

미생물에 의한 생물 계면활성제 대량생산을 위한 기술개발

김주현 · 김기은*

서경대학교 생물공학과

Development of a Microbial Biosurfactant Production Process

Ju-Hyun Kim and Gi-Eun Kim*

Department of Biotechnology, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea

Abstract The microbial biosurfactants can be substituted to the chemical detergents in some industrial processes. In this study we developed a biotechnological processes for the biosurfactants with microorganisms. The biosurfactants have a lot of advantages in comparison with the chemical surfactants. They are proenvironmental even during and after industrial use. But there are not so many kinds of biosurfactants. The production cost and the end price is much higher than the chemical surfactants. But nowadays there are many kinds of microorganisms, which can produce the surfactants in large quantity and fast. We tried to develop a production process for the large scale with some microorganisms. At first *Candida bombicola* KCTC 7145, *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955 and *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818 are cultivated and studied. For the large scale production process we used molasses as a complex medium and tried to optimize the process. Molasses contains 17 to 25% of water, 45 to 50% of sugar and 25% of carbohydrate, it can be fully used as a substrate. The microorganisms have been cultivated in the diluted media with molasses 2, 5, 8 and 10%, respectively. The optimal conditions for the cultivation and the production process have been studied. For the study the optical density, glucose concentration and the surface tension were measured. *Candida bombicola* KCTC 7145 and the 5% molasses media was selected as an optimal condition for the production process of a biosurfactant. During cultivation of *Candida bombicola* KCTC 7145 in the 5% molasses medium kerosene and corn oil were added for promoting the biosurfactants.

Keywords: Biosurfactant, Molasses, *Candida bombicola* KCTC 7145, Surface tension, Kerosene, Corn oil

서 론

계면활성제란 동일 분자 내에 친수기와 소수기를 동시에 갖는 양친매성 물질로 계면에 흡착되어 계면의 자유에너지를 낮춤으로써 계면의 성질을 현저하게 변화시키며(1, 2), 유화 분산을 촉진시키는 물질이다(3, 4). 여기서 계면이란 서로 불용성인 상태의 경계를 의미하며, 실제로 우리가 접하는 계면은 기체·액체, 기체·고체, 액체·액체, 액체·고체, 고체·고체 등의 5종류이다(5). 계면활성제는 이러한 성질로 인해 표면 또는 계면의 장력을 줄이고, microemulsion을 형성시켜 물속의 탄화수소를 가용화

시키거나 물을 탄화수소에 가용화 시킨다. 이러한 계면의 성질은 계면장력과 표면장력, 처음 micelle을 이루게 되는 농도인 critical micelle concentration (CMC)로 대변되며, 이들은 계면활성제의 양친매성 구조로 인해 야기된다. 계면활성제가 표면 또는 계면에 흡착됨으로써 표면장력 및 계면장력의 강하가 일어나며 친매성의 회합에 의해 micelle의 형성이 일어난다. 따라서 계면활성제의 성능에 대해서 이야기할 때에는 반드시 표면장력 강하와 CMC를 언급해야 한다(6). 일반적으로 계면활성제로 성능이 좋다고 말하려면 CMC는 매우 작고, 표면장력은 30 mN/m 정도로 낮출 수 있어야 한다(6). 계면활성제에서의 micelle 형성은 가역적인 변화이므로 이미 형성된 micelle도 계면활성제의 농도가 떨어지면 사라지고 분자상태로 분산되게 된다. 계면활성제는 섬유, 제지, 사진, 도료, 화장품, 의약품, 농약, 금속, 토목, 건축, 운

*Corresponding author

Tel: +82-2-940-7154, Fax: +82-2-919-0345

e-mail: gkeun@skuniv.ac.kr

활유, 식품 전자산업 등 여러 산업분야에서 유화제, 분산제, 습윤제, 기포제, 소포제, 세정제, 대전 방지제, 응집제, 살균제, 보존제 등의 용도로 널리 사용되며(1, 7), 요즘에는 응용영역이 더욱 확장되어 microelectronics, 자기 기록 매체, 고급 전지, 최신 분리기술, 배기가스 중 탄화수소의 제거, 전자 인쇄용 액체 인쇄제 등의 개발과 연구에도 활용되고 있다(8, 9). 기존의 합성 계면활성제는 상대적으로 빠르고, 값싸게 유출된 기름을 처리할 수 있으며 응용범위가 넓지만, 대부분 그 자체의 독성 및 난분해성으로 인해 2차적인 환경오염을 초래한다(10, 11). 그러므로 독성이 적고 생분해가 쉬운 생물 계면활성제의 사용이 요구되었다(12).

미생물이 대사물질로서 생물 계면활성제를 생산함은 오래 전부터 알려져 왔다. 생물 계면활성제는 미생물에 의해 세포 표면에 생성되거나 세포 외로 분비되는 화합물로서 친수성인 부분과 소수성인 부분을 동시에 갖고 있어 표면 또는 계면장력을 감소하는 것(13)과 살아있는 세포, 주로 미생물에 의해 생산되는 표면활성을 갖는 분자(14)의 정의가 가장 많이 인용되고 있다. 생물 계면활성제의 유일한 목적은 산업단계에서 화학 계면활성제 대신으로의 사용가능이다(7, 14). 미생물에 의해 탄화수소가 분해되는 것은 처음으로 Mioshi에 의해 발견되었다(15). 미생물에 의해 생산되는 생물 계면활성제는 비교적 간단한 배양과정과 기질을 이용하여 쉽게 대량생산 할 수 있으며, 생분해가 가능하고, 독성이 상대적으로 적어서 2차적인 오염을 발생시키지 않기 때문에 현장에서 바로 사용할 수 있다. 또, 표면장력 저하능력, 온도, pH에 대한 안정성 등 생물 계면활성제의 물리·화학적 성능 면에서 기존의 화학합성 계면활성제와 거의 대등한 결과를 보인다는 장점을 가지고 있다(16, 17). 게다가, 기존의 방법으로 합성하기 어려운 화학구조로 인해 특수한 목적으로 사용될 수 있다는 특징을 가지고 있다(16, 18). 하지만, 비싼 생산단가 및 생물을 다루어야 하는 어려움으로 인해 아직까지 산업적으로 많이 사용되지 못하고, 무독성이 반드시 요구되는 화장품 및 식품 분야와 오염처리 분야에서만 어느 정도 사용되고 있을 뿐이다. 요즘에 의약 분야 등에 사용할 수 있는 항균 활성 이외에도 특수한 기능을 갖는 고부가가치의 생물 계면활성제에 대한 연구가 주로 이루어지고 있다.

