

*Penicillium spiculisporum*으로부터 미생물 계면활성제의 최적생산에 관한 연구

김 동 호 · *이 정 복 · *임 건 빈 · †김 은 기

*고려합섬(주) 대덕연구소, 인하대학교 생물공학과

Optimized Production of Microbial Surfactant, S-acid, from *Penicillium spiculisporum*

Dong-Ho Kim, Jeong-Bok Lee*, Guhn-Been Yim* and Eun-Ki Kim †

*Kohap R & D Center, Dept. of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

ABSTRACT

Investigation and optimization of culturing conditions were performed for the production of microbial surfactant, O-acid (precursor of S-acid) using *Penicillium spiculisporum*. Glucose and ammonium nitrate were found to be the most effective carbon and nitrogen sources, respectively. Supplementation of medium with trace elements, such as CaCl₂ and FeSO₄, increased the O-acid production by 20% and maintenance of the dissolved oxygen tension near saturation increased 40% of the O-acid productivity. Also 60% increase in the O-acid production was observed by maintaining the glucose concentration near 50g/l by feeding glucose during the cultivation.

서 론

O-acid(4-hydroxy-4,5-dicarboxypentadecanoic acid)는 *Pecillium spiculisporum*으로부터 생산되는 미생물계면활성제로서 배양 중 불용성 결정형태로 세포 외부로 배출되며 이 물질을 분리, 재결정을 하면 산업적으로 응용범위가 많은 dicarboxylic acid 형태인 S-acid(spiculisporic acid)로 전환된다(1). S-acid는 소수성 부분으로 n-데실기 및 두 개의 카르복실기를 가지고 있고 친수성 부분으로 한 개의 락톤링을 가지고 있다(Fig. 1). 현재 S-acid는 화장품 산업에서 일부 이용되고 있으며 일본에서는

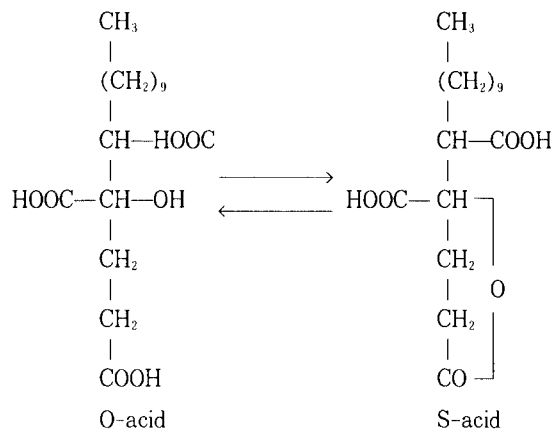


Fig. 1. Relationship between S-acid & O-acid.

† Corresponding Author

S-acid의 염이나 유도체에 대한 응용연구가 많이 이루어지고 있다(2-4).

이러한 미생물계면활성제에 대한 연구 및 고찰은 환경에 적합한 물질로의 대체가 소위 "그린라운드" (Green Round)를 통해 국제적으로 법적인 규제에 들어서면서 더욱 관심을 끌고 있다. 미생물계면활성제는 기존의 화학적으로 합성되는 계면활성제에 비해 많은 장점을 가지고 있다. 즉, 독성이 거의 없고 생분해가 잘 되며, 얻기 쉬운 원료로부터 배양을 통해 쉽게 생산할 수 있고, 화학합성을 하기에 어려운 구조를 가진 종류가 많다는 장점이 있다. 특히 이들의 다양하고 특이한 구조적 특성때문에 특정분야에 많은 응용성을 가지고 있다. 반면 이들 미생물 계면활성제는 화학합성제보다 가격경쟁력이 낮기 때문에 산업화를 위해서는 생산수율 향상을 통한 생산단가를 낮추는 연구가 선행되어야 한다.

생산성을 높이는 방법으로서의 균주의 돌연변이 및 유전자조작, 배양조건의 최적화를 통한 수율향상 등이 다양하게 연구되고 있다. 유전자조작을 통하여 생산관련 유전자를 클로닝하여 수율을 높이려는 연구는 *Bacillus*, *Yeast* 및 *Pseudomonas* 등에서 진행되고 있으나, 미생물계면활성제가 균체성장 후기에 생산되는 2차산물 형태가 대부분이어서 생산경로가 분명히 알려져 있지 않고, 유전자의 확인, 분리 및 제어, 발현에 대한 연구가 초보에 머물러 있는 실정이다(5-7). 미생물계면활성제의 경우, 배양조건의 변화에 따라 생산량은 많은 차이를 보이고 있다. 예를 들면 효모에서 생산되는 소포리피드의 경우, 탄소원인 Oil의 종류 및 배합비율, 공급방법 등에 따라 생산량이 30-120(g/l)의 많은 변화를 보이고 있다(8). 따라서 미생물계면활성제의 생산관련인자에 대한 연구는 배양조건의 최적화에 따른 수율향상 효과뿐만 아니라 대사경로 등에 많은 정보를 주고 있어 많은 연구가 필요한 부분이다.

