KOREAN J. POST-HARVEST SCI. TECHNOL. AGRI. PRODUCTS
Vol. 4. No. 3, pp. 343~349

Bacillus sp. K-1과 변이주들에 의해 생산된 Biopolymer의 물성에 미치는 온도 및 농도의 영향

정낙현 · 윤광섭* · 임무현**

가톨릭상지전문대학 식품영양과, *대구효성가톨릭대학교 식품공학과, **대구대학교 식품공학과

Effects of Temperature and Concentration on the Rheological Properties of the Biopolymer Produced by *Bacillus* sp. K-1 Strain and Mutants

Nack-Hyun Choung, *Kwang-Seob Youn and **Moo-Hyun Yim

Department of Food and Nutrition, Catholic Sangji Junior College
**Department of Food Science and Technology, Catholic University of Taegu-Hyosung*
***Department of Food Technology, Taegu University*

Abstract

The rheological properties of biopolymers produced by *Bacillus* sp. K-1 and its mutant strains(KM-21, KM-83) were studied at the temperature ranges with 20~80℃, at the concenration of 2~6%, at the pH ranges from 3.0 to 9.0 and at the shear rate of 9.3-930sec^{-1}. The apparent viscosity of biopolymers was decreased with increasing shear rate, and thereby biopolymers showed pseudoplastic characteristics. It was found that the apparent viscosity models respected to temperature, concentration and both temperature and concentration were expressed by Arrhenius Model, Exponential Model and combined of the above two Models. Therefore, the apparent viscosity could be predictable by Arrhenius and Exponential Models with high R^2.

Key words : biopolymers, rheology, modeling

서 론

미생물을 이용한 biopolymer의 생산은 1942년 *Leuconostoc mesenteroides*의 배양에 의한 dextran을 생산한 이래로 xanthan gum, zooglan, pullulan과 curdlan등의 생산이 일반화되고 있다[1-4]. 미생물에 의해 생성되는 세포외 다당류는 미생물의 1, 2차 대사산물로서 일반적으로 다당류나 그의 유도당으로 구성되어 있으며, 분자량이나 결합양식 등에 따라서 다양한 물성을 나타내는 수용성의 gum이다[5-7]. 현재 이러한 물성적 특성으로 인하여 많은 양의 biopolymer가 식품공업에서 물성개량제, 유화제, 안정제, 응고제, 피막형성제, 보습제 등으로 다양하게 이용되고 있다[8,9]. 특히 미생물이 생산하는 고분자 물질은 항보체 활성을 나타내므로서 생체 내에서 면역활성이 증가하는 것으로 알

Corresponding author : Kwang-Seob Youn, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Taegu-Hyosung, Hayang, 712-702, Korea

려져 그 효능과 이용분야에 대한 관심이 점차 높아지고 있다[10,11]. 이들 미생물이 생성하는 다당류 중 *Bacillus*균에 의해 생산되는 점질물은 청국장균(*Bacillus subtilis*)을 증자한 대두에 접종하여 발효숙성시킬 때 생성되는 특유의 점질성 물질로 polyglutamate와 levan form fructan이 혼합되어 있으며, 이들은 제품의 물성적 특성에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이들 점질물의 특성을 이용하여 혈액의 흐름에 직접 영향을 주는 dextran이나 유체식품의 물성조절에 사용되는 등 이들 polymer들의 유동학적 특성이 많이 응용되기 때문에 현재 biopolymer의 물성학에 관한 많은 연구들이 수행되어 오고 있다[12-14]. 우리나라의 전통 발효식품인 동시에 biopolymer인 점질물을 함께 생산하는 청국장에 대한 연구로는 청국장 숙성과정 중 당성분의 변화와 아미노산의 변화에 관한 연구[15]등이 있으며, 고분자 물질인 청국장의 점질물에 관한 연구는 전무한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 볏짚으로 부터 분리한 *Bacillus* sp. K-1[16]을 분리하여 다량의 점질물을 생산하는 변이주 KM-21, KM-83을 유도하고, 이들 변이주가 생산한 점질물의 특성과 모균주가 생산한 점질물의 특성을 서로 비교 검토하였다. 또 본 실험에서 측정된 점도의 최적함수를 유도하여 예측모델을 수립하고 점도와 관련된 변수에 따라 점성물질의 특성을 파악함으로써 새로운 *biopolymer*의 개발 가능성과 함께 그 이용가능성을 파악하기 위한 기초자료로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

