

*Candida magnoliae*에 의한 에리스리톨 생산을 위한 최적 배양환경과 질소원 선별

고은성¹ · 문관훈 · 한기철 · 유연우² · 서진호*

서울대학교 식품공학과, ¹서울대학교 협동과정 생물화학공학 전공, ²아주대학교 분자과학기술학과

Optimization of Culture Conditions and Nitrogen Sources for Production of Erythritol by *Candida magnoliae*.

Koh, Eun-Sung¹, Kwan-Hoon Moon, Ki-Cheol Han, Yeon-Woo Ryu², and Jin-Ho Seo. Department of Food Science and Technology, and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea, ¹Interdisciplinary program for Biochemical Engineering & Biotechnology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, ²Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea - Culture conditions and nitrogen sources were optimized for production of erythritol, a natural sweetener, by *Candida magnoliae* M26. The optimal culture conditions were found to be culture temperature of 28 °C, initial pH of 7, aeration of 1 vvm and agitation speed of 500 rpm in a 2.5 l jar-fermentor. Glucose was chosen as the best carbon source based on cell growth and erythritol productivity. Light steep water (LSW) and corn steep liquor (CSL) which are by-products in starch processing from corn were tested as a nitrogen source substitute for yeast extract. The use of either LSW or CSL did not change the fermentation performance. The experimental results using LSW and CSL showed 1.5 times higher in cell growth and almost the same value in erythritol productivity compared with the control fermentation using yeast extract as a nitrogen source. These results suggested that either LSW or CSL could be used as a nitrogen source in a large-scale fermentation for erythritol production.

Key words: *Candida magnoliae*, erythritol, culture condition, optimization, light steep water, corn steep liquor

최근 건강식품에 대한 사회적 관심이 높아지면서 설탕 대체 감미료를 이용한 식품의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 설탕대체 감미료로 주로 거론되는 물질은 감미도가 설탕과 비슷한 수준에 칼로리량이 낮은 당알콜류인 xylitol, erythritol (에리스리톨), sorbitol, mannitol 등을 들 수 있다 [1]. 이 중에서 에리스리톨은 감미도가 설탕의 70~80% 정도이며 칼로리량이 설탕의 10% 미만이고 또 충치를 유발하지 않고 입에서 녹을 때 청량감을 주며 가공성이 우수한 당알콜이다 [2,3]. 에리스리톨은 4탄당의 당 알콜로서 자연계에는 버섯류, 과일류에 함유되어 있으며 발효식품에는 포도주, 간장, 청주등에 포함되어 있고, 그 외에 포유동물의 체액에도 다량 존재한다 [4]. 에리스리톨 생산에 있어서 화학 합성법은 원료물질이 고가이고 합성과정 중에 생산되는 부산물의 제거가 용이하지 않고 수율이 낮아 산업적으로 대량생산이 어렵다 [4,5]. 따라서 화학 합성법의 단점을 극복할 수 있는 방안으로 발효법의 연구가 활발히 진행되어 왔다. 미생물 발효공정을 이용한 에리스리톨 생산연구는 1960년대부터 이루어졌으나 에리스리톨 외에 glycerol과 ribitol과

같은 부산물을 많이 만들어서 산업화에는 이르지 못하였다 [6]. 1988년에 Ishizuka가 고농도의 포도당 배지를 이용한 선별작업에서 발포성과 내당성을 개선한 에리스리톨을 생산하는 변이균주를 개발하여 실용화에 성공하였다 [7]. 최근에는 Kim 등은 *Torula* sp. 균주를 이용한 에리스리톨 생산의 최적 발효조건을 결정하였다 [8].

