

최 중
연구보고서

해양생물유래 천연유화물의 제조 및 고기능성
수산가공제품에의 응용

Production of biosurfactant from Marine organism
and Its Application to the functional Fish Based
Products

2002. 12

주관연구기관 부경대학교

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “해양생물유래 천연유화물의 제조 및 고기능성 수산가공제품에의 응용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002 년 12 월 20 일

주관연구기관명 : 부경대학교

총괄연구책임자 : 공 재 열

세부과제책임자 : 변 대 석

연 구 원 : 김 학 주

연 구 원 : 임 동 중

연 구 원 : 정 용 실

연 구 원 : 이 경 미

요 약 문

I. 제 목

해양생물유래 천연유화물의 제조 및 고기능성 수산가공제품에의 응용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

어유등 이용성이 낮은 유지를 천연 유화물 생산 균주의 기질로 사용함으로써 부가가치를 높이고, 천연유화물의 물성과 고 기능성 전환기술 및 대량생산 생산실용화 기술을 개발하여 고 기능성 수산가공제품개발에 응용하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

▣ 제1세부과제 : 해양생물 유래 천연유화물의 대량생산 및 수산가공제품에의 응용

1. 천연유화물 생산균주를 분리한 후 최적배양조건과 천연유화물의 구성성분 및 물성 조사

- 천연유화물 생산 균주의 분리 및 동정
- 어유에 대한 기질 특이성을 지닌 고효율 천연유화물 생산 균주의 선별
- 최적배양조건 검토(Flask 배양)

(탄소원, 질소원, 무기염류, 온도, pH 등)

- 천연유화물의 추출 및 분리·정제
 - 구성성분 분석
 - 물리·화학적특성 검토
 - (유화활성, 유화안정성, 생분해능, 세척능, 거품능, 보습능, 표면장력, 계면장력 등)
 - 시판용 화학합성 유화제와의 물성비교
2. 천연유화물의 대량생산 및 수산가공제품에의 응용
- 7L 발효기를 이용한 천연유화물의 최적 발효생산 조건 검토
 - 회분발효(Batch fermentation)
 - 반회분발효(Fed batch fermentation)
 - 연속발효(CSTR)
 - 균체고정화를 이용한 천연유화물의 연속생산
 - Pilot plant(200L)를 이용한 대량생산
 - 대량분리 공정법 개발
 - 수산가공제품에의 응용
3. 경제성검토 및 생산 실용화 기술 개발
- 생산수율 등에 대한 경제성검토
 - 대량생산을 위한 생산실용화 기술개발
 - 제품화

▣ 제2세부과제 : 해양생물유래 천연유화물의 기능성 및 안전성 검토

1. 천연유화물의 식품 안전성 및 독성 조사
- 식품첨가제로서의 안전성조사 (생리안전성 검토)
 - 급성독성검사, LD₅₀ 측정

- 항 돌연변이원성 test, Ames test
- 항균활성(In vitro)

2. 천연유화물의 기능성 조사

◦ 기능성 조사

- 중금속 흡착능(In vitro)
- 세포증식능
- 항암활성
(In vivo(Sarcoma-180), In vitro(DNA/methylgreen assay))
- 항체생성능(In vitro)

IV. 연구개발결과

▣ 제1세부과제 : 해양생물 유래 천연유화물의 대량생산 및 수산가공제품에의 응용

- 1) 남해안에서 우수한 유류분해능을 지닌 해양미생물을 분리하여 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2로 동정하였다
- 2) Flask 상에서의 균주 최적배양조건을 검토하였다.
- 3) 천연유화물을 추출·농축한 결과 crude한 천연유화물을 약 10.1g/L 회수하였으며 정제하여 NS-1이라 명명하였다.
- 4) 구조분석 결과 2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxy decanoic acid methyl ester로 밝혀졌다
- 5) 천연유화물은 유화활성 및 유화안정성, 생분해능, 표면장력, 계면장력, 열안정성 등이 화학합성 유화제에 비해 매우 우수함을 확인하였다.

- 6) 대량생산을 위해 반회분발효 및 Air lift 생물반응기에서 연속반응한 결과, 각각 22.7g/L, 0.1g/h의 천연유화물을 얻을 수 있었다. 또한 200 L Pilot plant 규모 발효시 18.2g/L를 얻을 수 있었다.
- 7) 천연유화물 대량 생산 후 분리·정제를 위한 공정을 modeling 하였다.
- 8) 천연 유화물을 첨가한 수산가공제품을 제조하여 제품품질 향상을 시도하였다.
- 9) 해양미생물 유래 천연유화물은 화학유화제에 CMC 값 60배, 표면장력 저하능이 2배가량 우수하며, 가격과 기능면에서 시판된 생물유화제에 비해 탁월하여 매우 경쟁력 있는 천연유화물인 것으로 판단된다
- 10) 천연유화물의 대량생산을 위한 pilot를 설계하였다.

■ 제2세부과제 : 해양생물유래 천연유화물의 기능성 및 안전성 검토

- 1) 시판용 유화제에 비해 천연유화물의 뛰어난 항균활성을 확인하였다.
- 2) 독성실험결과 천연유화물은 무해한 식품첨가물임을 확인하였다.
- 3) 천연유화물은 항돌연변이 생리활성이 높은 것으로 나타났다.
- 4) 천연유화물은 중금속 흡착능이 우수한 것으로 나타났다.
- 5) 항종양활성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

V. 연구성과 및 활용계획

1. 연구성과

가. 국내외 학술지 발표실적

- ◆ 국제학술논문집 논문발표 - 2건

- LEE, KYUNG MI, SOON DUCK HA, BONG-JO KIM, SUN HEE HWANG, DONG JUNG LIM, JAI-YUL KONG, "Rhamnolipid Production in Batch and Fed-batch Fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P" *J. of Microbiol. Biotechnol.*,
- Hye Sung Jeong, Sun Hee Hwang, Min Young Kim¹, Soon Duck Ha, and Jai Yul Kong, "Production of Rhamnolipid by Immobilized *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) Using Modified Polyvinyl Alcohol" *Biotechnol. Lett.*, 투고중

◆ 국내학술논문집 논문발표 - 4건

- 김학주, 김봉조, 공재열, 구현서, 남해안 해수로부터 원유분해세균의 분리 및 특성, 한국생물공학회지, 15(1), 27-34 (2000)
- 김학주, 김봉조, 하순득, 황선희, 공재열, 해양세균 *Pseudomonas* sp. CHCS-2에 의한 원유분해 및 생물유화제의 성분분석, 한국생물공학회지 14, 192-197 (1997)
- 정용실, 변대석, 공재열, 해양세균 *Pseudomonas* sp. CHCS-2가 생산하는 생물유화제의 식품첨가제로서의 안정성, 한국식품위생안전성학회지, 투고중.
- 정용실, 변대석, 공재열, 해양세균 *Pseudomonas* sp. CHCS-2가 생산하는 생물유화제의 생리학적 기능성, 한국식품위생안전성학회지, 투고중

나. 국내외 학술발표대회 참가실적

◆ 국제학술대회발표 - 4건

- 孔在烈, 黃先姬, 河順得, 金瑋祚, 卞大錫, "菌体固定化法および流加培養法による生物乳化劑の大量生産とその機能性", The 9th Academic Plaza in International Food Machinery Exhibition 2002, Abstract, p, 172-175 2002. 6.

11. - 14. 2002國際食品工業展 INTERNATIONAL FOOD MACHINERY EXHIBITION アカデミックプラザ 研究發表要旨集 VOL.9

- Kong, J. Y., Kim, H. J., Lee, K. M., Kim, B. J. Ha, S. D. and Kim, M. Y., "Isolation and structural analysis of biosurfactant produced by marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P)" The Fourth Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2002. 4. 22- 26, p60, Honolulu, Hawaii, USA

- Jai-Yul Kong, Hak-Ju Kim, and Sun-Hee Hwang, "The present status and prospects of the health food in Korea" 保健食品科學化와 工業化 研究會, p30-41, 2001. 2. 8. 台灣, 國立台灣大學, 中華保健食品學會

- J.Y.Kong, H.S.Jung, H.J.Kim, S.D.Ha, B.J.Kim, H.S. Koo and S.K.Bae, 食品添加劑としての生物乳化劑の特性, The 7th Academic Plaza in International Food Machinery Exhibition 2000, Abstract, 2000. 5. 15. - 18. 200-203

◆ 국내학술대회발표 - 11건

- 전병진, 김학주, 김민용, 구헌서, 공재열, "천연유화물첨가어묵의 물성 특성" 2002년 한국산업식품공학회, 2002. 11. 16. 천안, 상록리조트

- 이경미, 황선희, 하순득, 김학주, 공재열, 해양생물유래 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)로부터 biosurfactant 생산성 향상을 위한 fed-batch 배양, 2001 한국생물공학회 춘계학술발표대회, p 841-844, 2001. 11. 8, COEX Convention Center, Seoul, Korea

- 이경미, 황선희, 하순득, 김학주, 공재열, "해양생물 유래 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)의 biosurfactant 생산을 위한 배양조건 및 발효공정의 최적화", 2001 한국생물공학회 춘계학술발표대회, p165-168, 2001. 4. 14, 건국대학교

- 이경미, 김학주, 하순득, 정혜성, 공재열, 해양생물유래 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)가 생산하는 biosurfactant의 물리·화학적 특성, 한국생명과학회 제 31회 학술심포지움 및 춘계학술대회 :기능성물질과 생물산업(The 31th Symposium of Korean Society of Life Science)제31회 한국생명과학회 학술발표회 논문초록, p28, 2001. 2. 20. 국립밀양대학교
- 이경미, 김학주, 하순득, 강양순, 공재열, 해양 유래 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)가 생산하는 Biosurfactant의 구조분석, 2000한국생물공학회 추계학술발표대회 및 Bio-Venture Fair, p626- 629, 2000. 11. 9-11. 천안상록리조트
- 정혜성, 김학주, 김봉조, 황선희, 공재열, Air lift 반응기를 이용한 생물유화제의 연속생산, 2000한국생물공학회 추계학술발표대회 및 Bio-Venture Fair, p329-331, 2000. 11. 9-11. 천안상록리조트
- Hye-Sung Jeong, Soon-Duck Ha, Hak-Ju Kim, Bong-Jo Kim, and Jai-Yul Kong, Production of Biosurfactant by Immobilized *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P Using Modified Polyvinyl Alcohol, 한국산업미생물학회 추계학술대회 2000, p273, 2000. 10. 28. 전북대학교
- 김학주, 이경미, 정혜성, 김봉조, 강양순, 공재열, *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2에 의한 생물유화제의 발효생산, 한국생물공학회추계학술발표대회, p263-266, 2000. 4. 8
- 정혜성, 김학주, 하순득, 황선희, 구헌서, 공재열, *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2의 균체고정화법을 이용한 생물유화제의 생산, 한국생물공학회추계학술발표대회, p378-381, 2000. 4. 8
- 정혜성, 김학주, 황선희, 공재열, 해양세균 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2가 생산하는 glycolipid의 발효생산, 한국산업미생물학회 추계학술발표대회 p265 1999. 10. 30

- 김학주, 강양순, 정혜성, 공재열, 해양세균 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2가 생산하는 Glycolipid의 물리·화학적 특성과 구조분석, 한국산업식품공학회 추계학술발표대회 p140-141 1999. 10. 23

다. 특허실적 - 1건

- 람노리피드와 메칠람노리피드를 동시에 생산하는 해양세균 슈도모나스 아에루기노사 비와이케이-2. 출원번호 10-2000-0049891, 2000. 8. 26, 한국

2. 활용계획

- ▶ 통조림, 어묵, 계맛살류, 어육소시지 등의 수산가공제품에 고기능성 천연유화물을 첨가함으로써 고부가가치의 기능성 수산가공제품 제조에 활용한다.
- ▶ 천연유화물이 가지는 기능성을 이용하여 수산식품 제조에 활용함으로써 식품보존성과 유통기한의 연장이 가능하기 때문에 이와 관련된 제조기술을 수산물 제조 가공업체에 제공한다.
- ▶ 인체 내 생리기능 조절 및 각종 질병 예방기능성을 활용하여 의약품 개발에 이용한다.
- ▶ 개발된 천연유화물의 종류별 특성을 감안하여, 식품, 제약, 화장품, 섬유, 농약, 세제, 유처리제 등 여러 산업 분야에 활용한다.
- ▶ 검증된 결과를 바탕으로 천연유화물의 대량생산에 활용한다.
- ▶ 연구성과는 국내 및 국외 학술지에 발표함으로써 천연유화물 개발에 관련된 기술을 검증 받은 후 특허를 출원하고, 수산가공제품에 그 기술 적용시킴으로써 고기능성 수산가공제품 개발에 활용하고 해외시장 개척에도 적극 활용한다.

S U M M A R Y

I. Title of research

Production of Biosurfactant from Marine Organism and Its Application to the Functional Fish Based Products

II. Objectives of research and its importance

- Isolation and optimization of microorganism producing biosurfactant and investigation of component, rheology
- Overproduction of biosurfactant from marine organism and its applicate to seafood processing products
- Economics analysis and development of useful technology
- Food safety and lethal dosage of biosurfactant
- Function of biosurfactant

III. Contents and scopes of research

▣ Overproduction of biosurfactant from marine organism and its applicate to seafood processing products

1. Isolation and optimization of microorganism producing biosurfactant and investigation of component, rheology
 - Isolation and identification of bacterium producing biosurfactant

- Selection of the specific substrate for producing biosurfactant
 - Investigation of optimal culture conditions(Flask culture)
 - (Carbon source, Nitrogen source, inorganic salts, temperature, pH etc.)
 - Extraction, isolation and purification of biosurfactant
 - Analysis of component
 - Investigation of physicochemical properties
 - (Emulsifying activity, emulsifying stability, biodegradation, washing capacity, foamforming, water holding capacity, surface tension, etc.)
 - The rheological properties comparison with chemical surfactant
2. Overproduction of biosurfactant from marine organism and its applicate to seafood processing products
- Optimization Condition of fermentation for biosurfactant production with 7 L fermentor
 - Batch fermentation
 - Fed-batch fermentation
 - Continuous Stirred Tank Reactor
 - Continuous production of biosurfactant by cell immobilization
 - Overproduction using Pilot plant(200L)
 - Development of separation process
 - Application to seafood processing products
3. Economics analysis and development of useful technology
- Economics analysis for production yields
 - Determining bioprocess design for scale-up

- Manufacture

▣ Physiological functionality and safety of the biosurfactant from marine organism

1. Food safety and lethal dosage of biosurfactant

- Safety as food additive
 - Acute toxicity, LD₅₀
 - Antimutagenicity effect, Ames test
 - Antibacterial activity(In vitro)

2. Function of biosurfactant

- Function
 - Adsorption Capacity of Heavy Metals(In vitro)
 - Cell proliferation
 - Anticancer activity
(In vivo(Sarcoma-180), In vitro(DNA/methylgreen assay))
 - Immunomodulating activity (In vitro)

IV. Results of research

▣ Overproduction of biosurfactant from marine organism and its applicate to seafood processing products

1) A marine bacterium having a high oil-degrading activity was isolated in the southern sea, and was identified as *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2.

- 2) The optimum culture conditions in flask level has been determined.
- 3) The biosurfactant has been extracted and concentrated, obtained (a crude biosurfactant about 10.1g/L) and then named as NS-1
- 4) From the analysis of the chemical structure, Biosurfactant was estimated as 2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxy-decanoyl- β -hydroxy decanoic acid methyl ester
- 5) It was exhibited that the biosurfactant has an emulsifying activity, emulsifying stability, biodegradation, surface tension, interfacial tension, and thermal stability compare to those of some commercial surfactants.
- 6) In Fed-batch, Air-lift bioreactor for overproduction, obtained about 22.7g/L and 0.1g/h, respectively. Also, In the 200 L pilot plant, obtained biosurfactant about 18.2g/L.
- 7) Pilot-plant process for purification was modeled.
- 8) Development of functional fish based product by addition of biosurfactant.
- 9) The biosurfactant showed particularly excellent results in respect to the emulsifying activity than those of other chemically synthesized surfactants.
- 10) The details of process flow diagram was completed.

■ Physiological functionality and safety of the biosurfactant from marine organism

- 1) Excellent result in respect to the antibacterial activity than those of the other chemically synthesized surfactants.
- 2) Antimutagenicity effect of biosurfactant was confirmed to be very high and the value of LD₅₀ proved biosurfactant to be GRAS grade.

- 3) Superior adsorption capacity to heavy metals
- 4) Exhibited anticancer activity.

V. Applications

1. Research results

A. Announcements of scientific papers

◆ The foreign papers

- Lee, K. M., S. D. Ha, B. J. Kim, S. H. Hwang, D. J. Lim, and J. Y. Kong, Rhamnolipid Production in Batch and Fed-batch Fermentation using *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P, *J. of Microbiol. Biotechnol.*, Submitted
- Jung, H. S., S. H. Hwang, M. Y. Kim, S. D. Ha, and J. Y. Kong, Production of Rhamnolipid by Immobilized *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) Using Modified Polyvinyl Alcohol. *Biotechnol. Lett.*, Submitted

◆ The domestic papers - 4

- Kim, H. J., B. J. Kim, J. Y. Kong, and G. S. Koo, Isolation and characterization of oil degrading bacteria from southern sea of korea, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, 27-34 (2000)
- Kim, H. J., B. J. Kim, S. D. Ha, S. H. Hwang, and J. Y. Kong, Biodegradation of crude oil by marine bacterium and composition of the biosurfactant, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 14, 192-197(1999)
- Jung, Y. S., D. S. Byun, and J. Y. Kong, Stability for food additive of

biosurfactant produced by marine bacterium *Pseudomonas sp.* CHCS-2, *J. Fd Hyg. Safety*, Submitted

- Jung, Y. S., D. S. Byun, and Kong, J. Y. Physiological function of bio-surfactant produced by marine bacterium *Pseudomonas sp.* CHCS-2, *J. Fd Hyg. Safety*, Submitted

B. Announcements of scientific meeting

◆ The foreign meeting - 4

- 孔在烈, 黃先姬, 河順得, 金琇祚, 卞大錫, 菌体固定化法および流加培養法による生物乳化剤の大量生産とその機能性, The 9th Academic Plaza in International Food Machinery Exhibition 2002, Abstract, p172-175 2002. 6. 11. - 14. 2002國際食品工業展 INTERNATIONAL FOOD MACHINERY EXHIBITION アカデミックプラザ 研究發表要旨集 VOL.9

- Kong, J. Y., H. J. Kim, K. M. Lee, B. J. Kim, S. D. Ha, and M. Y. Kim, Isolation and structural analysis of biosurfactant produced by marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P), The Fourth Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2002. 4. 22- 26, p60, Honolulu, Hawaii, USA

- Kong, J. Y., H. J. Kim, and S. H. Hwang, The present status and prospects of the health food in Korea, 保健食品科學化と工業化 研究會, p30-41, 2001. 2. 8. 台灣, 國立台灣大學, 中華保健食品學會

- Kong, J. Y., H. S. Jung, H. J. Kim, S. D. Ha, B. J. Kim, H. S. Koo, and S. K. Bae, 食品添加劑としての生物乳化剤の特性, The 7th Academic Plaza in International Food Machinery Exhibition 2000, Abstract, 2000. 5. 15. - 18. 200-203

◆ The domestic meeting -11

- Jun, B. J., H. J. Kim, B. J. Jun, H. J. Kim, M. Y. Kim, H. S. Koo, and J. Y. Kong, Rheological properties of surimi by addition of biosurfactant, Korea society for food engineering conference, Abstract, Chonan, Korea, 2002. 11. 16.
- Lee, K. M., S. H. Hwang, S. D. Ha, H. J. Kim, and J. Y. Kong, Fed-Batch fermentation from overproduction of biosurfactant from marine organism *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P) Korean Institute of biotechnology and bioengineering conference 2001, p 841-844, 2001. 11. 8, COEX Convention Center, Seoul, Korea
- Lee, K. M., S. H. Hwang, S. D. Ha, H. J. Kim, and J. Y. Kong, "Optimization of cultural and fermentation process for biosurfactant production from marine organism *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P), 2001 Korea Institute of Biotechnology and Bioengineering Conference, p 165-168, 2001. 4. 14, Konkuk Univ.
- Lee, K. M., H. J. Kim, S. D. Ha, H. S. Jung, J. Y. Kong, Physicochemical properties of biosurfactant produced by marine organism *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P), The 31th Symposium of Korean Society of Life Science, Abstract, p28, 2001. 2. 20. Miryang Univ.
- Lee, K. M., H. J. Kim, S. D. Ha, Y. S. Kang, and J. Y. Kong, Structural analysis of biosurfactant produced by marine organism *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P), 2001 Korea Institute of Biotechnology and Bioengineering Conference and Bio-Venture Fair, p 165-168, 2001. 4. 14, Chonan
- Jeong, H. S., H. J. Kim, B. J. Kim, S. H. Hwang, and J. Y. Kong,

Continuous production of biosurfactant using Air-lift reactor, 2001 Korea Institute of Biotechnology and Bioengineering Conference and Bio-Venture, p329-331

- Jeong, H. S., S. D. Ha, H. J. Kim, B. J. Kim, and J. Y. Kong, Production of Biosurfactant by Immobilized *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P Using Modified Polyvinyl Alcohol, 2000 The Korean society for microbiology and biotechnology conference, p273, 2000. 10. 28. Chonbuk Univ.

- Kim, H. J., K. M. Lee, H. S. Jeong, B. J. Kim, Y. S. Kang, and J. Y. Kong, Fermentation production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2, Korea Institute of Biotechnology and Bioengineering Conference, p263-266, 2000. 4. 8

- Jeong, H. S., H. J. Kim, S. D. Ha, S. H. Hwang, H. S. Koo, and J. Y. Kong, Production of biosurfactant by cell immobilization of *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2, Korea Institute of Biotechnology and Bioengineering Conference, p378-381, 2000. 4. 8

- Jeong, H. S., H. J. Kim, S. H. Hwang, and J. Y. Kong, Fermentation production of glycolipid produced by marine *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2, The Korean society for microbiology and biotechnology conference, p265, 1999. 10. 30

- Kim, H. J., H. J. Kim, Y. S. Kang, H. S. Jeong, and J. Y. Kong, Physicochemical properties and structural analysis of glycolipid produced by marine *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2, Korean society for food engineering conference, p140-141 1999. 10. 23

C. The patents of application

The marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 producing rhamnolipid and methylrhamnolipid simultaneously. App. no. 10-2000-0049891, 2000.

8. 26, Korea

2. The plans of application

▶ On the basis of the various properties of biosurfactant, the industrial use for canned, surimi, crabmeat products, fish usage, etc were expected.

▶ Biosurfactant was identified various kinds good properties rather than the manufactured other surfactants and that expects development of manufactured good for improving economical value of deserted fish oil.

▶ This biosurfactant is good enough to substitute for existing commercial surfactants.

▶ We made the bioreactor producing functional biosurfactant and developed bioprocesses design for mass production.

CONTENTS

PROPOSITION.....	1
SUMMARY.....	2
ENGLISH SUMMARY.....	10
ENGLISH CONTENTS.....	19
CONTENTS	25
Chapter 1. Summary of the study	31
Section 1. Property of the study	31
Section 2. Necessity of the study	33
1. Technical aspect	33
2. Economical aspect	35
3. Social and cultural aspect	36
Section 3. Ranges of the study	37
Chapter 2. Technical states of domestic and foreign	39
Section 1. Domestic technical state	39
Section 2. Foreign technical state	41

Chapter 3. Objectives and achievement of the study	42
Section 1. Objectives of study	42
Section 2. A progress chart of study	42
Section 3. Achievement of study	43
Chapter 4. Contents and Results of the study	49
Section 1. Contents	49
■ Part I	49
1. Isolation and identification of the strain for biosurfactant production	49
(1) Microorganism	49
(2) Medium	53
(3) Emulsifying activity	54
(4) Cell adherence	54
(5) Optimal culture conditions	55
(6) Extraction	57
(7) Isolation and Purification	57
(8) Analysis with HPLC	58
(9) Analysis with TLC	58
(10) Analysis of structure	58
(11) Physicochemical properties	59
2. Optimal fermentation condition	61
(1) Organism and medium	61

(2) Seed culture	62
(3) Batch fermentation	62
(4) Dry cell weight	62
(5) Emulsifying activity	62
(6) Substrate consumption	63
(7) Orcinal assay	63
(8) Fed-batch fermentation	64
(9) Continuous fermentation	66
3. Production of biosurfactant by immobilized cell	68
(1) Cell immobilization	68
(2) Cell culture	69
(3) Measurement of bead strength	69
(4) Scanning electron microscopy	69
(5) Air lift bioreactor	71
4. Overproduction using Pilot plant (200 L fermentor)	71
5. Development of separation process	71
6. Application to seafood processing products	73
(1) Materials	73
(2) Manufacture of surimi	73
(3) Measurement of rheology	78
(4) Detect of color	78
(5) Optimal formulation	78
(6) Statistical research	78

▣ Part II	79
1. Antibacterial activity and toxicity	79
(1) Antibacterial activity	79
(2) MIC TEST	79
(3) Acute toxicity	80
(4) Antimutagenicity effect	81
2. Adsorption capacity of heavy Metals(In vitro)	82
3. Anticancer activity	82
(1) In Vivo	82
(2) In Vitro(DNA/Methylgreen assay)	83
4. Immunomodulating activity	84
 Section 2. Results	 86
 ▣ Part I	 86
1. Isolation and optimization of microorganism producing biosurfactant and investigation of component, rheology	 86
(1) Isolation and identification	86
(2) Medium	88
(3) Cell adherence	92
(4) Optimal culture conditions	97
(5) Extraction	109
(6) Analysis of component	109
(7) Analysis of structure	109
(8) Physicochemical properties	124

2. Optimal fermentation condition	145
(1) Batch Fermentation	145
(2) Fed-batch fermentation	164
(3) Continuous fermentation	169
3. Production of biosurfactant by immobilized cell	169
(1) Selectivity of optimal carrier	171
(2) Effect of cell loading	171
(3) Effect of bead size	171
(4) Effect of medium to bead volume ratio	175
(5) Repeated batch culture	175
(6) Stability of bead strength	179
(7) Scanning electron microscopy	179
(8) Air lift bioreactor	179
4. Overproduction using Pilot plant (200 L fermentor)	182
(1) Effect of Airflow rate	182
(2) Effect of Agitation	182
(3) Production under optimal conditions	185
5. Development of separation process	186
6. Application to seafood processing products	190
7. Economics analysis and development of useful technology	200
▣ Part II	206
1. Antibacterial activity and toxicity	206
(1) Antibacterial activity	206
(2) MIC TEST	209

(3) Acute toxicity	212
(4) Antimutagenicity effect	217
2. Physiological functionality	219
(1) Adsorption capacity of heavy metals	219
(2) Anticancer activity	222
(3) Immunomodulating activity	227
Chapter 5. A plan of application	229
Chapter 6. References	233

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
SUMMARY	10
CONTENTS	19
목 차	25
제 1 장 연구개발과제의 개요	31
제 1 절 연구개발의 목적	31
제 2 절 연구개발의 필요성	33
1. 기술적 측면	33
2. 경제·산업적 측면	35
3. 사회·문화적 측면	36
제 3 절 연구개발의 범위	37
제 2 장 국내외 기술개발 현황	39
제 1 절 국내 기술 현황 및 문제점	39
제 2 절 해외 기술 현황	41

제 3 장 연구 목표 및 달성도	42
제 1 절 연구 목표	42
제 2 절 연구 진도표	42
제 3 절 연구개발목표의 달성도	43
제 4 장 연구개발 수행 내용 및 결과	49
제 1 절 연구수행 내용	49
▣ 제1세부과제	49
1. 천연유화물 생산 균주의 분리 및 동정	49
(1) 균주의 선정	49
(2) 기본배지의 선정	53
(3) 유화활성도(Emulsifying activity)	54
(4) 탄소원에 대한 세포부착능(cell adherence)	54
(5) 최적배양조건의 검토	55
(6) 천연유화물의 추출	57
(7) 천연유화물의 분리·정제	57
(8) HPLC 분석	58
(9) TLC를 이용한 구성성분 분석	58
(10) 천연유화물의 구조분석	58
(11) 천연유화물의 물리·화학적 특성	59
2. 천연유화물의 최적 발효생산 조건 검토	61
(1) 사용균주 및 배지	61
(2) 종균 배양	62

(3) 회분발효 (Batch fermentation)	62
(4) 균체 건조 중량 (dry cell weight)	62
(5) 유화활성도 (Emulsifying activity) 측정	62
(6) 기질소비량 측정	63
(7) 천연유화물의 정량화	63
(8) 반회분발효 (Fed-batch fermentation)	64
(9) 연속발효 (Continuous fermentation)	64
3. 균체 고정화법을 이용한 천연유화물의 생산	68
(1) 균체의 고정화 방법	68
(2) 고정화 균체의 배양	69
(3) 비드의 강도 측정	69
(4) 고정화된 비드의 관찰	69
(5) Air lift 생물반응기	71
4. Pilot plant (200 L fermentor)를 이용한 대량생산	71
5. 대량분리 공정법 개발	71
6. 수산가공제품에의 응용	73
(1) 실험재료	73
(2) 어묵의 제조	73
(3) 물성의 측정	78
(4) 색도 측정	78
(5) 최적 formulation	78
(6) 통계분석	78
▣ 제2세부과제	79
1. 천연유화물의 항균활성 및 독성 검사	79

(1) 항균활성(DISC법)	79
(2) Microplate reader를 이용한 MIC TEST	79
(3) 급성독성검사	80
(4) 항돌연변이 효과	81
2. 중금속흡착능(In vitro)	82
3. 항종양활성	82
(1) In Vivo	82
(2) In Vitro(DNA/Methylgreen assay)	83
4. 항체 생성능	84
(1) 실험동물의 면역화	84
(2) 세포배양	84
(3) 항체 Detection	85
제 2 절 연구 결과	86
▣ 제1세부과제	86
1. 천연유화물 생산균주를 분리한 후 최적배양조건과 천연유화물의 구성성분 및 물성조사	86
(1) 해양유래 유류분해 세균의 분리동정	86
(2) 배지 선별	88
(3) 탄소원에 대한 cell adherence	92
(4) 최적배양조건 검토	97
(5) 천연유화물의 추출	109
(6) TLC를 이용한 천연유화물의 구성성분 분석	109
(7) 천연유화물의 구조분석	109
(8) 생물 유화제의 물리 화학적 특성	124

2. 천연유화물의 최적 발효생산 조건 검토	145
(1) 회분발효배양	145
(2) 반회분발효 (Fed-batch fermentation)에 의한 천연유화물의 발효생산 조건 검토	164
(3) 연속발효 (Continuous fermentation)	169
3. 균체 고정화 기법을 이용한 천연유화물의 생산	169
(1) 천연유화물의 생산량을 향상시키기 위한 최적 지지체의 선정	171
(2) 지지체 내의 균체 농도에 따른 천연유화물 생산의 영향	171
(3) 비드 크기에 따른 천연유화물 생산의 영향	171
(4) 배지와 비드 부피 비에 따른 천연유화물 생산의 영향	175
(5) 반복 회분식 배양에서의 천연유화물 생산	175
(6) 반복 회분식 배양에서의 시간에 따른 비드 강도의 안정성	179
(7) 주사 전자 현미경을 이용한 고정화 균체의 관찰	179
(8) Air lift bioreactor를 이용한 천연유화물의 생산	179
4. Pilot plant (200 L fermentor)를 이용한 대량생산	182
(1) 통기량 에 따른 천연유화물의 대량생산	182
(2) 교반속도에 따른 천연유화물의 대량생산	182
(3) 최적 조건에서의 천연유화물의 대량생산	185
5. 대량 분리 공정법 개발	186
6. 수산가공제품에의 응용	190
(1) 천연유화물과 일반유화제의 첨가에 의한 영향	191
(2) 천연유화물 첨가 농도에 따른 영향	194
(3) 재료의 혼합 순서에 따른 영향	194
7. 경제성 검토 및 생산 실용화 기술개발	200
(1) 시판중인 유화제와의 가격 경쟁력 비교	201

(2) 생산실용화 기술 개발	203
▣ 제2세부과제	206
1. 천연유화물의 항균활성 및 독성 검사	206
(1) 항균활성	206
(2) Microplate reader를 이용한 MIC TEST	209
(3) 급성독성검사	212
(4) 항돌연변이 효과	217
2. 천연유화물의 기능성 조사	217
(1) 중금속흡착능	219
(2) 항종양활성	222
(3) 항체생성능	227
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	229
제 6 장 참고문헌	233

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

유화제(계면활성제, surfactants)는 친수성 부분과 소수성 부분을 동시에 가지고 있는 양친매성(amphipathic) 분자로, 계면의 표면장력을 감소시키는 성질을 가지고 있는 물질을 총칭한다. 이러한 구조적인 특징에 의해 기체, 액체, 고체와 같은 서로 성격이 다른 상 사이의 계면에 작용하여 흡착함으로써 계면의 물리적 현상 및 그 성질을 변화시킨다.

이러한 다양한 응용성은 친수성 부분과 소수성 부분의 상대적인 크기와 종류에 기인하여, 유화, 분산, 가용화, 계면 및 표면장력의 조절, 기포·소포작용, 응집이나 세정작용 외에 대전방지, 유탄과 살균 등의 다양한 작용을 나타내기 때문에 의약품, 화장품, 농약, 세제 등의 산업 전반에 널리 사용되고 있다.

유화제는 1917년 독일에서 공업화된 후 2차 세계대전 이후 생산량과 소비량이 급증하여 1990년 중반 전 세계의 유화제 시장은 이미 94억불에 이르렀으며, 매년 35% 이상의 성장을 할 것으로 예측되고 있다. 그러나 산업에서 사용되고 있는 거의 모든 유화제는 석유로부터 화학적으로 합성된 것들로서 그들 중 많은 종류가 독성이 강하고 쉽게 생분해 되지 않기 때문에 1980년대부터 선진국에서는 많은 제품들에 대해 사용 및 생산금지 조치를 취하고 있는 실정이다.

최근들어 환경문제에 대한 관심이 증대되어 생분해 될 수 있는 물질등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 비교적 큰 시장을 가지고 있는 세계 부분에서 생분해도가 높은 합성세제 및 다양한 생물들에서의 대체 물질 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 대체물질 중에서도 특히 생물 또는 미생물 유래의 생물유화제(microbial biosurfactant)는 여러 가지 장점을 가지

고 있어 관심의 대상이 되고 있다. 즉 화학합성이 어려운 새로운 구조를 가지는 유화제를 생산할 수 있으며, 비교적 간단한 배양과정과 간단한 원료들로부터 쉽게 대량생산이 가능하며 무엇보다도 대부분이 쉽게 생분해될 수 있고, 독성이 적다는 점이다.

생물유화제(천연유화물) 생산 미생물에 대해서는 이미 오래전부터 토양과 해양 등을 대상으로 많은 연구가 수행되어 있으며, 최근에는 특성과 기능성에 관련된 다양한 용도의 개발로 유처리제 뿐만 아니라 식품, 화장품, 세제, 제지, 농업 등 다양한 산업분야에서 이용되고 있어 점차 합성계면활성제 시장을 대체해 가고 있는 실정이다.

그러나 국내에서는 이와 관련된 연구가 극히 미진하여 연구 개발된 제품이 거의 전무한 실정으로 본 연구에서는 해양생물체를 대상으로 화학유화제를 대신 할 새로운 형태의 환경친화적인 천연유화물 개발하고 또한 그 응용분야를 살펴보고자 하였다.

국내 연안 유류 오염 지역으로부터 유류분해능 및 천연유화물 생산능을 지닌 균주를 분리하고, 어유 등 이용성이 낮은 유지를 천연유화물 생산을 위한 기질로 사용함으로써 부가가치를 높이고, 천연유화물의 물성과 기능성 등을 이용하여 고기능성 수산가공제품 개발에 응용하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

농수산물의 식량자원중 수산물은 유일한 수출우위의 자원으로 예로부터 수산자원의 생산 및 이용방법이 발달하였으며, 60년대에는 잡는 어업에서 70년대는 잡는 어업과 기르는 어업이 크게 발전하여 국가 산업의 중요한 위치를 차지하였다. 80년대 들어서면서 국내외 수산업 여건의 변화 및 내수산업의 급격한 성장으로 국내수산업도 가공산업 위주의 이용분야에 크게 성장하게 되었고 90년대 접어들면서 고품질의 수산가공식품과 위생 및 영양을 동시에 만족해야 상품성이 인정되는 고품위의 제품생산시대에 접어들었고 95년도 1월에 발족한 WTO의 체제하에서는 국가 경쟁력까지 확보하지 않으면 안되게 되었다.

그러나 80년대 중반에 접어들면서부터 세계 연안 각국의 수산자원 보호 정책의 강화 태국, 중국, 칠레 등 개발도상국의 수산업발전, 국내 연 근해 및 원양어업 생산의 정체 및 인건비 상승 등에 의한 2차 가공산업 여건의 변화는 그 동안 양적인 증산 시책 및 원료상태의 수출에 의한 국내 수산업의 성장기반을 크게 악화시키게 되었으며 수출채산성의 악화는 곧바로 가공 식품산업 발전과 내수 시장 기반구축으로 이어지게 되었다.

원천 기술의 개발 없이 외국의 가공기술을 손쉽게 들여 올 수 있었던 몇몇 수산 대기업의 주도로 참치 통조림, 맛살류, 조미오징어, 조미김, 젓갈류 등의 상업적 제품이 크게 성공하여 비교적 짧은 시간에도 불구하고 국내의 내수시장은 80년대부터 크게 성장하게 되었다.

수산물 이용현황을 보면 총어획량에서 수산제품의 가공에 이용되는 원료공급율은 82.3%로 전년보다 약간 증가한 현상으로 최근 몇 년간 국민들의 수산

물 소비성향은 단순가공품에서 고차가공품으로 전환되고 있는 실정이다. 특히 어육연제품의 경우 선상연육의 이용으로 전반적인 품질이 고급화되어 가고 있고 소비자의 기호에 따라 다양한 제품이 개발되어 국민식생활 개선에 기여하고 있다. 이러한 생산량은 91년 이후부터 10만톤 이상씩 생산량이 꾸준히 유지되어 팔목할만하며 게맛살류를 포함한 어육연제품은 고차 가공품중에서도 생산량이 가장 많은 품목으로 아주 중요한 내수시장용 수산가공품으로 급부상하게 되었다. 연제품의 산업적 발전은 우수한 품질의 연육생산, 대량생산 설비의 확충, 위생적 유통시스템 구축등 주로 일본에서 개발된 기술의 국내 도입 및 단기간 접목에 의해 이루어졌으며 독자적 기술개발이 전무한 상태에서 주로 자본의 집중도입에 의한 산업의 조기 발전 및 성장으로 신제품 개발보다는 기존제품의 생산성 향상에만 모든 기술개발 노력이 집중되어져 있다. 연제품 분야의 국내 기술개발은 주로 대학이나 국가연구기관에서 대체 연육개발 등 부분적 기술이 연구되고 있으나 연육첨가소재인 고기능성 유화물의 개발에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

고기능성 천연 유화물이란 항균, 항산화성, 가열안정성, 콜레스테롤 저하, 풍미 안정성등의 기능을 가진 유화물로서 주로 미생물에 의해서 생산되며, 물리·화학적 특성으로는 유화, 보습, 결, 탄력, 조직형성능등과 보존성 우수한 식품 소재로서 기능성 연제품의 개발과 유통기한의 연장이 가능하며 맛살류등에 첨가하여 섭취할 경우 체내 환경호르몬과 같은 내분비계 교란물질과 납, 수은, 다이옥신과 같은 유해물질들과 결합하여 무독화 반응을 일으키고 폐질환 치료등에도 이용될 수 있는 고기능성 고부가가치의 식품소재이기 때문에 연구 개발할 경우 수산가공제품에 있어서 산패나 세균의 증식을 억제할 수 있어 식품의 유통기한을 연장할 수 있는 장점이 있으며 우수한 유화능과 보습능, 조직감등으로 품질 향상을 꾀할 수 있어 신기능성 천연유화물의 개발필요성은 매우 크다.

2. 경제·산업적 측면

국내의 경우, 60년대 초반까지만 해도 전통적인 식단 및 식생활습관 그리고 경제적인 이유로 인하여 지방질(가시 지방과 비가시 지방의 합) 섭취가 상당히 낮아서 총 열량중 지방이 차지하는 비율이 6%정도였으나 최근에는 여러 가지 사회 경제적인 여건으로 인하여 식생활 패턴이 점차 서구화되면서 식용 유지의 섭취량이 급격히 증가되고 있다.

수산가공제품의 산업발전은 위생적 제품생산공정의 확대 및 대량생산, 유통체계의 확립 등으로 요약될 수 있으며 기술 개발도 이와 같은 목표 지향적 특성을 갖는다. 이와 같은 산업발전은 80년대로부터 일기 시작한 기존의 국내 수산업 구조변화 추세와 연결 지어 고찰할 수 있다. 즉, 수 차례에 걸친 오일 쇼크, 200해리 어업 경제수역 선포의 국제화, 원양어업 여건 악화, 연안 어자원의 고갈 및 환경악화, 인건비 상승 등으로 원료 수출 중심의 수산업 여건이 급격히 악화되면서 주요 수산기업의 내수시장 개발 노력이 집중되었으며, 중요한 내수 시장용 수산 가공품으로 급 부상하게 되었다.

수산가공 연제품의 경우 생산에 이용되는 대부분의 설비는 외국에서 도입되었으며, 연제품 가공에 필요한 식품첨가물 소재 또한 대부분 외국으로부터 수입에 의존하고 있어 식품 산업전반에 기본이 되는 천연 첨가물의 개발을 소홀히 할 경우 기술 종속국으로 전락하게 되며 외국 수입 원자재 값에 의해 국내 산업 기반이 붕괴될 가능성이 있기 때문에 천연 식품 첨가물의 개발은 필수적이다. 또한 천연 유화물의 경우 건강 보조식품으로 이용가능성이 있기 때문에 고기능성 천연유화물의 연구 개발은 수산가공제품 산업을 고부가가치 산업으로 전환시킨다는 차원에서 매우 바람직한 시도로 사료된다.

3. 사회·문화적 측면

현재 수산가공식품 특히, 통조림, 어육 연제품(어묵소시지, 어묵, 맛살류 등)에 사용되는 유화물의 경우 대부분 동·식물성 유지를 사용하고 있으며, 이러한 유지의 경우 과다 섭취시 심장질환, 비만과 암의 유발등 건강상 많은 문제를 일으키기 때문에 저 칼로리의 고기능성 유지의 필요성을 절감하게 되었다.

국내의 경우에도 인구의 고령화로 여러 가지 노인성 질환에 대한 국가적 부담이 증대될 것으로 예상되는 바, 이에 대한 대책의 일환으로 값싸고 안전하며 효능이 있는 천연 식품첨가물의 개발이 요구되고 있다.

따라서, 유지의 섭취로 인한 비만과 성인병 등 건강상의 문제점을 줄이는 한편, 유지의 기호성 즉, 풍미성과 입에서 느끼는 감촉 등을 그대로 유지하며 인체에 꼭 필요한 필수 지방산의 섭취하는 방법을 모색하게 되었다.

제 3 절 연구개발의 범위

■ 제1세부과제 : 해양생물 유래 천연유화물의 대량생산 및
수산가공제품에의 응용

구 분	목 표	내용 및 범위
1차년도 (1999년)	<ul style="list-style-type: none"> 천연유화물 생산균주를 분리한 후 최적배양조건과 천연유화물의 구성성분 및 물성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> 천연유화물 생산 균주의 분리 및 동정 어유에 대한 기질 특이성을 지닌 고효율 천연유화물 생산 균주의 선별 최적배양조건 검토(Flask 배양) (탄소원, 질소원, 무기염류, 온도, pH 등) 천연유화물의 추출 및 분리·정제 구성성분 분석 물리·화학적특성 검토 (유화활성, 유화안정성, 생분해능, 세척능, 거품능, 보습능, 표면장력, 계면장력 등) 시판용 화학합성 유화제와의 물성비교
2차년도 (2000년)	<ul style="list-style-type: none"> 천연유화물의 대량생산 및 수산 가공제품에의 응용 	<ul style="list-style-type: none"> 7L 발효기를 이용한 천연유화물의 최적 발효생산 조건 검토 <ul style="list-style-type: none"> -회분발효(Batch fermentation) -반회분발효(Fed batch fermentation) -연속발효(CSTR) Pilot plant(200L)를 이용한 대량생산 대량분리 공정법 개발 수산가공제품에의 응용
3차년도 (2001년)	<ul style="list-style-type: none"> 경제성검토 및 생산 실용화 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> 생산수율 등에 대한 경제성검토 대량생산을 위한 생산실용화 기술개발 제품화

■ 제2세부과제 : 해양생물유래 천연유화물의 기능성 및 안전성 검토

구 분	목 표	내용 및 범위
2차년도 (2000년)	<ul style="list-style-type: none"> • 천연유화물의 식품 안전성 및 독성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 식품첨가제로서의 안전성조사 (생리안전성 검토) <ul style="list-style-type: none"> - 급성독성검사 LD₅₀ 측정 - 항 돌연변이원성 test Ames test - 항균활성(In vitro)
3차년도 (2001년)	<ul style="list-style-type: none"> • 천연유화물의 기능성 조사 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 기능성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 중금속 흡착능(In vitro) - 세포증식능 - 항암활성 In vivo(Sarcoma-180) In vitro(DNA/methylgreen assay) - 항체생성능(In vitro)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술 현황 및 문제점

- 국내에 유통되는 수산가공식품은 기온이 낮은 동절기에는 유통상에 큰 문제점이 없지만 하절기에는 유통기한이 짧아 위생상 많은 문제점으로 지적되어왔다. 그러나 현재 국내의 유통기한을 연장할 수 있는 천연식품첨가물의 개발이 일부 진행되고 있으나 이에 관한 연구가 극히 미진한 상태이다.
- 수산가공식품에 사용되는 유화물의 경우 대부분 동·식물성 유지를 사용하는데, 국내유지자원의 경우 자급율이 떨어지는 경향으로 국내 유지자원의 증산과 새로운 유지자원의 개발 및 용도개발, 품질향상을 위한 유지가공기술의 연구개발에 대한 투자가 요구되고 있으나 극히 미진한 상태이다.
- 국산 유지의 생산이 저조한 이유는 첫째, 경지면적이 제한되어 있어 다른 식량자원과 경합하기 때문이며, 둘째, 유지 원료의 수급이 안정적으로 이루어질 수 있는 유통 체계가 미미하고, 셋째, 국내 유지작물 및 유지 가격이 수입되는 것과 비교할 때 경제성이 떨어져 작물재배 및 유지 생산을 기피하고 있기 때문이다. 또한 기능성과 관련해서 볼 때 유지자원 개발자체를 동·식물에만 국한시켜 보고있기 때문에 해양생물 등에 의해 생산 가능한 유지자원에 대한 연구가 부족한 실정이다.
- 국내의 경우, 동·식물·어류 등에서 추출한 유지자원의 정제유 생산기술은 높은 수준에 도달하였으나, 가공유지제품의 이용과 기능성에 관한 연구

는 부족한 실정이다.

- 천연유화물 연구의 경우, 국내 몇몇 연구자 등에 의하여 토양세균 유래 천연유화물에 대한 연구가 일부 있으나 개발된 제품이 없고, 해양생물 유래 천연유화물 연구는 거의 전무한 실정이다.
- 고기능성 천연유화물을 생산하는 해양생물의 분리·보존기술 및 배양기술의 문제와 분리·추출공정 및 대량생산과 관련된 장치 산업이 대부분 외국에서 수입되어 하드웨어적인 국내기술은 거의 없고, 소프트웨어적인 기술 자체도 상품의 품질관리차원에서 이루어지고 있다.
- 국내에서 사용중인 유화물의 경우 대부분 화학합성 유화물로 안전성이 확보되지 않아 식품소재로서의 이용은 실정이며, 따라서 고부가가치 산업인 화장품, 의약품 등에 사용되는 유화물의 대부분 수입에 의존하고 있는 실정이다.
- 천연유화물에 대한 항균성 및 면역기능(cytokine 분비능 등)에 대한 연구 및 제품개발에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다.

제 2 절 국외 기술 현황

- 미국 Martek사에서는 Microalgae(MK8805)를 배양하여 DHA 함량이 48%에 이르는 단세포 유지(Single Cell Oil)를 개발 “DHASCO”라는 상품명으로 생산, 판매하고 있다.
- 일본에서는 토양에서 아라키돈산 고 생산균인 *Mortierella Alpina* 1S-4를 분리하여 위 점막 보호작용, 지방간 예방, 간 경변에 있어 지질대사이상개선 및 태아의 신체 발육과 뇌 발육에 중요한 아라키돈산 함유유지를 공업적 발효생산에 성공하여 생산하고 있다.
- 수산가공식품과 일반 제조 식품의 기능성에 관한 연구는 1984년부터 일본 문부성 주관으로 식품의 기능을 맛, 영양, 생체조절로 구분, 각각 1차, 2차, 3차 기능으로 분류하여 3차 기능을 중심으로 현재 활발히 연구가 진행되고 있다.
- 구미에서는 해양생물의 대량배양을 통해서 추출한 지질성분을 taurine, glycine, bile salts 등의 단백질 성분과 결합시켜 합성한 후 면역세포의 기능강화를 비롯한 다양한 생리기능성을 보고하고 있다.

제 3 장 연구 목표 및 달성도

제 1 절 연구 목표

어유등 이용성이 낮은 유지를 천연 유화물 생산 균주의 기질로 사용함으로써 부가가치를 높이고, 천연유화물의 물성과 고 기능성 전환기술 및 대량생산 생산실용화 기술을 개발하여 고 기능성 수산가공제품개발에 응용하고자 한다.

