

Candida parapsilosis 돌연변이주에 의한 Xylitol 생산의 배지조건 최적화

오덕근^{1*} · 윤상현 · 김정민 · 김상용 · 김정희²

¹우석대학교 식품공학과, 동양제과(주) 기술개발연구소, ²한국과학기술원 생물과학과

Optimization of Medium for Xylitol Production by a Mutant of *Candida parapsilosis*. Deok-Kun Oh^{1*}, Sang-Hyun Yoon, Jung-Min Kim, Sang-Yong Kim and Jung-Hoe Kim. ¹Department of Food Science and Technology, Woosuk University, Cheonju 565-800, Korea, Tong Yang Confectionery Co., R and D Center, Seoul 140-715, Korea, ²Department of Biological Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon 305-701, Korea — Medium optimization for xylitol production from xylose by *Candida parapsilosis* ATCC 22019 mutant was performed. Effect of various nitrogen sources on xylitol production was investigated. Of inorganic nitrogenous compounds, ammonium sulfate was effective for xylitol production and yeast extract was the most suitable organic nitrogen nutrient for enhancement of xylitol production. Effect of inorganic salts such as KH_2PO_4 and $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on xylitol production was also studied. Optimal medium was selected as xylose of 50 g/l, yeast extract of 5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of 5 g/l, KH_2PO_4 of 5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ of 0.2 g/l. In a fermentor by using the optimal medium, a final xylitol concentration of 37 g/l could be obtained from 50 g/l of xylose with a xylitol yield of 74% and a xylitol productivity of 0.58 g/l-hr. At 300 g/l xylose, fermentation was also carried out and then a final xylitol concentration of 242 g/l was obtained at 272 hours. It was corresponding to xylitol yield of 80.7% and xylitol productivity of 0.58 g/l-hr.

오탄당 알코올인 xylitol은 과일, 채소 및 버섯등의 자연에서 소량 존재하고 또한 포유동물 탄수화물대사의 중간산물이다(1). Xylitol은 당뇨병 환자가 xylitol을 소화시키기 위하여 insulin을 필요로 하지 않아 당뇨병 치료를 위한 대용당으로 사용되고 있고(2), sorbitol보다 감미도가 2배 높으므로 식품의 여러분야에서 감미료로 응용되고 있다(3).

Xylitol은 xylose가 많이 함유된 반섬유소 가수분해물(hemicellulose hydrolysate)을 환원시키는 화학적 방법으로 부터 생산하여 왔으나, 화학적 방법은 xylose 또는 xylitol과 반섬유소 부분에서 생기는 다른 고분자당의 가수분해물들과의 분리와 정제가 어렵고 그 수율도 50~60% 정도로 낮다. 또한 알칼리를 이용한 고온 고압의 반응이므로 위험성과 폐기물 문제가 존재하는 단점이 있다(4). 이러한 단점을 해결하기 위하여 미생물에 의한 xylitol 생산방법에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 미생물에 의한 xylitol의 생산은 효모의 경우 *Candida*속의 *blankii*, *guilliermondii*, *pelliculosa*, *tropicalis*, *utilis*와 *Saccharomyces*속의 *bailii*, *rouxii*, *uvarium*와 *Schizosaccharomyces*속의 *pombe* 등이 있고(5-9), 세균의 경우 *Enterobacter liquefaciens*(10), *Corynebacterium* sp.(11)와 *Mycobacterium smegmatis*(12) 등이 있다.

지금까지 xylitol 생산에 관한 논문은 매우 많으나

배지성분에 관한 논문은 RSM(Response surface method)를 사용하여 rice bran, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 과 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 의 3가지 성분을 최적화한 것(13)과 질소원(14, 15), biotin을 포함한 비타민(16, 17)과 magnesium(18) 정도이다. 그러므로, 본 연구에서는 *Candida parapsilosis* ATCC 22019 돌연변이주(19)를 사용하여 배지성분이 xylitol 생산에 미치는 영향을 살펴보고 xylitol 생산성을 증가시키기 위하여 각 배지성분의 최적 농도를 구하고자 한다.

재료 및 방법

미생물 및 배지

본 연구에서는 냉동보관(-70°C)중인 균주 *Candida parapsilosis* ATCC 22019 돌연변이주를 사용하였다. 성장배지로는 glucose 20 g/l, peptone 5 g/l, yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l로 구성된 YM배지를 사용하였고 발효배지로는 탄소원으로 xylose 50 g/l 또는 300 g/l, 질소원으로 yeast extract와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 또한 무기염으로 KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 로 구성된 배지를 사용하였고 각 성분의 양은 xylitol의 생산성을 높이기 위하여 변화시켰다.

배양조건

종배양은 냉동보관 균주를 YM배지 50 ml가 들어있는 250 ml 플라스크에 접종하여 진탕 배양기에서 240 rpm, 30°C로 균체농도가 3~4 g/l(약 14~16시간)로 성장할

*Corresponding author.

