

## 자연계로부터 Erythritol 생산 균주의 분리

이광준<sup>1,2</sup> · 주영란<sup>2</sup> · 이길웅<sup>2</sup> · 오경수<sup>2</sup> · 이윤진<sup>2</sup> · 박상희<sup>1</sup> · 임재운<sup>1\*</sup>

충북대학교 자연과학대학 미생물학과, <sup>1</sup>국립보건원 미생물화학학과

자연계로부터 erythritol 생산균주를 선별하기 위하여 옥수수밭이나 사탕수수밭의 토양이나 자판기와 같은 당이 많은 지역으로부터 sampling하여 검색한 결과 erythritol을 생산하는 약 200여 균주를 분리할 수 있었으며 이들을 paper chromatography법으로 1차 선별한 후 HPLC를 이용하여 배양액 중의 erythritol 생산량을 측정함으로써 생산성이 가장 우수하고 부생성물이 가장 적은 KJ81균주를 최종 선별하였다. 선별된 균주의 형태학적 생리학적 특성을 조사하여 *Penicillium* sp. KJ81로 동정하였다. 균주의 콜로니 색은 백색에서 녹색으로 변화하였고 1-3단계 분기의 분생자병과 플라스크형의 경자를 보였다.

KEY WORDS □ Erythritol, paper chromatography, *Penicillium* sp., sugar alcohol

Erythritol은 설탕의 70-80% 감미도를 갖는 당알콜로서  $C_4H_{10}O_4$ 의 화학구조를 갖는다. 최근 일본 식품연구소와 H研化學의 공동연구로 포도당에서 erythritol을 발효법에 의하여 생산하는 기술개발에 성공하였다(11). Erythritol은 자연계에 소량이지만 널리 존재하며 과일류(~10 mg/250 g)(12), 이끼류(0.3-5%)(4), 버섯류(2-4%)(18), 발효식품(13) 등에도 함유되어 있다. 또한 식물뿐만 아니라 포유동물에서도 특히 혈청, 뇨, 정액 등에도 함유되어 있다(8).

지금까지 공업적으로 생산 가능한 당알콜로는 glycerol, xylitol, mannitol 그리고 sorbitol 등이 있다. 한편 erythritol은 화학적 합성법으로 meso-tartarate의 환원에 의한 방법, 4,6-O-ethylidene-D-glucose의 산화 환원에 의한 방법 등이 알려져 있으나 아직 공업화에는 이르지 못한 실정이다(11). 특히 erythritol은 당알콜 중 유일하게 미생물 발효에 의한 대량 생산방법이 개발되어 있다.

최근 건강 저칼로리 감미료에 대한 수요가 증가함에 따라 체내에서 흡수되지 않는 감미료에 대한 관심이 높아져 fructo-oligo당, malto-oligo당, galacto-oligo당 등의 건강 감미료를 미생물을 이용하여 생산하려는 연구가 이루어지고 있으며 상품화되어 판매되기도 한다(1). Erythritol은 설탕에 가까운 감미도를 갖는 감미료로서 체내에서 거의 에너지원으로 이용되지 않고 배설되며, 다른 당알콜보다 안정하여 열, 산, 알칼리에 대하여 높은 안정성을 보이고(7) 다른 당알콜보다 설사 등을 일으키는 경우가 적다는 면에서 저칼로리 감미료로서 유망시 되고 있다.

포도당을 기질로 하여 erythritol을 주된 산물로 생성하는 균주로는 *Trigonopsis variabilis*, *Candida zeylanoides*(9), *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*(5) 그리고 *Aureobasidium* sp. 등을 들 수 있다. 이 중 Hajny가 분리한 *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*는 glucose로부터 약 41% erythritol 생산능이 있

으나 부생성물이 많아 공업화에 이르지 못했으며(4) H研化學에서 개발한 *Aureobasidium* sp. SN-G42균주만이 공업화에 성공한 것으로 알려지고 있다(16, 17).

