Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 30, No. 2, 167–171 (2002)

Candida sp. SY16의 휴식세포를 이용한 생물계면활성제 Mannosylerythritol Lipid의 생산

김희식 · 전종운 · 최우영[1] · 오희목 · 이기형[2] · 권태종[3] · 윤병대*
한국생명공학연구원 생물공정연구실, [1]충남대학교 농화학과,
[2]공주대학교 생명과학과, [3]건국대학교 미생물공학과

Production of a Biosurfactant Mannosylerythritol Lipid by Resting Cell of *Candida* sp. SY16. Kim, Hee-Sik, Jong-Woon Jeon, Woo-Yong Choi[1], Hee-Mock Oh, Ki-Hyeong Rhee[2], Tae-Jong Kwon[3], and Byung-Dae Yoon*. *Biomolecular Process Engineering Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejon 305-333, Korea, [1]Department of Agricultural Chemistry, Chungnam National University, Daejon 305-764, Korea, [2]Department of Biological Science, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea, [3]Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea* - The resting cells of *Candida* sp. SY16 produced a large amount of mannosylerythritol lipid as a biosurfactant when incubated in the distilled water containing only the carbon source. The resting cells exhibited the highest production at 20 g cells per liter on the soybean oil of 75 g/l as a sole substrate and pH 4~5 in the shaking culture. Under the optimal conditions, the biosurfactant was extracellularly produced to 58 g/l after 120 h in jar fermentor, and the yield became higher than that obtained by using the growing cells of the strain in batch fermentation.

Key words: Biosurfactant, *Candida* sp., mannosylerythritol lipid, resting cell

계면활성제는 계면장력저하능, 습윤능, 마이셀형성능, 소포능, 세정능, 유화능 등 넓은 범위에서 사용되고 있으나, 현재 범용의 화학합성계면활성제는 환경오염 유발 및 독성 등의 단점으로 인해 환경친화적인 생물계면활성제에 관한 연구가 진행되어 왔다[1]. 그러나, 미생물의 발효를 이용한 생물계면활성제 생산은 생산조건 확립에 어려움이 많으며, 발효시간이 길고, 높은 생산 비용이 요구되므로 아직까지는 산업적으로 널리 사용되고 있지 않는 실정이다.

본 연구에서 생산하는 계면활성제는 식물성 오일을 기질로 사용하여 *Candida* sp. SY16에 의해 생산되는 당지질계 생물계면활성제로서 mannosylerythritol lipid (MEL)로 구조가 결정되었다[6]. 이 MEL은 최소표면장력이 29 dyne/cm이며, 미셀형성농도(CMC)는 15 μM(10 mg/l)로서 기존에 사용되는 화학합성계면활성제와 거의 같은 표면활성을 나타낸다[6]. 또한, MEL은 그람 양성세균의 성장을 억제하며[7], HL-60, K-562, KU-812 등 인체 백혈병 세포주에 대하여 세포분화나 성장을 저해한다고 보고하고 있어[4] 산업적 용도 이외의 의약용으로도 유용하게 이용될 가능성이 있다.

당지질계 생물계면활성제와 같은 2차 대사산물을 생산하는 미생물의 경우, 대수증식기에 균체의 증식이 이루어지며, 정지기에 2차 대사산물이 생산된다. 즉, 휴식세포(resting cell)를 이용하면 세포성장기를 배제하고, 생물계면활성제가 생산되는 정지기에 초점을 맞춤으로 기존의 성장세포(growing cell)를 이용한 발효생산방법보다 생산관리가 용이하며, 생산시간을 단축시키고, 산물의 분리 · 정제공정을 단순화시키며, 높은 생산수율로 계면활성제를 생산할 수 있다[12]. 본 연구는 생물계면활성제 생산균주인 *Candida* sp. SY16의 휴식세포를 이용하여 식물성오일로부터 생물계면활성제인 MEL을 생산하는 시스템 확립을 위한 기초적 반응조건을 조사하여 제공하는 것이 목적이다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용된 균주 *Candida* sp. SY16(KCTC 7804)은 oil film collapsing assay를 통해 생물계면활성제 생산 미생물로 분리되었으며, YM 고체배지(yeast extract 3 g/l, malt extract 3 g/l, peptone 5 g/l, glucose 1 g/l, agar 20 g/l)에서 30°C로 3일간 배양 후 4°C에서 보관하였다.

