

산업용 배지를 이용한 *Candida magnoliae*의 2단계 유가식 배양에서 에리스리톨의 생산

박 선 영 · ¹서 진 호 · † 유 연 우
아주대학교 분자과학기술학과, ¹서울대학교 식품공학과
(접수 : 2003. 2. 4. 게재승인 : 2003. 7. 4.)

Two-Stage Fed-Batch Culture of *Candida magnoliae* for the Production of Erythritol using an Industrial Medium

Sun-Young Park, Jin-Ho Seo¹, and Yeon-Woo Ryu†

Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

(Received : 2003. 2. 4. Accepted : 2003. 7. 4.)

Experiments were carried out to select an industrial nitrogen source and optimize erythritol production by *Candida magnoliae* in fed-batch culture. Among the industrial nitrogen sources tested, light steep water (LSW) was found to be the best nitrogen source for producing erythritol, based on erythritol yield and raw material price. The maximum erythritol concentration obtained a 131.6 g/L, with a 52.6% yield and 0.52 g/L-hr productivity from a 250 g/L glucose and 43.3 mL/L LSW in batch culture. Two-stage fed-batch culture was chosen to improve the volumetric productivity and the yield of erythritol. High cell density culture in cell growth stage was achieved by batch type culture containing 100 g/L glucose and 500 mL/L LSW. The cell concentration was 71.0 g/L after 23 hours of culture. Erythritol productivity was decreased by increasing glucose concentration in the production stage. But 37.3% of the maximum erythritol yield was obtained with 185.5 g/L of erythritol and 1.66 g/L-hr of productivity when 820 g of glucose powder was directly added to a concentration of 450 g/L glucose in production stage.

Key Words : Light steep water, two-stage fed-batch culture, *Candida magnoliae*, erythritol

서 론

Erythritol은 자연계에서 과일(1), 버섯(2), 발효식품(1) 및 포유동물의 체액(3) 등에 매우 낮은 농도로 존재하는 4탄당의 당알콜로서 설탕의 70~80% 당도를 갖는 천연 감미료이다(4). 이러한 erythritol은 일부 미생물들이 삼투압이 높은 환경에서 세포내 삼투압 조절물질 (compatible solute)로 pentose phosphate pathway를 통하여 생성한다(5, 6).

Erythritol의 산업적인 생산을 위한 발효조건과 방법에 대한 연구는 많이 이루어져 있지 않다. 즉 erythritol 생산을 위한 발효조건에 대한 연구에서 삼투압의 영향과 발효를 위한 최적 온도 및 pH 조건에 대한 연구가 일부 수행되었다(7-11).

또한 erythritol 발효에서 가장 중요한 통기조건은 최대의 호기조건을 유지해 주어야 한다고 알려져 있는데, 이는 통기가 충분하지 못할 경우에 에탄올과 glycerol 같은 부산물이 생성되는 경향이 있기 때문이다(10-12). 발효방법에 대한 연구에서는 erythritol의 생산성을 높이기 위한 two-stage 유가식 배양법이 연구되었다. 즉 Kim 등(8)은 osmophilic yeast인 *Trigonopsis variabilis*가 KCl보다 glucose에 의한 높은 삼투압 조건이 erythritol 생산에 더 유리하다는 것을 발견하고, 그 이 유가 glucose 배지에서 비성장속도와 세포농도가 더 높기 때문이란 점을 확인하였다. 따라서 세포농도를 높이기 위하여 낮은 농도의 glucose 배지에서 배양을 시작한 뒤 대수증식기 말기에 높은 농도의 당 용액을 첨가하여 삼투압을 높여 주는 two-stage 배양법을 통하여 erythritol의 생산성을 2배 증가시켰다고 보고하였다. 또한 Ryu 등(13)은 *Candida magnoliae*를 이용한 erythritol의 생산에서 고농도의 세포를 pH-stat 배양법에 의하여 얻은 다음에 glucose를 분말상태로 발효조에 첨가하여 높은 삼투압 조건을 제공한 결과 41%의

† Corresponding Author : Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

Tel : +82-31-219-2449, Fax : +82-31-216-8777

E-mail : ywryu@ajou.ac.kr

수율과 187 g/L의 농도로 erythritol을 생산하였으며, 이때의 생산성은 2.79 g/L-hr로 회분식 배양에 비하여 약 3배 증가되었다고 보고하였다. 한편 Oh 등(14)은 erythritol 생성 균주인 *Torula sp.*을 가지고 초기 300 g/L의 glucose와 phosphate source로 3.3 mM의 phytic acid가 첨가된 배지에서 배양하면서 초반에 80% glucose 용액을 공급해 줌으로써 일정시간 glucose 농도를 225 g/L로 유지시키는 방법으로 유가식 배양을 수행한 결과 lag time이 감소되었고, erythritol을 48%의 수율과 2.26 g/L-hr의 높은 생산성으로 얻을 수 있었다고 보고하였다.

