

## 수용성 생물 고분자 합성에 관한 연구

이 기 영 · 김 재 형 · \*최 응 · \*유 영 제 · 나 건  
전남대 공업화학과, \*서울대 화학공학과

## A Study on the Synthesis of Aqueous Biopolymer

Ki Young Lee, Jae Hyung Kim, Ung Choi\*, Young Je Yoo\*, Kun Na  
Department of Chemical Technology, Chonnam National University  
\*Department of Chemical Engineering, Seoul National University

### ABSTRACT

The aspects of pullulan production by *Aureobasidium pullulans* were investigated under various initial pH, carbon source and nitrogen source conditions. The resulting pullulan fermentation broths were analyzed by using GC, LC and GPC techniques. The maximum pullulan production was obtained in the culture medium containing 5% sucrose at pH 6, 28°C after 7 days of cultivation. Under the pH 3, pullulan was almost not produced although the total cell mass of *A. pullulans* was increased, and the case on using  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as a nitrogen source, which usually cause the fermentation medium under pH 3, also gave the similar phenomena. Sucrose was believed to converted to trisaccharide and glucose extracellularly and polymerization of glucose was proceeded intracellularly.

### 서 론

플루란은 균체외로 분비되는 생물고분자로 균체내 생물 고분자보다 생성물 분리가 용이하고 독성이 전혀 없으며<sup>1)</sup> 물리적 특성이 특수하여 식품의 물성개량제로 적합하고 그 가소성을 이용한 여러 방면의 응용이 연구되고 있다.<sup>2)</sup> 특히 저열량 식품으로의 개발이 가능하고 우수한 막 형성능력을 가지고 있어 국내에서의 대량생산이 필수적이다.

1958년 Bernier<sup>3)</sup>는 *Aureobasidium pullulans* 균주가 플루란을 생산하는 것을 관찰하였다.

그후 플루란 생산에 영향을 미치는 인자로는 탄소원<sup>4)</sup>, 질소원<sup>5)</sup>, pH<sup>6)</sup> 형태학적 모양<sup>7)</sup>이 조사되었으나 사용된 균주, 배양조건, 분석방법, 조사자에 따라 아주 다양하여 각 인자들 사이의 관계가 제대로 정립되어 있지 않고 있어 이에 대한 기초연구가 절실히 요청된다.

본 연구의 목적은 발효진행에 따라 생성된 배양액을

전통적인 방법과 GC, LC, GPC를 이용하여 분석하고 플루란 발효의 특성을 조사 확인하는데 있다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배양조건

*Aureobasidium pullulans* IFO 4464 균주를 사용하였고 sucrose 50g/l, yeast extract 1 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.6 g/l,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 g/l, NaCl 1 g/l,  $\text{MgSO}_4$  0.1 g/l를 기본배지로 삼았다.

한천 고체배지에서 1 백금이를 100ml의 기본배지가 들어있는 500ml플라스크에 접종시켜 28°C, 200 rpm의 진탕배양기에서 3일간 전배양한 후 그 5%를 기본배지 100ml가 들어있는 주발효 플라스크 혹은 2.5 l 발효조(NBS)에 접종시켜 7일간 배양하였다.

#### 건조균체량과 플루란 농도의 측정

건조균체량은 발효액을 15000 rpm으로 원심분리시켜 얻은 침전물을 24시간 건조시켜 측정하였고 플루란 농도는 원심분리후의 상등액에 에탄올을 2배 가해 얻은 침전물을 95℃에서 24시간 건조시켜 정량하였다.

**잔당과 환원당의 측정**

균체를 침전 제거시킨 상등액에서 잔당과 환원당이 측정되었다. 잔당은 페놀 황산법<sup>9)</sup>을 이용하여 분광광도계(490nm)로 측정하였고 환원당은 DNS법<sup>9)</sup>을 이용하여 측정하였다.

**질소함량의 측정**

질소함량은 발효액에서 균체를 제거한 상등액 2ml가 Micro Kjeldahl법으로 측정하였다.<sup>10)</sup>

**배출기체의 분석**

발효조 배출기체는 GC내에 있는 Porapak Q column과 Molecular sieve column에 의한 O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>로 분리하고 이것에 의해 산소 흡수속도와 이산화탄소 발생속도를 계산하였다.<sup>11)</sup>

