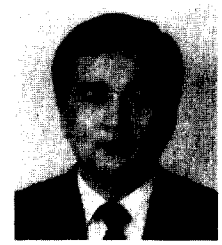
Pullulan



(주)농심 기술개발연구소 **남 희 섭**

1. 서 론

pullulan은 maltotriose를 기본 단위로 하여 α(1→4), α(1→6) 결합으로 구성된 일종의 α glucan으로, 'black yeast'로 알려진 *Aureobasidium pullulans*에 의해 세포외로 생산되는 다당류이다.[1]

pullulan은 다른 다당류에서 볼 수 없는 많은 우수한 성질이 있어, 식품에서 접착, 증점, 안정, 품질 개량 효과 등의 이용을 비롯하여, 산소 불투과성 필름, 가식성 필름, 플라스틱 결착제, 코오팅제 등 여러 가지 무공해 재료로써 광범위한 분야에 그 이용 가능성이 모색되고 있다.[2]

본 고에서는 *A. pullulans*를 이용한 pullulan 생산의 연구 현황과 그 특성 및 응용 가능성에 대해 고찰해 보고자 한다.

2. *Aureobasidium pullulans*에 의한 pullulan의 생산

pullulan의 생합성 경로는 아직 잘 알려져 있지 않아, *A. pullulans*에 의한 pullulan 생산 연구는 배양 생리학적 측면에서 연구되고 있다. *A. pullulans*는 단당류, 이당류, 전분 등 비교적 다양한 탄소원에서 잘 성장할 수 있으며, 특히 sucrose,[3] soluble starch,[4] 기타 전분 가수분해물[1]에서 pulluan 생산 수율이 높다고 보고되고 있지만, 실험에 사용되는 균주에 따라 그 수율이 달라지기도 한다.[5] 한편, 탄소원은 발효공정 cost에 크게 영향을 미치므로 값싼 원료 혹은 폐자원을 활용하는 방안이 검토되어, 돼지감자 전분,[6] cheese whey에 존재하는 lactose,[7] peat hydrolyzate[8] 등을 기질로 이용하여 pullulan을 생산하는 연구가 시도되었다. 이외에도 여러 농산 폐기물, 식품 가공업체에서 발생하는 전분 부산물 등이 pullulan 생산 기질로 사용될 수 있을 것으로 예측되는데,[9] 예를 들면, potato chip 제조 과정에서 나오는 감자 껍질은 섬유소와 전분으로 구성되어 있어, 적절히 처리하면 pullulan 생산에 값싼 기질로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

질소원의 종류는 pullulan 생산 수율에 영향을 미친다. 여러 유기 질소원 및 무기 질소원을 같은 양으로 배지에 첨가했을 때, $(NH_4)_2SO_4$가 pulluan 생산 수율에 가장 좋은 질소원으로 보고되고 있다.[4,10] 한편, 필자의 실험실에서 질소원의 종류가 *A. pullulans*의 pullulan 생산 수율에 미치는 영향을 조사해 본 결과, NH_4Cl가 $(NH_4)_2SO_4$보다 pullulan 생산에 더 우수한 질소원임을 알았다(표 1). 이것은 균주에 따라 질소원의 종류가 pullulan 생산 효율에 미치는 영향이 다름을 시사한다.

질소원의 농도가 pullulan 생산에 미치는 영향에 대해서는 아직 서로 다른 견해가 있지만, 일반적으로 배지 중에 초기 질소원의 농도가 높을수록 biomass는 증가하지만 pullulan 생산은 낮아진다. 다시 말하면, 배양시 *A. pullulan*에 의한 pullulan 생산은 질소 농도 제한하(nitrogen limitation)에서 시작된다.[11,12] 반면, pullulan 생산은 biomass 증가와 더불어 병행한다는 보고도 있다.[10] 분명한 것은, 고농도의 질소원 배지에서는 pullulan 생산이 급격히 감소되는데, 이 현상에 대해서는 아직 분명하지 않으나, 과량의 질소 이온(NH_4^+)이 질소 대사에 관련된 key enzyme의 세포내 농도와 활성에 영향을 주고 carbon flow를 biomass 생성쪽으로 전환시키는 역할을 한다고 추측하고 있다.[10,11,13]

표 1. 질소원의 종류가 *A. pullulans*의 pullulan 생산에 미치는 영향.

