

생체계면활성제 소포로리피드의 생합성과 계면 특성

강창범 · 류경임* · 임경희

중앙대학교 화학공학과, 서울특별시 동작구 흑석동 221
*산업자원부 기술표준원, 경기도 과천시 중앙동 2
(2000년 4월 13일 접수, 2000년 8월 30일 채택)

Biosynthesis and Interfacial Properties of Sophorolipids As a Biosurfactant

Chang-Beom Kang, Gyung-Ihm Rhyu*, and Kyung-Hee Lim

Department of Chemical Engineering, Chung-Ang University, Seoul 156-756

*Agency for Technology and Standards, Ministry of Commerce, Industry, and Energy

(Received, April 13, 2000 ; Accepted August 30, 2000)

Abstract : Sophorolipids were biosynthesized using a strain of yeast, *Torulopsis bombicola* ATCC 22214. It has been reported that this yeast gives the highest yields for the production of biosurfactant sophorolipids. Hence, this yeast was used in this study. One of the objectives of this study is to increase the yield of the sophorolipid synthesis. To meet this end, basic culture medium was formulated on the basis of literature research to-date. When this medium was used, the increase in yield from 15% to 150% was observed compared to using the media in the literature. To examine how the interfacial characteristics of sophorolipids change with substrate, glucose (the first carbon source) was maintained in the media and after being cultured for three days, the second carbon sources such as alkanes, vegetable oils, alcohols or organic acids were added. The whole broth was extracted twice with ethyl acetate and the extract was analyzed by thin layer chromatography(TLC). After qualitative analyses by TLC, surface tensions of sophorolipids were measured by the Wilhelmy plate method and critical micelle concentration(CMC) was determined using these surface tension data. Also, interfacial tensions were measured by the spinning drop method and emulsions of the three-component water/decane/sophorolipid system were tested. Sophorolipids were effective and efficient in terms of surface tension reduction and CMC, but they were ineffective as emulsifiers because emulsions were separated within 30 minutes.

1. 서론

계면에 흡착하여 계면의 성질을 현저히 바꾸어 주는 물질인 계면활성제는 석유 화학, 섬유, 의학, 화장품, 세제, 식품 등 거의 모든 산업에 쓰일 정도로 폭넓은 용도를 지니고 있다. 이러한 이유로 계면활성제 산업은 매년 14%의 고성장 추세를 나타내고 있으며 미국의 경우 1980 년대에 300%의 성장을 보였다.[1] 그러나, 이런 고성장 추세에도 불구하고 계면활성제 산업이 기술적인 문제로 인하여 어려움을 겪게 되었다. 그것은 다름 아닌 그린라운드(Green Round)의 실행으로 대표되는 강화된 환경 규제로 인해서 환경 오염의 문제를 최소화하면

서 보다 나은 기능을 수행할 수 있는 생체 계면활성제의 개발이 요구되었기 때문이다.

생체 계면활성제는 구조가 다양하며 생물학적 친화성이 우수하고, 생분해성이 좋으며 낮은 독성을 나타내는 장점이 있어서 화학 합성 계면활성제를 대체할 수 있는 물질이다.[1] 그러나, 이를 위해서는 가격이 비싼 단점을 해소하고 우수한 계면 특성을 갖는 생체계면활성제를 합성해야 한다. 따라서 (가) 우수한 종균의 개발, (나) 배지의 개발, (다) 발효공정의 최적화 등에 대한 연구를 통하여 기능적으로는 우수한 계면활성을 나타내고 경제적으로는 값이 싼 생체 계면활성제를 합성할 수 있어야 한다.

본 연구는 배지의 개발에 중점을 두고, 당지질의 일종인 소포로리피드(sophorolipid)를 생합성하고 이의 계면 특성을 조사하는데 목적을 두었다. 소포로리피드는 탄수화물에 지질이 결합된 당지질(glycolipid)의 일종이다.[2] 소포로리피드는 표면 장력의 저하 능력이 우수하고 보습 효과가 뛰어나며 항균 작용도 있어 여러 산업에 이용될 수 있는 가능성이 풍부한 생체계면활성제로, 화장품과 같은 고부가가치 산업에 이용될 수 있다. 본 연구에서는 이런 장점을 가진 소포로리피드의 계면 특성을 조사하여 이의 실용성을 검토하고자 하였다. 소포로리피드는 이당류인 소포로스(sophorose)에 지방(lipid)이 결합된 형태로서,[35] 일차탄소원인 글루코스(glucose)가 소포로스를 제공하고 이차탄소원이 지방 부분을 생성할 것으로 추측된다. 여기에서 일차탄소원은 기본 배지에 첨가되는 탄소원으로서 미생물의 성장을 돕고, 이차탄소원은 미생물이 성장을 멈추는 휴지기에 첨가되어 소포로리피드의 수율을 향상시키는 데 많은 영향을 끼친다. 본 연구에서는 효모의 한 strain인 *Tarulopsis bambicola*를 이용하여 소포로리피드를 생합성하였는데, 미생물의 성장에 좋은 역할을 하는 글루코스를 일차탄소원으로 공통적으로 이용하였고, 소포로리피드의 수율과 계면 특성에 많은 영향을 끼치는 이차탄소원을 바꾸어 주면서 그의 효과를 관찰하였다. 여기에서 사용한 이차탄소원은 14~18개의 탄소를 가진 식물성 기름, 알칸, 알코올, 유기산이다.[15,16]

소포로리피드와 관련된 지금까지의 연구[3-29]는 수율의 향상에 초점을 맞추어 진행되어 이의 계면 특성의 관찰에는 다소 미흡한 면이 있다. 이로 인하여 수율에 있어서는 340g/l까지 증가시켜 많은 진전이 있었지만,[3] 소포로리피드의 유효농은 좋지 못한 것으로 나타났다. 따라서, 본 연구에서는 수율을 높이는 배지를 개발할 뿐만 아니라 소포로리피드의 생합성에 많은 영향을 끼치는 이차탄소원의 효과를 관찰하였다. 또한, 표면 장력, 계면 장력 이외에도 유효농을 정량적으로 조사하여 소포로리피드의 계면 특성을 관찰하였다. 이를 위해 미생물의 성장이 우수한 기본 배지(basic media)를 조제하고 여기에 여러 이차탄소원을 첨가하여 소포로리피드를 생합성하였다. 합성한 소포로리피드는 본래 여러 가지의 구조를 가질 수 있는데[3-5], 대개 5~7가지의 구조가 섞여 있는 혼합물로 존재하므로 이들을 확인하기 위하여 thin layer chromatography (TLC)에 전개시켜서 정성 분석을 하였다.[4-6] 또한, 계면활성제로서의 기능을 시험하기 위하여 Wilhelmy plate 방법을 이용하여 표면 장력을 측정

하였고, 여러 농도에서 측정된 표면 장력을 통해 임계 미셀 농도 (critical micelle concentration, CMC)를 결정하였으며, spinning drop 방법[7]을 사용하여 물과 데칸(decane)의 이성분계에서 계면 장력을 측정하였다. 또한 20°C에서 소포로리피드의 유효농[8]을 조사하였는데 물/데칸/소포로리피드의 3성분계에서 에멀전의 형태와 시간에 따른 평형상의 분리율을 관찰하여[9] 에멀전의 안정성을 시험하였다. 위의 연구를 통하여 식물성 기름, 알칸, 알코올, 유기산 등의 이차탄소원이 소포로리피드의 생합성과 계면 특성에 끼치는 영향을 조사하였다.

2. 실험

2.1. 미생물 및 시약

소포로리피드를 합성하기 위한 미생물로 효모의 일종인 *Tarulopsis bambicola* ATCC 22214를 한국 미생물 보존 센터(KCCM)에서 사면 배양(slant culture)한 상태로 구입하였다. 그리고, 이를 petri dish에 고체 배양하고 균주의 훼손을 막기 위해 4°C에서 보관하였다.

