

염의 삼투압이 *Torula* sp.의 증식과 Erythritol 생산에 미치는 영향

김경아 · 노봉수 · 김상용¹ · 오덕근^{2*}
서울여자대학교 식품·미생물공학과, ¹동천컨설팅,
²우석대학교 식품공학과

Effect of Osmotic Pressure of Salts on Growth of *Torula* sp. and Erythritol Production. Kim, Kyung-Ah, Bong-Soo Noh, Sang-Yong Kim¹, and Deok-Kun Oh^{2*}. Department of Food and Microbial Technology, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea. ¹Dong Cheon Consulting Co., Kyunggi-Do 445-930, Korea. ²Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Chunbuk 565-800, Korea - To investigate the effect of salts on the production of erythritol by *Torula* sp., cells were grown on the media containing various concentrations of KCl or NaCl. Cell growth and glucose consumption rates decreased when KCl or NaCl concentration increased from 0.0 to 0.5M. The production of erythritol, however, was maximal at 0.3M NaCl or 0.4M KCl. The erythritol concentration of 54.3 g/l in the medium containing 0.3M NaCl and 200 g/l glucose was obtained after 120 h. The production of erythritol decreased in cultures above 0.3M NaCl or 0.4M KCl due to the inhibition of cell growth. To elucidate the effect of salts more quantitatively, KCl and NaCl concentrations were converted to osmotic pressure. As the osmotic pressure increased, the yield of erythritol from glucose increased regardless of the kinds of salts and the yield of erythritol was approximately 49% at the osmolality of 2.4 Os/kg. When the osmotic pressure increased to 2.5 Os/kg, the specific growth rate of cells decreased but the production rate of erythritol increased. For the effective production of erythritol, osmotic pressure must be adjusted not to inhibit markedly the growth rate of cells and to stimulate the production rate of erythritol by supplementing salt.

Key words: *Torula* sp., erythritol, osmotic pressure, KCl, NaCl

사탕당 알코올인 erythritol은 울리고당이나 xylitol과 더불어 대표적인 기능성 감미료로 자연계에 광범위하게 존재하고 있으며, 해초류와 버섯류의 저장물질이고, 멜론, 포도, 배 등과 같은 과실류에도 함유되고 있다. Erythritol은 세균과 효모 등 미생물에 의해서도 생산되므로 포도주나 맥주, 된장 등의 발효식품에서도 검출된다[13, 14, 16].

Erythritol은 설탕의 70~80%의 당도를 가지고 용해될 때 열 감소가 일어나는 특성으로 인하여 입안에서 느끼는 청량감이 크고 용해도가 낮아 결정성이 부여되며 이러한 성질들로 인하여 청량감과 결정성이 필수적인 캔디 등의 제과제품의 무설탕 원료로 사용되고 있다[3]. Erythritol은 저 칼로리 감미료로 체내에서 에너지원으로 이용되지 않고 소변으로 대부분 배출되며, 충치 예방 효과도 가지고 있다[7]. 또한, 저분자인 erythritol은 어는점 강하와 끓는점 상승을 유도 할뿐 아니라 삼투압을 증가시키는 물질이므로 저 흡습성 물질과 저 점도성 물질과 같이 사용

하면 식품의 수분 활성도의 조절에 매우 용이하다[6].

Erythritol의 생산에는 추출법, 화학합성법 및 발효법이 있다. 이중 추출법은 과일이나 채소 등의 자연상태에서 극히 미량으로만 존재하기 때문에 산업적으로 경제성이 없다. 화학합성법은 원료물질이 고가이기 때문에 경제성이 없어 대량생산에 이용되고 있지 못하다[3]. 따라서 현재 발효법으로 생산되며 새로운 미생물에 의한 연구도 활발히 진행되고 있다.

