

## Whey를 이용한 Pullulan의 발효생산에 관한 연구

정영일·\*김동운·\*\*김재형·\*\*박돈희·\*\*이기영  
전남대학교 공과대학 화학공학과·\*공업화학과·\*\*생물화학공학과  
A Study on the Pullulan Production Using Whey

Young-Il Jeong, \*Dong-Woon Kim, \*\*Jae-Hyung Kim,  
\*\*Don-Hee Park and \*\*Ki-Young Lee

Department of Chemical Engineering, \*Department of Chemical Technology,

\*\*Department of Biochemical Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

### ABSTRACT

In this study, pullulan production from whey medium by *Aureobasidium pullulans* was investigated. When the pullulan production from whey medium was carried out, final cell concentration was similar to sucrose basal medium, but pullulan concentration was less than 5g/l. For pullulan production from whey medium, adaptation culture technique was tried on lactose and galactose base medium. When the adaptation culture technique was not applied, the maximum concentration of pullulan was 3.4g/l for lactose, 2.5g/l for galactose. Adapted strains produced 10~12g/l from lactose, 10~11g/l from galactose. The pullulan production from lactose basal medium was 13.5g/l for lactose adapted strains and 18.6g/l for galactose adapted strains. When the adapted strains was inoculated on whey medium, maximum pullulan production was obtained at initial pH 3.0.

### 서론

풀루란(pullulan)은 흑효모라고 불리는 *Aureobasidium pullulans*에 의하여 합성되는 수용성 세포 외다당류(water-soluble extracellular-polysaccharide)로서 maltotriose를 기본단위로 하여  $\alpha(1-4)$ 와  $\alpha(1-6)$ 결합으로 중합된  $\alpha$ -glucan으로 알려져 있다. 풀루란은 Bernier[1]에 의하여 최초로 관찰된 이래로 많은 연구가 이루어졌는데 독성, 돌연변이성 등이 전혀 없는 가식성(可食性) 다당류로서 가식성(可食性) 포장용 재료[2], 식품원료 및 물성개량제로 적합하므로 그 특성을 응용하여 화장품, 의약품 등의 코팅제, 필름 형성제 등 사용범위가 광범위한 생물고분자로 각광받고 있다.

풀루란의 생산에 영향을 미치는 인자로는 탄소원,

질소원 및 pH 등이 있으며 탄소원의 비용을 절감하는 연구가 다양하게 이루어지고 있다. 그 동안 풀루란 발효에 대한 연구는 주로 sucrose를 탄소원으로 하여 이루어졌으며 10%의 전분가수분해물에서 최고 76%의 수율을 얻은 것으로 보고된 바 있으나 [2] 재현성은 없는 것으로 나타났다[3]. Shin 등 [4]은 돼지감자로부터 17.5 g/l의 풀루란을 얻었으며, LeDuy 등[5, 6]은 *Ceratocystis ulmi*와의 혼합 배양을 통하여 lactose로부터 15.5g/l를 얻었고, peat hydrolyzate 등을 이용하려는 연구도 시도되었 다.

한편, whey는 공업적인 이용가치면에서 가장 주목받는 부산물의 하나로서 치즈 제조시 나오는 액체인데 [7], 그대로 방출시에는 수질오염의 큰 요인이 되며 [8], 산소 요구량도 32,000ppm 이상이 되므

로 폐수처리시 상당한 비용이 소요된다. 이 whey에는 약 5%의 lactose, 1%의 단백질, 0.2%의 지질, 0.25%의 젖산 및 0.6%의 염류 등[9], 풍부한 영양소가 함유되어 있어서 식품첨가물, 동물의 사료 및 가수분해 후 whey음료 개발[10], whey를 이용한 알코올성 음료[11], 구연산 생산에의 응용[12] 등, whey를 이용하기 위한 다양한 연구가 시도되어 왔으며 다당류 생산의 배지로서도 주목받아 왔다. Stauffer 등[13]은 whey 또는 가수분해 whey를 사용하여 각종 다당류를 생산하였고 Schwartz 등[14, 15]은 whey-sucrose 배지와 whey-glucose 배지로부터 각각 Dextran 및 고점성 Xanthan 발효액의 생산 등을 보고하였다. Fu와 Tseng 등[16]도 *Xanthomonas campestris*의 유전조작을 통한 xanthan gum 생산의 증진 등을 보고하였다.

