

*Candida magnoliae*의 발효 조건이 erythritol의 생산에 미치는 영향

최정현¹ · 김명동¹ · 서진호¹ · 안장우*

¹서울대학교 식품공학과 및 농업생물신소재 연구센터, 청강문화산업대학 식품생명과학과

Effects of Fermentation Conditions on Production of Erythritol by *Candida magnoliae*

Jung-Hyun Choi¹, Myoung-Dong Kim¹, Jin-Ho Seo¹ and Jang-Woo Ahn*

¹Department of Food Science and Technology and Research Center for New Biomaterials in Agriculture, Seoul National University

Department of Food and Biotechnology, Chungkang College of Cultural Industries

This study was carried out to examine the effects of fermentation conditions on the production of erythritol by osmophilic yeast *Candida magnoliae*. It was found that sucrose was superior to glucose as carbon source and 109 g/L erythritol was produced from 400 g/L sucrose. When yeast extract was used as nitrogen source, maximum values of yield and productivity for erythritol were obtained at 15 and 20 g/L of yeast extract, respectively. A mixture of 15 g/L yeast extract and 3 g/L ammonium phosphate allowed more efficient utilization of sucrose and hence resulted in 149 g/L of erythritol, 0.37 g erythritol/g sucrose of erythritol yield and 0.78 g/L·hr of erythritol productivity. A batch fermentation supplemented with 40 g/L KCl resulted in an erythritol concentration of 167 g/L and an erythritol yield of 0.42 g erythritol/g sucrose.

Key words: erythritol, *Candida magnoliae*

서 론

최근 건강식품에 대한 사회적 관심이 높아지면서 설탕 대체 기능성 감미료를 이용한 식품의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 대부분의 이런 감미료들은 미생물에 의하여 생산되고 있는데 이는 다른 동, 식물에 의한 생산보다 경제성이나 효율성 등에서 큰 이점을 가지고 있다⁽¹⁾. 미생물에 의하여 생산이 보고된 건강감미료로는 올리고당, xylitol과 erythritol 등이 있다. Erythritol은 설탕의 70~80% 감미도를 갖는 4탄당의 당알콜로서 C₄H₁₀O₄의 화학구조를 가지고 있다⁽²⁾. Erythritol은 자연계에 소량이지만 널리 존재하며 버섯류, 이끼류 및 발효식품 등에도 함유되어 있다. 또한 식물뿐만 아니라 포유동물의 혈청과 뇨 등에도 함유되어 있다⁽³⁾. Erythritol은 설탕에 가까운 감미도를 가지면서 인체 내에서는 에너지원으로 거의 이용되지 않고 배설되며, 산과 알칼리 등에도 비교적

안정하여 각종 가공식품에 널리 이용될 수 있다. 또한 충치균에 의하여 전혀 이용되지 않고, 다른 당알콜보다 설사를 일으키는 경우가 적으며, 저 칼로리이기 때문에 감미료로서 유망하다^(2,3). Erythritol의 생산을 위해서는 추출법, 화학합성법 및 발효법이 있다. 이중 추출법은 과일이나 채소 등의 자연상태에서 극히 미량만으로 존재하기 때문에 산업적으로 경제성이 없다. 화학합성법은 원료물질이 고가이기 때문에 경제성이 없어 대량생산에 이용되지 못하고 있다⁽⁴⁾. 현재로서는 유일하게 미생물발효에 의한 당알콜생산 공정개발이 1990년 일본 일연화학에 의해 처음으로 산업화되었고, 그 후 미생물을 이용한 erythritol의 생산에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 시장규모도 확대되고 있다.

생물공정에 의한 erythritol의 생산은 주로 효모를 이용하고 있는데, 지금까지 보고된 효모는 *Torula magnoliae*, *T. veratilis*⁽⁵⁾, *Trichosporon* sp⁽⁶⁾, *Candida* sp⁽⁷⁾ 및 *Aureobasidium*⁽⁸⁾ 등이 있다. 최근의 연구는 기존의 erythritol의 생산 균주의 개선 노력과 함께 수율과 생산성의 향상, 내당성 및 부산물의 비율 등의 개선을 위한 연구가 진행되고 있는 추세이다^(6,7,9,10).

