

*Aureobasidium pullulans*에 의한 플루란 생산에서 pH와 질소원의 영향

*나 건 · †이 기 영 · 박 돈 희

*전남대 공업화학과, 생물화학공학과

Effects of pH and Nitrogen sources on the Pullulan Production by *Aureobasidium pullulans*

Kun Na*, Ki-Young Lee†, and Don-Hee Park

Department of Biochemical Eng., Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

*Department of Chemical Tech., Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

ABSTRACT

In this study, the effects of nitrogen sources and pH on pullulan production were investigated. As a result, the best nitrogen source in pullulan production by *Aureobasidium pullulans* was shown to be peptone and its product yield was 62%. Optimum concentration of carbon/nitrogen source ratio was 50/0.15 and the production of pullulan was inhibited at ratios higher than 50/0.15. *Aureobasidium pullulans* had produced 29.1, 27.4 and 26.5 g/L pullulan, respectively in media I, II, and III containing mixed nitrogen sources. This result showed that pullulan could be produced efficiently from mixed nitrogen source. It was found that pullulan yield with pH control was higher than that with no pH control. In fed-batch fermentation, pullulan yield obtained with a feeding rate of 0.05 N-g/L for nitrogen source was higher than that without nitrogen source feeding.

서 론

흑효모라고도 불리는 불완전 곰팡이인 *Aureobasidium pullulans*에 의해 생산되는 중성 세포의 다당류인 플루란은 maltotriose와 maltotetraose가 α -1,6와 α -1,4단위의 결합으로 중합된 직쇄상의 비교적 간단한 고분자인 α -glucan으로 알려져 있다. Bernier(1) 등에 의해 최초로 관찰된 이래로 많은 연구가 진행되고 있는 플루란은 균체외로 분비되는 생물고분자로 균체내 생물 고분자보다 생성물 분리가 용이하고 독성이 전혀 없다. 여러 미세 입자들에

대한 효과적인 응집제라는 화학적 특성(2)과 독특한 물리적 특성(3)때문에 식품의 물성 개량제로 적합하고 그 가소성을 이용한 응용이 여러 방면에서 연구되고 있으며, 특히 저열량 식품으로의 개발이 가능하고 우수한 막형성 능력을 가지고 있어 투명도와 광택, 그리고 강도를 유지하는데 적당하기 때문에(4) 국내에서의 대량생산이 필수적이라고 생각된다. 최근에는 각 기질의 종류와 농도 변화(5)와 고정화에 의한 플루란 생산(6) 등에서 그것의 최적수율과 그것의 overproduction의 생리학적 이해를 돕는 몇 가지 연구결과가 나오면서 더욱 활발한 연구가 진행되고 있다. *Aureobasidium pullulans*에 의한 플루란 생산에서 가장 중요한 변수로 보통 pH를 들수가

† Corresponding Author

있는데 Catley(7) 등은 초기 pH를 6.0~7.0으로 배양시킨 후 5.0으로 낮추는 것이 플루란 생산에 유리하다고 보고하였으며, Heald(8) 등은 배양액의 pH는 플루란 생산 뿐만 아니라 미생물형태에도 영향을 미쳐서 pH 2.0~2.5에서는 균사형이 지배적이지만 pH 6.0~8.0에서는 효모형이 지배적이라고 지적한 바 있다. 따라서 pH는 세포의 성장과 형태 그리고 플루란 수율 등 플루란 발효에서 전반적으로 지배적인 역할을 한다고 할 수 있다. 또 최근에는 플루란의 분자량에도 크게 영향을 미친다고 보고된 바 있다(9, 10).

