

*Candida bombicola*로 부터 미생물 계면활성제 생산시 관여 인자에 관한 연구

김 원 경 · 김 은 기
인하대학교 공과대학 생물공학과

Effects of Culturing Parameters on the Production of Microbial Biosurfactant from *Candida bombicola*

Won Kyung Kim and Eun Ki Kim
Department of Biological Engineering, Inha University
Inchon, Namgu, Yonghyun, Inchon Korea 402-751

ABSTRACT

Effects of nitrogen sources and C/N ratio were investigated on the production of extracellular microbial surfactant, sophorolipid, from *C. bombicola*. Organic nitrogen sources, such as urea, peptone and yeast extract were found to be more effective for sophorolipid production, than inorganic nitrogen sources. Depending on the nitrogen sources, sophorolipid production pattern varied by increasing C/N ratio. Increased production of sophorolipid could be obtained up to 90g/L by feeding carbon source again 2 days after cultivation.

서 론

최근들어 미생물에서 생산되는 계면활성제 (Microbial surfactant, Biosurfactant)에 대한 관심이 고조되고 있다(1, 2). 미생물계면활성제는 기존의 합성계면활성제에 비해서 많은 장점을 가지고 있다. 예를들면 독성이 적은 점, 생분해가 잘 되는 점, 여러종류의 화학구조에 따라 각각의 특이성이 있어서 적용분야가 넓은 점, 미생물에 의해 낮은 가격으로 쉽게 구할 수 있는 원료에서 생산될 수 있는 점, 등을 들 수 있다(3). 특히, 합성계면활성제가 환경오염의 주원인이 되면서 이에 대한 대처품이 요구되는 상황에서 미생물에 의해 대량 생산될 수 있고 또 쉽게 분해되는 미생물계면활성제는 환경보존의 의미에서도 중요하다 하겠다. 따라서 미생물계면활성제는 많은 분야에서 그 이용성을 찾을 수 있다. 즉, 세제, 식품 및 음료, 석유관련제품, 의약품, 화장품공업, 페인트공업 등등에서 유화제, 분산제, 세제등의 광범위한 용도를 가지고 있다. 이러한 많은 응용성과 장점을 가진 미생물계면활성제 중 상품화가 되어있는

대표적인 것으로는 미국의 Petroferm 회사에서 생산하는 Emulsan으로서 기름에 오염된 탱커의 처리, 전자기관의 3차 세척용 등으로 사용되고 있다(4). 그외에 약 20여종의 미생물계면활성제가 특허화되어서 상품개발의 수준까지 와 있으나, 산업체 사이의 경쟁 및 보안관계로 극히 일부만이 보고되고 있다(5). 미생물계면활성제가 산업화되기 위해서는, 이것만이 가지는 특수한 용도를 개발하거나, 기존의 화학합성 계면 활성제에 비하여 낮은 가격으로 생산될 수 있어야 한다. 따라서 미생물계면활성제의 생산에 관여하는 여러 인자를 조사하여 생산성을 높여야 한다. 그러나 미생물내에서 아직 구체적인 생산 경로조차 확실치 않게 밝혀져 있지 않고 최근들어서야 이에 대한 연구가 진행되고 있다.

Sophorolipid는 sophorose sugar와 탄소수가 15개인 fatty acid로 이루어진 Glycolipid의 일종으로서 효모인 *Candida bombicola*로부터 생성되는 미생물계면활성제이다. 이에 대한 상업적인 응용연구도 활발하여 sophorolipid를 몇 단계의 화학적인 modification을 통해 강력한 보습 효과를 가진 유도

체를 생산하여 화장품에 응용하고 있다(7). 하지만 sophorolipid가 bulk product로 응용되기 위해서는 생산성을 높이는 연구가 필요하다. Sophorolipid의 전구체인 fatty acid의 생성경로가 lipid와 유사한 것으로 알려져 있어(3), 질소원 및 C/N비율에 많은 영향을 받을 것으로 판단되나, Sophorolipid의 경우, 일부 무기질소원의 세포 성장에 관한 실험결과만이 보고되어 있다(8). 따라서 유기질소를 포함한 질소원이 sophorolipid 생산수율에 미치는 영향에 대한 연구를 통하여, 최적의 생산조건을 확립하는 것이 중요하다 하겠다.

본 연구에서는 효모인 *Candida bombicola*에서 제면활성을 가진 Sophorolipid를 생산할 때 질소원의 종류와 C/N 비율에 따른 생산량의 변화 및 탄소원의 공급방법에 따른 생산량 변화를 조사하였다.

실험재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 균주는 효모인 *Candida bombicola* 7145(ATCC 22214)로 YM 사면 배지 형태로 4°C에 저장, 사용하였다. 사용된 배지의 조성은 Table 1. 과 같으며, YM배지에서 1일 배양한 1ml를 50ml 배양액(500ml 플라스크)에 접종하여, 30°C, 150rpm으로 7일간 배양 하였다.

