

## Xylose 발효효모의 분리 및 성질

김남순·서정훈\*

경북대학교 자연과학대학 미생물학과

### Isolation and Identification of Xylose Fermenting Yeast

Kim, Nam Soon and Jung-Hwn Seu\*

Department of Microbiology, College of Natural Science,  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Ethanol productivity of a xylose fermenting yeast (*Candida* sp. X-6-41) isolated from soil was investigated in laboratory scale using Erlenmeyer flask and mini-jar fermentor. The optimal conditions of xylose fermentation in flask experiment were pH4, asparagine as nitrogen source, xylose 20g/l, and in these condition, ethanol yield was about 80% to theoretical yield. Using mini-jar fermentor containing 5% total sugar with 2.5% xylose and 2.5% glucose, we obtained 2.3% (v/v) ethanol and the corresponding efficiency was 72.3% of total sugar. In this case, the consuming speed of sugar under aerobic condition was faster than that of anaerobic condition, and glucose was used previously to xylose. The optimum concentration of xylose for ethanol-fermentation in mini-jar fermentor scale was 5%, and the efficiency was 69% of total sugar (Alc. 2.2% v/v).

Biomass의 상당량을 차지하는 xylan의 주된 구성 성분은 xylose이며, 이 xylose를 기질로 하여 alcohol을 생성할 수 있는 효모는 알려지지 않았으나 1980년 초 Slininger 등(1-3)에 의해 *Pachysolen tannophilus*가 xylose를 발효할 수 있다는 보고 이래 xylose 발효효모(4-6)에 대해 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구는 Biomass를 alcohol의 기질로 이용하기 위하여 xylanase 분비성이며 xylose를 발효할 수 있는 효모균주 개발이 목적이므로 본 연구실에서는 배 등(7)에 의해 xylanase 분비효모를 분리, 동정하였다. 본 보에서는 xylose 발효효모를 토양에서 분리, 선정하여 최종적으로 X-6-41 균주를 얻어 이를 동정하였다. Xylan의 구성당으로는 xylose가 주된 당이나 이외에 glucose, galactose, mannose 등의 당도 약간 함유되어 있으며 또한 Biomass를 alcohol 발효기질로 사용할 경우, 실제적으로는 xylose만을 분리하여 사용하지 못하고 cellulose와 혼재되어 있는 Biomass를 그대로 화학적으로나 효소학적으로 분해해서 사용하므로 분해산물중에는 glucose와 xylose가 공존해 있게됨으로 X-6-41 균주의

발효력 조사에는 xylose를 단일기질로 한 것 외에도 glucose와 xylose를 섞은 혼합기질에서 발효력을 조사하였다. 또 xylose 발효에 있어서는 효모가 xylose를 up take하는 과정에 O<sub>2</sub>가 필요하다는 연구보고(2)를 감안하여 alcohol 발효과정에서 O<sub>2</sub>의 영향도 동시에 조사하였다.

#### 재료 및 방법

##### 사용균주

Xylose를 탄소원으로 한 배지를 사용하여 대구근 교 토양으로부터 분리한 400여 효모균주중 Durham 발효관 test에 의해 xylose 발효능이 가장 높은 균주인 X-6-41을 선별하여 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

##### 균주의 동정방법

균의 형태적, 생리적 및 배양상의 특성을 조사하여 Lodder氏(9) 방법에 준하여 동정하였다.

Key words: Xylose fermentation, yeast, xylitol

\*Corresponding author

**배 지**

삼각플라스크 정치배양용 alcohol 발효배지 조성은 carbon source로서 xylose 2%, Yeast extract 0.2%, polypeptone 0.1%, NH<sub>4</sub>Cl 0.3%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, pH 4.0~5.0으로 하여 사용하였으며, Mini-Jar fermentor용 alcohol 발효배지 조성은 carbon source(glucose, xylose) 2%, 5% 및 10%, Yeast extract 0.1%, polypeptone 0.2%, NH<sub>4</sub>Cl 0.3%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%, pH 4.0~5.5로 하였다.

