

색소 생성능이 결여된 *Aureobasidium pullulans* GM21 분리균주로부터 순수한 풀루란의 생산

신용철* · 구부금 · 김태운¹ · 김기석
경상대학교 미생물학과, ¹지산보건전문대학 임상병리학과

Production of Pure Pullulan from the Pigment-Deficient Isolate of *Aureobasidium pullulans* GM21

Shin, Yong-Chul*, Bu-Geum Gu, Tae-Un Kim¹ and Ki-Seok Kim

Department of Microbiology, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea
¹Department of Clinical pathology, Jisan Junior College, Pusan 609-323, Korea

Abstract— A fungal strain was isolated as a pullulan-producer from plant leaves and identified as *Aureobasidium pullulan* GM21. With *A. pullulans* GM21, culture conditions were optimized for the pullulan production and the changes of the molecular weight of pullulan produced were investigated according to the culture conditions. We obtained maximum conversion yield of pullulan about 58~60%(40.8~42.0 g/l) from 7% sucrose at 25°C, initial pH 7.5 by the batch cultivations either in Erlenmeyer flask or in jar fermentor. The molecular weights of pullulan produced at initial pH 6.0 and 7.5 were 820,000 and 260,000, respectively. Compared with a conventional pullulan producer, *A. pullulans* IFO4464, the isolate was unique in that it produces nearly the pure pullulan into the culture medium without the contaminations of melanin-like black pigment and acidic or other neutral polysaccharides and that it produces pullulan as high as 60% conversion yield.

풀루란은 불완전 곰팡이의 일종인 *Aureobasidium pullulans*(*Pullularia pullulans*)가 세포밖으로 분비하는 다당류이다. 풀루란은 maltotriose를 기본단위로 하여 이들이 α -(1,6)결합으로 연결된 계단모양의 선형구조를 가지고 있기 때문에(1-4), 단순히 포도당의 α -(1,4)결합으로 이루어진 아밀로오즈와는 달리 용해도와 유연성이 뛰어나 필름이나 섬유형성능이 우수한 것으로 평가되고 있다. 이러한 풀루란은 일본의 林原생화학 연구실에서 공업적으로 생산되어 필름, 산소 불투과성코팅, 접착제, 섬유(5, 6) 또는 cyanoethylpullulan 형태로 부전도체(7) 등의 재료로서 사용되고 있다. 앞으로 풀루란은 난분해성 합성고분자 필름을 부분적으로 대체할 수 있는 생분해성 필름소재로서의 응용가능성이 크게 기대되고 있다.

본 연구자들은 풀루란의 공업적 생산을 목적으로 생산균주로 알려진 *A. pullulans* IFO4464와 그 변이주를 이용하여 풀루란 발효조건을 검토한 바 있다(8-11). *A. pullulans* IFO4464인 경우 5% 설탕으로부터 약 50%의 비교적 높은 세포외 다당류 수율을 보였으나 풀루란 생산에 있어서 몇가지 문제점이 있었다. 첫번째 문제점은 풀루란 생산과 더불어 풀루란 이외의 산성다당류 및 기타 중성다당류들이 생산되어 이들이 혼합된 형태로 세포외 다당류를 구성한다는 것이다(12-14). 따라서 순수한 풀루란의 분리, 정제에 어려움이 있어 고순도 풀루란의 제조가 힘들게 된다. 두번째는 대부분의 풀루란 생산균주가 흑색색소를 분비하여 세포외 다당류를 착색시킨다는 것이다(15-18). *A. pullulans*가 분비하는 흑색색소는 멜라닌으로서 풀루란과 결합하게 되면 풀루란의 순도를 저하시킬 뿐만 아니라 풀루란의 용해도를 떨어뜨리는 등의 문제를 야기시킨다. 따라서 풀루란에 결합된 흑색색소를 제거하기 위해서 심한 탈색공정이 필요하게 된다.

Key words: *Aureobasidium pullulans* GM21, pure pullulan production, pigmentless, change of molecular weight

*Corresponding author

세번째는 값싼 탄소원 개발이 필요하고 아직도 탄소원으로부터 생산할 수 있는 풀루란 수율이 낮다는 점이다. *A. pullulans* IFO4464의 경우 탄소원으로 포도당, 과당, 맥아당, 설탕 등을 사용할 때 세포외 다당류 수율이 60%를 넘지 않는 것으로 보고되고 있다(19, 20). 일본의 林原생화학 연구실에서는 DE (dextrose equivalent) 50의 전분 부분가수분해물 10%를 이용하여 76%(76 g/l)의 풀루란 수율을 얻을 수 있었다고 보고하였다(5). 그러나 본 연구자들의 실험 결과 *A. pullulans* IFO4464 균주로서는 전분 가수분해물로부터 약 34%의 풀루란 수율을 얻을 수 있었으며(21), 이와 비슷한 연구결과는 다른 연구자들에 의해서도 확인되었다(22). 따라서 현재까지 최고 약 60%의 세포외 다당류수율을 얻을 수 있다고 할 때 기타의 다당류를 제외한 순수한 풀루란의 생산수율은 이것보다 훨씬 낮을 것으로 예측된다.

풀루란 생산에 있어서 이와 같은 문제점을 해결하기 위해서 흑색색소 생성능이 결여되고 풀루란 생산성이 우수한 균주를 자연으로부터 선별하고자 하였다. *A. pullulans*의 색깔변이주에 관하여서 Wickerham과 Kurtzman(23)이 처음으로 황색, 적색, 자주색 변이주를 분리하여 색소생성에 관하여 연구하였으나, 풀루란 생산성과의 관계는 보고하지 않았다. 그 뒤에 Leathers 등(22)이 옅은 분홍색, 분홍색, 자주색, 적색 등의 색깔변이주를 분리하여 풀루란 생산성을 조사하였는데, 그 중에서 NRRL12,974균주가 옥수수 전분으로부터 10% 전환수율로 풀루란을 생성하였을 뿐 나머지 색깔변이주들은 풀루란 생산성이 낮았다. NRRL12,974 균주는 세포외 다당류 중에서 71%의 풀루란 함량을 보였으며, 배양액의 색깔은 황갈색이었다(24). 최근에 Pollock 등(25)은 색소 생성능이 낮고 분자량이 큰 풀루란을 생산하는 균주를 분리하였으나, 풀루란 수율은 25 g/l 이하로 낮았다. 본 논문에서는 세포외 색소 생성능이 결여된 풀루란 생산균주 GM21을 분리하여 배양조건에 따른 풀루란의 생산성, 풀루란의 순수도, 풀루란 분자량 변화 등을 조사하였다.

재료 및 방법

풀루란 생산균주의 분리 및 동정

나뭇잎으로부터 풀루란을 생산하는 *A. pullulans* 균주를 선택적으로 분리하기 위해서 Pollock 등(25)의 방법을 사용하였다. 1차적으로 분리된 *A. pullulans* 균주를 5% 설탕이 포함된 AYS 배지(26) 15 ml에 접

종하여 25°C에서 4일간 배양한 후 생산된 세포외 다당류를 정량하여 최종적으로 풀루란 생산성, 고체배지나 액체배지에서의 색소생성유무 등을 고려하여 우수균주를 선별하였다. 본 연구에서는 분리균주 중에서 색소생성능이 거의 없고 풀루란 생산성이 우수한 GM21 균주를 사용하였다. GM21균주를 동정하기 위해서 형태적 특징을 현미경으로 관찰하였으며, 탄소원 자화성 실험은 API 20C system (Analytab Products, Plainview, USA)을 사용하였다. 비교실험으로서 *A. pullulans* IFO4464 균주도 동일한 조건에서 실험하였으며, 실험결과는 Ainsworth 등(27)의 'The Fungi, Vol. IV A'에 따라 동정하였다.

