

***Aureobasidium pullulans* 에 의한 Exopolysaccharide 生産**
— 멜라닌 색소의 출현에 관한 연구 —

金在亨, 李基永*, 姜成弘
全南大學校 工科大學 工業化學科 *化學工學科

Exopolysaccharide Production by *Aureobasidium pullulans*
— Appearance of Melanin Pigment —

Jae-Hyung Kim, Ki-Young Lee and Sung-Hong Kang*
Department of Chemical Technology and
*Department of Chemical Engineering,
Chonnam National University

ABSTRACT

In exopolysaccharide fermentation by *Aureobasidium pullulans*, the effects of culture conditions (concentrations of nitrogen, potassium phosphate, dissolved oxygen, and initial pH) on the production of exopolysaccharide and the appearance of melanin pigment were investigated. The results are as follows.

- (1) The specific growth rate and the specific production rate of exopolysaccharide were inhibited by substrate when the carbon source(sucrose) concentration higher than 50 g / ℓ and the cell growth increased with increases of nitrogen source(yeast extract) but exopolysaccharide production decreased with the nitrogen concentration when it becomes greater than 1 g / ℓ.
- (2) The maximum cell growth and the maximum exopolysaccharide production were obtained at initial pH values of 3.0 and 7.5 respectively. As the initial pH increased, the yeast-like cells increased and the increase of dissolved oxygen increased the cell growth and exopolysaccharide production.
- (3) As the concentration of dissolved oxygen is increased or the concentration of nitrogen source is decreased, the period of melanin pigment appearance becomes shorter and the melanin pigment never appeared when the initial pH was less than 3.0 or the potassium phosphate was not added.

序 論

多糖類는 食品, 化學 에너지 生産과 製藥工業 等に 多樣한 應用 可能性을 가지는 巨大 分子 集團이다.

實際로 重要한 많은 多糖類는 微生物 醱酵에 의해서나 天然資源으로 부터 얻고 있다. 多糖類는 生物 高分子 分野에 해당되지만 많은 사람들이 關心갖는 研究 對象이 되지 못하고 있다.

最近에 DNA 遺傳子 再組合 技術, 微生物 遺傳學, 微生物學의 急速한 發展은 多糖類의 生産 活動과 經濟性 向上을 提供해 주고 있다(1).

Pullulan은 *Aureobasidium pullulans*(*Pulularia pullulans*(구))에 의해서 生産되는 水溶性 多糖類이다. Berner(2)가 觀察한 이래로 生成物 構造에 對해서 많은 研究家들의 關心對象이 되고 있다.

Pullulan은 maltotriose가 α -1,6 결합으로 重合된 枝 쇄상의 비교적 간단한 高分子인 α -glucan이다. pullulan은 매우 낮은 酸素透過性, 無毒性, 낮은 粘性을 가지므로 Film, food coating, packing agents, food ingredients, adhesives, fabrics에 利用됨은(3) 물론 最近에는 16DM, 64DM等 大規模 集積回路(ULSI 또는 SLSI)를 만드는데도 使用되고 있다(4).

Pullulan의 分子量은 대략 $4 \times 10^4 \sim 3 \times 10^5$ 정도라

한다. 糖의 Pullulan 으로의 轉換收率은 무엇보다도 어떤 菌株을 使用했는가에 달려있다. 特히 調査된 16種 中에 5種이 pullulan 을 거의 生産하지 못했고 나머지는 5.9%에서 25.4%까지 多様했다(5).

pH 影響은 여러 研究家들에 의해서 調査되었는데 Cately 等(6, 7, 8)은 pH6.0 ~ 7.0 으로 培養해서 pH5.0 으로 減少되는 것은 pullulan 生成을 有利하게 함을 보고했으며 신(9)은 固定된 pH7.5 또는 2.5에서는 pullulan 生成收率が 낮은 값을 나타낸 反面 固定된 pH 4.5에서는 多少 높은 生産性を 보였지만 初期 pH 7.5에서 自發의으로 변할때 보다는 生産성이 떨어짐을 指摘하기도 했고 Heald 等(10, 11)에 의하면 培養液의 pH는 pullulan 의 生成뿐만 아니라 *Aureobasidium pullulans* 의 形態에 影響을 미쳐서 菌糸型和 酵母型은 각각 pH 2.0 ~ 2.5 와 pH 6.0 ~ 8.0 에서 支配되고 pullulan 生成과 關聯됨을 指摘하고 있다. Cately (20)는 連續 培養技術에 의해 pullulan 生成開始가 室素源이 거의 없는 水準에서 일어남을 報告한바 있다.

Aureobasidium pullulans 의 가장 두드러진 特徵은 멜라닌이라 불리우는 검은 色素이다. 이 色素은 아세톤, 에테르, 벤젠 等과 같은 유기용매에 不溶性이다(12, 13). 멜라닌 色素은 *Aureobasidium Pullulans* 의 形態變化 過程 동안 hyphae, Swollen cell, chlamydo spore 에서 發見되는데 Brown 等(14, 15)에 의하면 實驗培地에서의 멜라닌 色素과 酵母型 細胞들의 chlamydo spore 로의 변형은 培養條件의 範圍등의 營養制限과 구리 濃度에 의해 影響을 받는다고 指摘하고 있다. 검은 色素은 pullulan 生成過程에서 生成物에 附着되어 나타나기 때문에(16) 色素의 除去는 產業적으로 必要하다. 그러므로 本 研究에서는 pullulan 生産 收率에 미치는 影響과 멜라닌 色素 出現時間을 調査하기 위해서 室素源의 濃度, 磷酸염의 濃度, 酵素供給 및 pH 等の 培養 條件을 變化시켜 實驗하였다.

