

## Candida sp.의 Catabolite Derepressed Mutant에 의한 Xylitol 생산

한 완 옥 · 서 진 호 · 유 연 우  
아주대학교 생물공학과, 서울대학교 식품공학과  
(접수 : 1997. 5. 21., 게재승인 : 1997. 10. 21.)

### Production of Xylitol by Catabolite Derepressed Mutant of *Candida* sp.

Wan-Ok Han, Jin-Ho Seo<sup>1</sup>, and Yeon-Woo Ryu<sup>†</sup>

Dept. of Biotechnology, Ajou University, Suwon, Kyonggi 442-749, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Food Science & Technology, Seoul National University, Suwon, Kyonggi 441-744, Korea

(Received : 1997. 5. 21., Accepted : 1997. 10. 21.)

In order to produce xylitol from hemicellulose hydrolysate which is widely used as a substrate, the development of strain such as catabolite derepressed mutant is required. After treatment of *Candida* sp. with EMS, GM-17 and PM-34 as catabolite derepressed mutant were isolated from *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*, respectively. Mutant GM-17 and PM-34 simultaneously assimilated xylose and glucose during the fermentation. The specific xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of mutant strains were also higher than those of wild strains in glucose medium and mixed medium of glucose and xylose. The xylitol productivity and yield of mutant GM-17 and PM-34 were improved as compared to the wild types in the mixed medium. The xylitol productivity and yield of mutant GM-17 were 0.09 g/L · hr and 0.56 g-xylitol/g-xylose, and those of mutant PM-34 were 0.21 g/L · hr and 0.52 g-xylitol/g-xylose in the mixed medium, respectively.

Key Words : *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, xylitol, xylose, catabolite derepressed mutant.

#### 서 론

자연계에 존재하는 당알콜중에서 xylitol은 미생물이나 과일·채소류에 포함되어 있으며 인체의 포도당 대사과정에서 중간 대사산물로 생성되는 천연물질이다(1,2). Xylitol은 설탕과 유사한 감미도를 가지며(3), 물에 대한 용해도가 커서 (169g/100g H<sub>2</sub>O), 용해시 36.5 cal/g의 열을 흡수하므로 청량감이 다른 당알콜류보다 뛰어나다(4). 더구나 xylitol을 0.5% 첨가했을 때 식품부패균인 *Clostridium butyrican*, *Salmonella typhi* 등의 생육을 강력하게 억제하기 때문에 식품보존제로 사용이 가능하다(5). 또한 xylitol은 insulin에 의한 혈당농도의 조절이 요구되지 않아 당뇨병 환자와 glucose-6-phosphate dehydrogenase가 결핍된 환자들에게 설탕 대체물질로의 이용이 가능하며(6), 충치 유발균인 *Streptococcus mutans*에 의해 이용되지 않아 치약, 음료수, 껌 등에 사용되고 실제로 국내에서 생산되고 있는 무설탕껌의 감미료로 사용되고 있다(7). 이러한 xylitol의 우수한 기능성에도 불구하고 용도가 한정된 이유는 경제적인 생산이 어렵기 때문인

것으로 여겨진다.

Xylitol의 생산은 식물체에서 추출할 수 있으나 원료에 xylitol의 함량이 소량이기 때문에 비경제적이며 가격도 매우 비싸게 된다. 또한 자연계의 섬유성 물질인 hemicellulose에 30~40%가 존재하는 xylose를 순수분리하여 xylose로 부터 화학적으로 수소화 반응을 시켜 생산할 수 있으나 고압과 고온에서 금속촉매를 요구하고 있으며 원하지 않는 부산물들의 제거를 위한 분리·정제공정이 어려워 xylitol의 가격이 비싸게 된다(8). 따라서 발효에 의한 xylitol의 생산에 대한 연구는 처음으로 Onishi와 Suzuki(9)가 xylose 대사과정의 주요 생성물로 xylitol이 생성됨을 보고한 이후에 yeast에 의한 xylitol의 생산에 대한 많은 연구들이 이루어 졌다. 즉 *Candida* 속들 중에서 *C. pelliculosa* (10), *C. boidinii*(11), *C. guilliermondii*(12), *C. tropicalis*(13), *C. parapsilosis*(14)와 *Pichia stipitis*(15), *Pachysolen tannophilus* (16) 등이 xylitol을 생산한다고 보고되었다. 이러한 보고들에서 yeast에 의한 xylitol의 생산에서는 90% 이상의 수율과 100 g/L 이상의 최종 생성농도를 얻을 수 있고 생산성도 0.32~1.67 g/L · hr로 매우 양호한 편이다. 특히 Gong 등(13)은 높은 수율과 생산성으로 xylitol을 생산하는 *Candida tropicalis* HXP2인 변이균주를 분리하였음을 보고하였다. 따라서 현재로서는 yeasts가 공업적인 xylitol의 생산에 가장 적합한 미생물이므로 많은 연구가들이 yeasts에 의한 xylitol의 생산성, 수율 및 최종농도 증가를 위한 배지조성 및 생산조건의 최적화와 균주개량에 대한

<sup>†</sup> Corresponding Author : Department of Biotechnology, College of Engineering, Ajou University, Suwon 442-749, Korea

Tel : 0331-219-2449, Fax : 0331-216-8777

E-mail : ywryu@madang.ajou.ac.kr

많은 연구들을 수행하고 있다.

