

*Candida magnoliae*에 의한 erythritol 생산을 위한 유가식 공정의 개발

박창열, 서진호¹, 유연우²

(주)두산 Venture BG Biotech BU, 서울대학교 식품공학과¹, 아주대학교 분자과학기술학과²
전화 (0331) 260-1344, 팩스 (0331) 260-1381

Abstract

Two-stage fed-batch culture was performed to improve the volumetric productivity of erythritol. In the growth phase dissolved oxygen was maintained to 20% and the feed medium was automatically supplied to the fermenter by pH-stat mode. The cell yield was 0.76 g-cell/g-glucose. In two-stage fed-batch culture, 41% of total erythritol conversion yield with 187 g/L of erythritol concentration and 2.79 g/L-h of maximum erythritol productivity were obtained when 400 g/L of glucose was directly added in the form of non-sterile powder at production phase. The erythritol productivity increased in parallel with cell mass. The metabolic shift in the biosynthetic pathway of erythritol was caused by dissolved oxygen concentration. The production of gluconic acid was observed when the dissolved oxygen in the medium was maintained over 40% during the production phase, whereas the dissolved oxygen concentration lower than 40% caused the production of citric acid. But the butyric acid was produced independently with dissolved oxygen concentration in the medium. The production of organic acids such as gluconic acid, citric acid, and butyric acid was decreased by addition of mineral salts.

서론

산업적으로 가치를 가지는 대표적 당알콜로는 sorbitol, erythritol, xylitol, mannitol 등이 있다. 당알콜은 화학 구조상의 특징 때문에 당류에 비해 열과 pH 변화에 대한 안정성이 높고 물과의 친화성이 높으며 maillard 반응을 일으키지 않는다. 그 외에 저 칼로리이며 비충치적인 특성과 함께 물에 용해시 흡열작용으로 인한 청량감은 식품공업 측면에 유리한 장점이라 할 수 있다. 또한 당알콜은 종류에 따라 단맛의 정도와 칼로리 등의 독특한 물리 화학적 특징을 갖고 있다. 이밖에도 특유의 산, 알칼리에 대한 안전성, 흡습성 등을 가지므로 식품용도뿐만 아니라 공업용, 의약품용 등으로 사용되고 있다. 현재 당알콜의 국내시장을 살펴보면 sorbitol이 최대 시장을 형성하고 있으며, 그밖에 maltitol, xylitol이 당알콜 시장을 형성하고 있다. 이러한 당알콜중에 sorbitol과 mannitol이 현재 국내생산이 이루어지고 있다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 균주는 서울대학교 식품공학과 서진호 교수님 실험실에서 벌집에서 분리한 후 본 실험실에서 돌연변이를 통하여 얻은 고농도 erythritol 생산 균주인 *Candida magnoliae* SR 101을 이용하였다. Glycerol, erythritol의 정량, 정성 분석은 NH₂ column (Shisheido, Japan)을 이용하여 HPLC (Waters, USA)에서 RI Detector로 측정하였으며 배지 내 glucose의 농도는 당알콜 분석과 같은 조건으로 HPLC를 사용하였다. 유기산의 분석은 HPLC(waters, USA) system을 사용하였으며, 배지 내 에탄올의 농도는 flame ionization detector를 이용한 gas chromatography (Hitachi Model 263-30, Japan)로 측정하였으며, 균체량 측정은 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu, Japan)를 사용하여 620 nm에서 optical density를 측정하여 흡광도와 건조균체량(dry cell weight)의 표준곡선에 의하여 건조 균체량(g/L)으로 환산하였다.

유가식 배양은 3.3 L 발효조 (NBS Bioflo III, USA)에서 초기 세포 성장 배지로 glucose 10 g/L와 yeast extract 6.7 g/L를 이용하였으며, 세포의 성장에는 pH-stat 유가식 배양 방법을 사용하였다. 세포 성장 시기 동안 용존 산소량을 포화 용존 산소량의 20%가 되도록 유지함으로써 세포 성장에 따른 D.O limitation을 방지하였다. pH-stat 유가식 배양 방법에 의해 고농도의 세포를 얻은 다음 세포에 삼투압을 가하기 위하여 고농도의 glucose를 발효조에 공급하였다. 이때 glucose는 멸균되지 않은 powder 형태를 발효조에 직접 공급하여 주었으며 이때부터 배지의 pH는 조절하여 주지 않았다.