材料 및 方法

微生物과 菌株保管

本 實驗에 使用한 菌株은 *Aureobasidium Pullulans* IFO 4464이고 接種과 培地 조성은 Table 1과 같다.

本 實驗에서는 炭素源(sucrose), yeast extract, K₂HPO₄ 濃度는 實驗目的에 따라 變化시켰으며 培養液의 初期 pH는 진한 HCl(1.N) 溶液으로 pH 7.5로 調節했다.

本 實驗에서의 菌株은 27℃ 培養器에서 3일동안 培養後 使用할 때까지 4℃ 냉장고에 保管하였다.

Inoculum과 主 培養

100ml의 培養 培地가 들어 있는 500ml Erlenmeyer 플

Table 1. Composition of medium.

Component	Concentration(g/L)
Sucrose	50
K ₂ HPO ₄	5
NaCl	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6
yeast extract	1
agar	20

라스크에 agar plate에서 1백금이를 取하여 3일간 27℃, 200rpm으로 shaking incubator에서 培養後 培養液의 5%를 새로운 培地에 옮겨서 같은 條件으로 1일 동안 培養시켰다. 이것을 主 培養을 위한 inoculum으로 使用했다.

非 增殖 培養

1000ml 플라스크에 500ml 培養液을 넣고 5%의 inoculum을 取하여 20時間동안 培養시켰다. 이 培養液을 100ml, 300ml, 500ml씩을 取하여 10000rpm에서 30分間 遠心分離한 後 NaCl 溶液 (8.5 g/l)으로 두번 洗滌한 細胞를 각각 100ml, 300ml, 500ml의 室素源이 없는 培地에서 再 培養했다.

乾燥細胞 무게와 細胞外 多糖類 濃度の 測定

乾燥細胞 濃度 測定은 醱酵液 4ml에 2배의 蒸溜水를 加하여 10000rpm에서 30分동안 遠心分離한 後 上清액은 細胞外 多糖類 濃度 測定에 使用하였으며 沈澱物은 같은 부피의 蒸溜水로 洗滌하여 55℃의 眞空오븐으로 一定한 무게가 될 때까지 乾燥시켜 定量하였다. 細胞外 多糖類 濃度 測定은 上記 上清액에 두배의 에탄올을 添加한 後 다시 8000rpm에서 30分동안 遠心分離하고 에탄올로 洗滌後 眞空오븐에서 乾燥시켜 定量하였다.

糖의 測定

糖의 測定은 위의 細胞外 多糖類를 除去한 上清액에서 殘餘 糖濃度 測定을 하였다. 總 殘餘糖은 페놀-황산법을 利用하여 spectrophotometer(波長490nm)에서 測定했다.

總 室素 含量的 測定

醱酵液에서 細胞를 除去한 後 上清액 2ml를 乾燥시켜 Micro-kjeldahl法을 利用하여 測定했고 櫛模로서 過酸化水素를 使用했다. 總 室素 含量은 다음 式을 利用해서 計算했다.

總 室素 含量 (mg/ml)

$$= (\text{ml HCl for sample} - \text{ml HCl for blank}) \times N \times 14.007$$

Sample(ml)

여기서 N은 適定에 사용되는 HCl의 規定 濃度이다.

結果 및 考察

炭素源의 轉化

Fig. 1은 炭素源이 生成物로의 轉化 過程에 隨伴되는 糖消費, 生成物, pH 窒素含量的 變化를 나타낸 것이다. 培養 7일 後에 최대 細胞量과 細胞外 多糖類는 15.5 g / l와 30g / l 를 얻었다. 培養 1일까지는 窒素含量과 pH의 變化 速度가 크고 細胞量이 細胞外 多糖類 生産量보다 높다. 이 기간에서의 窒素含量과 pH의 減少는 細胞外 多糖類 合成에 기여한다고 報告된바 있다.

培養 時間의 增加와 더불어 細胞外 多糖類 生成은 細胞量에 비해서 훨씬 增加하고, 細胞 形態에 있어서도 효모형 細胞가 가지를 친 菌糸形 細胞로 變하고 있음을 確認할 수가 있었다. 이것은 結局 細胞外 多糖類 生成은 細胞 增殖과 一致하지 않음을 알 수가 있었다.

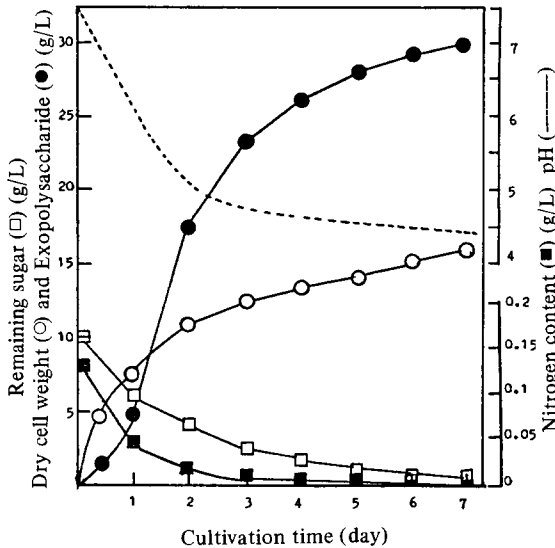


Fig. 1. Fermentation course on sugar consumption, cell growth, exopolysaccharide, nitrogen, and pH.