Yeasts에 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 두단계 반응이다. 그런데 hemicellulose의 가수분해 산물에는 주요 구성성분인 D-xylose 뿐만아니라 D-glucose, D-mannose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose 및 cellobiose가 혼합당으로 존재한다. 이때 대부분의 xylose를 이용할 수 있는 yeast들은 xylose의 존재하에서 xylose의 대사에 관련된 XR과 XDH가 유도되지만(17), 쉽게 대사될 수 있는 D-glucose의 존재하에서 *C. utilis* (18), *C. shehatae* (19), *P. stipitis*(19) 및 *P. tannophilus*(20) 등에서는 catabolite repression에 의하여 XR 및 XDH의 생성이 억제된다는 보고가 있다. 특히 *P. stipitis*와 *P. tannophilus*에서는 D-glucose 뿐만 아니라 D-mannose와 대사되지 않는 D-glucose 유도체인 2-deoxy-D-glucose에 의해서도 XR과 XDH의 생성이 억제된다(17,21). 이때 *P. stipitis*에서는 D-glucose에 의한 XR 및 XDH의 생성억제가 가장 크게 나타났다. 반면 *P. tannophilus*에서는 D-glucose와 D-mannose에 의한 XR 및 XDH의 생성억제 효과가 거의 유사하였으나, XDH의 생성억제가 XR 보다 더 크게 나타났으며 2-deoxy-D-glucose에 의해서는 XDH의 생성억제만이 나타났다(17).

따라서 본 연구에서는 *Candida* sp.를 이용한 hemicellulose의 가수분해 용액으로부터 xylitol 생산을 위한 균주개발을 목적으로 glucose와 xylose를 동시에 이용할 수 있는 catabolite derepressed mutant의 선별과 이 mutant들의 발효특성에 대한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 연구에서는 *C. guilliermondii* ATCC6260, *Candida parapsilosis* ATCC22019를 생명공학 연구소로부터 분양받아 사용하였다.

### 배양배지 및 배양조건

배양배지는 10 g/L yeast extract, 15 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.4 g/L MgSO<sub>4</sub>에 xylose 또는 xylose와 glucose의 혼합당을 첨가하여 사용하였다. 접종용 균주는 20 g/L xylose가 첨가된 배양배지 50 mL를 250 mL의 Erlenmeyer flask에 넣고 균주를 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 진탕배양하여 사용하였다. 진탕배양기에 의한 xylitol 발효는 50 g/L의 당이 포함된 발효배지 200 mL를 500 mL 삼각 flask에 넣고 30°C에서 150 rpm으로 진탕배양하였으며, 발효기를 이용한 xylitol 발효는 50 g/L의 당이 포함된 발효배지 1.5 L를 2.5 L 발효기 (KFC, Korea)에 넣고 30°C에서 0.3 vvm으로 통기하고 250 rpm으로 교반하면서 실험을 수행하였다.

### 돌연변이 유도

*Candida* sp.의 spores를 얻기위해서 먼저 YPD 배지에서 18 시간 배양한 후 prespore 형성배지 plate (glucose 10%, yeast extract 0.8%, pepton 0.3%, agar 2%)에 도말하여 30°C에서 24

시간 배양하였다. 이를 다시 spore 형성배지 plate (glucose 0.1%, potassium chloride 0.18%, yeast extract 0.25%, sodium acetate 0.85%, agar 1.5%)에 도말하여 30°C 배양기에서 4일간 배양한 후 4°C 냉장고에 한달 보관하였다.

돌연변이는 Ryu 등(22)의 방법으로 8% ethylmethane sulfonate (EMS)를 처리하여 유도하였다. 즉 한달간 보관한 spore 형성배지 plate에서 spore를 멸균 증류수로 수집하였다. Spore를 10 mM 2-mercaptoethanol 용액으로 30분간 처리한 후 0.5 mg/mL lyticase (100,000 unit) 용액에 4시간동안 반응시켜 vegetative cell을 파괴시켰다. Spore를 멸균증류수로 2회 세척한다음 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시킨 8% EMS을 30분간 처리하여 변이를 유도한 후에 동일 부피의 5% sodium thiosulfate를 첨가하여 변이유도를 중단시켰다.

### 우수 변이균주의 선별

변이가 유도된 spore의 현탁액을 non-fermentable 2-Deoxy-D-glucose가 함유된 변이균주 선별배지 (2-deoxy-D-glucose 1%, xylose 2%, yeast nitrogen base 0.7%, agar 2%)에 도말하여 6일간 30°C 배양기에서 배양하였다. 성장이 매우 양호한 colony를 선별한 후 네번 계대배양하여 안정화시켰다. 안정화된 변이균주들을 5 g/L glucose와 5 g/L xylose가 함유된 배양배지에서 배양하여 glucose와 xylose를 동시에 이용하는 우수 변이균주를 선별하였다.

