한국생물공학회지 제15권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 15, No. 6, 566-572(2000)

에리스리톨의 수율 향상을 위한 *Candida magnoliae*의 삼투압 내성 변이균주의 개발과 탄소원 및 질소원의 최적 농도 결정

양 성 욱 · [1]서 진 호 · †유 연 우
아주대학교 분자과학기술학과, [1]서울대학교 식품공학과
(접수 : 2000. 8. 11., 게재승인 : 2000. 11. 14.)

Development of Osmotolerant Mutant, *Candida magnoliae* M26 and the Determination of the Optimum Concentrations of Carbon and Nitrogen Sources to Improve Erythritol Yield

Sung Wook Yang, Jin Ho Seo[1], and Yeon Woo Ryu†
Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, and [1]Department of Food Science & Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea
(Received : 2000. 8. 11., Accepted : 2000. 11. 14.)

Experimental studies were carried out to develop an osmotolerant mutant of *Candida magnoliae* JH and to determine the optimum concentrations of carbon and nitrogen sources to improve erythritol yield and productivity. Mutants of *C. magnoliae* JH were prepared by treatment with ethylmethane sulfonate, and osmotolerant mutants were isolated from the agar plate colonies containing 2.5 M KCl. Among the mutants isolated, one mutant M26 was finally selected based on erythritol yield and productivity. In shake flask culture, glucose proved to be the best carbon source and the optimum yeast extract concentration was 5 g/L based on 100 g/L glucose. The erythritol yield and productivity of mutant M26 were greater than wild type in 100 g/L glucose medium. In the fermentation experiments, erythritol production increased with increased glucose concentration, up to a limit of 250 g/L. The maximum concentration of erythritol achieved 127.5 g/L, and the yield and productivity of erythritol production were 51.0% and 0.63 g/L-h, respectively.

Key Words : erythritol, *Candida magnoliae*, osmotolerant mutant, erythritol yield

서 론

Erythritol은 4탄당의 당알콜로서 자연계에서 과일(1,2), 버섯(3), 발효식품(2) 및 포유동물의 체액(4) 등에 매우 낮은 농도로 존재한다. 이러한 erythritol은 설탕의 70-80% 당도를 가지고 있는 감미료로서 우수한 결정성으로 인하여 기존의 설탕 수요를 대체할 수 있는 기능적인 특성이 있으며(5), 결정이 물에 녹을 때 강한 흡열반응을 일으키므로 섭취시에 청량감과 산뜻한 단맛을 주는 장점과 열 안정성 때문에 츄잉껌, 사탕, 크림 등의 제과류와 청량음료의 제조에 폭 넓게 이용될 수 있다. 더구나 인체에 독성이 없는 저 칼로리 감미료로서 소변으로 대부분이 배출되며(5,6,7), 혈장에서 glucose 농도에 영향을 미치지 않으므로 당뇨병 환자가 이용할 수 있다(7). 또한 구강에서 충치균에 의하여 이용되지 않기 때문에 충치예방에도 효과가 있다(8).

미생물 발효에 의한 erythritol의 생산에 대한 연구는 균주의 탐색, 변이균주의 개발 및 발효조건 최적화가 이루어져 왔다. Ohnishi(9)는 156가지 효모들의 당알콜 생성에 대한 연구를 통하여 *Pichia, Candida, Torulopsis* 등이 erythritol 생산 균주임을 보고하였다. Hajny 등(10)은 화분에서 분리한 yeast-like fungus인 *Moniliella tomentosa var. pollinis*가 35.7%의 glucose 배지에서 45.6%의 수율로 erythritol을 생산하였다는 결과를 보고하였다. 그 후 Hattori 등(11)은 *Candida zeylanoides*에 의한 erythritol 생산에 대한 연구를 수행하였으며, Wako 등(12)은 고농도의 erythritol을 생산하는 균주를 탐색하는 과정에서 *Aureobasidium* sp.라는 erythritol 생산 균주를 분리하였다. 또한 최근에는 Aoki 등(13)이 꿀 벌집(honeycomb)에서

†Corresponding Author : Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea
Tel : +82-31-219-2449, Fax : +82-31-216-8777
E-mail : ywryu@madang.ajou.ac.kr

Trichosporonoides sp.라는 균주를 선별하여 40%의 수율로 erythritol을 생산한다고 발표하였다. 국내에서는 Kim 등(14)이 꿀 벌집에서 분리한 *Candida* sp.가 erythritol을 생성함을 보고하였으며, 역시 Park 등(15)도 꿀 벌집에서 분리한 *Moniliella suaveolens* var. *nigra*가 40%의 glucose로부터 42%의 수율과 1.4 g/L-h의 생산성으로 erythritol을 생산함을 보고하였다(16). 또한 Park 등(17)도 꿀 벌집에서 분리한 *Trichosporon* sp.가 30%의 glucose 배지에서 141 g/L의 erythritol이 생성됨을 보고하였다. 그러나 대부분의 분리한 균주들이 glycerol, ribitol, mannitol 등의 부산물을 생성하거나 수율 및 생산성이 낮아 산업화에 이용하지 못하고 있다.

