

생물공학적인 방법에 의한 에리스리톨 생산기술의 개발

이정걸 · 김상용 · 노봉수*

(주)바이오엔진, *서울여자대학교 식품미생물공학과

식품 산업은 소비자의 기호와 편의성을 추구하면서 발전되어 왔다. 현대에 이르러 의학이 발달함에 따라 소비자들의 건강에 대한 관심이 증가하여 식품에 대한 선호도 역시 변화되고 있다. 즉 비만, 당뇨 등의 질병으로 인해 저 칼로리 기능성 식품에 대한 요구가 증가하고 있으며, 이에 따라 설탕을 대체할 수 있는 기능성 감미료에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 최근 이러한 기능성 감미료 중에서 특히 당알코올에 대한 연구가 활발히 진행되어 지고 있다[1]. 당알코올이란 당의 환원성 말단기에 수소가 첨가되어 알코올기로 환원된 당류를 말하며, 산업적으로 가치있는 당알코올로는 에리스리톨, 자일리톨, 솔비톨, 만니톨, 리비톨, 말티톨 등을 들 수 있다[1, 3]. 당알코올류는 일반적으로 열, 산, 알칼리에 안정하고 가열 시 갈변 현상을 일으키지 않는 등의 물성적 특징을 가지고 있고, 영양학적 측면에서 살펴보면 단맛을 지니면서도 칼로리가 낮고 충치를 일으키지 않는 특징이 있을 뿐만 아니라 물에 용해시킬 경우에 강한 흡열 작용으로 청량감을 주기 때문에 껌, 캔디, 빵, 음료수 등의 식품에 폭넓게 이용되고 있다. 현재 국내에서 생산되고 있는 당알코올로는 솔비톨, 말티톨, 자일리톨 및 에리스리톨 등이 있다(LG화학, 삼양제넥스, 보락, 바이오엔진). 그 중 에리스리톨은 1990년 일본 日研化學에 의해 미생물 발효에 의한 공정개발이 성공되어 처음으로 산업화되었고, 그 이후 이 물질이 지닌 뛰어난 물성적 특징이 알려지면서 급속하게 시장규모가 확대되고 있다[29]. 본고에서는 최근 당사에서 개발한 신균주 *Torula sp.*를 이용한 에리스리톨의 생물공학적 생산기술에 관련하여 간략히 서술하고자 한다.

에리스리톨의 특성

에리스리톨은 4탄당의 당알코올로서 1874년 최초로 발견되었고[19], 그 구조는 1958년 Shimada에 의해 확인되었으며[38], 올리고당이나 자일리톨과 더불어 대표적인 기능성 감미료로 자연계에 광범위하게 존재하고 있다. 식물계에서는 지의류, 버섯류 및 멜론, 포도, 배 등과 같은 과일류에 저장물질로서 함유되어 있고, 세균과 효모 등 미생물에 의해서도 생산되므로 포도주나 맥주, 된장 등의 발효식품에서도 검출되며, 그 외 포유류의 체액에도 다량 존재한다[7].

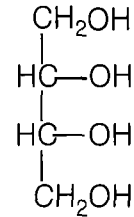


Fig. 1. Chemical structure of erythritol.

에리스리톨의 물리화학적 특징을 살펴보면(Table 1) 구조적으로 4개의 탄소 원자가 각각 1개씩의 hydroxyl group을 가지고 있는 직쇄상의 탄수화물 분자(Fig. 1)이며 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등과 같은 단당류 당알코올이다. 에리스리톨은 대칭적 분자구조의 meso form으로만 존재하며 환원 말단이 존재하지 않기 때문에 열과 산에 안정하다.

