

Aureobasidium pullulans ATCC 9348의 Pullulan 생산과 균체 형태의 변화

권오성 · 남희섭* · 이형재 · 신용철¹
(주) 농심 기술개발연구소, ¹경상대학교 미생물학과

Pullulan Production and Morphological Change of *Aureobasidium pullulans* ATCC 9348

Kwon, Oh-Sung, Hee-Sop Nam*, Hyung-Jae Lee and Yong-Chul Shin¹

Research and Development Center, Nong Shim Co., LTD., Kunpo 435-030, Korea
¹Department of Microbiology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

Abstract — The pullulan production and morphological change of *Aureobasidium pullulans* ATCC 9348 were investigated both in batch fermentation and in continuous fermentation. The best carbon source for pullulan production was sucrose among seven different carbon sources. The pullulan production of *A. pullulans* was increased with increasing the carbon to nitrogen ratio of the medium using sucrose as a carbon source. In batch fermentation, production of pullulan occurred following exhaustion of the nitrogen source from the medium. The continuous fermentation showed that the pullulan production was closely paralleled with cell growth and was most effective at a dilution rate of 0.06~0.07 hr⁻¹. The ratio of yeast-like cells (blastospores) of *A. pullulans* increased with the increase of growth rate, and reached 100% over the growth rate of 0.07 hr⁻¹. The growth rate, within a certain range, affected not only on the cell morphology, but on the specific pullulan productivity of *A. pullulans*.

Pullulan은 maltotriose를 기본단위로 하여 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 우수한 물성과 안전성을 가지고 있어, 식품첨가물, 가식성 필름, 플라스틱 결합제, 코오팅제 등 광범위한 분야에 그 이용 가능성이 모색되고 있다(2).

*A. pullulans*에 의한 pullulan 생산에 관한 배양학적 연구에는, 탄소원의 종류(3-5), 질소원의 종류(6) 및 농도(7), pH(8), fermentor 내 압력(9)의 영향 등이 있다. 특히, 여러 배양조건에 따른 균체의 형태 변화와 이에 따른 pullulan 생산성의 영향에 대해 많은 검토가 이루어졌다(6, 10-12).

그러나 지금까지 연구의 대부분은 회분식 배양에 의한 결과들로서, 배양중의 영양성분 및 pH의 변화,

여러 배양요인에 따른 균체형태 및 균체 age의 변화 등 복잡한 변화가 동시에 일어나기 때문에, 어떤 한 요인이 pullulan 생산에 직접적으로 영향을 주었다고 볼 수 없다. 이러한 다양한 요인들은 균체의 growth rate에 영향을 미칠 것이고, 따라서 growth rate가 균체의 형태와 pullulan 생산에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 본 논문에서는 *A. pullulans* ATCC 9348의 pullulan 생산과, 연속배양시 growth rate가 세포형태 변화와 pullulan 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용된 균주는 *Aureobasidium pullulans* ATCC 9348로, YM 한천 배지에서 4주마다 계대배양하여 사용하였다.

배지 및 배양

배양 조건을 조사하기 위한 기초 배지 조성은, 0.5%

Key words: *Aureobasidium pullulans* ATCC 9348, pullulan, morphology, continuous culture, C/N ratio, carbon source

*Corresponding author

K_2HPO_4 , 0.1% NaCl, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 였으며, 탄소원의 종류를 결정하는 실험에서는 0.1% yeast extract를, 탄소원의 농도 영향 및 fermentor 실험에서는 0.06% NH_4Cl 을 각각 질소원으로 사용하였다.

배지를 500 ml Erlenmyer flask에 100 ml을 넣고 초기 pH를 7.0으로 조정된 다음, 27°C, 200 rpm에서 7일간 배양하였다. Fermentor를 사용한 회분식 배양에서는 위의 배지 구성에 5% sucrose를 첨가하여 사용하였다. Fermentor는 Bioflo III model(New Brunswick Scientific Instrument Co., USA)을 사용하였으며, working volume은 2l, 배양 온도는 27°C, 통기량 1 vvm, 교반속도 500 rpm의 조건에서 배양하였다. 연속식 배양은 dilution rate 0.03 hr⁻¹에서 0.10 hr⁻¹ 범위에서 회분식 배양과 동일한 배지 및 배양 조건으로 실험하였다.

균체량 및 세포외 다당류의 정량

균체를 얻기 위해 배양액 5 ml에 동량의 증류수를 첨가하여 혼합한 뒤, 20,000×g에서 10분간 원심분리한 후 침전된 균체에 5 ml의 증류수를 가해 3000×g에서 5분간 원심분리하여 상층부의 mycelium 형태 부분과 하층부의 yeast 형태 부분을 분리하였다. 이후 각각의 부분에 증류수를 5 ml 씩 가해 20,000×g에서 10분간 원심분리하여 세척한 다음, 105°C에서 15시간 건조시켜 균체의 건조 무게를 측정하였다. 세포외 다당류는 균체가 제거된 배양액에 2배 부피의 ethanol을 첨가하여 잘 흔들어 준 다음, 건조 균체량을 측정하는 동일한 실험 방법으로 건조 무게를 측정하였다.

잔존 배지성분 분석

배양액에 잔존하는 당은, 균체 및 다당류를 제거한 배양액을 50°C 진공하에서 ethanol을 증발시킨 후 phenol sulfuric acid 법(13)에 의해 총당으로 측정하였다. 배양액 중 NH_4Cl 의 농도는 micro-Kjeldahl 법으로 측정하였다.

배양액의 색도 분석

배양액의 색도는 Minolta Chroma Meter CR-200 (Minolta Camera, Japan)을 이용하여 ΔL^* (brightness), Δa^* (blue-red), Δb^* (green-yellow)를 측정하였으며, 이를 이용하여 ΔE^* 값으로 정량화하였다. 여기서 ΔE^* 는 $\Delta E^{*2} = \Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}$ 의 식에서 구했으며, whiteness의 기준이 되는 순백색 표준물질과의 차이를 나타낸다.

