

Bacillus polymyxa YU-101 균이 생산하는 생물고분자의 물성 특성

장재권*

청강문화산업대학교 푸드스쿨 식품영양전공

Rheological Property of Biopolymer Produced from *Bacillus polymyxa* YU-101

Jae-Kweon Jang*

Dept. of Food Nutrition, Chungkang College of Cultural Industries, Ichon, Korea

Abstract

For the study of the production and availability of biopolymer from *Bacillus polymyxa* YU-101, its rheological properties were investigated in comparison with other polysaccharides. The intrinsic viscosity of the biopolymer was 35.18 dL/g, showing the characteristics of the polyelectrolyte. The chain stiffness of the biopolymer was 0.55, which was expected to be extremely flexible, and the coil overlap parameter and the critical concentration were 0.722 and 0.15 dL/g, respectively. The activation energy of the biopolymer calculated by intrinsic viscosity showed two linear relationships at 50°C. Biopolymer showed pseudoplastic flow characteristics with increasing shear rate. At a concentration of 0.5% (w/w), the consistency index was 660.39 mPa·S and the flow behavior index was 0.765 and 0.4 at the shear rates of 0-11.7 s⁻¹ and 11.7-105.3 s⁻¹, respectively, similar to guar gum. At the shear rate of 58.5 s⁻¹, the apparent viscosity of the biopolymer with the change of pH showed an abrupt increase in the range of acidity. In addition, the apparent viscosity of the biopolymer showed the maximum value at the 0.3%(w/w) concentration of salt, increased only by sucrose in the tested sugars.

Key words: *Bacillus polymyxa* YU-101, biopolymer, rheological properties, viscosity

서 론

생명공학(biotechnology)의 발전과 함께 생물체에 의해서 생산되는 생물고분자, 특히 탄수화물 고분자와 이의 유도체들인 다당류는 일반적으로 10개 이상의 단당 그리고 여기에 우론산(uronic acid) 등의 유기산이나 아미노당 등으로 수식된 생체 고분자 화합물이다. 분자량, 구성당의 종류, 결합순서, 결합양식, 결합위치 및 분지(branching) 유무 등에 따라 많은 종류가 존재하며 그 기원에 따라 식물, 동물 및 미생물 다당류로 구분한다(Sinskey et al., 1986). 이들 생물고분자는 주로 식물 및 미생물에 의해서 생합성되는데 미생물이 생산하는 다당류 또는 이의 유도체는 이미 알려진 식물 또는 해조류 유래의 천연다당류나 기타 합성 고분자와는 달리 독특한 기능성과 생리활성을 나타내며 적당한 생산균주의 선택 및 배양방법의 개발로 대량생산이

가능하여 산업적으로 많은 관심을 받고 있다. 특히 바이오 의약품의 응용은 물의 rheology를 바꿀 수 있는 능력이나 그들의 특수한 생물학적 활성에 의존되는 데, 이러한 연구들은 미생물학, 미생물 유전학, 재조합 DNA 기술과 같은 새로운 미생물학적 기술의 인식에 기초를 두고 있기 때문에 다당류 용액의 점성(viscosity)에 높은 관심을 가지고 있다. Biopolymer들은 특수한 조건하에서 water holding capacity, moisturizing effect, thickening, lubrication, adhesion, coating, drag reduction, shape retention 등과 같은 기능적 특성을 갖는다(Mitchell, 1980). Hyaluronic acid는 안과 수술용 viscosurgery 및 류마티스 치료의 lubricant로 이용될 수 있으며, *Pseudomonas elodea*로 부터 생산되는 gellan gum은 신규 hetero 다당으로 agar 대용의 겔화제로서 사용될 수 있다. 그리고 gellan gum과 유사한 구조인 wellan 및 rhamsan gum도 각각 안정제 및 비료 현탁제로의 용도가 개발되었고, *Leuconostoc mesenteroids*의 유전자 조작에 의한 변이주로부터 생산한 Dextran (R4)도 식품, 화장품, 의약품등에서 우수한 성능의 신소재로서 사용될 수 있음이 밝혀졌다. 다당류는 젤형성능, 유화안정력 및 표면장력의 조절능, 물흡수능, 접착능, 필름형성능 등의 광범위한 기능특성을 가지며 수용액의 rheology적 성질을 크게 변화시킴으로서 그 특성에 따라 각종 공업에서 광범위

*Corresponding author: Jae-Kweon Jang, Department of Food Nutrition, Chungkang College of Cultural Industries, 389-94, Chungkang-gachang-Ro, Haewol-Li, Majang-Myeon, Ichon-Si, Kyunggi-Do 17390, Republic of Korea
Tel: +82-31-639-5905; Fax: +82-31-639-5929
E-mail: jkjang@ck.ac.kr
Received March 12, 2019; revised April 25, 2019; accepted May 1, 2019

하게 사용되고 있다. 선박의 난류억제(drag reduction), 대규모 집적회로에서의 광저항성(photo-resist) 및 초전도 복합소재(super conducting composite material)에도 응용되고 있다. 또 상처치료, 암 치료 및 각종 세균 질병의 진단 예방과 관련되는 바이오 의약품의 소재와 같은 부가가치성 높은 용도적성도 발견되어 그 중요성은 더욱 고조되고 있다(Sandford & John, 1982; Wang et al., 2016). 새로운 생물고분자 생산에 관한 연구는 유용물질생산의 국산화 측면에서는 물론, 신물질 개발의 균형 있는 발전을 위해서도 그 필요성은 매우 높다고 할 수 있다. 본 연구는 *Bacillus polymyxa* YU-101 균주로부터 생합성된 생물고분자의 물성특성을 파악하기 위하여 수행된 것이다.

재료 및 방법

균주의 배지조성 및 배양

본 실험에 사용한 전배양 및 생산용 배지는 가용성 전분 2%, soybean meal 1%, KH₂PO₄ 0.2%, MgSO₄ 0.1%, NaCl 0.2%, CaCO₃ 0.2%로 조성한 배지를 121°C에서 15분간 가압 살균하여 사용하였다. 접종균의 전배양은 균주를 배지 20 mL를 함유한 100 mL 삼각플라스크에 1 백금이 접종하고 30°C에서 12시간 진탕배양 하였다. 본 배양은 생산용 배지 50 mL를 함유한 250 mL 삼각플라스크에 전배양액을 3%(v/v) 접종한 후, 30°C에서 120 rpm으로 2일간 진탕배양 하면서 행하였다.

Crude biopolymer(조생물고분자)의 분리 및 정제

배양액을 3배 희석하고 9,000 g의 원심력으로 60분간 원심분리 하여 균체를 제거하였다. 상등 액에 3배 부피의 isopropyl alcohol (IPA)를 첨가하여 교반으로 휘저으면서 고점성의 섬유상 집합체를 얻은 후 vacuum으로 건조하고 반복과정을 한 번 더 거친 후 crude biopolymer로 하였다(Minakami et al., 1984).

모세관 점도계에 의한 고유점도 측정

시료 액의 조제

시료 액의 조제는 시료고분자에 증류수를 가하여 0.025-0.1 g/dL의 농도범위로 균일하게 용해시킨 시료 액을 사용하였다.

