

Candida sp.를 이용한 에리스리톨 발효특성의 해석

김세용 · 박성식 · 전영중* · 서진호

서울대학교 식품공학과 농업생물신소재 연구센터, *제일제당 종합연구소

Analysis of Fermentation Characteristics for Production of Erythritol by *Candida* sp.

Seh-Yong Kim, Sung-Sik Park, Yeong-Joong Jeon* and Jin-Ho Seo

Department of Food Science & Technology and

Research Center for New Biomaterials in Agriculture, Seoul National University

*Research & Development Center, Cheil Foods & Chemical Inc.

Abstract

A *Candida* sp. strain was isolated from honeycombs and used to produce erythritol, which was identified by HPLC and gas chromatography-mass spectrometry. This strain grown in the YPD medium containing 100 g/l of glucose was able to produce 21 g/l of erythritol without formation of by-products such as glycerol and ethanol. The yield of erythritol production was further improved by growing in the YPD medium containing 300 g/l of sucrose. The maximum erythritol concentration, 80.2 g/l was obtained with an erythritol yield of 0.345 g erythritol/g sucrose and productivity of 0.472 g/l · hr.

Key words: erythritol, GC-MASS, sugar-alcohol, *Candida*

서 론

건강에 대한 관심이 증가하면서 식품의 기능적인 측면이 중시되고 있다. 특히, sucrose의 과다섭취로 인한 문제점이 커지면서 이를 대체할 수 있는 천연 감미료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁽¹⁾.

에리스리톨은 올리고당이나 xylitol과 더불어 대표적인 기능성 감미료로, C₄H₁₀O₄의 화학구조를 가지는 당알콜이다⁽²⁾. 에리스리톨은 자연계에도 존재하며 지의류, 과실류 및 발효식품 등에서 소량으로 발견되고 있다⁽³⁾. Sucrose의 70~80%의 당도를 가지고 있는 에리스리톨은 용해시에 흡습작용이 매우 강하여 청량감이 뛰어나다. 또한 내열성도 뛰어나 200 °C에서 1시간동안 가열하여도 분해되지 않을 뿐만 아니라, 흡습성도 낮아서 결정을 쉽게 형성하는 장점을 가지고 있다. 에리스리톨은 이러한 물리화학적 장점과 아울러 기능성에서도 우수한 감미료이다. 저 칼로리 식품으로 다른 감미료와 달리 체내에서 에너지원으로 이용되지

않고 소변으로 대부분 배출되며, 충치균(*Streptococcus mutans*) 등에 의해 이용되지 않기 때문에 충치 예방효과도 가지고 있다⁽⁴⁾.

에리스리톨 생산에는 화학합성법과 발효법이 있는데, 화학합성법은 원료물질이 고가이기 때문에 경제성이 없어 대량생산에 이용되지 못하고 있다. 따라서 발효법은 화학합성법의 단점을 극복할 수 있는 방안으로 연구가 활발히 진행되고 있다.

미생물 발효공정을 이용한 에리스리톨 생산 연구는 1960년대부터 이루어졌다. 1964년에 Hanjny가 분리한 *Tolura* 12 A (*Moniliella tomentosa* var. *pollinis*)는 포도당으로부터 약 41%의 에리스리톨을 생산하여, 이 균주를 이용한 실용화 연구가 수행되었으나 에리스리톨 외에 glycerol과 ribitol같은 부산물을 많이 만들어서 산업화에는 이르지 못하였다⁽⁵⁾. 또한 알칸게 기질을 이용하는 *Candida zeylanoides*와 같은 균주들도 산업화 시도가 있었으나 실패하였다. 1988년에 일본의 Ishizuka가 고농도의 포도당 배지를 이용한 선별작업에서 *Aureobasidium* sp.라는 에리스리톨 생산균주를 발견하였다. 이 균주는 발포성을 나타내고 내당성에 있어서도 만족한 결과를 얻지 못하였지만 자외선, 감마선,

Corresponding author: Jin-Ho Seo, Department of Food Science & Technology, Seoul National University, Seodun-dong 103, Kweonsun-gu, Suwon, Kyonggi-do 441-744, Korea

Co 조사 및 변이유발제를 혼합 적용하여 내당성을 개선하였고 발효과정 중 거품 생산을 최소화시켰다⁽⁶⁾. 1993년에는 Marina 등이 벌집에서 *Trichosporonoides* sp.라는 균주를 선별해냈는데 40%의 수율로 에리스리톨을 생산한다고 발표하였다⁽⁷⁾.