### 효소 활성 (XR, XDH) 측정

효소용액의 준비는 발효배지에서 탄소원을 변화시켜 일정시간 배양한 후 배양액을 원심분리하여 상등액을 제거하고 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척한 후 30% 2-mercaptoethanol을 30분간 처리하였다. 다시 buffer로 3회 세척한 후 sonicator를 이용하여 cell을 파쇄한 후에 원심분리 (12,000rpm, 15min)로 상등액을 취하여 효소용액으로 이용하였다. 모든 효소용액의 준비과정은 4°C에서 수행하였다. 효소용액의 단백질 농도는 Lowry-Poline법 (23)에 의하여 측정하였으며, xylose reductase (XR)와 xylitol dehydrogenase (XDH) 활성측정은 Yokoyama 등의 방법(24)에 의하여 다음과 같이 측정하였다. XR의 활성측정은 1.0 M phosphate buffer (pH 7.0) 1 mL, 0.1 M 2-mercaptoethanol 0.2 mL, 4 mM NADPH 0.2 mL, 효소용액 2.0 mL를 넣고 기질로서 0.5 M xylose 0.2 mL를 첨가하여 반응을 시작한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 1 unit는 1분당 1 nmol NADPH가 감소하는 초기 속도로 정의하였다. 또한 XDH 활성측정은 1.0 M phosphate buffer (pH 7.0) 1 ml, 0.1 M 2-mercaptoethanol 0.2 mL, 4 mM NAD<sup>+</sup> 0.2 mL, 효소용액 2 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 nmol NADH가 생성되는 초기 속도로 정의하였다. 또한 효소의 specific activity는 unit/mg-protein로 나타내었다.

### 분석방법

균체량은 spectrometer로 620 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 당과 당알콜의 농도는 carbohydrate analysis column (Waters,

USA)을 사용하여 HPLC (Waters, USA)로 측정하였다. Ethanol의 농도는 GC (Hitachi, Japan)로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### Glucose에 의한 catabolite repression

*Candida* sp.의 xylose reductase (XR)와 xylitol dehydrogenase (XDH)의 생성유도 및 억제에 대한 현상을 알아보기 위하여 glucose와 xylose가 동시에 존재하는 배지에서 배양하여 두 기질의 배지내 농도를 측정하였다. 실험결과 Figure 1에서와 같이 *C. guilliermondii*의 경우에는 glucose가 먼저 이용되기 시작하여 18시간 배양시에 모두 소모되었으며 xylose는 6시간 배양시부터 느리게 이용하기 시작하여 56시간 배양시에 거의 모두 사용되었다. 또한 xylose는 glucose가 모두 사용된 후에 빠르게 이용되는 경향을 나타내었다. 세포성장도 XR과 XDH의 유도기간 동안에 약간의 정체시기가 배양 18시간에서 22시간 사이에 나타나는 diauxic kinetic form을 나타내고 있으며, 이때 glucose에 대한 최대 비성장속도 ( $\mu_m$ )는  $0.267 \text{ hr}^{-1}$ 로서 xylose에 대한 최대 비성장속도 ( $\mu_m$ )인  $0.026 \text{ hr}^{-1}$ 보다 약 10배 더 높았다. *C. parapsilosis*도 Figure 2에서와 같이 glucose가 먼저 이용되기 시작하여 18시간 배양시에 모두 소모되었으며 xylose는 6시간 배양시부터 느리게 이용되기 시작하여 38시간 배양시에 모두 사용되었다. 세포성장은 glucose가 주로 이용되는 18시간 배양시까지는 매우 빠르게 이루어지다가 glucose가 모두 소모된 후에는 세포성장이 느리게 진행되었다. 이와같이 *Candida* sp.들에서 종간의 차이는 있지만 사용한 두 균주 모두 glucose에 의해 xylose의 이용이 catabolite repression을 받는 것으로 나타났으며, 이는 *Candida utilis*(18), *Candida shehatae*(19) 및 *Pichia stipitis*(19), *Pachysolen tannophilus*(20)가 glucose에 의해 xylose 이용이 catabolite repression을 받는다는 보고된 결과들과 동일하였다.

Glucose의 유도체인 2-deoxy-D-glucose는 glucose와 같이 catabolite repression에 의하여 효모의 XR과 XDH의 합성을 억제한다(17, 21). 따라서 유일 탄소원으로 xylose만이 존재하는 배지

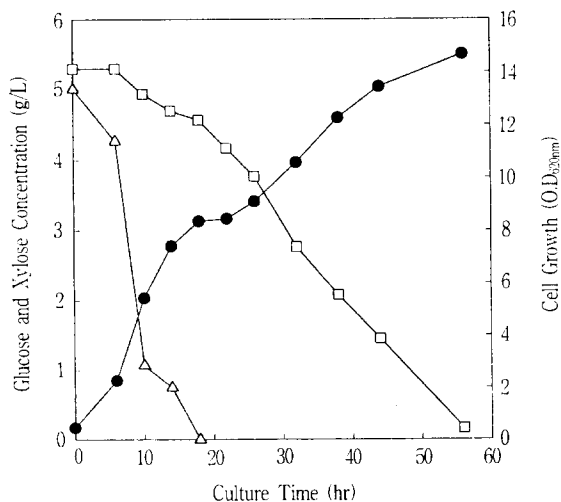


Figure 1. Profiles of cell growth(●), glucose(▲) and xylose (□) concentrations during the culture of *C. guilliermondii*.

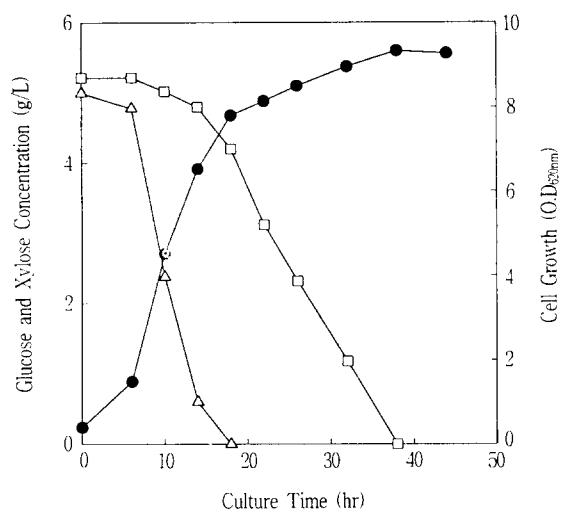


Figure 2. Profiles of cell growth(●), glucose(▲) and xylose (□) concentrations during the culture of *C. parapsilosis*.

