

생물계면활성물질(Biosurfactant)의 기초이론

김 정 회, 김 필

한국과학기술원 생물과학과

서 론

계면활성제는 지금까지 석유화학공업의 원료를 이용하거나 일부는 동·식물의 지질을 이용하여 화학적으로 합성하는 방법으로 생산되어 왔다. 이러한 합성 계면활성제는 1917년 독일에서 처음으로 공업화된 이후, 제 2차 세계대전부터 지금까지 세계적으로 그 생산량과 소비량이 증대되고 있으며 의약품, 음료, 화장품, 농약, 세제 및 각종 공업생산공정에 사용되고 있다.

그러나 합성계면활성제의 과소비와 함께 환경공해문제가 심각하게 대두되고 있다. 합성계면활성제는 사용후 자연분해가 늦고 또한 독성이 강하기 때문에 1980년대에 선진국에서는 이미 합성계면활성제의 문제점들이 제기되면서 ABS (alkyl benzene sulfonate) 등 품목에 대해서는 사용 및 생산을 금지시키고 있으며, 그 외의 현재 사용중인 계면활성제에 대해서도 환경오염의 논란이 끊이지 않고 있다. 이에 반해 생물계면활성물질은 주로 생물체에 의하여 생합성되는 물질이기 때문에 저독성이며 생태계에 의하여 분해가 용이하기 때문에 최근 선진국에서 생물계면활성물질의 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

같은 조건에서 독성검사 결과를 보더라도 생물계면활성물질이 합성계면활성제보다도 50-100배의 안정을 보이고 있다. 생물계면활성물질의 자연적 분해도에 관해서도 *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Paecilomyces variotii* 등에 의해서 분해가 잘되므로 환경오염상 문제가 되지 않는다. 역사적으로는 식물에서 추출된 gum, lecithin, polysaccharides, alginate 등과 콩 단백질이 계면활성제로서의 성질을 갖고 있음이 밝혀져 식품 등에 광범위하게 사용되어 왔다. 그밖에 계란에서 추출한 lipoprotein, 유제품 및 혈액, 생체막등 동물체로부터 추출된 계면활성제도 화장품, 의약, 농약등에 다양하게 사용되어 왔다. 그러나 최근 유전공학과 생물공학기술의 발달로 미생물의 대사경로가 밝혀지면서 미생물에 의한 생물계면활성물질의 개발에 연구의 초점이 맞추어져 있기 때문에 본 고에서도 이 분야에 대한 소개를 하고자 한다.

생물계면활성물질의 종류 및 특성

미생물은 다양한 환경하에서도 생명력을 유지하기 위하여 다양한 기능을 갖고 있으며 필요시에 그 기능이 발현된다. 생물계면활성물질은 1970년대 초 석유화합물을 기질로 한 미생물 단세포 단백질의 생산과정에서 발견되었다. 미생물이 천연성인 석유화합물을 효과적으로 이용하기 위하여 즉, 세포 주변에 석유화합물을 분산시킬 목적으로 다량의 계면활성물질을 생산한다는 사실을 알게 되었다. 그 이후 지금까지 약 30여종의 다양한 구조의 생물계면활성물질이 보고되었으며 분자량도 저분자로부터 약 100만KD 정도의 고분자도 발견되었다. 표 1은 현재까지 보고된 각종 생물계면활성물질을 구성성분과 구조적 특성에 따라 분류한 것이며 대표적인 구조식은 그림 1에 표시한 바와 같다.

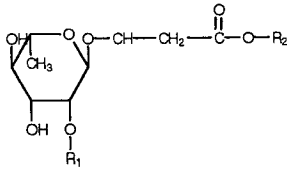
표 1. Structures interfacial properties and production level of typical biosurfactant

