

새로운 에리스리톨 생산균주인 *Moniliella suaveolens* var. *nigra*의 탐색 및 특성

박 지 만 · †박 홍 우

한양대학교 화학공학과

(접수 : 1997. 12. 12., 게재승인 : 1998. 4. 10.)

Screening and Characterization of a Novel Erythritol-producing Microorganism, *Moniliella suaveolens* var. *nigra*

Jiman Park and Hongwoo Park†

Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

(Received : 1998. 12. 12., Accepted : 1998. 4. 10.)

Erythritol is a four-carbon sugar alcohol with a low calorific value and non-cariogenicity. Erythritol is a new functional sweetener which can be used as sugar alternative. Erythritol does not cause discomfort such as diarrhoea and flatulence upon ingestion. The purpose of this study is to develop a novel process of erythritol economically in a large scale. To obtain a high erythritol producer, we have screened 3500 colonies from molasses, honey and honey combs. We have selected 40 erythritol-producing microorganisms, one of which yields 140g/L erythritol in 40% glucose medium. We have tested this strain in 5L fermentor to examine the fermentation characteristics. Results of fermentation show that the erythritol production was about 1.4g/L · hr in 400g/L glucose media with a 42% conversion. Further improvements require mutation for a higher producer, process optimization to reduce glycerol, and suppression of excessive foaming.

Key Words : Erythritol, Fermentation, *Moniliella suaveolens*, Sweetener

서 론

에리스리톨은 천연에 존재하는 4탄당의 당알코올로서 설탕에 비하여 80%의 감미도를 갖고 있으며 칼로리는 10%에 불과하여 설탕 대체물질로서의 유용성이 크다(1). 에리스리톨은 입안에서 녹을 때 주위의 열을 흡수하여 청량감을 주며, 결정성이 우수하고 비흡습성이어서 가루당을 만들기가 용이하다(2,3). 또 산이나 열에 안정하며 섭취 후 설사 등의 부작용이 적고 비중치성으로 식품첨가물로의 용도가 광범위하다(4).

에리스리톨을 생산하는 방법으로 화학적 방법과 미생물 발효법이 있다. 화학적 방법은 dialdehyde starch를 니켈 촉매 하에 고온에서 반응을 시켜 에리스리톨을 생산하는 것으로 수율이 낮고 부산물 제거의 어려움이 있어 산업화에 응용되지 못하였다. 미생물 발효법은 Hajny 등이 처음으로 *Torula*종을 꽃가루로부터 분리하여 포도당으로부터 에리스리톨을 생산하였는데, 그 수율은 35-40% 정도이었다(5). 에리스리톨을 생산하는 균주로는 n-Alkane을 기질로 사용하는 *Candida zeylanoides*(6), 포도당을 이용하는 *Aureobasidium* sp.(7), 설탕이나 포도당을 기질로 이용하는 *Trichosporonoides* sp.(8), *Moniliella pollinis*종(2) 등이 보고

되었다.

현재 에리스리톨의 생산은 대부분 회분식 배양으로 수율은 40-50%, 생산성은 1.5-2.0 g/L · hr 정도이다(9). *Torula* sp. 균주의 수율은 35-40% 보이며, *Aureobasidium* sp. 균주는 45%수율과 2.0 g/L · hr의 생산성을 보였다. 에리스리톨의 경제적 생산을 위하여는 기질에 대한 수율을 높여야 하고, 대부분의 균주들이 생산하는 부산물인 글리세롤은 분리공정을 어렵게 하므로, 글리세롤의 생성은 가능한 억제하여야 한다(10). 따라서 수율과 생산성을 높이는 새로운 배양공정 또는 새로운 균주를 개발하는 것이 필요하다.