에리스리톨은 설탕의 70~80%의 감미도를 가지며 이미, 이취가 없는 부드러운 감미와 품질을 가진 무수 결정으로서 비환원성 말단기를 가지고 있다. 에리스리톨의 물성적 측면에서의 특징은 설탕과 유사한 우수한 결정성(녹는점 126°C), 상온에서 상대습도 90%까지 흡습하지 않는 저흡습성, 낮은 가열 착색성 등으로 식품으로의 가공성이 매우 우수하다. 다른 당알코올 대비 에리스리톨의 장점을 나열하면 다음과 같다. i) 저칼로리; 칼로리 값이 1g 당 0.3 Kcal로서 설탕의 10% 미만이며 대체 감미료로 쓰이고 있는 자일리톨(2.8 Kcal/g), 솔비톨(2.8 Kcal/g), 말티톨(1.4 Kcal/g) 등의 칼로리 값보다 매우 낮기 때문에 다이어트 식품의 감미료로 적합한 물질이다[14]. 에리스리톨의 칼로리 값이 낮은 이유는 에리스리톨의 분자량이 작기 때문에 분자량이 큰 다른 대체 감미료보다 상대적으로

Table 1. Physical and chemical properties of erythritol

Formula	C ₄ H ₁₀ O ₄
Molecular weight	122
Melting point	126°C
Boiling point	329-331°C
Heat stability	> 160°C
Solubility	37% at 20°C
Heat of solution	-23.3 Kcal/kg
Specific gravity	1.099 at 25°C, 30% solution
Viscosity	3.0 cp at 25°C, 30% solution

소장에서 쉽고 빠르게 흡수되어 효소에 의해 분해되지 않고 콩팥을 거쳐 체외로 직접 배출되기 때문이다. ii) 낮은 부작용; 에리스리톨은 소장에서 80%이상의 많은 양이 흡수되기 때문에 다른 대체 감미료에 비해 대장에서의 발효과정이 적어 설사와 같은 부작용을 덜 유발한다. iii) 당뇨병 환자에게 적당한 감미료; 에리스리톨은 체내에서 효소작용에 의해 대사과정에 이용되지 않기 때문에 혈당량과 인슐린의 양을 거의 변화시키지 않아서 당뇨병 환자가 설탕 대신 감미료로 사용해도 안전하다. iv) 비충치성; 에리스리톨은 대체 감미료로 사용되는 다른 당알코올처럼 비충치성 물질이기 때문에 어린이용 식품이나 치약과 건강식품에 사용할 수 있다. v) 뛰어난 청량감; 에리스리톨은 매우 낮은 용해열(-23.3 cal/g)을 가지고 있기 때문에 물에 녹을 때 주위의 열을 흡수하므로 시원한 맛을 느낄 수 있어 껌이나 사탕에 유용하게 쓰일 수 있다. 이와 같은 장점으로 인해 에리스리톨은 음료, 과자, 초콜릿, 껌, 캔디, 유제품 등 저칼로리, 비충치성을 원하는 제품뿐만 아니라 에리스리톨의 청량감 있고 산뜻한 맛을 이용할 수 있는 여러 제품에 다양하게 응용이 가능하다.

에리스리톨의 제조방법

에리스리톨의 제조방법으로는 추출법, 화학합성법 및 발효법이 연구되었다. 이 중 추출법은 과일이나 채소 등의 자연상태에서 극히 미량으로만 존재하기 때문에 산업적으로 경제성이 없어 대량생산에 이용되지 못하고 있다[6]. 화학합성법은 니켈 촉매 하에서 dialdehyde starch의 가수분해[32], 수소첨가에 의한 방법 및 meso-tartarate의 환원에 의한 방법 등이 알려져 있으나 고가의 원료 물질과 합성 과정 중 생성되는 부산물 제거의 어려움, 낮은 수율 등의 문제점 때문에 산업화되지 못했다[7]. 이러한 화학 합성법의 단점을 극복할 수 있는

방안으로 발효법에 관한 연구는 1960년대부터 비교적 많이 수행되어왔는데, 주로 당을 기질로 이용하는 호삼투성 효모에 의해 에리스리톨을 생산하였다. 에리스리톨의 생합성 경로는 Fig. 2와 같이 1 mole의 glucose가 pentose phosphate pathway에 의해 2 mole의 CO₂와 1 mole의 erythrose-4-phosphate로 전환되어 phosphatase와 erythrose reductase에 의해 에리스리톨이 생산된다[33, 34]. 일반적으로 당내성(sugar-tolerant) 또는 염내성(salt-tolerant) 효모는 높은 당농도 및 염이 포함되어 있는 환경하에서 세포 내외로 당알코올을 축적한다. 축적된 당알코올은 고삼투압으로부터 세포막과 단백질을 보호하는 삼투압 대항 물질(compatible solute)로서의 역할을 한다[8, 9, 20].