발효법에 의한 erythritol의 생산은 주로 효모에 의해서 일어나고 지금까지 보고된 효모는 *Torulopsis*속의 *T. magnoliae*, *T. veratilis*, 및 *T. candida*[12]; *Endomycopsis chodatii*[12]; *Hansenula supelliculsa*; *Pichia miso*[12]; *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*[8]; *Trigonopsis variabilis*[11]; *Trichosporonoides*[2]; *Candida zeylanoides*[9];와 *Aureobasidium*[10]가 있다. *Leuconostoc oenos*[4]와 같은 세균도 erythritol을 생산한다고 보고되고 있다. 이 중 *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*는 포도당으로부터 41%라는 고수율로 erythritol을 생산하였지만 glycerol, ribitol이 부산물로 많이 생산되기 때문에 공업화에는 이르지 못했다[8]. 또한, 공업적 생산에는 *Aureobasidium*이 이용되고 있으며 이 균주는 일본의 농림수산

*Corresponding author
Tel. 82-652-290-1441, Fax. 82-652-291-9312
E-mail: deokkun@unitel.co.kr

성의 식품종합연구소와 일연화학의 공동연구에 의하여 분리 동정된 바 있다[10]. 자연에서 분리한 *Aureobasidium* 야생균주는 erythritol 생산성과 내당성에 있어서 만족할만하지 못했지만 이 균주를 돌연변이시켜 크게 개선되었다. 이 변이주는 포화 glucose 농도(83.3%)에서도 발효가 가능하고 glucose 농도 40~50%에서 2 g/l·h의 erythritol 생산속도를 보였다. 또한, glucose으로부터 erythritol의 수율이 45%(w/w)로 높은 수준이었으며 부산물로는 소량의 glycerol을 생산하였다[10].

*Torula*로 추정되는 균에 의한 erythritol의 생산에 대하여 보고되었으나[8] 이것은 뒤에 *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*로 밝혀졌다[5]. 그러므로, 아직까지 *Torula* sp.에 의한 erythritol의 생산에 대하여 보고되지 않았다. 본 실험에 사용한 *Torula* sp.는 40% 설탕용액을 공기 중에 방치하여 오염된 균 중에서 선별한 것이다. 대부분의 당알코올 생산 균주들이 삼투압이 높은 환경하에서 성장할 수 있다는 사실이 알려져 있으며, 미생물에 의한 당알코올의 생산이 미생물의 성장 삼투압과 관련되어 있다는 것이 제안되고 있다[1]. 따라서, 본 실험에서는 지금까지 erythritol 생산이 보고되어 있지 않고 높은 삼투압에서 glucose으로부터 erythritol의 수율이 높은 *Torula* sp.를 사용하여 염의 삼투압이 erythritol 생산에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

미생물 및 배지

본 연구에 사용된 균주는 경기도 오산에 있는 (주)보락 기술연구소에서 40% 설탕 용액을 공기 중에 방치하여 얻은 균이다. 분리된 균은 균주 동정회사인 미국 MicroCheck사에 의뢰한 결과 *Torula* sp.로 동정되었다. 성장배지와 생산배지 모두 200 g/l glucose, 10 g/l yeast extract로 구성된 배지를 사용하였다. 염의 삼투압이 erythritol 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 생산배지에 NaCl 또는 KCl을 첨가하였다. NaCl 또는 KCl배지는 200 g/l의 glucose와 10 g/l의 yeast extract 및 여러 농도의 NaCl 또는 KCl로 구성되어 있다.

Erythritol 생산균주의 선별

40% 설탕 용액에 오염된 균주를 200 g/l glucose, 10 g/l yeast extract와 20 g/l agar가 포함된 plate에 도말한 후 30℃에서 48시간 배양하였다. 생산된 colony를 tooth picking한 후 200 g/l glucose, 10 g/l yeast extract가 포함된 test tube에 접종하여 30℃에서 24시간 배양하였다. 배양액을 NTG로 변이처리 후 다시 tooth picking하여 test tube에 접종하여 34℃에서 120시간 배양하여 erythritol이 가장 많이 나오는 균을 선별하였다.

