

응집성 효모인 *Candida* sp. HY200에 의한 xylitol 생산강희윤, 서진호¹, 유연우아주대학교 분자과학기술학과 발효대사공학실험실, ¹서울대학교 식품공학과
전화 (031) 219-2455, 팩스 (031) 216-8777

Abstract

On the basis of high-osmotic tolerance and xylitol productivity, it was isolated a novel strain from soil of rice field. An isolated strain was tentatively designated as *Candida* sp. HY200, deduced from the systematic approaches of bacterial identification by Biolog MicrologTM and, revealed an interesting ability of flocculation during the cultivation. With respect to the osmotic-tolerance and flocculation ability, experiment was carried out to investigate the production of xylitol in high xylose concentration. When xylose concentration was 260 g/L, it was obtained 205 g/L xylitol with 79% of yield and 2.14 g/L · h of productivity. Consequently, We convinced that *Candida* sp. HY200 stands a very favorable comparison with *C. tropicalis*.

서론

Xylitol은 xylose의 carbonyl group이 환원된 것으로 설탕과 유사한 감미도의 5탄당 당알콜로서 미생물이나 과일, 채소류에 포함(9g/kg)되어 있고, 인체의 포도당 대사과정에서 중간 대사산물로 하루에 5~15g이 생성되는 천연물질이다. Xylitol은 충치 유발균인 *Streptococcus mutans*에 의해 이용되지 않아 치약, 음료수, 껌 등에 사용되고 있고, 용해될 때 흡열하는 특성(-36.5 cal/g)이 있어 청량감을 주며, insulin에 의한 혈당농도의 조절이 요구되지 않아 당뇨병 환자와 glucose-6-phosphate dehydrogenase가 결핍된 환자들에게 대체감미료로서의 이용이 가능하다. 또한 식품 부패균(*Clostridium butyricum*, *Salmonella typhi* 등)의 생육을 억제하여 식품의 저장성을 강화시키는 기능을 갖고 있다. 현재까지 연구된 바에 의하면 많은 미생물들이 xylose의 대사과정에서 xylitol을 분비한다는 사실이 밝혀짐에 따라 생물공학적인 전환 공정에 의하여 고수율, 고생산성의 xylitol을 생산할 수 있게 되었다.

재료 및 방법

균주는 경기도 화성군 소재의 추수가 끝난 논에서 벗짚이 부패되어 냄새가 심한 흙으로부터 분리하여 사용하였다. 흙 시료 10 g을 xylose 300 g/L의 flask에 넣어

shaking incubator에 200 rpm, 30°C 조건으로 일주일간 배양한 후 배양액을 agar plate(yeast extract 10 g/L, peptone 10 g/L, xylose 100 g/L, agar 20 g/L)에 도말한 후 30°C incubator에서 3일간 배양하였다. 가장 빠르게 colony를 형성한 균주 5개를 다시 고농도 xylose agar 배지에 도말하여 3일간 배양한 후, xylose에 대한 삼투압 내성이 우수한 1개의 균주를 선별하여 HY200으로 임시 명명하였다.

선별한 균주의 접종용 배지는 YM배지(yeast extract 3 g/L, malto extract 3 g/L, peptone 10 g/L, glucose 20 g/L)를 사용하였다. 접종용 균주의 배양은 배지 50 mL을 250 mL 삼각 flask에 넣고 멸균한 후에 접종하여 shaking incubator에서 30°C, 200 rpm으로 12시간 동안 진탕배양하였다.

발효조(2.5L jar fermenter, 한국발효기)에서의 xylitol 생산을 위한 배지는 yeast extract 10 g/L, bacto peptone 10 g/L, xylose 100 g/L를 사용하였고, 30°C, 330 rpm, 1 vvm으로 배양하였으며, 접종용 균주의 양은 5%(v/v)로 하였다.

균주의 동정은 Biolog Microstation automated microbial identification system (Biolog Microlog™ release 3.5, Hayward, CA)을 이용하여 동정하였다.