Nitrogen sources	Biomass(g/L)	Pullulan(g/L)
$(NH_4)_2CO$	7.9	14.9
$(NH_4)HCO_3$	2.0	1.0
CH_3COONH_4	11.0	11.9
$(NH_4)_2SO_4$	14.5	18.1
NH_4Cl	10.7	24.0
KNO_3	10.6	15.8
yeast extract	14.8	18.5
peptone	14.8	19.4

일반적으로 배지내 pH는 *A. pullulans*의 성장 형태와 pullulan 생산에 영향을 미친다. Heald & Kristiansen은,[14] $(NH_4)_2SO_4$를 질소원으로 사용하여 각 pH별로 *A. pullulans*를 batch fermentation했을 때, 배지내 pH가 높아질수록 총 biomass 중 효모 형태(blastospore)의 비율이 균사 형태(mycelium)보다 비율이 높음을 보고하였다. 이 결과는 continuous fermentation 실험에서도 같은 경향으로 나타났다.[15] (그림 1). 몇몇 연구자들의 결과에 따르면,[14,16,17] 배양액내 균체 중 효모 형태의 비율이 높아질수록 pullulan 생산성이 높아진다고 한다. 즉, 효모 형태의 단위 균체당 pullulan 생산 능력은 일정하지만, 배양 환경에 따라 biomass 중 효모 비율이 높아지면, 전체 배양액 중 pullulan 생성량은 높아진다. 그러나, 성장 형태가 직접적으로 pullulan 생산에 어떤 영향을 미치는지는 명확하지 않다. McNeil 등은,[15] continuous fermentation으로 배양 조건을 steady state로 유지하여 pH가 *A. pullulans*의 성장 형태 및 pullulan 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 실험된 pH 2.5-6.5 범위에서 배양액의 pH가 높아질수록 효모 형태가 증가하지만, pullulan의 최대 생산은 pH 4.5에서 나타났다. 이때 biomass는 효모 형태와 균사 형태가 비슷한 비율로 구성되었다. 이것은 batch fermentation에서 두 종류의 형태가 같이 존재할 때 pullulan 생산이 최적이라는 결과와[18] 일치하였다.

또, 질소원이 달라지면 낮은 pH(2.5)에서도 pullulan 수율이 높아지기도 한다. Auer & Seviour에 의하면,[10] 질소원으로 $(NH_4)_2SO_4$를 사용했을 때는 낮은 pH에서 pullulan 생산성이 낮아졌지만, glutamate를 질소원으로 사용한 동일한 실험에서는 pH 2.5에서도 pullulan 생산이 높아졌다고 한다. 따라서, 모든 배양 환경, *A. pullulan*의 life cycle 중 모든 시기에서 일정한 양상으로 pH가 성장 형태에 영향을 미치거나 성장 형태에 따라 pullulan 생합성이 결정되는 것은 아닌 듯 하다. 즉, 세포 형태에 따라 pullulan 생성속도는 서로 달라지고, pH에 따라 소비되는 기질의 biomass, pullulan, maintenance에 이용되는 비율이 변할 것으로 보인다.

