

Bacillus spp.를 이용한 Biosurfactant 생산공정

허성호[†] · 양지석* · 홍정화**

동의공업대학 식품과학연구소

*유니푸드테크(주)

**인제대학교 식품과학부

Production of Biosurfactant Using *Bacillus* spp.

Sung-Ho Hur[†], Ji-Seok Yang* and Jeong-Hwa Hong**

Institute of Food Science, Donggeui Institute of Technology, Busan 614-715, Korea

*Unifood Tech, Kimhae 621-010, Korea

**School of Food Science, Inje University, Kimhae 621-749, Korea

Abstract

Among the bacterial strains isolated from chungkook-jang, *Bacillus subtilis* CH-1, *Bacillus circulans* K-1 and *Bacillus subtilis* (natto) N-1, *Bacillus subtilis* CH-1 showed the highest productivity of biosurfactant. A-medium was selected for the basal medium in the large scale production of biosurfactant, and modified to synthetic medium which containing 2% glucose, 0.3% soy peptone, and mineral salts. The surface tension was reduced to maximal value after 96 hr after fermentation, about the 43% of initial tension. Temperature and initial pH of medium was not critical factor for the biosurfactant production. The yield of crude biosurfactant was 6 g/L under the optimum condition.

Key words: biosurfactant, chungkook-jang, *Bacillus subtilis* CH-1

서 론

계면활성제(surfactant, emulsifier)는 분자 내에 소수성 부분과 친수성 부분을 함께 함유하고 있어 계면상의 장력을 감소시키는 능력이 있는 양극성 분자이다(1). Oil/water 또는 air/water 경계면과 같이 극성이 다른 유동단계 사이의 경계면에 우선적으로 작용하여 표면장력을 감소시키며, 생성 미생물에 따라 구조가 다양한 그룹(2)으로서 최근 biosurfactant의 antitumor activity, antibacterial substance, fibrin clot formation inhibitor, anti HIV-activity, hemolysis, cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, 지질 이중막에 ion-channel 형성 등의 다양한 생리활성기능이 보고되고 있다(3-10).

Biosurfactant는 미생물에 의해 생산되는 양쪽성 화합물로 성장체의 세포 표면에 붙어 있거나 세포 외부로 배출된다(11). 초기의 bacterial surfactant에 대한 보고 이후로 다양한 biosurfactant가 보고되고 있으며, glycolipid, phospholipid, lipopeptide, neutral lipid, fatty acids 그리고 lipopolysaccharides 등의 연구가 그 대부분을 차지하고 있다. 미생물 계면활성제는 독성이 적고, 생분해되어 비교적 간단한 배양과정 및 포도당, hydrocarbon, 식품성 기름 등 단순 원료를 이용해서 쉽게 생산된다는 장점 외에도 화학적으로 합성이 어려운

특수한 구조를 가지고 있다(2). 이와 같은 장점을 지닌 미생물 계면활성제는 최근 미국, 캐나다 등지에서 glycolipid 계통의 미생물 계면활성제를 원유의 삼차회수, 수송관을 통한 장거리 수송시 점도저하용 및 원유탱커 청소용 등 석유산업분야에 이용하고 있으며(12), 일본에서는 glycolipid 계통의 sophorose lipid가 이미 상업화되어 화장품 원료로 사용된다. 미생물 계면활성제 이외에도 유럽에서는 alkylpolyglycosides, starch-based surfactants 등 환경적합제인 "Green detergents"가 세제 등의 용도로 상업화되어 있다. 또한 식품, 의약품, 화장품 등의 유화제로 carbohydrate ester 등의 계면활성제가 사용되고 있는 추세이므로 이에 대한 수요는 계속 증가할 것으로 판단된다(13).