Xylose와 xylitol 농도는 carbohydrate analysis column(Waters, USA)을 이용하여 HPLC(Waters, USA)에서 RI detector로 측정하였다. 이동상의 조성은 acetonitrile과 물을 85:15로 혼합하여 flow rate 2mL/min으로 분석하였다. 세포농도는 배양액을 4,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 세포를 수집한 후, spectrophotometer UV1201 (Shimadzu, Japan)로 600nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

담토(贖上)에서 새로이 분리한 균주를 Biolog automated microbial identification system을 이용하여 동정한 결과 *Candida tropicalis* B type이었고, 유사성은 76.2%이었다. 유사성이 낮지만 다른 종과의 유사성은 1%미만이었기 때문에 *Candida* sp. HY200이라고 임시 명명하고 18S rRNA의 염기배열을 통한 동정을 준비하고 있다.

Candida sp. HY200과 *Candida tropicalis*를 xylose 200 g/L의 농도로 120시간 동안 flask 배양을 한 결과 균체의 성장은 큰 차이를 보이지 않았으나, xylose 농도는 HY200이 200 g/L를 거의 소모한 반면 *C. tropicalis*는 70g /L(34%)가 남아있었다 (Fig. 1). 또한 xylitol의 생성도 HY200이 30% 더 높았다. 따라서 새로이 분리한 *Candida* sp. HY200은 기존에 실험실에서 xylitol 발효에 사용하던 *C. tropicalis* 균주와는 몇가지 다른 특성을 나타냈다. 즉, *C. tropicalis*보다 짧은 시간에 xylose를 소모하고, 당내성이 우수하며, flocculation이 나타났다. 발효기를 이용한 실험에서 *Candida* sp. HY200은 100 g의 xylose를 평균 30시간이내에 소모하는 반면, *C. tropicalis*는 36시간이상 요구되었다. 또한 HY200은 flask 배양을 할 때 shaking incubator에서 꺼내어 잠시 놓아두면 쉽게 응집이 일어났으며(Fig. 2), 또한 발효조

를 이용한 실험에서는 jar 내부에서 wall growth를 하는 특징을 볼 수 있었고 27°C 이하의 온도에서는 균체 성장에 저해를 받아 균체 증식이 이루어지지 않는다. 따라서, HY200은 *C. tropicalis*와는 다른 특성을 가진 균주라고 판단하여 HY200을 이용한 xylitol 발효실험을 실행하였다.

HY200의 발효기 배양조건을 결정하기 위하여 교반속도를 250 rpm에서 500 rpm까지 실험한 결과 400 rpm 이상에서는 최대 균체량이 27 g/L이었고, 배양 24시간 이내에 xylose 100 g를 모두 소모하였으며 생산성은 2.38 g/L·h를 나타냈지만 수율이 0.43으로 나타났고, 500 rpm 이상에서는 최대 균체량이 33 g/L 이상이지만 xylitol 수율은 30%를 넘지 않았다. 통기량은 1.25 vvm에서 0.9의 수율과 1.7g/L·h를 보였으며, 0.75vvm이하에서는 균체가 morphology의 변화를 가져왔다. 고농도인 260 g/L xylose에서의 xylitol 발효에서 수율은 79%이고 생산성은 2.14 g/L·h이었으며, 최대균체량은 8 g/L 이었다(Fig. 3). 이는 고농도 균체를 짧은 시간에 얻은 후 용존산소를 제한 하는 방법으로 300 g/L의 xylose로부터 43시간만에 240 g/L의 xylitol을 생산한 오 등(1997)의 결과 보다는 생산성은 낮으나 수율이 80%로 비슷한 수준을 보였다. 또한 *C. tropicalis* KFCC-10960의 응집성 돌연변이주로 5회에 걸쳐 repeated-fed batch를 수행하여 200 g/L의 xylose로부터 76시간만에 157.2g/L의 xylitol을 얻은 고(2000)의 연구에서 2.07 g/L-h의 생산성과 0.79 g-xylitol/g-xylose의 수율에 해당하는 결과를 보고하였다. *Candida* sp. HY200은 담토에서 분리한 야생균주로서 균주개량과 배지 및 발효의 공정을 최적화 한다면 보다 우수한 생산성과 수율을 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

요약

담토에서 분리한 균주는 *Candida* sp. HY200이라 임시 명명하였고, *Candida tropicalis* 보다 짧은 시간에 xylose를 소모하고, 당내성이 우수하며, flocculation의 특성을 갖고 있다. 260 g/L의 고농도 xylose 배지에서 xylitol 발효는 수율 79%, 생산성 2.14 g/L·h의 결과를 얻었다.