따라서, 본 연구에서는 pH에 따른 여러 변수의 변화와 pH 뿐만 아니라 플루란 분자량에도 영향을 미치는 것으로 알려진 질소원(11, 12)에 관하여 종류와 농도를 변화시켜 실험을 행하였다. 그리고 플루란 생산에서 pH를 조절하는 경우와 pH를 조절하지 않는 경우의 플루란 생산량을 비교하였으며, 기질 저해의 최소화과 다당류 회수시 경제성을 갖는 유가식 발효(13)에서 질소원의 영향을 고찰하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용된 균주는 *Aureobasidium pullulans* IFO 4464이다.

배지

본 연구에 사용된 배지의 조성은 sucrose 5%(w/v), K_2HPO_4 0.5%, NaCl 0.1%, $MgSO_4$ 0.04% 그리고 yeast extract, peptone, sodium-glutamate같은 유기 질소원과 $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ 같은 무기 질소원을 실험 목적에 따라서 순수한 질소 농도가 0.1~0.25N-g/L(이하 N은 질소원 중 순수 질소라는 의미)가 되도록 조절하여 사용하였다. 혼합 질소원은 총 질소 농도가 0.15N-g/L가 되도록 일정 비율로 혼합된 혼합 질소원 I(peptone 1: glutamate 3), 혼합 질소원 II(peptone 1: $NaNO_3$ 2) 그리고 혼합 질소원 III($(NH_4)_2SO_4$, 1: $NaNO_3$ 4)를 만들어 실험을 행하였다. 또, 균주는 한천 배지에서 4°C로 유지하여 매 주마다 신선한 배지로 계대배양하였다.

배양방법

배지 100ml가 들어있는 500ml 삼각 플라스크에 전 배양액 5%을 접종시킨 후 진탕배양기(Vision

Scientific Company)에서 28°C, 220rpm으로 6일간 운행하여 초기 pH와 질소원의 영향을 알아보는 실험을 행하였다. 발효조 실험은 pH를 일정하게 하여 플루란 생산량에 영향을 미치는 요인에 대하여 알아보았다. 본 연구에 사용된 발효조는 2.5L Jar Fermentor(NBS. Bioflowll)로서 여기에 발효배지 2L를 넣고 28°C, 900rpm, 1vvm의 조건으로 5일간 운행하였다.

분석방법

건조 균체량과 플루란 정량

채취된 발효액 10mL를 증류수로 2배 희석하여 15000rpm으로 30분간 원심분리시킨 후 상등액은 따라내고 침강된 세포를 거두어 내어 80~90°C의 진공오븐속에서 24시간 동안 건조시킨 후 정량하였다. 플루란 정량은 따라낸 상등액 10mL에 2배의 에탄올을 가하여 혼든 후 여기서 분리된 플루란을 80~90°C 진공오븐 속에서 하루동안 건조한 후 그 무게를 정량하였다.

당 측정

세포를 원심분리시킨 후 그 상등액을 가지고 다시 플루란을 제거한 다음 그 용액으로 총당을 측정하였다. 총당측정을 위하여 페놀-황산법(14)을 사용하였으며, 환원당 측정을 위하여는 DNS법(15)을 사용하였다.

질소원 측정

배양액의 질소량은 원심분리시킨 시료 2mL를 가지고 micro-kjeldhal법(16)을 사용하여 정량하였다.

광학현미경 관찰

배지내의 미생물의 형태와 그 분포를 관찰하기 위하여 카메라가 장착된 광학현미경(Nikon)을 가지고 100, 400, 1000배 등의 배율로 관찰하였다.

