

에리스리톨 고생산성 변이주인 *Moniliella suaveolens* var. *nigra*의 선별과 배양특성

이금숙·†박홍우
한양대학교 화학공학과

(접수 : 2002. 6. 4., 게재승인 : 2002. 6. 25.)

Selection and Characterization of a High Erythritol Producing Mutant of *Moniliella suaveolens* var. *nigra*

Keum Sook Lee and Hong Woo Park†

Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791 Korea

(Received : 2002. 6. 4., Accepted : 2002. 6. 25.)

The present work describes the improvement of an erythritol-producing strain to lower the formation of glycerol, which is a characteristic by-product of the strain and could cause difficulties in the recovery and purification of the final product. The yeast-like fungi *Moniliella suaveolens* var. *nigra*, isolated previously in the same laboratory from beehives, was mutated by exposing it to a 4 g/L NTG solution. From a total of 2000 mutated strains, Em6j30-14 was selected as the one having the most desirable properties. Cultivating the strain for seven days in 300 mL flasks containing 30 mL of a 400 g/L glucose medium resulted in an erythritol yield of 43%. The glycerol yield was 5%, which is a value 50% lower as compared with the wild type. However, attempts to reproduce the above results in a 5L-fermenter failed, resulting in a similar erythritol concentration but a much higher formation of glycerol. Possible reasons for such a different behaviour could be oxygen limitation or the aggregation of cells, but the exact mechanism could not yet be identified. Foam formation, which is another major problem in large-scale fermentation, tended to be much lower for the mutant strain.

Key Words : erythritol, *Moniliella suaveolens*, fermentation, glycerol

서론

에리스리톨은 설탕의 약 70~80%의 감미도를 지닌 4탄당의 당알코올이다. 에리스리톨은 다른 당알코올 감미료와 비슷한 저칼로리 및 비충치성이라는 성질을 지니고 있다. 이로 인해 설탕 대체물질로서의 그 유용성이 크다(1). 에리스리톨은 다른 당알코올 감미료보다 더 낮은 칼로리량을 지니고 있으며, 산이나 열에 안정하며 섭취 후 설사나 방귀를 덜 유발시키며 입에서 녹을 때 청량감이 높고, 비흡습성, 우수 가공성 등 식품에 응용하기에 좋은 장점들이 많다(2,3). 자일리톨에 비하여 칼로리, 가격, 흡습성, 가공성 등 여러 면에서 장점이 있고, 솔비톨에 비하여 가격은 다소 높으나 감미도, 칼로리 등의 측면에서 우수하다(4).

에리스리톨을 생산하는 균주로는 n-Alkane을 기질로 사용하는 *Candida zeylanoides*(5) 포도당을 이용하는 *Aureobasidium* sp.(6) 설탕이나 포도당을 함께 이용하는 *Trichosporonoides* sp.(7), *Moniliella pollinis*(2) 등이 알려져 있다. 효모에 의한 발효 시 사용되는 탄소원에 따라 에리스리톨 외에 여러 부산물이 함께 생성된다. 생성된 부산물로는 주로 글리세롤, 다당류 등이 있으며 이런 부산물을 제거하지 않고 에리스리톨을 결정화시켜 분리하면, 에리스리톨의 순도 및 결정화 효율 저하를 가져오게 되고 과도한 부산물은 분리정제 과정 중 추가적인 세척공정을 요하기 때문에 전체 생산비용을 증가시킨다(8).

미생물발효를 통해 에리스리톨을 경제적으로 대량 생산하기 위해서 여러 가지 연구들이 진행되어 왔다. 꿀이나 당밀 또는 벌집으로부터 균주 스크리닝을 통한 고생산성 균주를 탐색하거나(9), 이들 균주의 수율과 생산성을 최적화하기 위한 여러 가지 연구들이 진행되어져 왔다(10,11). 또한, 꽃가루로부터 추출해낸 *Ustilaginomyces* 균주를 계속적인 포도당의 공급을 통한 continuous culture로 최대 100 g/L의 에리스리톨을 생산하였고 39.3%의 효율을 나타내었다(12). 또한 벌

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea
Tel : +82-2-2290-0487, Fax : +82-2-2299-9496
E-mail : hhwwnn@chollian.net