결과 및 고찰

Erythritol을 생산하기 위하여 'growth phase'와 'production phase'로 구분하여 two-stage fed-batch culture를 수행하였다. Growth phase에서는 pH가 설정된 값에서 떨어질 때마다 feed medium이 자동적으로 공급되는 pH-stat fed-batch culture를 수행하여 76 g/L의 세포 농도를 얻었으며 이때의 생산성은 3.62 g/L-h이었다. 고 농도의 세포를 얻은 후 멸균되지 않은 분말 형태의 glucose를 400 g/L가 되도록 첨가한 결과 187 g/L의 erythritol을 생산 할 수 있었으며 이때의 수율과 생산성은 각각 41%, 2.79 g/L-h 이었다(Fig. 1). Production phase에서 erythritol 생산에 대한 삼투압의 영향을 알아 본 결과 glucose의 농도가 증가할 수록 생성되는 erythritol 농도가 증가하여 glucose 400 g/L가 되도록 첨가한 경우에 187 g/L의 erythritol을 생산 할 수 있었으며, 더 높은 glucose 농도에서는 erythritol 생성이 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 세포 농도와 erythritol 생성의 상관 관계를 알아 본 결과, 세포 농도에 따른 erythritol 생산 수율에는 큰 차이가 없었으나, 세포농도가 증가할 수록 비례하여 erythritol 생산성이 증가하여 세포 농도가 110 g/L인 경

우 2.79 g/L-h의 erythritol 생산성을 얻을 수 있었다(Fig. 3). 용존 산소량에 따른 유기산 생성 변화를 알아 본 결과 용존 산소량에 관계없이 butyric acid는 생성되었으며 40%의 DO 이하에서는 citric acid가 생성되고 40%이상의 DO에서는 gluconic acid가 생성되어 용존 산소량에 의하여 metabolic shift가 유도됨을 알 수 있었다(Fig. 4). 유기산 생성에 대한 mineral salts의 영향에서 gluconic acid는 KH_2PO_4 에 의하여 증가하고 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 또는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 의하여 감소되었다. Butyric acid는 KH_2PO_4 또는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 의하여 감소되었으며 두 가지를 동시에 사용하였을 경우 synergic 효과에 의하여 butyric acid의 생성이 크게 억제되었다(Fig. 5).

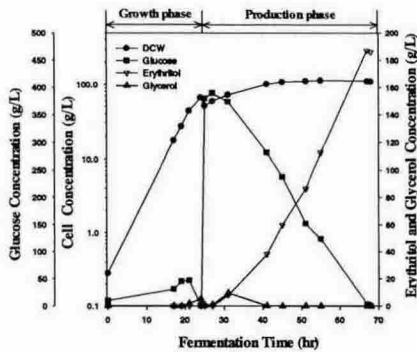


Figure 1. Profiles of the concentrations of cell, glucose, erythritol and glycerol during the two-stage fed-batch fermentation of *C. magnoliae* SR 101. The glucose concentration in the culture broth was 400 g/L after feeding of 800g glucose powder.

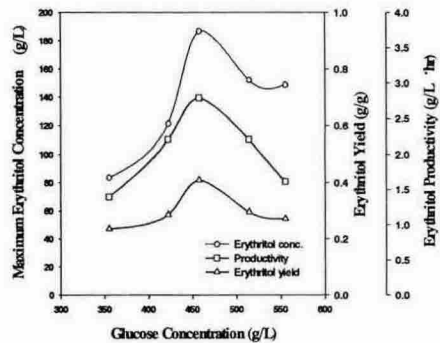


Figure 2. Effect of erythritol yield and productivity, maximum erythritol concentration on glucose concentration at production phase of two-stage fed-batch fermentation.