지금까지 연구결과에 의하면 미생물계면활성제의 생산에 영향을 미치는 주요인자로는 탄소원의 종류, 영양원의 제한, 탄소원/질소원 비의 변화 및 질소원의 종류, 배양조건(pH, 용존산소의 양, 온도, 교반속도)의 조정, 다가이온의 공급(9), 성장시기(10), 생산물에 의한 저해작용(11) 등이 있다.

본 실험에서는 S-acid의 open ring acid 형태인 O-acid를 *Penicillium spiculisporum*로부터 생산시 수율 향상목적으로 생산 관련인자 즉, 1) 질소원 및 탄소원, 2) 미량원소, 3) 탄소원의 공급방법 등을 조사하고 유가식배양을 통한 최적생산조건을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

Penicillium spiculisporum Lehman No 10-1 (ATCC 16071)을 ATCC에서 구입, 사용하였으며 단기보관으로는 malt extract agar plate 및 slant, 장기보관으로는 glycerol stock(65% glycerol)으로 -70°C에 보관하였다. 기본배지로서는 Glucose 110g/l, NH₄Cl 1g/l, KH₂PO₄ 1g/l, MgSO₄ 1g/l, CSL 1g/l를 사용하였다. 플라스크 배양의 경우 glycerol stock으로부터 10ml 기본배지(100ml 플라스크)에 3일간 배양 후, 50ml 기본배지(500ml Sakaguchi 플라스크)에 5%(V/V) 접종을 하여 30°C, 200rpm으로 진탕배양기를 사용, 7일간 배양하였다. Fermentor의 경우 2.5ℓ jar fermenter(한국발효기, 인천)를 사용, 1ℓ working volume으로 공기공급량(0.8 VVM 기준) 및 교반속도를 조절하여 용존산소를 조절하였으며, pH는 별도 조정하지 않았다.

분석방법

균체량

배양액을 20ml 취하여 불용성 O-acid를 NaOH(10N, 1ml)로 용해시킨 후, 여과하여 90°C 증류수로 2회 세척한 후 90°C에서 1일간 건조시켜 건조중량을 측정하였다.

O-acid

O-acid는 보통 상온에서 불용성이므로 배양액 1ml를 취한 후 페놀프탈레인 지시약을 사용하여 0.1N NaOH로 종말점까지 적정하였다. 이 경우 1ml의 0.1N NaOH는 11.5mg의 O-acid에 해당되었다.

포도당 농도

0.1ml의 배양상등액을 10배 희석하여 5ml의 D-toluidene reagent(Sigma)와 혼합하고 이를 100°C에서 10분간 가열하여 635nm에서 흡광도를 측정하였다.

암모니움, 질산이온

암모니움농도 측정은 Berthelot 반응에 의해 측정하였다. 즉, 2ml의 용액 A(10g/l phenol, 10mg/l sodium nitroprusside)를 0.1ml의 sample과 혼합하고 2ml 용액 B(90g/l Na₂HPO₄, 12H₂O, 6g/l NaOH and 10ml/l NaOCl)와 혼합하여 37°C에서

30분간 incubation 후 630nm에서 흡광도를 측정하였다(12). 질산이온의 측정은 질산이온전극법을 사용하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 영향

Table 1에서와 같이 탄소원으로 포도당을 사용했을 때가 균체성장이 가장 좋았고 O-acid의 생산량도 가장 (25.5g/l) 많았다. Sucrose의 경우 포도당과 비슷한 양의 O-acid를 생산하였다. 효모에서 소포리피드의 생산시 포도당과 옥수수유(corn oil)를 탄소원으로 썼을 때 생산수율을 올릴 수 있었으나(13) 이 실험에서는 오히려 낮은 생산량을 보여주었다. 소포리피드 혹은 람노리피드의 경우처럼 oil 혹은 hydrocarbon이 있어야만 많은 양이 생산되는 다른 계면활성제의 경우에 비해서 O-acid의 경우는 oil 등이 계면활성제 생산에 영향이 없는 것으로 보아 포도당이 lipid 축적과정인 구연산의 과량생산에 의한 지방산 생산경로를 따라서 소수성 그룹을 생산하는 것으로 사료된다.

