(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C12N 1/16 (2006.01)

(45) 공고일자 2006년11월10일
(11) 등록번호 10-0643793
(24) 등록일자 2006년11월01일

(21) 출원번호 10-2005-0062209
(22) 출원일자 2005년07월11일

(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 강희윤
경기 수원시 권선구 호매실동 LG아파트 109동 1703호

유연우
서울 강남구 압구정1동 현대아파트 87동 1401호

(74) 대리인 이원희

심사관 : 양인수

(54) 신규 응집성 효모 칸디다 트로피칼리스 H Y200, 이의배양방법 및 이를 이용한 반복 회분식 자일리톨 생산방법

요약

본 발명은 신규한 캔디다 속 균주 HY200 및 이를 이용하여 자일리톨을 생산하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 응집성을 갖는 캔디다 속 균주인 HY200 및 이를 이용하여 D-자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 HY200 균주는 응집성을 가지고 있어 상기 균주를 이용한 생산방법은 추가공정 없이 세포를 침강시킬 수 있으므로 다양한 식품 첨가물로 사용되는 자일리톨을 낮은 비용으로 대량생산하는데 이용될 수 있다.

대표도

도 1

색인어

캔디다 속, 자일로스, 자일리톨, 응집성

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 HY200 균주를 2.5l 발효조에 배지와 함께 넣고 교반시켰을 때, 15분 후에 균주 자체의 응집성만으로 침강되는 현상을 나타낸 사진이고,

(A) 교반을 멈춘 후 0분 (B) 15분

도 2는 본 발명의 HY200 균주(오른쪽)와 다른 캔디다 트로피칼리스(ATCC 20336, 왼쪽)와의 응집성(flocculation)을 비교한 결과를 나타낸 사진이고,

(A) 교반을 멈춘 후 0분 (B) 1분 (C) 2분 (D)3분 후

도 3은 200g/l 의 자일로스, 10g/l의 효모 추출물 및 7g/l의 트립톤을 포함하는 배지에서 자일리톨 생산에 대한 회분식 발효공정(batch fermentation)의 결과를 나타낸 프로파일이다.

▼: 건조 세포 중량 ●: 자일로스 ○: 자일리톨

도 4는 30℃에서 420 rpm, 0.5 vvm 조건으로 반복된 회분식 배양을 실시한 결과를 나타낸 프로파일이다.

DCW: ▼ 자일로스: ● 자일리톨: ○ pH: △ 응집성(%): .■

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 신규한 캔디다 속 균주 HY200 및 이를 이용하여 자일리톨을 생산하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 고농도의 자일로스에 대한 내성을 가지며 응집성을 갖는 캔디다 트로피칼리스 HY200 및 이를 이용하여 D-자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법에 관한 것이다.

자일리톨(xylitol)은 다양한 과일과 몇몇 야채에서 발견되는 5탄당 알코올로(Washuttle. J. et al., J. Food Sci. 38:1262, 1973) 높은 당도를 갖고 있고 분해시 인슐린이 필요하지 않기 때문에 당뇨병과 글루코스-6-포스페이트 탈수소효소-결핍질병 치료를 위한 설탕 대용품으로 각광받고 있다(Maekinen. K. K. Adv. Food Res. 25: 137-158, 1979; Ylikahri, R. Adv. Food Res. 25: 159-180, 1979). 또한 충치균인 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)와 스트렙토코커스 소브리누스(*S. sobrinus*)의 탄소원으로 이용되고 대사되면 충치를 일으키는 산이 발생하지 않으므로 치아의 이차 우식(anticariogenic)을 방지하며(Maekinen. K. K. Adv. Food Res. 25: 137-158, 1979) 클로스트리디움 부티리칸(*Clostiridium butyrican*)과 살모넬라 티피(*Salmonella typhii*)와 같은 부생균(saprophyte)을 억제함으로써 음식의 저장기간을 연장하는 기능도 있다(Emodi, A. Food Thechol. 32: 20-32, 1978). 따라서 츄잉검, 소프트 드링크, 아이스크림 및 치약과 같은 다양한 상품에 첨가된다.

자일리톨은 일반적으로 자일로스(xylose)의 화학적 환원에 의해 생산되는데 주로 자작나무와 같이 자일로스가 풍부한 물질의 헤미셀룰로스 가수분해물(hemicellulose hydrolysate)로부터 유래된다. 이러한 천연물질의 헤미셀룰로스 부분으로부터 자일리톨을 수득할 수 있기는 하나, 다양한 당과 그의 중합체가 함께 포함되어 있어 자일리톨만 수득하기 위해서는 비용이 많이 드는 여러 분리단계를 거쳐야만 한다(Hyvoenen L., Adv. Food Res. 28: 373-403, 1983). 반면 자일리톨을 미생물로 생산하는 방법은 과정이 간단하고 많은 양의 자일리톨을 수득할 수 있으므로 매우 주목받고 있는 방법이다.

몇 가지 미생물이 자일리톨 생산 균주로 스크리닝되었고 그들 대부분은 캔디다 속(*C. boidinii, C. gulliermondii, C. parapsilosis, C. pelliculosa, C. shehatae* 및 *C. tropicalis*)에 포함되거나 캔디다 속과 관련된 종인 *Debaryomyces hansenii* 및 *Pichia stipitis*인 것으로 밝혀졌다(Barbosa, M. F. S et al., J. Ind. Microbiol. 3; 241-251, 1988; Du Preez, J. C. et al., Enzyme Microb. Technol. 32: 20-32, 1978; Jeffries, T. W. Biotechnol. Bioeng. 24: 371-384, 1981; Kim, S. Y. et al., J. Ferment. Bioeng. 83: 267-270, 1997; Kitpreechsvanich, V. et al., Biotechnol. Lett. 6: 651-656, 1984; Ligthelm, M. E., et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 63-68, 1988; Ligthelm, M. E., et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 193-296, 1988; Vongsuvalert, V. and Y. Tani. J Ferment. Bioeng. 67: 35-39, 1989). 자일리톨은 상기 효모의 주요한 자일로스 환원 산물이지만 생산과 배출을 조절하는 인자는 아직 분명히 밝혀져 있지 않다. 그들 가운데 캔디다 트로피칼리스, 피키아 스티피티스 및 재조합 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)가 자일리톨 생산을 위한 회분식(batch)이나 유가식(fed-batch) 배양에 주로 사용되어 왔고(Kim, M. S. et

al., J. Microbiol. Biotechol. 11: 564-569, 2001; Lee, W. J. et al., J. Microbiol. Biotechnol. 13: 725-730, 2003; Vandeska, E. S. et al., J. Microbiol. Biotechnol. 11: 213-218, 1995) 상기 균주를 이용하여 높은 수율의 약 80% 정도의 자일리톨이 수득되었다.