Key words: Xylitol, medium optimization, *Candida parapsilosis* mutant

때까지 수행하였다. 플라스크 배양에서는 종배양액을 발효배지가 50 ml 들어있는 250 ml 플라스크에 접종하여 배양온도는 30°C, 초기 pH는 5.0, 교반속도는 190 rpm으로 하여 3일간 배양하였다. 이때, 배양중 pH는 조절하지 않았다. 발효조 배양은 종배양액을 배지부피가 3L인 5L 발효조(한국발효기(주))에 접종하여 pH는 발효 전과정 동안 5.0으로 일정하게 조절하였고, 용존산소 농도는 배양초기에는 충분히 유지시키다가 일정 균체 농도가 되는 시점 부터 통기량을 1.0 vvm으로 하고 교반속도(100~500 rpm)를 조절하여 0.5~1.0% 정도로 유지하여 xylose가 완전히 소모될 때까지 배양하였다.

분석방법

Xylose와 xylitol의 농도는 Sugar-Pak I column이 장착된 HPLC(Shimadzu C-R7A, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 물을 사용하였고, 온도는 90°C 이고, 유속은 0.5 ml/min이었다. 균체농도는 탁도계를 이용하여 600 nm에서 현탁도를 측정하여 미리 측정된 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다. 용존 산소농도는 Ingold사(Swiss, polarographic type)의 용존산소 전극을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

질소원이 xylitol 생산에 미치는 영향

Xylose 50 g/l, 질소원 5 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.4 g/l로 구성된 발효배지에서 여러가지 질소원

Table 1. Effect of various nitrogen sources on xylitol production

Compound	Specific growth rate (hr ⁻¹)	Cell concentration (g/l)	Xylitol concentration (g/l)	Xylitol productivity (g/l-hr)
Inorganic Nitrogen				
NH ₄ Cl	0.155	5.82	5.3	0.07
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.160	5.72	13.5	0.19
NH ₄ NO ₃	0.245	7.34	13.0	0.18
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.182	6.21	9.2	0.13
NH ₄ HCO ₃	0.174	6.11	9.7	0.13
Organic Nitrogen				
Yeast extract	0.455	7.43	28.2	0.39
Yeast nitrogen base	0.497	9.54	25.3	0.35
Malt extract	0.286	7.50	8.6	0.12
Pepton	0.130	6.92	27.2	0.38
Trypton	0.407	7.32	27.6	0.38
Soybean flour	0.427	6.51	4.0	0.06
Corn steep liquor	0.357	9.82	6.2	0.09

이 xylitol 생산에 미치는 영향을 살펴보았다. Table 1에서 보듯이, 최종 균체농도 및 비증식속도는 무기질소원 중에서는 NH₄NO₃이 가장 좋았고 유기질소원 중에서는 yeast nitrogen base가 가장 좋았다. 그러나, 최종 xylitol 농도 및 생산성은 무기질소원 중에서는 (NH₄)₂SO₄가 가장 좋았고 유기질소원 중에서는 yeast extract가 가장 좋았다.

Xylitol의 생산성이 가장 좋은 질소원인 yeast extract를 선택하여 yeast extract의 농도가 xylitol 생산에 미치는 영향을 플라스크 실험에서 수행하였다(Fig. 1). Yeast extract의 농도가 증가할수록 균체의 비증식 속도와 xylitol 생산량은 증가하였고 5 g/l 이상 농도에서는 증가 정도가 적어 최적농도를 5 g/l로 결정하였다.

