

특집: 생물공정 기술의 최적화(II-V)

생물공학적 방법에 의한 당알코올 생산기술의 개발

윤종원 · 서승현¹ · 전영중¹

대구대학교 생물공학과, ¹제일제당 종합연구소

당알코올이란 당류의 환원성말단에 수소를 첨가하여 알코올기(-OH)로 만든 당류를 말하는데 산업적인 가치를 가지는 대표적인 당알코올로는 sorbitol, mannitol, maltitol, xylitol, erythritol 등을 들 수 있다. 당알코올류는 일반적으로 열 및 산·알칼리에 안정하고 가열시 갈변현상을 일으키지 않는 등의 물성적 특징을 가지고 있고, 식품영양학적 측면에서는 저칼로리이며, 비충치성의 특징을 가진 외에 물에 용해시 강한 흡열작용으로 청량감을 주므로 껌, 캔디, 빵, 음료수 등 식품에 폭넓게 이용되고 있다. 그뿐만 아니라 고침투성 보습성, 단백질 변성방지효과도 있어 수산물 가공용, 의약품, 공업용 등으로도 폭넓게 이용되고 있다. 당알코올의 제법으로는 일반적으로는 aldose 혹은 ketose형태의 당을 고온·고압 하에서 수소첨가하여 환원시키는 방법을 채택하고 있으나 유일하게 에리스리톨만은 미생물발효를 이용한 대량생산방법이 개발되어 있다. (Table 1) 당알코올류의 국내시장현황은 sorbitol이 연간 약 30,000톤으로서 최대시장을 형성하고 있고 나머지는 maltitol, xylitol이 500~1,000톤 규모로 현재로는 시장규모가 미미하나 최

근 급속한 성장세를 보이고 있는 실정이다. 현재 국내에서 생산되는 당알코올은 솔비톨과 말티톨 뿐이다.(LG화학, 삼양제넥스) 일본에서의 당알코올류의 품목별 시장규모는 Table 2와 같다.

본고에서는 당사에서 최근 개발성공한 에리스리톨을 중심으로 다른 당알코올들의 생물공학적 생산방법에 대하여 간략하게 기술해 보고자 한다.

만니톨 (Mannitol)

만니톨은 버섯, 해조류, 과일 등에 광범위하게 소량 존재하는 6탄소 당알콜(hexitol)의 일종이다(1-3). 만니톨은 설탕의 30~40% 정도의 감미도를 가지고 있어 설탕의 사용이 제한되는 식품제조에서 대용감미료로 사용되고 있을 뿐 아니라, 냉음미 (cooling taste), 저흡습성 (low hygroscopicity) 등의 우수한 특성을 갖고 있으므로 껌, 캔디 등의 제과류의 첨가제로 많이 응용되고 있다. 또한 저혈압 치료제의 중간물질로 사용되

Table 1. Comparison of sugar alcohols

	Raw material	Production method	Relative sweetness	Type	Calory (Kcal/g)	Heat of solution (Kcal/g)
Sorbitol	Glucose	Hydrogenation	60	Syrup, Crystal	2.8	- 26.0
Maltitol	Maltose	Hydrogenation	80	Syrup Powder	1.8	- 18.9
Reduced corn syrup	Corn syrup	Hydrogenation	10-60	Syrup Powder		
Lactitol	Lactose	Hydrogenation	40	Crystal	1.6	- 13.9
Palatinit	Palatinose	Hydrogenation	50	Powder	2.0	
Mannitol	Sucrose	Hydrogenation	70	Crystal		- 28.5
Xylitol	Xylose	Hydrogenation	100	Crystal	2.8	- 36.5
Erythritol	Glucose	Fermentation	80	Crystal	0.3	- 42.8

Table 2. Market of sugar alcohols in Japan

	Consumption(Ton/yr)	Price(Yen/Kg)	Amounts (10 ⁸ Yen)
Sorbitol	90,000	130	117.0
Maltitol	12,000	400	48.0
Xylitol	400	1,800	7.2
Lactitol	180	500	0.9
Reduced corn syrup	22,000	200	44.0
Erythritol	2,500	800	20.0

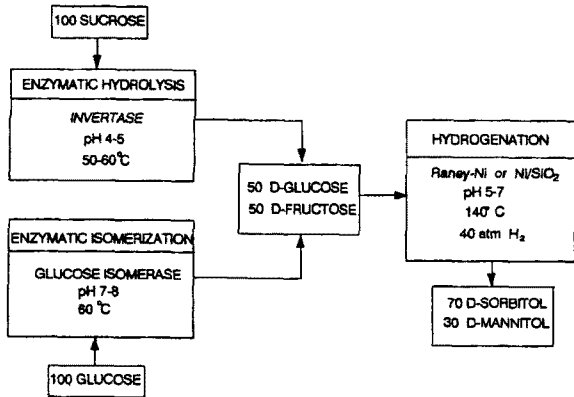


Fig. 1. A commercial process for mannitol production.

