

미생물을 이용한 정밀화학소재의 탐색 및 이용기술

(중과제명)

A Study on the Screening and Applications of Fine
Chemicals from Microorganisms

당지질계 생물고분자 유화제의 탐색 및 응용기술

(세부과제명)

A Study on the Screening and Applications of
Lipopolysaccharide Emulsifier

연구기관

한국과학기술원

과학기술처

제 출 문

과 학 기 술 처 장 관 귀 하

본 보고서를 ‘미생물을 이용한 정밀화학소재의 탐색 및 이용기술’에 관한 연구과제의 세부 과제 ‘당지질계 생물고분자 유화제의 탐색 및 응용기술’의 1차년도 보고서로 제출합니다.

1995. 8. 25

주관연구기관명 : 한국과학기술원

총괄연구책임자 : 김 정 회

연 구 원 : 김 선 원
 김 필
 이 정 걸
 이 경 한
 장 건 희

여 백

요 약 문

I. 제 목

당지질계 생물고분자 유화제의 탐색 및 응용기술

II. 연구개발의 목적 및 중요성

가. 최종 연구개발 목표

- 유화제로 사용할 수 있는 당지질계 생물고분자 탐색 및 특성규명
- 관능기들의 생물학적 변형에 따른 유화특성 개선 및 신규특성 개발
- 개발된 당지질계 생물고분자 유화제의 식품첨가제로서의 사용허가 획득

나. 당해년도 연구개발 목표

- 당지질계 생물고분자 분비미생물의 탐색기술 개발
- 생물고분자의 구조분석 및 구조변환기술 개발

다. 연구개발의 중요성

- 생물공학적 구조변환 기술을 통해 기존의 기능을 개량 또는 강화하여 산업용 소재로 개발하는 기술이므로 전반적인 생물산업의 확대와 발전에의 기여가 큼.
- 미생물 계면활성제와 같은 특수산업 용도의 소재 관련 생산기술은 현재 미개발 상태이며 주로 수입에 의존하고 있는 실정임.
- 미생물 계면활성제는 생분해가 잘되는 점, 특이한 구조에 따라 특이한 용도를 찾을 수 있다는 점 등의 장점을 가지고 있으며 용도개발 또한 실로 무한하고 그 개발이 주목됨.

- 앞으로 산업활동에 의한 환경오염이나 인체에 대한 유독성 등에 더욱 엄격한 제재가 가해질 전망이고 이에 따라 biosurfactants의 필요성이 강조되며, biosurfactant의 기술개발의 산업화 및 성공여부는 환경 적합성이 가미된 경제성에 있음.
- 환경오염 예방이라는 사회적 요구와 생물공학의 비약적 발전으로 보아, biosurfactant의 산업화가 가까운 장래에 이루어져, 중요한 생물산업소재로 각광받을 것이 예상됨.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 본 실험에서는 lipopolysaccharide biosurfactant인 Emulsan의 소수성 부분을 생물학적으로 변형시키기 위해 ethanol이나 oleic acid와 기타 다른 탄화수소의 종류와 혼합비율을 달리하면서 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1을 배양하여 emulsan을 생산한다. 이러한 절차로 생산한 emulsan을 분리정제하여 일차적으로 emulsifying activity를 측정한 후, 소수성 부분의 성분 분석, 분자량 및 계면활성제 고유성질인 표면 및 계면장력 조절능, 그리고 이에 의해 생성된 에멀전의 안정성을 조사한다. 또한 *Acinetobacter calcoaceticus*의 불포화지방산 영양요구성 돌연변이를 이용하여 세포의 지방산 조성을 조절하고 emulsan의 물성을 변화시키기 위하여 불포화지방산 영양요구성 돌연변이를 분리한다.

IV. 연구개발 결과 및 기대되는 성과

가. 연구개발 결과

- *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1이 생산하는 Emulsan의 지방산 조성을 다른 종류의 탄소원을 기질로 공급함으로써 변화시킬 수 있었다.

- 지방산 조성이 바뀐 Emulsan은 oil/water system에서 서로 다른 emulsifying activity를 나타내었다.
- Emulsan의 구성지방산중 3-hydroxydodecanoic acid가 emulsifying activity에 가장 중요하게 작용하는 것으로 나타났다.

나. 기대되는 성과

- 현재 우수한 분리균주들이 생산하는 유화제를 분리, 정제하여 구조를 분석하므로써 다양한 특성의 유화제의 개발이 기대된다.
- Emulsan의 경우 3-Hydroxydodecanoic acid의 함량과 유화능이 비례관계에 있으므로, 배양기술과 지질대사 연구를 통해 emulsan의 생물학적 구조변형은 물론, 그에 따른 유화능의 예측까지 확대되리라고 기대된다. 즉 용도에 맞는 biopolymer의 engineering 기술의 확립이 가능할 것으로 기대된다.
- 지질대사 변이연구를 통해 더욱 다양한 지질조성과, 유화능을 갖는 생물계면활성제를 생산할 수 있으리라 기대된다.
- 복합 식품계에서의 유화제 연구를 통해 다양한 기능을 갖는 생물고분자가 최종적으로 제품에 응용될 수 있는 가능성을 높일 수 있다.

여 백

Summary

- Emulsan is an extracellular polyanionic lipopolysaccharide produced by Gram-negative hydrocarbon-degrading bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1.
- Emulsan contains about 15% long fatty acid which are thought to modulate hydrophilic-lipophilic balance.
- It was found that the composition of fatty acid of emulsan could be significantly altered by supplying the different types of chemicals as a carbon and energy source in the culture medium.
- Emulsan having the modified fatty acid group also showed the different emulsifying activity in hydrocarbon-in-water system.
- Emulsan contained about 10 different fatty acids and major components were found to be 3-hydroxydodecanoic acid, hexadecanoic acid, and octadecenoic acid. Among them, 3-hydroxydodecanoic acid seems to be the most important fatty acid in the active emulsan preparations.

여 백

목 차

제 출 문	1
요 약 문	3
제 1 장. 서 론	11
제 1 절. 이론적 배경	11
1) Biosurfactant	11
2) Emulsan	16
제 2 절. 연구 추진 목적	18
제 2 장. 연구 추진 방법(실험방법)	19
제 1 절. 미생물 및 배지	19
제 2 절. 배양과 발효조건	19
제 3 절. Emulsan의 분리 및 정제	20
제 4 절. 분석방법	20
1) Emulsifying activity 측정.	20
2) Emulsan의 지방산 분석.	21
3) 불포화지방산을 영양요구하는 돌연변이주의 분리	23
제 3 장. 연구결과 및 고찰	24
제 1 절. Emulsifying activity 측정 방법 고찰	24
1) Shaking 후의 standing time 결정	24
2) Emulsifying activity와 hydrocarbon substrate specificity	26

제 2 절. 공급 탄소원 종류에 따른 Emulsan의 물리 화학적 특성.	26
1) Emulsan 구성 지방산 정성 및 emulsifying activity의 변화	26
2) Fatty acid와 emulsifying activity와의 상관관계	35
제 3 절. 불포화지방산을 영양요구하는 돌연변이주의 분리	36
제 4 장. 결 론	37
제 5 장. 참 고 문 헌	38
제 6 장. 제 1 위탁과제	41
당지질계 생물고분자 유화제의 응용기술	
제 7 장. 제 2 위탁과제	107
당지질계 생물고분자 유화제 생산 미생물의 탐색	
제 8 장. 국제공동과제	129
생물고분자 계면활성제 및 기능성 다당류의 유동 특성과 구조분석을 통한 용도에측 기술개발	

제 1 장. 서 론

제 1 절. 이론적 배경

1. Biosurfactant

가. 계면활성제의 용도 및 미생물 계면활성제(Biosurfactant)

계면활성제는 분자 내에 친수성 부분과 소수성 부분을 함께 가지고 있는 양친매성(amphipathic) 분자로서, 수용액상과 기체상 혹은 수용액상과 유기용매상과 같은 두 가지 상태의 경계면에 선택적으로 배향 흡착하여 계면의 성질을 변화시킨다. 계면활성제의 친수성 및 소수성 부분의 상대적 크기와 두 상태(phase)의 물질에 따라 유화, 분산, 가용화, 계면, 표면장력 조절, 흡착, 흡윤, 침투, 기포, 소포작용, 응집이나 세정 작용 외에 대전 방지, 윤활, 살균 등의 다양한 작용을 나타내기 때문에 여러 산업 및 생활 분야에서 널리 이용되고 있다.

최근 들어 환경문제에 대한 관심이 급증되면서 생분해될 수 있는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 비교적 큰 시장을 이루고 있는 세탁제 부분에서 생분해가 높은 세제 생산으로의 연구 및 Biopolymer부분에서의 연구 등등이 활발하다. 그 중 미생물에 의해서 생산되는 계면활성제(Biosurfactant)에 대한 최근의 연구는 특히 주목할 만하다.

Biosurfactant의 장점이라면 화학합성이 어려운 새로운 구조를 가지는 계면활성제를 생산할 수 있고, 비교적 간단한 배양과정과 간단한 원료로부터 쉽게 생산될 수 있으며, 무엇보다도 대부분이 쉽게 생분해될 수 있고, 독성이 적다는 점이다. 이러한 생물체 유래의 계면활성제는 화학구조와 성질이 다양하고 특이하며, 인위적인 구조 변형도 가능하여 특수용도에 맞는 여러 산업적 용도에 활용할 수 있다.

나. Biosurfactant의 연구개발 현황

1960년대말 합성계면활성제가 일으키는 환경오염, 공해문제 등이 표면화 되어 안정성이 높고 생분해성이 좋은 계면활성제의 개발이 요구되는 상황에서 1960년대 후반에 시작한 탄화수소를 발효원료로 한 석유발효의 연구도중에 미생물이 비교적 다량으로 계면활성물질을 생산하는 것이 알려져 biosurfactant에 대한 본격적인 연구가 시작되었다. 현재까지 biosurfactant는 생산 및 기능, 용도 등의 응용연구로 대별되어 왔는데, 외국에서는 미생물을 기원으로 하는 biosurfactant에 대한 관심이 학술적으로 일찍부터 자리잡아 왔다. 특히 합성계면활성제가 환경오염의 주범으로 인식되면서 그 대체품이 요구되는 추세 등과 함께, 생물자원을 활용하는 고등기술을 개발하려는 선진 기술적 측면에서 biosurfactant개발이 중요한 연구분야를 이루어 왔다. 대표적으로는 미국 Petroferm사에서 Emulsan이라는 biosurfactant를 생산하여 상품화하고 있으며, 그 밖에도 Biodispersan, Liposan등 20여종에 이르는 미생물 기원의 계면활성제가 특허화되어 상품개발되고 있으나, 업체간의 경쟁과 보안 유지로 그 연구 내용이 많이 알려져 있지는 않은 실정이다.

우리나라에서는 최근 그 대부분은 생물계면활성물질을 생산하는 미생물 균주에 대해서 탐색단계에 있는 실정이고, 자연계로부터 biosurfactant 생산 미생물을 분리하려는 연구와, 한편으로는 외국에서 기존의 알려진 미생물 균주를 도입하여 Biosurfactant 생산기작을 연구 발표하는 등의 사례가 있다.

다. Biosurfactant의 구조와 특성

Biosurfactant의 화학구조와 분자형태는 합성계면활성제와는 현저히 상이하다. 일반적으로 biosurfactant는 전형적인 계면활성제의 amphiphathic structure를 가지는 미생물 대사산물로서, 소수성 부분은 포화 또는 불포화 long-chain fatty acid, hydroxy fatty acid, 또는 α -alkyl- β -hydroxy fatty acid,

그리고 친수성 부분은 carboxylic acid, alcohol 등이다. 합성계면활성제는 극성 부분의 본질에 따라 구분되어지나, biosurfactant는 대개 생화학적인 분자형태와 생산미생물 종에 근거하여 구분되어진다. 주요한 biosurfactant의 종류와 생산미생물을 Table 1.에 나타내었다. Biosurfactant중 glycolipids가 가장 흔하며, 그 중 *Pseudomonas aeruginosa*의 Rhamolipids와 *Rhodococcus erythropolis*의 trehalose lipid가 가장 많이 연구 되어졌다. 두 화합물에서 소수성 부분의 사슬길기와 carbohydrate head group의 구조는 생산조건에 따라 상당한 변이가 나타난다(1).

Biosurfactant 성능을 가장 잘 반영하는 것은 표면장력, 계면장력, 그리고 cmc 이다. *Rhodococcus sp.* H13A가 생산하는 glycolipids와 *Bacillus licheniformis* strain JF-2가 생산하는 Biosurfactant는 수용액의 표면장력을 26-27 mN/m, octane이나 decane에 대한 계면장력을 10^{-2} mN/m까지 감소시킨다는 결과가 보고되고 있으며(2,3), *Rhodococcus sp.* H13A는 서로 상승적으로 작용하는 서너 가지 다른 계면활성물질을 부가적으로 생산한다(4). 또한 일부 biosurfactant는 열적, 화학적 안정성이 좋은 게 특징인데, 예를 들어 *B. licheniformis* JF-2가 생산하는 lipopeptide는 75°C에서 무려 140여시간 동안이나 안정하고, pH 5.5-12에서도 안정하며, 훨씬 산성조건에서야 비로소 활성을 잃는 걸로 보고되어 있다(5). Surfactants의 계면성질은 수용액의 이온조성에도 좌우된다. 높은 NaCl농도는 *T. apicola*의 glycolipids를 불활성화시킨다. 이에 반해 *B. licheniformis* JF-2의 발효액의 계면장력은 10% NaCl 존재하에서 상당히 감소되어지나, calcium salts에 의해서는 영향을 받지 않는다(3,5).

구조와 표면에서의 성질을 연관시킬 수 있는 방법으로 HLB값을 들 수 있다. HLB란 hydrophile-lipophile balance란 의미로서, 계면활성제의 친수성 부분과 소수성 부분의 비율을 나타낸다(6). 그 값이 7이상이면 비교적 친수성 계면활성제라 할 수 있다. Sophorose lipid의 경우 HLB의 값이 8-10 정도로 O/W emulsifier 나 detergent solubilizer등의 용도에 적합하고, monoglyceride의 경우 4-8의 HLB 값을 나타내 wetting agent의 용도로 쓰일 수가 있다.

Table 1. List of surfactant uses by industry

Agriculture	
Phosphate fertilizers Spray application	Prevent caking during storage Wetting, dispersing, suspending of powdered pesticides and emulsification of pesticide soln.
Building and construction	
Paving Concrete	Improve bond of asphalt to gravel and sand Promote air entrainment
Elastomers and plastics	
Emulsion polymerization Foamed polymers Latex adhesive Plastic articles	Solubilization, emulsification of monomers Introduction of air, control of cell size Promote wetting, improve bond strength antistatic agents
Metals	
Concentration of ores Cutting and Forming	Wetting and foaming, collectors and frothers Wetting, emulsification, lubrication and corrosion inhibition in rolling oils, cutting oils, lubricants
Casting Rust and scale removal Plating	Mold release additives In pickling and electrolytic cleaning Wetting and foaming in electrolytic plating
Paint and protective coatings	
Pigment preparation	Dispersing and wetting of pigment during grinding
Latex paints	Emulsification, dispersing of pigment, stabilize latex, retard sedimentation and pigment separation, rheology
Paper	
Pulp treatment Paper machine Calender	Deresinification, washing Defoaming, color leveling and dispersing Wetting and leveling, coating and coloring
Petroleum production and products	
Drilling fluids	Emulsify oil, disperse solids, modify rheological properties of drilling fluids for oil and gas wells
Workover of producing wells	Emulsify and disperse sludge and sediment in cleanout of wells
Producing wells	Demulsify crude petroleum, inhibit corrosion of equipment
Secondary recovery Refined products	In flooding operations, preferential wetting Detergent sludge dispersant and corrosion inhibitor in fuel oils, crank-case oils and turbine oils
Textiles	
Preparation of fibers	Detergent and emulsifier in raw wool scouring; dispersant in viscose rayon spin bath; lubricant and antistat in spinning of hydrophobic filaments
Dyeing and printing	Wetting, penetration, solubilization, emulsification, dye leveling detergent and antistatic additives to finishes
Finishing of textiles	Wetting and emulsification in finishing formulations, softening, lubricating and antistatic additives to finishes

Table 2. Major types of biosurfactants produced by Microorganisms

Biosurfactant type	Producing microbial species
A. Glycolipids	
Trehalose mycolates	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i> <i>Mycobacterium phlei</i>
Trehalose esters	<i>Mycobacterium fortitum</i> <i>Micromonospora</i> spp. <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Mycobacterium paraffinicum</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Mycolates of mono-, di-, and trisaccharide	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Arthrobacter</i> spp.
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas</i> spp.
Sophorolipids	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Candida</i> spp.
B. Phospholipids and fatty acids	
Phospholipids and fatty acids	<i>Candida</i> spp. <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp.
Phospholipids	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Aspergillus</i> spp.
C. Lipopeptides and Lipoproteins	
Gramicidins	<i>Bacillus brevis</i>
Polymyxins	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ornithine-lipid	<i>Pseudomonas rubescens</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Cerilipin	<i>Gluconobacter cerinus</i>
Lysin-lipid	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
Surfactin, Subtilysin	<i>Bacillus licheniformis</i>
Peptide-lipid	
D. Polymeric surfactants	
Lipoheteropolysaccharide	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> RAG-1
Heteropolysaccharide	<i>A. calcoaceticus</i> A2
Polysaccharide-protein	<i>A. calcoaceticus</i> strains <i>Candida lipolytica</i> <i>S. cerevisiae</i>
Manno-protein	<i>Candida petrophilum</i>
Carbohydrate-protein	<i>Endomycopsis lipolytica</i> <i>Candida tropicalis</i>
Mannan-lipid complex	<i>Shizoneella melanogramma</i>
Mannose/erythrose-lipid	<i>Ustilago maydis</i> <i>Pseudomonas</i> spp.
Carbohydrate-protein-lipid complex	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Debaryomyces polymorphus</i>
E. Particulate Biosurfactants	
Membrane vesicles	<i>Acinetobacter</i> sp. H01-N
Fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>

라. 용도 개발

미생물 계면활성제는 생분해가 잘 되는 점, 특이한 구조에 따라 특이한 용도를 찾을 수 있다는 점 등의 장점을 가지고 있으며 용도개발 또한 실로 무한한 편이다. 이미 산업화되어 있는 미생물 계면활성제로는 *Acinetobacter* 에서 생산되는 Emulsan으로서 주로 MEOR(microbial enhanced oil recovery)에 사용되고 있다. 현재 응용되고 있는 분야로는 강력한 보습효과를 가지는 glycolipid의 유도체를 생산하여 화장품에 응용하고 있으며(20), penicillium으로 생산되는 S-acid는 정전기 방지, 흐림 방지 등의 특성을 가지고 있는 미생물 계면활성제로서 그 개발이 주목된다. 최근에는 응용가능성이 있으나 적게 생산되는 미생물 계면활성제를 유전공학적인 방법으로 많이 생산토록 하는 연구도 진행되고 있다.

2. Emulsan

가. 특성

Emulsan은 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1이 정상기나 불균형 성장기에 세포외부로 방출하는 amphiphathic, polyanionic lipopolysaccharide로서 hot phenol로 추출, 제거 가능한 10-15%의 단백질과 결합하고 있는 분자량 100만 정도의 생물 고분자이다. Polysaccharide backbone은 세 가지 아미노당 (D-galactosamine, D-galactosaminouronic acid, Diamino sugar)으로 구성되어 있고, 여기에 5-15%의 지방산이 O-ester결합으로 연결되어 있으며, 구성 지방산은 주로 C12, hydroxy C12, C14, C16, C18 등이다(Fig.1). Emulsan은 탄화수소 기질에 대해 상당한 특이성을 보이며 O/W system에서 유화제로 작용하면서 생성된 에멀전을 안정화시킨다. 이 때 emulsan은 기름방울 표면에 강하게 달라붙어 단층분자막을 형성하며 일단 생성된 에멀전은 coalescence없이 안정화되는데 이는 기름 방울 외부표면에 존재하는 emulsan carboxyl group의 강한 음성전하로 인한 에멀전간의 반발효과때문이다.

Emulsan은 전통적인 계면활성제와 에멀전 안정제보다 몇 가지 장점이 있는데, 첫째, oil/water 계면이 매우 높은 친화성을 보이기 때문에 매우 낮은 농도로도 유화활성을 보이며 이때 oil이나 water phase에 emulsan은 존재하지 않고 계면에만 흡착한다. 일단 emulsan에 의해 안정화된 O/W 에멀전은 심지어 물과 기름의 비가 1:4인 상태에서도 W/O 에멀전으로의 inversion이 일어나지 않는다. 또한 무독성으로 인체에 해가 없으며 생물적인 분해가 가능하여 환경오염의 위험이 없다(22).

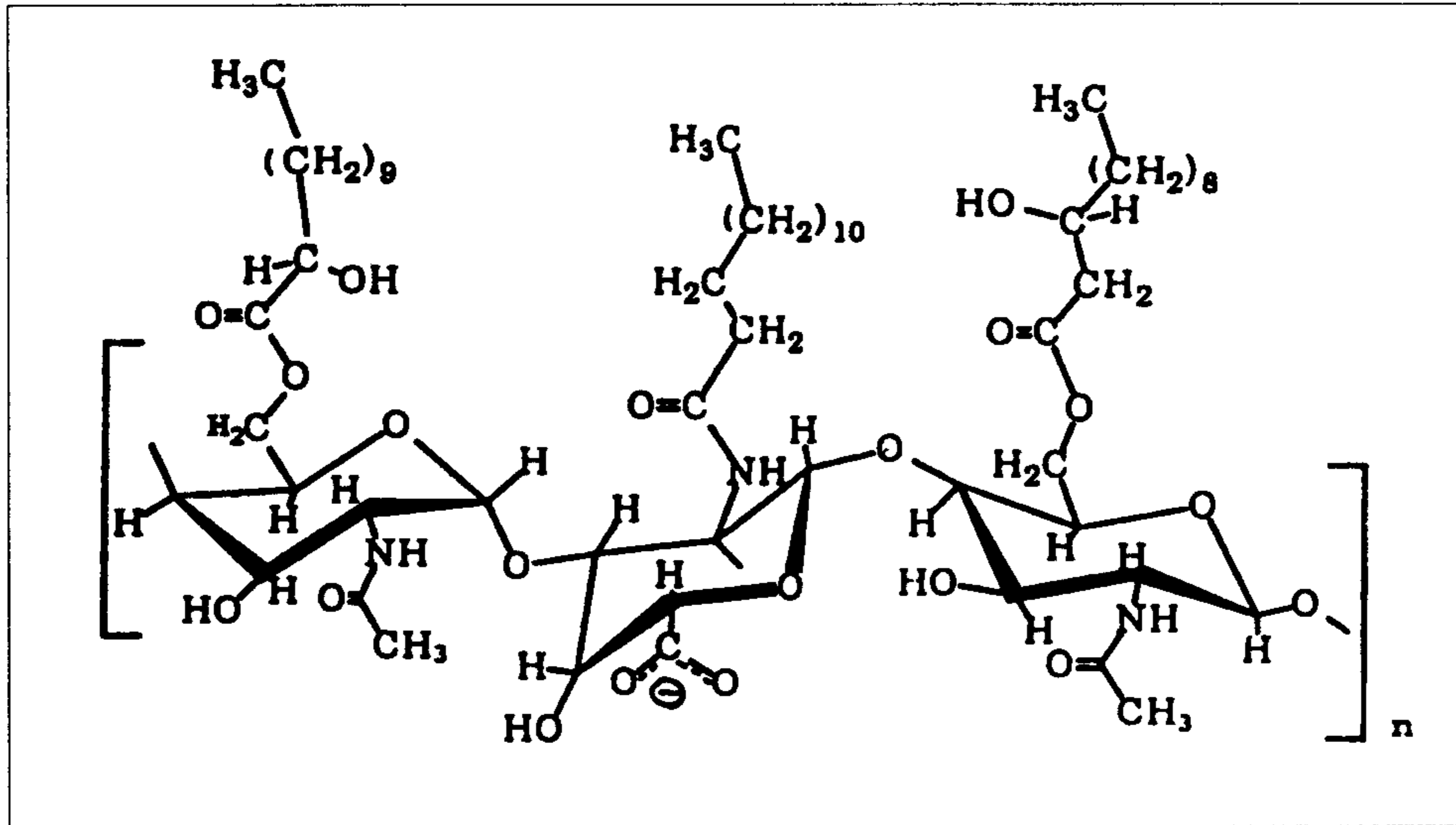


Fig. 1. Approximate structure of Emulsan

나. 활용

Emulsan은 현재 상업화된 대표적인 biosurfactant로서 MEOR등에 사용되고 있다. 유정의 암석 틈에서 emulsan은 원유의 점도와 계면활성을 감소시켜 유동성을 증가시킨다. 또한 안정화된 에멀전도 형성하여 oil spill처리에도 응용되는데, 즉 탱크 바닥의 oil sludge를 제거하여 청소하며, sludge 중 90%의 탄화수소를 회수 재사용하고 있다. 또한 원유 수송에도 중질유의 점도 강하

제로서 송유비용을 절감시키기도 하고, 연료에 소량의 물을 주입하여 에멀전을 형성시켜 연료 연소 특성을 향상시켜 주기도 한다. 최근에는 화장품에도 그 유용성이 응용되고 있다.

제 2 절. 연구 추진 목적(실험 목적)

Biosurfactant는 구성물질, 분자량, 구성성분의 결합순서, 결합양식, 결합위치등에 따라 물성과 응용범위가 다양해지는데, 화학적, 효소적 또는 생물학적 수식 방법에 의해 기존의 물질 구조를 변형시킴으로써 더욱 바람직한 물성을 갖도록 유도하고 있다. 화학적, 효소적 수식방법의 경우 일단 biosurfactant를 생산, 분리, 정제한 후에 반응을 시키는 방법상의 절차와 수율 향상에도 문제가 따르나 생물학적인 방법의 경우 미생물의 정상적인 대사과정중에 외부조건의 변화로 값싼 기질로 특이한 다양한 구조 변형을 전체적으로 유도할 수 있으며, 절차상 간편하고 경제적인 특징이 있다.

본 실험에서는 lipopolysaccharide biosurfactant인 Emulsan의 소수성 부분을 생물학적으로 변형시키기 위해 ethanol이나 oleic acid와 기타 다른 탄화수소의 종류와 혼합비율을 달리하면서 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1을 배양하여 emulsan을 생산한다. 이러한 절차로 생산한 emulsan을 분리정제하여 일차적으로 emulsifying activity를 측정 후, 소수성 부분의 성분 분석 및 정량, 분자량 및 계면활성제 고유성질인 표면 및 계면장력 조절능, 그리고 이에 의해 생성된 에멀전의 안정성을 조사한다. 또한 불포화지방산 영양요구성 돌연변이를 이용하여 세포의 지방산 조성을 조절하고 emulsan의 물성을 변화시키기 위하여 불포화지방산 영양요구성 돌연변이를 분리한다.

제 2 장. 연구 추진 방법(실험 방법)

제 1 절. 미생물 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1로서, eppendorf tube 에 냉동상태로 보관하여 사용하였다. 균주의 배양에 사용한 배지 조성은 탄소원, 1% urea 2g/l; K_2HPO_4 22.2 g/l; KH_2PO_4 7.3 g/l; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/l; 그리고 stock trace metal solution 3 ml이었다. 이때, $MgSO_4$ 용액은 100배로 농축한 용액을 따로 조제하여 멸균하여 멸균배지에 위의 농도가 되게 첨가하였으며, trace metal solution은 100ml당 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 36.8 mg; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 62.4 mg; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 60.4 mg; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 59.4 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 42.2 mg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 78.8 mg; Na_2MoO_4 69.6 mg이 함유된 것으로, 미네랄 침전을 막기 위해서 $c-H_2SO_4$ 를 사용하여 pH 2.0으로 산성화시킨 후 $0.45 \mu m$ membrane filter로 여과시킨 것이다. 사용균주가 잘 이용하는 지방산이나 이들 유도체를 사용하는 실험을 제외하고, 다른 cosubstrate 혼합물을 사용하는 실험에서는 0.4% cosubstrate를 먼저 배지에 첨가한 후에 나머지 0.4% cosubstrate의 기대되는 성장 저해효과를 방지하기 위함이었다.

제 2 절. 배양과 발효 조건

배양전 냉동상태의 균주를 $30^\circ C$ water bath에서 녹인 후, 탄소원과 에너지 원으로 1% ethanol을 함유한 50 ml의 배지가 든 250 ml의 삼각 플라스크에 옮긴 후, 진탕배양기(New Brunswick Scientific)에서 $30^\circ C$, 250 rpm으로 24시간 동안 배양하였다. 그런 후 배양액 5 ml를 새로운 증식배지에 옮겨 16시간동안 같은 조건으로 배양하여, 이 배양액을 발효의 inoculum으로 사용하였다. 모든 주요 발효실험에서 500 ml의 발효배지가 든 2.8 l 삼각플라스크를

사용하였으며, 20 ml의 seed culture를 접종하여 진탕배양기(NBS)에서 30°C, 250 rpm으로 72시간동안 배양하여 emulsan을 생산하였다.

제 3 절. Emulsan의 분리 및 정제

500 ml의 발효액을 4°C에서 Sorvall GSA-R을 이용 5000rpm(3600g)으로 20분 동안 원심분리하여 세포들을 제거한다. 상등액을 47% ammonium sulfate로 처리(상등액 500ml에 137g 첨가)하여, 저온상태(4°C)에 두면 crude emulsan 침전물이 만들어진다. 침전물 형성이 가시적으로 확인되는 이러한 현탁액을 저온(4°C), 7500 rpm(6700g)에서 20분 동안 원심분리한다. 원심분리로 침전된 것을 50-80 ml의 증류수에 녹인 후 dialysis tubing(Spectra/por MWCO;12000-14000, Thomas Scientific Co.)을 이용 저온에서 증류수에 5번 정도 반복하여 삼투 희석시킨다. 투석된 용액을 동결건조시키고, 건조된 emulsan은 Soxhlet 추출기로 1-2일 동안 ether로 추출한 후 오븐에서 100°C로 건조시킨다. 이렇게 분리, 정제된 emulsan sample을 다음 분석 실험에 사용하였다.

제 4 절. 분석 방법

1. Emulsifying activity 측정

125 ml 삼각플라스크(Pyrex)에 TM buffer(20mM Tris. HCl buffer, pH 7.2, 10 mM MgSO₄)와 일정량의 정제한 emulsan을 넣어 최종부피가 7.5 ml가 되게 한 후, 0.1 ml의 standard mixture (hexadecane / 2-methylnaphthalene [1:1, vol/vol))를 첨가하여 고무마개로 꼭 막는다. 그런 후 shaking water bath (Vision Co. Std)에서 30°C를 유지하며, 1시간동안 그대로 방치한 후에

Abs._{610nm}를 측정한다.(Shimadzu UV 160A). 다른 탄화수소에 대한 emulsifying activity측정에 있어서도 같은 절차로써, 0.1 ml hexadecane이나 0.1 ml 2-ethylnaphthalene을 standard mixture대신 사용한다. 각 측정값은 2개 측정값의 평균이다. Spectrophotometer 610 nm에서 Abs. 1을 나타낼 때 1 unit의 emulsifying activity를 가진다고 정의한다.

2. Emulsan의 지방산 분석

분리정제한 5 mg의 emulsan을 3 ml-Microreaction vessel에 담아 6N HCl 2 ml를 가한 후 Reacti-therm heating block module(Pierce Co.)에서 100°C, 16시간 동안 반응시킨다. 반응물이 식으면 상분리를 증진시키기 위해 1ml의 증류수를 가하고 emulsan 분자에서 가수분해된 지방산을 3ml ether로 5번 반복 추출해 낸다. Ether 추출물은 같은 부피의 증류수로 세번 세척한 후 MgSO₄로 건조시킨다. 이런 절차를 거친 ether 추출물의 용매를 물 증탕을 통하여 농축, 증발시킨후 GC/MS분석을 위하여 다음과 같이 fischer esterification 방법에 따라 methylation하였다.

먼저 aq. 6N HCl(81.3 ml)에 MeOH(68.8 ml)를 가하여 methylation reagent stock solution을 만들었다. 산 가수분해한 시료에 2 ml의 methylation reagent를 넣고 10초간 vortex하여 시료를 완전히 녹였다. 80°C shaking water bath에서 10분간 반응시킨 후, 1.25ml의 추출 용매(hexane:ether=1:1)를 가하여 10분간 섞고 나서 수용액층을 제거하였다. 여기에 3ml의 basic washing solution(0.3M aq. NaOH)을 가하여 5분간 섞어준 후 유기층을 추출하여 vial에 옮기고 rotary evaporator로 농축하였다.

이상과 같이 얻어진 시료의 GC분석을 통하여 각각의 GC chromatogram을 얻었으며, 각 peak에 해당하는 탄소수 8에서 24까지의 포화 및 불포화 지방산과 2-hydroxydodecanoic acid, 3-hydroxydodecanoic acid 등 standard 시료의 retention time과 비교함으로써 각 지방산을 일차적으로 정성하였다. 그리고

나서 GC/MS(Cl, 70eV) spectrum상에서의 quasimolecular ion peak과 구성 지방산의 분자량을 비교하고, fragmentation pattern을 분석함으로써 정성을 confirm하였다.

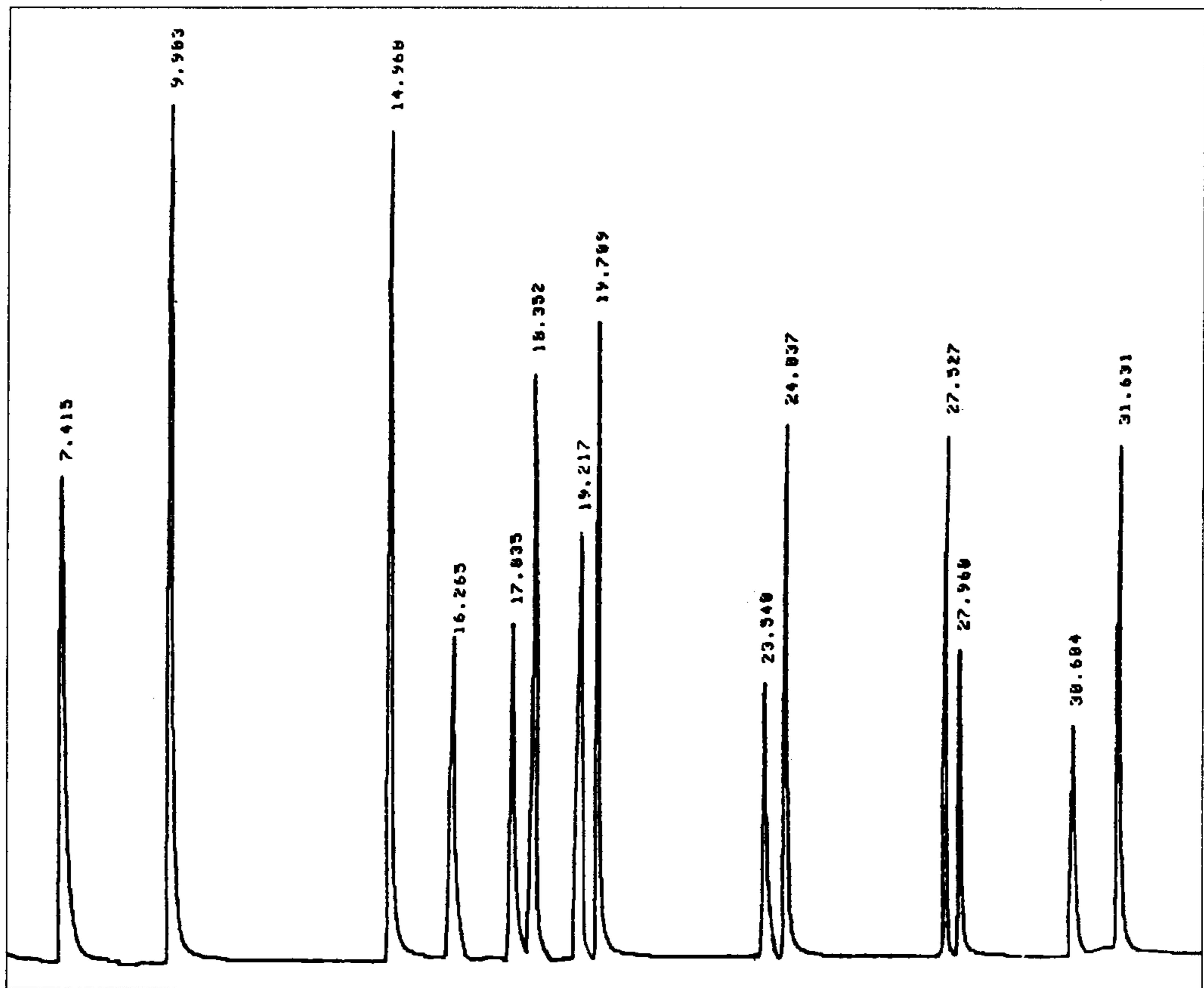


Fig.2. GC chromatogram of standard fatty acids.

3. 불포화지방산을 영양요구하는 돌연변이주의 분리

*Acinetobacter calcoaceticus*를 M9 최소 buffer에 5mM oleic acid를 유일 탄소원으로 하는 액체배지에서 성장시켰다. 이때, 비용성인 oleic acid를 emulsify하기 위해 0.5% Tween 20을 첨가했다. 돌연변이 유발원으로는 nitrosoguanidine(NTG)을 사용했으며 처리방법은 Miller의 방법을 따랐다. 지수 성장 (OD 560 = 0.4-0.6)한 3 ml 세포액을 원심분리 후, 0.1 M citrate buffer (pH 5.5)로 2회 세척했다. 다시 1.2 ml의 동일 buffer로 resuspend시킨 후, 25 μ g/ml이 되도록 NTG를 첨가하고 37°C에서 10분간 (예비실험을 통해 % survival이 50%인 시간) 처리했다. NTG가 처리된 세포액을 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.0)으로 열배 희석한 후 원심분리하고 다시 동일 buffer로 2회 세척했다.

NTG를 처리한 세포들을 0.6% glycerol, 0.025% Tween 20, 0.01 % oleic acid가 포함된 M9 최소 배지로 resuspend시켜 overnight 배양하였다. 이를 다시 0.6% glycerol, 0.025% Tween 20, 0.01% oleic acid가 포함된 M9 평판배지 (unselective medium)에 plate당 500 colony가 되도록 희석하여 도말한다. 이렇게 해서 얻은 colony들을 oleic acid가 첨가되지 않은 평판 배지(selective medium)로 replica 하여 unselective medium에서는 자라지만 selective medium에서는 자라지 않는 colony를 선별하였다.

제 3 장. 연구결과 및 고찰

제 1 절. Emulsifying activity 측정 방법 고찰

1. Shaking 후의 standing time 결정.

0.8% oleic acid와 0.2% 1-phenyldodecane 혼합물에서 RAG-1을 배양한 후 ammonium sulfate precipitation으로 배양 상층액으로 부터 분리 정제한 emulsan으로 Mg^{2+} 를 함유한 buffer용액에서 standard hydrocarbon mixture를 emulsification (350 μ g Emulsan/7.5ml assay volume) 시킨 후 시간에 따른 turbidity 감소 정도를 관찰하였다.

Fig. 3.에서 볼 수 있듯이 1시간 shaking 후 flask에 그대로 방치한 것과 cuvette에 emulsification 반응 수용액층을 취한 것의 turbidity 감소 경향을 610nm에서 관찰해 보면 flask에 그대로 두었을 때 더욱 감소 속도가 바르며 10분 후부터는 거의 일정해짐을 알 수 있었다.

이와 같은 turbidity의 감소 이유는 shaking으로 인해 emulsan에 의해 안정되어 지지 않고 수용액상에 분산된 형태의 탄화수소 droplet들이 서로 뭉쳐 큰 drop을 형성함으로써 완전한 상분리가 이루어짐(coalescence)과 동시에 공기방울들의 표면 위로의 부상, 또한 emulsan에 의해 유화되고 안정화된 에멀전 입자들이 두 phase간의 밀도 차이로 인해 표면위로 떠오르기 때문이다(creaming). 또한 cuvette incubation에서 turbidity 감소가 더 늦게 나타나는 이유는 cuvette에 비해 flask에서 표면으로 떠오르는 이동거리가 더 작기 때문에 그만큼 빨리 일정한 turbidity에 도달하기 때문이다. 따라서, emulsification시킨 후 flask를 그대로 10분간 방치한 후 turbidity를 측정하는 게 적당하다. 방치해 둔 emulsion 용액을 몇 번 흔들어 준 후 turbidity변화를 반복적으로 측정해 보아도 거의 비슷한 결과를 나타내었다.

따라서, emulsification시킨 후 flask를 그대로 10분간 방치한 후 turbidity를

측정하는 게 적당하다. 방치해 둔 emulsion 용액을 몇 번 흔들어서 준 후 turbidity변화를 반복적으로 측정해 보아도 거의 비슷한 결과를 나타내었다.