결과 및 고찰

초기 pH의 영향

Fig. 1은 각 초기 pH에 대한 미생물 양의 변화를 나타낸 것으로, 처음 하루까지는 비교적 높은 pH인 6과 8에서 미생물 양이 빠르게 증가함을 보였지만 하루가 지난 후부터는 낮은 pH에서의 미생물 양의 성장이 지속적으로 계속 되어 결국 그 양이 pH 6과 8에서보다 커짐을 알 수 있다. 특히, 초기 pH 2에

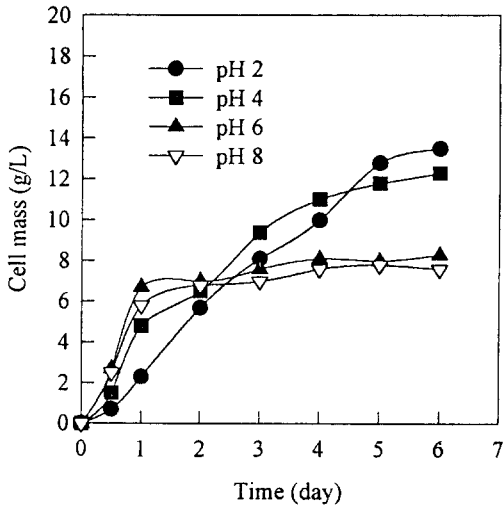


Fig. 1. Changes of cell mass with time for various initial pHs.

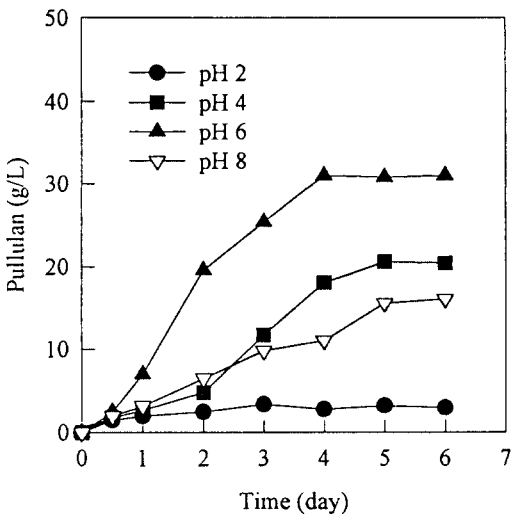


Fig. 2. Changes of pullulan with time for various initial pHs.

서는 이틀까지는 미생물 양이 pH 6보다 적었지만 3 일 후부터는 초기 pH 6보다 미생물 양이 커짐을 보였다. 그후 계속적으로 미생물 양이 시간과 비례하여 지속적으로 증가함을 보이는데 이는 미생물이 극한 환경에서는 플루란 생산보다 생존을 위하여 기질을 소비하였기 때문이라고 생각되어진다. 초기 pH 8에서는 미생물의 형태가 효모형이 지배적으로 나타

Table 1. Effect of Initial pH on Pullulan Production.

		Unit : g/L			
Initial pH		2	4	6	8
Result	Final pH	2.1	3.4	4.9	6.8
	Cell mass	3.0	12.6	9.1	8.5
	Pullulan	13.4	22.5	30.7	18.4

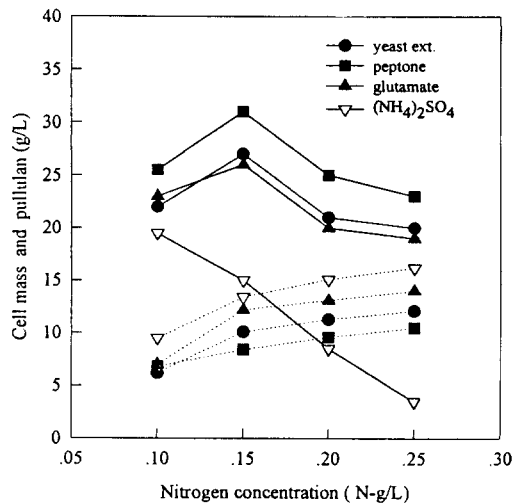


Fig. 3. Effects of various nitrogen sources and concentrations on cell mass(.....) and pullulan(—)production.