결과 및 고찰

최적 탄소원

탄소원의 종류는 pullulan 생산에 영향을 미친다. Pullulan 생산수율에 좋은 탄소원으로는 sucrose(3, 4), soluble starch(5) 등이 알려져 있다.

A. pullulans ATCC 9348은 본 실험에 사용된 탄소원들 중, glucose, fructose, sucrose, maltose 등에서 높은 pullulan 생산성을 나타내었다(Table 1). 특히 sucrose는 균체량 11.8 g/l, pullulan 22.4 g/l로 가장 좋은 탄소원임을 알 수 있었다. 반면, glycerol이 함유된 배지에서는 균체 성장에 비해 pullulan은 거의 생산되지 않았다.

탄소원의 농도

일반적으로 고정된 질소원 농도에서 탄소원의 농도 즉, C/N 비율이 높을수록 다당류 생산에 좋다(14). 0.06% NH_4Cl 을 질소원으로 사용하고 sucrose 첨가 농도를 달리하여 *A. pullulans*의 균체 성장 및 pullulan 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1). 7일간의 진탕배양 결과, 균체량은 sucrose 농도가 7%일 때 최대값을 보이다가 그 이상의 sucrose 농도배지에서는 더 이상 증가하지 않았다. Pullulan 생산은 sucrose 농도 11%까지 계속 증가하여 43.5 g/l에 달했다. Sucrose 농도 11%일 때 배지의 C/N 비율은 296으로, 높은 pullulan 생산에 높은 C/N 비율이 요구됨을 알 수 있다. 이상의 결과에서, 본 실험에 사용된 균주는 고농도의 sucrose 배지에서도 많은 양의 균체량과 pullulan을 생산할 수 있음을 알 수 있었다. 기질 소모량에 대한 pullulan 전환수율은, sucrose 농도 7%일

Table 1. Effect of carbon source on the growth and pullulan production of *A. pullulans*¹⁾

| Carbon source | Dry cell weight (g/l) | Pululan (g/l) |
|----------------|-----------------------|---------------|
| Glucose | 10.1 | 19.2 |
| Fructose | 7.1 | 13.4 |
| Galactose | 9.6 | 2.3 |
| Sucrose | 11.8 | 22.4 |
| Maltose | 10.6 | 19.5 |
| Soluble starch | 14.5 | 8.2 |
| Glycerol | 4.6 | 1.0 |

¹⁾*A. pullulans* ATCC 9348 was cultivated for 7 days at 27°C in liquid media containing 5% various carbon sources.

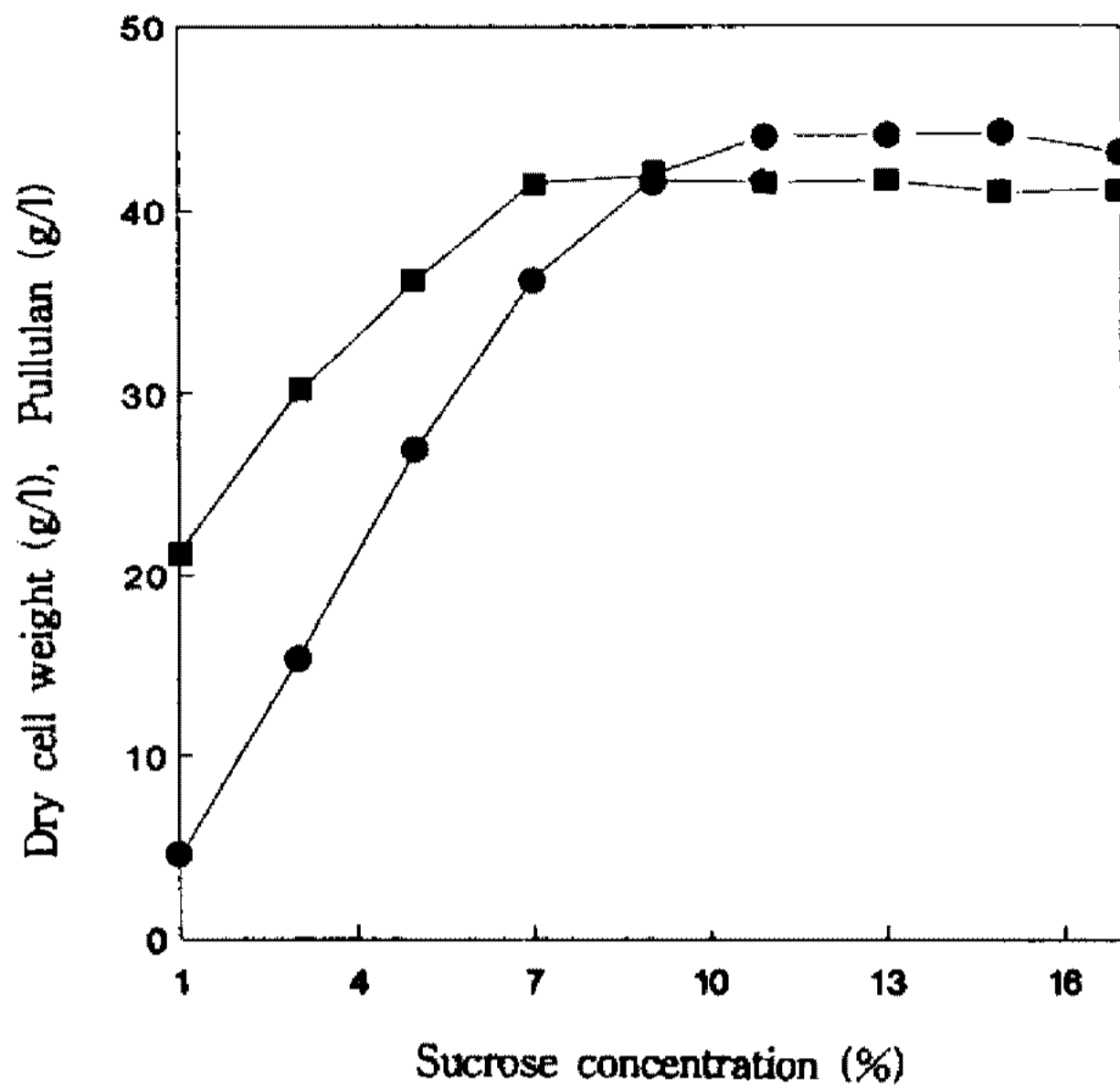


Fig. 1. Effect of sucrose concentration on the growth and pullulan production of *A. pullulans*.
 -■- Dry cell weight, -●- Pullulan