실험에 사용한 균주는 볏짚으로 부터 분리·동정한 *Bacillus* sp. K-1과 이의 변이주 KM-21과 KM-83을 종균으로 사용하였으며[16], 이들 균은 T.S.B.(Tryptic Soy Broth, Difco)배지에 보존하였고, TSB 액체배지에 종배양 한 후 Table 1과 같은 배지조성으로 38℃에서 72시간 배양하여 점성물질을 생산하였다.

Table 1. The Composition of culture media for the biopolymer production

Ingredients	Concentration(%)
Sucrose	8.0
M.S.G.*	2.0
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0.4
$MgSO_4.7H_2O$	0.08
Biotin	0.3g/ml
pH	6.0

*MSG; Monosodium glutamate

Polymer 생산

균의 배양은 500ml 삼각 플라스크에 200ml의 배지를 넣고 2%로 종균을 접종한 후 200rpm으로 교반하면서 38℃에서 72시간 배양하여 균체를 배양하였다. Polymer의 회수는 Tanaka 등[17]에 의한 방법에 따라 배양액을 8,000rpm에서 20분간 원심분리한 다음, 상등액에 동량의 ethanol을 첨가하여 4℃에서 하룻밤 정치시켰다가 다시 원심분리하여 polymer를 회수하였다. 회수한 점질물을 증류수에 용해한 후 다시 ethanol로 침전, 회수하는 조작을 2회 반복하여 정제하고 이를 동결 건조시켜 시료로 사용하였다.

점도측정

다당류의 물성학적 성질을 조사하기 위하여 회전점도계(Model LVDV-II, Brookfield)를 사용하였으며, 인산-시트르산 완충용액과 붕산-염화칼륨 완충용액으로 pH를 3.0, 5.0, 7.0, 9.0으로 조제한 후 2, 4, 6% 농도별로 용해한 시료의 15㎖를 small sample adapter에 넣고 circulate 항온수조로 30분이상 열적평형을 이룬 후 각 온도에서 측정하였다. 점도계의 전단속도를 9.3에서 930(1/s)까지 증가시키면서 일정한 값에 도달한 apparent viscosity를 측정하였다[13].

겉보기 점도의 온도, 농도 의존성

온도와 농도의 변화에 따른 겉보기 점도의 변화로서 유동특성을 조사하였으며, 이들 변수에 의한 점도의 변화를 예측할 수 있는 모델을 수립하고자 온도와 농도에 따른 기존의 모델식을 적합시켜 그 적합도를 알아 보았다. 먼저 온도변화에 따

른 각 시료의 점도변화는 Arrhenius model식(1)로 나타내었으며, 농도의존성은 지수함수모델 식(2)와 power model 식(3)에 각각 적용시켜 그 적합도를 조사하였다. 온도와 농도에 따른 관계식과 그 적합도를 얻기 위하여 SAS 통계 package 중 regression program을 이용하여 예측 모델식을 수립하였다.

$$\mu = A \exp(Ea/RT) \quad (1)$$

$$\mu = A \exp(k C) \quad (2)$$

$$\mu = A\ Cn \quad (3)$$

where, μ : Apparent viscosity, Pa · s

Ea : Activation energy of flow, J/kg · mol

R : Gas constant, J/kg · mol · K

T : Absolute temperature, K

C : Concentration, %

A, k, n : Experimental constants

결과 및 고찰

시료별 겉보기 점도의 변화

전단속도의 증가에 따른 겉보기 점도의 변화를 관찰하고자 시료를 pH 7.0의 완충용액에 4% 농도로 용해한 각 시료를 20℃에서 전단속도를 9.3 ~ 930 sec^{-1} 로 변화시키면서 겉보기점도를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