본 연구실은 전보 [9-11]에 의해 에리스리톨을 효과적으로 발효하는 균주인 *Candida magnoliae*와 그의 변이균주 *C. magnoliae* M26을 개발하였고 효과적인 유기식 발효방법에 대하여 논하였다. 본 연구는 에리스리톨 생산 변이균주인 *C. magnoliae* M26을 이용하여 대량생산 공정개발을 위한 발효조건 최적화와 탄소원, 질소원의 영향을 살펴보았다. 특히 질소원의 영향에서는 에리스리톨의 생산단가를 낮추기 위하여 고가의 yeast extract 대신 사용되는 산업용 배지인 light steep water (LSW), corn steep liquor (CSL) 등을 이용한 최적 배양조건을 결정하는 연구를 수행하였다. LSW와 CSL은 옥수수로부터 전분을 생산하는 과정에서 부산물로 생성되는 물질로서 1940년대에 페니실린 대량생산에 처음으로 사용되는 등 산업용 배지로서 다양한 발효공정에 이용되고 있다 [12,13]. 이러한 식품 산업체의 부산물인 LSW, CSL를 에리스리톨 생산에 이용한다면 에리스리톨의 생산비용의 절감에 많은 기여를 하리라 기대된다.

*Corresponding author

Tel. 82-31-290-2583, Fax. 82-31-293-4789
E-mail: jhseo94@snu.ac.kr

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 벌집에서 선별한 *C. magnoliae* 와 이를 돌연변이 시킨 *C. magnoliae* M26이다[9,10]. 이 균주들은 glucose 50%, bactopectone 2%, yeast extract 1%, agar 2% 인 plate에서 두 달에 한번 계대 배양을 하면서 냉장보관 하였다. 냉장보관중인 균주를 glucose 25 %, bactopectone 2%, yeast extract 1% 인 배지가 50 ml 들어있는 500 ml baffled flask에 접종하여 30°C, 200 rpm의 진탕배양기(Vison, 한국)에서 24시간 전배양을 한 후 본 배양 배지의 10%를 본 배양 배지에 접종하여 본 배양을 수행하였다.

본 연구에서는 flask scale 과 jar-fermentor scale의 2 종류의 본 배양을 수행하였다. Flask scale의 본 배양은 50 ml의 배지가 들어있는 500 ml baffled flask를 30°C, 200 rpm 의 진탕 배양기에서 수행하였고 jar-fermentor scale의 본 배양은 2.5 l jar-fermentor발효기(KF2.5l, 한국발효기, 한국)에서 조업부피 1 l, 30°C, 1 vvm, 500rpm, 초기 pH 6.0 의 조건으로 수행하였다.

에리스리톨 대량생산을 위한 산업용 배지의 적용 가능성을 검토하기 위해 대체 질소원으로 전분당 공장의 부산물인 LSW(Light steep water, 14BX, 두산 이천 전분당 공장, 한국) 와 CSL(Corn steep liquor, 49BX, 두산 이천 전분당 공장, 한국)을 사용하였다.

분석법

균체농도는 주기적으로 채취한 배양액을 희석하여 Spectrophotometer(Shimadzu UV-1061, 일본)을 이용하여 600nm에서 흡광도 0.1-0.3 사이로 희석하여 측정 후 미리 구한 건조 균체 중량 환산계수(0.258)를 곱하여 구하였다.

당과 당알콜 분석은 carbohydrate analysis column (Cat. No 84038, 3.9×300 mm, Waters, 미국)이 장착되어있는 HPLC(Knauer, 독일)을 사용하여 측정하였다. 이동상은 acetonitrile와 2차 증류수를 80:20으로 혼합한 용매를 1.5 ml/min의 유속으로 흘려주고 RI detector를 사용하여 검출한 결과를 미리 구한 standard curve를 이용하여 정량 하였다.

