

호 알칼리성 *Alcaligenes* sp.가 생산하는 γ -Polyglutamic Acid의 용액 특성

†이 신 영 · 강 태 수 · *김 갑 수
강원대학교 발효공학과, *샘표식품(주) 기술개발실
연세대학교 생물산업소재연구센터

Solution Properties of γ -Polyglutamic Acid Produced by Alkalophilic *Alcaligenes* sp.

Shin-Young Lee[†], Tae-Su Kang and Kap-Soo Kim^{*}

Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

^{*}Research Lab., Sampyo Foods Co., Ltd., Seoul 132-040, Korea

Bioproducts Research Center, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT

The high viscous γ -polyglutamic acid(γ -PGA) from alkalophilic *Alcaligenes* sp. was purified and its solution property was investigated. The intrinsic viscosities for Na⁺ form and H⁺ form of γ -PGA were 31.1 and 0.38dℓ/g, respectively. The viscosity of H⁺-PGA was not influenced by pH or salts while that of Na⁺-PGA was influenced. The intrinsic viscosity of Na⁺-PGA solution decreased remarkably at the alkaline or acidic pH and showed the sharp decrease when salts were added. γ -PGA exhibited the property of the polyelectrolyte showing the sharp decrease of intrinsic viscosity by the addition of NaCl, and intrinsic viscosity of dilute solution with the low concentration of NaCl was exponentially dependent on temperature and its temperature dependency increased with increasing NaCl concentration. The chain stiffness, coil overlap parameter and critical concentration of Na⁺-PGA were 0.08, 5.25 and 0.07g/dℓ, respectively.

서 론

묽은 용액의 점도 특성은 생물고분자 사슬의 고차 구조와 관계되는 분자량, 분자사슬의 형태, 고분자와 용매의 상호작용 및 coil overlap parameter 등에 대한 유용한 정보를 제공하므로 다당이나 단백질의 용액 특성을 판단하는 매우 간편한 수단이다(1).

그 동안 저자들은 새로운 생물고분자의 생산과 이의 기능성 탐색 및 용도개발을 목표로 한 일련의

연구로서 토양으로부터 호알칼리성의 *Alcaligenes* sp.을 분리동정하고 이 균주가 생산하는 생물고분자를 분리 정제하여 이의 화학적 및 구조적 특성을 조사하였다(2). 또 이 균주가 생산하는 고점성 생물고분자의 생산조건에 대한 최적화를 행한 바 있다(3). 이 생물고분자는 glutamic acid가 γ -peptide 결합한 γ -polyglutamic acid(γ -PGA)로 분자량은 약 650,000이고 γ -PGA 2.7잔기당 1개의 음이온이 존재하였는데, 지금까지 *Alcaligenes* sp.에 의한 γ -PGA의 생산에 대하여는 보고된 바 없었다.

본 연구에서는 이의 용액 특성을 검토함으로써 이

† Corresponding Author

로부터 호알칼리성 *Alcaligenes* sp.가 생산하는 γ -PGA 사슬의 고차구조와 관련되는 각종 기초자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

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

용액 특성의 측정 및 특성값 산출

시료액의 조제

시료액의 조제는 시료 고분자에 증류수를 가하여 0.025~0.3g/dℓ의 농도범위로 균일하게 용해시키고 pH(2-12) 및 NaCl농도(0~1.0M)를 일정 간격으로 조절하여 시료액으로 하였다. 이때 pH는 1N NaOH 또는 1N HCl로 조절하였고, NaCl 첨가 시료액은 미리 농도별로 NaCl용액을 조제한 다음 여기에 시료고분자를 가한 후 용해시켜 조제하였다.

용액 특성의 측정

시료액의 용액 특성은 20~80°C로 유지한 점도측정용 항온조에서 모세관 점도계(개량형 Ostwald capillary viscometer)로 점도를 측정하여 구하였다. 즉 일정량(10ml)의 시료액을 점도계에 넣고 20분간 열평형시킨 다음 시료액이 유하하는 시간을 측정하여 점도를 구하였다. 이때 점도계산에 필요한 시료용액의 밀도는 비중계로 비중을 측정하여 구하였다(5).