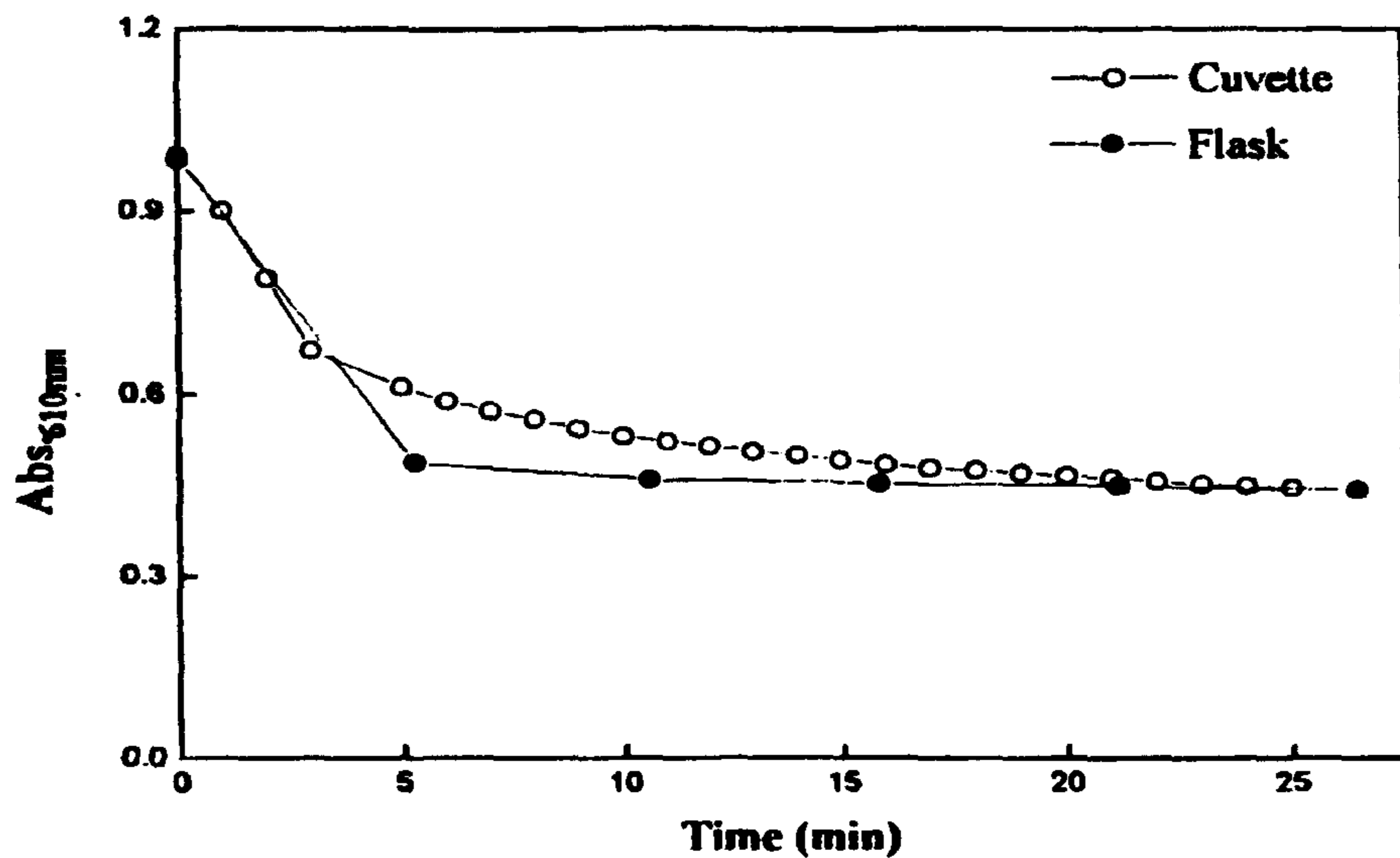


Fig.3. Effect of standing time on emulsion formation after shaking

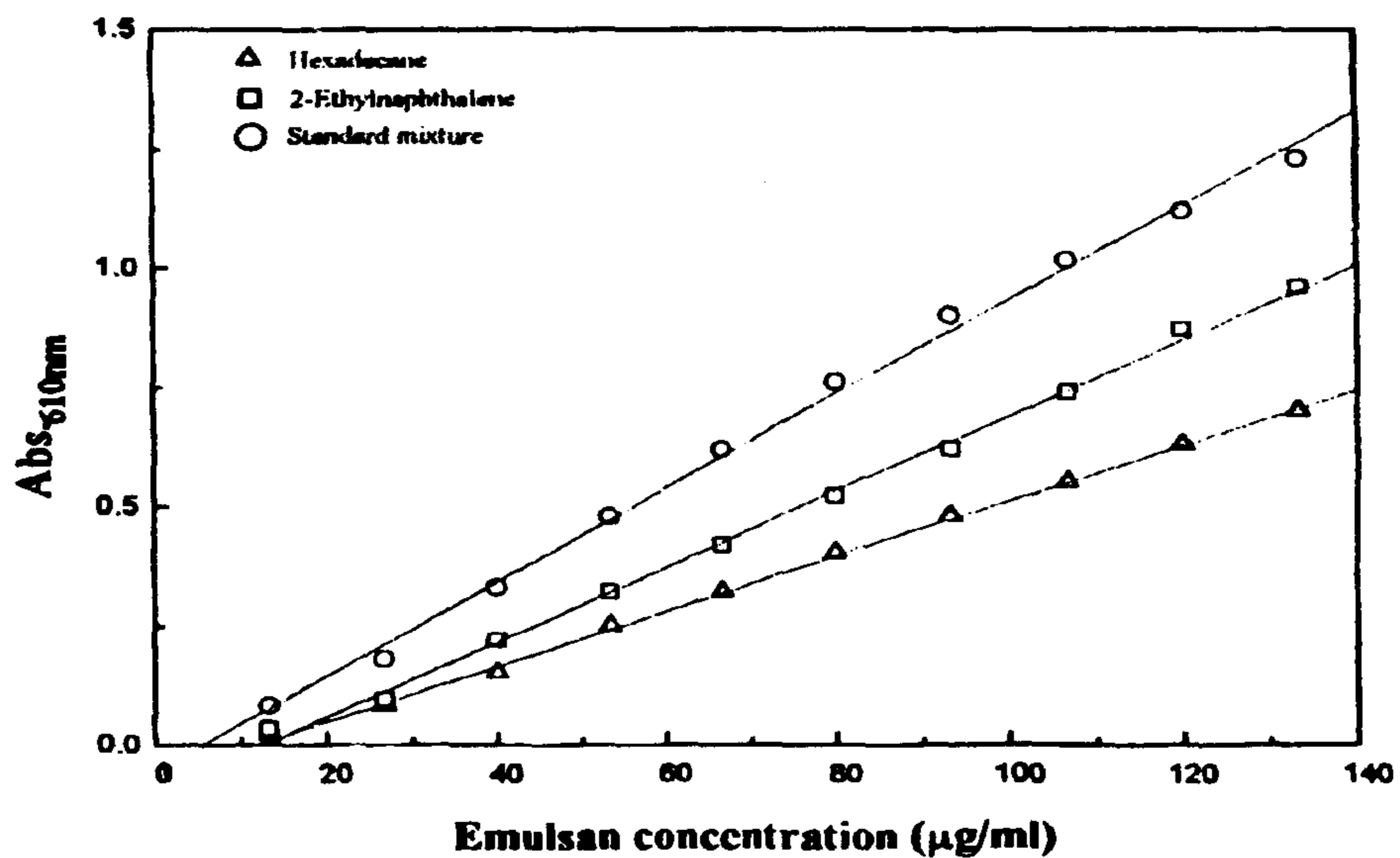


Fig.4. Standard emulsifying activity assay for emulsan

2. Emulsifying activity와 hydrocarbon substrate specificity

Emulsan sample의 농도를 달리하면서 세 가지 탄화수소 기질에 대한 emulsifying activity를 관찰하였다. Hexadecane이나 2-ethylnaphthalene에서 보다 standard hexadecane/2-methylnaphthalene mixture에서 emulsifying activity가 훨씬 높게 나타나고, aliphatic hexadecane보다는 aromatic 2-ethylnaphthalene에서 보다 활성이 높게 나옴을 알 수 있어 emulsan이 이들 세 가지 탄화수소 기질들에 대해 서로 다르게 interaction함을 알 수 있었다. (Fig. 4). 이와 같이 생물 고분자는 화학적으로 합성된 물질들에서는 보이지 않는 특이성을 나타내고, 이러한 기질 특이성은 아직은 불분명하여, 구조와 기능과의 관계는 보다 상세한 characterization을 요한다.

또한, 사용한 emulsan양과 유화되어 안정화된 O/W emulsion의 turbidity간에는 양적인 비례관계가 성립하였다. 이러한 비례관계는 amphipathic 생물고분자인 emulsan이 탄화수소와 물의 계면에 비가역적으로 배향흡착하여 단분자층의 얇은 film을 형성, emulsion의 coalescence를 방지하여 안정화시키기 때문이다. 실험조건에서 일정하게 반응온도를 유지시켜 주는 게 중요하며 일반적으로 온도는 계면장력이나 액상의 상호 용해도, 분산입자의 열적 교란 등에 영향을 미치며, 반응시의 불안정한 온도가 실제로 이러한 linearity로부터 deviation을 유발시킴이 관찰되어져 일정 온도의 유지가 바람직하다.

제 2 절. 공급 탄소원 종류에 따른 Emulsan의 물리 화학적 특성

1. Emulsan 구성 지방산의 정성 및 emulsifying activity의 변화

가. Emulsan 구성 지방산의 조성

GC/MS로 lipopolysaccharide인 emulsan의 소수성 부분을 분석해 본 결과, 주로 10가지 정도의 지방산과 그 외 방향족화합물들로 이루어져 있었으며, 비교적 상대적 함량이 높은 지방산은 3-hydroxydodecanoic acid, hexadecanoic acid, octadecenoic acid이었다. 그 외에 octanoic acid, decanoic acid, dodecanoic acid, dodecenoic acid, 2-hydroxydodecanoic acid, tetradecanoic acid, hexadecenoic acid, octadecanoic acid 등이 구성 지방산으로 존재하였다.

그 차지하는 비율은 상당히 낮지만 cyclohexanebutanoic acid, 2-dodecyloxyethanol, 2-ethyl-2-methyltridecanol, 3hydroxyoctadecanoic acid, 9,12-octadecadienoic acid, 3-hydroxyoctadecanoic acid 등도 지방산 구성성분으로 발견되었으며, 방향족 화합물로는 dodecyl bezene, 2,5-dibromobenzoic acid, 1,2-benzenedicarboxylic acid, 1-phenanthrenecarboxylic acid, 2-*t*-butyl-4-(dimethylbenzyl)phenol, 2,4-bis(dimethylbenzyl)phenol 등이 발견되었다.

Table 3. Different carbon source

Carbon source	Structure
Ethanol	CH ₃ -CH ₂ -OH
Oleic acid	CH ₃ -(CH ₂)-CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH
4-Dodecylphenol	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -C ₆ H ₄ OH
1-Pheylododecane	C ₆ H ₅ -(CH ₂) ₁₁ -CH ₃
Octylether	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -O-(CH ₂) ₇ -CH ₃
Igepal	4-(C ₉ H ₁₉)C ₆ H ₄ -O-CH ₂ -CH ₂ -OH
Ricinelic acid(castor oil)	CH ₃ -(CH ₂) ₅ -CH(OH)-CH ₂ -CH=CH-(CH ₂) ₇ -COOH
<i>n</i> -Octylepoxystearic acid	(C ₈ H ₁₇)(CH ₂) ₁₅ -COOH
Stearonitrile	CH ₃ -(CH ₂) ₁₆ -CN
Diocylamine	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -NH-(CH ₂) ₇ -CH ₃
Oleylamine	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH=CH-(CH ₂) ₈ -NH ₂
Alkylated fatty acid (methyl-, propyl-, butyl-)	

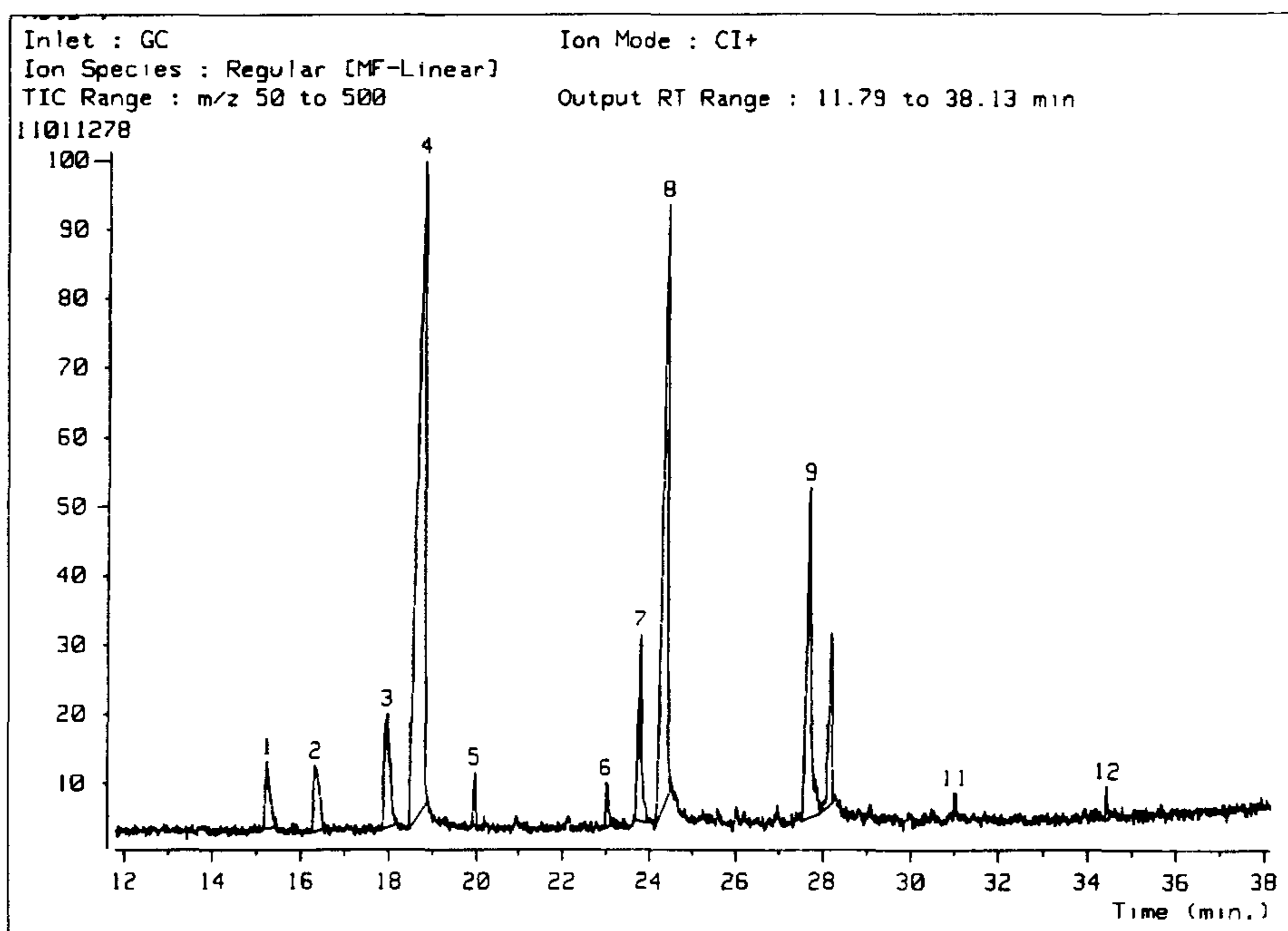


Fig. 5. GC chromatogram of a emulsan sample

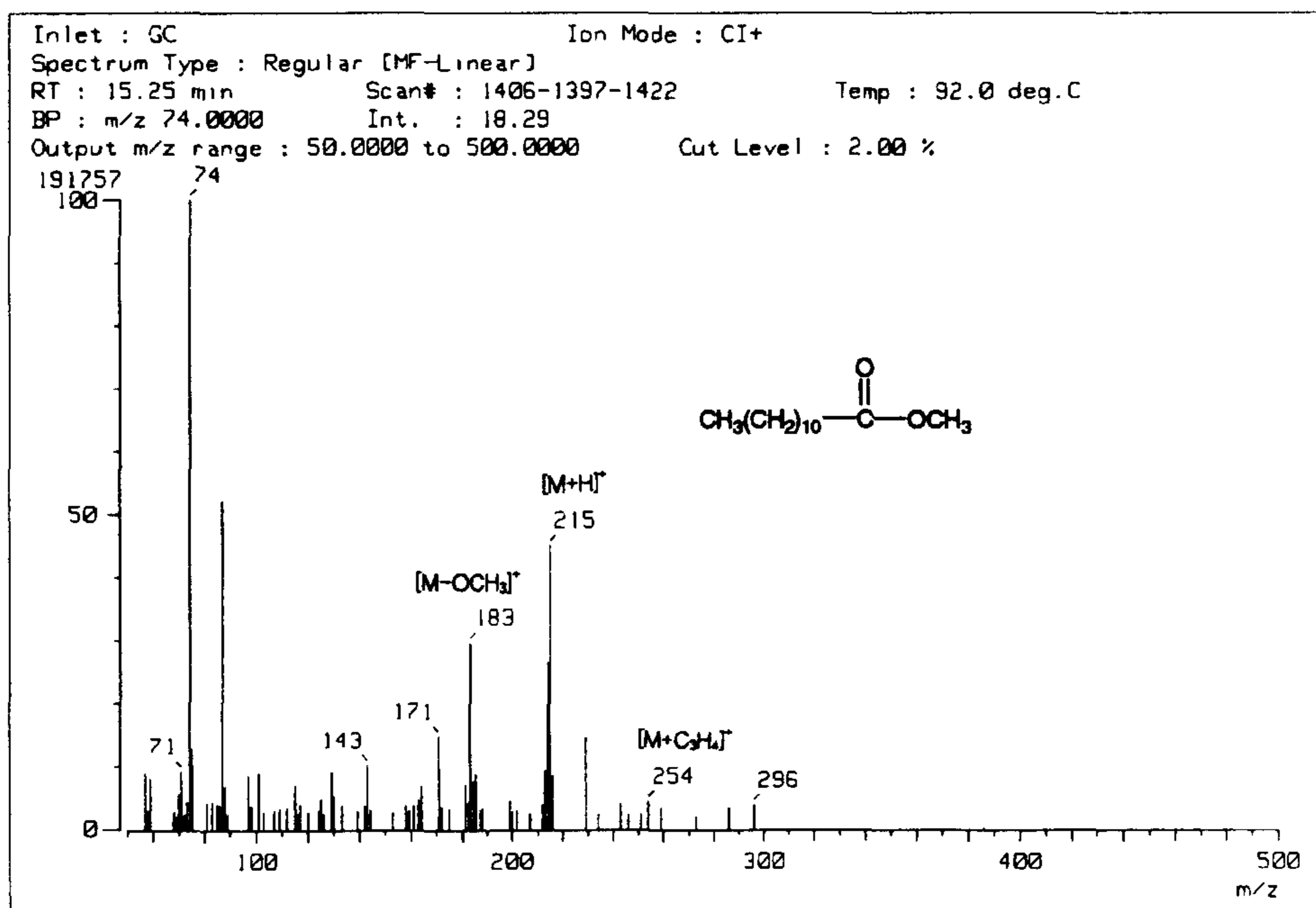


Fig. 6. Mass spectrum (CI, CH₄, 70eV) of 1th peak in Fig. 5.

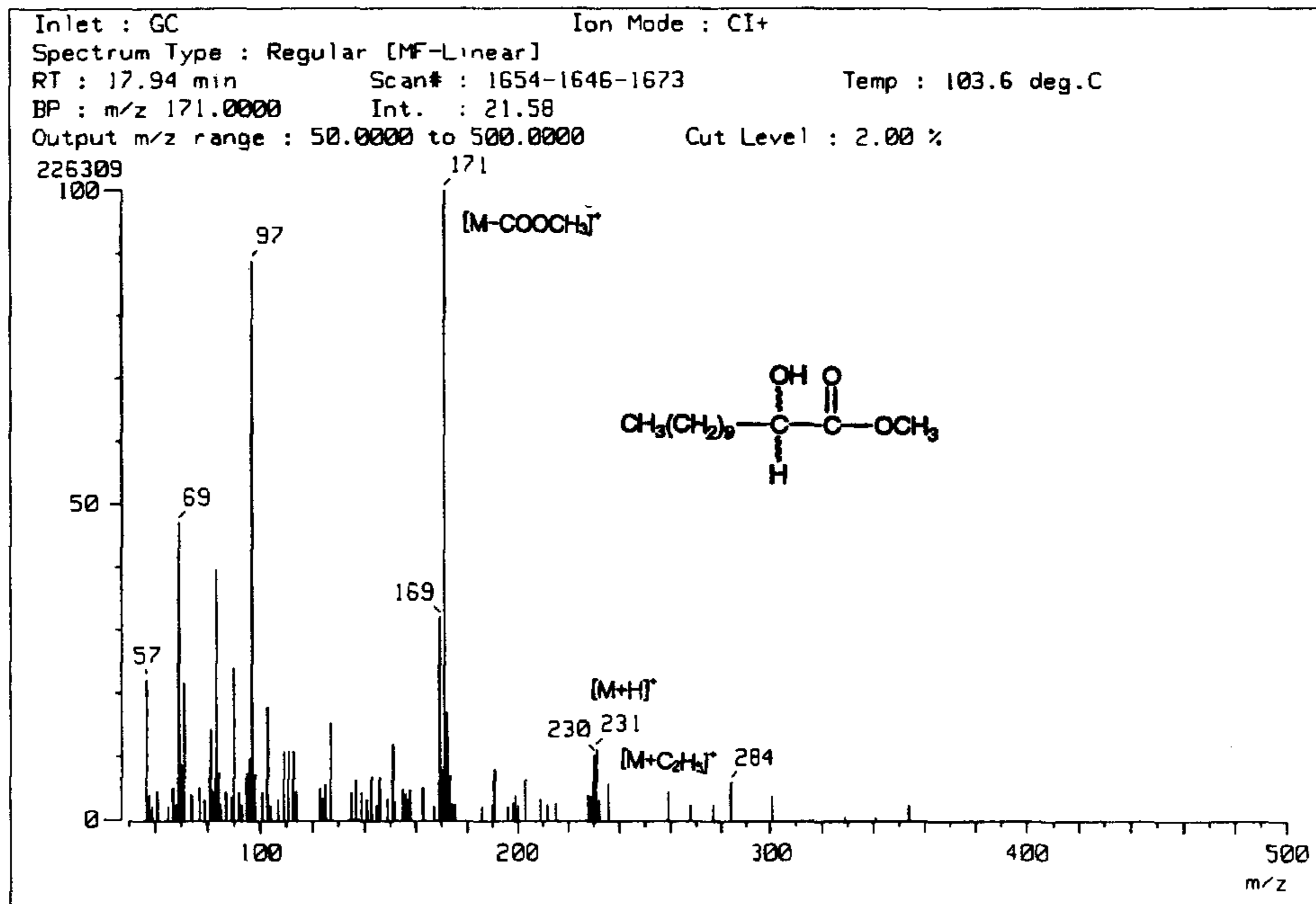


Fig. 7. Mass spectrum (CI, CH₄, 70eV) of 3th peak in Fig. 5.

나. Emulsifying activity의 변화

Ethanol이나 oleic acid에 다른 종류의 탄화수소를 cosubstrate로 첨가하거나 또는 이들간의 혼합비율을 달리하여 공급할 경우 생산된 각 emulsan에 있어서 구성 지방산 변화와 더불어, 세 기질에 대한 emulsifying activity도 서로 다르게 나타났다. Emulsifying activity측정에 사용한 emulsan양은 300 μg이었으며, emulsification시켰을 경우 emulsifying activity가 standard mixture의 경우 0.21-3.99 U/mg, 2-ethylnaphthalene, 그리고 hexadecane에 대해서는 비교적 활성이 낮은 편이었다. 그러나, 0.8% oleic acid와 0.2% octylether 혼합물, oleic acid와 ricinoleic acid 혼합물(0.2%:0.8%, 0.5%:0.5%, 0.8%:0.2%), 0.2% ethanol이나 0.2% oleic acid와 0.8% ethyloleic acid 혼합물에서 생산한 emulsan의 경우 세 기질 중에 2-ethylnaphthalene에서 활성이 더 높게 나타났다.

Standard mixture에 대한 emulsifying activity가 상대적으로 높게 나타난 emulsan은 1% oleic acid, oleic acid와 octylepoxystearic acid의 혼합물 (0.5%:0.5%, 0.8%:0.2%), 0.8% oleic acid와 0.2% ricinoleic acid 혼합물, 0.8% oleic acid와 0.2% octylether 혼합물로부터 생산해낸 것들이었다.

여러 탄소원에서 생산해낸 전체 emulsan중 세 기질에 대한 emulsifying activity를 서로 비교해 볼 때, standard mixture, hexadecane에 대해서는 0.2% oleic acid와 0.8% methyloleic acid 혼합물로부터 생산한 emulsan이, 그리고 2-ethylnaphthalene에 대해서는 0.8% oleic acid와 0.2% octylether로 부터 생산한 emulsan이 각각 emulsifying activity가 가장 높게 나왔다.

Table 4-1. Lipid content and emulsifying activity with different carbon source

Substrate Component($\times 10^2$ mg)	1% Ethanol	1% Oleic acid
Dodecanol	2.8	3.7
Dodecanoic acid	8.1	7.9
Dodecenoic acid	3.3	3.7
2-OH-Dodecanoic acid	1.9	1.2
3-OH-Dodecanoic acid	16.4	31.9
Tetradecanoic acid	4.8	1.6
Hexadecenoic acid	3.5	3.4
Hexadecanoic acid	23.5	8.5
Octadecenoic acid	14.7	17.2
Octadecanoic acid	9.0	4.6
Octanoic acid	2.2	2.0
Phen. carbox. acid	1.5	1.2
Phenolic compound	3.5	4.4
Unidentified compound	4.8	8.7
Emulsifying activity (U/mg)		
Strandard mixture	1.396	3.330
2-Ethylnaphthalene	1.010	2.450
Hexadecane	0.250	0.930

Table 4-2. Lipid content and emulsifying activity with different carbon source

Substrate Component(%)	Mixture of ethanol and octyl ether		
	0.2% : 0.8%	0.5% : 0.5%	0.8% : 0.2%
Dodecanol	5.1	4.7	4.1
Dodecanoic acid	5.9	10.6	4.1
Dodecenoic acid	2.9	5.4	2.4
2-OH-Dodecanoic acid	1.6	2.7	2.2
3-OH-Dodecanoic acid	18.8	25.2	30.7
Tetradecanoic acid	1.1	1.7	T
Hexadecenoic acid	5.0	4.1	2.6
Hexadecanoic acid	12.4	11.2	12.3
Octadecenoic acid	31.3	21.7	28.6
Octadecanoic acid	6.2	1.9	1.9
Octanoic acid	4.5	3.9	4.2
Phen. carbox. acid	T	T	T
Phenolic compound	T	1.0	1.8
Unidentified compound	5.2	5.4	5.1
Emulsifying activity (U/mg)			
Strandard mixture	0.646	2.050	3.246
2-Ethyl-naphthalene	1.050	2.056	4.143
Hexadecane	0.233	0.546	0.583

Table 4-3. Lipid content and emulsifying activity with different carbon source

Substrate Component(%)	Mixture of ethanol and ricinoleic acid		
	0.2% : 0.8%	0.5% : 0.5%	0.8% : 0.2%
Dodecanol	7.2	5.1	4.8
Dodecanoic acid	8.4	9.0	11.3
Dodecenoic acid	5.1	5.0	4.4
2-OH-Dodecanoic acid	4.1	3.5	2.2
3-OH-Dodecanoic acid	18.0	20.8	15.5
Tetradecanoic acid	1.2	1.4	3.7
Hexadecenoic acid	1.9	3.1	3.8
Hexadecanoic acid	18.7	17.1	18.1
Octadecenoic acid	15.0	15.5	16.6
Octadecanoic acid	4.6	4.4	5.1
Octanoic acid	2.6	3.6	3.3
Phen. carbox. acid	1.0	1.1	1.1
Phenolic compound	4.1	4.1	4.3
Unidentified compound	8.1	6.7	5.6
New : 9,12-Octadecadienoic acid	3.4	2.8	T
Emulsifying activity (U/mg)			
Strandard mixture	1.096	1.450	0.766
2-Ethyl-naphthalene	0.756	0.853	0.633
Hexadecane	0.543	0.723	0.583

Table 4-4. Lipid content and emulsifying activity with different carbon source

Substrate Component (%)	Mixture of ethanol and cosubstrate (0.2% : 0.8%)			
	Butyricinoleic acid	Butyloleic acid	Methyloleic acid	Methylauric acid
Dodecanol	5.9	6.1	5.4	6.1
Dodecanoic acid	9.5	6.4	6.4	9.4
Dodecenoic acid	3.1	2.6	3.7	3.6
2-OH-Dodecanoic acid	2.9	2.1	3.2	3.5
3-OH-Dodecanoic acid	21.3	18.8	34.7	32.0
Tetradecanoic acid	5.4	2.4	0.8	2.6
Hexadecenoic acid	2.7	T	3.8	4.1
Hexadecanoic acid	16.7	17.5	11.7	18.3
Octadecenoic acid	12.4	26.7	19.4	8.8
Octadecanoic acid	4.1	3.1	2.1	4.3
Octanoic acid	3.0	2.9	2.1	1.4
Phen. carbox. acid	T	T	T	T
Phenolic compound	T	T	T	T
Unidentified compound	13.0	11.4	6.7	6.0
New : 9,12-Octadeca- dienoic acid	1.3	1.3	T	T
Emulsifying activity (U/mg)				
Strandard mixture	0.743	0.493	3.040	1.423
2-Ethynaphthalene	0.273	0.156	2.850	2.293
Hexadecane	0.473	0.270	0.600	0.426

이처럼 공급되는 탄소원의 변화가 지질 대사에 관여하고 emulsan 생산량과 구성 지방산 조성에도 영향을 미쳐 각 조건에서 생산한 emulsan의 emulsifying activity능력을 결정하는 것 같다.

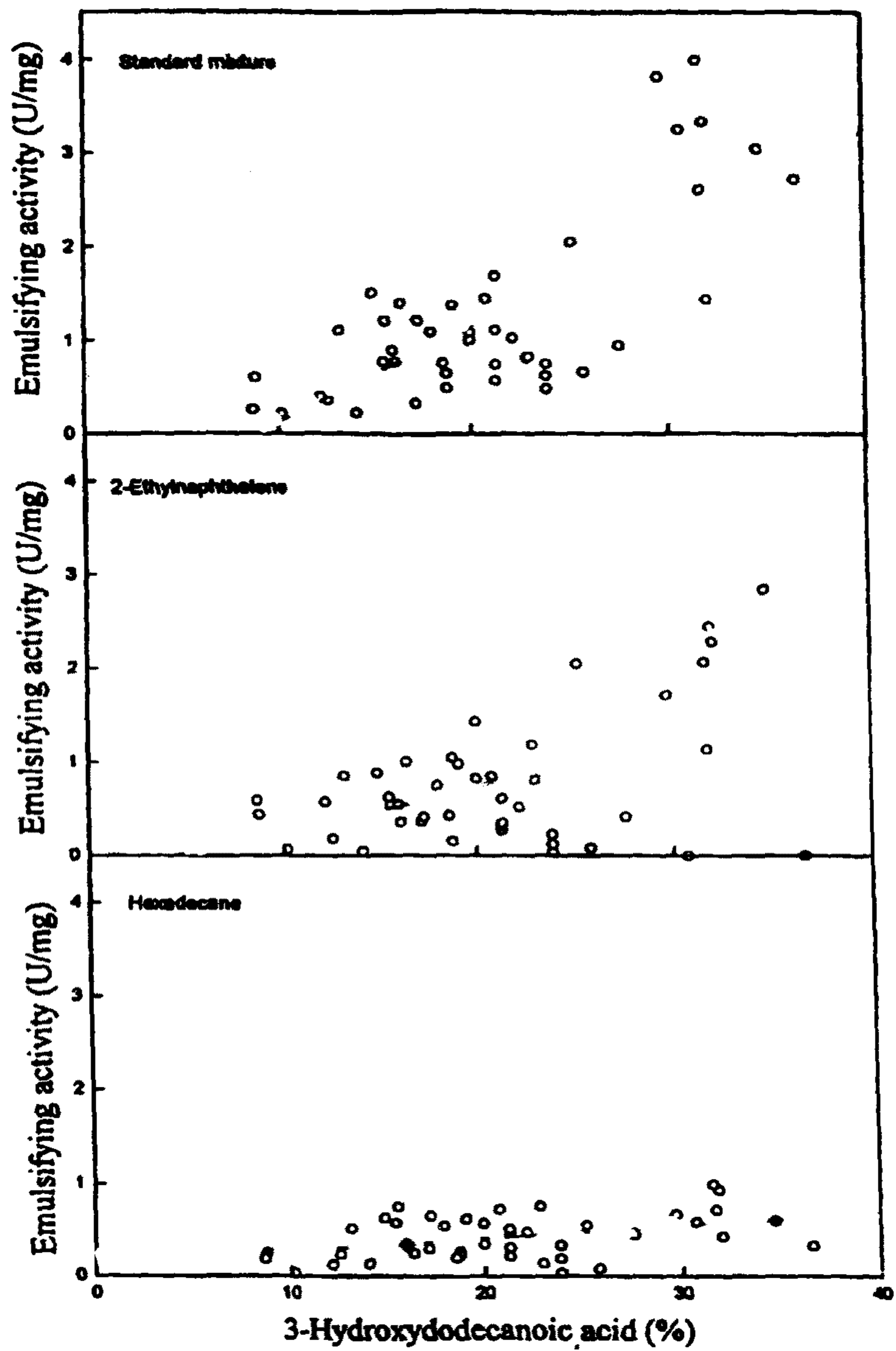


Fig.8. Relationship between 3-Hydroxydodecanoic acid content and the emulsifying activity.

2. Fatty acid와 emulsifying activity와의 상관관계

배지에 공급된 탄소원의 종류와 상대적 양의 변화가 emulsan의 생산량에 매우 커다란 효과를 미쳤으며, 또한 실질적인 구성 지방산 조성에도 영향을 주었다. 그리고 이러한 emulsan의 지방산 함량과 조성변화가 emulsifying activity에 중요한 역할을 한다고 생각한다. 특히 3-hydroxydodecanoic acid는 활성이 높은 emulsan 제조에 있어서 가장 중요한 구성지방산으로 생각되어진다. 각기 다른 탄소원에서 생산해 낸 각 emulsan내의 3-hydroxydodecanoic acid 함량비율과 emulsifying activity간의 상관관계를 Fig.8.에 도시하였다.

그림에서 보인것 처럼 3-hydroxydodecanoic acid의 함량은 emulsifying activity와 비례 관계가 있는 것으로 생각된다. 이러한 연구 결과로부터, 제 2 단계 연구에서는 3-hydroxydodecanoic acid의 절대량과 emulsifying activity와의 관계를 규명하도록 하겠다.

제 3 절. 불포화지방산을 영양요구하는 돌연변이주의 분리

40,000여개의 colony를 확인하여 한 개의 불포화지방산 영양요구 돌연변이를 획득했다. 이 돌연변이주는 oleic acid가 첨가되지 않은 배지에서는 매우 낮은 성장속도를 나타냈다. 성장 비교는 0.025% Tween 20과 0.6% glycerol에 0.01% oleic acid가 첨가되거나, 첨가되지 않은 두 가지 경우에서 확인하였다. 야생형의 성장속도에 대해 돌연변이는 20% 정도의 성장을 보이며 oleic acid가 첨가되면 80% 정도 회복되었다.

이 돌연변이주가 생산하는 emulsan의 물성이 성장인자로 첨가해 주는 불포화지방산의 종류와 농도에 따라 어떤 변화가 있는지를 확인해야 하며 이에 따른 emulsan의 물성이 향상되는 조건에서 성장온도나 배양조건을 달리하여 emulsan 생산을 최적화하는 연구가 수행되어야 한다.

제 4 장. 결론

1. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1이 생산하는 Emulsan의 지방산 조성을 다른 종류의 탄소원을 기질로 공급함으로써 변화시킬 수 있었다.
2. 지방산 조성이 바뀐 Emulsan은 oil/water system에서 서로 다른 emulsifying activity를 나타내었다.
3. Emulsan의 지방산은 decanoic acid, dodecanoic acid, dodecenoic acid, 2-hydroxydodecanoic acid, 3-hydroxydodecanoic acid, tetradecanoic acid, hexadecanoic acid, hexadecenoic acid, octadecanoic acid와 octadecenoic acid 등으로 이루어져있다.
4. Emulsan의 구성지방산중 3-hydroxydodecanoic acid가 emulsifying activity에 가장 중요하게 작용하는 것으로 나타났다.
5. 40,000여개의 colony로 부터 야생형에 대해서 20% 정도의 성장을 보이며 oleic acid가 첨가되면 80% 정도 성장이 회복되는 한개의 불포화지방산 영양요구 돌연변이를 획득하였다.

제 5 장. 참 고 문 헌

1. Ristau, E. and Wagner, F.(1983) , *Biotechnol.Lett.* 5:95-100
2. Javaheri, M., Jennenman, G. E, McInerney, M. J. and napp, R. M. (1985)
Appl. Environ. Microbiol. 50: 698-700
3. McInerney, M. J., Javaheri, M. and Nagle, D. P. (1990),
Ind. Microbiol. 5: 95-102
4. Finnerty, W. R. and Singer, M. E. (1984)
Dev. Ind. Microbiol. 25:31-46
5. Lin, S. C., Goursaud, J. C., Kramer, P. J., Georgiou, G. and Sharma, M. M
(1990) *Microbiol Enhancement of Oil Recovery-Recent Advances*, E. C
(Ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
6. Becher, P. (1966), *Emulsion:Theory and Practice*. 2nd ed.,
Krieger Publ. Co. Huntington, New York
7. Copper, D. G. and J. E. Zajic (1980), *Adv. Microbiol. Physiol.* 26: 229-254
8. C. Ratledge and S. G. Wilkinson(1988), *Microbial Lipids, Vol.I*, Academic
Press, New York.
9. Kosaric, N. (1993), *Biosurfactants*, Marcel Dekker, Inc., New York.
10. A. P. Tulloch, J. F. T. Spencer, and A. J. Gorin (1962), *Can. J. Chem*
40:1326
11. Copper, D. G., and D. A. Paddock (1982), *Appl. Environ. Microbiol*
47:173
12. A. Zuckerborg, A. Diver, A. Poeri, D. L. Gutnick, and E. Rosenberg
(1979), *Appl. Environ. Microbiol.* 37:414-420
13. K. Hisatsuka, T. Nakahara, Y. Minoda, and K. Yamada (1977)
Agr. Biol. Chem. 41:445-450
14. E. Ristan and F. Wagner (1983), *Biotech. Lett.* 5:95-100

15. M. C. Cirigliano and G. M. Carman (1984), *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 747-750
16. S. Inoue and S. Ito (1982), *Biotech. Lett.* 4:3-8
17. H. Kaweshima, T. Nakahara, M. Oogaki and T. Tabuch (1983)
J. Ferm. Tech. 61:143
18. Gerson, D. F, and J. E. Zjic (1979), *antonie van Leeuwenhook* 45:81
19. Cooper, D. G., C. R. MacDonald and N. Kosaric (1981),
Appl. Environ. Microbiol. 42:408
20. Inoue. S. (1988) *Proceedings of world Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry*, p. 206
21. D. L. Gutnick (1987), *Biopolymers.* vol.26:223-240
22. M. E. Hayes, E. Nestass, K. R. Hrebenar (1986), *Chemtech*, April. 239 - 243
23. E. Rosenberg, et al.(1979), *Appl. Environ. Microbiol.* 37:409-413
24. 北原文雄, 界面活性剤, の 分析と 試験法, 講談社, 1990
25. Ki Young Lee and Young Je Yoo (1993) *Biotech. Lett.* 15:1021-1029
26. N. Kosaric and W. L. Cairns (1987) *Biosurfactant and Biotechnology* 129-130p. Marcel dekker, Inc., New York
27. Z. Zosim, G, Fleminger, D. Gutnick & E, Rosenberg, Goerge S. Wise (1989), *J. Dispersion Science and Technology.* 10(3)-307311
28. M. A. Poter(1991), *Handbook of surfactants*, Chapman and Hall, New York
29. Yutaka Ishigami (1994), *油化学*, 41:30-39

여 백

제1차년도
최종보고서

당지질계 생물고분자 유화제의 응용기술
(위탁과제명)

A Study on the Applications of
Lipopolysaccharide Emulsifier

연구기관
한국과학기술원

과 학 기 술 처

여 백

I. 서론

코코아 버터는 카카오 종자(*Theobroma cacao*)에서 얻어진 천연의 지방성분으로, 미국 식품 의약국에서는 “성숙된 코코아 콩이나 코코아 콩을 볶은 후 채취한 식용 지방”으로 정의하고 있다⁽¹⁾.

코코아 버터는 94~96%가 트리글리세라이드로 이루어진 지방으로 실온에서 고체 형태로 존재한다⁽²⁾. 코코아 콩에서 착유된 코코아 버터는 20~30℃에서 녹기 시작하여 27~33℃에서 급격히 용융되는 흡열반응으로 입 속에서 시원한 감(coolness)을 느끼게 하는 독특한 용융특성을 보여준다^(1,3). 그리고 이러한 코코아 버터는 주로 초코렛 제조에 사용되어 초코렛을 먹을때 입 속에서 부드럽게 녹아 내려 좋은 향미를 발현시키는 특징을 주게 된다^(4,5).

코코아 버터는 28-36%정도 초코렛에 첨가되어 설탕, 코코아 및 분유등의 분말 원료와 함께 균일하게 분산된 脂肪相(fat phase)을 만들며, 코코아 버터의 溶融 舉動(melting behavior)과 結晶의 多形現像(polymorphism)에 의하여 최종 제품의 식감, 향미 발현(flavor release), 외관, 광택, 내열성 및 보존성과 같은 품질 특성에 영향을 준다^(6,7,8).

일반적으로 코코아 버터의 트리글리세라이드 조성, 템퍼링(tempering, 調質)에 의한 結晶化 및 多形現像 등에 관한 연구에서 코코아 버터에는 4~6개의 多形이 존재하며, 이들이 안정한 多形性 형태(polymorphic form)로 변하는 것을 코코아 버터의 트리글리세라이드 조성에 의한다고 한다^(9,10,11).

코코아 버터는 고가의 유지로 작황에 따라 가격 파동이 크기 때문에 원가 절감뿐만 아니라, 이의 물성과 유사하게 하여 품질 개선용으로 사용하기 위한 대체 유지가 지속적으로 개발되고 있으며, 그에 따른 연구가 계속 진행되고 있다^(12,13).