**액체 분석기의 구성 및 분석조건**

LC분석을 위해 Fig. 1과 같은 분석장치를 사용하였다. 용리액은 LC등급의 증류수였고 용리액의 온도는 80℃였으며 컬럼으로 들어가는 용리액 유량은 0.5ml/min 였다. 용리액의 일부는 펌프를 통해 굴절률 검출기의 reference cell로 들어가 기준용액으로 작용하고 다른 일부는 펌프를 통해 시료가 합쳐지는 U 6K injector와 sugar pak column을 거쳐 굴절률 검출기로 들어가 당 분석에 이용되었다. Fig.1의 구성은 GPC실험에도 사용되었으며 이때 용리액은 25℃의 0.1M NaCl이고 column으로 들어가는 용리액 유량은 0.6ml/min이었다. 사용한 column은 hydrodynamic volume에 따라 분리되는 ultra-

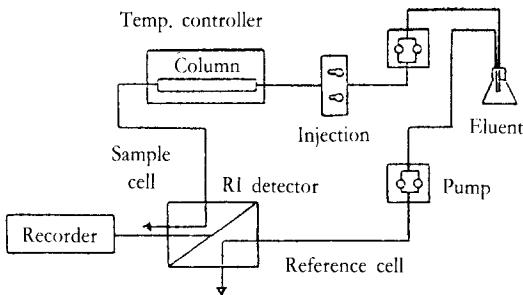


Fig. 1. Schematic diagram of system for LC Analysis.

hydrogel linear column이었다. 시료의 분자량 결정에 쓰인 표준물은 Shodex pullulan standard 였다.

**결과 및 고찰**

**초기 pH 효과**

Table 1은 초기 pH가 다른 여러 발효조건에 따라 말기 pH와 세포량, 플루란 생산량이 크게 변한다는 것을 나타낸 것이다.

세포생장은 산성조건에서 더 활발하였으나 플루란 생산은 중성조건에서 더 활발하였으며 초기 pH 6.0에서 플루란 생산량은 최대값을 나타내었다.

Table 1. Effect of Initial pH on growth and pullulan Production from *A. pullulans*.

	Initial pH			
	3.0	4.5	6.0	7.5
Final pH	2.4	2.6	3.4	5.6
Dry cell wt, g / l	16.6	18.2	11.4	9.6
Pullulan conc., g / l	12.7	19	24.5	22.1

**고정화 효과**

Table 2는 균체를 스폰지에 흡착시켰을 때 스폰지 밖으로 배출한 발효 배양액의 분석 결과이다. 이때도 free cell의 경우와 마찬가지로 초기 pH 6.0에서 최대의 플루란을 생성하였으나 그 값은 현저히 적었다.

Table 2. Effect of Immobilization on growth and pullulan production from *A. pullulans*.

	Free cell		Immobilized cell	
Initial pH	6.0	4.5	6.0	7.5
Final pH	3.4	1.8	3.4	4.8
Dry cell wt, g / l	13.0	14.8	17.6	15.0
Pullulan conc., g / l	22.2	11.2	13.6	11.18

Fig. 2는 free cell과 고정화 세포에서 얻은 플루란 배양액의 분자량 분포이다. 고정화 세포로 얻은 플루란은 free cell에서 얻은 플루란 보다 농도는 낮지만 분자량은 더 컸다.

**질소원의 효과**

Table 3은 질소원을 펩톤, 글루타메이트, 효모 추출물, 황산 암모늄 각 1.6 g / L 혹은 효모 추출물 1 g / L+

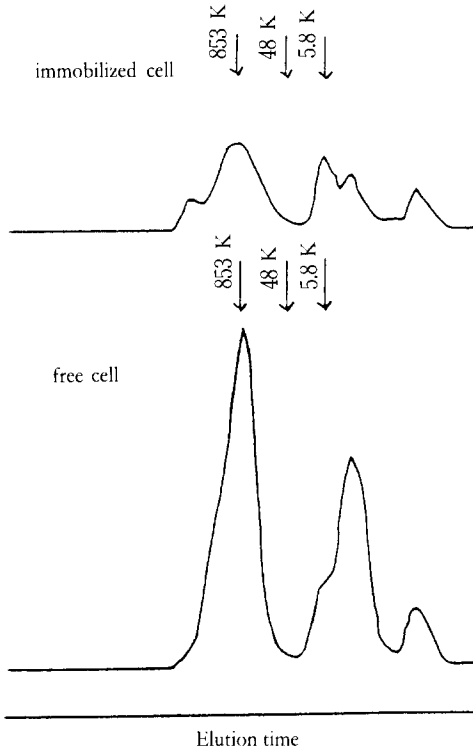


Fig. 2. GPC chromatogram of the free and immobilized cell fermentation.

황산 암모늄 0.6 g / l로 하였을 때의 발효 실험 결과이다.

