

## *Candida parapsilosis* 돌연변이주에 의한 Xylitol 생산조건의 최적화

오덕근<sup>1</sup> · 김상용<sup>2</sup> · 김정희<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>우석대학교 식품공학과, <sup>2</sup>동양제과(주) 기술개발연구소, <sup>3</sup>한국과학기술원 생물과학과

**초록** : *Candida parapsilosis* ATCC 22019 돌연변이주를 이용하여 xylitol 생산에 영향을 주는 배양 조건인 pH와 온도 그리고 교반속도 및 산소전달속도 등의 환경인자가 xylitol의 생성에 미치는 영향을 살펴보았다. 발효조에서 pH가 증가 할수록 균체농도와 기질소비속도가 증가하여 발효시간이 단축되었다. 그러나, xylitol 생산은 pH 4.5와 5.5에서 큰 차이 없이 50 g/l의 xylose로 부터 약 34 g/l로 최대농도를 보여주었다. 온도가 증가 할수록 최대 비증식속도가 증가하였지만 최종 균체농도는 감소하였고, xylitol 생산성은 30°C에서 최대값을 보여주었다. 산소전달속도의 영향을 조사하기 위하여 발효조의 교반속도를 변화시키면서 배양한 결과 균체농도는 산소전달속도가 높을수록 증가하였지만, xylitol 생산은 크게 감소하였다. 교반속도를 150 rpm(산소전달속도 30 hr<sup>-1</sup>에 해당)으로 배양할때 발효시간 62시간에서 50 g/l의 xylose로 부터 xylitol 농도가 35.8 g/l로 최대값을 나타내었다. Xylitol 생산성을 증가시키기 위하여 1차 발효가 끝난 발효조에서 균체를 회수하여 20 g/l로 농축하여 최적조건인 pH 4.5, 30°C, 산소전달속도 30 hr<sup>-1</sup>에서 재배양을 하였을 때 50 g/l의 xylose가 배양시간 약 18 시간만에 모두 이용되었고 전환수율 80%에 해당하는 40 g/l의 xylitol이 생성되었다. 이때 xylitol의 생산성은 2.22 g/l-hr으로 일반 발효때 얻은 0.5~0.7 g/l-hr 보다 약 3~4배 증가되었다.(1996년 4월 17일 접수, 1996년 5월 20일 수리)

### 서 론

과일이나 채소에서 소량 존재하는 오탄당인 xylitol은 높은 감미도로 인하여 식품의 여러분야에서 감미료로 응용되고 있고,<sup>1)</sup> 또한 당뇨병 환자나 glucose-6-phosphate dehydrogenase 결핍 환자의 대용당으로 사용되고 있다.<sup>2)</sup> 지금까지 xylitol은 xylose가 많이 함유된 반섬유소가 수분해물(hemicellulose hydrolysate)을 환원시키는 화학적 방법으로 부터 생산하여 왔으나, 화학적 방법은 xylose 또는 xylitol과 반섬유소 부분에서 생기는 다른당의 고분자들과의 분리와 정제가 어렵기 때문에 xylitol의 생산가가 높고 알칼리 조건하에서의 고온 고압반응이므로 위험성과 폐기물 문제가 존재하는 단점이 있다.<sup>3)</sup> 이러한 단점을 해결하기 위하여 미생물중 효모에 의한 xylitol 생산방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 미생물에 의한 xylitol의 생산은 효모의 경우 *Candida shehatae*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*,<sup>4-8)</sup> *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarium*<sup>4)</sup>과 *Pichia stipitis*<sup>8)</sup> 등이 있다.

미생물에 의한 xylitol의 생성은 효소 xylose reductase에 의하여 xylose가 환원되어 xylitol로 전환되어 일어난다(Fig. 1). 생성된 xylitol의 일부는 xylitol dehydrogenase에 의하여 xylulose로 산화된후 대사경로를 거쳐 세포내 에너지 공급 및 세포구성 성분으로 전환된다.

