

## *Candida bombicola* 로 부터 생산된 미생물 계면활성제(Sophorolipid)의 응용에 관한 연구

김 원 경·김 은 기  
인하대학교 공과대학 생물공학과

### Application of Biosurfactant (Sophorolipid) Produced from *Candida bombicola*

Won Kyung Kim and Eun Ki Kim

Department of Biological Engineering, Inha University  
Inchon, Namgu, Yonghyun, Inchon Korea 402-751

#### ABSTRACT

Characteristics of the sophorolipid produced from *Candida bombicola* were investigated as an emulsifier of oil, a detergent or as a dispersant. Improved emulsification of crude oil was observed at high temperature (70°C) with less than 1% concentration. Sophorolipid solution produced few foam even at reduced surface tension, however performance as a detergent of soiled cloths was poor. Dispersing and stabilizing abilities of sophorolipid solution were proved to be superior to those of chemical dispersants when examined by dispersing Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> or carbon black powders.

#### 서 론

계면활성제의 용도는 실로 다양하여 섬유, 피혁, 식품, 화장품, 안료등 모든 산업 부분에서 유화제, 분산제, 침투제등의 용도로 쓰이고 있으며 국내의 경우 약 1.4조원(1988기준)의 계면활성제 시장을 보유하고 있고 이중 약 50% 정도를 수입하고 있다. 그중 국내시장의 70%가 섬유공업 및 세제에 사용되고 의약, 화장품이 15% 정도를 차지하고 있다.

현재 사용되고 있는 많은 종류의 계면활성제가 독성이 있고 쉽게 생분해가 되지 않아서 최근 환경에 대한 관심의 집중과 함께 생분해 될수 있는 계면활성제에 대한 관심이 집중되고 있다. 그중 미생물에 의해서 생산되는 계면활성제(Biosurfactant, Microbial surfactant, Bioemulsifier)는 독성이 적고 생분해 될수 있는 특징을 가지고 있어서 환경, 화장품, 식품, 의약품 등의 분야에 있어서 기존의 계면활성제를 능가할 수 있으리라 본다(1).

유류유출에 의한 해양오염의 경우, 특히 해안이 오염되었을 경우 화학분산제를 사용하여 분산, 처리하고 있으나 이의 독성 때문에 시급히 독성이 없는

분산제로서의 대체가 시급하다(2-4). 즉 해안을 합성계면활성제로 씻어내는 경우, 해안의 2차 오염 및 토양오염 등의 문제를 미생물계면활성제를 대신 사용하여 오염지역의 유류제거 및 그 지역의 환경을 빨리 복구시킬 수 있다는 것이다. 이러한 연구로는 *Pseudomonas aeruginosa*에서 생산된 glycolipid 계통의 미생물 계면활성제를 사용하여 유류에 오염된 모래, 자갈 등에서 유류 분산 및 제거효과 등에 탁월한 효과를 보인 것을 들 수 있다(5). 따라서 합성계면활성제의 2차 오염문제 때문에 비록 속도가 느린 해도 미생물에 의한 오염지역의 유류제거가 가장 적당한 방법으로 평가되고 있다. 실제로 알라스카 지방의 Exxon Valdez호 침몰사고의 유류오염 지역에서는 원래 그곳에 서식하는 미생물이 유류를 섭취, 분해 할 수 있는 환경을 만들기 위해 일종의 비료로 질소, 인 등의 원료를 공급하여 일부 지역을 제거한 결과 탁월한 해안 정화능력을 보였다(6). 일부 유전공학적 기술에 의한 유류 제거관이 보고되어 있으나, 환경영향 평가가 되어 있지않은 상황으로 인하여 실제로 대부분의 알라스카 해변은 고온 고압의 물로써 해변의 지각과 바위를 씻어내는데 그쳤으나

이것 자체로 그리 효과적이지는 못했다. 이처럼 물만으로 자갈에 묻어있는 유류를 분산시켜 효과적으로 세척 할 수 없는 경우 여기에 주변환경에 해롭지 않은 유화제, 예를 들면 미생물로부터 생성된 계면활성제를 사용하면 해안의 유류제거를 2차 오염의 위험성 없이 수행 할 수가 있다.