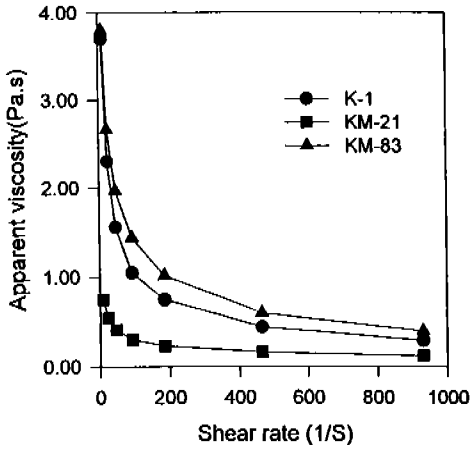

Fig. 1. Influence of shear rate on the apparent viscosity of poymers at 20℃, 4% and pH 7.0.

그림에서 보는 바와 같이 세시료 모두 전단속도의 증가에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 특히 낮은 전단속도에서는 점도의 급격한 감소가 있었으나 전단속도가 증가함에 따라 그 감소율은 낮아져서 일정한 값에 도달하는 pseudoplastic 특성을 나타내었다. 세 시료 중 변이주 KM-21의 시료가 가장 낮은 값을 보였고 모균주인 K-1 과 변이주 KM-83이 생산한 시료는 비슷한 정도의 점도를 보였으나 KM-83이 약간 더 높은 값을 보였다. 이는 세 시료의 biopolymer 구성물질의 조성 비율과 분자량 크기 등이 다르기 때문에 각각 다른 유동학적 특성을 나타내는 것으로 생각된다. 따라서 변이주를 유도하여 물성이 다른 biopolymer의 생산이 가능하며, 물성적 특성을 검토하여 적합한 응용성을 찾을 수 있을 것으로 생각된다.

온도의 변화에 따른 겉보기점도의 변화

온도를 함수로 하여 리올로지 특성을 파악하고자 하는 연구[18]가 활발히 진행되고 있는데 온도 변화에 따른 다당류의 물성학적 특성을 알아 보기 위하여 시료를 4%의 농도로 인산 완충용액에 용해하여 20℃에서 80℃까지 온도를 변화시키면서 점도를 측정한 결과, 세 시료 모두 온도가 증가함에 따라 점도가 점차 감소하는 경향을 보여 일반적으로 다당류들의 점도가 절대온도의 역수(1/T)에 비례한다는 점과 서로 일치하는 것으로 나타났다. 이는 열에 의한 교란으로 흐름에 대한 저항력이 적어지기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 모균주 K-1과 KM-83이 생산한 두 biopolymer는 변화에 따라 점도의 변화가 많았으나, KM-21이 생산한 다당류는 온도 변화에 따른 점도의 변화가 비교적 적은 것으로 나타났다. 이와 같이 세 시료간의 점성차이는 시료의 구성성분 차이에 따른 분자간의 결합력 차이와 이로 인한 물성학적 특성의 차이에 기인하는 것으로 사료된다. 본 실험에서 시료의 온도의존성을 살펴보기 위하여 사용한 예측모델로는 기존의 Arrhenius 모델인 식 (1)을 이용하였다. 즉 전단속도 93 sec^{-1}에서 1/T 와 $\ln(\mu)$에 대하여 회귀분석하여 그 적합도를 조사하였으며 그 적합도의 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 세시료 모두 4%의 농도에서 측정한 값으로, 겉보기점도와 온도의 역수

