



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0034360
(43) 공개일자 2015년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/64 (2006.01) C12N 1/16 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0114333
(22) 출원일자 2013년09월26일
심사청구일자 2013년09월26일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
김은기
서울특별시 양천구 목동서로 38 목동1단지아파트 131동 506호
박지호
인천광역시 동구 화도진로 187 주공아파트 101동 1101호
(74) 대리인
최규환

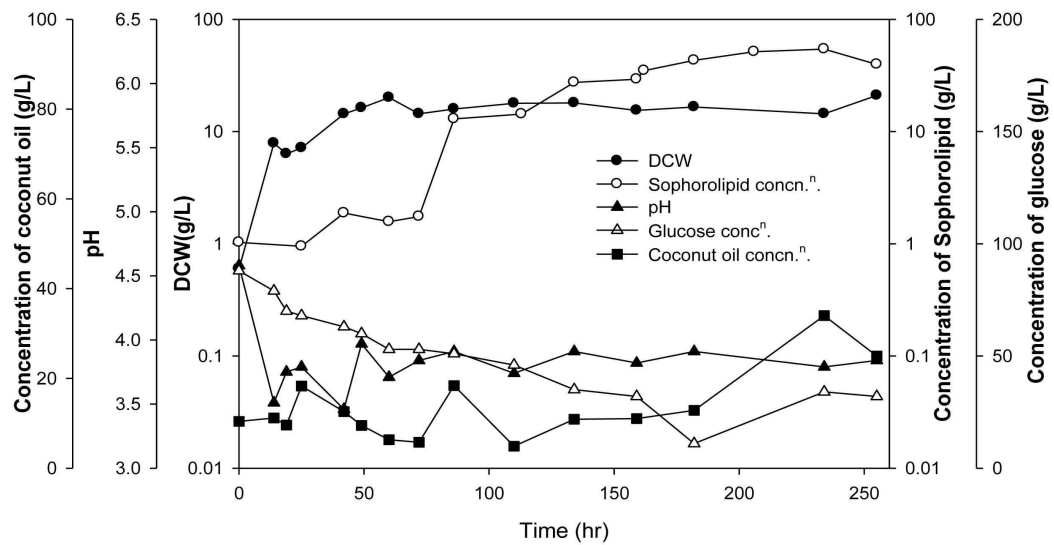
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 야자유를 이용한 소포로리피드의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 야자유를 이용한 소포로리피드의 생산 방법에 관한 것으로, 야자유 (coconut oil) 및 글루코오스 (glucose)를 포함하는 배지에서 캔디다 봄비콜라 (*Candida bombicola*) 균주를 배양하여 소포로리피드 (sophorolipid)를 생산하는 본 발명의 방법을 이용하면, 유성 오염포에 대한 세척력이 높고, 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) 및 대장균 (*Escherichia coli*)에 대해 항균 활성을 나타내는 소포로리피드를 대량 생산할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A103017

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 글로벌코스메틱연구개발사업단

기 여 율 1/1

주관기관 (재)대한화장품산업연구원

연구기간 2012.11.01 ~ 2013.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

야자유 (coconut oil) 및 글루코오스 (glucose)를 포함하는 배지에서 효모를 배양하는 단계; 및
상기 배양액으로부터 소포로리피드를 추출하는 단계를 포함하는 소포로리피드 (sophorolipid)의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 효모는 캔디다 봄비콜라 (*Candida bombicola*) 균주인 것을 특징으로 하는 소포로리피드의 생산 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 배양은 2단계 회분식 배양 (batch cultivation) 또는 유가식 배양 (fed-batch cultivation)인 것을 특징으로 하는 소포로리피드의 생산 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 2단계 회분식 배양은 14~16 g/L의 야자유 (coconut oil) 및 8~12 g/L의 글루코오스 (glucose)를 포함하는 pH 4.8~5.2의 배지에서 교반 속도 150~250 rpm, 배양 온도 24~32℃ 및 폭기율 0.4~1.2 vvm으로 효모를 배양하는 단계 및 14~16 g/L의 야자유 및 95~105 g/L의 글루코오스 (glucose)를 포함하는 pH 3.4~3.6의 배지에서 교반 속도 150~250 rpm, 배양 온도 24~32℃ 및 폭기율 0.4~1.2 vvm으로 소포로리피드를 생산하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 소포로리피드의 생산 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 유가식 배양은 8~12 g/L의 야자유 (coconut oil) 및 8~12 g/L의 글루코오스 (glucose)를 포함하는 pH 4.5~5.0의 배지에서 교반 속도 150~250rpm, 배양 온도 24~32℃ 및 폭기율 0.4~1.2 vvm으로 2~4일 동안 효모를 배양한 후 13~16 g/day/L 비율의 야자유 및 8~12 g/day/L 비율의 글루코오스가 유지되고 pH가 3.4~3.6으로 조절된 배지에서 교반 속도 150~250 rpm, 배양 온도 24~32℃ 및 폭기율 0.4~1.2 vvm으로 12~14일 동안 소포로리피드를 생산하는 것을 특징으로 하는 소포로리피드의 생산 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 소포로리피드는 52~55%의 C12 지방산 및 20~23%의 C14 지방산을 포함하는 것을 특징으로 하는 소포로리피드의 생산 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 소포로리피드를 유효성분으로 함유하는 향균용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 소포로리피드는 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) 및 대장균 (*Escherichia coli*)에 대한 향균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 향균용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 소포로리피드를 유효성분으로 함유하는 세척용 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 거품이 발생하지 않는 소포로리피드를 유효성분으로 함유하는 세척용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 야자유를 이용한 소포로리피드의 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 야자유 (coconut oil) 및 글루코오스 (glucose)를 포함하는 배지에서 효모를 배양한 후 배양액에서 소포로리피드를 추출하는 단계를 포함하는 소포로리피드 (sophorolipid)의 생산 방법 및 상기 방법에 의해 생산된 소포로리피드를 유효성분으로 함유하는 향균용 조성물 및 세척용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

소포로리피드 (Sophorolipid)는 캔디다 봄비콜라 (*Candida bombicola*), 캔디다 아피콜라 (*C. apicola*), 캔디다 바티스테 (*C. batistae*), 위커라미넬라 도메리카에 (*Wickerhamiella domericqiae*) 및 로도토룰라 보고리엔시스 (*Rhodotorula bogoriensis*)와 같은 일부 효모 종에 의해 합성되는 글리코리피드 (glycolipid) 형태의 계면활성 (surface-active) 물질이다 (Konishi *et al.*, *J. Oleo. Sci.* 57, 359-369, 2008). 소포로리피드의 연간 소비량은 약 1000만 톤 정도로 추산되며, 주로 가정용/세탁용 세제로 사용되지만, 화학 제품, 식물, 음식, 종이 및 화장품 산업에서도 몇 가지 잠재적인 적용성을 갖는다 (Van Bogaert *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (1), 23-34, 2007).