본 실험에서 사용된 시약은 크게 세 가지로 분류할 수 있다. 첫째, 미생물을 성장시키는 데 필요한 영양소를 함유하는 배지(culture media)용 시약, 둘째, 소포로리피드의 합성을 위해 첨가해 주는 이차탄소원(second carbon source), 셋째, 분석을 위해 사용된 시약이 그것인데 표 1에 시약들의 용도, 등급과 제조 회사 등을 나타내었다. 영양소는 기본 배지에 첨가되는 시약으로 미생물의 성장에 필수적인 것이며 탄소원, 질소원, 무기물(minerals)로 구성된다. 여기에서 탄소원은 가장 중요한 역할을 하는 영양소로서 세포를 형성하고 대사 작용에 있어 에너지원으로 작용하여 미생물의 성장은 물론 생체계면활성제의 합성에 큰 영향을 끼친다. 특히 글루코스는 에너지원으로 작용할 뿐만 아니라 이당류인 소포로스를 형성하는데 관여하여 소포로리피드를 합성하는데 좋은 탄소원이다.[10,11] 질소원은 아미노산, 퓨린, 피리미딘 등을 형성하여 미생물의 성장을 돕는 작용을 하는데, NH_4^+ 이온을 함유하는 질소원이 효소의 작용을 도와 소포로리피드의 합성에 유리하다.[12] 또한, 질소원 뿐만 아니라 여러 비타민을 함유하고 있는 효모 추출물은 미생물의 성장을 돕고 효소의 작용을 촉진시켜 생체 계면활성제의 수율을 높일 수 있다.[13] 그런데, 배지에 질소원이 과량 함유되면 미생물의 성장은 좋지만 대사산물의 생성을 억제하여 생체 계면활성제의 합성에

부작용을 끼칠 수도 있어 적절한 양을 배지에 포함시키는 것이 중요하며,[12] 탄소원과 질소원의 적정비는 6.8 정도이다.[8] 무기물은 미생물의 대사 작용을 돕는 역할을 하는데, Na^+ 와 K^+ 는 세포막의 삼투압을 조절하여 주고, Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 는 세포의 지지(support) 작용을 하며, PO_4^{3-} 와 CO_3^{2-} 는 pH를 조절하는 완충제로서의 역할을 한다.[14] 그런데, 영양소로서 쓰이진 않지만 구연산소다(sodium citrate)는

소포로리피드를 결정 형태로 합성하는 작용을 하여 이를 분리하기 쉽게 한다.[6] 그리고, 미생물은 pH에 민감하므로 이들 영양소를 녹이는 용매인 증류수는 탈이온수를 사용하였다.

이렇게 합성한 소포로리피드의 분리와 분석을 위한 시약은 다음과 같다. 아세트산에틸은 배양액으로부터 소포로리피드를 추출하는데 쓰였으며, n-헥산은 소포로리피드와 함께 섞여 있는 이차탄소원을

Table 1. Chemicals Used in the Experiments

Chemicals	Chemical formula	Grades	Purity (%)	Manufacturer +
Potassium phosphate monobasic	KH_2PO_4	Special	99	(1)
Potassium phosphate dibasic	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	First	98	(2)
Sodium chloride	$NaCl$	//	99.5	(3)
Magnesium sulfate	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	//	99	(4)
Calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	//	98	(3)
Ammonium sulfate	$(NH_4)_2SO_4$	//	99	(3)
Sodium citrate	$C_6H_5Na_3O_7$	//	99	(3)
Yeast extract	*	-	-	(5)
D-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	Special	99	(5)
Safflower oil	*	-	-	(5)
Sunflower oil	*	-	-	(5)
Olive oil	*	-	-	(5)
Apricot oil	*	-	-	(5)
Tetradecane	$C_{14}H_{30}$	Special	99	(5)
Hexadecane	$C_{16}H_{34}$	//	99	(5)
Cetyl alcohol	$CH_3(CH_2)_{14}CH_2OH$	//	99	(5)
Stearyl alcohol	$CH_3(CH_2)_{17}OH$	//	99	(5)
Oleic acid	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$	First	99	(6)
Stearic acid	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	Special	99	(5)
Ethyl acetate	$CH_3COOC_2H_5$	//	99.5	(3)
n-Hexane	C_6H_{14}	//	99	(3)
Chloroform	$CHCl_3$	//	99	(3)
Methanol	CH_3OH	//	99.6	(2)
p-anisaldehyde	$HOC(C_2H_5)_6CHO$	//	99	(7)
Sulfuric acid	H_2SO_4	First	95	(3)
Acetic acid	CH_3COOH	//	99	(2)
Decane	$C_{10}H_{22}$	Special	99	(8)

* mixed compound

+ (1) Hayashi Pure Chemical Industries.
 (3) Yakuri Pure Chemical Co.
 (5) SIGMA Chemical Co.
 (7) Janssen Chimica Co.

(2) Duksan Pharmaceutical Co.
 (4) Wako Pure Chemical Industries.
 (6) Kanto Chemical Co.
 (8) Aldrich Chemical Co.

제거하는데 사용되었다.[16] 그리고 분리한 소포로 리피드는 정성 분석을 위해 TLC에 전개시켰는데, spotting 한 시료를 plate의 윗 쪽으로 이동시키는 전개 용매(developing solvent)는 $CHCl_3$ 와 CH_3OH 를 이용하였으며, anisaldehyde를 H_2SO_4 와 CH_3COOH 의 용매에 녹인 용액을 진단(detection) 시약으로 사용하였다.[5,6]

2.2. 장치

본 실험에서 사용한 실험 장치는 크게 두 가지로 분류할 수 있다. 미생물을 배양하기 위한 장비와 합성된 소포로리피드를 분석하고 계면 특성을 조사하기 위한 장치가 그것인데 표 2에 이들의 기능과 제작사 등을 나타내었다.

미생물의 배양을 위해서는 우선 잡균의 오염을 막아야 하므로 autoclave를 이용하여 배지를 살균하였다. 그리고, 잡균의 혼입을 막을 수 있는 clean bench에서 소포로리피드의 생합성에 사용되는 효모인 *Torulopsis bombicola*를 살균이 끝난 배지에 접종하였으며, 일정한 온도에서 교반을 할 수 있는 shaking incubator에서 배양을 하였다. 배양이 끝난 후 생성물은 아세트산에틸로 추출한 후에 감압 상태에서 증발기를 이용하여 용매를 증발시켜 소포로리피드를 분리하였으며, 분리되지 않고 소포로리피드와 섞여 있는 이차탄소원은 n-헥산으로 씻어주고 12,000 rpm에서 원심 분리하여 제거하였다. 그리고, 합성한 소포로리피드는 TLC의 silica plate 위에 전

개시켜 정성 분석을 하였다.