이때 xylose reductase의 조효소로는 NADH와 NADPH가 관여하고, xylitol dehydrogenase의 조효소로는 NAD<sup>+</sup>가 관여한다.<sup>9,10)</sup> Xylose 전환과정에서 과량의 산소가 공급되면 NAD(P)H/NAD<sup>+</sup>의 비율이 감소하여 생성된 xylitol의 많은 부분이 xylulose가 되고 그 결과 균체농도가 증가하고 xylitol의 생산성은 감소한다. 반면에 산소 공급이 부족하면 미생물의 증식속도가 떨어지고 xylitol 생합성 속도도 떨어진다. 그러므로 산소농도 조절은 상기의 산화-환원 반응속도의 균형을 xylitol 축적 쪽으로 유도하여 고수율의 xylitol생산을 위하여 필수적이다.<sup>11-13)</sup>

본 연구에서는 *Candida parapsilosis* ATCC 22019 돌연변이주를 이용하여 pH와 온도, 교반속도 및 산소전달속도와 같은 환경인자가 xylitol의 생성에 미치는 영향을 살펴보고 최적 조건을 구한후 최적 배양조건에서 xylitol 생산성 증가를 시도하였다.

### 재료 및 방법

#### 미생물 및 사용배지

냉동보관(-70°C)중인 *Candida parapsilosis* ATCC 22019 돌연변이주를 YM 배지(포도당 20 g/l, peptone 5 g/l, yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l) 50 ml가 들어있는 250 ml 플라스크에 접종한후 진탕 배양기에서 240 rpm, 30°C로 16시간 배양하였다. 이 배양액을 xylose 50 g/l, yeast extract 5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l, MgSO<sub>4</sub>·

