

*Candida parapsilosis*에 의한 Xylitol 발효시 Arabinose가 미치는 영향

오덕근* · 김상용¹

우석대학교 식품공학과, ¹동양제과(주) 기술개발연구소

Effect of Arabinose on Xylitol Fermentation by *Candida parapsilosis*. Deok-Kun Oh* and Sang-Yong Kim¹. Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Chonbuk 565-800, Korea, ¹Tong Yang Confectionery Co., R&D Center, Seoul 140-715, Korea - Effect of arabinose on xylitol production from xylose by *Candida parapsilosis* KFCC 10875 was investigated at the different concentrations of arabinose. When the arabinose was added in xylose medium, the cell growth increased and the final cell concentration was maximum at 10 g/l arabinose. The consumption rate of arabinose was greatly lower than those of xylose and arabinose. Above 10 g/l arabinose, it was not completely consumed and then remained in the medium during xylitol fermentation. Estimated cell mass obtained from arabinose increased with increasing consumed arabinose. As arabinose concentration was increased, xylitol production decreased but ethanol production increased. The inhibitory effect of ethanol, a major by-product, on xylitol production was also studied. As the ethanol concentration added increased, xylitol production decreased. When cells were inoculated in a xylose medium after removing ethanol, xylitol production was not inhibited. This results suggested that the inhibition of xylitol production resulted from ethanol which was formed by adding arabinose. It was also interesting that total products(xylitol and ethanol) yield was constant regardless of the arabinose concentration. This result suggested that the total amount of products such as xylitol and ethanol from xylose was constant regardless of the arabinose concentration and arabinose shifted the carbon flow from xylitol to ethanol.

오탄당 알코올인 xylitol은 과일, 채소 및 버섯 등의 자연에서 소량 존재하고 또한 포유동물 탄수화물대사의 중간산물이다(1). Xylitol은 용해될 때 열 감소가 일어나서 입안의 청량감을 크게 느끼는 특성이 있다. 이러한 특성으로 인하여 식품의 여러 분야에서 감미료로 응용되고 있다(2). 또한 xylitol의 대사는 insulin 비의존성이므로 당뇨병 환자의 설탕대용으로도 사용되고 있고 충치 발생균인 *Streptococcus mutans*의 생육을 억제하므로 충치 발생의 억제용으로 사용되고 있다(3).

지금까지 xylitol은 목재, 뱃질이나 수수속 등이 가수분해되어 나온 xylose를 환원하는 화학적 방법으로 생산하여 왔으나, 화학적 방법은 분리정제가 어렵고 다량의 유기용매를 이용한 고온 고압의 반응이므로 위험성과 폐기물이 존재하는 문제점을 가지고 있다(4). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 미생물에 의한 xylitol의 생산방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(5-12).

미생물에 의한 xylitol 생산할 때의 원료로 사용하는 반섬유소 가수분해물은 그 내용물 중에 xylose외 존재하는 성분으로 1.0~4.0%의 glucose, 0.0~0.5%의 acetic acid와 0.2~5.0%의 arabinose와 이외 미량의 galactose

와 mannose를 포함하고 있는데(13-14), 이중에서 xylose의 배지에 포함된 glucose(15) 또는 acetic acid(16)가 xylitol의 생산에 미치는 영향은 저자들이 이미 살펴 보았다. 그러나, arabinose가 xylitol의 생산에 미치는 영향은 지금까지 문헌에 보고된 적이 없다. 그러므로 본 실험에서는 *Candida parapsilosis* KFCC-10875를 사용하여 arabinose가 첨가된 xylose의 배지로부터 xylitol의 생산 실험을 수행하여 기질로서 반섬유소 가수분해물을 사용시 주성분인 xylose외에 기질 내에 포함되어 있는 arabinose가 xylitol의 생산에 미치는 영향을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

미생물 및 배지

본 연구에서는 냉동보관(-70°C)중인 균주 *Candida parapsilosis* KFCC-10875를 사용하였다. 성장배지로는 glucose 20 g/l, peptone 5 g/l, yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l로 구성된 YM배지를 사용하였고, 발효배지로는 xylose 50 g/l, yeast extract 5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l로 구성된 최적배지(17)를 사용하였다.

배양조건

종배양은 냉동보관된 균주를 YM배지 50 ml가 들어있

*Corresponding author

Tel. 82-652-290-1632, Fax. 82-652-291-9312

E-mail: deokkun@unitel.co.kr

Key words: Xylitol, Arabinose, Xylose, Ethanol, *Candida parapsilosis*

는 250 ml 플라스크에 접종하여 진탕배양기에서 240 rpm, 30°C로 균체농도가 3-4 g/l(약 14-16시간)로 성장할 때까지 수행하였다. 종 배양액을 배지 부피가 3 l인 5 l 발효조(한국발효기(주))에 접종하여 pH는 발효 전과정 동안 5.0으로 일정하게 조절하였고, 배양초기에는 용존 산소 농도를 충분히 유지시키다가 일정 균체농도가 되는 시점(발효시간 약 12 시간)부터 통기량을 1.0 vvm으로 하고 교반속도를 100 rpm에서 500 rpm의 범위로 조절하여 용존산소 농도를 0.5-1.0%로 유지시켜(18,19) xylose가 완전히 소모될 때까지 배양하였다.

분석방법

Xylose, xylitol, ethanol과 arabinose의 농도는 Sugar-Pak I column이 장착된 HPLC(Waters, USA)를 이용하여 측정하였으며, 이때 용매는 물을 사용하였고, 온도는 90°C이었고, 유속은 0.5 ml/min이었으며, 검출기는 RI를 사용하였다. 균체농도는 탁도계를 이용하여 파장 600 nm에서 현탁도를 측정하여 미리 측정한 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다.

결과 및 고찰

Arabinose가 첨가된 xylose배지에서 균체증식 및 기질이용

Xylose로부터 xylitol 생산할 때 *Candida parapsilosis* KFCC-10875의 균체증식을 여러 가지 arabinose의 농도에서 발효조를 이용하여 실험한 결과를 Fig. 1에 나타내

었다. 첨가된 arabinose의 농도가 증가할수록 최종 균체 농도가 증가하여 농도가 10 g/l일 때는 최대값인 11.8 g/l까지 증가하였다. 그러나, arabinose의 농도가 20 g/l로 증가할 때는 균체농도가 10.5 g/l로 오히려 감소하였다.