휴식세포의 준비

Candida sp. SY16을 YM배지와 MEL생산배지(soybean oil 100 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/l, K_2HPO_4 1 g/l, NaH_2PO_4 0.1 g/l, peptone 1 g/l, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.02 g/l, $MgSO_4 \cdot$

*Corresponding author
Tel. 042-860-4320, Fax. 042-860-4598
E-mail: hkim@mail.kribb.re.kr

$7H_2O$ 0.5 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g/l, pH 7.5) 200 ml 이 포함된 1,000 ml Erlenmyer flask를 사용하여 120 rpm의 왕복진탕으로 30°C에서 2일간 배양하였다. 배양액을 원심분리(3,000 × *g*, 10 min)로 회수한 후 생리식염수로 2회 세척하여 -80°C에서 보관하면서 MEL 생산을 위한 휴식세포로 사용하였다.

생물계면활성제 생산을 위한 휴식세포의 반응조건

휴식세포는 20 ml의 멸균된 증류수 혹은 완충용액이 포함된 250 ml Erlenmyer flask에 5~20 g/l의 농도가 되도록 현탁하고, 단일기질로서 soybean oil을 50~100 g/l 첨가하여 120 rpm의 왕복진탕으로 30°C에서 5일간 반응시켰다. 발효기를 이용한 휴식세포 반응은 5 l jar-fermentor(Korea Fermentor Company, Inchon, Korea)를 이용하였으며, working volume은 2 l이었고, 30°C에서 500 rpm의 교반과 0.5 vvm의 통기조건으로 운전되었다.

균체량 측정

균체를 배양액 1 ml로부터 원심분리(3,000 × *g*, 10 min)로 회수하고, ethanol/*n*-butanol/chloroform(10:10:1, by volume) 1 ml로 세척한 후, 증류수 1.5 ml로 다시 세척하여 균체탁도(A_{660})를 측정하였다. 균체의 건조중량은 측정된 탁도로부터 계산하였다(dry cell mass(g/l) = $A_{660} \times 0.25$).

생물계면활성제의 정량

당지질계 생물계면활성제는 Kitamoto 등[8]의 방법을 변형하여 농도를 결정하였다. 배양액 0.5 ml에 ethyl acetate를 2 ml 넣고, 강력하게 섞어주어 지질성분을 추출한 후, 추출된 용매 층에서 100 μl를 취하여 감압증류로 용매를 제거한다. 용매가 제거된 시료에 0.4 N NaOH를 1 ml 넣고, 55°C에서 30분간 정치한 후, 현탁액 200 μl를 취한다. 취해진 시료에 200 μl의 5% phenol 용액을 첨가하고, 1 ml의 sulfuric acid를 첨가하여 30분 후에 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 표준시료로 정제된 MEL-SY16[6]을 이용하여 표준곡선을 작성하였다.

인 정량

배양액 내의 인 농도는 ascorbic acid method[3]로 분석하였다. 배양액을 15분간 10,000 rpm으로 원심분리하여 얻은 상등액 10 ml에 ammonium molybdate 용액(30 g/l), sulfuric acid 용액(140 ml/l), ascorbic acid 용액(54 g/l), antimonyl potassium tartarate 용액(1.36 g/l)을 2:5:2:1(by volume)의 비율로 혼합한 시약 1.0 ml을 첨가하고, 20분 후에 분광광도계(UV-160A, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 885 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시료로 KH_2PO_4 0.2197 g/l(PO_4-P, 50 μg/ml)을 사용하여 표준곡선을 작성하였다.

Table 1. Effects of resting cell concentration on biosurfactant production.

