

## Effect of pH on the elaboration of pullulan and the production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans*.

김정화, Il-hui Zhu\*, 김미령, 이지현, 김성구

부경대학교 생물공학과, Wuxi University of Light Industry\*

TEL. (051) 620-6188, FAX. (051) 620-6180

### Abstract

The effect of on the cell growth, the elaboration of pullulan, the morphology and were the effect of on the molecular weight of pullulan were investigated. *A. pullulans* showed maximum pullulan production when initial pH 6.5 was 11.98 g/l in shake-flask culture. In batch culture, the maximum pullulan production of 15.16 g/l was obtained at an aeration rate of 0.5 vvm. The mixture of yeast-like form and mycelial form of cells was found at the constant pH 4.5, at which condition, the elaboration of pullulan was high, about 13.31 g/l. However, pullulan with its higher molecular weight (>1,000,000) was produced at the constant pH 6.5.

### 서론

pullulan은 maltotriose단위를 기본으로 하여  $\alpha(1 \rightarrow 6)$ 결합으로 구성된 일종의 aglucan으로 black yeast로 알려진 *A. pullulans*에 의해 세포외로 생산되는 다당류이다<sup>1)</sup>. pullulan은 다른 다당류에서 줄 수 없는 우수한 물성과 안전성을 가지고 있어 식품, 필름, 포장, 전자, 의료, 사진, 인쇄등의 재료로 이용되고, 산소 불투과성필름, 플라스틱 결착제, 포오팅제 등의 효과로 그 이용범위가 넓으며, 앞으로도 그 용도가 계속 개발 개선됨에 따라 여러가지 무공해 재료로써 광범위한 분야에서 그 이용 가능성이 모색되고 있다<sup>2)</sup>. *A. pullulans*에 의한 pullulan 생산에 관한 배양학적 연구는 탄소원의 종류 및 농도<sup>3)</sup>, 질소원의 종류 및 농도<sup>4)</sup>, 탄소원과 질소원의 비율농도<sup>5)</sup>, 배지의 초기 pH와 pH조절<sup>6)</sup>, 산소공급의 영향<sup>7)</sup>등이 있다. 특히, 여러 배양조건에 따른 균체의 형태변화와 이에 따른 pullulan 생산성의 영향에 대한 많은 검토가 이루어졌다. 이러한 다양한 요인들은 균체량에 영향을 미칠것이며, pullulan 생산에도 영향을 줄 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 배지의 pH를 조절하고, 이에 따른 균체의 형태변화 및 pullulan 생성수율과 분자량에 미치는 영향을 관찰하였다. 또한, 산소공급속도에 따른 pullulan의 최적조건을 알아보았다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주

사용된 균주는 *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023로 agar 배지에서 4°C로 유지하였고, 매달마다 신선한 배지로 계대배양 하였다.

#### 배지 및 배양조건

사용된 기초 배지조성(%, w/v)은 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%, NaCl 0.1%, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.02%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.06%, Yeast extract 0.25%, Glucose 5%로 하였다. 삼각플라스크를 이용한 배양

에서는 HCl과 NaOH를 이용하여 pH를 2.5-8.5로 조절한 배지 150ml을 500ml 삼각플라스크에서 전 배양액 5%(v/v)를 접종하여 28°C, 200rpm으로 6일간 배양하여 초기 pH 조절에 의한 영향을 알아보았다. 발효조 실험은 발효동안 pH를 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5로 조절하여 pH-stat에 의한 *A. pullulans*의 pullulan 생성성에 대하여 알아보았다. 사용된 발효조는 2.5L Jar Fermentor(NBS. Bioflow-III)이고, 발효배지 2L를 넣고 28°C, 500rpm, 0.5vvm의 조건으로 6일간 운전하였다.

#### 건조 균체량과 플루란 정량

균체를 얻기 위해서 배양액 5ml에 동량의 증류수를 첨가하여 혼합한 뒤, 6,000rpm, 20min, 4°C에서 원심분리 하였다. 상등액은 따라내고 침전된 세포를 분리하여 105°C에서 overnight 한 후 건량을 측정하였다. 균체량은 배양액 1ℓ 당 건조무게로 표시하였다. pullulan 생성량은 균체가 제거된 배양액에 2배 부피의 ethanol을 첨가하여 잘 혼합한 후, 24시간동안 방치하여 pullulan를 침전시키고 105°C에서 overnight 한 후 건량을 측정하였다. pullulan 생성량은 배양액 1ℓ 당 건조무게로 표시하였다. pullulan 분리시 얻어진 상등액은 당분석에 사용하였다.

