

염 내성 변이균주 *Candida magnoliae* M26에 의한 에리스리톨 발효특성

이 강 희·¹서 진 호·*유 연 우
아주대학교 분자과학기술학과, ¹서울대학교 식품공학과
(접수 : 2002. 8. 10., 게재승인 : 2002. 11. 25.)

Fermentation Characteristics of Salt-Tolerant Mutant, *Candida magnoliae* M26, for the Production of Erythritol

Kang Hee Lee, Jin Ho Seo¹, and Yeon Woo Ryu*

Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

¹Department of Food Science & Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

(Received : 2002. 8. 10., Accepted : 2002. 11. 25.)

Experiments were carried out to optimize the fermentation conditions for the production of erythritol by salt-tolerant mutant, *Candida magnoliae* M26. The optimum conditions of erythritol production showed a 1.0 vvm aeration and 500 rpm agitation at 28°C with an initial medium pH of 7.0. The pH control during the fermentation did not improve the erythritol yield and productivity. The maximum erythritol concentration of 143.3 g/L was obtained with 57% yield and 0.70 g/L-h productivity from 250 g/L of glucose and 5 g/L of yeast extract under an optimum fermentation conditions. The medium containing 0.5 M KCl or 0.5 M NaCl enhanced the production of erythritol and glycerol. However, glycerol production increased and erythritol production decreased by increasing the concentration of NaCl or KCl.

Key Words : Erythritol, *Candida magnoliae*, glycerol, salt-tolerant mutant

서 론

Erythritol은 자연계의 과일(1), 버섯(2), 발효식품(1) 및 포유동물의 체액(3) 등에 매우 낮은 농도로 존재하는 4탄당의 당알콜로서 설탕의 70-80% 당도를 갖는 천연 감미료이다(4). 또한 이러한 erythritol은 일부 미생물들이 삼투압이 높은 조건에서 세포 내 삼투압 조절물질(compatible solute)로 생성한다(5). 따라서 미생물을 이용한 발효법에 의하여 erythritol을 생산하기 위한 균주의 선별과 개량에 대한 연구결과들이 보고되어 있으나(6-8), 발효조건들에 대한 연구는 많이 이루어져 있지 않고, 단지 일부 통기 및 발효온도의 최적조건과 삼투압의 영향에 대한 연구가 수행되어 있다.

Erythritol 발효에서 용존산소량은 glucose의 대사과정과 erythrose가 erythritol로 전환되는 환원반응을 제어하기 때문에 세포의 성장과 erythritol 생성에 매우 중요한 요소로 보고되어 있다(9,10). 즉 효모에 의한 erythritol의 생성은 glucose가 pentose phosphate pathway를 통하여 이루어지므로 산소의 공급이 제한되면 세포전반의 대사속도는 낮아지게 되는 반면

에 에탄올과 glycerol 같은 부산물이 생성된다(11). 이러한 이유는 세포 내의 NAD(P)⁺/NAD(P)H redox balance에 따라 glucose의 대사속도가 조절되는데, 이때 세포내의 redox balance에 가장 큰 영향을 미치는 인자가 산소이기 때문에 erythritol 발효에서 적정량의 통기조건과 교반속도에 의해 최대의 erythritol 수율을 얻을 수 있다고 보고되었다(7,11). 발효동안의 배양온도는 세포의 대사반응 속도와 세포의 구성성분 등에 영향을 주어 세포성장 속도는 일반적으로 온도 증가에 따라 비례적으로 증가하다가 일정 온도 이상에서는 감소하는 경향을 나타내기 때문에 미생물의 성장과 대사산물의 형성에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Erythritol의 생산을 위한 최적의 배양온도에 대한 연구결과에서 Kim 등(12)과 Aoki 등(7)은 30°C 이상의 온도를 최적 배양온도로 보고하였으며, Chun 등(8)은 *Trichosporonoides* sp.를 이용한 erythritol 생산에서 erythritol 생산수율에는 온도의 영향이 없었지만 32°C 이상의 온도에서 부산물로 glycerol의 농도가 증가함을 보고하였다. 또한 erythritol의 생성과 pH와의 관계에서 Hallsworth 등(13)은 pH 2.9에서 곰팡이인 *Paecilomyces farinosus*의 conidia에 높은 함량으로 glycerol과 erythritol이 존재한다고 보고하였다.