표면 장력은 KSV 사의 표면장력계 (model: Sigma 70)를 이용하여 Wilhelmy plate 방법[7]으로 측정하였으며, 계면 장력은 KRUSS 사의 spinning drop tensiometer (model: Site 04)를 사용하여 측정하였다. 이 방법은 모세관에서 계면활성제 수용액 안에 있는 데칸 방울을 고속으로 회전시킬 때 방울의 직경이 감소하는 정도와 그 때의 각속도를 측정하여 이로부터 계면 장력을 계산한다. 이 방법의 원리는 데칸 방울을 회전시킬 때 계면 장력이 낮을수록 방울의 직경이 감소하는 정도가 심해지는 점을 고려한 것이며, γ 는 (1) 식에서 구할 수 있다.

$$\gamma = 3.427 \cdot 10^{-7} \cdot (v \cdot d)^3 \cdot w^2 \cdot (\rho_1 - \rho_2) \quad (1)$$

여기에서 γ 는 계면장력 (mN/m), v 는 확대 인자 (enlargement factor [mm/sdv])로서 $v =$ 실제 직경 (mm)/측정된 선 직경(measured wire diameter in scale division)으로 정의된다. 또 d 는 측정된 입자 직경 (sdv), w 는 회전수 (rpm), ρ_1 은 무거운 유체의 밀도 (g/cm^3), 그리고 ρ_2 는 가벼운 유체의 밀도 (g/cm^3)이다. 이 때 방울의 직경은 표면장력계에 부착된 렌즈를 통하여 측정되는데, 렌즈의 배율에 따라 달라지므로 실제의 직경을 알기 위해서는 다음과 같은 계산이 필요하다. 우선, 실제의 직경을 알고 있는 calibration wire가 렌즈를 통해 볼 때 가지는 직경인 scale division(sdv)을 측정하면 이로부터

Table 2. Experimental Apparatus Used in Biosynthesis of Sphorolipids and Measurements of Interfacial Properties

Experimental apparatus	Usage	Manufacturer	Remarks (* Model)
Autoclave	sterilization	SANYO	MLS-3000*
Clean bench	inoculation	SaeWoon instrument Co.	-
Shaking incubator	culture	Vision scientific Co.	VS-8480SR*
Evaporator	sapARATION	BUCHI	EL-131*
Centrifuge	separation	Du pont chemical Co.	-
TLC plate	analysis	SIGMA chemical Co.	silica plate
Tensiometer (Wilhelmy plate method)	surface tension measurements	KSV Co.	Sigma 70*
Tensiometer (spinning drop method)	interfacial tension measurements	KRUSS Co.	Site 04*
Water bath	emulsification	Dae San scientific Co.	PID controller

확대 인자를 알 수 있으므로 실제 대칸 방울의 직경을 구할 수 있다. 본 실험에서는 1 mm의 실제 직경을 가진 calibration wire를 렌즈를 통하여 직경의 눈금을 읽은 결과 4 mm의 scale division을 나타내어서 확대 인자는 0.25 mm/sdv이었다.

2.3. 생체계면활성제 소포로리피드의 생합성

배지의 조성: 미생물은 여러 영양소를 섭취하여 대사 산물로 생체 계면활성제를 합성하는데, 이 때 탄소원, 질소원, 무기물, 산소가 요소이다.[14] 탄소원은 미생물의 성장에 있어 기본적인 영양소이면서 에너지원으로 이용되며, 질소원은 미생물의 성장뿐만 아니라 효소의 작용을 돕는다. 또한, 무기물은 미생물의 대사 작용을 촉진시키며, 산소는 호기성 미생물의 주된 영양소이면서 세포 안에 존재하는 물의 구성 성분이 된다. 따라서, 배지를 조성하는데 있어서 이들 영양소가 모두 포함되어야 한다. 본 연구에서는 소포로리피드를 합성하기 위하여 미생물의 성장에 중요한 역할을 하는 탄소원, 질소원과 여러 가지 미량 원소들을 함유하여 기본 배지(KL 배지)를 조성하였는데, 이 배지의 성분과 양은 표 3과 같다.

무기물은 소포로리피드의 수율에 큰 영향을 끼치지 않지만 미생물의 성장에 있어 중요하므로, 미생물의 성장에 좋은 결과를 나타낸 연구들[6,16]의 무기물 첨가량을 참고하였다. 따라서, KH_2PO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 양은 미생물의 성장이 10~15 g/l로서 좋은 결과를 보인 Cooper와 Paddock[16]의 배지를 따랐고, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $NaCl$ 의 양은 이들의 배지에서는 다소 미량이 첨가

되어서 Stuver 등[6]의 배지를 따랐다. Stuver et al의 연구 결과에 의하면 구연산소다가 5 g 일때 소포로리피드를 결정 형태로 가장 많이 합성하는 결과를 얻어서 이를 참고하여 배지에 포함시켰다. 그리고, D-글루코스는 소포로리피드의 친수성 부분인 소포로스의 합성에 도움을 주어 탄소원으로 사용하였는데, 10 wt%를 배지에 첨가했을 때 소포로리피드의 수율이 가장 높다는 결과가 보고되어 있다.[21] 그런데, 질소원은 부족할 경우에는 미생물의 성장이 좋지 않고, 과다할 경우에는 생체계면활성제의 합성에 있어서 억제 효과를 유발할 수 있으므로 질소원의 적정 농도가 아주 중요하다. 이와 관련된 연구를 살펴보면 Cooper와 Paddock[16]의 배지에서는 질소원으로 효모 추출물 5 g을 첨가하였지만, NH_4^+ 이온을 함유하여 효소의 작용을 촉진시키는 질소원은 첨가하지 않았다. 또한, Hommel[12]은 NH_4^+ 이온이 함유된 질소원인 $(NH_4)_2SO_4$ 4 g과 효모 추출물 1 g을 배지에 포함시켜 소포로리피드의 수율을 향상시켰다. 그리고, Zhou 등[27]에 의하면 효모 추출물이 3 g 일때 소포로리피드의 수율이 가장 높다고 보고하였다. 위의 연구들에서는 D-글루코스 100g 당 질소원을 5g 첨가하여 좋은 수율을 보였다. 따라서, 본 배지에서는 질소원으로 NH_4^+ 이온을 함유하여 효소의 작용을 촉진시키는 $(NH_4)_2SO_4$ 와 여러 비타민을 함유하여 소포로리피드의 합성에 유리한 효모 추출물을 배지에 포함시켰는데, 위의 결과를 토대로 효모 추출물 3 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g을 배지에 첨가하였다.

배양 조건: 배지를 조제한 후에는 다른 미생물로 인한 오염을 막기 위해 먼저 살균을 실시하여야 하므로, 조제가 끝난 배양액을 10 개의 500 ml 플라스크에 100 ml씩 나누어 넣고 발포 마개를 이용하여 막았다. 살균을 하기 위해서 플라스크를 autoclave에 옮긴 후 121°C에서 30 분간 살균을 실시하였고 이차탄소원을 공급해 주기 위하여 사용하는 피펫도 함께 살균하였다. 살균이 끝난 플라스크를 clean bench에 옮기고 충분히 냉각될 때까지 기다린 후에 효모의 일종인 *Torulopsis bombicola* ATCC 22214를 접종하였는데, 백금이를 가스 버너로 골고루 화염 살균한 후에 고체 배양된 균주를 채취해 플라스크에 떨어뜨려 접종을 하였다. 오염을 막기 위해 접종할 때마다 백금이를 화염 살균하였으며 모든 작업은 clean bench 안에서 행하였다. 접종이 끝난 플라스크를 shaking incubator에 옮기고 30°C, 125 rpm의 조건에서 배양을 하였는데, 배양이 시작되고 24 시간 정도가 지나면서 배지가 뿌옇게 되어 미생물이 자라는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 배

Table 3. Compositions of the KL Basic Culture Medium

Components	Amounts
KH_2PO_4	1 g
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	0.4 g
NaCl	0.5 g
Sodium Citrate	5 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
Yeast extract	3 g
D-Glucose	100 g
Distilled water	1 l

