

에리스리톨 생산균주 탐색 및 특성 연구

박 지만, 최 병욱, 박 홍우
한양대학교 화학공학과

Screening of Erythritol-producing microorganisms and
Study of its characters

Ji Man Park, Byung Wook Choi, Hong Woo Park
Department of Chemical Engineering, College of Engineering,
Hanyang University

서론

에리스리톨은 설탕의 약 70~80%의 감미도를 지니는 4탄당의 당알코올이다. 구조와 물성치는 그림 1.에 나타나 있다.^{1,6,7}

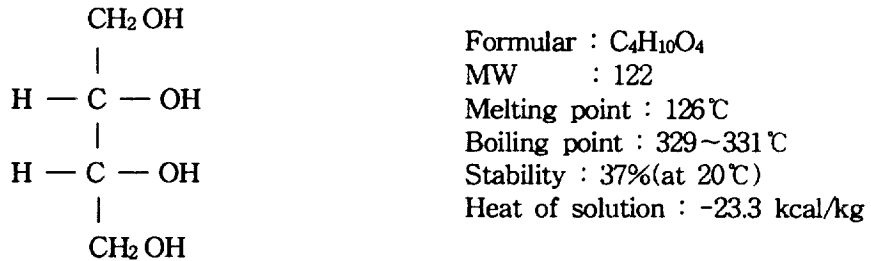


그림 1. 에리스리톨의 구조와 물성치

에리스리톨은 자연계에 널리 존재하는 물질로 멜론, 배 등의 과일이나 해초, 버섯에 존재한다. 또한 에리스리톨이 미생물의 발효에 의해 생성되기 때문에 포도주, 맥주 등의 발효식품에 존재하며, 인간이나 동물의 조직과 체액, 특히 눈의 수정체 조직, 혈청, 그리고 오줌 등에도 존재한다.

현재 시장에 나와 있는 당알코올 감미료로는 자일리톨, 솔비톨 등이 있다. 에리스리톨은 다른 당알코올 감미료처럼 저칼로리 및 비충치성이라는 성질 이외에 다른 당알코올 감미료보다 우수한 특성들을 지니고 있다.

즉 에리스리톨은 칼로리량이 타당알코올에 비해 매우 낮은 편이다(0.3kcal/g). 그리고, 에리스리톨은 다른 당알코올에 비해 설사나 방귀와 같은 부작용이 덜 일어난다. 그래서 설사유발한계섭취량이 상대적으로 높다. 또한 에리스리톨은 체내에서 에너지 생성에 기여하지 않으므로 당농도를 조절하는 조절과정에 영향을 주지 못한다. 따라서 에리스리톨을 당뇨병 식이음식으로 사용할 수 있다. 그외 에리스리톨의 식품으로서의 장점은 청량감, 비흡습성, 물에서의 낮은 용해도 등이 있으며, 또한 결정성이 뛰어나서 가루당으로 만들기가 쉽다. 이런 성질들이 에리스리톨을 우수한 설탕대체물질로서의 이용이 가능하게 한다.

에리스리톨을 생산하는 방법에는 화학반응을 이용한 화학합성법과 미생물에 의한 발효법으로 나눌 수 있다. Otey⁴ 등은 니켈 촉매하의 고온에서 화학반응을 일으켜 dialdehyde starch로부터 에리스리톨을 생산하였다. 이 방법은 수율이 낮고 부산물 제거에 어려움이 있어 산업화에 응용되지 못하였다. Park³ 등은 osmophilic yeasts를 이용하여 설탕이나 포도당으로부터 에리스리톨을 생산하였

다. Hattori와 Suzuki²는 *Candida zeylanoides*를 이용하여 *n*-Alkane으로부터 많은 양의 에리스리톨과 소량의 만니톨을 생산하였다. 또한 Wako⁵ 등은 포도당으로부터 *Aurebasidium* sp.를 이용하여 약 45%의 수율로 에리스리톨을 생산하였으며, 이때 소량의 글리세롤이 생산되었다.

에리스리톨 생산에서 가장 중요한 과제는 고생산성 균주의 확보이다. 즉, 고당도에서 잘 자라고, 글리세롤과 같은 부산물이 적으며, 에리스리톨 생산 수율이 높은 균주의 개발이 중요하다.

본 연구에서는 에리스리톨이 잘 자라는 고당물질에서 새로운 고생산성 균주를 탐색하여 에리스리톨 생산성을 높이고자 하였다. 또한 내당성이 크고 기존의 산업 기질을 이용하는 균주를 탐색하여 전체 생산공정의 비용을 낮추고자 한다. 또, 개량된 균주에 대한 최적 발효 조건을 확립하고 에리스리톨 생산 및 수율을 극대화하여 경제성있는 기술이 되도록 한다.