따라서 산업적인 erythritol 생산을 위한 균주 개량에 대한 연구는 미생물들이 삼투압 조절물질로 당알콜들을 생성하기 때문에 삼투압에 대한 내성이 높은 균주일 수록 erythritol 생성 능력이 우수한 균주라는 점을 이용하여 변이균주를 선별하는 것이 일반적이다. 즉 Ishizuka 등(18)은 *Aureobasidium* sp.에 UV 조사와 NTG 처리를 연속적으로 사용하여 최대 erythritol 생산량이 야생균주에 비하여 50% 증가한 당 내성 변이균주를 선별하였으며, 이 변이균주는 현재 일본의 日硏化學에서 산업적으로 이용되고 있는데 수율은 40%이고 생산성은 2.0 g/L-h 정도의 수준인 것으로 알려져 있다. 전 등(19)도 *Trichosporonoides* sp.에 EMS를 처리하여 당내성과 염내성이 뛰어난 변이균주를 분리한 결과 당 내성 변이균주는 야생균주에 비해 생산성이 2.7배 증가한 것으로 보고하였다. 반면에 Loray 등(20)은 에탄올 생산 균주인 *Saccharomyces cerevisae*와 염 내성 효모인 *Debaryomyces hansenii*의 세포융합을 통하여 높은 농도의 당이 함유된 배지에서 에탄올과 당알콜의 생성능력이 뛰어난 hybrids를 얻었다고 발표하였다.

일반적으로 erythritol 생산을 위한 중요한 발효배지의 선택은 탄소원의 종류와 조성 및 삼투압 조건 등에 있다. Hallsworth 등(21)은 배지내의 탄소원으로서 glycerol, glucose, trehalose, starch 등을 사용하여 탄소원의 종류와 농도가 당알콜 생성에 미치는 영향을 고찰하였고, 각 탄소원의 종류와 농도에 따라서 균주들이 생산하는 당알콜의 종류와 농도가 다르다는 결과를 보고하였다. Aoki 등(13)은 당들이 pentose phosphate pathway를 거쳐 erythrose-4-phosphate로 전환되고 phosphatase와 erythrose dehydrogenase에 의해 erythritol이 생성되는 대사과정에서 glucose가 가장 빨리 대사과정에 이용됨을 고찰하였다. 또한 꿀 벌집에서 분리한 *Trichosporonoides* sp.를 사용한 실험을 통하여 glucose와 sucrose에 의한 erythritol의 발효 경향을 비교한 연구결과에서 수율과 당의 소모속도에서 glucose가 더 우수하였으며(13), 이때 400 g/L의 glucose 농도에서 최대 47%의 수율을 얻었다(22). 미생물 발효를 통한 대사산물의 생산에서 대사산물을 과량으로 얻기 위해서는 미생물의 생장을 제한하는 경우가 있는데, 일반적으로 erythritol을 포함한 당알콜 발효배지는 질소원에 비해 탄소원의 농도가 높은 특성을 가지고 있다. 그 결과 질소원의 고갈에 의하여 세포의 성장이 제한될 때에 당알콜의 분비가 촉진된다고 알려져 있다(23). 또한 Pfyffer 등(24)은 곰팡이를 이용한 실험에서 질소원의 고갈로 인한 성장제한이 균체내의 당알콜 축적을 증가시킨다는 연구결과를 발표하였다. 따라서 당알콜 생산을 위한 배지의 C/N ratio는 일반적인 발효 배지의 C/N ratio 보다 높은 특성을 가지며 당알콜 생산에 이용되는 균주의 종류에 따라 각각의 발효배지는 적정 수준의 C/N ratio를 요구하고 있다. 즉 C/N ratio가 필요 이상으로 높을 경우에는 당의 소모속도가 저하되고 다량의 부산물이 생성되는 반면 낮을 경우에는 세포농도가 증가하여 erythritol의 수율이 떨어지는 단점이 있다(19).

따라서 본 연구에서는 높은 수율로 erythritol을 생산하기 위하여 꿀 벌집에서 분리한 *Candida magnoliae* JH를 이용한 삼투압 내성 변이균주의 개발과 탄소원 및 질소원의 최적 농도결정에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용한 균주는 서울대학교 식품공학과 서진호 교수 연구실에서 꿀 벌집으로부터 분리하여 *Candida magnoliae* JH로 동정된 균주를 분양 받아 이용하였다(14).

배양배지 및 배양조건

접종용 균주의 배양은 20 g/L glucose, 10 g/L yeast extract 및 10 g/L peptone이 포함된 배지 50 mL를 250 mL baffled flask에 넣고 멸균한 후에 접종하여 30℃에서 48시간 200 rpm으로 진탕 배양하여 사용하였다. 모든 flask 배양 및 fermenter에서의 접종량은 5% (v/v)로 하였다. Erythritol 생산을 위한 발효배지는 100~300 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L KH_2PO_4, 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0.4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$를 사용하였다. 진탕배양기에 의한 erythritol 발효는 발효배지 200 mL를 500 mL baffled flask에 넣고 28℃에서 200 rpm으로 진탕배양하였다. 발효조를 이용한 erythritol 발효는 발효배지 1.0 L를 2.5 L jar fermenter (KFC, Korea)에 넣고 멸균한 후에 28℃에서 0.5 vvm의 통기와 700 rpm으로 교반하면서 실험을 수행하였다. 모든 발효배지의 초기 pH는 5 N KOH를 이용하여 7.0으로 조절하였다.