미생물들에 의한 당알콜의 생성은 삼투압이 높은 환경에서 세포 내에 삼투압 조절물질로 생성하여 미생물의 생육을 가늠하게 하기 때문에 당알콜의 생산에는 삼투압 내성이 큰 미생

* Corresponding Author : Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea
Tel : +82-31-219-2449, Fax : +82-31-216-8777
E-mail : ywryu@madang.ajou.ac.kr

물을 사용하는 경우가 많다. 특별 삼투압 내성이 높은 미생물의 경우 NaCl 이나 KCl 등의 첨가에 의한 삼투압의 증가로 당알콜류의 생산이 증가된다고 보고되어 있다(14,15). 즉 Reed 등(16)은 NaCl에 의하여 stress를 받은 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Zygosaccharomyces rouxii* 등의 효모들이 exponential growth phase에 삼투조절물질로서 glycerol을 생성하였고, 과량의 glycerol이 생성된 원인으로 NaCl의 첨가에 의한 삼투압 증가 때문이라고 밝혔다. 특별 salt-tolerant yeast로 알려진 *Debaryomyces hansenii*에 관한 연구에서는 salt stress에 의한 삼투압 조절기작이 exponential phase에선 glycerol로 이루어지는 반면에 stationary phase에선 arabitol로 조절된다는 것을 확인하였다(17,18). 또한 Nobre 등(19)은 *Debaryomyces hansenii*를 이용하여 엽, 당, 그리고 polyethylene glycol로 삼투압을 높인 배지에서 glycerol과 arabitol을 얻을 수 있음을 보고하였다. 그러나 일반적으로 glucose 또는 NaCl로 삼투압을 높인 환경에서 31종류의 yeasts에 대한 발효를 수행한 결과에서 같은 수분 활성도를 나타내더라도 NaCl 보다 glucose로 배지 내의 수분 활성도를 낮추었을 경우에 훨씬 많은 양의 당알콜이 생산된다고 보고하였다(20). 이러한 이유로 Kim 등(12)은 osmophilic yeast인 *Trigonopsis variabilis*가 KCl보다 glucose에 의해 발생하는 고삼투압 조건이 erythritol 생산에 더 유리하다는 것을 발견하고 그 이유가 glucose 배지에서의 specific growth rate와 cell density가 더 높기 때문이란 점을 확인하였다.

따라서 본 연구에서는 엽 내성 변이균주인 *C. magnoliae* M26에 의한 erythritol의 생산을 위해서는 효모의 생육과 erythritol의 생성에 커다란 영향을 미치는 통기 및 교반, 발효온도, 배지의 초기 pH 및 pH 조절과 KCl 및 NaCl의 첨가에 의한 삼투압 증가가 erythritol의 생산에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에서 사용한 균주는 꿀 벌집(honeycomb)으로부터 동정한 *Candida magnoliae* JH(21)의 엽 내성 돌연변이 균주 M26을 이용하였다(22).

접종용 균주의 배양 및 배양배지

접종용 균주의 배양은 20 g/L glucose, 10 g/L yeast extract 및 10 g/L peptone이 포함된 배지 50 mL를 250 mL baffled flask에 넣고 멸균한 후에 접종하여 30°C에서 48시간 200 rpm으로 진탕 배양하여 사용하였다. 발효배지는 250 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 5 g/L KH₂PO₄, 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.4 g/L MgSO₄ · 7H₂O를 사용하였으며, 초기 pH는 1.0 N KOH와 HCl을 이용하여 7.0으로 조절하였다. 모든 배양에서

의 접종량은 5%(v/v)로 하였다.

