 포함한 17개의 실험군을 각 3번의 반복실험을 통해 산출된 만니톨 생산량(Y, g/l)의 결과값을 Table 5에 나타내었다. 이에 대한 모델식 예측은 Design expert 11 program을 이용하여 분석하였으며, 만니톨 생산량에 대한 회귀방정식은 다음과 같다.

$$Y = 17.67744 + 0.097452 * \text{fructose} - 0.803151 * \text{sucrose} + 0.045599 * \text{peptone} - 0.003409 * \text{fructose} * \text{sucrose} + 0.004323 * \text{fructose} * \text{peptone} + 0.008166 * \text{sucrose} * \text{peptone} - 0.001901 * \text{fructose}^2 + 0.026707 * \text{sucrose}^2 - 0.003349 * \text{peptone}^2$$

분산분석 결과 *F-value*가 8.76으로 나타나 실험 모델이 적합함을 확인하였으며, *p-value*가 0.0046으로 0.05보다 낮으므로 통계적으로 유의한 범위에 존재하였고 결정계수(R-square) 또한 0.9185로 1에 가까운 수치를 나타내어 높은 유의성을 나타내었다. 표준편차를 평균에 대한 백분율로 나타낸 변동계수(CV, Coefficient of variation)는 5.81%로 나타나 독립적인 영향과 변수간의 상호작용이 매우 안정적으로 작용하고 있음을

Table 4. Statistical analysis of medium components on mannitol production as per Plackett-Burman design

Variables (X <sub>i</sub> )	Effect (Ex <sub>i</sub> )	Coefficient (β <sub>i</sub> )	Sum of squares	F-value	P-value	Confidence level (%)
Model	7.46	3.73	96.33	562.99	0.0018**	99.82
Glucose	0.7883	0.39415	7.46	479.44	0.0021**	99.79
Fructose	2.30	1.15	63.49	4081.70	0.0002***	99.98
Sucrose	1.28	0.64	19.60	1259.85	0.0008***	99.92
Molasses	0.6104	0.3052	4.47	287.39	0.0035**	99.65
Yeast extract	0.1153	0.05765	0.1595	10.25	0.0853	91.47
Peptone	0.1903	0.09515	0.4346	27.94	0.0340*	96.6
Tryptone	-0.0438	-0.0219	0.0230	1.48	0.3476	65.24
Beef extract	-0.0816	-0.0408	0.0798	5.13	0.1517	84.83
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0826	0.0413	0.0820	5.27	0.1486	85.14
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	-0.1649	-0.08245	0.3265	20.99	0.0445*	95.55
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.132	0.066	0.2091	13.44	0.0670	93.3

Level of significance was confirmed statistically (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001).