용액의 특성값 산출

γ -PGA의 상대점도는 용액 특성의 측정항에서 측정된 유하시간과 밀도를 다음 식(1)에 대입하여 계

산하였다.

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

여기서 η_{ref} 와 η_{sample} 은 각각 표준용액인 glycerol 및 시료용액의 절대점도이고 ρ_{ref} 와 ρ_{sample} 은 각각 glycerol 및 시료용액의 밀도이며 t_{ref} 및 t_{sample} 은 glycerol 및 시료용액의 유하시간이다.

비점도(η_{sp})와 환원점도(η_{rel})는 위에서 구한 시료용액의 상대점도로부터 각각 다음 식(2) 및 (3)에 의하여 구하였다.

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

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

또 고유점도($[\eta]$)는 식(4)의 Huggins 식(6) 또는 식(5)의 Fuoss(7) 식에 의하여 산출하였다.

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

$$(\eta_{\text{sp}}/C)^{-1} = 1/A + (B'/A) C^{1/2} \quad (5)$$

여기서 $[\eta]$ 및 A는 시료의 고유점도(dℓ/g)이고 K'는 Huggins 상수, B'는 Fuoss 상수이다. 시료 농도에 대한 환원점도를 도시하여 얻어지는 직선의 절편값 또는 $C^{1/2}$ 에 대한 $(\eta_{\text{sp}}/C)^{-1}$ 을 도시하여 얻어지는 직선의 절편값으로부터 고유점도 $[\eta]$ 값을 산출하였다.

한편, 시료 고분자의 chain stiffness는 식(6)의 Smidsord와 Haug(8) 식에 의하여 계산하였다.

$$[\eta] = A_1 + B[\eta]_{0.1}^{1/3} C_s^{-1/2} \quad (6)$$

여기서 A₁은 상수, B는 chain stiffness, $[\eta]_{0.1}$ 은 0.1M NaCl용액에서의 고유점도, C_s는 NaCl 농도이다. 각 NaCl 농도별로 고유점도를 측정하여 NaCl 농도 제곱근의 역수에 대한 고유점도값을 도시한 다음 직선의 기울기값(B $[\eta]_{0.1}^{1/3}$)을 최소자승법에 의하여 계산하고 이로부터 chain stiffness B를 산출하였다.

Coil overlap parameter C $[\eta]^*$ 는 log η_{sp} 와 log $[\eta]$ 관계의 기울기가 서로 달라지는 두 직선의 변곡점에 일치하는 log C $[\eta]$ 값으로부터 산출하였으며 이에 해당되는 농도를 dilute zone과 semidilute zone을 구분짓는 임계농도(C*)로 산출하였다(9). 또 고유점도의 온도 의존성에 대한 활성화 에너지는 Arrhenius식에 의하여 계산하였다.

$$[\eta] = A_0 \exp(-E_a/RT) \quad \text{또는} \\ \log [\eta] = \log A_0 - E_a/2.303RT \quad (7)$$

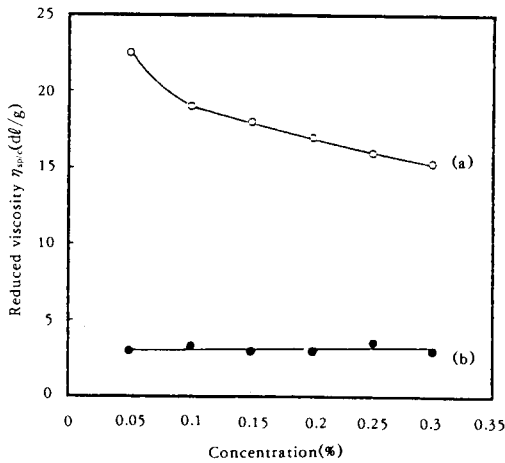


Fig. 1. Plot of reduced viscosity vs. concentration of Na⁺ form (a) and H⁺ form of PGA (b) produced by *Alcaligenes* sp.

여기서 $[\eta]$ 는 고유점도(dℓ/g), A₀는 빈도인자, E_a는 활성화 에너지(Kcal/g.mol), R은 기체상수, T는 절대온도이다.