실험실에서 연구용으로 사용되는 소규모의 발효배지는 대부분이 산업용 배지와 다르다. 이는 실험용으로 사용하는 배지성분의 가격이 매우 비싸기 때문에 산물의 생산원가 측면에서 배지의 가격이 차지하는 비중이 큰 경우에는 원하는 산물의 생산성을 유지하면서 값이 저렴한 배지를 이용하는 것이 매우 중요한 일이다. 따라서 산업용 배지의 선택에서 가장 중요한 점은 가격이 저렴하면서도 취급이 용이하고, 성분이 일정해야 하며, 연중 쉽게 구입이 가능해야 한다. 또한 배양 중에는 통기와 교반에 영향이 없고 부산물 생성이 적으면서 산물이나 균체를 고농도로 생산시킬 수 있어야 하며 산물의 추출 및 정제, 폐기물 처리에 어려움이 없어야 한다.

따라서 본 연구에서는 *C. magnoliae* M26에 의한 erythritol의 산업적인 생산을 위하여 고가의 yeast extract 대신에 저렴한 가격의 산업용 질소원을 선정하고, 이를 이용한 2단계 유가식 배양에서 erythritol의 생산에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에서 사용한 균주는 꿀 벌집 (honey comb)으로부터 분리하여 동정한 *Candida magnoliae* JH(10, 15)의 염내성 돌연변이 균주 M26을 이용하였다(9).

배양배지

접종용 균주의 배양은 20 g/L glucose, 10 g/L yeast extract 및 10 g/L peptone이 포함된 배지 30 mL를 250 mL baffled flask에 넣고 멸균한 후에 접종하여 28°C에서 200 rpm으로 24시간 진탕 배양하여 사용하였다. 모든 배양에서의 접종량은 5% (v/v)로 하였다. Erythritol 생산을 위한 기본 발효배지로는 250 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하였다.

산업용 질소원의 선정

발효조를 이용한 회분식 배양은 기본 발효배지 1.2 L를 2.5 L 발효조 (KoBioTech, Korea)에 넣고 멸균한 후 28°C에서 500 rpm의 교반속도와 1.0 vvm의 통기조건에서 실험을 수행하였다. 배지의 초기 pH는 1M NaOH를 이용하여 7.0으로 조절하였으며 foam의 조절은 Neorin을 3배 희석하여 사용하였다. 산업용 유기질소원에 대한 영향은 옥수수 전분의 가공과정 중에서 부산물로 생성되면서 가격이 저렴한 light-steep water (LSW: 16.5 Brix, 두산, 한국), 이를 농축한 corn-steep liquor (CSL: Sigma, USA) 및 CSL를 powder로 제

조한 corn-steep powder (CSP: Marco Co. USA)와 urea (Sigma, USA)에 대하여 검토하였다. 첨가량은 yeast extract 5 g/L에 대응하는 총 질소함량을 기준으로 결정하였다.

2단계 유가식 배양

2단계 유가식 배양은 3.3 L 발효조 (NBS Bioflo III, USA)를 이용하여 수행하였다. 먼저 세포성장 단계에서는 세포성장 배지 (glucose 100 g/L와 LSW 500 mL/L) 1.5 L를 발효조에 넣고 28°C와 1.0 vvm의 통기조건에서 용존산소량이 20%가 되도록 교반속도를 AFS program (NBS, USA)에 의하여 200 rpm에서 1000 rpm까지 단계적으로 증가하도록 하면서 회분식 방법으로 배양하였다. 이때 배지의 초기 pH는 1 M NaOH 또는 28%의 암모니아 용액으로 조절하였으며, antifoam은 Neorin을 3배 희석하여 사용하였다. Erythritol의 생산단계에서는 glucose를 powder 상태로 발효조에 직접 공급하여 높은 삼투압 조건을 제공하였으며, 배양이 끝난 후 최종 배양 부피는 약 1.9 L이 되도록 하였다.

분석방법

Erythritol의 분석은 NH_2 column (Shisheido, Japan)을 이용하여 HPLC (Waters, USA)에서 RI Detector로 측정하였다. 이때 용매는 물과 acetonitrile을 20 : 80으로 혼합하여 사용하였고 유속은 1.4 mL/min, column의 온도는 40°C로 하였다. 배지 내 glucose의 농도는 당알콜 분석과 같은 조건으로 HPLC를 사용하여 측정하였다. 또한 HPLC로 정확한 glucose의 정량이 불가능한 경우 Glucose Analyzer (YSI, SIDEKICK 1500, USA)를 사용하여 분석하였다.

