

*Candida tropicalis*의 2단계 유가식 배양에 의한 Xylitol 생산의 최적화

조영일·서진호¹·유연우*
아주대학교 대학원 분자과학기술학과, ¹서울대학교 식품공학과
(접수 : 2002. 1. 19., 게재승인 : 2002. 2. 18.)

Optimization of Xylitol Production by *Candida tropicalis* in Two-stage Fed-batch Culture

Jo, Young-Il, Jin-Ho Seo¹, and Yeon Woo Ryu*

Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea
¹Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea
(Received : 2002. 1. 19., Accepted : 2002. 2. 18.)

Two-stage fed-batch culture of *Candida tropicalis* that was designated primarily to cultivate the cell in the glucose medium (1st stage) and then produced the xylitol from xylose medium (2nd stage) was developed to improve a xylitol yield and productivity. In the growth stage, glucose was automatically supplied to the fermentor by pH-stat mode when the pH was up 5.7. When a feeding medium was added in order to reach the glucose and yeast extract concentrations up to 100 and 40 g/L, respectively, a high cell concentration and a relatively low ethanol concentration were obtained in 18.5 h culture. In the production stage, initial xylose concentration of 150 g/L was the most favorable for obtaining the final xylitol concentration and productivity. The addition of mineral salts was also enhanced a xylitol production. But the aeration rate was not significantly affected a xylitol production. When the addition of 16 g yeast extract and 232.5 g xylose powder at the production stage was used, xylitol yield and productivity were significantly increased. With these conditions, xylitol concentration, yield and productivity of 108.9 g/L, 74% and 3.3 g/L · h, respectively, were obtained in a final volume of 1.58 L. The further addition of 16 g yeast extract and 232.5 g xylose powder increased the working volume partly (1.67 L) and resulted in a relatively high xylitol concentration, yield and productivity of 193 g/L, 70% and 3.6 g/L · h, respectively.

Key Words : *C. tropicalis*, xylitol, xylose, two-stage fed-batch culture

서론

효모에 의한 xylitol의 생성에 관련된 중요한 효소는 xylose를 xylitol로 환원시키는 NAD(P)H-dependent xylose reductase (XR)와 xylitol을 D-xylulose로 다시 산화시키는 NAD-dependent xylitol dehydrogenase(XDH)이다(1,2). 이때 효모를 이용한 발효법으로 xylitol을 생산하는 경우에 원료인 xylose의 가격이 비싸기 때문에 높은 수율과 생산성이 요구되고, 또한 분리정제 비용을 낮추기 위해서는 높은 농도의 xylitol 생산이 필요하다. 그런데 회분식 배양에 의한 xylitol의 생산에서는 초기 배지에 xylose 농도가 높아야 만이 높은 농도의 xylitol을 생산할 수 있지만, 발효시간이 길어지기 때문에 생산성이 낮아진다(3). 반면에 연속식 배양에 의한 xylitol의 생산에서는 회

분식 배양에서보다 높은 생산성을 얻을 수 있지만, 회석속도가 증가함에 따라 최종 xylitol의 농도가 감소하고, 회석속도를 낮게 하면 생산성이 낮아진다(4). 또한 최근에는 xylitol 수율을 향상시키기 위하여 XDH-defective mutant(5,6)와 XR 유전자가 주입된 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*(7)에 의한 xylitol의 생산에서 수율은 95% 이상을 얻을 수 있었지만, 세포 내에서 XR의 활성유지와 co-factor인 NAD(P)H의 재생 및 기본 대사유지에 요구되는 co-substrate의 선택에 대한 문제로 최종 xylitol 농도가 약 100 g/L 정도이었다. 따라서 최근에는 유가식 배양에 의한 xylitol의 생산에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.

유가식 배양에 의한 xylitol의 생산에 대한 연구에서 Rodrigues 등(8)은 exponential feeding으로 xylose 농도를 일정하게 유지시킴으로써 *C. guilliermondii*에 의하여 sugar cane bagasse hydrolysate로부터 44 g/L의 xylitol을 0.62 g/L · h의 생산성으로 얻었다고 보고하였다. Lee 등(7)은 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 xylitol 생산에서 ethanol의 생성을 억제하기 위하여 배양액을 일정 시간마다 분석한 후에 glucose의 공급속도를 변화시키

*Corresponding Author : Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 442-749, Korea
Tel : +82-31-219-2449, Fax : +82-31-216-8777
E-mail : ywryu@madang.ajou.ac.kr

는 유가식 배양을 수행한 결과 105.2 g/L의 xylitol을 생산하였다. 또한 Yahashi 등(9)은 *C. tropicalis*를 이용한 xylitol 생산에서 glucose의 공급속도에 따른 xylitol 생산에 관한 식을 만든 후에 최적의 glucose 공급속도에서 실험을 수행한 결과 104.5 g/L의 xylitol을 생산할 수 있었다. Oh 등(10)은 *C. tropicalis* DS-72를 이용한 유가식 배양에 의하여 240 g/L의 xylitol과 5.38 g/L·h의 생산성을 얻었다고 보고하였으며, Vandeska 등(3)은 *C. boidinii*를 이용한 xylitol 생산에서 회분식 배양을 이용하여 이론 수율의 53%를 얻었으나, 유가식 배양의 경우 이론 수율의 75%를 얻을 수 있었으며, 생산성은 0.46 g/L·h로서 회분식 배양에 비해 2배로 증가하였다고 보고하였다. 또한 Choi 등(11)은 cell recycle에 의한 xylitol 발효에서 82%의 수율과 4.94 g/L·h의 생산성으로 189 g/L의 xylitol을 얻었다고 보고하였다.

