

## *Pichia stipitis*의 Xylitol Dehydrogenase Defective Mutant에 의한 Xylitol 수율 향상

김민수, <sup>1</sup>김철, <sup>2</sup>서진호, \*유연우  
아주대학교 대학원 분자과학기술학과 및 <sup>1</sup>화학생명공학부, <sup>2</sup>서울대학교 식품공학과  
(접수 : 1999. 10. 18., 게재승인 : 2000. 3. 31.)

### Enhancement of Xylitol Yield by Xylitol Dehydrogenase Defective Mutant of *Pichia stipitis*

Kim, Min Soo, Chul Kim<sup>1</sup>, Jin-Ho Seo<sup>2</sup>, and Yeon Woo Ryu\*

Department of Molecular Science and Technology  
<sup>1</sup>School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 442-749, and  
<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea.  
(Received : 1999. 10. 18., Accepted : 2000. 3. 31.)

In order to produce xylitol with high yield, experiments were carried out to develop xylitol dehydrogenase (XDH) defective mutant from *Pichia stipitis* and to investigate the xylitol fermentation characteristics of mutant strain. After treatment of *P. stipitis* with EMS, mutant PXM-4 was selected based on the XDH activity and xylitol production capability. Among the tested cosubstrates, galactose was selected as an adequate cosubstrate on xylitol production of mutant PXM-4. With the increase of galactose concentration, xylitol production was decreased because the transport of xylose into cell was inhibited by galactose. The optimal concentration of galactose for the production of xylitol using 20 g/L xylose was 20 g/L. Under this condition, maximum concentration of xylitol and yield were 14.4 g/L and 97%, respectively. In order to prevent the inhibitory effect of xylose transport by galactose, galactose was fed with low concentration and the concentration of xylitol produced was increased up to 25 g/L. In the fermentation of corn cob hydrolyzate by mutant PXM-4, xylose was completely converted to xylitol with a 100% yield in 4 days culture.

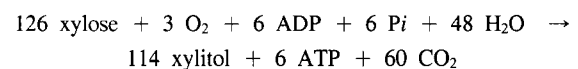
**Key Words** : *P. stipitis*, xylitol, xylitol dehydrogenase defective mutant, galactose

#### 서론

미생물에 의한 xylitol의 생산에 대한 연구는 Onish와 Suzuki(1)가 xylose 대사과정 중에 주요 생성물로 xylitol이 생산됨을 보고한 이후 주로 효모에 의한 xylitol 생산에 대한 많은 연구가 이루어졌다. Xylitol은 설탕 대체 감미료로서 우수한 기능성에도 불구하고 xylitol의 생산 기질인 xylose의 단가가 비싸기 때문에 사용이 제한적이다. 따라서, 현재로서는 xylitol의 산업적인 생산을 위한 수율 및 생산성 증가에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

효모에 의한 xylose의 초기 대사과정은 먼저 D-xylose가

NAD(P)H-dependent xylose reductase(XR)에 의하여 xylitol로 환원되고, 다음으로 NAD<sup>+</sup>-dependent xylitol dehydrogenase (XDH)에 의하여 xylitol을 D-xylulose로 산화시키는 두 단계 반응이다. 이러한 반응경로를 통한 효모의 xylitol 생산에서 Barbosa 등(2)은 NADH를 cofactor로 사용하였을 경우에 효모의 xylose 대사반응은 다음과 같다.



위의 stoichiometry에 의한 xylitol의 이론적인 수율은 0.905 g-xylitol/g-xylose로 보고되고 있다(2). 일반적으로 xylitol 생산에 중요한 영향을 미치는 제한 요인으로 용존산소량인 것으로 보고되고 있다. 산소 제한조건에서 세포내 NADPH와 NADH의 농도가 높아지게 되어 D-xylose의 환원이 유도되어 xylitol이 축적된다(3). Furlan 등(4)은 배지 내 용존산소량을

\*Corresponding Author : Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea  
Tel : 0331-219-2449, Fax : 0331-216-8777  
E-mail : ywryu@madang.ajou.ac.kr