질소원의 영향

미생물계면활성제 생산의 일반적인 기작은 질소원의 고갈로 인한 lipid계통의 생산 경로와 관련된 것으로 보고되었지만(14), O-acid의 경우, 질소원에 대한 분명한 기작은 밝혀져 있지 않다. S-acid 생산의 질소원의 영향을 조사하기 위해서 질소원의 농도, 종류를 변화시켰다. 유기질소원인 Yeast extract,

Malt extract, Peptone을 기본배지 성분인 NH₄Cl과 비교하였으며 이들의 농도를 0.1, 0.5, 1, 2g/l로 변화시켜서 실험을 하였다. 균체량의 경우, 1g/l (NH₄Cl)에서 최대였으며, O-acid의 생산은 Yeast extract(1g/l)가 28g/l로 가장 많았다(Table 2 참조). 무기질소원으로는 NH₄Cl, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃를 조사한 결과 (NH₄)₂SO₄가 NH₄Cl 경우와 유사한 O-acid의 생산량을 보였으나 수율에 있어서는 NH₄Cl보다 낮은 결과를 보였다. 이러한 무기질소원을 이용하는 경우에 있어서 질소원으로서 암모늄 이온이나 질산이온의 농도는 미생물계면활성제의 생산에 많은 영향을 준다는 보고가 있다(15). O-acid의 경우에도, 생산량은 질소원의 형태에 의해 영향을 받는 것으로 보인다. 질소원의 종류에 따라 O-acid 생산의 영향을 살펴 본 결과, NH₄Cl의 양이 증가할수록 O-acid의 양이 감소하는 결과를 보여주고 있다(Fig. 2). 이것은 앞서 언급한대로 질소원의

Table 2. Effect of organic nitrogen sources on O-acid production.

	Concentration(g/l)*	O-acid(g/l)	Yield(%) [†]
Peptone	0.5	24.5	24
Yeast extract	1	28	29
Malt extract	0.5	26	28
NH ₄ Cl	1	25	27

* Optimum concentrations, determined from separate experiments

[†] Yield(g. acid/g. glucose consumed)

Table 1. Effect of carbon sources on the production of O-acid.

Carbon sources (110g/l)	Biomass (g/l)	O-acid (g/l)	Specific Yield (g acid/g cell)
Glucose	10.7	25.5	2.38
Fructose	6.4	10	1.58
Sucrose	9.8	23.5	2.39
Lactose	5.7	8.3	1.45
Glycerol	5.8	6.5	1.12
Glycerol + Glucose(50:60)	7.4	12	1.62
Glucose + Corn oil(55:55)	ND*	6	ND
Corn oil	5.9	12	1.12

*ND: Not Determined.

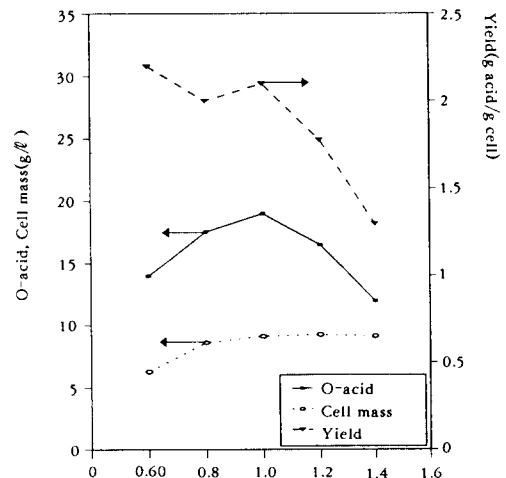


Fig. 2. Effects of NH₄Cl on O-acid production.

결핍이 있을 때, lipid 등이 축적되는 것과 같은 현상으로서 O-acid의 경우도 이 경우에 해당하는 것이 아닌가 한다. 하지만 NaNO_3 를 질소원으로 하여 그 농도를 증가시켰을 때에는 NH_4Cl 의 경우처럼 O-acid의 생산량이 떨어지는 현상을 보이지 않았다. 특히 NH_4NO_3 의 경우 Table 3에서 보듯이 질소량 기준으로 같은 양을 사용했을 때, 가장 많은 S-acid를 생산하였다. 시간별 생산곡선을 조사한 결과 Fig. 3에서 보듯이 NH_4^+ 이 소비된 후, NO_3^- 도 소비되기 시작하였다. 이에 비해 NO_3^- 단독으로 사용하는 경우 S-acid 생산량도 적고, 분명한 경계점을 보이지 않는 특징을 보이고 있다(Fig. 4 참조).