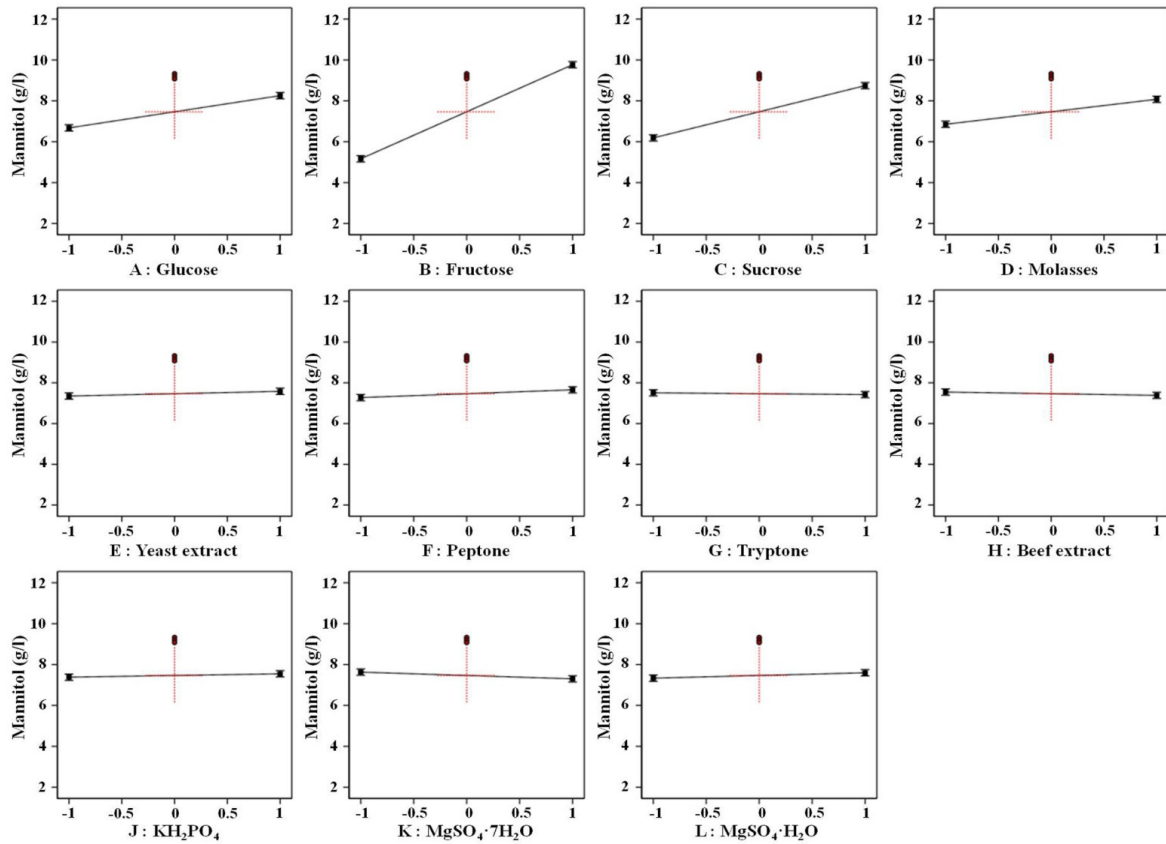


Fig. 3. One factor plot of the effects of each variable on mannitol production using Plackett-Burman design.

Table 5. Central composite design matrix with experimental values of mannitol production

Factors	Symbol (unit)	Coded variable levels				
		-2	-1	0	+1	+2
Fructose	X <sub>1</sub> (g/l)	5	20	35	50	65
Sucrose	X <sub>2</sub> (g/l)	10	15	20	25	30
Peptone	X <sub>3</sub> (g/l)	20	25	30	35	40

Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y (mannitol, g/l)
1	0	0	0	19.12336
2	0	0	2	20.02153
3	0	0	0	18.91642
4	-1	-1	1	16.22555
5	-1	-1	-1	15.36235
6	1	1	-1	19.69279
7	-2	0	0	15.93994
8	0	-2	0	19.00452
9	0	2	0	24.30189
10	-1	1	1	22.20411
11	0	0	-2	17.27354
12	-1	1	-1	20.74138
13	2	0	0	18.60233
14	1	-1	-1	15.55371
15	1	1	1	22.66955
16	0	0	0	18.70998
17	1	-1	1	17.49672



Table 6. ANOVA for the experimental results of the central composite design (quadratic model)

Sources	Coefficient estimate	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	Standard error	F-value	p-value, Prob>F
Model	18.78	95.52	9	10.61	0.6071	8.76	0.0046**
X <sub>1</sub>	0.7755	2.41	1	2.41	0.5503	1.99	0.2016
X <sub>2</sub>	3.91	61.09	1	61.09	0.5503	50.44	0.0002***
X <sub>3</sub>	1.59	10.15	1	10.15	0.5503	8.38	0.0232*
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	-1.02	0.5231	1	0.5231	1.56	0.4319	0.5321
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	1.30	0.8410	1	0.8410	1.56	0.6944	0.4322
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.8166	0.3335	1	0.3335	1.56	0.2753	0.6160
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	-1.71	3.55	1	3.55	1	2.93	0.1308
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	2.67	8.63	1	8.63	1	7.13	0.0320*
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	-0.3349	0.1358	1	0.1358	1	0.1121	0.7475
Residual	8.48		7	1.21			
Lack of fit	8.39		5	1.68		39.29	0.0250*
Pure error	0.0854		2	0.0427			
Cor Total	103.99		16				
Standard deviation		1.10		Press		71.33	
Mean		18.93		R-squared		0.9185	
Coefficient of variation (%)		5.81		Adjusted R-squared		0.8137	

X<sub>1</sub>: Fructose, X<sub>2</sub>: Sucrose, X<sub>3</sub>: Peptone. Level of significance was confirmed statistically (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001).