났지만 플루란 생산량은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 16g/L로 mycelium이 효모형보다 더 지배적인 pH 4의 20.5g/L보다 더 적은 양을 나타냈는데(Data not shown), 이것은 결국 미생물의 형태가 플루란 생산에 큰 영향을 미친다는 McNeil 등(17)의 보고와는 상반된 결과를 보여 주고 있다. 가장 많은 플루란 생산량을 보인 초기 pH는 6으로 이때 플루란 생산량은 31g/L였다. 초기 pH 2에서는 3g/L정도의 플루란 생산량을 보였다. 또한 최종 pH의 변화는 pH 2, 4, 6 그리고 8에서 각각 2.1, 3.4, 4.9 그리고 6.8로 나타났다(Table 1).

질소 농도와 다양한 질소원들의 영향

Fig. 3은 sucrose 50g/L가 들어있는 기본 배지에 질소원 중 순수 질소 농도가 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 N-g/L로 달리하여 각 질소 농도에 따른 미생물 양

Table 2 Effect of Various Nitrogen Sources on Pullulan Production (Nitrogen concentration: 0.50N-g/L).

Result \ Nitrogen source	Unit: g/L				
	Yeast extract	Peptone	Sodium glutamate	(NH ₄) ₂ SO ₄	NaNO ₃
Final pH	5.3	5.4	6.8	2.1	7.5
Cell mass	15.2	14.2	16.3	19.7	17.2
Pullulan	12.5	16.1	8.4	2.5	6.2

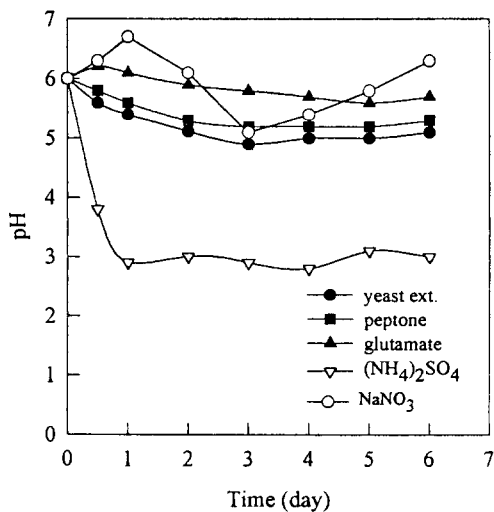


Fig. 4. Changes of pH for various nitrogen sources.

과 플루란 생산량을 나타낸 것이다. peptone을 질소원으로 사용한 경우에는 질소농도가 0.15N-g/L에서 플루란 생산량이 32g/L로 최고를 보였고, yeast extract와 sodium glutamate를 사용한 경우에도 질소 농도 0.15 N-g/L에서 최고 플루란 생산량을 보임을 알 수 있었다. 하지만, (NH₄)₂SO₄ 경우에는 기질 50g/L일 때 질소원 0.10 N-g/L에서 최고수율을 보였는데, 이는 (NH₄)₂SO₄의 양이 많을수록 pH가 급격하게 감소하기 때문이라 생각된다. Table 2는 각 질소원의 질소 농도를 0.5 N-g/L로 한 결과인데, (NH₄)₂SO₄ 경우에는 pH가 2.1까지 감소한 반면, NaNO₃ 경우에는 7.5까지 증가함을 보였다. 이는 질소원의 농도가 pH에 크게 영향을 미침을 보여준다. 이때, 미생물 양과 플루란 생산량을 보면, 모든 질소원에서 미생물 양은 크게 증가 하였지만

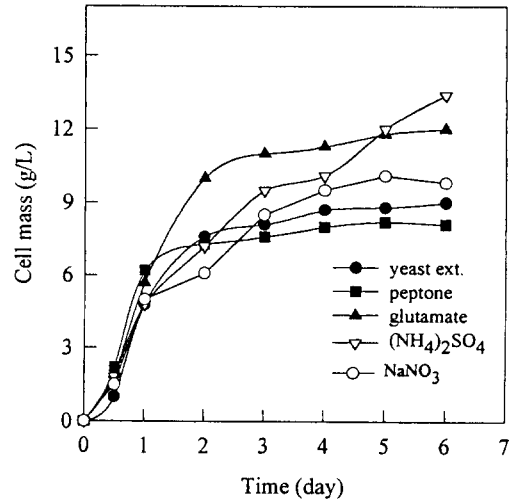


Fig. 5. Changes of cell mass for various nitrogen sources.