유가식 배양방법 중에서 세포의 성장조건과 원하는 대사산물의 생성조건이 다르면서 생성물의 생성이 균체량에 비례하여 증가하는 경우에 2단계 유가식 배양방법을 이용하면 높은 수율과 생산성을 얻을 수 있다(12). 따라서 xylitol의 생산에서도 세포가 최대 비 성장속도로 자라는 growth stage에서는 저렴한 가격의 glucose를 기질로 하여 고농도로 세포를 성장시킨 다음에 원하는 산물을 얻는 production-stage에 xylose를 첨가하여 xylitol로 전환시키는 2단계 유가식 배양방법이 요구된다. 이는 xylose로부터 xylitol의 생성이 세포농도에 비례하여 증가하는 반면에 xylitol의 생성을 위해서는 용존산소량이 1% 이하인 microaerobic 상태를 유지시켜야 하고 세포성장을 위해서는 충분한 산소공급이 필요하기 때문이다(13). 특히 본 연구에 사용한 *C. tropicalis*는 glucose 배지에서 ethanol을 생성하는데, ethanol은 세포의 성장과 xylitol의 생산을 억제한다(14).

따라서 본 연구에서는 2단계 유가식 배양방법을 이용하여 cell growth-stage에서는 높은 농도의 세포성장과 낮은 농도의 ethanol 생성을 위한 glucose의 공급방법, yeast extract 농도를 최적화하고, production-stage에서는 xylitol 생성을 위한 mineral salts, 초기 xylose 농도, 통기조건 및 yeast extract의 영향을 검토하여 xylitol 생산을 위한 최적조건을 결정하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서는 *Candida tropicalis* ATCC 20336을 생명공학 연구소로부터 분양 받아 실험에 사용하였다.

접종용 균주의 배양

접종용 균주의 배양은 100 mL의 YPD 배지(yeast extract 10 g/L, bacto peptone 10 g/L, glucose 20 g/L)를 500 mL flask에 넣고 멸균한 후에 균주를 접종하여 30°C에서 8시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하여 사용하였으며, 접종량은 5%(v/v)로 하였다. 균주는 YPD에 20 g/L agar를 첨가한 plate에 접종하여 배양한 후 4°C에 보관하고, 4주마다 계대 배양하면서 사용하였다.

세포 배양조건 최적화

세포의 배양은 3.3 L 발효조(Bioflo III, NBS, USA)를 사용하였으며, initial working volume을 1.3 L로 하였다. 초기 glucose와 yeast extract의 농도는 각각 15 g/L과 7.5 g/L이 되도록 하였

으며, 세포배양을 위한 feeding medium은 468 g/L의 glucose와 180.8 g/L의 yeast extract가 포함된 300 mL의 배지를 모두 첨가하는 경우에 배양액의 최종 glucose와 yeast extract의 농도가 각각 100 g/L과 40 g/L이 되도록 하였다. 세포배양 동안의 용존산소량(D.O)은 500 rpm의 교반과 1.0 vvm의 통기로 시작하여 교반속도의 조절에 의하여 40%로 유지시켰다. 배양배지의 feeding은 pH-stat 방법과 continuous feeding 방법을 사용하였다. pH-stat에서는 pH가 5.7 이상으로 올라가는 것을 배지공급의 신호로 이용하였는데, 이때 배양액 내의 glucose가 고갈된 상태의 시간을 최소화하기 위하여 pH가 5.68 이하가 되면 1N NaOH가 첨가되어 생성된 유기산들이 약간만 이용되더라도 pH가 5.7 이상이 되도록 하였다. Continuous feeding 방법은 당이 거의 소모되는 8시간 배양 후부터 feeding medium의 공급속도를 16 mL/h로 시작하여 매 시간 3 mL/h씩 증가하도록 하였다. Feeding medium은 glucose와 yeast extract를 분리하여 멸균하였다. 즉 yeast extract는 pore size가 0.2 µm인 membrane filter (Gelman, USA)를 이용하여 여과멸균 하였다.

Xylitol 생산조건 최적화

Feeding medium의 공급이 끝난 시점에서 xylose를 powder 형태로 첨가하였으며, 통기 조건은 1.0 vvm과 500 rpm으로 고정시켜 microaerobic 상태로 용존산소량을 조절하였다. 초기 xylose 농도의 최적화 실험은 xylose가 100 g/L에서 300 g/L이 되도록 첨가하였으며, 최적의 초기 xylose 농도에 맞는 mineral salts에 대한 실험은 (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O를 powder 형태로 발효동안에 1~3회 첨가하였다. 통기조건에 대한 실험은 교반속도를 500 rpm으로 고정하고 0.2, 0.5, 1.0 vvm의 통기조건에서 실험을 수행하였다. 또한 yeast extract에 대한 영향은 xylose 농도 150 g/L에 대하여 10 g/L(16 g)과 20 g/L(32 g)이 되도록 powder 형태로 첨가하여 실험을 수행하였다.

