

## 호 알카리성 *Alcaligenes* sp.가 생산하는 $\gamma$ -Polyglutamic Acid의 기능성 및 리올로지 특성

†이 신 영 · 강 태 수 · \*김 진 영 · \*심 창 섭 · \*\*김 갑 수  
강원대학교 발효공학과, \*(주)김정문 알로에 기술연구소  
\*\*샘표식품(주) 기술개발실, 연세대학교 생물산업소재연구센터

### Functional and Rheological Properties of $\gamma$ -Polyglutamic Acid Produced by Alkalophilic *Alcaligenes* sp.

Shin-Young Lee,† Tae-Su Kang, Jin-Young Kim\*  
Chang-Sub Shim\* and Kap-Soo Kim\*\*

Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea  
\*Kim Jungmoon Aloe Co. Ltd.

\*\*Research Lab., Sampyo Foods Co., Ltd., Seoul 132-040, Korea  
Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

#### ABSTRACT

Some functional and rheological properties of the  $\gamma$ -polyglutamic acid( $\gamma$ -PGA) produced from alkalophilic *Alcaligenes* sp. were investigated. Viscosity synergism with thickening agents, capacities for gelling, entrapping of heavy metals, and flocculability of  $\gamma$ -PGA were not observed, but the relatively good compatibility with various polyvalent metallic ions, excellent absorption ability and spinnability were observed. The  $\gamma$ -PGA solution showed non-Newtonian flow behavior and exhibited pseudoplastic property with a yield stress at above 1% concentration. The values of flow index for 1% solution were in the range of 0.41~0.75 showing shear rate dependency and the value of yield stress was 2.28 Pa. The value of consistency index was 0.868 Pa · S<sup>n</sup> and was exponentially dependent on concentration and temperature.

#### 서 론

최근 미생물이 생산하는 생물고분자의 생산에 관한 관심의 고조로 이에 대한 각종의 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 새로운 생물고분자의 탐색이나 용도개발과 밀접한 관련을 가져서 산업적 응용의 중요한 지표가 되고 있는 기능성 탐색을 위한 적극

적인 연구는 아직 매우 미흡한 실정이다.

생물고분자의 대부분 기능성은 수용액의 리올로지적 성질을 변화시키는 성질에 기인하는데, 이러한 리올로지적 성질은 성분의 변화나 구조와 밀접한 관련을 가지므로 리올로지 특성의 연구는 기능성 탐색을 위한 기초 연구로서 매우 유효하다(1-3).

따라서 본보에서는 전보(4-6)의  $\gamma$ -PGA 생산균주와 생성고분자의 특성, 회분 및 연속배양에 의한 대량생산 연구 그리고  $\gamma$ -PGA의 용액 특성 연구에

† Corresponding Author

이어 *Alcaligenes* sp.가 생산한  $\gamma$ -PGA의 몇몇 가능성을 탐색하고 리올로지적 특성을 검토하므로써 이로부터 *Alcaligenes* sp.가 생산하는  $\gamma$ -polyglutamic acid( $\gamma$ -PGA)의 용도개발자료를 마련하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용한 재료는 토양에서 분리하였던 호알칼리성의 *Alcaligenes* sp.(2)가 생산한  $\gamma$ -PGA이다. 균주는 한천 사면배지(2, 4)에서 30°C로 12시간 배양한 후 4°C에서 보존하였으며, 작업용량 1ℓ의 jar fermentor(Marubishi MD-250)에 전배양액을 5%(v/v) 접종한 다음, 전보(3)에서 보고한  $\gamma$ -PGA의 최적 배지를 사용하여, 온도 31°C, pH 10, 통기속도 2.2vvm 및 교반속도 90rpm으로 36시간 동안 회분배양하였다. 배양액을 2배로 희석하고, 9,000xg의 원심력으로 60분간 원심분리하여 균체를 제거한 다음, 전보(2)에서와 마찬가지로 cetylpyridinium chloride(CPC) 침전처리하여 정제하고, Na<sup>+</sup> 및 H<sup>+</sup>형의  $\gamma$ -PGA를 얻었으며, 이중 점성이 높았던 Na<sup>+</sup>형  $\gamma$ -PGA를 시료로 하였다.