Resting cell concentration (g/l)	YM medium		MEL production medium	
	MEL (g/l)	Specific productivity (g·MEL/g·cell)	MEL (g/l)	Specific productivity (g·MEL/g·cell)
1	1.1	1.10	1.4	1.40
5	4.9	0.98	5.6	1.12
10	8.1	0.81	8.0	0.80
20	15.4	0.77	14.9	0.75
30	16.8	0.56	15.5	0.52

Resting cells were prepared by the cultivation of *Candida* sp. SY16 in YM medium and MEL production medium. The incubation of resting cell for the biosurfactant(MEL) production was performed in distilled water containing soybean oil at 100 g/l on a shaker at 120 rpm and 30°C for 5 days.

결과 및 고찰

생물계면활성제 생산에 미치는 휴식세포 농도의 영향

휴식세포 시스템에서 생물계면활성제(MEL) 생산에 미치는 휴식세포 농도 및 휴식세포의 준비를 위한 배지의 영향을 조사하였다. *Candida* sp. SY16을 YM배지와 soybean oil을 탄소원으로 포함하는 MEL생산배지를 이용하여 각 각 배양하여 휴식세포를 준비한 후, cell 농도가 1~30 g/l로 포함된 반응액에 soybean oil 100 g/l를 첨가하여 생물계면활성제 생산을 위한 반응을 수행하였다. 휴식세포 농도 20 g/l까지 세포농도가 증가할수록 생물계면활성제의 생산이 거의 비례적으로 증가하는 것을 확인하였으며, YM배지와 MEL 생산배지 사이에는 생물계면활성제 생산에 있어 유의적인 차이를 나타내지는 않았다(Table 1). YM배지에서 배양한 휴식세포를 20 g/l로 첨가하여 반응한 결과, 약 15 g/l의 생물계면활성제가 생산되었으며, specific productivity는 0.77 g MEL/g cell이었다. YM배지에서 생산된 휴식세포가 soybean oil이 첨가된 MEL생산배지로부터 얻은 세포보다 더 안정적이고, 재연성있는 생물계면활성제 생산을 보였다.

생물계면활성제 생산에 미치는 pH의 영향

휴식세포 시스템에서 생물계면활성제 생산에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 휴식세포가 20 g/l로 포함된 증류수를 각 각의 초기pH로 조정하여 5일 동안 생물계면활성제 생산을 위한 반응을 수행하였다. Table 2에서 볼 수 있듯이 MEL의 생산은 반응액의 pH에 상당히 민감한 것으로 나타났다. Final pH의 관찰로부터 pH가 4~5 범위인 경우에 높은 MEL 생산을 보였으며, pH가 6 이상인 경우는 매우 낮은 MEL 생산을 나타내었고, 배양시간에 따라 전체적으로 pH가 상승하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 완충용액이 아닌 증류수를 반응액으로 사용했기 때문으로 생각된다. 생물

Table 2. Effects of pH on the biosurfactant production in resting cell system.

pH		MEL (g/l)
Initial	Final	
2.9	4.0	42.4
3.5	4.5	41.3
4.6	5.1	38.5
6.0	6.8	9.9
6.5	7.9	1.5

Resting cells were added to distilled water at 20 g/l, and each initial pH was adjusted with 1 N HCl and NaOH. Resting cell was incubated at 100 g/l of soybean oil on a shaker at 120 rpm and 30°C for 5 days.

계면활성제 생산을 위한 *Candida* sp. SY16의 회분식 배양의 경우에서도 배양액 pH가 4일 때 가장 높은 MEL 생산을 보였으며, pH 3 이하 혹은 pH 6 이상의 경우는 급격히 생산이 감소하였다[5].

