고분자량의 pullulan 생산을 위한 발효공정의 최적화

김성구, 이지현, 김정화, 김미령, 이진우*
부경대학교 식품생명공학부 생물공학과, *동아대학교 생명자원과학부
전화 (051) 620-6188, skkim@mail.pknu.ac.kr

Abstract

For the maximum production of pullulan from glucose as a carbon source, the effects of glucose concentration, pH and dissolved oxygen concentration on the cell growth and mass production of high-molecular weight pullulan by *A. pullulans* ATCC 42023 were evaluated.

A. pullulans showed optimum pullulan productivity when glucose concentration was 0.3M (54g/L). And inhibitory effects on the cell growth and the pullulan production were observed at the glucose concentration higher than 0.3M (54g/L).

The influence of pH control and dissolved oxygen on the pullulan production and growth of *A. pullulans* was studied. In shake-flasks, maximum pullulan production was obtained with 11.98g/ℓ when initial pH was 6.5. In the batch fermentation, the maximum pullulan production of 13.31g/ℓ was obtained with constant pH 4.5. And it was found that pullulan yield and synthesis rate increased with oxygen availability.

For the production of commercially useful pullulan with high-molecular weight, a mixed carbon source, which was a mixture of glucose and glucosamine, was used for the pullulan fermentation with *A. pullulans*. On the basis of 5% mixed carbon source, culture with 3% glucosamine with 2% glucose was optimum condition for the production of high (M.W.> 1,000,000) and medium (M.W.> 200,000) molecular weight pullulan with considerable yields of cell mass and product. And the influence of pH control on the molecular weight of pullulan was studied in batch fermentation. It was found that the productivity of high-molecular weight pullulan with pH control at 6.5 was higher than that with no pH control.

서 론

Pullulan은 maltotriose단위를 기본으로 하여 α(1→6)결합으로 구성된 일종의 α-glucan으로 'black yeast'로 알려진 *A. pullulans*에 의해 세포외로 생산되는 다당류이다. Pullulan은 다른 다당류에서 볼수 없는 우수한 물성과 안전성을 가지고 있어 식품, 필름, 포장, 전자, 의료, 사진, 인쇄등의 재료로 이용되고, 산소 불투과성필름, 플라스틱 결착제, 코오팅제등 광범위한 분야에서 그 이용 가능성이 모색되고 있다.

현재 공업적으로 생산되는 pullulan의 평균분자량은 약 20만이다. Pullulan의 응용성을 높이기 위해서는 고분자량이 필요하나 배양시간이 경과함에 따라 pullulanase 효소작용에 의해 초기 수백만에서 수십만 혹은 수만짜리의 분자량을 갖게된다. 따라서 pullulan의 분자량 조절은 산업적 측면에서 매우 중요한 문제이다.

현재까지 탄소원의 종류 및 농도, 질소원의 종류 및 농도, 탄소원과 질소원의 농도비율, 배지의 초기 pH, 산소공급의 영향등 여러 배양 조건에 따른 균체의 형태변화와 이에 따른

pullulan 생산성에 미치는 영향에 관한 많은 검토가 이루어 졌다.

본 연구에서는 발효공정의 중요한 변수인 탄소원의 농도, pH와 용존산소량이 pullulan 생산성과 분자량에 미치는 영향에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용된 균주는 *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023이며 glucose 50, K_2HPO_4 5, NaCl 1, $MgSO_4$ 0.2, $(NH_4)_2SO_4$ 0.6, yeast extract 3 (g/ℓ)를 기본배지로 하였다. KF-5 ℓ fermenter와 2.5 ℓ-Bioflow Ⅲ fermenter를 이용하여 초기 pH 6.5, 28℃를 유지하였으며 세포 생장과 다당류 생성량을 알기위해 건중량(g/ℓ)을 측정하였으며 분자량분포를 알기 위해 GPC system(HP-1100)을 이용하였다.

