

(S2-A) BIOPOLYMER 생산 미생물의 탐색 및 생산된 BIOPOLYMER의 특성

윤병대, 이경, 박찬선, 안종석, 민태익

한국과학기술연구원 유전공학연구소

P.O.Box 17 Taedok Science Town, Taejon, KOREA

I. 서론

합성고분자 화합물은 석유 정밀화학공업 및 고분자화학공업의 발달로 현대 생활의 필수 소재로서 다양하게 이용되고 있다. 그러나 최근, 합성고분자화합물이 갖는 특성, 즉 난분해성 물질로 인한 환경오염문제가 심각히 대두됨에 따라 세계 각국에서는 이의 사용규제를 법률로 엄격히 제한하는 한편, 합성고분자화합물의 대체용 고분자화합물의 개발에도 많은 관심을 두고 있다.

미생물이 생산하는 BIOPOLYMER는 생물분해성으로 환경오염발생의 문제점이 배제되며, 그외 가수분해성, 생체적합성, 광학활성, 열압전성 등의 특성으로 현용의 합성고분자화합물의 대체용으로서 뿐 만 아니라 새로운 기능성 소재로서도 주목되고 있다.

현재, 합성고분자화합물의 대체용 고분자화합물의 개발에 관한 연구는 i)합성고분자화합물의 미생물분해 ii)생물분해성 BIOPOLYMER의 개발 iii)광분해성 BIOPOLYMER의 개발 등이 각분야별로 활발히 진행되고 있으며, 이와 병행하여, PHB, xanthan gum등 수종류의 BIOPOLYMER가 산업적으로 생산되어 다방면으로 이용이 되고 있지만, 특수용도로의 개발에 따른 고부가가치성이 점차 인식되고 있어 신기능성 BIOPOLYMER의 탐색 및 개발에도 집중적인 연구가 이루어지고 있다.

본 symposium에서는 상기 ii)항의 목적 및 기존 산업화된 BIOPOLYMER보다 우수한 물성 및 특성을 갖는 BIOPOLYMER를 개발할 목적으로 연구한 결과에 관해 보고하고자 한다.

II. BIOPOLYMER 생산미생물의 분리 및 동정

A) BIOPOLYMER 생산미생물의 분리

토양시료로 부터의 BIOPOLYMER 생산 균주의 분리에는 0.2% yeast extract가 함유된 Czapeck배지(Y-Czapeck배지)에 30 μ g/ml chloramphenicol 및 100 μ g/ml nystatin을 첨가하여 사용하였다. 110 $^{\circ}$ C 건열기에서 30분간 전처리한 토양시료(0.5g)을 상기 조성의 액체 배지 (5ml)가 들은 시험관에 넣어 28 $^{\circ}$ C에서 2일간 진탕배양한 다음, viscosity가 생성된 시험관의 배양액을 상기 조성의 한천평판배지상에 도말하여 생성된 colonies을 획득하였다.

이와같이 분리한 50여 균주들을 사용하여 생육 및 점도, 그리고 생산한 BIOPOLYMER의 구성성분등을 조사하여 신규성일 가능성이 높고 목적에 적합한 균주 LK-1을 최종 선별하였다.

B) 균주 LK-1의 동정

형태학적 특징으로서 LK-1 균주는 Y-Czapeck 액체 배지에 배양할 경우, 배양초기에는 rod type 이나 BIOPOLYMER를 생산하는 시기부터 점차 ellipsoidal cell로의 형태전환이 관찰된다. Gram positive인 이 균주의 rod type일 경우의 크기는 1 \times 4-5 μ m이며, ellipsoidal cell의 경우는 2 \times 3 μ m 정도이다. Table 1에 나타난 LK-1 균주의 생리적 특성 및 결과, 또 지방산, quinone류, GC 함량 및 세포벽조성등을 검토한 결과, *Bacillus* 속 세균일 것으로 추정되어 최종적으로 *Bacillus* sp. LK-1으로 명명하였다.

III. *Bacillus* sp. LK-1이 생산하는 BIOPOLYMER

A) BIOPOLYMER의 추출 및 정제

Y-Czapeck 액체배지를 이용하여 28°C에서 48시간 배양한 배양액에 NaOH를 첨가한 후 원심분리하여 균체를 제거하고, 이 용액의 pH를 7.0으로 중화한 다음 70% ethanol을 첨가하여 BIOPOLYMER를 침전시켰다. 침전물은 용해 ↔ 침전 과정을 2차 반복하고, 최종적으로 증류수로 투석한 다음 획득한 백색 침전물(POL-II)은 이하 연구에 사용하였다.