제 2 절 연구 진도표

세부과제 및 주요내용	연 도												진도 (%)														
	2000 년 (1차년도)																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
▶해양생물유래 천연유화물의 대량생산 및 수산가공제품에의 응용																											
- 해양생물종의 분리 및 동정																											100
- 고효성 천연유화물의 선별 및 최적배양조건검토																											100
- 분리·정제 및 구성 성분 분석																											100
- 고효성 천연유화물의 물리·화학적 특성검토																											100
- 발효생산 조건 검토 및 대량생산 (Pilot plant)																											100
※ 균체고정화에 의한 천연유화물의 생산																											추가결과
- 대량 분리 공정법개발																											100
- 수산가공제품에의 응용																											100
- 경제성 검토 및 생산 실용화 기술개발																											100
- 제품화																											100
▶해양생물유래 천연유화물의 기능성 및 안전성 검토																											
- 식품첨가제로서의 안정성 및 독성조사																											100
- 천연유화물의 기능성 조사																											100
총 진도율																											100

제 3 절 연구개발목표의 달성도

▣ 제1세부과제 : 해양생물 유래 천연유화물의 대량생산 및 수산가공제품에의 응용

1. 천연유화물 생산균주를 분리한 후 최적배양조건과 천연유화물의 구성성분 및 물성조사

(1) 해양유래 유류분해 세균의 분리동정

남해안 유류오염지역 등 남해안 전지역에는 유류분해 세균이 고르게 분포되어 있는 것으로 확인되었으며, 이러한 세균들에 의해 유출유가 자연 정화되는 것으로 나타났다. 특히, 배양 2일 만에 ACO가 완전히 분해된 지역(경남 통영의 도남항, 거제도 장승포, 전남 여수 국동항)의 해수로부터 유류 분해능이 우수한 세균을 분리하였으며, 분리된 BYK-2 균주의 각종 형태, 생리, 생화학적 특성을 조사한 결과 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되어, *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC18012P)로 명명하였다.

(2) 최적배양조건 검토

천연유화물의 생산에 영향을 미치는 최적 탄소원은 olive oil 이었으며, 최적 질소원은 MLBM 이었다. 또한 최적 무기염류는 FeSO_4 0.05mM 이었으며, 최적 NaCl 농도는 0%, 최적 pH는 7.0, 최적 온도는 25℃로 나타났으며, 500ml erlenmeyer flask와 baffle flask를 이용하여 flask type에 따른 균 성장과 유화 활성도를 조사한 결과 baffle flask에 배양할 때가 1.6배 가량 높게 나타났다.

(3) 천연유화물의 추출 및 정제

본 균주가 생산하는 천연유화물의 구성성분을 분석하기 위해 1%(w/v) fish oil을 기질로 배양된 상층액으로부터 천연유화물을 유기용매 추출법으로 추출·농축하여 무게 정량을 한 결과, crude한 천연유화물을 약 10.1g/L 회수하였으며 이 유화물을 정제하여 NS-1이라 명명하였다.

(4) 천연유화물의 구조분석

FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C FT-NMR, DEPT, RELAY, HSQC, HMBC 등을 통하여, NS-1의 구조를 살펴본 결과, 2개의 α-L-rhamnose와 1개의 β-hydroxydecanoic acid, 1개의 β-hydroxydecanoic acid methyl ester가 결합된 2-O-α-L-rhamnopyranosyl-α-L-rhamnopyranosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoic acid methyl ester로 밝혀졌다.

(5) 천연유화물의 물리 화학적 특성

분리정제된 천연유화물의 최적 pH는 5.6으로 나타났으며, 표면장력이 29.5 mN/m로 측정되었다. 또한, 해수나 담수 등에서 유화활성과 유화안정성이 우수하며, 열 안정성이 아주 우수한 것으로 확인되어, 식품첨가물, 세제, 유출유처리제 등 다양한 산업분야에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

2. 천연유화물의 대량 생산 및 수산가공제품에의 응용

Pseudomonas aeruginosa BYK-2 (KCTC 18012P)에 의한 천연유화제 생산을 향상시키기 위하여 반회분발효를 실시하였다. 반회분발효의 배양조건은 회분발효에서 최적조건실험결과를 바탕으로 7L Jar Fermentor를 이용하여 초기 working volume 3L, 교반속도 200 rpm, 통기량 0.67 vvm 및 온도 25°C에서 회분발효를 실시하다가 fish oil의 농도가 5g/L 이하로 떨어지는 시점에서 fish

oil의 농도 및 공급량을 달리하여 발효조에 주입하여 배양한 결과 최대 생산량 22.7g/L를 얻을 수 있었다.

3. 균체 고정화 기법을 이용한 천연유화물의 생산

보다 다양한 방법으로 대량의 천연유화물을 생산해 내기 위하여 균체고정화 기법을 추가로 실시하였다. 최적 지지체로 10% (w/v) MPVA를 선정, 최적의 조건에서 고정화 균체의 연속배양을 위해 사용되는 Air lift 생물반응기를 이용하여 회분식 반응의 조건을 검토해 본 결과, 통기량 0.5 vvm, flow rate 25 ml/h, 그리고 회석을 0.02 h⁻¹의 조건에서 약 5.6g/L의 천연유화물을 연속생산할 수 있었다.

4. Pilot plant (200 L fermentor)를 이용한 대량생산

천연유화물의 대량생산을 위해 200 L fermentor에서 통기량 5.5L/h, 교반속도 150rpm, 기질농도 2.5% (v/v) fish oil 그리고 온도 25°C의 배양조건에서 회분배양을 실시하여 천연유화물의 생산량을 검증한 결과, 174h 배양시 18.2g/L의 천연유화물이 생산되었다. 7 L Jar fermentor에서의 천연유화물의 생산량을 비교하면 200L fermentor에서 2-3g/L 더 좋은 것으로 나타났다.

5. 대량 분리 공정법 개발

천연유물 대량 생산 후 분리·정제를 위한 공정을 modeling 하였다.

6. 수산가공제품에의 응용

본 천연유화물의 경우 유화제로서의 기능뿐만 아니라 식품첨가물로서의 신기능성도 함유하고 있는 것으로 밝혀졌으므로, 어묵, 어육소세지 및 계맛살 등

의 대표적인 수산가공제품에 천연유화물을 넣어 제조하여, 신기능성이 부가된 수산가공제품의 개발을 위한 기초실험을 실시하였다. 일반적으로는 수산가공 제품에서 유화제가 어육소세지에 0.2-0.5 % 첨가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 천연유화물의 경우 유화제로서의 기능이 매우 탁월하므로 저농도로 첨가하여도 물리·화학적(관능적) 특성에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

7. 경제성 검토 및 생산 실용화 기술개발

본 연구에 사용된 해양미생물 유래 천연유화물과 현재 시판중인 유화제를 가격과 기능면에서 그 경쟁력을 비교하여 보았다. 천연유화물은 화학유화제에 비해 고가라는 가장 큰 단점이 있으나(Emulsan / LABS =12배), 본 연구에서 생산되는 천연유화물은 6\$/kg으로 화학유화제보다는 비싸나 같은 천연유화물들에 비해서는 4-5배 저렴하다. 그러나 동일량(무게단위)을 첨가하였을 경우, CMC 값으로 알아본 유화안정성은 본 연구산물의 것이 화학유화제에 비해 60 배 가량 우수하고 표면장력저하능도 2배 가량 우수하므로 실제 사용량에 대한 가격면을 비교해 보면 오히려 본 연구산물의 가격 경쟁력이 10배 정도 더 뛰어난 것으로 나타났다. 대량생산하여 제품화될 경우 매우 우수한 가치를 가지는 경쟁력있는 천연유화물일 것으로 판단된다.

■ 제2세부과제 : 해양생물유래 천연유화물의 기능성 및 안전성 검토

1. 천연유화물의 항균활성 및 독성 검사

(1) 항균활성

천연유화물의 항균활성능력을 시판용 surfactant의 것과 비교·검토하기 위

해서 *E. coli*가 함유된 평판배지에 Tween 20, Tween 80, Triton X-100, 천연 유화물을 0.1%, 0.5%, 1% 농도로 10 μ L 씩 DISC에 흡습시켜 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 결과, 천연유화물이 더 우수한 항균활성이 있는 것으로 나타났다.

(2) Microplate reader를 이용한 MIC TEST

세균배양액에서 세균의 증식이 천연유화물의 경우 0.0391% 이상의 농도에서 거의 억제되었으며, Triton X-100의 경우에는 0.0781%이상의 농도에서 거의 억제되어 천연유화물이 Triton X-100보다 두 배이상의 항균활성을 보이는 것으로 나타났다. 따라서 천연유화물의 항균활성은 매우 뛰어난 것으로 나타났으며, 매우 낮은 농도에서도 안정된 효과를 나타내었다.

(3) 급성독성검사

천연유화물이 복강을 통해서 투여된 후, 대사과정을 거치는 동안 우려할 부작용은 일으키지 않는 것으로 판단된다.

(4) 항돌연변이 효과

Pseudomonas aeruginosa BYK-2로부터 추출한 천연유화제를 MNNG에 의해 돌연변이를 일으킨 *Salmonella typhimurium* TA 100가 첨가된 배지에서 복귀 돌연변이균주의 수를 측정된 결과, 50%이상의 돌연변이 저해효과가 매 있는 것으로 예상되어졌다.

2. 천연유화물의 기능성 조사

(1) 중금속흡착능

천연유화물과 중금속을 시간대별로 반응시키면서 중금속 제거율을 살펴보았

다. 5분 이내에 40%이상이 제거되었고, 15분 이후에는 거의 100%에 가까운 중금속 제거율을 보였다. 이 결과는 비록 생세포를 이용한 실험은 아니었지만 산업적으로나 환경적으로 신속한 중금속의 제거방법을 제시하는 것으로, 본 실험에 사용한 천연유화물은 거의 무독하기 때문에 중금속이 오염된 수질정화에 매우 효과적이라고 사료된다.

(2) 항종양활성

In vitro test 결과, 천연유화제는 Distamycin A과 비교해볼 때 비슷하거나 약간 낮은 정도의 항생효과를 보이는 것을 알 수 있다. 또한 IC 50값도 distamycin 값이 11.29($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)이고, surfactant는 13.52($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)로 비슷한 수치를 보임으로써 항생물질로서의 개발 가능성을 제시하는 결과라고 할 수 있을 것이다.

제 4 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 내용

▣ 제1세부과제 : 해양생물 유래 천연유화물의 대량생산 및 수산가공제품에의 응용

1. 천연유화물 생산 균주의 분리 및 동정

(1) 균주의 선정

1) 시료 수집

국내 남해안 경남 통영, 거제도, 마산, 진해, 남해와 전남 여천, 여수, 고흥, 완도, 해남 등지의 유류오염지역 30여 군데의 해수를 채취하여 screening oil medium(SOM : 비멸균 해수, 50 mL; 비멸균 arabian light crude oil (ACO), 0.5 g; yeast extract, 5.0×10^{-3} g; K_2HPO_4 , 0.5×10^{-3} g; $(NH_4)_2SO_4$, 0.5×10^{-3} g)에 50 mL 해수를 넣고 ice box에 보관한 상태로 실험실로 옮긴 후, 진탕배양기를 이용하여 25℃, 180 rpm으로 배양하였다(Fig. 1).

2) 균주의 분리

채취한 시료는 7일간 배양한 후 가장 유류 분해능이 우수한 flask를 선별하였다. 선별된 flask 배양액은 121℃에서 1.2기압으로 10분간 가압멸균된 50mL SOM에 2% (v/v) 접종한 후 3일간 배양하였으며, 3일 간격으로 2회 연속 반



Fig. 1. Map of sampling stations in southern sea of Korea.

- K gedo** : 1, K ge bridge; 2, Changsungpo; 3, Hakdong; 4, Tappo;
- Tongyong**: 5, Tonamdong; 6, Tala; 7, Samduck; 8, Tangdong;
- Namhaedo** : 9, Changs ndo; 10, Murim; 11, Mijo; 12, Tanghang;
- Yosu** : 13, LG oil refinery; 14, Kukdong; 15, Tolsando; 16, Y chun-
hang; **Kohung** : 17, Naenarodo; 18, Yaenarodo; 19, Ok-gang; 20,
Toyang; **Wando** : 21, Shinjido; 22, Mangnam; 23, Passenger ship
terminal; 24, Kugyed ng; 25, Tang-in; **Haenam** : 26, Lands end;
- Chindo** : 27, K mgae; 28, Chupdo; 29, Chisan; 30, Nokjin

복 실험을 행하였다. 그 중 유류 분해능이 가장 우수한 배양액을 멸균된 인공 해수(ASW : NaCl, 23.4 g; KCl, 0.7 g; MgCl₂ · 6H₂O, 10.6 g; CaCl₂, 1.1 g; Na₂SO₄, 3.9 g; NaHCO₃, 0.2 g; (NH₄)₂SO₄, 1.0 g; K₂HPO₄, 0.01 g; Tris, 6.05 g; D.W., 1.0 L; pH 7.0)를 이용하여 희석한 후 희석액 0.1 mL를 1.3% (w/v) agar가 첨가된 변형된 해수배지(MMM : peptone, 5.0 g; yeast extract, 1.0 g; ferric citrate, 0.1 g; NH₄NO₃, 1.6×10⁻³ g; Na₂HPO₄, 8.0×10⁻³ g; agar, 13.0 g; sea water, 1.0 L; pH 7.0)에 도말 하였다. 도말된 petridish는 25℃ 항온 배양기에서 24시간 배양하여 single colony를 분리하였다. 분리된 colony는 50mL SOM에 한 백금이를 접종하여 7일간 25℃, 180 rpm으로 진탕 배양하였으며, 그 중, 유류분해능이 가장 우수한 균주를 최종 선정하였다(Fig. 2).

3) 균주의 동정

최종 선정된 oil 분해능이 우수한 균주는 gram 염색을 통한 현미경상에서의 형태학적 관찰과 API 20NE kit를 이용한 생화학적 특성을 검사하였으며, 보다 정확한 동정을 위하여 인제대학교 부속 백병원 임상병리과에 의뢰하여 균주를 동정하였다. 분리 균의 형태는 전자현미경(SEM, DSM940A, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

① 전자현미경 SEM(Scanning Electron Microscopy) 관찰

분리 균의 형태적 특성조사는 영양 한천 배지에 하루 전배양 해놓은 균체를 멸균 증류수에 소량 취해 희석한 후, carbon-coated grid에 균 현탁액을 한 방울 떨어뜨려 무균상태에서 5분간 건조시키고 2% PTA(phosphotungstic acid, pH 7.0)로 염색하여 전자현미경으로 관찰하였다.

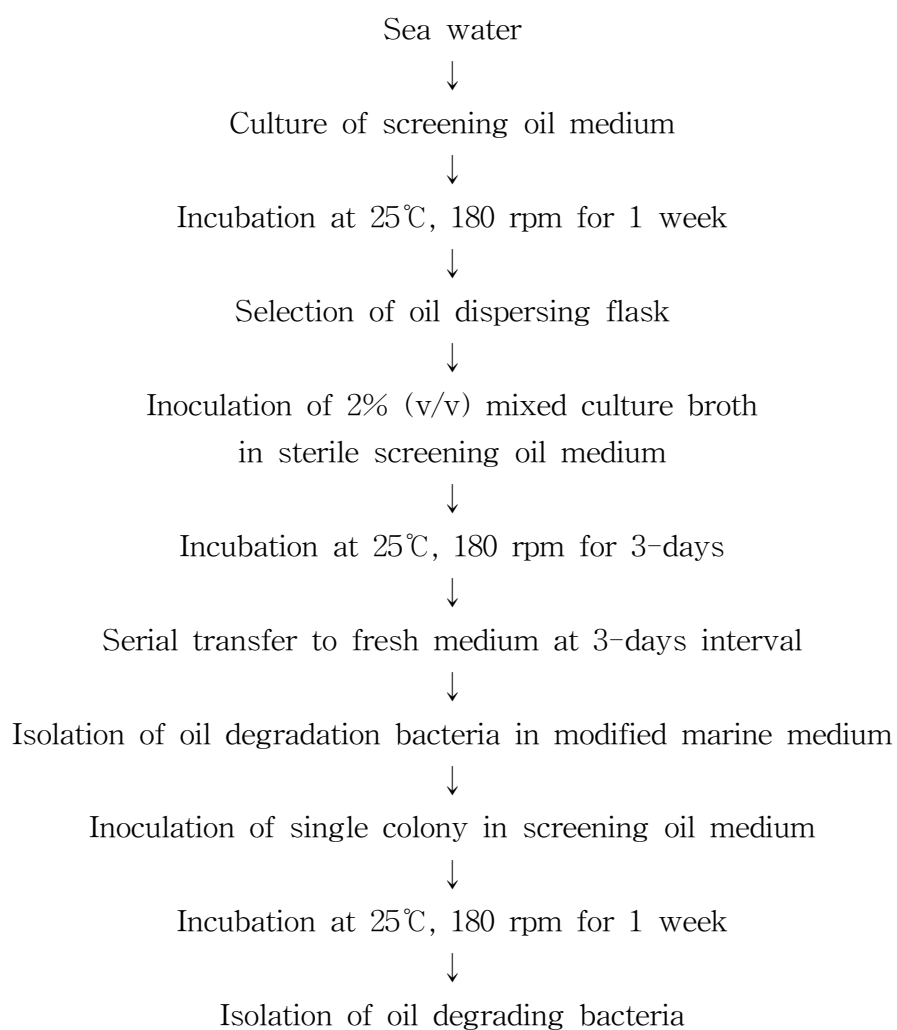


Fig. 2. Isolation method of oil degrading marine bacterium.

② 운동성

30시간 배양한 대수증식기의 균 배양액을 광학현미경으로 관찰하여 균의 운동성 유무(편모확인)를 확인하였다.

③ 생리·생화학적 특성조사

- 그람염색

분리 균의 세포벽 특성에 관해서는 그람염색법을 이용하여 조사하였다. MMM 고체 배지 상에서 colony를 선별하여 영양 한천배지에 접종하였다. 하루정도 배양한 후 배지 표면에 형성된 single colony를 멸균증류수에 1drop 취해 현탁한 후 그람 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 동 균에 대한 표준 균주로는 그람음성의 *E. coli*를 이용하였고, safranin에 역염색하여 적색을 띠는 균은 그람음성, 그렇지 않은 균은 그람양성으로 판단하였다.

- Catalase tests

호기균의 대사 독성물질인 H_2O_2 는 산화환원제인 catalase에 의해 H_2O 와 O_2 로 분해된다. 이에 분리균의 catalase test를 행하였다. 대수기의 단일 colony를 멸균증류수에 소량 취해 현탁한 후, slide glass에 균 현탁액 한 방울을 떨어뜨려 도말 하고, 여기에 1mL의 3% (v/v) 과산화수소 (H_2O_2) 용액을 소량 가해 기포발생 유무를 확인하였으며, 기포 발생 균을 catalase 양성으로 기포 발생이 없는 균을 catalase 음성으로 하였다.

(2) 기본배지의 선정

천연유화물 생산과 관련된 기본배지의 선정을 위해 사용된 배지는 자연해수(NSW), 인공해수(ASW), basal salts 배지(BSM : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g; KH_2PO_4 , 1.0 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; $NaNO_3$, 2.0 g; $CaCl_2$,

0.01 g; KCl, 0.1 g; D.W., 1.0 L; pH 7.0), 3M 배지($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.22×10^{-1} g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.75×10^{-1} g; NaNO_3 , 1.38×10^{-1} g; CaCl_2 , 2.8×10^{-3} g; KCl, 5.5×10^{-2} g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.25×10^{-5} g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 8.26×10^{-5} g; H_3BO_3 , 1.65×10^{-5} g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8.3×10^{-6} g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 8.3×10^{-6} g; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5.5×10^{-6} g; NaCl, 5.5×10^{-2} g; H_3PO_4 ($\rho=1.71$), 0.55 mL; D.W., 1.0 L; pH 7.0), MMM, LB배지(tryptone, 10.0 g; yeast extract, 5.0 g; D.W., 1 L), 변형된 LB 배지(MLBM : tryptone, 10.0 g; yeast extract, 5.0 g; BSM, 1 L, pH 7.0)를 사용하였으며, 기질로는 1% (w/v) n-hexadecane을 사용하였다. 균접종량은 1%(v/v)로 48시간 동안 배양한 후 균 성장 및 유화활성도를 측정하였다. 균성장은 O.D. 660nm에서 흡광도를 측정하였으며, 유화활성도는 Rosenberg E. 등(1979)의 방법에 의하여 측정하였다.

(3) 유화활성도(Emulsifying activity)

각종 탄소원을 기질로 하여 균주 배양액을 원심분리 (15,000g× 10 min)한 후, 배양상층액 1.25 mL에 n-hexadecane : 2-metylnaphtalene을 1:1로 혼합한 기질 0.05 mL와 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 3.7mL를 넣어 vortex로 1분간 강하게 교반하여 10분간 정치시킨 후, O.D. 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

유화활성도 1 unit는 배양상층액 1.25 mL에 대한 유화흡광도 0.1을 1 unit로 환산하였으며, 흡광도 2.0 이상에서는 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 희석하여 측정하였다.

(4) 탄소원에 대한 세포부착능(cell adherence)

MLBM에 각종 탄소원 (ACO, kuwait crude oil(KCO), BCO(bunker C oil), n-paraffin, n-hexadecane, n-tetradecane, oleic acid, olive acid, lecithin, fish

oil, arabinose, trehalose, dextrose, galactose, lactose, fructose, sucrose)을 기질로 1% (w/v) 첨가하여 48시간 배양한 후, cell adherence를 Rosenberg M. 등 (1982)의 방법으로 측정하였다. 배양액으로부터 원심분리 (10,000g × 10 min, at 4°C)하여 얻은 균체를 PUM buffer ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 22.2g; KH_2PO_4 , 7.26g; urea, 1.8g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L pH 7.0)로 2회 세척하고 다시 PUM buffer로 녹인 후, 400nm에서 초기 흡광도를 약 1.5로 맞추었다. 1% (v/v) n-hexadecane이 첨가된 2 mL cell 혼탁용액을 10분간 25°C 항온배양기에 방치한 후 1분간 강하게 vortex하여 15분간 실온에 방치하여 400nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 oil/water의 interface에 부착된 cell을 현미경으로 관찰하였다. ACO를 기질로 하여 25°C, 180 rpm으로 48시간 배양한 배양액을 1방울 slide glass에 적하시킨 후 광학 현미경(×400)으로 관찰하였다.

(5) 최적배양조건의 검토

1) 배양온도

해양에서 분리한 균주를 이용, 천연유화물 생산에 영향을 미치는 배양온도 및 최적배양시간을 조사하였다. 각 온도별 (25°C, 30°C, 37°C)로 180 rpm에서 배양하였으며, 4시간별로 sampling하여 균성장 및 천연유화물 생산을 O.D. 660nm에서 흡광도와 유화활성도로서 측정하였다.

2) 탄소원의 영향

천연유화물 생산을 위한 최적 탄소원을 선정하기 위하여 MLBM에서 25°C, 180 rpm으로 진탕 배양하였으며, 기질로는 hydrocarbons (ACO, KCO, BCO, liquid paraffin, n-hexadecane, n-tetradecane)와 fatty acids(oleic acid, olive acid, lecithin, fish oil), 그리고, sugars(arabinose, trehalose, dextrose,

galactose, lactose, fructose, maltose, D-sorbitol, sucrose)를 각각 1% (w/v)씩 첨가하였으며 48시간 배양한 후 배양 시간에 대한 탄소원별 상대 균성장과 유화활성도를 비교하였다.

3) 질소원의 영향

천연 유화물의 최적생산과 관련된 질소원으로는 MLBM 구성 성분을 중심으로 하여 비교하였으며, 그 외에 peptone과 urea를 농도별로 첨가하여 1% (w/v) fish oil을 기질로 48시간 배양한 후 균 성장과 유화활성을 비교하였다.

4) 무기염류에 대한 영향

기본배지인 MLBM 성분 중에서 BSM의 성분을 하나씩 제거하여 1% (w/v) fish oil을 기질로 25°C, 180 rpm으로 48시간 진탕 배양하여 균 성장과 유화활성도를 비교하였으며, 그 중 유화활성에 가장 큰 영향을 미치는 무기염류에 대하여 농도별로 다시 25°C, 180 rpm으로 48시간 배양하여 균 성장과 유화 활성도를 비교하였다.

5) 초기 pH의 영향

천연유화물의 생산에 영향을 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 기본 배지의 pH를 2N-HCl 및 2N-NaOH로 pH 3.0~10.0까지 적정하였고, 25°C에서 180rpm으로 48시간 배양한 후 균성장과 원심분리하여 얻은 배양상층액으로부터 유화 활성도를 측정하였다.

6) NaCl 농도의 영향

NaCl 농도가 균성장 및 천연유화물 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여, MLBM에 NaCl 농도를 0~9%(w/v)까지 넣고 48시간 배양한 후 배양 상층액

으로부터 유화활성도를 측정하였다.

7) 최적배양시간의 검토

천연유화물의 최적생산을 위한 배양시간을 조사하기 위하여 최적 온도, 탄소원, 질소원, 무기염류, 배양온도, pH 등의 조건 하에서 180 rpm으로 진탕 배양하여, 4시간마다 시료를 채취하고, 배양시간에 따른 균 성장과 유화 활성도의 변화를 측정하여 최적 배양시간을 조사하였다.

(6) 천연유화물의 추출

각종 탄소원을 기질로 하여 균주를 배양한 후 그 배양액을 8,000g로 4℃에서 10분간 원심분리 한 다음 배양 상층액을 회수하였다. 회수한 배양 상층액은 5N-HCl로 pH를 2.0으로 맞춘 후 동량의 diethylether 또는 CM 혼합용매 (Chloroform : methanol = 1:1, v/v)로 10분간 magnetic stirrer로 추출하였으며 회전진공증발기로 농축하였다.

(7) 천연유화물의 분리·정제

농축하여 얻어진 시료는 silica gel이 충전된 column (2.5 × 100cm)을 이용하여 chloroform으로 먼저 잔존하는 기질을 제거한 후, CM 혼합용매 (chloroform : methanol = 1:1, v/v)를 사용하여 천연유화물을 분리후 농축하였다. 이렇게 얻어진 crude 천연유화물은 재차 silica gel이 충전된 column으로 CMW (chloroform : methanol : water = 60:25:4, v/v) 혼합용매를 이용하여 용출시켰다. Fraction collector로 분별 수집한 시료는 농축하여 TLC로써 순도를 확인하였다. 명확히 분리되지 않은 시료는 재차 회수하여 농축한 후, sep-pak silica cartridge(Waters Co., USA)를 이용하여 분리하였다. Sep-pak silica cartridge를 이용한 천연유화물 분리법에는 먼저 silica cartridge를

chloroform 20mL로 세척한 후, chloroform으로 녹인 시료를 silica cartridge에 넣고 시료를 흡착시켰다. 흡착시킨 시료는 chloroform, methanol을 이용하여 농도 비로 시료를 용출시켜 정제하였으며, 최종 순도확인은 HPLC (pharmacia LKB Co, Sweden)로 행하였다.

(8) HPLC 분석

정제된 천연유화물의 순도 분석에는 Aquasil SS-652N(8ψx250mm, Senshu Pak Co., Japan) column을 사용하였으며, UV detector로 $\lambda=265\text{nm}$ 에서 분석하였다. 이동상으로는 chloroform : methanol : water = 60 : 25 : 4(v/v)로 혼합한 용매를 사용하였으며, 유속은 0.5 mL/min으로 하였다.

(9) TLC를 이용한 구성성분 분석

정제된 천연유화물과 crude 천연유화물에 대한 구성성분은 TLC (Thin layer chromatography) 분석으로 확인하였다. TLC 분석에는 silica gel 60 F₂₅₄ glass plate(Merck Co., German)를 사용하였고 전개용매는 CMW (chloroform : methanol : water = 60:25:4, v/v)를 사용하였으며, 검출시약으로는 α -naphtoresorcinol, ninhydrine, rhodamin 6G를 사용하였다.

(10) 천연유화물의 구조분석

1) FT-IR spectrum 분석

시료는 정제된 천연유화물을 100°C, dry oven에서 농축한 후 시료와 KBr의 미분말을 균등하게 혼합하고 압착하여 투명한 원판을 만들어 측정하는 KBr법으로 조제한 후 FT-IR(Genesis Series, ATI matson Co., USA)로 측정하였다.

2) NMR 분석

정제된 천연유화물의 구조를 분석하기 위하여 NMR(unity INOVA 750 MHz, Varian, Australia) 실험을 행하였다. 시료 100mg을 CD₃OD에 녹여 high field NMR sample tube(5×180mm)에 넣은 후 750MHz NMR(unity INOVA 750MHz, Varian, Australia)로서 ¹H-NMR, ¹³C FT-NMR, DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) 분석과 2D-NMR인 NOESY(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), RELAY(Relayed Correlation Spectroscopy), TOCSY(Total Correlation Spectroscopy), HSQC(Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC(Heteronuclear Multiple-bond Correlation) 분석을 통하여 구조를 해석하였다.

(11) 천연유화물의 물리·화학적 특성

1) 표면장력의 측정

배양액으로부터 천연유화물을 분리 추출하여 농축한 후 silica gel column에서 chloroform으로 잔류 기질을 제거하고 CM혼합용매로 분리하여 농축한 시료를 crude 천연유화물로 정의하였다. 이 crude 천연유화물을 사용하여 표면장력계(TD-1, Lauda, German)로 표면장력을 측정하였으며, crude 천연유화물의 농도별(0, 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 25, 50, 100 mg/L)로 표면장력을 측정하여 CMC(critical micelle concentration) 값을 결정하였다. 또한 상업적으로 시판되고 있는 유화제(Triton X-100, SDS, Tween 80, Tween 40, Tween 20, Emulsan)와 조 천연유화물에 대해서 표면장력을 비교검토하였다. 이때 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 0.01%(w/v)의 유화제를 첨가하여 실험에 사용하였다.

2) pH에 대한 표면장력의 변화

Crude 천연유화물을 각각 10 mg/L씩 3종류의 buffer(pH3.0~6.0, 50mM citrate, sodium citrate buffer; pH6.0~8.0, 100mM phosphate buffer; pH 9.0~10.0, 50mM boric acid-NaOH buffer)에 넣고 표면 장력을 측정하였다.

3) 계면장력 측정

시판용 유화제(Triton X-100, SDS, Tween 80, Tween 40, Tween 20, Emulsan)를 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 0.01%(w/v) 넣고, 4%(w/v) ACO를 넣어 1분간 강하게 vortex 시킨 후 30분간 정치시킨 시료의 계면장력을 측정하였다. 계면장력의 측정은 표면장력계(TD-1, Lauda Co. Germany)를 사용하였다.

4) HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) value

Hydrophilic lipophilic balance의 측정은 정제된 천연유화물과 crude 천연유화물 및 시판용 유화제(Triton X-100, SDS, Tween 80, Tween 40, Tween 20, Emulsan)을 사용하여 Porter(1994)등에 의한 titration method로서 측정하였다. 측정은 0.01g의 각종 유화제를 10 mL의 D.W.에 녹인 후 4% (v/v) benzen과 96% (v/v) 1,4-dioxane이 혼합된 유기용제로서 적정을 하였다. 각종 유화제가 녹아있는 10 mL의 용액은 magnetic stirrer로 계속 교반하면서 적정하였으며, HLB 값은 clear한 종말점이 나올 때까지 계속 유기용제를 적하시켜 적하량으로 구하였다.

5) 유화활성 및 유화 안정성

각종 시판용 유화제(Triton X-100, SDS, Tween 80, Tween 40, Tween 20, Emulsan)와 crude 천연유화물을 각각 0.01 % (w/v)씩 넣고 Rosenberg E. 등

(1979)의 방법으로 유화활성도를 측정하였다. 유화안정성은 유화활성도 측정법과 동일한 방법으로 실험을 행한 후 10분 간격으로 620nm에서 흡광도를 측정하여 변화된 값의 기울기로부터 Kd 값을 산출하였다.

$$Kd = (\log X_2 - \log X_1) / 10$$

(X₁ : 진탕 후 10분 정치시킨 후의 흡광도 값,

X₂ : 매 10분 간격마다 측정한 흡광도 값)

6) 온도 및 열 안정성

천연유화물의 온도 및 열 안정성은 유화안정성 측정법과 동일한 방법으로 행하였으며, 온도별(20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100℃) 유화안정성을 측정하였다. 또한 열 안정성 실험을 위하여 천연유화물을 가압멸균기를 이용하여 121℃에서 10분간 고온 가압한 후 열처리를 하지 않은 시료와 열 안정성을 비교하였다. 실험은 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 0.01 %(w/v)의 crude 천연유화물을 첨가하여 사용하였다.

2. 천연유화물의 최적 발효생산 조건 검토

(1) 사용균주 및 배지

남해안 유류오염 지역으로부터 분리하여 천연유화물 생산능이 우수한 균주를 사용하였다. 기본 배지 성분(MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, KH₂PO₄ 1.0, K₂HPO₄ 0.5, NaNO₃ 2.0, CaCl₂ 0.01, KCl 0.1, urea 0.01 g/L, pH 7.0)에서 배양하였다.

(2) 종균 배양

보존용 고체배지로부터 single colony를 50 mL 기본배지에 기질로 1% (w/v) fish oil를 첨가한 250 mL erlenmeyer flask에 접종하여 25°C, 180 rpm으로 40시간 동안 진탕 배양한 후 발효조에 접종하였다.

(3) 회분발효 (Batch fermentation)

천연유화물의 생산량을 증가시키기 위하여 7 L Jar fermentor (BEST KOREA Co., Ltd.)에 working volume을 3 L로 하여 회분 배양하였다. 회분배양 조건은 flask 배양을 통하여 얻어진 최적 배양배지 조건을 사용하였다. 최적생산을 얻기 위한 발효배양 조건으로 온도 25°C, 초기 pH 7.0, 교반속도 100~350 rpm, 통기량 0.33, 0.5, 0.67, 1.0 vvm, 종균 접종량 1, 1.5, 2.0% (v/v), 기질농도 0.5~3.0% (w/v) fish oil의 범위에서 배양을 실시하였다. 그리고 시간별 유화활성도, 천연유화물의 생산량, 균성장 및 기질소비량을 조사하기 위해 12시간마다 35 mL씩 시료를 채취하였다.

(4) 균체 건조 중량 (dry cell weight)

천연유화제 생산균주의 biomass량을 구하기 위하여, 시간별로 sampling 한 시료 10 mL를 원심분리하여 (10,000g×10min, at 4°C) pellet을 수집하였으며, 이 pellet을 30 mL 증류수로 washing 한 후 다시 원심분리하여 상층액은 버리고, pellet을 회수하였다. 이 과정은 2회 반복 실험하였으며, 회수된 pellet은 미리 건조하고 정량화된 알루미늄 컵을 이용하여, 110°C dry oven에서 12시간 건조한 후 무게로 정량하였다.

(5) 유화활성도 (Emulsifying activity) 측정

균주를 배양한 배양액을 원심분리 (10,000g×10min)한 후, 배양상층액 1.25

mL에 n-hexadecane : 2-methylnaphtalene을 1 : 1로 혼합한 시약 0.05 mL와 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 3.7 mL를 넣고 vortex로 1분간 강하게 교반하여 10분간 정치시킨 후 O.D. 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 유화활성도 1 unit는 배양상층액 1.25 mL에 대한 유화흡광도 0.1을 1 unit로 환산하였으며, 흡광도 2.0 이상에서는 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 희석하여 사용하였다.

(6) 기질소비량 측정

배양과정 중 기질소비량은 유기용매 추출에 의한 중량법으로 계산하였다. 기질소비량을 구하기 위해서 배양액 20 mL에 n-hexane을 20mL 첨가하여 분별깔대기에 넣고 1분간 혼합한 후 20분간 정치시켜 추출하등액은 버리고 상등액만 무수 Na₂SO₄으로 수분을 제거한 후, 미리 건조하여 정량화된 알루미늄 컵을 이용하여 dry oven에서 4시간 건조하여 중량한 것으로 잔존 기질량을 측정하여 기질소비량으로 환산하였다.

(7) 천연유화물의 정량화

배양과정 중에 생산된 천연유화물 정량을 위하여 Orcinol assay 법과 유화활성 측정법으로 정량화를 시도하였다.

천연유화물의 정량을 위하여 Koch 등 (1991)에 의한 orcinol assay 법을 사용하였다. 이 방법은 원심분리하여 얻은 배양상층액 0.1 mL를 53% H₂SO₄ 용액에 0.19 % orcinol이 녹아있는 반응시약 0.9 mL에 첨가하여 100℃ 끓는 물에서 20분간 중탕가열하고 15분간 실온에서 정치시킨 후 O.D. 421nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 표준곡선은 Sigma 사로부터 구입한 rhamnose (특급시약)를 0, 10, 20, 30, 40, 50µg씩 orcinol 반응시약에 넣고 반응시킨 값을 사용하였다.

1) 표준곡선의 작성

당정량법인 orcinol 방법을 이용하여 rhamnose를 표준당으로 하여 농도별 (0, 10, 20, 30, 40, 50 μ g)로 반응시켰으며, O.D. 421nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다. 또한 정제된 천연유화물과 crude 천연유화물을 이용하여 농도별 (0, 50, 100, 150, 200 μ g)로 표준곡선을 작성하였다.

2) 천연유화물 농도에 따른 유화활성도의 변화

정제된 천연유화물과 crude 천연유화물로 각 농도 (0, 50, 100, 150, 200 μ g)에 따른 유화활성도의 변화를 Rosenberg 등 (1979)의 방법에 의하여 측정하였다.

3) 회분발효배양액을 이용한 천연유화물의 정량화

앞서 작성된 표준곡선과 천연유화물 농도에 따른 유화활성도의 변화곡선을 이용하여 발효 배양액에 대한 정량화를 시도하였다. 발효배양은 7L Jar fermentor (BEST KOREA Co., Ltd.)를 이용하여 working volume 3L, 교반속도 200 rpm, 배양온도 25 $^{\circ}$ C, 통기량 0.67 vvm (volume of gas per volume of reactor per min)의 조건으로 배양하였으며, 측정에 이용된 시료는 12시간별로 채취한 시료를 사용하였다.

(8) 반회분발효 (Fed-batch fermentation)

반회분발효는 기질을 연속적으로 또는 반연속적으로 공급하는 반면에 유출액을 불연속적으로 제거하는 배양법이다(Fig3). 이러한 방법은 기질을 공급함에 있어 기질저해 또는 이화생성물 억제를 극복하기 위하여 기질의 공급 농도를 조절함으로써 발효의 생산성을 증가시킬 수있다. 반회분발효 실험은 7 L Jar fermentor(BEST KOREA Co., Ltd.)를 이용하여 초기 working volume

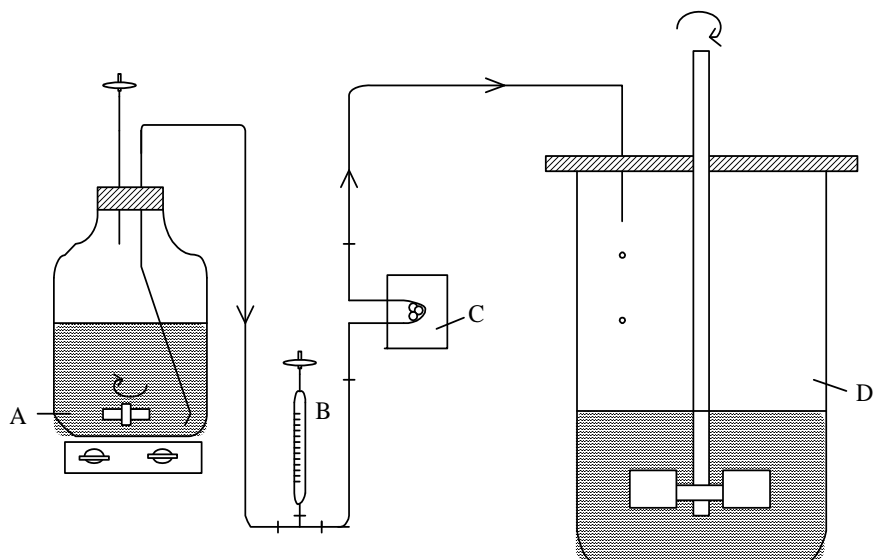


Fig. 3. Schematic diagram of a fed-batch culture system.

(A) Feed reservoir; (B) flow meter assembly; (C) peristaltic pump

(D) STR (Stirred Tank Reactor)

3L, 온도 25℃에서 회분배양을 실시하다가, fish oil의 농도가 떨어질 때 기질 공급농도 및 공급량을 달리하여 발효조에 주입하였다. 초기 배양액 및 공급배양액은 기질로 fish oil을 첨가한 기본배지를 사용하였고, 공급배양액의 경우 수용성인 배지와 fish oil의 비혼합성 해소방안으로 기본배지와 fish oil을 따로 따로 공급하였다.

(9) 연속발효 (Continuous fermentation)

연속발효는 발효조에 신선한 배지를 일정 속도로 공급하고, 이것과 동량의 배양액을 연속적으로 배양조 외로 배출함으로써, 발효조내의 액량이 언제나 일정하게 유지되도록 고안된 배양법이다(Fig.4). 회분발효배양에서는 초기 기질농도가 소비되면 배양을 종료하지만, 연속배양에서는 이론적으로 무한하게 배양을 지속할 수가 있다. 일반적으로 회분배양에서는 미생물의 증식과 함께 기질소비, 대사생산물의 축적이 진행되어, 미생물이 처한 환경조건(균체농도, 기질농도, 생산물 농도, pH 등)이 배양시간의 경과에 따라서 항상 변한다. 이것에 비해 연속배양에서는 이들의 인자가 언제나 일정하게 유지되는 생태-정상상태(Steady-state)를 계속적으로 유지할 수 있다는 장점이 있다. 이것은 공급된 기질량과 그것을 소비하여 증식된 균체량 및 유출량 사이에 균형이 성립된 것을 나타내므로, 연속발효는 균체생장과 산물 생성에 필요한 일정한 환경조건을 마련해 주어 균일한 질의 산물을 공급받을 수 있다. 따라서 얻어진 최적 회분배양 조건을 기초로 하여 천연유화물의 연속발효를 실시하였다. 연속배양은 7 L Jar fermentor를 이용하여 working volume 3 L, 교반속도 200 rpm, 통기량 0.67 vvm의 조건으로 배양하였다.

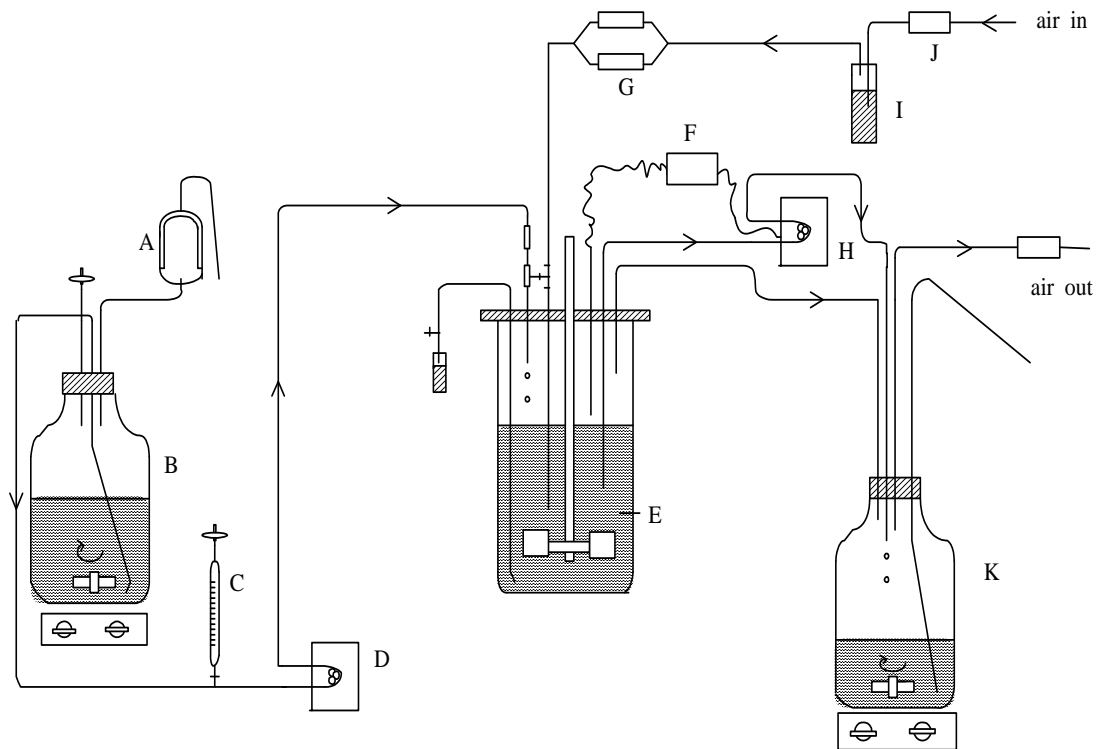


Fig. 4. Schematic diagram of a laboratory chemostat culture.
 (A) Medium filter; (B) feed reservoir; (C) flowmeter assembly;
 (D) peristaltic pump (feed); (E) STR (Stirred Tank Reactor);
 (F) level control module; (G) double air filters;
 (H) peristaltic pump (product); (I) air humidifier; (J) air filter;
 (K) product receiver

3. 균체 고정화법을 이용한 천연유화물의 생산

천연유화물을 연속생산하기 위한 방법으로, 균체를 재 사용할 수 있고 반응기 내의 높은 균체 농도 유지가 가능하며 미생물 대사활동의 안정성 등의 장점을 지니고 있는 고정화 기술을 사용하였다. 고정화 방법에는 크게 담체결합법, 가교법, 포괄법 등이 있는데 균체 고정화의 경우 균체 유실이 적은 포괄법이 자주 사용되고 있다. 이런 고정화법에 사용되는 지지체의 종류는 천연고분자, 합성고분자, 무기물 등 여러 가지가 있지만 미생물에 독성이 없으며, 경제적이고, 비드 강도 및 내구성이 우수한 합성고분자인 modified polyvinyl alcohol을 이용하여 고정화하였다. 마지막으로 air lift 반응기를 이용하여 천연유화물의 연속생산을 모색하고자 하였다.

(1) 균체의 고정화 방법

고정화 지지체로는 비드 강도 및 내구성이 우수한 합성고분자인 modified polyvinyl alcohol (MPVA)을 사용하였다. 먼저, 균체를 얻기 위해서 7 L Jar fermenter (BEST Korea Co. Ltd., Korea)를 이용하여 working volume 5.5 L, 0.3 vvm의 통기율, pH 7.0, 교반속도 200 rpm, 25°C의 조건으로 배양한 후, 배양액을 10,000×g, 4°C, 10분으로 원심분리하였다. 분리된 pellet을 지지체에 혼합하여 고정화에 사용하였다(Fig. 5). 고정화 지지체로 이용된 MPVA는 PVA의 단점을 보완한 것으로 젤화되는 동안 PVA 용액에 소량의 alginate를 첨가하여 비드를 제조하고, 제조된 비드를 phosphate 용액 처리를 통하여 alginate를 다시 용출시킴으로써 적당한 구멍(pore)이 형성되게 하여 기질 투과성이 약한 PVA 비드 내의 투과성을 증가시키는 방법이다. 본 실험에서는 최적농도로 10 %(w/v) PVA (Av. M.W. 70,000~100,000 Sigma chemical Co., USA)와 0.5 %(w/v) alginate (Sigma Chemical Co., USA)을 약 2 % (w/w)에서 10 %(w/w)의 균체 농도로 각각 혼합한 다음, 포화된 boric acid용액과 0.3 M

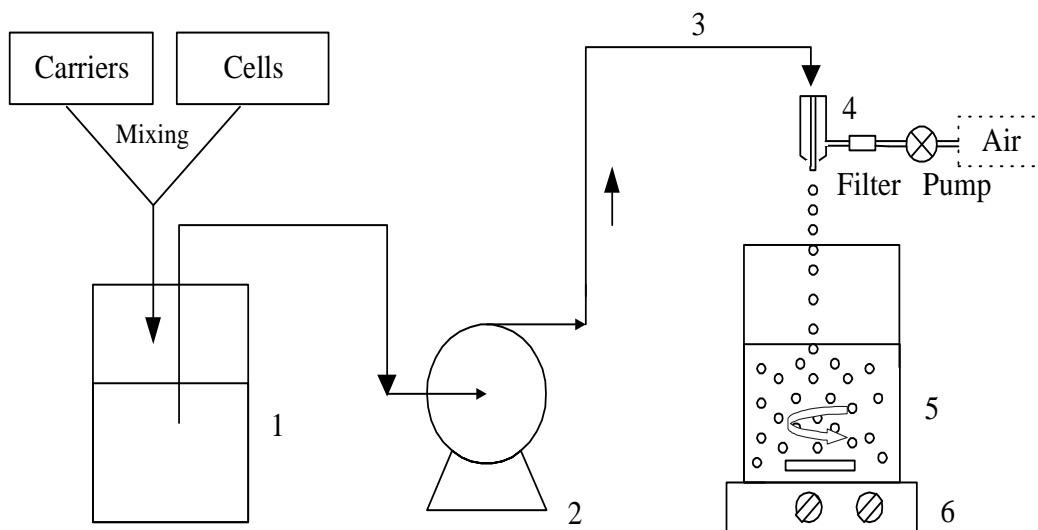


Fig. 5. Immobilization procedure of *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P.

- | | |
|-------------------------------|---------------------|
| 1. Carriers and cells mixture | 2. Peristaltic pump |
| 3. Silicon tube | 4. Syringe |
| 5. Gelling solution | 6. Magnetic stirrer |

CaCl₂ · 2H₂O가 섞인 용액에 적하시키며 교반기로 1 시간동안 가볍게 교반하며 완전구형의 비드를 제조하였다. 형성된 비드의 강도를 높이고 비드내의 alginate를 녹여내기 위해 Sodium phosphate 용액 (0.3 M NaH₂PO₄ · 2H₂O, pH 4.5)에 옮겨 일정시간 교반한 후, 제조된 비드들을 멸균된 증류수로 세척하여 4℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

(2) 고정화 균체의 배양

고정화된 균체를 배양하기 위한 배지 조성은 다음과 같다. MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g; FeSO₄ · 7H₂O, 0.01 g; KH₂PO₄, 0.20 g; K₂HPO₄, 0.1 g; NaNO₃, 0.4 g; CaCl₂, 0.01 g 그리고 KCl, 0.1 g을 1 L 증류수에 녹여 사용하였고, 120 rpm, 25℃ shaking incubator에서 배양하며 실험을 실시하였다.