회분식 배양 과정의 중요한 단계는 세척, 발효조의 멸균 및 그 후 세포를 다시 키우는 데 소요되는 시간이다. 유가식 배양은 공정 중의 세포 손실은 피할 수 없고 작동시 재적응시간(readjustment time)의 변동을 초래한다. 이러한 문제를 해결하고 자일리톨 수율을 향상시키기 위하여 배양액으로부터 세포의 분리가 용이한 응집성이 있는 세포를 사용하거나 세포를 고정하는 전략이 대안으로서 고려되고 있으며, 이는 또한 배지에서 세포를 쉽게 분리하고 세포의 오염과 손실의 위험을 줄일 수도 있다(Jang, S. H. et al., J. Microbiol. Biotechnol. 13: 501-508, 2003; Roca, E. et al., Biotechnol. Bioeng. 51: 317-326, 1996; Yahashi, Y. et al., Biotechnol. Lett. 18: 1395-1400, 1996).

대한민국 출원 10-1997-0010244, 10-1997-009717, 10-1998-0020034는 신균주 캔디다 트로피칼리스에 의한 자일리톨 제조방법에 대해 기술하고 있으나 본 발명과는 균주 자체가 다르고 앞서 언급한 바와 같은 회분식 또는 유가식 배양 과정 중에 발생하는 문제점을 해결할 수 없었다.

이에, 본 발명자들은 반복되는 배치 배양과정에서 자일리톨 생산의 증가 및 공정의 단순화 효과를 가져올 수 있는, 응집성을 가지며 높은 자일로스 농도에 내성을 갖는 신규한 균주를 분리하고자 시도하였다. 논의 흙에서 분리 및 동정된 본 발명의 캔디다 속 HY200 균주가 상기와 같은 특성을 가지고 있음을 발견하였으며, 높은 세포 질량으로 반복된 배치(batch) 조작과 세포의 유지 및 재사용이 용이하며 높은 자일리톨 수율과 생산이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 신규한 캔디다 속 균주를 제공하는 것이다.

본 발명은 또한 상기 균주를 이용하여 D-자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신규한 캔디다 트로피칼리스 HY200을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 균주를 이용하여 자일리톨을 생산하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 신규한 캔디다 트로피칼리스 HY200을 제공한다.

본 발명자들은 논에서 다양한 토양 샘플을 수득한 후, 이에 부착된 세포를 모아 고농도의 자일로스가 포함된 증균배지에서 배양하였다. 이를 자일로스가 포함된 한천배지에 도말하고 배양하여 뚜렷한 세포 성장을 나타내는 콜로니를 골라 자일리톨 액체배지에서 응집성을 시험하였다. 응집성을 보이는 배양액은 적절히 희석하여 고체배지에 도말하였고, 빠르게 성장하여 큰 콜로니를 형성한 5개의 균주를 선택하였다. 선택된 균주들을 100 g/l의 자일로스 액체 배지에서 배양하여 자일리톨-생산능과 응집현상을 비교하였다. 이 중, 가장 높은 수율을 가진 하나의 종인 HY200을 최종 선택하였으며, 100g/l의 자일로스, 100g/l 효모 추출물 및 10g/l 박토 펩톤으로 보강된 증균배지에서 배양되었을 때 최대 세포 농도는 10.8g/l 였고 자일리톨 농도는 73.3g/l였다. 선별된 균주는 상대적으로 높은 세포 성장과 적은 지체시간(lag time)을 가지므로 저농도 자일로스(100g/l)에서 배양하였으며 종 분류를 위한 유전형과 표현형의 특징에 따라 체계적으로 동정하였다.

상기 균주는 이동성이 없고 크림색이고 약간의 균사체 경계(mycelial border)를 가지고 있는 호기성 미생물로 카탈라제와 산화제 양성 반응을 나타내었다. Biolog Microlog ^{TM}(Biolog)을 사용하여 실험한 결과 HY200은 글루코스, 프럭토스, 말토스 만니톨, 자일로스와 이노시톨 라피노스를 탄소원으로 사용하고 최적 성장 온도 범위는 30에서 34 ℃임을 확인하였다.

상기 생리학적 분류 방법 외에 계통 관계를 측정하는 강력한 수단인 18S 리보솜 RNA(rRNA) 서열 정보를 분석하였으며, HY200의 18S rRNA 서열은 전형적인 캔디다 균주, 특히 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*)와 매우 높은 상동성(99% 이상)을 나타냄을 확인하였다.

따라서, 18S rRNA 의 상동성 수준과 생리학적 분류 결과로부터 HY200이 캔디다 트로피칼리스 종임을 확인하고 균주의 이름을 캔디다 트로피칼리스 HY200이라고 명명하였다. 본 발명의 캔디다 트로피칼리스 HY200 세포주는 2005년 6월 2일에 한국생명공학연구원 생물자원센타에 기탁되었으며 수탁번호는 KCTC 10813BP이다.

자일리톨 생산을 늘리기 위한 다양한 노력들이 있어 왔는데 자일리톨의 대사 및 세포성장에 자일리톨이 에너지원으로 사용되는 것을 막고 최초 자일로스 농도를 높여 많은 자일리톨 생산을 가능하게 하려는 것이 그것이다. 캔디다 종에 의한 자일리톨 생산시 자일로스 뿐 아니라 자일리톨도 탄소원으로 사용한다고 알려져 있기 때문에 탈수소화효소에 의한 자일리톨의 그 다음 단계로의 대사를 막아 자일리톨의 감소를 줄일 필요가 있었다. 또한, 세포 성장에 이용되는 자일리톨의 양을 줄이기 위하여 세포 성장에 사용되는 대안적인 탄소원을 밝혀낸다면 수득할 수 있는 자일리톨 양이 증가할 것이라고 여겨져 왔다.

본 발명자들은 먼저, 자일로스 외에 HY200이 대사할 수 있는 탄소원을 찾아내기 위해, 18가지 탄소원에 대한 동화작용의 활성을 테스트하였다. 그 결과, HY200이 비교적 높은 세포 농도에서도 프럭토스, 글루코스, 말토스 및 만니톨을 잘 대사시키고 이노시톨, 라피노즈 람노즈를 탄소원으로 이용할 수 있었으나 자일리톨은 탄소원으로 이용하지 못하였다. 이로써 HY200이 자일로스 외에 다른 탄소원도 이용할 수 있었으나 자일리톨은 대사하지 못함으로써, 자일로스로부터 손실없이 자일리톨을 생산할 수 있는 우수한 후보임을 확인하였다.

이와 같이 HY200은 자일로스를 더 빨리 소비하고 고농도의 자일로스에 내성이 있으며 탄소원으로서 자일리톨을 이용하지 않고 응집성이 있어 배양시 쉽게 가라앉음으로써 원심분리와 같은 추가공정 없이도 세포와 수용성 산물이 분리되는 장점을 가지므로 여타의 캔디다 속 균주와 큰 차이점을 지니고 있다(도 1 및 도 2 참조).

또한, 본 발명은

1) HY200 균주를 종 배양하는 단계;

2) 단계 1의 배양액을 발효배지에 접종한 후 공기 공급량, 교반속도 및 온도를 조절하여 배양하는 단계; 및

3) 단계 2의 배양액으로부터 자일리톨을 정제하는 단계를 포함하는 자일리톨 생산방법을 제공한다.

본 발명자들은 본 발명의 HY200으로부터 효과적으로 자일리톨을 생산하기 위하여 배지조건을 최적화할 수 있는 방법을 연구하였다.

