

최 증
연구보고서

농산폐자원을 이용한 기능성 감미물질 생산

Production of Functional Sweeteners
from Agricultural Residues

서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산폐자원을 이용한 기능성 감미물질 생산” 과제의
최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 26.

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 서진호

협동연구기관명 : 아주대학교

협동연구책임자 : 유연우

협동연구기관명 : 한국과학기술원

협동연구책임자 : 김정희

요 약 문

I. 제 목

농산폐자원을 활용한 기능성 감미물질 생산

II. 연구개발의 목적 및 중요성

농산 폐자원인 섬유성 물질로부터 기능성 식품 소재인 당알코올을 생물공학적으로 생산하기 위한 공정 개발이 본 과제의 최종 연구목표이다. 특히 농산 폐자원인 볏짚과 옥수수 속으로부터 높은 수율로 xylose와 glucose를 얻는 공정과 이들로부터 우수 변이균주 및 재조합 균주를 이용하여 높은 생산성으로 xylitol와 erythritol을 생산하는 생물전환 공정의 개발에 있다.

국내의 농산물 생산량은 제한되어 있으므로 전분을 이용한 감미 물질의 생산은 국제적으로 가격 경쟁이 어렵다. 따라서 국내에서도 매년 생산되면서 폐기되는 농산 폐자원을 이용하여 고부가가치의 기능성 감미료를 생산한다면 간접적으로는 농업 증산을 가져와 농업발전에 기여할 것이며, 또한 청정기술인 생물공학 기술을 활용한 기능성 감미물질의 생산기술 개발은 직접적으로 국내 식품산업체의 국제경쟁력 강화에 크게 기여할 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. Xylitol 생산균주의 개발 및 XR 유전자의 클로닝

농산폐자원의 산 가수분해 산물로부터 직접 발효에 의하여 높은 수율의 xylitol 생산을 위한 연구를 수행하였다. 이를 위하여 *Pichia stipitis* 및 *Candida* sp.를 이용한 xylitol dehydrogenas (XDH) defective mutant를 선발에 대한 연구와 NAD(P)H의 지속적인 공급과 세포성장을 위한 co-substrate 선별 및 발효조건 최적화에 대한 연구를 수행하였다. 또한 *Candida* sp.로부터 xylose reductase gene의 cloning과 이 유전자의 특성을 연구 수행하였다. 즉 이미 확보된 *Pichia stitis*의 xylose reductase(XR)와 발표된 *Candida tropicalis*의 XR 유전자 서열을 기초로 하여 oligonucleotide를 합성, PCR 기법을 이용하여 *Candida* sp.의 genomic DNA로 부터 xylose reductase 유전자를 클로닝 하였다. 또한 여러종의 *Candida*에 대한 XR 유전자들의 특성에 대한 연구도 수행하였다. 또한 Random mutagenesis에 의한 *Candida tropicalis*의 Flocculent mutant 개발, 우수한 균주를 선별하여 발효를 하였고 Flocculating agent 첨가에 의한 flocculating yeast의 xylitol 생산을 실험하였다. 개발된 균주를 이용하여 산화 환원 전극 전위와 용존산소의 상관관계와 산화 환원 전극 전위가 xylitol생산에 미치는 영향을 연구하였다.

2. Xylose로부터 생물전환에 의한 xylitol생산 공정의 최적화

기능성 감미료인 xylitol을 섬유소 가수분해물의 주성분인 xylose로부터 xylitol 생산능이 우수하다고 선별된 *Candida tropicalis* ATCC 13803을 이용하여 생산하기 위한 공정의 최적화 연구를 수행하였다. Xylitol

생산성과 수율을 동시에 높이기 위한 발효공정을 개발, 확립하였다. 세포농도를 높여 생산성을 향상시키기 위하여 초기 포도당의 농도를 높이면 그에 비례하여 부산물인 ethanol이 생산되고 이는 세포의 성장 속도 및 xylose 대사 속도를 둔화시키는 원인이 된다. 따라서 세포의 성장 및 xylitol 생산에 관련된 속도식을 이용하여 computer simulation에 의한 최적화 과정을 수행하였다.

분리 정제 공정의 효율을 높이기 위하여 는 최종 xylitol 농도가 높을수록 유리하다. 따라서 최종 xylitol의 농도를 높이기 위한 유가식 배양의 퇴축화를 수행하였다. 마지막으로 산업화를 위한 기초 자료를 마련하기 위하여 1L 실험의 재현성과 3L, 30L로 scale up 실험을 수행하였다.

3. Erythritol 생산 균주의 개발 및 야생 효모를 이용한 발효 공정 최적화

내당성이면서 높은 수율의 erythritol 생산균주의 선별하여 변이 균주를 개발하고, 개발한 변이균주에 의한 높은 생산 수율과 생산성으로 erythritol을 생산할 수 있는 최적 발효조건을 확립하였다. 즉 당알콜류는 내삼투성이 높은 균주들에서 생산되기 때문에 벌집의 꿀에서부터 균주를 분리하였으며, 분리한 균주들 중에서 erythritol의 생성이 우수한 효모를 동정하여 *Candida* sp. JH를 얻었다. 이 야생균주를 변이유도에 의하여 erythritol의 생산성과 수율이 향상된 균주로 개량하였다. 또한 erythritol 생산 수율이 매우 우수한 변이균주인 M-26을 이용한 발효조건을 최적화 하기 위한 실험을 수행하였다. 또한 야생 효모를 이용하여 포도당으로부터 부산물 없이 고수율, 고생산성으로 erythritol을 생산하는 공정을 개발, 최적화 하였다.

3. 농산 폐자원인 섬유성 물질의 전처리 공정의 최적화

섬유성 물질로부터 기능성 감미물질의 생산원료를 얻기 위해서는 첫째로 섬유성 물질로부터 lignin을 제거시키고 동시에 cellulose와 hemicellulose를 분리하기 위한 전처리 공정이 요구되며, 두번째로는 hemicellulose와 cellulose를 xylose와 glucose로 분해시키는 가수분해 공정이 필요하다. 따라서 본 연구의 최종목표인 농산 폐자원을 이용한 기능성 감미물질 생산에 관한 연구의 일환으로 농산 폐자원인 옥수수 속과 벗짚을 이용하여 xylose와 glucose를 높은 수율로 얻을 수 있는 가수분해 시킬 수 있는 전처리 공정선별에 관한 연구를 수행하였다. 또한 효소적 처리에 의한 섬유성 물질의 분해를 위하여 섬유소 분해능이 있는 균주를 선별하고 효소를 분리 정제하여 그 특성을 보았다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 고수율 xylitol 생산 균주의 개발과 발효조건 최적화

Xylitol의 대량 생산을 위하여 높은 생산 수율과 생산성으로 농산 및 임산 폐기물로부터 xylitol을 생산할 수 있는 균주의 개발과 발효조건 최적화에 대한 연구를 수행하였다. Xylitol 생산 균주인 *Candida* sp.의 xylitol reductase (XR)와 xylitol dehydrogenase (XDH)의 생성에 대한 연구결과 균주에 따라 정도의 차이는 있지만 XR과 XDH의 합성이 모두 glucose의 catabolite repression에 의하여 억제되었으며, 이를 극복하기 위하여

catabolite derepressed mutant 균주를 선발하였다. 선별한 변이균주는 혼합 당에서 glucose와 xylose를 동시에 이용할 수 있었으며, glucose 존재 하에서도 XR과 XDH의 생성이 wild-type에 비하여 크게 증가하였으며, xylitol 생산도 wild-type 보다 우수하였다. 또한 xylitol 발효를 위한 배지선정에서 질소원으로 casamino acid를 이용하는 것이 xylitol 생산 수율이 우수함을 알 수 있었다. Xylitol 발효조건에 대한 연구에서는 통기량의 증가에 따라 xylitol의 생산성은 증가하였으나 xylitol 생산 수율은 0.7 vvm에서 0.80 g-xylitol/g-xylose로 최대값을 얻을 수 있었다. Xylitol 발효에서 생산 수율을 향상시키기 위하여 XDH가 결여된 변이균주의 개발과 co-substrate의 선별에 대한 연구에서 co-substrate로서는 fructose가 이용될 수 있음을 확인하였다. 개발한 XDH defective mutant인 변이균주 CXM-1을 이용하여 100 g/L의 xylose와 100 g/L의 fructose가 포함된 발효배지에서 5일간 발효를 수행한 결과 최대 xylitol 농도는 89.0 g/L로서 xylitol 생산 수율은 0.89 g-xylitol/g-xylose 이고 생산성은 0.74 g/L-hr 였다. 또한 *P. stipitis*의 XDH defective mutant인 PXM-4를 이용하여 옥수수 속의 산 가수분해 용액을 이용한 xylitol 생산에서는 거의 100% 수율로 xylitol을 얻을 수 있었다.

나. *Candida* sp.의 XR 유전자 구조분석 및 클로닝

Candida sp.의 genomic DNA 양상을 *P. stipitis*의 XR 유전자를 probe 로 하여 분석한 결과 *C. guilliermondii*, *C. albicans*에서는 XR 유전자가 단일 copy 이거나 나머지 copy는 염기서열의 상동성이 낮은 것으로 생각된다. *C. parapsilosis*는 *P. stipitis*의 XR 유전자와 상동성이 매우 낮은 것으로 보인다. *C. tropicalis* ATCC20336의 경우 특이하게 여러 개의 band가 혼성화 되는 것으로 보아 2개 이상의 XR 유전자가 존재하는 것으로 보인다. 또한

그 밖의 *C. tropicalis*에서는 모두 1 kb의 단일 band 만이 혼성화되어 나타났다. 따라서 *C. tropicalis* ATCC20336의 XR 유전자를 클로닝하고 염기서열을 결정하였다. Southern hybridization 결과를 기초로 4.5 kb *SacI-XhoI*으로 size selected library를 제조하여 수십 개의 positive colony를 얻었으며, 이들 중에서 1개를 골라 제한효소 지도를 작성하고 그 위에 XR 유전자의 위치를 지정하였다. 지정된 XR 유전자 부분인 3개의 단편을 분리한 후 subcloning하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 BLAST와 DNASTAR 프로그램을 이용하여 보고된 *C. tropicalis*의 XR 유전자 2개와 *P. stipitis*의 XR 유전자 1개의 염기서열을 비교 분석한 결과 전사조절 부위인 TATA Box 부분과 aldose reductase cofactor 결합부위는 Ile-Pro-Lys-Ser로써 매우 잘 보존되었으나, 본 연구에서 얻은 *C. tropicalis*의 XR 유전자 (XRCTS)와 *xyrA* 또는 *xyrB*와의 상동성은 *P. stipitis*의 XR 유전자와의 상동성 보다는 높은 것으로 보아 XRCTS는 *C. tropicalis*의 *xyrA* 및 *xyrB*에 더 가까움을 알 수 있었다.

다. Flocculation mutant에 의한 xylitol 생산

*Candida tropicalis*의 사멸율이 90% 이상되는 조건으로 EMS 농도 30.0mg/ml, 반응시간을 1시간 30분으로 Flocculent mutant로 ww1, ww2, cc2 선별하였다. 선별된 Flocculent mutant를 이용하여 72시간 배양하였을 때 최종 세포 농도는 wild type이 3.7g/l, ww1이 2.3g/l, ww2 이 2.4g/l, cc2 이 2.7g/l 으로 Xylitol 수율은 wild type, ww1, ww2, cc2는 각각 0.55, 0.45, 0.50, 0.55으로 나타났다 우수한 flocculent mutant로 ww2 결정하였다.

Flocculating agent 첨가에 의한 flocculating yeast의 xylitol 생산을 위하여 7가지의 cationic salt와 5가지의 positively charged polymer의 선정 각각의 sample이 flocculation에 미치는 영향 조사하여 후보 물질 중 dosage가 가장

낮은 Zetag78을 cationic flocculant로 결정하였고 발효 배지 내에서의 flocculation 억제요인 조사하여 배지내 yeast extract가 그 저해 요인임을 밝혀내고 다른 회사 (GistBrocades) 제품인 Gistex LS ferm...powder로 대체 하였다. 또한 발효 배지내의 세포농도에 따른 flocculant 첨가량과의 상관관계 조사로 거의 직선의 관계가 있음을 확인하였다.

Flocculating yeast를 이용하여 repeated batch 공정으로 xylitol 생산하였고 그 조절 인자로 산화 환원 전극 전위가 세포생장과 xylitol생산에 미치는 영향을 연구하여 세포의 생육은 산화환원전극전위의 증가에 따라 완만하게 증가하여 100mV 일 때 8.3 g/l, 200mV일 때 12.3 g/l로 나타나고 xylitol의 생산은 100mV 까지는 비례적으로 증가하다가 그 이상에서는 감소하여 xylitol의 비생산성과 용적 생산성 모두 100mV일 때 0.16 g/g-h, 0.7 g/L-h로 최대를 나타냄을 알 수 있었다.

라. Xylose로부터 생물전환에 의한 xylitol생산 공정의 최적화

고수율, 고생산성으로 xylitol을 생산하기 위하여 xylose 대사의 중간산물로 생산되는 xylitol을 산소전달을 조절하여 세포의 성장 없이 생물전환 공정으로 생산하였다. 또한 수율과 생산성을 높이기 위하여 포도당을 이용한 세포성장으로 반응기내 세포농도를 높인 후 xylose로부터 생물전환 공정으로 xylitol을 생산하는 2단계 발효공정을 확립하였다.

2단계 발효공정에서 환경인자의 영향을 조사하여 pH6, 산소전달량은 1vvm, 500rpm ($K_{La}=1.06/\text{min}$), 초기 xylose 농도는 100g/L가 최적임을 알 수 있었다. 산소전달량이 낮을 경우 세포의 성장속도가 떨어지고 Xylitol dehydrogenas와 xylulose kinase의 조효소인 NAD⁺/NADH와 ATP의 비율이 낮아져 xylose의 세포내 흐름을 xylitol 생산으로 유도하여 높은 xylitol 생산수율을 얻을 수 있었다. 그러나 너무 낮은 산소전달

속도는 세포 전반의 대사속도를 떨어뜨려 xylose reductase의 보조기질인 NADPH의 재생산을 저해하여 생산성을 감소시켰다. 100g/L 이상의 초기 xylose 농도에서 xylose 대사속도가 떨어지는 것은 기질 저해 현상이라기 보다는 삼투압의 영향인 것으로 밝혀졌다.

세포농도를 높여 생산성을 향상시키기 위하여 초기 포도당의 농도를 높이면 그에 비례하여 부산물인 ethanol이 생산되고 이는 세포의 성장 속도 및 xylose 대사 속도를 둔화시키는 원인이 된다. 따라서 실험을 통해 얻은 ethanol 농도와 세포의 성장, xylose 생물전환 공정과의 관계식 이용하여 computer simulation으로 28g/L의 최적 포도당 농도를 구하였다. 세포의 성장단계에서 ethanol이 미치는 영향은 비성장 속도는 Luong식으로, 포도당 비소모속도와 ethanol 비생산속도는 logistic equation으로 수식화하였다. Xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도가 모두 allosteric하게 감소하고 xylitol 생산 수율이 ethanol의 농도에 영향을 받지 않은 것으로 보아 ethanol은 xylitol 생산의 특정한 효소를 저해하는 것이 아닌 세포 대사 전반의 속도를 떨어뜨리는 것으로 생각된다. 최적의 환경에서 실험한 2단계 반응의 생산성 및 수율은 각각 5.15 g-xylitol/L·hr, 0.81 g-xylitol/g-xylose 였다.

배지중 xylitol의 최종 농도를 높이기 위한 유가식 배양중 배지중의 xylose와 xylitol의 농도가 높아지면 osmotic stress에 의하여 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도가 낮아졌다. 특히 xylitol 농도의 증가에 따른 xylitol 생산 및 xylose 소모 속도의 감소가 두드러졌으며 배지중의 xylose 농도가 낮을 경우 더 큰 감소를 보였다. 배지중 xylose농도는 100g/L를 유지하는 것이 적당함을 알 수 있었다. 배지중 xylose 농도를 일정하게 유지하기 위한 주입식을 유도하고 이를 이용하여 유가식 배양을 실시한 결과 3.9 g-xylitol /L·hr의 생산성과 0.75 g-xylitol/g-xylose의

수율을 얻었고 최종 xylitol의 농도는 185g/L였다. 산업화를 위한 기초 자료를 마련하기 위하여 1L 실험의 재현성과 3L, 30L로 scale up 실험을 수행하여 성공적인 결과를 얻었다.

마. 고수율 erythritol 생산 균주의 개발과 발효조건의 확립

벌집에서부터 분리한 osmophilic yeast인 *Candida* sp. JH를 이용한 flask 배양에서 당농도 100 g/L인 경우 최대 erythritol 수율은 19.7 % 이고 생산성은 0.23 g/L-hr 이었다. 균주의 수율 향상을 위하여 야생균주를 mutation 한 후 2차에 걸친 선별과정을 통해 고농도의 당과 염에서 자랄 수 있는 삼투압 내성이 우수한 변이균주 M26을 선별하였다. 선별한 변이균주를 이용한 flask 배양에서 당농도 100 g/L인 경우에 수율은 약 25%이고 생산성은 0.30 g/L-hr로 야생균주에 비하여 크게 증가하였으며, 당농도가 200 g/L인 배지에서의 발효결과는 야생균주 보다 수율이 약 5배 높았다.

당알콜 발효배지에 염(KCl)을 첨가함으로써 발효기간 중 지속적인 water-stress를 제공하여 고농도 erythritol의 생성을 유도하는 실험을 수행한 결과 염이 있는 배지에서의 배양시 cell growth가 멈춘 후에도 erythritol의 생성이 증가되는 경향을 보였다. 염(KCl)의 최적 농도는 야생균주의 경우 20 g/L이고, 변이균주 M26의 경우는 50 g/L인 것으로 밝혀졌으며 이때의 수율 증가는 각각 1.4배, 1.1배 였으며, 생산성은 각각 0.26 g/L-hr와 0.33 g/L-hr 였다. 발효조에서의 야생효모와 변이균주 M26의 발효 최적조건을 결정하였는데 다른 조건은 flask 배양의 경우와 동일하였고 통기조건으로 0.5 vvm의 aeration과 700~800 rpm의 매우 높은 agitation이 요구되었다. 또한 배지내의 당 농도가 증가함에 따라 수율 및 생산성이 크게 증가하여 변이균주 M26의 경우 250 g/L의 glucose 배지에서 최대 수율과 생산성을 얻을 수 있었으며, erythritol 외에 다른 부산물이 생산되지 않아 분리 정제

상의 장점을 갖고 있었다. 발효조를 이용한 최적 발효조건하에서 야생효모의 경우 수율은 25.4 %이고 생산성은 0.24 g/L·hr 이었으며, 변이균주 M26의 경우는 산업화가 가능한 수준인 50.4 %의 수율로 향상되었으며, 생산성은 0.60 g/L-hr로 매우 양호하였다. 발효에 의한 erythritol 생산에 있어서 높은 삼투압에 내성인 변이균주 M26을 이용하여 산업용 발효배지에의 적용을 통한 생산성과 수율 및 최종 농도가 높을 때 산업화가 유리하다. Flask 배양에서 실험한 결과와 비교하여 발효조에 의한 회분식 배양에서는 충분한 산소의 공급에 의하여 부산물인 glycerol이 생성되지 않았으며 균체 성장속도와 erythritol의 생산수율 및 생산성 모두가 증가되는 결과를 얻었다. 교반속도를 500 rpm으로 고정하고 통기조건을 1 vvm으로 했을 때 glucose가 모두 소비되는 발효 205 시간을 기준으로 생산성은 0.7 g/L-hr 이었으며, 생산수율은 0.57 g-erythritol/ g-glucose 이고 최종 erythritol의 농도는 143.3 g/L 이었다. 산업용 발효배지로 널리 쓰이고 있는 corn steep liquor (CSL), corn steep powder (CSP), soybean meal (SbM) 등을 질소원으로 배지에 첨가한 경우에 CSP 5 g/L, CSL 1% (v/v), SbM 7.5 g/L 일 때 각각에서 최대의 에리스리톨 생산성과 수율을 얻었으며 그 중에서 CSP 5 g/L일 때 최대의 생산성인 0.61 g/L-hr와 56%의 생산수율을 나타내었으며, 이때의 erythritol 농도는 139.5 g/L 있었다. 또한 36시간이 경과한 발효시간에 고농도의 당용액을 첨가한 유가식 배양을 통하여 발효시간을 12시간 단축시킬 수 있었는데 이때의 생산수율은 50.2% 이었으며, 생산성은 0.62 g/L-hr로 약간 증가하였다.

사. 농산 폐자원의 전처리 조건의 확립

농산 폐자원인 섬유성 물질로부터 기능성 감미물질의 생산원료를 얻기 위해서는 첫째로 섬유성 물질로부터 lignin을 제거시키고 동시에 cellulose와

hemicellulose를 분리하기 위한 전처리 공정이 요구되며, 두번째로는 hemicellulose와 cellulose를 xylose와 glucose로 분해시키는 가수분해 공정이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 농산폐자원인 벚짚과 옥수수 속의 hemicellulose와 cellulose를 발효당으로 전환시키기 위한 전처리 공정선별에 관한 연구를 수행한 결과 옥수수 속과 벚짚에 존재하는 총당의 함량은 전체 시료의 약 70% (w/w) 이었고, lignin을 포함한 그 외 물질은 약 30% (w/w) 이었다. 이러한 시료에서 hemicellulose를 1% H_2SO_4 로 100℃에서 먼저 가수분해시키는 경우에 생성된 xylose와 glucose의 양은 최대 8.2 g/L 와 4.1 g/L로 나타났으며, 이때 원료에 존재하는 xylose에 대한 수율은 거의 95% 였다.

농산폐자원의 주요구성물질인 cellulose와 xylan을 가수분해 하기 위해 우수한 효소를 생산하는 미생물을 탐색하여 성공적으로 확보하였고 분리균이 생산하는 효소를 정제하여 그 특성을 조사함으로써 농산폐자원의 가수분해 조건 확립을 위한 기초 조사에 성공하였다. 정제효소를 이용하여 xylan을 가수분해 시켜 최종 분해 산물인 xylose까지 가수분해가 됨을 확인하였으며 xyloanase와 β -xylosidase를 동시에 사용함으로써 가수분해 효율이 상승됨을 확인하였다. 또한 상품화된 cellulase를 이용하여 농산폐자원을 가수분해 시킬 때 cellulose가 xylan보다 가수분해 효율이 낮다는 문제점과 원인을 발견하였다. 섬유소 물질 분해 효소 xylanase, β -xylosidase, β -glucosidase 유전자를 성공적으로 크로닝하였다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 고 부가가치의 기능성 감미료인 xylitol과 erythritol을 생산함으로써 국민의 식생활 개선 및 보건 향상에 기여할 수 있다. 본 연구에 의하여 이루어진 기술은 농산 폐자원을 활용하여 고 부가가치의 상품

을 제조할 수 있으므로 영세농업 지원전략에도 활용할 수 있다. 또한 산·학·연의 관련 전문인력을 유기적으로 연결하여 전문 기술인력의 양성 및 교육창구로 이용할 수 있으며, 연구수행 중에 수집한 고급정보와 기술은 국내 탄수화물 관련분야 정보의 data base로 활용할 수 있다. 또한 1단계 3년간의 기반 연구가 완료되면 2단계에서는 기업체와 협동연구로 대량생산을 위한 산업화에 대한 연구를 수행할 예정이다.

SUMMARY

(영문 요약문)

1. Improvement and Characterization of Xylitol Producing Microorgams

In order to produce xylitol from hemicellulose hydrolysate which is widely used as a substrate, the development of strain such as catabolite derepressed and xylitol dehydrogenase(XDH) defective mutant is required. After EMS treatment, catabolite derepressed mutants were isolated from *C. tropicalis* sp. The mutants isolated simultaneously assimilated xylose and glucose during the fermentation. The specific xylose reductase activity of mutant strains were also higher than that of wild strains in glucose medium. In the xylitol fermentation, XDH defective mutant CXM-1 in a media containing 100 g/L of xylose and 100 g/L of fructose as co-substrate was showed the best xylitol production and xylitol yield. In the fermentation of corn cob hydrolyzate by XDH defective mutant PXM-4, the maximum xylitol production was 5.0 g/L with a 100% yield at 3 days culture. From *C. tropicalis* ATCC20336, NADPH-dependent XR gene was analyzed and cloned. The analysis of genomic DNA confirmed that *C. tropicalis* contained at least two XR genes. We obtained the positive clone from the 4.5 kb of *SacI-XhoI* digestion of genomic DNA and cloned XR gene by subcloning of 4.5 kb DNA fragment. The sequence analysis of XR gene of *C. tropicalis* reveals that TATA box and aldose reductase cofactor binding regions are identical with the XR genes in *Candida tropicalis* and *Pichia stipitis*.

Flocculent mutants was isolated from non-flocculent strain, *Candida tropicalis*, by random mutagenesis using EMS. The selected mutants showed low final cell concentration, but similar xylitol yield, compared with wild type strain. In order to develop efficient bioprocess of xylitol production, repeated batch fermentation was carried out for xylitol production of flocculating yeast by addition of flocculating agent. Among the tested flocculating agents, Zetag78 was selected on the basis of its functionality and dosage effect. In complex media, the factors affecting cell flocculation were investigated ; yeast extract with high salt content affected it but pH didn't.

In order to enhance xylitol production, an optimum DO concentration range and redox potential were determined. By controlling redox potential in the range from -60 mV to 250 mV cell concentration of *Candida parapsilosis* was increased along with redox potential, but xylitol production was maximum at 100 mV. At this point, specific xylitol productivity was 0.16g/g-hr, and volumetric productivity was 0.7 g/L-hr.

2. Process Optimization for Xylitol Production by Xylose Bioconversion

A biological process using *Candida tropicalis* ATCC 13803 was proposed to produce xylitol, functional sweetener, from xylose, which is a major component of hemicellulose hydrolyzates. Xylitol could be produced as an intermediate of xylose metabolism through bioconversion from xylose without cell growth by controlling oxygen supply. In order to increase xylitol yield and productivity, a two-substrate fermentation using glucose for cell growth followed by xylose bioconversion to xylitol was designed.

Effects of pH, agitation rate and initial xylose concentration on xylitol production were investigated in an effort to optimize environmental conditions. Optimum values were pH6, 1vvm, 500rpm ($K_{La}=1.06$ /min) and 100g/L of initial xylose concentrations. In the case of low oxygen supply, a high xylitol yield was obtained due to decrease of cell growth. Low levels of NAD⁺/NADH ratio and ATP, the both used as cofactors of xylitol dehydrogenase and xylulose kinase, led the xylose flux in cell toward xylitol production. But below the optimum oxygen supply rate, a volumetric productivity decreased owing to reduction of overall activity of cell metabolism and regeneration rate of NADPH required for xylose reductase. Osmotic stress, rather than substrate inhibition, gave rise to decrease of specific xylose consumption rate and specific xylitol production rate above 100g/L of an initial xylose concentration.

Even though high initial glucose concentrations increased volumetric productivity by reducing a conversion time due to high cell mass, they also caused production of ethanol, which, in turn, inhibited cell growth

and xylose bioconversion. 28g/L of initial glucose concentration was achieved from computer simulation by the 5th Runge-Kutter method using kinetic equations of cell growth and xylose bioconversion related to ethanol concentration. Specific growth rate was described by the Luong equation based on a non-linear regression analysis. Specific glucose consumption rate and specific ethanol production rate were described by the logistic equation. Specific xylose consumption rate and specific xylitol production rate showed an allosteric inhibition pattern and a xylitol yield was not influenced by ethanol concentrations. The optimized two-substrate batch fermentation resulted in a volumetric productivity of 3.85 g-xylitol/L-hr and a yield of 0.81 g-xylitol/g-xylose.

Fed-batch cultures were also run to increase a final xylitol concentration. An increase in osmotic pressure by high concentration of xylose or , especially, xylitol caused a decrease in specific xylose consumption rate and specific xylitol production rate. Reduction of xylose bioconversion rate by increasing xylitol concentrations was more significant at low xylose concentrations in the medium. It was appropriate to maintain 100g/L of xylose in the medium for xylitol production. The optimized fed-batch fermentation to keep a xylose concentration in the medium constant yielded a volumetric productivity of 3.9g-xylitol/L • hr, a yield of 0.75g-xylitol/g-xylose and a final xylitol concentration of 185g/L.

Scale-up experiments to 3L and 30L were successfully carried out to reproduce the experimental results obtained in the 1L fermentations.

3. Erythritol Production by Bioconversion

Glucose and yeast extract were the best carbon and nitrogen sources of *Candida* sp. JH to produce erythritol at 28 °C and the initial pH_i of 7.0 respectively. The medium containing the 20 g/L of KCl enhanced the erythritol yield, showing erythritol production of *Candida* sp. JH was stimulated by high salt concentration of medium. After EMS treatment, mutant M26 which showed high KCl tolerance and erythritol yield was selected. With wild strain, 25.5 % of erythritol yield and 0.235 g/L-hr of productivity were obtained. In contrast, with mutant M26, 29.1% of erythritol yield and 0.465 g/L-hr of productivity were obtained at 0.5 vvm aeration and 700 rpm agitation. The erythritol yield demonstrated a 1.2-fold increase in the medium containing 50 g/L KCl. Erythritol production was proportionate up to 250 g/L of glucose concentration. However the maximum cell concentration was decreased in the high glucose concentration. Mutant M26 produced 126.4 g/L erythritol from 250 g/L glucose medium. The erythritol yield and productivity were 50.4% and 0.602 g/L-hr, respectively.

4. Development of Agricultural Waste Hydrolysis Method

The hydrolysis methods were investigated to obtain the fermentable carbohydrates, glucose and xylose, from agricultural waste. It was found that hydrolysis of hemicellulose by acid followed by removal of lignin by addition of base is efficient procedure. Six hour treatment at 100°C using 1% sulfuric acid was optimum conditions for acid hydrolysis of hemicellulose. Acid hydrolysis of hemicellulose in strew and corn steep

under optimum conditions resulted in 4.2~4.6 g/L of glucose and 8.0~8.2 g/L of xylose with 100% yield of hydrolysis. During the series of hydrolysis, efficiency of hydrolysis was decreased significantly after 4th process. Corn steep hemicellulose was more easily hydrolyzed than straw hemicellulose.

For enzymatic hydrolysis of cellulose and xylan, which are major component of agricultural wast, purification and characterization of enzyme from selected microorganism grown in hemicellulose was performed. It was proved that purified enzymes were xylanase and β -xylosidase and it could hydrolyze xylan to xylose. Hydrolysis efficiency was increased by using xylanase and xylosidase simultaneously. Xylanase, β -xylosidase, β -glucosidase genes were cloned successfully.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1 Introduction

Section 1 Objects.

1. Objects
2. Reference

Chapter 2 Improvement and Characterization of Xylitol Producing microorganism by Biological Conversion Process

Section 1 Introduction

Section 2 Materials and Methods

1. Materials
 - a. Reagents and microorganism
 - b. Culture medium and conditions
2. Experimental methods
 - a. Selection of xylitol dehydrogenase(XDH) defected mutant
 - b. Characterization of xylose fermentation by Candida sp.
 - c. Selection of medium for xylitol production
 - d. Effects of aeration of xylitol production

- e. Mutation
 - f. Selection of co-substrate
 - g. Characterization of fermentation by XDH defected mutant
 - h. Xylitol production using corn steep hydrolyzate
 - i. EMS Mutagenesis for flocculant mutant selection
 - j. Selection of cationic flocculant
 - k. Identification of cell aggregation
 - l. Selection of flocculant mutant
 - m. Selection of organic nitrogen source
3. Analysis methods
- a. Xylitol and carbohydrates
 - b. Cell density
 - c. Ethanol concentration
 - d. Xylose reductase(XR) and XDH activity
4. Analysis and cloning of xylose reductase gene
- a. Isolation of genomic DNA
 - b. Digestion of genomic DNA
 - c. Genomic Southern hybridization
 - d. Construction of size-selected genomic library
 - e. Library screening by colony hybridization

f. Restriction map and subcloning

g. Sequencing of XR gene

Section 3 Results and Discussion

1. Fermentation characteristics of *Candida* sp. and development of catabolite de-repressed mutant
 - a. Investigation of induction and repression of XR and XDH
 - b. Characterization of xylitol production by *Candida* sp.
 - c. Selection of catabolite de-repressed mutant.
 - d. XR and XDH activity of catabolite de-repressed mutant
 - e. Xylitol production by catabolite de-repressed mutant
2. Optimization of xylitol production and development of XDH defected mutant
 - a. Selection medium for xylitol production
 - b. Effects of aeration for xylitol production
 - c. Selection of XDH defected mutant
 - d. Effects of initial pH and xylose concentrations
 - e. Fed-batch fermentation for xylitol production
 - f. Xylitol production using acid hydrolyzate of corn steep.

3. Analysis and cloning of XR gene
 - a. Analysis of *Candida* sp. XR gene
 - b. Construction of size-selected genomic library
 - c. Library screening by colony hybridization
 - d. Restriction map and subcloning
 - e. Sequencing of XR gene
4. Development of flocculant mutant and xylitol production by repeated batch culture
 - a. Screening of Flocculent mutant of *Candida tropicalis* by Random mutagenesis
 - 1) EMS Mutagenesis for the selection of Flocculent mutant
 - 2) Selection of flocculent mutant
 - 3) Production of xylitol by selected flocculent mutants
 - b. Selection of optimal flocculant
 - 1) Effect of cationic salt on Cell flocculation
 - 2) Effect of cationic polymer on Cell flocculation
 - 3) Selection of optimal flocculating agent by its dosage
 - c. Determination of Optimal condition for Flocculation
 - 1) Cell flocculation in fermentation medium
 - 2) Effect of pH on cell flocculation in fermentation medium

- 3) Effect of dilution factor on cell flocculation in fermentation medium
 - 4) Effect of yeast extract on cell flocculation in fermentation medium
 - 5) Relationship between flocculant dosage and cell concentration for cell flocculation in fermentation medium
- d. Xylitol production of flocculating yeast
- 1) Repeated batch production of xylitol by flask culture
 - 2) Effect of cosubstrate supply for enhancement of xylitol yield
 - 3) Effect of dissolved oxygen concentration for enhancement of xylitol yield
 - 4) Repeated batch production of xylitol using 2.5L jar fermenter
 - 5) Effect of redox potential for xylitol production

Section 4 Conclusion

Section 5 Reference

Chapter 3 Optimization of Xylitol Production by Xylose Bioconversion

Section 1 Introduction

1. Processes for Xylitol Production

2. Xylitol production by microorganisms
 - a. Effects and metabolic pathway of xylitol production
 - b. Xylitol production by yeast
 - c. Xylitol production by other microorganisms

Section 2 Materials and Methods

1. Materials
 - a. Microorganism
 - b. Preservation of microorganism and pre-culture
 - c. Flask culture
 - d. Batch and fed-batch culture
2. Methods
 - a. Analysis of glucose, xylose, xylitol and xylulose
 - 1) HPLC
 - 2) Bail's reagent
 - 3) Xylitol/Sorbitol kit
 - b. Cell mass
 - c. Ethanol concentration
 - d. Measurement of Oxygen transfer coefficient

Section 3 Results and Discussion

1. Fermentation strategy and conditions

- a. Objects
 - b. Fermentation strategy
 - c. Fermentation conditions
2. Analysis and optimization of environmental conditions
 - a. Objects
 - b. Effects of pH
 - c. Effects of agitation
 - d. Effects of initial xylose concentration
 - e. Effects of arabinose and utilization
3. Optimization of two-substrate fermentation
 - a. Objects
 - b. Effects of ethanol of cell growth
 - c. Effects of ethanol on xylose bioconversion
 - d. Computer simulation for determination of optimum initial glucose concentration
4. Optimization of fed-batch fermentation
 - a. Objects
 - b. Effects of incresement of xylitol concentration on xylose bioconversion
 - c. Effects of osmotic poessure in the medium

- d. Determination of feeding strategy
- e. Effects of pH control
- 5. Scale up
 - a. Objects
 - b. 3L experiments
 - c. 30L Experiments

Section 4 Reference

Chapter 4 Erythritol Production by Bioconversion

Section 1 Introduction

Section 2 Materials and Methods

- 1. Materials
 - a. Reagents and microorganism
 - b. Medium
- 2. Experimental methods
 - a. Selection of erythritol fermentation medium
 - b. Characteristics of erythritol fermentation
 - c. Osmotic tolerance test of wild type yeast
 - d. Mutation and Selection of osmotic tolerance mutant
 - e. Optimization of fermentation conditions

3. Analysis methods
 - a. Carbohydrate alcohol
 - b. Carbohydrate
 - c. Ethanol
 - d. Cell mass

Section 3 Results and Discussion

1. Selection of fermentation medium
 - a. Effects of carbon sources
 - b. Selection of fermentation medium
2. Selection of osmotic tolerance M/O
 - a. Osmotic tolerance of wild type yeast.
 - b. Selection of Selection of osmotic tolerance mutant
 - c. Characterization of erythritol fermentation ny wild type yeast and mutant M26
3. Optimization of fermentation medium for erythritol production by mutant M26
 - a. Selection of carbon source
 - b. Effects of glucose concentrations
 - c. Effects of yeast extract concentration
 - d. Effects of inorganic slats

- e. Effects of osmotic pressure by salt
- 4. Optimization of fermentation conditions for erythritol production by mutant M26
 - a. Effects of aeration
 - b. Effects of agitation
 - c. Effects of temperature
 - d. Effects of initial pH and pH control
- 5. Development and analysis of environmental factors for erythritol production by wild type yeast.
 - a. Effects of carbon source
 - b. Effects of pH on cell growth and erythritol production
 - c. Effects of osmotic pressure on cell growth and erythritol production
 - 1) Effects of KCl concentrations
 - 2) Effects of NaCl concentrations

Section 4 Conclusion

Section 5 Reference

Chapter 5 Development of Agricultural hydrolysis methods

Section 1 Introduction

Section 2 Materials and Methods

1. Analysis methods
2. Acid hydrolysis of cellulose and hemicellulose,
3. Enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose
 - a. Screening of hemicellulose hydrolyase producing microorganism
 - b. Activity assay
 - c. Activity staining
 - d. Purification of enzyme
 - e. Characterization of enzyme
 - f. Analysis of Products
 - g. Sequencing of N-terminal amino acid

Section 3 Results and Discussion

1. Analysis methods
2. Acid hydrolysis of cellulose and hemicellulose,
 - a. Hemicellulose hydrolysis after removal of lignin
 - b. Hemicellulose hydrolysis before removal of lignin
 - c. Determination of acid for agricultural waste hydrolysis
 - d. Determination of acid concentration
 - e. Continuous acid hydrolysis
3. Enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose

- a. Screening of hemicellulose hydrolyase producing microorganism
- b. Characterization and purification of cellulose and hemicellulose hydrolyzing enzyme
 - 1) Characterization and purification of xylanase produced by *Bacillus* sp. KK-1
 - 2) Characterization and purification of xylanase produced by Recombinat *E.coli*
 - 3) Characterization and purification of β -xylosidase produced by *Bacillus* sp. KK-1
- c. Enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose
 - 1) Product analysis of xylanase
 - 2) Product analysis with enzyme compositions
 - 3) Enzymatic hydrolysis of agricultural waste
 - 4) Hydrolysis of xylan by xylanase and β -xylosidase
 - 5) Hydrolysis of cellulose by customized cellulase
- d. Analysis and cloning of cellulase and hemicellulose hydrolysis enzyme
 - a) Analysis and cloning of xylanase and β -xylosidase from *Bacillus* sp. KK-1
 - b) Cloning of β -glucosedaase from *B.subtilis* 79-23

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적

1. 연구개발의 목적
2. 참고문헌

제 2 장 생물학적 전환공정에 의한 xylitol 생산균주의 개량 및 특성규명

제 1 절 서 설

제 2 절 연구재료 및 방법

1. 실험재료
 - 가. 시약 및 사용균주
 - 나. 배양배지 및 배양조건
2. 실험방법
 - 가. Mutant 균주의 선별
 - 나. *Candida* sp.의 xylitol 발효특성 연구
 - 다. Xylitol 생산을 위한 배지의 선정
 - 라. 통기조건이 xylitol 생산에 미치는 영향
 - 마. 돌연변이 유도 및 우수 변이균주의 선별
 - 바. Co-substrate의 선별

사. XDH defective mutant 발효특성 연구

아. 옥수수 속의 가수분해 용액의 xylitol 발효

자. Flocculent mutant 선별을 위한 EMS Mutagenesis

차. Cationic flocculant의 선정과 stock solution 제조

카. 세포 응집 여부의 확인

타. Flocculation이 일어나는 mutant 선별

하. 최적 유기 질소원의 선정

3. 분석방법

가. Xylitol 및 당 정량

나. Cell 농도 측정

다. 에탄올 정량

라. 효소의 활성 (XR, XDH) 측정

4. XR 유전자의 분석과 클로닝

가. Genomic DNA 순수분리

나. Genomic DNA digestion

다. Genomic Southern hybridization 분석

라. Size-selected genomic library 제조

마. Colony hybridization에 의한 library screening

바. 제한효소 지도 작성 및 subcloning.

사. XR 유전자 염기서열 분석

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. *Candida* sp.의 xylitol 발효특성 및 Catabolite repression이 제거된 변이균주 개발
 - 가. XR 및 XDH의 생성유도 및 억제현상연구
 - 나. *Candida* sp.의 xylitol 발효특성
 - 다. Catabolite derepressed mutant 선별
 - 라. Catabolite derepressed mutant의 XR 및 XDH 활성
 - 마. Catabolite derepressed mutant에 의한 xylitol 발효
2. Xylitol 발효조건외 최적화와 XDH defective mutant 균주 개발
 - 가. Xylitol 발효를 위한 배지의 선정
 - 나. 통기조건이 xylitol 생산에 미치는 영향
 - 다. Co-substrate의 선별
 - 라. XDH defective mutant의 선별
 - 마. 초기 pH 및 초기 xylose 농도의 영향
 - 바. 유가식 배양에 의한 xylitol 생산
 - 사. 옥수수 속의 산 가수분해 용액을 이용한 xylitol 발효
3. XR 유전자의 분석과 클로닝
 - 가. *Candida* sp.의 XR 유전자 분석
 - 나. Size-selected genomic library 제조
 - 다. Colony hybridization에 의한 library screening

라. 제한효소 지도 작성 및 subcloning.

마. XR 유전자 염기서열 결정 및 유전자 분석

4. Flocculent mutant 개발 및 repeated batch culture에 의한 xylic acid 생산

가. Random Mutation에 의한 *Candida tropicalis*의 flocculation mutant 개발

- 1) EMS Mutagenesis를 이용한 flocculent mutant 선별
- 2) 선별된 Flocculent mutant를 이용한 xylic acid 생산 및 우수 flocculent mutant 선별

나. flocculant의 선정

- 1) Cell flocculation에 미치는 cationic salt의 영향
- 2) Cell flocculation에 미치는 cationic polymer의 영향
- 3) Cationic flocculant dosage에 따른 flocculating agent 선정

다. Flocculation 최적 조건의 확립

- 1) 발효배지 내에서의 cell flocculation
- 2) 발효 배지 내에서의 세포 응집에 미치는 pH의 영향
- 3) 발효 배지 내에서의 세포 응집에 미치는 dilution factor의 영향
- 4) 발효배지 내에서의 세포응집에 미치는 Yeast Extract의 영향

5) 발효배지 내에서의 세포 응집시 cell 양과 flocculant 양 사이의 상관 관계

다. Flocculating yeast를 이용한 xylitol의 생산

- 1) 250ml flask를 이용한 xylitol의 repeated batch production.
- 2) Xylitol 생산량 증가를 위한 cosubstrate 공급의 효과
- 3) Xylitol 생산량 증가를 위한 배지내 용존 산소 농도의 조절
- 4) 25 L jar fermenter를 이용한 xylitol의 repeated batch production
- 5) 산화환원 전위가 xylitol 생산에 미치는 영향

제 4 절 결 론

제 5 절 인 용 문 헌

제 3 장 Xylose로부터 Xylitol 생산을 위한 생물전환 공정의 최적화

제 1 절 서 설

1. Xylitol의 생산 공정
2. 미생물에 의한 xylitol의 생산
 - 가. Xylitol 생산 경로 및 생산에 영향을 주는 요인
 - 나. 효모에 의한 xylitol의 생산
 - 다. 기타 미생물에 의한 xylitol의 생산

제 2 절 연구 재료 및 방법

1. 실험 재료

가. 균주

나. 균주 보관 및 전배양

다. Flask 배양

라. 진탕 배양 및 유가식 배양

2. 분석 방법

가. 포도당, xylose, xylitol xylulose 분석

1) HPLC

2) Bail's reagent

3) Xylitol/Sorbitol kit

나. 균체농도

다. Ethanol 농도

라. KLa(산소전달계수) 측정

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 발효 전략 및 발효 조건 수립

가. 실험목적

나. 발효 전략

다. 발효 조건

2. 환경인자의 영향 고찰 및 최적화

가. 실험 목적

나. pH의 영향

다. 교반속도의 영향

라. 초기 xylose 농도의 영향

마. Arabinose 첨가의 영향 및 그 이용

3. 2단계 발효공정의 최적화

가. 실험 목적

나. Ethanol이 세포 성장 단계에 미치는 영향

다. Ethanol이 xylose의 생물전환공정에 미치는 영향

라. 최적의 초기 포도당 농도 결정을 위한 computer simulation

4. 유가식 배양의 최적화

가. 실험목적

나. Xylitol 농도의 증가에 따른 xylose 생물전환공정의 영향

다. 배지내 삼투압의 영향

라. Xylose 용액의 주입전략 결정

마. pH 조절 효과

5. scale-up 실험

가. 실험목적

나. 3L 실험

다. 30L 실험

제 4 절 참고문헌

제 4 장 생물공학적 전환에 의한 Erythritol의 생산

제 1 절 서 설

제 2 절 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 시약 및 균주

나. 배양배지 및 배양조건

2. 실험 방법

가. Erythritol 발효를 위한 배지 선정

나. Erythritol 발효의 특성

다. 야생균주의 삼투압 내성 시험

라. 변이유도 및 삼투압 내성 변이균주의 선별

마. 발효조건 최적화 연구

3. 분석 방법

가. 당알콜 분석

나. 당 정량

다. 에탄올 정량

라. Cell mass 측정

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 발효 배지의 선정

가. 탄소원의 영향

- 나. 발효 배지의 선정
- 2. 삼투압 내성 변이균주의 선별
 - 가. 야생균주의 삼투압 내성
 - 나. 우수 삼투압 내성 변이균의 선별
 - 다. 야생균주와 변이균주 M26의 erythritol 발효 특성
- 3. 변이균주의 erythritol 발효배지 최적화
 - 가. 탄소원의 선정
 - 나. Glucose 농도의 영향
 - 다. Yeast extract 농도의 영향
 - 라. 무기염 농도의 영향
 - 리. 염 농도에 의한 삼투압 영향
- 4. 변이균주의 erythritol 발효조건의 최적화
 - 가. 통기량의 영향
 - 나. 교반속도의 영향
 - 다. 최적 발효온도의 결정
 - 리. 배지의 초기 pH 및 pH 조절의 영향
- 5. 야생효모를 이용한 erythritol 생산 공정 개발 및 환경요인 분석
 - 가. 탄소원의 영향
 - 나. 세포의 생육과 erythritol 생산에 미치는 pH의 영향
 - 다. 삼투압에 의한 세포의 성장 및 erythritol 생산의 영향

1) KCl첨가 농도에 따른 영향

2) NaCl 첨가에 따른 영향

제 4 절 결 론

제 5 절 참고문헌

제 5 장 농산 폐자원의 전처리 공정의 선정

제 1 절 서 설

제 2 절 연구재료 및 방법

1. 사용원료의 분석

2. 섬유성 물질의 가수분해 공정 선별

3. 효소적 방법에 의한 섬유소 분해

가. 섬유물질 분해 효소 생산 미생물의 탐색

나. 효소 활성 측정

다. 효소의 활성염색

라. 효소의 정제

마. 효소의 특성 결정

바. 반응산물의 분석

사. 아미노 말단의 아미노산 잔기배열 결정

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 사용 원료의 분석

2. 섬유성 물질의 분해공정 선별

가. Lignin 제거후 hemicellulose 분해공정

나. Hemicellulose 가수분해후 lignin 제거공정

다. 농산폐자원의 전처리를 위한 산(acid)의 선정

라. 전처리를 위한 산(acid) 농도의 결정

마. 연속적 산 처리에 의한 가수분해

3. 효소적 방법에 의한 섬유소 분해

가. 섬유소물질 분해 효소 생산균의 탐색과 동정

나. 섬유소 물질을 분해하는 분리균이 생산하는 섬유물질 분해

효소의 특성과 정제

1) *Bacillus* sp. KK-1이 생산하는 xylanase의 특성과 정제

2) 대장균 형질전환주로 부터 xylanase Y의 정제와 특성

3) *Bacillus* sp KK-1이 생산하는 β -xylosidase 분석

다. 섬유물질의 효소학적 분해

1) Xylanase에 의한 반응산물의 분석

2) 효소의 구성에 따른 반응산물의 분석

3) 농산 부산물의 효소학적 가수분해

4) Xylanase와 β -xylosidase를 이용한 xylan의 가수분해

5) 상품화된 cellulase를 이용한 섬유물질의 가수분해

라. 섬유물질 분해 유전자 크로닝과 분석

가) *Bacillus* sp. KK-1로 부터 xylanase와 β -xylosidase 유전자
의 크로닝과 유전자 분석

나) *B. subtilis* 79-23의 β -glucosidase 유전자의 크로닝

제 4 절 결 론

제 5 절 참 고 문 헌

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적

1. 연구개발 목적

현대과학의 발달에 의하여 생활, 문화, 경제, 산업 등 모든 영역에서 급속도로 성장하고 있으며 생활수준의 향상에 따라 건강에 대한 예방의식 또한 높아져 가고 있다. 우리의 식생활에서 설탕이 차지하는 비중은 매우 크다. 비만, 당뇨병 등의 각종 성인 질병과 충치 발생이라는 단점을 가지고 있음에도 불구하고 아직까지는 설탕을 대체할 만한 물질을 개발하지 못하고 있다. 과거 사카린은 인공감미료로 세계를 제패했었으나 발암물질일 가능성이 있다는 연구결과가 나온 이후 거의 사용되지 않고 있으며 다른 인공감미료인 어세솔페임-K는 식용으로 제한적인 사용승인만을 받아 실제 식품에 이용되지 못하고 있다. 국내에서는 소주에 첨가되어온 스테비오사이드의 유효과동을 겪으면서 새로운 감미료에 대한 관심이 높아져 각종 학술지, 잡지 또는 신문 등을 통해서 이들을 소개하는 자료들이 속출하고 있다. 감미료의 종류에는 당류, 당알콜, 방향족 화합물, 기타 단맛 물질로 합성감미료 등이 있는데 당류만이 식품으로 분류되어 있다. 이 중에서 발효감미료로 분류될 수 있는 것으로는 전화당, 올리고당, 일부의 당알콜 등이다. 주류나 장류와 같은 식품은 전통적인 발효를 통해 얻어 왔지만 발효감미료는 식품의 기능성과 관련해서 생산기술이 최근에 개발되었으며, 현재 기능성 규명 과 이용에 관한 연구가 활발히 진행중이다. 설탕 대용의 감미료로 거론되는 것으로는 설탕과 비슷하거나 낮은 감미도를 기본적으로 갖고 있는 당알

콜류 이다.

국내에서 생산되고 있는 농산 폐자원인 섬유성 물질이 연간 118억톤 이지만 대부분이 이용되지 못하고 있다. 섬유성 물질의 농산 폐자원을 이용하기 위해서는 첫째로 섬유성 물질로부터 lignin을 제거하고 hemicellulose와 cellulose를 분리하여야 하며, 두번째로는 cellulose와 hemicellulose를 가수분해시켜 glucose와 xylose를 얻어야 한다. 이러한 농산 폐자원에 의한 고부가가치의 기능성 감미료를 생산한다면, 농업 생산성 향상 및 농민의 소득 재분배 창출이 이루어져 농업발전에 크게 기여할 것으로 기대된다. 또한 청정기술인 생물공학 기술을 활용한 감미료 생산기술의 개발은 직접적으로 국내 식품업체의 국제경쟁력 강화에 크게 기여할 것이며, 천연 폐기물 및 오염물질의 무공해 처리로 환경보호 및 Green Round 대비상품을 제조하여 쾌적하고 깨끗한 환경을 조성할 수 있다.

당알콜(sugar alcohol: polyol)이란 당류의 환원성 말단기에 수소가 첨가되어 알코올기로 된 당류를 말하는데 과일, 버섯 등과 같은 자연계와 발효 식품에 존재한다. 또한 많은 발효 식품에는 glucose, maltose와 같은 당류 외에 glycerol, arabitol, mannitol 등의 당알콜류가 함유되어 있는데 당알콜의 함량에 따라 숙성 과정 중 효모의 활동 정도를 알 수 있기 때문에 당알콜은 발효식품의 맛을 결정하는 중요한 인자가 된다(1). 자연계에서 발견되는 당알콜류는 sorbitol, erythritol, ribitol, xylitol, mannitol 등이 있으며, 이들은 식품, 의약품 및 화장품 분야에 폭넓게 이용되고 있다. 당알콜은 화학구조상의 특징에 의해 당류에 비하여 안정성이 높고, 물과의 친화력이 크며, 쉽게 결정화되지 않을 뿐만 아니라 Maillard 반응을 일으키지 않는다. 이러한 당알콜류는 식품의 가공성을 높이고, 저 칼로리이고, 용해 반응이 흡열반응 이어서 청량감이 뛰어나 그 유용성이 매우 높다고 할 수 있다.

당알콜의 기능은 주로 구강에 상주하고 있는 치아 부식성 세균인

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrinus* 등에 의해서 일어나는 감염 증인 치아부식을 예방할 수 있다. 설탕과 같은 발효성 당질이 밀접한 관계가 있는데 부식 과정에서 부식성 세균이 설탕으로부터 점착성의 glucan을 합성하여 치아에 강하게 부착하고 구강내 세균들과 엉켜 치석을 형성한다. 아울러 발효성 당질이 이들 세균들에 의해서 젖산, 초산, 프로피온산과 같은 유기산으로 분해되어 구강내 산도(pH)를 더욱 낮추게 된다. 치아의 성분인 인산칼슘중 Ca^{2+} 을 녹아 내리게 하여 치아 표면에 미세한 홈집을 형성시키고 결국에는 부식까지 이르게 한다. 당알콜류는 구강내에서 치아부식의 원인균인 *Streptococcus mutans* 균에 의하여 불용성 glucan으로는 전환되지 않으며 균의 성장에도 기여하지 않는다고 알려지고 있다(2,3). 당알콜류는 완화작용이 있으며 혈당을 상승시키지 않기 때문에 당뇨병 환자용 감미성 식품에 이용되고, 또한 껌류에 설탕 대신 사용되고 있다. 현재 상품명에 당알콜을 쓰는 국내 회사 제품도 소개되고 있다. 이러한 당알콜은 종류에 따라 소화, 흡수, 대사 정도가 달라 sorbitol, mannitol 등은 소장에서 15~20% 정도만 흡수되며 간에서 대사되고, erythritol은 90% 이상 흡수되나 체내에서 전혀 대사되지 않고, maltitol, lactitol 등의 이당류 당알콜은 소화되지 않고 대장에서 장내미생물에 의해 발효되는 것으로 알려져 있다(2). 즉 당알콜류는 난소화성으로 흡수가 서서히 일어나고 소량 섭취시 일부분만이 흡수되는데 보통 2.0~2.4 kcal/g의 열량을 낸다. 대량으로 섭취할 때는 흡수가 적어 열량의 양은 적어지고 대장에서 장내 세균에 의하여 분해되어 흡수되는 에너지는 극히 적다. Maltitol, paratinitol 등은 소장에서 소화 흡수되기 어렵고 erythritol은 다른 당알콜류와는 달리 대부분 소장에서 흡수되거나 거의 전부 뇨중으로 배설된다. 지방과 당질을 같이 섭취하면 혈중 인슐린의 분비가 자극되어 지방조직 중의 lipoprotein lipase 활성이 높아진다. 따라서 지방세포 중에 중성 지방 축적이 촉진되어 비만을 일으키는데 당알

콜류는 지방과 같이 섭취하여도 인슐린을 자극하지 않으므로 체내 축적이 되지 않는다(3). 당알콜의 감미도는 Table 1에서 보듯이 설탕과 비교하여 다소 낮거나 거의 유사하다(4).

Table 1. Relative sweetness of various sugar alcohols.

Polyalcohols	Sweetness relative to sucrose = (100)
Sorbitol	60
Mannitol	50
Maltitol	90
Erythritol	80
Lactitol	40
Xylitol	100

산업적으로 가치를 가지는 대표적 당알콜로는 sorbitol, erythritol, xylitol, mannitol 등이 있다. 당알콜류의 국내시장 현황은 sorbitol이 연간 약 30,000톤으로서 최대 시장은 형성하고 있고 나머지는 maltitol과 xylitol이 500 ~ 1,000톤 규모로 현재로는 시장 규모가 미미하나 최근 급속한 성장세를 보이고 있는 실정이다(5). 이러한 시장 규모는 일본에서도 유사한 양상을 보이고 있다 (Table 2). 당알콜의 제법으로는 일반적으로 aldose 혹은 ketose 형태의 당을 고온 고압 하에서 수소를 첨가하여 환원시키는 방법을 채택하고 있다. 그러나 이러한 화학적인 합성법으로는 생산수율이 낮고 부산물 제거에 문제점들이 많으며 원료 물질이 고가이기 때문에 미생물 발효

를 통한 당알콜의 대량생산을 위한 연구가 활발히 진행 중이다(4). 더구나 섬유성 물질 중에 lignin의 함량이 낮으면서 hemicellulose의 함량이 매우 높은 볏짚과 옥수수 속으로부터 고부가가치의 xylitol과 erythritol을 저렴한 가격에 생산할 수 있는 공정의 개발은 생물산업 및 식품산업 발전에 매우 중요하다고 생각된다. 이러한 기술의 개발에 의하여 농산 폐자원을 다른 발효공정의 원료로 이용할 수 있어 그 파급효과는 매우 클 것으로 예상된다.

따라서 농산 폐자원인 섬유성 물질로부터 기능성 식품 소재인 당알콜을 생물공학적으로 생산하기 위한 공정 개발이 본 과제의 최종 연구목표이다. 특히 농산 폐자원인 볏짚과 옥수수 속으로부터 높은 수율로 xylose와 glucose를 얻는 공정과 이들로부터 우수 변이균주 및 재조합 균주를 이용하여 높은 생산성으로 xylitol와 erythritol을 생산하는 생물전환 공정의 개발에 있다.

Table 2. Market of sugar alcohols in Japan (1995)

	Consumption (ton/yr)	Price (Yen/Kg)	Amounts (10 ⁸ Yen)
Sorbitol	90,000	130	117.0
Maltitol	12,000	400	48.0
Xylitol	400	1,800	7.2
Lactitol	180	500	0.9
Erythritol	1,000	800	8.0

2 참고문헌

1. Shindoh, T., Y. Sasaki, A. Miki, T. Eguchi, K. Hagiwara, and T. Ichikawa. 1989. Identification of erythritol by HPLC, and GC-MS and quantitative measurement in pulps of various fruits. *J. Agric. Food. Chem.* **37**, 1474
2. 박영민. 1998. 당알코올류의 특성과 저충치성 감미제 솔비톨의 연구 및 생산동향. *생물산업*, **11**(2) 44-52.
3. Pepper, T. and P. M. Olinger. 1988. Xylitol in sugar-free confection. *Food Technol.*, **10**, 98-106.
4. 이우중, 서진호. 1995. 발효감미료의 연구현황 및 전망. *생물산업*, **8**(2), 38-43.
5. 전영중, 서승현. 1995. 미생물 발효에 의한 에리스리톨 생산공정의 개발. *생물화공*, **9**(4), 24-29.

제 2 장 생물학적 전환공정에 의한 xylitol 생산 균주의 개량 및 특성 규명

제1절 서 설

Xylitol은 설탕과 유사한 감미도의 5탄당 알코올로서 미생물이나 과일, 채소류에 포함되어 있으며 인체의 포도당 대사과정에서 중간 대사산물로 하루에 5~15 g이 생성되는 천연물질이다(3,4). Xylitol의 가장 주목할 만한 특징은 치아에 매우 안전하다는 것이다. Xylitol을 단독으로 또는 다른 당과 함께 첨가한 추잉검을 사람이 소비하였을 때 충치 발생이 급격히 감소한다는 보고가 있으며(1), 충치 유발균인 *Streptococcus mutans*에 의해 이용되지 않아 치약, 음료수, 껌 등에 사용되고 실제로 국내에서 생산되고 있는 무설탕껌의 감미료로 사용되고 있다. 또한 xylitol은 용해될 때 흡열하는 (-36.5cal/g) 특성이 있어 청량감을 주며 insulin에 의한 혈당농도의 조절이 요구되지 않아 당뇨병 환자와 glucose-6-phosphate dehydrogenase가 결핍된 환자들에게 설탕 대체물질로의 이용이 가능하다(5,6). 더구나 식품 부패균의 생육을 저해하여 식품의 저장성을 강화시키는 기능도 가지고 있다(7). 즉 xylitol을 0.5% 첨가했을 때 식품부패균인 *Clostridium butyrican*, *Salmonella typhi* 등의 생육을 강력하게 억제하기 때문에 식품보존제로도 사용된다(8). 이러한 xylitol의 우수한 기능성에도 불구하고 용도가 한정된 이유는 경제적인 생산이 어렵기 때문이다.

Xylitol의 생산은 과일이나 야채와 같은 식물체 100 g 당 900 mg의 xylitol이 존재함으로 여기에 oxalic acid를 처리하여 추출이 가능하지만 원

료에 xylitol의 함량이 소량이기 때문에 비경제적이며 가격도 매우 비싸게 된다(6). 현재 산업적인 xylitol의 생산은 xylose 함량이 높은 목재의 hemicellulose 산 가수분해로부터 얻은 xylose를 화학적인 환원법에 의하여 생산하고 있다(9). 즉 100℃에서 4% H₂SO₄에 의한 옥수수속을 가수분해한 다음 methanol로 xylose를 추출하고 MgSO₄ 존재 하에 methanol로부터 결정화시켜 xylose를 Ni/Al₂O₃을 촉매로 수소화 반응에 의하여 얻는다. 이때 연속적인 반응장치로 용매 및 시약을 재 순환시키면서 xylitol을 75 kg/hr로 생산할 수 가 있다(6). 이러한 공정에서는 다른 당들도 포함되어 있기 때문에 부산물의 제거를 위한 분리·정제공정을 필요로 한다(10). 따라서 화학적인 방법에 의한 xylitol 생산은 고온과 고압에서 금속촉매를 요구하고 있으며 원하지 않는 부산물들의 제거를 위한 분리·정제 공정이 어려워 xylitol 가격이 비싸게 된다.

최근 생물공학제품에 대한 선호도가 높아지면서 미생물 발효에 의한 xylitol 생산이 특허로 등록되어 있다(11). 생물공학적 생산방법의 장점은 생산수율이 높으며, 상온·상압에서 생산이 가능하고, xylose를 비롯한 혼합 당 용액을 기질로 사용할 수 있다는 것이다. 현재까지 연구된 바에 의하면 많은 미생물들이 xylose의 대사과정에서 xylitol를 주요 대사산물로 생성하여 분비한다는 사실이 밝혀짐에 따라 생물공학적인 전환공정에 의하여 xylose가 포함된 원료로부터 대량으로 xylitol를 생산할 수 있는 가능성을 제시하였다. 따라서 최근에는 미생물을 이용하여 xylose로부터 xylitol을 생산하기 위한 미생물 균주의 탐색, 돌연변이 유발과 재조합 DNA 기술에 의한 균주개량, 발효조건의 최적화 및 발효공정 개발에 의한 수율 및 생산성 향상 등에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

미생물들 중에서 bacteria는 *Enterobacter liquefaciens*(12), *Corynebacterium* sp.(13), *Mycobacterium smegmatis*(14) 등이 xylitol를 생

산한다는 보고가 있으나 bacteria에 의한 xylitol의 생산에서는 생산성은 높으나 수율과 최종 농도가 낮다(12,13,14). Yeast에 의한 xylitol의 생산은 처음으로 Onishi와 Suzuki(15)가 xylose 대사과정의 주요 생성물로 xylitol이 생산됨을 보고하였으나 수율은 50% 이하였다. 그후 yeasts에 의한 xylitol의 생산에 대한 많은 연구들이 이루어 졌다. 즉 *Candida*속들 중에서 *C. pelliculosa*(16,17), *C. boidinii*(18), *C. guilliermondii*(19,20,21), *C. tropicalis*(19,22,23), *C. parapsilosis*(23)와 *Pachysolen tannophilus*(20), *Pichia stipitis*(24) 등이 xylitol을 생산한다고 보고되었다. 이러한 보고들에서 yeasts에 의한 xylitol의 생산에서는 90% 이상의 수율과 100 g/L 이상의 최종 생성 농도를 얻을 수 있고 생산성도 0.32~1.67 g/L-hr로 매우 양호한 편이다. 특히 Gong 등(22)은 높은 수율과 생산성으로 xylitol을 생산하는 *Candida tropicalis* HXP2인 변이균주를 분리하였음을 보고하였다. 따라서 현재로서는 yeasts가 산업적인 xylitol의 생산에 가장 적합한 미생물이므로 많은 연구자들이 yeasts에 의한 xylitol의 생산성, 수율 및 최종 농도 증가를 위한 배지조성 및 생산 조건의 최적화와 균주개량에 대한 많은 연구들을 수행하고 있다. 반면 fungi 중에서는 *Petromyces albertensis*(25)가 xylitol을 생산한다는 보고가 있으나 fungi에 의한 xylitol의 생산에서는 수율과 생산성이 매우 낮다.

Yeasts에 의한 xylose 대사의 critical step은 D-xylose가 D-xylulose로 전환되는 두단계 반응이다(Fig. 1). 먼저 D-xylose가 NAD(P)H-dependent xylose reductase (XR : EC 1.1.1.21)에 의하여 xylitol로 환원되고(26,27), 다음으로 NAD⁺-dependent xylitol dehydrogenase(XDH : EC 1.1.1.9)에 의하여 xylitol를 D-xylulose로 산화시킨다(28,29). 이때 *Pichia stipitis* 와 *Candida shehatae* 의 xylose reductase는 환원제로 NADH와 NADPH를 모두 이용할 수 있지만(30,31), *Pachysolen tannophilus*와 같은 효모들에서는

NADH 보다 NADPH에 대한 활성이 더 높다(27). 따라서 cofactors의 기능과 재생은 용존산소량에 의하여 결정되지만, xylose reductase는 xylitol에 의한 효소 활성의 억제가 없기 때문에 xylose로 부터 높은 수율로 고농도의 xylitol를 생산할 수 있는 가능성을 제시하였다(27).

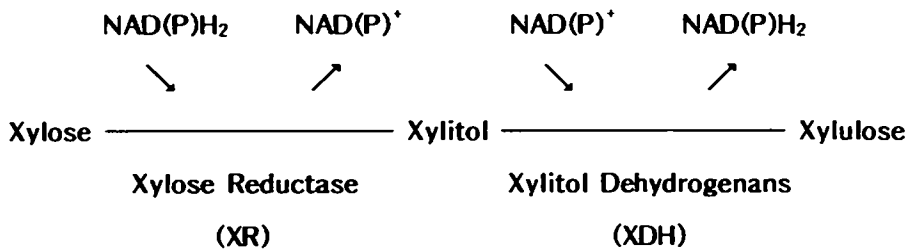


Fig. 1. Critical step of xylose metabolism by yeasts.

Yeasts에 의한 xylitol의 생산에서 생산성 및 수율의 향상을 위한 배양조건 연구에서 중요한 첫 번째 요소는 배지 내 용존산소량이다. 이는 일부 yeasts에서 XR과 XDH가 NAD(P)⁺/NAD(P)H redox system에 의하여 ethanol 생성과 xylitol 생성에 커다란 영향을 미치기 때문이다. 즉 일부 yeasts는 혐기적 조건에서 xylose를 거의 이용하지 못하지만 일부의 yeasts는 xylose를 ethanol 이나 xylitol로 전환시키는데(32), 이는 NAD(P)⁺/NAD(P)H₂ redox balance 때문이다(33). 이때 혐기적 조건에서 xylose를 이용하지 못하는 것은 xylitol의 산화에 의한 xylulose의 생성 시에

respiratory chain에 의하여 생성되는 NAD^+ 가 요구되는데 혐기적 조건에서 NAD^+ 의 결여에 의하여 xylulose를 ethanol로 전환시키지 못하기 때문이다 (34). 더구나 yeast에는 transhydrogenase 활성이 없어 과량의 NADH 를 산화시키지 못하여 hydrogen acceptor의 결여에 의하여 대사활성이 중단된다 (35). 따라서 최근의 연구에서 통기 조건에 따라 달라지지만 대체적으로 *P. stipitis* (24, 33-39), *P. tannophilus*(29,40,41) 및 *C. shehatae*(37,42)는 ethanol 생성이 우수한 반면, *C. parapsilosis*(23,24), *C. tropicalis*(23,43), *C. boidinii*(18), *C. guilliermondii*(19,21) 및 일부의 *P. tannophilus* (21,44)은 xylitol 생산이 우수하다. 이와 같이 yeasts에 의한 xylitol의 생산은 사용하는 균주와 배양시의 통기조건에 따라 xylitol과 ethanol이 반비례적으로 생산된다. 즉 *P. stipitis*에서는 낮은 용존산소량의 조건에서 xylitol의 생성없이 최대의 ethanol을 생산하는 반면, *C. parapsilosis*는 낮은 용존산소량의 조건에서 ethanol의 생성없이 최대로 xylitol을 생산할 수 있다(24). 그러나 *P. tannophilus*와 *C. shehatae*에서는 용존산소량의 변화에 따라 ethanol과 xylitol의 생성량도 변화였다(28). 또한 *C. guilliermondii*의 경우에도 용존산소량에 따라 xylitol의 수율이 60~75% 까지 변화였는데, 이는 세포내 $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)}\text{H}_2$ redox balance에 따라 xylitol의 일부가 대사과정을 통하여 분해되기 때문이다. Xylitol은 NAD(P)^+ 의 존재 하에서 xylulose로 전환된 후에 pentose phosphate pathway를 통하여 대사 되어 cell maintenance, cell growth 및 ethanol 생성에 이용되기 때문이다(21). 더구나 methylotrophic yeast인 *C. boidinii*의 경우에 xylose와 함께 methanol을 첨가하면 xylitol의 수율이 증가하여 최대 90% 까지 얻었으며(18), Nishio 등(17)은 *C. pelliculosa*와 hydrogenase 및 F_{420} NADP^+ oxidoreductase가 존재하는 *Methanobacterium* sp. 을 동시에 고정시켜 100%의 xylitol 수율을 얻을 수 있었지만 기질과 함께 계속적으로 NADP^+ 를 첨가하는 문제점이 있

다.

Yeasts에 의한 xylitol의 생산에서 두번째로 중요한 요소는 hemicellulose의 가수분해 산물에는 주요 구성성분인 D-xylose 뿐만 아니라 D-glucose, D-mannose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose 및 cellobiose가 혼합당으로 존재한다(45,46). 이때 대부분의 xylose를 발효시킬 수 있는 yeast들은 xylose의 존재 하에서 xylose의 대사에 관련된 XR과 XDH가 유도되지만(47,48), 쉽게 대사될 수 있는 D-glucose의 존재 하에서 *C. utilis*(49), *C. shehatae* (45), *P. stipitis*(45) 및 *P. tannophilus*(50) 등에서는 catabolite repression에 의하여 XR 및 XDH의 생성이 억제된다는 보고가 있다(51). 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(48,51). 이때 *P. stipitis*에서는 D-glucose에 의한 XR 및 XDH의 생성 억제가 가장 크게 나타났다. 반면 *P. tannophilus*에서는 D-glucose와 D-mannose에 의한 XR 및 XDH의 생성 억제 효과가 거의 유사하였으나, XDH의 생성억제가 XR보다 더 크게 나타났으며 2-deoxy-D-glucose에 의해서는 XDH의 생성억제만이 나타났다(48). 따라서 XR과 XDH의 합성을 위한 유전자들은 서로 다른 조절기작에 의하여 합성되는 것으로 추정하고 있다.

세 번째로 중요한 요소는 우수한 xylitol 생산 균주를 이용하여 산업적인 xylitol을 생산하기 위해서는 농산 및 임산 폐기물을 원료로 이용해야 한다. 이때 이러한 원료들의 산 가수분해 물질에는 yeasts의 성장과 발효활성을 억제하는 많은 독성 물질들이 존재한다. 따라서 성공적인 xylitol의 산업적인 생산을 위해서는 hemicellulose의 산 가수분해에 의하여 생성된 독성 물질에 저항성을 갖는 효모 균주의 선별이 필요하다(52). 실제로 Chen 등(53)은 균주의 변이와 선별과정을 통하여 얻은 *Candida* sp. B-22를 이용한

hemicellulose의 산 가수분해 용액으로부터 91.9%의 수율로 96.8 g/L의 xylitol을 96시간 배양에 의하여 생산하였음을 보고하였다. 또한 Meyrial 등 (21)은 *C. guilliermondii*에 의한 xylitol의 생성에 대한 연구에서 xylitol의 생성이 유도기(lag time) 없이 생성되기 시작하여 쉽게 배지 내로 분비되므로 높은 수율로 최대 221 g/L 까지 생산됨을 보고하였다. 또한 이 균주의 당들에 대한 이용에서는 D-glucose, D-mannose 및 D-galactose가 xylose보다 더 빠르게 이용되었으며 hexoses는 대응하는 polyols로 전환되지 않고 대부분이 ethanol로 전환되었고 L-arabinose 만이 arabitol로 전환되지만 생성 속도와 생산 수율은 매우 낮았다. 따라서 *C. guilliermondii*을 이용한 xylitol의 생성에서는 부산물로 ethanol과 arabitol만이 생성되며, 생성된 ethanol은 다른 탄소원의 고갈시에 세포성장을 위하여 탄소원으로 이용하기도 한다.

끝으로 최근에는 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용한 xylitol의 생산에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 이는 *S. cerevisiae*가 XR과 XDH의 결여에 의하여 xylose를 발효시키지 못하지만(54), *S. cerevisiae*는 xylose를 발효시키는 다른 yeasts 보다 hemicellulose의 산 가수분해 산물에 존재하는 여러 가지 독성 물질에 대한 저항성이 크다(55). 더구나 *S. cerevisiae*는 유전자 조작을 위한 기초 연구가 많이 이루어져 있어 vector 및 transformation 방법 등이 확립되어 있으며, 또한 이미 재조합 *S. cerevisiae*에서 XR gene의 발현에 대한 보고가 있다(55,56,57). 특히 Calsen *et al.*(58)에 의하면 XR gene을 소유한 재조합 *S. cerevisiae*는 XDH gene이 존재하지 않아 생성된 xylitol이 분해되지 않기 때문에 100%의 xylitol 수율을 얻을 수 있다고 보고하였다. 그러나 재조합 *S. cerevisiae*의 생존과 XR의 cofactor인 NAD(P)H의 공급을 위하여 다른 탄소원을 함께 첨가하여야 한다. 이때 주입하는 탄소원과 배양조건에 따라 xylitol의 생산성

이 다르게 나타난다. 즉 통기조건하의 회분식 발효에서 탄소원으로 glucose, ethanol 및 acetate를 xylose와 함께 첨가하는 경우에 세포성장뿐만 아니라 100%의 수율로 xylitol 생성이 가능하다. 그러나 높은 xylitol의 생산성 및 glucose에 대한 높은 수율을 얻기 위해서는 two phase 배양이 매우 유용하다. 즉 glucose 배지에서 통기조건으로 고농도의 세포를 얻은 다음 xylose를 첨가하여 혐기적 조건에서 배양하면 xylose에 대한 xylitol의 수율은 거의 100% 이고 glucose에 대한 xylitol의 수율은 2.2 g/g-glucose이며 생산성은 1.26 g/L-hr이고 비생산성은 0.12 g/g-hr로 *C. guilliermondii* (26) 보다 더 높았다는 보고가 있다(58). 이와 같이 외국에서의 xylitol 생산에 대해서는 생산성 및 수율의 향상을 위한 균주개발과 발효공정에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그러나 국내에서는 황 등(59)에 의하여 토양에서 분리한 *Candida* sp. BT001의 xylose reductase를 이용한 xylitol 생산과 오 등(59)이 *Candida parapsilosis*에 의한 xylitol 생산조건의 최적화에 대한 보고가 있으며, 최근 많은 연구가 진행되고 있다.

따라서 앞으로 식품 및 의료용으로 수요가 급증할 xylitol의 대량생산을 위하여 높은 수율과 생산성으로 농산 및 임산 폐기물로부터 xylitol을 생산할 수 있는 균주개발이 필요하다고 할 수 있다. Hemicellulose의 가수분해 산물에는 주요 구성성분으로 xylose가 40% 정도 존재하지만 그 이외에 glucose 및 다른 hexoses와 pentoses도 존재한다. 이러한 hemicellulose 가수분해 산물을 원료로 하여 xylitol을 생산하기 위해서는 사용균주의 XR 생성이 glucose에 의한 catabolite repression을 받지 않으면서 XDH가 결여된 변이균주의 개발이 요구된다. 본 연구에서는 *Candida* sp.를 이용한 xylose로부터 xylitol의 생산성 및 수율을 향상시키기 위한 균주개발과 배지 및 배양조건에 대한 연구를 수행하였다.

제 2절 연구 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 시약 및 사용균주

D-xylose 등의 모든 당과 ethyl methane sulfonate (EMS), lyticase, 및 2-mercaptoethanol은 Sigma(U.S.A)사 제품을 이용하였고, yeast extract, bacto peptone 및 agar는 Difco사 제품을 이용하였다. 그 외의 모든 시약들은 특급 및 1급을 이용하였다. 본 연구에서는 *Candida guilliermondii* ATCC6260, *Candida parapsilosis* ATCC22019, *Candida tropicalis* ATCC20336, ATCC 0750, ATCC13803을 생명공학 연구소로부터 분양 받아 이용하였다.

나. 배양배지 및 배양조건

접종용 균주 배양은 Table 1의 배지 50 mL을 250 mL 삼각 flask에 넣고 멸균한 후에 균을 접종하여 30℃에서 48 시간 동안 150 rpm으로 진탕 배양하여 사용하였다. Xylitol dehydrogenase (XDH) defective mutant의 배양은 Table 1에서 xylose 대신 glucose를 사용하였다. 모든 배양 및 발효를 위한 접종용 균주의 양은 5%(v/v)로 하였다. Catabolite repression에 대한 연구는 Table 2의 배지 200 mL를 500 mL 삼각 flask에 넣고 멸균한 후에 30℃에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 모든 배지의 멸균 과정에서 xylose와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 별도로 멸균하여 혼합하였다. Xylitol 생산을 위한 발효배지는 Table 3의 배지에 당을 첨가하여 사용하였다. 진탕 배양기에 의한 xylitol 발효는 10~100 g/L의 당이 포함된 발효배지 200 mL를 500

mL 삼각 flask에 넣고 30℃에서 150 rpm으로 배양하였다. 발효조를 이용한 xylitol 발효는 10~100 g/L 당이 포함된 발효배지 1.5 L를 2.5 L fermentor (KFC, Korea)에 넣고 30℃에서 0.3 vvm으로 통기하고 250 rpm으로 교반하면서 실험을 수행하였다.

Table 1. The medium composition for inoculum.

Compounds	Composition (g/L)
D-Xylose	20
Yeast extract	10
KH ₂ PO ₄	15
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	2

Table 2. The medium composition for the experiment of catabolite repression.

Compounds	Composition (g/L)
D-Glucose	5
D-Xylose	5
Yeast extract	2
KH ₂ PO ₄	5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	2

Table 3. The composition of fermentation medium.

Compounds	Composition (g/L)
Yeast extract	10
KH ₂ PO ₄	15
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	2

2. 실험 방법

가. Wild type과 mutants 균주의 enzyme activity 측정

Table 3의 배지조성에서 탄소원으로 10 g/L glucose가 첨가된 배지, 10 g/L xylose가 첨가된 배지, 5 g/L glucose와 5 g/L xylose가 함께 첨가된 혼합배지에 *Candida* sp.의 wild type과 catabolite derepressed mutants을 30°C, 250 rpm으로 배양한 후 배양액을 취하여 세포성장 및 잔당을 분석하고 XR와 XDH의 활성을 측정함으로써 *Candida* sp.의 wild type과 catabolite derepressed mutants의 특성을 비교하였다.

나. *Candida* sp.의 xylitol 발효특성 연구

Candida sp. 균주들의 xylitol 생산능력 및 발효특성을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 50 g/L xylose가 포함된 발효배지와 25 g/L xylose와 25 g/L glucose가 포함된 혼합배지를 이용한 flask 배양에서 배양시간에 따른 세포성장, xylitol 및 ethanol 생성에 대한 발효특성을 알아보았다.

다. Xylitol 생산을 위한 배지의 선정

Candida sp.에 의한 xylitol 생산과정에서 적절한 배지 선정을 위하여 기존 연구자들인 Dahiya 등(60), Horitsu 등(43), Onishi 등(15)이 실험한 배지 조성과 일부 질소원을 변화시켜 flask에서 배양하면서 xylitol 생산성을 비교함으로써 적절한 배지 선정을 위한 연구를 수행하였다.

라. 통기조건이 xylitol 생산에 미치는 영향

Xylitol 발효과정에서 가장 중요한 배양조건은 통기조건이다(32-35). 따라서 *Candida* sp.의 xylitol 발효과정에서 통기조건에 영향을 검토하기 위하여 발효조에서 교반을 250rpm으로 유지하고 통기를 0.1, 0.2, 0.3, 0.7, 1.0, 2.0 vvm으로 증가시키면서 xylitol 생산에 대한 통기의 영향을 연구하였다.

마. 돌연변이 유도 및 우수 변이균주의 선별

Candida sp.으로 부터 spores를 얻기 위해서 효모 균주를 YPD 배지 (Table 4)에서 18시간 배양한 후 prespore 형성배지 plates (Table 5)에 도말하여 30℃ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이를 다시 spore 형성배지 plates (Table 6)에 도말하여 30℃ 배양기에서 4일간 배양한 후 4℃ 냉장고에 한달 가량 보관하였다. 변이의 유도 및 XDH defective mutant의 선별은 본 연구실에서 사용하는 방법(61,62)으로 수행하였다. 즉 돌연변이는 ethylmethane sulfonate (EMS) 또는 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)를 처리하여 유도하였다. 방법은 먼저 한 달간 보관한 spore 형성배지 plates에서 균체를 멸균증류수로 수집하여 10 mM 2-mercaptoethanol에서 30분간 처리한 후 0.5 mg/L lyticase (100,000 unit) 현탁액에 4시간 동안 반응시켜 spores를 추출하였다. 여기에 3% (w/v)의 EMS 또는 0.8% (w/v)의 NTG를 처리하여 각각의 효모 균주가 99.9% 이상의 사멸율을 나타내는 시

간동안 변이를 유도하고 5% sodium thiosulfate를 첨가하여 돌연변이 반응을 중단시켰다. Catabolite derepressed mutant의 선별은 다음과 같다. 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℃ 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 우수한 변이균주를 선별하였다. XDH defective mutant의 선별은 다음과 같다. 변이가 유도된 spores의 현탁액을 YPD plates (20 g/L의 agar가 포함된 Table 4의 배지)에 도말하여 30℃ 배양기에서 6일간 배양하였다. YPD plates에서 성장한 colonies를 유일 탄소원으로 xylose가 존재하는 YNB plates (Table 7)에 picking 시켜 30℃에서 6일간 배양하였다. 1차적으로 YPD plate에서 colony 형성이 양호한 반면 YNB plate에서 colony 형성이 되지 않거나 또는 매우 미미하게 형성되는 것을 선별하였다. 1차적으로 선별한 변이균주를 25 g/L xylose와 25 g/L의 glucose가 함유된 혼합당 배양배지에서 배양하여 xylitol 생산성을 측정하여 xylitol 수율이 우수한 것을 최종적으로 XDH defective mutant로 선별하였다.

Table 4. The composition of YPD medium.

Compounds	Composition (g/L)
D-Glucose	20
Yeast extract	10
Bacto peptone	10

Table 5. The medium composition for presporulation.

Compounds	Composition (g/L)
D-Glucose	100
Yeast extract	8
Bacto peptone	3
Agar	20

Table 6. The medium composition for spores formation

Compounds	Composition (g/L)
D-Glucose	1.0
Yeast extract	2.5
KCl	1.8
Sodium acetate	8.5
Agar	15.0

Table 7. Yeast nitrogen base agar medium (YNB).

Compounds	Composition (g/L)
D-Xylose	20
Yeast nitrogen base	7
Agar	20

바. Co-substrate의 선별

XDH defective mutant에 의한 xylitol를 생산하기 위해서는 XR의 생성을 억제하지 않는 co-substrate가 필요하다. 따라서 co-substrate를 선별하기 위한 실험을 수행하였다. Co-substrate로서 fructose, galactose, mannose, maltose, ethanol, sorbitol, sucrose, cellobiose, glycerol, hydrol 등을 xylose와 각각 10 또는 20 g/L씩 첨가한 후 flask 배양을 수행하여 당 농도와 xylitol의 생산을 알아보았다.

사. XDH defective mutant 발효특성 연구

XDH defective mutant들의 xylitol 생산능력 및 발효특성을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 10 또는 20 g/L xylose가 포함된 발효배지와 25 g/L xylose와 25 g/L glucose가 포함된 혼합배지를 이용한 flask 배양에서 배양 시간에 따른 세포성장 및 xylitol 생성에 대한 발효특성을 조사하였다. 또한, 선별된 XDH defective mutant에 의한 xylitol 생성을 위한 최적 발효조건 확립에 관한 실험을 수행하였다.

아. 옥수수 속의 가수분해 용액의 xylitol 발효

Corn cobs의 시료는 다음과 같이 제조하였다. 옥수수 속을 60℃에서 건조시킨 후, 20~40 mesh sieve을 사용하여 옥수수 속이 20~40 mesh 되도록 하였고, 시료는 실험에 사용하기 전에 60℃에서 24시간 이상 건조시켜 사용하였다.

Lignin 제거를 위해서는 4% (w/v) NaOH를 사용하였고, hemicellulose의 추출 및 가수분해를 위해서는 1% (w/v) H₂SO₄를 사용하였다. 20~40 mesh의 옥수수 속 300 mg을 10 mL을 공정에 따라 각각 4%(w/v) NaOH를 첨가하여 lignin을 제거시킨 후 1% (w/v) H₂SO₄에 첨가하여 100℃

water-bath에서 다양한 시간 동안 incubation 시킨 후, Watman filter paper No.1을 이용하여 filtration 하여 얻어진 산 가수분해 용액을 xylitol 발효에 사용하였다. 이와 같은 방법으로 추출된 시료는 HPLC (Waters)를 이용하여 xylose와 glucose의 농도를 측정하였다.

자. Flocculent mutant 선별을 위한 EMS Mutagenesis

Alkylating agent로 돌연변이 유발물질인 EMS(Methanesulfonic acid ethylester)를 이용한 균주개량기술을 적용하였다. EMS를 여러농도로 처리하여 사멸율(death rate)이 90% 이상인 농도를 결정한 후, 이 농도로 처리하여 mutant를 확보하였다.

차. Cationic flocculant의 선정과 stock solution 제조

Cationic flocculant를 선정할 때 cationic flocculant로서 가능성이 있는 salt와 polymer를 선별하여 그것들이 각각 세포응집(flocculation)에 미치는 영향을 조사하였다. 이때 사용한 salt는 divalent cation의 효과를 보기 위한 CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 와 monovalent cation의 효과를 보기 위한 NaCl , KCl 로 1 M stock solution을 만들어 사용하였다. 또한 polymer는 cationic polyacrylamide copolymer인 Zetag48, Zetag63, Zetag78, Zetag92 (Allied Colloids Ltd.)을 1 % (w/v) stock solution으로 제조하였고, chitosan은 완전한 용해를 위해서 2%(v/v) acetic acid solution에 1% (w/v)가 되도록 녹여 본 실험에 사용하였다.

카. 세포 응집 여부의 확인

세포 응집 여부 확인시에는 30℃에서 키운 50ml의 배양액에 적절한 농도로

flocculant를 첨가하고 잘 흔들어 섞어준 다음 약 5분간 방치하여 응집 여부를 확인하였다.

현미경을 통해 cell들이 서로 엉겨붙는지의 여부를 관찰하는 방법과 뭉치는 정도에 따른 육안에 의한 식별법, 또 flocculant를 첨가하기 전의 optical density (OD)와 flocculant를 첨가하고 나서 상층에서 취한 sample의 OD를 비교하여 그 차이로 cell이 가라앉는 정도를 측정하는 방법으로 세포 응집 여부와 정도를 확인하였다.

다. Flocculation이 일어나는 mutant 선별

위에서 확보된 mutant를 YM agar plate에 spreading하여 얻은 colony중에서 그 크기가 큰 것을 5ml YM 배지가 든 test tube에 접종하여 3일간 배양하였다. 3일간의 배양후 배양액을 5분간 방치하였을때 세포가 바닥에 가라앉는 정도가 높은 균주를 flocculent mutant로 선별하였다. 선별 방법은 test tube를 shaking하였을 때의 배양액의 OD와 5분 방치후 세포가 바닥에 가라앉았을 때 상층부의 OD간의 차이가 큰 것일수록 flocculation이 잘 된 것으로 분석하였다.

하. 최적 유기 질소원의 선정

여러 가지 유기 질소원이 cell flocculation과 xylitol 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 다음과 같은 sample을 준비하였다. Yeast Extract (Difco), Yeast Extract (조흥화학), Yeast Extract (가림산업), Yeast Extract (Geneco), Yeast Extract (제일유니버살), Yeast Extract (Acumedia), Expresa2200 (GistBrocades), Gistex LS ferm powder (GistBrocades), Yeast Peptone (Biospringer), Meat Peptone (Marcor), Casitone (Difco), Cotton seed flour (Traders)의 12가지 sample로 각각의

영향을 살펴보고 최적의 효과를 나타내는 유기질소원을 선정하였다.

3. 분석 방법

가. Xylitol 및 당 정량

Xylitol 및 모든 당의 농도는 carbohydrate analysis column (Waters, USA)을 이용하여 HPLC (Waters, USA)에서 RI detector로 측정하였다. 용매의 조성은 acetonitrile : H₂O 가 85:15, flow rate는 2 mL/min으로 하여 분석하였다. 또한, 분석을 위한 시료는 0.2 μ L의 filter를 이용하여 filtration하여 분석에 이용하였다.

나. Cell 농도 측정

세포농도는 배양액을 4,00rpm으로 15분간 원심 분리하여 상등액을 제거하고 cell을 수집한 후에 증류수로 1회 washing 한 후, spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu, Japan)로 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 에탄올 정량

배양액중의 에탄올 농도는 flame ionization detector를 이용한 gas chromatography (Hitachi Model 263-30, Japan)로 측정하였다. 이 때 사용한 column 은 chromosorb W/AW (60-80 mesh)에 20% carbowax 20M을 포화시킨 물질을 packing 한 2 mm \times 2.0 m stainless column을 이용하였다. Gas chromatography의 조작은 injector와 detector의 온도를 250 $^{\circ}$ C로 하였고 oven 온도를 100 $^{\circ}$ C로 하였다. Internal standard 시료액으로 2% (v/v) butanol를 사용하였다.

라. 효소의 활성화 (XR, XDH) 측정

효소용액의 준비는 배양액을 원심 분리하여 상등액을 제거하고 cell을 수집한 후에 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하고 30% 2-mercaptoethanol을 30분간 처리하였다. 다시 buffer로 3회 세척하여 sonicator로 cell을 파쇄한 후에 원심분리 (12,000 rpm, 15 min)하여 얻은 상등액을 효소용액 (enzyme solution)으로 하였다. 모든 효소용액의 준비과정은 4°C에서 수행하였다. XR과 XDH의 활성화는 다음과 같이 측정하였다 (63,64). XR의 활성화는 1.0M Phosphate buffer (pH 7.0) 1.0 mL, 0.1 M 2-mercaptoethanol 0.2 mL, 4 mM NADPH 0.2 mL, 효소용액 2.0 mL을 넣고 기질로서 0.5 M D-xylose 0.2 mL을 첨가하여 반응을 시작한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 1 unit는 1분당 1 nmol NADPH가 감소하는 초기 속도로 정의하였다. XDH의 활성화는 1.0 M Phosphate buffer (pH 7.0) 1.0 mL, 0.1 M 2-mercaptoethanol 0.2 mL, 4 mM NAD 0.2 mL, 효소용액 2.0 mL을 넣고 기질로서 0.5 M D-xylitol 0.2 mL을 첨가하여 반응을 시작한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 1 unit는 1분당 1 nmol NADH가 생성되는 초기 속도로 정의하였다. 단백질 정량은 BSA를 표준으로 하여 Lowry-Poline법(65)에 의하여 측정하였으며, 효소의 specific activity는 unit/mg-protein으로 정의하였다.

4. XR 유전자의 분석과 클로닝

가. Genomic DNA 순수분리

효모를 배양하여 세포를 수집한 후에 spheroplast buffer로 현탁시켰다. 1.0 mL의 lyticase solution (10 mg/mL)을 넣고 37°C에서 overnight 시켰다. 다시 세포를 수집하여 spheroplast buffer로 현탁시킨 후에 TEN buffer와

10% SDS, RNase를 넣고 37℃에서 2시간 반응시켰다. 반응물질에 proteinase K를 넣고 다시 2시간 반응시킨 후에 65℃에서 30 분간 가열하고 상온에서 서서히 식혔다. Phenol/chloroform을 넣고 원심분리하여 불순물을 제거하고 NaCl과 ethanol를 넣고 DNA를 침전시키고 침전물을 수집하여 적당량의 TE buffer에 녹였다.

나. Genomic DNA digestion

Genomic DNA 10 μ g 정도를 *Sall*, *EcoRI*, *SacI*, *XhoI*과 같은 여러 가지 제한효소로 digestion하여 전기영동하고 gel 상의 DNA를 모세관 현상을 이용하여 Nytran filter (Scheicher & Schuell)로 transfer 시켰다.

다. Genomic Southern hybridization 분석

Hybridization solution에 Nytran filter를 넣고 상온에서 prehybridization 한 후에 probe를 넣고 30℃에서 12시간 이상 hybridization 시켰다. 이때 probe로는 *P. stipitis* XR 유전자의 *Sall-Sall* 단편인 1 kb의 DNA에 32 P로 표지하여 이용하였다.

라. Size-selected genomic library 제조

Genomic Southern blot의 결과 hybridization band를 보인 제한효소를 이용하여 size-selected library를 제조하였다. Genomic DNA를 제한효소로 자른 후 전기영동을 하여 원하는 부위의 gel로부터 DNA를 추출하여 insert DNA를 준비하였다. pBluescript KS(+) Π plasmid DNA를 동일한 제한효소로 처리한 후 특정한 size의 genomic DNA를 T4 ligase를 사용하여 재조합 plasmid를 만들었다. *E. coli* JM101을 숙주로 electroporator를 이용하여 transformation함으로써 size-selected partial library를 제조하였다.

마. Colony hybridization에 의한 library screening

제조된 size selected library를 LB plate (+ Ampicillin + X-gal + IPTG)에 갈아서 white colony만을 선별하여 master plate를 만들었다. Master plate의 colony들을 Nytran filter에 옮겨 filter를 ^{32}P 가 표지된 '*P. stipitis*' XR 유전자의 *SaII-SaII* 단편을 probe로 hybridization 하였다.

바. 제한효소 지도 작성 및 subcloning.

Positive colony 중에서 한 개의 클론을 선택하여 DNA를 다량으로 얻어 여러 가지 제한효소로 처리한 후 Nytran filter에 올려 Southern hybridization을 병행하여 XR 유전자의 지도를 작성하고 coding 부위로 예상되는 부분을 확인하였다. Coding 부위를 포함하는 DNA 절편을 pBluscript KS(+)-II를 vector로 이용하여 ligation한 후 *E. coli* JM101에 transformation하여 subcloning 하였다.