미량원소의 영향

미생물계면활성제의 생산경로와 유사한 lipid를 생산할 경우 수율을 향상시킬 수 있는 일반적인 pre-

Table 3. Effect of inorganic nitrogen sources on O-acid production.

Nitrogen source	Conc. (g/l)*	Biomass (g/l)	O-acid (g/l)	Yield (%)†
NH_4Cl	1	10.1	23.5	23
NaNO_3	1.5	8.2	18	22
NH_4NO_3	0.8	11.3	27	17
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.2	11.1	22.5	25

* Moles of nitrogen were same in each cases.

† Yield : (g. acid/g. glucose consumed)

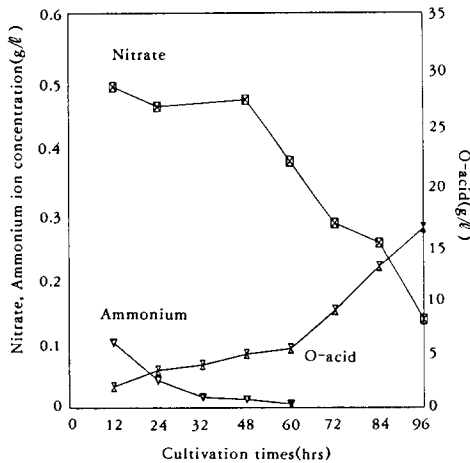


Fig. 3. Consumption of ammonium and nitrate during cultivation.

cursor 및 몇 가지의 trace metal ion 등이 보고되어 있다. 이중 몇 가지의 농도를 변화시켜서 그 효과를 고찰하였다. 미생물계면활성제의 생산에 있어서 iron의 효과는 그 기작이 알려져 있지 않지만 세포 성장이나 계면활성제의 생산에 있어서 영향이 크다는 보고들을(16) 근거로 실험을 하였으며 TCA cycle의 주요 stimulatory effector인 칼슘 이온의 효과를 CaCl_2 로 실험을 하였다. 실험 결과 CaCl_2 나 FeSO_4 의 첨가에 의해 약 3~5g/l의 증가를 보였다 (Table 4 참조).

용존산소의 영향

이 실험에서는 공기공급량 및 교반속도를 조정하여 용존산소를 포화용존산소의 30%, 70%, 95%로

Table 4. Effect of trace elements on the O-acid production.

Trace element	Optimum Concentration(g/l)**	O-acid increased(g/l)*
ZnSO	0.01	2
FeSO	0.05	4-5
CaCl	0.001	3-4
EDTA	0.01	3-4
Yeast extract	0.01	3-4
Sodium citrate	0.001	1-2

* Compared to the control(g/l)

** Optimum concentration was obtained by measuring the amount of O-acid from 5 different concentrations of each trace element.

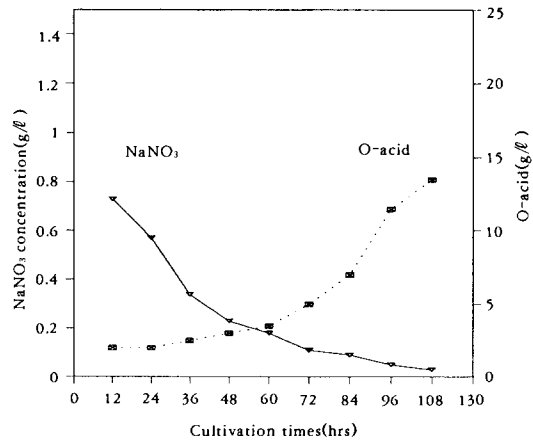


Fig. 4. Production of O-acid with NaNO_3 .