[0003]

소포로리피드 기반 제품의 상용화는 한방 화장품의 시장 점유율을 빠르게 차지하고 있으며, 프랑스 기업 Soliance (<http://www.groupe-soliance.com>) 및 한국의 MG Intobio Co. Ltd는 소포로리피드-기초 화장품 및 피부 관리 제품을 생산하고 있다. 소포로리피드는 계면활성제 특성 뿐만 아니라, 프로피오니박테리움 아크네스 (*Propionibacterium acnes*) 및 코리네박테리움 제로시스 (*Corynebacterium xerosis*)에 대한 항균 특성을 갖고, 낮은 세포 독성을 나타내기 때문에, 화장품 제형에서 다른 계면활성제보다 더 좋은 유효제가 된다. 또한, 소포로리피드의 항암, 진피 섬유아세포 (dermal fibroblast) 대사 촉진, 자유 라디칼 제거, 표피층 박리 및 미백, 모발 보호 및 위생처리 (sanitization)와 같은 다양한 장점들은 소포로리피드를 화장품 및 피부용 의약품 (pharmacodermatological product)을 위한 매력적인 성분으로 만든다 (Shao *et al.*, *J. Surg. Res.* 173(2), 286-291, 2012).

[0004]

소포로리피드를 생산하는 개체들 중, 캔디다 봄비콜라는 생산량 측면에서 가장 높은 순위를 차지한다. 사실상, 캔디다 봄비콜라 (*C. bombicola*)에 의해 합성된 소포로리피드는 지방산 일부의 유형, 락톤화 (lactonization) 및 아세틸화 양상과 같은 구조적 측면에서 다양성을 가진 분자들의 혼합물이다. 이러한 다양성은 소포로리피드 분자의 소수성에도 영향을 미친다는 것이 보고되었다 (Van Bogaert *et al.*, *Process Biochem.* 46(4), 821-833, 2011). 자연에서, 소포로리피드 분자는 산성 (acidic) 및 락톤 형태 (lactonic form)의 혼합물로 합성되며, 매우 큰 구조적 다양성을 보여준다 (Kim *et al.*, *Bioresour. Technol.* 100(23), 6028-6032, 2009). 소포로리피드와 같은 고분자 화합물의 생물학적 활성은 클래스 의존적이며, 화합물의 크기, 구조적 이상 및 순도 또한 역할에 크게 기여한다는 것이 보고되었다 (Morya *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93(1), 71-82, 2012).

[0005]

캔디다 봄비콜라에 의한 소포로리피드의 통합된, 데노보 (de-novo) 및 생물학적 전환 생산은 생산자로 이를 선택하기 위한 추가적인 이점이 된다. 데노보 합성 (de-novo synthesis)의 산물은 주로 팔미트산, 스테아르산 및 올레산의 유도체이다 (Van Bogaert *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (1), 23-34, 2007). 소포로리피드의 생산을 위한 오일의 생물학적 전환은 데노보 합성 후에 오일의 글리세롤이 보조기질 (co-substrate)로서 개체에 의해 소비되고, 지방산이 원료로 사용되는 다양한 기작을 갖는다 (Kim *et al.*, *Bioresour. Technol.* 100(23), 6028-6032, 2009). 따라서, 오일은 소포로리피드의 생산 동안 원료뿐만 아니라 영양소로도 사용될 수 있다.

[0006]

지난 수년간, 다양한 식물성 오일들이 다양한 생물학적 활성을 갖는 소포로리피드의 생산을 위해 선별되었다 (Kim *et al.*, *Bioresour. Technol.* 100(23), 6028-6032, 2009). 사용된 많은 기질들의 생산 가변성은 계면활성제로서 소포로리피드의 산업적 적용에 대한 주요한 제약이 되어왔다. 선행 연구에서, 중간 사슬 소포로리피드 생산을 위해 다양한 기질이 사용되었으나, 많은 제한 요소 때문에 산업 공정에는 적용되지 못했다. 1998년에, Brakemeier와 동료들은 중간 사슬 소포로리피드를 생산하기 위한 대체 방법으로 글루코스 (탄소 공급원)와 함께 기질로 이차 알콜 (secondary alcohol, C12 및 C14)을 사용했다 (Brakemeier *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 161-166, 1998). 그러나, 그 방법은 이차 알콜의 높은 비용 때문에 업계에 채택되지 못했다 (Van Bogaert *et al.*, *Process Biochem.* 46(4), 821-833, 2011).