풀루란 생산 실험

풀루란 생산성 실험은 분리균주인 *A. pullulans* GM21 균주와 비교실험목적으로 기존에 풀루란 생산균주로 알려진 *A. pullulans* IFO4464를 사용하였다. 기본배지로서 본 연구자들이 풀루란 생산배지로 최적화시킨 바 있는 AYS 배지를 사용하였는데, 그 조성은 5% sucrose, 0.5% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.06% $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% yeast extract였으며, 배지의 초기 pH를 7.5로 조정하여 사용하였다. 종배양은 500 ml 삼각플라스크에 100 ml의 배지를 넣고 균주를 한 백금이 접종한 다음 25°C에서 2일간 150 rpm으로 진탕배양하여 사용하였다. 본 배양은 종배양을 2%(v/v) 접종하여 위와 같은 동일한 조건하에서 배양하였다. 발효조 배양실험은 5리터 발효기(Marubishi, Model MD300-5L, B.E. Mitsubishi Co., Japan)에 3리터 AYS 배지를 넣고 배양하였다. 이때 설탕의 농도는 7%(w/v)였으며, 종배양액을 5% 접종하였고, 배양온도, 교반속도, 통기속도는 각각 25°C, 200 rpm, 0.7 vvm이었다.

균체량 및 세포외 다당류의 정량

균체를 모으기 위해 배양액 100 ml를 8,000 rpm에서 30분 원심분리하였으며, 점도가 높아 균체분리가 어려운 경우 배양액을 증류수로 2배 희석한 다음 원심분리하였다. 침전된 균체를 증류수 100 ml에 현탁하여 세척한 다음 알루미늄접시에 넣고 105°C에서 15시간 건조시켜 건조무게를 측정하였다. 균체량은 배양액 1리터당 건조무게로 표시하였다. 균체가 제거된 배양액에 1배 부피의 아이소프로필알콜을 첨가한 후 1시간 방치하여 다당류를 침전시킨 다음 침전된 다당류를 원심분리방법이나 핀셋으로 직접 회수하였다.

다당류를 아세톤으로 세척한 다음 알루미늄접시에 넣고 105°C 에서 15시간 건조시켜 건조무게를 측정하였다. 세포의 다당류량은 배양액 1리터당 건조무게로 표시하였다.

세포외 다당류의 구조분석

분리균주 GM21이 생산하는 세포외 다당류의 주된 구조를 밝히기 위하여 세포외 다당류를 pullulanase로 처리하여 반응생성물을 thin layer chromatography (TLC)로 분석하였다. 1 mg/ml 농도의 세포외 다당류 1 ml에 0.1 M Na-acetate 완충용액(pH 5.0) 250 μ l, pullulanase 5 μ l(Sigma Chemical Co., 0.24U)를 섞은 다음 50°C 에서 2시간 반응시켰다. 반응생성물을 Kiesel gel 60F254 plate(Merck, Germany)에 spotting한 후 butanol/acetic acid/water(3/1/1, v/v/v)의 용매를 사용하여 전개시켰다. 전개가 끝난 후 에탄올에 녹아 있는 50% 황산용액을 plate에 분사시켜 120°C 에서 1시간 태운 후 반응물을 발색하였다.

세포외 다당류의 성분분석

일반적으로 풀루란 생산균주는 풀루란과 함께 산성다당류 및 기타 중성다당류를 생산하므로 분리균주 GM21 및 IFO4464 균주가 생산하는 세포외 다당류의 조성을 조사하였다. 산성다당류를 측정하기 위해서 건조된 세포외 다당류를 증류수로 20 mg/ml 농도로 녹인 다음 이 용액 2.5 ml에 1% cetyltrimethyl ammonium bromide 용액 2.5 ml를 첨가하여 상온에서 1시간 방치하였다. 침전물을 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 회수한 후 건조무게를 측정하여 산성다당류 함량으로 결정하였다. 순수한 풀루란 함량을 측정하기 위해서 세포외 다당류를 pullulanase로 완전가수분해한 다음, 생성되는 maltotriose를 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(28)으로 정량하였다. 즉, 세포외 다당류용액(20 mg/ml) 4 ml에 0.1 M Na-acetate 완충용액(pH 5.0) 1.0 ml, pullulanase 20 μ l(0.97 U)를 섞은 다음, 50°C 에서 5시간 반응하였다. 반응액 1 ml를 이용하여 DNS 방법으로 maltotriose량을 측정하였으며, 이것으로부터 세포외 다당류 중의 순수한 풀루란 함량(pullulanase-sensitive polysaccharide)을 결정하였다. 나머지 4 ml 반응액에 아이소프로필알콜을 처리하여 pullulanase로 분해되지 않는 다당류를 침전시킨 다음 건조무게를 측정하여 비풀루란 함량(pullulanase-resistant polysaccharide)으로 결정하였다.

풀루란의 분자량 측정

분리균주 GM21이 생산하는 풀루란의 무게평균 분자량측정은 Buliga 등(29)이 제안한 고유점도 $[\eta]$ 와 풀루란 분자량(M_w)과의 관계식 $[\eta] = (0.000258) M_w^{0.646}$ 을 이용하였다. 풀루란 용액을 증류수에 녹여 1%, 0.7%, 0.5%, 0.3%, 0.1% 용액을 만든 다음 capillary viscometer(Cannon-Fenske type, capillary No. 75)를 이용하여 25°C 에서 5회 반복하여 efflux time(sec)을 측정한 후 평균 efflux time을 계산하였다. 여러가지 풀루란 농도에서의 점도(η_{sp} , specific viscosity)는 다음 식을 이용하여 구하였다.

$$\eta_{sp} = \frac{\eta' - \eta}{\eta} \cong \frac{t' - t}{t}$$

이때 η = 증류수의 viscosity, η' = 풀루란 용액의 viscosity, t = 증류수의 efflux time, t' = 풀루란 용액의 efflux time을 나타낸다. 점도와 풀루란 농도와의 직선그래프에서 y축의 절편값으로부터 고유점도를 구하였다.