그러나 앞으로 합성 계면활성제를 대체해야 할 것이라는 점에서 생물 계면활성제에 대한 연구는 필수적이다. 앞으로의 발전을 위해서 균주의 개량, 개선이 필요하고, 대량생산을 위한 고정화 단계를 준비해야 한다. 또, 유화능, 가용성, 습윤성 등의 고도의 특성과 선택성을 갖는 물질의 합성, 저렴한 발효공정 개발, 우수한 계면 활성능을 갖는 물질의 개발들이 필요하다.

본 연구는 다양한 분야에서 이용될 수 있지만, 단가에 의해 제한적으로 사용되는 생물 계면활성제를 낮은 단가에서 생산하여, 기존보다 광범위한 이용을 위해 유기폐기물인 당밀을 이용한 배지개발 및 공정을 연구하였다. 본 연구에

사용된 미생물은 *Candida bombicola* KCTC 7145(4, 19), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955(10), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818(19, 20)이다. 실험 결과 얻어진 데이터는 차후 대량생산공정에서 적용 가능한 기초 데이터로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

균주선발과 배지선택

생물 계면활성제를 생산한다고 알려진 균주인 *Candida bombicola* KCTC 7145(4, 19), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955(10), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818(19, 20) 등을 사용하여 생물 계면활성제의 생산을 확인한다. 기존 화학적 합성에 의해 생산되는 화학 계면활성제에 비해 단가가 높은 생물 계면활성제의 대량생산을 위해 식품가공 후 나온 유기폐기물인 당밀을 사용한다. 당밀은 다른 원료에 비하여 낮은 가격의 기질로 이용될 수 있다는 장점을 가지고 있다(21). 본 연구를 위한 당밀은 모 제당 회사에서 구입하였다.

최적농도 선택과 균주선발을 위한 배지제조

원액의 당밀을 증류수를 이용하여 각각 2, 5, 8, 10%의 당밀 용액을 만들었다. 각각의 총 볼륨은 250 ml이다.

최적농도 선택과 균주선발 위한 성장곡선 확인

최적의 농도를 찾기 위해 2, 5, 8, 10%의 당밀배지를 제조하고, 이들 중 최적농도를 선택하기 위하여 광밀도(Optical density), 포도당 값(Glucose concentration value)을 측정한다.

3종류의 균주 *Candida bombicola* KCTC 7145 (24°C), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955 (28°C), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818 (30°C)을 250 ml의 2, 5, 8, 10%의 당밀배지에 5 ml씩 접종한다. 접종 후 shaking incubator에서 3일간 배양했다. 측정은 매 12시간 마다 채취하여 분광광도계(spectrophotometer (SHIMADZU, 일본)로 광밀도와 포도당 값을 측정한다. 광밀도는 660 nm에서 측정하며, 오차를 줄이기 위하여 증류수로 25배 희석한 후 측정한다. 측정된 수치에 희석배수를 곱한다. 이때, 영점(autozero)은 증류수를 사용한다. 포도당 값은 Glucose kit (바이오크리니칼시스템, 한국)를 사용하여 505 nm에서 측정한다. 위에서 사용한 kit는 포도당의 농도가 600 mg/dl까지 직진성이 있으므로 이 범위 안에 들어오게 희석하여 측정 하였다. 희석은 증류수를 이용하여 3배 희석한다. 그리고 측정된 수치에 희석배수를 곱한다. Glucose Kit의 사용 방법은 Table 1에 있다.

Table 1. Measurement method of glucose kit

	Blind ^a	Standard ^b	Specimen ^c
Sample (ml)	0.02	0.02	0.02
Enzyme solution (ml)	3.0	3.0	3.0

^aBlind : Mixture of distilled water 0.02 ml and enzyme solution 3.0 ml.

^bStandard : Mixture of standard solution 0.02 ml and enzyme solution 3.0 ml.

^cSpecimen : Mixture of specimen serum 0.02 ml and enzyme solution 3.0 ml.

최적농도 선택과 균주선발 위한 표면장력 실험

균주 배양액 10 ml를 채취한 후, 원심분리기 (Hanil, 한국)를 사용하여 원심분리를 실시한다. 원심분리는 3000 rpm에서 2000초 동안 실시된다. 채취한 상등액 (suspension)을 filtration 시키고, 상온에서 ring method(22)로 Tensiometer (KRUSS, 독일)를 사용하여 3회 반복 측정 한다.

최적배지 선발

선 실험에서 선택된 최적 농도의 당밀배지에 생물 계면활성제의 생산속진 여부를 확인하기 위한 물질인 등유와 식용유를 첨가하고, 3종류의 균주 중 활성이 가장 뛰어난 미생물을 사용하여 실험을 실시한다.

최종 선발된 배지농도와 미생물은 5% 당밀배지와 *Candida bombicola* KCTC 7145이다. 5% 당밀배지, 5% 당밀과 등유 혼합배지, 5% 당밀과 식용유 혼합배지 250 ml에 5 ml의 *Candida bombicola* KCTC 7145를 접종한다. 접종 후 24°C shaking incubator에서 3일간 배양하며, 분광광도계를 사용하여 매 12시간에 한번 씩 광밀도와 포도당 값을 측정한다. 그리고 표면장력도 측정한다. 광밀도와 포도당 값, 표면장력의 측정은 앞선 실험 ‘최적농도 선택과 균주선발 위한 성장곡선 확인’, ‘최적농도 선택과 균주선발 위한 표면장력 실험’과 동일한 방법으로 실시한다.