炭素源의 影響

實驗方法에서 炭素源으로 sucrose를 使用해서 7일 동안 培養한 結果를 보면 Fig. 2에 나타난 것처럼 sucrose 濃度가 100 g / l 일때 乾燥 細胞量과 細胞外 多糖類가 最大값을 보였고, yeast extract 濃度가 1 g / l 와

3 g / l 일때는 각각 12 g / l 22 g / l 이고 細胞外 多糖類는 32 g / l 28 g / l 이었다.

Fig. 3는 Fig. 2의 結果를 比增殖 速度와 比生産 速度의 項으로 나타낸 것으로 炭素源이 50 g / l 이상의 濃度일때는 比증식 速度가 감소함을 나타내고 있는데 이것은 기질 저해 현상이 작용하고 있음을 暗示해 주고 있다.

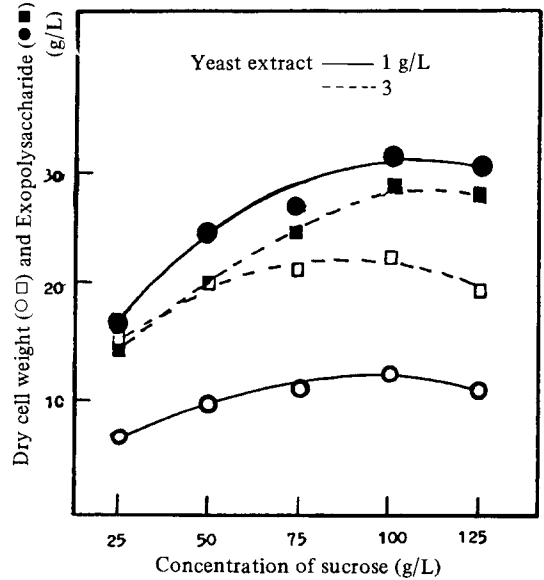


Fig. 2. Effect of the concentration of sucrose on cell growth and exopolysaccharide.

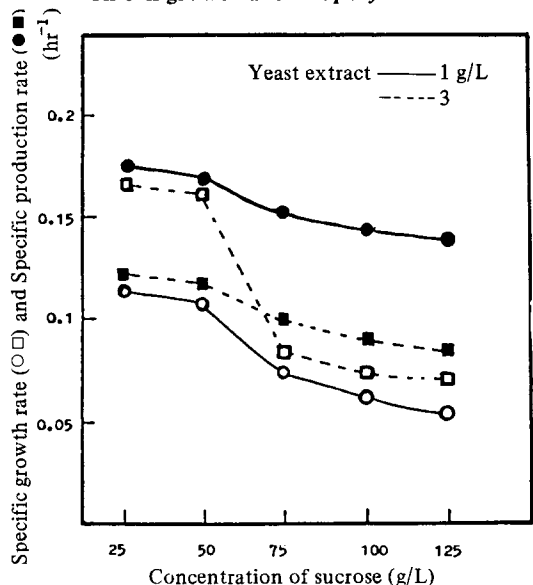


Fig. 3. Effect of the concentration of sucrose on specific growth rate and specific production rate.

Yeast Extract影響

Fig. 4에서 보는 바와 같이 yeast extract濃도의 增加에 따라서 細胞 增殖이 增加하지만 細胞外 多糖類 生産은 yeast extract가 1 g/l 까지는 濃度 增加에 따라 비례하고 그 以上일 때에는 減少하기 始作했다. 이것은 yeast extract 濃도가 最適 濃度보다 높으면 炭素源은 細胞外 多糖類 生成보다는 細胞增殖을 하는 데 사용되고 너무 낮은 濃도는 細胞增殖을 制限해서 細胞外 多糖類 生成이 減少하기 때문이라고 생각된다.

Fig. 5은 Fig. 4의 結果를 比增殖 速度의 項으로 나타낸 것으로 이것은 yeast extract濃도가 增加할수록 比增殖 速度는 增加하고 있지만 比生産 速度가 1 g/l 以上에서는 減少함을 나타내고 있다.

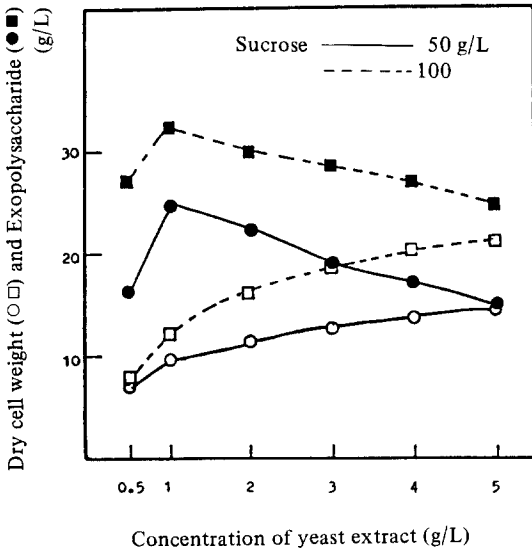


Fig. 4. Effect of the concentration of yeast extract on cell growth and exopolysaccharide.