고 각종 의약품제제의 제조공정에서 쓴 맛을 경감시켜 주기 위한 코팅제로도 이용되고 있는 등, 식품 및 의약품 산업에서 광범위하게 사용되고 있다(4). 만니톨은 다른 당알콜류와 함께 우수한 기능성을 갖고 있어 대체감미료서의 응용가능성 또한 높다.

만니톨의 상업적 제조공정은 포도당 또는 과당을 금속촉매 하에서 화학적으로 환원시키는 방법인데(Fig. 1), 합성법에 의한 제조공정은 솔비톨을 부산물로 생산하여 이를 분리하기 위한 별도의 정제공정이 필요할 뿐 아니라 수율이 낮은 단점을 안고 있다. 생물학적 공정에 의해 만니톨을 제조하려는 노력은 1980년대 말에 이르러 비로소 시작되어, 현재 일본의 쓰미모토 중공업 (Sumitomo Heavy Industries, Ltd.)과 아지노모토 (Ajinomoto Co.)가 가장 활발하게 연구를 수행중인 것으로 알려져 있으나(5, 6), 국내의 경우는 이에 대한 연구노력이 대단히 부족한 실정이다.

미생물에 의한 만니톨의 생합성경로는 사용되는 탄소원과 미생물의 종류에 따라 서로 다르다는 사실이 알려져 있을 뿐, 각 미생물에 대한 정확한 생합성경로는 지금까지 정확하게 규명되어 있지 않지만, Fig. 2에 나타난 바와 같이 주로 두가지 생성경로를 따른다(7-10). 첫째, NADH 또는 NADPH 존재하에서 mannitol dehydrogenase (EC 1.1.1.67)에 의해 fructose를 직접 탈수소화(direct dehydrogenation)시켜 생성되는 경우이고, 두번째 경로는 mannitol-1-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.17)에 의해 전구체인 mannitol-1-phosphate를 생성한 후 mannitol 1-phosphatase (EC 3.1.3.22)에 의해 mannitol이 생성되는 것이다.

미생물이 발효과정중에 만니톨을 생성하는 이유는 미생물의 종류에 따라 다소 다른데, 일부 효모의 경우 lipid 구성성분으로 생합성되기도 하고, 일부 bacteria의 경우는 cell wall 구성성분으로, 또 일부 fungi의 경우에는 구조상 (structural) 또는 저장성다당류 (storage polysaccharides)로서의 기능을 위해서 생합성된다고 알려져 있으며, 내삼투압성 (osmotolerant)

생물산업

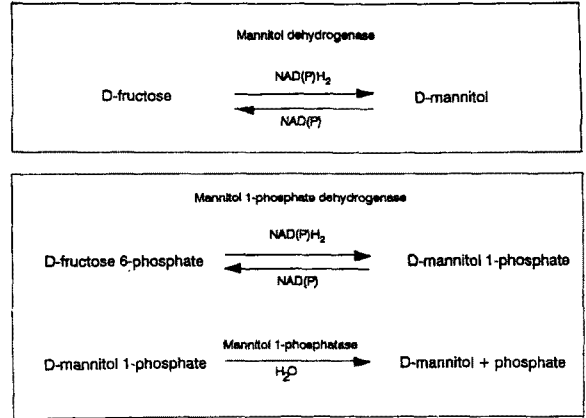


Fig. 2. Two proposed pathways of mannitol formation.

미생물들의 경우 삼투압 극복을 위한 compatible solute로서 만니톨을 분비하는 것으로 알려져 있다(11, 12). 그러나 주 발효대사산물로서 만니톨을 생산하는 경우는 *Lactobacillus*속과 *Leuconostoc*속 등의 젖산생성균 (lactic-acid bacteria)들에 의한 비균일발효 (heterofermentation)에 의해서이고 (Glucose+2 Fructose → 2 Mannitol+Acetic acid+Lactic acid+CO₂), 따라서 생물공학적인 방법에 의한 만니톨 생산공정의 개발을 위해서 주로 이들 젖산생성균들은 이용하여 왔다(5, 6, 13). Glucose는 fructose가 mannitol로 환원되는데 전자공여체로 작용하고, 부산물로 생성되는 유기산들에 의해 발효중에 pH가 급격히 낮아질 뿐 아니라 최종발효액으로 부터 만니톨을 분리해 내는데 이온교환수지탑을 이용한 분리정제 공정이 필수적이다. 일본 쓰미모토 중공업의 연구팀은 자체개발한 *Lactobacillus*속 미생물을 이용하여 이성화당, CSL 등의 산업기질을 이용하여 128 g/l의 고농도로 만니톨을 생산하는데 성공한 바 있고(5), 국내의 경우 김치의 발효중에 분리된 새로운 젖산생성균 (*Lactobacillus*속)을 이용하여 과당으로 부터 75 g/l의 발효농도로 만니톨을 생산한 예가 있어(14-16), 멀지않아 생물공학적 공정에 의한 만니톨의 대량생산이 가능해 지리라 기대된다.