확인하였다(Table 6). 만니톨 생산량에 각 독립변수가 다른 독립변수에 미치는 영향을 확인하기 위해 선별된 3개의 변수 중 하나의 독립변수를 최적값에 고정한 후 나머지 2개 변수의 농도 변화를 이용한 3차원 등고선으로 변수간의 상호작용을 나타낸 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 설정범위 내에서 sucrose와 peptone은 농도가 높아질수록 만니톨 생산량이 증가하는 것으로 나타났으나 fructose는 농도가 높아질수록 만니톨 생산이 증가하다 일정농도 이상에서는 다시 감소하는 것으로 나타났다. 중심합성계획법을 기반으로 만니톨 생산 증가에 영향을 주는 변수와 각 변수의 최적 농도를 예측하였고 모델에 의해 예측된 만니톨 최대 생산을 위한 배지조성의 농도는 fructose 38.68 g/l, sucrose 30 g/l, peptone 39.67 g/l로 나타났으며, 이때의 최대 만니톨 생산량은 27.48±1.10 g/l로 예측

되었다.

**실험모델의 검증**

중심합성계획법에 의해 예측된 만니톨 생산을 위한 최적 배지에서의 만니톨 생산량을 검증하기 위해 모델에 의해 예측된 배지에 *L. mesenteroides* SRCM201425 균주를 접종하여 만니톨 생산량을 측정하였다. 배양액의 만니톨 함량을 측정할 결과 27.01±0.38 g/l로 MRS 배지에서의 생산량보다 약 20배의 만니톨이 생산되는 것으로 측정되었고, 예측된 값인 27.48±1.10 g/l의 오차범위 내에 존재하여 실측값이 예측값과 동일함을 확인하였으며, 100 g/l의 fructose를 첨가한 MRS배지에서의 만니톨 생산량과 거의 유사한 것으로 나타났다(Fig. 5). 이전의 연구결과[10]에 의하면 40 g/l의 fructose를 첨가한 MRS

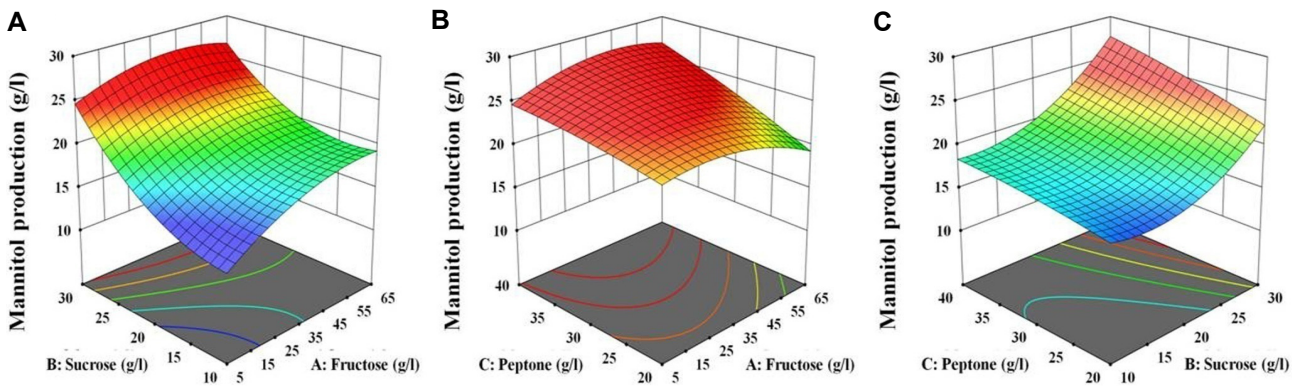


Fig. 4. Three dimensional response surface plots by response surface methodology showing (A) influence of fructose (X<sub>1</sub>) & sucrose (X<sub>2</sub>), (B) fructose (X<sub>1</sub>) & peptone (X<sub>3</sub>), (C) sucrose (X<sub>2</sub>) & peptone (X<sub>3</sub>).



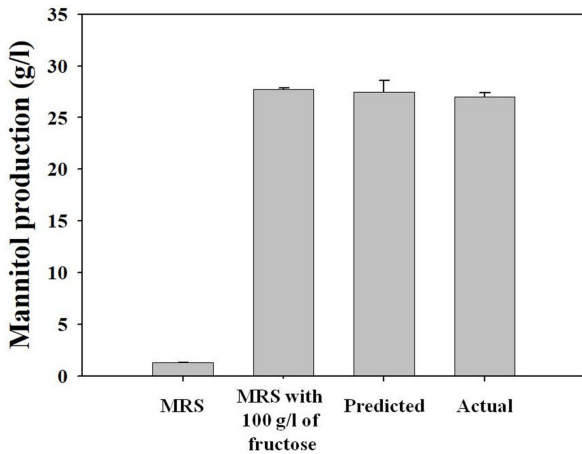


Fig. 5. Comparison of mannitol production in different media, MRS (basal medium), MRS supplemented with 100 g/l of fructose as well as comparing the model to actual. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of triplicates.