결과 및 고찰

pH와 배양 온도의 영향

배양 조건 중에서 pH의 영향을 조사하기 위하여 배양 배지의 초기 pH를 4.0~8.0의 범위에서 *C. magnoliae* M26을 flask scale에서 30°C 배양온도로 84시간 배양하여 균체의 성장과 에리스리톨의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 1과 같이 초기pH가 7.0인 경우가 에

Table 1. Effects of initial pH on cell growth and erythritol production by *C. magnoliae* M26 grown at 30°C

Initial pH	Dry cell weight (g/l)	Final erythritol concentration (g/l)
4	18.9	12.6
5	21.4	21.4
6	24.0	21.6
7	22.6	23.5
8	22.8	18.6

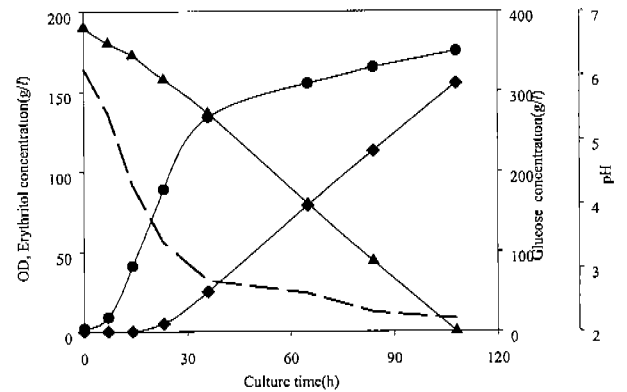


Fig. 1. Effect of pH on erythritol production in jar-fermentor scale by *C. magnoliae* M26.

▲ : glucose, ● : optical density at 600 nm, ◆ : erythritol, ... : pH.

리스리톨의 생산에 가장 좋았다. 또한 이 균주의 배양 경과를 보면 균체의 대수증식기에 pH가 3이하로 떨어지는데도 보통의 균주와 달리 에리스리톨 생산이 계속되는 결과를 보였다 (Fig. 1). 이러한 결과로부터 *C. magnoliae* M26는 pH 조절이 필요 없는 간편한 배양방법으로도 최적의 에리스리톨 생산이 가능하다는 것을 알 수 있었다.

C. magnoliae M26의 배양 온도가 균체의 성장과 에리스리톨의 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 배양 온도를 24~30°C의 범위에서 *C. magnoliae* M26을 flask scale로 배지 초기pH 6.0으로 84시간 배양하여 조사한 결과, Table 2에서 볼 수 있듯이 28°C인 경우가 균체의 성장과 에리스리톨의 생산에 가장 좋았다.