지금까지 알려진 에리스리톨 생산균주로는 1967년 Ohnishi의 156가지 효모 균주들의 당알코올 생성에 대한 연구를 통하여 제안된 *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis*[30] 등과 비당질계 원료인 n-paraffin을 이용하는 citric acid 생산 균주인 *Candida zeyanoides*[18], lactic acid bacteria인 *Leuconostoc oenos*[6], 1993년 Aoki 등이 별집에서 선별하여 40%의 수율로 에리스리톨을 생산한다고 발표한 *Trichosporonoides sp.* 등이 있다[3]. 또한 Hajny 등은 화분에서 분리한 *Moniliella tomentosa var. pollinis*를 사용하여 35.7%의 glucose 배지에서 발효를 통해 45.6%의 수율로 에리스리톨을 생산하고, 산업화를 시도하였으나 glycerol과 ribitol 등의 부산물들이 많이 생성된다는 단점 때문에 성공하지 못하였다[16]. 현재 산업적으로 이용되고 있는 균주는 일본의 日研化學에서 개발한 *Aureobasidium sp.*로 알려져 있는데 수율은 45%, 생산성은 2.0 g · L⁻¹ · h⁻¹ 정도의 수준인 것으로 보고되고 있다[48].

에리스리톨 생산 중에 부산물로 생성되는 소량의 물질들에는 글리세롤, 리비톨, 만니톨 및 미세한 정도의 다른 당알코올과 몇몇 유기산 등이 보고되고있다. 발효가 완료됨과 동시에 균체는 여과하거나 원심분리에 의하여 분리되고 배양액은 이온교환 크로마토그래피 등의 연속적 정제공정을 거쳐 농축, 냉각 및 결정화된다. 최종적으로 고순도 물질을 만드는 과정을 거쳐 현재의 기술로 99%까지 결정화할 수 있다.

Torula sp.에 의한 에리스리톨의 고수율 생산공정 개발

(1) 에리스리톨 생산 균주의 동정 및 특성연구

에리스리톨 생산용 균주를 고농도 당용액에서 스크리닝하고 동정을 실시하였다. 분리된 균주는 26s rRNA의 염기서열을 분석하는 방법[25] 및 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 Yarrow[46]의 방법에 준하여 조사하였고, Barnett 등의 분류 방법에 따라 *Torula sp.*로 동정되었다[5]. 에리스리톨의 생산성 향상을 위하여 *Torula sp.* 야생 균주를 NTG로 변이 처리

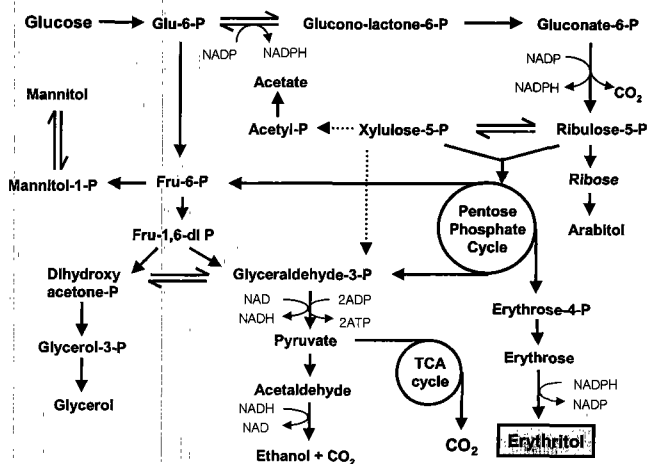


Fig. 2. Proposed biosynthetic pathway of erythritol by osmophilic yeasts.