생물계면활성제 생산에 미치는 인의 영향

위의 실험에서 휴식세포의 반응시 pH의 변화가 상당히 컸기 때문에, 20 mM potassium phosphate buffer 등의 완충용액을 이용하여 pH의 영향을 조사하여 보았으나, 오히려 pH의 변화가 크지 않았음에도 불구하고 생물계면활성제의 생산이 향상되지 않았고, 인산염(phosphate) 완충용액의 경우는 생물계면활성제 생산이 거의 관찰되지 않았다(data not shown). 이에 인산염이 생물계면활성제 생산을 저해하는 것으로 추측되어 인산염 농도별 생물계면활성제 생산을 조사하였다. Table 3에서 볼 수 있듯이 인산염 농도가 증가할수록 MEL 생산이 저해됨을 알 수 있었으며, 초기 인산염을 K_2HPO_4 1 g/l와 NaH_2PO_4 0.1 g/l의 농도(PO_4-P 농도 198 μg/ml) 이상으로 첨가하면 MEL의 생산이 저해받기 시작하는 것으로 나타났다. 잔존 인(PO_4-P)의 농도로 보아 MEL 생산이 인 제한조건과 완전히 일치하지는 않지만, 어느 수준 이상의 인 농도에서는 저해받는 것으로 나타났다. 이 결과로부터 20 mM 인산염 완충용액(PO_4-P 농도 619 μg/ml)에서 MEL이 거의 생산되지 않았던 것은 당연한 결과임을 확인할 수 있었다. Kitamoto 등[9]도 그 기작은 알 수 없지만, 과량의 인산염 이온이 생물계면활성제 생산을 저해한다고 보고하였으며, Ramana 등[11]은 *Psedomonas aeruginosa*에 의해 생산되는 rhamnolipid의 경우 무기인산염에 의해 생합성이 저해된다고 보고하였다.

Table 3. Effects of phosphate concentration on the biosurfactant production in resting cell system.

Initial phosphate salts		Initial PO_4-P (μg/ml)	MEL (g/l)	Residual PO_4-P (μg/ml)
K_2HPO_4 (g/l)	NaH_2PO_4 (g/l)			
0	0	0	35.4	0
0.1	0	17.8	31.3	7.7
1	0.1	197.7	39.7	21.1
2	0.2	395.4	9.3	58.0
3	0.3	593.1	1.3	179.1

Resting cells were incubated in the distilled water containing phosphate salts at each concentration, 20 g/l of resting cell and 100 g/l of soybean oil. The resting cell reaction for MEL production was performed on a shaker at 120 rpm and 30°C for 5 days. The phosphorus concentration was calculated as PO_4-P.

Table 4. Effects of soybean oil concentration on the biosurfactant production in resting cell system.

Soybean oil (g/l)	MEL (g/l)	Yield ($Y_p/_s$)	Final pH
25	12.3	0.49	5.3
50	24.2	0.48	5.3
75	35.4	0.47	5.1
100	36.9	0.37	5.4

Resting cells were added at 20 g/l to the distilled water containing soybean oil at each concentration, 1 g/l of K_2HPO_4 and 0.1 g/l of NaH_2PO_4. The resting cell reaction was performed at the initial pH of 4.5 ± 0.5 on a shaker at 120 rpm and 30°C for 5 days.

생물계면활성제 생산에 미치는 기질 오일농도의 영향

단일 탄소원 기질인 soybean oil을 25, 50, 75, 100 g/l의 농도로 첨가하여 기질농도가 생물계면활성제 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 최종 pH는 5.2 ± 0.2정도로 거의 같은 pH를 유지하였으며, 첨가된 기질오일농도 25, 50, 75 g/l 에서는 기질 대비 생산수율($Y_{p/s}$)이 약 0.5로 유의적 차이가 없었으나, soybean oil 농도 100 g/l에서는 0.37로 급격히 감소되는 것을 확인할 수 있었다(Table 4). 따라서, 휴식세포농도가 20 g/l인 경우, 기질오일을 75 g/l의 농도로 첨가할 때가 최적의 생물계면활성제 농도와 기질대비 생산수율을 나타내었다.

휴식세포 시스템을 이용한 생물계면활성제의 생산

지금까지 플라스크에서 휴식세포를 이용한 생물계면활성제 생산조건을 조사한 결과, 휴식세포 20 g/l, pH 4.5 ± 0.5, soybean oil 75 g/l, 반응액은 인농도가 200 μg/ml 이하로 포함된 증류수에서 최적의 MEL 생산을 보였다. 이 생산조건으로 2 l의 증류수를 포함하는 5 l jar fermentor를 이용하여 pH를 4.5 ± 0.5로 조절하면서 30°C, 500 rpm, 0.5 vvm의 운전조건으로 5일 동안 MEL 생산을 위한 반응을 수행하였다. 반응시간이 경과함에 따라 MEL의 생산이 96시간까지 거의 비례적으로 증가하여 최종적으로 반응 120시간에 58 g/l의 농도로 생산되었고, 기질대비 생산수율은 0.77, 생산속도는 0.48 g/l/h이었다(Fig. 1). 이것은 *Candida* sp. SY16을 이용한 회분식 발효[5]의 경우보다 높은 MEL 농도를 보였으며, 생산수율과 생산속도는 2배 이상 높아졌고, 배양시간은 약