본 연구에서 지자 등은 미생물 효소를 이용한 erythritol의 생산을 위하여 먼저 자연계로부터 폭 넓은 검색을 통하여 erythritol 생산 균주를 확보하기 위한 연구를 수행하였으며 분리 균주 중 erythritol 생산성이 가장 우수한 균주를 선별하여 균주의 일반적 특성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 시 약

HPLC와 paper chromatography에 사용된 용매는 HPLC grade로 MERCK사(Rahway, N.J., U.S.A.)에서 구입하였으며 표준당과 그 외의 배지용 시약 등은 SIGMA사(St. Louis, MO, U. S. A.)에서 구입하여 사용하였다.

#### 표준당

표준당으로 sucrose, glucose, mannitol, fructose, erythritol을 사용하였으며 이들 당은 HPLC grade water로 현탁한 1.0% 용액을 사용하였다.

#### Erythritol 정성 분석

Erythritol 정성분석은 paper chromatography법을 이용하였다. Whatman 3MM paper(No 1.)에 표준당 및 배양액을 5  $\mu$ l씩 spotting하고 건조시킨 후, ethylacetate-isopropanol-water(6:3:1)의 전개용매로 16시간 전개시킨 후 건조하여 silver nitrate spraying방법으로 발색시켜(15) 분석하였다.

#### Erythritol 정량 분석

생산된 erythritol을 정량하기 위하여 HPLC를 사용하였다. HPLC는 Gilson model 712 system으로 실험하였다. 사용한

\*To whom correspondence should be addressed

column은 RAININ NH<sub>2</sub> column(4.6×250 mm)이고 mobile phase는 acetonitrile : water(75 : 25)를 이용하였으며 1.0 ml/min 의 flow rate로 실험하였다. Detector는 RI detector를 이용하였다. 표준당은 1% 용액 10 µl를 injection하였다.

Erythritol의 정량은 전 논문에서(2) 보고한 기술대로 erythritol standard curve를 작성, 1차 회귀 방정식을 구하고 각 수치를 대입하여 값을 산출하였다.

### Erythritol 생산균주의 선발

커피 자판기와 같이 당이 많은 곳과 옥수수더미, 수수밭 등 경기, 강원, 충청일대의 토양 그리고 하천수 등에서 시료를 채취한 후 생리식염수로 희석한 후 배양배지(40% sucrose or glucose, 0.5% yeast extract)에 접종하여 1차 선발하였다. Erythritol을 많이 생산하는 것으로 알려진 호기적인 효모를 일차 선발하기 위하여 배양배지를 30°C에서 5일간 200 rpm으로 흔들며 배양한 후 20% glucose 또는 sucrose, 0.5% yeast extract, 2% agar 배지에 도달한 후 다시 20% glucose 또는 sucrose, 0.5% yeast extract, 0.1% urea, 2% agar 배지에서 순수 분리하였다. 활성 균주의 선발은 먼저 paper chromatography법으로 선발한 후 HPLC를 이용하여 활성이 가장 높은 2-3균주를 최종 선별하였다(Fig. 1). 또한 기존의 등록된 특히 균주 중 *Aureobasidium*속에 속하는 균주와 유사한 등록균주들을 분양 받아 erythritol의 생산여부를 위와 같은 방법으로 확인하여 균주를 선발하였다.

### 선발균주의 배양과 동정

선발균주의 동정을 위해 Czapek-Dox한천배지를 이용, 37°C에서 3일간 배양하면서 균주의 색과 모양을 육안으로 관찰하고 포자의 형태와 분생자병의 형태는 LEIKA WILD MPS 28/32를 이용하여 1000배로 관찰하였다. 이들은 "Introduction to Food-Borne Fungi"(10)를 참고로 하여 분류, 동정하였다.

