

## Xylitol의 생산성 향상을 위한 Two-stage Fed-batch 배양조건의 최적화

조영일, 서진호<sup>1</sup>, 유연우아주대학교 대학원 분자과학기술학과, 서울대학교 식품공학과<sup>1</sup>

전화 (031) 219-2455, FAX (031) 216-8777

## Abstract

A two-stage fed-batch fermentation was carried out to increase xylitol productivity by *Candida tropicalis*. The first stage for cell growth was performed in the pH-stat and continuous fed-batch modes. The higher cell growth and lower ethanol production obtained in the fed-batch mode where the growth medium was fed when pH of culture broth increased over 5.7. And also the effect of oxygen transfer on xylitol production was investigated by changing agitation speed under 0.5 vvm of aeration. The maximum xylitol productivity and yield were obtained at 500 rpm of agitation.

## 서론

Xylitol은 설탕과 유사한 감미도의 5탄당 알콜로서 감미도가 설탕과 비교하여 거의 유사한 수준이다<sup>1)</sup>. 충치유발균인 *Streptococcus mutans*에 의해 이용되지 않아 치아에 매우 안전하며 용해될 때 흡열하는 (-36.5 cal/g) 특성이 있어 청량감을 준다. 또한 insulin에 의한 혈당농도의 조절이 요구되지 않아 당뇨병 환자와 glucose-6-phosphate dehydrogenase가 결핍된 환자들에게 설탕 대체 물질로의 이용이 가능하며<sup>2)</sup> 식품 부패균의 생육을 저해하여 식품의 저장성을 강화시키는 기능을 갖고 있다.

본 실험에서는 xylitol 생산 균주인 *Candida tropicalis*를 고농도로 배양한 후 xylose를 첨가하는 two-stage fed-batch를 수행하여 xylitol의 생산성을 높이고자 하였다.

## 재료 및 방법

Xylitol 발효균주는 *Candida tropicalis* ATCC 20336을 사용하였으며, 접종용 균주 배양은 YPD 100 mL(Yeast extract 1%, Bacto peptone 1%, Glucose 2%)을 500 mL flask에서 30°C, 200 rpm으로 13시간동안 배양하였다. 발효조는 3.3 L 발효조(Bioflo III, NBS, USA)를 사용하였으며, 초기의 working volume을 1.3 L로 15 g/L의 glucose와 7.5 g/L의 yeast extract가 포함된 배지를 이용하였다. Cell growth를 위한 feeding medium은 300 mL로 배양액의 최종 glucose와 yeast extract 농도가

각각 100 g/L와 40 g/L가 되도록 하였다. Growth-stage에서 통기조건은 초기 500 rpm과 1 vvm으로 시작하여 DO를 40%로 조절하였다. 배양배지의 feeding 방법은 pH-stat 방법과 continuous feeding 방법을 사용하였다. pH-stat에서는 pH가 4.6에서 떨어지는 것과 pH가 5.7에서 올라가는 것을 각각 기질공급의 신호로 하는 두가지 방법을 사용하였다. pH가 5.7에서 올라가는 것을 기질공급의 신호로 하는 방법에서는 glucose가 고갈된 상태로 pH가 올라가는 시간을 줄이기 위해 pH가 5.68에서 떨어질 때 1N NaOH가 첨가되도록 하였다. Continuous feeding 방법은 초기 당이 거의 소모되는 8 hr부터 feeding solution의 공급속도를 16 mL/h로 시작하여 매 시간 3 mL/h씩 증가하도록 하였다. Xylitol의 production-stage에서는 xylose를 powder 상태로 100 g/L가 되도록 첨가하여 주었으며, xylitol 생성에 대한 용존산소량의 영향을 보기 위해 통기는 0.5 vvm으로 고정하고 교반속도를 변화시켜 xylitol 발효를 수행하였다. 세포의 OD는 spectrophotometer를 이용하여 620 nm에서 측정하였으며, glucose의 농도는 glucose analyzer를 이용하였다. Xylose와 xylitol의 농도는 carbohydrate analysis column (Waters, USA)을 이용하여 HPLC (Waters, USA)에서 RI detector로 측정하였다.

#### 결과 및 고찰

Xylitol의 생산성을 높이기 위하여 glucose로 세포를 고농도로 배양한 후, xylose를 첨가하여 xylitol을 생산하는 two-stage fed-batch를 수행하였다. Glucose를 feeding 하는 방법은 pH-stat과 continuous feeding 방법을 이용하였다. 이 때 탄소원이 고갈되면 pH가 증가하는 것을 신호로 하여 기질이 공급되도록 하는 방법에서 최종 cell OD가 185.0으로 가장 높았고 glucose의 농도가 0.24 g/L이하로 유지됨으로써 xylitol 생성에 저해 인자인 ethanol 생성<sup>3)</sup>을 1.0 g/L로 줄일 수 있었다(Table 1). 따라서 이후의 세포배양 단계는 모두 이 방법을 이용하였다. Production-stage에서의 xylitol 생성에 대한 용존산소의 영향을 알아보았다. 최적 xylitol 생산을 위해서는 일정한 범위의 산소전달 속도를 유지하여야 하나 이는 DO를 가지고 조절하기가 어려우므로 교반속도를 이용하여 조절하고자 하였다. 통기는 0.5 vvm으로 고정시키고 교반속도를 300 rpm에서 600 rpm까지 변화시켰을 때 500 rpm에서 55.2%의 xylitol 수율과 2.19 g/L·h의 생산성으로 가장 우수함을 관찰하였다(Table 2). 300 rpm에서 500 rpm까지는 xylitol 수율이 비슷했으나 산소 공급이 제한 될 수록 세포전반의 대사 속도가 느려져 생산성이 떨어짐을 알 수 있었으며, 600 rpm에서는 세포의 대사속도는 빨라졌으나 xylitol 수율이 낮아 생산성이 떨어짐을 볼 수 있었다.