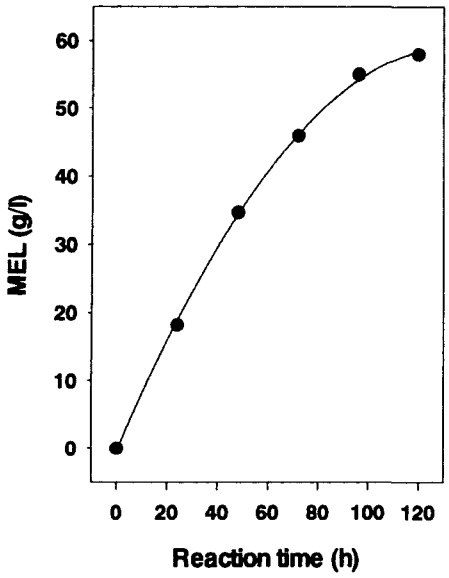

Fig. 1. Production of biosurfactant by the resting cell of *Candida* sp. SY16 in jar-fermentor. Resting cells were added at 20 g/l to the distilled water containing 75 g/l of soybean oil, 1 g/l of K_2HPO_4 and 0.1 g/l of NaH_2PO_4. Resting cells were reacted in a 5 l jar fermentor(working volume of 2 liters) at 30°C, 500 rpm and 0.5 vvm. The pH was controlled at 4.5 ± 0.5 with 1 N HCl and NaOH solution.

Table 5. Comparison of a biosurfactant production between batch fermentation and resting cell reaction by *Candida* sp. SY16.

	Batch fermentation	Resting cell system
Maximun biosurfactant concentration (g/l)	37	58
Yield ($Y_{p/s}$)	0.37	0.77
Volumetric production rate (g/l/h)	0.19	0.48
Culture time (h)	200	120
Reference	[5]	this study

Batch fermentation was performed on a 5 l jar fermentor containing 2 l of MEL production medium at 30°C with 500 rpm and 1 vvm.

40% 감소시킬 수 있었다(Table 5).

Fig. 1의 실험에서 반응시간에 따라 휴식세포의 형태학적 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 반응 1시간의 경우는 YM 배지에서와 같이 전형적인 출아효모의 세포형태를 보여주고 있으나, 점차 반응시간에 따라 균체의 양쪽 끝부분이 볼록하게 체적증가현상(반응 24시간)을 보이며, 반응 72시간에는 세포 전체의 체적이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. Oleaginous yeast의 경우, 세포내에 오일을 저장물질로서 축적하며[2], *Candida antarctica*의 경우는 MEL을 세포내에 축적한다는 보고가 있다[10]. 본 실험에서 사용한 *Candida* sp. SY16 세포의 형태학적 변화도 이와 유사하게 세포내에 지질성분을 축적하는 현상으로 보이며, 이는 MEL 생합성과

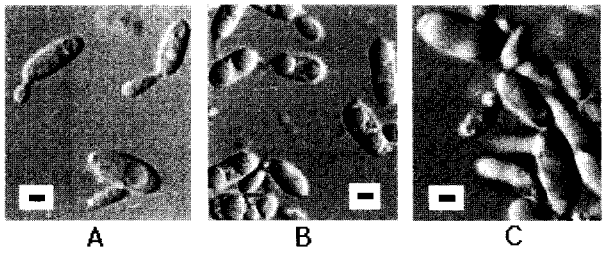

Fig. 2. Morphological change of *Candida* sp. SY16 during resting cell reaction for the biosurfactant production (×1,000). The bar markers indicate 1 μm. A: 1 h, B: 24 h, and C: 72 h.

