

Pullulan 생합성에 대한 통기와 교반의 영향

양승남 · 백승우* · 김남기†

성균관대학교 화학공학과

*(주)두산 Venture BG BIOTECH BU

(2000년 2월 18일 접수, 2000년 5월 12일 채택)

Effect of Aeration and Agitation Rates on Pullulan Production

Seung Nam Yang, Seung Woo Beak* and Nam Ki Kim†

Department of Chemical Engineering, SungKyunKwan University, Suwon, Kyonggi 440-746, Korea

*Doosan Corporation Venture BG Biotech BU, Suji-Eup, Yongin-City, Kyonggi-Do 449-840, Korea

(Received 18 February 2000; accepted 12 May 2000)

요 약

Pullulan 생합성에 대한 통기와 교반의 영향에 대하여 알아보기로 *Aureobasidium pullulan* GM21을 이용하였다. 통기속도를 0.5, 1.0, 1.5 vvm으로 증가시켰을 때 pullulan의 최대 비생산속도는 0.022-0.082(hr^{-1})로 변화하였고, 최대 비성장속도는 0.20-0.25(hr^{-1})로 변화하였다. 25 °C, 1.5 vvm, 500 rpm으로 배양하였을 때 sucrose의 최대 전환 수율은 약 76%(38.29 g/L)이었다. 균체성장과 pullulan 생합성에 대한 교반의 효과는 1.5 vvm에서 교반속도를 200, 500, 900 rpm으로 변화시켜가면서 연구하였다. 균체성장은 500 rpm일 때가 가장 좋게 나타났다. 교반속도를 900 rpm으로 증가시켜도 pullulan의 생산량은 증가하지 않았다. 고농도 sucrose에 의한 기질저해효과를 극복하기 위해서 유가식 배양을 하였다. Sucrose가 감소하는 시기에 반연속적으로 기질을 공급함으로써 57.15 g/L의 pullulan을 생산할 수 있었다.

Abstract – The effects of aeration and agitation rates on the production of pullulan with *Aureobasidium pullulans* GM21 were studied. When it was cultured in jar fermentor at 25 °C, 1.5 vvm, and 500 rpm, maximum conversion yield of sucrose into pullulan was about 76%(38.29 g/L). As increase in the aeration rates 0.5, 1.0, and 1.5 vvm at 500 rpm, the maximum specific production rates of pullulan were increased from 0.022 to 0.082 (hr^{-1}), and the maximum specific growth rates of cell from 0.20 to 0.25(hr^{-1}). The effect of agitation rate on the cell growth and pullulan production was investigated by changing the agitation rates 200, 500, and 900 rpm at 1.5 vvm. 500 rpm was the most sufficient for the cell growth, but the pullulan was not more produced at 900 rpm. To overcome the inhibitory effect of the high sucrose concentration, fed-batch fermentation was introduced. By using fed-batch fermentation with two-intermittent additions of sucrose, 59.26 g/L of the pullulan was produced.

Key words : *Aureobasidium Pullulans* GM21, Aeration, Agitation, Specific Growth Rate, Specific Production Rate, Batch Culture, Fed-Batch Fermentation

1. 서 론

Pullulan은 불완전곰팡이의 일종으로서 일반적으로 흑효모라고 알려진 *Aureobasidium pullulans*에 의해서 생성되고 체외로 분비되는 생분해성 천연다당류의 한 종류로 maltotriose의 고분자로 형성되어 있다. Pullulan의 생합성 경로는 아직 잘 알려져 있지 않으므로, *A. pullulans*에 의한 pullulan의 생산 연구는 배양 생리학적 측면에서 연구되고 있다[1, 2]. Pullulan은 다른 어떤 다당류보다도 물에 대한 용해성이 뛰어나므로 tea bag이나 photosensitive resin 등과 같이 수용성 포장이나 coating 재료로 널리 사용될 수 있는 독특한 성질을 가지고 있다. Pullulan은 인체에 독성이 전혀 없으며 인체에 흡수되면 소화기관에서 분해가 거의 일어나지 않

때문에 저칼로리 식품첨가제로서 사용될 수도 있다. Pullulan은 화학적으로 합성된 고분자와는 달리 *Aerobacter aerogenes*가 분비하는 pullulanase나 *Aspergillus niger*가 분비하는 isopullulanase에 의해서 쉽게 분해되므로 환경오염의 문제가 없다[3, 4]. 이런 다양한 물성에 의해서 식품, 필름, 포장, 전자, 의료, 사진, 인쇄 등 적용범위가 넓으며 용도가 개발 및 개선됨에 따라 시장이 증가하는 추세에 있다[5]. 현재 세계시장은 일본에서 독점 공급 생산하고 있으며 국내에서는 전량 일본에서 수입하고 있는 실정이다.