유지, 배양을 하였다. 그 결과 Fig. 5에서 보듯이, 30%를 유지한 경우 성장속도 및 포도당공급속도도 느리고 O-acid 생산량도 낮았으며 95%의 용존산소를 유지한 경우가 성장속도 및 O-acid 생산량, 수율이 가장 좋은 결과(30%의 용존산소 유지시 29g/l, 95%의 용존산소 유지시 42g/l의 O-acid)를 보였

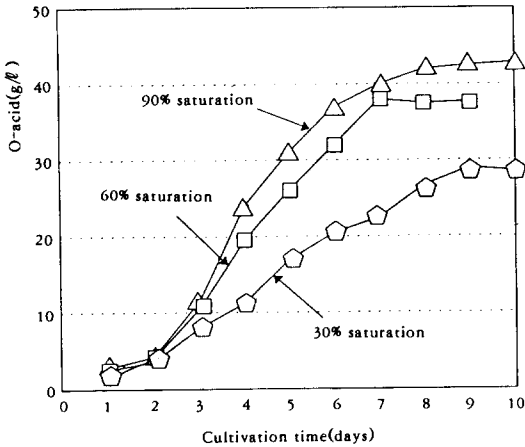


Fig. 5. O-acid production at different aeration conditions.

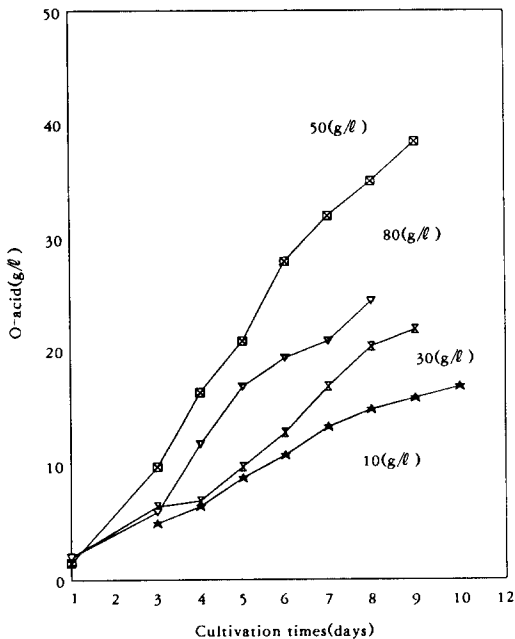


Fig. 6. Effects of glucose concentration during culture on O-acid production.

다. 용존산소의 양이 O-acid 생산에 미치는 영향에 대해 현재까지 확실한 보고가 없으며, *P. spculisporum*의 경우 충분한 aeration 상황에서 호기적 대사를 이용한 성장이 빨라질 수 있고 탄소원의 흡수 및 이용속도에 큰 영향을 주는 것으로 생각된다. Lipid의 생합성이나 과잉생산을 유도하려면 일단 TCA cycle상의 citrate의 축적현상이 필요하므로 일단 여기까지의 경로상에서 충분한 산소의 양은 에탄올이나 다른 유기산의 합성경로를 저해하고 당의 이용을 가속화하여 lipid 계통의 metabolite인 O-acid의 합성에 좋은 효과를 주는 것으로 보이는 것으로 보인다.

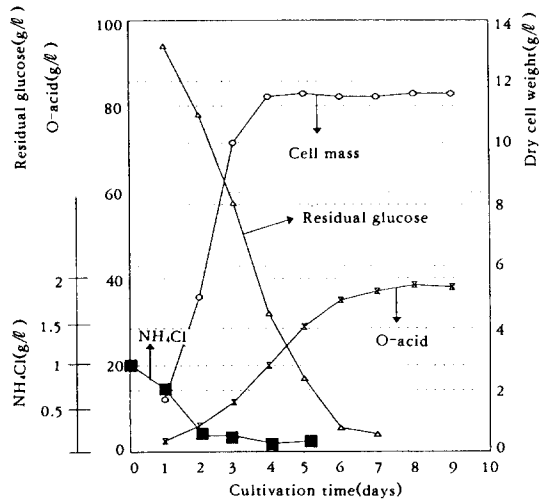


Fig. 7. Time course behaviour of batch culture.

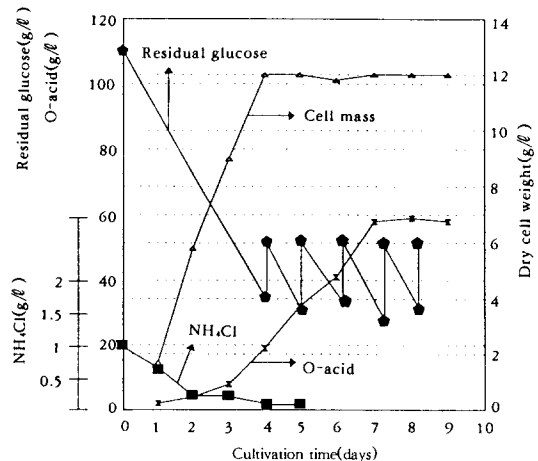


Fig. 8. Time course of fed-batch culture.