Arabinose의 첨가농도가 기질인 xylose와 arabinose의 이용에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 xylose와 arabinose을 측정하였다. Xylitol의 이용을 살펴보면 첨가된 arabinose의 농도가 10 g/l 이내에서는 농도가 증가할수록 감소하였으나 차이가 크지않았다. 그러나, arabinose의 농도가 20 g/l에서는 xylose의 이용속도가 비교적 크게 감소하였다(Fig. 2). 이는 arabinose의 농도가 20 g/l로 증가될 때 균체농도가 오히려 감소된 결과를 설명해준다. Arabinose의 이용속도는 xylose의 이용속도에 비하여 현저히 떨어지고 arabinose의 농도가 10 g/l 이상에서는 일부만 이용되어 배지에 잔존하였고 균체농도는 이용된 arabinose에 어느정도 비례하여 증가함을 보여 주었다(Fig. 3). 특히 arabinose의 농도 10 g/l에서는 다른 농도보다 arabinose가 많이 이용되었다. 배양초기에는 arabinose의 이용속도가 배양후기에 비하여 느리게 나타나서 배양초기보다 배양후기에는 arabinose농도에 따라 균체농도가 더 차이가 나는 결과가 나타났다. 다른 문헌에서 arabinose의 이용에 대하여 살펴보면 *C. guilliermondii*(12)는 arabinose를 거의 이용하지 않았고 *Candida. sp. B-22*(13)는 arabinose의 이용속도가 xylose의 이용속도보다 5배정도 느리게 나타났다.

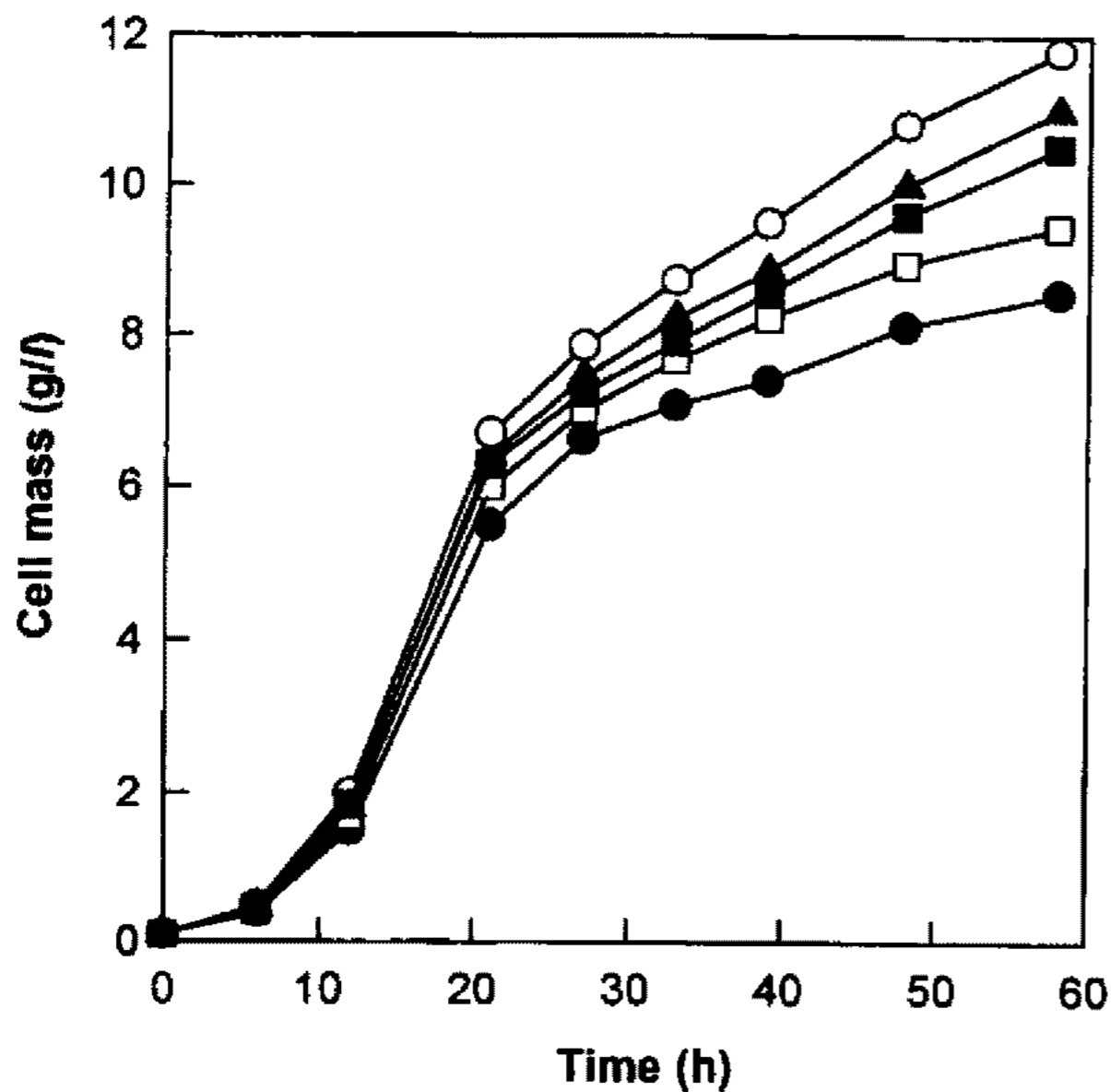


Fig. 1. Cell growth by *Candida parapsilosis* KFCC-10875 cultivated in xylose medium containing different arabinose concentrations.
Initial concentrations of arabinose were 0 g/l(●), 2 g/l(□), 5 g/l(▲), 10 g/l(○), and 20 g/l(■).