Table 1. Composition of culture medium

COMPONENT	CONTENT(%)
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄	0.5
CaCl ₂	0.01
NaCl	0.01
GLUCOSE	10
CORN OIL	10
*NITROGEN SOURCE	0.05mole as N

*질소원 및 농도는 실험에 따라 변동

분석방법

〈균체〉

건조 질량으로 그 양을 측정했으며 남아있는 oil을 제거하기 위해 10ml 배양액을 취하여 3500rpm에서 20분 동안 원심분리하였다. 상등액은 버리고 남은 세포를 증류수와 세척액(chloroform : methanol = 2 : 1 v/v(%))을 사용, 세척한 후 남은 pellet을 70°C에서 2일간 건조, 측정하였다.

〈Sophorolipid〉

배양이 끝난 배양액을 20ml 취하여 3500rpm에서 20분 동안 원심 분리한다. 침전된 균체와 갈색의 sophorolipid 중 sophorolipid만 취하여 건조하고 상등액내에 용해되어 있는 sophorolipid를 얻기 위해 상등액을 동량의 에틸아세테이트로 추출한후 에틸아세테이트층을 분리하여 50°C에서 건조한후 침전된 것과 함께 crude sophorolipid를 얻어서, 건조중량으로 sophorolipid의 양을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

1) 질소원의 종류 및 C/N비율의 영향

Fig. 1에는 배지속에 포함된 질소원의 종류를 변화시켰을때 생성된 Sophorolipid의 양과 균체량을 표시하였다. Sophorolipid의 생성량은 질소원의 종류에 따라 많은 변화를 보여주고 있다. 즉, 유기질소원인 Urea, Peptone, Yeast Extract등이 비교적 높은 생성량을 나타내고 있는 반면, NaNO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄등은 균체의 성장과 관계없이 낮은 수율을 보여주고 있다. 이러한 현상은 Lipid를 생산하는 다른

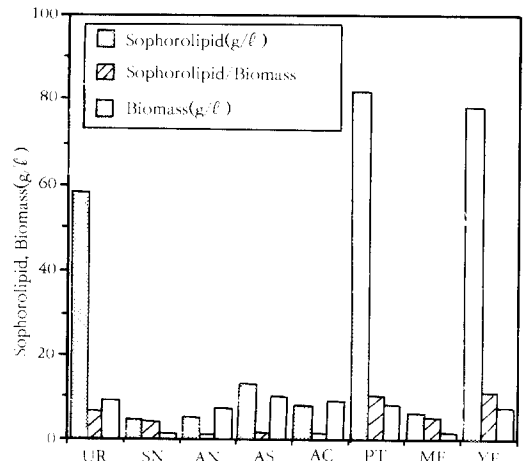


Fig. 1. Effects of Nitrogen Sources on Sophorolipid Production

- UR : Urea(0.05M)
- AN : Ammonium Nitrate(0.05M)
- AC : Ammonium Chloride(0.05M)
- ME : Malt Extract(0.5%)
- SN : Sodium Nitrate(0.05M)
- AS : Ammonium Sulfate(0.05M)
- PT : Peptone(0.5%)
- YE : Yeast Extract(0.5%)

연구에서도 보고되어 있다(9). 즉 NH_4^+ 염을 질소원으로 사용하는 경우에 *R. toruloides*의 lipid 축적량은 균체의 18%에 머무르고 있으나, 유기질소원인 Urea를 사용했을 경우 균체의 50%가 Lipid로 축적되었다. 이 경우 해당작용관련 효소 중 phosphofructokinase와 pyruvate kinase가 유기질소원을 사용했을 때 활성이 높아지기 때문인 것으로 알려져 있다(10). 따라서 Sophorolipid의 구성부분중 Fatty acid chain의 생성경로가 Lipid생성경로와 유사하기 때문에, 유기질소원을 사용했을 때 Sophorolipid의 수율이 증가하는 것으로 사료된다.

Peptone, Yeast Extract의 경우에는 0~3%의 범위중 0.5%가 제일 높은 생성량을 보여주고 있다. 특히 Peptone(0.5%) Yeast Extract(0.5%)의 경우에는 생성된 Sophorolipid의 양이 약 80g/L에 이르고 있어서 적절한 질소원의 선택이 많은 영향을 미침을 보여주고 있다. 생산가격을 비교한 다른 논문을 보면 Sophorolipid의 생산량이 67g/l를 보일 때 생산단가는 2.75 \$/Kg이었고 이에 비해서, 합성계면활성제인 Span 60은 3.25 \$/Kg이었다(11). 따라서 본 연구에서의 80g/l의 수율은 Sophorolipid의 생산가격을 더욱 낮출수 있을 것으로 판단된다.