분석방법

Glucose 농도는 Glucose analyzer(YSI SIDEKICK, USA)를 이용하여 측정하였다. Xylose와 xylitol을 비롯한 모든 당과 당알콜의 농도는 carbohydrate analysis column (Waters, USA)을 이용하여 HPLC (Waters, USA)에서 RI detector로 측정하였다. 배양액 중의 에탄올 농도는 flame ionization detector를 이용한 gas chromatography (Hitachi Model 263-30, Japan)로 측정하였다. 이때 사용한 column은 chromosorb W/AW (60-80 mesh)에 20% carbowax 20 M을 포화시킨 물질을 packing 한 2 mm×2.0 m stainless column을 이용하였다. 세포농도는 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 620 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도와 건조균체량의 표준곡선에 의하여 건조균체량(g/L)으로 환산하였다. 이때 *C. tropicalis*의 흡광도(OD) 1.0에 해당되는 건조균체량은 0.367 g/L이었다.

결과 및 고찰

세포배양

*C. tropicalis*에 의한 xylitol의 생산에서 고농도의 세포를 얻기 위해서는 초기 배지의 glucose 농도가 높아야 하는데, 높은 glucose 농도에서는 충분히 산소가 공급되어도 ethanol이 높은

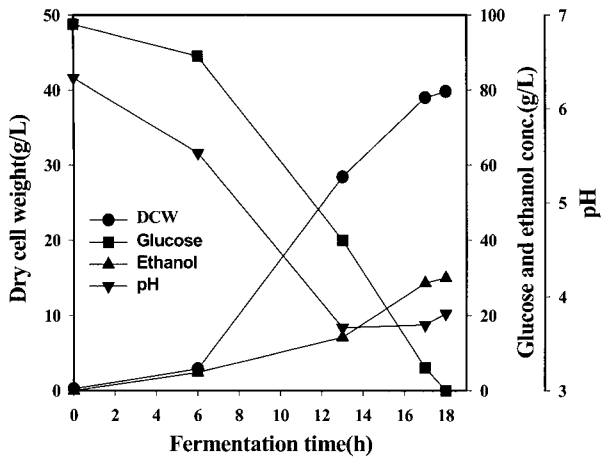


Figure 1. Profiles of cell growth, glucose and ethanol concentrations, and pH change during the batch culture of *C. tropicalis*. Dissolved oxygen concentration was maintained above 40%.

농도로 생성되므로 ethanol의 생성을 최소화시키고 높은 세포농도를 얻기 위한 세포 배양법에 대한 연구를 수행하였다.

회분식 배양을 3.3 L의 발효조에 100 g/L의 glucose와 40 g/L의 yeast extract가 포함된 배지 1.3 L을 넣고, 1.0 vvm의 통기조건에서 교반속도에 의하여 40% 이상의 D.O를 유지하면서 30°C에서 실험을 수행하였다. 질소원으로 yeast extract를 사용한 것은 Oh 등(10)의 연구에서 *C. tropicalis*의 세포성장과 xylitol 생성에 최적 질소원으로 알려졌다 때문이다. 실험결과(Figure 1)에서 glucose는 18시간 동안에 모두 소비되었고, pH는 초기 6.3에서 13시간 배양 후에 3.7까지 낮아졌다. 최대 세포농도는 40 g/L이었으며, 이때 세포 수율은 0.41 g-cell/g-glucose이고, 생산성은 2.22 g/L·h이었다. 초기 100 g/L의 glucose 농도로 인하여 ethanol 농도가 30 g/L로 세포성장과 xylitol의 생성을 억제시킬 수 있는 농도이었다(7). 이는 Kim 등(14)이 *C. tropicalis* ATCC 13803을 이용하여 초기 100 g/L의 glucose와 100 g/L의 xylose를 사용하였을 때 39 g/L의 최종 세포농도와 27 g/L의 ethanol 농도를 얻었다는 보고와 비슷한 결과이었다.

따라서 ethanol의 생성을 최대로 억제하면서 고농도의 세포를 얻기 위한 유가식 배양이 요구된다. 이를 위한 유가식 배양에서 배지의 첨가방법으로 continuous feeding과 pH-stat를 검토하였다. Continuous feeding에 의한 유가식 배양은 회분식 배양에서 당이 거의 소모되는 8시간 이후부터 feeding medium을 공급하였다. 실험결과(Figure 2)에서 feeding medium은 10시간 동안에 모두 공급되었고, 총 배양시간은 18시간이었으며, 최대 세포농도는 42.4 g/L이었다. 이때의 세포 수율은 0.42 g-cell/g-glucose이고, 생산성은 2.49 g/L·h이었다. 최대 ethanol 농도는 15.5 g/L로 회분식 세포배양보다 50% 정도 감소하였지만, 여전히 높은 농도로 축적됨을 알 수 있었다. Glucose 농도는 배지의 공급시기부터 0.1 g/L에서 2 g/L 사이로 유지되었지만, ethanol 생성이 높았다.