유지방도 조직 개선제(textural modifier)와 fat bloom의 억제제로서 코코아 버터

에 12~30%로 첨가되고 있다^(14~20). 특히, 만약 30%이상 첨가되면 코코아 버터의 고체지 함량을 변화시켜 연화를 촉진시키며, 50%정도에서는 β' 형으로 존재한다. 반면에 유지방은 코코아 버터의 β_2 -3(V)형이 β_1 -3(VI)형으로 전이되는 것 (polymorphic transition)을 억제하기 때문에 초코렛의 bloom 발생을 지연시킬수 있다고 알려져 있다. 이와 같이 유지방이 코코아 버터와 우수한 相溶性 (compatibility)을 갖는 요인은 고체 지방의 함량이 코코아 버터보다 적은 것으로 설명할 수 있다^(21,22).

일반적으로, 두 종의 油脂가 함께 사용될 경우에는 유지내의 고체지방 함량에 의한 相互作用(interaction)과 相溶性이 중요한 고려사항이 된다⁽¹⁴⁾. 이는 油脂를 구성하는 트리글세라이드의 변화로 고체지 함량이 달라지기 때문이다. 따라서, 혼합 유지가 결정화될 경우에 다른 결정으로 변형되어 응용 특성이 달라지게 된다⁽²³⁾. 이러한 물리적 暴動은 共融現象(eutectic interaction)과 dilution효과로 설명되며, phase diagram^(20,28), isothermal diagram^(14,26,27), 固體脂 含量(solid fat content)^(23~25) 등으로 나타내어 두 유지간의 상용성을 판단하는 기준으로 사용되고 있다^(20,21).

유지방 첨가량의 증가에 따라 코코아 버터의 고화를 지연시키고, 조직의 연화를 방지하기 위하여 유지방을 분획(fractionation)하는 방법이 응용되고 있으며, 유지방의 분획으로 얻어진 milk fat fraction은 지방산과 트리글리세라이드 조성을 변화시키고 다형현상의 변화를 일으켜 코코아 버터와의 상용성을 향상시키는 것으로 알려져 왔다^(29~31). 현재 코코아 버터에 첨가하는 경우의 물리적 특성과 다형현상의 변화에 관한 연구가 진행되고 있지만, fractionated milk fat를 첨가한 코코아 버터 및 초코렛의 품질 특성에 미치는 영향은 거의 알려져 있지 않는 실정이다.

Barna⁽²⁶⁾등은 20%이상 HMF를 첨가한 경우에 템퍼링이 되지 않으나, 이를 제외한 핵분의 첨가시는 템퍼링에 어려움이 없고, Timms⁽²¹⁾는 코코아 버터에 유지방을 30%이상 첨가하면 LMF에 의한 연화효과(softening effect)가 일어나고 MMF

에 의한 공용작용이 부수적으로 일어나며, 50% 첨가한 경우에는 β' -3형과 함께 β -3형이 나타난다고 하였다. Paulika⁽²⁸⁾는 fat phase의 50%를 유지방으로 대체하면 연화는 되지만, solid-solid fat 전이에 의한 fat bloom은 억제할수 있다고 하였다. Hogenbirk⁽¹⁵⁾은 코코아 버터는 유지방 첨가시 연화되거나 결정화가 지연되는 경향이 있는 반면에 팔레이지아산은 다른 품종의 코코아 버터에 비해 오히려 결정화가 빨라진다고 하였다.

따라서, 본 연구에서는 유지방을 산업적으로 이용하는데, 바탕이 되는 기초 자료를 마련하기 위하여 유지방을 용융 결정법에 의하여 유지방 획분을 만들어 이의 이화학적 특성, 고체지 함량, melting thermogram을 함께 관찰하고, 이들 유지방 획분을 첨가시켜 만든 유지방 획분-코코아 버터 혼합유의 용융특성, 결정 형태, 관능검사 결과를 비교 분석하여 유지방이 코코아 버터의 용융거동에 미치는 영향 인자를 고찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료

1-1. 재료

본 실험에 사용한 코코아 버터는 탈취 코코아 버터(Gerkens Co., Holland)를 구입하여 사용하였으며, 유지방은 무염버터(남양유업社)를 사용하였다.

1-2. 유지방 및 유지방 획분의 제조

본 실험에 사용한 유지방은 무염버터를 60℃에서 용해시키고 상층부를 분리하여 여과지(Wattman No.5)로 이물질을 완전히 제거한 후에 얻어진 유지 부분을 anhydrous milk fat(AMF)로 하였다. 유지방의 분획은 Barna⁽²⁶⁾ 등의 방법을 응용하여 Fig. 1과 같이 용제 및 첨가물을 사용하지 않는 용융 결정화(melt crystallization) 방법으로 행하였다. 용해된 AMF를 실험용 結晶機(crystallizer)로 30℃와 20℃에서 순차적으로 결정화한 후에 고압 분리 공정을 거쳐 용융점이 40.6℃, 37.4℃, 33.5℃ 및 6.5℃인 4종의 유지방 획분을 제조하였다. 우선, 60℃에서 완전히 용해시킨 AMF를 crystallizer(Φ15×20, 5l)에 넣고 20~25rpm으로 교반하면서 5시간동안 30±1℃까지 서서히 냉각시킨 후에 용기(W:20×L:30×H:6cm)에 담아 항온기(LT1 600SD, Eyela, Japan)에서 결정화 하였다. 고용점 획분(high melting fraction : HMF)은 30℃에서 24시간에 걸쳐 결정화시키고 나서 고압 filterpress(Order made, Malaysia)를 이용하여 제조하였으며, 중용점 획분(medium melting fraction : MMF1)은 HMF를 분리하고 남은 여액을 20℃에서 24시간에 걸쳐 결정화시켜 filter press로 압착 여과

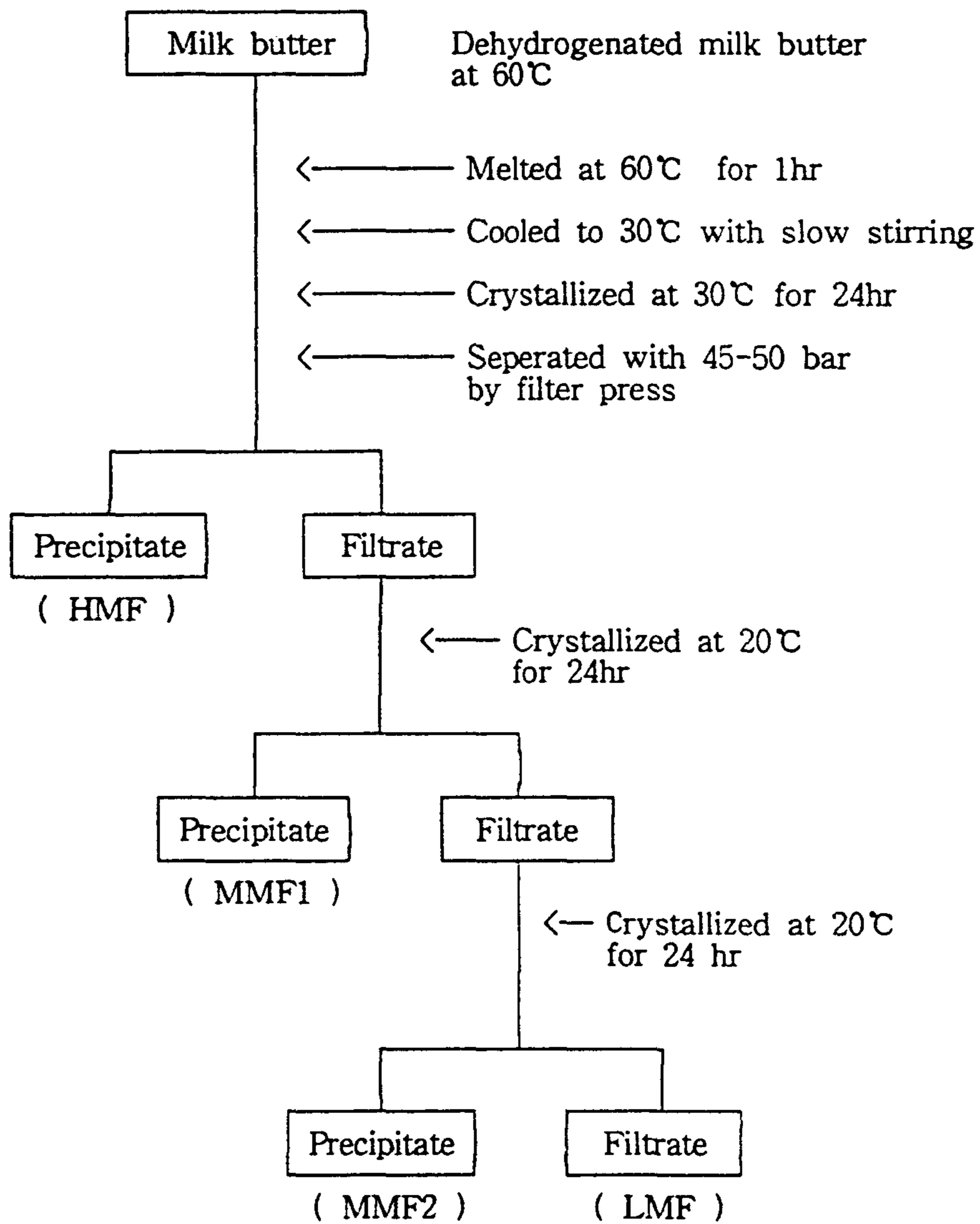


Fig. 1. Flow chart for fractionation of milk fat.

하여 만들었다. MMF1을 분리하고 남은 여액은 다시 20℃에서 24시간동안 결정화시키고 압착 여과하여 MMF2로 하였으며, 최종적으로 분리하고 남은 liquid part는 저용점 획분(low melting fraction : LMF)으로 하였다.

제조된 유지방 획분 HMF, MMF1, MMF2 및 LMF의 수율은 각각 8.4%, 10.2%, 11.4%, 70%였으며, 4℃에서 냉장 보관하며 실험에 사용하였다.

1-3. 유지방 획분-코코아 버터 혼합유의 제조

원료 유지인 코코아 버터와 제조한 AMF 및 유지방 획분을 각각 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30의 비율로 혼합하여 균일하게 교반시켜 측정에 사용하였다.

2. 실험 방법

2-1. 시료유지의 이화학적 분석

본 실험에 사용되어진 유지의 산가, 과산화물가, 요오드가 및 용점은 A.O.C.S.법⁽³²⁾에 준하여 측정하였다.

2-2. 지방산 조성 분석

시료 유지인 코코아 버터, AMF 및 유지방 획분의 지방산 조성은 gas chromatograph(Hewlett Packard 5890A, USA)를 이용하여 측정하였다.

Morrison⁽³³⁾ 등의 방법에 따라 시료유지 0.3g을 ester회수용 flask에 정확히 취해 0.5N NaOH methyl alcohol용액 5ml를 가하고 냉각기를 부착하여 유적이 손실되

어 균일한 용액이 될때까지 water bath 상에서 검화하였다.

냉각기 상부로 부터 14%(V/V) BF₃-methanol 용액 7ml를 가하고 2분간 비등시킨 후 hexane 6 ml를 가하여 다시 1분간 비등시킨 후 냉각하였다. 여기에 염화나트륨 포화용액으로 hexane층이 flask의 목 부위에 이를 때까지 과잉의 양을 가하고 hexane층 만을 따로 취하여 소량의 무수유산나트륨으로 탈수하여 지방산 조성 측정 용 시료로 사용하였다. 지방산 조성을 측정하기 위한 gas chromatography의 측정 조건은 Table 1.에 나타내었다.

2-3. 트리글리세라이드 조성 분석

본 실험에 사용된 시료유지의 트리글리세라이드 조성은 지방산 조성 측정에서와 같이 gas chromatograph(Hewlett Packard 5890A, USA) 를 사용하여 측정하였다. 시료 유지 0.3 g을 CCl₄에 녹여 전체가 10 g으로 되게하여 측정용 시료(3% w/w)로 하였으며, 시료의 전 처리 과정은 앞에서 설명한 지방산 조성 측정때와 동일한 방법으로 측정하였다. triglyceride 조성을 관찰하기 위한 분석 조건은 Table 2에 나타내었다.

2-4. 고체지(solid fat) 함량 측정

실험에 사용되어진 각각의 유지와 코코아 버터에 유지방이 혼합된 시료의 고체지 함량(solid fat content, SFC)은 pulsed nuclear magnetic resonance(NMR, Minispec PC-10, Bruker, Germany)을 이용하여 측정하였다.

모든 시료에 대해서는 IUPAC method⁽³⁴⁾에 준하여 Fig. 2와 같이 60℃에서 20분, 0℃에서 90분, 26℃에서 24시간, 다시 0℃에서 90분, 각 측정온도(10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 32.5℃, 35℃, 40℃)에서 60분동안 holding 한 후에 SFC를 측정하였다.

Table 1. The operating condition of gas chromatography apparatus used for the analysis of fatty acid composition.

Column	SP I330(30m × 0.2 μm × 0.25mm)
Oven temperature	180 °C
Injection temperature	230 °C
Detector temperature	240 °C
Carrier gas	N ₂

Table 2. The operating condition of gas chromatography apparatus used for the analysis of triglyceride composition.

Column	SE 30 (OV-1)
Oven temperature	200-230 °C (2 °C/min.)
Injection temperature	330 °C
Detector temperature	350 °C

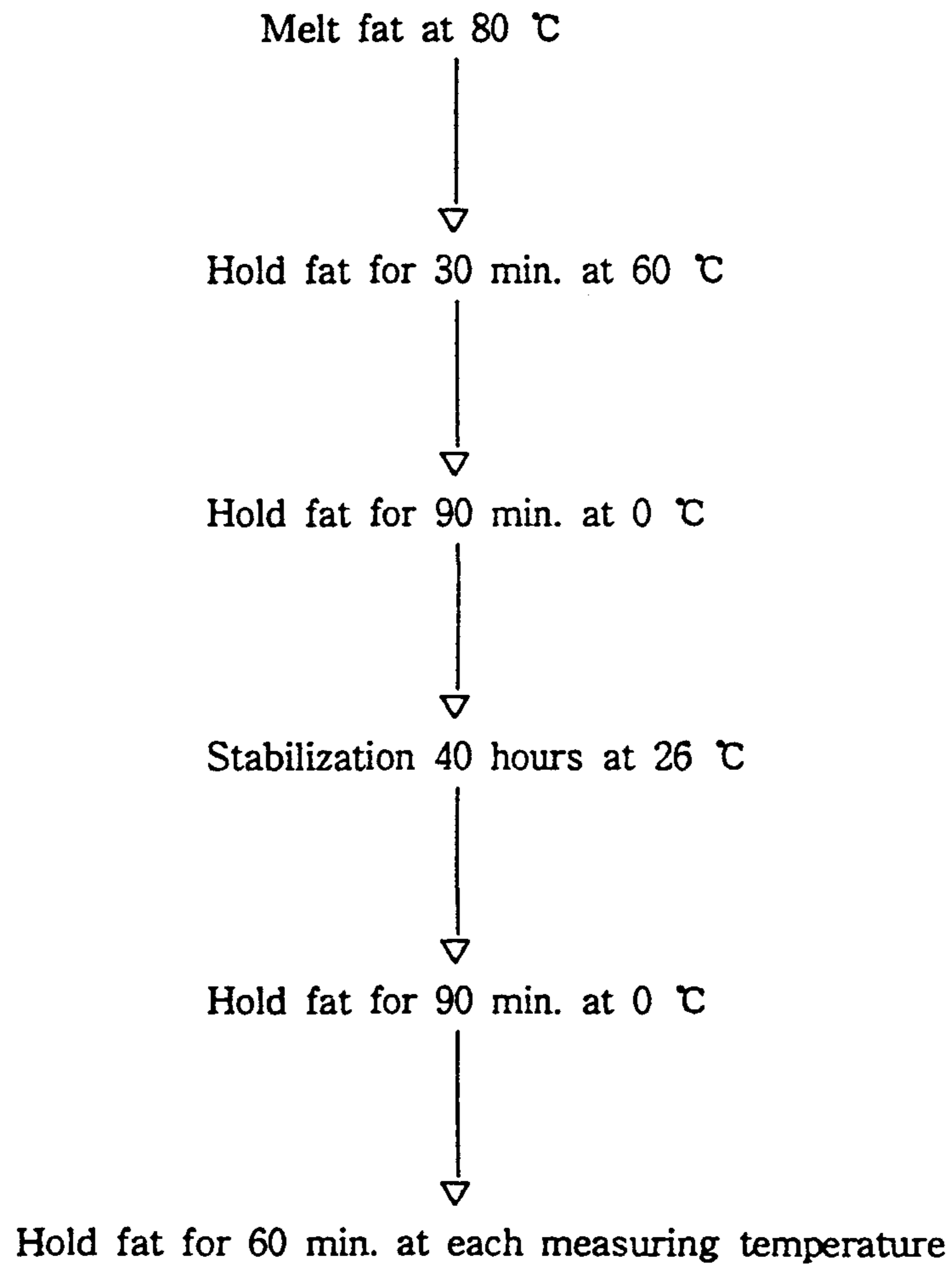


Fig. 2. Tempering and stabilization procedure used in this study

이때 얻은 SFC로 부터 유지방 분획-코코아 버터 혼합유의 isothermal diagram을 얻은 결과로 각 첨가구의 특성을 비교하였다.

2-5. 용융 열선도(melting thermogram) 측정

실험에 사용된 시료유지 및 혼합유의 용융 특성은 differential scanning calorimeter (SSC/220C, Seike Co, Japan)를 이용하여 A.O.C.S.법⁽³⁵⁾을 응용하여 측정하였다. 기기는 indium 과 gallium을 이용하여 보정 하였으며, 오차를 제거하기 위하여 질소를 60 ml/min의 속도로 흘려 보냈다. 측정 시료 7~8mg을 시료용 aluminium pan에 넣고 밀봉하여 SFC 측정과 동일한 IUPAC⁽³⁴⁾법에 따라 처리하고 사용하였다. 가열 온도 범위는 -40℃에서 60℃까지로 선택하였으며, heating rate는 5℃/min 로 하였다. 이때 얻은 thermogram으로 부터 각 시료의 용융 정점 온도와 엔탈피를 구하였다.

2-6. 결정형태의 측정

본 실험에 사용된 유지의 결정형태는 편광현미경(Olympus BH2, Olympus Optical Co., Japan)을 이용하여 관찰하였다. 용해된 시료유지는 Vaeck⁽⁵¹⁾의 방법에 따라 slide glass 위에 한방울을 떨어뜨리고, cover glass로 덮어 0℃에서 90분을 유지하고, 그후 26℃에서 하루를 보관한 후에 관찰하고, 사진은 결정 크기에 따라 40~400배에서 촬영하였다.

2-7. 관능검사

관능검사에 사용된 초코렛은 Table 3과 같은 혼합비율로 총지방의 함량은 34%로 하였고, batch량은 2Kg으로 하였으며 코코아 버터에 해당하는 비율만큼 앞에서 제조한 유지방-코코아 버터 혼합유를 대체 사용하여 초코렛을 제조하고, 일정한 크기

로 성형하여 18~20℃에서 10일간 안정화 시킨후에 측정 시료로 사용하였다.

관능검사는 12명의 전문 검사원을 통하여 초코렛의 조직에 관한 항목으로 경도 (hardness), 끈기(waxness), 시원한 감(coolness), 부드러움(smoothness), 깨짐성 (brittleness)등에 대하여 조사하여 비교 분석하였다.

각 항목에 대해 코코아 버터를 첨가하여 제조한 시료를 기준으로 더 강한 것을 "+ 3"점, 약한 것을 "- 3"점으로 하여 1점단위로 7점 평점법에 의하여 비교 평가 하였다.

Table 3. The chemical ingredients of chocolate.

(unit:%)							
Concentration of milk fat and its fractions(%)							
Ingredient*	Control	5	10	15	20	25	30
Sugar	40.5	40.5	40.5	40.5	40.5	40.5	40.5
Cocoa paste	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0	18.0
Milk powder	16.0	16.0	16.0	16.0	16.0	16.0	16.0
Cocoa butter	25.0	23.75	22.5	21.25	20.0	19.75	17.5
Milk fat	-	1.25	2.5	3.75	5.0	6.25	7.5
Lecithin	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
100.0 %							

* Cocoa paste : 55% fat contained

Milk powder : skimmed milk powder

Milk fat : used milk fat and its fractions

III. 결과 및 고찰

1. 시료유지의 이화학적 특성 및 용점의 변화

실험에 사용된 유지방 획분, 코코아 버터의 이화학적 성분의 분석 결과는 Table 4와 같다.

유지방(AMF)의 상승용점(open tubed melting point)는 31.2℃였고, 유지방을 분획하여 제조한 HMF, MMF1, MMF2 및 LMF의 용점은 각각 40.6℃, 37.4℃, 33.5℃, 6.5℃로 나타났으며, 코코아 버터는 33.3℃였다.

이와 같은 유지방 획분의 용점 분포는 다른 연구자들의 실험 결과와 약간의 차이를 보이고 있다. 이는 품종과 제조 방법의 차이에 의한 유지방 성분의 차이에서 기인되는 것으로 생각된다. 이러한 원인은 지방산 및 트리글리세라이드 조성의 변화에서도 영향을 미치게 된다. Barna⁽²⁶⁾ 등은 AMF를 분획하여 얻은 획분의 용점은 각각 43.0℃, 33.9℃, 18.0℃였고, Kankare⁽³⁶⁾는 각각 40.6℃, 35.8℃, 22.3℃, 12.2℃의 유지방 획분을 얻었고, Fjaervoll⁽³⁷⁾은 용점이 28.2℃인 유지방에서 38.0℃, 22.1℃인 획분을 얻었다고 보고하였다. 한편 Solvent fraction으로 얻은 유지방 획분의 용점에 관한 보고에서 용점이 32.43~34.46℃인 AMF로 얻은 유지방 획분의 용융점은 39.0℃, 24.1℃였다고 하였다.⁽⁵⁰⁾ 특히 획분의 용점이 증가할수록 고급지방산 함량은 증가하고, 저급지방산과 불포화 지방산 함량은 감소하며, 이러한 현상은 유지방 획분의 용융온도 변화에 영향을 주는 인자로 작용한다^(38~41).

2. 지방산 조성의 변화

유지방, 유지방 획분 및 코코아 버터의 지방산 조성을 분석한 결과는 Table 5에

Table 4. Physico-chemical properties of cocoa butter, milk fat and milk fat fractions.

Samples ¹⁾	Acid value (KOHmg/g)	Peroxide value (meg/Kg)	Iodine value (g/100g)	Melting point (°C)
AMF	0.51	3.03	33.0	31.2
LMF	1.33	3.39	43.3	6.5
MMF2	0.45	2.53	31.3	33.5
MMF1	0.39	2.11	26.2	37.4
HMF	0.34	1.34	22.2	40.6
C.B	0.6	0.8	35.1	33.3

- ¹⁾AMF ; anhydrous milk fat
 LMF ; low melting fraction of milk fat
 MMF2 ; medium Melting fraction 2 of milk fat
 MMF1 ; medium Melting fraction 1 of milk fat
 HMF ; high Melting fraction of milk fat
 C.B ; cocoa butter

나타내었다. 이들 지방산의 조성을 알아보기 위해 Deman⁽¹⁹⁾의 방법에 의하여 저급지방산(short chain fatty acid, SCFA, C4-C10), 중급지방산(medium chain fatty acid, MCFA, C12-C14), 고급지방산(long chain fatty acid, LCFA, C16-C18) 및 불포화지방산(unsaturated fatty acid, USFA, C14:1-C18:3)으로 나누어 비교하였다. Table 5에서 나타난 바와 같이 AMF의 지방산 중 포화 지방산과 불포화 지방산 함량은 코코아 버터와 유사한 수준이었지만, SCFA 및 MCFA 함량은 높게 나타났다.

Fig. 3에서 나타난 바와 같이 분획으로 얻은 유지방 획분의 구성 지방산 중 LCFA 함량은 32.37~56.88% 범위에서 HMF > MMF1 > MMF2 > AMF > LMF 순으로 감소한 반면에 SCFA 및 MCFA는 각각 3.11~5.90%, 9.52~14.27% 범위에서 MMF2만 AMF보다 증가하고 나머지 획분은 감소하였다.

또한 포화 및 불포화 지방산 함량은 각각 45.0~74.83%, 22.5~50.83% 범위에서 SAFA는 HMF > MMF1 > MMF2 > AMF > LMF 순으로 감소하였고, USFA는 HMF < MMF1 < MMF2 < AMF < LMF 순으로 증가하였다. 용점이 높은 유지방 획분으로 갈수록 SAFA는 증가하고 USFA는 감소하는 경향을 보였다.

본 실험의 결과 HMF 및 MMF1의 지방산 중 LCFA와 SAFA 함량은 AMF에 비하여 증가되었고, SCFA, MCFA 및 USFA 함량은 감소된 반면 LMF에서는 USFA만 증가되었고 MMF2는 USFA만 감소되었다.

Deman⁽⁴³⁾은 유지방 획분의 이화학적 특성에 관한 연구에서 지방산 조성에는 뚜렷한 변화는 없었으나, 고급 포화지방산의 함량이 증가할수록 그리고 저급 및 불포화 지방산의 함량이 감소할수록 유지방 획분의 용점은 증가되었다고 하였다. 그리고 고용점의 HMF로 갈수록 trans형 불포화 지방산이 증가되었으며, 고용점 글리세라이드 중 저급 지방산의 증가는 용점 저하를 가져왔다고 하였다. 저급 지방산이 용점을 저하시키는 이유로 Woodrow⁽⁴⁴⁾ 등은 저급 지방산이 비록 포화 지방산

으로 분류되지만 불포화 지방산과 같은 특성을 갖기 때문이라고 하였다.

따라서 유지방 획분의 용점이 높을수록 지방산중 저급 지방산및 중급 지방산 함량은 일률적인 변화 경향을 보이지 않는 반면 고급및 포화 지방산 함량은 증가되었고 불포화 지방산은 감소되는 것을 확인하였다. 이와 같은 유지방 획분의 저급 지방산및 중급 지방산 함량이 용점의 증감에 따라 그 함량의 변화가 일률적인 변화되는 경향을 보이지 않는 것은 유지방 획분의 저급 지방산및 중급 지방산 함량에 관한 보고에서 각각 0.8~13.1%, 12.1~16.4% 범위에서 분포하고 있다는 결과보다 낮은 것에 기인하는 것으로 생각된다^(19,21,29,42).

한편 유지방 획분-코코아 버터 혼합유의 지방산 함량 변화는 유지 각각의 지방산 조성을 혼합 비율별로 계산하여 얻은 값으로 비교하였다. long chain fatty acid 함량은 유지방 획분의 첨가량이 증가함에 따라 모든 첨가구에서 무첨가구보다 감소하는 경향을 보였으며, 특히 LMF로 갈수록 크게 감소하였다(Fig. 4). 또한 medium chain fatty acid와 short chain fatty acid 함량은 모든 첨가구에서 증가하는 경향을 보였으며, 특히 MMF2 첨가구에서 증가 폭이 약간 높았다(Fig. 5). 반면에 포화 지방산 함량은 HMF및 MMF1 첨가구에서 무첨가구보다 증가하였고, LMF 첨가구는 크게 감소하였다. 불포화 지방산의 변화는 포화지방산의 경우와 반대의 경향을 보였다. AMF및 MMF2 첨가구는 포화 및 불포화 지방산 변화에 영향을 미치는 영향이 적었다(Fig. 6).

위의 결과는 분획된 유지방의 구성 지방산이 코코아 버터의 트리글리세라이드 분자종의 배열을 변화시켜 고체지 함량을 변화 시킨다는 Jeffery⁽¹⁶⁾의 보고와 일치하고 있다.

따라서, 시료 유지에서 고찰되었듯이 유지방 획분의 구성 지방산은 유지방 획분-코코아 버터 혼합유의 지방산 조성을 변화시켜 트리글리세라이드 배열을 재구성

Table 5. Fatty acid composition of cocoa butter, milk fat and milk fat fractions¹⁾

(unit : %)

Fatty acid ²⁾	C.B	AMF	HMF	MMF1	MMF2	LMF
C 6	-	1.54	1.40	1.71	1.83	0.84
C 8	-	1.11	0.97	0.92	1.27	0.63
C 10	-	2.69	2.19	1.87	2.80	1.64
C 10:1	-	0.26	0.16	0.19	0.30	0.13
C 12	0.04	3.22	2.80	2.50	3.41	2.30
C 12:1	-	-	0.13	0.13	0.18	-
C 14	0.11	10.28	10.59	9.93	10.86	7.22
C 14:1	-	1.67	1.10	1.29	1.58	1.61
C 15	-	0.94	0.32	0.95	0.97	0.70
C 15:	-	0.31	-	0.31	0.32	0.30
C 16	25.44	29.22	37.35	34.05	30.74	21.29
C 16:	-	2.40	1.72	1.95	2.25	2.69
C 17	-	0.54	0.79	0.73	0.59	0.60
C 17:1	-	0.36	0.23	0.28	0.33	0.43
C 18	36.65	12.86	18.74	17.00	13.47	10.48
C 18:1	33.17	27.93	17.47	22.50	24.58	40.94
C 18:2	2.88	3.11	1.87	2.18	2.81	4.86
C 18:3	0.18	0.09	0.11	0.20	0.19	-
C 20	1.14	0.19	0.28	0.29	0.13	0.31
C 20:1	-	0.83	0.56	0.89	0.76	1.44
SCFA(C4-10)	-	5.34	4.56	4.50	5.90	3.11
MCFA(C12-14)	0.15	13.50	13.39	12.43	14.27	9.52
LCFA(C16-18)	62.09	42.62	56.88	51.78	44.80	32.37
USFA (C14:1-18:3)	36.23	33.89	22.50	28.71	32.06	50.83
SAFA	62.24	61.46	74.83	68.71	64.97	45.00
UNS. /SAT. RATIO	0.58	0.55	0.3	0.4	0.49	1.13

¹⁾Refer to Table 4.

²⁾SCFA ; short chain fatty acid
 MCFA ; medium chain fatty acid
 LCFA ; long chain fatty acid
 USFA ; unsaturated fatty acid
 SAFA ; saturated fatty acid

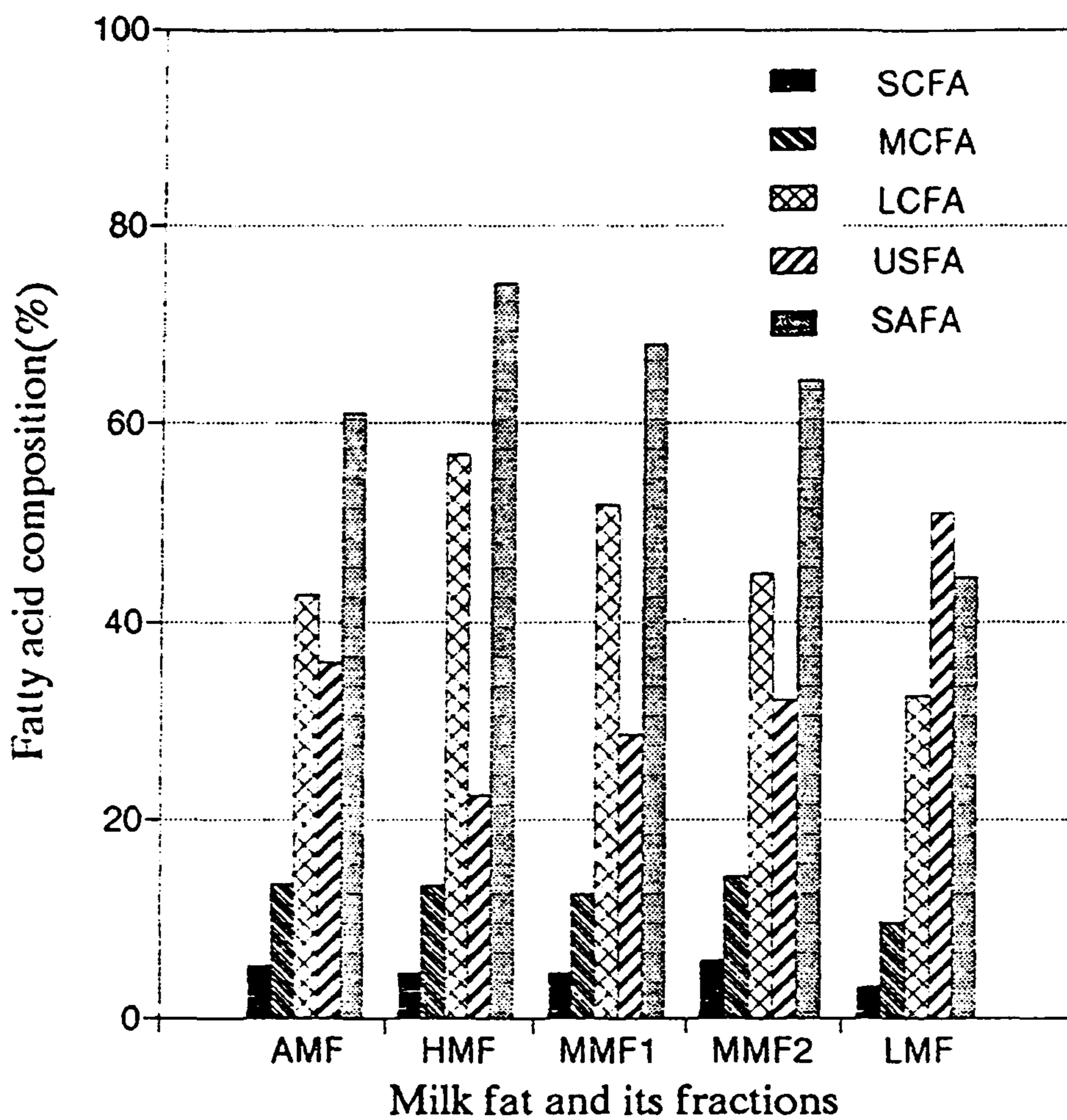


Fig. 3. Distribution of fatty acid composition in milk fat and milk fat fractions

SCFA : short chain fatty acid(C4-C10)
 MCFA : medium chain fatty acid(C12-C14)
 LCFA : long chain fatty acid(C16-C18)
 USFA : unsaturated fatty acid(C14:1-C18:3)
 SAFA : saturated fatty acid

AMF : anhydrous milk fat
 HMF : high melting fraction
 MMF1 : medium melting fraction 1
 MMF2 : medium melting fraction 2
 LMF : low melting fraction

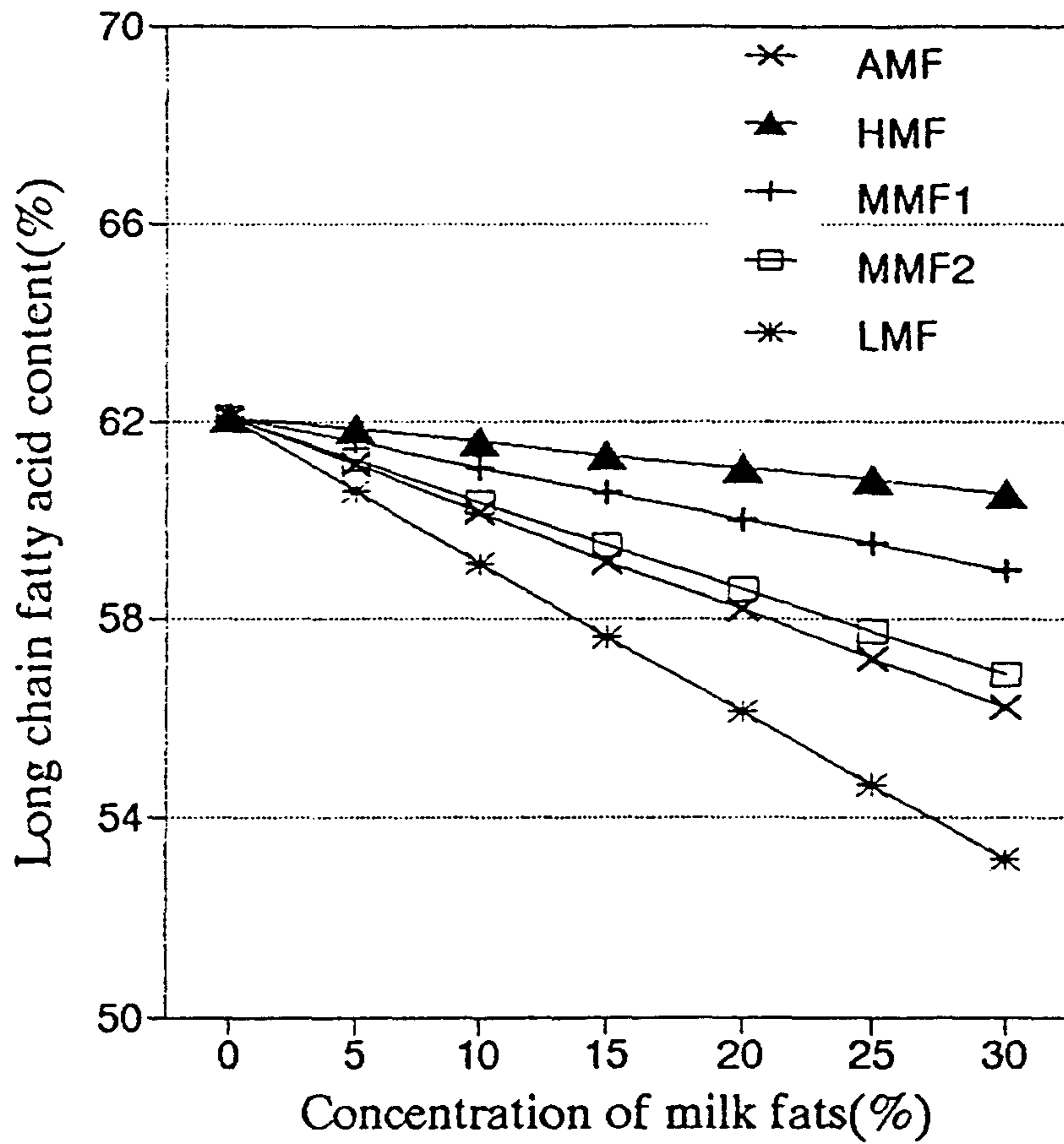


Fig. 4. Changes of long chain fatty acid composition in the mixture of fractionated of milk fats and cocoa butter

AMF : anhydrous milk fat
HMF : high melting fraction
MMF1 : medium melting fraction 1
MMF2 : medium melting fraction 2
LMF : low melting fraction

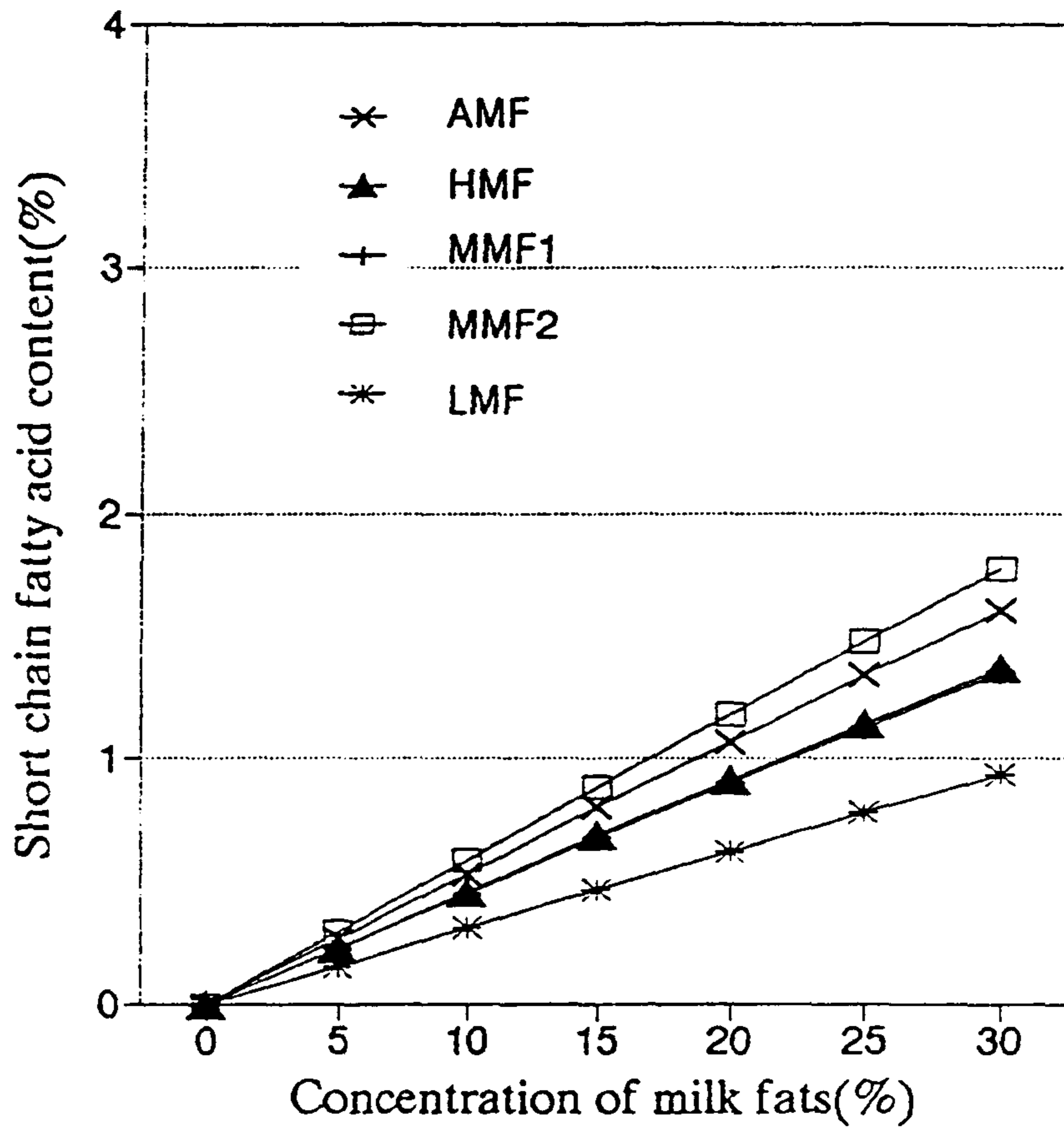


Fig. 5. Changes of short chain fatty acid composition in the mixture of fractionated of milk fats and cocoa butter

AMF : anhydrous milk fat
HMF : high melting fraction
MMF1 : medium melting fraction 1
MMF2 : medium melting fraction 2
LMF : low melting fraction

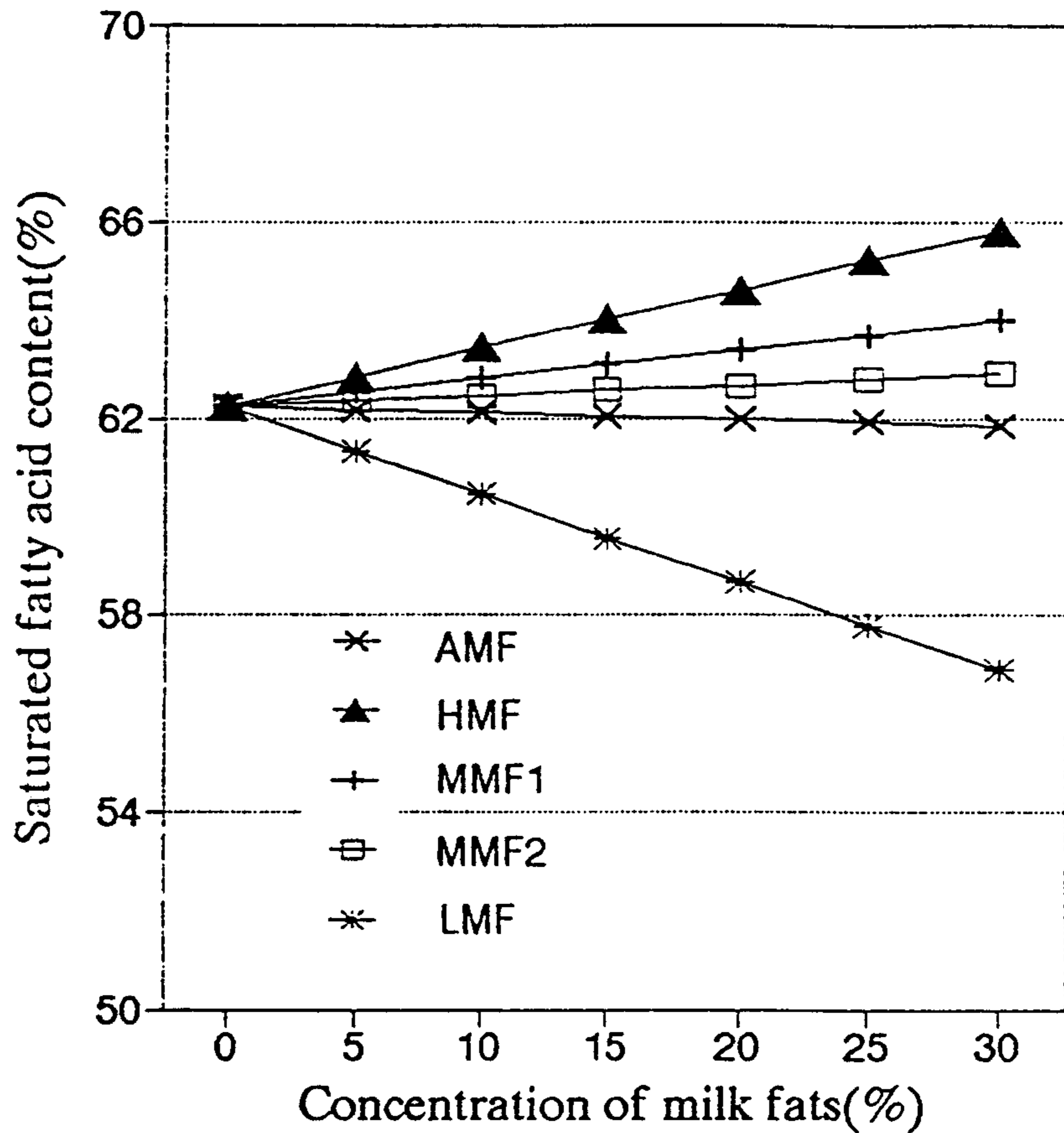


Fig. 6. Changes of saturated fatty acid composition in the mixture of fractionated of milk fats and cocoa butter

AMF : anhydrous milk fat
HMF : high melting fraction
MMF1 : medium melting fraction 1
MMF2 : medium melting fraction 2
LMF : low melting fraction

시키는 인자라고 생각되며 이러한 트리글리세라이드 재구성은 혼합유의 고체지방 함량, melting thermogram 및 결정 형태에 영향을 미칠 것으로 추측된다.