세포농도는 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu, Japan)를 사용하여 620 nm에서 optical density (O.D)를 측정하였다. 건조 균체량은 흡광도와 건조 균체량 (dry cell weight)의 표준곡선에 의하여 건조 균체량 (DCW : g/L)으로 환산하였다. 이때 표준곡선은 일정 농도 비율의 균체에 대한 흡광도를 측정 후 이 용액 10 mL를 0.45 μm membrane filter로 여과한 다음 진공건조기 (80°C의 50 mmHg)에서 48시간 건조시켜 균체량을 측정하였다. 실험결과 *C. magnoliae*의 변이균주 M26은 1.0 O.D가 0.25 g/L의 건조 균체량 (DCW)에 해당되었다.

결과 및 고찰

산업용 질소원의 선정

Erythritol 생산의 산업화를 위해서는 고가의 질소원인 yeast extract를 대신할 수 있는 저렴한 가격의 산업용 배지를 이용해서 생산원가를 낮추는 것이 필요하다. 이를 위하여 산업용 발효배지의 질소원으로 널리 이용하는 LSW, CSL, CSP 및 urea를 이용한 erythritol 발효를 수행하였다. 실험은 기본 발효배지에서 yeast extract 5 g/L에 들어있는 총 질소함량을 기준으로 산업용 질소원을 이용하여 실험을 수행한 결과를 Table 1에 나타내었다. 실험결과에서 CSL, CSP, LSW를 질소원으로 사용하였을 경우에 사용한 glucose에 대한 erythritol의 수율은 각각 35%, 35%, 53%로 LSW에서의 수율은 yeast extract보다 약간 높았다. 반면에 생산성은 각각 0.59 g/L-hr,

0.56 g/L-hr, 0.52 g/L-hr로서 yeast extract에서 보다 낮았다. 이는 당알콜 생산에서 균체의 성장이 억제되어야 수율이 증가하는데, CSL과 CSP의 경우 총 질소함량이 3.36%와 6.72% (w/w)로 yeast extract의 총 질소함량 9.18% (w/w)보다 낮지만 lactic acid, fat, fiber, vitamin, amino acid 및 mineral들이 풍부하게 존재하여 세포의 성장이 촉진되므로 최종 세포농도는 증가하는 반면에 erythritol의 생성은 감소되었다. Urea를 질소원으로 사용하는 경우에는 세포성장이 충분히 이루어지지 않기 때문에 240시간 배양 후에도 glucose가 58% 남았으며, 이때 생성된 erythritol의 농도는 18.6 g/L로 매우 낮았다. 따라서 LSW의 가격이 다른 질소원들에 비하여 매우 저렴하고 erythritol의 수율과 생산성이 yeast extract와 유사함으로 LSW를 산업용 질소원으로 선정하였다.

Table 1. Comparison of various nitrogen sources on erythritol production with *Candida magnoliae* M26

Nitrogen-source	N-Conc.	DCW (g/L)	Erythritol		
			Conc. (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L-hr)
Yeast extract(Difco)	5 g/L	53.6	125.5	50	0.65
CSP(Marco)	6.83 g/L	60.9	87.2	35	0.56
CSL(Sigma)	13.7 mL/L	62.4	85.5	35	0.59
LSW(Doosan)	43.7 mL/L	45.9	131.6	53	0.52
Urea(Sigma)	0.98 g/L	19.8	18.6	18	0.08

2단계 유가식 배양을 위한 고농도 세포배양

2단계 유가식 배양에서 먼저 고농도의 균체를 얻기 위한 세포성장 단계에서는 탄소원과 질소원의 비가 매우 중요하다. 즉 Carbon/Nitrogen (C/N, w/w) ratio가 낮을 경우 세포의 증식과 생명유지에 필요한 에너지의 결핍으로 세포성장의 저해가 일어날 수 있으며, 그와 반대로 C/N ratio가 높을수록 단백질과 핵산의 합성에 필요한 질소원의 결핍으로 고농도의 균체를 얻을 수가 없다. 따라서 고농도의 균체를 얻기 위한 최적의 C/N ratio를 결정하기 위하여 glucose 10 g/L를 탄소원으로 하여 C/N ratio를 1.0~3.0의 범위에서 LSW를 질소원으로 첨가한 배지 1.5 L을 3.3 L jar fermentor에 넣고 배지의 초기 pH를 7.0으로 조절한 후에 28℃에서 500 rpm과 1.0 vvm의 조건으로 실험을 수행하였다. 이때의 C/N ratio는 glucose에 포함된 탄소원자의 무게를 LSW에 존재하는 질소원자의 무게로 나눈 값이다. 실험결과 (Table 2)에서 C/N ratio가 1.7 일 때 가장 높은 84%의 세포 수율로 8.18 g/L의 균체를 얻을 수 있었다. 반면에 C/N ratio가 2 이상일 경우에는 erythritol이 생성됨으로 인하여 균체 생성 수율과 생산성이 점차 낮아짐을 알 수 있었다. 따라서 glucose와 LSW를 성장배지로 하여 고농도 균체를 얻기 위한 C/N ratio는 1.7로 하였다.