와의 관계가 모두 직선적인 결과를 보여 Arrhenius 식이 온도의존성을 나타내는 예측모델로 적합함을 알 수 있었다. 이들 결과로 부터 농도와 pH변화에 따른 실험상수와 활성화 에너지, 그리고 적합도를 구해 본 결과를 Table 2와 3에 나타내었다. 농도와 pH의 변화에 관계없이 대부분의 R^2 가 0.95 이상으로 높은 적합도를 보여 각 조건에서 온도에 따른 겉보기점도의 예측 모델이 사용될 수 있을 것으로 생각한다. 이들 세 시료중 KM-21이 생산한 다당류가 가장 높은 활성화 에너지를 보이므로써 분자간의 결합력이 크다는 것을 알 수 있었다.

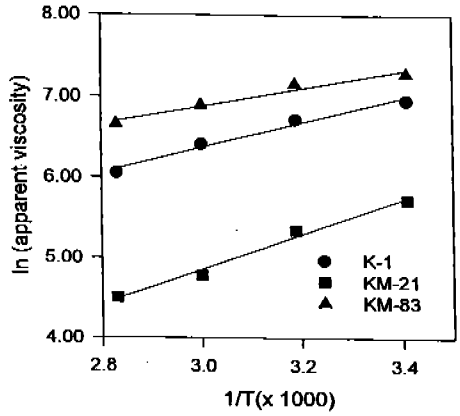

Fig. 2. Effects of temperature on the apparent viscosity using Arrhenius model.

Table 2. Effect of temperature on apparent viscosity of polymers using Arrhenius model at various concentation

Sample	Concen-tration (%)	Viscosity Model Constants A	Ea ($\times10^4$ kJ/kg mole)	Correlations coefficients R^2
KM-21	2	0.0489	1.917	0.9768
	4	0.1823	1.815	0.9896
	6	0.2436	2.183	0.9381
K-1	2	0.3139	1.787	0.9523
	4	5.6091	1.284	0.9834
	6	1.9155	2.119	0.9586
KM-83	2	3.7670	1.061	0.9933
	4	37.6289	0.899	0.9628
	6	398.5368	0.572	0.9586

농도의 변화에 따른 겉보기점도의 변화

농도에 따른 겉보기 점도의 변화를 알아보고자 각 농도에서의 겉보기 점도를 전단속도 93 sec^{-1}에서 측정하였다. 각 시료를 2%, 4%, 6%의 농도로 인산완충용액(pH 7.0)에 용해하여 농도에 따른 점도의 변화는 세시료 모두 농도의 증가에 따라 급격한 증가를 나타내었다. 이들 세 시료 중에서 모균주인 K-1의 시료가 농도 의존성이 가장 큰 점성 물질인 것으로 나타났으며, 특히 변이주 KM-21의 시료가 상대적으로 농도 의존성이 낮은 것으로 나타났다. 세 시료 모두 유동지수(n)가 1이하인 의가소성 유체의 특성을 나타내었고 농도가 높을수록 의가소성 특성이 커짐을 알 수 있었다.

Table 3. Effect of temperature on apparent viscosity of polymers using Arrhenius model at various pH

Sample	pH	Viscosity Model Constants A	Ea ($\times10^4$ kJ/kg mole)	Correlations coefficients R^2
KM-21	3.0	0.0241	2.081	0.9868
	5.0	0.0001	4.437	0.9965
	7.0	0.1823	1.815	0.9896
	9.0	0.1639	1.706	0.9326
K-1	3.0	0.1894	1.934	0.9874
	5.0	0.0077	2.904	0.9637
	7.0	5.6091	1.285	0.9834
	9.0	1.5653	1.562	0.9664
KM-83	3.0	0.0202	2.122	0.9620
	5.0	0.5135	1.926	0.9725
	7.0	37.6788	0.899	0.9628
	9.0	92.6213	0.803	0.9837

