

생물계면활성제를 이용한 휘발성유기물질의 처리

이기섭 · 김기은*

서경대학교 생물공학과

Microbial Biosurfactants and the Treatment of Volatile Organic Compounds

Ki Sup Lee and Gi Eun Kim*

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

Abstract For the biosurfactant production process at first *Candida bombicola*, *Sphingomonas yanoikuyae*, *Sphingomonas chungbukensis* and *Myxococcus flavescens* were studied. As the most productive microorganisms *C. bombicola*, *S. yanoikuyae* and *S. chungbukensis* were selected. During many petrochemical industrial processes variable volatile organic compounds are produced and they can cause an unpleasant and unhealthy atmosphere. Usually the volatile organic compounds are treated with chemical detergents. The chemical detergents cannot be easily degradable and can be accumulated in the nature. In this study we tried to develop a production process for the biosurfactants, which can substitute some chemical detergents in some chemical processes, with microorganisms. At second the treatment of the volatile organic compounds with the biosurfactants were tested and compared with the treatment with chemical detergent. The production productivities of the biosurfactant with microorganisms were compared. The growth patterns and kinetics of the microbial cells and the surface tension values of the biosurfactants were studied. The changes of the surface tension in variable pH conditions and sodium chloride concentrations were also studied. The volatile organic carbons were treated in a small plant scale. As the result of this study, it indicated that the specific growth rate of *S. chungbukensis* was the fastest by 0.144 (hr^{-1}). For surface tension, *C. bombicola* (38.1 dyne/cm) had the lowest value, and solubility of the volatile organic carbon was similar in *C. bombicola* and *S. chungbukensis*. (Toluene: about 0.1 Unit, Chloroform: about 0.6~0.7 Unit, Benzene : about 0.5~0.8 Unit). The biosurfactant, which were produced by *C. bombicola*, was selected for the further study for the volatile organic carbon treatment. With the biosurfactants from *C. bombicola* could remove the volatile organic carbon about 80% and this removal rate can be comparable with chemical detergent.

Keywords: biosurfactant, specific growth rate, VOCs, *Candida bombicola*, surface tension

서 론

계면활성제란 한분자내에 친수기와 소수기를 모두 가지는 양친매성 물질이다. 이 계면활성제는 표면 성질이 다른 두 계면의 분산 및 유화를 촉진하여 표면장력을 감소시키는 물질이다. 표면장력은 성격이 다른 두 상이 서로 인접하여 있을 때, 액체의 자유표면에서 표면을 작게 하려고 작용하는 장력을 말한다. 상이 물일 경우 계면활성제는 물 분자의 서로 끌어당기는 인력을 약화시키며 바깥쪽에는

친수기, 안쪽에는 소수기를 위치시킨 미셀 (micelles)의 구조를 형성하게 한다. 이러한 특징은 석유탄화수소의 탈착과 용해도를 증가시켜 미생물에 의한 생분해를 가능하게 한다(8, 9, 12). 이러한 이유로 현재 계면활성제는 환경, 식품, 의약품, 오일산업, 화장품, 펄프 및 제지산업, 세계 산업 등 다양한 분야에서 널리 사용되고 있다(15, 19). 최근에는 마이크로전자분야 (microelectronics), 자기기록매체, 고급전지, 전자 인쇄용 액체 인쇄제 등의 개발과 연구에도 활용이 되고 있다는 보고도 있다(3, 18).

계면활성제라 함은 보통 화학적 계면활성제를 일컫는다. 화학적 계면활성제는 석유화학 제품을 이용하여 화학적으로 합성된 것을 일컫는다. 이런 화학적 계면활성제는 넓은 응용범위와 낮은 단가란 장점으로 인해 위에 제시된

*Corresponding author

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

e-mail: gkeun@skuniv.ac.kr

여러 분야에서 거의 대부분 사용되고 있다. 그러나 화학적 계면활성제는 거품으로 인한 햇빛 및 산소의 차단, 계면활성제 자체의 독성 그리고 난분해성으로 2차적인 환경오염이 발생한다는 문제점을 가지고 있다(10, 11, 12).

미생물에 의해 생산된 계면활성제를 생물계면활성제라 한다(14). 이는 1947년 Zobell에 의해 최초로 알려 졌다(26). 이후 1960년대 후반에 시작된 미생물이 탄화수소를 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 연구에서 탄화수소에서 비교적 다량으로 계면활성제를 생산하는 것이 알려 졌다(4, 6). 이로서 화학적 계면활성제를 대체하기 위해 활발한 연구가 시작되었다. 실제 산업에서 생산되는 생물계면활성제의 경우 주로 미생물의 생산에 의존하고 있다. 그 이유는 다른 생물체 (동식물 세포 등)에 비해 다루기가 쉬우며, 더 다양한 종류의 생물계면활성제를 얻을 수 있고, 무엇보다 생산량이 많기 때문이다(12). 생물계면활성제는 화학적 계면활성제와는 달리 우수한 생분해도, 낮은 독성, 온도변화, pH에 대한 안정성, 화학적 계면활성제와의 대등한 계면활성능력 등의 장점이 있는 것으로 보고되었다(11, 12). 그러나 실제 산업에서 사용되는 경우는 극히 드물었다. 계면활성제의 선택 기준에서 가장 큰 비중을 차지하는 높은 단가와 생물계면활성제를 대량생산할 때 발생하는 문제 때문이다(7).