본 연구에서는 벌집에서 선별된 *Candida* 균주⁽⁷⁾를 이용한 erythritol의 발효생산에서 erythritol의 생산수율을 향상시킬 목적으로 배지성분인 탄소원과 질소원, 배지의 pH 및 삼투압이 erythritol의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

*Corresponding author : Jang-Woo Ahn, Department of Food Science and Biotechnology, Chungkang College of Cultural Industries, Haewol-li San 37, Majang-myun, Icheon, Kyonggi-do 467-810, Korea
 Tel: 82-31-639-5902
 Fax: 82-31-637-9696
 E-mail: jwahn@chungkang.ac.kr

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용한 균주는 경기도 일대의 벌집에서 선별하였으며⁽⁷⁾, *Candida magnoliae*로 동정되었다.

배지 및 배양조건

균주는 yeast extract(Difco, USA) 10 g/L, bactopectone(Difco, USA) 20 g/L, agar(Difco, USA) 10 g/L, 포도당(Sigma, USA) 20 g/L가 포함된 YPD 배지(pH 5.2)를 이용하여 4°C에서 보관하였다. 발효조 배양을 위한 전배양은 10 g/L yeast extract, 20 g/L bactopectone의 YP 배지에 100 g/L 포도당을 첨가된 배지에 균주를 백균이로 접종하여 26°C에서 12시간 동안 실시하였다. 발효조 배양에 사용된 배지는 탄소원으로 포도당 또는 sucrose 400 g/L, 질소원으로 yeast extract 15~30 g/L을 사용하였다. 경우에 따라서, YP 배지에 polypeptone 또는 casamino acid 20 g/L를 질소원으로 첨가하였다. 발효조를 배양을 위하여 실험실 규모의 발효조(한국발효기, 인천)를 이용하여 1리터의 조업부피로 배양하였다. 배양온도는 26°C, 발효기의 교반속도는 700 rpm, 공기는 1 vvm으로 주입하였고, 배양기간 동안 pH는 6.7로 유지하였다. 소포제로 Antifoam 289(Sigma, USA)를 사용하였다.

균체 농도 측정

균체 농도는 채취한 배양액을 적당한 배율로 희석하여 spectrophotometer(UV-2201, Shimadzu, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(Abs₆₀₀)를 측정하였다. 흡광도와 건조균체량에 대한 상관관계는 다음과 같다.

$$\text{Dry cell weight (g/L)} = \text{Abs}_{600} \times 0.15 \quad (r^2 = 0.99)$$

당알콜과 당의 정량

채취한 균체배양액을 10,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 얻은 상정액을 각 당의 농도가 40~50 g/L정도 되게 희석한 후 Carbohydrate Analysis column(Waters, USA)이 장착된 HPLC(Knauer, Germany)를 이용하여 정량하였다. 이동상으로 3차 증류수와 acetonitrile을 15:85로 혼합하여 2 mL/min의 유속으로 흘러주었으며, RI 검출기를 이용하여 실온에서 분석하였다. 포도당은 필요에 따라 glucose kit(영동제약)을

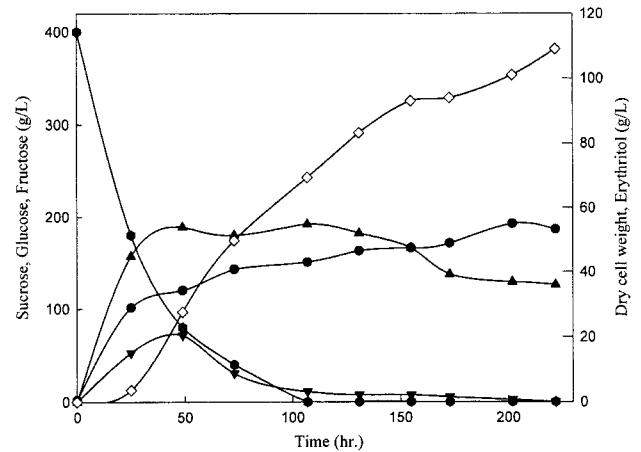


Fig. 1. Time courses of erythritol production by *Candida magnoliae* grown in the medium with an initial sucrose concentration of 400 g/L at pH 6.7 and 26°C.

●: Dry cell weight (DCW), ◇: Erythritol, ▲: Glucose, ▼: Fructose, ■: Sucrose.