한 후, 포도당을 고농도로 함유한 고삼투압성 plate 상에서 빠른 성장을 보이고, colony 색깔이 비교적 흰 5000여 개의 colony를 선별하고, 플라스크실험을 거쳐 에리스리톨 생산성 및 수율이 우수한 변이주 BNG2729를 최종 선별하였다. 당알코올 생산을 위한 mutant 선별 방법은 자연계의 풀이나 별집 같은 삼투압이 높은 조건에서 생육하는 미생물이 당알코올 발효에 유리한 균주로 선별되는 것처럼 삼투압 내성이 높은 균주일수록 당알코올 생성 능력이 우수한 균주라는 점을 이용하여 mutant를 선별하는 것이 일반적이다[46]. 국내에서의 에리스리톨 발효를 위한 균주 개량 연구로는 *Trichosporonoides* sp.를 EMS 처리를 통하여 당내성과 염내성이 뛰어난 균주를 분리한 연구가 보고되어 있다[48]. 이 실험에서 glucose 내성 mutant는 야생균주에 비해 생산성이 2.7배 증가한 것으로 밝혀졌다. 또한, Ishizuka 등은 *Aureobasidium* sp.에 UV조사와 NTG처리를 연속적으로 사용하여 당내성이 높은 mutant를 분리하였고, 이 mutant의 최대 에리스리톨 생산량이 50% 증가하였다고 보고하였다[21].

(2) 에리스리톨 생산 균주 BNG2729의 발효 특성

탄소원 및 질소원의 선정

Torula sp. BNG2729 균주를 사용하여 여러 발효조건에서의 특성시험을 시행하였다. 먼저 여러 탄소원을 비교 실험한 결과 에리스리톨의 생산성 및 수율 측면에서 포도당이 가장 우수하였고, 질소원으로는 효모 추출물 또는 옥수수 침지액이 가장 우수한 결과를 나타내었다. 또한, 당농도를 10~60%까지 변화시키면서 그 영향을 살펴 본 결과 당농도 40%이상에서 에리스리톨 수율이 저하되기 시작했으며 50%이상에서는 급격한 저하가 관찰되었다. 미생물 발효를 통한 대사 산물의 생산에서 대사 산물을 과량으로 얻기 위해 미생물의 성장을 제한하는 것이 요구되는데, 일반적으로 에리스리톨을 포함한 당알코올 발효 배지는 질소원에 비해 탄소원의 농도가 높은 특성을 가지고 있다. 그 결과 질소원의 고갈에 의한 성장 제한이 일어나는데 이때 당알코올의 분비가 촉진된다고 알려져 있다 [13, 35]. 따라서 당알코올 생산을 위한 배지의 C/N ratio는 일반적인 발효 배지의 C/N ratio보다 높은 특성을 가지며 당알코올 생산에 이용되는 균주의 종류에 따라 각각의 발효 배지는 적정 수준의 C/N ratio를 요구하고 있다. 즉 C/N ratio가 필요 이상으로 클 경우 당 소모속도가 저하되고 다량의 부산물이 생성되는 반면 작을 경우 당소모 속도는 증가되나 균체의 농도가 증가하여 에리스리톨의 수율이 떨어지는 단점이 있다 [48]. 이와같이 에리스리톨 발효 생산에 있어서 C/N ratio는 중요한 요소로 에리스리톨 농도 및 부산물 부생에 민감하게 작용한다. *Torula* sp.를 이용한 에리스리톨 생산에 있어서 포도당 40%를 기준으로 했을 때 효모추출물의 농도는 1.5~2.0% 사이가 최적이었다.

생물산업

Table 2. Effect of dissolved oxygen on erythritol production by *Torula* sp. in 5 L fermentor.

Agitation speed(rpm)	400	500	600	500-850
Dissolved oxygen(%)	1.5-2.0	2.0-5.0	5.0-10	20±1
Cell mass(g/L)	14.5	16.9	30.4	43.3
Erythritol(g/L)	157.7	175.3	190.0	150.0
Yield(%)	39.4	43.8	47.5	37.5
Productivity(g/L·h)	1.1	1.4	1.7	1.5
Fermentation time(h)	140	130	120	100

최적 온도, pH 및 용존산소 농도

당알코올 발효를 위한 최적온도와 pH 등 환경조건에 대한 연구는 Hallsworth 등에 의해 연구되었으며 일반적으로 최대 세포성장을 위한 최적 조건이 당알코올의 생성을 위한 최적 조건과는 다르게 나타났다[20]. 즉, 에리스리톨 발효의 가장 중요한 발효 조건인 통기 조건은 최대의 호기 조건을 유지해 주어야 한다고 알려져 있는데, 통기량이 충분치 못할 경우 에탄올과 glycerol같은 부산물이 생성되는 경향이 있다[11].