본 연구는 위와 같이 다양한 분야에서 친환경적이며 다방면의 용도로 사용될 수 있는 생물계면활성제를 이용하여 휘발성 유기화합물질 (volatile organic compounds : 이하 VOCs)의 처리기술에 대한 가능성을 연구하였다. 휘발성 유기화합물질들은 대기중의 탄화수소화합물의 총칭이다. 휘발성 유기화합물질은 종류가 다양하고 여러 가지 형태로 환경오염을 가중시키며 인간이 영위하는 생활환경에 치명적인 영향을 끼치고 이로 인한 피해가 증가추세에 있다(13). 이로 인해 국내에서는 환경보건학적 영향과 관련하여 유기화합물질에 대한 관심이 높아지고 있다(2). 1995년 12월에 개정된 대기환경 보전법에 의해 휘발성 유기화합물질의 배출시설은 관리를 받도록 규정하였으며, 1997년 7월 국가 산업단지내의 휘발성 유기화합물질 배출방지 대책이 고시되면서 규제되지 않았던 휘발성 유기화합물질의 배출규제가 본격적으로 시행되었다. 휘발성 유기화합물질의 제거는 소각방법 (직화식 연소법, 촉매 연소법, 농축촉매 연소법 등등), 비 소각방법 (활성탄 흡착법, 액상촉매 탈취법, 바이오필터 등등), 회수방법 (K-Filter 흡착법, 증기막 분리법 등등)이 있어 회사별로 발생하는 유기화합물질의 특성에 따라 선택하여 시설을 설치하였다. 그러나 산업현장에 실제로 적용하는 데에는 많은 어려움이 뒤따랐다. 국내의 기술 및 경험이 부족한 점도 있지만 사업장의 경제적 부담이 가장 큰 문제가 되었다(13). 본 연구는 이미 많이 연구된 미생물을 흡착시켜 반응기를 가동하는 바이오필터를 사용하지 않고, 생물계면활성제를 생산하는 균주 배양액을 이용하여 유기화합물질의 처리를 연구하였다. 생물계면활성제를 생산해 내는 여러 균주 중 계면활성제를 생산하는 것으로 보고된 균주 4가지를 선별하였다. 균주는 *C. bombicola*

(KCTC 7145)(5, 20), *S. yanoikuyae* (KCTC 2818)(20), *S. chungbukensis* (KCTC 2955)(25), *M. flavescens* (KCTC 9843)(1) 이들 중 산업현장에서 적용하기에 가장 적합한 균주를 선별하여, 대량으로 생산하여 파일럿 플랜트 규모에 직접 적용 결과를 도출하여 추후 산업현장에서 이용 가능한 실용화 기초 데이터로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 선택 및 사용배지

생물계면활성제 생산균으로 추정되는 4가지의 균주를 선정하였다.

C. bombicola (KCTC 7145), *S. chungbukensis* (KCTC 2955), *S. yanoikuyae* (KCTC 2818), *M. flavescens* (KCTC 9843) 사용 배지 및 배양은 *C.*는 YM 배지 (yeast extract 3.0 g, malt extract 3.0 g, peptone 5.0 g, dextrose 10.0 g, distilled water 1.0 L)를 이용 하여 24°C 진탕배양기에서 120 rpm으로 3일간 배양하였다.

*S. chungbukensis*는 TSB 배지 (trypticase soy broth 30.0 g, distilled water 1.0 L)를 이용하여 28°C 진탕배양기에서 120 rpm으로 3일간 배양하였다.

*S. yanoikuyae*는 IFO203 배지 (teast extract 5 g, liver, infusion from 25 g, glucose 3 g, glycerol 15 g, distilled water 1.0 L)를 이용 하여 30°C 진탕배양기에서 120 rpm으로 3일간 배양하였다.

*M. flavescens*는 yeast extract 1.0 g, raffinose 1.0 g, sucrose 1.0 g, galactose 1.0 g, soluble starch 5.0 g, bacto casitone 2.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 0.25 g, distilled water 1.0 L의 agar 또는 broth를 조제하여 30°C 진탕배양기에서 120 rpm으로 3일간 배양하였다. 배지에 대한 정보는 '생물자원센터 (KCTC)'에서 검색하였다.

생육특성조사

C. bombicola (24°C), *S. chungbukensis* (28°C), *S. yanoikuyae* (30°C), *M. flavescens* (30°C)를 진탕배양기에서 120 rpm에서 12시간마다 시료를 채취하여 흡광도 (O.D 660 nm) 및 포도당 함량을 측정했다. 흡광도는 분광광도계 (Spectrophotometer, Shimadzu)를 이용하여 660 nm에서 측정하였고 포도당 분석은 영동제약 포도당 측정 키트를 이용하여 분광광도계에서 505 nm에서 측정하였다. 측정시간은 12시간을 기준으로 측정하였다.

미생물 성장동력학 계수 산출

기질과의 친화도 및 반응기 설계, 미생물 성장의 특성 그리고 생물계면활성제의 저비용 고효율 생산 시스템을

갖추기 위한 기초 자료로 활용하기 위해 12시간 마다 660 nm에서 흡광도를 측정하여 생물량으로 변환을 하였고 성장동력 (growth kinetics)을 계산하였다. 계산식은 $\ln X$ 를 t 에 대해 도식화하여 기울기를 구하였다. 계산식은 $\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$ 이다. 여기서 μ 는 비성장속도 (specific growth rate)이다. 여기서 \ln 은 자연로그를 뜻하며, t 는 시간을 뜻한다. 기질수를 Y 를 구하는 식은 $Y = -\frac{\Delta X}{\Delta S}$ 이다. 여기서 X 는 biomass의 농도이고, S 는 기질의 농도를 뜻한다(24).