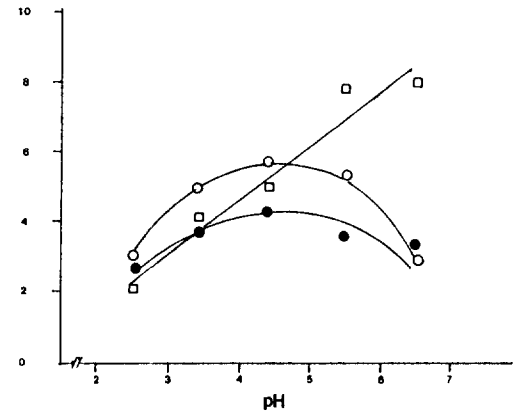


그림 1. 여러 pH별 *A. pullulans*의 continuous culture ($D=0.075\ h^{-1}$) ○: biomass, ●: pullulan, □: 효모형태비율.

*A. pullulan*에 의한 pullulan을 효율적으로 생산하기 위해 몇 가지 배양방식이 제안되었다. *A. pullulans*를 pH 2에서 batch fermentation하면, 아주 높은 biomass를 얻을 수 있지만 pullulan 생성량은 적다. 따라서 pullulan 생산을 효율화하기 위해서, 제 1단계에서는 낮은 pH에서 biomass를 최대로 얻고, 제 2단계에서 pH를 높혀 pullulan를 생산하는, bistaged fermentation이 제안되었다.[19] 이 배양 방식은 배지내 pullulan 생성량을 높일 수 있을 뿐 아니라, 비무균적 상태에서도 pullulan 생산의 가능성을 보였다.

탄소원의 농도는 pullulan의 생산성에 영향을 미쳐, 배지내 sucrose 농도가 5% 이상일 때 *A. pullulans*의 biomass와 pullulan 생산을 저해한다. 따라서, 고농도 기질에 의한 *A. pullulans*의 성장과 pullulan 생산 저해 현상을 극복하기 위해, Shin 등[20]은 fed-batch fermentation 방식을 채택하여 10% sucrose 기질을 이용, 58g/L의 pullulan을 생산하였다.

한편, 고정화 세포를 이용한 pullulan 생산 방법에

대한 연구는 거의 없었다. 그 이유는, 기존의 entrapment와 microencapsulation 방법 등에 의한 pullulan 생산은 pullualn 분자가 너무 커서 gel matrix를 통과하기 어렵고, 배양액의 점도가 너무 높을 뿐 아니라, 산소 투과도도 역시 문제가 되기 때문이다. Mulchandani 등[21]은, *A. pullulans*를 polyurethane foam에 포집시킨 고정화 세포를 이용하여 pullulan 생성 실험을 한 결과, 고정화 세포들은 shear stress에 잘 견디며 별 무리없이 지속적으로 pullulan을 생산할 수 있었다. 그러나, 아직까지 배양액의 고점성을 극복해야 하는 문제점이 남아있으므로, 고정화 기술에 많은 진전이 필요하다.

Dafresne 등[22]은, *A. pullulans*의 성장에 필요한 산소량을 충족시키고 pullulan 생산을 높이기 위해 high pressure fermentation의 사용 가능성을 검토하였다. 통기 속도를 높여줌에 따라 고압 상태가 될 때, *A. pullulans*의 성장을 상당히 증가시켰지만, pullulan 생산은 특정 한계 압력 이상에서는 오히려 급격히 감소하는 결과가 나타났다. 또, 배양기내 압력이 고압이 될수록 세포의 형태에 변화가 있어 aggregation 현상이 두드러졌다. 통기속도를 높힘에 따라 *A. pullulans*에 의한 morphology의 변화와 pullulan의 생성에 미치는 mechanism에 대한 연구는 좀 더 검토되어야 할 것이다.