pH 影響

細胞 增殖과 細胞外 多糖類 生成에 對한 初期 pH 影響을 調査해본 結果를 보면 Fig. 6에서 보는 바와 같이 pH 3.0에서 最大 乾燥 細胞量은 24.5 g/l 를 얻었지만 이 점에서의 細胞外 多糖類量은 9 g/l 이었다. 最大 細胞外 多糖類 生産은 初期 pH 7.5에서 29.5 g/l 이었다. 初期 pH 3.0 以上에서는 pH가 增加함에 따라 細胞量이 多少 減少하는 傾向을 보였고, 초기 pH 2.0에서는 細胞外 多糖類가 거의 生成되지 않았다. 이 結果는 細胞外 多糖類 生成의 最適 pH가 細胞增殖 最適 pH와 다르다

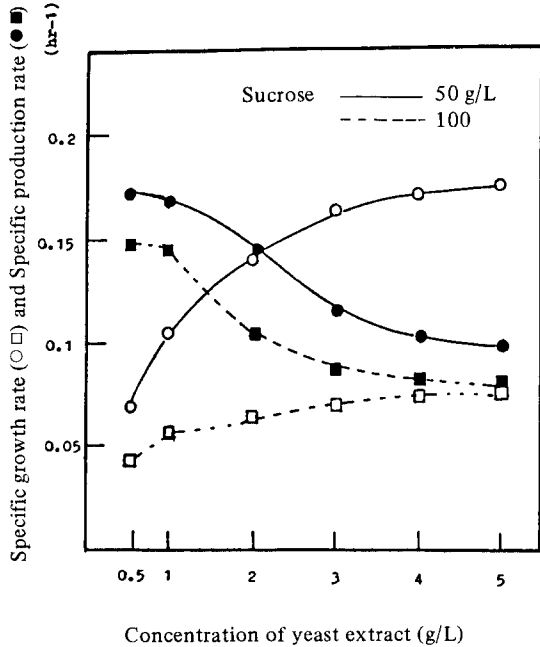


Fig. 5. Effect of the concentration of yeast extract on specific growth rate and specific production rate.

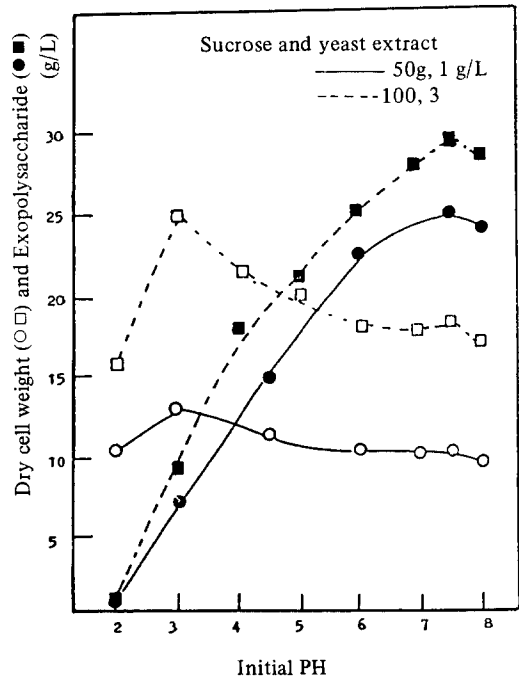


Fig. 6. Effect of initial pHs of culture broth on the cell growth and exopolysaccharide.

는 것을 나타내 주고 있다. Fig. 7은 pH 2.0, 3.0, 8.5에서 培養된 細胞의 形態를 나타낸 것으로 初期 pH 3.0일 때는 대수기에서 菌糸體 伸張이 일어나 菌絲結合 形態가 된다. 初期 pH 4~8.5에서는 酵母型과 菌糸型이 共存하고 있지만 pH가 增加함에 따라 酵母型의 비율이 높아지고 pH가 減少할수록 菌糸型 比率이 增加되었다. 그러나 初期 pH 2.0에서는 菌糸體가 짧아졌고 응집된 菌糸型이 觀察되기도 했다.

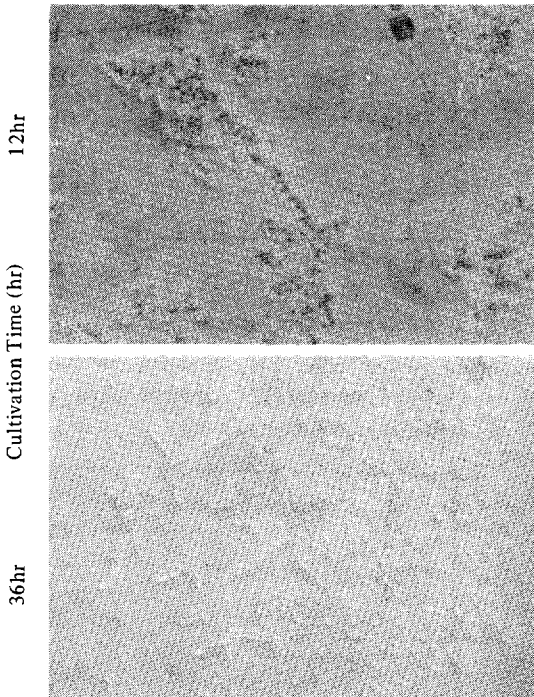


Fig. 7-1. Photographs of *A. pullulans* observed at initial pH 2.