#### 당 측정

배양액에 잔존하는 당은, 균체를 제거한 상등액에서 pullulan을 제거한 용액을 50°C 진공하에서 ethanol을 증발 시킨후 배양액과 동량의 증류수를 넣어 조절한 후 잔당량을 측정하였다. 환원당은 Miller의 방법에 따라 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)를 사용하여 정량하였다.<sup>8)</sup> 이때 표준곡선은 포도당을 이용하여 작성하였다. 또한 배양액중의 glucose 농도는 영동제약의 glucose kit (BC103-E)와 Sigma glucose kit (No. 635-100)를 사용하여 측정하였고, total residual sugars는 phenol-sulfuric acid 방법으로 측정하였다.<sup>9)</sup>

#### **결과 및 고찰**

##### **1) Pullulan 생산을 위한 최적조건**

Pullulan생산의 최적조건을 모색하기 위하여 각 배양액의 초기 pH 및 산소 공급속도에 대한 영향을 조사하였다. 250ml의 삼각 플라스크에서 6일간 배양한 결과 초기pH 2.5와 3.5에서는 균체성장이 시간과 비례하여 지속적으로 증가하여, 최대 균체량, 6.87g/l를 나타내었다. 반면에 pullulan생산은 pH 2.5에서 최저 생산을 보였으며, 초기 pH 6.5일 때 11.98 g/l로 최대값을 나타내었고, 이때의 기질 소모에 대한 pullulan 전환수율 (Y<sub>p/s</sub>)은 24 g/l였다. 또한 pullulan specific yield도 pH 6.5일 때 2.474로 가장 높았다(Figure 1).

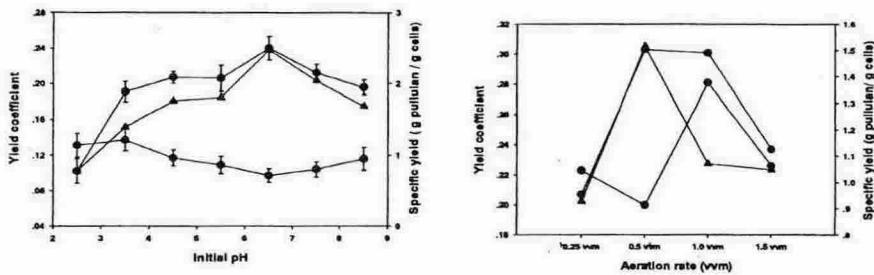


Figure 1. Effect of initial pH concentration and aeration rate on pullulan production by *A. pullulans* with (-●-) : yield coefficient (g cell/ g substrate added) of cell mass, (-○-) : yield coefficient (g pullulan/ g substrate added) of pullulan , (-■-) : specific yield (g pullulan/ g cell)shake-flasks.

위의 초기 배양액의 pH 실험을 토대로 하여 2.5L jar fermenter (NBS, Inflow-III)을 이용하여 산소공급 속도를 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 vvm 조건으로 조절하면서 pullulan 생산성에 대해 관찰해 보았다. 균체는 배양 하루까지는 거의 비슷하게 성장하였으나, 산소 공급속도 1.5 vvm에서 급속하게 성장하는 것을 볼 수 있었으며, 균체량은 14.03 g/l로 최대값을 나타내었고, 0.5 vvm에서는 최저 생성을 보였다. 반면 pullulan의 생성은 산소공급 속도 0.5 vvm에서 최대값 15.16 g/l을 나타내었으며, 전환수율 ( $Y_p/s$ )은 0.30 g/l였고, pullulan생산의 specific yield도 1.513으로 가장 높았다. *A. Pullulan*의 색소출현에서는 산소공급이 적을수록 느리게 나타났으나, 0.5 vvm 이하의 적은 산소공급 일 때는 pullulan의 생산보다는 균체의 생성이 더 많았다. 따라서 0.25 vvm 조건에서는 전환수율 ( $Y_p/s$ )이 0.21로 최저값을 나타내 보였다.