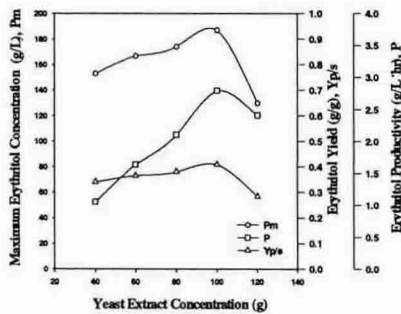


Figure 3. Effect of maximum erythritol production, erythritol yield and productivity on yeast extract concentration.

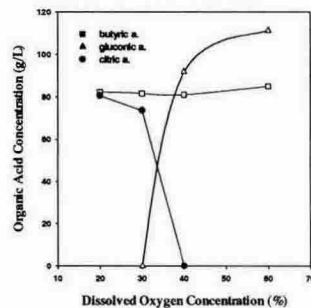


Figure 4. Effect of dissolved oxygen concentration on the production of organic acids.

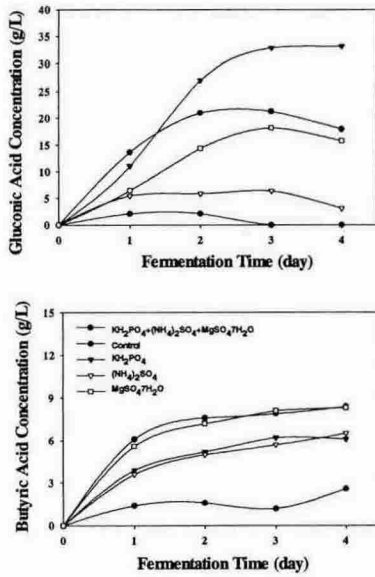


Figure 5. Effect of mineral salts on the production of organic acids

요약

효모를 이용하여 높은 생산성으로 고농도의 erythritol을 생산하기 위하여 '세포 성장단계'와 'erythritol 생성단계'로 나누어 2 단계 유가식 배양을 수행하였다. 세포 성장 단계에서는 pH-stat 유가식 배양을 수행하여 3.62 g/L-h의 생산성으로 76 g/L의 균체 농도를 얻을 수 있었다. pH-stat 유가식 배양을 수행하여 고농도의 균체 농도를 얻은 후에 멸균되지 않은 분말형태의 glucose를 발효조에 400 g/L가 되도록 공급하여 세포에 osmotic stress를 가해준 결과 41%의 수율로 187 g/L의 erythritol을 생산할 수 있었으며, 이때의 생산성은 2.79 g/L-h로서 기존에 보고된 어느 결과보다도 높은 값을 얻을 수 있었다.

Production phase에서 erythritol 생산에 대한 삼투압의 영향을 알아 본 결과 glucose의 농도가 증가할 수록 생성되는 erythritol 농도가 증가하였으며 세포 농도에 따른 erythritol 생산 수율은 큰 차이는 없었으나 세포 농도가 증가할수록 이에 비례하여 erythritol 생산성이 크게 증가하였다. Erythritol 생산에서 용존 산소량에 관계없이 butyric acid가 생성되었으며 40%의 DO 미만에서는 citric acid가 생성되고, 40% 이상의 DO에서는 gluconic acid가 생성되어 용존 산소량에 의하여 metabolic shift가 유도되었다. 고 농도의 glucose 첨가 후 용존 산소량을 20%로 조절하면서 pH를 3.0으로 낮춘 결과 citrate synthetase의 활성이 억제되어 citric acid가 생성되지 않았으며 gluconic acid 농도는 KH_2PO_4 에 의하여 증가하고 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 또는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 의하여 감소되었다. Butyric acid 농도는 KH_2PO_4 또는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 에 의하여 감소되었으며 synergic effect에 의하여 억제되었다.

Table 1. Comparison of erythritol production

Strains	Culture mode	Osmotic stress	Pm (g/L)	P (g/L-h)	Yp/s (%)	References
Strain 618A-01	Two-stage	Glucose	100	0.19	39.3	Saraya Co, 1999
<i>Trichosporonides</i> sp ST1	CFBC	Glucose	220	1.56	55.0	제일제당, 1997
<i>Aureobasidium</i> sp.	Batch	Glucose	175	1.82	43.8	Nikken Chemical Co.,1989
<i>Candida magnoliae</i> SR 101	FBC	Glucose	187	2.79	41.0	This work