Clear zone 관찰

Candida bombicola KCTC 7145에 의해 생산된 생물 계면활성제의 활성을 측정하기 위하여 YM 복합배지 (yeast extract 3.0 g, malt extract 3.0 g, peptone 5.0 g, dextrose 10.0 g, 증류수 1.0 L), 2, 5, 8, 10%의 당밀배지, 5% 당밀과 등유 혼합배지, 5% 당밀과 식용유 혼합배지를 사용한다. 이 실험은 기존의 방법(23)을 변형하여 실시한다. Petri dish (90 × 15 mm)에 증류수를 30 ml씩 분주한다. 등유와 식용유를 각각 50 µl씩 분주하여 유막을 형성시킨다. 각각의 배지 100 ml에 *Candida bombicola* KCTC 7145를 2 ml씩 접종한 후 24°C shaking incubator에서 3일간 배양한다. 배양한 배양액을 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후, 상등액 50 µl를 채취하여 각각의 petri dish에 형성된 유막에 떨어뜨려 clear zone의 직경을 측정한다. 이때, *Candida*

bombicola KCTC 7145에 의해 생산된 생물 계면활성제의 활성을 기존의 주방용 세제를 사용하여 비교하여 실제 사용 가능성을 관찰한다.

통기속도에 따른 기질수율과 표면장력의 변화

통기속도에 따른 *Candida bombicola* KCTC 7145의 생장속도와 생물 계면활성제의 생산을 비교하기 위하여, 반응기 내에서 배양실험을 하였다. 실험에 이용된 반응기는 5 L 통기성 교반발효기이며, 초기 배양액은 3 L였다. 앞선 배양에서 이용한 5% 당밀 배지를 넣고, 농도 0.1 N의 NaOH와 HCl용액을 이용하여 pH를 6.0으로 조절한 후 1.5기압, 121°C에서 15분간 멸균하였다. 이후 0.22 µm membrane filter를 이용하여 식용유를 첨가하고, 용존산소량은 통기속도를 이용하여 통제하였다. 통기속도는 0.5, 1, 2, 3 L/min로 반응기에 넣어 주었다. 실험은 통기성 교반 발효기를 통하여 수행하였으며, rpm은 50으로 고정시켰다.

교반속도에 따른 기질수율과 표면장력의 변화

교반속도에 따른 *Candida bombicola* KCTC 7145의 생장속도와 생물 계면활성제의 생산을 비교하기 위하여, 반응기를 이용하여 실험 하였다. 실험에 대한 준비과정은 ‘통기속도에 따른 기질수율과 표면장력의 변화’에서와 같다. 그러나 교반속도는 30, 50, 100, 200 rpm으로 변화를 주었다. 여기서는 통기속도를 2 L/min으로 고정시켰다.

결과 및 고찰

균주선발과 배지선택

화학적 합성에 의해 생산되는 화학 계면활성제에 비하여 단가가 높은 생물 계면활성제의 대량생산을 위하여 식품을 가공하고 남은 유기폐기물인 당밀을 사용했다. 생물 계면활성제 생산 균주인 *Candida bombicola* KCTC 7145, *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955, *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818의 값비싼 복합배지를 기질로 이용하는 것은 높은 단가로 인해 산업화가 불가능함에 따라 값싼 배지인 당밀배지를 선택하였다. 당밀은 17~25%의 물과 45~50%의 당 성분 (자당, 포도당, 과당), 25%의 탄수화물 성분 (덱스트린, 오탄당, 우론산)을 포함하고 있어서 미생물 생장의 기질로 사용된다(24).

최적농도 선택을 위한 성장곡선 및 표면장력확인

당밀배지의 최적농도 판단은 광밀도와 포도당 값, 표면장력을 이용하여 결정하였다. 포도당 값은 바이오크리니칼시스템의 메뉴얼에 따라서 측정하고, 계산하였다. 측정

된 수치는 다음과 같은 식에 의해 계산하였다. Glucose량 (mg/100 ml) = (검체의 흡광도/표준의 흡광도) × 200. 표면장력은 상온에서 ring method로 측정하였다. 최적배지를 선택하는데 가장 큰 역할을 하는 것이 표면장력이므로, 생물 계면활성제의 성능에 대해 이야기 할 때에는 반드시 표면장력을 언급해야 한다(6).

원액의 당밀을 2, 5, 8, 10%의 당밀배지로 희석시킨 후 각각 3가지 균주를 접종배양하며 관찰한 결과, 3가지 균주 모두 5%의 당밀배지에서의 성장 속도가 가장 빨랐으며, 상대적으로 포도당 값의 감소는 느린 것으로 확인되었다(Fig. 1, 2, 3, 4). 또, 생물 계면활성제의 생산 여부를 확인할 수 있는 결정적인 방법인 표면장력과 균주의 성장 속도, 포도당 값을 비교해 본 결과, 생장은 빠르고, 기질의 소모는 느리며, 표면장력의 수치가 급격히 감소하는 5% 당밀배지가 최적농도임을 확인할 수 있다(Fig. 5, 6, 7, 8). 부가적으로, 성장곡선의 광밀도와 표면장력을 비교해 보았을 때, 균주가 생장을 한 후, 생물 계면활성제의 생산이 월등히 증가하여 표면장력이 갑작스럽게 감소함을 확인할 수 있다(Fig. 10). 이와 같은 결과로 생물 계면활성제는 생장에 필수적인 1차 대사산물이 아닌 2차 대사산물임을 추측할 수 있었다. 이러한 비성장 관련 산물의 생성은 성장속도가 0인 정지기 동안 진행되는 것으로(Fig. 9), 위와 같은 패턴을 관찰 하였을 때 3가지 균주에 의해 생산되는 대부분의 생물 계면활성제는 비성장 관련 산물임을 확인할 수 있었다(25).

최적 균주 선발을 위한 성장곡선 및 표면장력확인

3가지의 균주 (*Candida bombicola* KCTC 7145, *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955, *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818) 중 *Candida bombicola* KCTC 7145는 나머지 2개의 균에 비해 모든 당밀배지에서 성장속도가 월등하게 빠른 것을 확인 하였다(Fig. 1, 2, 3, 4).

