

## *Bacillus subtilis* PUL-A로부터 생산된 Biopolymer 응집제의 물리화학적 특성

류미진<sup>1</sup> · 장은경<sup>2</sup> · 이삼빈<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>계명대학교 자연과학대학 식품가공학과,  
<sup>2</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

**Physicochemical Properties of a Biopolymer Flocculant Produced from *Bacillus subtilis* PUL-A.** Ryu, Mi-Jin<sup>1</sup>, Eun-Kyung Jang<sup>2</sup>, and Sam-Pin Lee<sup>1,2\*</sup>. <sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701 Korea, <sup>2</sup>Traditional Microorganism Resources Center, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea – Soybean milk cake (SMC) was used for the solid-state fermentation by *Bacillus subtilis* PUL-A isolated from soybean milk cake. In the presence of 5% glutamate the maximum production of biopolymer (59.9 g/kg) was performed by fermentation at 42°C for 24 hr. The recovered biopolymer was consisted of 87%  $\gamma$ -polyglutamic acid with molecular weight of  $1.3 \times 10^6$  dalton and other biopolymer. The biopolymer solution showed the great decrease in consistency below pH 6.0, regardless of the molecular weight of PGA. Biopolymer solution has a typical pseudoplastic flow behavior and yield stress. The consistency of biopolymer solution was greatly decreased by increasing heating time and temperature in acidic condition compared to the alkaline condition. In kaolin clay suspension, the flocculating activity of biopolymer was the highest value with 15 mg/L biopolymer and 4.5 mM CaCl<sub>2</sub>, but decreased greatly with FeCl<sub>3</sub>. The flocculating activity of biopolymer was maximum at pH5, but decreased drastically by heating at 60~100°C. In particular, biopolymer with native PGA showed the efficient flocculating activity compared to that of modified biopolymer containing low molecular weight of PGA

**Key words:** Soybean milk cake, bioflocculant, *Bacillus subtilis*, consistency

### 서 론

생분해고분자 물질은 친환경 소재로서 식품이나 생물공학에서 널리 이용되면서 많은 연구들이 수행되고 있다. 자연에서 얻을 수 있는 생분해성 고분자 중에서 미생물이 생산하는 생고분자는 pullulan, microbial cellulose, xanthan 등의 다당류와 폴리펩타이드계의 poly- $\gamma$ -glutamic acid(PGA) 등이 있다[22]. 미생물이 생산하는 생분해성 고분자물질은 인체에 무해하며, 생물계에서 쉽게 분해되므로 응집제 사용으로 인한 2차 환경오염을 방지할 수 있고, 가축의 사료 및 작물의 비료로 재활용하는 등의 부수적인 효과를 거둘 수 있다[9-10, 21, 27]. 특히 PGA는 일본 전통식품 natto, 한국 청국장 등의 점질물질로 잘 알려져 있으며 glutamic acid로 구성된 거대한 biopolymers로 그 분자량은 생산균에 의해 100-2,000 kDa 정도이다[8]. 음이온성 고분자인 PGA는 사람과 환경에 독성이 없고, 수용성이며 생분해 가능한 고분자이다. 이런 특징 때문에 PGA는 침전농축장치, 습윤제, 동결방지제, drug carrier, 생분해성 섬유, 사료첨가제 등의 다양한 분야에

서 이용가능하기 때문에 최근 식품, 화장품, 의약 등의 산업에서 많은 관심을 가지고 있는 바이오소재이다[19]. 이러한 PGA 생산은 액체배양에 의한 PGA 생산연구가 현재까지 활발히 진행되어오고 있으나 배지내의 점도증가로 인한 산소 전달의 어려움과 기포를 조절하지 못하여 세포성장이나 억제되어 PGA 수율이 감소하는 것이 보고되었다[1]. PGA 생산을 위한 submerged fermentation(SmF)의 경우 생산원료인 배지류가 상대적으로 고가이므로 상업적 생산에 사용하는 데에 어려움이 있다. 그러나 대두(soybean) 등을 이용한 고체발효(solid state fermentation, SSF)의 경우 에너지 요구성이 낮으며 배양기법이 간단하고 물이 거의 소모되지 않고 SmF에서 나타나는 기포들이 발생하지 않는 이점이 있다[2, 23-24]. 또한 본 실험에 사용된 비지는 두부 제조시에 생산되는 대두부산물로서 일부만이 식용과 사료로 이용되고 대부분이 폐기처분되어지는 소재로서 산업적인 활용인 큰 소재라고 할 수 있다[14, 20].

비지의 산업적 이용을 위한 연구들이 수행되어왔으며, 특히 젖산균을 이용한 비지의 생물전환을 수행한 연구보고[3]가 있으며, 최근에는 전통콩발효식품으로부터 점질물 생산이 우수한 유용균주의 분리에 관한 연구와, 비지의 고초균 발효를 통한 기능성소재로 전환에 관한 연구 등이 보고되었다[15-17]. 따라서 부산물인 비지를 고초균에 의한 생물전환

\*Corresponding author

Tel: 82-53-580-5554, Fax: 82-53-580-5554

E-mail: splee@kmu.ac.kr

을 통해서 기능성성분을 함유하는 소재로 전환이 가능하며, 이로부터 생산된 점질물의 응용분야에 관한 연구가 필요할 실정이다.