사. XR 유전자 염기서열 분석

Subcloning한 DNA를 dideoxy 방법을 이용하여 직접 염기서열을 결정하고 Mini prep kit (Promega 사)로 좀더 정제한 DNA를 이용 automatic sequencer로 다시 한 번 염기서열을 확인하여 최종결과를 얻었다.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. *Candida* sp.의 xylitol 발효특성 및 Catabolite repression이 제거된 변이균주 개발

가. XR 및 XDH의 생성유도 및 억제현상연구

Candida sp.의 XR과 XDH의 생성 유도 및 억제에 대한 현상을 알아보기 위하여 glucose와 xylose가 동시에 존재하는 배지에서 효모 균주들을 배양하면서 두 기질의 배지내의 농도를 측정하였다. 실험결과 Fig. 2에서와 같이 *C. guilliermondii*의 경우에는 glucose가 완전히 이용된 후에 xylose가 이용됨을 알 수 있었다. 세포성장도 XR과 XDH의 유도기간 동안에 약간의 정체시기가 배양 18시간에서 22시간사이에 나타나는 diauxic kinetic form을 나타내고 있으며, 이때 glucose에 대한 최대 비성장속도(μ_m)는 0.267 hr^{-1} 로서 xylose에 대한 최대 비성장속도(μ_m)인 0.026 hr^{-1} 보다 약 10배 더 높았다. 그러나 *C. parapsilosis*의 경우는 Fig. 3에서와 같이 세포성장에서 정체기가 나타나지 않는 것으로 보아 *C. guilliermondii* 보다 xylose 이용에 대한 glucose의 catabolite repression에 대한 영향이 약간 적은 것으로 추정된다. 반면 Fig. 4에서와 같이 *C. tropicalis*에서는 10 g/L glucose와 10 g/L xylose로 총 당농도가 20 g/L로 증가시켰는데도 glucose에 대한 최대 비성장속도(μ_m)가 0.358 hr^{-1} 로 *C. guilliermondii*와 *C. parapsilosis* 보다 성장속도가 매우 높았다. 또한 glucose에 의한 catabolite repression에 대한 영향도 다른 두 균주보다 더 적은 것으로 나타났다. 이와 같이 *Candida* sp.들에서 종간의 차이는 있지만 모두 glucose에 의하여 xylose의 이용이 catabolite repression을 받았다. 이는 *C. utilis*(49), *C. shehatae*(45), *P.*

stipitis(45), *P. tannophilus*(50) 및 *C. guilliermondii*(63)가 glucose에 의하여 xylose 이용이 catabolite repression을 받는다는 이미 보고된 결과와 동일하였다.

Glucose의 유도체인 2-deoxyglucose는 glucose와 같이 효모들에서 catabolite repression에 의하여 XR과 XDH의 합성을 억제한다(48,52). 따라서 유일 탄소원으로 xylose가 첨가된 배지에 2-deoxyglucose를 첨가하여 *Candida* sp.를 배양하면 catabolite repression에 의하여 XR과 XDH가 생성이 되지 않아 효모들이 성장하지 못할 것이다. 사용한 *Candida* sp.의 2-deoxyglucose에 대한 성장 억제 농도 결정을 위한 실험결과를 Table 8에 나타내었다.

실험결과에서 *C. guilliermondii*와 *C. tropicalis* ATCC 13803은 catabolite repression에 의하여 XR과 XDH가 유도되지 않아 세포가 성장할 수 없는 2-deoxyglucose의 농도는 10 g/L였으며, *C. parapsilosis*의 경우는 2-deoxyglucose 농도가 20 g/L에서 세포성장이 완전히 억제되었다. 반면 *C. tropicalis* ATCC 20336과 ATCC 0750은 20 g/L의 2-deoxyglucose 농도에서도 세포성장이 가능하였다. 이러한 결과는 glucose와 xylose의 혼합배양에서 나타난 세포성장 특성의 결과와 동일하였다. 특히 *P. stipitis* CBS 5776을 20 g/L의 2-deoxyglucose의 농도에서도 세포성장이 매우 양호하였다. 이러한 결과로 볼 때 glucose에 대한 catabolite repression은 균주의 종에 따라 매우 다르게 나타남을 알 수 있었으며 보고된 결과와도 유사하였다 (48,51).

Table 8. Effect of 2-deoxyglucose on cell growth of *Candida* sp. on mutant selection medium at 10 days culture.

Strains	2-deoxyglucose (g/L)						
	0	2.5	5	7.5	10	15	20
<i>C. guilliermondii</i> ATCC 6260	+++	+	+	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	+++	+	+	+	+	+	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 20336	+++	++	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC 0750	+++	++	+	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	+++	+	+	+	-	-	-
<i>P. stipitis</i> CBS 5776	+++	++	++	++	++	++	++

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

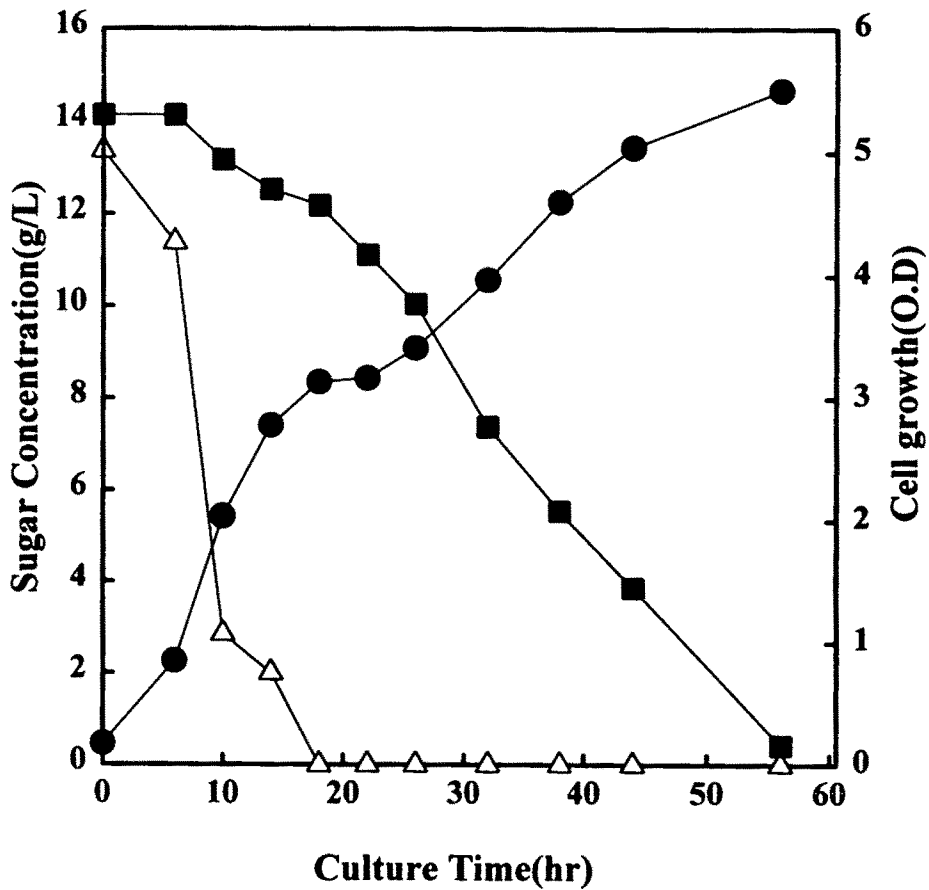


Fig. 2. Profiles of cell growth(●), glucose(△), and xylose(□) concentrations during the culture of *C. guilliermondii*.

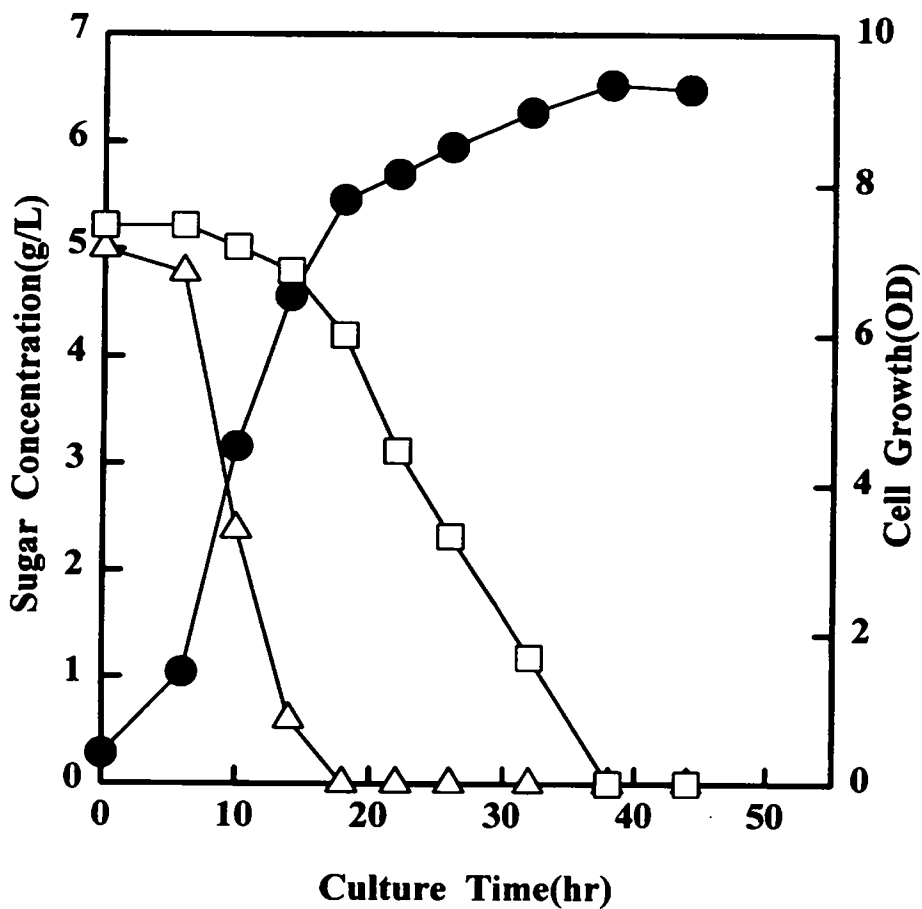


Fig. 3. Profiles of cell growth(●), glucose(△), and xylose(□) concentrations during the culture of *C. parapsilosis*.

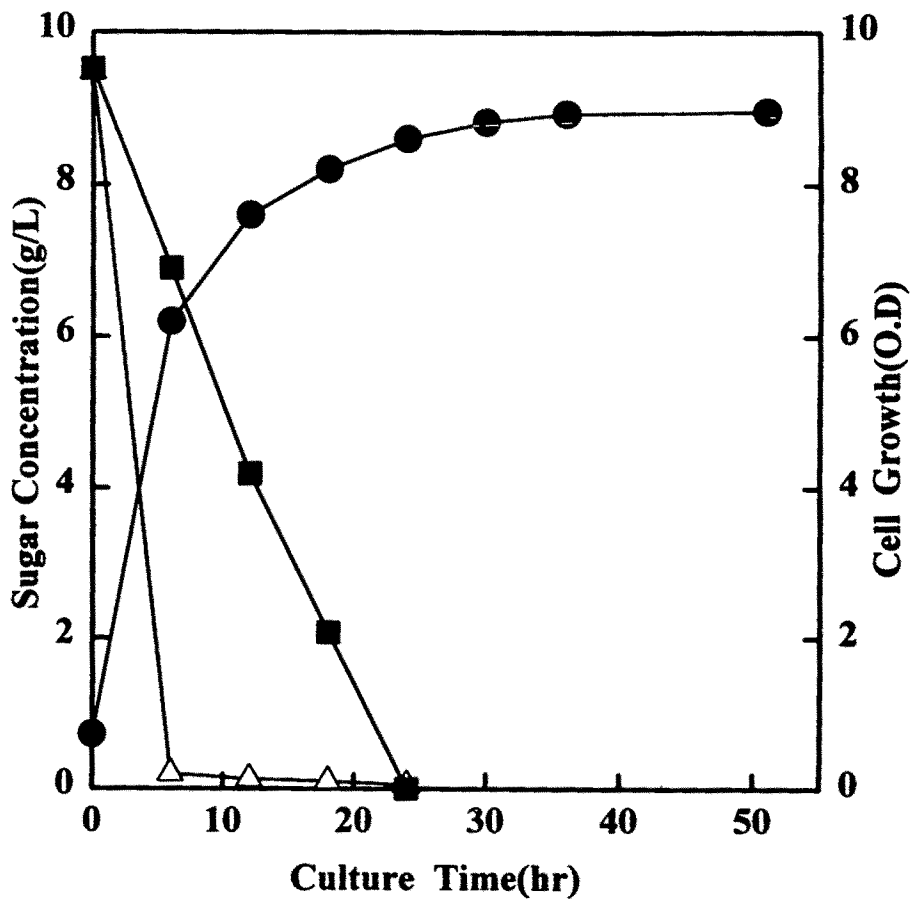


Fig. 4. Profiles of cell growth(●), glucose(△), and xylose(□) concentrations during the culture of *C. tropicalis*.

나. *Candida* sp.의 xylitol 발효특성

Candida sp. 균주들의 xylitol 생산 능력 및 발효 특성을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 먼저 50 g/L의 xylose가 포함된 발효배지를 shaking incubator에서 flask 배양한 결과를 Table 9에 나타내었으며, 또한 배양시간에 따른 세포성장, xylitol 및 ethanol 생성에 대한 발효특성을 Fig. 5~Fig. 7에 나타내었다.

실험결과에서 *C. guilliermondii*는 Fig. 5에서와 같이 xylitol의 생성은 세포성장과 비례하여 3일 배양시기까지 증가하였으나 xylose 농도가 10 g/L 이하에서는 xylitol 생성보다는 세포 성장에 xylose를 이용하였다. 또한 약간의 ethanol도 5일 배양시기까지 계속적으로 생성되었다. 따라서 xylose가 존재하는 동안에는 ethanol과 xylitol을 세포 성장을 위한 탄소원으로 이용하지 않는 것으로 추정된다. 최대의 xylitol 농도는 19.5 g/L로 수율은 0.38 g-xylitol/g-xylose 이었다.

Table 9. Cell growth, xylitol and ethanol production of *Candida* sp. from 50 g/L xylose fermentation medium.

Strains	Cell Growth O.D at 620nm	Ethanol Conc. (g/L)	Xylitol Conc. (g/L)	Xylitol Yield (g/g)
<i>C. guilliermondii</i> ATCC 6260	30.9	2.3	19.5	0.38
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	36.7	0.3	30.8	0.63
<i>C. tropicalis</i> ATCC 20336	27.0	0.4	29.1	0.54
<i>C. tropicalis</i> ATCC 0750	21.0	0.4	30.3	0.58
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	23.6	0.9	32.9	0.61

*C. parapsilosis*는 Fig. 6에서와 같이 3일 배양시기까지 세포성장과 xylitol 생성이 비례적으로 증가하여 최대 xylitol 농도가 30.9 g/L가 되었으며 이후부터는 xylitol 농도가 감소하였다. 이때 3일 배양시의 xylitol 수율은 0.63 g-xylitol/g-xylose로서 보고된 결과와 거의 유사한 값을 얻을 수 있었다(24). 반면 세포성장은 이미 생성한 xylitol과 ethanol을 탄소원으로 이용하여 5일 배양시기까지 계속적으로 증가하였다.

*C. tropicalis*의 경우도 Fig. 7에서 보듯이 xylitol의 생산은 3일 배양시기에 최대 32.9 g/l로서 이때의 수율은 0.61 g-xylitol/g-xylose 이었다. Xylose 농도도 3일 배양시기에 거의 모두 소모되었으며, 세포성장은 초기의 높은 xylose 농도에서 매우 낮은 반면에 xylose 농도가 10 g/L 이하인 배양 2일 이후부터는 세포의 성장속도가 증가하였다. 또한 세포의 성장은 xylose가 모두 소모된 이후에도 생성된 xylitol과 ethanol을 이용하여 5일 배양까지 계속 증가하였다. 초기의 최대 비성장속도는 *C. guilliermondii*가 가장 높는데, 이는 당 농도에 대한 내성이 높기 때문이다(21). 반면 *C. tropicalis*는 높은 초기 당 농도에서 세포 성장이 억제되는 반면 xylitol의 생성은 균주들 중에서 가장 우수한 것으로 사료된다.

결론적으로 *C. guilliermondii*는 높은 당 농도에 대한 내성은 우수하지만 xylose의 이용 속도는 낮아 xylitol의 생성이 우수하지 못하였고 *C. tropicalis*는 높은 당 농도에서의 세포 성장은 억제되었지만 XR의 활성이 우수하여 배양 초기부터 높은 속도로 xylose를 xylitol로 전환시켜 생산성이 0.46 g/L-hr로 균주들 중에서 가장 높았다. 반면 *C. parapsilosis*는 *C. guilliermondii*와 *C. tropicalis*의 중간적인 특성을 나타내었다. 또한 ethanol은 *C. guilliermondii*에서 최대 2.3 g/L가 생성되었으나 다른 균주에서는 ethanol의 생성이 매우 낮았다. 더구나 ethanol은 xylose가 모두 소모된 이후에 xylitol과 마찬가지로 균주의 성장을 위한 탄소원으로 이용되었다. 따라서 균주들은 모두 XR의 활성이 XDH 보다 매우 높으며 생성된 xylitol이 쉽게 배지 내 분비됨을 알았다.

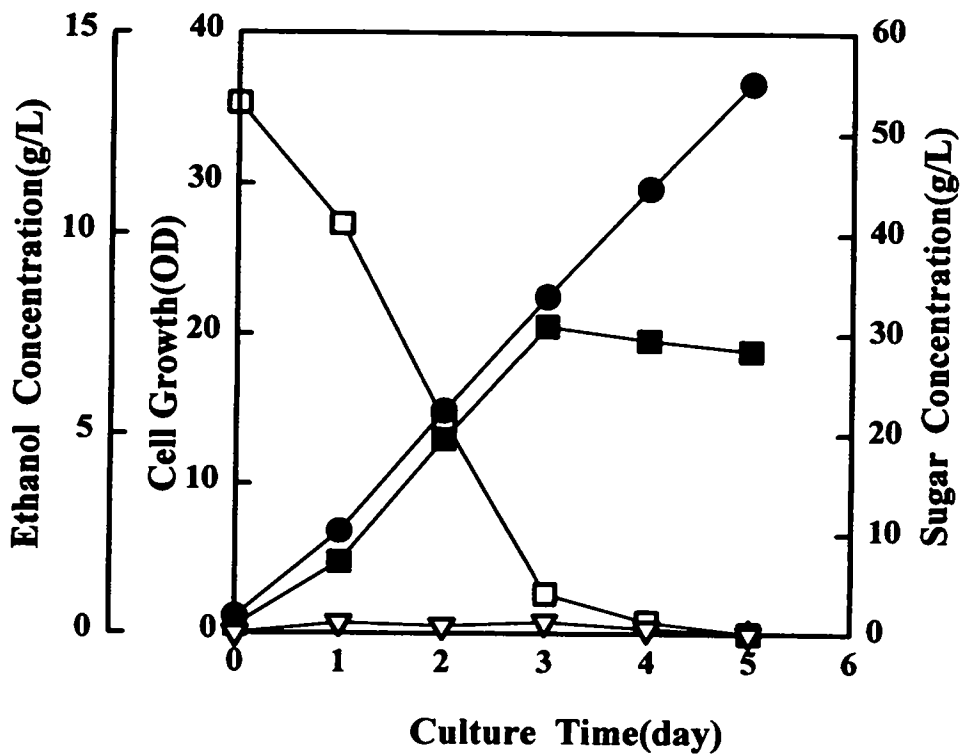


Fig. 5. Profiles of cell growth(●), xylose(□), xylitol(■), and ethanol(▽) concentrations during the culture of *C. guilliermondii*.

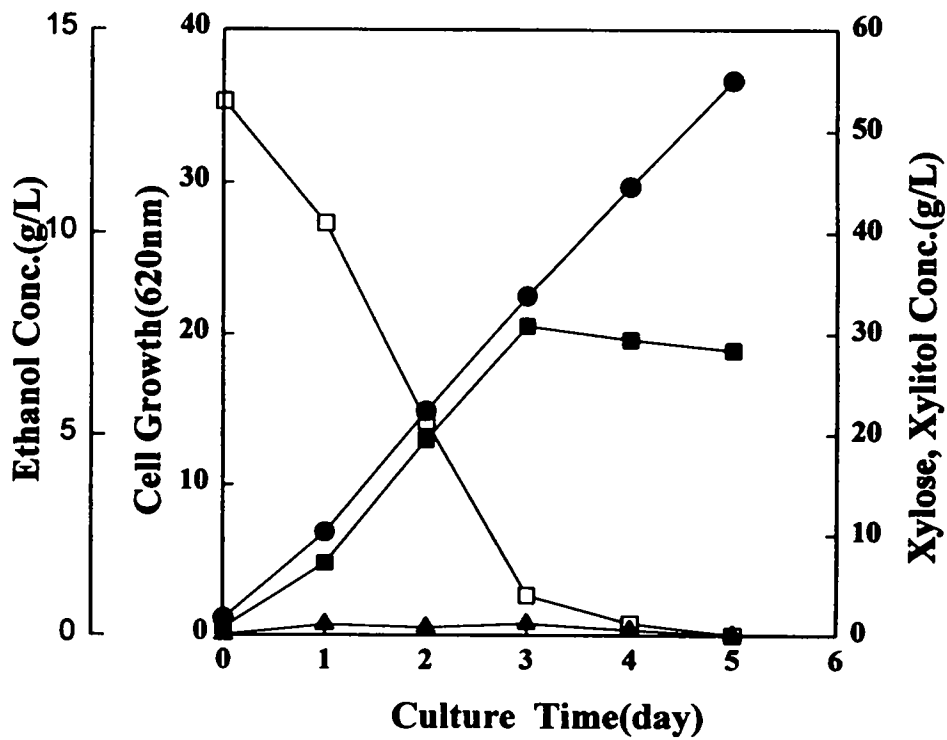


Fig. 6. Profiles of cell growth(●), xylose(□), xylitol(■), and ethanol(∇) concentrations during the culture of *C. parapsilosis*.

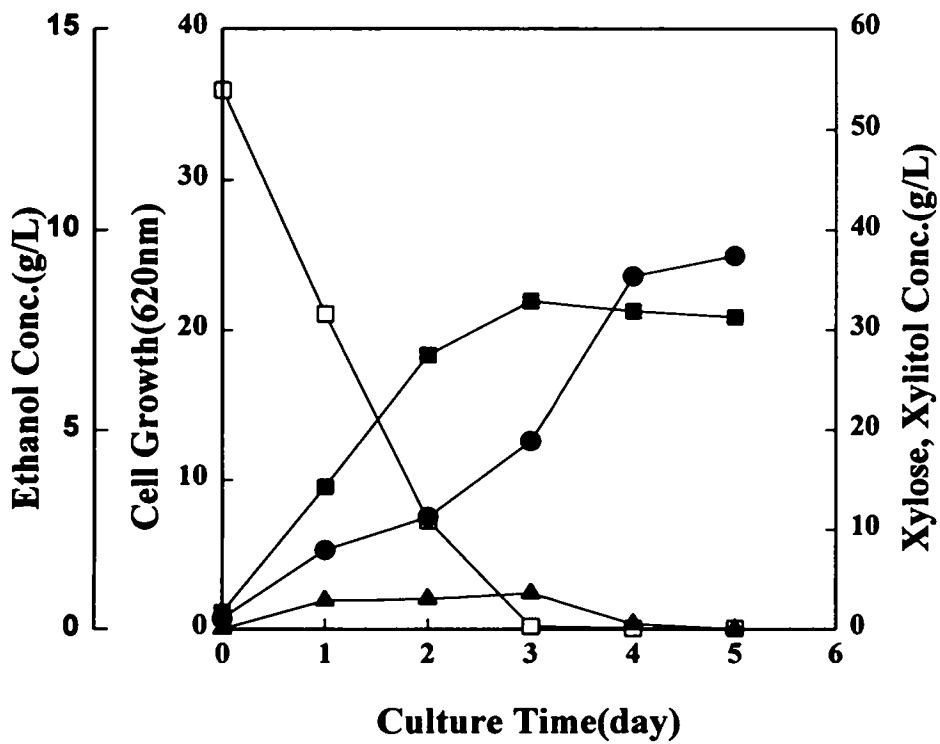


Fig. 7. Profiles of cell growth(●), xylose(□), xylitol(■), and ethanol(▽) concentrations during the culture of *C. tropicalis*.

Glucose에 의한 catabolite repression이 xylitol 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 25 g/L의 glucose와 25 g/L의 D-xylose가 포함된 발효배지를 flask 배양한 결과 Table 10과 Fig. 8~Fig. 10에 나타내었다. 실험결과 Table 10에서 보듯이 혼합당에서는 glucose가 1일 배양시기에 모두 소모되면서 ethanol이 생성되었으며 xylitol 생성의 수율은 전반적으로 xylose만을 이용한 배지에서 보다 낮았다.

균주들에 따른 혼합당에서의 발효특성을 보면 *C. guilliermondii*의 경우 Fig. 8에서 보듯이 세포성장은 배양 4일까지 계속되었다. Ethanol의 생성은 1일 배양 시에 7.1 g/L가 된 이후에 거의 일정한 값을 유지하였다. 이는 균주가 xylose로부터의 ethanol 생성이 매우 낮던지 또는 생성된 ethanol을 탄소원으로 다시 이용하기 때문으로 사료된다. Xylitol의 생산은 glucose가 모두 소모된 1일 배양 이후부터 생성되기 시작하여 5일 배양시기에 최대 6.2 g/L로 수율은 0.25 g-xylitol/g-xylose로서 매우 낮았다. 또한 5일 배양 시기까지 xylose를 모두 소모되지 못하였다. 이는 생성된 ethanol에 의한 xylose의 uptake가 억제되었던지 또는 XR의 합성 및 활성이 ethanol에 의하여 억제되기 때문으로 사료된다. 더구나 *C. guilliermondii*는 glucose에 의한 catabolite repression에 매우 민감한 균주이므로 배양 초기에 XR의 합성이 억제되고 glucose가 모두 소모된 이후에는 ethanol에 의한 XR의 활성 또는 생성 억제가 발생하여 xylitol 생산이 매우 낮은 것으로 사료된다. 따라서 *C. guilliermondii*의 경우는 catabolite derepressed mutant 균주의 개발이 요구된다.

Table 10. Cell growth, xylitol and ethanol production of *Candida* sp. from 25 g/L glucose and 25 g/L xylose fermentation medium.

Strains	Cell Growth O.D at 620nm	Ethanol Conc. (g/L)	Xylitol Conc. (g/L)	Xylitol Yield (g/g)
<i>C. guilliermondii</i> ATCC 6260	28.3	7.8	6.2	0.25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	36.7	9.4	11.9	0.49
<i>C. tropicalis</i> ATCC 20336	30.4	8.1	15.3	0.55
<i>C. tropicalis</i> ATCC 0750	32.2	7.6	7.9	0.29
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	28.2	10.4	10.9	0.39

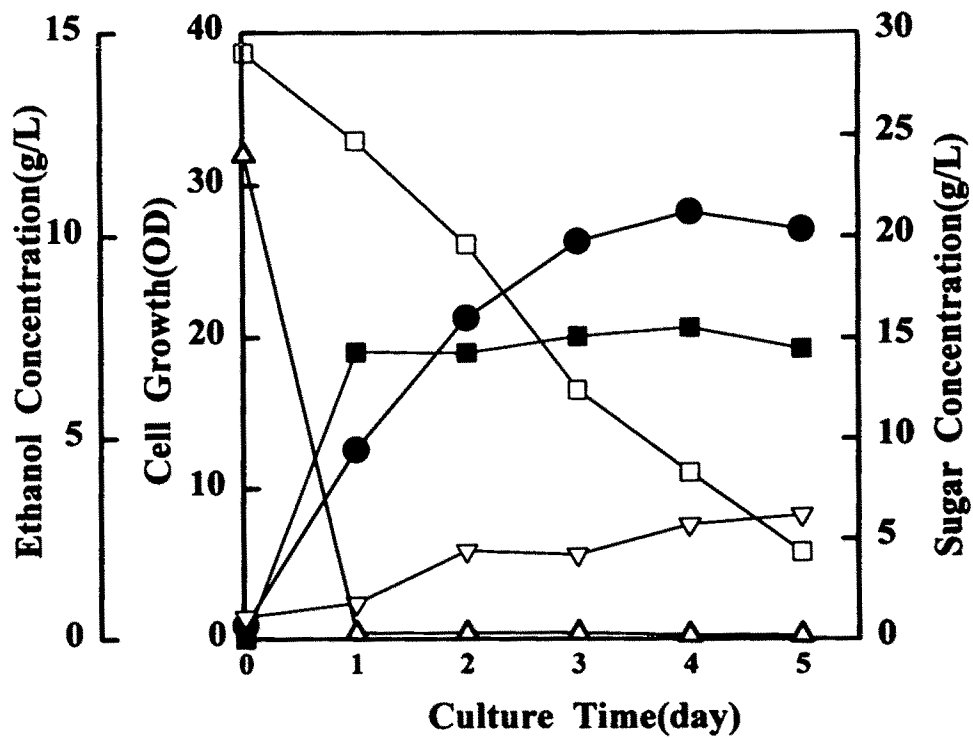


Fig. 8. Profiles of cell growth(●), glucose(△), xylose(□), xylitol(■), and ethanol(▽) concentrations during the culture of *C. guilliermondii*.

*C. parapsilosis*는 Fig. 9와 같이 세포성장은 5일 배양시기까지 계속적으로 증가하였으나 ethanol의 생성은 glucose가 완전히 소모되는 1일 배양시기에 최대값을 나타낸 후 배양 3일째까지 일정한 값을 유지하였다가 xylose가 거의 모두 소모되는 배양 3일 이후부터는 감소하였다. 또한 xylitol의 생성은 2일 배양시기까지 증가하여 약 11.2 g/L에 도달된 후에 거의 일정한 값을 유지하였으며 이때의 수율은 0.49 g-xylitol/g-xylose 이었다. 따라서 *C. parapsilosis*의 혼합당에 대한 발효특성은 발효 초기에는 glucose를 이용하여 세포성장과 ethanol이 생성되면서 동시에 일부의 xylose는 xylitol로 전환되었다. 즉 *C. parapsilosis*는 *C. guilliermondii* 보다는 glucose의 catabolite repression에 대한 감수성이 적기 때문에 발효초기에도 xylose가 xylitol로 전환되었다. 그러나 xylose 농도가 5 g/L 이하가 되는 배양 2일째부터는 xylitol 생성도 중단되고 xylose를 단지 세포성장을 위하여 이용하고 있음을 알 수 있었다. 또한 배양 3일 이후부터는 생성된 ethanol을 탄소원으로 이용하여 세포성장을 계속하였다.

*C. tropicalis*는 Fig. 10에서 보듯이 혼합당의 발효특성이 *C. parapsilosis*와 유사하였다. 단지 xylose가 2일 배양시기까지 거의 모두 소모되었으며, 이때의 xylitol 생성은 15.3 g/L로 수율은 0.55 g-xylitol/g-xylose 이었다. 세포성장은 *C. tropicalis*에서도 당이 모두 소모된 이후에 ethanol과 일부의 xylitol을 탄소원으로 이용하여 성장을 계속하는 특성이 있으며, 또한 glucose의 catabolite repression이 *C. guilliermondii* 보다는 민감하지 않았다. 결론적으로 xylose 단독 배지에서나 glucose와 xylose의 혼합당에서 *C. parapsilosis*와 *C. tropicalis*가 xylitol 생성에 대한 수율 및 생산성에서 우수한 균주로 판명되었다. 그러나 이 균주들은 당에 대한 내성이 낮고 당이 모두 소모된 이후에는 xylitol 및 ethanol을 탄소원으로 이용하여 세포성장을 계속하는 단점이 있다. 따라서 발효조건을 최적화 하면 xylitol의 수율과 생산성을 더 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다.

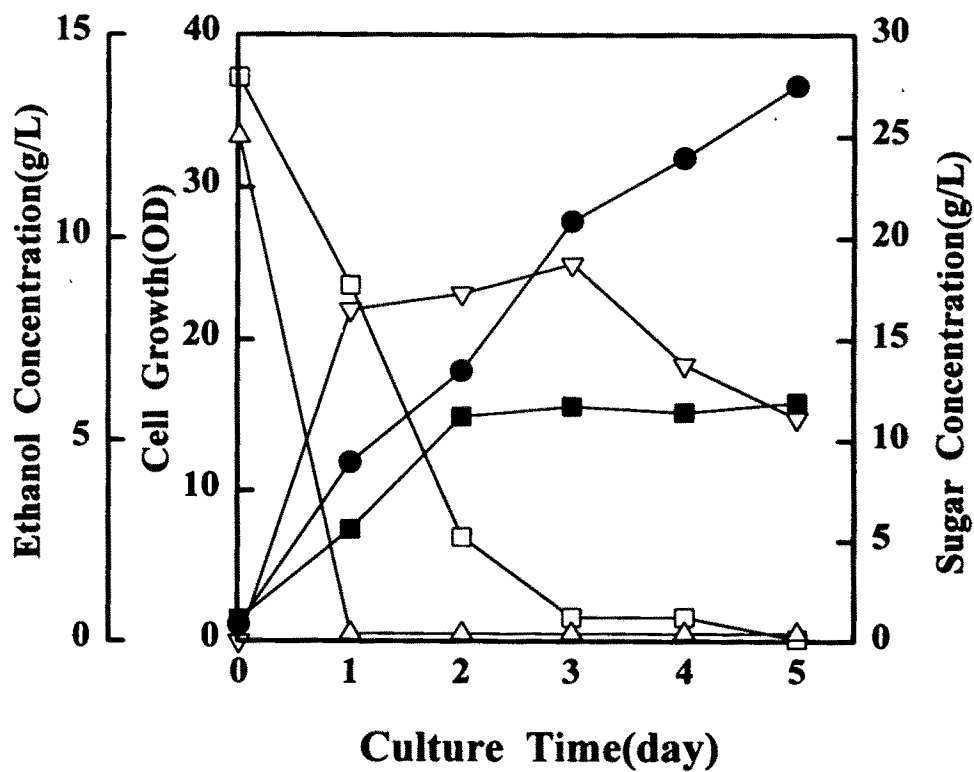


Fig. 9. Profiles of cell growth(●), glucose(△), xylose(□), xylitol(■), and ethanol(▽) concentrations during the culture of *C. parapsilosis*.

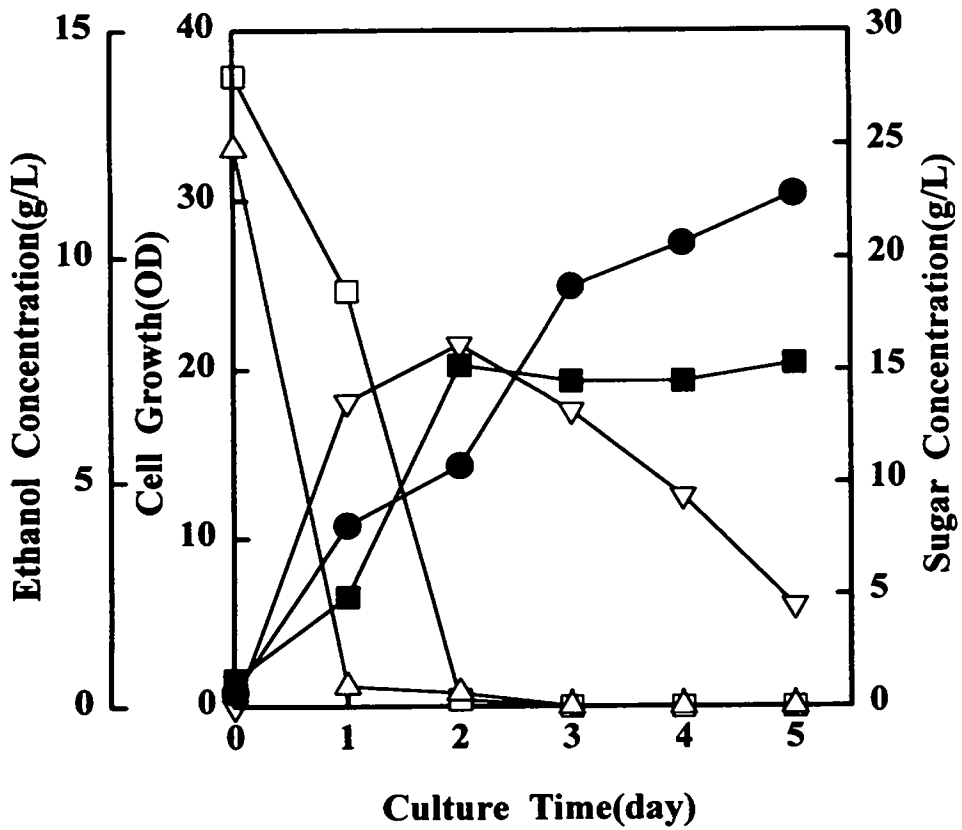


Fig. 10. Profiles of cell growth(●), glucose(△), xylose(□), xylitol(■), and ethanol(▽) concentrations during the culture of *C. tropicalis*.

다. Catabolite derepressed mutant 선별

Hemicellulose의 가수분해 산물에는 주요 구성성분인 D-xylose 뿐만 아니라 D-glucose, D-mannose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose 및 cellobiose가 혼합당으로 존재한다(45,46). 이러한 hemicellulose 가수분해 산물을 원료로 하여 xylitol을 생산하기 위해서는 사용하는 효모균주의 XR 생성이 glucose에 의하여 catabolite repression을 받지 않는 균주의 개발이 필요하다. 따라서 *Candida* sp.의 catabolite derepressed mutant를 선별하기 위하여 먼저 효모 균주를 haploid상의 포자를 형성시킨 후에 mutagen인 ethylmethane sulfonate (EMS)를 처리하여 변이를 유도시켰다. 변이균주는 유일한 탄소원으로 xylose가 첨가된 배지에 2-deoxyglucose를 야생균주가 성장할 수 없는 농도로 첨가하여 선별하였다. Catabolite derepressed mutants로 선별된 균주는 *C. guilliermondii*에서 약 50개, *C. parapsilosis*에서 약 50개 및 *C. tropicalis*에서 약 150개 정도를 분리하였다. 이때 *C. tropicalis*에서 mutant가 많이 분리된 것은 이 균주가 20 g/L의 2-deoxyglucose 존재 하에서도 유일한 탄소원으로 xylose를 이용하여 세포생장이 가능하기 때문이다 (Table 8). 선별된 mutants 균주들은 5 g/L의 glucose와 5 g/L의 xylose가 혼합당으로 존재하는 배양 배지에 접종하여 shaking incubator에서 12시간 배양 후에 세포생장과 glucose 및 xylose 농도를 측정하여 세포생장이 우수하고 glucose와 xylose를 모두 잘 이용하는 균주를 1차 적으로 선별하였다. 1차 선별한 변이 균주들의 glucose와 xylose의 이용 patterns을 검정하여 최종적으로 각 균주들에 대하여 가장 우수한 catabolite derepressed mutants를 선별하였으며, 이들에 대한 혼합당의 이용 pattern을 Fig. 11~Fig. 13에 나타내었다.

*C. guilliermondii*의 catabolite derepressed mutant인 GM-17인 경우 Fig. 11에서 보듯이 배양시간에 따라 glucose와 xylose가 동시에 이용되었

다. 즉 glucose는 18 시간 이내에 모두 소모되었으며, xylose는 배양 30시간에 모두 소모되었다. 반면 Fig. 2에서 보듯이 wild type에서는 xylose가 56 시간 배양 후에 모두 소모되었다. 또한 wild type에서 나타났던 diauxic form의 growth pattern도 없어졌다. 따라서 GM-17은 glucose 존재 하에서도 XR과 XDH가 유도되는 catabolite derepressed mutant임을 확인할 수 있었다. *C. parapsilosis*는 glucose의 catabolite repression에 대하여 *C. guilliermondii* 보다 덜 민감하였다. 따라서 Fig. 12에서 보듯이 *C. parapsilosis*의 catabolite derepressed mutants인 PM-34는 Fig. 3의 wild type에서와 비슷하여 glucose의 이용속도는 약간 느려진 반면 xylose의 이용속도는 약간 더 빨라졌다. 이는 PM-34의 경우 glucose 존재 하에서 XR과 XDH의 합성이 wild-type 보다 더 증가하여 xylose의 이용이 더 빨라졌기 때문으로 사료된다. *C. tropicalis*의 mutant인 TM-117의 경우는 Fig. 13에서 보듯이 Fig. 4의 wild type와 큰 차이 없이 단지 glucose의 이용속도만 감소하였다. 이는 *C. tropicalis*의 wild type에서는 glucose의 catabolite repression에 의한 XR과 XDH의 생성 억제가 크지 않기 때문으로 사료된다. 따라서 glucose에 의한 catabolite repression에 대한 좀더 확실한 검토를 위하여 glucose의 존재 하에서 배양한 균주들의 XR과 XDH의 효소활성에 대한 연구를 수행하였다.

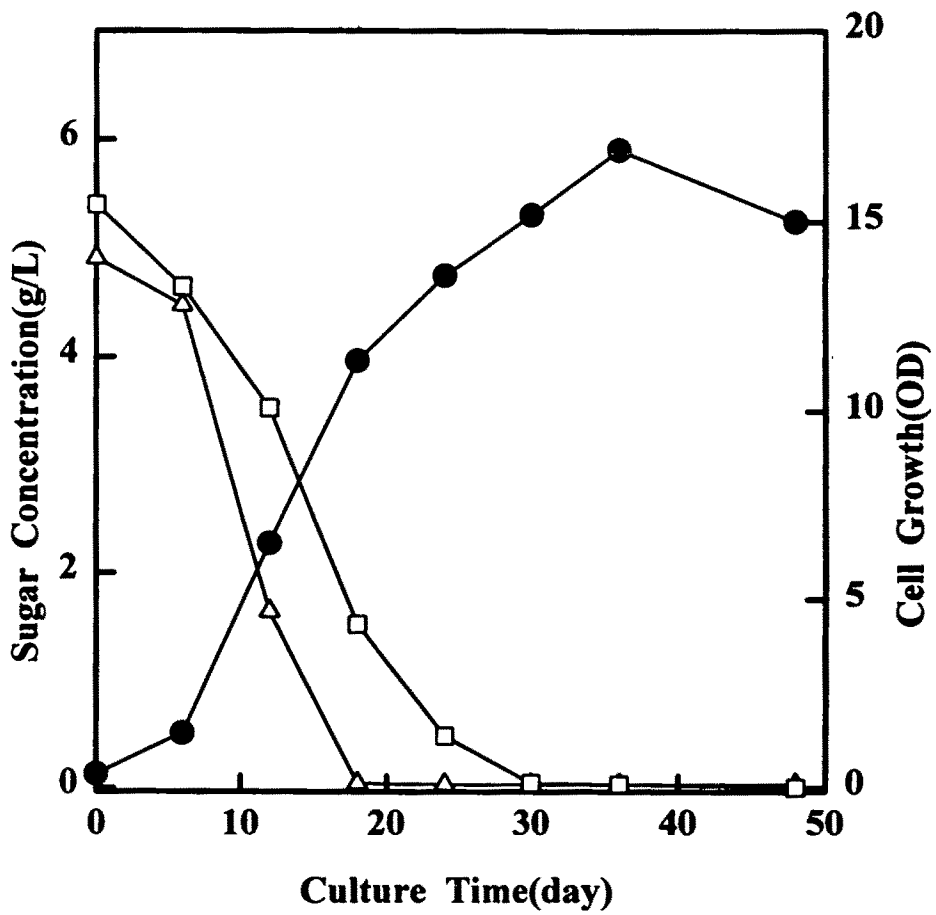


Fig. 11. Profiles of cell growth(●), glucose(Δ), and xylose(□) concentrations during the culture of GM-17.

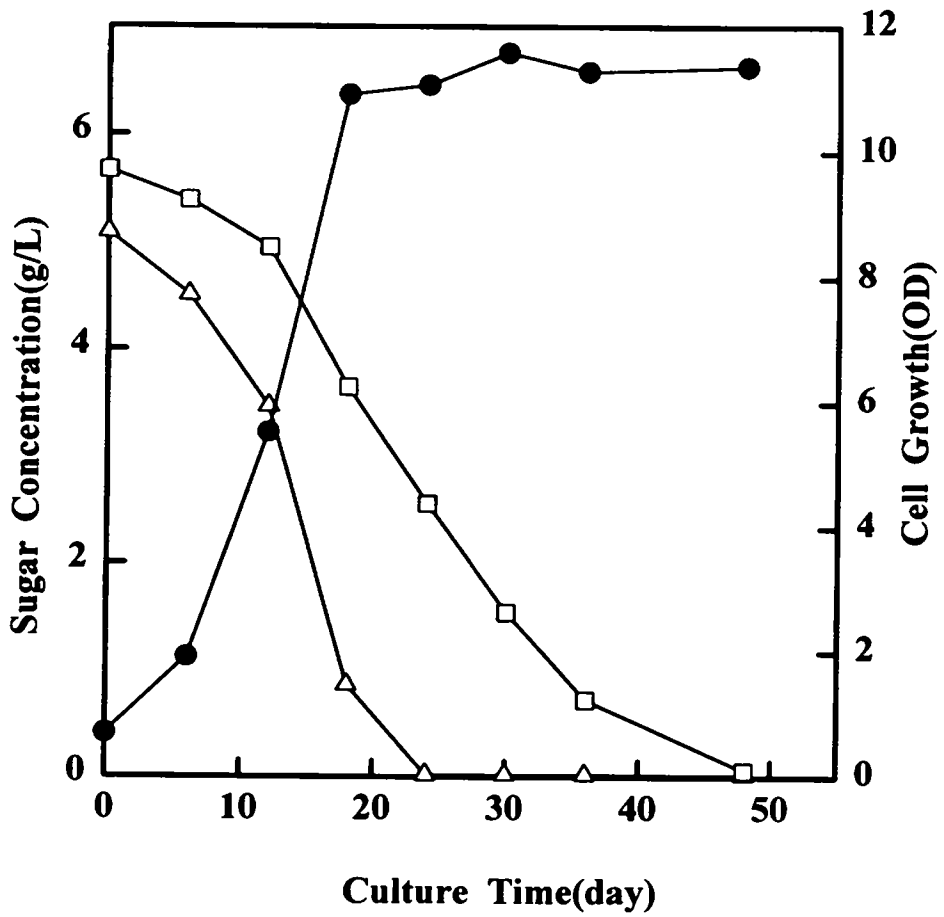


Fig. 12. Profiles of cell growth(●), glucose(△), and xylose(□) concentrations during the culture of PM-34.

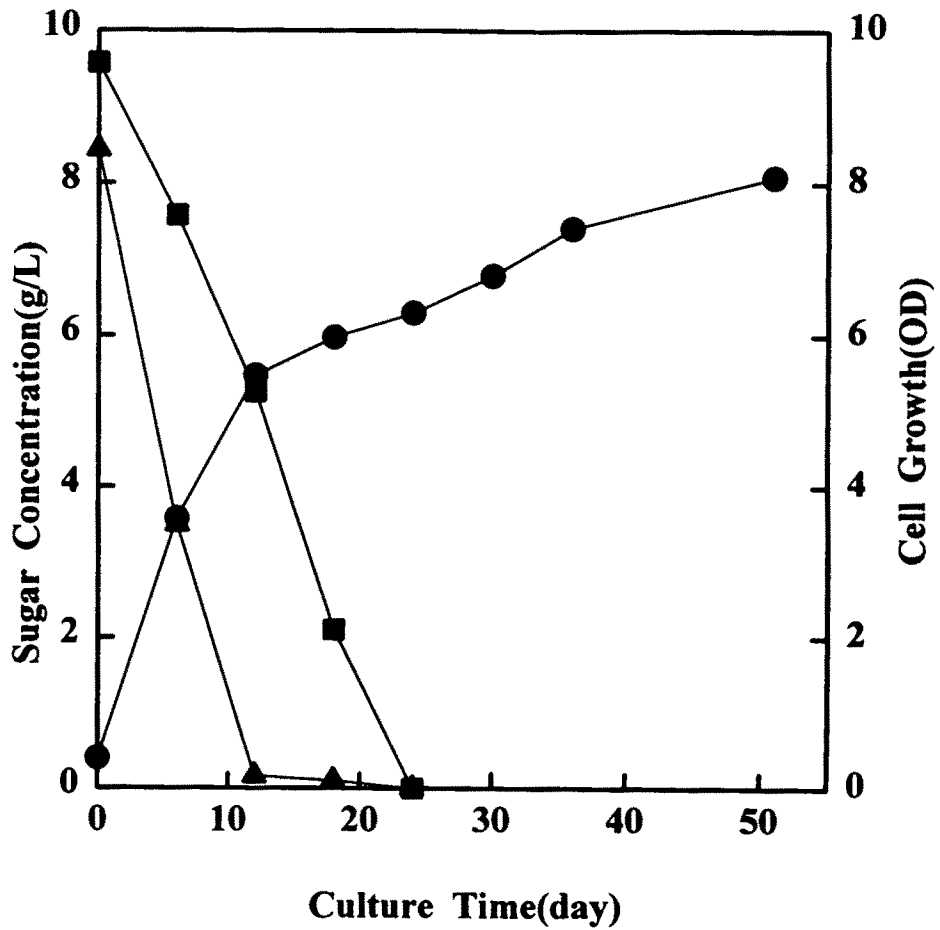


Fig. 13. Profiles of cell growth(●), glucose(△), and xylose(□) concentrations during the culture of TM-117.

라. Catabolite derepressed mutant의 XR 및 XDH 활성

Catabolite derepressed mutants에 대한 확인을 위하여 glucose 배지, xylose 배지 및 glucose와 xylose의 혼합배지에서 wild type와 mutants를 배양하여 XR과 XDH의 효소활성을 측정하였다. 즉 Table 1의 배지조성에서 탄소원으로 10 g/L의 glucose가 첨가된 배지, 10 g/L의 xylose가 첨가된 배지, 5 g/L의 glucose와 5 g/L의 xylose가 함께 첨가된 혼합배지에 *Candida* sp.의 wild types와 catabolite derepressed mutants를 배양하여 XR과 XDH의 효소 활성을 측정하였다. 실험결과에서 *C. guilliermondii*의 mutant인 GM-17의 경우 glucose 배지에서 20시간 배양 시에 XR의 specific activity가 1,670 unit/mg-protein으로 wild type의 200 unit/mg 보다 8배 더 높았으며 XDH의 specific activity는 wild type 보다 6배 더 높게 나타났다(Table 11).

이러한 결과로 mutant GM-17은 catabolite derepressed mutant임을 확인할 수 있었다. 또한 xylose와 glucose의 혼합당에서 wild type인 경우에 XR과 XDH의 specific activity가 10시간과 20시간 배양시기에 각각 1,333과 2,000 unit/mg으로 glucose가 모두 소모된 후에는 enzymes의 specific activities가 다시 증가됨을 나타내었다. 그러나 mutant GM-17은 혼합당에서도 XR의 specific activity가 배양 10시간과 20시간에서 각각 4,335와 4,665 units/mg으로 거의 동일하지만, 전체적으로 wild type 보다 enzymes의 specific activities가 높게 나타났다. 이러한 점에서 mutant GM-17의 경우 glucose에 의해 catabolite repression이 유발되지 않는 catabolite derepressed mutants임을 확인할 수 있었으며 hemicellulose 가수분해 산물에서 xylitol 발효를 수행하면 xylitol의 생산성이 향상될 것으로 예상된다.

*C. parapsilosis*와 mutant인 PM-34의 경우 (Table 13)는 glucose 배지에서 XR과 XDH의 specific activities가 각각 1,108과 135 unit/mg으로 wild

Table 11. Specific enzyme activity of *C. guilliermondii* and mutant PM-34 in various carbon sources.

Carbon source	Cell O.D (at 620nm)		Residual sugar (g/L)		Specific enzyme activity (unit/mg)			
	Wild type	GM-17	Wild type	GM-17	XR		XDH	
					Wild type	GM- 17	Wild type	GM- 17
Glucose (after 20hr)	6.3	5.6	0.7	5.0	200	1,670	230	868
Xylose (after 20hr)	8.7	6.4	2.1	3.0	4,443	5,110	490	600
Xylose + Glucose (after 10hr)	7.3	3.9	G : 0	G: 4.0	1,333	4,335	333	935
			X: 4.2	X: 3.8				
Xylose + Glucose (after 20hr)	9.8	6.0	G : 0	G: 3.0	2,000	4,665	650	1,565
			X: 2.4	X: 2.3				

Table 13. Specific enzyme activity of *C. parapsilosis* and mutant PM-34 in various carbon sources.

Carbon source	Cell O.D (at 620nm)		Residual sugar (g/L)		Specific enzyme activity (unit/mg)			
	Wild type	PM-34	Wild type	PM-34	XR		XDH	
					Wild type	PM- 34	Wild type	PM- 34
Glucose (after 20hr)	6.4	8.7	0	0.2	332	1,108	38	135
Xylose (after 20hr)	6.5	6.9	2.2	1.6	1,703	4,300	155	440
Xylose + Glucose (after 10hr)	5.7	6.1	G: 0	G: 3.0	613	1,682	38	327
			X: 4.6	X: 4.1				
Xylose + Glucose (after 20hr)	7.0	7.0	G: 0	G: 2.0	826	2,485	56	309
			X: 2.6	X: 3.0				

type의 332와 38 unit/mg보다 높게 나타났다. 이와 같이 glucose 배지에서 mutant PM-34의 enzyme activities가 증가한 것은 catabolite repression이 없어졌기 때문으로 사료된다. 혼합당에서도 mutant PM-34가 wild type보다 enzyme activity가 높게 나타났지만 xylose 배지에서보다는 낮았는데, 이는 glucose에 의한 catabolite repression이 완전히 제거되지 않았기 때문으로 사료된다. 또한 혼합당에서 mutant PM-34인 경우에 XR의 specific activity는 배양시간의 증가에 따라 1,682에서 2,485 unit/mg으로 증가하는 경향을 나타낸 반면, XDH의 specific activity는 조금 감소하였다. 따라서 mutant PM-34는 glucose에 의한 catabolite repression이 일부만이 제거되었을 것으로 추정된다.

C. tropicalis ATCC20336과 mutant인 TM-64의 XR과 XDH의 specific activity 측정에서 mutant TM-64의 enzyme activity가 wild type보다 높게 나타났으며, 혼합당에서도 XR의 specific activity도 1,398과 1,685 unit/mg으로 xylose 배지에서의 1,011 unit/mg보다도 높게 나타났다. 이것으로 mutant TM-64도 catabolite derepressed mutant임을 확인 할 수 있었으나 다른 균주와는 다르게 glucose 배지에서 XR과 XDH의 specific activity가 xylose 배지나 혼합당의 배지에서 보다 높게 나타났다(Table 14). 이는 변이유도 과정에서 glucose를 이용하는 유전자에 손상이 발생하여 glucose 사용이 느려지게 된 것으로 사료된다.

Table 14. Specific enzyme activity of *C. tropicalis* ATCC20336 and mutant TM-64 in various carbon sources.

Carbon source	Cell O.D (at 620nm)		Residual sugar (g/L)		Specific enzyme activity (unit/mg)			
	Wild type	TM-64	Wild type	TM-64	XR		XDH	
					Wild type	TM- 64	Wild type	TM- 64
Glucose (after 20hr)	7.4	3.0	0.1	8.3	145	2,634	57	540
Xylose (after 20hr)	6.8	6.9	3.1	6.6	1,647	1,011	132	102
Xylose + Glucose (after 10hr)	5.5	4.0	G: 0	G: 5.0	395	1,398	48	145
			X: 4.4	X: 4.5				
Xylose + Glucose (after 20hr)	7.9	7.2	G: 0	G: 3.6	564	1,695	64	156
			X: 0.9	X: 3.9				

결론으로 XR과 XDH의 specific activities의 측정을 통하여 선별한 변이 균주들이 catabolite derepressed mutant임을 확인할 수 있었다. 또한 enzyme 수준에서만 볼 때 catabolite derepressed mutant는 hemicellulose 가수분해 산물을 이용한 xylitol 발효에 적합할 수 있을 것으로 기대된다.

마. 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 15에서 보듯이 비슷하였다.

Table 15. Cell growth, xylitol and ethanol production 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

이것은 Table 13의 효소활성 측정에서 보듯이 xylose 배지의 경우 wild type과 변이균주의 XR 및 XDH 생성이 비슷하였기 때문에 사료된다. 이때 wild type의 xylitol 수율은 0.65 g-xylitol/g-xylose로서 Roberto 등 (66)이 *C. guilliermondii* FTI20037에 의해 얻은 0.68 g-xylitol/g-xylose와 비슷한 값을 나타내었으나 생산성은 보고된 0.54 g/L-hr 보다 낮은 결과를

나타내었다. 그러나 Table 16에서 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 Fig. 8과 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 Fig. 14에서와 같이 glucose와 xylose를 동시에 이용하기 시작하여 glucose는 3일째에

Table 16. Cell growth, xylitol and ethanol production 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

모두 사용하고 xylose는 5일째에 4.8 g/L가 잔존하였다. GM-17이 혼합당 배지에서 수율이 향상되고 발효경향이 변화한 것은 Table 12의 효소활성 측

정결과에서 보듯이 혼합당에서 GM-17의 XR과 XDH 활성이 wild type보다 높고 glucose 배지에서도 XR, XDH 활성이 높은 catabolite derepressed mutant이기 때문에 사료된다. *C. parapsilosis*와 PM-34의 경우 50 g/L xylose 배지에서는 Table 15에서 보듯이 xylitol의 수율과 생산성은 비슷하였으며, 이때 wild type의 수율은 Nolletu. 등(67)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(68)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 Fig. 9에서 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-xylose 였다. *C. parapsilosis*의 catabolite derepressed mutant인 PM-34는 Fig. 15에서와 같이 xylose와 glucose를 동시에 이용하기 시작하였으며 glucose의 소모속도가 느려져 배양 2일째에 모두 사용하였다. 또한 xylose는 wild type과 같은 3일째에 모두 사용하였으며 ethanol의 생성이 1일 배양 시에 최대 4.9 g/L로 낮아졌다. 반면에 xylitol 생산은 3일 배양 시에 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 13에 보듯이 혼합당에서 PM-34의 XR의 활성이 wild type보다 높게 나타났기 때문에 사료된다.

이상의 결과에서 catabolite derepressed mutant인 GM-17과 PM-34의 경우 xylose 배지에서는 xylitol 수율과 생산성이 wild type과 비슷하였으나

glucose와 xylose의 혼합당 배지에서는 향상되었다. 따라서 glucose에 의한 catabolite repression에 대한 좀더 자세한 연구와 XDH defective mutant를 얻어 xylitol을 탄소원으로 이용할 수 없는 균주의 개발이 필요하며, 이러한 균주를 개발하면 혼합당에서 xylitol 수율과 생산성을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 기대되어 XDH defective mutant 균주의 개발에 대한 연구를 수행하였다.

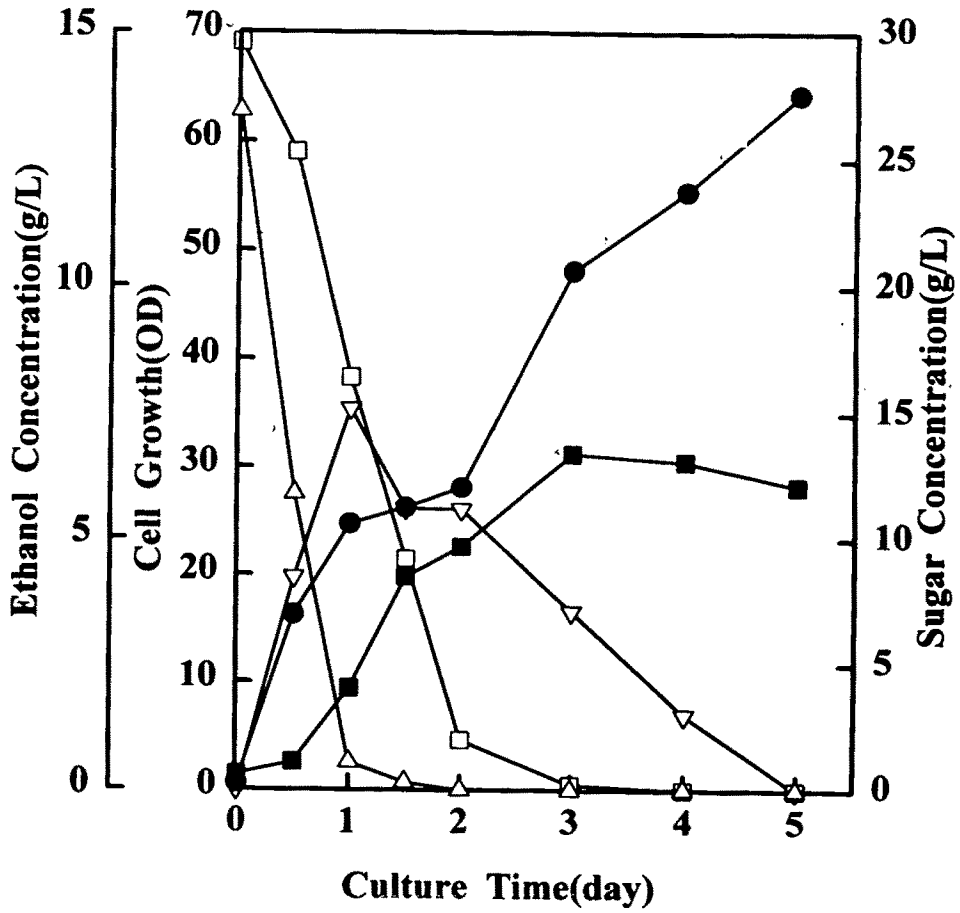


Fig. 14. Profiles of cell growth(●), glucose(△), xylose(□), xylitol(■), and ethanol(▽) concentrations during the culture of GM-17.

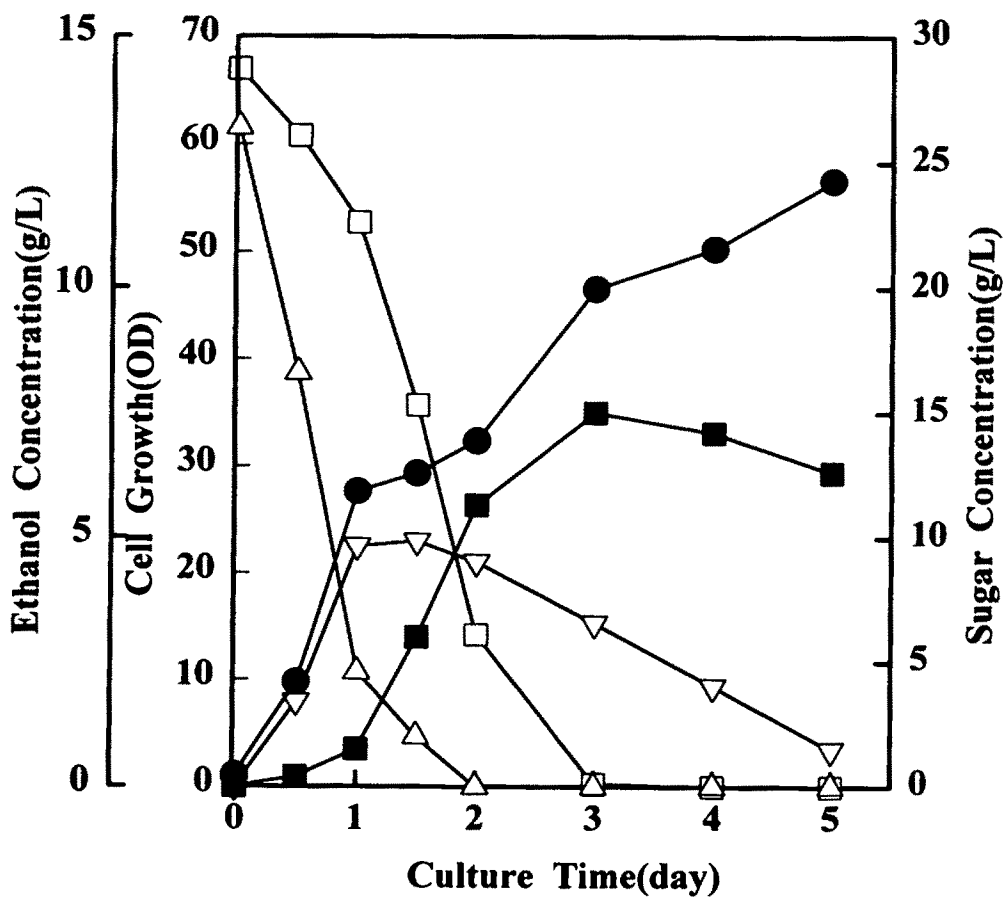


Fig. 15. Profiles of cell growth(●), glucose(△), xylose(□), xylitol(■), and ethanol(▽) concentrations during the culture of PM-34.

2. Xylitol 발효조건의 최적화와 XDH defective mutant

균주 개발

가. Xylitol 발효를 위한 배지의 선정

Candida sp.에 의한 xylitol 발효배지를 선정하기 위하여 Table 17에서와 같이 기존 연구자들인 Dahiya 등(60), Horitsu 등(43), Onishi 등(15)이 실험한 배지조성과 일부 질소원을 변화시킨 배지를 이용하여 실험을 수행하였다. 실험은 50 g/L의 xylose가 포함된 각각의 배지를 이용한 flask 배양에서 xylitol 생산성을 비교하였다.

Table 17. The composition of various media for xylitol fermentation.

Compounds	Medium-1 (g/L)	Medium-2 (g/L)	Medium-3 (g/L)	Medium-4 (g/L)	Medium-5 (g/L)
Yeast extract	5	10	10	1	
Casamino acid				4	
Urea					10
K ₂ HPO ₄	1				
KH ₂ PO ₄	1	15	15	1	15
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	1	0.4	0.5	1
NH ₄ C ₂ H ₃ O ₂	5				
(NH ₄) ₂ HPO ₄		3			
(NH ₄) ₂ SO ₄			2		3
CaCl ₂ ·H ₂ O				3	
NaCl				0.1	
Reference	(60)	(43)		(15)	

*C. guilliermondii*의 경우 Fig. 16과 Table 18에서 보듯이 세포성장은 medium-3과 medium-5에서 우수하였지만, xylitol의 최대 농도와 수율 및 생산성은 medium-4가 가장 우수하였다. 특히 medium-5의 경우에는 5일 배양 시에도 당을 모두 소비하지 못하였으므로 첨가된 urea는 xylitol 발효를 위한 질소원으로서 적절하지 못한 것으로 판단되었다. Onishi 등(15)이 사용한 medium-4에서는 xylitol 수율이 0.59 g-xylitol/ g-xylose 이고 생산성은 0.30 g/L-hr로 다른 배지에 비하여 높은 값을 나타내었다. 또한 부산물로서 에탄올도 적게 생성되었다. Medium-4에는 질소원으로 4 g/L casamino acid를 사용하였는데 casamino acid의 35%가 NaCl이기 때문에 이 medium에는 총 1.5 g/L의 NaCl이 포함되어 있다(Table 17). 이 배지에서 xylitol 수율과 생산성이 증가한 것은 *C. guilliermondii*가 osmotolerant한 균주이기 때문에 많은 양의 NaCl이 존재함으로써 osmoregulation을 위해 xylitol 생산이 증가되는 것으로 사료된다.

Table 18. Kinetic parameters of xylitol fermentation in different medium containing 50 g/L xylose by *C. guilliermondii*.

Medium	Cell O.D (620nm)	Fermentation Time (hr)	Ethanol (g/L)	Xylitol (g/L)	Residual Xylose (g/L)	$Y_{p/s}$	P
1	18.5	120	1.1	23.9	8.6	0.51	0.20
2	18.3	96	1.7	21.0	6.9	0.43	0.22
3	21.2	120	1.9	24.7	4.0	0.48	0.21
4	19.5	96	1.3	28.7	6.5	0.59	0.30
5	21.8	120	1.1	17.6	14.8	0.43	0.15

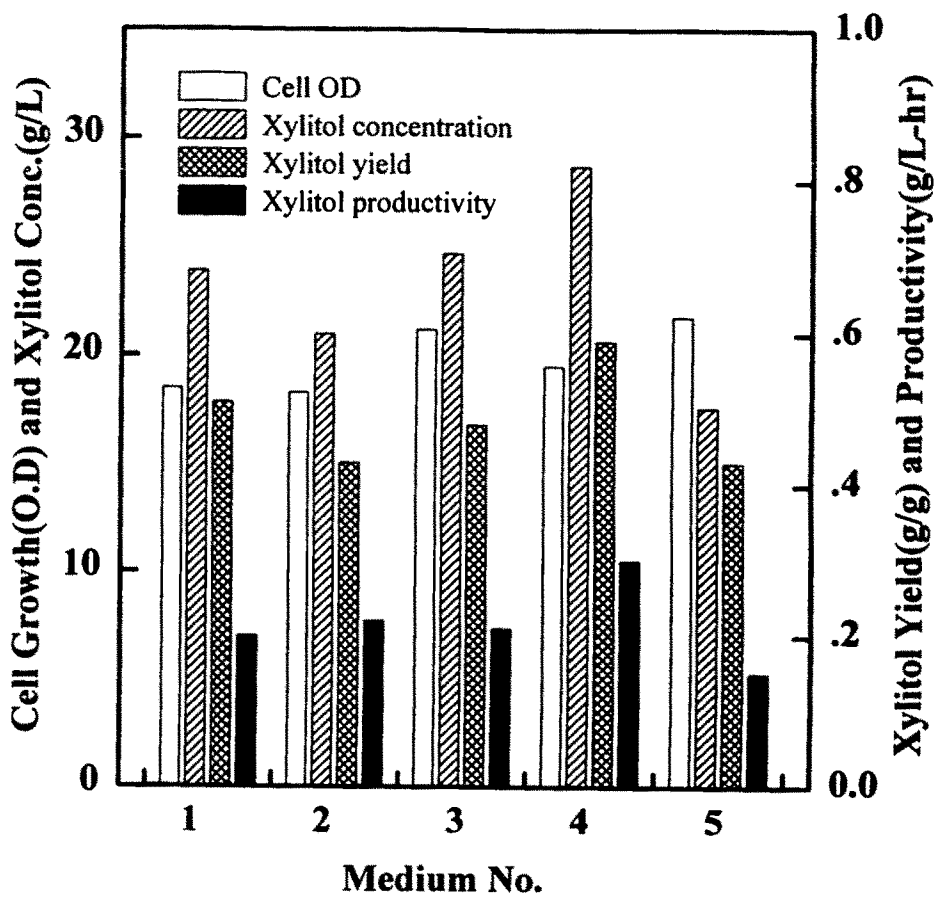


Fig. 16. Cell growth and xylitol production with various medium containing 50 g/L xylose by *C. guilliermondii*.

*C. parapsilosis*와 *C. tropicalis* ATCC20336의 경우 medium-2, medium-3, medium-4에서 xylitol 수율은 비슷하였으나 생산성은 medium-4가 조금 높은 것으로 나타났다 (Table 19, Table 20, Fig. 17, Fig. 18). Medium-4와 medium-5에서는 다른 배지와 다르게 세포성장이 매우 좋았다. 그러나 medium-4의 경우 xylitol 수율이나 생산성이 다른 배지와 비슷하거나 조금 향상되었으나 medium-5의 경우는 낮은 값을 나타내었다.

Table 19. Kinetic parameters of xylitol fermentation in different medium containing 50 g/L xylose by *C. parapsilosis*.

Medium	Cell O.D (620nm)	Fermentation Time (hr)	Ethanol (g/L)	Xylitol (g/L)	Residual Xylose (g/L)	$Y_{p/s}$	P
1	10.1	96	1.3	20.1	18.2	0.54	0.21
2	16.3	96	1.9	35.6	0.2	0.64	0.37
3	17.2	96	1.5	35	0.2	0.63	0.37
4	24.5	96	1.1	36.1	0	0.65	0.38
5	28.5	120	0	20.7	8.5	0.44	0.17

Medium-4에서 각 균주의 발효특성을 보면 *C. guilliermondii*는 5일 배양 시까지 xylose를 모두 소모하지 못하였으며 4일 배양 시에 xylitol 생성이 최대가 되었다(Table 18). 또한 부산물인 에탄올은 배양 1일에 최대값을 나타내어 3일까지 일정하게 유지되다가 소모되는 경향을 나타내었다. *C. parapsilosis*와 *C. tropicalis*는 배양 4일만에 모든 당을 사용했으며 이 시기

에 xylitol 생성도 최대가 되었다. 또한 당이 모두 소모된 후에는 생성된 xylitol과 에탄올을 이용하여 세포성장을 계속하였다.

배지선정을 위한 실험결과에서 *C. guilliermondii*의 경우 medium-4가 가장 적합한 것으로 보이며 *C. parapsilosis*와 *C. tropicalis*의 경우는 medium-2, medium-3, medium-4가 수율 면에서는 비슷하지만 생산성이 조금 나은 medium-4가 더 적절하였다. Medium-5에서는 질소원으로 urea가 사용되었는데 urea는 xylitol 발효에서 질소원으로 적합하지 못하였다. 또한 medium-4의 경우 질소원으로 4 g/L casamino acid가 사용되었는데, 이는 산업적인 적용에서 더 유리할 것으로 기대된다.

Table 20. Kinetic parameters of xylitol fermentation in different medium containing 50 g/L xylose by *C. tropicalis* ATCC20336.

Medium	Cell O.D (620nm)	Fermentation Time (hr)	Ethanol (g/L)	Xylitol (g/L)	Residual Xylose (g/L)	$Y_{p/s}$	P
1	12.3	120	0.1	30.8	6.8	0.63	0.26
2	13.9	96	1.7	32.6	0.4	0.59	0.34
3	11.7	96	1.3	34.7	0.4	0.63	0.36
4	19.6	72	1.7	29.8	4.2	0.58	0.41
5	24.4	120	3.2	11.7	3.3	0.23	0.10

$Y_{p/s}$: Xylitol yield (g-xylitol/g-xylose),

P : Volumetric productivity (g/L-hr)

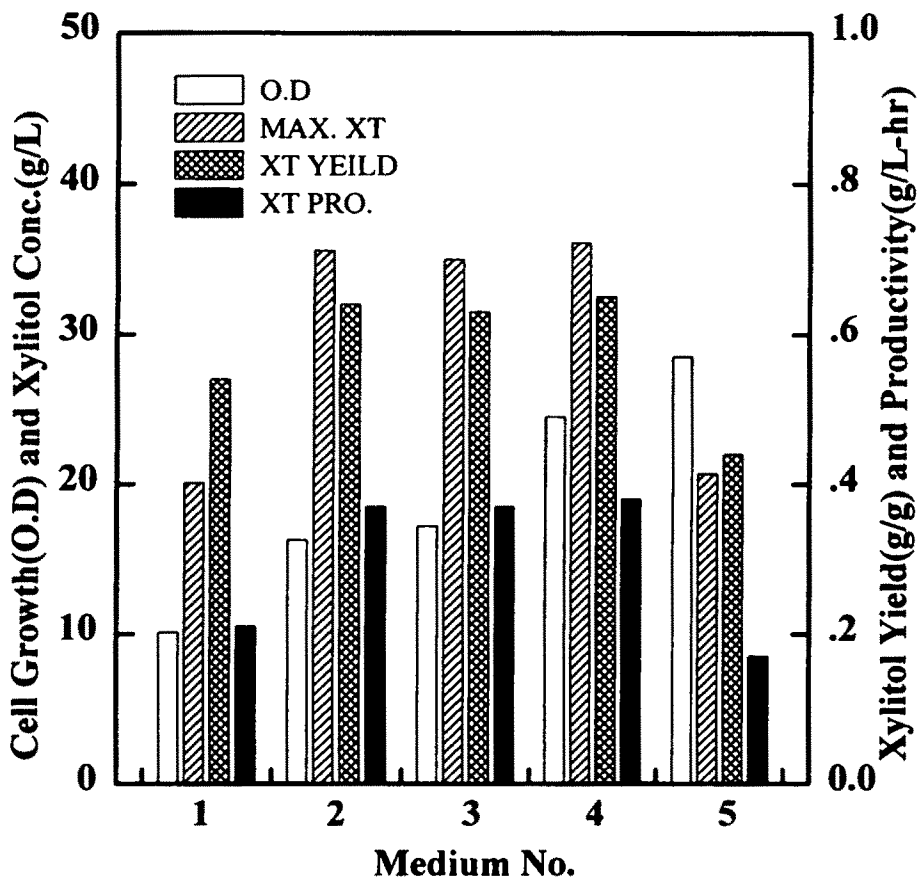


Fig. 17. Cell growth and xylitol production with various medium containing 50g/l xylose by *C. parapsilosis*.

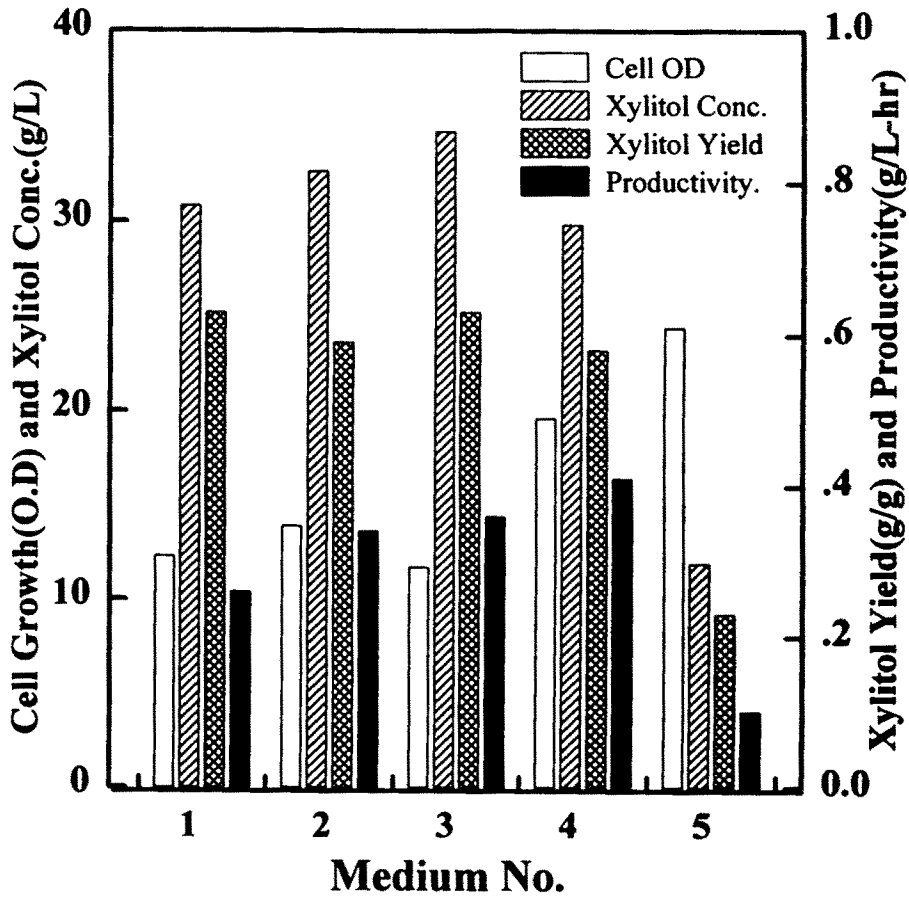


Fig. 18. Cell growth and xylitol production with various medium containing 50 g/L xylose by *C. tropicalis*.

나. 통기조건이 xylitol 생산에 미치는 영향

Xylitol 발효에서 가장 중요한 배양조건 중 하나가 통기조건이다 (32,33,34,35). 따라서 *Candida* sp.의 xylitol 발효에서 통기조건에 영향을 검토하기 위하여 발효조에서 교반을 250 rpm으로 유지하고 통기를 0.1, 0.2, 0.3, 0.7, 1.0, 2.0 vvm으로 증가시키면서 xylitol 생산에 대한 연구를 수행하였다. 실험결과(Table 21)에서 *C. guilliermondii*의 경우는 통기량의 증가에 따라 xylitol 생산성은 계속 증가하여 2.0 vvm에서 0.55 g/L-hr로 최대값을 나타내었으나 xylitol 수율은 통기량의 변화에 큰 영향을 받지 않았다. 최대 세포농도는 통기량의 증가에 따라 증가하였다(Fig. 19). 당의 이용에서도 0.1 vvm에서는 120시간 배양시기에 22 g/L의 xylose가 남아있었지만, 통기량의 증가에 따라 당의 이용속도가 빨라져서 2.0 vvm에서는 48시간 배양시기에 7.0 g/L의 xylose만이 남아 있었다. 또한 통기량의 증가에 따라 부산물인 에탄올의 생성도 감소하였다.

Table 21. Kinetic parameters of xylitol fermentation in 50 g/L xylose medium by *C. guilliermondii*.

Aeration rate (vvm)	Cell O.D (620nm)	Fermentation Time (hr)	Ethanol (g/L)	Xylitol (g/L)	Residual xylose(g/L)	$Y_{p/s}$	P
0.1	13.2	120	1.0	14.6	22.0	0.66	0.12
0.2	18.2	96	0.6	27.3	8.2	0.65	0.28
0.3	26.8	120	0.6	23.9	5.3	0.54	0.20
0.7	35.4	96	0.1	28.2	2.6	0.60	0.30
1.0	38.3	72	0.2	25.9	5.2	0.58	0.36
2.0	49.5	48	0.2	26.4	7.0	0.61	0.55

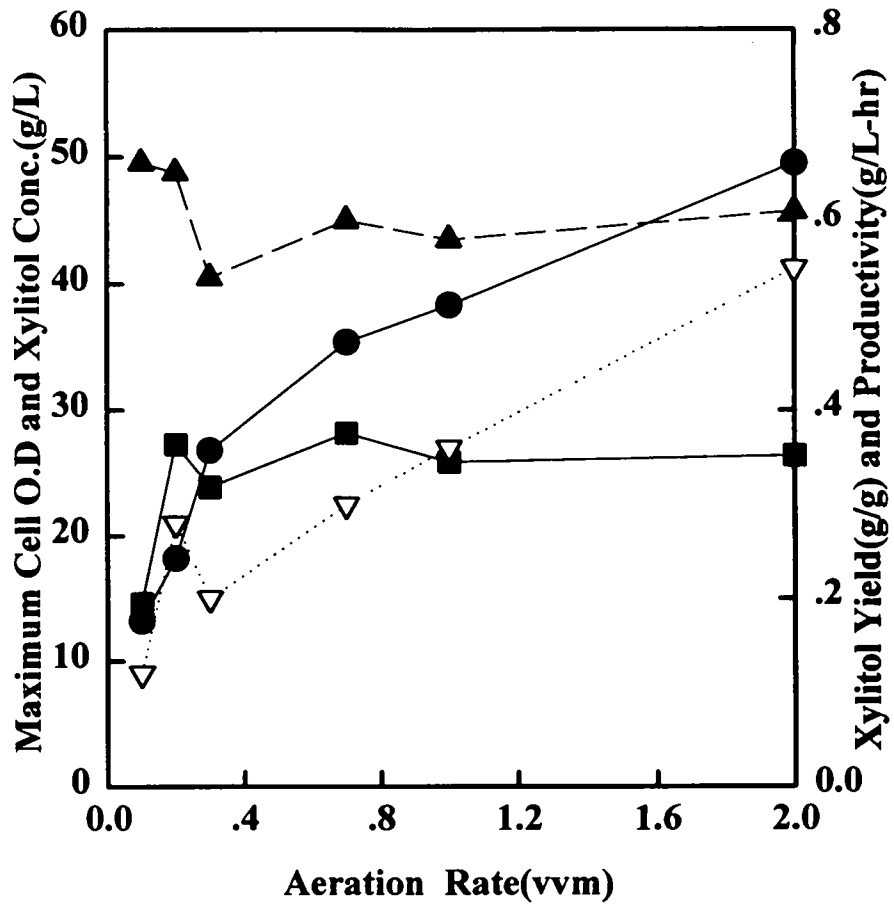


Fig. 19. The effect of aeration on maximum cell growth(●), xylitol concentration(■), yield(▲) and productivity(▼) by *C. guilliermondii*.

*C. parapsilosis*에서도 Table 22과 Fig. 20에서 보듯이 *C. guilliermondii*와 비슷한 경향을 보였다. 즉 최대 세포농도와 xylitol 생산성은 통기량의 증가에 따라 증가하였으며, 당의 이용속도도 통기량의 증가에 따라 빨라져서 2.0 vvm 에서는 36시간 배양시기에 6.9 g/L의 xylose 만이 존재하였다. 이때 최대 xylitol 수율은 0.7 vvm에서 0.80 g-xylitol/g-xylose 이고, 최대 xylitol 생산성은 2.0 vvm에서 0.83 g/L-hr 였다.

Table 22. Kinetic parameters of xylitol fermentation in 50 g/L xylose medium by *C. parapsilosis*.

Aeration rate (vvm)	Cell O.D (620nm)	Fermentation Time (hr)	Ethanol (g/L)	Xylitol (g/L)	Residual Xylose(g/L)	$Y_{p/s}$	P
0.1	10.8	120	0.8	33.0	4.8	0.71	0.28
0.2	11.1	120	0.4	33.4	7.1	0.74	0.35
0.3	19.4	96	0.1	33.4	0.3	0.67	0.35
0.7	15.0	96	0.2	37.6	3.5	0.80	0.52
1.0	21.2	48	0.2	30.2	7.2	0.71	0.63
2.0	24.9	36	0	29.7	6.9	0.69	0.83

$Y_{p/s}$: Xylitol yield(g-xylitol/g-xylose),

P : Volumetric productivity (g/L-hr)

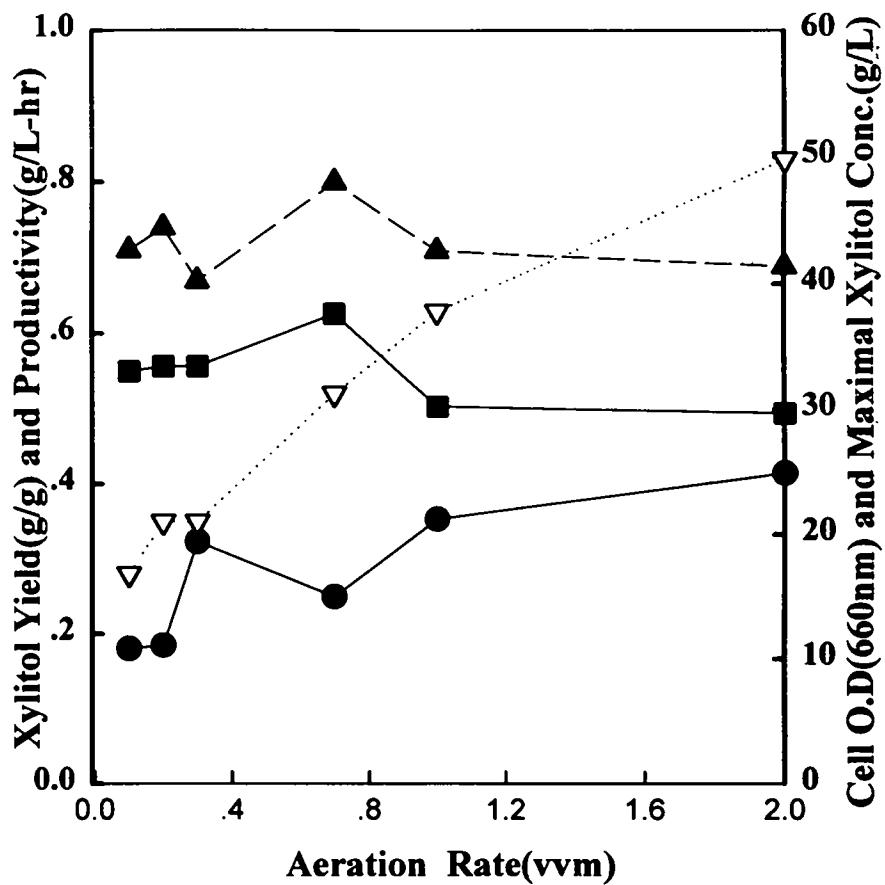


Fig. 20. The effect of aeration on maximum cell growth(●), xylitol concentration(■), yield(▲) and productivity(▼) by *C. parapsilosis*.

두 균주의 세포성장은 xylose가 모두 소모된 후에 생성된 에탄올과 xylitol을 이용하여 계속되었다. 통기량의 증가에 따라 xylitol 수율은 거의 일정하였으나 생산성은 증가하였는데 다른 연구자들이 보고한 0.3 vvm과 250 rpm의 agitation 보다 높은 통기조건에서는 xylitol 수율과 생산성이 감소한다는 내용과는 다른 경향을 나타내었다(6,24). 이러한 경향은 xylitol 생성이 세포성장과 직접적으로 연관되어 있어 통기량의 증가에 따라서 세포성장이 촉진되어 빠른 시간에 당을 이용함으로써 xylitol 수율은 일정하게 유지된 반면 생산성은 증가된 것으로 사료된다. 또한 통기의 증가는 sugar transport를 촉진하여 xylose reductase의 activity를 증가시킴으로써 생산성이 향상되었다고 할 수 있다(6). 두 균주를 비교한 결과 *C. parapsilosis*가 xylitol 생산에 더 우수한 균주임을 알 수 있었다.

다. Co-substrate의 선별

XDH defective mutant에 의한 xylitol 발효를 위해서는 균주의 세포성장과 에너지 대사 및 NAD(P)⁺의 regeneration을 위한 co-substrate가 필요하다. 더구나 사용하고자하는 co-substrate는 *Candida* sp.에서 XR 유전자의 발현을 억제하지 않아야 한다. Glucose에 의하여 XR과 XDH의 발현이 catabolite repression을 받지 않는 catabolite derepressed mutant를 선별하였지만, glucose에 의하여 catabolite repression은 받지 않는 완벽한 변이균주를 얻지는 못하였다. 따라서 glucose 이외에 *Candida* sp.가 탄소원 및 에너지원으로 이용이 가능하면서 XR의 발현을 억제하지 않는 co-substrate의 선별에 대한 실험을 수행하였다. Co-substrate로서는 fructose, galactose, mannose, maltose, ethanol, sorbitol, sucrose 및 cellulose를 우선적으로 검토하였다. 실험은 10 g/L의 xylose와 각각의 co-substrate 10 g/L를 첨가한 혼합당 배지를 이용하여 flask 배양을 수행한 후에 당 이용의 경향과 xylitol

생성능력을 검토하였다. 균주는 *C. parapsilosis*와 *C. tropicalis*를 사용하였다.

실험결과에서 *C. parapsilosis*의 경우(Table 23) fructose와 mannose는 배양 12시간만에 모두 이용이 되었고 xylose는 이들이 거의 소모된 이후부터 이용되기 시작하였다. 따라서 *C. parapsilosis*에서 fructose와 mannose는 co-substrate로서 적합하지 못하였다. 반면 sorbitol, maltose, ethanol, cellobiose는 xylose가 먼저 거의 모두 이용된 이후부터 서서히 이용되기 시작하였다. 따라서 이들도 co-substrate로서 적합하지 못하였다. 단지 sorbitol을 첨가하는 경우에는 xylose가 모두 이용된 후에 세포성장을 위하여 xylitol 대신 sorbitol을 더 쉽게 이용하기 때문에 xylitol 수율이 매우 높은 반면 에탄올인 경우는 xylose가 모두 이용된 후에 세포성장을 위하여 에탄올보다는 xylitol이 더 쉽게 이용되어 xylitol 수율이 sorbitol일 때보다는 낮았다. Sucrose와 galactose는 xylose보다 약간 먼저 이용되면서 xylose도 함께 이용되었다(Fig. 21, Fig. 22). 또한 sucrose 또는 galactose와 xylose의 혼합당에서 xylitol 수율도 양호한 편이었기 때문에 *C. parapsilosis*에서는 sucrose와 galactose를 적합한 co-substrate로 판정하였다.

위와 동일한 실험을 *C. tropicalis* ATCC22019를 이용하여 실험을 수행한 결과를 Table 24에 나타내었다. *C. tropicalis*에서의 co-substrate 선별에 대한 실험결과도 *C. parapsilosis*와 거의 유사한 경향을 나타내었다. 단지 *C. tropicalis*에서는 maltose가 xylose와 거의 동시에 이용되는 경향을 나타내었으며 galactose는 xylose보다 약간 먼저 이용되는 경향을 나타내었다(Fig. 23, Fig. 24).

종합적으로 co-substrate에 대한 영향을 검토한 결과 fructose는 xylose의 이용을 억제하여 fructose가 모두 이용된 이후에 xylose가 이용되었다. 반면 sorbitol, ethanol, cellobiose는 xylose가 모두 이용된 이후에 이용되었

으며, 이때 sorbitol은 xylose가 모두 이용된 후에 세포성장을 위하여 xylitol 보다 더 쉽게 이용되므로 xylitol수율이 매우 높았다. 따라서 *C. parapsilosis*와 *C. tropicalis*의 co-substrate로서는 galactose가 가장 우수한 것으로 판단되었다.

Table 23. Kinetic parameters of xylitol fermentation with 10 g/L xylose and 10 g/L co-substrate media at 36 hr culture by *C. parapsilosis* ATCC 22013.

Kinetic parameter Co-substrate	Cell O.D (620 nm)	Xylose Residue (g/L)	Co-substrate Residue (g/L)	Xylitol (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)
Ethanol	20	0.8	11.0	4.0	0.33
Fructose	25	0.5	0	2.4	0.23
Galactose	22	1.7	0	2.3	0.25
Maltose	26	0.5	8.5	1.8	0.17
Mannose	24	1.0	1.9	1.9	0.19
Sorbitol	18	0	8.6	3.6	0.36
Sucrose	22	1.1	0	2.9	0.33
Cellobiose	16	0.4	8.3	3.3	0.31

Table 24. Kinetic parameters of xylitol fermentation with 10 g/L xylose and 10 g/L co-substrate media at 36 hr culture by *C. tropicalis* ATCC 22019.

Kinetic parameter Co-substrate	Cell O.D (620 nm)	Xylose Residue (g/L)	Co-substrate Residue (g/L)	Xylitol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)
Ethanol	15	0	1.0	5.7	0.48
Fructose	19	0	0	4.3	0.39
Galactose	19	0	0.2	3.8	0.35
Maltose	20	0.4	2.2	1.9	0.23
Mannose	17	0	0	3.9	0.39
Sorbitol	18	0	8.0	4.9	0.49
Sucrose	15	0	0	2.9	0.29
Cellobiose	16	0	7.0	4.4	0.41

* $Y_{P/S}$: Xylitol yield (g-xylitol/g-xylose consumed)

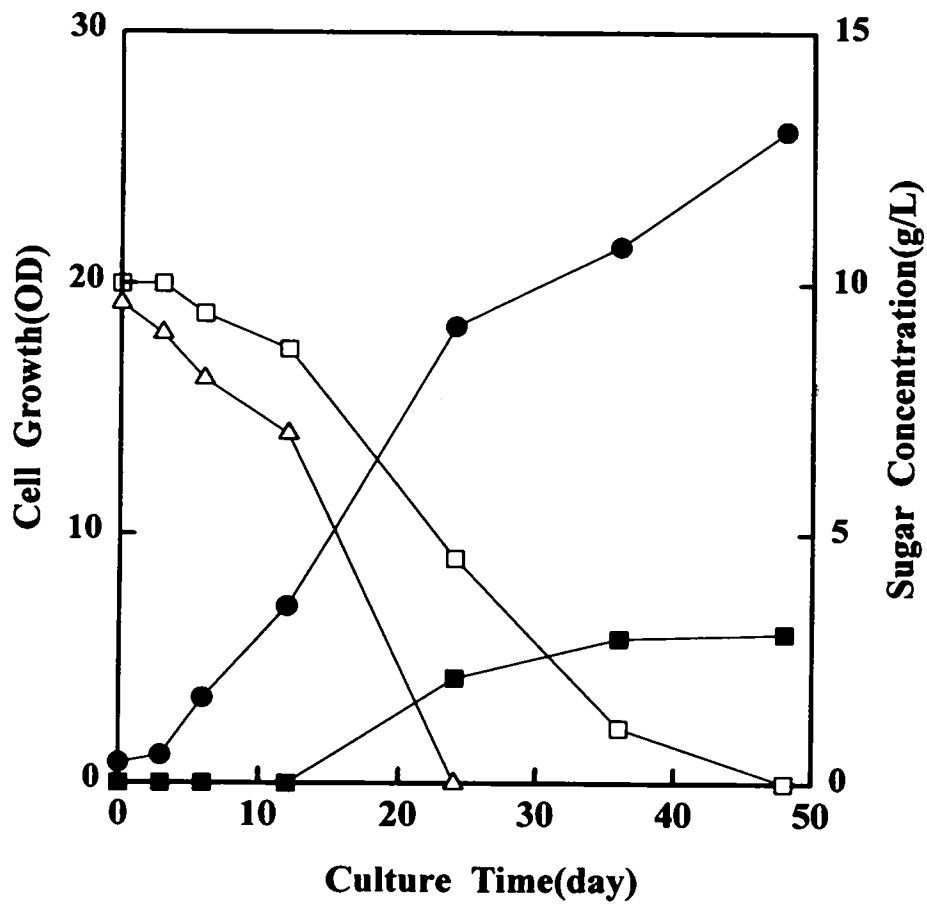


Fig. 21. Profiles of cell growth(●), sucrose(Δ), xylose(□) and xylitol(■) concentration during the culture of *C. parapsilosis*.