플루란 생산량은 peptone의 경우 질소농도 0.15N-g/L에서보다 16g/L정도 적은 양을 보였다. Fig. 4는 다양한 질소원을 순수 질소 농도가 최적 질소 농도인 0.15N-g/L로 하여 사용했을 때의 pH의 변화를 보여 주는데, (NH₄)₂SO₄을 사용한 경우, 다른 질소원에서는 pH가 1~2 정도 폭으로 완만하게 감소하는데 비해 pH가 3이하로 급격하게 감소함을 보인다. Lee(10)는 (NH₄)₂SO₄의 양을 0, 0.6, 1.0, 2.0g/L와 효모 추출물 1g/L를 첨가 하였을 때 pH는 (NH₄)₂SO₄가 없을 때에는 4.2내지 4.4로 되며 2.0g/L가 있을 때에는 2.3으로 감소한다고 주장하였고, Catley(7) 등은 미생물이 암모늄 이온을 흡수한 후 양자(Proton)을 배출하므로 급격한 pH의 감소를 가져온다고 보고하였는데, 결국 이것이 급격한 pH의 감소를 가져온 이유라고 생각된다. 또 NaNO₃나 sodium glutamate는 초기에는 pH가 상승함을 보여 주는데, 이는 Na 이온에 의해 NaOH나 다른 수산기염이 생성된 때문이라 하겠다. Fig. 5는 미생물 양의 변화를 보여 주고 있는데 peptone의 경우 최대 미생물량이 9g/L정도를 보인 반면, (NH₄)₂SO₄은 14g/L를 보였다. Fig. 6은 플루란 생산량의 변화를 보여 주는 것으로 peptone을 질소원으로 사용하였을 때 지금까지 가장 좋은 질소원으로 알려진 yeast extract보다 약 7% 많은 31g/L로 최고를 나타내었다. (NH₄)₂SO₄의 경우 15g/L를 보였으며 또한, 플루란 생산량과 미생물 양에서는 그 크기가 반비례하

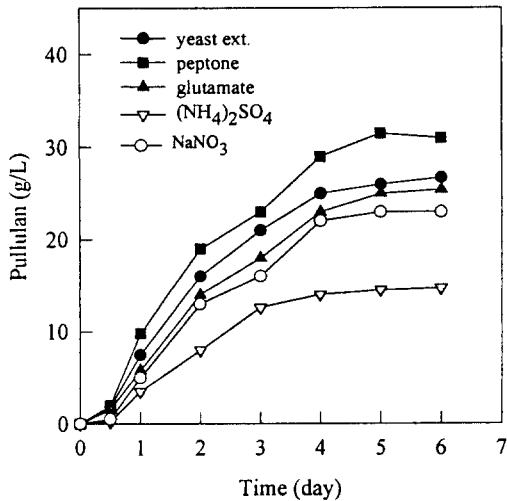


Fig. 6. Changes of pullulan for various nitrogen sources.

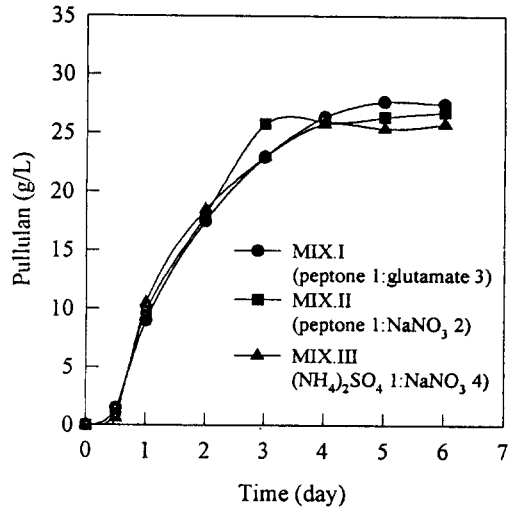


Fig. 8. Profiles of pullulan concentration for various mixed nitrogen sources.