실험 방법

생산균주의 스크리닝

에리스리톨 균주를 선별하기 위한 고당물질로 제일제당의 당밀, 인도네시아와 태국산 혼합 당밀, 강원도의 토종꿀, 벌집을 사용하였다.

순수 배양을 위해 고당물질을 멸균수에 현탁한 뒤 상등액을 30% glucose가 포함된 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.3% peptone, 2% agar로 이루어진 고체분리배지에 도말하였고, 이 고체배지를 항온기에서 30℃로 배양하였다. 2~3일 후 크고 잘 자라는 균집체를 선택하여 20% glucose, 0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.3% peptone, 0.1% urea, 2% agar로 이루어진 stock slant에 접종하고 상온에서 2일 동안 키운 후, slant를 냉장고에 보관하였다. Stock slant에 저장된 균주는 1주일 이내에 배양하여 에리스리톨 생산성을 조사하였다.

배양은 45mL 시험관에 5mL의 배지를 사용하였고, 원활한 산소 공급을 위해 시험관을 45° 기울여 5일 동안 200rpm, 30℃로 진탕 배양하였다. 사용 배지의 조성은 10% glucose, 0.5% yeast extract, 0.1% urea이며, 배지의 pH는 6.4이다.

배양 후 발효액을 원심분리한 후 상등액만을 취하여 filter (millex HV 0.45 μ m)로 여과시킨 뒤, HPLC로 분석하였다.

HPLC는 Waters사의 제품을 사용하였으며 컬럼은, Carbohydrate Analysis Column(CAT. No. 84038)을 사용하였다. 이동상으로는 water과 acetonitrile을 1:3으로 혼합한 용액을 사용하였고, 유속은 1.5mL/min으로 하였으며, 시료의 검출은 Waters사의 굴절을 검출기(M410)를 사용하였다.

플라스크 배양

플라스크 배양을 하기 전에 균주의 활성을 높이기 위해 pre-culture를 하였다. 균주 스크리닝을 통해 선별한 에리스리톨 생산균주를 5mL의 배지가 포함된 45mL 시험관에서 3일간, 200rpm으로 배양하였다. 이 때 사용한 배지의 조성과 pH는 균주 스크리닝의 경우와 같다.

배양은 부피가 300mL인 진탕 플라스크에서 30mL의 배지를 사용하였다. 사용한 배지의 조성은 20% glucose, 0.5% yeast extract, 0.1% urea이며, 배지의 pH는 6.4로 조정하였다.

배양 방법은 시험관에서 pre-culture한 균주를 1mL 취하여 플라스크에 접종한 뒤 shaking incubator에서 하였으며, 7일 동안 30℃, 180rpm으로 배양하였다.

배양 후 발효액을 채취하여 HPLC로 분석하였다. 사용한 HPLC는 균주 스크리닝에 사용한 것과 같은 Waters사의 제품을 사용하였으며, 컬럼은 Aminex HPX-87H column(CAT. No. 125-0140)을 사용하였다. 이동상으로는 0.01N

H₂SO₄를 사용하였고, 유속은 0.6mL/min으로 하였으며, 시료의 검출은 Waters사의 굴절율 검출기(M410)를 사용하였다.

배양기에서의 배양

플라스크 배양을 통해 고생산성 균주를 선별하였다. 이 균주를 3L배지가 포함된 5L 배양기에서 배양시켰다.

결과 및 고찰

에리스리톨 생산균주는 고삼투압하의 환경에서 잘 자란다. 그래서 30% 설탕 또는 포도당이 포함된 고체분리배지에서 균주를 선별하여 실험하였다. 에리스리톨 생산 균주를 선별하기 위해서 당밀, 별꿀 등에서 총 3000여개의 균집체를 선별하여 배양해 보았다.

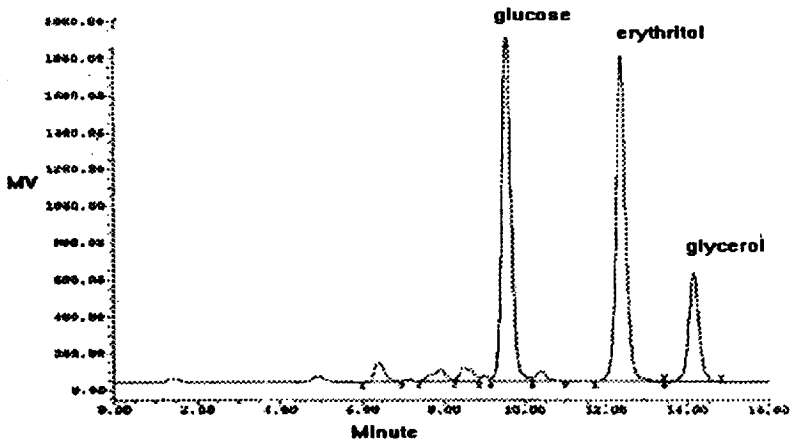
별집에서는 1000여개의 균집체를 선별하여 배양, 분석하였는데, 이 중에서 에리스리톨 생산균주 40여개를 선별하였다. 그 생산량은 10% 포도당을 포함한 배지에서 최고 36g/L이었다. 이들 중 빨리 자라면서 많은 양의 에리스리톨을 생산하는 균주를 선별하기 위하여 플라스크 배양을 하였다.