솔비톨 (Sorbitol)

솔비톨은 만니톨과 물리화학적 성질이 유사한 hexitol로서 공업적 제조공정상 만니톨과 함께 생산할 수도 있는데(4), 그 구조상 만니톨이 과당을 환원시켜 생산되는데 비해 포도당을 환원시켜 생산되므로 생산가격이 만니톨에 비해 낮은 뿐 아니라 당알콜류 중에서도 가장 낮다. 또한 물에 대한 용해도 (60%, w/w, 25°C)가 만니톨(20%, w/w)에 비해 크게 높아서 식품 등의 첨가제 용도로서의 응용성이 좋아 그 수요가 만니톨의 30배 정도에 이르고 있다.

화학합성법에 의한 솔비톨의 생산공정이 매우 경제적이기

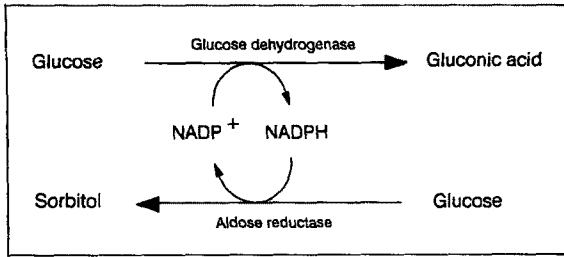


Fig. 3. An enzyme system for sorbitol production from glucose.

때문에 지금까지 생물공학적 공정에 의한 생산공정의 개발에 대한 관심이 대단히 부족하였다. 지금까지 탐색된 솔비톨을 생산하는 미생물로는 *Zymomonas*속 세균이 대표적이인데 (17-20), Fig. 3에 도식한 바와 같이 이 세균은 포도당을 기질로 배양할 경우 NADP가 결합된 glucose-fructose oxidoreductase를 분비하고 gluconic acid와 함께 솔비톨을 생산한다. 그러나 발효농도가 매우 낮을 뿐 아니라 조효소의 재생이 효과적으로 일어나지 않아 연속생산공정이 실제로 매우 어렵다는 단점이 있어 새로운 미생물의 탐색이 요구된다. Ikemi 등 (21)은 음이온으로 하전된 membrane에 NADP를 효과적으로 고정화시킨 생물반응기를 사용하여 솔비톨의 연속생산을 시도하였다. 이 결과, 240 g/l 포도당 용액을 기질로 사용하여 100 g/l의 솔비톨과 120 g/l의 gluconic acid를 동시에 생산하였는데, 800시간까지 조효소를 성공적으로 재생시키면서 연속생산이 가능하였으나 이때 생산성은 114 g//day 로서 낮은 수준이었다.

그럼에도 불구하고 고수율 솔비톨 생산균에 대한 개발노력이 계속되고 있는 중요한 이유는 만니톨 생성균의 대부분이 과당을 주로 이용하는데 비해, 솔비톨 생산균의 경우 기질로서 전분가수분해산물 등의 다양한 산업기질을 직접 이용할 수 있기 때문이다.

잘리톨 (Xylitol)

잘리톨은 여러가지 과일과 채소류에 소량 함유되어 있는 오탄당알콜 (pentitol)로서 에리스리톨과 함께 충치 및 당뇨유발을 억제하는 등의 기능이 다른 당알코올류에 비해 우수한 특징이 있다(22). 잘리톨의 상업적 제조공정 역시 xylose 또는 그 유도체를 화학적으로 환원시키는 방법에 의해 제조하는 것인데, 특히 xylose가 고가의 원료임에도 불구하고 반응수율이 낮아서 생산가격이 매우 높은 단점이 있다. 다른 여러가지 당알코올류와 비교해서 잘리톨의 이용에 대한 관심이 높은 이유는 전술한 우수한 기능성 이외에도 감미도가 설탕과 거의 유사한 수준이고, 용해될 때의 흡열량 (heat of solution)이 -36.5 Kcal/g 으로 매우 커서 청량감을 제공하는데 유리하며, 수용액에서의 용해도 (64%, w/w)가 높아 첨가제로서의 가공특성이 좋은

점 등을 들 수 있다(23).