발효조건의 최적화 및 삼투압의 영향

발효조건에서는 통기, 교반, 배양온도, 배지의 초기 pH 및 pH 조절, NaCl 및 KCl 첨가 영향을 검토하여 erythritol의 생산 농도, 수율 및 생산성을 검토하여 최적의 조건을 결정하였다. Flask 배양은 발효배지 50 mL를 250 mL baffled flask에 넣고 멸균한 후에 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 진탕 배양하였다. 발효조에 의한 배양은 발효배지 1.0 L를 2.5 L jar fermenter (KoBioTech, Korea)에 넣고 실험을 수행하였다.

분석방법

Erythritol과 glycerol의 정량은 NH₂ column (Shiseido, Japan)으로 HPLC (Waters, USA)에서 RI Detector로 측정하였다. 이때 용매는 85% acetonitrile을 사용하였으며, 유속은 1.4 mL/min 이고 column의 온도는 40°C이었다. Glucose는 Glucose Analyzer(YSI, USA)를 사용하여 분석하였다. 세포농도는 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu, Japan)를 사용하여 620 nm에서 optical density(O.D)를 측정하였다. 건조 균체량은 흡광도와 건조 균체량(dry cell weight)의 표준곡선에 의하여 건조 균체량(g/L)으로 환산하였다. *C. magnoliae*의 변이균주 M26은 1 O.D가 0.25 g/L의 건조 균체량에 해당되었다.

결과 및 고찰

통기량의 영향

배지 내의 용존산소량은 당알콜의 생성에 큰 영향을 미치는데, 이는 세포 내에서 산소가 glucose의 대사과정에 관여하여 세포의 성장과 당알콜의 생성에 관여하기 때문이다. 즉 효모에 의한 erythritol의 생성은 glucose가 pentose phosphate pathway를 통하여 생성되므로 용존산소량의 증가에 따라 세포의 성장속도가 증가하여 최대 세포농도는 높아지지만 erythritol의 수율이 낮아지고, 용존산소량이 낮아지면 산소의 공급이 제한되므로 세포의 대사속도가 낮아지게 되어 에탄올과 glycerol 같은 부산물이 생성된다(7,10,11). 따라서 본 실험에서는 엽내성 변이균주 M26을 이용한 erythritol 생산에서 통기의 영향을 검토하였다. 즉 glucose 농도가 250 g/L이고 pH가 7.0인 발효배지 1.0 L를 2.5 L의 발효조에 넣고 발효조의 온도와 교반속도를 28°C 및 500 rpm으로 유지하면서 0.75에서 2.0 vvm까지의 통기조건에서 glucose가 모두 소모되는 시간까지 실험을 수행한 결과를 Table 1에 나타내었다. 실험 결과에서 통기조건이 1.0 vvm인 경우에 세포성장과 erythritol의 생산이 가장 우수하였다. 즉 Figure 1에서와 같이 세포농도는 48시간 배양까지 급격히 증가하다가 그 이후에는 서서히 증가하여 205시간 배양에서 glucose가 모두 소모되면서

Table 1. Effect of aeration rate on the cell growth and erythritol production of mutant M26

Aeration rate (vvm)	0.75	1.0	1.5	2.0
Cell concentration (g/L)	29.3	33.6	32.6	32.1
Erythritol concentration (g/L)	131.2	143.3	115.0	111.8
Erythritol yield (%)	52.5	57.3	46.0	44.7
Erythritol productivity (g/L-h)	0.55	0.70	0.60	0.58
Fermentation time (h)	240	204	192	192

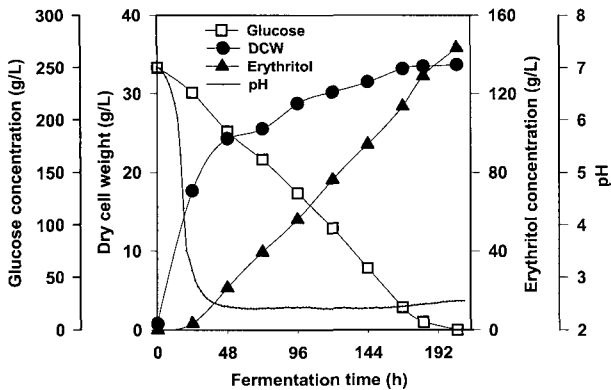


Figure 1. The profiles of cell growth, pH, erythritol and glucose concentrations during the batch culture of mutant M26 under aeration at 1.0 vvm.