## 2) pH 조절에 의한 영향

본 실험에서는 pH를 2.5 – 7.5로 다양한 범위에서 조절하면서 pH가 pullulan의 형태와 분자량에 어떠한 영향을 미치며, 또한 균체성장과 pullulan 생산에 대해서도 알아보았다. 균체는 배양 하루까지는 거의 비슷하게 성장하였으나, 그 이후부터는 pH 6.5에서 급속하게 성장하는 것을 볼 수 있었으며, 균체량은 16.56 g/l로 최대값을 나타내었고, pH 4.5에서는 최저 생장을 보였다. 반면 pullulan의 생성은 pH 4.5에서 최대값 13.31 g/l를 나타내었으며, 전환수율 ( $Y_p/s$ )은 26.62 g/l 였고, specific yield에서도 1.496으로 가장 높았다. 그러나 pH 6.5와 7.5에서는 최저값을 나타내었다(Figure 2). 이러한 균체량과 pullulan 생성의 상반된 결과는 *A. pullulans*가 균체 성장과 pullulan을 생산할 경우, 적절한 환경에서는 굳이 자체내에서 pullulan을 힘들여 생산하지 않아도 균체성장이 가능하므로 pH 6.5, 7.5에서 pullulan의 생산량이 적은 것으로 사료된다.

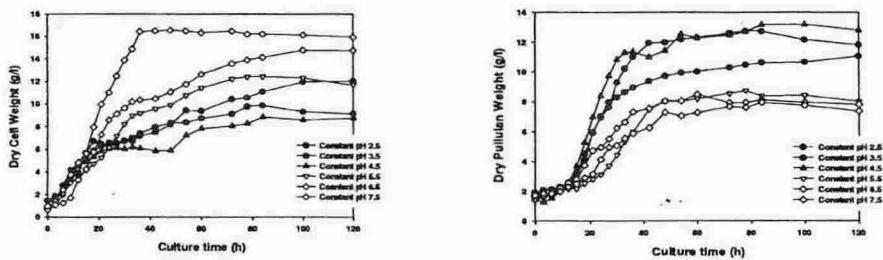


Figure 2. Effect of constant pH of culture broth on the cell growth and pullulan production by *A. pullulans*.

## 요약

불완전 곰팡이의 일종인 *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 균주를 이용한 pullulan의 최적조건 및 pH 조절에 따른 pullulan의 생성 그리고 균체형태와 고분자 pullulan 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 삼각플라스크 내에서 최대의 pullulan 생산은 초기 pH 6.5일 때 11.98 g/l의 pullulan을 생산하였고, 회분식 발효에서는 산소 공급속도 0.5 vvm일 때 15.16 g/l의 최대의 pullulan 생산량을 나타내었다. pH조절에 따른 실험에서는 pH 4.5일 때 13.31 g/l의 pullulan 생산량을 보였고, 이때 균체의 형태는 효모형과 균사형태의 성장을 하였다. 그러나 분자량 생성면에서는 pH 6.5일 때 100만 이상의 고분자가 가장 많이 생산되었다.

## 참고문헌

- 1) Bouveng HO, Kiessling H, Lindberg B, McKay J. Polysaccharides elaborated by *Pullularia pullulans* (1963). *Acta Chem Scand.* 17: 797-800.
- 2) Badr-Eldin SM, El-Tayeb OM, El-Masry EG, Mohamad OA, El-Rahman OAA. Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*: factors affecting polysaccharide formation (1994). *World J. microbiol. biotechnol.* 10: 423-426.
- 3) Shin YC, Han JK, Lee HS, Byun SM. Inhibition effect of sugar concentrations on the cell growth and the pullulan production of *Aureobasidium pullulans* (1987). *Kor. J. Microbiol.* 25: 360-366.
- 4) Desmond PF, Auer and Seviour RJ. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture (1990). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 637-644.
- 5) 나건, 이기영, 박돈희. *Aureobasidium pullulans*에 의한 플루란 생산에서 pH와 질소원의 영향(1996). *K. J. Biotechnol. Bioeng.* 11(4): 497-503.
- 6) Shin YC, Byun SM. Effect of pH on the Elaboration of Pullulan and the Morphology of *Aureobasidium pullulans* (1991). *K. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19(2): 193-199.
- 7) Ono K, Yasuda N, Ueda S. Effect of pH on pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* S-1 (1977). *Agric. Biol. Chem.* 41: 2113-2118.
- 8) Miller, GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar (1959). *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- 9) Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colometric method for determination of sugars and related substances (1956). *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- 10) McNeil B, Kristiansen B. Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks (1990). *Enzyme Microb. Technol.* 12: 521-526.