### 가능성의 관찰

#### 염류와의 상용성(compatibility)(7)

1% 시료액에 각종 무기염류를 0.5% 첨가한 다음 pH 변화에 따른 겔의 형성유무를 관찰하여 판단하였다.

#### 유화안정성(8)

증류수와 대두유의 1:1 혼합물에 0.5%의 시료고분자를 첨가하여 상온에서 30분간 균질화 시켰다. 균질화한 유화액 10ml를 시험관(높이 10cm×내경 1.6cm)에 취하였으며, 시간경과에 따른 크림층의 분리정도를 육안으로 관찰하여 유화안정성을 판단하였다.

#### 필름형성능(8)

105°C 건조기에서 10분간 가열한 유리판(10×10cm)에 1%의 시료액을 펼쳐넣고 실온에서 24시간 건조시켰다. 이를 desiccator에 옮겨서 24시간 건조한 후 필름형성 정도를 육안으로 관찰하여 판단하였다.

#### 응집성(9, 10)

Bentonite에 의한 침강실험법을 사용하여 다음과

같이 행하였다.

즉, bentonite 10g을 증류수 1000ml에 현탁하고 이액 80ml를 취하여 내경 28mm의 mess cylinder 중에 넣고 시료 0.2wt% 수용액 20ml를 넣어 혼합하고 5회 전도시킨 후 실온에 방치하여 침강속도를 측정하였다.

#### 중금속이온 포집능(9)

소정량의 시료를 물 25ml 중에 평형 팽윤시킨 다음 여기에 각종 농도의 금속염 수용액(Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O)을 25ml가하여 하룻밤 정치 흡착시켰다. 흡착량은 상등액의 흡광도를 Co<sup>2+</sup>은 510nm, Cr<sup>3+</sup>은 580nm에서 각각 측정하여 구하였다. 흡광도는 UV/VIS spectrophotometer(Perkin-Elmer 522S)를 사용하여 측정하였다.

#### 흡수율(9, 10)

상법에 따라서 일정량의 건조시료(W<sub>0</sub>)를 칭량하고 과잉의 증류수 또는 인공노로 충분히 팽윤시킨 다음 겔부위를 여과, 분리하고 그 중량(W<sub>1</sub>)을 측정하여 다음식으로부터 계산하였다.

$$\text{흡수율} = (W_1 - W_0) / W_0$$

이때, 인공노의 조성(중량백분율)은 요소 1.94%, NaCl 0.8%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.11%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.08%, 증류수 97.07%의 것을 사용하였다.

#### 예사성(spinnability)(11)

예사성은 시료 용액에 원통형(직경 0.2cm×길이 10cm)의 금속제 plunger를 1cm 깊이까지 넣고 일정속도(5cm/sec)로 상승시키면서 실의 형성여부 및 실의 길이(5cm 미만, 5~10cm, 10cm 이상)로부터 판단하였다.

#### 리올로지 특성의 측정 및 특성값 산출

##### 시료액의 조제

각종 시료 고분자에 증류수를 가하여 0.5~2.5% 농도범위의 현탁액을 만들고 이를 균질기로 120rpm에서 1hr 용해시킨 후 1N NaOH 또는 1N HCl로 pH를 조절하여 시료액으로 하였다.

##### 리올로지 특성의 측정

시료액의 리올로지 특성은 회전점도계(Brabender Viscotron)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 측정용컵(E17)에 시료액 8ml를 넣고 측정온도를 20~80°C의 일정온도로 유지한 온도조절용 용기에서 10분간 열평형 시킨 다음 0~130rpm의 회전속도

변화에 따른 토오크(torque)의 변화를 x-y-t 기록 제로 자동 기록하였다.

리올로지 특성값의 산출

리올로지 특성값은 식(1)의 Herschel-Bulkley식 (12)으로부터 계산하였다.

$$\tau = \tau_0 + K \cdot D^n \quad (1)$$

여기서  $\tau$ 는 전단응력(Pa),  $\tau_0$ 는 항복응력(Pa), D는 전단속도( $s^{-1}$ ), n은 유동거동지수(-), K는 유체의 점도지수( $Pa \cdot s^n$ )이다.