2단계 유가식 배양에서 고농도 균체 배양을 위한 기질 공급 방법은 최대 세포농도에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 생산성에도 영향을 주기 때문에 매우 중요하다. 그러나 초기 세포성장 단계에서 질소원으로 쓰이는 LSW는 액상이며 총 질소함량이 1.06% (16 Brix)으로 매우 낮고 불용성 침전물이 많기 때문에 고농도 균체 배양에서 첨가하는 배지의 부피가 매우 커지게 될 뿐만 아니라 불용성 침전물에 의해 첨가 시

에 어려움이 따르며 고농도로 농축시켜 첨가할 수가 없다. 따라서 앞서 최적화 된 C/N ratio 1.7의 비율로 질소원인 LSW 500 mL/L를 fermenter에 먼저 넣은 후 100 g/L의 glucose를 함께 넣어 배양하는 회분식 방법과 glucose 농도가 최대 20 g/L이 되도록 glucose 용액을 각각 5번으로 나누어 공급하는 간헐적 첨가에 의한 배양을 수행하였다. 이때 간헐적 첨가에 의한 고농도 균체 배양에서 배지 내 glucose의 농도가 5 g/L이하가 될 때 glucose 용액을 첨가해 주었으며, fermenter 내에 공급된 glucose의 농도는 최종적으로 100 g/L이 되도록 하였다. 배지의 초기 pH는 1M NaOH로 7.0으로 조절하였으며, 배양은 28℃에서 1.0 vvm의 통기조건에서 교반속도를 변화시켜 용존산소량을 20%로 유지하였다. 회분식 배양의 경우 초기 배양부피를 1.5 L로 하였으며, 간헐적 첨가방법에 의한 배양의 경우에도 첨가하는 배지를 공급한 후의 최종 배양부피를 동일하게 1.5 L이 되도록 하였다.

Table 2. Comparison of growth kinetic parameters on various C/N ratio

C/N ratio	LSW conc. (mL/L)	X _m	Y _{X/S}	P	μ _{max}
1.0	87	6.75	0.70	0.52	0.26
1.5	58	8.15	0.82	0.68	0.30
1.7	50	8.18	0.84	0.63	0.31
2.0	43	7.14	0.77	0.55	0.31
3.0	26	5.18	0.53	0.37	0.24

* X_m : Maximum cell concentration (g-cell/L)

* Y_{X/S} : Cell mass yield (g-cell/g-glucose)

* P : Volumetric cell productivity (g-cell/L-hr)

* μ_{max} : Maximum specific growth rate (hr⁻¹)

Table 3. Comparison of growth kinetic parameters on various feeding methods of 100 g/L glucose for high density cell culture

	X _m (g/L)	Y _{X/S} (g/g)	P (g/L-hr)	Erythritol conc. (g/L)	Culture time (hr)
Batch	71.0	0.72	3.09	3.1	23
Intermittent	68.6	0.69	3.11	1.1	22
pH-stat*	76.0	0.76	3.62	0.0	21

* : Reference 13.

실험결과 (Table 3)에서 회분식 방법으로 배양한 결과 glucose는 23시간 만에 모두 소비되면서 71.0 g/L의 세포 농도를 얻을 수 있었으며, 이 때 균체 수율은 0.72 g-cell/g-glucose이고 생산성은 3.09 g/L-hr 이었다. Erythritol은 20시간이 경과된 후부터 생성되기 시작하였으며 최종 농도는 3.1 g/L 이었다. 간헐적 첨가방법으로 배양한 결과 glucose는 22시간이 경과된 후에 모두 소비되었으며 0.69 g-cell/g-glucose의 세포 수율과 3.11 g/L-hr의 생산성으로 68.6 g/L의 균체를 얻을 수 있었고, 1.1 g/L의 erythritol이 생성되었다. 회분식 배양에 비해 초기 glucose의 농도가 20 g/L로 낮아짐으로 인하여 세포의 적응시간이 짧아져 배양시간이 1시간 단축됨으로서 생산성은 더 높았다. 그러나 *C. magnoliae* M26이 당 내성 균주이므로 100 g/L 이하의 glucose 농도에서는 세포 성장에 큰 영향을 미치지 못하는 못하였다. 이러한 결과는 glucose와 yeast extract를 이용한 고농도 세포 배양에서 pH-stat에 의한 첨가방법으로 배양한 결과(13)와 비교하여 세

포의 수율과 생산성이 약간 낮은 편이지만, 앞서 언급한 액상배지인 LSW의 단점을 극복할 수 있으며 배양공정이 보다 간편해질 수 있기 때문에 2단계 유가식 배양에서 고농도 세포 배양은 회분식 배양법으로 결정하였다.