본 연구는 꿀, 당밀, 벌집으로부터 균주 스크리닝을 통해서 고당물질에서 잘 자라며 에리스리톨의 생산성이 높은 균주를 탐색하였는데 그 결과 선별된 균주는 *Moniliella suaveolens* var. *nigra*임이 밝혀졌고, 수율은 42%, 생산성은 1.4g/L · hr으로 밝혀졌다. 그러나, 이 균주는 부산물인 글리세롤의 생성량이 에리스리톨 생성량의 60%에 이르러 이를 개선함이 요구된다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에서 사용한 시약은 효모 추출물(yeast extract), 박토펙톤(bacto peptone), malt 추출물(malt extract)는 Difco Co.(U.S.A)로부터 구입하였다. 포도당, 한천, 요소는 Junsei Co.(Japan)에서 구입하였다. 에리스리톨, 포도당, 글리세롤 등의 분석용 시약은

† Corresponding author : Dept. of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791 Korea
Tel : (02)290-0487, FAX : (02)299-9496
e-mail: hhwwpp@chollian.net

Sigma Co.(U.S.A)에서 구입하였다.

균주 선별을 위해서 국내 설탕공장의 당밀, 인도네시아산과 태국산 혼합당밀, 국내의 꿀 및 벌집 등을 시료로 사용하였다.

균주 스크리닝

균주 선별을 위해 당밀, 꿀, 벌집 등을 멸균수에 현탁한 후, 상등액 0.2ml을 30% 포도당이 포함된 0.3% 효모 추출물, 0.3% 말트 추출물, 0.3% 박토 펙톤, 2% 한천의 고체 배지에 도말한 후, 30℃ 항온기에서 2-3일 배양하였다. 이 균집체들 중에서 잘 자라는 단일 균집체를 선택한 후, 백금이를 사용하여 20% 포도당, 0.3% 효모 추출물, 0.3% 말트 추출물, 0.3% 박토 펙톤, 0.1% 요소, 2% 한천의 균주 저장용 사면배지에 접종한 후, 상온에서 2일 동안 키우고 4℃ 냉장고에 보관하였다.

균주들의 에리스리톨 생산 여부를 조사하기 위해 10% 포도당, 0.5% 효모 추출물, 0.1% 요소, pH 6.4인 배지 5mL가 들어 있는 시험관에 접종한 후, 원활한 산소 공급을 위해 시험관을 45° 기울여서, 5일 동안 200rpm, 30℃로 배양하였다. 배양 후 발효액을 원심분리한 후 상등액을 취하여 0.45µm membrane(Millipore, U.S.A) filtering을 한후 HPLC로 분석하였다. 에리스리톨을 생산하는 균주들의 생산성을 조사하기 위해, 먼저 시험관에서 증배양한 후 배양액 1mL를 취하여 20% 포도당, 0.5% 효모 추출물, 0.1% 요소, pH 6.4인 배지 30mL가 들어 있는 300mL용량의 진탕 플라스크에 접종한 후 7-8일 동안 30℃, 180rpm으로 배양하였다.

5L 발효기 배양

배양기는 (주)한국발효기(Korea)에서 구입한 5L jar fermentor (KF-5L)를 사용하였으며, 배양조건은 30℃, 1000rpm, 공기유입 속도는 0.5 또는 1vvm에서 행하였다. 배지의 조성은 300g/L 또는 400g/L 포도당, 10g/L 효모추출물, 2g/L 요소이다. 배양부피는 1.5L이며, 균주는 플라스크 배양을 통해 선별한 H5G13-20균주를 이용하였다. 배양은 40% 포도당 배지에서 3-4일간 증배양한 후, 배양부피의 5%를 접종하였다.

분석

분석기기는 Waters Co.(U.S.A)의 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)와 RI(Refractive Index) detector를 30℃로 설정하여 사용하였다. 포도당, 에리스리톨, 글리세롤의 분석칼럼은 carbohydrate analysis column-3.9mm×300mm (Waters Co. U.S.A)이며, pre-column은 µ-Bondapak NH₂ column-

19mm×150mm를 사용하였다. 이동상으로는 물과 acetonitrile를 1:3(v/v)으로 혼합한 용액을 사용하였고, 유속은 1.5mL/min으로 하였고, 주입부피는 2µl로 하였다. 머무름 시간은 10분으로 하였다.