- [0007] 많은 기질 및 배양 조건이 소포로리피드의 새로운 특성을 획득하고, 적용을 확대하기 위해 시도되었으며 (Kim *et al.*, *Bioresour. Technol.* 100(23), 6028-6032, 2009), 선행 연구들은 주로 C18 또는 고급지방산 (higher fatty acid)을 포함하는 기질로 수행되었다. 소포로리피드의 계면활성 능력은 주로 지방산 사슬 길이 및 각각의 변형, 즉 불포화된 결합 및 측기에 의해 결정되며, 지방산 도메인의 긴-사슬 길이가 생물학적 이용성을 제한하고, 생물학적 특성 또한 약화시킨다는 것이 보고되었다 (Van Bogaert *et al.*, *Process Biochem.* 46(4), 821-833, 2011). 반면에 중간 또는 작은 크기의 지방산은 β -산화를 통해서 쉽게 대사되지만, 발효 과정 동안 소포로리피드의 수율이 낮은 것으로 나타났다. 따라서, 이러한 문제를 해결하기 위한 발효 조건의 최적화는 여전히 연구자들의 주요 과제로 남아있다 (Van Bogaert *et al.*, *Process Biochem.* 46(4), 821-833, 2011).
- [0008] 한편, 야자유는 주요 지방산 구성요소로 주로 로르산 ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$)을 포함한다. 야자유 지방산의 90% 이상은 최저의 산화 손상 위험을 갖는 포화 지방산 (요오드 값 7 내지 12)인 것으로 보고되었다. 야자유는 가장 풍부한 중간 사슬 지방산 (medium chain fatty acid; MCFA)의 공급원 중 하나이다. 또한 야자유는 총 지방산 중 로르산 (C12) 47.5%와 미리스트산 (Myristic acid, C14) 18.1%를 포함하는 것으로 보고되었다 (Gordon and Rahman, *JAACS.* 68(8), 574-576, 1991).
- [0009] 본 발명은 소포로리피드 생산에서 생물학적 활성과 수율 문제를 해결하기 위해, 야자유를 중간 사슬 스포로리피드의 생산을 위한 기질로 사용하였으며, 연구 기간 동안 발효 조건 (pH, 온도, 폭기율, 교반 등)의 설계 및 확립을 위한 실험을 수행하였다. 이러한 발효 조건 외에도 소포로리피드의 표면 특성, 향균 특성 및 분자량에 대해 더 연구하였다.
- [0010] 한편, 한국등록특허 제0569238호에는 '콩기름 부산물을 이용한 소포로리피드의 생산방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1125189호에는 '항-염증성 소포로리피드의 생산 방법'이 개시되어 있다. 그러나 본 발명에서와 같이 야자유를 이용한 소포로리피드의 생산 방법에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 야자유 (coconut oil) 및 글루코오스 (glucose)를 포함하는 배지에서 칸디다 봄비콜라 (*Candida bombicola*) 균주를 배양한 결과, C12 및 C14 지방산을 포함하는 소포로리피드 (sophorolipid)가 효율적으로 생산되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 야자유 (coconut oil) 및 글루코오스 (glucose)를 포함하는 배지에서 효모를 배양하는 단계 및 상기 배양액으로부터 소포로리피드를 추출하는 단계를 포함하는 소포로리피드 (sophorolipid)의 생산 방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 소포로리피드를 유효성분으로 함유하는 향균용 조성물 및 세척용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따른 야자유 (coconut oil) 및 글루코오스 (glucose)를 포함하는 배지에서 칸디다 봄비콜라 (*Candida bombicola*) 균주를 배양하여 소포로리피드 (sophorolipid)를 생산하는 방법을 이용하면, 유성 오염포에 대한 세척력이 높고, 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) 및 대장균 (*Escherichia coli*)에 대해 항균 활성을 나타내는 소포로리피드를 대량 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 칸디다 봄비콜라 (*Candida bombicola*; ATCC 22214) 균주를 이용하는 공급 속도 조절 유가식 배양 (fed-batch cultivation)에서 야자유로부터 소포로리피드를 생산하기 위한 발효 조건을 나타낸다.
- 도 2는 거품 발생력과 안정도를 측정한 결과를 나타낸다. LAS (Linear Alkylbenzen Sulfonate), 슈가 에스터 (sugar ester), 야자유 유래 소포로리피드 및 옥수수유 유래 소포로리피드의 거품을 발생시킨 직후 및 5분 후의 거품 높이를 측정하였다.

도 3은 야자유 및 옥수수유 유래의 소포로리피드의 계면활성 특성 및 유화력을 측정한 결과를 나타낸다. LAS 및 슈가 에스터가 대조구로 사용되었다. (A) 최소 표면장력 및 CMC 곡선, (B) 분산력, (C) 세척력, (D) 유화력 측정 결과. LAS: Linear alkylbenene sulphonate, Sugar ester: 슈가 에스터, SL: 소포로리피드, JIS: 복합 오염포, AS-10: 얼룩진 오염포 (CFT AS-10) 및 WFK 10D: 유성 오염포.

도 4는 야자유 및 옥수수유 유래 소포로리피드의 항균 활성을 나타낸다. (A) 대장균 (*E. coli*)에 대한 항균 활성, (B) 황색포도상구균 (*S. aureus*)에 대한 항균 활성. SL: 소포로리피드, DCF-100: 포도씨 추출물.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 야자유 (coconut oil) 및 글루코오스 (glucose)를 포함하는 배지에서 효모를 배양하는 단계 및 상기 배양액으로부터 소포로리피드를 추출하는 단계를 포함하는 소포로리피드 (sophorolipid)의 생산 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에 있어서, 상기 효모는 캔디다 봄비콜라 (*Candida bombicola*) 균주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 따른 배양 방법에 있어서, 상기 배양은 2단계 회분식 배양 (batch cultivation)일 수 있으며, 더 바람직하게는 14~16 g/L의 야자유 (coconut oil) 및 8~12 g/L의 글루코오스 (glucose)를 포함하는 pH 4.8~5.2의 배지에서 효모를 배양하는 단계 및 14~16 g/L의 야자유 및 95~105 g/L의 글루코오스 (glucose)를 포함하는 pH 3.4~3.6의 배지에서 소포로리피드를 생산하는 단계로 이루어지는 2단계 회분식 배양일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 15 g/L의 야자유 (coconut oil) 및 10 g/L의 글루코오스 (glucose)를 포함하는 pH 5.0의 배지에서 효모를 배양하는 단계 및 15 g/L의 야자유 및 100 g/L의 글루코오스 (glucose)를 포함하는 pH 3.5의 배지에서 소포로리피드를 생산하는 단계로 이루어지는 2단계 회분식 배양일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 2단계 회분식 배양의 배양 조건은 균주 성장을 위해 총 배지 부피의 4~6% (v/v) 종균액 (inoculum)을 접종하고, 교반 속도 150~250 rpm, 배양 온도 24~32℃ 및 폭기율 0.4~1.2 vvm으로 배양하는 단계 및 소포로리피드 생산을 위해 교반 속도 150~250 rpm, 배양 온도 24~32℃ 및 폭기율 0.4~1.2 vvm으로 배양하는 단계로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 총 배지 부피의 5% (v/v) 종균액을 접종하고, 교반 속도 200 rpm, 배양 온도 30℃ 및 폭기율 1.0 vvm으로 배양하는 단계 및 소포로리피드 생산을 위해 교반 속도 200 rpm, 배양 온도 25℃ 및 폭기율 1.0 vvm으로 배양하는 단계로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 본 발명의 일 구현예에 따른 배양 방법에 있어서, 상기 배양은 유가식 배양 (fed-batch cultivation)일 수 있으며, 더 바람직하게는 8~12 g/L의 야자유 (coconut oil) 및 8~12 g/L의 글루코오스 (glucose)를 포함하는 pH 4.5~5.0의 배지에서 효모를 배양한 후 13~16 g/day/L 비율의 야자유 및 8~12 g/day/L 비율의 글루코오스가 유지되고 pH가 3.4~3.6으로 조절된 배지에서 소포로리피드를 생산하는 유가식 배양일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 10 g/L의 야자유 (coconut oil) 및 10 g/L의 글루코오스 (glucose)를 포함하는 pH 4.8의 배지에서 효모를 배양한 후 15 g/day/L 비율의 야자유 및 10 g/day/L 비율의 글루코오스가 유지되고 pH가 3.5로 조절된 배지에서 소포로리피드를 생산하는 유가식 배양일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 상기 유가식 배양의 배양 조건은 균주 성장을 위해 총 배지 부피의 1.0~6.0% (v/v) 종균액을 접종하고, 교반 속도 150~250 rpm, 배양 온도 24~32℃ 및 폭기율 0.4~1.2 vvm으로 2~4일 동안 배양한 후, 소포로리피드 생산을 위해 교반 속도 150~250 rpm, 배양 온도 24~32℃ 및 폭기율 0.4~1.2 vvm으로 12~14일 동안 배양하는 조건으로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 총 배지 부피의 5% (v/v) 종균액을 접종하고, 교반 속도 150 rpm, 배양 온도 30℃ 및 폭기율 0.4 vvm으로 3일 동안 배양한 후, 소포로리피드 생산을 위해 교반 속도 250 rpm, 배양 온도 27℃ 및 폭기율 1.0 vvm으로 13일 동안 배양하는 조건으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 상기 소포로리피드의 생산 균주의 배양 및 소포로리피드 생산을 위한 배지는 예를 들어, YM 배지, LB 배지, TSA (Trypticase Soy Agar) 배지, BHI (Brain heart infusion) 배지, TBS (Tris-Buffered Saline) 배지, SD (Sabouraud Dextrose) 배지 및 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 배지 등을 사용할 수 있으며, 균주의 증식에 유해한 영향을 미치지 않고, 정상적인 소포로리피드 생산을 유도하는 배지라면 사용에 제한되지 않는다. 또한, 상기 소포로리피드 생산 균주의 배양은 미생물 배양에 사용되는 통상의 조건을 사용하는 어떠한 방법도 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에 있어서, 상기 소포로리피드는 C12 지방산 및 C14 지방산을 포함하는 소포로리피드일 수 있으며, 바람직하게는 52~55%의 C12 지방산 및 20~23%의 C14 지방산을 포함하는 소포로리피드일 수

