

*Candida parapsilosis*에 의한 Xylitol 생산시 균체농도가 미치는 영향

김상용 · 윤상현 · 김정민 · 오덕근*
동양제과(주) 기술연구소, *우석대학교 식품공학과

Effect of Cell Density on Xylitol Fermentation by *Candida parapsilosis*

Sang-Yong Kim, Sang-Hyun Yoon, Jung-Min Kim and Deok-Kun Oh*

Tong Yang Confectionery Co., R&D Center

*Department of Food Science and Technology, Woosuk University

Abstract

Effect of cell density on the xylitol production from xylose by *Candida parapsilosis* KFCC 10875 was investigated. The concentrated cells were obtained by centrifugation of culture broth. The xylitol production rate was maximum at the cell concentration of 20 g/l and the specific xylitol production rate decreased when the cell concentration was increased due to oxygen limitation. Effect of the initial concentration of xylose on the xylitol production was also examined using the concentrated cells of 20 g/l. The xylitol production rate, specific xylitol production rate, and xylitol yield from xylose were maximum at 170 g/l xylose. Above 170 g/l xylose, the xylitol production rate was remarkably decreased. The concentrated cells could also be obtained by adjusting the dissolved oxygen (DO) during fermentation. The rapid accumulation of cells up to 20 g/l was achieved by maintaining an increased level of DO during the exponential growth phase and then, for the efficient xylitol production, the DO was changed to a low level in the range of 0.7-1.5%. A fed-batch fermentation of xylose by adjusting the DO level was carried out in a fermentor and the final xylitol concentration of 140 g/l from xylose of 200 g/l could be obtained for 56 h fermentation.

Key words: xylitol, concentrated cell, *Candida parapsilosis*

서 론

오탄당 알코올인 xylitol은 과일, 채소 및 버섯 등의 자연에서 소량 존재하고 또한 포유동물 탄수화물대사의 중간산물이다⁽¹⁾. Xylitol은 당도가 설탕과 같고 낮은 점도와 용해될 때 열 감소가 일어나는 특성으로 인하여 식품중 특히 제과에서의 사용이 증가하고 있다^(2,3).

Xylitol은 xylose가 많이 함유된 물질 또는 목재의 반섬유소(hemicellulose) 부분을 가수분해한 후 환원시키는 화학적 방법으로 생산하여 왔으나, 화학적 방법은 분리정제의 비용이 고가이고 다량의 유기용매를 사용하여 고온 고압에서 진행시키는 반응이므로 다량의 폐기물이 발생하고 위험성이 상존하는 문제점을 가지고 있다⁽⁴⁾. 이러한 단점을 해결하기 위하여 미생물에 의한 xylitol 생산방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 미

생물에 의한 xylitol의 생산방법은 주로 효모로부터 이루어지고 있다. Xylitol을 많이 생산할 수 있는 효모는 *Candida*속의 *blankii*, *guilliermondii*, *pelliculosa*, *shehatae*, *tropicalis*, *utilis*와 *Saccharomyces*속의 *bailii*, *rouxii*, *uvarium*와 *Schizosaccharomyces*속의 *pomb* 등이 있다⁽⁵⁻¹⁰⁾.

본 연구에서는 *Candida parapsilosis* KFCC-10875⁽¹¹⁻¹⁵⁾를 사용하여 xylose로부터 초기 균체농도와 초기 xylose 농도가 xylitol의 생산속도에 미치는 영향을 살펴보고 발효과정 중에 균체를 농축하는 방법을 시도하여 xylitol의 생산속도를 증가시켜 발효시간을 단축하고자 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,

Corresponding author: Deok-Kun Oh, Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Cheonbuk 565-800, Korea

malt extract 3 g/l로 구성된 YM배지를 사용하였고, 발효 배지로는 xylose 50-270 g/l, yeast extract 5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g/l로 구성된 최적배지⁽¹²⁾를 사용하였다.