생물계면활성제 용액의 휘발성 유기화합물질 용해도측정

실제 산업 현장에서 이용가능성이 가장 높은 균주를 선별하기 위해 *C. bombicola*, *S. chungbukensis*, *S. yanoikuyae*, *M. flavescens*가 생산하는 생물계면활성제의 휘발성 유기화합물질의 용해도를 측정하였다. 배양은 생육특성조사 때와 같은 방법으로 진탕배양하여 사용하였다. 방법은 100 ml 바이알에 30 ml의 계면활성제 용액 (배양액을 3,000 rpm에서 원심분리 후 0.02 μ m 막필터에 여과한 용액)과 20 ml의 액상 휘발성 유기화합물질 용액 (톨루엔, 클로로포름, 벤젠)을 섞은 후 밀봉한다. 이를 혼합기를 이용 (800 rpm)하여 30분간 교반하였다. 교반된 용액을 20분간 원심분리 (2500 rpm)하여 용해되지 않은 휘발성 유기화합물질 용액을 분리한 후 HPLC (Waters 510)를 이용하여 분석하였다. 분석은 고정상으로 reversed phase C-12 column을 장착한 HPLC를 이용하여 RI detector에 의해 측정되었다. 이동상은 아세토니트릴과 비이온수를 65 : 35 비율로 혼합하여 사용하였다. 이동상의 유속은 1 mL/min 이다.

표면장력측정

표면장력 (surface tension) 측정은 250 ml의 배양액 중에서 12 ml 시료를 배양액으로부터 채취한 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리 후 상등액을 이용해 표면장력을 측정하였다. 측정은 12시간을 간격으로 측정하였다. 표면장력은 독일의 "KRUSS GmbH"사가 제작한 표면장력측정기 (surface tensiometer)를 이용하여 표면장력을 2회 반복하여 측정하였다. 측정은 상온에서 링 측정법 (ring method)를 사용하였다(16).

대량생산 및 산업용 배지 배양

배양에 사용한 배지들은 복합배지이므로 산업적으로 배양하기에는 높은 단가가 걸림돌 이었다. 그러므로 값비싼 복합 배지의 사용보다는 보다 저렴한 배지를 찾을 필요성이 있다. 저렴한 배지는 페니실린의 대량생산공정을 비롯하여 다양한 대량생산공정에서 쓰이는 당밀배지를 선정하였다(14). 이를 이용하여 당밀배지와 복합 배지에서 데이터를 비교 분석하였다(최종선택된 *C. bombicola* 만을 당밀배지에 배양).

당밀 배지는 모 제당회사에서 제공하여 배지로 사용 할 수 있었다. 당밀배지는 증류수 총 볼륨의 5%를 첨가하여 만들었다.

이 후 실험에서는 식용유 (corn oil)를 첨가 하였다. *C. bombicola*가 생산하는 생물계면활성제는 식용유가 첨가된 배지에서 높은 농도로 생산이 된다는 논문을 참고하였다(20).

pH 안정성 및 염 안정성

당밀 배지 (500 ml)에 식용유를 10 ml첨가 후 진탕배양 하였다. 샘플 채취 후 거름종이로 표면에 부유해 있는 기름을 제거한 후 3,000 rpm에서 30분간 원심분리한 상등액을 0.02 μ m의 막에서 여과하였다. 1 N HCl과 1 N NaOH를 각각 첨가하여 pH 2.0~pH 10.0까지 1.0간격으로 다양한 범위의 pH 용액을 만든 후 pH 측정기로 측정하여 pH를 보정하였다. 이 후 앞서 만들어 여과된 용액과 다양한 범위의 pH 용액을 1 : 3으로 섞었다. 상온에서 24시간 방치 후 표면장력측정기 (tensiometer)를 이용하여 pH 충격에 대한 표면장력 값의 변화를 살펴보았다. 측정은 3회 반복하여 측정하였다.

염에 대한 안정성은 pH 안정성 실험과 같은 방법으로 진탕배양, 기름제거, 원심분리, 여과한 후 그 액을 이용하였다. 여과액에 NaCl을 첨가하여 NaCl의 농도가 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%가 되도록 만들었다. 염의 농도 보정은 "Lutron의 YK-31SA" (range : 0~10%)를 이용하였다. 원하는 농도로 보정된 액을 표면장력측정기를 이용하여 표면장력 값의 변화를 살펴보았다. 측정은 3회 반복하여 측정하였다.

파일럿 플랜트 (Pilot plant)규모 적용

생산 균주를 선택한 후 당밀배지에 대량배양하여 파일럿 플랜트 규모에서 휘발성 유기화합물질의 흡수 처리율을 분석하였다. 대량배양은 반응기를 이용하지 않고 플라스크를 이용하여 생육특성조사 때와 같은 조건에서 진탕배양하였다. 식용유 첨가는 배지 1 L를 기준으로 20 ml를 첨가하였다. 처리비교 계면활성제로는 Tween81 (Sigma 사)을 사용하였다. 측정은 입구와 출구에서 분출되는 시료를 비교 분석하였다. 분석 조건으로 송풍기는 2고 가스플로우 (gas flow)는 0.5 CMM으로 하였다. 분석은 가스크로마토그래피를 이용해 분석하였다. 가스크로마토그래피는 FID detector가 장착된 HP6890 (Hewlett Packward사) 가스크로마토그래피를 이용하였다. GC column은 PE-1 이고 initial temp는 30 $^{\circ}$ C (10 min), oven ramp rate 5 $^{\circ}$ C/min, final temp는 230 $^{\circ}$ C (10 min)이다. column내 속도는 ~2 mL/min이다.