따라서 생물공학적 방법에 의한 잘리톨 생산에 관한 연구가 오랫동안 많은 연구자들에 의해 이루어져 왔고, 잘리톨 생산능이 있는 많은 종류의 미생물들이 알려져 있다(24-26). 그 중에서 고수율로 잘리톨을 생산하는 대표적인 미생물은 *Candida*속으로서 이 미생물을 이용하여 많은 연구자들이 만족할 만한 잘리톨 생산수율을 보고한 바 있다(27-29). 최근 국내 연구팀에 의해서도 *Candida parapsilosis* 변이주를 이용하여 300 g/l의 xylose로부터 최고 242 g/l의 잘리톨을 생산한 예 (30)도 있어 조만간 산업적 규모의 생산공정이 개발될 전망이다. 그러나 발효기질로 고가의 xylose를 사용하고 발효기간이 10일 이상 요구되는 단점이 해결해야 할 문제인데, 기질의 대체를 위한 노력의 일환으로 목재 가수분해산물 (wood hydrolysates) 중 hemicellulose 성분을 미생물이 이용하게 하여 잘리톨 발효 연구를 수행한 경우도 있다(31). Onishi 등(24)은 포도당을 잘리톨 생산기질로 이용하기 위하여 잘리톨 생산능이 있는 128종의 미생물을 검토한 결과, 잘리톨의 생성경로상 포도당을 직접 발효기질로 이용하는 것은 불가능하였고, 3단계의 발효과정 (Glucose → arabitol → xylulose → xylitol)을 통해 잘리톨을 생산하는 방법을 제안하였으나 공정이 복잡하여 대량생산에는 비경제적인 방법인 것으로 판단된다. 잘리톨 생성경로에서 발효과정중에 DO level, 포도당 첨가유무 등의 영향에 따라 ethanol 또는 glycerol 등의 부산물이 생성될 수도 있으므로 발효공정의 운전시 세심한 주의가 요구된다(30,32).

에리스리톨

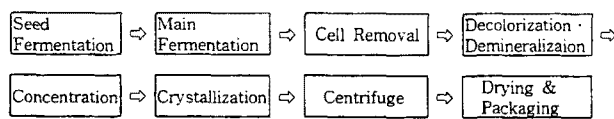
에리스리톨 개요

에리스리톨은 전술한 바와 같이 당알코올류 중에서 현재로서는 유일하게 미생물발효에 의하여 제조 가능한 품목으로서 최근까지 대량생산 방법이 개발되지 않아 산업화되지 못하였으나 1990년 일본 日研化學에 의해 미생물(효모)발효에 의한 process개발이 성공되어 처음으로 산업화되었고 그 이후 이 물질이 지닌 뛰어난 물성적 특징이 알려지면서 급속하게 시장규모가 확대되고 있다(33). 에리스리톨(meso-Erythritol)은 4탄당의 당알코올로서 문헌상으로 1874년 최초로 발견되었고(34) 그 구조는 Shimada(35)에 의해 확인되었다. 에리스리톨은 발효식품, 동식물 등 자연계에 폭넓게 존재하며 그 분포는 Table 3과 같다.

에리스리톨의 대량생산을 위한 제조방법으로 화학합성법과 발효법이 연구되었다. 화학합성법은 meso-tartarate의 환원에 의한 방법 및 dialdehyde starch의 가수분해, 수소첨가에 의한 방법이 알려져 있으나 경제성이 없어서 산업화되지는 않았다(36). 발효법에 관한 연구는 화학합성법에 비해 많이 수행되어 왔는데 비교적 주목받는 에리스리톨 생산균주로는 글루코스

Table 3. Occurrence of erythritol in nature

Plant	lichens	3~50 mg/g
	mushrooms	20~40 mg/g
	lemons	0.022~0.047 mg/g
	pears	0~0.040 mg/g
	grapes	0.042 mg/g
Fermented food	wine	170~300 mg/l
	rice wine	150~180 mg/l
	soybean paste	1.31 mg/g
	soybean sauce	910 mg/l
	Mammalian	bull semen
	chicken semen	50 mg/g
	human semen	ND
	human serum	0.45 mg/g
	human urine	1.6~3.3 mg/L

**Fig. 4.** Schematic process flow for erythritol production.

를 약 40%의 수율로 전환하는 *Toula* sp.(38), 일본의 日研化學에서 개발한 *Aureobasidium* sp.(39-41) 그리고 비당질계 원료인 n-paraffin을 이용하는 citric acid 생산 균주인 *Candida zeylanoides*를(42) 들 수 있다. 이 중 현재까지 산업적으로 이용되는 것으로 확인된 균주는 일본의 *Aureobasidium* sp.이며 *Toula* 균주의 산업적 이용 여부는 확인되지 않고 있다. 에리스리톨의 전체제조공정은 Fig. 4와 같다.