에 2-deoxy-D-glucose를 첨가하여 효모의 성장정도로 catabolite repression에 의한 XR과 XDH의 생성억제 정도를 조사하였다. 실험결과 Table 1에서와 같이 *C. guilliermondii*는 catabolite repression에 의하여 XR과 XDH가 유도되지 않아 세포가 성장할 수 없는 2-deoxy-D-glucose의 농도는 7.5 g/L 였으며 *C. parapsilosis*는 20 g/L 였다. 이러한 결과는 glucose와 xylose의 혼합배양에서 나타난 세포성장 특성과 동일하였다.

Table 1. Effect of 2-deoxy-D-glucose on cell growth of *Candida* sp. on mutant selection plate for 10 days culture.

| Strains                       | 2-deoxy-D-glucose (g/L) |     |   |     |    |    |    |
|-------------------------------|-------------------------|-----|---|-----|----|----|----|
|                               | 0                       | 2.5 | 5 | 7.5 | 10 | 15 | 20 |
| <i>Candida guilliermondii</i> | +++                     | +   | + | -   | -  | -  | -  |
| <i>Candida parapsilosis</i>   | +++                     | +   | + | +   | +  | +  | -  |

\* Colony diameter : upper 6mm(+++), 3~5mm(++), under 2mm(+), no growth(-)

### Catabolite derepressed mutant 선별

Hemicellulose의 가수분해 산물을 원료로 발효에 의하여 xylitol를 생산하는 경우에는 원료에 glucose가 다량으로 포함되어 있기 때문에 XR의 생성이 glucose에 의해 억제되지 않는 catabolite derepressed mutant의 개발이 요구된다. 따라서 *Candida* sp.의 catabolite derepressed mutant를 선별하기 위하여 먼저 균주를 haploid 상의 포자를 형성시킨 후에 mutagen인 ethylmethane sulfonate를 처리하여 변이를 유도하였다. 변이균주는 유일한 탄소원으로 xylose가 첨가된 배지에 10 g/L의 2-deoxy-D-glucose를 첨가하여 선별하였다. Catabolite derepressed mutant로 선별된 균주는 *C. guilliermondii*에서 약 50개, *C. parapsilosis*에서 약 60개 정도를 선별하였으며, 선별한 변이균주들을 glucose와 xylose의 혼합당 배양배지에 접종하여 진탕배양한 후 세포성장이 우수하고 glucose와 xylose를 동시에 이용하는 변이균주인 GM-17과 PM-34를 각각 선별하였다. *C. guilliermondii*의 catabolite derepressed mutant인 GM-17인

경우 Figure 3에서 보듯이 배양시간에 따라 glucose와 xylose를 동시에 이용하였다. 즉 glucose는 xylose와 같이 이용되기 시작하여 18시간 배양시에 모두 소모되었으며, xylose는 배양 30시간에 모두 소모되었다. 반면 Figure 1에서 보듯이 wild type에서는 xylose가 56시간 배양 후에 모두 소모되었다. 또한 wild type에서 나타났던 diauxic form의 성장형태도 없어졌다. 따라서 변이균주 GM-17은 glucose 존재하에서도 XR과 XDH가 유도되는 catabolite derepressed mutant임을 확인할 수 있었다. *C. parapsilosis*의 catabolite derepressed mutant인 PM-34도 Figure 4에서와 같이 glucose와 xylose를 동시에 이용하기 시작하였다. 이때 glucose는 wild type보다 6시간 늦은 24시간 배양후에 모두 소모되었으며 xylose도 wild type보다 늦은 48시간 배양시에 모두 사용하였다. 따라서 변이균주 PM-34도 wild type과는 다르게 두 당을 동시에 이용하는 catabolite derepressed mutant임을 확인할 수 있었다.

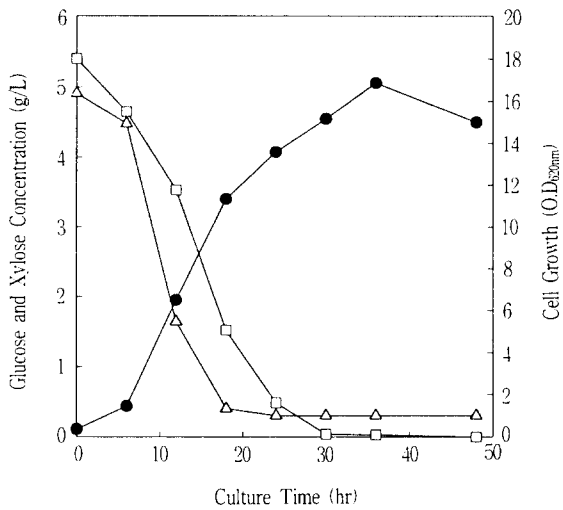


Figure 3. Profiles of cell growth (●), glucose (▲) and xylose (□) concentrations during the culture of mutant GM-17.