본 연구진은 청국장 발효 과정 시 생성되는 항균물질에 관한 연구를 수행 중 특이한 항균활성을 나타낸 물질을 정제 분석하여 본 결과 biosurfactant로 확인되었다. 이에 본 연구에서는 산업적으로 적용범위가 넓은 미생물 유래의 계면활성제 개발을 위해 청국장에서 분리한 균주인 *Bacillus circulans* K-1, *Bacillus subtilis* (natto) N-1, *Bacillus subtilis* CH-1로부터 생산되는 biosurfactant의 생산수율 향상을 목적으로 생산 관련인자인 탄소원, 질소원, 미량원소를 조절하였으며, 최적 생산조건을 알아보기 위하여 온도, pH에 따른 차이를

[†]Corresponding author. E-mail: benhur@dit.ac.kr
Phone: 82-51-860-3170, Fax: 82-51-860-3331

살펴보았다. 이를 통하여 biosurfactant의 대량 생산을 통한 산업적 활용으로 계면활성제 생산에 이바지하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

청국장에서 분리한 균주인 *Bacillus circulans* K-1, *Bacillus subtilis*(natto) N-1, *Bacillus subtilis* CH-1을 시험균주로 사용하였다(14). 균주들은 nutrient agar(NA) 사면배지에 계대배양한 후 이를 4°C에서 보존하면서 사용하였으며, 전 배양은 250 mL 삼각 플라스크에 tryptic soy broth(TSB) 100 mL를 넣고 여기에 NA 사면배지에 보존하였던 균주를 백금이로 1회 접종한 후 180 rpm, 30°C에서 24시간 진탕배양하였다.

배지 및 시약

Biosurfactant 생산 배지로서 Landy medium(LM) (15, 16), nutrient broth(NB), TSB를 제조하여 사용하였으며 A-medium(AM)은 *Bacillus* spp.를 이용한 biosurfactant 생산 배지의(17) 무기염 조성(Table 1)에 미량원소(Table 2)를 0.1 mL/L 농도로 일정하게 한 후 탄소원으로 sucrose를 혼합하여 제조하였다. 각각의 배지는 삼각 플라스크 250 mL에 100 mL씩 분주한 후 시험 균주를 2%(v/v)농도로 접종하여 30°C에서 96시간 진탕 배양하고 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 20 min)한 후 상등액을 취하여 표면장력을 측정하였다.

표면장력 측정

표면장력의 측정은 CSC-DuNouy Tensiometer를 이용한 ring method로 측정하였다(14).

무기염

무기염의 조성은 Table 2와 같으며 여기에 미량원소 용액

Table 1. Composition of mineral salt solution (%)

KNO ₃	0.3
Na ₂ HPO ₄	0.22
KH ₂ PO ₄	0.014
NaCl	0.001
MgSO ₄	0.06
CaCl ₂	0.004
FeSO ₄	0.002

Table 2. Composition of trace element solution (g/L)

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2.32
MnSO ₄ · 4H ₂ O	1.78
H ₃ BO ₃	0.56
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.00
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.39
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.42
EDTA	1.00
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.004
KI	0.66
Distilled water	1000 mL

(Table 2)을 0.1 mL/L 농도로 일정하게 하여(14) 탄소원과 질소원을 변화시켜 실험하였다.

탄소원

탄소원으로 glucose, sucrose, soluble starch, sodium acetate를 각각 2%(v/v) 농도로 첨가한 후 우수한 탄소원에 대하여 농도를 1, 2, 3%로 변화시켜 표면장력을 측정하였다. 배지의 갈변을 막기 위해 무기염과 탄소원을 각각 2배 농도로 제조하여 멸균(121°C, 15 min)한 후 250 mL 삼각 플라스크에 각각 50 mL씩 분주하여 30°C에서 180 rpm으로 96시간 진탕 배양하였다. 배양한 배지의 표면장력을 측정 후 탄소원을 결정하였다.

질소원

질소원으로 soy peptone, peptone, yeast extract, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄를 각각 0.3% 첨가한 후 우수한 질소원에 대하여 농도를 0.1, 0.3, 0.6, 1.0%로 변화시켜 사용하였다. 배지의 갈변을 막기 위해 무기염과 질소원 그리고 탄소원을 각각 2배 농도로 제조하여 멸균(121°C, 15 min)한 후 250 mL 삼각 플라스크에 각각을 50 mL씩 분주하여 30°C에서 180 rpm으로 96시간 진탕 배양하였다.