본 연구에서는 비지의 산업적 이용을 높이기 위하여 점질물 생산이 우수한 균주를 선별하여 비지를 발효원료로 사용하여 점질물이 다량 함유된 발효물을 제조하였으며, 생산된 생분해고분자물질의 물리화학적 특성을 알아보고, 이들의 응집제 또는 응집보조제로서의 가능성을 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

비지 발효물 제조를 위해서 (주)풀무원(창녕, 경상남도)에서 생산되는 비지를 사용하였고, sodium monoglutamate는 Yakuri (Kyoto, Japan)사의 것을, 탈지대두미세분말(Defatted soy flour, DSF)은 Archer Daniels Midland Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Acid clay와 HPLC 용 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)사의 것을 사용하였으며, 그 외의 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 균주 및 스타터 제조

비지의 고초균 발효에 이용된 균주는 비지에서 분리한 *Bacillus subtilis* PUL-A를 사용하였으며 API kit와 16S rDNA sequencing을 통해서 동정하였다. 균주는 MRS agar 배지를 이용하여 42°C에서 24시간동안 배양하여 활성화시킨 후, 멸균한 50mL 탈지대두분말 5% 용액(w/v)에 접종하여 42°C에서 24시간 배양(180rpm)하여 스타터로 사용하였다.

### 비지발효물 제조

비지 50 g을 250 mL 비이커에 넣어 121°C에서 15분간 증자하여 냉각한 다음 starter 1%와 멸균된 glutamate 용액(35%, w/v)을 비지에 5% 되게 첨가하여 42°C에서 24시간 발효하였다.

### 생고분자물질의 분리 및 정제

비지 발효물 5g에 증류수 100 mL을 첨가하여 균질화시킨 후 여과체(sieve, 0.99 mm)를 이용하여 여과시킨 후 15,000rpm에서 20분간 원심분리하여 균체 및 debris를 제거하고 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액의 2배 부피에 해당하는 isopropanol을 첨가하여 점질물을 침전시킨 후 회수하여 증류수에 녹인 다음 다시 2배 부피의 isopropanol을 첨가하여 점질물을 회수하였다. 회수된 점질물은 진공 건조기(VO-200, Sunil Eyela Co., Ltd. Korea)를 이용하여 유기용매를 제거시킨 후 분쇄하여 체(100mesh)를 통과시켜 응집활성 측정의 생고분자 시료로 사용하였다. 생고분자물질의 정제를 위해서 건조한 생고분자 시료를 증류수에 녹인 다음

HCl로 pH를 3.0으로 조정후 4°C에서 16시간이상 방치하여 15,000 rpm, 15분 동안 원심 분리하였다. 상등액을 투석한 후 동결 건조하여 순수 생고분자 시료로 사용하였다[4].

### PGA 분자량 측정

부분 정제한 생고분자물질의 분자량은 gel permeation chromatography를 이용하여 측정하였으며, 검출기는 RI (Waters 410, USA)를 이용하였으며, GPC column은 OHpak SB 800 HQ series column(SB 802.5, SB 805, Shodex, Japan)를 이용하여 이동상을 0.1M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/0.05% (w/v) NaN<sub>3</sub>(glacial acetic acid로 pH를 4로 조정)으로 유속은 1.0 mL/min의 속도로 흘러주었다[6]. 표준곡선은 dextran (American Polymer Corporation, USA)을 이용하여 작성하였다. PGA의 함량은 정제한 PGA를 표준물질로 사용하여 GPC 분석을 실시하고 생성된 peak area를 이용하여 계산하였다.

### 점조도 측정

비지 발효물 5 g에 증류수 45 mL을 첨가하여 균질화 한 후에 여과체를 이용하여 점질성의 여과액을 제조하였다. 여과액 13 mL을 취하여 원통형점도계(HAAKE RheoStress 1, Germany)에 spindle (Rotor DG43 DIN 53544 Titan)을 장착하여 measuring cup DG43을 사용하여 점조도를 측정하였다. 측정온도는 20°C에서 전단속도( $\dot{\gamma}$ )는 1~100s<sup>-1</sup>의 범위에서 전단응력의 측정을 통해서 유체의 유동특성을 조사하였고, 점조도 지수는 Power law model로 측정하였다[5].

$$\text{Power law model} : \sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

여기서  $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(s<sup>-1</sup>),  $\sigma$ 는 전단응력(Pa), K는 점조도 지수(consistency index, Pa·s<sup>n</sup>), n은 유동성 지수(flow behavior index)이다.

### pH 및 온도에 따른 점조도 및 분자량 변화

생고분자물질의 농도를 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0% 용액으로 제조하여 점조도 변화를 측정하였으며, pH 변화에 따른 점조도 및 분자량 변화는 1% 생고분자 용액을 이용하여 측정하였다. 점질물 용액의 pH는 6N HCl 과 6N NaOH로 조정하였으며, 점질물 용액은 60°C, 80°C, 100°C에서 각각 5, 10, 20, 30, 60분 동안 열처리한 후 점조도 및 분자량을 측정하였다.