꿀이나 높은 당분이 함유된 음식물로부터 분리된 *Moniliella* 균주를 144시간 동안 배양한 결과, 최대 111 g/L의 생산량을 나타내었다는 것이 알려졌다(13). 효모를 이용한 에리스리톨 생산 시 고려되어야 할 사항은 저렴한 탄소원의 선정, 배양 중 거품 생성의 억제, 글리세롤 등 타 당알콜류 생성의 억제, 발효속도 및 수율의 제고 등을 들 수 있다. 무엇보다도 경제적인 에리스리톨 생산을 위해서는 높은 기질농도에서 높은 에리스리톨을 생산하는 균주의 확보와 부산물이 적은 균주의 개발 및 생산공정의 확보가 중요하다.

본 연구에서는 고에리스리톨 및 저글리세롤 생산균주를 확보하기 위해 우리연구실에서 균주스크리닝으로 얻었던 wild-type *Moniliella suaveolens var. nigra*를 N-methyl-N'-N-nitroguanidine을 사용하여 변이 시켰다. 약 2,000여개의 변이 균주를 스크리닝하여 고에리스리톨 및 저글리세롤 생성 균주를 선별하였다. 선별된 변이균주는 wild type 균주와 비교해 글리세롤의 생성이 50% 이상 줄었으며 거품의 생성이 감소하였다.

재료 및 방법

재료

효모추출물(yeast extract), malt extract, bacto peptone은 Difco사(USA)로부터 구입하였고, 포도당, 한천, 요소는 Junsei 사(Japan)로부터 구입하였으며, K_2HPO_4 와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 은 Hayashi사(Japan)로부터 구입하였다. 에리스리톨, 글리세롤, NTG (N-methyl-N'-N-nitroguanidine)는 분석용 시약급으로 사용하였다. Antifoam인 neorin은 (주) 제일제당에 의해 제공되었다.

균주

균주는 본 연구실에서 벌집으로부터 분리한 *Moniliella suaveolens var. nigra*이다(9). 이 균주는 내삼투압성 효모로 pseudohyphae를 형성한다. 최적 온도는 30°C이며, 포도당과 설당을 발효물질로 이용한다. 균주는 stock slant배지에서 냉장 보관하였고 활성을 유지하기 위해 2주에 한번씩 계대배양을 하였다. 장기간 보관하기 위해 균주를 동결건조기(ADVANTEC VF-35)로 동결건조하여 밀봉된 상태로 보관하였고, 10% 글리세롤에 넣어 -70°C인 극저온 냉동고에도 보관하였다.

배지

균주를 저장하기 위해 한천배지를 사용하였는데 그 조성은 포도당 200 g/L, 효모추출물 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 3 g/L, 요소 1 g/L, 한천 20 g/L이다. 균주스크리닝을 위해서는 포도당농도가 700 g/L인 위의 한천배지를 사용하였다. 배양을 위한 액체배지는 포도당 200 g/L, 효모추출물 5 g/L, 요소 1 g/L이고 플라스크배양과 배양기배양에서 균주의 생산성 조사를 위한 생산배지는 포도당 400 g/L, 효모추출물 3 g/L, 요소 2.72 g/L, K_2HPO_4 1.79 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 이다. 생산배지를 제조할 때 효모추출물, 요소, K_2HPO_4 의 혼합액과 포도당용액을 따로 멸균하여 browning 현상을 막았다. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 도 침전이 생길 수 있기 때문에 따로 멸균하

여 식힌 후, 배지액에 첨가하였다(10). 고체 및 액체배지의 멸균은 121°C, 15분간 고압멸균기로 실행하였다.

균주의 mutation

고에리스리톨 및 저글리세롤 생산성 균주의 확보를 위해 *Moniliella suaveolens var. nigra* 균주의 wild-type을 돌연변이 유발원인 NTG를 이용하여 변이시켰다. NTG처리 과정은 균주를 200 g/L 포도당 액체배지에 종배양하여 400 g/L 포도당 액체배지에 접종하고 균체 농도가 8 g/L일 때의 배양액을 원심분리한 후 균체를 pH 5.0의 0.5 M citrate buffer와 pH 7.0인 0.1 M phosphate buffer로 세척하고 20분동안 4 g/L의 NTG로 처리하였다. 위의 NTG농도와 처리시간은 균체의 99% 치사율을 나타낸다.