배지에서 10종의 *Leuconostoc* 속의 균주가 23.5-30.4 g/l의 만니톨을 생산하는 것으로 알려져 있으며, 100 g/l의 fructose를 첨가한 배지에서 *L. mesenteroides* sp. JFY 균주[16]와 *L. mesenteroides* KCTC13305 균주[11]가 각각 31.5 g/l, 39.03 g/l의 만니톨을 생산하는 것으로 알려져 있다. 본 연구결과를 통하여 이전의 연구결과들과 유사하거나 상대적으로 낮은 만니톨 생산량을 나타냈으나, MRS 배지를 대체할 수 있는 배지조성을 확립하였다. 본 연구를 통해 fructose를 첨가한 MRS 배지에서의 생산비용 대비 약 30%-50%의 생산비용을 절감할 수 있을 것으로 예상되며, 대량생산시 생산비용 절감효과는 더 커질 것으로 판단된다. 향후 만니톨 생산을 위한 산업적 균주 개량과 만니톨 생산을 위한 배양 초기 pH, 배양 온도 등의 추가적인 물리적인 요인의 최적화를 수행을 통해 만니톨 생산량을 더욱 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 2019년 산업통상자원부 산업기술거점기관지원 (한국형 유용균주, 과제번호: R0004073) 사업의 지원에 의해 수행된 것임.

## References

- Andreevskaya, M., Johansson, P., Jääskeläinen, E., Rämö, T., Ritari, J., Paulin, L., Björkroth, J. and Auvinen, P. 2016. *Lactobacillus oligofermentans* glucose, ribose and xylose transcriptomes show higher similarity between glucose and xylose catabolism-induced responses in the early exponential growth phase. *BMC Genomics* **17**, 539.
- Bong, K. M., Kim, K. M., Seo, M. K., Han, J. H., Park, I. C., Lee, C. W. and Kim, P. I. 2017. Optimization of medium for the carotenoid production by *Rhodobacter sphaeroides* PS-24 using response surface methodology. *Kor. J. Org. Agric.* **25**, 135-148.
- Ghoreishi, S. M. and Gholami, R. 2009. Innovative strategies for engineering mannitol production. *Trends Food Sci. Technol.* **20**, 263-270.
- Grobben, G. J., Peters, S. W. P., Wisselink, H., Weusthuis, R. A., Hoefnagel, M. H. N., Hugenholtz, J. and Eggink, G. 2001. Spontaneous formation of a mannitol-producing variant of *Leuconostoc pseudomesenteroides* grown in the presence of fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2867-2870.
- Ha, G. S., Yang, H. J., Jeong, S. J., Ryu, M. S., Kim, J. W., Yang, H. Y., Shin, S. J., Im, S. A., Seo, J. W., Jeong, S. Y. and Jeong, D. Y. 2018. Medium optimization for enhanced growth of *Bacillus subtilis* SRCM102046 possessing antibacterial activity using response-surface methodology. *Kor. J. Food Preserv.* **25**, 613-624.
- Jeong, E. J., Moon, D. W., Oh, J. S., Moon, J. S., Seong, H. B., Kim, K. Y. and Han, N. S. 2017. Development of Cabbage juice medium for industrial production of *Leuconostoc mesenteroides* starter. *J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 2112-2118.
- Jeong, S. J., Yang, H. J., Jeong, S. Y. and Jeong, D. Y. 2015. Identification of characterization and statistical optimization of medium constituent for *Bacillus subtilis* SCJ4 isolated from Korean traditional fermented food. *Kor. J. Microbiol.* **51**, 48-60.
- Joshi, S., Yadav, S., Nerurkar, A. and Desai, A. J. 2007. Statistical optimization of medium components for the production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* K51. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 313-319.
- Lee, H. R., Ahn, J. E. and Han, N. S. 2013. Chemical mutation of *Leuconostoc mesenteroides* for improved mannitol production: development of a high-throughput screening strategy. *Biothechnol. Bioprocess Eng.* **28**, 213-215.
- Otgonbayar, G. E., Eom, H. J., Kim, B. S. and Han, N. S. 2011. Mannitol production by *Leuconostoc citreum* KACC 91348P isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 968-971.
- Park, E. H., Yoo, B. H. and Kim, M. D. 2018. Characterization of the petent mannitol producer *Leuconostoc mesenteroides* KCTC13305. *J. Agri. Life. Sci.* **30**, 41-49.
- Ryu, B. H., Kim, D. H. and Yun, J. W. 1996. Characteristics of mannitol production by *Leuconostoc* sp. KY-002. *KSBB J.* **11**, 636-641.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Seo, J. W., Yang, H. J., Jeong, S. J., Ryu, M. S., Ha, G. S., Jeong, S. Y. and Jeong, D. Y. 2018. Characterization of *Lactobacillus brevis* SCML 432 isolated from Meju in Sunchang and optimization of its culture conditions by statistical methods. *Kor. J. Food Preserv.* **25**, 397-410.
- Yang, H. J., Park, C. S., Yang, H. Y., Jeong, S. J., Jeong, S. Y., Jeong, D. Y., Kang, D. O., Moon, J. Y. and Choi, N. S. 2015. Optimization of medium for the production of cellulase by *Bacillus subtilis* NC1 using response surface method-