찾는말 : Xylitol, optimization of culture conditions, *Candida parapsilosis*

\*연락처

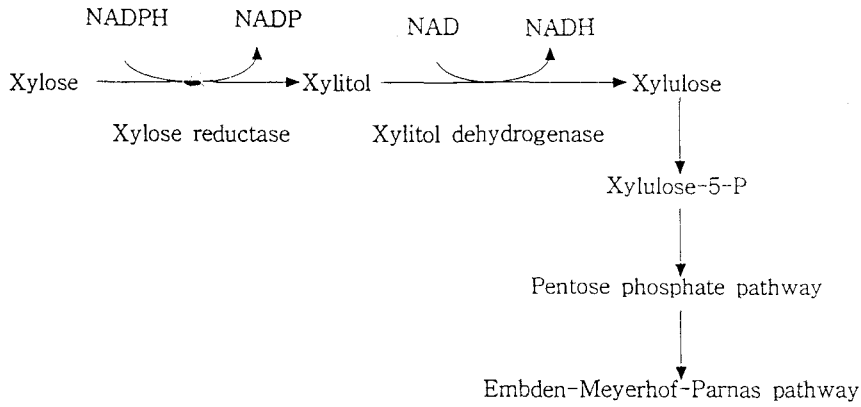


Fig. 1 Schematic illustration of xylose metabolic pathway.<sup>13)</sup>

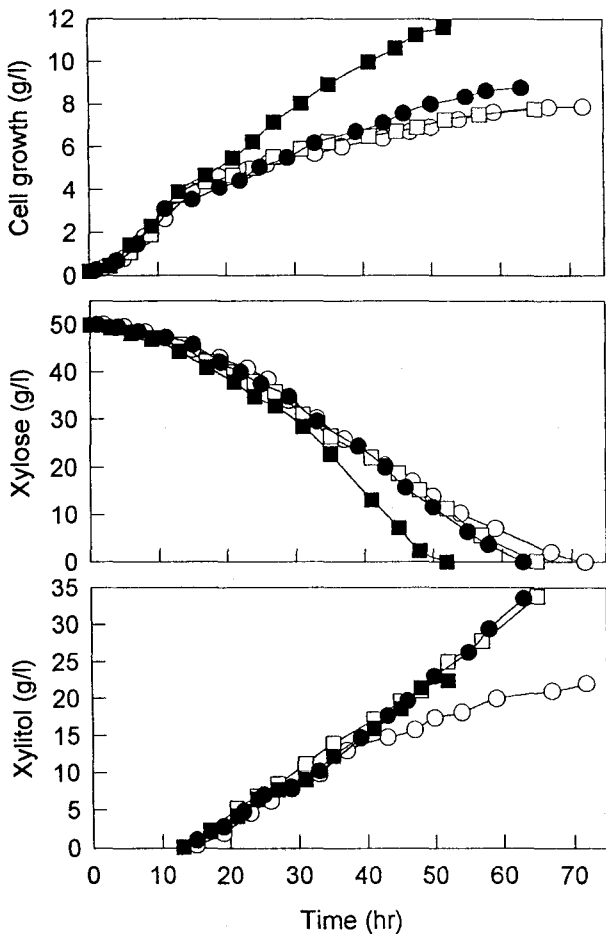


Fig. 2. Effect of cultivation pH on cell growth, xylose consumption and xylitol production. pH 3.5(○-○), pH 4.5(□-□), pH 5.5(●-●) and pH 6.5(■-■) at 30°C.

7H<sub>2</sub>O 0.4 g/l가 포함된 발효배지를 이용하여 발효조에서 5%(v/v)로 접종하여 발효를 수행하였다.

**배양방법**

한국발효기(주)에서 제작된 5L 발효조에서 배양액을 3L로 하여 균체증식 및 xylitol 생산성을 조사하기 위하여 배양 조건 인자인 온도, pH, 교반속도를 변화시

키면서 배양하였다. 통기량은 1.0 vvm으로 고정하였다.

**용존산소농도 및 산소전달속도의 측정**

배양중의 용존산소농도는 polarographic 전극(Ingold Electrodes, Swiss)을 이용하여 측정하였고, 산소전달속도(k<sub>La</sub>)는 배양액이 담겨있는 발효조에 통기를 중단하고 질소가스를 공급하여 용존산소의 농도가 0이 되도록 한 다음 일정한 속도로 통기하여 용존산소의 농도 변화를 BASIC program을 이용한 dynamic법을 사용하여 측정하였다.<sup>14)</sup>

**분석방법**

Xylose와 xylitol의 농도는 Sugar-Pak I column이 장착된 HPLC (Shimadzu C-R7A, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 물을 사용하였고, 온도는 90°C이고, 유속은 0.5 ml/min 이었다. 균체농도는 탁도계를 이용하여 600 nm에서 현탁도를 측정하여 미리 결정한 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다.

**결과 및 고찰**

**균체증식 및 xylitol생산에 미치는 pH의 영향**

효모를 이용하여 xylitol을 생성하는 경우 약산성 조건(pH 4~5)에서 수행되고 있으므로<sup>11-13)</sup> pH가 균체증식 및 xylitol생산에 미치는 영향을 약산성 조건을 중심으로 하여 pH 2.5에서 6.5까지 변화시키면서 5L 발효조에서 실험을 수행하였다(Fig. 2). pH가 증가 할수록 균체농도와 비증식속도(specific growth rate)가 증가하였고 이에 따라 기질소비속도가 증가하여 발효시간은 pH 3.5의 경우 약 72시간에서 pH 6.5의 경우 약 52시간으로 단축되었다. 그러나, 최종 xylitol 농도, xylitol 수율 및 생산성(volumetric productivity)은 pH 4.5와 5.5 사이에서 각각 최대값인 33.8 g/l, 67.5% 그리고 0.52 g/l-hr을 보여 주었다(Table 1).

pH 2.5의 경우에는 낮은 pH임에도 불구하고 균체증식은 7.2 g/l로 비교적 높은 수준이었으나 xylitol의 생산은 18.4 g/l로 36%의 낮은 수율을 보였다. pH를 6.5로

Table 1. Summary of pH effect on kinetic parameters of xylitol fermentation.

pH	X (g/l)	P (g/l)	$\mu^{max}$ (hr <sup>-1</sup> )	q <sub>P</sub> (g/g-hr)	IP (g/l-hr)	t <sub>f</sub> (hr)
2.5	7.23	18.4	0.24	0.04	0.14	128
3.5	7.90	24.0	0.37	0.07	0.33	72
4.5	7.78	33.8	0.40	0.10	0.52	65
5.5	8.74	33.5	0.45	0.10	0.53	63
6.5	11.60	22.4	0.52	0.08	0.43	52

Table 2. Summary of temperature effect on kinetic parameters of xylitol fermentation.