에리스리톨의 물성적 측면에서의 특징은 설탕과 유사한 우수한 결정성, 상온에서 상대습도 90%까지 흡습하지 않는 저흡습성, 낮은 가열착색성, 물에 용해시 흡열반응을 일으키기 때문에 발생하는 섭취시의 청량감 등을 들 수 있다. 특히 에리스리톨의 물에 대한 용해열은 Table 1에 나타난 바와 같이 글루코스의 약 3배, 솔비톨의 1.8배 정도로 통상 사용되는 감미료 중 가장 낮은 편이다. 또한 에리스리톨은 생리적 측면에서도 저칼로리(설탕의 1/10 이하) 및 비충치성의 우수한 특성을 보이고 있다. 에리스리톨은 음료, 과자, 초코렛, 껌, 캔디, 유제품 등 저칼로리, 비충치성을 원하는 제품 뿐만 아니라 에리스리톨의 청량감있고 산뜻한 맛을 이용할 수 있는 여러 제품에 다양하게 응용이 가능하다. 각종 고감도 감미료(아스파탐, 스테비아)와 적정비율로 혼합할 경우 설탕의 맛과 유사한 초저칼로리, 비충치성의 탁상 감미료를 만들 수 있으며 요쿠르트에 있어서는 에리스리톨의 저 칼로리 특성 외에도 난발효성 특성이 이용된다. 에리스리톨이 요쿠르트에 사용되는 경우 설탕을 사용할 경우에 비해 적정 pH로 추정되는 4.2로 도달하는데 긴 시간이 소요되고 보존 중 pH저하가 억제되어 보존기간의 연장이 가능하다.

생물산업

Table 4. Comparison of CFW001 with Nikken Chemical's strain

Strain	Cheil Sugar	Nikken Chemical
	<i>Trichosporonoides</i> sp. <i>Aureobasidium</i> sp.	
Feed conc. (g/L)	400	400
Erythritol conc. (g/L)	130	180
Yield (%)	32.5	45
Fermentation time (h)	228	90
Productivity (g/l/h)	0.57	2.0

에리스리톨 발효공정의 개발

(1) Wild균주의 특성연구

1) 내삼투압성

먼저 에리스리톨 생산용 wild균주를 자연계로부터 선별하여 분리동정을 실시한 결과 Haskin(43) 문헌을 참고로하여 *Trichosporonoides* sp.로 분류하고 CFW001이라는 고유번호를 부여하였다. 이 균주는 Yeast malt agar배지에서 cream색 colony를 형성하고 원형에 가까운 타원형의 모양을 지닌 단세포 형태로 출아에 의해 번식하는 전형적인 효모로서 분절포자, 출아포자 및 분생포자를 형성한다. 일반적으로 당내성(sugar-tolerant) 또는 염내성(salt-tolerant) 효모는 높은 당농도 및 염이 포함되어 있는 환경 하에서 세포내외에 당알코올류(polyol)를 축적한다. 축적된 당알코올류는 삼투압대항물질(compatible solute)의 역할을 하여 고삼투압으로부터 세포를 보호하여 준다(44-45). CFW001 균주는 80% 당농도, KCl 1.5M에서도 생육이 가능한 강한 내삼투압성 균주로 판명되었다. 또한 내삼투압성이 높은 균주를 선별할 경우 에리스리톨 역가가 높은 균주가 분리되는 것으로 보고되어 있어(46) 이러한 원리를 내삼투압 mutant 선별실험의 기본전략으로 이용하였다.

2) 역가수준의 평가

40% glucose 생산배지를 사용할 경우의 CFW001 균주의 에리스리톨 생산역가를 日研化學에서 발표한 개발균주인 *Aureobasidium* sp. SN-G42의 역가와 비교해 본 결과는 Table 4와 같다. CFW001 균주는 에리스리톨을 주로 축적하며 약간의 glycerol과 ribitol를 부생한다. CFW001균주는 日研化學의 개량균주에 비해 수율은 72% 수준이나 생산성은 28% 수준에 불과하다. 이것은 CFW001균주가 에리스리톨의 생성속도면에서 개량이 필요하다는 점을 의미하며 따라서 실제 산업적 적용이 가능한 균주를 개발하기 위해서는 특히 속도면에서의 개량이 필요하다.