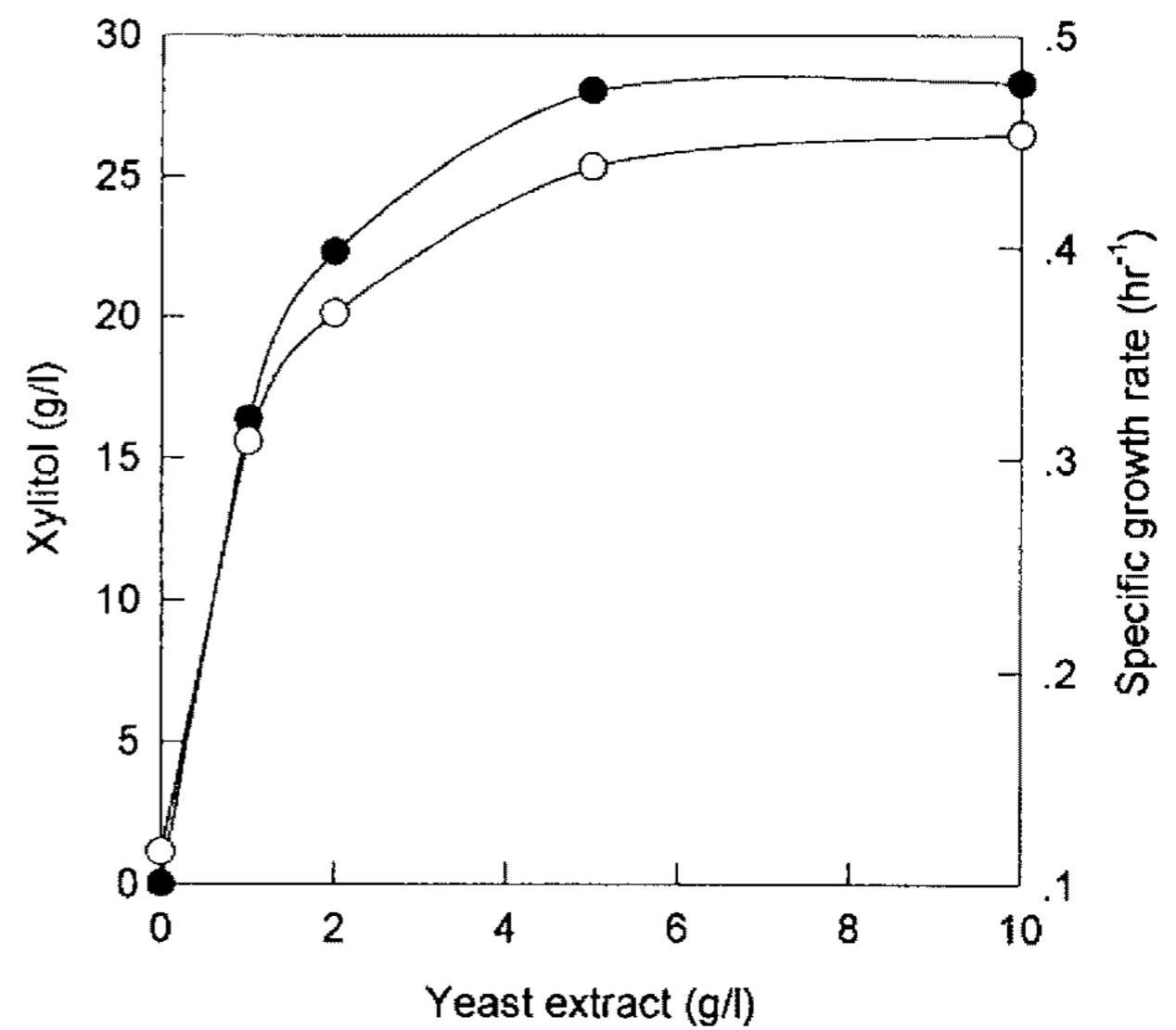


Fig. 1. Effect of yeast extract on cell growth and xylitol production.

Xylitol (●), specific growth rate (○).