Potassium phosphate의 影響

基本 培地에 K_2HPO_4 , 0, 1.5, 3, 4, 5 g/l 를 添加한 結果를 보면 Fig. 8에 나타낸 바와 같이 K_2HPO_4 를 添加하지 않을 때에는 細胞外 多糖類 生成이 적었으며 급격한 pH 變化를 隨伴했다. Fig. 9는 K_2HPO_4 濃도가 0, 15 g/l 일때의 細胞 形態를 觀察한 것으로 K_2HPO_4 濃도가 15 g/l 일때 菌體의 形態는 대부분이 酵母型이었고 K_2HPO_4 가 전혀 添加되지 않을 때에는 pH 2의 形態와 비슷한 모양이 觀察되었다.

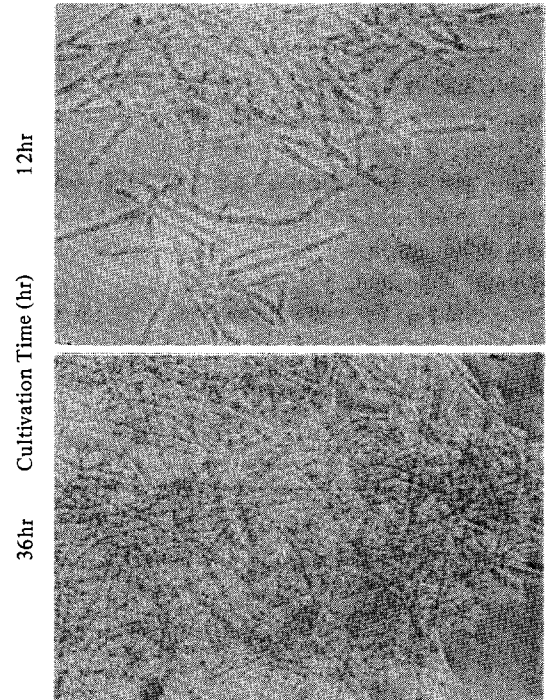


Fig. 7-2. Photographs of *A. pullulans* observed at initial pH 3.

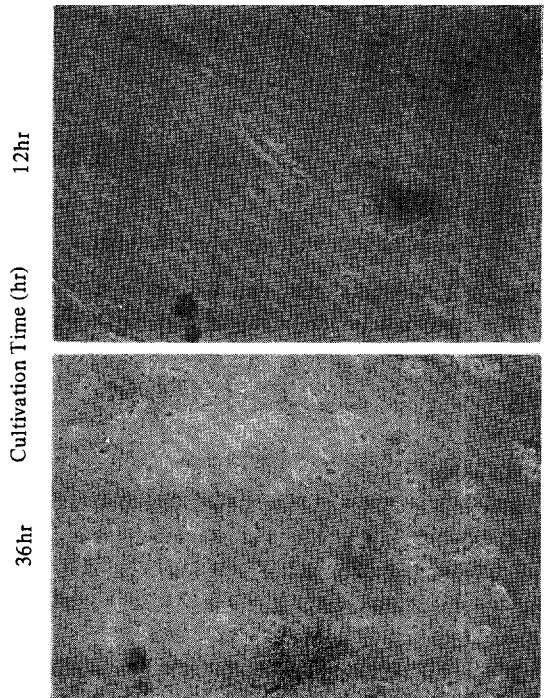


Fig. 7-3. Photographs of *A. pullulans* observed at initial pH 8.5.

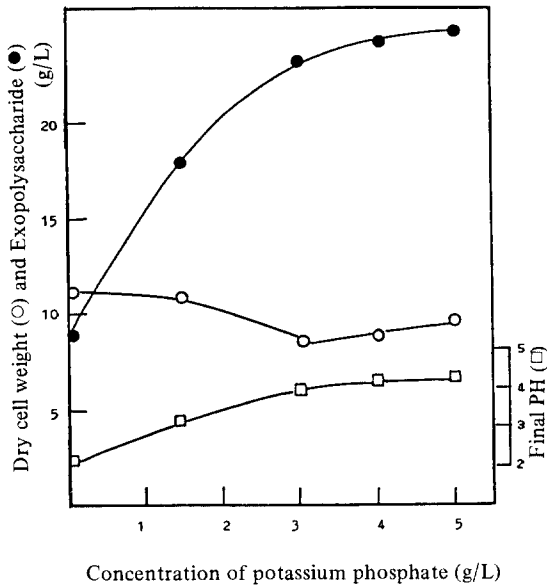


Fig. 8. Effect of the concentration of potassium phosphate on cell growth and exopolysaccharide.

細胞外 多糖類 生成에 대한 酸素 影響

500ml Erlenmeyer 플라스크에서 細胞外 多糖類 生成에 對한 酸素의 影響을 조사한 것을 보면 微生物이 사용할 수 있는 플라스크 안에서의 酸素量은 培地의 부피와는 反比例함을 알 수 있다.