$\log[\eta]$ 와 $1/T$ 의 직선관계로부터 최소자승법에 의하여 직선의 기울기($-E_a/2.303R$)를 구하였으며 이로부터 활성화 에너지값을 산출하였다.

결과 및 고찰

정제한 γ -PGA 시료(H⁺ 및 Na⁺형)의 농도에 따른 환원점도의 변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 같다.

H⁺형의 시료는 농도증가에 따라 환원점도도 완만한 직선적인 증가를 보여서 이들 관계는 Huggins 식(6)에 잘 따름을 보였고, 절편값으로부터 산출한 고유점도값은 0.38dℓ/g이었다. 그러나 Na⁺형의 경우는 농도증가에 따라 환원점도가 오히려 급격히 감소하고 전형적인 고분자 전해질의 특성을 나타내었다. 따라서 Fuoss의 식(7)을 사용하여 y축 절편값으로부터 고유점도를 구하였으며(Fig. 2), 그 값은 약 31.1dℓ/g이었다. Hydrodynamic volume을 나타내는 이 값은 rhamosan gum(10)(88.5dℓ/g) 및 xanthan gum(11)(50~70dℓ/g)보다는 매우 작았으나 sodium alginate(31dℓ/g), gellan(39.4dℓ/g) 및 welan(10)(37.4 dℓ/g)과는 비교적 비슷하였다. 또, H⁺와 Na⁺형 시료사이의 큰 고유점도값 차이는 용액내의 입체형태와 관계되는 것으로 생각되었다.

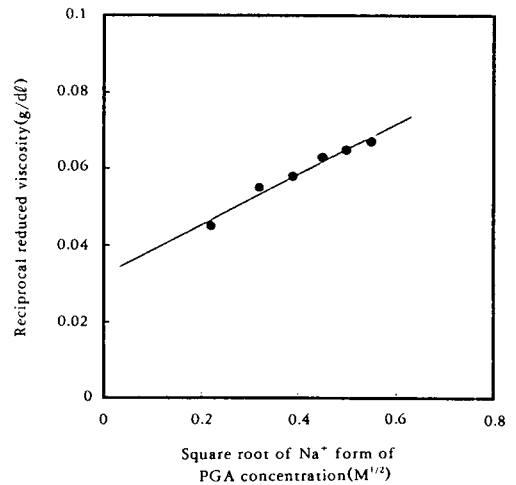


Fig. 2. Reciprocal plot of reduced viscosity vs. square root of concentration for Na⁺ form of PGA.

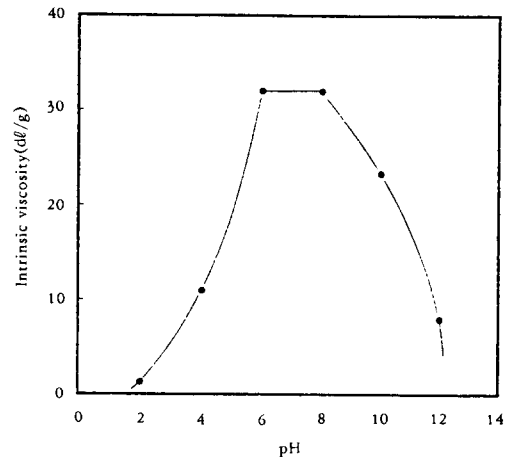


Fig. 3. Effect of pH on the intrinsic viscosity of Na⁺ form of PGA.

한편, Na⁺형 정제 고분자의 pH에 따른 고유점도의 변화를 살펴 본 결과는 Fig. 3과 같다.

고유점도는 중성 pH 부근(pH 6~8)에서 가장 높았으며, 산성 및 알칼리성 부근에서는 급격한 감소를 보여 대부분의 산성고분자의 경향과 비슷한 결과를 보였다(12). 특히, pH 2에서는 random 구조를 갖는 다른 산성고분자와 마찬가지로 가장 낮은 값을 보여서 본 고분자는 강산성 용액에서는 random 구조를 가질 것으로 추측되었다. 대표적 산성고분자인 xanthan gum의 경우는 사슬을 이루고 있는 구성당