3. 트리글리세라이드 조성의 변화

코코아 버터, AMF, HMF, MMF1, MMF2 및 LMF의 트리글리세라이드 조성을 분석한 결과는 Table 6에 나타내었다.

유지방 및 유지방 획분, 코코아 버터의 트리글리세라이드 조성을 Sonntag⁽⁴⁵⁾의 방법에 따라 총탄소수가 26에서 34까지인 저융점의 short chain triglyceride (SCTG), 총탄소수가 36에서 46까지인 중융점의 medium chain triglyceride (MCTG) 및 48에서 54까지인 고융점의 long chain triglyceride(LCTG)로 분류하여 비교하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 AMF의 구성 트리글리세라이드 중 MCTG, SCTG 함량은 코코아 버터에 비해 상대적으로 높게 나타났다.

Fig. 7에서 나타난 바와 같이 분획에 의해 변형된 유지방 획분의 트리글리세라이드 조성 중 LCTG 함량은 34.47~46.45% 범위에서 HMF > MMF1 > MMF2 > AMF > LMF 순으로 감소하였으며, MCTG 및 SCTG는 각각 48.91~53.10%, 4.63~12.4% 범위에서 획분간 뚜렷한 변화 경향을 보이지 않았다.

위의 결과 HMF로 갈수록 LCTG 함량은 증가하고 MCTG 및 SCTG는 감소하였고 MMF1, MMF2에서는 AMF의 트리글리세라이드 조성 과 유사하게 나타났다. 이는 지방산 조성에 관찰되었듯이 유지방의 저급 지방산 함량이 낮기 때문인 것으로 여겨진다^(45,47).

Timms⁽²¹⁾는 유지방에는 트리글리세라이드가 다양하게 분포되어 있으며, 유지방 과 다른 융점을 가진 획분을 얻을수 있는 것은 이들의 트리글리세라이드 조성이 서로 다르기 때문이라고 하였다. 또한 HMF 및 MMF의 융점은 뚜렷하게 나타나는

반면에 LMF는 HMF 및 MMF 중의 solid fraction에 의하여 일어나는 dilution 현상의 영향을 받아 용점이 뚜렷하지 않으며, 이들의 결정에 있어서는 β , β' (소량의 γ 형 포함) polymorph였다고 하였다. 그러나, Deman⁽³¹⁾은 에스테르 교환으로 만든 유지방을 급냉 또는 완냉할 경우에 β' polymorph만 보였다고 하였다. 그러나 이에 관한 계속적인 연구로 수주일 보관 후에는 소량의 β crystal이 생성되는 것이 밝혀졌으며, 이러한 유지방내의 β polymorph 생성은 소량의 고용점 3중 포화 트리글리세라이드 때문이라고 하였다^(44,49). 한편, Barna⁽²⁶⁾ 등은 용융결정법으로 얻은 획분의 용점이 다름에도 불구하고 트리글리세라이드 조성에는 별 차이를 보이지 않았다고 하여 견해 차이를 보이기도 하였다.

본 실험의 결과로 분석으로 얻은 HMF 용점이 높은 것은 유지방의 고용점 트리글리세라이드가 HMF의 트리글리세라이드 중에 무작위하게 재분포되어 고용점의 트리글리세라이드를 형성하기 때문이라고 생각된다. 그러나 MMF1 및 MMF2는 AMF와 유사하게 나타난 것으로 보아 트리글리세라이드를 구성하는 지방산의 종류에 더 큰 영향을 받는 것으로 여겨진다. 이러한 현상은 유지방의 구성 지방산 및 트리글리세라이드 결합이 다른 유지보다 다양하기 때문인 것으로 알려져 있다^(19~21,31,48). 이와같은 트리글리세라이드의 재분포는 유지방 획분의 물리적 특성인 고체 지 함량 및 melting thermogram에 영향을 미치는 인자로 작용할 것으로 추측된다. 그러나, MMF는 트리글리세라이드 조성보다 지방산 조성에 더 큰 영향을 받는 것으로 보여진다.

한편, 유지방 획분이 코코아 버터에 첨가될 때 구성 트리글리세라이드 조성을 혼합 비율별로 계산하여 비교한 결과, 획분의 첨가량이 증가함에 따라 LCTG 함량은 모든 첨가구에서 무첨가구보다 감소되었고, SCTG 및 MCTG는 증가되는 경향을 보였다. 이 때 LCTG 함량은 LMF 첨가구에서 다른 획분에 비하여 상대적으로

Table 6. Triglyceride composition of cocoa butter, milk fat and milk fat fractions¹⁾

(unit : %)

Triglyceride ²⁾	C. B	AMF	HMF	MMF1	MMF2	LMF
C 28	-	-	0.24	0.57	0.53	1.00
C 30	-	1.06	0.46	1.05	0.93	1.79
C 32	-	2.07	1.05	2.14	1.85	3.25
C 34	-	4.56	2.88	4.28	4.50	6.36
C 36	-	8.89	8.09	9.73	9.37	9.56
C 38	-	12.60	10.18	12.15	12.14	14.08
C 40	-	10.72	7.98	9.85	10.49	12.25
C 42	-	6.88	6.81	6.56	7.01	6.56
C 44	-	6.23	7.38	6.06	6.37	5.33
C 46	-	6.72	8.49	6.63	6.89	5.32
C 48	-	8.10	10.68	8.50	8.55	5.93
C 50	17.31	12.22	15.57	13.30	13.02	8.50
C 52	45.04	12.19	13.78	12.95	12.41	12.36
C 54	35.43	7.20	6.42	6.20	5.96	7.68
C 56	1.79	-	-	-	-	-
SCTG(C26-34)	-	7.69	4.63	8.04	7.81	12.40
MCTG(C36-46)	-	52.04	48.91	51.08	52.18	53.10
LCTG(C48-56)	99.57	39.71	46.45	40.95	39.94	34.47

¹⁾Refer to Table 4.

²⁾SCTG ; short chain triglyceride
MCTG ; medium chain triglyceride
LCTG ; long chain triglyceride

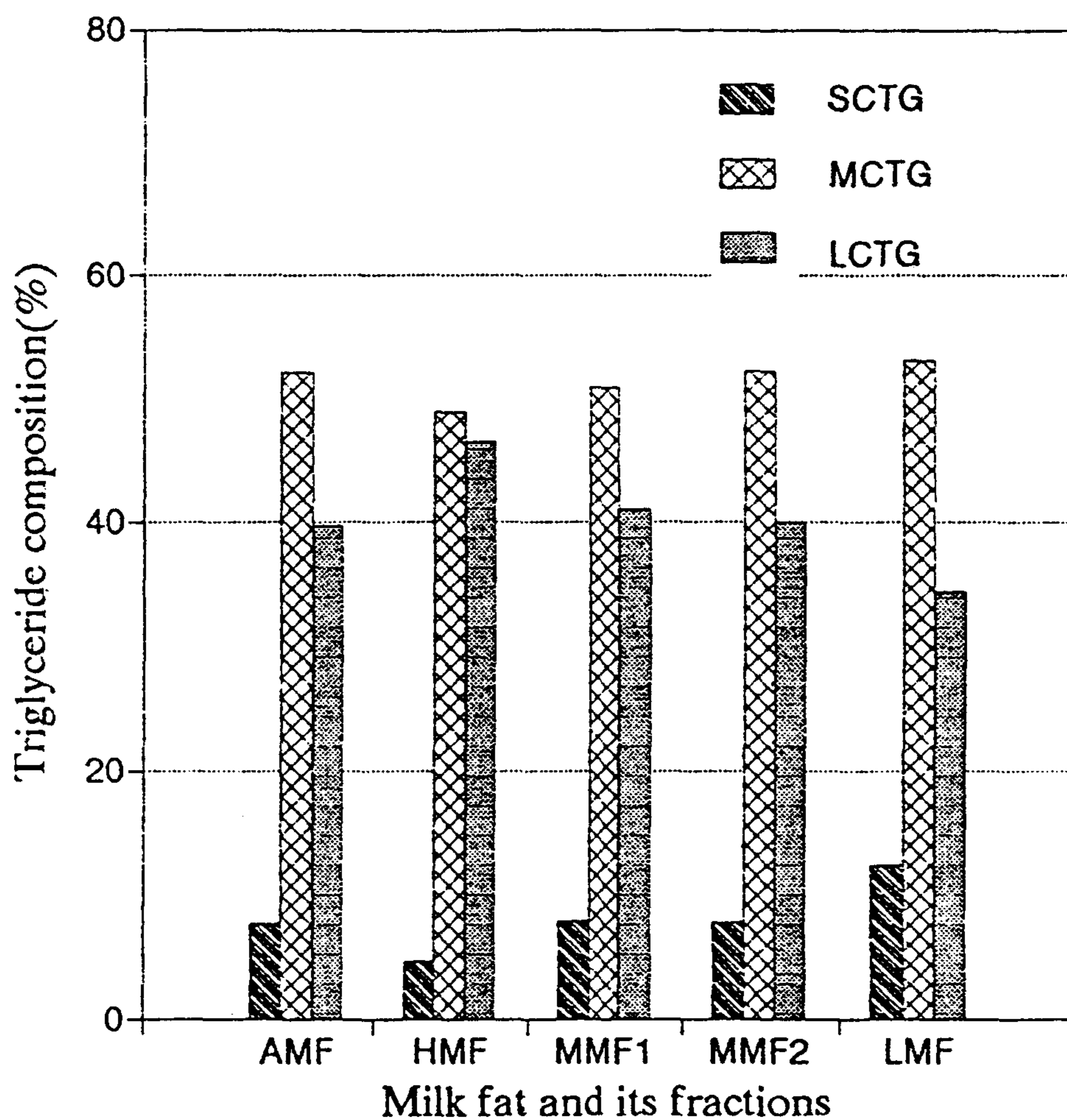


Fig. 7. Distribution of triglyceride groups in milk fat and milk fat fractions.

SCTG : short chain triglyceride(C26-C34)

MCTG : medium chain triglyceride(C36-C46)

LCTG : long chain triglyceride(C48-C54)

AMF : anhydrous milk fat

HMF : high melting fraction

MMF1 : medium melting fraction 1

MMF2 : medium melting fraction 2

1 LMF : low melting fraction

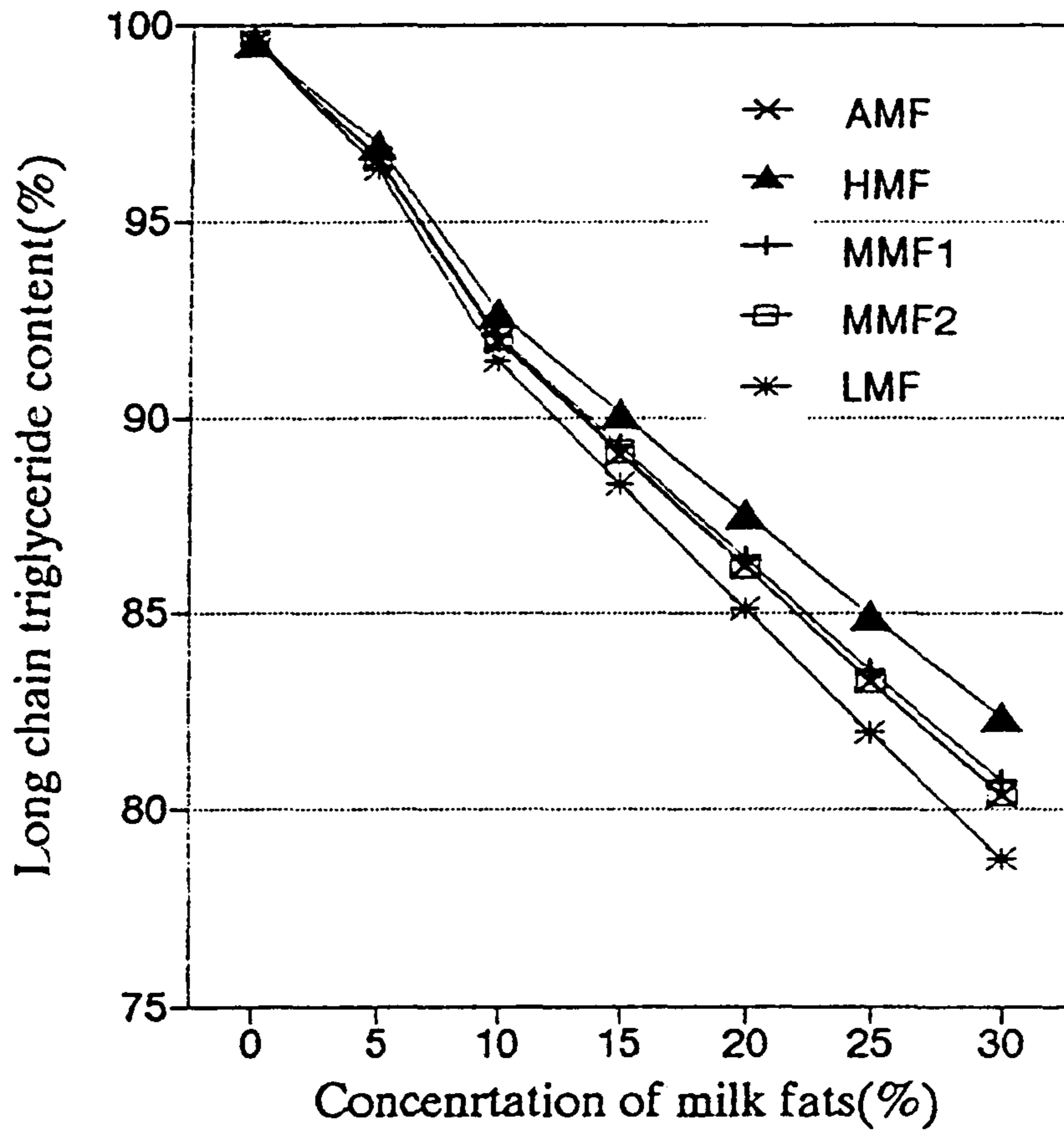


Fig. 8. Changes of long chain triglyceride composition in the mixture of fractionated milk fats and cocoa butter

AMF : anhydrous milk fat
HMF : high melting fraction
MMF1 : medium melting fraction 1
MMF2 : medium melting fraction 2
LMF : low melting fraction

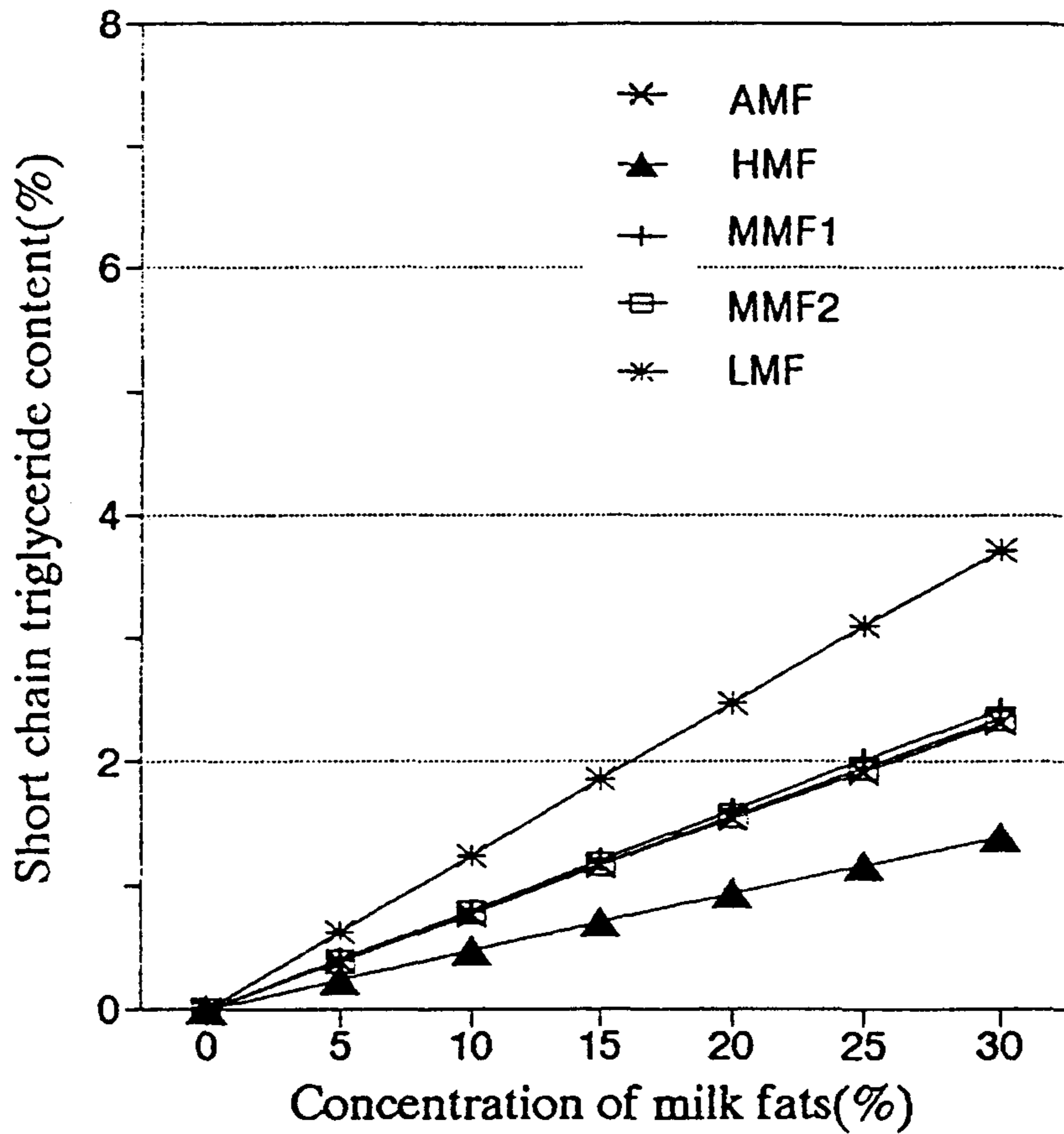


Fig. 9. Changes of short chain triglyceride composition in the mixture of fractionated milk fats and cocoa butter

AMF : anhydrous milk fat
HMF : high melting fraction
MMF1 : medium melting fraction 1
MMF2 : medium melting fraction 2
LMF : low melting fraction

로 감소 폭이 크게 나타났으며, HMF 첨가구에서 비교적 감소 폭이 적게 나타났다(Fig. 8). 반면 SCTG 함량은 LCTG와는 반대로 LMF 첨가구에서 큰 폭으로 증가되었고, HMF 첨가구에서 증가 폭이 비교적 적게 나타났다(Fig. 9). 이는 시료 유지의 트리글리세라이드 조성에서 확인된 바와 같이 HMF와 LMF의 LCTG 및 SCTG 함량에서 큰 차이를 보였기 때문인 것으로 생각된다.

위의 결과로 유지방 획분-코코아 버터 혼합유에서 LMF는 고용점 트리글리세라이드 함량을 크게 감소시키고 저용점 트리글리세라이드 함량을 증가시키는 인자로 작용하며, HMF는 LMF에 비하여 고용점 트리글리세라이드의 급격한 감소를 억제시키고 저용점 트리글리세라이드를 서서히 증가시키는 인자로 작용하는 것으로 여겨진다. 반면에 MMF1, MMF2, 및 AMF는 구성 트리글리세라이드 변화 비율에 미치는 영향이 적은 것으로 생각된다.

4. 고체지(solid fat) 함량의 변화

4-1) 시료유지

코코아 버터의 물리적 특성은 고체지 함량(solid fat content, SFC)에 의해 좌우된다. 즉 측정온도 25℃에서의 SFC는 상온에서의 굳기정도(hardness)를 의미하고, 25~30℃에서의 SFC는 입안의 열에 의해 쉽게 녹지않는 내열성을, 27~33℃에서의 SFC는 입속에서 시원한 감(coolness)을 느끼게 하는 인자로 작용하여, 35℃에서의 SFC는 확정한 식감을 결정지우는 주요한 요인이 된다^(2,8).

실험에 사용된 시료 유지의 물리적 특성을 알아보기 위해 측정된 고체지 함량은 Table 7에 나타내었다. 이들 시료 유지의 SFC 변화는 HMF > MMF1 > MMF2 > AMF > LMF 순으로 감소하였고, 코코아 버터에 비해 매우 완만하게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 10)

본 실험에서 나타난 결과는 유지방의 분획의 SFC 연구 보고에서 나타난 결과와 유사한 것이며^(26,38~40,42), AMF 및 유지방 획분의 SFC 함량 변화는 앞에서 나타난 용점의 변화와 같은 경향을 보였다. 이는 유지방의 분획으로 물리적 특성이 변화 되었음을 보여주는 것으로, 이러한 변화는 분획에 의해 유지방의 지방산 및 트리글리세라이드 조성에 변화가 일어났기 때문이며, 이는 용융과 고화에 영향을 미치는 인자로 작용하게 된다^(5,20,21,26).

4-2) 유지방 획분-코코아 버터 혼합유

유지방이 코코아 버터에 혼합되는 경우와 같은 혼합 유지의 phase behaviour는 고체 유지와 액체 유지와의 평형도를 그래픽으로 나타내는 phase diagram 혹은 isothermal diagram으로 설명되고 혼합 유지의 고체지 함량을 기본으로 그려진다⁽¹⁴⁾. 이러한 결과는 혼합유지 중의 액체지로 인한 dilution으로 고체지 함량이 감소되는 연화효과(softening effect) 또는 공용작용(eutectic interaction)에 의한 incompatibility를 이해하는데 이용되고 있다^(20,27).

유지방 획분이 코코아 버터의 고체지 함량에 미치는 영향을 알아보기 위해 유지방 획분을 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% 비율로 코코아 버터에 첨가시켜 측정된 SFC 값은 Table 8에 나타내었다. Fig. 11에서 보는 바와 같이, AMF 첨가량이 증가할수록 각 측정 온도의 SFC가 코코아 버터와 같이 일정한 비율로 감소되는 경향을 보이는 것은 유지방이 코코아 버터와의 상용성이 우수하다는 것을 시사하는 것이다.

동일한 함량의 유지방 획분의 첨가군과의 비교에서 5% AMF 첨가구와 유사한 것은 5% HMF, 5% 및 10% MMF1, 5% MMF2, 5% LMF 첨가구들이었고, 10% LMF 첨가구는 10% HMF, 15% MMF1, 10% 및 15% LMF 첨가구들이, 15%

Table 7. Solid fat content(%) of cocoa butter, milk fat and milk fat fractions.

Samples ¹⁾	Temperature(°C)									
	5.0	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0	32.5	35.0	37.5	40.0
AMF	49.56	42.83	29.41	14.73	8.15	3.94	2.12	0.32	-	-
LMF	5.11	1.98	0.04	-	-	-	-	-	-	-
MMF2	59.70	54.03	39.85	22.12	11.84	5.89	3.63	1.31	0.40	-
MMF1	73.50	69.94	60.44	43.30	24.09	14.36	10.30	5.97	2.67	0.12
HMF	80.81	79.82	74.13	62.34	41.26	26.05	20.59	14.60	8.85	4.30
C. B	88.80	84.60	79.16	74.55	65.53	40.88	13.78	1.03	-	-

¹⁾Refer to Table 4.

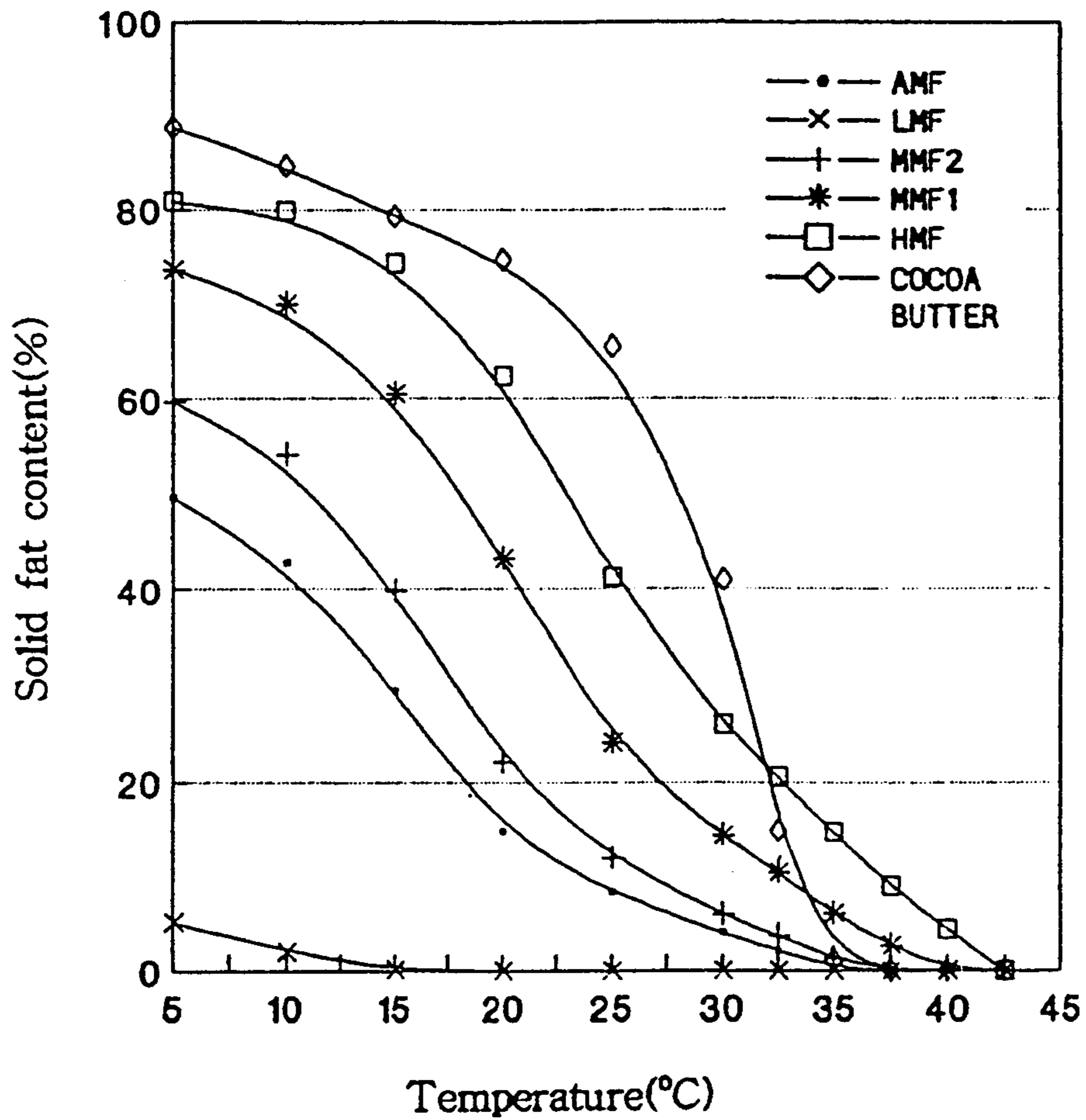


Fig. 10. Solid fat content of cocoa butter, milk fat and milk fat fractions

AMF : anhydrous milk fat
 HMF : high melting fraction
 MMF1 : medium melting fraction 1
 MMF2 : medium melting fraction 2
 LMF : low melting fraction
 C. B : cocoa butter

AMF 첨가구는 15% 및 20% MMF2, 20% LMF 첨가구들이 유사한 경향을 보였다. 이 결과에서 5% 및 10% 첨가군은 AMF와 유사하거나 다소 증가하였고, 30% 첨가군에서는 LMF를 제외한 모두에서 AMF보다 감소하는 것으로 나타났다.

유지방 획분 - 코코아 버터 혼합유의 phase behaviour의 변화는 isothermal diagram으로 비교하였으며 굳기정도를 의미하는 온도인 25℃의 isothermal diagram으로 변화점을 결정하였다. Fig. 12~14의 isothermal diagram에서 유지방 획분의 첨가량이 증가함에 따라 고체지 함량이 감소되는 경향을 보였다. AMF와 LMF 첨가구는 감소 경향이 유사하였고, HMF, MMF1 및 MMF2 첨가구는 이들 두 획분 첨가구와는 다른 경향을 보였다.

유지방 획분의 첨가량에 따른 변화점의 비교한 Fig. 15에서 LMF는 0~30% 첨가구 모두에서 일률적으로 감소되는 경향을 보였고, AMF도 LMF와 같이 일정한 비율로 감소되다가 30% 첨가구에서 크게 감소되었다. 반면에 HMF는 15% 첨가구에서 AMF의 SFC보다 크게 감소되었고, MMF1은 25%, MMF2는 30% 첨가구에서 크게 감소되는 경향을 보였다.

Chapman⁽⁹⁾ 등은 코코아 버터의 다형현상에 관한 연구에서 유지방의 첨가에 따라 isosolid diagram이 일정한 비율로 감소되는 것은 혼합된 fat system의 결정화가 억제되기 때문이며, 이로 인해 유지방 획분의 첨가구 모두에서 연화효과가 나타났다고 하였다. 이러한 현상은 2종의 유지에 의한 공용작용으로 트리글리세라이드의 결정화가 방해받기 때문이라고 하였다. Barna⁽²⁶⁾ 등은 유지방 획분이 코코아 버터의 공용작용에 미치는 영향에 관한 연구에서 HMF는 저함량(10-20%)의 첨가구에서 공용작용이 나타났고, MMF는 대부분의 첨가구에서 약간의 공용작용이 관찰되었으며, LMF는 높은 함량까지 첨가하여도 공용작용은 나타나지 않았다고 하였다. 또한, Timms⁽²¹⁾ 도 유지방-코코아 버터의 혼합유에서 HMF는 phase

Table 8. Solid fat content(%) in the mixture of fractionated milk fats and cocoa butter.

Concentration(%) milk fat : C.B ¹⁾		Temperature(°C)							
		5.0	10.0	15.0	20.0	25.0	30.0	32.5	35.0
AMF	0 : 100	88.80	84.60	79.16	74.55	65.53	40.88	13.78	1.03
	5 : 95	84.69	79.03	73.30	66.96	56.37	34.64	10.11	0.59
	10 : 90	82.41	76.11	69.41	62.51	50.78	30.39	9.65	0.85
	15 : 85	80.34	73.06	63.44	54.40	44.03	24.62	8.39	0.70
	20 : 80	77.82	70.83	57.50	43.98	35.89	19.47	7.44	0.20
	25 : 75	77.37	70.20	55.50	37.71	29.59	16.74	6.20	0.13
	30 : 70	75.41	59.30	52.47	28.97	15.89	8.80	3.47	0.16
LMF	0 : 100	88.80	84.60	79.16	74.55	65.53	40.88	13.78	1.03
	5 : 95	83.55	78.32	73.13	67.49	56.23	34.19	9.61	0.64
	10 : 90	79.23	73.42	67.79	62.01	49.36	28.96	7.54	0.36
	15 : 85	74.62	68.20	62.76	55.48	42.88	23.52	5.34	0.06
	20 : 80	71.18	63.77	57.68	50.62	36.32	18.46	3.61	0.04
	25 : 75	67.33	59.16	50.90	44.22	29.83	14.11	2.33	0.14
	30 : 70	63.90	54.88	44.57	37.33	24.66	10.86	1.90	0.20
MMF2	0 : 100	88.80	84.60	79.16	74.55	65.53	40.88	13.78	1.03
	5 : 95	86.69	82.00	76.00	70.08	59.41	36.60	10.47	0.72
	10 : 90	83.86	78.15	70.83	63.37	51.86	31.33	9.80	1.04
	15 : 85	82.13	75.84	64.76	54.37	44.66	25.24	9.02	0.53
	20 : 80	82.02	75.62	63.90	52.75	43.78	24.72	8.97	0.27
	25 : 75	80.85	74.05	60.21	45.00	36.88	21.21	8.32	0.69
	30 : 70	78.63	72.16	56.40	31.47	14.66	8.89	4.57	0.28
MMF1	0 : 100	88.80	84.60	79.16	74.55	65.53	40.88	13.78	1.03
	5 : 95	87.21	82.44	76.44	70.36	59.71	36.62	10.78	0.38
	10 : 90	86.48	81.66	75.79	69.18	58.04	35.36	10.60	0.55
	15 : 85	85.17	79.81	70.92	61.72	51.13	30.06	9.81	0.63
	20 : 80	84.51	78.42	64.63	44.73	34.84	22.04	9.62	1.00
	25 : 75	83.89	78.37	64.44	39.04	22.06	14.78	7.30	1.38
	30 : 70	82.83	77.14	62.51	32.94	10.94	7.23	3.60	1.20
HMF	0 : 100	88.80	84.60	79.16	74.55	65.53	40.88	13.78	1.03
	5 : 95	86.95	81.53	74.70	67.69	56.64	33.83	10.00	0.55
	10 : 90	86.33	81.21	70.43	59.91	51.20	31.44	10.90	0.66
	15 : 85	86.17	81.06	68.03	47.70	37.40	24.67	11.54	1.60
	20 : 80	87.01	81.87	69.24	41.56	20.02	13.97	7.59	1.80
	25 : 75	86.75	82.03	68.91	38.59	14.72	10.37	5.35	1.36
	30 : 70	84.90	79.63	65.94	31.69	12.30	8.45	4.89	1.86

¹⁾Refer to Table 4.

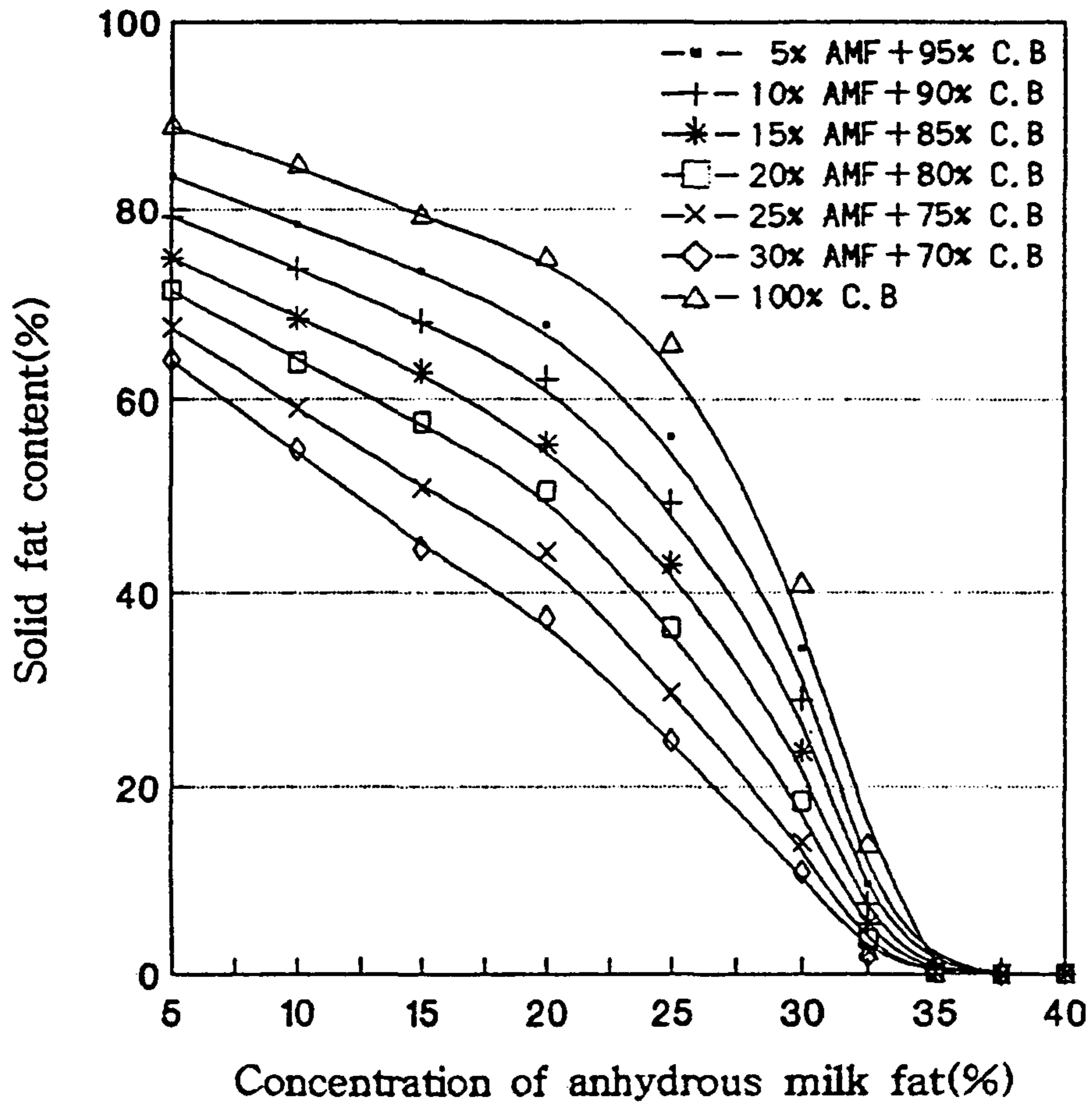


Fig. 11. Solid fat content in the mixture of anhydrous milk fat(AMF) and cocoa butter.

behavior에 큰 영향을 미치지 않고 용융점과 SFC함량을 증가시켰고, MMF는 25%첨가시부터 공용작용이 관찰되었으며, LMF는 0-30% 첨가시에 dilution 연화효과가 관찰되었다고 하였다. 이들의 결과는 본 실험의 결과와 일치하는 것이다. 반면에 유지방 획분-코코아 버터 혼합유의 isothermal diagram에서는 연화효과와 미세한 공용작용이 나타나지만, HMF가 첨가된 초코렛에서만 차이가 나타났고 그 나머지의 첨가군에서는 뚜렷한 차이가 없다고 하였다⁽²⁶⁾. 또한, 유지방의 연화효과는 대개의 경우 liquid 트리글리세라이드에 의하여 발생하고 공용작용은 유지방을 30%이상의 첨가시에 일어나며⁽²⁰⁾, modified 유지방을 코코아 버터에 첨가하는 경우에도 동일하다⁽⁵⁰⁾고 하여 유지방을 30%까지 첨가하여도 품질에 영향이 없다는 견해도 있다.