그래서 pH-stat에 의한 배지공급 방법에 대하여 검토하였다. 즉 당이 모두 고갈되면 pH가 상승하는 것을 신호로 배지를 공급하는 방법으로서 pH가 5.68 이하가 되면 1N NaOH가 공급되고, 당이 고갈된 후 약간의 유기산 소모로도 pH 5.7 이상이 되면 feeding medium이 첨가 되도록 하였다. 실험결과(Figure 3)에서 초기 pH가 6.8인 배양액은 3.5시간 배양에서 pH가 5.68 이

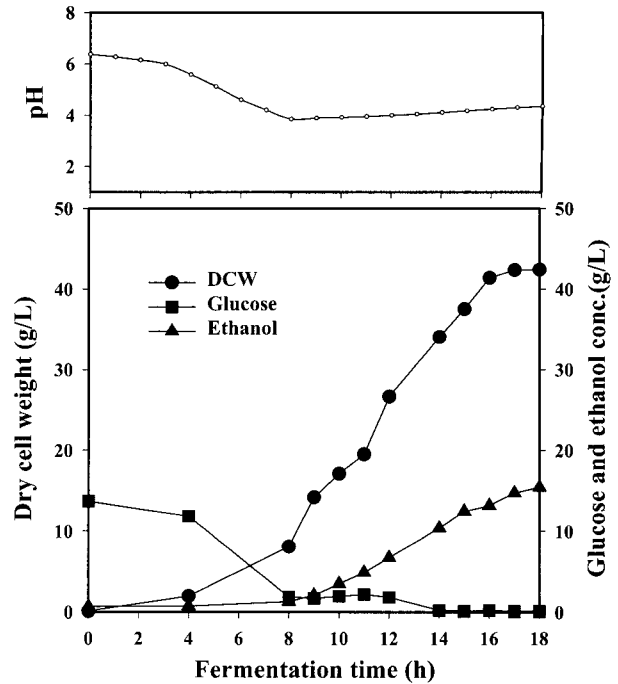


Figure 2. Profiles of cell growth, pH change, glucose and ethanol concentrations during the fed-batch culture of *C. tropicalis* by continuous feeding. Dissolved oxygen concentration was maintained above 40%.

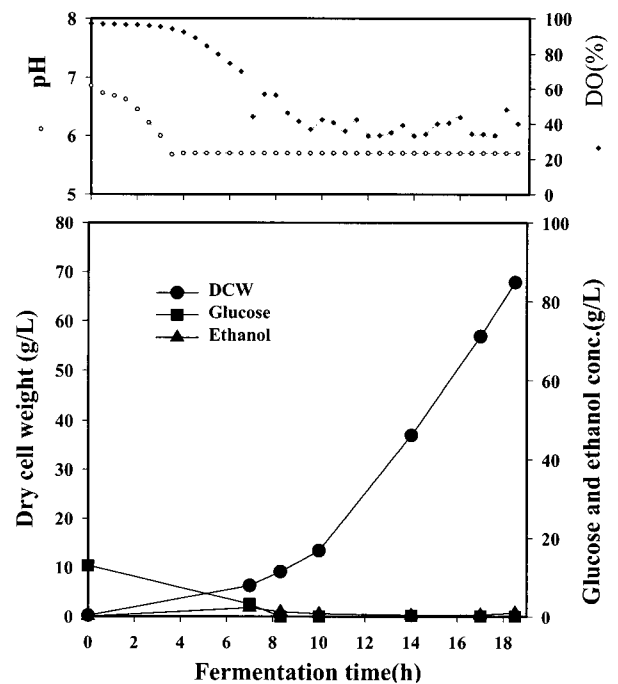


Figure 3. Profiles of cell growth, pH change, glucose and ethanol concentrations during the fed-batch culture of *C. tropicalis* by pH-stat. The feeding medium was fed when pH of culture broth increased up to 5.7 and 1N NaOH was fed when pH decreased down to 5.68. Dissolved oxygen concentration was maintained above 40%.

하가 되었으며, 배양 4시간부터 feeding medium이 공급되기 시작하였다. Glucose의 농도는 배양 7시간 이후부터 1.0 g/L 이하로 유지되었으며, 총 배양시간은 18.5 시간이었다. 이때의 최종

세포농도는 67.9 g/L로 3.67 g/L · h의 생산성을 얻을 수 있었다. 최종 ethanol 농도는 1 g/L 이하로서 세포성장과 xylitol 생성의 억제를 일으키지 않는 수준이었다. 이는 Ryu 등(12)이 *C. magnoliae* SR 101을 이용하여 100 g/L의 glucose로 pH가 떨어지는 것을 기질 공급의 신호로 하는 pH-stat을 사용하였을 때 76 g/L의 세포농도와 3.62 g/L · h의 세포 생산성을 얻을 수 있었다는 보고와 유사하였다. 따라서 production-stage의 연구를 위한 세포배양은 pH-stat에 의한 유가식 배양법을 이용하였다.