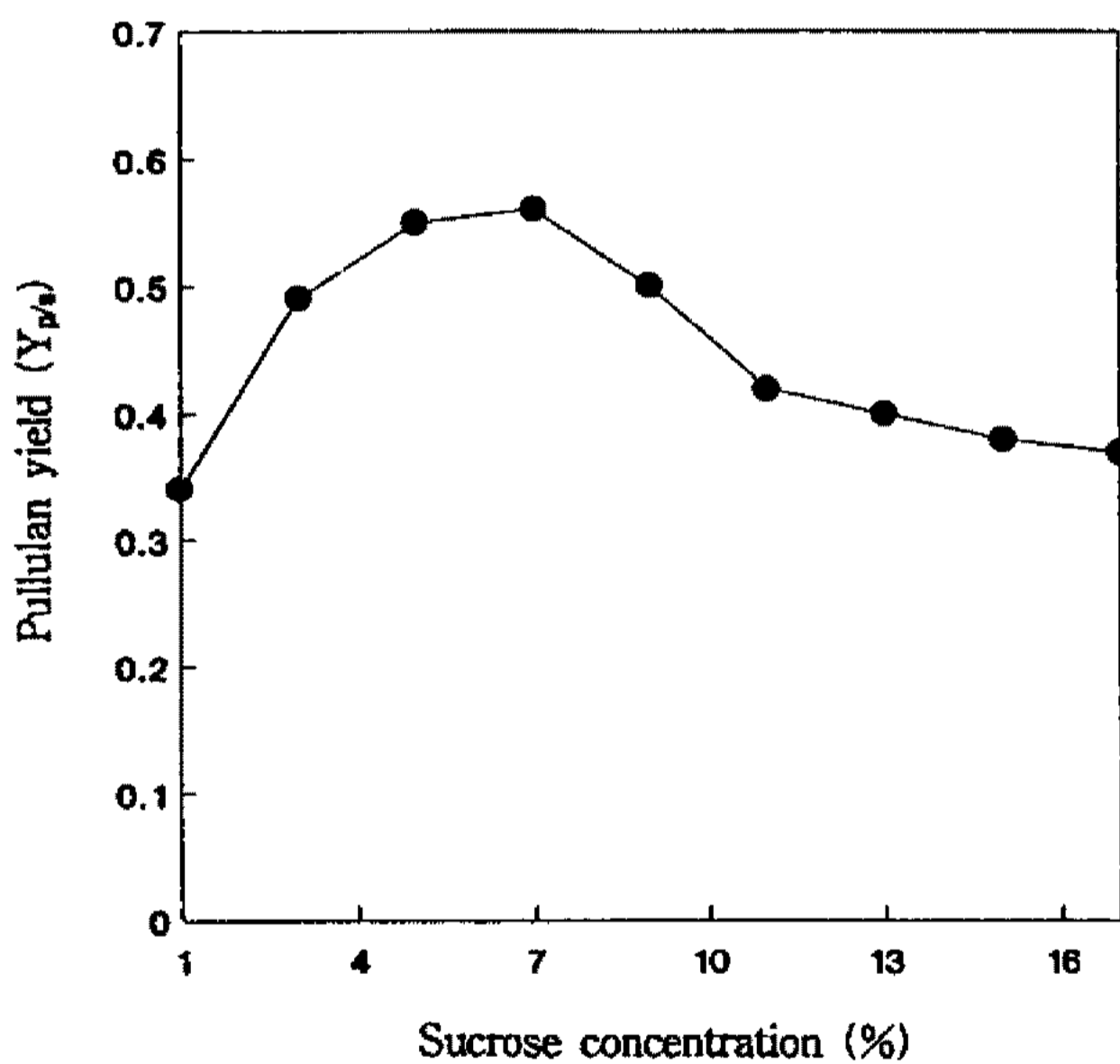


Fig. 2. Effect of sucrose concentration on the pullulan yield of *A. pullulans*.

때 0.57로 최대값을 나타내었으나, 그 이상의 sucrose 농도에서는 pullulan 전환수율이 급격히 낮아져(Fig. 2), 탄소원의 농도가 지나치게 높으면 pullulan 생산 효율이 떨어진다는 다른 보고들의 결과와(3, 15) 일치하였다.

배양시간에 따른 pullulan 생산

Fermentor를 이용하여 5% sucrose, 0.06% NH₄Cl 배지에서 회분식 배양을 했을 때, 배양시간에 따른 pullulan 생산은 Fig. 3과 같다.