배양조건

종배양은 냉동보관 균주를 YM배지 50 ml가 들어 있는 250 ml 플라스크에 접종하여 진탕배양기에서 240 rpm, 30°C로 균체농도가 3-4 g/l(약 14-16시간)로 성장할 때까지 수행하였다. 균체농도가 xylitol의 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 종배양액을 xylose가 함유된 발효배지가 2 l 들어있는 5 l 발효조(한국발효기(주))에 접종하여 배양온도는 30°C, 교반속도는 190 rpm으로 하여 균체농도가 약 7 g/l가 될 때까지 배양한 후 원심분리를 하였다. 농축된 균체의 농도를 달리하여 50 ml의 발효배지가 들어있는 250 ml의 플라스크에 접종하였다. 배양은 최적조건⁽¹³⁾인 교반속도 190 rpm, 온도 30°C와 초기 pH 5.0에서 하였고 배양과정 중에 pH는 조절하지 않았다.

발효조 배양은 종배양액을 5 l 발효조에 접종하여 배양초기에는 200 g의 xylose가 함유된 2 l의 배양액으로 배양하였고 발효과정 중에 200 g의 xylose가 함유된 500 ml의 용액을 2번 첨가하여 최종 배양액의 부피가 3 l(최종 첨가한 xylose농도는 200 g/l)가 되게 하는 유가식 배양을 하였다. pH는 발효 전과정 동안 일정하게 5.0으로 조절하였고, 온도는 30°C로 하고, 통기량을 1.0 vvm으로 하였고 용존산소는 교반속도를 400-700 rpm으로 조절하여 배양초기에는 20% 이상 유지시키다가 균체농도가 약 20 g/l되는 시점부터 교반속도를 350-380 rpm으로 낮추어 최적 용존산소 농도 조건⁽¹⁵⁾인 0.7-1.5% 정도로 유지하여 xylose가 완전히 소모될 때까지 배양하였다.

분석방법

Xylose와 xylitol의 농도는 Sugar-Pak I column이 장착된 HPLC (TM-600, 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 표준 곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다.

결과 및 고찰

균체 농도가 xylitol 생산에 미치는 영향

농축된 *C. parapsilosis*의 균체를 50 g/l의 xylose가 함유된 배지에 접종하여 초기 균체농도를 다르게하여 시간경과에 대한 xylitol의 생산을 Fig. 1에 나타내었다. 초기 균체농도가 20 g/l까지는 균체농도가 증가할수록 시간에 따른 xylitol 생산량은 증가하여 균체농도 20 g/l를 사용한 발효에서는 배양시간 12시간에 34 g/l의 xylitol이 생성되어 68%의 전환수율을 보여주었다. 이것은 농축하지 않은 보통의 발효에서 배양시간 64시간에 30 g/l의 xylitol이 생산되는 것에 비하여 현저히 생산성이 증가한 것이다. 그러나, 균체농도가 30 g/l에서는 오히려 시간에 따른 xylitol의 증가량이 감소하였다.

균체농도가 xylitol 생산속도에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 Fig. 1을 균체농도 변화에 따른 xylitol 생산속도(단위시간당 생산하는 xylitol의 양)와 비 xylitol 생산속도(단위시간당 단위 균체가 생산하는 xylitol의 양)의 변화로 다시 나타내었다(Fig. 2). Xylitol 생산속도는 균체농도 20 g/l에서 최대값 2.8 g/l-h를 보여주었으며 비 xylitol 생산속도는 균체농도가 증가할수록 감소하였다. 초기 균체농도가 증가할수록 xylitol 생산속도의 증가폭이 감소하는 것과 비 xylitol 생산속도가 감소하는 것은 플라스크 조건(190 rpm)에서는 산소공급이 충분하지 못하여 균체농도의 증가로 인한 산소요구의 증가를 충족시키지 못하여 산소결핍을 초래하여 생긴 결과로 생각된다.