유기 질소원의 경우 최종 pH는 4.8을 보였으나 황산 암모늄으로 발효시킬 때는 2.6정도로 크게 떨어지고 유기 질소원의 무기질소원이 혼합되어 있는 경우는 그 중간 값인 3.4를 보였다.

황산 암모늄 만으로의 실험 결과로 생긴 발효배지의

Table 3. Effect of nitrogen source on growth and pullulan production from *A. pullulans*.

	Pep- tone	Gluta- mate	Yeast	Yea + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>4</sub>	SO <sub>4</sub>
Initial pH	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Final pH	4.8	4.9	4.8	3.4	2.0
Dry cell wt, g / l	9.6	10.0	8.9	9.5	9.2
Pullulan conc., g / l	31.6	27.0	26.0	26.0	5.2

플루란 농도가 특히 낮은것은 발효과정중에 pH가 2.0까지 떨어졌기 때문인 것으로 생각된다.

**탄소원의 효과**

Table 4는 탄소원을 달리했을 때의 발효실험 결과이다.

sucrose로 발효시킬 때 최대의 플루란을 생산할 수 있었다.

Fig. 3 및 4는 발효액의 LC분석 결과이다. 2 당류인 sucrose (Fig. 3)는 3 당류와 포도당으로 전화되는데 비해 포도당 (Fig. 4)은 그러한 전화과정없이 곧장 플루란으로 중합되었다. 이 재중등의 올리고당 합성 연구<sup>12)</sup>나 신<sup>13)</sup>의 연구결과를 본 실험 결과에 종합해 보면 2 당류의 전화효소는 세포 밖에 배출되어 3 당류와 단당류로 전화시키는 반응에 관여하지만 단당류를 중합시켜 플루란을 생성하는 효소는 균체밖으로는 배출되지 않고 균체안에 존재하는 것으로 판단되었다.

단당류 중 fructose는 ketose라서 포도당의 선형 중합체인 플루란을 구성 성분이 될 수 없으므로 fructose는 직접 중합된다기 보다는 fructose가 포도당으로 바뀌었다가 플루란으로 중합된다고 생각된다. 아울러 균체속에는 isomerase가 존재하여 포도당이 fructose로 가역 전화되는 것으로 추론되었다.

위의 여러 사항을 고려하면 플루란의 발효생성반응은 다음과 같은 경로를 거쳐 진행된다고 추정된다.

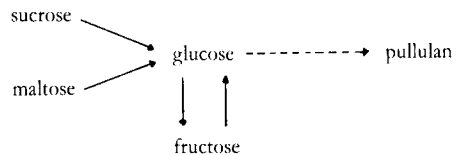


Table 4. Effect of carbon source on growth and pullulan production from *A. pullulans*.

	Sucr- ose	Gluc- osc	Fruc- tose	Malt- ose
Pre-culture time, hr	72	72	72	48
Initial pH	6.0	6.0	6.0	6.0
Final pH	3.6	2.8	3.4	3.6
Dry cell wt, g / l	12.0	20.6	12.7	10.9
Pullulan conc., g / l	27.7	5.6	17.6	13.2

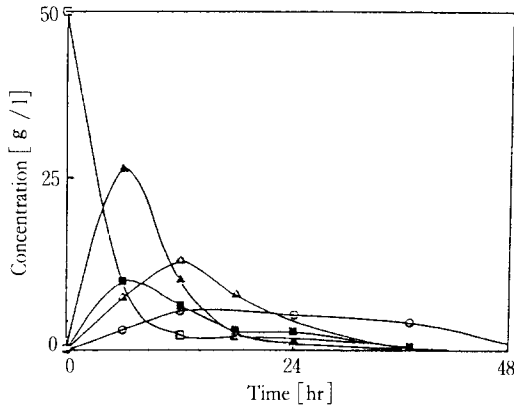


Fig. 3. LC analysis of fermentation broth (sucrose=50 g / l).  
 △ C 4, ▲ C 3, □ Sucrose, ■ Glucose, ○ Fructose

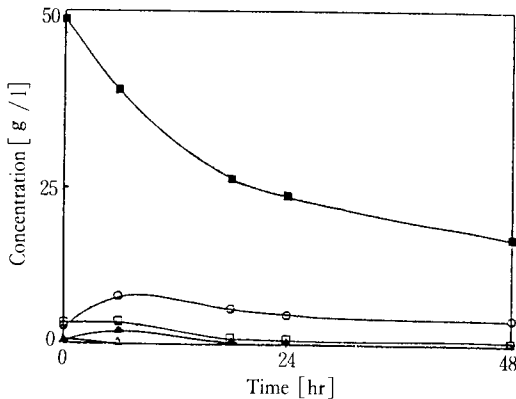


Fig. 4. LC analysis of fermentation broth (glucose=50 g / L).  
 △ C 4, ▲ C 3, □ Sucrose, ■ Glucose, ○ Fructose