5L 배양기 실험에서의 분석은 Aminex HPX-87H column (Bio-rad, U.S.A)와 Cation H guard cartridge(Bio-rad, U.S.A)를 사용하였다. 이동상으로는 0.01N 황산(松野園製藥, Japan)을 사용하였고, 유속은 0.6mL/min으로 하였다. 주입부피는 2µl로 하였고, 머무름 시간은 20분으로 하였다. Aminex HPX-87H column은 이동상으로 0.01N 황산을 사용하기 때문에 carbohydrate analysis column의 이동상인 acetonitrile 보다 비용면에서 매우 저렴할 뿐만아니라, column의 수명이 길다.

균주 동정

스크리닝을 통해서 선별한 우수한 에리스리톨 생산균주를 한국생명공학연구원 유전자원센터에서 생장조건 test, psedohyphae 형성유무, 당의 fermentation test와 assimilation test 등을 행하여 동정결과를 얻었다.

실험 결과

균주 스크리닝 결과

에리스리톨을 생산하는 균주를 스크리닝하기 위해서 당밀, 꿀, 벌집 등의 시료 적당량을 취하여 실험하였다. 30%의 설탕 또는 포도당이 포함된 고체배지에 도말하여, 총 3500여개의 균집체를 스크리닝하여 에리스리톨 생산유무를 조사해 보았다. Table 1. 에 나타낸 바와 같이 국내 당밀과 꿀에서는 총 620개의 균주를 배양, 분석해 보았으나 에리스리톨 생산균주를 발견하지 못하였으며, ribitol과 glycerol을 생성하는 균주만을 발견하였다. 인도네시아산과 태국산 혼합 당밀의 경우, 약 1800여개의 균주를 실험해 보았다. 여기서는 10여개의 에리스리톨 생산균주가 발견되었으나, 그 생산량이 1g/L 정도로 매우 적어 실용성이 없었다. 국내 벌집에서는 1000여개의 균집체를 선별하여 배양, 분석하였는데, 이중 에리스리톨 생산균주 40여개를 얻었다. 에리스리톨 생산량은 10% 포도당을 포함한 배지를 사용하였을 때 최고 36g/L이었으며, 부산물로 소량의 글리세롤도 생성되었다. 국내 벌집중에서 스크리닝한 에리스리톨 생산균주가 혼합당밀에서 스크리닝한 균주보다 에리스리톨 생산량이 높는데, 이는 벌집이 혼합당밀보다 에리스리톨 생산균주의 성장환경이 좋은 것으로 추측된다.

Table 1. Screening results for erythritol-producing microorganisms.

| Screening Samples | Strains Number | Screening results |
|---|----------------|--|
| A. Honey | 200 | No erythritol producer, A few ribitol & glycerol producers |
| B. Molasses from a Korean sugar plant | 420 | No erythritol producer, A few ribitol & glycerol producers |
| C. Molasses from Indonesia & Tailand sugar plants | 1800 | Some erythritol producers with low productivity. Some ribitol & glycerol producers |
| D. Honey comb | 1120 | 40 erythritol producers with high productivity |

Table 2. Erythritol production with selected strains in the culture media containing 20%, 30%, 40% glucose.

| Microorganism | Produced erythritol concentration(g/L) | | |
|---------------|--|-------------|-------------|
| | 20% glucose | 30% glucose | 40% glucose |
| H5G13-30 | 121 | 119 | 136 |
| H5G13-26 | 108 | 121 | 60 |
| H5G13-20 | 120 | 117 | 140 |
| H5G13-18 | 100 | 120 | 120 |
| H5G13-14 | 88 | 100 | 90 |
| H5G6-5 | 110 | 125 | 98 |
| H5G6-3 | 108 | 140 | 90 |

* Fermentations were carried out for 8 days

고생산성 균주 선별

균주 스크리닝을 통해서 선별한 에리스리톨 생산균주 40여개를 20% 포도당이 포함된 배지가 들어 있는 플라스크에서 배양하였다. 여기서 7개의 고생산성 균주를 얻었다. 이들 7개 균주의 내당성과 에리스리톨 생산성을 알아보기 위하여 포도당 농도를 각각 20%, 30%, 40%로 변화 시켜서 플라스크에서 배양하였다.