배양조건

종배양은 plate상의 colony를 성장배지 5 ml가 들어있는 20 mm 직경의 test tube에 접종하여 진탕 배양기에서 250 rpm, 30℃로 48시간 동안 수행한 후 성장배지 100 ml가 들어있는 500 ml의 baffled flask에 접종하여 250 rpm, 30℃로 24시간 배양하였다. 본 배양은 생산배지 100 ml가 들어있는 500 ml의 baffled flask에 접종하여 진탕 배양기에서 250 rpm, 34℃로 120시간 동안 수행하였다. pH는 발효 초기에 5.5로 조절하였다.

분석방법

Erythritol의 농도는 NH₂ column(Kromasil, Sweden)이 장착된 HPLC(JASCO, Japan)의 Refractive Index Detector(JASCO, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 acetonitrile과 물을 부피비율로 8대 2로 섞어 사용하였고, 유속은 2.0 ml/min이었다. 균체농도는 분광계를 이용하여 600 nm에서 현탁도를 측정하여 미리 측정된 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 전환하였다. Glucose의 농도는 glucose oxidase kit(영동제약, 대한민국)를 사용하였다. 균체의 비 성장속도(specific growth rate of cells)는 균체 생산량의 로그값을 시간에 따른 기울기로부터 구하였고 산물의 비 생산속도(specific production rate of product)는 시간에 따른 산물증가의 기울기를 평균 균체농도로 나누어 구하였다. 삼투압은 glucose, NaCl 및 KCl의 농도에 따른 삼투압 값들이 나타난 CRC Handbook of Chemistry and Physics 문헌의 표를 이용하여 계산하였다[15].

결과 및 고찰

NaCl 농도가 erythritol의 생산에 미치는 영향

NaCl 농도 변화가 erythritol 생산에 미치는 영향을 여러 농도의 NaCl이 포함된 배지에서 살펴보았다. NaCl 또는 KCl과 같은 염이 포함되지 않은 배지에서 발효한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 발효시간을 120시간으로 제한한 이유는 120시간 이후에서는 glucose의 소모가 잘 이루어지지 않았으며, erythritol의 생산량도 크게 증가하지 않았고, 발효가 장시간 진행됨에 따라 발효액의 증발이 많이 일어났기 때문이었다. 발효 후기에 glucose가 잘 이용되지 않는 것은 플라스크 배양에 의한 산소 부족에 의한 것으로 추정된다. 균체성장은 약 24시간 동안에는 급격히 일어났으나 그 이후에는 느리게 일어났다. Erythritol의 생산은 발효시간 약 70~80 시간까지는 시간에 따라 비례적으로 증가하였으나 그 이후에는 생산속도가 감소하였고 120시간 이후에는 거의 증가하지 않았다. 염이 없는 경우 발효시간 120시간에서 약 200 g/l glucose로부터 약 42 g/l erythritol을 얻었고 glucose에

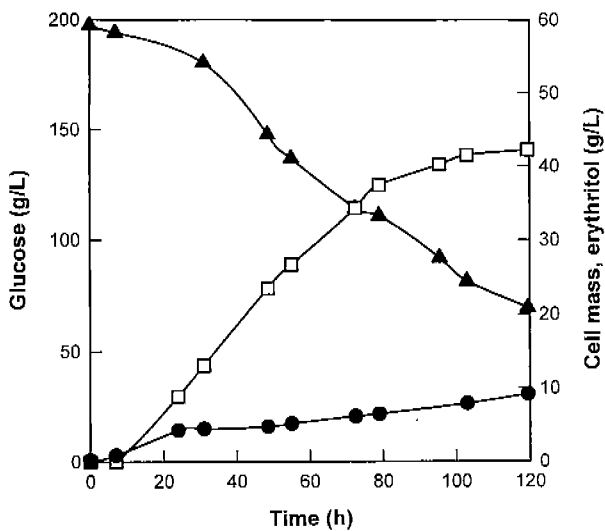


Fig. 1. Erythritol production without NaCl or KCl by *Torula* sp. Cell mass (●), erythritol (□), glucose (▲).

대한 erythritol의 수율은 33%로 나타났다.