Fig. 10은 增殖 培地의 경우 플라스크에서의 乾燥 細胞量과 細胞外 多糖類量을 나타낸 것으로 플라스크에 들어있는 培地의 부피가 적을수록 細胞增殖과 細胞外 多糖類 생성이 증가하고 있음을 보여주고 있다. 또 生成物의 影響으로 培地의 부피가 적을수록 pH 變化 速度가 큼을 알 수 있다.

일반적으로 溶存酸素가 증가할수록 細胞外 多糖類 生成 速度가 빨라지고 細胞의 增殖 速度는 增加함은 여러 研究家들에 의해서 立證되어 왔다. 그러나, Denis Rho 등은 室素源이 들어 있지 않은 非增殖 培地에서 3개의 다른 溶存酸素(10%, 25%, 85%)로 實驗한 結果 細胞外 多糖類 合成 速度가 逆으로 觀察되었고 細胞量도 10%, 85%, 25% 順으로 溶存酸素에 비례하지 않음을 知的하였다. 그러나 Fig. 11에 보는 바와 같이 500ml 플라스크 에서 培地의 부피를 다르게 해서 實施해 본 結果 非增殖 培地에서도 增殖 培地에서와 마찬가지로 培地의 부피가 減少할수록 細胞外 多糖類 生成量이 增加함을 보여 주고 있다.

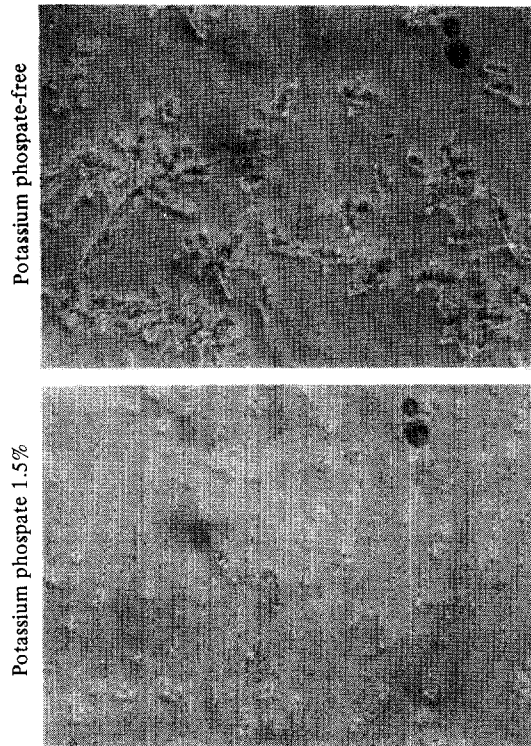


Fig. 9. Photographs of *A. pullulans* observed at different concentration of Potassium Phosphate.

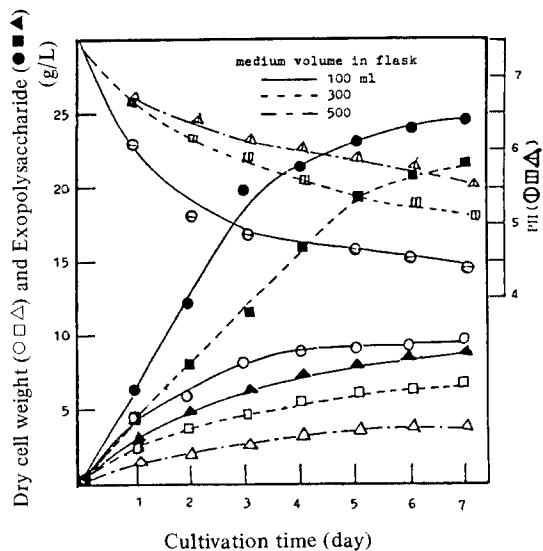


Fig. 10. Effect of oxygen limitation on cell growth and exopolysaccharide.

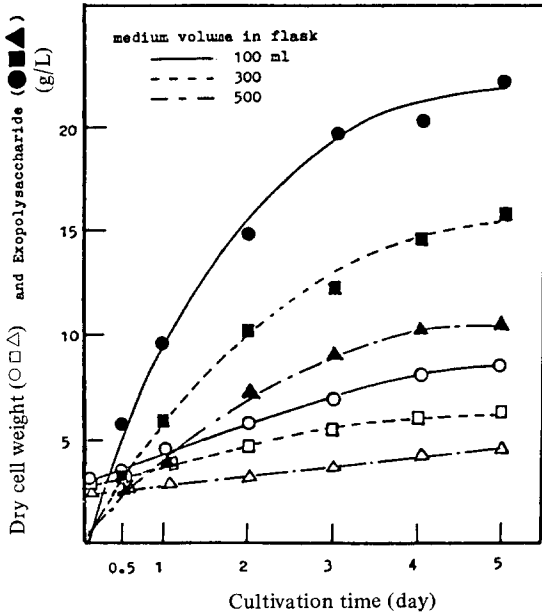


Fig. 11. Effect of oxygen limitation on cell growth and exopolysaccharide in a nitrogen-free medium.

멜라닌 색소出現 시간에 대한影響

*Aureobasidium pullulans*에 의한 醱酵過程 中에 검은 색소의 生成이 觀察된다. 멜라닌 색소出現은 색소가 없는 blastospore라고 하는 酵母型 細胞가 색소가 있는 chlamyospore라는 큰 swollen 細胞로의 形態變化와 並行해서 나타난 것을 확인했다.