시료의 종류에 관계없이 농도가 증가함에 따라 겉보기점도가 현저하게 증가하는 지수적 증가 추세를 보여주었는데 이러한 농도에 따른 겉보기점도의 증가를 모델화 하고자 Harper[19]는 토마토 쥬스와 농축현탁액의 경우 Power law model이 적합하다고 보고 하였으며, 일반적으로 지수적으로 증가하는 경우에 해당하는 Exponential model에 각각 적합시켜 각 시료의 겉보기 점도에 대한 농도 의존성을 살펴 본 결과를 Table 4, 5에 나타내었다. 농도에 따른 겉보기 점도 예측모델이 각 온도에서 상관계수 R^2 값이 대부분 0.95 이상으로 적합함을 보였으며 pH에 따라서는 다소 낮은 적합도의 경향을 보였지만, 전반적으로 온도와 pH에 상관없이 두 모델 모두 높은 적합도를 보였다. 본 실험에서는 Power law model에 비해 Exponen-

Table 4. Effect of concentration on apparent viscosity of biopolymers using Exponential and Power law model at various temperature

Sample	Temperature (℃)	Exponential Model			Power law Model		
		A	k	R^2	A	n	R^2
KM-21	20	23.0231	0.7459	0.9532	16.6798	2.5620	0.8624
	40	27.6520	0.5342	0.9965	20.8155	1.8759	0.9435
	60	10.7941	0.6578	0.9846	7.8177	2.2894	0.9284
	80	8.1989	0.6623	0.9794	5.9733	2.2985	0.9162
K-1	20	84.7664	0.7675	0.9514	63.5864	2.6018	0.8134
	40	65.6672	0.7274	0.9562	47.7939	2.5011	0.8788
	60	17.2825	0.9289	0.9964	10.4510	3.2692	0.9572
	80	46.8616	0.6256	0.9642	35.3571	2.1575	0.8816
KM-83	20	84.3858	0.6675	0.9978	54.0116	2.4150	1.0000
	40	61.4239	0.6981	0.9862	37.7618	2.5409	1.0000
	60	47.4273	0.7062	0.9876	29.2535	2.5636	1.0000
	80	32.5735	0.7607	0.9936	19.9673	2.7373	0.9981

Table 5. Effect of concentration on appa- rent viscosity of biopolymers using Exponential and Power law modelat various pH

Sample	pH	Exponential Model			Power law Model		
		A	k	R^2	A	n	R^2
KM-21	3.0	17.3137	0.6043	0.8867	14.1229	2.0310	0.7789
	5.0	18.3641	0.7102	0.9778	130710	2.4649	0.9154
	7.0	23.0231	0.7459	0.9542	16.6798	2.5620	0.8624
	9.0	24.5570	0.6347	0.8468	20.3890	2.1117	0.7236
K-1	3.0	46.6839	0.6200	0.9944	33.3514	2.1825	0.9568
	5.0	59.3231	0.7963	0.9765	40.9151	2.7565	0.8992
	7.0	84.7664	0.7675	0.9132	63.5864	2.6018	0.8188
	9.0	58.6096	0.7753	0.9836	39.6503	2.7062	0.9233
KM-83	3.0	3.6895	0.9027	0.9954	2.3043	3.1630	0.9442
	5.0	54.6418	0.7278	0.9821	33.2215	2.6418	1.0000
	7.0	84.3858	0.6678	0.9962	54.0116	2.4150	1.0000
	9.0	107.1039	0.7057	0.9441	62.0598	2.6085	0.9968

tial model이 더 높은 상관계수(> 0.95)를 나타내었으나 하[20]의 보고에 의하면 토마토 케찹의 농도의존성을 나타내기 위해서는 Power Model이 더 적합하다고 보고하였다. Fig. 3에서는 농도의존성을 Exponential model에 적합시킨 결과를 나타내었는데 세시료 모두 20℃의 온도에서 측정한 것으로서 KM-21의 시료는 다소 적합도가 떨어졌으나 전반적으로 직선적인 결과를 보여 Exponential model이 적합함을 확인 할 수 있었다.

pH변화에 따른 겉보기점도의 변화

pH에 변화에 따른 점성의 예측모델로는 일반적으로 많이 사용되는 이차식에 적용하여 적합성을 알아본 결과 일부구간에서 적합도가 높지 않아 범용적으로 사용되기에는 미흡한 것으로 나타났다.