결과 및 고찰

(1) Glucose농도의 영향

Glucose의 첨가 농도를 달리하여 6일간 배양한 결과, glucose 농도가 0.6M (108g/l)일 때 균체량은 11.48g/l를 나타내었으며, pullulan 생산은 glucose농도 0.3M (54g/l)까지 계속해서 증가하여 14.66g/l의 최대값을 얻을수 있었으며 pullulan 전환수율($Y_{p/s}$)은 glucose 농도 0.2M (36g/l)과 0.3M (54g/l)일 때 최대의 productivity를 나타내었으나, 이 이상의 glucose 농도에서는 pullulan 전환수율이 급격히 낮아지는 현상을 볼 수 있었다(Fig. 1). 이상의 결과에서는 탄소원의 농도가 지나치게 높으면 pullulan 생산수율이 떨어진다는 다른 보고들의 결과와 일치하였다(Shin et al., 1987).

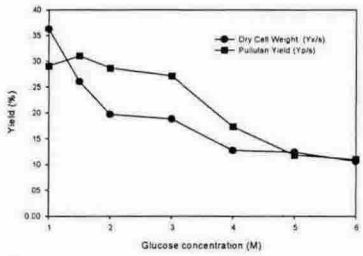

Fig. 1. Effect of glucose concentration on the dry cell weight and pullulan yields.

(2) pH와 용존산소량의 영향

a) pH 조절 유무와 용존산소량의 영향

Pullulan 생산에서 pH를 조절하는 경우와 pH를 조절하지 않는 경우의 pullulan 생산성에 미치는 영향을 비교하였다. pH를 조절하지 않았을 경우 약 20시간후 배양액의 pH는 3.5~4.7로 급격히 변화하였으며 120시간후 25.54g/ℓ와 18.73g/ℓ의 pullulan을 생산하여 각각 51%와 37%의 수율을 나타내었다(Table 1). pH를 6.5로 조절한 경우는 120시간후 13.62g/ℓ

와 13.10g/ℓ의 pullulan을 생산하여 pH를 조절하지 않는 경우가 높은 생상성을 나타냄을 알 수 있다. 용존산소량이 미치는 영향을 살펴보면, pH를 조절하지않고 용존산소량을 50% 이상으로 조절하면 조절하지 않은 경우보다 높은 pullulan 생산성을 보였다. 이는 교반속도를 증가시켜 산소 전달을 증가시킴으로써 pullulan 생산을 증가시켰다는 다른 여러 보고들과 일치하였다.

Table 1. Effect of pH and Dissolved Oxygen on the production of pullulan.

	pH	DO	Cell		Pullulan		
			concentration (g/ℓ)	yield (g/g)	concentration (g/ℓ)	yield (g/g)	productivity (g/ℓ/h)
(a)	control	control	16.86	0.34	13.10	0.26	0.11
(b)	control	No control	15.84	0.32	13.62	0.27	0.11
(c)	No control	control	14.26	0.29	25.54	0.51	0.21
(d)	No control	No control	11.27	0.23	18.73	0.37	0.16

b) 배양초기 pH의 영향

각 배양액의 초기 pH를 달리하여 6일간 배양한 결과, 초기 pH 2.5와 pH 3.5에서는 균체 성장이 시간과 비례하여 지속적으로 증가하여, 최대균체량, 6.87g/ℓ를 나타내었다. 반면, pullulan 생산은 pH 2.5에서 최저 생산을 보였으며, 초기 pH 6.5일 때 11.98g/ℓ로 최대값을 나타내었고, 이때의 기질소모에 대한 pullulan 전환수율($Y_{p/s}$)은 24.0g/g였다. 이러한 현상은 균체 성장이 극한 환경에서는 pullulan 생산보다는 자기 생존을 위하여 기질을 소비하였기 때문이라고 사료된다. McNeil에 따르면 *A. pullulans*는 생장중에 여러번의 형태변화를 가지며, 효모형과 균사형으로 나타나는데, 이 중에서도 pullulan 생성률 면에서는 효모형태인 경우가 가장 좋았다고 보고하였다. 반면에 나등에 따르면 초기 pH 8.5에서는 미생물의 형태가 효모형이 지배적이고, 초기 pH 4.5에서는 균사형태가 지배적으로 나타났으며, pH 4.5에서 최대의 pullulan 생산량을 보여 본 실험의 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다.