배지의 초기 pH 조절 방법에 따른 erythritol 생성의 영향

LSW는 옥수수로부터 전분 생산 과정에서 생성되는 부산물로서 약 1%의 phytic acid와 2%의 lactic acid를 함유하고 있다(16). 따라서 LSW의 초기 pH는 3.8이며 2단계 유가식 배양에서 LSW를 유기질소원으로 할 경우 *C. magnoliae* M26의 성장을 위한 최적 pH가 5~7(13)이므로 배지의 초기 pH를 6.5~7.0으로 조절하기 위하여 NaOH나 KOH를 사용하게 되면 LSW에 들어있는 phytic acid의 pH 완충작용으로 인하여 1M 이상의 농도가 필요하게 되고 Na⁺나 K⁺ 이온에 의한 이온강도의 증가로 세포의 외부 삼투압이 증가하게 된다. 따라서 2단계 유가식 배양에서 배지의 초기 pH를 NaOH를 사용하여 6.5로 조절하게 되면 생산단계에서 외부 삼투압을 높이기 위하여 첨가해 주는 glucose 이외에도 배지 내의 Na⁺ 이온이 염으로 작용, 외부 삼투압이 증가함으로써 erythritol 발효에 영향을 미칠 것으로 예상된다. 따라서 본 실험에서는 2단계 유가식 배양에서 초기 pH의 조절방법이 세포성장과 erythritol 생산에서 미치는 영향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 즉 배지의 초기 pH를 1 M의 NaOH 또는 28% 암모니아 용액으로 6.5로 조절하고 생산단계에서는 720 g의 glucose를 분말 형태로 공급하여 최종 glucose의 농도가 400 g/L이 되도록 실험한 결과를 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Effects of initial medium pH on cell growth and erythritol production in two-stage fed-batch culture

pH	Erythritol			DCW (g-cell/L)
	Erythritol conc. (g/L)	Y _{PS} (%)	P (g/L-hr)	
6.5 (1 M NaOH)	193.4	42.6	1.26	108.2
6.5 (25 mL A.W)	156.1	34.4	2.00	158.5
3.5 (No Control)	117.1	25.8	1.18	137.3

실험결과에서 NaOH 또는 암모니아 용액으로 pH를 조절한 경우에 세포농도는 각각 71.6 g/L과 70.5 g/L로 큰 차이가 없었다(Fig. 1, Fig. 2). 이는 NaOH로 pH를 조절한 경우에 Na⁺ 이온에 의한 이온강도가 증가할지라도 삼투압 내성이 우수한 *C. magnoliae* M26의 세포 성장에 큰 영향을 미치지 않았기 때문으로 사료된다. 그러나 생산단계에서는 glucose 만을 첨가하기 때문에 NaOH로 pH를 조절한 경우에는 질소원의 결핍에 의하여 세포성장이 낮아 최종 세포농도가 108.2 g/L 인 반면에 암모니아로 pH를 조절한 경우의 세포성장은 암모니아가 질소원으로 이용되므로 최종 세포농도가 158.8 g/L로 크게 증가하였다. 반면에 NaOH로 pH를 조절하는 경우에는 외부 삼투압의 증가에 의하여 erythritol의 생산은 193.4 g/L의 농도와 42.6%의 수율로 매우 우수하였으나, 세포성장의 저해로 인하여 glucose의 소비 속도가 낮아져 배양기간이 156 시간으로 길어져 생산성은 1.26 g/L-hr로 낮았다(Fig. 1). 반면에 암모니아 용액으로 pH를 조절한 경우에는 78 시간만

에 glucose를 모두 소비하면서 34.4%의 수율로 156.1 g/L의 erythritol을 생산하여 NaOH로 pH를 조절한 경우보다 낮았으나 생산성은 2.00 g/L-hr로 증가하였다(Fig. 2).

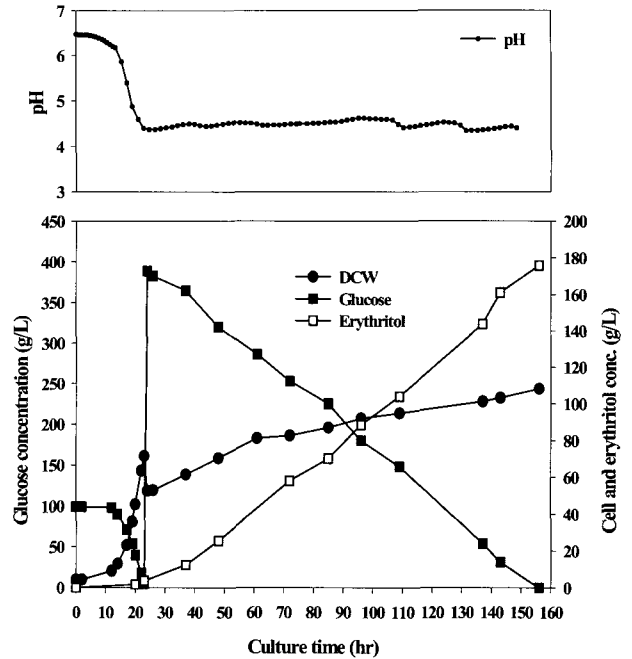


Figure 1. Profiles of cell, erythritol, glucose concentrations and pH during the two-stage fed-batch culture by *Candida magnoliae* M26. The initial pH of medium was adjusted 6.5 by 1M NaOH.