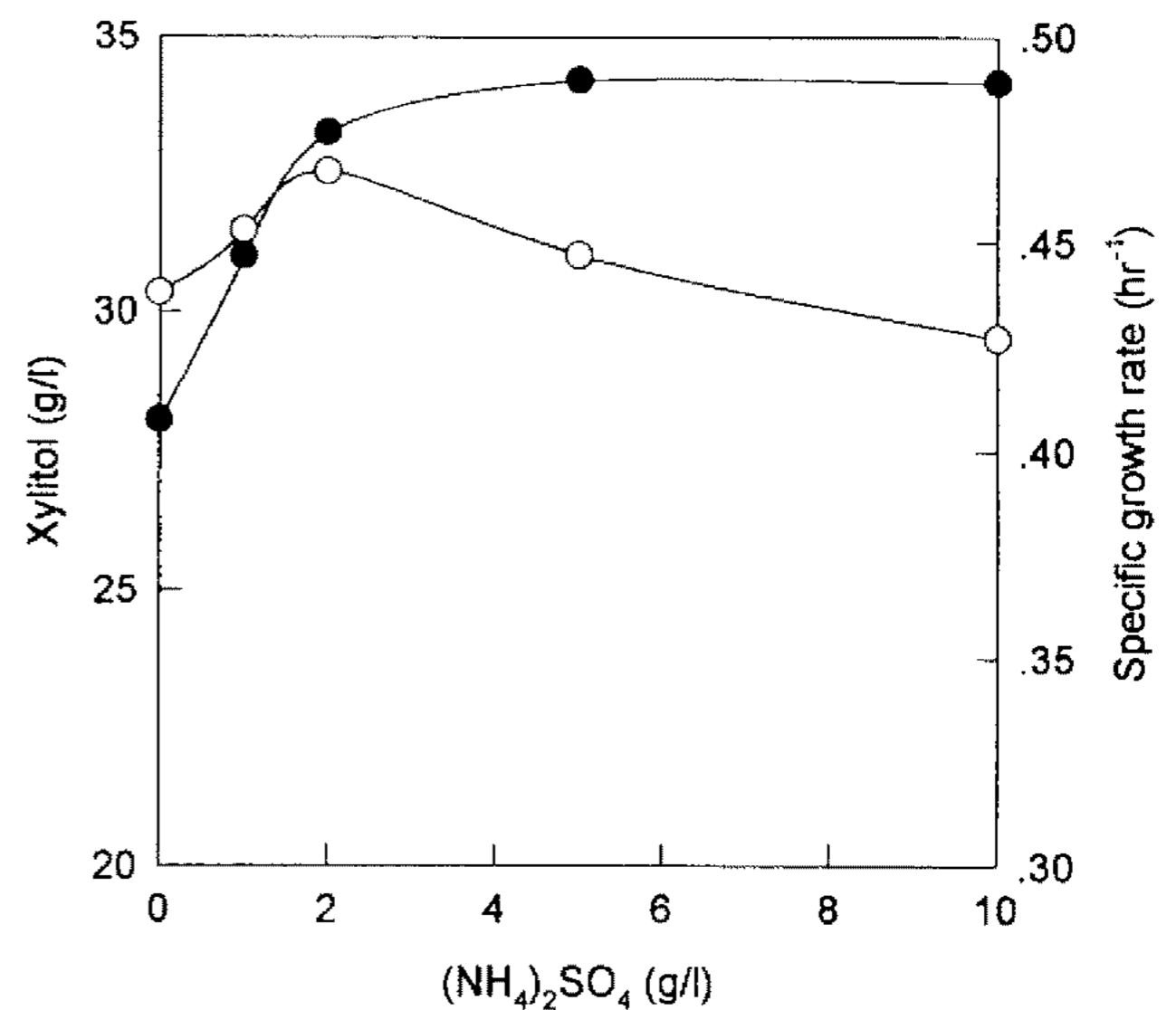


Fig. 2. Effect of ammonium sulfate on cell growth and xylitol production.

Xylitol (●), specific growth rate (○).

질소원으로 yeast extract 5 g/l에 무기 질소원인 (NH₄)₂SO₄을 첨가하여 첨가한 (NH₄)₂SO₄이 균체의 비증식 속도와 xylitol 생산에 미치는 영향을 살펴보았다 (Fig. 2). 균체의 비증식 속도는 (NH₄)₂SO₄ 2 g/l에서 최대값을 보여 5 g/l보다 크게 나타났으나 두 경우의 균체농도를 시간 차이로 환산하면 발효시간 2시간 이내로 큰 차이가 없었다. 그러므로 (NH₄)₂SO₄의 최적농도는 xylitol 생산량을 기준으로 선정하여 5 g/l로 결정하였다.

무기염이 xylitol 생산에 미치는 영향

*C. parapsilosis*의 경우 xylose를 xylitol로 전환하는 효소인 xylose reductase의 조효소로 NADPH가 관여하므로 phosphate는 xylitol 생산에 필수적인 인자이다 (20). xylose 50 g/l, yeast extract 5 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.4 g/l로 구성된 발효배지에서 phosphate의 농도가 xylitol 생산에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 3에서 나타난 것처럼, 균체의 비증식 속도는 KH₂PO₄의 농도가 2 g/l에서 최대값을 보였으나, xylitol의 생성량은 KH₂PO₄의 농도가 5 g/l까지는 급격히 증가하였고 그 이상에서는 큰 차이를 보여주지 않아 최적 KH₂PO₄의 농도는 5 g/l로 하였다.

*Pichia stipitis*의 경우 저농도의 magnesium은 xylitol의 생산을 촉진시키고 고농도의 magnesium은 ethanol의 생산을 촉진시킨다는 보고가 있다(18). 그러나, *C. parapsilosis*의 경우 실험결과 magnesium을 첨가하지 않았을 때 오히려 xylitol이 최대로 생산되어 37 g/l를 보여주었고 magnesium의 농도가 증가 할수록 xylitol의 생산이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 균체의 비증식 속도는 magnesium의 농도가 증가 할수록 현저히

증가하여 0.6 g/l에서 최대값 0.48 hr⁻¹을 보여주었다. Magnesium을 첨가하지 않은 배지에서는 균체의 비증식 속도가 현저히 감소하여 xylitol의 생산성이 떨어지므로 생산의 최적조건은 magnesium의 xylitol의 생산 저해 정도가 비교적 적은 0.2 g/l로 선정하였다.

최적배지에서의 xylitol 생산

일반적으로 xylitol 생산에 많이 사용하는 xylose 50 g/l, yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, peptone 10 g/l로 구성된 YMP 배지(yeast extract-malt extract-peptone)를 사용하여 발효조로 배양하여 균체농도가 3 g/l되는 시점에서 용존 산소농도를 0.5~1.0%로 조절