용액특성의 측정

시료 액의 용액특성 측정은 4-80°C로 유지한 항온수조(ThermoFisher Scientific SC160, Waltham, MA, USA)에 모세관 점도계(Canon-Fenske size 200-350, Cannon Instrument Co., State College, PA, USA)를 이용하여 점도를 측정하였다. 즉, 일정량(10 mL)의 시료액을 점도계에 넣고 20분간 열평형 시킨 다음 시료 액이 유하하는 시간을 측정하여 점

도를 구하였다. 시료의 상대점도는 위의 방법을 이용하여 측정된 유하시간과 밀도를 식 (1)에 대입하여 구하였다.

$$\frac{\eta_{\text{sample}}}{\eta_{\text{ref}}} = \frac{\rho_{\text{sample}} \times t_{\text{sample}}}{\rho_{\text{ref}} \times t_{\text{ref}}} \quad (1)$$

여기서, η_{ref} (reference viscosity)와 η_{sample} 은 각각 glycerol의 절대점도(η_{ref})와 시료용액의 상대점도(η_{sample} 또는 η_{rel})이고, ρ_{ref} 와 ρ_{sample} 은 각각 glycerol 및 시료용액의 밀도이며, t_{ref} 및 t_{sample} 은 glycerol과 시료용액의 유하시간이다.

비점도(η_{sp} (specific viscosity))와 환원점도(η_{red} (reduced viscosity))는 위에서 구한 시료용액의 상대점도로부터 각각 (2) 및 (3)에 의하여 구하였다.

$$\eta_{\text{sp}} = \eta_{\text{rel}} - 1 \quad (2)$$

$$\eta_{\text{red}} = \eta_{\text{sp}}/C \quad (3)$$

C는 시료의 농도(g/dL)이며, 고유점도는 식 (4)의 Huggins 식(Krigham & Flory, 1953)에 의하여 산출하였다.

$$\eta_{\text{sp}}/C = [\eta] + K'[\eta]^2C \quad (4)$$

여기서 $[\eta]$ 는 시료의 고유점도이고 K'은 Huggins상수이다. 시료농도에 대한 환원점도를 도시하여 얻어지는 직선의 절편 및 기울기 값으로부터 각각 $[\eta]$ 와 $K'[\eta]^2$ 을 구하였으며, 이로부터 고유점도와 Huggins 상수를 구하였다. 고유점도의 측정은 3회 반복하여 측정하였으며 결과 값의 표준편차는 $\pm 1.5-2.8$ 의 범위에 있었다.

Chain stiffness의 산출

Biopolymer 시료용액의 chain stiffness는 식 (5)의 Smidsord와 Haug의 식(Smidsord & Haug, 1971)에 의해 계산하였다.

$$[\eta] = A1 + B[\eta]_{0.1}^{1.3}Cs^{-1/2} \quad (5)$$

(A1은 상수 B는 chain stiffness, $[\eta]_{0.1}$ 은 이온강도 0.1 M NaCl 용액에서의 고유점도, Cs는 NaCl 농도이다)

Coil overlap parameter의 산출

Biopolymer의 coil overlap parameter($C^* \cdot \eta$)는 Morris와 Ross-Murphy의 방법(Morris & Ross-Murphy, 1981)에 따라 Log η_{sp} 와 Log $C \cdot \eta$ 관계의 기울기가 서로 달라지는 두 직선의 변곡점에 일치하는 Log $C^* \cdot \eta$ 값으로부터 산출하였다.

활성화 에너지

Biopolymer 유동특성에서 온도의존성에 대한 활성화 에너지는 식 (6)의 Arrhenius식에 의하여 계산하였다.

$$\eta = A_0 \exp(-E_a/RT) \quad \text{또는} \quad \eta = \log A_0 - E_a/2.303RT \quad (6)$$

여기서 η 는 고유점도(intrinsic viscosity, dL/g), A_0 는 빈도 인자(frequency factor, dL/g), E_a 는 활성화 에너지(activation energy, Kcal/g·mol), R 은 기체상수(gas constant, Kcal/g·mol·K), T 는 절대온도(absolute temperature, K)이다. 즉, $\log \eta$ 와 $\log 1/T(K^{-1})$ 의 직선관계로부터 직선의 기울기($-E_a/2.303R$)를 구하여 이로부터 활성화 에너지를 계산하였다 (Morris et al., 1980a).

회전 점도계에 의한 점도 측정

시료액의 조제

Crude biopolymer 시료에 증류수를 가하여 0.25-1% 농도범위의 현탁액을 만들고 1N NaOH 또는 1N HCl로 pH를 조절하여 시료 액으로 하였다. 한편 염류는 NaCl과 $CaCl_2$ 를 사용하여 농도별로 시료 액에 첨가하여 조제하였다.

Rheology 특성의 측정

시료 액의 rheology 측정은 회전점도계인 Haake Rotovisco RV 100 (Haake Buchler Instruments Inc., Saddle Brook N.J.)을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 측정용 컵에 시료 액을 40 mL를 넣고 측정온도를 4-80°C 범위의 일정온도를 유지한 온도조절 용기에서 10분간 열평형 시킨 후 0-50 rpm의 회전속도 변화에 따른 항복응력(shear stress, Pa), τ 의 변화를 자동기록 하였다.

Rheology 특성값의 산출

Rheology 특성 값은 Herschel-Bulkley (Kim et al., 1990, Lee et al., 1992)의 식 (7)식을 이용 하였는 데, 식 (7)에 대수를 취하여 식 (8)를 얻은 다음, $\log D=0$ 일 때의 절편 값과 직선의 기울기로부터 특성값을 구하였다. 항복응력(τ_y , yield stress)은 Casson model 식(Yoon & Goo (1994))인 식 (9)로 부터 계산하였다.

$$\tau = \tau_y + KD^n \quad (7)$$

$$\text{Log}(\tau - \tau_y) = \log K + n \log D \quad (8)$$

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_y} + K\sqrt{D} \quad (9)$$

여기서 τ 는 전단력(shear stress, Pa), τ_y 는 항복응력(yield stress, Pa), D 는 전단속도(shear rate(1/s)), K 는 점조도지수(consistency index, Pa·sⁿ), n 은 유동거동지수(flow behavior index, n)이다.

기능 특성의 관찰

염류와의 상용성

1%의 시료액에 NaCl, $CaCl_2$ 를 농도별(0.1-3%, w/w)로 첨가하고 pH의 변화에 따른 겔의 형성유무를 관찰하였다 (Pettit, 1982).

유화안정성

증류수와 대두유의 1:1 혼합물에 0.3%의 시료고분자, xanthan, sodium alginate 및 tween 80을 각각 첨가하여 상온에서 30분 간 균질화하여 각각의 유화액 10 mL를 시험관에 취해 시간경과에 따른 유화 안정성을 시험관 유화액 길이(cm)에 대하여 분리된 길이(cm)의 비율로 판단하였다 (Tako et al., 1977).

Cd 제거능

중금속 중 카드뮴(Cd)의 제거능은 Cd^{++} 5 ppm 용액 40 mL에 Biopolymer 0.2% 용액 10 mL를 첨가한 후 35°C에서 250 rpm으로 진탕하면서 평형에 이를 동안 실시한 후, 침전물을 12,000 rpm에서 원심분리하여 제거하고 상등액에 남은 Cd^{++} 의 양을 측정하였다. Cd^{++} 의 양은 microwave digestion system (Prolabo Co., France)에서 황산과 질산으로 전 처리한 액을 증류수 50 mL로 정용한 다음 ICP-MS (ELAN 6100 DRC II, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 214.438 nm의 파장에서 분석하였다. 표준시약은 1,000 ppm (Accustandard, New Haven, CT, USA)의 Cd 용액을 사용하였으며 시료의 이동과 분석에는 아르곤 가스를 사용하였다.