40여개의 균집체를 20% 포도당이 포함된 배지에서 플라스크 배양을 하였는데 이 중 5개의 균집체가 고생산성을 보였다. 5일 배양 후 포도당은 모두 소비되었으며, 7일 배양 후에는 에리스리톨 생산량이 58~62 g/L이었으며, 글리세롤 또한 소량 검출되었다. 그림 2.에 플라스크 배양을 통해 검출한 HPLC peak를 나타내었다.

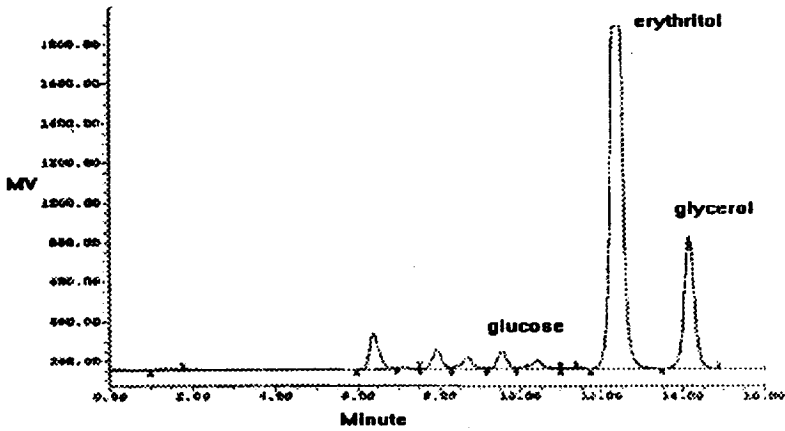
스크리닝을 통해 선별한 에리스리톨 생산균주의 특징은 배양시에 응집성을 보이며, 약간의 거품을 형성하였다. 또한 5일 후면 포도당을 거의 소비하고 부산물로서 글리세롤을 생성한다.

참고 문헌

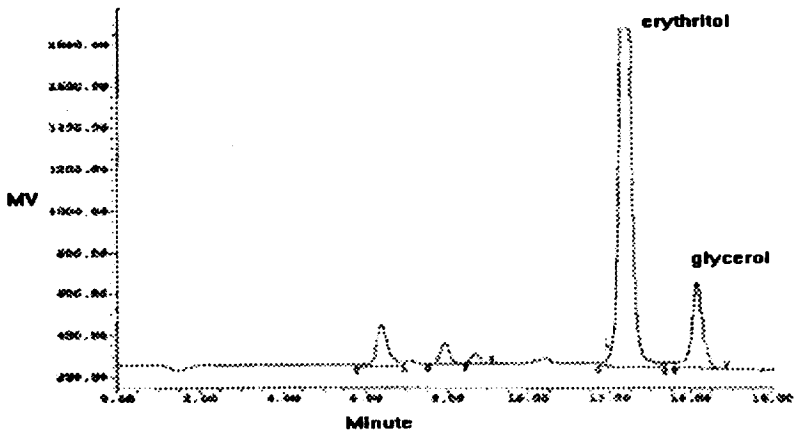
1. O. Tsunew and T. Sasaki: *New Food Ind.*, **35**, 38-45(1993).
2. K. Hattori and T. Suzuki: *Agr. Biol. Chem.*, **38**, 1203-1208(1974).
3. Marina A.Y., Aoki, Glancia M. Pastore, and Yong K. Park: *Biotechnology Letters*, **15**, 383-388(1993).
4. F.H. Otey, J.W. Sloan, C.A. Wilham, and C.L. Mehlretter: *Industrial and Eng. Chemistry*, **53**, 267-268(1961).
5. Wako K., Gaku K., Nawaguchi K., etc.: *Hakkokogaku*, **63**, 209-215(1988).
6. Kyoji N.: *Nutrient Metabolism*, **122**, 1266-1272(1992).
7. Anon: *Food Trade Review*, **64**, 75(1994).



3일 배양 후



5일 배양 후



7일 배양 후

그림 2. HPLC peak