0.44%에서 0.80%로 증가시켰을 때, 생산된 xylitol 농도 및 수율이 감소하였다고 보고하였으며, 또한 Nolletu 등(5)과 Winklenhausen 등(6)은 *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. boidinii*에 의한 xylitol 발효에서 배지 내 통기량을 감소시킴으로써 ethanol 보다는 xylitol의 생산성 및 수율이 증가한다고 보고하였다. Xylitol 수율을 증가시키기 위한 또 다른 요인으로는 cosubstrate의 첨가이다. Silva 등(7)은 *C. guilliermondii*를 이용한 xylitol 발효에서 glucose의 첨가는 xylose reductase(XR)의 활성을 억제시키기 때문에 xylitol 농도는 감소한다고 보고하였다. 그러나 Yahashi 등(8)은 고정화된 *C. tropicalis*에서 cosubstrate로서 glucose를 첨가함으로써 xylitol의 생산수율 및 발효속도가 증가한다고 보고하였으며, 그 원인은 세포성장을 위해 glucose가 xylose보다 더 빨리 소비됨으로써 pentose phosphate pathway에서 NADPH의 생성을 증가시켜 xylitol 생산 수율이 증가하였기 때문으로 분석하였다.

따라서 본 연구에서는 xylitol 생산 수율의 증가를 목적으로 *Pichia stipitis* CBS 5773으로부터 xylitol dehydrogenase (XDH)의 활성이 제거된 변이균주를 개발하고, 이를 이용한 xylitol 발효에서 cosubstrate 첨가가 xylitol 생산에 미치는 영향에 관한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배지조성

본 연구에서는 *P. stipitis* CBS 5776으로부터 xylitol dehydrogenase (XDH)의 활성을 완전히 제거시킨 변이균주 PXM-4를 사용하였다. 야생균주의 보관용 배지는 YPX (10 g/L yeast extract, 10 g/L Bacto peptone, 20 g/L xylose)에 20 g/L agar를 첨가한 사면배지를 사용하였으며, 변이균주 PXM-4는 xylose 대신 glucose (YPD)가 첨가된 배지를 사용하였다. 균주의 계대는 사면배지에 균을 접종시켜 항온 배양기에서 30°C로 24시간 배양한 후 4°C에 보관하면서 사용하였으며, 4주마다 동일한 조성의 사면배지에 계대배양하였다. XDH defective mutant의 선별을 위한 배지는 YPDx (10 g/L yeast extract, 10 g/L Bacto peptone, 20 g/L xylose, 5 g/L glucose) 배지를 사용하였다. 접종용 균주의 배양은 250 mL 삼각 flask에 YPD 배양배지 50 mL를 첨가하여 멸균한 후 균주를 접종하여 12시간 동안 30°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하여 사용하였다. 모든 배양을 위한 접종용 균주의 양은 0.2 g/L로 하였다. 또한 배지의 pH는 필요에 따라 1 N HCl 및 NaOH를 이용하여 pH를 조절하였다.

### Xylitol 발효

Xylitol 생산을 위한 발효배지는 5 g/L yeast extract, 5 g/L Bacto peptone, 5 g/L  $K_2HPO_4$ , 2 g/L  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.4 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 사용하였고, xylose 및 cosubstrate의 농도는 필요에 따라 변화시켜 사용하였다. 진탕 배양기에 의한 xylitol 발효는 10~100 g/L의 당이 포함된 발효배지 200 mL를 500 mL 삼각 flask에 넣고 30°C에서 150 rpm으로 배양하였다.

### 옥수수 속의 산 가수분해

옥수수 속의 시료는 다음과 같이 제조하였다. 옥수수 속을

60°C에서 48시간동안 건조시켜 파쇄한 후, 20~40 mesh가 되도록 하였으며, 시료는 실험에 사용하기 전에 60°C에서 24시간 이상 건조시켜 사용하였다. 20~40 mesh의 옥수수 속에 4%(w/v) NaOH를 첨가하여 lignin을 제거하고 여기에 1%(w/v)  $H_2SO_4$ 를 첨가하여 100°C에서 4시간 동안 반응시킨 후, Whatman filter paper No. 1를 통과시켜 얻어진 산 가수분해 용액을 발효에 이용하였다.

### 돌연변이의 유도 및 XDH defective mutant의 선별

돌연변이의 유도는 Ryu 등(9)의 방법에 따라 기본 배양 배지에서 12 시간 동안 배양한 세포 5 mL를 원심분리 하여 세포를 수집하고 멸균수로 2회 세척한 후 돌연변이 유도를 위한 시료로 사용하였다. 시료에 3%(v/v) ethylmethane sulfonate (EMS)를 처리하여 변이를 유도하였으며, EMS의 처리 시간은 시간에 따른 생존곡선을 작성한 후 99.9% 이상이 사멸하는 20분 동안 처리하였다. 또한 동일 부피의 5%(w/v) sodium thiosulfate를 첨가하여 변이 유도를 중단하고, 적절하게 희석하여 선별배지에 도말 한 후에 30°C에서 3일 간 배양하여 생성된 colonies 중에서 상대적으로 작은 colonies를 선별하였다. 일차적으로 선별한 변이균주를 각각 20 g/L glucose 및 xylose가 포함된 배양 배지에서 replica plating 방법을 이용하여 5회 계대배양 한 후 xylose 배지에서 성장하지 못하는 변이균주를 최종적으로 선별하였다.