그러나 아직 whey로부터 풀루란 생산에 대하여서는 보고된 바가 없으므로 본 연구에서는 whey로부터 풀루란의 발효생산을 위하여, lactose를 탄소원으로 한 기본배지에서 적응배양(adaptation culture)을 시도하였으며 풀루란으로 거의 전환되지 않거나 풀루란 합성을 저해하는 것으로 보이는 galactose[17]를 탄소원으로 한 기본배지에서도 적응배양을 시도하여 풀루란 합성에 미치는 영향을 조사하였고 whey를 이용한 배지에서 풀루란의 생산을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양

본 연구의 균주는 *Aureobasidium pullulans* IFO 4464 이었고 2주일마다 보존배지(Maintenance medium)에 28°C에서 2일 동안 계대배양한 후 사용할 때까지 4°C에서 보관하였다. 배양은 보존 균주를 pH 6.0으로 조정한 100ml의 배지가 들어 있는 500ml Erlenmeyer flask에 백금이로 2회 접종시켜 28°C, 210rpm의 진탕배양기에서 3일간 전배양하였으며, 이 전배양액 5%(v/v)를 각 생산배지에 접종하여 배양하였다. 배지의 조성은 Table 1과 같다.

### 적응배양실험

적응배양실험은 sucrose를 탄소원으로 한 배지에서 3일간 배양시켜 lactose와 galactose를 탄소원으로 사용한 생산배지에 5%(v/v)를 접종한 후 발효하여 첫번째 적응배양으로 하였고 이를 5일간 배양 후 매번 새로운 배지에 재접종하여 행하였다.

Table 1. The composition of maintenance, pre-culture and adaptation culture medium.

	Maintenance	Pre-culture	Adaptation Culture Medium	
	Medium	Medium	Lactose	Galactose
Carbohydrate				
Sucrose	5.0%	5.0%		
Lactose			5.0%	
Galactose				5.0%
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5%	0.5%	0.5%	0.5%
NaCl	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%
Bacto peptone	0.125%	0.125%	0.125%	0.125%
Agar	2.0%			

### Whey의 전처리 및 이용

Whey는 치즈 제조회사(광주직할시 광산구 소재 한국 뉴질랜드 치즈)로부터 입수하여 95°C에서 20분간 처리하여 침전물을 Toyo No. 2 filter paper를 사용하여 거른 후에 4°C 이하에 보관하면서 사용하였다. Whey용액의 lactose농도는 4.7%였으므로 5%(w/v)가 되도록 조정된 후에 120°C (15psig)로 15분 동안 멸균하였다. 이때 침전물은 다시 무균적인 조건에서 Toyo No. 6 filter paper로 거른 후에 0.5% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% NaCl, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% Bacto Peptone 등의 미량원소를 분리 멸균하여 첨가하여 배지로 사용하였다.

적응배양액에 의한 whey로부터의 풀루란 생산 실험을 위하여 상기의 적응배양실험이 끝난 배양액을 새로운 배지에 5%(v/v) 접종하여 4일간 배양시킨 후, 1%(v/v)를 다시 새로운 배지에 접종하여 3일간 배양한 후에 최종 접종액으로 사용하였다.

### 균체량과 풀루란의 정량

배양액 6ml를 채취한 후, 5ml를 정량하고 증류수로 2배 희석시켜 15000rpm에서 20분 동안 원심분리시킨 다음 침전된 균체를 95% 에탄올로 세척한 후, 95°C의 진공건조기에서 24시간 동안 건조시켜 건조 균체량을 정량하였으며, 풀루란은 상징액 5ml를 2배의 95% 에탄올로 세척한 후에 4°C에서 12시간동안 침전시킨 후, 95°C의 진공건조기에서 24시간 동안 건조시켜 정량하였다.