있으며, 더욱 바람직하게는 약 53%의 C12 지방산 및 약 21%의 C14 지방산을 포함하는 소포로리피드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 소포로리피드를 유효성분으로 함유하는 항균용 조성물을 제공한다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 소포로리피드는 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) 및 대장균 (*Escherichia coli*)에 대한 항균 활성을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 용어 "항균 (antimicrobial)"은 특정 농도에서 미생물의 성장 또는 생존을 감소, 방지, 억제, 또는 제거하는 능력을 의미한다. 상기 항균용 조성물은 본 발명에 따른 캔디다 봄비콜라 균주 배양액 또는 상기 배양액으로부터 추출된 소포로리피드를 유효성분으로 함유할 수 있으며, 용액 또는 다른 형태로 조성물에 첨가될 수 있다. 또한, 소포로리피드의 항균 특성에 유해한 영향을 미치지 않는 범위 내에서 적합한 부형제 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 소포로리피드를 유효성분으로 함유하는 세척용 조성물을 제공한다. 상기 세척용 조성물은 본 발명에 따른 캔디다 봄비콜라 균주 배양액 또는 상기 배양액으로부터 추출된 소포로리피드를 유효성분으로 함유할 수 있으며, 거품이 생기지 않는 것을 특징으로 하며, 용액 또는 다른 형태로 조성물에 첨가될 수 있다. 또한, 소포로리피드의 세척 능력에 유해한 영향을 미치지 않는 범위 내에서 적합한 부형제 (carrier) 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다.

[0028] 부형제는 본 발명의 소포로리피드와 조합되는 화합물, 성분 또는 구조를 의미하고, 조성물의 제조를 돕거나 용이하게 하고, 저장, 투여, 전달, 효능, 선택성, 또는 의도된 용도 또는 목적을 위한 다른 형태를 가질 수 있다. 즉, 부형제는 활성 성분의 분해를 최소화하고 추가의 부작용을 최소화하기 위해 선택될 수 있다. 바람직한 예의 수성 및 비수성 부형제, 희석제, 용매는 물, 에탄올, 폴리올 (프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세롤 등), 식물성 오일 및 이들의 적절한 혼합물을 포함한다.

[0029] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 재료 및 방법

[0031] 1. 균주, 배지 및 배양 조건

[0032] 스포로리피드를 생산하기 위해 캔디다 봄비콜라 (*Candida bombicola*; ATCC 22214) 균주를 이용하였다. -70℃에 동결보존된 캔디다 봄비콜라는 YM 브로스 (broth) 배지 (3.0 g/L 효모 추출물, 3.0 g/L 맥아 추출물, 5.0 g/L 펩톤 및 1.0 g/L 글루코오스)에서 회복시켰고, 25℃에서 250 rpm으로 교반하면서 24시간 동안 배양했다. 이 배양 브로스의 일부는 생산 배지로 옮겼으며, 나머지 일부는 추가의 세포 보관을 위해 보존되었다. 생산 배지의 구성은 간단히 말해서, 1 리터의 증류수에 100.0 g 글루코오스, 5.0 g 효모 추출물, 1.0 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g NaCl, 0.7 g 펩톤 및 10% (w/v) 식물성 오일을 포함한다. 모든 화학 약품은 Sigma-Aldrich 제품을 이용하였다. 배양 배지 및 구성 성분은 각각 Difco 및 Merck에서 구입했으며, 야자유 및 옥수수유는 Shindongbang Co. (대한민국)에서 구입했다.

[0033] 본 발명에서 소포로리피드 생산 균주의 접종 규모는 총 생산 배지 부피의 5% (v/v)로 하였다. 발효는 30 L 발효기 (Kobiotech, 대한민국)에서 배양액 부피 (working volume) 15 L로 수행했다. 본 발명에 사용된 회분식 배양을 위한 조건은 온도 28℃, pH 3.5 유지, 교반속도 150 rpm, 폭기율 0.5 vvm 및 배양 기간 3 내지 8일이었다. 산소 포화도는 교반 속도를 변경하여 20%로 조절하였다. 필요한 경우, 배양 pH는 6 N NaOH를 이용하여 적정했다. 샘플은 추가의 분석을 위해 1일 간격으로 배양액에서 채취했다.