**Alcohol 정량**

삼각플라스크 정치배양의 경우 배양일수에 따른 CO<sub>2</sub> 생성량에 의한 중량감소로 발효율을 환산하고 최종적으로 발효액 10 ml을 증류하여 gas chromatography로 alcohol 농도를 측정하였다. Mini-Jar fermentor인 경우 발효액 250 ml를 취해 증류한 후 alcohol hydrometer로 측정하여 v/v(%)로 나타내었다.

**잔당 분석**

발효액내의 잔당은 Somogyi-Nelson(10) 방법으로 측정하였다.

**발효력 조사**

**삼각플라스크 정치배양** : Alcohol 발효력을 조사하기 위하여 250 ml 삼각플라스크에 50 ml의 발효용 배지를 첨가, 살균하고 Conc-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 발효관을 연결하여 균을 접종한 다음 30°C에서 정치배양하였다. 발효가 진행됨에 따라 생성되는 CO<sub>2</sub>의 중량감소로써 발효율을 산출하고 생성된 alcohol은 발효액을 증류하여 gas chromatography로 정량하였다.

**Mini-Jar fermentor** : 발효용 기본배지에 발효기질(탄소원)을 첨가한 발효배지 2,000 ml를 3,000 ml volume의 Mini-Jar fermentor(Model M-100, Tokyo RIKAKAKU K.K)에 넣어 120°C 30분간 살균한 뒤 1.5%의 종균을 seeding하여 30°C에서 발효를 진행시켰다. 이때 통기량은 주로 0.2 v/v/min이었으며 교반속도는 150 rpm, pH는 2N-NaOH로 4.0으로 조절하였다.

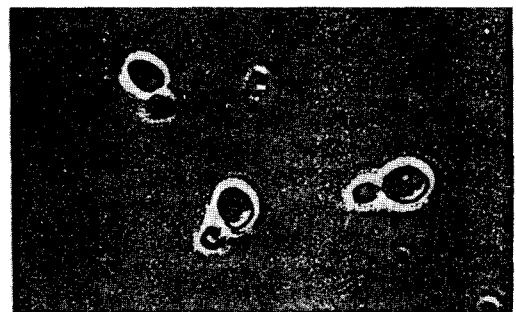
**결과 및 고찰**

**분리균의 동정**

토양에서 분리된 xylose 발효효모 X-6-41의 형태적, 생리적, 배양상의 특성을 토대로 Lodder氏(9)의 분류에 따라 동정한 결과 Table 1에서 보는 바와

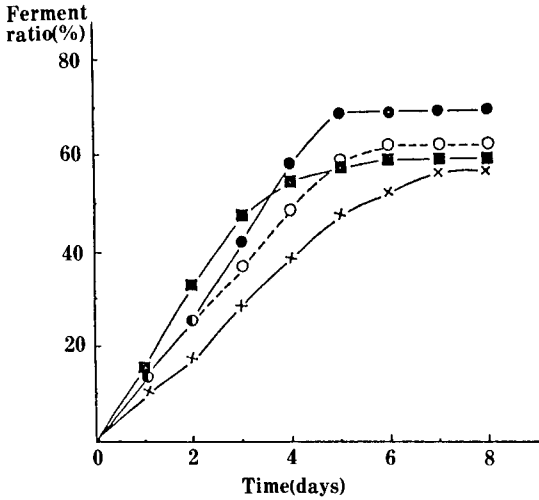
**Table 1. The physiological and cultural characteristics of X-6-41**