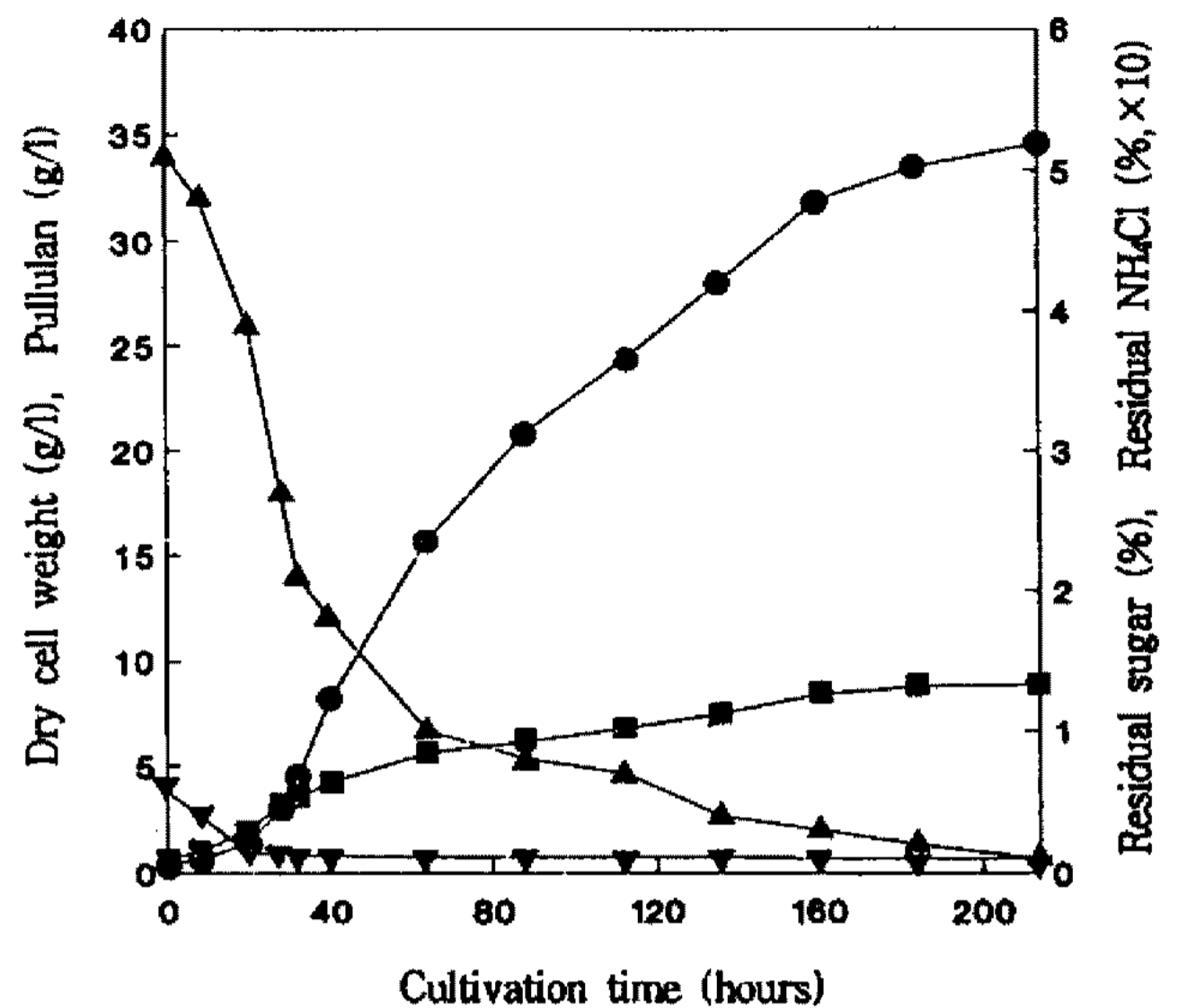


Fig. 3. Time course of batch culture of *A. pullulans* ATCC 9348.
 -■- Dry cell weight, -●- Pullulan, -▲- Residual sugar, -▼- Residual NH₄Cl

A. pullulans ATCC 9348은 배지중 sucrose 농도의 감소와 함께 균체량과 pullulan의 생산이 병행해서 증가하여, 또 다른 pullulan 생산균주인 *A. pullulans* QM 3092의 균체성장 및 pullulan 생산 양상과 유사하였다(6, 7). 배지중 질소원의 농도는 배양 초기에 급격히 떨어져 접종 후 20시간만에 고갈되었다. 균체량은 접종 후 증가하였지만, pullulan은 질소원이 고갈되는 시점부터 생산되기 시작하여 배양 214시간에 35.1 g/l로 최대치를 나타내었다. 따라서 본 균주는 배지중에 과량의 질소원이 존재하면 pullulan 생산이 억제됨을 알 수 있었다. 실험적으로 얻은 기질 소모량에 대한 pullulan 수율은 0.67로써, 이 값은 glucose를 기질로 했을 때 얻은 pullulan 생산수율인 0.52 (16)보다 다소 높았다.

연속배양에서 pullulan 생산

*A. pullulans*의 growth rate가 pullulan 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해, 질소원인 NH₄Cl의 농도를 0.03%로 공급하고 pH를 7.2로 유지한 연속배양 실험을 하였다. 수시로 배양액 중 균체량을 측정하여, 그 변화가 거의 없는 steady state에 들어갔을 때 배양액을 취하여 pullulan을 분석하였다.

균체량은 growth rate(=dilution rate)가 증가함에 따라 서서히 감소하다가, 0.08 hr⁻¹ 이후에는 급격히 감소하여 전형적인 wash-out 현상을 나타내었다(Fig. 4). 또 pullulan 생산도 균체량의 변화와 유사한 양상을 나타내었다(Fig. 4). 이러한 결과는, pullulan이 2차 대사산물이라는 주장(17)과는 다르게, pullulan