결과 및 고찰

Biopolymer의 고유점도(Intrinsic viscosity)

IPA로 정제하고 투석한 고분자의 농도에 따른 환원점도(reduced viscosity)의 변화는 Fig. 1과 같으며, 본 실험의 고유점도의 측정에 대한 정확성을 검증하기 위해 20 dL/g로 보고된 xanthan gum (Rinaudo & Milas, 1978)도 함께 측정하였다. Huggins 식에 의하여 y절편 값으로부터 산출한 고유점도 값은 biopolymer가 35.18 dL/g으로, 측정된 xanthan gum의 19.32 dL/g의 고유점도 값보다 큰 값을 나타내었다. 본 biopolymer의 고유점도를 여러 다당류들과 비교해보면 guar (15-19.2 dL/g), CMC (14.4 dL/g), locust bean (16 dL/g) (Elfak et al., 1977; Rao et al., 1981), sodium alginate (31 dL/g)의 다당류들보다는 큰 값이었고, NaCMC (125 dL/g), κ -carrageenan (42 dL/g) (Elfak et al., 1977), gellan (39.4 dL/g), wellan (137.4 dL/g), rhamsan (88.5 dL/g) (Rinaudo & Milas, 1978)의 다당류들 보다는 작은 값의 범위였다.

pH와 NaCl에 대한 biopolymer의 고유점도 변화

투석(dialysis)을 행하고 정제본 고분자의 pH에 따른 고유점도의 변화를 살펴본 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 고유점도는 중성 pH에서 가장 높은 값을 보였고 산성 및 알칼리성 부근에서는 급격한 감소를 보였다. 일반적으로 대표적인 산성고분자인 xanthan gum은 구성당 잔기의 pyruvic

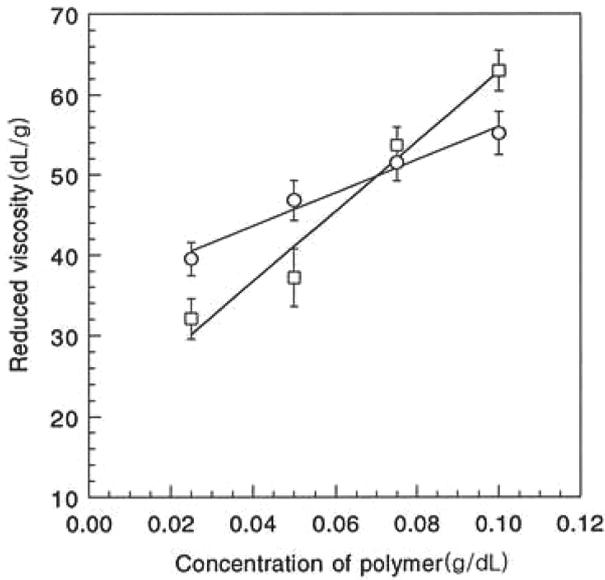


Fig. 1. Variation of reduced viscosity according to concentration of biopolymer and xanthan gum (○: biopolymer, □: xanthan gum).

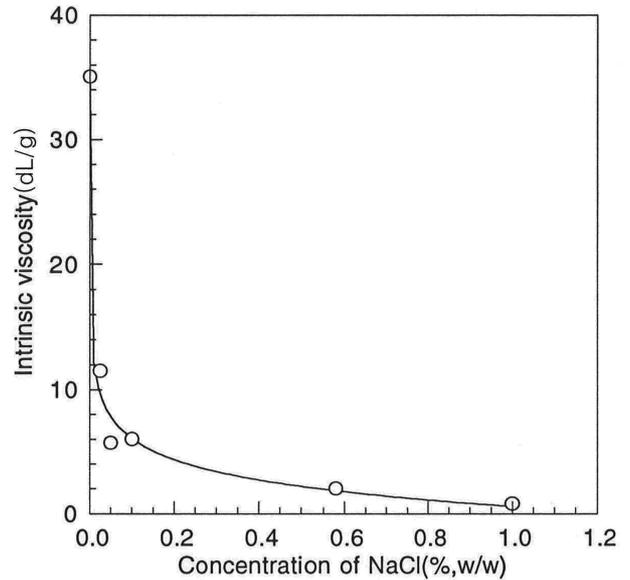


Fig. 3. Changes in the intrinsic viscosity of biopolymer solution by increasing NaCl concentration.

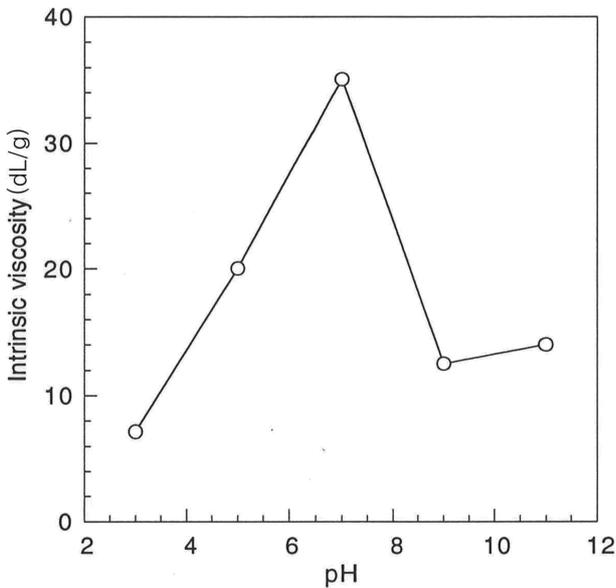


Fig. 2. Effect of pH on the intrinsic viscosity of biopolymer in aqueous solution.

acid의 pH가 3으로서 3이하의 pH에서는 이온화가 되지 않아서 정전기적 반발이 일어나지 않아 사슬의 긴장을 일으키지 않기 때문에 점도가 급격히 감소하는 것으로 알려져 있다(Rinaudo & Milas, 1978). 17.5%의 uronic acid를 보유하고 있는 본 biopolymer도 중성 pH 부근에서 산성고분자임을 나타내는 가장 높은 고유점도 값을 보였다. 고유점도에 대한 biopolymer의 NaCl 농도의 영향을 살펴본 결과는 Fig. 3과 같다. 0.005 M의 NaCl 농도에도 급격한 점도의 저하를 보여 대부분의 다가전해질의 산성고분자와 비

슷한 특성을 나타내었으며 NaCl 농도의 증가에 따라 고유점도가 감소하는 경향을 보였다. Lang과 Rha(1981)는 염이 다가전해질을 차폐(shielding)시키기 때문인 것으로 설명하였으며 Nakamura 등(1987)도 다가 고분자 전해질은 charge 이온들 사이에 정전기적 반발이 존재하여 비이온성 고분자보다 더 팽창된 구조를 가지는데 용액의 이온강도가 증가함에 따라 반발이 감소하여 점도가 감소한다고 하였다.

Biopolymer의 chain stiffness

NaCl의 농도($Cs^{-1/2}$)에 따른 고유점도 값의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. 직선의 기울기로부터 chain stiffness B값을 구한 결과 0.55이었으며, 다른 다당류들과 비교하여 Table 1에 나타내었다. Lang 등(1982)의 보고에 의하면 다가전해질 다당류의 Chain stiffness 특성 값은 0.05-0.24 범위이며 이 값이 작을수록 rigid rod 한 형태를 가지고 클수록 flexible 하다고 하였다. 따라서 본 biopolymer의 사슬형태는 기존의 다당류 보다 flexible 할 것으로 판단되었다.