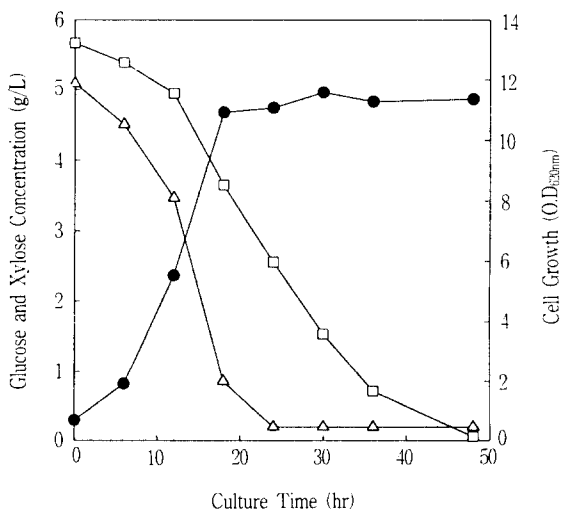


Figure 4. Profiles of cell growth (●), glucose (▲) and xylose (□) concentrations during the culture of mutant PM-34.

효소 (XR, XDH) 활성 측정

탄소원으로 10 g/L glucose가 첨가된 배지, 10 g/L xylose가 첨가된 배지, 5 g/L glucose와 5 g/L xylose가 함께 첨가된 혼합배지에서 선발한 변이균주인 GM-17, PM-34와 각각의 wild type을 배양하여 XR과 XDH의 활성을 측정하여 효소생성 정도를 검토하여 Table 2에 나타내었다. *C. guilliermondii*의 변이균주인 GM-17의 경우 glucose 배지에서 20시간 배양시에 XR의 효소 활성이 1670 unit/mg-protein으로 wild type보다 8배 더 높았으며 XDH의 활성은 4배 더 높게 나타났다. 이러한 결과로 변이균주 GM-17이 catabolite derepressed mutant임을 확인할 수 있었으며, 또한 glucose에 의한 catabolite repression이 제거됨으로서 XR 및 XDH의 활성이 높아진 것으로 사료된다. 이는 xylose와 glucose의 혼합당에서 10시간 배양시에 wild type은 glucose에 의하여 XR 및 XDH 생성이 억제되어 낮은 수준으로 유지되다가 glucose가 모두 소모되고 xylose만 존재하는 배양 20시간에서는 XR 및 XDH의 생성이 다시 증가된 실험결과로도 확인할 수 있었다. 또한 *C. parapsilosis*의 변이균주인 PM-34도 glucose 배지에서 XR과 XDH의 활성이 모두 wild type보다 크게 증가하였다. 그러나 glucose 배지에서 변이균주 PM-34의 XR과 XDH 활성이 xylose 배지에서 wild type의 XR과 XDH의 활성보다는 약간 낮았는데, 이는 변이균주 PM-34의 glucose에 의한 catabolite repression이 부분적으로 해소되었기 때문으로 사료된다. 더구나 xylose 배지와 혼합배지에서 변이균주인 PM-34의 XR 및 XDH의 활성이 wild type보다 크게 증가된 결과로부터 변이균주인 PM-34의 XR 및 XDH 생성은 xylose에 의하여 촉진되는 것으로 추정된다.

이와같이 XR과 XDH 활성측정을 통해 변이균주 GM-17과 PM-34가 catabolite derepressed mutant임을 확인할 수 있었으며, 효소생성 관점에서만 보면 선발한 catabolite derepressed mutant 균주들은 hemicellulose 가수분해 산물을 이용한 xylitol 발효에 적합한 균주로 사료되었다.

Table 2. Specific enzyme activities (unit/mg-protein) of *C. guilliermondii*, mutant GM-17, *C. parapsilosis* and mutant PM-34 in various carbon sources.

| Carbon sources         | <i>C. guilliermondii</i> |     | Mutant GM-17 |      | <i>C. parapsilosis</i> |     | Mutant PM-34 |     |
|------------------------|--------------------------|-----|--------------|------|------------------------|-----|--------------|-----|
|                        | XR                       | XDH | XR           | XDH  | XR                     | XDH | XR           | XDH |
| Glucose (20hr culture) | 200                      | 230 | 1670         | 868  | 332                    | 38  | 1108         | 135 |
| Xylose (20hr culture)  | 4443                     | 490 | 5110         | 600  | 1703                   | 155 | 4300         | 440 |
| Xyl+Glu (10hr culture) | 1333                     | 333 | 4335         | 935  | 613                    | 38  | 1682         | 327 |
| Xyl+Glu (20hr culture) | 2000                     | 650 | 4665         | 1565 | 826                    | 56  | 2485         | 309 |

Catabolite derepressed mutant에 의한 xylitol 발효

선별된 우수 변이균주인 GM-17 및 PM-34와 각각의 wild type을 xylose 배지와 glucose-xylose의 혼합당 배지에서 배양하면서 xylitol 생산을 비교하였다. *C. guilliermondii*와 변이균주 GM-17의 경우 50 g/L xylose 배지에서 xylitol의 수율과 생산이 Table 3에서 보듯이 비슷하였다. 이것은 Table 2의 효소활성 측정에서 보듯이 xylose 배지의 경우 wild type과 변이균주의