통기조건의 영향

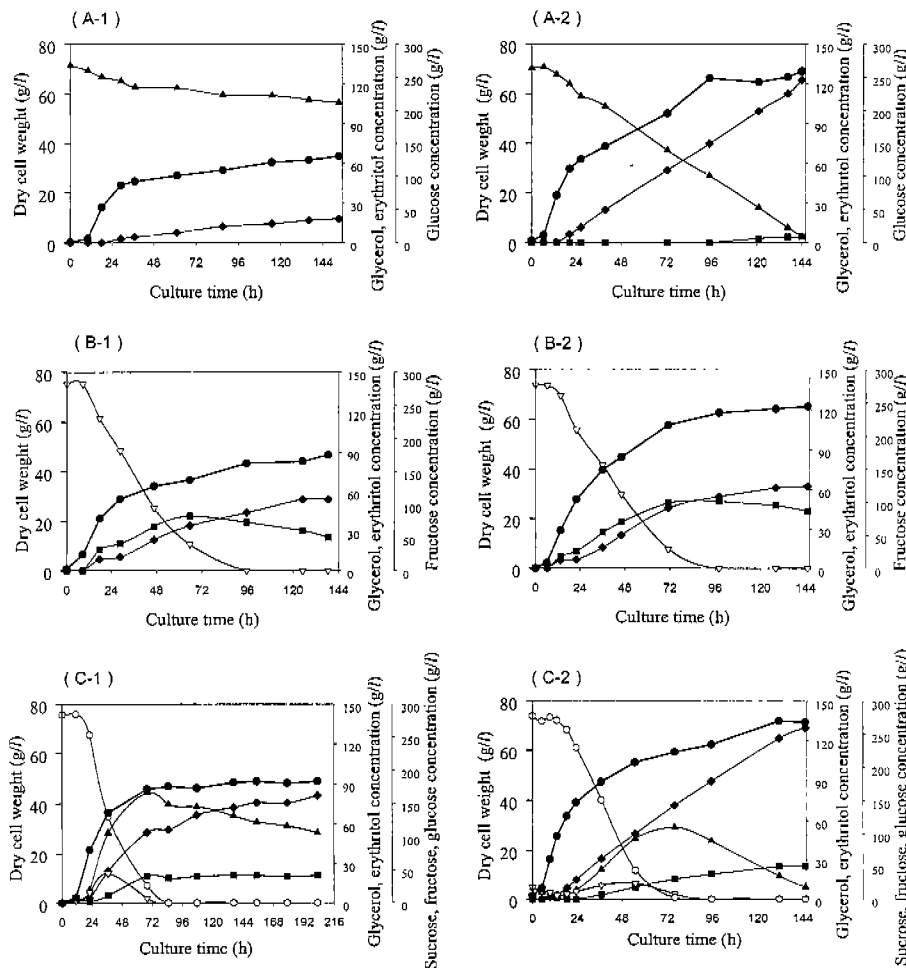
당 알코올 발효의 중요한 조건중의 하나는 통기 조건이

Table 2. Effects of temperature on cell growth and erythritol production by *C. magnoliae* M26 grown at initial pH 6.0

Temperature (°C)	Dry cell weight (g/l)	Final erythritol concentration (g/l)
24	18.2	15.4
26	18.2	25.0
28	24.1	25.0
30	21.8	20.7

Table 3. Effects of aeration and agitation speed on cell growth and erythritol production by *C. magnoliae* M26 grown at initial pH 7.0 and 28°C

		Dry cell weight (g/l)	Final erythritol concentration (g/l)	Erythritol productivity (g/l·h)
Aeration (vvm)	0.75	29.3	131.2	0.55
	1.00	35.7	143.3	0.70
	1.50	31.7	115.0	0.54
	2.00	32.1	111.8	0.58
Agitation speed (rpm)	400	39.0	103.5	0.50
	500	35.7	143.3	0.70
	600	33.1	120.7	0.66

**Fig. 2. Effects of various sugars on erythritol production by wild type *C. magnoliae* and its mutant *C. magnoliae* M26.**

(A-1) glucose in *C. magnoliae*, (A-2) glucose in *C. magnoliae* M26, (B-1) fructose in *C. magnoliae*, (B-2) fructose in *C. magnoliae* M26, (C-1) sucrose in *C. magnoliae*, (C-2) sucrose in *C. magnoliae* M26. ○: sucrose, ▽: fructose, ▲: glucose, ●: dry cell weight, ■: glycerol, ◆: erythritol.

며, 통기가 부족한 경우 에탄올 생성이 증가하여 에리스리톨 생산을 감소시키며 통기량이 너무 과다하면 높은 동력 비용과 균체에 shear stress를 주어 균체 성장저해과 생산량 감소라는 결과를 나타낼 수 있기에 적절한 통기량의 공급은 매우 중요하다. 따라서 jar-fermentor scale에서 통기량

과 교반속도가 에리스리톨 생산에 미치는 영향을 조사하여 최적의 통기조건을 알아보았다.

먼저 에리스리톨 생산에 대한 통기량의 영향을 조사하였다. Jar-fermentor scale에서 배지 초기 pH를 7.0으로 하여 배양온도 28°C, 교반속도 500rpm의 조건으로 배양을 한

결과 Table 3와 같이 1.0vvm의 통기량이 가장 적절하였다. 또한 교반속도의 영향을 알아보기 위하여 통기량 1.0vvm, 초기 배지 pH 7.0, 배양온도 28°C에서 배양한 결과 Table 3와 같이 교반속도 500 rpm이 가장 적절하였다.

