

생물계면활성제의 발효 최적화 및 분리공정의 개발

안도균, 정은혜, 박창호
경희대학교 공과대학 화학공학과

Optimization of the biosurfactant fermentation and separation processes

Doh Gyeuhn Ahn, Eun Hae Jung and Chang Ho Park
Dept. of Chemical Eng. Kyung Hee University

서론

미생물이 생산하는 계면활성제는 일반적인 화학합성계면활성제의 특성외에 생분해성, 무독성을 가지고 있으며 식품이나 화장품, 석유산업, 제지산업등에 중요한 소재로써 개발되고 있으며 특히 환경분야에서 기름을 유화시키는 미생물에 의한 오염유류의 제거등에 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 생물계면활성제를 생산하는데 있어서 미치는 주요인자로는 탄소원의 종류, 영양원의 제한, 탄소원과 질소원의 비의 변화 및 질소원의 종류, pH, 용존산소의 양, 온도, 교반속도, 다가이온의 공급, 성장시기, 생산물에 의한 저해작용등이 있으며 또한 생물계면활성제의 성능을 알기위하여 표면장력의 감소능이나 유화능을 시험하여 간접적으로 그 생산량을 알수가 있다.

본 실험에서는 기름을 사용하여 유화제를 생산하는 균주를 선별하여 80P라 명명하고 이 균주에 대한 유화제 생산 최적 초기 pH를 flask 배양을 통하여 1차적으로 정하고 7L 발효조를 통하여 온도에 의한 생산효과와 pH에 의한 효과등을 연구하였으며 또한 기존의 분리 방법중 최적의 분리방법을 모색하였다.

실험

유화제 생산을 위한 기초 배지조성은 Glucose ; 20g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.5g/l, NH_4NO_3 ; 1.0g/l, K_2HPO_4 ; 1.0g/l, KH_2PO_4 ; 0.5g/l, Yeast extract ; 1.0g/l, NaCl ; 0.1g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0.01g/l, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$; 0.01g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.01g/l 으로 Sigma 시약을 사용하였으며, 표면장력은 윤회법을 이용한 일본 吉田사의 표면장력기를 사용하였다. UV-spectrophotometer 는 일본 Shimadzu사 모델 UV-1601을 사용하였으며 발효 실험은 7L 발효조(한국발효기)를 가지고 2L 조업부피로 하여 최초 30°C, 300rpm 으로 약 35시간 배양하였으며 소포제로 Antifoam A (Sigma Co.)를 사용하였다. 또한 유화능이 우수한 균주를 선별하여 80P 라 명명하였다.

유화능의 측정

Zuckerberg 의 방법을 인용하여 배양액을 20mM citrate-phosphate buffer(pH 5.1)

로 60배 희석하여 9.9ml을 채취한 후 여기에 2-methylnaphthalene 과 n-hexadecane 의 동량혼합물(v/v) 0.1ml을 첨가하여 25°C, 150rpm 에서 1시간 동안 왕복진탕하고 10분간 정치한 후에 UV 620nm 에서 흡광도를 측정하여 유화능을 결정하였다.

표면장력의 측정

Du Nouy 의 윤환법을 이용하였으며 이때 온도나 먼지, 표면의 상태등에 따라 표면장력이 변할 수 있으므로 세심한 주의가 필요하였다.

건조균체량의 측정

배양액을 15000×g 로 15분간 원심분리하여 증류수로 두번 세척 후 drying oven 에서 24시간 건조후 평량하여 건조 균체량으로 하였다.

결과 및 토론

증류수의 표면장력은 온도에 따라 차이가 있으나 대략 72~75dyne/cm을 나타내며 초기에 표면장력의 감소로 유화제의 생산을 간접적으로 알 수 있으나 시간이 지남에 따라 표면장력과 유화제 생산량과는 관계가 적은 것으로 생각된다. 발효조 실험에서는 주로 aeration에 의하여 기포가 많이 생겼으며 이때 pH가 초기에 증가하는 경향이 있다. 초기 pH에 따라 배양액의 색깔이 옅은 고동색에서 진한 연두색의 다양한 빛깔을 나타냈으며 주로 연두색의 빛을 띠었을 때 비교적 높은 유화능을 나타내었고 이때의 pH는 5.6~7.0 사이이며 pH와 균체성장과는 반비례의 경향을 띠는 것으로 보여진다.

참고문헌

1. Kosaric, N., W. L. Cairns and N. C. C. Gray (1987) Biosurfactants and Biotechnology, Marcel Dekker, INC. : 89-116
2. Kosaric, N. (1993) Biosurfactants, Marcel Dekker, INC. : 18-21
3. J. D. Desai (1987) J. of Scientific & Industrial Research 46, 440-449
4. Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz and D. L. Gutnick (1979) Appl. Environ. Microbiol. 37, 402-408
5. Mulligan, C. N., G. Mahmoudides and B. F. Gibbs (1989) J. of Biotechnology 12, 199-210
6. Ramana, K. V. and N. G. Karanth (1989) J. Chem. Tech. Biotechnol. 45, 249-257
7. Manresa, M. A., M. E. Mercadé, M. Robert, C. de Andrés, M. J. Espuny and J. Guinea (1991) J. Ind. Microbiol. 8, 133-136
8. 김은기 (1991) 생물화공 5, 31-38

