

## pH 조절에 의한 *A. pullulans*의 pullulan 생산성에 대한 영향

김정화, Ju-Yi Hui\*, 김미령, 이지현, 김성구

부경대학교 생물공학과, Wuxi University of Light Industry\*

TEL. (051) 620-6188, FAX. (051) 620-6180

### Abstract

The pullulan production and morphological change of *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023 were investigated in shake-flasks and in 2.5L batch fermentor. In shake-flasks, maximum pullulan production was obtained with 11.98g/ℓ when initial pH was 6.5. The batch fermentation was performed in the medium with pH control ranged pH 2.5-7.5. The maximum pullulan production of 13.31g/ℓ was obtained with pH 4.5. However, the cell growth was the highest at pH 6.5.

### 서론

Pullulan은 maltrose단위를 기본으로 하여  $\alpha(1\rightarrow6)$ 결합으로 구성된 일종의  $\alpha$ -glucan으로 'black yeast'로 알려진 *A. pullulans*에 의해 세포외로 생산되는 다당류이다.<sup>1)</sup> Pullulan은 다른 다당류에서 볼수 없는 우수한 물성과 안전성을 가지고 있어 식품, 필름, 포장, 전자, 의료, 사진, 인쇄등의 재료로 이용되고, 산소 불투과성필름, 플라스틱 결합제, 코오팅제등의 효과로 그 적용범위가 넓으며, 앞으로도 그 용도가 계속 개발 및 개선됨에 따라 여러 가지 무공해 재료로써 광범위한 분야에서 그 이용 가능성이 모색되고 있다.<sup>2)</sup> *A. pullulans*에 의한 pullulan 생산에 관한 배양학적 연구는 탄소원의 종류 및 농도<sup>3)</sup>, 질소원의 종류 및 농도<sup>4)</sup>, 탄소원과 질소원의 비율농도<sup>5)</sup>, 배지의 초기 pH와 pH 조절<sup>6)</sup>, 산소공급의 영향<sup>7)</sup>등이 있다. 특히, 여러 배양 조건에 따른 균체의 형태 변화와 이에 따른 pullulan 생산성의 영향에 대한 많은 검토가 이루어졌다. 이러한 다양한 요인들은 균체량에 영향을 미칠것이며, pullulan 생산에도 영향을 줄 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 배지의 pH를 조절하고 이에따른 균체의 형태 변화와 pullulan의 생성 수율과 분자량에 미치는 영향을 관찰하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주

사용된 균주는 *Aureobasidium pullulans* ATCC 42023로 agar 배지에서 4℃로 유지하였고, 매달마다 신선한 배지로 계대배양 하였다.

#### 배지 및 배양조건

사용된 기초 배지조성(% w/v)은 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5%, NaCl 0.1%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.02%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.06%, Yeast extract 0.25%, Glucose 5%로 하였다. 삼각플라스크를 이용한 배양에서는 HCl과 NaOH를 이용하여 pH를 2.5-8.5로 조절한 배지 150ml을 500ml 삼각플라스크

에서 전 배양액 5%(v/v)를 접종하여 28℃, 200rpm으로 6일간 배양하여 초기 pH 조절에 의한 영향을 알아보았다. 발효조 실험은 발효동안 pH를 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5로 조절하여 pH-stat에 의한 *A. pullulans*의 pullulan 생산성에 대하여 알아보았다. 사용된 발효조는 2.5L Jar Fermentor(NBS, Bioflow-III)이고, 발효배지 2L를 넣고 28℃, 500rpm, 0.5vvm의 조건으로 6일간 운전하였다.

#### 건조 균체량과 플루란 정량

균체를 얻기 위해서 배양액 5ml에 동량의 증류수를 첨가하여 혼합한 뒤, 6,000rpm, 20min, 4℃에서 원심분리 하였다. 상등액은 따라내고 침전된 세포를 분리하여 105℃에서 overnight 한 후 건량을 측정하였다. 균체량은 배양액 1ℓ 당 건조무게로 표시하였다. pullulan 생성량은 균체가 제거된 배양액에 2배 부피의 ethanol을 첨가하여 잘 혼합한 후, 24시간동안 방치하여 pullulan를 침전시키고 105℃에서 overnight 한 후 건량을 측정하였다. pullulan 생성량은 배양액 1ℓ 당 건조무게로 표시하였다. pullulan 분리시 얻어진 상등액은 당분석에 사용하였다.