Torula sp.를 이용한 에리스리톨 생산에서 최적온도는 34°C, 최적 pH는 5.5이었으며, 5~10%로 용존산소 농도가 유지될 때 최대 생산성 및 수율을 나타내었고, 용존산소가 부족한 환경이 될수록 당 소모속도와 에리스리톨 생성속도가 떨어지는 현상이 관찰되었다(Table 2).

삼투압이 에리스리톨 생산에 미치는 영향

삼투압이 높은 환경에서 미생물 발효를 통한 당알코올의 생성에 대한 연구가 많이 진행되어 왔는데, 이는 미생물이 생산하는 당알코올이 삼투압이 높은 조건에서 삼투압 조절물질(compatible solute)로서 생성되어 미생물의 생육을 가능케 하기 때문이다[2]. 이러한 이유 때문에 당알코올의 생산에 삼투압 내성이 큰 미생물을 사용하는 경우가 많은데 특별히 내삼투압성 미생물의 경우 NaCl이나 KCl등의 염의 첨가에 의한 삼투압 증가로 축적되는 당알코올의 농도가 증가되며 생성되는 당알코올의 종류도 변할 수 있으며 [42], 당알코올의 생산이 미생물 성장환경의 삼투압과 밀접하게 관련되어 있다는 것이 제안되고 있다[8, 43]

NaCl 농도 변화가 에리스리톨 생산에 미치는 영향을 여러 농도의 NaCl이 포함된 플라스크 배지에서 살펴보았다. 약 200 g/L 포도당과 0.3M 이내의 NaCl을 첨가하여 배양한 결과 NaCl의 농도가 증가할수록 에리스리톨의 농도가 증가하였고, 균체의 농도는 감소하였다(Table 3). 염을 첨가한 경우 80시간 이후에서 에리스리톨 생산속도가 증가한 것을 보아 염을 첨가하지 않은 경우는 발효가 진행됨에 따라 배지중의 포도당 농도가 감소하여 삼투압이 떨어져 낮은 삼투압에서 에리스리톨의 생산능력이 떨어진 결과로 생각된다. NaCl의 첨가 실험 결과 균체 농도 및 포도당 소비량은 NaCl 농도가 높을수록 적었

Table 3. Effect of osmotic pressure of NaCl on the kinetic parameter of erythritol fermentation.

NaCl(M)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Initial osmolality(Os/kg)	1.5	1.7	1.9	2.1	2.2	2.4
Consumed glucose conc.(g/L)	136.1	132.9	132.5	131.2	125.2	84.8
Cell mass(g/L)	9.2	9.2	8.4	7.6	7.1	6.2
Erythritol(g/L)	42.2	46.4	51.1	54.3	52.7	41.8
Yield(%)	31.0	34.9	38.6	41.4	42.1	49.3
Productivity(g/L·h)	0.35	0.35	0.43	0.45	0.44	0.35

으나 에리스리톨 생산량과 생산성은 0.3M NaCl 배지에서 최대로 나타났다. 이것은 에리스리톨 생산성을 높이기 위해서는 균체 성장속도가 저해를 적게 받으면서 에리스리톨 생산속도가 높은 적당한 삼투압으로 발효조건의 조절이 필요하고 삼투압을 조절하기 위해서는 NaCl 등의 염과 같은 삼투압 조절물질을 첨가해야함을 의미한다.

미량원소의 영향

다양한 무기염류 중에서 망간과 구리를 각각 10 및 2 µg/ml의 농도로 에리스리톨 생산배지에 첨가하였을 때 약 12%의 에리스리톨 생산 수율의 증가가 나타났는데 이는 망간의 경우 *Torula sp.*의 세포막 투과성을 증가시킴으로써 생산수율을 향상시킨 것이다[27]. 구리의 경우는 에리스리톨 생산효소(erythrose reductase)의 비경쟁적 저해제인 fumarate의 합성을 억제하여 에리스리톨 생산효소의 저해를 완화시킴으로써 에리스리톨의 생산수율을 향상시킨 것이다[28].