결과 및 고찰

풀루란 생산균주의 분리 및 GM21 균주의 동정

자연계에서 채취한 여러가지 시료로부터 Pollock 등(25)의 방법에 따라 *A. pullulans*를 선택적으로 분리하여 색소생성, 세포외 다당류생산성 등을 검토하여 최종적으로 GM21 균주를 선발하였다. 분리균주 GM21은 AYS 한천배지에서도 AYS 액체배지에서 2주 이상 배양하여도 흑색색소를 전혀 생산하지 않았으며, 또한 AYS 액체배지에서는 백색의 다당류를 과량 생산하였다(Fig. 1). 그러나 기존에 풀루란 생산균주로서 알려진 *A. pullulans* IFO4464 균주는 한천배지상에서 흑색의 색소를 다량 생산하였고, 또한 액체배지에서도 흑색색소를 분비하여 아이소프로필알콜로 회수된 풀루란을 착색시켰다. 액체배양시 5% 설탕을 탄소원으로 사용한 AYS 배지로부터 GM21 균주는 약 58%(29 g/l)의 다당류 전환수율을 보이는 반면에 *A. pullulans* IFO4464 균주는 44%(22 g/l)를 보여 GM21 균주가 다당류생산성이 높은 것으로 나타났다. GM21 균주가 생산하는 다당류가 풀루란인지를 확인하기 위해서 배양액으로부터 회수한 다당류에 pullulanase을 처리하여 생성물을 TLC로 분석하여 보았다. 그 결과 maltotriose만 검출되어 분리균주 GM21이 생산하는 세포외 다당류는 풀루란인 것으로 확인되었다(Fig. 2).

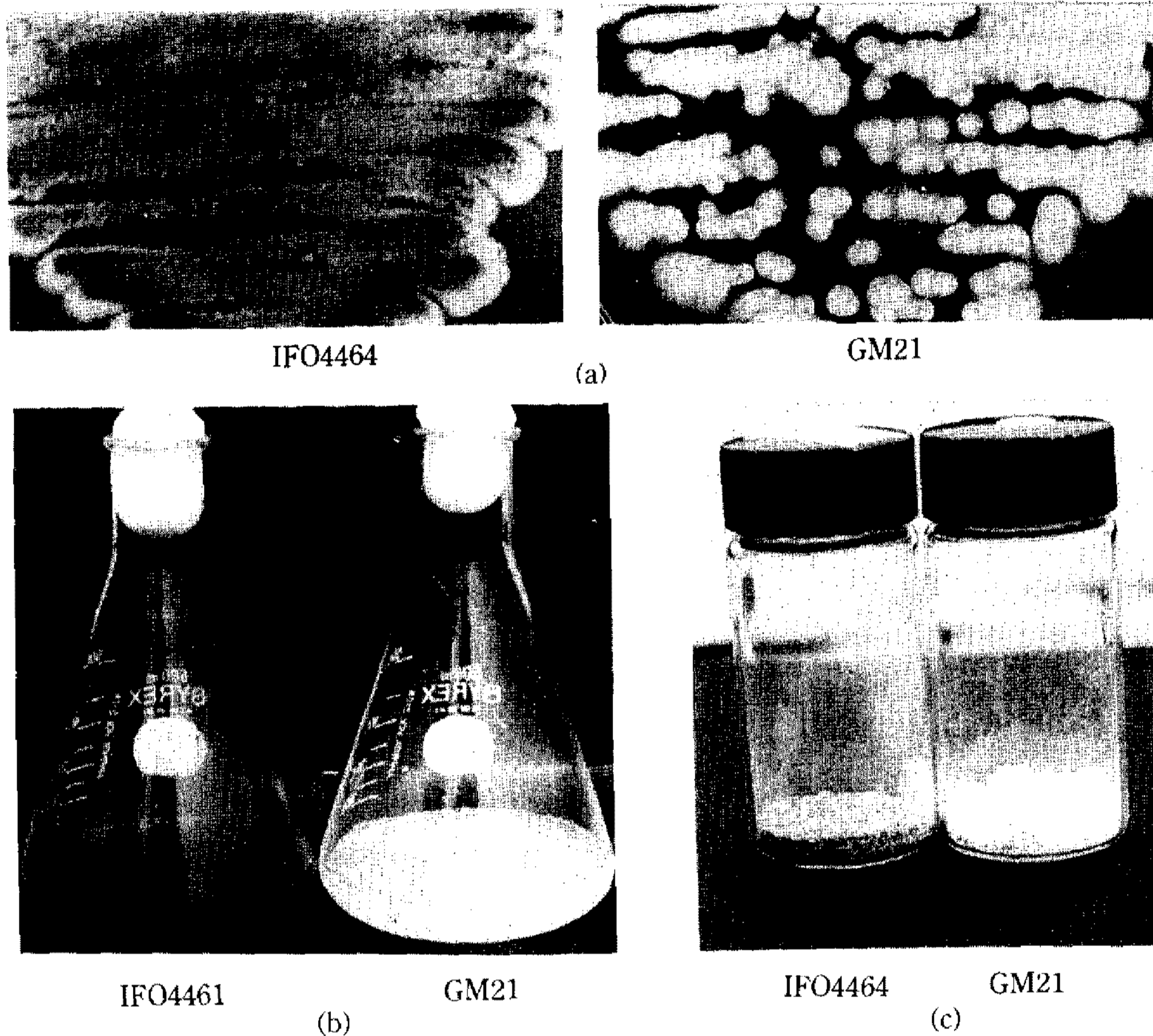


Fig. 1. Comparison of the isolate GM21 with *A. pullulans* IFO4464.

(a) Colony morphology; (b) broth cultures of the fungi on AYS media; (c) the exopolysaccharide recovered by isopropylalcohol precipitation.