3. pullulan의 특성

공업적으로 제조되는 pullulan은, 전분을 효소나 산으로 가수 분해한 starch syrup에 질소원, 무기염류 등을 첨가한 배지에 *A. pullulans*를 통기 교반하면서 배양하여 생산한다.[23] 배양 조건을 변화시키면 분자량이 수십만에서 수백만의 다양한 분자량을 갖는 pullulan을 얻을 수 있는데, 예를 들면 배지내 탄소원의 농도를 변화시키면 생산되는 pullulan의 분자량은 변한다.[24] 현재, 공업적으로 생산되는 pullulan의 평균 분자량은 약 20만이다. 배양이 종료되면 여과를 하여 제균한 다음, 탈색, 정제, 건조하여 무미, 무취의 백색 pullulan 분말을 얻는다. pullulan은 급성 독성, 만성 독성, 돌연변이성 등이 전혀 없는 가식성 천연 다당류로써, 식품 원료 및 가식성 포장 재료로 사용해도 안전하며, 일본에서는 표시 의무가 없다.[25]

표 2. 각종 다당류 수용액의 점도(1%, 30℃).

다당류	점도(cp)
pullulan	~2
arabic gum	~1
methyl cellulose	200
CMC	200~1,000
xanthan gum	2,000~3,000
sodium alginate	200~700

pullulan은 냉수, 온수에 잘 녹으며 유기 용매에는 잘 녹지 않는다. 그 수용액의 점도는 비교적 낮아서 (표 2), 분무 건조 등의 작업 적성이 용이하다. 또, pullulan 분자량이 크고 농도가 높을수록 수용액의 점도는 증가하지만, 다른 고분자 물질과는 달리 완만한 점도 증가 현상을 보이고, pH 변화에 대해서도 비교적 점도가 안정되어 장류, 소오스류, 조림 등에 안정한 점성을 줄 수 있다.[23]

pullulan은 접착력이 강하여 종이, 목재, 금속 등에 접착 효과가 크며, 전분과 비교하여 노화 및 결정화가 덜 일어나서 장기간 안정한 접착력을 유지할 수 있다.

pullulan은 전분과 거의 마찬가지로 250℃ 부근에서 분해가 시작되며, 400℃ 근처에서 분해가 끝나는데, 고열 및 유독 가스가 발생하지 않는다. 자연계에 있는 곰팡이, 세균류 등에 의해 완전히 분해되므로 환경 오염 문제가 없다. 또, 동물 체내에서는 cellulose와 마찬가지로 거의 분해되지 않아 저칼로리 식품, 드링크류 등에 사용할 수 있다.

pullulan에 물을 넣고 가열, 가압하면 polystyrene과 같은 투명한 성형물을 얻을 수 있으며, 이것은 광택이 있고 탄력성이 높아 가식성 필름으로 응용될 수 있다. 이 pullulan 필름은 첨가되는 pullulan의 분자량과 농도를 조절하여 필름의 두께를 조절할 수 있다. 한편, pullulan은 직경이 미세한 실 형태로 제조할 수 있고 생체 친화성이 높아 의료 분야에 이용이 기대된다.

pullulan의 또 하나의 특징은 우수한 피막성이다. 식품을 pullulan 수용액에 침지한 후 건조시키면 안정된 피막을 얻을 수 있다. 이때, 사용되는 pullulan의 농도가 높을수록 피막의 두께도 두꺼워진다.

4. pullulan의 이용

표 3. 식품에서 pullulan 이용 예.

특 성	품 목	사 용 효 과
접착성	쌀과자	강력한 접착력, 광택
		작업성 및 미각 개선
	콩과자	접착, 결착효과, 산화방지, 광택
피막성	맛김	광택
	건조 어개류	광택
점착성	소오스류	부착성 향상, 식감개선, 광택, 내염성
	조림	광택보존향상, 국물흐름방지
	쿠키	성형성, 광택, 부스러짐 방지
	채소 절임	광택, 내염성, 내효소성
	수산물	광택, 변색 방지
보습성	스폰지 케익	보습효과, 식감개선, 기포의 안정화
	껌	열화방지, 품질향상
	냉동식품	품질개량, drip 방지
	어묵	식감개선, 노화방지, 부착효과
	면	노화방지, 보수성향상, 품질개량

pullulan은 식품, 의약품, 화장품 분야 등에 광범위하게 이용될 수 있다. 표 3은 pullulan의 식품에서의 이용 예를 나타낸 것이다.