플라스크 배양 결과는 Table 2. 에 나타낸 것과 같이 20% 포도당 배지에서 H5G13-30과 H5G13-20의 경우가 약 120g/L로 가장 많은 에리스리톨 생산량을 보였다. 30% 포도당 배지에서는 H5G6-5가 가장 많은 에리스리톨 생산량을 보였으며, 그 다음으로 H5G13-26, H5G13-18, H5G13-30, H5G13-20이 비슷한 생산량을 나타내고 있다. 40% 포도당 배지에서는 H5G13-20의 균주가 약 140g/L의 에리스리톨 생산량을 보이고 있으며, 그다음으로 H5G13-30이 많은 에리스리톨 생산량을 보였다.

위의 실험 결과로부터 7개의 균주 중에서 H5G13-20이 20%, 30%, 40% 포도당 농도에서 높은 에리스리톨 생산성을 보임을 알았다. 특히 40% 포도당 농도에서 다른 균주보다 많은 에리스리톨을 생산하는데, 이것은 H5G13-20의 내당성이 좋음을 나타내고 있다. H5G13-20 균주가 포도당의 농도가 높은 곳에서 에리스리톨의 생산성이 좋은 것으로 보아서, 고삼투압에 잘 견디는 균주인 것으로 여겨진다.

5L 발효기 배양의 결과

에리스리톨 생성 균주인 H5G13-20 균주를 5L 발효기에서의 배양을 통하여 에리스리톨 생산성과 균주의 특성을 알아보았다. 실험은 배지 중에서 탄소원인 포도당의 농도에 따른 배양 특성을 알아보기 위하여 300g/L와 400g/L의 포도당 농도에서 각각 배양시켜 보았다. 또 공기유입속도에 따른 세포성장과 에리스리톨 생성 관계를 알아보기 위하여 공기유입속도를 0.5vvm 또는 1vvm에서 각각 배양하였다.

300g/L 포도당 배지와 400g/L 포도당 배지에서의 배양 결과는

Table 3. Fermentation results in the glucose media at 0.5vvm and 1vvm.

| | Glucose media | | |
|------------------------|---------------|-------------|-------------|
| | 30% glucose | 40% glucose | 40% glucose |
| Erythritol conc.(g/L) | 92 | 104 | 167 |
| Erythritol yield* | 0.31 | 0.26 | 0.42 |
| Glycerol yield* | 0.17 | 0.145 | 0.29 |
| Fermentation time(hr) | 120 | 120 | 120 |
| Productivity(g/L · hr) | 0.77 | 0.87 | 1.4 |
| Aeration(vvm) | 0.5 | 0.5 | 1 |

* Yields were calculated with the consumed glucose in the culture media.

Table 3. 에 나타내었다. 에리스리톨 생성 수율은 300g/L 배지일 때 0.31로써 400g/L 배지에서의 결과인 0.26보다 높게 나타났고 에리스리톨 생산 속도면에서는 400g/L 배지가 0.87 g/L · hr로 300g/L 배지의 0.77 g/L · hr보다 높게 나타났다. 이는 고농도 당에서 저농도의 당보다 당의 대사속도가 빠름을 나타낸다.

공기유입속도가 0.5vvm, 1vvm일 때의 배양 결과는 Table 3. 에 나타내었다. 에리스리톨의 생산은 1vvm일 때 생산속도가 1.4 g/L · hr이며 수율은 0.42로써 0.5vvm의 생산 결과보다 우수함을 보인다. 이는 공기의 주입속도가 높을수록 에리스리톨의 생산이 증가됨을 보인다. 글리세롤의 경우 공기 주입속도가 높을수록 부산물인 글리세롤의 생산량이 적을 것으로 예상되었으나 1vvm일 때 0.29 g/L · hr로써 0.5vvm의 0.14 g/L · hr보다 높음을 보인다. 이와 같은 배양 결과는 산소 전달속도가 빠름에 따라 에리스리톨과 글리세롤이 함께 증가함을 나타낸다.