(2) Wild 균주의 발효특성

Wild *Trichosporonoides* sp. CFW001 균주를 사용하여 여러 발효조건에서의 특성시험을 시행하였다. 먼저 탄소원으로서 glucose와 sucrose를 비교실험한 결과 에리스리톨의 생산 측면에서는 두 가지가 동일한 결과를 보였으나 sucrose 사용시에는

Table 5. Erythritol productivity of mutant strains (40% glucose medium)

Strain	Erythritol (g/L)	Glycerol (g/L)	Culture time (days)	Productivity (g/L/h)	Remarks
Wild	130	12	8	0.57	
ST 1	220	11	5	1.56	Sugar-tolerant
ST 2	199	12	5	1.41	Sugar-tolerant
KT 1	180	18	7	1.07	KCl-tolerant
KT 2	178	21	7	1.06	KCl-tolerant
KT 3	175	30	7	1.04	KCl-tolerant

부산물로서 리비톨이 많이 축적되는 단점이 있었다. 또한 당 농도를 10~50%까지 변화시키면서 그 영향을 살펴 본 결과 당 농도 30% 이상에서 에리스리톨 수율이 저하되기 시작했으며 50% 이상에서는 급격한 저하가 관찰되었다. 또한 당농도가 증가함에 따라 여러 다른 당알코올류를 다량 부생하는 경향이 있었다. 이 균주의 경우 60% 이상의 당농도에서는 발효가 불가능하였다. 최적온도는 32°C이었으며 aeration이 부족한 환경이 될수록 당소모속도와 에리스리톨 생성속도가 떨어지는 현상이 관찰되었다

(3) 변이처리에 의한 우수균주의 개발

Wild균주인 CFW001의 특성연구 결과를 바탕으로 다음과 같은 목표를 설정하여 균주개발을 실시하였다. 1) 에리스리톨 수율의 제고, 2) 발효시간의 단축을 통한 생산성 향상, 3) 거품 발생이 적은 균주의 개발.

균주개발을 위한 방법으로는 모균주를 NTG 혹은 UV를 이용하여 변이처리한 후, glucose 혹은 KCl을 고농도로 함유한 고삼투압성 plate상에서 빠른 성장을 보이는 colony를 선정하여 flask배양으로 역가를 평가하는 보편적인 방법을 사용하였다. 이와 같은 방법으로 10개월의 기간동안 약 10,000개의 colony를 선별하여 flask 실험을 실시한 결과 5주의 우수균주를 선별하였으며 그 결과는 Table 5와 같다.

내당성 mutant중 가장 우수한 ST1의 경우, wild 균주에 비해 생산성은 최고 2.7배 이상, 발효농도는 70% 이상 향상되었으며 부산물 부생비율이 상대적으로 저하되었다. 또한 당소모속도가 가장 빠르고 에리스리톨 축적 농도가 mutant 5주중 가장 높았으며 배양 5day에서의 균체 농도는 O.D.값 40으로 wild균주의 약 2배이었다. 이 결과를 일본 日研化學 *Aureobasidium* sp. SN-G42 균주와 비교하면 ST1 균주의 생산성(총발량 15% 감산)은 1.56 g/L/h로 약 80% 수준이었으므로 향후 최적발효조건을 찾아낼 경우 거의 대등한 수준 이상으로 달성 가능할 것으로 기대된다. KCl 내성 mutant의 경우에는 에리스리톨 농도가 35% 이상 향상되었으나 균주의 stability가 떨어지는 약점이 발견되었다. 변이균주 ST1을 이용한 전형적인 발효graph는 Fig. 5와 같다. 에리스리톨은 초기에 약간의 lag period를 지난 후 24 hr째부터 시작해서 glucose가 거의 소진되는 72 hr까지 급속히 축적된 후 그 이후의 시간에는 서서히 증가한다. 일단 glucose가 거의 소진 후에는 그 때까지 상

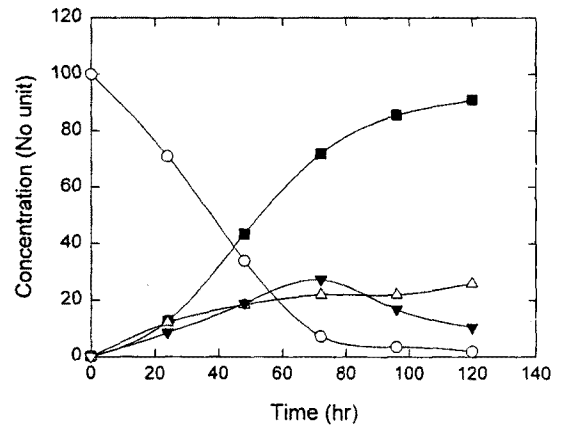


Fig. 5. Typical time course of erythritol fermentation with *Trichosporonoides* sp. ST1. ○, glucose; ■, erythritol; ▼, glycerol; △, cell mass.