Pullulan 발효는 호기성 발효로 교반속도나 배지의 pH, 질소원과 탄소원의 상대적 농도, O_2 전달 등과 같은 배양 조건에 따라 균체량과 pullulan 생산이 증가한다. Pullulan 생산은 반응이 진행됨에 따라 생물반응기내 용액의 점도가 증가함으로 교반이 곤란해지고, 용존산소량이 감소되어 pullulan 생산성이 떨어지게 되는데, 이 문제는 산소이용도

†E-mail: nkkimdr@hanmail.net

(oxygen availability)를 증가시킴으로써 해결할 수 있을 것으로 예측하여 최적 통기와 교반 조건을 구하고 최적의 발효조건을 연구함으로써, 가격 경쟁력이 있는 pullulan의 산업화 생산기술을 확보하고자 하는데 본 연구의 목적이 있다.

2. 실험

2-1. 사용균주

본 연구에서 pullulan 생합성을 위해 사용한 *A. pullulans* GM21 균주는 ATCC에서 분양받았다.

2-2. 배지 및 실험조건

A. pullulans GM21은 한천배지(pH7.5)에 접종하고 25 °C에서 3일간 배양하여 실험에 사용하였으며, 배지조성은 sucrose 5%, K_2HPO_4 0.5%, $NaCl$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.06%, yeast extract 0.1% (w/v)였다. 본 배양은 5 L 발효기(KFC)에 3 L의 배양액을 넣어 수행하였다. 접종은 전체의 10%(v/v)를 하였고, 통기속도는 0.5, 1.0, 1.5 vvm으로, 교반속도는 200, 500, 900 rpm으로 변화시켰다.

2-3. 건조 균체량과 pullulan 정량

균체량 측정은 배양액 10 mL을 8,000 rpm에서 20분 원심분리시켰으며, 상등액은 pullulan 정량 및 당분석에 사용하였다. 점도가 높아 균체 분리가 어려운 경우에는 배양액을 증류수로 2배 희석한 다음 원심분리시켰다. 침전된 균체를 증류수 10 mL에 현탁하여 1회 세척한 다음 70 °C에서 15시간 정도 건조시켜 건조무게를 측정하였다. Pullulan 농도는 균체가 제거된 배양액에 2배 부피의 에탄올을 첨가한 후 냉동실에 30분 정도 방치하여 다당류를 침전시킨 다음 6,500 rpm에서 원심분리시키고 상등액은 버렸다. Pullulan의 세척을 위해서 다시 에탄올을 가하고 원심분리시켰다. 원심분리후에 알코올액은 버리고 70 °C에서 15시간 건조시킨 후 무게를 측정하였다.

2-4. 당분석

잔여 sucrose 농도는 배양액을 원심분리한 상등액에서 채취한 시료 1 mL을 HPLC(Waters 510)를 사용하여 정량하였다[6].

3. 결과 및 고찰

3-1. 통기속도의 변화에 따른 pullulan 생산성 변화

Fig. 1과 2에서 볼 수 있듯이 0.5 vvm에서 균체량은 초기 24시간까지는 비교적 낮은 1.8 g/L의 균체농도를 보였지만 24시간이 지난 후부터는 균체의 성장속도가 증가하여 배양 3일만에 5.32 g/L의 최대 균체농도를 보였다. 탄소원은 배양 3일째가 되면 거의 다 고갈되어 균체의 성장은 더 이상 없었고, 배양 5일이 지난 후에는 점도가 점차 감소하므로서 pullulan이 분해되는 역반응이 진행됨을 알 수 있었으며, 이런 역반응이 진행되면서 균체가 pullulan을 탄소원으로 이용해 재 성장함을 보여주었다. 그 결과 0.5 vvm, 500 rpm에서 최고 27.19 g/L의 pullulan이 생산됨을 볼 수 있었다. 1.0 vvm과 1.5 vvm 두 경우에 있어서도 균체가 24시간이 지난 후부터 균체량이 증가함을 볼 수 있었다. 균체는 통기속도가 높을수록 성장이 더 활발하였으며 배양 96시간에 1.0 vvm에서는 14.86 g/L의

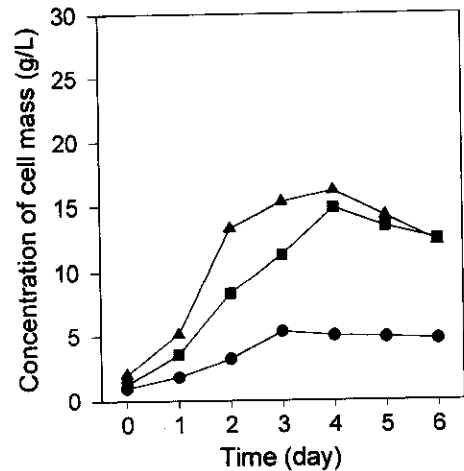


Fig. 1. Effect of aeration rates on the cell growth of *A. pullulans* GM21 at 500 rpm.