### 생고분자물질의 응집활성 측정

응집활성 측정을 위한 표준시료로 kaolin clay을 사용하였다. Test tube(14×150 mm)에 kaolin clay 현탁액(5g/L) 4.65 mL을 넣고 90mM CaCl<sub>2</sub> 용액 100  $\mu$ L를 첨가한 후 농도별로 희석한 생고분자 용액 100  $\mu$ L를 첨가하였다. 이 용액을 혼합한 후 상온에서 5분간 정치한 다음 1 mL의 상등액을

을 취하여 550nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조구는 생고분자 용액 대신 증류수를 사용하였으며 이 두 흡광도의 차이를 응집활성으로 나타내었다[25]. 측정된 흡광도에 의한 응집활성(Flocculating Activity: FA) 계산은 다음 식과 같다 [9, 11].

$$\text{Flocculating activity} = 1/\text{OD}_{550} - 1/(\text{OD}_{550})_c$$

$$\text{OD}_{550} = \text{Sample의 } 550\text{nm에서의 O.D.값}$$

$$(\text{OD}_{550})_c = \text{Control의 } 550\text{nm에서의 O.D.값}$$

**무기염류 및 pH에 따른 응집활성**

무기염류에 대한 응집활성 영향을 측정하기 위하여 kaolin clay현탁액을 표준시료로 사용하였으며, 실험방법은 상기에 언급된 바와 같이 하였다. 무기염류 CaCl<sub>2</sub> 용액은 다양한 무기염류용액으로 교체하여 측정하였다. 사용된 무기염류는 AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, NaCl, KCl 로 양이온성 무기염류를 사용하였다. 생고분자 물질의 응집활성에서의 pH의 영향은 kaolin clay현탁액, 생고분자 용액과 CaCl<sub>2</sub> 용액이 들어있는 반응액의 pH를 HCl 과 NaOH로 각각 2에서 10의 범위로 조정하여 상기와 같은 방법으로 측정하였으며, 실험의 재현성을 위하여 3번 반복하여 실험하였다.

**결과 및 고찰**

**균주의 분리 및 동정**

한국에서 시판되고 있는 각종 청국장 제품 및 비지를 멸균 증류수로 희석하여 MRS agar plate상에서 균들을 배양한 후 colony의 형태, 색깔, 크기 및 점질물 생성에 따라 30개의 균주를 분리하였다. 분리한 30개의 균주를 5% 탈지대두미세분말 용액에 배양하여 starter로 제조한 다음 비지에 1%씩 접종하여 배양(42°C, 24 h)한 후 점질물 생성이 우수한 균주를 2차 선별하였다. 선별된 균주들 중에서 점질물 생성이 가장 우수한 PUL-A 균주를 API kit와 16S rDNA sequence를 이용하여 확인, 동정한 결과 *Bacillus subtilis* Z99104와 98.7%의 상동성을 나타내었다(data not shown). 따라서 본 최종 선별 균주는 *Bacillus subtilis* PUL-A로 명명하였다(GenBank Accession Number, EU144043).

**비지 발효물로부터의 생고분자물질 생산**

*B. subtilis* PUL-A 균주를 이용한 비지 발효물로부터의 생고분자물질의 생산은 배양온도, 시간과 glutamate 첨가에 따른 변화를 조사하였다. 배양온도 및 시간에 따른 점조도의 변화는 42°C와 37°C의 경우 배양시간 24시간과 36시간일 때 각각 3.32 Pa·s<sup>n</sup>, 3.10 Pa·s<sup>n</sup> 으로 최대 점조도 값을 나타내었다. 그러나 배양시간이 길어질수록 점조도 값은 점차적으로 감소하였다. 따라서 본 연구에서 비지 발효온도는

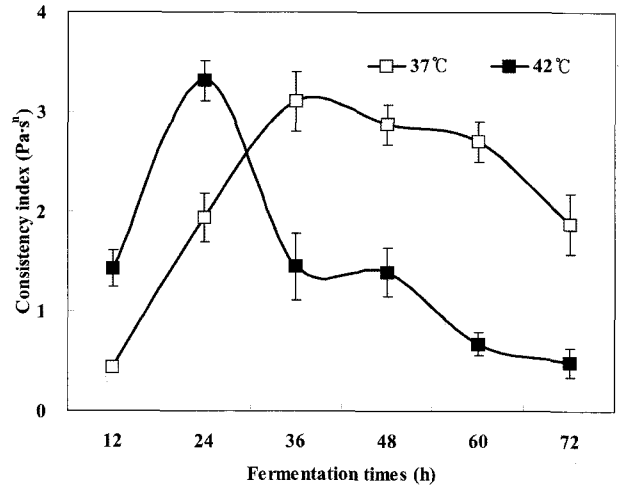


Fig. 1. Changes in the consistency index of SMC fermented by *B. subtilis* PUL-A according to fermentation time and temperature.