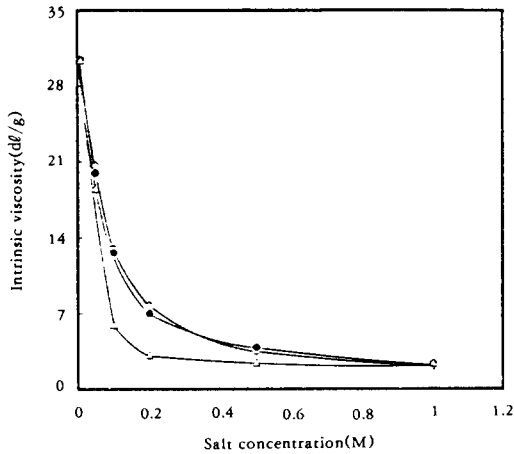


Fig. 4. Influence of salt concentration on the intrinsic viscosity of Na⁺ form of PGA.

○:NaCl ●:KCl △:CaCl₂

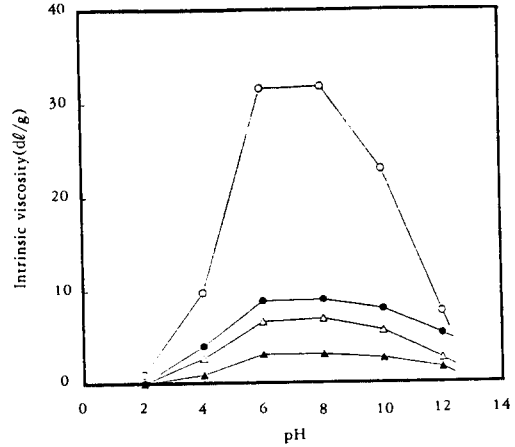


Fig. 5. pH dependence of the intrinsic viscosity for Na⁺ form of PGA solutions at different concentrations of NaCl. ○:No addition

●:0.005M NaCl △:0.01M ▲:0.1M NaCl

잔기에 pyruvic acid가 결합되어 있는데, 이 pyruvic acid의 pK_a(pK=3)보다 낮은 pH에서는 이온화가 일어나지 않은 상태이기 때문에 고유점도값이 급격히 감소하는 것으로 보고되었다(11, 13). 그러나 일반적으로 pH 4 이상에서는 고분자의 하전그룹들이 이온화되어 서로 정전기적 반발이 일어나서 다소 사슬의 신장을 일으키기 때문에 고유점도가 커지게 된다. 따라서 중성의 pH를 peak로 하는 점도의 변화는 γ -PGA의 수용액 중에서의 형태변화에 기초하는 것으로 볼 수 있다. 즉 산성수용액 중의 γ -PGA는 pH의 증가에 따라 carboxylic acid(pK_a=2.27)의 이온화가 진행되어 carboxylic acid 분자사이의 정전기 발생으로 분자가 펼쳐져서 용액점도가 상승한다고 볼 수 있다. 이러한 분자의 신장은 carboxylic acid 분자의 수소결합이 절단될 때까지 진행되며 수소결합 절단 후에 이온형의 γ -PGA가 점유하는 체적이 급격하게 확장되는 것으로 생각된다.

또, Na⁺형 시료의 고유점도에 대한 NaCl, KCl 및 CaCl₂ 농도의 영향을 살펴 본 결과는 Fig. 4와 같다.

0.05M의 염 첨가라도 급격히 고유점도값이 저하하여 대부분의 음전하를 띠는 전해질고분자와 비슷한 결과를 보였다(11, 13). 그러나 염농도의 증가에 따라 감소폭은 완만하였으며 1M 농도 이상부터는 고유점도값은 3.75dl/g의 일정한 값을 보였다. Tako들(14)도 xanthan gum용액이 중성인 경우 0.001N NaCl을 첨가했을 때 급격히 감소하고 0.1

~1N로 농도를 증가시키면 고유점도는 서서히 감소한다고 보고하였다. 이와 같은 염의 영향에 대해 Muller들(15)은 다가전해질에 대한 차폐현상에 기인한다고 하였다. 또, 2가염인 CaCl₂ 0.1% 첨가시에는 더욱 급격히 감소하였는데, 이는 대응하는 농도에서 전리된 이온수의 증가로 전기적 차폐현상이 증가되었기 때문이라 생각된다(16).