양이 진행될수록 배지의 탁한 정도가 뚜렷해지지만 72시간을 지나면서는 거의 변화가 없었다. 이것은 미생물이 성장기를 거쳐 휴지기(stationary phase)에 접어들었다는 것을 알 수 있다. *Torulopsis bombicola*의 경우에는 휴지기에 접어들었을 때 대사 산물로 소포로리피드를 많이 생산하게 되므로, 이 시점에서 지방 부분을 제공할 수 있는 이차탄소원을 공급해 주면 소포로리피드의 수율이 향상된다. 따라서, 생체계면활성제의 합성에 수율이 높은 C_{14} ~ C_{18} 로 구성된 식물성 기름, 알칸, 알코올, 유기산 등을 이차탄소원으로 배지에 첨가하였다. 이 때 식물성 기름은 잇꽃 기름(safflower oil), 해바라기씨 기름, 올리브 기름, 살구씨 기름이었으며, 알칸은 테트라데칸과 헥사데칸을 이용하였다. 또한, 알코올은 세틸 알코올, 스테아릴 알코올이었으며 유기산은 올레인산과 스테아린산을 이용하였다. 위에 나열된 탄소원들은 배지에 첨가되는 양이 각기 달랐는데 식물성 기름은 100g/l [16], 알칸은 50g/l [6]이고 알콜과 유기산은 36g/l [1]로서 문헌에서 소포로리피드의 높은 수율을 보인 양이었다. 배양이 72 시간 동안 진행되어 미생물이 휴지기에 접어들었을 때 잠시 배양을 중단하고 플라스크를 clean bench에 옮기고 피펫을 이용하여 이차탄소원을 배지에 첨가하여 주었다. 그리고, 다시 86시간 동안 배양을 하였으며, 따라서 총 배양 시간은 158 시간이었다.

2.4. 소포로리피드의 분리 및 분석

배양액으로부터 소포로리피드의 분리: 합성된 소포로리피드는 추출과 증발을 통해 분리해 낼 수 있었다. 배양액 100 ml가 담긴 플라스크에 같은 부피의 아세트산에틸을 넣고 잘 흔들어주어 배양액 속에 녹아 있던 소포로리피드가 용해도가 높은 초산에틸 용매 쪽으로 추출되도록 하였다. 그리고, 분리 깔데기를 이용하여 상층액인 초산 에틸 용매층을 분리해 내었다. 위와 같은 과정을 두 번 반복하여 얻은 아세트산에틸 용매층을 증발 장치를 이용하여 감압 상태에서 용매가 모두 날아갈 때까지 증발시켰다. 이 때 증발은 아세트산에틸의 끓는 점(77°C) 이하인 40°C에서 실행하였으며, 용매가 모두 증발된 후에 소포로리피드가 생성된 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 하지만, 배양을 할 때 첨가한 이차탄소원이 아세트산에틸에 미량 추출되어서 소포로리피드와 섞여 있었다. 그러므로 이것을 제거하기 위하여, 합성한 소포로리피드에 헥산을 넣고 잘 흔들어 주어 이차탄소원이 헥산에 녹아 나오게 하였다. 그리고, 이것을 원심 분리하여 상층액을 제거하고 황갈색의 결정인 소포로리피드를 분리해 낼 수

있었다.

TLC를 이용한 정성 분석: TLC를 이용하여 앞에서 합성한 물질이 소포로리피드인지를 확인하는 정성 분석을 하였다. 소포로리피드는 아니스알데히드로 발색할 때 녹색을 띠게 되는데,[4,6] TLC를 통한 정성 분석은 (1) TLC silica plate의 활성화, (2) spotting, (3) 용매의 전개, (4) 진단 시약을 사용한 발색과 같은 절차를 거쳐 이루어진다. 따라서, TLC에 용매를 전개하기 위해서는 우선 전개 용매가 silica에 잘 흡착할 수 있도록 수분을 제거하기 위하여 TLC 판을 활성화시켜야 하므로 110°C 에서 1 시간 동안 가열하였고, 활성화된 TLC 판은 전개할 때까지 항상 건조기에 보관하였다. 다음에는 합성한 시료를 용매에 녹인 용액(loading solution)을 활성화된 TLC 판에 흡착시키는 점을 찍는 작업(spottling)이 필요하였다. 이를 위해 합성한 시료 5 mg을 $CHCl_3/CH_3OH = 2/1$ 의 비율로 섞은 용매 210 μ l에 녹여 loading solution을 만들었다. 점을 일정하게 찍기 위한 준비 작업으로 TLC 판 위에 0.8 cm 정도의 간격으로 눈금을 표시하였고, 모세관을 이용하여 한 번에 2 μ 씩 5 회 반복하여 점을 찍었다. 다른 종류의 시료를 spotting 할 때에는 사이 사이에 70 % 에탄올을 이용하여 모세관을 씻어주었다.

TLC 판에 점을 찍은 후에 시료가 plate에 잘 흡착할 수 있도록 진공 오븐을 사용하여 120°C에서 1시간 동안 건조시켰다. 건조시키는 동안 plate에 흡착되어 있는 시료를 전개하기 위하여 $CHCl_3/CH_3OH/H_2O = 65/15/2$ 의 부피비로 섞은 전개 용매(deveoping solvent)를 만들었는데,[4] 그 양은 plate를 TLC chamber에 넣었을 때 용매가 spotting한 부분을 넘지 않도록 200 ml로 하였다. 또한, 전개가 잘 이루어지도록 용매를 TLC chamber 안에서 15 분 동안 포화시켰는데, chamber는 포화를 돕기 위해 랩으로 잘 봉해 주었다. 여기까지의 과정이 끝난 후 진공 오븐에서 건조시킨 TLC 판을 꺼내어 TLC chamber에 넣고 1 시간 동안 전개를 하였다. 그리고, 전개된 용매가 거의 TLC 판의 끝 부분에 도달하면 전개를 멈추고 TLC 판을 꺼내어 전개된 용매가 마를 때까지 약 30분 동안 후드에서 건조시켰다. 마지막으로 전개된 시료를 발색시키기 위해 아니스알데히드/황산/아세트산 = 0.5/1 /50의 부피비로 섞여 진단 시약을 만들고,[6] 이것을 스프레이를 이용해 TLC 판에 골고루 뿌려 주었다. 그리고, 60°C에서 60 분간 건조시켰더니 TLC 판의 일정한 위치에 녹색의 띠가 형성되었는데, 이로써 합성한 시료가 소포로리피드임을 알 수 있었다. 그런데, 소포로리피드가 혼합

물이기 때문에 여러 개의 녹색 띠가 발견되어서, 이의 각각에 대해 시료의 전개 높이를 확인하였다.

2.5. 소포로리피드의 계면 특성

표면 장력, 계면 장력의 측정 및 CMC의 결정: Micelle이 형성되는 최초의 농도인 CMC를 결정하기 위하여 소포로리피드 수용액의 9 가지 다른 농도(2000, 1000, 500, 200, 100, 50, 20, 10, 5 mg/l)에서 표면 장력을 측정하였다. 그리고, 표면 장력이 감소하는 구간과 일정하게 유지되는 구간에서 각각 직선을 구하여 이들의 교차점이 되는 농도를 CMC로 결정하였다.

Wilhelmy plate 방법은 계면 장력이 3 mN/m 이하에서는 정확한 측정이 불가능하여서, KRUSS사의 spinning drop tensiometer (model: Site 04)를 이용하여 계면 장력을 측정하였다. 계면 장력은 물과 데칸의 계면에서 측정하였는데, 이를 위해 데칸/물 = 1/1의 부피비로 섞은 용액에 0.1 wt%의 소포로리피드를 녹여서 1 시간 정도 평형에 도달하도록 하였다. 그리고, 냉각수를 순환시켜 모세관의 온도를 20°C로 유지하면서, 용액을 모세관에 주입시켜 계면활성제 용액에 있는 데칸 방울이 모세관의 중앙에 오도록 위치시켰다. 이 때 각속도(rpm)를 증가시켜 방울의 직경이 4 배 정도 늘어나면 렌즈를 통하여 방울의 직경을 측정하고 각속도를 구하였다. 이 측정값을 식 (1)에 대입하여 계면 장력을 구하였는데, 10 가지의 이차탄소원에서 합성한 각각의 소포로리피드에 대해 계면 장력을 두 번씩 측정하여 평균값을 취하였다.