Temp (°C)	X (g/l)	P (g/l)	$\mu^{max}$ (hr <sup>-1</sup> )	q <sub>P</sub> (g/g-hr)	IP (g/l-hr)	t <sub>f</sub> (hr)
27	11.20	33.5	0.37	0.08	0.41	83
30	7.78	33.8	0.40	0.10	0.52	65
33	7.50	25.0	0.45	0.08	0.34	74
36	7.00	24.4	0.55	0.07	0.28	86
39	2.22	6.43	0.60	0.02	0.03	109

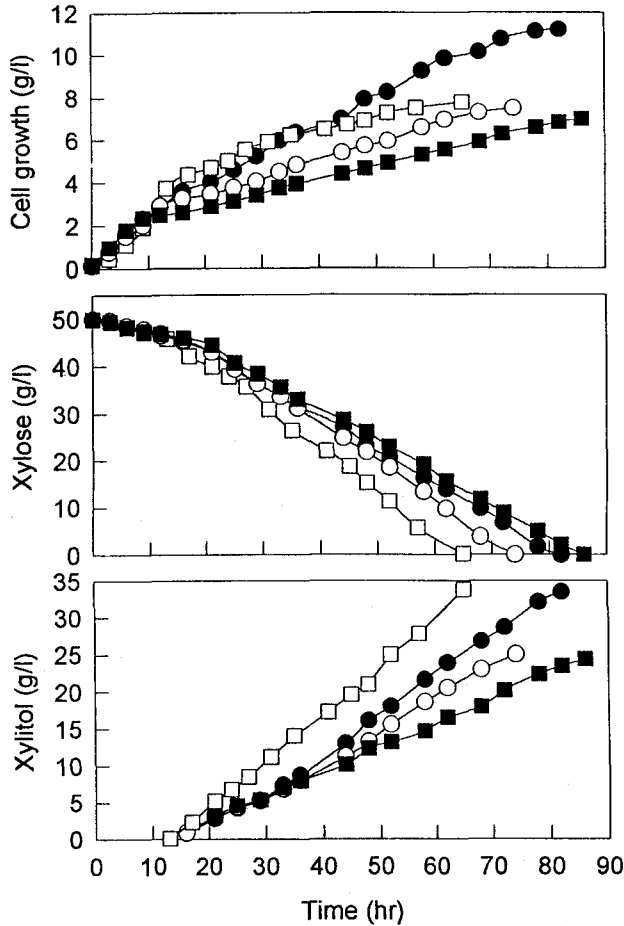


Fig. 3. Effect of cultivation temperature on cell growth, xylose consumption and xylitol production. 27°C(●-●), 30°C(□-□), 33°C(○-○) and 36°C(■-■) at pH 4.5.

증가시킨 경우에는 균체량과 비증식속도는 각각 11.6 g/l과 0.52 hr<sup>-1</sup>로 최대값을 보였으나 xylitol 생산은 22.4 g/l로 약 45%의 비교적 낮은 생산수율을 보였다. 그러므로 xylitol의 생산을 위한 최적 pH는 4.5~5.5임을 알 수 있었다.