(●: 0.5 vvm, ■: 1.0 vvm, ▲: 1.5 vvm)

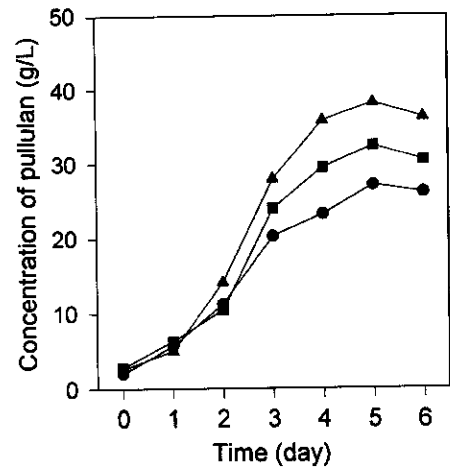


Fig. 2. Effect of aeration rates on pullulan production by *A. pullulans* GM21 at 500 rpm.

(●: 0.5 vvm, ■: 1.0 vvm, ▲: 1.5 vvm)

최대 균체농도를, 1.5 vvm에서는 16.16 g/L의 최대 균체농도를 보임을 알 수가 있었다. 생산되는 pullulan의 양도 역시 통기속도가 높을수록 증가함을 알 수 있었다. 즉 1.0 vvm에서는 최대 32.51 g/L의 pullulan, 그리고 1.5 vvm에서는 최대 38.29 g/L의 pullulan이 생산되었다. 즉 통기속도를 증가시킴으로써 산소 공급량을 증가시켰으며 이로 인하여 균체의 물질대사가 왕성해졌고 pullulan 생산량이 증가하였다.

Table 1에 균체의 성장속도와 여러 가지 정량적인 결과를 나타내었다. 통기속도를 0.5 vvm, 1.0 vvm 그리고 1.5 vvm으로 변화시켰을 경우, 균체량(X_{max})과 pullulan 수율($Y_{p/s}$)은 5.32, 14.86, 16.16(g/L) 그리고 0.54, 0.65, 0.76(g/g)으로 각각 변화하였고, 최대 비성장속도(μ_{max})는 0.20, 0.23, 0.25(hr^{-1})으로 변화하였다. 최대 비생산속도($q_{p,max}$)는 0.022, 0.071, 0.082(hr^{-1})까지, 생산성(productivity)은 0.23, 0.27, 0.32($g/L \cdot hr$)까지 증

Table 1. Kinetic and stoichiometric results obtained at the different aeration rates

| vvm | X_{max} (g/L) | P_{max} (g/L) | $Y_{x/s}$ (g/g) | $Y_{p/s}$ (g/g) | μ_{max} (hr^{-1}) | $q_{p,max}$ (hr^{-1}) | Productivity($g/L \cdot hr$) |
|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 0.5 | 5.32 | 27.19 | 0.11 | 0.54 | 0.20 | 0.022 | 0.23 |
| 1.0 | 14.86 | 32.51 | 0.31 | 0.65 | 0.23 | 0.071 | 0.27 |
| 1.5 | 16.16 | 38.29 | 0.32 | 0.76 | 0.25 | 0.082 | 0.32 |

Table 2. Kinetic and stoichiometric results obtained at the different agitation rates

| rpm | X_{max} (g/L) | P_{max} (g/L) | $Y_{x/s}$ (g/g) | $Y_{p/s}$ (g/g) | μ_{max} (hr ⁻¹) | q_{pmax} (hr ⁻¹) | Productivity (g/L · hr) |
|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| 200 | 8.06 | 23.23 | 0.16 | 0.47 | 0.21 | 0.034 | 0.19 |
| 500 | 16.16 | 38.29 | 0.32 | 0.76 | 0.25 | 0.082 | 0.32 |
| 900 | 11.19 | 28.37 | 0.22 | 0.57 | 0.28 | 0.062 | 0.25 |

가하였다. 통기속도의 증가에 의한 산소공급량의 증가는 pullulan 생산을 위한 균체들의 대사작용을 향상시키는 중요한 인자이다.