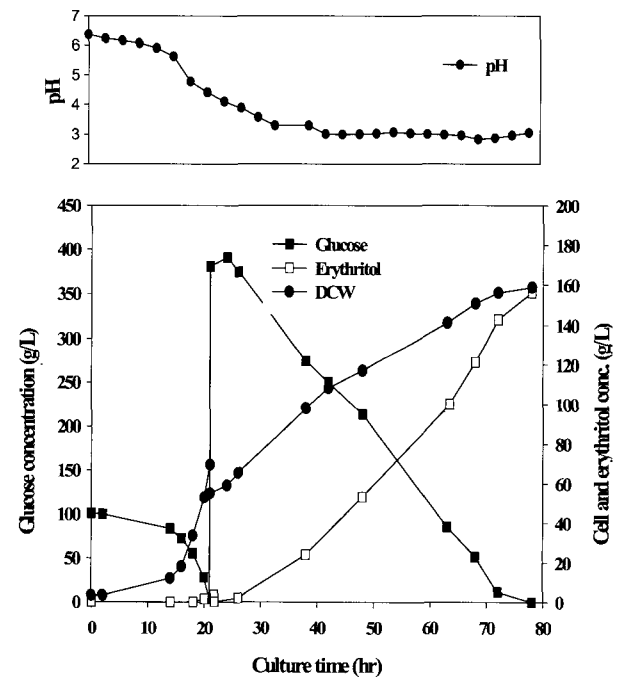


Figure 2. Profiles of cell, erythritol, glucose concentrations and pH during the two-stage fed-batch culture by *Candida magnoliae* M26. The initial pH of medium was adjusted 6.5 by 28% ammonia water.

이는 pH 조절을 위하여 첨가된 암모니아가 질소원으로 이용되어 세포성장이 계속되었기 때문에 생산단계에서 당에 의한 외부의 삼투압이 증가되었음에도 불구하고 glucose 소비 속도가 높아짐으로써 erythritol의 생산성이 향상된 것으로 사료되었다. Takeharu 등(17)은 유가식 배양에 의한 poly-D-3-hydroxybutyric acid의 생산에서 대수증식기의 초반에 5.8% 암모니아 용액을 첨가해 줌으로써 세포성장을 촉진시킬 수 있다고 보고하였으며, 이는 암모니아에 의한 세포성장이 촉진된 결과와 일치한다. 따라서 2단계 유가식 배양에서 erythritol의 생산성 향상을 위해서는 NaOH보다는 암모니아 용액으로 pH를 적절해야 될 것으로 판단되었다. 그러나 pH 조절을 위하여 첨가한 암모니아가 생산단계에서 질소원으로 이용되어 erythritol의 생산을 위해 첨가해준 glucose가 세포성장에 더 많이 이용됨으로서 erythritol의 수율은 낮아지게 되었다. 반면에 pH를 조절하지 않고 유가식 배양을 수행한 경우에 세포성장단계에서의 세포농도는 72.0 g/L로 큰 차이가 없었으나 생산단계에서의 erythritol 생산은 배지의 초기 pH를 6.5로 조절하는 경우보다 매우 낮았다.

2단계 유가식 배양의 생산단계에서 glucose 농도의 영향

Erythritol의 산업적인 생산을 위해서는 약 40% 이상의 수율과 2.0 g/L-hr의 생산성으로 180 g/L의 최종 erythritol 농도가 요구된다. 따라서 이러한 수율과 생산성을 얻기 위한 생산단계에서 최적의 glucose 첨가 농도를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 배지의 초기 pH는 28% 암모니아 용액으로 6.5로 조절하였으며, 2단계 유가식 배양은 먼저 회분식 배양을 통하여 고농도의 균체를 얻은 다음 분말형태의 glucose를 첨가하여 배지 내에 glucose 농도가 350~500 g/L이 되도록 하였다.

Table 5. Effect of glucose concentration on cell growth and erythritol production at the production stage of two-stage fed-batch culture

Final glucose conc. (g/L)	DCW (g/L)	Erythritol			Fermentation time(hr)
		Conc. (g/L)	Y _{P/S} (%)	P (g/L-hr)	
350 (426)*	155.7	137.3	32.2	2.02	68
400 (454)*	158.5	151.6	34.4	2.00	78
450 (497)*	135.6	185.5	37.3	1.66	112
500 (545)*	131.6	198.7	36.5	1.45	137

* Final glucose concentration during the two stage fed-batch culture (g-glucose/L)