(3) 비드의 강도 측정

고정화 비드의 강도는 texture analyser (TA-XT2i, Stable Micro systems, UK)를 사용하여 측정하였다. 이때의 비드 강도는 hardness와 springiness로 측정하였는데, 압축되는 거리는 비드 지름의 70%, 시간은 3 sec의 조건으로 실험하였다.

(4) 고정화된 비드의 관찰

주사 전자현미경 (Hitachi S-2400 SEM, Japan)을 이용하여 배양시간에 따른 고정화된 비드 내의 균체를 관찰하였다. 먼저 glutal aldehyde로 비드를 고정화한 후 액체 질소를 이용하여 비드를 절단하고, 30, 50, 80, 90, 95 % (v/v)로 희석한 에탄올에 순차적으로 침지하여 수분을 제거하고, 금코팅 한 후 비드 내부의 균체 분포를 주사 전자 현미경으로 확인하였다.

(5) Air lift 생물반응기

1.8 L Air lift 생물반응기(BEST Korea Co., Ltd. Korea)를 사용하여 고정화 균체를 이용한 천연유화물의 연속생산을 실시하였다(Fig. 6). 반응 조건으로는 1% (v/v) fish oil, 0.5 vvm의 통기량, 1.2 L 샘플부피로 회분 배양하였고, 연속 배양으로는 통기량 0.5 vvm, flow rate 25 mL/h, 그리고 희석율 0.02 h⁻¹의 조건으로 수행하였다.

4. Pilot plant (200 L fermentor)를 이용한 대량생산

천연유화물 대량생산을 위해 Scale-up된 fermentor에서 천연유화물의 생산량을 검증한 후 제품화 가능성을 최종적으로 검토할 필요가 있다. 천연유화물 대량 발효 생산을 위한 배양조로 200 L fermentor (한국발효기, automatic system)를 이용하여 초기 working volume 120 L, 2.5% (v/v) fish oil을 넣어 최적 조건을 구하기 위한 통기량 및 교반 속도를 달리하여 배양하였다.

5. 대량분리 공정법 개발

발효 생성물의 회수와 분리·정제는 어떤 상업적인 공정에서도 필수적이다. 발효액의 화학적 성질이 아주 복잡하거나 순도 높은 생성물이 요구되는 경우, 분리와 정제는 많은 공정단계를 필요로 한다. 발효생산물의 분리와 정제에 차지하는 비용은 전체 제조 비용 중 20 - 60 %를 차지하므로 어떤 경우에는 제조비용에 있어서 생성물 생산보다 더 많은 비용이 든다. 공정의 수율을 높이기 위해서는 공정장치의 선택이 중요하고 공정에 사용하는 장치는 배양이 끝난 배양물을 허용된 시간내에서 처리될 수 있도록 하는 적절한 처리능력을 가지고 있어야 한다. 따라서 대량생산을 위해서 천연유화물의 수율도 높이고 분리·정제비용도 절감할 수 있는 공정법을 개발하였다.

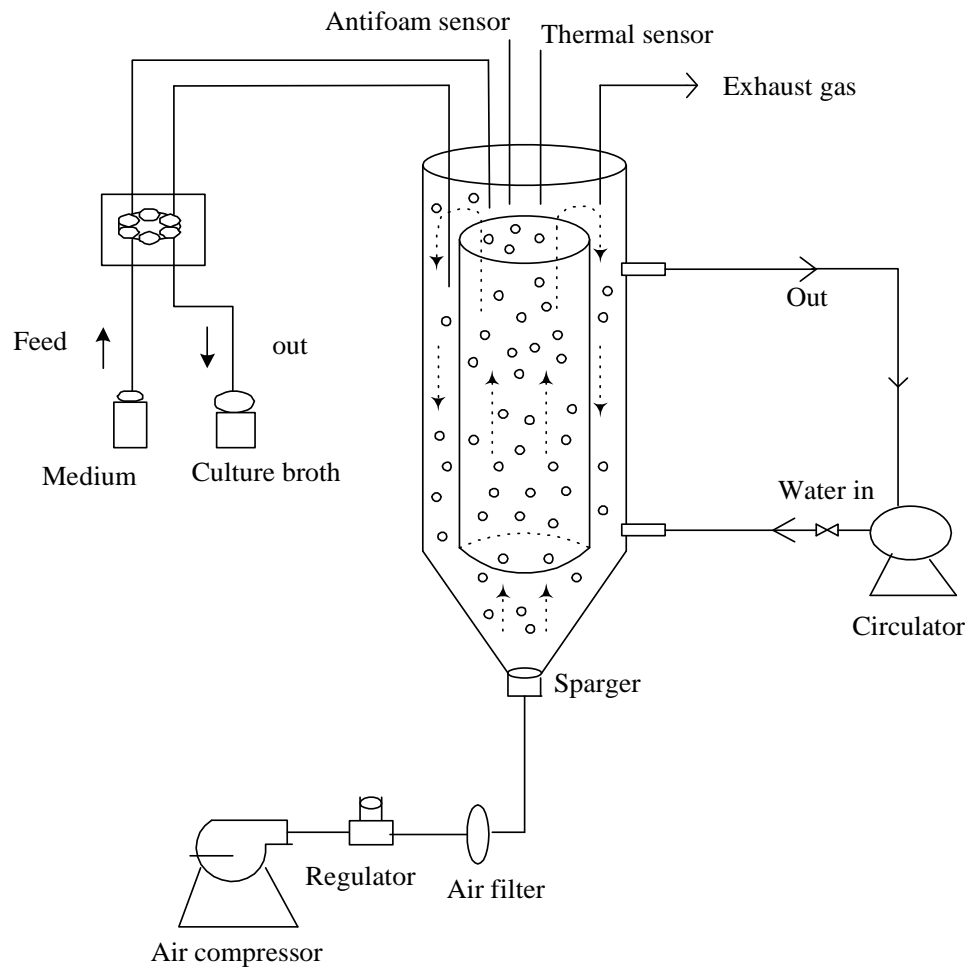


Fig. 6. Schematic diagram of the Air-lift bioreactor.

Total volume : 1.8 L Drafter diameter : 60 D x 200 H
 Vessel diameter : 100 mm Air flow rate : 0.5-5 NL/min
 Vessel depth : 320 mm Micro sparger : 20 μ /min

6. 수산가공제품에의 응용

생산된 천연유화물의 수산가공제품으로의 응용방안을 검토하기 위하여 천연유화물을 첨가한 수산가공제품 - 어묵을 제조하여 여러 가지 물성을 검토하였다.

(1) 실험재료

본 실험에 사용한 연육은 부산소재 (주)성진 수산에서 명태 연육(RA등급)을 구입하여 실험실로 운반한 후 500g단위로 잘라 -20℃의 냉동고에서 보관하면서 어묵 제조에 사용하였다.

(2) 어묵의 제조

천연유화물을 첨가한 어묵의 제조는 다음과 같이 세 가지로 나누어 행하였다.

1) 천연유화물과 일반 유화물의 복합첨가

유화제의 첨가가 어묵의 물성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각종 유화제를 복합 첨가하여 어묵의 물성 변화를 측정하였다. 조성은 Table 1에 나타내었다.

냉동고기풀을 얇게 절단하여 반해동시킨 다음 잘 마쇄한 다음 각각 생물유화제 및 유화제를 0.5 % 씩 첨가하고 수분함량을 얼음물과 오일을 78 %로 맞추는 뒤 균질기로 5분간 혼합하고 2 %의 NaCl를 첨가하여 다시 5분간 균질기로 균질화시킨 후, sausage 충전기(Buffalo, Sausage Maker, NY, USA)를 사용하여 polyvinylidene chloride(Φ 3.0 cm \times 25 cm) 필름에 충전, 결속하여 90℃에서 40분간 가열하고 냉각수에 다시 40분간 냉각한 뒤 90℃에서 30초간 주름펴기를 하고 비닐 백에 넣어 18시간 냉장 보관한 후 겔의 특성 실험에 사

Table 1. surfactants and biosurfactant formulation by two-level design

No.	surimi (g)	moisture(mL)		salt (g)	Biosur- factant (g)	GT- 1000 (mL)	Tween- 20 (mL)	Elimi- nator (mL)	total (g)
		water (mL)	oil(mL)						
1	200	85.90		8.84	0	0	0	0	294.74
		83.32	2.58						
2	200	97.99		9.31	0	0	1.55	1.55	310.25
		95.05	2.94						
3	200	97.99		9.31	0	1.55	0	1.55	310.25
		95.05	2.94						
4	200	97.99		9.31	0	1.55	1.55	0	310.25
		95.05	2.94						
5	200	97.99		9.31	1.55	0	0	1.55	310.25
		95.05	2.94						
6	200	97.99		9.31	1.55	0	1.55	0	310.25
		95.05	2.94						
7	200	97.99		9.31	1.55	1.55	0	0	310.25
		95.05	2.94						
8	200	111.44		9.82	1.6375	1.6375	1.6375	1.6375	327.49
		108.10	3.34						

용하였다.

2) 천연유화물 농도별 첨가

천연유화물 첨가에 의한 어묵의 물성변화를 조사하기 위하여 0~0.4 % 농도별로 달리 첨가하여 어묵을 제조하였다.

냉동고기풀을 얇게 절단하여 반해동시킨 다음 잘 마쇄한 다음 천연유화물을 각각 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 및 0.5 % 첨가하고 수분함량을 얼음물과 오일을 78%로 맞춘 뒤 균질기로 5분간 혼합하고 2%의 NaCl를 첨가하여 다시 5분간 균질기로 균질화시킨 후 sausage 충전기(Buffalo, Sausage Maker, NY, USA)를 사용하여 polyvinylidene chloride(Φ 3.0 cm \times 25 cm) 필름에 충전, 결속하여 90℃에서 40분간 가열하고 냉각수에 다시 40분간 냉각한 뒤 90℃에서 30초간 주름펴기를 하고 비닐 백에 넣어 18시간 냉장 보관한 후 겔의 특성 실험에 사용하였다(Table 2).

3) 재료의 혼합 순서에 따른 영향 조사

연육과 나머지 재료의 혼합에 있어 혼합 순서가 어묵의 물성에 어떠한 영향을 미치는가를 살펴보기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

어묵에 첨가되는 어육, soy protein concentrate, 천연유화물, vegetable oil, 얼음물, NaCl의 혼합과정에 있어 soy protein concentrate 3%, 천연유화물 0.1%, vegetable oil 6%, 얼음물을 따로 혼합하여 emulsion 형태로 만든 후 어육을 넣어 혼합한 경우(Table 3의 No. 1, 2)와 이전의 실험과 동일하게 한꺼번에 혼합하여 어묵을 제조한 경우(Table 3의 No. 3, 4)로 나누어 제조하였다.

나머지 제조방법은 이전의 실험과 동일하게 하였다.

Table 2. Formulas for preparation of fish meat paste containing biosurfactant

No.	surimi (g)	moisture(mL)		salt (g)	Biosur- factant (g)	total (g)
		water (mL)	vegetable oil(mL)			
1	200	60.68		5.32	0	266.00
		57.04	3.64			
2	200	61.17		5.33	0.13	266.63
		57.50	3.67			
3	200	61.67		5.35	0.27	267.27
		57.97	3.70			
4	200	62.67		5.37	0.54	267.55
		58.91	3.76			
5	200	63.68		5.40	0.81	269.84
		59.86	3.82			
6	200	64.70		5.42	1.08	271.15
		60.82	3.88			
7	200	65.73		5.45	1.36	272.47
		61.79	3.94			

Table 3. Formulas for preparation of fish meat paste containing biosurfactant

No.	surimi (g)	moisture(mL)		soy protein concentrate(g)	Biosur- factant(g)	salt (g)	total (g)
		ice/water (mL)	vegetable oil(mL)				
1	200	82.95		8.92	0	5.95	297.38
		77.97	4.98				
2	200	84.31		8.97	0.299	5.98	299.12
		79.25	5.06				
3	200	82.95		8.92	0	5.95	297.38
		77.97	4.98				
4	200	84.31		8.97	0.299	5.98	299.12
		79.25	5.06				

1, 2의 경우 soy protein concentrate, biosurfactant, oil, ice/water를 미리 혼합
 3, 4의 경우 앞의 실험방법과 동일

(3) 물성의 측정

물성은 Okada의 방법으로 측정하였다. 실린더형의 시료($\psi 3 \times 3$ cm) 위에 지름 5mm의 구형(球形) plunger를 장착하여 60 mm/min의 속도로 올리면서 rheometer(Rheometer, Model CR-100D, Sun Scientific Co., Tokyo, Kapan)로 파괴강도(g)와 변형(mm)값을 측정하였다.

(4) 색도 측정

CIE Lab color는 색차계(ZE-2000, Nippon Densoku, Japan)를 이용하여 겔의 표면 색도(L, a, b)를 측정하여 백색도 지표, L-3b를 이용하여 계산하였다. 측정은 시료 5개 이상을 측정하여 평균값으로 구하였다.

(5) 최적 formulation

어육 단백질 겔의 물성에 미치는 천연유화물 및 유화제의 종류에 따른 영향을 검토하기 위하여 통계 프로그램인 JMP를 이용하여 실험 계획에 따라 가장 유효한 유화제를 선별하였다. 그리고 screening design을 통하여 겔 강화에 효과가 있는 천연유화물과 타 유화제를 인자로 설정하였다.

(6) 통계분석

표준편차, 유의성 검증은 SAS 통계 패키지에 의한 ANOVA 및 Duncan's multiple range test로 실시하였다.

■ 제2세부과제 : 해양생물유래 천연유화물의 기능성 및 안전성 검토

1. 천연유화물의 항균활성 및 독성 검사

(1) 항균활성(DISC법)

항균활성을 알아보기 위해 KCTC에서 항균 테스트용 *E. Coli* 균주를 분양 받아 사용하였다. 천연유화제를 원심분리하여(20,000rpm, 30min) 고형성분을 제거한 후 각 농도별로 증류수에 녹여서 0.22 μ m 주사기필터를 이용하여 무균적으로 여과하여 실험에 이용하였다. 실험균을 LB배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 400rpm으로 진탕 배양한 후 UV-Spectrophotometer로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 O.D. (Optical density)가 1이 되게 조절하여 실험에 사용하였다.

천연유화제가 항균활성이 있는지 여부를 먼저 확인하기 위하여 DISC 법으로 다음과 같이 예비실험을 수행하였다. 세균배양액 100 μ L을 평판배지에 도말하고 시료를 농도별로 10 μ L씩 멸균된 DISC에 흡습시켜 세균 plate에 심은 후, 37 $^{\circ}$ C의 배양기에서 24시간 배양한 다음 clear zone이 나타나는지 여부를 동량의 증류수를 DISC에 흡습시킨 대조군과 비교 관찰하였다.

(2) Microplate reader를 이용한 MIC TEST

96 well microplate의 각 well에 1.0×10^4 cells/mL 의 *E. coli*를 함유하는 100 μ L의 tryptic soy broth를 가하고, well 당 시료용액이 10 %가 되도록 조제하여 100 μ L를 첨가하고 이 농도로부터 단계적으로 두 배씩 희석되도록 하여 10%에서 0.0049%가 되도록 well에 준비하였다. Microplate reader 내에서 37 $^{\circ}$ C, 18시간 배양하면서 흡광도 600nm에서 세균의 성장을 측정하여 MIC

(minimum inhibition concentration) 농도를 구하여 항균활성능력을 조사하였다.

(3) 급성독성검사

급성독성검사에 사용된 실험동물은 SD 계통의 수컷 랫트와 ICR 계통의 수컷 마우스로 특정병원균이 부재된 것으로 한국화학연구소 안전성연구센터 실험동물육종실에서 구입하여 실험에 사용하였다. 독성시험에 적당한 실험동물로서 현재 급성독성시험에 가장 널리 사용되고 있는 랫트와 마우스를 선택하였으며 종간의 특성차이를 보기 위해서 두 종류의 실험동물로 실시하였다. 동물입수 후 외관을 육안으로 검사하고, 실험을 실시하는 동물사육실에서 7일간 순화시킨 후 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 사용하였다.

동물사육실의 환경조건은 실내온도 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 15\%$, 12시간 (오전 8시~오후 8시) 주기로 명암을 조절하였고, 고품사료와 수분을 충분히 공급하였다. 실험기간 중 사육실 온·습도는 자동 온·습도측정기로 매시간마다 측정하였으며, 실험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동사항은 발견되지 않았다.

실험동물의 입수시 마우스와 랫트는 모두 3주령이었고, 이 때 랫트와 마우스의 체중은 각각 평균 69.5g과 16.9~18.2g이었다. 투여 개시 시 실험동물은 4주령이었고, 체중은 랫트의 경우 119.3~136.1g이고, 마우스의 경우는 21.2~22.4g이었다. 예비실험의 경우, 투여개시시 동물수는 각각 10마리였고, 본실험의 경우는 각각 25마리였다.

급성독성검사에 사용된 천연유화제는 예비시험 한계용량인 2000 mg /100 g body weight를 기준으로 1000 mg씩 늘려 3000, 4000, 5000, 6000, 7000 mg / 100 g body weight까지 투여하여 사망을 일으키는 용량수준을 확인하였으며, 대조군은 천연유화물을 투여하지 않고 생리식염수만 동량 투여하였다. 투여

전날 하룻밤을 절식시킨 후 일회용 주사기를 이용하여 투여 당일 오전에 개체 별로 단회 복강투여하였다. 복강투여 후 6시간까지는 한시간 간격으로, 14일까지는 매일 1회 이상 일반증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다. 실험종료 후 생존동물을 에테르로 마취시키고 개복하여 방혈치사시킨 후 육안으로 모든 내부장기를 관찰하였고, 채취한 혈액은 혈액분석기로 대조군과 투여량에 따른 차이를 비교·분석하였다. 혈액의 생화학적 검사는 BUN (Blood Urine Nitrogen), Blood glucose, Serum protein, serum albumin, total cholesterol, Triglyceride 항목으로 분석하였다.

(4) 항돌연변이 효과

직접 돌연변이 유발원으로 사용된 N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG)은 미국 Sigma사로부터 구입하여 증류수에 2 μ mol의 농도가 되도록 녹여서 사용하였고, *Samonella typhimurium* LT-2의 Histidine 영양요구성인 *Salmonella typhimurium* TA100은 인제대학교 식품영양학과 화학공학연구실로부터 분양받아 실험에 사용하였다.

항돌연변이원성은 2 μ mol의 MNNG를 함유하는 500 μ L의 0.2 M 인산 완충액에 100 μ L의 전배양된 균주인 *Salmonella typhimurium* TA 100(2×10^9 cells / mL)와 100 μ L의 시료를 ice bath에 담긴 cap tube에 넣고 가볍게 vortex 한 후 Minimal glucose agar plate에 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 48시간배양한 후 복귀주의 수를 측정하여 아래의 식에 의해 돌연변이 억제효과의 정도(Inhibion rate)를 계산하였다.

$$\text{Inhibition Rate(\%)} = 100 \times [(a-b)/(a-c)]$$

a : 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이의 수

b : 시료를 처리하였을때의 복귀돌연변이의 수

c : 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연복귀돌연변이의 수

실험에 사용된 천연유화제의 농도와 돌연변이 유발물질인 MNNG의 농도는 예비 실험을 통하여 결정하였다.

2. 중금속흡착능(In vitro)

시료인 천연유화제를 5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.3125%로 24-well에 첨가하고, 무첨가군을 대조군으로 한 후, 100ppm의 중금속 납(Pb), 아연(Zn), 철(Fe), 카드뮴(Cd)을 가해 37°C의 진탕항온수조(120rpm)에서 0분, 5분, 15분, 30분, 60분으로 각각 반응시킨 후, 14,000rpm에서 5분간 원심분리하여 천연유화물을 제거한 후 상층액을 조심스럽게 분리하여 ICP-AES(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer; Optima-3300XL, Perkin Elmer, USA)로 분석하였다.

3. 항종양활성

(1) In Vivo

유방암세포(MCF-7)와 사람의 간암세포(SNU 368)을 동아대학교 의과대학 생화학교실에서 분양받아 계대배양하여 실험에 이용하였다. 부착성 세포인 MCF-7과 SNU 368을 trypsin으로 처리하여 세포를 플라스크 바닥으로부터 떼어낸 후 RPMI-1640(Serum free) 배양액으로 중화시키고, 5 분간 1,500 rpm의 조건으로 원심분리하여 세포를 침전시킨 후 10 mL의 RPMI-1640 배양액(with 10% Fetal bovine serum)을 가해 단일 세포부유액을 조제하였다. 세포의 적정농도(2×10^4 개)를 예비실험을 통해 알아내었고, multichannel pipette을 이용하여 각 well에 180 μ L의 세포부유액을 접종하였다. 시료인 천연유화제는 증류수에 0.001, 0.01, 0.1, 0.5 %로 되도록 녹인후 멸균처리한 0.45 μ m membrane filter를 통과시켰다. 시료를 농도별로 20 μ L씩 세 개의 well에 첨

가하여 triple test가 되도록 하였다. 대조군으로서 세포부유액에 시료 대신 PBS만을 20 μ L 첨가하여 100 % 생존군으로 삼았다. 암세포와 시료가 접종된 well plate를 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 상태의 incubator에서 0, 1, 2, 3 일간 배양하였다. 지시한 시간대의 plate는 각각의 well에 0.1 mg (50 μ l of 2 mg/mL)의 MTT를 가해주고 다시 37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 하에서 4 시간 더 배양하여 MTT가 환원되도록 하였다. 배지를 모두 제거하고 well내에 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해시키기 위하여 DMSO를 100 μ L 씩 가한 후 약 15분간 가볍게 진탕한 뒤, 96-well plate용 광도계 (ELISA reader)로 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

시험군의 세포 생존율은 다음과 같이 계산하였다.

$$\frac{\text{mean optical density in test well}}{\text{mean optical density in control well}} \times 100$$

(2) In Vitro(DNA/Methylgreen assay)

표준물질 Distamycin A와 시료인 천연유화제 간의 50% Inhibition Concentration(IC₅₀)값을 구함으로서 시료의 항암활성 정도를 DNA/Methyl green Assay에 의해서 측정하였다. 표준물질 Distamycin A를 에탄올에 0.001, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 70, 100 μ g/mL 가 되도록 조제하고, 시료인 계면활성제도 같은 농도가 되도록 조제하였고, 대조군은 에탄올로 준비하였다.

DNA / methylgreen (20 mg)은 100 mL의 0.05M Tris-HCl, pH7.5 buffer (containing 7.5mM MgSO₄)에 녹여 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 stirring시키면서 완전히 용해시켰다.

시료와 표준용액 각각을 농도별로 20 μ L씩 가하고 DNA/methylgreen용액을

180 μ L 씩 가한 즉시 630nm에서 흡광도를 측정하고, 25 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시킨 후 630nm로 흡광도를 측정하여 IC₅₀ 값을 구하였다.

4. 항체 생성능

(1) 실험동물의 면역화

실험에 사용한 동물은 BAL/c Female로 생후 6주인 것을 사용하였고, 사육시 물과 사료는 충분한 양을 공급하였다. 항원인 carrier protein으로서는 KLH(keyhole limpet hemocyanin, Sigma H5654, 10mg)을 인산완충용액 2mL에 녹여 사용하기 직전까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. Adjuvant는 Sigma 사로부터 구입(Sigma F 5881, Freund's Adjuvant, complete)하여 carrier protein과 동량으로 섞어서 마우스당 400 μ L씩 투여하였다. 시료는 PBS를 사용하여 1% (10 mg/mL)되게 조제한 뒤 5일간 마우스당 400 μ L씩 투여하였고, 대조군은 여과한 PBS를 동량으로 투여하였다. 투여10일후 실험동물을 희생시켜 비장을 적출한 후 세포를 분리하였다. 이때 비장세포는 대부분이 B세포로 이루어져 있다.

(2) 세포배양

DMEM with HEPES(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma D5648)을 구입하여 3차 증류수 1 L에 녹인 후, 여기에 sodium bicarbonate 3.7g을 넣고 HCl로 pH를 7.2로 맞추었다. 이것을 500mL로 나누어 0.45 μ m로 filter sterilization 한 후, sodium pyruvate(\times 100) 5 mL, Fetal calf serum 50 mL, Non-essential amino acid 5 mL, 2-mercaptoethanol(\times 100) 0.5 mL, penicillin-streptomycin(\times 200) 2.5 mL, 열처리한 Fetal bovine serum 50 mL를 무균적으로 첨가한 다음 2-6 $^{\circ}$ C에서 첨가하여 배지로 사용하였다. 분리한 세포를 1×10^7 개가 되도록 배지에 부유시킨 후, 72 시간동안 5% CO₂배양기로 배양하였

다. 72시간 배양 후 세포배양액을 원심분리하여 세포를 제거하고 상층액은 mouse IgG antibody 검출에 사용하였다.

(3) 항체 Detection

Mouse의 IgG를 검출하기 위해서 (주)네오딘으로부터 Anti-HBs EIA (Cat No. ND1203)을 구입하여 ELISA sandwich법으로 분석하였다. Mouse IgG에 대한 antigen이 흡착된 12-well plate에 음성대조군, 양성대조군, 시료를 각각 3개의 well에 50 μ L씩 가하고, 효소표지액(human HBs-Horse Radish Peroxidase)을 각 well에 50 μ L 가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 반응이 끝나기 5-10분전에 기질액을 조제(H_2O_2 : 0.6 mg/mL of 3,3',5,5'-Tetra-methylbenzidine = 1 : 1, v/v)하여 암실에 둔다. 반응종료 후 각 well의 내용물을 흡입해 내고, 세척액(400 μ L)으로 6회 세척하였다. 세척된 플레이트를 흡습지에 뒤집어 강하게 쳐서 남아있는 세척액을 완전히 제거한 다음, 암실에 둔 기질액을 각 well에 100 μ L씩 넣고 frame을 가볍게 쳐서 잘 혼합한 후 실온에서 빛이 들어가지 않도록 하여 30분간 반응시켰다. 반응 정지액을 100 μ L씩 각 well에 넣어 반응을 정지시켰다. 표준액과 검체의 흡광도를 450nm에서 10분이내에 측정하였다.

제 2 절 연구 결과

▣ 제1세부과제 : 해양생물 유래 천연유화물의 대량생산 및 수산가공제품에의 응용

1. 천연유화물 생산균주를 분리한 후 최적배양조건과 천연유화물의 구성성분 및 물성조사

(1) 해양유래 유류분해 세균의 분리동정

천연유화물을 생산하는 생물을 검토해 본 결과, 미생물에서 생산되는 예가 다수 발견되었으므로, 남해안 유류 오염지역을 중심으로 해수를 채취하여 유류 분해 세균을 분리하였다.

1) 유류분해 세균의 분리

남해안 유류오염지역 등 남해안 30여 곳의 지역 해수를 채취하여 SOM에 넣고 25°C, 180 rpm으로 1주일간 배양한 결과 모든 지역의 해수로부터 ACO가 분해되었다. 따라서, 남해안 전지역에는 유류분해 세균이 고르게 분포되어 있는 것으로 확인되었으며, 이러한 세균들에 의해 유출유가 자연 정화되는 것으로 나타났다(Table 4).

특히, 배양 2일 만에 ACO가 완전히 분해된 지역(경남 통영의 도남항, 거제도 장승포, 전남 여수 국동항)의 해수로부터 유류 분해세균이 다수 분리되었으며, 이들 지역의 해수로부터 각각 10 균주씩 colony를 분리하였다. 분리된 colony를 각각 SOM에 접종하여 7일간 배양하며 유류 분해능이 뛰어난 균주를 선별하였으며, 배양 2일 만에 ACO를 완전히 분해시킨 BYK-2 균주를 최

Table 4. Distribution of oil-degrading bacteria in southern sea of Korea

Number	Stations	Oil degradability
1	K gedo K ge bridge	++
2	Changsungpo	+++
3	Hakdong	++
4	Tappo	++
5	Tongyong Tonamdong	+++
6	Tala	++
7	Samduck	++
8	Tangdong	++
9	Namhaedo Changs ndo	++
10	Murim	++
11	Mijo	++
12	Tanghang	++
13	Yosu LG oil refinery	++
14	Kukdong	+++
15	Tolsando	++
16	Y ch nhang	++
17	Kohung Naenarodo	++
18	Yaenarodo	++
19	Okgang	++
20	Toyang	++
21	Wando Shinjido	++
22	Mangnam	++
23	Passenger ship terminal	++
24	Kugyed ng	++
25	Tang-in	++
26	Haenam Lands end	++
27	Chindo K mgae	++
28	Chupdo	++
29	Chisan	++
30	Nokjin	++

+++ , Profuse growth; ++ , moderate growth;

+, a little growth as evidenced by turbidity; -, no growth.

종적으로 분리하였다(Table 5). 분리된 BYK-2 균주를 MMM에서 18시간 배양한 후 그 배양액 800 μ L에 glycerol 200 μ L를 넣고 혼합하여 -75 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관하며, 향후 실험에 사용하였다.

2) 분리된 균주의 동정

분리된 BYK-2 균주의 각종 형태, 생리, 생화학적 특성을 조사한 결과를 Table 6에 나타내었다. 분리된 균주는 gram negative이고, 운동성을 가지며, rod type으로 cell size는 1.4~1.7 μ m였으며(Fig. 7), catalase, oxidase에서 양성반응을 나타내었다. 그 외 여러 가지 특징들을 Bergey's manual of systematic bacteriology를 근거로 조사한 결과, 신뢰도 96%의 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었으며, *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2로 명명하였다. 또한, 한국중균협회에 균주를 등록하여 KCTC 18012P으로 고유 번호를 지정 받아 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)의 고유 명칭을 갖게 되었다.

(2) 배지 선별

해양에서 분리한 본 균주를 이용하여 천연유화물의 생산을 위한 기본 배지를 선택하였다. 기본배지에 사용된 무기 염류로는 NSW, ASW, *Pseudomonas aeruginosa* 배양배지로 가장 많이 알려진 BSM과 Guerra-Santos 등(1984)이 *Pseudomonas aeruginosa* 균주로 천연 유화물의 연속 생산에 사용한 3M 배지를 사용하였다.

각 무기영양염류 배지에 유기질소원인 MMM과 LB를 첨가하여, 1% (w/v) n-hexadecane을 기질로 25 $^{\circ}$ C에서 48시간동안 180 rpm으로 배양하여 cell growth와 유화활성도를 측정하였다.

그 결과, MLBM에서 유화활성도가 111.4 unit로 가장 높게 나왔으며, ASW

Table 5. Oil-degrading capabilities of isolated strains southern sea of Korea(K ege Changsungpo, Tongyong Tonamdong, and Yosukukdong)

Strain number	Stations		
	K ege Changsungpo	Tongyong Tonamdong	Yosukukdong
1	+	+	-
2	-	++	+++
3	+	++	+
4	++	+	-
5	-	+	+
6	-	-	+
7	++	+	++
8	-	-	+
9	++	+	+
10	-	++	++

+++ , Profuse growth; ++ , moderate growth;

+, a little growth as evidenced by turbidity; -, no growth.

Table 6 Morphological and biochemical characteristics of marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2

Characteristics	Results
Gram stain	(-)
Cell size	1.4~1.7 μ m
Morphology of colony	Rod
Oxidase	-
Rhamnose	-
N-acetylglucosamine	+
D-ribose	+
Inositol	-
Sucrose	-
Maltose	-
Itaconate	+
Suberate	-
Malonate	+
Acetate	+
D,L-lactate	+
L-alanine	+
5-ketogluconate	-
Glycogen	-
3-hydroxy-benzoate	+
L-serine	+
Mannitol	+
D-glucose	+
Salicine	-
D-melibiose	-
L-fucose	-
D-sorbitol	-
L-arabinose	-
Propionate	+
Caprate	+
Valerate	+
Citrate	+
Histidine	+
2-ketogluconate	+
3-hydroxy-butylrate	+
p-4-hydroxy-benzonate	+
L-proline	+

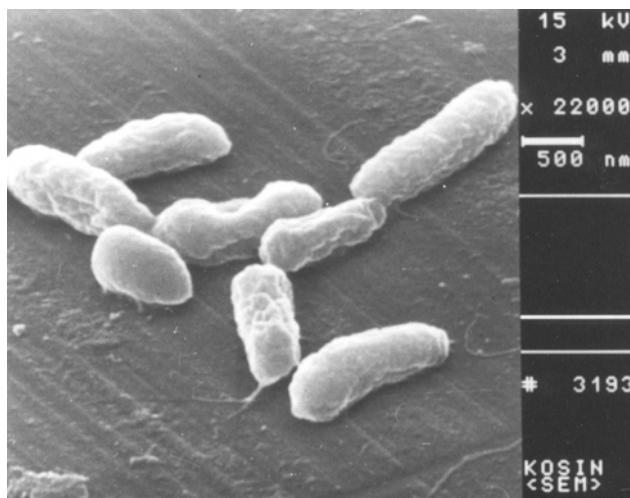


Fig. 7. Scanning electron microscopy of *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (original magnification approximately $\times 30,000$).

에 LB가 첨가된 배지에서 유화활성은 47.7 unit, 3M 배지에 LB가 첨가된 배지에서는 40.9 unit로 측정되었다. 유화활성도가 높은 것은 천연유화물의 생산이 많다는 것을 의미하는 것으로 이후 실험에서는 MLBM을 사용하여 각종 실험을 행하였다(Table 8).

(3) 탄소원에 대한 cell adherence

탄소기질별로 48시간 배양된 배양액을 원심분리하여 균체를 회수한 후, hydrocarbon에 대한 cell 부착능을 측정하였다. 그 결과 hydrocarbon류(ACO, KCO, BCO, n-paraffine, n-hexadecane, n-tetradecane)를 기질로 했을 경우 80 % 이상의 높은 cell 부착능을 나타냈으며, 지방산들 가운데 lecithin을 기질로 배양했을 때 91.5%로 가장 높은 cell 부착능을 나타내었다. 당류들은 arabinose, galactose, sorbitol, sucrose를 제외하고는 모두 70%이하의 cell 부착능을 나타냈다(Fig. 8). Hydrocarbon류에서 공통적으로 cell adherence가 높게 나타나는 것은 cell adherence 측정 이전에 이미 균체가 기질로 사용된 탄소원에 대해 induce된 결과에 의한 것으로 보여진다.

또한 oil/water의 계면에 부착된 cell을 $\times 400$ 광학현미경으로 관찰하였다(Fig. 9). 둥근 모양의 큰 입자는 ACO가 천연유화물에 의해 잘게 부서져 있는 모습이며, 점모양은 균체가 ACO에 부착되어 있는 모습을 보여주고 있다. Koch 등 (1991)이 *Pseudomonas aeruginosa* mutant를 모델로 제시한 이론에 의하면, 유류분해 세균은 hydrocarbon을 기질로 이용할 경우, 세포내에서 합성된 천연유화물을 세포막을 통해 세포밖으로 내보낸 후 세포밖의 alkane과 aggregated되어 soluble alkane 형태로 cell 내로 diffusion되거나 active transport되어 보내지게 되며, 이것을 탄소원으로 다시 천연유화물을 합성하여 cell밖으로 내보내는 기작을 반복하면서 유류를 분해하고 천연유화물을 생산하는 것으로 보고하고 있다(Fig. 10). 따라서 본 균주의 경우도 같은 *Pseudo-*

Table 7. Selection of optimal culture medium of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(incubation for 48h at 25°C)

Medium	Cell growth (O.D.660nm)	Emulsifying activity(Unit)
A	0.15	4.4
AL	6.85	15.4
AM	3.60	4.4
B	0.15	4.0
BL	6.81	47.7
BM	3.26	5.7
C	0.17	5.7
CL	7.45	111.4
CM	2.52	8.2
D	0.15	2.3
DL	8.04	40.9
DM	1.89	22.1

A, NSW; AL, NSW+LB; AM, NSW+MMM; B, ASW; BL, ASW+LB;
 BM, ASW+MMM; C, BSM; CL, BSM+LB; CM, BSM+MMM;
 D, 3M; DL, 3M+LB; DM, 3M+MMM

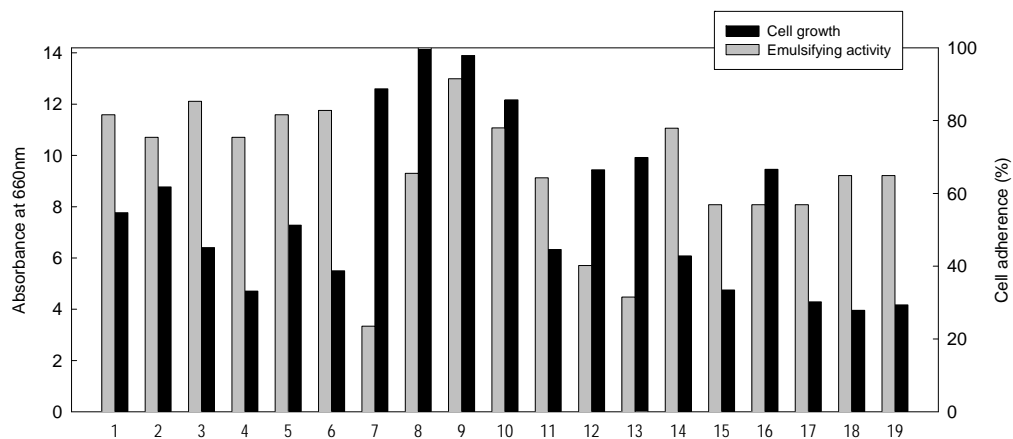


Fig. 8. Comparison of cell adherence on the various carbon source by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2.

- 1, arabian light crude oil; 2, kuwait crude oil; 3, bunker C oil; 4, n-paraffine;
 5, n- hexadecane; 6, n-tetradecane; 7, oleic acid; 8, olive oil; 9, lecithin;
 10, fish oil; 11, arabinose; 12, trehalose; 13, dextrose; 14, galactose;
 15, lactose; 16, fructose; 17, maltose; 18, sorbitol; 19, sucrose



Fig. 9. *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 biosurfactant producing microbes, aggregation around arabian light crude oil droplets (approx. 400× magnification).

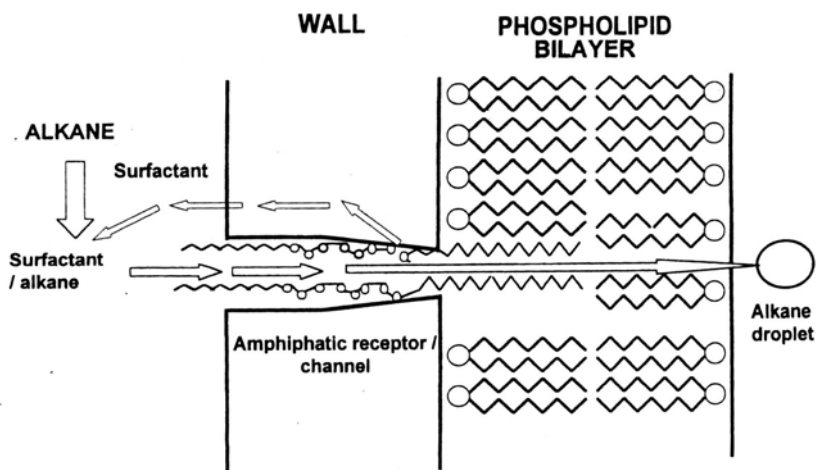


Fig. 10. Hypothetical scheme for surfactant-linked alkane uptake into a microbial cell(Koch et al).

monas aeruginosa 계열 균주로서 천연유화물을 생산하면서 기질로 사용된 원유가 배양시간에 따라 계속 감소하는 것으로 보아 Koch 등이 제시한 oil uptake 모델과 유사한 기작에 의하여 원유분해와 천연유화물의 생산이 이루어지는 것으로 보여진다.

(4) 최적배양조건 검토

1) 최적배양온도

배양온도에 따른 천연유화물의 생산은 배양상층액의 유화활성도를 기준으로 측정하였다. 온도를 25℃, 30℃, 37℃에서 각각 실험을 행한 결과, 최적 배양온도는 25℃로 나타났다(Fig. 11).

2) 탄소원의 영향

탄소원은 미생물 생육에 있어 가장 기본이 되는 에너지원으로 균체의 성장과 천연유화물의 생산에 절대적인 영향을 미친다. 따라서 본 실험에서는 hydrocarbons, fatty acids, sugars를 탄소원으로 하여 25℃에서 48시간동안 180rpm으로 배양하였고, 배양후의 균성장과 유화활성도를 측정하여 기질별로 상대 비교함으로써 최적기질을 선정하였다. 그 결과 hydrocarbon들 중에는 n-hexadecane이 균성장도 7.3AU, 유화활성도 110.5 unit로, fatty acid들 중에는 fish oil이 균성장도 12.2AU, 유화활성도 168.4 unit로, 당들 중에는 fructose를 기질로 하였을 경우, 균성장도 9.5AU에 유화활성도가 85.4 unit로 fish oil에서 가장 높게 나왔다(Table 9).

또한 기질로 사용되는 탄소원은 균성장 및 유화활성도에 영향을 미칠 뿐만 아니라 생산된 유화물의 향기에도 독특한 특성을 부여하는 것으로 나타났다. Olive oil로 생산한 천연유화물은 향긋한 향이 났으나, fish oil로 생산된 천연유화물에서는 비릿하고 둔탁한 향이 났다. 분리 정제한 후에도 향은 각각 그

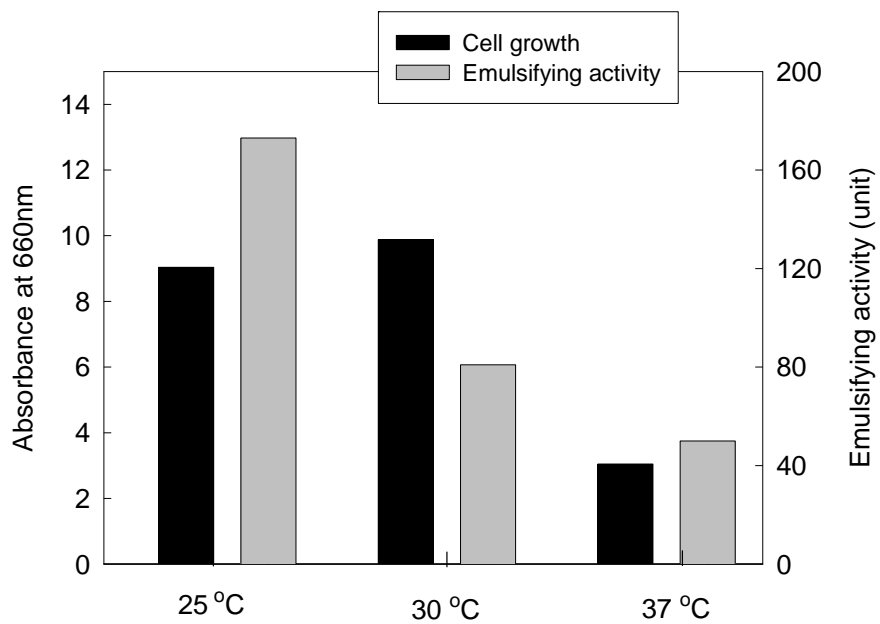


Fig. 11. Effect of temperature on the cell growth and biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2.

Table 9. Effect of various carbon sources on the biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(incubation for 48h, at 25°C)

Carbon sources	Cell growth (O.D.660nm)	Emulsifying activity(Unit)	Final pH
Arabian light crude oil	7.8	51.3	8.7
Kuwait crude oil	8.8	52.0	8.4
Bunker C oil	6.4	51.5	8.4
Liquid paraffine	4.7	26.0	8.6
n-Hexadecane	7.3	110.5	8.4
n-Tetradecane	5.5	79.5	8.7
Oleic acid	12.6	9.0	8.3
Olive oil	14.2	71.5	8.6
Lecithin	13.9	22.7	8.4
Fish oil	12.2	168.4	6.2
Arabinose	6.3	34.8	7.6
Trehalose	9.4	60.7	8.3
Dextrose	9.9	12.4	8.3
Galactose	6.1	42.0	7.8
Lactose	4.8	36.9	8.6
Fructose	9.5	85.4	8.5
Maltose	4.3	34.3	8.5
D-sorbitol	4.0	36.3	8.3
Saccharose	4.2	27.0	8.3

대로 유지되었으나, 이후의 실험결과, 구조는 동일한 것으로 밝혀졌다.

유화활성도가 가장 높은 fish oil을 최적기질로 하여 이후 각종 실험에 사용하였다.

3) 질소원의 영향

세균의 증식 및 단백질 합성 등에 필요한 영양원으로 사용되는 질소원에 대한 영향을 살펴보기 위하여 MLBM의 구성성분인 tryptone과 yeast extract, MMM의 구성성분인 peptone과 무기질소원인 urea에 대하여 균체생육 및 천연유화물 생산을 검토하였다.

MLBM에서 배양하였을 때의 유화활성도가 167.1 unit로 그 값은 tryptone이나 yeast extract, peptone 등의 유기물질을 BSM에 첨가하여 배양했을 때보다 높게 나왔다. 또한 0.2% urea를 BSM에 첨가하였을 때에도 유화활성이 147.9 unit로 나와 대량배양시 cost를 낮출 수 있는 무기질소원으로 적합한 것으로 확인되어(Table 10), BSM배지에 urea를 농도별(0.01- 2.0%)로 첨가하여 48시간 배양한 후 천연유화물의 생산 및 생육특성을 조사하였다. 그 결과 urea 농도가 0.01%(w/v)일 경우, MLBM 배지에서 배양했을 때 보다 유화활성도가 1.7배 가량 높게 나오는 것으로 확인되었다(Fig. 12). 따라서 최적 질소원으로 0.01% (w/v) urea를 선정하였다.

4) 무기화합물에 대한 영향

MLBM을 구성하고 있는 BSM에 함유되어 있는 무기 염류들을 하나씩 제거한 후, 25℃에서 48시간동안 배양하여 균성장과 유화활성도를 측정하였다. 측정 결과 FeSO₄를 제거하였을 때 유화활성도가 98.4 unit로 급격히 감소함을 알 수 있었다(Table 11). 이러한 결과는 FeSO₄를 제거하지 않은 MLBM에서 배양하여 측정한 유화활성도 173.1 unit에 비해 64.3%가 감소한 것으로서

Table 10. Effect of various nitrogen sources on the biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(incubation for 48h, at 25°C)

Nitrogen sources	Cell growth (O.D.660nm)	Emulsifying activity(Unit)	Final pH
Luria Broth¹	7.56	167.1	6.70
1% tryptone ¹	4.73	62.64	6.40
0.5% yeast extract ¹	2.35	58.11	6.20
0.5% peptone ¹	2.53	59.01	6.30
0.5% tryptone ¹	2.37	59.82	6.20
0.5% tryptone + 0.5% yeast extract ¹	6.62	122.5	6.20
0.5% peptone + 0.5% yeast extract ¹	6.60	88.7	6.30
0.2% urea ²	6.91	147.9	6.40

¹ Basal salt medium(BSM) : 0.5g MgSO₄ · 7H₂O, 0.01g FeSO₄ · 7H₂O, 1.0g KH₂PO₄, 0.5gK₂HPO₄, 2.0g NaNO₃, 0.01g CaCl₂ and 0.1g KCl in 1Ldistilled water(pH7.0)

² Basal salt medium(absence 2.0g NaNO₃) + Luria broth(LB)

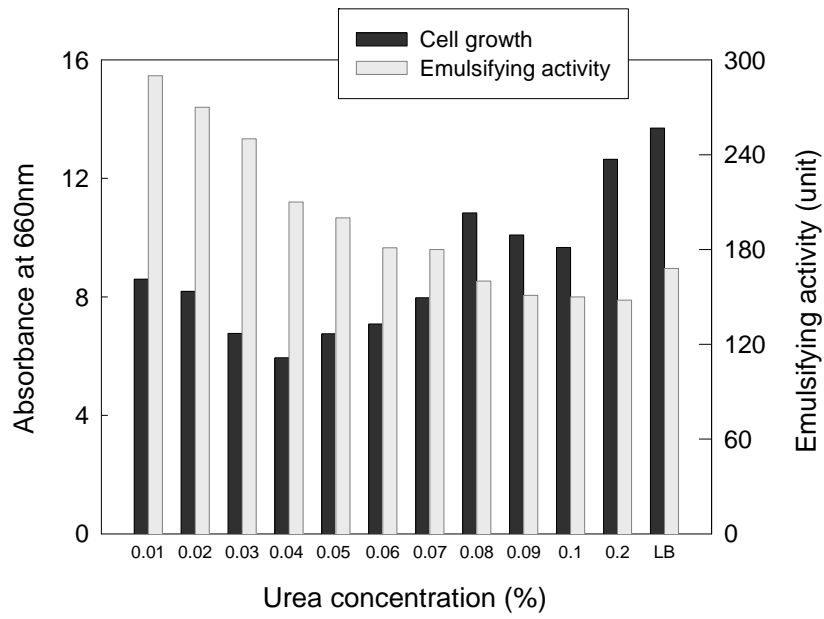


Fig. 12. Effect of urea concentration on the cell growth and emulsifying activity by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 at 25°C.