### 당 분석

Lactose의 분석은 Nickerson 등[18]에 의한 methylamine 분석법을 사용하여 분석하였으며, 환

원당은 Miller[19]의 DNS법을 사용하여 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 플루란 생산에 대한 탄소원의 영향

Fig. 1은 whey를 배지로 사용하였을 때 플루란 발효의 결과로서 pH는 배양 3일째까지 감소하여 pH 4.0이 된 후에 다시 pH 6.0 이상으로 상승하는 경향을 보였다. 균체성장은 6일째에 11.7g/l에 이르렀고 플루란의 생산은 5g/l로 저조하였다.

Fig. 2는 lactose를 기질로 하여 6일간 배양한 결과이다. 탄소원이 lactose인 경우에는 균체성장 및 플루란 생산이 저조하였고 pH가 5.6까지 감소하였으므로 lactose의 가수분해가 활발하지 못함을 알 수 있었다. 또한 총 환원당은 50g/l에서 36.3g/l까지 떨어졌으나 lactose농도는 29g/l까지 떨어진 것으로 보아 이당류인 lactose가 단당류인 glucose와 galactose로 분해되었지만 생산물로의 전환은 낮음을 보였다.

Fig. 3은 glucose를 기질로 하여 6일간 배양한 결과이다. 탄소원이 glucose인 경우에는 균체성장 및 플루란 생산이 활발하여 glucose농도 50g/l에서 25.5g/l의 플루란이 생산되었으며 배지의 탄소원은 3일째에 거의 다 소모되었고 pH는 2일 이후 4.0까지 감소되었다.

Fig. 4는 galactose를 기질로 하여 6일간 배양한 결과이다. 탄소원이 galactose인 경우에는 lactose나 glucose를 탄소원으로 사용한 경우와는 달리 pH가 다소 상승하는 경향을 보였으며 균체 성장과 플루란 생산이 아주 저조하였을 뿐만 아니라 3일 이후에는 균체량이 다소 줄어드는 경향을 보임으로써 galactose는 동화되기 힘든 탄소원인 것으로 사료된다.

#### 적응배양에 대한 영향

Whey로부터 플루란 생산의 향상을 위해서는 Whey의 주성분인 lactose의 이용을 증진시킬 필요가 있다. Fig. 5는 적응배양을 시도한 결과로서 첫 번째 적응배양에서는 균체 성장과 플루란 생산은 낮았다. 그러나 세번째 적응배양에서부터 플루란 생산량이 점차 증가하기 시작하여 여섯번째 적응배양에서는 급속히 증가하여 균체량은 7.1g/l, 플루란농도는 12.2g/l에 이르렀으며 균체 성장과 플루란농도는 동일 수준을 계속 유지하였다.

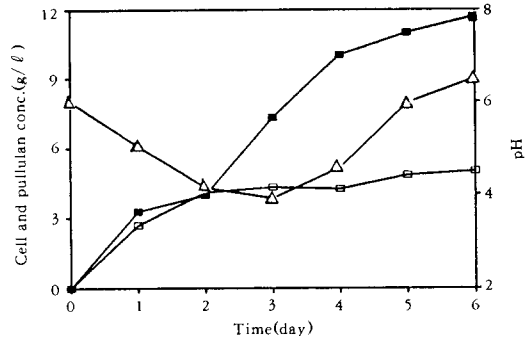


Fig 1. Time courses of pH(△), cell mass(■) and pullulan production(□) of *Aureobasidium pullulans* from whey medium.

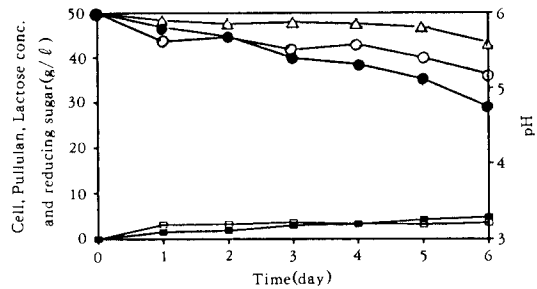


Fig 2. Time courses of pH(△), cell mass(■), pullulan production(□), lactose concentration(●) and reducing sugar(○) from medium containing lactose as a carbon source.

