

Candida magnoliae SR101에 의한 Erythritol 및 Gluconic acid 생산에 대한 Phosphate의 영향

박병준, ¹서진호, 유연우

아주대학교 분자과학기술학과, ¹서울대학교 식품공학과

전화 (0331) 219-2455, 팩스 (0331) 216-8777

Abstract

The effect of phosphate on the production of erythritol and gluconic acid during the batch fermentation of *Candida magnoliae* SR101 was investigated. In the flask culture experiments, the results showed that phosphate concentration affected the production of erythritol and gluconic acid in *Candida magnoliae*. In the fermentor experiments, the increase of phosphate concentration of medium up to 10 g/L increased the gluconic acid, while the maximum erythritol concentration was 121.7 g/L from 250 g/L glucose and 3 g/L KH_2PO_4 .

서론

설탕의 70~80% 정도의 당도를 갖고 있지만 설탕의 5%에 불과한 열량을 갖고 있는 4탄당의 당알콜인 erythritol은 최근에 감미료의 하나로서 관심을 끌고 있다. 또한 erythritol은 난충치성이며 당뇨병 환자에게도 안전하다. 본 연구에서는 *Candida magnoliae* SR101를 이용한 erythritol 발효에서 배지내의 phosphate의 농도가 erythritol 및 gluconic acid 생성에 미치는 영향에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1) 사용균주

본 연구에서는 별집에서 분리한 *Candida magnoliae*를 돌연변이 시킨 변이균주를 사용하였다.

2) 배양조건

본 배양은 250 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 2 g/L ammonium sulfate를 기본 배지로 하여 수행되었다. Flask 배양은 250 mL 삼각 flask에 30 mL의 배지를 넣고 28°C, 200 rpm에서 진탕배양을 하였으며, fermentor 배양은 2.5 L jar fermentor(KFC)에 1.0 L의 배지를 넣고 28°C에서 1.0 vvm의 통기량과 500 rpm 교반속도에서 발효를 수행하였다.

3) 분석방법

세포 농도는 620 nm에서의 흡광도에 의하여 측정되었고, glucose 및 erythritol의 농도는 NH_2 column(Shisheido, Japan)을 사용하여 Waters사의 HPLC를 이용하여 분석하였다. Column 온도를 40°C로 유지하면서 이동상으로 acetonitrile과 물의 비율이 8 : 2 인 용매를 1.4 mL/min로 흘려주면서 RI detector로 분석하였다. Gluconic acid의 농도는 AminexTM HPX-87H column(Bio-Rad, USA)을 사용하였으며, 이동상으로는 5 mM의 H_2SO_4 용액을 사용하였다. Column 온도 40°C, 유속

0.6 mL/min를 유지하면서 215 nm에서 UV detector로 분석하였다.

결과 및 고찰

배지 내 KH_2PO_4 의 농도를 0 g/L 에서 20 g/L 까지로 달리하면서 flask 배양을 수행한 결과 KH_2PO_4 의 농도가 증가할수록 생성되는 gluconic acid의 농도는 증가한 반면, erythritol은 KH_2PO_4 농도 3 g/L ~ 5 g/L에서 최대로 생산되었다(Table 1). KH_2PO_4 에 함유된 원소 중에서 potassium과 phosphate 중에 어떤 원소가 erythritol 과 gluconic acid 생성에 영향을 미치는가를 알아보기 위해 3 g/L의 KH_2PO_4 에 해당하는 potassium 또는 phosphate를 함유한 NaH_2PO_4 , H_3PO_4 , KCl를 각각 배지에 첨가하여 flask 배양을 수행한 결과, phosphate를 함유한 NaH_2PO_4 또는 H_3PO_4 가 각각 첨가된 배지에서는 3 g/L의 KH_2PO_4 에서 생성되었던 농도에 근접한 erythritol 과 gluconic acid가 생성된 반면, KCl를 첨가한 배지에서는 glucose 소비 속도가 느려지면서, 생성되는 erythritol과 gluconic acid 농도도 감소하였다(Table 2). 이 결과로 볼 때, potassium과 phosphate 중에 erythritol과 gluconic acid 생성에 영향을 미치는 원소는 phosphate인 것으로 사료되어진다. Flask 배양에서 확인된 phosphate의 영향을 2.5 L jar fermentor를 이용하여 확인하였다. 0 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L, 10 g/L의 KH_2PO_4 가 포함된 배지를 이용하였다. Fermentor에서 실험을 수행한 결과, flask 배양 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었다(Fig 1, Table 3). 배지 내 KH_2PO_4 의 농도가 0 g/L에서 3 g/L까지 증가할수록 배양시간이 단축되고 erythritol 생성도 증가하였는데, 이는 3 g/L 이하의 KH_2PO_4 농도에서 cell의 기본대사와 erythritol 생성 대사에 필요한 phosphate가 부족하여 carbon source인 glucose 소비 속도가 감소하고(1), 또한 KH_2PO_4 의 buffering capacity가 부족하여 gluconic acid에 의한 pH 저하가 심해짐에 따라 cell의 maintenance 에너지가 증가하여 erythritol 생성이 감소하는 것으로 생각되어진다. 한편, 배지 내 KH_2PO_4 농도 10 g/L 이상에서 gluconic acid 생성은 급격히 증가하고 erythritol 생성은 감소하였다. 이는 glucose를 기질로 gluconic acid가 생성될 때의 key enzyme인 glucose oxidase가 KH_2PO_4 buffer에서는 매우 안정한 반면, pH가 낮아질수록 효소활성이 급격히 감소하기 때문(2,3)에, 배지 내 KH_2PO_4 농도 10 g/L 이상에서는 glucose oxidase 활성이 높게 유지되어 glucose에서 gluconic acid 생성으로의 flux는 증가하고 glucose가 pentose phosphate cycle로의 flux는 감소하기 때문인 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Marc E., Lenburg, Eric K. O' Shea, *Tre. Biochem. Sci.* 21: 383-386 (1996)
2. T. Roukas, L. Harvey, *Biotechnol. Lett.* 10: 289-284 (1988)
3. Rando D., Kohring G.-W., Giffhorn F., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 34-40 (1997)