c) pH 조절의 영향

각 배양액을 일정한 pH를 유지하도록 조절하면서 6일간 운전하였다. 균체는 배양 하루까지는 거의 비슷하게 성장하였으나, 그 이후부터는 pH 6.5에서 급속하게 성장하는 것을 볼 수 있었으며, 균체량은 16.56g/ℓ로 최대값을 나타내었고, pH 4.5에서는 최저 생장을 보였다. 반면 pullulan의 생성은 pH 4.5에서 최대값 13.31g/ℓ를 나타내었으며, 전환수율($Y_{p/s}$)은 26.62g/g였고, pH 6.5, 7.5에서 최저값을 나타내었다. 이러한 균체량과 pullulan 생성의 상반된 결과는 *A. pullulans*가 균체성장과 pullulan을 생산할 경우, 생존하기 적절한 환경에서는 굳이 자체내에서 pullulan을 힘들여 생산하지 않아도 균체성장이 가능하므로 pH 6.5, 7.5에서 pullulan의 생산량이 적은 것으로 사료된다. Shin등에 따르면, *A. pullulans*는 pH 2.5에서는 균사형태, pH 7.5에서는 효모형태의 성장을 주로하며, 이 두 조건하에서는 모두 낮은 pullulan 생산성을 보였으나 pH 4.5 조건에서는 균사형태와 효모형태가 혼합된 성장을 보이고 최고의 pullulan을 생산하였다고 보고하였는데, 본 실험과 일치하였다.

(3) 혼합 탄소원을 이용한 고분자 pullulan의 생산

탄소원으로써 glucose와 glucosamine을 혼합하여, 혼합 탄소원의 비를 농도별로 조절했을 경우에 균체량은 glucosamine의 농도가 20%일 때 가장 높은 생산률 (12.28 g/l)을 나타내었고, pullulan 생산량에서는 glucosamine의 농도가 60%일 때 최대값 (12 g/l)을 나타내었다. 이러한 결과에서 탄소원 농도 50g/l의 경우 glucose와 glucosamine을 40 : 60의 비율로 혼합하여 공급 하였을 때 pullulan의 생산률에 대한 최적조건 비율임을 알 수 있었다.

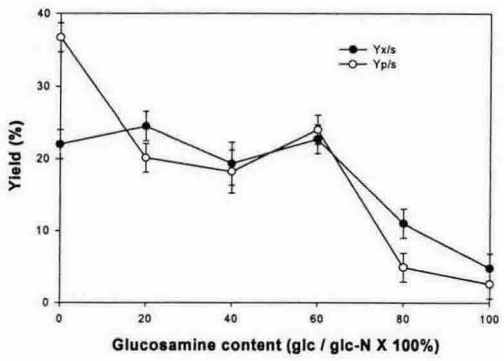

Fig. 2. Effect of glucosamine concentration on the cell growth and pullulan production.