균주의 스크리닝

NTG처리된 균주를 700 g/L의 포도당 액체배지에서 2~3회 계대배양한 후, 같은 농도의 포도당 한천배지 plate에 도말하였다. 이 plate를 30°C 항온기에서 배양한 뒤 2~3일 후 잘 자라는 균집체를 선택하여 stock slant에 접종하였다. 에리스리톨 및 글리세롤의 생산성을 조사하기 위해 선별된 균주들은 300 mL 플라스크에서 6~7일간 배양되었으며, 그 상등액은 HPLC를 이용해 분석하였다.

300 mL 플라스크배양

고농도에서 잘자라는 균주선별을 위한 고농도 계대배양, 선별된 변이주와 wild type 균주의 생산성 비교실험, 선별된 변이주의 대사실험은 300 mL 진탕플라스크에서 수행하였다. 배양은 균체농도가 8-10 g/L인 종배양액 1 mL를 배양액 30 mL가 담긴 플라스크에 접종한 후 30°C, 240 rpm으로 수행하였다.

5 L 배양기 배양

5 L 배양기 배양(working volume 2L)은 산업적으로 이용함에 있어 재현성이 있는지의 여부를 알아보기 위해 플라스크배양을 통해 선별한 변이균주를 30°C, 1000 rpm, air flow rate 1 vvm의 조건 하에서 7일간 회분식 배양을 하였다. 5 L 배양기 배양은 생산배지조성으로 하였으며 거품이 다량 생성되어 배양을 어렵게 하기 때문에 거품을 제거하기 위해 antifoam인 neorin을 0.05% 첨가하였다. 배양기의 pH는 조절하지 아니하였다.

균체농도 측정

균체농도는 분광광도계(Milton Roy, spectronic20D)를 이용, 562 nm에서 OD (Optical Density)를 측정한 후 건조균체농도를 아래 식으로 계산하였다(10).

$$\text{건조균체농도(g/L)} = 0.553 \times \text{OD at } 562 \text{ nm}$$

포도당, 에리스리톨, 글리세롤의 분석

포도당, 에리스리톨, 글리세롤의 분석은 배양액을 10,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액을 filter(Millipore, milllex HV 0.45 μm)로 여과시킨 후 HPLC(Waters)로 분석하였다. 분

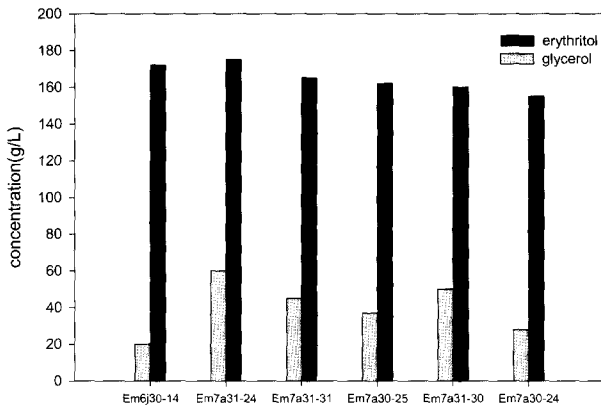


Figure 1. Comparison of flask cultures of NTG-treated strains.

석칼럼은 Aminex HPX-87H column(Bio-rad)를 사용하였고 이동상으로는 0.01 N H₂SO₄를 사용하였다. 이동상 유속은 0.6 mL/min, 시료의 주입 부피는 2 μ L, 이때의 머무름 시간은 20분, 칼럼의 온도는 40 $^{\circ}$ C로 유지하였다. Pre-column으로는 Cation H Guard cartridge(Bio-rad)를 사용하였으며, 시료의 검출은 굴절율 검출기를 사용하였다. 검출기의 온도는 30 $^{\circ}$ C로 유지하였다.