먼저 최고 수율로 자일리톨 생산에 적합한 질소원을 선택하기 위하여, 액체 녹말 웨이스트, 효모 추출물 및 소이톤(soytone)으로 테스트한 결과, HY200가 효모 추출물, 트립톤 또는 이의 혼합물에서 높은 생산성과 응집성을 나타내는 것을 확인하였다.

한편, 자일로스 농도를 증가시키면 자일리톨 수율이 증가되나 에탄올 수율은 낮아지는 것으로 알려져 있는데 Nolleau 등은 초기 자일로스 농도의 증가는 기질 억제 및/또는 삼투압에 의해 세포 성장이 억제됨을 보고하였으나 Sirisansanneeyakul 등은 유사한 특정 성장속도에서 자일로스 농도의 증가는 자일로스 흡수와 자일리톨 생산을 증가시킴을 보고하였다. 이에 세포성장과 최대의 자일리톨 수율을 위해 HY200의 배양에 적합한 초기 자일로스 농도를 알아보기로 하였다. 이를 위해 각기 다른 초기 자일로스 농도를 갖는 발효조에서 세포를 첨가한 후 결과를 관찰한 결과, 초기 자일로스 농도가 200 g/l 이하일 때는 자일로스 농도가 증가할수록 세포농도와 생산성이 증가하는 반면 자일리톨 수율에서는 약간의 차이만이 있었다. 자일로스 농도가 200 g/l 보다 높아지면(200 내지 300 g/l) 배양시간이 급격하게 증가하였고 세포 성장과 생산성이 떨어졌다(표 2). 이런 결과는 초기 자일로스 농도가 200g/l에서 최고의 수율을 얻을 수 있음을 밝힌 Gong et al.과 Ikeuchi의 보고와도 일치한다.

세포 증식, 자일로스 소비 및 자일리톨 생산에서 과도한 통기(aeration)는 세포량이나 자일리톨 생산을 줄인다는 의견이 있는 반면, 산소 수치가 낮을수록 세포 성장을 제한하고 자일리톨 생산을 감소시킨다는 연구 결과도 있다(Furlan, S. A. et al., Process Biochem. 29: 657-662, 1994; Furlan, S. A. et al., Biotechnol. Lett. 13: 203-206, 1991; Roseiro, J. c. ET AL., 156: 484-490, 1991; Walther. T. et al.Biores. Technol. 76: 213-220, 2001). 따라서 본 발명자들은 최적의 통기량을 알아보기 위하여 다양한 통기량을 가하였을 때, 자일리톨 생산량의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 1.5 vvm의 통기

속도에서 세포 농도는 최대에 달했으나 자일로스가 자일리톨로 변하는 수율은 상대적으로 다른 조건보다 낮았고 0.5 vvm 통기속도에서는 자일리톨 생산성과 수율은 높았지만 배양시간이 매우 길었다. 상기 결과를 종합하여 최적 통기 속도는 약 1.0 vvm으로 결정하였다(표 3).

한편, 최종 세포량과 자일리톨 생산성은 교반 속도가 증가함에 비례하여 증가하였으나 배양시간과 자일리톨 수율은 교반 속도가 증가함에 따라 감소하여(표 4) 최대 자일리톨 생성의 교반속도는 330rpm 이었다. 배양온도가 30 ℃로 유지되면 최대 자일리톨 수율과 생산성을 나타내었고 27℃ 보다 낮으면 세포 성장이 갑자기 감소하였고 32℃ 보다 높으면 세포 성장 속도는 낮아지고 자일리톨 생산성 또한 감소하였다. 최초 pH는 자일리톨 생산에 거의 영향을 미치지 않았으나 그 중 pH가 4.0일 때 세포 성장이 제일 높았다.

분리된 균주인 캔디다 트로피칼리스 HY200을 100ml 자일로스 배지(300g/l 자일로스, 10g/l 효모 추출물, 10g/l 박토 펩톤)에 접종하여 교반속도 200rpm으로 30℃에서 24 시간동안 종 배양하였다. 상기 종 배양액을 발효 배지와 1-l 작용 부피(working volume)로 혼합하여 본 배양하였다. 상기한 바와 같이 교반속도는 330rpm, 통기량은 1.0 vvm, 초기 pH는 4.0 배양온도는 30 ℃, 초기 자일로스 농도는 200g/l으로 최적의 배지 및 배양조건을 설정한 후 HY200 균주를 배양하였다. 배양 후, 세포는 원심분리 후 분광기로 확인하고 배양 배지는 high performance liquid chromatograpy(Waters)로 분석하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 HY200의 자일리톨 생산은 직선으로 증가했고 자일로스 소비속도는 직선으로 감소했으며 최초 자일로스 농도가 200g/l로 공급되었을 때, 자일리톨 수율은 77%와 생산성은 2.57g/l・h로 가장 높음을 확인하였다.

상기와 같은 방법으로 생산된 자일리톨은 배지로부터 통상적인 방법으로 분리되어 수득될 수 있다. 예를 들어 원심분리와 같은 방법으로 배지를 제거한 후 남아있는 용액은 활성화된 탄소, 이온-교환 수지 등에 의해 탈염된 후 결정화될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 효소와 화학물질 준비

D-자일로스 및 자일리톨은 Sigma에서 구입하였다. 제한효소, Taq DNA 중합효소, pGEM-T 벡터와 게놈 DNA 분리 키트는 Promega에서 구입하였고 모든 다른 시약과 화학물질은 분석용 품위(analytical grade)로 사용하였다.

<실시예 2> 증균배양 및 스크리닝

한국의 화성과 수원에 위치한 논에서 다양한 토양 샘플을 수득한 후, 이를 밤새도록 식염수(saline buffer) 또는 증균 배지에 강하게 흔들어 현탁하여 대부분의 부착 세포를 배출시켰다. 현탁 세포는 원심 분리로 회수하거나 300g/l 자일로스, 10g/l 효모 추출물 및 10g/l 박토 펩톤(Difco)을 포함하는 증균 배지(pH 6.0)에 접종하였다. 10개의 샘플이 300g/l 자일로스가 첨가된 증균배지에서 뚜렷한 세포 성장을 나타냈는데 이러한 종들은 100g/l의 자일로스가 첨가된 동일한 배지로 접종한 후 응집성(flocculation)을 분석하였다.

몇몇 플라스크에서 응집 현상이 관찰됨에 따라 배양 배지는 적절히 희석한 후 동일한 고체 배지에 도말하였다. 그 결과 약 38 개의 콜로니를 우선적으로 스크리닝하였고 이들은 높은 자일로스 농도(300g/l)의 고체배지에 도말한 후, 빠르게 성장하여 큰 콜로니를 형성한 5개의 균주를 선택하였다. 선택된 균주들을 100 g/l의 자일로스 액체 배지에서 배양하여 잠재적인 자일리톨-생산능과 응집현상이 비교되었다.

배양한 세포는 원심분리(4000 rpm, 5분)하여 회수한 후 분광기(600nm, UV-1201 Shimazu)로 확인하고 배양 배지는 high performance liquid chromatography(Waters)로 분석하였다. 자일로스와 자일리톨 분석을 위해 탄수화물 분석 컬럼(Waters)을 이용하였고 상기 컬럼은 아세토니트릴과 증류수를 80:20으로 섞은 용액으로 평형화한 후 2ml/min 의 일정한 유속으로 작동시키고 이동상 용매(eluent)는 RI(굴절률) 검출기(Waters)를 사용하여 기록하였다.