**균체증식 및 xylitol생산에 미치는 온도의 영향**

온도는 균체증식 뿐만아니라 산물생성에 영향을 주는 중요한 환경인자 중의 하나이다. 온도를 27°C로 부터 39°C까지 변화시키면서 온도가 균체증식 및 xylitol생산에 미치는 영향을 살펴보았다(Fig. 3). 이때 pH는 4.5로 고

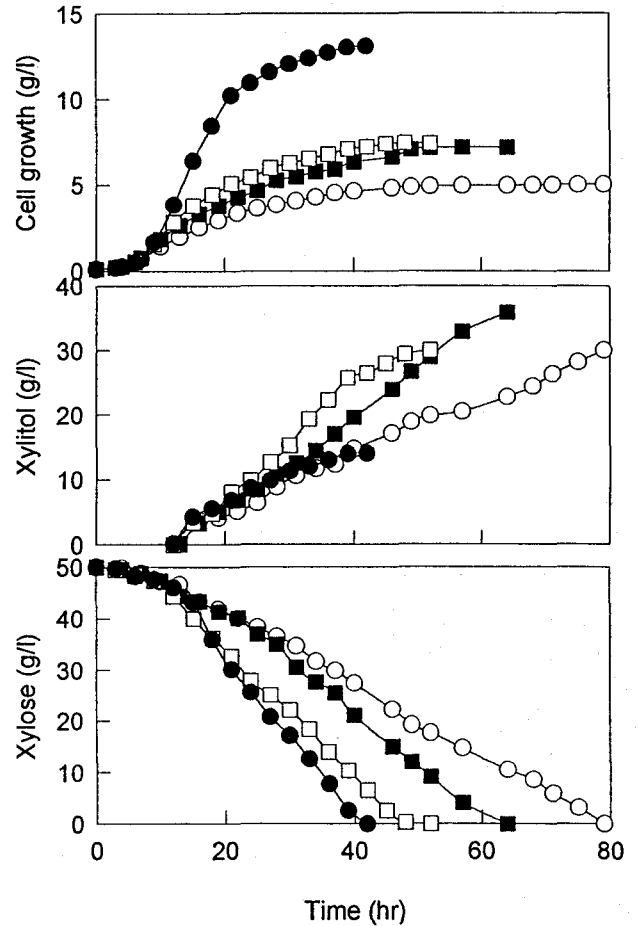


Fig. 4. Effect of agitation speed on cell growth, xylose consumption and xylitol production. 100 rpm(○-○), 150 rpm(■-■), 200 rpm(□-□) and 300 rpm(●-●) at 30°C and pH 4.5.

정하였다. 온도가 증가 할수록 비증식속도는 27°C, 0.37 hr<sup>-1</sup>에서 39°C, 0.60 hr<sup>-1</sup>로 점진적으로 증가하였지만 최종 균체농도는 11.2 g/l에서 2.2 g/l로 현저하게 감소하였다. 또한 xylitol의 생성량도 온도의 증가에 따라 점진적으로 감소하였으며 특히 39°C에서는 6.43 g/l로 급격히 감소하였다. 최종 xylitol 농도, xylitol 생산수율과 생산성은 30°C에서 최대값을 보여주었다(Table 2).

**Xylitol의 생산에 미치는 교반속도 및 산소전달속도의 영향**

서론에서 언급하였듯이 미생물에 의한 xylitol의 생산

[Table 3. Summary of effect of agitation speed and oxygen transfer rate on kinetic parameters of xylitol fermentation.

Agitation (rpm)	X (g/l)	P (g/l)	$\mu^{max}$ (hr <sup>-1</sup> )	$q_p$ (g/g-hr)	$\bar{P}$ (g/l-hr)	$t_f$ (hr)
100	4.98	30.0	0.39	0.09	0.38	79
150	7.18	35.8	0.40	0.13	0.58	62
200	7.38	30.0	0.40	0.14	0.67	45
300	13.10	14.0	0.42	0.03	0.33	42

은 xylose reductase에 의하여 xylose가 xylitol로 환원되고 생성된 xylitol은 xylitol dehydrogenase에 의하여 xylulose로 산화된 후 에너지 대사로 들어간다. 이때 환경인자 및 미생물의 생리적 조건에 따른 산화-환원 반응속도의 균형이 깨질때 즉, 환원반응속도는 빠르고 산화반응속도가 느리게 진행되면 xylitol은 일단 균체내에 축적되면서 세포내 농도가 증가함에 따라 세포밖으로 분비될 것이다. 그러므로 xylitol의 생산성을 높이기 위하여는 산화-환원 반응속도를 조절할 수 있는 용존산소농도 또는 배양액의 산화-환원 전위차의 조절이 매우 중요한 인자로 작용하게 될 것이다.