## 결과 및 고찰

본 연구에서는 자연계로부터 erythritol의 생산성이 우수한 미생물을 검색하여 이를 공업적 생산에 이용하고자 하였다. 앞에서 살펴본 바와 같이 erythritol을 미생물에 의하여 생산할 수 있음에도 불구하고 공업적으로 이용 가능한 균주는 별로 없는 실정이다. 따라서 건강감미료의 수요가 급증할 경우 이를 공업적으로 생산할 수 있는 균주의 선발은 매우 중요한 일이다.

### 균주 분리

40여곳의 수수더미나 옥수수밭, 질더미 등의 토양과 자판기 주변, 음료회사의 하천수 등으로부터 시료를 채취하여 배양배지에서 5일 배양한 후 성장한 균주를 순수분리한 결과 약 200여종의 균주를 분리할 수 있었다.

균주의 선정시 다양한 지역에서 시료를 채취하였으나 형태적으로 유사한 균주들이 많이 관찰되었다. 이는 sucrose의 농도가 높기 때문에 선택적으로 균이 성장할 수 있었기 때

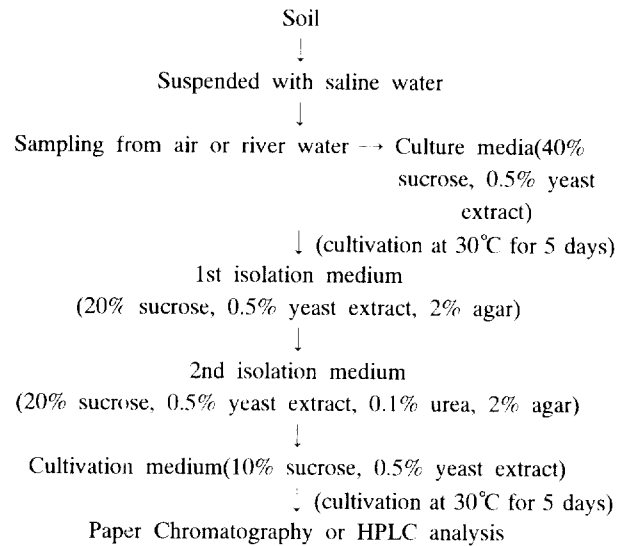


Fig. 1. Isolation procedures of erythritol producing microorganisms from nature.

문으로 사료되며 특히 산소의 양이 적은 경우에는 세균으로 보이는 균주들이 많이 관찰되었으나 대부분 erythritol의 생산에는 별 효과가 없는 것으로 관찰되었다. 따라서 대부분의 활성을 가지고 있는 균주는 효모나 곰팡이류에 속하는 것이었으며 이는 이미 보고된 결과와도 일치하는 결과였다.

1차 선별된 균주의 erythritol 생산 여부를 paper chromatography를 통하여 분석해 본 결과 생산성에서 안정성을 보인 약 17균주를 선별할 수 있었다. 일본의 경우 공업화에 성공한 균주가 *Aureobasidium* sp.에 속하는 균주였기 때문에(17) 기존의 등록 균주 중 *Aureobasidium* sp. 10여주를 구입하여 erythritol 생산여부를 관찰해 보았으나 생산능이 있는 균주는 관찰할 수 없었다. 또한 *Aureobasidium* sp. 외 실험실에 보유하고 있는 다른 등록 균주들 중 효모류와 곰팡이류를 중심으로 erythritol의 생산능을 검토해 본 결과 *Trichoderma koningii* ATCC 26113와 *Aspergillus niger* 35-1(14) 두 균주만이 약 10 mg/l 정도의 erythritol을 생성하였으며 나머지는 paper chromatography에 의해서만 측정될 수 있을 정도의 아주 적은 양을 생성하거나 전혀 erythritol을 생산하지 않았다(Table 1).

1차 선별 균주의 erythritol 생산여부는 paper chromatography를 통하여 관찰하였으며 Fig. 2에는 자연계와 등록균주 중 erythritol을 생산하는 균주들의 paper chromatography 결과를 보여 주고 있다.