(3)유가식 배양 공정 개발

Fig. 3A는 *Torula sp.*를 이용하여 회분식 배양을 수행한 전형적인 결과를 보여준다. 총 400 g/L의 포도당을 소모하여 180 g/L의 에리스리톨이 생성되었으며, 이때의 수율은 48%이었다. 그러나 생산성은 1.43 g·L⁻¹·h⁻¹로 매우 낮았다. 즉, 회분식 배양에 의해서는 비교적 높은 수율로 에리스리톨을 생산할 수는 있으나, 에리스리톨의 생산성이 매우 낮으므로 *Torula sp.*를 이용하여 산업적으로 에리스리톨을 생산하기 위해서는 유가식 배양 공정이 개발되어야 함을 알 수 있다.

*Torula sp.*의 발효 변수들에 대한 초기 포도당 농도의 영향을 알아보기 위하여 200~400 g/L로 농도를 달리하여 실험을 수행하였다. 초기 포도당 농도의 증가는 최종 에리스리톨 농도를 증가시켰으나, 비성장속도를 감소시켰다. 에리스리톨의 비생산속도 및 수율이 초기 포도당 농도 300 g/L에서 가장 높았으며, 배양시간 또한 가장 짧았다. 300 g/L 이하의 농도에서는 포도당 소비속도의 감소로 인해, 300 g/L 이상의 농도에서는 lag time의 증가로 인해 에리스리톨의 비생산속도가 감소하였다. 이는 세포에 대한 osmotic shock 또는 포도당 대사 효소들의 기질 저해에 기인한 것으로 여겨진다.

최대 에리스리톨 비생산속도를 나타내는 포도당 농도로의

조절은 에리스리톨 생산에 유익한 효과를 나타낸다. 유가식 배양 시, 포도당의 feeding 기간 중에 유지되는 당의 농도를 150, 175, 200, 225, 및 250 g/L로 조절할 결과 225 g/L로 유지하여 주었을 때, feeding 기간 중의 비생산속도가 2.49 g·L⁻¹·h⁻¹로 가장 높았다. 따라서 초기 당농도 300 g/L로 하여 배양을 시작한 후, 당농도가 225 g/L 이하로 떨어졌을 때, 80% 농도의 포도당을 feeding 하여 225 g/L 수준으로 유지시키는 방식으로 유가식 배양을 수행하였다. 유가식 배양을 통해서 세포 성장과 에리스리톨 생산의 lag time이 감소하였으며 에리스리톨의 비생산속도가 증가하였다. 그러나 60시간 이후에 현저한 비생산속도 감소가 나타났다. 그 원인은 미생물 세포의 생리와

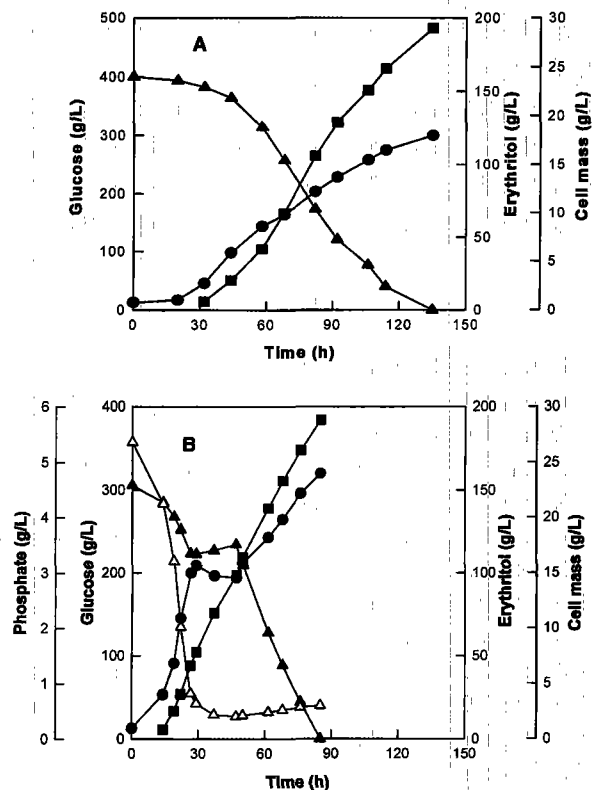


Fig. 3. A batch culture(A) with an initial 400 g/L glucose and a fed-batch culture(B) with a controlled glucose concentration of 225 g/L in medium containing 3 g/L phytic acid and a total concentration of added glucose of 400 g/L in a fermentor. Cell mass(●), glucose(▲), phosphate(△), and erythritol(■).