약 200 g/l glucose와 0.3M 이내의 NaCl를 첨가하여 배양한 결과 NaCl의 농도가 증가할수록 erythritol의 농도가 증가하였고 균체의 농도는 감소하였다(Table 1). 그러나, 기질 소비속도는 큰 차이가 없었다. NaCl을 첨가하여 배양한 경우에는 erythritol의 생산이 발효시간 약 70~80 시간까지는 NaCl을 첨가하지 않고 배양한 경우와 차이가 거의 없었으나 그 이후 시간에서는 NaCl의 농도가 증가할수록 erythritol의 생산속도가 증가함을 보여 주었다. 염을 첨가한 경우 80시간 이후에서 erythritol 생산속도가 증가한 것을 보아 염을 첨가하지 않은 경우는 발효가 진행됨에 따라 배지중의 glucose의 농도가 감소하여 삼투압이 떨어져 낮은 삼투압에서 erythritol의

생산 능력이 떨어진 결과로 생각된다. 0.3M NaCl 배지에서 발효시간 120시간에서 약 200 g/l glucose로부터 약 54 g/l erythritol을 얻었다. 0.5M NaCl 배지에서 배양한 결과 0.3M NaCl 배지보다 균체량과 erythritol의 농도가 감소하였다. 고농도의 NaCl에서는 균체의 성장이 크게 저해를 받았고 그 결과 glucose의 소비도 상대적으로 적게 일어났다. 그러므로 erythritol의 생산량 감소는 균체 성장의 저해에 기인된 것으로 생각된다.

NaCl의 첨가 실험 결과 균체농도 및 glucose 소비량은 NaCl 농도가 높을수록 적었으나 erythritol 생산량과 생산성은 0.3M NaCl 배지에서 최대로 나타났다. 이것은 erythritol 생산성을 높이기 위해서는 균체 성장속도가 저해를 적게 받으면서 erythritol 생산속도가 높은 적당한 삼투압으로 발효조건을 조절이 필요하고 삼투압을 조절하기 위해서는 NaCl과 같은 삼투압 조절 물질을 첨가해야 한다는 것을 의미한다.

KCl 농도가 erythritol의 생산에 미치는 영향

염의 종류는 호삼투압성 효모(osmophilic yeast)가 삼투압에 대한 저항 정도를 결정한다는 보고가 있다[1]. 그러므로, NaCl 대신 KCl을 사용하여 실험을 수행하였다. KCl을 첨가하여 배양한 결과는 NaCl을 첨가하여 배양한 결과와 균체의 성장, glucose의 소비 및 erythritol의 생산에서 거의 유사하게 나타났으나 erythritol의 생산량과 생산성은 NaCl과 달리 0.4M 배지에서 최대로 나타났다(Table 2). 특히, 0.4M KCl 배지에서 발효시간 120시간에서 200 g/l의 glucose로부터 약 53 g/l의 erythritol이 생산되었다. 0.5M KCl 배지에서는 0.5M NaCl 배지보다 균체의 농도, glucose의 소비 농도 및 erythritol의 농도가 상대적으로 높게 일어났다. 이것은 고농도의 NaCl이 KCl보다 저해정도가 더 큼을 의미한다.

Table 1. Effect of osmotic pressure of NaCl on the kinetic parameter of erythritol fermentation

NaCl (M)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Initial osmolality (Os/kg)	1.51	1.69	1.89	2.06	2.22	2.39
Consumed glucose concentration (g/l)	136.1	132.9	132.5	131.2	125.2	84.8
Cell mass (g/l)	9.18	9.18	8.42	7.57	7.08	6.23
Erythritol (g/l)	42.2	46.4	51.1	54.3	52.7	41.8
Volumetric production rate (g/l·h)	0.352	0.386	0.426	0.453	0.439	0.348

Table 2. Effect of osmotic pressure of KCl on the kinetic parameter of erythritol fermentation.