전보(7)의 생산조건에 대한 연구결과에 이어, 본 실험에서는 *Candida bombicola*로 부터 생성되는 glycolipid 계열의 미생물계면활성제인 sophorolipid의 응용에 관한 연구로서 계면활성제로서의 특성 중 분산력, 세척력, 용해성, 흡습력 등을 조사하였고 유류에 오염된 자갈로부터의 유류제거능력을 측정하였다.

### 실험재료 및 방법

#### 균주 및 배양조건

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

#### 분석방법

##### 균 체

건조 질량으로 그 양을 측정하였으며 남아있는 oil을 제거하기위해 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℃에서 2일간 건조, 측정하였다.

##### Sophorolipid:

배양이 끝난 배양액을 20ml 취하여 3500rpm에서

Table. 1. Composition of culture medium

COMPONENT	CONTENT (%)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub>	0.5
CaCl <sub>2</sub>	0.01
NaCl	0.01
GLUCOSE	10
CORN OIL	10
UREA	0.07

20분 동안 원심 분리 하였다. 침전된 균체와 갈색의 sophorolipid중 sophorolipid만 취하여 건조하고 상등액 내에 용해되어 있는 sophorolipid를 얻기 위해 상등액을 동량의 에틸아세테이트로 추출한후 에틸아세테이트층을 분리하여 50℃를 유지하면서 진공 상태에서 에틸아세테이트를 증발시킨후 남은 갈색의 물질을 헥산으로 세척하여 남아있는 옥수수 유를 제거하였다. 이것을 다시 50℃에서 건조한후 침전된 것과 함께 최종 crude sophorolipid를 얻고 그 건조량을 정량하였다.

#### Waste oil

원유(Arabian Light)로 오염된 자갈들을 크로로폼으로 추출하여 분광 광도계(Shimadzu, Japan)를 사용하여 파장 254nm의 흡광도로 부터 표준 곡선을 사용하여 얻었다.

#### 기포력

기포력 측정 장치(공업규격폼)를 사용하여 거품이 생긴 높이를 mm단위로 읽었다.

#### 세척력

물과 각각 0.2%의 sophorolipid용액, 화학계면활성제인 AES(alkyl-ethersulfate)용액을 사용하였다. 각 용액 1000ml에 오염포(EMPA 116: solid with blood/milk/carbon black)를 넣어 120rpm에서 교반하여 세척한후 원백포(R<sub>0</sub>), 오염포(R<sub>s</sub>), 세정포(R<sub>w</sub>) 각각의 표면 반사율을 측정하여 세정율, [(R<sub>w</sub>-R<sub>s</sub>)/(R<sub>0</sub>-R<sub>s</sub>)x100],을 산출했다.

#### 용해성

25℃에서 유기 용매제에 0.5%로 용해시킨다음 눈으로 용해된 정도를 측정하여 표현하였다.

#### 보습력(Hygroscopic property)

일정한 상대습도하에서 건조된 시험 물질 100g이 흡수한 물의 양을 그램으로 표현한 것으로서 포화소금용액을 사용, 일정습도(75%)를 유지한 용기 내에서 수분의 흡수에 의한 중량의 증가를 측정하였다.

#### 표면장력

일정 온도에서 Fisher Tensionmeter(Fisher, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 분산력

100ml mass cylinder에 각각 0.3g의 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>를 넣