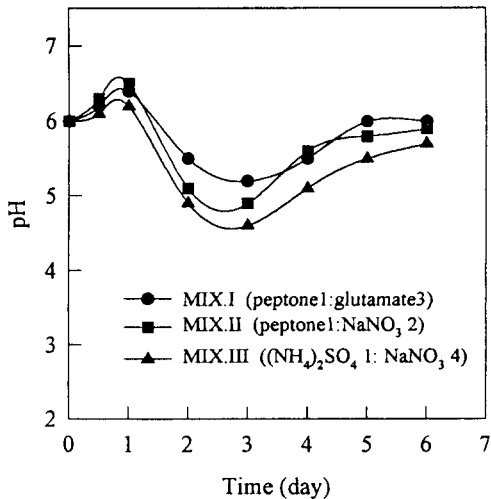


Fig. 7. Profiles of pH for various mixed nitrogen sources.

게 나타났는데, 이는 초기 pH 2의 경우처럼 미생물 성장과 플루란 생성 사이에서의 기질 소비 경쟁 때문이라 생각된다.

혼합 질소원의 영향

각 질소원들은 그 자체가 pH변화에 큰 영향을 미친다는 것이 본 실험에서 나타났는데 이것을 기초로

각 질소원이 갖는 pH의 변화 폭을 고려하여 (예를 들어 혼합 질소원 III((NH₄)₂SO₄ 1: NaNO₃ 4)의 경우 초기에 급격한 pH의 감소를 가져오는 (NH₄)₂SO₄에 초기 pH의 증가를 가져오는 NaNO₃의 질소비를 1:4로 하였을 때 가장 높은 pullulan 생산량을 보였음) 혼합된 상태에서 가장 높은 pullulan 생산량을 보인 비율을 선택하여 총 질소 농도가 0.15 N-g/L가 되도록 혼합하여 실험을 행하였다. Fig. 7에서는 세 가지 혼합 질소원들의 pH 진행형태를 보여 주는데, 최소 pH는 발효 3일째 각각 5.22, 5.08, 4.81를 보였으며, 최종 pH는 각각 5.98, 5.85, 5.65로 세 경우가 비슷한 값으로 변화함을 알 수 있다. Fig. 8은 플루란 생산량의 변화를 보여 주는 것으로 혼합 질소원 I(peptone 1: glutamate 3), 혼합 질소원 II(peptone 1: NaNO₃ 2) 그리고 혼합 질소원 III((NH₄)₂SO₄ 1: NaNO₃ 4)가 각각 29.1, 28.0, 26.5g/L로 peptone을 질소원으로 사용한 경우를 제외한 yeast extract나 glutamate와는 거의 비슷한 수율을 보였고 (NH₄)₂SO₄ 보다는 월등히 높은 수율을 보였다. 따라서, 각 질소원을 적절히 혼합하여 사용하면 고가인 peptone의 양을 감소시켜 생산원가를 절감하는 효과도 얻을 수 있다고 생각 되어진다.

pH가 조절된 발효와 조절되지 않는 발효의 비교
플루란 생산에서 pH 6이 발효 전 기간 동안 최적 pH로 작용하는지 아니면 초기에만 영향을 주는지

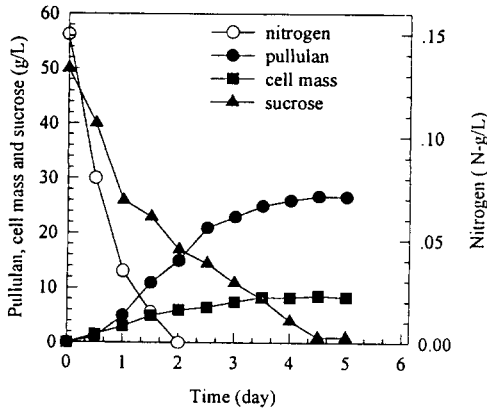


Fig. 9. Kinetics of pullulan fermentation at constant pH(6.0).