KCl (M)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Initial osmolality (Os/kg)	1.51	1.54	1.82	2.01	2.18	2.46
Consumed glucose concentration (g/l)	136.1	125.5	141.0	133.4	116.5	99.9
Cell mass (g/l)	9.18	9.54	9.09	8.58	7.97	7.15
Erythritol (g/l)	42.2	42.3	50.7	51.0	53.3	48.9
Volumetric production rate (g/l·h)	0.352	0.371	0.423	0.425	0.444	0.408

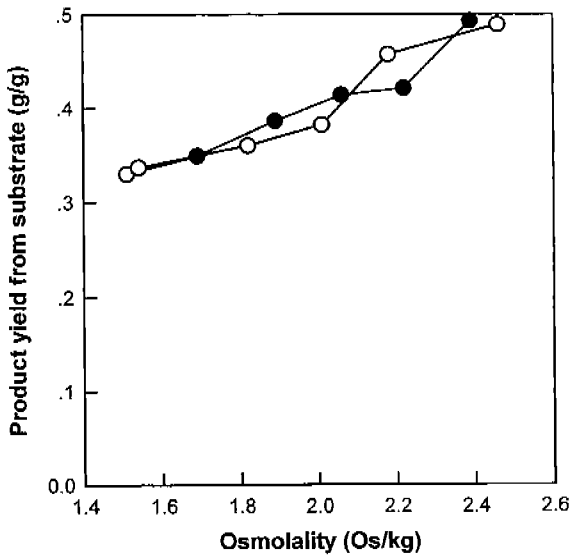


Fig. 2. Effect of osmotic pressure of salts on the erythritol yield from glucose by *Torula* sp. NaCl (●), KCl (○).

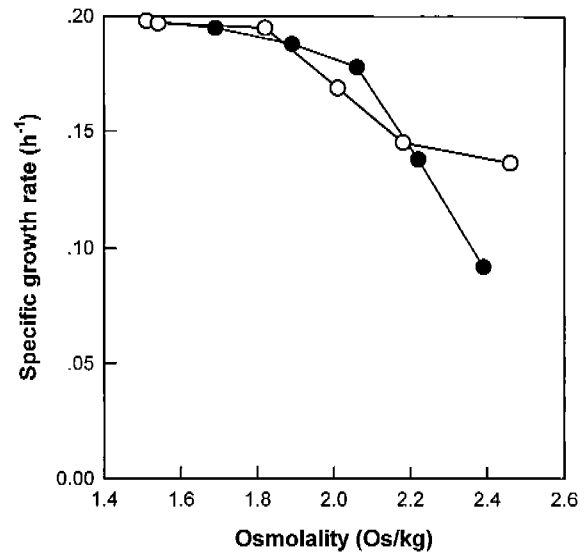


Fig. 3. Effect of osmotic pressure of salts on the specific growth rate of *Torula* sp. NaCl (●), KCl (○).

그러나, *Trigonopsis variabilis* 배양에서는 최종 균체 농도와 erythritol 생산량에서 염에 의한 저해가 크게 나타났고 NaCl을 사용한 경우, KCl의 경우보다 erythritol 생산이 현저하게 감소되는 것으로 보고되었다[11].

염의 삼투압이 erythritol의 발효상수에 미치는 영향

염의 삼투압이 erythritol의 발효상수에 미치는 영향을 보다 정량적으로 살펴보기 위하여 KCl과 NaCl의 농도를 삼투압으로 전환하고 KCl과 NaCl의 농도별 실험으로부터 기질에 대한 산물의 수율, 균체의 비 성장속도 및 산물의 비 생산속도를 구하였다.

삼투압에 따른 glucose에 대한 erythritol 수율은 Fig. 2에 나타내었다. 염의 종류에 따라 큰 차이 없이 삼투압이 증가할수록 수율이 증가하였다. 그 결과 삼투압 약 2.4 Os/kg에서 수율이 약 0.49(49%)를 보여주어 수율만 비교할 때 문헌에 보고된 최고 수율인 *Aureobasidium*의 47.6%보다 높은 결과를 나타내었다[10].