Xylitol 생성에 대한 초기 xylose 농도의 영향

Xylose의 농도는 cell growth와 xylitol 생성에 영향을 미치는데, 일반적으로 효모에서 높은 xylose 농도는 xylitol의 생성을 유도한다. Xylose의 농도가 증가할수록 ethanol의 수율은 감소하고 xylitol의 수율은 증가하여 xylitol/ethanol 생성비율이 증가하게 된다(15,16). 또한 초기 xylose 농도의 증가에 따라 substrate inhibition으로 세포성장 속도는 감소하지만 xylitol의 생성은 균주에 따라 차이를 보인다(15,17). 따라서 세포성장을 위한 유가식 배양에서 feeding medium의 공급이 끝난 시점에 xylose를 powder 형태로 100 g/L에서 300 g/L이 되도록 공급하였으며, mineral salts는 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O가 되도록 분말상태로 첨가하였다.

실험결과(Table 1)에서 초기 xylose 농도가 100 g/L인 경우에 xylitol 수율은 60%로 xylose 농도 150 g/L에서의 57% 보다 높았으나 xylitol의 최종 농도와 생산성은 150 g/L에서 각각 86.7 g/L과 2.06 g/L · h로 가장 높았다. 이러한 결과는 Gong 등(18)이 *C. tropicalis*에서 초기의 최적 xylose의 농도가 200 g/L라고 보고한 것과 Dominguez 등(19)이 *C. boindinii*의 경우 초기 xylose의 농도는 150 g/L이 가장 적합한 것으로 보고한 결과와 비슷하였으므로 초기 xylose의 첨가농도를 150 g/L로 결정하였다. 그러나 일반적으로 고농도의 xylose에서 xylitol의 생산 수율이 균체 수율의 감소보다 높다는 보고(20)와는 다르게 본 실험에서는 고농도의 xylose에서 균체의 수율도 감소하고 xylitol 생산 수율도 낮아졌다. 즉 xylitol 생산 수율은 xylose 농도 100 g/L과 150 g/L에서 큰 차이가 없으나 200 g/L과 300 g/L에서는 크게 감소하였다. 이러한 이유는 150 g/L 이상의 xylose 농도에서는 약 100 g/L

Table 1. Effect of initial xylose concentration on xylitol production in production stage

Initial xylose concentration (g/L)	100	150	200	300
Final xylitol concentration (g/L)	56.8	86.7	73.4	61.2
Xylitol yield (%)	60.0	57.0	39.2	22.7
Xylitol productivity (g/L · hr)	1.68	2.06	1.22	0.72
Cell mass yield (g-cell/g-xylose)	0.19	0.09	0.09	0.11

의 xylose가 소비된 이후부터 xylose의 소비속도가 크게 감소하기 시작하였는데, 이는 필수적인 영양소의 결핍이 원인으로 사료되기 때문에 특정한 영양소를 더 첨가하거나 발효조건을 최적화 한다면 더 높은 xylitol 수율과 생산성을 얻을 것으로 예상되었다.

Xylitol 생성에 대한 mineral salts의 영향

Mineral salts 중에 어떤 요소가 xylitol 생성에 효과가 있는지를 알아보기 위하여 flask 배양을 통하여 검토한 결과 (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄ 그리고 MgSO₄가 xylitol 생성에 positive effect를 보였다. 이는 (NH₄)₂SO₄가 production-stage에서 질소원으로 이용이 가능하고, K₂HPO₄는 *C. tropicalis*의 경우 xylose를 xylitol로 전환시키는 효소인 xylose reductase의 조효소로 NADPH가 관여하므로 phosphate가 NADPH 형성에 효과를 나타낸 것으로 보인다(21). 또한 MgSO₄는 *Pichia stipitis*의 경우 저 농도의 Mg²⁺ 이온이 xylitol 생산을 촉진시킨다는 보고와 일치하였다(22).

따라서 production-stage에서 초기 xylose 농도 150 g/L에 대한 mineral salts의 첨가 농도를 최적화 하기 위하여 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O를 분말상태로 발효기간 동안에 1, 2, 3회 첨가하면서 실험을 수행하였다. 실험결과(Table 2)에서 최종 세포농도와 production-stage 동안에 xylose를 탄소원으로 이용한 것에 대한 균체의 수율은 mineral salts의 첨가회수(첨가량)가 증가할수록 감소한 반면, 최종 xylitol의 농도는 mineral salts의 첨가량이 증가할수록 증가하였다. 즉 mineral salts의 첨가에 의하여 세포의 성장은 억제된 반면에 xylitol의 생성은 촉진되었다. 그러나 xylitol의 수율과 생산성은 mineral salts를 2회 공급한 경우에 각각 61.6%와 2.20 g/L · h로서 가장 우수하였다. 이때 2회의 mineral salt 공급에 비하여 3회의 공급에서 최종 xylitol의 농도가 더 높으면서도 xylitol의 수율과 생산성이 약간 낮은 것은 세포농도가 상대적으로 낮아 총 발효시간이 길어진 것과 세포성장이 잘 이루어지지 못하여 xylose reductase의 cofactor로 사용되는 NADPH의 재생이 빠르게 이루어지지 않았기 때문으로 사료된다. 따라서 이후의 실험에서는 xylose 150 g/L에 대하여 mineral salts를 분말상태로 2회 첨가하여 주었다.