변이유도 및 삼투압 내성 변이균주의 선별

염과 당에 대한 삼투압 내성을 갖는 변이균주의 선별을 위하여 야생균주의 생육이 불가능한 염 (KCl)과 당 (glucose)의 농도를 결정하는 실험을 수행하였다. 염에 대한 내성 실험은 300 g/L glucose, 0.7 g/L YNB (w/o amino acid), 20 g/L agar가 포함된 배지에 KCl를 2.0 M~3.0 M의 농도범위로 각각 첨가하여 사용하였고, 당에 대한 내성 실험을 위해서는 0.7 g/L YNB (w/o amino acid)와 20 g/L agar에 glucose를 각각 400~700 g/L의 농도범위로 첨가한 배지를 사용하였다. 실험 방법은 야생균주를 각각의 agar plate에 peaking한 후에 colony의 형성 여부를 확인하여 선택배지의 염과 당의 농도를 결정하였다. 야생균주의 변이유도를 위하여 먼저 spore를 Han 등(25)의 방법에 의하여 *C. magnoliae* JH의 spore를 얻었다. 변이유도는 본 실험실에서 사용하는 방법(25,26)으로 수행하였다. 즉 수집한 spores에 10 mM 2-mercaptoethanol에서 30분간 처리하였다. 그 후 0.5 mg/mL lyticase (100,000 unit) 현탁액에서 4시간 동안 반응시켜 vegetable cell을 제거하고 spore 만을 선별하였다. 여기에 0.8% ethylmethane sul-

fonate (EMS)를 30분간 처리하여 변이를 유도하고 5% sodium thiosulfate를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 이 spore 현탁액을 적정 배수로 희석한 후에 당 내성 변이균주 선별의 경우는 0.7 g/L YNB와 700 g/L glucose가 포함된 agar plate에 도말하고, 염 내성 변이균주의 선별은 0.7 g/L YNB, 300 g/L glucose 및 2.5 M KCl이 포함된 agar plate에 도말하여 30℃ 배양기에서 7일간 배양하였다. Colony 성장이 우수한 균주를 1차로 선별하였으며, 선별된 colony를 대상으로 flask 배양에 의하여 erythritol의 수율과 생산성이 가장 우수한 변이균주를 최종적으로 선발하였다.

분석방법

Glycerol, erythritol의 정량은 NH_2 column (Shisheido, Japan)을 이용하여 HPLC (Waters, USA)에서 RI Detector로 측정하였다. 이때 용매는 물과 acetonitrile을 15 : 85로 혼합하여 사용하였으며, 유속은 1.4 mL/min 이고 column의 온도는 40℃ 이었다. 배지 내 당들의 농도는 당알콜 분석과 같은 조건으로 HPLC를 사용하였다. 또한 HPLC로 정확한 glucose의 정량이 불가능한 경우 Glucose Analyzer (YSI, USA)를 사용하여 분석하였다. 세포 농도는 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu, Japan)를 사용하여 620 nm에서 optical density (O.D)를 측정하였다. 건조균체량은 흡광도와 건조균체량 (dry cell weight)의 표준곡선에 의하여 건조 균체량 (DCW : g/L)으로 환산하였다. 이 때 표준곡선은 일정 농도 비율의 균체에 대한 흡광도를 측정한 후에 이 용액 5 mL를 0.2 μm membrane filter로 여과한 다음 진공건조기 (80℃의 50 mmHg)에서 48시간 건조시켜 균체량을 측정하였다. 실험결과 *C. magnoliae* JH 및 mutant M26의 1.0 O.D는 0.25 g/L의 건조균체량을 나타내었다.

결과 및 고찰

삼투압 내성 변이균주의 선별

일반적으로 당알콜의 생산에는 삼투압 내성을 가진 균주가 유리한 것으로 알려져 있다(10,13). 즉 삼투압 내성의 정도는 당알콜의 생성 능력과 비례하므로 삼투압 내성이 우수한 변이균주의 선별을 통하여 당알콜 생산에 이용하려는 시도가 많이 보고되어 있다(18,19). 따라서 높은 수율로 erythritol을 생산하는 균주의 개발을 위하여 높은 농도의 당 또는 염에서 생육이 우수한 변이균주의 선별에 대한 실험을 수행하였다.

먼저 삼투압 내성이 높은 변이균주의 선별을 위하여 *C. magnoliae* JH의 당 및 염 내성에 대한 실험결과 (Table 1)에서 glucose는 700 g/L의 농도에서 생육이 불가능하였으며, KCl은 2.5 M에서 미약한 생육이 관찰되어 각각의 농도를 당 내성과 염 내성의 변이균주를 선별하기 위한 농도로 결정하였다. 또한 사용한 *C. magnoliae* JH는 일반적인 다른 osmophilic yeast와 같이 염 보다 당에 대한 내성이 더 뛰어났으며, 이는 배지내의 삼투압 조건을 높이는 시도를 통하여 높은 수율의 erythritol 생성을 유도하려는 실험을 수행할 경우 염보다 당을 사용하는 것이 유리하다는 점을 알 수 있었다(27).