유화 성능의 시험: 물, 데칸, 소포로리피드로 이루어진 3성분계에서 유화 성능을 시험하였다. 20°C에서 10 가지의 이차탄소원에서 합성한 소포로리피드를 사용하여 물, 데칸과 더불어 에멀전을 만들어서 이 에멀전의 높이, 수상(aqueous phase)과 유상(oleic phase)의 분리 정도를 시간에 따라 측정하였다. 이 때 소포로리피드는 CMC와 CMC의 두 배(CMC×2)가 되는 농도를 사용하였다. Elizalde 등 [30,31]은 계면활성제로 2-butoxyethanol을 사용한 경우에 CMC에서 기포의 높이가 제일 높다고 보고하였는데 이 사실이 에멀전의 안정도와 관계될 것으로 추정되어 CMC 농도를 사용하였다. 또한, 계면활성제의 농도가 크면 일반적으로 형성된 에멀전의 안정도가 증가하는 경향이 있으므로 CMC의 두 배가 되는 농도도 선택하였다.

항온조의 온도 안정성이 유지된 후 증류수 5 ml에 소포로리피드를 녹여서 CMC와 CMC×2 농도의 수용액을 만들고, 여기에 데칸 5 ml를 첨가하여 25

ml 실린더에 넣은 후에 상하로 30회 흔들어서 에멀전을 만들었다. 이들을 20 °C의 항온조에 1 시간 동안 넣고 시료가 열평형에 도달한 후에 꺼내어 30회 흔들고 다시 1 시간 동안 항온조에 넣어 두었는데, 이것은 에멀전 형성의 재현성을 높이기 위한 것이다. 이 과정이 끝난 후 실린더를 30회 흔들어서 에멀전을 만들고 항온조에 16일 동안 넣어 두면서 시간에 따른 에멀전의 높이와 물과 데칸의 분리율(separation ratio)을 아래의 식에 의하여 계산하였다.

$$\begin{aligned} & \text{SR of bottom phase, } SR_b \\ & = \frac{\text{height of bottom phase}}{\text{total height of emulsion}} \times 100 \end{aligned} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} & \text{SR of top phase, } SR_t \\ & = \frac{\text{height of top phase}}{\text{total height of emulsion}} \times 100 \end{aligned} \quad (3)$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 기본 배지의 개발

소포로리피드의 생합성에 수율을 좋게 하는 기본 배지를 찾기 위한 실험을 하였다. 이 실험에서 기존 연구자들과 조건을 동일하게 하기 위하여 일차탄소원은 글루코스, 이차탄소원은 잇꽃 기름을 공동적으로 사용하였으며, 사용된 배지를 표 4에 나타내었다. 여기에서 CP, ST, ZH 배지는 문헌에 보고된 Cooper & Paddock, Stuver et. al, Zhou et. al의 배지를 기초로 한 것을 나타내며, KL 배지는 본 실험에서 조제된 배지(표 3)를 말한다. 이들 배지를 사용하여 소포로리피드를 합성한 경우의 수율을 표 5에 나타내었다. 위의 결과에서 알 수 있듯이 KL 배지를 사용했을 때 수율이 2.3 g/l로써 가장 높았으며, 기존의 CP, ZH, ST 배지와 비교하여 15 %, 35%, 150%의 수율 증가를 가져왔다. 본 연구에서 조성한 KL 배지가 좋은 수율을 나타낸 것은 질소원과 탄소원의 비율(C/N)이 적절하고, 미생물의 성장과 소포로리피드의 합성에 좋은 영향을 끼치는 암모늄 이온이 들어있는 $(NH_4)_2SO_4$ 2 g과 효모 추출물 3g을 질소원으로 첨가한 것이 주된 요인인 것으로 추측된다.

3.2. 이차탄소원의 영향

미생물이 휴지기에 접어들었을 때 첨가하는 이차탄소원을 바꾸어 주면서 미생물의 성장과 소포로리피드의 수율을 측정하였다 (표 6). 이 실험에서는 KL 기본 배지에 이차탄소원으로 식물성 기

Table 4. Components of CP, ST, ZH and KL Media

Media	Common components	Other components
CP*	Glucose Safflower oil	KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , CaCl ₂ , NaCl, Yeast extract
ST*		MgSO ₄ · 7H ₂ O, NaCl, Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O, KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O, Sodium citrate, (NH ₄) ₂ SO ₄ , Yeast extract
ZH*		KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, Urea, Yeast extract
KL+		KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O, MgSO ₄ · 7H ₂ O, NaCl, Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O, Sodium citrate, (NH ₄) ₂ SO ₄ , Yeast extract

* Media of related researches.

+ Medium used in this study.

름, 알칸, 알코올, 지방산의 10 가지 중의 하나씩을 사용하였다. 이차탄소원을 첨가하지 않고 탄소원으로 글루코스를 넣어 주었을 때는 미생물의 성장이 4.26g/l로 비교적 괜찮았으나 소포로리피드는 거의 합성되지 않았다. 이것은 글루코스가 미생물의 성장에 많은 도움을 주며 소포로스를 형성하지만, 지방 부분을 제공할 수 있는 탄소원이 부족하여 미생물이 대사 산물로 소포로리피드를 합성하지 못한 것으로 추측된다. 이와는 달리 이차탄소원을 첨가하였을 때에는 미생물의 성장과 소포로리피드의 수율이 모두 달라졌다. 표 6의 결과와 같이 미생물의 성장에 있어서는 잇꽃 기름, 해바라기씨 기름과 같은 식물성 기름이 가장 효과적이었으며 테트라데칸, 세틸알코올, 스테아릴알코올은 이차탄소원을 사용하지 않았을 때와 큰 차이를 나타내지 않았다. 소포로리피드의 수율에 있어서는 살구씨 기름을 제외한 식물성 기름(잇꽃 기름, 해바라기씨 기름, 올리브 기름)이 상대적으로 높은 2 g/l 정도의 수율을 보였으며 미생물의 성장이 좋지 않았던 테트라데칸, 세틸알코올과 스테아릴알코올은 저조한 수율을 나타내었다. 배지의 pH는 미생물이 발효하는 동안 5.9에서 3.8 정도로 감소하였는데, 이차탄소원을 첨가하지 않았을 때와 첨가하였을 때의 pH가 거의 비슷하였다. 이것은 이차탄소원이 미생물의 휴지기에 첨가되는 만큼 미생물의 성장보다는 소포로리피드의 합성에 많은 영향을 끼침을 입증하여 준다. 이차탄소원 중에서는 식물성 기름과 헥사데칸이 미생물의 성장과 소포로리피드의 수율이 전반적으로 좋았고, 알코올과 유기산은 다소 떨어져 문헌상의 연구와 유사한 경향을 나타내었다. 위의 결과들로 미루어 볼 때 이차탄소원은 소포로리피드의 소수기인 지방 부분을 제공하는 데 많은 영향을 끼친다고 추측된다. 또한, 식물성 기름은 가격이 저렴하고 팔미틴산, 스테아린산, 올레인산, 리놀렌산 등의 여러 가지 지

Table 5. Yields of Sophorolipids from *T. bombicola* in Different Media

Media	pH of media	Yields of sophorolipids (g/l)
CP	5.81	1.9
ST	5.69	0.9
ZH	4.35	1.7
KL	5.88	2.3

Table 6. Effect of the Second Carbon Sources on the Biosynthesis of Sophorolipid with *Torulopsis bombicola*

Second carbon sources	Concentration* (wt%)	Cell growth (g/l)	Yield of sophorolipid (g/l)	Final pH
None	0	4.26	trace	3.87
Safflower oil	10	9.41	2.3	3.81
Sunflower oil	10	9.39	1.9	3.80
Olive oil	10	6.86	1.8	3.91
Apricot oil	10	5.17	0.9	3.87
Hexadecane	5	6.78	1.6	3.94
Tetradecane	5	4.53	0.95	3.90
Cetyl alcohol	3.6	4.99	0.92	3.89
Stearyl alcohol	3.6	4.67	0.82	3.87
Oleic acid	3.6	5.25	1.44	3.86
Stearic acid	3.6	5.04	1.12	3.87

* Concentrations of the second carbon sources added to culture media

방산을 함유하고 있어 소포로리피드의 합성에 좋은 탄소원으로 생각된다.