Xylitol 생성에 대한 aeration의 영향

효모에 의한 xylose의 대사과정에서 과량의 산소가 공급되면 NADH/NAD⁺의 비율이 감소하여 생성된 xylitol의 많은 부분이 xylulose로 전환되고, 그 결과 효모의 성장속도는 증가하지만 xylitol 생성은 감소한다. 반면에 산소 공급이 제한되면 효모의 성장이 억제되고 결과적으로 xylitol 생산량도 감소한다. 따라서 xylitol 생산에서 용존산소량의 조절은 산화-환원 반응속도의 평형을 xylitol이 축적되는 방향으로 유도하여 높은 수율로 xylitol

Table 2. Effect of mineral salts feeding times on cell growth and xylitol production in production-stage

Mineral salts feeding	One time	Two times	Three times
Final cell concentration (g/L)	64.2	60.8	58.0
Cell mass yield (g-cell/g-xylose)	0.09	0.07	0.05
Final xylitol concentration (g/L)	86.7	88.1	90.1
Xylitol yield(%)	57.0	61.6	60.2
Xylitol productivity(g/L · h)	2.06	2.20	1.94

Mineral salts were composed of 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L K₂HPO₄ and 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O for one time feeding.

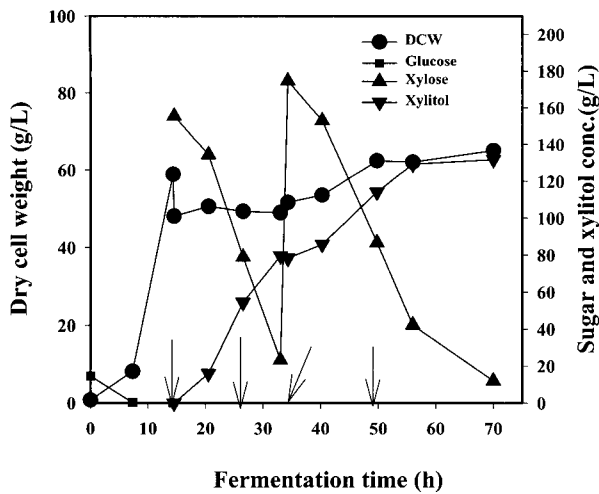


Figure 4. Profiles of cell growth and glucose, xylose and xylitol concentrations during the two-stage fed-batch of *C. tropicalis*. Agitation and aeration rate were 500 rpm and 0.5 vvm during production-stage. The arrows indicate the feeding of mineral salts.

을 생산하기 위해서 필수적인데, 낮은 농도로 용존산소량을 조절하는 것이 어려워서 production-stage 동안에 교반을 500 rpm으로 고정시키고 가장 적절한 통기조건을 찾기 위한 실험을 수행하였다. 이때 높은 농도의 xylitol을 생산하기 위하여 232.5 g의 xylose(약 150 g/L)를 powder 상태로 2회 첨가하고, mineral salts는 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 0.2 g/L MgSO₄ · 7H₂O를 분말상태로 4회 공급하였다(Figure 4)

실험결과(Table 3)에서 첫 번째 xylose의 첨가(1st feeding)에서는 통기조건에 대하여 세포성장과 xylitol 생산에 큰 차이가 없었다. 이러한 이유는 용존산소량이 모든 실험에서 0.5% 이하로써 microaerobic 상태였기 때문으로 사료된다. 그러나 두 번째 xylose의 첨가(2nd feeding)에서는 통기량의 증가에 따라 최종 세포 농도는 증가하였으나, 최대의 xylitol 농도는 0.5 vvm의 통기

조건에서 131.7 g/L를 얻을 수 있었다. 따라서 이후의 실험은 production-stage에서 교반과 통기를 각각 500 rpm과 0.5 vvm(이때의 K_La 값은 25.8 h⁻¹ 임)으로 하여 xylitol 발효를 수행하였다. 이러한 실험결과는 *C. tropicalis*에서 최대의 xylitol 수율을 위한 K_La는 29.0 hr⁻¹이고, 최대 xylitol production rate를 위한 K_La는 63.6 hr⁻¹이라는 보고(14)와는 유사하였다. 그러나 *C. guilliermondii*에서 최적 K_La가 10.6 h⁻¹이었고(23), *C. parapsilosis*에서 16.8 h⁻¹이었다는 보고(24)에 비하여 최적 K_La 값이 높았지만, *D. hansenii*(16)와 *C. tropicalis* IFO 0618(25)에서 최적 K_La 값이 각각 112.8 h⁻¹과 452 h⁻¹이었다는 보고에 비해서는 매우 낮은 결과를 보였다. 이는 배양액 내의 세포농도를 고려하지 않고 K_La를 측정했기 때문으로 사료된다. 그러나 xylitol의 수율과 생산성이 첫 번째 xylose의 첨가에 의한 결과가 두 번째 xylose를 첨가한 결과보다 더 우수하고, 두 번째 xylose의 첨가 후에 xylose의 소비가 점차로 느려지는 것으로 보아 xylitol의 수율 및 생산성 향상을 위해서는 용존산소량보다도 특정한 영양소가 요구된다고 판단되어 yeast extract의 첨가에 대한 영향을 검토하였다.