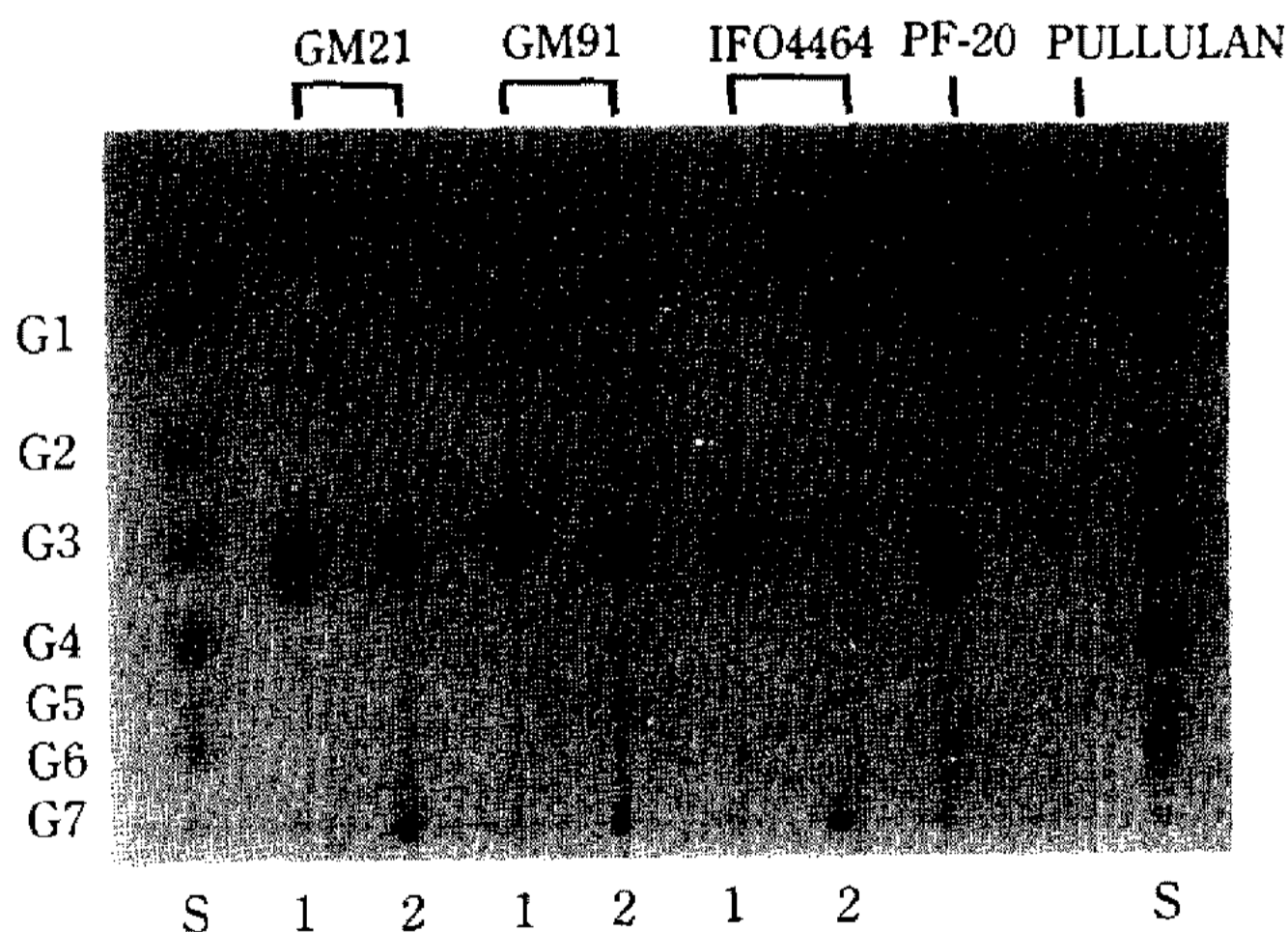


Fig. 2. Products analysis of the pullulanase-treated exopolysaccharides produced from sucrose (1) or soluble starch (2) media by the isolated strains, GM21 and GM91, and *A. pullulans* IFO4464.

S, standard sugars; G1, glucose; G2 to G7, maltooligosaccharides. PF-20 is commercial pullulan of Hayashibara Biochemical Laboratory and Pullulan is authentic pullulan from Sigma Chemical Co.

분리균주 GM21을 동정하기 위해서 형태적 특성과 탄소원 자화성을 조사하였다. 형태적 특성은 분생자(conidia)로서 많은 출아포자(blastospore)를 가지고 있었고, 투명하고 격벽이 있는 균사와 후막포자(chlamydospore)가 드물게 관찰되었다. GM21균주의 출아포자는 단일세포로 구성되어 있으며, 점물질을 생성하였고, 세포벽이 얇고 투명하였다(Table 1과 Fig. 3). GM21균주의 형태적 특징은 *A. pullulans* IFO4464와 거의 동일하였으나 *A. pullulans* IFO4464 균주는 GM21 균주보다 다량의 균사와 후막포자를 생성하였다. 탄소원 자화성을 API 20C system을 사용하여 조사해 본 결과 glucose, arabinose, xylose, sorbitol, inositol, N-acetyl-glucosamine, maltose, saccharose, trehalose, melezitose, raffinose 등을 이용하였고, glycerol, arabinose, lactose, cellobiose 등은 이용하지 못하였다. *A. pullulans* IFO4464의 탄소원 자화성은 GM21 균주와 거의 동일하였으나 2-keto-gluconate, cellobiose 자화성에 있어서만 달랐다. 이상의 결과로

Table 1. Characteristics of the isolated strain GM21

| Characteristics | GM21 | <i>A. pullulans</i> IFO4464 |
|------------------------------|--|--------------------------------|
| Morphology | | |
| Hypa | Transparent, septated | |
| Spore | Non-sexual | |
| Blastospore (conidia) | Blastospore, chlamyospore Amerosporous Gloiosporae Hyaline cell-wall Phialo-type | |
| Assimilation | | |
| Glucose | + | + |
| Glycerol | - | - |
| 2-Keto-D-gluconate | - | + |
| L-Arabinose | + | + |
| D-Xylose | + | + |
| Adonitol | - | - |
| Xylitol | - | - |
| Galactose | - | - |
| Inositol | + | + |
| Sorbitol | + | + |
| α -Methyl-D-glucoside | - | - |
| N-Acetyl-D-glucosamine | + | + |
| Cellobiose | - | + |
| Lactose | - | - |
| Maltose | + | + |
| Saccharose | + | + |
| Trehalose | + | + |
| Melezitose | + | + |
| Raffinose | + | + |

+: Positive response, -: negative response.

부터 분리균주 GM21은 *Aureobasidium pullulans*에 속하는 것으로 추정되어 *A. pullulans* GM21 균주로 명명하였다.