비교 결과, 30 ℃에서 24 시간 동안 100g/l의 자일로스, 10g/l의 효모 추출물 및 10g/l의 박토 펩톤이 첨가된 증균배지에서 배양하였을 때, 최대 세포량과 자일리톨 농도가 10.8g/l와 73.3 g/l로 가장 높았던 HY200을 최종적으로 선별하였다.

<실시예 3> 종 동정

상기 **<실시예 2>**와 같이, 다양한 논의 토양으로부터 연속적인 스크리닝 단계를 거쳐 분리한 HY200은 종 분류를 위해 유전형과 표현형의 특징에 따라 체계적으로 동정되었다. 이 균주는 이동성이 없고 크림색이고 약간의 균사체 경계(mycelial border)를 가지고 있는 호기성 미생물로 카탈라제(catalase)와 산화제 양성 반응을 나타내었다. Biolog Microlog ™ (Biolog)을 사용하여 실험한 결과 HY200은 글루코스, 프럭토스, 말토스, 만니톨, 자일로스와 이노시톨 라피노스를 탄소원으로 사용하였고 최적 성장 온도 범위는 30에서 34 ℃ 였으며 40 ℃에서는 자라지 못했다.

또한, 상기와 같은 생리학적 분류 외에 리보솜 RNA 유전자 서열은 계통 관계를 측정하는 강력한 수단을 제공하므로 18S 리보솜 RNA(rRNA) 서열 정보를 분석하여 HY200의 종을 동정하였다. 각각 서열번호 1과 2로 기재되는 공통적인 프라이머 세트를 이용하여 각각의 18S rRNA 유전자(1,785 bp)를 증폭시켰다. PCR은 Thermal Cycler(Techne)로 수행하였고 반응 조건은 하기와 같다. 96도에서 3분 동안 초기 변성 단계를 거친 후, 96도에서 30초간 변성하고 56도로 40초 동안 어닐링(annealing)하고 72도로 1분 동안 연장시키는 단계를 35 사이클 수행한 후 72도에서 3분 동안 마지막 연장 단계를 수행하였다. 증폭된 DNA 절편은 0.8% 아가로스 젤에 로딩하고 용리한 후, 정제하여 pGEM-T 벡터로 서브클로닝하고 이의 서열을 분석하였다. 그 결과, HY200의 18S rRNA 서열은 전형적인 캔디다 균주, 특히 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*)와 매우 높은 상동성(99% 이상)을 나타냄을 확인하였다. 18S rRNA의 상동성 수준은 생리학적 분류 결과와 함께 HY200이 캔디다 트로피칼리스 종임을 나타내므로 균주의 이름을 캔디다 트로피칼리스 HY200이라고 명명하였다.

<실시예 4> 응집성 테스트

1-1 작용 부피(working volume)을 포함하는 2.5l 발효조에서 HY200을 교반하다가 교반을 멈춘 즉시 그리고 교반을 멈추고 15분 뒤 HY200의 응집성을 확인하였다. 그 결과, 교반을 멈춘 직후에는 도 1의 A와 같이 HY200은 세포들이 응집을 시작하고, 15분 뒤에는 도 1의 B와 같이 대부분의 HY200이 응집되어 침강됨을 확인하였다.

또한, 본 발명의 HY200 균주는 뚜렷한 응집성을 나타내어, 자일리톨 생산에 일반적으로 이용되는 캔디다 속 균주인 *C. tropicalis* ATCC20336(도 2의 왼쪽)에 비해 교반시 빠르게 침강되었다(도 2의 오른쪽).

상기와 같이 스크리닝된 균주가 캔디다 트로피칼리스 종으로 동정되었으나 HY200이 자일로스를 다른 캔디다 트로피칼리스인 ATCC 20336 보다 더 빨리 소비하고 300g/l 이상의 높은 자일로스 농도에 내성이 있어 이 농도에서도 HY200의 세포 성장은 심하게 억제되지 않으며 배양시 응집이 잘 일어나 쉽게 가라앉는 장점이 있으므로, 산업상 용도로 일반적으로 사용되는 트로피칼리스(ATCC 20336)와는 분명히 구분되었다(도 2).

<실시예 5> 배지 및 배양조건 최적화

분리된 균주인 캔디다 트로피칼리스 HY200는 일정한 정도로 자라면 30℃에서 주기적으로 100g/l 자일로스 10g/l 효모 추출물, 10g/l 박토 펩톤 및 20g/l 아가를 포함하는 배지로 이동시켰다. 이를 300g/l 자일로스, 10g/l 박토 펩톤 및 10g/l 효모 추출물이 함유된 100 ml의 자일로스 배지를 포함하는 500ml Erlenmeyer 플라스크에서 30℃에 200 rpm으로 종 배양하였다.

종 배양한 배지를 하기 **<5-1>** 내지 **<5-6>**과 같이 각기 다른 탄소원과 질소원을 포함하는 발효배지와 혼합하여 배양하거나 다양한 통기량, 교반속도 또는 온도 조건으로 배양하였다. 배양한 세포는 원심분리(4000 rpm, 5분)하여 회수한 후 분광기(600nm, UV-1201 Shimazu)로 확인하고 배양 배지는 high performance liquid chromatography(Waters)로 분석하였다. 자일로스와 자일리톨 분석을 위해 탄수화물 분석 컬럼(Waters)을 이용하였고 상기 컬럼은 아세토니트릴과 증류수를 80:20으로 섞은 용액으로 평형화한 후 2ml/min 의 일정한 유속으로 작동시키고 이동상 용매(eluent)는 RI(굴절률) 검출기(Waters)를 사용하여 기록하였다.

상기 결과를 분석하여 자일리톨 수율과 생산성이 높은 최적의 배지 및 배양 조건을 설정하였다.

<5-1> 탄소원

본 발명자들은 자일로스 외에 HY200이 대사할 수 있는 탄소원을 찾아내기 위해, 18가지 탄소원에 대해 나타내는 동화작용의 활성을 테스트하였다. 그 결과, HY200은 비교적 높은 세포 농도에서도 프럭토스, 글루코스, 말토스 및 만니톨을 잘 대사시켰다. 글루코닉산과 락토스를 탄소원으로 했을 때는 세포가 성장하지 않았고 기존 연구에서 캔디다 트로피칼리스에 대한 결과와 반대로(Gong, C. S. et al., Biotech. Lett. 3: 130-135, 1981; Horitsu, et al., Biotechnol. Bioeng. 40:

1085-1091, 1992; Lu, Jean et al., Biotechnol. Lett. 17: 167-170, 1995; Oh, D. K. and S. Y. Kim Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 419-425, 1998; Walther, T. Biores. Technol. 76: 213-220, 2001) HY 200은 이노시톨, 라피노즈, 람노즈를 탄소원으로 이용할 수 있었다. 특이할 만한 사항으로, HY200은 단독의 탄소원으로서 자일리톨을 이용하지 못했는데 이는 HY200이 자일로스로부터 자일리톨을 생산할 수 있는 우수한 후보임을 강력하게 뒷받침한다.