사용하여 분석하였다. Erythritol 수율(g/g)은 소모된 기질에 대하여 생성된 erythritol의 양의 비율로 정의하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 종류 및 농도에 따른 영향

포도당과 sucrose가 각각 400 g/L 포함된 배지에서 배양한 실험결과는 Table 1과 같다. 질소원으로 yeast extract만을 사용했을 때와 yeast extract와 casamino acid를 함께 사용했을 때, 각각의 경우에서 모두 탄소원으로 포도당을 사용한 경우보다 sucrose를 사용한 경우에 erythritol의 농도, 수율 및 생산성이 증가하였으며, 또한 기질도 더 많이 소모하였다. 즉, 포도당을 기질로 사용할 경우, 당의 소모속도가 느리고 또한 잔당의 양이 많아 경제성을 고려한다면 포도당보다 sucrose 400 g/L과 yeast extract를 이용하는 것이 유리한 것으로 판단된다. Yeast extract를 질소원으로 첨가하였을 경우에 erythritol의 수율과 생산성이 높았기 때문에 탄소원으로 sucrose를, 질소원으로 yeast extract를 질소원으로 사용하였다. Sucrose 400 g/L와 yeast extract 20 g/L를 첨가하여 발효조 배양을 실시한 결과, 약 114 g/L의 erythritol을 얻을 수 있었다(Fig. 1).

Table 1. Effects of carbon sources on cell growth and erythritol production by *Candida magnoliae* at 26°C and pH 6.7

Initial substrate concentration (g/L)		Erythritol concentration (g/L)	Yield (g erythritol/g substrate consumed)	Productivity (g/L · hr)
Glucose 400	Y.E. ¹⁾ 15,	19.6	0.16	0.12
	C.A. ²⁾ 20			
	Y.E. 20	38.4	0.22	0.35
Sucrose 400	Y.E. 15,	69.8	0.21	0.42
	C.A. 20			
	Y.E. 20	113.9	0.37	0.51

¹⁾Y.E.: Yeast extract.

²⁾C.A.: Casamino acid.

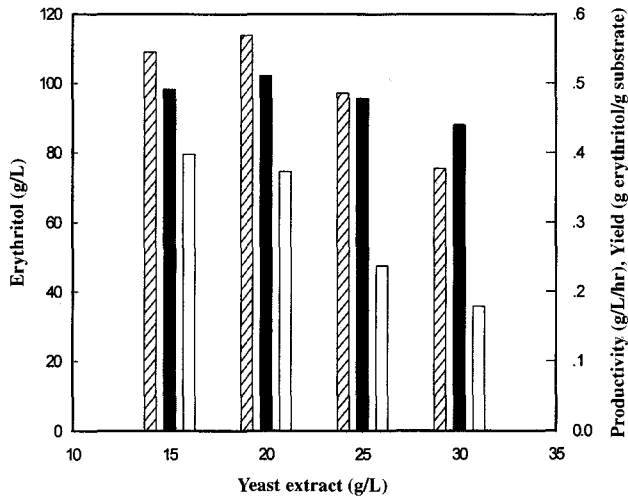


Fig. 2. Effects of yeast extract on erythritol concentration, yield and productivity by *Candida magnoliae* grown at pH 6.7 and 26°C.

▨: Erythritol, ■: Productivity, □: Yield.

Yeast extract의 영향

Erythritol 생산에 필수적인 것으로 추정되는 NADPH는 pentose phosphate pathway로부터 생산되는데, 아미노산의 합성에도 필요한 NADPH는 영양배지보다 최소배지에서 더 많이 생산된다⁽¹¹⁾. 따라서, 아미노산의 공급을 제한하면 NADPH의 증가에 의해 erythritol 생산도 증가할 것으로 판단되어 배지로부터 casamino acid를 제외하고 yeast extract만을 질소원으로 하였다. Sucrose 400 g/L를 기준으로 하여 yeast extract를 각각 15, 20, 25 또는 30 g/L의 농도로 첨가한 배지로 발효실험을 하였다. 실험결과, 생산된 erythritol의 농도는 yeast extract 20 g/L에서 제일 높았고, 25와 30 g/L 농도에서는 감소되었다. Yeast extract 15 g/L일 때 erythritol 수율은 소모한 sucrose에 대하여 0.40 g erythritol/g sucrose로 가장 높았다. 실험결과를 종합하여 yeast extract 첨가량에 따른 erythritol의 농도와 수율 및 생산성을 Fig. 2에 표시하였다. Yeast extract가 15 g/L의 농도로 첨가된 경우 생산된 erythritol 농도가 yeast extract 20 g/L 경우보다 낮았다. 반면에 yeast extract 15 g/L일 때의 배양액 중의 sucrose 농도는 20 g/L 첨가된 배양액 중의 sucrose 농도보다 높았다. 이러한 사실은 균체에 의한 탄소원의 소모 및 이에 따른 균체의 성장과 erythritol 생산에서 탄소원과 질소원의 비(C/N ratio)가 중요한 역할을 하는 것으로 판단할 수 있는 근거로서 사료되었다. 사실로 보아 yeast extract 15 g/L일 때의 erythritol 농도가 20 g/L일 때 보다 낮은 것은 배양액 중의 탄소원인 sucrose를 충분히 더 이용하지 못했기 때문으로 판단된다.