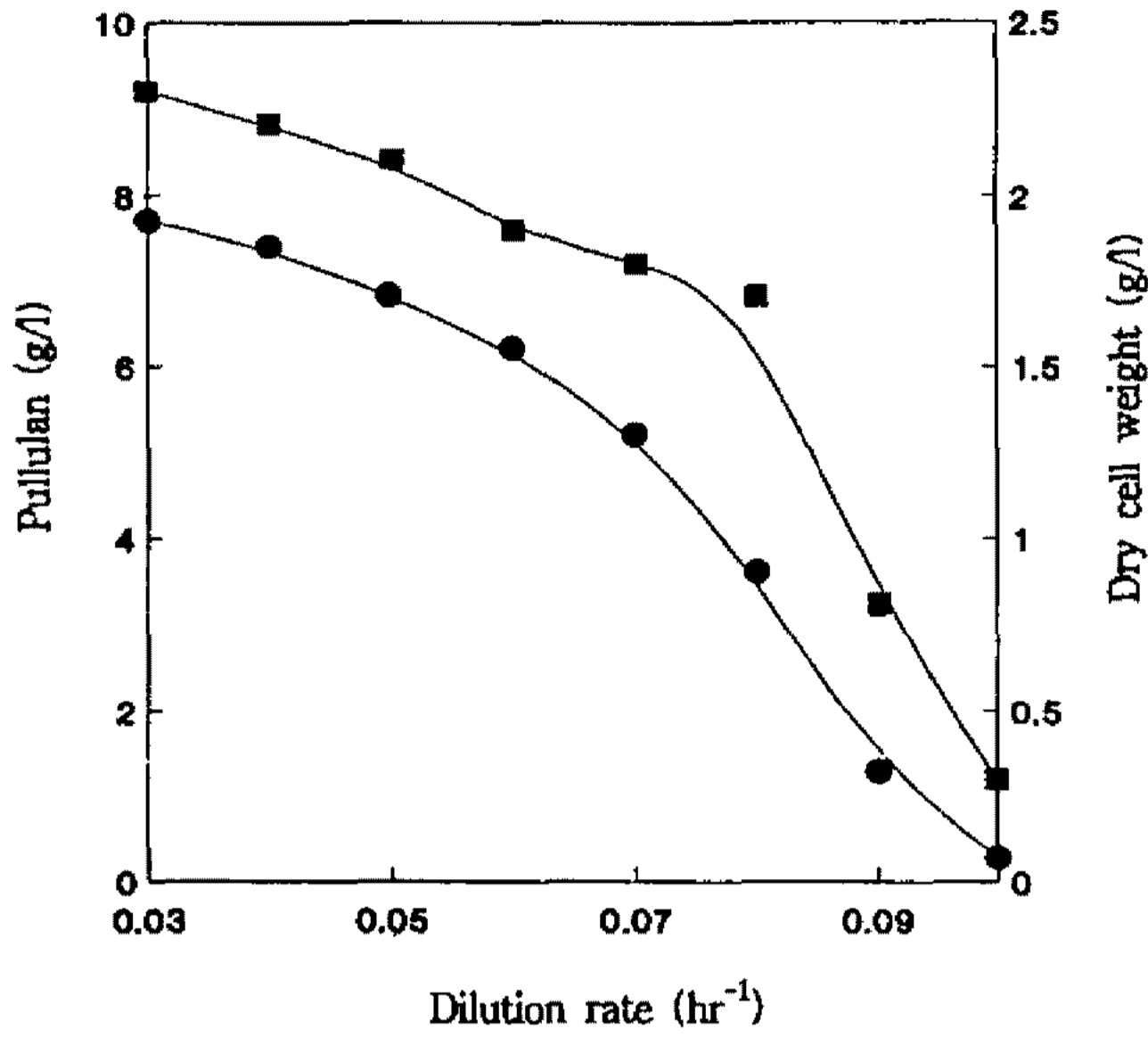


Fig. 4. Effect of dilution rate on the pullulan production of *A. pullulans* in a continuous culture. —■— Dry cell weight, —●— Pullulan