Xylose 농도가 xylitol 생산에 미치는 영향

약 20 g/l로 농축된 균체를 사용하여 초기 xylose의

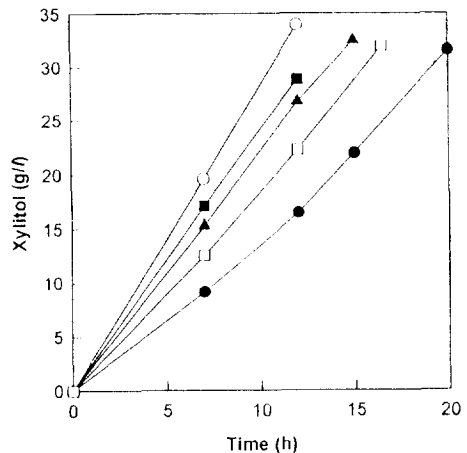


Fig. 1. Effect of cell concentration on the xylitol production from xylose. The initial cell concentrations were 5 g/l (●-●), 10 g/l (□-□), 15 g/l (▲-▲), 20 g/l (○-○), and 30 g/l (■-■).

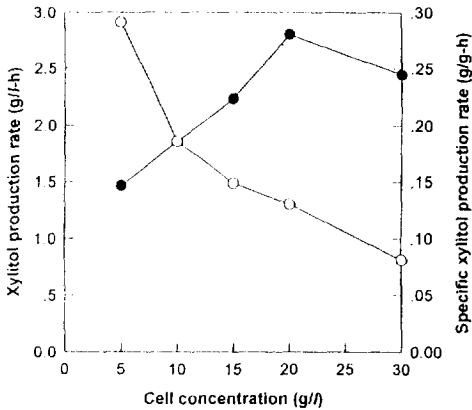


Fig. 2. Effect of cell concentration on the xylytol production rate and the specific xylytol production rate. Xylytol production rate (●—●) and specific xylytol production rate (○—○)

농도를 50 g/l에서 270 g/l로 변화시켜 초기 xylose의 농도가 xylytol의 발효변수에 미치는 영향을 살펴본 결과 Table 1과 같았다. 시간에 대한 xylytol의 생산농도의 증가는 비례적으로 일어났으며 초기 xylose 농도가 증가할수록 xylytol 생성량과 발효시간은 증가하였다. 그러나, xylytol 생산속도, 비 xylytol 생산속도 및 xylose에 대한 xylytol의 수율은 xylose 농도 170 g/l에서 최대값을 보여주었고 xylose 농도가 170 g/l 이상에서는 xylytol 생산성이 비교적 크게 감소하였다. 그러므로 효과적인 xylytol의 생산을 위하여서는 고농도의 xylose 함유보다 초기 xylose의 농도를 170 g/l 부근에서 시작하는 것이 바람직하다.

발효과정 중의 균체 축적을 이용한 xylytol 생산성 향상 고농도의 균체를 사용하여 xylytol의 생산성과 발효 시간을 단축시킬 수 있었다. 그러나, 발효 초기에 고농도의 균체를 사용하려면 xylose의 배지에서 배양된 균체를 다시 농축하여야 하는 단점이 존재한다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 발효과정 중에 균체를 농축하는 방법을 시도하였다(Fig. 3). 고농도의 균체를 얻기 위하여 지수증식기인 배양 초기에 용존산소의 농도를 충분히 유지시켜 18시간 배양하여 약 20 g/l까지 성장시켰다. 이 농축된 균체를 이용하여 xylytol을 생산하기 위하여 용존산소의 농도를 0.7-1.5%⁽¹⁵⁾로 낮추어 배양하였다. 이때, 기질의 농도는 xylytol의 생산성을 향상시키기 위하여 초기에 xylose의 양이 고농도가 되지 않게 하기 위하여 xylose를 나누어 첨가하였다. Xylose의 유가식 배양법으로 56시간 배양하여 200 g/l의 xylose로부터 약 140 g/l의 xylytol을 생산할 수 있었다.