본 실험의 결과로 LMF 첨가량의 증가에 따라 혼합유의 SFC가 일률적으로 감소되는 phase behaviour를 보이는 것은 LMF의 불포화 지방산 및 저융점 트리글리세라이드가 첨가량의 증가에 따라 코코아 버터의 고융점 트리글리세라이드를 dilution시켜 고체지 함량을 완만히 감소시키는 연화효과의 인자로 작용했기 때문인 것으로 추측된다. 반면, HMF 15%, MMF1 25%, MMF2 30% 그리고 AMF 30% 첨가구에서 SFC가 급격히 감소되는 phase behaviour를 보이는 것은 AMF와 유사한 함량인 HMF와 MMF의 저융점 지방산이 첨가량의 증가에 따라 코코아 버터의 고융점 트리글리세라이드의 결정화를 억제시켜 고체지 함량을 급격히 감소시키는 공용작용의 인자로 작용했기 때문이며, HMF와 같이 고융점 획분의 첨가시에 다른 획분보다 낮은 첨가량에서 공용작용이 일어난 것은 고융점 지방산(고급 및 포화 지방산) 또는 고융점 트리글리세라이드 함량이 상대적으로 높기 때문인 것으로 보여진다.

한편 제과용 유지를 코코아 버터에 첨가시 나타나는 공용작용의 연구에서

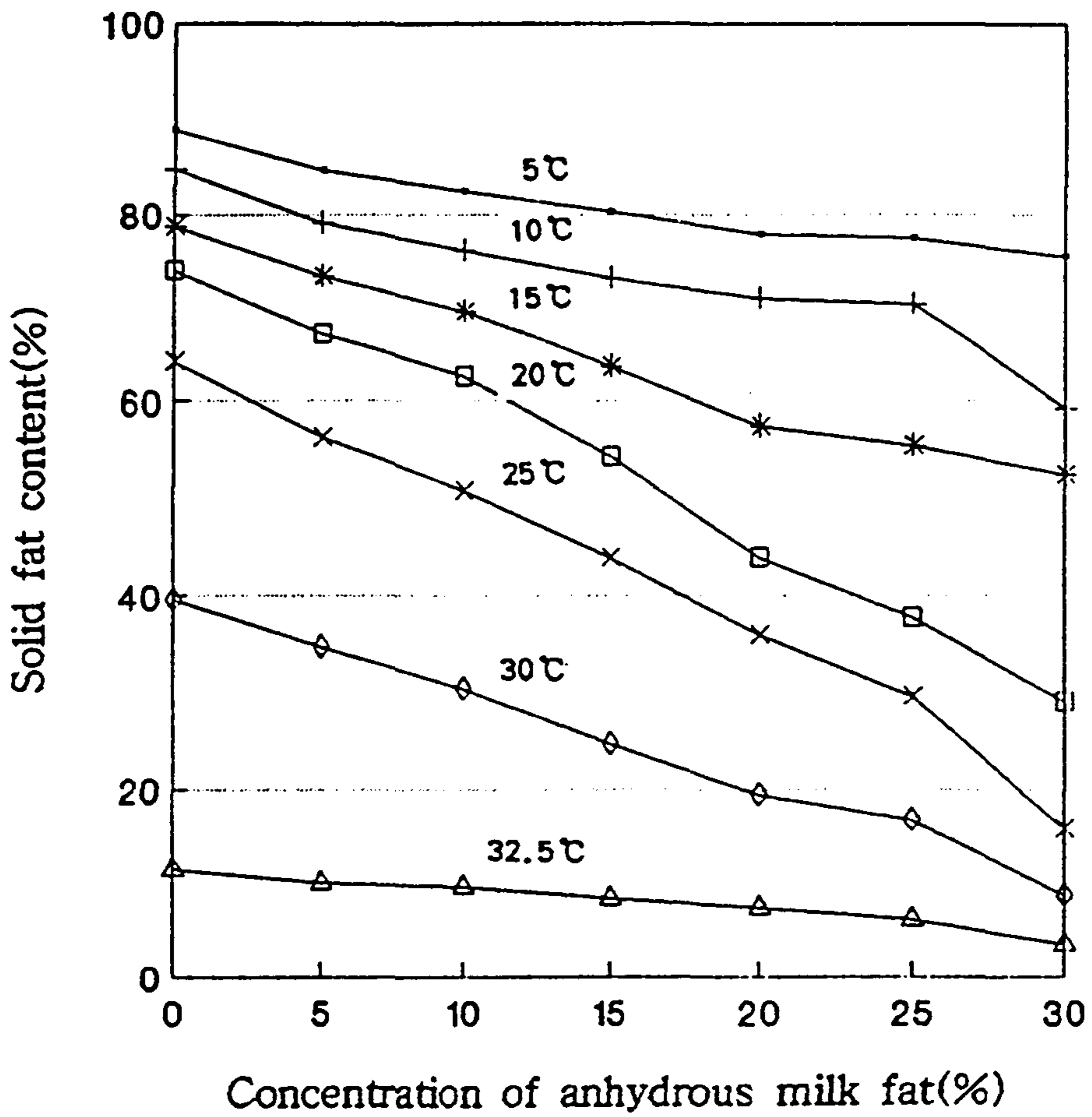


Fig. 12. Isothermal diagram in the mixture of anhydrous milk fat(AMF) and cocoa butter.

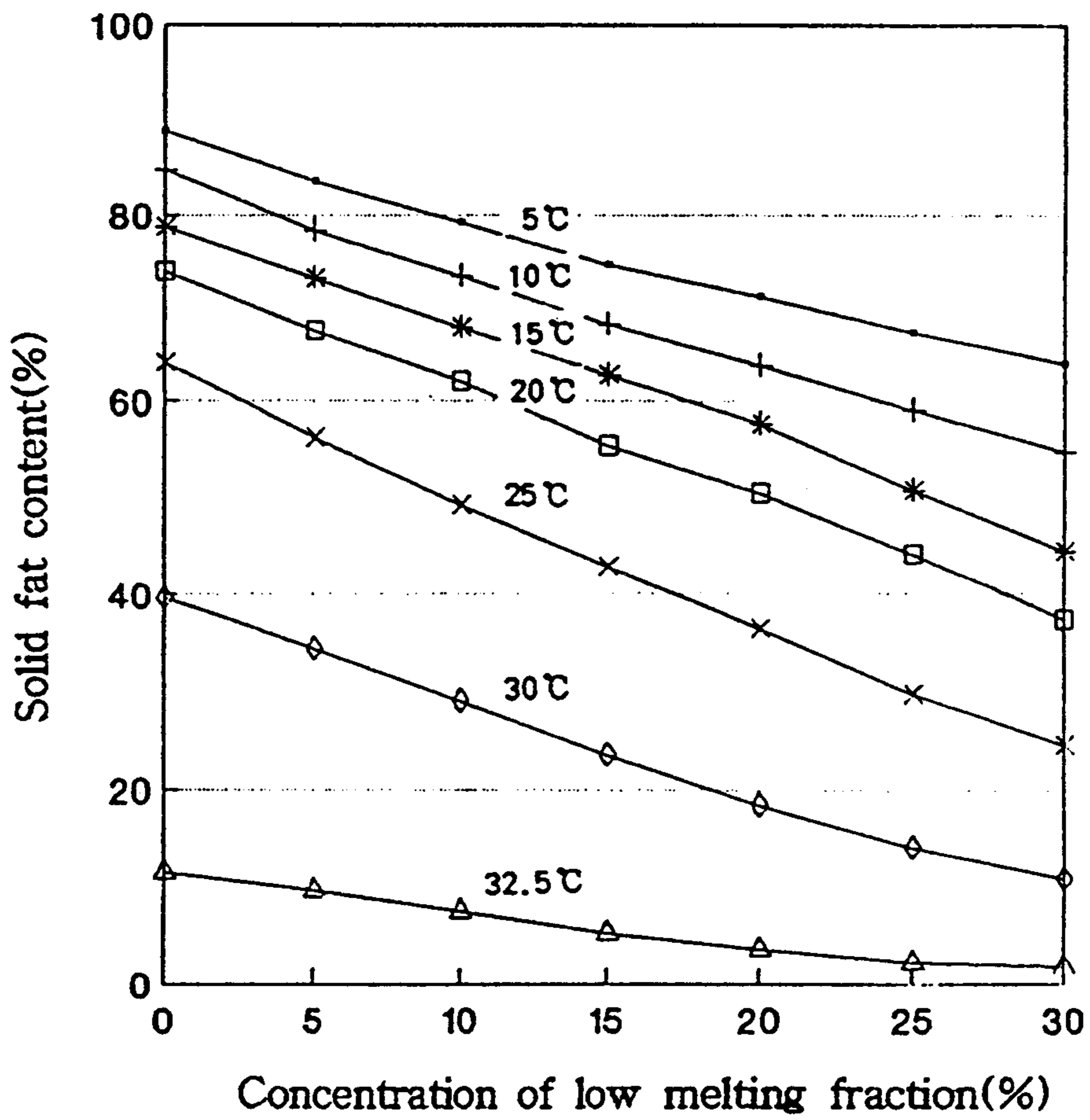


Fig. 13. Isothermal diagram in the mixture of low melting fraction(LMF) and cocoa butter.

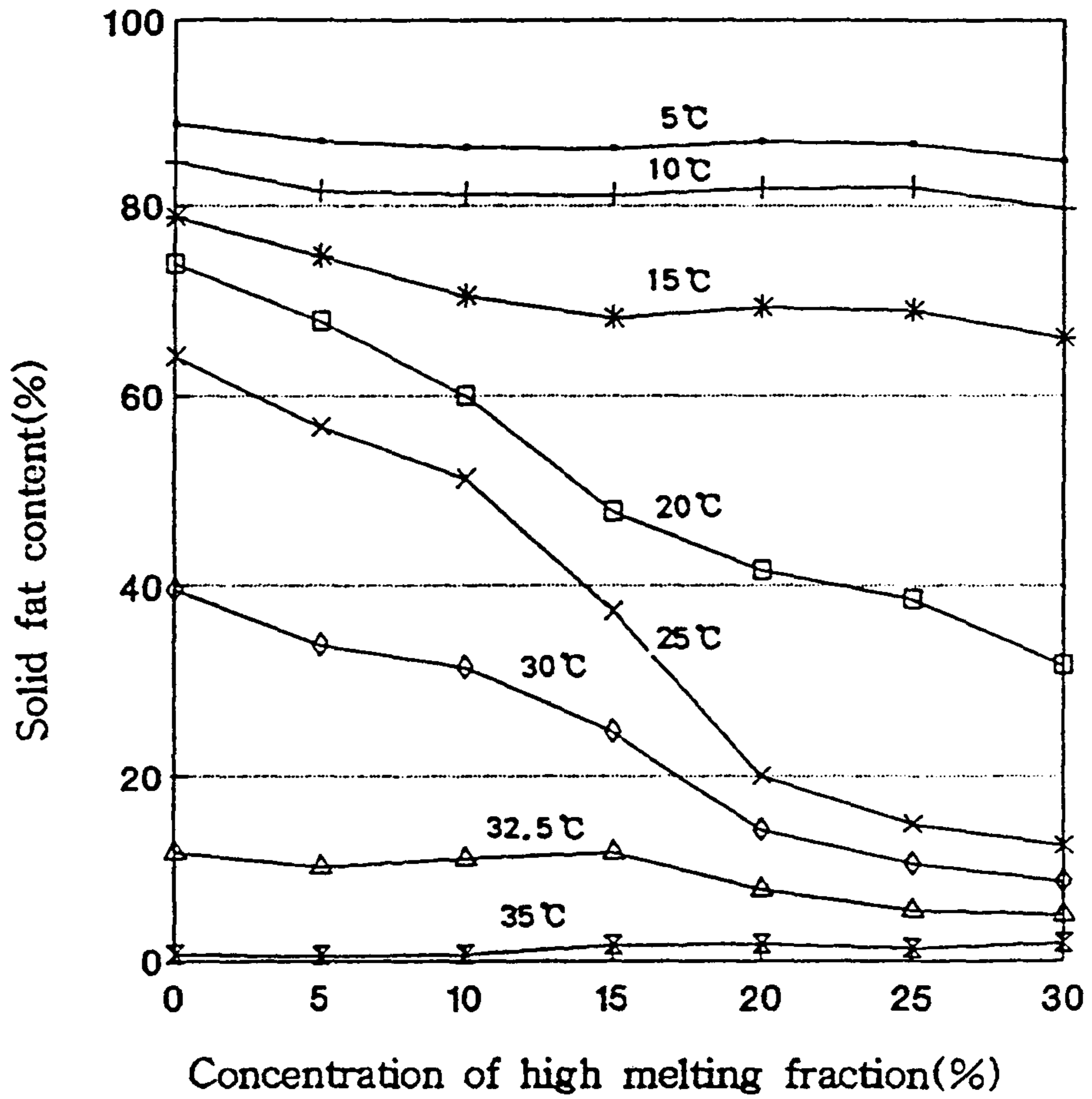


Fig. 14. Isothermal diagram in the mixture of high melting fraction(HMF) and cocoa butter.

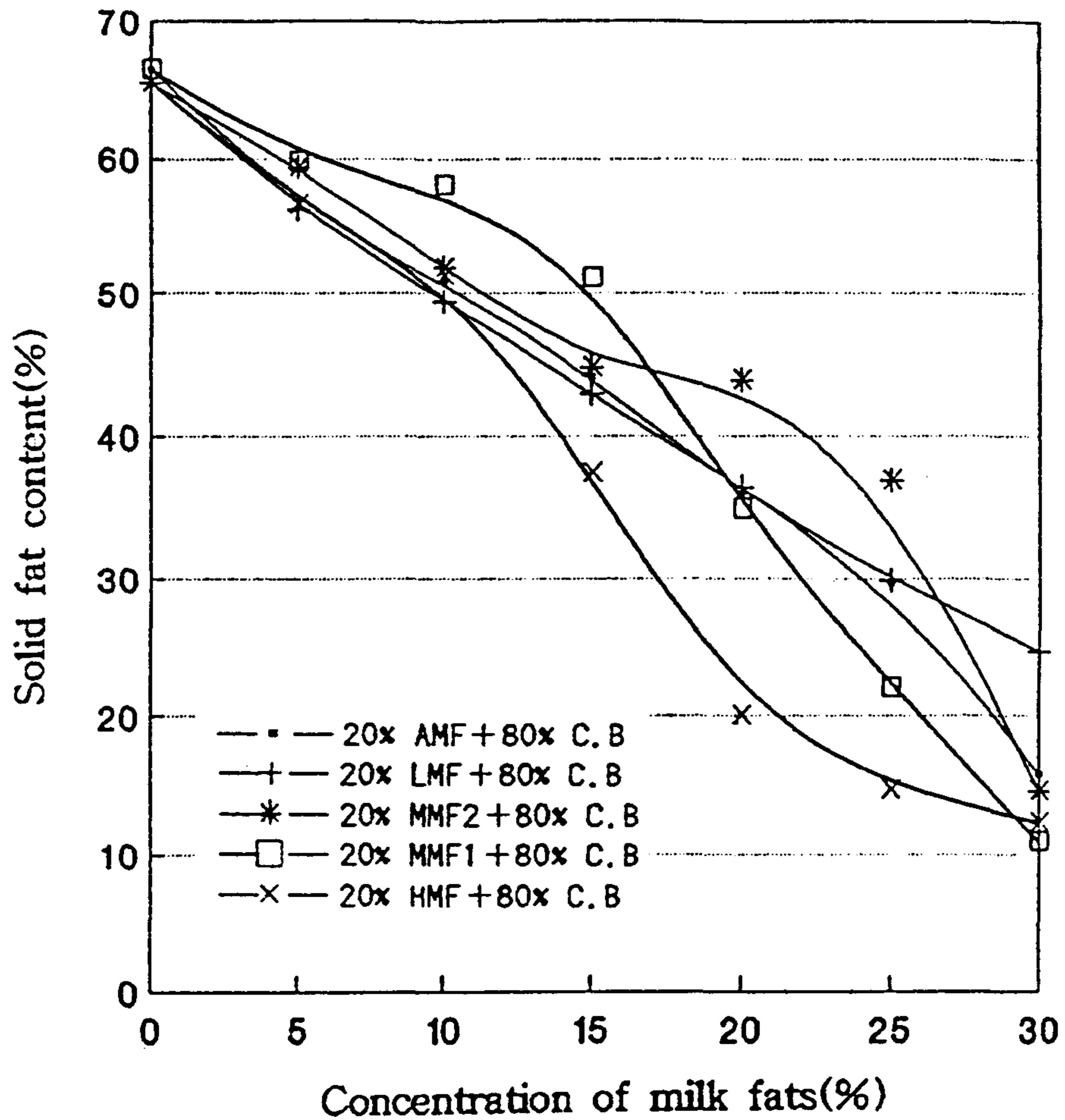


Fig. 15. Difference of isothermal diagram in the mixture of fractionated milk fat and cocoa butter on temperature 25°C

AMF : anhydrous milk fat
HMF : high melting fraction
MMF1 : medium melting fraction 1
MMF2 : medium melting fraction 2
LMF : low melting fraction

Bigalli⁽¹⁴⁾는 제과용 유지중 팜유 및 유지방등을 코코아 버터에 첨가시키면 이들은 대칭형(symmetrical) 트리글리세라이드를 함유하고 있지 않기 때문에 공용작용에 의한 연화가 일어났으며, 유지방 획분중 liquid fraction은 dilution 효과에 의한 연화가 일어났지만 bloom은 일어나지 않았다고 하였다. 이러한 dilution에 의한 연화는 제과용 유지에 대칭형 트리글리세라이드가 존재하기 때문이며, 공용작용은 이들이 존재하지 않기 때문이라고 보고한 바도 있다.

5. Melting behaviour(DSC thermogram)의 변화

5-1) 시료유지

코코아 버터, 유지방 및 유지방 획분의 melting behaviour를 알아보기 위해 IUPAC법⁽³⁴⁾에 따라 템퍼링하여 만든 시료유지의 DSC thermogram 흡열 정점온도와 흡열량은 Table 9에 표시하였다.

일반적으로 유지방의 용융은 -40℃에서 시작하여 0~20℃에서 용점이 나타나고, 15~18℃에서 뚜렷하게 나타나며 최대치의 용점의 위치는 냉각조건과 유지 조성에 의하여 좌우된다. 또한 고온측의 용점은 20~37℃ 사이에서 중심 peak를 보이며^(38,39), 유지방의 용융정점은 보통 3개로 나타나고 열처리 과정의 차이로 peak의 위치나 크기만 다른 것으로 알려져 있다⁽⁴²⁾.

유지방 획분의 thermogram에서 흡열 정점온도(endothermic height melting temperature)가 17~22℃부근인 저온 용융peak가, 34~38℃부근인 고온 용융peak가 관찰되었다. AMF의 melting thermogram은 고온 용융부와 저온 용융부에서 2개의 peak를 나타내며, 저온부의 peak는 용융범위가 넓게 나타났다.(Fig. 16)

또한, 유지방 획분의 용융 peak의 변화는 AMF에서 HMF로 갈수록 저온부는 17℃ 부근에서 부터 22℃ 부근으로 옮겨지는 경향을 보였으며, 고온부는 34℃ 부

Table 9. Height melting temperature(°C) and enthalpy(ΔH) of cocoa butter, milk fat and milk fat fractions.

Parameter Sample ¹⁾	1st peak		2nd peak	
	Temperature	ΔH	Temperature	ΔH
AMF	- /17.31	71.1	34.75	9.7
LMF	11.26/ -	80.9	-	-
MMF2	14.60/18.62	60.3	33.83	-
MMF1	10.58/21.10	11.8	37.21	75.3
HMF	- /22.66	47.4	38.55	36.0
C. B	-	-	35.76	130.1

¹⁾Refer to Table 4.

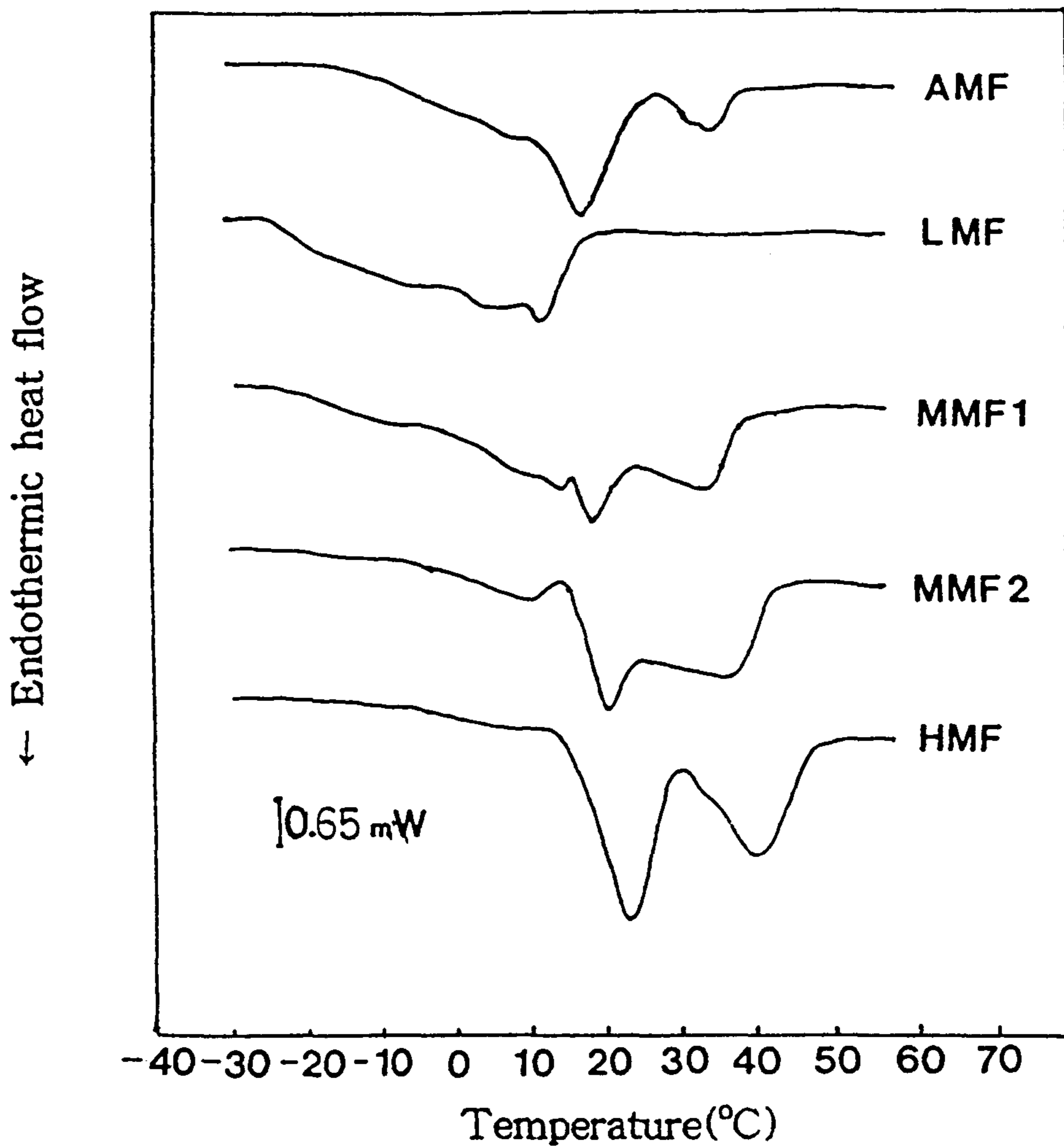


Fig. 16. DSC thermogram for cocoa butter, milk fat and milk fat fractions.

AMF : anhydrous milk fat
 LMF : low melting fraction
 MMF2 : medium melting fraction 2
 MMF1 : medium melting fraction 1
 HMF : high melting fraction

근에서 38℃ 부근으로 옮겨지는 경향을 보였다. 이때의 enthalpy는 증가하는 경향을 나타냈다. 반면에, LMF에서는 고온부는 나타나지 않고 저온부에서 용융 범위가 넓게 나타났다. 이는 LMF에는 저융점의 지방산과 트리글리세라이드 함량이 상대적으로 많이 포함되어 있기 때문인 것으로 보인다.

한편 고온부의 정점온도와 상승 용점과의 비교에서 MMF와 코코아 버터는 유사하게 나타났으나, AMF, HMF 및 LMF는 다소 차이를 보였다.

본 실험의 결과에서 AMF내의 저급지방산이 제거되고 고급지방산 함량이 높은 HMF로 갈수록 고온부의 enthalpy가 크게 나타났고 용융 정점온도도 뚜렷하게 나타났다지만, 상대적으로 저급지방산이 많은 LMF는 저온부가 넓게 나타났다.

5-2) 유지방 획분-코코아 버터 혼합유

AMF와 유지방 획분이 코코아 버터의 용융특성에 미치는 영향을 알아보기 위해 유지방 획분을 코코아 버터에 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%의 비율로 첨가하여 만든 혼합유를 IUPAC법⁽³⁴⁾에 따라 템퍼링하여 제조된 시료의 용융 thermogram의 흡열 정점온도와 흡열량은 Table 10에 나타냈다.

Fig. 17~Fig. 20에서 보는 바와 같이, 용융부의 정점온도가 13~19.75℃ 범위에서 저온부가 나타나고, 32.95~36.77℃에서 고온부가 관찰되었다. 이때 엔탈피의 변화는 15% 및 20% MMF2 첨가구에서 고온부의 엔탈피가 다소 증가하는 경향을 보였으나, 대체로 유지방의 첨가량이 증가될수록 고온부는 감소하는 반면에 저온부는 증가하는 경향을 보였다.

획분별 용융곡선 변화의 비교에서 AMF는 30% 첨가구에서는 전혀 다른 경향이 나타났으며, 이때 고온부의 정점 온도의 변화는 무첨가구(35.76℃)와 유사하게 나타났다(Fig. 17). HMF는 20% 첨가구, MMF1 및 MMF2는 25% 첨가구부터 다른

경향으로 나타났다(Fig. 18,19). 한편, LMF는 모든 첨가구에서 저온부가 서서히 증가하지만 다른 유지방 획분과 달리 저온부 엔탈피가 고온부보다 증가되지 않았다(Fig. 20). 이때의 용융 정점은 LMF의 고온부(36.07~36.51℃)에서만 다소 증가하는 경향을 보였다. 이는 앞에서의 isothermal diagram에서 HMF는 15% 첨가구, MMF는 25~30% 첨가구에서 공융현상이 관찰된 것에 비해 다소 차이는 있으나, 유사한 경향을 보이는 것으로 여겨지며, 결국 HMF 및 MMF는 각각 15% 및 25% 첨가구에서 용융 특성의 변화가 일어난다고 생각된다.

Barna⁽²⁶⁾ 등은 유지방 획분-코코아 버터 혼합유의 DSC thermogram에서 모든 획분에서 저온부(19℃)에서 흡열 peak가 나타났고, 20% HMF 첨가구에서 고온부(37℃) 흡열량이 감소하였고, MMF 첨가구에서도 고온부가 다소 감소하였으나 LMF 첨가구에서는 단지 저온부가 넓게 나타나는 경향을 보였다고 한 것은 본 실험의 결과와 대체로 일치하는 것이다. Chapman⁽⁹⁾은 30%의 유지방을 첨가한 코코아 버터에서 V형이 VI형으로 변형함에 있어서, 코코아 버터는 5개월이 소요되는 것에 비하여 유지방이 첨가된 코코아 버터는 23℃에서 8개월이 소요된 것은 유지방 첨가로 결정의 전이가 지연되었기 때문이라고 하였다. Blasker⁽⁴⁷⁾ 등도 DSC thermogram에서 AMF의 고온부의 정점은 40℃인 것에 비해 HMF의 고온부 온도는 30~45℃로 나타났다고 하였다.

본 실험의 결과에서 유지방의 모든 첨가구에서 저온부(13~19.75℃)에서 흡열 peak가 나타났고, 고온부는 모든 첨가구에서 흡열량이 감소하였다. 20% HMF 첨가구와 25% MMF 첨가구부터 고온부 흡열량이 크게 감소하였으나, LMF 첨가구는 저온부가 넓게 나타나는 경향을 보였다.

Table 10. Height melting point(°C) and enthalpy(ΔH) for the mixture of fractionated milk fats and cocoa butter.

Parameter		1st peak		2nd peak	
		Temperature	ΔH	Temperature	ΔH
Concentration(% ^h) milk fat : C.B ^h					
AMF	0 : 100	-	-	35.76	130.1
	5 : 95	15.12	12.4	34.97	110.3
	10 : 90	16.17	21.0	36.08	97.6
	15 : 85	17.51	32.4	35.64	66.4
	20 : 80	16.62	31.5	36.35	88.7
	25 : 75	16.17	33.1	36.29	66.2
	30 : 70	19.75	63.4	32.95	6.9
LMF	0 : 100	-	-	35.76	130.1
	5 : 95	15.71	10.8	36.09	133.5
	10 : 90	15.28	17.1	36.07	115.6
	15 : 85	14.84	22.2	36.07	104.7
	20 : 80	15.50	19.4	36.10	67.9
	25 : 75	14.37	34.1	36.08	63.3
	30 : 70	16.40	35.0	36.51	43.7
MMF2	0 : 100	-	-	35.76	130.1
	5 : 95	19.54	20.7	35.40	87.3
	10 : 90	15.28	14.9	34.98	81.5
	15 : 85	13.02	23.0	35.18	118.3
	20 : 80	15.26	26.0	34.73	106.9
	25 : 75	17.08	57.0	36.10	25.9
	30 : 70	17.29	66.1	36.75	15.4
MMF1	0 : 100	-	-	35.76	130.1
	5 : 95	15.94	13.4	36.07	121.4
	10 : 90	15.94	13.0	36.07	111.9
	15 : 85	16.18	22.6	36.77	103.2
	20 : 80	16.83	29.8	36.07	78.5
	25 : 75	17.29	45.4	35.87	26.0
	30 : 70	18.42	68.0	34.28	13.2
HMF	0 : 100	-	-	35.76	130.1
	5 : 95	16.64	14.0	35.86	113.7
	10 : 90	15.93	18.2	36.08	108.1
	15 : 85	16.86	27.1	36.29	83.0
	20 : 80	18.84	60.4	35.65	20.3
	25 : 75	18.86	58.0	35.41	12.5
	30 : 70	18.62	66.7	34.30	18.6

^hRefer to Table 4.

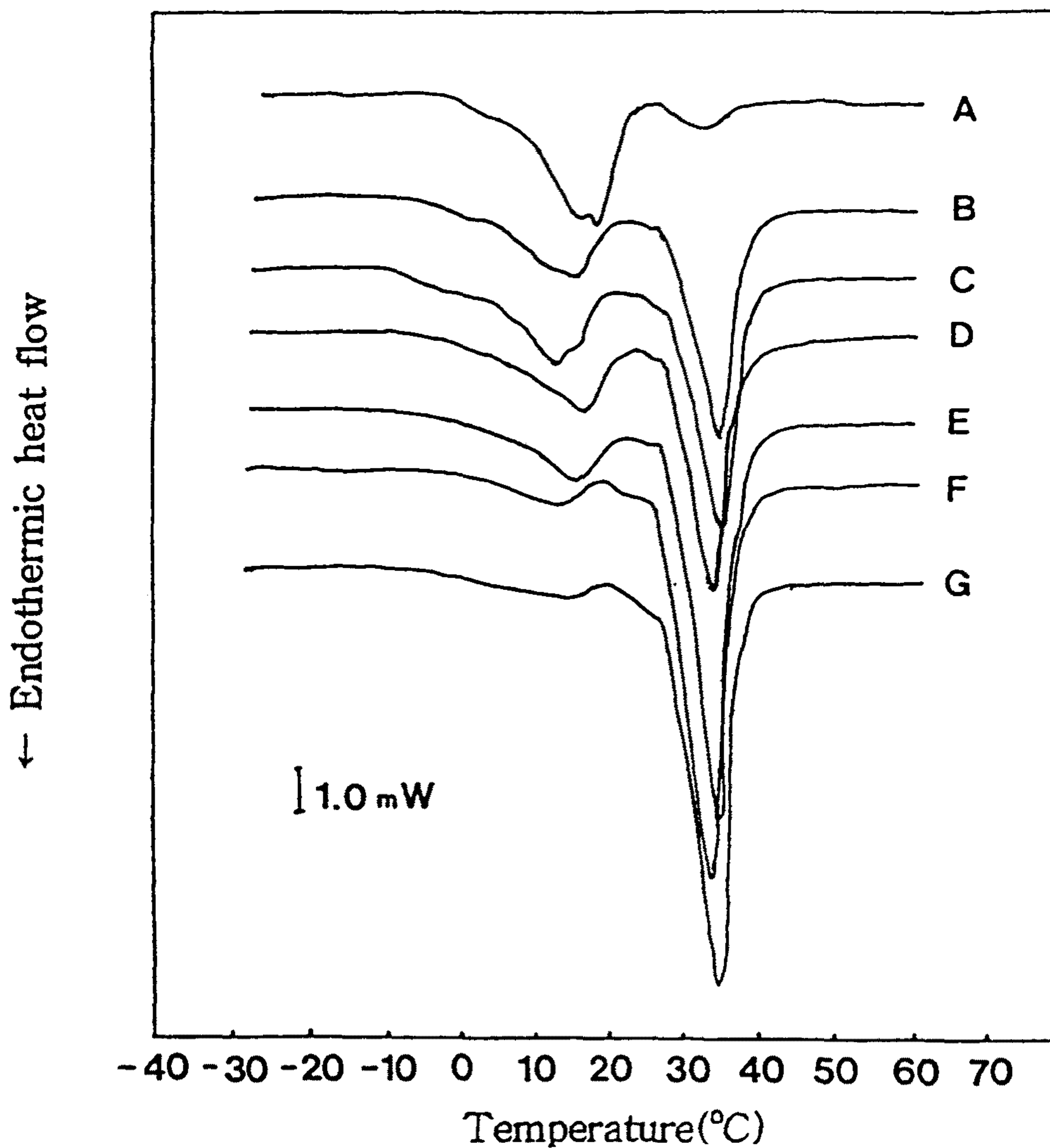


Fig. 17. DSC thermogram for the mixture of anhydrous milk fat(AMF) and cocoa butter.

- A : 30% AMF + 70% cocoa butter
- B : 25% AMF + 75% cocoa butter
- C : 20% AMF + 80% cocoa butter
- D : 15% AMF + 85% cocoa butter
- E : 10% AMF + 90% cocoa butter
- F : 5% AMF + 95% cocoa butter
- G : 100% cocoa butter

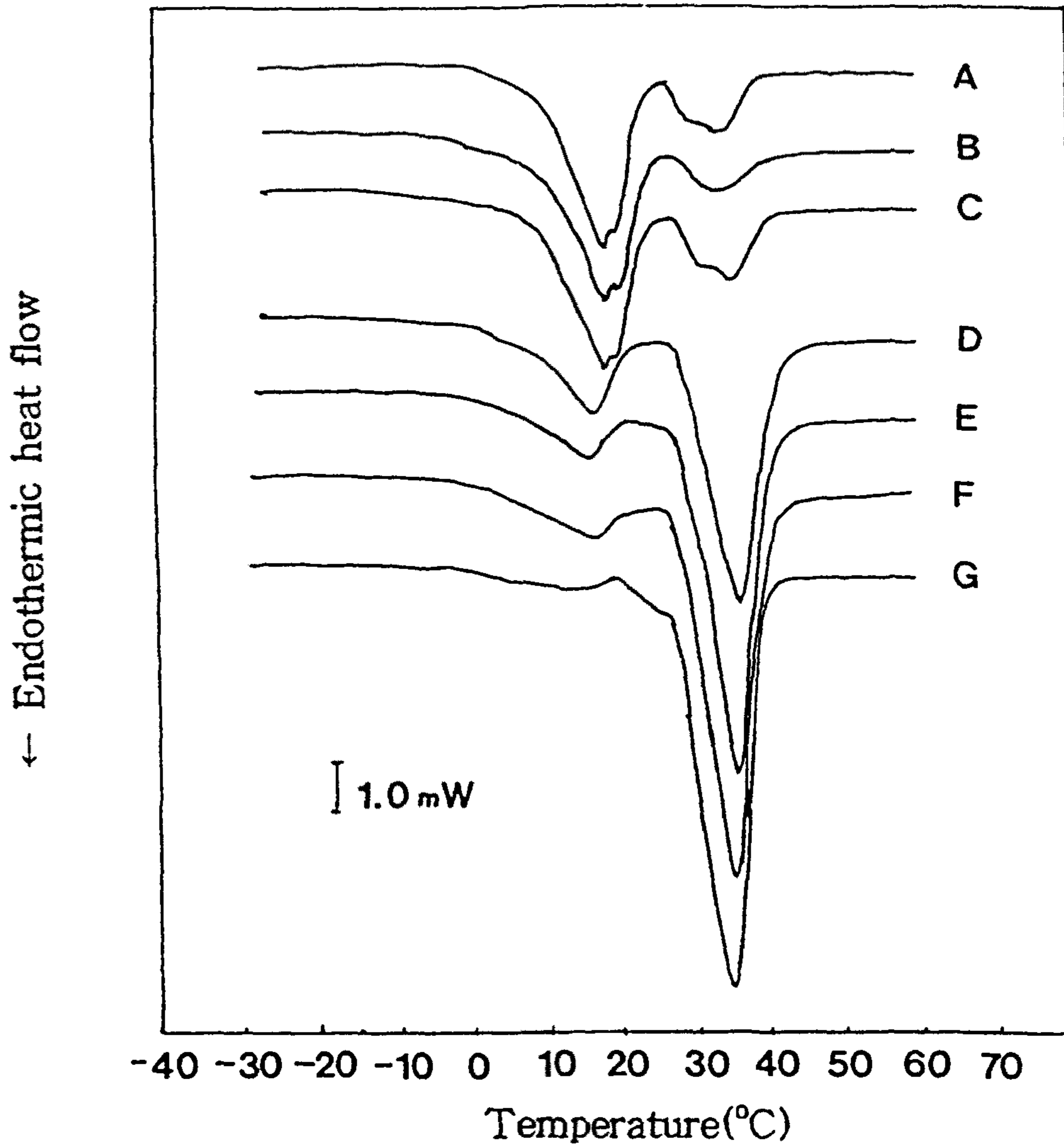


Fig. 18. DSC thermogram for the mixture high melting fraction (HMF) and cocoa butter.

- A : 30% HMF + 70% cocoa butter
- B : 25% HMF + 75% cocoa butter
- C : 20% HMF + 80% cocoa butter
- D : 15% HMF + 85% cocoa butter
- E : 10% HMF + 90% cocoa butter
- F : 5% HMF + 95% cocoa butter
- G : 100% cocoa butter

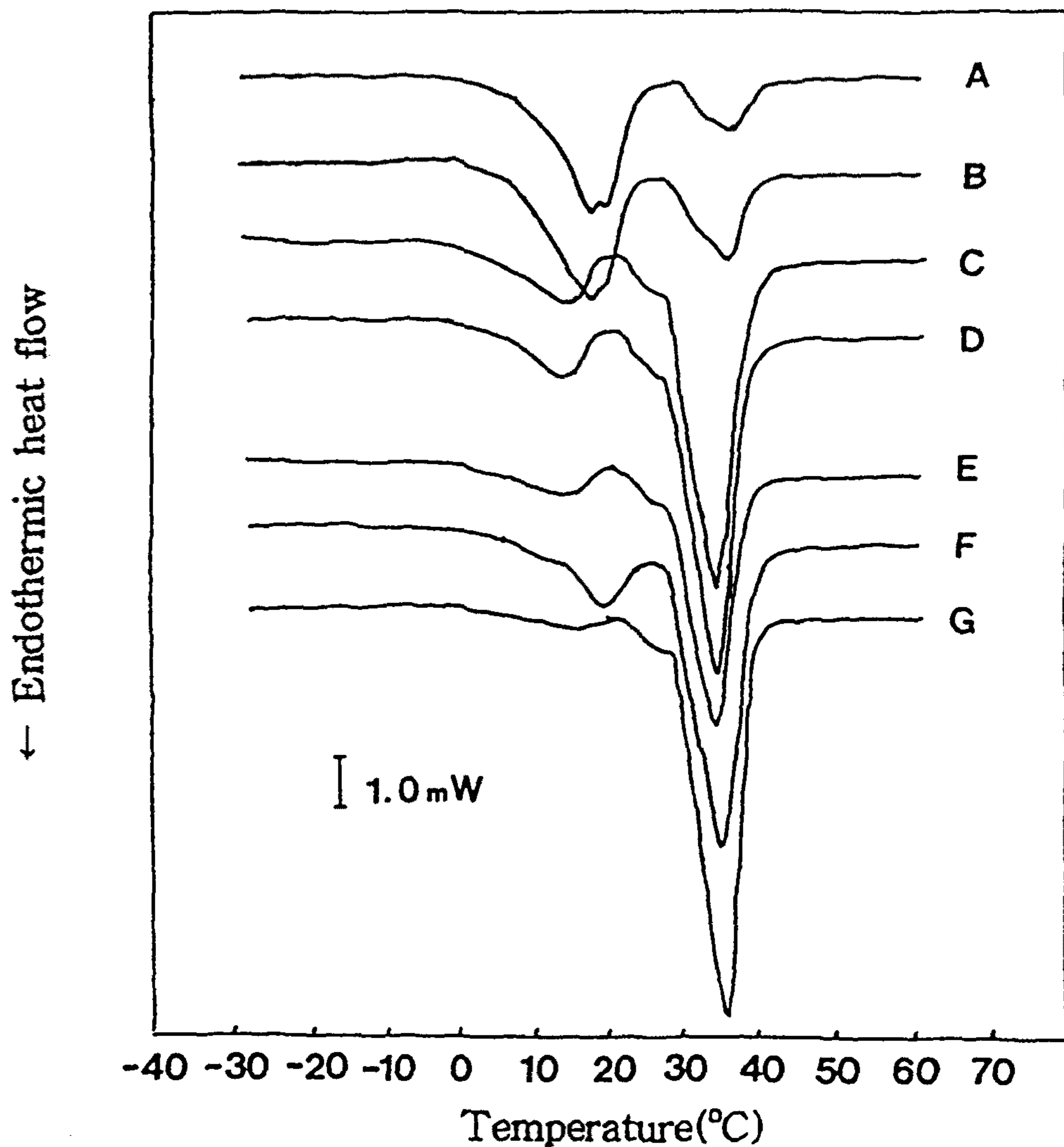


Fig. 19. DSC thermogram for the mixture of medium melting fractions(MMF2) and cocoa butter.