결과 및 고찰

복합배지배양 및 생육특성 조사

생물계면활성제를 생산한다고 보고된 균주 4가지를 선별

하여서 생육특성을 확인하기 위해 복합배지에 배양을 하였다. 균주밀도는 660 nm에서 측정하였다. 포도당의 함유량 분석은 영동제약에서 제시된 방법에 따라 실행하였다. 계산법은 다음과 같은 식을 사용하여 계산 하였다.

$$\text{포도당 (mg/100 ml)량} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준의 흡광도}} \times 200 \text{ (mg/100 ml)}. \text{ 이}$$

효소법은 포도당량이 600 mg/100 ml 까지 직진성이 있으므로 이 범위 안에 들어가게 희석하여 측정하였다. 다음 균주들의 복합배지 배양 결과는 *C. bombicola*, (Fig. 1), *S. chungbukensis*, (Fig. 2), *S. yanoikuyae*, (Fig. 3), *M. flavescens* (Fig. 4)이다. 복합배지에서의 특이사항은 없었다. 그러나 전환된 생물량을 비교해 보면 *M. flavescens*는 최종 생물량이 약 6 g/L로 나타났다. 비교대상인 *C. bombicola*, *S. chungbukensis*, *S. yanoikuyae*의 경우 약 18~20 g/L 나타나 *M. flavescens*는 상대적으로 생물량으로의 전환이 적다는 것으로 관찰 되었다. 또, *M. flavescens*의 경우 24시간 후 부터는 포도당의 양이 소폭 증가하는 것을 관찰할 수 있다. 이와 같은 결과는 배지에 소량 첨가된 포도당 또는, 갈락토오스를 탄소원으로 다 이용하고 나서 다당류를 포도당으로 분해하여 성장하는 것으로 추정할 수 있다.

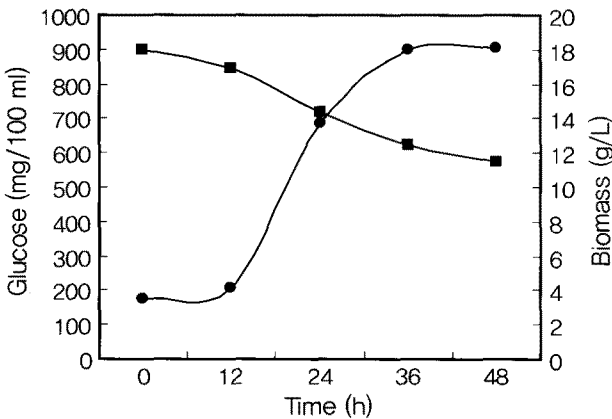


Fig. 1. Growth curve (●) and glucose concentration (■) during *C. bombicola* cultivation.

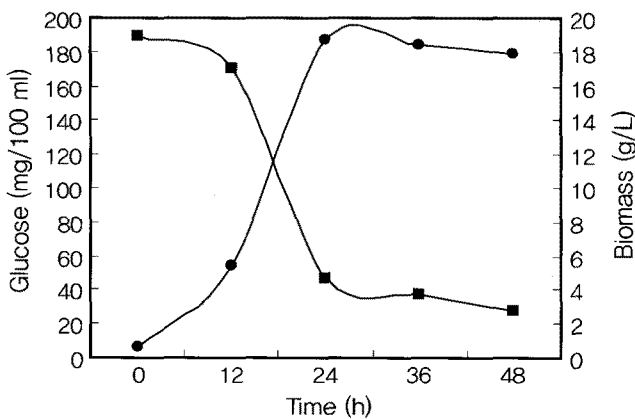


Fig. 2. Growth curve (●) and glucose concentration (■) during *S. chungbukensis* cultivation.

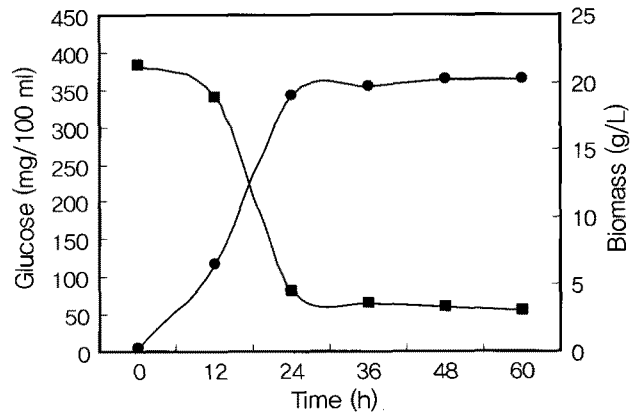


Fig. 3. Growth curve (●) and glucose concentration (■) during *S. yanoikuyae* cultivation.

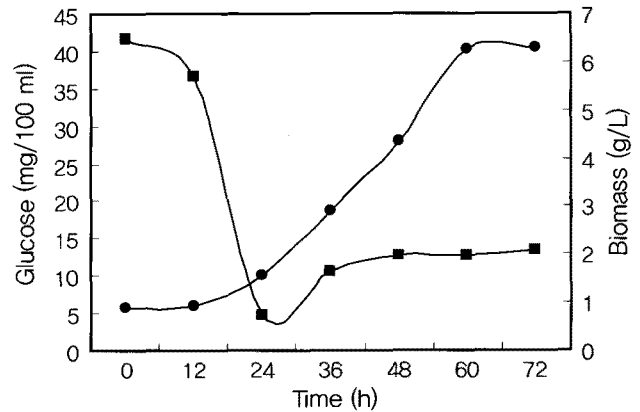


Fig. 4. Growth curve (●) and glucose concentration (■) during *M. flavescens* cultivation.

표면장력 (Surface tension)

미생물이 생물계면활성제를 생산하면 표면장력은 떨어진다. 이 사실을 이용해 표면장력 값으로 미생물이 생산하는 생물계면활성제의 활성을 확인해 볼 수 있다. 일반적으로 화학적 계면활성제는 표면장력이 25~50 dyne/cm 사이에서 값을 가진다(5). *C. bombicola*의 경우 표면장력이 66 dyne/cm에서 38.1 dyne/cm까지 떨어지고 표준편차는 0.1~1.1 dyne/cm 사이에 있다. *S. chungbukensis*는 60 dyne/cm에서 56 dyne/cm까지 떨어지고 표준편차는 0.1~1.3 dyne/cm 사이에 있고, *S. yanoikuyae*는 60 dyne/cm에서 55.7 dyne/cm까지 떨어지고 표준편차는 0.1~1.0 dyne/cm 사이에 있고, *M. flavescens*는 66.9 dyne/cm에서 56 dyne/cm까지 떨어지고 표준편차는 0.1~0.6 dyne/cm 사이에 있다 (Fig. 5). 표면장력이 낮은 것이 생물계면활성제의 활성이 우수한 것임에 착안할 때, 표면장력을 38.1 dyne/cm까지 떨어트린 *C. bombicola*가 우수한 생물계면활성제 생산 균주임을 확인 할 수 있었다. *C. bombicola*를 제외한 나머지 균주 3가지는 화학적 계면활성제 범위에 들어가지 못하는 것으로 나타났다.