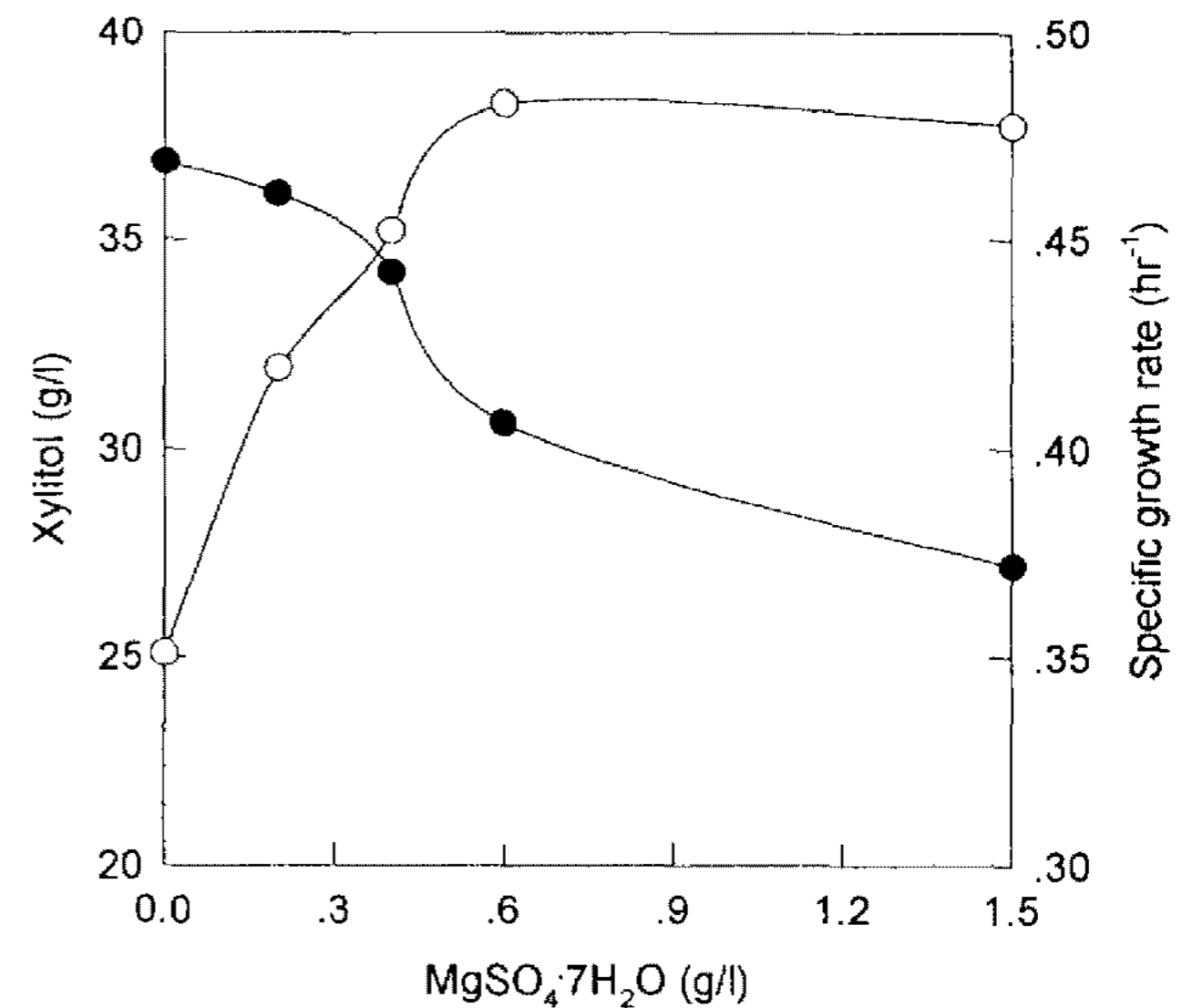


Fig. 4. Effect of magnesium sulfate on cell growth and xylitol production. Xylitol (●), specific growth rate (○).