- A : 30% MMF2 + 70% cocoa butter
- B : 25% MMF2 + 75% cocoa butter
- C : 20% MMF2 + 80% cocoa butter
- D : 15% MMF2 + 85% cocoa butter
- E : 10% MMF2 + 90% cocoa butter
- F : 5% MMF2 + 95% cocoa butter
- G : 100% cocoa butter

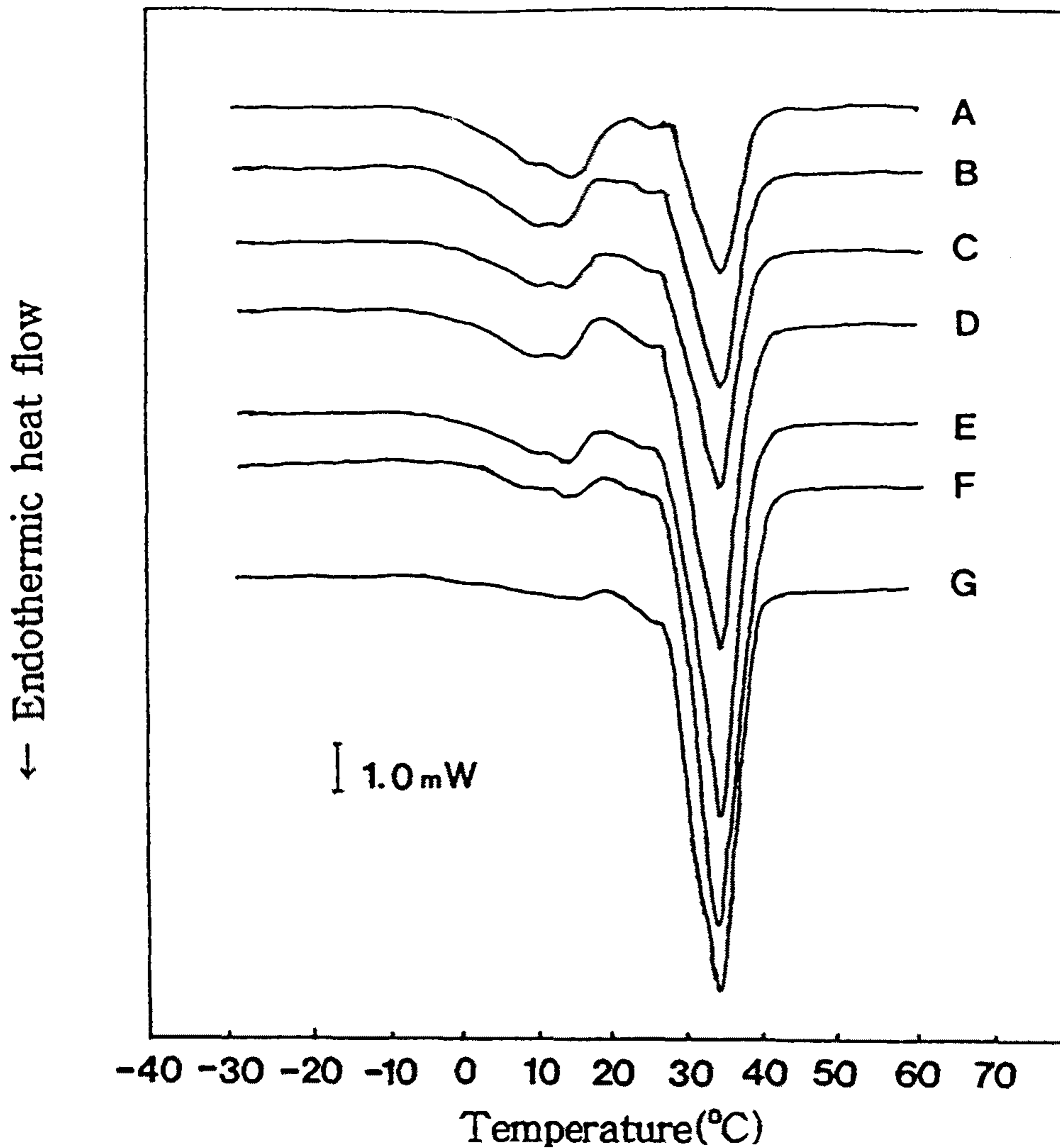


Fig. 20. DSC thermogram for the mixture of low melting fraction (LMF) and cocoa butter.

- A : 30% LMF + 70% cocoa butter
- B : 25% LMF + 75% cocoa butter
- C : 20% LMF + 80% cocoa butter
- D : 15% LMF + 85% cocoa butter
- E : 10% LMF + 90% cocoa butter
- F : 5% LMF + 95% cocoa butter
- G : 100% cocoa butter

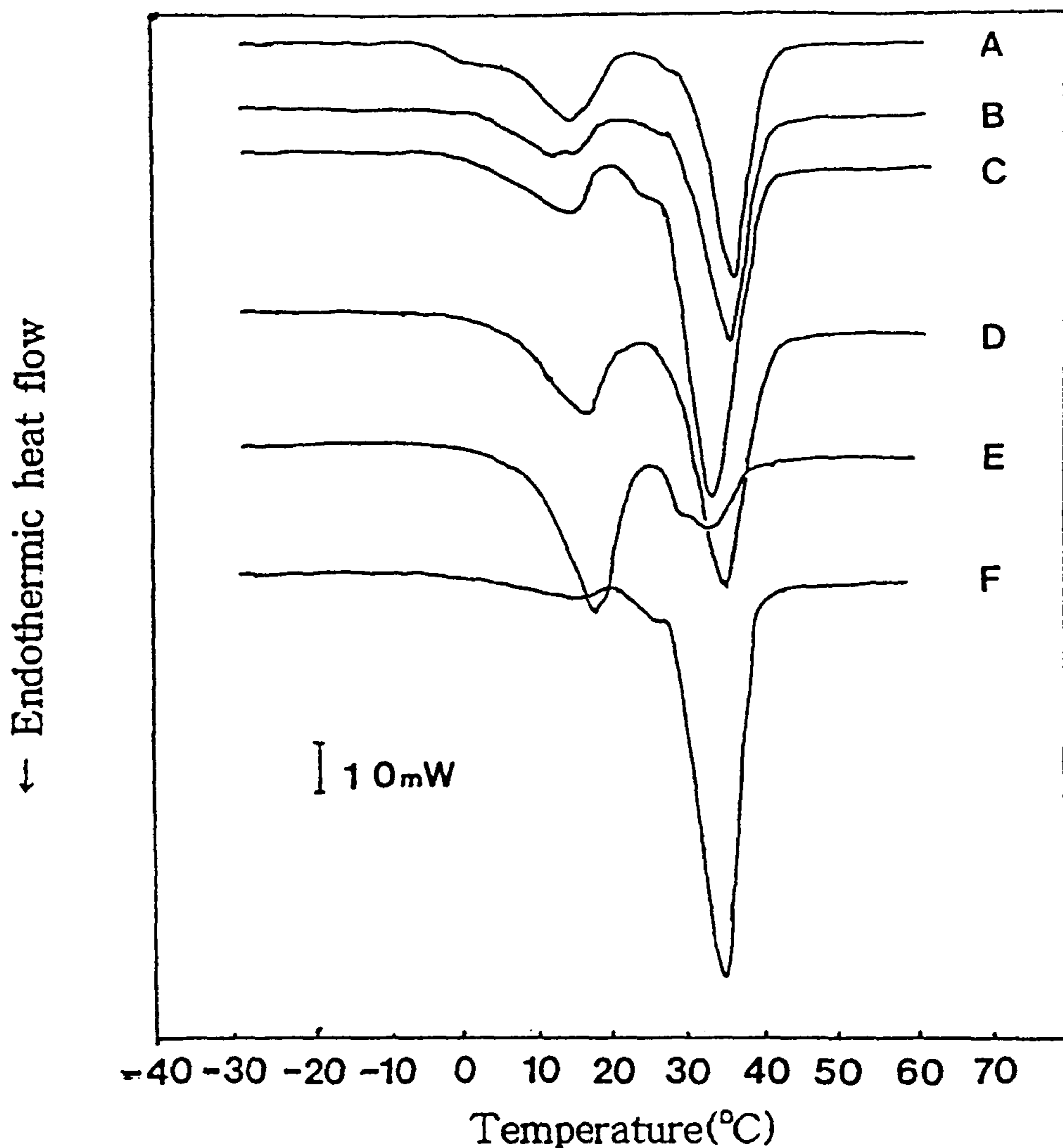


Fig. 21. DSC thermogram for the mixture of 20% fractionated milk fats and 80% cocoa butter.

- A : 20% anhydrous milk fat(AMF) + 80% cocoa butter
- B : 20% low melting fractions(LMF) + 80% cocoa butter
- C : 20% medium melting fractions(MMF2) + 80% cocoa butter
- D : 20% medium melting fractions(MMF1) + 80% cocoa butter
- E : 20% high melting fractions(HMF) + 80% cocoa butter
- F : 100% cocoa butter

6. 결정형태의 변화

유지방및 유지방 획득이 코코아 버터 결정형에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 시료유지를 IUPAC법⁽³⁴⁾에 따라 템퍼링한 후에 18~20℃에서 10일간 숙성시키고 나서 편광현미경에 의해 관찰한 결과는 Fig. 22에 나타냈다.

일반적으로, 코코아 버터는 결정화로 4개에서 6개의 결정이 생성된다. 그중 γ 형은 밝은 유리질형태의 미세 결정상으로 존재하지만 매우 불안정하여 급속히 α 형으로 변하고, 1시간내에 β' 형으로 전이한다. β' 형은 α 형과 유사하나 다소 희미하고 간혹 규칙적인 밝은 원구형으로 나타난다. β 형은 20~50 μm 의 원구형으로 나타나지만 점차 확산되어 침상또는 프리즘형태로 전이하며, 100 μm 의 크기로 완전한 변형이 일어난다. 하지만, 확산이 계속 진행되면 약 1mm까지 성장하여 fat bloom의 요인이 된다. 결정화 과정에서 불안정한 결정과 안정한 결정의 최소한 2가지 형태가 있으며, 불안정한 형태는 점점 안정한 형태로 되는 것으로 알려져 있다^(11,12,51).

시료유지의 현미경 관찰에서 HMF와 MMF1은 코코아 버터와 유사한 원구형의 안정한 형태가 뚜렷하게 나타났으며, MMF2와 AMF에서는 원구형과 침상형이 함께 존재하고 있었다. 이는 시료유지의 지방산과 트리글리세라이드 조성에서 나타난 바와 같이 유지방 획득내의 높은 함량의 고급지방산과 장쇄 트리글리세라이드에 의하여 결정핵이 형성되어 안정한 β 형으로 전이되는 것으로 보여진다. 반면에 LMF는 부정형 상태로 결정형태가 나타나지 않았다.

Fig. 22에서 보는 바와 같이 유지방 획득의 첨가량이 증가됨에 따라 원구형과 침상형이 함께 나타나거나, 침상 형태만 나타나는 경향을 보였다. 이는 유지방 획득의 종류와 첨가량에 따라 코코아 버터의 결정 형성에 영향을 주는 것으로 보여진다. AMF는 20%이상 첨가구부터 침상형 결정이 관찰되었다. LMF도 모든 첨가구에서 5%~15% AMF 첨가구와 같이 원구형이 관찰되었으나, 첨가량이 증가할

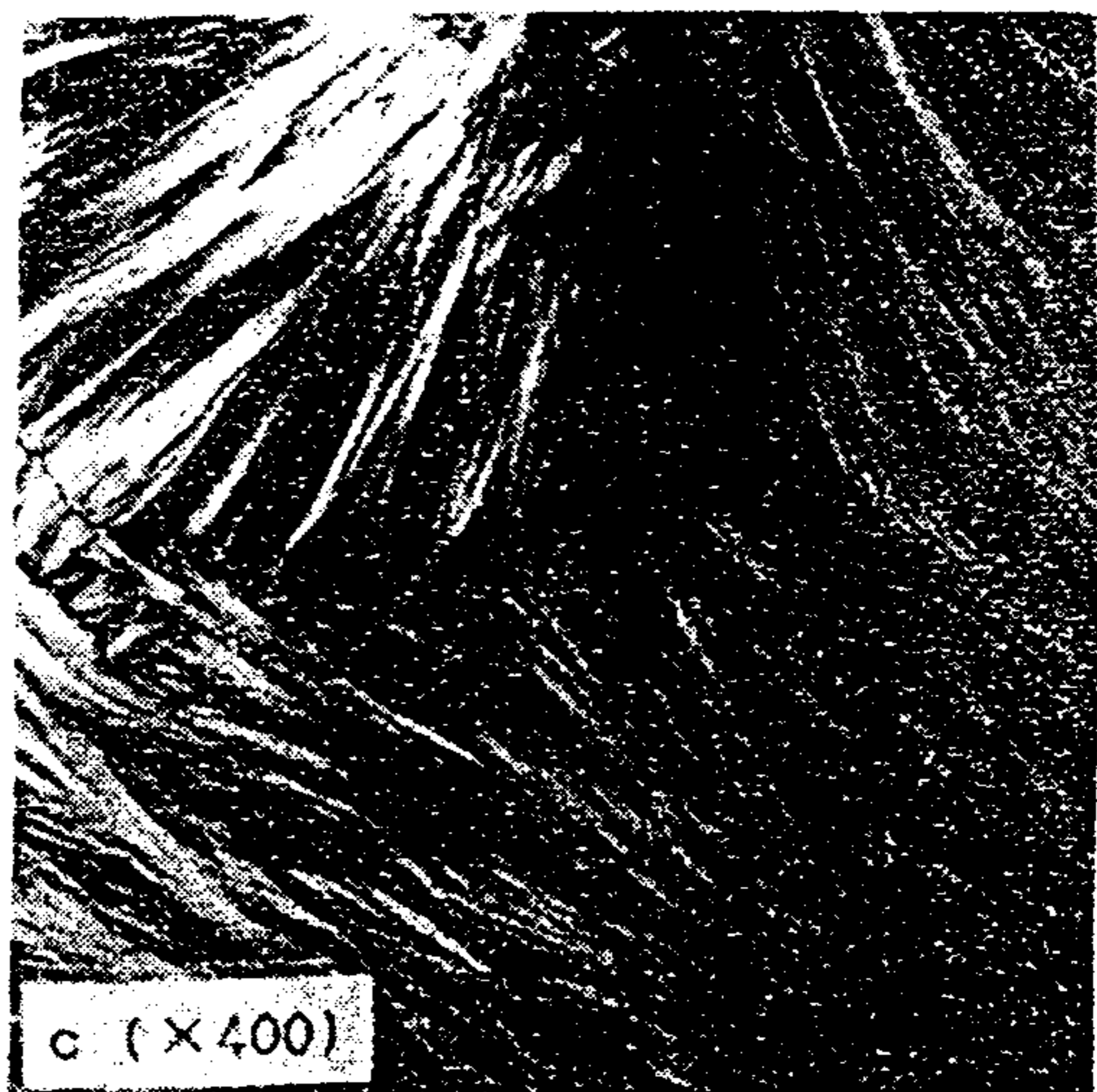
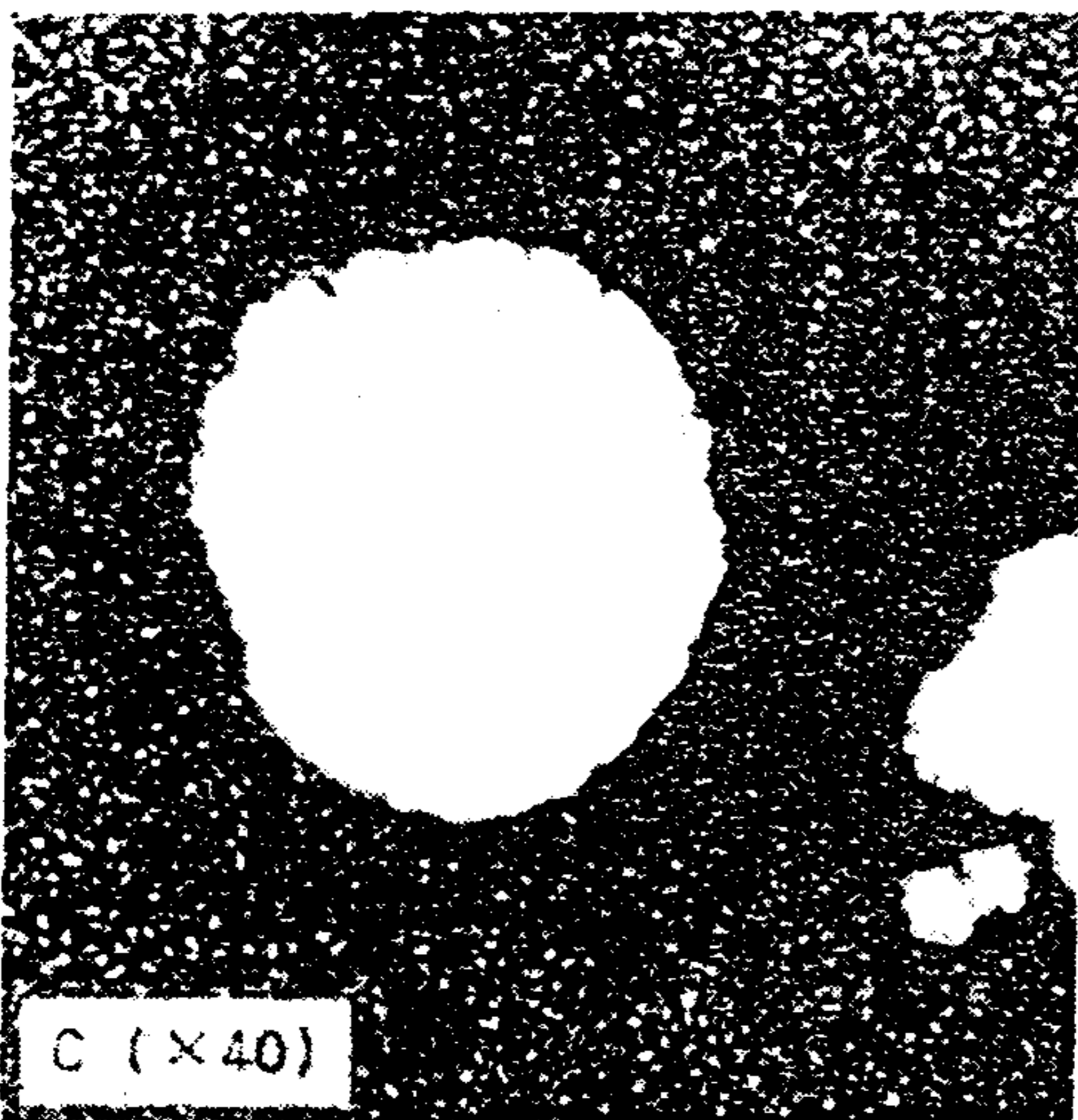
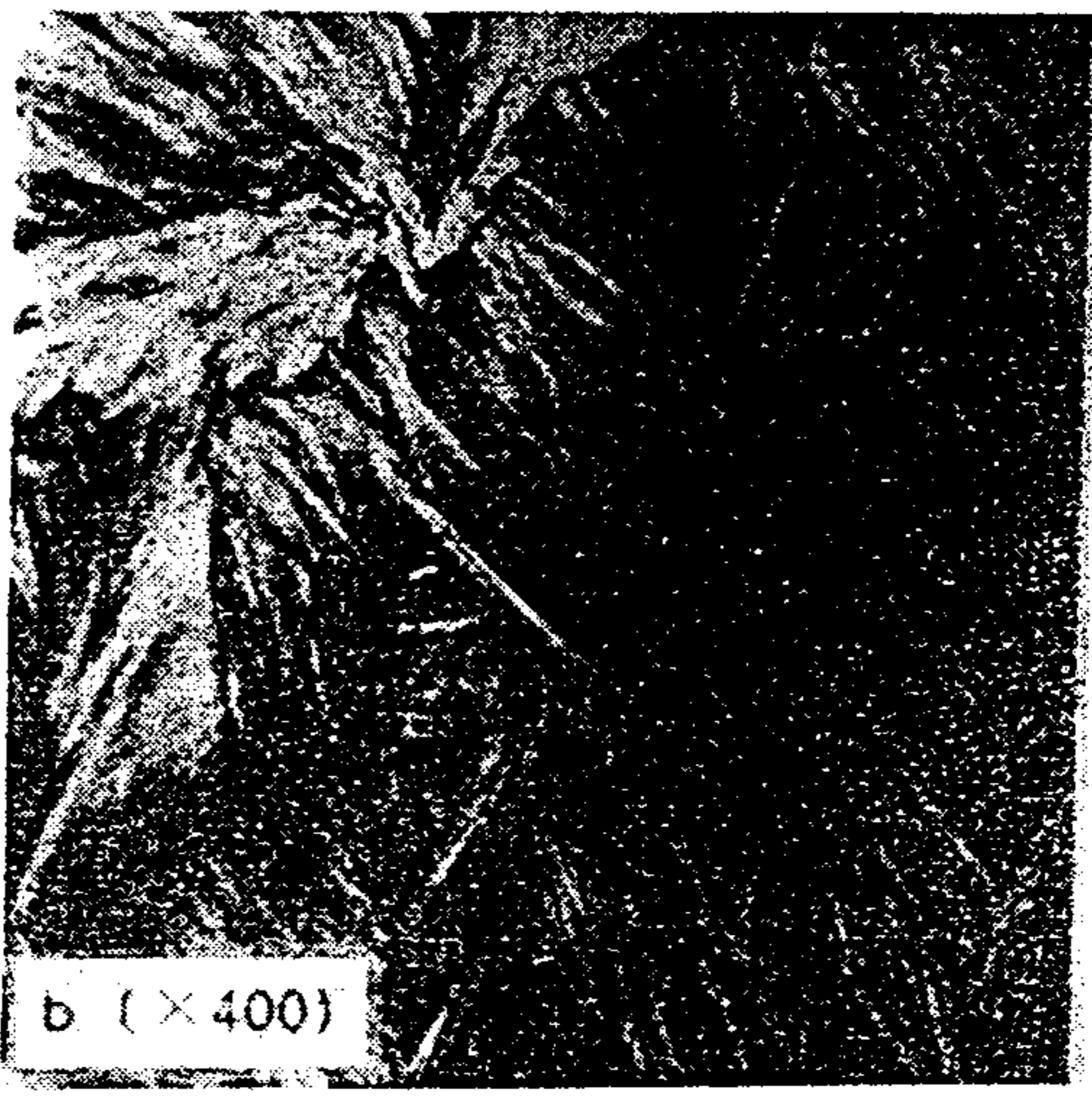
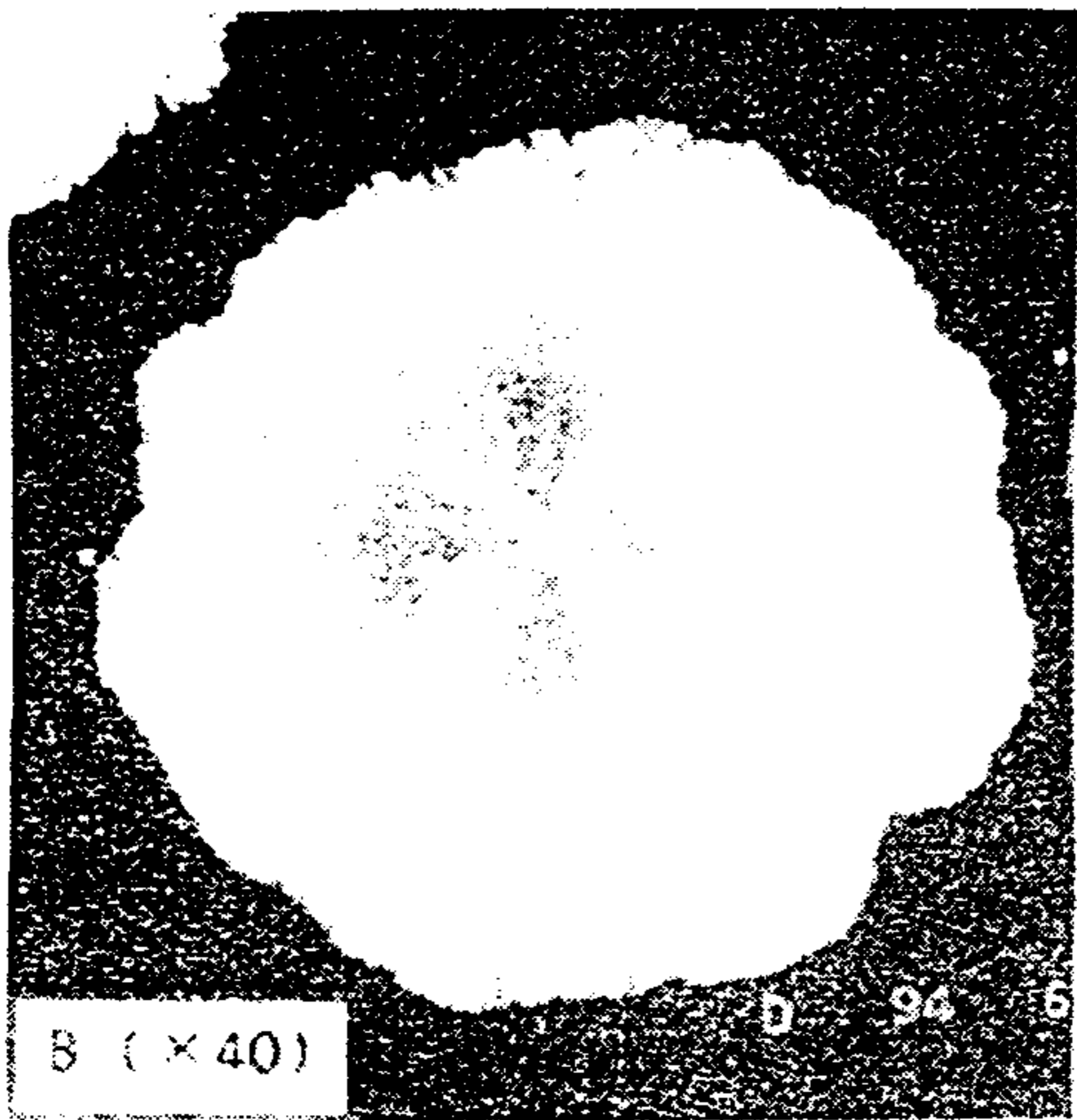
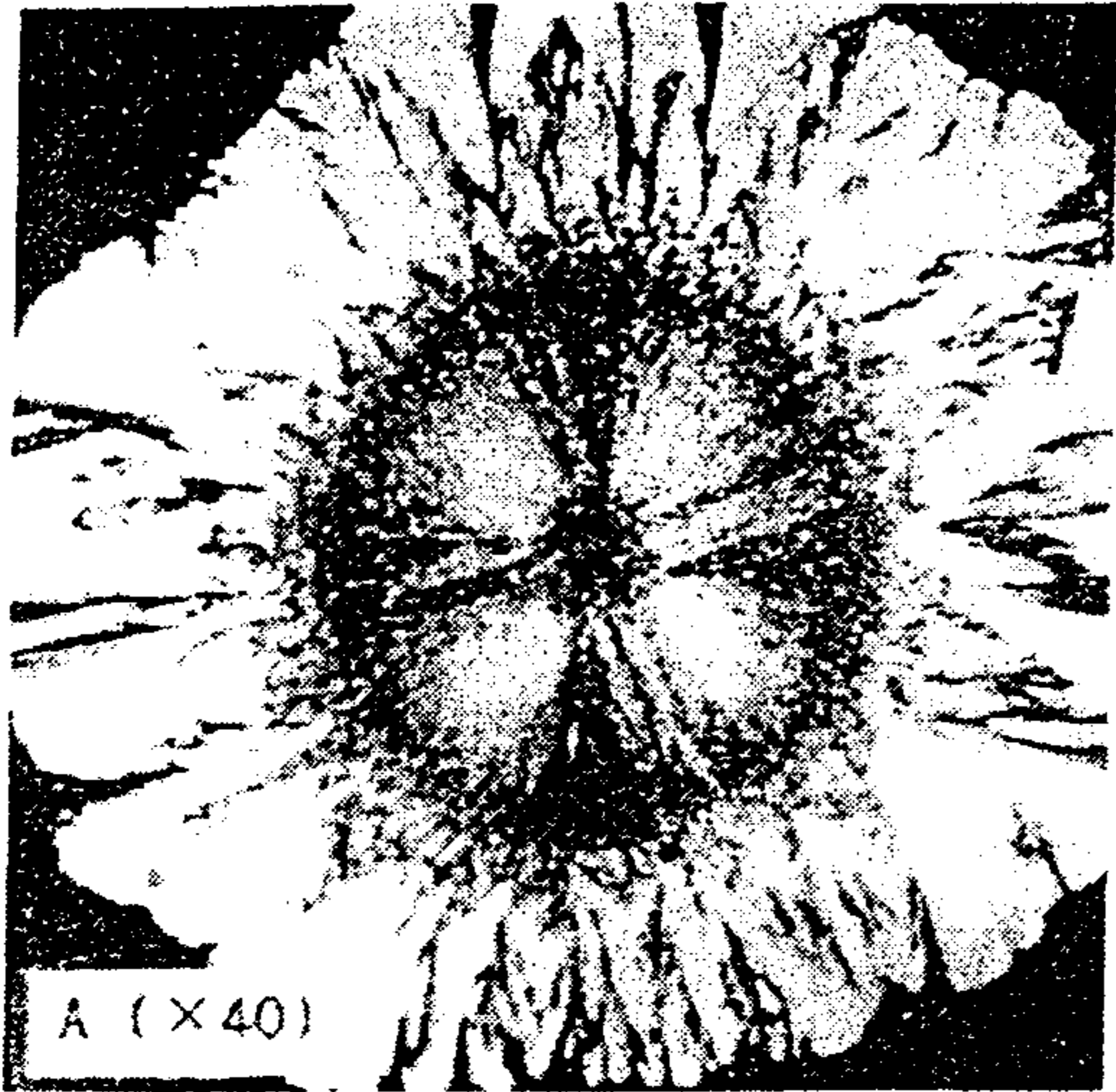
수록 결정은 조밀하지 않은 경향을 보였다. MMF2는 20% 첨가구에서 β' 형으로 보이는 십자형이 나타났으며, HMF는 15% 첨가구, MMF1은 20%부터 침상형의 결정형이 나타났다. 이는 고체지 함량, DSC에서 관찰된 결과와 유사한 경향을 보이는 것이다.

본실험의 결과, 유지방이 코코아 버터에 첨가된 경우에 유지방중 LMF는 코코아 버터에 30% 첨가되어도 안정한 결정형으로의 전이에 영향을 미치지 않았으며, HMF는 15%, MMF1 및 MMF2는 20% 첨가구부터 결정의 전이를 방해하는 인자로 작용하는 것으로 나타났다.

한편, Woodrow⁽⁴⁴⁾ 등은 X-ray diffraction에 의한 분석에서 유지방의 다형현상은 α , β' , β 형으로 매우 불안정하게 확산되어 있으나, 고압 여과로 liquid 부분을 제거시킨 획득의 결정형은 β' , β 형으로 개선된다고 하였다. Timms⁽⁴²⁾는 HMF는 β' 형만 나타났고, 40℃에서 31일간 저장하여도 전이되지 않았으며, LMF의 첨가시에는 β 형으로 전이되었다. 또한 MMF도 냉장 온도에서 10분 방치시에 α 형이 존재하고, 30℃에서 7일후에는 β' 형과 α 형이 함께 존재하다가 β' 형으로 전이되지만, HMF와 같이 40℃에서 31일간 저장하여도 전이되지 않았으나, LMF의 첨가시에는 β 형으로 전이되었다고 하였다. 이때 AMF는 β' 형과 소량의 β 형이 함께 존재하고 있었으며, 따라서 유지방의 β' 형은 MMF에 의해 결정 생성에 영향을 받고, β 형은 HMF, LMF에 의하여 전이가 가속화된다고 하였다. 또한, 유지방의 LMF 또는 glyceride가 복잡하게 구성된 유지방 획득은 α 형을 만들지 않고 바로 β' 형과 β 형이 함께 존재하는 영향 인자로 작용한다고 하였다.