Description; white or cream colonies, polar budding, no filaments, no sexual reproduction			
Fermentation			
D-Glucose	+	Trehalose	-
D-Galctose	+	Melibiose	-
L-Arabinose	-	Lactose	-
Mannose	+	Raffinose	-
Maltose	+	Starch	-
Sucrose	-		
Growth			
D-Galactose	+	Inositol	-
Lactose	+	Citrate	+
D-Ribose	+	Ethanol	+
D-Xylose	+	Nitrate	-
L-Arabinose	+	L-Lysine	+
L-Rhamnose	+	at 25 °C	+
Maltose	+	at 30 °C	+
Trehalose	+	at 37 °C	±
Me α-D-glucoside	-	at 42 °C	-
Salicin	+	0.01% Cycloheximide	+
Arbutin	+	0.1% Cycloheximide	+
Melibiose	-	50% D-Glucose	-
Raffinose	-	10% NaCl	-
Melezitose	+	1% Acetic acid	-
Erythritol	+		
Additional characteristics			
Starch formation	-	Urea hydrolysis	-
Acetic acid production	-	Diazonium Blue B reaction	-

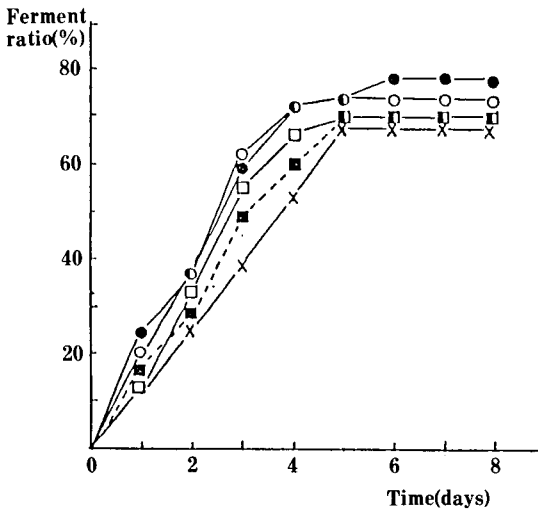


**Fig. 1. Photomicrograph of Candida sp. X-6-41**

같이 X-6-41 균주는 Candida sp. 균으로 동정되었다.



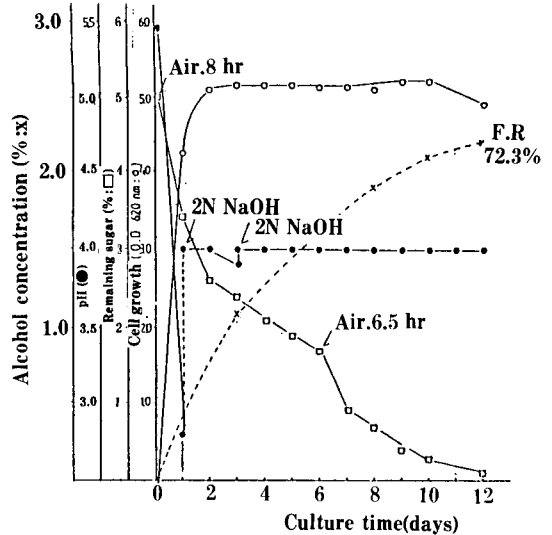
**Fig. 2. Effect of N. source on xylose fermentation.**  
The fermentation was performed by standing culture in a medium containing 2% xylose, 0.3% N. source, 0.2%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2% yeast extract and 0.1% polypeptone  
●-● : Asparagine      ○-○ : Yeast extract  
■-■ :  $NH_4Cl$       ×-× :  $(NH_4)_2SO_4$



**Fig. 3. Effect of initial pH on xylose fermentation.**  
The fermentation was performed by standing culture in a medium containing 2% xylose, 0.3%  $NH_4Cl$ , 0.2%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2% yeast extract and 0.1% polypeptone  
■-■ : pH 3      ●-● : pH 4      ○-○ : pH 4.5  
□-□ : pH 5      ×-× : pH 6

**삼각플라스크를 이용한 혐기적 alcohol 발효**

**Xylose 발효의 최적조건 검토 :** 공시균 X-6-41의 xylose 발효 조건을 검토하기 위하여 삼각플라스크를 이용한 정치배양법으로 질소원, pH의 영향을 조사하



**Fig. 4. Alcohol fermentation on mixed medium.**  
The fermentation was performed by mini jar fermentor (Model No. M-100, Tokyo RIKAKAKU K.K) with discontinuous aeration in a medium containing 5% total sugar with 2.5% xylose and 2.5% glucose, 0.2%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.3%  $NH_4Cl$ , 0.2%  $KH_2PO_4$ , 0.1% polypeptone and 0.1% yeast extract, pH 5.4 and seed culture was inoculated to 1.5% (v/v). During the fermentation, pH was adjusted to 4.0 by 2N-NaOH. The ethanol was measured after 12 days at 30°C  
Alcohol production = 1.3%  
Fermentation yield (yield/total sugar) = 71.2%  
Fermentation ratio (yield/consumed sugar) = 72.3%

였다.

