

Optimization of industrial medium for the production of erythritol by *candida magnoliae*

Seung Bum Kim, Sun Young Park, Jin Ho Seo¹, and Yeon Woo Ryu^{*}

Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, and

¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

TEL: +82-31-219-2449, FAX: +82-31-216-8777

Abstract

Experiments were carried out to investigate the selection of industrial medium and optimization of fermentation process for the production of erythritol by *Candida magnoliae* SR101.

In the batch fermentation, light steep water(LSW) was the best nitrogen source for the industrial production of erythritol. For the optimization of culture condition, the batch culture was performed. When the concentration of LSW was 65 mL/L in the defined medium containing 250 g/L of glucose, 44% of erythritol yield with 110 g/L of erythritol concentration and 0.66 g/L-hr of productivity, respectively were obtained.

Two-stage fed-batch culture was performed to improve the volumetric productivity of erythritol. High density cell culture in the growth stage was performed by batch type with 100 g/L glucose and 500 mL/L LSW concentration, respectively. The cell yield was 0.72 g-cell/g-glucose. Productivity of erythritol was increased and concentration of organic acids such as gluconic acid and acetic acid were decreased when initial pH of 6.5 controlled by 28% ammonia water. For increasing yield of erythritol, glucose concentration in the production stage was tested. 37% of total erythritol yield with 186 g/L of erythritol concentration and 1.66 g/L-hr of erythritol productivity were obtained when 820 g of glucose powder was directly added for making up 450 g/L of glucose at production stage.

서론

Erythritol은 $C_4H_{10}O_4$ 의 분자식을 가진 4탄당 당알콜로서 기능적인 특성은 xylitol, sorbitol, mannitol 같은 다른 당알콜과 유사하며, 설탕의 70-80%의 당도를 가지고

있으며, 단맛이 설탕과 유사하고 뒷맛이 쓰지 않고 물에 용해될 때 흡열반응에 의한 용해열(-23.3 Kcal/Kg)을 나타내므로 강한 청량감을 줄 수 있어 츄잉검, 캔디 등과 같은 식품에 이용할 수 있는 장점이 있다

Erythritol 생산을 위한 방법에는 화학 합성법과 발효법이 있는데, 화학 합성법은 고가의 원료 물질과 합성 과정 중에 생성되는 부산물의 제거가 어렵고, 낮은 수율 등의 문제점 때문에 산업화되지 못하였다. 따라서 발효법은 이러한 화학 합성법의 단점을 극복할 수 있는 방안으로 연구가 활발히 진행되고 있다(1-3).

Light steep water(LSW)는 corn wet milling의 부산물로서 미생물의 성장과 발효에 충분한 질소원을 제공 하면서 가장 값이 싼 질소원이며, Koh 등(4)은 erythritol의 효율적인 대량생산을 위해 yeast extract 대체 질소원으로 LSW등을 사용한 결과 yeast extract를 질소원으로 사용한 경우와 비슷한 erythritol 생성 수율과 생산성을 얻을 수 있었다고 보고하였다.

재료 및 방법

1. Glucose, Glycerol, erythritol의 정량, 정성 분석은 NH₂ column(Shisheido, Japan)을 이용하여 HPLC (Waters, USA)에서 RI Detector로 측정하였고, 유기산의 분석은 HPLC (Waters, USA)를 사용하였으며, column으로는 AminexTM HPX-87H (Bio-Rad, USA)를 사용하여 이동상으로 5 mM H₂SO₄ 용액을 0.6 mL/min으로 흘려보내면서 210 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2. 균체량 측정은 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu, Japan)를 사용하여 620 nm에서 흡광도를 측정한 후, 흡광도와 건조 균체량의 표준곡선을 이용하여 환산 측정하였다. 이때, *Candida magnoliae* SR101의 건조 균체량은 다음과 같은 식에 의하여 계산되었다.