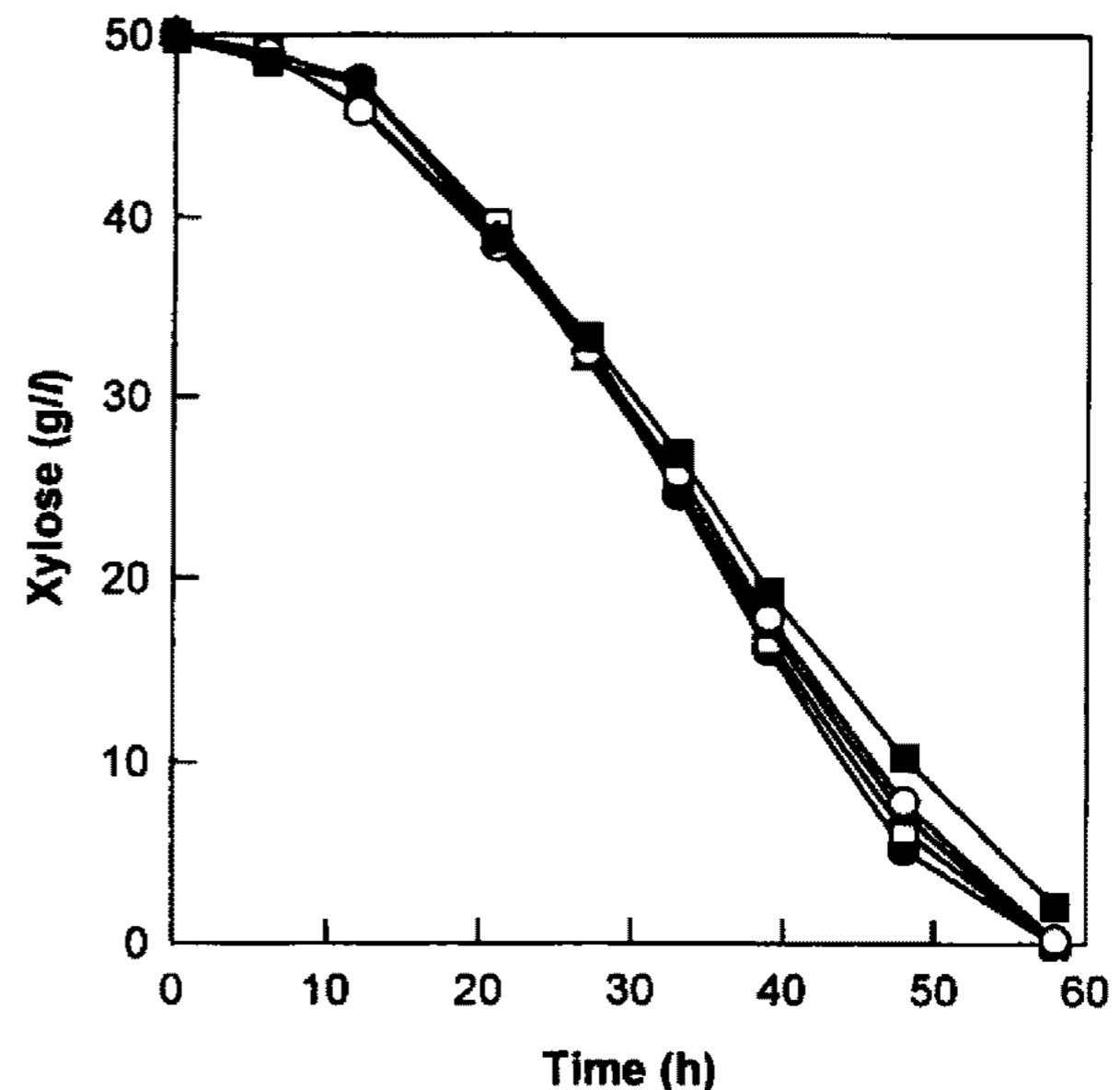


Fig. 2. Xylose consumption by *Candida parapsilosis* KFCC-10875 cultivated in xylose medium containing different arabinose concentrations.
Initial concentrations of arabinose were 0 g/l(●), 2 g/l(□), 5 g/l(▲), 10 g/l(○), and 20 g/l(■).

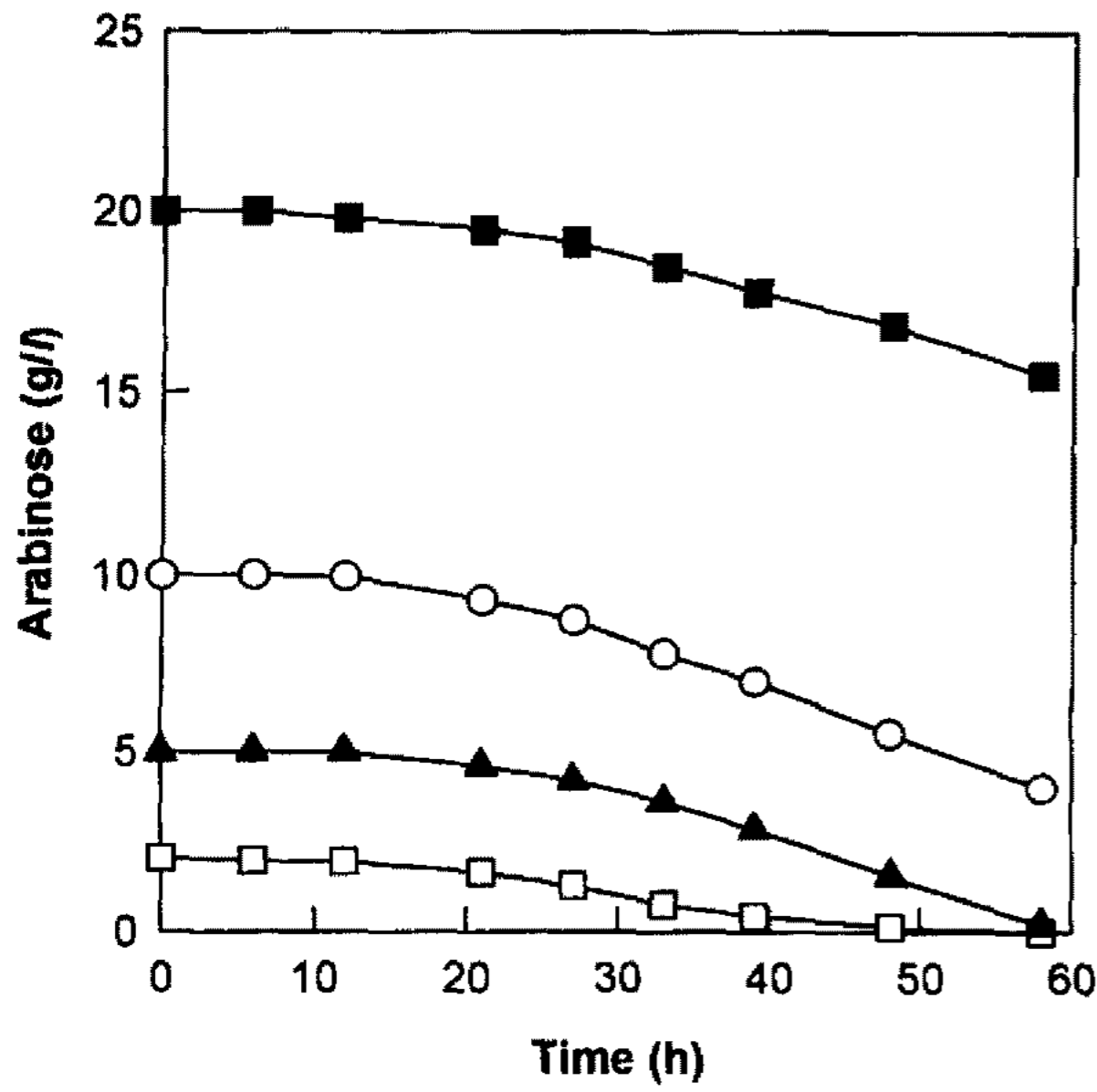


Fig. 3. Arabinose consumption by *Candida parapsilosis* KFCC-10875 cultivated in xylose medium containing different arabinose concentrations. Initial concentrations of arabinose were 0 g/l(●), 2 g/l(□), 5 g/l(▲), 10 g/l(○), and 20 g/l(■).