(4) Glucosamine 농도에 대한 pullulan 분자구조의 영향

Fig. 3은 GPC를 이용하여 glucose와 glucosamine의 혼합 탄소원 비율에 대한 pullulan의 분자구조 변화과정을 나타내었다. 탄소원 농도 50g/l를 기본으로하여 glucose 100%에서는 high molecuar weight의 pullulan을 거의 생성하지 못하였으나 glucose와 glucosamine의 혼합비 40 : 60 이상에서는 고분자의 pullulan이 급격하게 증가하는 현상을 볼 수 있었다. 그러나 glucosamine의 농도가 60% 이상에서는 high molecular weight의 pullulan이 생성되는 것 만큼, medium molecular weight의 생성률이 증가하였다. 따라서, 이상의 결과에서, glucose와 glucosamine을 40 : 60의 비율로 공급하였을 때 분자량 20만 이상의 medium size 및 200만 이상의 high molecular weight의 productivity가 가장 높은 것으로 보아, 이 조건으로 pullulan을 생성할 경우 산업적으로 유용한 고분자량의 pullulan을 높은 수율로 생산할 것으로 사료된다.

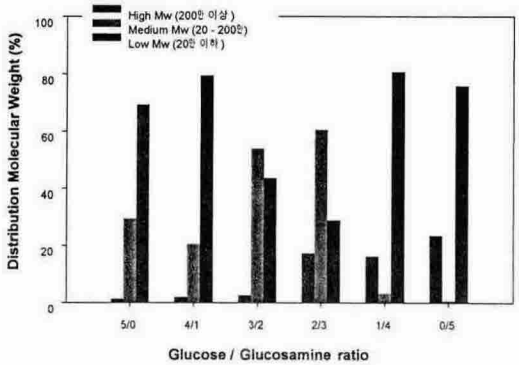

Fig. 3. Pattern of molecular weight fraction by the change in carbon source.

(5) pH 조절이 pullulan 분자량에 미치는 영향

Fig. 4은 배양결과 생성된 pullulan의 분자량 분포를 비교한 것이다. (a)와 (b)는 pH를 6.5로 조절한 경우이며 (c)와 (d)는 조절하지 않은 경우, 생성된 pullulan을 분자량 20만 이상과 20만 이하로 나누어 정량적으로 나타낸 결과이다. (c)와 (d)의 경우, 생성된 pullulan의 총량은 (a)와 (b)에 비하여 많은 반면에 배양시간이 경과함에 따라 pullulanase 효소의 작용으로 그 분자량이 감소함을 알 수 있다. 그리고 산업적으로 유용한 분자량 20만 이상의 pullulan은 오히려 pH를 6.5로 조절한 경우 그 함량이 많음을 알 수 있다. 이는 pH를 조절하지 않는 경우 약 20시간후 배양액의 pH가 3.5~4.7로 급격히 변화하기 때문인 것으로 생각된다. 즉, pH의 조절 유무가 pullulanase 효소작용에 미치는 영향에 기인한 것 같다.

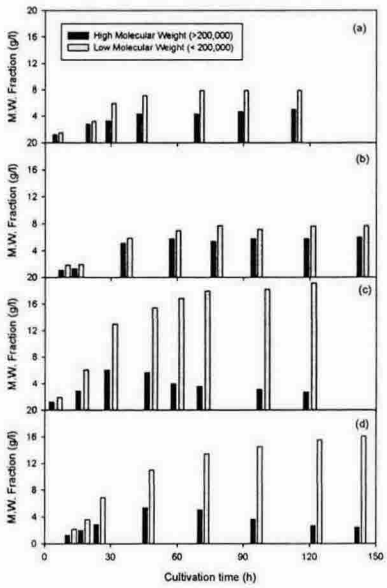

Fig. 4. Molecular Fraction as a funtion of culture time.
(a), pH control and DO control, (b), pH control and DO no control
(c), pH no control and DO contro, (d), pH no control and DO no control

요 약

A. pullulans ATCC 42023를 사용하여 고분자량의 pullulan을 대량생산하기 위한 연구로써, 탄소원의 농도, 용존산소량과 pH가 균체 성장 및 pullulan 생산에 미치는 영향에 대하여 연구하였다.