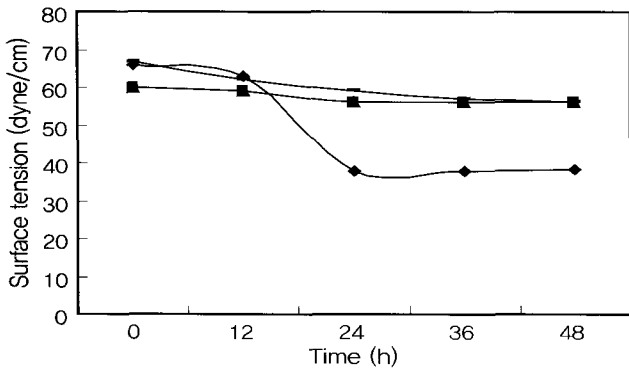


Fig. 5. Surface tension changes during cultivation. C-S.T (◆) : *C. bombicola* surface tension, S1-S.T (■) : *S. chungbukensis* surface tension, S2-S.T (▲) : *S. yanoikuyae* surface tension, M-S.T (-) : *M. flavescens* surface tension.

계면활성제 용액에서 휘발성 유기화합물질의 용해도 측정

계면활성제의 휘발성 유기화합물질 용해도 실험은 계면활성제가 얼마나 많은 휘발성 유기화합물질을 수용할 수 있는지를 판단하였다(Fig. 6). 가장 많이 휘발성 유기화합물질을 수용하는 것은 *S. chungbukensis*이고 두 번째로 휘발성 유기화합물질을 많이 수용하는 것은 *C. bombicola*로 나타났다. 특이사항은 *M. flavescens*의 수용할 수 있는 한계 용해도이다. *M. flavescens*는 톨루엔 (toluene), 클로로포름 (chloroform), 벤젠 (benzene)의 용해도가 0.2 Unit 이하로 나타났다. 이는 다른 미생물이 생산하는 생물계면활성제의 용해도가 클로로포름의 경우 0.55~0.74 Unit, 벤젠은 0.2~0.84 Unit까지 나타나는 것에 비하면 월등히 낮은 휘발성 유기화합물질의 물질 수용능력을 보였다. 그러나 톨루엔의 경우 *M. flavescens*이 근소하게 용해도가 높았다. 따라서 앞으로의 실험에서는 용해도가 비슷한 톨루엔과는 달리 클로로포름과 벤젠의 용해도가 낮은 *M. flavescens*를 배제하기로 했다.

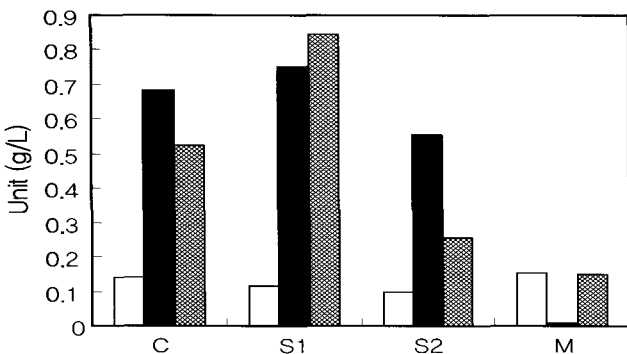


Fig. 6. The solubilities of toluene (□), chloroform (■) and benzene (▨) in the biosurfactant. (C : *Candida bombicola*, S1 : *Sphingomonas chungbukensis*, S2 : *Sphingomonas yanoikuyae*, M : *Myxococcus flavescens*.)

미생물 성장동력학 계수를 이용한 성장특성

미생물의 비성장속도 (μ)를 나타낸 것이 Table 1.에 있다. 비성장속도는 미생물의 성장속도를 나타낸 것으로 *M. flavescens*가 가장 낮은 값을 보여주고 있다. 이는 *M. flavescens*의 성장시간이 가장 오래 걸리는 것으로 판단할 수 있다. μ 값의 경우 자연로그를 이용하여 시간 (t)에 대해 도식화하여 구하였다. *S. chungbukensis*가 비성장속도와 기질수율이 좋은 것으로 나타났다. Substrate yield의 경우 반대로 *M. flavescens*이 가장 높게 나왔다. 그러나 *M. flavescens*의 경우 배지에 소량 첨가된 포도당 및 갈락토오스를 이용하여 일부 성장했다. 그리고 탄소원의 고갈에 따라 배지내의 다당류를 분해하여 성장하는 것에 착안한다면, 실제로 견보기 수율 (다당류를 분해하여 탄소원이 공급되는 상태를 고려하지 않고, 단순히 그래프 상에서만 보이는 수율)이 높게 나올 수 밖에 없었다.

Table 1. Specific growth rate (μ) and substrate yield

Microorganism	μ value	Substrate yield
<i>C. bombicola</i>	0.061	0.045
<i>S. chungbukensis</i>	0.144	0.107
<i>S. yanoikuyae</i>	0.091	0.061
<i>M. flavescens</i>	0.040	0.191

μ : Specific growth rate (hr^{-1}).
Substrate yield : g cells/100 ml substrate.