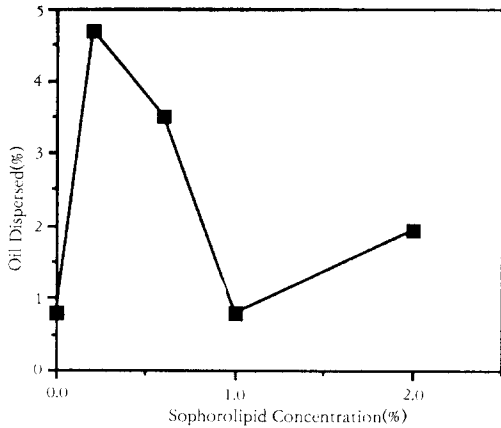


Fig. 1. Effects of Sophorolipid Concentration on the Dispersion of Oil

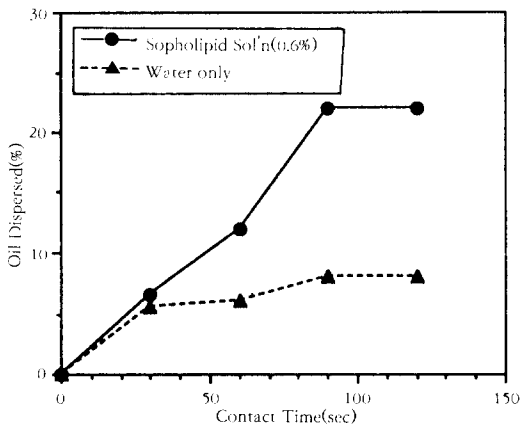


Fig. 2. Effects of Contact-Time on the Dispersion of Oil

은 후, 시료용액 혹은 증류수(control)를 100ml 채웠다. 일정 속도로 각 mass cylinder를 흔들어  $Fe_2O_3$ 를 골고루 분산시킨 후 일정 시간을 세워두었다. Mass cylinder 내 현탁물의 20ml 밑부분에서 2ml 씩 취하여 25ml 증류수로 희석시킨후 660nm에서 흡광도를 측정하여 분산력을 나타내었다. 이때 blank를 물로 하고 그의 흡광도를 0%로 한다.

### 결과 및 고찰

#### 유류의 분산 및 제거능력

에틸아세테이트 및 hexane으로 추출한 Crude sophorolipid용액의 유류분산 능력을 측정하기 위해

서 sophorolipid의 수용액상에서의 농도와 접촉 시간 별로 분산된 Oil의 양을 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 물만을 사용한 경우보다 0.3~0.6% 사이의 sophorolipid를 사용한 경우가 훨씬 높은 유류분산능력을 보이고 있다. 이 경우 0.6% 이상에서는 sophorolipid가 glycolipid 계열이므로 물에 완전히 용해되지 않는 현상을 보였고 약간의 가열이 필요하였다. Fig. 2에는 유류분산에 소요되는 시간을 표시하였다. 약 15분 후에는 최고점에 도달하였다. 그 이상에는 더 이상의 증가가 없는 것으로 보아 sophorolipid가 빠른 속도로 유류를 분산시킴을 알 수 있었다.

유류분산시 온도의 영향을 살펴 본 결과 온도에 따라 많은 변화를 보였다. Fig. 3에 보듯이 70℃ 부근에서는 같은 온도의 물보다는 약 7배의 유류 분산능력을 보이고 있다. 이러한 결과는 *P. aeruginosa*에서 생성된 glycolipid의 경우와 유사한 결과를 보이고 있다(5). 따라서 알래스카 해안에서 유류로 오염된 자갈의 세척시 고온의 물로 세척을 할 경우 sophorolipid와 같은 glycolipid 계열의 미생물 계면활성제를 첨가 한다면 제거 효율을 높일 수 있을 뿐더러 작은 입자로 분산시켜 해양서식 미생물에 의한 분해를 촉진시킬 수 있으리라 본다.

Fig. 4에는 유류에 침전시킨 왕모래에서 sophorolipid를 사용하여 유류를 제거할때, 접촉시간 및 온도에 따른 왕모래에서의 유류제거 능력을 도시하였다. 유류분산의 실험에서 보여 준 결과와 같이 70℃에서 좋은 결과를 보여주었으며 역시 같은 온도의 물보다는 sophorolipid를 첨가한 것이 탁월한 효과를 나타내고 있다.