<5-2> 질소원

본 발명자들은 본 발명의 HY200으로부터 효과적으로 자일리톨을 생산하기 위하여 높은 자일로스 농도와 세포량 등을 고려하여 배지조건을 최적화할 수 있는 방법을 연구하였는데, 먼저 최고 수율로 자일리톨 생산에 적합한 질소원을 선택하기 위하여, 몇몇 대표적인 질소원을 테스트하였다(표 1). 시중에서 쉽게 구할 수 있는 액체 녹말 웨이스트, 효모 추출물 및 소이톤(soytone)으로 테스트한 결과, 액체 녹말 웨이스트는 가장 높은 세포 농도(11.5g/l)를 보였고 효모 추출물은 자일리톨 수율이 최대였다. 소이톤은 세포 농도는 낮았으나 세포의 응집(flocculation)은 없었다. 트립톤은 펩톤보다 두 배 더 높은 세포 농도를 나타내었고 뚜렷한 응집반응을 나타내었다. 이러한 결과는 HY200가 효모 추출물이나 트립톤에서 높은 생산성과 응집반응을 나타낸다는 것을 나타낸다. 효모 추출물(10g/l)과 트립톤(7g/l)을 함께 사용했을 때도 높은 생산성과 응집반응을 나타내었고 무기 질소원은 세포 성장과 자일리톨 생산에 부적합했으며 이는 Sirisansanneeyakul에 의한 연구결과와도 일치한다(Sirisansanneeyakul, S. et al., J. Ferment. Bioeng. 80: 565-570, 1995).

[표 1]

질소원이 HY200의 자일리톨 생산에 미치는 영향

질소원	농도 (g/l)	DCW (g/l)	수율 (g-xylitol/g-xylose)
효모 추출물	10.0	5.2	0.74
박토 펩톤	5.7	3.8	0.42
액체 녹말 웨이스트	87.4	11.4	0.70
옥수수 침출 가루	13.7	9.7	0.72
소이톤	10.9	3.5	0.69
트립톤	6.9	6.8	0.67

<5-3> 최초 자일로스 농도

본 발명자들은 자일로스의 최초 농도가 세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 2.5l 발효조에 10g/l 효모 추출물, 7g/l 트립톤 및 100 내지 300g/l의 각기 다른 최초 자일로스 농도를 갖는 발효배지와 HY200 균주의 종 배양액을 1-1 작용부피(working volume)로 혼합한 후 세포의 성장을 관찰하였다. 그 결과, 최초 자일로스 농도가 200 g/l 이하일 때는 자일로스 농도가 증가할수록 생산성이 증가했고 자일로스 농도가 200 g/l 보다 높아지면(200 내지 300 g/l) 배양시간이 매우 늘어나고 세포 성장과 생산성은 떨어졌다. 배양시간은 회분식 배양에서 자일로스를 완전히 소비하는 시간을 나타낸다(표 2).

[표 2]

초기 자일로스 농도가 HY200의 자일리톨 생산에 미치는 영향

농도(g/l)	배양시간(h)	DCW (g/l)	수율(g xylitol/g xylose)	생산성(g/l·h)
100	42	9.3	0.69	1.74
150	48	11.2	0.73	2.17
200	60	11.7	0.74	2.52
250	90	11.5	0.76	2.23
300	120	11.2	0.72	1.68

<5-4> 통기(aeration)

몇몇 연구자들은 세포 증식, 자일로스 소비 및 자일리톨 생산에서 과도한 통기는 세포량은 증가되나 자일리톨 생산은 줄인다고 보고했고 또한 일부 연구자들은 산소 레벨이 낮을수록 세포 성장을 제한하고 자일리톨 생산이 감소한다고 보고했다(Furlan, S. A. et al. Process Biochem, 29: 657-662, 1994; Furlan, S. A. et al., Biotechnol. Lett. 13: 203-206, 1991; Roseiro, J. C. et al., Arch. Microbiol., 156: 484-490, 1991; Walther, T. et al., Biores. Technol. 76: 213-220, 2001).

본 발명자들은 통기조건을 최적화하기 위해, 2.5l 발효조에 100g/l 자일로스, 10g/l 효모 추출물, 7g/l 트립톤을 포함하는 발효배지와 HY200 균주의 종 배양액을 1-1 작용부피(working volume)로 혼합한 후, 300rpm의 교반속도로 0.5-1.5 vvm의 다양한 통기 조건에서 HY200 균주를 배양한 후, 자일리톨 생산량을 분석하였다.

[표 3]

통기(aeration)가 HY200의 자일리톨 생산에 미치는 영향

통기량 (vvm)	시간 (h)	DCW (g/l)	수율 (g xylitol/g xylose)	생산성 (g/l·h)
0.5	54	3.6	0.72	1.15
1.0	42	9.3	0.69	1.74
1.5	30	14.8	0.62	2.12

그 결과, 1.5vvm의 통기 속도에서 세포 농도는 최대인 약 14.8g/l에 달했으나 자일로스가 자일리톨로 변하는 수율은 상대적으로 다른 조건보다 낮았다. 0.5vvm 통기속도에서 자일리톨 생산성과 수율은 1.15 g/l · h 와 1g 자일로스 당 0.72 g 자일리톨로 생산성과 수율은 높았지만 배양시간이 매우 길었다. 상기 결과를 종합하여 최적 통기 속도는 약 1.0 vvm으로 결정하였다(표 3).

<5-5> 교반 속도

본 발명자들은 교반 속도를 최적화하기 위해, 2.5l 발효조에 100g/l 자일로스, 10g/l 효모 추출물, 7g/l 트립톤을 포함하는 발효배지와 HY200 균주의 종 배양액을 1-1 작용부피(working volume)로 혼합한 후, 1.0 vvm의 통기량으로 다양한 교반 조건에서 HY200 균주를 배양한 후, 자일리톨 생산량을 분석하였다.

[표 4]

교반 속도가 HY200의 자일리톨 생산에 미치는 영향

통기량 (rpm)	시간 (h)	DCW (g/l)	수율 (g xylitol/g xylose)	생산성 (g/l·h)
250	84	8.5	0.68	0.65
300	42	9.3	0.69	1.74
330	36	10.8	0.72	2.04
350	30	21.7	0.59	2.24
400	24	27.2	0.43	2.38
500	20	33.3	0.29	2.04

그 결과, 최종 세포량과 자일리톨 생산성은 교반 속도가 증가함에 비례하여 증가하나 배양시간과 자일리톨 수율은 교반 속도가 증가함에 따라 감소하는 것으로 관찰되었다(표 4). 이는 산소를 매개로한 NADH 소비 때문인데 NADH 소비는 NADH/NAD+ 의 레벨을 낮추어 자일리톨이 자일룰로스(xylulose)로 한단계 더 대사가 진행되는 것을 촉진하기 때문으로 생각된다.

최대 자일리톨 생성의 교반속도는 330rpm 이었으며 상기 조건에서 응집 표현형이 잘 관찰되었고 자란 세포는 쉽게 가라앉았다.