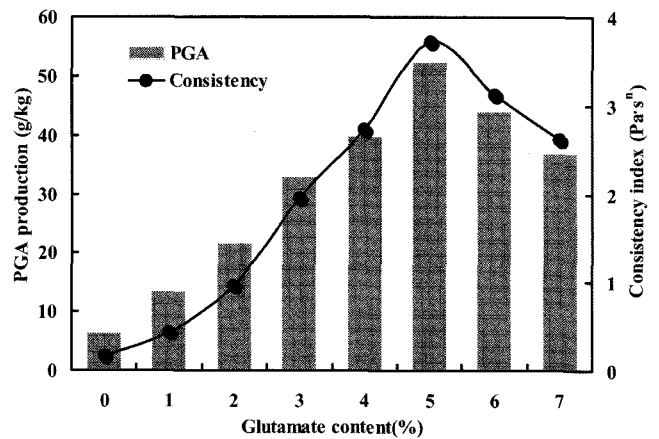


Fig. 2. Effect of glutamate content on the production of PGA and consistency index in the SMC fermented by *B. subtilis* PUL-A.

42°C에서 수행하였으며, 비지를 *B. subtilis* PUL-A를 이용하여 42°C에서 24시간 발효시킨 비지 발효물의 점조도가 최대인 것으로 나타났다 (Fig. 1). 고초균을 이용한 대두, 대두파쇄물 및 비지를 원료로 발효물을 제조하는 경우 점질물 최대 생산 온도 및 시간은 균주의 종류에 따라 차이가 있는 것으로 보고되었다[15].

Glutamate 첨가에 따른 비지 발효물의 점조도의 변화는 Fig. 2에서와 같이 glutamate의 농도가 증가할수록 점조도 값이 점차적으로 증가하는 것으로 나타났으며, glutamate를 5% 수준으로 첨가하였을 때 3.72 Pa·s<sup>n</sup> 으로 최대값을 나타내었으며, 발효비지에서 생합성된 생고분자물질은 59.9 g/kg이었으며, 이중 PGA의 함량은 52.2 g/kg으로서 87%의 순도를 나타내었다. Glutamate 첨가농도가 5% 일 때는 glutamate가 첨가되지 않은 대조구에 비하여 점조도와 PGA 생산량에서

각각 35배와 11배 이상의 차이를 나타내었다. 그러나 glutamate 농도가 5% 이상으로 첨가되는 경우 비지 발효물의 점조도 및 PGA 생산량이 점차 감소하였다. 이는 생고분자물질을 생산하는 고초균 중에서 glutamate 의존성 균주로 밝혀진 *B. subtilis* PUL-A는 발효배지로서 영양분이 불충분한 비지에 첨가된 glutamate를 효과적으로 이용하여 생고분자인 PGA를 다량 생산하는 것으로 사료된다. 그러나 비지와 콩파쇄물의 경우 첨가되는 glutamate 농도가 5% 이상 증가하게 되면 생고분자물질의 생산에 비효율적이 되면서 생산을 저해시키는 것으로 나타났다[7, 17]. 비지 발효물에 잔존하는 glutamate의 농도를 측정해본 결과 glutamate 5% 수준으로 첨가되는 경우 95% 이상의 전환율을 나타내었으나, 이보다 높은 농도로 glutamate가 첨가되면 glutamate 잔존량이 점차 커지는 것으로 나타났으며, 이는 콩 파쇄물을 이용한 고초균 발효에서와 유사한 경향을 보였다[7]. 비지에 첨가된 glutamate는 비지발효물의 PGA 생산에 직접적으로 관여하면서, glutamate 첨가량은 5%가 최적조건인 것으로 결정되었다.

**열처리 및 pH에 따른 생고분자물질의 점조도 및 분자량**

알코올 침전으로 회수하여 부분 정제한 발효비지의 생고분자물질은 glutamic acid의 중합체인 PGA를 87% 포함하였다. 이는 동일 비지 시료를 청국장장에서 분리된 다른 *Bacillus subtilis*로 발효시킨 비지발효물이 PGA 함량을 65% 정도 포함하는 것과 비교하여 비교적 높은 PGA 함량을 나타내고 있었으며[17], GPC로 분석한 PGA의 분자량은  $1.3 \times 10^6$ 으로 나타났다. pH 변화에 있어서의 생고분자물질의 점조도 및 분자량을 측정된 결과, Fig. 3에서와 같이 pH 6을 기준으로 산성 쪽으로 갈수록 점조도 값이 급격하게 감소하였으나 pH 6 이상에서는 점조도 값이 아주 완만하게 증가하는

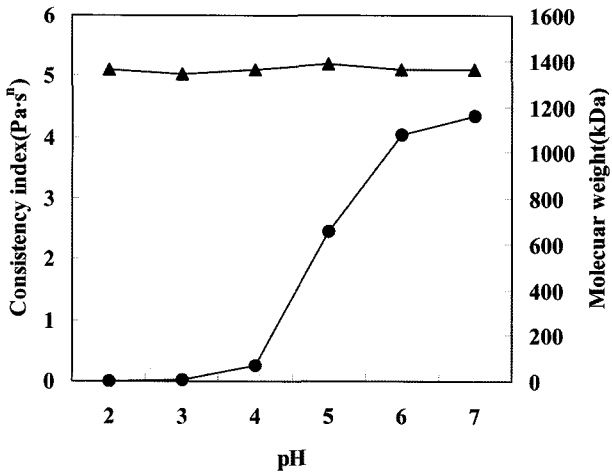


Fig. 3. Effects of pH on the consistency index and molecular weight of the biopolymer produced by *B. subtilis* PUL-A. Triangular, molecular weight; circle, consistency index.