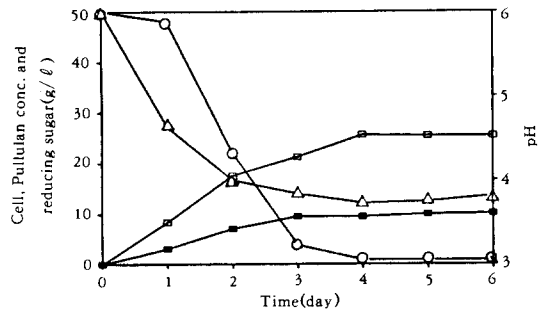


Fig 3. Time courses of pH(△), cell mass(■), pullulan production(□) and reducing sugar(○) from medium containing glucose as a carbon source.

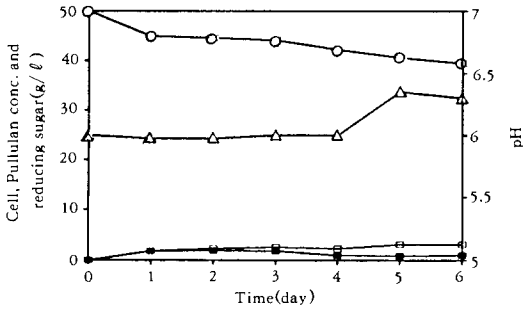


Fig 4. Time courses of pH(Δ), cell mass(■), pullulan production(□) and reducing sugar(○) from medium containing galactose as a carbon source.

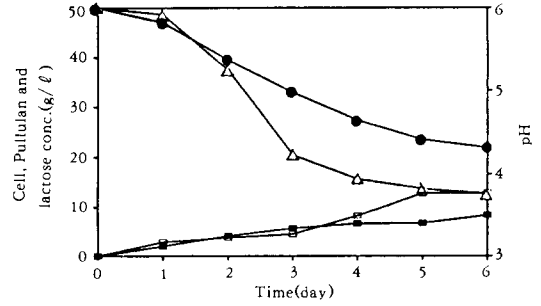


Fig 7. Time courses of pH(Δ), cell mass(■), pullulan production(□) and lactose concentration(●) from medium containing lactose

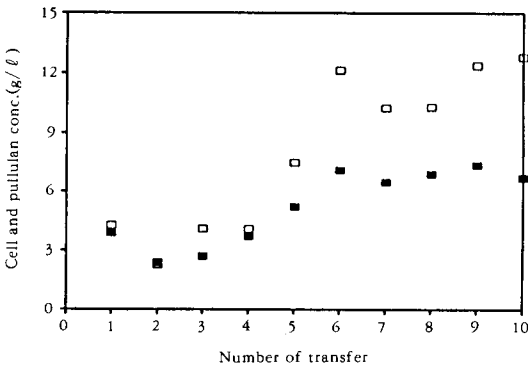


Fig 5. Multiple transfer adaptation on lactose basal medium. Cell Mass(■), Pullulan Production(□).

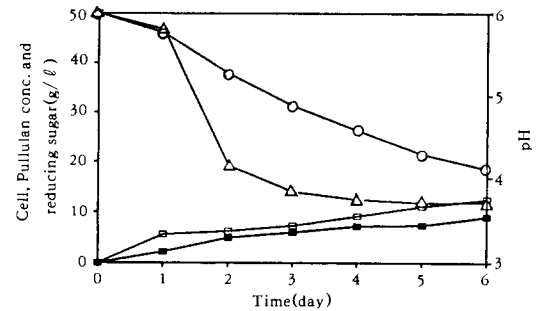


Fig 8. Time courses of pH(Δ), cell mass(■), pullulan production(□) and reducing sugar(○) from medium containing galactose as a carbon source(adaptation culture).