### XR 및 XDH 활성측정

XR 및 XDH 활성은 Han 등(10)의 방법을 변형시켜 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 효소용액의 준비는 발효배지에서 일정시간 배양한 후 배양액을 원심분리 하여 상등액을 제거하고 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 2회 세척한 후 beadbeater (Biospec. USA)를 이용하여 4,000 rpm으로 3분간 세포를 파쇄한 후에 원심분리 (12,000rpm, 15min)하여 상등액을 효소용액으로 이용하였다. 모든 효소용액의 준비과정은 4°C에서 수행하였다. XR 활성의 측정은 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 1.5 mL, 0.1 M 2-mercaptoethanol 0.2 mL, 4 mM NADPH 0.2 mL, 효소용액 1 mL를 넣고 기질로서 0.5 M D-xylose 0.2 mL를 첨가하여 반응을 시작한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 1 unit는 1분당 1 nmol의 NADPH가 감소되는 초기속도로 정의하였다.

또한 XDH 활성은 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 1.5 mL, 0.1 M 2-mercaptoethanol 0.2 mL, 4 mM  $NAD^+$  0.2 mL, 효소용액 1 mL를 넣고 기질로서 0.5 M D-xylitol 0.2 mL를 첨가하여 반응을 시작한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 1 unit는 1분당 1 nmol의 NADH가 생성되는 초기속도로 정의하였다. 또한 효소의 specific activity는 unit/mg-protein로 나타내었다. 효소용액의 단백질 농도는 Lowry-Foline 법(11)에 의하여 측정하였다.

### 분석 방법

균체량의 측정은 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도와 건조 균체량의 표준곡선에 의하여 건조 균체량으로 환산하였다. Xylitol 및 모든

당은 carbohydrate analysis column (Waters Co., USA)을 이용하여 HPLC (Waters Co., USA)에서 Refractive Index(RI) detector로 측정하였다. 용매의 조성은 물과 acetonitrile을 15:85로 혼합하여 사용하였으며, 유속은 2 mL/min으로 하였다. 세포내 galactose, xylose 및 xylitol의 농도는 배양액을 원심분리하여 얻은 세포를 일정량의 증류수에 현탁시켜 beadbeater (Biospec. USA)로 세포를 파쇄한 후에 원심분리 (12,000rpm, 15min)하여 상등액을 HPLC로 분석하였다.

**결과 및 고찰**

**XDH defective mutant의 유도**

Xylitol 생산을 위한 기질로서 xylose는 단가가 비싸기 때문에 xylitol 생산 수율의 증진은 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 효모의 xylose 대사 과정 중 xylitol로부터 xylulose로 전환을 야기하는 xylitol dehydrogenase의 활성이 제거된 변이 균주를 유도하였다. 일차적으로 선별한 변이균주를 각각 20 g/L glucose와 xylose가 포함된 배양 배지에서 replica plating 방법을 이용하여 5회 계대배양 한 후 xylose 배지에서 성장하지 못하는 변이균주를 최종적으로 선별하였다. *P. stipitis*의 wild type과 선별된 변이균주들을 10 g/L xylose와 10 g/L glucose가 첨가된 발효배지에서 배양하면서 XDH 활성 및 xylitol 생산 정도를 비교하여 Table 1에 나타내었다. XDH의 활성은 glucose가 모두 소비된 후 xylose가 소비되는 시간인 배양 24시간에서 측정된 결과 변이균주 PXM-4, 7, 13, 15는 XDH의 활성이 완전히 제거되었음을 확인하였다. 또한 배양 4일 후 최종 xylitol 농도를 분석한 결과 변이균주 PXM-4가 5.7 g/L로 가장 우수하였으며, 이 때의 수율은 98% 이었다. 따라서 이러한 결과에 근거하여 xylitol 생산 및 수율이 우수하고, XDH 활성이 완전히 제거된 변이균주인 PXM-4를 최종적으로 선별하였다.