본 연구에서는 벌집에서 에리스리톨 생산 수율이 높은 균주를 선별한 후, 선별된 균주의 형태, 생리적인 특성을 조사하고 에리스리톨 생산과 세포 생육에 미치는 환경인자의 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에 사용한 균주는 경기도 일대의 소비(벌집)에서 선별하였으며, *Candida* sp.로 동정되었다.

선별 방법

포도당 400 g/l와 yeast extract 10 g/l의 조성을 가진 배지를 담은 100 ml baffled flask에 소비 일부를 넣어 준 후 200 rpm의 교반속도로 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양액은 희석하여 agar 배지(포도당 200 g/l, yeast extract 10 g/l, agar 20 g/l)에 spreading하였고 48시간동안 30°C에서 배양하여 colony를 얻었다.

발효배지는 포도당 100 g/l와 yeast extract 10 g/l로 하였고, 소비에서 얻은 colony들을 5 ml test tube에 접종하여 200 rpm의 교반속도로 30°C에서 5일간 배양하였다. 이렇게 해서 얻은 배양액을 원심분리(10000 rpm, 5 min)하여 세포를 제거한 후, 에리스리톨 생산 여부를 HPLC와 gas chromatography-mass spectrometry (GC-MASS)로 검사하였다.

발효배지 및 배양방법

본 연구에서 배지조성은, 포도당 또는 sucrose 100~400 g/l, 그리고 yeast extract 10~20 g/l로 하였고, 질소 원료로는 polypeptone 또는 casamino acid 20 g/l를 이용하였다. 온도는 26°C에서 37°C사이에서, 초기 pH는 6.0을 기준으로 배양하였다. 발효기의 교반속도는 700 rpm을 기본으로 하였으며, 공기는 2 vvm으로 공급하였다.

분석방법

에리스리톨 생산여부는 HPLC와 GC-MASS를 이용하여 분석하였다. HPLC (Knauer, 독일) 분석에 사용된 column은 Aminex 87H (Bio-Rad)이지만, 빠른 분석을 위하여 fermentation monitoring column (Bio-Rad)

을 이용하기도 하였다. 온도는 두 column 모두 65°C로 고정하였으며 유속은 Aminex 87H의 경우 0.6 ml/min으로, fermentation monitoring의 경우 0.8 ml/min으로 조절하였다. 또한 HPLC 운용에 쓰인 용매는 두 column 모두 0.005 M H₂SO₄이었다.

GC-MASS에 이용할 시료를 얻기 위하여, 세포 배양액을 원심분리하여 세포를 제거한 여과액을 evaporator에서 감압농축하였다. 여기에 pyridine 0.5 ml와 acetic anhydride 1 ml를 섞고 1시간동안 끓는 물에서 반응시킨 후, ether 30 ml를 이용하여 추출하고 이 추출물을 증류수 20 ml로 분획여두에서 10번 정도 씻었다. 이것을 다시 감압농축시키고 ether 1 ml에 용해시켜서 시료를 준비하였다⁽⁸⁾.

GC-MASS (JMS-AX505WA)의 분석 조건은 다음과 같다.

- Ion source 온도: 200°C, ionization voltage: 30 or 70 eV, ion accelerating voltage: 3 kV, column: FFAP, column 온도: 180°C → 220°C (10 min) injection 온도: 220°C, interface 온도: 220°C, carrier: He

결과 및 고찰

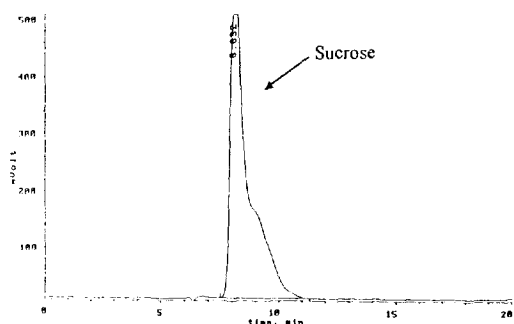
에리스리톨 생산균주 선별 및 에리스리톨 생산확인

소비에서 얻은 colony를 test tube에서 배양한 결과 에리스리톨을 생산하는 균주 4개를 선별하였고 그 중 생산능력이 뛰어난 균주를 이용하여 에리스리톨 생산 특성을 연구하였다. JH1으로 명명된 균주를 한국생명공학연구소에 의뢰한 결과 *Candida* sp.로 동정되었다.