최대 세포농도는 33.6 g/L이 되었다. 반면에 배지 내에 erythritol의 농도는 24시간 배양 이후부터 205시간 배양까지 거의 직선적으로 증가하여 최대 143.3 g/L의 erythritol을 얻을 수 있었다. 이와 같이 세포성장과 erythritol의 생산이 non-growth associated form을 나타내는 이유는 세포 내에서 erythritol 생성을 위한 대사과정의 특정한 단계, 또는 생성된 erythritol의 분비단계가 rate-limiting인 것으로 추정되며, 이에 대한 연구는 현재 진행 중에 있다. Erythritol 생산성과 수율도 1.0 vvm의 통기조건에서 각각 57.3%와 0.70 g/L-h로 가장 우수하였다. 이와 같이 erythritol의 생산이 특정한 통기조건에서 최대 값을 나타내는 이유는 세포 내의 NAD(P)⁺/NAD(P)H redox balance에 따라 glucose의 대사속도를 조절하는 인자인 산소의 영향이 매우 크기 때문으로 사료된다. 이러한 결과는 삼투압 내성 효모 균주를 사용한 erythritol 발효에서 최적의 용존산소량이 5~10%에서 최대의 농도와 수율 및 생산성을 얻었다는 연구결과와도 유사하였다(10,11). 또한 통기량의 증가에 따라 발효시간이 단축되는 경향을 나타내었으나 1.0 vvm 이상의 통기조건에서는 erythritol의 최종 농도가 감소하여 수율과 생산성이 감소하였으며, 이는 Kim 등(10)의 연구결과와도 일치하였다. 반면에 0.75 vvm에서는 세포성장 속도가 낮아져 glucose를 모두 소비하는 발효시간이 길어지고, 또한 산소의 공급이 충분하지 못할 경우에 에탄올과 glycerol 등과 같은 부산물이 생성되는 경향이 있기 때문에 수율과 생산성

이 낮게 나타났다(10,11).

교반속도의 영향

교반속도는 통기량과 마찬가지로 배지 내로의 산소 전달속도(oxygen transfer rate)에 영향을 미칠 뿐만 아니라 미생물이 이용할 수 있는 배지 내의 각종 영양분의 혼합에도 크게 영향을 미친다. 따라서 통기량을 1.0 vvm으로 유지하면서 400~600 rpm의 교반조건에서 250 g/L의 glucose가 포함된 발효 배지 1.0 L를 2.5 L의 발효조에 넣고 28°C에서 실험을 수행한 결과를 Table 2에 나타내었다. 실험결과에서 교반속도의 증가에 따라 배지 내로 산소의 전달과 영양분의 혼합은 증가지만 교반속도의 증가에 따라 세포농도는 감소하였다. 즉 교반속도 400 rpm에서 배양 204시간에 glucose가 모두 소모되면서 39.0 g/L의 최대 세포농도를 나타내었으나, 최대 erythritol의 농도, 수율 및 생산성은 500 rpm의 교반속도에서 얻을 수 있었다. 이는 400 rpm에서보다 500 rpm에서 erythritol 생성을 위한 최적의 용존산소량이었기 때문으로 사료되었다. 반면에 600 rpm의 교반속도에서는 glucose를 모두 소비하는 발효시간은 183시간으로 단축되었으나 최종 세포 및 erythritol의 농도와 erythritol의 수율 및 생산성이 교반속도 500 rpm에서보다 감소하였다. 따라서 erythritol 생산에서의 최적의 통기량과 교반속도는 1.0 vvm과 500 rpm으로 결정하였다.