균체의 비 성장속도는 삼투압 약 2.2 Os/kg 이내에서 염의 종류에 따라 큰 차이 없이 삼투압이 증가할수록 감소하였으나 삼투압 약 2.4 Os/kg에서는 염의 종류에 따른 차이가 나타나 KCl에서는 NaCl보다 현저히 감소함을 보여주었다(Fig. 3). 이것은 고농도의 KCl이 NaCl보다 균체 성장에 대한 저해 정도가 더 크다는 것을 의미한다. 염의 삼투압이 erythritol의 발효에 미치는 영향은 본 실험실에서 처음 *T. variabilis*을 사용하여 보고하였다[11]. 그러나, *T. variabilis* 배양에서는 염을 첨가하면 균체의 비 성장속도가 현저히 감소하였고 특히, NaCl을 사용하면 KCl보다 비 성장속도가 급격히 감소함을 보여주고 삼

투압 1.8 Os/kg에서 비 성장속도 0.007 h⁻¹로 매우 낮은 속도를 나타냈다.

삼투압 변화에 따른 erythritol의 비 생산속도를 살펴 보면 NaCl과 KCl간에 큰 차이가 없었으나 삼투압 약 2.2 Os/kg 이내에서는 KCl이 NaCl보다 약간 높게 나타났으나 삼투압 약 2.4 Os/kg에서는 반대로 나타났다(Fig. 4). *T. variabilis* 배양에서도 염에 따른 차이가 거의 없었으며 NaCl과 KCl 모두 erythritol의 비 생산속도가 삼투압 약 1.56 Os/kg에서 최대값을 보여주었고 그 이상의 삼투

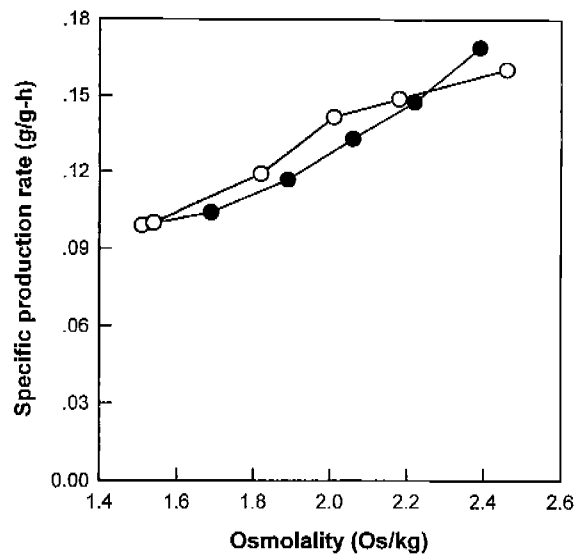


Fig. 4. Effect of osmotic pressure of salts on the specific production rate of erythritol by *Torula* sp. NaCl (●), KCl (○).

압에서는 감소하였다[11]. 이러한 결과로부터 *Torula* sp.가 *T. variabilis*보다 더 호삼투압성 균이고 더 높은 삼투압 조건에서 최대 erythritol 생산량을 나타내었음을 알 수 있었다.

결론적으로 살펴보면 균체생성량 및 glucose 소비량은 염의 농도가 높을수록 감소하였으나 erythritol 생산량과 생산성은 0.3M NaCl 배지 또는 0.4M KCl에서 최대로 나타났다. 삼투압으로 전환하였을 경우 약 2.5 Os/kg 이내에서 삼투압이 증가할수록 기질에 대한 erythritol의 수율과 erythritol의 비 생산속도는 증가하였으나 균체의 비 성장속도는 감소하였다. 또한, *Torula* sp.의 경우 높은 삼투압에서 KCl보다 NaCl에 균체성장이 더 저해되었으나 erythritol 생산 속도는 더 증가하였다.