결과 및 고찰

변이주의 확보

고에리스리톨 및 저글리세롤 생산성 균주의 확보를 위해 *Moniliella suaveolens var. nigra* 균주의 wild-type를 NTG처리 후 700 g/L의 고농도 포도당 고체 배지에서 도말하여 약 2,000여개의 균주를 스크리닝하였다. 이들 2000여개의 균주들을 각기 300 mL 진탕플라스크에서 6-7일간 배양하여 HPLC로 분석한 결과 에리스리톨의 생산성이 우수하고 글리세롤의 생성이 비교적 낮은 변이주를 2000개 중에서 6개를 선별하였다. Figure 1은 6개 변이주의 진탕플라스크 배양 결과인데 그 중 Em6j30-14가 에리스리톨의 생산성이 가장 우수하고 부산물인 글리세롤의 생성량이 비교적 적어 최종 우수 변이주로 선별하였다.

변이주의 특성

현미경으로 관찰한 변이주는 그 크기가 10-15 μ m이고 약간의 타원형의 모양을 하고 있다. 변이주를 고체배지에서 키우면 배양시간에 따라 균집체의 색이 처음에는 흰노란색, 점차 짙은 노랑색, 최종으로는 짙은 녹색으로 변한다. 고체배지에서의 시간에 따른 색의 변화는 wild-type 균체에 비교하여 그 정도가 덜하다. 변이주의 배양기 배양시 다량의 거품이 생성되나 그 정도는 wild-type 균체의 것에 비교하여 매우 덜하다. 변이주도 wild-type 균주와 같이 배양액 중 서로 응집된 형태로 존재하며 거품중 다량의 균체가 거품계면에 모여 있음이 관찰되었다.

변이주의 생산성 조사

선별한 변이주 Em6j30-14의 성능을 wild type 균주의 것과 비교하였는데 300 mL 플라스크배양에서는 변이주 배양액중

Table 1. Comparison of results of 300mL flask cultures with 400g/L glucose medium

	Wild type	Mutant
Initial glucose conc. (g/L)	400	400
Final Cell conc. (g/L)	50	60
Final pH	3.3	3.2
Residual glucose conc. (g/L)	2	0
Produced erythritol conc. (g/L)	180	172
Produced glycerol conc. (g/L)	46	20
Yield of erythritol (%)	45	43
Yield of glycerol (%)	11	5
Conc. glycerol./conc. erythritol	0.25	0.12

Table 2. Comparison of results of 5L fermentation experiments

	Wild type	Mutant
Initial glucose conc. (g/L)	400	400
Final pH	2.8	3.1
Residual glucose	3	0
Erythritol conc. (g/L)	165	167
Glycerol conc. (g/L)	106	105
Yield of erythritol (%)	41	42
Yield of glycerol (%)	26.5	26.3
Formation of foam	high	low

부산물 글리세롤이 현저히 감소하였으나 5 L 배양기결과에서는 글리세롤의 감소현상이 관찰되지 않았다. 배양결과를 Table 1에 나타난 바와 같이, 변이주의 경우는 세포의 성장 및 기질인 포도당의 소비가 빠르고 에리스리톨의 양은 172 g/L로 wild type과 차이가 없으나, 글리세롤의 양은 20 g/L로 에리스리톨에 대한 글리세롤의 비가 약 50%가 감소됨을 볼 수 있다. 변이주의 경우 수율에 있어 에리스리톨은 43%로 상업화에 사용되기에는 다소 미흡하나 부산물인 글리세롤이 5%로 적게 생성되어 순도 높은 에리스리톨 생산 및 분리, 정제시 비용절감에 적절할 것으로 판단된다.

5 L 배양기 배양 결과는 Table 2에 나타난 바와 같이 개량균주가 기질을 빨리 소비하나 300 mL 플라스크배양과는 달리 에리스리톨과 글리세롤의 생성에 있어 wild type과 별다른 차이가 없었다. 그러나 wild type 배양의 경우 난점이었던 다량의 기포 형성은 변이주의 경우 비교적 적게 생성됨을 볼 수 있었다. 5 L 배양에서 광학현미경을 이용해 배양액을 관찰해 본 결과, 세포는 응집되어 자라며 기포에 붙어 뜨는 현상을 보인다. 기포주변에 존재하여 부유된 세포는 세포의 성장 및 에리스리톨과 글리세롤의 생성에 커다란 영향을 끼친 것으로 판단된다.