당량 축적되었던 glycerol의 농도는 도로 감소하는 현상을 보였다.

(4) 변이균주(ST1)의 특성

변이균주인 ST1균주는 CFW001 보다 당소모속도가 빠르며 50%의 당농도에서도 에리스리톨 발효가 가능하였다. 또한 호흡억제제인 sodium azid를 minimal 배지에 농도별로 처리한 결과 ST1균주는 wild 균주에 비해 내성이 강하였다.

Flask 배지조건 실험에서 최적 N source는 yeast extract였으며 glucose 40%를 기준으로 했을 때 농도가 1.5~2.0%사이가 최적이었다. yeast extract의 원가비율을 감안하여 urea를 0.16%첨가하여 yeast extract의 농도를 1%로 감소시켰다. 에리스리톨 발효에 있어서 C/N ratio는 중요한 요소로 에리스리톨 농도 및 부산물 부생에 민감하게 작용한다. C/N ratio가 표준 조건보다 높으면 당소모속도가 저하되고 다량의 부산물을 축적한다. C/N ratio가 낮으면 당소모속도가 증가되나 균체농도가 증가하여 에리스리톨수율이 저하된다. N source가 과량 첨가(yeast extract 2%, urea 0.4% 이상) 되었을 때 성장이 저해되어 당을 전부 소모하지 못하였으며 에리스리톨 축적농도가 100 g/L 미만이었다. 이런 현상은 에리스리톨 생산균주의 분리 환경에 기인된 것으로 추정된다(최적 배지조건 Glucose 40%, Yeast 1%, Urea 0.16~0.18).

(5) 5L-Jar 배양조건

1200L scale-up 실험에 앞서 ST1 균주, 5L fermenter를 이용하여 여러조건 실험을 행하였다. 다른 미생물 발효와 달리 거품발생에 따른 over flow, 균체부양문제해결, 에리스리톨의 생산성, 농도 향상을 목표로 실험을 하였다.

Flask의 발효 최적 온도는 32°C 부근이었으나 5L 배양에서의 최적 온도는 36°C였다. 이결과는 Flask와 5L fermenter 사이의 배양환경 차이에서 기인 된 것으로 추정된다(통기, 교반 차이). 온도가 상승함에 따라 거품발생량이 저하되었으며 36°C에서의 거품발생량은 제일 적었다.

Aeration rate를 0.25 vvm 부터 1.2 vvm까지 변화시키면서 그 영향을 살펴 본 결과 5L fermenter에서의 최적 aeration rate는 0.5 vvm이었다.

5L fermenter의 impeller수와 rpm을 조정하여 O.T.R.를 0.15, 0.32로하여 그 영향을 살펴본 결과 O.T.R.이 커지면 당소 모속도가 증가하지만 균체농도가 증가하여 에리스리톨 수율이 저하되는 경향이 있었다. 최적 O.T.R.은 0.15~0.2 부근으로 추정된다.

Flask 배지조건을 배지조건을 5L fermenter에 적용하였을때 부산물인 glycerol농도가 35 g/L 이상 축적되었다. 부산물 축적농도를 줄이기 위하여 yeast extract의 농도를 1.2%, urea 0.16%로 하였을 때 glycerol농도는 26 g/L로 감소하였고 urea 농도를 0.4%까지 증가시켰을 때 glycerol 축적농도는 6.6 g/L수준으로 감소하였지만 에리스리톨 축적농도는 146.3 g/L로 저하되었다. 이상의 실험 결과를 바탕으로 5L fermenter의 최적 배지조건은 glucose 40%, yeast extract 1.2%, urea 0.16%였다.

(6) 1200L scale-up

앞서 5L fermenter에서 선정된 조건을 1200L fermenter에 적용하여 2회 반복 실험 하였다. 실험 결과 배양시간은 5L비해 24시간 단축 되었고 사상율도(1200L: 2단 condenser) 증가되어 에리스리톨 수율도 48%로 증가하였고 배양을 114시간까지 연장하였을 때 부산물인 glycerol 농도도 17.1 g/L로 감소하였다.