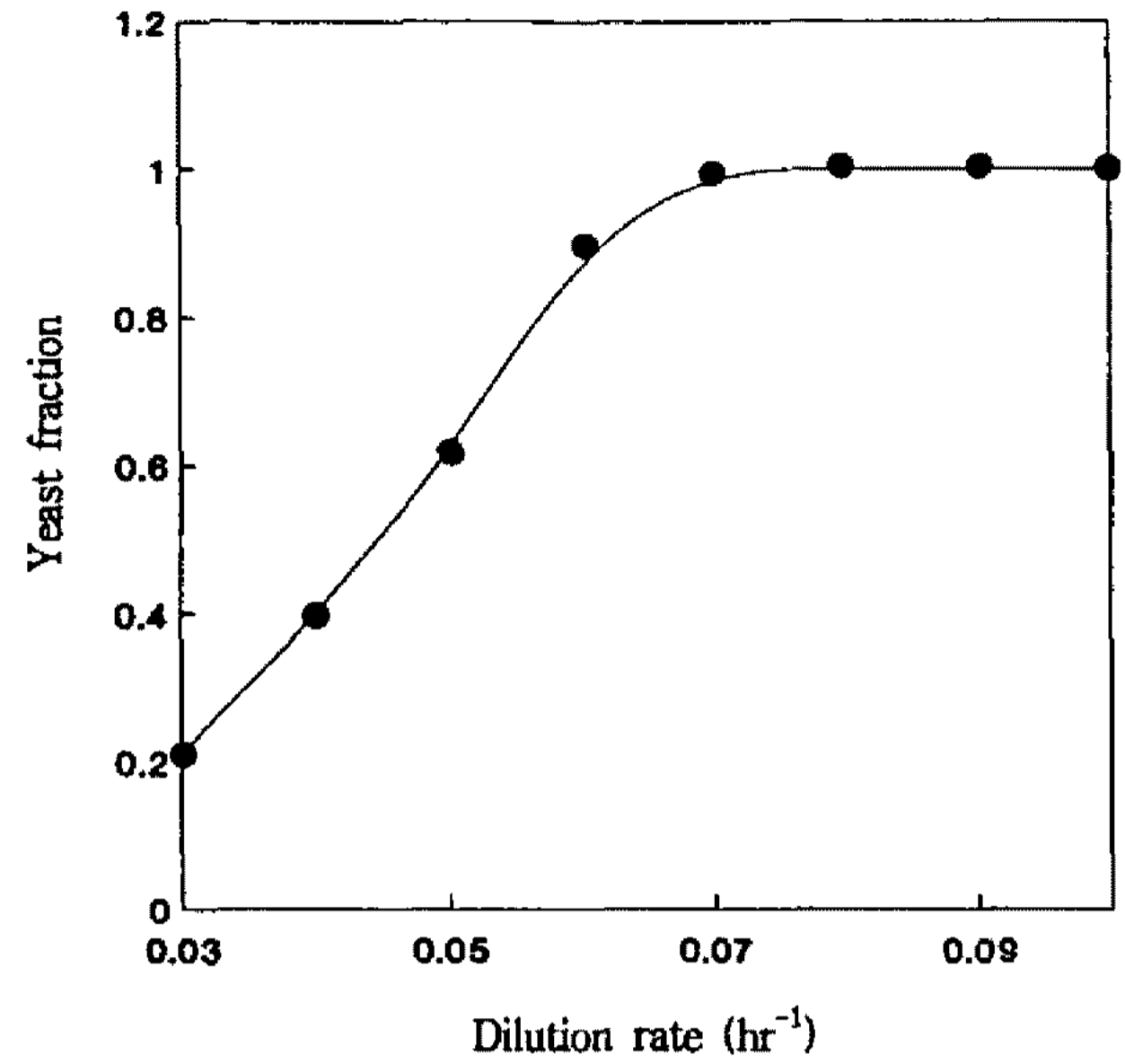


Fig. 6. Effect of dilution rate on the morphology of *A. pullulans*.

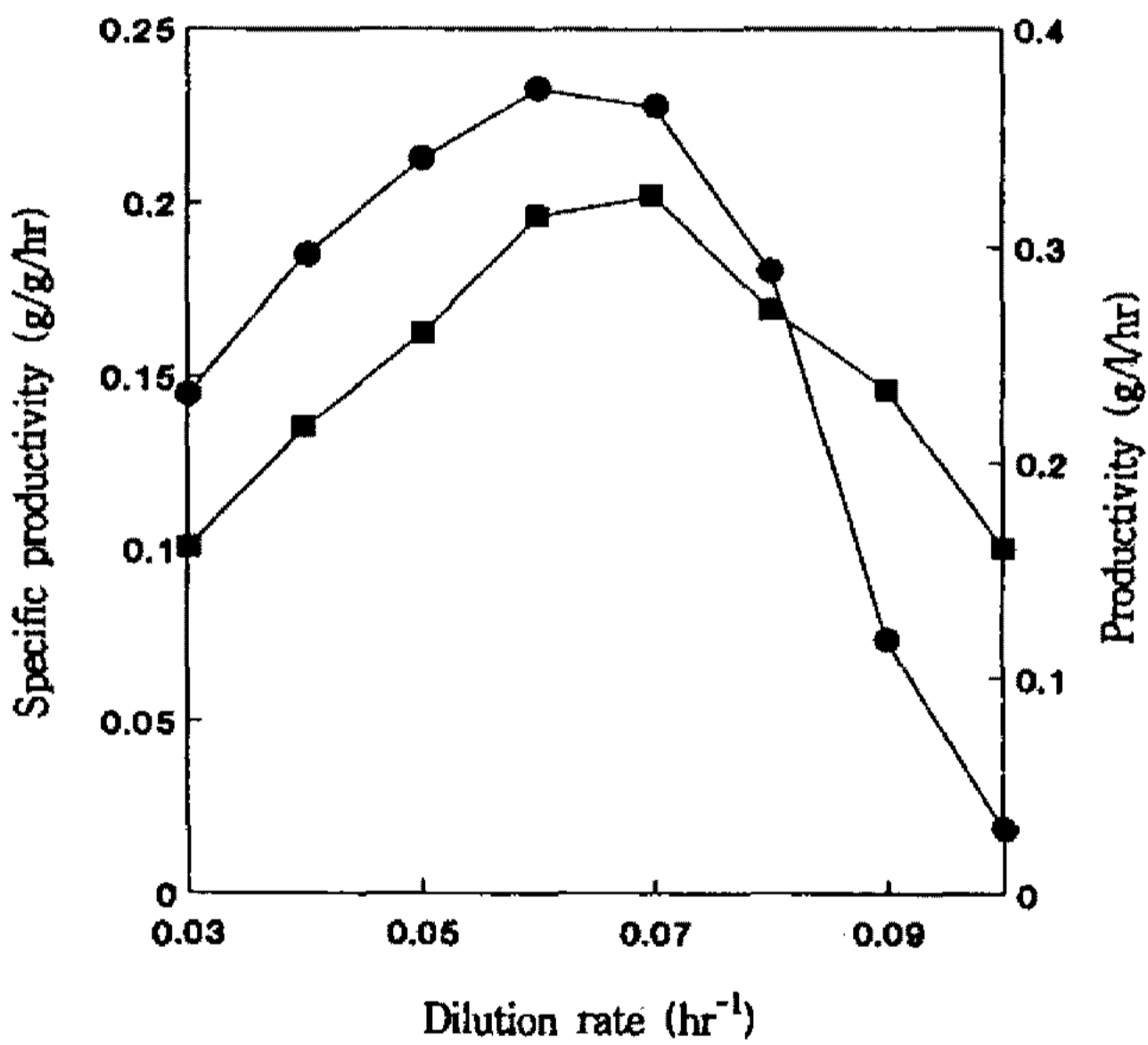


Fig. 5. Effect of dilution rate on the pullulan productivity and specific pullulan productivity of *A. pullulans*. —■— Specific productivity, —●— Productivity

생산이 균체 성장과 밀접한 관계를 나타낸다는 Auer와 Seviour의 결과(6)와 일치하였다. 연속배양에 의한 배양액 중 pullulan 생산량은 회분식 배양액의 pullulan 생산량보다 훨씬 낮아, 약 8 g/l 이하의 값을 보였다. 한편, 최대 pullulan productivity는 growth rate가 0.06 hr⁻¹일 때 0.372 g⁻¹hr⁻¹였으며, specific productivity는 growth rate가 0.07 hr⁻¹일 때 0.202 gg⁻¹hr⁻¹로 최대값을 나타내어(Fig. 5), 본 실험에 사용된 균주는 growth rate가 0.06~0.07 hr⁻¹일 때 pullulan 생산을 가장 효율적으로 하고 있음을 알 수

있었다.