<5-6> 배양 온도 및 pH

본 발명자들은 배양 온도를 최적화하기 위해, 2.5l 발효조에 100g/l 자일로스, 10g/l 효모 추출물, 7g/l 트립톤을 포함하는 발효배지와 HY200 균주의 종 배양액을 1-1 작용부피(working volume)로 혼합한 후, 1.0 vvm의 통기량과 330rpm의 교반 속도로 다양한 온도 조건에서 HY200 균주를 배양한 후, 자일리톨 생산량을 분석하였다.

그 결과, 배양온도가 30℃로 유지되면 최대 자일리톨 수율과 생산성은 각각 0.72g 자일리톨/g 자일로스와 1.72g/l・h 였고 27℃ 보다 낮으면 세포 성장이 갑자기 감소하면서 심각한 위균사(pseudomycelium)의 외형 변화를 가져왔다. 한편, 배양 온도가 32℃ 보다 높으면 세포 성장 속도는 낮아지고 자일리톨 생산성 또한 감소하였다.

한편, 최초 pH에 대해서도 동일한 실험을 실시한 결과, 최초 pH는 자일리톨 생산에 거의 영향을 미치지 않았으나 그 중 세포 성장이 제일 높은 것은 pH가 4.0일 때였다.

<실시예 6> 최적화된 조건에서 HY200에 의한 자일리톨 생산 분석

자일리톨 생산을 위한 효모 배양은 2.5l 발효조에 10g/l 효모 추출물, 7g/l 트립톤을 포함하는 발효배지와 HY200 균주의 종 배양액을 1-1 작용부피(working volume)로 혼합한 후, 교반속도는 330rpm, 통기량은 I.0 vvm, 초기 pH는 4.0 배양온도는 30 ℃, 초기 자일로스 농도는 200g/l로 **<실시예 5>** 의 결과에 따라 최적화하였다.

그 결과, 최적화된 조건에서 HY200의 자일리톨 생산과 자일로스 소비속도는 도 3에 나타난 바와 같이 직선으로 증가하고 감소했는데 이는 최초 자일로스 농도가 높을수록 수득되는 자일리톨 농도가 더 높다는 것을 의미한다. 실제로 최초 자일로스 농도가 200g/l일 때, 자일리톨 수율(0.77g 자일리톨/g 자일로스)과 생산성(2.57 g/l・h)이 상당히 높음을 확인하였다.

<실시예 7> HY200의 반복적인 회분식 발효공정에 의한 자일리톨 생산

반복적인 회분식 발효공정은 균주만 손실없이 지속할 수 있다면 개별적으로 회분식 발효공정을 여러번 하는 것 보다, 투입되는 배지의 양이나 기기 작동시 드는 비용 등에서 비용절감 효과가 있어 매우 효율적인 방법이다. 그러나 일반적인 균주는 반복적인 회분식 발효공정을 실시하였을 때, 원심분리나 배지 교환등의 과정 등을 거치면서 시간이 지체됨에 따라 균주의 손실이 생겨 생산성이 감소하게 되므로 반복적인 회분식 발효공정에 적합하지 않다. 반면 본 발명의 HY200 균주는 응집성이 있어 원심분리 등 별도의 과정이 필요하지 않아 반복적인 회분식 발효공정시 한 회분에서 다음 회분으로 빠르게 전환할 수 있으므로 매우 적합하다고 생각된다.

이에, 본 발명자들은 상기 실시예에서 회분식 발효공정에 적합하게 설정한 범위 내에서, HY200 균주의 응집성을 이용하여 반복적인 회분식 발효공정을 실시하였을 때 실제로 생산성을 향상시킬 수 있는 최적의 조건을 찾아보았다. 초기 자일로스 양은 200g/l에서 최고의 수율과 생산성을 나타내지만 반복 회분식 발효공정의 특징인 본 균주의 응집성에 대한 효과를 극대화 하고, 자일리톨 생산 자일로스 단가를 고려하여 적정 수준인 100g/l로 진행하였다.

본 발명자들은 교반속도 360rpm, 통기량 1vvm, 온도 30℃, 초기 자일리톨 농도 100g/l의 조건으로, 실제로 자일리톨을 생산할 때 사용되고 있는 반복적인 회분식 발효공정(repeated-batch fermentation)으로 HY200 균주를 배양하였다.

먼저 냉동시켜둔 HY200 균주의 현탁액을 5g/l 효모 추출물, 3g/l 몰트(malt) 추출물, 3g/l 펩톤 및 20g/l 글루코스로 이루어진 50ml의 성장배지를 넣은 250 ml 얼렌마이어(Erlenmeyer) 플라스크에서 30℃, 200 rpm으로 9시간 동안 전배양(preculture) 하였다. 이를 100g/l 자일로스, 10g/l 효모 추출물, 10g/l 박토-펩톤으로 이루어진 1-1 작용 배지(working

medium)를 넣은 2.5l 발효조로 옮겨 교반속도 360 rpm, 통기량 1 vvm, 온도 30℃, 초기 자일리톨 농도 100g/l의 조건으로 배양하였다. 거품 방지를 위해 항거품제(antifoam 289,Sigma)를 넣고 각 회분 발효공정의 마지막 단계에서 자일로스 양이 5g/l 이하인지 확인한 후, 교반, 통기를 멈추고 균주가 침강하도록 하였다.

응집성에 의해 자연적으로 침강되면 상등액 중 0.8l는 세포가 혼합되지 않도록 주의하여 펌프로 배출시키고 나머지 0.2l만 남겨 여기에 0.8l의 신선한 배지를 넣고 응집된 세포를 재현탁시켰다. 20분 동안 응집성에 의해 침강이 일어나 10분 동안 상등액을 배출시키고 새 배지를 채웠다. 즉 하나의 회분에서 다음 회분으로의 전환이 30분 만에 완료되었다. 상기와 동일한 과정을 5회 반복하였다.

그 결과, 첫 번째 회분 발효에서 자일리톨 수율이 0.59g/g, 생산성이 2.18g/l・h이었던 반면에 마지막 회분 발효에서는 자일리톨 수율이 0.64g/g, 생산성이 4.01g/l・h, 세포 매스(cell mass)도 21.28g/l로 증가하였다(표 5).

또한, 본 발명자들은 기존 수율을 유지하면서 생산성을 증가시키려면 운전(발효)시간을 줄여야 하기 때문에 교반속도를 증가시키고 통기량을 감소시켜 본 발명의 균주에 위한 자일리톨 생산의 최적 조건을 420 rpm, 0.5 vvm 으로 결정하여 100g/l의 조건으로 반복적인 회분식 발효공정, 즉 회분 발효를 6회 실시하였다.

그 결과, 첫 번째 회분 발효에서 자일리톨 수율이 0.64g/g, 3.02g/l・h이었던 반면에 마지막 회분 발효에서는 0.67g/g, 6.28g/l・h으로 증가하였다. 6회 배양 전체로 볼때, 평균 수율과 생산성도 0.66g/g, 4.6g/l・h, 세포 매스도 26.32g/l로 매우 높음을 확인하였다(표 5 및 도 4).

결론적으로, 반복적인 회분식 발효공정에서는 420 rpm, 0.5 vvm 의 배양조건이 기존의 수율을 유지하고 최고의 생산성을 확보할 수 있는 최적화된 조건임을 확인하였다.