**Cosubstrate의 선정**

변이균주 PXM-4는 세포의 성장과 유지 및 xylitol 생산을 위한 cofactor의 공급을 위해서는 xylitol 발효에서 cosubstrate의 첨가가 필수적이다. 따라서 선별된 PXM-4가 탄소원 및 에너지원으로서 이용 가능하면서 xylitol 생성을 위한 cofactor를 제공할 수 있는 cosubstrate의 선정에 관한 실험을 수행하

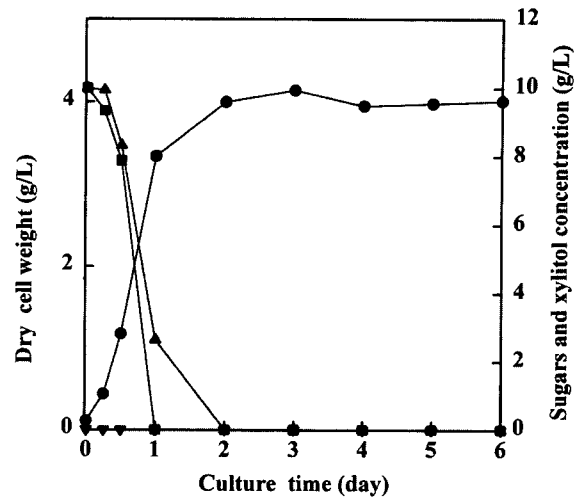


Figure 1. Profiles of cell growth(●), galactose(■), xylose(▲), and xylitol(▼) concentrations during the flask culture of *P. stipitis*.

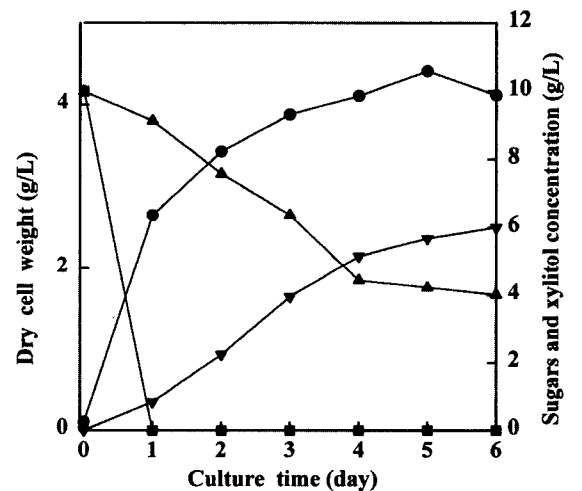


Figure 2. Profiles of cell growth(●), galactose(■), xylose(▲), and xylitol(▼) concentrations during the flask culture of mutant PXM-4.

였다. Cosubstrate 선정에 사용된 기질로서는 단당류 및 이당류 이었고, 각각 10 g/L cosubstrate와 10 g/L xylose가 첨가된 발효배지에서 xylitol 발효를 수행한 결과를 Table 2에 나

Table 1. Selection of XDH defective mutant from *P. stipitis* CBS 5776.

Strain	Residual xylose (g/L)	Xylitol conc.(g/L)	Xylitol yield (%)	Specific XDH activity (unit/mg-protein)
<i>P. stipitis</i>	0	0.2	2	107
mutant PXM-1	2.5	4.5	60	56
" -4	4.2	5.7	98	0
" -7	4.8	4.9	94	0
" -8	4.9	4.7	92	24
" -13	5.1	4.8	98	0
" -15	4.8	5.2	100	0
" -22	3.8	4.5	73	49
" -45	2.1	3.5	45	88

**Table 2.** Selection of appropriate cosubstrate for xylitol production by mutant PXM-4.

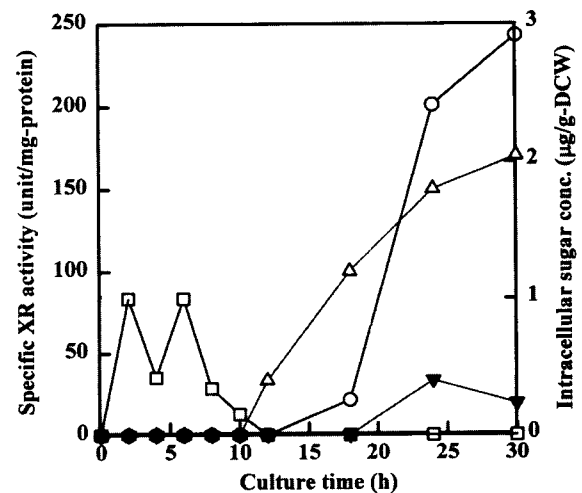
Cosubstrate	Dry cell weight (g/L)	Residual xylose (g/L)	Xylitol conc. (g/L)	Xylitol yield (%)
Fructose	6.2	5.2	4.4	92
Galactose	6.4	4.4	5.6	99
Glucose	6.4	4.3	5.6	97
Mannose	5.3	5.8	4.3	100
Cellobiose	0.2	9.7	0	0
Lactose	0.3	10.1	0	0
Maltose	7.2	7.6	1.1	43
Sucrose	6.5	8.6	0.7	53