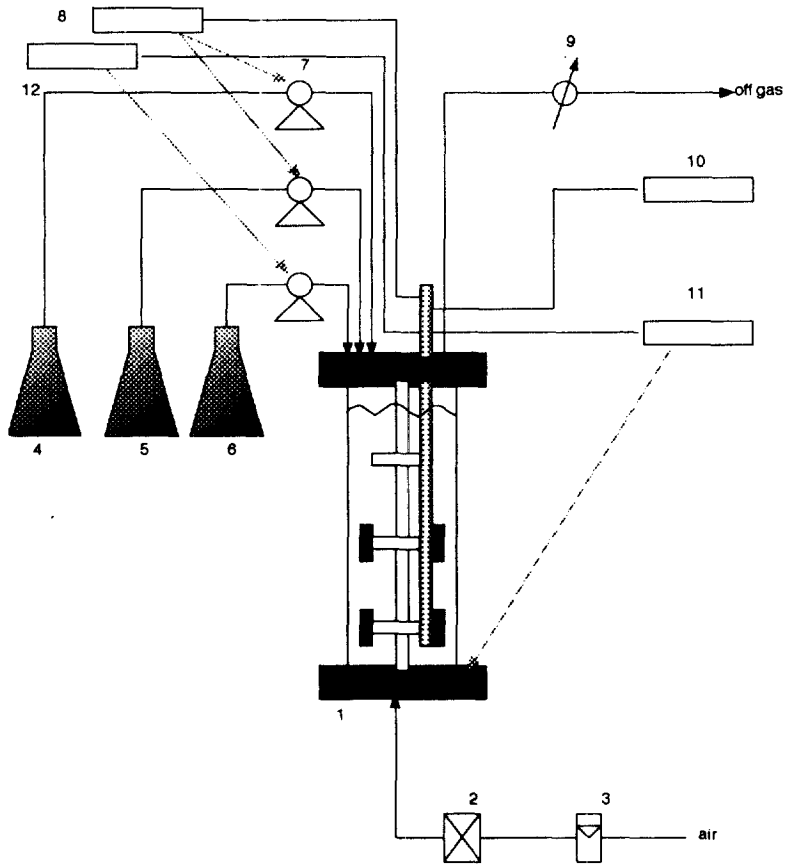


Fig. 1 Schematic diagram of experimental setup for batch system.
1: fermentor, 2: aseptic filter, 3: flow meter, 4: 1N NaOH,
5: 1N HCl, 6: antifoam, 7: peristaltic pump, 8: pH controller,
9: condenser, 10: DO controller, 11: temperature controller,
12: foam controller

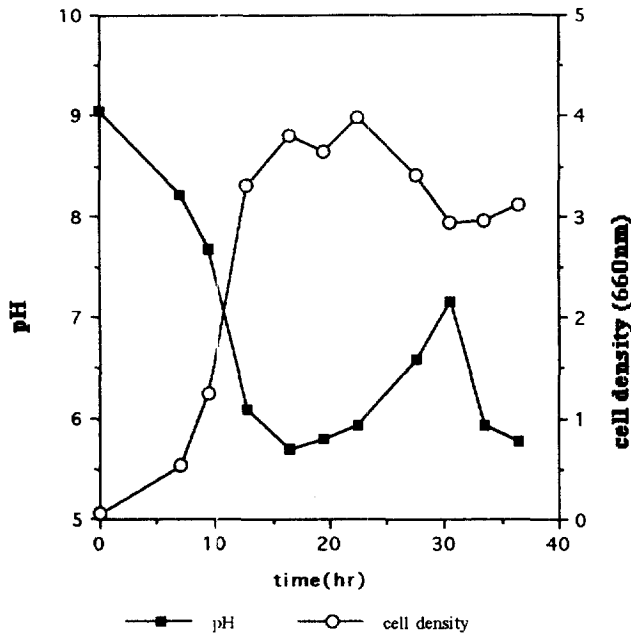


Fig. 2 pH variation and cell growth with time

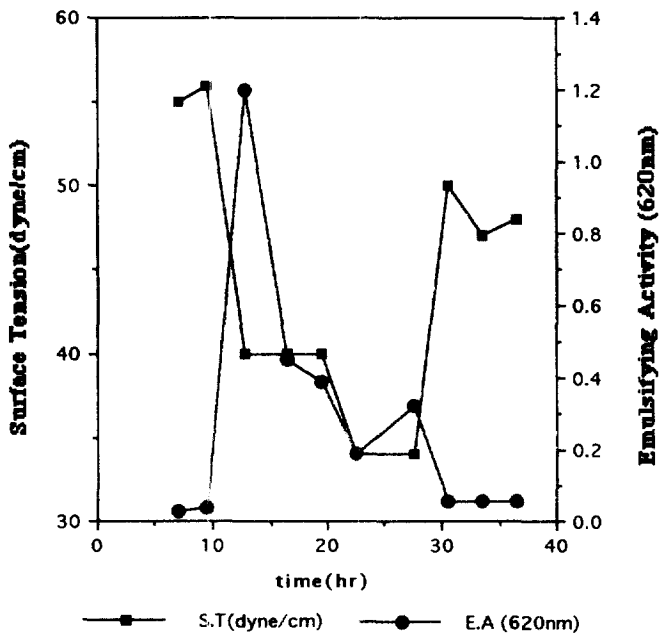


Fig. 3 The relation between surface tension and emulsifying activity with time