탄소원의 영향

당알콜의 생산을 위한 발효를 수행하기 위해 적합한 탄소원을 선정하는 작업이 필요하다. 탄소원으로는 포도당, 과당, sucrose를 선정하여, 이 당들을 야생균주인 *C. magnoliae*와 변이주 *C. magnoliae* M26을 같은 배양조건으로 jar-fermentation scale로 발효를 수행하였으며 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

우선 과당을 탄소원으로 사용한 경우(Fig. 2, B-1, B-2), 두 균주간의 과당 소비 경향은 비슷하며, 공통적으로 부산물인 glycerol이 거의 에리스리톨의 생산량과 비슷하게 생성되었음을 볼 수 있었다. 이는 이 균주가 벌꿀에서 동정된 것이므로 과당을 균체내로 이동시키는 능력이 월등히 뛰어나 균체내로 들어온 과당이 미생물이 대사 시킬 수 있는 능력을 초과하기 때문에 부산물인 glycerol을 생산하는 것이라 추측된다. Sucrose를 탄소원으로 사용한 경우 (Fig. 2, C-1, C-2), 일반적으로 catabolite repression으로 인해 포도당을 소모 한 후 과당을 소모하는 경향과는 달리 *C. magnoliae*의 경우에는 반대로 과당을 먼저 소모하는 양상을 보였다. 또한 포도당을 소모하는 시기에 *C. magnoliae*는 포도당만을 소모 할 때의 양상 (Fig. 2, A-1)과 마찬가지로 포도당을 거의 섭취하지 못함을 보였다. 마지막으로 포도당을 탄소원으로 사용한 경우 (Fig. 2, A-1, A-2), *C. magnoliae*는 포도당을 거의 이용을 못하고 건조세포중량도 36.5 g/l였으며, 에리스리톨은 20 g/l밖에 생산을 못했으나, *C. magnoliae* M26균주인 경우는 건조세포중량이 64.5 g/l까지 성장했으며, 부산물의 생성 없이 에리스리톨을 120 g/l 생산함을 보였다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때 *C. magnoliae* M26으로 에리스리톨 생산을 하기위한 적합한 탄소원은 포도당이라 판단되었다. 한편 Fig. 2, A-1, A-2에 나타난 결과를 살펴보면 같은 탄소원의 소모에 있어서도 두 균주간의 차이를 나타내었다. 이는 변이주인 *C. magnoliae* M26균주가 포도당을 대사하는 해당 과정 중 어느 부분에서 변이가 일어난 결과라고 판단되며, 이를 위해서 두 균주간의 생합성 차이를 대사공학적 기법을 이용하여 세포내 포도당 대사 관련 효소의 발현 정도의 차이를 밝히기 위한 연구를 현재 수행하고 있다.

질소원의 영향

에리스리톨의 효율적인 대량생산을 위해 고가의 질소원인 yeast extract를 대체할 값싼 산업용 질소원 배지를 검토하였다. 본 연구에서는 옥수수에서 전분을 생산하는 과정의 부산물인 CSL, LSW를 yeast extract 대체 질소원으로

검토하였고 그 결과를 Table 4에 정리하였다. CSL과 LSW의 배지 조성량에 대한 영향을 flask scale로 실험을 수행한 결과 각각 CSL 1.2%, LSW 4.0%인 경우 최고의 에리스리톨 생산농도를 보였다. 또한 yeast extract 1%을 사용한 경우 68.8 g/l의 최종 에리스리톨 농도와 0.409 g/l-h의 생산성을 보였으며 이 결과는 최적 LSW 농도의 발효결과보다는 다소 높으나 최적 CSL 농도의 발효결과와는 거의 비슷한 결과를 나타내었다. 이와 같이 전분가공공정의 부산물인 CSL, LSW를 에리스리톨의 생산에 이용한다면 현재의 에리스리톨 생산비용을 상당히 절감 할 수 있을 것으로 여겨진다. 그러나 이러한 flask scale실험에서는 배양중 충분한 통기효과를 줄 수 없으므로 ethanol과 glycerol이 과량 생성되어 결과적으로 생산수율의 저하를 가져 올 수 있다. 따라서 앞에서 밝혀진 최적화된 통기조건을 포함하여 최적화된 pH, 온도 그리고 탄소원을 적용한 jar-fermentor scale의 실험을 수행하여 flask scale에서 연구된 질소원 영향을 jar-fermentor scale의 실험을 통해 검증하였다.