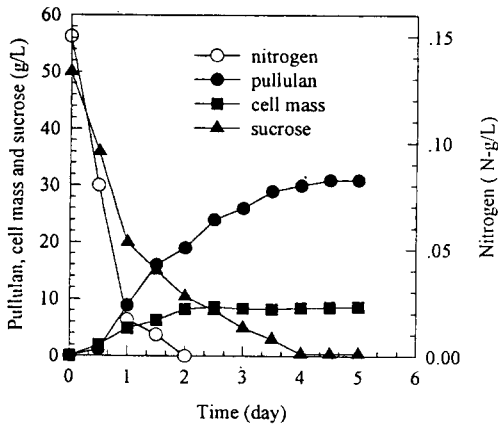


Fig. 10. Kinetics of pullulan fermentation with no pH control.

고찰하기 위하여 발효조 실험을 행하였다. Fig. 9와 Fig. 10은 질소원으로 peptone을 사용하여 비교한 결과로 pH를 조절할 때에는 질소가 1.5일째 0.02N-g/L 이하로 감소하지만 pH를 조절하지 않을 때에는 하루만에 0.02N-g/L 이하로 떨어지는 것으로부터 알 수 있듯이 질소원 소비가 빠르게 일어났다. 따라서, 미생물 성장도 빠르게 정상상태에 도달해 플루란 수율이 더 큼을 보인다. 결국 플루란 생산에서는 pH를 조절하지 않는 상태가 더 좋은 결과를 보임을 알 수 있다. 또, 플루란이 2차 대사물이라는 제안(18)은 본 연구와 이전의 연구(19)에 의해 증명되지 못했다. 플루란 합성은 초기 또는 정지 상에서

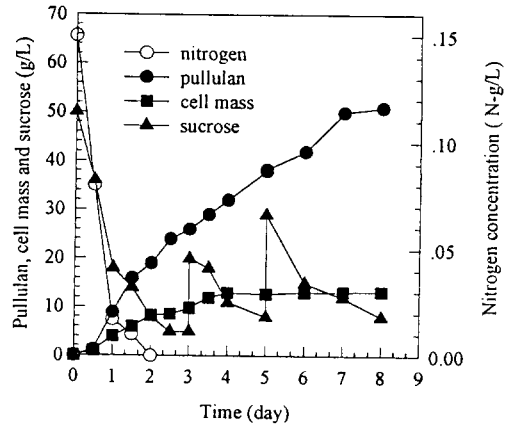


Fig. 11. Kinetics of fed-batch pullulan fermentation without nitrogen feeding.

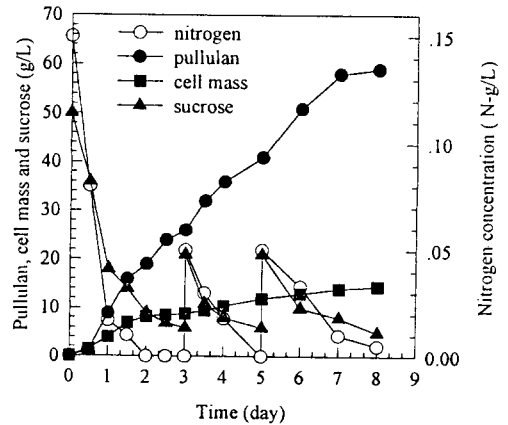


Fig. 12. Kinetics of fed-batch pullulan fermentation with nitrogen feeding.