배양이 끝난 후에 배지에서 생성물을 분리하였더니 소포로리피드로 믿어지는 황갈색을 띠는 입자들을 얻을 수 있었다. 이 입자들이 소포로리피드인지 확인하기 위하여 TLC에 전개시켜 아니스알데히드로 발색을 시켜보았다. 소포로리피드는 아니스알데히드로 발색할 때 녹색을 띄게 되는데, 본 실험에서는 그림 1과 같이 대부분 5~7 가지의 녹색 띠를 확인할 수 있었다. 이로써 합성한 물질이 소포로리피드이며 대부분 5~7 가지의 화합물로 구성되어 있다는 사실을 발견하였다. 소포로리피드는 10 가지 이상의 구조를 가질 수 있는데, 구조에 따라 TLC plate의 다른 위치에 흡착하여 전개율이 달라진다. 따라서, 전개율이 다르면 소포로리피드의 성분이 같지 않음을 나타낸다. 그림 1로부터 테트라데칸과 헥사데칸으로 합성한 소포로리피드의 경우 전개율이 비슷한 점으로 미루어 볼 때 이들은 거의 같은 조성으로 이루어진 소포로리피드임을 알 수

있다. 알콜이나 유기산의 경우에도 각각 이와 같은 경향을 나타내어서, 이차탄소원의 그룹 (식물성 기름, 알칸, 알코올, 산)에 따라 합성되는 소포로리피드의 종류가 유사함을 알 수 있다. 그러나, 알칸과 알코올을 비교할 때 전개율에서 많은 차이가 있는 점을 감안하면 이차탄소원의 특성에 따라 소포로리피드의 성분이 크게 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. 식물성 기름의 경우에는 전개율에서 다소 차이가 있는데, 이것은 식물성 기름 자체가 혼합 탄소원으로서 그의 성분이 다르기 때문에 소포로리피드의 조성에 있어 차이가 생긴다고 추측된다. 소포로리피드는 구조에 따라 계면 특성이 달라지는데, 위의 결과를 토대로 하여 생각할 때 이차탄소원은 소포로리피드의 구조에 영향을 주므로, 이로 인하여 소포로리피드의 계면 특성에도 영향을 미칠 것으로 생각된다.

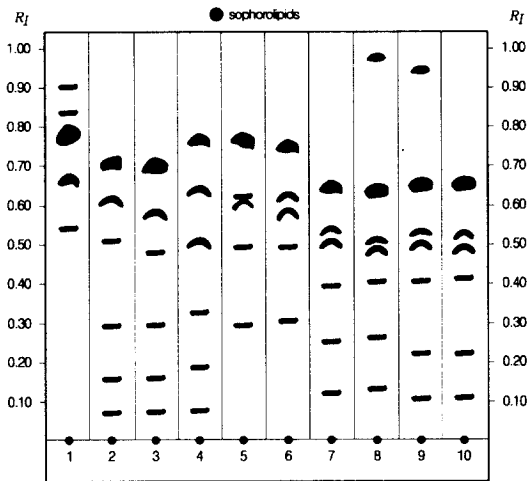


Fig. 1. TLC results of sophorolipids from the various second carbon sources: Safflower oil(1), sunflower oil(2), olive oil(3), apricot oil(4), hexadecane(5), tetradecane(6), cetyl alcohol(7), stearyl alcohol(8), oleic acid(9) and stearic acid(10).

3.3. 계면 특성

이차탄소원으로 알코올을 사용하여 생합성한 소포로리피드 수용액의 표면 장력을 측정된 결과를 그림 2에 나타내었다. 표면 장력은 소포로리피드의 농도가 증가할수록 계속 감소하다가 100~200 mg/l 농도에서 감소의 폭이 줄어들더니 500 mg/l 이상의 농도에서는 표면 장력이 거의 일정하게 유지되었다. 이것은 계면활성제 분자들이 스스로 회합하여 micelle을 형성하였기 때문이다. Micelle이 형성되는

최초의 농도는 계면활성제의 효율적인 측면에서 중요한데, 그림 2에 나타난 세틸알코올로부터 합성한 소포로리피드의 표면 장력을 측정된 결과를 이용하여 그림 3과 같이 표면 장력이 감소하는 구간과 일정하게 유지되는 구간에서 직선을 구하여 이들의 교차점을 임계미셀농도(CMC)로 결정하였다. 이와 같은 방식으로 10 가지의 이차탄소원에서 합성한 소포로리피드의 표면 장력으로부터 각각의 CMC를 결정하였다(표 7). Spinning drop 방법으로 물/데칸/소포로리피드의 3성분계에서 측정된 계면 장력은 대부분이 1~2 mN/m이었으며 서로 큰 차이를 보이지 않았는데, 이것은 Stuver et. al의 연구 결과인 9 mN/m 보다는 우수하였고 헥사데칸과의 계면 장력을 측정된 Cooper & Paddock의 1~2 mN/m와는 비슷한 결과를 보였다. 소포로리피드의 표면 장력은 테트라데칸을 이용하여 생합성하였을 때 표면 장력이 28.42 mN/m 로써 가장 낮았으며, 다른 이차탄소원으로 생합성한 경우에는 대부분 33~35 mN/m이었다. 일반적으로 우수하다고 평가되는 계면활성제는 표면 장력을 30 mN/m, 계면 장력을 1 mN/m까지 낮출 수 있어야 하는데, 본 실험에서 합성한 소포로리피드는 표면 장력이 28~35 mN/m, 계면 장력이 1~2 mN/m로서 표면 장력의 저하능은 우수한 편이었다. 또한, CMC가 상업화된 계면활성제의 500~2000 mg/l과 비교해 볼 때 현저히 낮아서 계면활성제의 기능적인 면에서 매우 효율적이었다.

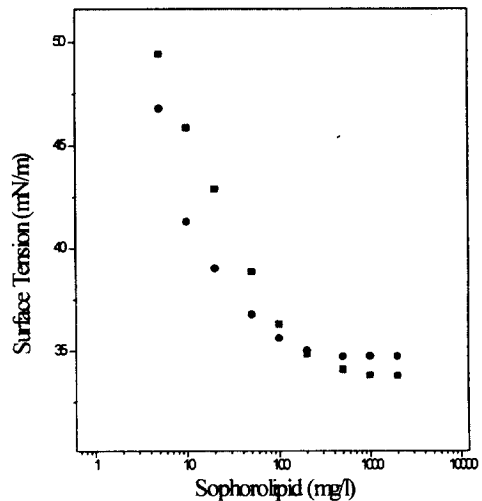


Fig. 2. Surface tensions of sophorolipids biosynthesized with alcohols as the second carbon sources: ■ cetyl alcohol; ● stearyl alcohol.