온도 변화에 따른 영향

결정된 탄소원과 질소원으로 배지를 제조한 후 각각 25, 30, 35°C에서 진탕배양하여 시간에 따른 표면장력 및 성장곡선을 측정하였다.

pH 변화에 따른 영향

배지의 초기 pH를 5.0, 7.1, 8.0으로 변화하여 pH의 변화에 따른 표면 장력 및 성장곡선을 비교하여 보았다. 배양은 35°C, 180 rpm에서 24시간동안 배양하면서 측정하였다.

Crude biosurfactants 제조

Crude biosurfactants는 Fig. 1과 같은 방법을 제조하였으며 이를 동결건조하였다.

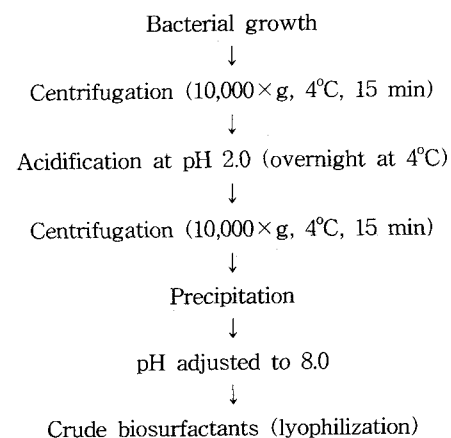


Fig. 1. The procedure for the preparation of crude biosurfactants.

결과 및 고찰

Biosurfactant 생성을 위한 최적 균주

Bacillus spp. 각 균주별 biosurfactant의 생산성을 비교하기 위해 기본배지인 LM배지에서 각각의 균주를 배양하고 배양액의 표면장력 저하도를 비교하여 biosurfactant의 생산력으로 평가하였다. 그 결과 *Bacillus subtilis* CH-1, *Bacillus circulans* K-1과 *Bacillus subtilis*(natto) N-1 모두 surfactant 활성을 나타내고 있었으며 특히 *Bacillus subtilis* CH-1의 배양액은 균을 접종하지 않은 Landy medium의 약 4/3의 표면장력을 나타냄으로써 biosurfactant 생산력이 우수한 균주임을 확인할 수 있었다. 따라서 이 균주를 대량생산을 위한 기본 균주로 선택하였다(Fig. 2).

Biosurfactant 생성용 기본 배지

Biosurfactant 대량 생산에 필요한 기본배지를 선정하기 위하여 AM, LM, NB과 TSB를 각각 제조하여 표면장력과 성장곡선을 비교하였다. 각각의 배지에서 *Bacillus subtilis* CH-1의 성장곡선을 비교한 결과(Fig. 3) 12시간 이후에는 균의 성장이 정지되어 일정한 값을 나타내었으며 biosurfactant 생성은 시간이 경과함에 따라 Fig. 4와 같은 양상으로 점차 증가하는 경향을 나타냈다. 이것은 다른 이차대사산물의 생성과 비슷하게 균체의 생육이 다소 제한된 조건에서 biosurfactant의 생성이 증가되는 것으로 사료된다. Biosurfactant의 생성은 표면장력이 최저가 되는 배양 후 96시간에 최대에 도달하는 것으로 판단되므로 이후 96시간 후의 측정치를 배양의 최대치로 하여 실험하였다.