Yeast extract 첨가가 xylitol 생성에 미치는 영향

Production-stage에서 xylose를 공급하는 시기마다 yeast extract가 10 g/L 또는 20 g/L이 되도록 powder 상태로 함께 공급하여 xylitol 발효를 수행하였다. 이때 mineral salts인 (NH₄)₂SO₄, K₂HPO₄, MgSO₄는 yeast extract 내에 존재하는 양을 고려하여 공급된 양만큼을 빼고 공급함으로써 N-source와 phosphate, magnesium을 제외한 다른 영양소의 영향만을 검토하였다. 실험결과(Table 4)에서 yeast extract의 첨가에 의하여 세포농도는 증가하였으나 xylitol의 수율과 생산성은 yeast extract를 10 g/L가 되도록 첨가하였을 때에 가장 우수하였다. 즉 첫 번째 232.5 g의 xylose를 첨가한 경우에 배양액의 volume은 1.58 L이고 xylitol 농도는 108.1 g/L이 되어 수율과 생산성은 73.8%와 3.26 g/L · h이었고, 두 번째 232.5 g의 xylose를 첨가한 경우에 배양액의 부피가 1.67 L이 되었고 193 g/L의 xylitol 농도를 얻었으

Table 3. Effect of aeration rate on cell growth and xylitol production in production-stage

Aeration	Xylose feeding	Cell conc. (g/L)	Xylitol conc. (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L · h)
0.2 vvm	1st feeding	56.4	84.1	60.6	2.16
	2nd feeding	60.1	129.0	44.1	1.63
0.5 vvm	1st feeding	54.9	84.7	60.2	2.23
	2nd feeding	65.1	131.7	44.7	1.78
1.0 vvm	1st feeding	60.8	88.1	61.6	2.20
	2nd feeding	81.0	126.2	43.9	1.86

Table 4. Effect of yeast extract on cell growth and xylitol production in production-stage

Yeast extract (g/L)	Xylose feeding	Cell conc. (g/L)	Xylitol conc. (g/L)	Xylitol yield (%)	Xylitol productivity (g/L · h)
0	1st feeding	51.7	84.0	57.2 ^a	2.27
	2nd feeding	62.5	126	43.8 ^b	1.85
10	1st feeding	56.19	108.2	73.8 ^a	3.26
	2nd feeding	65.7	193.4	69.7 ^b	3.55
20	1st feeding	67.9	102.4	69.8 ^a	3.21
	2nd feeding	70.6	181.7	65.4 ^b	3.43

^a Final working volume was 1.58 L. ^b Final working volume was 1.67 L.

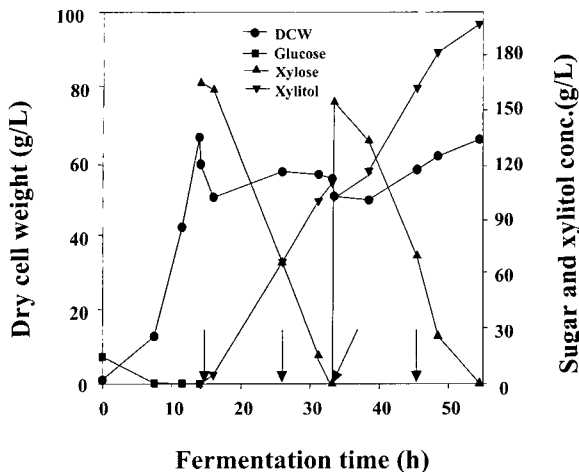


Figure 5. Profiles of cell growth, glucose, xylose and xylitol concentrations during the two-stage fed-batch culture of *C. tropicalis*. Yeast extract was added 16 g with 232.5 g xylose in two times during the production-stage. The arrows indicate the feeding of mineral salts.

며 수율은 69.7%로 감소하였지만, 생산성은 3.55 g/L·h로 증가하였다(Figure 5). 이것은 전체 발효기간 중에서 세포성장을 위한 시간이 감소하였기 때문이다. 이러한 결과는 보고된 문헌 중에 cell recycle fed-batch(11)에서의 생산성보다는 약간 낮았지만, Oh 등(10)과 Kim 등(14)이 유가식 배양에서 얻은 생산성과는 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 결론적으로 N-source와 phosphate, magnesium 외에도 yeast extract 내에는 xylitol 생성에 큰 영향을 미치는 영양요소가 있다고 판단되어 현재 이 영양소의 탐색에 관한 연구가 수행 중이다.