균주 동정

균주 선별을 통해서 얻은 에리스리톨 생성균주인 H5G13-20을 한국생명공학연구소 유전자원센터에 균주 동정을 의뢰한 결과, 이 균주가 *Moniliella suaveolens* var. *nigra*임이 밝혀졌다. 균주의 특징은 고삼투압에서 자라고 pseudohyphae를 갖는 유사효모이며 urease를 형성하고 37°C에서는 자라지 않았다. 당에 대한 발효성 및 유기산의 동화성을 Table 4. 에 나타내었다. 본 연구에서 선별된 균주는 유사균인 *Moniliella pollinis*와는 발효특성 및 morphology면에서 다르다.

고찰

균주를 배양한 결과를 살펴보면 배양 초기에는 에리스리톨의 생산량이 적으나, 포도당이 완전히 소비된 후에 에리스리톨 생산량은 많아지고, 부산물인 글리세롤량이 감소하였다. 포도당의 농도가 낮을 때 부산물인 글리세롤의 생성량이 감소하고, 산소의 공급이 증가함에 따라 에리스리톨의 생성량도 함께 증가함을 보인다. 이러한 결과에 대한 해석을 위해서는 생화학적 연구가 필요하다.

Table 4. Results of strain(HG5G13-20) identification.

| | | Characteristics | | | | | |
|--------------------------|---|-------------------|---|-----------|-------------------|------------|---|
| Physiological properties | | Fermentation test | | | Assimilation test | | |
| Urease production | + | Glucose | + | Glucose | + | Arabinose | - |
| DBB staining | + | Galactose | - | Galactose | + | Ribose | + |
| Pseudohyphae production | + | Sorbose | - | Sorbose | - | Rhamnose | - |
| Nitrate utilization | + | Sucrose | + | Sucrose | + | Glycerol | + |
| Growth on 37°C | - | Lactose | - | Maltose | + | Erythritol | + |
| | | Raffinose | - | Trehalose | - | Mannitol | + |
| | | Maltose | - | Lactose | - | Glucoside | - |
| | | Melibiose | - | Salicin | - | | |
| | | Raffinose | - | Lactate | - | | |
| | | Melezitose | - | Succinate | - | | |
| | | Inulin | - | Inositol | - | | |

5L 발효기 배양중 거품이 많이 생기고, 세포가 표면 위로 뜨는 현상을 보였다. 이것은 에리스리톨 생산균주가 응집성이 높아 응집된 세포들 사이에 기포가 형성되어 세포가 뜨는 것으로 여겨진다. 소포제를 배양중 첨가 하였지만 거품의 제거는 완벽하지 않았음이 관찰되었다. 따라서 효율적인 거품의 억제 방법이나 거품의 생성이 적은 균주의 개발이 요구된다.

포도당의 고갈 후에도 에리스리톨의 생성은 지속되고, 글리세롤의 양이 줄어드는 것이 관찰되는데, 이는 균주가 글리세롤을 기질로 이용하는 것으로 추측된다. 그러나, 글리세롤의 소비에 따른 에리스리톨의 생성속도는 포도당을 기질로 사용할때에 생성되는 에리스리톨의 생성속도에 비교하여 상당히 느림을 보인다.