김 등⁽¹¹⁾은 *Torula sp.*를 이용한 erythritol 발효생산 공정에서 최적의 sucrose 농도와 yeast extract 농도를 결정한 바 있다.

무기질소원의 영향

Yeast extract 15 g/L를 첨가하였을 때, erythritol 수율은 가장 높았으나(0.40 g erythritol/g sucrose) 생성된 erythritol의 양이 적었는데, 이는 질소원의 부족으로 세포성장이 억제되

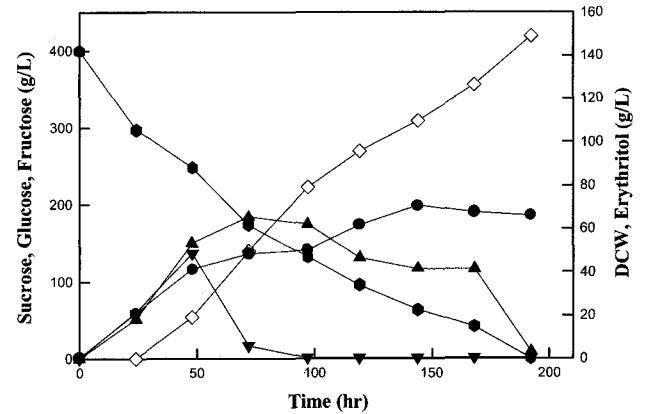


Fig. 3. Time courses of erythritol production by *Candida magnoliae* grown with an initial sucrose concentration 400 g/L, yeast extract 15 g/L and ammonium phosphate 3 g/L at pH 6.7 and 26°C.

●: Dry cell weight (DCW), ◇: Erythritol, ▲: Glucose, ▼: Fructose, ■: Sucrose.

었기 때문인 것으로 추정되었다. 이를 보완하기 위해, casamino acid, malt extract 및 polypeptone 등을 이용한 예비실험에서 가장 우수한 결과를 보인 무기질소원인 ammonium phosphate를 3 g/L의 농도로 첨가하여 배양한 결과 0.37 g erythritol/g sucrose의 수율로 149 g/L의 erythritol을 생산할 수 있었다(Fig. 3). 이 때의 수율은 yeast extract만을 주입했을 때 보다 낮았으나 sucrose 이용이 증가됨에 따라 생산된 erythritol의 양이 늘어 생산성은 오히려 0.78 g/L·hr로 증가하였다.

고 등⁽¹²⁾은 *C. magnoliae* 변이주를 이용한 erythritol 생산공정에서 전분가공 공정의 부산물로 생성되는 LSW와 CSL를 질소원으로 이용하여 균체성장을 약 50%이상 증가시킨 바 있다.

삼투압의 영향

미생물을 이용한 erythritol 생산공정에서 염의 첨가로 인한 삼투압의 증가가 erythritol 생산성을 증가시킨다는 사실이 보고된 바가 있다⁽⁹⁾. 또한 배양액에 첨가된 염의 종류는 호삼투압성 효모의 염에 대한 내성정도를 결정한다는 보고도 있다⁽¹⁰⁾. 본 연구에서는 KCl을 이용한 고삼투압 배지에서의 발효특성을 조사하여 erythritol의 생산수율을 높이기 위한 연구를 수행하였다.

KCl 첨가 농도가 erythritol의 생성에 미치는 영향과 KCl의 최적 농도를 알아보기 위해 배지에 100 g/L의 sucrose와 KCl을 10~40 g/L가 되도록 각각 첨가한 후에, 진탕배양기를 이용한 회분식 배양실험을 하였다. KCl을 10, 20, 30, 40 g/L 첨가한 배지에서 erythritol의 수율은 각각 0.27, 0.23, 0.30, 0.56 g erythritol/g sucrose이었다(Fig. 4). 즉, 배지의 삼투압이 증가할수록 더 많은 erythritol이 생성되었으며, KCl의 농도가 40 g/L일 때 erythritol의 생산에 가장 유리하였다.