최근에는 pullulan의 피막성을 이용하여 식품용 코오팅 재료로써의 개발이 활발하다. pullulan 용액을 분무, 도포, 침적에 의해 식품 원료에 적신 다음 건조시키면 피막을 형성한다. 이와 같이 코오팅을 하게되면, 식감을 손상시키지 않고 식품 표면에 광택을 유지할 수 있다. 또한, 방습도가 좋아져서 장기간 광택을 유지시킬 수 있어, 풍미를 유지하면서 표면 광택을 중요시하는 식품(맛김, 건조 어패류)에 적용하는 것이 좋다.[26]

pullulan은 다른 필름보다 산소 투과도가 비교적 낮아, 산화되기 쉽고 향이나 신선도를 중요시하는 식품에 코오팅을 하면 산화 방지 효과를 가져 올 수 있다.[2] 한편, pullulan은 식품에 사용되는 전분을 부분적으로 대체할 수 있어 조직감, 점성, 분산, 보습 등에 우수한 특성을 나타낸다.[27] 소화율이 낮아, 전분을 부분 대체했을 때 저칼로리 식품에 응용할 수 있고, 우수한 보습성 때문에 식품에서 결합력이 높아 전분이 과건조되거나 변패되는 것을 막아줌으로써 제품의 보존성을 향상시킨다. 또, pullulan 자체의 특성과 조직감으로 제품에 안정감을 주어 섭취시 포만감을 느끼게 한다.

분말 스프, 커피, 카레 및 각종 향신료가 들어 있는 동결 건조 식품을 pullulan 필름으로 포장하면, 풍미와 외관을 장기간 안정되게 보존할 수 있으며 사용시 개봉하지 않고 포장된 상태로 간편하게 조리할 수 있다. 또, 인쇄 적성이 뛰어난 필름 표면에 간단히 인쇄할 수 있을 뿐 아니라 식품 표면에 그대로 인쇄할 수 있다. 이 경우 물에 불용성이고 가식성인 색소(예를 들면 Monascus 색소)를 사용하여 필름위에 인쇄하면, pullulan 필름은 수분을 흡수하여 빨리 용해되고 그림이나 글자가 표면에 남는다. 현재 케이크, 쿠키, 아이스 캔디, 만두, 치이즈 등에 pullulan을 이용한 표면 인쇄기법이 활용되고 있으며, 앞으로 가식성 잉크 개발에 따라 그 용도가 확장될 전망이다.[23]

pullulan을 esterification하여 sheet 상태로 만들 수 있는데, 이것은 합판, 판자 등에 사용될 수 있을 뿐 아니라 식품의 sheet화에도 활용될 수 있다. 식품의 sheet화란, 필름을 만들때 수용성이며 분산이 잘 되는 물질을 넣어 필름을 제조한 것으로, 착색료, 향신료, 조미료, 감미료 등을 혼합하여 필름을 형성한 다음 건조하여 sheet 형태로 만든 것이다. 이러한 sheet 형태의 식품을 파쇄하여 혼합 조미료 제조 등에 이용할 수 있다.

pullulan 수용액으로 fiber를 만들 수 있는데, 이것은 나일론과 같이 우수한 인장력을 갖는다. 지금까지 전분이나 변성 전분을 이용하여 플라스틱 재료를 만들려는 시도가 많았지만 만족할만한 결과를 얻지 못하였으나, pullulan을 이용하여 어느 정도 가능하게 되었다. 이 밖에, pullulan은 점착성이 매우 우수하여 수분을 흡수하고 난 뒤, gel 상태를 계속 유지하고자 하는 제품에 점도 상승제로도 이용될 수 있다.

5. 결 론

이상에서 살펴본 바와 같이, pullulan은 여러 가지 우수한 기능적 특성을 가지고 있어, 식품을 포함한 여러 분야에서 그 응용 가능성이 증대되고 있다. 특히 화학적 수식 등의 가공 기술을 통해 그 응용 범위가 앞으로 확장될 전망이다.