밀접한 관계가 있을 것으로 생각된다.

이상과 같이 휴식세포를 이용하여 2차 대사산물인 당지질계 생물계면활성제의 생산에 영향을 미치는 요인을 탐색하여 최적의 생산조건을 확립하였다. 휴식세포를 이용한 생물계면활성제의 생산은 기존의 미생물발효에 비하여 반응시간을 단축시킬 수 있었으며, 생물계면활성제의 생산성을 증가시켰다. 또한 식물성오일만이 기질로 사용되었기 때문에 생물계면활성제의 분리·정제가 용이하여 경제적·산업적 이용측면에서도 다른 생물계면활성제 생산방법보다 효과적일 것으로 생각한다.

요 약

Candida sp. SY16의 휴식세포를 이용하여 탄소원만 포함되어 있는 증류수로부터 많은 양의 생물계면활성제(mannosylerythritol lipid: MEL)를 생산할 수 있었다. 플라스크를 이용한 생산반응의 경우, 20 g/l의 휴식세포를 75 g/l의 soybean oil이 포함되있고, pH는 4~5범위에서 반응할 때, 가장 높은 생산수율을 얻을 수 있었으며, 높은 농도(PO_4-P 농도 198 μg/ml 이상)의 인은 MEL 생산을 저해하는 것으로 나타났다. 최적화된 조건으로 jar fermentor를 이용하여 휴식세포를 반응한 경우 생물계면활성제를 120 h 반응 후, 58 g/l로 얻을 수 있었으며, 그 생산성은 성장세포를 이용한 회분식 발효의 경우보다 높았고, 배양시간도 단축시킬 수 있었다.

REFERENCES

1. Banat, I. M., R. S. Makkar, and S. S. Cameotra. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 495-508.
2. Botham, P. A. and C. A. Ratledge. 1979. A biochemical explanation for lipid accumulation in *Candida* 107 and other oleaginous micro-organism. *J. Gen. Microbiol.* **114**: 361-375.
3. Eaton, A. D., L. S. Clesceri, and A. E. Greenberg. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. pp. 4-113. 19th ed. American Public Health Association, Washington.
4. Isoda, H., D. Kitamoto, H. Shinmoto, M. Matsumura, and T.

Nakahara. 1997. Microbial extracellar glycolipid induction of differentiation and inhibition of the protein kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 609-614.
5. Kim, H. S. 2000. Studies on the biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* C9 and *Candida* sp. SY16. Ph. D. thesis, NAIST, Nara, Japan. 76-81.
6. Kim, H. S., B. D. Yoon, D. H. Choung, H. M. OH, T. Katsuragi, and Y. Tani. 1999. Charaterization of a biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 713-721.
7. Kitamoto, D., H. Yanagishita, T. Shinho, T. Nakane, C. Kamisawa, and T. Nakahara. 1993. Surface active prpoerties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by *Candida antarctica. J. Biotechnol.* **29**: 91-96.
8. Kitamoto, D., S. Akiba, C. Hioki, and T. Tabuchi. 1990. Extracellular production of a mannosylerythritol lipid by a stain *Candida antarctica. Agric. Biol. Chem.* **54**: 31-36.
9. Kitamoto, D., T. Fuzishiro, H. Yanagishita, T. Nakane, and T. Nakahara. 1992. Production of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by resting cells of *Candida antarctica. Biotechnol. Lett.* **14**: 305-310.
10. Kitamoto, D., T. Nakane, N. Nakao, T. Nakahara, and T. Tabuchi. 1992. Intracellular accumulation of mannosylerythritol lipids as storage materials by *Candida antarctica. Appl. Micrbiol. Biotechnol.* **36**: 768-772.
11. Ramana, K. V. and N. G. Karanth. 1989. Production of biosurfactnats by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. *Biotechnol. Lett.* **11**: 437-442.
12. Zhao, Y. and G. B. DeLancey. 1999. Transmembrane distribution of substrate and product during the bioreduction of acetophenone with resting cells of *Saccharomyces cerevisiae. Biotechnol. Bioeng.* **64**: 434-441.

(Received Dec. 6, 2001/Accepted May 3, 2002)