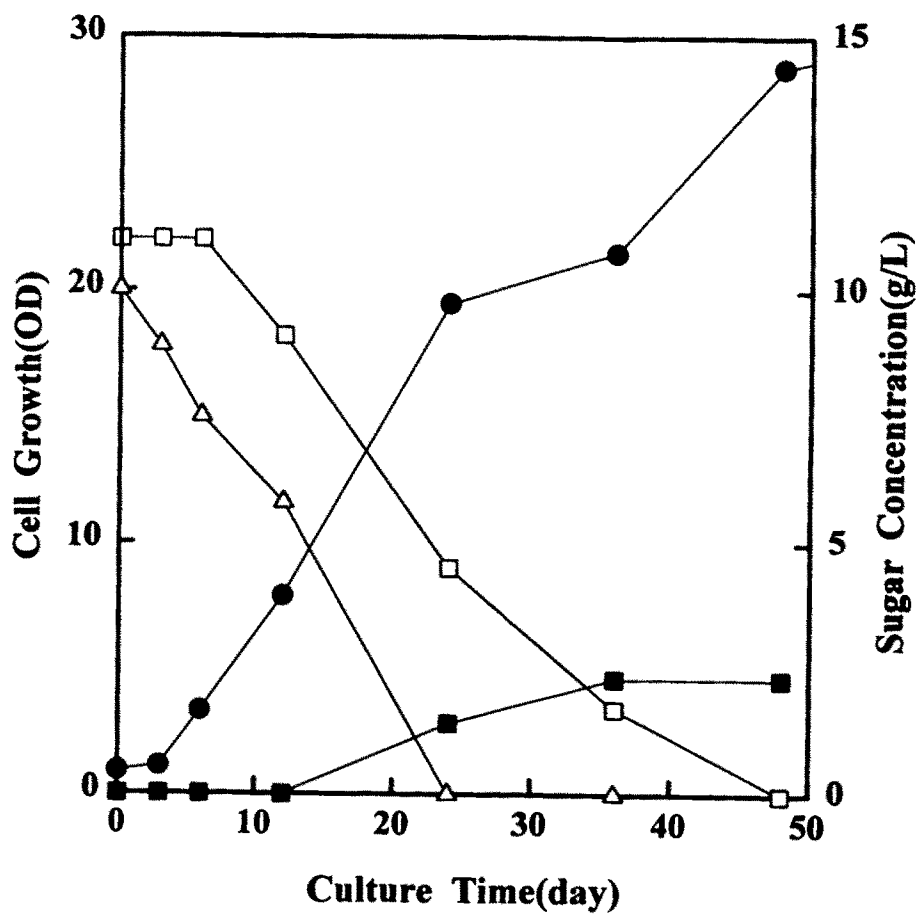


Fig. 22. Profiles of cell growth(●), galactose(Δ), xylose(□) and xylitol(■) concentration during the culture of *C. parapsilosis*.

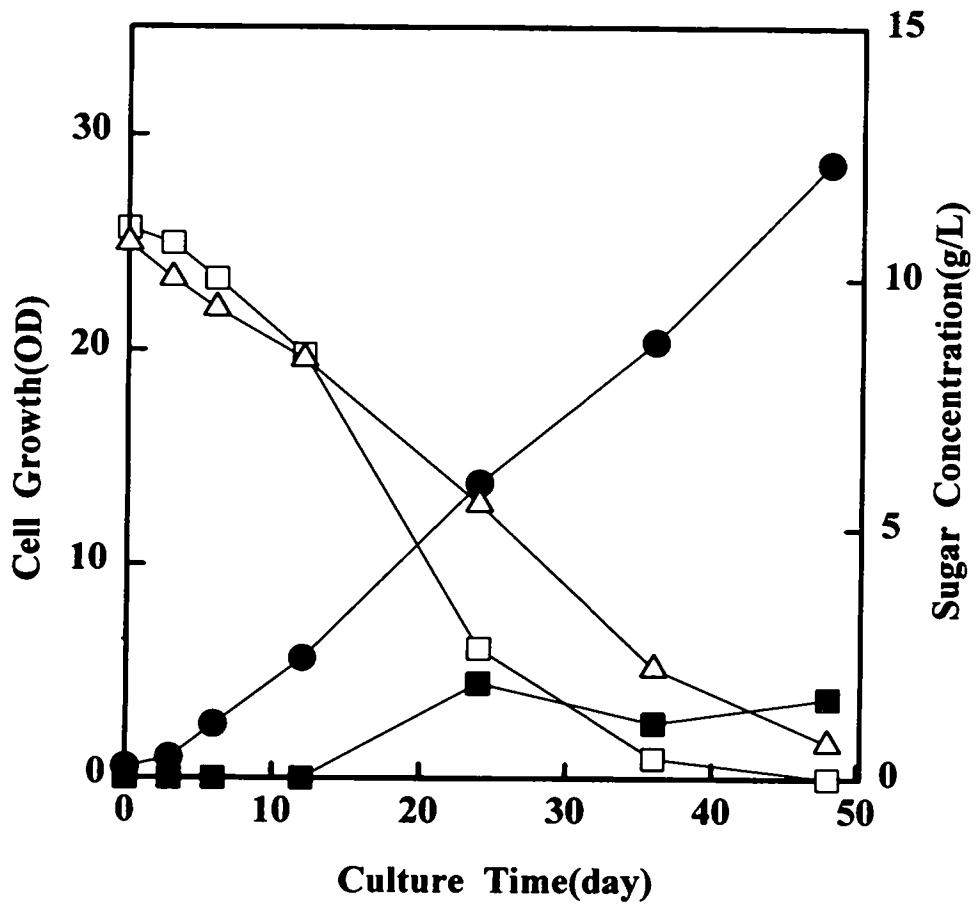


Fig. 23. Profiles of cell growth(●), maltose(△), xylose(□) and xylitol(■) concentration during the culture of *C. tropicalis*.

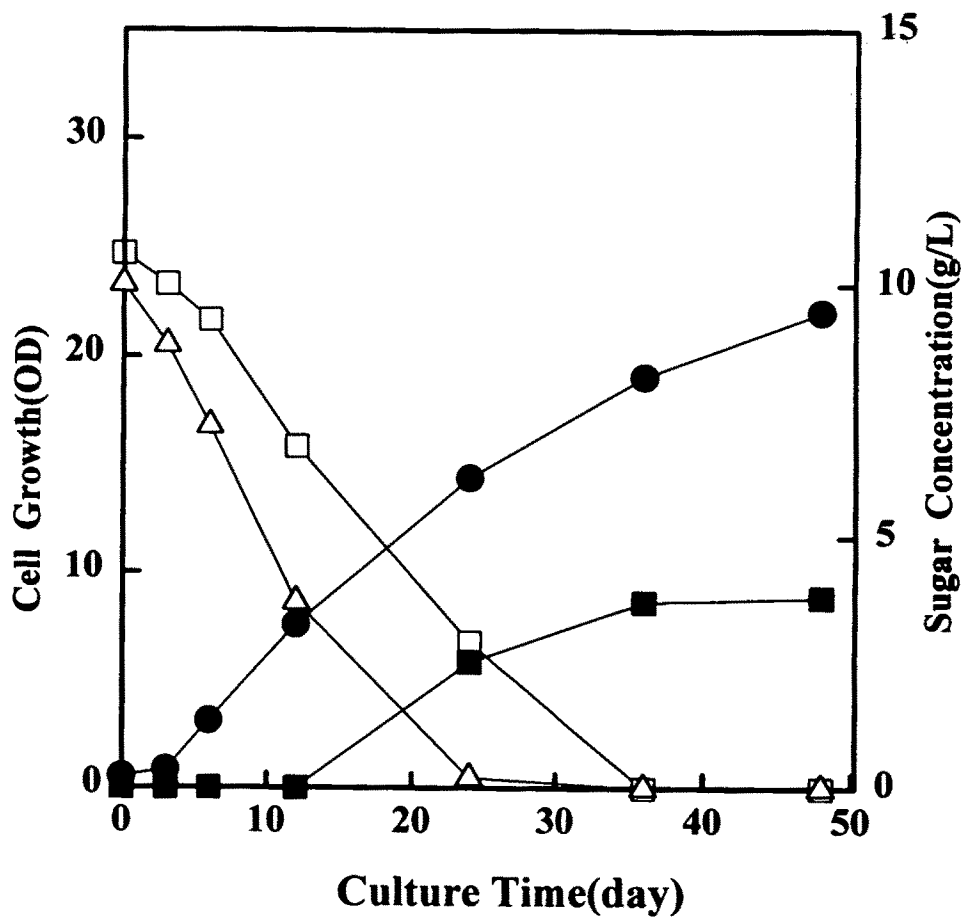


Fig. 24. Profiles of cell growth(●), galactose(△), xylose(□) and xylitol(■) concentration during the culture of *C. tropicalis*.

라. XDH defective mutant의 선별

Candida sp.에 의한 xylitol 발효에서 거의 모든 xylose를 xylitol로 전환시키기 위해서는 XDH defective mutant가 요구된다. 따라서 본 연구에서는 *C. parapsilosis*와 *C. tropicalis*를 이용하여 XDH defective mutant의 선별에 대한 실험을 수행하였다. 변이유도는 chemical mutagen인 EMS를 이용하였으나 *C. parapsilosis*와 *C. tropicalis*에서 XDH defective mutant를 얻지 못하였다. 따라서 mutation 능력이 더 강력한 NTG를 이용하였다. NTG를 이용한 mutation 결과 완벽한 XDH defective mutants는 선별하지 못하였고, xylose에서 성장이 미약한 XDH leaky mutant 만을 선별하였다. 이렇게 선별된 mutant를 10 g/L xylose와 10 g/L galactose가 포함된 액체 배지에서 24시간 배양한 후에 xylitol 수율이 우수한 *C. parapsilosis*의 XDH leaky mutant인 PA5와 *C. tropicalis*의 XDH leaky mutant인 TA8을 선별하였다. 선별된 mutant-PA5 및 mutant-TA8과 wild types를 25 g/L xylose와 25 g/L galactose 배지에서 xylitol 발효를 수행한 결과를 Table 25과 Fig. 25~Fig. 28에 나타내었다.

*C. parapsilosis*의 경우(Fig. 25)에 당의 소모는 xylose와 galactose가 동시에 이용되기 시작하여 60시간 배양시기에 거의 모두 소모되었다. 그러나 xylitol의 생산은 60시간 배양시기에 최대 16.5 g/L로서 수율은 0.66 g-xylitol/g-xylose 이었다. 세포의 성장은 xylose와 galactose가 모두 소모된 이후에도 생성한 xylitol를 이용하면서 계속되었으며, 에탄올 농도도 70시간 배양시기까지 계속 증가하였다. *C. parapsilosis*의 XDH leaky mutant-PA5인 경우(Fig. 26)도 xylitol의 발효 경향은 wild type과 유사한 경향을 나타내었다. 단지 mutant-PA5에서는 wild type보다 세포농도는 조금 낮았지만 에탄올과 xylitol 농도는 약간 더 높았다(Table 25). 따라서 선별된 mutant-PA5는 xylitol 발효에 적합하지 못하였다.

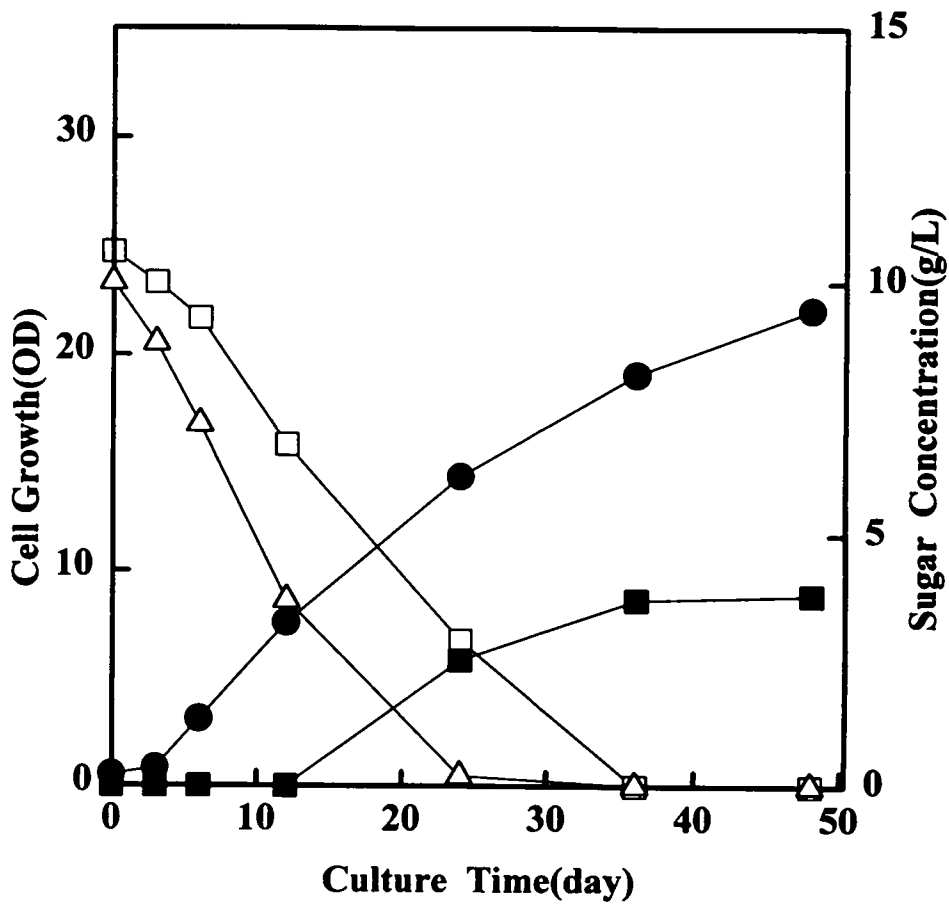


Fig. 25. Profiles of cell growth(●), galactose(△), xylose(□) and xylitol(■) concentrations during the culture of *C. parapsilosis*.

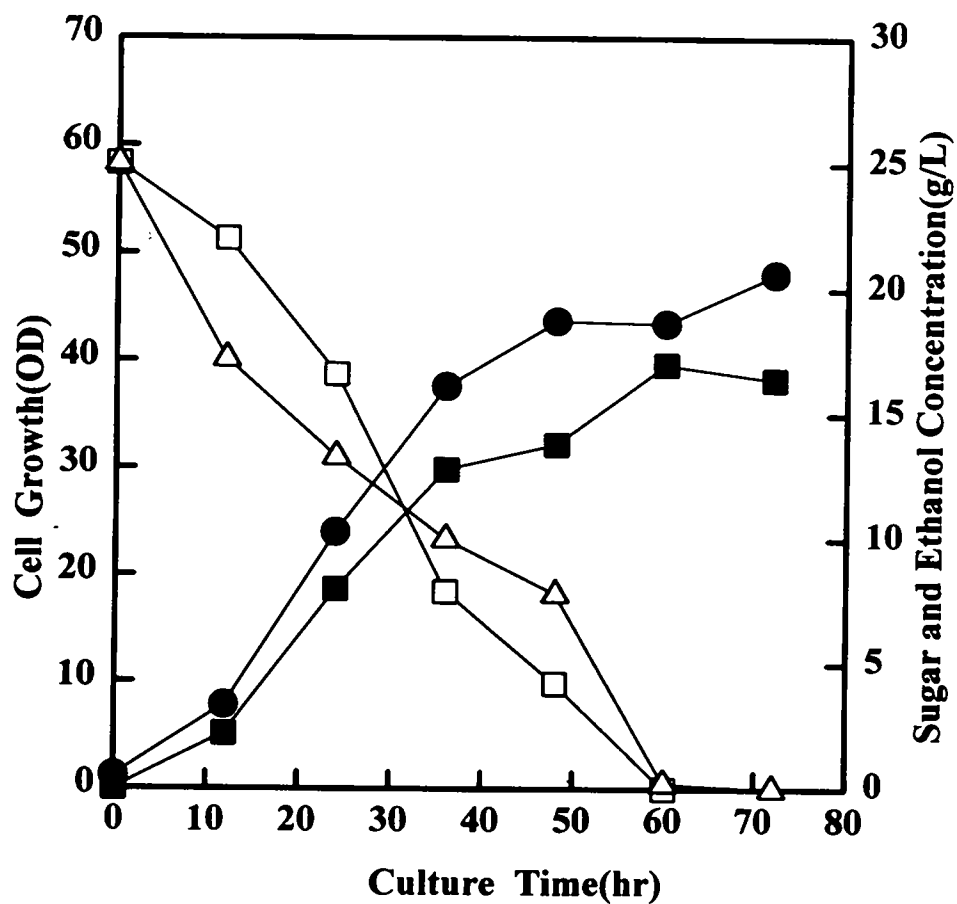


Fig. 26. Profiles of cell growth(●), galactose(△), xylose(□) and xylitol(■) concentrations during the culture of mutant PA-5.

C. tropicalis ATCC 20336인 경우(Fig. 27)에도 galactose는 적합한 co-substrate로서 xylose와 동시에 이용되었다. 세포성장은 xylose가 모두 소모된 이후에도 생성한 xylitol과 에탄올 및 galactose를 이용하면서 배양 60시간까지 지속되었다. Xylitol 농도는 배양 50시간에서 최대 11.9 g/L로 수율은 0.54 g-xylitol/g-xylose로서 매우 낮았다. 반면 mutant-TA8인 경우(Fig. 28)에는 60시간 배양시기에 최대 xylitol 농도가 17.1 g/L로 수율이 0.72 g-xylitol/g-xylose로서 wild type보다 크게 증가하였다. 당의 이용도 배양 초기에는 galactose를 먼저 이용하다가 36시간 배양 이후부터는 xylose를 더 빠르게 이용하였다. 그러나 세포성장은 xylose가 거의 소모된 이후에도 잔존하는 galactose와 생성한 xylitol를 이용하여 계속적으로 증가하였다. 따라서 mutant-TA8인 경우 wild type 보다 xylitol 수율이 증가하였지만 xylitol 발효를 위한 우수한 변이균주라고 할 수는 없었다.

결론적으로 *Candida* sp.로부터 완벽한 XDH defective mutants를 선별하지 못하였으므로 vegetative cell이 haploid인 *P. stipitis*와 *C. tropicalis*를 이용한 XDH defective mutant의 선별에 대한 실험을 더 진행하였다. 변이 유도는 chemical mutagen인 EMS 또는 NTG를 99.9% 이상의 사멸율을 나타내는 시간동안 처리하였다. Plate에 도말하여 나타난 colony 중에서 탄소원으로 xylose 만이 존재하는 plate에서 자라지 못하거나 매우 작은 colony로 자라는 변이균주들을 선별하였다. 일차적으로 선별한 변이균주를 *P. stipitis*의 변이균주들은 10 g/L xylose와 10 g/L glucose가 존재하는 배지에서 배양하여 xylitol 수율이 우수한 변이균주인 PXM-4를 선별하였으며, *C. tropicalis*의 경우에는 20 g/L의 xylose와 20 g/L의 glucose가 포함된 배지에서 배양한 후에 xylitol 수율이 우수한 변이균주 CXM-1을 선별하였다 (Table 26).

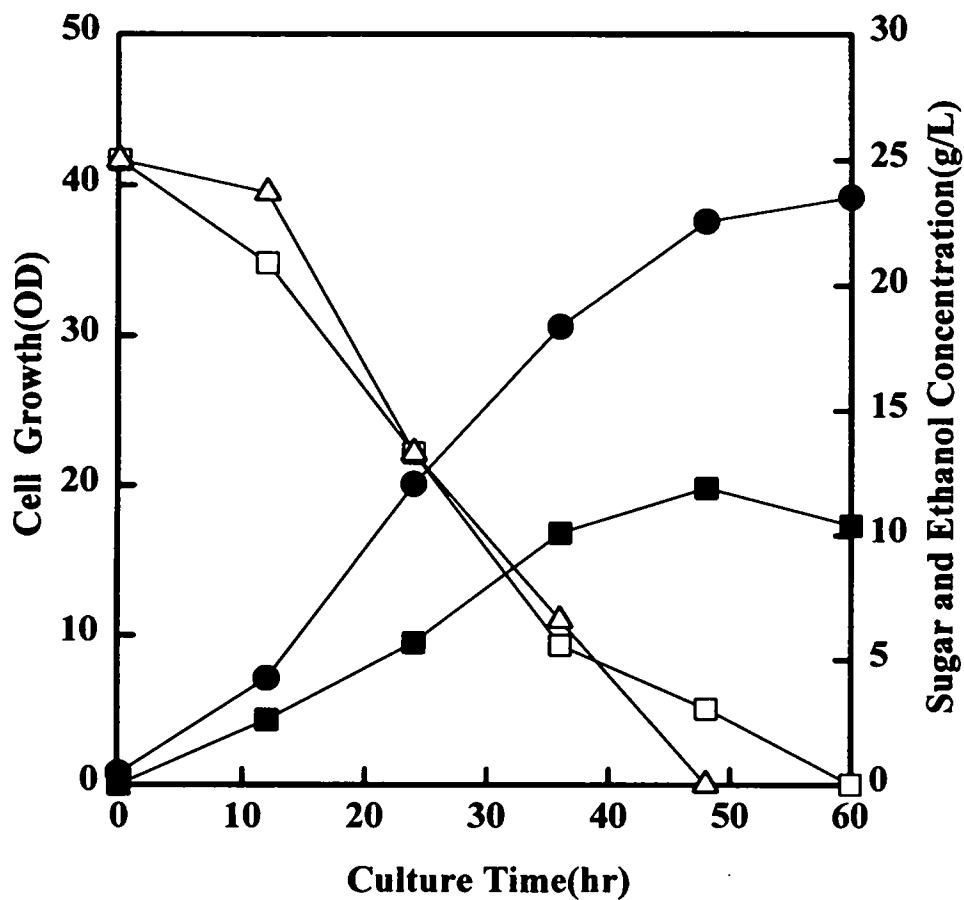


Fig. 27. Profiles of cell growth(●), galactose(△), xylose(□), and xylitol(■) concentrations during the culture of *C. tropicalis*.

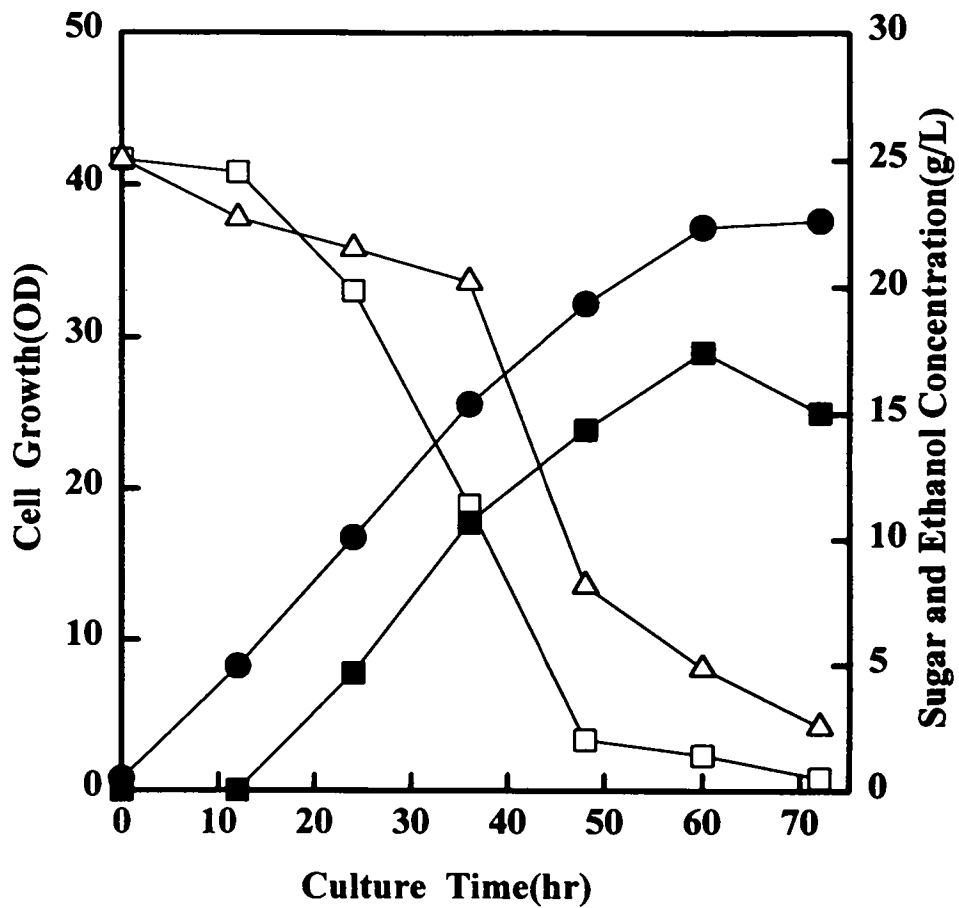


Fig. 28. Profiles of cell growth(●), galactose(△), xylose(□), and xylitol(■) concentrations during the culture of TA-8.

Table 25. Kinetic parameters of xylitol fermentation with 25 g/L xylose and 25 g/L galactos medium at 60 hr culture by *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, mutant-PA5 and mutant-TA8.

Strains	Cell O.D (620 nm)	Ethanol (g/L)	Xylose Residue (g/L)	Galactose Residue (g/L)	Xylitol (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g)
<i>C. parapsilosis</i>	56	2.8	0	0.6	16.5	0.66
Mutant-PA5	47.5	4.5	0	0.2	17.0	0.68
<i>C. tropicalis</i>	37.6	3.5	3.0	0	11.9	0.54
Mutant-TA8	37.1	-	1.2	5.2	17.1	0.72

Table 26. Selection of XDH defective mutant from *P. stipitis* and *C. tropicalis*.

Strain	Residual Xylose (g/L)	Xylitol (g/L)	Strain	Residual Xylose (g/L)	Xylitol (g/L)
<i>P. stipitis</i>	0	0.2	<i>C. tropicalis</i>	ND	9.6
PXM-4	4.4	5.6	CXM-1	ND	14.6
PXM-7	5.0	5.1	CXM-4	ND	10.1
PXM-8	4.9	5.1	CXM-5	ND	12.0
PXM-13	5.3	4.8	CXM-9	ND	12.4
PXM-14	5.1	4.3			
XM-15	4.8	5.2			

선별한 *P. stipitis*와 *C. tropicalis*의 XDH defective mutant에서 탄소원 및 에너지원으로 이용이 가능하면서 XR의 발현을 억제하지 않는 co-substrate의 선별에 대한 실험을 수행하였다. 선별한 *P. stipitis*의 변이 균주 PXM-4인 경우에 10 g/L의 fructose, galactose, mannose 및 glucose가 각각 포함된 발효 배지에 10 g/L의 xylose를 첨가하여 5일간 xylitol 발효를 수행하여 적합한 co-substrate를 선별하였으며, *C. tropicalis*의 변이 균주인 CXM-1의 경우에는 20 g/L의 fructose, galactose, mannose 및 glucose가 각각 포함된 발효 배지에 20 g/L의 xylose를 첨가하여 4일간 xylitol 발효를 수행하여 적합한 co-substrate를 선별하였다(Table 27). 변이 균주 PXM-4인 경우에 배양 5일에서도 xylose를 완전히 소비하지 못하였으나 대체적으로 xylitol 생성 수율은 95~100%로서 소비된 xylose는 모두 xylitol로 전환되었으며, 각 co-substrate 중에서 galactose가 xylitol 생성에 가장 적합하였다. 또한, *C. tropicalis* CXM-1의 경우에는 배양 4일에서 모든 xylose가 소비되었으나, 소비된 xylose에 대한 xylitol 생성 수율은 69~85%로써 fructose가 xylitol 생성에 가장 적합한 co-substrate 이었다.

Table 27. Selection of appropriate co-substrate for xylitol production by XDH defective mutant.

Co-substrate	PXM-4		CXM-1	
	Residual Xylose (g/L)	Xylitol (g/L)	Residual Xylose (g/L)	Xylitol (g/L)
Fructose	5.24	4.36	ND	16.90
Galactose	4.36	5.60	"	13.92
Glucose	4.27	5.56	"	15.67
Mannose	5.83	4.31	"	14.65

또한 *P. stipitis*의 wild type과 변이균주 PXM-4를 이용하여 10 g/L의 galactose와 xylose가 포함된 발효 배지에서 xylitol 발효를 수행하여 당 이용의 경향과 xylitol 생성능력을 검토한 결과에서 wild type의 경우(Fig. 29)는 배양 1일에 galactose 및 xylose를 모두 소비하였으나 xylitol은 전혀 생성되지 않았다. 반면 변이균주 PXM-4의 경우(Fig. 30)는 배양 1일에 galactose는 모두 소비되었고 xylose는 이들이 거의 소모된 이후부터 이용되기 시작하였다. 또한 배양 4일 이후에는 xylitol 생성 속도가 급격히 감소하였고, 배양 5일 이후에는 더 이상 xylitol의 생성이 증가하지 않았으며, 생성된 xylitol의 양은 약 6 g/L 이고, 생산 수율은 100% 이었다. 이러한 결과는 xylose가 co-substrate로서 사용된 당들의 transport system을 같이 이용하므로 co-substrate들에 의해 xylose의 이용이 억제되기 때문(69,70)이거나 co-substrate가 모두 소비됨으로써 xylose에서 xylitol로 전환되는 과정에서 필요한 NAD(P)H₂가 부족하기 때문인 것으로 사료된다.

*C. tropicalis*의 wild type과 변이균주 CXM-1을 이용하여 20 g/L의 fructose와 xylose가 포함된 발효배지에서 xylitol 발효를 수행하여 당 이용의 경향과 xylitol 생성 능력을 검토한 결과에서 wild type의 경우(Fig. 31)는 xylose가 fructose와 거의 동시에 이용되는 경향을 나타내었으며 배양 4일에 약 15 g/L의 xylitol이 생성되었다. 그러나 변이균주 CXM-1의 경우(Fig. 32)는 fructose가 배양 1일에 모두 소비된 반면 xylose는 fructose가 모두 소비된 이후 xylitol로 전환되기 시작하였고 배양 4일에 모두 소비되었으며, 이때 생성된 xylitol 농도는 약 17 g/L 이고, 수율은 85% 이었다.

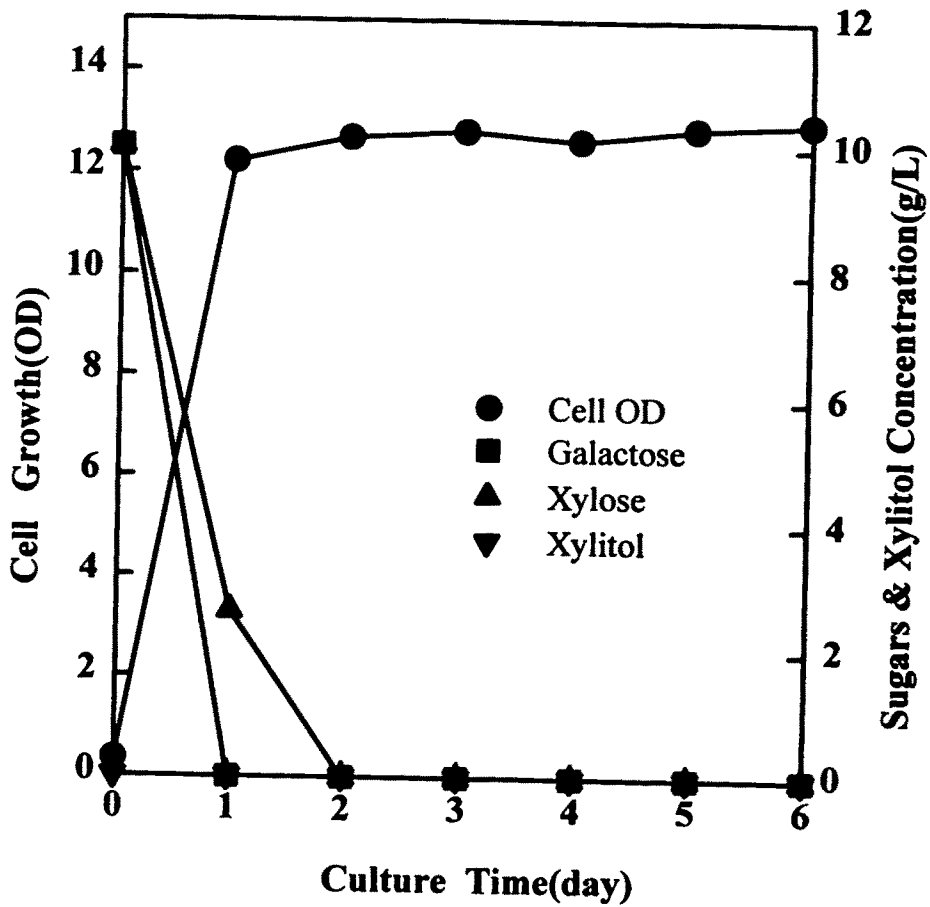


Fig. 29. Profiles of cell growth, galactose, xylose and xylitol concentration during the culture of *P. stipitis*.

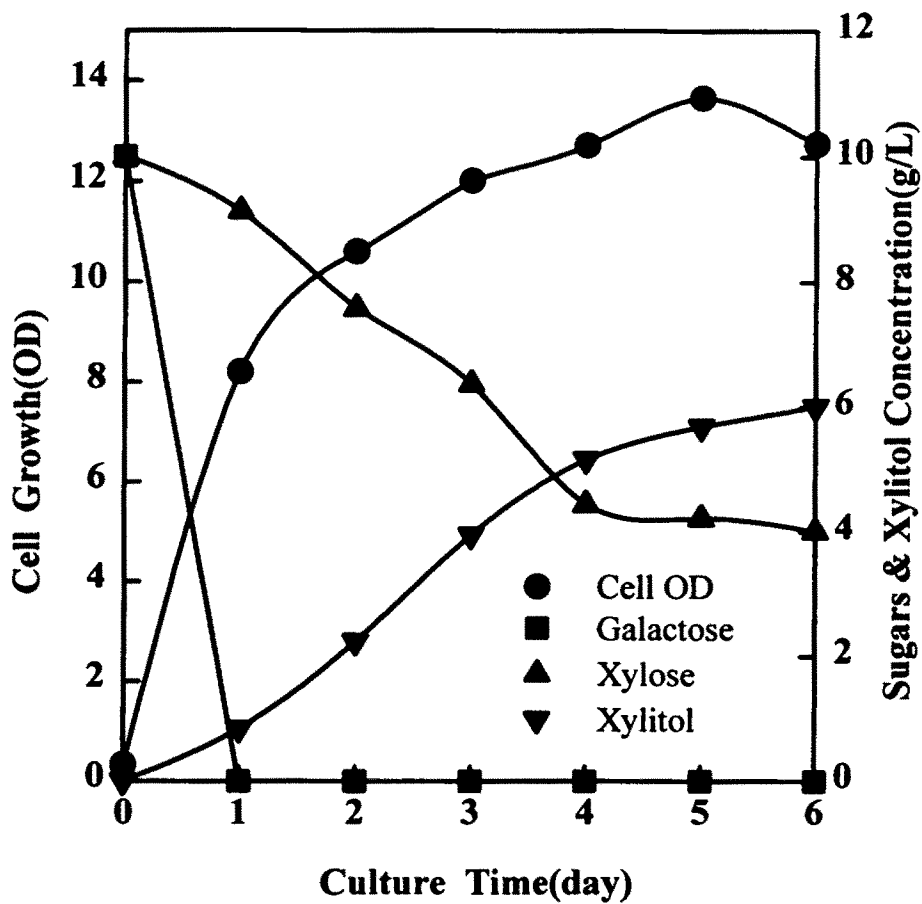


Fig. 30. Profiles of cell growth, galactose, xylose and xylitol concentration during the culture of PXM-4.

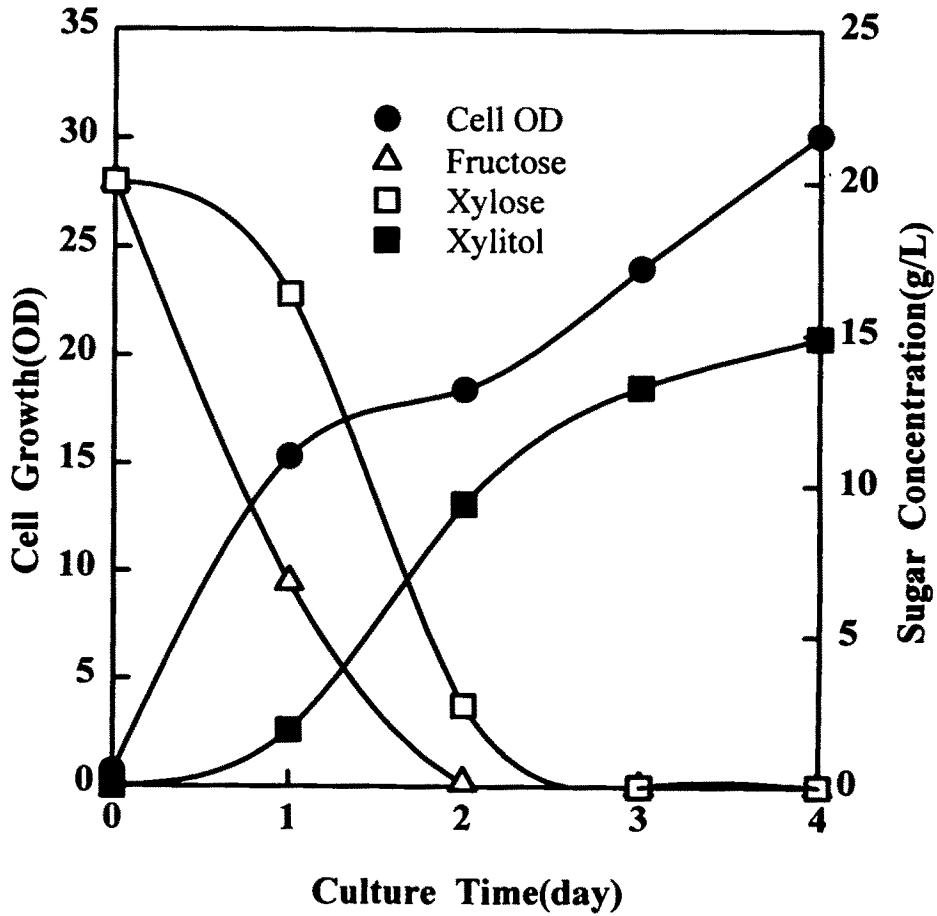


Fig. 31. Profiles of cell growth, fructose, xylose and xylitol concentration during the culture of *C. tropicalis*.

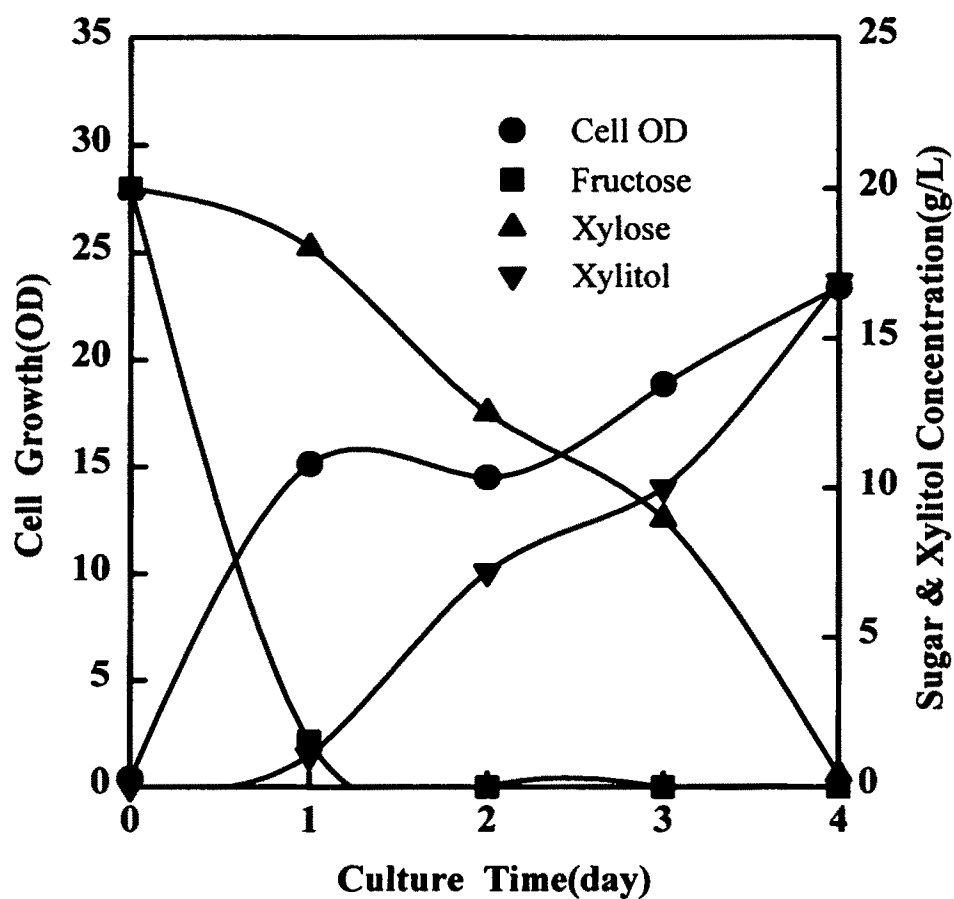


Fig. 32. Profiles of cell growth, fructose, xylose and xylitol concentration during the culture of CXM-4.

*C. tropicalis*의 CXM-1의 xylitol 생성 수율이 *P. stipitis*의 PXM-4보다 낮은 이유는 CXM-1이 XDH leaky mutant이기 때문인 것으로 생각된다. 이와 같은 결과에서 *P. stipitis* PXM-4의 경우 xylitol 생성 수율이 우수한 반면, xylitol 생성 속도가 느리기 때문에 xylitol 생성 속도를 증가시키기 위한 xylitol 발효 조건의 확립이 필요하다. 또한 *C. tropicalis* CXM-1은 xylitol 생성 속도는 빠른 반면 xylitol 생성 수율이 낮기 때문에 수율을 증가시키기 위한 균주의 개발 및 발효 조건의 확립이 필요하다.

마. 초기 pH 및 초기 xylose 농도의 영향

Xylitol 발효에서 중요한 발효조건 중에 하나가 초기 pH 및 초기 xylose 농도이다(71). 따라서 본 연구에서는 개발한 *P. stipitis* PXM-4와 *C. tropicalis* CXM-1을 이용하여 초기 pH의 영향에 대한 실험을 수행하였다.

*P. stipitis*의 PXM-4인 경우에는 각각 20 g/L의 xylose와 galactose가 포함된 발효배지에 각각의 초기 pH를 5~8로 적정한 후 5 일 동안 xylitol 발효를 수행하여 xylitol 생성을 비교하였다. 실험결과 Table 26에서 보듯이 소모된 xylose에 따른 생산수율은 거의 변화가 없었으나 세포성장 및 xylitol 생성은 pH가 증가함에 따라 감소하였고 pH 5.0에서 최종 xylitol 농도가 13.9 g/L로 가장 우수하였으나, Fig. 33에서 보듯이 xylitol 생성 속도 및 pattern은 pH 5~7에서는 큰 변화는 없었다.

*C. tropicalis*의 CXM-1인 경우에는 각각 20 g/L의 xylose와 fructose가 포함된 발효배지에 초기 pH를 5~8로 적정한 후에 5일 동안 xylitol 발효를 수행하여 xylitol 생성을 비교하였다. 변이균주 CXM-1은 초기 pH가 증가함에 따라 세포의 농도 및 xylitol 생성은 감소하였고, 특히 pH 7.0 이상에서는 세포의 농도 및 xylitol 생성이 급격히 감소하였다. Table 27의 결과에서와 같이 CXM-1의 최적 초기 pH는 6.0으로 나타났고, 이 때 최대

xylitol의 농도는 16.2 g/L 이고, 수율은 80%로 나타났다. 또한 Fig. 34에서 보듯이 pH 7.0 이상에서는 xylitol의 생성속도가 급격히 감소함을 알 수 있었다. 그러나 이러한 결과는 *C. shehatae*를 이용한 xylitol 발효에서 최적의 초기 pH가 4.5 이었다는 Sánchez 등(71)의 보고와는 차이가 있었다.

Table 26. Comparison of xylitol production at different initial pH by PXM-4.

Initial pH	Cell OD (620 nm)	Residual Xylose (g/L)	Xylitol (g/L)	Yp/s (g/g)
5	17.6	6.9	13.9	1.00
6	17.4	6.8	13.1	0.99
7	16.2	6.4	13.0	1.00
8	15.2	8.6	11.4	1.00

Table 27. Comparison of xylitol production at different initial pH by CXM-1.

Initial pH	Cell OD (620 nm)	Residual Xylose (g/L)	Xylitol (g/L)	Yp/s (g/g)
5	22.7	0	16.1	0.80
6	22.1	0	16.2	0.80
7	23.1	0	12.9	0.64
8	23.1	0	12.7	0.64

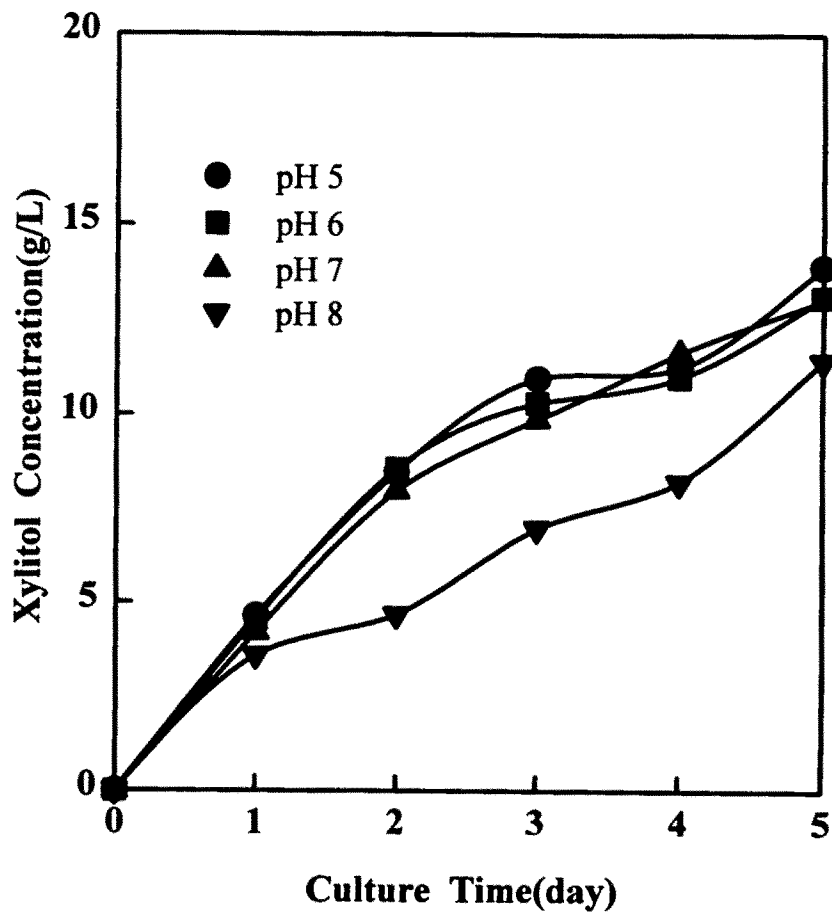


Fig. 33. The comparison of xylitol production on different initial pH by PXM-4.

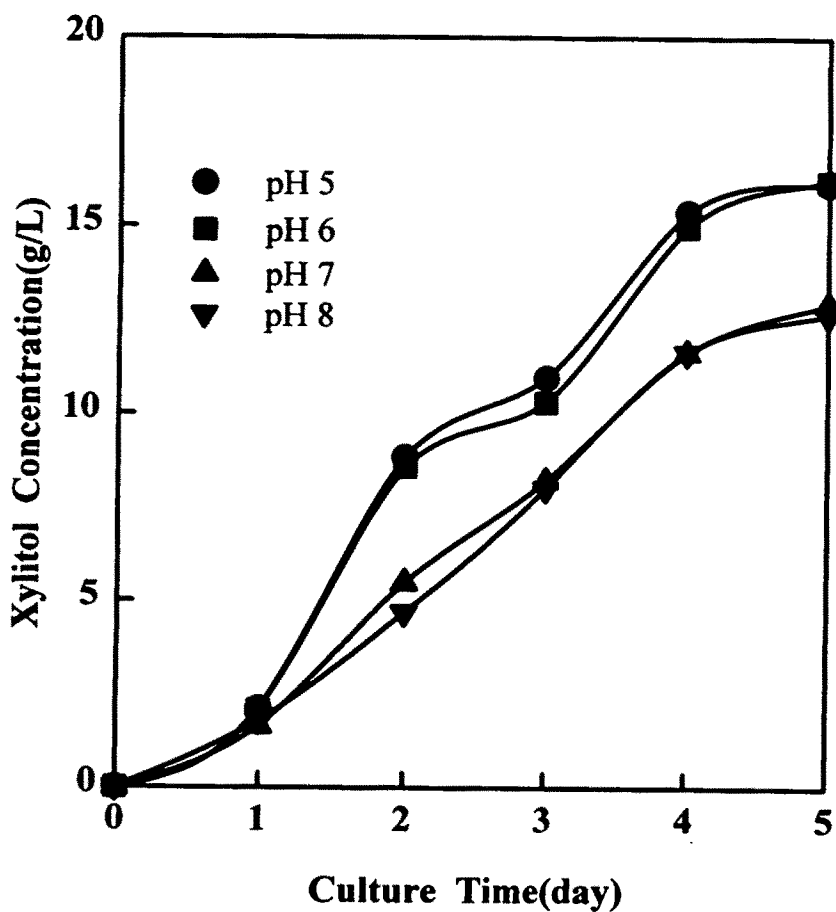


Fig. 34. The comparison of xylitol production on different initial pH by CXM-1.

또한 효율적인 xylitol 생산을 위하여 초기 xylose 농도의 영향에 대한 실험을 수행하였다. 초기 xylose 농도는 10~100 g/L로 변화시키고, 이때 co-substrate의 농도는 xylose의 농도와 1:1이 되도록 첨가하여 발효를 수행하였다. *P. stipitis*의 PXM-4인 경우(Table 28)에 세포성장은 초기 xylose의 농도가 20 g/L에서 가장 우수하였고, 50 g/L 이후에는 세포성장이 감소하였는데, 그 이유는 *P. stipitis* PXM-4가 당에 대한 내성이 낮기 때문인 것으로 사료되며, 또한 이러한 특성 때문에 초기 xylose의 농도가 증가함에 따라 잔존하는 xylose의 양도 증가함을 알 수 있었다.

Table 28. Comparison of xylitol production at different initial xylose concentration by PXM-4.

Initial Xylose Conc. (g/L)	Cell OD (620 nm)	Residual Xylose (g/L)	Xylitol (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/L)
10	14.4	4.7	5.7	1.00
20	15.0	6.8	13.1	0.99
50	14.1	32.1	18.7	1.00
100	13.9	80.1	21.6	1.00

*C. tropicalis*의 CXM-1인 경우에서도 세포성장은 초기 xylose의 농도가 20 g/L에서 가장 우수하였고, 50 g/L 이상에서는 세포성장이 감소하였으나, xylitol 생산수율은 초기 xylose의 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다(Table 29).

Table 29. Comparison of xylitol production at different initial xylose concentration by CXM-1.

Initial Xylose Conc. (g/L)	Cell OD (620 nm)	Residual Xylose (g/L)	Xylitol (g/L)	Y _{p/s} (g/L)
10	18.28	0	6.94	0.69
20	21.43	0	14.82	0.70
50	17.67	0	37.10	0.74
100	12.31	3.44	85.23	0.88

바. 유가식 배양에 의한 xylitol 생산

위의 실험결과에서 나타난 것처럼 *P. stipitis*의 PXM-4인 경우는 효과적인 xylitol 생성을 위해 잔존하는 xylose를 xylitol로 완전히 전환시키기 위한 방법이 필요하며, *C. tropicalis*의 CXM-1인 경우는 잔존하는 xylose가 없는 반면 xylitol 생산 수율이 낮은 단점을 보여주고 있다. 따라서 본 연구는 여러 가지 유가식 배양방법을 통한 최종 xylitol의 생성농도와 발효속도 및 생산 수율을 증가시키기 위한 실험을 수행하였다. *P. stipitis*의 PXM-4인 경우 잔존하는 xylose의 농도가 높은 이유는 배양 초기에 co-substrate인 galactose가 모두 소비됨으로써 xylose가 xylitol로 전환되는데 필요한 NAD(P)H₂가 부족하기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 초기에 50 g/L의 xylose와 10 g/L의 galactose가 포함된 배지를 이용하여 배양을 시작한 후에 1일 간격으로 10 g/L의 galactose를 첨가하는 경우와 galactose를 feeding하지 않은 경우와 비교하였다. Galactose를 feeding하지 않은 경우(Fig. 35)에서는 배양 1일에서 galactose가 모두 소비되었고, xylose는 그 이후부터 소비되는 경

향을 나타냈다. 이때 세포성장은 배양 2 일까지 증가하고 일시 성장이 멈춘 후 배양 3 일부터 다시 증가하였으며, 이러한 이유는 탄소원으로 galactose가 소비되면서 생성된 유기산이나 ethanol 등을 배양 3일부터 이용하기 때문인 것으로 사료된다. 또한 xylitol의 생성은 시간이 지남에 따라 증가하고, 배양 4일 이후에는 더 이상 증가하지 않았으며, 이때 최대 xylitol 농도는 19 g/L 이고, 잔존하는 xylose의 농도는 31 g/L 이었다. 이와 같이 잔존하는 xylose의 농도를 줄이기 위하여 1일 간격으로 10 g/L의 galactose를 첨가하고 시간에 따른 xylitol 생성을 조사하였다. Fig. 36에서 나타난 것처럼 10 g/L의 galactose를 계속적으로 feeding 함으로써 세포성장은 계속적으로 증가하였으나 xylitol의 생성은 크게 증가하지 않았으며, 최대 xylitol 농도는 배양 5 일에 15 g/L로 galactose를 feeding하지 않은 경우 보다 더 낮았다. 그 이유는 계속적으로 feeding되는 galactose로 인하여 xylose가 세포 내로 transport 되지 못하였거나 XR 효소의 합성이 저해되었기 때문인 것으로 사료된다. 따라서, 보다 효율적으로 xylitol을 생산하기 위하여 발효시기 중에서 xylitol의 생성이 증가하지 않는 시기인 배양 4일에서 galactose를 feeding하여 xylitol 생성에 대한 변화를 조사하였다. Fig. 37에서 나타난 것처럼 배양 4일에서 10 g/L의 galactose를 feeding 한 이후 배양 6일 까지 xylitol의 생성이 계속적으로 증가하고 배양 6일 이후에는 다시 xylitol 생성에 대한 변화가 없어지는 것을 알 수 있었다. 이러한 이유는 xylitol의 농도가 더 이상 증가하지 않는 시간대에서는 에너지 대사 및 NAD(P)H의 생성을 위한 substrate가 고갈되었기 때문에 이때 galactose를 공급함으로써 xylitol 생성을 증가시키는 결과를 얻었다.

또한, 이미 전술한 바와 같이 *C. tropicalis* CXM-1은 XDH leaky mutant이기 때문에 잔존하는 xylose가 없는 반면 xylitol의 생산 수율이 낮은 단점이 있다. 이것은 CXM-1이 일부 xylose를 탄소원으로 이용하기 때문이다. 따라서 탄소원으로 이용되는 xylose를 xylitol 전환시키기 위하여

co-substrate로서 fructose를 첨가시키는 유가식 배양 방법을 수행하였다. 초기 xylose 농도를 50 g/L로 하고 10 g/L의 fructose를 첨가한 배지를 이용하여 배양을 시작하면서 1일 간격으로 10 g/L의 fructose를 첨가하는 경우와 fructose를 feeding하지 않은 경우와 비교하였다. Fructose를 feeding하지 않은 경우(Fig. 38)에서는 fructose가 배양 1일에 모두 소비되었고, xylose는 그 이후부터 소비되는 경향을 나타냈다. 이때 세포성장은 배양 1일까지 증가하고 일시 성장이 멈춘 후 배양 4일부터 다시 증가하였으며, 이러한 이유는 탄소원으로 fructose가 소비되면서 생성된 유기산이나 ethanol 등을 배양 3일부터 이용하기 때문인 것으로 사료된다. 또한 xylitol의 생성은 시간이 지남에 따라 급격히 증가하였고, 최대 xylitol 농도는 40 g/L 이고, 이때의 생산 수율은 80% 이었다. 또한 xylose의 소비가 급격히 증가하는 배양 1일부터 4일 까지 세포 성장이 전혀 없는 것으로 보아 소비된 약 10 g/L의 xylose는 세포성장이 아닌 에너지 대사에 이용되었을 것으로 사료된다. 따라서 *P. stipitis*의 PXM-4인 경우와 같이 보다 효율적으로 xylitol을 생산하기 위하여 배양 4일에서 fructose를 feeding하여 xylitol 생성에 대한 변화를 조사하였다. Fig. 39에서 나타난 것처럼 배양 4일에서 10 g/L의 fructose를 feeding 한 이후에 세포성장은 계속적으로 증가하였으나 최종 xylitol의 농도는 42 g/L로써 크게 증가하지는 않았다. 이는 배양기간 중에 보다 정확한 시기에 co-substrate를 공급하지 않았기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 이렇게 소비된 xylose를 완전히 xylitol로 전환시키기 위해서는 배양하는 동안 10 g/L의 co-substrate를 1일 간격으로 공급하는 실험을 수행하였다. Fig. 40에 나타난 것처럼 10 g/L의 fructose를 계속적으로 feeding함으로써 세포성장은 계속적으로 증가하였으나 최대 xylitol 농도는 배양 5 일에 약 45g/L로 fructose를 feeding하지 않은 경우보다 더욱 증가하였다. 그러므로 이와 같이 유가식 배양 방법에 의하여 보다 효율적으로 xylose를 xylitol로 전환시킬 수 있게 될 것으로 기대된다.

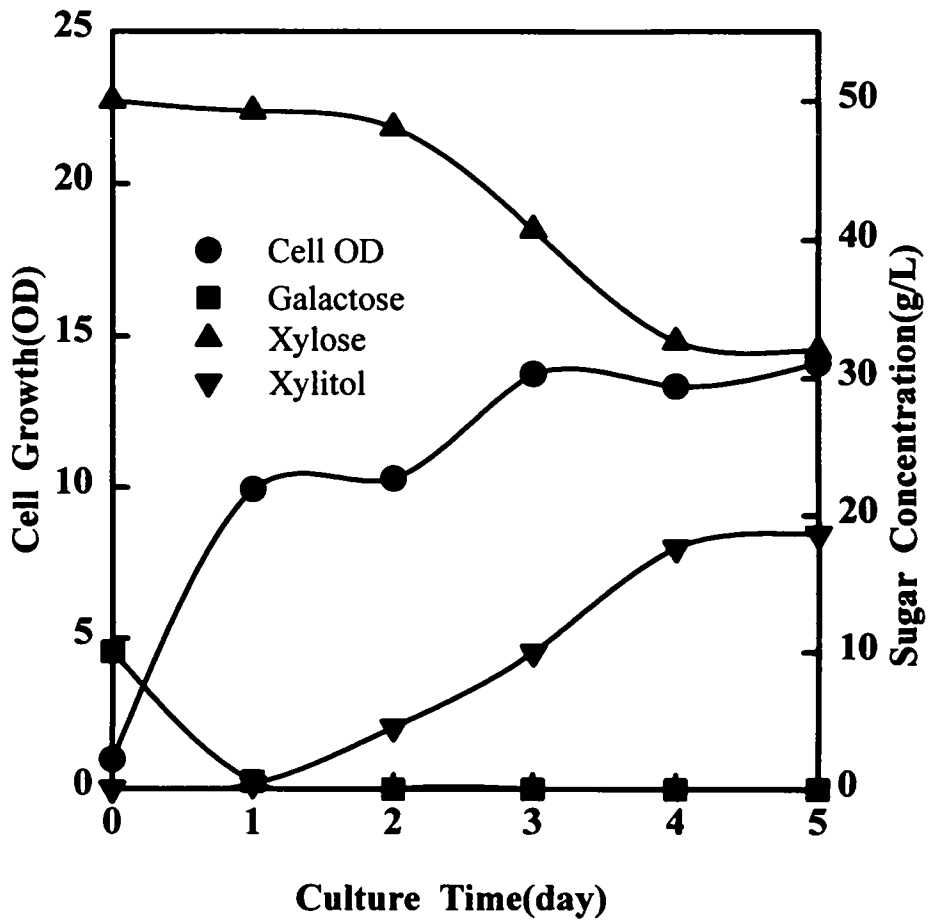


Fig. 35. Profiles of cell growth and xylitol production on the fermentation medium containing 50g/L xylose by PXM-4.

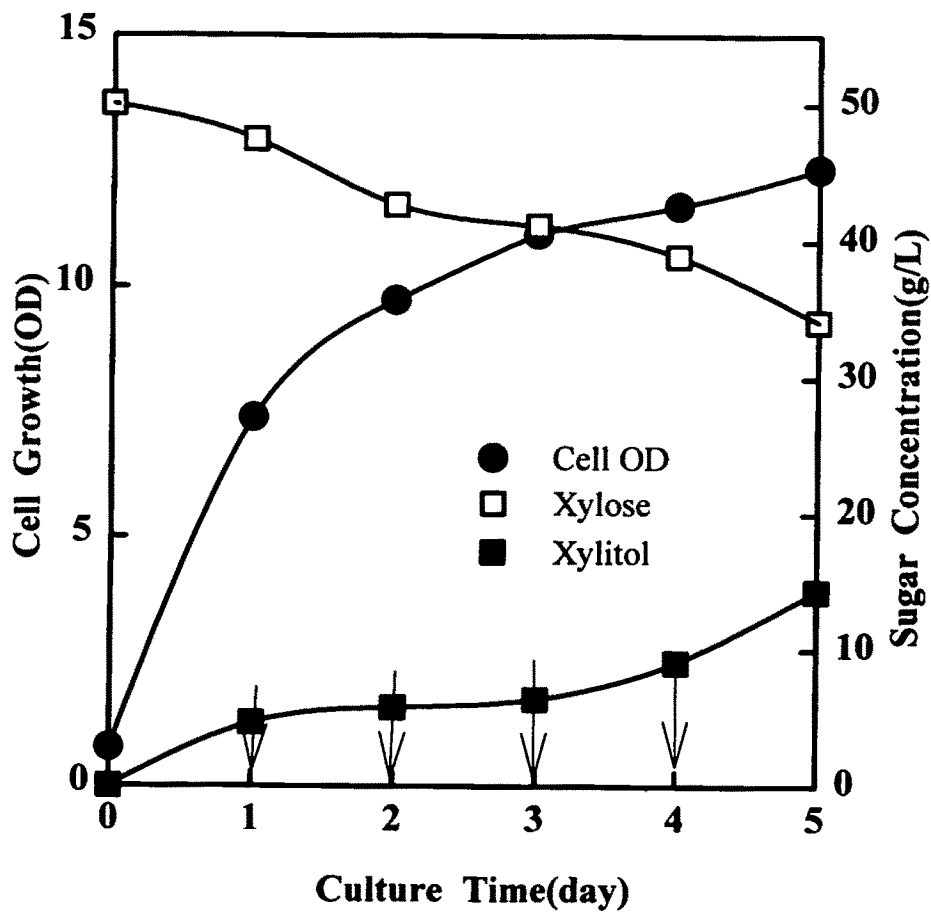


Fig. 36. Profiles of cell growth and xylitol production on the fermentation medium containing 50 g/L xylose with 10 g/L galactose feeding a day by PXM-4.

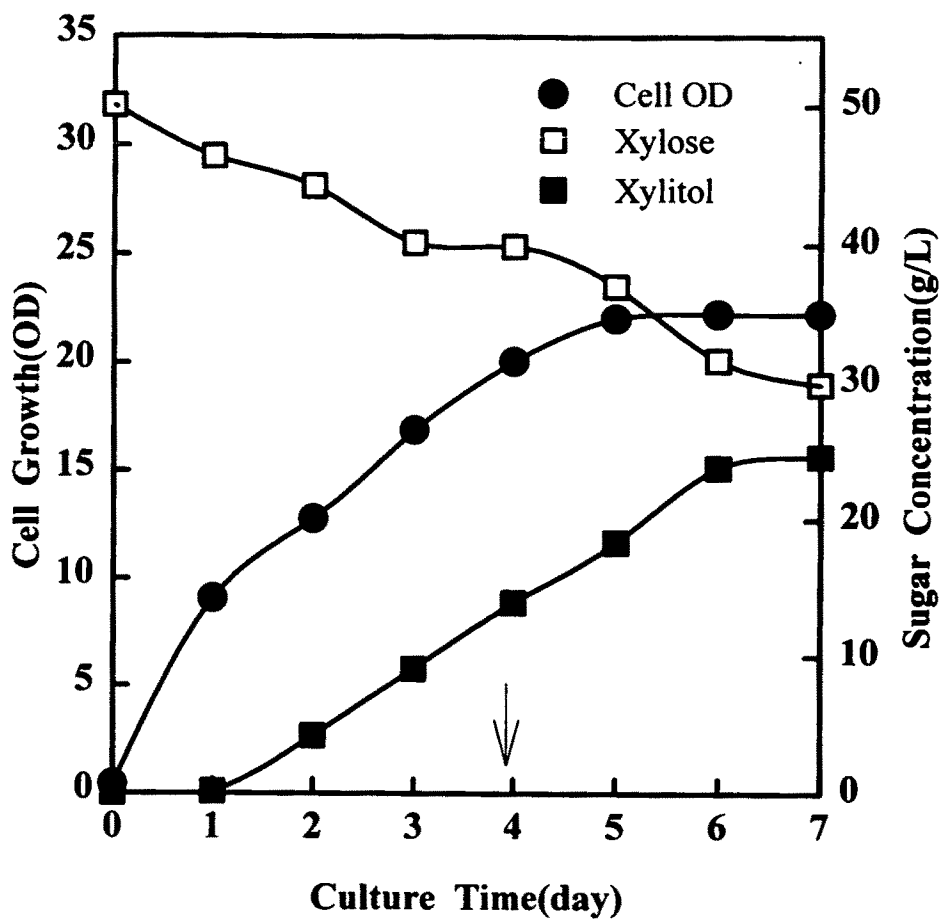


Fig. 37. Profiles of cell growth and xylitol production on the fermentation medium containing 50 g/L xylose with 10 g/L galactose feeding at 4 day by PXM-4.

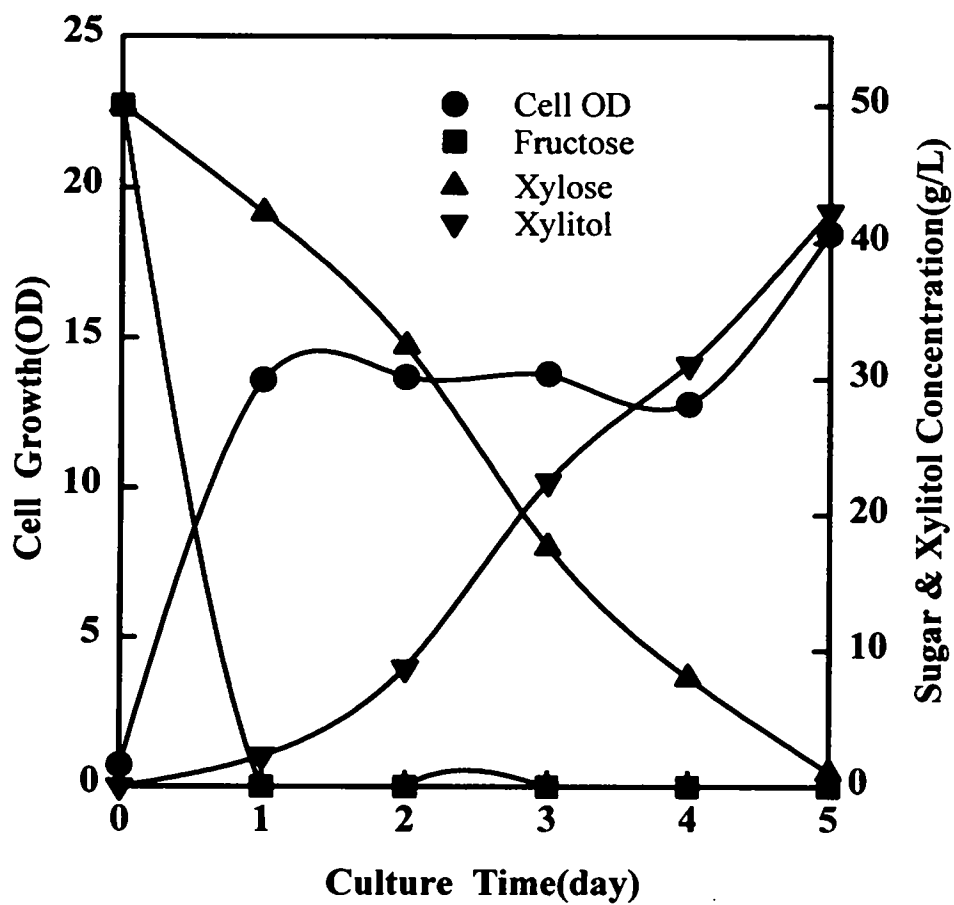


Fig. 38. Profiles of cell growth and xylitol production on the fermentation medium containing 50 g/L xylose by CXM-1.

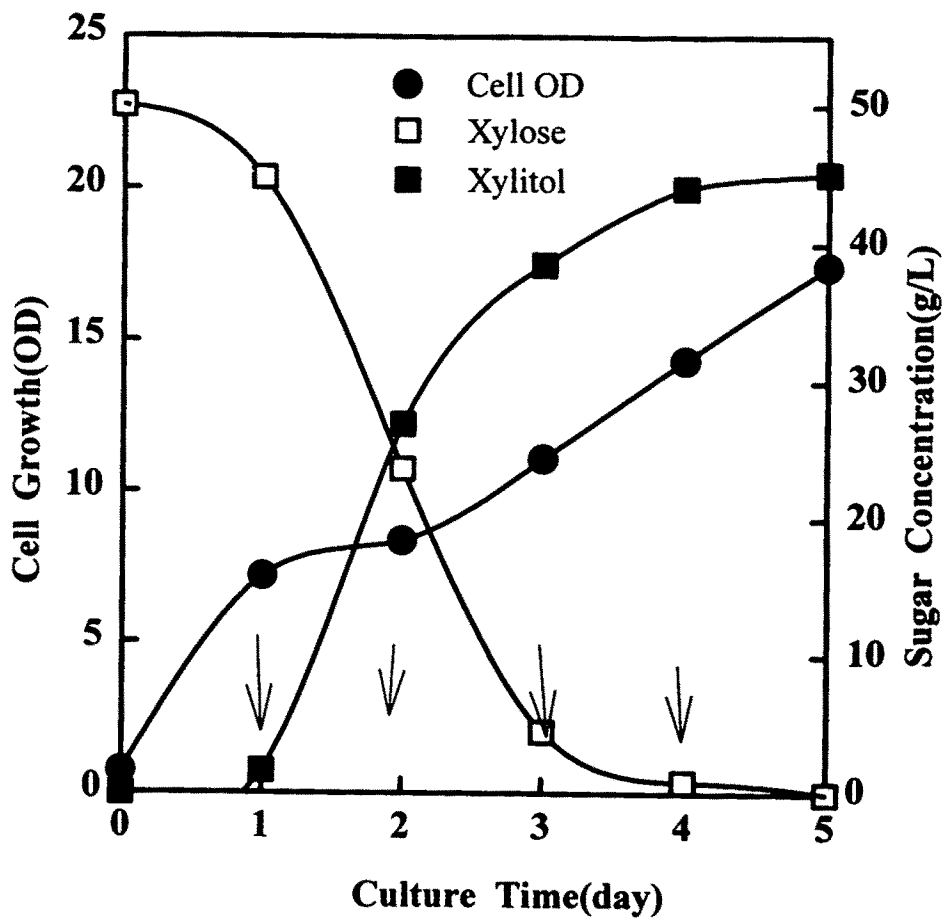


Fig. 39. Profiles of cell growth and xylitol production on the fermentation medium containing 50 g/L xylose with 10g/L galactose feeding at 4 day by CXM-1.

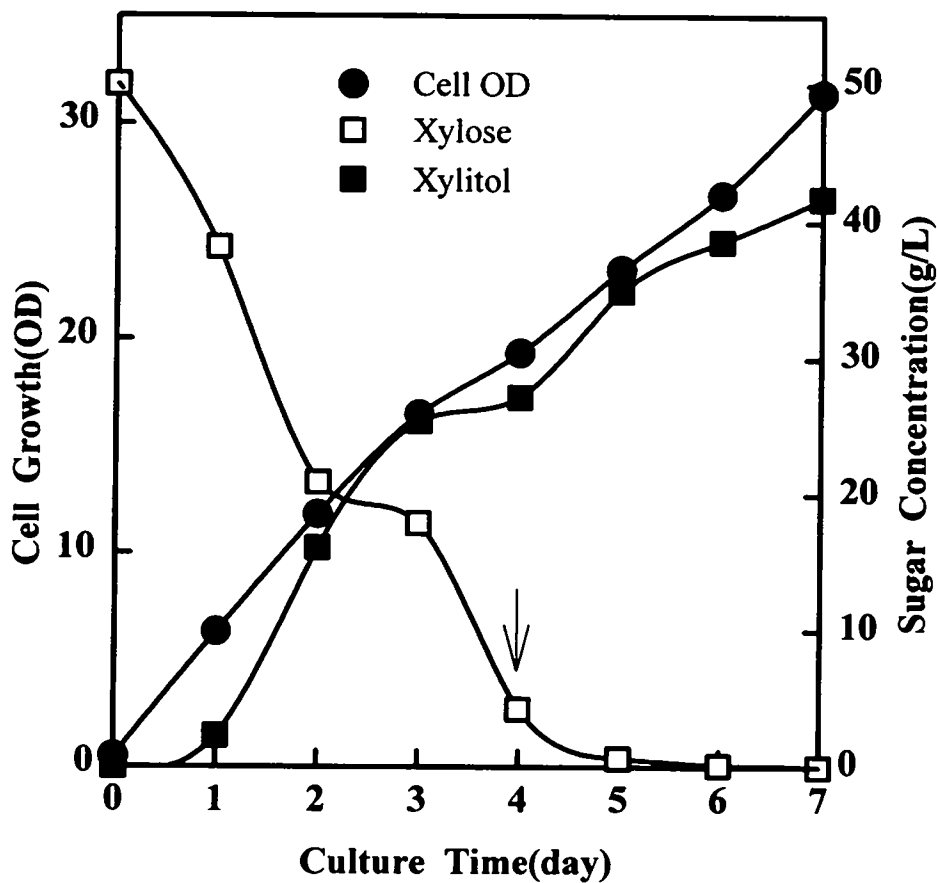


Fig. 40. Profiles of cell growth and xylitol production on the fermentation medium containing 50 g/L xylose with 10 g/L fructose feeding a day by CXM-1.

사. 옥수수 속의 산 가수분해 용액을 이용한 xylitol 발효

본 연구의 최종 목표인 농산 폐기물에 의한 xylitol 생산에 관한 연구의 일환으로써 옥수수 속의 산 가수분해 용액을 이용한 xylitol 발효에 대한 실험을 수행하였다. 옥수수 속의 산 가수분해는 전술한 실험방법에 따라 제조하였으며, 산 가수분해 시간에 따른 옥수수 속으로부터 추출되는 당 농도의 변화를 Fig. 41에 나타내었다. Fig. 41에서 보듯이 옥수수 속의 산 가수분해는 반응 4시간 이후부터는 더 이상 당의 추출이 없었으므로 산 가수분해는 반응시간은 4 시간으로 결정하였다. 옥수수 속의 산 가수분해 용액을 이용한 xylitol 발효는 추출된 용액의 xylose의 농도는 5 g/L 이었으며, *P. stipitis* PXM-4를 이용하여 실험을 수행하였다. 실험결과(Fig.42) 배지내에 존재하는 당의 농도가 높지 않고, 옥수수 속의 추출과정에서 생성되는 부산물로 인해 세포농도는 높지 않았으나 배지 내에 존재하는 xylose는 배양 4일에서 100% 모두 xylitol로 전환됨을 알 수 있었다. 따라서 본 연구 결과에 근거하여 본 연구의 최종 목표인 농산 폐기물에 의한 xylitol 생산에 관한 연구는 다양한 효모 균주로부터 XDH defective mutant를 개발하고 균주의 특성에 따른 발효공정을 개발하면 산업적인 이용도 충분히 가능성이 있다고 할 수 있다.

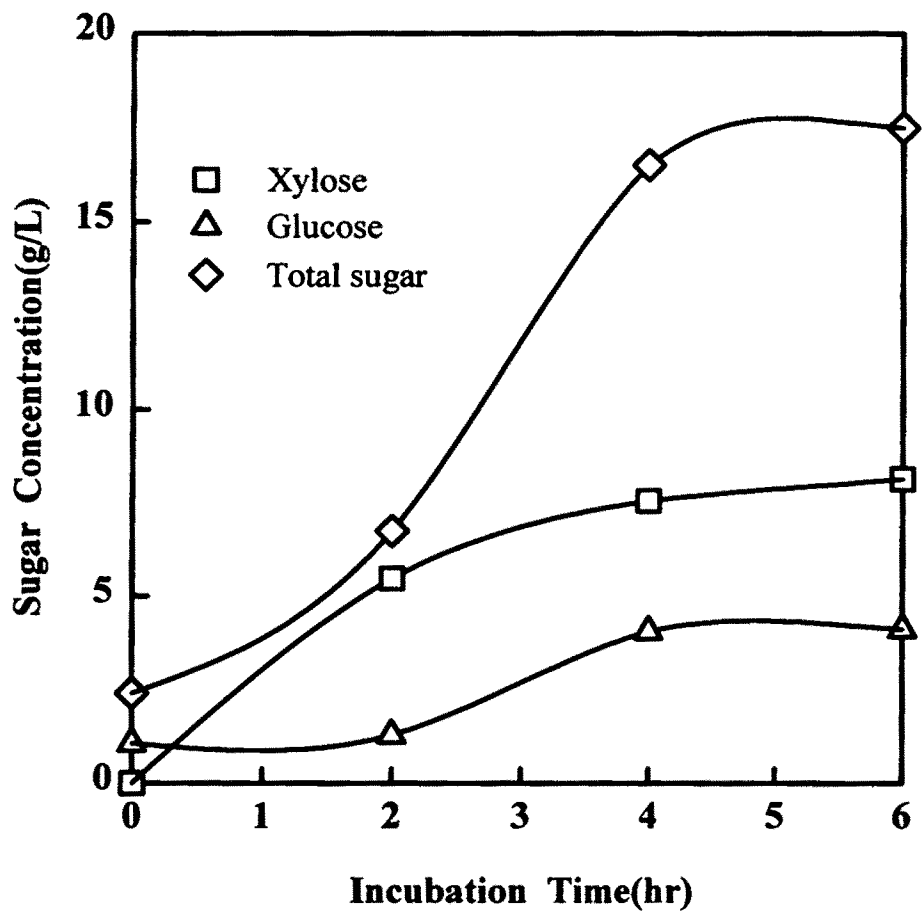


Fig. 41. Profiles of xylose, xylitol and total carbohydrates production in corn cob by treatment of sulfuric acid.

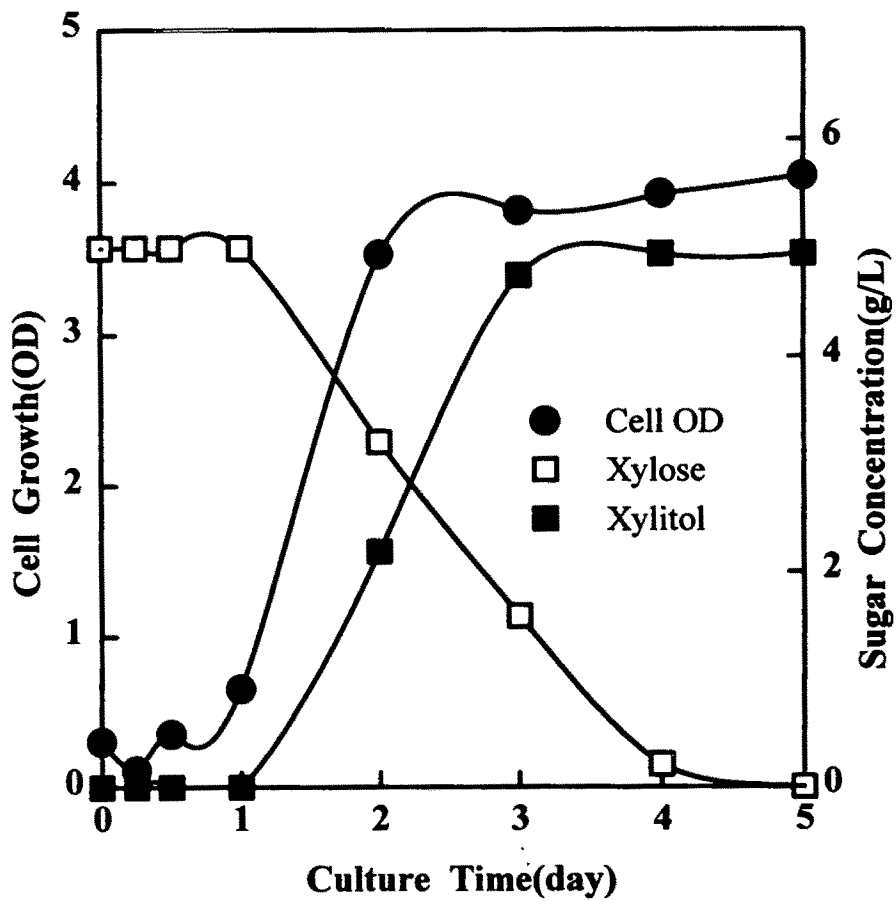


Fig. 42. Profile of cell growth, xylitol production in corn cob hydrolyzate by PXM-4.

3. XR 유전자의 분석과 클로닝

가. *Candida* sp.의 XR 유전자 분석

Candida spp. 들의 XR 유전자 양상을 분석하기 위해 우선 *C. tropicalis*, *C. guillermoidii*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*의 4종으로부터 genomic DNA를 얻어 southern blot을 수행하였다. 이때 사용한 probe는 서울대 농생대에서 클로닝한 *P. stipitis*의 XR 유전자로 *SalI-SalI* (1kb) 단편을 사용하였다. *C. albicans*의 경우 제한효소 *SalI*, *EcoRI*, *XhoI*, *EcoRV*의 처리시 단일 band가 약하게 hybridization되었고, *C. parapsilosis*의 경우는 아무런 band도 나타나지 않았다. 이로 보아 *C. albicans*의 경우 유전자가 하나이며 band가 약한 것은 probe로 사용한 *P. stipitis*의 XR 유전자와 상동성이 낮기 때문으로 생각되며 만약 유전자가 여러 개가 존재한다면 나머지 유전자는 *P. stipitis*의 XR gene과 상동성이 더욱 낮아 나타나지 않은 것으로 보인다. 또한 *C. parapsilosis*의 경우 *C. albicans* 보다도 *P. stipitis* XR 유전자와의 상동성이 더 낮아서 hybrid 되지 않은 것으로 해석된다. *C. guillermoidii*의 경우 *SalI*, *XhoI*, *SacI*과 같은 여러가지 제한효소의 처리시 단일 band만이 나타났는데, 이는 XR 유전자가 하나이기 때문으로 해석된다. *C. tropicalis*의 경우는 Yokoyama 등이 이미 2개의 유전자를 분리하여 그 서열까지 발표하였는데, 본 연구에서 사용한 *C. tropicalis* 변이 균주에서도 Southern blot 결과 0.5 kb, 1.4 kb, 2.5 kb, 3.2 kb size의 4개 *SalI* band가 hybridization 되는 것으로 보아 2개 이상의 유전자가 있음이 확인되었다. 이러한 결과로 보아 *C. tropicalis*의 XR 유전자의 활성이 *Candida* sp.들 중에서 가장 높은 이유가 gene의 수에 따른 gene dosage 효과가 기여하는 것으로 여겨진다.

이와같이 높은 수율로 xylitol를 생성하는 *C. tropicalis* KCTC7101과는

다르게 낮은 수율로 xylitol을 생성하는 *C. tropicalis* KCTC7212, KCTC7552, KCTC7725로부터 genomic DNA를 얻어 Southern blot을 수행하였다. Southern blot 결과 KCTC 7725를 제외한 두 가지 균주의 경우 제한효소 *SalI* digests에서 약 1kb 가량의 단일 band가 공통적으로 약하게 나타났다. 이것으로 보아 XR gene이 하나로 추정되기 때문에 같은 *C. tropicalis*인 KCTC7101에 비해서 xylitol 수율이 낮은 것으로 생각된다.

나. Size-selected genomic library 제조

Yokoyama 등(64)이 추측한 제3의 유전자를 찾기위해 PCR을 하였다. 본 실험에서 사용한 *C. tropicalis* 변이균주의 경우 Yokoyama의 염기서열을 근거로하여 제조한 primer를 사용할 경우 유전자가 증폭되지 않는 것으로 보아 Yokoyama의 XR 유전자와 특히 5' nontranscribed region 이나 3' region이 상이한 것으로 보인다. 따라서 그 발현율이나 조절에서도 차이가 있을 가능성도 배제할 수 없다. *C. tropicalis* 변이균주의 경우 XR 수율이 높으며 유전자가 두 개 이상이고 Yokoyama의 XR 유전자와 다른 새로운 유전자이므로 이로부터 XR 유전자를 cloning 하기로 하였다. 1차적으로 southern blot 결과중 *SalI* digest의 경우 2.7kb band의 유전자를 우선 cloning하기 위해 이 DNA 부위를 이용 size selected library를 만들었다. Genomic DNA를 hybridization band를 보인 제한효소로 자른 후 전기영동을 하여 원하는 부위의 gel로부터 DNA를 추출하여 insert DNA를 준비하였다. pBluescript KS(+)^{II} plasmid DNA를 동일한 제한효소로 처리한 후 특정한 size의 genomic DNA를 T4 ligase를 사용하여 재조합 plasmid를 만들었다. *E. coli* JM101을 숙주로 electroporator를 이용하여 transformation함으로써 size-selected partial library를 제조하였다.

다. Colony hybridization에 의한 library screening

제조된 size selected library를 LB plate (+ Ampicillin + X-gal + IPTG)에 깔아서 white colony만을 선별하여 master plate를 만들었다. Master plate의 colony들을 Nytran filter에 옮겨 filter를 ^{32}P 가 표지된 *P. stipitis* XR 유전자의 *SalI-SalI* 단편을 probe로 hybridization 하였다. 실험결과에서 *C. tropicalis*의 genomic DNA를 여러가지 제한효소를 이용하여 double digestion하여 Southern blot 결과 *XhoI*과 *SacI* double digest의 경우 3.5 kb, 4.5 kb 두 band를 보였고 이는 *XhoI-SacI* fragment이므로 클로닝 효율도 높았으므로 이를 이용하여 size selected library를 제조하였다. Colony hybridization 방법을 이용하여 전부 2×10^4 개의 colony를 screening 한 결과 57개의 positive들을 얻었다. 이들로부터 DNA를 분리하여 *XhoI* 과 *SacI*으로 digestion 한 결과 모두 4.5 kb짜리 fragment를 가지고 있는 것이 확인되었다. 이들 colony들 중 하나를 선택하여 자세한 제한효소 절단위치를 분석했다.

라. 제한효소 지도 작성 및 subcloning.

Positive colony 중에서 한개의 클론을 선택하여 DNA를 다량으로 얻어 여러가지 제한효소로 처리한 후 Nytran filter에 올려 Southern hybridization을 병행하여 XR 유전자의 지도를 작성하고 coding 부위로 예상되는 부분을 확인하였다. Coding 부위를 포함하는 DNA 절편을 pBluscript KS(+)-II를 vector로 이용하여 ligation한 후 *E. coli* JM101에 transformation하여 subcloning 하였다. Insert DNA의 양쪽 끝에 위치하는 *XhoI*, *SacI*을 기준으로 다른 제한효소들과 조합하여 digestion을 수행하였고 또한, 지금까지의 genomic DNA의 *SalI* digest에서 공통적으로 band가 나타났던 것을 고려해서 *SalI* single digestion도 같이 수행하였다. 그 결과 *SalI*

single digestion에서는 0.3, 0.5, 1.3 kb의 band가 나와서 *Sal*I site가 적어도 3개는 존재하는 것으로 예상되며 그 외에 *Xho*I, *Sac*I과 조합한 *Eco*RV, *Hind*III, *Eco*RI 등의 site가 존재함을 확인할 수 있었다. 이와같이 다양한 size로 digestion 된 DNA를 대상으로 Southern hybridization을 수행하였다. 실험 결과 0.5 kb와 1.3 kb 크기의 *Sal*I-*Sal*I 단편과 1.7 kb 크기의 *Sac*I-*Sal*I 단편이 각각 hybrid 되었다. 따라서 이 부분이 coding 부위를 포함하고 있는 것으로 생각된다. 위의 결과를 기초로 새로이 클로닝한 XR 유전자의 제한효소 지도는 Fig. 43과 같다.

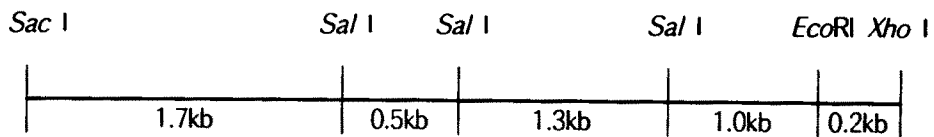


Fig. 43. Restriction map of a genomic clone, 4.5 kb *Xho* I/*Sac* I fragment.

마. XR 유전자 염기서열 결정 및 유전자 분석

Subcloning한 DNA를 dideoxy 방법을 이용하여 직접 염기서열을 결정하고 Promega사의 Mini prep kit로 좀더 정제한 DNA를 이용 automatic sequencer로 다시 한 번 염기서열을 확인하여 최종 결과를 얻었다 (Fig. 44). 위의 과정에서 3개의 단편을 각각 Bluescript plasmid에 subcloning하여 염기서열을 분석하는 실험을 수행하여 0.5 kb, 1.3kb의 전체 염기서열과 1.7 kb의 경우 5'의 744 bp 와 3' 755 bp를 각각 dideoxy termination 법을 이용하여 염기서열을 분석하고 automatic sequencer를 이용하여 2차적으로 염기서열을 확인하였다. 결정한 염기서열 2555개를 다른 XR 유전자의 염기서열과 비교 분석한 결과 421 bp의 5' noncoding 부위와 974 bp의 coding 부위 그리고 1230 bp의 3' noncoding 부위로 이루어져 있음을 밝혔다. 또한 5' noncoding 부위에 345번째 염기에서 TATA Box로 추정되는 부분을 찾을 수 있었다. TATA Box를 비롯한 promoter와 그 밖의 전사조절 부위를 reporter에 연결하여 유전자 총으로 *C. tropicalis*에 도입하면 전사조절 기작에 대한 연구를 수행할 수 있을 것으로 기대된다. 단백질 서열도 비교 분석하여 aldose reductase의 cofactor 결합 부위를 규명할 수 있었다.

바. 새로이 분리된 XR 유전자의 염기서열 비교 분석

본 연구에서 얻은 *C. tropicalis*의 XR 유전자 (XRCTS)의 염기서열과 기존에 밝혀진 2개의 *C. tropicalis* XR 유전자인 *xyrA* 및 *xyrB*의 염기서열 (64)과 1개의 *P. stipitis* XR 유전자의 염기서열(unpublished data)을 DNASTAR의 Wiber 방법을 이용해서 서열상의 상동성을 비교하였다 (Table 30). XRCTS의 염기서열은 *xyrA*와 *xyrB* 유전자의 서열과 각각 73.3%와 71.2%의 상동성을 나타내었으며, probe로 사용했던 *P. stipitis*의 XR 유전자

서열과는 58.8%의 상동성을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 얻은 *C. tropicalis*의 유전자는 *P. stipitis*의 XR 유전자 보다는 Yokoyama 등(64)이 보고한 두개의 *C. tropicalis* XR 유전자에 더 가까움을 알 수 있었다. 반면 이들 4가지 염기서열에 있어서 전사조절 부위인 TATA Box 부분과 aldose reductase cofactor 결합부위는 Ile-Pro-Lys-Ser로써 매우 잘 보존되어 있었다. 그러나 이들 4가지의 유전자들 사이의 상동성 비교에서 XRCTS와 *xyrA*와의 상동성 (73.3%) 또는 *xyrB*와의 상동성 (71.2%)은 *xyrA*와 *xyrB*와의 상동성 (98.2%) 보다 낮았고, XRCTS와 *P. stipitis*의 XR 유전자와의 상동성 (58.8%)도 *xyrA* 또는 *xyrB*와 *P. stipitis*의 XR 유전자와의 상동성 (73.4% 또는 73.6%) 보다 낮았다. 반면 XRCTS와 *xyrA* 또는 *xyrB*와의 상동성은 *P. stipitis*의 XR 유전자와 *xyrA* 또는 *xyrB*와의 상동성은 거의 유사하였다. 이러한 변이균주 *C. tropicalis*의 XR 유전자는 2번의 독립된 duplication을 통하여 유전자의 수가 증가된 것으로 보인다.

Table. 30. Nucleotide sequence homology among XR genes isolated *C. tropicalis* strains and *P. stipitis*.