시험 배지로 사용한 AM, LM, NB와 TSB배지의 표면장력 감소치를 배지 자체의 표면장력 값을 기준으로 하여 감소율을 계산한 결과 각각 45, 51, 52, 62%로 나타나 AM 배지에서의 biosurfactant 생성력이 가장 크게 나타났다. 또한 bio-

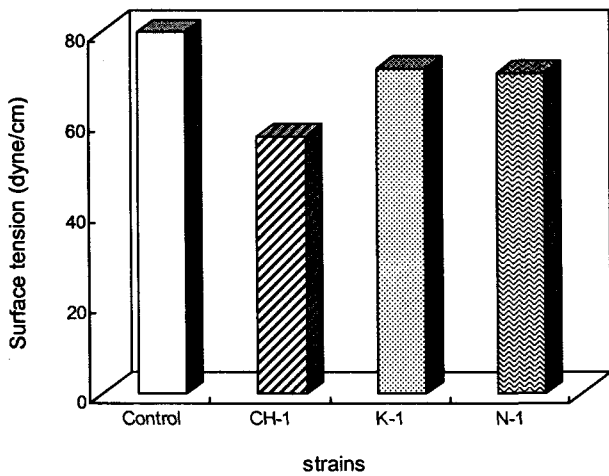


Fig. 2. Surface tension of culture broth of *Bacillus* spp. in Landy medium. Control: Landy medium, CH-1: *Bacillus subtilis* CH-1, K-1: *Bacillus circulans* K-1, N-1: *Bacillus* spp. from natto.

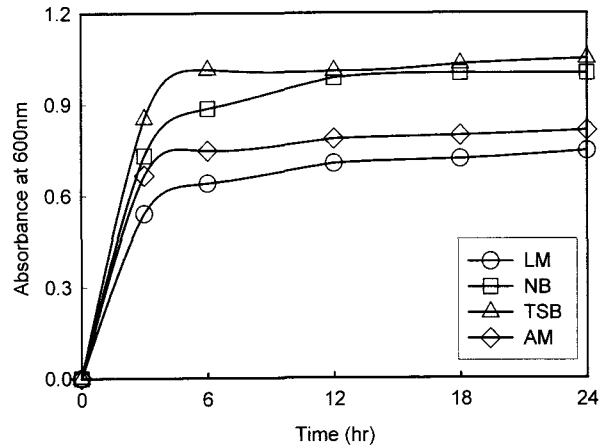


Fig. 3. Growth curve of *Bacillus subtilis* CH-1 with different media. AM: A-medium, NB: Nutrient broth, TSB: Tryptic soy broth, LM: Landy medium.

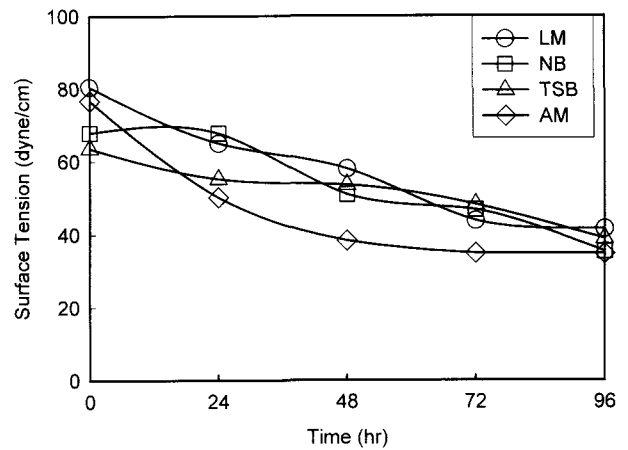


Fig. 4. Changes in surface tension during growth of *Bacillus subtilis* CH-1. AM: A-medium, NB: Nutrient broth, TSB: Tryptic soy broth, LM: Landy medium.

surfactant의 생성에 의한 최저 표면장력이 나타나는 시간도 AM 배지가 48시간으로 가장 짧아 기본배지로서 AM 배지가 적합한 것으로 사료되므로 이 배지를 이후 실험에도 사용하였다.