최적 발효온도의 결정

배양온도는 세포의 대사작용과 영양 요구성에 영향을 미쳐 세포의 구성성분 등이 달라지게 된다. 일반적으로 온도가 증가함에 따라 세포성장은 비례적으로 증가하다가 일정 온도 이상에서는 감소하는 경향을 나타내는데, lag phase에서의 미생물 성장과 대사산물의 형성에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

따라서 발효조를 이용한 최적의 발효온도를 결정하기 위하여 250 g/L의 glucose 배지 1.0 L를 2.5 L의 발효조에 넣고 1.0 vvm의 통기와 500 rpm의 교반으로 각각의 발효온도에서 glucose가 모두 소모되는 시간까지 실험을 수행한 결과를 Table 3에 나타내었다. 실험결과에서 변이균주 M26은 28°C에서 가장 높은 erythritol의 수율과 생산성을 나타내었으며, 세포농도는 30°C에서 41.0 g/L로 가장 높았다. 따라서 변이균주 M26을 이용한 erythritol 생산에서는 세포의 성장에 최적인

Table 2. Effect of agitation speed on the cell growth and erythritol production of mutant M26

Agitation speed (rpm)	400	500	600
Cell concentration (g/L)	39.0	35.7	33.1
Erythritol concentration (g/L)	103.5	143.3	120.7
Erythritol yield (%)	41.4	57.3	48.3
Erythritol productivity (g/L-h)	0.51	0.70	0.66
Fermentation time (h)	204	205	183

Table 3. Effect of culture temperature on the cell growth and erythritol production of mutant M26

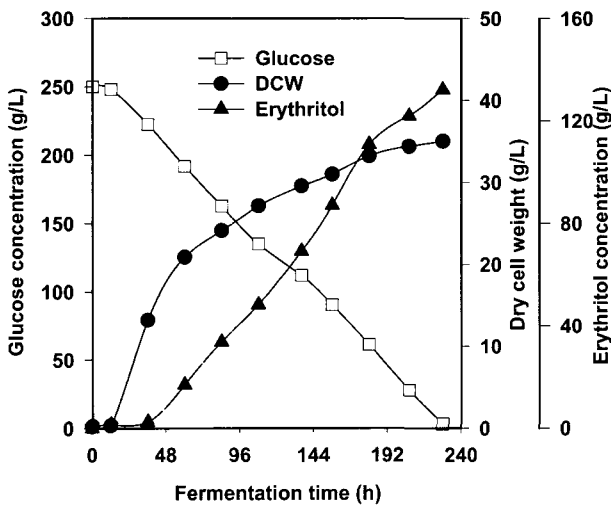
Temperature (°C)	26	28	30
Cell concentration (g/L)	34.4	35.7	41.0
Erythritol concentration (g/L)	108.0	143.3	86.7
Erythritol yield (%)	43.2	57.3	34.7
Erythritol productivity (g/L-h)	0.50	0.70	0.63
Fermentation time (h)	216	205	138

Table 4. Effect of initial pH on cell growth and erythritol production of mutant M26

Initial pH	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
Cell concentration (g/L)	20.0	22.7	25.4	24.0	24.2
Erythritol concentration (g/L)	12.6	21.4	21.6	23.5	18.6

Table 5. Effect of pH control on the cell growth and erythritol production of mutant M26

pH control	non-control	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
Cell concentration (g/L)	35.9	35.0	34.0	33.2	33.5	30.7
Erythritol concentration (g/L)	143.3	132.2	130.0	120.7	110.8	77.1
Erythritol yield (%)	57.2	52.9	52.0	48.3	44.3	30.8
Erythritol productivity (g/L-h)	0.70	0.58	0.57	0.46	0.40	0.32

**Figure 2.** Profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch fermentation of mutant M26 under the control of pH 3.0.

온도보다 약간 낮은 온도에서 erythritol의 생산이 더 높은 것으로 사료되었다. 이는 erythritol의 생산을 위한 최적의 배양 온도에 대한 기존 연구자들의 실험 결과를 보면 Kim 등(12)과 Aoki 등(7)은 30℃ 이상의 온도를 최적 배양온도로 보고하였으며, Kim 등(21)은 26℃에서 최대 수율의 erythritol을 얻을 수 있다고 보고하였다. 반면에 Chun 등(8)은 *Trichosporonoides* sp.를 이용한 erythritol 생산에서 erythritol의 생산수율에는 온도의 영향이 없었지만 32℃ 이상의 온도에서 부산물로 glycerol의 농도가 증가함을 보고하였다. 이처럼 최적의 발효 온도는 생산하는 당알콜의 종류뿐만 아니라 사용하는 균주의 종류에 따라 달라진다는 것을 알 수 있었다.