- ology. *J. Life Sci.* **25**, 680-685.
16. Yoo, S. K., Hur, S. S., Song, S. H., Kim, K. M. and Whang, K. S. 2005. Optimization of mannitol fermentation by *Leuconostoc mesenteroides* sp. strain JFY. *J. Life Sci.* **15**, 374-381.
  17. Yue, M., Cao, H., Zhang, J., Meng, Y., Chen, W., Huang, L. and Du, Y. 2013. Improvement of mannitol production by *Lactobacillus brevis* mutant 3-A5 based on dual-stage pH control and fed-batch fermentations. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1923-1930.
  18. Yun, J. W., Kang, S. C., Ryu, B. H. and Song, S. K. 1996. Production of mannitol by *Lactobacillus* sp. KY-107. *KSBB J.* **11**, 374-379.
  19. Yun, J. W. and Song, S. K. 1994. Mannitol production by *Aureobasidium pullurans*. *KSBB J.* **9**, 140-146.
  20. Zhang, Z., Cheng, W. Y., Ju, X. Y. and Jin, H. X. 2015. The effect of dextransucrase gene inactivation on mannitol production by *Leuconostoc mesenteroides*. *Indian J. Microbiol.* **55**, 35-40.

### 초록 : 반응표면분석법을 이용한 *Leuconostoc mesenteroides* SRCM201425의 만니톨 생산배지 최적화

하광수<sup>1\*</sup> · 신수진<sup>2\*</sup> · 정성엽<sup>1</sup> · 양호연<sup>1</sup> · 임수아<sup>1</sup> · 허주희<sup>1</sup> · 양희종<sup>1</sup> · 정도연<sup>1\*</sup>  
 (<sup>1</sup>(재)발효미생물산업진흥원(MIFI), <sup>2</sup>(사)한국미생물보존센터)

본 연구에서는 경제성 있는 생물학적 만니톨 고생산을 위해 선별균주의 만니톨 생산 최적화 배지조성을 RSM 방법을 이용하여 확립하고자 하였다. 먼저 김치로부터 분리된 10균주의 만니톨 생산량과 과당으로부터 만니톨 전환율 분석을 통하여 SRCM201425 균주를 선발하였으며, 선발균주는 16S rRNA 유전자 염기서열과 당 발효 분석을 통하여 *Leuconostoc mesenteroides*로 동정하였다. Plackett-Burman design (PBD)을 이용하여 만니톨 생산에 영향을 주는 배지 인자를 선별하기 위해 총 11개의 탄소원, 질소원, 무기원소의 영향을 조사하였으며, 통계학적 분석을 통하여 최종적으로 fructose와 sucrose, peptone을 선정하였다. 만니톨 생산을 위한 선별된 각 변수의 최적 농도를 결정하기 위한 방법으로 central composite design (CCD)과 반응표면 분석법을 이용하였으며, 최종적으로 CCD를 통해 만니톨 생산을 위한 배지 조성의 최적 농도는 fructose 38.68 g/l, sucrose 30 g/l, peptone 39.67 g/l 으로 예측되었으며, 통계학적 분석을 통해 실험모델의 적합성을 확인하였다. 최종적으로 MRS 배지에서의 생산량의 약 20배의 만니톨을 생산할 수 있었으며, 100 g/l의 fructose가 포함된 MRS 배지 대비 97.46%의 만니톨을 생산하면서, 산업화시 기존 배지 대비 생산비용을 크게 절감할 수 있을 것으로 예상되었다. 본 연구를 통하여 만니톨 생산을 위한 배지 조성의 최적화를 확립하였으며, 만니톨을 생산하기 위한 방법으로 주로 사용되고 있는 고비용의 촉매환원 방법을 대체할 방법을 제시할 수 있는 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.