전단응력  $\tau$ 와 전단속도 D는 실험으로부터 구한 토오크와 회전속도로부터 각각 식(2) 및 (3)에 의하여 구하였다.

$$\tau = B \cdot S \cdot Y \quad (2)$$

$$D = N \cdot X \quad (3)$$

여기서 S는 토오크값, N은 회전속도(rpm)이며 B, X 및 Y는 보정계수로 각각 토오크측정용 스프링에 의존하는 scale factor, shear factor 및 stress factor이다.

한편, 리올로지 특정값인  $\tau_0$ 값은 식(4)의 Casson 식(13)에 의하여 구하였다.

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + Kc \sqrt{D} \quad (4)$$

여기서 Kc는 Casson 점도( $Pa \cdot s^{1/2}$ )이다.

또한 K 및 n값은 식(1)을 변형하고 대수를 취하여 식(5)을 얻은 다음

$$\log(\tau - \tau_0) = \log K + n \log D \quad (5)$$

$\log(\tau - \tau_0)$ 와  $\log D$ 를 도시하여 얻은 직선의 기울기 및  $\log D = 0$ 일 때의 절편값으로부터 각각 구하였다.

### 결과 및 고찰

기능 특성

1% 시료 고분자( $Na^+$ -PGA)용액의 각종 기능 특성을 살펴 본 결과는 Table 1과 같다.

시료 고분자의 유화 안정성은 1일 경과 후 처음으로 크림층의 분리가 시작되었으며 3일 후 반 정도가 분리되어 비교적 낮은 유화안정성을 나타내었다.

타 다당과의 점도상승효과도 전혀 보이지 않았고, 또 점증제와의 겔형성 역시 관찰되지 않아서 사용된 고분자들간의 특정 친화성기에 의한 가교결합은 형

Table 1. Functional properties of  $Na^+$ -PGA(1wt%).

○ Emulsion stability : poor
○ Film formation
Aqueous solution : -
Dimethylsulfoxide(DMSO) solution : +
Trifluoroacetic acid(TFA) solution : +
○ Absorption(%)
Water : 725
Artificial urine : 433
○ Floc formation : no action
○ Adsorption of heavy metals : no action
○ Spinnability : excellent(10cm >)
○ Viscosity synerism or gel formation
Polysaccharides, mono or disaccharides : no

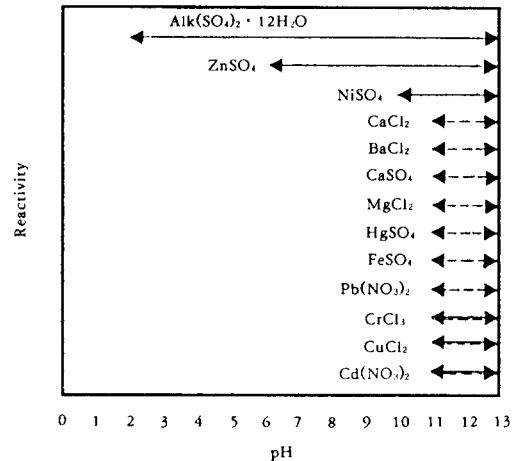


Fig. 1. Reactivity of  $Na^+$ -PGA to polyvalent metallic ions(Gel formation occurs in pH ranges encompassed by the double arrow)  
 ——: Formation of strong gel  
 .....: Formation of weak gel  
 =====: Formation of strong gel after sedimentation.