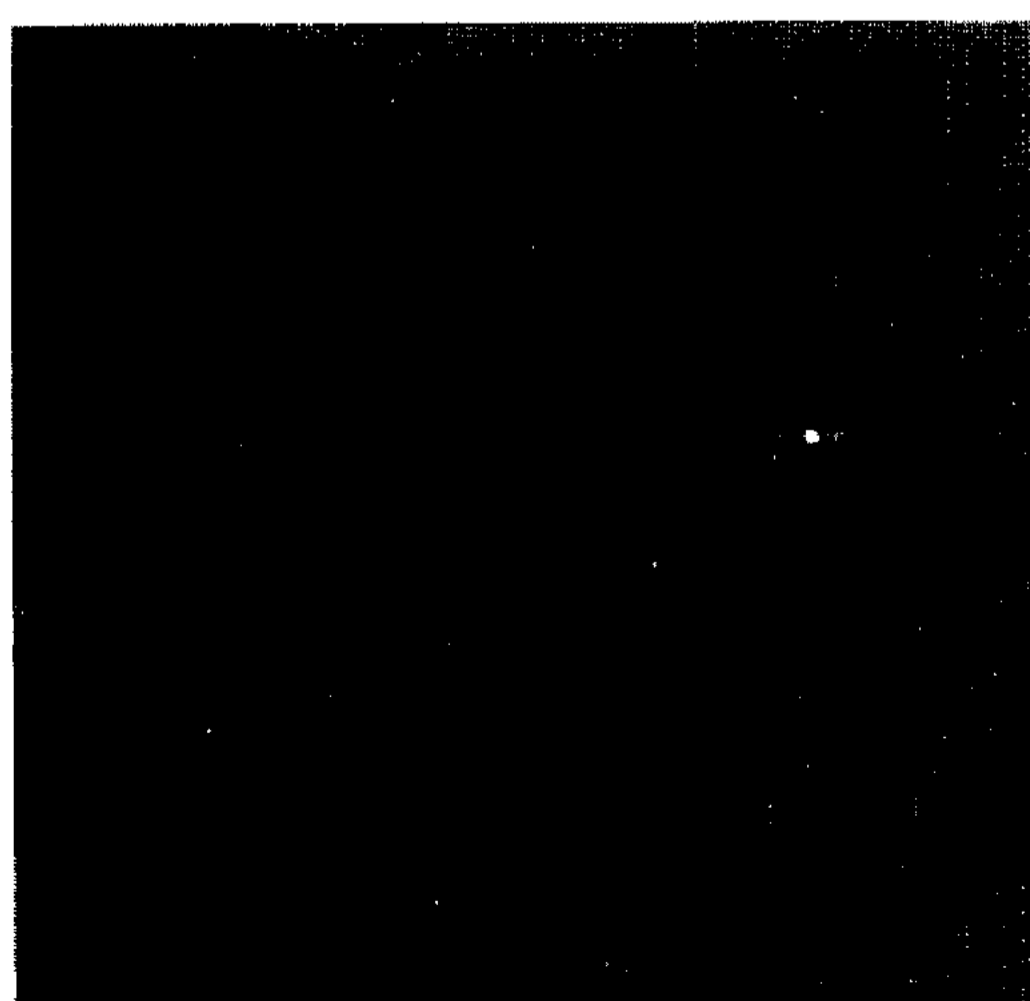
배양조건에 따른 *A. pullulans* GM21의 폴루란 생산성

초기 pH의 영향: *A. pullulans*는 배지의 pH에 따라서 균체성장과 폴루란 생산성이 크게 변하므로(11, 19, 20) AYS 배지의 초기 pH에 따른 폴루란 생산성의 변화를 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 균체성장은 배지의 초기 pH가 낮을수록 높았으나, 폴루란 생산은 반대로 배지의 초기 pH가 높을수록 증가하는 경향을 보여주어 초기 pH 7.5일 때 최고 약 29 g/l(58% 전환수율)의 폴루란을 생산할 수 있었다. *A. pullulans* GM21의 초기 pH에 대한 영향은 기존의 폴루란 생산균주들의 일반적 경향과 일치하는 결과

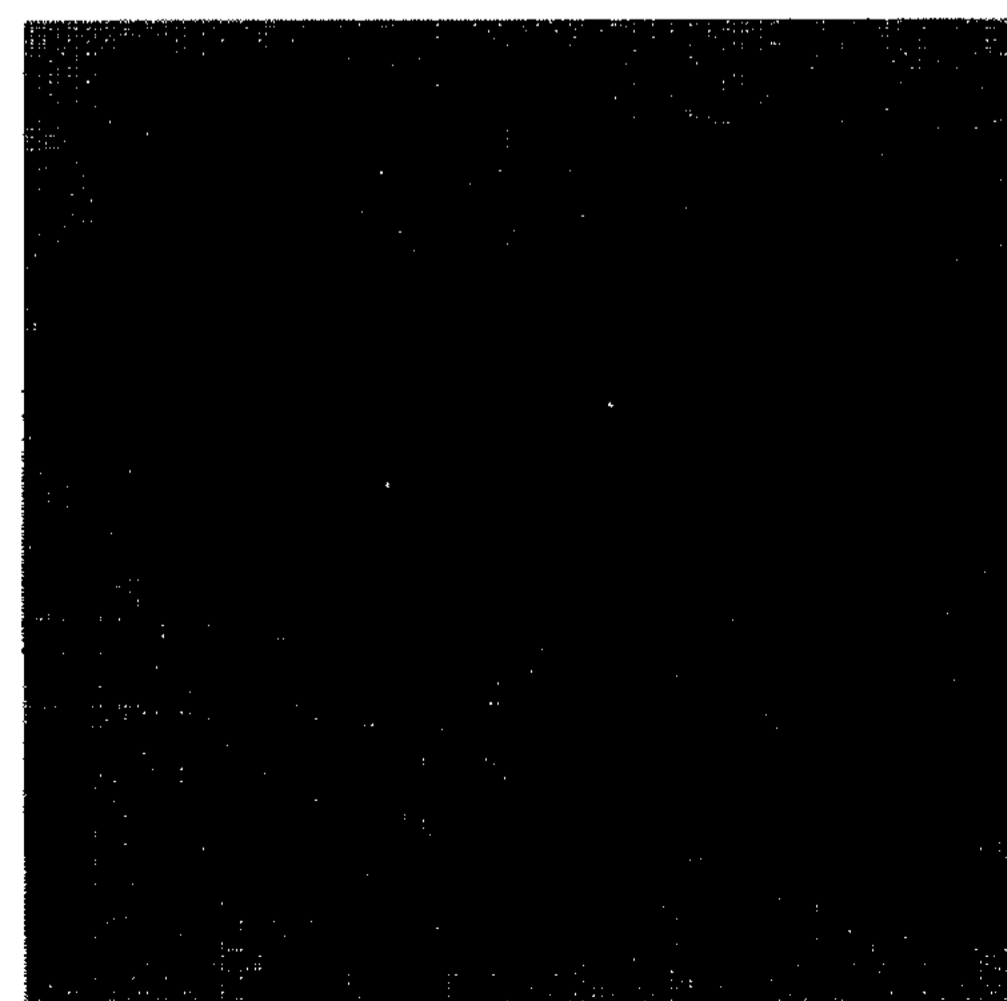
Table 2. Effect of initial pH on the cell growth and exopolysaccharide production of *A. pullulans* GM21^a

| Initial pH | Dry cell weight (g/l) | Exopolysaccharide (g/l) |
|------------|--------------------------|----------------------------|
| 4.0 | 10.6 | 0.3 |
| 5.0 | 10.8 | 1.6 |
| 6.0 | 9.3 | 17.2 |
| 7.0 | 5.8 | 30.1 |
| 7.5 | 5.8 | 29.3 |
| 8.0 | 5.7 | 28.9 |

^a*A. pullulans* GM21 was cultivated for 5 days at 25°C on AYS medium containing 5% sucrose as a carbon source.



IFO4464



GM21

Fig. 3. Microscopic morphology of the isolated strain GM21 and *A. pullulans* IFO4464.

Table 3. Effect of culture temperatures on the cell growth and exopolysaccharide production of *A. pullulans* GM21

| Temperature (°C) | Dry cell weight(g/l) | | Exopolysaccharide(g/l) | |
|------------------|----------------------|----------------|------------------------|----------------|
| | Initial pH 6.0 | Initial pH 7.5 | Initial pH 6.0 | Initial pH 7.5 |
| 20 | 8.3 | 4.5 | 17.9 | 27.1 |
| 25 | 11.3 | 6.1 | 19.1 | 31.2 |
| 30 | 9.1 | 5.8 | 11.5 | 24.8 |
| 37 | 0 | 0 | 0 | 0 |

A. pullulans GM21 was cultivated for 5 days at each temperature on AYS medium (initial pH 6.0 or pH 7.5) containing 5% sucrose as a carbon source.

Table 4. Effect of carbon sources on the cell growth and exopolysaccharide production of *A. pullulans* GM21 at initial pH 6.0 and 25°C

| Carbon source | Dry cell weight(g/l) | Exopolysaccharide (g/l) |
|----------------|----------------------|-------------------------|
| Glucose | 9.7 | 15.0 |
| Maltose | 7.3 | 16.1 |
| Sucrose | 9.2 | 17.2 |
| Soluble starch | 5.1 | 15.2 |

A. pullulans GM21 was cultivated for 5 days on AYS media containing 5% of various carbon sources.

였다. 한가지 특이한 점은 배지의 초기 pH가 6.0인 경우 초기 pH 7.5의 경우보다 풀루란의 생산성은 낮았으나 배양액의 점도가 월등히 높아 초기 pH 6.0 조건에서 분자량이 큰 풀루란이 생성되는 것으로 추정되었다.