포도당의 영향 및 유기식배양

Lipid 등의 생산에 있어서 충분한 탄소원을 공급하는 것이 필요한 경우는 많이 보고되어 있다. S-acid의 경우에는 너무 높거나 낮은 초기포도당 농도는 S-acid의 생산에 저해요인이며 특히 100g/l의 포도당 사용시 에탄올이 생산됨을 보고하였다(1). 따라서 배양기간 중 적절하게 포도당을 공급하는 것이 중요하다 하겠다. 최적당농도를 결정해야 하기 위해서 플라스크배양을 실시하였다. 초기의 포도당 농도를 80, 50, 30, 10g/l로 하여 1일 동안 소비한 양만큼을 공급하여 각각의 초기당농도를 유지하며 약 10일간 배양한 결과, 약 50g/l를 유지한 경우가 38g/l의 O-acid를 생산하여 가장 좋은 결과를 보였다, 이 경우 1일 평균 소모한 양은 약 18g/l 정도였다(Fig. 6 참조). 80g/l 이상에서의 O-acid생산량이 감소하는 것으로 보아 80g/l 이상의 당 농도에서는 저해효과가 있는 것으로 보인다. 앞서의 플라스크배양을 기초로 하여 Fermentor에서 포도당을 유기식으로 공급하였다. 그 결과 유기식 배양의 경우 회분식에 비해 균체량은 크게 변하지 않았으나 O-acid 생산량에 있어서 약 60%의 증가를 보였다(Fig. 7, 8).

요 약

*P. spiculisporum*으로부터 생산되는 미생물계면활성제인 S-acid의 전구체인 O-acid 생산에 영향을 주는 인자들을 검토하고 포도당 유기배양을 통해 최적생산조건을 조사하였다. 탄소원으로 oil 등은 별 영향을 미치지 않았고 포도당이 O-acid 생산에 적절한 탄소원이었으며 무기질소원으로는 NH_4NO_3 가 높은 O-acid 생산량을 보였다. 미량원소인 CaCl_2 , FeSO_4 등의 첨가에 의해 약 20% 정도의 O-acid가 증가되었으며 용존산소는 포화에 가깝게 유지한 경우 생산량은 40% 증가되었다. 배양 중 포도당농도는 50g/l로 유지하는 것이 최적이었으며 Fermentor에서 포도당의 유기식공급에 의한 경우, 회분식에 비하여 약 60%의 O-acid 생산증가를 보였다.

감 사

본 연구는 고려합섬(주)의 지원과 인하대 교내연

구비(1993)에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Tabuchi Nakamura and Kobayashi (1977), *J. Ferm. Technol.*, **55**, 38.
2. Tabuchi Nakamura and Kobayashi (1977), *J. Ferm. Technol.*, **55**, 42.
3. Yutaka Ishigami, Shinsuke Yamazaki and Yasuo Gama (1983) *J. of Colloid and Interface Science*, **94**(1), 131.
4. Yukata Ishigami, Yasuo Gama, Shinsuke Yamazaki and Shiegeru Suzuki (1989), *Proceedings World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry*, AOCS, 339.
5. Dai Kitamoto, Tkeyoshi Fuzishiro, Hiroshi and Tadatsu Nakahara (1992), *Biotech. Lett.*, **14**(4), 305.
6. Akihiro Ohno, Takashi Ano and Makoto Shoda (1992), *Biotech. Lett.*, **14**(2), 1165.
7. Stephen Picataggio, Tracy Rohrer and L.Dudley Eirich (1992), *Bio/Technology*, **10**, 894.
8. D. G Cooper, J. Akit and N.Kosaric (1982), *J. Ferm. Technol.*, **60**, 19.
9. T. Suzuki, K. Tanaka, I. Matsudara and S. Kinosita (1969), *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1619.
10. Yosset Shabtal and Daniel I. C. Wang (1990) *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 753.
11. D. G Cooper (1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, **42** (3), 408.
12. F. Srienc, B. Arnold, and J. E. Baily (1984), *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 982.
13. D. G. Cooper and D. A. Paddock (1984), *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 173.
14. Marie-Renee De Roubin and Catherin N. Mulligan (1980), *Can. J. Microbiol.*, **35**, 854.
15. Catherin N. Mulligan and Bernard F. Gibbs (1989), *Appl. Env. Microbiol.*, **55**(1), 3016.
16. A. Dalhoff and H. J. Rehm (1979), *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **3**, 203.