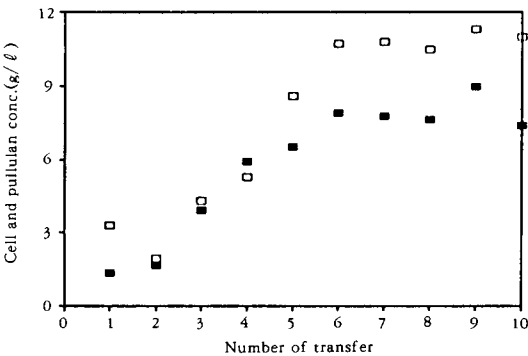


Fig 6. Multiple transfer adaptation on galactose basal medium. Cell Mass(■), Pullulan Production(□)

Fig. 6은 galactose 적응배양에 의한 풀루란 생산성 향상 가능성을 알아보기 위하여 galactose를 적응배양 탄소원으로 실험한 결과이며 galactose 적응배양의 경우에는 두번째까지는 균체량과 풀루란 농도가 미미하였으나 그 이후로는 계속 증가하여 여섯번째 이후에는 10g/l ~ 11g/l 정도에 이르렀고 그 이후는 동일한 수준을 유지하였다.

Fig. 7은 열번째까지 lactose에 적응배양된 접종액을 50g/l의 lactose배지에 접종한 결과로서 lactose농도는 Fig. 2의 경우와 비교하여 훨씬 더 감소되었으며, pH도 3일 이후로는 4.5 이하로 감소하였고, 균체성장 및 풀루란 생산이 각각 1.7배 및 3.7배 정도 향상되었다.

Fig. 8은 열번째까지 galactose에 적응배양된 접종액을 50g/l의 galactose배지에 접종한 결과로서 galactose의 경우에도 Fig. 4의 경우와 비교하여 환

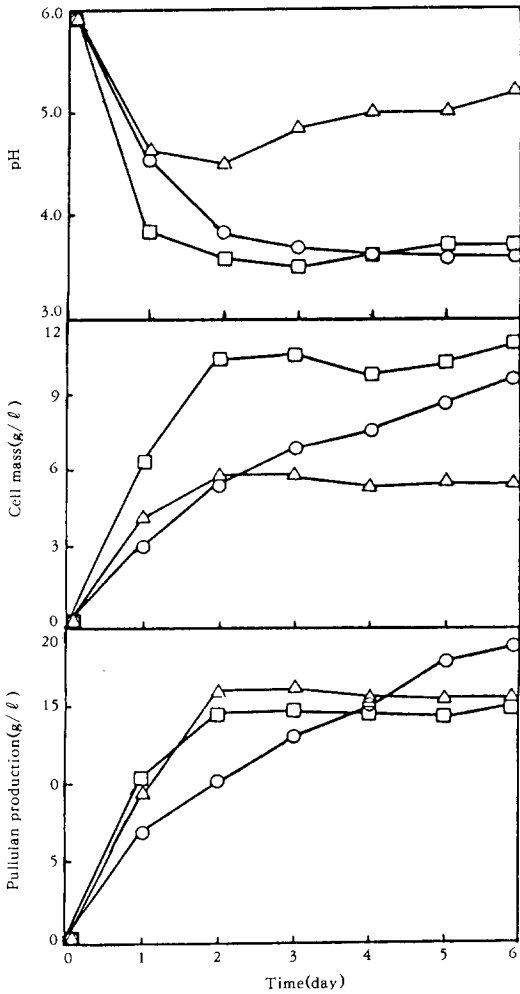


Fig 9. Time courses of pH, cell mass and pullulan production by different inocula from medium containing glucose and galactose as a carbon source.