성(14)되지 않음을 알 수 있었다. 중금속이온은 포집능, 응집능도 관찰되지 않았고, 수용액에 대한 필름형성은 육안관찰로써 확인되었을 뿐 쉽게 부서지며 불투명하였다. 그러나 물흡수능 및 예사성(spinnability)은 매우 우수하였으며 dimethylsulfoxide(DMSO) 및 trifluoroacetic acid(TFA)용액에서의 필름형성능도 매우 양호하였다. 한편, 서로 다른 pH에서의 각종 금속염과의 상용성은 Fig. 1에서와

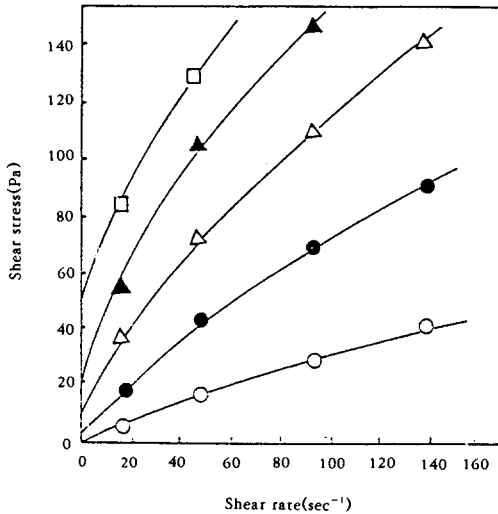


Fig. 2. Flow curve of Na<sup>+</sup> form of PGA solutions at different concentrations(% , w/v) ○ : 0.5% , ● : 1% , △ : 1.5% , ▲ : 2% , □ : 2.5%.

같이 AlK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O와 ZnSO<sub>4</sub>의 첨가시 각각 pH 2~13 및 pH 6~13의 넓은 pH 범위에서 강한 겔을 형성하였고 NiSO<sub>4</sub> 첨가시에도 pH 10~13 범위의 비교적 강알카리성 영역에서 강한 겔을 형성하였다. 반면 나머지 금속염의 경우는 pH 11 이상의 영역에서만 약한 겔을 형성하였고, 특히, CrCl<sub>3</sub>, CuCl<sub>2</sub> 및 Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>의 첨가시에는 침전물이 형성되었으며 형성된 침전물은 pH 11에서부터 녹기 시작하여 시간이 지남에 따라 gel을 형성하였다. 이와 같이 다가 금속염과 함께 겔 또는 침전을 형성하는 것은 일부 산성다당에서 주로 관찰되는 데, 이는 다당 분자의 음이온들과 금속염들과의 강한 상호작용에 기인한다(7). 이들 상용성 및 비상용성은 pH에 따라 조절이 가능하며 생물고분자의 응용성을 더욱 유용하게 하는 주요 성질로서 본 고분자의 경우 금속염과의 상용성은 비교적 우수한 것으로 판단되었다.

리올로지 특성

시료 고분자(0.5~2.5%)의 유동거동을 살펴 보기 위하여 전단속도(0~182s<sup>-1</sup>)에 따른 전단응력의 변화를 30℃에서 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

시료 모두 비직선적으로 증가하여 비뉴우톤 유체의 거동을 나타내었고 1% 이상에서 항복응력이 존재하였다. 이러한 유동거동은 일반적으로 점질 다당류의 경우 분자사슬간의 결합에 기인한 상호작용으

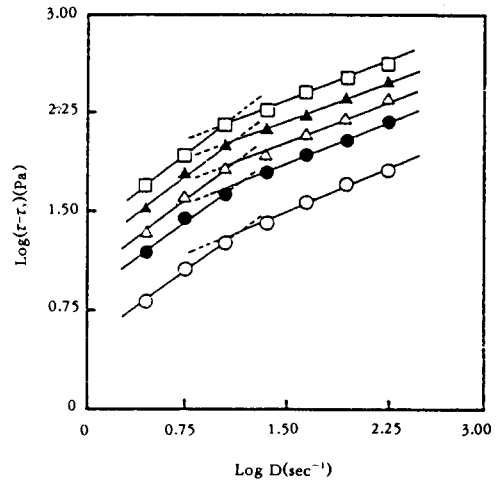


Fig. 3. Plot of log(τ-τ<sub>0</sub>) vs. log D for Na<sup>+</sup> form of PGA solution at various concentrations ○ : 0.5% , ● : 1% , △ : 1.5% , ▲ : 2% , □ : 2.5%.

Table 2. Calculated rheological parameters for Na<sup>+</sup> form of PGA solutions of various concentrations at 30℃.