**발효조에 의한 배양**

Fig. 5는 2 일된 전배양액을 peptone이 질소원인 발효 배지에 집중시켜 얻은 발효경시변화이고 Fig. 6은 산소흡수속도 및 이산화 탄소 배출속도의 측정결과이다. 2, 3일 경과한 즉 균체는 최대성장을 보였고 30시간에서 최대 이산화탄소 배출 속도 6 m mol CO<sub>2</sub>/L. hr를 보였으며 pH와 질소 소비는 발효경과에 따라 서로 비슷한 저하경향을 보였다.

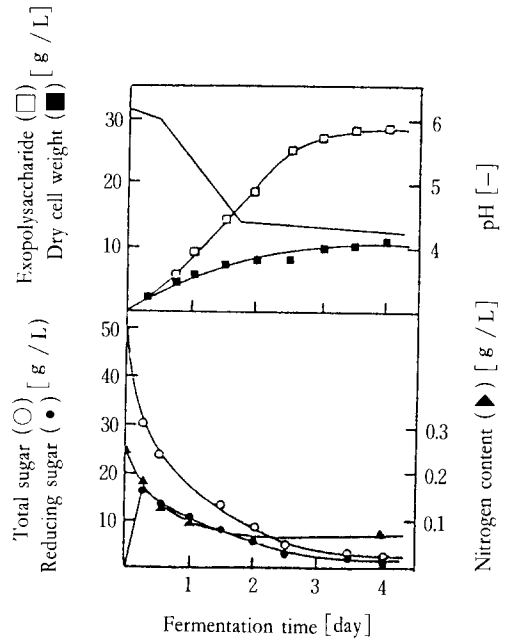


Fig. 5. The change of contents in the batch fermentation of *A. pullulans*. (preculture time 48 hr, nitrogen source peptone, 28°C, 900 rpm, 1 vvm)

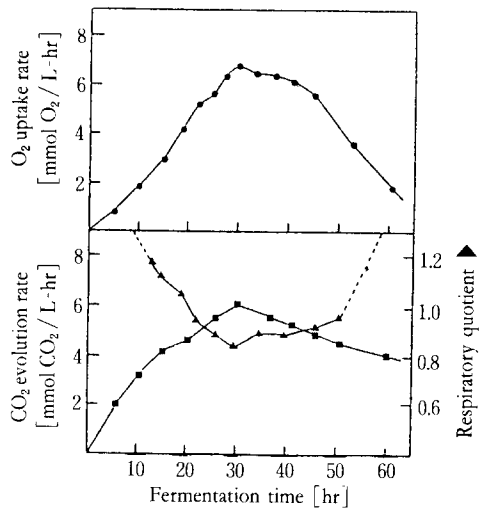


Fig. 6. The plot of fermentation time vs. O<sub>2</sub> uptake rate, CO<sub>2</sub> evolution rate during the pullulan fermentation using peptone as nitrogen source.

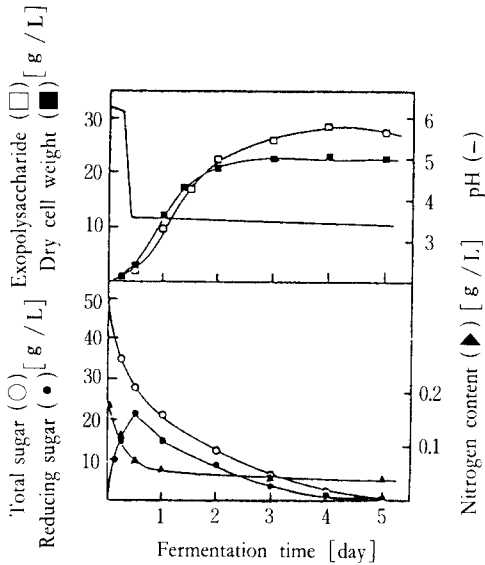


Fig. 7. The change of contents in the batch fermentation of *A. pullulans*. (preculture time 72 hr, nitrogen source yeast extract and  $(NH_4)_2SO_4$  28°C, 900rpm, 1 vvm)