Table 1. Salts and sugar tolerance of *Candida magnoliae* JH.

KCl (M)			Glucose (g/L)		
2.0	2.5	3.0	500	600	700
+	±	−	+ +	+	−

+ : growth, - : no growth

C. magnoliae JH의 spores에 EMS를 처리하여 변이를 유도한 후에 선별배지에 접종하여 colony 생장이 우수한 균주를 1차로 선별하였다. 여러 번의 변이유도 실험결과에서 700 g/L의 glucose 배지에서 생육이 가능한 당 내성 변이균주는 얻지 못하였다. 이는 선별배지의 glucose 농도가 너무 높게 설정되었거나 EMS에 의한 변이유도에서 당에 대한 내성이 우수한 변이균주가 유도되지 않았기 때문으로 추정된다. 그러나 2.5 M의 KCl 배지에서는 100개 이상의 colony를 얻을 수 있었으며, 이중에서 colony 성장이 우수한 32개를 선별하여 100 g/L의 glucose 발효배지에서 erythritol 생성능력을 비교하는 실험을 수행하였다. 즉 120시간 발효에서 erythritol의 생성능력이 우수한 4개의 변이균주와 야생균주에 대한 실험결과를 Table 2에 나타내었다. 선별한 4개 변이균주들의 발효속도는 비슷하나 erythritol의 생산능력에 차이가 있음을 알 수 있었다. 변이균주들 중에서 erythritol의 수율과 당의 소모속도에서 모두 우수한 변이균주 M26을 최종적으로 선별하였다.

야생균주와 변이균주 M26의 erythritol 발효 특성

발효배지에서 야생균주인 *C. magnoliae* JH와 선별한 염 내성 변이균주 M26의 발효특성을 알아보았다. 우선 glucose의 농도가 100 g/L인 발효배지에서 실험을 수행하였다. 이때 배양은 배지의 초기 pH가 7.0인 발효배지 200 mL를 500 mL의 baffled flask에 넣고 온도는 30℃에서 200 rpm으로 진탕배양하였다.

야생균주의 실험결과에서 erythritol은 세포성장과 더불어 증가함을 알 수 있었으며, 최대 erythritol의 생산은 glucose가 거의 소모된 84시간 배양에서 나타났다 (Figure 1). 그러나 84시간 이후에는 erythritol의 농도가 약간 감소하는 경향을 나타내었는데, 이는 기질인 glucose가 다 소모된 후에 erythritol을 기질로서 이용하기 때문으로 사료되었다. 또한 최대 균체의 농도가 나타나는 시간에 최대의 erythritol 농도를 나타내었으므로 erythritol의 생산은 growth associated form인 것으로 관찰되었다. Erythritol 이외의 다른 부산물로는 소량의 glycerol이 배양 초기에 생성되었으나 erythritol이 최대로 생

Table 2. Cell growth and erythritol concentrations by wild type and salt-tolerant mutants at 120 h culture.

Strains	Wild	M19	M26	M29	M32
Cell concentration (g/L)	11.8	12.5	14.7	11.4	13.1
Erythritol concentration (g/L)	6.9	11.1	15.1	9.2	10.9
Residual glucose concentration (g/L)	30.6	32.2	28.0	35.4	34.4
Erythritol yield (%)	9.9	16.4	21.0	14.2	16.6

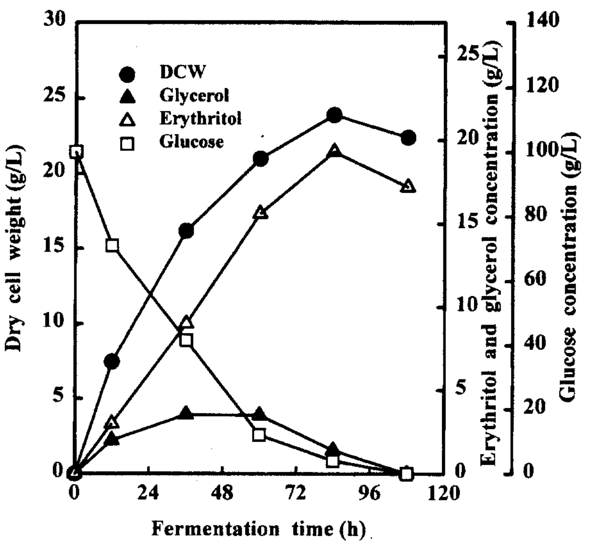

Figure 1. Profiles of cell growth, erythritol, glycerol and glucose concentrations during the baffled flask culture of *C. magnoliae* JH.