본 실험에서는 용존산소농도 조절의 한방법으로 통기량을 1 vvm으로 고정된 상태에서 발효조의 교반속도를 100, 150, 200, 그리고 300 rpm으로 변화시키면서 실험을 수행하였다. 이때 각 교반속도에서의 산소전달속도를 측정된 결과  $k_La$ 값이 각각 20, 30, 45, 85 hr<sup>-1</sup>이었다. Fig. 4에서 볼 수 있듯이 교반속도를 증가시켜 산소전달속도를 증가시킬수록 균체농도가 현저히 증가하여 300 rpm( $k_La=85$  hr<sup>-1</sup>)에서는 균체농도가 13.1 g/l에 도달하였다. 이때 용존산소는 약 3~5% 수준으로 유지되었다. 반면 xylitol의 생산은 14.0 g/l로 현저하게 낮았다. 최대 xylitol 생산은 150 rpm( $k_La=30$  hr<sup>-1</sup>)에서 62시간 배양시 농도 35.8 g/l, 그리고 생산수율 71.6%를 보였다. 200 rpm( $k_La=45$  hr<sup>-1</sup>)에서는 xylitol 농도 및 생산수율은 30.0 g/l와 60%로 150 rpm보다 약간 감소하였지만 생산성면에서는 최대값인 0.68 g/l-hr로 150 rpm에서의 0.58 g/l-hr 보다 다소 증가되었다(Table 3). 용존산소의 농도는 100 rpm에서는 거의 0% 이하로 계측기 상에서 측정이 불가능 하였으며 150 rpm과 200 rpm에서는 약 2~3% 미만으로 유지되었으나 그 차이를 구별하기는 쉽지 않았다. 이를 위하여는 좀더 정밀한 계측기와 산소전극의 사용 및 정밀한 산소농도조절 시스템의 개발이 요구된다. 이상의 실험을 통하여 xylitol 생산을 위한 최적 산소전달속도는 약 150 rpm에서  $k_La=30$  hr<sup>-1</sup> 부근임을 알 수 있었다. 150 rpm 이하에서는 산소의 부족으로 균체의 증식속도가 감소되고 모든 대사활동이 낮아져서 발효시간도 증가하였다. 150 rpm 이상에서는 용존산소농도의 증가로 균체의 증식속도와 대사활동은 증가되나 생성된 xylitol의 산화반응속도도 증가되기 때문에 결국 축적되는 xylitol의 양은 감소되는 것으로 판단된다. 이 결과는 효모에 의한 xylitol의 생산과정에서 산소농도 조절이 중요한 인자임을 보고한 다른 논문들

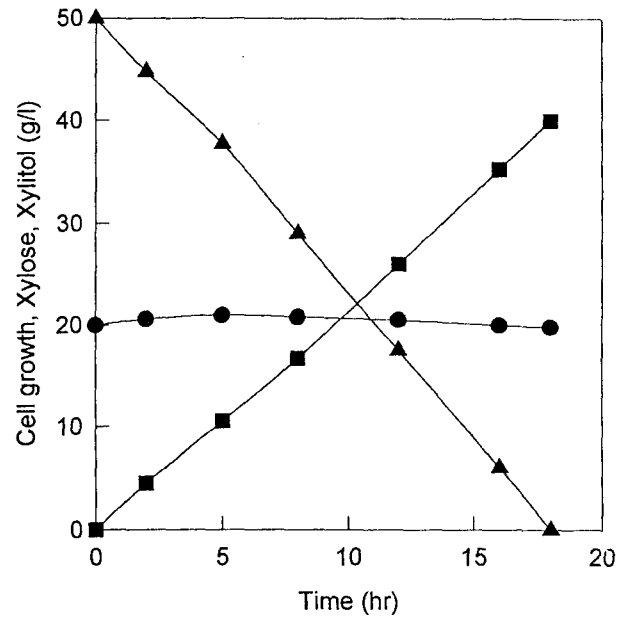


Fig. 5. Xylitol production using the concentrated cell mass. Cell growth(●-●), xylose(▲-▲) and xylitol(■-■).