대체 질소원의 jar-fermentor 배양 영향

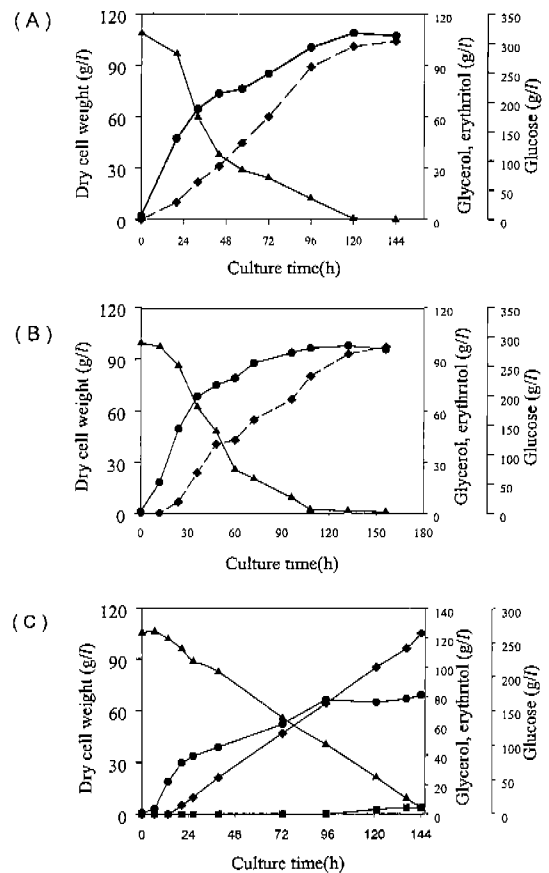


Fig. 3. Effects of various nitrogen sources on erythritol production by *C. magnoliae* M26. (A) LSW 4.0%, (B) CSL 1.2%, (C) yeast extract 1.0%. ▲ : glucose, ● : dry cell weight, ■ : glycerol, ◆ : erythritol

Table 4. Comparison of various nitrogen sources on erythritol production by *C. magnoliae* M26 grown at initial pH 7.0 and 28°C

	Medium composition (%)	Final erythritol concentration (g/l)	Erythritol productivity (g/l·h)
Corn steep liquor (CSL)	1.0	60.2	0.358
	1.2	66.1	0.403
	1.6	50.5	0.300
	2.0	55.8	0.332
	2.4	33.1	0.197
Light steep water (LSW)	3.2	49.4	0.294
	4.0	57.7	0.343
	4.8	56.7	0.337
	5.6	55.4	0.329
	6.4	40.9	0.243
Yeast extract	1.0	68.8	0.409

Flask scale에서 최적 배지 조성량인 LSW 4.0%, CSL 1.2% 와 기존의 질소원 배지인 yeast extract 1.0%을 사용하여 앞에서 논의된 최적화된 발효조건을 이용한 jar-fermentor scale의 에리스리톨 회분식 발효를 수행하였고 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 발효결과 부산물인 ethanol과 glycerol은 거의 생성되지 않았으며, LSW와 CSL의 발효양상과 발효결과는 매우 비슷하게 나타났다. Yeast extract를 사용한 배양의 최종 세포건조중량 68.2 g/l에 비하여 LSW와 CSL의 최종 세포 건조중량 (109, 97.8 g/l) 결과가 약 1.5배 정도 증가한 결과를 나타내어 LSW, CSL은 yeast extract에 비해 세포성장을 촉진시키는 결과를 보였다. 또한 yeast extract의 에리스리톨 생산성 0.996 g/l·h에 비하여 LSW의 0.893 g/l·h과 CSL의 0.868 g/l·h를 보여 모두 약 90%에 해당하는 에리스리톨 생산성을 보였다. 따라서 이러한 결과들로부터 에리스리톨 대량생산에 있어서 대체 질소원으로 LSW와 CSL사용이 가능함을 알았다.