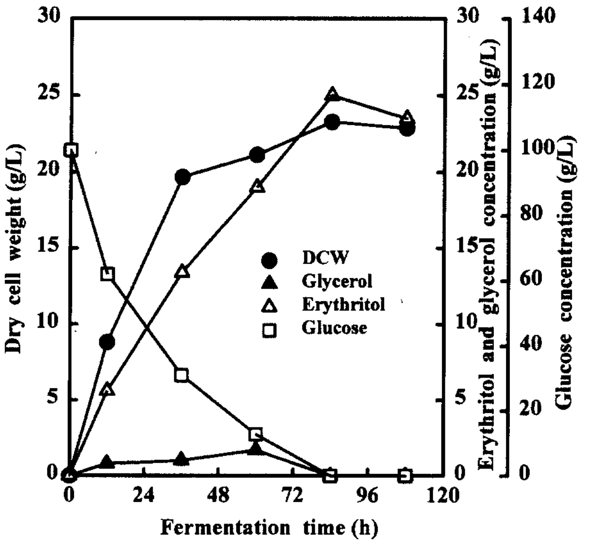

Figure 2. Profiles of cell growth, erythritol, glycerol and glucose concentration during the baffled flask culture of mutant M26.

성되는 84시간 이후에는 생성되지 않고 오히려 감소하였다. 이는 삼투압 조절기작이 세포성장 초기에 glycerol에 의해서 이루어지고 중기와 후기에는 erythritol이 삼투압 조절물질로서 생성되기 때문이다. 이러한 경향은 exponential phase에서 glycerol이 생성되고 stationary phase에서는 arabitol이 생성되어 삼투압 조절기작이 이루어진 *Debaryomyces hansenii*의 실험결과와 유사하였다(28). 또한 소량의 glycerol이 생성되는 것은 *C. magnoliae* JH가 낮은 glycerol 농도에서도 glycerokinase와 glycerol phosphate-ubiquinone oxidoreductase가 유도되어 glycerol을 소모하기 때문이다(14). 야생균주의 경우에는 100 g/L의 glucose 발효배지에서 최대의 erythritol 생성량은 19.3 g/L 임을 알 수 있었으며, 이때의 erythritol 수율은 20.3%이고 생산성은 0.23 g/L-h 이었다.

염 내성 변이균주인 M26의 경우에 erythritol이 생성되는 경향은 야생균주와 비슷하였다. 그러나 변이균주 M26의 발효속도가 야생균주에 비하여 훨씬 우수하여 60시간 이후에 glucose가 모두 소모되었다 (Figure 2). 또한 배양초기의 세포성장이 고농도 당에 의하여 억제되는 정도가 낮아서 야생균주에 비하여 높은 세포농도를 나타내었다. 이러한 결과는 모두 야생균주에 비해 변이균주가 삼투압 내성이 크기 때문에 더 높은 당 농도에서는 발효속도가 더 큰 차이를 보일 것으로 판단되었다. 더구나 변이균주 M26은 야생균주 보다 glycerol을 더 적게 생산함을 알 수 있었으며, 이는 삼투압 조절기작이 erythritol에 의하여 전적으로 이뤄지고 있음을 보여주었다. 이러한 변이균주 M26의 경우에 최대의 erythritol 생성량은 25.0 g/L이고 수율은 25.0%이었으며, 생산성은 0.30 g/L-h로서 염 내성 변이균주에 의하여 당알콜의 수율 및 생산성을 높일 수 있었다.

탄소원의 선정

Erythritol의 발효에서 사용되는 탄소원은 pentose phosphate pathway를 통하여 직접 erythritol로 전환되므로 변이균주 M26을 이용한 여러 종류의 탄소원들에 대한 erythritol 발효를 수행하여 세포성장과 erythritol의 수율 및 생산성이 가장 우수한 탄소원을 선별하고자 하였다.

당 농도가 100 g/L인 발효배지 200 mL를 500 mL baffled flask에 넣고 120 시간 배양하여 세포농도와 erythritol 농도를 측정한 결과를 Table 3에 나타내었다. 세포농도는 sucrose 배지에서 20.0 g/L로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 glucose, galactose, fructose 순서로 세포농도가 높게 나타났다. 한편 xylose는 탄소원으로 이용하지 못하였다. 반면 galactose는 세포성장에는 이용되었지만 erythritol로 전환되지는 못하였다. 따라서 erythritol의 생산은 glucose를 탄소원으로 이용했을 경우에 12.6 g/L로 가장 높았으며 fructose를 탄소원으로 이용하는 경우에는 세포성장이나 erythritol의 수율 및 생산성이 glucose와 sucrose 보다 낮았는데, 이와 같은 결과는 효모에 의한 erythritol의 생성이 주로 pentose phosphate pathway를 거쳐 생성된 erythrose에 의하여 생성되기 때문이다. 이러한 결과는 Aoki 등(13)이 꿀 벌집에서 분리한 *Trichosporonoides* sp.를 이용한 glucose와 sucrose의 erythritol 발효에서 glucose가 가장 빨리 대사에 이용된다는 보고와 일치하였다. 따라서 변이균주 M26의 모 균주인 *C. magnoliae* JH는 꿀 벌집에서 분리되었고, 높은 삼투압에 내성인 균주들이 공통적으로 가지는 특성들을 지닌 효모로서 탄소원으로 glucose를 이용한 경우가 erythritol의 생성이 가장 높았으므로 탄소원으로 glucose를 선정하였다.

Table 3. Effect of carbon sources on cell growth and erythritol production of mutant M26.