[표 5]

조건	변수	회분배양 수					
		1st	2nd	3rd	4th	5th	6th
360 rpm 1 vvm	Q_p[a] ($g\ l^{-1}h^{-1}$)	2.18	2.43	3.27	3.57	3.99	4.01
	$Y_{P/S}$[b] ($g\ g^{-1}$)	0.59	0.58	0.60	0.58	0.61	0.64
	Cell mass ($g\ l^{-1}$)	9.94	12.67	14.68	18.26	20.47	21.28
	q_p[c] ($g\ g^{-1}$)	5.89	4.60	4.01	2.93	2.92	2.83
420 rpm 0.5 vvm	Q_p[a] ($g\ l^{-1}h^{-1}$)	3.02	3.73	4.18	4.89	5.75	6.28
	$Y_{P/S}$[b] ($g\ g^{-1}$)	0.64	0.63	0.65	0.69	0.66	0.67
	Cell mass ($g\ l^{-1}$)	10.83	14.52	18.95	23.52	25.21	26.32
	q_p[c] ($g\ g^{-1}$)	6.69	4.62	3.97	3.11	3.42	2.86

[a] 부피당 자일리톨 생산성 ($g\ xylitol\ l^{-1}h^{-1}$)

[b] 자일로스로부터 자일리톨 수율 ($g\ g^{-1}$)

[c] 세포 매스 당 자일리톨 수율 ($g\ g^{-1}$)

<실시예 8> HY200에 의해 생산된 자일리톨 정제

상기와 같은 방법으로 생산된 자일리톨은 다음과 같은 방법으로 정제하였다.

<8-1> 불순물 제거 및 색가 제거

배양종료 후 배양액으로부터 세포를 4,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 제거하고 상등액 만을 취한 후, 막 여과(membrane filtration)에 의한 불순물을 제거하였다. 이후 활성화된 탄소(100 g, 50 mesh)를 통과시켜 유기 불순물(단백

질, 지질, 염료)를 제거시킨 후 유리 필터 페이퍼를 이용하여 다시 여과하였다. 활성화된 탄소에 의한 탈취 및 탈색 정도를 조사하기 위하여 분광기와 전도도를 이용해서 측정하였다(P. V. Gurgel. et al., Bioresource Technology, 52: 219-223, 1995).

<8-2> 이온교환 수지

이온교환수지를 이용한 실험을 하기 위하여 이온교환 수지량을 결정 하였다. 실험에 사용된 배지의 양은 1 l로 실험을 하였으며 이온교환수지량은 실험의 신뢰성을 유지하기 위하여 20 ml 이상으로 하였다. 또한 양이온 수지와 음이온 수지를 각각의 컬럼에 충진한 후 순차적으로 통과하였다(Jose M. et al., Bioresouce Technology 61:85-90, 1997)

이온교환수지를 이용한 실험 장치는 주문 제작하였다. 이송 펌프(feeding pump)를 사용하지 않았기 때문에 세정액을 컬럼보다 20 cm 정도 위에 위치하도록 하였다. 유속은 하부 콜크를 개방하여 통액시킨 후 통액 시간과 통액량을 측정하여 환산하였다.

활성화된 탄소를 통해 착색 및 탈취를 한 여과액 안에 포함되어 있는 이온 성분을 제거하기 위해서 음이온 교환수지 뿐 만 아니라, 양이온 교환수지를 사용하여 이온성분을 제거하였다. 실험에서는 강 양이온 교환수지인 C100H(Samyang Diaion.Co.)와 강 음이온 교환수지인 WA30(Samyang Diaion.Co.), 약 음이온 교환수지 PA412 (Samyang Diaion.Co.)를 이용하였다. 이온수지의 전 처리는 컬럼에 이온수지를 충진 후 양이온 수지는 1N HCl과 증류수로, 음이온 교환수지는 1N NaOH와 증류수로 각각 세정 후 사용하였다(Jose M. Dominguez et al., Bioresouce Technology 61: 85-90, 1997).

<8-3> 결정화 단계

자일리톨 용액을 농축하기 위하여 본 연구에서는 EYERA Rotavapor A-3S (Tokyo Rikikai. co.,Japan) 를 이용하여 300 rpm, 45℃의 조건으로 총부피의 90%를 농축하였다. 자일리톨의 농도를 100 g/l까지 농축한 후 간헐적으로 쉐이킹을 하였고, 이때 4℃에서 보관하여서 결정을 얻었다. 결정화된 자일리톨은 분말 내에 20% 전후의 많은 수분을 함유하고 있으므로 이를 효과적으로 제거하기 위하여 자일리톨 분말을 100% 에탄올 500 ml로 현탁한 후 필터를 이용하여 진공 펌프로 수분과 에탄올을 동시에 제거하였다. 그 후 진공 건조 오븐에서 24 시간 건조시켜 자일리톨을 결정화 하였다(Richard Peter Affleck. Recovery of xylitol from Fermentation of Model Hemicellulose Hydrolysates Using Membrane Technology. Masters thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Verginia, 2000)

발명의 효과

본 발명의 HY200 균주는 고농도의 자일로스에 대한 내성과 응집성을 가지고 있어 상기 균주를 이용한 생산방법은 추가공정 없이 세포를 침강시킬 수 있으므로, 공정단계를 줄여 자일리톨 생산비용을 절감할 수 있다. 따라서, 다양한 식품 첨가물로 사용되며 이의 대부분을 수입에 의존하고 있는 자일리톨을 낮은 비용으로 대량생산함으로써 자일리톨의 수입을 대체할 수 있을 뿐 아니라 연간 3만톤의 시장규모를 갖는 해외에서도 높은 가격 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 기대된다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

하기의 균학적 특성을 갖는 캔디다 트로피칼리스 HY200(*Candida tropicalis* HY200) 균주(수탁번호 KCTC 10813BP):

ⅰ) 크림색의 이동성이 없는 호기성 미생물;

ⅱ) 캔디다 트로피칼리스 균주 배양에 통상적으로 사용되는 탄소원 이외에 이노시톨, 라피노즈 및 람노즈로 이루이진 군으로부터 하나 이상 선택되는 탄소화합물을 탄소원으로 이용가능;

ⅲ) 응집성 시험결과, 자일로스 100g/ℓ를 포함하는 발효배지와 종 배양액이 1 : 1 작용부피(working volume)로 혼합된 발효조에서, 교반을 시작하여 교반을 멈춘 직후 응집이 개시되어 15분후 침강됨.

청구항 2.

1) 제 1항의 균주를 종 배양하는 단계;

2) 단계 1의 배양액을 자일로스를 포함하는 발효배지에 접종한 후 공기 공급량, 교반속도 및 온도를 조절하여 배양하는 단계; 및

3) 단계 2의 배양액으로부터 자일리톨을 정제하는 단계를 포함하는 자일리톨 생산방법.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 단계 2의 배양방법은 반복적인 회분 발효공정(repeated-batch fermentation)임을 특징으로 하는 자일리톨 생산방법.

청구항 4.

제 2항에 있어서, 단계 2의 발효배지는 탄소원으로 D-자일로스 또는 이노시톨, 라피노즈, 람노즈, 프럭토스, 글루코스, 말토스 또는 만니톨로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 탄소원과 D-자일로스의 혼합물을 포함하는 액체배지인 것을 특징으로 하는 자일리톨 생산방법.