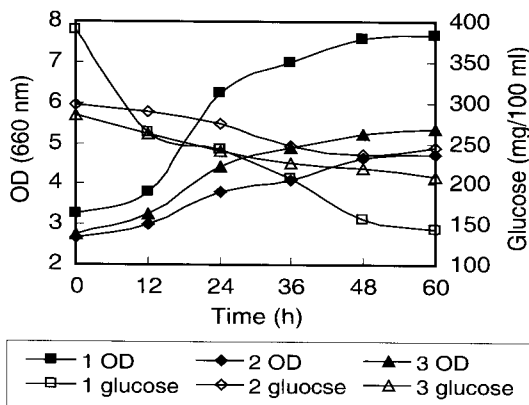


Fig. 1. The growth curve of *Candida bombicola* KCTC 7145(1), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955(2), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818(3) in 2% molasses medium.

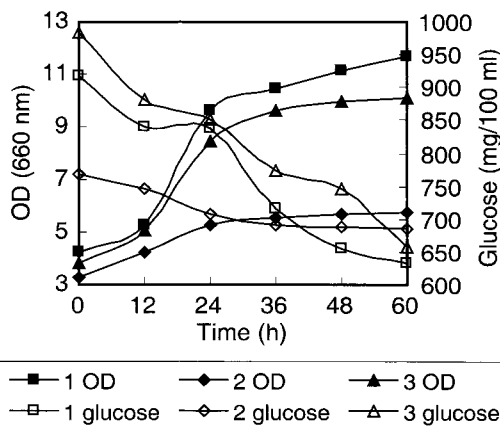


Fig. 2. The growth curve of *Candida bombicola* KCTC 7145(1), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955(2), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818(3) in 5% molasses medium.

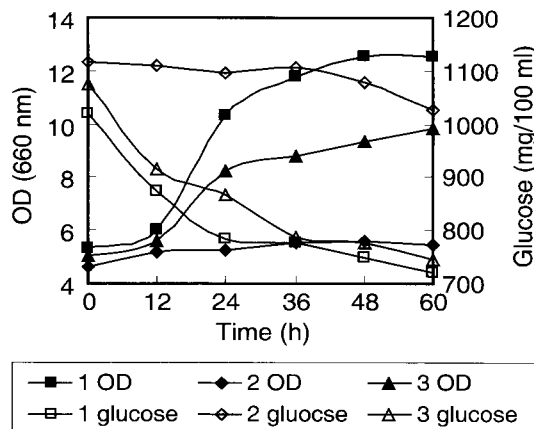


Fig. 3. The growth curve of *Candida bombicola* KCTC 7145(1), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955(2), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818(3) in 8% molasses medium.

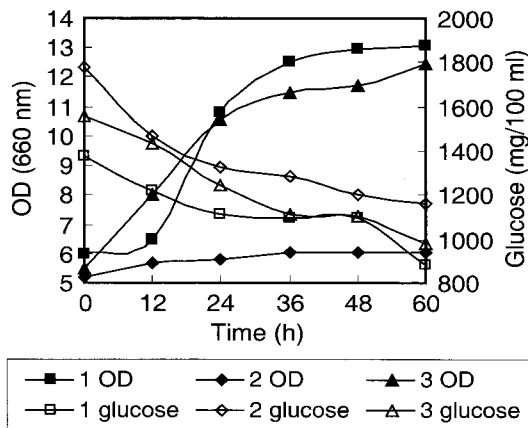


Fig. 4. The growth curve of *Candida bombicola* KCTC 7145(1), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955(2), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818(3) in 10% molasses medium.

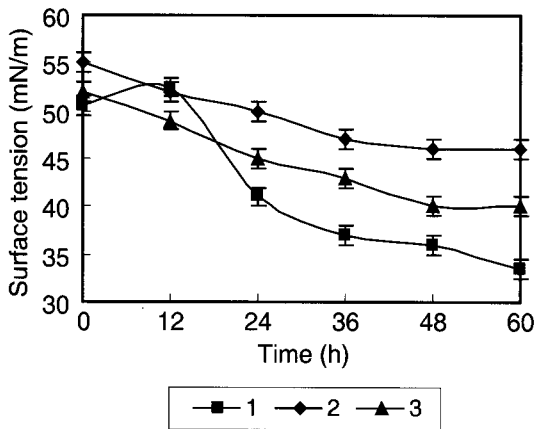


Fig. 5. The surface tension of *Candida bombicola* KCTC 7145(1), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955(2), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818(3) in 2% molasses medium.

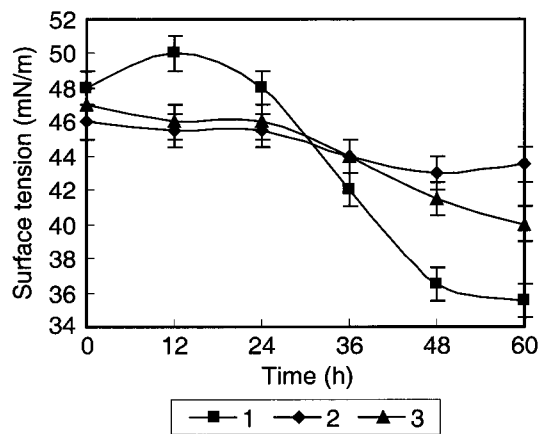


Fig. 8. The surface tension of *Candida bombicola* KCTC 7145(1), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955(2), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818(3) in 10% molasses medium.

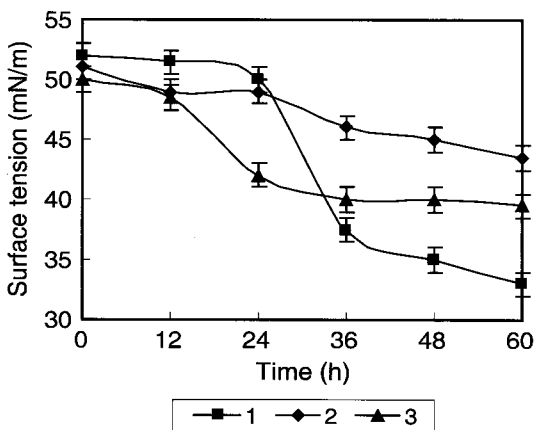


Fig. 6. The surface tension of *Candida bombicola* KCTC 7145(1), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955(2), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818(3) in 5% molasses medium.

