

Candida magnoliae SR101에 의한 Erythritol의 생산에서 산업용 질소원의 선정 및 최적화

박선영, 서진호¹, 유연우

아주대학교 분자과학기술학과 발효대사공학실험실, ¹서울대학교 식품공학과

전화 (031) 219-2455, FAX (031) 216-8777

Abstract

In this experiment, we tested various nitrogen sources and then culture condition was optimized for industrial applications. The batch culture of *Candida magnoliae* SR101 grown in a defined medium supplemented with light steep water (LSW) as a sole nitrogen source showed a relatively high yield of erythritol production (53%), which was slightly higher than that using yeast extract as a nitrogen source, while the productivity and cell mass were maintained at similar levels. For the optimization of culture condition, the batch culture was performed. When the concentration of LSW was 65 mL/L in the defined medium containing 250 g/L of glucose, the concentration, yield and productivity of erythritol were 110 g/L, 44%, and 0.66 g/L-hr, respectively. The high yield and comparable productivity obtained with a cheap nitrogen source could be expected as a basis for the mass production of erythritol in the industrial scale.

서론

에리스리톨은 4탄당의 당알콜로서 설탕에 비해 70-80 %의 감미도를 갖고 있으며 칼로리는 10%에 불과하여 설탕 대체물질로서의 유용성이 크다. 에리스리톨은 입안에서 녹을 때 주위의 열을 흡수하여 청량감을 주며, 결정성이 우수하고 비흡습성이어서 powder 상태의 제조가 용이하다. 또 산이나 열에 안정하며 난충치성이고 당뇨병 환자에게도 안전하다. 본 연구에서는 *Candida magnoliae* SR101을 이용한 에리스리톨 발효에 있어서 산업적인 대량생산을 위하여 값이 저렴한 질소원을 선별하고 이를 회분식 배양에서 최적화 된 발효조건을 결정하는 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

본 연구에서 사용된 균주는 벌집에서 분리한 *Candida magnoliae*를 EMS 처리하여 돌연변이를 통해 개량한 *Candida magnoliae* SR101이다.

본 배양은 250 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L

ammonium sulfate, 0.4 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 기본 발효배지로 하여 수행하였다. Fermentor 배양은 2.5 L jar fermentor(KFC)에 1.2L의 배지를 넣고 28°C, 1 vvm, 500 rpm 조건에서 수행하였다.

균체량 측정은 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. Erythritol의 정량분석은 NH_2 column(Shisheido, Japan)을 가지고 Waters사의 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 40°C로 column 온도를 유지하면서 acetonitrile과 물의 비율이 8 : 2 인 용매를 1.4 mL/min로 흘려주면서 RI detector로 분석하였다. 유기산 분석은 HPLC(Waters, USA)를 사용하였으며, column으로는 AminexTM HPX-87H column(Bio-Rad, USA)을 사용하였으며, 이동상으로는 5 mM의 H_2SO_4 용액을 0.6 mL/min으로 흘려보내면서 210 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glucose 농도는 Glucose Analyzer (YSI, SIDEKICK 1500, USA)로 측정하였다.

결과 및 고찰

에리스리톨의 수율, 생산성 및 최종 농도와 배지의 가격을 고려하여 고가의 질소원인 yeast extract를 대체할 산업용 질소원의 선정에 대한 연구를 수행한 결과 옥수수로부터 전분의 가공과정에서 부산물로 생성되는 light steep water(LSW)가 가격이 가장 저렴하면서도 43 mL/L의 농도로 사용할 경우에 250 g/L의 glucose로부터 erythritol을 53 %의 수율과 0.52 g/L-hr의 생산성 및 132 g/L의 농도로 생산할 수 있었으며 이는 대조 실험인 yeast extract를 질소원으로 하였을 때와 비교하여 에리스리톨의 생산성은 약간 낮아지지만, 더 높은 수율을 얻을 수 있기 때문에 산업용 유기 질소원으로 LSW를 선정하였다(Table 1). 산업용 질소원으로 선정된 LSW의 최적 농도를 선정하기 위하여 250 g/L의 glucose가 포함된 발효배지에 LSW의 농도를 43 mL/L에서 108 mL/L까지로 변화시키면서 fermentor 배양을 수행한 결과 LSW의 농도가 43 mL/L 일 때 에리스리톨의 수율은 53%로 가장 높았지만 배양기간이 233 시간으로서 너무 길어 생산성이 떨어졌다. 질소원으로 공급해 주는 LSW의 농도가 증가함에 따라 에리스리톨의 수율은 감소하는 반면에 생산성과 균체량은 증가하는 경향을 보였으며, 이는 미생물 발효를 이용하여 대사산물을 과량으로 얻기 위해서는 carbon/nitrogen(C/N) ratio가 높은 배지를 사용하였을 때 미생물의 성장이 제한되면서 당알코올의 분비가 촉진된다고 보고된 결과와 일치하고 있다. LSW의 농도가 65 mL/L일 경우(C/N ratio 33) 에리스리톨의 수율은 44%로 약간 낮지만, 이때의 생산성이 0.66 g/L-hr로 높기 때문에 회분식 배양에서 에리스리톨의 생산을 위한 최적의 농도로 결정하였다(Table 2). 회분식 배양에서 일정 시간에 생성되는 에리스리톨의 생산성이 높아야 하고 또한 배지 비용과 반응기의 크기를 줄이기 위해서는 배지에 첨가되는 포도당으로부터 생성되는 에리스리톨의 수율이 높아야 하기 때문에 선정된 C/N ratio 33에서 초기 포도당의 농도를 250 g/L에서 400