[0034] 2. 지방산 조성

[0035] 오일 및 각 소포로리피드의 지방산 조성은 2009년에 Kim 등에 의해 보고된 표준 방법을 사용하여 불꽃 이온화 검출기 (GC-FID, HP 6890, HP, USA)가 장착된 가스 크로마토그래피로 측정하였다 (*Bioresour. Technol.* 100(23), 6028-6032, 2009).

[0036] **3. 배양 조건의 최적화와 친수성 및 친유성 탄소 공급원**

[0037] 소포로리피드의 최대 생산을 위한 글루코오스 소비 속도의 최적화는 2단계 회분식 발효 (batch fermentation)를 통해 달성되었다. 생장기 (0-72 시간) 동안, 적절한 세포 성장을 위해 10 g/L의 글루코오스가 표준 배지에 보충되었다. 최적의 세포 성장 후에, 생산기 (72-96 시간) 동안 다양한 농도의 글루코오스 (10-200 g/L)가 15 g/L의 야자유와 함께 각각 다른 배지에 보충되었다. 배양은 교반 속도 250 rpm, 초기 pH 5.0, 배양 온도 25℃, 250 mL 플라스크에서 배양액 부피 50 mL로 배양 및 4일의 배양 기간 (3일 생장 및 1일 생산)의 조건으로 수행하였다. 배양 후에는 배양액을 수집하여 잔류 오일, 글루코오스, 소포로리피드 함량의 측정 및 건조 생물량의 추정을 위해 분석하였다.

[0038] **4. 잔류 오일 분리 및 소포로리피드의 추출**

[0039] 잔류 오일은 n-헥산을 사용한 추출 방법으로 배양액 여과액에서 분리하였다 (Shin *et al.*, *Bioresour. Technol.* 101(9), 3170-3174, 2010). 식물성 오일을 포함하는 상부의 비-수용액 층은 분별 깔대기를 이용해서 분리하였다. 분리한 오일은 회전 진공 증발기 (rotary vacuum evaporator; Eyela, Japan)를 이용하여 n-헥산을 증발시킨 후 회수하였고, 무게를 측정하였다. 수용액 층에서는 동일한 부피의 에틸 아세테이트를 사용하여 소포로리피드를 3회 추출하였다. 추출한 (crude) 소포로리피드는 회전 진공 증발기 (Eyela, Japan)를 이용하여 에틸 아세테이트를 증발시킨 후 수거하였고, 무게를 측정하였다.

[0040] **5. 잔류 글루코오스 및 건조 세포 중량의 측정**

[0041] 소포로리피드 및 잔류 오일의 추출 후에, 남은 배양액은 미량의 용매를 제거하기 위해 회전 진공 증발기 (Eyela, Japan)에서 증발시켰다. 상기 수용성 배양액은 15분 동안 7000×g로 원심분리하였다. 잔류 글루코오스는 상층액에서 추정하였으며, 펠렛은 생물량 추정을 위해 건조시킨 후 무게를 측정하였다 (Kim *et al.*, *Bioresour. Technol.* 100(23), 6028-6032, 2009). 글루코오스 수준은 배양하는 동안 부족한 글루코오스를 즉시 공급하기 위해 Accu-Check (Loche)를 사용하여 조사하였으며, HPLC (Aminex HPX-87H 컬럼; 이동상, 0.01 N H₂SO₄, 유속 1.0 mL/min)를 통해 재확인하였다.

[0042] **6. 공급 속도 조절 유가식 배양**

[0043] 유가식 배양 (fed-batch cultivation)은 30 L의 산업용 발효기 (Kobitech, 대한민국)에서 배양액 부피 15 L로 수행하였다. 증기 멸균되고, 적절히 안정된 배지에 1:100 (접종량:배지)의 비율로 소포로리피드 생산 균주가 접종되었다. 초기 발효 조건은 교반 속도 130 rpm에서 배양 온도 30℃, 0.3 vvm의 폭기율로 3일 동안 수행되었다 (생장기). 산소 포화도는 교반 속도를 변경하여 30%로 조절하였다. 3일의 생장기 후에, 최종 배양 조건은 교반 속도 250 rpm, 배양 온도 27℃, 폭기율 1.0 vvm로 조절하여 13일 동안 배양하였다. 배양액 샘플은 발효 배양액으로부터 정기적으로 채취하였고, 변화를 측정하기 위해 분석하였다. 공급한 배지는 소포로리피드 생산 동안 10% 글루코오스 및 15% 야자유를 최종 농도로 포함했다. 거품 형성을 조절하기 위해 배양 초기에 10%의 야자유를 첨가했으며, 6N NaOH를 이용하여 pH를 3.5로 유지하였다.

[0044] **7. 계면활성 특성 및 유화력의 측정**

[0045] 추출된 소포로리피드의 표면 장력은 플래티넘이리듐 링 (platinumiridium ring; 원주 5.935 cm)을 사용하여 du Nuoy 방법 (Surface Tensiomat, model 21, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, U.S.A.)으로 측정하였다 (Ma *et al.*, *J. Colloid. Interface. Sci.* 376(1), 165-172, 2012). 증류수에 포함된 다양한 농도 (0 내지 300 ppm)의 소포로리피드의 표면 장력이 측정되었으며, 상기 용액은 표면 장력 측정에 사용하기 전에 30분 동안 반응시켰다. 소포로리피드가 미셀을 형성하기 시작하는 농도이며, 최소 표면 장력의 한계점에 해당하는 임계 미셀 농도 (critical micelle concentration; CMC)는 25℃에서 상기와 동일한 장력계 (tensionmeter)를 사용하여 측정하였다. CMC 및 최소 표면 장력 값은 소포로리피드 농도와 해당 농도의 표면 장력 사이의 관계 곡선으로부터

얻었다 (Ma *et al.*, *J. Colloid. Interface. Sci.* 376(1), 165-172, 2012).

[0046] 분산력 (dispersion power)은 표준화된 프로토콜에 따라 측정하였다 (Ma *et al.*, *J. Colloid. Interface. Sci.* 376(1), 165-172, 2012).