배지의 초기 pH 및 pH 조절의 영향

pH는 세포성장 및 대사산물의 생산에 중요한 영향을 미치는데, 이는 발효배지의 초기 pH가 세포 내의 대사과정에 영향을 주어 세포 성장에 큰 영향을 미치기 때문이다. 특히 erythritol 발효에서는 일반적으로 발효과정 중에 배양액의 pH가 낮아지는데, 본 실험에서도 초기 배지의 pH가 7.0인 경우 발효 후기에 pH가 2.5까지 낮아지는 것을 알 수 있었다 (Figure 1). 이는 발효 동안에 유기산들이 생성되기 때문인 것으로 확인되었다. 이처럼 낮아진 배양액의 pH는 세포의 성장과 당알콜의 생산에 큰 영향을 미치기 때문에 필요에 따라

발효과정 중에 pH 조절이 요구되기도 한다. 따라서 본 실험에서는 pH를 조절하지 않고 배지의 초기 pH를 4.0~8.0 범위로 하여 100 g/L의 glucose와 5 g/L의 yeast extract가 포함된 발효배지 50 mL를 250 mL baffled flask에 넣고 30℃에서 84시간 200 rpm으로 진탕 배양한 결과를 Table 4에 나타내었다. 실험결과에서 세포 성장은 pH 6.0에서 우수하였으나 erythritol의 생산은 pH 7.0에서 가장 우수하였다. 따라서 발효 동안에 pH를 일정하게 조절하기 위하여 발효조에서 실험을 수행하였다. 실험은 250 g/L의 glucose 배지를 이용하여 1.0 vvm의 통기와 500 rpm의 교반속도로 28℃의 조건에서 pH를 조절하면서 실험을 수행한 결과를 Table 5에 나타내었다. 실험결과에서 pH를 3.0으로 조절하는 경우(Figure 2)에 배양 40시간 이후부터 erythritol이 생성되기 시작하였으며, 배양 228시간에 glucose를 모두 소모하면서 최대 132.2 g/L의 erythritol을 생산하였다. 이때의 erythritol의 수율은 53%이었으며, 생산성은 pH를 조절하지 않은 조건보다 낮은 0.58 g/L-h이었다. 세포의 농도는 배양 말기에 최대 35.0 g/L로서 pH를 조절하지 않은 경우와 비슷하였다. 그러나 Table 5에서 보듯이 조절하는 pH가 높아질수록 최대 세포의 농도는 약간씩 감소한 반면에 최대 erythritol의 농도는 크게 감소하는 결과를 얻었다. 이는 세포의 성장에 미치는 pH의 영향은 적은 반면에 erythritol의 생성은 낮은 pH에서 촉진되기 때문으로 사료되었다. 이러한 결과는 낮은 pH에서 곰팡이인 *Paecilomyces farinosus*의 conidia에 높은 농도의 당알콜이 축적된다는 보고와 유사하였으며(13), 또한 erythritol의 분비가 H⁺의 transport와 관련이 있을 것으로도 사료되었다. 결과적으로 *C. magnoliae*의 변이균주 M26에 의한 erythritol의 생산에서는 발효 동안에 pH를 조절하지 않고 단지 배지의 초기 pH만을 7.0으로 하여 발효를 수행하는 것이 erythritol의 수율과 생산성이 가장 우수하였다.