	XRCTS	<i>xyrA</i>	<i>xyrB</i>	<i>P. stipitis</i>
XRCTS		73.3%	71.2%	58.8%
<i>xyrA</i>	73.3%		98.2%	73.4%
<i>xyrB</i>	71.2%	98.2%		73.6%
<i>P. stipitis</i>	58.8%	73.4%	73.6%	

XRCTS: XR gene isolated from *C. tropicalis* KCTC7101 by this study.

xyrA and *xyrB*: XR genes isolated from *C. tropicalis* by Yokoyama *et al.*

P. stipitis: XR gene isolated from *P. stipitis* CBS5776 [unpublished data]

5' -NTGCGGCTNATTNNGACTCACTCATAGGGCGAATTGGAGCTCAACAGCGAAACCGCTACAGACGCCATCACAGTCCCAACGCTTGAC
GCAAGCAACGGGCTGGTAATAGCAGTGTCAATTGAGGGTGACACAGGCAAGTTGGAGAGTATAGOGACGACAGGAACACAGTTGCGGCA
ATTAGATCGGTGTGAGCTTTACAACCTTGTCCGATTATCTCCGCTCTCTAATAGATAGATATACATAATTATTAGTAAGAGTTGA
TAAAAATACATACAAAAAACAACCTAAGGGATACCGTTATACATATTACTTCAGTTTCGTAAACAATCAGACGANTGNTATCTGGCTGG
CTATGTNATTAAOCGGGATGGGAGCATTGTTTCTCTCCCGTGGGCGAANTCTGCTTAAACCCAGGATCTGCAGCCTGCAAAACCCAG
TGCACTCCATTGAACAGANCTGGAGGAAATTTCTCGAAACATTTCCAGACCTTGGACTTATCCACCGAGAAATGCAACOCNAG
AACACGCAAGTTTCAGTGTTCCTTTTGTATTTTGAAGTGCATACCCAGTGTGAGTGAATGATGTGATGGGTTCTGCTTTGT
GGATTTCCAGTTACGCTCTGGTATTAAATGTTCTTTGGGGTTNGGCNCCNTTGGTAOCTGTTGGTACAAGNGGGTTTTTNTTGC
NCTTCCCTTGGAAATANAACCTGCTTCTCCCGGAAACGTTGGNCTGGACGGAAATTTTTTAACCCN---TTTNGGCCATNATNTTTT
NCTTCCCAANTTTATTTCCAGATCAATCCCGGATTTTINATTTTNGATTATTTTAAOCACAAAACAAAAACCGGTTTTTT
TTTTTTTTTTTCCATTGGNCGGNGGCCAATGGACCGAGTTTACGNCGAGAAATCAATTCAAGTTTAAATACCTGGNAGACAAGA
CAAAGGGAAGNGATTAGAACACATTTGTGTGCGNACTTGTTCNCCNCGGGTGTTCGCAAAGATTTTTTCCGCTCGNGAAAA
ATCCGCTCCTCCCGAATTTATTCGATGTTTAGATTTTTTCAACAACTATAANGGGATCNNGAATCTCAGACACTNTTGT
CATNGCTTCTCTNGAOCATTATCAANTTAOCAAACNACAAN-

1 ATGTTTANTGNTANNNGTCCCNACNATCAAATTGAACTCCGGNTANG
50 AAANGCATTGTTGGTTGTTTCGGCTGNNGGAAAGTCAACAACGCTACCG
100 TGCCGACCGATTAAACAACGCATCAAGACCGGGTACAGATTNNTTGACG
150 GTGCCGAGGACTACGGCAACGAGAAGGAAGTGGTGAAGGTATCAACA
200 GAGCCATCAAGGACGGTGGTCAAGAGAGAAGAGTTGTTTACCTC
250 CAAGTTATGGAACAAATCCACGACCCAAAGAAGTGGAGGTCGCTTGA
300 ACAAGACCTTGAGCGACTTGAACCTGGACTACGTCGACTTGTCTTGAT
350 CCAATCCCAATCTTTCAANTTTGTCCCAATTGAAAAAATAACCCAC
400 TGGCTTCTACTGCGGAGACGGCGACAAGTTCCACTACAAAAACNTCCCAT
450 TGTGGACTGGAAGGCTTTGAAAAATTTGGTTGACCCCGGCAAAATCA
500 ANTCCATCGGTATCTCCAACCTCNCGGTGCNTTGATCTACAACCTGATN
550 GGGGGCCCNCCATCAANCCCGCGTGTNCAAAATCNAACNCCNCCCA
600 TACTTGAACAGCCAAAGTTGATCGAGTACNTCCANAAGCAAGGCATCG
650 CCATCACCGGTACTCCTCCTTCGGTCCAGTCTTCTTGGAGTTGGAG
700 TCCAAAANAGCCTTGGACACCCCTNCCTTGTCCAGCACAAAGACAATCA
750 ATTCCATTGCCGACAAGCACGCAAGTCCGACCCAGGTCTTGTGTA
800 GATGGGCTACCCAGAAAGGCATCGCTGTCAATCCAAATCACACCTCC
850 CCAACAGATTGGCTCAAACCTGTCTGTGCTGACTTTGACTTGACCCA
900 GGAGGACTTGGACAAGATTGCCAAGTTGGACATTGGCTTGAATCAAC
950 GACCCATGGGACTGGGACAACATTCCAATCTTTGTTAA

990AGGAACACTCGTANTNTTATGTACATGCNATTAATAAATTTATNTTGGTCTAANAACGGCTTGTCTGCGAAAACTATTAACCTCAAT
CTACTTACAAGTCTCTCTCAGATGNTGCTCCGACAACTTCTCTTGCCTGAACTCCGCTCAAAATGGAANCTCTCCAGTTG
TCNAAAATCAAGCCTGGCTGTTTCAACTGGTAAAAATCTCGTNTCAGGGGAGCTGATAATACTCNCOCAGTTGCGAATCNCCTCG
TAAAACTTCGGAACATCCTCCGGGTTCTTCCAGTATCCATAGTGNATCTATCNCCTGGTCCATCTCACTGCAACAACTCCOACTTC
TCGTNCANCTTNAAAATCGGCTTGGTTTCACTGGCTGGATGCACACTTCTCCTCGTCCGCGGANTGGCGGGATCTTGATCCTCGTC
ATCACCTCGTAGCTCTCGGGTGTCTTCTCTCAANATCTCTGCACACTTGANCGGTCACCAACNACTCNTCCGCGGGTGGCGTAT
GGAAACAAGTGAACAACCTGCCCGCGGNTGTTGGAACATTACTTCCGCGGGTGGAACTGATGTCAAATTCGTGTTCCCGTGTG
GGCTGGGCAATCGGACGTGAAGTCCAGAACCCGCAATAGTGGTGGTGGATGTAGTTCAACTTCTGCAACAACTCCTCGGTGTCN
TCCGCTGAGCGGGACGTTGTGATGAGGACAGAACCGGTCGCGCAGATCTTCAOAGACAGTCTTGTGATCGCGTCTCGTGTGATCT
GTAGCAGCCATGACATCGTGTAGTCCAGCGGGCATGTTGTTCTCGATGTCCTTACTTGGCATAACTCGCTGCAAGCAACGTCG
GCGCTTGAACCTTGTCCGTAACCGGCAACAAACGAGGACGATCGAGTCAATCTCAOCCAGTGAAGTGTACTTGAGACGTGTTGCT
CCTGGTCCACGTATCTCAATTCCTGAGTCCCTGCTCAGCAATGAATGGGGCTGATGTTGGGTCGATGCTGGGGAGTTGA
GCAACCTCTGTTGTAAGGTGATGAGCAGGACAGACAGTGGCAGTTGTCAOCCAGATGTTGTTGACGTCGAC-3'

Fig. 44. Nucleotide sequence of a XR gene from *C. tropicalis* KCTC7101

4. Flocculent mutant 개발 및 repeated batch culture에 의한 xylitol 생산

가. Random Mutation에 의한 *Candida tropicalis*의 flocculation mutant 개발

ㄱ. EMS Mutagenesis를 이용한 flocculent mutant 선별

EMS(Methanesulfonic acid ethylester)를 여러농도로 처리하여 사멸율(death rate)이 90% 이상인 농도인 30.0mg/ml로 결정하였다. *Candida tropicalis*를 배양하여 exponential growth phase에 있을 때 결정된 농도로 1시간 30분 동안 처리하여 돌연변이주를 확보하였다.

위에서 확보된 mutant를 YM agar plate에 spreading하여 얻은 colony중에서 그 크기가 큰 것을 5ml YM 배지가 든 test tube에 접종하여 3일간 배양하였다. 3일간의 배양후 배양액을 5분간 방치하였을때 세포가 바닥에 가라앉는 정도가 높은 균주를 flocculent mutant로 선별하였다. 그 결과는 Fig. 1과 같다. 이 중에서 flocculation 정도가 높은 ww1, ww2, cc2를 선별하였다.

ㄴ. 선별된 Flocculent mutant를 이용한 xylitol 생산 및 우수 flocculent mutant 선별

선별된 flocculent mutant ww1, ww2, cc2를 Xylose 배지에서 배양한 결과는 Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4와 같다. 최종 세포 농도는 wild type은 3.7g/l이었으며, flocculent mutant ww1, ww2, cc2는 각각 2.3g/l, 2.4g/l, 2.7g/l이었다. Xylitol 수율은 wild type은 0.55이었으며, flocculent mutant ww1, ww2, cc2는 각각 0.45, 0.50, 0.55이었다. cc2 균주의 경우 세포성장과 xylitol생산은 좋았으나 flocculation정도가 좋지 않았으며, ww2 균주의 경우 세포성장은

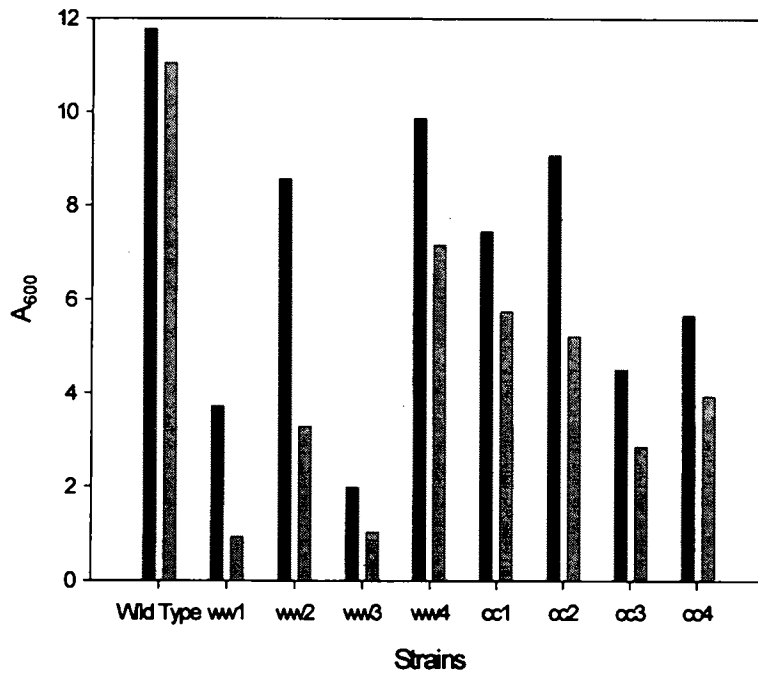


Fig 1. Flocculation mutant의 Flocculation 정도 (■ ; 배양액 OD, ■ ; 5분 후 상층액 OD.)

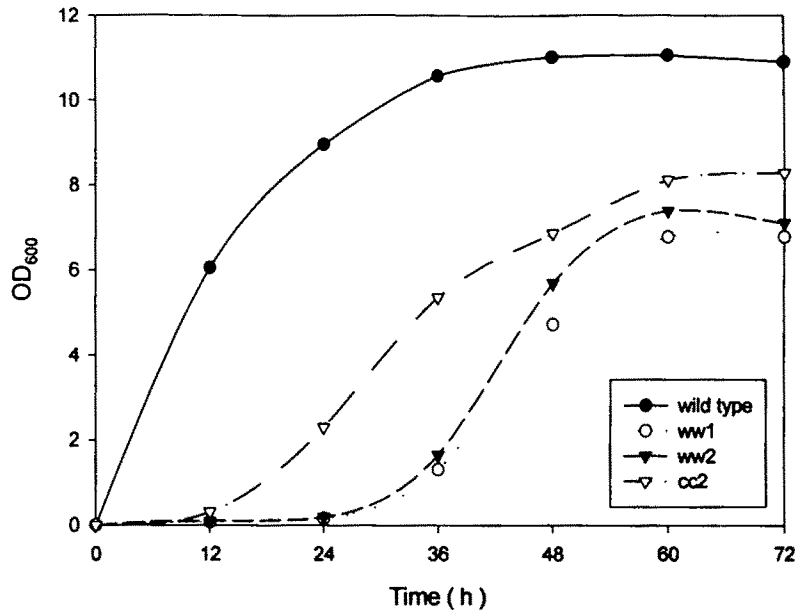


Fig. 2 *Candida tropicalis* wild type과 flocculent mutant들의 성장 곡선

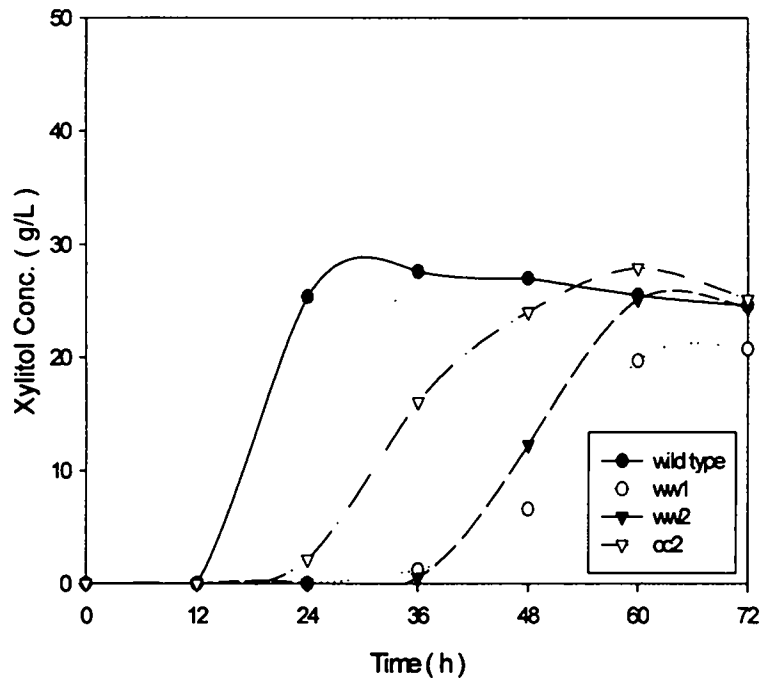


Fig. 3 *Candida tropicalis* wild type과 flocculent mutant들의 Xylitol 생산 곡선

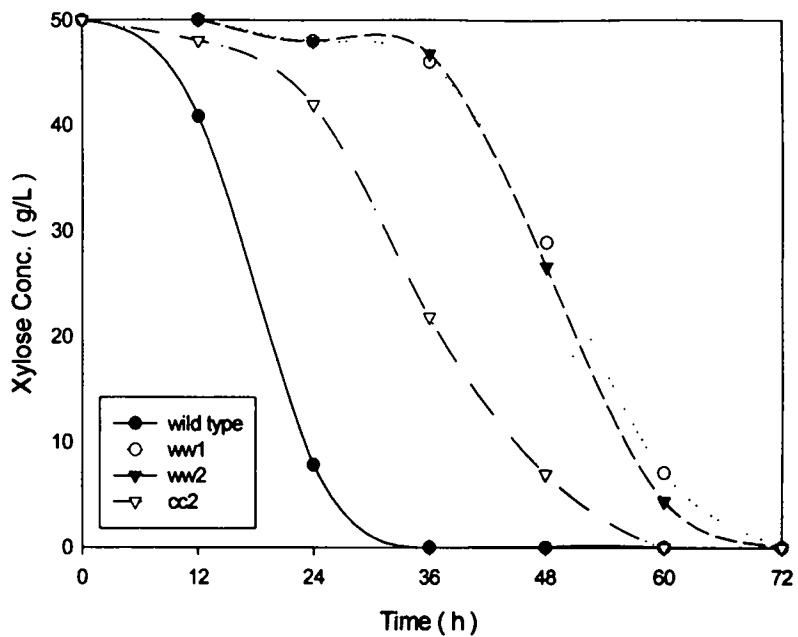


Fig. 4. *Candida tropicalis* wild type과 flocculent mutant들의 Xylose 소모 곡선

cc2보다는 뒤지지만, flocculation정도가 좋았기 때문에, ww2 균주를 우수 flocculent mutant로 선발하였다. Flocculent mutant ww2균주는 72시간 배양후 최종 세포농도가 2.4g/l이며, Xylitol 수율은 0.50 이었다. 이 결과는 wild type의 세포성장과 Xylitol 수율에 못미치지만, Flocculation특성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

나. hl적 flocculant의 선정

ㄱ. Cell flocculation에 미치는 cationic salt의 영향

세포의 응집에 가장 효율적으로 작용할수 있는 flocculant를 결정하기 위하여 가능성이 있는 여러 가지 물질들을 선발하여 그 효과를 조사하였다. 본 실험에서 사용된 균주인 *Candida tropicalis*는 자체적으로는 응집이 일어나지 않는 non-flocculent strain이기 때문에 이 균주의 flocculation을 위해서는 flocculating agent의 역할을 담당할 수 있는 물질을 첨가해주어야 한다.

본 실험에서는 cationic flocculant의 영향을 조사하기 위하여 salt 계열과 polymer 계열로 나누어, cell들을 complex media에서 키운 다음 distilled water로 washing하여 사용하였다.

Salt 계열로는 divalent cation들이 cell과 cell 사이에 bridge를 형성한다는 calcium-bridging hypothesis를 근거로 하여 calcium ion을 비롯한 몇가지 divalent cation과, cell 간의 (-) charge로 인한 electrostatic repulsive force를 없애주는 역할을 하는 것으로 보고된 몇가지 monovalent cation으로 선정하여, 모든 cation들을 chloride salt 형태로 첨가하였다. 그 결과는 Fig. 5에서 알 수 있는 바와 같이 *Candida tropicalis* 균주의 cell flocculation에 그다지 큰 효과를 보이지 못하는 것으로 나타났다.

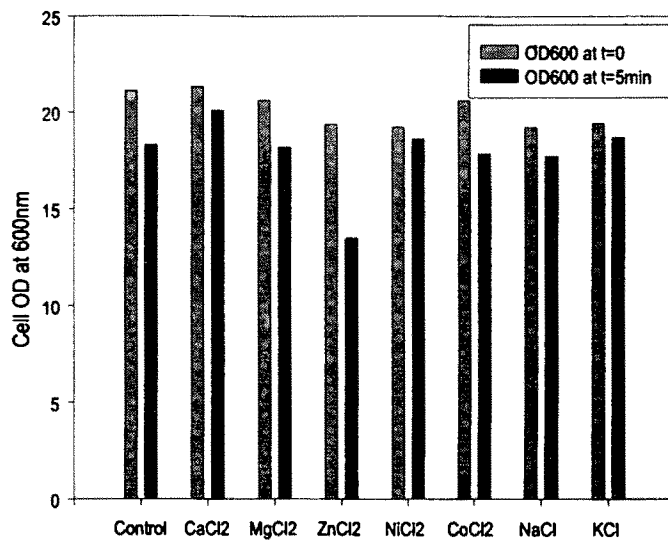


Fig 1. Effect of various cations on flocculation of *Candida tropicalis*. All cations were added as chloride salts. The cells were grown in the complex media at 30°C and 200rpm, and then washed in distilled water. Cations were dosed at a concentration of 10mM into 50mL of culture.

다른 cation들에 비해서 $ZnCl_2$ 의 경우 첨가하고 나서의 cell 농도에 약간의 감소 현상을 보였으나 그 정도가 육안으로 관찰되기 어려워서 본 실험 목적에 적합하지 않았으며 같은 조건에서 cation들의 첨가량을 조절하여 실험하였을 때에도 뚜렷한 flocculation 현상은 발견하지 못하였다.

지금까지 여러 문헌에서 flocculent yeast cell들의 flocculation 시에 Ca^{2+} ion을 비롯한 몇가지 cation들의 flocculation promoting effect가 보고된 바 있어, 이러한 cationic salt로 인한 상당한 효과를 기대하였으나, 본 균주에서는 관찰되지 않은 것으로 미루어, 이러한 특성은 flocculent strain의 flocculation에 제한적인 특성임을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 실험을 위한 cationic flocculant로서 divalent나 monovalent cation을 지닌 salt는 적합하지 않는 것으로 확인되었다.

ㄴ. Cell flocculation에 미치는 cationic polymer의 영향

Cationic charge를 띠고 있는 몇가지 polymer들을 선별하여 그 효과를 조사하였으며, 그 결과는 다음 Fig. 6에서 나타내었다.

Polymer의 경우 대체적으로 상당히 좋은 flocculation 효과를 나타내었으며 이 때 사용한 물질들 중 Zetag series (Allied Colloids Ltd.)는 *Bacillus subtilis*나 *Zymomonas mobilis* 같은 bacteria의 응집에 사용된 바 있는 cationic polyacrylamide copolymer로서 높은 분자량과 점도를 지닌 synthetic flocculant이다. 이 때 나타나는 효과의 차이는 사용된 polymer의 고유한 특성인 charge density에 따른 것으로 cationic charge density가 높을수록 좋은 효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 즉, 여기서의 flocculation 작용기작은 polymer의 amine group과 negatively charged cell surface 간의 electrostatic interaction에 따른 것이다.

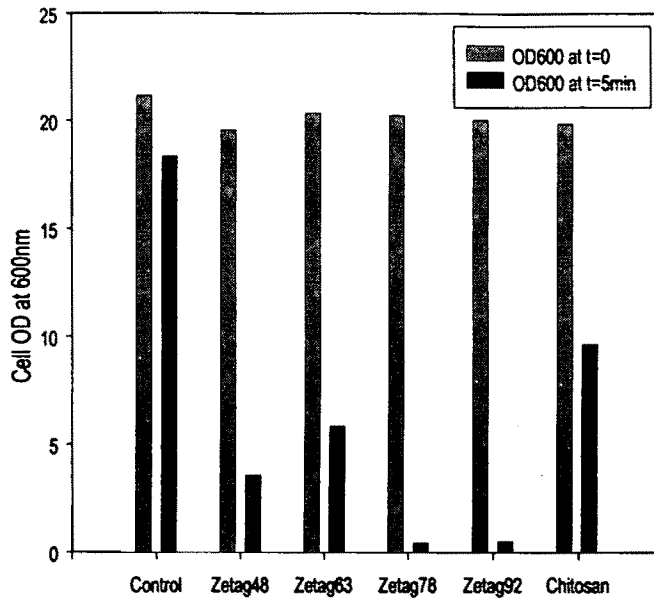


Fig. 6. Effect of cationic synthetic flocculants and chitosan on flocculation of *Candida tropicalis*. The cells were grown in the complex media at 30°C and 200rpm, and then washed in distilled water. Synthetic flocculants were prepared from solid beads (or a 50% dispersion in the case of Zetag 78), to give a 1% stock solution. Chitosan flakes were dissolved in a 2% solution of acetic acid to give a 1% stock solution. Flocculants were dosed at a concentration of 0.01% into 50mL of culture.

ㄷ. Cationic flocculant dosage에 따른 flocculating agent 선정

최적의 flocculant를 선정하기 위하여 사용되었던 polymer들 중 flocculation 효과가 나타나는 flocculant에 대하여 각각 일정 세포량에 대한 flocculant의 최소첨가량을 측정하였다. 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

위의 결과로부터 Zetag78의 경우 단위 세포의 1g DCW 당 첨가해야 할 flocculant의 양이 가장 적은 것을 확인할 수 있었고, 따라서 본 실험에서 사용할 cationic flocculant는 Zetag78로 선정하였다.

충분히 성장시킨 cell suspension에 적정 농도의 Zetag78을 첨가하고 잘 섞은 다음 가만히 놓아두면 cell flocculation이 매우 왕성하게 일어나 침전이 일어나게 되는데 이 경우 5분 이내에 거의 모든 cell들이 침전되는 현상을 관찰할 수 있었다.

ㄹ. Flocculation 최적 조건의 확립

ㄱ. 발효배지 내에서의 cell flocculation

발효배지내의 조건에서도 위의 결과가 적용될 수 있는 지 여부를 확인하기 위하여 앞서 선발한 Zetag78을 이용하여 complex media에서의 cell의 flocculation을 조사하였다. 그 결과 증류수와 달리 발효배지 내에서는 cell flocculation이 저해되는 것으로 나타났다.

ㄴ. 발효 배지 내에서의 세포 응집에 미치는 pH의 영향

여기에서 사용된 complex media는 xylose 50g/l, glucose 5g/l, yeast extract 5g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/l, KH_2PO_4 7.5g/l 로 구성된 최적 배지였으며 어떠한 요인이 flocculation을 inhibition하는지를 알아내기 위하여 다음과 같은

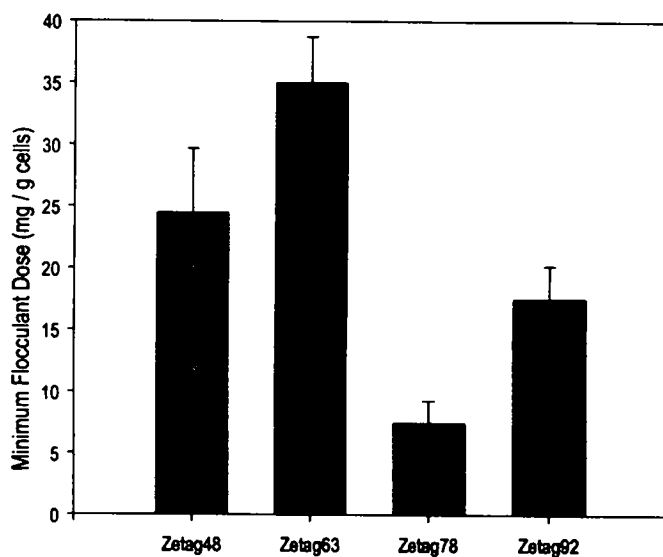


Fig.3. Minimum flocculant dose for the flocculation of *Candida tropicalis*. The cells were grown in the complex media at 30°C and 200rpm, and then washed in distilled water. The flocculant dose is expressed in terms of mg (flocculant) / g (dry cell weight). This dose is obtained from the amount of flocculant that can be seen around 100% relative reductions in turbidities.

실험을 수행하였다. 우선, cell들의 응집에 중요한 역할을 담당하는 cation들의 activity에 배지 내의 pH range가 큰 변수로 작용한다는 보고가 있어 이에 따라 배지 내의 pH를 변화시켜 그 영향을 조사하였다. 원래의 배지의 pH는 약 4.5 정도였으며 각각 배지 내의 pH를 적절하게 변화시켜 flocculation 실험을 수행하였고 그 결과는 다음 Fig.8과 같다. 결과적으로 배지 내의 pH는 cell flocculation에 별다른 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

ㄷ. 발효 배지 내에서의 세포 응집에 미치는 dilution factor의 영향

증류수에서와는 달리 발효 배지에서는 flocculation이 저해되는 현상이, pH와 같은 배지 조건의 조절로는 해결되지 않기 때문에, 발효 배지 내의 어떤 특정 성분의 작용인지를 조사하기 위하여 각각 적절한 배수로 배지를 dilution했을 때의 flocculation 여부를 알아보는 실험을 수행하였고 그 결과는 Fig.9와 같다.

실험 결과로부터 배지의 희석 배수가 증가함에 따라 flocculation이 일어나는 정도도 증가함을 확인하였고, 이 결과로 미루어 complex media 내의 특정 성분이 cationic flocculant와 cell surface 간의 interaction을 방해하여 flocculation을 억제한다는 사실을 알 수 있었다.

ㄹ. 발효배지 내에서의 세포응집에 미치는 Yeast Extract의 영향

배지 구성 성분인 Xylose 50g/l, Glucose 5g/l, Yeast Extract 5g/l, (NH₄)₂SO₄ 5g/l, KH₂PO₄ 7.5g/l를 이용하여 각각의 구성 성분들에서의 flocculation 여부를 실험하였고 그 결과 발효배지에서 flocculation을 저해한 요인은 유기질소원으로 사용된 yeast extract라는 것을 확인하였다.

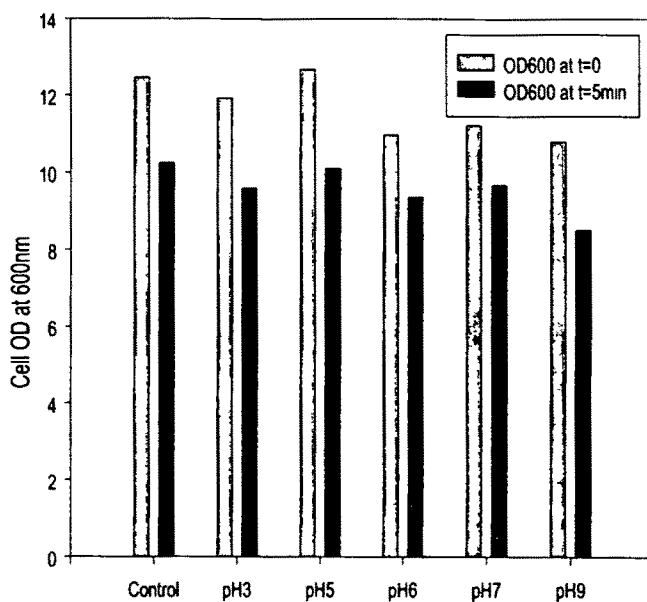


Fig. 4. Effects of pH of media on the flocculation of *Candida tropicalis*. Cells were grown in complex media at 30 °C, 220rpm and then the pH of media was controlled by 1.0N HCl and 1.0N NaOH. Zetag78 as a cationic flocculant was dosed at a concentration of 0.01% into 50ml of culture.

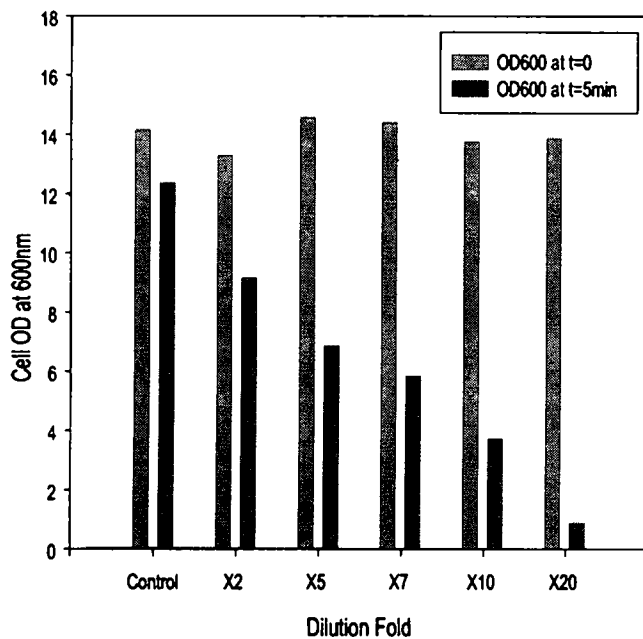


Fig. 8. Effects of dilution on the flocculation of *Candida tropicalis*. The cells were grown in the complex media at 30°C, 200rpm, and then the cell suspension was prepared by dilution factor. Zetag78 as a cationic flocculant was dosed at a concentration of 0.01% into 50ml of culture.

그러나 본 실험에 사용된 균주인 *Candida tropicalis*는 xylitol의 생산시 유기질소원으로서의 yeast extract가 반드시 필요하고, 최적배지에서 사용된 yeast extract의 농도 또한 xylitol의 생산성을 높이는 데에 밀접하게 관련되어 있는 특성을 지니고 있다. 따라서 배지 구성 성분 중에서 yeast extract의 농도를 변화시키는 일은 고수율로 xylitol을 생산하고자 하는 본 실험의 목표에 부합하지 않았고, 복합 질소원인 yeast extract의 특성상 그 안의 어느 특정 성분이 이러한 영향을 미친다는 것을 명확하게 밝혀내기는 거의 불가능했다. 결과적으로 지금까지 배지에 사용했던 yeast extract (Difco) 대신, cell growth나 xylitol 생산에 있어서는 본래의 역할을 충분히 담당하고 있으면서도 cell flocculation을 저해하지 않는 다른 organic nitrogen source를 선별하여 이를 대체하는 방법을 이용하였다. 즉, Difco 이외의 다른 회사에서 제조된 yeast extract들과, 산업적으로 많이 이용되어지고 있는 organic nitrogen source들을 다음 Table 1. 과 같이 선별하여 우선 이들이 각각 cell growth와 xylitol production에 미치는 영향을 살펴보았다.

실험 결과로부터 12가지 sample 중 Yeast Extract (Acumedia) 와 Meat Peptone (Marcor), Casitone (Difco)를 제외한 다른 nitrogen source를 이용한 경우에는 대략 비슷한 정도로 cell growth와 xylitol production이 이루어지고 있다는 사실을 확인할 수 있었으며, 이들 sample이 cell flocculation 여부에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음 Fig. 10과 같다.

Fig. 10의 결과로부터 같은 회사 제품인 Expressa 2200 (GistBrocades)과 Gistex LS ferm powder (GistBrocades)가 cell flocculation이 이루어지는 nitrogen source라는 것을 확인하였다.

Table 1. Effect of various organic nitrogen sources on cell growth and xylitol production

Sample No.	제품명	회사명	Cell Conc. (g/l)	Xylitol Conc. (g/l)
A	Yeast Extract	Difco	5.80	30.5
B	Yeast Extract	조흥화학	6.55	28.8
C	Yeast Extract	가림산업	7.15	31.4
D	Yeast Extract	Geneco	6.43	30.9
E	Yeast Extract	제일유니버살	6.67	29.0
F	Yeast Extract	Acumedia	3.68	2.25
G	Expresa 2200	GistBrocades	6.84	32.8
H	Gistex LS ferm	GistBrocades	6.25	34.5
I	Yeast Peptone	Biospringer	6.39	32.7
J	Meat Peptone	Marcor	5.37	5.97
K	Casitone	Difco	2.94	2.48
L	Cotton seed flour	Traders	6.18	29.1

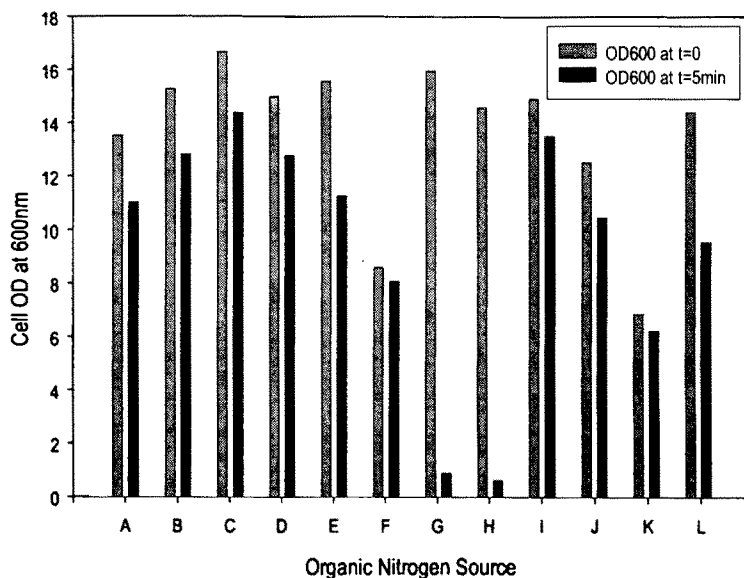


Fig. 6. Effect of various nitrogen sources on cell growth and flocculation.

Zetag78 was used as cationic flocculant and the cells were grown in 250ml flask containing 50ml fermentation medium at 30 °C, 220rpm for 36hours. Most cultures were performed until the xylose was completely consumed.

A: Yeast Extract (Difco) ; B: Yeast Extract (Choheung) ; C: Yeast Extract (Karim) ; D: Yeast Extract (Geneco) ; E: Yeast Extract (Cheiluniversal) ; F: Yeast Extract (Acumedia) ; G: Expresa2200 (GistBrocades) ; H: Gistex LS ferm (GistBrocades) ; I: Yeast Peptone (Bio-springer) ; J: Meat Peptone (Marcor) ; K: Casitone (Difco) ; L: Cotton seed flour (Traders)

이들 Expressa 2200과 Gistex LS ferm powder는 각각 *Saccharomyces uvarium*, *Sacchromyces cerevisiae*를 원료로 하여 만들어진 yeast extract이고 amino nitrogen과 vitamin의 함량이 높다는 특성을 가지고 있다. 또한 이 두가지 yeast extract의 제조상 특징으로서 chloride를 비롯한 salt의 함량이 1% 이하로 Difco를 비롯한 다른 회사의 제품들에 비해 유난히 낮은 것을 발견하였다. 이러한 사실로 미루어, 발효 배지 내의 cell flocculation이 저해되는 구체적인 원인은 yeast extract의 제조시에 함유된 고농도의 salt라는 것을 유추할 수 있었다.

이 결과를 뒷받침하기 위해, yeast extract의 국내 생산 회사인 '조흥화학' 제품 가운데 salt 함량이 거의 없는 yeast extract로 flocculation 여부를 조사하여 보았다. 그 결과 salt의 함량이 낮은 yeast extract를 사용하면 cell flocculation이 성공적으로 이루어짐을 확인하였고, '조흥화학'의 일반적인 yeast extract의 경우에는 flocculation이 이루어지지 않았던 앞의 실험 결과와 비교할 때, cell flocculation의 방해 요인은 역시 yeast extract 내의 salt 농도의 영향이었다는 것을 결론지을 수 있었다.

발효 배지 내에서도 cell flocculation을 일으킬 수 있는 두가지 yeast extract 즉, Expressa 2200과 Gistex LS ferm은 또한, 앞서 Table 1.에서 확인했듯이 cell growth와 xylitol production에 있어서도 다른 것들보다 우수한 효과를 나타내고 있어 앞으로의 사용이 기대되어지며, 그 중에서도 좀더 높은 xylitol 생산량을 나타내는 Gistex LS ferm powder를 본 실험에서의 organic nitrogen source로 선발하여 flocculation을 통한 flocculating yeast의 xylitol 생산에 이용하였다.

ㄷ. 발효배지 내에서의 세포 응집시 cell 양과 flocculant 양 사이의 상관 관계

앞서 실험한 결과들을 토대로 세포 응집을 위한 cationic flocculant로는 Zetag78 (Allied Colloids Ltd.)를 사용하고 배지 내의 organic nitrogen source로는 Gistex LS ferm powder (GistBrocades)를 사용하여 발효 배지 내에서의 flocculation 조건을 확립하였고, 발효 배지 상에서의 cell의 농도에 따라 첨가해야 할 최적 flocculant 양과의 상관관계를 다음 Fig.11과 같이 조사하였다.

다. Flocculating yeast를 이용한 xylitol의 생산

ㄱ. 250ml flask를 이용한 xylitol의 repeated batch production.

앞서 서술한 flocculation process를 이용하여 xylitol을 생산하였다. Batch culture를 통해 기질인 xylose가 다 소모되어 xylitol로 전환되고 나면, 선발한 flocculant인 Zetag78을 이용하여 cell을 응집시켜 이를 배지와 분리한 후 다시 새로운 배지를 넣어주어 culture를 계속하는 repeated-batch fermentation 방법을 이용하였다. 이러한 repeated batch fermentation 공정은 이미 자란 cell들을 그대로 다시 이용하는 것이기 때문에 따로 cell들을 키우는데 드는 시간과 경비를 절감할 수 있으며 생산성도 증가시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다. 이러한 공정을 이용하여 실험을 수행하였고 다음 Fig. 12 과 같은 결과를 얻었다.

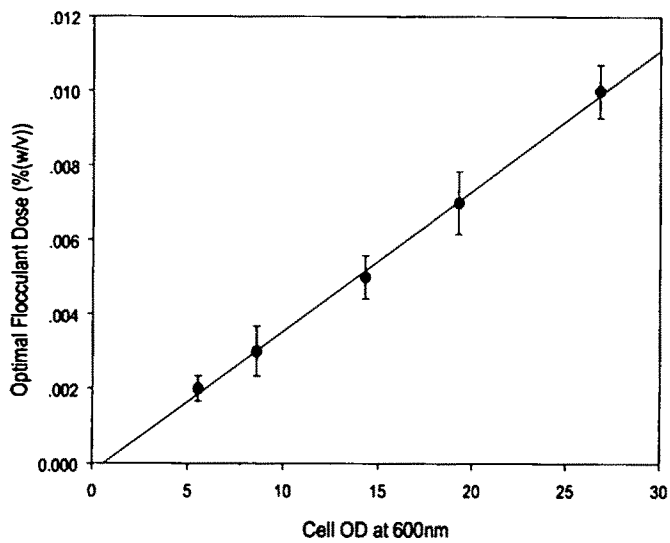


Fig. 7. Dose optimization curve of flocculating agent for the flocculation of *Candida tropicalis*. Cells were grown in complex media at 30 °C, 220rpm. Zetag78 was used as cationic flocculant.

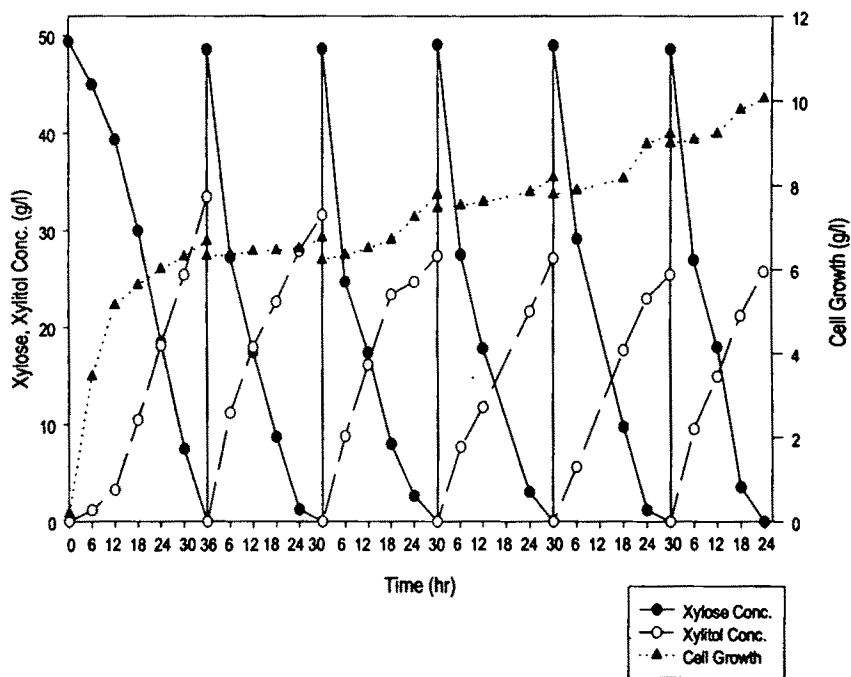


Fig. 3. Xylitol production by *Candida tropicalis* using repeated batch fermentation. The cells were grown in 250ml Erlenmeyer flask containing 50ml complex media at 30 °C, 220rpm. The media containing 5% Xylose, 0.5% Glucose, 0.5% LS ferm powder (GistBrocades), 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.75% KH₂PO₄ was used.

그림에서 보는 바와 같이 repeated batch fermentation을 수행했을 경우에 flocculation을 통해 이미 자란 cell들을 그대로 계속 이용하는 것이기 때문에 batch가 계속될수록 cell 양이 상대적으로 많아져서 xylose 소모 속도가 조금씩 빨라지는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 xylitol 생산성을 높이는 데 도움을 줄 수 있을 것으로 보여지나, 실제 실험 결과에서는 batch가 반복됨에 따라 기질 소모 속도는 줄어들고 있지만 xylitol의 생산량이 조금씩 감소하고 있어 사실상의 xylitol productivity에는 별다른 증가를 보이지 않음을 발견하였다. 각 batch마다의 평균적인 xylitol yield는 약 60% 정도였으며 이때의 xylitol productivity는 약 1.0g/l-hr에 해당하는 값으로 나타났다.

ㄴ. Xylitol 생산량 증가를 위한 cosubstrate 공급의 효과

Batch가 반복될수록 xylitol의 생산량이 줄어드는 문제를 해결하기 위하여 두번째 batch부터 들어가는 배지 내의 glucose의 양을 증가시켜 보았다. 이는 flocculation된 이후의 cell들이 maintenance하는데 필요한 energy는 glucose로부터 얻고 기질인 xylose의 좀더 많은 부분이 xylitol로 conversion될 수 있도록 cofactor를 제공해주기 위함을 그 목적으로 하는 것이었다. 그 결과는 다음 Fig. 13와 같이 별다른 효과를 나타내지 못하는 것으로 확인되었다.

ㄷ. Xylitol 생산량 증가를 위한 배지내 용존 산소 농도의 조절

현재까지 많은 문헌에서 oxygen-limiting condition에서 고수율의 xylitol을 생산하였다는 보고에 따라 배지 내의 용존산소 농도 조절을 시도하였다. *Candida* sp.에 의한 xylitol의 생성은 효소 xylose reductase에 의하여 xylose가 환원되어 xylitol로 전환되어 일어난다. 생성된 xylitol의 일부는 xylitol dehydrogenase에 의하여 xylulose로 산화된 후 대사경로를 거쳐 세포내 에너지 공급 및 세포 구성성분으로 전환된다.

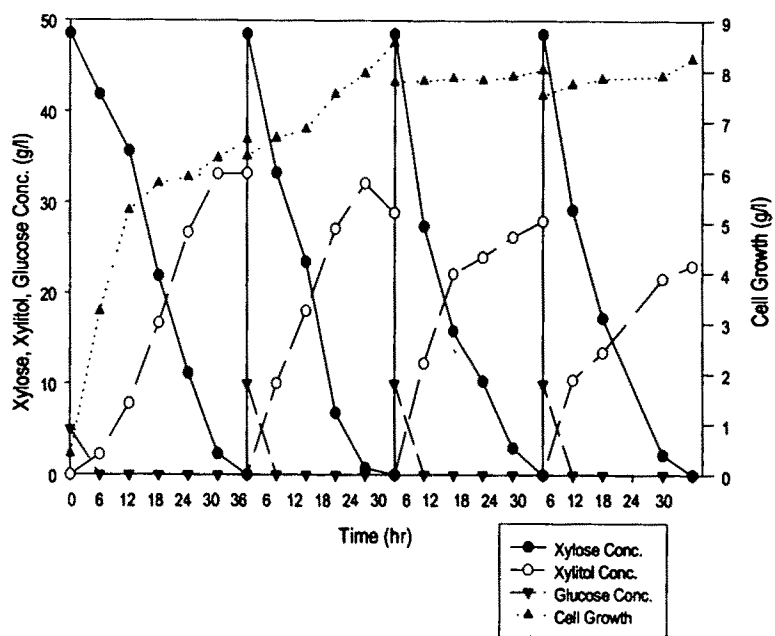


Fig.9. Xylitol production by *Candida tropicalis* using repeated batch fermentation. The cells were grown in 250ml Erlenmeyer flask containing 50ml fermentation medium. The media containing 5% Xylose, 0.5-1.0% Glucose, 0.5% Gistex LS ferm powder (GistBrocades) 0.5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.75% KH_2PO_4 was used.

이때 xylose reductase의 조효소로는 NADH와 NADPH가 관여하고 xylitol dehydrogenase의 조효소로는 NAD⁺가 관여한다. Xylose 전환과정에서 과량의 산소가 공급되면 NAD(P)H/NAD⁺의 비율이 감소하고 생성된 xylitol의 많은 부분이 xylulose가 되고 그 결과 균체 농도가 증가하고 xylitol의 생산성은 감소한다. 반면에 산소 공급이 부족하면 미생물의 증식속도가 떨어지고 xylitol 생합성 속도도 떨어진다. 그러므로 xylitol 생산시 산소농도 조절은 상기의 산화-환원 반응 속도의 균형을 xylitol 축적 쪽으로 유도하여 고수율의 xylitol 생산을 위하여 필수적이다.

Flask에서는 배지 내 용존산소 농도를 직접 측정하는 것이 불가능하기 때문에 배양시 rpm을 조절하여 줌으로써 배지 내의 DO level을 변화시켜 그에 따른 xylitol 생산을 조사하여 최적의 xylitol 생산조건을 확립하였고, 그 결과를 다음 Fig.14에 나타내었다.

즉 rpm 조절을 통해 배지 내의 DO level을 조절하여 주었을 때, batch가 반복되어도 xylitol 생산량이 줄어들지 않을 뿐 아니라 조금씩 증가하고 있음을 확인할수 있었다. 이는 매 batch마다 평균적으로 약 68% 정도의 xylitol 수율을 나타내고 있는 것이며, 이 때의 xylitol productivity도 batch가 반복될수록 조금씩 증가하여 최대 1.42g/l-hr의 productivity를 얻을수 있었다.

ㄹ. 2.5 L jar fermenter를 이용한 xylitol의 repeated batch production

이와 같은 250ml Erlenmeyer flask에서의 발효 조건을 2.5 L jar fermenter에 적용시켜 다음과 같이 실험을 수행하였다. 즉 *Candida tropicalis*에서 용존산소농도에 따른 xylitol의 생산량을 정량적으로 알아보기 위하여 xylose를 기질로 용존산소농도를 변화시키며 발효실험을 수행하였다.

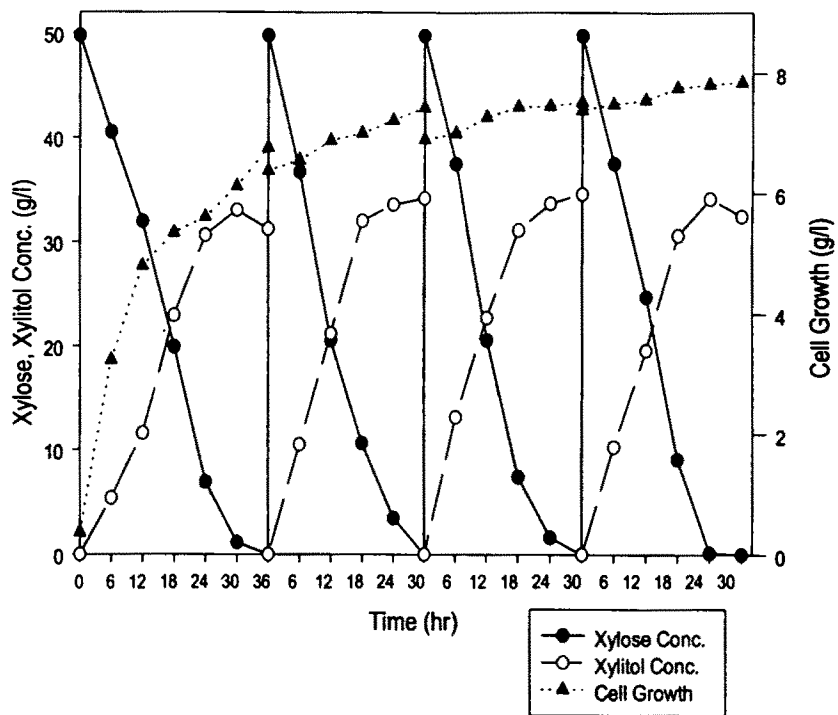


Fig. 10. Xylitol production by *Candida tropicalis* using repeated batch fermentation. The cells were grown in 250ml Erlenmeyer flask containing 50ml fermentation medium. The initial condition of culture was controlled at 30°C and 220rpm, and the agitation rate was decreased to 200rpm in the last two batches.

Xylitol의 생산율과 최종농도를 증대시키기 위해서, 1단계로 발효 초기에 높은 수준의 용존산소 농도를 유지하여 균체의 성장을 빠르게 증대시켜 균체 농도가 약 8g/l 정도에 도달하면, 2단계에서는 용존산소농도가 1.0~2.5%로 유지되도록 하는 2-stage xylitol 생산전략을 착안하였고 그 결과를 통해 다음 Fig. 15와 같은 결과를 얻었다.

이 결과로부터 2.5 L jar fermenter를 이용한 배양에서 평균 약 70%의 xylitol 수율과 1.5g/l-hr 정도의 xylitol productivity를 얻어낼 수 있었다.

□. 산화환원 전위가 xylitol 생산에 미치는 영향

*Candida tropicalis*에 의한 xylitol 생산실험을 5L규모의 실험용 발효기에 서 행하였다. 통기조건은 0.5 vvm, 교반조건은 120 rpm으로 하여 용존산소와 산화환원 전극전위를 동시에 측정하면서 행하였는데, 전체발효시간은 78시간이었고, 세포성장은 7시간 이후부터 대수기로 들어가 22시간이후에는 정체기였으며, 세포농도는 5.3g/l였고, 용존산소농도는 초기에 세포의 성장과 함께 급격히 감소하여 11시간 이후에는 제로 근처에서 수준을 유지하여 정확한 측정이 불가능 하였으나, 산화환원전극전위의 경우 초기에는 용존산소 농도의 감소와 함께비례적으로 감소하였고, 용존산소가 제로이하인 부근에서는 2-3mV를 일정하게 유지하였다. 산화환원전극전위치가 높을때에는 xylitol 생산보다는 세포생육이 더 잘 일어났으며, 낮은 산화환원전극전위에서는 xylitol 생산을 촉진시켰다. 용존산소농도는 제로 이하의 수치를 나타내서 측정이 어려웠으며, 반면에 산화환원전극전위는 조절하기가 상대적으로 용이하였다. 산화환원전극전위가 세포생장과 xylitol 생산에 미치는 영향을 살펴보기 위해서는 생산단계에서 산화환원전극전위를 조절하여 수행하는 몇 가지의 발효실험을 수행하였는데, 이때의 세포농도는 3g/l로 유지하였고,

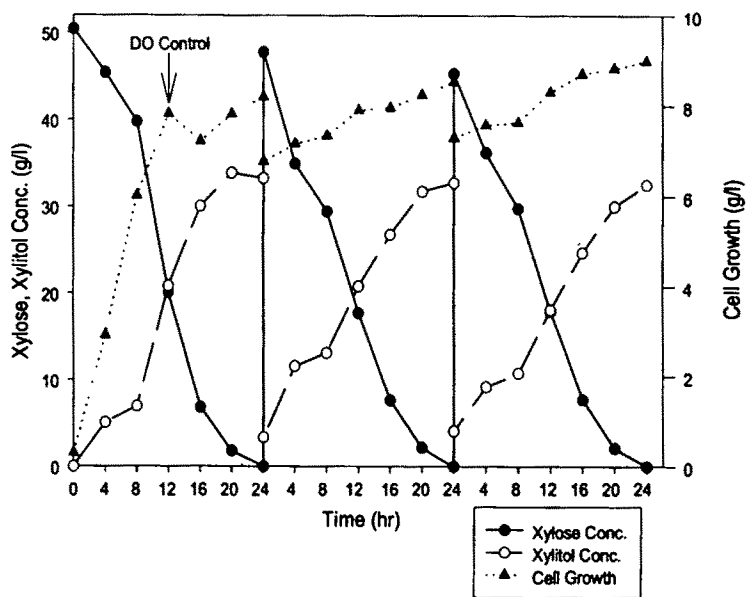


Fig. 14. Xylitol production by *Candida tropicalis* using repeated batch fermentation. Fermentation was performed at 30°C, pH4.5 in 2.5L jar fermenter containing 1L fermentation medium. The dissolved oxygen concentration was controlled at 400rpm, 1.0vvm after cell growth was approached to 8g/l.

산화환원전극전위는 -60mV 에서 250mV 의 범위에서 조절하였다. Xylitol 생산은 100mV 수준에서 최대였으며, 이 이상의 범위에서는 산소의 공급이 xylose carbon flux를 xylitol 생산에서 세포생육으로 변화시킴을 의미한다

세포의 생육은 산화환원전극전위의 증가에 따라서 완만하게 증가하여 100mV 일 때 8.3g/l , 200mV 일 때 12.3g/l 였으며, xylitol 생산의 경우는 100mV 까지는 비례적으로 증가하였으나 그 이상에서는 오히려 감소하였다. 산화환원전극전위가 xylitol의 용적생산성에 미치는 영향을 살펴본 결과 xylitol의 비생산성과 용적 생산성 모두 산화환원 전극전위값이 100mV 일 때 최대를 나타내었고, 100mV 까지는 비례적으로 증가하다가 그 이상에서는 오히려 감소되어, 100mV 일 때, 비생산성은 0.16g/g-h , 용적생산성이 0.7g/L-h 였다.

제 4 절 결 론

Xylitol의 대량 생산을 위하여 높은 생산 수율과 생산성으로 농산 및 임산 폐기물로부터 xylitol을 생산할 수 있는 균주의 개발과 발효조건 최적화에 대한 연구를 수행하였다. Xylitol 생산 균주인 *Candida* sp.의 xylitol reductase (XR)와 xylitol dehydrogenase (XDH)의 생성에 대한 연구결과 균주에 따라 정도의 차이는 있지만 XR과 XDH의 합성이 모두 glucose의 catabolite repression에 의하여 억제되었으며, 이를 극복하기 위하여 catabolite derepressed mutant 균주를 선발하였다. 선별한 변이균주는 혼합 당에서 glucose와 xylose를 동시에 이용할 수 있었으며, glucose 존재 하에서도 XR과 XDH의 생성이 wild-type에 비하여 크게 증가하였으며, xylitol 생산도 wild-type 보다 우수하였다. 또한 xylitol 발효를 위한 배지선정에서 질소원으로서 casamino acid를 이용하는 것이 xylitol 생산 수율이 우수함을 알 수 있었다. Xylitol 발효조건에 대한 연구에서는 통기량의 증가에 따라 xylitol의 생산성은 증가하였으나 xylitol 생산 수율은 0.7 vvm에서 0.80 g-xylitol/g-xylose로 최대값을 얻을 수 있었다. Xylitol 발효에서 생산 수율을 향상시키기 위하여 XDH가 결여된 변이균주의 개발과 co-substrate의 선별에 대한 연구에서 co-substrate로서는 fructose가 이용될 수 있음을 확인하였다. 개발한 XDH defective mutant인 변이균주 CXM-1을 이용하여 100 g/L의 xylose와 100 g/L의 fructose가 포함된 발효배지에서 5일간 발효를 수행한 결과 최대 xylitol 농도는 89.0 g/L로서 xylitol 생산 수율은 0.89 g-xylitol/g-xylose 이고 생산성은 0.74 g/L-hr 였다. 또한 *P. stipitis*의 XDH defective mutant인 PXM-4를 이용하여 옥수수 속의 산 가수분해 용액을 이용한 xylitol 생산에서는 거의 100% 수율로 xylitol을 얻을 수 있었다.

Candida sp.의 genomic DNA 양상을 *P. stipitis*의 XR 유전자를 probe 로 하여 분석한 결과 *C. guilliermondii*, *C. albicans*에서는 XR 유전자가 단일 copy 이거나 나머지 copy는 염기서열의 상동성이 낮은 것으로 생각된다. *C. parapsilosis*는 *P. stipitis*의 XR 유전자와 상동성이 매우 낮은 것으로 보인다. *C. tropicalis* ATCC20336의 경우 특이하게 여러 개의 band가 혼성화 되는 것으로 보아 2개 이상의 XR 유전자가 존재하는 것으로 보인다. 또한 그 밖의 *C. tropicalis* 에서는 모두 1 kb의 단일 band 만이 혼성화되어 나타났다. 따라서 *C. tropicalis* ATCC20336의 XR 유전자를 클로닝하고 염기서열을 결정하였다. Southern hybridization 결과를 기초로 4.5 kb *SacI-XhoI* 으로 size selected library를 제조하여 수십 개의 positive colony를 얻었으며, 이들 중에서 1개를 골라 제한효소 지도를 작성하고 그 위에 XR 유전자의 위치를 지정하였다. 지정된 XR 유전자 부분인 3개의 단편을 분리한 후 subcloning하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 BLAST와 DNASTAR 프로그램을 이용하여 보고된 *C. tropicalis*의 XR 유전자 2개와 *P. stipitis*의 XR 유전자 1개의 염기서열을 비교 분석한 결과 전사조절 부위인 TATA Box 부분과 aldose reductase cofactor 결합부위는 Ile-Pro-Lys-Ser 로써 매우 잘 보존되었으나, 본 연구에서 얻은 *C. tropicalis*의 XR 유전자 (XRCTS)와 *xyrA* 또는 *xyrB*와의 상동성은 *P. stipitis*의 XR 유전자와의 상동성 보다는 높은 것으로 보아 XRCTS는 *C. tropicalis*의 *xyrA* 및 *xyrB*에 더 가까움을 알 수 있었다.

*Candida tropicalis*의 사멸율이 90% 이상되는 조건으로 30.0mg/ml EMS 농도로 반응시간을 1시간 30분으로 mutant ww1, ww2, cc2를 선별하였다. 선별된 flocculent mutant를 이용하여 xylitol 생산을 위하여 72시간 배양하였을 때 최종 세포 농도는 wild type이 3.7g/l, ww1이 2.3g/l, ww2 이 2.4g/l, cc2 이 2.7g/l 으로 xylitol 수율은 wild type, ww1, ww2, cc2는 각각 0.55,

0.45, 0.50, 0.55으로 나타났다. 우수 flocculent mutant로 ww2 결정하였다. 7가지의 cationic salt와 5가지의 positively charged polymer의 선정하여 flocculating agent 첨가에 의한 flocculating yeast의 xylitol 생산을 실험한 결과 후보 물질 중 dosage가 가장 낮은 Zetag78을 cationic flocculant로 결정하였다. 발효 배지 내에서의 flocculation 억제요인과 배지내의 pH와 dilution factor에 따른 영향 조사 배지내 yeast extract가 그 저해 요인임을 밝혀내고 다른 회사 (GistBrocades) 제품인 Gistex LS ferm powder로 대체 하였고 발효 배지내의 세포농도에 따른 flocculant 첨가량과의 상관관계 조사로 거의 직선의 관계가 있음을 확인하였다. Flask와 fermenter를 이용하여 flocculating yeast로 repeated batch 공정으로 xylitol 생산실험을 하였다. Batch 반복시 나타나는 xylitol 생산량의 감소 현상에서 배지 내 용존산소 농도가 그 원인이었음을 밝혀내었다. 세포배양 11시간 후에는 용존산소농도가 영점근처에서 유지함. 이 때 용존산소농도는 정확한 측정이 불가능한 반면 산화환원전극전위는 2 - 3mV를 유지하는 것으로 나타나 용존산소 대신 산화 환원 전극 전위를 조절 인자로 선택하였다. 세포의 생육은 산화환원전극전위의 증가에 따라 완만하게 증가하여 100mV 일 때 8.3 g/l, 200mV 일 때 12.3 g/l로 나타나고 xylitol의 생산은 100mV 까지는 비례적으로 증가하다가 그 이상에서는 감소하였다. Xylitol의 비생산성과 용적 생산성 모두 100mV일 때 최대를 나타내었고, 각각 0.16 g/g-h, 0.7 g/L-h로 나타났다.

제 5 절 인 용 문 헌

1. Pepper, T. and P. M. Olinger. 1988. Xylitol in sugar-free confection. *Food Technol.*, **10**, 98-106.
2. 이우중, 서진호. 1995. 발효감미료의 연구현황 및 전망. *생물산업*, **8**(2), 38-43.
3. 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.
4. 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.
5. Ylikahri, R. 1979. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. *Adv. Food Res.*, **25**, 159-180.
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. Emodi, A. 1978. Xylitol: its properties and food applications. *Food Technol.*, **32**, 20-32.
9. Day, A., K. K. Sen, and D. Sardar. 1989. Xylitol from jute stick. *Res. Indust.* **34**, 202-4.
10. Melaja, A. and L. Hämäläinen. 1977. Process for making xylitol. U.S. Patent 4,008,285.
11. Heikkilae, H., J. Nurmi, L. Rahkila and M. Toeyrylae. 1992. U.S.

Patent 5,081,026.

12. Yoshitake, J., H. Ishizaki, M. Shimamura, and T. Imai. 1973. Xylitol production by an *Enterobacter species*. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2261-2267.
13. Yoshitake, J., H. Ohiwa, and M. Shimamura. 1971. Production of polyalcohol by a *Corynebacterium* sp. Part I: Production of pentitol from aldopentose. *Agric. Biol., Chem.* **35**, 905-911.
14. Izumori, K. and K. Tuzaki. 1988. Production of xylitol from D-xylose by *Mycobacterium smegmatis*. *J. Ferment. Technol.* **66**, 33-36.
15. Onishi, H. and T. Suzuki. 1966. The Production of xylitol, L-arabitol and ribitol by yeasts. *Agric. Biol. Chem.*, **30**, 1139-1144.
16. Kitpreechvanich, V., M. Hayashi, N. Nishio and S. Nagai. 1984. Conversion of D-Xylose into xylitol by xylose reductase from *Candida pelliculosa* coupled with oxidoreductase system of methanogen strain HU. *Biotechnol. Lett.*, **61**, 651-656.
17. 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.
18. Vongsuvanlert, V. and Y. Tani. 1989. Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii*(*Kloeckera* sp.) No.2201. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 35-39.
19. Barbosa, M. F. S., M. B. de Medeiros, I. M. Mancilha, H. Schneider and H. Lee. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol.*, **3**, 241-251.

20. Lee, H., A. L. Atkin, M. F. S. Barbosa, D. R. Dorsheid and H. Schneider. 1988. Effect of biotin limitation on the conversion of xylose to ethanol and xylitol by *Pachysolen tannophilus* and *Candida guilliermondii*. *Enzyme. Microbiol. Technol.*, **10**, 81-84.
21. 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.
22. 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.
23. Gong C. S. 1983. Recent advances in D-xylose conversion by yeasts. In *Annual Rep. Ferm. Proc.*, **16**, 253-297.
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. Maleszka, R. and H. Schneider. 1982. Fermentation of D-xylose, xylitol and D-xylulose by yeasts. *Can. J. Microbiol.*, **28**, 360-365.
26. Chiang, C. and S. G. Knight. 1960. Metabolism of D-xylose moulds. *Nature(London)*, **188**, 79-81.
27. Verduyn, C., R. van Kleef, J. Frank Jzn, H. Schreuder, J. P. van Dijken and W. A. Scheffers. 1985. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Biochem. J.* **226**, 669-677.
28. Jeffries, T. W. 1983. Utilization of D-xylose by bacteria, yeast and fungi. *Adv. Biochem. Eng.*, **27**, 1-32.

29. Schneider, H., P. Y. Wang, Y. K. Chan and R. Maleszka. 1981. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.*, **3**(2), 89-92.
30. Rizzi, M., P. Erlemann, N. A. Bui-Thanh and H. Dellweg. 1988. Xylose fermentation of yeasts. 4. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 148-154.
31. Bruinenberg, P. M., P. H. M. de Bot, J. P. van Dijken and W. A. Scheffers. 1984. NADH-linked aldose reductase : The key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 256-260.
32. Barnett, J. A. 1976. The utilization of sugars by yeasts. *Adv. Carb. Chem. Biochem.*, **32**, 125-228.
33. Bruinenberg, P. M., P. H. M. de Bot., J. P. van Dijken and W. A. Scheffers. 1983. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. *Eur. J. Appl. Biotechnol. Microbiol.*, **18**, 287-292.
34. Ligthelm, M. E., B. A. Prior and J. C. du Preez. 1989. Effect of hydrogen acceptors on the xylose fermentation of anaerobic culture of immobilized *Pachysolen tannophilus* cells. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 839-844.
35. van Dijken J. P. and W. A. Scheffers. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Rev.*, **32**, 199-224.
36. Delgènes, J. P., R. Moletta and J. M. Navarro. 1988. Fermentation of D-xylose, D-glucose and D-arabinose mixture by *Pichia stipitis*

- Y7124. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 155-161.
37. Toivola, A., D. Yarrow, E. van den Bosh, J. P. van Dijken and W. A. Scheffer. 1984. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**(6), 1221-1223.
 38. 권순효, 유연우, 서진호. 1993. *Pichia stipitis*에 의한 xylose 발효의 최적조건 결정. 한국생물공학회지, **8**, 452-456.
 39. 정봉환, 유연우, 서진호. 1994. 오탄당과 육탄당의 혼합용액에서 *Pichia stipitis*에 의한 에탄올 발효. 한국생물공학회지, **9**, 395-399.
 40. Dekker, R. F. H. 1982. Ethanol production from D-xylose and other sugars by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Lett.*, **4**(7), 411-417.
 41. Slininger, P. J., R. J. Bothast, J. E. van Cauwenberge and C. P. Kurstman. 1982. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 371-384.
 42. du Preez, J. C. and J. P. van der Walt. 1983. Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. *Biotechnol. Lett.*, **5**(5), 357-362.
 43. 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.
 44. Watson, N. E., B. A. Prior, J. C. du Preez and P. M. Lategan. 1984. Oxygen requirements for D-xylose fermentation to ethanol and polyols by *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.*, **6**, 447-450.

45. 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.
46. Neirinck, L., R. Maleszka and H. Schneider. 1982. Alcohol production from sugar mixtures by *Pachysolen tannophilus*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **12**, 161-169.
47. Bolen, P. L. and R. W. Detroy. 1985. Induction of NADPH-linked D-xylose reductase and NAD-linked xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* by D-xylose, L-arabinose or D-galactose. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 302-307.
48. 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.
49. Hsiao, H. Y., L. C. Chiang, P. P. Ueng and G. T. Tsao. 1982. Sequential utilization of mixed monosaccharides by yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 840-845.
50. 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.
51. Gancedo, J. and C. Gancedo. 1986. Catabolite repression mutants of yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 179-187.
52. 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.

53. Chen, L. F. and C. S. Gong. 1985. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. *J. Food Sci.*, **50**, 226-228.
54. Lindén, T., J. Peetre and B. Hahn-Hägerdal. 1992. Isolation and characterization of acetic acid-tolerant galactose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor fermentation plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1661-1669.
55. Hallborn, J., M. Walfridsson, U. Airaksinen, H. Ojamo, B. Hahn-Hägerdal, M. Penttilä and S. Keränen. 1991. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technol.*, **9**, 1090-1095.
56. Takuma, S., N. Nakashima, M. Tantirungkij, S. Kinoshita, H. Okada, T. Seki and T. Yoshida. 1991. Isolation of xylose reductase gene of *Pichia stipitis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **28**, 327-340.
57. Tantirungkij, M., N. Nakashima, T. Seki and T. Yoshida. 1993. Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, **75**, 83-88.
58. Calsen, H. N., J. Hallborn, M. F. Gorwa and B. Hahn-Hägerdal. 1994. Bioconversion of xylose to xylitol with *in situ* generation of NAD(P)H in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. 6th European Congress on Biotechnology* (L. Alberghina, L. Frontali, P. Sensi eds), pp.313-316, Elsevier Science B.V.
59. 오덕근, 김상용, 김정희. 1996. *Candida parapsilosis* 돌연변이주에 의한 xylitol 생산조건의 최적화. *한국농화학회지*, **39**(3), 172-176.

60. Dahiya, J. S. 1991. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. *Can. J. Microbiol.* **37**, 14-18.
61. Ryu, Y. W. and S. H. Ko. 1993. Selective isolation and characterization of *Schwanniomyces castellii* mutants with increased production of α -amylase and glucoamylase. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 95-98.
62. Ryu, Y. W., S. H. Ko, S. Y. Byun and C. Kim. 1994. Direct alcohol fermentation of starch by a derepressed mutant of *Schwanniomyces castellii*. *Biotechnol. Lett.*, **16**, 107-112.
63. Sugai, J. K. and J. P. Delgenes. 1995. Catabolite repression of induction of aldose reductase activity and utilization of mixed hemicellulosic sugar in *Candida guilliermondii*. *Curr. Microbiol.* **31**, 239-244.
64. Yokoyama, S., T. Suzuki, K. Kawai, H. Horitsu, and K. Takamizawa. 1995. Purification, Characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*. *J. Ferment. Bioeng.* **79**(3), 217-223.
65. 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.
66. 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.
67. Nolleau, 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.
68. 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.
69. Nina, Q. M., H. Bâbel. 1997. Fed-batch xylitol production with two recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *xyII* at different levels, using glucose as a cosubstrate : a comparison of production parameters and strain stability. *Biotech. Bioeng.* 54: 391-399.
70. Rusturia, A. and R. Lagunas. 1986. Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 379-385.
71. Sánchez, S., B. Brovo, E. Castro, A. J. Moya and F. Camacho. 1997. The influence of pH and aeration rate on the fermentation of D-xylose by *Candida shehatae*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 21: 355-360.

제 3 장 Xylose로부터 Xylitol 생산을 위한 생물전환 공정의 최적화

제 1 절 서 설

1. Xylitol의 생산 공정

기능성 감미소재인 xylitol을 천연의 소재에서 추출한다는 것은 경제성과 실용성이 없다. 현재 xylitol의 생산은 xylose를 원료로 촉매에 의한 수소화 반응으로 생산하고 있다. xylose는 식물성분 중 hemicellulose의 중요 구성 성분으로 자작나무, 귀리, 목화씨 껍질, 옥수수 속대, 사탕수수 찌꺼기, 밀짚, 벧짚 등 hemicellulose 성분이 풍부한 원료를 산가수분해하여 얻는다 (1).

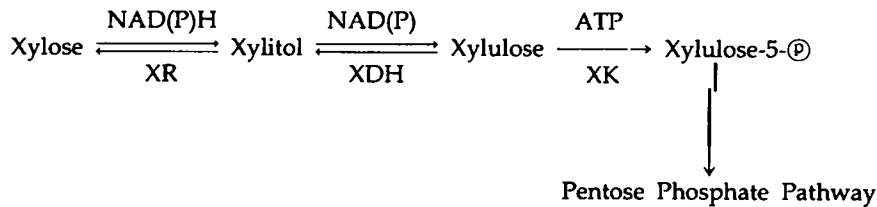
우선 원료 물질에서 lignin과 cellulose성분을 제거하며 산가수분해하여 xylose를 녹여낸다. 이 과정에서 xylanolytic enzyme을 이용할 수도 있으나 실제 산업에서는 아직 광범위하게 이용되고 있지는 않다. 분해된 xylose는 oxalic acid 처리법 또는 ion exchange column을 통과시켜 탈색을 한 후 methanol에서 결정화시키는 분리법(Isolation method)과 ion exchange exclusion과 탈색반응을 여러 번 거치는 비분리법(Non-isolation method)으로 정제한다. 정제된 xylose는 50 atm, 80~140℃의 고온 고압의 조건에서 Raney nickel 촉매법으로 수소화 반응으로 xylitol로 전환된다. 반응물은 filtration을 거쳐 고형물을 제거하고 ion exchange exclusion 후 alcohol 용매를 이용하여 결정화시켜 정제와 농축을 한다. 이러한 공업적 생산으로 얻을 수 있는 xylitol의 수율은 보통 원료 물질의 20~30%가 xylan 또는 xylose로 되고 그 중 약 50~60%가 xylitol로 전환되어진다.

2. 미생물에 의한 xylitol의 생산

가. Xylitol 생산 경로 및 생산에 영향을 주는 요인

Xylitol은 xylose의 대사과정의 중간산물로 xylose의 대사경로는 다음과 같다.

Xylitol의 생산을 위하여는 xylose reductase (XR)의 역가를 극대화하고 xylitol dehydrogenase(XDH)의 역가를 떨어뜨려 세포 내에 축적되는 xylitol을 세포 밖으로 배출해 내는 방법이 필요하다. 그러나 XR의 역가를 유지하기 위하여 보조기질인 NAD(P)H의 재생산 및 세포의 최소 대사활성을 유지



하기 위하여 xylitol이 XDH와 xylulose kinase(XK)를 거쳐 세포내 탄수화물 대사과정을 거쳐야 한다. 이는 xylitol의 생산 수율을 감소시키는 원인이 되므로 NAD(P)H의 재생산을 위하여 보조기질이나 혼합당을 이용한 배양이 연구되었다. 그러나 5탄당인 xylose는 6탄당에 비하여 세포내로의 전달속도가 늦고 친화성이 낮아 혼합당 배양의 경우 xylose의 세포내 이동이 xylitol 생산속도에 큰 영향을 주게 된다. 또한 혼합당의 배양시 XR과 XDH의 역가 및 발현이 다른 당들에 의해 저해를 받는다고 알려져 있어 문제가 되고 있다. 따라서 최적의 xylitol의 생산을 위하여는 xylose의 세포내로의 전달 및 XR, XDH의 발현과 그 역가의 유지, xylose의 XR과 XDH를 거쳐 분배되는 carbon flux, 세포의 대사에 영향을 주는 요인 즉 다른 탄소원, 질소원, 산소

전달문제, 기질의 농도, 보조기질 등이 고려되어야 한다.

나. 효모에 의한 xylitol의 생산

현재 연구되고 있는 미생물에 의한 xylitol의 생산의 대상 균주는 대부분이 효모로 오탄당의 이용능력이 뛰어난 균주들이 선택되어 있다(2,3,4). 오탄당을 이용한 발효의 주된 산물인 xylitol과 ethanol의 생산은 서로 상반된다. 즉 xylose가 xylitol을 거쳐 탄소 대사 경로로 들어가면 ethanol이 부산물로 발생하고 xylitol의 생성량은 감소한다. Xylitol 생성 균주는 오탄당을 이용하는 균주중 ethanol을 소량으로 생성하는 균주로 *C. guillemontii* (5,6,7,8,9), *C. tropicalis* (10,11,12), *C. parapsilosis* (13), *C. boidinii* (14, 15), *C. pelliculosa* (16)같이 주로 *Candida* sp.가 많고 *Pachysolen tannophilus* (17)도 보고되었다. *Saccharomyces* sp.는 xylose를 이용하지 못하거나 거의 이용하지 못하고 xylitol 생성도 없는 것으로 알려져 직접 xylose 발효에는 사용하지 못하고 있다 (18). 그러나 *S. cerevisiae*는 가장 잘 연구되어진 효모 균주이므로 xylose를 이용 가능한 효모 균주로부터 분리, cloning 한 xylose reductase gene, 또는 xylose reductase와 xylitol dehydrogenase gene로 형질전환시켜 xylitol 발효에 사용하고 있다(19). 기타 *Schizosaccharomyces pombe*를 이용한 실험에서는 xylose의 소모는 관찰되나 xylitol의 생성량은 미미한 것으로 보고 되었다.

Xylose를 이용한 발효에서 얻을 수 있는 최대의 수율은 i) xylose reductase는 NADPH만을 사용한다. ii) xylitol dehydrogenase는 NAD 만을 사용한다. iii) NADH는 전자전달계에서만 재생산된다. iv) fructose-6-phosphate는 산화적 오탄당 인산화 반응(oxidative pentose phosphate cycle)을 통해 전량 산화된다. v) 세포는 분열하여 성장하지 않는다. vi) ATP는 xylulose의 인산화 반응에만 사용된다는 가정하에 대사 반응식에 의

하여 0.9 mol xylitol / mol xylose로 이론적으로 계산되었다(5). 재조합 효모에 의한 발효에서는 xylose가 세포내 대사에 사용되지 않고 xylitol로의 전환만 이루어지게 균주를 만들었으므로 수율은 0.9~1 (g xylitol/g xylose)을 보이고 있으나 세포내 xylose reductase의 역가 유지 및 NAD(P)H의 재생산, 세포 기본대사 유지에 필요한 탄소원의 문제로 생산성이 낮아 생산성 향상을 위한 보조 기질 및 혼합당 배양의 문제가 연구의 중요한 핵심이 되고 있다. 재조합 효모에 의한 발효시 문제가 되는 것은 세포내 xylose reductase의 역가 유지 및 NAD(P)H의 재생산, 세포 기본대사 유지에 필요한 탄소원이 제기 되고 있다. Xylose를 xylitol로 전환시켜주는 xylose reductase는 주로 *Pichia stipitis*에서 유래된 효소로 재조합 효모의 성장 초기에는 왕성히 발현되어 역가가 높으나 세포내 안정성 및 발현 promoter의 문제로 xylose를 xylitol로 전환시키는 상태에서는 역가가 떨어지는 현상을 나타낸다. 또한 NAD(P)H의 재생산과 세포 기본대사 유지에 필요한 탄소원 또는 보조기질은 xylose의 세포내로의 이동을 억제 또는 저해하여 xylitol 생산성을 떨어뜨리는 요인이 되고 xylose 이외 탄소원의 대사에서 생기는 부산물인 ethanol과 각종 유기산 또한 세포의 상태를 변환시켜 생산성을 감소시키는 원인이 되고 있어 이에 대한 연구가 진행중에 있다.

다. 기타 미생물에 의한 xylitol의 생산

Bacteria에 의한 xylitol의 생산은 *Enterobacter liquaefaciens*(20) *Corynebacterium* sp (21), *Mycobacterium smegmatis* (22)등에 대하여 연구가 되었다. *E. liquaefaciens*의 경우 4일간의 실험으로 100g/L의 xylose에서 33g/L의 xylitol을 얻을 수 있었다. *Salmonella*에 대한 실험을 하였으며 (23), filamentous fungi들은 *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Gliocladium* *Neurospora*등은 xylose를 섭취하여 대사하는 능력을 가지고

있으나 *Fusarium*속은 26개의 strain을 가지고 실험한 결과 1가지 속만 xylose에서 ethanol을 생산하는 것으로 판명되었다(24). *Petromyces albertensis*는 100g/L xylose에서 10일간의 발효 후 40g/L의 xylitol을 생산하였다(25). NADH/NADPH의 재생산을 위하여 고정화된 *Candida pelliculosa*와 *Methanobacterium*의 혼합배양이 시도되었다. 이러한 미생물을 이용한 방법 외에 효소를 이용한 효소 반응기에서의 xylitol 생산도 연구되고 있다. Xylose dehydrogenase를 고정화하여 xylose을 xylitol로 전환시키고 조효소인 NAD(P)H의 재생산을 위하여 methanogen의 산화 환원 효소 반응계를 쓰는 반응기 (26)와 포도당을 보조기질로 혹은 xylose만을 보조기질로 사용하는 반응기에 대한 실험도 수행되었다.

제 2 절 연구 재료 및 방법

1. 실험 재료

가. 균주

Candida guilliermondii ATCC 6260, *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida tropicalis* ATCC 22336, *Candida parapsilosis* ATCC 22019를 가지고 xylytol 생산능 실험을 거쳐 선정된 *C. tropicalis* ATCC 13803을 가지고 실험을 수행하였다.

나. 균주 보관 및 전배양

균주는 yeast extract(Difco, 미국) 10g/L, bactopecton(Difco, 미국) 20g/L, agar (Difco, 미국) 10g/L, xylose(sigma; 미국, Showa; 일본) 50g/L가 포함된 YPX plate에 도말 성장시킨 후 4℃에서 보관하였다. 균주의 활성유지를 위하여 1개월마다 계대를 실시하였다. 발효조 배양을 위한 전배양은 10g/L yeast extract, 20g/L bactopecton의 YP medium에 20g/L 포도당과 50g/L xylose를 첨가하여 만든 배지에 균주를 plate에서 직접 loop(Difco, 미국)로 접종하여 24시간 배양 후 사용하였다. 부피는 본배양의 10%로 하였다.

다. Flask 배양

100mL의 YP medium을 기준으로 실험에 따라 포도당과 xylose농도를 달리하여 실험하였다. 초기 세포농도를 일정하게 맞춰야하는 경우 flask 배양을 실시한 후 일정한 부피의 배양액을 접종하였다. 200rpm, 30℃를 유지하며 진탕배양기(한국종합기기, 한국)를 사용하여 배양하였다.

라. 진탕 배양 및 유가식 배양

진탕배양 및 유가식 배양은 각 2.5L, 5L jar를 사용하여 발효기(한국발효기, 한국)를 사용하여 배양하였다. 배지는 YP medium을 기준으로 실험에 따라 포도당과 xylose의 농도를 조절하여 탄소원으로 사용하였다. 질소원과 탄소원은 따로 살균하여 주입하였다. 초기 접종농도는 0.5~1g/L가 되게 하였다. 온도는 30℃를 유지하였고 pH는 2N NaOH와 HCl로 조절하였다. 통기량과 교반속도는 실험에 따라 조절하였다. 유가식 배양시 주입액은 700g/L xylose 농축액을 사용하였고 주입은 digital pump (Masterflex®, 미국)를 이용하여 발효 전략에 따라 유속을 조절하여 배지내 xylose의 농도를 조절하였다. Scale-up 실험을 위한 대용량 발효는 50L 발효기 (한국 발효기, 한국)를 이용하여 수행하였고 발효조건은 위와 동일하다.

2. 분석 방법

가. 포도당, xylose, xylitol xylulose 분석

1) HPLC

채취한 배양액을 8,000g에서 5분간 원심분리 후 얻은 상등액을 각 당의 농도가 50g/L정도 되게 희석 한 후 HPLC(Knauer, 독일 ; TSP, 미국)를 이용하여 정량하였다. Column 및 분석 조건은 다음과 같다. Aminex HPX-87C (Biorad, 미국)을 사용한 경우 용매를 3차 증류수를 0.6mL/min으로 흘렸고 column은 heater를 사용하여 85℃로 유지하였다. 포도당과 xylose, xylulose, xylitol의 retention time은 각각 10분, 11분, 13분, 21분 이었다. Carbohydrate Analysis column (Waters, 미국)을 사용한 경우 용매는 3차 증류수와 Acetonitril을 85:15로 혼합하여 2mL/min으로 흘려주었고 실

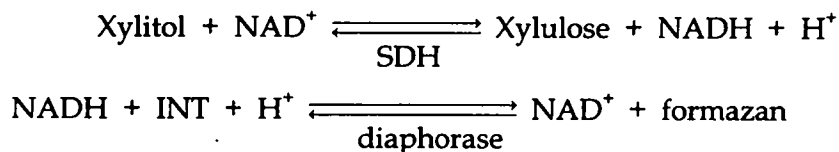
온에서 분석하였다. Xylulose, xylose, xylitol, 포도당의 순으로 용출되어 나왔고 retention time은 각각 4분, 5분, 7분, 12분 이었다. 검출은 refractive index detector를 사용하였고 각 peak의 면적을 미리 구한 표준 곡선을 이용하여 농도로 전환하였다. 표준곡선은 매번 실험 때 마다 구하여 사용하였다.

2) Bail's reagent

발효도중 배지내 xylose와 xylitol 농도를 확인하며 xylose를 주입하여야 하는 유가식 배양시 HPLC로 분석이 불가능한 경우 xylose의 농도를 Bail's reagent (Sigma, 미국)를 사용하여 정량하였다. Ornicol 1g을 250mL HCl에 용해한 후 25방울의 FeCl₃를 첨가하여 만든 Bail's reagent 1mL에 상등액 100 μ l를 첨가하고 끓는 물에서 15분간 반응시킨 후 470nm에서 측정한 흡광도를 미리 만들어 놓은 표준곡선을 이용하여 xylose농도로 전환하였다. 측정한 흡광도는 10~100 g/L까지 직선적으로 비례하는 관계를 보였다.

3) Xylitol/Sorbitol kit

낮은 농도의 xylitol을 측정하는데는 D-sorbitol/xylitol kit (Boehringer Mannheim, 독일)를 사용하였다. 반응식은 다음과 같다.



SDH : Sorbitol dehydrogenase

INT : Iodonitrotetrazolium chloride

나. 균체농도

균체농도는 일정시간마다 채취한 배양액을 적당한 배율로 희석하여 spectrophotometer (HITACHI U-1100, Hitachi, 일본)로 600nm에서 optical density를 측정한 후 미리 구한 환산계수 0.227 g/L-OD를 곱하여 구하였다. Optical density는 0.30 미만에서 측정된 값을 사용하였다.

다. Ethanol 농도

에탄올의 농도는 gas chromatography(M600D, 영인과학, 한국) 측정하였다. GC column은 2HWP/10PEG20M을 사용하였고 carrier gas로 질소를 50mL/min으로 흘려주어 사용하였고 flame ionization detector(FID)를 사용하여 검출하였다. Injector와 detector의 온도는 200℃, column의 온도는 150℃였고 수소는 2.0kg/cm², 공기는 1kg/cm²의 압력으로 흘려 주었다. 각각의 시료와 ethanol 표준용액에 2%(V/V) n-butanol을 internal standard로 첨가하여 시료와 표준용액의 peak 높이를 비교 계산하여 ethanol의 농도를 계산하였다.

라. K_{La} (산소전달계수) 측정

산소전달계수는 unsteady-state method를 이용하여 구하였다.

Antiform을 첨가한 발효배지에 N₂ gas를 불어넣어 O₂를 제거하여 DOT를 0로 맞춘 후 각각의 교반속도, 통기량에서 시간에 따른 DOT의 변화를 측정한 후 다음 식을 이용하여 K_{La} 를 구하였다.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 발효 전략 및 발효 조건 수립

가. 실험목적

본 연구의 기본 목적은 높은 수율과 생산성으로 xylose에서 xylitol을 생산하는 것이다. 생산성의 정의는 단위시간당 생산한 xylitol의 양으로 최종 xylitol의 농도를 생산 시간으로 나누면 된다. 수율은 넣어준 xylose가 최대한 다른 곳, 즉 세포의 성장 및 maintenance에 사용되지 않고 xylitol로 전환되면 높은 수율을 얻을 수 있다. 그러나 xylitol은 세포 성장 기질인 xylose의 대사 중간물질로 xylose가 대사되어야만 생성되는 즉 growth-associate하게 생산되는 물질로 이러한 경우 수율은 떨어지게 된다. 그러나 세포의 대사 속도는 빨라져 발효시간이 짧아지므로 생산성은 증가하게 된다. 즉, 생산성과 수율은 서로 반비례 관계에 있게 된다. 따라서 먼저 이 두 목적변수를 모두 만족시키기는 발효전략을 구상하고 발효전략을 만족시키는 기본적인 발효 조건을 잡기로 하였다. Xylitol 생산능이 우수하다고 알려진 *Candida* sp.의 *Candida tropicalis* 2종, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermindii* 중 예비실험을 거쳐 가장 xylitol 생산능이 우수한 *Candida tropicalis* ATCC 13803을 선정하여 실험에 사용하였다.

나. 발효 전략

Fig. 1에서 알 수 있듯이 xylose는 *C.tropicalis*의 membrane에 있는 specific transporter에 의해 세포내로 이동된 후 NADPH를 조효소로 사용

한 xylose reductase에 의해 xylitol로 변환된다. 변환된 xylitol은 세포내에 과량 축적되어 세포 밖으로 배출되거나 NAD를 조효소로 사용하는 xylitol dehydrogenase에 의해 xylulose로 변환되고 이 후 ATP에서 phosphate를 받아 xylulose kinase에 의해 xylulose-5-phosphate로 변환되어 pentose phosphate pathway로 들어가 세포 대사에 사용된다. Xylitol의 생산 수율을 높이기 위하여는 세포내로 들어간 xylose가 전량 xylitol로 전환된 후 세포 밖으로 배출되면 가장 이상적이거나 xylose reductase의 조효소인 NADPH를 재생산할 수 있는 방법이 없으므로 이는 불가능하다. 이러한 이유로 xylitol이 간단한 1단계 효소 반응이나 효소적 생산이 불가능하고 살아있는 세포 또는 NADPH의 재생산 system을 따로 갖추고 있는 공정에서 가능하다. 따라서 최고의 발효방법은 보조기질이 xylose와 동시에 세포내로 이동되어 에너지 생산경로에 직접 들어가 xylitol 생산에 필요한 NADPH를 공급하고 xylose는 전부 xylitol로 전환된 후 에너지 생산 경로로 들어가지 않고 세포 밖으로 빠져나오는 것으로 이러한 연구는 다양하게 진행중이다(27~31). 이것이 가능하려면 첫째, xylose와 보조기질이 동시에 세포내로 이동되고 그 이동을 저해하지 않고 둘째, 보조기질의 대사에 필요한 효소와 xylose의 xylitol의 전환에 필요한 효소가 서로 독립적이고 반대기질에 의해 저해받지 않아야 한다. 그러나 가장 경제성있는 보조기질로 생각할 수 있는 포도당은 xylose transporter를 저해하고 xylose reductase의 발현 및 역가를 떨어뜨린다고 알려져 있다(32-35). 그리고 다른 보조기질로 acetic acid 및 ethanol은 세포의 대사를 저해하는 것으로 알려져 있어 보조기질로는 적당하지 못할 것으로 생각된다. 따라서 다른 보조기질을 사용하지 않고 xylose를 이용하여 NADPH를 재생산하며 xylitol을 생산하는 system을 선택하였다.

Fig 1. Metabolic Pathway of Xylose in *C.tropicalis*

Xylitol 생산 수율을 높이기 위한 조절 인자로 산소의 공급량을 선택하였다. 산소의 공급을 억제하면 TCA cycle의 순환을 떨어뜨려 ATP level을 떨어뜨려 세포 성장을 막고 조효소의 양이 줄어든 xylulose kinase의 역할을 낮춤과 동시에 NAD/NADH 비율을 높여 xylitol reductase의 역할을 제어할 수 있다. 이와 같이 세포의 성장에 이용되는 xylose flux를 완전히 막지는 않고 산소의 공급량을 조절하여 xylitol에서 갈라지는 세포내 xylose flux를 이상적인 상태로 맞춰 이론 최대 수율인 0.9 g-xylitol/g-xylose를 얻는 것을 목표로 하였다. Growth- associate 하게 생산되는 xylitol을 세포의 성장 없이 세포를 촉매처럼 이용하는 xylose의 bioconversion으로 생산하는 전략을 택하였다. 세포의 성장이 없으므로 생체촉매인 세포의 xylitol 생산능 척도로는 단위시간당, 단위 세포당 xylose를 소비하고 xylitol을 생산하는 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도를 사용하기로 하였다.

생산성을 올리기 위하여는 발효시간을 줄이는 것도 중요하다. 발효시간은 세포의 양에 비례하여 짧아지나 순수한 xylose의 생물전환 공정은 세포의 성장을 배제하므로 세포농도가 낮아 장시간이 소요된다. 세포농도를 올리기 위하여 xylose를 사용하면 수율이 낮아지므로 xylose가 아닌 값싼 기질인 glucose를 사용하여 세포의 농도를 올리는 two-substrate 발효를 고안하였다. 포도당과 xylose가 동시에 존재하면 세포는 포도당을 먼저 이용하고 포도당이 고갈된 후 xylose를 이용하는 것으로 알려져 있으므로 먼저 포도당을 이용하여 세포의 농도를 올리는 세포 성장단계와 고농도의 세포를 이용하여 xylose를 xylitol로 전환 시키는 2단계 반응을 발효전략으로 선택하였다.

다. 발효 조건

선정된 2단계 반응의 기본 발효조건을 확립하는 실험을 수행하였다. 발효

의 온도 및 pH는 문헌상에 나온 효모의 최적값이라 알려진 pH6, 30℃로 정하였다. 가장 중요한 산소 공급량은 혐기적 배양부터 점차 공급량을 올려 실험하기로 하였고 오탄당과 육탄당을 이용할 때 생성 될 수 있는 부산물인 ethanol, acetate, glycerol 등의 생성 및 그 이용을 관찰하였다. Fig. 2는 혐기적으로 세포를 키운 결과이다. 먼저 16g/L의 포도당을 이용하여 4.5g/L의 세포가 성장하였고 9g/L의 ethanol이 생성되었다. 혐기적 배양이기 때문에 성장시간이 많이 걸리고 세포 수율도 낮았으며 과량의 ethanol이 생성되었다. 포도당의 소모시에는 xylose의 이용은 관찰되지 않았으며 포도당의 이용이 끝나면서 xylitol이 생성되었다. Xylitol이 생성되는 과정에는 세포 성장은 무시할 정도였고 생성된 ethanol은 이용되지 않고 배지에 남아있었다. Xylitol 생산수율은 0.5g/g으로 낮았고 2.5g/L의 xylitol이 생성되는데 70시간이나 걸리는 낮은 생산성을 보였다. Fig.3은 발효기에서 400rpm, 0.67vvm으로 산소공급량을 늘려 실험한 결과이다. 포도당이 소모되는 동안 ethanol이 생성되었고 생성된 ethanol은 xylose 대사과정 중에 소모되지 않았다. 포도당의 대사가 끝난 후 xylitol이 생성되었으나 yield와 생산성이 낮았다. 산소공급량이 너무 낮아 세포의 대사 속도가 떨어지고 maintenance에 에너지 소모가 심하기 때문에 수율과 생산성이 낮은 것으로 생각된다. Ethanol을 제외한 다른 부산물의 생성은 관찰되지 않았다. 산소전달량을 조금 더 늘려 실험하였다. Fig. 4은 통기량과 교반속도를 1vvm, 500rpm으로 실험한 결과이다. 앞의 결과와 같이 포도당을 가장 먼저 이용하고 다음 xylose를 이용하고 마지막으로 포도당 대사의 부산물로 생성된 ethanol을 사용하는 것으로 나타났다. 포도당은 세포의 성장에 이용되었고 이 동안의 xylose의 이용은 관찰되지 않아 포도당을 세포 성장기질로 사용하기에 적합함을 알 수 있었다.