[0047] 기포력 (foaming power)은 국제 표준 ISO 696에 따른 Ross 및 Miles 방법으로 50℃에서 측정하였다 (Urum and Pekdemir, *Chemosphere*. 2004 Dec;57(9), 1139-1150, 2004).

[0048] 세척력은 표준 절차에 의해 측정하였으며 (Shin *et al.*, *Bioresour. Technol.* 101(9), 3170-3174, 2010), 간단히 말하면, 올레산, 트리올레인, 콜레스테롤 올리에이트, 파라핀 왁스, 스쿠알렌, 콜레스테롤, 젤라틴, 점토, 카본 블랙 (carbon black)으로 오염된 복합 오염포 (JIS); 안료, 오일, 우유로 얼룩진 오염포 (CFT AS-10); 및 안료, 피지로 오염된 유성 오염포 (WFK 10D)가 사용되었다. 식물 (오염포)의 반사율은 표준 절차를 사용하여 측정하였으며, 세척력 (rinsing power)은 하기 공식으로 계산되었다 (Shin *et al.*, *Bioresour. Technol.* 101(9), 3170-3174, 2010).

[0049] 세척력 $P(\%) = \{(R-R_0)/(65-R_0)\} \times 100$

[0050] R_0 는 세척 전의 반사율 (reflectivity)을 나타내며, R 은 세척 후의 반사율을 나타내고, P 는 상대적인 세척력을 나타낸다.

[0051] 대두유에 대한 소포로리피드의 유화력은 표준 방법을 사용하여 측정하였다. 간단히 말하면, 2.0 mL의 0.1% (w/v) 소포로리피드 용액은 2.0 mL의 인산 버퍼 (200 mM, pH 7.0)와 함께 2.0 mL의 대두유를 첨가한 후, 1분 동안 볼텍싱하여 혼합했다. 유화력은 540 nm에서 흡광도를 측정하여 10분 간격으로 관찰하였다 (Shin *et al.*, *Bioresour. Technol.* 101(9), 3170-3174, 2010).

[0052] 8. 항균 활성

[0053] 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*) 및 대장균 (*Escherichia coli*)에 대한 소포로리피드의 항균 능력은 Shin 등에 의해 기술된 방법에 따라 측정되었다 (Shin *et al.*, *Bioresour. Technol.* 101(9), 3170-3174, 2010). DF-100 (포도씨 추출물)이 표준물질로 사용되었다 (Defer *et al.*, *Aquaculture*. 293(1-2), 1-7, 2009).

[0054] 9. 소포로리피드의 HPLC 및 LC-MS 분석

[0055] 야자유 유래의 추출된 소포로리피드는 에탄올에 용해되었고, 4.6 mm × 150 mm Spherisorb ODS2 컬럼 (Waters Inc)을 사용한 분석용 HPLC로 분석되었다. 아세트니트릴/물 혼합액은 15분 동안의 40%에서 60%까지의 아세트니트릴 구배에 이어서 35분 동안의 60%에서 80%까지의 아세트니트릴 구배로 분당 0.5mL 유속의 이동상으로 사용되었다. 주입 부피는 25 μ l였고, 용출액 (eluent)은 195 nm에서 UV 검출기로 측정하였다.

[0056] LC-MS 시스템 (HP 1100 series with UV-Visible diode-array detector-Bruker's Esquire electrospray MSn analyzer)은 각각의 소포로리피드 구성 성분의 구조를 분리 및 규명하기 위해 사용되었다. 사용된 이동상은 아세트니트릴/H₂O (8/2, v/v)이다. HPLC에 의해 분리된 소포로리피드는 질량 분석계 (mass spectrometer)를 통해 분석되었다 (Tran *et al.*, *Bioresour. Technol.* 115, 84-87, 2012). 분자 이온은 이온 트랩에서 수집되었고, 질량/전하 (m/z) 값이 검출되었다. 이온 트랩 내의 이온은 분리될 수 있고, 헬륨 분자와의 충돌 (collision)에 의해 더 분열될 수 있다. 분자 구조는 선행문헌에 기재된 것처럼 LC-MS 데이터로부터 도출되었다 (Tran *et al.*, *Bioresour. Technol.* 115, 84-87, 2012).

[0057] 10. 통계 분석

[0058] 실험은 3회 반복 수행되었으며, 결과는 그래프에서 오차 막대로 표시된 표준 편차 (SD)와 함께 평균으로 나타내었다.

[0059] 실시예 1. 지방산 잔기의 분석

[0060] GC-FID 결과는 본 발명에 사용된 야자유가 49.83% C12 및 17.55% C14를 포함한다는 것을 보여주었다. 또한, 야자유로부터 생산된 소포로리피드는 53.27% C12 및 21.54% C14를 포함했다. 반면에 대조구로 사용된 옥수수유 및 옥수수유 유래의 소포로리피드에는 C12 및 C14 지방산이 존재하지 않았다 (표 1). 이러한 결과는 야자유로부터 얻은 소포로리피드가 주로 로르산 (C12) 및 미리스트산 (C14) 유도체로부터 유래된다는 것을 제시한다. 또한, 본 발명에서 생산된 야자유 유래의 C12 소포로리피드의 비율은 정제하기에 충분한 수준으로 수율이 높았다. 그러나, 특정한 유형의 소포로리피드 생산을 위한 기질로서 n-알칸 및 글루코오스를 사용한 이전의 방법은 수율이 낮고 생산 비용이 매우 높았다 (Van Bogaert *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76 (1), 23-34, 2007).

표 1

[0061] 지방산 함량 분석 결과 (%)

지방산	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C18:3
야자유	8.66	6.95	49.83	17.55	8.81	0.94	5.76	1.51	0.00
소포로리피드 (야자유)	3.01	4.47	53.27	21.54	9.51	0.00	8.20	0.00	0.00
옥수수유	0.00	0.00	0.00	0.00	13.64	4.41	25.58	51.96	4.41
소포로리피드 (옥수수유)	0.00	0.00	0.00	0.00	7.41	0.79	27.00	64.80	0.00

[0062] 실시예 2. 배양 조건과 친수성 및 친유성 탄소 공급원의 최적화

[0063] 2단계 회분식 발효 (batch fermentation) 동안, 캔디다 봄비콜라 (*Candida bombicola*; ATCC 22214) 균주를 이용한 소포로리피드의 생산은 100±5 g/L의 글루코오스 농도에서 최적인 것으로 관찰되었으며, 실험하는 동안 약 100 g/L의 글루코오스 농도가 계속 유지되었다. 글루코오스의 정기적인 관찰과 보충이 소포로리피드의 최적 생산을 위해 수행되었으며, 야자유 유래 지방산의 중화는 6 N NaOH로 조절되었다. 균주 생장기 동안의 pH는 최적 성장을 위해 약 pH 5±0.1로 유지되었다. 소포로리피드 생산기 동안 배지의 pH가 크게 감소되는 것을 확인하였고, pH 3.5가 소포로리피드 생산에 적합한 최적 pH로 확인됨에 따라, 소포로리피드의 생산을 위한 배양을 수행하는 동안 6 N NaOH를 사용하여 배지의 pH를 3.5로 유지하였다.