요 약

C. magnoliae M26을 이용하여 천연 감미료인 에리스리톨의 발효생산 환경의 최적화와 대량생산을 위한 산업용 배지의 적용가능성을 검토하였다. 에리스리톨의 발효생산의 최적 조건은 28°C의 발효온도와 초기 pH 7 이었으며, 1 vvm, 500rpm의 2.5 l jar-fermentor에서의 통기 조건이었다.

C. magnoliae M26에 적합한 탄소원을 알아보기 위해 포도당, 과당, sucrose에 대하여 탄소원의 소비 경향과 에리스리톨의 생산성을 알아 본 결과, 포도당이 가장 적합했다.

에리스리톨의 효율적인 대량생산을 위해 진분가공공정의 부산물인 LSW와 CSL가 yeast extract대체 질소원으로서의 가능성을 검토하였다. 대체 질소원인 LSW와 CSL은 서로의 발효 양상과 결과는 거의 비슷했고, 대조 실험인 yeast extract 결과 (68.2 g/l)에 비하여 세포성장이 약 1.5배 정도로 세포성장은 촉진되었고 에리스리톨 생산성은 yeast

extract결과 (0.966 g/l·h)의 약 90% 정도로 거의 비슷한 에리스리톨 생산성을 보였다. 따라서 LSW와 CSL은 yeast extract 대체 질소원으로 산업화 공정에 사용이 가능한 것으로 판단되었다.

감사의 글

본 연구는 과학 기술부와 교육부의 BK21 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사의 말씀을 드립니다.

REFERENCES

1. Noh, B. S. and S. Y. Kim. 2000. Characteristics and applications of sugar alcohols. *Asia Munhwa Publishing Co.*
2. Goossen, J., and H. Röper. 1996. Erythritol, a new sweetener. *Confectionery Production. March. 62: 6-7.*
3. Byum, S. H. and C. H. Lee. 1998. Dental caries suppression effect and other physiological properties of erythritol. *Kor. J. Food Sci. Technol. 30: 446-449.*
4. Billanx, M. S., B. Fluorie, C. Jaequemmin, and B. Messing. 1991. Sugar alcohols in Handbook of sweeteners. *S. Marie and F.R. Pogolt (eds.): 72-103.*
5. Otey, F. H., J. W. Sloan, C. A. Wilham, and C. L. Mehlretter. 1961. Erythritol and ethylene glycol from dialdehyde starch. *Ind. Eng. Chem. (International edition) 53: 267-268.*
6. Sasaki, T. 1989. Production and properties of erythritol obtained by *Aureobasidium* fermentation. *Nippon Nogeikagaku Kaishi. 63: 1130-1135.*
7. 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.*
8. Kim, K. A., B.S. Noh, J. K. Lee, S. Y. Kim, Y. C. Park, and D. K. Oh. 2000. Optimization of culture conditions for erythritol production by *Torula* sp. *J. Microbiol. Biotechnol. 10: 69-74.*
9. Kim, S. Y., S. S. Park, J.J. Jeon, and J. H. Seo. 1996. Analy-

- sis of fermentation characteristics for production of erythritol by *Candida* sp. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**: 935–939.
10. Yang, S. W., J. B. Park, N. S. Han, Y. W. Ryu, and J. H. Seo. 1999. Production of erythritol from glucose by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*. *Biotechnol. Lett.* **21**: 887–890.
 11. Ryu, Y. W., C. Y. Park, J. B. Park, S. Y. Kim, and J.H. Seo. 2000. Optimization of erythritol production by *Candida magnoliae* in fed-batch culture. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* In press.
 12. Shah, M. M. and M. Cheryan. 1995. Acetate production by *Clostridium thermoaceticum* in corn steep liquor media. *J. Ind. Microbiol.* **15**: 424–428.
 13. Lawford, H. G., and J.D. Rousscau. 1997. Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zymomonas* ethanol fermentations. *Appl. Biochem. Biotech.* **63**: 287–304.

(Received September 16, 2000)