Xylose를 2% 첨가하고 각각의 질소원을 0.3% 첨가하여 xylose 발효에 대한 질소원의 영향을 조사한 바(Fig. 2) 무기 N원 첨가시보다 유기 N원을 질소원으로 사용한 경우 발효율이 더 높음을 알 수 있는데 이는 Skoog(4) 등의 질소원 영향과도 유사한 결과이었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 X-6-41 균주의 xylose로부터 alcohol 생성을 최대로 하기 위하여 배양시 배지내의 pH를 3.0에서 6.0까지 맞추어 그 영향을 조사한 바 약산성 범위내에서는 거의 비슷한 발효율을 보였으나 pH 4.0일 때 발효율이 약 80%로 최대에 도달하였다.

**Mini-Jar fermentor를 이용한 alcohol 발효**

**혐기적과 호기적 상태에서의 xylose 발효(xylose 발효에 있어  $O_2$ 의 영향) :** 일반적으로 효모에 의한 xylose 발효는  $O_2$ 가 관여하는 호기적 발효라고 알려져 있다(2).

본 실험에서는 공시균주 X-6-41 균주의 xylose 발

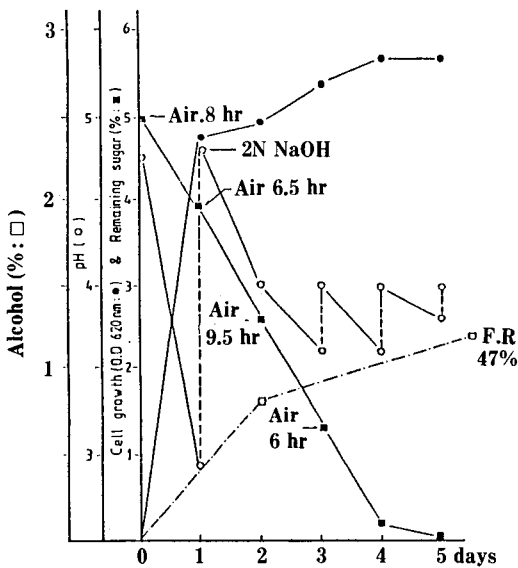
효에 대한 O<sub>2</sub>의 영향을 살펴보기 위하여 총당 5%의 혼합기질 (xylose : glucose=1 : 1)에 상법에 따라 종균, 접종 후 경시적으로 alcohol 발효력과 잔당을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4에 나타난 바와 같이 종균, 접종 후 2일째까지의 비교적 빠른 당소비는 glucose로 추측되었으며 이후의 비교적 느린 당소비는 xylose로 추측되었다. 이어 배양 6일째에 재차 6.5시간 동안 aeration을 시킨 후 잔당을 분석한 결과, 당의 소비속도는 배양초기속도 정도로 빨라졌으나 균의 증식은 더이상 진행되지 않았다. 본 결과로 미루어 보아 X-6-41 균주의 xylose 발효는 O<sub>2</sub>가 필요한 호기

적 발효임을 추측할 수 있었다(Fig. 4).