#### 요약

Xylitol의 생산성을 높이기 위해 two-stage fed-batch를 수행하였다. Glucose가 고

갈되어 pH가 5.7에서 올라가면 glucose를 공급하는 방법에서 최종세포의 OD 185.0과 최종 ethanol 농도 1.0 g/L를 얻었다. 산소전달에 대한 xylitol의 생성 영향에서는 통기량 1 vvm에서 500 rpm의 교반속도일 때 xylitol 수율 55.2%와 생산성 2.19 g-xylitol/L · h를 얻었다.

참고문헌

1. 이우중, 서진호, "발효감미료의 연구현황 및 전망"(1995), 생물산업, 8(2), 38-43
2. P. Nigam and D. Singh, "Processes for fermentative production of xylitol-a sugar substitute"(1995), Process Biochem., 30(2), 117-124
3. 김재한, 유연우, 서진호, "Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*"(1999), J. Ind. Microbiol. 22, 181-185

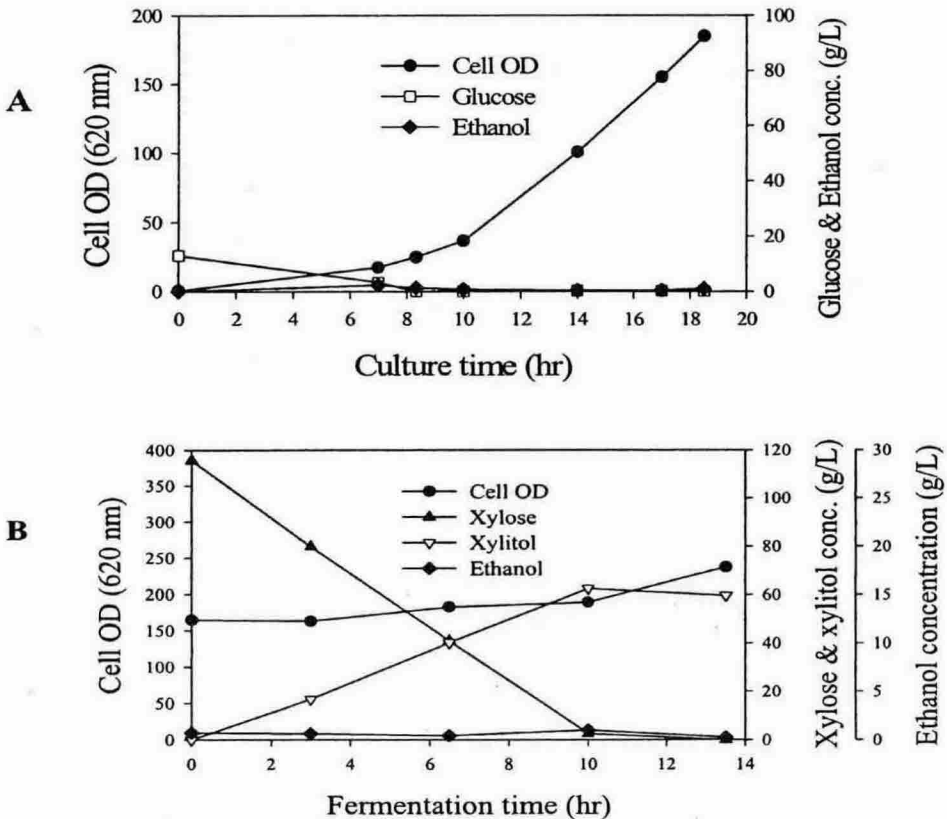


Fig 1. Figure A represents pH-stat fed-batch culture for cell growth and B is profiles of xylitol fermentation under 0.5 vvm of aeration and 500 rpm of agitation..

Table 1. Effect of substrate feeding modes on the cell growth and ethanol production in growth-stage.

Glucose feeding method	Final cell OD	Specific growth rate( $\text{hr}^{-1}$ )	Final ethanol concentration (g/L)	Culture time (hr)
pH stat (pH4.6, decreasing)	124.7	0.32	15.0	16
pH stat (pH5.7, increasing)	185.0	0.32	1.0	18.5
Continuous feeding	115.4	0.34	14.7	17

Table 2. Effect of agitation speed on the xylitol production in production-stage under 0.5 vvm of aeration.

Agitation speed(rpm)	Fermentation time(hr)	Xylitol yield (%)	Productivity (g/L · h)	Xylose consumption rate(g/L · h)
300	41.17	53.5	0.94	2.54
400	15.83	53.4	1.54	7.32
500	10	55.2	2.19	11.32
600	9	47.3	2.10	13.31