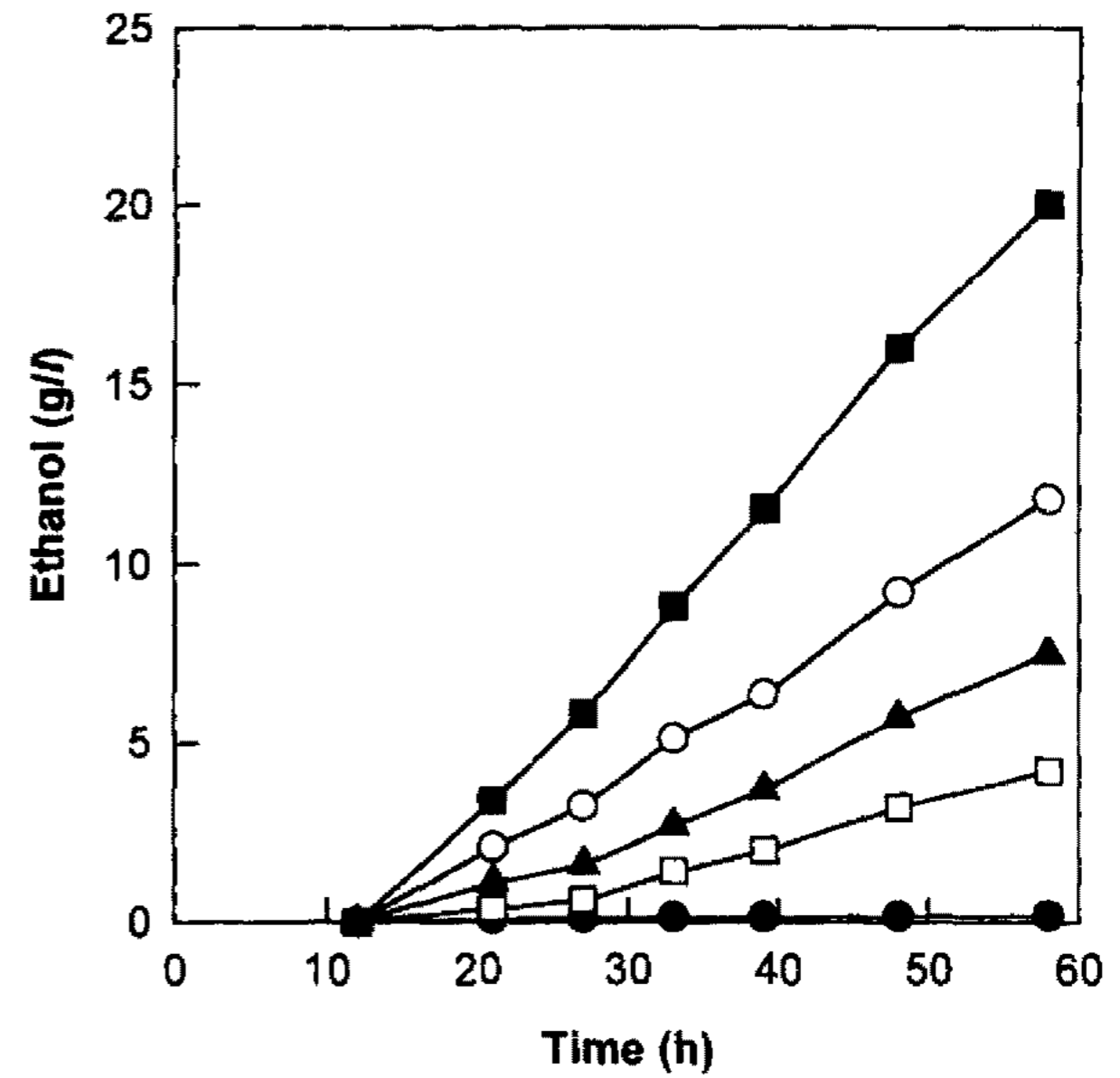


Fig. 5. Ethanol production by *Candida parapsilosis* KFCC-10875 cultivated in xylose medium containing different arabinose concentrations. Initial concentrations of arabinose were 0 g/l(●), 2 g/l(□), 5 g/l(▲), 10 g/l(○), and 20 g/l(■).