Table 11. Effect of inorganic compounds on the biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(incubation for 48h, at 25°C)

Inorganic compound	Cell growth (O.D.660nm)	Emulsifying activity(Unit)	Final pH
LB ¹	8.56	173.1	8.7
LB ¹ - NaNO ₃	6.52	155.0	8.7
LB ¹ - MgSO ₄	5.92	154.6	8.7
LB¹-FeSO₄ · 7H₂O	6.92	98.4	8.6
LB ¹ - KH ₂ PO ₄	6.29	146.2	8.7
LB ¹ - K ₂ HPO ₄	6.41	156.5	8.6
LB ¹ - CaCl ₂	7.41	144.6	8.6
LB ¹ - KCl	8.68	128.4	8.5

¹ Luria broth(LB) : 10g tryptone, 5g yeast extract and 1Lbasal salt medium(pH7.0)

FeSO₄가 보조인자로, 천연유화물 생산에 촉매 역할을 하는 것으로 확인되었다. 따라서 천연 유화물 생산에 영향을 미치는 FeSO₄의 최적농도는 0.05 mM이었으며, 유화활성도는 기존농도인 0.04 mM의 농도에서 보다 5.8 unit 증가하였다(Table 12).

5) 초기 pH의 영향

천연 유화물 최적생산 pH를 구하기 위하여 pH범위를 3.0~10.0까지 조절하여 48시간 배양하였다. 균성장 및 천연유화물 생산에 영향을 미치는 최적 초기 pH는 7.0으로 중성영역에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, pH 5.0미만의 범위에서는 균성장 및 유화활성도가 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다(Fig. 13).

6) NaCl 농도에 대한 영향

일반적으로 토양에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa*는 6.5% 이상의 NaCl농도에서는 균이 전혀 성장하지 않는 것으로 보고되고 있으나, 해양에서 분리한 본 균주의 경우 0~9% (w/v) 범위에서 균체가 성장하였으며, NaCl의 농도가 높아질수록 균성장과 유화활성이 감소됨을 알 수 있었다(Fig. 14).

7) 최적배양시간의 검토

천연유화물의 최적 배양시간을 조사하기 위하여 최적 배양온도인 25℃에서 각종 최적 조건(탄소원, fish oil; 질소원, 0.01% urea; 무기염류, 0.05mM FeSO₄; pH 7.0) 하에서 180 rpm으로 진탕 배양하여, 배양시간별로 시료를 채취한 후 천연유화물 생산 최적 배양시간을 조사하였다. 매 12시간 별로 172시간 배양한 결과, 120시간 배양시 유화활성도가 1,680 unit로 최적 배양시간은 120시간으로 확인되었다(Fig. 15).

Table 12. Effect of ferric sulfate concentration on the biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(incubation of 48h, at 25°C)

FeSO ₄ · 7H ₂ O concentration	Cell growth (O.D.660nm)	Emulsifying activity(Unit)	Final pH
0.00mM	6.64	102.9	6.5
0.01mM	6.28	119.7	6.5
0.02mM	7.86	129.2	6.5
0.03mM	7.74	158.3	6.5
0.04mM	8.68	168.4	6.5
0.05mM	8.97	174.2	6.4
0.06mM	8.51	149.4	6.4
0.07mM	7.02	143.9	6.4
0.08mM	7.18	142.3	6.5
0.09mM	8.50	146.4	6.5
0.10mM	8.93	142.4	6.5
0.20mM	5.96	104.1	6.4

¹ Luria broth(LB) : 10g tryptone, 5g yeast extract and 1Lbasal salt medium(pH7.0)

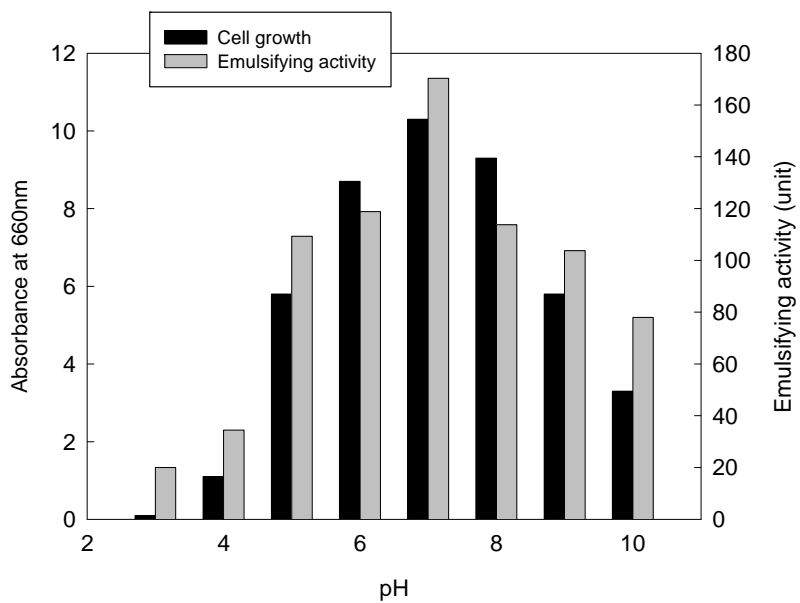


Fig. 13. Effect of pH on the cell growth and biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (incubation for 48h). Each medium containing 1%(w/v) fish oil.

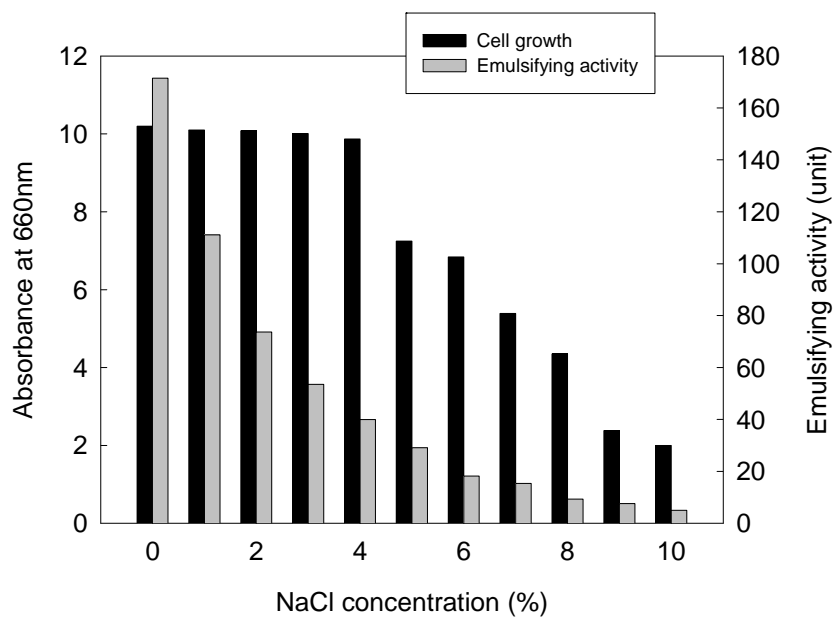


Fig. 14. Effect of NaCl concentration on the cell growth and biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (incubation for 48h). Each medium containing 1%(w/v) fish oil.

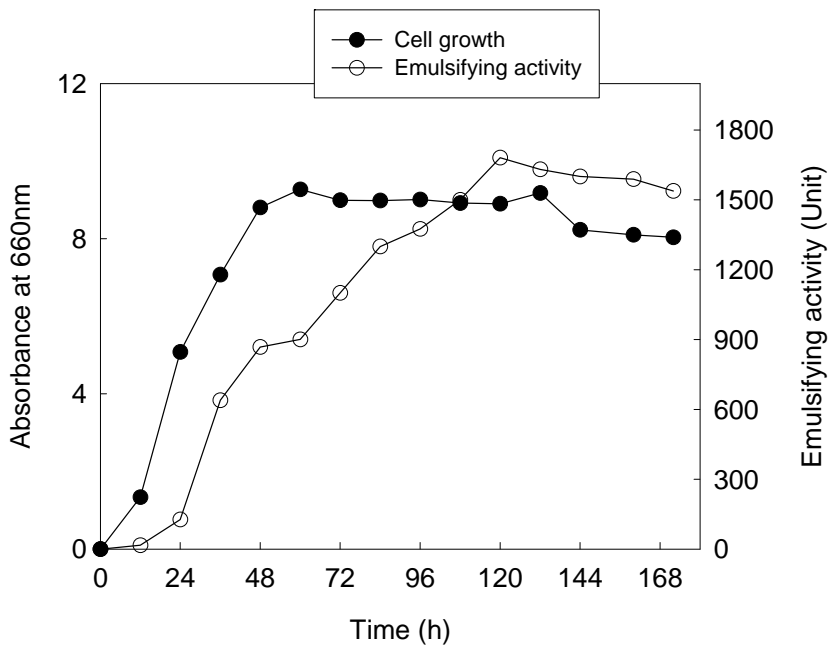


Fig. 15. Time course of cell growth and biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 at 25°C.

(5) 천연유화물의 추출

본 균주가 생산하는 천연유화물의 구성성분을 분석하기 위해 1%(w/v) fish oil을 기질로 배양된 상층액으로부터 천연유화물을 유기용매 추출법으로 추출·농축하여 무게 정량을 한 결과 crude한 천연유화물을 약 10.1g/L 회수하였다.

(6) TLC를 이용한 천연유화물의 구성성분 분석

본 균주가 생산하는 천연유화물의 구성성분을 분석하기 위해 1%(w/v) fish oil을 기질로 배양된 상층액으로부터 천연유화물을 유기용매 추출법으로 추출·농축한 후 구성성분을 분석하였다. 구성성분 분석에는 silica gel 60F₂₅₄ glass plate를 이용하여 TLC를 행하였으며, 전개용매로는 CMW (chloroform : methanol : water = 60 : 25 : 4, v/v)를 사용하였다. TLC 전개 후 검출시약 α -naphtoresorcinol, rhamnose 6G와 ninhydrine으로 각각 당, 지질, 단백질의 유무를 판단하였다.

그 결과 Rf 0.48, 0.65, 0.82는 α -naphtoresorcinol과 rhodamine 6G에 red와 red violet color로 각각 양성반응을 보였으며, ninhydrine에서는 red purple로 단백질(청색)은 음성으로 나타났다(Table 13). 따라서 본 균주가 생산하는 천연유화물은 당지질(glycolipid)로 구성 되어있는 것으로 확인되었다.

한편, Rhodamin 6G에서 red violet으로 양성반응이 나타나는 Rf 0.96은 기질로 사용된 fish oil의 잔류지방산으로 보인다.

(7) 천연유화물의 구조분석

1) 구조분석에 사용된 시료의 분리·정제

천연유화물의 구조를 분석하기 위하여 얻어진 배양 상층액을 유기용매 추출

Table 13. TLC analysis of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2

Rf value	Detection reagent		
	α -Naphtoresorcinol	Rhodamine 6G	Ninhydrine
0.48	R	RV	RP
0.65	R	RV	RP
0.82	R	RV	RP
0.96	G	RV	P

R, red; G, green, RV, red violet; RP, red purple; P, purple

법과 silica gel chromatography, sep-pak silica cartridge (2cm, Waters Co., USA) 처리로 분리하였으며, 순도 검증은 TLC와 HPLC로 하였다.

이전의 결과에서 fish oil을 기질로하여 배양할 경우 3종류의 glycolipid (Rf 0.48, 0.65, 0.82)가 생산됨을 확인하였으며, 그 중 생산량이 많은 Rf 0.65의 시료를 silica gel chromatography법과 Sep-pak silica cartridge로 정제하여 400 mg의 시료를 얻었으며, 이 시료는 TLC와 Aquasil SS-652N (100)(8 ψ ×250 mm) column이 장착된 HPLC로 분석하였다(Fig. 16). HPLC 결과, Rf값 0.65는 RT가 14.24이며, 순도가 95.1%임을 알 수 있었다.

이 시료를 NS-1(Natural Surfactant)으로 명명하였으며, 구조분석 실험에 사용하였다.

2) FT-IR 분석

정제된 천연유화물(NS-1)의 구조가 가지는 functional group을 확인하기 위하여 FT-IR분석을 행하였으며, 시료의 조제는 KBr 법으로 하였다.

분석 결과, NS-1은 3450 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , 1750 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1050-1120 cm^{-1} 의 파장을 흡수하였으며, 이들을 동정해보면 hydroxyl group, long chain hydrocarbon, esters 기, methyl 기 등을 가지고 있는 것으로 나타났다(Fig. 17).

- 3450 cm^{-1} - hydroxyl group (-OH),
- 2920 cm^{-1} - long chain hydrocarbon(-CH₂-),
- 1750 cm^{-1} - esters(-CH₂-CO-O-R),
- 1450 cm^{-1} - methyl(-CH₃),
- 1050-1120 cm^{-1} - vibration(-CH₂-)

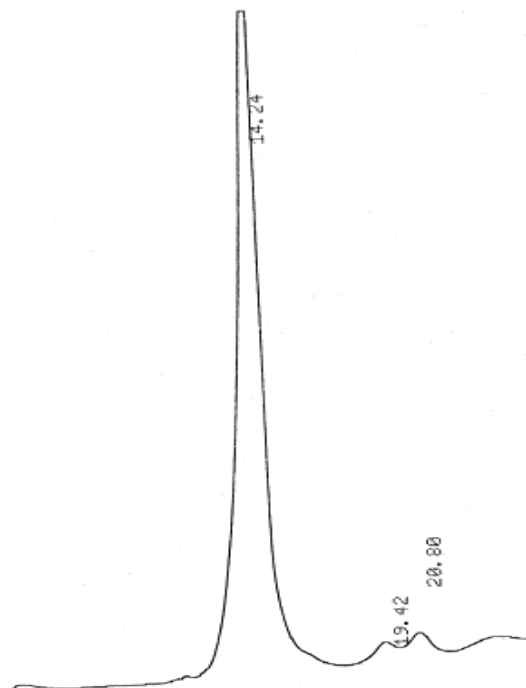


Fig. 16. HPLC profile of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2. column, Aquasil SS-652N (100) (8 ψ ×250mm); mobil phase, CMW(60:25:4, v/v) isocratic; flow rate, 0.5mL/min; detector, UV(λ =265nm).

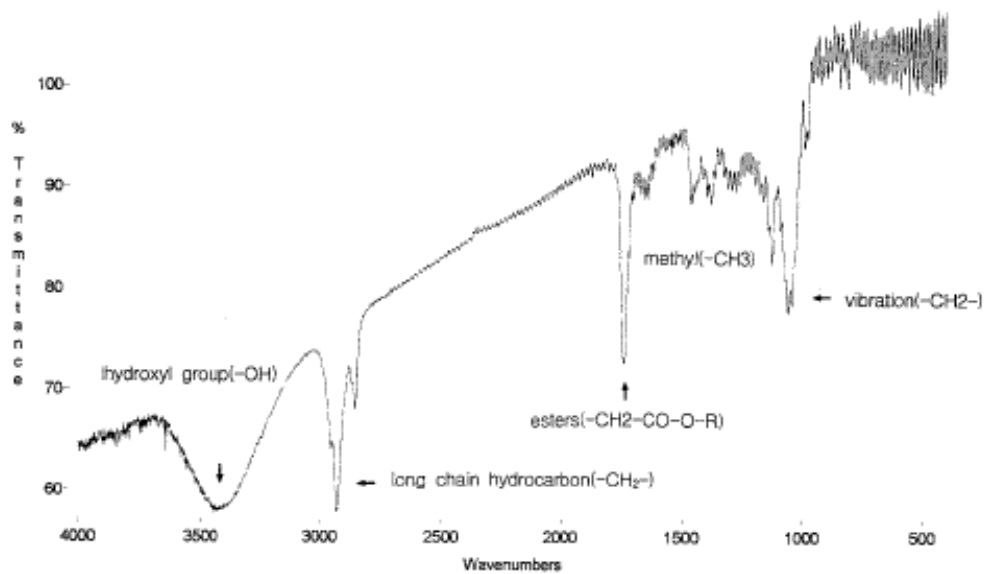


Fig. 17. FT-IR spectrum of biosurfactant NS-1 produced by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2.

3) NMR

NS-1의 구조분석을 위하여 ^1H -NMR, ^{13}C FT-NMR, DEPT, 2D-NMR 분석(RELAY, HSQC, HMBC)을 실시하였다.

① ^1H -NMR 분석

분리 정제된 NS-1로부터 ^1H 의 결합형식과 위치에 관한 구조적 정보를 얻고자 ^1H -NMR을 행하였다. 실험결과, NS-1의 spectrum값 $\delta(\text{ppm})$ 은 0.92, 1.25, 1.32, 1.56, 1.64, 2.07, 2.5, 2.63, 3.34, 3.4, 3.65, 3.76, 3.98, 4.04, 4.14, 4.28, 4.8, 4.90, 4.95, 5.22를 얻었다. $\delta=4.90$, $\delta=4.92$ 부분에서 α -sugar가 확인되었으며, $\delta=1.25$ 에서 deoxy sugar(CH_3 of C_6)가 확인되었다. 대략 sugar는 $\delta=3.0 \sim 5.6$, lipid는 $\delta=0.8 \sim 2.2$ 에서 proton spectrum이 나타났다(Fig. 18).

② ^{13}C FT-NMR 분석

^{13}C -FT NMR은 물질을 구성하고 있는 탄소골격에 대한 직접적인 정보를 얻을 수 있는 분석방법으로 NS-1의 탄소개수 및 배열을 분석하고자 실험을 행하였다. 분석결과 biosurfactant NS-1은 33개의 탄소골격을 가지는 것으로 확인되었으며, sugar 당 부위에 12개의 탄소와 aglycon부위에 21개의 탄소가 존재함을 확인하였다(Fig. 19).

특히 $\delta=100.0$, $\delta=104.2$ 에 anomeric carbon이 $\delta=172.2$, $\delta=173.0$ 에서는 aglycon 부위의 1번 탄소(CH_3 -)가 존재함을 알 수 있었다. 또한 CD_3OD 부위 ($\delta=48.5$)를 전·후에서 $\delta=0 \sim 48.5$ 사이에서는 주로 aglycon 부위가 $\delta=70 \sim 110$ 사이에는 sugar부위가 존재하는 것으로 나타났다(Table 14).

③ DEPT 분석

NS-1의 DEPT 135° 분석결과 anomeric carbon인 $\delta=100.0$, $\delta=104.2$ 은

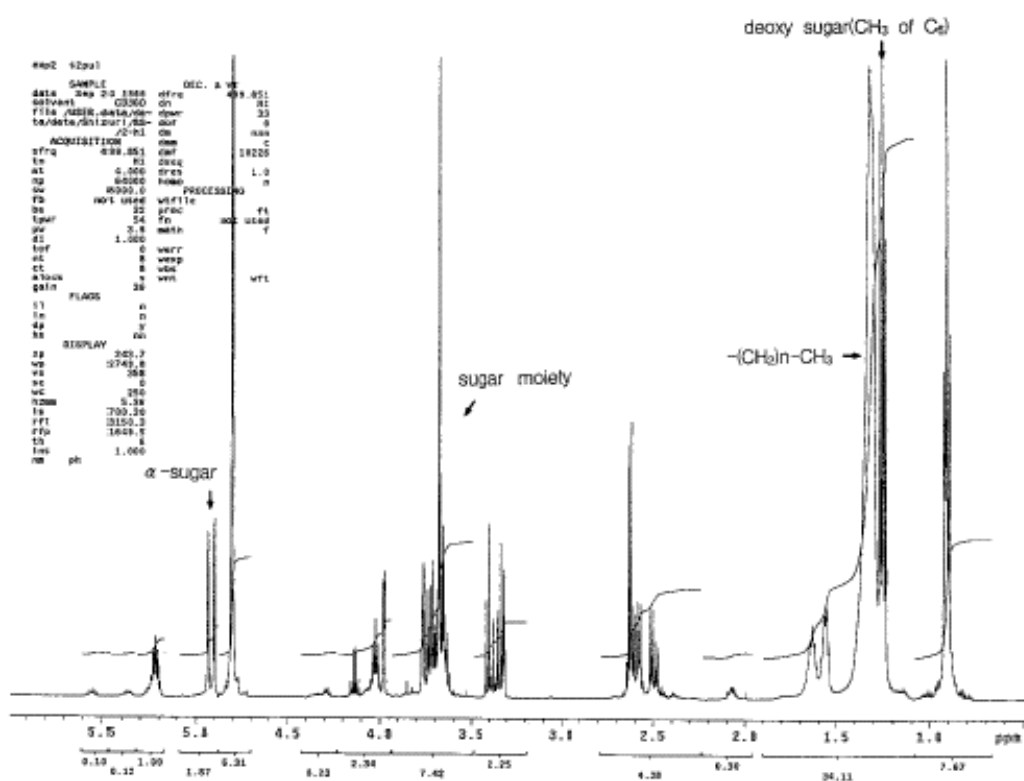


Fig. 18. ¹H-NMR spectrum of biosurfactant NS-1 produced by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2.

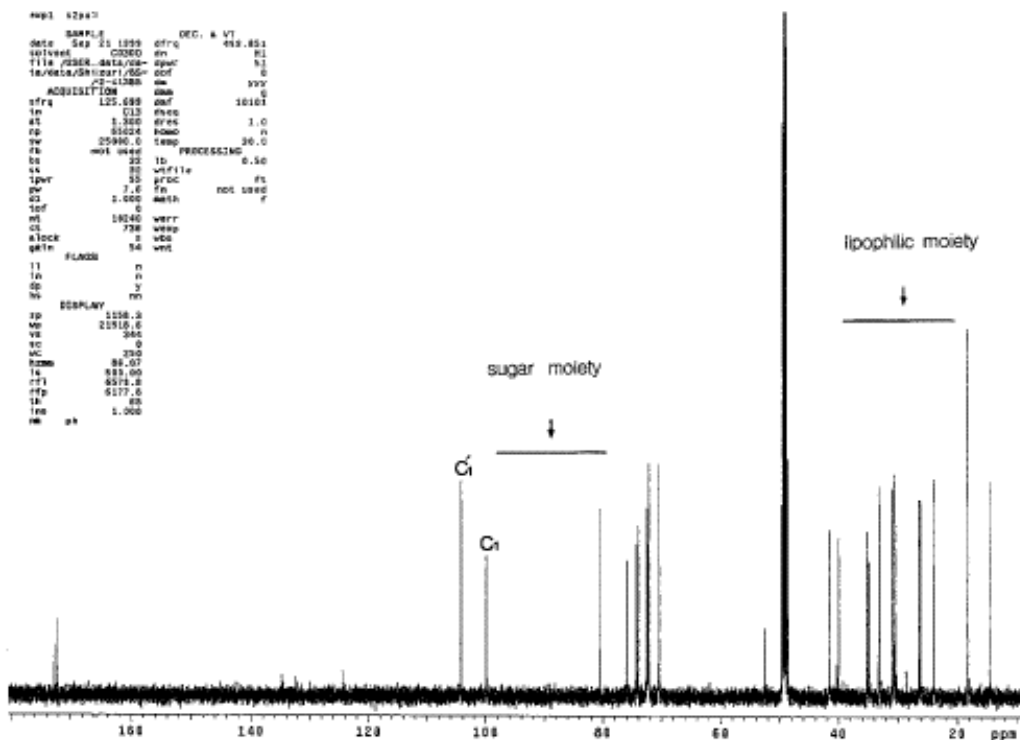


Fig. 19. ¹³C FT-NMR spectrum of biosurfactant NS-1 produced by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2.

Table 14. ^{13}C -FT NMR spectra data of biosurfactant NS-1 produced by
Pseudomonas aeruginosa BYK-2(750 MHz in CD_3OD)

Carbon (sugar moiety)		$\delta(\text{ppm})$		Carbon (aglycon moiety)		$\delta(\text{ppm})$	
C ₁	C _{1'}	100.0	104.2	C ₁	C _{1'}	172.2	173.0
C ₂	C _{2'}	80.8	72.0	C ₂	C _{2'}	41.7	40.0
C ₃	C _{3'}	74.5	74.0	C ₃	C _{3'}	76.0	73.0
C ₄	C _{4'}	72.4	72.2	C ₄	C _{4'}	34.8	34.2
C ₅	C _{5'}	71.0	71.0	C ₅	C _{5'}	26.3	26.0
C ₆	C _{6'}	18.4	18.4	C ₆	C _{6'}	30.8	30.8
				C ₇	C _{7'}	31.1	31.1
				C ₈	C _{8'}	33.0	33.0
				C ₉	C _{9'}	24.0	24.0
				C ₁₀	C _{10'}	14.5	14.5
					C _{11'}		52.8

CH-구조로 되어 있음을 확인하였고 sugar부위인 $\delta=70 \sim 110$ 사이에서 전부 CH-로 구성되어 있으며 aglycon 부위인 $\delta=20 \sim 45$ 사이에는 $(\text{CH}_2)_n$, $\delta=18.3$ 과 $\delta=14.7$ 에는 CH_3 가 존재함을 확인하였다(Fig. 20).

④ RELAY 분석

직접 결합을 하지 않는 두 스핀사이에 결합을 중계하는 partner를 이용하여 결합을 유발시키는 RELAY분석을 실시하였다. a sugar부위인 $\delta=4.95$ 는 $\delta=3.98, 3.76, 3.65, 2.63, 1.32, 1.25, 0.92$ 와 $\delta=4.90$ 은 $\delta=3.98, 3.76, 3.65, 1.32, 1.25, 0.92$ 사이에서 결합이 유발되며, sugar 부위 $\delta=4.04$ 는 $\delta=2.63, 2.5, 1.54, \delta=3.98$ 은 $\delta=3.65, 1.25, \delta=3.76$ 는 $\delta=3.4, 3.34, 1.25, \delta=3.65$ 는 $\delta=3.4, 3.34, 1.25, 0.92, \delta=3.4$ 는 $\delta=3.34$ 사이에서 결합이 유발되었다. Lipid 부위인 $\delta=2.63$ 은 $\delta=1.32, 1.25, 0.92, \delta=1.64$ 는 $\delta=1.32, \delta=1.54$ 는 $\delta=1.32, \delta=1.32$ 는 $\delta=1.25, 0.92, \delta=1.25$ 는 $\delta=0.92$ 사이에서 각각 결합을 유발하는 것으로 나타났다(Fig. 21).

⑤ HSQC 분석

Glycolipid NS-1에 대한 HSQC의 결과를 살펴보면 1번 탄소 위치인 anomeric carbon $\delta=100.0(\text{C}_1), \delta=104.2(\text{C}_1')$ 는 ^1H 의 $\delta=4.95, \delta=4.90$ 과 coupling되어 있으며, $\delta=80.8(\text{C}_2), \delta=72.0(\text{C}_2')$ 은 ^1H 의 $\delta=3.76, \delta=3.98$ 와 $\delta=74.5(\text{C}_3), \delta=74.0(\text{C}_3')$ 은 ^1H 의 $\delta=3.34, \delta=3.4, \delta=72.4(\text{C}_4), \delta=72.2(\text{C}_4')$ 은 ^1H 의 $\delta=3.65, \delta=3.76, \delta=71.0(\text{C}_5), \delta=71.0(\text{C}_5')$ 은 ^1H 의 $\delta=3.65, \delta=3.76$ 과 $\delta=18.4(\text{C}_6), \delta=18.4(\text{C}_6')$ 은 ^1H 의 $\delta=1.25, \delta=1.25$ 과 각각 coupling 하고 있다. Glycosidic bond의 연결부위인 aglycon의 3번 탄소는 $\delta=76.0(\text{C}_3)$ 는 ^1H 의 $\delta=4.04$ 과 $\delta=73.0(\text{C}_3')$ 은 ^1H 의 $\delta=5.22, \delta=41.5(\text{C}_2), \delta=41.1(\text{C}_2')$ 은 ^1H 의 $\delta=2.50, \delta=2.63, \delta=34.8(\text{C}_4), \delta=34.2(\text{C}_4')$ 은 ^1H 의 $\delta=1.64, \delta=1.56, \delta=26.3(\text{C}_5),$

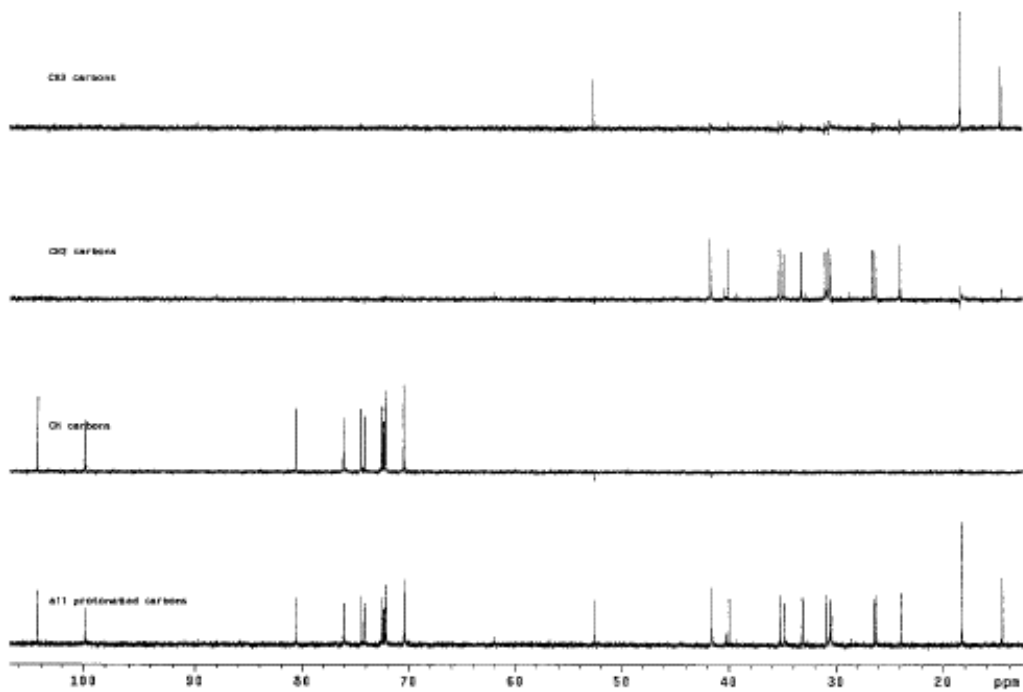


Fig. 20. DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) spectrum of biosurfactant NS-1 in CD_3OD .

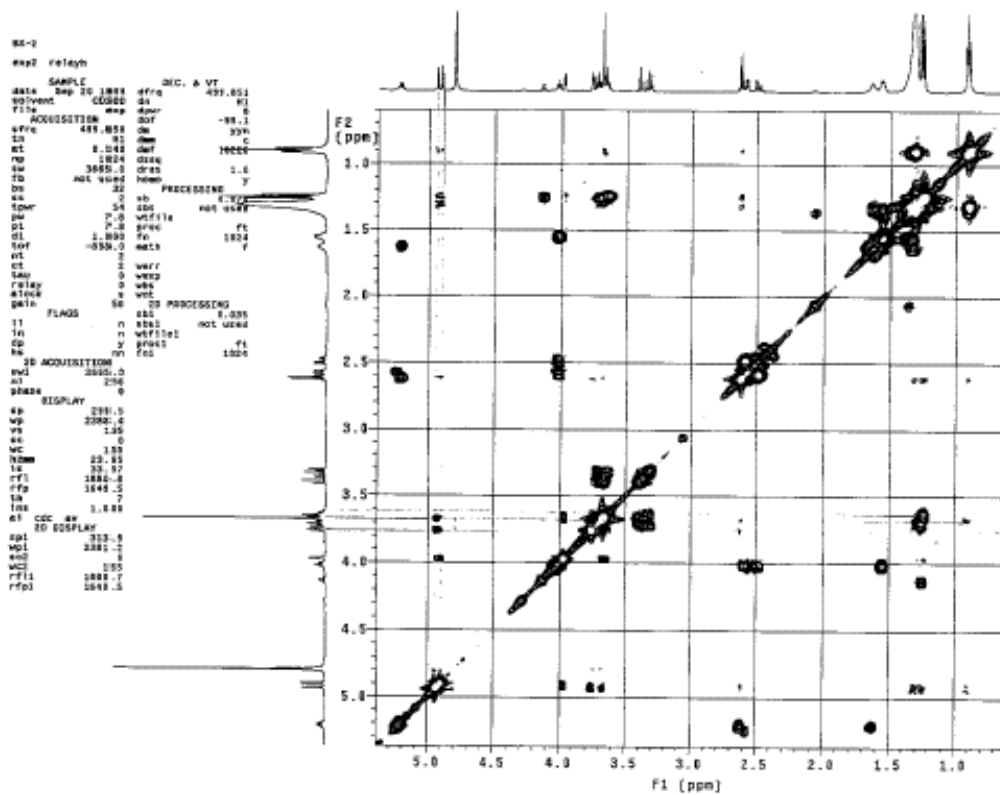


Fig. 21. RELAY(Relayed Correlation Spectroscopy) spectrum of biosurfactant NS-1 in CD₃OD.

$\delta=26.0(C_5')$ 은 1H 의 $\delta=1.32$, $\delta=1.32$, $\delta=30.8(C_6)$, $\delta=30.8$ 는 1H 의 $\delta=1.32$, 1.32 , $\delta=32.6(C_7)$, $\delta=32.8(C_7')$ 은 1H 의 $\delta=1.32$, $\delta=1.32$, $\delta=33.0(C_8)$, $\delta=33.0(C_8')$ 은 1H 의 $\delta=1.32$, $\delta=1.32$, $\delta=24.0(C_9)$, $\delta=24.0(C_9')$ 은 1H 의 $\delta=1.32$, $\delta=1.32$, $\delta=14.5(C_{10})$, $\delta=14.5(C_{10}')$ 은 1H 의 $\delta=1.25$, $\delta=1.25$ 와 coupling되어 있는 것으로 확인되었다. 또한 aglycon 부위의 $\delta=52.8(-CH_3)$ 는 $^1H(\delta=3.65)$ 와 coupling되어 있는 것으로 확인되었다(Fig. 22).

⑥ HMBC 분석

NS-1의 anomeric carbon 1번 탄소 위치 $C_1(\delta=100.0)$ 에 aglycon $C_3(\delta=76.0)$ 가 coupling 되어있으며, anomeric carbon $C_2(\delta=80.8)$ 와 anomeric carbon $C_1'(\delta=104.5)$ 이 coupling되어 있다. 또한 anomeric carbon $C_1(\delta=100.0)$ 번과 coupling하고 있는 1H 의 $\delta=4.08$ 의 위치에 aglycon $C_2(\delta=41.7)$, $C_4(\delta=34.8)$, $C_5(\delta=26.3)$, $C_6(\delta=30.8)$, $C_7(\delta=31.1)$, $C_8(\delta=33.0)$, $C_9(\delta=24.0)$ 가 coupling 되어 있으며 $C_9(\delta=23.9)$ 의 위치와 같은 선상에 놓여있는 $^1H(\delta=1.32)$ 와 $C_{10}(\delta=14.7)$ 이 coupling되어 있다.

Aglycon $C_3'(\delta=73.0)$ 과 coupling하는 $C_2'(\delta=40.0)$ 은 $C_1'(\delta=173.0)$ 와 $C_4'(\delta=34.2)$ 와 같은 $^1H(\delta=5.25)$ 위치에 있으며, $C_5'(\delta=26.0)$, $C_6'(\delta=30.8)$, $C_7'(\delta=31.1)$, $C_8'(\delta=33.0)$, $C_9'(\delta=24.0)$, $C_{10}'(\delta=14.7)$ 이 coupling되어 있는 것으로 나타났다. 또한 aglycon 부위의 $\delta=52.8(-CH_3)$ 은 $^1H(\delta=3.65)$ 과 결합하고 있으며, 같은 결합부위인 $C_1'(\delta=173.0)$ 과 coupling되어 있는 것으로 확인되었다(Fig. 23).

⑦ NS-1의 구조결정

1H -NMR, ^{13}C -FT-NMR, 2D NMR 등의 결과로부터 glycolipid NS-1의 구조는 2개의 α -L-rhamnose와 1개의 β -hydroxydecanoic acid, 1개의 β -hy-

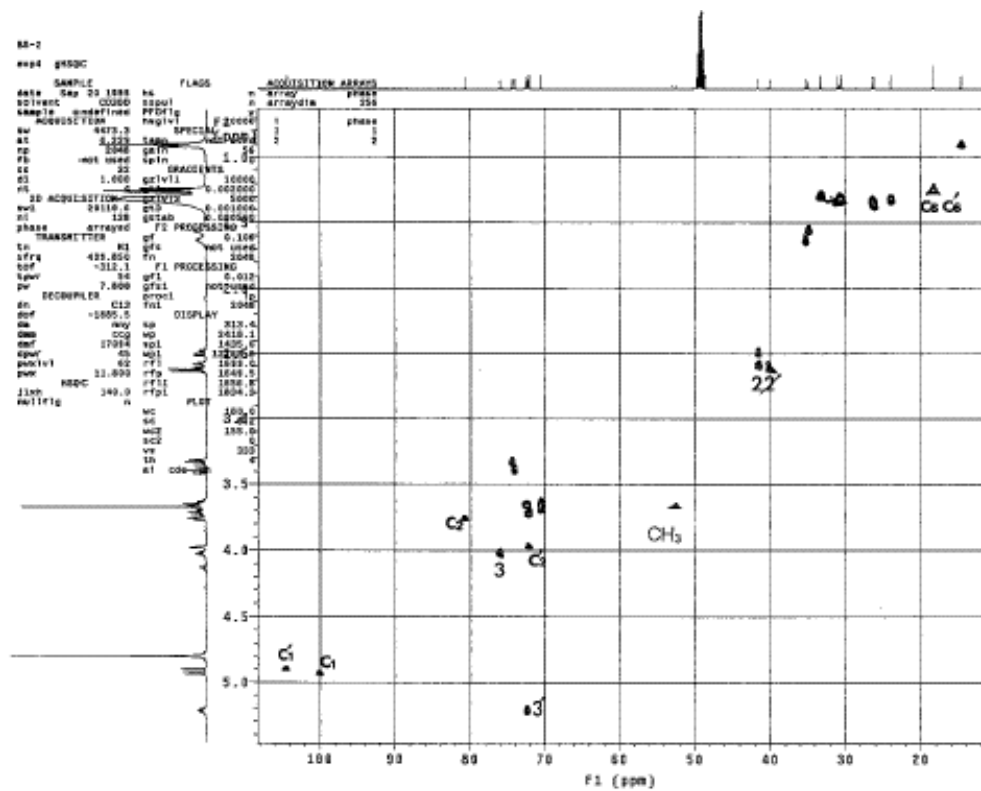


Fig. 22. HSQC(Heteronuclear Single Quantum Coherence) spectrum of biosurfactant NS-1 in CD_3OD .

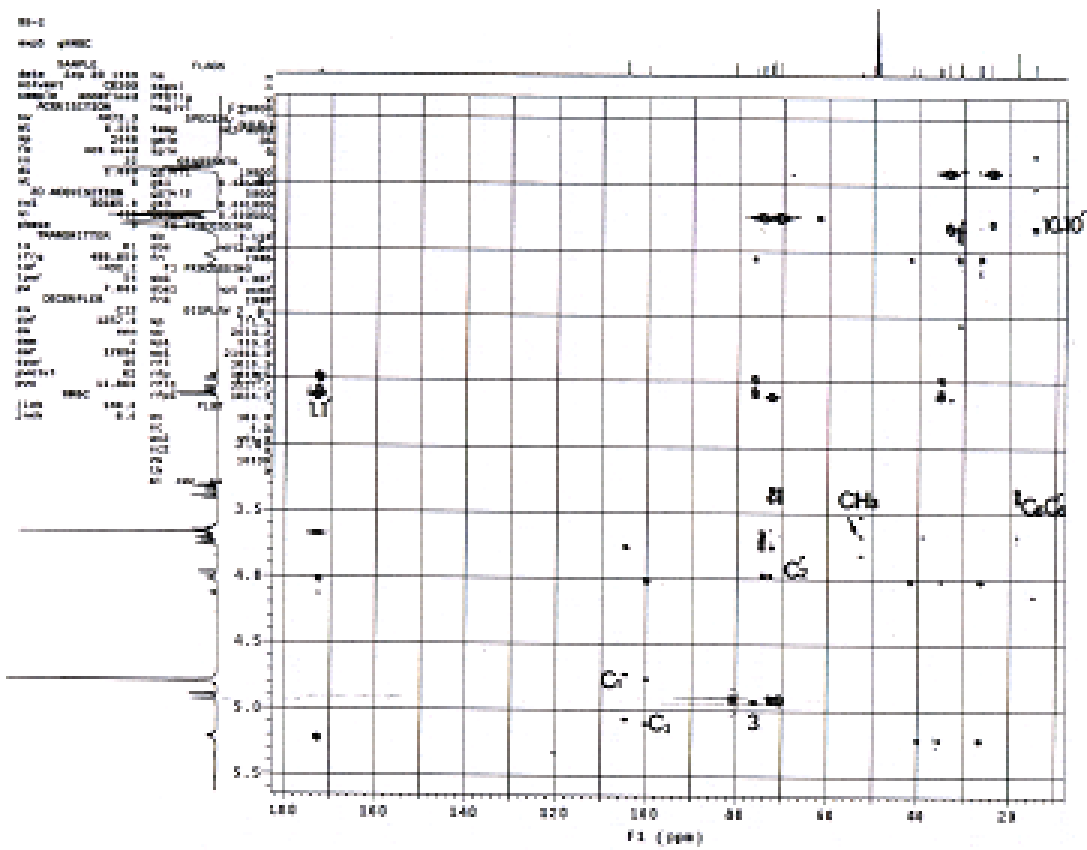


Fig. 23. HMBC(Heteronuclear Multiple Bond Correlation) spectrum of biosurfactant NS-1 in CD₃OD.

droxydecanoic acid methyl ester가 결합된 2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxy decanoic acid methyl ester로 밝혀졌다(Fig. 24).

(8) 생물 유화제의 물리 화학적 특성

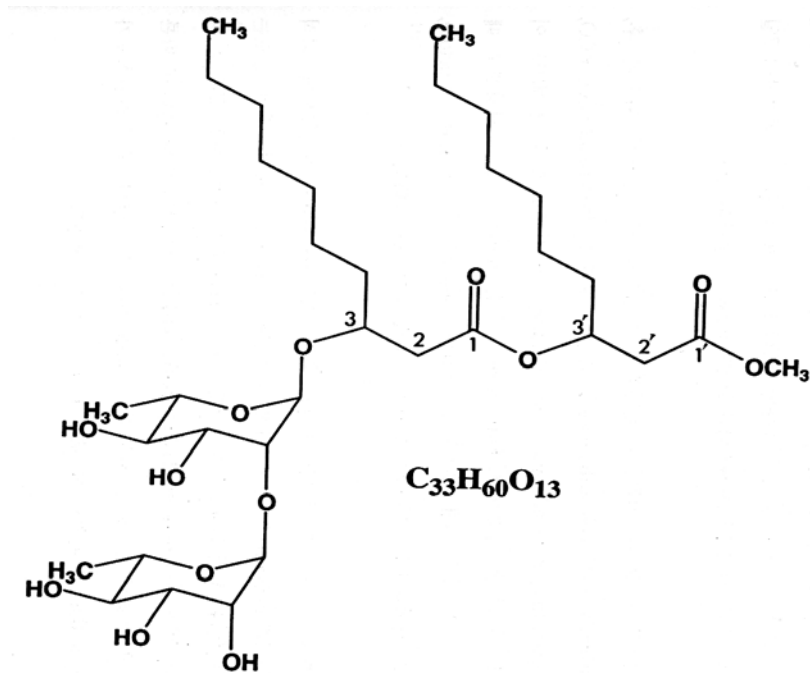
1) 생물 유화제의 표면 장력 저하에 미치는 pH의 영향

표면장력에 영향을 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여, pH에 변화(3.0~10.0)를 주어 pH 변화에 따른 표면장력의 저하능을 표면장력계로 측정한 결과, 최저의 표면장력은 pH 5.6에서 나타났으며, 이때 표면장력은 29.5 mN/m로 측정되었다(Fig. 25). 이 결과를 바탕으로 CMC(critical micelle concentration)값과 시판용 surfactant와 본 균주가 생산하는 천연유화물의 표면장력 및 계면장력을 비교하였다.

2) CMC(critical micelle concentration) 값의 결정

일반적으로 계면활성제들은 낮은 농도에서는 흡착의 형태로 표면장력과 계면장력의 저하에 관여하다가 농도가 진해지면 계면활성제의 흡착이 포화상태에 도달하여 집합체를 형성하는데 이것이 임계마이셀 농도(CMC)이다. 이러한 micelle의 중요한 성질은 입자콜로이드와는 달리 수중에서 매우 안정된 형태를 취하고 있어 유화제의 본래 목적인 유화안정성을 유지시키는데 중요한 역할을 하게 된다.

일반적으로 CMC를 가지는 이유는 모든 형태의 에너지들은 열역학적으로 자유에너지가 낮은쪽으로 임하려고 하는 성질이 강하기 때문에 계면활성제의 농도가 일정농도 이상으로 되면, 단일 또는 이온으로 수용액 속에 존재하는 것보다 집단을 형성하는 것이 유리하며, 이러한 형태를 유지시켜주는 힘이



2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl-
 β -hydroxydecanoate methyl ester

Fig. 24. Structure of biosurfactant NS-1(methyl rhamnolipid) produced by
Pseudomonas aeruginosa BYK-2.

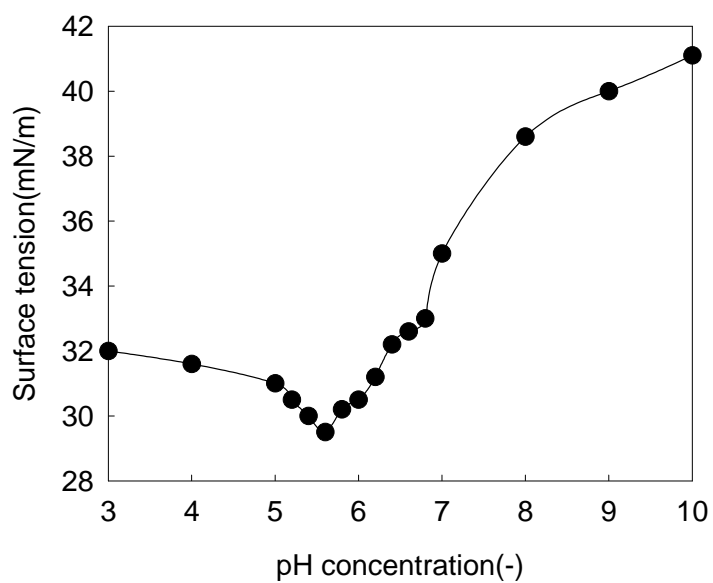


Fig. 25. Effect of pH on the surface tension of crude oil biosurfactant solutions. The pH of biosurfactant solution(10mg/L) in three kinds of buffer* was varied, and it was measured at 25°C.
 * pH 3.0-6.0, 50mM citrate, sodium citrate buffer; pH 6.2-8.0, 100mM phosphate buffer; pH 9.0-10.0, 50mM Boric acid,NaOH buffer

hydrophobic interaction과 van der waals force로 알려져 있다 (Porter et al., 1994).

따라서 본 실험에서는 본 균주가 생산하는 천연유화물이 화학적으로 안정된 형태를 취하는 CMC 농도가 얼마인지를 표면장력계로 측정하였다. 그 결과, 본 균주가 생산하는 천연유화물의 CMC 농도는 10 mg/L로 측정되었고, 이때 표면장력은 29.5 mN/m였다. 이 농도는 토양에서 분리된 *Peudomanas aeruginosa*가 생산하는 rhamnolipid의 CMC 농도 15 mg/L(Mulligan et al., 1993)와 *Peudomanas aeruginosa* ATCC9027이 생산하는 rhamnolipid의 CMC 농도 50 mg/L(Zhang et al., 1992) 보다도 낮은 농도로서, 적은량으로도 유화안정성이 아주 우수하다는 결과이다(Fig. 26).

3) 시판용 surfactant와 천연유화물의 표면장력 및 계면장력 비교

현재 시판중인 emulsan과 합성유화제인 TritonX-100, SDS, Tween 80, Tween 40, Tween 20과 본 균주가 생산하는 천연유화물(biosurfactant)을 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 녹인 후 표면장력을 측정하여 비교하였다.

그 결과, 대조군인 20mM Tris-HCl buffer의 표면장력은 72 mN/m였으며, emulsan은 46 mN/m ; Triton X-100, 32 mN/m ; SDS, 36 mN/m ; Tween 80, 40 mN/m ; Tween 40, 38 mN/m ; Tween 20, 37 mN/m로 각각 측정되었으며, 본 균주가 생산하는 천연유화물은 29.5 mN/m로 측정되었다(Fig. 27).

또한 O/W 사이의 계면장력을 비교하기 위하여 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 각종 surfactant를 0.01% (w/v) 첨가하고 4% (w/v) arabian light crude oil을 넣고 O/W 계면 장력 저하능을 측정하였다. 그 결과, 대조구인 20mM Tris-HCl buffer는 28.0 mN/m, emulsan, 9 mN/m ; Triton X-100, 2.3 mN/m ; SDS, 14.8 mN/m ; Tween 80, 3.5 mN/m ; Tween 40, 3.2 mN/m ; Tween 20 3.0 mN/m로 측정되었으며, 본 균주가 생산하는 천연유화

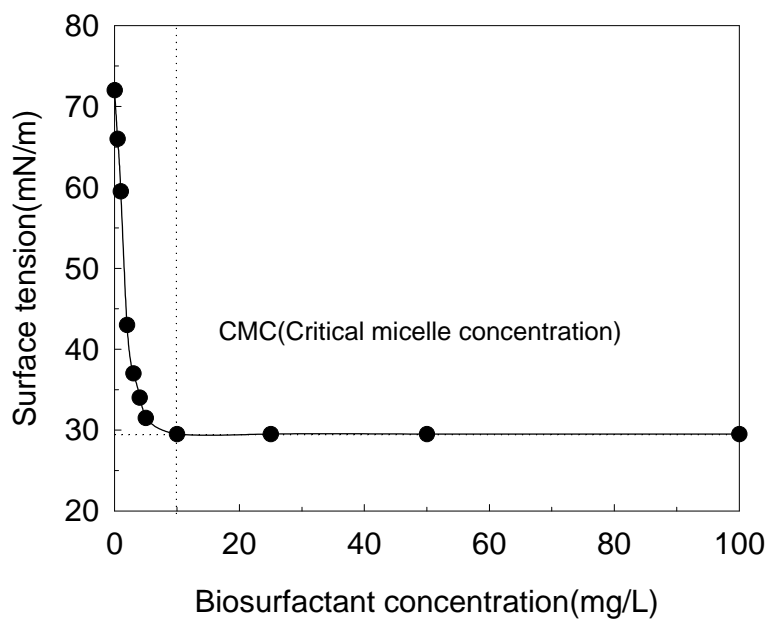


Fig. 26. Effect of increasing biosurfactant concentrations on the surface tension. Biosurfactant solution was prepared in 50mM citrate, sodium citrate buffer(pH 5.6).