Sophorolipid의 생산량은 질소원의 종류이외도, C/N비율에 많은 영향을 받음을 알 수 있었다. Fig. 2와 Fig. 3에는 Urea와 NH_4NO_3 를 질소원으로 종류에 따라, 생산량이 각기 다른 형태임을 보여주고 있다. 즉, Urea의 경우 C/N이 커질수록 급격히 증가하여, 약 C/N=100이상에서 최대치를 보이고 있는 반면에 NH_4NO_3 의 경우 C/N 비율이 1000까지의 급격히 증가, 최대치를 보이고 그 이상의 높은 C/N비율에서는 Sophorolipid의 양이 감소함을 보여주고 있다. 이러한 경향은 질소원으로 NH_4Cl 을 사용한 경우에도 같은 경향을 보여서 C/N 비율이 1000~3000 범위에서 최대를 보이고 C/N비율이 더 증가하면 급격히 감소하였다. 질소원이 고갈되고 탄소원이 충분히 있을 경우 Lipid의 축적이 시작되는 것은 이미 많은 연구를 통해 알려져 있다(12). 따라서 C/N비율이 증가함에 따라 Sophorolipid의 양이 증가하는 것은 Lipid생성이 경우와 같이 질소원이 고갈됨에 따라 NAD^+ -dependent isocitrate dehydrogenase의 저해에 의해서 Fatty acid의 생성이 촉진되기 때문이라 사료된다(13).

(2) 탄소원 공급방법의 영향

배지에 사용되는 탄소원이 공급방법이 Sophorolipid의 생성에 영향을 미치는가를 조사하기 위해서

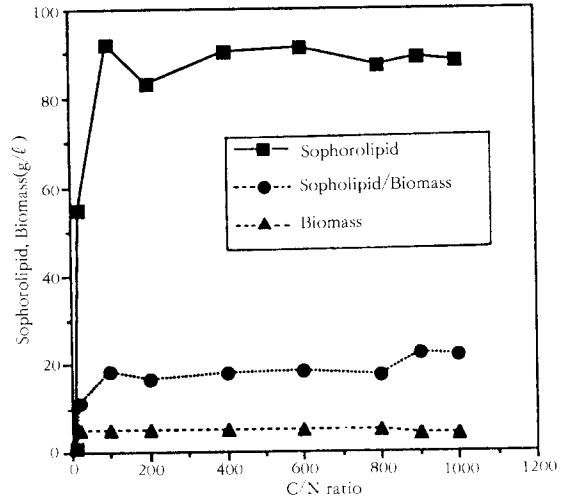


Fig. 2. Effects of C/N ratio of Urea on Sophorolipid Production

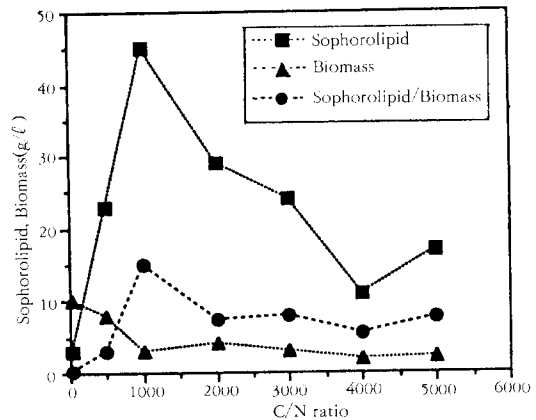


Fig. 3. Effects of C/N Ratio of Ammonium Nitrate on Sophorolipid Production

탄소원이 사용된 포도당과 Corn oil의 공급방법을 각기 달리하였다. Fig. 4에는 Corn oil의 배지공급 시기를 각기 달리 하였을 경우의 변화를 보여주고 있다. 그림에서와 같이 처음부터 포도당과 함께 Corn oil을 공급하는 것이 제일 높은 생산량을 보였고 Corn oil을 공급 안했을 경우 균체의 성장과는 별 관계없이 Sophorolipid가 전혀 생산이 안 됨을 보여주는 점이 특이하다 하겠다. Sophorolipid의 구성성분인 친수성 Sophorolipid와 소수성 Fatty acid의 합