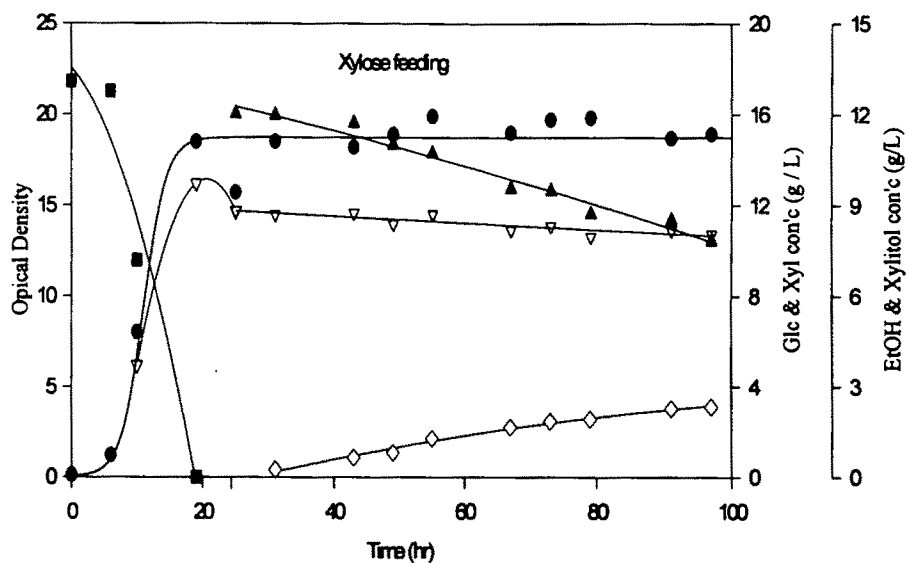


Fig. 2 Anaerobic flask culture at pH6, 30°C and 200rpm. Xylose was fed after glucose depletion. (● optical density, ■ glucose, ▲ xylose, ▽ ethanol, ◇ xylitol)

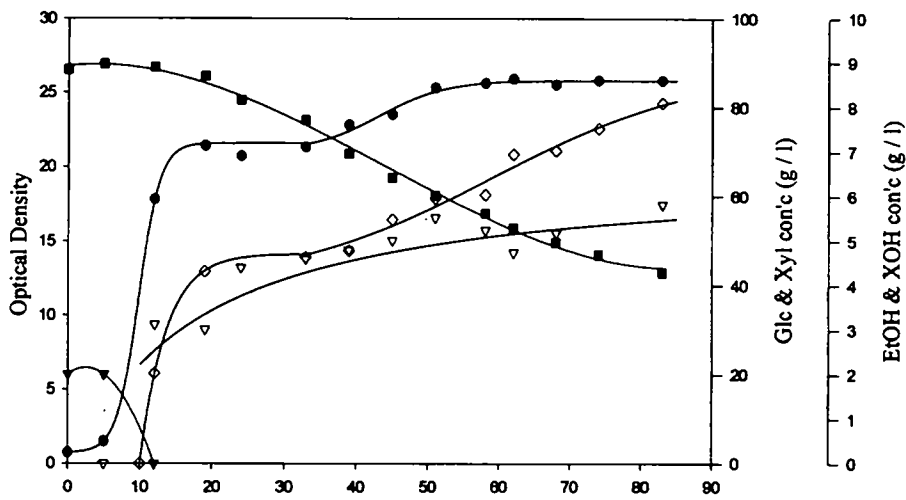


Fig. 3 Two-substrate batch culture at 400rpm and 0.67vvm. Volume, pH and temperature were 1.5L, pH7 and 30°C respectively. (● optical density, ◇ xylitol(g/L), ■ glucose(g/L), ▲ xylose(g/L), ▽ ethanol (g/L))

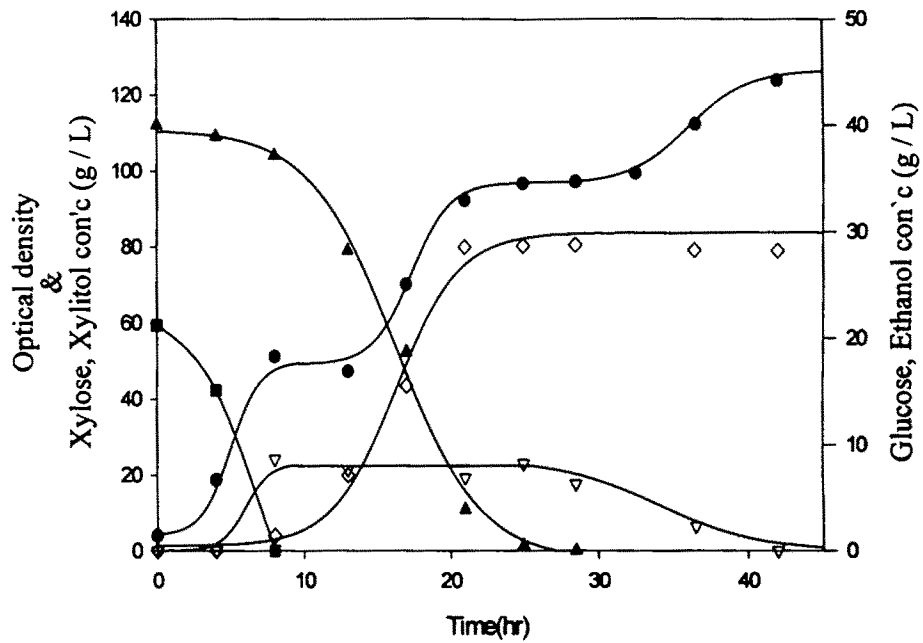


Fig 4 Two substrate batch culture at 500rpm and 1vvm. Volume, pH, temperature were 1L, pH7, and 30°C respectively. (● optical density, ◇ xylitol(g/L), ■ glucose(g/L), ▲ xylose (g/L), ▽ ethanol (g/L))

20g/L의 포도당을 이용한 세포성장 수율은 0.43 g dry cell weight / g glucose로 일반적인 효모의 수율과 동일했으며 부산물로는 8 g/L의 ethanol이 생성되었다. 포도당을 완전히 소모한 후 xylose를 이용하여 xylitol을 생산하였다. BioRad Aminex-87C, 87H column을 이용하여 분석한 결과 xylitol의 생산과정 중 ethanol, acetate, glycerol등 대사 부산물의 생성은 관찰되지 않았다. Xylose를 이용한 xylitol 생산 단계에서 세포 전체 중량은 10.9 g/L가 증가하여 0.098 g dry cell weight/ g xylose의 낮은 세포 성장 수율을 보인 반면 xylitol의 생산은 0.75 g xylitol/ g xylose의 높은 수율을 나타내 xylitol 생산에 유용한 양상을 보였다. 포도당 발효에서 생성된 ethanol은 xylose대사시 같이 이용되지 않아 xylitol 생산에 사용된 NADPH의 재생산 보조 기질로 사용은 불가능함으로 판명되었다. Ethanol은 xylose가 모두 소모된 이 후 기질로 이용되었다. 0.75g-xylitol/g-xylose의 높은 수율과 3.3 g-xylitol/L·hr의 생산성을 보여 기본 발효조건을 pH6, 30℃, 1vvm, 500rpm, 포도당 20g/L, xylose 100g/L가 함유된 YP medium으로 결정하였다.

2. 환경인자의 영향 고찰 및 최적화

가. 실험 목적

Xylitol 생산에 큰 영향을 주는 것은 산소전달 이외에 기타 환경인자의 영향에 관하여는 질소원(37, 38), 보조기질(29-31), xylose 및 xylitol의 농도(39,40), 에탄올, 초산(41,42)등 세포성장 저해제(43), mineral(44), vitamin(45) 등과 초기세포 농도(46)등 이 연구되었다. 확립된 2단계 발효공정의 초기 최적화로 공정에 영향을 주는 환경 변수들을 실험하였다.

미생물에 의한 xylitol 생산에서 가장 중요한 조절인자는 산소전달 속도이다. 세포내에서 xylose는 산소가 충분히 공급되면 xylitol로 전환된 후 축적되지 않고 자일톨로스를 거쳐 세포 성장 및 ATP 생산으로 사용되어 xylitol 생산 수율이 감소된다. 세포내에서 xylitol의 flux는 xylose reductase의 조효소인 NADPH의 재생산 및 세포 maintenance 에너지에 필요한 정도로 공급되고 XR에 의해 생성된 xylitol은 세포밖으로 배출될 수 있게 조절되어야 높은 xylitol 수율을 얻을 수 있다. 이러한 이상적인 상태를 가정하고 화학 반응식을 이용하여 구한 이론 최대 xylitol 생산수율인 0.9 mole-xylitol / mole-xylose에 가까운 값을 가지기 위하여는 산소전달 속도의 제거가 중요한 인자로 작용한다. 세포내 탄소흐름의 최종반응에 작용하는 산소는 세포성장을 제어하고 xylitol을 축적, 배출시키는 역할을 하여 xylitol 생산 수율에 영향을 미치는 가장 큰 요인이 된다. 그러나 수율을 높이기 위하여 극도로 산소 공급을 제한하면 탄소의 흐름은 xylitol 생산으로 진행되나 세포 전반의 대사속도가 늦어져 생산성이 떨어지게 된다. 따라서 생산성과 수율을 모두 증가시킬 수 있는 만족시킬 수 있는 최적 산소전달 속도를 구하는 실험을 수행하였다.

미생물을 이용한 xylytol 생산의 장점중 하나는 xylose와 xylytol의 분리 공정이 필요없다는 것이다. 화학적 생산은 기질인 xylose와 반응물인 xylytol이 반응 후 일정한 비율로 평형을 이루고 있어 이 두 물질을 분리하여야 한다. 그러나 화학적 반응으로 생성하면 xylose와 xylytol은 비슷한 물리·화학적 성질을 가져 분리공정이 까다로와 현재는 이온 교환 크로마토그래프의 방법으로 분리와 정제를 하고 있다. 생물공학적 공정은 미생물이 xylose를 높은 수율로 xylytol로 전환하고 배지 중에는 xylose가 남아있지 않아 분리 및 정제 공정이 쉬워진다. 이러한 장점을 이용하기 위하여는 발효공정의 선택에 제한을 받는다. 배지와 산물이 같이 나오는 연속식 공정 및 그 응용 공정을 사용하면 미생물을 이용한 생산 공정의 장점 중 한가지가 없어지게 된다. 따라서 단순 진탕 배양 또는 유가식 배양을 선택하여야 하고 또한 생산성을 높이기 위하여는 한번의 배양에 많은 기질을 전환시킬 수 있어야 한다. 이러한 점을 고려하여 기질의 농도에 따른 xylytol 생산 특성 변화를 관찰하였다.

또한 Xylose의 원료 물질인 hemicellulose hydrolyzate에는 xylose 이외에 다른 당들이 들어있다. 생산 단가를 낮추기 위하여 완전히 정제되지 않은 xylose syrup으로 실험을 할 경우 기타 다른 당들이 xylose 발효에 주는 영향을 확인하기 위하여 대표적으로 세포의 대사를 저해하거나 사용되지 않는 당으로 알려진 arabinose를 첨가하여 실험하였다. 또한 발효공정의 기본인자인 pH의 영향을 살펴보았다.

나. pH의 영향

YP medium에 포도당 20g/L와 xylose 100g/L를 넣고 1vvm, 500rpm으로 산소 공급량을 고정하고 30℃에서 실험 하였다. pH에 따른 xylytol 생성

및 비성장속도를 실험한 결과의 종합은 Fig. 5에 나타내었다. Xylose 비소모 속도(specific xylose consumption rate)는 pH 5, 6, 7이 0.47~0.50 g-xylose/g-cell · hr로 거의 비슷했으며 xylitol 비생성속도는 pH 6과 7이 0.41 g-xylitol/g-cell · hr로 같았다. 따라서 최적 pH는 수율에서 가장 높은 0.81 g-xylitol/g-xylose를 보인 pH 6으로 정하였다. pH에 따른 비성장속도의 차이는 거의 없었다. 특히 xylitol의 생산단계인 2번째 phase에서의 비성장속도는 0.035~0.04 hr⁻¹로 매우 낮았고 pH간의 차이는 거의 없었다. 이는 포도당으로 높은 균체 농도를 유지한 후 산소공급을 조절하여 세포의 성장을 최대한 억제하여 xylose의 xylitol로의 전환 수율을 극대화하기 위한 실험의 전략에 부합하는 것이었다. 세포성장 속도는 pH보다는 통기에 더 큰 영향을 받는 것으로 생각되어진다.

최적인 pH 6에서의 실험 결과는 Fig. 6과 같다. 포도당을 이용한 세포성장단계와 세포의 성장을 억제하고 xylitol을 생성하는 단계가 명확히 구분이 되고 있다. 에탄올은 포도당 대사의 부산물로 생성이 되었으며 xylose의 대사과정에서는 생성되지 않았다. 10g/L의 xylose가 22시간에 84.8g/L의 xylitol로 전환되어 volumetric productivity는 3.85 g-xylitol/L · hr이었다.

일반적으로 xylose에서 xylitol을 생산하는 경우 배지 pH를 균체 생육 최적의 pH인 4~5로 조절한다. 그러나 *C. parapsilosis*인 경우 pH 4.75(47), *C. guilliermondii*의 경우 pH 6.0(48)이 *Candida boidinii*의 경우 pH 7.0(15)등 균주에 따라 다른 최적 pH가 보고 되기도 하였다. 미생물 발효의 주요 부산물인 초산이 xylitol 생성에 미치는 영향은 H⁺의 직접적인 영향보다는 해리되지 않은 초산의 영향으로 생각되어진다(41,42).

Xylitol 생성에 직접 관여하는 xylose reductase (XR) 와 xylitol dehydrogenase (XDH)의 열역학적 평형상수는 다음과 같아(5,48) 세포내 pH가 낮을수록 xylitol이 생성되는 방향으로 반응은 진행된다.

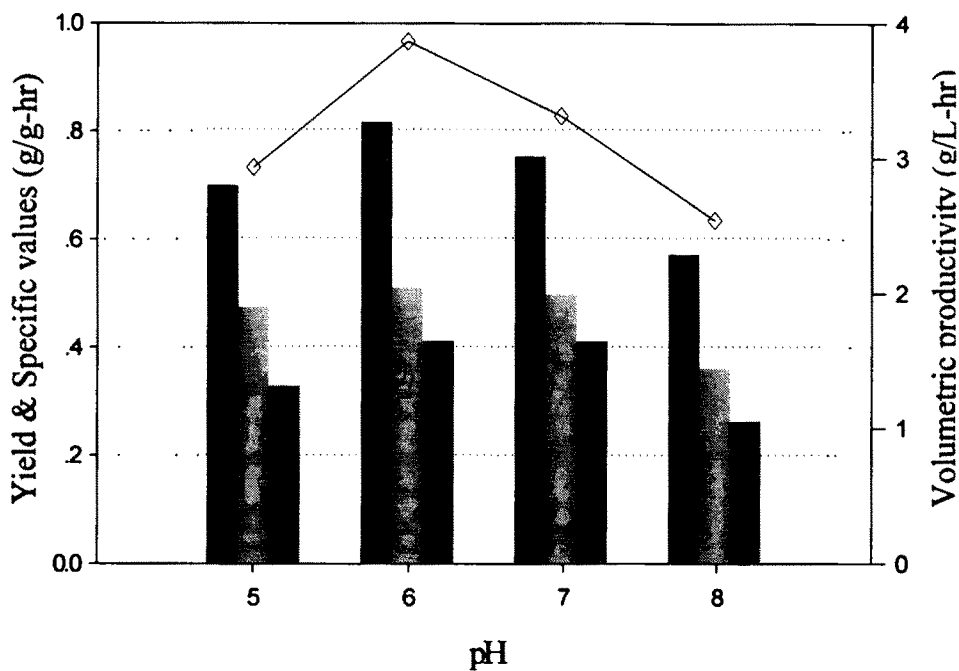


Fig. 5 Effects of pH on xylitol production. (\diamond volumetric productivity (g/L · hr), xylitol yield (g/g), specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass · hr), specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell mass · hr))



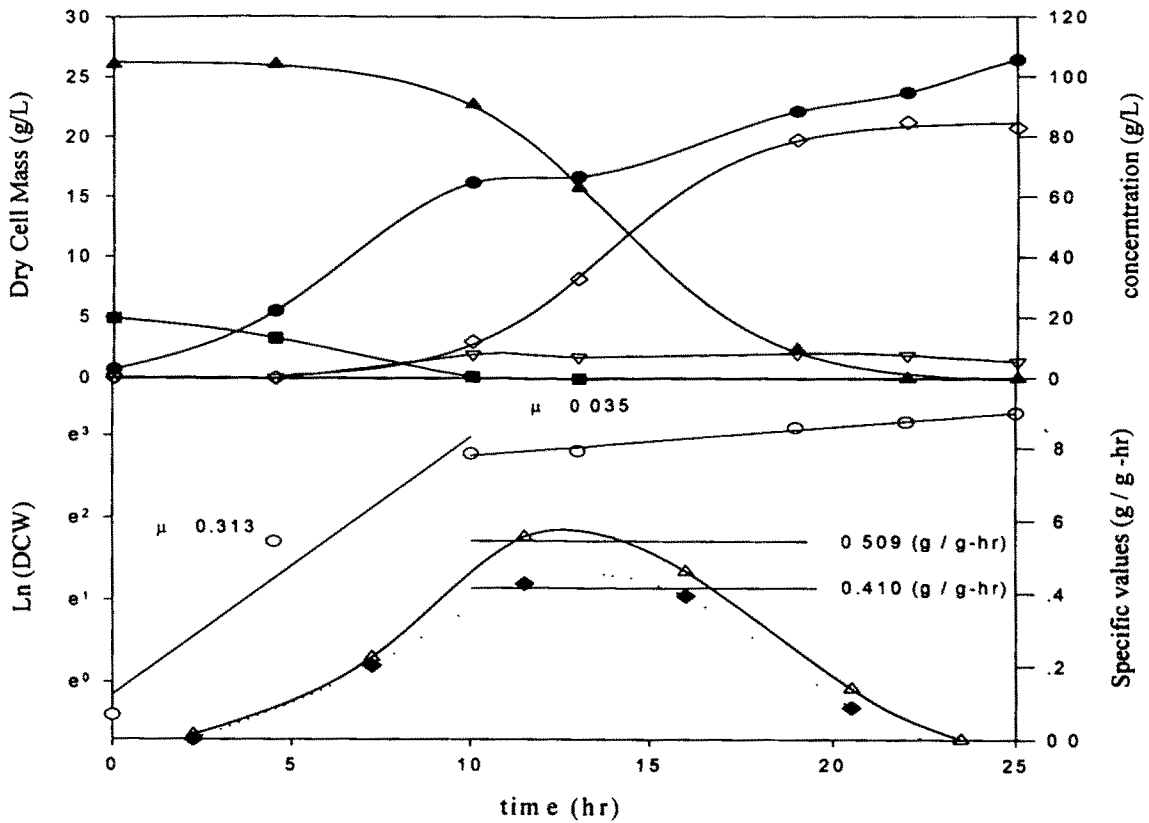
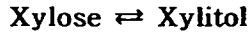


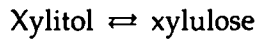
Fig. 6 Results of two-substrate batch fermentation at pH 6.

Volumn, temperature, agitation and aeration were 1L, 30°C, 500rpm and 1vvm, respectively. (● dry cellmass (g/L), ■ glucose(g/L), ▲ xylose (g/L). ◇ xylitol (g/L), ▽ ethanol (g/L), ○ Ln (dry cell mass), △ specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell • hr), ◆ specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell • hr))



XR

$$K_{eq} = \frac{[NADP][xylitol]}{[NADPH][xylose][H^+]} = 10^{10}$$



XDH

$$K_{eq} = \frac{[NADH][xylulose]}{[NAD][xylitol]} [H^+] = 2.7 \sim 5.8 \times 10^{-8}$$

그러나 세포의 pH는 세포내 H⁺ 농도를 변화시켜 반응의 평형에 직접 영향을 미치기 보다는 전반적인 세포의 대사상태 및 세포막 이동에 영향을 주어 수율 및 xylitol 비생성속도를 변화시킨 것으로 생각된다.

다. 교반속도의 영향

Xylitol이 생성되는 산소전달 상태는 micro-aerobic한 상태로 배지내 산소농도를 퍼센트로 나타낸 DOT 1% 미만이 되어야 xylitol 생성에 적합한 상태가 된다(49-54). 그러나 산소공급이 제한을 받으면 세포의 기초 대사에 영향을 주어 세포내 대사산물의 반응 속도를 떨어뜨리게 된다. 이와 같이 최적 xylitol 생산을 위하여는 일정한 범위의 산소전달 속도를 유지하여야 하나 이는 DOT를 가지고 조절하기가 어려우므로 교반속도를 이용하여 조절하고자 하였다. 공기주입량을 1 vvm과 2vvm으로 유지하고 교반속도를 달리하였을 때 산소전달 속도 상수의 변화는 Fig. 7과 같다.

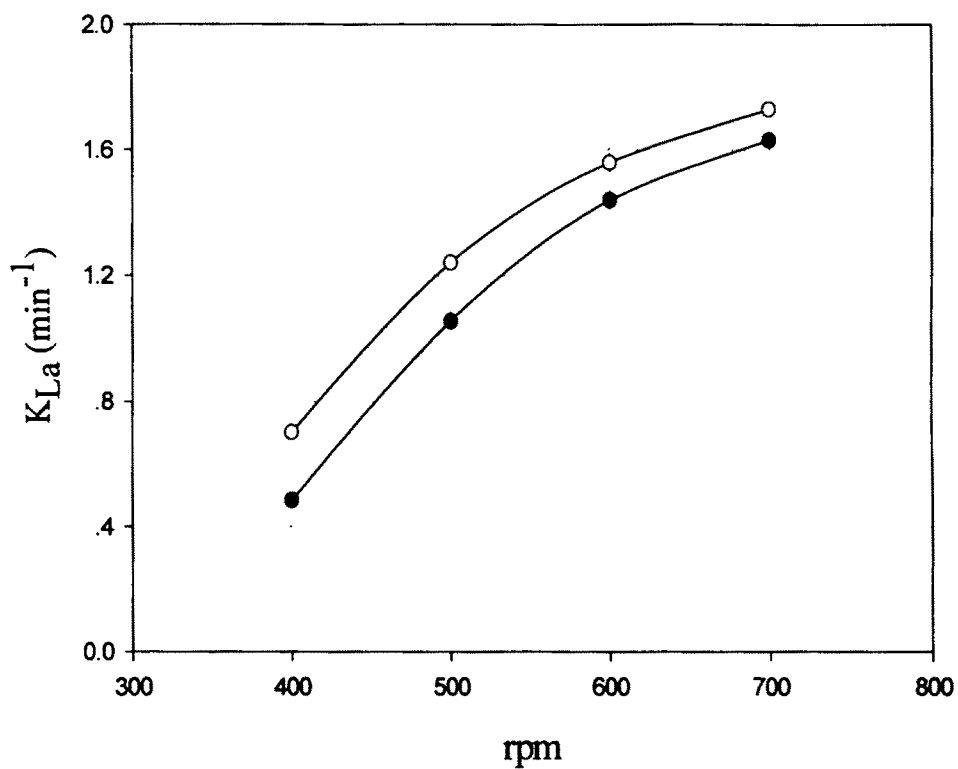


Fig.7 Oxygen transfer coefficient (K_{La}) in the YPX medium at 1L, 30°C, pH6 as a function of agitation and aeration. (○ 1vvm, ● 2vvm)

발효조와 교반기의 특성에 따라 산소전달 속도가 달라지나 통기량보다는 교반속도에 의해 더 큰 영향을 받는 것으로 밝혀졌다.

산소전달속도의 영향을 알아보기 위하여 YP medium에 포도당을 첨가하지 않고 xylose만을 유일한 탄소원으로 하여 100g/L를 첨가하고 pH6, 30℃에서 실험하였다. 각 rpm에서 실험 한 발효 결과는 Fig. 8에 나타내었다. Fig 8은 1 vvm, 500 rpm으로 시험한 결과이다. 초기에는 xylose를 이용하여 세포가 성장하였고 세포가 성장하여 DOT가 1% 미만으로 유지되는 micro-aerobic 상태에 도달하면 xylitol 생성이 왕성하여지는 것을 관찰 할 수 있었다. 생산성은 3.82 g/L·hr로 높았으나 xylose가 세포의 성장에 사용되어 수율이 0.62 g-xylitol/g-xylose로 낮아졌다. 교반 속도를 높여서 실험한 결과에서도 마찬가지로 초기 세포의 성장이 일어나고 일정량의 세포가 생성되어 산소전달이 제한받으면 xylitol이 생성되기 시작하였다. 교반속도를 달리하여 얻은 실험 결과는 Table 1에 정리하였다. Table 1.에서 보는 바와 같이 교반속도를 증가할수록 DOT가 낮아진 상태에서도 비성장속도가 커져 균체농도가 증가하였고 따라서 xylitol의 생성 수율이 떨어지게 되었다. 400rpm ($K_{La}=0.484 \text{ min}^{-1}$)에서는 비성장속도가 0.0051 hr^{-1} 로 세포의 증가가 거의 없었고 xylitol의 수율도 가장 높았다. 그러나 2단계 발효전략을 구사할 경우 최적 교반속도로 500rpm ($K_{La}=1.06 \text{ min}^{-1}$)을 결정하였다. 그 이유로는 첫째, 500rpm이 400rpm보다 xylitol 수율이 낮으나 이는 발효 전반의 xylitol 수율로 DOT가 1% 미만으로 떨어지는 xylose의 전환단계만을 고려하면 400rpm과 비교하여 0.68 g-xylitol/g-xylose로 낮지 않고 둘째, 기질 중 세포성장과 xylitol로 전환되지 않고 세포의 기초대사 기능 유지에 사용된 부분을 고려하면 500rpm이 대사기능 유지에 사용되는 xylose의 양이 적은 것을 알수 있었다. 셋째, 증식된 일정량의 세포로 기질을 전환하는 공정에서 생산성을 직접 좌우하는 xylitol 비생산속도도 500rpm에서 $0.3 \text{ g-xylitol/g-cell} \cdot \text{hr}$ 로 400rpm에서보다 더 높은 생산성을 기대할 수 있기 때문이다.

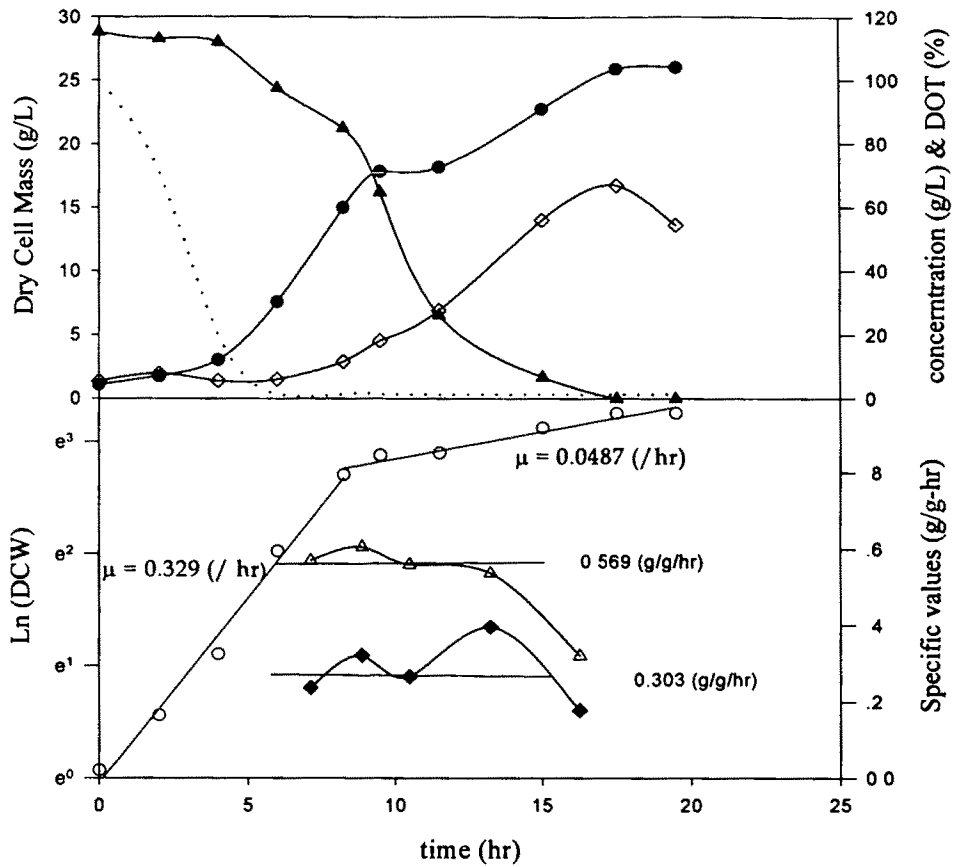


Fig. 8 Results of batch fermentation at 500rpm.

Volume, pH, temperature and aeration were 1L, pH6, 30°C and 1vvm, respectively. (● dry cell mass (g/L), ■ glucose(g/L), ◇ xylitol (g/L), ○ Ln(DCW), △ specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass • hr), ◆ specific xylitol production rate (g-xylitol /g-cell mass • hr) DOT (%))

Table 1. Effects of agitation rate on xylitol production by *C. tropicalis* ATCC13803 at 30°C and pH 6.

		400rpm	500rpm	600rpm	700rpm
Xylitol yield ($Y_{P/S}$ [g/g])		0.68	0.56	0.49	0.34
Cell mass yield ($Y_{X/S}$ [g/g])		0.019	0.23	0.30	0.48
Maintenance ($1-(Y_{X/S}+Y_{P/S})$ [g/g])		0.301	0.21	0.21	0.18
Specific xylose consumption rate (q_s [g/g · hr]) ¹⁾		0.35	0.57	0.42	0.41
Specific xylitol production rate (q_p [g/g · hr]) ²⁾		0.27	0.30	0.22	0.14
Specific growth rate (μ [hr ⁻¹])	below DOT 1%	0.0056	0.049	0.064	0.078
	above DOT 1%	-	0.329	0.338	0.414
Fermentation time [hr]		53	19.5	19.5	19.5
Final dry cell mass [g/L]		2.64	24.9	32.7	51.5

라. 초기 xylose 농도의 영향

각 초기 기질 농도에 따른 발효 결과를 종합한 수율, 기질 비소모속도, xylitol 비생산속도의 변화는 Fig. 9와 같다. 초기 xylose의 농도가 100 g/L 일 때 수율 및 기질의 비소모속도, xylitol의 비 생산속도 모두 최고값을 나타냈고 기질의 농도가 증가하거나 감소하면 그 값들이 모두 감소하였다. 이러한 경향은 다른 균주를 이용한 실험에서도 같은 경향을 보이고 있으나 최적의 농도는 균주 및 실험에 따라 조금씩 차이가 났다. *C. guilliermondii*(2)의 경우 200g/L의 xylose 농도에서 0.22 g-xylitol/g-cell • hr로 최고의 비생산성을 수율은 300 g/L에서 0.75 g-xylitol / g-xylose를 보였다.

다른 보고에 의하면 *C. tropicalis*(20)는 Box-Wilson 방법으로 계산한 최적 xylose 농도가 172g/L로 보고되었다. Xylose 비소모속도 및 xylitol 비생산 속도의 변화는 기질의 농도가 증가함에 따라 그 값들이 감소하는 기질 저해현상으로 볼 수 있다. 그러나 일반적인 기질저해 공식에 대입하기에는 300g/L에서 감소량이 커 단순한 기질 저해현상 외에 다른 요소가 작용한 것을 생각할 수 있다.

첫째, xylose의 xylitol로의 전환 공정중 건조세포중량 증가량은 6~10g/L로 거의 차이가 없었으며 비성장속도도 유사하였으나 수율이 기질의 농도가 증가함에 따라 감소하였다. 즉 세포가 xylose를 소모하는 속도와 xylitol을 생산하는 반응 속도만 늦어지는 것이 아니라 세포의 상태 유지에 소모되는 xylose 양이 증가함을 알 수 있다. 이를 보아 균주가 내당성 또는 당과 당알코올에 의한 osmotic tolerance가 낮아 균주의 대사 전반의 진행속도가 감소한 것으로 볼 수 있다. 두번째, 산소전달 속도는 여러 가지 요인에 영향을 받으며 그 중 하나는 배지의 점도이다. 배지의 점도는 교반에 소요되는 용력에 영향을 주기도 하고 산소 확산계수에 영향을 주기도 한다. 즉 기질의 점도가 증가할수록 산소전달이 잘되지 않아 대사 속도가 떨어졌다고 생각할 수도 있다.

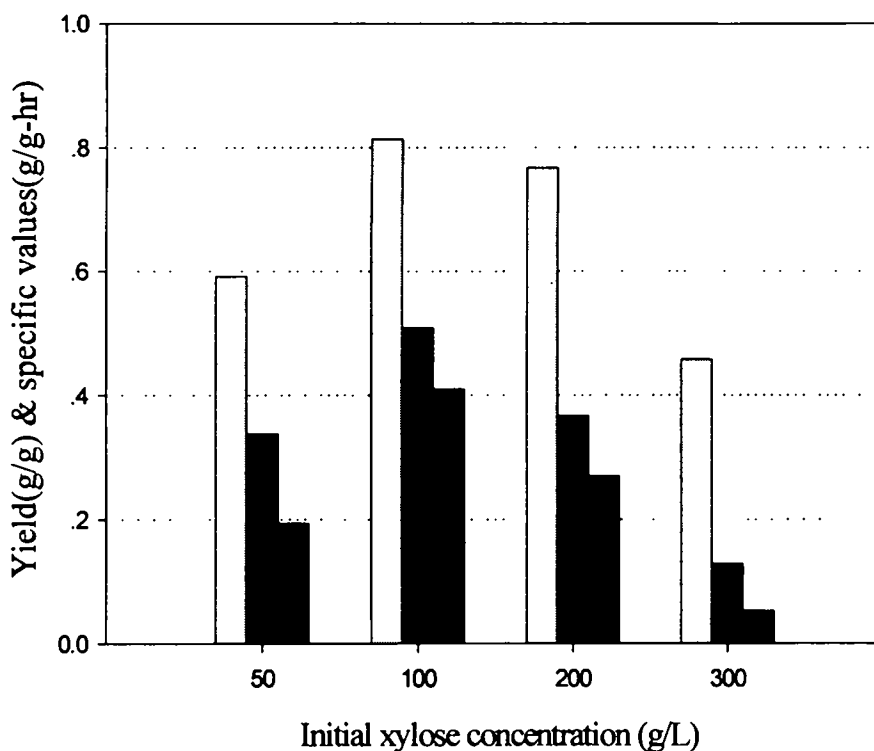


Fig. 9 Effects of initial xylose concentrations on xylose consumption rate and xylitol production. (\square xylitol yield (g/g), \blacksquare specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass · hr), \blacksquare specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell mass · hr))

고농도의 당용액에 의한 점도상승으로 산소전달의 저해가 발생할 수 있으므로 이를 확인하기 위하여 교반속도를 높여 실험 하였으나 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도의 값은 증가하지 않아 산소전달의 문제는 아니었음을 알 수 있었다. 그러나 세포의 성장 속도는 증가하고 xylitol 생산 수율은 낮아져 산소에 의한 탄소흐름 제어는 당의 농도에 무관하게 영향을 미침을 알 수 있었다.

마. Arabinose 첨가의 영향 및 그 이용

YP medium에 20g/L과 100g/L xylose외에 10g/L의 arabinose를 첨가하여 실험하였다. 실험 조건은 2단계 전환 공정을 위한 조건을 적용하였다. 발효 결과는 Fig. 10에 나타내었다. 생산성은 3.58g/L, 수율은 0.67g-xylitol/g-xylose로 arabinose는 xylitol생산에 영향을 미치지 않는 것으로 볼 수 있다. 수율이 조금 낮은 것은 포도당의 소모 후 초기 xylose대사를 할 때 산소의 공급량이 많아 xylose가 xylitol로 전환되지 않고 세포의 성장에 사용되어 수율이 감소한 것이다. 포도당에 의한 세포의 성장단계에서의 비성장속도와 xylitol 생산 단계에서의 xylose 비소모속도, xylitol 비생산속도는 모두 arabinose를 첨가하지 않았을 경우와 차이가 없어 arabinose가 세포의 성장, xylitol 생산 모두를 저해하지 않음을 알 수 있었다.

Arabinose는 포도당과 xylose의 존재하에서 세포에 의해 사용되지 않았고 xylose가 전부 소모된 시점부터 세포에 의해 소모되었다. Arabinose가 소모되는 동안 xylitol은 약 10g/L가 감소하여 장시간 xylitol 생산이 끝난 상태로 방치하는 것은 좋지 않음을 알 수 있었다.

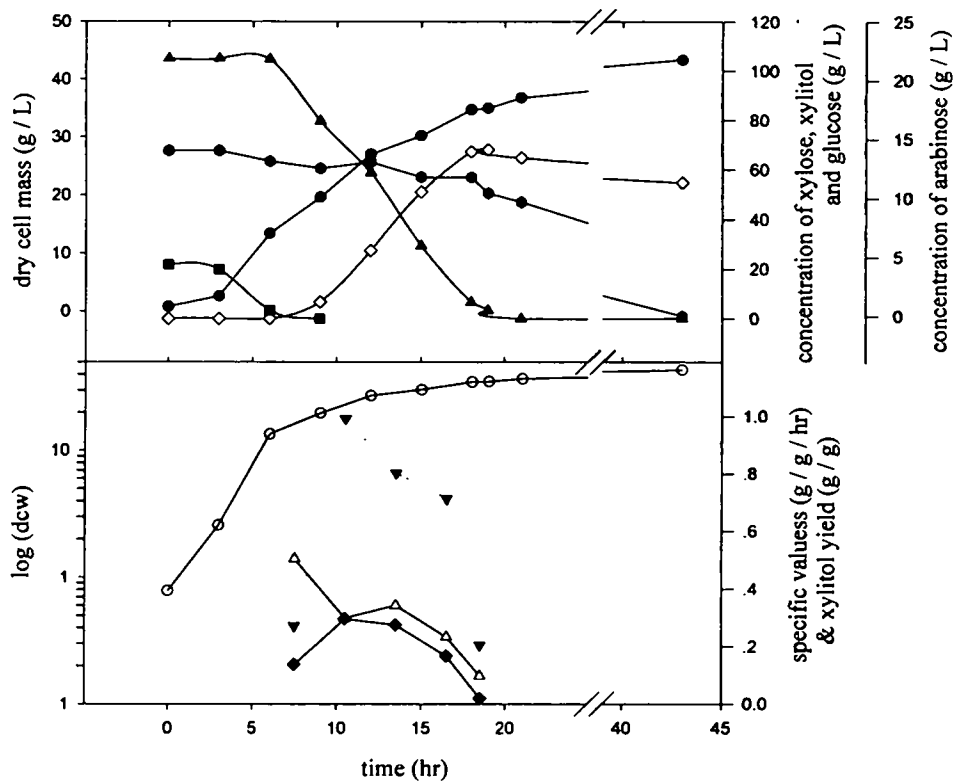


Fig 10 Effects of arabinose on xylitol production. Operation conditions were 1L, 30°C, pH 6, 1vvm and 500rpm. (● cell mass (g/L), ■ glucose (g/L), ▲ xylose (g/L), ● arabinose (g/L), ◇ xylitol (g/L), ○ log(g-cell mass), ▼ xylitol yield (g-xylitol/g-xylose), △ specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell · hr), ◆ specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell · hr))

Arabinose는 약 20시간의 긴시간 동안 소모되었으나 산소 공급량이 제한된 즉, 세포의 성장이 억제된 상태이므로 xylitol 생상이 끝난 시점부터 산소의 공급량을 늘려 세포 대사속도를 원활히 하면 빠른 시간에 세포의 성장기질로 사용될 것이다. 세포가 arabinose를 대사하는 과정에서 생성된 부산물은 측정되지 않았다. Xylitol 생산 수율은 0.67 g-xylitol/g-xylose, 생산성은 3.58g-xylitol/L · hr였다.

3. 2단계 발효공정의 최적화

가. 실험 목적

Xylose의 전환공정에서 수율을 높이기 위하여는 xylose가 세포의 성장에 이용되지 않고 xylitol로 전환되어야 한다. Xylose 전환공정은 세포의 농도에 비례하여 공정의 시간이 단축되고 이에 xylitol 생산성이 커지므로 초기 세포농도를 높일 필요가 있다. 따라서 초기에는 포도당을 이용하여 세포를 증식시키고 증식된 세포를 이용하여 세포의 성장없이 xylose에서 xylitol을 생산하는 2단계 발효 전략을 확립하였다. Xylitol 생산 수율은 산소의 공급을 조절하여 xylose의 bioconversion으로 높은 수율을 얻을 수 있었으나 생산성은 최종 xylitol 농도 이외에 발효시간을 고려하여 향상시켜야 한다. 생산성은 최종 xylitol 생성 농도를 발효시간으로 나눈 것으로 정의할 수 있다. 최종 xylitol 생성 농도는 넣어준 xylose의 양과 xylose의 전환 수율에 의해 발효시간은 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도등 kinetic parameter에 의해 좌우된다. 따라서 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도가 최적화되어 일정하게 유지되고 다른 영향요인에 영향을 받지 않으면 발효시간은 세포의 농도에 반비례하여 짧아지게 된다. 즉 세포성장 단계에서 고농도의 세포를 얻으면 생산성은 향상된다. 그러나, 초기 세포의 농도를 높이기 위하여 포도당의 농도를 크게하면 포도당 대사의 부산물로 ethanol이 생성되고 이는 세포의 성장, 증식 및 대사를 저해하여 발효시간을 길어지게하고 생산성을 떨어 뜨리는 원인이 된다. 따라서 초기에 세포의 성장을 위하여 넣어주는 포도당의 양을 computer simulation을 이용하여 결정하였다. 세포의 성장과 xylitol 생산단계를 분리하여 각 단계에서 ethanol이 미치는 영향을 실험에서 얻은 결과를 토대로 수식화한 후 이들을 이용하여 simulation으로 최적 포도당 농도를 결정하였다. 실험은 YP medium에 xylose의 양은 100g/L

로 일정하게 유지하고 포도당의 양을 변화시켜 생성되는 ethanol에 의한 영향을 관찰하였다. Ethanol은 xylose의 전환공정에서는 이용되지도 xylose 대사의 부산물로 생산되지도 않으므로 따로 외부에서 첨가하지 않고 포도당의 대사산물로 생산된 ethanol이 xylitol 생산에 미치는 영향을 보았다. 0 g/L ethanol 실험, 즉 포도당이 첨가되지 않은 실험구를 제외하고는 포도당이 완전히 소모될 때까지 DOT를 20%이상으로 조절하여 세포의 성장단계에서는 산소공급이 충분히 되도록 하였다. Xylose의 xylitol로 전환공정에서는 xylose bioconversion이 이루어지도록 산소의 공급량을 조절, DOT 5% 미만으로 제한하였다.

나. Ethanol이 세포 성장 단계에 미치는 영향

Ethanol은 포도당 대사의 주요 부산물로 세포 성장, 분열 및 대사를 저해한다는 것은 널리 알려진 사실이다. 먼저 생산된 ethanol은 세포의 비성장 속도에 영향을 준다. Fig. 11은 ethanol에 의하여 세포의 비성장 속도가 변화하는 것을 나타낸 것이다.

실험에서 얻은 결과를 ethanol의 농도와 비성장속도와의 관계를 가장 잘 표현하는 Luong equation에 비선형회기법으로 curve-fitting 하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

$$\frac{1}{x_1} \frac{dx_1}{dt} = \mu_{1 \max} \left(1 - \left(\frac{P_1}{P_{1m}}\right)^a\right) \quad (1)$$

$$\mu_{1 \max} : 0.56 \text{ hr}^{-1}$$

$$P_{1m} : 24.4 \text{ g/L}$$

(critical ethanol concentration above which cell cannot grow)

$$a : 0.271 \text{ (dimensionless constant)}$$

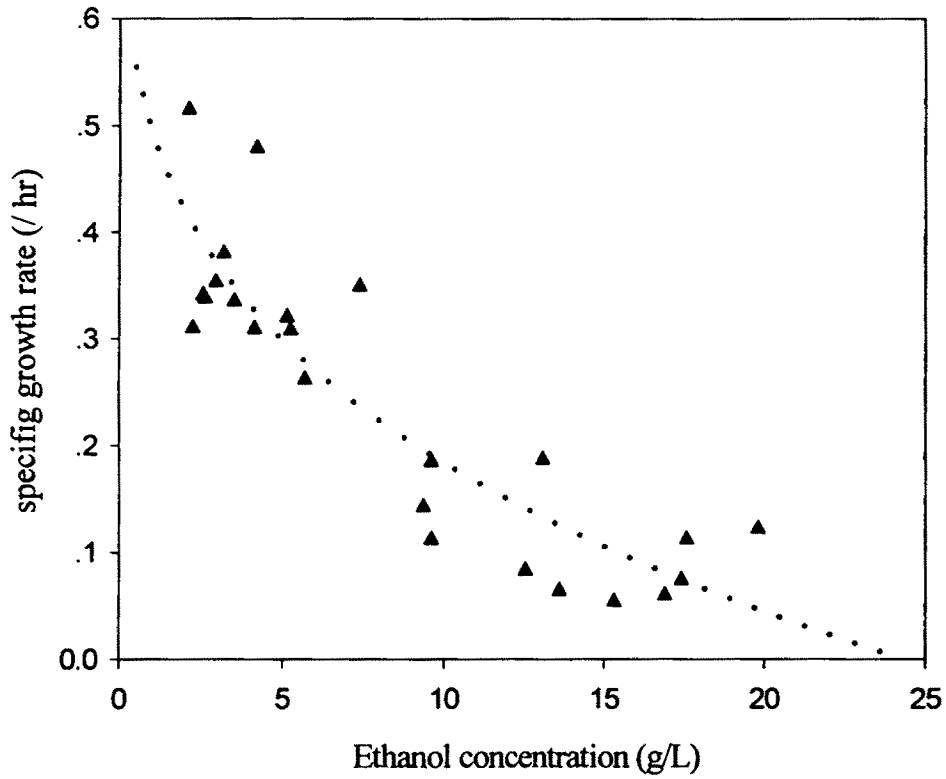


Fig. 11 Effects of ethanol on specific growth rate during cell growth phase. (\blacktriangle specific growth rate (hr^{-1}), Luong equation)

Ethanol의 생성은 비성장속도 뿐만 아니라 기질인 포도당 소모 속도와 product인 ethanol의 생산속도에도 영향을 준다. Fig 12는 ethanol 농도에 따른 포도당 비소모속도 및 ethanol 비생산속도를 표시하고 실험결과를 가장 잘 표현하는 logistic equation를 이용하여 비선형회기법으로 curve fitting 한 결과이다.

포도당 비소모속도는 0.53 g glucose/ g cell-hr에서 0.32 g glucose/g cell-hr로 변화하였고 ethanol 비생산속도는 0.15 g ethanol/ g cell-hr에서 0.04 g ethanol/g cell-he로 변함이 관찰되었다.

Logistic equation 으로 curve fitting 한 결과 그 변곡점은 포도당 비소모속도와 ethanol 비생산속도가 모두 13.5g/L로 계산되었고 변곡점을 중심으로 그 값의 변화가 현저하게 나타났다. 따라서 첫번째 단계 즉 세포 성장 단계에서 포도당 비소모속도와 ethanol 비생산속도식은 다음과 같이 간단히 상수로 정의할 수 있다.

$$\frac{1}{x_1} \frac{dS_1}{dt} = -q_{s1} = \begin{pmatrix} 0.53 (g/g \cdot hr) , P_1 < 13.5 (g/L) \\ 0.32 (g/g \cdot hr) , P_1 \geq 13.5 (g/L) \end{pmatrix} \quad (2)$$

$$\frac{1}{x_1} \frac{dP_1}{dt} = q_{p1} = \begin{pmatrix} 0.15 (g/g \cdot hr) , P_1 < 13.5 (g/L) \\ 0.04 (g/g \cdot hr) , P_1 \geq 13.5 (g/L) \end{pmatrix} \quad (3)$$

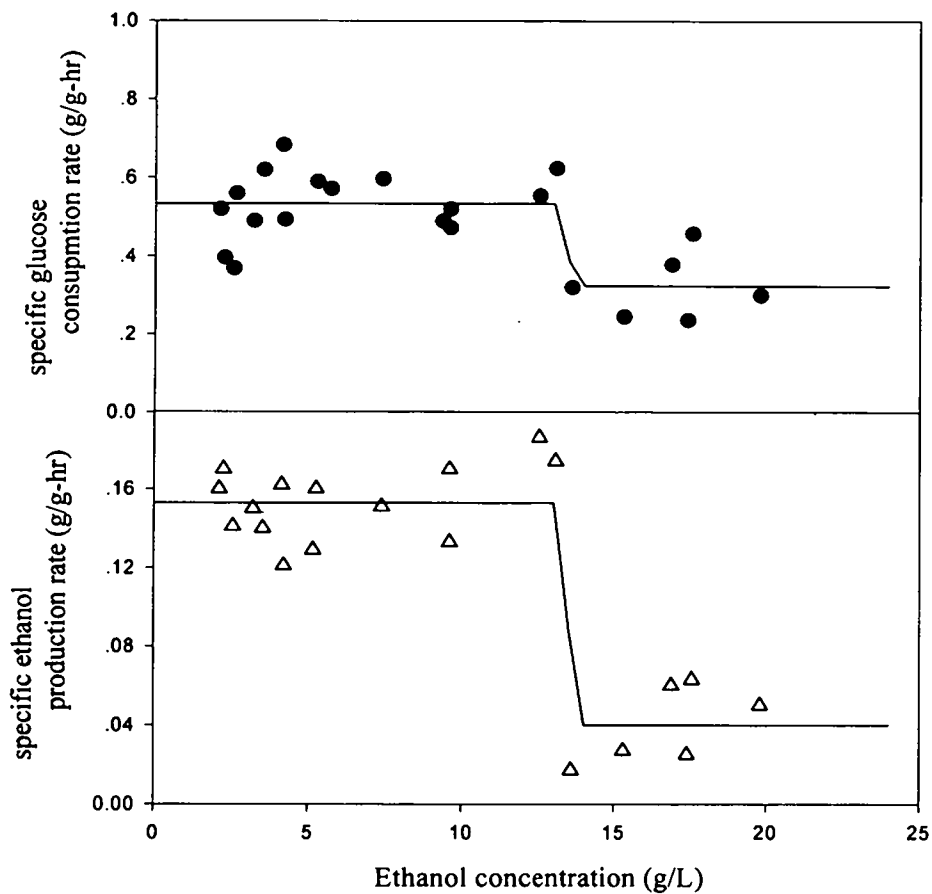


Fig. 12 Effects of ethanol on glucose utilization and ethanol production during growth phase. (● specific glucose consumption rate (g-glucose/g-cell mass • hr), △specific ethanol production rate(g-ethanol/g-cell mass • hr), — logistic equation)

다. Ethanol이 xylose의 생물전환공정에 미치는 영향

포도당의 대사중 생성된 ethanol은 xylose 대사 및 xylitol 생산에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Fig. 13에서 ethanol이 xylose 대사를 저해하는 것을 명확히 알 수 있었다. 초기 ethanol의 농도가 증가할수록 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도가 감소하였다. xylose 비소모속도의 감소 형태는 logistic equation을 이루며 감소하였고 xylitol 비생산속도의 감소도 xylose 비소모속도의 감소형태와 같은 logistic equation의 형태를 이루었다. Ethanol 농도가 0 g/L인 실험은 포도당을 넣지 않고 xylose만을 기질로 하여 실험한 결과로 세포농도가 높아져 산소 소모속도가 xylitol 생산에 알맞은 상태가 되기까지 세포성장으로 xylose가 사용되어 수율이 낮아지고 xylitol 비생산속도도 떨어진다. 따라서 table 2에 정리한 것과 같이 0g/L의 실험은 xylitol 비생산속도와 수율을 두가지로 나눌 수 있다. 하나는 전체의 결과를 나타내는 값이고 또다른 하나는 세포의 성장으로 microaerobic 한 상태 이후의 값으로 이 값이 ethanol의 영향을 받지 않은 xylose의 bioconversion상태의 값이다. 실험의 목표는 xylitol 생산수율을 높이는 것이므로 후자를 선택하였다.

후자의 경우는 포도당의 소모가 끝남과 동시에 aeration을 조절하여 microaerobic한 상태를 만들어 xylose가 세포의 성장에 사용되지 않고 xylitol 생산으로 가게 공정을 조절한 경우이다. 실험에서 얻은 결과에 가장 근접한 수식을 비선형 회기법으로 구한 결과는 다음과 같다.

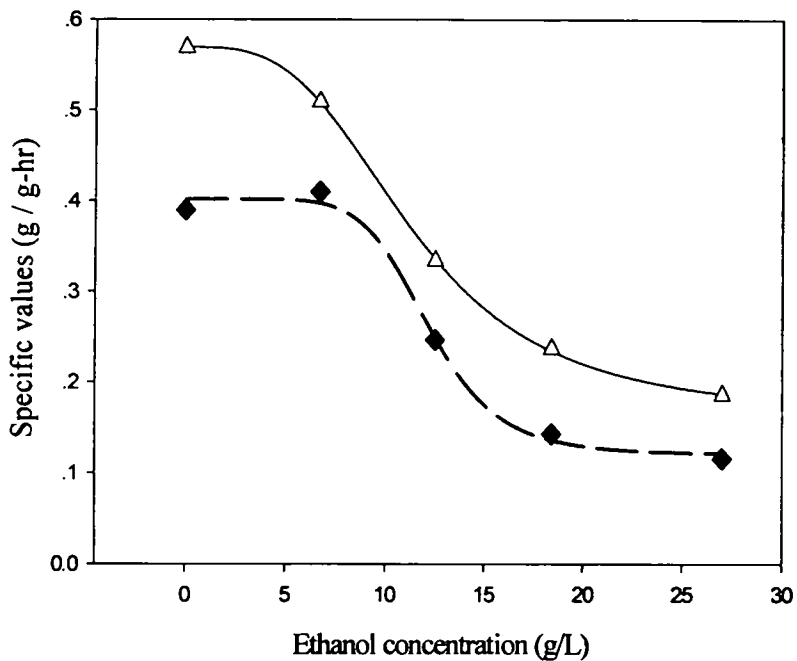


Fig. 13 Effects of ethanol on xylitol production during xylose bioconversion phase. (\triangle specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass • hr), \blacklozenge specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell mass • hr), — logistic equation for specific xylose consumption rate, - - - logistic equation for specific xylitol production rate)

Table 2. Effects of ethanol on xylitol production

Glucose (g/L)	0g/L					
	Overall fermentation	Xylitol production period	20g/L	40g/L	60g/L	100g/L
Ethanol (g/L)	0	0	6.7	12.5	18.4	27.0
Final cell mass (g/L)	26	11	28	23	22	39
q_s (g-xylose/g-cell • hr)	0.57	0.57	0.51	0.33	0.24	0.19
q_p (g-xylitol/g-cell • hr)	-	0.39	0.41	0.25	0.14	0.12
μ at xylitol production phase (/hr)	-	0.04	0.03	0.01	0.01	0.02
Y_p (g-xylitol/g-xylose)	0.58	0.62	0.81	0.72	0.63	0.69

$$\frac{1}{x_2} \frac{dS_2}{dt} = -q_{S_2}$$

$$\frac{1}{x_2} \frac{dP_2}{dt} = q_{P_2}$$

$$= y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

specific xylose consumption rate : a = 0.41 (g/g · hr)

$$b = 3.25$$

$$X_0 = 11.36 \text{ (g/L)} \quad (4)$$

$$Y_0 = 0.16 \text{ (g/g · hr)}$$

specific xylitol production rate : a = 0.28 (g/g · hr)

$$b = 6.89$$

$$X_0 = 12.19 \text{ (g/L)} \quad (5)$$

$$Y_0 = 0.12 \text{ (g/g · hr)}$$

Table 2에서 나타난 바와 같이 수율의 변화는 ethanol의 농도에 영향 큰 영향을 받지 않았다. Xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도의 감소는 단순히 ethanol 농도에 비례하지 않고 같은 형태로 logistic하게 감소하는 것으로 보아 세포가 ethanol에 어느 정도까지는 내성을 가지며 allosteric 하게 반응하는 것을 알 수 있었다. 이를 보아 ethanol은 xylitol 생산에 관여하는 특정한 enzyme을 저해하는 것이 아니라 세포 전반의 대사속도를 allosteic하게 저해함을 알 수 있었다.

라. 최적의 초기 포도당 농도 결정을 위한 computer simulation

이상의 실험 결과를 가지고 2단계 발효전략에서 최적 포도당 농도 결정을 위한 computer simulation을 수행하였다. 생산성의 정의는 실험의 준비시간, 공정 원료비는 고려하지 않고 단순히 생산된 xylitol양을 총 발효시간으로 나눈 volumetric productivity (Q_p)로 정하였다. 총 발효시간은 xylose bioconversion 시기의 lag time은 ethanol의 농도에 상관없이 일정하다는 가정으로 cell growth time과 xylose bioconversion time의 합으로 나타내었다.

$$Q_p = \frac{P_{2f}}{t_{total}} = \frac{P_{2f}}{(t_1 + t_2)} \quad (6)$$

포도당을 이용한 세포성장 단계의 세포(X), 기질(S_1 : glucose), 생산물(P_1 : ethanol)의 수지식은 (1)~(3)을 사용하였다. Xylose 전환공정에서의 비성장속도는 세포의 성장을 무시하는 과정이고 실제 실험 결과 매우 낮은 값을 가지며 산소전달 속도가 같은 경우 다른 영향을 받지 않았으므로 실험 결과의 평균값인 0.03 hr^{-1} 의 상수로 정하였다.

$$\frac{1}{x_2} \frac{dx_2}{dt} = \mu = 0.03/hr \quad (7)$$

기질(S_2 : xylose)의 이용은 식 (4)를 생산물(P_2 : xylitol)의 이용의 수지식은 식 (5)를 사용하였다. 포도당 농도인 S_1 을 5~100g/l로 변화시켜가며 4차 Runge-Kutta방법으로 미분방정식을 수치해석하여 각각의 생산성을 구하였다. 미분방정식의 초기 조건은 X_i (초기접종농도)=1g/L, $P_{1i} = 0\text{g/L}$, $S_{2i} = 100\text{g/L}$, $P_{2i} = 0\text{g/L}$ 로 하였다.

Fig. 14는 포도당의 농도가 변할 때 세포 성장단계의 최종 균체농도 (X_1)와 발효시간(t_1), ethanol의 농도(P_1)를 나타낸 것이다. 포도당을 기질로 이용하는 과정에서는 초기 포도당 농도가 증가함에 따라 발효시간, 세포농도, ethanol 생성량이 모두 증가하였고 그 증가량을 ethanol이 생성됨에 따라 감소하였다. 두번째 단계인 xylose의 전환공정의 결과(X_2 , t_2 , P_2)는 Fig. 15에, 총 발효시간, 생산성을 simulation 한 결과는 그림은 Fig. 16에 표시하였다. 낮은 포도당 농도에서는 최종 xylitol농도가 최고로 나오지 않는 것은 세포농도가 낮은 경우 xylitol 수율이 초기 세포농도가 있을 경우보다 조금 낮고 세포성장으로 xylose의 흐름이 유도되어 이러한 현상이 발생했다. Xylose의 생물전환공정중의 세포성장량은 5~13g/L로 억제되었다(X_2 in Fig. 15). 가장 높은 최종 xylitol 농도는 포도당 농도가 34g/L일 때 87.0g/L였고 가장 짧은 발효시간은 포도당농도가 23g/L 일 때 16.2시간이 걸리는 것으로 나타났다. 최고의 생산성을 올릴 수 있는 포도당의 농도는 32g/L로 이 때 최종 xylitol은 86.3g/L, 발효시간 16.8 hr로 5.15 g-xylitol/L · hr의 생산성을 올릴 수 있는 것으로 나타났다. Fig. 17은 최적화된 조건에서 2단계 발효를 한 결과로 0.81g-xylitol/g-xylose의 xylitol 수율과 5.06g/L의 생산성을 얻어 simulation 결과를 실험적으로 증명한 것으로 재현성이 있음을 알 수 있었다.

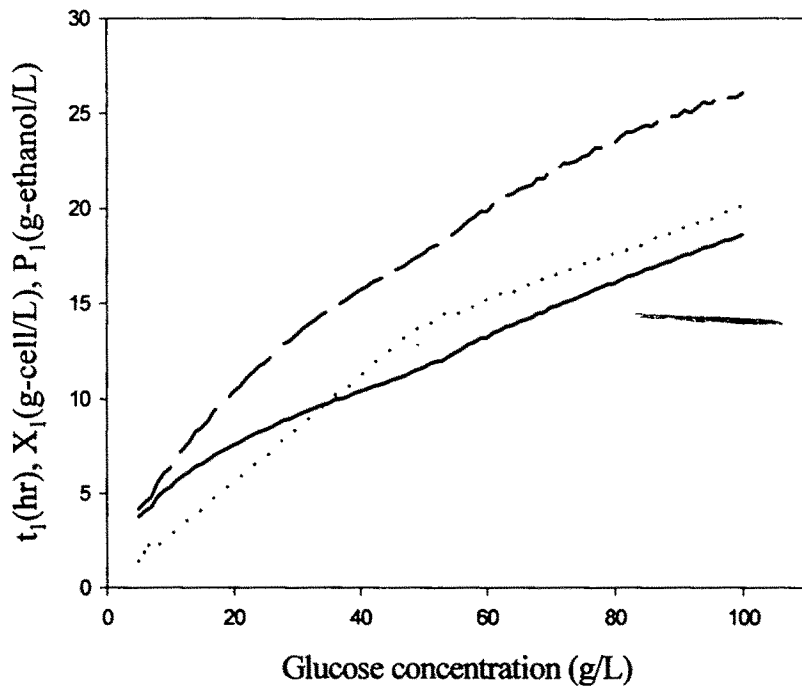


Fig. 14 Simulations results of cell growth phase. $S_0(\text{xy})=100$ (g/L), $P_0(\text{ethanol})= 0$ (g/L), $P_0(\text{XOH}) = 0$ (g/L) and $X_0= 1$ (g/L) were initial condition of derivative equations. (- - - $X_f(\text{glc})$; final cell mass (g/L), $P_f(\text{EtOH})$; final ethanol concentration (g/L), ——— $T_f(\text{glc})$; fermentation time of cell growth phase (hr))

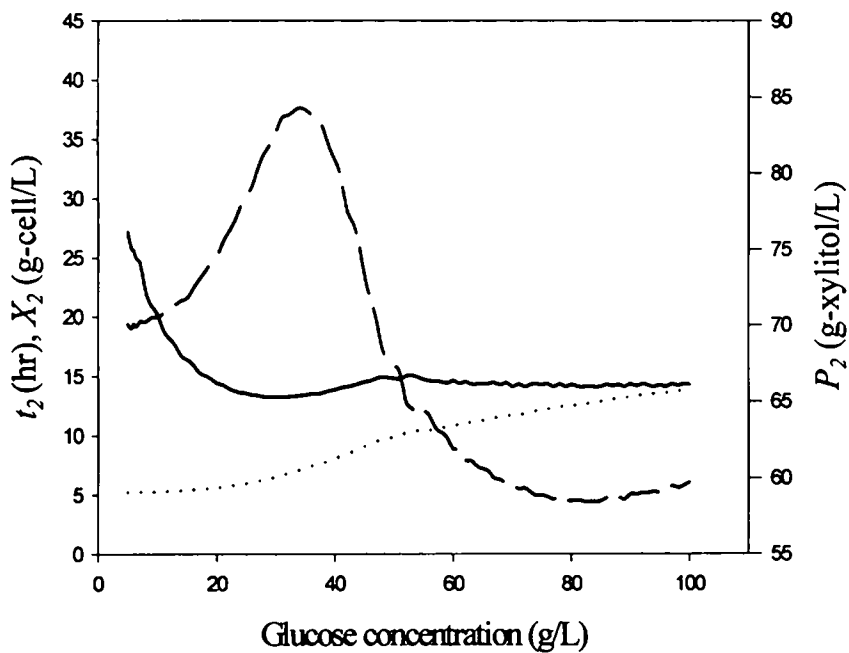


Fig. 15 Simulation results of xylose bioconversion phase. Initial conditions of derivative equations were obtained from result of growth phase. (— $T_2(\text{xyl})$; xylose bioconversion time (hr), $X_2(\text{xyl})$; cell growth during xylose bioconversion (g/L), - - - $P_2(\text{XOH})$; final xylitol concentration (g/L))

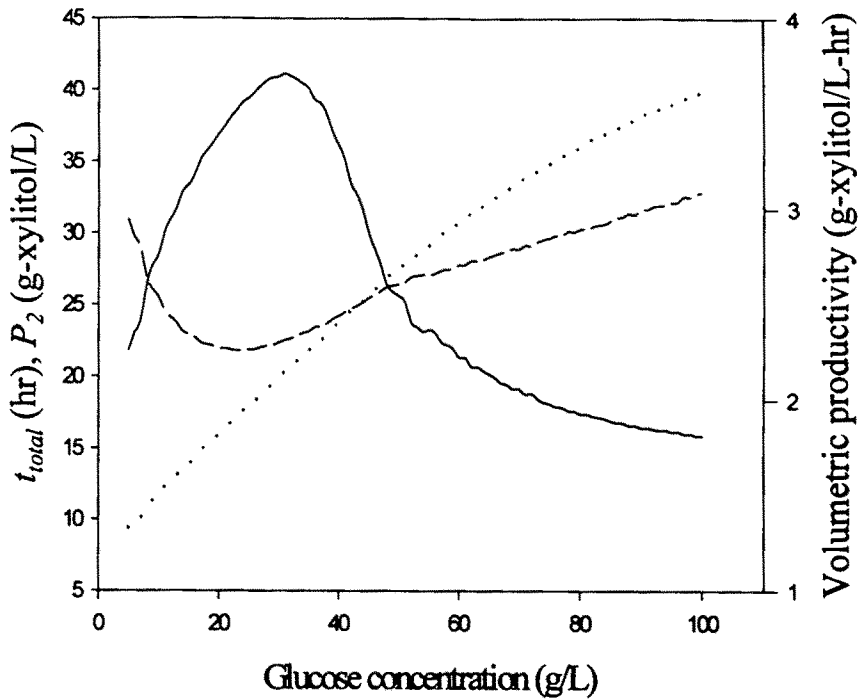


Fig. 16 Simulation results of total operation time and volumetric productivity. (— Q_p ; volumetric productivity (g/L • hr), X_{total} ; final cell mass ((g/L), - - - t_{total} ; total operation time (hr))

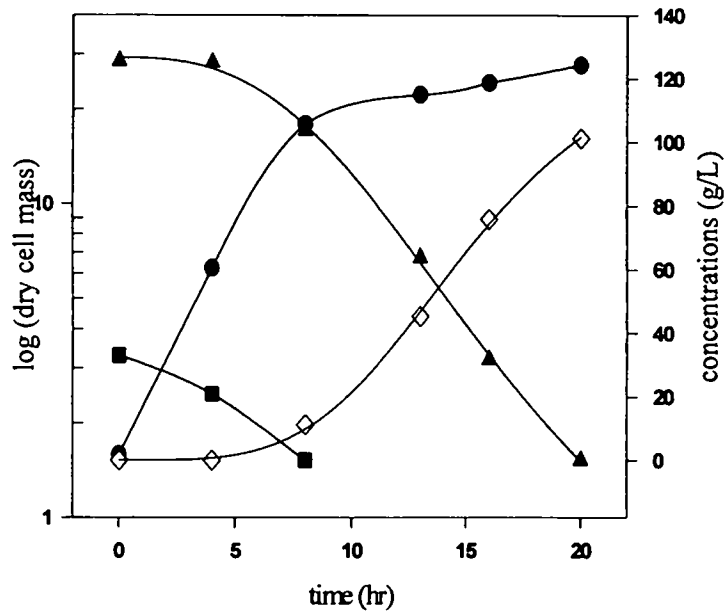


Fig. 17 Experimental results of the two-substrate batch culture under optimized conditions (● log (g-cell mass), ■ glucose (g/L), ▲ xylose (g/L), ◇ xylitol (g/L))

4. 유가식 배양의 최적화

가. 실험목적

생산된 xylitol은 정제의 과정을 거쳐야 한다. Xylitol은 배지중에 남아있는 기타 잔류당과 N-source등을 제거하고 결정화를 시켜 순수분리한다. Xylitol의 결정화를 위하여는 생산된 xylitol를 농축시켜 그 농도를 높여야 한다. 따라서 최종 xylitol의 농도가 높을수록 산업화에는 유리하게 되고 전체 생산성 또한 증가하게 된다. 따라서 단순한 회분식 배양이 아닌 유가식 배양으로 최종 xylitol의 농도를 높이기로 하였다. 일반적으로 생산물이 세포의 성장과 같이 생산되는 growth associate 형이면 연속식 공정이, growth independent하면 유가식 배양이 적당한 것으로 알려져 있다(55). 또한 미생물에 의한 xylitol 생산의 장점은 남아있는 잔당이 없다는 점과 xylose가 세포의 성장에 사용되지 않는다는 점이므로 연속식 배양은 적합하지 않음을 알 수 있다. 유가식 배양의 가장 중요한 점은 어떤 목적으로, 또 그 목적을 이루기 위하여 어떠한 요인이 가장 중요하게 영향을 미치며 조절 인자를 무엇으로 삼아 어떻게 조절하느냐 하는 것이다. 이상의 것을 나열하면 다음과 같다.

- 목적 : 수율과 생산성을 유지 또는 증가시키며 최종 xylitol 농도를 높이는 것.
- 영향요인 : 최적화된 회분식 배양의 환경인자를 적용하며 주요 영향요인은 배지내 xylose와 xylitol의 농도이다. 특히 배지내 xylitol의 농도가 증가하면 product inhibition 또는 osmotic stress에 의한 저해등 xylitol의 생산에 부정적인 영향을 미칠 것이다.
- 조절인자 : 가장 중요한 영향요인으로 배지내 xylitol과 xylose의 농도가 선택되었고 주입하는 것은 xylose이므로 xylose의 feeding을

조절하여 배지내 xylose농도 및 xylitol 농도를 조절인자로 선택하였다.

- 조절방법 : Xylose 용액의 주입을 조절한다. 연속식 주입, 간헐식 주입, programed feeding등의 주입방식과 배지내 xylose 농도선택, 유지를 위한 방법등을 연구하여야 한다. 이상의 목적과 방법으로 유가식 배양의 최적화 실험을 수행하였다.

나. Xylitol 농도의 증가에 따른 xylose 생물전환공정의 영향

Xylitol과 xylose는 모두 OH group을 많이 가지는 water holding capacity가 큰 물질로 water activity를 낮추고 osmotic pressure를 높이는 것으로 알려져 있다. Water activity를 낮추고 osmotic pressure를 높이는 것은 모두 세포의 대사에 부담을 주어 xylitol의 생산성을 떨어뜨릴 수 있다. 회분식 배양에서 나타난 것과 같이 초기 xylose 농도가 높아짐에 따라 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도가 떨어짐을 관찰 할 수 있었고 이는 osmotic stress 때문인 것으로 추측되었다. Water activity와 osmotic stress는 세포에 주는 영향이 다르다. Water activity가 떨어지면 직접적인 원인으로서는 세포가 사용가능한 H₂O의 양이 줄어들어 세포의 대사가 저해받게 된다. Osmotic pressure는 osmotic pressure를 주는 물질에 따라 달라진다. 이온성 물질인 경우와 비이온성 즉 당 및 당알코올에 의한 경우가 달라지게 된다. 이온성 물질은 세포막의 이온 이동통로로 들어가 세포의 이온평형을 무너뜨리고 산화환원 평형을 한쪽으로 치우치게하여 세포의 대사를 저해한다. 비이온성 물질인 당 또는 당알코올등은 1차적으로 세포 내외부의 osmotic pressure차이에 의하여 세포막에 변형을 주어 세포막 단백질, 특히 각종 transporter들과 signal protein에 영향을 주게 된다. 또한 이러한 비이온성물질의 osmotic pressure는 세포 내외부의 H₂O의 이동을 유발하여 국

부적으로 water activity를 변화시켜 세포 대사에 영향을 줄 것으로 생각된다(56,57).

따라서 배지내 xylose와 xylitol 농도 증가에 따른 xylitol 생산속도 변화가 어느 요인에 의한 것이지를 밝히기 위하여 800g/L의 xylose와 xylitol 용액의 경우 water activity를 측정하였다. Water activity는 xylose와 xylitol 용액이 모두 0.9로 세포의 성장에 큰 피해를 주지 않는 범위에 들어있어 비이온성 물질의 osmotic pressure에 의한 것임을 알 수 있었다.

유가식 배양의 목적은 최종 xylitol 농도의 증가이고 xylitol 농도 증가는 세포 대사를 저해하는 것으로 알려져 있다. 배지내 xylitol의 농도 증가에 따른 xylose 대사저해 정도를 알아보기 위하여 회분식 배양을 실시하였다. 발효조건은 진탕배양에서 얻은 최적 조건을 사용하였다. 배지내 xylose의 양은 100g/L에서 ± 20 g/L를 유지하게 간헐적으로 600g/L의 xylose 용액을 주입하였다. Fig. 18에서 나타난 것과 같이 주입한 총 xylose양이 늘어날수록 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도가 줄어드는 것을 알 수 있다. 주입된 총당의 농도가 250 g/L, 400g/L까지와 그 이상의 구간의 3단계로 구분하여 분리하면 xylose 비소모속도는 각각 평균 0.70 g-xylose/g-cell · hr, 0.38 g-xylose/g-cell · hr, 0.15 g-xylose/g-cell · hr를 Xylitol 비생산속도는 0.55 g-xylitol/g-cell · hr, 0.27 g-xylitol/g-cell · hr, 0.045 g-xylitol/g-cell · hr를 나타내어 그 차이가 확실히 드러났다. 배지내 고농도의 당용액에 의한 점도상승으로 산소전달의 저해가 발생할 수 있으므로 이를 확인하기 위하여 600 및 700rpm으로 교반속도를 높였으나 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도의 값은 증가하지 않아 산소전달의 문제는 아니었음을 알 수 있었다.

그러나 교반속도를 증가시킨 경우 세포농도는 증가하고 자일리톨 생산 수율은 낮아져 산소에 의한 탄소흐름 제어는 당의 농도에 무관하게 일정함을 확인 할 수 있었다.

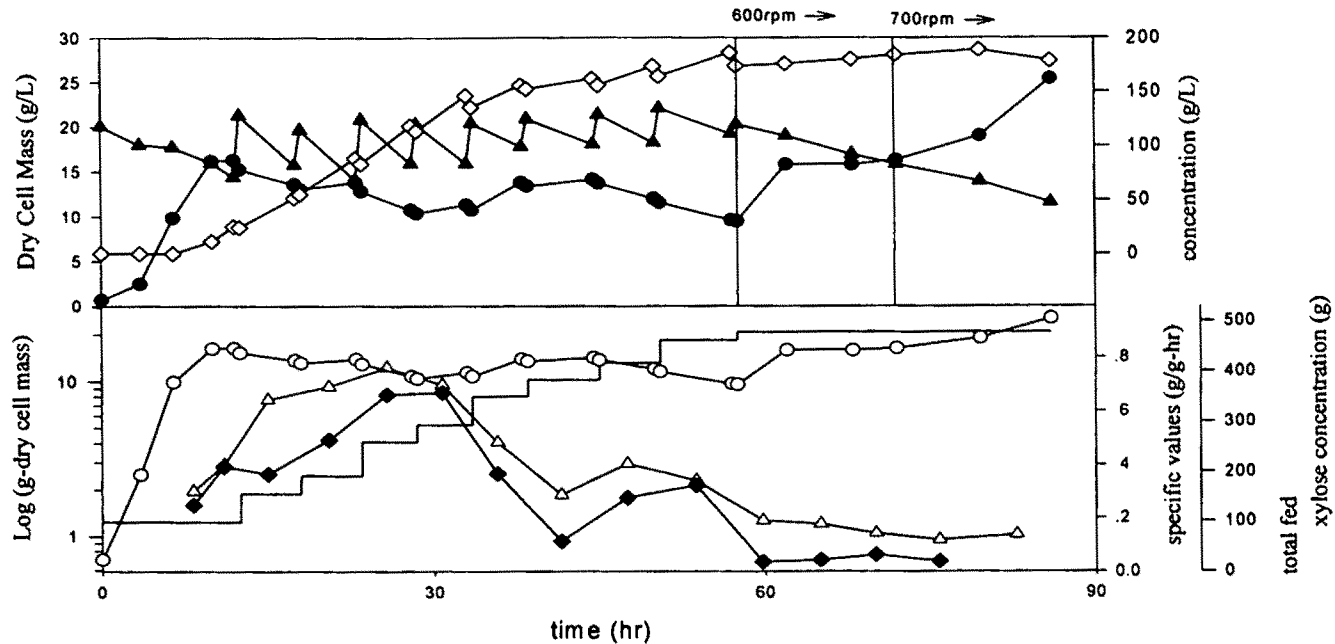


Fig. 18 Changes of xylose utilization and xylitol production with increasing the xylitol concentrations in the medium. Environmental conditions were pH6, 500rpm, 1vvm. 600g/L of xylose solution was fed to keep the xylose concentration between 120g/L and 80g/L. (● dry cell mass (g/L), ▲ xylose (g/L), ◇ xylitol (g/L), ○ Log (g-cell mass), ◆ specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell mass · hr), △ specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass · hr) ----- total fed xylose (g))

또한 xylitol 비생산속도가 떨어짐에 따라 생성되는 xylitol의 양에 비하여 xylose 용액의 주입으로 인한 회석효과가 커져 xylitol 농도의 증가도 감소하였다. 이러한 이유로 계속 xylose 용액을 주입하면 생산성은 감소하였다. 따라서 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도를 유지하고 xylose 용액에 의한 회석효과를 줄여 생산성을 유지할 수 있는 xylose 용액 주입 범위를 정하였다. 총 주입한 xylose 용액이 250g/L까지는 xylitol 생산속도를 유지하였고 이러한 경우 xylitol 수율은 평균 0.8 g-xylitol/g-xylose이므로 배지내 xylose와 xylitol의 농도의 합이 200g/L까지 xylose 용액을 주입하기로 하였다. 이러한 전략으로 600g/L의 xylose 용액을 이용하여 유가식 배양을 실시하였다. 초기 포도당을 이용하여 세포의 농도를 높이고 이후 초기 배지에 넣어준 100g/L의 xylose를 이용하여 xylitol을 생성하기 시작하여 배지내 xylose의 농도가 80g/L가 되면 xylose 용액을 주입하기 시작하였다. 배지내 xylose 용액이 80g/L이하로 떨어지지 않게 xylose 비소모속도를 기준으로 연속식 주입을 실시하고 배지내 생성된 xylitol의 농도와 남은 xylose 농도의 합이 200g/L에 이르면 xylose 용액의 주입을 정지하였다. 또한 공기주입량을 조절하여 xylose가 세포성장에 사용되는 것을 최대한 억제하였다. Fig. 19은 그 결과이다. $\log(\text{g-cell mass})$ graph의 기울기는 세포의 비성장속도를 나타내는 것으로 xylitol 생산과정에서는 비성장속도가 0.003 hr^{-1} 로 세포의 성장은 거의 없이 상태유지에만 그쳤음을 알 수 있다.

Xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도가 모두 끝까지 일정한 값을 유지하여 실험 목적을 달성하였다. 최종 xylitol 농도는 187g/L, 수율은 0.8g-xylitol/g-xylose, 생산성은 $3.82 \text{ g-xylitol/L} \cdot \text{hr}$ 로 유가식 배양의 목적을 달성할 수 있었다.

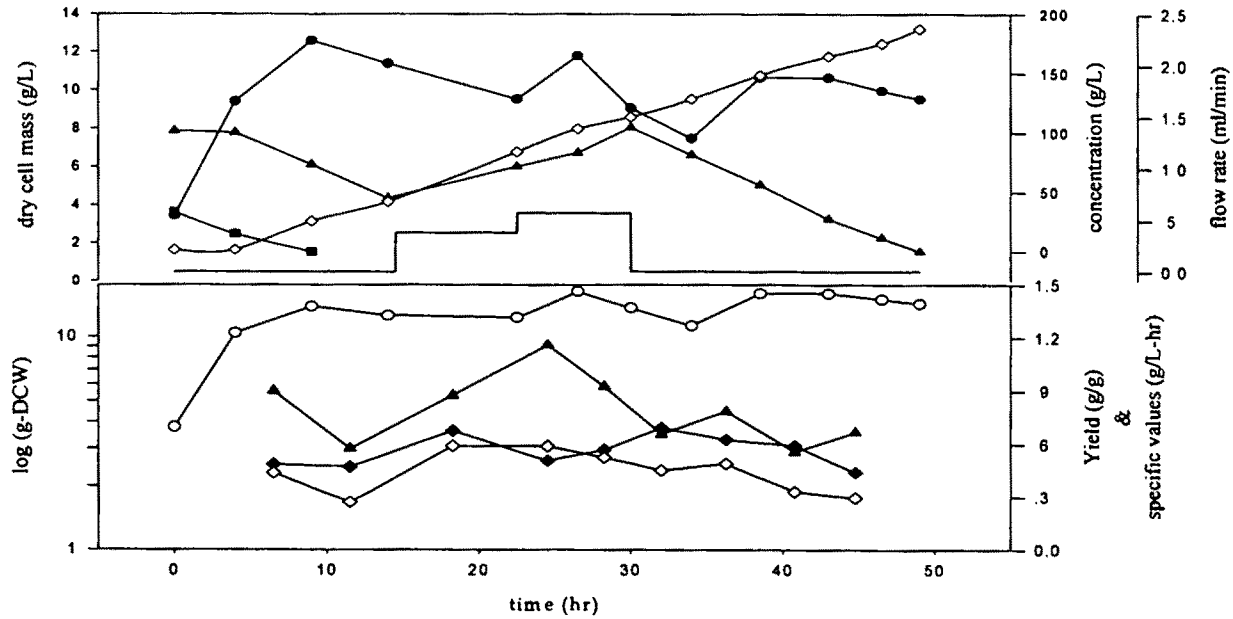


Fig. 19 Experimental results of fed batch culture with constant feeding. 600g/L xylose solution was fed by digital pump to keep xylose concentration in medium between 80~120g/L. (● dry cell mass (g/L), ■ glucose (g/L), ▲ xylose (g/L), ◇ xylitol (g/L), △ specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass · hr), ◆ specific xylitol production rate (g-xylitol/g-xell mass · hr), ▲ xylitol yield (g/g), ○ log (g-cell mass), — flow rate of feeding solution (ml/min))

다. 배지내 삼투압의 영향

배지내 xylitol 농도의 영향 뿐만 아니라 xylose의 농도가 주는 영향을 관찰하기 위하여 배지내 xylose 농도와 xylitol 농도를 달리하여 실험하였다. 배지내 xylose 농도를 30g/L와 120g/L로 하여 각각의 경우 xylitol 농도가 0, 30, 100, 200g/L일 경우 xylitol 생산에 미치는 영향을 알아 보았다. Fig.20은 그 결과로 세포의 비성장 속도는 모든 경우 $0.05\sim 0.03\text{hr}^{-1}$ 로 xylose bioconversion process를 따르는 조건으로 실험하였다. 배지내 xylose의 농도가 높은 경우와 낮은 경우 모두 xylitol의 농도가 증가하면 xylose 비소모 속도, xylitol 비생산속도, 수율 모두가 감소하였고 특히 다른 값들의 감소보다 xylitol 비생산속도의 감소가 두드러졌다. 수율의 감소현상은 osmotic stress에 의하여 세포의 maintenace energy 증가 및 xylitol 생산량의 감소로 해석할 수 있다.

같은 농도의 xylitol이 존재할 경우 xylitol 농도에 상관없이 xylose 농도가 높은 수록 xylose 소모 및 xylitol 생산속도가 높음을 알 수 있었다. 특히 수율 보다는 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도의 감소현상이 두드러진데 이는 osmotic stress가 전반적인 xylose 대사속도를 감소시키지만 세포내 xylose flux는 변화시키지 못하는 것으로 해석할 수 있다. 따라서 세포내 xylose flux를 제어하는 것은 현재까지 실험에서 밝혀진 바로는 산소공급량으로 생각되어진다. 배지내 xylose와 xylitol 농도의 합이 같은 경우라도 xylitol의 양이 많은 경우가 xylitol 생산의 저해가 더 심하였다. Xylose와 xylitol의 분자량은 각각 162와 160으로 같은 농도면 몰농도의 차이는 거의 나지 않는다. Xylose만 120g/L가 있는 경우는 xylose 비소모속도는 3배, xylitol 비생산속도는 4배가 xylose 30g/L와 xylitol이 100g/L가 있는 경우보다 높았다. 또한 120g/L의 xylose, 100g/L의 xylitol이 들은 경우는 30g/L xylose, 200g/L xylitol이 있는 경우보다 xylose 비소모속도가 3.4배, xylitol 비생산속도는 22배가 높은 값을 보였다.

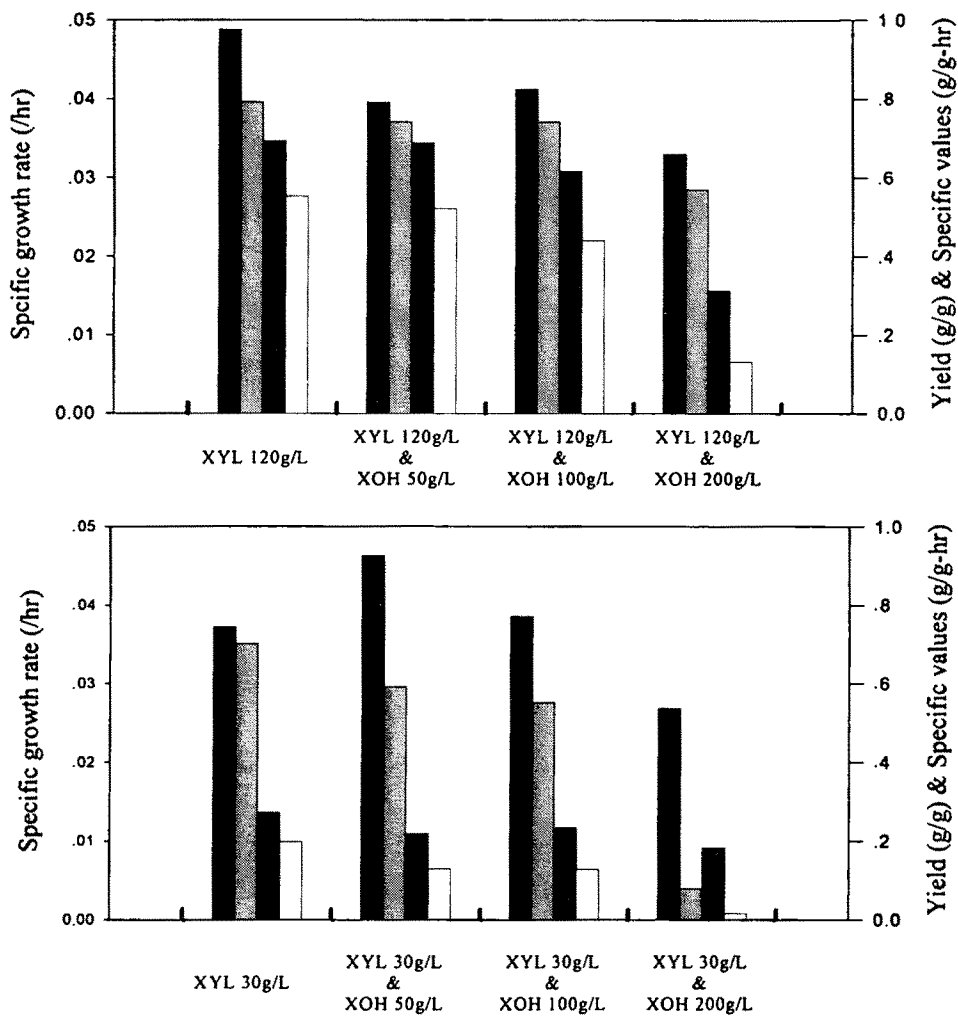


Fig. 20 Effects of osmotic stress by xylitol on xylitol production. A : Effects of xylitol at high xylose concentration, B : Effects of xylitol at low xylose concentration. (■ specific growth rate (/hr), ▨ xylitol yield (g/g), ■ specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass · hr), □ specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell mass · hr))

이러한 현상은 두가지로 해석이 가능하다. 첫째는 xylitol에 의한 세포의 대사 속도 저하가 xylose보다 심하다는 세포 특이성에 관한 해석이고 두번째는 총 당의 함량은 같아도 xylitol의 농도가 높고 xylose의 농도가 낮은 경우 세포내에서 축적된 xylitol이 세포밖으로 빠져나오는 것이 힘들어지게 된다. 따라서 xylitol 비생산성은 떨어지고 또한 세포내의 xylitol 양이 높아짐에 따라 xylose reductase의 평형이 치우쳐서 xylose의 uptake가 늦어지기 때문에 xylose 비소모속도가 늦어진다는 해석이 가능하다. 두가지 해석 중 어느 한가지만이 작용하거나 맞다고는 생각되어지지 않지만 더 실험을 하여야 정확한 원인을 알 수 있을 것이다.

이상에서 배지중 기질인 xylose와 생산물인 xylitol 농도의 총합을 일정하게 유지하여도 xylose의 농도가 낮고 xylitol의 농도가 증가함에 따라 xylitol 생산속도가 떨어짐을 알 수 있었다. 따라서 유가식 배양중 xylose의 농도는 xylose에 의한 osmotic stress를 받지 않는 범위안에서 높게 유지하는 것이 중요함을 알수 있었고 이에 회분식 배양에서 최적의 초기 xylose 농도로 판명된 100g/L를 이에 적용하기로 하였다.

라. Xylose 용액의 주입전략 결정

배지내의 xylose농도를 100g/L로 유지하기 위하여는 xylose 용액의 주입 속도를 조절하여야 한다. 유가식 배양의 기본 balance 식들을 이용하여 xylose 용액 주입식을 유도하였다.

주입식을 유도기 위한 가정은 다음과 같다.

(1) xylose 비소모속도(q_{S2}) , xylitol 비생산속도(q_{P2})는 상수이다.

$$\frac{1}{X_2} \frac{dS_2}{dt} = -q_{S_2} = \text{constant}$$

$$\frac{1}{X_2} \frac{dP_2}{dt} = q_{P_2} = \text{constant}$$

주입식은 xylos의 소모속도에 따라 주입량을 결정하여야 하므로 시료의 sampling 마다 xylose의 농도를 측정하여 각 구간별 xylose 비소모속도를 계산한다. 그리고 그 구간 안에서의 xylose 비소모속도는 상수로 정하여 다음 구간에서 그 값을 유지 할 것을 기대하고 주입식 계산에 이용한다. Fig. 18과 Fig. 19에서 나타난 것과 같이 기질과 생산물 농도의 합이 200g/L미만 일 경우는 회분식 배양에서와 같이 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도 값이 거의 일정한 상수 값을 가지므로 이러한 가정을 적용시킬 수 있다. 또한 기질과 산물 농도의 합이 200g/L를 넘어도 그 농도의 구간별로 일정한 값을 가지므로 이러한 가정으로 주입식을 결정하여도 무리는 없다.

(2) Xylitol 생산 구간 동안의 세포 비성장 속도는 상수이다.

$$\frac{1}{X_2} \frac{dX_2}{dt} = \mu = 0.01/hr$$

역시 Fig. 18과 Fig. 20에서 나타나고 xylose biconversion의 가정을 만족시키기 위하여 비성장속도는 매우 낮은 값을 가지고 그 값은 구간전반의 상수라 정의하여도 무방하다.

(3) 기질인 xylose와 생산물인 xylitol 농도의 합은 200g/L미만을 유지한다.

$$S_2 + P_2 < 200g/L$$

(4) 배지내 기질인 xylose의 농도는 100g/L로 일정하다.

$$\frac{dS_2}{dt} = 0$$

$$\therefore S_2 = 100\text{g/L}$$

앞에서 실험한 결과 그 이상의 농도를 유지할 경우 생산성이 떨어짐을 알았으므로 생산성 유지 측면에서 다음과 같은 제한을 정하였다.

기타 pump의 feeding 속도제한과 조업부피의 제한 등 기계적인 제한사항은 생략하였다.

이상의 가정 및 제한사항을 가지고 xylose 용액의 주입식을 결정하였다. 유가식 배양의 기본 물질 수지식은 다음과 같다.

$$\frac{d(VX_2)}{dt} = \mu \cdot V \cdot X_2 \quad (1)$$

$$\frac{d(VS_2)}{dt} = F \cdot S_{2\text{ feed}} - q_{S_2} \cdot V \cdot X_2 \quad (2)$$

$$\frac{d(VP_2)}{dt} = q_{P_2} \cdot V \cdot X_2 \quad (3)$$

$$\frac{dV}{dt} = F \quad (4)$$

이와 같은 수지식에서 위의 가정을 작용하면 수식 (1)에서 세포의 농도를 결정하는 식 (1)'이 유도되고 이를 바탕으로 기질의 변화를 나타내는 식 (2)에서 가정 (4)를 이용하여 xylose 용액의 주입식 (2)'을 구할 수 있다.

식(3)과 (4)에서 xylitol의 농도와 배지의 부피 변화를 나타내는 식 (3)'과 (4)'을 각각 구할 수 있다. Xylose 주입식 (2)'에서 S_{feed} , S , V_0 , X_0 , μ 가 모두 상수이므로 q_{S_2} 만 정하면 시간에 따른 xylose 주입량의 변화를 수식화할 수 있다.

$$V \cdot X = V_0 \cdot X_0 \cdot \exp(\mu \cdot t) \quad (1)'$$

Since S is constant, $\frac{dS}{dt} = 0$

$$\therefore \frac{d(VS)}{dt} = V \frac{dS}{dt} + S \frac{dV}{dt} = S \cdot F = S_f \cdot F - q_s \cdot V \cdot X$$

$$F = \frac{q_s}{(S_f - S)} V \cdot X = \frac{q_s}{(S_f - S)} V_0 \cdot X_0 \cdot \exp(\mu \cdot t) \quad (2)'$$

$$\begin{aligned} V &= \int F dt = \frac{q_s}{(S_{2f} - S_2)} \int (X_2 \cdot V) dt \\ &= \frac{q_s}{(S_{2f} - S_2) \cdot \mu} V_0 \cdot X_0 \cdot [\exp(\mu \cdot t) - 1] \end{aligned} \quad (3)$$

$$V \cdot P_2 = q_{p2} \cdot \int_0^t (V \cdot X_2) dt = \frac{V_0 \cdot X_0 \cdot q_{p2}}{\mu} \cdot [\exp(\mu \cdot t) - 1] \quad (4)$$

이상의 결과를 이용하여 바탕으로 유가식 배양을 실시하였다. Fig. 21은 유가식 배양의 결과를 나타낸다. Log (g-cell mass)에서 알 수 있듯이 xylose bioconversion의 비성장속도는 0.01 hr^{-1} 을 유지하게 산소공급량을 조절하였고 xylose의 양도 100 g/L 를 유지하게 feeding을 조절하였다. Xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도는 발효 마지막에 약간의 감소를 보였으나 그 외에는 거의 일정한 값을 유지하였다. 실험 결과 최종 xylitol 농도는 184 g/L , 수율은 $0.75 \text{ g-xylitol/g-xylose}$, 생산성은 $3.9 \text{ g-xylitol/L} \cdot \text{hr}$ 였다.

마. pH 조절 효과

고농도의 당을 이용하여 대사 중간산물인 당알코올을 생산하는 것은

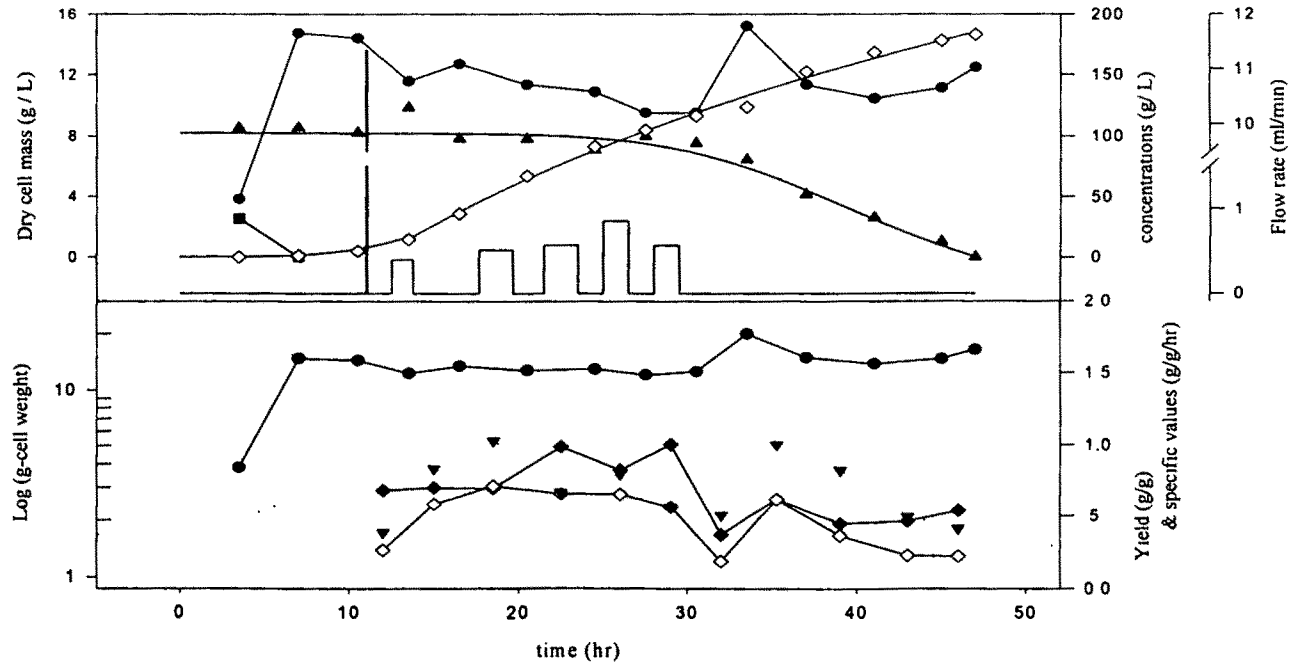


Fig. 21 Results of fed-batch fermentation controlled xylose concentration at 100g/L. Experimental conditions were 1L, pH 6, 1vvm and 500rpm. 700g/L xylose solution was fed by digital pump. (● dry cell mass (g/L), ■ glucose (g/L), ▲ xylose (g/L), ◇ xylitol (g/L), ○ log(g-cell mass), ◆ specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell mass · hr), △ specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass · hr), ▼ xylitol yield (g/g))

xylitol 이외에 erythritol이 있다(64). Erythritol을 생산하는 균주는 본 실험 균주와 같은 종인 *Candida* sp.이고 생산 조건이 400g/L sucrose의 고농도 당용액에서 발효를 한다. 즉 osmotic stress가 높은 상태에서 발효를 하는 것이다. 이러한 erythritol 발효에서 최적의 pH조건은 pH를 조절하지 않았을 때로 알려졌다(personal comunication). pH가 효모 발효의 최적 pH로 실험을 하였을 때보다 낮은 pH로 실험을 할 때가 생산성과 수율이 모두 월등히 우수하였다. 또한 낮은 pH로 초기부터 조절하는 것은 lag time이 길었으므로 초기 배지의 pH를 효모 최적의 pH로 맞추고 조업중 인위적으로 pH를 조절하지 않고 균주들이 스스로 배지의 pH를 낮춰 조업을 하는 것이 가장 좋은 조건임을 알 수 있었다. 따라서 배지중 xylitol양이 늘어가는 본 xylitol 생산의 유가식 배양에서도 xylitol에 의한 osmotic stress가 문제가 되므로 pH를 조절하지 않고 실험을 하여 보았다.