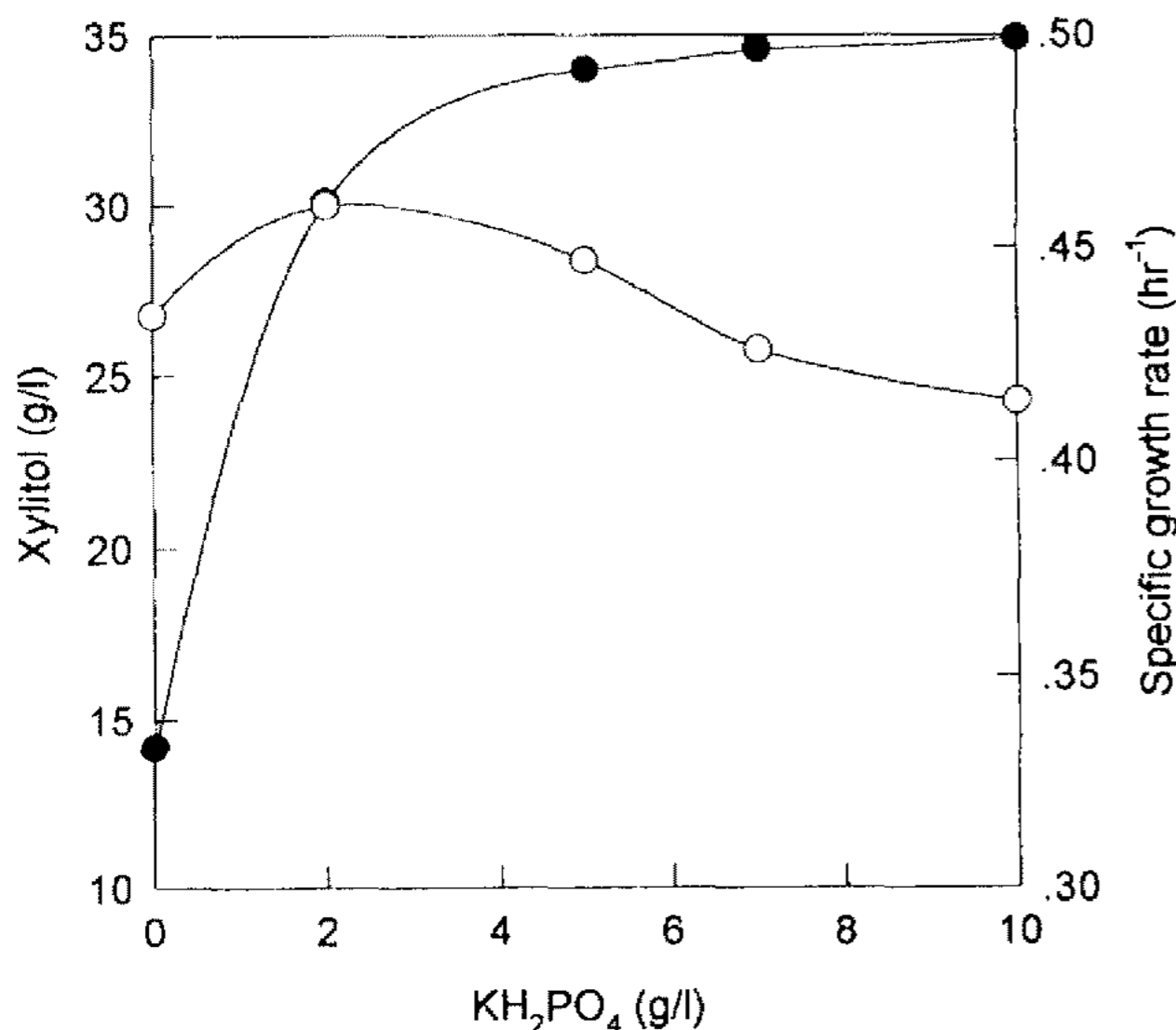


Fig. 3. Effect of potassium diphosphate on cell growth and xylitol production. Xylitol (●), specific growth rate (○).

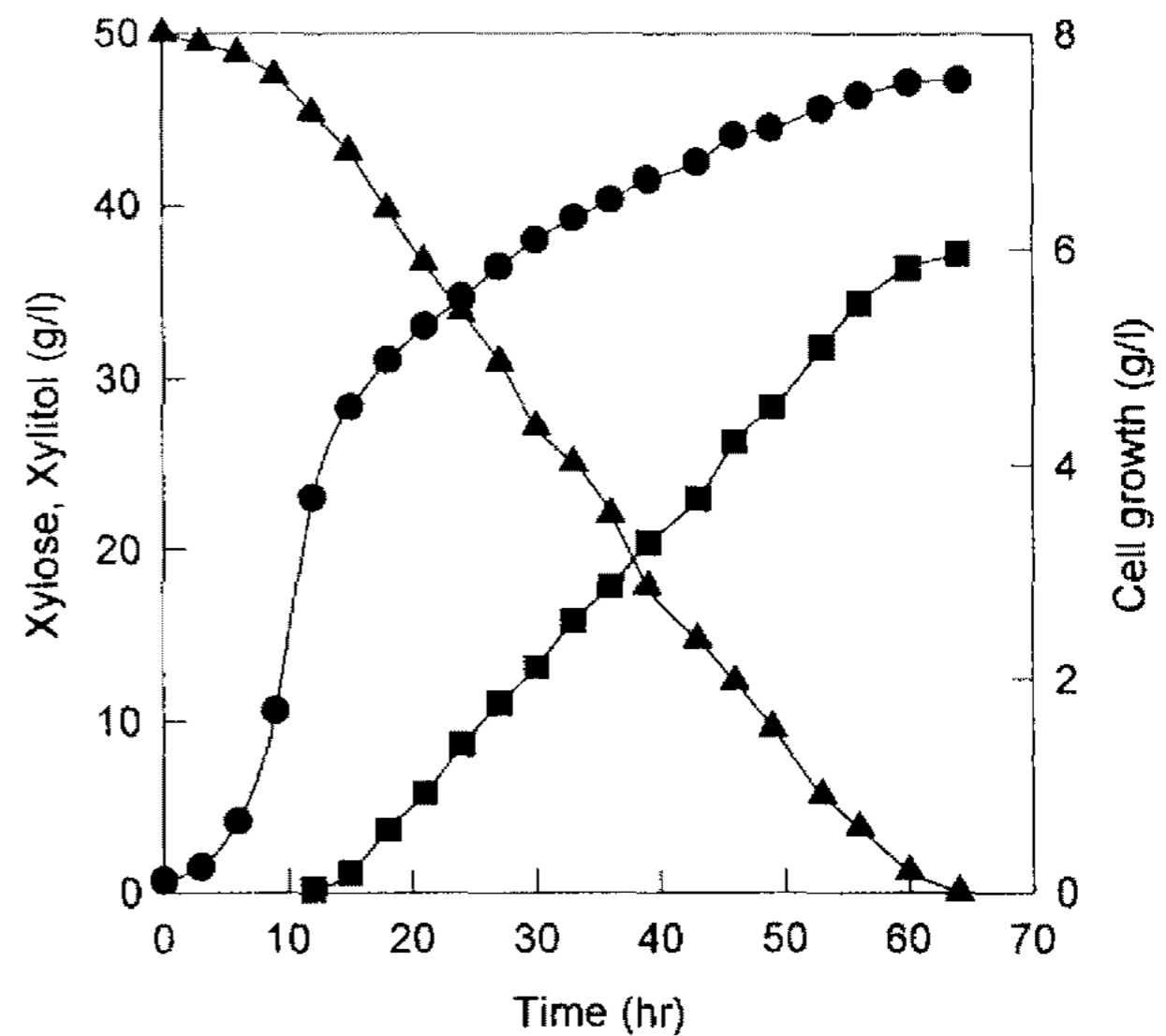


Fig. 5. A typical time course of xylitol fermentation in a fermentor by using optimal medium. Cell growth (●), xylose (▲), and xylitol (■).