또 NaCl 농도와 pH를 동시에 변화시킨 경우 고유점도의 변화를 살펴 본 결과는 Fig. 5와 같다.

본 고분자의 고유점도는 pH 2에서는 NaCl의 첨가 유무나 농도에 관계없이 0.5dl/g으로 일정하였다. 그러나 이 이상의 pH에서는 NaCl을 첨가하지 않은 경우와 마찬가지로 중성 pH에서 높고 강산 및 강알칼리성 pH에서 낮아지는 경향을 보였으며 무첨가시의 고유점도 보다는 훨씬 낮은 값을 나타내었다. 아울러 NaCl 농도의 증가로 감소하는 경향을 보였으나 NaCl의 농도 0.1M 이상에서는 모두 일정하게 나타났다.

이와 같이 본 고분자의 고유점도가 pH 4~12 범위에서 NaCl 농도가 증가함에 따라 감소되는 이유는 염존재시 반대하전 이온들이 하전그룹을 차폐시켜 정전기적 반발이 감소되기 때문인 것으로 생각된다. Nakamura들(17)도 다가 고분자전해질은 하전 이온들 사이에 정전기적 반발이 존재하므로 비이온성 고분자보다 더 팽창된 구조를 가지며 이러한 특성은 용액의 이온강도가 증가함에 따라 감소한다고 하였다.

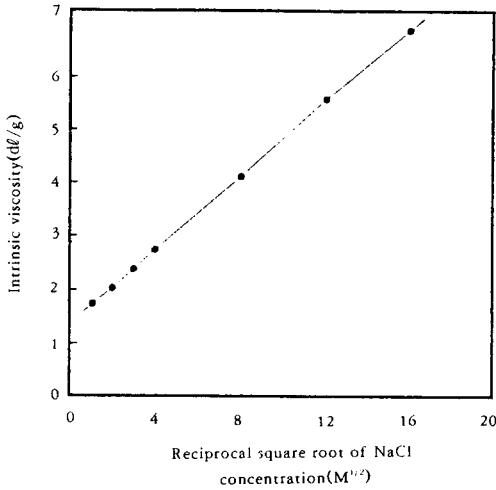


Fig. 6. Ionic strength dependence of intrinsic viscosity for Na⁺ form of PGA.

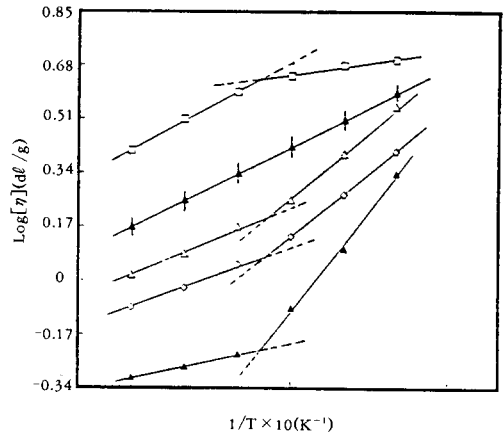


Fig. 8. Arrhenius plot for $[\eta]$ of Na⁺ form of PGA solution at various concentrations of NaCl. □: No addition ▲: 0.0025M NaCl △: 0.005M NaCl ◇: 0.015M NaCl ♣: 0.085N NaCl

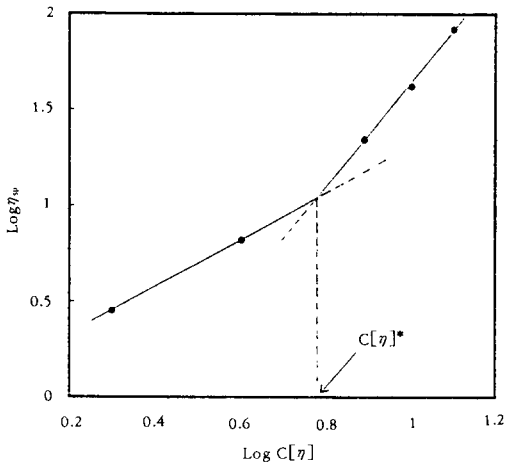


Fig. 7. Log-log relationship between specific viscosity and $C[\eta]$ characterized by the coil overlap parameter.