것으로 나타났다. 점조도의 급격한 감소와는 달리 PGA의 분자량은  $1.3 \times 10^6$  값을 유지하면서 변화는 거의 나타나지 않았다. 이는 생고분자용액의 pH 산성화는 고분자 분자구조에 영향을 미치면서 점조도에 영향을 주는 것으로 사료된다. PGA는 구성단위인 glutamic acid의  $\gamma$ -carboxyl group이 이온화될 수 있는 음이온성 고분자로 수용액상의 pH에 따라서 다른 구조를 가진다고 알려져 있다[28]. 산성조건에서 glutamic acid의 carboxyl group이 비이온화 되면서 분자 내에서 음전하에 의한 반발력은 감소되지만, carboxyl group의 pK 값 이상의 pH를 띠는 알칼리조건에서는 음전하를 띄게 되면서 PGA 분자 내 음전하에 의한 반발력이 강해져서 분자는 더욱 팽창되어 수용액의 점조도는 높은 값을 유지하는 것으로 사료된다. 생고분자의 농도에 따른 유동특성을 보면 농도가 증가할수록 전형적인 비 뉴턴의 의가소성 흐름특성을 나타내었으며, 또한 농도 증가에 따라 항복력(yield stress)

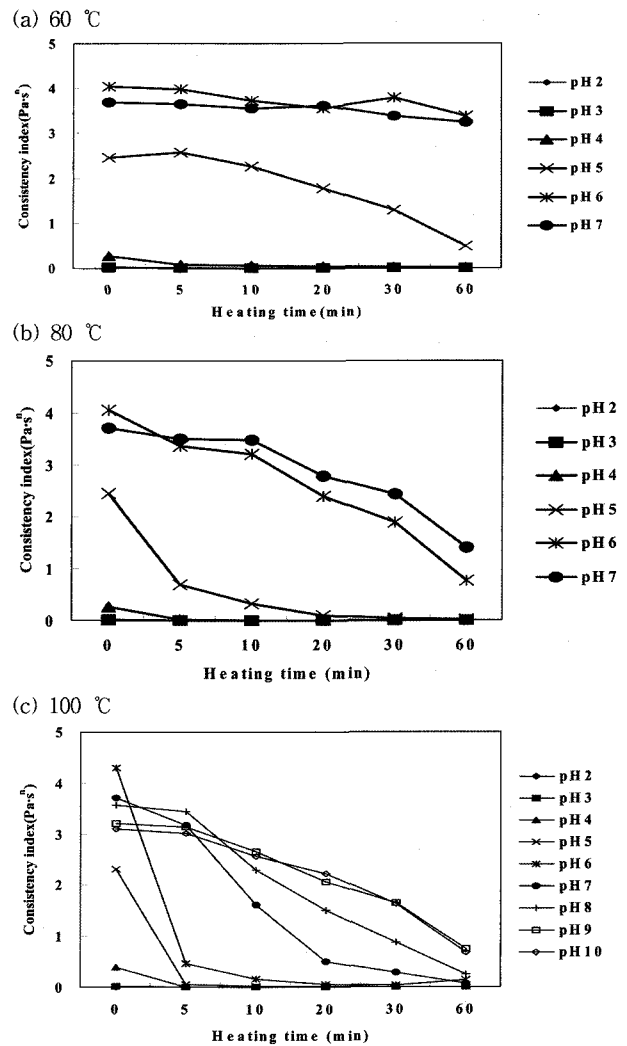
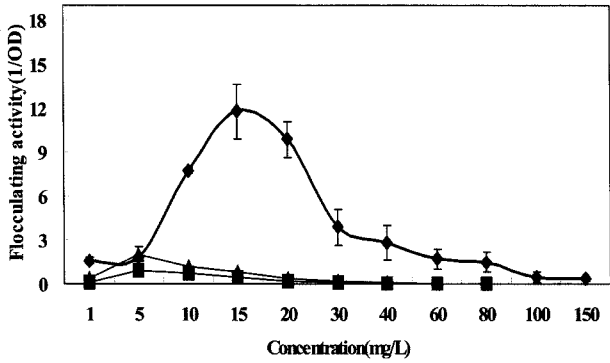


Fig. 4. Changes in the consistency index of biopolymer according to the heat-treatment at different pH. \*Biopolymer solution: 1% (w/v)



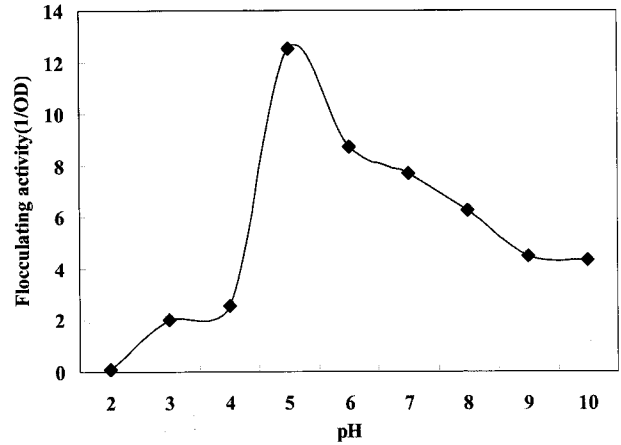
**Fig. 5. Effect of biopolymer concentration on flocculating activity.** Flocculating activities in kaolin clay suspensions containing 4.5 mM Ca<sup>2+</sup> and various concentrations of the biopolymer were measured. Diamond, 1,300 K; triangular, 64 K; square, 24 K.