Fig. 12는 500ml 플라스크에서 培地量에 따라 green色으로 변하는데 걸리는 所要時間을 나타낸 것이다. 培地の 부피가 增加함에 따라서 멜라닌 색소出現 시간이 길어졌으며 嫌氣 條件下에서 培養液의 색깔은 거의 변하지 않았다. 이것은 酸素가 充分히 공급되지 않으면 멜라닌 색소 出現 시간이 遲延된다는 것을 의미한다.

Yeast extract의 濃度가 增加함에 따라 달라지는 멜라닌 색소出現 시간을 調査해 본 結果를 보면 Fig. 13에서 보는 바와 같이 yeast extract 濃度가 增加함에 따라 멜라닌 색소出現 시간이 길어지고 있음을 알 수 있다. 이것은 yeast extract 濃度가 增加함에 따라서 細胞增殖이 活潑해지고 培養液에 있는 溶存酸素의 減少가 促進되기 때문이라고 생각된다.

Fig. 14는 potassium phosphate 濃度가 1 g/l 에서 5 g/l 까지 변할 때의 멜라닌 색소出現 시간을 나타낸 것으로 potassium phosphate의 濃度가 3 g/l 까지는 점차 멜라닌出現 시간이 減少했지만 3 g/l 以上에서 거

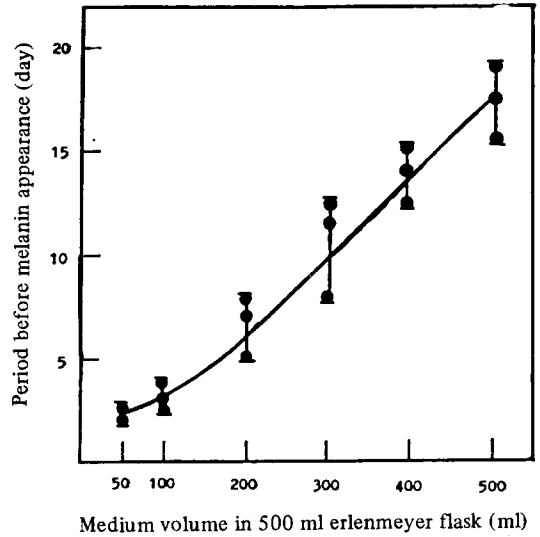


Fig. 12. Effect of oxygen limitation on melanin appearance.

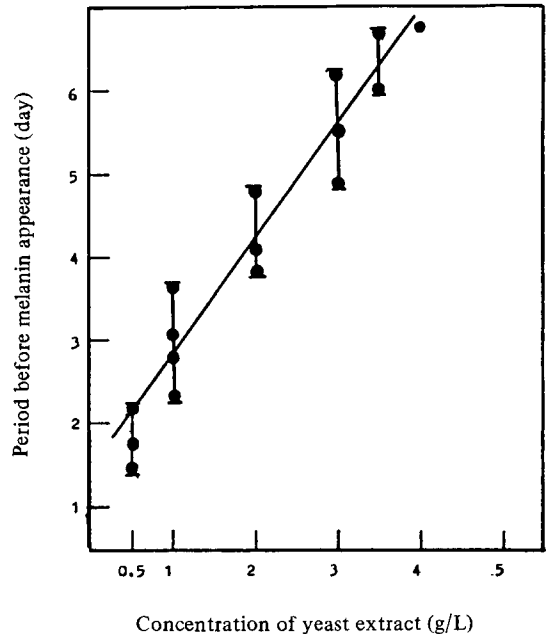


Fig. 13. Effect of the concentration of yeast extract on melanin appearance.

의 비슷한 값을 보였고 potassium phosphate 濃度가 0에 接近하면 멜라닌 색소가出現하지 않았다. 이것은 potassium phosphate 濃度가 減少함에 따라 처음 1日 以內에 pH 變化 速度가 빨라졌고 濃度가 0일 때는 pH 2~2.5

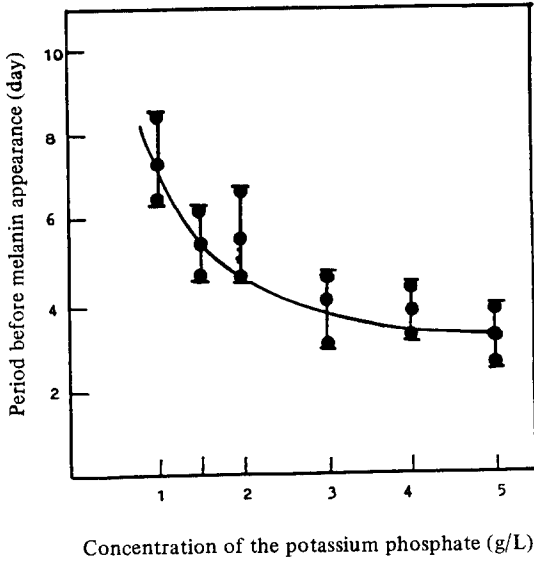


Fig. 14. Effect of the concentration of potassium phosphate on melanin appearance.