Biopolymer의 coil overlap parameter와 임계농도

Biopolymer의 coil overlap parameter $C^* \cdot [\eta]$ 를 구하기 위하여 $\log \eta_{sp}$ 와 $\log C \cdot [\eta]$ 관계를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5의 변곡점으로 부터 구한 coil overlap parameter 값은 0.722였으며 이로부터 구한 임계농도(C^*)는 0.15 dL/g 이었다. 다당류들에 대한 coil overlap parameter ($C^* \cdot [\eta]$) 값들은 3-6의 범위(Morris et al., 1980b)로, 본 연구에서의 biopolymer의 coil overlap parameter ($C^* \cdot [\eta]$) 값은 보고된 값들보다 작았다. 임계농도(C^*)는 welan gum의 0.056 g/dL, xanthan gum의 0.024 g/dL, rhamosan gum의 0.025 g/dL

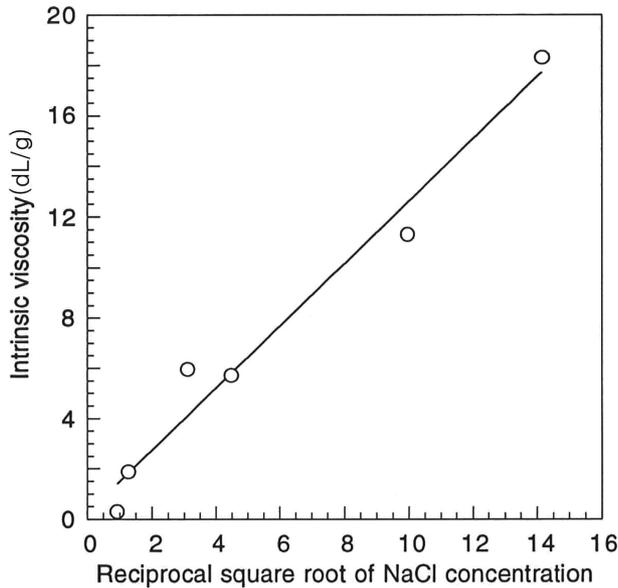


Fig. 4. Ionic strength dependence on intrinsic viscosity of biopolymer solution.

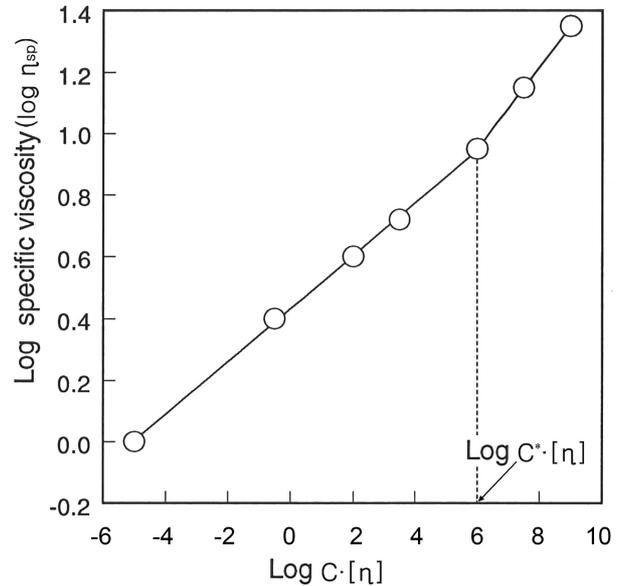


Fig. 5. Plot of log specific viscosity (η_{sp}) and log $C \cdot [\eta]$ for coil overlap parameter of biopolymer solution.

Table 1. Chain stiffness parameter of gums

Biopolymer	0.555	
Zooglan	0.02	Nakamura et al., 1987
Alginate	0.04	Smidsord & Haug, 1971
Sodium Pectinate	0.04	Smidsord & Haug, 1971
Carboxymethyl cellulose	0.05	Trivedi & Patel, 1982
Xanthan	0.05	Rinaudo & Milas, 1978
Chitosan	0.06	Signini et al., 2000
Hyaluronic acid	0.07	Lang et al., 1982
Carboxymethylamylose	0.2	Patel et al., 1967
Dextran sulfate	0.23	Smidsord & Haug, 1971

(Launay et al., 1986; Hwang & Shin, 2000; Jampen et al., 2000)의 값들 보다는 큰 값이어서 분자 개개의 물리적 접촉으로 일어나는 entanglement의 시작은 이러한 다당류들 보다는 높은 농도에서 시작될 것으로 판단되었다.

Biopolymer의 고유점도 측정에 의한 활성화 energy

4°C에서 80°C까지의 온도범위에서 $\log(\eta)$ 와 $1/T$ 의 관계를 Fig. 6에 나타내었다. 50°C를 전후로 9.55, 3.55 Kcal/gmol의 서로 다른 활성화 에너지를 나타내었다. Tako 등 (1977)은 두 가지의 직선관계는 굴절점에서 다당 분자사슬의 입체구조가 변화하기 때문이라고 하였다. 본 biopolymer의 경우도 50°C에서 분자사슬의 입체구조가 달라질 것으로 예상되었다.

회전점도계에 의한 biopolymer의 유동거동

0.5%(w/w) 용액의 농도에서 biopolymer, guar gum, xanthan gum, carrageenan gum을 20°C에서 회전점도계로

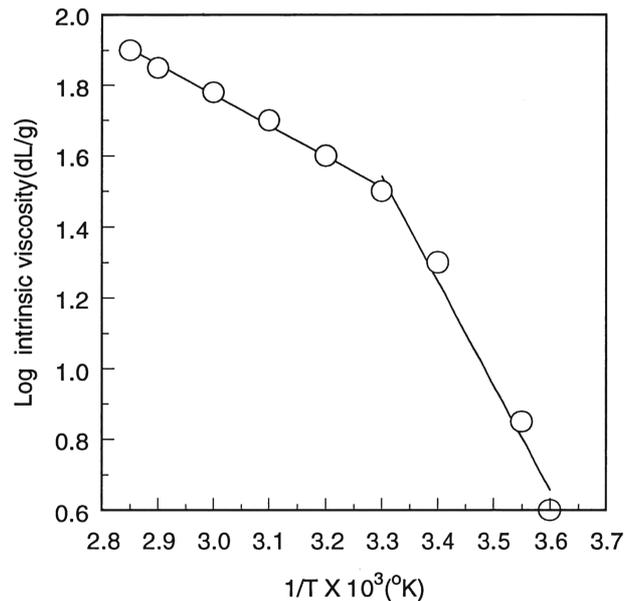


Fig. 6. Arrhenius plot of biopolymer solution.