이 증가되는 경향을 나타내었다.

pH 및 열처리가 생고분자물질의 점조도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1% 생고분자 용액의 pH를 각각 2-7로 조정 한 후, 60, 80, 100°C에서 시간별로 열처리를 수행한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. pH 5이하에서는 80°C와 100°C의 열처리에서 점조도 값이 급격하게 감소하는 것으로 나타났으며 열처리 20분 만에 점조도가 소실되는 것으로 나타났다. 점조도 값이 최대치를 나타낸 pH 6에서도 열처리 온도 100°C에서는 점조도 값의 급격한 감소를 나타내었다. 생고분자 용액의 점조도 값은 pH가 높을수록 열에 상당히 안정한 것으로 나타났으나, 열처리에 따른 점조도 값은 pH에 따라 급격하게 변화하는 것으로 나타났다.

**생고분자물질의 농도 및 분자량에 따른 응집활성**

생고분자물질의 농도에 따른 응집활성은 4.5 mM CaCl<sub>2</sub>을 함유한 kaolin clay suspension (5g/L)에 다양한 농도의 생고분자 용액을 첨가하여 측정하였다. 응집활성은 첨가된 생고분자농도 15 mg/L까지는 증가하였으나 그 이후로는 감소하였다(Fig. 5). 생고분자용액의 농도증가에 따른 응집활성의 감소는 생고분자 농도가 증가할수록 kaolin clay 입자 표면에 과잉의 응집제가 흡착되면서 생기는 분자 간의 반발에 따른 오히려 분산[18]의 결과로 생각된다. 응집활성이 최대치를 나타낸 생고분자용액의 농도는 15 mg/L로 나타났으며, 저분자 PGA(24K, 64K)를 이용한 응집활성에서는 응집활성이 크게 감소하는 것으로 나타났으며, 24K와 64K의 경우에는 생고분자 농도 5 mg/L 일 때 최대 응집활성을 나타내었다(Fig. 5).



**Fig. 6. Effect of initial pH on flocculating activity of biopolymer.** Flocculating activities in kaolin clay suspensions containing 4.5 mM Ca<sup>2+</sup> and 0.1% of the biopolymer were measured.

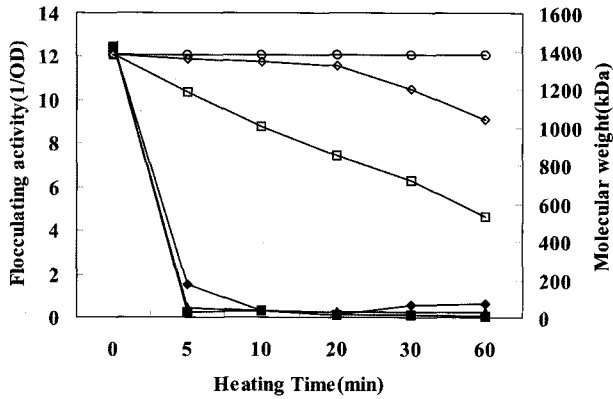
**응집활성에 미치는 무기염류 및 pH 와 온도의 영향**

생고분자의 응집활성은 Ca<sup>2+</sup> 과 Mg<sup>2+</sup> 을 첨가할 때 크게 증가하였으나, 3가 양이온인 Fe<sup>3+</sup>와 1가 양이온인 Na<sup>+</sup> 첨가한 경우는 급격하게 감소하는 것으로 나타났다(Table 1). 최대 응집활성을 나타낸 Ca<sup>2+</sup> 이온의 농도는 4.5mM 을 나타내었다. Ca<sup>2+</sup>와 Mg<sup>2+</sup> 이온의 경우는 kaolin clay입자와 서로 결합하는 PGA의 carboxyl group의 남아있는 negative charge의 중성화 및 안정화에 관여하여 응집력을 향상시키는 것으로 여겨진다[12-13]. 또한 3가 양이온인 Fe<sup>3+</sup>를 첨가할 시 응집활성이 급격하게 감소하는 것은 kaolin clay suspension에 FeCl<sub>3</sub>을 첨가하게 되면 pH가 2.66으로 급격하게 감소하기 때문인 것으로 여겨진다.