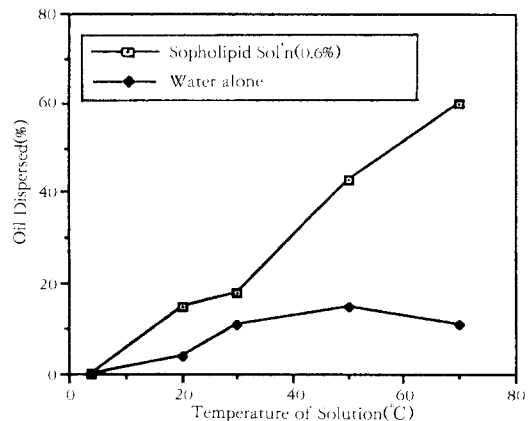


Fig. 3. Effects of Temperature on the Dispersion of Oil

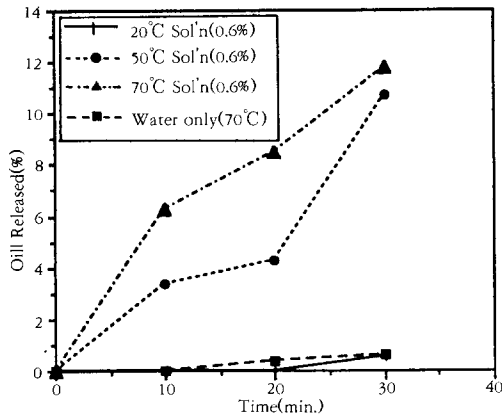


Fig. 4. Time-course Release of Oil From Contaminated Stone.

세제 및 분산제로서의 특성

Sophorolipid의 세제 및 분산제로서의 능력을 측정하기 위하여 기포력, 세척력, 용해력, 보습력, 분산력 등을 조사하였다. Table 2에는 기포력을 측정한 결과를 나타내었다. 화학계면활성제가 160mm인 것에 비하여 sophorolipid의 경우는 10mm이하 이어서 거의 거품이 일지 않는다고 볼 수 있다. 실제로 2ℓ 발표조에서도 많은 sophorolipid (~90 g/L)가 생성되어도 전혀 거품이 일지 않는 것으로 관측되었다. 이 경우 0.2% sophorolipid의 표면장력이 38.8mN/m의 낮은 표면장력 임에도 불구하고 거품이 형성 안 되는 현상을 보여주고 있어 낮은 표면장력이 반드시 거품을 형성 한다고는 볼 수 없다. 거품의 형성은 세척력과는 무관한 것으로 알려져 있으며 최근 거의 거품이 일지 않는 세제개발이 진행되고 있다. 또한 하천수에서 사용한 세제에 의해 형성된 기포는 햇빛 및 공기와와의 접촉을 차단하여 수중 생태계에 악영향을 끼치는 것으로 알려져 있어서 오히려 기포가 없는 계면활성제를 선호한다고 할 수 있다.

Sophorolipid의 옷감에 대한 세정능력은 탄소, 우유, 혈흔등의 인공오염포를 사용한 결과 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 일반적으로 가정에서 사용하는 세탁 용도로 보다는 다른용도의 세제의 특성, 예를 들면 유류오염 제거의 세척 및 인체에 관련된 세제 등을 고려해야 할 것으로 사료된다.

앞서 언급한대로 sophorolipid는 glycolipid 계열이기 때문에 1% 이상의 수용액에서는 불용성을 보이고 있다. 이러한 sophorolipid의 용해도를 높이기 위하여 여러 용매에 대한 용해성을 조사한 결과 etha-

Table 2. Height of foam at various temperature and concentration.

Temp(°C)	Sophorolipid Conc.(wt%)			Unit:mm
	0.1	0.2	0.3	AES*
20	10	10	8	160
50	6	4	4	N.D.**
80	9	7	5	N.D.