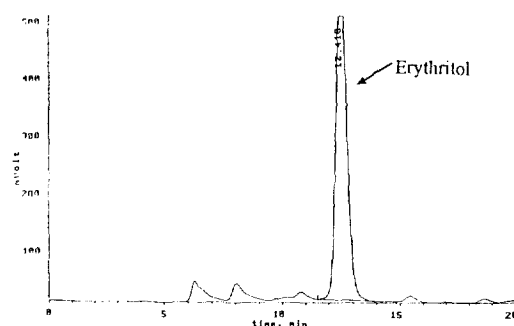
선별된 *Candida* sp.의 발효 배양액을 HPLC로 분석한 결과 에리스리톨을 생산하는 것을 확인할 수 있었으며 에리스리톨 외에 다른 당알콜류 생산은 미미하였다(Fig. 1). *Candida* sp.의 에리스리톨 생산여부를 GC-MASS로 정밀분석하였다. 정확한 정보를 위해서 30 eV와 70 eV의 ionization voltage를 사용하였고, 70 eV에서 얻은 mass spectrum 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Gas chromatography에서 에리스리톨과 같은 retention time의 peak를 mass spectrum으로 분석한 결과 표준시료인 에리스리톨과 *Candida* sp.배양액에서 동일한 결과를 얻었으므로 소비에서 선별한 *Candida* sp.가 생산하는 물질이 에리스리톨임을 확인하였다.

에리스리톨 생산 특성

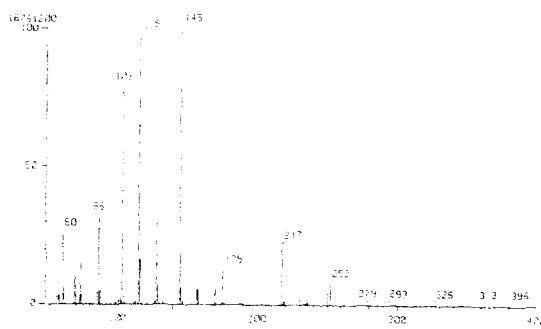
Candida sp.의 에리스리톨 생산양상을 살펴보기 위



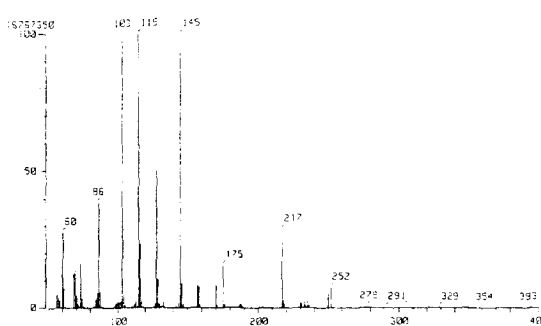
(a) Medium before fermentation



(b) Culture broth after 7 days



(a) Erythritol tetraacetate



(b) Fermentation broth of *Candida* sp.

Fig. 1. Liquid chromatogram of the fermentation broth of *Candida* sp. grown at 26°C and pH 6.0

Fig. 2. Electron-impact mass spectra of erythritol-tetraacetate (a) and the fermentor broth (b) of *Candida* sp (70 eV)

해 기본배지인 YPD배지(yeast extract 1%, peptone 2%, 포도당 100 g/l)에서 질소원으로 peptone을 casamino acid로 바꾼 배지를 이용하였다. Flask 배양에서 pH와 온도의 영향 등 환경인자의 영향을 살펴 본 결과 pH는 6.0, 온도는 26°C가 최적조건이었기 때문에 동일한 조건에서 발효를 행하였으며 결과는 Fig. 3에 나타냈다. 에리스리톨 생성속도는 균체 증가 속도에 비례하였으며 최대의 균체농도를 나타내는 시간과 최대의 에리스리톨을 생산하는 시간은 거의 유사하였다. 따라서 에리스리톨 생산은 세포생육 의존형이었으며 세포성장기 활발한 대수증식기에 에리스리톨 생성속도가 최대가 되었다. 포도당은 약 70시간 경과하면서 거의 다 고갈되었고 대수증식기에서 비성장속도는 0.11 hr⁻¹, 최대 균체 농도는 36.3 g/l이었다. 에리스리톨 농도는 19.7 g/l, 수율은 0.21 g/l이었다. 발효과정 중에 부산물로 ethanol이 1 g/l가 생겼으나 발효 후반기에 모두 소모하였으며, 에리스리톨 발효의 부산물로 알려진 glycerol은 생성되지 않았다. 이는 적은 glycerol 농도에서도 *Candida* sp.에서는 glycerokinase와 glycerol phosphate-ubiquinone oxidoreductase가 유도되어 glycerol을 소모하기 때문으로 생각된다⁽⁹⁾. 이와