B) POL-II의 구성성분

2N H₂SO₄로 산 가수분해하여 TLC 및 HPLC상에서 검토한 POL-II의 구성 성분은 glucose : glucuronate : xylose : mannose = 1 : 2 : 1 : 2 인 것으로 밝혀졌다.

C) POL-II의 성질

현재 시판중인 대표적 POLYSACCHARIDE인 xanthan gum과 본 연구에서 분리한 POL-II의 물리화학적 성질을 비교 검토하였다. 이하 본 연구에서의 점도는 Brookfield viscometer (model : LVT) #3 spindle을 사용하여 측정하였다.

a) 점 도 0.1% - 1.0%사이의 POL-II와 xanthan gum의 농도에 따른 점도변화를 비교한 결과, 동일농도에서 POL-II가 xanthan gum보다 높은 점도를 보였으며, 1.0%농도에서는 약 10배 이상의 점성을 나타내었다. POL-II는 2.0%농도에서 gel화가 일어나며, 3.0%농도에서는 고무처럼 늘어나는 성질을 보였다(Fig. 1).

b) Shear rate 0.3% 농도의 POL-II 및 xanthan gum을 이용한 shear rate의 비교에서는 rpm의 증가에 따라 점도는 모두 저하하였으며, 저하 pattern은 POL-II와 xanthan gum 모두 동일하였다(Fig. 2).

c) 열, pH, 염의 점도에 대한 영향 POL-II 및 xanthan gum 점도의 열에 대한 효과는 저온에서는 높은 점도를 나타내었으나 온도가 증가함에 따라 점도는 저하하여 80°C 부근에서는 거의 점성을 나타내지 않았다. 점도 저하의 pattern은 비슷하다(Fig. 3). pH의 효과는 xanthan gum의 경우 pH 1-13까지 비교적 안정한 상태를 보였으나, POL-II의 경우 pH 7-9사이는 안정하나, 그 외의 pH에서는 점도가 급격히 저하하는 현상을 나타내었다(Fig. 4). 염에 대한 효과는 NaCl을 0-5.0%까지 첨가하여 검토하였다. Xanthan gum의 경우 NaCl 5.0%까지 농도를 증가시켜도 점도에는 별 영향이 없으나, POL-II의 경우 NaCl의 농도가 증가할수록 점도는 저하하였다(Fig. 5).

d) 기타 POL-II의 성질 및 특성 POL-II의 분자량은 80만 이상이며, X-ray 촬영결과 결정성은 거의 없는 것으로 나타났다. DSC 측정결과 86°C 부근에 흡열 peak가 있는 것이 확인되었으며, I.V.는 0.924였다. Film 성형 후 rheobibration을 측정한 결과, 상온에서의 modulus는 2 GPa정도이며, 80°C 부근에서 modulus가 증가하는 현상이 나타났으며, 200°C 정도에서 열분해가 일어났다.

IV. 토 론

이상과 같이 토양시료에서의 BIOPOLYMER 생산균주의 분리 및 분리균주의 동정 (*Bacillus* sp. LK-1), 생산된 BIOPOLYMER (POL-II)의 특성 등을 검토한 결과를 보고하였다.

Table 1의 결과 *Bacillus*속 세균으로 동정하였으나, 배양시간에 따른 형태 변화 및 지금까지 보고된 *Bacillus*속 세균이 생산하는 BIOPOLYMER의 조성과의 비교검토 결과, *Bacillus*속 세균 중에서도 아직 보고되지 않은 신균주일 것으

로 추정된다.

한편, *Bacillus* sp. LK-1이 생산하는 BIOPOLYMER, POL-II는 xanthan gum과의 비교검토에서 나타난 바와 같이 1.0% 농도에서 xanthan gum 보다 상대적으로 10배 이상 점도가 높은 것으로 나타났으나, pH 및 염에 대해서는 불안정한 것으로 나타났다.

POL-II의 용도개발을 위해서는 보다 구체적인 rheological data 및 역학, 광학, 전기적 및 연소성 등의 물리화학적 성질에 관한 연구 검토가 필요하지만, 현재로서는 film의 coating 재료에 target를 둔 물성연구를 진행중에 있다.