한편, 시료 고분자의 NaCl농도($C^{-1/2}$)에 따른 고유점도의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 6과 같다.

직선의 기울기로부터 chain stiffness B를 구하였으며, 그 값은 0.08이었다. 이는 Nakamura들(17)이 보고한 xanthan gum의 chain stiffness 0.05보다는 크고 dextran sulfate의 0.23보다는 작았으나 chitosan의 0.10과는 비슷하였다. Lang들(18)의 보고에 의하면 다가 전해질 다당의 chain stiffness 특성값은 0.05~0.24 범위이고, 이 값이 작을수록 강체상의 막대 형태를 가지며, 클수록 유연하다. 그

러므로 본 고분자의 사슬형태는 어느 정도 rigid 형태임을 알 수 있었으나, xanthan gum보다는 덜 단단한 것으로 판단되었다. 아울러 시료고분자의 coil overlap parameter $C[\eta]^*$ 를 Fig. 7의 $\log \eta_{sp}$ 와 $\log C[\eta]$ 관계의 변곡점으로부터 구한 결과 그 값은 5.25이었다. 또, 이로부터 구한 본 시료고분자의 임계농도(C^*)는 0.07g/dl이었다. Morris들(19)은 hyaluronate와 같이 단단하고 신장된 사슬의 coil overlap parameter 값 $C[\eta]^*$ 는 1.5이나 일반적인 값은 3-6이라고 보고하였는데 이는 본 실험결과와 잘 일치하는 값 범위이다. 그러나 본 고분자의 C^* 값 (0.07g/dl)은 박들(20)이 보고한 welan gum의 C^* 값인 0.056g/dl 및 xanthan gum의 0.024g/dl 그리고 rhamsan gum의 0.025g/dl보다는 큰 값을 보여서 분자 개개의 물리적 접촉으로 일어나는 엉킴 현상은 이들 보다 약간 높은 농도에서 시작됨을 알 수 있었다. 한편, 임계농도를 중심으로 저농도에서의 직선의 기울기는 1.32, 고농도에서는 2.73으로 이 값은 Vreeman들(21)이 보고한 rhamsan gum과 비슷하였다. 그러나 Morris(19)가 보고한 대부분의 수용성 다당류에서 나타나는 값인 저농도에서의 1.4 및 고농도에서의 3.5와 비교하면 고농도에서는 다소 낮아서 농도증가에 따른 엉킴작용에 의한 급격한 점도상승작용은 없을 것으로 생각되었다.

한편, Fig. 8은 서로 다른 NaCl에서 $\log[\eta]$ 와 1/

T의 관계를 나타낸 결과로 NaCl농도에 따라 다양한 형태를 보였으나 모두 직선관계를 보여서 Arrhenius식에 잘 따랐다. 0.0025M의 NaCl용액을 함유한 시료고분자용액 이외의 모든 용액은 약 45°C에서 변곡점을 보였으며, 이 온도를 전후로 고온에서의 활성화 에너지는 NaCl농도에 관계없이 3.85kcal/g·mol로 일정하였다. 그러나 저온에서의 활성화 에너지는 NaCl농도의 증가에 따라 1.62kcal/g·mol에서부터 9.82kcal/g·mol까지 약간씩 증가하였으며, NaCl의 증가로 온도 의존성이 매우 커지는 특징을 보였다. 온도에 따른 서로 다른 활성화 에너지는 온도변화에 따라 유동기구와 분자사슬의 입체구조가 달라짐을 의미한다(22). 본 고분자의 경우 45°C (318°K)를 전후로 이러한 변화가 일어남을 알 수 있었으며, 이 온도는 Tako들(23)이 고농도의 몇몇 다당에 대해서 보고한 결과와 비슷하였다.

결 론

미생물을 이용한 생분해성 고분자 생산연구의 일환으로 토양으로부터 분리한 *Alcaligenes*속의 한 균종이 생산하는 γ -PGA의 용액 특성을 조사하였다.