초기 세포 성장단계에서는 pH를 6으로 조절하고 이 후 xylose bioconversion 단계에서는 pH를 조절하지 않았다. pH는 xylitol이 생산됨에 따라 20시간동안 계속 감소하여 pH 3.8에 도달하였고 이 값을 계속 유지하였다(Fig. 22). Fig. 18의 pH를 조절하였을 때 xylitol에 의한 대사 저해정도를 알아보는 실험을 비교구로 설정하고 기질과 생산물 농도의 합이 200g/L가 넘어도 xylose 용액을 계속 주입하였다. 결과에서 pH를 조절하였을 경우보다 월등히 높은 값을 얻을 수 있었다. xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도가 배지내 xylitol 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보이는 점은 같았으나 수율이 더 높았다. 최종 xylitol 농도는 210g/L, 수율은 0.75g-xylitol/g-xylose, 생산성은 3.6g-xylitol/L·hr 였으나 발효 후반부에 수율과 생산성이 모두 떨어졌으므로 기질과 산물농도의 합을 200g/L로 인 xylitol농도 153.2g/L, xylose 농도 62.3g/L에서 xylose 용액의 공급을 중단하면 생산성은 4.6g-xylitol/L·hr 로 더 높은 값을 가질 수 있다.

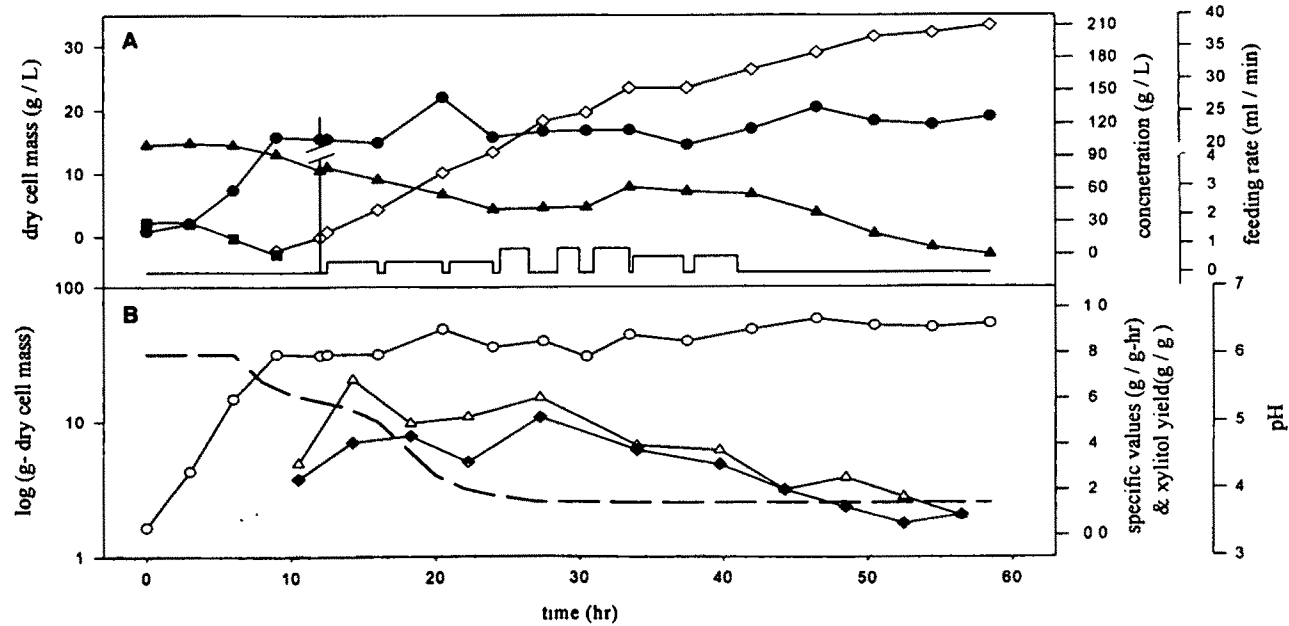


Fig. 22 Results of fed batch culture without pH control at optimized condition. Experimental conditions were 1L, pH 6, 1vvm and 500rpm. 700g/L xylose solution was fed by digital pump. (● dry cell mass (g/L), ■ glucose (g/L), ▲ xylose (g/L), ◇ xylitol (g/L), ○ log(g-cell mass), ◆ specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell mass · hr), △ specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass · hr), - - - pH)

5. scale-up 실험

가. 실험목적

Xylitol은 산업적으로 널리 쓰일 수 있는 제품이고 현재 화학적 방법으로 대량생산을 하고 있는 제품이다. 따라서 식품의 첨가물로서 산업적으로 생물공학적 방법으로 생산하기 위하여는 대량생산이 가능하여야 한다. 따라서 산업적 생산을 위한 목적으로 scale-up 실험을 수행하였다. Scale-up은 3.5L 발효기를 이용하여 조업부피 3L로의 1단계와 50L 발효기를 이용하여 조업부피 30L로 2단계 scale-up 실험을 수행하였다. 발효기의 부피와 baffle의 갯수, 크기가 바뀌면 통기량과 교반속도의 조건이 달라진다. 즉, 같은 양의 산소전달속도를 유지하기 위하여는 1L의 조건을 사용하면 맞지 않는다. 이러한 경우 1L 발효시의 세포의 성장속도와 xylitol 비생산속도, xylose 비소모속도를 기준으로 각각 환경이 바뀐 경우의 최적의 조건을 찾아가는 방법을 택하였다. 1L 수율과 생산성의 90%의 결과를 얻은 경우를 재현성있는 결과로 판단하고 그 이상의 실험은 진행하지 않았다. 환경이 바뀐 경우 평균 1번의 실험이 후 2번째 실험에서 1L 실험결과의 재현성 있는 값을 얻을 수 있었다.

나. 3L 실험

3L의 조업부피를 가지고 1L 실험의 결과를 재현하기 위한 실험을 수행하였다. 실험은 최적화된 조건에서의 two-substrate 실험, 유가식 실험을 수행하였다. Two-substrate 진탕배양에서는 2번째 실험에서 수율 0.71 g-xylitol/g-xylosed과 3.09 g-xylitol/L·hr의 생산성을 얻을 수 있었다. Xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도도 1L 실험결과를 재현하였다.

750g/L xylose 용액을 주입하여 실시한 유가식 배양은 기대한 값을 얻지 못하였다. 2번의 실험을 실시하였으나 첫번째 실험은 0.51g-xylitol/g-xylose의 수율, 2.28g-xylitol/L·hr의 생산성과 118.2 g/L의 최종 xylitol을 얻을 수 있었다. 2번째 실험에서도 0.52g-xylitol/g-xylose의 수율, 2.63g-xylitol/L·hrdml 생산성과 126.4 g/L의 최종 xylitol을 얻었다. 두 실험 모두 초기 xylose를 주입할 시에는 xylose 비소모속도와, xylitol 비생산속도를 유지하였으나 xylose 농축액의 주입을 끝내는 시점 이후에서 그 값의 급격한 감소를 보였다. 이는 배지중에 생산된 xylitol의 농도가 높아짐에 따라 배지중의 xylose와 같이 세포에 osmotic stress를 주기 때문인 것으로 생각되어진다. 최종 xylitol의 농도를 높이는 목적으로 수행되는 유가식 배양에서는 이러한 osmotic stress에 따른 세포의 대사 저해현상 및 대사 속도의 저하가 가장 큰 문제로 생각된다. 또한 대사의 속도가 저해되는 osmotic stress를 받는 상태에서는 발효기 내에 거품이 다량 발생하여 조업상의 문제로 들어났다. 거품의 발생은 단백질 성분이 배지 내에 다량 노출됨에 따라 발생하는 현상으로 생각된다. 단백질의 유래는 두가지로 생각할 수 있다. 하나는 외부의 osmotic stress에 견디지 못하는 세포가 lysis되어 세포내의 단백질이 대량 노출되는 경우이다. 두번째는 세포는 외부에서 stress가 오면 이에 반응하는 protein을 발현한다. 대표적인 것이 열에 반응하는 heat shock protein이 있다. 이러한 heat shock protein은 열에만 반응하는 것이 아닌 다량의 protein을 발현으로 세포에 부하가 걸릴 경우 도움을 주는 shaperon으로 또는 산소의 공급이 제한받았을 경우 발현되는 단백질의 일종으로 알려져 있다. 따라서 이와 같이 외부에서 osmotic pressure라는 stress가 걸렸을 경우에도 다량의 단백질이 발현 될 것이라고 생각 할 수 있다.

다. 30L 실험

50L 발효기를 이용하여 조업부피 30L로 scale-up 실험을 수행하였다. Fig. 23은 two-substrate 최분식 배양의 결과이다. 0.62g-xylitol/g-xylose의 수율과 3.18g-xylitol/L·hr의 생산성을 얻어 1L 실험의 80%이상의 결과를 얻었다. Fig. 24는 유가식 배양의 결과이다. 시작부피를 20L로 하여 700g/L xylose 용액 2.5L를 4번에 걸쳐 주입하였다. 준비된 digital pump의 용량의 한계로 배지중의 xylose 농도를 100g/L로 유지하기 위한 xylose 용액의 주입은 실시하지 못하였고 xylose 농도를 100g/L ± 30g/L로 유지하는 pulse feeding을 수행하였다. 산소의 공급량은 세포의 성장과 xylose 비소모속도를 기준으로 조절하였다. Fig. 24에 표시한 것처럼 유가식배양은 성공적으로 수행되었다. 3번째의 주입시 이미 배지내 xylose의 농도와 xylitol의 농도가 각각 96g/L, 163g/L로 유가식의 최적화에서 가정한 것과 같이 두 당 농도의 합이 200g/L를 넘어 더 이상의 주입을 중단하고 잔류 xylose를 xylitol로 전환시키는 공정으로 들어가는 것이 최적의 발효이다. 따라서 최적화된 30L 유가식 발효의 수율 및 생산성은 0.86 g-xylitol/g-xylose, 4.74 g-xylitol/L·hr이다. 이 후의 발효에서는 xylose 비소모속도와 xylitol 비생산속도의 급격한 감소를 보였다. 이는 다른 경우와 같이 osmotic stress에 의한 것으로 생각된다.

이상의 결과를 Table 3에 정리하였다. 1L 실험은 최적화된 조건에서 재현성 실험을 한 결과이고 1L 실험 중 simple batch culture는 two-substrate 유가식 배양의 control 실험으로 포도당을 넣지 않고 xylose만을 유일한 탄소원으로 하여 실험한 결과이다. %성취도는 1L 실험의 two-substrate 유가식 배양의 재현된 결과를 100으로 하여 상대적인 값을 표시한 결과이다.

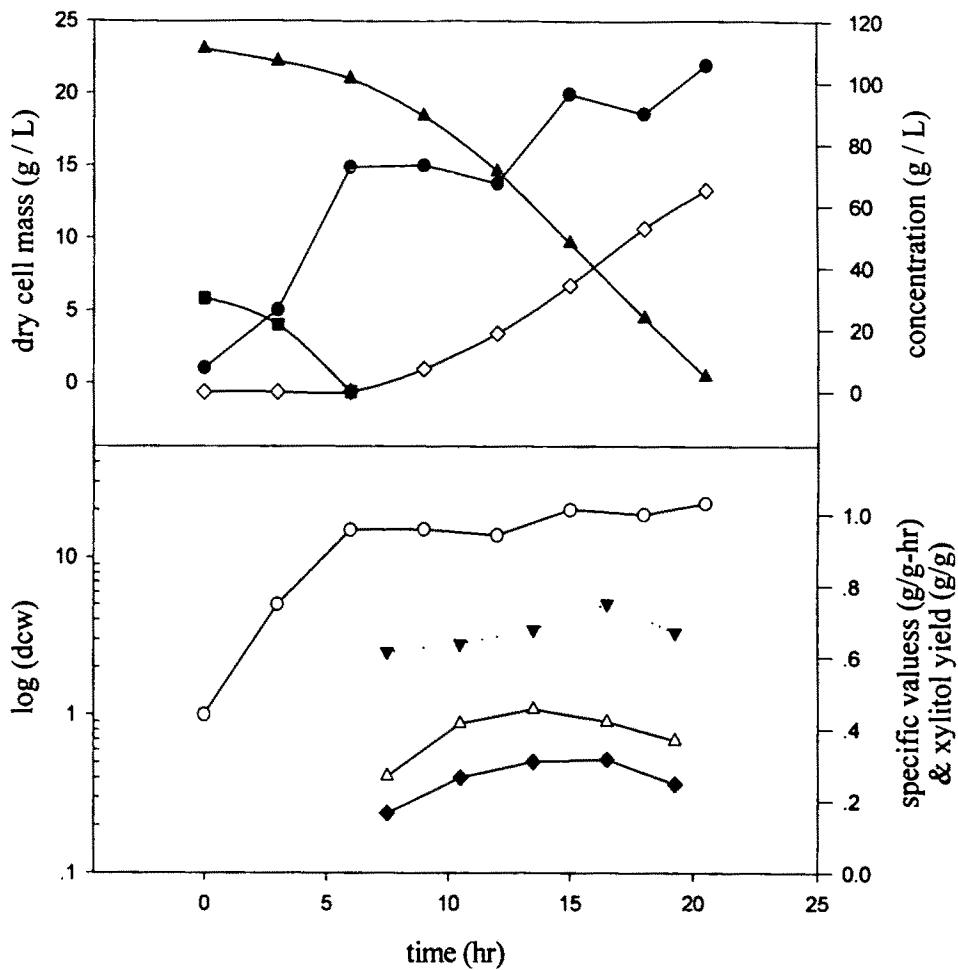


Fig 23. Results of 30L tow-substrate batch fermentation. (● dry cell mass (g/L), ■ glucose (g/L), ▲ xylose (g/L), ◇ xylitol (g/L), ○ log (g-dry cell mass), ◆ specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell mass • hr), △ specific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass • hr), ▼ xylitol yield (g/g))

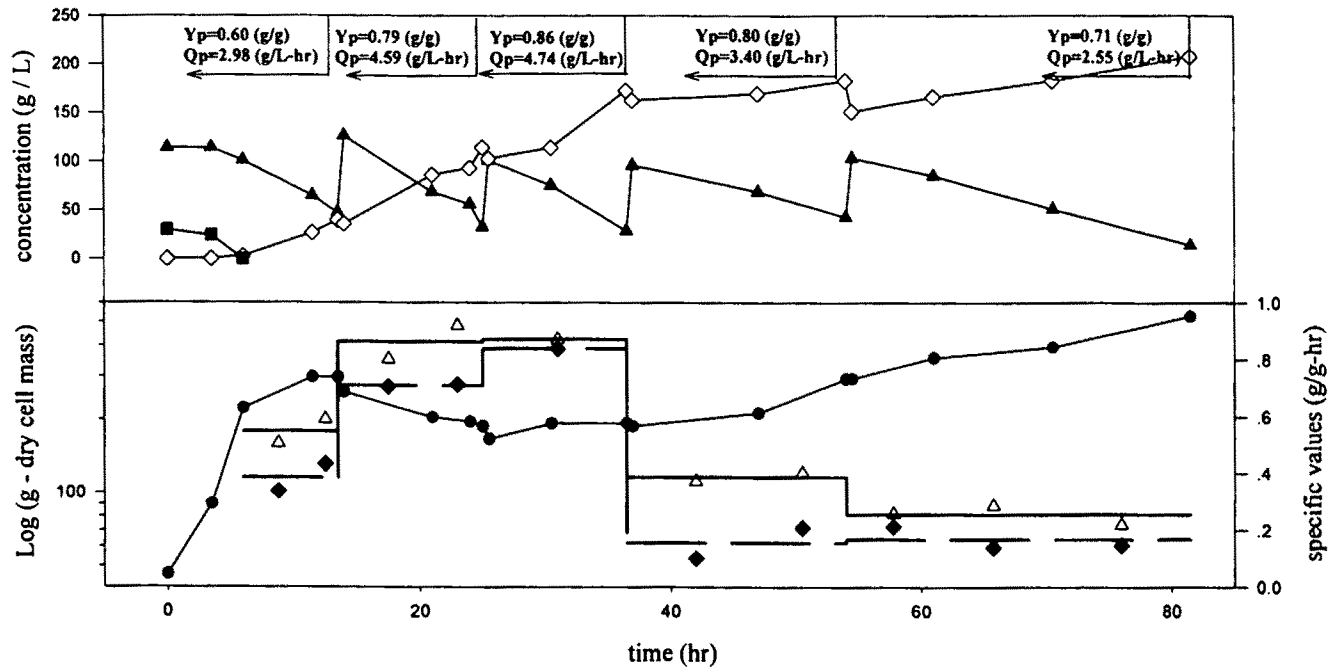


Fig 24 Results of 30L fed-batch fermentation Environmental conditions were pH 6, 0.5~0.83 vvm, 220~250rpm. 2.5L of 700g/L xylose solution was fed 4 times (◇ xylitol (g/L), ▲ xylose (g/L), ■ glucose (g/L), ● log (g-dry cell mass), solid line & △ sepcific xylose consumption rate (g-xylose/g-cell mass · hr), dash line & ◆ specific xylitol production rate (g-xylitol/g-cell mass · hr))

Table 3. Results of scale-up and reproducibility test

		Xylitol yield (g/g)	Volumetric productivity (g/L-hr)	Xylitol concentration (g/L)	% Reproducibility (Yield/productivity)
1L	Simple batch ²	0.58	3.33	60	73/97
	Batch(II)	0.79	3.44	79.1	100/100
	Fed-batch	0.75	3.90	184	95/113
3L	Batch(II)	0.71	3.09	74.1	90/90
	Fed-batch	0.51	2.28	118	65/67
30L	Batch(II)	0.62	3.18	65.3	79/92
	Fed-batch	0.86 ^a (0.71) s	4.74(2.55)	179(208)	109(90)/138(74)

제 4 절 참고문헌

1. Sadler, J. N. (1993) Bioconversion of forest and agricultural plant residues In *Biotechnology in Agriculture*, C.A.B. International, Wallingford, Vol. 9, 231-290
2. Gong, C. S., Claypool, T. A., McCracken, L. D., Maun, C. M., Ueng, P. p., and Tsao, G. T. (1983) Conversion of pentoses by yeasts. *Biotech Bioeng.*, **25**, 85-89
3. Oshini, H. and T. Suzuki (1966) The Production of Xylitol, L-Arabinitol and Ribitol by Yeasts. *Agr. Biol. Chem.* **30**, 1139-1144
4. Maleszka, R. and Schneider, H. (1982) Fermentation of D-xylose, Xylitol, and D-xylulose by Yeast. *Can. J. Microbiol.* **28**, 360-363
5. Barbosa, M. F. S., de Medeiros, M. B., de Mancilha, I. M., Schneider, H. and Lee, H. (1988) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol.* **3**, 241-251
6. Felipe, M. G. A., Vieira, D. C., Vitolo, M., Silva, S. S., Roberto, S. I. C. and Manchila, I. M. (1995) Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*, *J. Basic. Microbiol.* **35**,

171-177

7. Roberto, I. C., Mancilha, I. M., de Souza, C. A., Felipe, M. G. A., Sato, S. and de Castro, H. F. (1994) Evaluation of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate in the Production of Xylitol by *Candida guilliermondii*. *Biotech. Lett.* **16**, 1211-1216.
8. Meyrial, V., Delgenes, J. P., Moletta, R. and Navarro, J. M. (1991) Xylitol Production from D-xylose by *Candida guilliermondii* : Fermentaion Brhaviour. *Biotech. Lett.* **13**, 281-286
9. Silva, S. S., Ribeiro, J. D., Felipe, M. G. A and Vitolo, M. (1997) Miximizing the Xylitol Production from Sugar Cane Bagasse Hydrolyzate by Controlling the Aeration Rate. *Appl. Biochem. Biotech.* **63/65**. 557-563
10. Yahashi, Y., Horitsu, H., Kawai, K., Suzuki, T. and Takamizawa, K. (1996) Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis* : the effect of D-glucose feeding. *J. Fermen. Bioeng.* **81**, 148-152
11. Gong, C. S., L. F. Chen, and G. T. Tsao (1981) Quantitative Production of Xylitol form D-Xylose by High Xylitol Producing Yeast Mutant *Candida tropicalis* HXP2. *Biotechnol. Lett.* **3**, 130-135
12. Hiroyuki, H., Yuuichi, Y., Kazuhiro, T., Keiichi, K., Tohru, S. and

- Noriyasu, W. (1992) Production of Xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis* : Optimization of Production Rate. *Biotech.Bioeng.* **40**, 1085-1091
13. Kim S. Y., Kim, J. H. and Oh. D. K. (1997) Improvement of Xylitol Production by Controlling Oxygen supply in *Cnadida parapsilosis*. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 267-270
14. Vandeska, E., Amartey, S., Kuzmanova, S. and Jeffriws, T. W. (1996) Fed-Batch Culture for Xylitol Production by *Candida boidinii*. *Process Biochem.* **31**, 265-270
15. Vongsuvanlert, V. and Y. Tani (1989) Xylitol Production by a Methanol Yeast *Candida boidinii* (Kloekera sp.)No.2201. *J. Ferment. Bioeng.* **67**, 35-39
16. Kitpreechavanich, V., M. Hayash, N. Nishio, and S. Nagai (1984) Conversion of D-Xylose into Xylitol by Xylose Reductase from *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp. HU. *Biotechnol. Lett.* **6**, 651-656
17. Chung, I. S. and Y. Y. Lee (1986) Effect of Oxygen and Redox Potential on D-Xylose Fermentation by Non-growing Cells of *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 503-507
18. Batt, C. A., Carvallo, S., Easson, D. D., Akedo, M. and Singkey, A. J.

- (1986) Direct Evidence for Xylose Metabolic Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* **28**, 549-553
19. Hallbprn, J., Walfridsson, M., Airaksinen, U., Ojamo, H., Hahn-Hagerdahl, B., Penttila, M and Keranen, S. (1991) Xylitol Production by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio/Technol.* **9**, 1090-1096
206. Yoshitke, J., H. Ohiwa, M. Shomamura, and T. Imai (1973) Xylitol Production by an *Enterobacter Species*. *Agr. Biol. Chem.* **37**, 2261-2267
21. Yoshitake, J., H. Ohiwa, M. Shimamura, and T. Imai (1971) Production of Polyalcohol by a *Corynebacterium Species*. Part I. Production of Pentitol from Aldopentose. *Agr. Biol. Chem.* **35**, 905-911
22. Izumori, K. and K. Tuzaki (1988) Production of Xylitol from D-Xylose by *Mycobacterium smegmatis*. *J. Ferment. Technol.*, **66 (1)**, 33-36
23. Shamanna, D. K. and Sanderson, K. E. (1979) Uptake and Catabolism of D-xylose in *Salmonella typhimurium* LT2. *J. Bacterol.* **139**, 64-70
24. Suihko, M. L. and T. M. Enari (1981) The Production of Ethanol from D-Glucose and D-Xylose by Different *Fusarium* Strains, *Biotechnol. Lett.* **3**, 723-728

25. Dahiya, J. S. (1991) Xylitol production by *Petromyces albertensis* Grown on Medium containing D-xylose. *Can. J. Micoriol.*, **37**, 14-18
26. Bernd, N., Wilfried, N., Dietmar, H. and Klaus, D. K. (1996) Continuous Enzymatic Production of Xylitol with Simultaneous Coenzyme Generation in a Charged Membrane Reactor. *Biotech.Bioeng.* **52**, 387-396
27. Kruse, B. and Schugerl, K. (1996) Investigation of Ethanol Formation by *Pachysolen tannophilus* from Xylose and Glucose/Xylose Co-substrates. *Process Biochem.* **31**, 389-407
28. Jeffris, T. W., Fady, J. H. and Lightfoot, E. N. (1985) Effects of Glucose Supplements on the Fermentation of Xylose by *Pachysolen tannophilus*. *Biotech. Bioeng.* **27**, 171-176
29. Yuuichi, Y., Hiroyuki, H., Keiichi, K., Tohru, S. and Kazuhiro, T. (1996) Production of Xylitol from D-xylose by *Candida torpicalis* : the Effect of D-glucose feeding. *J. Ferment. Bioeng.* **81**, 148-152
30. Meinander, N. Q. and Hahn-Hagerdal, B. (1997) influence of Cosubstrate Concentration on Xylose Conversion by Recombinant, XYL1-Expressing *Sacchromyces cerevisiae* : a comparision of Different Sugar and Ethanol as Cosubstrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1959-1964

31. Yahashi, Y., Hatsu, M., Horitsu, H., Kawai, K., Suzuki, T. and Takamizawa, K. (1996) D-glucose feeding for Improvement of Xylitol Productivity from D-xylose Using *Candida tropicalis* Immobilized on a Non-Woven Fabric. *Biotech. Lett.* **18**, 1395-1400
32. Dias, M. L. (1987) Glucose and Polyol Transport System in *Candida intermedia* and their Regulation. *J. General. Microbiol.* **133**, 2737-2742
33. Kilian, S. G. and Uden, N. (1988) Transport of xylose and Glucose in the xylose-Fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **27**, 545-548
34. Does, A. L. and Bisson, L. F. (1989) Characterization of Xylose Uptake in the Yeasts *Pichia heedii* and *Pichia stipitis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 159-164
35. Lucas, C. and Uden, N. (1986) Transport of Hemicellulose monomers in the Xylose-Fermenting Yeast *Candida shehate*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 491-495
36. Panchal, C. J., Bast, L., Russell, I. and Stewart, G. G. (1988) Repression of Xylose Utilization by Glucose in Xylose-Fermenting Yeasts. *Can. J. Microbiol.* **34**, 1316-1320
37. Roberto, I. C., Sato, S., Manchila, I.M. and Taqueda, M. E. S. (1995)

- Influence of Media Composition on Xylitol Fermentation by *Candida guilliermondii* Using Response Surface Methodology. *Biotech. Lett.* **17**, 1223-1228
38. Lu, L., Tasi, L. B., Gong, C. S. and Taso, G. T. (1995) Effects of Nitrogen Sources on Xylitol Production from D-Xylose by *Candida* Sp. L-102. *Biotechnol. Lett.* **17**, 167-170
39. Chen, L. F. and Gong, C. S. (1985) Fermentation of Sugar Cane Bagasse hydrolyzate-acclimatized yeast. *J. Food Sci.* **50**, 226-228
40. Kastner, J. R., Roberts, R. S. and Jones, W. J. (1996) Effects of Xylitol on the Metabolism and Viability of *Candida Shehatae*. *Biotechnol. Lett.* **18**, 31-34
41. 김상용, 윤상현, 김정민, 오덕근, (1996) *Candida parapsilosis*에 의한 xylitol 발효시 acetic acid가 미치는 영향. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 756-761
42. Felipe, M. G. A., D. C. Vieira, M. Vitolo, S. S. Silva, I. C. Roberto, and I. Manchiha (1995) Effect of Acetic Acid on Xylose Fermentation to Xylitol by *Candida guilliermondii*. *J. Basic Microbiol.*, **35**, 171-177
43. Mahler, G. F. and Guebel, D. V. (1994) Influence of Magnesium concentration on Growth, Ethanol and Xylitol Production by *Pichia*

- stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnol. Lett.* **16**, 407-412
44. Lohmeier-Vogel, E. and Hahn-Hagerdal, B. (1985) The Utilization of Metabolic Inhibitors for Shifting Product Formation from Xylitol to Ethanol in Pentose Fermentation using *Candida tropicalis*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **21**, 167-172
45. Lee, H., Atkin, A. L., Barbosa, M. F. S., Dorshied, D. R. and Schneider, H. (1988) Effects of Biotin Limitation on the Conversion of Xylose to Ethanol and Xylitol by *Pachysolen tannophilus* and *Candida guilliermondii*. *Enzy. Microbiol. Technol.* **10**, 81-84
46. Cao, N. J., Tang, R., Gong, C. S. and Chen, L. F. (1994) The Effect of Cell Density on the Production of Xylitol from D-xylose by Yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **45/46**, 515-519
47. Nolleau, V., Preziosi-Belloy, L. and Navarro, J. M. (1995) The Reduction of Xylose to Xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis* : Incidence of Oxygen and pH. *Biotechnol. Lett.* **17**, 417-422
48. Ditzelmuller, G., C. P. Kubicek, W. Wöhrer, and M. Röhr (1984) Xylitol Dehydrogenase from *Pachysolen tannophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 195-198
49. Girio, F. M., Roseiro, J. C., Sa-Machado, P., Duarte-Rei, R. and

- Amaral-Collaco, M. T. (1994) Effect of Oxygen Transfer Rate on Levels of Key Enzymes of Xylose Metabolism in *Debaryomyces hansenii*. *Enz. Microb. Technol.* **16**, 1074-1078
50. 김상용, 윤상현, 김정민, 오덕근, (1996) *Candida parapsilosis* 돌연변이주에 의한 xylitol 생산시 배양조건의 최적화. *산업미생물학회지* **24**(4), 507-511
51. Win kelhausen, E., Pittman, P., Kuzmanova, S. and Jeffries, T. W. (1996) Xylitol Formation by *Candida boidinii* in Oxygen Limited Chemostat Culture. *Biotechnol. Lett.* **18**, 753-758
52. Furlan, S. A., Bouilloud, P., Strehaiano, P. and Riba, J. P. (1991) Study of Xylitol Formation from Xylose under Oxygen Limiting Conditions. *Biotechnol. Lett.* **13**, 203-206
53. Hinfray, C., Jouenne, T., Mignot, L. and Junter, G. A. (1995) Influence of the Oxygenation Level in the D-Xylose Fermentation by Free and Agar-Entrapped Cultures of *Candida shehatae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 682-687
54. Vandeska, E., Kuzmanova, S. and Jeffries, T. W. (1995) Xylitol Formation and Key Enzyme Activities in *Candida boidinii* under Different Oxygen Transfer Rates. *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 513-516
55. Bailey, J. E. and Ollis, D. F. (1986) *Biochemical Engineering*

Fundamentals 2nd ed., pp373-456, MacGraw-Hill, USA

56. Krallish, I., Jeppsson, H., Rapoport, A. and Hahn-Hagerdal, B. (1997) Effect of Xylitol and Trehalose on Dry Resistance of Yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 447-451

57. Walter, R. P., Morris, J. G. and Kell, D. B. (1987) The Role of Osmotic Stress and Water Activity in the Inhibition of the Growth, Glycolysis and Glucose Phosphotransferase System of *Clostridium pasteurianum*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 259-266

58. 김세용, 박성식, 전영중, 서진호 (1996) *Candida* sp.를 이용한 에리스리톨 발효특성의 해석. *한국식품과학회지*, **28**(5), 935-939

여 백

제 4 장 생물공학적 전환에 의한 Erythritol의 생산

제1절 서 설

Erythritol은 4탄당의 당알콜로서 4개의 탄소에 각각 1개씩의 hydroxyl group을 갖고 있으며 문헌상으로는 1874년에 최초로 발견되었다(1). Erythritol은 발효 식품, 동·식물 등 자연계에 폭넓게 존재하며 식물계에서는 지의류, 버섯류, 과일 등에 함유되어 있고 발효 식품으로는 포도주, 청주, 간장 등에 존재하며, 그 외에 포유동물의 체액에도 다량 존재한다. Erythritol의 생리화학적 특성을 살펴보면 우선 화학적으로 $C_4H_{10}O_4$ 의 화학 구조를 가지며 sorbitol, xylitol, glycerol과 같이 monosaccharide polyols로 분류된다. Erythritol은 또한 symmetrical molecule로서 오직 한가지 형태인 meso-form으로만 존재한다. 다른 당알콜의 물리·화학적인 특징과 같이 erythritol은 환원 말단기(reducing end group)가 없어서 열과 산에 탁월한 안정성을 갖고 있으며 설탕과 유사한 우수한 결정성과 90%인 상대습도 하에서도 수분을 흡수하지 않는 저 흡습성, 그리고 상대적으로 낮은 흡열량 등은 다른 당알콜과 구분되는 특성들이 있다(Table 1).

Erythritol은 당알콜 중 가장 분자량이 작은 물질로서 다른 당알콜과 구별되는 영양학적 특성을 갖고 있다. 즉 동물과 사람의 소화계에서의 흡수, 투과율이 우수한 장점을 갖고 있어서 건강 식품과 의약품 제조에 유리한 특징이 되고 있다. 실제 rat을 대상으로 한 실험에서 erythritol의 흡수 및 배

출에 대한 실험을 수행한 결과 erythritol은 소장에서 대부분이 빠르게 흡수되어 생체 내에서 대사되지 않고 오줌으로 배출되며 흡수되지 않은 부분은 대장에서 장내세균에 의해 발효되는 것으로 보고되고 있다(2). 이와 같이 erythritol은 난소화성 당류인 maltitol과 paratinit 등과는 달리 소장에서 대부분이 흡수되어 24시간 이내에 90%가 오줌으로 배설되기 때문에 다른 당알콜들의 과다 섭취시에 때때로 발생하는 설사 등의 부작용이 없다. 대장에 존재하는 약 6~10%의 erythritol은 장내 세균에 의하여 분해되어 휘발성의 지방산 또는 CO₂로 배설되고 변으로는 1% 이하가 배설된다. 장내에서 세균에 의하여 발효되어 대사에 이용되는 에너지는 0.2~0.3 Kcal/g 정도의 상대적으로 낮은 열량 등이 다른 당알콜과 구분되는 특성들이다. 즉 다른 당알콜의 7~13%와 설탕의 5% 수준의 열량값을 가진다. 더구나 다른 당알콜과 마찬가지로 erythritol은 혈장내 glucose 농도와 insulin의 적정수준에 영향을 미치지 않으므로 당뇨병 환자에게 안전한 단맛을 제공한다.

Table 1. Physicochemical Properties of Erythritol.

	Erythritol	Xylitol	Mannitol	Sorbitol	Maltitol	Lactitol
Carbon number	4	5	6	6	12	12
Molecular weight	122	152	182	182	344	344
Melting point(℃)	126	94	165	97	150	122
Heat of solution	- 23.3	-36.5	-28.5	-26	-18.9	-13.9
Heat stability(℃)	>160	>160	>160	>160	>160	>160
Raw material	Glucose	Xylose	Sucrose	Glucose	Maltose	Lactose
Calory (Kcal/g)	0.3	2.8	-	2.8	1.8	1.6
Relative sweetness (sucrose=100)	80	100	50	60	90	40

또한 구강내 충치의 원인균인 *Streptococcus mutans* 및 구강내 세균인 *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*들에 대한 erythritol의 이용성 조사 결과, erythritol은 충치 세균에 의해 불용성의 glucan 및 유산 등을 생성하는데 이용되지 않는 것으로 보고되었다(3).

Erythritol의 기능적 측면에서의 특성을 살펴보면 erythritol은 설탕의 70-80% 당도를 갖고 있으며 단맛이 설탕과 유사하고 뒷맛이 쓰지 않기 때문에 aspartame과 같은 감미료와 혼합 사용하여 감미도를 향상시키는데 이용될 수 있다. Erythritol은 결정이 물에 녹을 때 강한 흡열반응을 일으키므로 섭취시에 청량감과 산뜻한 단맛을 주는 장점 때문에 츄잉껌, 사탕, 크립 등의 제과류 제조 산업에 폭 넓게 응용될 수 있다. 또한 뛰어난 erythritol의 열 안정성은 170℃ 이상의 조건에서도 제품의 분해, 탈색을 막아 주는 역할을 하며, 요쿠르트 생산에서는 erythritol의 난 발효성 특성이 이용된다. Erythritol이 요쿠르트에 사용되는 경우 설탕을 사용할 경우에 비해 적정 pH로 추정되는 4.2로 도달하는데 긴 시간이 소요되고 보존중에 pH 저하를 억제하여 보존 기간을 연장시킬 수 있다. 또한 erythritol의 낮은 용해도는 우수한 결정 제품의 생산과 분말 제품의 다양한 응용을 가능케 하며 설탕의 우수한 결정성으로 인하여 기존의 설탕 수요를 대체할 수 있는 기능적인 특성이 된다(4).

이러한 erythritol의 시장동향을 보면 이미 일본의 Nikken 화학이 독자적으로 생산하고 있으며 미국과 유럽 업체도 대형 공장을 가동할 계획이다. 미국의 Nebraska 지역에 Cargill-Mitsubishi 합작회사가 설립한 erythritol 공장은 연간 20,000 metric tons 이상의 생산능력을 갖추고 1999년에 생산을 시작할 전망이다. 또한 Cerestar Holding B.V., Mitsubishi Chemical Co, 그리고 Nikken Chemicals Co. 등의 erythritol 제조회사협회가 제출한

GRAS(Generally Recognized As Safe) 승인신청서가 1997년 1월에 FDA의 승인을 받게되면서 erythritol은 미국의 식품 및 화장품 등의 산업에 이용될 수 있다. 일본에서는 1990년부터 식품의 첨가물로 이용하고 있으며 연간 약 1,000톤 정도를 생산하는데, 생산단가를 낮추어 경제성이 보완될 경우 생산량은 크게 증가될 것으로 전망된다. 최근 국내에서도 건강 감미료인 올리고당들에 못지 않게 좋은 물성 및 생리적 특성을 보이고 있어 대량 생산이 이루어질 경우에 대체 감미료로서 각광을 받을 것으로 예상된다. 그러나 국내에서는 아직도 다른 당알콜과 마찬가지로 erythritol 생산에 대한 연구보고 외에 산업화되고 있지 않으며 전량 수입에 의지하고 있는 실정이다.

Erythritol 생산을 위한 제조 방법에는 화학 합성법과 발효법이 있다. 화학 합성 방법으로는 Otey 등(5)이 니켈 촉매하에서 dialdehyde starch로부터 고온 화학반응에 의해 erythritol을 생산한 보고가 있다. 그 외 meso-tartrate의 환원에 의한 방법 등이 알려져 있다. 그러나 화학 합성법은 고가의 원료 물질과 합성 과정에서 생성되는 부산물의 제거가 어려우며, 낮은 수율 등의 문제점 때문에 산업화되지 못하였다. 따라서 발효법은 이러한 화학 합성법의 단점을 극복할 수 있는 방안으로서 비교적 많은 연구가 수행되어 왔다. 미생물 발효에 의한 erythritol의 생산에 대한 연구는 일찍부터 이루어져 왔다. 즉, Maria 등(6)은 lactic acid bacteria인 *Leuconostoc oenos*가 erythritol을 생산한다는 것을 발견하고 대사과정 및 erythritol 생성을 위한 조절기작 등을 연구하여 발표하였다. 또한 Ohnishi(7)는 156가지 효모 균주들의 당알콜 생성에 대한 연구를 통하여 *Pichia*, *Candida*, *Torulopsis* 등이 erythritol을 생산하는 균주로 보고하였다. 또한 Hajny 등(8)은 화분에서 분리한 yeast-like fungus를 사용하여 35.7%의 glucose 배지에서 발효를 통해 45.6%의 수율로 erythritol을 생산했다는 보고를 하였고, 그 후에 이 균주는 *Moniliella tomentosa* var. *pollinis*로 동정되었다. 이 균

주를 이용한 발효공정은 산업화를 위한 연구로 진행되었으나 glycerol과 ribitol 등의 부산물들이 많이 생성된다는 단점 때문에 성공하지 못했다. 그 후 Hattori 등(9)은 *n*-alkane을 기질로 이용하여 erythritol과 미량의 mannitol을 생산하는 *Candida zeylanoide*를 사용한 연구를 수행하였는데 산업화에는 실패하였다. 또한 Wako 등(10,11)은 고농도의 erythritol을 생산하는 균주를 탐색하는 과정에서 *Aureobasidium sp.* 라는 erythritol 생산 균주를 분리하였고 20% glucose 배지에서 약 43%의 수율로 erythritol을 생산한 연구결과를 발표하였다. 최근 Aoki 등(12)은 벌집에서 *Trichosporonoides sp.*라는 균주를 선별하여 40%의 수율로 erythritol을 생산한다고 발표하였다. 현재 산업적으로 이용되고 있는 균주는 일본의 日研化學에서 개발한 *Aureobasidium sp.*로 알려져 있는데 수율은 45% 이고, 생산성은 2.0 g/L-hr 정도의 수준인 것으로 보고되고 있다(13).

산업적인 erythritol 생산을 위하여 균주개량에 대한 연구도 활발히 진행 중이다. Erythritol 생산을 위한 변이균주의 선별방법은 자연계의 풀이나 벌집과 같은 삼투압이 높은 조건에서 생육하는 미생물들이 erythritol 생성에 유리한 균주로 선별되는 것처럼 삼투압 내성이 높은 균주일수록 erythritol 생성 능력이 우수한 균주라는 점을 이용하여 변이균주를 선별하는 것이 일반적이다. 국내에서의 erythritol 생산을 위한 균주개량에 대한 연구로는 *Trichosporonoides sp.*를 EMS 처리하여 당내성과 염내성이 뛰어난 균주를 분리한 경우가 보고되어 있다(13). 이 연구에서 glucose 내성 변이균주는 야생균주에 비해 생산성이 2.7배 증가한 것으로 밝혀졌다. 또한 Ishizuka 등(14)은 *Aureobasidium sp.*에 UV 조사와 NTG 처리를 연속적으로 사용하여 당내성이 높은 변이균주를 분리하였고, 이 mutant의 최대 erythritol 생산량이 50% 증가하였다고 보고하였다. Mutagen 처리에 의한 균주개량의 방법 외에 세포융합법이 시도되었다. Loray 등(15)은 산업용

에탄올 생산 균주인 *Saccharomyces cerevisiae*과 salt-tolerant yeast인 *Debaryomyces hansenii*의 세포융합을 통하여 고농도의 당이 함유된 배지에서 에탄올과 당알콜의 생성능력이 뛰어난 hybrids를 얻었다고 발표하였다.

일반적으로 당알콜 생산을 위한 중요한 발효조건으로 탄소원의 종류와 조성 및 삼투압 조건 등이 많이 연구되어 왔다(16,17). 최근에 와서 Hallsworth 등(18)은 배지내의 탄소원으로서 glycerol, glucose, trehalose, starch 등을 사용하여 탄소원의 종류와 농도가 당알콜 생산에 미치는 영향을 고찰하였고, 각 탄소원의 종류와 농도에 따라서 *M. anisooliae*, *P. farinosus*와 같은 fungi가 생산하는 당알콜의 종류와 농도가 다르다는 결과를 얻을 수 있었다. 또한 mannitol 생산에 이용되는 osmophilic yeast인 *Aureobasidium pullulans*를 사용하여 polyols 생성에 미치는 12종류의 탄소원에 대한 영향을 검토한 연구에서는 오직 sucrose를 비롯한 4종류의 탄소원만이 발효를 통하여 당알콜의 생산이 가능한 것으로 보고되었다(19). 그러나 erythritol 발효를 위해서는 기질로서 glucose를 제외한 다른 당들이 사용될 경우 발효 산물로서 ribitol과 같은 부산물이 생성된다는 단점이 있는 것으로 알려져 있으며 yeast의 glucose 대사경로(Fig. 1)에서 보듯이 erythritol은 주로 glucose가 pentose phosphate cycle을 거쳐 생성된 erythrose에 의해 생산된다. Aoki 등(12)은 당이 pentose phosphate pathway를 거쳐 erythrose-4-phosphate로 전환되고 phosphatase와 erythrose dehydrogenase에 의해 erythritol이 생성되는 대사과정에서 glucose가 가장 빨리 대사과정에 이용됨을 고찰하였다. 또한 벌집에서 분리한 *Trichosporonoides sp.*를 사용한 실험을 통하여 glucose와 sucrose에 의한 erythritol의 발효 경향을 비교 연구하였는데 수율과 당의 소모속도에서 glucose가 우수함을 발표하였다.

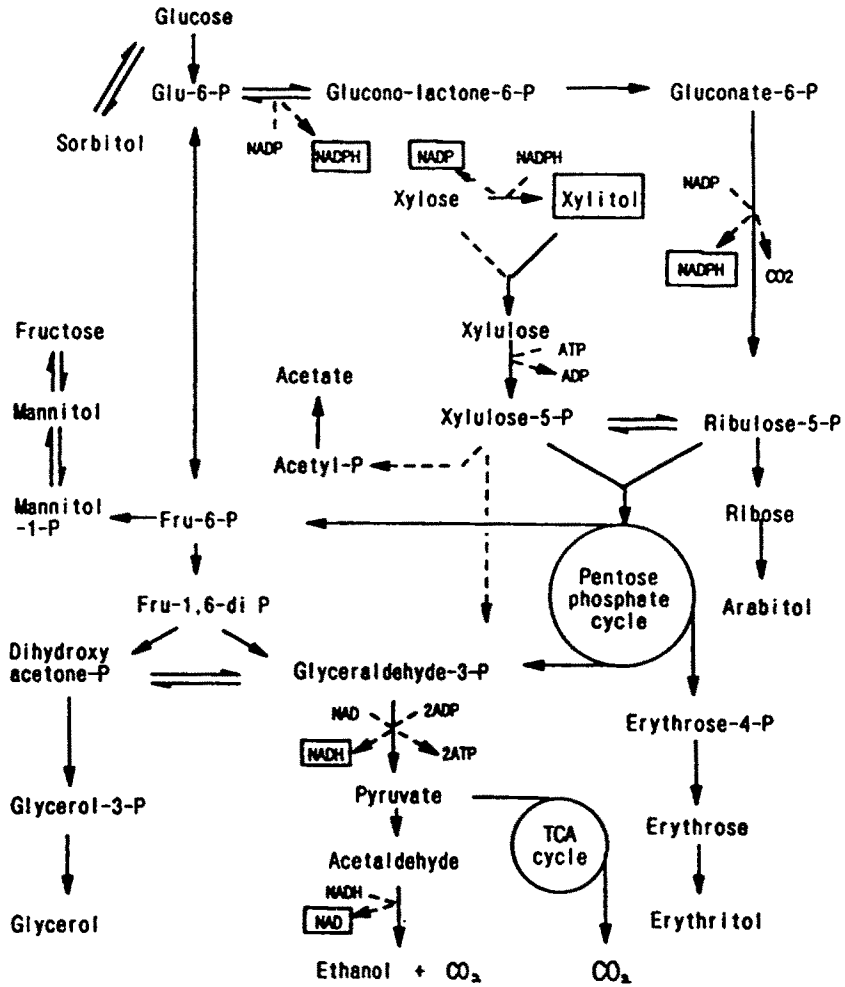


Fig. 1. Metabolic pathway of D-glucose to erythritol by yeast.

미생물 발효를 통한 대사산물의 생산에서 대사산물을 과량으로 얻기 위해 미생물의 성장을 제한하는 것이 요구되는데 일반적으로 erythritol을 포함한 당알콜 발효 배지는 질소원에 비해 탄소원의 농도가 높은 특성을 가지고 있다. 그 결과 질소원의 고갈에 의한 성장 제한이 일어나는데 이때 당알콜의 분비가 촉진된다고 알려져 있다(20). 또한 Pfyffer 등(21)은 non-entomopathogenic fungi를 이용한 실험에서 질소원 고갈로 인한 성장 제한(nitrogen-substrate limitation)이 균체내의 당알콜 축적을 증가시킨다는 연구결과를 발표하였다. 따라서 당알콜 생산을 위한 배지의 C/N ratio는 일반적인 발효 배지의 C/N ratio 보다 높은 특성을 가지며 당알콜 생산에 이용되는 균주의 종류에 따라 각각의 발효배지는 적정 수준의 C/N ratio를 요구하고 있다. 즉 C/N ratio가 필요 이상으로 클 경우 당의 소모속도가 저하되고 다량의 부산물이 생성되는 반면 작을 경우 세포농도가 증가하여 erythritol의 수율이 떨어지는 단점이 있다(13).

삼투압이 높은 조건에서 미생물에 의한 당알콜의 생산에 대한 연구가 많이 진행되어 왔는데, 이는 미생물이 생산하는 당알콜이 삼투압이 높은 조건에서 삼투압 조절물질(compatible solute)로서 생성되어 미생물의 생육을 가능케 하기 때문이다(22). 이러한 이유 때문에 당알콜의 생산에 삼투압 내성이 큰 미생물을 사용하는 경우가 많은데 특별히 내 삼투압성 미생물의 경우 NaCl 이나 KCl 등의 염의 첨가에 의한 삼투압의 증가로 당알콜류의 생산이 크게 증가된다는 많은 보고가 있다(23,24). 즉 Beaver 등(25)은 filamentous fungi인 *Aspergillus nidulans*의 배양배지에 NaCl, KCl, glucose 등을 사용하여 삼투압을 높게 조정하여 배양한 후에 세포 내에 축적된 당알콜의 조성을 연구하였다. 그 결과 glycerol을 비롯한 erythritol이 osmoregulatory solute로 생성됨을 보고하였다. 또한 Hallsworth 등(26)은 *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* 같은 entomopathogenic fungi를 사용하

여 배지 내에 KCl이 존재할 때 당알콜로서 mannitol과 소량의 arabitol, erythritol이 축적되며 배지내 수분활성도(a_w)를 0.998에서 0.950으로 낮출 경우 총 당알콜의 생성량이 증가하는 양상을 밝혀 냈다. 이러한 보고는 yeast-like fungi 에서도 마찬가지이다. Luxo 등(27)은 NaCl에 의한 water-stress가 주어질 때 *Geotrichum* 과 *Endomyces* 속 미생물의 반응을 고찰하는 실험을 수행하였다. 그 중 *Endomyces* 속의 yeast-like fungi의 경우 NaCl이 없는 배지에서는 삼투 조절물질로서 mannitol을 더 많이 생성하였으나 water-stress가 주어질 경우 더 많은 arabitol이 생성된다고 보고하였는데, 이는 염과 당에 의한 water-stress가 미생물에 가해질 경우 축적되는 당알콜의 농도가 증가하며 생성되는 당알콜의 종류도 변할 수 있다는 점을 확인하는 연구 결과이다. 이와 같은 양상은 yeast에서도 유사하다. Reed 등(28)은 NaCl에 의하여 stress를 받은 *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces rouxii*가 exponential growth phase에 삼투 조절물질로서 glycerol을 생성함을 확인하였고, 당알콜을 과량으로 생성하는 원인이 NaCl 첨가에 의한 삼투압 증가 때문이라는 것을 밝혀 냈다. 특별히 salt-tolerant yeast로 알려진 *Debaryomyces hansenii*에 관한 연구에서는 salt stress에 의한 삼투압 조절기작이 exponential phase에선 glycerol로 이루어지고 stationary phase에선 arabitol로 조절된다는 것이 확인되었으며 외부 염농도의 상승에 따라 세포내 glycerol의 내부 농도가 더 큰 비율로 증가하는 염내성 mutant를 분리하였다고 보고하였다(29,30). 또한 glycerol의 산업적 생산을 위한 osmotolerant yeast인 *Hansenula anomala*(31)의 경우도 NaCl이나 glucose를 이용한 water-stress에 대한 반응으로 glycerol을 과량 생산하고 있다. 그러나 NaCl이나 glucose에 의해 삼투압이 증가될 때 specific growth rate는 감소하는 경향을 나타내지만 glycerol의 생산량이 증가하는 연구결과는 yeast에 의한 당알콜 생산에서 최적의 세포성장 보다 더

요구되는 것은 균주의 높은 삼투압 내성이라는 것을 보여준다(32). 또한 Nobre 등(33)은 염과 당 뿐만 아니라 polyethylene glycol(PEG)를 이용해서 삼투압을 높인 배지에서 *Debaryomyces hansenii*를 배양하여 glycerol과 arabitol을 얻을 수 있음을 보고하였다. 또한 erythritol과 mannitol이 탄소 원으로 사용된 배지에서 배양할 경우 외래 당알콜의 축적으로 인해 arabitol 축적은 억제되는 반면 erythritol의 축적은 exponential phase에 일어나는 것을 확인하였으며, erythritol은 1M의 NaCl 배지에서 glycerol의 축적을 억제하면서 최대 농도로 생산된다고 보고하였다. 이는 염을 사용한 삼투압 증가에 의한 erythritol의 효율적인 생성유도와 glycerol 축적을 대체할 수 있는 가능성을 보여주는 결과이다. 그러나 glucose와 NaCl로 삼투압을 높인 조건에서 31종류의 yeasts에 대한 발효를 조사한 Van Eck 등(34)의 연구 결과를 보면 같은 수분 활성도를 나타내더라도 NaCl 보다 glucose로 배지 내의 수분활성을 낮추었을 때에 훨씬 많은 양의 당알콜이 생산된다고 보고하였는데, 이는 osmophilic yeast가 염보다는 당에 대한 삼투압 내성이 크기 때문이다(35,36). 일반적으로 염과 당에 의한 삼투압의 증가로 과량의 당알콜 생산은 가능하며 어떤 방법이 효과적인가 하는 것은 생산하려는 당알콜의 종류와 이용하는 균주에 따라 다르다고 보고되어 있다.

발효를 통한 당알콜의 생산을 위한 발효 조건과 방법으로는 많은 연구가 이루어져 있지 않다. 당알콜 발효를 위한 최적온도와 pH 조건에 대한 연구는 Hallsworth 등(37)에 의해 연구되었으며 일반적으로 최대 세포성장을 위한 최적 조건이 당알콜의 생성을 위한 최적 조건과는 다르게 나타났다. 즉, erythritol 발효의 가장 중요한 발효조건인 통기조건은 최대의 호기조건을 유지해 주어야 한다고 알려져 있는데 aeration이 충분치 못할 경우 에탄올과 glycerol 같은 부산물이 생성되는 경향이 있다(38). 또한 당알콜 발효의 생산성을 높이기 위한 방법으로 two-stage (growth and production stage)

culture가 시도되고 있다. Kim 등(39)은 osmophilic yeast인 *Trigonopsis variabilis*가 KCl보다 glucose에 의해 발생하는 고삼투압 조건이 erythritol 생산에 더 유리하다는 것을 발견하고, 그 이유가 glucose 배지에서의 specific growth rate와 cell density가 더 높기 때문이란 점을 확인하였다. 그 후 cell density를 더 높이기 위해 저 농도의 glucose 배지에서 배양을 시작한 뒤 exponential phase 말기에 고농도의 당 용액을 첨가하여 삼투압을 높여 주는 two-stage culture를 통해 erythritol의 생산성을 2배 증가시켰다고 보고하였다. 최근에 Park 등(40)은 *Trichosporon* sp.를 이용하여 400 g/L의 glucose 농도에서 최대 47%의 에리스리톨의 수율을 얻을 수 있었다고 보고하였으며 glucose를 모두 소비한 이후에는 생성된 erythritol이나 glycerol을 이용하여 균체량은 계속적으로 증가하였다고 보고하였다.

본 연구에서는 높은 수율과 생산성으로 erythritol을 생산하기 위하여 본 연구팀에서 분리한 *Candida* sp. JH를 이용한 균주의 개발과 발효조건의 최적화 및 발효공정의 개발에 대한 연구를 수행하였다.

제 2절 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 시약 및 균주

배지 제조용의 일반 시약 및 erythritol, lyticase, 2-mercaptoethanol 등은 Sigma(U.S.A.)사 제품을 사용하였고 yeast extract, peptone, agar 등은 Difco(U.S.A.)사 제품을 이용하였다. 그 외의 모든 시약들은 특급 및 1급을 이용하였다. 본 연구에서 사용된 균주인 *Candida sp.* JH는 서울 대학교에서부터 분양 받아 이용하였다.

나. 배양배지 및 배양조건

접종용 균주의 배양은 Table 2의 배지 50 mL를 250 mL 삼각 flask에 넣고 멸균한 후에 접종하여 30°C 에서 48시간 200 rpm 으로 진탕 배양하여 사용하였다. 모든 flask 배양 및 fermenter 발효에서의 접종량은 5% (v/v)로 하였으며 erythritol의 생산을 위한 발효 배지는 Table 3의 배지를 사용하였다. 염을 사용한 높은 삼투압 조건에서의 실험을 위한 발효배지는 KCl을 Table 3의 배지에 첨가하여 제조하였으며, 진탕배양기에 의한 erythritol 발효는 발효배지 200 mL를 500 mL 삼각 baffled flask에 넣고 28°C에서 200 rpm으로 진탕배양하였다. 발효조를 이용한 erythritol 발효는 발효 배지 1.0 L를 2.5 L jar fermenter (KFC, Korea)에 넣고 멸균한 후에 28°C에서 500~800 rpm으로 교반하면서 실험을 수행하였다. 또한 야생균주와 변이균주 M26의 보관 및 계대배양 배지로는 Table 2 또는 Table 4의 배지를 사용하였다.

Table 2. The composition of medium for inoculum.

Compound	Composition (g/L)
D-Glucose	20
Yeast extract	10
Peptone	10

Table 3. The composition of fermentation medium.

Compound	Composition (g/L)
D-Glucose	100~300
Yeast extract	5
KH_2PO_4	5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.4

Table 4. The composition of medium for sub-culture of strains

Compound	Composition (g/L)
D-Glucose	300
Yeast extract	10
Peptone	10
Agar	20

2. 실험 방법

가. Erythritol 발효를 위한 배지 선정

Erythritol 생산을 위한 최적의 배지를 선정하기 위하여 기존 연구자들인 Aoki(12), 성(41), 한(42)이 실험한 배지들과 질소원을 변화시킨 배지를 대상으로 flask 배양을 통하여 최대 erythritol의 수율을 얻기 위한 배지선정에 대한 실험을 수행하였다.

나. Erythritol 발효의 특성

야생균주인 *Candida sp.* JH의 erythritol 생산능력 및 발효 경향을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. Table 3의 발효배지를 사용하여 flask 배양을 하였으며, 배양시간에 따라 발효액을 취하여 세포성장, glycerol, erythritol 생성 및 당의 소모 경향 등을 알아보았다.

다. 야생균주의 삼투압 내성 시험

염과 당에 대한 삼투압 내성을 갖는 변이균주의 선별을 위하여 야생균주의 생육이 불가능한 염(KCl)과 당(glucose)의 농도를 결정하는 실험을 수행하였다. 염에 대한 내성 실험을 위해 Table 5의 배지를 사용하였는데 KCl의 농도는 1.5M~2.5M로 하였고, 당에 대한 내성 실험을 위해서는 glucose의 농도가 400~700 g/L인 Table 6의 배지를 제조하여 이용하였다. 실험 방법은 야생균주를 각각의 agar plate에 peaking한 후에 colony의 형성 여부를 확인하여 선택 배지의 염과 당의 농도를 결정하였다.

Table 5. The composition of medium for salt tolerance test.

Compounds	Composition
D-Glucose	300 (g/L)
KCl	1.5~2.5 (M)
Yeast extract	10 (g/L)
Peptone	10 (g/L)
Agar	20 (g/L)

Table 6. The composition of medium for glucose tolerance test.

Compounds	Composition (g/L)
D-Glucose	400~700
Yeast extract	10
Agar	20

라. 변이유도 및 삼투압 내성 변이균주의 선별

야생균주의 변이유도를 위하여 먼저 spore를 *Candida* sp. JH의 spore를 형성시켰다. 균주를 YPD 배지(Table 2)에 접종하여 36시간 배양한 후 prespore agar plate (Table 7)에 도말하여 colony를 얻었다. 이를 다시 spore 형성배지 (Table 8)에 도말하고 30℃ 배양기에서 4일간 배양한 후 4℃ 냉장고에 한달 가량 보관하였다. 변이유도 방법은 본 실험실에서 사용하는 방법(43,44)으로 수행하였다. 우선 한 달간 보관한 spore 형성배지

plate에서 세포 및 spores를 멸균 증류수로 수집하여 10 mM 2-mercapto ethanol에서 30분간 처리하였다. 그 후 0.5 mg/mL lyticase (100,000 unit) 현탁액에서 4시간 동안 반응시켜 vegetable cell을 제거하고 spore 만을 선별하였다. 여기에 0.8% ethylmethane sulfonate (EMS)를 30분간 처리하여 변이를 유도하고 5% sodium thiosulfate를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 이 spore 현탁액을 적정 배수로 희석한 후 mutant 선별 배지 (Table 9, Table 10)에 도말하여 30°C 배양기에서 7일간 배양하였다. Colony 성장이 우수한 균주를 1차로 선별하였으며, 선별된 colony를 대상으로 flask 배양에 의한 실험을 수행하여 erythritol의 생산능력이 우수한 변이균주를 선별하였다.

Table 7. The composition of prespore medium.

Compounds	Composition (g/L)
D-Glucose	100
Yeast extract	8
Peptone	3
Agar	20

Table 8. The composition of sporulation medium.

Compounds	Composition (g/L)
D-Glucose	1.0
Yeast extract	2.5
KCl	1.8
Sodium acetate	8.5
Agar	15.0

**Table 9. The composition of selection medium
for salt-tolerant mutant.**

Compounds	Composition (g/L)
D-Glucose	300
KCl	186.4
YNB (w/o amino acid)	0.7
Agar	20

**Table 10. The composition of selection medium
for sugar-tolerant mutant.**

Compounds	Composition (g/L)
D-Glucose	700
YNB (w/o amino acid)	0.7
Agar	20

마. 발효조건 최적화 연구

온도와 배지의 초기 pH, 배지내 염농도 및 통기조건, 초기 당농도, 무기염, yeast extract의 농도 등의 발효 조건을 최적화 하기 위하여 야생균주와 선별된 변이균주를 사용하여 실험을 수행하였다. Flask 배양을 통하여 온도(24~30℃), pH(5~8) 및 염농도(10~60 g/L)의 최적조건을 결정하였다. Fermenter를 이용한 발효실험으로 통기조건 및 교반과 배지내 초기 당농도(100~300 g/L) 및 yeast extract 농도(3~10 g/L)를 최적화 하는 실험을 수행하였다. 통기조건은 500 rpm의 교반에서 0.75~2.0 vvm, 교반은 1.0 vvm의 통기조건에서 400, 500, 600 rpm에서 erythritol 생산을 위한 통기 및 교반조건을 최적화 하였으며, 배지내 glucose의 농도는 100 g/L에서 300 g/L까지 변화를 주어 발효를 수행하였으며, yeast extract의 최적농도 결정은 250 g/L의 glucose 농도에서 실험을 수행한 후에 erythritol의 수율 및 생산성을 고찰하였다. 또한 100 g/L glucose의 발효 배지에서 배양을 시작하고 세포성장이 끝난 시점에 고농도의 당을 첨가하는 방법으로 Fed-batch culture 실험을 수행하였다.

3. 분석 방법

가. 당알콜 분석

Glycerol, erythritol의 정량·정성 분석은 NH₂ column (Shisheido, Japan)을 이용하여 HPLC (Waters, USA)에서 RI Detector로 측정하였다. 이때 용매는 물과 acetonitrile을 15 : 85로 혼합하여 사용하였으며 유속은 1.4 mL/min 이고 column의 온도는 40℃였다.

나. 당 정량

배지내 glucose 및 sucrose의 농도는 당알콜 분석과 같은 조건으로 HPLC를 사용하였다. 또한 HPLC로 정확한 glucose의 정량이 불가능한 경우 Glucose Analyzer (YSI, USA)를 사용하여 분석하였다.

다. 에탄올 정량

배지내 에탄올의 농도는 flame ionization detector를 이용하여 (Hitachi, Japan)로 측정하였다. 이때 사용한 column은 chromosorb W/AW에 20% cabowax 20M을 포화시킨 물질을 packaging한 stainless column을 이용하였다.

라. Cell mass 측정

세포 농도는 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu, Japan)를 사용하여 620 nm에서 optical density를 측정하였다.

균체량 측정은 spectrophotometer (UV-1201, Shimadzu, Japan)를 사용하여 620 nm에서 optical density를 측정하여 흡광도와 건조균체량(dry cell weight)의 표준곡선에 의하여 건조 균체량(Dry Cell Weight : g/L)으로 환산하였다. 이 때 표준곡선은 일정 농도 비율의 균체에 대한 흡광도를 측정 한 후 이 용액 5 mL를 0.2 μ m membrane filter로 여과한 다음 진공건조기(8 0°C의 50mmHg)에서 48시간 건조시켜 균체량을 측정하였다. 실험결과 *Candida* sp. JH 및 변이균주 M26의 optical density 1.0은 균체량 0.249 g/L 이었다.

제 3 절 연구 결과 및 고찰

1. 발효 배지의 선정

가. 탄소원의 영향

많은 발효에서 최종 생성물의 원가에 탄소원이 차지하는 비중이 매우 크다. 일반적으로 발효배지의 탄소원으로는 molasses가 많이 이용되므로 탄소원으로 glucose와 sucrose를 대상으로 하여 야생균주인 *Candida* sp. JH에 의한 erythritol 발효에 대한 실험을 수행하였다. 기존의 연구자들이 가장 많이 이용한 glucose와 sucrose 만을 대상으로 하였는데 50 g/L의 농도로 제조한 발효배지를 이용한 flask 배양에 의하여 실험을 하였고 당이 모두 소모될 때까지 배양한 실험결과를 Table 11에 나타내었다.

Table 11. Effect of carbon sources on erythritol production by *Candida* sp. JH.

Carbon Source	Glucose	Sucrose
Cell concentration (g/L)	23.4	21.2
Fermentation time (hr)	60	72
Erythritol (g/L)	7.2	6.1
Glycerol (g/L)	0.4	0.3
Erythritol yield (g/g)	0.14	0.12

실험결과에서 glucose가 erythritol 발효에 유리한 탄소원임을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 사용한 *Candida* sp. JH의 경우 비록 sucrose 발효에

서 단점으로 지적되어 온 ribitol 등과 같은 부산물이 생성되지 않았지만 당의 소모속도 및 erythritol의 수율에서 glucose가 sucrose 보다 우수한 탄소원임을 알 수 있었다(13,39). 또한 이러한 결과는 erythritol 생산을 위한 탄소원의 영향을 실험한 연구결과와 일치한다(12). 이는 pentose phosphate pathway에서 erythrose-4-phosphate가 생성되고 phosphatase와 erythrose dehydrogenase에 의해 erythritol이 생성되는 대사과정에서 glucose가 가장 빨리 대사에 이용되기 때문이다.

나. 발효 배지의 선정

Erythritol의 발효를 위한 *Candida* sp. JH의 최적 배지 선정을 위한 탄소원으로서 glucose를 결정하고 질소원의 영향에 대한 연구를 flask 배양에 의하여 수행하였다. 미생물이 이용하는 질소원의 종류에 따라 당알콜의 생합성 경로에 차이가 나서 생성되는 당알콜의 종류와 양이 달라지는 경우도 있기는 하나 대부분의 경우 질소원이 생합성 경로에 미치는 영향은 없는 것으로 보고되어 있다(45). 일반적으로 당알콜 생성에 가장 유리한 질소원은 yeast extract로 알려져 있는데 이를 기준으로 문헌 조사를 통하여 yeast extract가 포함된 배지(12,41,42)와 기존의 YPD 배지를 대상으로 발효실험을 수행하였다. 이때 각 배지의 비교를 위해 glucose의 농도를 100 g/L로 고정하였으며, Table 12에 사용한 배지의 조성을 나타내었다.

실험결과 Medium④를 제외한 ①,②,③의 배지에서 모두 72시간이 배양에서 당을 모두 소모하였다(Table 13). 세포농도는 Medium①이 가장 우수했으나 erythritol의 수율이 낮아서 세포성장과 당알콜의 생산조건은 서로 다르다는 점을 확인했다(37). 최대 erythritol 생산은 Fig. 2에 나타낸 것처럼 Medium②가 가장 우수한 것을 알 수 있었으며 발효 경과 시간도 제일 짧았다. 그러나 수율 면에서 Medium④가 우수하였으므로 높은 수율의 발

효배지를 선정하기 위하여 Medium②와 Medium④의 질소원과 염 등을 조정
 한 배지(Table 14)를 제조하여 실험을 수행하였다. 실험결과에서 4가지
 배지에서의 세포농도는 비슷하였으나 성(41)의 배지에서 peptone를 제거한
 medium⑤가 erythritol의 최대 생산량과 수율에서 우수하였다(Table 15,
 Fig. 3). 따라서 medium⑤를 erythritol의 발효배지로 선정하였다. 배지의
 성분중에 질소원의 농도가 낮은 경우에 당알콜의 생산이 우수한 것은 세포
 성장이 질소원의 고갈로 인해 제한을 받을 때에 당알콜의 생성이 유리하다
 는 연구결과와 일치한다(13,21).

Table 12. The composition of medium used.

Compounds	Medium① (g/L)	Medium② (g/L)	Medium③ (g/L)	Medium④ (g/L)
Yeast extract	10	5	10	5
Peptone	10	5		
KH ₂ PO ₄		5	15	
(NH ₄) ₂ PO ₄		2	2	
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.4	0.4	
Urea				1
Reference		(41)	(42)	(12)

Table 13. Effect of medium composition on the cell growth, erythritol production for 72 hr of culture.

	Medium①	Medium②	Medium③	Medium④
Cell concentration (g/L)	12.7	11.7	11.8	11.1
Erythritol (g/L)	7.5	10.6	10.0	9.7
Glucose (g/L)	0	0	0	14.9
Erythritol yield (g/g)	0.075	0.106	0.100	0.114

Table 14. The composition of modified medium for medium selection.

Compounds	Medium② (g/L)	Medium③ (g/L)	Medium④ (g/L)	Medium⑥ (g/L)
Yeast extract	5	5	5	5
Peptone	5			
KH ₂ PO ₄	5	5		5
(NH ₄) ₂ PO ₄	2	2		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4	0.4		0.4
Urea			1	1
Reference	(42)		(15)	

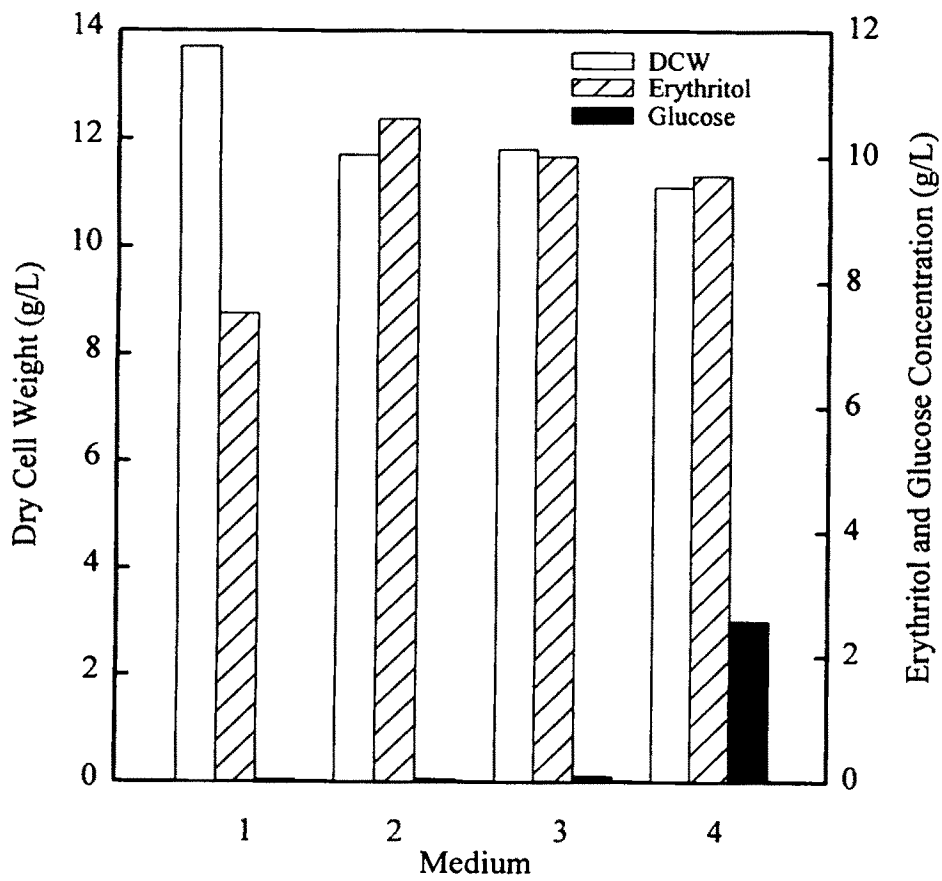


Fig. 2. Cell growth and erythritol production of various media for 75 hours culture.

**Table 15. Effect of medium composition on the cell growth,
erythritol production for 72 hr of culture.**

	Medium②	Medium⑤	Medium④	Medium⑥
Cell concentration (g/L)	32.4	35.8	33.4	31.6
Erythritol (g/L)	3.4	6.0	5.7	5.5
Glucose (g/L)	4.6	5.3	7.3	16.1
Erythritol yield (g/g)	0.034	0.063	0.061	0.065

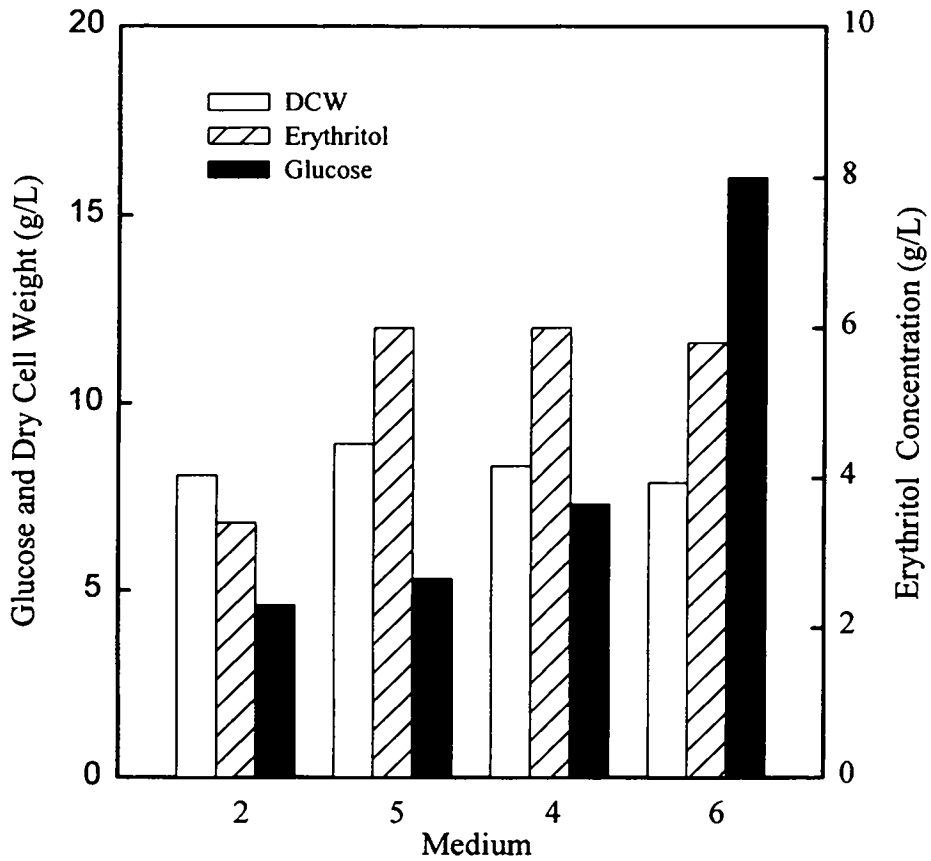


Fig. 3. Cell growth and erythritol production of various modified media for 75 hours culture.

2. 삼투압 내성 변이균주의 선별

일반적으로 당알콜의 생산에는 삼투압 내성을 가진 균주가 유리한 것으로 알려져 있다(8,12). 즉 삼투압 내성의 정도는 당알콜의 생성 능력과 비례하므로 삼투압 내성이 우수한 변이균주의 선별을 통하여 당알콜 생산에 이용하려는 시도가 많이 보고되어 있다(13,14). 따라서 높은 농도의 당 또는 염에서 생육이 우수한 변이균주의 선별에 대한 실험을 수행하였다.

가. 야생균주의 삼투압 내성

먼저 삼투압 내성이 높은 변이균주를 선별하기 위한 선별배지를 결정하였다. 즉 야생균주의 생육이 불가능한 염(KCl) 또는 당(glucose)의 농도를 찾기 위한 실험을 수행하였다. 염과 당의 농도를 다르게 한 Table 5 과 Table 6의 배지에서 *Candida* sp. JH의 생육 여부와 colony 성장속도 등을 관찰하였다(Table 16).

Table 16. Salts and sugar tolerance of *Candida* sp. JH.

Strain	KCl (M)			Glucose (g/L)		
	2.0	2.5	3.0	500	600	700
<i>Candida</i> sp. JH	+	±	-	++	+	-

(+: growth, -: no growth)

실험결과에서 glucose는 700 g/L (약 3.9 M)의 농도에서 생육이 불가능하였으며 KCl은 2.5 M에서 미약한 생육이 관찰되어 각각 내당성과 내염성의 변이균주를 선별하기 위한 선별농도로 결정하였다. 또한 사용 균주인 *Candida* sp. JH는 일반적인 다른 osmophilic yeast와 같이 염 보다 당에 대

한 내성이 더 뛰어났으며, 이는 배지내의 삼투압 조건을 높이는 시도를 통하여 높은 수율의 erythritol 생성을 유도하려는 실험을 할 경우 염보다 당을 사용하는 것이 유리하다는 점을 알 수 있었다(35,36).

나. 우수 삼투압 내성 변이균의 선별

본 실험에서는 Ryu 등(43,44)의 방법을 사용하여 돌연변이를 유도하여 변이균주 선별배지(Table 9, Table 10)에 도달하고 colony 생장이 우수한 균주를 1차로 선별하였다. 실험결과에서 고농도의 glucose 배지에서는 colony를 얻지 못하였다. 이는 선별배지의 glucose 농도가 너무 높게 설정되었거나 EMS에 의한 변이유도에서 당에 대한 내성이 우수한 변이균주가 유도되지 않았기 때문으로 추정된다. 그러나 고농도의 KCl 배지에서는 100 여개의 colony를 얻을 수 있었으며 생장이 우수한 colony 32개를 선별하여 100 g/L의 glucose 발효배지에서 erythritol 생성능력을 비교하는 실험을 수행하였다. 실험결과 120시간 발효에서 erythritol의 생성능력이 우수한 변이균를 선별한 결과 변이균주들의 발효속도는 비슷하나 erythritol의 생산능력에 차이가 있음을 알 수 있었다(Table 17, Fig. 4). 변이균주들 중에서 erythritol의 수율과 당의 소모속도에서 모두 우수한 변이균주 M26을 선별하였다.

Table 17. Cell growth, erythritol and glucose concentration by wild type and selected salt-tolerant mutants.

	Wild	M19	M26	M29	M32
Cell concentration (g/L)	11.8	12.5	14.7	11.4	13.1
Erythritol (g/L)	6.9	11.1	15.1	9.2	10.9
Glucose (g/L)	30.6	32.2	28.0	35.4	34.4
Erythritol yield (g/g)	0.10	0.16	0.21	0.14	0.17

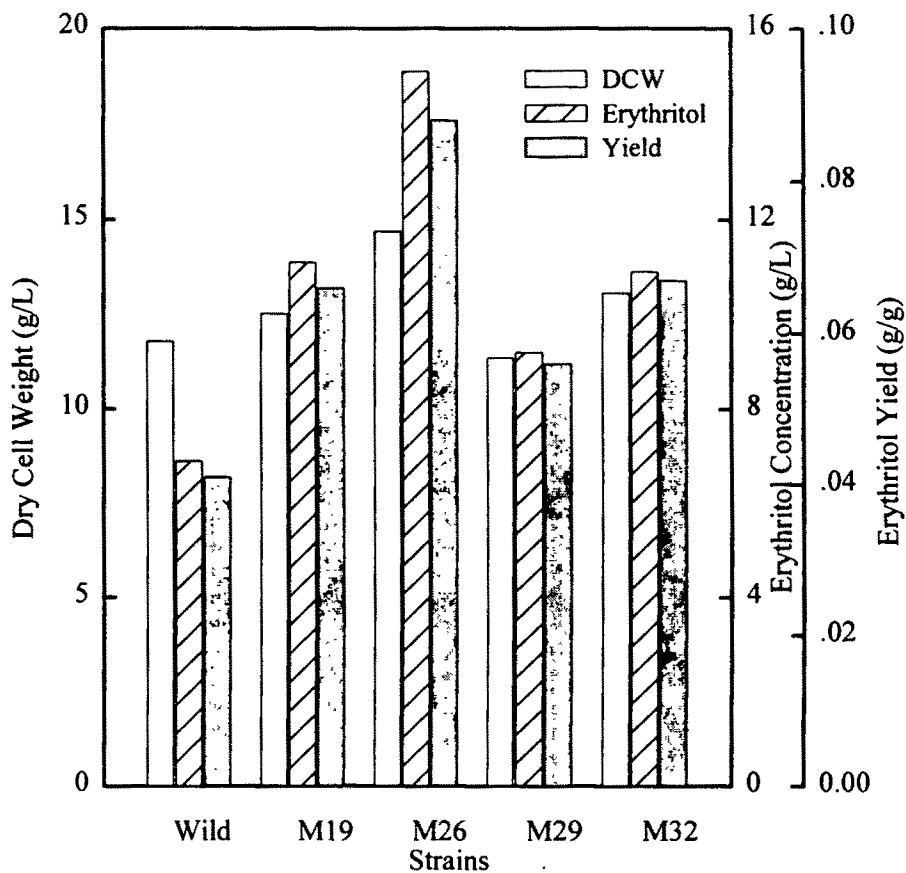


Fig. 4. Cell growth and erythritol production of wild and mutant strains in the medium containing 100 g/L glucose.

다. 야생균주와 변이균주 M26의 erythritol 발효 특성

선정한 배지에서 야생균주(*Candida* sp. JH)와 선별된 염내성 변이균주 M26의 발효특성을 알아보았다. 우선 100 g/L의 glucose 발효배지에서 실험을 수행하였는데 온도는 30℃, 배지의 초기 pH는 7.0으로 하였으며 baffled flask를 사용하였다.

야생균주의 실험결과 erythritol은 세포성장과 더불어 증가함을 알 수 있었으며 최대 erythritol의 생산은 glucose가 거의 소모된 84시간 배양에서 나타났다(Fig. 5). 그러나 84시간 이후에는 erythritol의 농도가 약간 감소하는 경향을 나타내었는데 이는 기질인 glucose가 다 소모된 후 erythritol을 기질로서 이용하기 때문으로 사료된다. 또한 최대 균체의 농도가 나타나는 시간에 최대의 erythritol 농도를 나타냈으므로 erythritol의 생산은 growth associated form인 것으로 관찰되었다. Erythritol 외에 다른 부산물로는 소량의 glycerol이 배양 초기에 생성되었으나 erythritol이 최대로 생성되는 84시간 이후에는 생성되지 않고 오히려 감소하였다. 이는 삼투압 조절기작이 세포성장 초기에 glycerol에 의해서 이뤄지고 중기와 후기에는 erythritol이 삼투압 조절물질로서 생산되기 때문인 것으로 생각된다. 이러한 경향은 exponential phase에는 glycerol이 생성되고 stationary phase에서는 arabitol이 생성되어 삼투압 조절기작이 이루어진 *Debaryomyces hansenii*의 발효실험 결과와 일치하는 것이다(29). 또한 소량의 glycerol이 생성되는 이유로서 *Candida* sp에서는 낮은 glycerol 농도에서도 glycerokinase와 glycerol phosphate-ubiquinone oxidoreductase가 유도되어 glycerol을 소모하기 때문으로 보고되어 있다(46). 야생균주를 사용한 발효 실험을 통하여 100 g/L의 glucose 발효 배지에서의 최대 erythritol의 생산량은 19.3 g/L임을 알 수 있었으며, 이때의 erythritol 수율은 20.3 % 이고 생산성은 0.23 g/L-hr 였다.

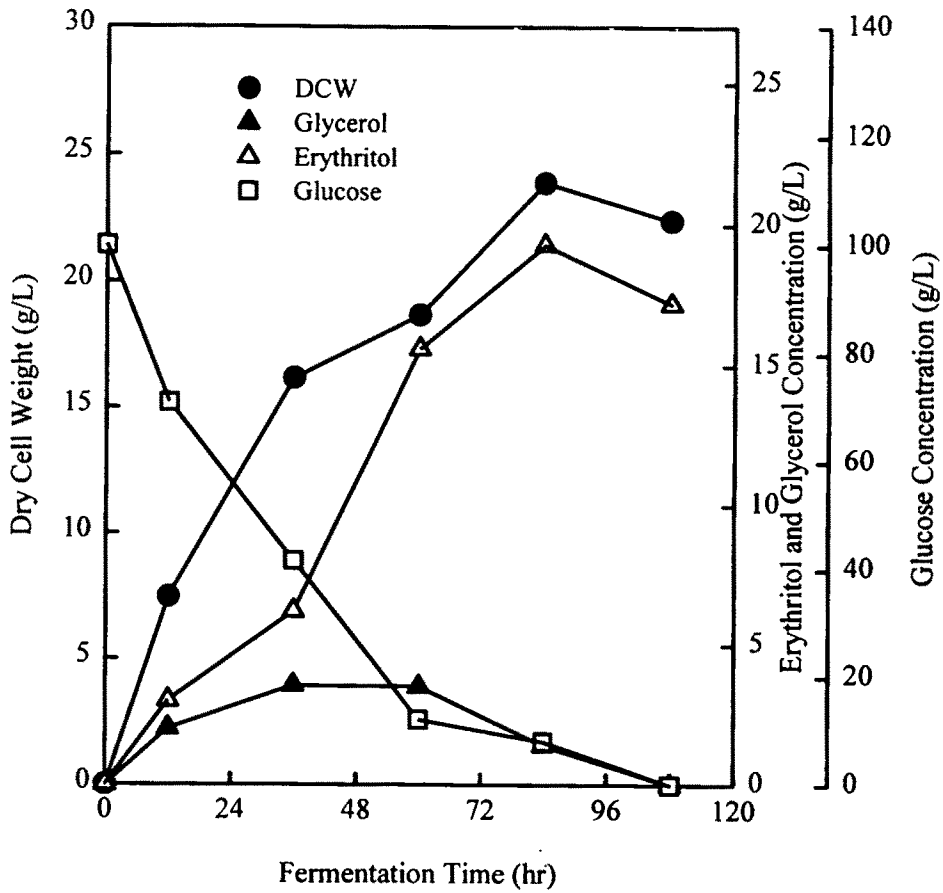


Fig. 5. Profiles of cell growth, erythritol, glycerol and glucose concentrations during the baffled flask culture of wild type.

염내성 변이균주인 M26의 경우 erythritol이 생산되는 발효 경향은 야생균주와 비슷하였다. 그러나 변이균주 M26은 발효속도 면에서 야생균주에 비하여 훨씬 우수하였는데 60시간 이후에 glucose가 모두 소모된 것을 관찰할 수 있다(Fig. 6). 또한 배양초기의 세포성장이 고농도 당에 의해 저해받지 않아 야생균주에 비해 높은 세포농도를 나타낸다. 이러한 결과는 모두 야생균주에 비해 변이균주가 삼투압 내성이 크기 때문에 더 높은 당농도에서는 발효속도가 더 큰 차이를 보일 것으로 판단된다. 더구나 변이균주 M26은 야생균주 보다 더 적은 량의 glycerol을 생산함을 알 수 있었으며, 이는 삼투압 조절기작이 erythritol에 의하여 전적으로 이뤄지고 있음을 보여준다. 변이균주 M26을 사용한 발효실험에서 최대 erythritol의 생산은 25.0 g/L이고 수율은 25 %로 나타났으며, 생산성은 0.30 g/L-hr로서 염내성 변이균주에 의하여 당알콜의 생산성을 높일 수 있음을 확인할 수 있었다.

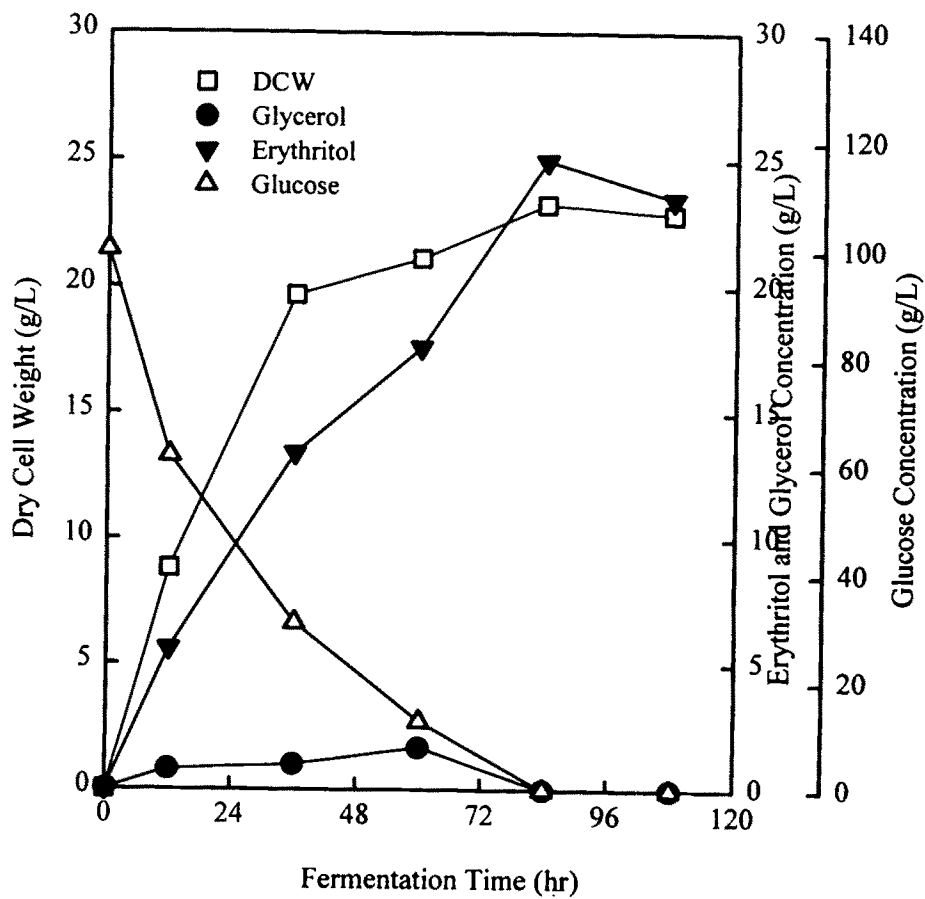


Fig. 6. Profiles of cell growth, erythritol, glycerol and glucose concentration during the baffled flask culture of mutant M26.

3. 변이균주의 erythritol 발효배지 최적화

가. 탄소원의 선정

본 연구에서는 변이균주 M26을 이용하여 농산 폐자원인 섬유성 물질과 식품산업의 부산물들의 주요 구성성분인 glucose, xylose, sucrose, fructose, galactose 등의 탄소원들에 대한 erythritol 발효를 수행하여 세포성장과 erythritol의 수율 및 생산성이 가장 우수한 탄소원을 선별하고자 하였다.

당 농도가 100 g/L인 Table 3의 발효배지 200 mL를 500 mL baffled \angle flask에 넣고 실험을 수행하였다. Glucose가 모두 소모되는 180 시간을 배양하여 세포농도와 erythritol 농도를 측정한 결과(Table 18)에서 세포농도는 sucrose 배지에서 18.6 g/L로 가장 높게 나타났으며, 다음으로 glucose, galactose, fructose 순으로 세포농도가 높게 나타났다. 한편 xylose는 탄소원으로 이용하지 못하였다. 반면 galactose는 세포성장에는 이용되었지만 erythritol로 전환되지는 못하였다. 따라서 erythritol의 생산은 glucose를 탄소원으로 이용했을 경우에 12.6 g/L로 가장 높았으며 fructose를 탄소원으로 이용하는 경우에는 세포성장이나 erythritol의 수율 및 생산성이 glucose와 sucrose 보다 낮았는데, 이와 같은 결과는 효모에 의한 erythritol의 생성이 주로 glucose가 pentose phosphate cycle을 거쳐 생성된 erythrose에 의하여 생성되기 때문이며, Aoki 등(12)이 벌집에서 분리한 *Trichosporonoides* sp.를 이용한 glucose와 sucrose의 erythritol 발효에서 glucose가 가장 빨리 대사에 이용된다는 보고와 일치하였다.

따라서 M26의 모 균주인 *Candida* sp. JH는 꿀에서 분리되었고 높은 삼투압에 내성인 효모균주들이 공통적으로 가지는 특성들을 지닌 균주로서 탄소원으로 glucose를 이용하였을 때 erythritol의 생성량이 가장 높았으므로 erythritol 생산을 위한 탄소원으로 glucose를 선정하였다.

Table 18. Effect of carbon sources on the production of erythritol by mutant M26.

Carbon source	DCW (g/L)	Erythritol (g/L)
Glucose	18.6	12.6
Sucrose	20.0	11.1
Fructose	16.7	5.1
Galactose	17.3	0
Xylose	0.4	0

나. Glucose 농도의 영향

고수율의 당알콜 생산을 위해 염이나 당에 의한 높은 삼투압 조건의 제공은 필수적으로 요구된다. 그런데 같은 수준의 삼투압이라도 염보다는 당을 이용하여 높여 준 배지에서의 발효가 더 효율적이라는 연구 보고가 있다 (41). 이는 일반적으로 osmophilic yeast가 염보다 당에 대한 내성이 커서 고농도 당의 배지에서의 specific growth rate와 cell density가 상대적으로 높기 때문인 것으로 밝혀졌다. 본 실험에서는 erythritol 생산에 미치는 배지의 초기 당 농도의 영향을 살펴보기 위하여 glucose의 농도 범위를 100~300 g/L로 해준 배지를 사용하여 baffled flask에서 야생균주와 변이균주 M26을 이용하여 발효실험을 수행한 후에 결과를 비교하였다.

야생균주를 이용한 발효에서 84시간 배양시의 erythritol 생산량을 비교해보면 비슷한 수준의 수율로 erythritol이 생성됨을 알 수 있는데 야생균주를 사용한 발효에서 배지의 당 농도는 erythritol의 수율에 아무런 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다(Table 19). 배지내의 잔류당의 양은 100 g/L의

glucose 배지에서는 84시간 이후에 당이 거의 다 소모되었으나 150 g/L 이상의 배지에서는 132시간이 지나도 소모되지 않고 반 이상이 남아 있었다.

변이균주 M26의 경우도 마찬가지였다. 배양 72시간에서 erythritol은 비슷한 수율로 생성되었으며 당 소모속도도 야생균주에 비해 빠르지 못했다 (Table 20). 이것은 flask 배양조건하에서는 glucose에 의한 높은 삼투압 조건이 높은 수율의 erythritol 생성을 가능하게 하지 못하는 것으로 추정된다. 그러나 변이균주 M26은 100 g/L 이상의 고농도 glucose 배지에서도 비슷한 수율로 발효가 이루어질 수 있는 삼투압 내성을 가진 균주인 것을 확인할 수 있었다.

일반적으로 당알콜 생산용 균주로서 이용되기 위해서는 높은 농도의 당이 함유된 배지에서 직접 발효가 가능해야 한다. 삼투압 내성이 우수한 것으로 입증된 변이균주 M26은 이러한 점에서 높은 수율의 erythritol 생산에 유리한 균주이며 높은 농도의 배지에서 발효가 가능할 것으로 예상되었다. 따라서 야생균주와 변이균주 M26을 이용하여 발효조(KFC)에서 100~300 g/L 범위의 glucose 배지를 사용하여 발효실험을 수행하였으며 각각의 경우에서 수율과 생산성을 검토하였다.

Table 19. Effect of glucose concentration on the production of erythritol by wild type.

Glucose Concentration (g/L)	DCW (g/L)	Erythritol (g/L)	Erythritol Yield (g/g)
100	16.3	21.6	0.240
150	16.2	21.6	0.243
200	14.8	22.1	0.227

Table 20. Effect of glucose concentration on the production of erythritol by mutant M26.

Glucose Concentration (g/L)	DCW (g/L)	Erythritol (g/L)	Erythritol Yield (g/g)
100	19.7	18.9	0.228
150	16.7	18.6	0.216
200	16.4	18.6	0.227
250	15.8	17.2	0.221

야생균주의 경우 100 g/L 이상의 glucose 배지에서는 erythritol의 수율이 비슷하였으나 당의 소비속도가 감소하여 생산성은 오히려 약간 떨어지는 결과가 나타났다. 그러나 변이균주 M26에서는 100 g/L glucose 이상의 당 농도에서 세포성장이 저해를 받지 않았으며 수율 및 생산성도 더 높게 나타났다. 또한 높은 농도의 당에서 야생균주와 변이균주 M26의 발효경향을 검토하기 위하여 200 g/L glucose 배지에서의 발효경향을 비교한 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 실험결과 야생균주인 경우 180시간 발효까지도 glucose가 모두 소모되지 못하였으며, 또한 erythritol의 생성도 매우 낮았다. 이는 야생균주의 경우 세포성장 및 erythritol 생성이 높은 당 농도의 삼투압에 의하여 억제되기 때문인 것으로 사료된다. 반면 염내성 변이균주인 M26은 160시간 발효에서 모든 당이 소모되었으며 erythritol은 180시간 발효에서 최대 87.2 g/L로 수율은 43.6% 였다. 따라서 변이균주 M26을 이용한 erythritol 발효에서 최적의 당 농도조건을 결정하기 위한 실험을 fermenter를 이용하여 수행하였으며 실험결과를 Table 21과 Fig. 8에 나타내었다.