반응액(reaction mixture)의 pH가 생고분자 응집활성에 미치는 영향을 검토하기 위해, kaolin clay suspension, 90mM CaCl<sub>2</sub> 용액과 생고분자 (15mg/L) 용액을 혼합하여 HCl 과 NaOH를 이용하여 pH를 조정 한 후 응집활성을 측정하였다. 그 결과 pH 5에서 최대 응집활성을 나타내었으며, 산성부근에서는 급격하게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6). 최대 응집활성을 나타낸 pH 5의 생고분자 용액을 60°C, 80°C, 100 °C에서 열처리를 하여 응집활성을 측정한 결과, 열처리시간이 길어질수록 응집활성이 급격하게 감소하는 것을 나타내었다 (Fig. 7). 또한 열처리시간에 따른 PGA 분자량 변화를 보면, 100°C의 경우에는 열처리 시간이 증가함에 따라서 PGA분자량의 변화가 크게 감소하였으며, 80°C에서는 완만하게 감소하는 경향을 보였다. 반면에 60°C에서 60분 동안 열처리된 생고분자의 PGA의 분자량은 변화가 없었다. 이는

**Table 1. Effect of various cations on flocculating activity of biopolymer.**

Suspension	Flocculating activity (1/OD)						
	Al <sup>3+</sup> (AlCl <sub>3</sub> )	Fe <sup>3+</sup> (FeCl <sub>3</sub> )	Fe <sup>2+</sup> (FeSO <sub>4</sub> )	Ca <sup>2+</sup> (CaCl <sub>2</sub> )	Mg <sup>2+</sup> (MgCl <sub>2</sub> )	Na <sup>+</sup> (NaCl)	K <sup>+</sup> (KCl)
Kaolin clay	0.90	0.37	1.89	13.04	6.77	0.29	0.87



**Fig. 7. Changes in flocculating activity and molecular weight of flocculant following heat-treatment.** After heating of biopolymer solution (1g/L, pH 5) at 60, 80 and 100°C, flocculating activity in a kaolin clay (close symbol) and molecular weight(open symbol) were measured. Square, 100°C; diamond, 80°C; circle, 60 °C.

생고분자에 포함된 PGA가 산성조건에서 열처리 온도에 따라서 PGA의 분자량의 크기를 조절할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 열처리에 따른 분자량의 변화가 없음에도 불구하고 응집활성이 낮아지는 경향을 보였다. 이는 PGA의 점조도가 응집활성에 크게 영향을 미치며, 응집활성에서의 일시적인 감소는 저분자로 분해되어 일어나는 화학적 구조의 비가역적 변화에 의한 것이 아니라는 것을 나타낸다[26].

## 요 약

비지로부터 분리한 *Bacillus subtilis* PUL-A 균주를 이용한 비지발효물로부터의 biopolymer flocculant 생산은 glutamate 함량이 5% 첨가한 후 42°C에서 24시간동안 발효하는 경우에 PGA 생산량은 52.2g/ kg으로 최대를 나타내었다. 부분 정제된 biopolymer flocculant의 PGA의 함량은 87%이었으며, 분자량은  $1.3 \times 10^6$  dalton 이상을 나타내었다. PGA의 pH 변화에 따른 점조도는 pH 6을 기준으로 산성 쪽으로 갈수록 급격하게 감소하였으나, 분자량의 변화는 거의 나타나지 않았다. Bioflocculant의 유동특성은 농도가 증가할수록 전단속도가 증가되어 전형적인 의가소성 흐름특성을 나타내었으며, 항복력도 증가하였다. Bioflocculant 용액의 점조도 값은 pH가 높을수록 열에 상당히 안정하였으나 열처리온도 및 시간이 증가할수록 pH에 따라 급격하게 감소하였다. Kaolin clay suspension을 이용한 응집활성에서 bioflocculant의 농도가 15 mg/L 일 때 최대 응집활성을 나타내었으며, 응집활성은  $\text{Ca}^{2+}$ 을 첨가할 때 가장 높게 증가하였으며 최적 농도는 4.5mM로 나타났다. 그러나 3가 양이온인  $\text{Fe}^{3+}$ 을 첨가할 경우는 응집활성이 급격하게 감소하였다. 응집활성은 pH 5에서 가장 높게 나타났으며, 60~100°C에서 열처리함에 따라 응집활성은 급격하게 감소하였다. 또한 저분자량의 PGA 보다는 native 고분자량의 PGA가 응집

활성에 매우 효과적인 것으로 나타났다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원과 산업자원부의 지역혁신 인력양성 사업으로 지원된 것입니다.