[0064] 캔디다 봄비콜라 균주의 세포 성장은 배양 48시간 후에 정지기에 이르렀으며, 건조 세포 중량은 약 16 g/L이었다. 그러나 본격적인 소포로리피드의 생산은 지수기 (exponential phase)의 중간부터 (배양 4일 이후) 이루어졌으며, 생산기 동안 지속적으로 생산되었다.

[0065] 실시예 3. 공급 속도 조절 유가식 배양 (fed-batch cultivation)

[0066] 본 발명은 유가식 배양 조건에서 야자유 및 글루코오스를 사용하여 가능한 최대의 소포로리피드를 생산하기 위해 설계되었다. 도 1에 나타난 것처럼, 유가식 배양은 초기 10 g/L의 글루코오스 농도 및 10 g/L의 야자유를 사용하여 수행되었다고, 공급 속도 조절 유가식 배양은 정체기 (stationary phase)까지 거의 2배인 것으로 나타났다. 그 결과, 54 g/L의 소포로리피드가 발효 10일 후에 얻어졌다. 발효 후에 배양액의 점도가 매우 높아졌기 때문에, 10일 이상 발효를 수행하는 것은 불가능했다.

[0067] 야자유의 공급은 물질 대사 보호와 소포로리피드 생산을 위해 제한하였다. 야자유의 소비는 배지의 pH 조절과 관련 있었으며, 이는 6 N NaOH로 조절하였다.

[0068] 실시예 4. 계면활성 특성 및 유화력

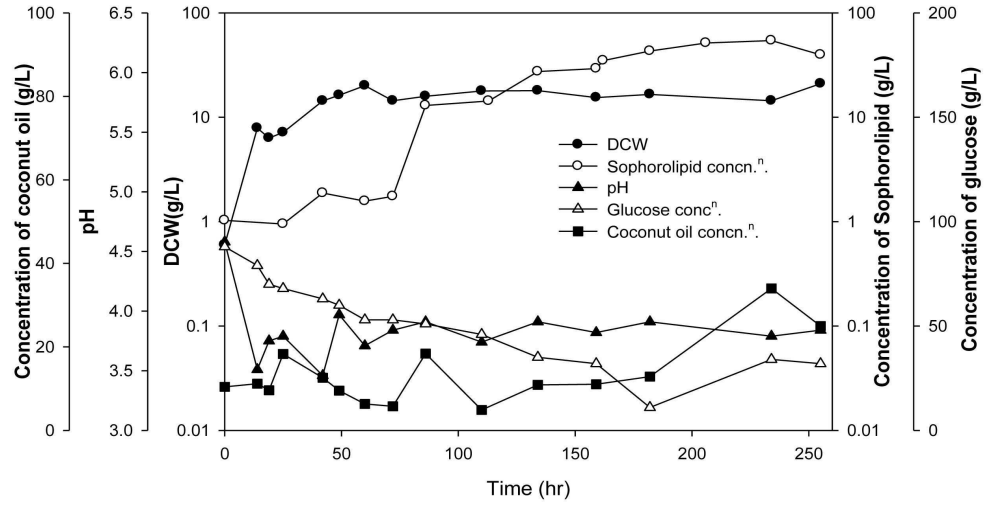
[0069] 야자유 유래의 소포로리피드의 계면활성 특성 및 유화력 측정 결과는 도 2에 나타내었다. 두 가지 경우 모두에서, LAS (Linear Alkylbenzen Sulfonate) 및 슈가 에스터 (sugar ester)가 대조구로 사용되었다.

[0070] 거품 발생력 측정 장치를 이용하여, 거품 발생력과 안정도를 측정한 결과, LAS 및 슈가 에스터에 비해 야자유 및 옥수수유 유래의 소포로리피드는 상대적으로 더 낮은 거품 발생력 (foamability)을 나타냈다. 또한 5분 후의 거품 높이로 측정된 것처럼 거품 안정도가 매우 낮은 것으로 나타났다. 소포로리피드의 거품 발생력은 지방산 사슬의 탄소 길이가 증가함에 따라 감소하는 것으로 알려져 있는데, 옥수수유 유래의 소포로리피드는 야자유 유래 소포로리피드보다 약간 더 높은 거품 발생력을 나타냈다 (도 2).