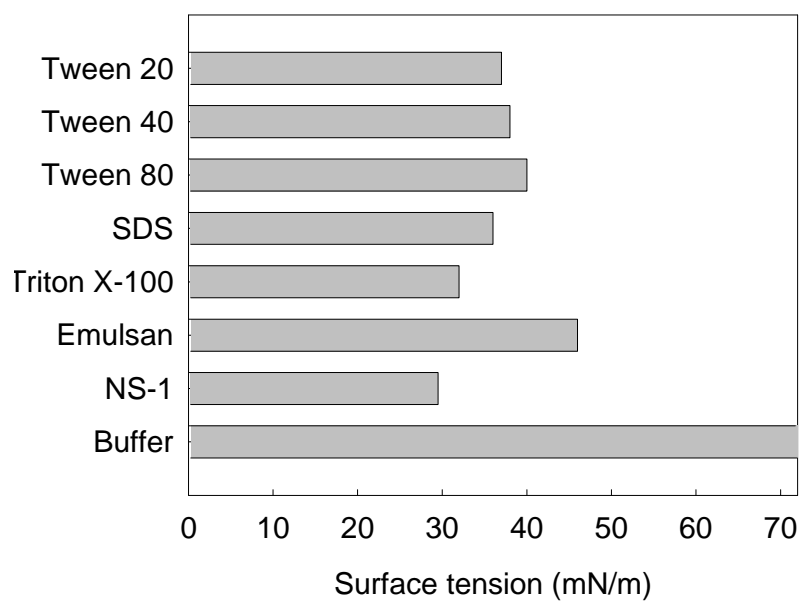


Fig. 27. Effect of surface tension for 0.01%(w/v) various surfactants.

물은 0.9 mN/m로 측정되었다(Fig. 28).

따라서 같은 농도에서 표면장력과 계면장력의 저하능을 비교한 결과, 본 군주가 생산하는 천연유화물이 시판중인 유화제보다 표면장력과 계면장력 저하능이 우수함을 확인되었다.

4) 수질의 종류에 따른 시판용 유화제와의 유화활성 및 안정성 비교

본 군주가 생산하는 천연유화물의 이용가능성을 조사하기 위하여 수질의 종류에 따라 유화활성도와 유화안정성을 측정하였다. 실험에 사용된 용액으로서 는 수돗물, 자연해수, 그리고 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0), 50mM Citrate, Sodium citrate buffer(pH 5.6)을 사용하였다.

수질의 종류에 따라 유화활성도를 측정한 결과, 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)를 이용하였을 경우 유화활성도는 Triton X-100이 138unit로 가장 높은 유화활성을 가졌고, 조 천연유화물(crude biosurfactant), Tween 20, Tween 80, SDS 순으로 각각 122.7, 23.4, 14.4, 12.2, 1.1 unit의 유화활성값을 가졌다(Fig. 29).

50mM citrate, sodium citrate buffer(pH 5.6)를 사용할 경우, 유화활성도는 Triton X-100이 144unit로 가장 높은 활성을 가졌고, crude biosurfactant, Tween 40, Tween 20, Tween 80, SDS 순으로 각각 83.6, 69.9, 39, 28.5, 14.2, 2.0 unit의 유화활성값을 가졌다(Fig. 30).

Tap water를 사용할 경우 유화활성도는 Triton X-100이 133.6unit로 가장 높았고, crude biosurfactant, Tween 20, Tween 40, emulsan, Tween 80, SDS 순으로 각각 110.1, 34.1, 22.2, 20.4, 18.5, 4.2unit의 유화활성 값을 가졌다(Fig. 31).

Sea water를 사용할 경우 유화활성도는 Triton X-100이 168.9unit로 가장 높았고 emulsan, crude biosurfactant, Tween 40, Tween 20, Tween 80, SDS

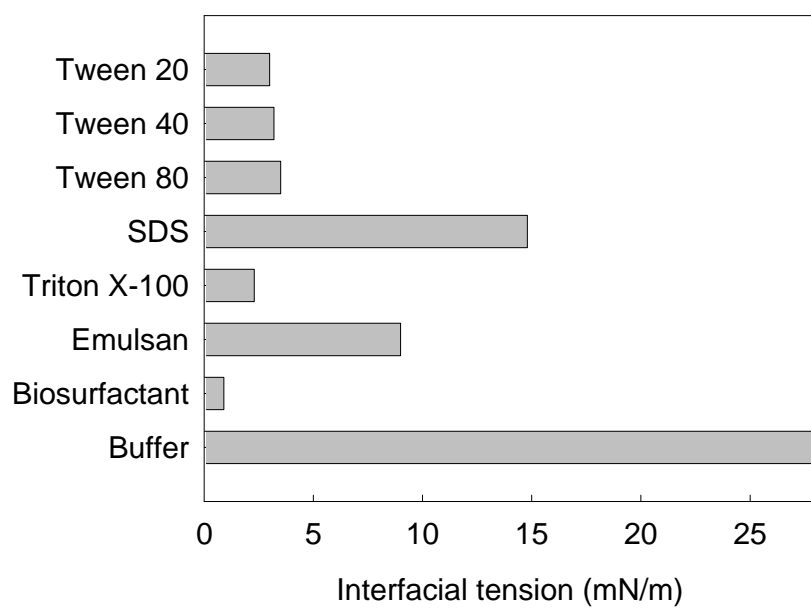


Fig. 28. Effect of interfacial tension for 0.01%(w/v) various surfactants.

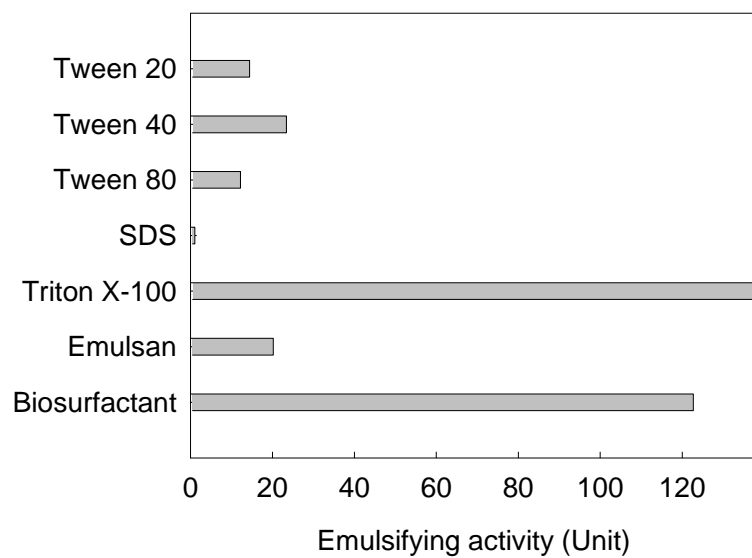


Fig. 29. Emulsifying activity of 0.01% (w/v) various surfactants containing 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)

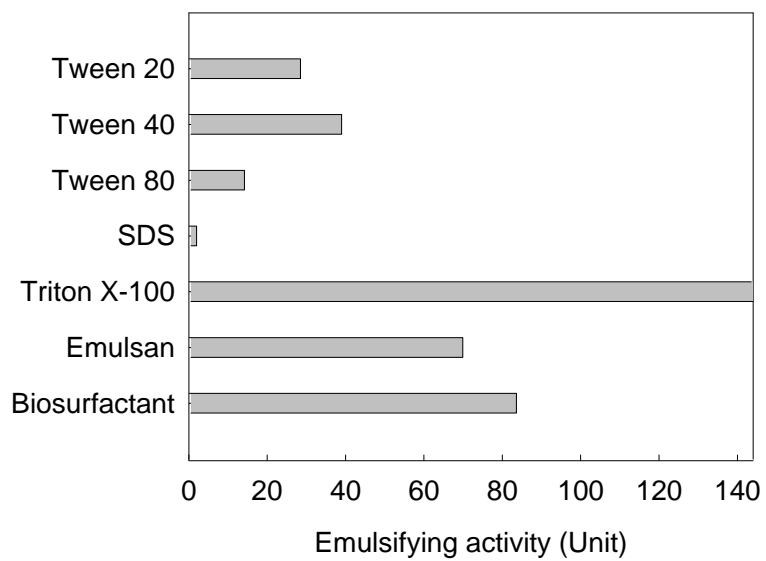


Fig. 30. Emulsifying activity of 0.01%(w/v) various surfactants containing 50mM citrate, sodium citrate buffer(pH5.6).

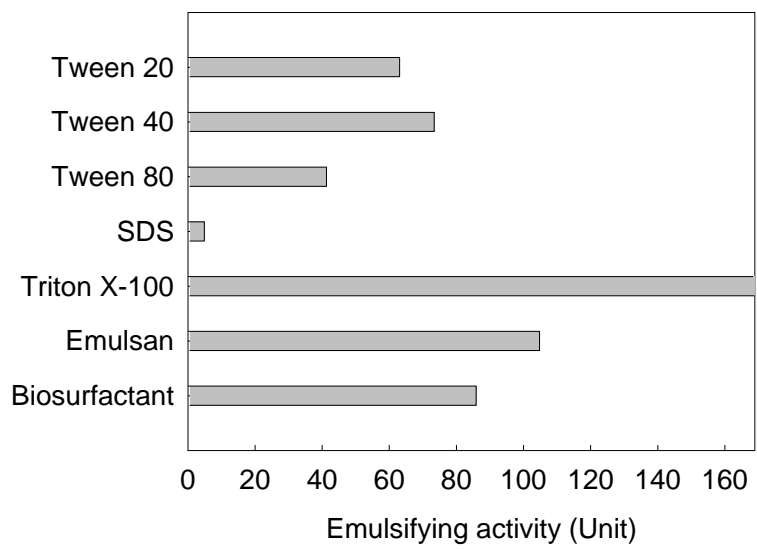


Fig. 31. Emulsifying activity of 0.01%(w/v) various surfactants containing tap water.

순으로 각각 104.8, 85.9, 73.4, 63.1, 41.3, 4.9 unit의 유화활성값을 가졌다(Fig. 32).

또한 유화안정성을 비교한 결과, 20mM Tris-HCl buffer에서는 본 균주가 생산하는 천연유화물이 5시간이 지난후에도 $K_d = -33.5$ 로 가장 안정성이 우수하였으며(Fig. 33), 50mM Citrate, sodium citrate buffer (pH 5.6)에서는 $K_d = -22.2$ 로 emulsan이(Fig. 34), tap water에서는 본 균주가 생산하는 천연유화물이 $K_d = -26$ 으로(Fig. 35), sea water에서는 emulsan과 Tween 40, 천연유화물의 $K_d = -36.6$, $K_d = -40.3$, $K_d = -43.8$ 로 다소 emulsan이 높기는 하지만 거의 유사한 안정성을 나타내었다(Fig. 36).

이러한 결과를 종합해 볼 때 본 균주가 생산하는 천연유화물은 해수나 담수 등에서 유화활성과 유화안정성이 우수한 것으로 밝혀져, 식품첨가물, 세제, 유출유 처리제 등 다양한 산업분야에 응용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 NS-1의 화학 구조 변화를 통하여 표면장력 기능강화도 고려될 수 있을 것으로 사료되어진다.

5) 천연유화물의 온도 및 열 안정성 검토

식품첨가물에 천연유화물을 사용하기 위해서는 온도 및 열 안정성이 우수하여야 제품안정성이 우수하기 때문에 본 실험을 행하였다. 먼저 온도변화에 따른 유화안정성을 검토하기 위해, 온도 20℃~100℃까지의 범위에서 60분간 유화안정성을 측정하였다.

그 결과, 20℃~100℃ 범위 내에서 온도에 관계없이 고른 유화안정성을 유지하였으며, 각 온도별(20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃, 100℃) 유화안정성에 대한 K_d 값은 -6.82, -6.79, -6.07, -8.73, -9.04, -9.45, -10.7로 나타났다(Fig. 37).

또한 천연유화물의 열 안정성을 측정하기 위하여 121℃에서 10분간 고온가

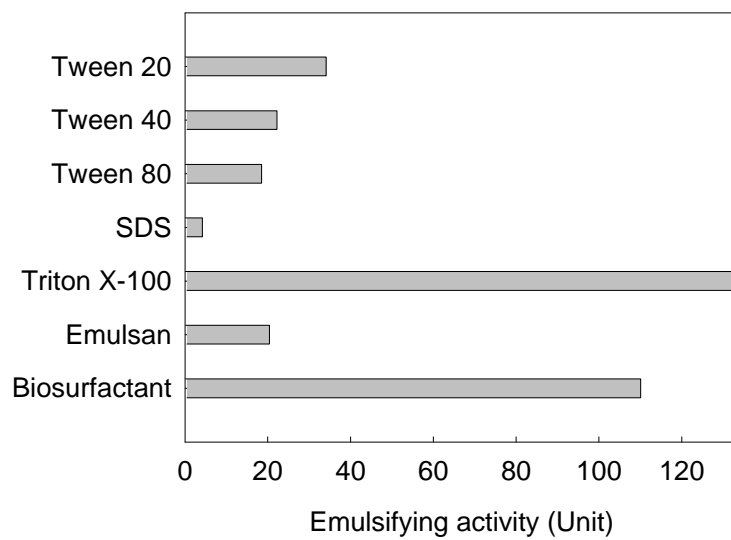


Fig. 32. Emulsifying activity of 0.01%(w/v) various surfactants containing sea water.

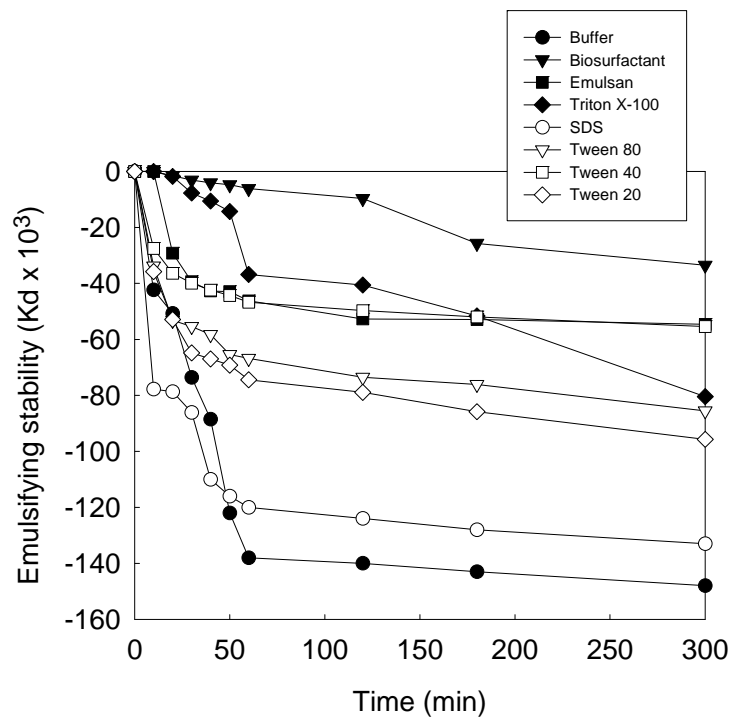


Fig. 33. Emulsifying stability of 0.01%(w/v) various surfactants containing 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0).

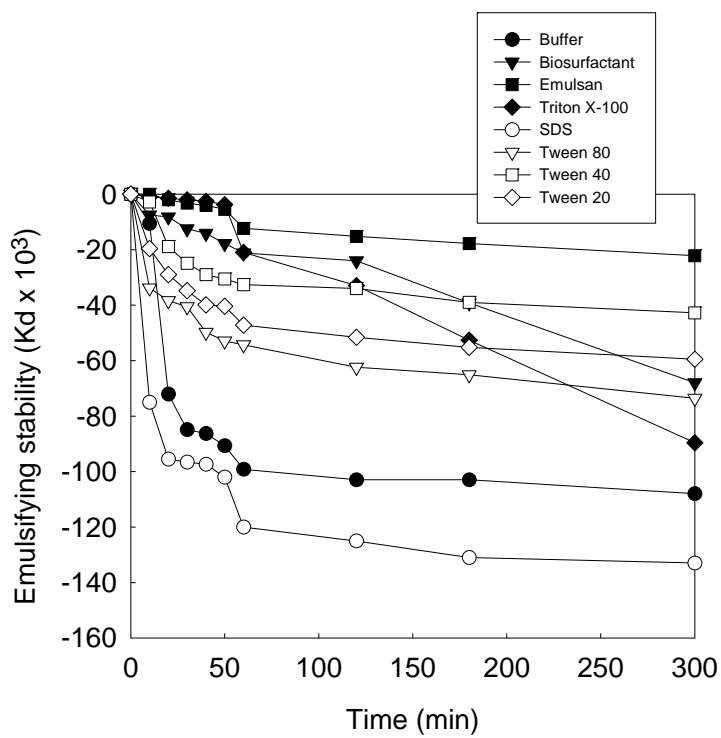


Fig. 34. Emulsifying stability of 0.01%(w/v) various surfactants containing 50mM citrate, sodium citrate buffer(pH 5.6).

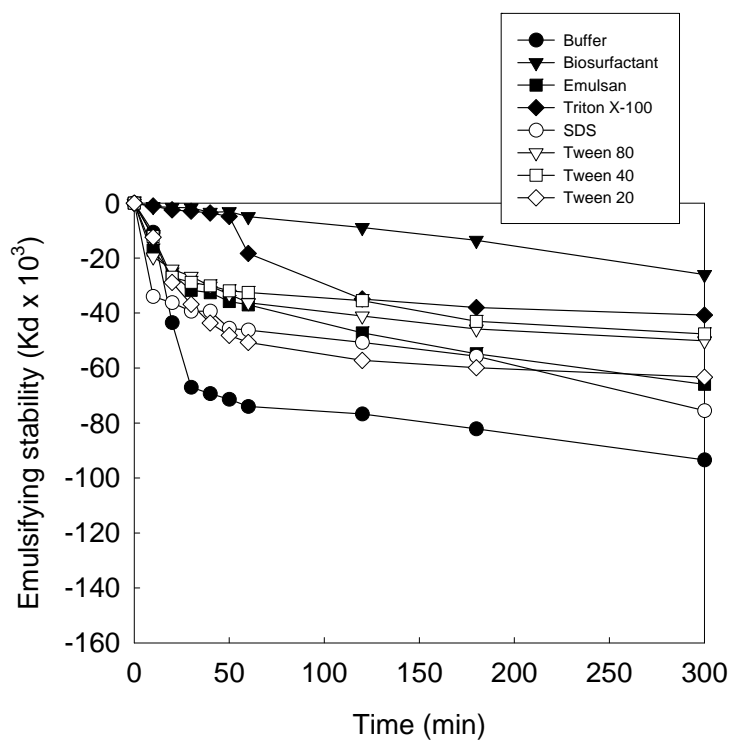


Fig. 35. Emulsifying stability of 0.01%(w/v) various surfactants containing tap water.

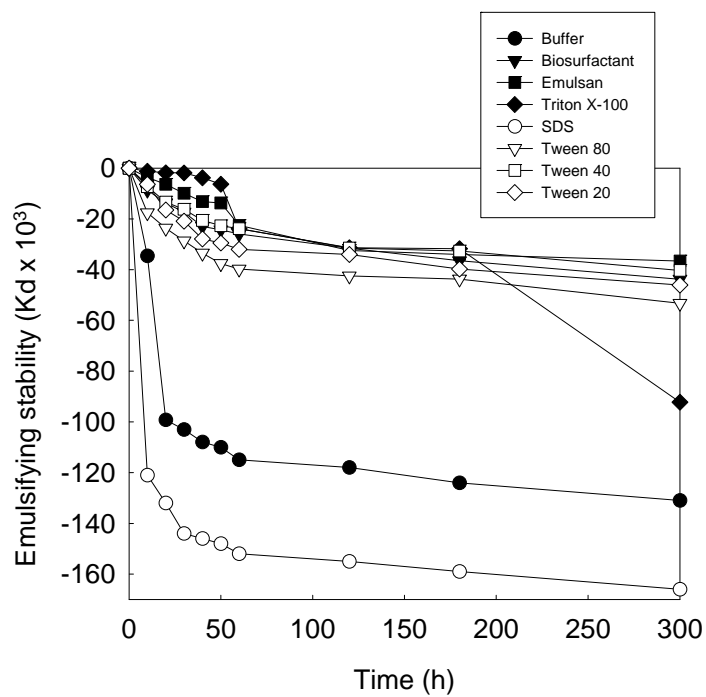


Fig. 36. Emulsifying stability of 0.01% (w/v) various surfactants containing sea water.

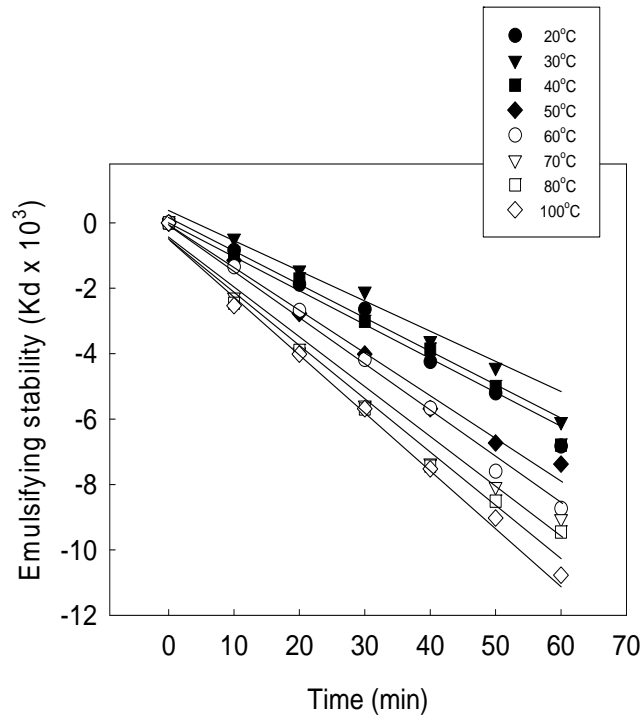


Fig. 37. Effect of emulsifying stability for temperature on the 0.01%(w/v) crude biosurfactant containing 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0).

압 멸균을 실시한 결과, 유화안정성을 고온가압 멸균처리를 하지 않은 것과 비교해 볼 때 열처리하지 않은 것의 60분 후 Kd 값은 -6.13이었고, 열처리 한 것의 경우 -6.53으로 열 안정성이 아주 우수한 것으로 확인되었다(Fig. 38).

6) HLB 값의 측정

HLB 값은 천연유화물이 친수성 성질이 강한지, 소수성 성질이 강한지를 확인하는 수치로 유화형태나 특성을 나타내는 지표가 된다. HLB 값이 1~7인 것은 W/O (Water in Oil)형이고, 10-13은 O/W (Oil in water) 형으로 보고되고 있다(Poter et al., 1994). 그 특징으로는 HLB 값이 1~4는 불용성이며, 4-7은 안정성과 분산능이 떨어지며, 7~9는 안정적이지만 불투명하며, 10~13은 약간 흐리며, 13 이상은 투명한 용액으로 존재하는 것으로 알려져 있다.

따라서, 본 실험에서는 조 천연유화물(crude biosurfactant)과 정제된 천연유화물(NS-1)의 HLB 값을 측정하였으며, 시판용 각종 surfactant(emulsan, Triton X-100, SDS, Tween 80, Tween 40, Tween 20)에 대해서도 측정하였다.

조 천연유화물의 HLB 값은 11.1, 정제된 천연유화물(NS-1)은 10.6, emulsan은 11.4, Triton X-100은 10.0, SDS는 10.6, Tween 80은 15.0, Tween 40은 13.4, Tween 20은 12.1로 측정되어 실험에 사용된 각종 surfactant는 모두 O/W 형으로 확인되었다(Fig. 39).

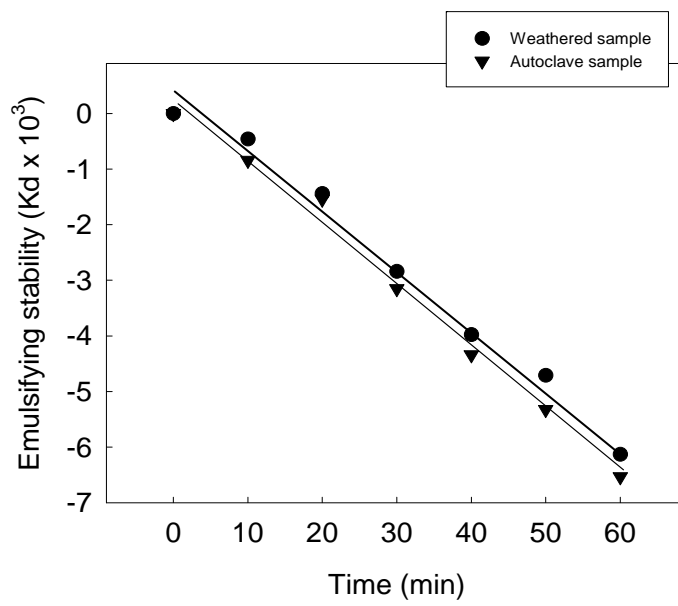


Fig. 38. Emulsifying stability of the biosurfactant treated by heating at 121 °C.

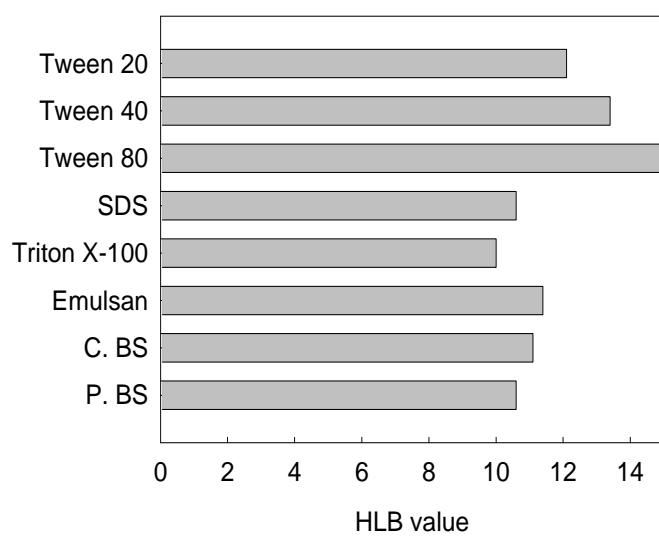


Fig. 39. HLB(Hydrophilic lipophilic balance) value for various surfactants.

2. 천연유화물의 최적 발효생산 조건 검토

(1) 회분배양배양

1) 교반속도에 대한 영향

7 L Jar fermentor에 working volume을 3L로 하여, 기질 1.0 %(w/v) fish oil, 25°C, 0.67 vvm (2L/min)의 조건, 교반속도별 (100, 150, 200, 250, 300, 350 rpm)로 회분배양을 실시하였다.

배양결과, 200 rpm에서 가장 많은 천연유화물이 생산되는 것으로 확인되었다(Fig. 40). 그리고 200 rpm이상의 교반속도에서는 31시간 이후부터 많은 양의 foam이 발생하였으므로 foam에 의해 다량의 배양액이 fermentor 밖으로 overflow되는 것을 막기 위해 5 %(v/v) antifoam (Dow Corning DB-110A 실리콘 소포제)을 사용하였다. 교반속도를 300 rpm 이상으로 올릴 경우 생산량이 계속 감소하는데, 이것은 높은 교반속도로 인하여 전단 속도 (shear rate)가 증가하여 배양조의 혼합은 잘 되지만, 교반기 주위에 소용돌이(eddies)가 많이 생겨 균체 세포막에 손상을 주므로서 천연유화물 생산에 영향을 미치는 것으로 추정되는 결과이다.

2) 통기량의 영향

교반속도 200 rpm, 기질농도 1.0% (v/v) fish oil, 온도 25°C의 배양조건에서 7L Jar fermentor를 이용하여 working volume 3L로 통기량별 (0.33, 0.5, 0.67, 1.0 vvm) 회분배양을 실시하였다.

배양결과, 0.67 vvm (2L/min)에서 가장 많은 천연유화물 생산이 나타났다(Fig. 41). 교반속도실험에서와 마찬가지로 많은 양의 foam이 발생하여 5% (v/v) antifoam (Dow Corning DB-110A 실리콘 소포제)을 사용하였다. 통기

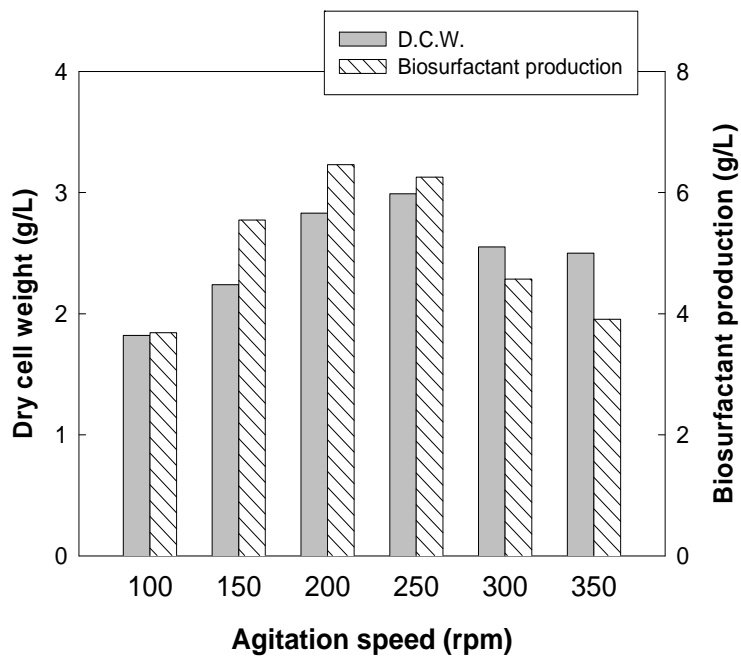


Fig. 40. Effect of agitation speed on the cell growth and biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P) at a batch fermentation condition (Sampling point 96hr).

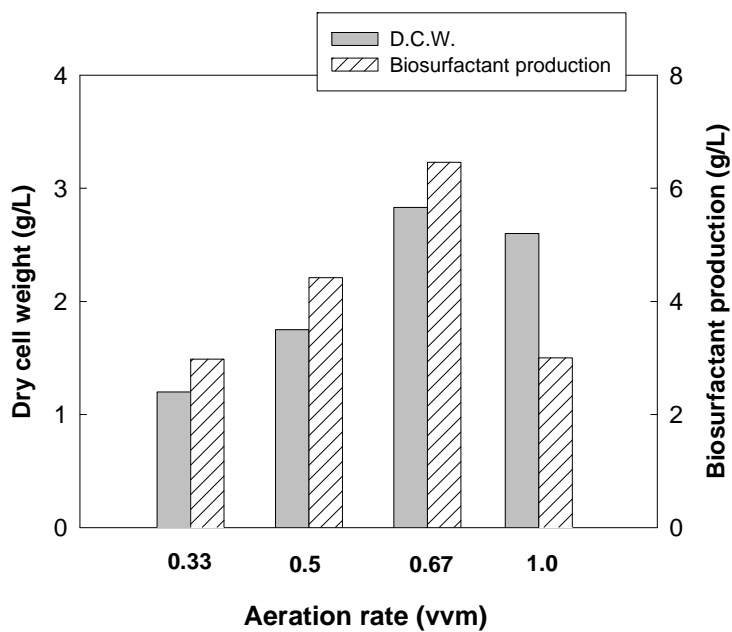


Fig. 41. Effect of aeration rate on the cell growth and biosurfactant production at a batch fermentation condition (Sampling point 96hr).

량 1.0 vvm (3L/min)의 경우 생산량이 0.67 vvm에 비해 반으로 감소하였는데, 이는 foam발생에 의해 antifoam이 배양조에 다량으로 들어가 천연유화물 생산량에 영향을 준 것으로 사료된다.

3) 종균배양의 접종량에 따른 영향

발효조내 균체량의 증가는 종배양액의 균체량에 비례하지만, 종배양액을 적당량 이상 접종하면 배지내의 각종 영양원이 희석될 뿐만 아니라, 종배양액내에 축적된 노폐물이 많이 혼입되어 세포의 노화를 촉진하게 되므로 성공적인 배양을 수행할 수 없다. 따라서 발효조 배양시 종균의 접종량에 따른 균체 생육의 영향 및 천연유화물 생산량에 미치는 영향을 조사하였다.

2.0 % (v/v)의 종균을 접종하였을 경우, 1.5 % (v/v)보다 세포 농도는 높았지만 생산량은 떨어졌다(Fig. 42). 이는 종균량이 많아짐으로서 배양초기에 영양원의 희석이나 종균배양시 축적된 노폐물이 미치는 원인으로 판단된다. 또한 1.0, 1.5 % (v/v) 접종량보다 2.0 % (v/v)의 DO(용존 산소량)가 낮으므로 높은 세포 농도에서는 산소 소모 속도가 공급속도를 초과하여 산소 부족이 야기되고, 이것이 생산량 감소로 이어진 또 다른 원인으로 예상할 수 있었다.

4) 탄소원 농도의 영향

탄소원은 미생물 생육에 있어 가장 기본이 되는 에너지원으로서 균체의 성장과 천연유화물 생산에 절대적인 영향을 미친다. 따라서 Flask 배양조건 (25°C, 180rpm)에서 hydrocarbons, fatty acids, sugars를 탄소원으로 배양한 후, 균성장과 유화활성도를 측정하여 기질별로 상대 비교함으로써 최적기질을 선정하였다.

그 결과, 최적 탄소원은 fish oil이었고, 이를 바탕으로 회분발효에서 7 L Jar fermentor를 이용하여 working volume 3 L, 종균 접종량 1.5%, 교반속도

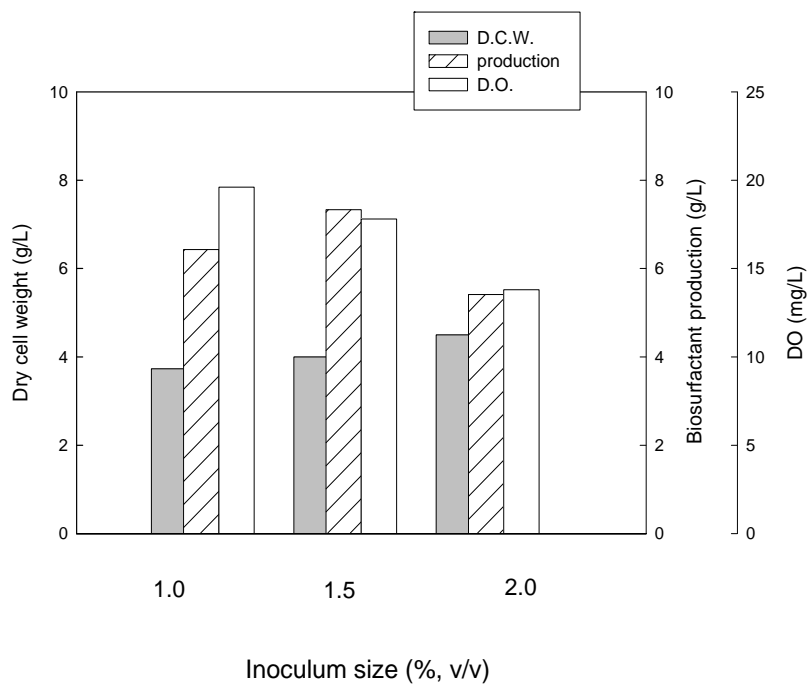


Fig. 42. Effect of inoculum size on the cell growth, biosurfactant production and DO by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) at 200 rpm, 0.67 vvm, 25°C.

및 통기량 200 rpm, 0.67 vvm의 발효조건에서 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0% (v/v) fish oil 농도별로 배양시간에 따른 균체건조 중량, 천연유화물 생산량 및 기질소비량을 측정하였다. 그 결과 2.5% (v/v) fish oil에서 균체건조 중량과 천연유화물 생산량 모두 다른 기질농도에 비해 가장 높은 것으로 확인되었다 (Fig. 43-45).

5) 회분발효배양을 통한 천연유화물 생산과 유화활성 측정법을 이용한 천연유화물의 정량화

천연유화물 생산량을 정량화하기 위하여 회분발효배양을 실시하였다. 배양 조건은 이전 실험과 동일한 조건에서 실시하였으며, 천연유화물 정량분석을 위하여 orcinol assay법을 사용하여 농도별 표준곡선을 작성하였다.

그 결과, rhamnose 농도별, 흡광도 값은, A_{421nm} 에서 rhamnose 10 μ g당, 1.0AU의 흡광도 값을 가지는 것으로 나타났으며, 상관계수는 0.998이었다(Fig. 46).

7 L 발효기로 192시간 동안 배양한 결과, 균체의 증식 속도는 108시간까지는 계속 증가하였으나, 120시간부터 조금씩 감소하는 추세였으며, 이때 균체건조 중량은 6.17 g/L이었다(Fig. 47). 생산된 천연유화물은 당지질로서 정량화를 위하여 당과 지질 사이의 결합을 가수분해시켜 당 부위만을 detection하는 orcinol assay법으로 천연유화물을 정량화하였다.

그 결과, 배양시간에 따라 당의 양은 계속 증가하였으며, 192시간 배양시 15.6 g/L의 가장 많은 당이 검출되었다. 또한 기질소비량의 변화에서 초기 25g/L이던 fish oil의 농도가 192시간 배양시 5g/L로 잔류 oil이 20 % 가량 남아있었다. 이는 배양시간을 더 늘린다면 천연유화물의 생산량을 계속 증가시킬 수 있을 것으로 사료되는 결과이다. 그러나 배양시간에 따른 유화활성도 변화는 48시간까지는 증가하다가 60시간 이후부터는 감소하는 것으로 나타났

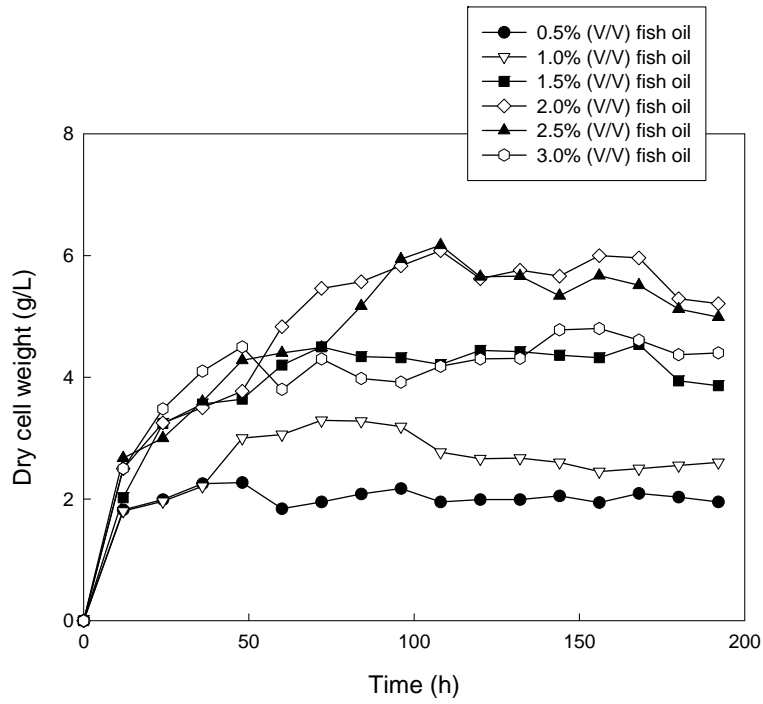


Fig. 43. Effect of fish oil concentrations on the cell growth during a 7L batch fermentation at 25°C, 200rpm, 0.67vvm.

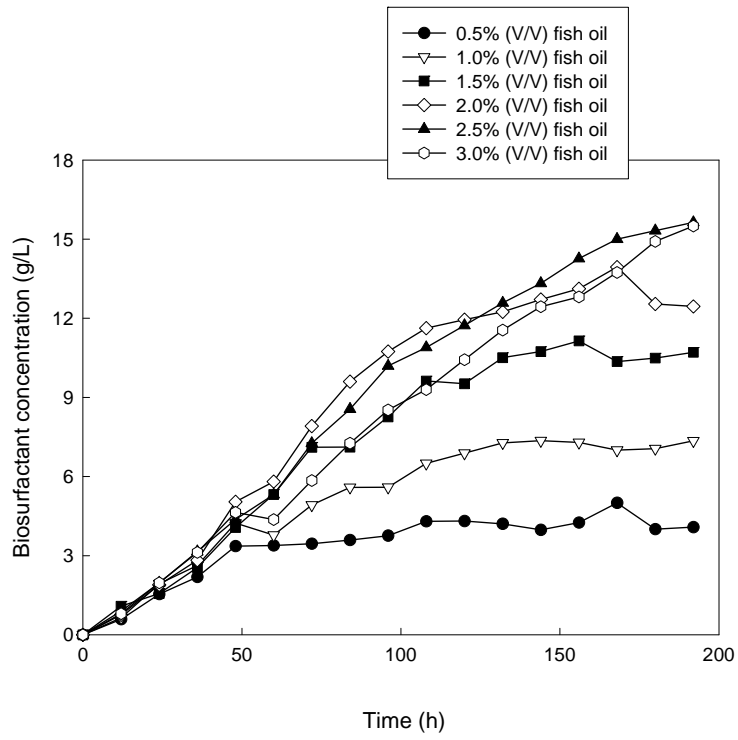


Fig. 44. Effect of fish oil concentrations on the Biosurfactant during a 7L batch fermentation at 25°C, 200rpm, 0.67vvm.

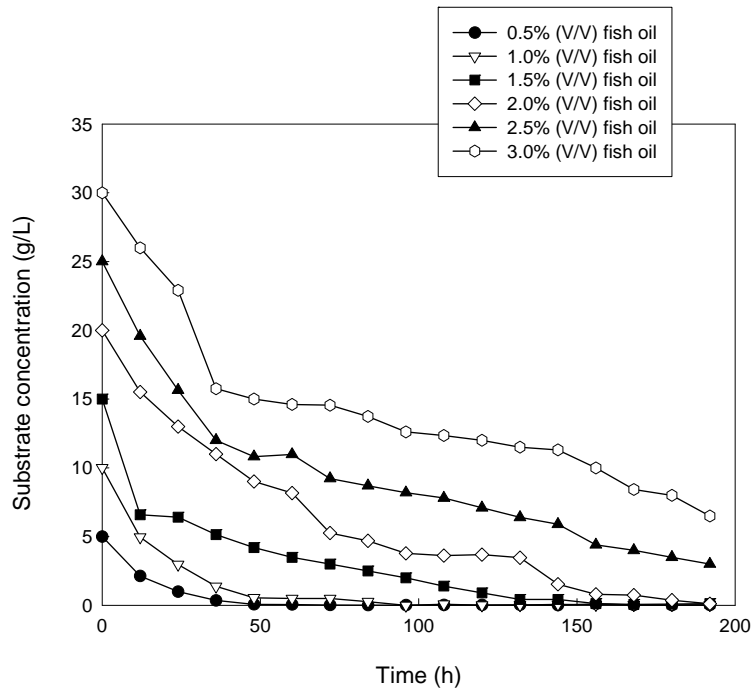


Fig. 45. Effect of fish oil concentrations on the substration concentration during a 7L batch fermentation at 25°C, 200rpm, 0.67vvm.

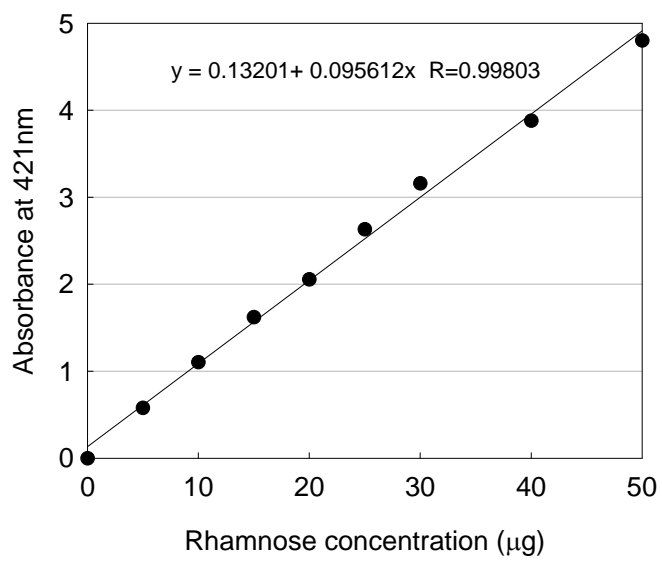


Fig. 46. Standard curve for rhamnose concentration.

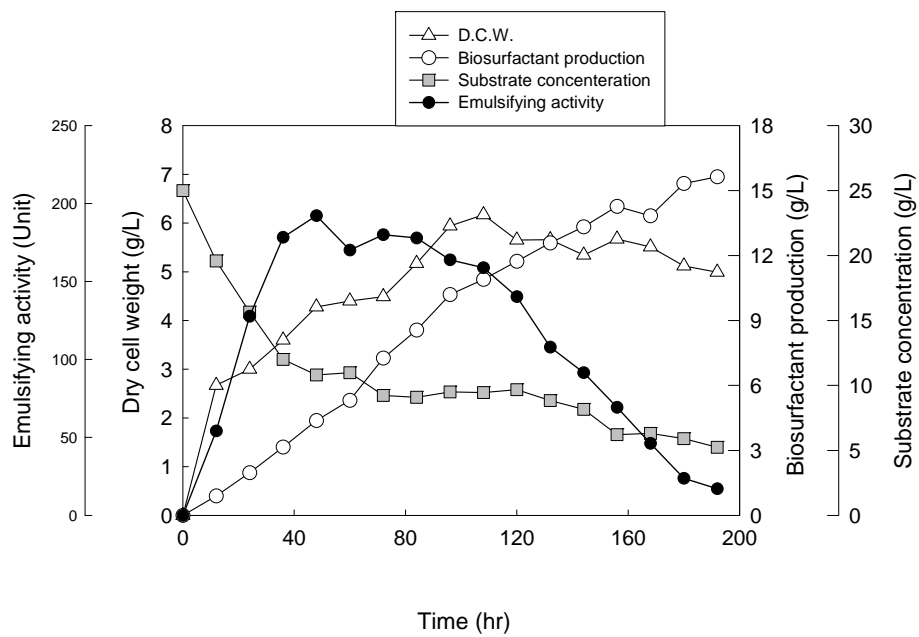


Fig. 47. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) during a 7L batch fermentation. Conditions: 2.5% (v/v) fish oil, 0.01% (w/v) urea, 25°C, 200rpm and 0.67vvm

다. 배양시간에 따라 천연유화물의 당 농도는 계속 증가한 반면, 유화활성도는 56시간 이후부터 계속 감소하는 것으로 나타나는 현상을 규명하기 위해 다음 2가지 가능성을 가설로 설정하여 실험을 실시하였다.

- ① 배양중인 균체가 기질로 천연유화물을 소비해 버리는 경우
- ② 배양시간에 따른 천연유화물의 생산량 증가로 유화에 관여하는 micelle의 형태가 변화하는 경우

①의 경우에는 유화활성이 감소하는 시점이 탄소원으로 사용되는 기질이 완전히 소비되지 않는 시점 (잔존 기질량 10 g/L)으로 균이 생산된 천연유화물을 기질로 사용할 가능성이 낮다는 점과 실제 배양시간별 (12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h)로 각 시료를 2 mL씩 취하여 유기용매 추출법으로 추출 농축한 시료를 같은 농도로서 TLC plate에 점적하여 분석한 결과, 천연유화물의 농도가 감소하지 않은 점 등의 결과로부터 미루어 볼 때 ①의 가능성은 매우 낮은 것으로 나타났다 (Fig. 48).

반면, ②의 경우 Porter 등이 유화물의 농도가 점차 증가하면 유화물은 micelle이 형성되었다가 Hexagonal → Lamellar → revers micelle로 구조적 변형을 일으킨다는 보고가 있다. 따라서 본 균주가 생산하는 천연유화물의 경우, 천연유화물의 생산량이 증가하면 이러한 원인에 의해 유화활성이 감소되는지를 확인하기 위하여 유화활성이 감소되는 시간의 배양상층액을 농도별로 희석하여 유화활성도를 측정하였다. 유화활성도를 측정하기 위하여 먼저 희석 농도를 결정하였으며, 희석농도는 orcinol 법에 의해 천연유화물의 당 농도가 가장 높은 192시간때의 시료를 이용하여 희석농도를 결정한 결과, 최적 희석농도는 20배로 확인되었다 (Fig. 49). 이러한 결과를 뒷받침하기 위하여 정제된 천연유화물을 이용하여 농도별 유화활성도를 측정하였으며, 이 경우에도

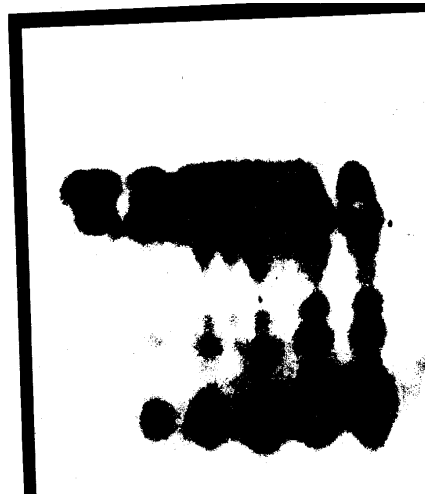


Fig. 48. TLC chromatogram of time course on the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (incubation for 192h). A, 12h; B, 24h; C, 48h; D, 72h; E, 96h; F, 120h. detection reagent, α -naphtoresorcinol; development solvent, CMW(60 : 25 : 4, v/v).