타내었다. 세포 성장은 cosubstrate로서 maltose를 사용한 경우 7.3 g/L로 가장 우수하였으나, xylitol 생산을 위한 cosubstrate로서는 galactose가 가장 적합한 것으로 확인되었으며, 이 때 생산된 xylitol의 농도는 5.6 g/L이었고, 수율은 99%이었다.

또한 *P. stipitis*의 야생균주와 변이균주 PXM-4를 이용하여 10 g/L galactose와 xylose가 포함된 발효 배지에서 xylitol 발효를 수행하여 당의 이용 경향과 xylitol 생성능력을 검토한 결과, 야생균주의 경우(Figure 1)는 배양 1일만에 galactose와 xylose를 모두 소비하였으나 xylitol은 전혀 생성하지 않았다. 반면, 변이균주 PXM-4의 경우(Figure 2)는 배양 1일만에 galactose를 모두 소비하였고, xylose는 galactose가 모두 소모된 이후부터 이용되기 시작하였다. 또한, 배양 4일 이후에는 xylitol 생성 속도가 급격히 감소하였고, 배양 5일 이후에는 더 이상 xylitol의 농도가 증가하지 않았다. 생성된 xylitol의 양은 약 6.0 g/L로, 소비된 xylose에 대한 xylitol 생산 수율은 100%이었다. 이러한 결과는 galactose가 xylose의 transport를 억제함으로써 galactose가 모두 소비된 이후에 xylose가 세포 내로 주입됨으로써 xylose가 xylitol로 전환되는 과정에 필요한 NAD(P)H가 부족하기 때문인 것으로 사료된다(12,13).

### Sugar transport와 XR 활성과의 관계

Xylose로부터 효율적으로 xylitol을 생산하기 위해서는 cosubstrate에 의해 XR의 cofactor인 NAD(P)H의 지속적인 공급이 필요하다. 호기적인 조건하에서 NAD(P)H는 pentose phosphate pathway, glycolysis 및 TCA cycle에서 생산되며, 이러한 과정은 모두 세포 내 redox balance와 관계가 있다(14). 그러므로 xylitol의 수율 증가를 위해서는 xylose와 cosubstrate가 동시에 세포 내로 운반되어 cosubstrate는 세포의 성장 및 XR의 cofactor인 NAD(P)H의 공급에 이용되는 것이 바람직하다. 따라서 본 실험에서는 cosubstrate로 선정된 galactose의 세포 내 이동 및 XR의 활성과의 관계에 대한 실험을 수행하였다. Figure 3에서 나타난 것과 같이 배지 내 galactose가 완전히 소비되는 시간인 배양 12시간까지는 세포 내로 galactose가 먼저 transport되고, xylose는 그 이후에 transport가 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 세포 내로 xylose가 transport된 후부터 XR의 활성은 증가하기 시작하였다. 이러한 결과로 볼 때, galactose에 의하여 xylose의 transport가 억제됨을 확인



**Figure 3.** Profiles of specific XR activity(○) and intracellular galactose(□), xylose(△), xylitol(▼) concentrations during the flask culture of mutant PXM-4.

할 수 있었으며, 이로 인하여 galactose가 먼저 세포에 주입되어 소비됨으로써 xylose를 xylitol로 전환하기 위한 NAD(P)H의 공급이 부족하게 되어 첨가한 xylose가 모두 xylitol로 전환되지 못하는 것을 확인하였다.