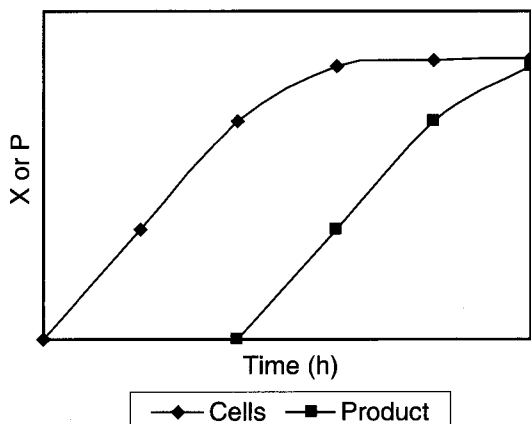


Fig. 9. Nongrowth-associated product formation(25).

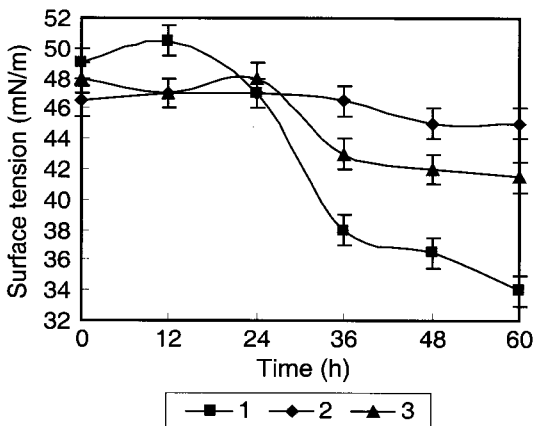


Fig. 7. The surface tension of *Candida bombicola* KCTC 7145(1), *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955(2), *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818(3) in 8% molasses medium.

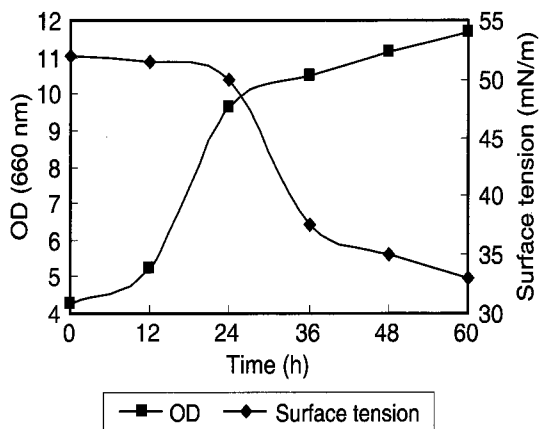


Fig. 10. Comparison of OD value and surface tension of *Candida bombicola* KCTC 7145 in 5% molasses medium.

반면에 *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955는 3가지의 균주 중에서 성장속도가 가장 느림을 확인 할 수 있었다

(Fig. 1, 2, 3, 4). 하지만 이 3가지 균주는 모두 비슷한 패턴으로 성장한다는 공통점을 가지고 있다. 특히, *Candida bombicola* KCTC 7145는 생장이 빠를 뿐만 아니라 기질의 소모속도도 느리고, 생물 계면활성제의 활발한 생산으로 인해 표면장력이 급격히 감소함을 확인 할 수 있다(Fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8). 이러한 결과로, 모든 당밀배지에서 생물 계면활성제 생산의 최적균주는 *Candida bombicola* KCTC 7145임을 확인 하였다.

생물 계면활성제의 생산속진

생물 계면활성제를 생산하는 3가지의 균주 배양의 최적 농도로는 5% 당밀배지로 선택되었고, 3가지의 균주 중 생물 계면활성제의 생산이 활발한 *Candida bombicola* KCTC 7145가 최적 균주로 선택되었다. 서두에서도 밝힌 바와 같이 미생물에 의해 탄화수소가 분해되는 것이 처음으로 Mioshi에 의해 발견되었다(15). 여기에 기인하여 탄화수소류를 첨가한 배지는 생물 계면활성제가 더 많이 생산된다고 판단할 수 있어 이에 대한 실험을 진행 하였다. 선택된 5% 당밀 배지에 등유와 식용유를 각각 첨가하여 배지를 준비하고, *Candida bombicola* KCTC 7145를 접종하여 위와 같은 실험을 반복하였다. 그 결과, 아무것도 첨가되지 않은 5% 당밀배지에 비하여, 각각 등유와 식용유를 첨가시킨 당밀 배지에서 *Candida bombicola* KCTC 7145의 빠른 성장과 균체량의 증가, 생물 계면활성제의 생산이 높아짐에 따라 표면장력이 급격히 낮아지는 것이 확인되었다(Fig. 11, 12). 특히, 식용유의 첨가는 적은 양의 기질을 사용하여 *Candida bombicola* KCTC 7145의 빠른 성장과 균체량의 급격한 증가를 가능하게 하였으며, 이것은 생물 계면활성제의 생산 증가에 결정적인 역할을 하였다(Fig. 11, 12). 등유와 식용유의 첨가가 생물 계면활성제의 생산을 촉진시킨다는 것을 확인 할 수 있었고, 실제 산업화에서 다량의 생물 계면활성제를 유도할 기초 데이터로 활용할 가능성을 열어두었다.

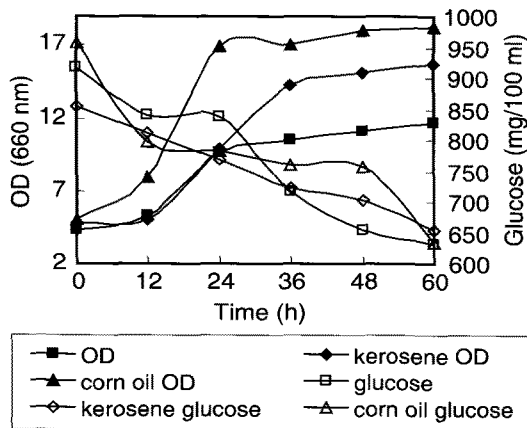


Fig. 11. The growth curve of *Candida bombicola* KCTC 7145 in 5% molasses, 5% molasses + kerosene, 5% molasses + corn oil medium.