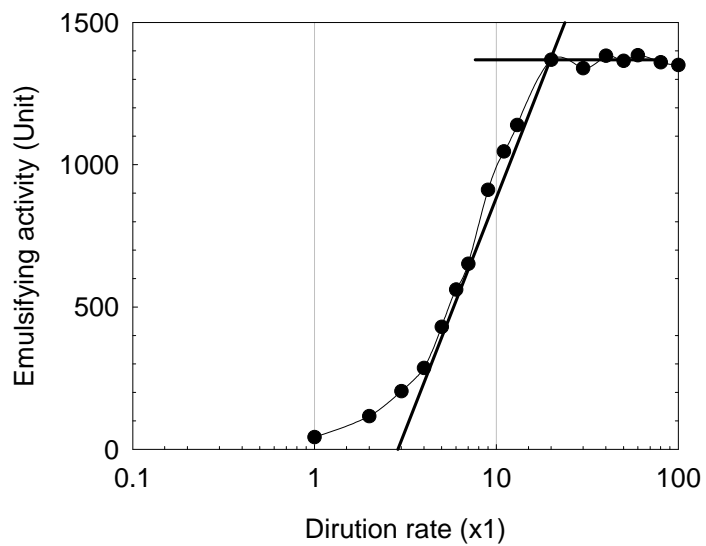


Fig. 49. Emulsifying activity of optimum dilution rate for cultur broth (incubation for 104h).

앞선 결과와 마찬가지로 250 μ g 농도이후부터는 유화활성이 감소됨을 알 수 있었다. 따라서 배양시간에 따른 유화활성의 감소원인은 ②의 경우처럼, 천연유화물의 농도가 증가함에 따라 micelle의 구조가 변화됨으로써 유화안정성이 떨어져 유화활성이 낮게 나오는 것으로 추정된다 (Fig. 50).

- 천연유화물의 정량분석

정제된 천연유화물과 crude 천연유화물을 농축하여 각 시료를 50 μ g, 100 μ g, 150 μ g, 200 μ g 씩 저울로 정량화하여 orcinol assay 분석법으로 표준곡선을 작성하였다. 분석결과, 정제된 천연유화물의 상관계수는 0.998이었고, crude 천연유화물은 0.992로 각 시료농도별 상관도가 높은 것으로 확인되었으며, 정제된 천연유화물에 포함된 rhamnose의 농도를 rhamnose 표준곡선과 비교한 결과, 천연유화물 100 μ g당 흡광도는 4.91AU를 가지며, rhamnose 50 μ g당 4.9AU를 가짐을 알 수 있었다(Fig. 51). 따라서 rhamnose 농도에 대한 천연유화물의 농도비는 1: 2로 천연유화물의 농도 중 1/2이 rhamnose 농도이며, 1/2이 lipid 성분임을 예상할 수 있었다.

이러한 결과를 바탕으로 천연유화물의 농도에 따른 유화활성도 값을 계산하였다. 정제된 천연유화물의 농도를 50 μ g, 100 μ g, 200 μ g으로 정량하여 농도별 유화활성도를 측정하였고, 그 결과 정제된 천연유화물 100 μ g당 36 unit의 유화활성도값을 가졌다(Fig. 52). Crude 천연유화물은 100 μ g당 16 unit의 유화활성도를 가졌다.

이 결과를 천연유화물의 정량에 이용하였다.

- 유화 활성도 값을 이용한 생산된 생물 유화제의 정량방법

유화활성도 값을 이용한 천연유화물을 정량화하는 방법을 정리하면 다음과 같다.

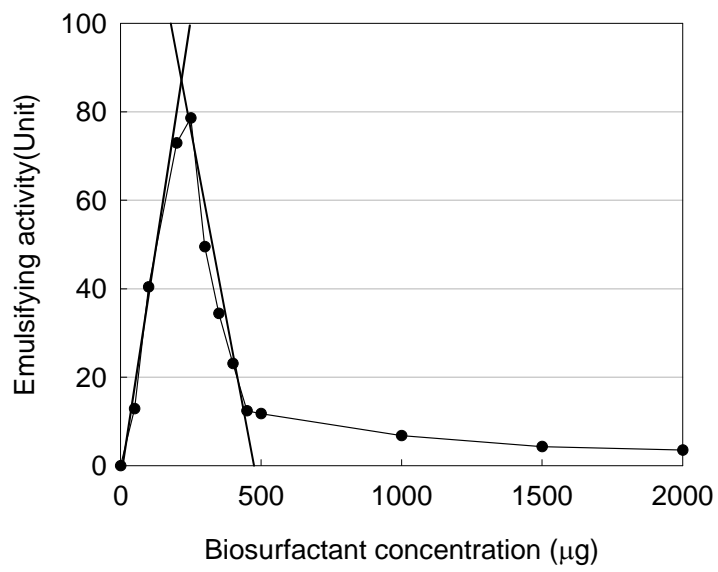


Fig. 50. Change of emulsifying activity on the purified biosurfactant concentration.

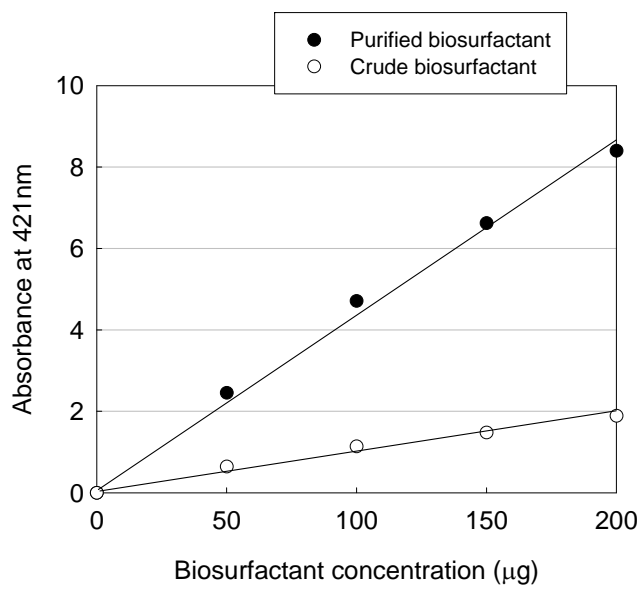


Fig. 51. Standard curve of sugar content on the biosurfactant concentration.

● $y = 0.244 + 0.0419x$ $R = 0.99784$; ○ $y = 0.1076 + 0.009236x$ $R = 0.99232$

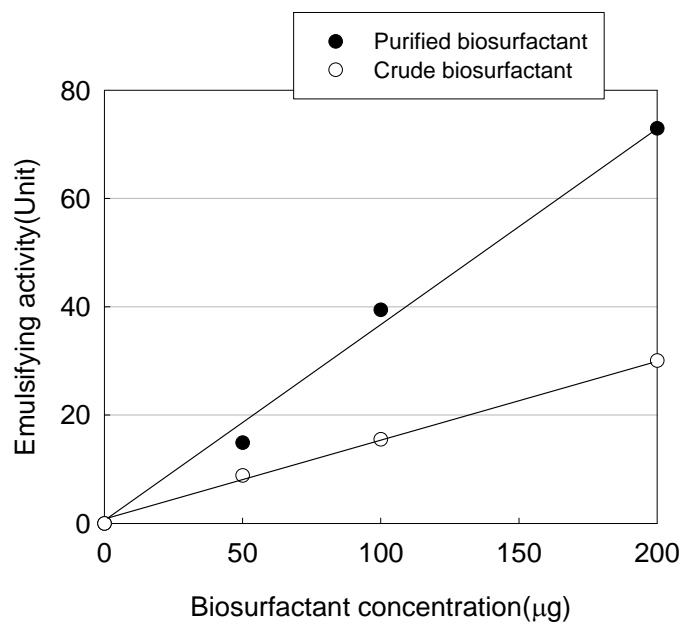


Fig. 52. Standard curve of emulsifying activity for biosurfactant concentration.

● $y = -0.1348 + 0.37609x$ $R = 0.9935$; ○ $y = 0.0624 + 0.014833x$ $R = 0.99889$

a. 표준곡선(Standard curve) 작성

① 시판용 rhamnose를 이용하여 농도별로 orcinol assay법으로 421nm 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성한다.

$$Cr = A \quad \text{--- (1)}$$

(Cr, concentration of rhamnose ; A, absorbance)

② 정제된 천연유화물을 무게로 정량하여 각 농도별 당(rhamnose)량을 orcinol법으로 측정하여 표준곡선을 작성한다.

$$W_{PB} = Cr \times f \quad \text{--- (2)}$$

(W_{PB}, weight of purified biosurfactant ; f, factor)

③ 정제된 천연유화물의 농도에 대한 유화활성도를 측정한다.

$$E_{PB}(U) = W_{PB} \quad \text{--- (3)}$$

(E_{PB}, unit of emulsifying activity)

④ 배양상층액 1 L당 유화활성도를 계산한다.

$$E_{(CB)} = E_{(1.25mL)} \times 800 \quad \text{--- (4)}$$

(E_(CB), emulsifying activity of culture broth liter)

b. 유화활성도값을 이용한 배양액 내 천연유화물의 정량

$$P_{(BS)} = E_{(CB)}/E_{(PB)}$$

(P_(BS), Concentration of biosurfactant from culture broth)

(2) 반회분발효 (Fed-batch fermentation)에 의한 천연유화물의 발효생산 조건 검토

Pseudomonas aeruginosa BYK-2(KCTC 18012P)에 의한 천연유화제 생산을 향상시키기 위하여 반회분발효를 실시하였다. 반회분발효의 배양조건은 회분발효에서 최적조건 실험결과를 바탕으로 7L Jar Fermentor를 이용하여 초기 working volume 3L, 교반속도 200 rpm, 통기량 0.67 vvm 및 온도 25°C에서 회분발효를 실시하다가, fish oil의 농도가 5g/L 이하로 떨어지는 시점에서 fish oil의 농도 및 공급량을 달리하여 발효조에 주입하였다.

Fig. 53은 공급배지를 2.5% fish oil을 사용하여 배양 4일째부터 공급을 시작하여 24시간마다 기질을 2.5 mL씩(100 mL medium) 공급하였다. 최대 균체량과 천연유화물 생산량은 각각 6.1 g/L, 22.7 g/L(264h)이었다. 배양이 끝난 이후에도 균체 및 천연유화물생산량은 계속 증가하였으나, 14일 이후부터 다소 감소하였다.

Fig. 54에서는 공급배지를 Fig. 53에서와 같은 농도의 2.5% fish oil을 사용하였고 공급량을 10배로 늘여 25mL fish oil (1L medium)을 공급하였다. 이때 최대 균체량과 천연유화물 생산량은 각각 5.5 g/L, 12.9 g/L(240h)이었다.

Fig. 55에서는 공급기질의 농도를 낮게하여 1.0 % fish oil을 10mL fish oil (1L medium)을 공급하였다. 배양시간이 240h일 때 최대 천연유화물 생산량은 9.8 g/L이고, feeding 했을 때 균체량 및 생산량이 감소하는 경향이 나타났는데 이는 낮은 농도의 공급배지에 의해 균체량과 생산량이 희석된 것으로 판단되는 결과이다.

그러므로 균체의 희석효과를 감소시키기 위하여 고농도의 fish oil을 일정하게 공급하는 continuous fed-batch를 실시하였다(Fig. 56). 그 결과, 최대 균체량과 천연유화물 생산량은 각각 6.0g/L, 19.3g/L (384h)였다. 고농도의 공급배지로 인해 균체량은 계속 증가하였지만, 다량의 기질로 인해 물질전달과 산소

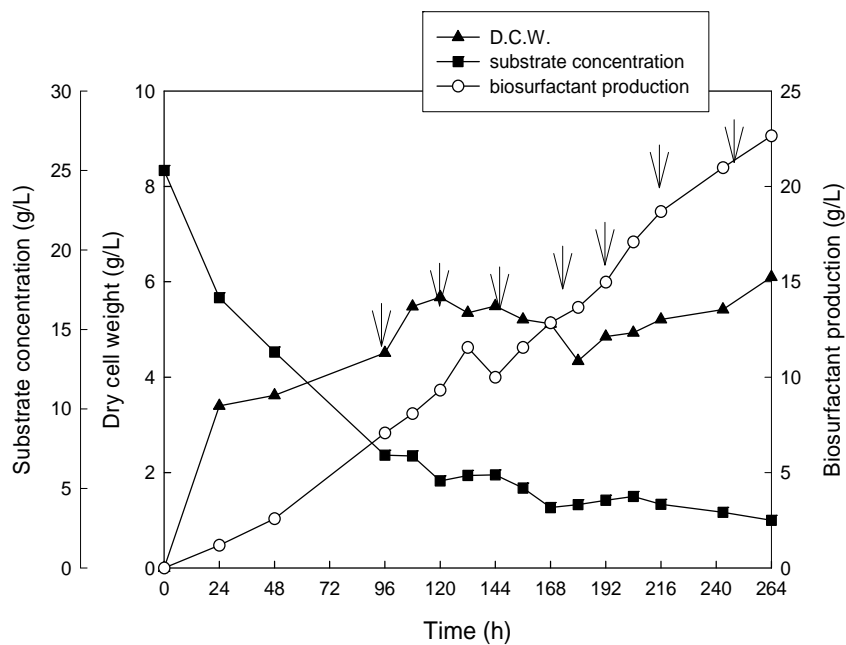


Fig. 53. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) during a fed-batch fermentation on 200rpm and 0.67vvm. The arrow indicates the start of medium feeding (2.5mL fish oil/100mL medium).

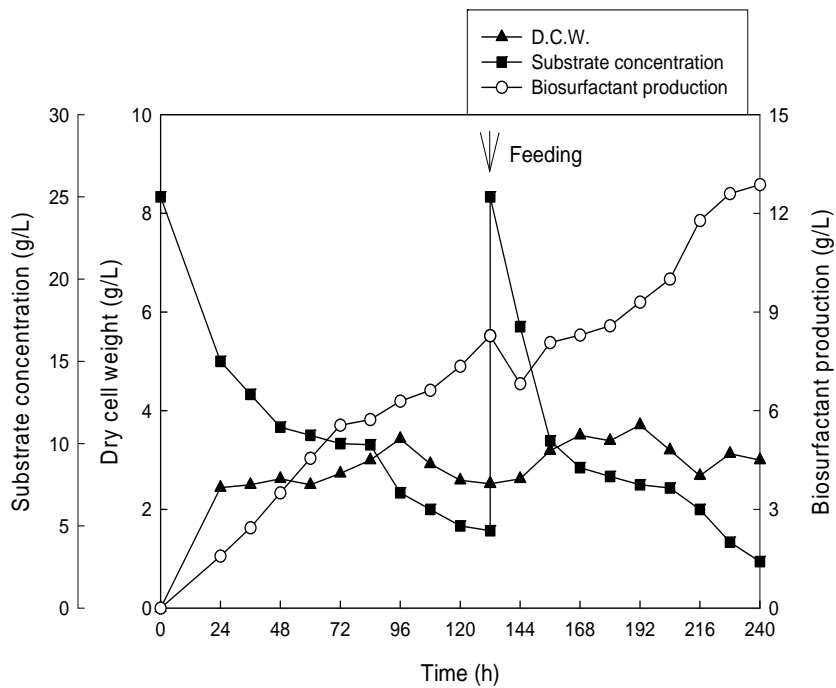


Fig. 54. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) during a Fed-batch fermentation on 200rpm and 0.67vvm. The arrow indicates the start of medium feeding (25mL fish oil/1L medium).

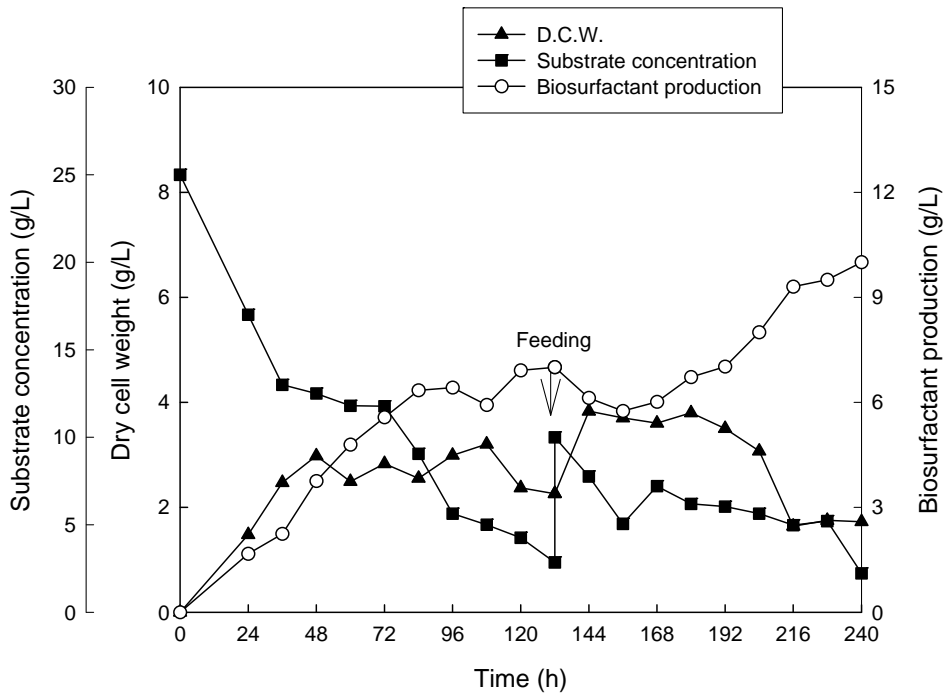


Fig. 55. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) during a Fed-batch fermentation on 200rpm and 0.67vvm. The arrow indicates the start of medium feeding (10mL fish oil/1L medium).

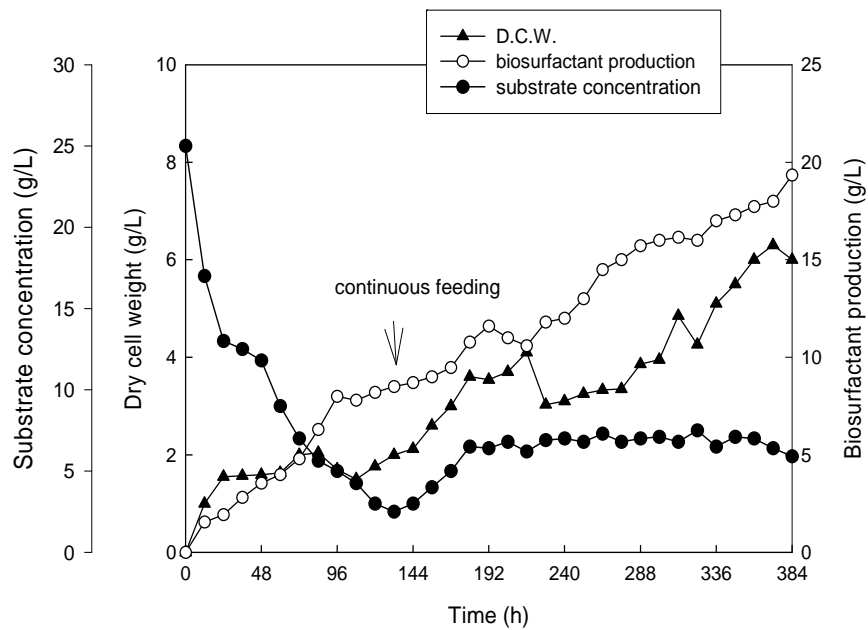


Fig. 56. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) during a continuous fed-batch fermentation on 200rpm and 0.67vvm. The arrow indicates the start of medium feeding.

공급이 제한되어 Fig. 53보다 천연유화물 생산량이 감소되었다. 그러나 공급속도를 조절한다면 생산량을 더 높아질 가능성이 있다.

반회분배양의 경우 공급 농도 2.5% fish oil을 사용하여 적은 공급량 (2.5mL fish oil/100mL medium)으로 배양액내 의 fish oil이 거의 고갈되었을 때마다 기질을 공급하여 배양한 결과 최대 생산량 22.7g/L를 얻을 수 있었다 (Fig. 53).

(3) 연속발효 (Continuous fermentation)

연속발효 배양조건은 회분발효의 최적조건 실험결과를 바탕으로 7 L Jar Fermentor를 이용하여 초기 working volume 3L, 교반속도 200 rpm, 통기량 0.67 vvm 및 온도 25°C에서 실시하였다(Fig. 57). 균체가 정지기에 도달하고 기질 (fish oil)이 거의 소비되었을 때 기질과 배양액을 주입하고, 동시에 발효기내의 배양액을 제거함으로써 배양 부피를 일정하게 유지하였다. 반회분 발효 배양시 많은 공급량을 주입했을 때 균체량과 생산량이 희석되는 결과가 나타났으므로, 연속배양액에서는 희석율을 최대로 낮추어 균체나 생산된 천연유화물이 세출 (washout)되는 현상이 일어나지 않도록 하였다. Fig. 57에서 보면 5-6일째부터 균체량이 정상상태 ($dX/dt=0$)에 도달하였고 이 때 희석속도 (D)는 0.008 h^{-1} 이었다.

3. 균체 고정화 기법을 이용한 천연유화물의 생산

천연유화물을 연속생산하기 위한 방법으로 균체를 재 사용할 수 있고, 반응기 내의 높은 균체 농도 유지가 가능하며 미생물 대사활동의 안정성 등의 장점을 지니고 있는 균체 고정화 기술을 사용하였다.

균체고정화에 사용되는 최적 지지체, 균체농도, 비드 크기 등을 조사하고, 생물반응기에서 연속생산을 시도하였다.

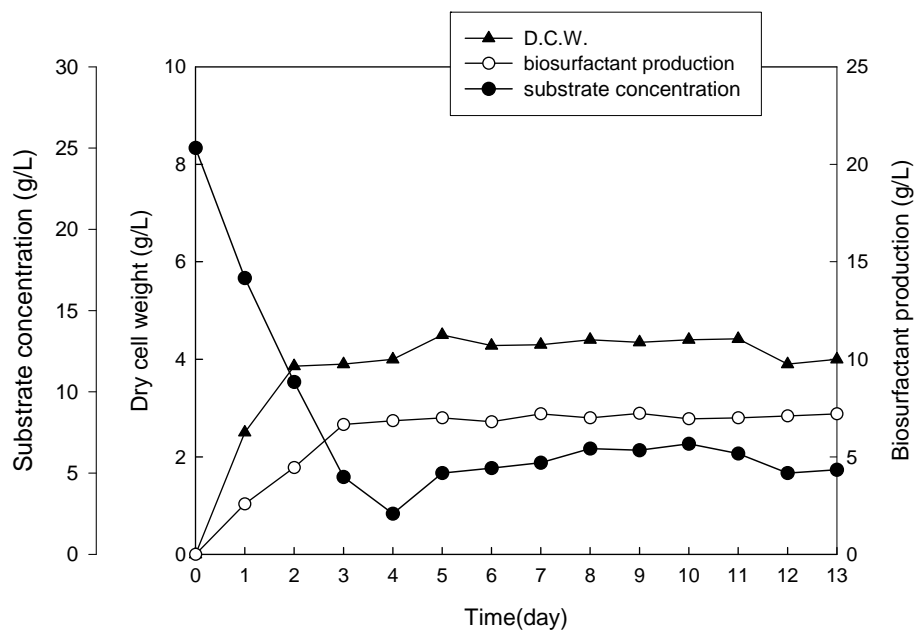


Fig. 57. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) during a continuous fermentation on 200rpm and 0.67vvm.

(1) 천연유화물의 생산량을 향상시키기 위한 최적 지지체의 선정

균체를 고정화함에 있어 지지체의 선정이 중요한데 천연고분자인 alginate와 합성고분자인 PVA 그리고 PVA와 alginate를 혼합하여 만든 MPVA bead를 사용하였다. 시간에 따른 천연유화물의 생산량을 살펴본 결과, 초기 생산량의 경우 3 % (w/v) alginate, 10 % (w/v) MPVA, 10% (w/v) PVA 순으로 나타났으나, 120 시간을 1 cycle로 하여 연속적으로 재 배양하였을 때, MPVA의 경우 초기 생산량은 alginate에 비해 낮았지만 연속배양에 대한 생산의 안정성을 고려하여 최적 지지체로 10 % (w/v) MPVA를 선정하였다(Fig. 58, 59).

(2) 지지체 내의 균체 농도에 따른 천연유화물 생산의 영향

지지체 내의 균체 농도에 따른 천연유화물 생산량에 대하여 조사하였다.

비드 내의 균체 농도 (w/w, %)는 고정화 지지체의 농도에 대한 균체의 농도로 정의된다. 고정화를 위한 균체 농도는 각각 2 %, 5 %, 10 %, 그리고 15 % (w/w, g wet cell weight/100 g carrier)로 제조하였다. MPVA의 균체농도에 따른 천연유화물 생산량을 조사해본 결과, 2 % (w/w)에서 10 % (w/w)로 농도가 증가함에 비례하여 천연유화물의 생산량도 증가되는 경향을 나타내었고, 10 % (w/w) 균체 농도 이상에서는 생산량의 증가가 거의 보이지 않아, 최적 농도는 10 % (w/w, 약 84×10^9 cfu/ g carrier)로 선정하였다(Fig. 60).

(3) 비드 크기에 따른 천연유화물 생산의 영향

고정화된 비드 내의 균체들은 지지체에 의해 둘러 쌓여져 있기 때문에 배양에 있어서 기질이 비드 내부로 투과하는데 제한을 받을 수 있다. 이러한 기질 투과성의 제한은 생산량의 감소를 가져올 수 있다. 그러므로, 기질투과성 저해를 줄이기 위한 한가지 방법으로 고정화에 사용된 비드의 크기를 줄이는 방법을 시도하였다.

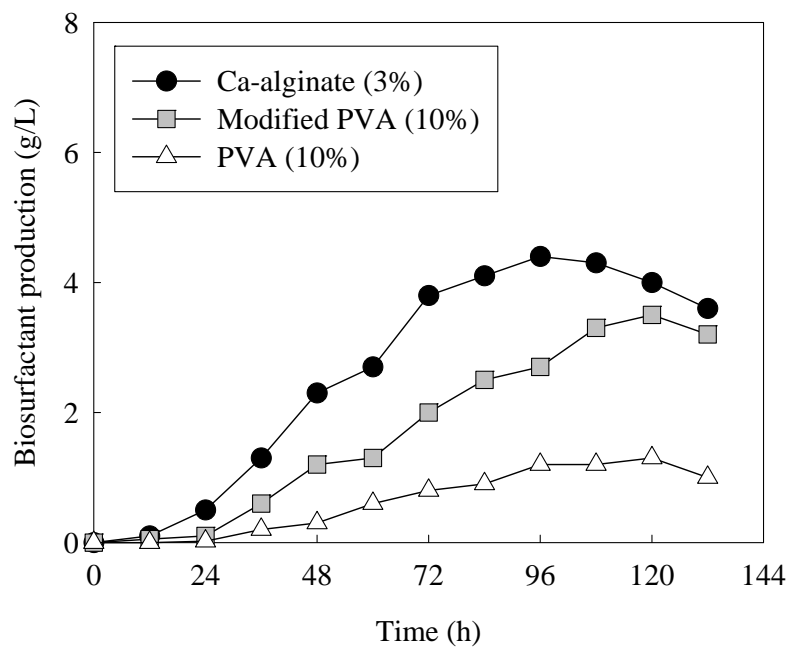


Fig. 58. Comparison of different carriers on biosurfactant production. Culture conditions: 25°C, pH 7.0, 100 rpm, 2% (w/w) cell loading.

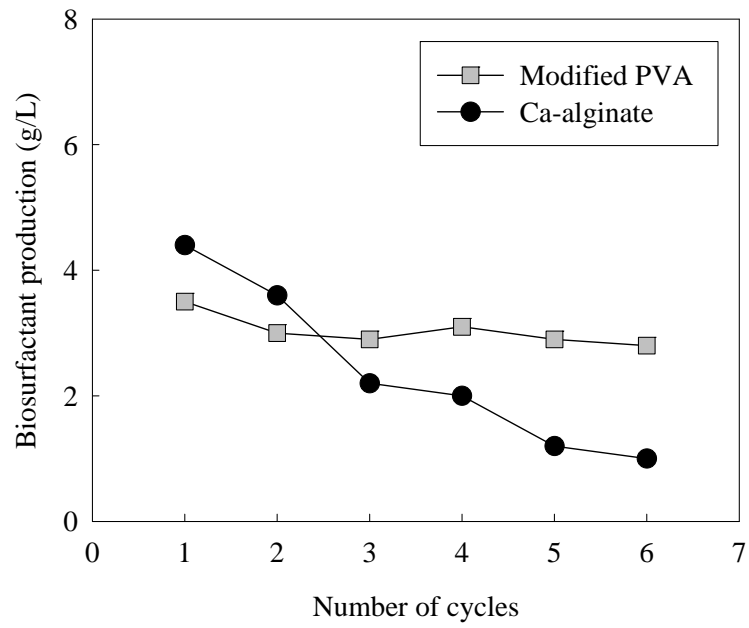


Fig. 59. Comparison of the stability of modified PVA and Ca-alginate beads on biosurfactant production in repeated batch culture.

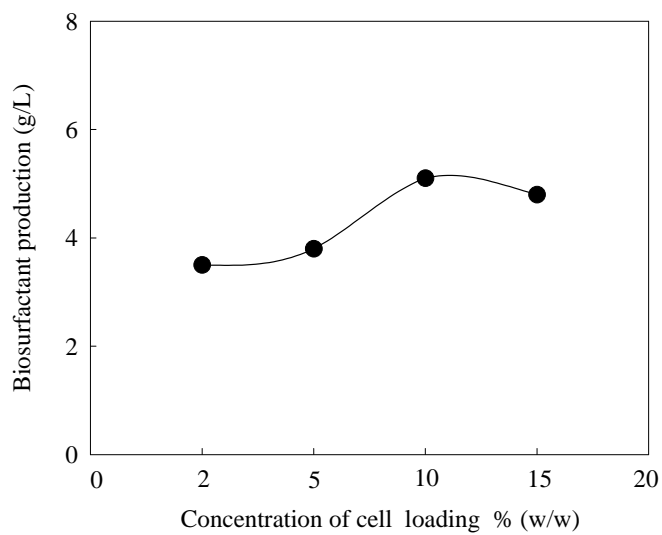


Fig. 60. Effect of cell loading on biosurfactant production by the immobilized cell. (Cell loading % (w/w) : g cell wet weight/ 100g carrier)

비드 크기에 따른 천연유화물의 생산량의 영향을 알아보기 위하여 서로 다른 크기의 syringe로 2.0 mm, 3.0 mm, 3.5 mm, 4.0 mm의 비드를 각각 제조하였다. 같은 배양 조건, 25℃, 120 rpm으로 120 h 배양한 결과, 비드 크기가 작은 샘플일수록 생산량이 증가되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 같은 무게의 비드에서 크기가 작을수록 전체 표면적이 증가하여 생산량이 높아진 것으로 사료된다. 본 실험에서 사용된 비드 크기의 최적 조건은 2.0 mm로 결정되었다(Fig. 61).

(4) 배지와 비드 부피 비에 따른 천연유화물 생산의 영향

배지 부피와 비드 부피의 비를 3 : 1, 5 : 1, 10 : 1, 20 : 1로 달리하여 최적의 천연유화물 생산조건을 조사하였다. 위의 조건에서 만들어진 2.0 mm 비드를 이용하여 배지 부피와 비드 부피 비에 따른 천연유화물 생산량을 확인해 본 결과, 비드 부피가 높아지는 조건, 즉 그 비율이 작아질수록 생산량은 증가하였으나, 10 : 1 이하에서는 거의 일정하게 나타났으므로 최적 배지 부피 대 비드 부피의 비를 10 : 1로 결정하였다(Fig. 62).

(5) 반복 회분식 배양(repeated batch culture)에서의 천연유화물 생산

천연유화물 생산의 안정성을 확인하기 위해 반복 회분식 배양을 이용하였다. 최대 천연유화물 생산량을 보인 120h를 1 cycle로 하여 연속적으로 15 회 재 배양하며 각각의 생산량을 초기생산량과 비교하여 나타내는 상대적 생산량(Relative activity, %)로 나타내었다. 연속배양에서 가장 중요한 요소인 생산의 안정성을 살펴본 결과 15회 반복 배양 시에도 초기 천연유화물 생산량 4.6g/L의 80~90%의 생산량을 보여 높은 생산의 안정성을 나타내었다(Fig. 63).

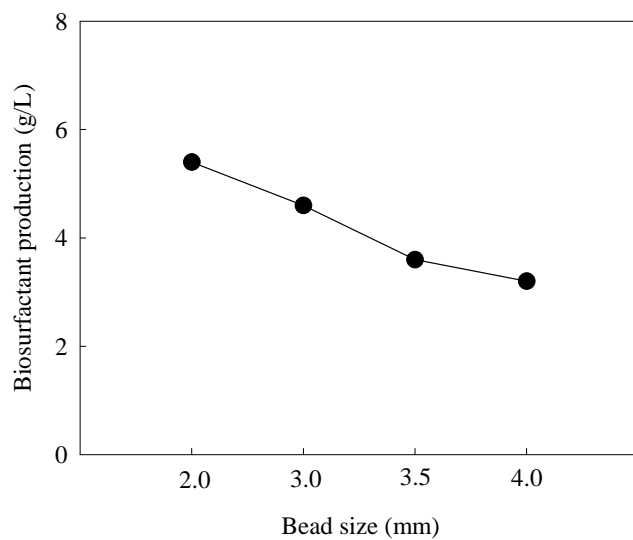


Fig. 61. Effect of bead size on biosurfactant production by the immobilized cell. Bead size were 2.0mm, 3.0mm, 3.5mm and 4.0mm respectively.

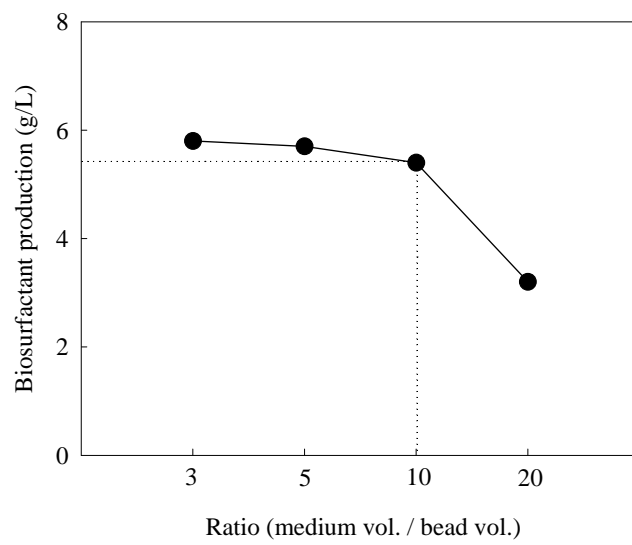


Fig. 62. Effect of medium volume to bead volume ratio on biosurfactant production by the immobilized cell.

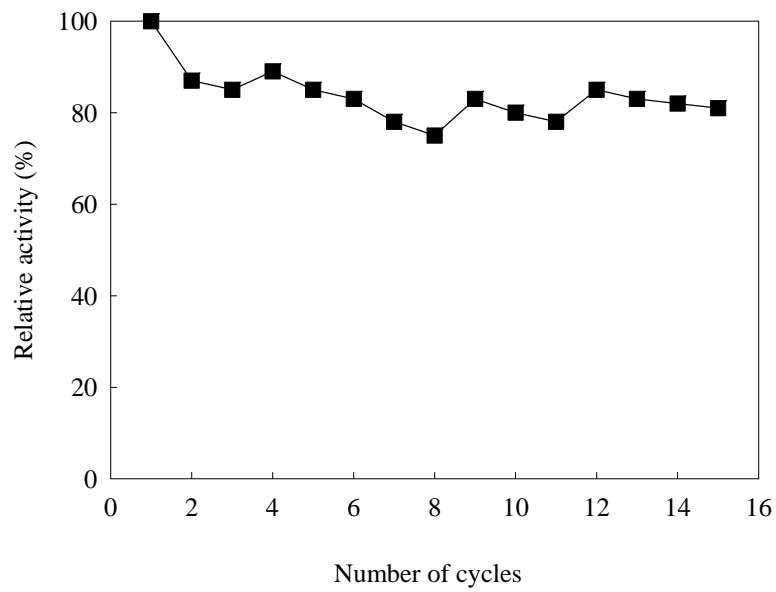


Fig. 63. Relative activity of biosurfactant production by the immobilized cell in a repeated batch of culture. Every cycle incubated for 120hr at 25°C, 120rpm

(6) 반복 회분식 배양에서의 시간에 따른 비드 강도의 안정성

고정화의 방법과 지지체의 물리적인 특성은 공정상의 안정성에 중요한 영향을 미친다. 그러므로 비드를 변형시키기 위해 필요한 힘인 hardness와 압축에 의해 변형되기까지 거리와 변형된 비드가 원래상태로 돌아오려는 거리의 비율을 나타낸 springiness를 texture analyser을 이용하여 측정하여 MPVA의 강도를 관찰하였다.

MPVA의 경우 초기 비드의 hardness와 springiness는 각각 220 g-force와 0.82로 각각 나타났는데 반복회분식 배양에서 15회 (약 90일) 동안 초기강도와 비교해서 약 90% 이상 유지됨을 알 수 있었다(Fig. 64).

(7) 주사 전자 현미경을 이용한 고정화 균체의 관찰

주사 전자현미경을 이용하여 고정화 지지체 내부에 포함되는 균체의 생존력 (viability)을 알아보았다. 배양시간에 따른 고정화 비드내의 균체 변화를 관찰한 결과 고정화 직후 (A)에서 천연유화물의 최대생산량을 보인 대수증식기를 나타내는 120 h (C)동안 시간이 지남에 따라 비드내의 균체가 증가하였고 정지기인 (D)에서는 일정하게 유지됨이 확인되었다 (Fig. 65).

(8) Air lift bioreactor를 이용한 천연유화물의 생산

고정화 균체의 연속배양을 위해 사용되는 생물반응기의 종류로, 호기성 균에 적합하고 기질의 접촉을 원활하게 해주는 방법으로 air lift 생물 반응기가 널리 쓰이고 있다. 본 실험에서는 1.8 L air lift 생물반응기를 이용하여 회분식 반응의 조건을 검토해 보았고, 이러한 조건들을 바탕으로 천연유화물의 연속 생산에 접근해 보았다.

반응 조건으로는 1%(v/v) fish oil, 0.5 vvm의 통기량, 1.2L 샘플부피의 조건으로 회분 배양한 결과, 기질인 fish oil이 소비됨에 따라 천연유화물의 생산이

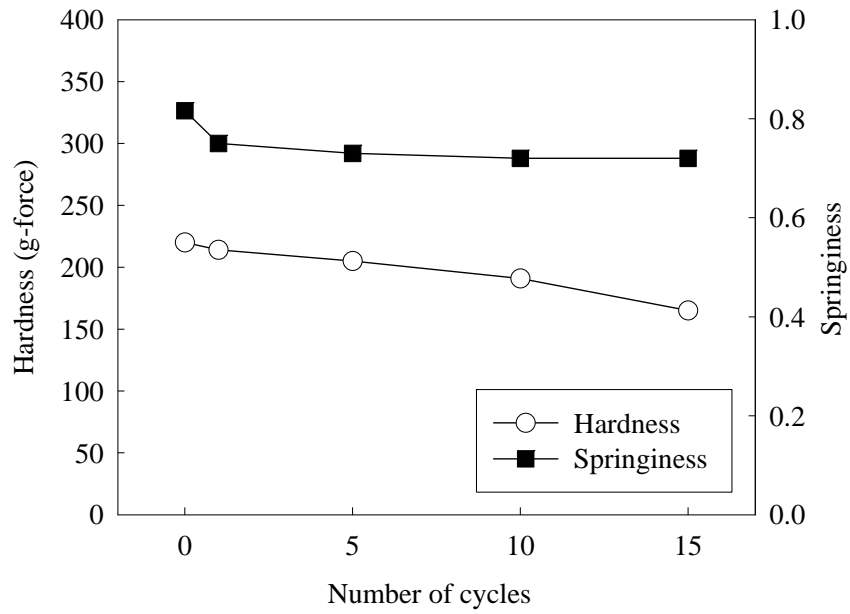


Fig. 64. Stability of bead hardness and springiness in a repeated batch of culture using texture analyser. Initial hardness and springiness were 220g-force, 0.82.

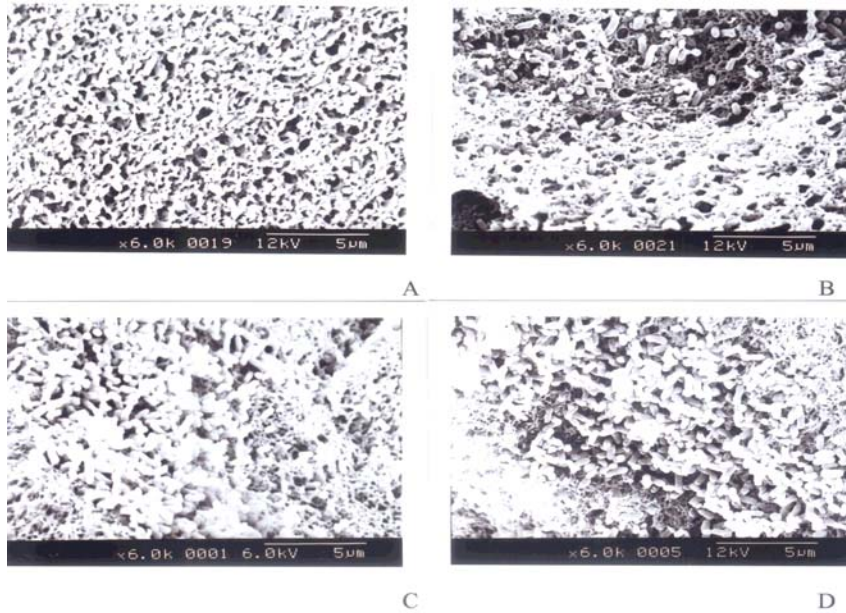


Fig. 65. Scanning electron micrographs of immobilized cells in modified PVA. A, after entrapment of cells; B, after 24 h (initial phase of logarithmic growth); C, after 120 h (final phase of logarithmic growth); D, after 1440 h (stationary growth phase)

증가됨을 알 수 있었고, 회분식 배양에서의 최대 생산량은 5.6g/L로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 통기량 0.5 vvm, flow rate 25 mL/h, 그리고 희석율 0.02 h⁻¹의 조건에서 약 5.0 g/L의 천연유화물을 연속생산 할 수 있었다 (Fig. 66, 67).

4. Pilot plant (200 L fermentor)를 이용한 대량생산

천연유화물의 대량생산을 위해 scale-up된 200 L fermentor에서 생산을 검토해 보았다.

(1) 통기량 (Air flow rate)에 따른 천연유화물의 대량생산

200 L fermentor를 이용하여 working volume 120 L에서 통기량별 (0.33, 0.46, 0.50 vvm)로 25°C, 150rpm으로 회분배양을 실시하였다. 기질로는 2.5% (v/v) fish oil을 사용하였으며, foam에 의해 다량의 배양액이 fermentor 밖으로 overflow되는 것을 막기 위해 5% (v/v) antifoam (Dow Corning DB-110A 실리콘 소포제)을 사용하였다.

배양결과 0.33 vvm의 경우 156h 배양시 6.1 g/L, 0.46 vvm일 때 18.0 g/L (168h)이었다. 그리고 0.50 vvm의 경우 많은 량의 foam이 발생하여 일부가 overflow됨으로써 천연유화물 생산에 영향을 주어 생산량이 4.9 g/L로 더 이상 증가되지 않았다(Fig. 68).

(2) 교반속도 (Agitation) 에 따른 천연유화물의 대량생산

통기량 0.46 vvm, 기질농도 2.5% (v/v) fish oil, 온도 25°C의 배양조건에서 200Lfermentor를 이용하여 교반속도별 (100, 150, 200rpm) 회분배양을 실시하였다. 그 결과 168h 배양시, 100 rpm의 경우는 12.5 g/L의 천연유화물이 생산하였고 150 rpm은 18.0 g/L로 가장 많은 량의 천연유화물을 생산하였다. 200 rpm의 경우 많은 량의 foam이 발생하여 일부가 overflow됨으로써 84h 배양시

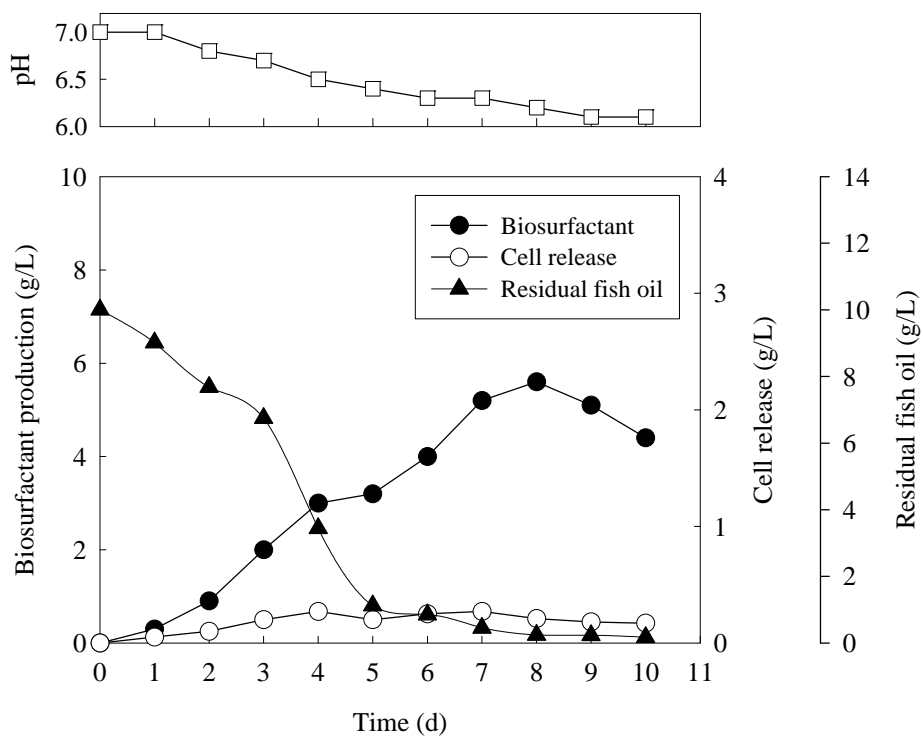


Fig. 66. Time profile of biosurfactant production by immobilized cell in 1.8 L air lift bioreactor. Conditions: 1% (v/v) fish oil, 25°C, 0.5 vvm, 1.2 L working volume, 10% (w/w) cell loading.

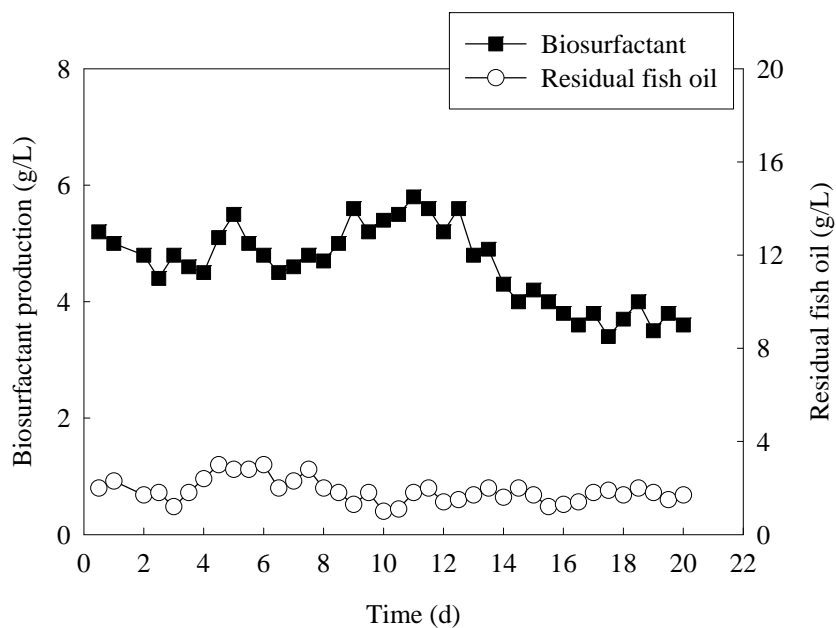


Fig. 67. Continuous production of biosurfactant by immobilized cell using 1.8 L air lift bioreactor under continuous feed 20 ml/hr flow rate of medium containing fish oil 10 g/L, and 25°C, 0.5 vvm, 10% (w/w) cell loading.

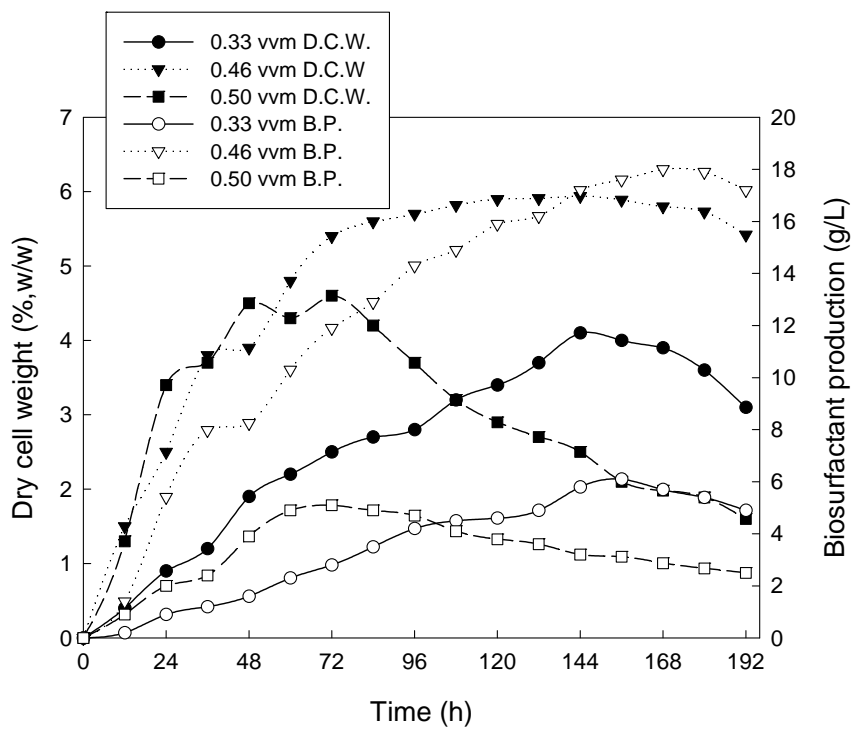


Fig. 68. Effect of air flow rate for cell growth and biosurfactant production
D.C.W., dry cell weight; B.P., biosurfactant production.