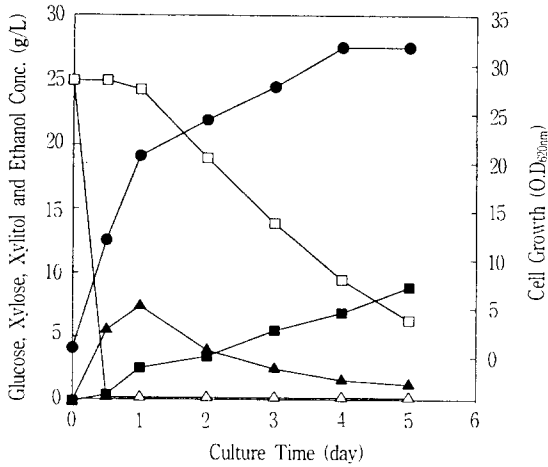


Figure 5. Profiles of cell growth (●), and glucose(▲), xylose (□), xylitol(■) and ethanol(▲) concentrations during the culture of *C. guilliermondii*.

XR 및 XDH 생성이 비슷하였기 때문에 사료된다. 이때 wild type의 xylitol 수율은 0.65 g-xylitol/g-xylose로서 Roberto 등(25)이 *C. guilliermondii* FT120037에 의해 얻은 0.68 g-xylitol/g-xylose와 비슷한 값이었으나 생산성은 보고된 0.54 g/L·hr 보다 낮은 결과를 나타내었다. 그러나 Table 4에서 보듯이 혼합당 배지인 경우에 변이균주인 GM-17의 xylitol 수율과 생산성이 0.56 g-xylitol/g-xylose와 0.09 g/L·hr로서 wild type보다 약간 향상되었으며, wild type는 Figure 5와 같이 glucose를 먼저 이용하기 시작하여 12시간 배양시에 모두 사용하였고 xylose는 12시간 배양시부터 이용하기 시작하여 배양 5일째에 6.3 g/L가 잔존하였다. 그러나 catabolite derepressed mutant인 GM-17은 Figure 6에서와 같이 glucose와 xylose를 동시에 이용하기 시작하여 glucose는 3일째에 모두 사용하고 xylose는 5일째에 4.8 g/L가 잔존하였다. GM-17이 혼합당배지에서 수율이 향상되고 발효경향이 변화한 것은 Table 2의 효소활성 측정결과에서 보듯이 혼합당에서 GM-17의 XR과 XDH 활성이 wild type보다 높고 glucose 배지에서도 XR, XDH 활성이 높은 catabolite derepressed mutant이기 때문으로 사료된다.

*C. parapsilosis*와 PM-34의 경우 50 g/L xylose 배지에서 Table 3에서 보듯이 xylitol의 수율과 생산성은 비슷하였으며, 이때 wild type의 수율은 Nolletu. 등(26)이 *C. parapsilosis* ATCC28474에 의해 얻은 수율 0.75 g-xylitol/g-xylose와 유사하였다. 그러나 xylitol 생산성에 있어서 *C. guilliermondii*나 *C. parapsilosis*에서 얻은 값은 Yahashi 등(27)이 보고한 3.26 g/L·hr의 최고 생산성과 비교하여 매우 낮은 값이다. 따라서 경제적인 xylitol 생산을 위해서는 유가식 배양이나 연속 배양을 통해 xylitol 생산성을 증가시켜야 할 것이다. 혼합당에서 *C. parapsilosis*는 Figure 7에서 보듯이 glucose는 배양 1일만에 거의 모두 소모되었으며 xylose는 배양 1일부터 이용되기 시작하여 3일째에 모두 사용되었다. Xylitol 생산은 배양 3일째에 최대 13.4 g/L였으며, 이때의 수율은 0.46 g-xylitol/g-xylose였다. *C. parapsilosis*의 catabolite derepressed mutant인 PM-34는 Figure 8에서와 같이 xylose와 glucose를 동시에 이용하기 시작하였으며 glucose의 소모속도가 느려져 배양 2일째에 모두

Table 3. Cell growth, xylitol and ethanol productions from 50 g/L xylose by *C. guilliermondii*, mutant GM-17, *C. parapsilosis* and mutant PM-34.

| Strains                  | Cell O.D (at 620nm) | Ethanol (g/L) | Xylitol (g/L) | Xylitol Yield (g/g) | P (g/L·hr) |
|--------------------------|---------------------|---------------|---------------|---------------------|------------|
| <i>C. guilliermondii</i> | 18.2                | 1.7           | 27.3          | 0.65                | 0.28       |
| Mutant GM-17             | 29.5                | 0.21          | 28.1          | 0.64                | 0.29       |
| <i>C. parapsilosis</i>   | 11.1                | 1.1           | 33.4          | 0.74                | 0.35       |
| Mutant PM-34             | 22.6                | 0             | 33.3          | 0.69                | 0.35       |

Table 4. Cell growth, xylitol and ethanol productions from 25 g/L glucose and 25 g/L xylose by *C. guilliermondii*, mutant GM-17, *C. parapsilosis* and mutant PM-34.

| Strains                  | Cell O.D (at 620nm) | Ethanol (g/L) | Xylitol (g/L) | Xylitol Yield(g/g) | P (g/L·hr) |
|--------------------------|---------------------|---------------|---------------|--------------------|------------|
| <i>C. guilliermondii</i> | 31.7                | 5.5           | 8.9           | 0.48               | 0.07       |
| Mutant GM-17             | 35                  | 3.2           | 11.3          | 0.56               | 0.09       |
| <i>C. parapsilosis</i>   | 64.4                | 7.6           | 13.4          | 0.46               | 0.19       |
| Mutant PM-34             | 56.3                | 4.9           | 15.0          | 0.52               | 0.21       |