대량생산을 위한 균주 선택

대량생산 및 산업화 시킬 수 있는 균주 선택을 위해 실험 결과를 종합해 보았다. 휘발성 유기화합물질의 용해도 실험 결과 *S. chungbukensis*와 *C. bombicola*가 휘발성 유기화합물질에 우수한 용해도를 나타내는 것으로 나타났다(Fig. 6). 비성장계수와 기질효율을 높은 값 순으로 나열하자면 *S. chungbukensis*, *S. yanoikuyae*, *C. bombicola*가 된다(Table 1). 이 두 자료로 비교 한다면 최종 균주 선택은 *S. chungbukensis*가 되어야 하나, 연구 목적은 우수한 생물계면활성제를 생산하는 균을 이용한 실용화 연구이기에 표면장력을 일반적인 화학적 계면활성제 범위의 반값정도 낮추는 *C. bombicola*를 최종적으로 선택하였다(Fig. 5).

대량생산을 위한 복합배지 배양

산업에 적용하기 위해서는 낮은 단가를 필요로 한다(7). 생물계면활성제가 이용에 상당히 제한적인 것은 바로 이 단가에서 기인한다. 이를 극복하기 위해 본 연구에서는 당밀배지를 이용하였다. 당밀배지는 사탕수수에서 설탕을 만들고 남은 찌꺼기로써 버려지는 자원이었다. 그러나 페니실린 배지로 사용이 되고 페니실린의 생산 농도가 높아짐으로서 산업용 탄소원으로 각광을 받기 시작했다(23).

이 사실을 바탕으로 생물계면활성제가 가지는 단점인 높은 단가를 해결하려 했다. 5%의 당밀배지를 만들어 복합배지와 같은 방법으로 배양을 하였다. 그리고 당밀배지와 복합배지에서 생산된 생물계면활성제를 비교하여 당밀배지에서 표면장력 저하 능력 재연성을 실험하였다. 그 결과 복합배지보다 당밀배지에서 최종 표면장력이 3 dyne/cm 정도 더 낮은 것으로 나타났다. 그러나 당밀배지에서는 표면장력이 복합배지보다 약 12시간 정도 뒤늦게 떨어졌으나, 표면장력에는 아주 큰 변화는 없는 것으로 나타나 대량 생산 배지로 당밀배지를 이용할 수 있음을 알 수 있었다 (Fig. 7). 또한 단가가 낮은 배지뿐만 아니라, 산업에 적용을 위해선 높은 생산수율도 보여야 한다. *P. aeruginosa* S8을 이용한 하이드로카본혼합물의 분해실험에서 생물계면활성제가 생산되는 것을 확인한 실험과 com oil을 첨가한 실험에서 생물계면활성제가 많이 생산된다는 것을 찾아볼 수 있었다(17, 22, 20). 이 논문을 참고하여 당밀배지 배양과 당밀배지에 식용유를 첨가한 배지에서 균을 배양하였고 이 두 배지에서 생산된 생물계면활성제의 휘발성 유기화합물질의 흡수율을 비교하였다(Table 2).

Table 2. Removal of benzene, toluene and xylene in the biosurfactant with the addition of plant oil

		20 min		40 min		60 min	
		M	M+S	M	M+S	M	M+S
Benzene	I-O (ppm)	0	192	96	160	0	272
	removal (%)	0	80	75	67	0	85
Toluene	I-O (ppm)	0	400	80	400	80	640
	removal (%)	0	38	25	71	20	80
Xylene	I-O (ppm)	80	80	0	320	0	400
	removal (%)	33	33	0	80	0	85.7

I-O : inlet value - outlet value, M : molasses, M+S : molass with addition of plant oil.

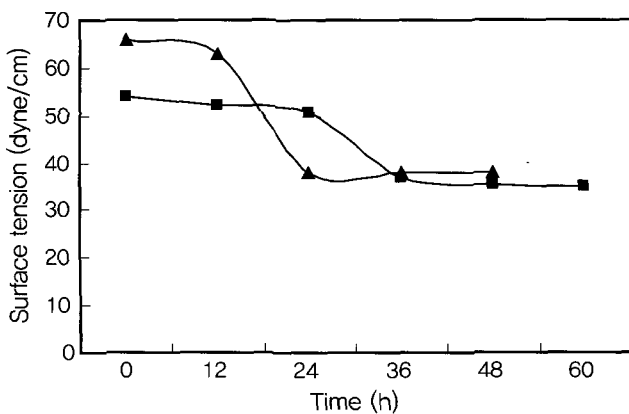


Fig. 7. Comparison of surface tensions between microbial biosurfactants.

C-S.T (▲) : Biosurfactant produced by *Candida bombicola* in compound medium.
 MC-S.T (■) : Biosurfactant produced by *Candida bombicola* in molass medium.

식용유를 첨가하지 않은 당밀배지에서 배양되어 생산된 생물계면활성제는 20분대에서 벤젠과 톨루엔의 흡수율은 0%였고 크실렌의 경우 33%의 흡수율을 보였다. 40분대부터는 크실렌의 제거율이 0%인 것으로 나타나 계면활성제의 한계수용능력이 적은 것으로 판단할 수 있다. 그러나 당밀배지에 식용유를 첨가하여 배양하여 생산된 생물계면활성제는 40분대부터 월등한 제거율을 보였다. 20분대에는 크실렌(Xylene)의 제거율이 둘 다 비슷하였다.

pH 안정성 및 염 안정성

현장에서 적용되는 생물계면활성제는 다양한 pH 및 염의 변화를 겪게 된다. 그러므로 배양 초기에 pH 및 염의 농도를 맞추고 배양하여 표면장력의 안정성을 보기 보다는 생물계면활성제가 함유되어 있는 시료에 다양한 pH 용액을 첨가하여 pH에 대한 충격을 주거나, NaCl을 첨가하여 염에 대한 충격을 주었다. 당밀 배지 자체의 완충 작용능력을 테스트 후 생물계면활성제 시료와 다양한 pH 용액을 1:3으로 섞은 후 24시간 방치 했다. 그 결과 pH 2~pH 10의 충격에서 표면장력 값은 크게 변하지 않는 것으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Surface tension in the molass media with variable pH conditions

pH	S.T	pH	S.T
pH 2	37.0 ± 0.1	pH 7	37.0 ± 0.2
pH 3	37.2 ± 0.2	pH 8	37.2 ± 0.5
pH 4	37.3 ± 0.5	pH 9	37.0 ± 0.3
pH 5	37.0 ± 0.7	pH 10	37.4 ± 0.5
pH 6	37.4 ± 0.2	원 액	37.0 ± 0.1

S.T : Surface tension (dyne/cm).