7. 혼합유로 제조한 초코렛의 관능검사

유지방 획득을 첨가하여 만든 초코렛의 관능검사는 고체지 함량과 DSC



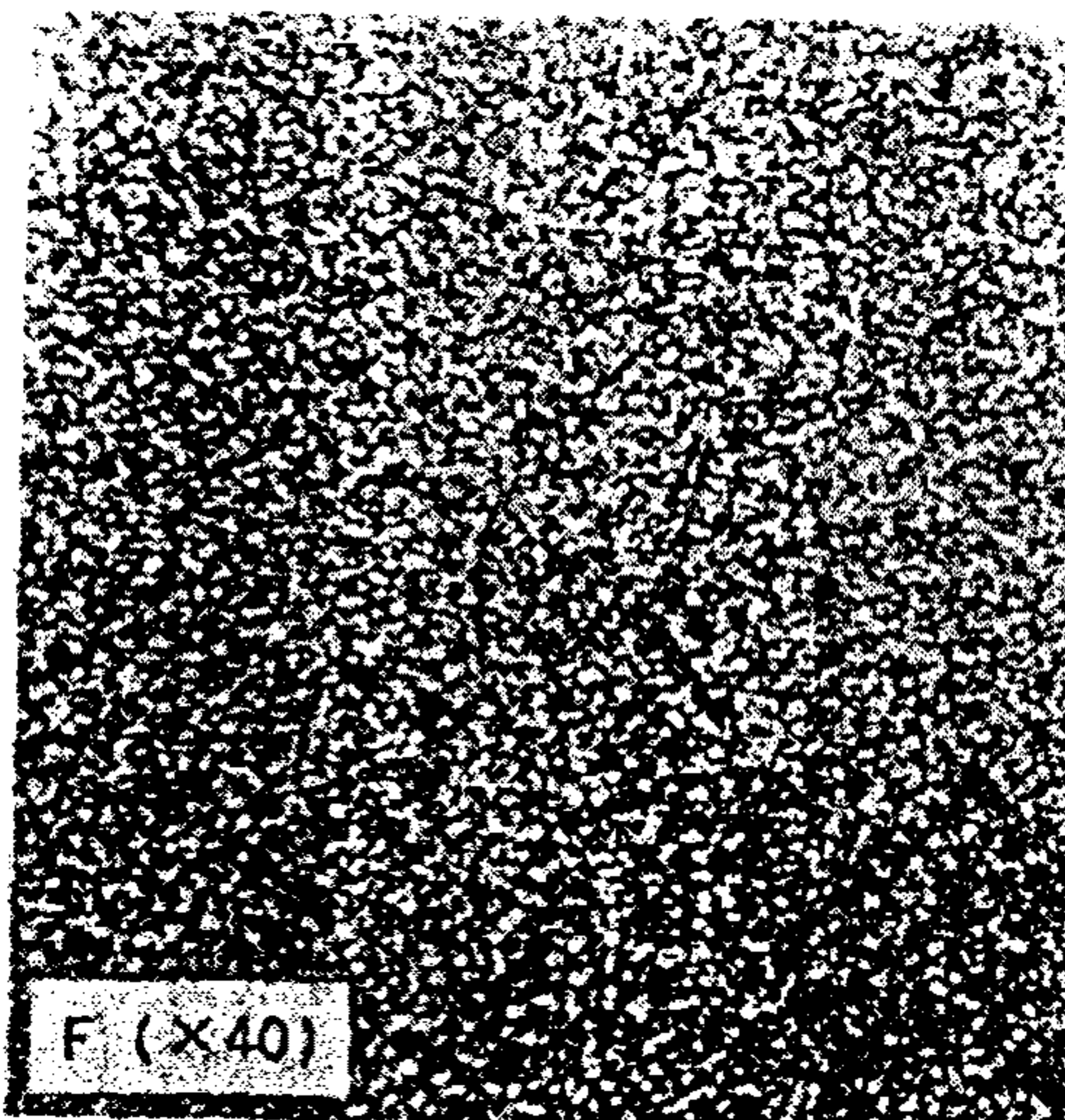
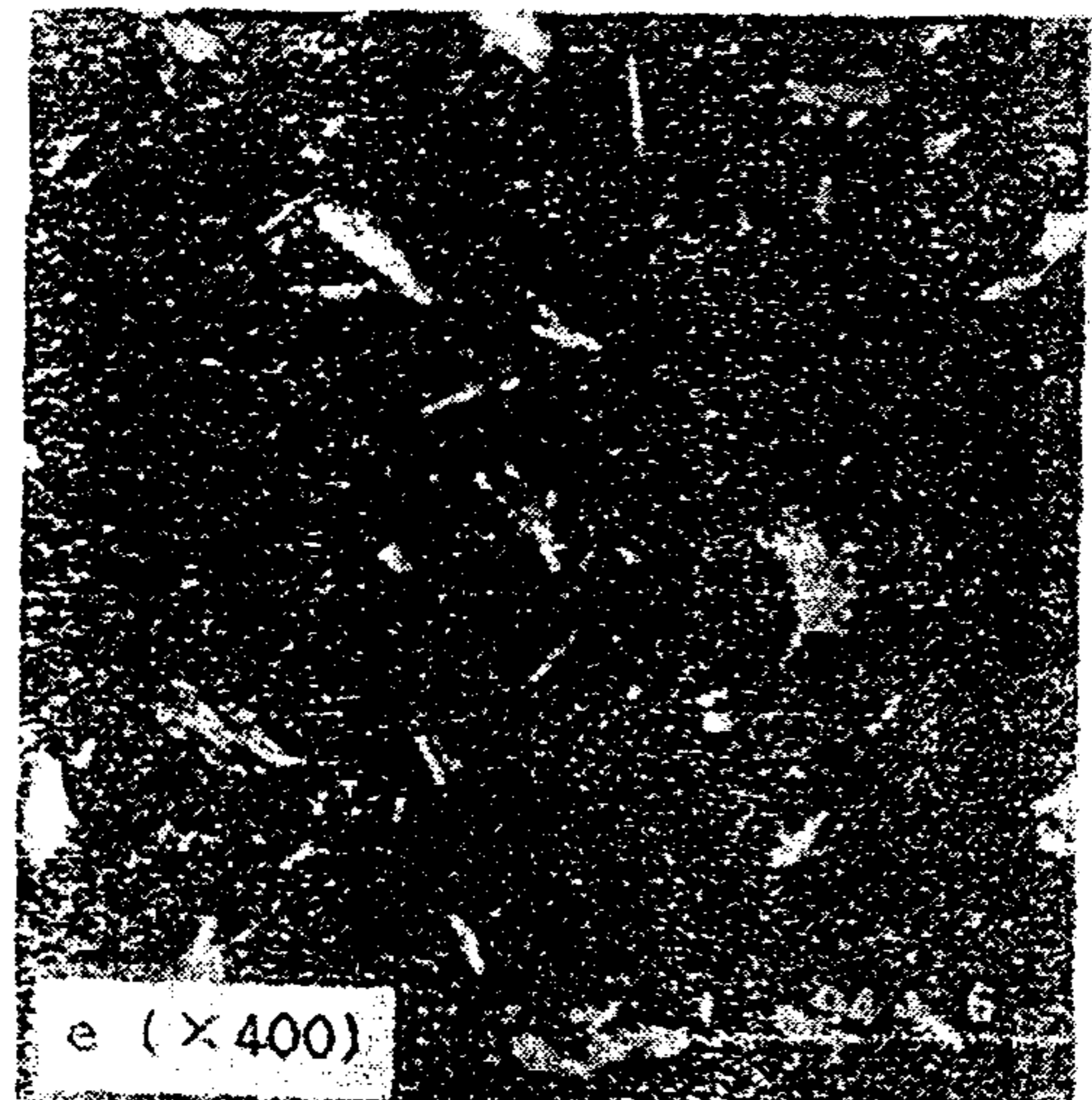
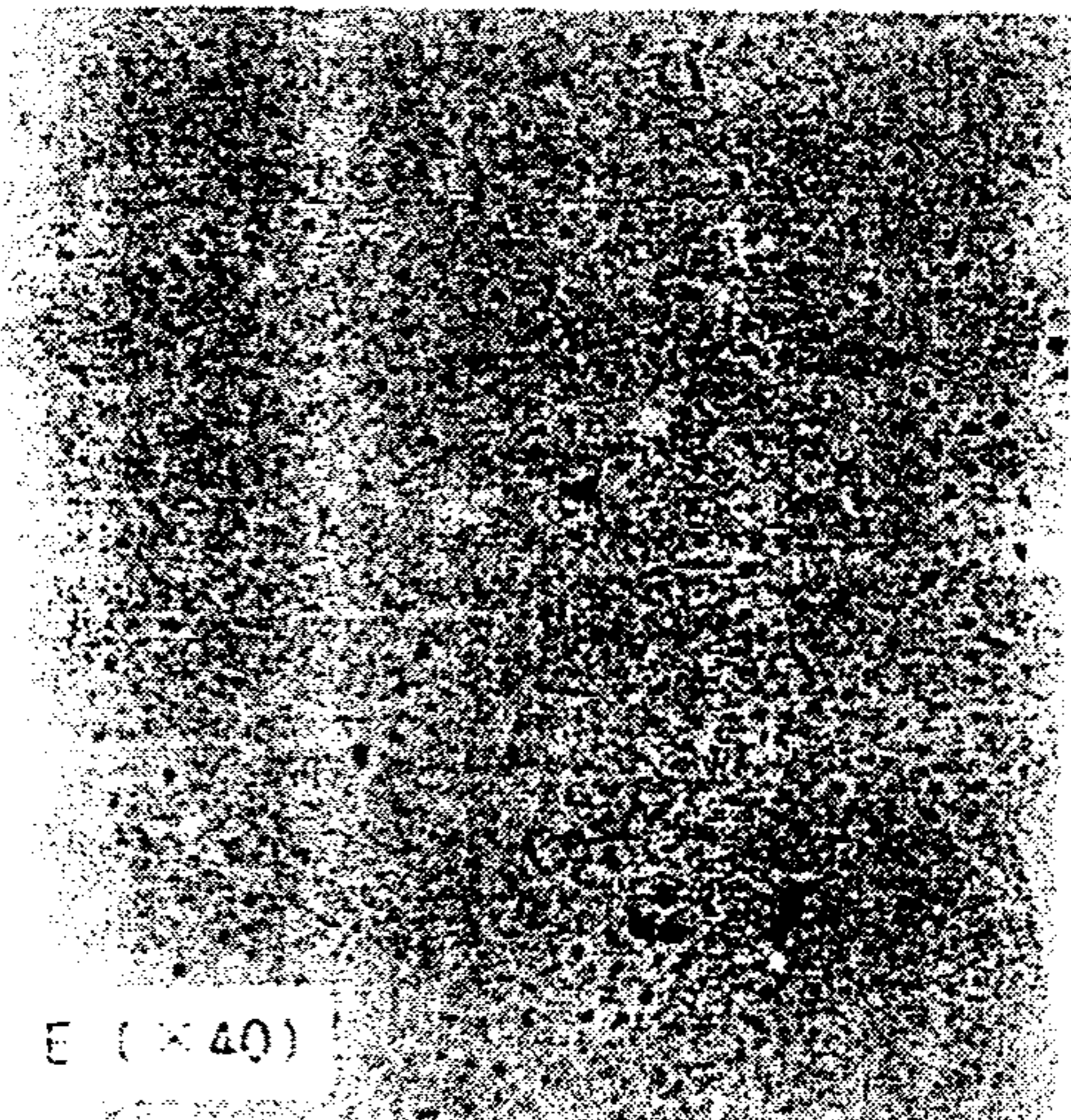
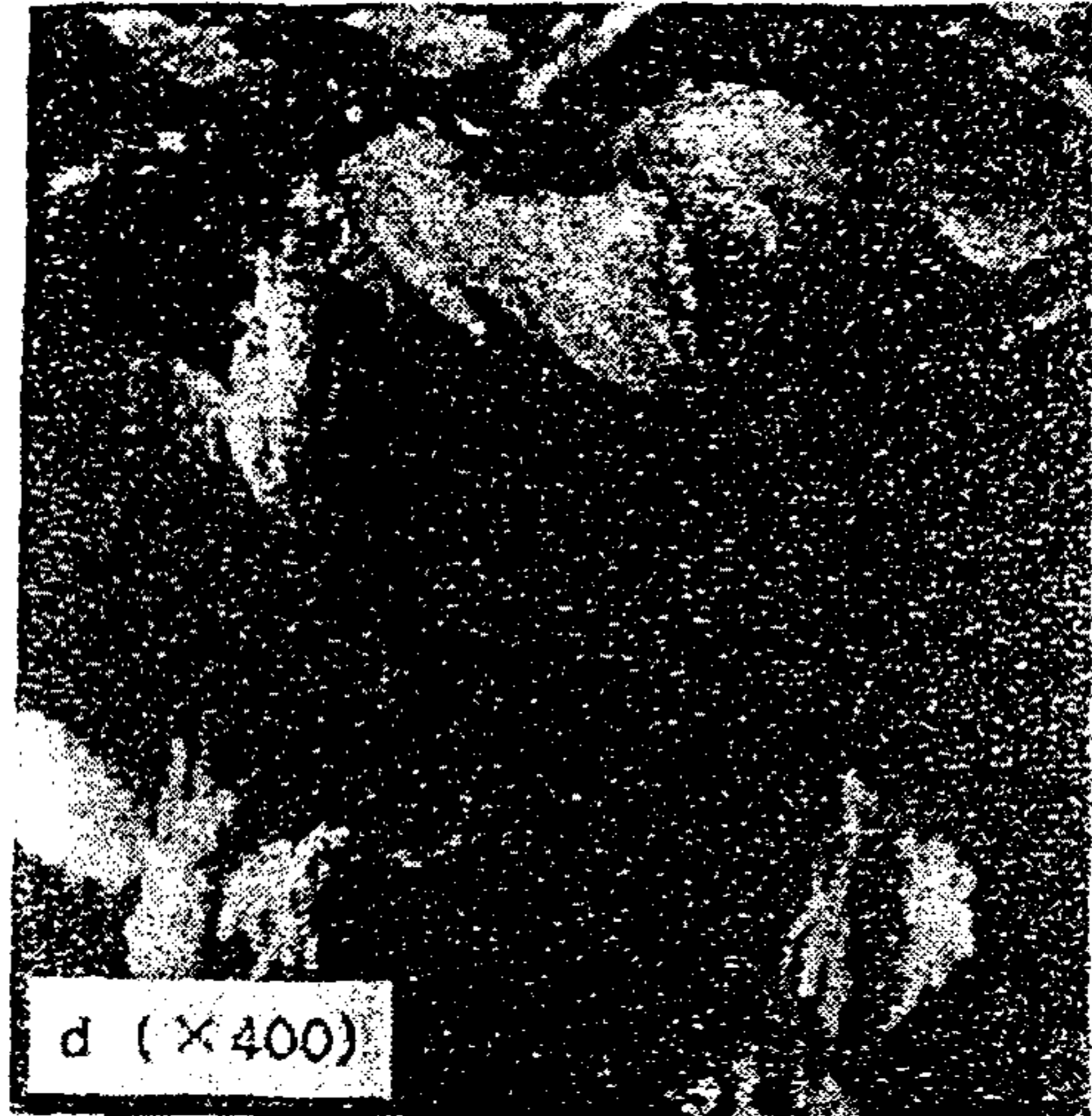
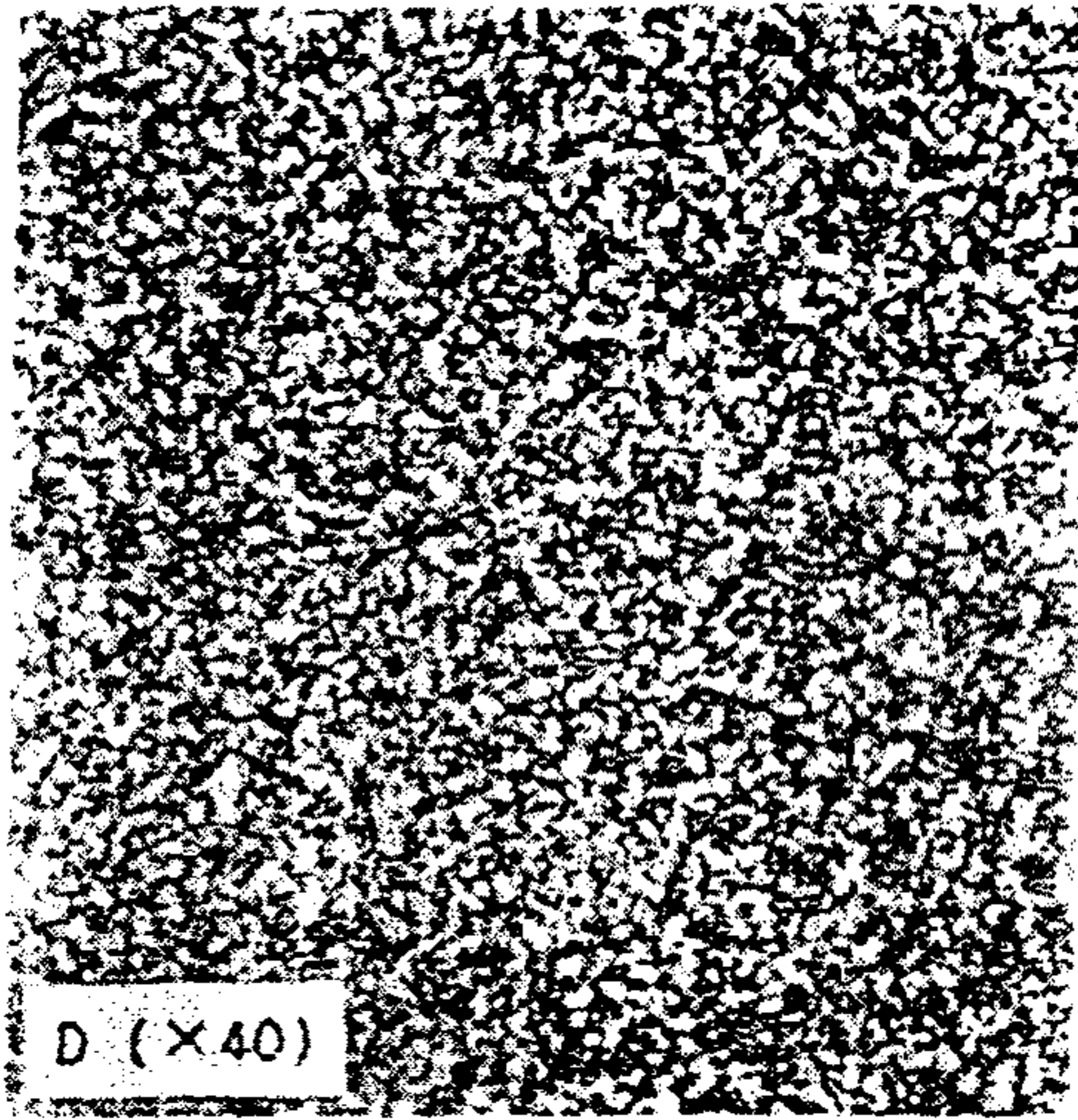


Fig. 22. Photomicrographs of fractionated milk fat-cocoa butter mixtures.

A,B,C,D,E,F : tempering in 26°C/40hr

a,b,c,d,e,f : stabilized sample A,B,C,D,E,F in 20°C/10days

A, a : 100% cocoa butter

B. b : 15% anhydrous milk fat(AMF)+75% cocoa butter

C. c : 30% low melting fractions(LMF)+70% cocoa butter

D. d : 30% medium melting fractions(MMF2)+80% cocoa butter

E. e : 25% medium melting fractions(MMF1)+75% cocoa butter

F. f : 15% high melting fractions(HMF)+85% cocoa butter

thermogram에서 나타난 결과를 토대로 thermogram이 유사한 첨가구들을 같은 군으로 분류하여 Table 11과 같이 14군으로 나누고, 12종에 대하여 관능검사를 실시하였다.

유지방 획분을 첨가하여 만든 초코렛의 관능검사에서 5% 및 10% 첨가구는 무첨가구에 비하여 경도가 강하고 딱시하며 부드럽지 못하기 때문에 거부하였으며, 첨가량이 증가될수록 경도는 약해지고 부드럽지 못하다고 하였다. 유지방 및 유지방 획분 함량이 15~25% 첨가구에서 입 안에서의 용융감(mouth feeling)이 대체로 좋은 것으로 나타났다. HMF를 제외한 나머지 첨가구에서 20% 및 25% AMF 첨가구와 MMF 첨가구는 경도가 약하고 부드러운 조직감을 느낄 수 있어 선호하였다. 이는 고체지 함량, melting thermogram, 결정 형태 등의 관찰에 나타난 결과와 대체로 일치하는 것이다.

Table 11. Comparision of melting thermogram patten of the mixture fractionated milk fat¹⁾ and cocoa butter.

Sieres no.	AMF	LMF	MMF2	MMF1	HMF
1	5%	-	5%,10%	-	-
2	10%	5%,10%	-	5%,10%,15%	5%
3	15%	15%,20%	15%,20%,25%	-	10%
4	20%	-	-	-	-
5	25%	-	-	-	-
6	30%	-	-	-	-
7	-	25%	-	-	-
8	-	30%	-	-	-
9	-	-	-	20%	-
10	-	-	-	25%	-
11	-	-	-	-	15%
12	-	-	-	-	20%
13	-	-	-	30%	25%
14	-	-	30%	-	30%

1) : Refer to table 4.

% : concentration of fractionated milk fat added to cocoa butter.

Table 12. Sensory evaluation¹⁾ on several characteristics of chocolate made with fractionated milk fat-cocoa butter mixtures.

Concentration of milk fat(%)		Hardness	Coolness	Waxyiness	Smoothness	Brittleness	Accepability
AMF	5	0.54	-0.46	0.77	-0.32	0.62	-0.16
"	10	0.12	0.03	0.52	0.18	0.48	0.03
"	15	-0.69	0.15	0.38	0.38	0.46	0.50
"	20	-1.30	0.38	0.04	0.42	-0.33	0.82
"	25	-1.08	0.04	-0.15	0.62	0.31	0.42
"	30	-1.77	-0.15	0.27	-0.07	-1.08	-0.15
MMF2	30	-1.54	-0.88	-0.23	-0.38	-0.69	0.15
MMF1	20	-1.05	0.38	-0.04	0.25	0.00	0.61
"	25	-1.54	0.08	0.58	0.25	-0.42	0.67
HMF	15	-0.50	0.25	-0.17	-0.08	-0.50	-0.08
"	20	-1.77	-0.15	-0.27	-1.08	-0.07	-0.15
LMF	25	-1.46	-0.77	0.19	-1.27	-0.19	-0.15

1) : evaluated average score by scoring method

IV. 요약

코코아 버터의 용융 특성에 미치는 유지방의 영향을 검토하기 위하여 용융 결정법(melt crystallization)으로 4가지 유지방 분획을 얻은 후, 각 분획의 이화학적 성질, 고체지함량, 결정형태, melting thermogram을 관찰하였으며, 이들 유지방 분획이 첨가된 코코아 버터의 melting behavior 변화를 조사하였다.

1. 유지방 획분의 용점은 6.5-40.6℃로 나타났으며, HMF, MMF1, MMF2, LMF 및 AMF의 용점은 각각 40.6℃, 37.4℃, 33.5℃, 6.5℃ 및 31.2℃ 였다. 코코아 버터의 용점은 33.3℃ 였다.

2. HMF, MMF1, MMF2, LMF 및 AMF의 포화지방산은 각각 74.83%, 68.71%, 64.97%, 45.0% 및 61.46% 였다. 유지방 획분의 용점이 낮을수록 고급지방산(C16-C18) 함량은 감소하였다. AMF의 포화 지방산 함량은 33.89%였고, LMF의 포화 지방산은 50.83%였다. 트리글리세라이드 조성에서 유지방 획분의 용점이 낮을수록 장쇄 트리글리세라이드(C48-C54) 함량은 감소한 반면에 단쇄 및 중쇄 트리글리세라이드는 증가하였다.

3. 유지방 획분을 코코아 버터에 첨가된 경우의 고체지 함량(SFC)의 변화는 HMF 15% 첨가구에서 뚜렷하게 나타났다. 혼합유에 대한 isothermal diagram 관찰에서 AMF 및 LMF 첨가구 0-30% 모두에서 연화효과가 나타났으며, HMF 15%, MMF1 30% 그리고 MMF2 25% 첨가구에서 공동작용이 나타났다.

4. 이들의 DSC thermogram에서 peak는 13.02-19.75℃, 32.95-36.77℃ 범위로 2개의 용융부가 나타났다. 유지방 첨가량이 증가할수록 고온부의 흡열량이 점차

감소하였으며, LMF 첨가구에서 고온부의 흡열 정점온도가 다소 상승하였다. HMF는 20%, MMF는 25% 그리고 AMF는 30% 첨가구에서 용융거동에 큰 변화를 보인 반면에 코코아 버터에 0-20% MMF1, AMF 및 LMF 첨가시에 용융 거동에 변화가 적었다.

5. 현미경에 의한 결정형태 관찰에서 첨가량이 증가할수록 침상형이 관찰되었다. LMF는 모든 첨가구에서 원구형이 관찰되어 코코아 버터의 결정 형태에 영향을 미치지 않았다. 15% HMF, 25% MMF1 그리고 20% AMF 첨가구에서는 침상이 관찰되어 결정 형성에 영향을 주는 인자로 파악되었다.

6. 유지방이 첨가된 초코렛의 관능검사에서 유지방의 획분의 첨가량이 증가할수록 연화되었으며, 특히 5% 및 10% 첨가구에서 딱딱하고 왁시하였다. HMF첨가구를 제외한 15~20% MMF, AMF 및 LMF 첨가구가 대체로 부드럽게 녹아 입 안에서의 용융거동이 좋다는 결론을 얻었다.

7. 결론적으로, 유지방이 코코아 버터에 첨가될 경우 용융거동의 변화는 15~25% 첨가구에서 나타났다. HMF, MMF는 공용작용에 의하여 연화되는 반면에 LMF와 AMF는 dilution효과에 의하여 연화되는 경향을 보였다. 한편 HMF를 제외한 유지방 획분의 첨가로(15~20%) 입안에서의 용융감이 부드럽게 개선되는 효과가 있는 것으로 나타났다. 이는 고용점 글리세라이드 함량이 높은 HMF가 코코아 버터의 결정 형성을 간섭하는 인자로 작용하여 용융거동에 영향을 미치는 반면에 저용점 글리세라이드 함량이 높은 LMF는 결정 형성을 지연시킴으로써 연화를 일으키는 영향 인자로 작용하기 때문으로 여겨진다.

V. 참고문헌

1. Minifie, B.W. : Cocoa and chocolate. In *chocolate, cocoa and confectionery: science and technology*, 3rd ed., AVI Publishing Co. Inc., Westport, 1(1989)
2. Dimick, P.S.: Principles of C.B. crystallization. *Manuf. Conf.*, 51(5), 109(1991)
3. Weiss, T.Y. : Commercial oil and sources. In *Food Oils and Theirs Uses*, 2nd ed., AVI Publishing Co.Inc., Westport, 51(1983)
4. Chalseri, S. and Dimick, P.S. : Cocoa butter-its composition and properties. *Manuf. Conf.*, 9, 115-122(1987)
5. Hachiya : チョコレートの物性と品質. *油脂*, 42(6), 50-57(1989)
6. Dimick, P.S. and Davis, T.R. : Solidification of cocoa butter. *40th Pensilvanisa Manufacturing Confectioners' Assoc.*, 45, 104(1986)
7. Jewell, G.G. : Factors influencing the crystallization of chocolate. *35th Pensilvanisa Manufacturing Confectioners' Assoc.*, 35, 63-66(1981)
8. Cook, L.R.: In *chocolate production and use*, ed. by Cook, L.R., rev. by Meursing, E.H., H.B.J. Inc., New York, 401-423(1982)
9. Chapman, G.M., Akehurst, E.E. and Wright, W.B. : C.B and confectionery fats. studies using programmed temperature X-ray diffraction and DSC. *J. Am. oil Chem. Soc.*, 48, 824(1971)
10. Wille, R.L. and Lutton, E.S.: Polymorphism of Cocoa butter. *J. Am. oil Chem. Soc.*, 43, 491(1966)
11. Manning, D.M. and Dimick, P.S.: Cocoa butter crystallization studies. *35th Pensilvanisa Manufacturing Confectioners' Assoc.*, 35, 56(1981)
12. Dimick, P.S. and Manning, D.M.: Thermal and compositional properties of cocoa butter during static crystallization. *J. Am. oil Chem. Soc.*, 64(12), 1663(1987)
13. Timms, R.E.: Polymorphism & properties behavior of fats. *talk given at SCI Teach-in.Feb*, 19-20(1987)

14. Bigalli, G.L. : Practical aspects of the eutectic effect. 42nd *Pensilvanisa Manufacturing Confectioners' Assoc.*, 42, 66-71(1988)
15. Hogenbirk, G. : The influence of milk fat on the crystallization properties cocoa butter and cocoa butter alternatives. *Manuf. Conf.*, 50(5), 133-140 (1990)
16. Jeffery, M.S.: The effect of cocoa butter origin, milk fat and lecithin level on the temperability of cocoa butter systems. *Manuf. Conf.*, 51(5), 76(1991)
17. Gilmore, T.M.: Milk and milk derived productions. 42th *Pensilvania Manufacturing Confectioners' Assoc.*, 42, 89-94(1988)
18. Edwards, W.P.: Uses for dairy ingredients in confectionery. *J. Soc. Dairy Technol.*, 37(4), 122-125(1984)
19. De Man, J.M.: In *principles of food chemistry*, AVI Publ. Cong. 38 (1976)
20. Timms, R.E.: Phase behavior of fats and their mixtures. *Progress in Lip. Res.*, 23, 1-38(1984)
21. Timms, R.E.: The phase behavior of mixtures of cocoa butter and milk fat. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 13, 61-65(1980)
22. Nickless, N. and Sidaway, A.F. : Fats and oils : chemistry and technology, ch. 8 , London. (1980)
23. Shukla, V.K.S.: Studies on the crystallization behavior of C.B.E. by pulse NMR-part I. *Fat Sci. Aus.*, 12, 467-471(1983)
24. Shukla, V.K.S.: Confectionery fat. In *edible fats and oils processing : basic principles and modern practices*, ed. by Erickson, D., *J. Am. oil Chem. Soc.*, 2281(1990)
25. Petersson, B. : Pulsed NMR method for solid fat content(part II). *Fette Sei. Anst.*, 4, 128-136(1986)
26. Barna, C.M., Hortel, R.U. and Metin, S.: Incorporation of milk fat fraction into milk chocolate. *Manuf. Conf.*, 52(6), 107-116(1992)

27. Hogenbirk, G.: Compatibilities of speciality fats with cocoa butter. *38th Pensilvanisa Manufacturing Confectioners' Assoc.*, 38, 116-121(1984)
28. Paulicka, F.R.: Phase behavior of fats in confectionery coatings. *Chem. Ind (London)*, 835-839 (1973)
29. Amer, M.A., Kupranycz, D.B. and Baker, B.E.: Physical and chemical characteristics of butter fractions obtained by crystallization from molten fat. *J. Am. oil Chem. Soc.*, 62(11), 1551(1985)
30. Schaap, J.E., Baddings, H.T., Schmidt, D.G. and Frede, E.: Difference in butter fat crystals, crystallizes from acetone and from the melt. *Neth Milk Dairy J.*, 29, 242(1975)
31. De Man, J.M.: Physical properties of milk fat(part II). *J. Dairy Res.*, 28, 17-122(1961)
32. A.O.C.S. : In *official and tentative methods of american oil chemicals' society*, 3rd ed., Champaign, IL, (1973)
33. Morrison, W.R. and Smith, S.M.: Preparation of fatty acid methyl-esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol, *J. Lipid Res.*, 5, 600(1964)
34. IUPAC : In *standard methods of for the analysis of oils, fats and derivatives*, 7th ed. by the International Union Pure and Applied Chemistry, ed. by Paquot, C. and Hauttfence, A., Blackwell Scientific Publications, London, 59(1987)
35. A.O.C.S. : In *official and tentative methods of amer. oil chemicals society*, 4th ed., Champaign, IL, method Cd 16-81, (1989)
36. Kankare, V.: *Meijeritieteellinen Aikakauskirja*, 33(2), (1974)
37. Fjearvoll, A.: Anhydrous milk fat fractionation. *Dairy Ind.*, 35(8), 502 (1970)
38. Sherbon, J.W.: Crystallization and fractionation of milk fat, Presented at the AOCS 46th annual fall meeting, Sep. 1972. *J. Am. oil Chem. Soc.*, 51, 22-25(1974)

39. Antilla, V.: The fractionation of milk fat. *Milk Industry*, 81(8), 17(1979)
40. Sherbon, J.W., Dolby, R.M. and Rossell, R.W.: Preparation and fractionation of the high melting glyceride fraction of milk fat. *J. Dairy Sci.*, 56(1), 52(1973)
41. Walstra, P.: Fat crystallization. In *food structure and behavior*, ed. by Blanshard, J.M.V., A.P., 67(1987)
42. Timms, R.E.: The phase behavior and polymorphism of milk fat, milk fat fraction and fully hardened milk fat. *Aus. J. Dairy Technol.*, 35, 47-53(1980)
43. De Man, J.M.: In *Dairy lipids and lipid metabolism*, ed. by Bricnk, M.F., AVI Publ., Westport, Comm., 15-27(1968)
44. Woodrow, I.L. and de Man, J.M.: Polymorphism in milk fat shown by X-ray diffraction in infrared spectroscopy. *J. Dairy Sci.*, 51, 996(1968)
45. Sonntag, N.O.V.: In *Bailey's industrial oil and products, V.I.*, ed. by Formo, N.W., Jungermann, E. and Norris, F.A., John Wiley & Sonn Inc., New York, 301(1979)
46. Padley, F.B., Gunstone, F.D. and Harwood, J.L.: Occurrence and characteristics of oils and fats. In *the lipid handbook*, ed. by Gunstone, F.D., Harward, J.L. and Padley, F.B., 49(1986)
47. Bhaskar, A.R., Rizvi, S.S.H. and Sherbon, J.W.: Anhydrous milk fat fractionation with continuous countercurrent supercritical carbon dioxide. *J. of Food Sci.*, 58(4), 748(1993)
48. Jebson, R.S.: *The use of fractions of milk fat in chocolate*. Brief Communication, XIX, Dairy Congr., IE, 761(1974)
49. Parodi, P.W.: *Aust. J. Dairy Technol.*, 29, 20(1974)
50. Timms, R.E. and Parekh, K.H.: The possibilities for using hydrogenated, fractionated, or interesterified milk fat in chocolate. *Lebensm. Wiss. U. Tech.*, 13, 177-181(1980)
51. Vaeck, S.V.: Cocoa butter and fot bloom. *Manuf. conf.*, 40(6), 35(1960)

제1차년도
최종보고서

당지질계 생물고분자 유화제 생산 미생물의 탐색

(위탁과제명)

A Study on the Screening of Microorganisms for
the production of Lipopolysaccharide Emulsifier

연구기관
한 국 과 학 기 술 원

과 학 기 술 처

여 백

1. 서 론

오늘날 사용되고 있는 계면활성제는 거의 모두가 화학적 합성방법으로 생산되고 있으며, 상당 부분이 독성이 있거나 난분해성때문에 환경오염의 원인이 되고 있다. 또한 일련의 합성과정과 분리, 정제 과정중에 유독화합물을 사용하게 되거나 반응단계가 많아지므로 해서 가격이 상승하게 된다. 이러한 합성 계면활성제의 문제점을 해결하고자 미생물이 생산하는 계면활성제를 탐색하게 되었다. 미생물이 만드는 계면활성제는 glycolipid계, phospholipid 혹은 지방산계, lipopeptide 혹은 lipoprotein계, 고분자 계면활성제 및 particulate 계면활성제 등으로 분류될 수 있으며, 지금까지 비교적 잘 연구된 미생물 유래의 계면활성제 종류는 표1과 같다.

본 연구의 1차년도에는 식품공업, 의약품 공업, 화장품공업, 농업 및 일반 화학공업에서 사용될 수 있는 새로운 미생물 유래의 다양한 생물계면활성제(biosurfactant)를 탐색하고자 목적하였다. 앞으로 본 연구를 통해서 선발된 미생물을 이용하여 biosurfactant 생산조건의 최적화, biosurfactant의 화학구조 및 물리, 화학적 성질, biosurfactant의 생리적 기능, biosurfactant합성에 관련된 유전자 및 효소 연구를 통한 생합성 경로의 규명, biosurfactant의 생물학적 modification등의 연구를 계속적으로 추진 하고자 한다. 이러한 연구를 통하여 새로운 기능과 성질을 갖는 biosurfactant를 개발해 내는데 본 연구의 최종적인 목적이 있다.

2. 재료 및 방법

1) Biosurfactant 생산 미생물의 분리

우리나라 전역에서 수집한 토양, 해수, 담수, 공장폐수, 두엄, 잎사귀 등 총 100여점의 시료를 사용하여 biosurfactant 생산 미생물을 분리하였

다. 시료를 멸균 증류수에 현탁시킨 후, 현탁액을 고농도(50%, v/v) Bunker-C유가 함유된 EB액체배지(표 2)에 접종하여 25°C, 200rpm 조건하에서 5일간 배양하였다. 1차배양 후 새로운 EB배지로 옮겨 반복해서 enrichment배양을 하였다. 2차배양 후 10⁴, 10⁵, 10⁶ 배율로 희석한 배양액을 MA한천배지(표 2)에 도말하고 25°C에 incubation하여 콜로니를 형성시켰다. 콜로니를 MA 한천배지에 다시 streaking하여 콜로니를 순수분리한 후 실험에 사용하였다. 분리균주는 균체를 15% glycerol용액에 현탁시킨 후 -70°C에 보관하였다.

표 1. 미생물이 생산하는 주된 biosurfactants(36).

Biosurfactants 종류	생산 미생물
A. Glycolipids	
Trehalose mycolates	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Arthrobacter paraffineus</i>
Trehalose esters	<i>Mycobacterium phlei</i> <i>Mycobacterium fortitum</i> <i>Micromonospora spp.</i> <i>Microbacterium smegmatis</i> <i>Microbacterium paraffinicum</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Mycolates of mono-, di-, and trisaccharide	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Microbacterium smegmatis</i> <i>Arthrobacter spp.</i>
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas spp.</i>
Sophorolipids	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Torulopsis apicola</i>

B. Phospholipids and Fatty Acids

Phospholipid and fatty acid	<i>Candida spp.</i> <i>Corynebacterium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Acinetobacter spp.</i>
Phospholipids	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> <i>Aspergillus spp.</i>

C. Lipopeptides and Lipoproteins

Gramicidins	<i>Bacillus brevis</i>
Polymyxins	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ornithine-lipid	<i>Pseudomonas rubescens</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Cerilipin	<i>Gluconobacter cerinus</i>
Lysin-lipid	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i>
Surfactin, subtilysin	<i>Bacillus subtilis</i>
Peptide-lipid	<i>Bacillus licheniformis</i>

D. Polymeric Surfactants

Lipoheteropolysaccharide	<i>Arthrobacter calcoaceticus RAG-1</i>
Heteropolysaccharide	<i>A. calcoaceticus A2</i>
Polysaccharide-protein	<i>A. calcoaceticus strains</i> <i>Candida lipolytica</i>
Manno-protein	<i>S. cerevisiae</i>
Carbohydrate-protein	<i>Candida petrophilium</i> <i>Endomycopsis lipolytica</i>
Mannan-lipid complex	<i>Candida tropicalis</i>
Mannose/erythrose-lipid	<i>Shizonella melanogramma</i> <i>Ustilago maydis</i>
Carbohydrate-protein-lipid complex	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Debaryomyces polymorpha</i>

E. Particulate Biosurfactants

Membrane vesicles	<i>Acinetobacter sp.</i> H01-N
Fimbriae	<i>A. calcoaceticus</i>
Whole cells	Variety of microbes

표 2. Biosurfactant 생산 미생물 분리배지.

Enrichment 액체배지(EB)		Single colony 분리 한천배지(MA)	
NH ₄ (SO ₄) ₂	0.50	Bacto-peptone	0.5
K ₂ HPO ₄	0.25	Yeast extract	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.10	Ferric citrate	0.01
Corn steep liquor	0.10	NH ₄ NO ₃	1.6mg/l
Bunker-C oil	Ca. 50	Na ₂ HPO ₄	8.0mg/l
pH	7.5	NaCl	2.0
		Agar	1.5
		pH	7.5

(단위; % (W/V))

2) 분리균주의 emulsifying activity 측정

분리균주를 50ml ETP배지(표 3)에 접종하고 25°C , 200rpm 조건에서 3일 배양한 후 7,000rpm에서 10분간 원심분리하여 배양 상등액을 얻었다.

Emulsifying activity는 배양 상등액을 이용하여 Zuckerberg 등(22)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 100ml Erlenmeyer flask에 hexadecane : 2-methynaphthalene (1:1, V / V) 100 μ l, 100mM Tris-HCl-20mM MgSO₄ 완충용액(pH 7.4) 3.75ml, 적당량의 배양 상등액을 넣고 증류수를 첨가하여 최종부피를 7.5ml로 맞추고 혼합액을 26 $^{\circ}$ C, 150strokes/min(Eyela shaking water bath, Model NT-1300, Tokyo) 조건에서 1시간 교반시킨 후 600nm 에서 흡광도를 측정하였다. Emulsifying activity는 위와 같은 실험 조건하에서 흡광도를 0.1 단위 증가시키는 배양상등액의 양을 1unit(U)로 정의하였다. 분리균주들의 emulsifying activity를 측정하기 위해서 통상 배양 상등액 3ml을 이용하여 측정하였으며 활성이 높은 균주의 경우 1ml , 500 μ l , 100 μ l 등의 배양 상등액을 이용하여 활성을 측정하였다. 분리균주들의 emulsifying activity는 배양액 ml당 emulsifying activity units로 표시하여 비교하였다.

표 3. Biosurfactant 생산을 위한 ETP 배지 성분.

성분	함량(% , W / V)
Paraffin	1.0
Glucose	0.05
Yeast extract	1.0
Tryptone	0.5
KH ₂ PO ₄	0.05
K ₂ HPO ₄	0.1
CaCl ₂	0.001
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0.001
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.001
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001
pH	7.5

3) 분리균주의 동정

Emulsifying activity가 높은 20종의 분리균주를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(37) 방법에 따라 동정하였다. 또한 API kit(Analytical Products, New York)를 이용하여 균의 당 이용성, 생화학적 특성 등을 조사하여 분리균주의 동정에 활용하였다.

4) Biosurfactant의 추출

분리균주가 생산하는 biosurfactant를 배양 상등액으로부터 순수분리하기 위해서 먼저 용매 추출법을 사용하였다. 배양 상등액을 동결건조기로 농축시킨 후 chloroform : methanol(2:1, V/V) 용액으로 추출하였다. 하층부의 chloroform층으로 추출된 biosurfactant를 rotary evaporator를 이용하여 40°C에서 용매를 증발시킨 후, 남은 물질을 증류수에 녹여 emulsifying activity를 조사하였다.

5) 분리균주 *Pseudomonas fluorescens* SF-25균주의 genomic library제조

본 연구에서 emulsifying activity가 높은 균으로 선발된 *P. fluorescens* SF-25 균주로부터 biosurfactant합성에 관련된 유전자를 클로닝하기 위해서 genomic library를 제조하였다. 먼저 *P. fluorescens* SF-25균주의 chromosomal DNA를 분리하고 Sau3AI 제한효소로 부분분해한 후 20~28kb 범위의 DNA fragments를 electroelution하였다. Vector로서 cosmid pLARF3를 사용하였으며, pLARF3를 BamHI으로 완전분해시키고 calf-intestinal alkaline phosphatase(CIAP)를 처리한 후 chromosomal DNA fragments와 ligation시켰다. Ligated DNA를 in-vitro package시킨 후 *E. coli*에 transduction시켜 genomic library를 만들었다. *E. coli* transformant로부터

recombinant plasmid를 triparental conjugation방법으로 *Pseudomonas putida*(biosurfactant- negative strain)균주로 옮겨 biosurfactant 생산 유전자를 screening하고자 하였다.

3. 결과 및 고찰

1) Biosurfactant생산 미생물의 탐색

전국에서 수집한 100점의 시료로부터 100종의 미생물을 순수분리하여 보관하였다. 분리균주를 탄소원으로서 1% paraffin oil과 0.05% 포도당이 함유된 ETP액체배지와 ETP배지의 paraffin oil 대신에 1%포도당이 첨가된 ETG배지에 접종하여 25°C, 200rpm조건으로 3일간 진탕배양한 후 배양 상등액의 emulsifying activity를 조사하였다. 활성이 높은 대표적인 분리균주의 emulsifying activity는 표 4와 같았다. 표 4에서 보는 바와 같이 분리균주 SF-25의 경우 탄소원으로서 포도당을 사용한 배지에서나 paraffin oil을 사용한 배지에서 공히 높은 emulsifying activity를 보였다. 그러나 분리균주 SF-46, SF-49, SF-51등의 경우는 포도당 배지에서 paraffin oil배지보다 높은 emulsifying activity를 나타내었으며, 반대로 분리균주 SF-63, SF-73, SF-75, SF-93 등의 경우는 paraffin oil배지에서 포도당 배지보다 높은 활성을 보였다. Specific emulsifying activity($(\mu/m^2) \div \text{cell growth}(\text{Abs.600nm})$) 에서도 위와 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 분리균주에 따라 각기 다른 탄소원에서 emulsifying activity가 높게 나타난 것은 미생물이 생산하는 emulsifying agent의 생리적 역할이 다르기 때문으로 추정된다. 즉, paraffin oil 배지에서 높은 emulsifying activity를 보이는 미생물은 불용성 기질을 녹여 세포가 흡수하기 쉬운 상태로 만들기 위해서 emulsifying agent를 만드는 것으로 생각된다. 그러나 포도당 배지에서 높은 emulsifying activity를 보이는 미생물의 경우는 이와는 달리 다

른 생리적 필요성에 때문에 생산되는 것으로 보이나 이 부분에 관해서는 더 많은 연구가 필요한 것으로 생각된다.

표 4. 대표적인 분리균주들의 emulsifying activity 비교.

분리 균주명	Cell growth (Abs.600nm)		Emulsifying activity(U/ml)		Specific emulsifying activity(U/Abs.600nm/ml)		분리 시료명
	ETP	ETG	ETP	ETG	ETP	ETG	
SF-11	9.70	1.77	5.5	4.9	0.57	2.77	석유유출하수
SF-13	4.58	2.34	11.5	0.6	2.51	0.26	석유유출 흙
SF-25	3.32	12.13	38.8	67.8	11.69	5.59	꽃
SF-46	4.57	17.13	3.1	51.1	0.68	2.98	꽃
SF-49	6.57	7.12	6.1	32.3	0.93	4.54	나뭇잎
SF-51	3.48	2.93	0.3	15.6	0.09	5.32	콩잎
SF-63	4.86	3.18	18.7	3.9	3.85	1.23	양조장폐기물
SF-73	4.28	2.64	9.8	1.8	2.29	0.68	두엄
SF-75	10.66	2.19	11.9	1.5	1.12	4.34	밭토양
SF-88	5.42	1.45	0.5	2.3	0.09	1.59	공단폐수
SF-93	3.03	3.14	16.2	1.3	5.35	0.41	나뭇잎
SF-99	9.51	25.21	1.7	3.0	0.18	0.12	꽃
SF-390	2.44	1.11	0.1	0.6	0.04	0.54	폐수 슬러지

2) 분리균주의 동정

표 4에 나타낸 대표적 biosurfactant 생산균주들을 동정하였다. 미생물학적, 생화학적 검사결과는 표 5와 표 6과 같았다. 이상을 결과로부터 분리균주들을 표 7과 같이 동정할 수 있었다. 대표적인 분리균주들은 *Acinetobacter haemolyticus*가 6종, *Pseudomonas fluorescens*가 2종, *Pseudomonas putida*가 2종, *Bacillus*가 1종, *Agrobacterium radiobacter*가 1종, *Acinetobacter calcoaceticus*가 1종으로 나타났다.

지금까지 biosurfactant 생산균으로서 비교적 잘 연구된 것에는 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1, *Pseudomonas aerogenosa*, *Bacillus licheniformis* 등(표 1)이 있다. 본 연구에서 분리된 균주들도 지금까지 보고된 균주들과 유사한 균주들이 많았다. 본 연구에서는 paraffin oil 배지에서 보다 포도당 배지에서 biosurfactant 생산성이 높은 분리균주를 1차적 연구대상으로 하여 biosurfactant 생산 조건 및 biosurfactant의 분리, 정제 및 제 성질, 구조 결정 연구를 수행하기로 계획하고, 분리균주 중에서 보고된 균주와 비슷하지만 활성이 높은 *P. fluorescens* SF-25, *Bacillus* sp. SF-49를 비롯하여, 활성이 높으면서 지금까지 보고되지 않은 *Agrobacterium radiobacter* SF-51를 선발하고 다음 실험을 계속하였다.

표 5. 분리균주들의 미생물학적, 생화학적 특성.

No.	Gram stain	Nutrient agar		MacConkey agar		Cat.	Oxi.	OF	TSI	SIM			Citrate	PEA
		30°C	37°C	30°C	37°C					H ₂ S	Ind	Mo		
11	GNC	GG	GG		small	+	-	NR	K/NC	-				
13	GNC	GG	GG		small	+	-	NR	K/NC	-				
25	GPR	GG	0/24, 0/48	GG	0/24, 0/48	+	+	NR	37°CNG	-				
34	GPR	GG	pin point		small	+	+	NR	K/NC	-				
46	GPR	small	0/24, 0/48	small	0/24, 0/48	+	++						-	-
49	GPR	GG	GG		0/24, 0/48	+								
51	GNC	pin point	0/24, 0/48	GG	0/24, 0/48	+	-						-	-
63	GNC	GG	GG	GG	GG	+	-	OX	K/NC	-				
73	GNC	GG	GG		GG	±	-	NR	K/NC	-			+	-
75	GNC	GG	GG		GG	+	-	NR	K/NC	-			+	-
88	GNC	GG	GG		GG	+	-	OX	K/NC	-				
93	GNR	GG	GG		GG	+	±		K/NC	-				
95	GPR	pin point	0/24, 0/48	NG	0/24, 0/48	+								
99	GNR	GG	small		GG	+	++	NR	NG	-			-	-

Abbreviations: Cat, catalase; Oxi, oxidase; PEA, phenylalanine deaminase; GNC, gram negative cocci; GPR, gram positive rod; GG, good growth; 0/24, no growth within 24hr; 0/48, no growth within 48hr; small, less than 1mm; Ind, indole; Mo, motility; OF, oxidation and fermentation; OX, oxidative; NR, nonreactive; K/nc, alkaline slant and alkaline butt; SIM, sulfide-indole-motility medium; TSI, triple sugar iron agar.