겉보기 점도의 온도 · 농도의존성

온도와 농도의 변화에 따른 겉보기 점도의 변화를 예측하는 모델을 수립하고자 온도의존성을 나타내는 모델로는 Arrhenius model을 적용하고, 농도의존성은 Exponential model로서 예측할 수 있었으므로 온도 및 농도에 따른 예측모델식을 다음과 같이 나타낼수 있다.

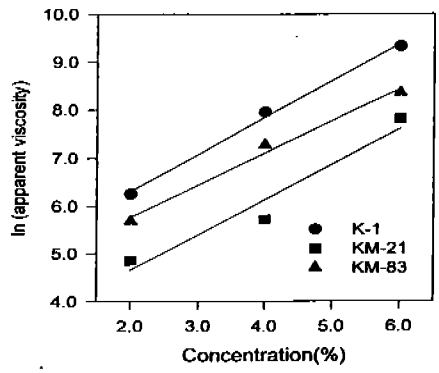

Fig. 3. Effects of concentration on the apparent viscosity using Exponen- tial model.

$$\mu = \mathrm{Exp}(A/T - B) \cdot \mathrm{Exp}(k\ C)$$

여기서 A, B, k는 실험상수로서 얻어진 계수값들은 Table 6에 나타내었다. 따라서 세 시료 모두 온도와 농도에 따른 점성의 변화를 Arrhenius 및 Exponential model의 복합모델로 예측할 수 있었으

Table 6. Effect of temperature and concentration on apparent viscosity of biopolymers at various pH

Sample	pH	Viscosity Model Constants			Correlation coefficients
		A	k	B	R^2
KM-21	3.0	3106.15	0.3597	-6.86	0.9365
	5.0	627.54	0.7628	-13.11	0.9460
	7.0	2371.87	0.6500	-4.64	0.9611
	9.0	2674.76	0.5827	-5.76	0.9578
K-1	3.0	2444.71	0.4751	-3.88	0.9375
	5.0	4026.86	0.7382	-9.17	0.9697
	7.0	2081.19	0.7623	-2.67	0.9430
	9.0	3715.89	0.7536	-8.43	0.9400
KM-83	3.0	2991.29	0.5320	-7.48	0.9836
	5.0	2682.46	0.7798	-5.30	0.9664
	7.0	1015.36	0.7081	0.82	0.9847
	9.0	1309.95	0.7411	0.06	0.9469

며 예측모델의 상관계수값이 비교적 높게 나타나 예측 모델이 적절하게 수립되었음을 알 수 있었다. 따라서 주어진 모델식에 아래의 계수값을 사용하면 임의의 온도와 농도에서 점도를 예측할 수 있을것으로 생각된다.

요 약

볏짚으로부터 분리한 *Bacillus* sp. K-1와 그의 변이주를 개발하여 이들이 생산한 점질물들의 유동특성을 온도 20 ~ 80℃, 농도 2 ~ 6 %, pH 3.0 ~ 9.0에 대하여 전단속도 9.3 ~ 930 sec^{-1}의 범위에서 연구하였다. 세 시료 모두 전단속도의 증가에 따라 겉보기 점도가 감소하는 pseudoplastic 유동특성을 나타내었다. 겉보기 점도에 따른 온도의존성을 예측하고자 활용한 모델은 Arrhenius 모델로 각각의 온도나 pH에서 높은 적합도를 보였다. 농도의존성을 알아보고자 적용한 모델은 Power 모델과 Exponential 모델로서 Exponential 모델이 좀더 높은 적합도를 보여 농도의존성을 예측하는 모델로 선정할 수 있었다. pH의존성을 나타내고자 이차식에 적용하여 적합성을 알아본 결과 일부구간에서 적합도가 높지 않아 범용적으로 사용되기에는 미흡한 것으로 나타났다. 따라서 온도와 농도에 따른 겉보기 점도 예측식으로 Arrhenius 모델과 Exponential 모델을 고려한 μ = Exp(A/T - B) · Exp(k C) 로 예측모델을 수립하였다.