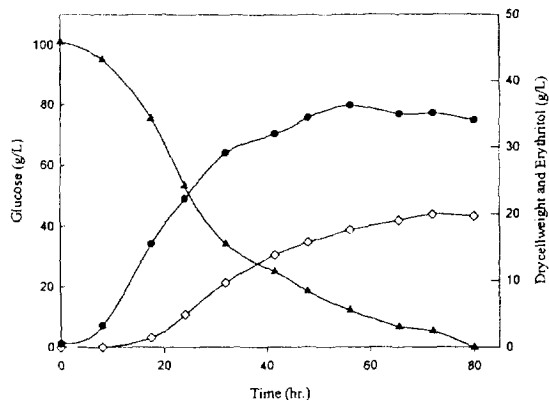


Fig. 3. Fermentation profiles of *Candida* sp. grown at 26°C and pH 6.0 with an initial glucose concentration of 100 g/l (●—●, Dry cell weight; ◇—◇, Erythritol; ▲—▲, Glucose)

같이 부산물을 형성하지 않고 에리스리톨을 생산할 수 있다는 것이 이 균주의 장점이다. 또한, 기존의 에리스리톨 발효과정에서 문제점이 되어 온 거품 형성도 거의 없었다.

탄소원 농도의 영향을 살펴보기 위하여 포도당 300

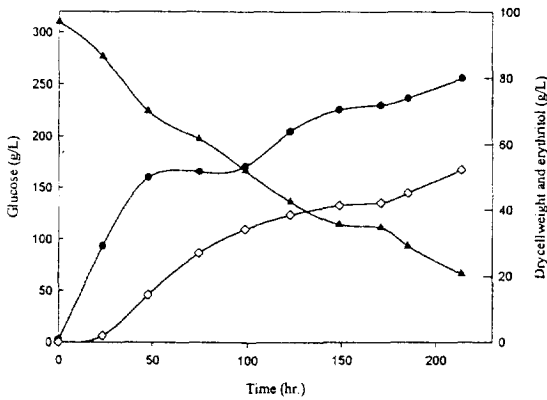


Fig. 4. Fermentation profiles of *Candida* sp. at 26°C and pH 6.0 with an initial glucose concentration of 300 g/l (●—●, Dry cell weight; ◇—◇, Erythritol; ▲—▲, Glucose)

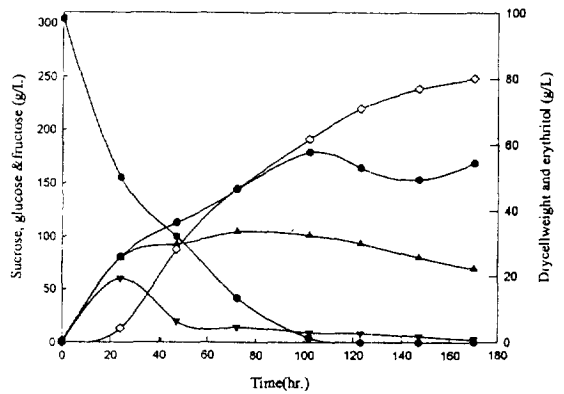


Fig. 5. Fermentation profiles of *Candida* sp. grown at 26°C and pH 6.0 with an initial sucrose concentration of 300 g/l (●—●, Dry cell weight; ◇—◇, Erythritol, ▼—▼, Fructose; ▲—▲, Glucose; ●—●, Sucrose)

Table 1. Effects of carbon sources on cell growth and erythritol production of *Candida* sp. at 26°C and pH 6.0

Sugar	Erythritol concentration (g erythritol/g sugar)	Yield (g erythritol/g sugar)	Specific ¹⁾ growth rate (hr ⁻¹)	Dry cell weight (g/l)
Glucose 100 g/l	19.7	0.206	0.11	36.3
Sucrose 100 g/l	20.8	0.200	0.15	60.3
Glucose 300 g/l	52.3	0.215	0.15	80.2
Sucrose 300 g/l	80.2	0.345	0.16	57.7

¹⁾determined at the exponential phase of batch culture

g/l에서 배양하였다(Fig. 4). 전반적인 발효양상은 Fig. 3과 비슷하였다. 발효가 완료된 시점에서 포도당이 배지에 남아 있었는데 이는 다른 영양소의 고갈에 기인하는 것으로 추정된다. 최대 에리스리톨 농도는 52.3 g/l이고 수율은 0.215 g/l이었으나, 생산성은 0.245 g/l·hr로 포도당 100 g/l의 경우보다 감소하였다. 비성장속도는 0.15 hr⁻¹, 최대 균체 농도도 80.2 g/l로 증가하였다. 이는 배지중 포도당 농도의 증가때문인 것으로 생각된다.