6.8 g/L의 천연유화물을 생산하였다(Fig. 69).

(3) 최적 조건에서의 천연유화물의 대량생산

천연유화물의 대량생산을 위해 200L fermentor에서 통기량 0.46 vvm, 교반 속도 150 rpm, 기질농도 2.5 % (v/v) fish oil 그리고 온도 25°C의 배양조건에서 회분배양을 실시하여 천연유화물의 생산량을 검증한 결과, 174 h 배양시 18.2 g/L의 천연유화물이 생산되었다. 7 L Jar fermentor에서의 천연유화물의 생산량을 비교하면 200 L fermentor에서 2-3 g/L 더 좋은 것으로 나타났다. 그러나 약 30배 scale-up 된 것에 비해 생산량이 높지 않은 것은 scal-up에 따른 부피에 대한 표면적 비의 변화 및 시스템 균일성 유지가 어렵고 배양시간이 길어짐에 따라 배양 자체에 변화가 일어난 때문인 것으로 사료된다(Fig. 70).

5. 대량 분리 공정법 개발

천연유물 대량 생산 후 분리·정제를 위한 공정은 Fig. 71와 같다.

A는 미생물 발효기로 용적이 10ton이고 working volme 7ton으로 7일간 배양하면 대량생산 (200 L) 결과에 의해 crude 천연유화물 1.75ton (불순물 포함 전체 배양액 량의 25% 기준)을 얻을 수 있다. B, 원심분리기는 배양액에서 균체를 제거하기 위해 처리 용량이 2ton/h인 멀티타입 연속식 원심분리기를 사용한다. 배양 상층액은 진공농축기(C)로 옮겨진다. 진공농축기는 처리용량이 1 ton/h이고 용적이 10ton으로 상층액은 30 % (v/v) 농축된다. 다음은 건물기준 0.5 ton/h의 처리용량을 가진 진공 건조기(D)로 배양액을 건조한 후 5ton의 추출조(E)로 보내진다. 추출은 유기용매 ethanol 및 methanol 2ton을 이용하여 천연유화물을 추출하여 진공농축기(F)로 옮겨져 유기용매를 제거한다. 이 진

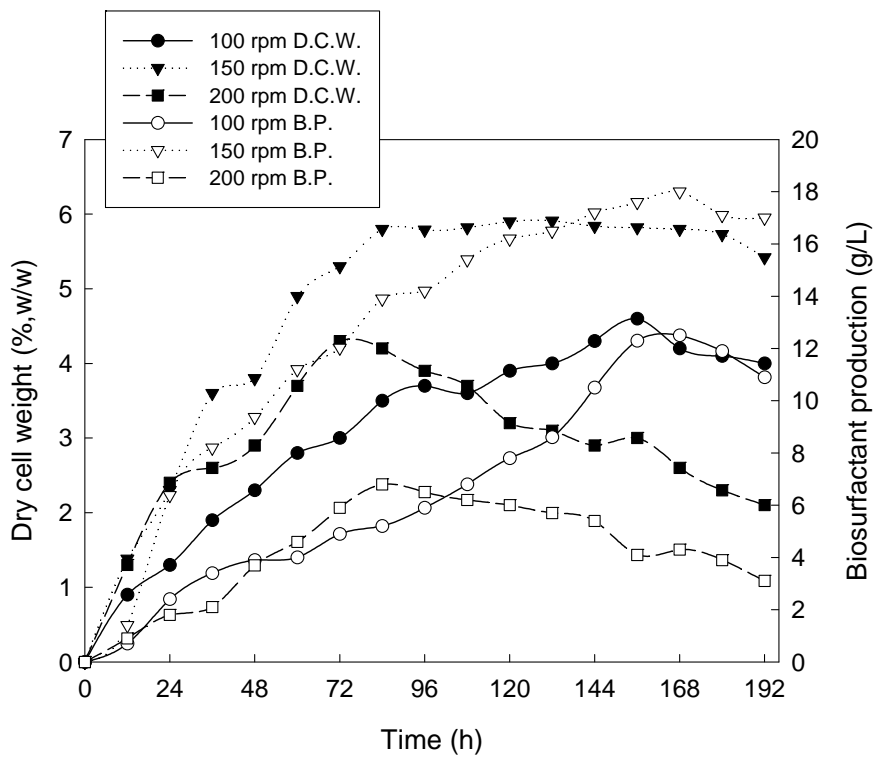


Fig. 69. Effect of agitation speed for cell growth and biosurfactant production. D.C.W., dry cell weight; B.P., biosurfactant production

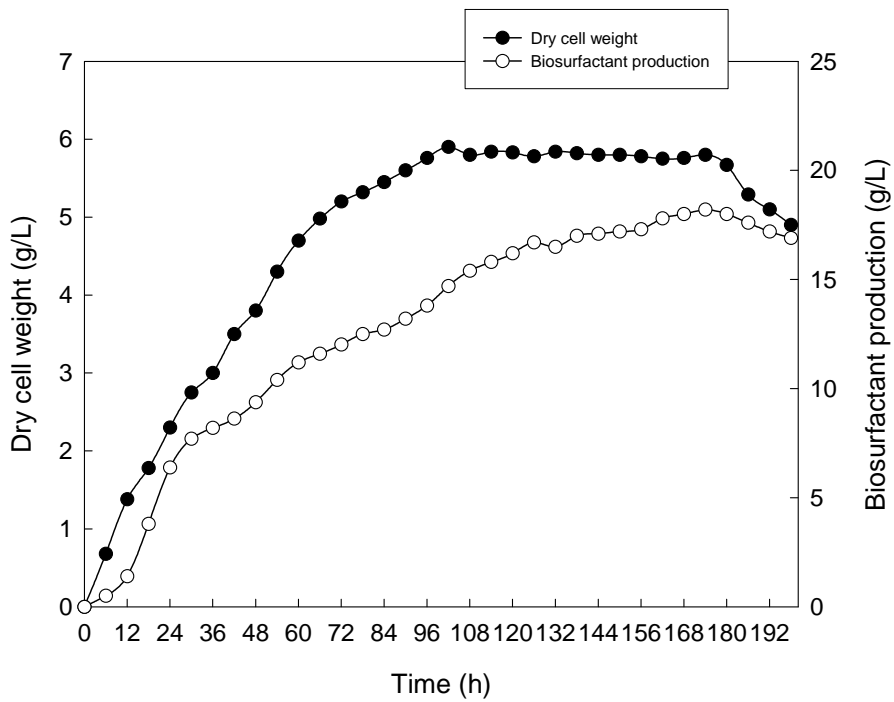


Fig. 70. Time course of cell growth and biosurfactant production by 200L fermentor

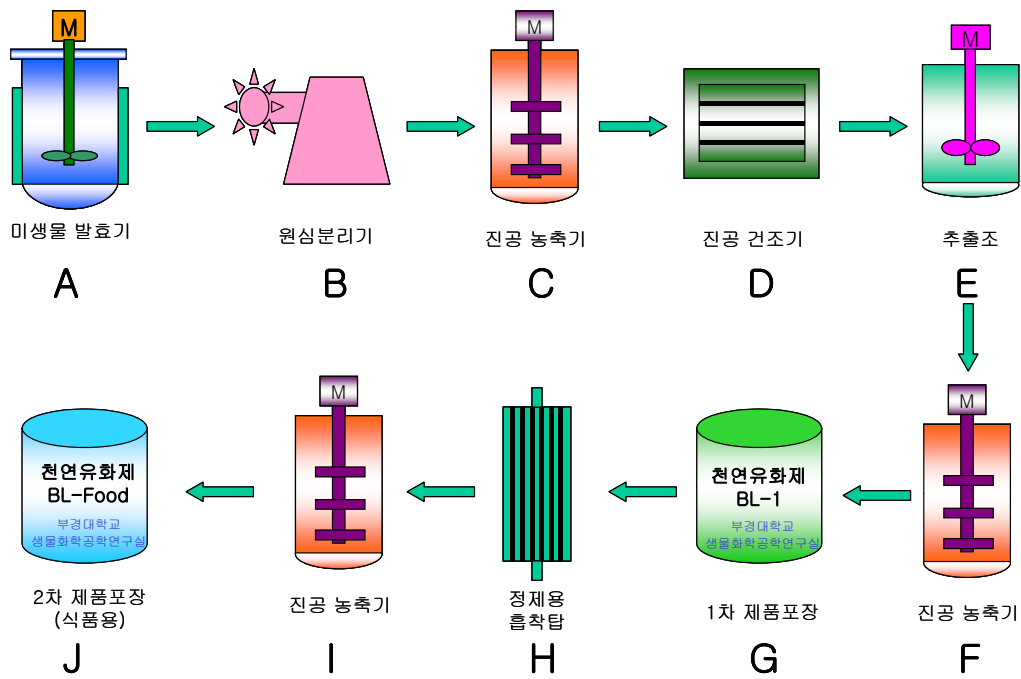


Fig. 71. 천연유화물 생산을 위한 Real Plant 공정도

공농축기는 용적이 2 ton으로 1 ton/h을 처리할 수 있고 유기용매 회수율 85 % (v/v) 이상이다. 이렇게 만들어진 crude 천연유화물은 식품을 제외한 적용 가능한 모든 산업 분야에 이용하기 위해 1차 제품포장한다. H는 정제용 흡착탑으로 2ton/일 처리가능하고 정제된 천연유화물은 다시 진공농축기(I)로 보내지고 최종적으로 식품용 천연유화물이 포장(J) 되어진다.

6. 수산가공제품에의 응용

연제품의 산업적 발전은 우수한 품질의 연육생산, 대량생산 설비의 확충, 위생적 유통시스템 구축 등 주로 일본에서 개발된 기술의 국내 도입 및 단기간 접목에 의해 이루어졌으며 독자적 기술개발이 전무한 상태여서 주로 자본의 집중도입에 의한 산업의 조기 발전 및 성장으로 신제품 개발보다는 기존제품의 생산성 향상에만 모든 기술개발 노력이 집중되어져 있다. 연제품 분야의 국내 기술개발은 주로 대학이나 국가연구기관에서 대체 연육개발 등 부분적 기술이 연구되고 있으나 연육 첨가소재인 고기능성 유화물의 개발에 관한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

고기능성 천연 유화물은 항균, 항산화성, 가열안정성, 콜레스테롤 저하, 풍미 안정성 등의 기능을 가진 유화물로 주로 미생물에 의해서 생산되며, 물리·화학적 특성으로는 유화, 보습, 결, 탄력, 조직형성능 등과 보존성 우수한 식품소재로서 기능성 연제품의 개발과 유통기한의 연장이 가능하며 맛살류 등에 첨가하여 섭취할 경우 체내 환경호르몬과 같은 내분비계 교란물질과 납, 수은, 다이옥신과 같은 유해물질들과 결합하여 무독화 반응을 일으키고 폐질환 치료에도 이용될 수 있는 등, 고기능성 고부가가치의 식품소재이기 때문에 연구개발할 경우 수산가공제품에 있어서 산패나 세균의 증식을 억제할 수 있어 식품의 유통기한을 연장할 수 있는 장점이 있으며 우수한 유화능과 보습능, 조

직감등으로 품질 향상을 꾀할 수 있어 신기능성 천연유화물의 개발필요성은 매우 크다.

일반적으로는 수산가공제품에서 유화제를 어육소세지에만 0.2-0.5 % 첨가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 천연유화물의 경우 유화제로서의 기능뿐만 아니라 식품첨가물로서의 신기능성도 함유하고 있는 것으로 밝혀졌으므로, 어묵, 어육소세지 및 계맛살 등의 대표적인 수산가공제품에 넣어 제조하여, 신기능성이 부가된 수산가공제품으로 개발할 수 있으므로 이를 위한 기초실험이 필요하다.

따라서 본 연구에서 생산한 고기능성 천연유화물을 수산가공제품에 첨가하여 물리·화학적 특성 및 관능검사를 실시하였다.

대표적인 수산가공제품인 어묵에 대하여 다음과 같이 세 가지 방법으로 첨가 영향을 살펴보았다.

(1) 천연유화물과 일반유화제의 첨가에 의한 영향

본 실험에서는 천연유화물과 타 유화제의 첨가에 따른 어묵의 물성에 대한 효과를 알아보기 위하여 각각 또는 복합적으로 첨가하여 물성과 색차를 측정하였다(Table 16, Fig. 72).

천연유화물이 첨가된 경우 다른 유화제가 첨가된 어묵보다 훨씬 whiteness를 감소시키는 경향을 보였는데 이것은 천연유화물이 가지는 고유한 색깔때문으로 생각된다. Deformation에 있어서 GT-1000과 Eliminator가 증가시키는 경향을 보였고, 반대로 Tween-20은 감소시키는 경향을 보였다. 이에 비해서 천연유화물을 첨가한 경우에 deformation이 다른 유화제에 비해서 월등히 증가하는 경향을 보였다. 또 천연유화물을 첨가시킨 경우 force 값을 증가시키는 경향을 보였고, GT-1000이나 Tween-20은 영향을 주지 않거나 감소시키는 경향을 보였으며, Eliminator를 첨가시킨 경우에는 force가 증가하는 경향을 보

Table 16. Changes in whiteness, deformation and force of biosurfactant and surfactant based products

	whiteness	deviation	deformation	deviation	force	deviation
no add	43.17	0.45	3.96	0.36	63.20	3.56
Tween-20+ Eliminator	42.51	0.55	3.99	0.27	55.00	3.39
GT-1000+ Eliminator	44.28	0.69	4.11	0.19	61.80	5.45
GT-1000+ Tween-20	41.74	1.08	4.17	0.46	52.40	5.77
Biosurfactant+ Eliminator	28.26	1.30	4.71	0.76	73.40	10.45
Biosurfactant+ Tween-20	29.40	1.71	4.09	0.30	49.40	9.40
Biosurfactant+ GT-1000	30.48	0.41	4.92	0.83	70.40	6.50
All	27.92	0.94	5.13	0.50	54.00	3.67

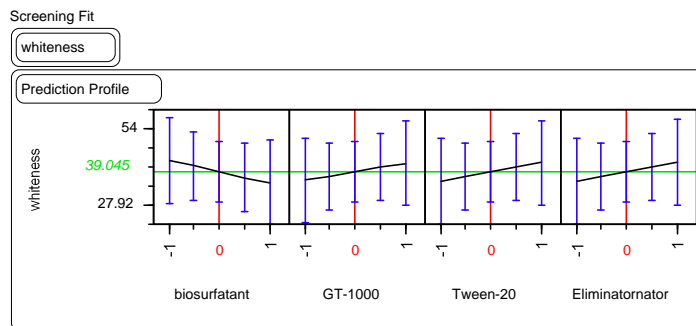
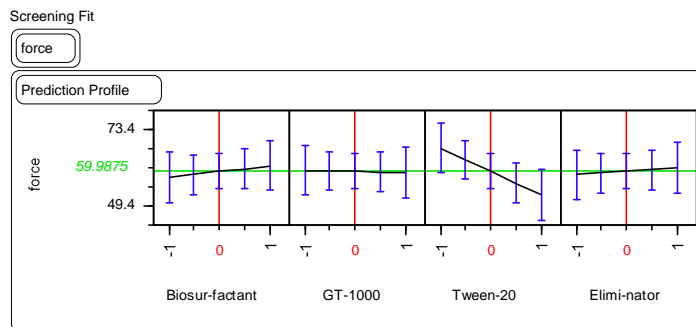
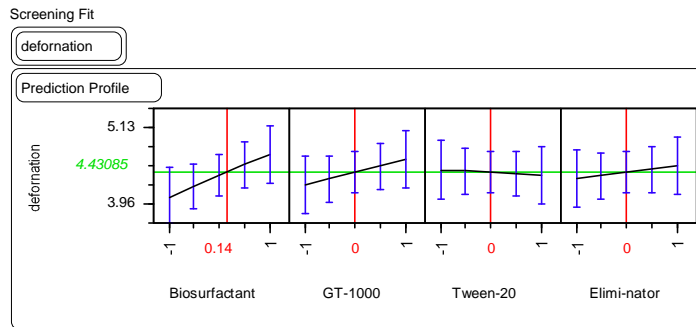


Fig. 72 Screening of biosurfactant and surfactant add on kamaboko by fractional factorial design.

였다.

이것으로 미루어 보아 biosurfactant를 첨가하여 어묵을 조제하였을 경우 타 유화제에 비해서 어묵의 품질을 더욱 향상시킬 수 있는 요인으로 작용가능할 것으로 사료가 된다.

(2) 천연유화물 첨가 농도에 따른 영향

본 실험에서는 천연유화물을 단독으로 첨가함에 있어 0~0.5 % 각 농도별로 어묵의 물성에 미치는 영향을 알아보았다(Table 17, Fig. 73~75).

Whiteness는 농도가 증가함에 따라서 점차 감소하는 경향을 보였고, deformation은 0.1 %를 첨가한 어묵이 9.446 mm로 가장 높았으며 force는 0.5% 첨가구가 119.2 g로 높았고 0.1 %첨가구가 113.2 g으로 비슷한 수치를 보였다. 이상의 결과에서 0.1 %첨가 어묵을 최적 농도로 선정할 수가 있었으며 이후의 실험은 0.1 %의 생물유화제를 첨가하여 사용하기로 하였다.

(3) 재료의 혼합 순서에 따른 영향

외부에서 soy protein과 oil 및 생물유화제를 emulsion type으로 만들어서 연육에 첨가했을 경우와 기존의 방식대로 한꺼번에 혼합하는 방법으로 어묵을 조제하였을 경우의 물성 차이에 대해서 알아보았다(Table 18, Fig. 76~78). 색차의 경우, 유화제를 첨가하지 않은 것이 유화제를 첨가한 어묵보다 좋았다. 이것은 유화제가 가지는 고유한 색깔에서 기인한 것으로 생각된다. 그리고 emulsion type이 기존의 방법으로 만든 어묵보다는 높은 수치를 나타내었다. 특히 deformation의 경우 Emulsion B가 4.72mm로 다른 어묵보다 훨씬 높은 수치를 나타내었으며 나머지는 모두 비슷한 수치를 나타내었다.

Force는 기존의 방법으로 조제한 것이 가장 높은 값을 나타내었으며 유화제를 첨가하여 만든 어묵이 첨가하지 않은 어묵보다는 높은 수치를 나타내었다.

Table 17. Changes in whiteness, deformation and force of biosurfactant based products

Biosurfactant concentration	whiteness	deviation	deformation (cm)	deviation	force (g)	deviation
0%	45.13	4.012	5.32	1.28	97.60	10.55
0.05%	43.47	1.13	5.21	1.49	106.4	11.67
0.1%	39.37	0.58	9.45	3.81	113.2	10.62
0.2%	41.46	0.57	6.76	2.03	101.00	10.17
0.3%	36.60	0.51	6.40	1.87	116.0	6.04
0.4%	35.98	0.72	6.27	1.27	100.6	8.14
0.5%	33.84	0.63	4.78	0.62	119.2	9.63

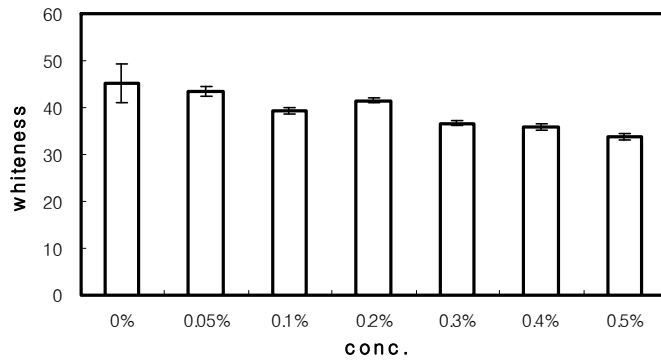


Fig. 73. The effect of biosurfactant on whiteness values of kamaboko.

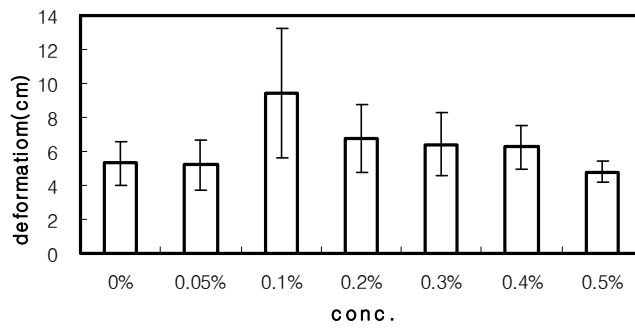


Fig. 74. The effect of biosurfactant on deformation of kamaboko.

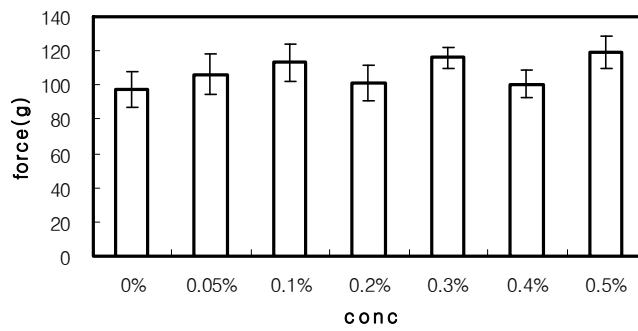


Fig. 75. The effect of biosurfactant on force of kamaboko.

Table 18. Changes in whiteness, deformation and force of biosurfactant based products

	Whiteness deviation		Deformation (mm)	deviation	Force (g)	deviation
Emulsion N	44.66	0.73544	4.26	0.25671	128.6	3.36155
Emulsion B	41.67	0.837974	4.72	0.539212	130.2	5.890671
0% 첨가	43.74	1.383286	4.11	0.28728	127.2	6.379655
0.1% 유화물첨가	40.41	1.810351	4.24	0.448141	138.0	11.26943

Emulsion N : soy protein concentrate, oil, ice/water를 미리 혼합

Emulsion B : soy protein concentrate, biosurfactant, oil, ice/water를 미리 혼합

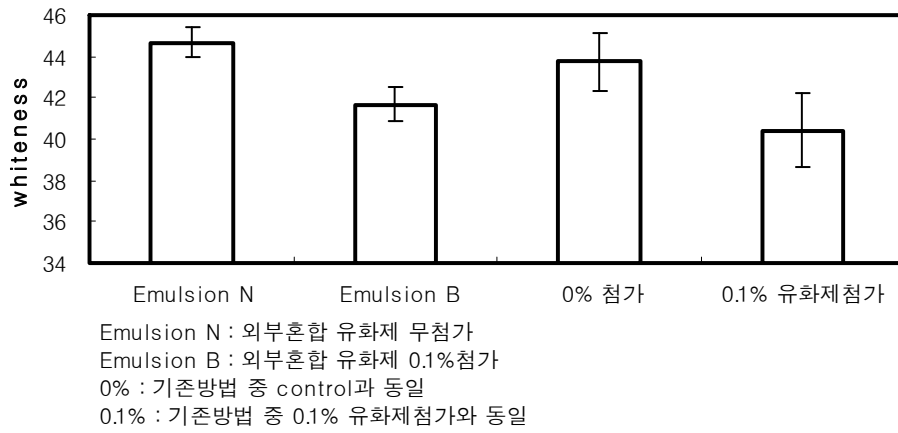


Fig. 76. The effect of biosurfactant on whiteness values of kamaboko.

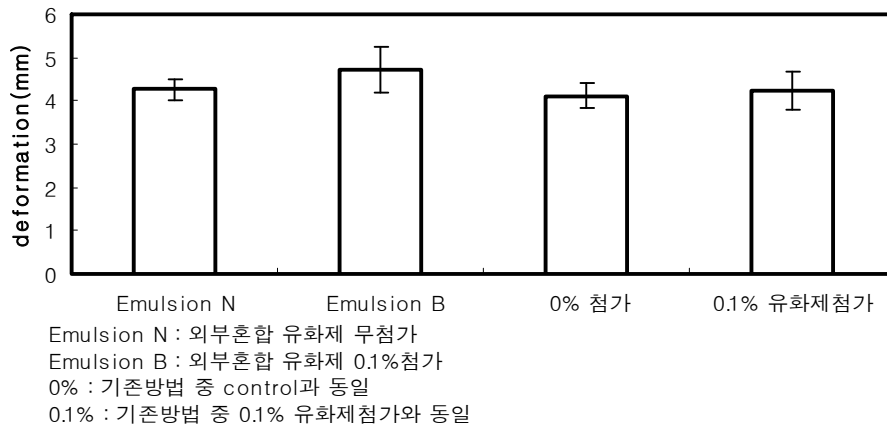


Fig. 77. The effect of biosurfactant on deformation of kamaboko.

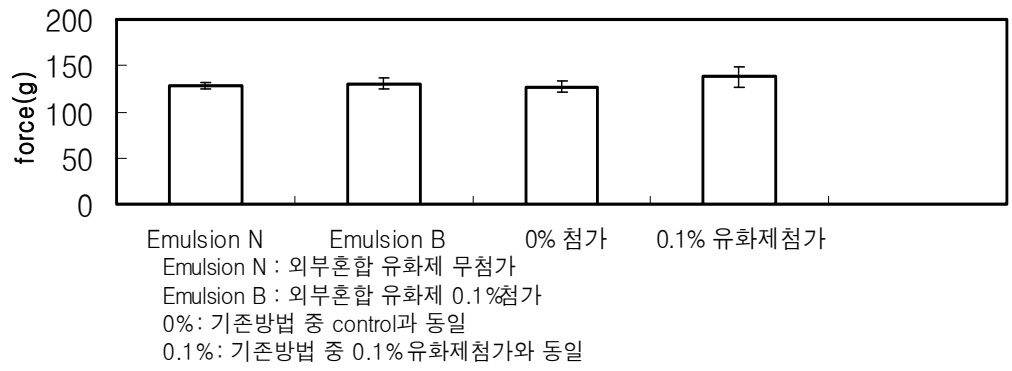


Fig. 78. The effect of biosurfactant on force of kamaboko.

이와 같은 결과로 미루어 볼 때 어묵의 조제시에는 외부에서 emulsion type 으로 만들어서 연육에 첨가하여 어묵을 조제함으로써 제품의 quality를 높일 수 있고, 0.1%의 생물유화제를 첨가함으로써 첨가하지 않은 제품보다 품질을 향상시킬 수 있을 것으로 기대가 된다.

일반적으로는 수산가공제품에서 유화제가 어육소세지에 0.2-0.5 % 첨가하는 것으로 알려져 있으나 본 천연유화물의 경우 유화제로서의 기능이 매우 탁월하므로 저농도로 첨가하여도 물리·화학적(관능적) 특성에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

7. 경제성 검토 및 생산 실용화 기술개발

최근들어 환경문제에 대한 관심이 증대되어 생분해 될 수 있는 물질들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 비교적 큰 시장을 가지고 있는 세제 부분에서 생분해도가 높은 합성세제 및 다양한 생물들에서의 biopolymer 등 대체물질 개발에 관한 연구가 활발하다. 이러한 대체물질 중에서도 특히 미생물 유래의 생물계면활성제는 여러 가지 장점을 가지고 있어 관심의 대상이 되고 있다. 즉, 화학합성이 어려운 새로운 구조를 가지는 계면활성제를 생산할 수 있으며, 비교적 간단한 배양과정과 간단한 원료들로부터 쉽게 대량생산이 가능하며, 무엇보다도 대부분이 쉽게 생분해될 수 있고, 독성이 적다는 장점이 있다. 이미 계면활성제로서의 성질이 알려진 식품유래의 gum, lecithin, 콩단백질 등은 식품산업에 광범위하게 사용되고 있으며, 동물유래의 lipoprotein, 혈액과 허파 등에서 추출한 계면활성제 역시 화장품, 세제, 치약, 껌 등에 사용되어 왔다. 미생물에 의해서 생산되는 생물계면활성제는 합성계면활성제가 환경오염의 주범으로 인식되면서 그 대체품이 절실히 요구되는 추세와 함께, 생물자원을 활용하고 고등기술을 개발하려는 선진 기술적 측면에서 biosur-

factant의 개발이 중요한 연구분야를 이루고 있다. 대표적으로는 미국 Petroleum사에서 생산하는 Emulsan이 기름에 오염된 탱커의 처리, 전자기판 3차 세척용 등으로 사용되고 있으며, *Penicillium* sp. 균주가 생산하는 S-acid는 정전기 방지, 흐림방지의 특성으로서 개발되고 있고, 강력한 보습효과를 가지는 glycolipid의 유도체를 생산하여 화장품에 응용하고 있으며, 그 외에 biodispesan, liposan 등 다양한 미생물 유래의 계면활성제가 특허화되어 상업화되고 있다. 따라서 미생물 유래의 생물계면활성제는 합성제품의 대체물질로서 그 사용이 확대될 것으로 생각되며, 또한 폐수 처리, 토양의 재활성화, 유류 유출에 의한 해양의 오염문제 및 oil-recovery 등에도 그 응용성이 크게 기대된다.

본 연구에서는 개발, 생산해 낸 천연유화물도 독특한 성질을 이용하여 특수 용도에 맞는 여러 가지 산업적 용도에 활용할 수 있다.

(1) 시판중인 유화제와의 가격 경쟁력 비교

본 연구에 사용된 해양미생물 유래 천연유화물과 현재 시판중인 유화제를 가격과 기능면에서 그 경쟁력을 비교하여 보았다(Table 19). 먼저 10t의 대량 배양조를 이용하여 천연유화물을 생산할 경우 예상되는 제조원가를 재료비, 노무비, 기타 경비 등의 항목으로 세분하여 예측하여 보았다. 10t 배양조에 working volume 700L로 가동시키면 20g/1L의 생산수율에 의거 140kg의 천연유화물을 얻을 수 있다. 140kg/1회를 기준으로 1달간 4회 가동시키면 560kg/월 생산이 가능하다.

시판중인 유화제 중 대표적인 생물유화제(Emulsan)과 화학유화제(LABS)를 표본으로 하여 가격경쟁력을 비교해 보면, 생물유화제는 화학유화제에 비해 고가라는 가장 큰 단점이 있으나(Emulsan / LABS =12배), 본 연구에서 생산되는 천연유화물은 6\$/kg으로 화학유화제보다는 비싸나 같은 생물유화제들에

Table 19 천연유화물제조원가계산표

품 목		구 분	금 액 (원)	비 고	
제조원가	재료비	직접재료비	260,000	0.5톤/월	
		간접재료비	7,800	직접재료비×3%	
		소계	267,800		
	노무비	직접노무비	1,200,000	1인: 1,200,000원/월	
		간접노무비	168,000	직접노무비×14%	
		소계	1,368,000		
	경 비	전력비	150,000		
		연료비	120,000		
		공업용수비	84,900	28,300원/100톤	
		소모품비	24,200	(재료비+노무비) ×1.479%	
		감가상각비	36,000	직접노무비×3%	
		수리수선비	6,800	(재료비+노무비) ×0.418%	
		연구개발비	1,000,000		
		기타경비	8,179	(재료비+노무비) ×0.5%	
		보험료	39,210	(재료비+노무비) ×2.397%	
		소계	1,469,289		
	계		3,105,089		
	일반관리비 (5%)			155,254	재료+노무+경비
	이 윤 (10% 이내)			299,254	노무+경비+일관
총 원 가			3,559,597	0.5톤 기준	
			7,119원/kg (6.0\$)		

비해서는 4-5배 저렴하다(Table 20).

그러나 동일량(무게단위)을 첨가하였을 경우, CMC 값으로 알아본 유화안정성은 본 연구산물의 것이 화학유화제에 비해 60배 가량 우수하고 표면장력저하능도 2배 가량 우수하므로 실제 사용량에 대한 가격면을 비교해 보면 오히려 본 연구산물의 가격 경쟁력이 10배 정도 더 뛰어난 것으로 나타났다. 대량 생산하여 제품화될 경우 매우 우수한 가치를 가지는 경쟁력있는 천연유화물질일 것으로 판단된다.

(2) 생산실용화 기술 개발

천연유화물질의 실용화를 위한 대량 생산 공정을 설계하였다(Fig. 79). 이 공정으로 천연유화물질을 540kg/월의 수준으로 생산가능하다.

생산되어진 천연유화물질은 식품첨가 소재로의 사용 뿐만 아니라 화장품, 의약품 분야에서도 사용될 수 있으며, 특히 공업적으로 어폐수 처리시의 활성오니로도 사용 가능할 것으로 추측되어진다.

또한 가정에서 주로 사용하는 세탁세제나 식기 세척용 제품으로의 개발도 가능하다. 식품첨가물로 쓰일 수 있는 안전성 있는 제품이므로, 기존의 화학세제들이 갖는 환경오염 문제 해결 뿐만 아니라, 건강에 대한 한층 높은 안정성을 부여할 수 있으므로 소비자들의 기호에 부합할 수 있을 것으로 사료된다.

맛, 냄새, 안전성 등의 측면에서 질 높은 제품이 요구될 때는 배양기질을 olive oil 등을 이용, 분리 정제 단계를 한단계 더 설치하고, 맛, 냄새 보다는 기능적 측면을 고려해야 하는 제품이 요구될 때는 값싼 fish oil과 분리 정제 단계의 간소화로 적합한 제품의 생산이 가능하다.

Table. 20 유화제의 가격 비교

항목	천연유화물 (NS-1)*	생물유화제 (Emulsan**)	화학유화제 (LABS**)	비고
가격 (\$/kg)	6.0 (제조원가)	30.0 (판매가)	2.5 (판매가)	
CMC (mg/L)	10	-	592	본 제품의 유화안정성이 화학유화제에 비해 약 60배 우수
표면장력 (mN/m)	29.5	45.0	47.0	본 제품의 성능이 화학유화제에 비해 2배 우수

*; 본 연구제품, **; 제품명

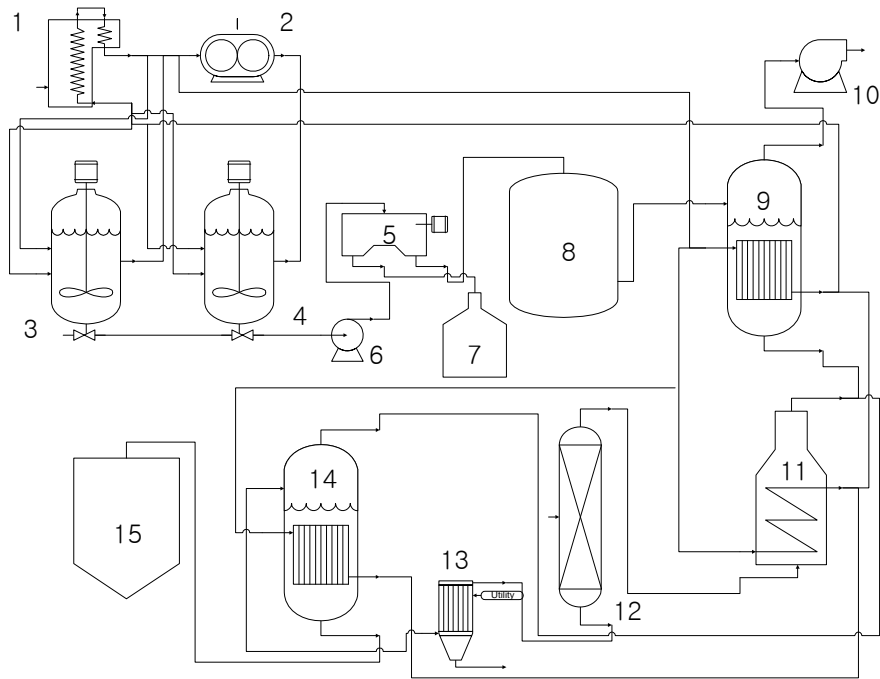


Fig. 79. 천연유화물생산 공정도

- | | | |
|---------------------|-------------------|------------------|
| 1. Boile | 2. Air compressor | 3. Tank 1(5Tone) |
| 4. Tank 2(5Tone) | 5. Centrifuge | 6. Pump |
| 7. Pellet collector | 8. Storage tank | 9. Evaporator |
| 10. Blower | 11. Dryer | 12. Separator |
| 13. Filter | 14. Evaporator | 15. Storage |

▣ 제2세부과제 : 해양생물유래 천연유화물의 기능성 및 안전성 검토

1. 천연유화물의 항균활성 및 독성 검사

(1) 항균활성

천연유화물의 항균활성이 있는지 여부를 확인하기 위하여 *E. coli*가 함유된 평판배지 DISC법을 이용하여 살펴보았다. 1%, 5%, 10%농도의 천연유화물이 흡습된 DISC의 *E. coli* 성장억제대의 크기는 Fig. 80과 같고 대조군은 증류수를 이용하였다. 천연유화물 1%이상의 농도에서 탁월한 세균성장저지능이 나타났고, 1%에서도 성장억제대의 크기가 1cm 정도되는 것으로 보아 항균활성능력이 매우 큰 것으로 나타났다. 1%미만의 농도에서도 세균억제능력이 있는지 여부를 확인해 보아야 할 것으로 사료된다.

천연유화물의 항균활성능력을 시판용 surfactant의 것과 비교·검토하기 위해서 *E. coli*가 함유된 평판배지에 Tween 20, Tween 80, Triton X-100, 천연유화물을 0.1%, 0.5%, 1% 농도로 10 μ L씩 DISC에 흡습시켜 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였다(Fig. 81). Tween series의 경우는 상기의 농도에서 항균활성을 보이지 않았으며 Triton X-100은 1%의 농도에서 항균활성을 나타내었으나, 천연유화물과 비교했을 때 천연유화물이 더 우수한 항균활성이 있는 것으로 나타났다. Tween series와 Triton X-100은 계면활성제로서 다양하게 이용되지만 그 독성 때문에 사용이 제한되어 있어 새로운 계면활성제의 개발이 필요한 시점에서, 본 천연유화물은 독성에 대한 안정성 여부만 확보된다면 Triton X-100의 계면활성능력에 안전성까지 보장된 보다 새로운 천연유화물(Biosurfant)로서 상품적 가치를 확보할 수 있을 것으로 여겨진다.

천연유화물이 항균활성이 있다는 것은 다수의 보고에서 찾아볼 수 있다.



Fig. 80. Antibacterial activity of Biosurfactant on various concentrations.

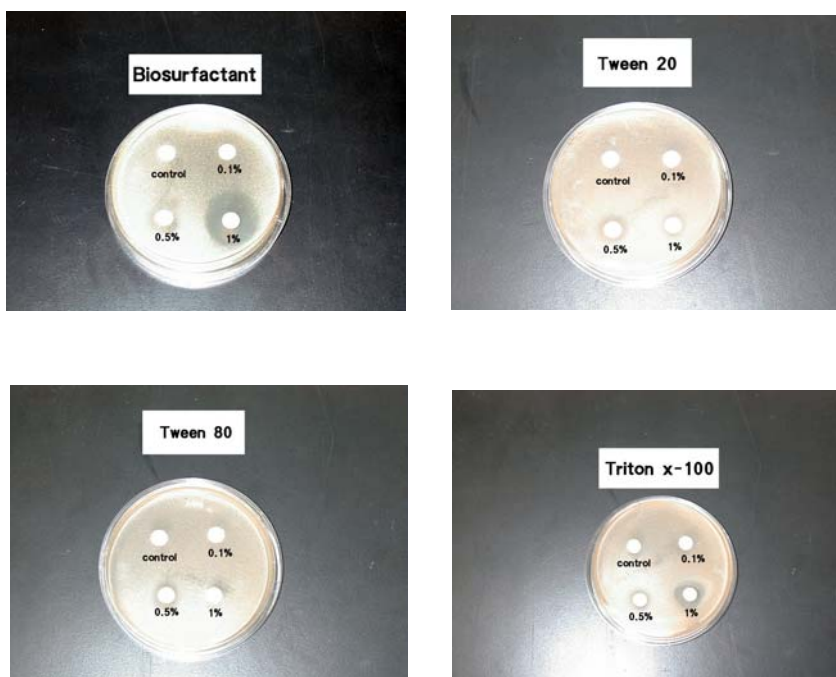


Fig. 81. Antibacterial activity of Various Surfactant.

E. coli 뿐만 아니라 *Staphylococcus aureus*의 감염시 체내의 식세포를 활성화시켜 식작용을 통해 세균을 사멸시키는 능력이 보고되고 있으며 (Geertsma M.F. et al., 1993, 1994, Hayakawa, H. et al., 1989, Sherman M.P. et al., 1988), 사람을 비롯한 포유동물의 폐에 주로 감염되어 폐결핵을 유발하는 *Mycobacterium tuberculosis*균에 대해서도 강한 항균활성을 보이는 것으로 보고되고 있다(Gaynor C. D. et al., 1995, Hwang and Clements, 1990).

(2) Microplate reader를 이용한 MIC TEST

Fig. 82, 83은 천연유화물과 Triton X-100의 MIC값(Minimum Inhibition Concentration)을 측정한 것이다. 세균배양액에서 세균의 증식이 천연유화물의 경우 0.0391% 이상의 농도에서 거의 억제되었으며, Triton X-100의 경우에는 0.0781%이상의 농도에서 거의 억제되어 천연유화물이 Triton X-100보다 두 배이상의 항균활성을 보이는 것으로 나타났다. 또한 Triton X-100과 천연유화물의 MIC값도 각각 0.0391%와 0.0195%로 두 배이상의 차이가 나타났다. 따라서 천연유화물의 항균활성은 매우 뛰어난 것으로 나타났으며, 매우 낮은 농도에서도 안정된 효과를 나타내었다. Tween 20과 Tween 80도 같은 농도로 실험을 수행하였으나 거의 항균활성이 없는 것으로 나타났다.

생물유화제가 합성계면활성제보다 항균활성이 뛰어난 이유는 생물유화제의 구성성분이 인지질, 중성지질, 당질, 단백질 등으로 세균이나 세포의 막성질과 비슷하여 막구조를 변화시키거나 뚫고 들어가서 세균이나 세포를 사멸시켜 항균활성을 나타내는 방법과, Lectin과 같이 세균에 대한 식작용 능력을 가지는 식세포나 면역세포를 자극한 후 활성화된 면역세포가 이차적으로 감염된 세균이나 세포를 사멸시키는 방법으로 체내에서 항균작용을 하고 있는 것으로 여겨진다 (Borron P.J. et al., 1998, Wilsher M. L. et al., 1988, Holmskov U. et al., 1994).

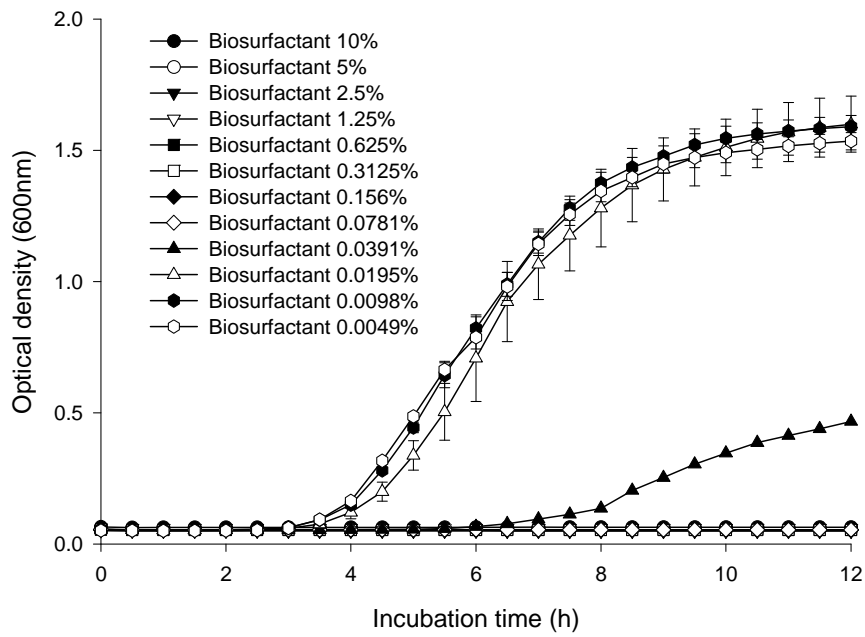


Fig. 82. Growth curve of *E. coli* treated with biosurfactant of various concentration

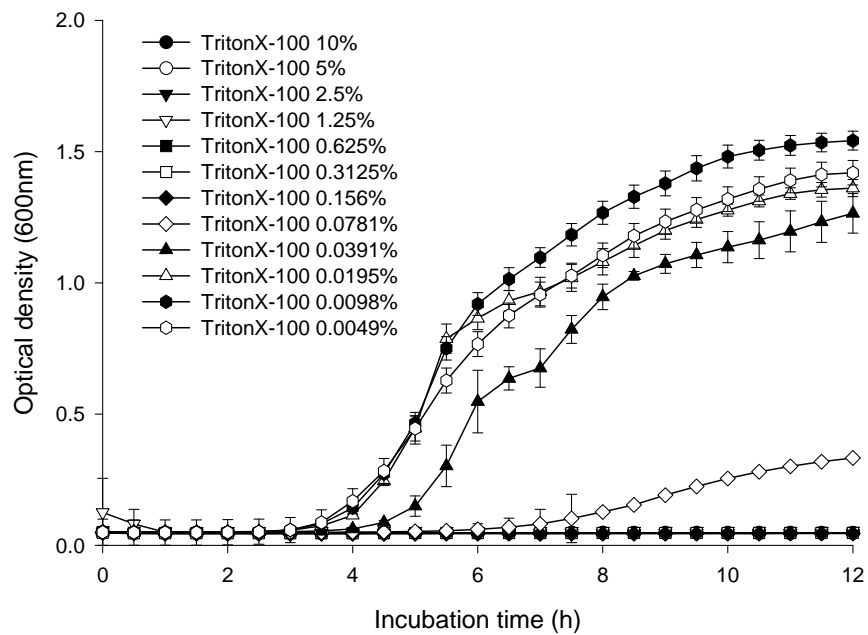


Fig. 83. Growth curve of *E. coli* treated with TritonX-100 of various concentration.

(3) 급성독성검사

우리나라 식품의약품 안전청에 의한 의약품 독성시험기준에는 한계용량에 대한 기준이 없기 때문에 일본 후생성의 의약품 비임상시험 Guideline 해설 (1997)을 참고로 용량을 정하였다. 급성독성검사의 예비실험에서 한계용량인 천연유화물 2000 mg/100g body weight 투여군에서 시험기간을 통하여 사망 동물은 관찰되지 않았으며, 실험동물에 대한 본 시험물질의 LD₅₀값은 각각 2000 mg/kg을 상회할 것으로 사료되었다. 본 실험으로 SD계 Rat와 ICR mouse를 각각 5군으로 나누어 4000 mg/100g body weight, 5000 mg/100g body weight, 6000 mg/100g body weight, 7000 mg/100g body weight, 무처리군으로 나누어 1회 복강투여 후 14일간의 사망율, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였으며 그 결과는 다음과 같으며 Fig. 84로 간략하게 표현할 수 있다.

① 천연유화물에 의한 사망률은 ICR mouse에서는 6000 mg/100g body weight에서 한 마리의 사망이 나타났고, 7000 mg/100g body weight에서는 전체사망을 나타내었다. SD rat군에서는 4000mg/100g body weight에서 2마리의 사망이 나타났고, 그 이상의 용량투여군에서는 전체사망을 나타내었다. 따라서 ICR mouse에서의 천연유화물의 LD₅₀치는 6000 mg/100g body weight와 7000 mg/100g body weight 사이에 존재할 것으로 사료되며, SD rat의 경우는 4000mg/100g body weight와 5000mg/100g body weight 사이에 존재할 것으로 사료된다. 따라서, 두 종류의 실험동물에서 생계면활성제의 LD₅₀치는 4000 mg/100g body weight를 상회할 것으로 여겨진다. 현재 식품첨가물로 사용되고 있는 유화제 중 프로필렌글리콜지방산에스테르의 경우 LD₅₀가 1350 mg/100g body weight로 본 천연유화물이 식품으로 첨가물로서 안정성이 더 높은 것으로 나타났다.

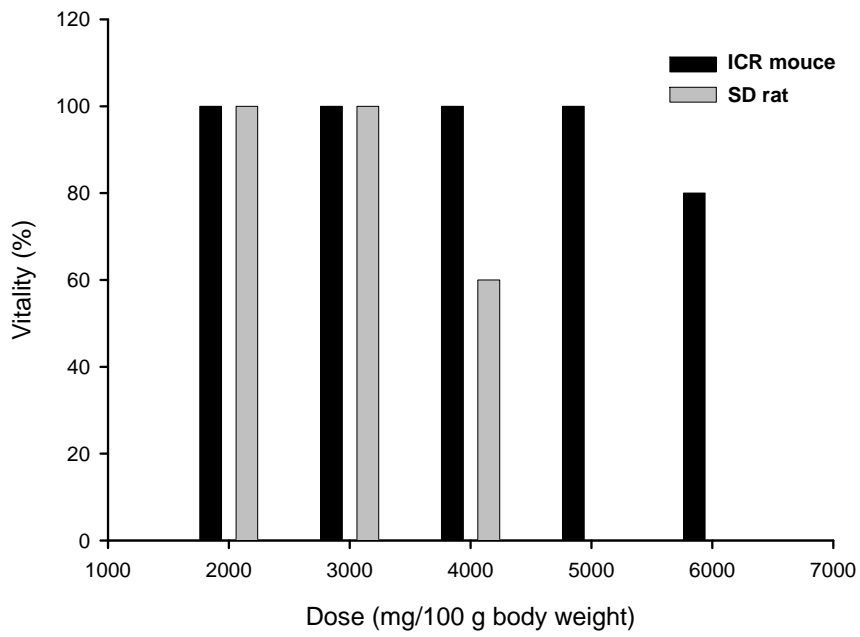


Fig. 84. Vitality of ICR mouse and SD rat injected biosulfactant on the various dose.