기질과 생성물에 대한 변이주의 대사 조사

300 mL 진탕플라스크배양에서 같은 기간에 변이주와 wild type의 에리스리톨의 생성량은 비슷하나 변이주의 경우 포도당이 빨리 소모되어 없었으며 글리세롤은 절반으로 감소됨을 볼 수 있었다. 기질로 사용되는 포도당과 생성물인 에리스리톨과 글리세롤에 대한 균주의 대사를 파악하기 위해 Table 3

Table 3. Effects of addition of glucose, erythritol, and glycerol to the initial medium

added amounts (g/L)			glucose conc.(g/L)		erythritol conc.(g/L)		glycerol conc.(g/L)	
glucose	erythritol	glycerol	3day	6day	3day	6day	3day	6day
135	183	138	9	0	241	249	202	210
135	183	0	0.2	0	223	244	40	17
135	0	138	0	0	39	57	161	128
135	0	0	0	0	43	50	21	2
0	183	0	0	0	180	177	0	0
0	0	138	0	0	9	25	105	72
0	183	138	0	0	209	242	114	88

* Media containing yeast extract 5g/L, urea 1g/L

에 나타낸 것과 같이 포도당, 에리스리톨, 글리세롤을 초기배지에 몰수에 비례적으로 첨가하여 배양하였으며 3일과 6일배양 시점에서 배양액을 분석한 결과이다. 에리스리톨만을 첨가하여 배양한 경우, 배양시간에 따른 농도변화가 거의 없었으며, 글리세롤만을 첨가하여 배양한 경우, 글리세롤은 감소하는 반면 에리스리톨은 증가함을 보인다. 에리스리톨과 글리세롤을 함께 넣어 배양한 결과는 에리스리톨이 증가하고 글리세롤은 감소함을 보이는데 이는 글리세롤이 에리스리톨로 전환되는 대사가 존재함을 보여주고 있다. 포도당, 에리스리톨, 글리세롤을 모두 첨가한 경우는, 포도당이 소비되면서 에리스리톨과 글리세롤이 같이 생성됨을 보인다.

본 실험에서 기질인 포도당이 모두 소비된 후에는, 글리세롤은 에리스리톨로 가는 대사가 존재하나 에리스리톨이 글리세롤로 가는 대사는 이루어지지 않음을 알 수 있다. 그러나 포도당이 모두 소비되지 않은 경우에는 에리스리톨이 글리세롤로 가는 대사는 물론 글리세롤이 에리스리톨로 가는 대사 또한 이루어지지 않음을 알 수 있다.

결론

본 연구에서는 에리스리톨의 생산성을 높이며 글리세롤의 생성을 낮추는 균주개량을 목적으로 본 실험실에서 탐색한 *Moniliella suaveolens var. nigra* 균주를 4 g/L의 NTG 용액으로 mutation시켰다. 고농도에서 잘 자라는 균주를 선별하기 위해 700 g/L의 고농도의 포도당 배지에서 배양하여 약 2,000여개의 균주를 스크리닝한 결과 고농도의 포도당 액체 배지에서도 잘 자라며 에리스리톨의 생성이 좋고 글리세롤 생성이 적은 변이주를 얻었다.

개량균주의 성능을 조사하기 위해 wild type 균주와 변이주를 400 g/L 포도당 액체배지를 이용하여 300 mL 진탕플라스크에서 배양하였다. 그 결과, 개량균주의 에리스리톨의 생성량은 172 g/L로 wild type 균주와 비슷하나 글리세롤이 20 g/L 생성되어 wild type 균주에 비해 약 50%의 감소를 보였다. 균주의 재현성을 보기 위해 5 L 배양기 배양을 하였다. 그 결과 변이균주의 에리스리톨의 생성량은 167 g/L로 300 mL 플라스크배양결과와 거의 비슷하였으나, 글리세롤의 수율은 105 g/L로 5배 증가하였다. 이러한 원인은 규명되지 않았으나 기포주변에 존재하는 부유한 세포들이 배양기내의 세포정

장 및 에리스리톨과 글리세롤의 생성에 커다란 영향을 끼친 것으로 추측된다. 개량된 변이균주는 wild-type과 비교하여 상대적으로 기포의 발생이 적어 실제 배양공정에서 그 적용이 용이할 것이다.