Carbon sources	Dry cell weight (g/L)	Erythritol (g/L)
Glucose	18.6	12.6
Sucrose	20.0	11.1
Fructose	16.7	5.1
Galactose	17.3	0
Xylose	0.4	0

Yeast extract 농도의 영향

일반적으로 당알콜 발효배지는 질소원에 비하여 탄소원의 농도가 높은 특성을 가지고 있다. 이는 질소원의 고갈에 의한 세포의 성장이 제한될 경우에 당알콜의 생성이 촉진된다고 보고되어 있기 때문이다(24). 따라서 C/N ratio가 erythritol 생성에 매우 중요하므로 yeast extract 농도가 erythritol 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 즉 glucose가 250 g/L로 첨가된 발효배지 1.0 L를 2.5 L jar fermenter (KFC, Korea)에 넣고 yeast extract의 농도를 3~10 g/L로 변화시키면서 변이균주 M26을 사용하여 glucose가 모두 소모되는 시간까지 배양한 실험결과를 Table 4에 나타내었다.

실험결과에서 5 g/L의 yeast extract 농도에서 최대 51%의 수율을 나타내었으며, yeast extract 농도가 5 g/L 이상에서는 수율은 감소하였으나, 생산성은 증가하였다. 이와는 반대로 세포농도는 yeast extract의 농도가 증가함에 따라 증가하여 10 g/L의 yeast extract 농도이상에서 최대 44.2 g/L의 세포농도를 얻을 수 있었다. 이와 같이 C/N ratio가 낮은 배지에서는 erythritol의 수율이 감소하였는데, 이는 미생물 발효에서 당알콜을 과량으로 얻기 위해서는 C/N ratio가 높은 배지를 사용하였을 때 미생물의 성장이 제한되면서 당알콜의 분비가 촉진된다는 결과와 일치하였다(24). 따라서 당알콜 생산을 위한 배지의 C/N ratio는 일반적인 발효배지의 C/N ratio 보다 높아야 되며, 세포성장의 조절을 통해서 더 높은 수율의 erythritol을 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

Glucose 농도의 영향

높은 수율의 당알콜 생산을 위하여 당과 염에 의한 높은 삼투압 조건의 제공은 필수적으로 요구된다. 특히 당을 이용하여 삼투압을 높여주는 경우가 염에 의한 것보다는 더 효율적이라는 연구보고가 있다(27,29). 이는 일반적으로 osmophilic yeast가 염보다 당에 대한 내성이 커서 높은 농도의 당이 함유된 배지에서 초기 세포성장 속도와 최대의 세포농도가 상대적으로 높기 때문이다(27). 더구나 당알콜 생산용 균주로 이용되기 위해서는 높은 농도의 당이 함유된 배지에서 직접 발효가 가능해야 한다. 삼투압 내성이 우수한 것으로 입증된 변이균주 M26은 이러한 점에서 높은 수율의 erythritol 생산에 유리한 균주이며, 높은 당 농도의 배지에서 발효가 가능하였다. 따라서 변이균주 M26을 이용하여 100~300 g/L 범위의 glucose가 포함된 발효배지 1.0 L를 2.5 L jar fermenter (KFC, Korea)에 넣고 glucose가 모두 소모되는 시간까지 실험을 수행하였다.

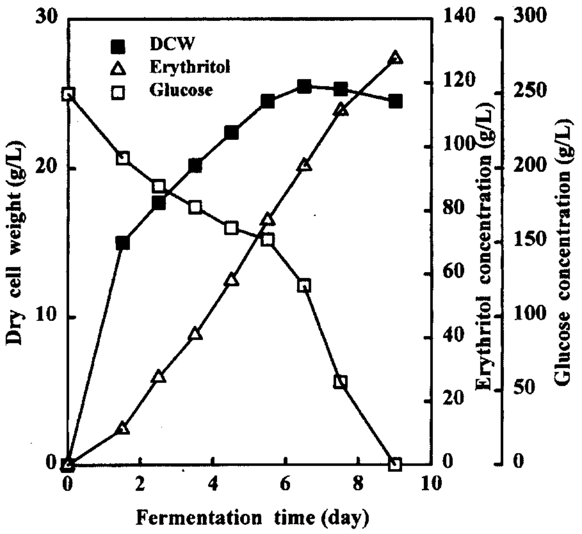

Figure 3. Profiles of cell growth, glucose and erythritol concentrations during the batch fermentation of mutant M26 in the medium containing of 250 g/L glucose.

실험결과(Table 5)에서 최대 세포농도는 당 농도의 증가에 따라 감소하였으나 최대 erythritol의 농도는 당 농도의 증가에 따라 증가하여 250 g/L의 glucose 농도에서 최대 127.5 g/L가 생산되었다. 또한 erythritol의 수율과 생산성도 glucose 농도의 증가에 따라 250 g/L까지 증가하여 최대의 수율은 51.0%이고 생산성은 0.63 g/L-h 이었으나, 300 g/L의 glucose 농도에서는 약간씩 감소하였다. 이러한 결과는 Kim 등(14)이 야생균주인 *C. magnoliae* JH를 이용한 실험결과와 비교할 때 수율이 2.3배, 생산성이 2.5배 증가한 값이었다. 이러한 결과로부터 회분식 발효에서 최적의 glucose 농도는 250 g/L 임을 알 수 있었다. 변이균주 M26을 이용한 250 g/L의 glucose 농도에서 회분식 발효를 수행한 결과를 Figure 3에 나타내었다. Erythritol의 농도는 세포성장과 더불어 지속적으로 증가하는 경향을 볼 수 있으며, 세포성장이 최대에 도달한 이후부터 glucose의 농도가 급속히 감소하는 것을 알 수 있었는

Table 4. Effect of yeast extract concentration on cell growth and erythritol production of mutant M26 in fermenter.