표 6. API 20NE kit를 이용한 분리균주들의 생화학적 특성 검사.

No.	11	13	25	34	46	51	63	73	75	88	93	99	390
NO ₂	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU _f	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ESC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
PNC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GLU _a	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
ARA	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
MINE	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
MAN	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
NAG	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
MAL	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
GNT	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
CAP	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
ADI	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
PAC	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
OX	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-

Abbreviations: NO₂, nitrate reduction; TRP, tryptophane deaminase; GLU_f, glucose fermentation; ADH, arginine decarboxylase; URE, urease; ESC, esculin hydrolysis; GEL, gelatin hydrolysis; PNC, p-nitro-phenyl β-D-galactoside; GLU_a, glucose assimilation; ARA, arabinose assimilation; MINE, mannose assimilation; MAN, mannitol assimilation; NAG, N-acetyl glucosamine assimilation; MAL, maltose assimilation; GNT, gluconate assimilation; CAP, caprilate assimilation; ADI, adipate assimilation; MLT, malate assimilation; CIT, citrate assimilation; PAC, phenylacetate assimilation; OX, cytochrome oxidase.

표 7. 분리균주들의 동정 결과.

분리균주명	동정 결과
SF-11	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
SF-13	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
SF-25	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
SF-46	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
SF-49	<i>Bacillus</i> sp.
SF-51	<i>Agrobacterium radiobacter</i>
SF-63	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
SF-73	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
SF-75	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
SF-88	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>
SF-93	<i>Pseudomonas putida</i>
SF-99	<i>Pseudomonas putida</i>
SF-390	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

3) 배양시간에 따른 biosurfactant 생산 비교

분리균주 SF-25, SF-49, SF-51를 ETG 배지에서 배양하면서 배양시간에 따른 균체성장과 emulsifying activity를 조사하였다. 그림 1에서 보는 바와 같이 SF-51 분리균주가 가장 높은 emulsifying activity를 보였으며, 배양 24시간째 최고 35U/ml의 활성을 나타내었다. 다음으로 SF-25균주가 활성이 높았으며, 비교 균주로 사용한 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG1균주는 6U/ml의 낮은 활성을 보였다. RAG1 균주는 탄화수소, acetate, ethanol배지에서 biosurfactant생산성이 높은 균주로 보고되었는데, RAG1균주가 낮은 활성을 보인 것은 사용배지가 탄소원으로서 포도당을 함유한 ETG 배지를 사용하였기 때문으로 생각된다.

4) Biosurfactant의 추출

SF-25, SF-49, SF-51 배양액을 원심분리하여 상등액을 모아 용매 추출방법으로 biosurfactant를 추출하였다. Biosurfactant는 chloroform : methanol(2:1, V/V) 용액으로 추출하였을 때 하층부의 chloroform층에서 대부분의 biosurfactant가 추출되었으며, interface에서나 물층에서는 전혀 emulsifying activity가 발견되지 않았다. Heptane으로 추출하는 경우 상층부의 heptane층에서 biosurfactant가 추출되었으나 하층부의 물층에서도 여전히 상당량의 emulsifying activity가 발견되어 Heptane 추출방법으로는 biosurfactant를 완전히 추출할 수 없었다. 본 연구에서 선발한 3 균주 모두 동일한 추출양상을 보여 주었다. 현재 추출된 biosurfactant를 silica-column을 이용하여 분리, 정제 연구를 수행 중에 있다. 앞으로 silica-column으로 순수분리되지 않을 경우 preparative TLC방법으로 emulsifying activity를 보이는 물질을 순수분리하고자한다. Biosurfactant 물질이 순수분리되는 경우 화학적, 효소적 방법으로 물질의 구성성분, 물질의 구조 및 제 성질들을 연구하고자 한다.

5) *Pseudomonas fluorescens* SF-25의 genomic library제조와 biosurfactant 합성 유전자의 cloning 연구

Cosmid pLARF3를 이용하여 분리균주 *P. fluorescens* genomic library를 완성하였다. *E. coli*에서 약 20kb의 insert DNA가 pLARF3 plasmid에 들어있는 것을 확인하였다. Conjugation방법으로 *E. coli*에 들어있는 재조합 plasmid를 emulsifying활성이 없는 *P. putida*에 도입하였다. 현재 conjugation에 의해서 생겨난 *P. putida*를 이용하여 emulsifying activity를 조사하고 있다. 약 500~1000개의 transformants를 조사하는 경우 *E. coli*나 *P. putida*에서 biosurfactant생합성에 관련된 유전자를 찾을 수 있을 것으로 생각된다.

4. 참고문헌

1. 박중연, 박인식, 서근학, 홍용기. 해양세균 *Achromobacter* sp. M-1220 균주에 의한 Buncker-C 유의 유화. 한국산업미생물학회지 16:384-388(1988).
2. H. E. Reiling, U. Thanei-Wyss, L. H. Guerra-Santos, R. Hirt, O. Kappeli and A. Fiechter . Pilot Plant Production of Rhamnolipid Biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl. Environ. Microbiol.* 51:985-989(1986).
3. Catherine N. Mulligan, Georges Mahmoudides and Bernard F. Gibbs. The Influence of Phosphate Metabolism on Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. biotechnol.* 12:199-210(1989).
4. D. G. Cooper and D. A. Paddock. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis Bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:173-176(1984).
5. Adrian J. Cutler and Robley J. Light. Regulation of Hydroxydocosanoic Acid Sophoroside Production in *Candida bogoriensis* by the Levels of Glucose and Yeast Extract in the Growth Medium. *J. Biol. Chem.* 254:1944-1950(1978).
6. Takashi Iguchi, Isao Takeda and Hiroshi Ohsawa. Emulsifying Factor of Hydrocarbon Produced by a Hydrocarbon-Assimilating Yeast. *Agr. Biol. Chem.* 33:1657-1658(1969).
7. Michael C. Cirigliano and George M. Carman. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl.*

Environ. Microbiol. 50:846–850(1985).

8. Zu-Yi Li, Siegmund Lang, Fritz Wagner, Ludger Witte and Victor Wray. Formation and Identification of Interfacial-Active Glycolipids from Resting Microbial Cells. Appl. Environ. Microbiol. 48:610–617(1984).

9. Luis H. Guerra-Santos, Othmar Kappeli and Armin Fiechter. *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source. Appl. Environ. Microbiol. 48:301–305(1984).

10. Luis H. Guerra-Santos, Othmar Kappeli and Armin Fiechter. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:443–448(1986).

11. J. D. Walker and R. R. Colwell. Measuring the Potential Activity of Hydrocarbon-Degrading Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 31:189–197(1976).

12. Takeo Suzuki and Kiyoshi Ogawa. Transient Accumulation of Fatty Alcohols by *n*-Paraffin-grown Microorganism. Agr. Biol. Chem. 36:457–463(1972).

13. David G. Cooper and David A. Paddock. *Torulopsis petrophilum* and Surface Activity. Appl. Environ. Microbiol. 46:1426–1429(1983).

14. Axel Kretschmer, Hans Bock and Fritz Wagner. Chemical and Physical Characterization of Interfacial-Active Lipids from *Rhodococcus erythropolis*

Growth on n-Alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:864–870(1982).

15. Kenichi Hisatsuka, Tadaatsu Nakahara and Koichi Yamada. Protein-like Activator for n-Alkane Oxidation by *Pseudomonas aeruginosa* S₇B₁. *Agr. Biol. Chem.* 36:1361–1369(1972).

16. David G. Cooper, James E. Zajic and Donald F. Gerson. Production of Surface-Active Lipids by *Corynebacterium lepous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:4–10(1979).

17. Colin R. Macdonald, David G. Cooper and James E. Zajic. Surface-Active Lipids from *Nocardia erythropolis* Grown on Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:117–123(1981).

18. Peter Rapp, Hans Bock, Victor Wray and Fritz Wagner. Formation, Isolation and Characterization of Trehalose Dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* Grown on n-Alkanes. *J. Gen. Microbiol.* 115:491–503(1979).

19. Ken-ichi Hisatsuka, Tadaatsu Nakahara, Noritoshi Sano and Koichi Yamada. Formation of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its Function in Hydrocarbon fermentation. *Agr. Biol. Chem.* 35:686–692(1971).

21. E. Rosenberg, A. Zuckerberg, C. Rubinovitz and D. L. Gutnick. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and Emulsifying Properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:402–408(1979).

22. A. Zuckerberg, A. David, Z. Peeri, D. L. Gutnick and E. Rosenberg. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Chemistry and Physical Properties. *Appl.*

Environ. Microbiol. 37:414-420(1979).

23. Seiga Itoh and Takeo Suzuki. Fructose-Lipids of Arthrobacter, Corynebacteria, Nocardia and Mycobacteria Grown on Fructose. Agr. Biol. Chem. 38:1443-1449(1974).

24. D. F. Gerson and J. E. Zajic. Comparison of surfactant production from kerosene by four species of Corynebacterium. Antonie van Leeuwenhoek 45:81-94(1979).

25. J. E. Zajic, Helene Guignard and D. F. Gerson. Emulsifying and surface Active Agents from Corynebacterium hydrocarboclastus. Biotechnol. and Bioeng. 616:1285-1301(1977).

26. 강상모, 김대원, 김혜자. Biosurfactant를 생산하는 *P. aeruginosa*. KK-7의 분리 및 Biosurfactant의 생산. Kor. J. Appl. Microbiol. Bictchnol. 22:92-98(1994).

27. Takeo Suzuki, Hiroko Tanaka and Seiga Itoh. Sucrose Lipids of Arthrobacteria, Corynebacteria and Nocardia Grown on Sucrose. Agr. Biol. Chem. 38:557-563(1974).

28. P. A. J. Gorin, J. F. T. Spencer and A.P. Tulloch. Hydroxy Fatty Acid Glycosides of Sophorose from *Torulopsis Magnoliae*. Can. J. Chem. 39:846-855(1961).

29. George Hauser and Manfred L. Karnovsky. Studies on the Production of Glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 68:645-654(1954).

30. E. G. Bligh and W. J. Dyer Can. J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37:911-917(1959).
31. B. Boothroyd, J. A. Thorn and R. H. Haskins. Biochemistry of the Ustilales. Can. J. Biochem. Physiol. 33:289-296(1955).
32. Muneo Yamaguchi, Akio Sato and Akira Yukuyama. Microbial production of sugar-lipids. Chemistry and Industry 4:741-742(1976).
33. J. L. Parra, J. Guinea, M. A. Manresa, M. Robert, M. E. Mercade, F. Comelles and M. P. Bosch. Chemical Characterization and physicochemical behavior of Biosurfactants. JAOCS 66:141-145(1989).
34. E. Ristau and F. Wagner. Formation of Novel Anionic Trehalose tetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under Growth Limiting Conditions. Biotechnol. Lett. 5:95-100(1983).
35. H.-H. Lautenschlager et al. Substituted aminoalkanol phospholipids. U.S. Patent No. 4,565,659(1986).
36. J. D. Desai and A. J. Desai. Production of biosurfactants. in Biosurfactants(N. Kosaric ed.) pp. 65-98, Marcel Dekker, Inc., New York(1993).
37. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore(1986).

여 백

국 제 공 동 과 제

생물고분자 계면활성제 및 기능성 다당류의
유동특성과 구조분석을 통한 용도에측 기술개발

A Study on Developement of Estimation Technique for
Biosufectant and Functional Polysaccharide
by Rheological and Structual Characteristics

여 백

제목 : 분자구조 예측 및 동특성 연구 (methylan을 중심으로)

제 1 절. 국제협력사업의 필요성

◎ 생물고분자(biopolymer)는 미생물 유래 고분자 물질로써 식품, 화장품, 화학, 생화학 제제, 의약품등의 다양한 산업적 응용에 따라 연구대상으로써 주목받고 있다. 또한 구조적인 면에 있어서 매우 높은 정확도를 가지고 고분자 물질을 생산할 수 있을 뿐만 아니라 다양한 형태의 고분자 물질을 높은 효율로 생산할 수 있기 때문에 미생물을 이용한 생물고분자의 생산은 매우 유망하다. 특히 이와같은 다당류의 개발은 구조적 변화등에 따라서 다양한 물성학적 성질을 나타내며 이로부터 새로운 산업적 용도의 개발이 용이해진다. (1)

◎ 생물고분자 계면활성제 및 기능성 다당류(Polysaccharide)는 구조적으로 볼 때 한종류 또는 수종의 단당이 복잡한 결합형태로 연결된 Homopolysaccharide 또는 Heteropolysaccharide가 backbone으로 되어 있으며 수산기 또는 알콜기에 여러 종류의 다양한 기능성 그룹이 결합되어 있는 생물고분자의 일종임. 이러한 화합물들은 1차적으로 polysaccharide backbone의 당조성 또는 조성비율, 당의 결합형태, 분자량, 수용액 또는 기름과 물의 계면에서의 hydrodynamic property (즉 intrinsic viscosity, shape, size, chain conformation, chain flexibility, surface tension, surface area, rheological property 등)에 따라서 그 특성이 결정되며, 2차적으로는 backbone에 결합되어 있는 기능성 그룹의 종류에 따라서 2차적 특성이 나타난다. 그러므로 자연계에서 분리한 여러 종류의 생물고분자 계면활성제 및 기능성 다당류의 성질을 규명하고 산업적 용도를 개발하기 위해서는 앞에서 언급한 polysaccharide backbone의 구조분석 및 hydrodynamic property의 정확한 이해 없이는 좋은 산업적 용도의 개발은 기대하기 어렵

다.

◎ “미생물을 이용한 정밀화학소재의 탐색 및 이용기술” 중과제는 다당류계 생물고분자와 구조적으로 깊은 연관성이 있기 때문에 상기과제들의 성공적 연구수행을 위해서는 polysaccharide의 구조적 특성 및 물성특성 연구가 필수적으로 수행되어야 한다. 그러나 아직 국내에서는 polysaccharide의 구조적 특성 및 hydrodynamic property의 규명에 대한 연구인력 및 연구경험의 부족때문에 이 분야의 전문그룹이 있는 미국 MIT와의 국제공동 연구를 추진코자 한다.

◎ 다당류는 그 구조의 다양성으로부터 다양한 용도의 가능성을 나타내는 것이 가장 독특한 특징이기 때문에 용액성질의 규명을 통한 구조를 이해하게 되면 다양한 용도의 산업적 이용을 통한 새로운 시장을 형성할 수 있다. (표1 참조)

◎ 본 연구에서는 생물고분자, 특히 methylan을 중심으로 화학구조와 성분 및 물성학적 특성, 그리고 수용액 상에서의 구조예측을 통해 산업적인 용도에 알맞는 생물고분자를 개발하고자 한다.

표 1 Carbohydrate/Polysaccharide의 대표적 기능성 및 응용

기능	응용 분야
Adhesives	Cosmetics and toiletries; Foods: glazes, textiles, adhesives, paper and pesticides
Antimigration agent	Paper
Antiredeposition agent	Detergent
Binding agent	Confectionery, pharmaceuticals, and paper
Bodying agent	Confectionery and soft drinks
Bulking agent	Pharmaceuticals and dietetic foods
Crystallization inhibitor	Foods: ice creams, frozen foods, syrups, and confectionery
Cloud agent	Foods: juices and soft drinks
Emulsifier	Foods: salad dressings; cosmetics and toiletries, and soft drinks
Encapsulant	Pharmaceuticals and soft drinks
Film former	Pharmaceuticals, textiles, paper; Food: sausage casings and beer
Foam stabilizer	Food: whipped toppings and beer
Friction reducer	Petroleum Industry
Gellant	Desserts, confectionery, and petroleum
Lubricant	Pharmaceuticals
Protective colloid	Foods: confectionery and flavor emulsions; adhesives, pharmaceuticals, and cosmetics and toiletries
Stabilizer	Inks, foods, paper, pesticides, cosmetics and toiletries, and pharmaceuticals
Suspending agent	Foods, petroleum, foundry, pharmaceuticals, and cosmetics and toiletries
Swelling agent	Petroleum, cosmetics and toiletries, Foods: processed meats
Syneresis inhibitor	Foods: cheeses and frozen foods
Texturizer	Confectionery and soft drinks
Whipping agent	Toppings
Thickening agent	Confectionery, cosmetics and toiletries, inks, petroleum, paints, adhesives, textiles, explosives; Foods: jams, sauces and gravies

제 2 절. 추진 방법

● 기술정보수집 및 전문가 확보는 미국과의 국제 공동 연구를 함으로써 세계적인 첨단기술 및 인력을 활용할 수 있으며 아울러 한국의 참여 기관의 연구원들을 미국에 파견함으로써 기술의 자연적인 도모한다.

● 한국과학기술원 생물공학과에서는 선도기술과제에서 담당하고 있는 탐색된 여러종류의 다당류 및 당지질계 생물고분자에 관하여 1차적으로 화학조성을 규명한 후 용액의 물성 및 hydrodynamic property를 조사하고 유화제, 점도증진제, drilling mud 등의 기능성과의 상관관계를 규명한다. 또한 부산수산대학에서는 주로 다당류의 intrinsic viscosity와 식품에서의 hydrocolloid의 안정성(stabilizer), gelling agent로서의 특성등에 관한 연구를 수행한다.

● 미국 MIT에서는 light scattering 기술을 이용한 다당류의 절대 분자량과 분자운동 특성을 규명하고 chain conformation에 관련된 구조를 예측하고 산업적 용도개발에 관련된 idea 및 정보를 획득한다.

● 1단계 연구에서 이상과 같은 실험결과들을 토대로 구조-기능성-성질간의 관계를 정립한 후 2단계에서는 관련 산업체와 유전공학연구소팀과 협력하여 산.학.연 공동으로 산업적 용도개발을 적극 추진한다.

● 본 국제공동연구의 일환으로 한국과학기술원 생물공학과 졸업생인 최준호 박사가 금년 7월부터 미국 MIT에 post-doc으로 파견되어 현재 연구를 수행중에 있다.

제 3 절. 성과 및 기대효과

(1). 서 론

1. 다당류의 물성학적, 화학적 성질

● 다당류의 물성학적 성질을 유체의 유동학적인 관점에서 외부의 힘에 의한 물질의 변형 및 흐름의 특징으로 규명하고 그 정도를 정량적으로 표현함으로써 모든 고분자 물질의 rheological behavior를 결정지을 수 있다. 기본적인 유체의 흐름을 전뉴우톤성 유체로써 대별된다. 대부분의 미생물 배양액 특히 미생물이 생산해낸 다당류 용액은 비뉴우톤성 유체 중 pseudoplastic fluid의 특성을 보이고 있다.

● 다당류 용액의 점도는 다당류의 총분자량, 구성성분의 성분비, 배양조건의 변화, organic substituent의 성분과 함량등에 의해 영향을 받는다. 또한 구성성분의 배열 형태 (linkage type)가 직선형 (linear) 또는 측쇄형 (branched)사슬이냐에 따라서도 많은 영향을 받는다. 다당류 용액의 유체성질은 이상과 같은 구조적인 인자이외에도 수용액의 주변 환경인자인 다당류의 농도, 온도, pH, 전해질 등에 의해서도 결정지워진다(2). 수용액상에서의 다당류의 molecular domain은 용액상에서 각각의 분자들이 지닌 hydrodynamic volume으로 표시되는 고유점도 (intrinsic viscosity) 에 의해서 규명되어질 수 있다. 이러한 molecular domain은 전체 전하량 (ionic strength), 다당류의 농도, 다당류의 형태에 따라서 많은 영향을 받을 뿐만 아니라 다당류의 기본구조 (backbone)가 팽창 또는 수축되기도 한다(3,4).

● 미생물 유래 다당류는 독특한 물리학적 그리고 화학적 성질을 지닌 중요한 생물고분자이다. 이러한 고분자물질의 구조와 조성에 있어서의 다양성은 산업적인 응용에 있어서 많은 다양성을 부여하기 때문에 중요하다. 미생물 다당류의 조성구성은 많은 인자, 즉 미생물의 종류, 기질의 종류와 상태, 배양조건 등에 의해서 결정지워진다. 다당

류의 구조적 동정은 매우 복잡하며 많은 시간을 요구한다. 통상적으로 oligosaccharide들이 모여 있는 복합탄수화물 (complex carbohydrate) 의 분석으로 부터 시작한다. 다당류 구성성분으로써 여러종류의 다당류와 non-sugar성분의 규명과 더불어 구성당의 조성을 정량적인 변화 (derivatization)에 의한 GC-MS 기술에 의해 수행되어진다. 대부분 분리 기술에 의해 정제한 뒤 여러 단계에 의한 derivatization을 통하여 최종적으로 GC-MS방법에 의해 결정되어진다.

◎ 본 연구에서는 그동안 본 연구실에서 개발한 미생물 다당류의 일종인 Methylan을 중심으로 용액상에서의 구조를 예측하고 물성을 조사하여 산업적 용도개발을 효율적으로 할 수 있는 기초연구 및 기술개발을 목적으로 수행하였다. 그리고 이 연구가 성공적으로 수행될 경우 같은 연구방법을 다른 다당류 고분자에도 적용하여 구조-성질-산업적 용도간의 상호연관성을 규명하는 것을 최종적인 연구목표로 하였다.

2. 미생물 다당류 methylan에 대한 선행 연구결과

◎ *Methylobacterium organophilum*이 methanol을 sole carbon source로 사용하고, 특별한 배양조건하에서 형성되는 methylan은 세포외로 분비되는 고정성 다당류로써 80%의 탄수화물과 그외 uronic acid, pyruvic acid, protein으로 구성되어 있는 다당류이다. (표 2.) Methylan은 glucose, galactose, mannose가 약 2 : 3 : 2의 비율로 구성되어 있으며, glucuronic, galacturonic, mannuronic acid를 함유하고 있다.

Table 2. Chemical components of polysaccharide.

Chemical components	Contents(w/w, %)	
	Purified Polysaccharide	partially purified polysaccharide
Total Sugar	80.4	65.4
Reducing Sugar	77.9	57.6
Protein	6.1	4.73
Pyruvic Acid	5.1	4.17
Uronic Acid	12.4	9.2
Inorganic Ash	-	22.21
Elemental Analysis	Contents	
Carbon	40.1	31.2
Hydrogen	6.14	4.78
Oxygen	52.7	41.01
Nitrogen	0.72	0.56
Sulfur	0.32	0.25
Ash	-	22.21

◎ 다당류 분자들간의 상호작용은 다당류용액의 점도 또는 consistency index에 관여한다. 특히 분자들의 overlapping 정도는 다당류의 농도와 분자크기에 좌우한다. 수용액 내에서의 다당류 분자간의 상호작용이 없다면, 다당류의 농도와 점도는 직선관계에 있다. 이러한 직선관계는 다당류의 농도가 0.5 g/l 이하에서만 성립한다. 다당류 농도가 0.5 g/l 이상에서는 다당류 분자간의 overlapping이 심화되고 다당류용액의 겔보기점도는 급격히 증가하게 된다. 여러 농도의 다당류 용액에서의 consistency index와 flow behavior index를 표 3,4에 비교하였다.

표 3. Viscosities of polysaccharide solutions

Polysaccharide	Consistency index (cP) (1% solution)
Gum Arabic	1-5
Methylcellulose	200
Pullulan	1-100
Sodium alginate	500
CMC	300-1000
Guar gum	2000-3000
Loust bean gum	2000-3000
Xanthan	2000-3000
Gellan	200
Welan	8000
Rhamsan	7000
Zanflo	2500
Scleroglucan	5000
Methylan	18000

표 4. Flow behavior index (n) of polysaccharides

Polysaccharide	Concentration (%)	n
Locust bean gum	0.4	0.78
Sodium CMC	0.27	0.62
Furcellaran	0.8	0.55
	1.2	0.45
	1.6	0.24
Gur gum	0.4	0.78
	0.5	0.45
	1.0	0.17
	2.0	0.09
Xanthan	0.5	0.37
	1.0	0.29
	1.2	0.26
Ammonium alginate	3.3	0.48
Zooglan	1.0	0.60
	1.5	0.40
Methylan	0.25	0.56
	0.5	0.27
	1.0	0.15

● methylan의 고유점도는 증류수 내에서 20dl/g으로 측정되었다. (표 5) 또한 수용액내의 NaCl(0.01-0.2M) 존재에 따라 다당류의 고유점도는 12.8-14.0dl/g으로 감소하였다. 그러므로 다당류는 수용액에서 전형적인 electrolyte의 성질을 갖고 있으며, 간접적으로 여러 하전그룹을 갖고 있다는 것을 알 수 있다. 이러한 다당류의 고유점도는 다른 미생물 유래의 다당류에 비해 매우 넓은 molecular domain을 갖음을 알 수 있었다.

Table 5. Intrinsic viscosity $[\eta]$ of other polysaccharidea.

Polysaccharide	$[\eta]$ ml/g	MW	Sol'n. Condition
Alginate	1190	150,000	NaCl
Amylopectin	127	90,000,000	
Amylose	81	488,000	0.33M KCl
	154	1,750,000	
CM-amylase	174	1,000,000	0.42M NaCl
CM-cellulose	22400	970,000	H ₂ O
	1040	970,000	NaCl
Cellulose	1230	346,000	
Chitosan	800	130,000	NaCl pH2.5
	640	170,000	
	700	170,000	TFA
Guar gum	230	268,000	
	675	850,000	
Gum arabic	12.5	320,000	
	25.4	1,185,000	
Hyaluronic acid	1340	500,000	0.1M NaCl
	850	500,000	1.0M NaCl
Locust bean gum	1000	1,200,000	
Sodium alginate	225	112,000	
	3100	1,550,000	
Xanthan gum	19000	2,000,000	H ₂ O
	1900	2,000,000	NaCl
Methylan	2000	2,000,000	H ₂ O
	1300	2,000,000	0.1M NaCl

- Light scattering technique에 의한 다당류의 절대분자량 측정
 30°C, 0.9% NaCl 용액에서의 메틸란의 dn/dc 는 0.216이었다

Batch 형태의 light scattering 데이터는 Zimm plot으로부터 계산되었다. (그림1) 이 그림으로부터, 2차 virial coefficient (A_2)는 $2.908 \times 10^{-3} \text{ cm}^3 \text{ mol} / \text{g}^2$ 으로 구할 수 있었다. 이 방법을 통하여 구해진 메틸란의 분자량은 $1.76 \times 10^6 \sim 2.21 \times 10^6 \text{ g/mol}$ 이고, 회전각도(Radius of gyration)는 123-151 nm였다. (표 4)

Table 4. Summary of data from Zimm plot

MW 1 (g/mol)	MW 2 (g/mol)	RMS 1 (nm)	RMS 2 (nm)	2nd virial coeff.
1.676×10^6	1.676×10^6	113	113	3.129×10^{-3}
1.622×10^6	1.662×10^6	113	113	2.478×10^{-3}
1.755×10^6	1.755×10^6	123	123	3.005×10^{-3}
2.126×10^6	2.126×10^6	144	144	3.128×10^{-3}
2.194×10^6	2.194×10^6	150	150	3.063×10^{-3}
2.209×10^6	2.209×10^6	151	151	2.918×10^{-3}
2.137×10^6	2.137×10^6	146	146	2.748×10^{-3}
1.982×10^6	1.982×10^6	128	128	2.622×10^{-3}
2.014×10^6	2.024×10^6	134	134	3.079×10^{-3}

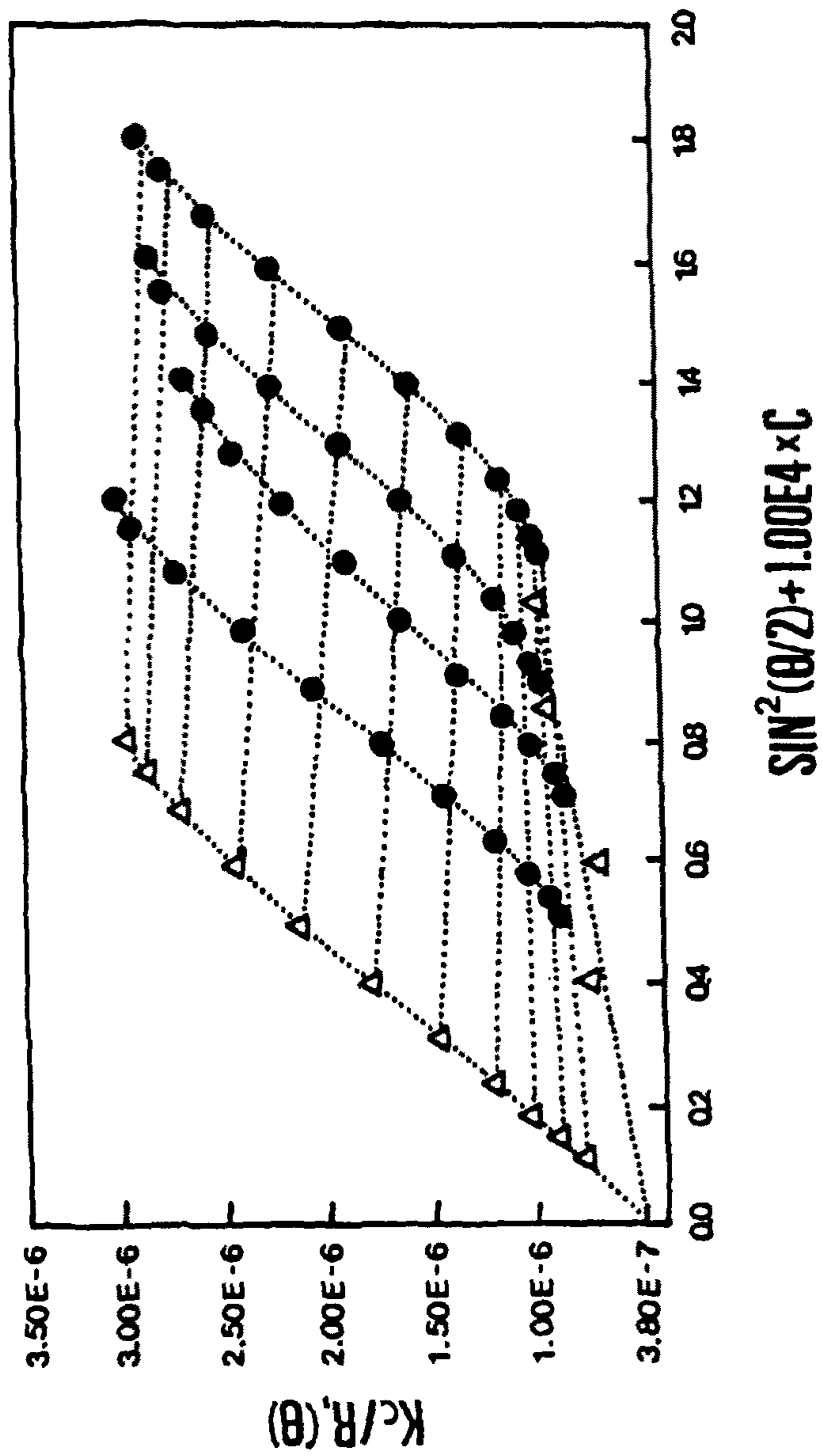


Figure 1. Zimm plot of Methylan in 0.9% NaCl solution

(3) 결과 및 고찰

1. 수용액상에서의 다당류의 구조(conformation)예측 (메틸란을 중심으로)

◎ 이론적으로 메틸란의 수용액에서의 동특성은 고유정도를 통해 예측할 수 있다(8,9). 즉 절대정도를 통해 수화부피 (hydrated volume), 회전각도(radius gyration), overlapping parameter등 conformation 예측에 필요한 여러가지 structure parameter들을 계산할 수 있다.

1.1 메틸란 분자의 수화부피 (hydrated volume)

$$\begin{aligned}\text{◎ hydrated volume} &= \text{Intrinsic viscosity} * \text{M.W.} * (\text{Avogadro no.})^{-1} \\ &= ([\eta] * \text{M.W.}) / \text{Avo} \\ &= 4.07 * 10^8 [\eta] \text{ \AA}^3/\text{molecule}\end{aligned}$$

1.2 메틸란의 extended chain length.

$$\begin{aligned}\text{◎ Degree of polymerization} &= \text{M.W. polysaccharide} / \text{M.W. monomer} \\ &= 2.44 * 10^6 \text{ g}/178\text{g} \\ &= 1.37 * 10^4\end{aligned}$$

(단, methylan의 단분자는 포도당이라고 가정한다.)

$$\text{◎ Glucose Dimension} = \text{length} * \text{width} = 5.4 * 2.7 \text{ \AA}^2$$

$$\begin{aligned}\text{◎ Chain Length (L)} &= \text{DP} * \text{Unit length of glucose} \\ &= 1.37 * 10^4 * 5.4 \\ &= 7.4 * 10^4 \text{ \AA}\end{aligned}$$

1.3 메틸란의 총 단면적

$$\begin{aligned}\text{◎ Cross Sectional area (A)} &= \text{hydrated volume} / \text{chain length} \\ &= 4.07 * 10^8 [\eta] \text{ \AA}^3 / \text{molecule} / 7.40 * 10^4 \text{ \AA} \\ &= 5.5 * 10^3 [\eta] \text{ \AA}^2\end{aligned}$$

1.4. Intrachain Distance (ID)

● Intrachain Distance (ID) =

$$\begin{aligned} & (\text{Cross Sectional area})^{1/2} \times (\text{Packing fraction})^{1/2} \times (4/\pi) - \text{chain height} \\ & = 83.7 \times ([\eta] \psi_m)^{1/2} - \text{chain height} \end{aligned}$$

cf) Packing fraction = 0.82 (Rods, Unlax random)

1.5. Characteristic Ratio (C_{∞})

$$C_{\infty} = \frac{6(R_g)^2}{N_w \cdot l^2}$$

단 $N_w = D \cdot P$

l = 단분자 길이 (Å)

R_g = radius of gyration (Å)

1.6 Critical Overlapping Concentration

● C^* = characteristic concentration

● C^{**} = critical concentration

2. Methylan의 물성 실험 데이터의 응용.

메틸란의 절대점도 ($[\eta]$)는 12.8 dl/g 인 것으로 밝혀졌으므로, 위의 구조와 관련된 파라미터들을 계산하면 다음과 같다.

● 0.9% NaCl 용액에서의 hydrated volume : $5.21 \times 10^9 \text{Å}^3/\text{molecule}$

● Degree of polymerization(DP) = 1.37×10^4

● Chain length = Contour length = $7.40 \times 10^4 \text{Å}$

● Cross sectional area = $7.40 \times 10^4 \text{Å}^2$

● Intrachain distance = $75.78 \times [\eta]^{1/2} \text{Å} = 271 \text{Å}$

● Characteristic ratio(C_{∞}) = 38.4($R_g = 1600 \text{Å}$) in 0.9% NaCl solution
= 33.8($R_g = 1500 \text{Å}$) in 0.9% NaCl solution

cf) Characteristic ratio = $\{(1-\cos\theta)/(1+\cos\theta)\} \{(1+\cos\phi)/(1-\cos\phi)\}$

assume θ (bond angle) = 107 degree

then ϕ (angle of rotation) = 24.6 degree

● Characteristic concentration (C^*) = 0.053 g/dl in deionized water

● Critical concentration (C^{**}) = 0.212 g/dl in deionized water

$C^*[\eta] = 1.06$ and $C^{**}[\eta] = 4.23$

3. 메틸란의 수용액상에서의 구조 예측

● 앞절에서 계산된 특징들을 살펴보면, characteristic ratio (C_{oo}) 가 증가함에 따라 회전각도는 감소하게 된다. 즉, 더욱 단단한 chain이 된다. 또한 characteristic ratio로부터 예측한 glycosidic link는 $\beta(1\rightarrow4)$ 또는 $\alpha(1\rightarrow3)$ 이 될 것이다. 즉, 수용액상에서의 메틸란은 cellulose나 xanthan과 같은 extended ribbon 형태를 가질것으로 예상된다. (그림2. type A) 그러나 메틸란의 경우에는 side group으로 인하여 조금 더 단단한 구조일 것이다. 이렇게 extended ribbon 형태를 갖는다면 메틸란은 하나는 backbone chain안에, 다른 하나는 backbone과 side group안에 2개의 수소결합이 형성될 수 있다.

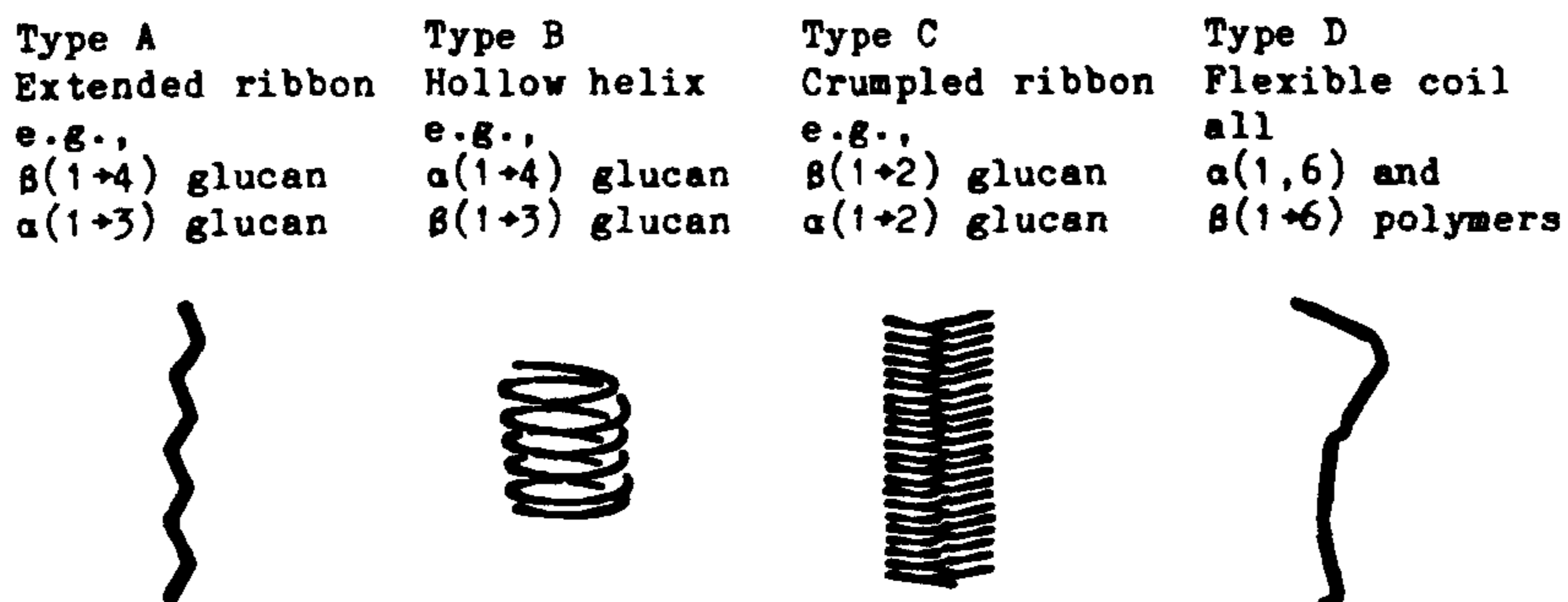


Figure 2. Schematic Representation of the Regular conformation Predicted for Homopolysaccharides by Conformational Analysis

제 4 절. 결 론

- 메틸란은 음하전을 갖고 있으며, 비교적 큰 수화부피를 갖는다. 증류수에서의 절대점도는 20.0 dl/g이다.
- 메틸란의 분자량은 2×10^6 달톤이다. 또한 회전각도는 160 nm였다.
- 하전그룹간, 분자내의 수소결합은 메틸란의 수화부피를 크게 하는 중요한 이유로 추정된다.
- 수용액 내의 메틸란은 extended 또는 helical 구조를 갖는 것으로 추정된다.

제 5 절. 건의사항 및 문제점

본 연구는 G-7 중과제의 효율적 연구를 수행하기 위하여 미국의 MIT 측과 1994. 12월부터 3년간의 연구기간으로 수행키로 상호협정이 이루어 졌으나 1단계 G-7 연구과제의 종료시점에서 제 2단계부터는 중과제 단위가 폐지되고 세부단위과제별로 지원한다는 과기처의 방침 변경에 따라 자동적으로 1995. 7월에 종료되었다. 현재 상호 협력을 바탕으로 좋은 연구결과가 나오고 있고, 또한 연구인력 교류도 시작되어 과제가 막 활성화되고 있는 단계에서 정부의 제도변경으로 인하여 연구가 중단 되게 된 것에 대하여 매우 유감스럽게 생각된다. 일단 과제가 선정된 경우 연구수행이 불성실하고 결과가 없는 경우를 제외하고는 최소한의 연구기간은 보장되어야 함이 지극히 당연한 일이다. 특히 외국과의 국제공동연구의 경우에는 상호 신뢰성 구축과 약속이행이 매우 중요함은 아무리 강조해도 지나침이 없는 사안이므로 앞으로는 보다 더 신중히 업무처리를 하여줄 것을 과기처 담당부서에 호소한다.

제 5 절. 참고문헌

1. N.M.Bikales (Eds.) In "Water Soluble Polymer", 227, Flenum Publishing Corp., New York, N.Y. (1973)
2. M.Glicksman, In "Food Hydrocolloids", Vol. 1, CRC Press Inc. (1982)
3. H.W.Chien, C.H.Ishihara and A.Lishara, Poly. J., 3. 288 (1976)
4. C.A.Kienzle - Sterizer, J. Appl. Polym. Sci., 27, 4467 (1982)
5. M.Dubois, K.A.Gilles, J.K.Hamilton, P.A.Rebers and F.Smith, Anal. Chem., 28, 350 (1965)
6. G.L.Miller, Anal. Chem., 31. 426 (1967)
7. B.H.Zimm, J. Chem. Phys. 16. 1099 (1948)
8. M.L.Huggins, J. Am. Chem. Soc., 64. 2716 (1942)
9. P.J.Flory, In "The Principles of Polymer Chemistry", Cornell Univ. Press, Ithaea, N.Y. (1953)