에리스리톨 생산성은 400g/L 포도당 배지에서 약 1.4 g/L · hr 로 *Aureobasidium sp.* 균주의 생산성인 2.0 g/L · hr에는 아직 못 미친다(9). 따라서 계속해서 에리스리톨 생산성을 높이기 위한 방법으로 변이를 통한 고역가 균주의 개발이나 연속 배양 등의 공정개발이 필요하다. 또한, 기질에 대한 에리스리톨의 수율이 낮으면 배지 비용만 증가하므로 배지 비용을 낮추는 배지개량이 요구되며, 5L 발효기 배양시 균주의 성장과 에리스리톨 및 글리세롤의 생성에 영향을 미치는 거품의 제어와 거품 발생원인의 규명이 앞으로의 연구과제이다.

요 약

에리스리톨은 4탄당의 당알코올류에 속하며, 청량감이 있고 칼로리가 낮아서 설탕을 대체하는 다이어트 식품 첨가물질로 이용가능한 신기능 감미료로 각광받고 있다. 또한, 에리스리톨은 설사, 가스를 일으키지 않을 뿐 아니라 비충치성 물질이다. 발효에 의한 에리스리톨의 생산에 있어서, 우수한 에리스리톨 생산균주의 확보가 산업화의 중요한 과제였다. 그래서, 본 연구는 고생산성 균주를 스크리닝하고자 하였다. 우리가 식품으로 이용하는 당밀, 꿀, 벌집 등의 고당식품에서 내당성이 높고, 인체에 안전한

균주를 확보하고자 하였다. 위 시료를 30% 포도당 고체 배지에 도말하여 총 3500여개의 균주를 스크리닝한 결과 40개의 균주를 선별하였고, 이들 균주중에서 수율과 생산성이 높고, 부산물인 글리세롤을 적게 생산하는 균주를 얻었다. 이 균주를 동정한 결과 *Moniliella suaveolens var. nigra* 임을 밝혔다. 이 균주를 이용하여 5L 발효기에서 배양한 결과 40% 포도당배지에서 생산성이 1.4 g/L · hr, 수율이 42%임을 보였다. 생산성 향상을 위하여 배양공정의 최적화, 변이를 통한 균주 개량, 발효중 거품발생의 억제에 대한 연구가 필요하다고 판단된다.

감 사

본 연구는 '94년도 국책개발연구사업으로 과학기술처와 제일제당으로부터 연구비를 지원받았음에 감사드립니다. 논문정리에 도움을 준 이상환군에게도 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. H. Roper and J. Goossens (1993), Erythritol, A New Raw Material for Food and Non-food Applications, *Starch/Starke*, 45, 400-405.
2. H. Roper and J. Goossens (1994), Erythritol, A New Bulk Sweetener, *IFI NR.*, 1/2, 27-33.
3. O. Tsunew and T. Sasaki (1993), 바이오テクノロジーの産物「エリスリトール」, *New food Ind.*, 35, 38-45.
4. 小田 恒郎, 日下部 正裕, 佐々木 堯 (1989). エリスリトールの製法と食品工業への応用, *食品工業*, 41-48.
5. G. J. Hajny, J. H. Smith, and J. C. Garver (1964), Erythritol Production by a Yeastlike Fungus, *Applied Microbiology*, 12, 240-246.
6. Kiyoji Hattori and Takeo Suzuki (1993), Production of

- Erythritol by n-Alkane-grown Yeasts, *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 581-586.
7. T. Maeda, M. Shida, Y. Ohshima, T. Yamada, and K. Fujimura (1992), EP 0525659.
 8. Marina A.Y. Aoki, Glaucia M., Pastore, and Yong K. Park (1993), Microbial Transformation of Sucrose and Glucose to Erythritol, *Biotechnology Letters*, **15**, 383-388.
 9. Hiroaki Ishizuka, Katsuo Wako, Takafumi Kasumi and Takashi Sasaki (1989), Breeding of a Mutant of *Aureobasidium* sp. with High Erythritol Production, *J. of Fermentation and Bioengineering*, **68**, 310-314.
 10. K. Wako, H. Ishizuka, G. Kawaguchi, N. Kubo, T. Kasumi, and K. Hayashi (1988), *Aureobasidium* sp. SN-115 による エリスリトールの生産, *醸造工学*, **63**, 217-223.