- (A) Glucose 25g/l --- Sucrose Preculture (△)
- (B) Glucose 25g/l + Galactose 25g/l --- Sucrose Preculture (□)
- (C) Glucose 25g/l + Galactose 25g/l --- Adaptation Culture (○)

원당의 농도가 대폭 감소되었으며 적응배양전과 비교할 때 *Aureobasidium pullulans*가 galactose를 동화시키는 활성이 크게 증가함을 나타내었다. 적응배양 후에는 균체 성장 및 풀루란 생산량이 각각 9

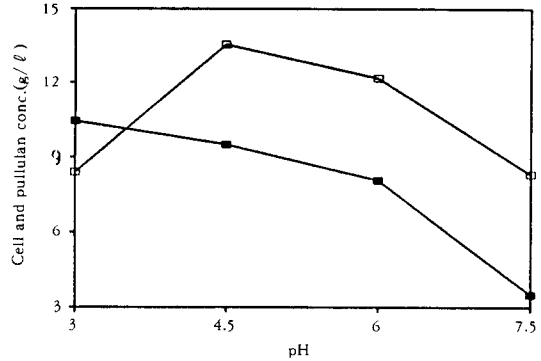


Fig 10. Effect of initial pH on the cell mass (■) and pullulan production (□).

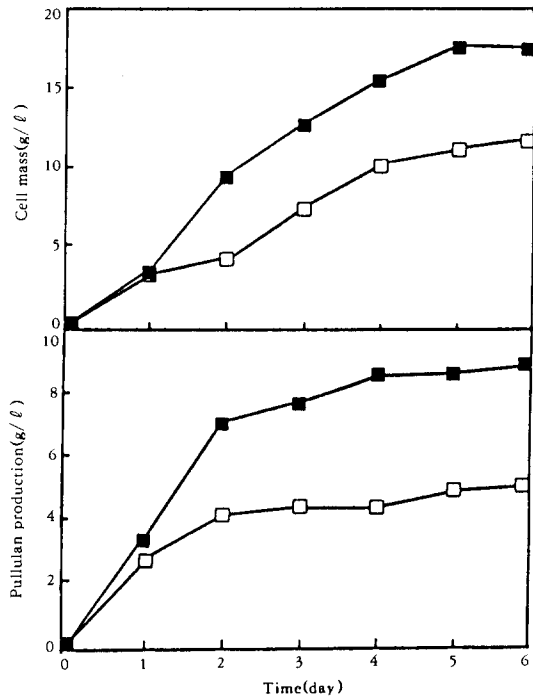


Fig 11. Time courses of cell mass and pullulan production by sucrose preculture (□) and adaptation culture (■) from whey medium.

배 및 4.9배 정도 향상되었으며 lactose에서 보다 더 빠른 속도로 발효되었다.

Fig. 9는 각각 sucrose를 탄소원으로 사용한 전배양액을 glucose 25g/l의 배지(A), glucose 25g/l와 galactose 25g/l의 혼합탄소원이 포함된 배

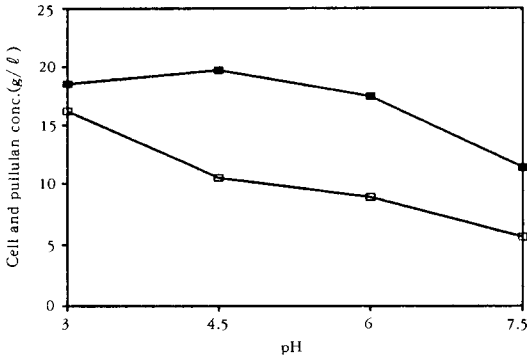


Fig. 12. Effect of initial pH on the cell mass(■) and pullulan production(□) from whey medium.

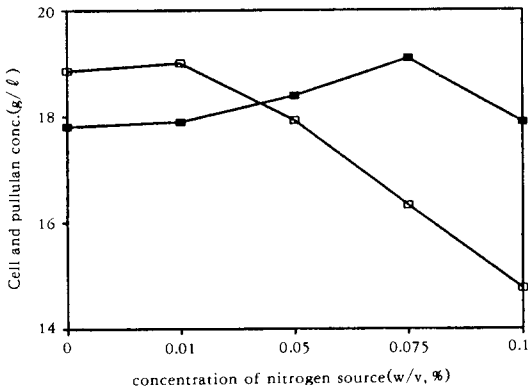


Fig. 13. Effect of concentration of nitrogen source (bacto peptone) on the cell mass(■) and pullulan production(□) from whey medium.