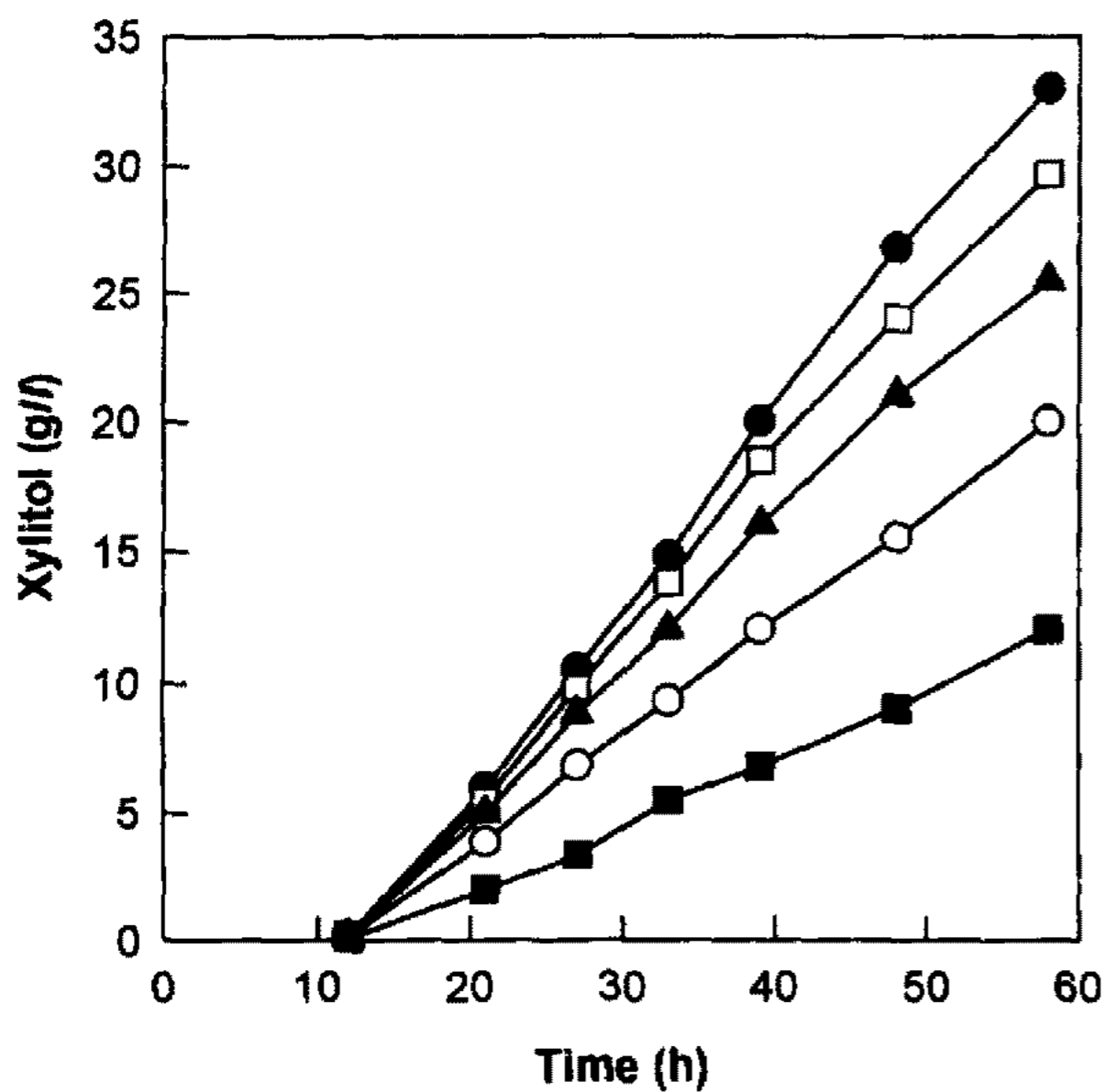


Fig. 4. Xylitol production by *Candida parapsilosis* KFCC-10875 cultivated in xylose medium containing different arabinose concentrations. Initial concentrations of arabinose were 0 g/l(●), 2 g/l(□), 5 g/l(▲), 10 g/l(○), and 20 g/l(■).

Arabinose가 첨가된 xylose배지에서 xylitol과 ethanol의 생산

Xylose 배지에서 arabinose의 농도를 0-20 g/l로 첨가하여 arabinose 농도가 xylitol의 생산에 미치는 영향을 Fig. 4에 나타내었다. Xylitol의 생산은 arabinose의 농도가 증가함에 따라서 비례적으로 감소하여 arabinose의 농도 20 g/l에서는 arabinose를 첨가하지 않은 경우보다

xylitol의 생성량이 1/3 수준으로 감소하였다. 그러므로 첨가된 arabinose는 xylitol 생성을 저해하는 역할을 하는 것으로 생각된다.

Arabinose의 농도가 증가할수록 사용되는 xylose에 비하여 생성되는 xylitol의 농도가 현저히 감소하므로 다른 부산물이 존재할 것이라는 생각으로 여러 가지 물질을 조사한 결과 ethanol이 생성된다는 것을 발견하였다. 그러므로 arabinose가 첨가된 xylose배지에서 ethanol 생성을 조사하여 Fig. 5에 나타내었다. Arabinose를 첨가하지 않았을 때 ethanol은 거의 생성되지 않았고 ethanol의 생성량은 arabinose의 농도가 증가할수록 비례적으로 증가하였다. 그러므로, arabinose의 첨가는 xylitol의 생성을 감소시키고 ethanol생성의 증가를 일으키는 것을 알 수 있었다. 특히 arabinose의 농도 20 g/l에서는 ethanol의 생성량이 20 g/l까지 증가하였고 이때 균체농도는 arabinose의 농도 10 g/l 일때보다 오히려 감소하였다. 균체감소는 arabinose 20 g/l를 첨가한 경우의 생성된 과량의 ethanol이 균체의 성장을 저해시켜 arabinose 10 g/l를 첨가한 경우보다 균체농도가 감소된 것으로 생각된다.

Xylose에 대한 arabinose 비율이 높을수록 xylose에 대한 xylitol의 수율이 감소하는 이유를 살펴보기 위하여 부산물인 ethanol이 xylitol 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 6). Xylose 50 g/l의 배지에서 여러 가지 농도의 ethanol을 xylitol이 생성되는 시점인 배양시간 12시간(균체농도 약 3.5 g/l)에 첨가하였다. 균체농도는 5 g/l의 ethanol을 첨가한 경우는 증가하였으나 그 이상의