KCl 첨가에 따른 발효기 배양 특성을 알아보기 위해 기질로 sucrose를 400 g/L로 사용하고 플라스크 배양에서 가장 높은 수율을 보인 KCl 40 g/L 첨가구와 KCl 20 g/L 첨가구로 나누어 26°C, 700 rpm으로 발효기 배양을 수행하였다.

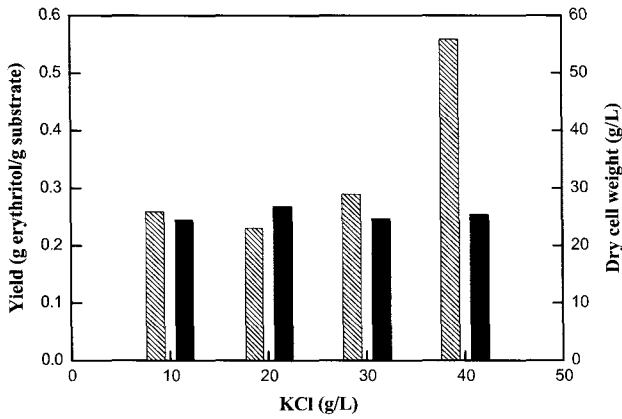


Fig. 4. Effects of KCl concentrations on erythritol yield and dry cell weight of *Candida magnoliae*.
 ▨ : Dry cell weight, ■ : Yield.

을 보면 KCl 20 g/L 첨가구와는 달리 erythritol은 발효 초기부터 생성되었다. Erythritol 생성량은 167 g/L로 증가되었고 수율은 0.42 g erythritol/g substrate로 향상되었다. Erythritol의 농도는 기질인 sucrose가 거의 소모된 다음인 150시간 이후에 최고치를 나타내었다. 이후에는 erythritol의 농도가 더 이상 증가하지 않았는데 이것은 기질인 sucrose가 분해된 후 포도당과 과당 같은 잔당을 소비하지 못했기 때문으로 사료된다. 이러한 결과는 *Torula sp.*를 이용한 erythritol 공정에서 고농도의 KCl이나 NaCl을 첨가하였을 때, 균체성장은 감소하지만 erythritol 생산은 증가한다는 김 등⁽⁹⁾의 보고와 상응하는 결과였다. 또한 오 등⁽¹³⁾은 *Torula sp.*를 이용한 erythritol 유가식 배양공정에서 초기 포도당 농도와 유가식 배양기간 동안 포도당의 주입속도를 조절하여 48%의 수율과 약 2.3 g/L · hr erythritol 생산성을 획득하였다.

요 약

내삼투압성 효모인 *Candida magnoliae*의 발효조건이 erythritol의 생산에 미치는 영향에 대해 조사하였다. 탄소원으로는 포도당보다 sucrose가 우수하였으며, sucrose 400 g/L를 주입하였을 때 109 g/L의 erythritol이 생산되었다. 질소원으로 yeast extract을 사용했을 때, 질소원의 농도가 낮을수록 높은 erythritol 수율을 획득할 수 있었으며, 15 g/L의 yeast extract와 함께 무기질소원인 ammonium phosphate를 3 g/L의 농도로 첨가하므로써, 수율 0.37 g/g, 0.78 g/L · hr의 생산성으로 149 g/L의 erythritol을 얻을 수 있었다. KCl을 이용한 높은 삼투압 조건에서의 플라스크 배양 결과, 40 g/L의 농도로 첨가한 경우가 erythritol 생산에 가장 유리하였으며, 이와 같은 실험결과를 발효기 배양에서 검증한 결과, KCl을 40 g/L로 첨가하여 167 g/L의 erythritol을 0.42 g erythritol/g sucrose의 수율로 생산할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 신화학공정개발사업의 지원으로 진행되었으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

문 헌

1. Lee, W.J. and Seo, J.H. Research status and prospect of fermented sweeteners. *Bioindustry* 8: 38 (1995)
2. Roper, H. and Goossens, J. Erythritol, a new raw material for food and on-food applications. *Starch/Stärke* 45: 400-405 (1993)
3. Kawanabe, J., Hirasawa, M., Takeuchi, T., Oda, T. and Ikeda, T. Non-cariogenicity of erythritol as a substrate. *Caries Res.* 26: 358-362 (1992)
4. Goossen, J. and Roper, H. Erythritol, a new sweetener. *Confect. Product* 62:6-7 (1996)
5. Onishi, H. Production of polyalcohols by yeasts. *Hakko Kyokai-shi* 25: 495-506 (1967)
6. Park, J.B., Seo, B.C., Kim, J.R., Pek, U.H. and Park, Y.K. Effects of glucose concentration on the production of erythritol by *Trichosporon sp.* *J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 543-546 (1998)
7. Kim, S.Y., Park, S.S., Jeon, Y.J. and Seo, J.H. Analysis of fermentation characteristics for production of erythritol by *Candida sp.* *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 935-939 (1996)