#### 당 측정

배양액에 잔존하는 당은, 균체를 제거한 상등액에서 pullulan을 제거한 용액을 50℃ 진공하에서 ethanol을 증발 시킨후 배양액과 동량의 증류수를 넣어 조절한 후 잔당량을 측정하였다. 환원당은 Miller의 방법에 따라 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)를 사용하여 정량하였다.<sup>8)</sup> 이때 표준곡선은 포도당을 이용하여 작성하였다. 또한 배양액중의 glucose 농도는 영동제약의 glucose kit (BC103-E)와 Sigma glucose kit (No. 635-100)를 사용하여 측정하였고, total residual sugars는 phenol-sulfuric acid 방법으로 측정하였다.<sup>9)</sup>

#### 결과 및 고찰

##### 1) 배양초기 pH의 영향

각 배양액의 초기 pH를 달리하여 *A. pullulans*의 균체 성장 및 pullulan 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 1). 6일간 배양한 결과, 초기 pH 2.5와 pH 3.5에서는 균체 성장이 시간과 비례하여 지속적으로 증가하여, 최대균체량, 6.87g/ℓ를 나타내었다. 반면, pullulan 생산은 pH 2.5에서 최저 생산을 보였으며, 초기 pH 6.5일 때 11.98g/ℓ로 최대값을 나타내었고, 이때의 기질소모에 대한 pullulan 전환수율( $Y_{p/s}$ )은 24.0g/ℓ였다. 이러한 현상은 균체 성장이 극한 환경에서는 pullulan 생산보다는 자기 생존을 위하여 기질을 소비하였기 때문이라고 사료된다. McNeil<sup>10)</sup>에 따르면 *A. pullulans*는 성장중에 여러번의 형태변화를 가지며, 효모형과 균사형으로 나타나는데, 이 중에서도 pullulan 생성률 면에서는 효모형태인 경우가 가장 좋았다고 보고하였다. 반면에 나<sup>5)</sup>등에 따르면 초기 pH 8.5에서는 미생물의 형태가 효모형이 지배적이고, 초기 pH 4.5에서는 균사형태가 지배적으로 나타났으며, pH 4.5에서 최대의 pullulan 생산량을 보여 본 실험의 결과와 일치하는 것을 알 수 있었다.

## 2) pH조절에 의한 영향

2.5L Jar Fermentor (NBS, Bioflow-III)를 이용한 *A. pullulans*의 배양은 각각 pH를 달리하여 일정하게 조절하면서 6일간 운전하였다(Fig. 2). 균체는 배양 하루까지는 거의 비슷하게 성장하였으나, 그 이후부터는 pH 6.5에서 급속하게 성장하는 것을 볼 수 있었으며, 균체량은 16.56g/l로 최대값을 나타내었고, pH 4.5에서는 최저 성장을 보였다. 반면 pullulan의 생성은 pH 4.5에서 최대값 13.31g/l를 나타내었으며, 전환수율( $Y_{p/s}$ )은 26.62g/l였고, pH 6.5, 7.5에서 최저값을 나타내었다. 이러한 균체량과 pullulan 생성의 상반된 결과는 *A. pullulans*가 균체성장과 pullulan을 생산할 경우, 생존하기 적절한 환경에서는 균이 자체내에서 pullulan을 힘들여 생산하지 않아도 균체성장이 가능하므로 pH 6.5, 7.5에서 pullulan의 생산량이 적은 것으로 사료된다. Shin<sup>6)</sup>등에 따르면, *A. pullulans*는 pH 2.5에서는 균사형태, pH 7.5에서는 효모형태의 성장을 주로하며, 이 두 조건하에서는 모두 낮은 pullulan 생산성을 보였으나 pH 4.5 조건에서는 균사형태와 효모형태가 혼합된 성장을 보였다. 그러나 이때 최고의 pullulan을 생산 하였다고 보고하였는데, 본 실험과 일치하였다.