Paper chromatography에서 진한 spot을 보이면서 활성에 안정성을 보이는 1차 선별된 균주의 활성을 HPLC를 통하여 정량 분석함으로써 생산성이 가장 높은 균주를 최종 선별하였다.

Table 2에서 각 선별 균주의 HPLC를 통한 area를 비교 분석하였다. HPLC peak area로서 erythritol 생산 활성을 나타낼 수 있는지의 여부는 standard curve를 미리 작성하여 봄으로서 확인하였다(Data not shown). 따라서 정확한 erythritol의 양을 정량화 하기 위해서 전 보고(2)에서 기술한

**Table 1.** Erythritol production of registered strains

Strains	Erythritol production
<i>Kluyveromyces fragilis</i> ATCC1771	+
<i>Aureobasidium</i> sp. L-49	+
<i>Trichoderma koningii</i> ATCC 26113	++
<i>Aspergillus oryzae</i> A-3	-
<i>Aspergillus niger</i> 35-1(14)	++
<i>Pichia stipitis</i> KCTC 7222	-
<i>Aureobasidium pullulans</i> C-23	-
" NRRL 2311	-
" KCCM 11989	-
" KCCM 11869	-
" KCCM 12717	-
" KCCM 12718	-
" KCCM 12720	-
" KCCM 11723	-
Isolated strain KJ81	+++
Isolated strain KJ111	++
Isolated strain KJ122	+++



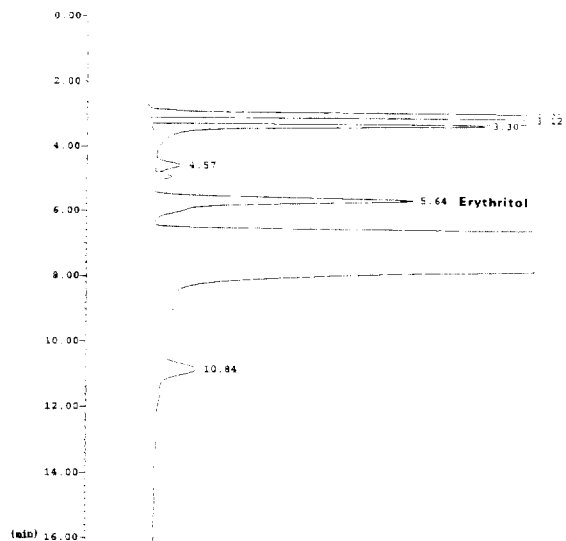
**Fig. 2.** Paper chromatography of various sugars and sugar alcohols produced by screening microorganisms. The symbol: E, Erythritol; M, Mixture; S, Sucrose; G, Glucose; F, Fructose; Gly, Glycerol. 1, *Trichoderma koningii*; 2, *Aspergillus niger*; 3, KJ3; 4, L23-2; 5, KJ81; 6, KJ103; 7, KJ111; 8, KJ113; 9, KJ122. Paper: Whatman 3MM paper(No 1.); Developing Solution: Ethylacetate-isopropanol-water (6:3:1). Staining: silver dip reagent.

대로 표준품 erythritol을 이용하여 1차 회귀방정식을 작성한 후 시료 중 erythritol의 양을 대입하여 그 값을 산출하였다. 그러나 이와 같은 방법은 정확한 값의 산출은 어렵기 때문에 전체 기질에 대한 수율 등으로의 산정법을 실험하고 있다. Table 2에서 보는 바와 같이 erythritol생성이 가장 우수한 균주는 KJ122였으나 부산물이 많이 생성되었으며, KJ81이 부산물이 비교적 적게 생성되고 erythritol의 생성도 양

**Table 2.** HPLC peak area of erythritol produced by selected strains

Screening No.	HPLC area	Erythritol productivity (g/l)
KJ 81	1,384,692	11.70
KJ 111	116,344	0.98
KJ 103	1,098,612	9.28
KJ 113	1,210,244	10.23
KJ 122	1,477,453	12.48
KJ 3	117,223	0.99
<i>Trichoderma koningii</i> ATCC 26113	421,389	3.56
<i>Aspergillus niger</i> 35-1(14)	161,865	1.37

Injection volume: 10  $\mu$ l, HPLC condition: same as in Fig. 2.