정제한 Na^+ -PGA 및 H^+ -PGA의 고유점도는 각각 약 31.1 및 0.38dl/g이었고 H^+ -PGA는 pH와 염에 따른 고유점도의 영향을 받지 않았으나 Na^+ -PGA는 산성 및 알칼리성 영역에서 급격한 감소를 보였다. 또, 저농도의 염 첨가로 고유점도는 급격히 감소하였으며 용액의 이온강도가 높을수록 감소경향은 더욱 컸다. Chain stiffness는 0.08, coil overlap parameter $C[\eta]^*$ 와 임계농도 C^* 는 각각 5.25(-) 및 0.07g/dl이었고, 염 농도에 따른 고유점도값 ($[\eta]$)은 지수 함수식에 따르는 온도 의존성을 나타내었다. 또, 0.0025M NaCl 첨가용액 이외의 모든 시료용액은 45°C에서 변곡점을 보였으며 이를 전후로 고온에서의 활성화 에너지는 일정하였으나 저온에서는 염 농도의 증가에 따라 온도 의존성이 매우 커지는 경향을 보였다.

참고 문헌

1. E. M. Morris and S. B. Ross-Murphy(1981), *Techniques in Life Sciences*, Kornberg, H. L. et al ed., B310/1-46, Elsevier, New York.
2. 이신영, 강태수, 김갑수, 유주현(1993), 한국생물공학회지, **8**, 209.
3. 이신영, 강태수, 김갑수(1993), 한국생물공학회지, **8**, 217.
4. K. Horikoshi and T. Akiba(1982), *Alkaliphilic Microorganisms, A New Microbial World*. Japan Scientific Co. Press, Tokyo, p. 1.
5. 한국규격협회(1972), KS A 0601, 액체비중 측정방법.
6. W. R. Krigham and P. J. Flory(1953), *J. Polymer Sci.*, **11**, 37.
7. R. M. Fuoss(1948), *J. Polymer Sci.*, **3**, 603.
8. O. Smidsord and H. Haug(1971), *Biopolymers*, **10**, 1213.
9. E. M. Morris and M. Ross(1981), *Techniques in Life Sciences*, Kornberg, H. L. ed., et al., B310/1, Elsevier, New York.
10. B. D. Kwon, P. A. Foss and C. K. Rha (1987), *Industrial Polysaccharide*, **3**, M. Yalpani ed., Elsevier Pub., p. 253.
11. M. Rinaudo and M. Milas(1978), *Biopolymers*, **17**, 2663.
12. E. R. Lang and C. K. Rha(1981), *J. Texture Studies*, **12**, 47.
13. W. E. Rochefort and M. Stanley(1987), *J. Rheology*, **31**, 337.
14. M. Tako, A. Asato and S. Nakamura(1984), *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2995.
15. G. Muller, M. Anhorache, J. Lecourtier and G. Chauveteau(1984), *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2987.
16. K. S. Kang, G. K. Veeder and I. W. Cottrelli (1983), *Progress in Industrial Microbiology*, **18**, 231.
17. T. Nakamura, S. J. Koo, P. Pradipasena, C. K. Rha and A. J. Sinskey(1987), *Flocculation in Biotechnology and Separation Systems*, Attia, Y. A. ed., Elsevier Science Pub., Amsterdam.
18. E. R. Lang, C. A. Kinzle-Sterzer, D. Rodriguez-Sanchez and C. K. Rha(1982), *The Japanese Society of Chitin and Chitosan*, P. 34.
19. E. R. Morris, D. A. Rees and E. J. Welsh (1980), *J. Mol. Biol.*, **138**, 383.
20. 박혜정(1988), *Alcaligenes*에 의해 생산되는 새로운 Hetero 다당류인 Welan과 Xanthan gum의 Rheology 특성에 관한 비교 연구, 경희대학

- 교 대학원 석사학위논문.
21. H. J. Vreeman, T. H. M. Snoeren and T. A. J. Payens(1980), *Biopolymers*, **19**, 1357.
 22. M. Tako, T. Nagahama and D. Nomura (1977), *Japanese J. Agric. Chem.*, **51**, 397.
 23. M. Tako, T. Nagahama and D. Nomura (1977), *Japanese J. Agric. Chem.*, **51**, 513.