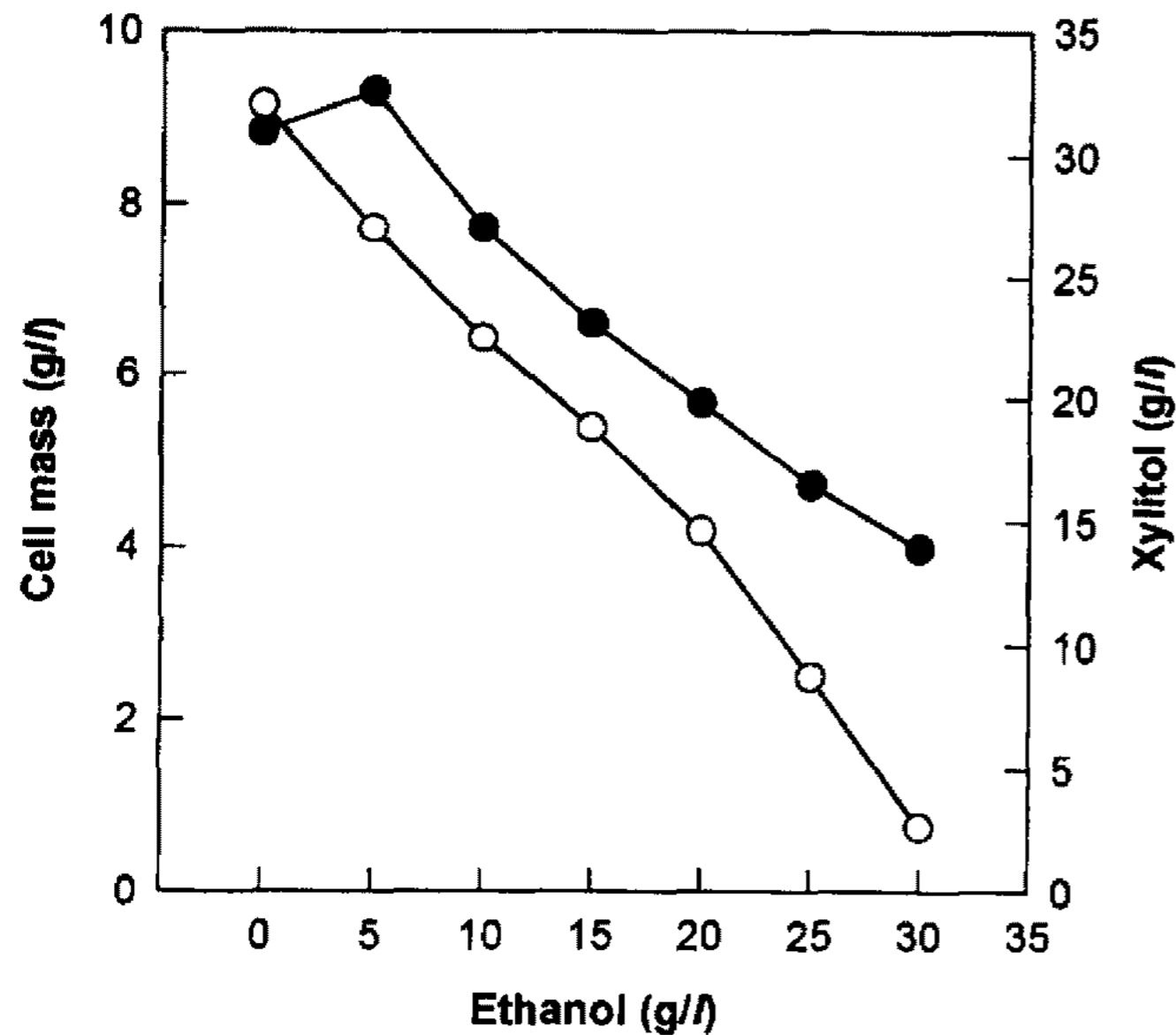


Fig. 6. Effect of ethanol concentration on xylitol production. Cell mass(●), and xylitol(○).

Table 1. Fermentation parameters of xylitol fermentation in the xylose medium containing different arabinose concentrations.

Arabinose (g/l)	μ^{\max} (h^{-1})	q_{S1} (g/g-h)	q_{P1} (g/g-h)	q_{P2} (g/g-h)
0	0.346	0.198	0.121	0.001
2	0.371	0.180	0.102	0.013
5	0.405	0.157	0.080	0.019
10	0.437	0.141	0.056	0.029
20	0.400	0.146	0.036	0.061

농도에서는 ethanol의 농도가 증가할수록 감소하였고 ethanol 농도 30 g/l에서는 ethanol의 첨가 시점과 비교하여 거의 증가하지 못하였다. Xylitol의 생성은 ethanol의 농도가 증가할수록 감소하여 ethanol의 농도 30 g/l에서는 xylitol의 농도가 2.5 g/l까지 감소하였다. Ethanol의 첨가는 xylitol생산을 감소시키므로 arabinose 농도가 증가할수록 xylitol 생산감소를 초래되는 것은 arabinose첨가시 생성된 ethanol로 기인된다고 생각된다.

Ethanol의 농도 30 g/l가 첨가되어 xylitol의 생산이 저해된 발효액을 원심분리하여 ethanol을 제거한 후 균체를 xylose 50 g/l가 함유된 발효배지에 접종하였을 때 xylitol이 33 g/l이 생성되었다. 이것은 ethanol의 존재가 xylitol 생성에 영향을 준다 것을 의미한다.

Arabinose 첨가가 fermentation parameter에 미치는 영향

Arabinose의 첨가효과를 정량적으로 알기 위하여 fermentation parameter의 분석을 시도하였다. Arabinose의 농도증가에 따른 최대 비 균체 증식속도(μ^{\max} ,

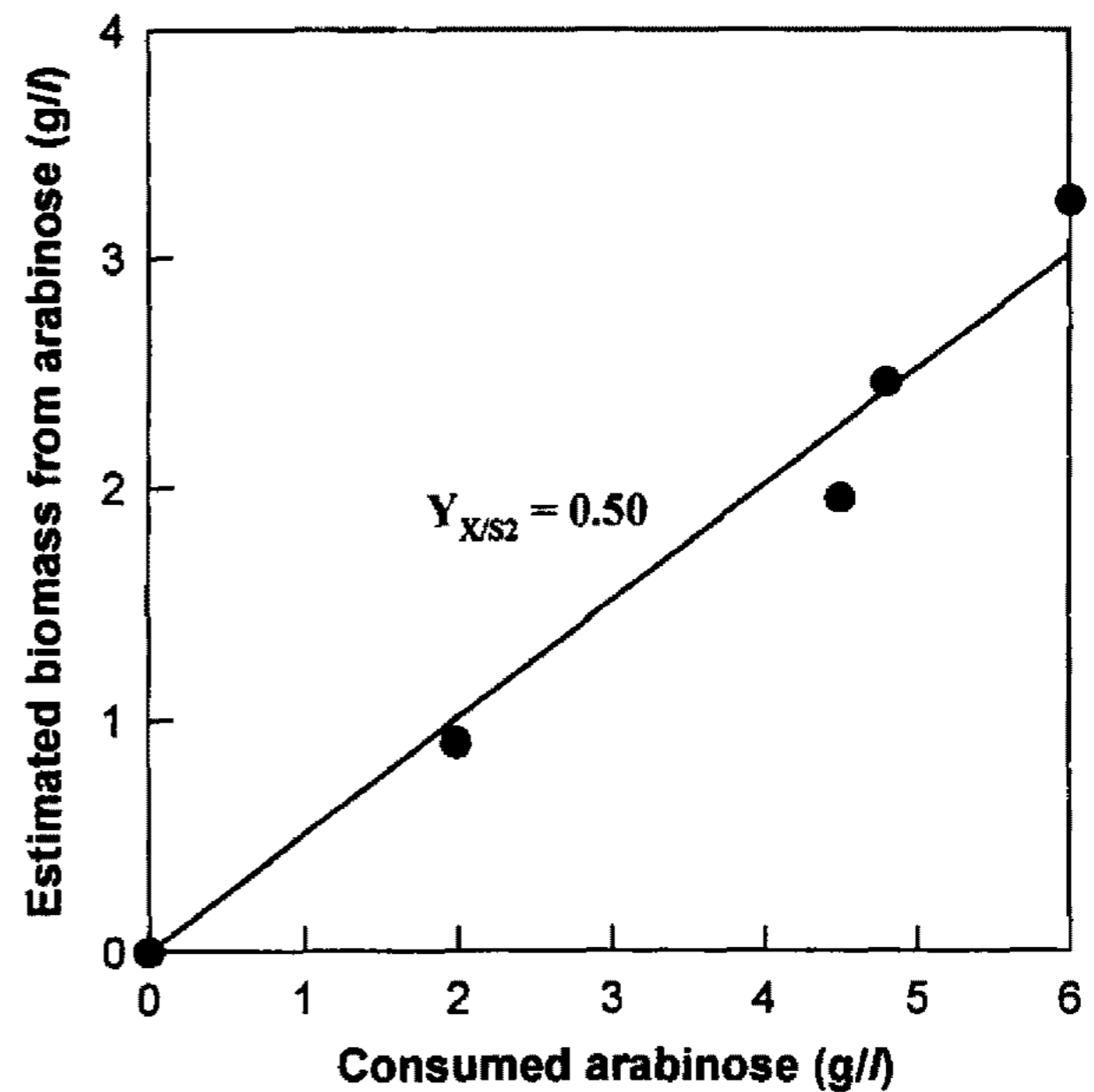


Fig. 7. Relationship of estimated biomass from arabinose and consumed arabinose.