3-2. 교반속도의 변화에 따른 pullulan 생산성 변화

호기적 발효에서의 교반은 기체와 액체 사이의 계면적을 증가시키고, 통기율을 향상시켜 준다. 균체의 성장과 pullulan 생산에 있어서의 교반속도의 효과에 대하여 통기속도를 1.5 vvm으로 고정시킨 후, 200, 500, 900 rpm으로 교반속도를 변화시켜 가면서 연구를 하였다. 이때의 균체의 성장속도와 여러 가지 정량적인 결과를 Table 2에 나타내었다.

통기속도가 1.5 vvm 이하에서, 교반은 pullulan 생산을 증가시키는데 매우 중요한 요소로 작용을 한다. 즉, 통기속도를 변화시키는 것보다 교반속도를 변화시키는 것이 산소전달량의 증가 및 전단력의 작용 등 주요 인자들로 인하여 pullulan 생산에 차이를 나타낼 수도 있을 것이다. Fig. 3과 4를 보면 교반속도가 200 rpm에서 pullulan 생산량이 23.23 g/L 였던 것이, 500 rpm으로 교반속도가 증가함으로써 38.29 g/L의 pullulan을 생산하였다. 그러나 900 rpm으로 교반속도가 증가된 경우 균체의 벽이 파괴되는 등 균체의 사멸로 인하여 균체농도의 감소현상이 나타났고 pullulan 생산량도 더 이상의 상승 결과를 나타내지 못했다. 결국, 교반속도가 빠를수록 균체의 성장은 빨라졌지만, 빠른 전단속도 또는 큰 전단응력에 기인한 전체 균수중의 사멸된 균수의 증가를 초래하여서 겉보기 성장률이 증가한 것처럼 나타났으나 실 성장률은 감소하였다고 볼 수 있다. 그러나 pullulan의 점성 증가로 인하여 산소공급량이 감소하는 경우에 대처하는 이런 강한 교반은 주로, 균체의 성장이 일어나는 초기상태(24시간 이내)보다는 pullulan이 생산 축적되는 시기(24시간 이후)에 필요하다는 것을 의미한다.

3-3. 유가식 배양에 의한 pullulan 생산

Sucrose를 탄소원으로 사용하는 경우 5% 이상의 sucrose 농도에서는 *A. pullulans* GM21의 비성장속도와 pullulan의 비생산속도가 감소하는 문제가 있는데, sucrose에 의한 효과를 극복하고 생산성을 향상시킬 목

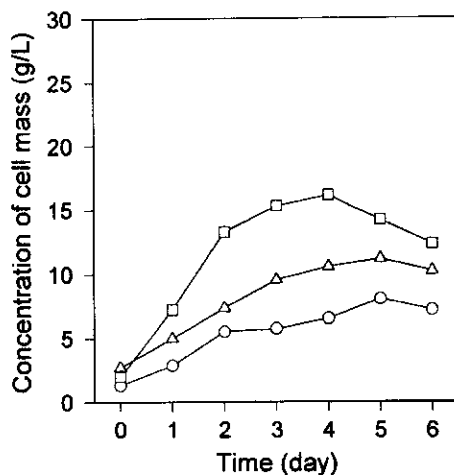


Fig. 3. Effect of agitation rates on the cell growth of *A. pullulans* GM21 at 1.5 vvm.

(○: 200 rpm, □: 500 rpm, △: 900rpm)

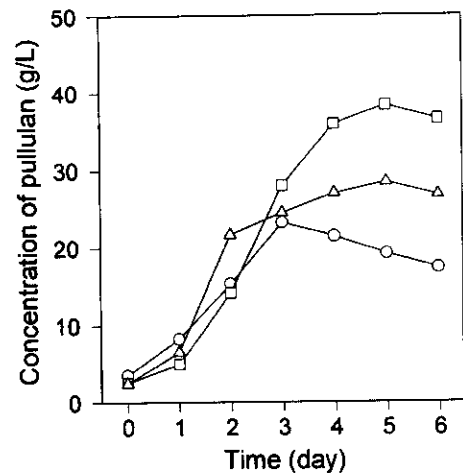


Fig. 4. Effect of agitation rates on the pullulan production by *A. pullulans* GM21 at 1.5 vvm.