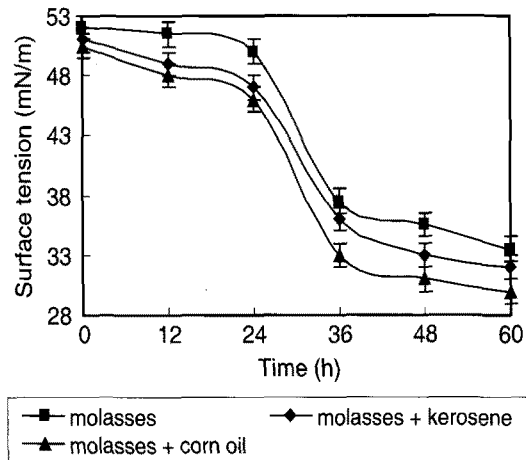


Fig. 12. The surface tension of *Candida bombicola* KCTC 7145 in 5% molasses, 5% molasses + kerosene, 5% molasses + corn oil medium.

Clear zone 관찰

생물 계면활성제의 생산여부와 활성을 측정하기 위하여 clear zone 실험을 실시하였다. 생물 계면활성제를 생산한다고 알려진 균주 *Candida bombicola* KCTC 7145를 등유와 식용유가 첨가된 배지에서 배양한 결과 등유와 식용유가 첨가 제거됨을 확인할 수 있었다. 이에 따라 기존에 알려진 방법과는 다르게, 등유와 식용유를 사용하여 유막 형성 후 clear zone을 관찰하였다. 기존의 최적배지로 알려져 있는 YM 복합배지에서 생물 계면활성제의 생산과 저가의 배지로 선택된 당밀배지에서의 생물 계면활성제의 생산과 저가의 배지로 선택된 당밀배지에서의 생물 계면활성제의 생산을 비교하였고, 기존의 사용 중인 주방용 세제와의 비교실험을 실시하였다.

총 7개의 배지 YM 복합배지, 2, 5, 8, 10%의 당밀배지와 5% 당밀배지와 등유 혼합배지, 5% 당밀배지와 식용유 혼합배지의 상등액을 등유와 식용유로 인해 형성된 유막에 떨어뜨린 결과는 Fig. 13, 14에 있다.

등유와 식용유 모두에서 2, 5, 8, 10%의 당밀배지 중 5%의 당밀배지에서 활성이 가장 좋았으며, 5% 당밀배지 보다는 5% 당밀배지와 등유 혼합배지와 5% 당밀배지와 식용유 혼합배지에서의 활성이 더 좋았음을 확인 할 수 있었다. 기존의 최적배지인 YM 복합배지와 5% 당밀배지와 등유 혼합배지, 5% 당밀배지와 식용유 혼합배지를 비교해 본 결과, 2, 5, 8, 10%의 당밀배지보다 활성이 적었음을 확인 할 수 있었다. 마지막으로 기존에 사용하고 있는 희석된 주방용 세제와 비교해 본 결과, 거의 비슷한 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이 결과, 당밀배지를 기질로 하여금 생물 계면활성제가 활성을 가지고 있음을 확인 할 수 있었고, 단가를 낮추기 위해 선택된 당밀배지에서의 생물 계면활성제의 생산을 위한 함을 확인할 수 있었다.

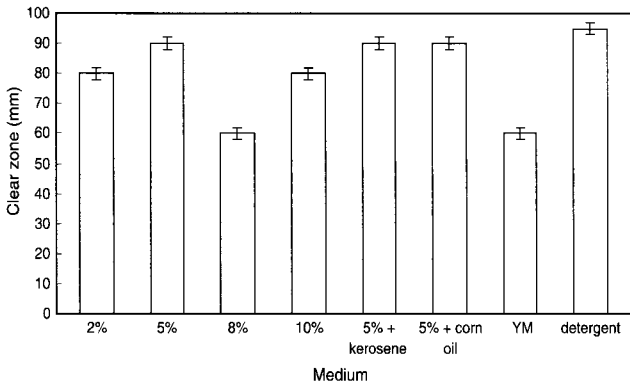


Fig. 13. The clear zones which are produced with the addition of kerosene.

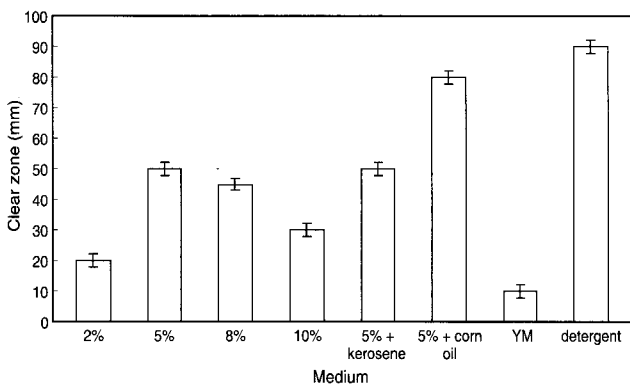


Fig. 14. The clear zones which are produced with the addition of corn oil.

통기속도에 따른 기질수율과 표면장력의 변화

통기속도에 따른 기질수율의 변화를 관찰 하였다. 기질 수율은 $Y_{(p/s)} = - \frac{\Delta P}{\Delta S}$ 에 의해 나타난다. 통기속도가 증가 할수록 기질수율이 커지는 결과가 Table 2에 나타나 있다. 이는 호기성 미생물로서 용액 속에 용존산소량이 많으면 잘 성장하는 특성을 지녔다고 볼 수가 있다. 그러나 표면장력의 변화를 보면 3 L/min에서 오히려 표면장력이 38 mN/m으로 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 공기의 공급량이 생물 계면활성제의 활성화에 영향을 미칠 수 있다는 Kim 등(26)의 연구결과를 재확인할 수 있었다. 이는 적정농도 이상의 용존산소는 생물 계면활성제의 활성을 떨어뜨린다는 결과를 확인 할 수 있었다.

Table 2. Change in yield of substrate and surface tension depending on air supply speed

Air supply speed (L/min)	Substrate yield (g cells/100 mL substrate)	Surface tension (mN/m)
0.5	0.021	35
1	0.048	32
2	0.069	30
3	0.075	38

교반속도에 따른 기질수율과 표면장력의 변화

교반속도에 따른 기질수율은 교반속도가 증가함에 따라 기질수율이 증가했다. 그러나 일정 rpm에서는 기질수율이 떨어지는 것을 확인 할 수 있었다(Table 3). 이는 *Candida bombicola* KCTC 7145가 빠른 교반속도에서는 Shear stress에 민감하다는 것을 알 수가 있다. 교반속도가 200 rpm에서는 표면장력이 42 mN/m까지 상승하였다.