Table 4. Erythritol productions from various microorganisms. Q_p volumetric production rate of erythritol, Y_p/S erythritol yield from glucose.

Microorganism	Glucose (g/L)	Erythritol (g/L)	Q_p (g/L·h)	Y_p/S (g/g)	Reference
<i>Aureobasidium</i> sp.	400	175	1.82	0.44	[21]
<i>Candida</i> sp.	300	80.2	0.47	0.27	[18]
<i>Moniliella tomentosa</i> var. <i>pollinis</i>	357	133	0.79	0.37	[16]
<i>Trichosporon</i> sp.	300	138	1.23	0.46	[33]
Fed-batch culture	333	150	1.50	0.45	
<i>Torula</i> sp.					
Batch culture	400	193	1.43	0.48	This study
Fed-batch culture	400	197	1.79	0.49	
Fed-batch culture with phytic acid	400	193	2.26	0.48	

대사에 영향을 끼치는 가장 중요한 배지 성분중 하나인 phosphate에서 찾을 수 있었다. 여러 가지 다양한 phosphate sources로 실험한 결과 phytic acid(inositol hexaphosphate)가 3 g/L의 농도에서 가장 높은 정도로 세포 성장과 에리스리톨 생산을 촉진하였다[28]. Phytic acid가 추가된 배지를 이용하여 유가식 배양을 수행한 결과 60시간 이후에도 에리스리톨의 비생산속도는 감소하지 않았으며(Fig. 3B), 현재까지 문헌에 보고된 값 중 가장 높은 $2.26 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 비생산속도를 나타내었다[31].

다양한 미생물에 의한 포도당으로부터 에리스리톨의 생산을 Table 4에 정리하였다. 본 연구에 의해 개발된 *Torula* sp.를 이용한 에리스리톨 생산 공정은 현재까지 보고된 생산 공정 중에서 가장 높은 에리스리톨의 생산성과 수율을 나타내었다.