\* Alkyl Ethoxylate Sulfate

\*\* Not Determined

Table 3. Solubility of sophorolipid

Solvent	Solubility	Solvent	Solubility
benzen	ID	benzyl alcohol	SD
2-butanon	D	ethyl alcohol	SD
cyclo-hexane	ID	methyl alcohol	D
oleic acid	D	petroleum ether	ID
propanol	SD	propylene glycol	D
tetrachloroethylen	ID	water	ID

Temp: 20°C, Conc:5%

Ssoluble, SD:soluble, dispersed, D:dispersed

ID:insoluble, but slightly dispersed, Iinsoluble

Table 4. Dispersion of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powder in various souldion Unit: absorbance 660nm

Time/Solution	Water	Sophorolipid	SDS*	Tween80	AOT**
after 4hrs	0.8	81.7	62.3	60.9	97.6
24hrs	0.0	73.0	56.7	41.4	94.7

\* SDS:Sodium Dodecyl Sulfate

\*\* AOT:Diocetyl sulfosuccinate

anol, propanol, benzyl alcohol 등에서 그 중 좋은 용해도를 보였다(Table 3).

Sophorolipid의 보습력(water uptake)을 조사하여 화장품등 보습력이 요구되는 분야에서의 응용성을 살펴보았다. 보습력이 좋은 것으로 알려진 sorbitol과 glycerol의 보습력에 비해서 약 5%, 및 10% 정도의 낮은 보습효과를 나타내었다. 이 경우, 본 실험에서 사용한 sophorolipid는 발효액을 에틸아세테이트로 추출한 후 헥산으로 남은 oil을 씻어내고 90°C에서 건조시킨 crude sophorolipid로서 끈끈한 액상이어서 당성분이 포함된 glycolipid계열의 계면활성제가 가질수 있는 보습력이 낮게 나타난 것이 아닌가 한다. 실제로 sophorolipid의 유도체는 높은 보습력을 가지고 있는 것으로 밝혀져 있어 화장품에

주로 사용되고 있다(8).

계면활성제의 특성중의 하나인 분산력(dispering power)을 측정, 다른 분산제인 SDS, Tween 80, AOT등과 비교하였다. Table 4에서 보는 바와같이 4시간, 혹은 24시간이 경과하여도 사용한  $Fe_2O_3$  용액을 분산시켜 침전되지 않도록하는 능력이 SDS나 Tween80보다 우수한 결과를 보여주고 있다. 활성탄 분말을 사용하였을 경우도 유사한 결과를 보여주었다.

## 요 약

*Candida bombicola*에서 생성된 sophorolipid의 응용성을 조사하기위하여 유류분산능력 및 세제, 분산제로서의 특성을 살펴보았다. 1%미만의 sophorolipid용액이 높은 온도(70°C)에서 유류분산 및 제거에 좋은 효과를 보였다. Sophorolipid용액은 낮은 표면장력에서도 거품이 형성되지않는 특성을 가졌으나, 옷감에 대한 세척력 및 보습력은 낮은 것으로 밝혀졌다. 기존의 다른 화학분산제에 비해 분산력 및 안정성이 특히 높은 것으로 관찰되었다.

## 감 사

세척력측정 등, 실험수행에 많은 도움을 준 무궁

화유지 연구소에 감사드리며, 해양유류 오염제거에 많은 조언을 주신 해안경찰청 연구소 이창섭과장님께 감사드립니다. 이 연구는 1991년도 인하대 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

1. N. Kosaric, W. Carinins and N. C. Gray (1987) *Biosurfactants and Biotechnology* (Kosaric and Gray, eds) ch. 2. Marcel Dekker Inc, N. Y.
2. M. McIntosh, (1990), NRC News Report **39**, 13
3. R. P. Griffiths, (1981), *Mar. Environ. Res* **5**, 83
4. T. R. Parsons, (1985), *Mar. Environ. Res.* **13**, 265
5. S. Harrey, I. Elashvili, J. Valdes, D. Kanely and A. M. Chakrabarty, (1990), *Biotechnology* **8**, 228
6. P. H. Pritchard and C. F. Costa (1991) *Environ. Sci. Technol.*, **25**(3):372
7. W. K. Kim, E. K. Kim (1992) Kor. J. Biotechnol. Bioeng. 7(2), (1992)
8. Y. Kimura (1989), *Fragrance Journal* **6**, 61