### 초기 xylose 및 galactose 농도의 영향

효율적인 xylitol의 생산을 위한 초기 xylose 농도의 영향에 대한 실험을 수행하였다. 초기 xylose 농도를 10~100 g/L로 변화시켰고, 이 때 galactose의 농도는 xylose의 농도와 1:1이 되도록 첨가하여 5일 동안 xylitol 발효를 수행한 결과를 Table 3에서 나타내었다. 실험결과 초기 xylose의 농도가 20 g/L에서 세포성장은 4.9 g/L로서 가장 우수하였고, xylose의 농도가 50 g/L 이상에서는 galactose의 농도가 증가함에도 불구하고 세포성장이 감소하였다. 이는 *P. stipitis*가 당에 대한 내성이 낮기 때문인 것으로 사료된다. 이러한 결과에 의하여 초기 xylose의 농도는 20 g/L가 가장 적합한 것으로 판정하였다. 또한 초기 xylose의 농도가 증가함에 따라 잔존하는 xylose의 농도가 크게 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Vandeska 등(15)이나 Meyrial 등(16)이 보고한 *Candida* sp.에서 초기 xylose의 농도가 증가함에 따라 xylitol의 생산 및 수

**Table 3.** Effect of initial xylose concentration on the production of xylitol by mutant PXM-4.

Initial xylose conc. (g/L)	Dry cell weight (g/L)	Residual xylose (g/L)	Xylitol conc. (g/L)	Xylitol yield (%)
10	4.7	4.7	5.7	100
20	4.9	6.8	13.1	99
50	4.6	31.1	18.7	100
100	4.5	78.3	21.6	100

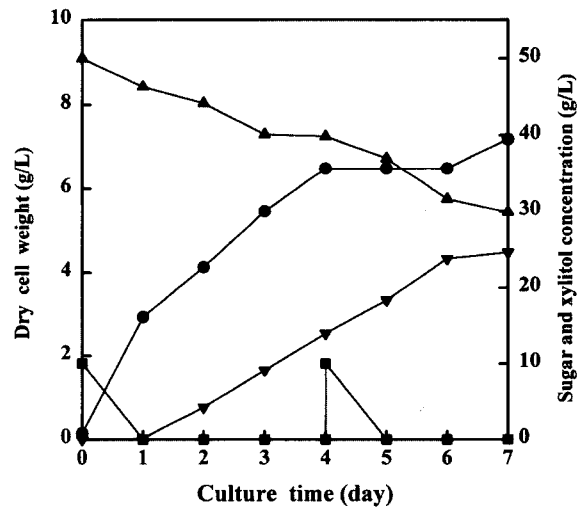
**Table 4.** Effect of initial galactose concentration of medium containing 20 g/L xylose on the production of xylitol by mutant PXM-4.

Initial galactose conc. (g/L)	Dry cell weight (g/L)	Residual xylose (g/L)	Xylitol Conc. (g/L)	Xylitol yield (%)
10	2.8	15.2	4.6	96
20	5.0	5.1	14.4	97
50	8.3	10.9	8.8	97
100	14.1	16.4	3.4	94

율이 증가한다는 결과와는 상이한 결과를 얻었다. 그 원인은 고농도로 첨가된 galactose가 xylitol 생산을 위한 cosubstrate로서의 역할보다는 xylose의 transport를 억제하였기 때문으로 사료된다. 따라서 xylose의 transport를 억제하지 않는 galactose의 최적 초기 농도를 선정하기 위한 실험을 수행하였고, 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 초기 xylose 농도는 20 g/L로 고정하였고, galactose의 농도는 10~100 g/L로 변화시켜 첨가한 후 5일 동안 xylitol 발효를 수행하였다. Table 4에 나타난 것과 같이 xylitol 생산을 위한 galactose의 농도는 20 g/L에서 가장 우수하였으며, 이 때 최종 xylitol의 농도 및 수율은 각각 14.4 g/L와 97% 이었다. 그러나, galactose의 농도가 증가함에 따라 세포 성장은 증가하여 100 g/L galactose 배지에서 14.1 g/L의 세포 성장을 나타내었으나, xylitol의 생산은 오히려 galactose의 농도가 증가함에 따라 급격히 감소하였다. 이러한 결과로 보아 고농도의 galactose는 xylose의 transport를 억제하여 xylitol 생산이 저해됨을 확인하였다. 또한 10 g/L galactose 배지에서는 4.6 g/L의 xylitol 만이 생산되었는데, 이는 첨가된 galactose가 대부분 세포 성장에 이용되어 xylitol 생산을 위한 cofactor를 충분히 공급하지 못하였기 때문으로 사료된다.