Estimated biomass obtained from arabinose=final cell mass with arabinose-final cell mass without arabinose. The slope means cell yield from arabinose($Y_{X/S2}$).

maximum specific growth rate of cell), 비 기질 소비속도(q_s , specific consumption rate of substrate) 및 비 산물 생산속도(q_p , specific production rate of product)를 Table 1에 나타내었다. 최대 비 증식속도는 arabinose가 증가할수록 증가하여 10 g/l 첨가되었을 때 최대값을 보여주었다. Xylose에 대한 비 소비속도는 arabinose가 증가할수록 감소하였다. 이것은 arabinose의 존재가 xylose의 소비속도를 감소시키는 것으로 의미한다. Arabinose가 증가할수록 xylitol의 비 생산속도는 감소하였고 arabinose의 농도가 10 g/l로 증가 할 경우 비 생산속도가 약 2배 감소하였다. 그러나 arabinose가 증가할수록 반대로 ethanol의 비 생산속도는 증가하였고 arabinose의 농도가 약 10 g/l로 증가 할 경우 비생산 속도도 약 2배 증가하였다.

Arabinose가 균체증식에 미치는 영향을 정량적으로 살펴보기 위하여 xylose가 고갈된 순간의 균체농도를 이용하여 소비된 arabinose와 관계를 살펴보았다. 이때, arabinose로부터 형성된 균체농도는 arabinose가 첨가된 배지에서 xylose가 고갈된 순간의 균체농도에서 arabinose가 첨가 안된 배지에서 xylose가 고갈된 순간의 균체농도를 뺀 것으로 가정하였다. 또한, arabinose에서는 xylitol이 생성되지 않으므로 소비된 arabinose는 균체성장에 사용되었다고 할 수 있다. 소비된 arabinose의 량과 arabinose로부터 형성된 균체농도를 살펴보면 소비된 arabinose의 량이 증가함에 따라 arabinose로부터 형성된 균체농도는 증가하였다(Fig. 7). 이들 두변수를 직선관계로 나타내면 기울기는 약 0.5이었고 이것은 ara-

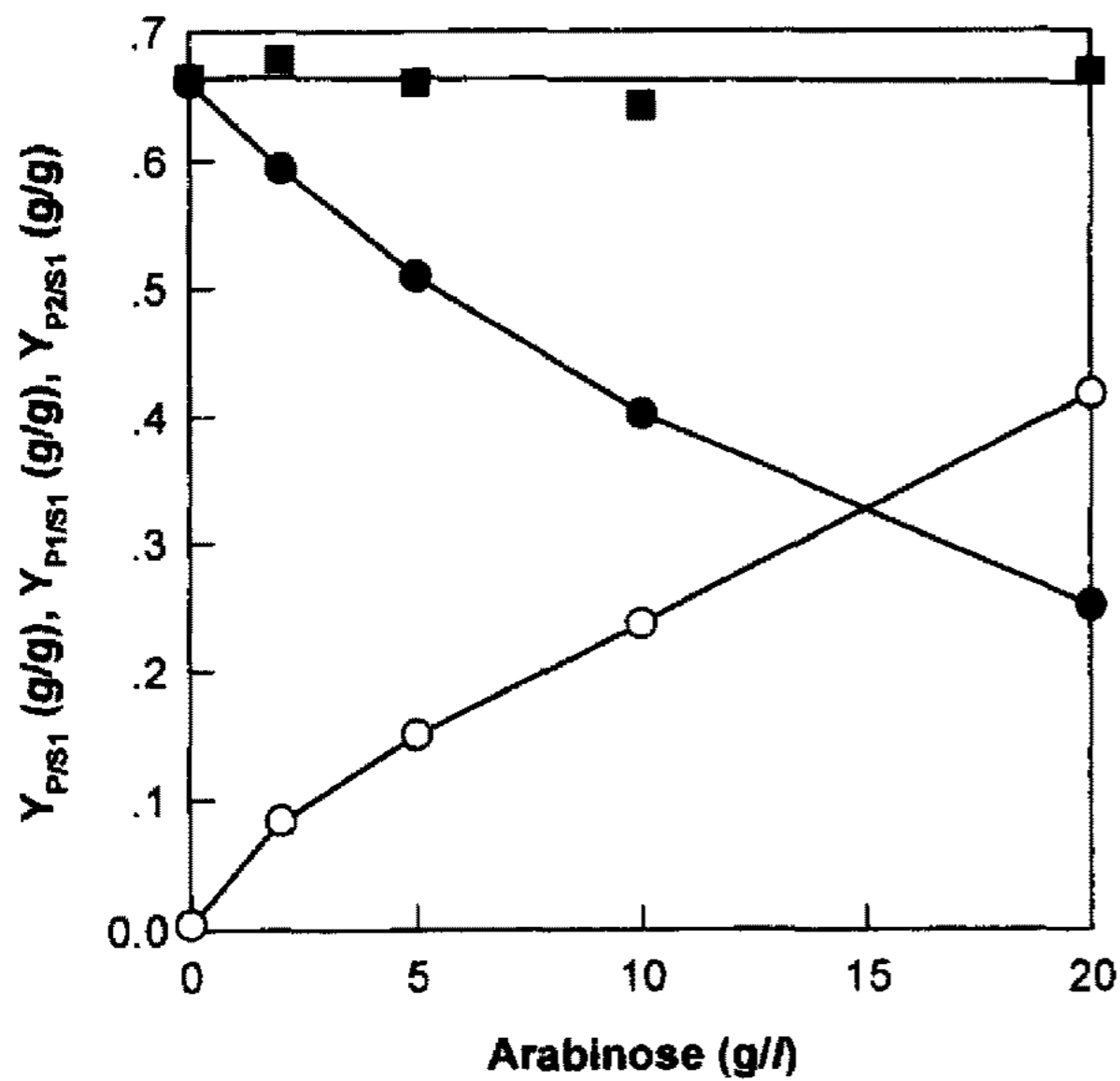


Fig. 8. Xylitol yield, ethanol yield, and products(xylitol and ethanol) yield from xylose.

Xylitol yield($Y_{P1/S1}$) (●), ethanol yield($Y_{P2/S1}$) (○), and products yield($Y_{P/S1}$) (■).

binose에 대한 균체수율($Y_{X/S2}$)을 의미한다.