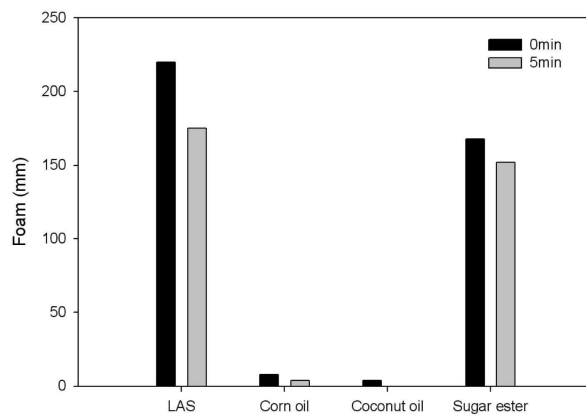
- [0071] 게다가, 계면활성제 용액의 거품 발생력은 임계 미셀 농도 (CMC)에 도달할 때까지, 낮은 계면활성제 농도에서 증가한다는 것은 잘 알려져 있다 (Montufar *et al.*, *Mater. Sci. Eng: C*. 31(7), 1498-1504, 2011). 그러므로 CMC 및 최소 표면장력 (surface tension)의 계산이 중요하다. 야자유 및 옥수수유 유래 소포로리피드의 표면 장력은 소포로리피드 농도의 증가 (야자유 유래 소포로리피드 농도 75 ppm, 옥수수유 유래 소포로리피드는 100 ppm)와 함께 약 70 dyn/cm에서 25-35 dyn/cm의 최소 표면 장력으로 급격히 감소했다 (도 3A). 야자유 유래 소포로리피드의 최소 표면 장력은 옥수수유 유래의 것보다 약간 낮았다. 이는 야자유 유래 소포로리피드가 크기는 더 작지만, 옥수수유 유래의 소포로리피드보다 소수성이 높다는 것을 나타낸다.
- [0072] 소포로리피드의 CMC 값은 20-35 mg/L까지 다양했고, 두 소포로리피드는 표준 계면활성제 (LAS 및 슈가 에스터)에 비해 현저하게 낮은 CMC를 나타냈다 (데이터 미제시).
- [0073] 야자유 및 옥수수유 유래 소포로리피드의 분산력은 LAS보다 더 나은 것으로 나타났다. 옥수수유 유래 소포로리피드에 비해 야자유 유래 소포로리피드가 더 높은 분산력을 나타냈다 (도 3B).
- [0074] 오염포 세척 시험 결과, 야자유 및 옥수수유 유래 소포로리피드는 LAS 및 슈가 에스터보다 세척력 (detergency)이 낮은 것으로 나타났다. 야자유 및 옥수수유 유래 소포로리피드는 거의 유사한 양상의 세척력을 보여주었으며, 특히 유성 오염포 (WFK 10D)에 대한 세척력이 높은 것으로 나타났다 (도 3C).
- [0075] 계면활성 특성과 함께, 우수한 유화력 또한 산업에 적용되는 바이오-계면활성제를 위한 중요한 고려사항이다. 야자유에서 얻은 소포로리피드는 표준물질 (LAS 및 슈가 에스터)보다 낮은 유화력을 갖는 것으로 나타났다 (도 3D). 계면활성 분자의 유화 활성은 표면 장력 뿐만 아니라, 소수성 기질과 분자의 소수성 부분의 직접적인 상호작용에 의해서도 측정되었다 (Shin *et al.*, *Bioresour. Technol.* 101(9), 3170-3174, 2010).
- [0076] **실시예 5. 항균 활성**
- [0077] 대장균 (*E. coli*) 및 황색포도상구균 (*S. aureus*)에 대한, 야자유 및 옥수수유 유래 소포로리피드의 항균 효능 데이터는 도 4에 나타났다. 소포로리피드의 대장균에 대한 항균 활성 측정 결과, 야자유로부터 합성된 소포로리피드는 DF-100 (포도씨 추출물)보다 더 높은 활성을 나타낸 반면, 옥수수유 유래 소포로리피드와는 유사한 활성을 나타냈다. 그러나, 황색포도상 구균에 대한 항균 활성은 야자유 유래 소포로리피드가 옥수수유 유래 소포로리피드보다 높았다.
- [0078] 상기 세균에 대한 소포로리피드의 항균 활성은 다른 병원성 세균에 대한 선별을 위해 소포로리피드의 사용을 장려할 수 있고, 과일과 채소의 세척에 적합한 살균제로도 사용될 수 있다.
- [0079] **실시예 6. 소포로리피드의 HPLC 분석**
- [0080] 소포로리피드 형태의 상세한 분석은 HPLC 분석에 의해 수행되었으며, HPLC 결과는 몇 개의 피크를 나타냈다 (데이터 미제시). 표 1에 기재된 것처럼, 야자유로부터 생산된 소포로리피드는 락톤 및 산성 소포로리피드를 포함하는 화합물이다. HPLC 데이터는 산성 소포로리피드가 결합된 4-7분 사이의 피크 및 락톤 소포로리피드가 결합된 10-20분 사이의 피크를 보여주었으며, 락톤 소포로리피드의 피크 면적이 더 크게 나타났다. 야자유 유래의 소포로리피드는 사슬 길이는 짧지만, 부분적으로 정제된 소포로리피드에서 높은 비율의 락톤 형태 때문에 높은 소수성이 나타났다. 락톤화뿐만 아니라 아세틸화 또한 분자의 높은 소수성에 기여한다.

도면

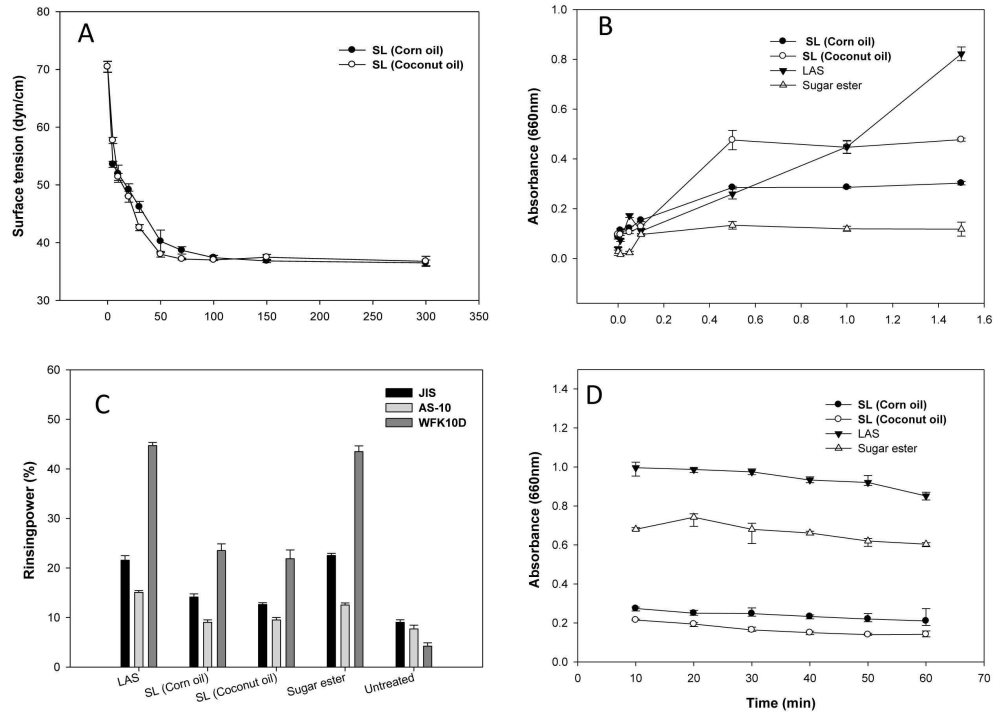
도면1



도면2



도면3



도면4