② 일반증상의 경우 생존한 모든 시험군에서 관찰기간 동안 시험물질의 투여와 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.

③ 체중변화의 경우 생존한 모든 시험군에서 정상적인 체중증가를 나타내었다.

④ 사망직후 복강개복과 내장기관의 부검소견의 경우 사망한 실험동물에서 육안으로는 이상 소견이 관찰되지 않았다.

⑤ 계획도살 부검소견의 경우는 생존한 실험동물의 전부에서 육안으로는 이상소견이 발견되지 않았다.

⑥ 계획도살 후 채취한 혈액의 생화학적 분석을 수행한 결과는 Table 21, 22와 같다.

마우스와 랫트의 경우 투여직후 사망한 개체를 제외하고 투여후 14일동안 생존한 실험동물을 계획도살한 후 혈액을 채취하여 혈청만을 분리한 후 자동혈액분석기로 혈청총단백질, BUN, Glucose, Albumin, 총 cholesterol, Triglyceride를 분석한 결과 대조군과 비교했을 때, 수치상의 큰 차이는 찾아볼 수 없었다.

시험물질로서 사용된 천연유화물의 주요성분은 지질성분이었기 때문에 다소 혈청속에 지질성분인 콜레스테롤이나 중성지질의 양이 증가할 것으로 예상하였다. 마우스의 경우에는 다소 증가하는 경향도 나타났으나 랫트의 경우에는 오히려 감소하는 경향도 보여서 천연유화물에 의한 영향이라고 보기는 힘들다. 또한 BUN이나 총단백질과 알부민의 양이 대조군과 비교했을 때 큰 차이를 보이지 않는 것으로 신장이나 간의 대사가 투여된 천연유화물에 의해 영

Table 21 Blood analysis results of ICR mouse injected biosurfactant

Items	Control	Biosurfactant	
	not treated (n=5)	2000mg/ 100g body weight (n=5)	4000mg/ 100g body weight (n=5)
BUN(mg/dL)*	21.0± 0.7	24.6± 0.9	28.7± 1.2
Glucose(mg/dL)	176.0±21.0	141.0±14.5	193.0±15.6
Total Protein(g/dL)	6.0± 0.8	5.4± 0.8	5.4± 1.2
Albumin(g/dL)	4.1± 0.6	3.0± 0.4	3.1± 0.2
Cholesterol(mg/dL)	104.0±10.2	126.0± 8.8	121.0±10.3
Triglycerides(mg/dL)	65.0± 5.7	75.3± 6.4	86.0± 4.6

* BUN : Blood Urine Nitrogen

Table 17. Blood analysis results of SD-Rat injected biosurfactant

Items	Control	Biosurfactant	
	not treated (n=5)	2000mg/ 100g body weight (n=5)	4000mg/ 100g body weight (n=3)
BUN(mg/dL)*	27.8± 2.3	20.6±1.2	22.3± 2.3
Glucose(mg/dL)	128.0±10.2	127.0±9.6	137.0±13.6
Total Protein(g/dL)	6.2± 0.3	5.8±0.8	5.7± 0.5
Albumin(g/dL)	4.4± 0.8	3.9±0.1	3.8± 0.1
Cholesterol(mg/dL)	121.0± 6.3	98.0±5.4	94.0±12.3
Triglycerides(mg/dL)	61.0± 4.2	64.5±3.6	57.0± 4.5

*BUN:Blood Urine Nitrogen

향을 받지 않고 정상적으로 대사됨을 알 수 있는 결과라고 하겠다. 따라서 시험물질이 복강을 통해서 투여된 후, 대사과정을 거치는 동안 우려할 부작용은 일으키지 않는 것으로 판단된다.

(4) 항돌연변이 효과

Salmonella typhimurium TA 100에 대해서 point mutation을 유발하는 유전독성을 가진 물질로 돌연변이를 유도한 후 생계면활성제를 배지에 첨가하여 돌연변이가 회복되는지 여부를 확인해보고자 본 실험을 수행하였다.

천연유화제의 직접돌연변이원에 의한 항돌연변이원성효과를 Table 23에 나타내었다. N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine(MNNG)은 *Salmonella typhimurium* TA 100에 대한 대표적인 직접돌연변이원으로서 발암성이 강하기 때문에 주로 위암연구에 많이 이용되고 있는 물질이다. 이 물질은 핵산의 알킬화와 같은 DNA염기배열에 이상을 일으키는 유전적인 작용과 아미노산의 니트로아미노화등의 DNA 유전정보 발현에 이상을 일으키는 등의 기전에 관여하여 암을 유발시킨다고 한다(Mclean and dutton, 1995).

항돌연변이 효과를 검색하는 방법에는 여러 가지가 있지만 본 연구에서는 1971년 Ames가 개발한 *Salmonella* 변이주 검출법을 이용하였다(Maron and Ames, 1983). 균주에 돌연변이 물질을 노출시킨 다음 천연유화제를 첨가된 minimal glucose agar plate에 형성된 복귀돌연변이균주의 수를 계수하여 돌연변이 및 항돌연변이성의 유무를 판정하는 것이다.

Pseudomonas aeruginosa byk-2로부터 추출한 천연유화제를 MNNG에 의해 돌연변이를 일으킨 *Salmonella typhimurium* TA 100가 첨가된 배지에 0.1, 0.5, 1, 5%농도로 첨가하여 24시간 배양한 후 복귀 돌연변이균주의 수를 측정 한 결과 1%와 5%에서 각각 50.4%와 62.5%로 관찰되었다. 이는 천연유화제 첨가농도가 1%이상에서 50%이상의 돌연변이를 저해효과가 매우 높음을

Table 23. Influence of biosurfactant on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine(MNNG) in *Salmonella typhimurium* TA100

Treatment	Concentration(%)	Revertant/plate	Inhibition Rate(%)
Control(MNNG) Spontaneous		986±62	
MNNG+biosurfactant	0.1	936±32	5.7
	0.5	854±25	15.0
	1	541±12	50.4
	5	434±11	62.5

시사하는 것이다. 저농도에서는 효과가 미미한 것으로 나타났으나 좀더 천연유화제를 정제한다면 그 효과가 커지리라 예상된다.

항돌연변이 물질이란 발암과정을 중지시키거나 지연시키는 역할을 하는 물질이라는 의미로, 전구체로부터 발암물질생성을 저해하는 물질군인 chemo-preventive agent, 발암물질과 세포성 분자들과의 반응을 저해하는 blocking agent, 발암물질과 세포성분과 결합한 후 신생물의 변화를 저해하는 suppressing agent의 3가지 범주로 나눌 수 있다(wattenberg, 1985, Hocman, 1989, Flora and Ramel, 1988, Flora 1988).

다수의 연구자들에 의해서 항돌연변이 효과가 있는 물질을 개발하고자 하는 이유는 최종적으로 안전하고, 효율적인 항암물질로서의 응용에 있다. 암세포라고 하는 것은 체세포가 일종의 돌연변이가 일어난 것으로서 하나의 지표가 될 수 있기 때문이다.

2. 천연유화물의 기능성 조사

(1) 중금속흡착능

Fig. 85-88은 천연유화제의 중금속흡착능을 살펴본 것이다. 연구계획서대로 실행한다면 실험동물의 혈액내에 존재하는 림프구들을 분리하여 중금속과 전배양하여 세포들을 중금속에 오염시킨 후, 천연유화제를 첨가하여 천연유화제가 세포내부와 배양액중의 중금속을 어느 정도 신속하게 제거하는지 여부를 살펴보려고 하였다. 그러나 중금속표준물질들 대부분이 물에는 불용이고, 3-5%질산용액에 녹아져 판매되고 있어서 이들을 배양액에 첨가하였을 경우, 세포의 정상적인 성장이 이루어지지 않았다. 따라서 세포를 제외하고 천연유화제와 중금속을 시간대별로 반응시키면서 중금속 제거율을 살펴보았다. 100ppm농도의 네가지의 중금속 철(Fe), 카드뮴(Cd), 납(Pb), 아연(Zn)이 함유

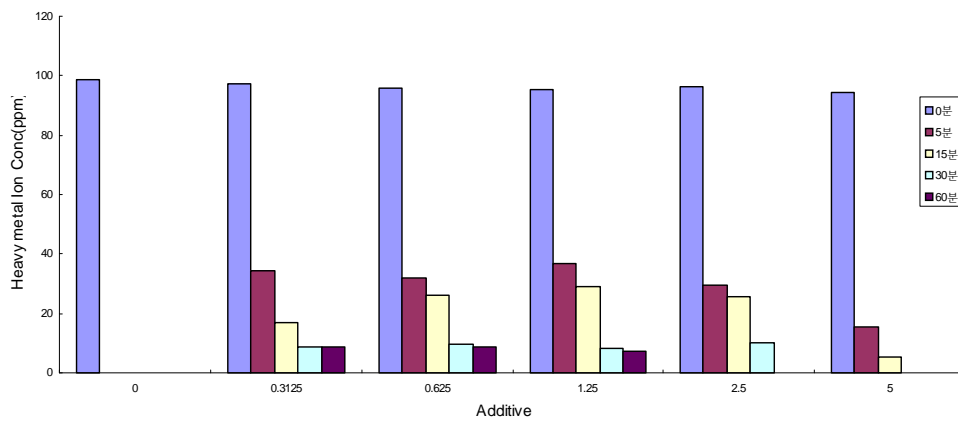


Fig. 85. Lead(Pb) removal from medium by biosurfactant on the various concentrations

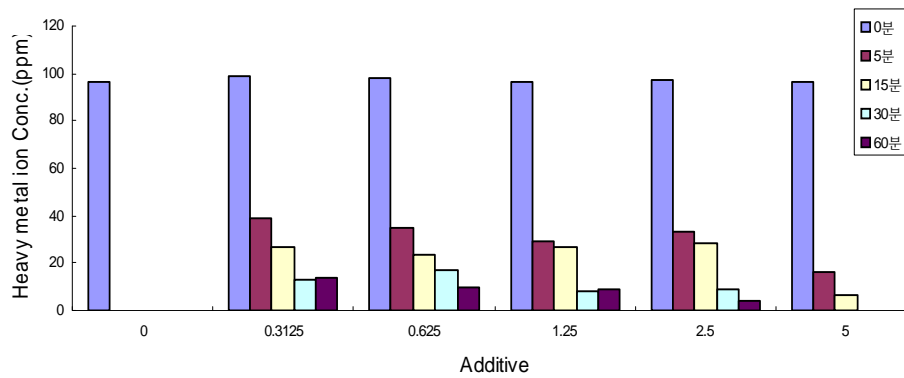


Fig. 86. Zinc(Zn) removal from medium by biosurfactant on the various concentrations

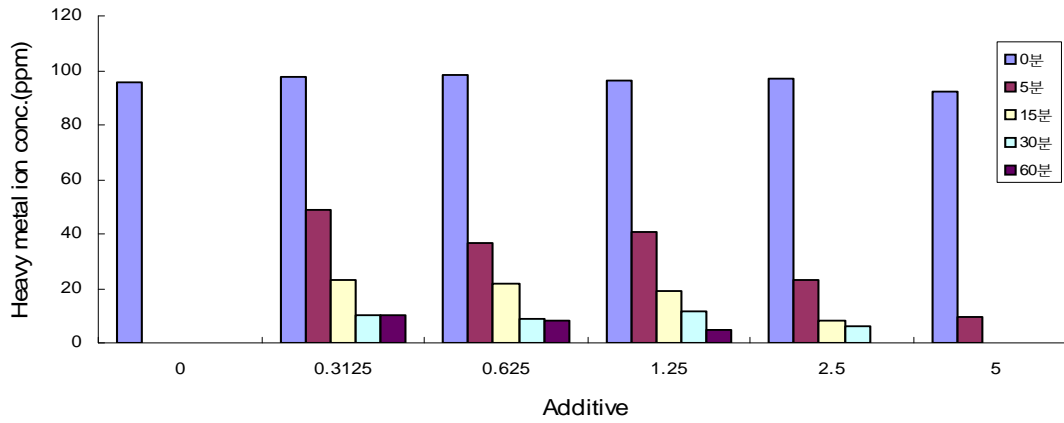


Fig. 87. Iron(Fe) removal from medium by biosurfactant on the various concentrations

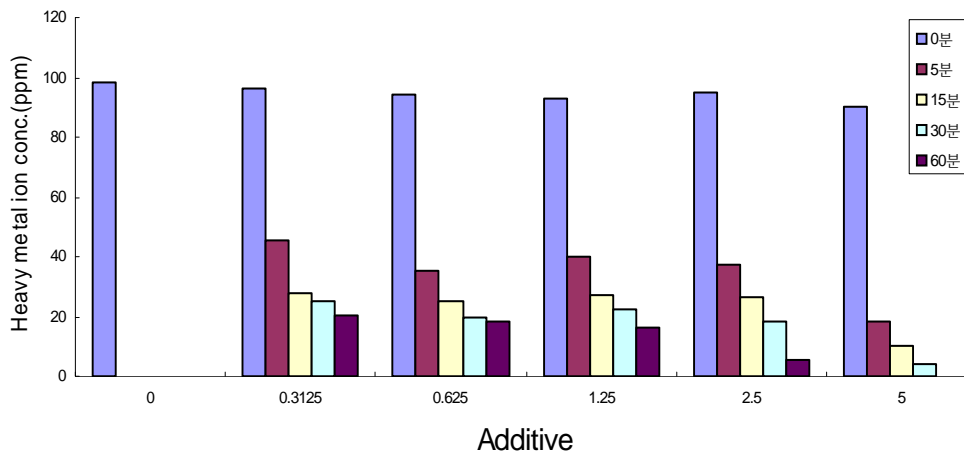


Fig. 88. Cadmium(Cd) removal from medium by biosurfactant on the various concentrations

된 용액에 0%, 0.3125%, 0.6215%, 1.25%, 2.5%, 5%농도가 되도록 천연유화제를 첨가하여 진탕항온수조에서 120rpm, 37°C에서 반응시키면서 0분, 5분, 15분, 30분, 60분 시간대별로 추출하여 원심분리한 후 상층액에 남아있는 중금속을 ICP-AES를 통해 분석하였다. 네 종류의 중금속은 그림에서 보면 알 수 있듯이 5분 이내에 40%이상이 제거되었고, 15분 이후에는 거의 100%에 가까운 중금속 제거율을 보였다. 이 결과는 비록 생세포를 이용한 실험은 아니었지만 산업적으로나 환경적으로 신속한 중금속의 제거방법을 제시하는 것으로, 본 실험에 사용한 계면활성제는 거의 무독하기 때문에 중금속이 오염된 수질정화에 매우 효과적이라고 사료된다. Catherine등(2001)은 천연유화제를 이용한 토양이나 수질중의 중금속제거능을 살펴본 결과 매우 탁월한 효과가 있었다고 보고하고 있으며, Li(1995)등은 제 88회 토양과 수질관리학회를 통해 발표된 내용 중에 카드뮴, 구리, 납, 수은, 니켈, 아연등은 세계환경기구(EPA)에서 정하는 가장 유해한 중금속으로 고려되고 있고, 토양중에 이들 중금속의 오염은 관심이 집중되어 있다고 하였다. 따라서 이들의 제거방법을 강구하여 토양중에 포함된 중금속이 지하수를 통해서 강이나 호수, 바다로 도달하지 못하도록 토양중의 중금속 제거방법을 신속히 강구할 것을 요구하고 있다고 한다. EPA에서는 토양 중에 포함된 중금속의 효과적인 제거방법중의 하나로 천연유화제의 사용을 권장하고 있고, 천연유화제의 경우 또다른 독성에 대한 우려없이 토양중의 중금속을 재빨리 제거한다는 논문도 다수 보고되고 있다.

(2) 항종양활성

1) In vivo test(Tetrazolium-based colorimetric Assay ; MTT Assay)

항종양활성을 살펴보기 위해서 본래의 의도는 sarcoma 180세포를 한국세포주은행으로 부터 구입하여 실험동물에 접종하고 고형암을 유발, 시료인 천연

유화제를 고형암에 주사하여 고형암의 성장이 저지되는지 여부를 조사하는 것이었다. 그러나 최근의 연구동향이 고형암세포인 sarcoma 180의 사용을 지양하는 추세에 있어서 생체에서 주로 암을 일으키는 암세포를 분양받아 천연유화제의 세포독성을 살펴보는 것으로 연구방향을 전환하였다.

현재 많이 사용되고 있는 Tetrazolium-based colorimetric (MTT) 검색법은 96-well plate를 사용하고 검사결과를 ELISA reader (multiwell microplate reader)를 이용하여 많은 시료를 간단히 빠르고 객관성 높게 판독할 수 있어 세포독성 및 세포증식 검색법으로서 널리 사용되고 있다(Carmichael, J. et al., 1987, Mosmann, T., 1983, Shoemaker R. H. et al., 1985)

대사과정이 온전한 암세포는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색 수용성 MTT tetrazolium을 자주색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시킨다. MTT formazan의 흡광도는 540 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있으며 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 즉, 흡광도는 MTT가 세포에 의해 환원된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 생존 세포수와 비례한다.

사람의 유방암 세포종(MCF-7)과 간암 세포종(SNU-386)의 성장에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 well 당 0.1%, 1%, 5%, 10% 농도가 되도록 천연유화제를 첨가하여 4일간 배양하면서 세포의 생존율을 살펴본 결과를 Fig. 89와 90에 나타내었다. 천연유화제를 첨가하지 않은 대조군에 비교한 시료군의 생존율은 매우 낮은 편이었다. 천연유화제는 암세포의 성장률을 최대 85%정도까지 억제하였으며, 강한 항암활성을 보인다고 여겨지는 결과이다. 천연유화제가 항암활성을 보인다는 문헌상의 보고는 입증된 바를 찾지 못하였으나 최근의 항암제 실험에서 주로 논의되고 있는 것이 리포솜을 이용한 항암제 투여이다. 플라티늄 항암제 이외에도 Doxorubicin, Camptothecin, Taxol등에 지질이나 계면활성제를 이용하여 리포솜을 형성하여 이들 약물을 세포내로 운반시킨

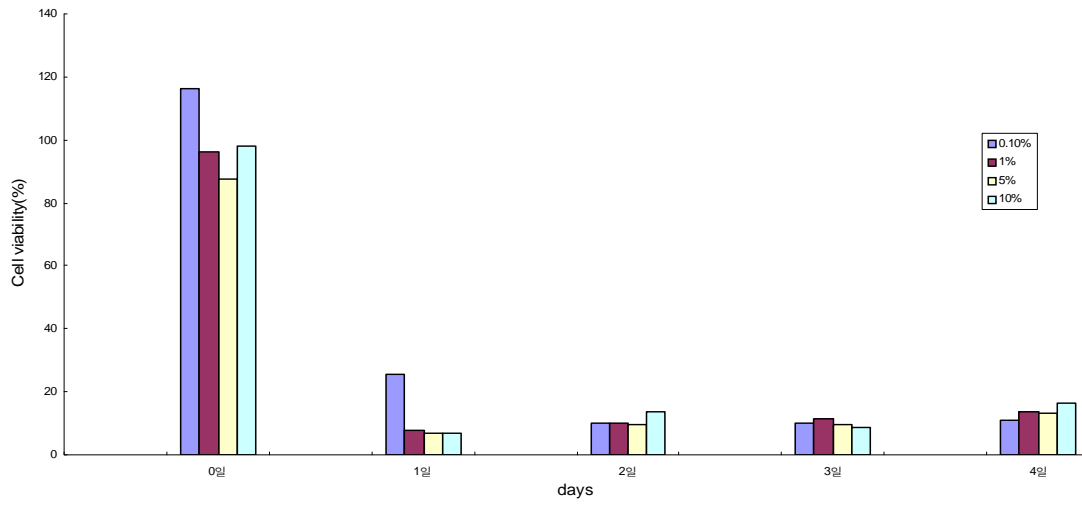


Fig. 89. Anticancer effect of surfactant for MCF-7 cell line on the various concentrations

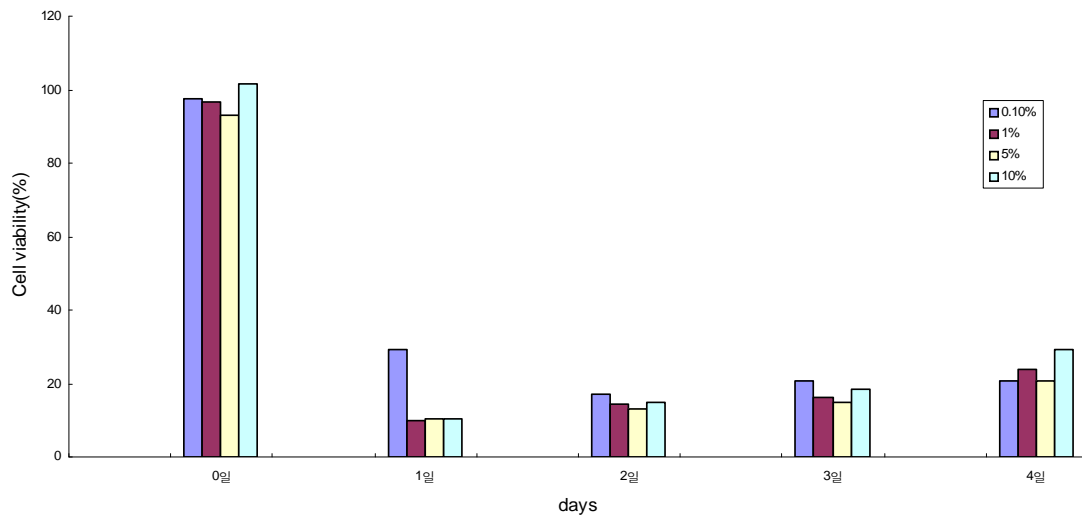


Fig. 90. Anticancer effect of surfactant for SNU 386 cell line on the various concentrations

다면 독성이 없고, naked 약물에 비해 세포내로의 약물운반능력과 체내순환율이 높아 항암효과가 증가된다는 것이다. 리포솜은 친수성, 소수성 그리고 양쪽성 분자까지도 높은 함유율로 제제할 수 있어 운반매개체로는 매우 강점이 있고, 리포솜 자체의 독특한 구조 때문에 약물이나 유전자운반 뿐만아니라 초음파나 MRI의 조영제로도 각광을 받고 있다는 것이다(Khokhar, A. R., 1989, 1991). 천연유화제 자체도 면역학적으로 면역억제의 성향을 띤다는 사실을 다수의 논문에서 보고된 바가 있고, 기존의 항암제와 병행하여 투여한다면 상승효과가 기대되는 결과라고 할 수 있겠다.

2) In vitro test

항종양활성을 살펴본 결과를 Fig. 91과 92에 나타내었다. 그림 91은 In vitro에서 천연유화제의 항종양활성을 나타낸 것이다. DNA/methyl green assay는 DNA/methylgreen복합체와 DNA Active agent 인 Distamycin A가 반응하여 DNA/Distamycin A복합체를 형성하고, methylgreen을 colorless carbinol이라는 물질로 전환시켜 630nm에서 흡광이 없어지도록 하는 것이 주된 원리이다. 이 분석법은 DNA와 강하게 결합하는 항암물질을 찾아내는데 목적이 있고, 최종목적은 보다강한 항생제를 찾아내어 항암효과를 극대화하고자 하는데 있다. 최근에는 미생물발효조에서 미생물들이 생산해내는 물질들 중에서 항암효과를 가지는 물질들을 검색하는 방법으로 각광받고 있는 분석법중의 하나이고, 대표적인 것이 streptomyces insignis ATCC31913이 생산하는 Daunomycin이다 (Neal S. et al, 1992).

본 연구에서는 시료로서 사용한 천연유화제는 Distamycin A과 비교해볼 때 Fig. 92에서 보면 알 수 있듯이 비슷하거나 약간 낮은 정도의 항생효과를 보이는 것을 알 수 있다. 또한 IC 50값도 distamycin 값이 11.29($\mu\text{g}/\text{mL}$)이고, surfactant는 13.52($\mu\text{g}/\text{mL}$)로 비슷한 수치를 보임으로써 항생물질로서의 개발

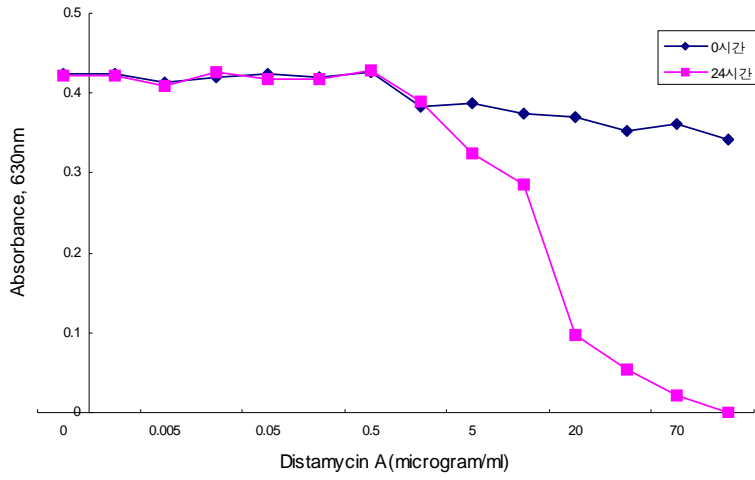


Fig. 91. Displacement of methyl green from DNA by distamycin A

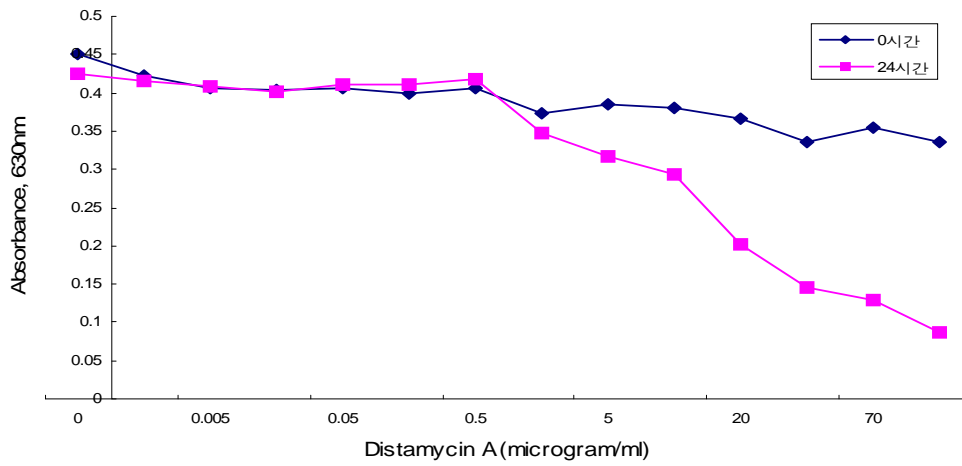


Fig. 92. Displacement of methyl green from DNA by surfactant.

가능성을 제시하는 결과라고 할 수 있을 것이다.

(3) 항체생성능

천연유화제의 면역체계에 미치는 효과를 조사하기 위해서 항체생성능을 살펴보았다. 단백질과 지질로서 구성된 계면활성제, 지질로만 구성된 계면활성제, 합성계면활성제를 포함한 모든 계면활성제는 어떤 방법으로든지 면역기능에 다양한 효과를 나타낸다고 보고되고 있다. 사람, 돼지, 토끼 등에서 추출된 계면활성제는 mitogen에 의해서 자극받은 림프구의 성장을 억제하며, Natural killer cell에 의한 target cell의 lysis를 저해, 마크로파지의 표면의 Fc receptor와 보체의 발현감소 등 면역기능억제의 효과가 두드러지게 보고되고 있다(Ansfield and Benson, 1980, Wilsher et al., 1988, Catanzaro et al., 1988, Coonrod and Yoneda, 1983).

본 연구에서도 비슷한 경향을 발견할 수 있었다. 마우스를 Hapten으로 면역화시킨 후, 10mg/mL의 천연유화제를 400 μ L씩 5일동안 복강투여한 후 마우스의 비장을 추출하여 B 림프구를 분리하여 72시간 배양한 후 배양액중의 항체중 IgG만을 검출하였다. 대조군으로서는 천연유화제 대신에 PBS를 투여한 것으로 하였다. 우선 IgG가 대조군에 비해서 많이 발현되었는지를 조사하기 위해서 (주)Neodin으로부터 Anti-HBs라는 ELISA kit를 구입하여 분석한 결과 시료의 흡광도가 대조군과 거의 차이가 없었다(Fig. 93). 더우기 양성대조군보다 더 낮은 흡광도를 보임으로써 천연유화제의 복강투여는 항체생산에는 거의 영향을 미치지 않은 것으로 보여진다. 재현성 있는 결과를 얻기 위해서 반복실험을 수행하였으나 결과에는 거의 차이가 없었다. 또한 분리된 B 림프구를 72시간 배양하면서, 대조군과 세포성장율을 비교한 결과 세포성장율도 거의 차이가 없거나 오히려 성장이 느린 경향을 나타나 일련의 참고문헌과 유사한 결과인 면역억제효과를 살펴볼 수 있었다.

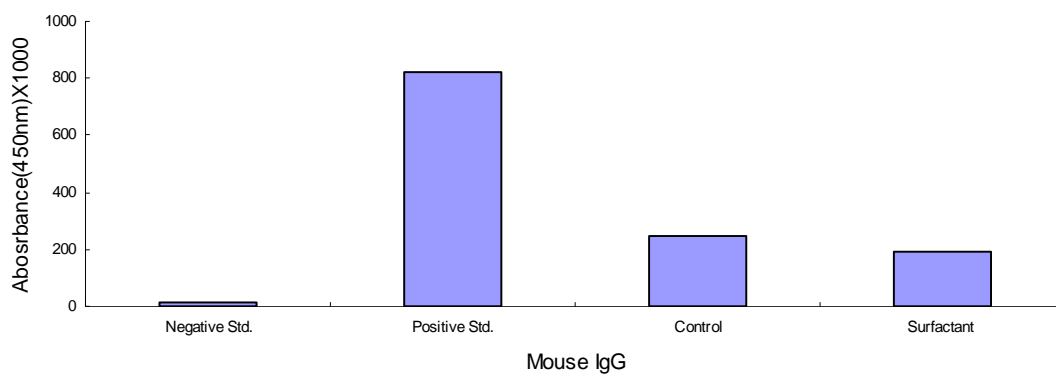


Fig. 93. Specific reactivity of ELISAs(sandwich method) against anti-mouse IgG antigen for detection mouse IgG

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1세부과제에서는 “해양생물 유래 천연유화물의 대량생산 및 수산가공제품에의 응용”의 연구를 수행하였다. 우리나라 남해안의 유류 오염지역을 중심으로한 남해안 전지역에서 천연유화물 생산능이 있는 균주를 분리한 후 그 분포도를 작성한 후, 천연유화물 생산능이 가장 우수한 한 균주를 선택하여 분리 동정한 결과, *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)로 명명하였다. 본 균주는 폐어유를 탄소원으로 천연유화제를 대량 생산해 내며, 생산된 천연유화물을 분리·정제하여 FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C FT-NMR, DEPT, RELAY, HSQC, HMBC을 통하여, NS-1의 구조를 살펴본 결과, 2개의 α-L-rhamnose와 1개의 β-hydroxydecanoic acid, 1개의 β-hydroxydecanoic acid methyl ester가 결합된 2-O-α-L-rhamnopyranosyl-α-L-rhamnopyranosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxy decanoic acid methyl ester의 새로운 신물질임이 밝혀졌다. 새로운 천연유화물의 생산능이 높은 균주의 분리는 본 연구의 기본 목적을 달성함에 있어 충분한 조건으로 판단되어진다.

분리된 천연유화물의 물리 화학적 특성을 살펴본 결과, 기존의 화학유화제와 비교하여 해수나 담수 등에서 유화활성과 유화안정성이 우수하며, 열 안정성이 아주 우수한 것으로 확인되어, 식품첨가물, 세제, 유출유 처리제 등 다양한 산업분야에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

Pseudomonas aeruginosa BYK-2(KCTC 18012P)에 의한 천연유화제 생산을 향상시키기 위하여 회분발효를 실시하다가 fish oil의 농도가 5g/L 이하로 떨어지는 시점에서 fish oil의 농도 및 공급량을 달리하여 발효조에 주입하여 배양한 결과 최대 생산량 22.7 g/L를 얻을 수 있었다. 또한, 계획하였던 연구 목록 이외에도 보다 다양한 방법으로 천연유화물을 생산해 내기 위하여 균체 고정화 기법을 추가로 실시한 결과, 최적 지지체로 10% (w/v) MPVA를 선

정, 최적의 조건에서 고정화 균체의 연속배양을 위해 사용되는 Air lift 생물반응기를 이용하여 천연유화물을 연속생산 할 수 있는 추가적인 결과도 얻을 수 있었다.

200 L fermentor를 이용한 pilot plant 생산 결과를 토대로 하여 대량 생산 공정 및 대량 분리공정을 modeling 할 수 있었다.

이렇게 얻어진 천연유화물을 식품(어육소세지)에 첨가하였을 때 유화제로서의 기능이 매우 탁월하므로 저농도로 첨가하여도 물리·화학적(관능적) 특성에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

본 연구에 사용된 해양미생물 유래 천연유화물과 현재 시판중인 유화제를 가격과 기능면에서 그 경쟁력을 비교하여 본 결과, 기능면에서 화학유화제에 비해 60배 가량 우수하고 표면장력저하능도 2배 가량 우수하므로 실제 사용량에 대한 가격면을 비교해 보면 가격 경쟁력이 10배 정도 더 뛰어난 것으로 나타났다. 대량생산하여 제품화될 경우 매우 우수한 가치를 가지는 경쟁력있는 천연유화물일 것으로 판단된다.

제2세부과제에서는 “해양생물유래 천연유화물의 기능성 및 안전성 검토”라는 목적으로 천연유화물의 항균활성 및 독성 검사, 항돌연변이효과와 중금속 흡착능, 항 종양활성 등의 기능성을 조사하였다. 그 결과, 다양한 기능성을 가지고 있음을 확인하였다.

천연유화제 생산균주의 분리, 페어유를 이용한 천연유화제의 생산, 그리고 천연유화제의 식품첨가제로 사용 가능한 여러 가지 특징들을 밝혔으며, 수산연제품에 첨가할 경우 생리활성을 지니는 고기능성의 제품 생산 가능성과 대

량생산 가능성도 제시하였으므로 본 연구목적을 달성한 것으로 판단된다.

이러한 결과를 이용하여 천연유화물은 다음과 같은 분야에 응용가능할 것으로 사료된다.

(1) 식품 산업 (Food industry)

- 1) 고기능성을 요구하는 식품에의 첨가
- 2) 수산가공제품에 대한 유통기한 연장 가능
- 3) 과다한 유지 섭취로 유발되는 성인병 예방식품으로 응용

(2) 화장품 산업 (Cosmetic industry)

- 1) 피부, hair 보습제
- 2) 무해한 천연 유화물의 첨가로 보관기간 연장 가능

(3) 제약산업 (Pharmaceutical industry)

- 1) 여러 가지 기능성을 가지는 약품으로서의 천연유화물
- 2) 약물눈반시스템으로서의 liposome으로 사용

(4) 석유산업 (Oil-industry)

- 1) Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) - 석유의 삼차회수와 유출유 처리에 응용, 중질유 저장 탱크의 crude oil sludge에서 oil의 회수
- 2) 중질유의 점성저하 - 고점도 oil의 파이프라인 수송 가능

(5) 토양의 재 활성화 (Microbial remediation of contaminated soils)

- 1) 오염된 토양의 정화에 사용

(6) 기타

- 1) 해양세균 유래 천연유화물의 분리·정제 기술의 확보, 대량생산에 사용
- 2) 폐어유의 고 부가가치화
- 3) 흡습이나 보습능을 향상시킨 농약 산업
- 4) 펄프나 제지산업
- 5) 금속공정 산업에서의 중금속 회수 및 폐수 처리

제 6 장 참고문헌

Anderson, W.(1961) The antipeptic activity of sulfated polysaccharides, *J. Pharm. Pharmacol.*, **13**, 139

Abe, S. and T. Kaneda(1975) Studies on the effect of marine products on cholesterol metabolism in rats-XI; Isolation of a new betaine, ulvaline, from a green laver *Monostroma nitidum* and its depressing effect on plasma cholesterol levels. *Bull. Jap. Fish. Soc.*, **41**, 567-571

Ahn, D. H. and Y. C. Chung(1992) Biopolymer Production of *Zoogloea ramigera* in Batch, Fed-Batch and Continuous Culture Processes. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**(2), 196-202

Andreas K. Koch, Othmar Kappeli, Armin Fiechter, and Jakob Reiser(1991) Hydrocarbon Assimilation and Biosurfactant Production in *Pseudomonas aeruginosa* Mutants. *Journal of Bacteriology.*, **173**(13), 4212-4219

Ansfield, M. J. and B. J. Benson(1980) Identification of the immunosuppressive components of canine pulmonary surface active material, *J. Immunol.* **125**, 1093-1098

B. Mcneil and L. M. Harvey(1990) Fermentation; a practical approach, Oxford University Press, 92-130

Bertolin, Telma Elita, Jorge Alberto Vieira Costa, and Gean Delise Leal Pasquali(2001) Glucoamylase Production in Batch and Fed-Batch Solid State

Fermentation: Effect of Maltose or Starch Addition. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**(1), 13-16

Billiot E., R.A. Agbaria, S. Thibodeaux, S. Shamsi, and I. M. Warner(1999) Amino acid order in polymeric dipeptide surfactants: Effect on physical properties and enantioselectivity, *Analytical Chemistry*, **71**(7), 1252-1256

Borron, P. J., E. C. Crouch, J. F. Lewis, J. R. Wright, F. P. Possmayor, and L. J. Fraher(1998) Recombinant Rat surfactant-associated protein D inhibits human T lymphocyte proliferation and IL-2 production, *J. Immunol.*, **161**, 4599

Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell(1987) Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assesment of chemosensitivity testing, *Cancer Res.* **47**, 936

Catanzaro, A., P. Richman, S. Batcher, and M. Hallman(1988) Immuno-modulation by pulmonary surfactant, *J. Lab. Clin. Med.*, **112**, 727-734

Catherine N. M., N. Y. Raymond, and F. G. Bernard(2001) Heavy metal removal from sediments by biosurfactants, *J. Hazardous Materials*, **85**, 111-125

Cecilia D. G., X. M. Francis, R. V. Dennis, E. M. Stephen, and S. S. Larry(1995), Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages, *The Journal of Immunology*, **155**, 5343-5351

Chan, J. K., T. A. Gill, and A. T. Paulsan(1992) Cross-linking of myosin heavy chains from cod, herring and silver hake during thermal setting. *J. Food Sci.*,

57(4), 906-912

Chobert, J. M., C. Bertrand-Hard, and M. Nicolas(1988) Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin., *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 883-892

Choi, Y. J., H. S. Lee, and J. J. Cho(1999) Optimization of Ingredients formulation in low grades surimi sor improvement of gel strength. *J. Korean Fish. Soc.*, **32**(5), 556-562

Coonrod, J. D. and K. Yoneda K. (1983) Effect of rat alveolar lining matrial on macrophage receptors, *J. Immunol.*, 130-2589-2596

Cooper, D. G., J. E. Zajic and D. F. Gerson(1979), Production of surface active lipids by *Corynebacterium lepus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**(1), 4-10

Flora, S. D. and C. Ramel(1988) Mechanisms of inhibition of mutagenesis and carcinogenesis : Classification and overview, *Mutat. Res.*, **202**, 285-306

Flora, S. D.(1988) Problems and prospects in antimutagenesis and anticarcinogenesis, *Mutat. Res.*, **202**, 279-283

Geertsma, M. F., H. R. Broos, M. T. van den Barselaar, P. H. Nibbering, and R. van Furth(1993), Lung surfactant suppresses oxygen-dependent bactericidal functions of human blood monocytes by inhibiting the assembly of the NADPH oxidase, *J. Immunol.*, **150**, 2931

Geertsma, Minke F., P. H. Nibbering, H. P. Haagsman, M. R. Daha, and Ralph van

Furth(1994), Binding of surfactant protein A to C1q receptors mediates phagocytosis of *staphylococcus aureus* by monocytes, *Am. J. Physiol.* **267**, L578

Goodwin, T. W.(1974), Carotenoids and billiproteins. in "Algal physiology and biochemistry"(W.D.P. Stewart ed.). Blackwell Scientific Publication, London, pp. 176-205

Guerra-Santos, L. H., O. Kappeli, and A. Fiechter(1986), Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 443- 448

Guerra-Santos, L. H., O. Kappeli, and A. Fiechter(1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 301-305

Haferburg, D., R. Hommel, R. Claus, and H. P. Kleber(1986) Extracellular microbial lipids as biosurfactants, *Adv. in Biochem. Bioeng. Biotechnol.*, **33**, 53-92

Hawgood, S. and J. A. Clements(1990) Pulmonary surfactant and its apoproteins, *J. Clin. Invest.*, **86**, 1

Hocman, G.(1989) Prevention of cancer : Vegetables and plants, *Comp. Biochem. Physiol.*, **93B**(2), 201-212

Holmskov, U., R. Malhotra, R. B. Sim, and J. C. Jensenius(1994) Collectins: Collagenous C-type lectins of the innale imuune defense system, *Immunol. Today*, **15**, 67

James M. B., T. Laurence, R. James, Y. L. Foo, and A. James(1998) Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen, *The Journal of Immunology*, **161**, 4000-4007

Kamath, G. G., T. C. Lanier, E. A. Foegeding and D. D. Hamann(1992) *J. Food Biochemistry*, **16**, 151-172

Kang, S. M., D. W. Kim, and H. J. Kim(1994) Isolation of biosurfactant producing *P. aeruginosa* kk-7 and the biosurfactant production, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**(1), 92-98.

Khokhar, A. R., S. Al-Baker, T. Brown, and R. Perez-Soler(1991) Chemical and biological studies on a series of lipid-soluble DACH-Pt(II) complexes incorporated in liposomes. *J Med Chem*, **34**, 325-329

Khokhar, A. R., S. Al-Baker, I. H. Krakoff, and R. Perez-Soler(1989) Toxicity and antitumor activity of cis-bis-carboxylato(trans-R,R-1,2-di-aminocyclohexane) platinum(II) complexes entrapped in liposomes, a new series of lipid-soluble drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*, **23**, 219-224

Kim, H. J., B. J. Kim, J. Y. Kong, and H. S. Koo(2000), Isolation and characterization of oil degrading bacteria from southern sea of Korea. *Kor. J. Biotechnol. bioeng.*, **15**, 27-34

Koch, A. K., O. Kappeli, A. Fiechter, and J. Reiser(1991), Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. bacteriol.*, **173**(13), 4212-4219.

Lasen, H. 1981. The family halobacteriaceae. *The procaryote.*, **1** : 976.

Laurence A., K. Kamen, V. Daniel, R. Catherine, F. Grayna, H. Nathalie, L. Shirley(1998) Generaion of lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type II phospholipase A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction, *J. Clin. Invest.*, **102**, 1152-1160.

Li, W., R. W. Peters, M. D. Brewster, and G. A. Miller(1995) Sequential extraction evaluation of heavy-metal contaminated soil: how clean is clean? in: proceedings of the air and water management association, 88th Annual Meeting and Exhibition, San Antonio, TX, 18-23, June.

Luis, G. S., O, Kappeli, and A. Fiechter(1984) *Pseudomonas aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuous Culture with Glucose as Carbon Source. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**(2), 301-305.

Macdonald, G. A. and T. C. Lanier(1994) Actinomyosin stabilization to freeze-thaw and heat denaturation by lactate salts. *J. Food Sci.*, **59**(1), 101-105

Maron, D. M. and B. N. Ames(1983) Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res.*, **113**, 173-215

Mclean, M and M. Dutton(1995) Cellular interactions and metabolism of aflatoxin ; An Updata. *Pharmac. Ther.*, **65**, 163-192

Minakawa, M.(1987), *Senzai Senjounojiten*, chap. 8. Asakurashoten.

Minke F. G., H. N. Peter, P. H. Henk, R. D. Mohamed, and V. F. Ralph(1994),

Binding of surfactant protein A to C1q receptors mediators phagocytosis of *staphylococcus aureus* by monocytes, *Am. J. physiol.*, **267**, 578-584.

Mosmann, T.(1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application of proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55

Neal S. Burres, F. Andrea R. R. Ronald, and M. James(1992) A colorimetric microassay for the detection of agents that interact with DNA, *J. Natural products*, **55**(11) 1582-1587

Niwa, E.(1975) Role of hydrophobic bonding in gelatin of fish paste. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **41**, 989-992

Okada, M.(1963) Elastic property of kamaboko. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **36**(1), 75-76

Park, J. W.(1994) Functional protein additives in surimi Gels. *J. Food Sci.* **59**(3), 525-527

Park, J. W., T. C. Lanier, and D. H. Pilkington(1993) Cryostabilization of functional properties of pre-rigor and post-rigor beef by dextrose polymer and/or phosphates. *J. Food. Sci.* **58**(3), 467-472

Pearce, K. N. and J. E. Kinsella(1978) Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, **26**(3), 716-723

Peypoux, F., J. M. Bonmatin, H. Labbe, B. C. Das, M. Ptak and G. Michel(1991), Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val]surfactin, *Eur.*

J. Biochem. **202**, 101-106

Reisfeld, A., E. Rosenberg, and D. Gutnick. 1972. Microbial Degradation of Crude Oil : Factors Affecting the Dispersion in Sea Water by Mixed and Pure Cultures. *Appl. Microbiol.*, **24**(3), 363-368

Reitman, S. and S. Frankel(1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56

Rigo, A. and G. Rotilio(1977) Simultaneous determination of superoxide dismutase and catalase in biological materials by polarography. *Anal. biochem.*, **81**, 157

Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz, and D. L. Gutnick(1979) Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 : Isolation and Emulsifying Properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**(3), 402-408

Rosenberg, M. A. Bayer, J. Delarea, and E. Rosenberg(1982) Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**(4), 929-937

Santos, L. G., O. Kappeli, and A. Fiechter(1984) *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 301-305

SAS Institute(1996) SAS user guide. Release 6.12 edition, SAS Institute Inc, N.C. USA

Seki, N., H. Uno, N. H. Lee, I. Kimura, K. Toyoda, T. Fujita, and Ken-ichi Arai(1990) Transglutaminase activity in alaska pollack muscle and surimi and its reaction with myosin B. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**(1), 125-132

Sherman, M. P., J. B. D'Ambola, E. E. Aeberhard, and C. T. Barrett(1988) Surfactant therapy of newborn rabbits impairs lung macrophage bactericidal activity, *J. Appl. Physiol.*, **65**, 137

Shoemaker R. H., Wolpert-DeFilippes M. K., Kern D. H., Lieber M. M., Makuch R. W., Melnick N. R., Miller W. T., Salmon S. E., Simon R. M., Venditti J. M. and Von Hoff D. D.(1985) Application of a human tumor colony-forming assay to new drug screening. *Cancer Res.*, **45**, 2145

Siemann, M. and F. Wagner(1993) in Biosurfactant : production, properties., Application, Surfactant series. Marcell Dekker Inc. New York., **48**(N. Kosaric), 99-133

Sych, J., C. Lacroix, L. t. Adambounou and F. Castaigne(1990) Cryoprotective effects of some materials on cod surimi proteins during frozen storage. *J. Food Sci.*, **55**(5), 1222-1227

Wan, J., J. Miura, and N. Seki(1992) Effect of monovalent cations on cross-linking of myosin in suwari geks from walleye pollack. *Nippon Suisan Gakakkaishi*, **58**(3), 583-590

Wattenberg, J. W.(1985) Chemoprevention of cancer, *Cancer Res.*, **45**, 1-8

Wilsher, M, L., D. A. Hughes and P. L. Haslam(1988) Immnuoregulatory properties

of pulmonary surfactants : effect of lung lining fluid on proliferation of human blood lymphocytes, *Thorax*, **43**, 354-359

Wilsher, M. L., D. A. Hughes, and P. L. Hastam(1988), Immunoregulatory properties of pulmonary surfactant: effect of lung lining fluid on proliferation of human blood lymphocytes, *Thrax*, **43**, 354

Yamaguchi S.(1999) Correlation between the mixing ratio of surfactants and the water/oil ratio in middle microemulsions in water mixed surfactant hydrocarbon systems, *Langmuir*, **14**(25), 7183-7188

Young Lee, Sang Yup Lee, and Ji-Won Yang(1999), Production of Rhamnolipid Biosurfactant by Fed-batch Culture of *Pseudomonas aeruginosa* Using Glucose as a Sole Carbon Source. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**(50), 946-947

Zhang, Y. and R. M. Miller(1992) Enhanced Octadecane Dispersion and Biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid Surfactant (Biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(10), 3276-3282

Zuckerberg, A., A. Diver, Z. Peeri, D. L. Gutnick, and E. Rosenberg(1979), Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 414-420.

공재열, 전홍기(1993), 미생물공학. 동화기술

金井泉, 臨床検査法提要, 改訂, 第 29 版, pp. 474(1983)

내외정보센터(1997), '98 화학시장정보총람, pp.469-482, 원화출판사

농축산신문, 1997 한국식품연감, pp.485-506

농축산신문, 1997 한국식품연감, pp.542-559

농축산신문, 1997 한국식품연감, pp.624-646

류병호, 김학주, 배승권, 김종덕, 공재열. 1993. 해양으로부터 분리한 *Pseudomonas* sp. CHCS-2가 생산하는 Biosurfactant의 정제 및 특성에 관한 연구. *한국생물공학회지*, **10**(5), 582-588.

일본유지화학협회(1991), 유지화학편람, pp.407-418, 대광출판사

일본후생성(1997). 의약품 비임상시험 guideline 해설

坂上良男(1983), 海藻の生化学と利用; 抗潰瘍性成分. 恒星社厚生閣, 東京, pp.90-100