균체 형태와 pullulan 생산

회분식 배양에서 *A. pullulans*의 배양액은, 배양시간이 경과함에 따라 점차로 어두워진다. 이와같은 현상은, *A. pullulans*의 melanin 색소 생성에 기인되는 것인데, 색소가 없는 yeast 형태인 blastospore가 큰 swollen 세포인 chlamyospore 혹은 mycelium 세포로 변할 때 melanin 색소가 출현한다고 한다(18).

*A. pullulans*의 연속배양시, growth rate가 커질수록 배양액 중 yeast 형태 비율이 점점 높아졌으며(Fig. 6), 배양액의 색도가 점점 밝아졌다. 배양액의 색도는 Hunter 색체계로 나타낼 수 있는데, Fig. 7은 연속배양에서 얻은 yeast 형태 세포 비율이 서로 다른 배양액을 색도 분석한 것이다. Yeast 형태 비율이 커질수록, L*(brightness) 값은 비례적으로 증가하였으며, a*(blue-red), b*(green-yellow) 값은 감소하였다. 한편, ΔE* 값은 yeast 형태 비율에 반비례 직선관계를 나타내어(상관계수, 0.989), 배양액의 색도가 균체 형태 비율에 밀접한 관계임을 알 수 있었다.

일반적으로 배지내 pH는 *A. pullulans*의 성장형태에 영향을 미친다고 한다. Heald와 Kristiansen(10)은 *A. pullulans*를 회분식 배양을 했을 때 배지내 pH가 높아질수록 균체중 yeast 형태 비율이 높아진다고 했다. 이것은 일정한 dilution rate에서 pH를 달리한 연속배양 실험에서 증명되었다(11). 그러나, 본 실험의 결과에서는 균체형태가 배지중의 pH에 영향을 받기 보다는 균체의 growth rate에 영향을 받는 것으로 나타났다(Fig. 6). 즉, 고정된 pH에서 growth rate가

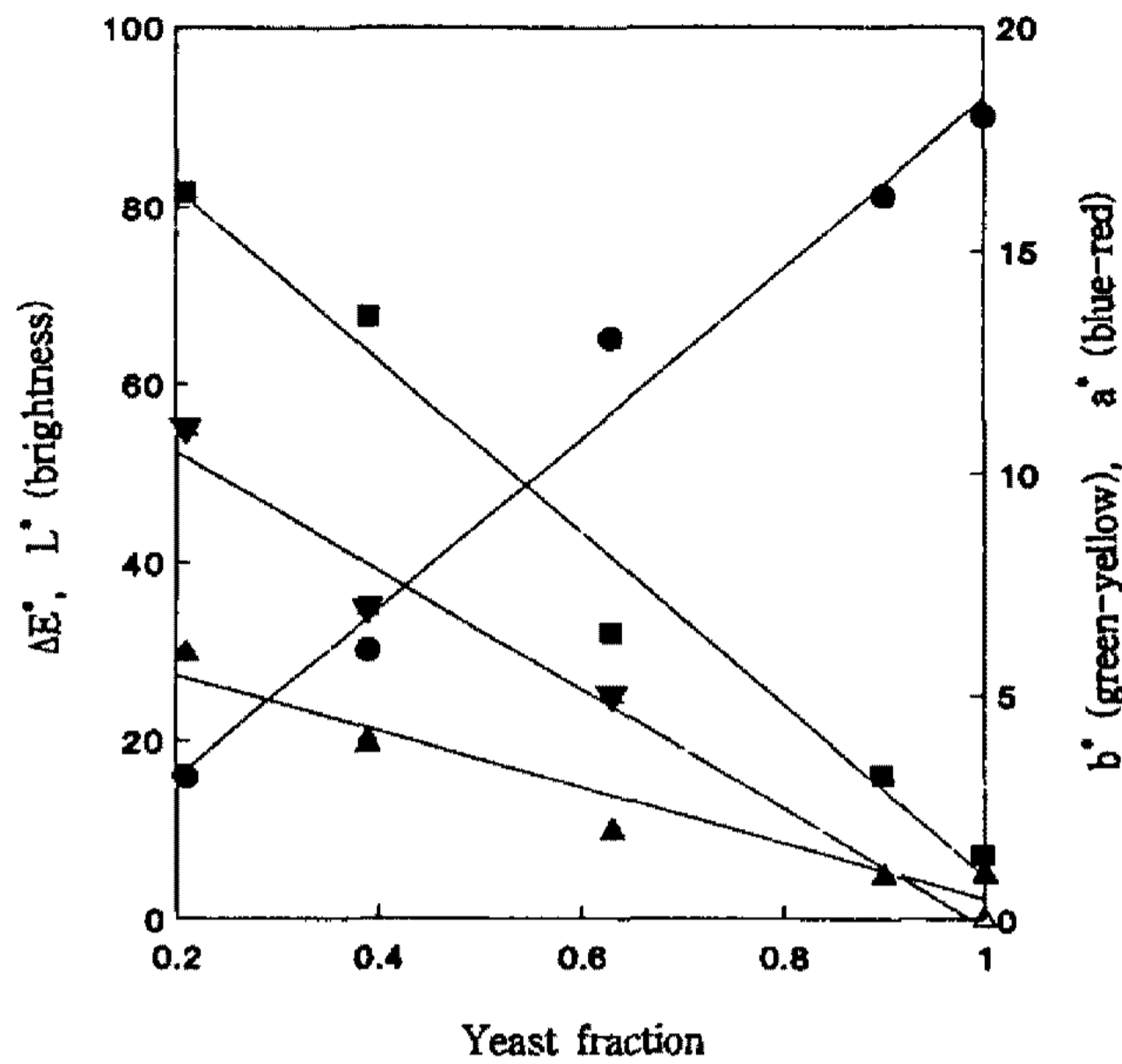


Fig. 7. Relationship between yeast fraction and color of *A. pullulans* culture broth.