**Fig. 3.** High performance liquid chromatogram of erythritol produced by *Penicillium* sp. KJ81 in assay media.

호하였다. 배양액 중 erythritol의 농도가 높고 부산생물이 적을수록 공업적으로 생산한 후에 정제에 용이하기 때문에 KJ81로 최종 선발하였다. 또한 KJ81의 경우는 배양액 중 glycerol 생성량도 KJ122보다 적어서 선발 균주로 적당하였다(Data not shown). KJ81균주 배양액의 HPLC 분석결과를 Fig.3에 나타내었다. KJ81 균주는 30% sucrose와 0.5% yeast extract를 포함한 배지에서 30°C로 5일간 배양하였을 때 약 11.7 g/l의 erythritol을 생산하였다. 제일세대의 *Trichosporonoides* sp. CFW001(3)과 Nikken chemical의 *Aureobasidium* sp. SN-G42의 erythritol 생산량을 비교할 때 이들은 각각 130 g/l와 180 g/l를 생산하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 균주는 이들 균주에 비하여 약 10% 수준에 불과하다. 그러나 이와 같은 생산량은 기본배지에서 상대적으로 짧은 시간 배양한 후의 결과이므로 배지조건, 배양시간, 산소량, 배양온도, pH 등 최적 배양조건을 확립하고 배양하였을 때 더 많은 erythritol을 생산할 수 있으리라 보며 앞으로 균주의 번이주 제작 등의 실험을 통하여 활성을 높일 수 있는 방안을 계획하고 있다.

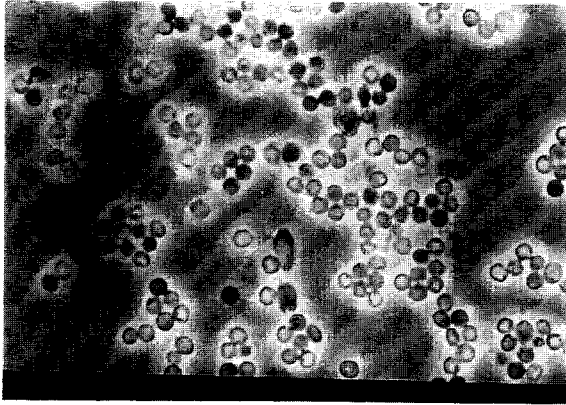


Fig. 4. Conidia of *Penicillium* sp. KJ81 ( $\times 1,000$ ).

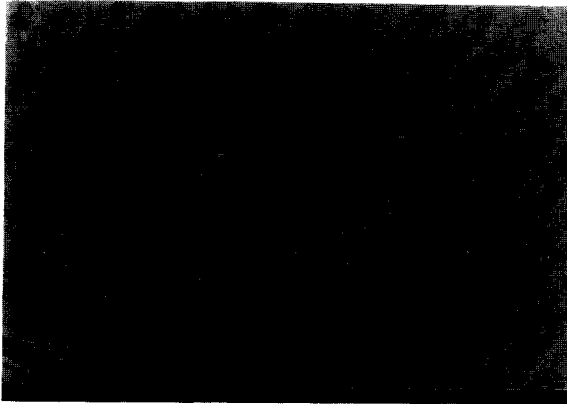


Fig. 5. Conidiophores of *Penicillium* sp. KJ81 ( $\times 1,000$ ).