균주의 대사를 조사한 결과, 포도당이 소비되는 중에는 에리스리톨과 글리세롤을 같이 생성하며, 포도당이 모두 소비되었을 경우는 적은 양의 글리세롤이 에리스리톨로 변환됨을 보이나 에리스리톨이 글리세롤로 변환됨은 관찰되지 않았다. 이는 생체내에서 글리세롤이 에리스리톨로 변환되는 대사가 존재함을 알 수 있다. 또한 낮은 농도의 포도당과 글리세롤의 첨가에서는 글리세롤이 모두 소비됨을 보였다.

본연구는 새로운 고생산성 *Moniliella* 변이주를 이용하여 순도 높은 에리스리톨 생성과 분리·정제 비용의 절감 가능성을 보여준다.

요약

경제적으로 에리스리톨을 대량 생산하기 위해 *Moniliella suaveolens var. nigra*의 wild type을 mutation시켜 변이주를 선별하였다. 선별된 변이주는 400 g/L 포도당배지 플라스크 배양에서 에리스리톨 172 g/L, 글리세롤 20 g/L를 생산하였는데 wild-type의 배양결과와 비교하면 에리스리톨의 생산성은 비슷하고 부산물인 글리세롤의 생성은 50% 적다. 변이주는 wild type 배양시 발생하는 다량의 foam을 적게 발생시키는 특성이 관찰되었다. 배양기 5 L 배양에서 변이주는 에리스리톨의 생산과 부산물 글리세롤의 생성이 wild-type의 것들과 비슷하였다. 이의 원인은 아직 규명되지 않았으나 배양중 부적절한 산소전달이나 배양중 발생하는 거품에 세포가 응집하였기 때문인 것으로 추측된다. 균주의 대사를 조사한 결과, 글리세롤은 에리스리톨로 변환되나 에리스리톨은 글리세롤로 변환되지 않음이 관찰되었다. 새로운 고생산성 *Moniliella* 변이주는 분리·정제 비용이 절감된 순도 높은 에리스리톨 생성을 가능하게 할 것이다.

REFERENCES

- Roper, H. and J. Goossens (1993), Erythritol, A New Raw Material for Food and Non-food Applications, *Starch/Stärke* **45**, 400-405.
- Roper, H. and J. Goossens (1994), Erythritol, A New bulk Sweetener *IFI NR.* 1/2, 27-33.
- Tsunew, O. and T. Sasaki (1993), "Erythritol" Product of Biotechnology, *New Food Ind.* **35**, 38-45.
- Anon, A. (1994), New Horizons in Low Calorie Bulk Sweeteners, *Food Trade Rev.* **64**, 75.
- Hattori, K. and T. Suzuki (1993), Production of Erythritol and Its Conversion to D-Mannitol Production by n-Alkane-grown *Candida zeylanoides*, *Agr. Biol. Chem.* **38**, 581-586.
- 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.
- Marina, A. Y., Aoki, G. M. Pastore, and Y. K. Park (1993), Microbial Transformation of Sucrose and Glucose to Erythritol, *Biotechnol. Lett.* **15**, 383-388.

8. Hajny, G. J., J. H. Smith, and J. C. Garver (1964), Erythritol Production by a Yeast-like Fungus, *Appl. Microbiol.* **12**, 240-246.
9. 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.
10. Chio, 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.
11. Yang, S. W., J. H. Seo, and Y. W. Ryu (2000), Development of Osmotolerant Mutant, *Candida magnoliae* M26 and the Determination of the Optimum Concentrations of Carbon and Nitrogen Sources to improve Erythritol Yield, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(6), 566-572.
12. Yoshihiko, H., I. Keisuke, E. Satoshi, and I. Todayuki (1999), High-Level Production of Erythritol By Strain 618A-01 Isolated from Pollen, *J. Biosci. Bioeng.* **87**(5), 630-635.
13. Lin, S. J., Chiou-Yen Wen, Jian-Ching Liau, and Wen-Shen Chu (2001), Screening and Production of Erythritol by Newly Isolated Osmophilic Yeast-like Fungi, *Proc. Biochem.* **36**(12), 1249-1258.