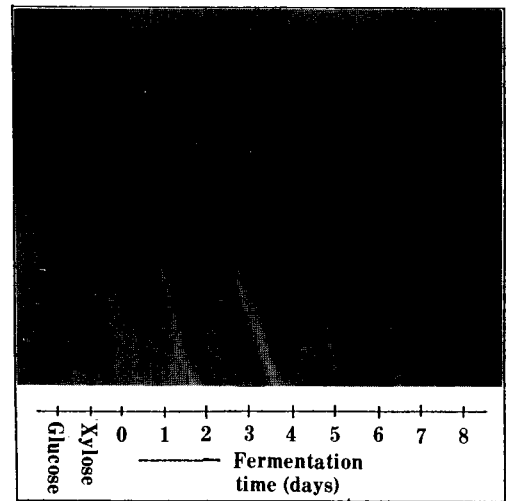
동일한 조건으로 연속적인 aeration으로 발효시킨 결과, Fig. 4에서 나타난 바와 같이 혐기적 상태에서는 발효 종료까지 약 12일 소모되었으나 연속 aeration 조건에서는 배양 5일만에 거의 발효가 종료되었다(Fig. 5).

한편 glucose와 xylose를 1 : 1 섞은 혼합배지에서 당이 소비되는 양상을 발효액을 경시적으로 취하여 TLC(Merk Art, 5735, DC-plastikfolen, Kieselgel 60F<sub>254</sub>, 0.2 mm) 방법으로 조사한 결과 glucose가 완전히 소비된 후에 비로소 xylose를 이용한다는 사실을 확인하였다(Fig. 6).

**Xylose 농도에 따른 alcohol 발효력 조사 :** X-6-41 균주의 xylose 발효에 있어서의 최적 기질농도를 알아보고서 xylose 농도를 2%, 5% 및 10%하여 alcohol



**Fig. 5. Alcohol fermentation with continuous aeration.** The fermentation was performed by mini jar fermentor (Model no. M-100, Tokyo RIKAKAKU K.K) with continuous aeration in a medium containing 5% total sugar with 2.5% xylose and 2.5% glucose, 0.2% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.3% NH<sub>4</sub>Cl, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% polypeptone and 0.1% yeast extract, pH 5.4 and seed culture was inoculated to 1.5% (v/v). During the fermentation, pH was adjusted to 4.0 by 2N NaOH. The ethanol was measured after 5 days at 30 °C.



**Fig. 6. Consumption pattern of mixed sugar (glc-xy) on fermentation.**

The sample spotted on thin layer chromatography was the supernat of fermentation broth which was cultured on mini-jar fermentor with discontinuous aeration.

**Table 2. Alcohol productivity from various of xylose**

Substrate	Conc. of substrate (%)	Temp. (°C)	Initial pH	pH control	Fermentation day	Cell growth (O.D. at 620nm)	Remaining sugar (%)	Alcohol (% v/v)	Fermentation (%)
Xylose	2	30	4.3	Yes	2	4.0	0.2	0.5	43
	5	30	5.0	Yes	3.5	4.6	0.1	2.2	69
	10	30	4.4	Yes	7	4.7	0.2	3.9	62

The fermentation was performed by mini-jar fermentor (Model No. M-100, Tokyo RIKAKAKU K.K) with continuous aeraton. During the fermentation, pH was adjusted to 4.0 by 2N NaOH.

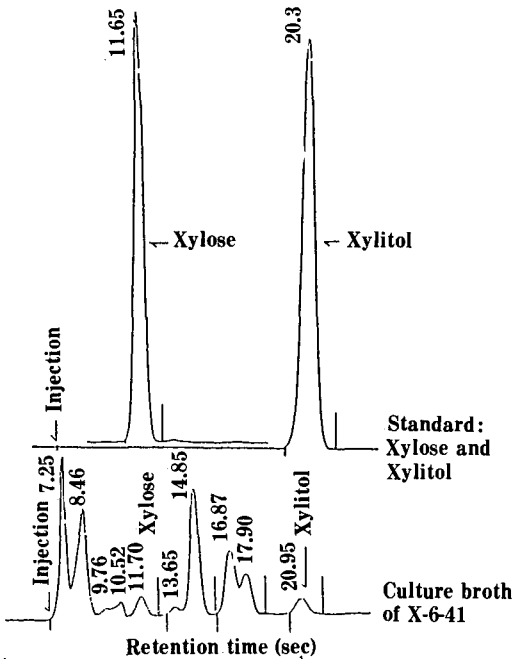


Fig. 7. Chromatogram of xylitol produced by *Candida* sp. X-6-41.