Yeast extract concentration (g/L)	3.0	5.0	7.0	10.0
Erythritol yield (%)	47.1	51.0	48.4	45.8
Productivity (g/L-h)	0.58	0.63	0.70	0.70
Erythritol concentration (g/L)	117.8	127.5	121.1	114.5
Cell concentration (g/L)	21.8	25.5	32.1	44.2

Table 5. Effect of glucose concentration on cell growth and erythritol production of mutant M26 in fermenter.

Glucose concentration (g/L)	DCW (g/L)	Erythritol (g/L)	Erythritol Yield (%)	Productivity (g/L-h)
100	31.9	29.1	29.0	0.46
150	31.3	64.9	43.3	0.50
200	26.7	87.2	43.6	0.54
250	25.5	127.5	51.0	0.63
300	22.2	117.4	39.0	0.57

데, 이는 남아있는 glucose가 발효후기에 빠르게 erythritol로 전환되기 때문으로 추정된다. 이와 같이 250 g/L의 glucose를 이용하는 경우에는 100 g/L의 glucose를 이용한 실험과 비교할 때 수율과 생산성이 각각 1.7배와 1.3배 증가한 것으로서 산업적인 erythritol 생산이 가능한 수준의 수율인 것으로 사료되었다. 또한 지금까지의 결과에서 250 g/L의 glucose 농도는 최대 수율의 erythritol 생성을 위한 최적의 C/N raitio 및 삼투압 조건을 제공한다는 것을 알 수 있었다. 즉 250 g/L 이상의 glucose 배지는 세포성장을 저해하여 초기의 세포성장 속도를 떨어뜨리며, 또한 그 이하의 낮은 glucose 농도에서는 erythritol 생산을 위하여 충분한 삼투압을 제공해 주지 못하기 때문인 것으로 생각된다(27,30).

요 약

C. magnoliae JH를 이용하여 높은 수율의 erythritol을 생산하기 위한 삼투압 내성의 변이균주 개발과 탄소원 및 질소원의 최적 농도결정에 대한 연구를 수행하였다. 꿀 벌집에서부터 분리한 야생균주인 *C. magnoliae* JH를 이용한 baffled flask 배양에서 당농도 100 g/L인 경우 erythritol 수율은 20.3% 이고 생산성은 0.23 g/L-h이었다. 균주의 수율 향상을 위하여 야생균주의 포자에 EMS를 처리한 후 2차에 걸친 선별과정을 통해 높은 농도의 염에서 세포성장이 우수하면서 동시에 erythritol의 수율과 생산성이 가장 우수한 삼투압 내성 변이균주 M26을 최종적으로 선발하였다. 선발한 변이균주 M26을 이용한 baffled flask 배양에서 100 g/L의 glucose인 경우에 erythritol의 수율과 생산성이 각각 25.0%와 0.30 g/L-h로서 야생균주에 비하여 증가한 반면에 glycerol의 생성은 오히려 감소하였다. 변이균주 M26을 이용한 탄소원의 선별에 대한 실험에서는 glucose가 erythritol 생산에 가장 적합하였다. 유기질소원인 yeast extract는 5 g/L의 농도에서 erythritol 수율이 가장 우수하였다. 발효조를 이용한 glucose 농도 결정에 대한 실험에서 세포농도는 glucose의 농도 증가에 따라 감소하였으나, erythritol 농도는 당 농도의 증가에 따라 증가하여 250 g/L glucose의 농도에서 최대 127.5 g/L가 생산되었으며, 발효말기에는 glycerol이 존재하지 않았다. 또한 수율과 생산성도 glucose의 농도 증가에 따라 250 g/L까지 증가하여 최대 51.0%의 수율과 0.63 g/L-h의 생산성을 나타내었다.