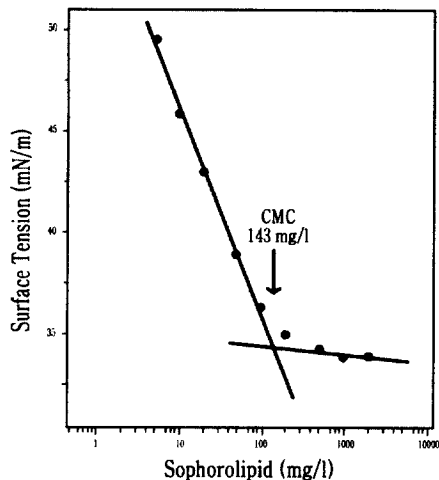


Fig. 3. Determination of CMC of sphorolipids biosynthesized with glucose (the first carbon source) and cetyl alcohol (the second carbon source).

Table 7. Interfacial Properties of Sphorolipids Biosynthesized with Various Second Carbon Sources

Second carbon sources	Surface tension (mN/m)	Interfacial tension (mN/m)	CMC (mg/l)	Area of hydrophilic head (Å ²)
Safflower oil	35.06	1.50	92	189.26
Sunflower oil	34.64	1.94	105	158.81
Olive oil	34.30	1.69	91	211.54
Apricot oil	34.86	1.72	155	203.68
Hexadecane	34.65	1.35	74	165.20
Tetradecane	28.42	1.80	78	105.04
Cetyl alcohol	33.82	1.82	143	177.85
Stearyl alcohol	34.73	1.25	59	289.26
Oleic acid	31.24	1.16	82	156.43
Stearic acid	34.17	1.54	39	110.70

3.4. 소포리피드 친수기의 크기

표면장력의 농도에 따른 변화로부터 친수기 머리의 표면적 a_H 를 아래의 식으로부터 구할 수 있다.[33,34]

$$a_H = (N_{AV} \Gamma)^{-1} \quad (5)$$

여기에서 N_{AV} 는 아보가드로 수이며 Γ 는 표면 과잉 농도 (surface excess concentration) 혹은 흡착량

을 나타낸다. Γ 는 CMC보다 적은 농도에서의 표면장력 변화량으로부터 다음 식에 의하여 구한다.

$$\Gamma = -\left(\frac{\partial \gamma}{\partial \mu}\right)_T = \frac{-1}{RT} \frac{d\gamma}{d \ln a} \quad (6)$$

이 때 γ 는 표면장력, μ 는 chemical potential, a 는 활동도를 나타낸다. 그런데 CMC 이하에서와 같이 농도가 묽을 때에는 활동도 a 는 농도 C 로 대신할 수 있으므로

$$\Gamma = \frac{-1}{RT} \frac{d\gamma}{d \ln C} \quad (7)$$

로 쓸 수 있다. 식 5로부터 구한 a_H 를 표 7에 나타내었다. 2차 탄소원에 따라 생성되는 소포리피드와 이들의 조성이 달라서 a_H 도 다를 수 있다. 스테아릴알코올을 사용했을 때 a_H 가 가장 컸으며 (289.26 Å²), 테트라데칸을 사용했을 때 a_H 가 가장 작았다(105.04 Å²).

3.5. 유화능

생합성된 소포리피드의 계면활성제로서의 유화능을 실험하기 위하여 소포리피드의 수용액과 데칸을 섞어 에멀전을 만들었다. 수용액 중의 소포리피드의 농도는 CMC와 CMC의 두 배(CMC×2)의 두 가지 경우이었다. 에멀전을 형성시키기 위하여 CMC와 CMC×2 수용액에 같은 부피의 데칸을 첨가한 후[그림 4(a)] 상하로 30 회 흔들어 주고 20°C 에서 평형을 유지시켰더니 그림 4(b)와 같이 뿌옇게 되었다. 이렇게 형성된 에멀전은 시간이 지남에 따라 그림 4(c)와 같이 소포리피드가 데칸에 많이 녹아 있고 흔탁한 윗 상과 주로 물인 투명한 아랫 상으로 분리되었다. 그런데, 시간이 더

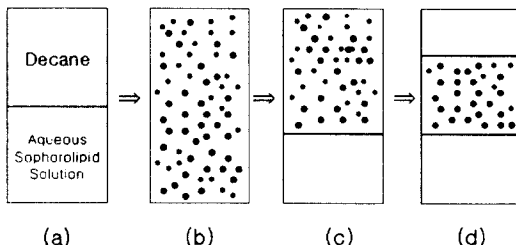


Fig. 4. Formation and separation of emulsions of water/decane/sphorolipids. (a) Before emulsification ; decane(top) and water(bottom). (b) Formation of emulsion after shaking. (c) Emulsions separated into two phases in which the top phase is turbid and the bottom phase is translucent. (d) Emulsions separated into three phases in which only the middle phase is turbid.

지나면 혼탁한 윗 상도 분리되어 그림 4(d)에서와 같이 투명한 윗상과 아랫상 및 혼탁한 중간상의 세 상(three phases)으로 분리되었다. 에멀전이 2-상과 3-상으로 분리되는 것은 에멀전이 2-상이나 3-상으로 되었음을 의미한다. 2-상 에멀전인 경우에는 윗상에 소포로리피드가 많이 함유되어 있으므로 실험 온도 20°C가 upper critical endpoint temperature T_{uc} 보다 큰 것을 말하여 주고 있다.

에멀전의 안정성을 관찰하기 위하여 시간에 따른 물과 데칸의 분리율(separation ratio, SR)을 조사하였다. 여기에서 분리율(SR)은 그림 4(b)와 같이 형성된 에멀전의 높이와 그림 4(d)처럼 윗 상과 아랫상이 분리된 높이를 측정함으로써 (2)-(4)식에서 구하였다.

그림 5는 잇꽃 기름으로부터 합성된 소포로리피드를 사용한 에멀전의 분리율을 측정된 결과를 나타낸 것이다. 그런데, 에멀전이 형성된 지 30분 안에 수상이 대부분 분리되어($SR_{bottom} = 31.7\%$) 에멀전의 안정성은 좋지 못하였다. 이것은 다른 탄소원의 경우에도 비슷한 경향을 나타내어서 소포로리피드는 유화제로서 만족스럽지 못하였다.

CMC와 CMC×2 수용액에서 에멀전을 형성시키고 16일 후에 분리율(SR)을 측정된 결과를 표 8에 나타내었는데, CMC 수용액에서는 세틸알코올로 합성한 소포로리피드가 분리율(42.3%)이 가장 낮았으며 10 가지의 이차탄소원으로 합성한 소포로리피드의 에멀전이 그림 4(d)와 같이 모두 3-상을 이루었다. 그런데, CMC×2 수용액에서는 잇꽃 기름으로 합성한 소포로리피드의 에멀전이 그림 4(c)와 같이 2-상을 이루면서 분리율(43.3%)이 가장 낮았고 나머지의 경우에는 3-상을 이루었다. 그런데, 표 8과 같이 에멀전의 분리율이 다른 이유는 10 가지의 이차탄소원에서 합성한 소포로리피드의 조성이 각기 다르기 때문인데, 락톤(lactone) 형태보다는 산(acid) 형태의 구조가 많이 함유된 소포로리피드가 에멀전이 잘 일어날 것이라고 추측된다. 이것은 산 형태가 락톤 형태 보다 친수기와 소수기가 잘 분리되어 있어 에멀전 입자의 계면에 소포로리피드가 잘 접근할 수 있기 때문으로 여겨진다.[32]

본 실험에서 소포로리피드의 유화력을 측정된 결과 수상(aqueous phase)이 빨리 분리되어 에멀전의 안정성이 좋지 못하였지만, 소포로리피드의 구조 중에서 산 형태가 에멀전을 안정화시키는 데 유리할 것으로 생각되기 때문에 향상의 여지가 있다고 본다. 따라서, 소포로리피드의 유화력을 향상시키기 위해서는 여러 가지 구조가 혼합된 소포로리피드를 분리한 후에 산 형태의 구조를 가진 물질만을 취하

여 에멀전을 형성시키는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

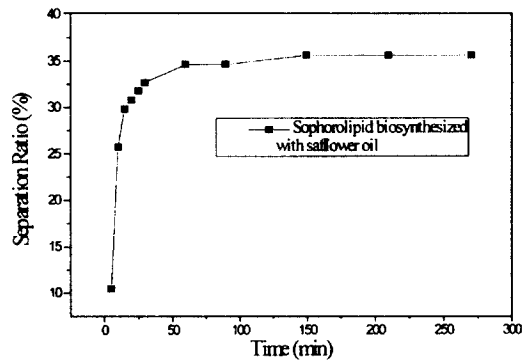


Fig. 5. Changes in separation ratios of emulsions with time.