(○: 200 rpm, □: 500 rpm, △: 900rpm)

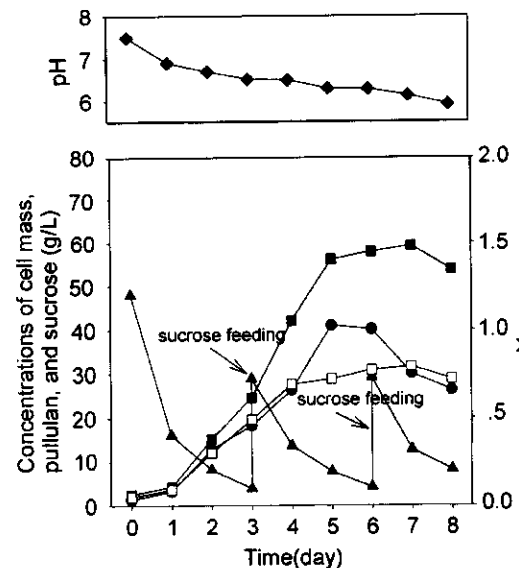


Fig. 5. Pullulan production with fed-batch fermentation.

(●: cell mass, ■: sucrose, ▲: pullulan, □: product yield; $Y_{p/s}$: pH)

적으로 유가식 배양(fed-batch culture)을 하여 배지내의 sucrose가 거의 소진되는 시기에 반연속적으로 5% sucrose를 500 mL씩 공급했다. 또한 첨가되는 소포제가 pH의 상승을 억제하고 생산촉진 효과도 있을 것으로 기대를 하여 소포제(다우코닝 DB-110A)도 첨가했다[7].

Fig. 5에서 보는 것처럼 배양 3일째에 균체농도는 18.25 g/L를, pullulan 생산은 24.59 g/L를 나타내었다. Sucrose를 공급한 후에 배양 5일째에 균체농도는 41 g/L까지 최대 성장을 하다가 이후에는 균체의 사멸로 인하여 차츰 감소하였고 배양 8일째에는 26.32 g/L까지 감소하였다. Pullulan 생산은 배양 7일째에 최대 59.26 g/L까지 증가를 하였으나 균체의 사멸, sucrose의 감소, 생성된 pullulan을 탄소원으로 이용하여 균체

가 재성장 하는 등 역반응이 진행됨에 따라서 pullulan이 감소하여 배양 8일째에는 53.77 g/L까지 감소를 하였다. 이때의 최대 pullulan 생산량은 Shin[5]의 결과(58.12 g/L)보다 증가(59.26 g/L)하였다.

4. 결 론

본 연구는 *A. pullulans* GM21을 사용하여 pullulan 생합성시 통기와 교반의 최적 조건을 구하기 위해서 통기속도와 교반속도를 바꾸어 가면서 pullulan 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 통기속도가 클수록 *A. pullulans* GM21의 성장이 더 활발하여 1.5 vvm, 500 rpm에서 16.16 g/L의 최대 성장을 보였고 이때 38.29 g/L의 최대 pullulan을 생산했다. 교반속도가 클수록 *A. pullulans* GM21의 성장은 빨라졌지만, 빠른 전단속도와 큰 전단응력에 기인한 균체의 사멸로 인하여 그 이상의 pullulan 생산성은 볼 수 없었다. 즉 pullulan 생산은 500 rpm에서 0.5 vvm에서부터 1.5 vvm까지 통기속도가 클수록 좋았다.

Pullulan의 유가식 배양의 결과 12.33 g/L의 균체농도와 59.26 g/L의 pullulan을 얻었지만 배양시간이 지남에 따라서 생산된 pullulan을 탄소원으로 이용하여 재성장하므로 pullulan의 생산은 증가하지 않았다. 이 때문에 배양 5일이 지난 후에는 sucrose를 공급한다고 해도 pullulan

생산에 그다지 큰 효과를 줄 수 없을 것이다.

참고문헌

1. Bender, H. and Wallenfels, K.: *Biochem. Z.*, **334**, 79(1961).
2. Wiley, B. J., Ball, D. H., Arcidiacono, S. M., Sousa, S., Mayer, J. M. and Kaplan, D. L.: *J. Environ. Poly. Deg.*, **1**, 3(1993).
3. Catley, B. J.: "Pullulan Synthesis by *Aureobasidium pullulans* in Microbial Polysaccharide and Polysaccharases," Academic Press, London, 69(1979).
4. Elionv, N. P. and Matveeva, A. K.: *Extracellular Glucan Produced by Aureobasidium pullulans Biokhimiya*, **37**, 255(1972).
5. Shin, Y.C., Kim, Y. H., Lee, H. S., Cho, S. J. and Byun, S. M.: *Biotechnol. Bioeng.*, **3**, 129(1989).
6. HPLC Applications, Macherey-Nagel, 254(1993).
7. Wiley, B. J., Arcidiacono, S., Sousa, S., Mayer, J. M. and Kaplan, D. L.: "Control of Molecular Pullulan Produced by the Fungus *Aureobasidium pullulans*," NATICK/TR-88/012-order No.AD-A191040, 29(1987).