전단속도(shear rate, D) 0-105 s⁻¹에 따른 전단 응력의 변화를 측정된 결과를 Fig. 7(A)에 나타내었다. Carrageenan gum은 원점을 지나면서 직선에 가까운 뉴우튼 유체(newton fluid)로서 거동하였고 biopolymer와 guar gum과 xanthan gum은 비뉴우튼 유체(pseudoplastic fluid)의 거동을 나타내었다. 다당류에 당 잔기가 결합되어있는 경우는 뉴우튼 유체의 거동을 보이며, 당 잔기가 없는 선형구조로 되어있는 다당류의 경우는 비뉴우튼 유체의 거동을 보인다고(Tako et al., 1977) 알려짐에 따라 본 biopolymer는 guar gum과 xanthan gum처럼 당 잔기가 결합되어 있을 것으로 판단되

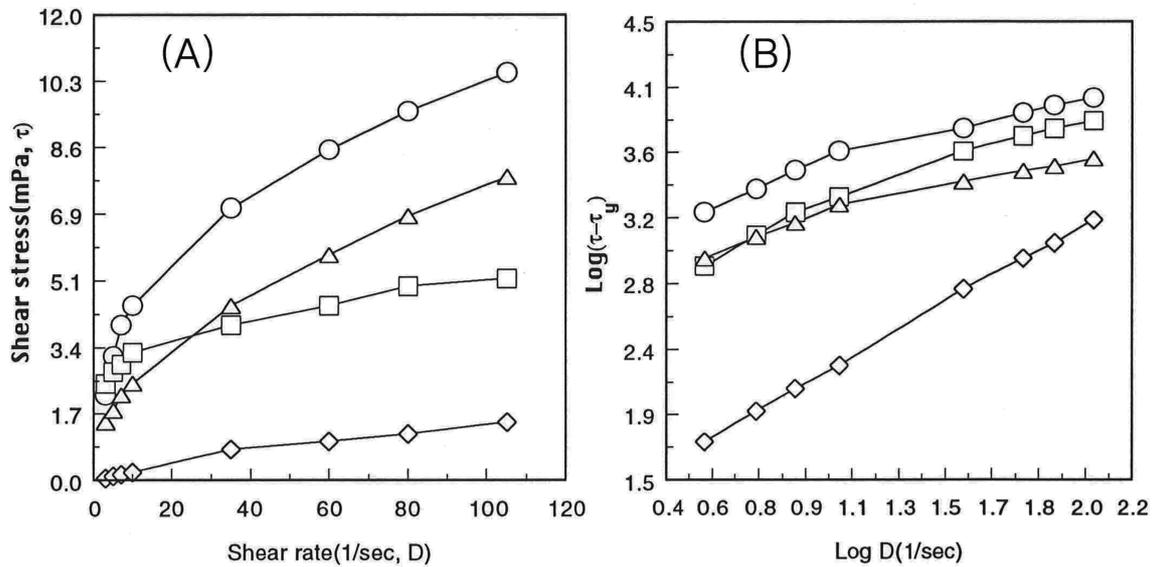


Fig. 7. Flow curve of shear rate vs shear rate (Fig. 7A) and plot of $\log(\tau - \tau_y)$ vs $\log D$ (Fig. 7B) of biopolymer and other gums at 0.5% solution (\circ : biopolymer, \square : guar gum, \triangle : xanthan gum, \diamond : carageenan gum).

Table 2. Calculated rheological parameters for 0.25, 0.5% solution of biopolymer and other gums

Materials	Concentration (%, w/w)	Rheological parameter			
		Consistency Index K (mPa·S)	Flow Index, n		Yield Stress τ_y (mPa)
			Shear rate 3.51-11.7 (s^{-1})	Shear rate 11.7-105.3 (s^{-1})	
Biopolymer	0.25	101.82	0.748		82.35
	0.5	660.39	0.765	0.430	467.94
Guar gum	0.25	42.36	0.792		11.75
	0.5	382.80	0.741	0.526	269.49
Xanthan gum	0.25	159.38	0.566	0.507	774.87
	0.5	483.88	0.590	0.329	1409.62
Carageenan gum	0.25	2.32	1.10		0
	0.5	11.71	0.960		0
Hyaluronate	0.25	119.83	0.921	0.716	4.92
	0.5	464.16	0.859	0.587	75.50

었다. 또한 Casson 식에 따라 항복응력(yield stress, τ_y)을 구한 후 시료의 전단응력에서 항복응력을 뺀 차이 값과 전단속도(shear rate)와의 관계를 Fig. 7(B)에 나타내었다. 또한 Herschel-Bulkely 식에 의해 0.25%, 0.5% 농도의 용액에서의 기울기와 $\log D = 0$ 일 때의 절편 값으로부터 각각 유동저항지수(n) 값과 점조도지수(K) 값을 계산하여 Casson 식으로부터 계산한 항복응력 값(τ_y)과 함께 Table 2에 나타내었다. 시료들은 0.5% 농도에서는 전단속도 $11.7 s^{-1}$ 를 기점으로 $0-11.7 s^{-1}$ 의 범위와 $11.7-105.3 s^{-1}$ 의 범위로 나누어져 carrageenan gum을 제외하고 모두 2개의 직선관계를 갖는 비뉴우튼성 유동을 보였으며 0.25% 농도의 다당류들은 xanthan gum 만이 $11.7 s^{-1}$ 을 기준으로 2개의 직선관계를 보여 xanthan은 0.25%의 농도에서도 비뉴우튼성 유동을 보임을 알 수 있었다. 이러한 기울기의 변화는 전단속

도의 증가에 따른 응집구조의 파괴로 인한 shear thinning 현상으로 보고(Tako et al., 1977)되고 있으며, 이 shear thinning은 비대칭분자의 배향성이 증가하거나 flexible 한 분자들의 형태변화 및 분자 간 인력 등의 요소들 때문으로 생각되고 있다. 또한 입자간 2차 결합력 등의 구조형성 능력과 관련을 갖는 항복응력값(τ_y)은 xanthan gum, biopolymer, guar의 순이었으며 점조도지수(K) 값은 0.5%의 농도 일 때 본 biopolymer가 $660.39 mPa \cdot s$ 로 실험한 다당류들 중 가장 큰 값을 나타내었다. Lee 등(1996)은 고분자 용액의 항복응력 값은 입자간 2차 결합력 등 구조형성능력과 밀접한 관련을 갖는 값으로, 고분자 용액의 농도가 증가할수록 분자간의 엉킴 밀도가 증가하고 이러한 엉킴의 정도에 따라 외부에서 가해지는 힘에 대한 반응이 다르게 나타나게 되어 분자간의 엉킴 밀도가 커짐에 따라 항복응력 값도 증가

하는 것으로 설명하고 있다. 또한 유동지수 n 값은 농도가 높아질수록 0.85-0.69로 점차 감소하여 농도가 높을수록의 가소성이 강해지는 경향을 보이는 데, 고분자 분자사슬의 농도증가에 따른 엉킴 밀도 증가 하여 고분자의 분자사슬의 운동성이 방해된다고 하였다. 식감에 대한 유동지수(n)와의 관련성에 있어서 Szczesniak과 Farkas(1962)는 유동지수 n 값이 높을수록 입안에서 slimy 한 느낌을 받으며 유동지수 n 값이 낮을수록 clean mouth feel을 느낀다고 하였다. 본 biopolymer의 유동지수 n 값은 전단속도 11.7 s^{-1} 의 전 후로 0.765, 0.43으로 guar gum과는 유사하나 xanthan gum 보다는 높은 값으로 다소 입안에서 clean mouth feel을 느끼게 할 것으로 생각되어진다. 또한 biopolymer는 0.75% 이상의 농도에서는 상온에서 증류수에 용해하는 것만으로도 gel을 형성하는 독특한 성질을 보였다.