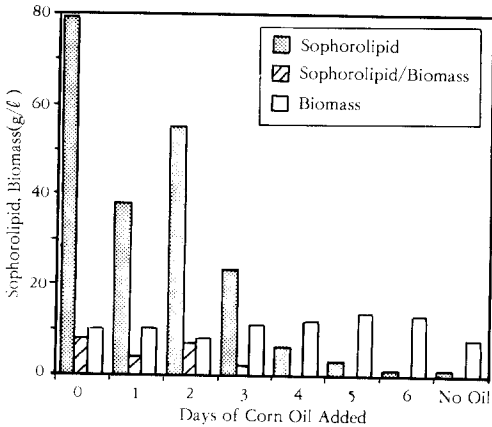


Fig. 4. Effects of Corn Oil Feeding Time on Sophorolipid Production

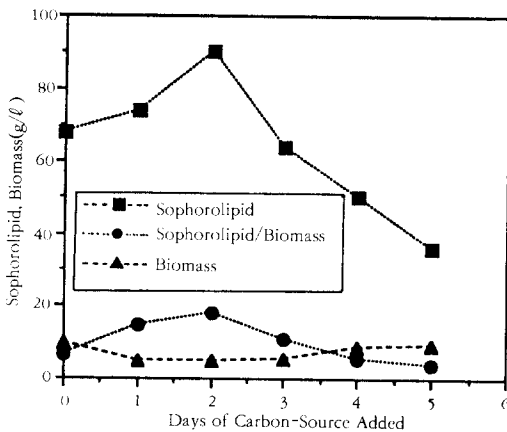


Fig. 5. Effects of Carbon-source Feeding Time on Sophorolipid Production

성을 위해서는 한 종류의 탄소원보다는 포도당 이외에도 Fatty acid를 쉽게 생성할 수 있는 시발물질로서 Corn oil을 처음부터 가해주는 것이 중요하다 하겠다. 이와 같은 현상은 배지에 포도당 이외에도 탄화수소를 첨가한 것이 더 많은 생성량을 보인 다른 실험과도 같은 결과를 보여주고 있다(14). 탄소원공급방법을 변화시킨 다른 실험으로서, 배지내의 탄소원의 50%를 나중에 공급할 때의 변화량을 조사하였다(Fig 5). 공급포도당의 50%를 2일째 공급하는 것이 약 30% 정도의 증가를 보임을 알 수 있다. 그러나 탄소원인 포도당과 Corn oil을 6일에 나누어 매일 공급한 경우는 Sophorolipid의 생성에 큰

영향이 없었다. 또한 생성된 Sophorolipid에 의한 저해현상을 조사하기 위해 생성된 Sophorolipid를 제거한 경우는 Sophorolipid 생산량에 큰 차이를 보이지 않았다. 이 경우 생성된 Sophorolipid는 배지의 아랫부분에 분리되는 층을 이루어서 약 10분간 정지 후에도 쉽게 분리, 제거되었다.

요 약

본 연구에서는 *C. bombicola*에서 생성되는 미생물 계면활성제인 Sophorolipid의 생산관련인자 중, 질소원의 종류에 따른 영향과 C/N비율에 따른 생성량의 변화를 관찰하였다. 유기질소원이 비교적 높은 생성량을 보였으며 그 중 pepton의 경우가 80g/L에 해당하는 높은 생성량을 보였다. C/N비율의 변화에 의한 Sophorolipid의 생성량의 변화 양상이 질소원의 종류에 따라 각기 다르게 나타났다. 또한 탄소원의 50%을 배양 이틀후 공급하는 방법으로 Sophorolipid가 약 30% 증가됨을 알 수 있다.

감 사

본 연구에는 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단 자유공모과제 학술연구조성비의 지원에 의해 연구되었음.

참고문헌

1. D. G Edward(1986), *Macrobiol Sci.*, **3**, 145
2. C. An Mulligan and B. F. Gibbs(1990), *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **47**, 23
3. N. Kosaric, W. Carinins and N. C. Gray (1987), *Biosurfactants and Biotechnolgy*, ch. 2. Marcel Dekker Inc, N. Y.
4. E. Rosenbery, A. Zuckerberg, C. Rubinowitz and P. L. Gutnick(1979), *Appl. Environ. Microbiol* **37**, 402
5. KAO Chemical Co.(1984) AP 8317-555
6. D. G. Cooper and Z. Zajic(1980), *Adv. Appl. Microbiol* **26**. 229
7. Y. Kimura(1989), *Fragrance Journal* **6**, 61
8. D. G. Cooper and D. A. Paddock (1984), *Appl Environ. Microbiol* **47**. 173
9. C. T. Evans and C. Ratledge(1984) *J. Gen Microbiol.* **130**. 1963

10. C. T. Evans and C. Ratledge(1984)*J. Gen Microbiol.* **130**, 3251
11. Itoh, S and S. Inoue(1982) *Appl. Environ. Microbiol.*,**36** 1278
12. C. Ratlege(1984) *Biotechnology for the Oils and Fat Industry*. (P. S. Dawson and J. B. M. Rattray. eds) American Oil Chemist's Society, Illinois
13. P. A. Botham and C. Ratledge(1979). *J. Gen. Microbiol.* **114**, 361
14. S. Inoue and S. Ito (1982), *Biotech. Lett.* **4**, 3