그러나 아직까지 pullulan은 다른 천연 다당류에 비해 가격이 비싼 편이어서, 실용화 진행 속도가

늦은 감이 없지 않다. 가격이 싼 pullulan을 공급하기 위해서는, pullulan 생산 가격을 낮추어야 하는데, 앞으로 많은 연구 개발이 진행되어야 할 것이다. 값싼 기질을 찾고, mutation 등에 의해 pullulan을 과잉 생산할 수 있는 *A. pullulans* 균주의 개발, 연속 생산을 할 수 있는 bioreactor system의 개발, 원활한 회수 방법 등이 고려되어야 할 것이다. 또, 아직까지 잘 알려져 있지 않는 pullulan의 생합성 경로를 규명함으로써, *A. pullulans*의 배양 생리를 예측하여 pullulan 수율을 높힐 수 있는 길도 모색되어야 할 것으로 생각된다. 한편, pullulan의 특성을 더 자세히 연구하여, 부가적인 기능적 특징을 찾게되면, 여러 분야에서 그 용도를 확장할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Yuen, S. 1974. *Process Biochem.* **22**: 7-9, 22.
2. 中村 敏. 1985. 油化學. **34**: 865-871.
3. Catley, B.J. 1971. *Appl. Microbiol.* **22**: 641-649.
4. 임무현, 손홍수, 정낙현, 양한철. 1984. 한국산업미생물학회지. **12**: 219-224.
5. Leathers, T.D., Nofsinger, G.W., Kurtzman, C. P., and R.J. Bothast. 1988. *J. Industrial Microbiol.* **3**: 231-239.
6. Shin, Y.C., Kim, Y.H., Lee, H.S., Cho, S.J., and S.M. Byun. 1989. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 129-133.
7. LeDuy, A., Yarmoff, J.J., and A. Chagraoui. 1983. *Biotechnol. Lett.* **6**: 49-54.
8. LeDuy, A., and J.M. Boa. 1983. *Can. J. Microbiol.* **29**: 143-146.
9. Shipman, R.H., and L.T. Fan. 1978. *Process Biochem.* March: 19-21.
10. Auer, D.P.F., and R.J. Saviour. 1990. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 637-644.
11. Seviour, R.J., and B. Kristiansen. 1983. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 178-181.
12. Catley, B.J. 1971. *Appl. Microbiol.* **22**: 650-654.
13. Bulmer, M.A., Catley, B.J., and P.J. Kelley. 1978. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 362-365.
14. Heald, P.J., and B. Kristiansen. 1985. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1516-1519.
15. McNeil, B., Kristiansen, B., and R.J. Seviour. 1989. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 1210-1212.
16. Catley, B.J. 1980. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 265-268.
17. Kelly, P.J., and B.J. Catley. 1977. *J. Gen. Microbiol.* **102**: 249-254.
18. Ono, K., Yasuda, Y., and S. Ueda. 1977. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 2313-2317.
19. Lacroix, C., LeDuy, A., Noel, G., and L. Choplin. 1985. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 202-207.
20. Shin, Y.C., Kim, Y.H., Lee, H.S., Kim, Y.N., and S.M. Byun. 1987. *Biotechnol. Lett.* **9**: 621-624.
21. Mulchandani, A., Luong, J.H.T., and A. LeDuy. 1989. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 306-312.
22. Defresne, R., Thibault, J., LeDuy, A., and R. Lencki. 1990. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 526-532.
23. 中村 敏. 1986. *Jap. Food Sci.* **4**: 61-67.
24. Miura, Y., Arima, H., and S. Ueda. 1977. *Hakkokagaku.* **55**: 80-83.
25. 中西 二三夫. 1989. *Food Packaging.* **5**: 73-82.
26. 大上 猛夫. 1987. 食品と開發. **22**: 24-27.
27. 大上 猛夫. 1986. 食品と開發. **21**: 16-20.