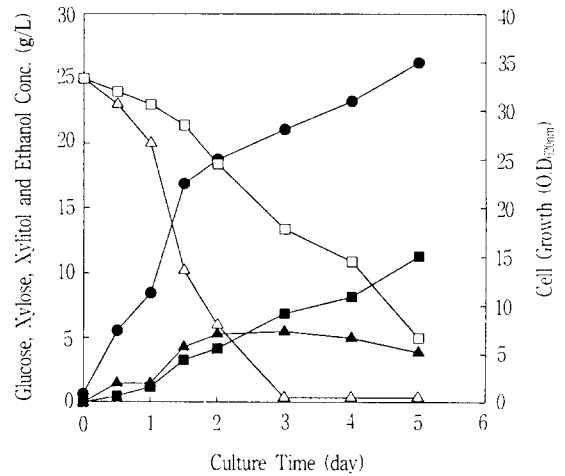


Figure 6. Profiles of cell growth (●), and glucose(▲), xylose (□), xylitol(■) and ethanol(▲) concentrations during the culture of mutant GM-17.

사용하였다. 또한 xylose는 wild type과 같은 3일째에 모두 사용하였으며 ethanol의 생성이 1일 배양시에 최대 4.9 g/L로 낮아졌다. 반면에 xylitol 생산은 3일 배양시에 최대 15.0 g/L가 된 후에 감소하기 시작하였으며, 이때의 수율은 0.52 g-xylitol/g-xylose로서 혼합당에서 최대값을 얻을 수 있었다. 혼합당에서 PM-34가 wild type보다 향상된 수율과 생산성을 나타낸 것은 Table 2에 보듯이 혼합당에서 PM-34의 XR의 활성이 wild type보다 높게 나타났기 때문으로 사료된다.

이상의 결과에서 catabolite derepressed mutant인 GM-17과 PM-34의 경우 xylose 배지에서는 xylitol 수율과 생산성이 wild type과 비슷하였으나 glucose와 xylose의 혼합당 배지에서는 향상되었다. 현재의 연구는 catabolite derepressed mutant를 이용하여 xylitol dehydrogenase defective mutant를 개발함으로써 xylose를 모두 xylitol로 전환시키고 세포성장을 위해서는

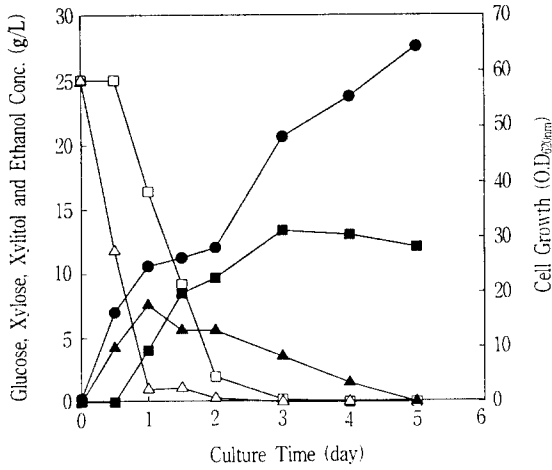


Figure 7. Profiles of cell growth(●), and glucose(▲), xylose(□), xylitol(■) and ethanol(▲) concentrations during the culture of *C. parapsilosis*.

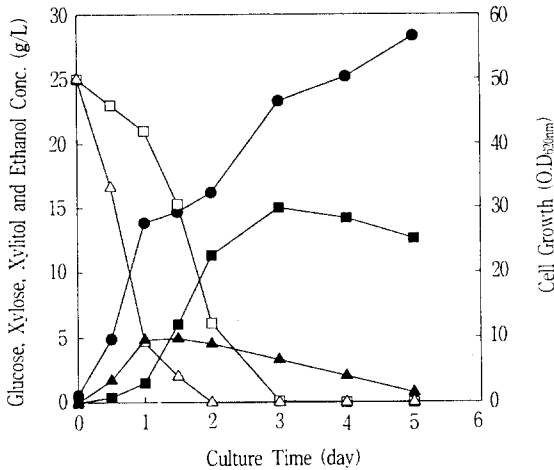


Figure 8. Profiles of cell growth(●), and glucose(▲), xylose(□), xylitol(■) and ethanol(▲) concentrations during the culture of mutant PM-34.

glucose나 다른 co-substrate를 사용하는 연구를 진행하고 있다. 이러한 균주를 개발한다면 hemicellulose의 가수분해 산물을 발효배지로 이용하여 xylitol를 생산하는 경우에 수율과 생산성을 증가시킬수 있을 것으로 기대된다.

요 약

Hemicellulose 가수분해 산물로 부터 xylitol를 생산하기 위해서는 glucose에 의한 catabolite repression에 의하여 xylose의 이용이 억제되지 않는 변이균주의 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 *Candida* sp.의 catabolite derepressed mutant의 선별과 이 변이균주에 의한 xylitol 발효에 대한 연구를 수행하였다. *Candida* sp.에 8% EMS를 처리하여 2-deoxy-D-glucose가 첨가된 선별배지에서 변이균주인 GM-17과 PM-34를 선별하였다. 선별한 변이균주는 혼합당에서 glucose와 xylose를 동시에 이용할 수 있었으며, 또한 glucose 배지와 혼합당 배지에서 XR

과 XDH의 생성이 wild type에 비하여 크게 증가한 catabolite derepressed mutants임을 확인하였다. 이 변이균주들에 의한 glucose와 xylose의 혼합당 배지에서 발효를 수행한 결과 변이균주 GM-17의 xylitol 생산성과 수율은 각각 0.09 g/L·hr, 0.56 g-xylitol/g-xylose였으며, 변이균주 PM-34는 0.21 g/L·hr와 0.52 g-xylitol/g-xylose로서 wild type 보다 향상되었다.