기존의 에리스리톨 생산균주는 부산물로 glycerol을 생성하여 sucrose를 기질로 이용할 경우 분리·정제에 많은 문제점이 있었으나, *Candida* sp.의 경우는 glycerol을 생성하지 않으므로 sucrose 이용이 가능하다. 그래서 포도당 대신에 sucrose 100 g/l를 탄소원으로 이용하여 발효실험을 행하였으며 결과는 Table 1에 정리하였다. 세포생육이나 에리스리톨 생성면에서 포도당 배지와는 별 차이가 없었다. 다만 sucrose가 포도당과 fructose로 분해된 후, fructose가 먼저 소모되고 포도당이 천천히 감소하는 것을 관찰할 수 있다. 부산물은 거의 형성되지 않았고 거품형성 역시 관찰할 수 없

었다.

Sucrose 농도를 300 g/l로 증가시켰을 경우 에리스리톨 수율과 생산성에서 현저한 증가를 가져왔다(Fig. 5). 최대 에리스리톨 농도는 80.2 g/l이었으며 이 때의 수율은 0.345 g erythritol/g sucrose이고 생산성은 0.472 g/l·hr이었다. 비성장 속도는 0.16 hr⁻¹로 포도당을 이용했을 때보다 컸지만 정제기에 들어가는 시간이 더 빨라서 최대 균체농도는 57.7 g/l로 오히려 감소되었다. 에리스리톨 생산수율과 생산성 증가에 대한 이유를 규명하기 위한 연구를 계속 수행하고 있다. 위의 결과로 볼 때 에리스리톨 수율이나 생산성 면에서 포도당보다는 sucrose 배지가 유리하리라고 판단되었다.

요 약

에리스리톨 발효 연구에 이용된 균주는 한국 경기도 일대의 별집에서 선별하였으며 *Candida* sp.로 동정되었다. 에리스리톨 생산 여부는 HPLC와 GC-MASS로 확인하였다. YPD배지(포도당 100 g/l)에서 peptone을 casamino acid로 바꾼 배지에서 에리스리톨 19.7 g/l를 생산하였다. 에리스리톨외의 glycerol과 ethanol 같은 당알콜류는 생성되지 않았으며, 에리스리톨 생산 발효과정의 문제점이었던 거품도 생기지 않았다. Sucrose 100 g/l를 기질로 한 실험에서는 포도당 배지와 유사한 결과를 얻을 수 있었다. Sucrose 300 g/l에서는 80.2 g/l의 에리스리톨을 얻을 수 있었으며, 이 때의 수율은 0.345 g erythritol/g sucrose이고 생산성은 0.472 g/l·hr이었다.

감사의 글

본 과제는 한국과학재단과 농업생물신소재 연구센터의 지원을 받았으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

문헌

1. 이우중, 서진호 : 발효감미료의 연구현황 및 전망. *생물산업*, **8**, 38 (1995)
2. Goldberg, I.: *Functional Foods*. Chapman and Hall, N.Y. (1994)
3. Billanx, M.S., Flourie, B., Jaequemmin, C. and Messing, B.: *Sugar alcohols in Handbook of sweeteners*. S. Marie and F.R. Pogolt (Ed.), p.72 (1991)
4. 佐々木堯, 小田恒郎, 貝沼圭二 : 醱酵法による新甘味料エリスリトール生産技術の開発. *ハイオサイエンスとインタスリー*, **46**, 3295 (1988)
5. 佐々木堯 : エリスリトールの生産技術. *Nippon No-geikagaku Kaishi*, **63**, 1130 (1989)
6. Ishizuka, H., Wako, K., Kasumi, T. and Sasaki, T.: Breeding of a Mutant of *Aureobasidium* sp. with High Erythritol Production. *J. Ferment. Bioeng.*, **68**, 310 (1989)
7. Aoki, M.A.Y., Pastore, G.M., and Park, Y.K.: Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotech. Lett.*, **15**, 383 (1993)
8. Shindou, T., Sasaki, Y., Miki, H., Eguchi, T., Hagiwara, K., and Ichikawa, T.: Identification of Erythritol by HPLC, and GC-MS and Quantitative Measurement in Pulps of Various Fruits. *J. Agric. Food. Chem.*, **37**, 1474 (1989)
9. Rose, A.H. and Harrison, J.S.: *The Yeasts*. Academic Press. **3**, 228 (1989)

(1996년 6월 3일 접수)