$$\text{Dry cell weight (g/L)} = 0.249 \times \text{OD}_{620}$$

3. 희분식 배양은 기본 발효배지(D-glucose 250 g/L, yeast extract 5.0 g/L, KH₂PO₄ 5.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.0 g/L, MgSO₄ · 7 H₂O 0.4 g/L) 1.2 L를 2.5 L 발효조(KoBioTech, Korea)에 넣고 멸균한 후 28°C에서 500 rpm의 교반속도와 1.0 vvm의 통기조건에서 실험을 수행하였다. 초기 pH는 4N NaOH를 이용하여 7.0으로 조절하였으며 foam 조절은 organic base인 neorin을 3배 희석하여 사용하였다. 유가식 배양을 위한 배양 조건은 3.3 L 발효조 (NBS Bioflo III, USA)에서 세포 성장 배지로 glucose 100 g/L와 LSW 500 mL/L를 이용하였으며, 초기 working volume은

1.5 L 였다. 세포 성장 시기 동안 교반 속도, aeration rate, 그리고 pure oxygen을 이용하여 용존 산소량을 포화 용존 산소량의 20%가 되도록 유지하였다. Glucose는 멸균되지 않은 powder 형태를 발효조에 직접 공급하여 주었으며, 배양이 끝난 후 final working volume은 약 1.9 L가 되었다.

결과 및 고찰

1. Erythritol 생산의 산업화를 위해서는 고가의 질소원인 yeast extract를 대신할 수 있는 저렴한 가격의 산업용 배지들을 이용하여 실험을 수행한 결과는 Table 1 과 같으며, 생산성은 LSW가 Difco 사의 yeast extract 보다 낮았지만, 수율에서는 오히려 yeast extract 보다 1.1 배가 높았다. 이러한 실험결과를 바탕으로 질소원으로 LSW를 선정 erythritol의 수율 및 생산성 향상을 위한 LSW의 최적 농도결정에 대한 실험을 수행하였다.

Table 1. Comparison of various nitrogen sources on the erythritol production with *Candida magnoliae* SR101.

Types of Nitrogen-source	N-Conc.	μ_{max} (hr ⁻¹)	DCW (g/L)	Erythritol		
				Conc. (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L-hr)
Yeast extract (Difco Co.)	5 g/L	0.16	53.6	125.5	50	0.65
Yeast extract (Cho-Heung Co.)	5 g/L	0.08	44.8	121.0	48	0.59
Yeast extract (Gist Co.)	5 g/L	0.07	46.3	133.9	54	0.62
CSP	6.83 g/L	0.05	60.9	87.2	35	0.56
CSL	13.7 mL/L	0.11	62.4	85.5	35	0.59
LSW	43.7 mL/L	0.09	45.9	131.6	53	0.52
Urea	0.98 g/L	0.06	19.8	18.6	18	0.08

Table 2. Effect of LSW concentrations on the erythritol production during the batch fermentation of *Candida magnoliae* SR 101.

	Concentration of LSW (mL/L)				
	43.3 (C/N=50)	48.3 (C/N=45)	65.0 (C/N=33)	87.0 (C/N=25)	108.0 (C/N=20)
Erythritol Conc. (g/L)	129.4	112.0	110.1	88.0	83.8
Yield (%)	52	45	44	35	34
Productivity (g/L-hr)	0.57	0.56	0.66	0.54	0.66
DCW (g/L)	47.6	48.7	50.0	56.6	60.7
μ_{MAX}	0.12	0.15	0.12	0.12	0.12
Fermentation time (hr)	233	194	168	158	145

3. *Candida magnoliae* SR101에 의한 erythritol 생산에 있어서 회분식 발효는 높은 수율로 erythritol을 생산할 수 있지만 생산성이 매우 낮으므로 산업적으로 erythritol을 생산하기 위해서 2단계 유가식 배양 공정을 개발하고자 실험을 수행하였다.