발효력을 비교 조사하였다. 이때 발효조건으로는 Mini-Jar fermentor에서 호기적으로 하여 30°C에서 배양하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 5% xylose일 때 총당에 대해 69%의 발효율(alcohol 2.2% (v/v))을 보였으며 기질농도가 높을수록 오히려 발효율이 떨어짐을 알았다. 이와같이 기질농도가 높아짐에 따라 발효율이 떨어지는 것은 Skoog(4) 등이 보고한 xylose fermenting yeast들과 비슷한 경향임을 알 수 있었다.

**Xylitol 생성**

Xylose 이용경로는 진핵과 원핵이 다르며 진핵에서는 xylitol을 거쳐 xylulose로 전환되어 이용되는 것이 주경로이나 원핵의 이용경로인 xylose isomerase에 의해 직접 xylulose로 전환되어 이용되는 경로 또한 존재할 것이라고 추측(2)되므로 HPLC(Water 社(미) : Biorad Aminex Hpx 87C Column, refractive index detector)상에서 culture broth를 필요량 취한 후 원심상등액을 injection sample로 하여 xylitol 생성 유무를 조사하였다. Fig. 7에서와 같이 xylitol의 retention time인 20.90 근처에서 Peak가 나타나므로 *Candida* sp.인 본 X-6-41 균주의 xylose 발효에서는 xylose가 xylitol로 전환되어 발효과정을 거치는 것으로 추측되었다.

**요 약**

Xylose 발효효모를 토양에서 분리하였으며 (X-6-41) 이는 Lodder氏 분류기준에 따라 *Candida* 속으로 동정되었다. 삼각플라스크 정치배양법에 의한 xylose 발효시 2% xylose, N원 asparagine, pH 4에서 발효율 약 80%로 나타났고 Mini-Jar fermentor를 이용하여 glucose와 xylose를 1:1로 혼합한 총당 5% 기질에서 발효를 시켜 본 바 발효율은 총당에 대해 약 72.3% (alcohol 2.3% (v/v))였다. 본 균주에 의한 xylose 발효는 일반적으로 보고된 바와 같이 호기적 발효과정이었으며 glucose와 xylose 혼합기질의 경우 glucose가 먼저 이용되고 xylose가 나중에 이용되는 것으로 나타났다. 5% xylose를 기질로 하여 Mini-Jar fermentor에서 발효시켰을 때 최대 발효율 69% (alcohol 2.2% (v/v))로 나타났으며 발효중에 xylitol이 생성되었다.

**사 사**

본 연구는 1986년도 한국과학재단 목적 기초 연구비에 의해 수행되었다.

**참고문헌**

1. Wang, P.Y., B.F. Johnson and H. Schneider: *Bio-technol. Lett.*, **2**, 279 (1980).
2. Slininger, P.J., P.L. Bolen and C.P. Kurtzman: *Enzyme Microb. Technol.*, **9**, 5 (1987).
3. Slininger, P.J., R.J. Bothast, J.E. van Cauwenberge, and C.P. Kurtzman: *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 85 (1983).
4. Skoog, K. and B.H. Hagerdal: *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 66 (1988).
5. Gong, C.S., L.F. Chen, M.C. Flickinger, L.C. Chiang, and G.T. Tsao: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 430 (1981).
6. Flickinger, M.C.: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 27 (1980).
7. Bae, M.A. and J.W. Seu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, In press.
8. 방원기, 이상협: *주류공업*, **7**, 4 (1987).
9. Lodder, J.: *The Yeasts*. North-Holland Publishing Co., Netherlands, 1st ed., (1970).
10. Ando, E., H. Terayama, K. Nishizwa and T. Yamakawa: *Biochemical reserch methods*. Asakura press, Tokyo, **1**, 126 (1967).

(Received October 13, 1988)