Table 1. Effect of potassium phosphate on the production of erythritol and gluconic acid in a flask

KH ₂ PO ₄ (g/L)	Dry cell wt. (g/L)	Erythritol (g/L)	Gluconic acid (g/L)	Culture time (hours)	Terminal pH
0	30.1	81.1	0	288	2.0
0.25	36.7	83.5	0.2	216	2.0
0.5	36.2	86.4	1.2	216	2.0
1	35.0	89.5	2.5	216	2.1
2	34.7	101.0	7.8	168	2.2
3	35.7	115.0	10.5	144	2.3
4	35.0	111.6	30.2	144	2.3
5	34.2	114.8	32.8	144	2.4
10	33.4	100.5	59.1	168	3.0
20	32.5	81.0	81.8	168	3.4

Table 2. Identification of the effect of potassium and phosphate on the production of erythritol and gluconic acid in a flask

Medium component	Dry cell wt. (g/L)	Erythritol (g/L)	Gluconic acid (g/L)	Culture time (hours)	Residual glucose (g/L)
NaH ₂ PO ₄	32.4	103.5	13.7	144	0
H ₃ PO ₄	32.6	105.0	15.2	144	0
KCl	27.1	60.1	0.6	288	39.3

Table 3. Effect of potassium phosphate on the production of erythritol and gluconic acid in a 2.5 L jar fermentor

KH_2PO_4 (g/L)	Dry cell wt. (g/L)	Erythritol (g/L)	Gluconic acid (g/L)	Culture time (hours)	Terminal pH
0	28.9	93.1	5.1	288	2.1
3	37.1	121.7	7.4	168	2.1
4	36.3	119.8	23.1	168	2.3
5	35.9	120.2	28.2	168	2.5
10	34.7	106.2	49.7	168	3.0

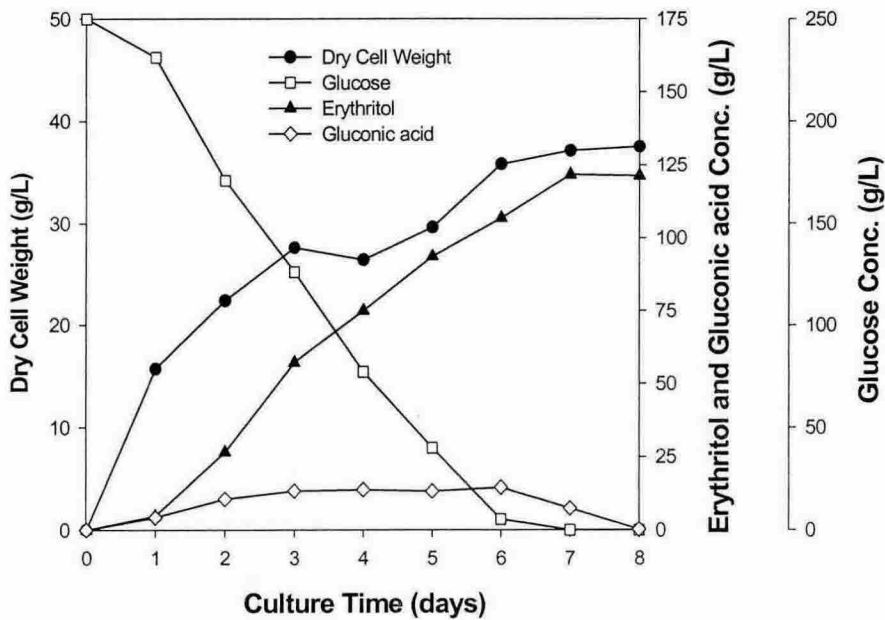


Fig. 1 The Profiles of erythritol production and gluconic acid production in the medium containing 3 g/L KH_2PO_4 in a 2.5 L jar fermentor