실험결과 (Table 5)에서 660 g의 glucose를 첨가하여 배지 내의 glucose 농도가 350 g/L이 되도록 한 경우에 glucose는 배양 68시간만에 모두 소비되면서 137.3 g/L의 erythritol이 생성되었으며, 생산성은 2.02 g/L-hr로 매우 높았으나 수율은 32.2%로 매우 낮았다. 이때의 erythritol 수율은 2단계 유가식 배양 중에 첨가한 총 glucose 농도 (Table 5의 괄호에 표시한 값)인 426 g/L에 대한 값이다. 세포농도는 155.7 g/L로 매우 높았는데, 이는 pH 조절을 위하여 첨가해준 암모니아가 세포 성장을 위한 질소원으로 이용되었기 때문이다. 또한 생산단계에서 첨가해준 glucose의 양이 적어 세포에 가해지는 외부

삼투압이 크지 않기 때문에 탄소원인 glucose가 pentose phosphate cycle을 통하여 erythritol이 생성되는 flux보다는 세포 성장으로의 flux가 증가되었기 때문으로 판단된다. 따라서 외부 삼투압을 증가시키기 위하여 glucose 농도가 400 g/L이 되도록 720 g의 glucose를 첨가하여 실험을 수행하였다(Fig. 2). 실험결과에서 배양 78 시간 만에 glucose가 모두 소비되면서 34.4%의 수율과 2.00 g/L-hr의 생산성으로 156.1 g/L의 erythritol이 생성되었다. 이때 생성된 세포농도는 158.5 g/L로 350 g/L의 glucose로 첨가했을 때와 거의 유사하였다. 반면에 450 g/L의 농도가 되도록 glucose를 첨가한 경우에 배양시간이 늘어나면서 배양 112시간 만에 glucose가 모두 소비되면서 최종 세포농도는 135.6 g/L 이고 erythritol 농도는 185.5 g/L 이었다(Fig. 3).

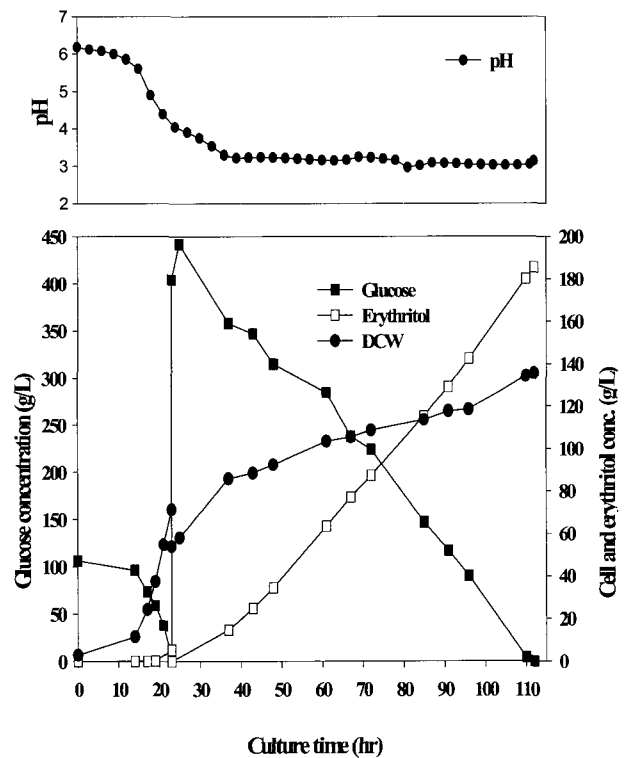


Figure 3. Profiles of cell, erythritol, glucose concentration and pH during the two-stage fed-batch culture by *Candida magnoliae* M26. The glucose concentration in the culture broth was 450 g/L after feeding of 820 g glucose powder.

이 때의 erythritol 수율은 37.3%로 증가하였으나 생산성은 1.66 g/L-hr으로 감소하였다. 이는 첨가해준 glucose에 의한 외부의 삼투압 증가로 세포성장은 낮아진 반면에 erythritol의 생성은 촉진되었기 때문으로 사료된다. Glucose의 농도가 500 g/L이 되도록 첨가해 준 경우에는 배양시간이 더욱 더 길어져 배양 137시간만에 glucose를 모두 소비하였으며, 이때의 세포농도는 131.6 g/L이고, erythritol 농도는 198.7 g/L로서 수율은 36.5%이고 생산성은 1.45 g/L-hr이었다. 결과적으로 첨가해 주는 glucose의 농도가 높을수록 이에 대한 적용 기간이 길어져 배양기간이 늘어나면서 최종 세포농도는

낮아지기 때문에 erythritol의 최종 농도와 수율은 증가하지만 생산성은 감소하였다. 따라서 가격이 매우 저렴한 산업용 질소원인 LSW를 이용한 2단계 유가식 배양에서 최종 erythritol 농도가 185.5 g/L이며, 이때의 수율이 37.8%이고 생산성이 1.66 g/L-hr로서 erythritol의 산업적인 생산을 위하여 매우 양호한 결과를 얻었다.