Biosurfactant 생산용 배지의 최적화

기본배지인 AM을 이용하여 탄소원과 질소원을 변화시켜 30°C에서 180 rpm으로 96시간 진탕 배양한 후 표면장력을 실험한 결과 탄소원으로는 다당류인 starch보다는 분자량이 작은 glucose, sucrose, sodium acetate에서 biosurfactant의 생성이 우수하였으며 특히 포도당 2%를 사용할 때 가장 효과적이었다(Fig. 5). 질소원으로는 무기태 질소원인 NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄보다는 유기태 질소원인 soy peptone, peptone, yeast extract 등에서 높은 생성력을 나타냈으며 특히 0.3% 농도의 soy peptone을 사용할 때 가장 효과적이었다(Fig. 6). 따라서 최적의 탄소원과 질소원을 함유하고 무기염을 포함하는 합성

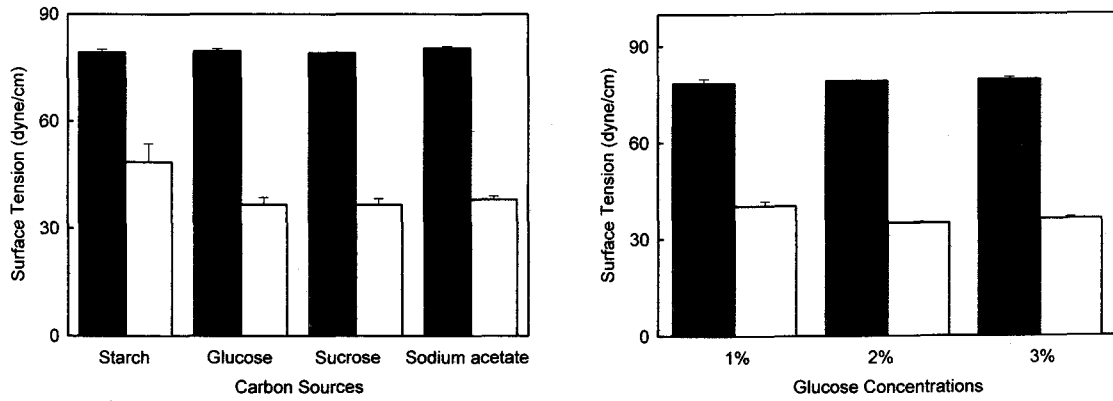


Fig. 5. Effect of carbon sources and glucose concentration on the surface tension of culture broth of *Bacillus subtilis* CH-1. Shaded bar corresponded to the initial surface tension of culture broth.

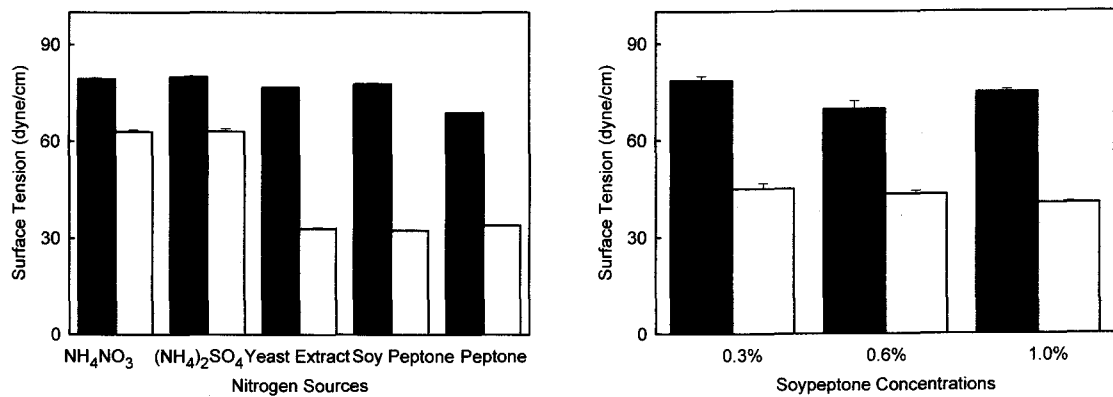


Fig. 6. Effect of nitrogen sources and soy peptone concentration on the surface tension of culture broth of *Bacillus subtilis* CH-1. Shaded bar corresponded to the initial surface tension of culture broth.