참 고 문 헌

1. Fyfe, J.A.M. and Govan, J.R.W. (1980) Alginate synthesis in mucoid Psedomonas aeroginosa ; A chromosomal locus involved in control. J. Microbiol., 119, 443
2. Goldberg, J.B. and Ohman, D.E. (1987) Construction and charaterization of Pseudomonas aeroginosa algB mutants ; Role of alg B in high-level production of alginate. J. Bacteriol., 169(4), 1593
3. Glicksman, M. (1982) Food Hydrocollids. Vol. I., CRC Press, Boca Roton, 47
4. Dolph, P.J., Majerczak, D.R. and Coplin, D.L. (1988) Characterization of a gene cluster for exopolysaccharide biosynthesis and virulence in Erwina stewarttii. J. Bacteriol., 170(2), 865
5. Ueda, S. and Kono, H. (1965) Polysaccharide produced by the genus pullularia. Applied Microbiol. 13, 882
6. Catly, F.T. (1970) Pullulan, a relationship between molecular weight and fine structure. F. E. B. S. Letters, 10, 190
7. Wilkinson, J.F. (1958) The extracellular polysaccharides of bacteria. Bacteriogical Reviews, 22, 47
8. Soldki, M.E. and Cadmus, M.C. (1978) Production of microbial polysaccharides. Appl. Microbiol., 23, 19
9. Dolph, P.J., Majerczak, D.R. and Coplin, D.L. (1988) Characterization of a gene cluster for exopolysaccharide biosynthesis and virulence in Erwina stewarttii. J. Bacteriol., 170(2), 865
10. Elisashvili, V.I. (1984) Levan synthesis by Bacillus sp.. Appl. Biochem. Microbiol., 20, 82
11. Leibovici, J. and Stark, Y. (1985) Increase in cell permeability to a cytotoxic agent by the polysaccharide levan. Cellular and Molecular Biology, 31(5), 337
12. Tsuchiya, H.M., Koepsell, H.T. and Corman, J. (1952) The effect of certain cultural factors on production on dextransucrase by Leuconostoc mesenteroides. J. Bacteriol. 64,

521

13. Sabatie, J. and Choplin. L. (1986) The effect of synthesis temperature on the rheological properties of native dextran. Biotechnol. Lett., 8, 425
14. Holme, S.K. and Peck, H. (1983) Analytical Biochemistry. Longman Group Ltd, London, 329
15. 김경자, 류명기, 김상순 (1982) 볏짚을 이용한 청국장 제조에 관한 연구. 한국식품과학회지. 14(4), 301
16. 이용림, 김성호, 정낙현, 임무현 (1992) 청국장 발효중 점질성 고분자물질의 생성에 관한 연구. 한국농화학회지. 35(3), 202
17. Tanaka, T., Oi, S. and Yamamoto, T. (1979) Synthesis of levan by levansucrase. J. Biochem., 85, 287
18. Rao, M.A. (1987) Predicting the flow properties of food suspensions of plant origin. Food Technol., 41, 85
19. Harper, J.C. and El-Shrigi, A.F. (1965) Viscometric behavior of tomato concentrates. J. Food Sci., 30, 470
20. 하성권 (1988) 토마토케찹의 리올로지 특성과 점성예측모델. 경북대학교 석사학위논문.

(1997년 11월 16일 접수)