요 약

Candida magnoliae M26에 의한 erythritol의 산업적 생산을 위한 산업용 질소원의 선정과 이를 이용한 유가식 배양에서의 erythritol 생산을 위한 최적 조건의 결정에 대한 실험을 수행하였다. 실험결과에서 산업용 질소원으로 가격이 가장 저렴하면서 erythritol의 수율과 생산성이 거의 yeast extract와 유사한 light steep water (LSW)를 선정하였다. 즉 선정된 LSW 43.3 mL/L과 glucose 250 g/L을 이용한 회분식 발효에서 52.6%의 수율과 0.52 g/L-hr의 생산성으로 131.6 g/L의 erythritol을 생산하였다. 생산성 향상을 위한 2단계 유가식 배양에서 고농도 균체를 얻기 위한 최적의 C/N ratio는 1.7로서 glucose 100 g/L와 LSW 500 mL/L를 이용한 회분식 배양에서 71.0 g/L의 세포농도를 얻을 수 있었다. 배지의 초기 pH 조절방법에 대한 연구에서는 28% 암모니아 용액으로 pH 6.5로 조절할 경우 erythritol의 수율은 감소하였으나 높은 생산성으로 erythritol을 얻을 수 있었다. 따라서 erythritol의 수율 향상을 위한 생산단계에서의 최적 glucose 농도는 450 g/L이 되도록 하는 경우이며, 이때에 37.3%의 수율과 1.66 g/L-hr의 생산성으로 185.5 g/L의 erythritol을 생산할 수 있었다. 따라서 산업용 질소원으로 선정된 LSW를 이용한 2단계 유가식 발효 공정을 통하여 회분식 배양과 비교해 볼 때 수율은 1.4배 정도 감소되었지만 erythritol의 생산성은 3.2배로 향상시킬 수 있었다.

감 사

본 연구는 경기지방중소기업청의 산학연공동기술개발 컨소시엄 연구비 (2000~2001)와 과기부의 중점국가연구개발사업 (신화학공정기술개발)의 일부 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Shindoh, T., Y. Sasaki, H. Miki, T. Eguchi, K. Hagiwara, and T. Ichikawa (1988), Determination of erythritol in fruits and fermented foods by high performance liquid chromatography, *Agric. Biol. Chem.* **62**, 623-626.
- Yoshida, H., T. Sugahara, and J. Hayashi (1984), Studies in free sugars and free sugar alcohols of mushrooms, *Jpn. Food Ind.* **31**, 765-771.
- Roberts, G. P., A. McDiarmid, and P. Gleed (1976), The presence of erythritol in the fetal fluids of fallow deer (*Dama dama*), *Res. Vet. Sci.* **20**, 254-256.
- Kim, S. Y., J. H. Choi, C. J. Kim, and J. H. Kim (1995), Functional properties of erythritol, *Food Sci. Ind.* **28**(2), 23-28.
- Rose, A. H. and J. S. Harrison (1986), *The Yeasts*, Vol 2, p.9, Academic Press, U.K.
- Aoki, M. A. Y., G. M. Pastore, and Y. K. Park (1993), Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol, *Biotech. Lett.* **15**, 383-388.
- Park, J. B., B. C. Seo, J. R. Kim, U. H. Pek, and Y. K. Park (1998), Effect of Glucose Concentration on the Production of Erythritol by *Trichosporon* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**(5), 543-546.
- Kim, S. Y., K. H. Lee, J. H. Kim, and D. K. Oh (1997), Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis*, *Biotechnol. Lett.* **19**(8), 727-729.
- Yang, S. W., J. H. Seo, and Y. W. Ryu (2000), Development of osmotolerant mutant, *Candida magnoliae* and the determination of the optimum concentration of carbon and nitrogen sources to improve erythritol yield, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(6), 566-572.
- Koh, E. S., K. H. Moon, K. C. Han, Y. W. Ryu, and J. H. Seo (2000), Optimization of culture conditions and nitrogen sources for production of erythritol by *Candida magnoliae*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**(6), 349-354.
- Hallsworth, J. E. and N. Magan (1996), Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose content of fungal propagules, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(7), 2435-2442.
- 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.
- 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. Biotechnol.* **25**, 100-103.
- Oh, D. K., C. H. Cho, J. K. Lee, and S. Y. Kim (2001), Increased erythritol production in fed-batch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 248-252, 2001.
- Kim, S. Y., S. S. Park, Y. J. Jeon, and J. H. Seo (1996), Analysis of fermentation characteristics for production of erythritol by *Candida* sp., *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**(5), 935-939.
- De Rham, O. and T. Joost (1979), Phytate protein interaction in soybean extracts and low-phytate soy protein products, *J. Food Sci.* **44**, 596-600.
- Takeharu, T., K. Tanaka, M. Shimoda, and A. Ishizaki (1999), Optimization of L-lactic acid feeding for the production of poly-D-3-hydroxybutyric acid by *Alcaligenes eutrophus* in fed-batch culture, *J. Biosci. Bioeng.* **88**(4), 404-409.