NaCl 및 KCl 첨가의 영향

당알콜 생산에 이용되는 삼투압 내성 균주는 배지 내에 염(salt)이 첨가될 때 water-stress를 받아 삼투조절물질로 고 농도의 당알콜을 생산한다는 많은 보고들이 있다(5,14-20). 따라서 본 실험에서도 NaCl과 KCl이 erythritol의 생성에 미치는 영향을 검토하여 최대의 erythritol 생성을 위한 최적의 NaCl 또는 KCl 농도를 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 즉 glucose가 250 g/L인 발효배지에 NaCl과 KCl의 농도를 0~1.5 M까지 첨가하여 제조된 배지 50 mL를 250 mL baffled

Table 6. Effect of NaCl concentration on the cell growth and erythritol production by mutant M26

NaCl(M)	DCW(g/L)	Erythritol(g/L)	Glycerol(g/L)	Residual sugar(g/L)
0	16.36	24.8	0	9.8
0.5	23.33	27.1	10.3	20.1
1.0	16.71	15.7	15.8	69.5
1.5	13.79	12.1	22.7	85.5

Table 7. Effect of KCl concentration on the cell growth and erythritol production by mutant M26

KCl(M)	DCW(g/L)	Erythritol(g/L)	Glycerol(g/L)	Residual sugar(g/L)
0	16.36	24.8	0	9.8
0.5	23.06	31.9	13.5	11.3
1.0	16.38	14.4	16.3	76.4
1.5	13.65	11.6	17.9	91.3

flask에 넣고 30℃에서 200 rpm으로 196시간 진탕 배양하여 균체량, erythritol 및 glycerol 생성량, glucose의 농도를 측정하였다.

실험결과(Table 6, Table 7)에서 NaCl과 KCl의 농도가 0.5 M이 포함된 배지에서는 erythritol과 균체의 농도가 NaCl이나 KCl을 첨가하지 않은 경우보다 높은 결과를 얻었는데, 이는 *C. magnoliae*의 변이균주인 M26이 염 내성 균주이기 때문에 glucose 250 g/L(1.4 M)에 의한 삼투압 보다 약간 더 높은 삼투압 조건이 erythritol의 생성에 최적 조건임을 확인하였다. 그러나 NaCl과 KCl의 농도가 1.0 M 이상에서는 염농도의 증가에 따라 erythritol과 균체의 농도가 감소하는 반면에 glycerol의 생성이 증가하고, 또한 glucose의 소비속도도 감소하여 이용하지 못한 glucose의 농도가 증가하였다. 이와 같이 일정 이하의 삼투압 조건(약 2.0 M의 용질)에서는 세포의 성장과 glucose의 대사속도를 감소시키지 않으며 세포에 지속적으로 water-stress를 제공하여 보다 많은 erythritol이 생성되었지만, 2.4 M 이상의 삼투압 조건(1.0 M 염 농도와 1.4 M의 glucose 농도)에서는 배지 내의 수분활성도가 미생물이 생육하기 힘든 정도까지 낮아져 glucose의 대사속도를 감소시키고 세포성장을 저해한 것으로 사료되었다. 따라서 변이균주 M26은 NaCl 또는 KCl의 염 첨가에 의한 water-stress가 주어질 때에 주요 삼투조절물질로 erythritol과 동시에 glycerol이 생성되므로 이 균주에 의한 erythritol의 생산에서는 염보다는 glucose에 의하여 약 2.0 M 정도의 삼투압 조건을 제공하는 것이 높은 수율과 생산성으로 erythritol을 얻을 수 있을 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 Kim 등(12)이 osmophilic yeast인 *Trigonopsis variabilis*에서 KCl 보다 glucose에 의해 발생하는 삼투압조건이 erythritol의 생산에 더 유리하다는 것과 유사하였다.

요 약

발효조건 최적화에 대한 연구결과 온도는 28℃, 배지의 초기 pH는 7.0, 통기와 교반 조건은 1.0 vvm과 500 rpm에서 erythritol의 생산이 가장 우수하였다. 이러한 최적의 발효조건에서 250 g/L의 glucose와 5 g/L의 yeast extract가 포함된 발효배지에서 최대 erythritol 농도는 143.3 g/L이었으며, 이때의 수율은 57%이고 생산성은 0.70 g/L-h이었다. 발효 중에 pH를

일정하게 조절하는 경우에 erythritol의 수율 및 생산성은 향상되지 못하였다. 발효배지에 0.5 M의 NaCl 또는 KCl의 첨가에 의해서 염이 첨가되지 않은 배지에 비해 erythritol의 생산이 약간 증가를 하였다. 그러나 NaCl 또는 KCl의 첨가농도가 증가할 수록 erythritol의 생성은 감소하고, 반면에 glycerol의 생성이 증가하였다.