배양온도의 영향 : *A. pullulans* GM21 균주는 37°C 에서 전혀 성장하지 못하였으며, 균체성장과 풀루란 생산이 25°C 에서 최대였다. 배지의 초기 pH를 6.0과 7.5 두가지로 실험했을 때 균체성장과 풀루란 생산은

서로 비슷한 패턴을 나타내었으나 pH 7.5에서는 pH 6.0에 비해서 풀루란 생산은 높고 균체성장은 낮았다 (Table 3).

탄소원의 영향 : Table 4에서 보는 바와 같이 *A. pullulans* GM21 균주는 포도당, 맥아당, 설탕, 가용성 전분을 이용하여 풀루란을 생산할 수 있었으며 설탕을 탄소원으로 사용하는 경우 가장 높은 풀루란 수율을 얻을 수 있었다. 가용성전분을 사용하는 경우 다른 탄소원에 비해서 균체성장과 풀루란 생산량은 낮았다. 설탕을 탄소원으로 사용하는 경우 초기 pH 6.0에서는 탄소원의 농도가 3%에서 10%로 증가할수록 풀루란 전환수율은 53.3%에서 20.2%로 떨어졌으나 초기 pH 7.5에서는 7% 설탕농도에서 58.3%(40.8 g/l)의 최대 풀루란 수율을 보였다(Table 5).

배양시간에 따른 풀루란 생산 : 삼각플라스크를 이용하여 7% 설탕배지에서 배양시간에 따른 풀루란 생산은 Fig. 4와 같았다. 초기 pH가 6.0인 경우 풀루란 생산은 배양 4일째에 최대 22 g/l를 나타냈으며, 초기 pH가 7.5인 경우에는 배양 5일째에 최대 약 41 g/l 풀루란 생산을 보였다. 그러나 초기 pH 6.0, 7.5인 경우

Table 5. Effect of the concentrations of sucrose on the cell growth and exopolysaccharide production of *A. pullulans* GM21

| Concentration(%) | Dry cell weight(g/l) | Exopolysaccharide(g/l) | Yield(%) |
|------------------|----------------------|------------------------|----------|
| Initial pH 6.0 | | | |
| 3.0 | 5.0 | 16.3 | 53.3 |
| 5.0 | 11.3 | 20.7 | 41.3 |
| 7.0 | 11.7 | 22.6 | 32.2 |
| 10.0 | 11.3 | 10.0 | 20.2 |
| Initial pH 7.5 | | | |
| 5.0 | 6.9 | 28.0 | 56.0 |
| 7.0 | 6.9 | 40.8 | 58.3 |
| 10.0 | 4.7 | 31.6 | 31.6 |

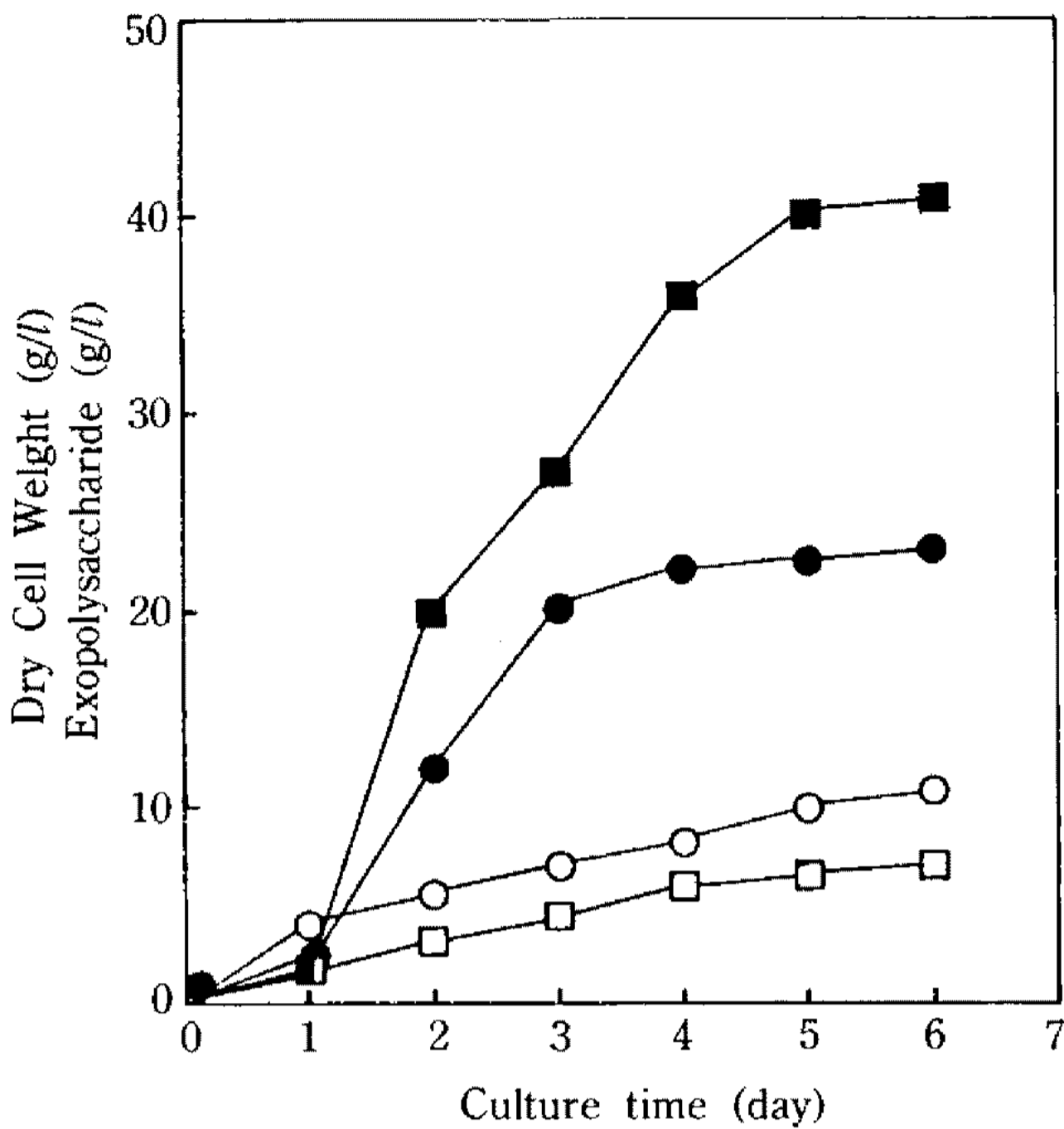


Fig. 4. Time courses of cell growth (open symbols) and exopolysaccharide production (closed symbols) of *A. pullulans* GM21 on AYS medium containing 7% sucrose at initial pH 6.0(○, ●) and 7.5(□, ■).

균체성장은 배양 6일까지 점진적으로 증가하는 패턴을 보였다. 발효조를 이용하여 초기 pH 7.5, 200 rpm, 0.7 vvm, 25°C 조건으로 3리터 배양을 하는 경우 7% 설탕으로부터 배양 6일째 약 42 g/l의 플루란과 5.8 g/l의 균체성장을 얻을 수 있어 삼각플라스크실험과 발효조실험에서 비슷한 결과가 나오는 것을 확인하였다. 삼각플라스크실험에서나 발효조실험에서 흑색 색소를 전혀 생성하지 않았으며, 용매침전시 백색의 다당류를 얻을 수 있었다. 초기 pH 7.5로 *A. pullulans* GM21을 배양하는 경우 대부분 다극출아를 통한 효모형 성장을 하였으며 균사는 거의 찾아볼 수 없었다.