지(B)에 접종한 경우와 galactose에 적응배양한 균주를 glucose 25g/ℓ와 galactose 25g/ℓ의 혼합탄소원 배지(C)에 접종하여 실험한 결과이다. (A)와 (B)의 비교에서 (B)의 경우에 pH가 더 떨어졌고 균체 성장도 훨씬 높았으나 풀루란 생산이 더 적었는데, 이는 주로 glucose만 소비되고 galactose는 동화되지 못하였기 때문인 것으로 보인다. 그러나 galactose에 적응배양한 균을 접종한 (C)의 경우, 균체 성장은 (B)보다 적었으나 풀루란 생산이 19g/ℓ에 이르러 적응배양을 통해 galactose가 균체 성장 및 풀루란 생산에 효과적으로 소비됨을 알 수 있었다.

초기 pH의 영향

Fig. 10은 lactose에 적응배양된 균 5%(v/v)를 lactose 배지에 접종하여 각 pH에 따른 영향을 검토한 결과 초기 pH 4.5의 조건에서 균체 성장 및 풀루란의 최대생산을 보였다. 반면 sucrose가 탄소원인 경우 풀루란의 생산은 초기 pH 6.0에서 시작하는 것이 유리하고, 균체 성장은 초기 pH 4.5에서 더 우수하다는 보고[20]와는 다르게 나타났다.

적응배양액의 접종비율에 따른 영향

Table 2는 lactose와 galactose에 적응배양된 균주의 접종비율이 풀루란 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 lactose 적응배양액과 galactose 적응배양액의 비율을 각각 5:0, 4:1, 3:2, 1:4, 0:5%(v/v)으로 변화시켜 접종한 균주로 lactose 배지를 발효시킨 결과이다.

균체량은 접종비율에 따라 그다지 큰 차이를 보이지 않았으나 galactose보다는 lactose 적응배양액의 비율이 높을 때 균체량이 다소 많은 경향을 보였으나 galactose 적응배양액의 비율이 높을수록 풀루란 생산이 더 우수한 경향을 보였다.

적응배양액 접종에 의한 Whey에서의 풀루란 생산

Fig. 11은 적응배양에 의하여 galactose를 동화할 수 있게 된 경우와 적응배양하지 않은 경우와의 차이를 비교한 것이다. 적응배양하지 않은 경우에 비하여 적응배양한 경우는 훨씬 높은 균체 성장을 보였는데 이는 적응배양에 의하여 *Aureobasidium pullulans*가 whey배지 내의 lactose를 원활하게 동화시켰기 때문이라고 생각된다. 풀루란의 생산에 있어서도 적응배양한 경우가 적응배양되지 않은 경우에 비하여 훨씬 높은 생산성을 보였다.

Whey배지에서 초기 pH의 영향

Fig. 12는 whey배지에 galactose에 적응배양된 균 5%(v/v)접종하여 초기 pH에 따른 균체농도와 풀루란 생산량의 변화를 나타낸 것이다. 산성인 초기 pH 4.5에서 19.7g/ℓ으로 가장 많은 균체량을 보였고 풀루란 생산은 기존의 방법에서는 초기 pH 6.0에서 최고의 생산성을 보이고 lactose 적응배양의 경우에는 초기 pH 4.5인 경우에 최고의 생산성을 보였으나 whey배지에서는 초기 pH 3.0에서 16.2g/ℓ의 풀루란을 생산하여 가장 높은 생산성을 보였다. 이러한 결과는 whey배지 내의 lactose가 산성 pH인 경우에 쉽게 가수분해되기 때문인 것으로 추

**Table 2. Effect of inoculum ratio(Lactose adaptation culture broth:Galactose adaptation culture broth) for pullulan production.**

Initial lactose conc. : 50g/ℓ			
Inoculum ratio (Lactose:Galactose)	Cell mass (g/ℓ)	Pullulan (g/ℓ)	Lactose conc. (g/ℓ)
5:0	9.48	13.5	22.1
4:1	8.94	14.5	21.0
3:2	8.88	17.3	21.2
1:4	9.16	17.6	21.5
0:5	8.60	18.6	21.5

정된다.