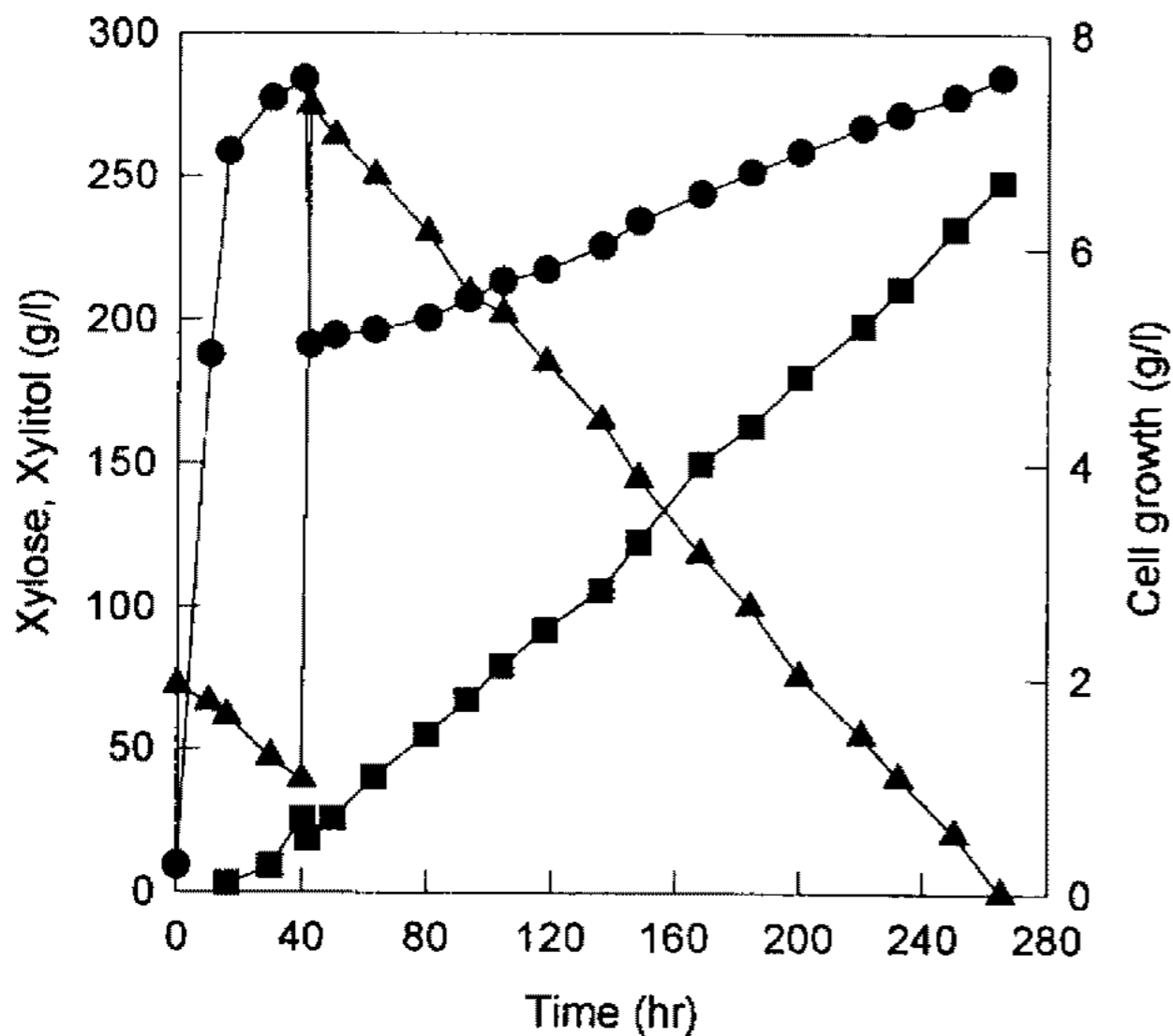


Fig. 6. Xylitol production from 300 g/l of xylose by *Candida parapsilosis* ATCC 22019 mutant. Cell growth (●), xylose (▲), and xylitol (■).

하였으며 배양한 결과 72시간에서 xylose가 모두 소모되었으며 24 g/l의 xylitol이 생성되었다. 이것과 비교하여 최적배지로 xylose 50 g/l, yeast extract 5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l, KH_2PO_4 5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l로 선정하여 같은 방법으로 발효조를 작동하였다(Fig. 5). Xylose는 64시간에 모두 소모되었으며 최종 균체농도는 7.6 g/l이었다. 최종 xylitol 생산량은 37 g/l(xylose로부터 xylitol의 전환수율 74%에 해당) 얻었고 xylitol 생산성은 0.58 g/l-hr를 얻었다. 이것은 YMP배지에 비하여 약 1.5배 증가한 결과이다.