플루란 분자량의 변화

A. pullulans GM21 균주에 의해서 생성되는 플루란의 분자량을 결정하기 위해서 각 시료의 고유점도를 구하고 이것으로부터 Buligad와 Brant(29)의 식으로부터 분자량을 계산하였다(Table 6). 배지의 초기 pH가 6.0일 때 플루란의 분자량은 약 820,000 정도로서 최대를 보였으며, 초기 pH가 이것보다 높아지거나 낮아지면 분자량이 현저히 감소하는 경향을 보여 pH 7.5일 때 약 360,000이었다. 탄소원의 종류에 따른 플루란 분자량의 차이를 보면 설탕의 경우 분자량이 가장 높았으며, 가용성전분의 경우 210,000으로 가장

Table 6. Changes of molecular weight of exopolysaccharide produced by *A. pullulans* GM21 according to the culture conditions

| Culture condition | Intrinsic viscosity (dl/g) | Weight-average molecular weight ($\times 10^3$) |
|------------------------------------|----------------------------|---|
| Sucrose 5%, 25°C, 5 days-culture | | |
| pH 5.0 | 1.2 | 480 |
| pH 6.0 | 1.7 | 820 |
| pH 7.0 | 1.4 | 610 |
| pH 7.5 | 1.0 | 360 |
| pH 8.0 | 1.0 | 360 |
| 25°C, pH 6.0, 5 days-culture | | |
| Glucose 5% | 1.0 | 360 |
| Sucrose 5% | 1.7 | 820 |
| Maltose 5% | 0.9 | 310 |
| Soluble starch 5% | 0.7 | 210 |
| Sucrose 5%, pH 6.0, 5 days-culture | | |
| 20°C | 1.2 | 480 |
| 25°C | 1.7 | 820 |
| 30°C | 0.8 | 260 |
| Sucrose 5%, pH 7.5, 5 days-culture | | |
| 20°C | 1.3 | 540 |
| 25°C | 1.0 | 360 |
| 30°C | 0.6 | 160 |

낮았다. 배양온도에 따른 플루란 분자량의 차이를 보면 초기 pH에 따라 다소 차이가 있는데, 초기 pH가 6.0인 경우에는 25°C에서, 초기 pH가 7.5인 경우에는 20°C에서 플루란의 분자량이 가장 높게 나타났다. *A. pullulans* GM21 균주가 생산하는 플루란의 분자량은 배양조건에 따라 낮게는 160,000에서부터 높게는 820,000에 이르는 것으로 나타났으며, 플루란 분자량의 변화는 배지의 초기 pH, 탄소원의 종류, 배양온도 등의 영향을 크게 받는 것으로 나타났다. 특히 배지의 초기 pH에 따라서 생성되는 플루란의 분자량이 크게 달라지는데 Table 7에서 보는 바와 같이 초기 pH를 6.0으로 맞추고 배양하는 경우 배양시간이 증가함에 따라 플루란의 분자량이 890,000에서 670,000 사이로 나타나 배양중에 분자량의 큰 변화는 없는 것으로 나타났다. 그러나 초기 pH를 7.5로 맞추고 배양하는 경우에는 분자량의 변화가 현저한데 배양 3일째 플루란의 분자량이 1,390,000까지 증가하였으나, 배양

Table 7. Changes of molecular weight of exopolysaccharide produced by *A. pullulans* GM21 according to the culture time

| Culture condition | Intrinsic viscosity (dl/g) | Weight-average molecular weight ($\times 10^3$) |
|--------------------|----------------------------|---|
| Sucrose 7%, pH 6.0 | | |
| 1 | 0.6 | 160 |
| 2 | 1.7 | 820 |
| 3 | 1.8 | 890 |
| 4 | 1.8 | 890 |
| 5 | 1.7 | 820 |
| 6 | 1.5 | 670 |
| Sucrose 7%, pH 7.5 | | |
| 1 | 0.2 | 30 |
| 2 | 1.4 | 610 |
| 3 | 2.4 | 1,390 |
| 4 | 1.2 | 480 |
| 5 | 0.8 | 260 |
| 6 | 0.7 | 210 |

시간이 증가함에 따라서 급격히 감소하여 배양 6일째 210,000 정도로 줄어들었다. 최근에 Wiley 등(30)은 *A. pullulans* NRRL-Y6220 균주를 사용하여 풀루란 분자량변화를 연구한 결과 1.0×10^5 에서 4.0×10^6 정도의 풀루란이 생성되며 이러한 분자량변화는 배지 조성, pH, 배양시간 등의 영향을 받는다고 보고하였다. 또한 Kato와 Shiosaka(7)는 배지의 초기 pH가 낮을 수록, 인산농도가 낮을수록 생성되는 풀루란의 분자량이 큰 것으로 보고하였다. 생성된 풀루란의 분자량 감소는 *A. pullulans*가 생성하는 일종의 아밀라아제에 의해서 풀루란이 분해되기 때문인 것으로 추정하고 있으나(4, 31), 현재 구체적인 실험적 증거는 아직 보고되지 않았다. 앞으로 풀루란의 분자량조절과 관련하여 *A. pullulans*의 세포외 아밀라아제에 관한 연구가 필요한 것으로 사료된다.

세포외 다당류의 성분분석

A. pullulans GM21 균주가 생성하는 세포외 다당류의 조성을 알아보기 위해서 성분을 분석하여 보았다. *A. pullulans* GM21 균주가 생산하는 다당류 중에서 순수한 풀루란의 함량은 pullulanase 처리시 분해되는 양으로 정하였고 비풀루란 함량은 pullulanase에 의해서 분해되지 않는 양으로 정하였다. Table 8에서 보는 바와 같이 *A. pullulans* GM21 균주가 포도당, 맥아당, 설탕배지에서 생산하는 세포외 다당

Table 8. Compositions of the exopolysaccharides produced by *A. pullulans* GM21

| Strain | Carbon source | Polysaccharide composition(%) | | |
|--------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------|
| | | Pullulanase-sensitive | Pullulanase-resistant | Acidic |
| GM21 | Glucose | 93.8 | N.D. ^a | N.D. |
| | Maltose | 97.5 | N.D. | N.D. |
| | Sucrose | 98.3 | N.D. | N.D. |
| | Soluble starch | 88.8 | N.D. | N.D. |
| PF-20 | (Hayashibara Biochemical Lab.) | 96.3 | N.D. | N.D. |

^aN.D., not detectable.