**Galactose의 feeding에 의한 xylitol 발효**

*P. stipitis*의 변이균주 PXM-4에 의하여 효과적으로 xylitol을 생산하기 위해서는 잔존하는 xylose를 완전히 xylitol로 전환시키는 것이 요구된다. 변이균주 PXM-4에 의한 xylitol 발효에서 잔존하는 xylose의 농도가 높은 이유는 배양 초기에 galactose가 모두 소비됨으로써 xylose에서 xylitol로 전환하는데 필요한 NAD(P)H가 부족하기 때문인 것으로 사료되었다. 따라서 유가식 배양 방법을 통한 최종 xylitol 농도와 전환 속도를 증가시키기 위한 실험을 수행하였다. 회분식 배양에서 xylitol 농도가 더 이상 증가되지 않는 시기인 배양 4일에 galactose를 feeding 하여 xylitol 생성에 대한 변화를 조사하



**Figure 4.** Profiles of cell growth(●), galactose(■), xylose(▲), xylitol (▼) concentrations during the flask culture of mutant PXM-4 with 10 g/L galactose feeding.

였다. Figure 4에서 나타난 것처럼 배양 4일에 10 g/L의 galactose를 feeding한 이후 배양 6일까지 xylitol의 농도가 계속적으로 증가하였고, 배양 6일 이후에는 다시 xylitol 생성이 중단되는 것을 알 수 있었다. 이는 xylitol의 농도가 더 이상 증가하지 않는 시간에서 에너지 대사 및 NAD(P)H의 regeneration을 위한 substrate가 고갈되었기 때문에 이때 galactose를 공급함으로써 xylitol 생성을 증가시킬 수 있다는 결과를 얻었다.

**옥수수 속의 산 가수분해 물을 이용한 xylitol 발효**

옥수수 속은 목재나 볏짚 등에 비해 상대적으로 hemicellulose의 함량이 높을 뿐만 아니라 glucose, galactose, arabinose 등과 같은 당 성분을 함유하고 있어 본 연구에 의해 개발된 변이균주 PXM-4를 이용한 xylitol 발효를 수행하였다.

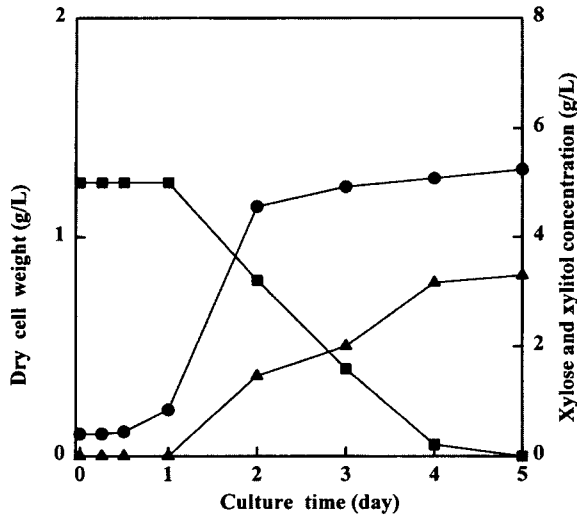


Figure 5. Profiles of cell growth(●), xylose(▲), and xylitol(▼) concentrations during the flask culture of corn cob hydrolyzate by mutant PXM-4.

옥수수 속의 산 가수분해 물을 이용한 xylitol 발효 실험은 옥수수 속으로부터 추출된 xylose의 농도가 5 g/L가 되도록 하여 변이균주 PXM-4를 이용하여 실험을 수행하였고, 그 결과는 Figure 5에 나타내었다. 배지 내 존재하는 당의 농도가 높지 않고, 옥수수 속의 추출 과정에서 생성되는 부산물로 인해 세포 농도는 1.31 g/L로서 높지는 않았으나 배지 내 존재하는 xylose는 배양 4일에 모두 xylitol로 전환된 것을 확인하였다. 이러한 결과는 옥수수 속의 산 가수분해 물에 존재하는 xylose 이외의 당 성분들이 세포 성장 및 xylitol 생산을 위한 cosubstrate로 이용되었기 때문으로 사료된다.