—■— ΔE*, —●— L*, —▲— b*, —▼— a*

높아질수록 yeast 형태 비율이 높아지며, growth rate가 0.07 hr⁻¹ 이상에서는 100% yeast 형태를 나타내었다. 반면에, 본 실험에 고정적으로 사용된 pH 7.2는 비교적 높은 값인데도 불구하고, 낮은 growth rate에서는 mycelium 형태의 세포비율이 높게 나타남을 알 수 있다(Fig. 6). 이와 같은 결과는 질소원의 종류에 따라 낮은 pH(2.5)에서도 yeast 형태 세포가 많이 생긴다는 결과(6)와 더불어, pH가 *A. pullulans* 배양액의 균체형태에 절대적인 영향인자는 아님을 증명하였다.

한편, 일정한 growth rate 범위에서 growth rate는 균체의 형태 뿐 아니라 균체당 pullulan의 specific productivity에 영향을 미쳤다(Fig. 5). 즉, growth rate가 0.07 hr⁻¹까지 높아질 때 균체당 pullulan의 specific productivity는 증가하였다. 이 결과는 growth rate가 높아질 때 배양액내 균체중 yeast 형태의 비율이 높아지는 것과 비교해 볼 만하다. 그러나, yeast 형태가 100%인 growth rate 0.07 hr⁻¹ 이상에서는 growth rate가 커짐에 따라 pullulan의 specific productivity가 떨어지므로, 균체의 형태가 pullulan 생산에 직접적으로 영향을 주는지는 명확하지 않다. 그러나, growth rate가 *A. pullulans*의 균체 형태와 specific pullulan productivity에 직접적인 영향을 미치는 것이 분명한 것으로 사료된다.

요 약

회분식 및 연속식 배양에서 *Aureobasidium pul-*

lulans ATCC 9348에 의한 pullulan 생산과 균체형태의 변화를 조사하였다. 최적의 탄소원은 sucrose였으며, 높은 pullulan 생산에 높은 C/N 비율이 요구되었다. 회분식 배양에서 pullulan은 배지중의 질소원이 고갈되는 시점부터 생산되기 시작하여, 균체증식과 병행해서 증가하였다. 연속배양에서, pullulan 생산은 균체증식과 밀접한 관계를 나타내었으며, growth rate가 0.06~0.07 hr⁻¹일 때 가장 효율적으로 pullulan을 생산하였다. 최대 pullulan productivity는 growth rate가 0.06 hr⁻¹일 때 0.372 g⁻¹hr⁻¹였으며, specific productivity는 growth rate가 0.07 hr⁻¹일 때 0.202 gg⁻¹hr⁻¹로 최대값을 나타내었다. Growth rate가 커질수록 yeast 형태의 세포 비율이 높아졌으며, growth rate가 0.07 hr⁻¹ 이상일 때는 100%에 달했다. 또, 일정한 범위에서 growth rate는 균체의 형태 뿐 아니라 균체당 pullulan의 specific productivity에 영향을 미쳤다.

참고문헌

1. Yuen, S. 1974. Pullulan and its applications. *Proc. Biochem.* 9: 7-9, 22.
2. 尾崎善英. 1994. プルランの物性と用途. *ジャパンフードサイエンス* 33: 68-74.
3. 신용철, 구부금, 김태운, 김기석. 1993. 색소 생성능이 결여된 *Aureobasidium pullulans* GM 21 분리 균주로부터 순수한 풀루란의 생산. *산업미생물학회지* 21: 494-503.
4. Catley, B.J. 1971. Utilization of carbon sources by *Pullularia pullulans* for the elaboration of extracellular polysaccharides. *Appl. Microbiol.* 22: 641-649.
5. 임무현, 손홍수, 정낙현, 양한철. 1984. *Aureobasidium pullulans*에 의한 Pullulan 생산에 관한 연구. *산업미생물학회지* 12: 219-224.
6. Auer, D.P.F. and R.J. Seviour. 1990. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 637-644.
7. Seviour, R.J. and B. Kristiansen. 1983. Effect of ammonium ion concentration on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 178-181.
8. Lacroix, C., A. LeDuy, G. Noel, and L. Choplin. 1985. Effect of pH on the batch fermentation of pullulan from sucrose medium. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 202-207.
9. Dufresne, R., J. Thibault, A. LeDuy, and R. Lencki. 1990. The effect of pressure on the growth of *Aureobasidium pullulans* and the synthesis of pullulan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 526-532.
10. Heald, P.J. and B. Kristiansen. 1985. Synthesis

- of polysaccharide by yeast-like forms of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Bioeng.* **27**: 1516-1519.
11. McNeil, B., B. Kristiansen, and R.J. Seviour. 1989. Polysaccharide production and morphology of *Aureobasidium pullulans* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 1210-1212.
 12. Catley, B.J. 1980. The extracellular polysaccharide, pullulan, produced by *Aureobasidium pullulans*: a relationship between elaboration rate and morphology. *J. Gen. Microbiol.* **120**: 265-268.
 13. Weinert, I. 1978. Determination of total carbohydrate in beer. *J. Inst. Brew.* **84**: 220-223.
 14. Margaritis, A. and G.W. Pace. 1985. Microbial polysaccharides, Pp. 1005-1044. In M.Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, Pergamon Press, New York.
 15. Shin, Y.C., Y.H. Kim, H.S. Lee, Y.N. Kim, and S.M. Byun. 1987. Production of pullulan by a fed-batch fermentation. *Biotechnol. Lett.* **9**: 621-624.
 16. Mulchandani, A., J.H.T. Luong, and A. Leduy. 1988. Batch kinetics of microbial polysaccharides biosynthesis. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 639-646.
 17. Bulmer, M.A., B.J. Catley, and P.J. Kelley. 1987. The effect of ammonium ions and pH on the elaboration of the fungal extracellular polysaccharide, pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 362-365.
 18. 김재형, 이기영, 강성홍. 1989. *Aureobasidium pullulans*에 의한 exopolysaccharide 생산-멜라닌 색소의 출현에 관한 연구. *한국생물공학회지* **4**: 134-142.

(Received August 19, 1994)