g/L로 달리하여 실험을 수행한 결과 생성되는 에리스리톨의 수율은 42%-44%로 비슷하였으나 초기 포도당의 농도가 높아질수록 고삼투압 환경에 대한 적응기간(lag time)이 길어지고 포도당의 소비속도가 낮아짐에 따라 배양기간이 길어져 생산성이 약간씩 감소하는 경향을 보였다. 따라서 초기 포도당의 농도가 250 g/L에서 에리스리톨의 수율과 생산성이 각각 44%와 0.66 g/L-hr로 높은 편이었으므로 회분식 배양에서 C/N ratio 33 일 때 초기 glucose의 농도는 250 g/L로 선정하였다(Table 3, Figure 1).

참고문헌

1. 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
2. Noh, B. S. and S. Y. Kim. 2000. Characteristics and applications of sugar alcohols. *Asia Munhwa Publishing Co.*
3. Sasaki, T. 1989. Production and properties of erythritol obtained by *Aureobasidium* fermentation. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **63**: 1130-1135

Table 1. Effect of nitrogen sources on the cell growth and erythritol production.

Types of N-source	N-Conc.	μ_{max}	DCW (g/L)	Erythritol			Culture Time (hr)
				Conc. (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L-hr)	
Yeast extract (Difco 社)	5 g/L	0.16	53.6	125.5	47	0.65	192
Yeast extract (ChoHung 社)	5 g/L	0.08	44.8	121.0	48	0.59	205
Yeast extract (Gist 社)	5 g/L	0.07	46.3	133.9	54	0.62	216
CSP (Marco 社)	12.5 g/L	0.05	60.9	87.2	35	0.56	157
CSL (Sigma 社)	25.8 mL/L	0.11	62.4	85.5	35	0.59	145
LSW(16.5 Brix) (국산)	43.7 mL/L	0.09	45.9	131.6	53	0.52	253
Urea (Sigma 社)	0.98 g/L	0.06	19.8	18.6	18	0.08	240

Table 2. Effect of light steep water concentrations on the erythritol production during the batch fermentation of *Candida magnoliae* SR 101

	Concentration of LSW (mL/L)				
	43 (C/N=50)	48 (C/N=45)	65 (C/N=33)	87 (C/N=25)	108 (C/N=20)
Erythritol Conc. (g/L)	129.38	112.00	110.118	88.03	83.78
Yield (%)	52	45	44	35	34
Productivity (g/L-hr)	0.57	0.56	0.66	0.54	0.66
DCW (g/L)	47.60	48.68	49.96	56.59	60.65
Fermentation Time	233 hr	194 hr	168 hr	158 hr	145 hr

Table 3. Effect of initial glucose concentration on the erythritol production during the batch fermentation of *Candida magnoliae* SR 101

	Concentration of Glucose (g/L)			
	250	300	350	400
Erythritol Conc. (g/L)	110.18	110.23	146.53	174.06
Yield (%)	44	37	42	44
Productivity (g/L-hr)	0.66	0.53	0.64	0.57
DCW (g/L)	49.96	58.73	66.75	71.90
Fermentation Time	168 hr	218 hr	240 hr	302 hr

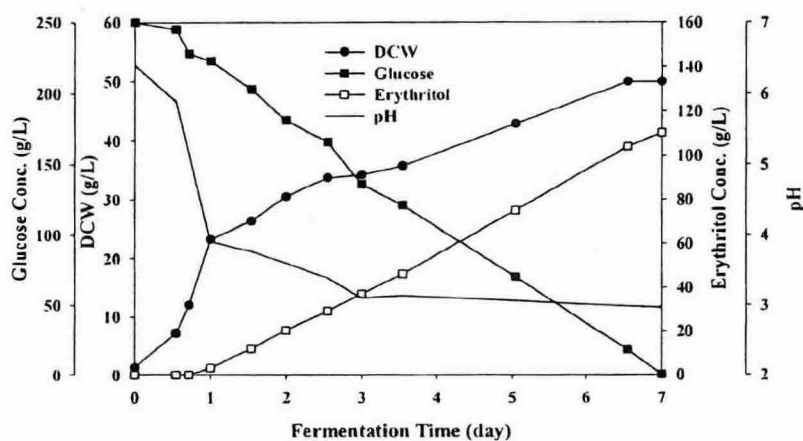


Fig 1. Profile of cell, erythritol, glucose concentration and pH during the batch fermentation in defined medium containing 250 g/L glucose and 65 g/L LSW