Table 1. Effect of initial concentration of xylose on the fermentation parameters of *Candida parapsilosis*

Initial xylose (g/l)	Final xylytol (g/l)	$Q_p^{1)}$ (g/l-h)	$q_p^{2)}$ (g/g-h)	$Y_{p/s}^{3)}$ (g/g)	Fermentation time (h)
50	34	2.83	0.13	0.68	12
90	63	3.40	0.16	0.70	18
140	103	3.45	0.17	0.74	33
170	125	3.57	0.18	0.74	37
220	159	3.07	0.15	0.72	51
270	189	2.41	0.13	0.70	85

¹⁾Xylytol production rate

²⁾Specific xylytol production rate

³⁾Xylytol yield from xylose

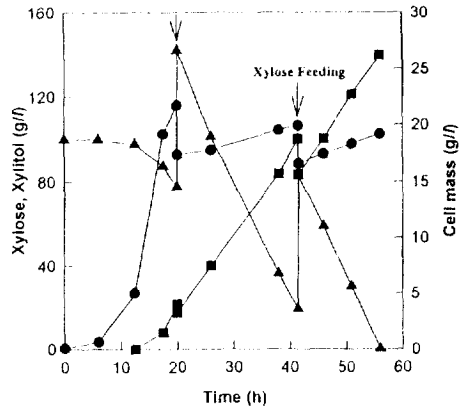


Fig. 3. Fed-batch fermentation of xylytol in a fermentor from 200 g/l xylose by *Candida parapsilosis* (arrows indicated the point of xylose feeding) Cell growth (●—●), xylose (▲—▲), and xylytol (■—■)

지금까지 균체 농축을 이용하지 않고 기질을 xylose로 하여 xylytol을 생성한 경우 문헌에 보고된 최고 수준은 플라스크에서 *C. guilliermondii*를 사용하여 292시간 배양한 결과 200 g/l의 xylose로부터 152 g/l의 xylytol을 생성한(생산수율 76%) 것이다⁽⁷⁾(Table 2). 이에 비하여 *C. parapsilosis*의 경우는 발효조를 사용하였고 xylytol의 생산성도 *C. guilliermondii*를 사용한 경우보다 5배 증가된 결과이었다. 농축균체를 사용한 경우의 문헌 보고 최고수준은 플라스크에서 *C. L-102*를 사용하여 66시간 배양하여 110 g/l의 xylose로부터 100 g/l의 xylytol을 생성한 (생산수율 88%) 것이다⁽¹⁶⁾. 이때, 균체는 xylose에서 성장한 균체를 6.6 g/l로 농축하여 사용하였다. *C. L-102*의 경우처럼 *C. parapsilosis*의 경우도 농축 균체를 사용한다면 6.6 g/l까지 균체농도를 얻는데 걸리는 시간인 12시간을 단축시킬 수 있어 xylytol 생산속도가 3.18 g/l-h로 증가할

Table 2. Xylitol production by *Candida* sp. L-102, *Candida guilliermondii*, and *Candida parapsilosis*

Yeast	Initial xylose (g/l)	Final xylitol (g/l)	Q _p ¹⁾ (g/l-h)	Y _{PS} ²⁾ (g/g)	Y _{XS} ³⁾ (g/g)	Time (h)	Ref.
<i>C. sp.</i> L-102	114	100	1.53	0.88	0.03	66	(7)
<i>C. guilliermondii</i>	200	152	0.52	0.76	0.03	292	(16)
<i>C. parapsilosis</i>	200	140	2.50	0.70	0.10	56	this study

¹⁾Xylitol production rate²⁾Xylitol yield from xylose³⁾Cell yield from xylose

것이다. 이러한 결과는 *C. L-102*를 이용한 발효와 비교하여 2배 이상의 생산성이 증가한 것이다.

따라서, *C. parapsilosis* KFCC-10875를 이용하여 xylose로부터 xylitol 발효를 수행할 때 고농도 균체를 xylitol의 생산에 적용하면 xylitol의 생산성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