Table 4. The surface tension in the molass media with variable NaCl concentrations

NaCl concentrations	1 %	2 %	4 %
medium	51.0 ± 1.4	51.5 ± 0.3	52.1 ± 0.4
culture + NaCl	37.4 ± 0.2	37.8 ± 0.4	38.0 ± 0.2
NaCl concentrations	6 %	8 %	10 %
medium	52.9 ± 0.5	54.0 ± 0.3	56.4 ± 0.4
culture + NaCl	39.8 ± 0.6	40.0 ± 0.1	40.8 ± 0.4

Culture (without NaCl) surface tensions : 37 ± 0.4 dyne/cm.
 Medium : medium with molass (dyne/cm).
 Culture + NaCl : culture with NaCl (dyne/cm).

*C. bombicola*가 배양되지 않은 초기 당밀배지액에 염을 첨가하여 표면장력 값의 변화를 관찰했다. 첨가된 ~%에 따라 초기 당밀배지액의 표면장력은 51~56.4 dyne/cm로 첨가된 염의 농도가 높을수록 표면장력 값이 높아지는 결과를 얻었다. NaCl을 첨가 하지 않은 배양액의 표면장력 값을 측정하였더니 37 dyne/cm였다. 1~10%의 다양한 농도로 배양액에 염을 첨가하면 표면장력은 37.4~40.8 dyne/cm로 증가하는 것으로 나타났다. 일반적으로 화학적 계면활성

제의 표면장력이 25~50 dyne/cm 사이임을 논문을 통해 확인할 수 있었다(5). 표면장력이 증가하긴 했지만 화학적 계면활성제의 표면장력 범위에 들어가므로 NaCl의 농도가 10%까지는 생물계면활성제의 표면장력이 대폭 변하지 않는 것으로 나타났다(Table 4).

파일럿 플랜트 규모 적용

*C. bombicola*에서 생산된 생물계면활성제를 산업적 규모에서의 적용을 테스트할 수 있도록 파일럿 플랜트 규모에서 실험하였다. 공장에서는 단일공정의 조작 및 유입수에 따라 폐수가 모이는 곳의 휘발성 유기화합물질의 농도가 실시간으로 변하게 된다. 이러한 점을 감안하여 화학적 계면활성제와 생물계면활성제의 제거율을 비교했다. 앞의 Table 2에서와 같이 파일럿 플랜트 규모로 적용하기 위해서 생산 수율이 높은 당밀과 식용유 배지를 이용하여 생물계면활성제를 생산하였다. 화학적 계면활성제로는 Tween81와 비교하였다(Fig. 8). 60분정도 처리되었을 때 화학적 계면활성제와 생물계면활성제 간의 제거율이 엇비슷하게 80%정도 되는 것으로 관찰되었다. 이로서 *C. bombicola*에서 생산된 생물계면활성제를 이용한 파일럿 플랜트 규모에서의 실험은 성공적으로 수행되었다.

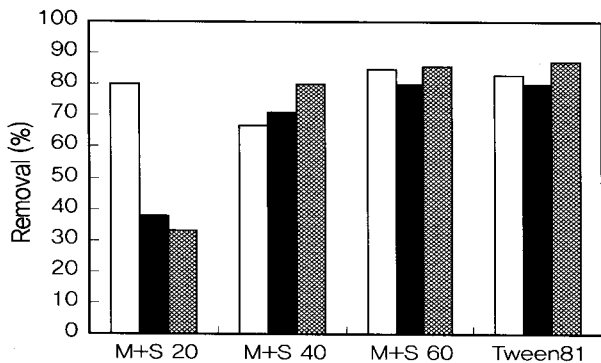


Fig. 8. Comparison of removal efficiencies of benzene (□), toluene (■), and xylene (⊗) between Tween81 and biosurfactants from molass and plant oil.
 M+S 20 : Treatment with biosurfactant for 20 min.
 M+S 40 : Treatment with biosurfactants for 40 min.
 M+S 60 : Treatment with biosurfactants for 60 min.

생물계면활성제에 의한 휘발성 유기화합물질 제거

생물계면활성제를 생산하는 것으로 보고된 균주 4가지를 선택하여, 산업화에 적당한 균주를 선별하였다. 최종 선별된 균주는 *C. bombicola*이며, 이 균주를 진탕배양하여 고농도의 생물계면활성제를 얻었다. 이를 실제 산업현장에서 파일럿 플랜트 규모 실험을 진행하여 실제 화학적 계면활성제와 비슷한 처리 효율이 있다는 결과를 얻었다. 이는 생물계면활성제를 이용하여 산업에서도 실용화 할 수 있는 가능성을 열어주는 연구 결과이다. 이 연구에서

는 계면활성제를 분리정제 하여 CMC (Critical micelle concentration)등을 확인하지 않았다. 생물계면활성제가 생산된다고 보고된 균주를 이용하여 실용화 연구를 한 것이기 때문이다. 실제 산업현장에서 적용할 때도 원심분리와 여과법을 적용하여 실험하였다. 당밀배지에서 생물계면활성제를 분리 정제하는 비용을 최대한으로 낮춤으로써 경제성을 높일 목적이었다.