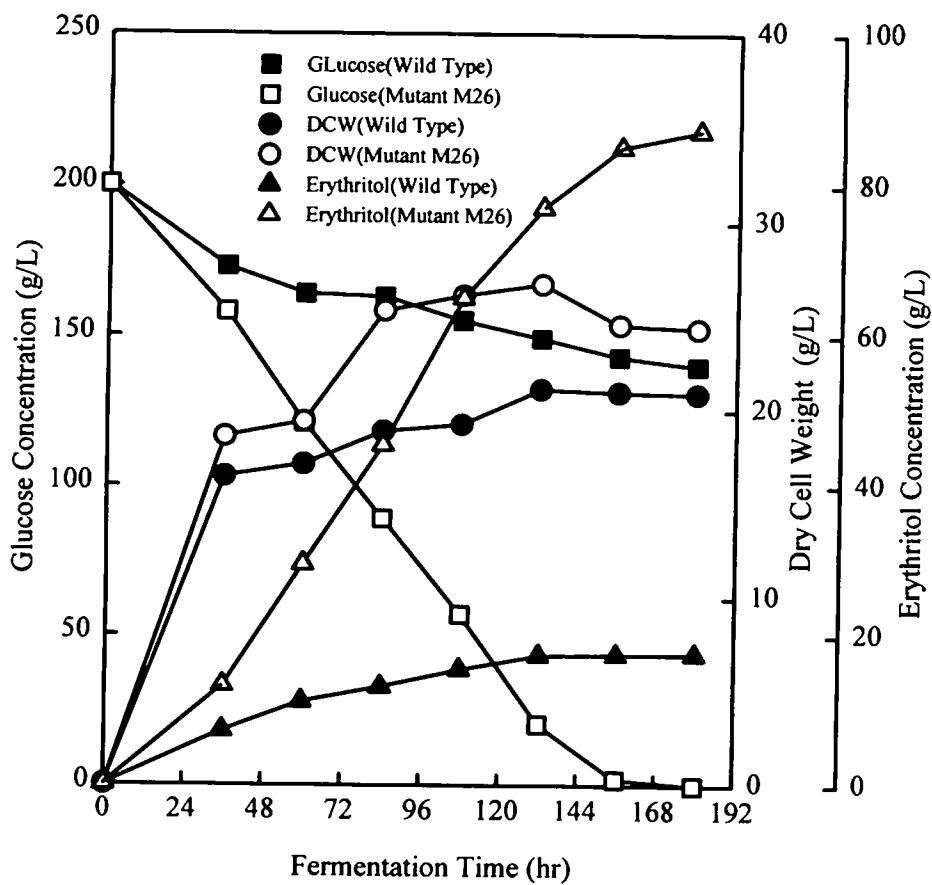


Fig. 7. Profiles of cell growth, erythritol production and glucose concentration during the batch culture of wild type and mutant M26 in the medium containing of 200 g/L glucose.

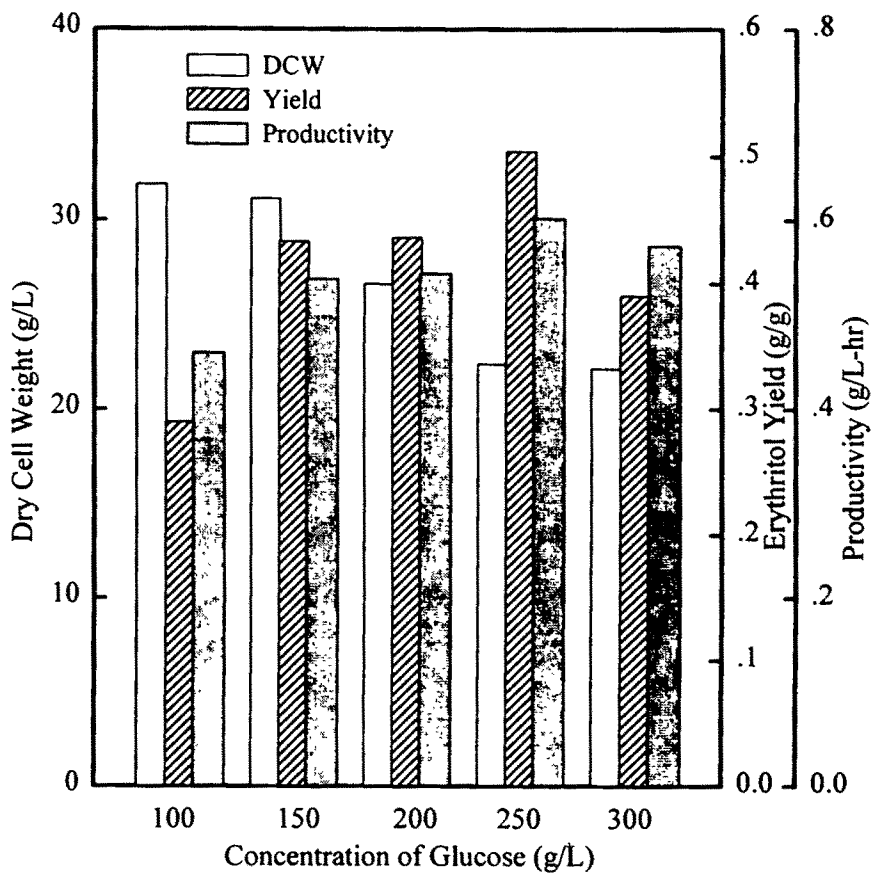


Fig. 8. Effect of glucose concentration on the cell growth, erythritol productivity and yield of mutant M26.

Table 21. Effect of glucose concentration on the production of erythritol by mutant M26.

Glucose concentration (g/L)	Cell conc. (g/L)	Erythritol (g/L)	Erythritol Yield (g/g)	Productivity (g/L-hr)
100	31.9	29.1	0.290	0.460
150	31.3	64.9	0.433	0.538
200	26.7	87.2	0.436	0.544
250	22.4	126.4	0.504	0.602
300	22.2	117.4	0.390	0.573

실험결과에서 최대 세포성장은 당 농도의 증가에 따라 감소하였으나 최대 erythritol 생성량은 당 농도의 증가에 따라 증가하여 250 g/L glucose 농도에서 최대 126.4 g/L의 erythritol이 생산되었다. 또한 수율은 50.4 %로 크게 증가하였으며 생산성도 0.602 g/L-hr로 향상되었다. 이러한 결과는 동일한 당 농도에서 야생균주의 실험결과와 비교할 때 수율이 약 5배 이상 증가한 수치이다. 또한 변이균주 M26의 수율과 생산성은 glucose 농도의 증가에 따라 250 g/L 까지 증가하였는데 300 g/L 이상의 glucose 농도에서는 약간씩 감소하였다. 이러한 결과로부터 회분식 발효에서 최적의 glucose 농도는 250 g/L임을 알 수 있었다. 변이균주 M26을 이용한 250 g/L의 당농도에서 회분식 발효를 수행한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. Erythritol의 양은 세포성장과 더불어 지속적으로 증가하는 경향을 볼 수 있으며 세포성장이 최대에 도달한 이후부터 glucose의 농도가 급속히 감소하는 것을 알 수 있었는데, 이는 남아있는 glucose가 발효후기에 빠르게 erythritol로 전환되기 때문으로 추정된다.

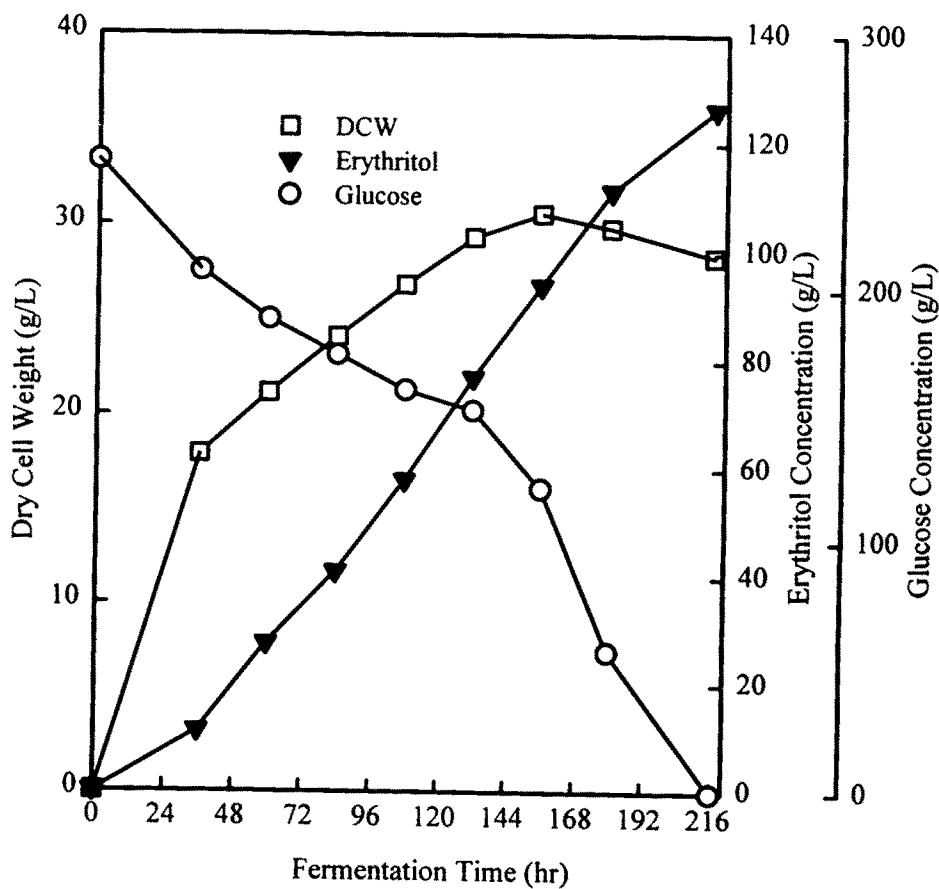


Fig. 9. Profiles of cell growth, glucose and erythritol concentrations during the batch fermentation of mutant M26 in the medium containing of 250 g/L glucose.

이러한 250 g/L glucose의 실험결과는 초기 100 g/L의 glucose를 사용한 실험과 비교할 때 수율과 생산성이 각각 1.7배, 1.3배 증가한 것으로서 산업적인 erythritol 생산이 가능한 수준의 수율인 것으로 사료된다. 또한 지금까지의 결과에서 250 g/L의 glucose 농도는 최대 수율의 erythritol 생성을 위한 최적의 C/N ratio 및 삼투압 조건을 제공한다는 것을 알 수 있었다. 즉 250 g/L 이상의 glucose 배지는 세포성장을 저해하여 specific growth rate를 떨어뜨리며, 또한 그 이하의 낮은 glucose 농도에서는 erythritol 생산을 위하여 충분한 삼투압을 제공해 주지 못하기 때문인 것으로 생각된다(4, 41).

다. Yeast extract 농도의 영향

본 실험에서는 Table 3의 발효배지를 기본으로 하여 yeast extract 농도가 erythritol 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 즉 glucose가 100 g/L로 첨가된 발효배지 200 mL를 500 mL baffled flask에 넣고 30 °C와 200 rpm에서 yeast extract의 농도를 5~15 g/L로 변화시키면서 변이균주 M26을 사용하여 84시간 배양한 실험결과를 Table 22과 Fig. 10에 나타내었다.

실험결과에서 5 g/L의 yeast extract 농도에서 최대 0.094 g-erythritol/g-glucose의 수율과 0.112 g/L-hr의 생산성을 나타내었으며, yeast extract 농도가 증가함에 따라 수율과 생산성 모두 감소하였다. 이와는 반대로 세포농도는 yeast extract의 농도가 증가함에 따라 증가하여 10 g/L의 yeast extract 농도에서 최대 15.3 g/L의 세포농도를 얻을 수 있었다. 그러나 yeast extract 농도가 10 g/L 이상인 경우에는 낮은 C/N ratio를 갖기 때문에 세포농도가 증가를 하지 않았는데, 이는 glucose가 세포의 생명유지에 필요한 대사에너지로 주로 이용되었기 때문인 것으로 사료된다. 이와 같이 C/N ratio가 낮은 배지에서는 erythritol의 수율과 생산성이 감소하였는데,

이는 미생물 발효에서 당알콜을 과량으로 얻기 위해서는 C/N ratio가 높은 배지를 사용하였을 때 미생물의 성장이 제한되면서 당알콜의 분비가 촉진된다는 Pfyffer 등(21)의 결과와 일치하였다. 따라서 당알콜 생산을 위한 배지의 C/N ratio는 일반적인 발효배지의 C/N ratio 보다 높아야 되며 세포성장의 조절을 통해서 높은 수율의 erythritol을 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

Table 21. Effect of yeast extract concentration on the production of erythritol by mutant M26.

Yeast extract [g/L]	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0
Erythritol yield [g/g]	0.094	0.079	0.043	0.030	0.024
Cell mass yield [g/g]	0.140	0.144	0.153	0.151	0.151
Specific growth rate [hr ⁻¹]	0.294	0.297	0.298	0.311	0.306
Productivity [g/L-hr]	0.112	0.094	0.051	0.036	0.040
Erythritol conc. [g/L]	9.4	7.9	4.3	3.0	2.4
Cell concentration [g/L]	14.0	14.4	15.3	15.1	15.1
Culture time [hr]	84	84	84	84	60

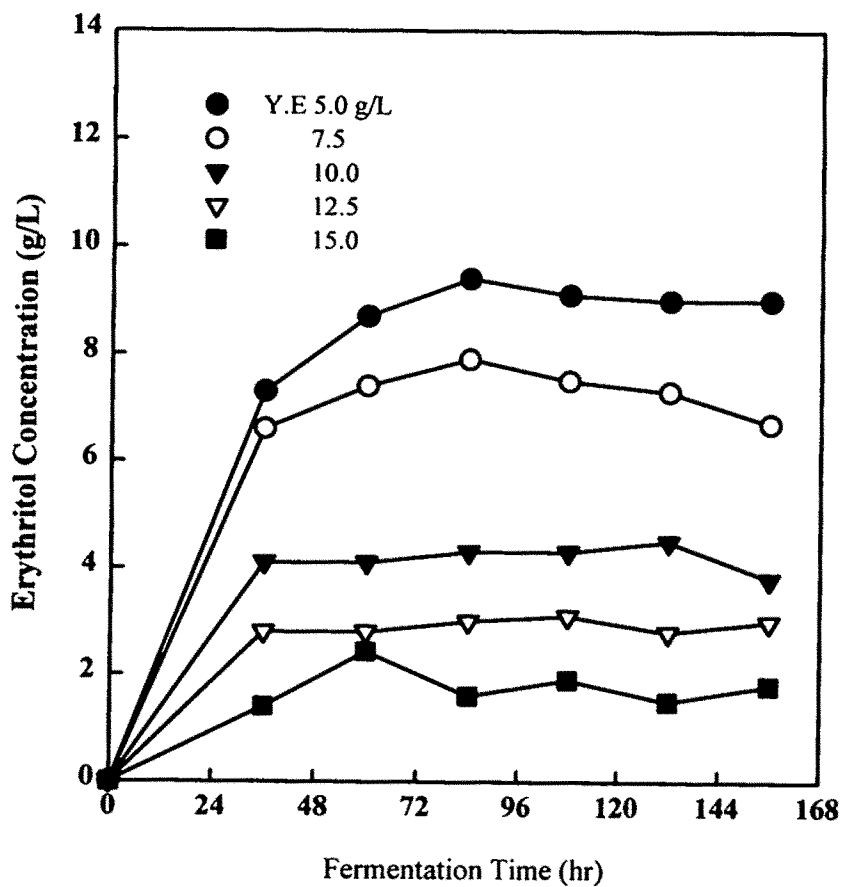


Fig. 10. Effect of yeast extract concentration on the production of erythritol by mutant M26.

라. 무기염 농도의 영향

본 연구에서 Table 3의 발효배지에 첨가된 KH_2PO_4 와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도에 대한 영향을 검토하였다. 우선 buffering agent로 첨가되는 potassium phosphate의 영향을 검토하기 위해서 100 g/L의 glucose와 5 g/L의 yeast extract가 포함된 배지 200 mL을 500 mL Δ baffled flask에 넣고 0~5 g/L의 potassium phosphate를 첨가하여 erythritol 발효를 수행하였다.

실험결과 Table 22과 Fig. 11에 나타난 것과 같이 배양 48시간에서 4 g/L 이상의 KH_2PO_4 농도에서는 erythritol의 생성이 상대적으로 높게 나타났는데, 이는 초기 세포 성장에 중요한 buffering agent로의 역할에 의하여 세포 성장과 초기 erythritol의 생성에 영향을 미친 것으로 사료된다. KH_2PO_4 의 농도가 4 g/L 이하에서는 배양 48시간에서 erythritol 생성이 유사하였다. 그러나 KH_2PO_4 를 첨가하지 않은 배지에서는 배양 말기까지 erythritol을 지속적으로 생성하여 최종 erythritol의 농도가 4 g/L의 KH_2PO_4 농도에서와 유사한 값을 나타내었다. Erythritol의 수율은 4 g/L의 KH_2PO_4 농도에서 0.152 g-erythritol/g-glucose으로 최대 값을 나타내었으며, 그 이하의 농도에서 보다 1.5배 가량 높은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 효모의 glucose 대사경로(Fig. 2)에서 보듯이 glucose가 pentose phosphate cycle을 거쳐 생성된 erythrose를 erythrose phosphatase의 효소활성에 의하여 erythrose-4-phosphate로 전환되는 과정에서 KH_2PO_4 농도가 효소활성에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

일반적으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 미생물의 무기 질소원으로 많이 이용되고 있다. 따라서 본 연구의 발효배지에도 포함되어 있는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도가 erythritol 생성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 250 g/L의 glucose와 5 g/L의 yeast extract가 첨가된 발효배지(Table 3)에 0~2.5 g/L의 농도를 달리하여 500 mL baffled Δ flask에서 실험한 발효경향을 Fig. 12와 Table 23

에 나타내었다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 첨가에 의해서 glucose 소모와 세포성장에는 크게 영향을 미치지 못했으나 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가하지 않은 경우보다 erythritol 생성이 감소하는 경향을 나타내며 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도가 증가함에 따라 부산물로 glycerol도 증가하는 경향을 나타내었다. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가하지 않은 경우 배양 297시간에서 0.54 g-erythritol/g-glucose의 최대 erythritol 수율과 0.395 g/L-hr의 생산성을 나타내었다. 이 때 소모되지 않고 남은 glucose의 양은 32.2 g/L이었다(Table 23, Fig. 12).

이상의 실험결과로부터 무기질소원으로 배지에 첨가된 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 초기 세포 성장에 영향을 주어 삼투조절 물질로 erythritol과 함께 부산물로 glycerol를 함께 생성함으로써 염 KCl 또는 NaCl의 첨가할 때와 유사한 결과를 나타내었으나, 당 소모속도는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도증가에 따라 크게 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 따라서 무기 질소원의 첨가는 erythritol 생산에서 부산물의 생성으로 인한 수율과 생산성을 감소시키는 결과를 얻었다.

Table 22. Effect of KH_2PO_4 concentration on the production of erythritol by mutant M26.

KH_2PO_4 (g/L)	0	1	2	3	4	5
Erythritol yield [g/g]	0.137	0.08	0.08	0.078	0.152	0.126
Cell mass yield [g/g]	0.132	0.122	0.129	0.128	0.131	0.154
Productivity [g/L-hr]	0.092	0.116	0.085	0.052	0.162	0.183
Erythritol conc. [g/L]	13.7	8.0	8.0	7.8	15.2	12.6
Cell conc. [g/L]	13.18	12.23	12.85	12.75	13.13	15.41
Culture time [hr]	149	69	94	149	94	69

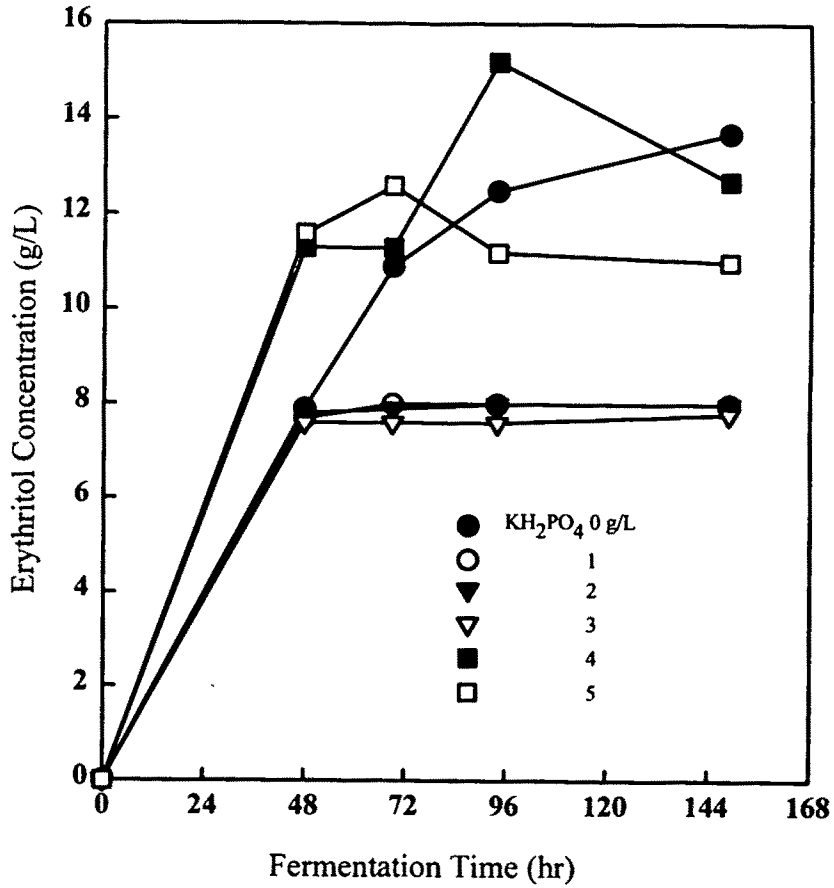


Fig. 11. Profiles of erythritol production at various KH_2PO_4 concentrations during the baffled flask cultures of mutant M26.

Table 23. Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on the production of erythritol by mutant M26.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5
Erythritol yield [g/g]	0.539	0.484	0.408	0.331	0.305	0.287
Productivity [g/L-hr]	0.395	0.348	0.277	0.210	0.193	0.208
Erythritol conc. [g/L]	117.3	103.3	96.1	82.8	76.2	61.8
Cell conc. [g/L]	21.58	21.98	23.17	24.16	23.92	23.00
Residual glucose [g/L]	0	5.5	6.4	6.1	6.0	11.6
Culture time [hr]	297	297	347	394.6	394	297

결론적으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 배지에 첨가하는 경우에는 exponential phase에서 세포성장과 glycerol의 생성을 촉진시켜 erythritol의 생산을 저해하였다. 변이균주 M26은 배지의 종류와 조성 그리고 염 첨가 등에 따라 성장하는 특성이 달라지며 erythritol을 주요 삼투조절 물질로 생산하지만, 환경변화 즉, 온도, pH, 그리고 통기조건에 따라 변화할 수 있음을 시사해 준다. 그러나 osmotolerant yeast인 *Hansenula anomala*(32)를 이용하여 NaCl이나 glucose로 배지에서 water-stress를 높여줌으로서 glycerol을 생산하였다고 보고하였으나 배지에 무기질소원의 첨가에 따라 다른 종류의 당알콜을 분비한다는 결과는 기존의 문헌보고에서 찾아볼 수 없었다. 이러한 결과로부터 순수 yeast extract를 이용한 기존의 발효배지에 첨가되어온 무기질소원인 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 발효배지에서 제거하고 유기질소원으로 배지조성을 개선할 필요성을 가지며 미생물의 생육과 대사산물의 생성에 영향을 미치는 효소의 co-factor 이온들과 vitamin들의 첨가가 erythritol 생산에 미치는 영향을 검토해야 할 필요성을 말해준다.

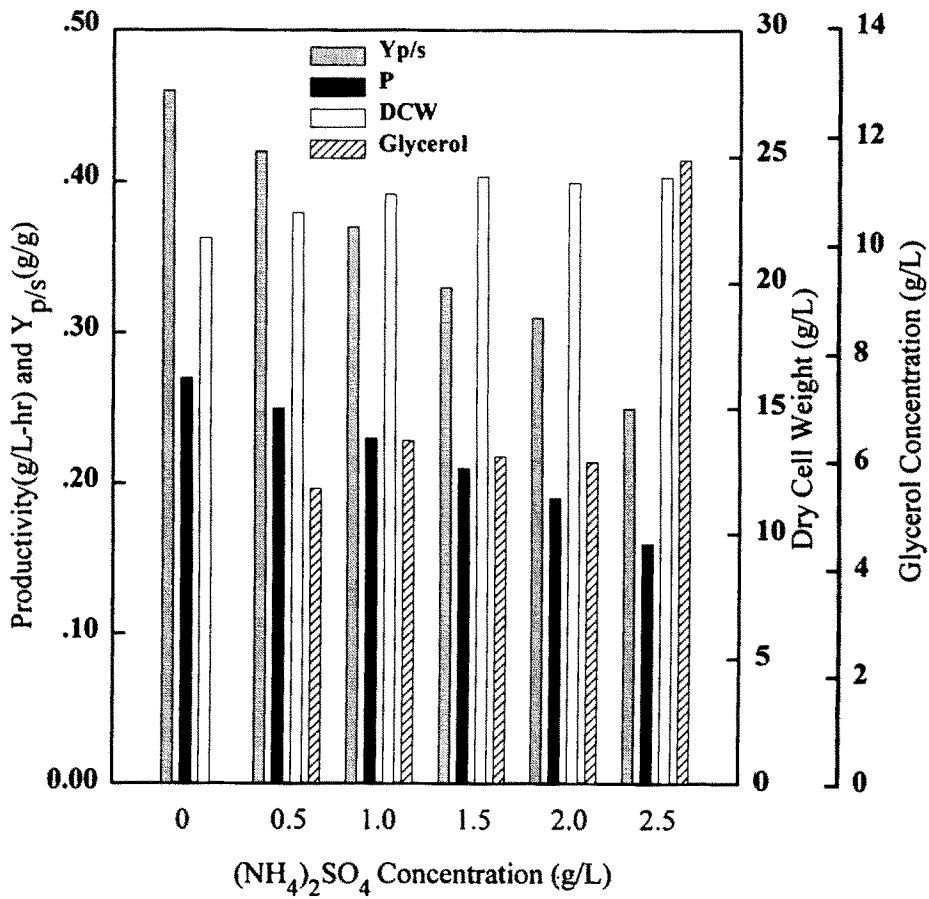


Fig. 12. Effect of (NH₄)₂SO₄ concentration on the production of erythritol by mutant M26.

라. 염 농도에 의한 삼투압 영향

당알콜 생산에 이용되는 삼투압 내성을 가진 균주는 배지내에 염이 첨가 될 때 water-stress를 받아 당알콜을 고농도로 생산한다는 많은 보고들이 있다(25,26). 따라서 본 실험에서도 KCl을 사용하여 염이 erythritol의 생성에 미치는 영향을 고찰하고 baffled flask 배양을 통하여 최대의 erythritol 생성을 위한 최적의 KCl 농도를 결정하는 실험을 수행하였다.

야생균주의 경우 배지 내 KCl의 농도를 0~40 g/L의 범위에서 flask 배양에 의한 실험을 수행하였는데 20 g/L에서 최대의 erythritol이 생성되었다 (Fig. 13, Table 24). 세포의 성장은 KCl의 농도가 20 g/L 이하에서는 염이 없는 경우보다도 높게 나타났는데, 이는 사용 균주인 *Candida* sp. JH가 osmophilic yeast임을 다시 한번 확인 시켜준 결과이다. 그러나 KCl의 농도가 20 g/L 이상의 조건에서는 세포성장이 저해를 받아 erythritol 생성량이 상대적으로 낮게 나타났다. 최적의 KCl 농도에 의해 water-stress를 받아 생성된 최대 erythritol의 양은 28.5 g/L이었으며, 이는 염이 없는 배지의 발효와 비교할 때 1.3배 증가한 수준이다. 배양 108시간 경과 후의 각 KCl 농도 배지에서 실험한 결과를 Table 24에 나타내었다.

Table 24. Effect of KCl concentration on the production of erythritol by wild type.

KCl Concentration (g/L)	Cell concentration (g/L)	Erythritol (g/L)
0	22.2	21.4
10	24.0	24.0
20	24.8	28.5
30	19.9	14.2
40	18.1	13.0

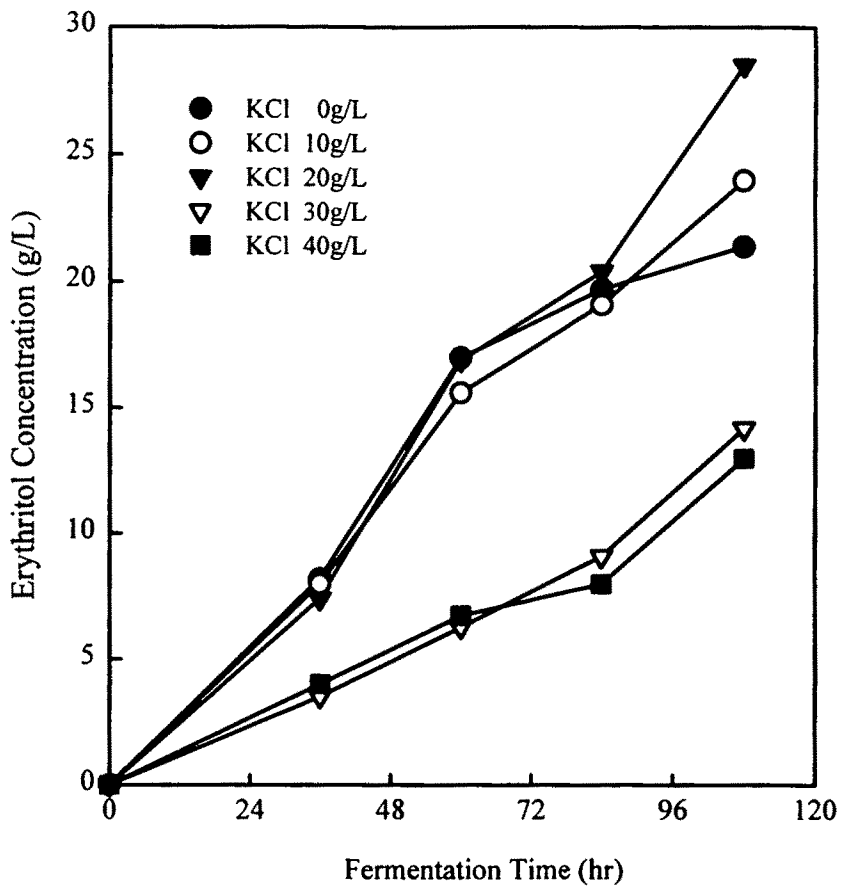


Fig. 13. Profiles of erythritol production at various KCl concentrations during the baffled flask cultures of wild type.

염내성 변이균주인 M26에 의한 84시간의 배양에서는 Table 25에서와 같이 50 g/L의 KCl 배지에서 최대의 erythritol이 생성되었다(Fig. 14). 최적의 KCl 농도가 야생균주에 비해 상대적으로 높은 것은 변이균주 M26이 염내성 변이균주임을 확인해 주는 것이며, 발효속도는 약 24시간 빠르게 진행되었다. 이러한 특성으로 인하여 변이균주 M26은 KCl의 농도가 50 g/L 이상에서도 세포 성장이 저해를 받지 않고 고농도의 erythritol 생성이 가능한 것으로 보인다. 이러한 변이균주 M26의 높은 삼투압 내성은 40 g/L의 KCl 배지에서 야생균주와 변이균주 M26의 발효경향을 비교해 보면 확실히 나타난다. 즉 야생균주는 염이 없는 배지에 비해 세포 성장이 80% 수준으로 떨어지는데 반하여 변이균주인 M26은 세포농도가 최대였으며, 특별히 erythritol이 약 2.1배 높게 생성됨을 알 수 있다. 반면에 최적의 KCl 농도에서 erythritol의 생성량은 염이 없는 배지에 비해 1.1배 증가라는 미미한 수준의 증가를 보이고 있는데, 이것은 변이에 의하여 증가된 변이균주의 삼투압 내성이 고농도의 당알콜 생성능력의 증가로 이어지기보다는 높은 삼투압 조건에서 세포성장의 방향으로 대사에너지가 사용되었기 때문으로 추정된다. 그러나 변이균주 M26의 뛰어난 염내성으로 인하여 당의 소모속도는 증가하여 각각의 KCl 농도에서 변이균주 M26의 erythritol 생산성은 야생균주에 비하여 크게 향상되었다. 즉 최적 KCl 농도에서 erythritol의 생산성은 야생균주가 0.26 g/L-hr 인데 비해 변이균주 M26은 0.33 g/L-hr로 우수한 결과를 나타냈다. 이처럼 염을 사용하여 삼투압을 높인 조건에서의 발효를 통해 compatible solute인 당알콜의 생산증가를 유도한 실험결과는 배지내 수분활성도가 염에 의해 낮아질 때 mannitol, erythritol을 비롯한 당알콜의 총 생성량이 증가한다는 보고와 일치하는 것이다(28). 또한 본 실험에서는 염에 의해 water-stress가 가해질 때 생성되는 당알콜의 종류가 변화한다는 Luxo 등(29)의 실험결과는 관찰되지 않았다.

배지내 염이 존재할 때와 존재하지 않을 때의 야생균주의 발효경향을 Fig. 15에서 비교하였다. 염이 없는 경우에는 stationary phase에 접어들어 세포성장이 둔화됨에 따라 erythritol의 증가 속도도 같이 감소하였다. 반면 염이 있는 경우에선 세포성장이 멈춘 후에도 지속적으로 erythritol이 생성되어 배양 60시간 이후부터의 erythritol 생성량이 현저한 차이를 나타내는 경향을 볼 수 있다. 이것은 배지내에 계속 남아 있는 염에 의한 water-stress가 미생물의 당알콜 분비를 촉진시키기 때문인 것으로 사료된다. 이와 같이 염에 의한 배지내 삼투압의 증가를 통해 erythritol 생산량의 증가가 일어남을 알 수 있었지만, 당에 비해 염은 상대적으로 적은 농도에서도 세포성장을 저해한다. 그러므로 염의 첨가에 의한 고수율의 erythritol 생산은 한계가 있는 것으로 생각된다.

Table 25. Effect of KCl concentration on erythritol production of mutant M26.

KCl Concentration (g/L)	Cell concentration (g/L)	Erythritol (g/L)
0	23.3	25.0
10	24.0	25.2
20	22.7	23.7
30	22.9	23.3
40	23.9	27.1
50	22.1	27.6
60	21.2	26.5

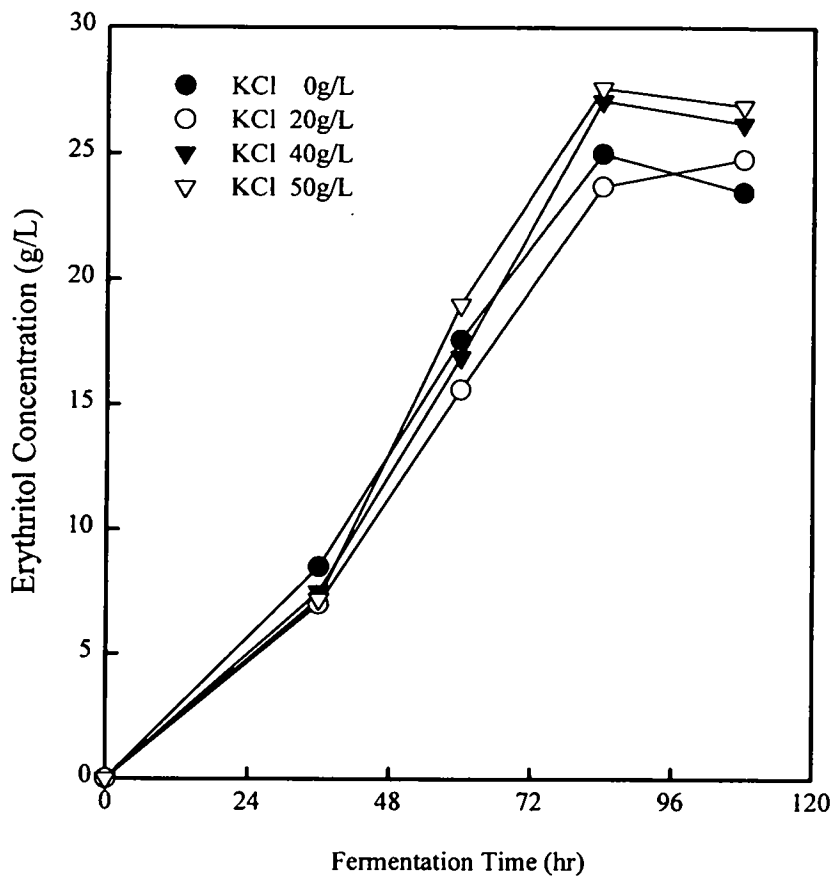


Fig. 14. Profiles of erythritol production at various KCl concentrations during the baffled flask cultures of mutant M26.

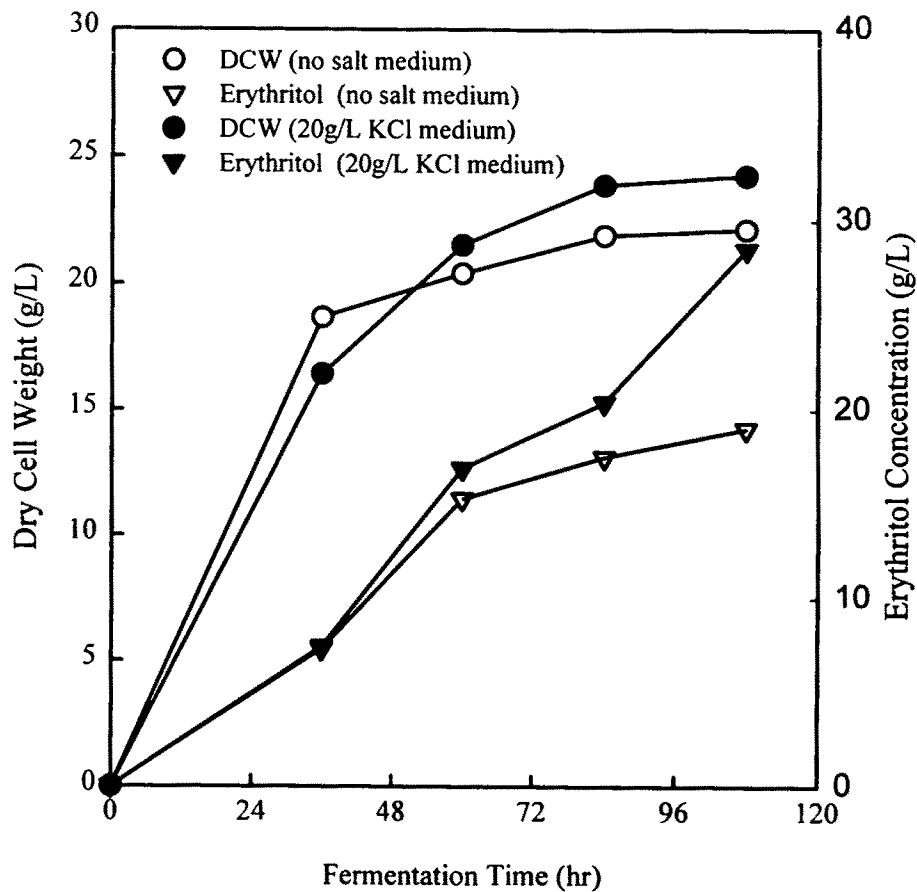


Fig. 15. Profiles of cell growth and erythritol production during the baffled flask cultures of wild type with and without KCl.

4. 변이균주의 erythritol 발효조건의 최적화

Erythritol 생산의 산업화를 위해서는 발효조건의 최적화를 통하여 최대의 수율과 생산성을 향상시키는 조건을 결정하였다. 본 연구에서는 효모의 생육과 erythritol의 생성에 커다란 영향을 미치는 동기 및 교반과 발효온도, 배지의 초기pH 및 pH의 조절이 erythritol의 생산에 미치는 영향을 검토하였다.

가. 통기량의 영향

당알콜 생산과 관련해서 중요한 조절인자로 배지 내의 산소의 공급이다. 세포 내 탄소흐름의 최종 반응에 작용하는 산소는 세포성장을 제어하여 당알콜의 생산과 분비에 관여하여 당알콜의 생산수율에 가장 큰 영향을 미치는 요인으로 작용한다. 그러나 산소공급을 제한하면 탄소의 흐름은 대사산물의 생산으로 진행되나 세포전반의 대사속도는 떨어지게 된다. 따라서 당알콜 생산에서 주요한 발효인자로 작용하는 통기의 영향을 알아보려고 하였다. 본 실험에서는 변이균주 M26을 이용한 erythritol 생산에서 통기의 영향을 검토하기 위하여 발효조의 교반속도를 500 rpm으로 유지하면서 0.75에서 2.0 vvm까지의 통기조건에서 초기 배지 pH를 7.0 이고 glucose 농도가 250 g/L인 발효배지 1.0 L를 2.5 L의 발효조(KFC)에 넣고 28 °C에서 실험을 수행하였다.

실험결과 통기의 증가에 따른 glucose, 균체량, 그리고 erythritol 농도변화를 Fig. 16~Fig. 19에 나타내었다. 통기조건이 1.0 vvm인 경우(Fig. 17)에 erythritol의 생산성 및 수율이 각각 0.7 g/L-hr과 0.57 g-erythritol/g-glucose로 가장 높게 나타내었다(Table 26). 세포농도는 배양 205시간에서 glucose를 모두 소모하면서 35.7 g/L의 최대값을 나타내었다. 이처럼 최

대의 erythritol 생산성과 수율을 나타낸 이유로는 세포의 생명유지에 이용된 에너지 값이 다른 통기조건 보다 낮은 0.287 g/g의 값을 나타내었기 때문인 것으로 사료된다. 또한 최종 erythritol의 배지 내 농도는 143.3 g/L로서 매우 높은 값을 나타내었는데, 이는 온도와 배지의 pH 등이 동일한 발효 조건으로 수행한 flask 배양에서의 수율과 생산성을 비교한 결과를 Table 27에 나타내었다. 비교에서 세포농도는 2.3배, erythritol 수율과 생산성은 각각 2.6배와 2.9배, 그리고 최종 erythritol 농도는 8.3배 향상된 값을 나타내었다(Fig 20). 이러한 결과는 flask 배양이 최대 수율의 erythritol 생산에 필요한 충분한 양의 산소를 제공하지 못하였으며 발효조에서는 향상된 통기 조건에서 250 g/L의 glucose를 모두 소모하면서 erythritol 생산이 발효말기까지 지속적으로 이루어졌기 때문이다. 이는 당알콜 생산에서 세포 내의 $NAD^+/NADH$ redox balance에 따라 glucose의 대사속도를 조절하는 인자인 산소의 영향은 크며, 또한 삼투압 내성 효모균주를 사용한 erythritol 발효에서 적정량의 통기조건과 교반속도에 의해 최대의 수율을 유도하였다는 Groleau 등(38)의 연구결과와도 일치한다. 통기량의 증가에 따라 당의 수송이 촉진된다고 알려져 있는데, 실험결과 통기량의 증가에 따라 발효시간이 단축되는 경향을 나타내었으나 1.0 vvm 이상의 통기조건에서는 erythritol 수율과 생산성이 감소하는 경향을 나타내었다. 삼투압 내성 효모균주들에 의한 당알콜의 생산에서 최대의 당알콜 생산을 위해서는 호기적 조건을 유지해 주어야 한다고 알려져 있는데, 이는 산소의 공급이 충분하지 못할 경우에 에탄올과 glycerol 등과 같은 부산물이 생성되는 경향이 있다고 보고되고 있다(38). 따라서 변이균주 M26은 호기적 발효조건에서 높은 농도의 erythritol을 유일한 삼투압 조절물질로 생산하기 때문에 erythritol의 분리정제가 매우 용이할 것으로 사료된다.

Table 26. Effect of aeration rate on the production of erythritol by mutant M26.

Aeration rate [vvm]	0.75	1.00	1.50	2.00
Erythritol yield [g/g]	0.55	0.57	0.46	0.45
Cell mass yield [g/g]	0.117	0.143	0.127	0.128
Maintenance [g/g]	0.333	0.287	0.413	0.422
Specific growth rate [hr ⁻¹]	0.152	0.131	0.126	0.156
Productivity [g/L-hr]	0.55	0.70	0.54	0.58
Erythritol concentration [g/L]	131.2	143.3	115.0	111.8
Cell concentration [g/L]	29.29	35.69	31.67	32.12
Culture time [hr]	240	205	212	192

Table 27. The comparison of cell mass, erythritol yield, and productivity in the flask and fermenter culture of mutant M26.

Fermentation parameter	Cell conc. [g/L]	Erythritol yield [g/g]	Erythritol conc. [g/L]	Productivity [g/L-hr]
Flask culture	15.74	0.221	17.2	0.239
Fermenter culture	35.69	0.570	143.3	0.700

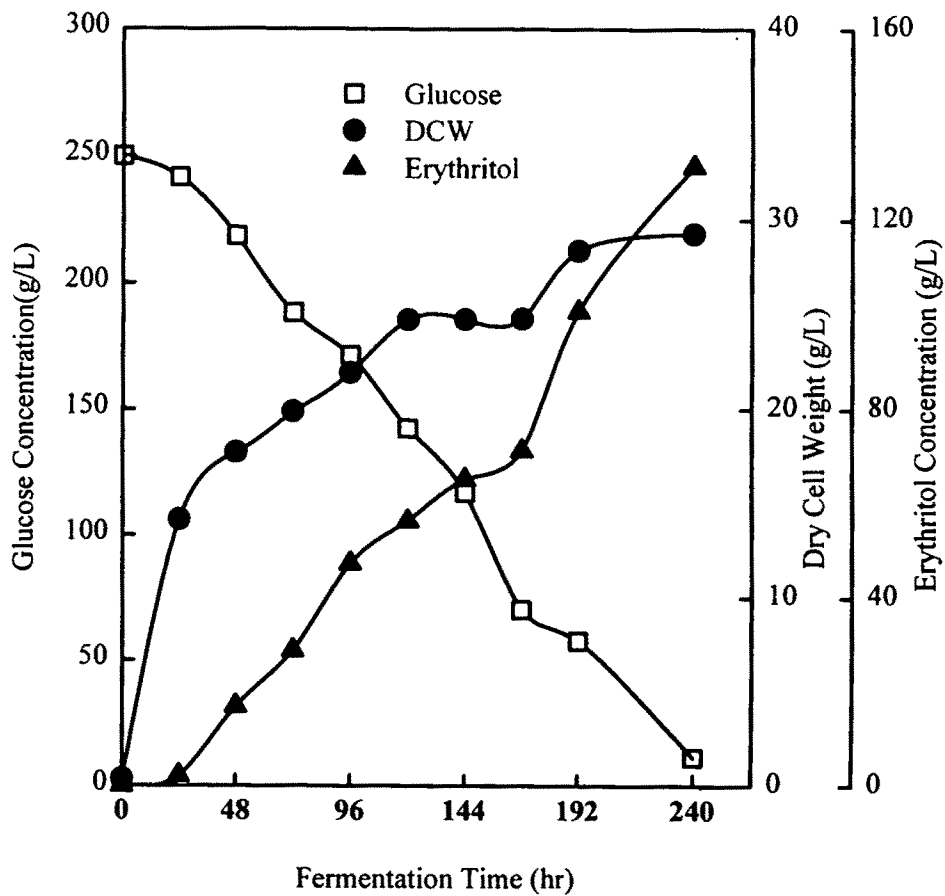


Fig. 16. The profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch culture of mutant M26 under aeration of 0.75 vvm.

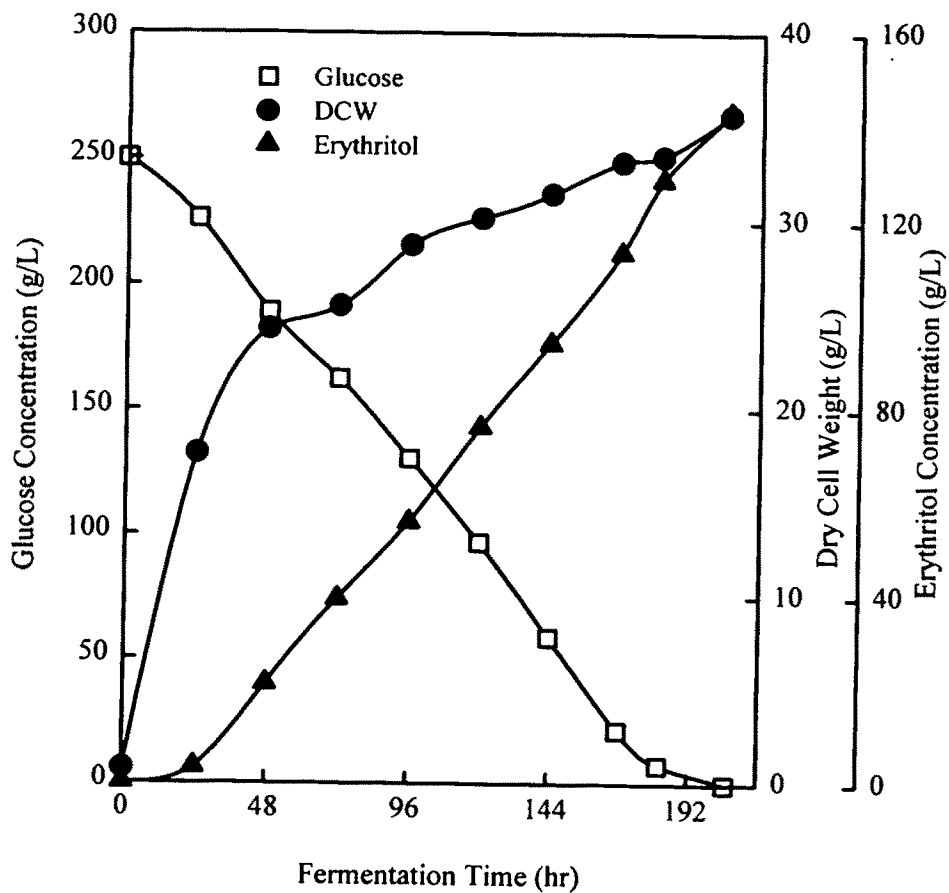


Fig. 17. The profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch culture of mutant M26 under aeration of 1.0 vvm.

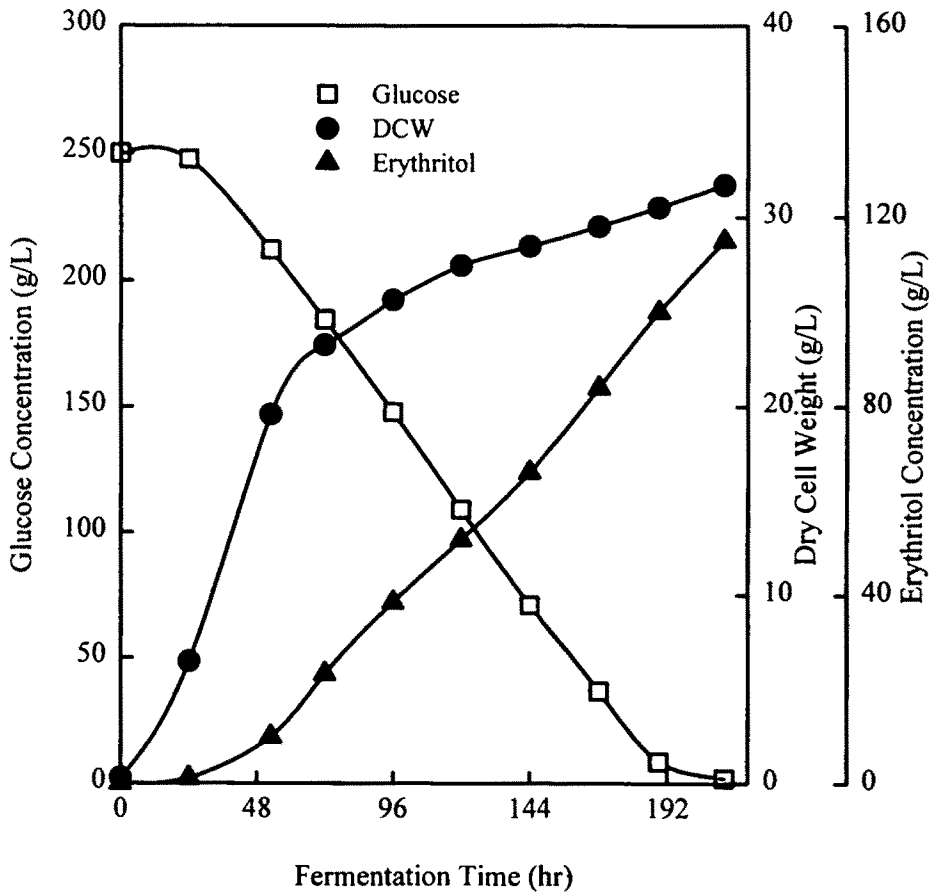


Fig. 18. The profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch culture of mutant M26 under aeration of 1.5 vvm.

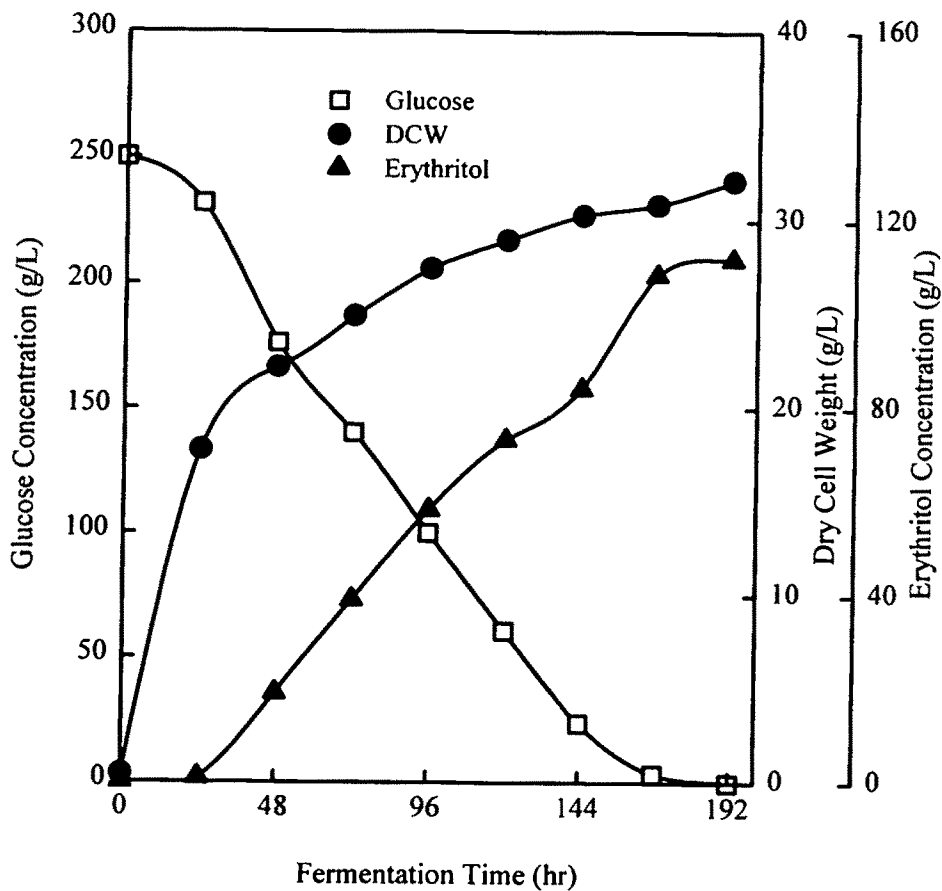


Fig. 19. The profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch culture of mutant M26 under aeration of 2.0 vvm.

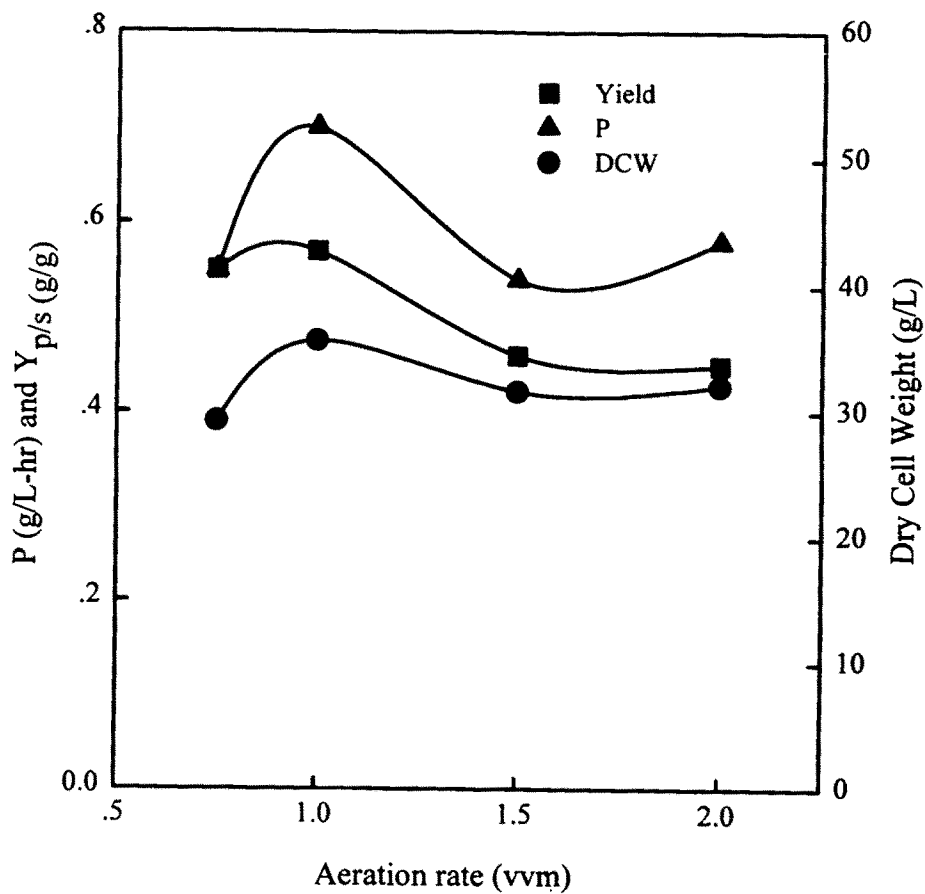


Fig. 20. The effect of aeration rate on the maximum cell growth, erythritol productivity and yield of mutant M26.

나. 교반속도의 영향

교반속도는 통기량과 마찬가지로 배지 내로의 산소 전달속도(oxygen transfer rate)에 영향을 미칠 뿐만 아니라 미생물이 이용할 수 있는 배지 내의 각종 영양분의 혼합에도 크게 영향을 미친다. 따라서 통기량을 1.0 vvm으로 유지하면서 400~600 rpm의 교반조건에서 250 g/L의 glucose가 포함된 발효배지(초기 pH 7.0) 1.0 L를 2.5 L의 발효조(KFC)에 넣고 28℃에서 실험을 수행한 결과를 Fig. 16, Fig. 21, Fig. 22에 나타내었다. 실험결과에서 교반속도의 증가에 따라 배지 내로의 산소의 전달과 영양분의 혼합이 증가를 할지라도 shear stress로 인한 세포의 성장에 물리적인 저해작용에 의하여 세포농도는 감소하였다. 즉 교반속도 400 rpm에서 배양 189시간에 glucose가 모두 소모되면서 38.6 g/L의 최대 세포농도를 나타내었다. 그러나 500 rpm의 교반속도에서 erythritol의 수율과 생산성은 각각 0.57 g-erythritol/g-glucose과 0.7 g/L-hr로 최대값을 나타내었다. 따라서 erythritol 생산에서 통기량과 교반속도는 1.0 vvm과 500 rpm에서 최대의 생산성과 수율을 얻을 수 있었다(Table 28, Fig 23).

Table 28. Effect of agitation speed on the production of erythritol by mutant M26.

Agitation speed [rpm]	400	500	600
Erythritol yield [g/g]	0.410	0.570	0.480
Cell mass yield [g/g]	0.154	0.143	0.132
Productivity [g/L-hr]	0.500	0.700	0.660
Erythritol concentration [g/L]	103.5	143.3	120.7
Cell concentration [g/L]	39.03	35.69	33.14
Culture time [hr]	204	205	183

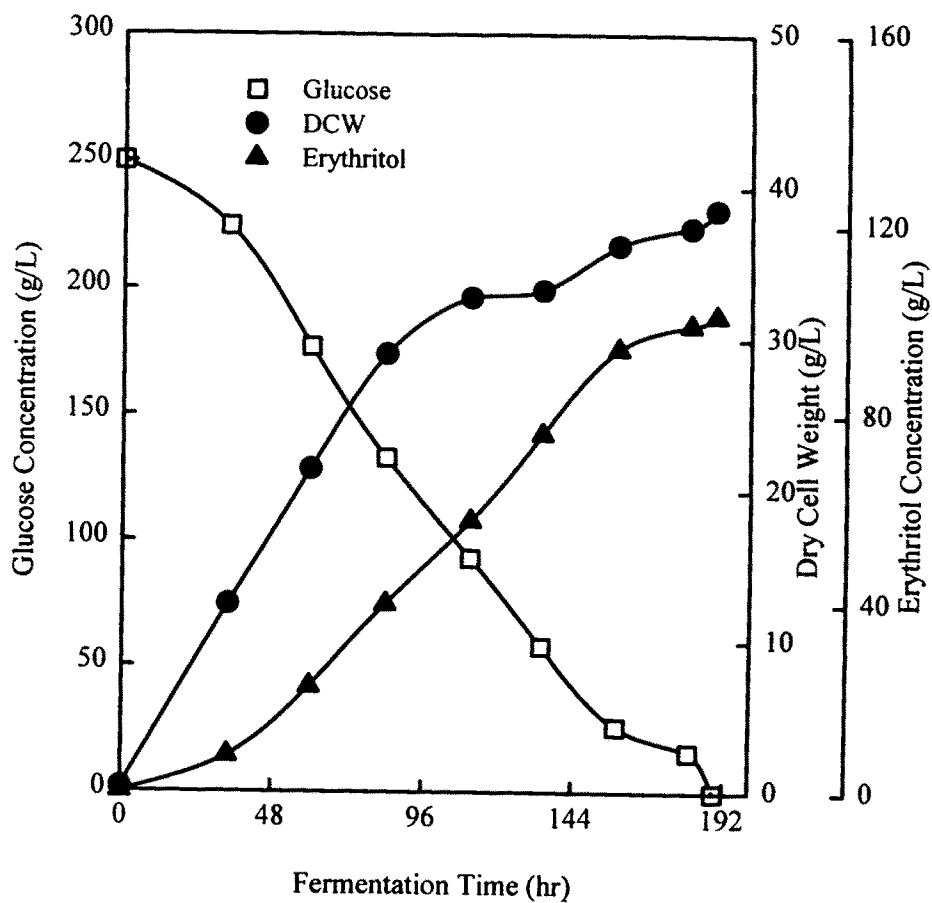


Fig. 21. The profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch culture of mutant M26 under agitation of 400 rpm.

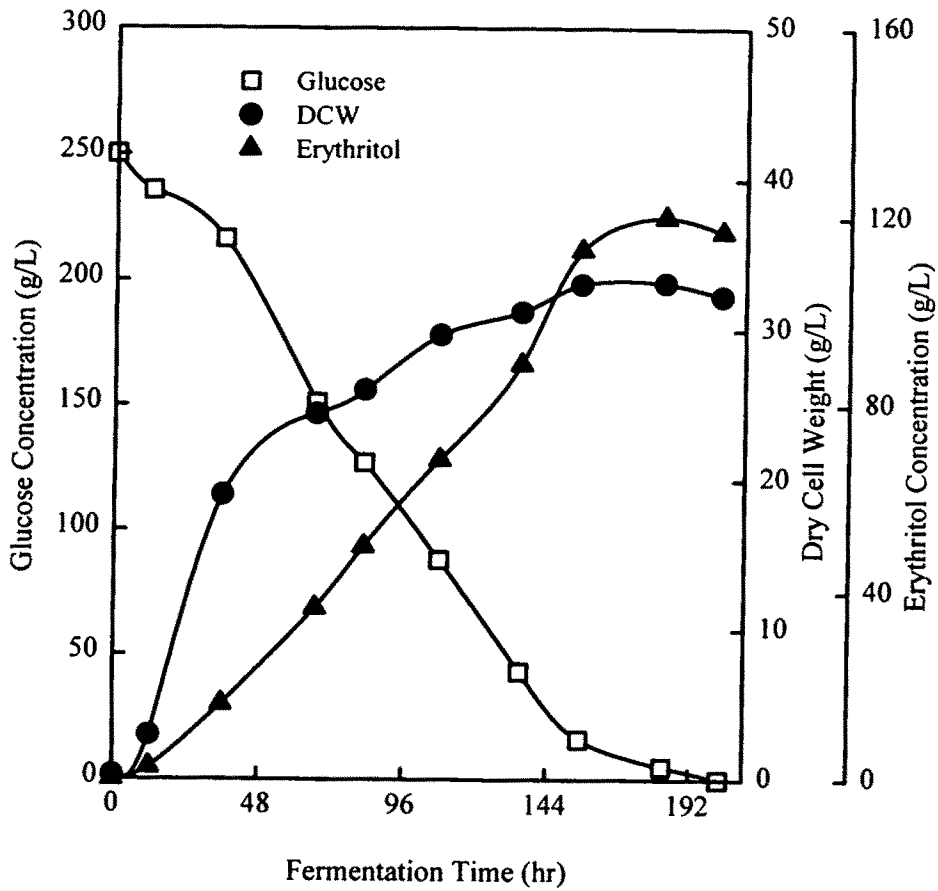


Fig. 22. The profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch culture of mutant M26 under agitation of 600 rpm.

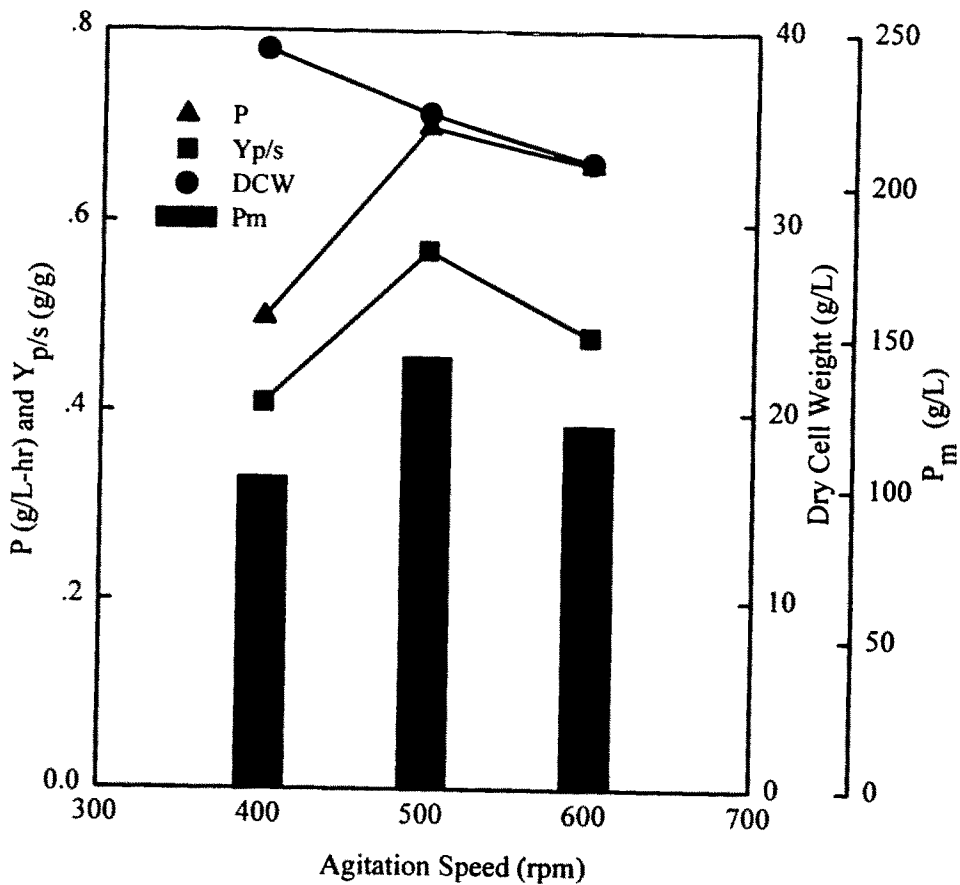


Fig. 23. The effect of agitation speed on the maximum cell growth, erythritol productivity and yield of mutant M26.

다. 최적 발효온도의 결정

온도는 세포의 반응속도, 대사작용, 영양요구성, 그리고 세포의 구성성분 등에 영향을 미친다. 일반적으로 온도가 증가함에 따라 세포성장은 비례적으로 증가하다가 일정 온도 이상에서는 감소하는 경향을 나타내는데 lag phase에서의 미생물 성장과 대사산물의 형성에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.

Erythritol 생산을 위한 최적의 배양온도를 결정하기 위하여 배양온도 범위를 24~30℃로 하여 100 g/L의 glucose 배지 200 mL을 500 mL의 baffled flask에서 배양하고 생성된 erythritol의 농도를 분석하였다. 배양 84시간에서의 야생균주와 변이균주 M26의 실험결과를 보면 야생균주의 경우에 세포성장은 26℃에서 가장 우수하였고 변이균주 M26은 28℃에서 가장 높은 세포농도를 나타냈다. 그러나 두 균주에서 모두 erythritol의 생산을 위한 최적온도는 28℃ 이었으며, 그 결과를 Table 29 및 Table 30과 Fig. 24와 Fig. 25에 나타내었다.

Table 29. Effect of culture temperature on the cell growth, erythritol production of wild type.

Temperature (°C)	Cell concentration (g/L)	Erythritol (g/L)
24	21.2	15.2
26	23.1	15.8
28	22.0	19.7
30	18.1	19.2

Table 30. Effect of culture temperature on the cell growth, erythritol production of mutant M26.

Temperature (°C)	Cell concentration (g/L)	Erythritol (g/L)
24	17.5	15.4
26	17.5	15.0
28	23.3	25.0
30	21.0	20.7

Flask 배양의 결과를 토대로 하여 발효조를 이용한 최적의 발효온도를 결정하기 위하여 250 g/L의 glucose 배지 1.0 L를 2.5 L의 발효조(KFC)에 넣고 1.0 vvm의 통기와 500 rpm의 교반으로 각각의 발효온도에서 실험을 수행하였다. 배양시간에 따른 glucose, 균체량, 그리고 erythritol 생성량 등을 Fig. 26, Fig. 17, Fig. 27에 나타내었고, Fig. 28에 온도에 따른 수율과 생산성의 변화를 나타내었다. 변이균주 M26은 28°C에서 가장 높은 erythritol 수율과 생산성을 나타내었으며 세포농도는 30°C에서 41.0 g/L로 가장 높게 나타났다(Table 31). 따라서 변이균주 M26을 이용한 erythritol 생산에서는 세포성장에 최적인 온도보다 약간 낮은 온도에서 erythritol 생성의 활성이 높은 것으로 사료된다. Erythritol의 생산을 위한 최적의 배양 온도에 대한 기존 연구자들의 실험 결과를 보면 Kim(39)과 Aoki 등(12)은 30°C 이상의 온도를 최적 배양온도로 보고하였으며, 김(46) 등은 26°C에서 최대 수율의 erythritol을 얻을 수 있다고 보고하였다. 반면에 전 등(13)은 *Trichosporonoides* sp.를 이용한 erythritol 생산에서 erythritol 생산수율에는 온도의 영향이 없었지만 32°C 이상의 온도에서 부산물로 glycerol의 농도가 증가함을 보고하였다. 이처럼 최적의 발효온도는 생산하는 당알코올의 종류 뿐 아니라 사용하는 균주의 종류에 따라 달라진다는 것을 알 수 있었다.

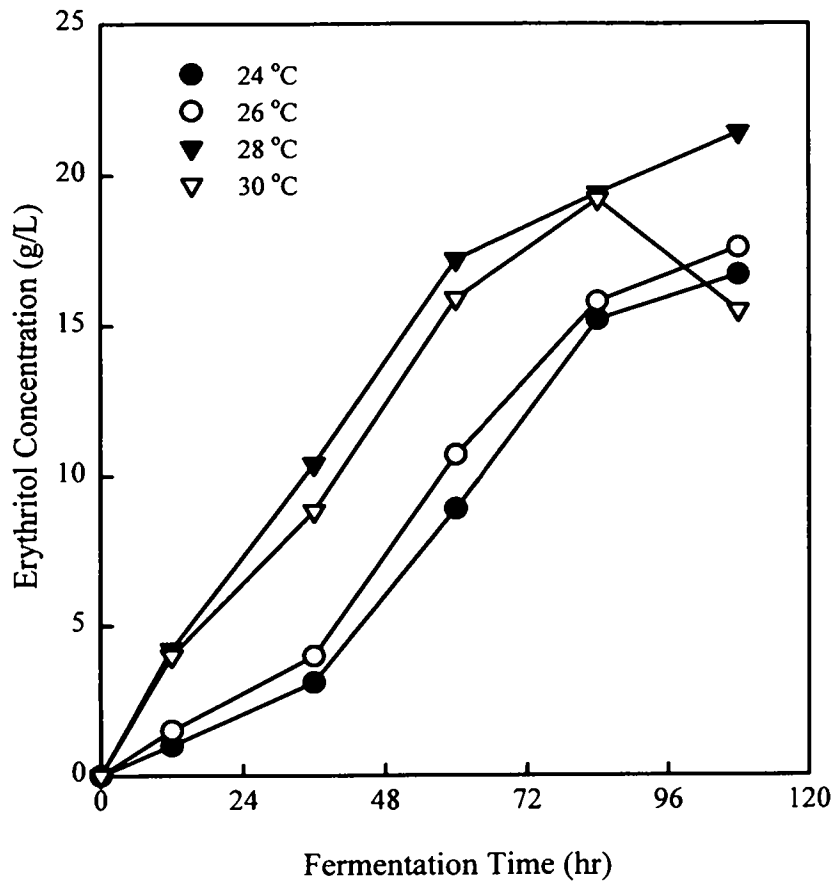


Fig. 24. Erythritol production of under various temperatures during the baffled flask culture of wild type.

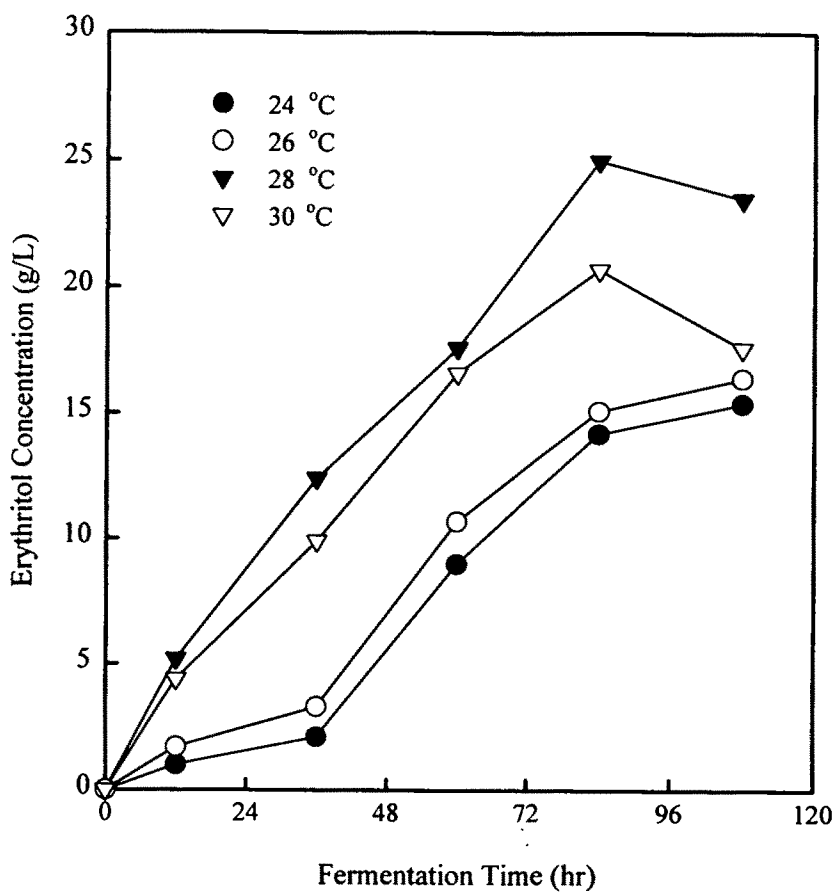


Fig. 25. Erythritol production of under various temperatures during the baffled flask culture of mutant M26.

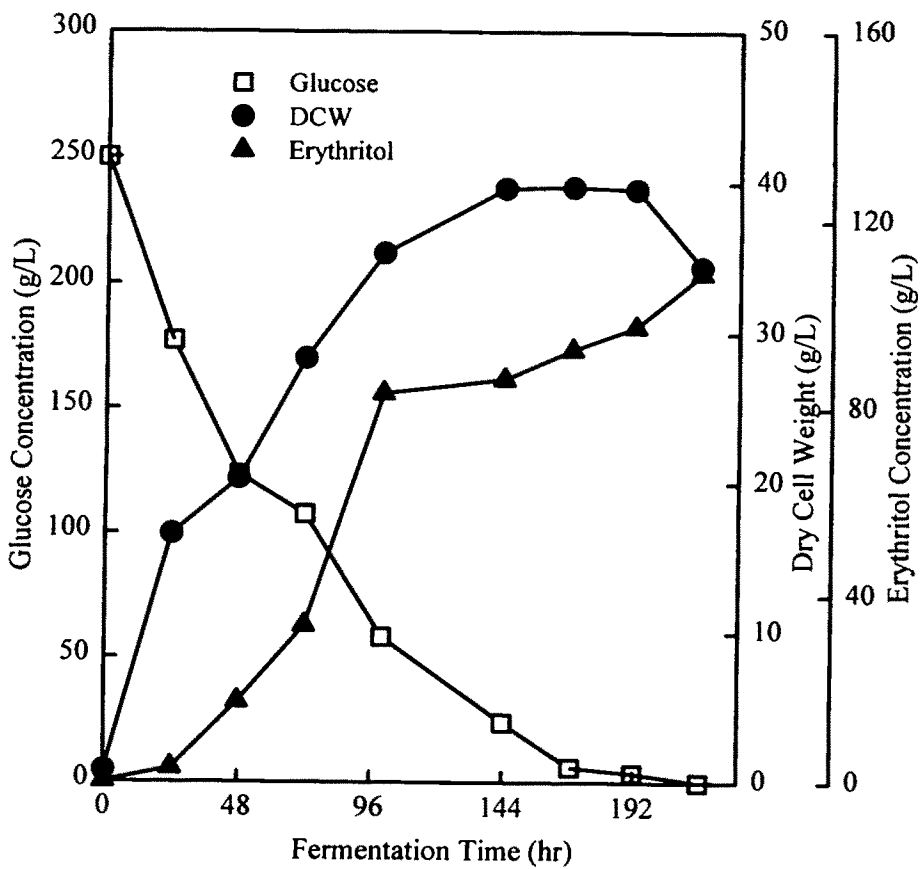


Fig. 26. Profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch culture of mutant M26 at 26°C

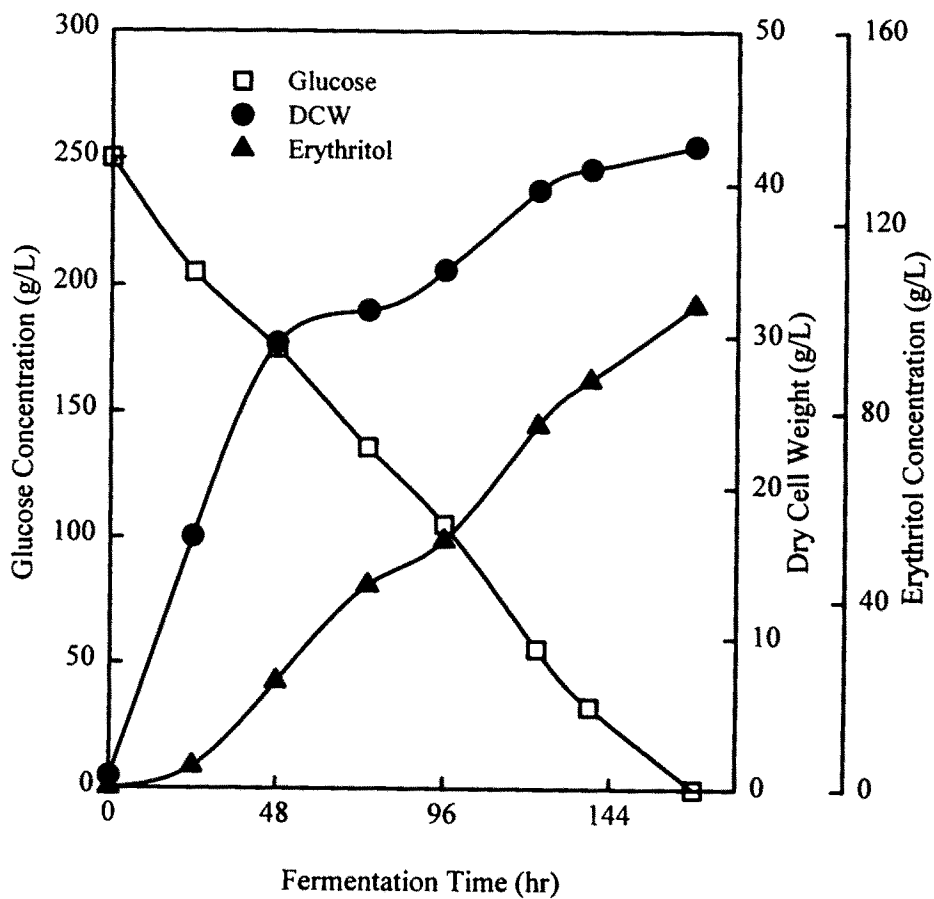


Fig. 27. Profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch culture of mutant M26 at 30°C

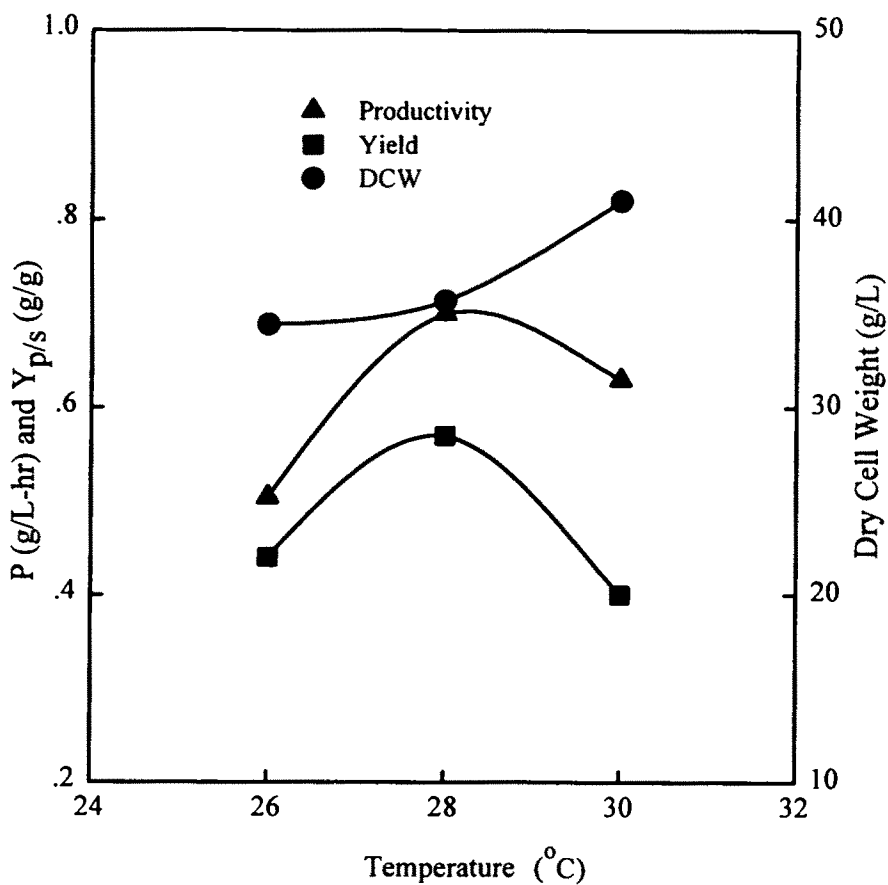


Fig. 28. Effect of fermentation temperatures on the production of erythritol by mutant M26.

Table 31. Effect of culture temperature on the cell growth, and erythritol production of mutant M26.

Temperature (°C)	26	28	30
Erythritol yield (g/g)	0.440	0.570	0.400
Productivity (g/L-hr)	0.504	0.700	0.63
Erythritol conc. (g/L)	108.0	143.3	86.7
Cell concentration(g/L)	34.43	35.69	40.99

라. 배지의 초기 pH 및 pH 조절의 영향

pH는 세포성장과 대사산물의 생산에서 주요한 영향을 미치는 발효인자인데, 이는 세포막을 자유롭게 통과하지 못하는 H^+ 와 OH^- 이온이 세포막을 가로질러 수소이온의 농도구배(proton motive force)를 형성하여 ATP 생성 기작에 중요한 역할을 한다. 특히 발효배지의 초기 pH는 당알콜 생산에 큰 영향을 미치는 인자이다. Erythritol 발효에서는 일반적으로 발효과정 중에 배양액의 pH가 낮아지는데, 본 실험에서도 초기 배지의 pH가 7.0인 경우 발효 후기에는 pH가 3.6까지 떨어지는 것을 알 수 있었다. 이는 배지에 NH_4^+ 가 질소원으로서 함유되어 있을 때 NH_4^+ 가 이용되면 H^+ 가 방출되고 배양액의 pH는 떨어지기 때문이다. 또한 다른 측면에서는 생성된 erythritol의 분비를 위하여 H^+ 이온이 배출되기 때문으로도 사료되지만 실험으로 확인하지는 못하였다. 이처럼 낮아진 배지의 pH는 세포 성장과 당알콜 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 조사되어 있으며 필요에 따라 발효과정 중의 pH 조절이 요구되기도 한다. 그러나 당알콜인 xylitol의 생산에는 pH를 조절하지

않는 것이 유리한 것으로 보고되어 있다(42). 따라서 본 실험에서는 pH를 조절하지 않고 배지의 초기 pH를 4.0~8.0 범위로 하여 발효실험을 수행하였으며, 84시간의 발효에서 실험결과를 비교하였다(Table 32, Table 33).

Table 32. Effect of initial pH on the cell growth and erythritol production of wild type.

Initial pH	Cell concentration (g/L)	Erythritol (g/L)
4	17.0	13.0
5	18.0	12.2
6	19.6	17.7
7	24.2	19.7
8	22.4	16.1

Table 33. Effect of initial pH on the cell growth, erythritol production of mutant M26.

Initial pH	Cell concentration (g/L)	Erythritol (g/L)
4	20.0	12.6
5	22.7	21.4
6	25.4	21.6
7	24.0	23.5
8	24.2	18.6

실험결과에서 야생균주의 경우 pH 7.0에서 세포성장과 erythritol의 생산량이 우수하였으며 변이균주 M26은 pH 6.0에서 세포성장이 우수하였으나 erythritol의 생산량은 야생균주와 같이 pH 7.0에서 가장 우수하였다(Fig. 29, Fig. 30). 대체적으로 erythritol의 발효에는 산성조건에서 보다 중성의 pH 조건이 유리한 것으로 나타났는데, 이는 erythritol 생성에 관여하는 erythrose dehydrogenase 등의 효소반응이 pH 7.0의 조건에서 최적이기 때문인 것으로 사료된다.

발효과정에서 pH를 일정하게 조절하면서 실험을 수행하기 위하여 발효조에서 실험을 수행하였다. 실험은 250 g/L의 glucose 배지를 이용하여 1.0 vvm의 통기와 500 rpm의 교반속도로 28°C의 조건에서 pH를 조절하면서 실험을 수행하여 glucose, 세포농도, erythritol 농도를 Fig. 31~Fig. 35에 나타내었다. 실험결과 Fig. 31에서 보듯이 pH 3.0에서 erythritol의 생성은 배양 40시간 이후부터 생성되기 시작하였으며 배양 228시간에 glucose를 모두 소모하면서 최대 132.2 g/L의 erythritol을 생산하였다. 배양말기까지 glucose를 0.052 g-glucose/g-cell·hr로 소모하여 54%의 수율을 나타내었으며 erythritol 비생성속도는 0.025 g-erythritol/g-cell·hr이었다. 이 때의 생산성은 pH를 조절하지 않은 조건보다 낮은 0.58 g/L·hr이었다. 세포의 최대 비성장속도는 0.155 hr⁻¹이었으며 배양 말기 34.98 g/L의 균체량을 나타내었다. Fig. 32에서와 같이 pH 4.0에서는 erythritol의 생성이 배양 10시간 이후부터 시작되어 배양 228시간에 glucose를 모두 소모하면서 최대 120.7 g/L의 erythritol을 생산하였다. Glucose의 비소모속도는 0.042 g-glucose/g-cell·hr이고 48%의 erythritol 수율을 나타내었다. 이때의 erythritol 비생성속도는 0.022 g-erythritol/g-cell·hr이었으며, 생산성은 pH를 조절하지 않은 조건보다 낮은 0.59 g/L·hr이었다. 세포의 최대 비성장속도(μ_{max})는 0.220 hr⁻¹로 pH 3.0보다 약간 높았으며 배양말기의 세포농도는 34.0 g/L 이었다.

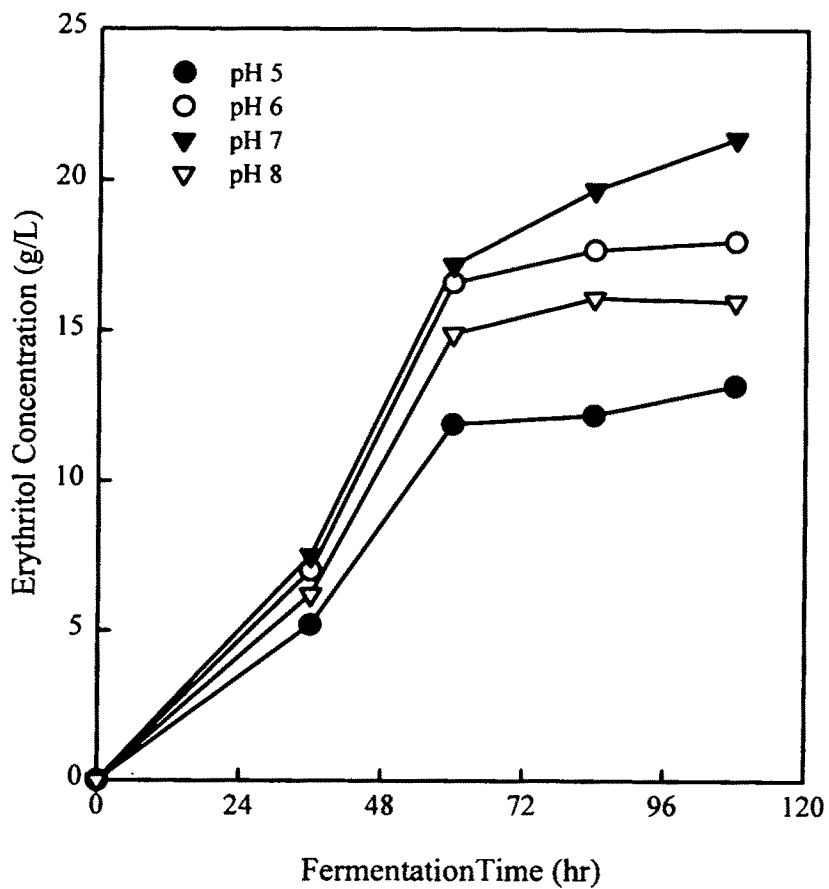


Fig. 29. Erythritol production at various initial pH of medium during the baffled flask culture of wild type.

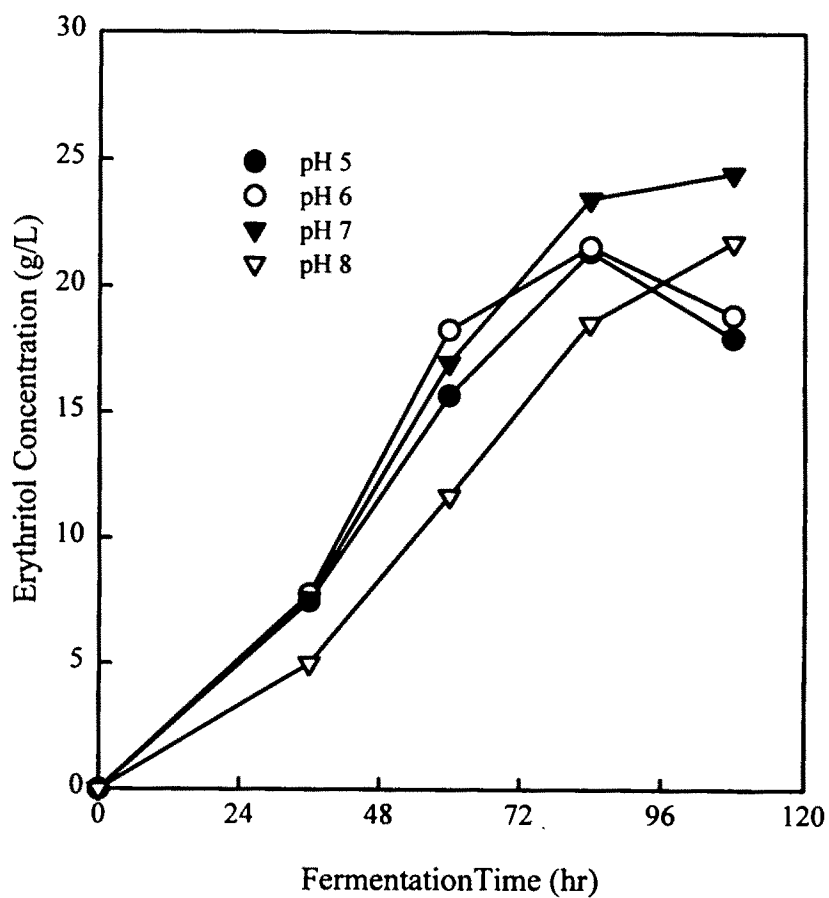


Fig. 30. Erythritol production at various initial pH of medium during the baffled flask culture of mutant M26.

Fig. 33에서 보듯이 pH 5.0에서 erythritol의 생성이 배양 초기부터 시작되어 배양 240시간에 glucose를 모두 소모하면서 최대 130.8 g/L의 erythritol을 생산하였다. 이때의 생산성은 pH를 조절하지 않은 조건보다 낮은 0.59 g/L-hr이었다. 세포의 최대 비성장속도(μ_{max})는 pH 6.0(Fig. 34)에서 0.260 hr⁻¹로 가장 높게 나타났으나 erythritol의 농도가 최대가 되는 배양 말기의 세포농도는 pH의 증가에 따라 다소 감소되는 경향을 보였다. pH 7.0(Fig. 35)에서는 glucose의 소모속도와 erythritol 생성속도가 매우 낮았으며 또한 최종 erythritol의 농도도 매우 낮게 나타났다.

변이균주 M26은 기질인 glucose를 소모하여 최대 비성장속도(μ_{max})가 중성 pH 조건에서 높게 나타났지만 배양 말기의 세포농도는 산성조건인 pH 3.0에서 35.0 g/L로 최대의 세포농도를 나타내었다. Glucose의 비소모속도는 pH 4.0에서 0.052 g/g-hr의 최대값을 나타내었으며 pH 7.0에서는 0.039 g/g-hr로 최소값을 나타내었다(Table 34). 이러한 결과는 초기 세포농도와 glucose의 소비속도는 중성 pH에서 높게 나타났으며, erythritol의 수율과 생산성은 낮은 pH 조건에서 최적인 것으로 나타났다. 또한 pH가 높아짐에 따라 erythritol의 생산속도는 반비례적으로 감소하였다. 따라서 세포성장의 속도가 높은 배양 초기 36시간 동안은 pH 7.0으로 유지하다가 36시간 이후부터 pH를 낮게 조절하였으나 erythritol의 생산성과 수율이 향상되지는 않았다(Fig. 36, Fig. 37).