Table I. Characteristics of Strain LK-1

Gram Staining	Oxidase	Catalase	Motility	O/F	Spore					
+	-	+	+	-	+					
Enzyme Activity										
H ₂ S	VP	Nitrate	Arg.	Lys.	Orn.	Ure.	Trp.	β -Glu.	β -Gal.	
		+	-	+	-	-	-	+	+	
Hydrolysis			Carbohydrate (Acid/Gas)							
Casein	Gelatin	Starch	Glu.	Man.	Ino.	Sor.	Rha.	Suc.	Sal.	Xyl.
+	+	+	-/-	-/-	-	-	-	-/-	-	-/-
Fatly Acid		Quinone	Cell Wall							
		MK-7	meso-DAP							

+, Positive ; -, Negative

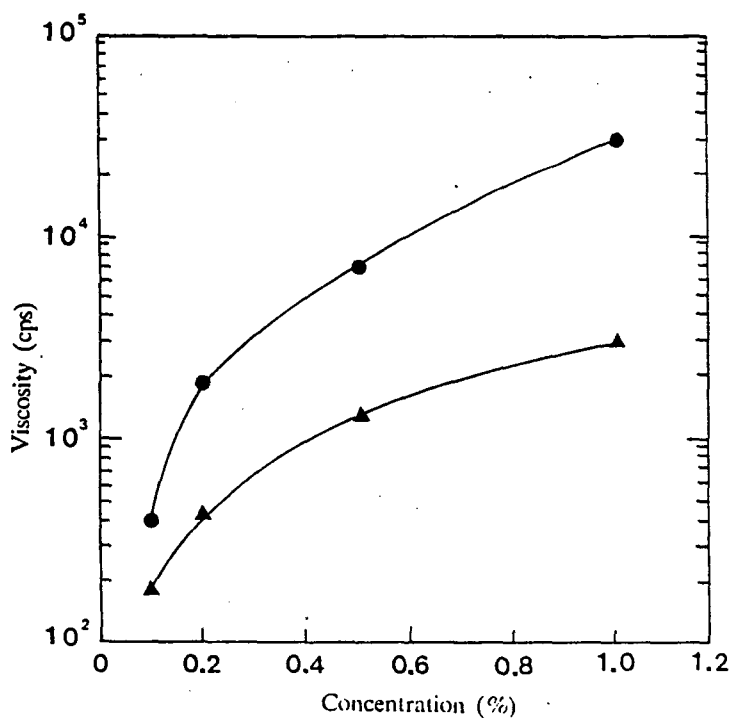


Fig. 1. Comparison of Viscosity by Different Concentration of Biopolymer between POL-II and xanthan gum
 —●—; POL-II, —▲—; Xanthan gum