요 약

Torula sp.에 의한 염이 erythritol의 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 0.0에서 0.5M까지의 NaCl 또는 KCl이 함유된 배지에서 균체를 배양하였다. 염의 농도가 증가할수록 균체 농도와 glucose 소비는 감소하였으나 erythritol 생산량과 생산성은 0.3M NaCl 또는 0.4M KCl에서 최대로 나타났다. 초기 glucose 농도 200 g/l로부터 120시간 후에 0.3M NaCl이 함유된 배지에서 54.3 g/l의 erythritol을 얻었다. 0.3M NaCl 또는 0.4M KCl 이상의 염 농도에서는 균체의 성장이 크게 저해를 받았고 그 결과 glucose의 소비도 상대적으로 적게 일어났고 erythritol의 생산량도 감소하였다. 보다 정량적으로 설명하기 위하여 KCl과 NaCl의 농도를 삼투압으로 전환하였다. 삼투압에 따른 glucose에 대한 erythritol 수율은 염의 종류에 따라 큰 차이 없이 삼투압이 증가할수록 수율이 증가하여 삼투압 약 2.4 Os/kg에서 수율이 약 49%를 보여 주었다. 균체의 비 성장속도는 삼투압 약 2.2 Os/kg 이내에서 염의 종류에 따라 큰 차이 없이 삼투압이 증가할수록 감소하였으나 삼투압 약 2.4 Os/kg에서는 염의 차이가 나타나 NaCl에서는 KCl보다 현저히 감소함을 보여 주었다. 삼투압 변화에 따른 erythritol의 비 생산속도를 살펴본 결과 삼투압에 따라 큰 차이가 없이 2.5 Os/kg 범위 내에서 삼투압이 증가할수록 증가하였다. Erythritol 생산성을 높이기 위해서는 균체 성장속도가 저해를 적게 받으면서 erythritol 생산속도가 높은 적당한 삼투압으로 발효 조건의 조절이 필요하고 삼투압을 조절하기 위해서는 염과 같은 삼투압 조절 물질을 첨가해야 한다.

REFERENCES

1. Anand, J. C. and A. D. Brown. 1972. Effect of osmotic

- pressure on glycerol production. *J. Gen. Microbiol.* **52**: 205-212.
2. Aoki, M. A. Y., G. M. Pastore, and Y. K. Park. 1993. Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotechnol. Lett.* **15**: 383-388.
3. Bilanx, M. S., B. Flourie, C. Jaequemmim, and B. Messing. 1991. Sugar alcohols, p. 72. In S. Marie and F. R. Pogolt (eds.), *Handbook of Sweeteners*. Blackie, Gasgow.
4. Cunha, M., P. Firme, M. V. San Romao, and H. Santos. 1992. Application of nuclear magnetic resonance to elucidate the unexpected biosynthesis of erythritol by *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2271-2279.
5. Dooms, L., G. L. Hennebert, and H. Verachtert. 1971. Polyol synthesis and taxonomic characters in the genus *Moniliella*. *Antonie van Leeuwenhoek* **37**: 107-118.
6. Goldberg, I. 1994. *Functional Foods*. Chapman and Hall, New York.
7. Goossen, J. and H. Röper. 1994. Erythritol, a new sweetener. *Confectionery Production March*: 182-188.
8. Hanjny, G. J., J. H. Smith, and J. C. Garver. 1964. Erythritol production by a yeast like fungus. *Appl. Microbiol.* **12**: 240-246.
9. Hattori, K. and T. Suzuki. 1974. Production of erythritol by *n*-alkane grown yeasts. *Agric. Biol. Chem.* **38**: 581-586.
10. Ishizuka, H., H. Wako, T. Kasumi, and T. Sasaki. 1989. Breeding of a mutant of *Aureobasidium* sp. with high erythritol production. *J. Ferment. Bioeng.* **68**: 310-314.
11. Kim, S. Y., K. H. Lee, J. H. Kim, and D. K. Oh. 1997. Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis*. *Biotechnol. Lett.* **19**: 729-733.
12. Onishi, H. 1967. Production of polyalcohols by yeasts. *Hakko Kyokaishi* **25**: 495-506.
13. Shindoh, T., Y. Sasaki, A. 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. Shindoh, T., Y. Sasaki, A. Miki, T. Eguchi, K. Hagiwara, and T. Ichikawa. 1989. Identification of erythritol by HPLC and GC-MS and quantitative measurement in pulps of various fruits. *J. Agric. Food Chem.* **37**: 1474-1476.
15. Wolf, A. V., M. G. Brown, and P. G. Prentiss. 1979. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC Press, Florida.
16. 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 February 22, 1999)