배지를 완성하여 biosurfactant의 생성력을 확인한 결과 배지 자체의 표면장력 값의 약 43%의 표면장력을 나타내 biosurfactant 생성에 효과적인 배지임을 확인할 수 있었다(Fig. 7). 한편 배양온도는 최종 표면장력 저하능에 크게 영향을 주지

않았으나 균주의 생육 최적 온도인 35°C에서 배양시 표면장력 저하시간이 가장 빠르게 나타났다(Fig. 8). 배양 pH에 따른 biosurfactant 생산은 크게 영향을 받지 않았으며 pH 5.0 ~ 8.0 범위에서 대체적으로 안정하였으며(Fig. 9), 1 L에 배양시 약 6 g의 crude biosurfactant를 얻을 수 있다.

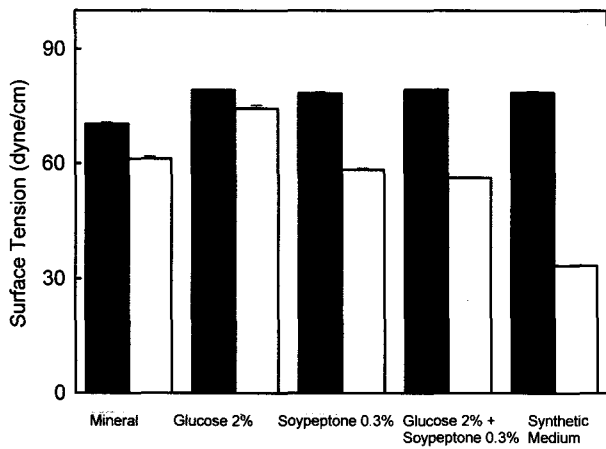


Fig. 7. Effect of different mineral addition on the surface tension of culture broth of *Bacillus subtilis* CH-1. Shaded bar corresponded to the initial surface tension of culture broth.

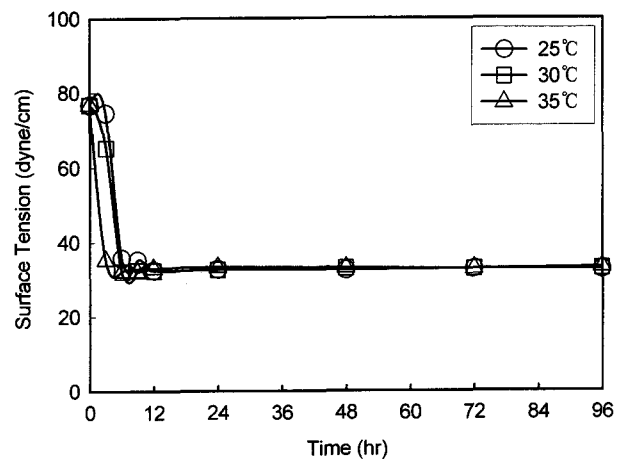


Fig. 8. Effect of temperature on the surface tension of culture broth of *Bacillus subtilis* CH-1.

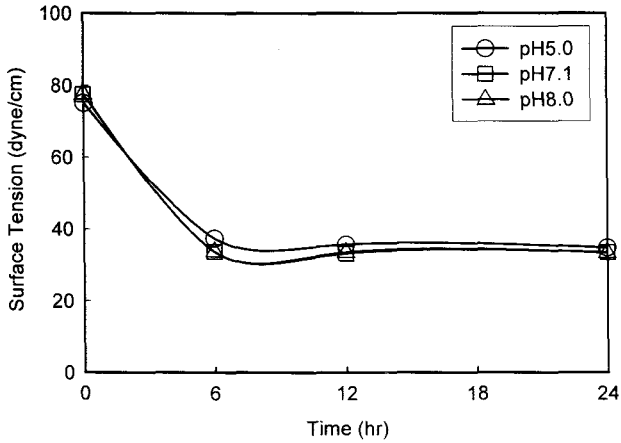


Fig. 9. Effect of initial pH on the surface tension of culture broth of *Bacillus subtilis* CH-1.