결론적으로 Fig. 38과 Table 34에서 보듯이 pH 조절을 통한 erythritol의 생산성과 수율을 높일 수 없었으므로 이후의 실험에서는 pH 조절을 하지 않았다. 초기 배지의 pH를 7.0으로 하여 조절하지 않고 배양하는 경우에 변이균주 M26은 배양과정에서 pH가 2.3~2.5 까지 낮아지는데, 이는 발효과정 중에 질소원으로서 함유되어 있을 때 NH₄⁺의 소비의 결과로 H⁺가 방출되고, 또한 erythritol의 분비를 위하여 H⁺가 배출되었기 때문으로 사료된다.

Table 34. The effect of pH control on the erythritol production by mutant M26.

pH control	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0
$Y_{p/s}$ (g/g)	0.54	0.48	0.52	0.44	0.35
q_s [g/g-hr]	0.048	0.052	0.042	0.040	0.039
q_p [g/g-hr]	0.026	0.025	0.022	0.018	0.014
μ_{max} [hr ⁻¹]	0.155	0.220	0.228	0.262	0.162
P [g/L-hr]	0.58	0.59	0.50	0.40	0.32
P_m [g/L]	132.2	120.7	130.8	110.8	77.1
DCW_f [g/L]	34.98	33.96	33.19	33.51	30.65
T_f [hr]	228	204	260	276	240

$Y_{p/s}$: Erythritol Yield [g-erythritol/g-glucose]

$Y_{x/s}$: Cell Mass Yield [g-cell mass/g-glucose]

M: Maintenance [1- $Y_{p/s}$ - $Y_{x/s}$]

μ_{max} : Specific growth rate [hr⁻¹]

P: Erythritol volumetric productivity [g/L-hr]

P_m : Maximum erythritol concentration [g-erythritol/L]

DCW_f : Final dry cell weight [g/L]

G_m : Maximum glycerol concentration [g/L]

T_f : Fermentation Time [hr]

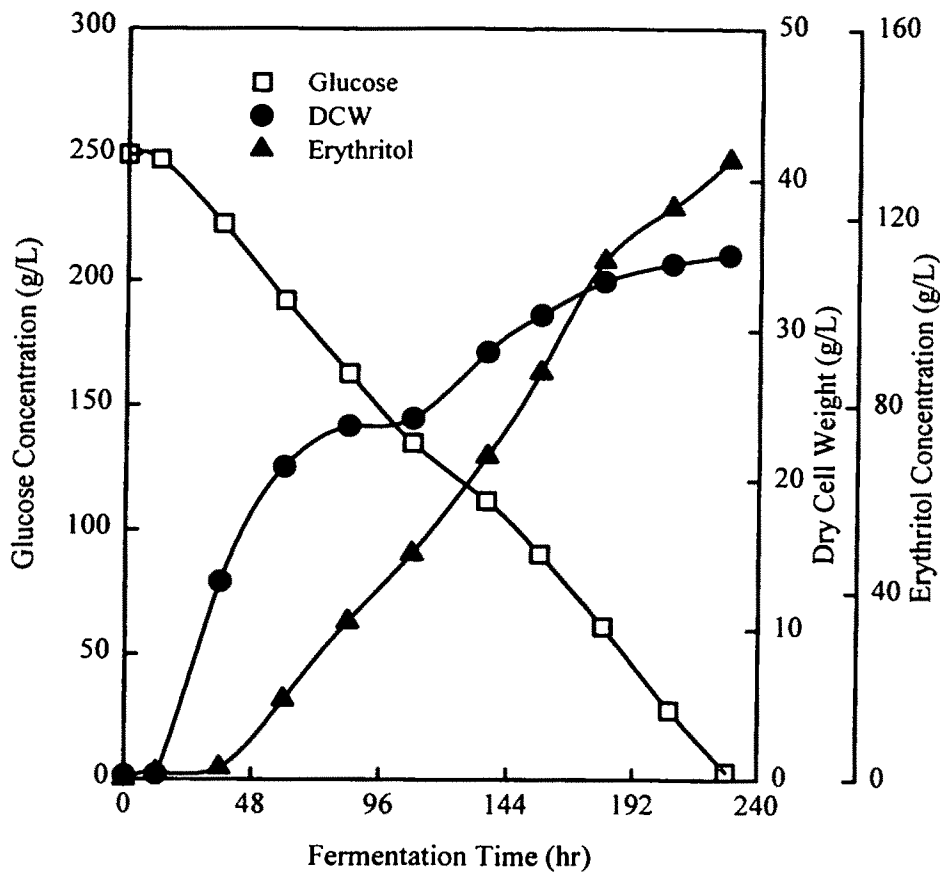


Fig. 31. Profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch fermentation of mutant M26 under the control of pH 3.0.

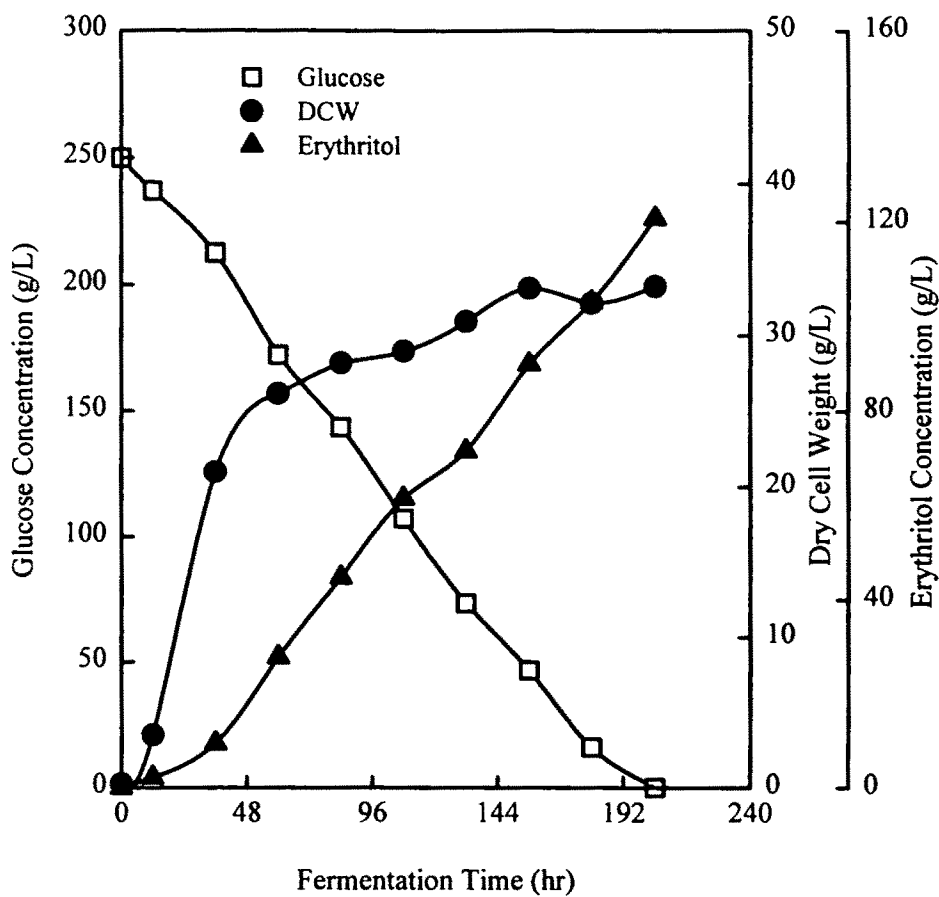


Fig. 32. Profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch fermentation of mutant M26 under the control of pH 4.0.

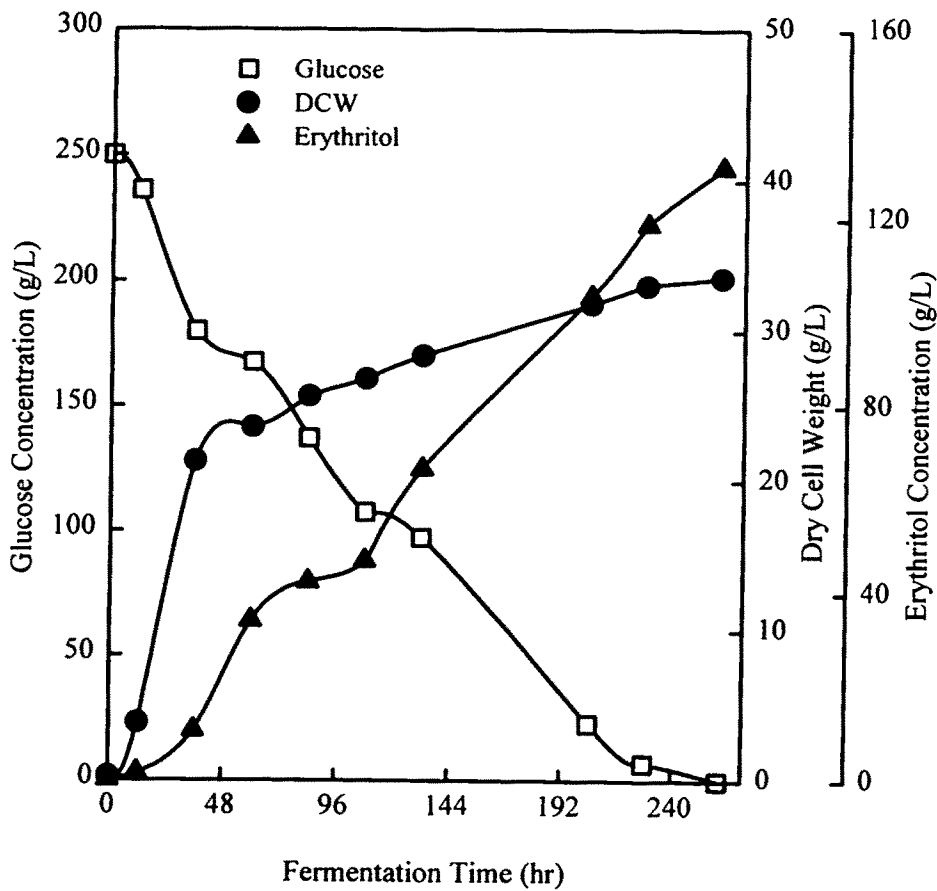


Fig. 33. Profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch fermentation of mutant M26 under the control of pH 5.0.

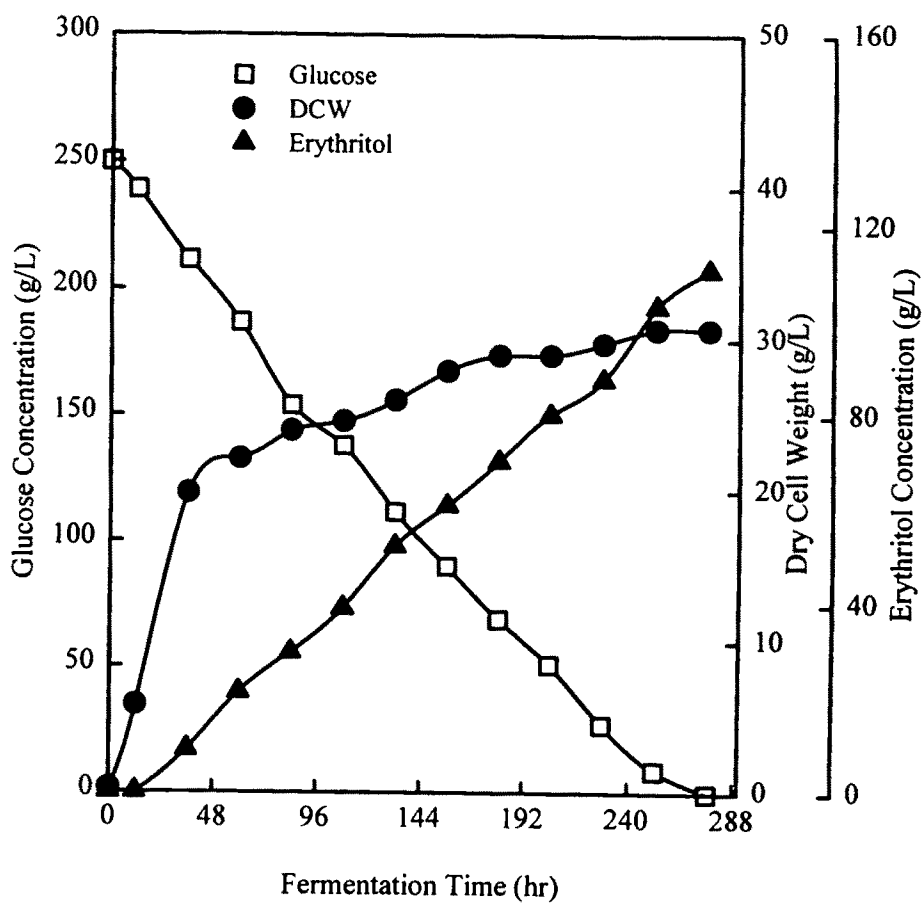


Fig. 34. Profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch fermentation of mutant M26 under the control of pH 6.0.

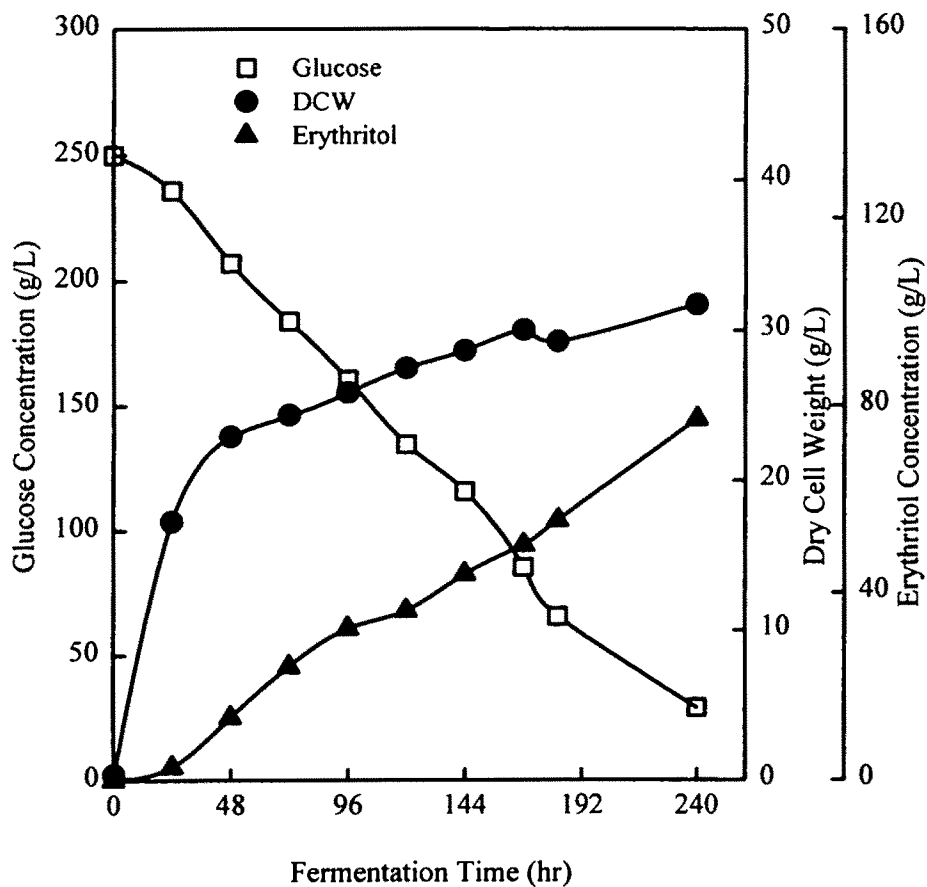


Fig. 35. Profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch fermentation of mutant M26 under the control of pH 7.0.

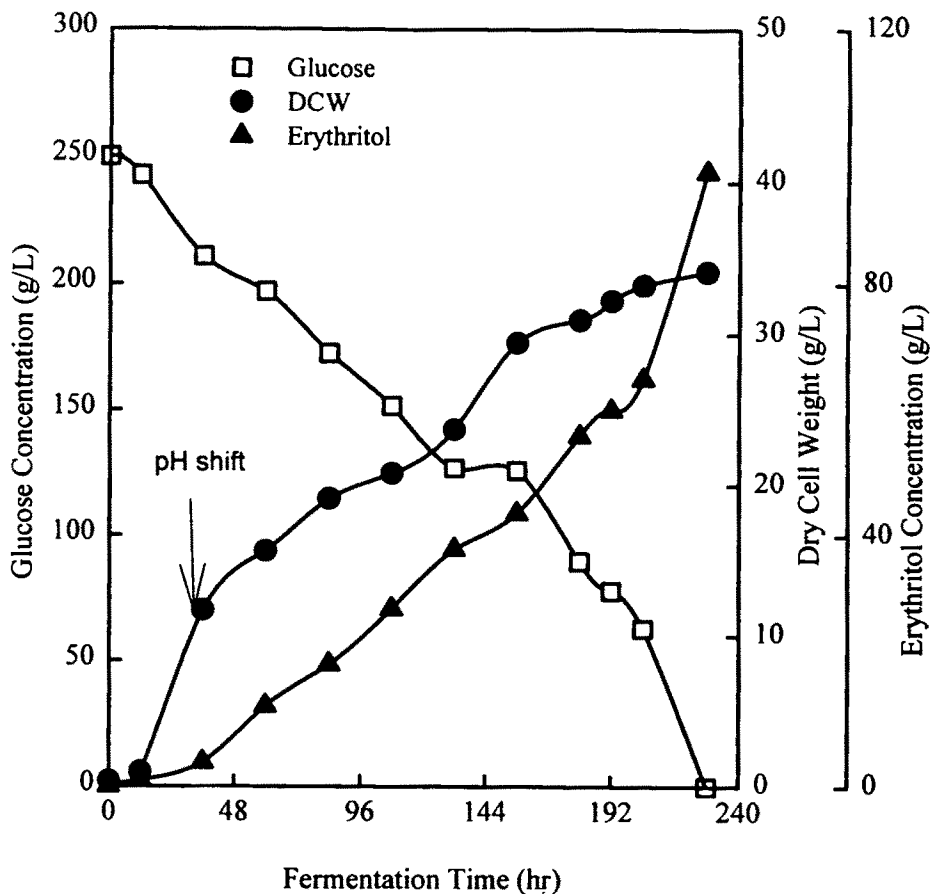


Fig. 36. Profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch fermentation of mutant M26 under the shift of pH control from 7.0 to 4.0.

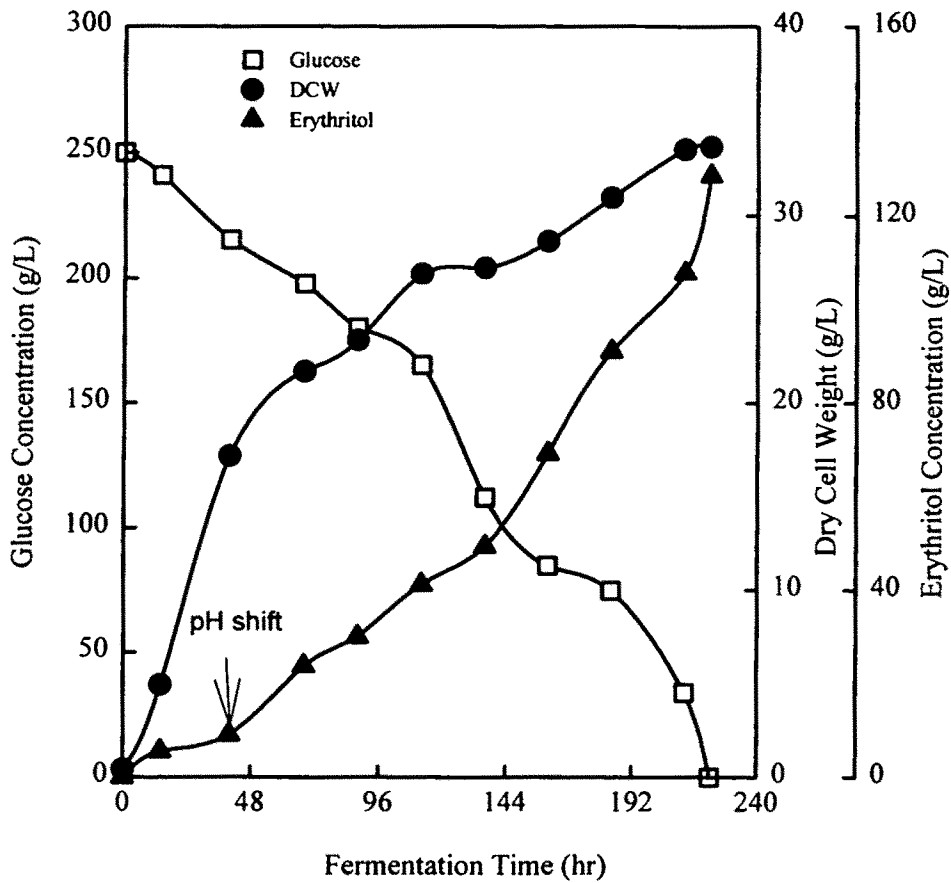


Fig. 37. Fig. 36. Profiles of cell growth, erythritol and glucose concentrations during the batch fermentation of mutant M26 under the shift of pH control from 7.0 to 5.0.

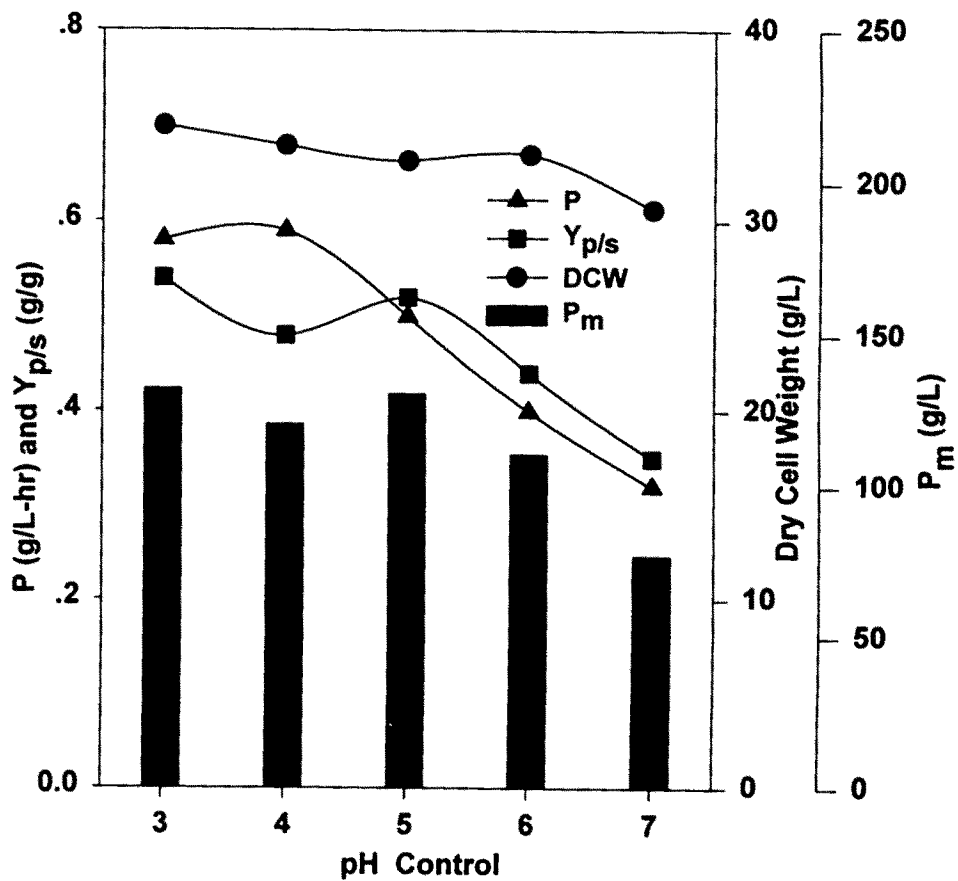


Fig. 38. Effect of pH control on the production of erythritol by mutant M26

5. 야생효모를 이용한 erythritol 생산 공정 개발 및 환경요인 분석

가. 탄소원의 영향

Erythritol의 생산에 적합하다고 알려진 sucrose와 sucrose의 분해산물인 fructose, glucose의 영향을 보기 위한 실험을 수행하였다. Sucrose 최적 농도인 400 g/L와 질소원으로 yeast extract 15 g/L, 그리고 질소원의 고갈에 의한 세포생육의 성장억제를 방지하기 위하여 무기 질소원인 ammonium phosphate 3 g/L를 첨가해 발효를 수행하였다. Fig. 39에서 보는 바와 같이 sucrose가 감소함에 따라 glucose와 fructose가 분리가 되고 fructose가 소비되기 전까지는 대부분의 세포성장 이루어지고, 기질이 소모되는 순간부터 erythritol이 생성되기 시작함을 알 수 있다. Fructose가 먼저 고갈이 되고 그 후 glucose가 소비되었다. 고수율의 erythritol을 생산하기 위한 최적조건으로 700rpm, 1vvm, 26°C로 배양을 하였다. 에리스리톨 농도는 149.15g/L이고 수율과 생산성은 각각 0.37 g erythritol/ g substrate, 0.78g/L.hr로 나타났다.

Sucrose 분해 산물인 fructose를 사용한 배양을 실시해 보았다. Sucrose를 이용한 발효와 같은 조건에서 당만 400g/L의 fructose를 사용하였다. Fig. 40에서 보면 기질소모는 초기농도의 절반밖에 소모하지 못하였지만 cell mass수율이 높았으나 erythritol 생산 수율은 0.22 g erythritol/ g substrate로 낮았다. 따라서 fructose는 에리스리톨 생성에 관여하기 보다는 생육 성장에 많은 의미를 두어야 하겠다. Glycerol의 생성이 두드러졌는데, 역시 발효 후반부에 갈수록 탄소원의 이용보다는 glycerol이 소모되는 양상을 확인할 수 있었다. 생산성이 0.77 g/L.hr 였다.

Fructose와 glucose를 각각 200g/L씩 사용하여 배양을 하였다. Fig. 41에서 보듯 sucrose를 기질로 사용했던 발효 양상과 거의 흡사하여 먼저 fructose 소비후 glucose를 소비함을 여전히 알 수 있었다. Fructose는 완전히 고갈된

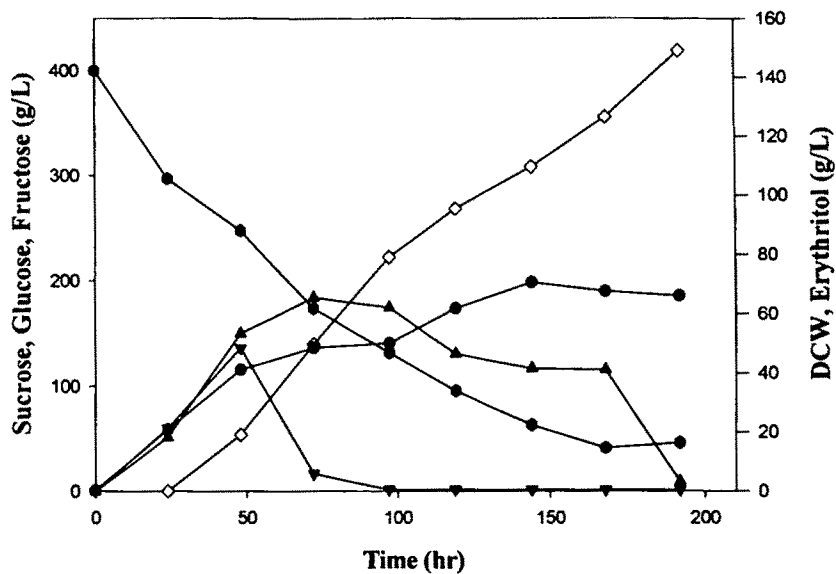


Fig. 39. Fermentation profiles for erythritol production by *Candida* sp. with sucrose of 400g/L, yeast extract of 15g/L, ammonium phosphate of 3g/L at 28°C, 700rpm, 1vvm.

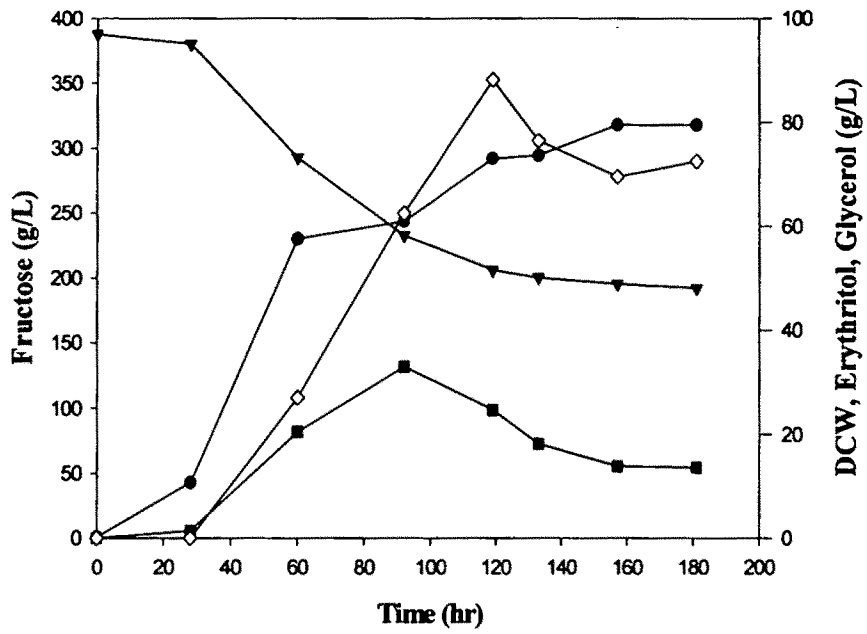


Fig. 40. Fermentation profiles for erythritol production by *Candida* sp with fructose of 400g/L.

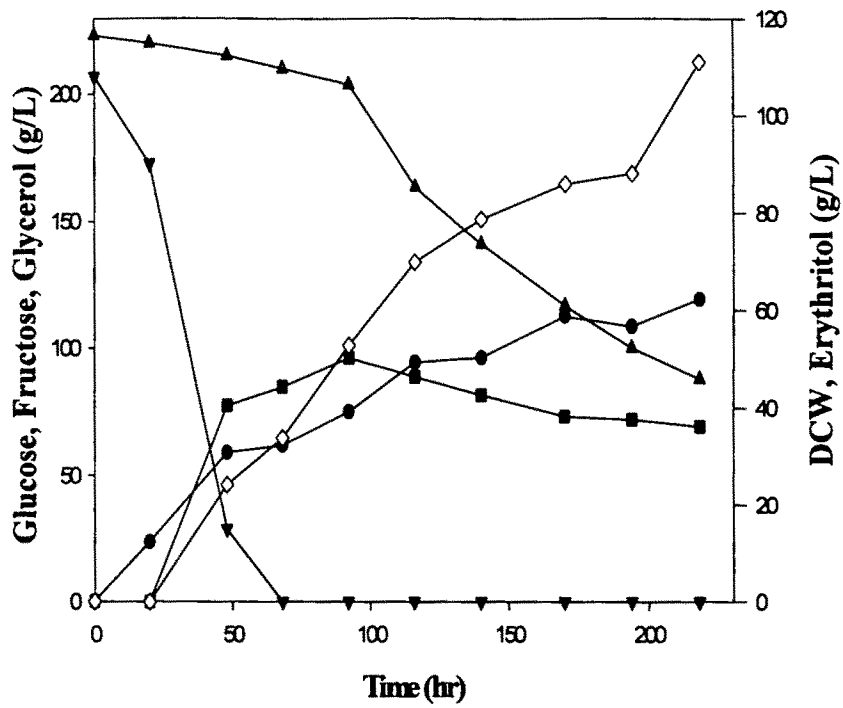


Fig. 41. Fermentation profiles for erythritol production by *Candida* sp with glucose of 200g/L and fructose of 200g/L.

반면에 여전히 glucose는 초기 농도의 절반 정도의 잔당이 존재하였고, 여러 가지 탄소원에 따른 발효 양상중 가장 많은 glycerol 형성을 보였다. 하지만 cell mass로 전환되는 것보다 에리스리톨 생성에 좋은 결과를 얻을수 있었다. Erythritol 농도는 111.05 g/L이었다.

나. 세포의 생육과 erythritol 생산에 미치는 pH의 영향

Erythritol 생산중 배지의 pH는 초기 배지 pH가 6.7에서 발효 후반기에는 pH가 2.5까지 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 따라서 pH가 세포의 생육과 erythritol 생산에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 pH를 조절하지 않은 실험구와 pH를 각각 6.7 4.0 2.5로 조절하여 실험한 실험구를 비교 하였다. pH 조절은 1 N NaOH를 사용하였다.

pH를 6.7로 조절하여 실험한 결과 에리스리톨 생성량은 69.48g/L이고 수율과 생산성은 각각 0.17 g erythritol/g substrate, 0.34 g/L.hr이었다. pH 4.0에서 control하며 발효를 수행한 결과 cell mass는 많이 생성되지 않은 반면에 erythritol 생성이 많음을 확인 할 수 있었다. 에리스리톨 생성량은 126.09g/L로 대체적으로 많은 생성을 보였고, 수율과 생산성은 각각 0.31 g erythritol/g substrate, 0.63 g/L.hr 이었다. pH를 조절하지 않았을 경우 pH가 2.5까지 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다. 본 실험은 낮은 pH에서도 생육이 가능한 균주의 특성을 고려하여 초기 부터 pH를 2.5로 조절하여 발효를 수행하였다. 초기 pH부터 낮게 조절되었으므로 50시간까지 전혀 cell 성장은 이루어지지 않았고, 에리스리톨 생성도 100시간이 되서야 조금씩 생성됨을 확인 할 수 있었다. 이는 배지내 pH가 적정수준으로 떨어질 때까지 lag phase가 길어짐을 의미한다. 발효 초기에는 sucrose의 해리에 의해 glucose와 fructose의 증가함만을 볼 수 있었고, 소비되는 경향은 보이지 않

왔다. 이상의 결과를 모두 종합하여 fig. 42에서 정리하였다. pH를 일정하게 유지하는 것보다 초기 배지 pH를 균주 생육에 적당한 6~7사이에 시작하고 균주가 성장함에 따라 배지내 pH가 낮아지는 형태를 보이는 pH를 조절하지 않은 시험결과가 dry cell mass나 erythritol 생성량 또한 수율 모든 면에서 우수한 점으로 확인되었다.

다. 삼투압에 의한 세포의 성장 및 erythritol 생산의 영향

고삼투압 환경하에서 이들 균주가 compatible solute로서 높은 농도의 polyols를 생산하는 점을 이용하여 염을 이용한 고삼투압의 배지에서의 발효특성을 고찰하고 erythritol의 생산수율을 높이기 위한 연구를 수행하였다.

가) KCl첨가 농도에 따른 영향

일반적으로 당알콜의 생산에는 삼투압 내성을 가진 균주로, 삼투압의 정도에 따라 당알콜 생성능력과 비례하므로 우선 100g/L의 sucrose 발효 배지에서 실험을 수행하였는데 온도는 26°C, 배지의 초기 pH는 6.7로 하였으며 baffled flask를 사용하였다. 그리고 고삼투압을 유지하기 위해 KCl 농도를 10-40g/L로 각각 첨가하였고, KCl로 삼투압을 높인 배지와 그렇지 않은 배지에서 그 영향을 비교하고 높은 erythritol 생산수율을 제공하는 KCl의 최적 농도를 찾는 연구를 수행하였다.

Erythritol 생성에 미치는 KCl의 영향을 고찰한 결과 KCl 10-40 g/L 배지에서 수율이 각각 0.27, 0.23, 0.30, 0.76 (g erythritol/g sucrose)으로 나타나 배지내에 염으로 삼투압을 높여줄 경우 cell은 compatible solute인 polyols을 더 많이 생산함을 알 수 있다. 이는 erythritol과 더불어 glycerol의 생성량도 커지는 결과를 통해 확인된다. 또한 erythritol의 생성 경향을 보면 KCl이 없는 배지에서는 비교적 cell mass의 증가와 나란히 erythritol이 생성되는데 비해 KCl 존재하에서는 세포성장이 거의 끝날무렵에도

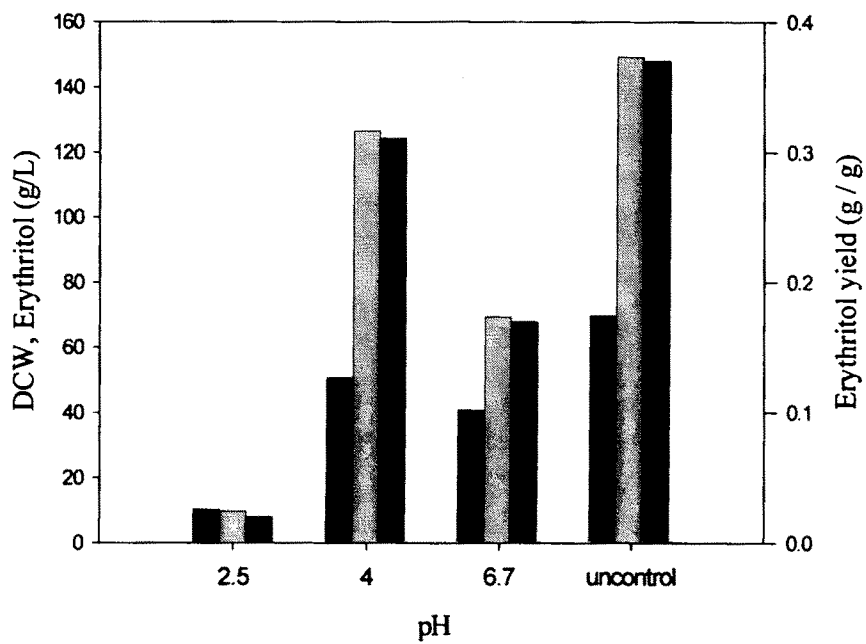


Fig. 42. Effects of pH on cell growth and erythritol production

erythritol이 증가하는 것으로 보아 배지내의 osmotic stress가 이를 유도함을 알수있다. 에리트리톨 생산을 위한 KCl의 최적 농도는 40g/L라 생각되어지며 이때의 최대 erythritol 생성량은 76.00g/L, 수율은 0.55 g erythritol/g sucrose 이었다(Fig. 43).

나) NaCl 첨가에 따른 영향

KCl 첨가외에 다른 염인 NaCl를 첨가하여 flask 배양을 실시하였다. 이 실험에서의 조건은 KCl 첨가시의 조건과 동일하였고, end point의 배양액을 분석하였다. Fig.44에서 보듯 KCl 첨가시와는 다른 양상을 보였는데, NaCl 농도가 높아질 수록 glucose의 함량, 즉 잔당이 많이 존재하는 것으로 보아 기질을 많이 소비하지 못했던 것으로 보였지만 상대적으로 erythritol 생성량은 큰 차이를 보이지 않았으므로 역시 염농도가 높을수록 osmotic stress를 더 많이 받아 대사산물이 더욱 축적되었다고 생각된다. cell mass 양은 KCl 첨가시와 다른 NaCl 20g/L에서 가장 높은 생육속도를 보였다.

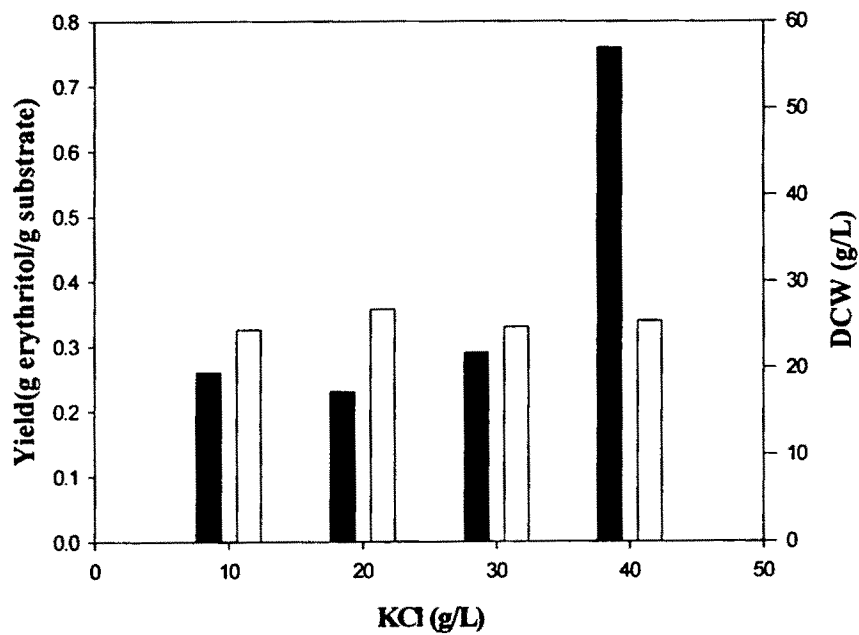


Fig. 43. Effects of KCl on Cell growth and erythritol production by *Candida* sp.

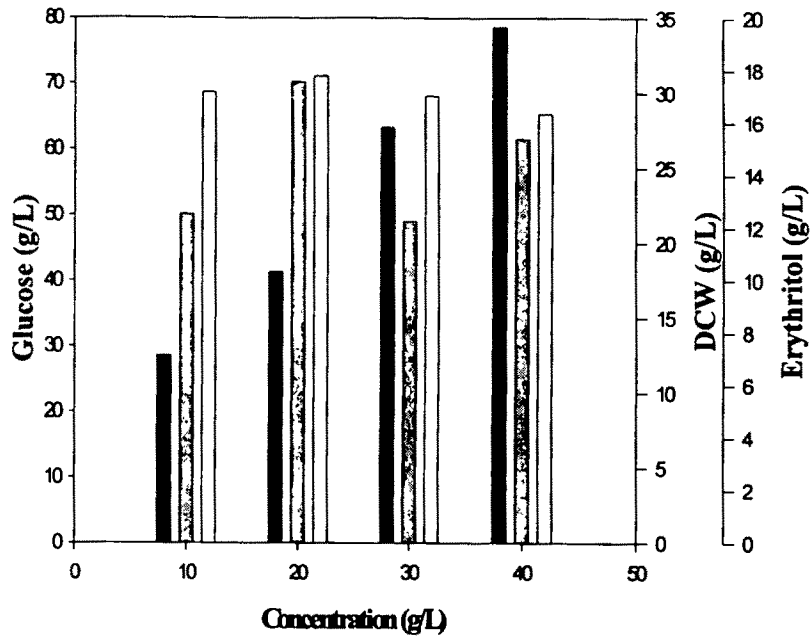


Fig., 44 Effects of NaCl on cell growth and erythritol production by *Candida* sp.

제 4 절 결 론

미생물 발효를 통한 고수율의 erythritol 생산을 위한 연구에 osmophilic yeast인 야생균주(*Candidia* sp. JH)를 사용하였다. 발효배지의 탄소원으로는 glucose가 가장 우수하였으며 질소원으로서 yeast extract 등이 포함된 배지를 erythritol 생산을 위한 발효배지로 결정하였다. 또한 이때 erythritol은 세포성장의 증가와 함께 증가하였다. 높은 수율의 erythritol을 생산하는 균주를 개발하기 위하여 mutagen을 처리하고 염(KCl)의 내성이 뛰어난 변이균주 M26을 얻을 수 있었다.

배지내에 KCl을 첨가한 발효배지에서 실험을 수행한 결과에서 야생균주는 20 g/L KCl 배지에서 약 1.4배의 수율증가를 보였으며 생산성은 0.26 g/L-hr 였다. 또한 변이균주 M26은 50 g/L KCl 배지에서 약 1.1 배의 수율 증가와 생산성 0.33 g/L-hr를 나타냈다. 이로서 염에 의한 water-stress가 erythritol의 생성을 촉진시킨다는 것을 확인하였다. 또한 높은 삼투압 조건에서 erythritol의 수율이 크게 증가하였는데, 염내성 변이균주인 M26을 50 g/L KCl 배지에서 발효실험을 한 결과 수율은 염이 없는 배지에 비해 1.2배 증가한 35.9% 하였다. 배지의 glucose 농도의 증가에 따라 250 g/L 까지 erythritol의 수율이 증가하였다. 즉 변이균주 M26은 250 g/L의 glucose 농도에서 최대 erythritol 생산량이 126.4 g/L로 생성되었으며 수율은 50.4 %, 생산성은 0.602 g/L-hr로 향상되었다.

발효조건 최적화에 대한 연구결과 온도는 28 ℃, 배지의 초기 pH는 7.0, 통기와 교반 조건은 1.0 vvm과 500 rpm에서 erythritol의 생산이 가장 우수하였다. 이러한 최적조건에서 250 g/L의 glucose와 5 g/L의 yeast extract 배지에서 erythritol 농도는 143.3 g/L으로 최대값을 나타내었다. 이때의 erythritol 수율은 57% 이고 생산성은 0.70 g/L-hr 이었다.

제 5 절 참고문헌

1. Hoffmann, A. W. 1874. *Ber.*, 7, 508 (1874)
2. Noda, K. *J. Nutr.* 26(6), 1266 (1992)
3. Hirasawa, M. and T. Takeuchi. *J. Den. Reaser.* 67, 925, 1988
4. Kim, Sang Yong, Jin Hwan Choi, Chul-Jai Kim, and Jung Hoe Kim. Functional Properties of Erythritol. *Food Sci. Ind.* 28(2), 23-28 (1995)
5. Otey, F. H., J. W. Sloan, C. A. Wilham, and C. L. Mehlretter. *Ind. Eng. Chem.* 53, 267-268 (1961)
6. Maria Veiga-Da-Cunha, Santos H. and E. V. Schaftingen. Pathway and regulation of erythritol formation in *Leuconostoc oenos*. *J. Bacteriol.* 175(13), 3941-3948 (1993)
7. Ohnishi, H. Production of polyalcohols by yeasts. *Hakko Kyokaishi*, 25, 495-506 (1967)
8. Hajny, G. J., J. H. Smith, and J. C. Garver. Erythritol production by a yeastlike fungus. *Appl. Microbiol.* 12, 240-246 (1964)
9. Hattori, K. and T. Suzuki. Large scale production of erythritol and its conversion to D-mannitol production by *n*-alkane-grown *Candida zeylanoides*. *Agr. Biol. Chem.* 38(6), 1203-1208 (1974)
10. Wako, K., G. Kawaguchi, N. Kubo, T. Kasumi, and K. Hayashi. Newly isolated yeasts producing high yields of polyols. *Hakkokogaku*, 66, 209-215 (1988)
11. Wako, K., H. Ishizuka, G. Kawaguchi, N. Kubo, T. Kasumi, and K. Hayashi. Erythritol production by *Aureobasidium* sp. SN-115. *Hakkokogaku*, 66, 217-223 (1988)

12. Aoki, M. A. Y., G. M. Pastore, and Y. K. Park. Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotech Lett.* **15**, 383 (1993)
13. 전영중, 서승현. 미생물 발효에 의한 에리스리톨 생산공정의 개발. *생물 화공*, **9**(4), 24-29 (1995)
14. Ishizuka, H., K. Wako, T. Kasumi, and T. Sasaki. Breeding of a Mutant of *Aureobasidium* sp. with High Erythritol Production. *J. Ferment. Bioeng.* **68**, 310-314 (1989)
15. Loray, M. A., J. F. T. Spencer, D. M. Spencer and L. I. C. de Figueroa. Hybrids obtained by protoplast fusion with a salt-tolerant yeast. *J. Ind. Microbiol.*, **14**, 508-513 (1995)
16. Warr, S. R. C., R. H. Reed and W. D. P. Stewart. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2169 (1984)
17. Hocking, A. D. *J. Gen. Microbiol.* **13**, 269 (1986)
18. Hallsworth, J. E. and N. Magan. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology*, **140**, 2705-2713 (1994)
19. 윤종원, 이경희, 송승구. *Aureobasidium pullulans*에 의한 Mannitol의 생산. *한국생물공학회지*, **9**(2), 140-146 (1994)
20. Ermakova, I. T., G. V. Lenkikh, T. A. Gaidenko, T. N. Medvedeva, E. G. Litvinova, and A. V. Korpachev. Biosynthesis of polyols by the yeast *Candida guilliermondii* grown in media with different carbon source. *Mikrobiologiya* **53**(5), 803-808 (1984)
21. Pfyffer, G. E. and D. M. Rast. The polyol pattern of some fungi not hitherto investigated for sugar alcohols. *Exp. Mycol.* **4**, 160-170

(1980)

22. Rose, A. H. and J. S. Harrison. The Yeasts, Vol 2., Academic press, U.K., 9-10 (1986)
23. Yun, J. W., M. G. Lee, and S. K. Song. *Biotechnol. Lett.* **16**, 359 (1994)
24. Tokuoka, K., T. Ishitani and W. C. Chung. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **38**, 35 (1992)
25. Beever, R. E. and E. P. Laracy. Osmotic adjustment in the Filamentous Fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **168**(3), 1358-1365 (1986)
26. Hallsworth, J. E. and N. Magan. Effect of KCl concentration on accumulation of acyclic sugar alcohols and trehalose in conidia of three entomopathogenic fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* **18**, 8-11 (1994)
27. Luxo, C., M. F. Nobre and M. S. D. Costa. Intracellular polyol accumulation by yeastlike fungi of the genera *Geotrichum* and *Endomyces* in response to water stress(NaCl). *Can. J. Microbiol.* **39**, 868-873 (1993)
28. Reed, R. H., J. A. Chudek, R. Foster and G. M. Gadd. Osmotic significance of glycerol accumulation in exponential growing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(9), 2119-2123 (1987)
29. Larsson, C. and L. Gustafsson. The role of physiological state in osmotolerance of the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Can. J. Microbiol.* **39**, 603-609 (1993)
30. Adler, L., A. Blomberg and A. Nilsson. Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J.*

- Bacteriol.* **162**(1), 300-306 (1985)
31. Barnett J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow. YEAST: Characteristics and Identification, Cambridge university Press, Cambridge and New York (1983)
 32. Johann, H., V. Eck, B. A. Prior and E. V. Brandt. Accumulation of polyhydroxy alcohols by *Hansenula anomala* in response to water stress. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 3505-3513 (1989)
 33. Nobre, M. F. and M. S. Da Costa. The accumulation of polyols by the yeast *Debaryomyces hansenii* in response to water stress. *Can. J. Microbiol.* **31**, 1061-1064 (1985)
 34. Eck, J. H. V., B. A. Prior and E. V. Brandt. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1047-1054 (1993)
 35. Anand, J. C. and A. D. Brown. *J. Gen. Microbiol.* **52**, 205-212 (1972)
 36. Onishi, H. *Adv. Food Res.* **12**, 53-94 (1968)
 37. Hallsworth, J. E. and N. Magan. Culture age, Temperature, and pH Affect the Polyol and Trehalose content of Fungal Propagules. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(7), 2435-2442 (1996)
 38. Groleau, D., P. Chevalier and T. L. S. Tse Hing Yuen. Production of polyols and ethanol by the osmophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Biotechnol. Lett.* **17**(3), 315-320 (1995)
 39. Kim, Sang-Yong, Kyung-Han Lee, Jung-Hoe Kim and Deok-Kun Oh. Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis*. *Biotechnol. Lett.* **19**(8), 727-729 (1997)
 40. Park, J. B., B. C. Seo, J. R. Kim, U. H. Pek, and Y. K. Park. Effect

- of Glucose Concentration on the Production of Erythritol by *Trichosporon* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8(5), 543-546 (1998)
42. 성정현. 전분의 직접 알콜 발효를 위한 *Schwanniomyces* sp. 균주의 선발 및 개량에 대한 연구. 아주대학교 생물공학과 석사학위 논문, 1992
 43. 한완옥. 자일리톨 생산을 위한 효모 *Candida* sp.의 균주 개량. 아주대학교 생물공학과 석사학위 논문, 1997
 44. Ryu, Y. W. and S. H. Ko. Selective isolation and characterization of *Schwanniomyces castellii* mutants with increased production of α -amilase and glucoamylase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 3, 95-98 (1993)
 45. Ryu, Y. W., S. H. Ko, S. Y. Byun and C. Kim. Direct alcohol fermentation of starch by a derepressed mutant of *Schwanniomyces castellii*. *Biotechnol. Lett.* 16, 107-112 (1994)
 46. 류병호, 김동현, 윤종원. *Leuconostoc* sp. KY-002의 Mannitol 생산 특성. 한국생물공학회지, 11(6), 636-641 (1996)
 47. 김세용, 박성식, 전영중, 서진호. *Candida* sp.를 이용한 에리스리톨 발효특성의 해석. 한국식품과학회지, 28(5), 935-939 (1996)

제 5 장 농산 폐자원의 전처리 공정의 선정

제 1 절 서 설

전 세계적으로 인구는 매년 증가하고 인구의 증가에 따라 식량의 소비량도 점차로 증가하고 있으나 농작물의 생산량은 한정되어 있다. 그러나 농작물이 광합성에 의하여 생성하는 유기물질의 전체량으로 볼때 인간이 이용하는 부분은 극히 일부에 지나지 않고 대부분은 폐기되고 있는 실정이다. 이와 같이 폐기되는 농산 자원에는 벃짚(rice straw), 밀짚(wheat straw), 옥수수 속(corn cobs), 옥수수 대(corn stalks), 보리 짚(barley straw), 사탕수수 대(cane bagasse) 등이 있는데, 이들은 모두 재생성의 자원들로서 대부분이 섬유성 물질(lignocellulosic materials)로 구성되어 있다.

전세계적으로 광합성에 의하여 생산되는 이용 가능한 섬유성 물질은 약 1,000억 톤 정도이며(1), 국내에서 생산되는 농산 폐자원의 양은 1988년에 약 118억 톤으로서 이중에 70% 정도가 벃짚이다(Table 1). 이러한 농산 폐자원을 국내에서는 일부 가축의 사료로 이용하고 있지만, 대부분이 퇴비나 또는 펄프용으로 이용되고 있는 실정이다. 따라서 농산 폐자원의 이용도를 높인다면 간접적으로 농업증산을 가져올 수 있으므로 농업 발전에 크게 기여할 것으로 기대된다.

Table 1. Agricultural residues produced in Korea(1988)

Residues	Amount(million tons)	Fraction(%)
Rice Straw	8,228	69.5
Rice Hull	1,487	12.6
Barley Straw	560	4.7
Pulse Residue	444	3.8
Others	1,124	9.4
Total	11,843	100.0

섬유성물질의 주요 탄수화물 구성성분은 섬유소(cellulose), 헤미셀룰로스(hemicellulose) 및 리그닌(lignin)으로 되어있으며, 각 성분의 함량은 Table 2에서와 같이 농산 폐자원에 따라 다르다(2). 섬유소(cellulose)는 glucose가 β -1,4-glycosidic linkage로 연결된 중합체(200~2,000 KDa)로서 결정체를 이루고 있다. Hemicellulose는 오탄당(주로 xylose와 일부 arabinose, ribose), 육탄당(glucose, mannose, galactose) 및 uronic acid 로 구성된 중합체이다. 반면 리그닌(lignin)은 방향족 화합물의 중합체로서 식물세포막의 목질화를 가져오는 주요 성분이다. 이러한 섬유성 물질의 구성 성분 중에 cellulose와 hemicellulose는 고 부가가치의 유용한 기능성 감미물질의 생산에 중요한 원료로 이용될 수 있다. 특히 국내의 주요 농산 폐자원인 벼짚에는 목질계에 비하여 리그닌 함량이 낮은 반면 hemicellulose의 함량이 매우 높아 기능성 감미물질인 xylitol의 생산에 매우 적합한 원료이다.

Table 2. Average composition of lignocellulosic material from agricultural residues.

Species	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Cane Bagasse	40%	30%	20%
Corn Cobs	45%	35%	15%
Corn Stalks	35%	25%	35%
Wheat, Rice, Barley Straw	30%	50%	15%

섬유성 물질로부터 기능성 감미물질의 생산원료를 얻기 위해서는 첫째로 섬유성 물질로부터 lignin을 제거시키고 cellulose와 hemicellulose를 분리하기 위한 전처리 공정이 요구되며, 두번째로는 hemicellulose와 cellulose를 xylose와 glucose로 분해시키는 가수분해 공정이 필요하다.

섬유성 물질의 전처리 가수분해공정은 오래 전부터 많은 연구가 이루어져 보고되어 있다. 보고된 공정들 중에서 농산 폐자원의 섬유성 물질에 적용하기 쉽고 경제적인 공정은 다음의 세 가지로 요약할 수 있다(3.4).

- ① Dilute acid prehydrolysis : 이 공정은 dilute acid(주로 H_2SO_4)를 처리하여 hemicellulose - lignin matrix를 prehydrolysis시키는 것이다. 90% 이상의 hemicellulose가 가수분해되어 xylose 등이 생성되지만, 일부의 5탄당들이 분해되어 미생물의 생육억제 물질들로 전환되는 단점이 있다. 나머지 고형물에는 Cadoxen(25% ethylenediamine + 4.5% cadmium hydroxide)를 첨가하여 cellulose를 용해시켜 침전된 lignin과 분리한다. 마지막으로 분리된 cellulose는 산 또는 효소 처리에 의하여 glucose로 전환시킨다.
- ② Organosolv 공정 : 이 공정은 water-alcohol 용액으로 lignin을 제거한 후에 산 또는 효소(xylanases 또는 cellulases) 처리에 의하여 glucose와 xylose를 얻는 방법이다.
- ③ Dilute base prehydrolysis : 이 공정은 1.5%의 NaOH를 원료에 처리한 후 효소(xylanases 또는 cellulases) 처리에 의하여 xylose와 glucose를 얻는 방법이다.

이러한 전처리 및 가수분해 공정은 여러 가지 반응 조건에 따라 최종산물의 생산수율에 커다란 영향을 미치게 되므로 실제의 실험을 통하여 최적조건들을 확립해야 한다. 특히 가수분해 방법 중에 산 가수분해 방법은 빠른 시간 내에 반응이 종결되나 부산물의 생성에 의한 유용한 당의 수율이 감소하고, 또한 생성된 부산물들이 미생물의 생육을 억제한다. 반면 효소가수분해 방법은 부산물의 생성이 없어 유용한 당의 수율이 높지만 반응시간이 길고, 효소의 가격이 비싸다. 그러나 고 부가가치의 기능성 감미물질의 원료를 생산하기 위해서는 효소가수분해 방법이 타당할 것으로 사려된다.

이와 같이 섬유성 물질로부터 기능성 감미물질의 생산원료를 얻기 위해서는 첫째로 섬유성 물질로부터 lignin을 제거시키고 동시에 cellulose와 hemicellulose를 분리하기 위한 전처리 공정이 요구되며, 두번째로는 hemicellulose와 cellulose를 xylose와 glucose로 분해시키는 가수분해 공정이 필요하다. 따라서 본 연구의 최종목표인 농산 폐자원을 이용한 기능성 감미물질 생산에 관한 연구를 위하여 농산 폐자원내의 hemicellulose와 cellulose를 발효당으로 전환시키기 위한 전처리 공정의 선별에 관한 연구를 수행하였다.

제 2 절 연구재료 및 방법

1. 사용원료의 분석

본 실험에 사용된 옥수수 속 및 벚짚의 시료는 Browing 방법(5)에 따라 다음과 같이 제조하였다. 옥수수 속 및 벚짚을 60℃에서 건조시킨 후, 20 mesh와 40 mesh screen을 사용하여 20~40 mesh 크기의 시료를 선별하였다. 시료는 실험에 사용하기 전에 60℃에서 24시간 이상 건조시켰다. 본 연구를 수행하기 전에 옥수수 속 및 벚짚에 존재하는 총 당의 함량을 Klason의 방법(6)에 따라 다음과 같이 측정하였다. 즉 시료 100 mg을 시험관에 넣고 72% H₂SO₄ 1 mL를 첨가하여 30±0.5℃ water-bath에서 1시간 동안 incubation 하였다. 시료를 100 mL Erlenmyer flask에 옮기고 증류수 29 mL을 첨가하여 회석한 후, 100℃에서 1 시간 동안 2차 가수분해하였다. 가수분해된 시료를 Watman filter paper No.1로 여과하여 60℃에서 건조시킨 후에 원래의 시료 무게에서 최종 시료의 무게를 제외한 값을 옥수수 속의 총당으로 표현하였다. 또한 Klason의 방법에 따라 가수분해된 상등액을 Anthrone 방법(7)에 의하여 총당의 함량을 측정하여 Klason의 방법에 의해 얻어진 결과와 비교하였다.

2. 섬유성 물질의 가수분해 공정 선별

20~40 mesh의 옥수수 속 300 mg에 1%(w/v) H₂SO₄ 10 mL를 첨가하여 100℃의 water-bath에서 다양한 시간 동안 반응시킨 후, Watman filter paper No.1을 이용하여 여과하였다. 여과된 용액은 중화시켜 xylose, glucose 및 총당을 측정하였다. 여과지에 남은 고형물은 다시 20 mL 증류수를 사용하여 washing한 후 4%(w/v) NaOH를 첨가하여 lignin을 추출하였다. 반응시킨 용액을 Watman filter paper No.1을 이용하여 여과한 후 각 단계별로 얻어진 시료는 HPLC(Waters)를 이용하여 xylose와 glucose의 농도를 측정하였고, Anthrone 방법(7)에 의해 총당을 측정였다.

3. 효소적 방법에 의한 섬유소 분해

가. 섬유물질 분해 효소 생산 미생물의 탐색

환경이 다른 여러종류의 토양을 취하여 0.85% NaCl 용액 10ml에 현탁한 후 현탁액의 적당량을 취하여 CMC나 xylan을 0.5% 씩 각각 포함하는 복합한천배지 (Y 배지: 0.5% polypeptone, 0.5% beef extract, 0.2% NaCl, 0.05% yeast extract, 2.0% agar)에 도말하여 55℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. CMC 분해균을 직접 선별하기 위해 배지 내에 tryphan blue (80 ml/ml)을 첨가하였다. 그리하여 콜로니 주위에 투명한 환이 나타난 균들을 1차적으로 분리하였고 이들을 액체배양하여 배양액에 존재하는 효소 활성을 온도에 대해 조사함으로써 내열성이 있는 CMCCase와 xylanase를 생산하는 균을 최종적으로 분리하였다.

나. 효소 활성 측정

Xylanase 활성은 xylan을 기질로 하여 효소 반응을 실시한 후 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁 시킨 1.0% (w/v) xyaln 용액 0.5 ml에서 효소액을 첨가하고 최종 반응액을 1.0ml의 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)이 되도록 하여 일정시간 반응 시킨 후 DNS 용액 3 ml을 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에 5분간 방치하여 발색시킨 후 원심분리를 하여 불용성 물질을 제거하였다. 발색된 용액을 540 nm에서 흡광도를 측정하여 이를 xylose를 표준시료로 사용하여 동일조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. Cellulase 활성은 xylanase 활성 측정방법과 동일하게 실시하였으며 기질로 CMC를 동량 사용하였다. β -Xylosidase의 활성은 para-nitrophenyl- β -D-xylopyranoside (pNPX)를 기질로 하여 pNPX로부터 유리된 para-nitrophenol을 정량함으로써 결정하였다. 증류수에 녹인 5 mM pNPX 100 μ l, 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5) 125 μ l와 적당량의 효소용액을 혼합하여 최종 반응부피가 0.5ml이 되도록 하여 40℃에서 15분간 반응 시킨 후 1M Na₂CO₃를 1ml 첨가함으로써 반응을 중지시킨 후 400 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 1.0 unit는 1분 동안 1 μ mole의 반응산물을 생성하는 효소의 양으로 정의 하였다.

다. 효소의 활성염색

분리균이 생산하는 xylanase와 β -xylosidase를 분석하기 위해 SDS-PAGE를 수행한 후 gel을 각 효소에 대해 활성염색을 하였다. 전기영동한 후의 gel을 25% isopropanol이 들어있는 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 담구어 흔들면서 SDS를 제거하였다. Xylanase 활성염색을 하기 위해서 0.2% xylan과 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0)을 함유한 agarose gel을 SDS가 제거된 polyacrylamide gel 위에 얹어 밀착시키고 50°C에서 일정시간 반응 시킨 후 agarose gel을 분리하여 Congo red (0.2%)로 염색시키고 1 M NaCl로 탈색시킴으로써 xylanase 효소활성이 있는 부위를 관찰하였다. β -Xylosidase 활성염색을 위해서는 xylanase와 동일한 과정으로 SDS를 제거시킨 polyacrylamide gel을 0.5 mM methylumberylferyll- β -D-xylopyranoside (MUX)를 함유한 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)에 담구어 40°C에서 반응시킨 후 자외선을 조사하여 효소활성 부위를 관찰하였다.

라. 효소의 정제

분리균이 생산하는 효소를 정제하기 위해서 세포내에 존재하는 β -xylosidase 경우 균체를 파쇄하여 얻은 조효소액을 정제에 사용하였고, 세포외 분비효소는 배양상등액을 ultrafiltration으로 농축한 후 정제에 사용하였다. 정제 단계는 ammonium sulfate 침전, 투석과정을 거쳐 얻은 효소액을 여러종류의 column chromatography를 행하여 정제 과정을 거침으로써 정제하였다. 효소 정제도는 SDS-PAGE를 실시하여 gel에 존재하는 단백질을 염색함으로써 결정하였다.

마. 효소의 특성 결정

정제된 효소의 분자량은 SDS-PAGE와 gel permeation chromatography를 행하여 결정하였고 효소반응의 최적화를 위해서 반응 pH, 온도, 금속이온 농도를 달리하여 이들이 효소반응에 미치는 영향을 조사하였다.

바. 반응산물의 분석

효소반응 후 유리된 당을 분석하기 위해 high performance anionic exchange chromatography (HPAEC)를 실시하였으며 mobile phase로는 0.1 N NaOH를 사용하였으며 용출되는 당은 pulse amperometric detector로 검색하였다.

사. 아미노 말단의 아미노산 잔기배열 결정

정제된 효소를 SDS-PAGE를 실시한 후 gel에 존재하는 단백질을 PVDF membrane으로 옮긴 후 단백질 염색을 하고 효소 단백질 부분만을 오려내어 Applied Biosystem 470A protein sequenator로 아미노 말단의 아미노산 잔기 배열을 결정하였다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 사용 원료의 분석

본 실험에 사용된 옥수수 속의 시료를 분석한 결과 Table 3.과 같이 나타났다. 옥수수속내 존재하는 총당량은 전체 시료의 약 68%(w/w) 였고, lignin을 포함한 그 외 물질은 약 32%(w/w)로 이미 보고된 결과들과 유사하였다(2).

Table 3. Analysis of total carbohydrates content of corn cob.

Total Carbohydrate concentration	Lignin & Others
68 %(w/w)	32 %(w/w)

2. 섬유성 물질의 분해공정 선별

농산 폐자원내의 hemicellulose와 cellulose를 발효 당으로 전환시키기 위한 전처리 공정은 크게 두 가지 방법으로 구분될 수 있다. 첫째는 NaOH를 사용하여 lignin 제거한 후에 묽은 H₂SO₄를 사용하여 hemicellulose를 추출 및 가수분해하고, 나머지 침전물

(cellulose)을 가수분해하는 공정이다. 두번째는 H₂SO₄를 사용하여 hemicellulose를 추출 및 가수분해한 후에 NaOH를 사용하여 lignin 제거하고, 나머지 침전물(cellulose)을 가수분해하는 공정이다. 이 두 공정 중에서 옥수수 속의 hemicellulose와 cellulose를 보다 효과적으로 추출 및 가수분해하는데 적합한 공정을 선별하기 위해 다음과 같이 실험을 수행하였다.

가. Lignin 제거후 hemicellulose 분해공정

20~40 mesh의 옥수수 속 300 mg에 4%(w/v) NaOH 10 mL를 첨가하여 100℃의 water-bath에서 다양한 시간 동안 incubation 시킨 후, Watman filter paper No.1을 이용하여 여과하였다. 침전물을 20 mL 증류수를 사용하여 washing한 후 1% (w/v) H₂SO₄를 첨가하여 100℃ water-bath에서 6시간 동안 산 가수분해를 시켰다. Watman filter paper No.1로 여과하여 얻어진 시료는 HPLC(Waters)를 이용하여 xylose와 glucose의 농도를 측정하였고, anthrone 방법(7)에 의해 총당을 측정한 결과를 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Extraction of lignin and hydrolysis of hemicellulose from corn cobs by first process at 100℃.

Time (hr)	Extraction of lignin with 4% NaOH			Hydrolysis of hemicellulose with 1% H ₂ SO ₄		
	Xylose (g/l)	Glucose (g/l)	Total sugar (g/l)	Xylose (g/l)	Glucose (g/l)	Total sugar (g/l)
0	ND	0.3	2.9	1.5	0.7	3.6
2	ND	0.3	3.3	2.0	0.9	5.5
4	ND	0.4	7.6	3.2	1.8	9.0
6	ND	0.5	7.9	2.5	1.1	9.3

실험결과 lignin을 먼저 제거하는 공정에서는 xylose의 손실은 거의 없었고 glucose의 경우 시간에 따라 0.3~0.5 g/L가 손실되는 것으로 나타났으며 xylose나 glucose와 다른 종류의 당의 경우 2.9~7.9 g/L로 시간이 증가함에 따라 유용한 당의 손실이 더욱 크게 증가하였다. 이후 1% H₂SO₄로 hemicellulose를 가수분해하였을 때 생성되는 xylose의 양은 최대 4시간 반응에서 3.2 g/L 였고, glucose의 양은 1.8 g/L 였다. 따라서 lignin을 먼저 제거시키는 공정에서는 lignin과 함께 많은 당들이 제거되는 단점이 있었다.

나. Hemicellulose 가수분해후 lignin 제거공정

20~40 mesh의 옥수수 속 300 mg에 1%(w/v) H₂SO₄ 10 mL를 첨가하여 100℃의 water-bath에서 다양한 시간 동안 반응시킨 후, Watman filter paper No.1을 이용하여 여과하였다. 여과된 용액은 중화시켜 xylose, glucose 및 총당의 농도를 측정하였다. 여과지에 남은 고형물은 다시 20 mL의 증류수를 사용하여 washing한 후 4%(w/v) NaOH를 첨가하여 lignin을 추출하였다. 반응시킨 용액을 Watman filter paper No.1을 이용하여 여과한 후 각 단계별로 얻어진 시료는 HPLC(Waters)를 이용하여 xylose와 glucose의 농도를 측정하였고, anthrone 방법(7)에 의해 총당의 농도를 측정하였으며 실험결과를 Table 5에 나타내었다.

실험결과 hemicellulose를 1% H₂SO₄로 100℃에서 먼저 가수분해시키는 경우에 생성된 xylose와 glucose의 양은 최대 8.2 g/L와 4.1 g/L로 나타났으며, 이때 원료에 존재하는 xylose에 대한 수율은 거의 95% 이상으로 추정된다. 이후에 4% NaOH를 처리하여 lignin을 제거하는 경우 xylose와 glucose의 손실은 거의 없었고, 유용한 당의 손실도 NaOH를 먼저 처리하는 공정보다 훨씬 감소하였다. 이러한 결과는 묽은 H₂SO₄를 먼저 처리함에 따라 H₂SO₄에 의해 많은 양의 당들이 먼저 추출되기 때문인 것으로 사료된다.

따라서 옥수수 속으로부터 유용한 당을 얻기 위해서는 먼저 H₂SO₄를 처리하여 hemicellulose를 가수분해하고, 이후 NaOH를 처리하여 lignin을 제거하는 공정이 보다 효율적임을 알 수 있었다. 다음의 연구는 최대 수율의 xylose 생산을 위한 공정의 최적 조건의 확립과 분리된 cellulose의 가수분해 조건에 대한 연구를 수행할 것이다.

Table 5. Hydrolysis of hemicellulose and extraction of lignin from corn cobs by second process at 100°C.

Time (hr)	Extraction of lignin with 4% NaOH			Hydrolysis of hemicellulose with 1% H ₂ SO ₄		
	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)	Total sugar (g/L)	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)	Total sugar (g/L)
0	ND	1.1	2.4	ND	0.2	1.9
2	5.8	1.3	6.8	ND	0.3	1.9
4	7.8	4.1	16.5	ND	0.2	2.9
6	8.2	4.1	17.5	ND	0.4	3.0

다. 농산폐자원의 전처리를 위한 산(acid)의 선정

동일한 산의 농도와 실험조건에서 여러 종류의 산에 의한 벧짚과 옥수수 속을 가수분해시킨 결과는 Table 6과 같다. 실험결과에서 hemicellulose의 가수분해는 황산과 질산이 우수하였으며, 보고된 많은 결과에서와 같이 황산이 가장 우수하였다(3,4). 즉 벧짚과 옥수수 속의 hemicellulose 부분을 1% H₂SO₄로 100°C에서 가수분해시킨 결과 xylose와 glucose의 양은 최대 8.0~8.2 g/L와 4.2~4.6 g/L로 나타났다. 이때 벧짚 또는 옥수수 속의 분말 원료 3 g을 100 mL의 황산용액과 혼합하여 산 가수분해를 수행한 후에 여과하여 얻은 상등 액의 부피는 약 90 mL 정도였다. 따라서 원료 1 g에 대하여 얻은 xylose의 양은 0.24 g-xylose/g-raw material 이고 glucose는 0.13 g-glucose/g-raw material 이다. 원료에 30%의 hemicellulose가 존재하고 이 중에서 80%가 xylose 라고 가정한다면, 원료에 존재하는 xylose에 대한 xylose의 수율은 거

의 100% 임을 알 수 있었다.

Table 6. Hydrolysis of corn cob and rice straw by various acids.

Raw materials	Acids	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)	Total sugar (g/L)
Corn cob	H ₂ SO ₄	8.2	4.2	17.5
	CH ₃ COOH	1.2	1.1	5.8
	HNO ₃	7.2	3.4	21.7
	H ₃ PO ₄	3.7	1.8	12.4
Rice straw	H ₂ SO ₄	8.0	4.6	22.1
	CH ₃ COOH	1.7	1.4	6.8
	HNO ₃	7.0	3.4	22.1
	H ₃ PO ₄	3.2	2.1	9.4

라. 전처리를 위한 산(acid) 농도의 결정

농산폐자원에 존재하는 hemicellulose의 산 가수분해에서 황산이 가장 우수하였으므로 황산 농도가 산 가수분해에 미치는 영향을 검토하였다. 실험은 벃짚 또는 옥수수 속 분말을 3 g/L로 하여 각각의 황산용액 100 mL와 혼합한 후에 산 가수분해시키면서 시간에 따라 xylose와 glucose 농도를 측정하였다. 실험결과 옥수수 속(Table 7)과 벃짚(Table 8)에서 1%의 황산의 경우에 거의 모든 hemicellulose가 가수분해되는 것으로 나타났다. 따라서 산 가수분해의 조건을 1%의 황산 농도로 100℃에서 6시간 처리하는 것으로 결정하였다.

Table 7. Hydrolysis of corn cobs with various concentration of H₂SO₄.

Reaction time(hr)	H ₂ SO ₄ Concentration %(w/v)					
	0.5		1		2	
	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)
0	0.05	ND	0.05	ND	0.07	ND
2	1.73	0.65	4.95	2.92	6.05	3.89
4	3.71	1.98	7.19	4.21	7.58	4.85
6	4.28	3.08	7.88	4.84	8.15	5.02
8	5.97	4.29	8.29	5.26	8.45	5.43

Table 8. Hydrolysis of rice straw with various concentration of H₂SO₄.

Reaction time(hr)	H ₂ SO ₄ Concentration %(w/v)					
	0.5		1		2	
	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)
0	0.11	ND	0.15	ND	0.17	ND
2	2.13	0.97	4.67	3.07	5.86	3.58
4	3.28	2.56	7.52	4.06	8.01	4.65
6	4.68	3.11	7.98	4.51	8.12	4.81
8	4.97	3.31	8.11	4.87	8.23	5.16

마. 연속적 산 처리에 의한 가수분해

벼짚 또는 옥수수 속의 산 가수분해 당화액에 당 농도를 높이기 위한 연속적인 산 가수분해 공정에 대한 실험을 수행하였다. 실험은 40 mesh 이하의 벼짚 또는 옥수수 속의 분말 5 g을 1% 황산용액 100 mL와 혼합하여 100°C에서 4시간 동안 산 가수분해를 시켰다. 반응액을 여과하여 얻은 용액에 1% 황산용액을 첨가하여 100 mL가 되게 한 후에 다시 원료 분말 5 g과 혼합하여 산 가수분해를 수행하였다. 이러한 산 가수분해 반응을 5회 연속적으로 수행한 결과를 Table 9와 Table 10에 나타내었다.

실험결과 옥수수 속과 벚짚에서 모두 4번째 이후부터는 당의 가수분해율이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 5번째 산 가수분해 결과 옥수수 속으로부터는 총 당농도 69.5 g/L에 대하여 26.2 g/L xylose와 20.4 g/L glucose가 존재하였다. 벚짚의 경우는 총 당농도 48.0 g/L에 대하여 12.2 g/L xylose와 6.9 g/L glucose가 존재하였다. 동일한 조건과 방법으로 연속적인 산 가수분해를 수행하였을 때 옥수수 속의 hemicellulose가 벚짚의 hemicellulose보다 더 용이하게 가수분해됨을 알 수 있었다.

Table 9. The concentration of total sugar, reducing sugar, xylose and glucose in each step of sulfuric acid hydrolysis of corn cobs.

Steps	Total sugar (g/L)	Reducing sugar (g/L)	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)
1st	22.41	17.68	10.26	6.63
2nd	41.95	37.86	14.45	9.80
3rd	58.19	54.54	19.34	14.81
4th	63.93	60.47	23.92	18.58
5th	69.52	66.06	26.17	20.39

Table 10. The concentration of total sugar, reducing sugar, xylose and glucose in each step of sulfuric acid hydrolysis of rice straw.

Steps	Total sugar (g/L)	Reducing sugar (g/L)	Xylose (g/L)	Glucose (g/L)
1st	13.57	12.73	4.45	2.28
2nd	22.58	21.25	7.81	4.78
3rd	26.82	29.91	10.15	4.06
4th	34.57	34.76	11.99	7.59
5th	47.99	41.94	12.17	6.92

3. 효소적 방법에 의한 섬유소 분해

가. 섬유소물질 분해 효소 생산균의 탐색과 동정

농산폐자원의 주요 구성물인 cellulose와 xylan을 효율적으로 분해할 수 있는 효소 자원을 확보하기 위해 자연계 시료에서 고온성 미생물을 분리하고 이들을 xylan과 CMC를 각각 함유한 Y 배지에서 배양함으로써 콜로니 주위에 생겨난 분해환과 효소 활성에 따라 최종적으로 xylan을 분해하는 *Bacillus* sp. KK-1과 CMC를 분해하는 *Bacillus* sp. 79-23을 선발하였다.

분리균을 동정하기 위해 형태학적 생화학적 특성을 조사한 결과 분리된 균주 KK-1과 79-23은 모두 *Bacillus* 속에 속하는 균으로 판명되었으며 79-23은 API 50 kit를 사용하여 동정한 결과 *B. subtilis*와 거의 유사한 특징을 지니고 있는 것으로 판명되었다.

나. 섬유소 물질을 분해하는 분리균이 생산하는 섬유물질 분해 효소의 특성과 정제

Xylan을 분해하는 분리균 *Bacillus* sp. KK-1이 생산하는 xylan 분해효소의 특성을 조사하기 위해 분리균 KK-1이 생산하는 xylanase와 β -xylosidase, 그리고 그들 효소 유전자가 크로닝된 대장균 형질전환주로 부터 xylanase와 β -xylosidase의 특성을 조사 하였다.

1) *Bacillus* sp. KK-1이 생산하는 xylanase의 특성과 정제

Bacillus sp. KK-1을 50℃에서 배양한 후 배양 상등액에 60% ammonium sulfate를 첨가하여 얻은 단백질 침전물을 25mM sodium phosphate 완충용액 (pH 7.0)에 현탁시켜 SDS-PAGE 전기영동하여 gel 상에서 xylanase 활성염색을 행한 결과 2 종류의 효소 활성을 나타내는 bands가 관찰되었는데 1종류는 (xylanase S) 활성이 높았고 1종류는 (xylanase Y) 활성이 매우 약하였다. 이러한 상기의 효소 현탁액을 20mM Tris·HCl 완충용액 (pH 8.3)에 투석시킨 후 DEAE Sephadex A-50 chromatography를 행하여 최종정제 수율이 13%가 되도록 xylanase S를 정제하였다.

정제된 효소를 사용하여 SDS-PAGE와 gel permeation chromatography를 향한 결과 xylanase S는 분자량이 45,000인 monomeric enzyme임이 판명되었다. pH와 온도가 효소의 활성과 안정성에 미치는 영향을 분석한 결과 효소 반응의 최적 온도는 70℃로 나타났고 80℃에서도 최적 활성의 40% 이상의 활성을 나타내었다. 또한, xylanase S의 활성이 50℃이하에서는 최적 활성의 35% 이하의 활성을 나타내었으나, 60℃에서 69%, 65℃에서 90%로 60℃와 70℃사이에서 높은 활성을 나타내었다. 그리고 열 안정성은 최적활성 온도인 70℃에서는 반감기가 30분 정도 였으나 65℃에서는 10시간 이후에도 75%의 활성을 유지하였다.

효소 활성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과, pH 7.0의 중성조건하에서 최적 활성을 나타내었으며 pH 5.0과 pH 9.0사이에서 최적 활성의 90% 이상의 활성을 유지하여 넓은 범위의 pH에 대해 높은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한 xylanase는 pH 5.0, pH 7.0, pH 9.0에서 모두 8시간 이상까지 방치하여도 활성을 상실하지 않았다.

2) 대장균 형질전환주로 부터 xylanase Y의 정제와 특성

Bacillus sp KK-1이 생산하는 xylanase Y의 양이 매우 적기 때문에 *Bacillus* sp KK-1에서 분리한 염색체 DNA에서 xylanase Y 유전자를 크로닝하여 얻은 대장균 형질전환체의 균체로 부터 xylanase Y를 분리 정제하였다. 균체파쇄액을 ammonium sulfate로 침전 시킨 후 침전단백질을 투석하고 DEAE-Sepharose, CM-Sepharose, hydroxyapatite, Phenyl-Sepharose column chromatography를 통해 최종 수율이 14%

가 되도록 효소를 정제하였다. 그리고 정제된 효소를 이용하여 특성을 분석하고 xylanase S와 비교한 결과 표 1에서 나타낸바와 같이 xylanase S는 내열성 효소이고 xylanase Y는 중온성 효소로 서로 다른 효소임이 확인되었다.

Table 1. Comparison of the properties between xylanase S and xylanase Y

Properties	Xylanase S	Xylanase Y
Molecular weight (Dal.)	45,000	45,000
Optimum pH	7.0	6.5
Optimum temperature (°C)	70	55
pH stability	4.0~11.0	4.0~9.0
Temperature stability	10 h at 65°C	1 h at 50°C
N-terminus amino acid	Ala-Asp-Thr-Ala-Ser-Tyr	Ala-Val-His-Ser-Lys-Thr

3) *Bacillus* sp KK-1이 생산하는 β -xylosidase 분석

분리균 *Bacillus* sp. KK-1이 생산하는 xylanase는 세포밖으로 분비되는 반면에 β -xylosidase의 활성은 균체내에서 높은 활성을 나타냈다. 그러므로 배양균체를 파쇄하여 얻은 세포 추출액을 이용하여 β -xylosidase의 특성을 조사하였다. 균체 파쇄액을 조효소액으로 사용하여 β -xylosidase의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과 70°C와 40°C에서 효소 활성이 높았는데 이로부터 β -xylosidase도 두 종류 이상 존재하는 것으로 판단되어 조효소액을 SDS-PAGE 전기영동하여 β -xylosidase 활성염색을 행한 결과 활성이 있는 부분이 2군데에서 관찰되었다. 그리고 조효소액에서 β -xylosidase의 열안정성은 80°C에서도 6시간 동안 최적 활성의 40% 이상의 활성을 유지하였다. 효소 활성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과, pH 7.2의 중성조건하에서 최적 활성을 나타내었으며 pH 6.5과 pH 7.8사이에서 최적 활성의 80% 이상의 활성을 보였다.

β -Xylosidase 유전자를 크로닝하여 얻은 대장균 형질전환주의 균체에서 β -xylosidase를 분리정제하기 위해 균체파쇄액을 ammonium sulfate로 단백질을 침전시키고 투석을 한 후 Phenyl-Sepharose, Resource-S, Superose 12, hydroxyapatite

column chromatography를 행한 결과 정제수율이 21.6%가 되도록 β -xylosidase 얻었다. 그리하여 대장균 형질전환주로 부터 정제된 β -xylosidase를 사용하여 반응 특성을 분석한 결과 최적 반응온도가 40°C임이 확인 되었는데 이를 *Bacillus* sp KK-1의 균체 파쇄액을 사용하여 조사한 β -xylosidase 활성의 특성과 비교한 결과 *Bacillus* sp KK-1가 β -xylosidase도 중온성과 내열성 두가지 효소를 생산하고 있는 것을 알 수 있었다.

이로써 *Bacillus* sp KK-1은 xylanase와 β -xylosidase간에 반응 최적온도와 열 안정성이 유사한 2 types의 xylan 분해효소를 각각 생산하고 있는 것을 알 수 있으며 이러한 유사성은 고온이나 중온에서 xylan 물질을 가수분해 할 때 반응조건에서 상기 두 효소를 동시에 반응온도에 따라 사용할 수 있는 장점으로 여겨지므로 *Bacillus* sp KK-1은 xylan을 함유한 물질의 고온성 가수분해 효소와 중온성 가수분해 효소의 유전 자원으로 활용될 수 있다.

다. 섬유물질의 효소학적 분해

1) Xylanase에 의한 반응산물의 분석

Oat spelt xylan을 xylanase로 분해하여 최종 반응 산물을 HPAEC (Bio-LC)로 분석한 결과, 주된 산물로 xylobiose, xylotriose, xylose가 생성되었다. xylobiose는 반응산물 중 28.5%의 높은 구성비를 보였으나 xylanase만으로는 xylan의 가수분해가 충분히 이루어지지 않고 다양한 종류의 가수분해 산물이 존재함을 알 수 있었다.

2) 효소의 구성에 따른 반응산물의 분석

Oat spelt xylan을 xylanase와 β -xylosidase으로 동시에 처리하여 가수분해한 반응산물을 HPAEC (Bio-LC)로 분석한 결과, 주된 산물로 xylose와 소량의 xylobiose가 생성되었다. 이 결과로 볼때 이 두효소의 동시 가수분해는 xylan의 분해에 매우 유용함을 확인할 수 있었다.

3) 농산 부산물의 효소학적 가수분해

농산 부산물의 하나인 밀기울을 기질로 해서 xylanase와 xylosidase로 동시에 처리하여 가수분해산물을 분석한 결과 xylose와 xylobise가 생성됨이 확인되었다. 또한

이와 더불어 다양한 종류의 미지의 당류들이 반응산물로 검출되었다. 이 결과로 볼때 밀기울 가수분해에 이 효소들이 매우 유용함을 확인할 수 있었고 효소 구성비를 조절하면 가수분해 효율을 증가시킬 수 있을 것으로 여겨진다.

4) Xylanase와 β -xylosidase를 이용한 xylan의 가수분해

Xylan의 효소적 가수분해 효율을 높이기 위해 *Bacillus* sp KK-1이 생산하는 중온성 효소 xylanase Y와 β -xylosidase를 동시에 처리하여 유리된 환원당의 양을 결정함으로써 가수분해 효율을 분석하였다. β -Xylosidase만으로 xylan을 분해할 경우 거의 분해되지 않으나 xylanase와 β -xylosidase를 동시에 처리하였을때 xylanase만을 처리하여 xylan을 분해할 때보다 훨씬 많은 양의 환원당이 생성되었으며 두 효소를 동시에 사용하였을때 환원당 생성량의 증가율이 각각의 효소만을 사용하여 얻은 환원당의 합보다 커 두 효소를 이용하여 xylan을 분해할 때 분해 효율이 상승효과를 나타내는 것이 확인되었다.

5) 상품화된 cellulase를 이용한 섬유물질의 가수분해

상품화되어 판매되고 있는 기존의 cellulase 제품 (Novo, 태평양)을 사용하여 xylan, CMC, wheat bran, Avicel, rice straw 등의 섬유소물질을 기질로 하여 가수분해하여 생성된 환원당의 양을 결정하여 본 결과 xylan, CMC, wheat, Avicel, rice straw의 순서로 가수분해 정도가 xylan이 가장 높았으며 CMC은 wheat bran과 Avicel 보다는 가수분해 효율이 높았지만 xylan보다는 낮았으며 rice straw가 가장 가수분해 효율이 낮았다.

이로 보아 곰팡이가 생산하는 cellulase 효소는 xylan의 가수분해력은 높으나 cellulose의 분해력이 낮다는 문제점이 있는 것으로 판명되었는데 이는 곰팡이가 생산하는 cellulase에는 β -glucosidase (cellobiase) 활성이 낮기 때문으로 판단되므로 분리 균 *B. subtilis* 79-23의 β -glucosidase (cellobiase) 유전자를 크로닝하여 형질전환주에서 발현량을 늘려 효소를 생산하여 곰팡이 생산 cellulase 효소에 첨가하여 사용할 경우 cellulose의 가수분해력이 상승될 수 있을 것으로 기대된다.

라. 섬유물질 분해 유전자 크로닝과 분석

가) *Bacillus* sp. KK-1로 부터 xylanase와 β -xylosidase 유전자의 크로닝과 유전자 분석

Bacillus sp. KK-1이 생산하는 xylan 분해 효소들은 넓은 온도와 pH 범위에서 우수한 활성을 지니며 농산부산물 가수분해능도 지니고 있는 것으로 나타났으므로 이들 효소 유전자를 크로닝하기 위해 분리균의 염색체 DNA를 분리한 후 제한 효소로 부분절단하고 대장균을 숙주균으로 하여 분리균 KK-1의 genomic bank를 제조하였다. Xylanase 유전자를 함유한 대장균 형질전환체를 선별하기 위해 0.5% xylan을 포함한 LB 배지에서 하룻밤 배양하여 콜로니 주위에 xylan이 분해되어 분해환이 생성된 형질전환주를 얻었다. Xylan을 분해하는 형질전환주를 액체배양하여 균체와 배양액에서 xylanase 활성을 조사한 결과 모두 효소활성을 보였다. 그리하여 형질전환주로 부터 재조합 plasmid를 분리하여 여러가지 제한 효소를 처리하여 제한효소 지도를 작성하였다. 작성된 제한효소 지도를 이용하여 기존에 GenBank에 보고된 xylanase 유전자의 제한 효소 절단 patterns와 비교한 결과 일치하는 것이 없는 것으로 확인되어 새로운 xylanase 유전자임을 알 수 있었다. 그리고 형질전환체가 생산하는 효소를 분리하여 특성을 조사한 결과 *Bacillus* sp. KK-1이 생산하는 중온성 효소 xylanase Y 임이 밝혀졌다.

또한 β -xylosidase 유전자를 크로닝하기 위해서는 대장균 형질전환체를 LB agar plate에 배양한 후 0.2 mM MUX를 함유한 sofr agar (0.8%)를 증충한 후 40°C에서 한 시간 방치하였다. 그리고 자외선을 조사하여 형광을 띄는 콜로니를 선별하였으며 이러한 대장균 형질전환주를 액체배양하고 균체과쇄액을 사용하여 pNPX를 가수분해 시켜 β -xylosidase 효소활성을 조사한 결과 β -xylosidase 유전자가 크로닝됨을 확인되었다. β -Xylosidase 유전자가 크로닝된 형질전환주가 생산하는 효소의 특성을 조사한 결과 이효소는 *Bacillus* sp. KK-1이 생산하는 중온성의 β -xylosidase 임이 확인 되었다. 또한 크로닝된 β -xylosidase 유전자의 제한효소 지도를 작성하고 제한효소 지도에 근거하여 이를 GenBank에 보고된 유전자와 비교한 결과 새로운 유전자로 판명되었다. 이로써 *Bacillus* sp. KK-1의 중온성 xylan 가수분해에 관여하는 2가지 효소 유전자를 확보 분석하였다.

나) *B. subtilis* 79-23의 β -glucosidase 유전자의 크로닝

곰팡이가 생산하는 cellulase를 사용할 때 cellulose 가수분해력을 높이기 위한 방법으로 β -glucosidase 활성을 증대시킬 필요가 있다. 그러므로 CMC를 분해하는 분리균 *B. subtilis* 79-23으로 부터 β -glucosidase 유전자를 크로닝하였다. 대장균을 숙주로 하여 *B. subtilis* 79-23의 genomic library를 제조한 후 형질전환체를 LB agar plate에서 배양한 후 0.2 mM methylumberylferyl β -D-cellobioside를 함유한 soft agar로 증충하여 37°C에서 한시간 방치한 후 자외선을 조사하여 형광을 띄는 콜로니를 선발하였다. 선발된 대장균 형질전환주를 액체배양하여 얻은 균체과쇄액을 사용하여 para-nitrophenyl- β -D-glucoside (pNPG)를 가수분해 시킨 결과 β -glucosidase 활성이 있음을 확인하였다. 이로써 *B. subtilis* 79-23의 β -glucosidase 유전자를 확보하였다.

제 4 절 결 론

농산 폐자원인 옥수수 속과 벚짚에 존재하는 총 당의 함량은 전체 시료의 약 68%(w/w) 이고, lignin을 포함한 그 외 물질은 약 32%(w/w)였다. 농산 폐자원으로부터 유용한 당을 얻기 위해서는 먼저 산을 처리하여 hemicellulose를 가수분해하고, 이후 염기를 처리하여 lignin을 제거하는 공정이 보다 효율적임을 알 수 있었다. 여러 종류의 산(acid)들 중에서 hemicellulose의 가수분해는 황산이 가장 우수하였으며, 산 가수분해의 조건은 1%의 황산으로 100°C에서 6시간 처리하는 것이 최적 이었다. 최적 조건에서 벚짚과 옥수수 속의 hemicellulose 부분을 산 가수분해시킨 결과 xylose와 glucose의 양은 최대 8.0~8.2 g/L와 4.2~4.6 g/L로 나타났으며, 이때의 원료에 존재하는 xylose에 대한 xylose의 수율은 거의 100% 임을 알 수 있었다. 연속적인 산 가수분해에서는 4번째 이후부터 당의 가수분해율이 급격히 감소하는 경향을 나타내었으며, 옥수수 속의 hemicellulose가 벚짚의 hemicellulose 보다 더 용이하게 가수분해됨을 알 수 있었다.

농산폐자원의 주요구성물질인 cellulose와 xylan을 가수분해 하기 위해 우수한 효소를 생산하는 미생물을 탐색하여 성공적으로 확보하였고 분리균이 생산하는 효소를 정제하여 그 특성을 조사함으로써 농산폐자원의 가수분해 조건 확립을 위한 기초 조사에

성공하였다. 정제효소를 이용하여 xylan을 가수분해 시켜 최종 분해 산물인 xylose까지 가수분해가 됨을 확인하였으며 xylanase와 β -xylosidase를 동시에 사용함으로써 가수분해 효율이 상승됨을 확인하였다. 또한 상품화된 cellulase를 이용하여 농산폐자원을 가수분해 시킬 때 cellulose가 xylan보다 가수분해 효율이 낮다는 문제점과 원인을 발견하였다. 섬유소 물질 분해 효소 xylanase, β -xylosidase, β -glucosidase 유전자를 성공적으로 크로닝하였다.

제 5 절 참고문헌

1. Parisi. F. 1988. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolyzates. *Adv. Biochem. Eng.*, **38**, 53-87.
2. Jeffries. T. W. 1983. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. *Adv. Biochem. Eng/Biotechnol*, **27**. 1-32.
3. Tsao, G. T., M. Ladisch, C. Ladisch, T. A. Hsu, B. E. Dale and T. Thou. 1978. Fermentation substrates from cellulosic materials : Production of fermentable sugars from cellulosic materials. *Ann. Rep. Ferm. Process*, **2**, 1-42.
4. Dale. B. E. 1985. Cellulose pretreatments : Technology and techniques. *Ann. Rep. Ferm. Process*, **8**, 299-323.
5. Browning, B. L. 1967. *Method of Wood Chemistry*, Vol.II Wiley, New York
6. Vogel, A. I. 1966. *Practical Organic Chemistry*, 3rd. Ed. Wiley. New York.
7. Weiner, J. 1978. Determination of total carbohydrate in beer. *Ind. Brew.*, **84**, 222.