**선발 균주의 동정**

활성이 가장 우수하면서도 erythritol 생산에 안정성을 보인 KJ81균주를 최종 선정하였으며 이 균주의 분생자와 분생자병의 형태는 Fig. 4, 5와 같았으며 Czapek-Dox배지에 배양한 colony의 형태는 Fig. 6과 같다. 분생자와 분생자병의 형태에서 볼 수 있듯이 이 균주는 전형적인 빗자루 모양의 분생자를 가지고 있었으며 colony의 색도 짙은 초록색을 띠어 *Penicillium* 속인 것으로 추정하였다. "Introduction to Food-Borne Fungi" 문헌을 참고로 하여 형태적, 생리적 결과를 비교 동정한 결과 *Penicillium* sp.에 속하는 것으로 판단되어 분리 균주를 *Penicillium* sp. KJ81로 명명하였다(10). 특히 *Penicillium chrysogenum*과 가장 유사하였으나 정확한 동정은 좀더 연구가 진행되어야 하리라 본다. *Penicillium* sp. KJ81의 일반적 형태와 특성을 Table 3에 표기하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 *Penicillium* sp.의 일반적 특성과 비교해 본 결과 본 균주는 그 형태적 면에서 *Penicillium* sp.로 분류하기에 충분하였다. 또한 *Penicillium* sp. KJ81은 생리적으로 glucose, fructose, mannose 그리고 mannitol과 같은 다양한 당을 이용하여 대사할 수 있었다.

앞으로 분리된 KJ81주를 이용하여 erythritol을 최대량 생산할 수 있는 배양조건을 확립하고자 하며 생산 관련 효소들을 분리 그 특성을 살피므로써 공업적 생산을 위한 기초

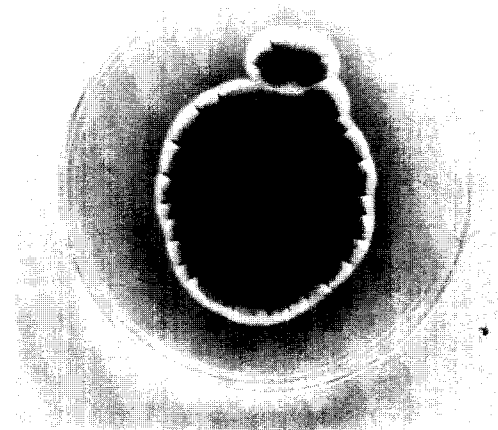


Fig. 6. Colony of *Penicillium* sp. KJ81. Cultivation was performed in Czapek-Dox media for 3 days at 37°C.

Table 3. Morphological and physiological properties of *Penicillium* sp. KJ81

Properties	<i>Penicillium</i> spp.	Isolated strain ( <i>Penicillium</i> sp. KJ81)
Color of colony	yellow-brown, white or green shade	white to green shade
Growth of colony	restricted or fast	fast (3-4 days)
Conidiospore stipe	rough or smooth	smooth
- Conidia	cylindrical, globose or ellipsoid	globose or ellipsoid
- Phialides	lanccolate or flask-shaped	flask-shaped
Type of conidiophores branching	one-stage branched or one-to three-stage branched	one-to three-stage branched
Assimilation of KNO <sub>3</sub>		+
- Fermented sugars		glucose, sucrose, maltose, mannose, fructose

자료로 이용하고자 한다. 또한 기존의 보고된 돌연변이주 제조기법을 이용, *Penicillium* sp. KJ81의 활성을 향상시킨 돌연변이주를 제작하고자 한다.

**감사의 말**

균주의 형태 관찰과 사진 촬영을 도와준 국립보건원 세균과 심영훈에게 감사드립니다. 본 연구의 일부는 교육부 기초과학육성연구비(BSRI-95-4432)의 지원으로 수행되었습니다.

**참고문헌**

1. 오태광. 1994. 식품신소재의 바이오 생산. 미생물과 산업 20, 34-7.