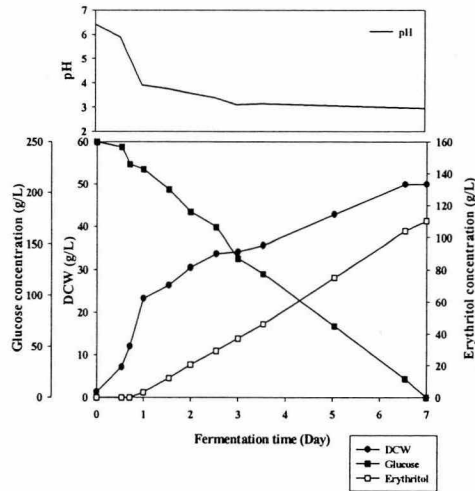


Fig 1. Profile of cell, erythritol, glucose concentration and pH during the batch fermentation in medium containing 250 g/L glucose and 65 mL/L light steep water.

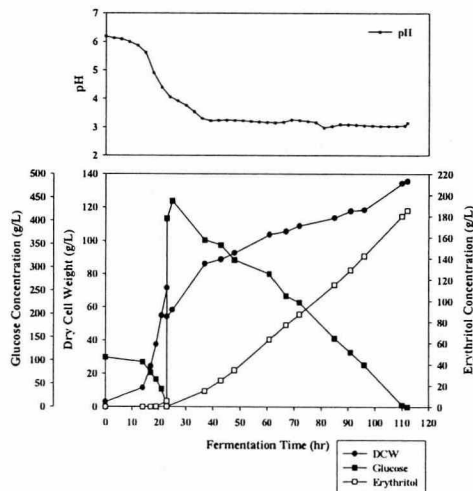


Fig 2. Profiles of cell, erythritol, glucose concentration and pH during the two-stage fed-batch

culture by *Candida magnoliae* SR101. The glucose concentration in the culture broth was 450 g/L after feeding of 820 g glucose powder.

요 약

LSW는 유기질소원으로 가격이 가장 저렴하면서도 43.3 mL/L를 이용할 경우에 250 g/L의 glucose로부터 erythritol을 53%의 수율과 0.52 g/L-hr의 생산성 및 132 g/L의 농도로 생산이 가능하였다. 따라서 산업용 쓰이기에 충분한 가능성을 보였다. Erythritol의 생산성 향상을 위한 발효 조건의 최적화에 대한 실험을 수행한 결과 기본 발효배지에 65 mL/L의 농도로 LSW를 이용할 경우에 250 g/L의 glucose로부터 erythritol의 수율은 44%로 약간 낮아졌지만, 생산성은 0.66 g/L-hr로 1.3배 증가하였다.

Growth stage에서 고농도 균체를 얻기 위하여 glucose를 feeding하는 방법에 관한 연구에서는 glucose 100 g/L와 LSW 500 mL/L를 같이 넣고 배양하는 회분식 배양 방법을 통해 23시간만에 77.6 g/L의 균체를 얻을 수 있었다. Erythritol의 수율 향상을 위하여 production stage에서 최적의 glucose 농도에 대한 연구를 수행한 결과 발효조 내에서 glucose의 농도가 450 g/L 가 되도록 할 경우에 185.5 g/L의 erythritol을 37.3%의 생성 수율과 1.66 g/L-hr의 생산성으로 얻을 수 있었다. 따라서 산업용 질소원으로 선정된 LSW를 가지고 2단계 유가식 배양을 통하여 회분식 배양과 비교해 볼 때 수율은 1.1배정도 감소되었지만 erythritol의 생산성은 2.5 배정도 향상시킬 수 있었다

참고문헌

1. Otey, F. H., J. W. Sloan, C. A. William, C. L. Mehtretter, Erythritol and ethylene glycol from dialdehyde starch, *Ind. Eng. Chem.* **53**, 267-268, 1961.
2. Hajny, G. J., J. H. Smith, and J. C. Garver, Erythritol production by a yeast-like fungus. *Appl. Microbiol.* **12**, 240-246, 1964.
3. Onishi, H., Production of polyalcohols by yeasts, *Hakko Kyokaiishi* **25**, 495-506, 1967.
4. Koh, Eun-Sung, Kwan-Hoon Moon, Ki-Cheol Han, Yeon-Woo Ryu, Jin-Ho Seo, Optimization of culture conditions and nitrogen sources for production of erythritol by *Candida magnoliae*, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **28**(6), 349-354, 2000.