Table 3. Change in yield of substrate and surface tension depending on stirring speed

Stirred speed (rpm)	Substrate yield (g cells/100mL substrate)	Surface tension (mN/m)
30	0.031	33
50	0.045	31
100	0.041	34
200	0.029	42

대량생산을 위한 최적화

본 연구의 결과, 최종 최적배지는 5% 당밀배지와 식용유 혼합배지이고, 최적 균주는 *Candida bombicola* KCTC 7145임을 확인하였다. 생물 계면활성제의 저가 배지를 이용한 최적 균주의 대량배양을 위하여 5 L의 생물 반응기를 사용하였다. 5% 당밀배지와 식용유 혼합배지 3 L에 *Candida bombicola* KCTC 7145를 접종 한 후 24℃에서 3일간 매 12시간 마다 광밀도, 포도당 값, 표면장력, pH를 측정하였다. 그 결과, 균주와 생물 계면활성제의 생산은 소량생산에서와 같이 원활히 이루어졌다(Fig. 15). 소량생산에서보다 대량생산에서의 균체량은 증가하였으며, 성장하는 경향은 비슷함을 확인 하였다. 소량생산에서보다 생장이 원활한 반면에, 기질의 소모는 더 줄어 들에 따라 경제력이 보안됨을 확인 할 수 있었다. 생물 계면활성제의 생산 여부를 결정지을 수 있는 표면장력이 30 mN/m보다 낮은 수치를 보였다(Fig. 16). 기존의 화학합성 계면활성제의 표면장력이 25~50 mN/m사이임에 비해(Table 4) 30 mN/m이란 수치는 생물 계면활성제로써의 역할이 충분히 가능함을 보여주고 있다(Fig. 16). pH의 측정결과 배양이 진행됨에 따라서 pH가 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 17).

Table 4. Microbial source and properties of important types of microbial surfactants

Biosurfactant	Surface tension (mN/m)	Reference
Rhamnolipids	29	5,29
Peptide-lipid	27	30, 31
Viscosin	26.5	32
Surfactin	27-32	33, 34
Fatty acids	30	35, 36
Carbohydrate-protein-lipid	27	37, 38

이는 기존에 알려진 것처럼 *Candida bombicola* KCTC

7145가 성장하는 동안 oleic acid(27), palmitic acid(28), vegetable oil(12)과 같은 산성의 sophorolipid를 생산한다고 알려져 있음을 다시 한번 확인하는 결과가 되었다.

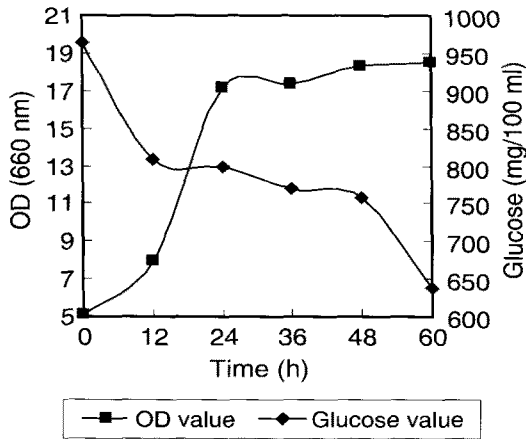


Fig. 15. The growth curve of *Candida bombicola* KCTC 7145 in 5% molasses + corn oil medium.

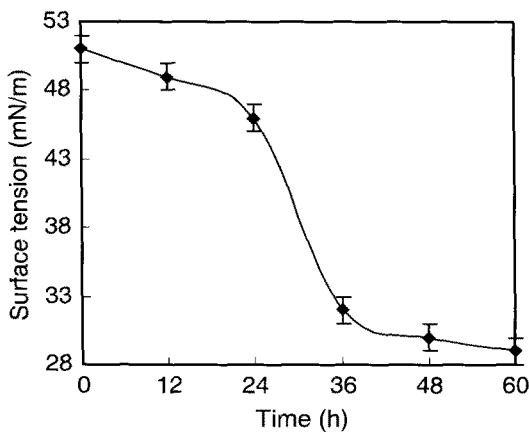


Fig. 16. The surface tension of *Candida bombicola* KCTC 7145 in 5% molasses + corn oil medium.

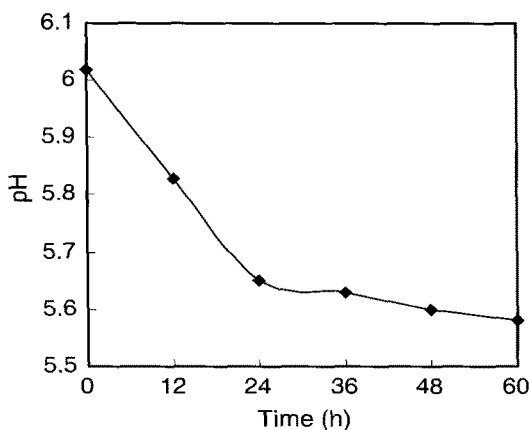


Fig. 17. pH change of *Candida bombicola* KCTC 7145 in medium of 5% molasses + corn oil medium.

본 연구의 목적은 생물 계면활성제를 생산하는 3가지의 균주, *Candida bombicola* KCTC 7145, *Sphingomonas chungbukensis* KCTC 2955, *Sphingomonas yanoikuyae* KCTC 2818의 최적배지를 선발하는 것으로, 단가가 비싼 생물 계면활성제의 대량생산을 위하여, 단가가 저렴한 당밀배지를 선택하였다. 선택된 당밀배지의 최적의 농도는 5%로 선발되었으며, 최적의 농도인 5% 당밀배지에 생물 계면활성제의 활성 및 생산을 자극시키는 등유와 식용유를 첨가시켰다. 자극제의 첨가에 따라 생물 계면활성제의 생산은 증가되었으며, 최적배지로는 5% 당밀배지와 식용유의 혼합배지가 선발되었다. 뿐만 아니라 반응기의 조건 조작 (통기속도: 2 L/min, 교반속도: 50 rpm)에 의해 생물 계면활성제의 생산이 더 증대됨을 확인 할 수 있었다.