만 합성되는 것이 아니라 질소원 소비와 더불어 시작된다고 할수 있다.

유가식 배양에서의 질소원의 영향

Fig. 11과 Fig. 12는 유가식 배양에서의 질소원의 영향을 검토한 것인데 발효 3일째와 5일째 각각 2차에 걸쳐 질소원이 제외되고 탄소원만 15g/L씩 첨가한 배지와 탄소원 15g/L에 질소원을 0.05N-g/L 씩이 함유된 배지를 주입한 결과이다. 이 결과는 유가식 배양중 질소원을 함유한 배지를 주입하였을때 플루란 생산량이 최종 60.5g/L로 질소원을 첨가하

지 않을때의 51g/L 보다 18.6% 향상을 보여 주었다.

요 약

본 연구에서는 질소원의 종류와 농도 그리고 pH가 플루란 생산에 미치는 영향을 고찰하였다.

*Aureobasidium pullulans*에 의한 플루란 생산시 가장 좋은 질소원으로는 수율 62%를 얻은 peptone 이었고, 최적 질소원 농도는 유기질소원의 경우 탄소원/질소의 비가 50/0.15N이었고 그 이상에서는 저해가 일어났다. 혼합질소원 I, II, III을 사용하였을 때 각각 29.1, 27.4, 26.5g/L의 플루란 생산량을 보였다. 그러므로, 혼합 질소원을 잘 이용하면 플루란을 효과적으로 생산할 수 있었다. pH를 조절하지 않을 때가 pH를 일정하게 할 때보다는 플루란 수율이 높았다. 또, 유기식배양시 탄소원과 질소원을 함께 공급하였을 때가 질소원만을 공급하였을 때 더 큰 플루란 수율을 보였다.

참 고 문 헌

1. B. Bernier(1985), *Can. J. Microbiol.*, **4**, 195.
2. J. E. Zajic and A. Leduy(1973), *Appl. Microbiol.*, **25**(4), 628.
3. J. E. Zajic(1976), U. S. Patent, 3,320,136.
4. J. E. Zajic and A. Leduy(1988), "pullulan", In Encyclopedia of polymer science and technology, 2nd ed. Wiley, New York. 13, 650.
5. 임성현, 손홍수, 정낙현, 양한철(1981), *Kor. Appl. Microbiol.*, **8**, 628.
6. M. Ashok and H. T. John(1989), *Biotechnol. Bioeng.*, **12**, 3, 219.
7. B. J. Catley(1981), *J. Gen. Microbiol.*, **120**, 265.
8. P. J. Heald and B. Kristiansen(1985), *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 1516.
9. A. Kato and S. Makoto(1973), U. S. Patent, 3,912,591.
10. K. Y. Lee(1991), "Optimization of Pullulan Fermentation Process", ph. D. Thesis, Seoul University.
11. B. J. Wiley, S. Arcidiacono, S. Sousa, J. M. Mayer, and D. L. Kaplan(1987), NATICK/TR-881012 : Order No. AD-A191040,2999.
12. 이기영, 김재형, 최웅, 유영제, 나건(1990), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 101.
13. Y. C. Shin, T. H. Kim, I. S. Lee, Y. N. Kim, and S. M. Baik(1987), *Biotechnol. Lett.*, **19**, 621.
14. M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, and F. Smith(1956), *Anal. Chem.*, **28**, 3, 150.
15. G. L. Miller(1959), *Analy. Chem.*, **31**, 261.
16. L. N. Strikar and R. Chandru(1983), *J. Food Technol.*, **18**, 261.
17. B. McNeil and B. Kristiansen(1990), *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 521.
18. M. A. Bulmer, B. C. Catley, and P. J. Kelly (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**, 362.
19. P. F. Desmond and J. S. Robet(1990), *Appl. Microbiol.*, **32**, 637.