감 사

본 연구는 과학재단 특정연구비(과제번호 : 95-0402-05-01-3)와 일부 서울대학교 농업생물신소재연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Mäkinen, K. K. and E. Söderling (1980), A Quantitative Study of Mannitol, Sorbitol, Xylitol, and Xylose in Wild Berries and Commercial Fruits, *J. Food Sci.* **45**, 367-371.
2. Hollmann, S. and O. Touster (1957), The L-xylulose-xylitol Enzyme and Other Polyol Dehydrogenase of Guinea Pig Liver Mitochondria, *J. Biol. Chem.* **225**, 87-102.
3. 이우중, 서진호 (1995), 발효감미료의 연구현황 및 전망. *생물산업*, **8**(2), 38-43.
4. Pepper, T. and P. M. Olinger (1988), Xylitol in Sugar-free Confection, *Food Technol.* **10**, 98-106.
5. Emodi, A. (1978), Xylitol: Its Properties and Food Applications, *Food Technol.* **32**, 20-32.
6. Nigam, P. and D. Singh (1995), Process for Fermentative Production of Xylitol - a Sugar Substitute, *Process Biochem.* **30**(2), 117-124.
7. Mäkinen, K. K. (1979), Xylitol and Oral Health, *Adv. Food. Res.* **25**, 137-158.
8. Melaja, A. and L. Hämäläinen (1977), Process for Making Xylitol, U.S. Patent 4,008,285.
9. Onishi, H. and T. Suzuki (1966), The Production of Xylitol, L-arabitol and Ribitol by Yeasts, *Agric. Biol. Chem.* **30**, 1139-1144.
10. Nishio, N., K. Sugawa, N. Hayase, and N. Nagai (1989), Conversion of D-Xylose into Xylitol by Immobilized Cells of *Candida pelliculosa* and *methanobacterium* sp. HU, *J. Ferment. Bioeng.* **67**, 356-360.
11. Vongsuvanlert, V. and Y. Tani (1989), Xylitol Production by a Methanol Yeast, *Candida boidinii*(*Kloeckera* sp.) No.2201, *J. Ferment. Bioeng.* **67**, 35-39.
12. 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.
13. Gong, C. H., L. F. Chen, and G. T. Tsao (1981), Quantitative Production of Xylitol from D-xylose by a

- High-xylitol Producing Yeast Mutant *Candida tropicalis* HXP2, *Biotechnol. Lett.* **3**, 130-135.
14. 오석근, 김상용, 김정희 (1996), *Candida parapsilosis* 돌연변이주에 의한 xylitol 생산조건의 최적화, *한국농화학회지*, **39**(3), 172-176.
  15. Furlan, S. A., P. Bouilloud, and H. F. de Castro (1994) Influence of Oxygen on Ethanol and Xylitol Production by Xylose Fermenting Yeasts, *Process Biochem.* **29**, 657-662.
  16. Maleszka, R. and H. Schneider (1982), Fermentation of D-xylose, Xylitol and D-xylulose by Yeasts, *Can. J. Microbiol.* **28**, 360-365.
  17. Bicho, P. A., P. L. Runnals, J. D. Cunningham, and H. Lee (1988), Induction of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on Mixed Sugars, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(1), 50-54.
  18. Hsiao, H. Y., L. C. Chiang, P. P. Ueng, and G. T. Tdao (1982), Sequential Utilization of Mixed Monosaccharides by Yeasts, *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 840-845.
  19. du Preez, J. C., M. Bosch, and B. A. Prior (1986), The Fermentation of Hexose and Pentose Sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 228-233.
  20. Detroy, R. W., R. I. Cunningham, and A. I. Herman (1982), Fermentation of Wheat Straw Hemicelluloses to Ethanol by *Pachysolen tannophilus*, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* **12**, 81-89.
  21. Gancedo, J. and C. Gancedo (1986), Catabolite Repression Mutants of Yeasts, *FEMS Microbiol. Rev.* **32**, 179-187.
  22. 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.
  23. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
  24. Yokoyama, S., T. Suzuki, K. Kawai, H. Horitsu, and K. Takamizawa (1995), Purification, Characterization and Structure Analysis of NADPH-Dependent D-xylose Reductase from *Candida tropicalis*, *J. Ferment. Bioeng.* **79**(3), 217-223.
  25. Roberto, I. C., S. Sato, I. M. de Mancilfia, and M. E. S. Taqueda. (1995), Influence of Media Composition on Xylitol Fermentation by *Candida guilliermondii* Using Response Surface Methodology, *Biotechnol. Lett.* **17**(11), 1223-1228.
  26. Nollet, V., L. Preziosi-Belloy, and J. M. Navarro (1995), The Reduction of Xylose to Xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: Incidence of Oxygen and pH, *Biotechnol. Lett.* **17**(4), 417-422.
  27. 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), 148-152.