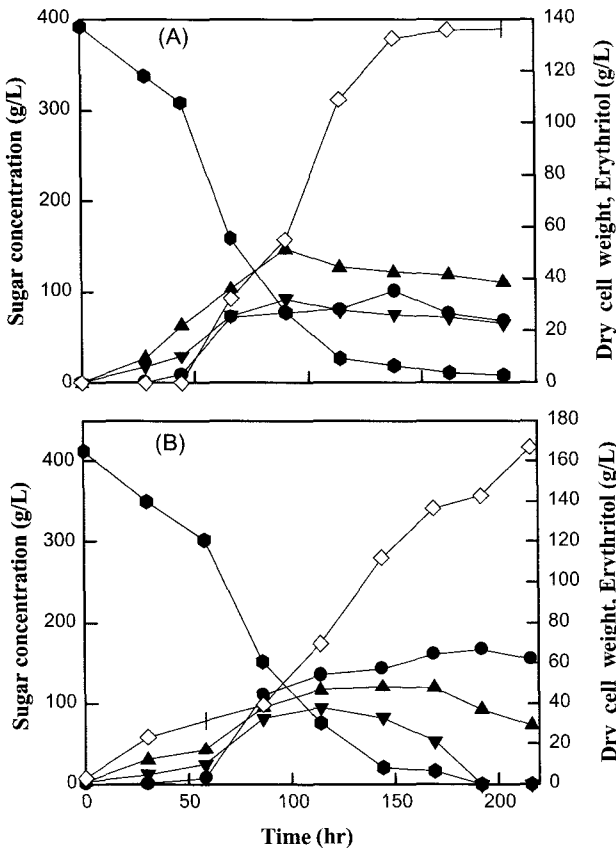


Fig. 5. Time courses of cell growth and erythritol production by *Candida magnoliae* supplemented with 20 g/L (A) and 40 g/L of KCl (B).
 ●: Dry cell weight (DCW), ◇: Erythritol, ▲: Glucose, ▼: Fructose, ■: Sucrose.

KCl 20 g/L를 첨가한 배지에서의 발효양상(Fig. 5A)을 보면 50시간까지 erythritol은 생성되지 않고 단지 기질의 분해만을 보였고 100시간쯤에 이르러서 erythritol이 급격히 생성되었다. 최종 erythritol의 생성량은 136 g/L였으며, 수율과 생산성은 각각 0.34 g erythritol/g substrate, 0.86 g/L · hr으로 나타났다. KCl을 40 g/L로 첨가한 배지에서의 발효양상(Fig. 5B)

8. Ishizuka, H., Wako, H., Kasumi, T. and Sasaki, T. Breeding of a mutant of *Aureobasidium* sp. with high erythritol production. *J. Ferment. Bioeng.* 68: 310-314 (1989)
9. Kim, K.A., Noh, B.S., Kim, S.Y. and Oh, D.K. Effect of osmotic pressure of salts on growth of *Torula* sp. and erythritol production. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 91-95 (1999)
10. Kim, K.A., Noh, B.S., Lee, J.K., Kim, S.Y., Park, Y.C. and Oh, D.K. Optimization of culture conditions for erythritol production by *Torula* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 69-74 (2000)
11. Gancedo, J.M. and Lagunas, R. Contribution of the pentose-phosphate pathway to glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: A critical analysis on the use of labeled glucose. *Plant Sci. Lett.* 1: 193-200 (1973)
12. Koh, E.S., Moon, K.H., Han, K.C., Ryu, Y.W., and Seo, J.H. Optimization of culture conditions and nitrogen sources for production of erythritol by *Candida magnoliae*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 349-354 (2000)
13. Oh, D.K., Cho, C.H., Lee, J.K. and Kim, S.Y. Increased erythritol production in fed-batch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26: 248-252 (2001)

(2003년 3월 7일 접수; 2003년 6월 16일 채택)