요 약

Candida parapsilosis KFCC-10875를 사용하여 균체 농도가 xylose로부터 xylitol의 생산에 미치는 영향을 조사하였다. Xylitol 생산속도는 균체농도 20 g/l에서 최대값 2.8 g/l-h를 보여주었으며 비 xylitol 생산속도는 농축된 균체에 의한 산소제한으로 균체농도가 증가할수록 감소하였다. 약 20 g/l로 농축된 균체를 사용하여 초기 xylose농도가 xylitol 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과 xylitol 생산속도, 비 xylitol 생산속도 및 xylose에 대한 xylitol의 수율은 xylose의 농도 170 g/l에서 최대값을 보여주었다. 고농도의 균체를 사용하려면 xylose의 배지에서 배양된 균체를 다시 농축하여야 한다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 발효과정 중에 균체를 농축하는 방법을 시도하였다. 고농도 균체를 얻기 위하여 지수증식기인 배양 초기에는 용존산소의 농도를 충분히 유지시켜 18시간 배양하여 약 20 g/l의 고농도 균체를 얻을 수 있었다. 고농도 균체를 이용하여 xylitol을 생산하기 위하여 용존산소의 농도를 0.7-1.5%로 낮추어 유지하였다. 이때, 기질의 농도는 xylose 농도가 170 g/l 이상에서는 xylitol 생산성이 비교적 크게 감소하므로 xylitol 생산성의 향상을 위하여 고농도의 xylose를 피하는 유가식 배양을 수행하였다. 그 결과 56시간 배양하여 200 g/l의 xylose로부터 약 140 g/l의 xylitol을 생산할 수 있었다.

문 헌

1. Makinen, K. K. and Soderling, E.: A quantitative study

- of manitol, sorbitol, xylitol, and xylose in wild berries and commercial fruits. *J. Food Sci.*, **45**, 367 (1980)
2. Pepper, T. and Olinger, P. M.: Xylitol in sugar-free confections. *Food Technol.*, **42**, 98 (1988)
3. Emodi, A.: Xylitol, its properties and food applications. *Food Technol.*, **32**, 20 (1978)
4. Hyvonen, L. and Koivistoinen, P.: Food technological evaluation of xylitol. *Adv. Food Res.*, **28**, 373 (1982)
5. Gong, C. S., Claypool, T. A., McCracken, L. D., Maun, C. M., Ueng, P. P. and Tsao, G. T.: Conversion of pentoses by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 85 (1983)
6. Horitsu, H., Yahashi, Y., Takamizawa, K. Kawai, K., Suzuki, T. and Watanabe, N.: Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of production rate. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1085 (1992)
7. Meyrial, V., Delgenes, J. P., Moletta, R. and Navarro, J. M.: Xylitol production by *Candida guilliermondii*: Fermentation behavior. *Biotechnol. Lett.*, **13**, 281 (1991)
8. Nishio, N., Sugawa, K., Hayase, N. and Nagai, S.: Conversion of D-xylose into xylitol by immobilized cells of *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp. HU. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 356 (1989)
9. du Preez, J. C., van Driessel, B. and Prior, B. A.: D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. *Biotechnol. Lett.*, **11**, 131 (1989)
10. Meyer, P. S., Du Preez, J. C. and Kilian, S.: Cultivation of *Candida blankii* in simulated bagasse hemicellulose hydrolysate. *J. Indust. Microbiol.*, **9**, 109 (1992)
11. 오덕근, 김종화: *Candida parapsilosis*에 의한 xylitol 생성시 포도당의 영향. *산업미생물학회지*, **24**, 230 (1996)
12. 오덕근, 윤상현, 김정민, 김상용, 김정희: *Candida parapsilosis* 돌연변이주에 의한 xylitol 생산시 배지조건의 최적화. *산업미생물학회지*, **24**, 507 (1996)
13. 오덕근, 김상용, 김정희: *Candida parapsilosis* 돌연변이주에 의한 xylitol 생산시 배양조건의 최적화. *한국농화학회지*, **39**, 172 (1996)
14. 김상용, 윤상현, 김정민, 오덕근: *Candida parapsilosis*에 의한 xylitol 생산시 acetic acid가 미치는 영향. *한국식품과학회지*, **28**, 756 (1996)
15. Kim, S. Y., Kim, J. H. and Oh, D. K.: Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis*. *J. Ferment. Bioeng.*, **81**, (in press) (1996)
16. Lu, J., Tsai, L. B., Gong, C. S. and Tsao, G. T.: Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida* sp. L-102. *Biotechnol. Lett.*, **17**, 167 (1995)

(1996년 7월 18일 접수)