요 약

청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* CH-1, *Bacillus circulans* K-1과 *Bacillus subtilis*(natto) N-1 모두 biosurfactant를 생성하며 이중 *Bacillus subtilis* CH-1가 가장 큰 생성력을 나타냈다. Biosurfactant를 대량 생산하기 위하여 AM, LM, NB과 TSB 배지중 AM을 기본배지로 선정하여 최적 탄소원과 질소원으로 glucose 2%, soy peptone 0.3%와 무기염을 포함하는 합성배지를 완성하였다. Biosurfactant의 생성은 96시간에 최대를 나타냈으며 이때 배지의 표면장력은 초기 값의 약 43% 값을 나타냈다. 한편 배양온도 및 pH는 biosurfactant 생산에 크게 영향을 주지 않았으며 pH 5.0~8.0 범위에서 대체적으로 안정한 생성을 유지하였다. 최적조건에서 배양시 crude biosurfactant 수율은 6 g/L를 얻을 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 동의공업대학 학술연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Lim KH. 1996. Biosurfactants: their structures, properties, and applications. *J Korean Oil Chemist's Soc* 13: 1-20.
2. Bognolo G. 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for

- hydrocarbons. *Colloids surfaces A: Physicochem Eng Aspects* 152: 41-52.
3. Pandey A, Selvakumar P, Soccol CR, Soccol VT, Krieger N, Fontana JD. 1999. Recent developments in microbial inulinases-its production, properties and industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol* 81: 35-52.
4. Ohno A, Ano T, Shoda M. 1995. Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics Iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solidstate fermentation. *J Fermentation Bioeng* 80: 517-519.
5. Nakayama S, Takahashi S, Hirai M, Shoda M. 1997. Isolation of new variants of surfactin by a recombinant *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 80-82.
6. Razafindralambo H, Hbid MP, Destain PJJ, Thonart P. 1993. Purification of antifungal lipopeptidase by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatography A* 639: 81-85.
7. Thimon L, Peypox F, Wallach J, Michel G. 1993. Ionophorus and sequestering properties of surfactin, a biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 1: 57-62.
8. Kluge B, Vater J, Salmikow J, Eckart K. 1988. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *FEBS Letters* 231: 107-110.
9. Malabarba A, Ciabatti R, Kettenring J. 1996. Structural modifications of the active site in teicoplanin and related glucopeptides. 1. Reductive hydrolysis of the 1,2- and 2,3-peptide bonds. *J Organic Chemistry* 61: 2137-2150.
10. Oren Z, Shai Y. 1997. Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin : structure-function study. *Biochemistry* 36: 1826-1835.
11. Angelica B, Schmauder HP. 1999. Lipophilic compounds in biotechnology-interactions with cells and technological problems. *J Biotechnol* 67: 13-32.
12. Fox SL, Bala GA. 2000. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Biore-source Technology* 75: 235-241.
13. Jung HK, Lee JB, Yim GB, Kim EK. 1995. Properties of microbial surfactant S-acid. *Korean J Biotechnol Bioeng* 10: 71-77.
14. Youn HK. 2000. Antimicrobial activity of viscous substance from *chongkukjang* fermented with different *Bacillus* spp. *MS Thesis*. Inje Univ.
15. Champion JT, Gilkey JC, Lamparski H. 1995. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology-Effects of pH, cadmium, and octadecene, source. *J Colloid & Interface Science* 170: 569-574.
16. Kim SH, Lim EJ, Lee TH. 1998. Optimization of culture condition of *Nocardia* sp. L-417 strain for biosurfactant production. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 252-258.
17. Lee MH. 1999. Antimicrobial activity of Korean leek (*Allium tuberosum*) and its application to food system. *MS Thesis*. Inje Univ.

(2002년 4월 1일 접수; 2002년 5월 31일 채택)