이번 연구는 생물 계면활성제의 대량생산 산업화에 대한 기초데이터로서 회분식에 제한되어 있으나, 앞으로 연속식반응기와의 비교연구가 수행되어야 할 것이다.

접수 : 2008년 10월 24일, 게재승인 : 2009년 4월 20일

REFERENCES

1. Lim, K. H. (1996), Their structure, properties, and applications, *J. Korean Oil Chemist's Soc.* **13**, 1-20.
2. Van Dyke, M. I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee, and J. T. Trevors (1993), *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants : structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can J. Microbiol.* **39**(11), 1071-1078.
3. Kosaric, N., C. C. Gray, and W. L. Carin (1983), Microbial emulsifiers and de-emulsifiers. *Biotechnology* **3**, 575-592.
4. Layman, P. (1985), Industrial set for strong growth. *Chem. Eng. News* **63**, 23.
5. Robert, M., M. E. Mercade, M. P. Bosch, J. L. Parra, M. J. Espuny, M. A. Manresa, and J. Guinea (1989), Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. *Biotechnol. Lett.* **11**, 871-874.
6. Lang, S. (2002), Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in colloid & Interface Science.* **7**, 12-20.
7. Desai, J. D. and I. M. Banet (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**(1), 47-64.
8. Banat, I. M., R. S. Markkar, and S. S. Cometra (2000), Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 495-508.
9. Milton, M. J. (1987), Surfactants in engineering technology, *Surfactant Science Series* **26**, Marcell

- Dekker, New York.
10. Dunvnjak, J. D., G. Cooper, and N. Kosaric (1982), Production of biosurfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558, *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 165-175.
 11. Poremba, K., W. Gunkel, S. Lang, and F. Wagner (1991), Marine biosurfactants, III. toxicity testing with marine microorganism and comparison with synthetic surfactants, *Z. Naturforsch* **46c**, 21-216, 14.
 12. Cooper, D. G. and D. A. Paddock (1984), "Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*", *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 173-176.
 13. Zajic, J. E., H. Gignard, and D. F. Gerson (1977), Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*, *Biotechnol. Bioeng.* **19**, 1303-1320.
 14. Fiechter, A. (1992), Integrated systems for biosurfactant synthesis. *Pure Appl. Chem.* **64**(11), 1739-1743.
 15. Beersteacher, E. (1954), *Petroleum Microbiology*. Elsevier. Houston.
 16. Bognolo, G. (1999), Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids surfaces A: Physicochem Eng Aspects* **152**, 41-52.
 17. Rosen. M. J. (1989), in *Surfactant and Interfacial Phenomena*, 2nd ed., Wiley. New York.
 18. MacFaddin. J. F. (1984), *Biochemical Tests for Identification for Medical Bacteria*, 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
 19. Schippers, C., K. Gessner, T. Muller, and T. Scheper (2000), Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorelipid mixture. *J. Biotechnol.* **83**(3), 189-198.
 20. Um, H. J., M. H. Kang, Y. P. Kim, S. J. Kim, and Y. C. Kim (2003), Sequence and phylogenetic analysis of the phnS gene encoding 2-hydroxy chromene-2-carboxylate isomerase in *Sphingomonas chungbukensis* DJ77. *The Korean Journal of Microbiology* **39**(3), 123-127.
 21. Makkar, R. S. and S. C. Cameotra, (1997b), Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **74**(7), 887-889.
 22. Magaritis, A., A. Kennedy, J. E. Zajic, and D. F. Gerson (1979), Biosurfactant production by *Nocardia erythropolis*. *Dev. Ind. Microbiol.* **20**, 623-630.
 23. Massaki, M., D. Hiromi, T. Toshifumi, M. Satoru, S. Yasutsugu, and I. Tadayuki (1993), A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. *Strain MIS38. J. Bacteriol.* **175**, 6459-6466.
 24. Najafpour, G. D. and C. P. Shan (2003), Enzymatic hydrolysis of molasses. *Bioresour. Technol.* **86**, 91-94.
 25. Shuler, M. L., F. Karg (2003), *Bioprocess engineering, Prentice Hall.* 194-196.
 26. Kim, S. H., E. J. Lim, K. S. Choi, Y. K. Jeong, K. L. Jang, and T. H. Lee (1996), Emulsifying agent production by *Acinetobacter* sp. BE-254, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 206-212.
 27. Asmer, H., S. Lang., F. Wagner, and V. Wray (1988), Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J. Am Oil Chem Soc.* **65**, 1460-1466.
 28. Ito, A., S. Inoue (1982), Sopholipids from *Touloopsis bombicola*; possible relation to alkane uptake. *Appl Environ Microbiol.* **43**, 1278-1283.
 29. Guerra-Santos, L. H., O. Kappeli, and A. Flechter (1986), Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 443-448.
 30. Javaheri, M., G. E. Jenneman, M. J. McInnerney, and R. M. Knapp (1985), Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 698-700.
 31. Yakimov, M. M., K. N. Timmis, V. Wray, and H. L. Fredrickson (1995), Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1706-1713.
 32. Neu. T. R. and K. Poralla (1990), Emulsifying agent from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 521-525.
 33. Arima, K., A. Kakinuma, and G. Tamura (1968), Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis* : isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 488-494.
 34. Bernheimer, A. W. and L. S. Avigad (1970), Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **61**, 361-369.
 35. Cooper, D. G., J. E. Zajic, and D. F. Gerson (1978), Production of surface active lipids by *Corynebacterium lepus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 4-10.
 36. Cooper, D. G., S. N. Liss, R. Longay, and J. E. Zajic (1989), Surface activities of *Mycobacterium* and *Pseudomonas*. *J. Ferment. Technol.* **59**, 97-101.
 37. Desai, A. J., K. M. Patal, and J. D. Desai (1988), Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. *Curr. Sci.* **57**, 500-501.
 38. Persson, A., E. Oesterberg, and M. Dostalek (1988), Biosurfactant production by *Pseudomonas Fluorescens* 378 : Growth and product characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 1-4.