감 사

본 연구는 농림부에서 시행한 농림특정연구사업(1996～1998)의 연구비와 일부 경기지방중소기업청의 산학연공동기술개발 컨소시엄 연구비의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Shindoh, T., Y. Sasaki, H. Miki, T. Eguchi, K. Hagiwara, and T. Ichikawa (1989), Identification of erythritol by HPLC and GC-MS and quantitative measurement in pulps of various fruits, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1474-1476.
2. Shindoh, T., Y. Sasaki, H. Miki, T. Eguchi, K. Hagiwara, and T. Ichikawa (1988), Determination of erythritol in fruits and fermented foods by high performance liquid chromatography, *Agric. Biol. Chem.*, **62**, 623-626.
3. Yoshida, H., T. Sugahara, and J. Hayashi (1984), Studies in free sugars and free sugar alcohols of mushrooms, *Jpn. Food Ind.*, **31**, 765-771.
4. Roberts, G. P., A. McDiarmid, and P. Gleed (1976), The presence of erythritol in the fetal fluids of fallow deer (*Dama dama*), *Res. Vet. Sci.*, **20**, 254-256.
5. Goossens, J. and H. Röper (1994), Erythritol: A new bulk sweetener, *Inter. Food Ingred.* **1/2**, 27-33.
6. Kawanabe, J., M. Hirasawa, T. Takeuchi, T. Oda, and T. Ikeda (1992), Non-cariogenecity of erythritol as a substrate, *Caries Res.*, **26**, 358-362.
7. Ishikawa, M., M. Miyashita, Y. Kawashima, T. Nakamura, N. Saitou, and J. Modderman (1996), Effects of oral administration of erythritol on patients with diabetes, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **24**, S303-S308.
8. Byun, S. H. and C. H. Lee (1998), Dental caries suppression effect and other physiological properties of erythritol, *Kor. J. Food. Sci. Technol.*, **30**(2), 446-449.
9. Ohnishi, H. (1967), Production of polyalcohols by yeasts, *Hakko Kyokaishi*, **25**, 495-506.
10. Hajny, G. J., J. H. Smith, and J. C. Garver (1964), Erythritol production by a yeastlike fungus, *Appl. Microbiol.* **12**, 240-246.
11. Hattori, K. and T. Suzuki (1974), Large scale production of erythritol and its conversion to D-mannitol production by *n*-alkane-grown *Candida zeylanoides*, *Agr. Biol. Chem.* **38**(6), 1203-1208.
12. Wako, K., H. Ishizuka, G. Kawaguchi, N. Kubo, T. Kasumi, and K. Hayashi (1988), Erythritol production by *Aureobasidium sp.* SN-115, *Hakkokogaku*, **66**, 217-223.
13. Aoki, M. A. Y., G. M. Pastore, and Y. K. Park (1993), Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotech. Lett.* **15**, 383-388.
14. Kim, S. Y., S. S. Park, Y. J. Jeon, and J. H. Seo (1996), Analysis of fermentation characteristics for production of erythritol by *Candida* sp., *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **28**(5), 935-939.
15. Park, J. M. and H. W. Park (1998), Screening and characterization of a novel erythritol-producing microorganism, *Moniliella suaveolens* var *nigra*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**(3), 331-335.
16. Choi, B. W. and H. W. Park (1999), Optimization of the medium and fermentation conditions with erythritol producing *Moniliella suaveolens* var *nigra*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **14**(5), 628-632.
17. Park, J. B., C. Yook, and Y. K. Park (1998), Production of erythritol by newly isolated osmophillic *Trichosporon* sp., *Starch/Stärk*, **50**, 120-123.
18. Ishizuka, H., K. Wako, T. Kasumi, and T. Sasaki (1989), Breeding of a mutant of *Aureobasidium* sp. with High erythritol production, *J. Ferment. Bioeng.* **68**, 310-314.
19. Chun, Y. J. and S. H. Seo (1995), Development of erythritol production process by microbial fermentation, *Kor. Biotechnol. Chem. Eng.*, **9**(4), 24-29.
20. Loray, M. A., J. F. T. Spencer, D. M. Spencer, and L. I. C. de Figueroa (1995), Hybrids obtained by protoplast fusion with a salt-tolerant yeast, *J. Ind. Microbiol*, **14**, 508-513.

21. Hallsworth, J. E. and N. Magan (1994), Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi, *Microbiology*, **140**, 2705-2713.
22. Park, J. B., B. C. Seo, J. R. Kim, U. H. Pek, and Y. K Park (1998), Effect of glucose concentraton on the production of erythritol by *Trichosporon* sp., *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**(5), 543-546.
23. Ermakova, I. T., G. V. Lenkikh, T. A. Gaidenko, T. N. Medvedeva, E. G. Litvinova, and A. V. Korpachev (1984), Biosynthesis of polyols by the yeast *Candida guilliermondii* grown in media with different carbon source, *Mikrobiologiya* **53**(5), 803-808.
24. Pfyffer, G. E. and D. M. Rast (1980), The polyol pattern of some fungi not hitherto investigated for sugar alcohols, *Exp. Mycol.* **4**, 160-170.
25. Han, W. O., J. H. Seo, and Y. W. Ryu (1998), Production of xylitol by catabolite derepressed mutant of *Candida* sp., *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **13**(1), 6-12.
26. Ryu, Y. W. and S. H. Ko (1993), Selective isolation and characterization of *Schwanniomyces castellii* mutants with increased production of α-amilase and glucoamylase. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 95-98.
27. Kim, S. Y., K. H. Lee, J. H. Kim, and D. K. Oh (1997), Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis*, *Biotechnol. Lett.*, **19**(8), 727-729.
28. Larsson, C. and L. Gustafsson (1993), The role of physiological state in osmotolerance of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*, *Can. J. Microbiol.* **39**, 603-609.
29. Eck, J. H. V., B. A. Prior, and E. V. Brandt (1993), The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts, *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1047-1054.
30. Kim, S. Y., J. H. Choi, C. J. Kim, and J. H. Kim (1995), Functional properties of erythritol. *Food Sci. Ind.* **28**(2), 23-28.