#### Whey배지에서 질소원 첨가에 의한 영향

Fig. 13은 whey배지에 galactose에 적응배양된 균 5%(v/v) 접종하고 질소원으로서 bacto peptone을 배지의 0.01%, 0.05%, 0.075%, 0.1%만큼 첨가하여 실험한 결과로서 균체량은 질소원 첨가 정도에 따라서 큰 차이를 보이지 않았으나 풀루란의 생산량은 질소원의 첨가농도가 낮을수록 생산이 증가하여 0.01%의 peptone 첨가시에 최고 18.9g/ℓ의 생산량을 보였다.

#### 요 약

*Aureobasidium pullulans*에 의한 whey배지에서 풀루란의 생산에 대한 연구가 수행되었다. Whey배지에서 풀루란의 발효생산에 대한 실험결과, 최종 균체농도는 sucrose 기본배지에서와 동일하였으나 풀루란의 생산은 5g/ℓ로 저조하였다.

Whey 배지에서 풀루란 생산을 향상시키기 위하여 lactose와 galactose 기본배지에서 적응배양을 시도하였다. 적응배양을 시도하지 않은 경우, lactose를 탄소원으로 한 배지에서 3.4g/ℓ, galactose를 탄소원으로 한 배지에서 2.5g/ℓ의 풀루란 생산을 보였으나 적응배양방법을 이용하여 lactose로부터 10~12g/ℓ, galactose로부터 10~11g/ℓ로 풀루란 생산을 증진시켰다. Lactose 기본배지에서 lactose에 적응배양된 균은 13.5g/ℓ의 풀루란을 생산하였고 galactose에 적응배양된 균은 18.6g/ℓ를 생산하였다.

Whey배지에 적응배양된 균을 접종한 결과 초기 pH 3.0일 때 풀루란 생산이 최대값을 보였다.

#### 참 고 문 헌

1. B. Bernier(1958), *Can. J. Microbiol.*, **4**, 195.
2. S. Yuen(1974), *Process Biochem.*, **11**, 7.
3. 신용철, 이현수, 변시명(1990), *생물화학*, **4**, 8.
4. Y. C. Shin, Y. H. Kim, H. S. Lee, S. J. Cho and S. M. Byun(1989), *Biotech. & Bioeng.*, **33**, 129.
5. A. LeDuy, I. I. Yarmoff and A. Chagroui (1983), *Biotechnol Lett.*, **5**, 49.
6. A. LeDuy and J. M. Boa(1983), *Can. J. Microbiol.*, **29**, 143.
7. R. R. Zall(1984), *J. Dairy Sci.*, **67**, 2621.
8. F. V. Kosikowski(1979), *J. Dairy Sci.*, **62**, 1149.
9. J. P. Kennedy(1985), *Cultured Dairy Product. J.*, **2**, 13.
10. M. J. Choi and T. R. Heo(1992), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 46.
11. S. Y. Kim(1988), M. S. Thesis, Kyung-Pook National University.
12. M. Hossain, J. D. Brooks and I. S. Maddox (1983), *NewZealand J. Dairy Sci. Technol.*, **18**, 161.
13. K. R. Stauffer and J. G. Leader(1978), *J. Food Sci.*, **43**, 756.
14. R. D. Schwartz and E. A. Bodie(1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 678.
15. R. D. Schwartz and E. A. Bodie(1986), *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 203.
16. I. F. Fu and Y. H. Tseng(1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 919.
17. P. F. Fox(1982), *Developments in Dairy Chemistry-3*, 133-141, Elsevier Applied Science Publishers.
18. T. A. Nickerson, I. F. Vujicic and A.Y. Lin (1976), *J. Dairy Sci.*, **59**, 386.
19. G. L. Miller(1959), *Anal. Chem.*, **31**, 426.
20. K. Y. Lee, J. H. Kim, U. Choi, Y. J. Yoo and K. Na(1990), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 101.