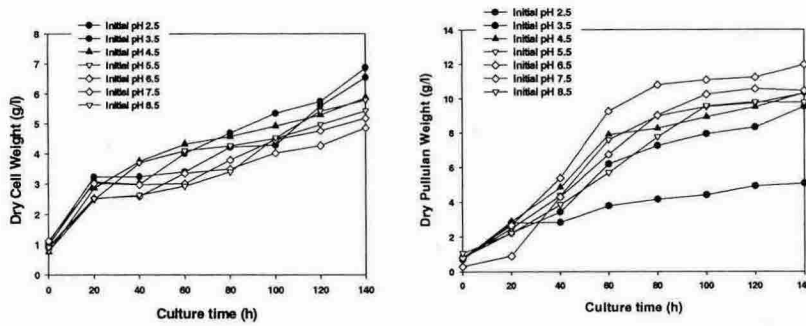


Fig. 1. Effect of initial pH of culture broth on the cell growth and pullulan production by *A. pullulans*.

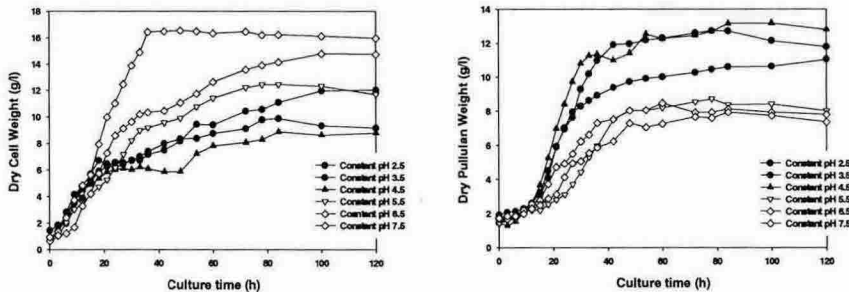


Fig. 2. Effect of pH control of culture broth on the cell growth and pullulan production by *A. pullulans*.

## 요약

*A. pullulans* ATCC 42023의 pullulan생산과 형태학적인 변화를 알아보기 위해서 삼각플라스크와 회분식 발효를 이용하여 실험하였다. 삼각플라스크 내에서 초기 pH 6.5는 11.98g/l의 pullulan을 생산하였고, 회분식 발효에서는 pH 2.5-7.5의 범위에서 pH를 조절하면서 실험한 결과, pH 4.5에서 pullulan생산 13.31g/l의 최대값을 나타내었다. 그러나 균체성장은 pH 6.5에서 가장 높았다.

## 참고문헌

- 1) Bouveng HO, Kiessling H, Lindlberg B, McKay J. Polysaccharides elaborated by *Pullularia pullulans* (1963). *Acta Chem. Scand.* 17: 797-800.
- 2) Badr-Eldin SM, El-Tayeb OM, El-Masry EG, Mohamad OA, El-Rahman OAA. Polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans*: factors affecting polysaccharide formation (1994). *World J. microbiol. biotechnol.* 10: 423-426.
- 3) Shin YC, Han JK, Lee HS, Byun SM. Inhibition effect of sugar concentrations on the cell growth and the pullulan production of *Aureobasidium pullulans* (1987). *Kor. J. Microbiol.* 25: 360-366.
- 4) Desmond PF, Auer and Seviour RJ. Influence of varying nitrogen sources on polysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture (1990). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32: 637-644.
- 5) 나건, 이기영, 박돈희. *Aureobasidium pullulans*에 의한 플루란 생산에서 pH와 질소원의 영향(1996). *K. J. Biotechnol. Bioeng.* 11(4): 497-503.
- 6) Shin YC, Byun SM. Effect of pH on the Elaboration of Pullulan and the Morphology of *Aureobasidium pullulans* (1991). *K. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19(2): 193-199.
- 7) Ono K, Yasuda N, Ueda S. Effect of pH on pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* S-1 (1977). *Agric. Biol. Chem.* 41: 2113-2118.
- 8) Miller, GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar (1959). *Anal. Chem.* 31: 426-428.
- 9) Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colometric method for determination of sugars and related substances (1956). *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- 10) McNeil B, Kristiansen B. Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks (1990). *Enzyme Microb. Technol.* 12: 521-526.