첨가된 arabinose가 생산물인 xylitol과 ethanol에 미치는 영향을 정량적으로 알아보기 위하여 생산된 xylitol과 ethanol을 xylose로부터 xylitol의 수율($Y_{P1/S1}$)과 ethanol의 수율($Y_{P2/S1}$) 및 xylitol과 ethanol의 합인 products의 수율($Y_{P/S1}$)로 전환하여 살펴보았다(Fig. 8). Xylose의 배지에서 arabinose의 농도가 증가할수록 ethanol의 수율은 증가하였으나 반대로 xylitol의 수율은 감소하였다. 그러므로 xylitol과 ethanol의 합인 products의 수율을 살펴보았다. 그 결과 products의 수율은 흥미롭게 arabinose의 농도와 무관하게 일정함을 보여주었다. 이러한 결과는 xylose로부터 생성되는 산물들(xylitol과 ethanol)의 총량은 첨가된 arabinose의 양에 관계없이 일정하고 arabinose는 탄소의 흐름(carbon flow)을 xylitol에서 ethanol로 전환하는 역할을 한다는 것을 시사한다.

사용기호

- S1 : xylose (g/l)
 S2 : arabinose (g/l)
 P1 : xylitol (g/l)
 P2 : ethanol (g/l)
 $Y_{P/S1}$: products yield from xylose (g/g)
 $Y_{P1/S1}$: xylitol yield from xylose (g/g)
 $Y_{P2/S1}$: ethanol yield from xylose (g/g)
 $Y_{X/S2}$: cell yield from arabinose (g/g)
 μ^{\max} : maximum specific growth rate (h^{-1})
 q_{S1} : specific consumption rate of xylose (g/g-h)

- q_{P1} : specific production rate of xylitol (g/g-h)
 q_{P2} : specific production rate of ethanol (g/g-h)

요 약

Candida parapsilosis KFCC-10875를 사용하여 arabinose가 xylitol 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 첨가된 arabinose의 농도가 증가할수록 최종 균체농도가 증가하여 농도가 10 g/l일 때는 최대값으로 증가하였으나, arabinose의 농도가 그 이상일 때는 오히려 균체농도가 감소하였다. Arabinose의 이용속도는 xylose의 이용속도에 비하여 떨어지고 arabinose의 농도 10 g/l 이상에서는 일부만 이용되고 배지 중에 잔존하였다. 소비된 arabinose가 증가할수록 arabinose로부터 형성된 균체농도는 증가하였다. Arabinose의 농도가 증가할수록 xylitol의 생산은 감소하였고 ethanol은 증가하였다. 이것을 수율로 전환하여 표시 할 경우 xylose에 대한 ethanol 수율은 증가하였고 xylitol 수율은 감소하였다. 첨가하는 ethanol의 농도를 변화시키면서 배양한 결과 첨가된 ethanol의 농도가 증가할수록 xylose에 대한 생성된 xylitol의 생산이 감소하였고 ethanol을 제거한 후 배양할 경우 xylitol생산이 저해되지 않았다. 이러한 결과는 xylitol의 생산저해가 arabinose의 첨가에 의하여 생성된 ethanol에 의한 것이라는 것을 설명한다. 또한, xylitol과 ethanol의 수율의 합인 products의 수율은 흥미롭게 arabinose의 농도와 무관하게 일정함을 보여주었다. 이러한 결과는 arabinose가 첨가된 xylose로부터 배양되어 생성되는 산물들인 xylitol과 ethanol의 총량은 arabinose의 첨가량에 상관없이 일정하고 첨가된 arabinose는 탄소의 흐름(carbon flow)을 xylitol에서 ethanol로 전환하는 역할을 한다는 것을 시사한다.

참고문헌

1. Makinen, K. K. and E. Soderling. 1980. A quantitative study of manitol, sorbitol, xylitol, and xylose in wild berries and commercial fruits. *J. Food Sci.* **45**: 367-372.
2. Emodi, A. 1978. Xylitol, Its properties and food applications. *Food Technol.* **32**: 20-32.
3. Pepper, T. and P. M. Olinger. 1988. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technol.* **42**: 98-106.
4. Hyvonen, L. and P. Koivistoinen. 1982. Food technological evaluation of xylitol. *Adv. Food Res.* **28**: 373-403.
5. 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.
6. Horitsu, H., Y. Yahashi, K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki, T. and N. Watanabe. 1992. Production of xylitol

- from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of production rate. *Biotechnol. Bioeng.* **40**: 1085-1091.
7. Meyrial, V., J. P. Delgenes, R. Moletta, and J. M. Navarro. 1991. Xylitol production by *Candida guilliermondii*: Fermentation behavior. *Biotechnol. Lett.* **13**: 281-286.
 8. Nishio, N., K. Sugawa, N. Hayase, and S. Nagai. 1989. Conversion of D-xylose into xylitol by immobilized cells of *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp. HU. *J. Ferment. Bioeng.* **67**: 356-360.
 9. 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.
 10. Yoshitake, J., M. Shimamura, H. Ishizaki, and Y. Irie. 1976. Xylitol production by *Enterobacter liquefaciens*. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 1493-1503.
 11. Yoshitake, J., H. Ohiwa, and M. Shimamura. 1971. Production of polyalcohol by a *Cornyebacterium* sp., Part I. Production of pentitol from aldopentose. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 905-911.
 12. Izumori, K. and K. Tuzak. 1978. Production of xylitol from D-xylulose by *Mycobacterium smegmatis*. *J. Ferment. Technol.* **66**: 33-36.
 13. Roberto, I. C., I. M. Mancilha, C. A. de Souza, M. G. A. Feplipe, and H. F de Castro. 1994. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol. Lett.* **16**: 1211-1216.
 14. Chen, L. F. and C. S. Gong. 1985. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. *J. Food Sci.* **50**: 226-228.
 15. 오덕근, 김종화. 1996. *Candida parapsilosis*에 의한 xylitol 생성시 포도당의 영향. *산업미생물학회지*, **24**(2): 149-154.
 16. 김상용, 윤상현, 김정민, 오덕근. 1996. *Candia parapsilosis*에 의한 xylitol 생산시 acetic acid가 미치는 영향. *한국식품과학회지* **28**(4): 756-761.
 17. 오덕근, 윤상현, 김정민, 김상용, 김정희. 1996. *Candida parapsilosis* 돌연변이주에 의한 xylitol 생산시 배지조건의 최적화. *산업미생물학회지* **24**(4): 507-511.
 18. 오덕근, 김상용, 김정희. 1996. *Candida parapsilosis* 돌연변이주에 의한 xylitol 생산시 배양조건의 최적화. *한국농화학회지* **39**(3): 172-176.
 19. Kim, S. Y., J. H. Kim, and D. K. Oh. 1997. Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis*, *J. Ferment. Bioeng.* **83**(3): 267-270.

(Received 10 November 1996)