따라서 본 연구 결과에 근거하여 고부가가치의 xylitol 생산 수율의 증가에 관한 연구는 효모 균주로부터 XDH defective mutant를 개발하고 그에 따른 적절한 cosubstrate의 선정과 발효 공정의 개발에 의하여 충분히 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

## 요 약

본 연구에서는 높은 수율로 xylitol을 생산하기 위하여 *P. stipitis* CBS 5776으로부터 xylitol dehydrogenase (XDH)의 활성이 결여된 변이균주의 개발과 xylitol 발효 특성에 관한 실험을 수행하였다. EMS를 처리하여 XDH defective 변이균주인 PXM-4를 최종적으로 선별하였고, 변이균주 PXM-4의 XDH 활성을 측정하여 XDH 활성이 완전히 제거된 변이균주임을 확인하였다. 변이균주 PXM-4의 xylitol 발효에서 가장 적합한 cosubstrate로서 galactose를 선정하였다. Galactose와 xylose의 혼합당 배지에서 xylitol 발효를 수행한 결과 galactose의 농도가 20 g/L 이상에서는 xylitol 생산이 오히려 낮아졌고, 20 g/L의 xylose를 이용한 xylitol 발효에서 가장 적합한 galactose의 농도는 20 g/L 이었으며, 생산된 xylitol의 농도는 14.4 g/L 이었고, 수율은 97% 이었다. 또한 잔존하는 xylose를 완전히 xylitol로 전환시키기 위하여 xylitol 농도가 증가되지 않는 시기에 galactose를 첨가함으로써 최종 xylitol

농도를 25 g/L 까지 향상시켰다. 옥수수 속의 산 가수분해 용액을 이용한 xylitol 발효에서 배지 내 존재하는 xylose는 모두 xylitol로 전환됨을 확인하였다. 이와 같은 결과에 따라 XDH defective 변이균주를 개발함으로써 높은 수율의 xylitol 생산이 가능함을 확인하였다.

## 감 사

본 연구는 서울대학교 농업생명연구소연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Onishi, H. and T. Suzuk (1966), The production of xylitol, L-arabitol and ribitol by yeasts, *Agric. Biol. Chem.* **30**, 1139-1144.
- Barbosa, M. F. S., M. B. Medeiros, I. M. de Mancilha, H. Schnieder, and H. Lee (1998), Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*, *J. Ind. Microbiol.* **3**, 241-251.
- Horitsu, H., Y. Hayashi, K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki, and N. Wadanabe (1992), Production of xylitol from xylose by *C. tropicalis*: Optimization of production rate, *Biotech. Bioeng.* **40**, 1085-1091.
- Furlan, S. A., P. Bouilloud, P. Strehaiano, and H. F. de Castro (1991), Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. *Biotechnol. Lett.* **13**, 203-206.
- Nolleau, V., L. Preziosi-Belloy, and J. M. Navarro (1995), The reduction of xylose to xylitol by *C. guilliermondii* and *C. parapsilosis*: Incidence of oxygen and pH. *Biotechnol. Lett.* **17**, 41-422.
- Winkenhausen, E., P. Pittman, S. Kuzmanova and T. W. Jeffries (1996), Xylitol formation by *Candida boidinii* in oxygen limited chemostat culture *Biotechnol. Lett.* **18**, 753-758.
- Silva, S. S., I. C. Roberto, M. G. A. Felipe, and I. M. Mancilha, Fed-batch culture for xylitol production by *C. guilliermondii*, *Process Biochem.* **31**, 205-208.
- Yahashi, Y., H. Horitsu, K. Kawai, T. Suzuki, and K. Takamizawa (1996), Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: The effect of D-glucose feeding, *J. Ferment. Bioeng.* **81**(2), pp. 148-152.
- Ryu, Y. W. and S. H. Ko (1993), Selective isolation and characterization of *Schwanniomyces castellii* mutants with increased production of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase, *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**(2), 95-98.
- Han, W. O., J. H. Seo, and Y. W. Ryu (1998), Production of xylitol by catabolite derepressed mutant of *Candida sp.* *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(1) 6-12.
- Lowry, O. H., N. R. Rosebrough, A. L. Farr, and R. G. Randall (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biochem.* **193**, 265-275.
- Nina, Q. M., and H. Babel (1997), Fed-batch xylitol production with two recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *xyl1* at different levels, using glucose as a cosubstrate: a comparison of production parameters and strain stability, *Biotech. Bioeng.* **54**, 391- 399.

13. Rusturia, A. and R. Lagunas (1986), Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.* **132**, 379-385.
14. Bruinenberg, P. M., J. P. van Dijken and W. A. Scheffers (1983), An enzyme analysis of NADPH production and consumption in *C. utilis*, *J. Gen. Microbiol.* **129**, 965-971.
15. Vandeska, E., S. Amartey, S. Kuzmanova, and T. W. Jeffries (1995), Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*, *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 213-218.
16. Meyrial, V., J. P. Delgènes, R. Moletta, and J. M. Navano (1991), Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii* : Fermentation behaviour, *Biotechnol. Lett.* **13**, 281-286.