참고문헌

1. 오덕근, 김상용. "Candida tropicalis에 의한 xylose와 glucose로부터 xylitol 생산"(1997), 산업미생물학회지, 25(5), 495-500
2. 고병삼. "Candida tropicalis의 응집성 돌연변이주를 이용한 xylitol 생산과 xylitol dehydrogenase의 클로닝"(2000), 한국과학기술원 석사학위논문
3. Juan Carlos Parajo et al. "Biotechnological production of xylitol. part2"(1998), Bioresource Technology, 65, 203-212

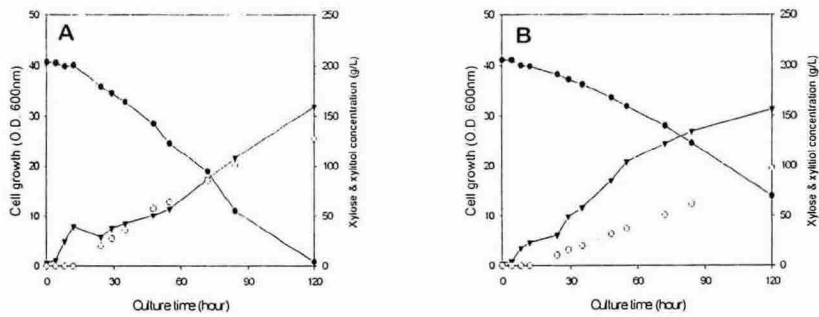


Fig 1. Profiles of cell growth and xylitol production on flask culture medium containing 200g/L of xylose by HY200(A) and *C. tropicalis*(B). (▼ ; Optical Density, ● ; xylose, ○ ; Xylitol)

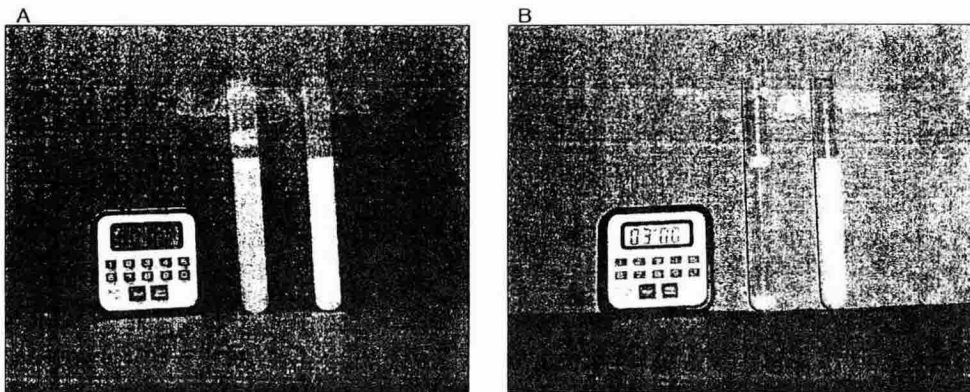


Fig 2. Photograph of flocculating; HY200(left tube) and *C. tropicalis*(right tube)
A; just set down after vortex mixing, B; passing 3 minutes after set down

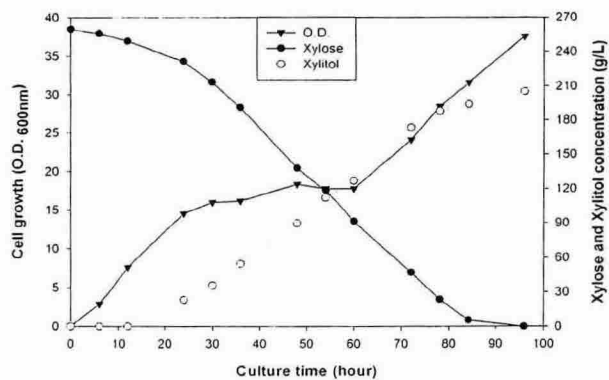


Fig 3. Profiles of cell growth and xylitol production on the fermentation medium containing 260g/L of xylose by *Candida* sp. HY200