류는 거의 순수한 풀루란임을 알 수 있었다. 가용성 전분을 탄소원으로 사용하는 경우에는 풀루란 함량이 다소 낮아 88.8%이었다. 그러나 *A. pullulans* IFO4464의 경우 설탕 혹은 전분배지에서 생산된 세포외 다당류의 19~51%가 풀루란(pullulanase-sensitive polysaccharide)이었으며 나머지는 산성다당류와 기타의 다당류인 것으로 보고되었다(22, 24). 이상의 결과로 *A. pullulans* GM21 균주는 기존의 생산균주인 *A. pullulans* IFO4464와는 달리 순수한 풀루란만을 세포외로 생산하는 것으로 판명되었다. *A. pullulans* GM21 균주의 이와 같은 특징은 풀루란의 분리, 정제공정을 용이하게 할 뿐만 아니라 고순도 풀루란을 제조할 수 있어 고순도 풀루란이 요구되는 분야에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

자연계에서 풀루란 생산성이 높고 흑색색소를 분비하지 않는 *Aureobasidium pullulans* GM21 균주를 분리하여 풀루란 생산성과 관련된 배양조건 및 풀루란 분자량변화를 연구하였다. 분리균주는 기존의 생산균주에 비하여 흑색색소나 산성 및 기타의 중성다당류가 없는 순수한 풀루란만을 세포외 배지중으로 생산한다는 점과 풀루란 수율이 높은 것이 특징이었다. *A. pullulans* GM21 균주를 삼각플라스크와 발효조를 이용하여 배양하는 경우 25°C, 초기 pH 7.5에서 7% 설탕으로부터 배양 6일째 최대 58~60%의 전환수율로 40.8~42.0 g/l의 풀루란을 생산하였다. 분리균주는 배지의 초기 pH를 6.0, 7.5로 배양하는 경우 배양 5일째 각각 분자량이 820,000과 260,000의 순수한 풀루란을 생산하였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 특정기초연구과제(과제 번호 : 91-05-00-17)로서 수행된 연구의 일부이며 연구비를 지원한 한국과학재단에 감사드립니다.

참고문헌

- Bender, H. and K. Wallenfels. 1961. Untersuchungen an pullulan. II. Spezifischer Abbau durch ein bakterielles enzym. *Biochem. Z.* **334**: 79-95.
- Bouveng, H.O., H. Kiessling, B. Lindberg and J. McKay. 1962. Polysaccharides elaborated by *Pullularia pullulans*. Part II. The partial acid hydrolysis of the neutral glucan synthesised from sucrose solutions. *Acta Chem. Scand.* **17**: 797-800.
- Wallenfels, K., G. Keilich, G. Bechtler and D. Freudenberger. 1965. Untersuchungen an pullulan. IV. Die Klärung des struktur-problems mit physikaakischen, chemischen und enzymatischen methoden. *Biochem. Z.* **341**: 433-450.
- Catley, B.J. and W.J. Whelan. 1971. Observations on the structure of pullulan. *Arch. Biochem. Biophys.* **143**: 138-142.
- Yuen, S. 1974. Pullulan and its applications. *Process Biochem.* **9**(11): 7-9, 22.
- Kato, K. and M. Shiosaka. 1975. Process for the production of pullulan. *U. S. patent* 3,912,591
- Onda, Y., H. Muto and H. Suzuki. 1982. Cyanoe-thylpullulan. *U. S. patent* 4,322,524.
- Shin, Y.C., and 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.
- Shin, Y.C., J.K. Han, Y.H. Kim, H.S. Lee and S.M. Byun. 1987. Inhibitory effect of sugar concentrations on the cell growth and the pullulan production of *Aureobasidium pullulans*. *Kor. Jour. Microbiol.* **25**: 360-366.
- Shin, Y.C., J.K. Han and S.M. Byun. 1990. Effects of aeration rates and rheological properties of fermentation broth on pullulan fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**: 533-538.
- Shin, Y.C. and S.M. Byun. 1991. Effects of pH on the elaboration of pullulan and the morphology of *Aureobasidium pullulans*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 193-199.
- Leal-Serrano, G., P. Ruperez and J. A. Leal. 1980. Acidic polysaccharide from *Aureobasidium pullulans*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **75**(1): 57-62.
- Bouveng, H.O., H. Kiessling, B. Lindberg and J. McKay. 1963. Polysaccharides elaborated by *Pullularia pullulans*. III. Polysaccharides synthesised from xylose solutions. *Acta Chem. Scand.* **17**: 1351-1356.
- Gorin, P.A.J. and J.F.T. Spencer 1968. Structural chemistry of fungal polysaccharides. *Advan. Carbohydrate Chem.* **22**: 367-417.
- Lingappa, Y., A.S. Sussman and I.A. Bernstein. 1963. Effect of light and media upon growth and melanin formation in *Aureobasidium pullulans*(de By.) Arn.(=*Pullularia pullulans*). *Mycopathol. Mycol. Appl.* **20**: 109-128.
- Merdinger, E. 1965. Growth and pigment studies of *Pullularia pullulans*. III. *State Acad. Sci. Trans.* **57**: 28-33.
- Gadd, G.M. 1980. Melanin production and differentiation in batch cultures of the polymorphic fungus *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**: 237-240.
- Gadd, G. M. and A. J. Griffiths. 1980. Effect of copper on morphology of *Aureobasidium pullulans*. *Trans. Br. mycol. Soc.* **74**: 387-392.
- Ono, K., N. Yasuda and S. Ueda. 1977. Effect of pH in pullulan elaboration by *Aureobasidium pullulans* S-1. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 2113-2118.
- 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.
- Shin, Y.C. 1988. Studies on the production of exopolysaccharide pullulan from *Aureobasidium pullulans*. *Ph.D. Thesis* in KAIST.
- Leathers, T.D., G.W. Nofsinger, C.P. Kurtzman and R.J. Bothast. 1988. Pullulan production by color variant strains of *Aureobasidium pullulans*. *J. Ind. Microbiol.* **3**: 231-239.
- Wickerham, L.J. and C.P. Kurtzman. 1975. Synergistic color variants of *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia.* **67**: 342-361.
- Silman, R.W., W.L. Bryan and T.D. Leathers. 1990. A comparison of polysaccharides from strains of *Aureobasidium pullulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **71**: 65-70.
- Pollock, T. J., L. Thorne and R. W. Armentrout. 1992. Isolation of new *Aureobasidium* strains that produce high-molecular-weight pullulan with reduced pigmentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 877-883.
- Shin, Y.C., Y.H. Kim, H.S. Lee, S.J. Cho and S.M. Byun. 1989. Production of exopolysaccharide pullulan from inulin by a mixed culture of *Aureobasidium pullulans* and *Kluyveromyces fragilis*. *Biote-*

- chnol. Bioeng.* **33**: 129-133.
27. Kendrick, W.B. and J.W. Carmichael. 1973. Deuteromycotina, hyphomycetes. Pp. 323-509. In G.C. Ainsworth and A.S. Sussman(ed.), *The Fungi, An Advanced Treatise*. Vol. 4A. Academic press, New York.
28. Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
29. Buliga, G. and D.A. Brant. 1987. Temperature and molecular weight dependence of the unperturbed dimensions of aqueous pullulan. *Int. J. Biol. Macromol.* **9**: 71-76.
30. Wiley, B.J., D.H. Ball, S.M. Arcidiacono, S. Sousa, J.M. Mayer and D.L. Kaplan. 1993. Control of molecular weight distribution of the Biopolymer pullulan produced by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Environmental Polymer Degradation.* **1**: 3-9.
31. Catley, B.J. 1970. Pullulan, a relationship between molecular weight and fine structure. *FEBS Lett.* **10**: 190-193.

(Received August 17, 1993)