참고문헌

1. Alder, L. 1980. *Arch. Microbiol.* 124.
2. Anthony, H. R. and J. S. Harrison. 1986. The Yeasts vol 2. Academic press, U.K., 9-10.
3. Aoki, M. A. Y., G. M. Pastore, and Y. K. Park. 1993. *Biotechnol. Lett.* 15: 383-388.
4. Anand, J. C. and A. D. Brown. 1972. *J. Gen. Microbiol.* 52: 205-212.
5. Barnett. 1983. Yeasts : Characteristics and identification, Cambridge university Press, London.
6. Bilanx, M. S., B. Flourie, C. Jaequemmim, and B. Messing. 1991. Sugar alcohols, p. 72. In: S. Marie and F. R. Pogolt(ed.), *Handbook of Sweeteners*. Blackie Academic & Professional, Gasgow, U.K.
7. *Bioindustry*, 5(9), 32(1988).
8. Brown, A. D. and J. R. Simpson. 1972. *J. Gen. Microbiol.* 72: 589-591.
9. Chirite, J., G. Favetto, and C. F. Fontan. 1984, *J. Appl. Bacteriol.* 56: 259-268.
10. Cunha, M., P. Firme, M. V. San Romao, and H. Santos. 1992. *Appl. Environ., Microbiol.* 58: 2271-2279.
11. Dennis, g., P. Chevalier, and T. H. Yuen. 1995. *Biotechnol. Lett.* 17(3): 315-320.
12. Dooms, L., G. L. Henneben, and H. Verachtert. 1971. *Antonie van Leeuwenhoek.* 37: 107-118.
13. Ermakova, I. T., G. V. Lenkikh, T. A. Gaidenko, T. N. Medvedeva, E. G Litvinova, and A. V. Korpachev. 1984. *Microbiologica* 53(5): 803-808.
14. Goossen, J. and H. R per. 1994. *Confectionery Production.* 24: 182-188.
15. Goldberg, I. 1994. *Functional Foods*. Chapman and Hall, New York, U.S.A
16. Hajny, G. J., J. H. Smith, and J. C. Garver. 1964. *Appl. Microbiol.* 12: 240-246.
17. Haskin, R. H. and Spener J. F. T. 1967. *Can. J. Botany* 45: 515.
18. Hattori, K. and T. Suzuki. 1974. *Agric. Biol. Chem.* 38: 581-586.
19. Hoffmann, A. W. 1874. *Ber.* 7: 508.
20. Hallsworth, J. E. and N. Mogan. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2435-2442.
21. Ishizuka, H., H. Wako, T. Kasumi, and T. Sasaki. 1989. *J. Ferment. Bioeng.* 68: 310-314.
22. Kim, K. A., B. S. Noh, S. Y. Kim, and D. K. Oh. 1999. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 91-95.
23. Kim, S. Y., K. H. Lee, J. H. Kim, and D. K. Oh. 1997. *Biotechnol. Lett.* 19: 729-733.
24. Kim, S. Y., S. S. Park, Y. J. Jeon, and J. H. Park. 1996. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 935-939.
25. Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. 1998. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 73(4): 331-71.
26. Larsson, C. 1990. *J. Bact. Apr.* 1769.
27. Lee, J. K., Ha, S. J., Kim, S. Y., and Oh, D. K. 2000. *Biotechnol. Lett.* 22: 983-986.
28. Lee, J. K., Koo, B. S., and Kim, S. Y. 2001. *FEBS Lett.* in press.
29. Nikkei. 1994. *Biotechnology Annual Report* 611.

30. Onishi, H. 1967. *Japan Ferment. Technol.* **25**: 495-506.
31. Oh, D. K., Cho, C. H., Lee, J. K., and Kim, S. Y. 2001. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **26**: 248-252.
32. Otey, F. H., J. W. Sloan, C. A. William, and C. L. Mehtretter. 1961. *Industrial Engineering Chemistry.* **53**: 267-268.
33. Park, J. B., B. C. Seo, J. R. Kim, and Y. K. Park. 1998. *J. Ferment. Bioeng.* **86(6)**: 577-580.
34. Park, J. B., B. C. Seo, J. R. Kim, U. H. Park, and Y. K. Park. 1998. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**: 543-546.
35. Pfyffer, G. E. and D. M. Rast. 1980. *Exp. Mycol.* **4**: 160-170.
36. Roper, H. and J. Goossens. 1993. *Starch/Starke.* **45**: 400-405.
37. Sasaki, T. 1989. *Japan Agr. Biol. Chem.* **63**: 1130-1132.
38. Shimada, A. 1958. *Acta. Ciyst.* **11**: 748.
39. Shindoh, T., Y. Sasaki, A. Miki, T. Eguchi, K. Hagiwara, and T. Ichikawa. 1988. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* **29**: 419-422.
40. Shindoh, T., Y. Sasaki, A. Miki, K. Hagiwara, and T. Ichikawa. 1988. *Japan Agr. Biol. Chem.* **62**: 623-626.
41. Shizuka, H., K. Wako, T. Kosumi and T. Sasaki 1989. *J. Ferment. Bioeng.* **68(5)**: 310-314.
42. Tokuoka, K. T. Ishitani and W. C. Chung. 1992. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **38**: 35-38.
43. Van Eck, J. H., B. A. Prior and E. V. Brandt. 1993. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 104-1054.
44. Wako, K., G. Kawaguchi, N. Kubo, T. Kasumi, and K. Hayashi. 1988. *醱酵工學* **66**: 209.
45. Wako, K. 1988. *醱酵工學* **66**: 217.
46. Yarrow. 1998. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
47. Yoshida, H., T. Sugawara, and J. Hayashi. 1984. *Japan Food Ind.* **31**: 765-771.
48. 전영중, 서승현. 1995. *생물화공* **9(4)**: 24-29.