참고문헌

- Lewis, D. H. and D. C. Smith 1967. *New Phytol.*, **66**, 143.
- Ikawa, T. T., T. Watanabe, and K. Nisizawa 1972. *Plant Cell Physiol.*, **13**, 1017.
- Wong, B., J. R. Perfect, S. Beggs, and K. A. Wright 1990. *Infection and Immunity*, **58**, 1664.
- Makkee, M., A. P. G. Kieboom, and H. Van Bekkum 1985. *Starch/Staerke*, **37**, 136.
- Sumitomo Heavy Ind. 1992. European Patent No. EP 486024.
- Ajinomoto. 1987. Japanese Patent No. JP 62239995.
- Smiley, J. L., M. C. Cadmus, and P. Liepins 1967. *Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 365.
- Lee, W. H. 1967. *Appl. Microbiol.*, **15**, 1206.
- Helle, K. B. and I. Klungsoyr 1962. *Biochim. Biophys. Acta.*, **65**, 461.
- Wolef, J. B. and N. O. Kaplan 1956. *J. Biol. Chem.*, **218**, 849.
- Jennings, D. H. 1984. *Adv. Microb. Physiol.*, **25**, 149.
- Luxo, C. 1993. *Can. J. Microbiol.*, **39**, 868.
- Soetaert, W., J. Domen, and E. J. Vandamme 1990. *Proc. of Physiol. Immobilized Cells.*, p. 307-310.
- Yun, J. W., S. C. Kang, and S. K. Song 1996. *Biotechnol. Lett.*, **18**, 35.
- Kang, S. C., J. W. Yun and T. W. Ro 1996. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **11**, 181.
- Yun, J. W., S. C. Kang, and S. K. Song 1996. *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, 279.
- Zachariou, M. and R. K. Scope 1986. *J. Bacteriol.*, **167**, 863.
- Viikari, L. 1984. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 252.
- Viikari, L. 1984. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 118.
- Doelle, H. W. and P. F. Greenfield 1985. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 411.
- Ikemi, M., N. Koizumi and Y. Ishimatsu 1990. *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 149.
- Hyvonen, L., and P. Koivistoinen 1983. *Adv. Food. Res.*, **28**, 273.
- Collins, P. M. 1995. Carbohydrates p.509, Chapman and Hall.
- Onishi, H. and T. Suzuki 1969. *Appl. Microbiol.*, **18**, 1031.
- Onishi, H. and T. Suzuki 1966. *Agr. Biol. Chem.*, **30**, 1139.
- Nishio, N., K. Sugawa, N. Hayase and S. Nagai 1989. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 356.
- Lu, J., L. B. Tsai, C. S. Gong and G. T. Tsao 1995. *Biotechnol. Lett.*, **17**, 167.
- Chiang, C. and S. G. Knight 1966. *Meth. Enz.*, **9**, 188.
- Horitsu, H., Y. yahashi, K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki and N. Watanabe 1992. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1085.
- Oh, D. K. and J. H. Kim 1996. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 149.
- Parajo, J. C., H. Dominguez, J. M. Dominguez 1995. *Biopr. Eng.*, **13**, 125.
- Du Preez, J. C., B. van Driessel and B. A. Prior 1989. *Biotechnol. Lett.* **11**, 131.
- Nikkei Biotechnology Annual Report 1994. 611, Nikkei BP.
- Hoffmann A. W. 1874. *Ber.*, **7**, 508.
- Shimada A. 1958. *Acta. Ciyst.*, **11**, 748.
- Bioindustry 1988. **5**(9), 32.
- 日本醸造協會雜誌 1981. **76**, 739.
- Hajny G. J. and Smith J. H. 1964. *Appl. Microbiol.*, **12**, 240.
- Wako K., Kawaguchi G., Kubo N., Kasumi T., and Hayashi K. 1988. *醱酵工學*, **66**, 209.
- Wako K. 1988. *醱酵工學*, **66**, 217.
- Ishizuka H. 1989. *J. of Ferm. and Bioeng.*, **68**(5), 310.

42. Hattory K. and Suzuki T. 1974. *Agri. Biol. Chem.*, **38**(6), 1203.
43. Haskin R. H. and Spencer J. F. T. 1967. *Can. J. Botany*, **45**, 515.
44. Larsson C. 1990. *J. Bact., Apr.*, 1769.
45. Alder L. 1980. *Arch. Microbiol.*, 124.
46. Shizuka, H., K. Wako, T. Kosumi and T. Sasaki 1989. *J. Ferm. Bioeng.* **68**(5), 310-314.