2. 이광준, 주영란, 임재윤. 1996. 미생물 배양액의 Erythritol 분석. 자연과학연구 10, 63-68.
3. 전영중, 서승현. 1995. 미생물 발효에 의한 에리스리톨 생산공정의 개발. 생물화공 9(4), 24-29.
4. Dooms, L., G.L. Hennebert and H. Verachtert. 1971. Polyol synthesis and taxonomic characters in the genus *Moniliella*. *Antonie van Leeuwenhoek* 37, 107-118.
5. Hajny, G.J., J.H. Smith and J.C. Garver. 1964. Erythritol production by a yeastlike fungus. *Appl. Microbiol.* 12, 240-246.
6. Huneck, S. and G. Trotet. 1967. Lichen constituents. XXXVII. Component of some species of *Rocella*. *Z. Naturforsch* 22B, 671-673.
7. Kawanabe, J., M. Hirasawa, T. Takeuchi, T. Oda and T. Ikeda. 1992. Noncarcinogenicity of Erythritol as a substrate. *Caries Res.* 26, 358-362.
8. Klark, J.B.K., E.F. Graham, B.A. Lewis and F. Smith. 1967. D-Mannitol, sorbitol, and glycerol in bovine serum. *J. Reprod. Fert.* 13(2), 189-197.
9. Onishi, H. 1967. Production of polyalcohols by yeasts. *Hakko Kyokaishi* 25, 497-506.
10. Robert, A.S., S.H. Ellen and A.N. Connie van Oorschot. 1981. Introduction to Food-Borne Fungi. *Centraalbureau Voor Schimmelcultures press*, 99-138.
11. Sasaki, T. 1989. Production and properties of erythritol obtained by *Aureobasidium* fermentation. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 63(6), 1130-1132.
12. Shindou, 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. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 62, 623.
13. Shindou, T., Y. Sasaki, H. Miki, T. Eguchi, K. Hagiwara and T. Ichikawa. 1988. Determination of erythritol in fermented foods by high performance liquid chromatography. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 29, 419-422.
14. Hara, T., J.Y. Lim, Y. Fujio and S. Ueda. 1983. Purification and properties of endo-polygalacturonase of *Aspergillus niger* cultured in medium containing Satsuma Mandarin Peel. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 33(11), 610-617.
15. Trevelyan, W.E., D.P. Procter and J.S. Harrison. 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 166, 4219, 444-5.
16. Wako, K., G. Kawaguchi, N. Kubo, T. Asumi and K. Hayashi. 1988. Newly isolated yeasts producing high yields of polyols. *Hakkokogaku* 66, 209-215.
17. Wako, K., H. Ishizuka, G. Kawaguchi, N. Kubo, T. Kasumi and K. Hayashi. 1988. Erythritol producing by *Aureobasidium* sp. SN-115. *Hakkokogaku* 66, 217-233.
18. Yoshida, H., T. Sugawara and J. Hayashi. 1984. Studies in free sugars and free sugar alcohols of mushrooms. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 31, 765-771.

(Received January 17, 1997/Accepted March 15, 1997)

---

**ABSTRACT: Isolation of Erythritol Producing Microorganisms from Nature**

Kwang-Jun Lee<sup>1,2</sup>, Young-Ran Ju<sup>2</sup>, Kil-Ung Lee<sup>2</sup>, Kyung-Su Oh<sup>2</sup>, Yun-Jin Lee<sup>2</sup>, Sang-Hee Park<sup>1</sup> and Jai-Yun Lim<sup>1\*</sup>(<sup>1</sup>Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, <sup>2</sup>Division of Microbiological Chemistry, National Institute of Health, 5 Nokbun-Dong, Seoul 122-020, Korea)

For the purpose of obtaining microorganisms producing high amount of erythritol, the screening test was carried out. Productivity of erythritol was analyzed by paper chromatography and HPLC methods. Among more than two hundred isolates, one strain(KJ81) was selected as an erythritol producer from the soil of corn shock. The isolated strain was identified as *Penicillium* sp. KJ81 from the morphological and physiological characteristics. *Penicillium* sp. KJ81 showed white to green colony color, two- to three-stage branching conidiophores and flask-shaped phialides.