요 약

C. tropicalis ATCC 20336을 이용하여 높은 수율과 생산성으로 xylitol을 생산하기 위하여 glucose 배지에서 짧은 시간에 고농도로 세포를 배양한 후에 xylose를 첨가하여 xylitol로 전환하는 2단계 유가식 발효공정에 관한 연구를 수행하였다. Cell growth-stage에서의 배지공급 방법으로는 glucose가 모두 고갈된 후에 pH가 5.7 이상으로 올라가는 것을 신호로 glucose를 첨가하는 pH-stat 방법으로 18.5시간 배양에 의하여 67.9 g/L의 세포 농도를 얻었으며, ethanol 생성은 1.0 g/L로 매우 낮았다. Production-stage에서 최적의 초기 xylose 농도는 150 g/L이었으며, 이때에 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L K₂HPO₄, 0.2 g/L MgSO₄·7H₂O로 구성된 mineral salt를 2회 첨가에 의하여 xylitol의 생성이 향상되었다. 그러나 0.2 vvm에서 1.0 vvm 사이의 통기조건에서는 xylitol의 생산에 큰 영향을 미치지 못하였다. 반면에 production-stage에서 yeast extract를 10 g/L가 되도록 첨가한 경우에 xylitol 수율과 생산성이 큰 폭으로 증가하였다. 즉 xylose 농도가 약 150 g/L이 되도록 232.5 g의 xylose를 2회 첨가한 경우에 배양액의 최종 부피는 1.67 L이 되었고, 이때의 xylitol 농도는 193 g/L이었으며, 수율은 70%이고 생산성은 3.55 g/L·h이었다.

감 사

본 연구는 산업자원부 청정생산기술 사업의 연구비에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Smiley K. L. and P. L. Bolen (1982), Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachsolon tannophilus*, *Biotechnol. Lett.* **4**, 607-610.
- Han, W. O., J. H. Seo, and Y. W. Ryu (1998), Production of xylitol by catabolite derepressed mutant of *Candida* sp., *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**(1), 6-12.
- Vandeska, E., S. Amartey, S. Kuzmanova, and T. W. Jeffries (1996), Fed-batch culture for xylitol production by *Candida boidinii*, *Process Biochem.* **31**, 265-270.
- Winkelhausen, E. and S. Kuzmanova (1998), Microbial conversion of D-xylose to xylitol, *J. Ferment. Bioeng.* **86**(1), 1-14.
- Kim, M. S., C. Kim, J. H. Seo, and W. W. Ryu (2000), Enhancement of Xylitol Yield by Xylitol Dehydrogenase Defective Mutant of *Pichia stipitis*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**(2), 113-119.
- Kim, M. S., Y. S. Chung, J. H. Seo, D. H. Jo, Y. H. Park, and Y. W. Ryu (2000), High yield production of xylitol from xylose by xylitol dehydrogenase defective mutant of *Pichia stipitis*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**(4), 564-569.
- Lee, W.-J., Y.-W. Ryu, and J.-H. Seo (2000), Characterization of two-substrate fermentation processes for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene, *Process Biochem.* **35**(10), 1199-1203.
- Rodrigues D. C. G. A., S. S. Da Silva, and M. G. A. Felipe (1999), Fed-batch culture of *Candida guilliermondii* FTI 20037 for xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate, *Lett. Appl. Microbiol.* **29**(6), 359-363.
- 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**, 148-152.
- Oh, D. K. and S. Y. Kim (1997), Xylitol production from xylose by *Candida tropicalis* DS-72, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 311-316.
- Choi, J. H., K. H. Moon, Y. W. Ryu, and J. H. Seo (2000), Production of xylitol in cell recycle fermentations of *Candida tropicalis*, *Biotechnol. Lett.* **22**(11), 1625-1628.
- Ryu, Y. W., C. Y. Park, J. B. Park, S. Y. Kim, and J. H. Seo (2000), Optimization of erythritol production of by *Candida magnoliae* in fed-batch culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 100-103.
- Kim, J. H., Y. W. Ryu, and J. H. Seo (1997), Effect of environmental factors on xylitol production by *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**(5), 509-514.
- Kim, J. H., Y. W. Ryu, and J. H. Seo (1999), Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 181-185.
- Vandeska, E., S. Amartey, S. Kuzmanova, and T. W. Jeffries. 1995. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. *W. J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 213-218.

16. Roseiro, J. C., M. A. Peito, F. M. Glrio, and M. T. Amaral-Collaco (1991), The effects of oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* **156**, 484-490.
17. Nolleau, V., L. Preziosi-Belloy, J. P. Delgenes, and J. M. Navarro (1993), Xylitol production from xylose by two yeast strains: sugar tolerance, *Curr. Microbiol.* **27**, 191-197.
18. Gong, C. S., L. F. Chen, and G. T. Taso (1981), Quantitative production of xylitol from D-xylose by high xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2, *Biotech. Lett.* **3**, 130-135.
19. Domínguez, J. M., C. S. Gong, and G. T. Tsao (1997), Production of xylitol from D-xylose by *Debaryomyces hansenii*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63**, 117-127.
20. Oh, D. K. and J. H. Kim (1996), Effect of glucose on xylitol production by *Candida parapsilosis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**(2), 149-154.
21. Hahn-Hagerdal, B., H. Jeppsson, K. Skoog, and B. A. Prior (1994), Biochemistry and physiology of xylose fermentation By yeasts. *Enzyme Microbiol. Technol.* **16**, 933-943.
22. Mahler, G. F. and D. V. Guebel (1994), Influence of magnesium concentration on growth, ethanol, xylitol production by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, *Biotechnol. Lett.* **16**, 407-412.
23. Silva, S. S., I. C. Roberts, M. G. A. Felipe, and I. M. Mancilha (1996), Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor, *Process Biochem.* **31**, 549-553.
24. 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.
25. 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.