고분자 다당류의 온도에 대한 겔보기 점도의 변화를 살펴보기 위하여 0.5% 농도에서 biopolymer, xanthan gum, guar gum 용액을 4-80°C의 온도범위에서 회전점도계를 이용하여 전단속도 58.5 s^{-1} 에서 겔보기 점도를 측정된 결과를 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 8에서 볼 수 있는 바와 biopolymer는 온도변화에 안정한 xanthan gum과 겔보기 점도가 감소하는 guar gum보다도 겔보기 점도의 감소폭이 온도가 증가함에 따라 확연하게 컸다. 이와 관련된 활성화 에너지의 값(9.55 Kcal/g.mol (Fig. 6))도 sodium alginate (5.0 Kcal/g.mol) 및 locust bean gum (6.87 Kcal/g.mol) (Tako et al., 1977)보다도 큰 값이어서 온도에 대한 의존성이 높음을 알 수 있었다. 또한 본 연구의 biopolymer는 농도 0.5%(w/w)에서 4-80°C의 실험온도범위에서 낮은 온도범위인 4°C에서는 약한 gel을 형성하는 특성도 보였다.

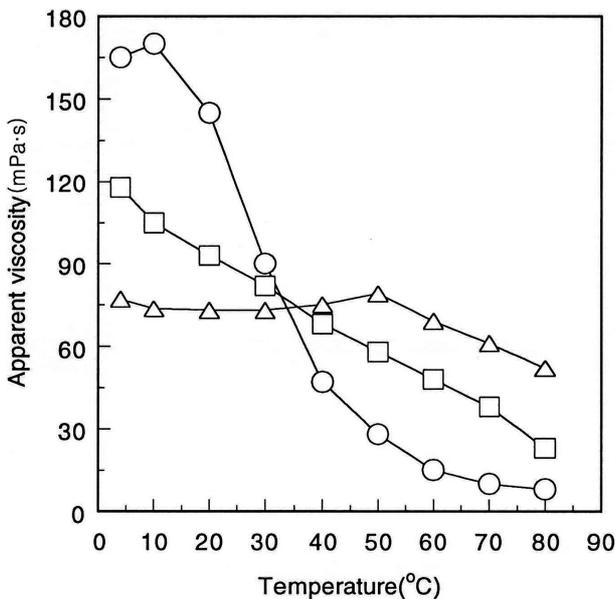


Fig. 8. Effect of temperature on apparent viscosity of biopolymer and gums of 0.5% solution at shear rate (D) 58.5 s^{-1} (○: biopolymer, □: guar gum, △: xanthan gum).

고분자 다당류 0.5%(w/w)의 농도에서 biopolymer, guar gum, xanthan gum의 전단속도(D) 58.5 s^{-1} 에서의 겔보기 점도에 대한 pH의 영향을 Fig. 9에 나타내었다. Guar gum과 xanthan gum은 pH의 변화에 따라 겔보기 점도의 변화가 거의 없으나 본 biopolymer는 pH가 낮아질수록 겔보기 점도가 증가 하는 경향을 보였으며 pH 3에서 약한 gel을 형성하면서 급격한 점도의 증가현상을 보였다. 이러한 현상은 CMC, sodium alginate 등의 대부분의 산성고분자가 산성 및 알칼리성에서 점도가 감소하는 경향과 다른 경향이였다. 이러한 겔보기점도의 결과는 고유점도실험에서 산성에서 분자상호간 전기적 반발의 감소로 점도가 감소하는 경향과는 다르게 나타난 현상으로, Morris 등(1980a)의 hyaluronic acid 결과와 유사한 특이한 경향이였다.

고분자 다당류 0.5%(w/w)의 농도에서 biopolymer, guar gum, xanthan gum의 전단속도(D) 58.5 s^{-1} 에서의 겔보기 점도에 대한 염류의 영향을 살펴본 결과는 Fig. 10(A, B)과 같다. 중성당인 guar gum은 NaCl 첨가에서 거의 영향을 받지 않았으며 음이온 다당류인 본 biopolymer와 xanthan gum은 NaCl 0.3%의 농도범위까지 점도상승현상을 보였으며 그 이상의 농도의 염에서는 점도가 감소하는 경향을 보였다. 또한 biopolymer는 염 첨가 시 gel을 형성하는 독특한 성질을 보였다. 또한 CaCl_2 첨가의 경우에서는 guar gum과 xanthan gum 모두 겔보기점도의 변화가 없었고 본 biopolymer만 NaCl 첨가 때와 유사한 경향을 보였다. Peter와 Francis (1961)는 고체고분자 분말이 액체에 더해져 평형이 되었을 때 aggregation의 평균상태는 용매에 영향을 받지 않는 상태(state I)와 부분적으로 swollen 된 상태(state Ia, Ib)와 높은 점도를 나타내는 부분적으로 분산

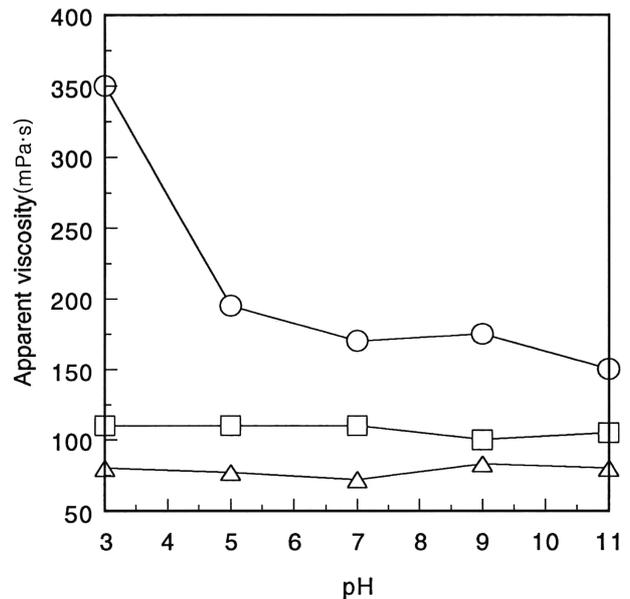


Fig. 9. Effect of pH on apparent viscosity of biopolymer and gums of 0.5% solution at shear rate (D) 58.5 s^{-1} (○: biopolymer, □: guar gum, △: xanthan gum).