청구항 5.

제 2항에 있어서, 단계 2의 발효배지는 질소원으로 효모 추출물, 트립톤 또는 이의 혼합물을 포함하는 액체배지인 것을 특징으로 하는 자일리톨 생산방법.

청구항 6.

제 2항에 있어서, 단계 2의 발효배지의 초기 자일로스 농도는 100g/l 내지 300g/l인 자일리톨 생산방법.

청구항 7.

제 2항에 있어서, 단계 2의 통기량은 0.5 내지 1.5 vvm인 자일리톨 생산방법.

청구항 8.

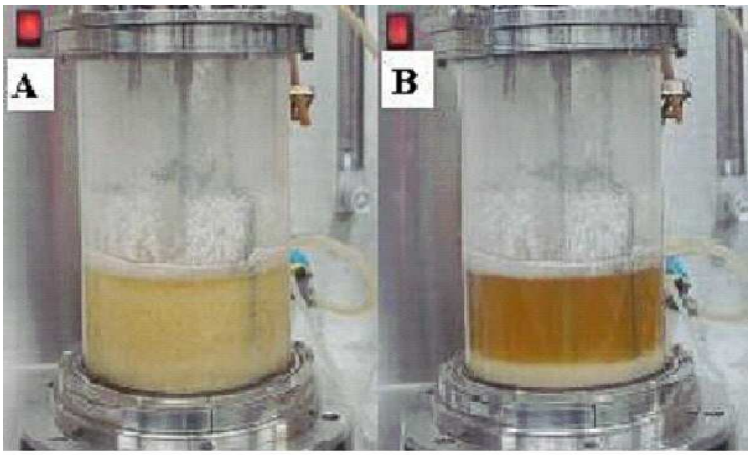
제 2항에 있어서, 단계 2의 교반속도는 250 내지 500 rpm인 자일리톨 생산방법.

청구항 9.

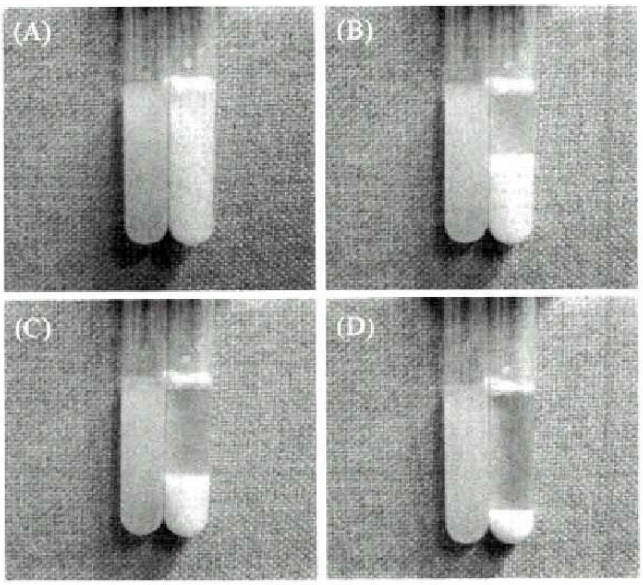
제 2항에 있어서,단계 2의 배양온도는 28℃ 내지 31℃인 자일리톨 생산방법.

도면

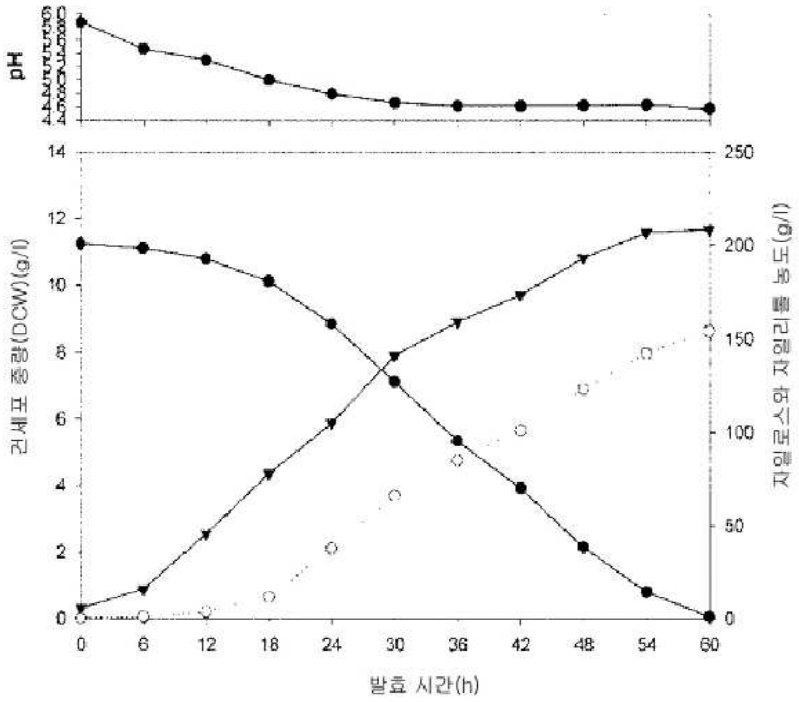
도면1



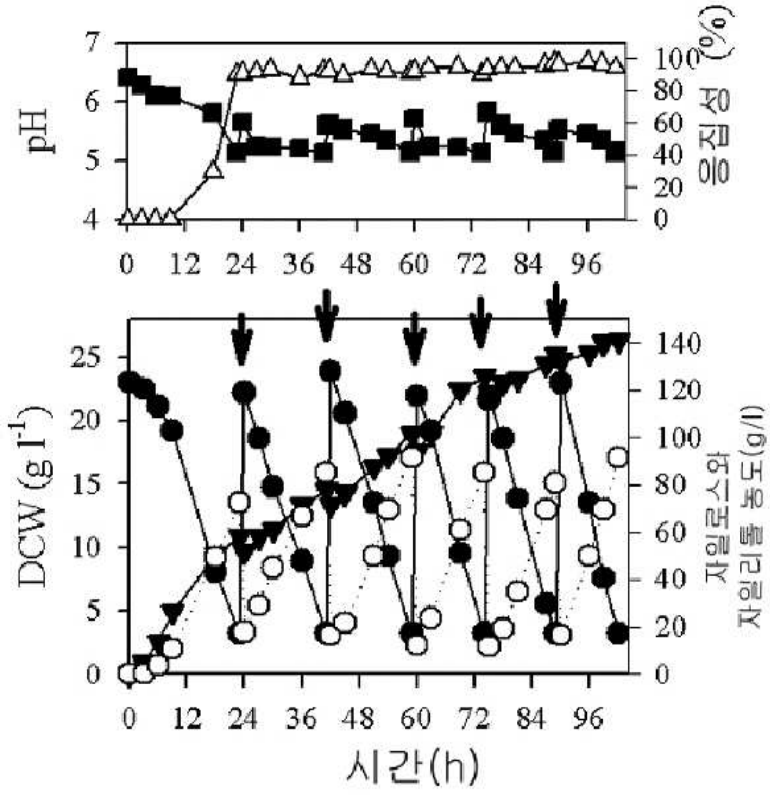
도면2



도면3



도면4



서열목록

서열목록 전자파일 첨부