Glucose의 당 농도에 따른 실험결과에서 glucose 농도가 0.3M (54g/l)일 때 최대의 pullulan 생산률을 나타내었고, 0.3M (54g/l)이상에서는 productivity가 급격하게 감소하는 기질 저해현상을 나타내었다. 삼각플라스크를 이용한 초기 pH의 영향에 대한 실험결과, 초기 pH 6.5는 11.98g/ℓ의 pullulan을 생산하였고, pH 4.5로 일정하게 조절한 결과, pullulan 생산은 13.31g/ℓ의 최대값을 나타내었다. 그러나 균체성장은 pH 6.5에서 가장 높았다. 그리고 용존산소량의 증가로 pullulan productivity를 증가시킬 수 있었다.

또한 산업적으로 유용한 고분자량의 pullulan을 생산하기 위한 탄소원으로 아미노당인 glucosamine을 사용하여 pullulan의 생성 및 분자구조 변형에 대하여 실험하였다. 탄소원 농도 50g/l 기준에서, glucose와 glucosamine을 40 : 60의 비율로 혼합하여 공급 하였을 때 분자량 20만 이상의 mediun size 및 200만 이상의 high molecular weight의 productivity가 가장 높았으며, *A. pullulans*의 specific growth rate도 가장 높았다.

참고문헌

Badr-Eldin, S. M., O. M. El-Tayeb, E. G. El-Masry, O. A. Mohamad, and O. A. A. El-Rahman. 1994. Polysaccaride production by *Aureobasidium pullulans*: factors affecting polysaccharide formation. Would J. microbiol. biotechnol. 10;423-426.

Imshenetskii, A. A., T. F. Kondrat'eva, and A. N. Smut'ko. 1981. Infuence of the acidity of the medium , conditions of aeration, and temperature on pullulan biosyhthesis by polyploid strins of *Pullularia(Aureobasidium) pullulans*. Microbiology(Engl. Transl. Microbiologiya) 50: 330-333.

McMeil, B., and B. Kristiansen. 1990. Temperature effects on polysaccharide formation by Aureobasidium pullulans in stirred tanks. Enzyme microb. Technol. 12: 521-526

Pollock. T. J., L. Throne, and R. W. Armentrout. 1992. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high-molecular-weight pullulan with reduced pigmentation. Appl. Environ. Microbiol. 58: 877-883.

Seviour. R. J., and B. Kristiansen. 1993. Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 178-181.

Slodki. M. E. and M. C. Cadmus. 1978. Production of microbial polysaccharides. Adv. Appl. Microbiol. 23: 19-54.

Taguchi. R, Y. Kikuchi, Y. Sakano, and T. Kobayashi. 1973. Structural uniformity of pullulan produced by several strains of *Pullularia pullulans*. Agric. Biol. Chem. 37: 1583-1588.

Wiley, B. J., D. H. Ball, S. M. Arcidiacono, J. M. Mayer, and D. L. Kaplan. 1993. Control of molecular weight distribution of the biopolymer pullulan produced by *Aureobasidium pullulans*. J. Environ. Polym. Degrad. 1: 3-9.

Ueda. S., K. Fujita, K. Komatsu, and Z. Nakashima. 1963. Polysaccharide produced by the genus *Pullularia*. Appl. Microbiol. 11: 211-215.

Wilely, B. J., D. H. Ball, S. M. Arcidiacono, J. M. Mayer, and D. L. Kaplan. 1993. Control of molecular weight distribution of the biopolymer pullulan produced by *Aureobasidium pullulans*. J. Environ. Polym. Degrad. 1: 3-9.

Youssef, F., T. Roukas, C. G. Briliaderis. 1999. Pullulan production by a non-pigmented strain of *Aureobisidum pullulans* using batch and fed-batch culture. 34: 355-366.

Shin, Y. C., J. K. Han, H. S. Lee, and S. M. Byun. 1987. Inhibition effect of sugar concetrations on the cell growth and the pullulan production of *Aureobasidium pullulans*. 25: 360-366