## REFERENCES

1. Ashiuchi, M., T. Kamei, D. H. Baek, S. Y. Shin, M. A. Sung, K. Soda, T. Yagi, and H. Misono. 2001. Isolation of *Bacillus subtilis*(chungkookjang), a poly- $\gamma$ -glutamate producer with high genetic competence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**: 764-769.
2. Ashok, P., R. S. Carlos, and M. David. 2000. New developments in solid state fermentation:I-bioprocesses and products. *Process. Biochem.* **35**: 1153-1169.
3. Baek, J., I. S. Lee, and S. P. Lee. 2002. Characterization and fermentation characteristics of lactic acid bacteria isolated from soybean curd residue(Biji). *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* **31**: 583-588.
4. Choi, S. H., J. S. Park, K. S. Whang, M. H. Yoon, and W. Y. Choi. 2004. Production of microbial biopolymer, poly( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* BS 62. *Agric. Chem. Biotechnol.* **47**: 60-64.
5. Genc, M., M. Zorba, and G. Oza. 2002. Determination of rheological properties of boza by using physical and sensory analysis. *J. Food. Eng.* **52**: 95-98.
6. Hong, X., J. Min, L. Hui, L. Dingqiang, and O. Pingkai. 2005. Efficient production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. *Proc. Biochem.* **40**: 519-523.
7. Jang, E. K., J. H. Seo, S. C. Park, B. S. Yoo, and S. P. Lee. 2007. Characterization of mucilage produced from solid-state fermentation of soybean grit by *Bacillus firmus*. *Food. Sci. Biotechnol.* *In Press*. Available 31 October. **16**(5).
8. Kunioka, M. and K. Furusawa. 1997. Poly ( $\gamma$ -glutamic acid) hydrogel prepared from microbial poly( $\gamma$ -glutamic acid) and alkane diamine with water-soluble carbodiimide. *J. Appl. Polym. Sci.* **65**: 1889-1893.
9. Kurane, R., K. Takeda, and T. Suzuki. 1986. Screening for and characteristics of microbial flocculants. *Agr. Biol. Chem.* **50**: 2301-2307.
10. Kurane, R., K. Toeda, K. Takeda, and T. Suzuki. 1986. Culture conditions for production of microbial flocculant by *Rhodococcus erythropolis*. *Agr. Biol. Chem.* **50**: 2309-2313.
11. Kurane, R., K. Hatamochi, T. Kakuno, M. Kiyohara, M. Hirano, and Y. Taniguchi. 1994. Production of a bioflocculant by *Rhodococcus erythropolis* S-1 grown on alcohols. *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**: 428-429.
12. Levin, S. and W. T. Friesen. 1987. Flocculation of colloid particles by water soluble polymers. pp. 3-20. *In* Y. A. Attia (ed.), *Flocculation in biotechnology and separation system*,

- Elsevier, Amsterdam.
13. Levy, N., S. Magdasi, and Y. Bar-Or. 1992. Physico-chemical aspects in flocculation of bentonite suspensions by a cyanobacterial. *Water Res.* **26**: 249-254.
  14. Oh, O. and J. S. Han. 2004. A survey on perception and usage of Bizi(soybean curd residue). *Int. J. Hum. Ecol.* **42**: 17-26.
  15. Oh, S. M., J. H. Seo, and S. P. Lee. 2005. Production of fibrinolytic enzyme and peptides from alkaline fermentation of soybean curd residue by *Bacillus firmus* NA-1. *J. Korean. Soc. Food. Nutr.* **34**: 904-909.
  16. Oh, S. M., C. S. Kim, and S. P. Lee. 2006. Functional properties of soybean curd residue fermented by *Bacillus* sp. *J. Korean. Soc. Food. Nutr.* **53**: 115-120.
  17. Oh, S. M., E. K. Jang, J. H. Seo, M. J. Ryu, and S. P. Lee. 2007. Characterization of the  $\gamma$ -Polyglutamic acid produced from solid-state fermentation of soybean milk cake using *Bacillus* sp. *Food. Sci. Biotechnol.* **16**: 509-514.
  18. Serita, H. 1995. Flocculation of kaolin suspension with graft copolymers of chitosan. *Kobunshi Ronbunshu.* **52**: 410-414.
  19. Shih, I. L. and Y. T. Van. 2001. The production of poly- $\gamma$ -glutamic acid from microorganisms and its variation applications. *Bioresour. Technol.* **79**: 207-225.
  20. Shurtliff, W. and A. Aoyagi. 1995. Tofu and Soymilk Production, pp. 168-169. New Age Food Study Center, Lafayette, CA, USA.
  21. Takagi, H. and K. Kadowaki. 1985. Purification and chemical properties of a flocculant produced by *Paecilomyces*. *Agr. Biol. Chem.* **49**: 3159-3164.
  22. Ashiuchi, M. and Misono, H. 2005. Polysaccharides and polyamides in the food industry: properties, production, and patents. pp.387-670. A. Steinbuchel and S.K. Rhee (eds.). Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
  23. Véronique, B. M., O. Olivier, and C. Pierre. 2003. Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochem.* **38**: 881-896.
  24. Xu, J., S. Chen, and Z. Yu. 2005. Optimization of process parameters for poly  $\gamma$ -glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTC202048. *Process Biochem.* **40**: 3075-3081.
  25. Yokoi, H., O. Natsuda, J. Hirose, S. Hayashi, and Y. Takasaki. 1995. Characteristics of a biopolymer flocculant produced by *Bacillus* sp. PY-90. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 378-280.
  26. Yokoi, H., T. Arima, J. Hirose, S. Hayashi, and Y. Takasaki. 1996. Flocculation properties of poly( $\gamma$ -glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. *J. Ferment. Bioeng.* **82**: 84-87.
  27. Zajic, J. E. and A. Leduy. 1973. Flocculant and chemical properties of a polysaccharide from *Pullularia pullulans*. *Appl. Microbiol.* **25**: 628-635.
  28. Zanuy, D., C. Aleman, and S. Munoz-Guerra. 1998. On the helical conformation of un-ionized poly( $\gamma$ -D-glutamic acid). *Int. J. Biolog. Macromol.* **23**: 175-184.

(Received Aug. 8, 2007/Accepted Sep. 9, 2007)