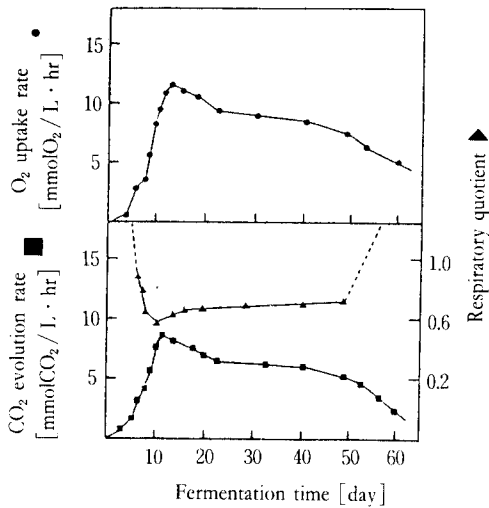


Fig. 8. The plot of fermentation time vs. O<sub>2</sub> uptake rate, CO<sub>2</sub> evolution rate during the pullulan fermentation using yeast extract and  $(NH_4)_2SO_4$  as nitrogen source.

Fig. 7은 3일된 전배양액을 효모 추출물 1g / l + 황산 암모늄 0.6g / l가 질소원인 발효배지에 접종시켜 얻은 발효경시변화이고 Fig. 8은 산소흡수속도 및 이산화탄소 배출속도의 측정결과이다. 2일만에 세포성장온은 정지하고 12시간에 최대 이산화탄소 배출속도 9mmol / CO<sub>2</sub> / L·hr를 보였다. 플라스크배양에서와는 달리 불과 2시간만에 pH가 6.1에서 3.5로 급격히 떨어졌는데 이는 통기속도에 따라 pH 강하속도가 빨라진다는 신<sup>19)</sup>의 보고사실을 고려할 때 교반속도 증가로 인한 산소의 물질전달 속도 증가에 기인한 것으로 생각된다. 이 경우에는 pH 감소는 질소 소비와 같은 경향을 나타냈었다.

요 약

*Aureobasidium pullulans*에 의한 플루란 생산이 다양한 pH, 탄소원, 질소원 조건하에서 수행되었다. 발효 배양액과 배출기체 조성은 GC, LC, GPC를 이용하여 분석되었다. 초기 pH 6.0이고 sucrose 50g / l를 사용했을 때 2.7g / l의 플루란이 생산되었다. pH가 3 이하로 내려가면 균체량은 증가하지만 플루란 생산은 거의 정지되었다. 질소원으로  $(NH_4)_2SO_4$ 만 사용한 경우의 발효에서는 pH가 3이하로 감소하였기 때문에 플루란 생산량이 적었으며 탄소원으로 포도당을 사용했을 때도 비슷한 현상이 관찰되었다.

sucrose같은 2 당류를 기질로 사용했을 때 2당은 포도당과 3 당류로 분해되고 포도당은 세포내에서 플루란으로 중합된 후 세포 밖으로 배출되는 것으로 추론되었다.

감 사

이 논문은 1989년도 문교부 지원 한국학술진흥재단의 자유 공모과제 학술 연구조성비에 의하여 연구된 것입니다. 이에 대해 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. S. Yuen(1974), *Process Biochem.*, **22** (11), 7.
2. B. Bernier(1985), *Can. J. Microbiol.*, **4**, 195.
3. A. Leduy, J. F. Zajic, J. H. T. Luong, and L. Choplin. "Pullulan" in *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, 2nd ed. Wiley, New York. (1988), vol. **13**, 650.
4. B. J. Catley(1971), *Appl. Microbiol.*, **22**, 641.
5. M. H. Yim, H. S. Son, N. H. Chung(1984), *Kor. J.*

- Appl. Microbiol. Bioeng.*, **12**(3), 219.
6. K. Ono, N. Yasuda, and S. Ueda, (1977), *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 2113.
  7. P. J. Heald and B. Kristiansen(1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1516.
  8. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton and F. Smith (1956), *Anal. Chem.*, **28**(3), 150.
  9. G. L. Miller, "Analytical Chemistry", (1959), Vol. **31** 3, 261.
  10. L. N. Strikar and R. Chandru(1983), *J. Food Technology.*, **18** , 261.
  11. A. Pons, C. G. Dussap and J. B. Gross (1989), *Biochem. and Biotechnol.*, **33**, 394.
  12. K. H. Jung, J. Y. Lim, S. J. Yoo, J. H. Lee and M. Y. Yoo (1987), *Biotechnol. Letter.*, **9**(10), 703.
  13. Y. C. Shin(1988), Ph. D Thesis, KAIST, Korea.

**(Received: June 20, 1990, Accepted: July 18, 1990)**