과도 일치한다.<sup>11,12)</sup>

#### 농축된 균체를 재이용한 xylitol의 생산성 향상

생물공정의 경제성 향상과 산업화를 위하여는 제품의 생산수율과 생산성 향상이 매우 중요한 요소이다. 본 실험의 경우 생산수율은 약 70% 수준으로 매우 높은 편이나 xylitol의 생산성은 0.5~0.7 g/l-hr로 비교적 낮은 편이다. 그러므로 생산성을 증가시킬 목적으로 농축된 균체의 재사용법을 이용한 발효공정의 개발 가능성을 검토하였다. 이를 위하여 5L 발효조 2대에서 1차 발효가 끝난 배양액을 원심분리하여 농축시켜 얻은 균체를 2.5L 발효조에 접종하고 배양액을 1.5L로 조절하였다. 이때 초기 균체농도는 약 20 g/l이었다. 발효 운전조건으로 통기량은 약 1 vvm, 온도 30°C로 하고 pH 4.5로 조절하였으며 산소전달속도는  $k_La$ 가 약 30 hr<sup>-1</sup>이 되도록 교반속도를 230 rpm으로 조절하였다. Fig. 5에서 볼 수 있듯이 초기 50 g/l의 xylose가 약 18시간만에 모두 이용되었으며 xylitol의 생산량은 수율 약 80%에 해당하는 40 g/l을 얻었다. Xylitol의 생산성은 2.22 g/l-hr로 균체를 농축하지 않은 일반 발효때의 생산성(0.5~0.7 g/l-hr)과 비교할 때 약 3~4배 증가되었다. 이는 일반 발효에서는 xylitol을 생산하기까지 균체증식에 시간을 필요로 하고 균체농도가 약 7~8 g/l인데 비하여 농축된 균체의 발효에서는 배양 초기부터 xylitol이 생산되고 균체농도도 20 g/l로 약 3배정도 증가한데서 기인한 것이다. 즉 xylitol의 생산성을 증가시키기 위하여는 고농도 균체를 적용할 수 있음을 시사한다. 또한 산소전달속도만 잘 조절한다면 1차 발효가 끝난후 균체를 다시 회수하여 반복 사용하여도 균체의 활성은 그대로 유지됨을 보여주는 결과이다. 저자들은 xylitol의 효율적인 생산공정을 개

발하기 위하여 현재 균체를 재사용하는 재순환 고농도 발효공정 또는 균체를 고농도로 고정화하는 방법에 관한 연구를 진행하고 있다.

## 사 용 기 호

- $k_{La}$  : 산소전달속도 상수 ( $hr^{-1}$ )  
 $P$  : 산물농도 (g/l)  
 $q_p$  : 산물의 비생산속도 (g/g-hr)  
 $IP$  : 용적생산성 (g/l-hr)  
 $t_f$  : 발효시간 (hr)  
 $X$  : 세포농도 (g/l)  
 $\mu^{max}$  : 최대 비증식속도 ( $hr^{-1}$ )