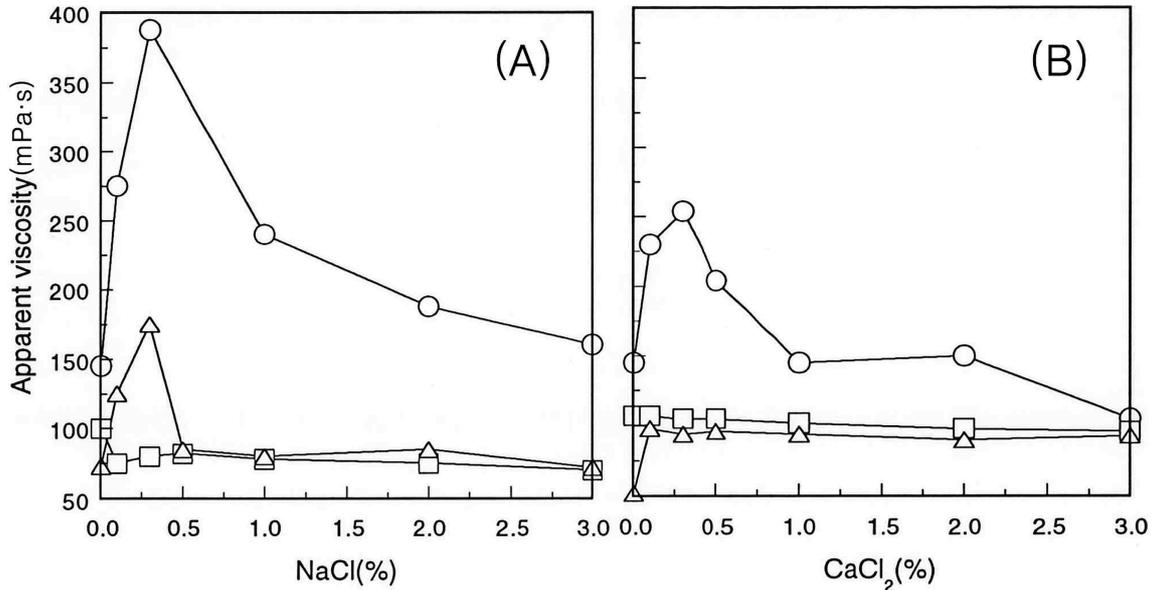


Fig. 10. Effect of NaCl (A) and CaCl₂ (B) on apparent viscosity of biopolymer and gums of 0.5% solution at shear rate (D) 58.5 s⁻¹ (O: biopolymer, □: guar gum, △: xanthan gum).

된 상태(state IIa)와 중간정도의 점도를 나타내는 완전 분산된 상태(state III)가 될 가능성이 높다고 하였다. CMC의 경우 0.5와 1% 범위의 농도로 NaCl을 첨가하였을 때 state II 상태에 도달하여 10배의 viscosity를 나타내었고 더 높은 NaCl 농도에서는 state Ib로 전환하여 aggregate binding force가 강해 부피감소로 인하여 점도가 감소하는 경향을 나타낸다고 하였다. 따라서 본 biopolymer의 경우도 aggregation의 평균상태가 0.3% NaCl 농도범위 이상에서는 State II에서 State Ib로 전환하여 점도가 감소하는 것으로 판단하였다. 또한 본 biopolymer의 유동거동에 대한 당류에 대한 영향을 살펴보기 위하여 glucose, fructose, sucrose의 농도 20%와 40%에서의 겔보기 점도를 비교한 결과를 Fig. 11에 나타내었다. Fig. 11에서 볼 수 있는 바와 같이 glucose와 fructose를 첨가한 시료 군에서는 겔보기 점도가 감소하는 경향을 보인 반면 sucrose를 첨가한 경우에는 겔보기 점도가 증가하는 현상을 보였다. 음이온 다당류 고분자용액의 점도는 sugar에 의해 영향을 받으며 (Francis, 1961) K-carrageenan과 Na-CMC는 다소 점도가 감소하나 pectin은 sucrose 첨가에서 겔보기 점도의 증가를 보이는 데 당과 polymer 분자들의 수소결합 때문인 것으로 해석된다(Attia et al., 1979; Chen & Joslyn, 1967). 보통 당의 첨가 시 점도의 증가는 sugar와 polysaccharide 사이의 수소결합에 기인하는 데(Furuuchi et al., 1968), 점도의 감소는 polymer 분자의 hydration과 extension을 제한하여 solute-solute 상호작용의 수를 감소시키는 것으로 알려져 있다(Nakagaki & Kawamura, 1964; Carlson & Ziegenfuss, 1965). 본 biopolymer의 경우도 glucose와 fructose를 첨가하였을 때 점도가 감소하는 것은 분자들의 hydration과

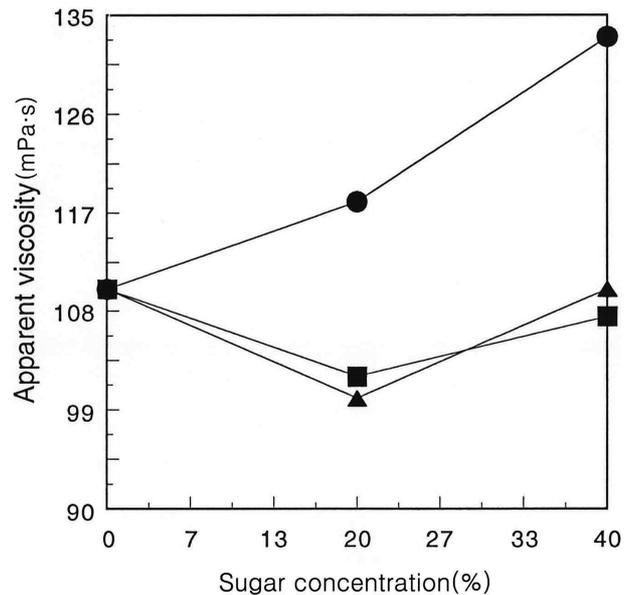


Fig. 11. Effect of sugar on apparent viscosity of biopolymer and gums of 0.5% solution at shear rate (D) 58.5 s⁻¹ (●: sucrose, ■: glucose, ▲: fructose).

extension의 감소로 해석된다.

유화 안정성을 시험해 본 결과, 증류수와 대두유의 대조군의 경우 30분 정도 경과 후 물과 기름 층이 뚜렷이 구분되었다. Tween 80을 첨가하였을 때의 유화안정성은 21시간 후 74% 정도 분리되었으며 45시간 후에는 100% 분리되는 현상을 나타내었다. Guar gum을 첨가한 경우 24시간 후에 74% 정도 분리되었으며 72시간 후에 완전히 분리되었다. Arabia gum의 경우도 24시간 후에 74% 분리되

었고 48시간 후에 완전히 분리되었다. Xanthan gum과 본 biopolymer의 경우는 3주 이상 지난 시점까지 층의 분리가 관찰되지 않아 두 시료 모두 유효안정성이 높음을 알 수 있었다. 한편, 중금속인 Cd^{++} 에 대한 biopolymer의 제거효과를 확인한 결과 본 biopolymer는 응집보조제인 $CaCl_2$ 의 첨가 없이도 약 73% 정도의 제거효과를 나타내었다.

요 약

미생물 *Bacillus polymyxa* YU-101이 생산하는 biopolymer의 기능성 탐색 및 용도개발을 위하여 물성학적 특성을 조사하였다. Biopolymer의 고유점도는 35.18 dL/g이었으며, 0.005 M의 NaCl의 농도에서도 급격한 고유점도의 감소를 보이는 산성고분자의 특성을 나타내었다. Biopolymer의 chain stiffness 값은 대단히 flexible 할 것으로 예상되는 0.55이었으며, coil overlap parameter 및 임계농도는 각각 0.722 및 0.15 dL/g 이었다. 고유점도에 따른 biopolymer의 활성화 에너지는 온도 50°C에서 서로 다른 두 개의 직선 관계를 나타내었다. Biopolymer는 전단속도의 증가에 따라 비뉴우튼 유체인 의가소성의 유동특성을 나타내었다. 0.5%(w/w)의 농도에서 점도지수(consistency index)는 660.39 mPa·S로 다당류들보다 높은 편이었으며, 유동지수(flow behavior index)는 전단속도 0-11.7 s⁻¹과 11.7-105.3 s⁻¹의 범위에서 각각 0.765와 0.4로 guar gum과 유사하였다. 전단속도 58.5 s⁻¹에서 pH의 변화에 따른 biopolymer의 겔 보기 점도는 guar gum과 xanthan gum과는 달리 산성의 조건에서 급격한 점도증가 현상을 보였다. 또한 염(NaCl과 $CaCl_2$)이 첨가된 조건에서 biopolymer의 겔 보기 점도는 염 0.3%(w/w) 농도까지 점도가 증가하면서 겔을 형성하였으며, 0.3%(w/w)의 농도보다 높은 농도에서는 점도가 감소하는 경향을 보였다. Biopolymer의 겔 보기 점도에 대한 당(glucose, fructose, sucrose)의 영향은 sucrose에 대해서만 점도가 증가하는 현상을 보였다. Biopolymer의 유효안정성은 3주이상 안정한 결과를 보였으며, 중금속제거능도 응집보조제인 $CaCl_2$ 의 첨가 없이도 약 73%의 제거효과를 보였다.