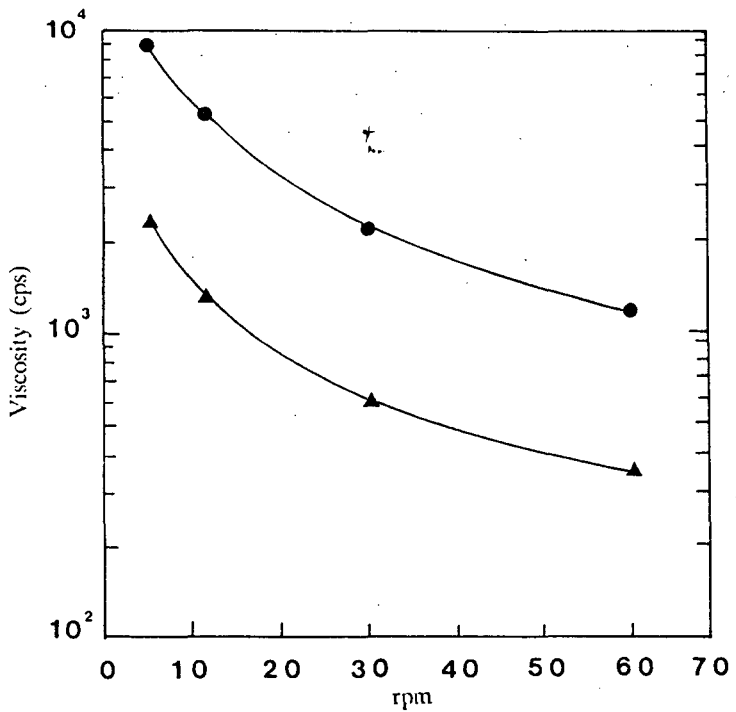


Fig. 2. Effect of Shear Rate on POL-II Viscosity

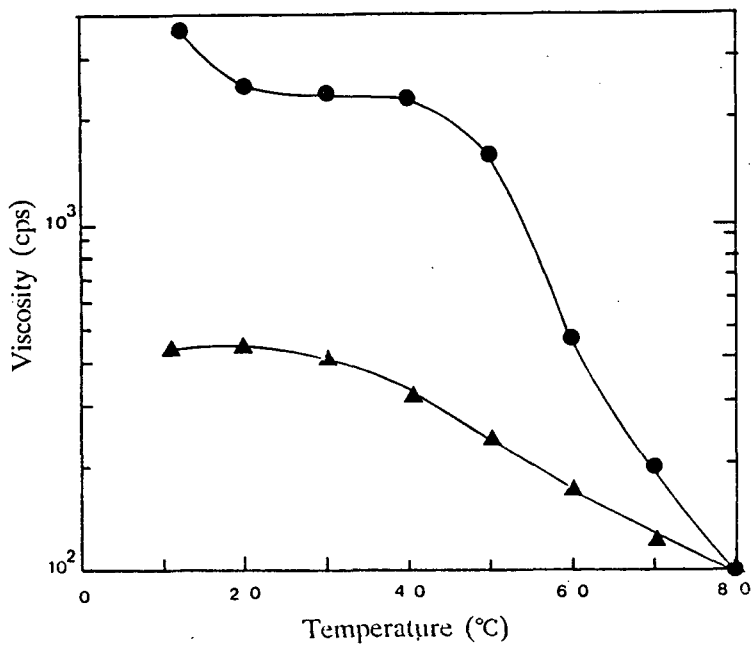


Fig. 3. Effect of Temperature on POL-II Viscosity

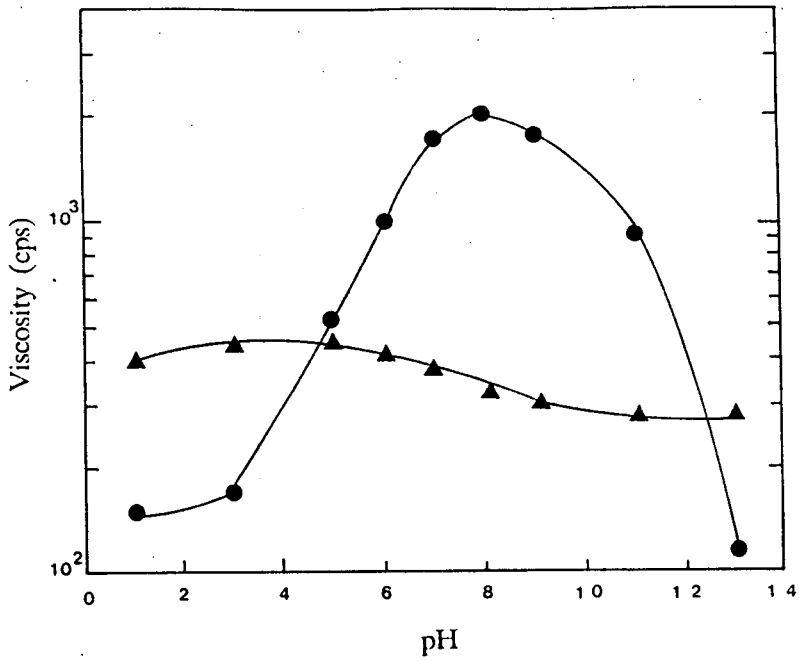


Fig. 4. Effect of pH on POL-II Viscosity

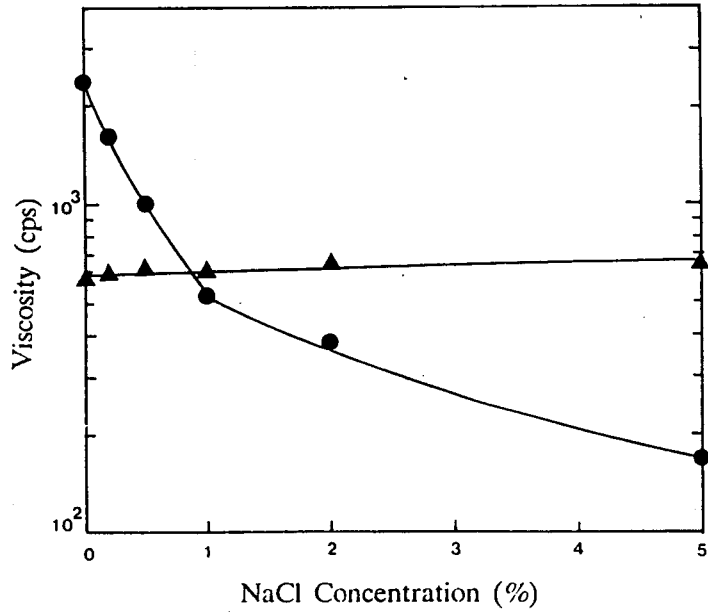


Fig. 5. Effect of NaCl Concentration on POL-II Viscosity