Table 8. Separation Ratios of Emulsions After 16 Days

Second carbon source	CMC			CMC × 2		
	SR_{bottom}^* (%)	SR_{top}^{**} (%)	Total SR ^{***} (%)	SR_{bottom}^* (%)	SR_{top}^{**} (%)	Total SR ^{***} (%)
Safflower oil	47.1	11.5	58.6	43.3	0	43.3
Sunflower oil	47.1	20.2	67.3	43.3	20.2	63.5
Olive oil	47.1	30.8	77.9	47.1	38.5	85.6
Apricot oil	46.2	34.6	80.8	43.3	11.5	54.8
Hexadecane	47.1	30.8	77.9	47.1	43.3	90.4
Tetradecane	47.1	4.8	51.9	45.2	1.9	47.1
Cetyl alcohol	40.4	1.9	42.3	46.2	26.9	73.1
Stearyl alcohol	49.0	30.8	79.8	48.1	19.2	67.3
Oleic acid	46.2	17.3	63.5	48.1	34.6	82.7
Stearic acid	49.0	19.2	68.2	48.1	47.1	95.2

*, **, *** Calculated from Eq. (2), (3), and (4), respectively.

4. 결론

본 실험에서 조성한 배지는 관련 연구에 비하여 소포로리피드의 수율을 15% 이상 향상시켰는데, 이것은 질소원으로 효소의 작용을 돕는 암모늄 이온이 함유된 $(NH_4)_2 SO_4$ 와 아미노산과 비타민 등을 제공하는 효모 추출물을 탄소원과 질소원의 비(C/N)를 적절히 맞추어 첨가한 결과라고 생각된다. 그리고 소포로리피드의 합성에 있어서 이차탄소원은 미생물의 성장보다는 소포로리피드의 지방 부분을 제공하여 수율을 향상시켰는데, 이차탄소원 중

에서는 잇꽃 기름이 23 g/l로 수율이 가장 높았다. TLC로 정성 분석을 한 결과 이차탄소원의 그룹에 따라 전개율이 유사한 점을 볼 때 이차탄소원은 소포로리피드의 구조에도 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서 합성한 소포로리피드의 표면 장력은 28~35 mN/m이고 CMC가 40~150 mg/l로서 일반 계면활성제와 비교해 볼 때 계면활성제의 효율적인 측면에서 우수한 특성을 나타내었다. 특히, 테트라데칸으로 합성한 소포로리피드의 표면 장력이 28.4 mN/m로 가장 낮아서 이것에 대하여 더욱 관심을 가질 필요가 있었다. 그러나, 물/테칸/소포로리피드 3성분계의 에멀전에서 30분 안에 수상이 대부분 분리되어 에멀전의 안정성은 좋지 못하였다.

감사

본 연구는 중앙대학교 교내학술연구비에 의하여 수행되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. N. Kosaric, "Biosurfactant", Marcel Dekker, Inc., New York (1993).
2. 임경희, 정밀화학심포지움 (한국공업화학회), 5, 13 (1995).
3. A. M. Davila, R. Marchal, and J. P. Vandecasteele, *J. Ind. Microbiol.* **13**, 249 (1994).
4. A. P. Tullock, A. Hill, and J. F. T. Spencer, *Can. J. Chem.*, **46**, 3337(1968).
5. H.-J. Asmer, S. Lang, F. Wagner, and V. Wray, *JAOCS*, **65**, 1460 (1988).
6. O. Stuver, R. Hommel, D. Haferburg, and H. P. Kleber, *J. Biotech.*, **6**, 259 (1987).
7. A. W. Adamson, "Physical chemistry of Surfaces", 5th. ed., Wiley, New York (1990).
8. 황경아, 김윤석, 안호정, 최규석, *공업화학*, **6**, 562 (1995).
9. 김형준, 류정용, 박돈희, *화학공학의 이론과 응용*, **1**, 559 (1995).
10. R. K. Hommel, and K. Huse, *Biotechnology Letters*, **15**, 853 (1993).
11. R. K. Hommel, L. Weber, A. Weiss, U. Himmelreich, and O. Rilke, *J. Biotech.*, **33**, 147 (1994).
12. R. K. Hommel, S. Stegner, L. Weber, and H. P. Kleber, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 192 (1994).
13. Q. H. Zhou, V. Klekner, and N. Kosaric, *JAOCS*, **69**, 89 (1992).
14. H. J. Rehm and G. Reed, *Biotechnology*, **3**, VCH, 1993.
15. S. Ito and S. Inoue, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1278 (1982).
16. D. G. Cooper and D. A. Paddock, *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 173 (1984).
17. A. Passeri, S. Lang, F. Wagner, and V. Wray, *Z. Naturforsch*, **46c**, 204 (1991).
18. C. Syldatk, S. Lang, U. Matulovic, and F. Wagner, *Z. Naturforsch*, **40c**, 65 (1985).
19. D. G. Cooper, C. R. Macdonald, S. J. B. Duff, and N. Kosaric, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 408 (1981).
20. E. Rosenberg, A. Zuckerberg, C. Rubinovitz, and D. L. Gutnick, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 402 (1979).
21. N. Desai, *Cosmet. Toilet.*, **105**, 99 (1990).
22. V. Gobbert, S. Lang, and F. Wagner, *Biotech. Lett.*, **6**, 225 (1984).
23. R. K. Hommel, O. Stuver, W. Stuber, D. Haferberg, and H. P. Kleber, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 199 (1987).
24. P. A. J. Gorin, J. F. T. Spencer, and A. P. Tulloch, *Can. J. Chem.*, **39**, 846 (1961).
25. L. Weber, J. Stach, and G. Haufe, *Carbohydrate Research*, **206**, 13 (1990).
26. A. M. Davila, R. Marchal, and J. P. Vandecasteele, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**, 6 (1992).
27. S. Lang and F. Wagner, "Biosurfactant and Biotechnology, Surfactant Science Series", **25**, Marcel Dekker, Inc., New York (1987).
28. D. G. Cooper and D. A. Paddock, *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 1426 (1983).
29. J. Kono, T. Suzuki, S. Inoue, and S. Hayashi, *Jpn. Patent* 80 43,642 Kao Soap Co. (1980).
30. F. Elizalde, J. Gracia, and M. Costas, *J. Phys. Chem.*, **92**, 3565 (1988).
31. K. H. Kang and K. H. Lim, *Kor. J. Oil Fat Chem.*, **1**(1), 19 (1998).

32. K. H. Lim, manuscript in preparation (2000).
33. D. F. Evans and H. Wennerstrom, "The Colloidal Domain: Where Physics, Chemistry, Biology, and Technology Meet", p.68, VCH, New York (1994).
34. K. H. Lim, Lecture Note (2000).
35. 임경희, *한국유화학회지*, **13**, 1(1996).