References

- Carlson WA, Ziegenfuss EM. 1965. The effect of sugar on guar gum as a thickening agent. *Food Technol.* 19: 954-958.
- Chen TS, Joslyn MA. 1967. The effect of sugars on viscosity of pectin solutions. I. Comparison of corn sirup with sucrose solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 23: 399-406.
- Elfak AM, Pass G, Phillips GO, Morley RG. 1977. The viscosity of dilute solutions of guar gum and locust bean gum with or without added sugars. *J. Sci. Food Agric.* 28: 895-899.
- Francis PS. 1961. Solution properties of water-soluble polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 5: 261-270.
- Attia ME, Geoffrey P, Glyn OP. 1979. The effect of shear rate on the viscosity of solutions of sodium carboxymethylcellulose and κ -carrageenan. *J. Sci. Food Agric.* 30: 724-730.
- Furuuchi Y, Takada S, Nagasawa S. 1968. On the viscosity of diluted solution of sodium carboxymethylcellulose containing saccharide and acid constituents. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi(J. Food Sci. and Technol.)* 15: 553-556.
- Hwang JK, Shin HH. 2000. Rheological properties of chitosan solutions. *Korea-Australia Rheol. J.* 12: 175-179.
- Jampen S, Britt IJ, Tung MA. 2000. Gellan polymer solution properties: dilute and concentrated regimes. *Food Res. Int.* 33: 579-586.
- Kim JH, Yoo YJ, Lee KY, Yun JS. 1990. A study on the production of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 5: 25-36.
- Krigham WR, Flory PJ. 1953. Molecular weight dependence of the intrinsic viscosity of polymer solutions. II. *J. Polymer Sci.* 11: 37-51.
- Lang ER, Kienzle-Sterzer CA, Rodriguez-Sanchez D, Rha CK. 1982. Rheological behavior of a typical random coil polyelectrolyte: Chitosan. *Proc. 2nd Int. Conf. on Chitin Chitosan Sapporo*, pp. 34-38.
- Lang ER, Rha CK. 1981. Yield stress of hydrocolloid dispersions. *J. Texture Stud.* 12: 47-62.
- Launay B, Doublier JR, Cuvelier G. 1986. Flow properties of aqueous solutions and dispersions of polysaccharides. In: *Functional properties of food macromolecules*. Mitchell JR, Ledward DA. (eds), Elsevier Applied Science, New York, USA. pp. 1-78.
- Lee SE, Lee BY, Jin JS, Kim DM, Kim KH. 1992. Rheological properties of radish juice concentrates. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 261-265.
- Lee SY, Kim JY, Shin CS. 1996. Rheological properties of biopolymer produced by alkali-tolerant *Bacillus* sp. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 538-544.
- Minakami H, Entani E, Tayama K, Fujiyama S, Masai H. 1984. Isolation and characterization of a new polysaccharide-producing *Acetobacter* sp. *Agric. Biol. Chem.* 48: 2405-2414.
- Mitchell JR. 1980. Rheology of gels. *J. Texture Stud.* 11: 315-337.
- Morris ER, Rees DA, Welsh EJ. 1980a. Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions, *J. Mol. Biol.* 138: 383-400.
- Morris ER, Rees DA, Robinson G, Young G. 1980b. Competitive inhibition of interchain interactions in polysaccharide systems. *J. Mol. Biol.* 138: 363-374.
- Morris EM, Ross-Murphy SB. 1981. Chain flexibility of polysaccharides and glycoproteins from viscosity measurements. In: *Techniques in Life Sciences*, Kornberg HL. (eds), Elsevier, New York, USA, pp.1-46.
- Nakagaki M, Kawamura S. 1964. Physicochemical studies on the suspension syrups. I. The electrical conductivity of some electrolytes and anionic surfactant. *Yakugaku Zasshi* 84: 246-251.
- Nakamura T, Koo SJ, Pradipasena P, Rha CK, Sinskey AJ. 1987. Solution Properties of Polysaccharide Flocculant Produced by *Zoogloea ramigera* 115. In: *Flocculation in Biotechnology and Separation Systems*. Atia YA. (eds), Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, pp. 399-413.
- Patel JR, Patel CK, Patel RD. 1967. Solution properties of sodium carboxymethyl amylose in salt solutions. *Starch* 19: 30-335.

- Peter S, Francis J. 1961. Solution properties of water-soluble polymers. I. Control of aggregation of sodium carboxymethyl-cellulose (CMC) by choice of solvent and/or electrolyte. *Appl. Polym. Sci.* 5: 261-270.
- Pettit DJ. 1982. Xanthan gum. In: *Food Hydrocolloids*, Vol. 1 Glicksman M. (eds), CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA, pp. 127-149.
- Rao MA, Walter RH, Cooley HJ. 1981. Effect of heat treatment on the flow properties of aqueous guar gum and carboxymethyl cellulose (CMC) solutions. *J. Food Sci.* 46: 496-498.
- Rinaudo M, Milas M. 1978. Polyelectrolyte behaviour of bacterial polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. Comparison with carboxymethylcellulose. *Biopolymers* 17: 2663-2678.
- Sandford PA, John B. 1982. Industrial utilization of polysaccharides. In: *The polysaccharides*. Aspinall GO. (eds), Academic Press, New York, USA, pp. 411.
- Signini R, Desbrie`res J, Campana Filho SP. 2000. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. *Carbohydr. Polym.* 43: 351-357.
- Sinskey A, James S, Easson JrD, Rha CK 1986. Biopolymers and modified polysaccharides. In: *Biotechnology in food processing*. Harlander SK, Laubuza TP. (eds), Noyes Pub., New Jersey, USA, pp.73.
- Smidsord O, Haug H. 1971. Estimation of the relative stiffness of the molecular chain in polyelectrolytes from measurements of viscosity at different ionic strength. *Biopolymers* 10: 1213-27.
- Szczesniak AS, Farkas E. 1962. Objective characterization of the mouthfeel of gum solutions. *J. Food Sci.* 27: 381—385.
- Tako M, Nagahama T, Nomura D. 1977. Some rheological properties of the viscous polysaccharide produced by coryneform bacteria strain C-8. *J. Agric. Chem. Soc. Japan* 51: 389-395.
- Trivedi HC, Patel RD. 1982. Studies on carboxymethyl cellulose: Estimation of the relative stiffness of polyions. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* 3: 317-320.
- Wang G, Zhu L, Yu B, Chen K, Liu B, Liu J, Qin G, Liu C, Liu H, Chen K. 2016. Exopolysaccharide from *Trichoderma pseudokoningii* induces macrophage activation. *Carbohydr. polym.* 149: 112-120.
- Yoon MH, Koo YM. 1994 Mechanism of dextran synthesis by dextransucrase. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 9: 1-7.