## 참 고 문 헌

- Emodi, A. (1978) Xylitol: Its properties and food applications. *Food Technol.* **32**, 20-32.
- Pepper, T. and P. M. Olinger, (1988) Xylitol in sugar-free confections. *Food Technol.* **10**, 96-106.
- Hyvonen, L. and P. Koivistoinen (1983) Food technological evaluation of xylitol. *Adv. Food Res.* **28**, 273-403.
- Gong, C. S., T. A. Claypool, L. D. McCracken, C. M. Maun, P. P. Ueng, and G. T. Tsao (1983) Conversion of pentoses by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* **25**, 85-102.
- Horitsu, H., Y. Yahashi, K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki, and N. Watanabe (1992) Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis* : Optimization of production rate. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1085-1091.
- Meyrial, V., J. P. Delgenes, R. Moletta, and J. M. Navarro (1991) Xylitol production by *Candida guilliermondii*: Fermentation behavior. *Biotechnol. Lett.* **13**, 281-286.
- Maria F.S. Barbosa, Maria B. de Medeiros, Ismael M. de Mancilha, Henry Schneider and Hung Lee (1988) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Industrial Microbiology.* **3**, 241-251.
- du Preez, J. C., B. van Driessel, and B. A. Prior (1989) D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotechnol. Lett.* **11**, 131-136.
- Smiley, K. L. and P. L. Bolen (1982) Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachsoletanophilus*. *Biotechnol. Lett.* **4**, 607-610.
- Rizzi, M., K. Harwart, N. A. Bui-Thahn, and H. Dellweg (1989) A kinetic study of the  $NAD^+$  xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. *J. Ferment. Bioeng.* **67**, 25-30.
- du Preez, J. C. (1994) Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 944-956.
- Furlan, S. A., P. Bouilloud, and H. F. de Castro (1994) Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochem.* **29**, 657-662.
- Hahn-Hagerdal, B., H. Jeppsson, K. Skoog, and B. A. Prior (1994) Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 933-943.
- 오덕근, 임현수, 김정희 (1995) 다당류, 메틸란, 발효배양액의 점성특성과 메틸란 생산에 미치는 교반속도의 영향. *한국농화학회지* **38**, 191-195.

**Optimization of Culture Conditions for Xylitol Production by A Mutant of *Candida parapsilosis***  
 Deok Kun Oh,<sup>1</sup> Sang Yong Kim,<sup>2</sup> Jung Hoe Kim<sup>3\*</sup> (<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Cheonju 565-800, Korea; <sup>2</sup>Tong Yang Confectionery Co., R&D Center, Seoul 140-715, Korea; <sup>3</sup>Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon 305-701, Korea)

**Abstract:** Effect of culture conditions such as pH, temperature, agitation speed and oxygen transfer rate on xylitol production from xylose by *Candida parapsilosis* ATCC 21019 mutant was investigated in a jar fermentor. The initial concentration of xylose was fixed at 50 g/l in this experiment. When pH was increased, cell growth and xylose consumption rate were increased, but maximum xylitol production was shown in the range of pH 4.5 and 5.5 with a yield of 0.68 g/g-xylose. The optimal temperature for xylitol production was determined to be 30°C. Considering the importance of dissolved oxygen tension, for xylitol production, the effect of oxygen transfer rate coefficient ( $k_{La}$ ) on fermentation parameters was carefully evaluated in the range of 20~85  $hr^{-1}$  of  $k_{La}$  (corresponding to 100~300 rpm of agitation speed). The xylitol production was maximized at 30  $hr^{-1}$  of  $k_{La}$  (150 rpm). A higher oxygen transfer rate supported better cell growth with lower xylitol yield. It was determined that maximum xylitol concentration, xylitol yield and productivity was 35.8 g/l, 71.6% and 0.58 g/l~hr, respectively, at 30  $hr^{-1}$  of  $k_{La}$ . In order to further increase xylitol productivity, fermentation using the concentrated biomass(20 g/l) was carried out at the conditions of pH 4.5, 30°C and 30  $hr^{-1}$  of oxygen transfer rate. The final xylitol concentration of 40 g/l was obtained at 18 hours of culture time. From this result, it was calculated that xylitol yield was 80% on the basis of xylose consumption and volumetric productivity was 2.22 g/l~hr which was increased by 3~4 fold compared with 0.5~0.7 g/l-hr obtained in a normal fermentation condition.

\*Corresponding author