최적배지에서 고농도의 xylose 배지에서 xylitol의 생산을 시도하였다. 배양초기에는 150 g xylose가 첨가된 2L 배양액으로 배양하였고, 균체농도가 5 g/l되는 시점에서 용존산소를 조절하였으며 배양시간 40시간에서 750 g의 xylose를 첨가하여 최종 배양액이 3L가 되게 하는(총 첨가된 xylose 농도는 300 g/l에 해당) 유가식 배양을 수행하였다(Fig. 6). 배양 결과 265시간에서 xylose를 모두 소모하였으며 xylitol의 생산량은 248 g/l이었고, xylose로부터 xylitol의 생산수율은 82.7%이었고 xylitol 생산성은 0.94 g/l-hr를 얻었다. 고농도의 xylose에서 xylitol 생산수율이 높은 것은 고농도일수록 xylose에 대한 균체 수율의 감소되기 때문이다. 즉, xylose의 균체수율은 50 g/l일 때 0.17 임에 비하여 고농도인 300 g/l의 경우 균체수율은 0.03이었다. 300 g/l의 xylose에서의 xylitol의 생산성이 0.94 g/l/h로 50 g/l의 xylose에서의 생산성 0.58 g/l/h보다 증가하였는데 이는 기질의 농도가 높을수록 전체 배양시간중 xylitol을 생성하지 않는 균체성장기가 차지하는 비율이 짧아지기 때문이다. 기질을 xylose로 하여 xylitol을 생성한 경우 문헌보고 최고수준은 *Candida guilliermondii*를 사용하

여 배양시간 406에서 300 g/l의 xylose로부터 221 g/l의 xylitol을 생성(생산수율 73.7%)하였고 xylitol 생산성은 0.54 g/l-hr를 얻었다(7). *C. parapsilosis* ATCC 22019 돌연변이주를 사용한 발효의 경우 *C. guilliermondii*를 사용한 경우보다 배양시간도 141시간 단축되었고 발효농도가 27 g/l 증가하였고 xylitol 생산성도 1.7배 증가한 결과를 보여주었다. 최근에는 농축된 *Candida* sp. L-102 균체를 사용하여 114 g/l의 xylose로부터 100 g/l의 xylitol을 65시간에 생성한 보고가 있다(15).

요 약

Candida parapsilosis ATCC 22019 돌연변이주를 사용하여 xylitol 생산에 영향을 주는 배지성분의 최적화를 수행하였다. Xylose 50 g/l 배지에서 여러 가지 질소원이 xylitol 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과 xylitol 생산에는 무기질소원으로는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 좋았으며 유기질소원으로는 yeast extract가 가장 좋았다. 무기염으로 KH_2PO_4 와 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 선정하여 최적화를 수행하였고 그 결과 최적배지로 xylose 50 g/l, yeast extract 5 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g/l, KH_2PO_4 5 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/l로 결정하였다. 최적배지를 사용하여 발효조에서 64시간 배양하였을 때 xylose는 모두 소모되었으며 최종 균체농도와 xylitol 생산량은 각각 7.6 g/l와 37 g/l을 얻었다. 이때, xylose로부터 xylitol의 전환수율 74%이었고, xylitol의 생산성은 0.58 g/l-hr이었다. 최적배지에서 총 첨가된 xylose 농도를 300 g/l로 하여 배양시간 265시간에서 최종 xylitol의 생산량은 248 g/l 얻을 수 있었고, 이것은 xylose에 대한 xylitol의 생산수율 80.7%에 해당되었고 xylitol의 생산성은 0.94 g/l-hr에 해당되었다.

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**: 367-370.
2. Pepper, T. and Olinger, P.M. 1988. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technol.* **10**: 96-106.
3. Emodi, A. 1978. Xylitol: Its properties and food applications. *Food Technol.* **32**: 20-32.
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, 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 *Enterbacter 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. Tuzaki. 1988. Production of xylitol from D-xylulose by *Mycobacterium smegmatis*. *J. Ferment. Technol.* **66**: 33-36.
13. Roberto, I.C., S. Sato, I.M. de Mancilha and M.E.S. Taqueda. 1995. Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. *Biotechnol. Lett.* **17**: 1223-1228.
14. Vongsuvanlert, V. and Y. Tani. 1989. Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii* (Kloeckera sp.) No. 2201. *J. Ferment. Bioeng.* **67**: 35-39.
15. Jean, L., L.B. Tsai, C.S. Gong and G.T. Tsao. 1995. Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida* sp. L-102. *Biotechnol. Lett.* **17**: 167-170.
16. Kossaczka, Z., E. Machova and A. Vojtkova-Lepiskova. 1991. D-xylose metabolism in *Aureobasidium pullulans*: effects of aeration and vitamins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 375-378.
17. Lee, H., A.L. Atkin, F.S. Barbosa, D.R. Dorscheid and H. Schneider. 1988. Effect of biotin limitation on the conversion of xylose to ethanol and xylitol by *Pachysolen tannophilus* and *Candida guilliermondii*. *Enzyme Microb. Technol.* **10**: 81-84.
18. Mahler, G.F. and D.V. Guebel. 1994. Influence of magnesium concentration on growth, ethanol and xylitol production by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **16**: 407-412.
19. 오덕근, 김종화. 1996. *Candida parapsilosis*에 의한 xylitol 생성시 포도당의 영향. *한국산업미생물학회지* **24**(2): 149-154.
20. 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.

(Received 10 March 1996)