Concentrations (g/ℓ)	Rheological parameters		
	Consistency index, K(Pa · s <sup>n</sup> )	Flow index, n(-)	Yield stress, τ <sub>0</sub> (Pa)
0.5	0.328	0.76 <sup>a</sup> 0.44 <sup>b</sup>	0.68
1.0	0.868	0.75 0.41	2.28
1.5	1.180	0.75 0.40	3.24
2.0	1.841	0.75 0.40	5.47
2.5	2.383	0.72 0.35	7.33

a : values calculated at the shear rate range of 0.25~11.26s<sup>-1</sup>  
 b : values calculated at the shear rate range of 11.26~182s<sup>-1</sup>

로 1% 이하의 저농도에서도 비뉴우톤 유동을 나타낸다고 한 보고사실(14)과 잘 일치하였다.

한편, Casson식(13)에 따라 항복응력(τ<sub>0</sub>)을 구한 후 시료의 전단응력값에서 항복응력을 뺀 차이값에 대한 전단속도의 관계를 대수값으로 도시한 결과 (Fig. 3), 모든 시료액은 기울기가 서로 다른 두 개의 직선관계를 나타냈으며 따라서 시료액의 유동거동은 Herschel-Bulkley식(12)에 잘 따름을 알 수 있었다. 선형 최소자승법에 따라 직선의 기울기 및 log D=0일 때의 절편값으로부터 각각 유동거동지수(n)값과 점조도지수(K)값을 구하였으며 그 결과를 Casson식으로 구한 항복응력값(τ<sub>0</sub>)과 함께 Table 2

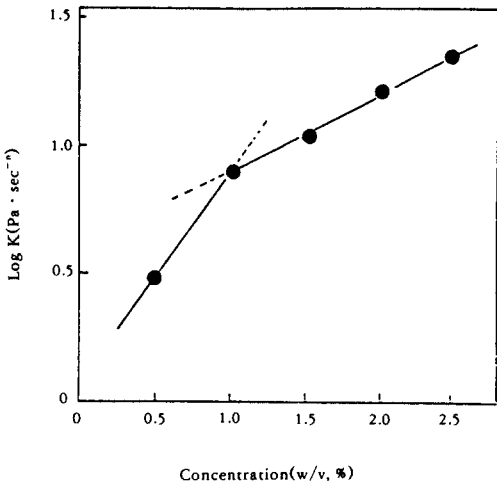


Fig. 4. Concentration dependence on consistency index of Na<sup>+</sup> form of PGA solution at 30 °C.

에 나타내었다.

1% 농도 이상의 고분자의 유동거동은 전단속도 11.26s<sup>-1</sup>을 기준으로 모두 기울기가 서로 다른 2개의 직선관계를 보여 n값의 전단속도 의존성을 보였다. 이와 같은 기울기의 변화는 전단속도증가에 따른 응집구조의 점차적인 파괴로 인한 전단에 의한 점도감소(shear thinning) 때문으로 보고(15)되고 있는데 이러한 shear thinning 현상은 비대칭 분자들의 배향성 증가나 유연한 분자들의 형태변화 및 분자간인력 등의 요소들 때문인 것으로 알려져 있다(15, 16). 아울러 n값은 농도증가에 따라 굴절점 전에서는 0.76~0.72이었고 굴절점 후에는 0.44~0.35로 점차 감소하여서 농도 및 전단속도가 높을수록 의가소성이 강해지는 경향을 보였다. 이와 같이 농도가 증가할수록 n값이 감소한 것은 고농도 일수록 응집구조의 전단속도 의존성이 커서 응집구조의 강도가 약해짐을 의미하는 것으로 볼 수 있다. 또, 항복응력( $\tau_0$ )값을 살펴 보면 농도증가에 따라 증가하는 현상을 보여서 고농도 일수록 입자간 결합력 등 구조형성의 정도가 커짐도 알 수 있었다. 또, 점조도지수(K)값의 농도 의존성은 Fig. 4에서와 같이 농도에 대한 log K값으로 도시한 결과 두 개의 직선관계를 나타내어 지수함수의 관계가 있음을 보였다. 일반적으로 기울기가 달라질 경우 굴절점 농도에서 분자간 인력 등에 기인하여 구조적 특성이 변하는 것으로 보고되고 있다(111). 이러한 결과는 guar