감 사

본 연구는 경기지방중소기업청의 산학연공동기술개발 컨소시엄 연구비(2000~2001)와 과기부의 중점국가연구개발사업(신화학공정기술개발)의 일부 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

- Shindoh, 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, *Agric. Biol. Chem.* **62**, 623-626.
- Yoshida, H., T. Sugahara, and J. Hayashi (1984), Studies in free sugars and free sugar alcohols of mushrooms, *Jpn. Food Ind.* **31**, 765-771.
- Roberts, G. P., A. McDiarmid, and P. Gleed (1976), The presence of erythritol in the fetal fluids of fallow deer (*Dama dama*), *Res. Vet. Sci.* **20**, 254-256.
- Kim, S. Y., J. H. Choi, C. J. Kim, and J. H. Kim (1995), Functional properties of erythritol, *Food Sci. Ind.* **28**(2), 23-28.
- Beever, R. E. and E. P. Laracy (1986), Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, *J. Bacteriol.* **168**(3), 1358-1365.
- Hajny, G. J., J. H. Smith, and J. C. Garver (1964), Erythritol production by a yeastlike fungus, *Appl. Microbiol.* **12**, 240-246.
- Aoki, M. A. Y., G. M. Pastore, and Y. K. Park (1993), Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol, *Biotech. Lett.* **15**, 383-388.
- Chun, Y. J. and S. H. Seo (1995), Development of erythritol production process by microbial fermentation, *Kor. Biotechnol. Chem. Eng.* **9**(4), 24-29.
- Sasaki, T. (1989), Production technology of erythritol, *Jpn*

- Agr. Biol. Chem.* **63**, 1130-1132.
10. Kim, K. A., B. S. Noh, J. K. Lee, S. Y. Kim, Y. C. Park, and D. K. Oh (2000), Optimization of culture conditions for erythritol production by *Torula* sp., *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**(1), 69-74.
 11. Denis, G., P. Chevalier, and T. H. Yuen (1995), Production of polyols and ethanol by the osmophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*, *Biotechnol. Lett.* **17**(3), 315-320.
 12. 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**(8), 727-729.
 13. Hallsworth, J. E. and N. Magan (1996), Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(7), 2435-2442.
 14. Hallsworth, J. E. and N. Magan (1994), Effect of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi, *Let. Appl. Microbiol.* **18**, 8-11.
 15. Luxo, C., M. F. Nobre, and M. S. D. Costa (1993), Intracellular polyol accumulation by yeastlike fungi of the genera *Geotrichum* and *Endomyces* in response to water stress(NaCl), *Can. J. Microbiol.* **39**, 868-873.
 16. Reed, R. H., J. A. Chudek, R. Foster, and G. M. Gadd (1987), Osmotic significance of glycerol accumulation in exponential growing yeasts, *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(9), 2119-2123.
 17. Larsson, C. and L. Gustafsson (1993), The role of physiological state in osmotolerance of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*, *Can. J. Microbiol.* **39**, 603-609.
 18. Adler, L., A. Blomberg, and A. Nilsson (1985), Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*, *J. Bacteriol.* **162**(1), 300-306.
 19. Nobre, M. F. and M. S. Da Costa (1985), The accumulation of polyols by the yeast *Debaryomyces hansenii* in response to water stress, *Can. J. Microbiol.* **31**, 1061-1064.
 20. Van Eck, J. H., B. A. Prior, and E. V. Brandt (1993), The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts, *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1047-1054.
 21. Kim, S. Y., S. S. Park, Y. J. Jeon, and J. H. Seo (1996), Analysis of fermentation characteristics for production of erythritol by *Candida* sp. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**(5), 935-939.
 22. Yang, S. Y., J. H. Seo, and Y. W. Ryu (2000), Development of osmotolerant mutant, *Candida magnoliae* M26 and determination of the optimum concentrations of carbon and nitrogen sources to improve erythritol yield, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(6), 566-572.