폐수공장에서 배출되는 휘발성 유기화합물질은 휘발되어 폐수 처리 유닛에서 배출되는 가스를 모아서 생물계면활성제가 분사되고 있는 관에 통과시킴으로써 휘발성 유기화합물질을 제거하는데 이용 가능한 예상 모식도를 Fig. 9에 나타내었다.

위 결과를 이용하여 생물계면활성제를 이용한 산업 실용화에 대한 기초 자료를 얻었고, 보다 나은 완벽한 실용화를 위해서 지속적인 연구가 필요할 것이다.

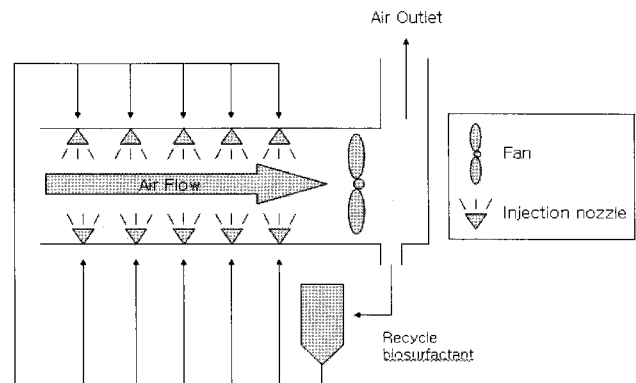


Fig. 9. Schematic of VOC removal process with biosurfactant.

접수 : 2008년 7월 31일, 게재승인 : 2008년 12월 16일

REFERENCES

1. Ahn, J. W. and B. S. Kim (2002), Isolation and in vivo Activities of Antifungal Compounds from *Myxococcus sp.* JW154 (Myxobacteria). *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 162-166.
2. Baek, S. O., S. H. Kim, and M. H. Kim (2005), Characterization of Atmospheric Concentrations of Volatile Organic Compounds in Industrial Areas of Pohang and Gumi Cities. *J. ENVIRON. TOXICOL.* **20**, 167-178.
3. Banat, I. M., R. S. Makkar, and S. S. Comeorta (2000), Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 495-508.
4. Boyle, C. D. and A. E. Reade (1983), Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 392-399.

5. Catherine N. Mulligan (2005), Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*. **133**, 183-198.
6. Copper, D. G. and D. A. Paddock (1984), Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 173-176.
7. Desai, J. D. and I. M. Banat. (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol.* **61**, 47-64.
8. Deshpande, S., B. J. Shiau., D. Wade., D. A. Sabatini, and J. H. Harwell (1999), Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *water Res.* **33**, 351-360.
9. Doong, R. A. and W. G. Lei (2003), Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. *J. Hazard Mater* **96**, 15-27.
10. Greek, B. F. (1991), Sales of detergents growing despite recession. *Chem. Eng. News* **69**, 25-52.
11. Hee. S. S. and K. R. Park. (2006), Characteristics of Biosurfactant Producing *Pseudomonas sp.* G314. *Kor. J. Microbiol.* **42**, 286-293.
12. Kim, J. S., H. Song., N. Chung, and W. G. Bang. (2005), Optimization of Production Conditions of Biosurfactant from *Bacillus sp.* and its Purification. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **48**, 109-114.
13. Kim, S. T. (2000), A Study on Installation of Removal Device for Volatile Organic Compounds from Petrochemical Plant. *Korean J. Sanitation.* **15**(2), 95-101.
14. Kim. Y. B. and E. K. Kim. (2004), Production and Application of Biosurfactant (Sphorolipid). *Prospect. Ind. Chem.* **7**, 15-20.
15. Lim, K. H. (1996), Their structure, properties, and applications. *J. Korean Oil Chemist's Soc.* **13**, 1-20.
16. Magaritis, A., A. Kennedy., J. E. Zajic, and D. F. Gerson (1979), Biosurfactant production by *Nocardia erythropolis*. *Dev. Ind. Microbiol.* **20**, 623-630.
17. Mattei, G., E. Rambeloarisoa, G. Giusti, J. F. Rontani, and J. C. Bertrand (1986), Fermentation procedure of crude oil in continuous culture on sea water. *Appl. Microbial. Biotechnol.* **23**, 302-304.
18. Milton, M. J. (1987), Surfactants if engineering technology. *Surfactant Science Series*. 26. Marcell Dekker, New York.
19. Mulligan, C. N. and B. F. Gibbs, in N. Kosaric (1993), Biosurfactants-production, properties, application, M. Dekker, New York, 329-372.
20. Pekin, G., F. Vardar-Sukan, and N. Kosaric (2005), Production of Sphorolipids from *Candida bombicola* ATCC 22214 Using Turkish Corn Oil and Honey. *Eng. Life Sci.* **5**, 357-362.
21. Schippers, C., K. Gessner., T. Muller, and T. Scheper (2000), Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sphorolipid mixture. *J. Biotechnol.* **83**, 189-198.
22. Shafeeq, M., D. Kokub., Z. M. Khalid., A. M. Khan, and K. A. Malik (1989), Degradation of different hydrocarbon and production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from coastal waters. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 505-510.
23. Shuler, Michale L., and Fikret Kargi (2002), Bioprocess Engineering. 2e. 1-10 Prentice Hall PTR.
24. Shuler Michale L. and Fikret Kargi (2002), Bioprocess Engineering. 2e. 155-200 Prentice Hall PTR.
25. 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-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase in *Sphingomonas chungbukensis* DJ77. *Kor. J. Microbiol.* **39**, 123-127.
26. Zobell, C. E. (1947), Bacterial release of oil from sedimentary material. *Oil Gas. J.* **46**, 62-67.