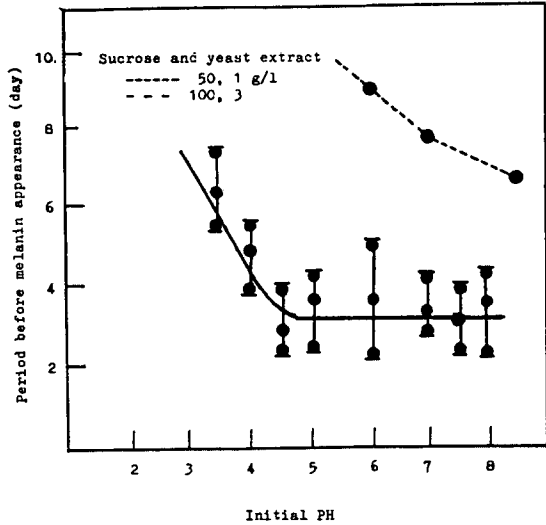


Fig. 15. Effect of the initial PHs on melanin appearance.

사이에 있게 되므로 멜라닌 색소의 생성이沮害된다고 생각된다.

Fig. 15는 初期 pH 2~8까지 멜라닌 색소 出現時間을 나타낸 것으로 초기 pH 4.5~pH 8 사이에서는 멜라닌 出現時間이 거의 비슷했지만 初期 pH 3~4 사이에서는 多少 길어지는 경향이 있고 初期 pH 3以下에서는 멜라닌 색소가 出現하지 않았다. 또 炭素源과 窒素을 增加시켰을 때 pH가 높을수록 즉 pH6~8.5 사이에서는 멜라닌 색소 出現時間이 多少 빨라지는 경향을 보였지만 pH 5以下에서는 멜라닌 색소가 나타나지 않았다.

요 약

*Aureobasidium pullulans*에 의한 細胞外 多糖類 生成 研究를 통한 결론은 다음과 같다.

(1) sucrose 濃度가 50 g/l 以上일 때는 基質에 의한 저해 작용이 나타나고 있음을 알았으며 窒素源의 增加에 따라서 菌體量은 增加하지만 細胞外 多糖類 生成은 最適 濃度 (1 g/l) 까지 增加하고 그 以上에서는 減少했으며 멜라닌 색소 出現時間은 길어졌다.

(2) 最大 菌體 成長은 初期 pH 3.0에서 보인 반면에 細胞外 多糖類 生成은 初期 pH 7.5에서 最大 값은 나타내었고 初期 PH가 增加함에 따라서 효모형 비율이 증가했으며 멜라닌 색소 出現時間은 pH 4.5~8까지는 거의 一定하게 나타났지만 pH 3以下에서는 전혀 멜라닌 색소가 나타나지 않았다.

(3) 炭素源과 窒素源을 增加시켰을 때 pH 5 이하에서

는 멜라닌 색소는 나타나지 않았으나 pH 6에서 pH 8.5로 pH가 높아짐에 따라 멜라닌 색소는 빨리 나타나는 경향을 보였다.

(4) 溶存酸素 濃度가 높을수록 菌體量과 細胞外 多糖類 生成이 增加했고 멜라닌 색소 出現時間이 빨라졌으며 potassium phosphate가 전혀 들어있지 않는 培地에서는 멜라닌 색소 出現은 觀察할수가 없었다.

참고문헌

1. A. Mulchandani and J.H.T.L. uong, A Leduy.(1988). *Biotechnology Bioeng*, **32**, 639.
2. B. Bernier, (1958), *Can. J. Microbiol*, **4**, 195.
3. S. Yuen, (1974). *process Biochem*. **22(11)**, 17.
4. 金貞 “효모와 반도체 혁명” 동아일보 제19941호.
5. S. Udea, K. Fujita, K. Komatsu, and Z. Nakashima, (1963).
6. B.J. Cately, (1971). *Appl. Microbiol*. **22**, 650.
7. K. One, Y. Kawahara, and S. Ueda, (1977). *Agric. Biol. chem*. **41**, 2313.
8. Y.C. Shin, “*Studies on the production of exopolysacchacide pullulan from Aureobasidium pullulans*”, PH.D. dissertation, Korea Advanced Institute of science and Technology(1988)
9. P.J. Heald, and B. Kristiansen, (1985). *Biotechnol. Bioeng*. **27**, 1516.
10. B.J. Cately, (1973). *J. General Microbiol*. **78**, 33.

11. P.A. Stanford, K.A. Barton, P.R. Watson, M.C. Cadmus, and A. Jeanes, (1975). *Appl. Microbiol.* **29(6)**, 769.
12. E. Gurr, (1960). *Methods of analytical history and histochemistry*, Willians and Wilkens Co.
13. R.G. Brown, L.A. Hanic, H. Hisao, (1973). *Can. J. Microbiol.* **19**, 163.
14. G.M. Gadd, and A.J. Griffinths, (1980). *Trans. Br. Mycol. Soc.* **74**, 387.
15. H. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Reber, and F. Smith (1956). *Anal. Chem.* **28(3)**, 350.
16. J.E. Zajic, and A. Leouy, (1973). *Appl. Microbiol.* **25**, 628.
17. G.L. Miller, (1959). *Anal. chem.* **31**, 426.
18. Denis Rho, Ashok Mulchandani, H.T. Luong, John and Anh Leouy. (1988) *Appl. Microbiol.* **28**, 361.
19. B.J. Cately, and P.J. Kelly, (1975). *Biochem. SOC. Trans.* **3**, 1079.

(Received July 5, 1989).