gum 및 xanthan gum 등과 같은 수용성 고분자 화합물에서 주로 관찰 되었는데, 수용액 내에서 고분자 분자들이 엉킴에 의한 구물구조를 형성하기 때문이라고 보고되었다(17). 따라서 본 고분자의 경우도 1% 농도 이상에서 이러한 엉킴으로 인한 구조적 변화가 일어날 것으로 생각되었다.

### 결 론

토양으로부터 분리한 *Alcaligenes*속의 한 균종이 생산하는  $\gamma$ -PGA의 용도개발 탐색연구의 일환으로 이의 몇몇 기능성 및 리올로지 특성을 조사하였다. *Alcaligenes* sp.가 생산하는  $\gamma$ -PGA는 점증제와의 점도상승효과, 겔형성능, 필름형성능, 중금속 포집능 및 응집능은 거의 없었고 유화안정능도 비교적 약하였다. 그러나 각종 금속염과의 상용성은 비교적 우수하였고, 매우 양호한 흡수성과 예사성을 나타내었다.

한편,  $\gamma$ -PGA 용액은 비뉴우튼 유체의 거동을 보였고 1% 이상에서 항복응력을 갖는 의가소성 유체의 거동을 나타내었다. 1% 용액의 유동지수(n)값은 0.41~0.75로 전단속도 의존성을 보였으며, 점조도지수(K) 값은 0.868Pa · s<sup>n</sup>, 항복응력( $\tau_0$ )값은 2.28Pa이었다. 또 점조도지수(K) 값은 지수 함수식에 따르는 농도 및 온도 의존성을 나타내었고, 농도 증가에 따라 의가소성은 강해졌다.

### 참 고 문 헌

1. F. Elizabeth and M. Glicksman(1967), *Food Technology*, **21**, 535.
2. G. W. Pace and R. C. Righelato(1980), *Advances in Biochemical Engineering*, **15**, 70.
3. K. Tadayra, O. Toshihiro, T. Tadashi, and T. Akira(1982), *Biopolymers*, **21**, 1623, ed. by Kornberg, H. L. etal, B310/1-46, Elsevier, New York.
4. 이신영, 강태수, 김갑수, 유주현(1993), 한국생물공학회지, **8**, 209.
5. 이신영, 강태수, 김갑수(1993), 한국생물공학회지, **8**, 217.
6. 이신영, 강태수, 김갑수(1995), 한국생물공학회지, **10**.
7. D. J. Pettite(1982), *Food Hydrocolloids*, Vol. 1, Glicksman, M. ed., CPC Press, Boca Raton,

- p. 127.
8. M. Tako, T. Nagahama, and D. Nomura (1977), *Japanese J. Agric. Chem.*, **51**, 389.
  9. 長田義仁, 高瀬三男(1983), *日本化学會誌*, **3**, 349.
  10. 倉根降 一郎(1990), *醸酵工學會誌*, **68**, 309.
  11. 早生好孝, 高橋秀臣(1990), *日本食品工業學會誌*, **37**, 428.
  12. S. D. Holdsworth(1971), *J. Texture Studies*, **2**, 393.
  13. N. Casson(1959), *Rheology of Disperse System*, C. C. Mill ed., Pergamon Press, **84**.
  14. B. D. Kwon, P. A. Foss, and C. K. Rha (1987), *Industrial Polysaccharides*, **3**, M. Yalpani ed., Elsevier Pub., p. 253.
  15. M. Tako, T. Nagahama, and D. Nomura (1977), *Japanese J. Agric. Chem.*, **51**, 397.
  16. M. Tako, T. Nagahama, and D. Nomura (1977), *Japanese J. Agric. Chem.*, **51**, 513.
  17. K. L. Krumal and N. Sorkar(1975), *Food Technology*, **29**, 36.