Biosurfactant	Microorganism	C-source	Surface tension (mN/m)	Interfacial tension (mN/m)	CMC
Glycolipid					
Glycolipids	<i>Rhodococcus aurantiacus</i>	n-alkane	26	0.35	na
Glycolipids	<i>Rhodococcus sp. H13A</i>	hexadecane	na	0.02 ^b	1.5g/l
Glycolipids	<i>Torulopsis apicola</i>	alkane/carbohydrate	30	<0.9 ^b	na
Pentasaccharide lipid	<i>Nordica corynebacteriodes</i>	alkane	26	<1 ^a	25mg/l
Rhamnolipid	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	glucose	29	0.25	na
Rubiwettins	<i>Serratia rubidaea</i>	glycerol	25.5	na	10mg/l
Sophorose lipid	<i>Torulopsis bombicola</i>	glucose/oleic acid	35	1.8	na
Trehalose-mono, dicorynomycolates	<i>Nordica corynebacteriodes</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	n-alkane	32-36	14-17	4mg/l
Lipopeptide/Amino lipids					
Lipopeptides	<i>Bacillus licheniformis</i> JF2	glucose	27	0.016 ^b	0.02mg/l
Lipopeptides	<i>Bacillus licheniformis</i> 86	glucose	27	0.36 ^a	10mg/l
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	glycerol	26.5	na	150mg/l
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>	glycerol	28-34	na	na
Fatty acid/Neutral lipids					
Fatty acid	<i>Corinebacterium lepus</i>	kerosene/alkane	na	2 ^c	150mg/l
Fatty acid+Neutral lipids	<i>Nocardia erythropolis</i>	hexadecane	32	<3	na
Others					
Protein-Carbohydrate Complex	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 378	sucrose	27	na	<10mg/l
Phosphatidylethanol amines	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	n-alkane	30	<1	30mg/l
na	<i>Corynebacterium insidiosum</i>	hexadecane	28.5	0.55 ^a	na

^aInterfacial tension measured against hexadecane. ^bagainst decane. ^cagainst kerosene.

na : Not Available

Rhamolipid



RL 1 : R1 = L- α -Rhamopyranosyl-

RL 2 : R1 = H

RL 3 : R1 = L- α -Rhamopyranosyl-

RL 4 : R1 = H

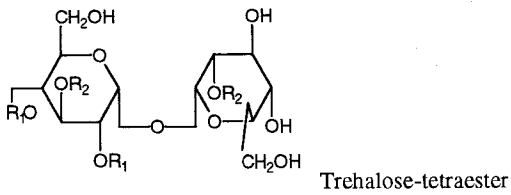
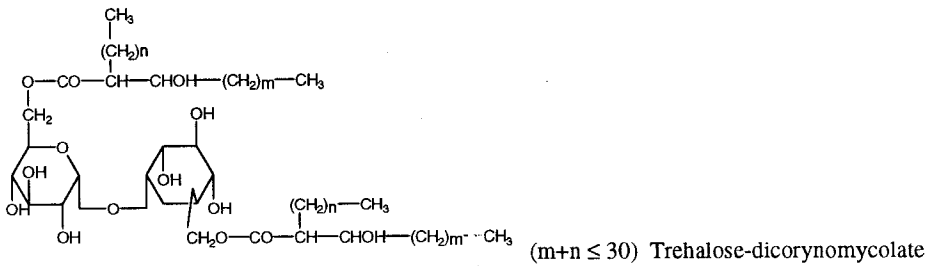
R2 = β -Hydroxydecanoic acid

R2 = β -Hydroxydecanoic acid

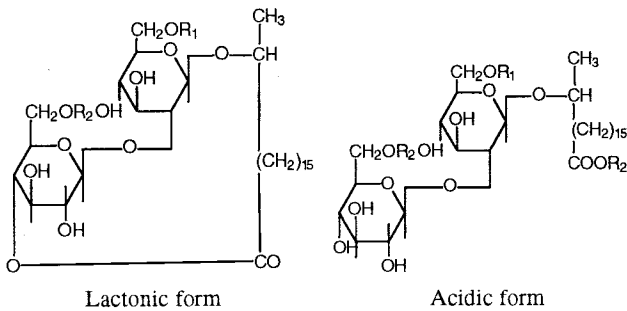
R2 = H

R2 = H

Trehalose lipid



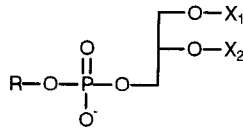
Soporose lipid



R1 = Ac, R2 = H

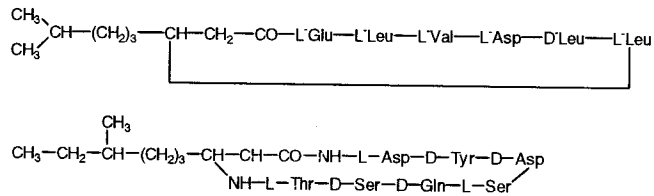
그림 1-A. Structure of biosurfactants

Phospholipid



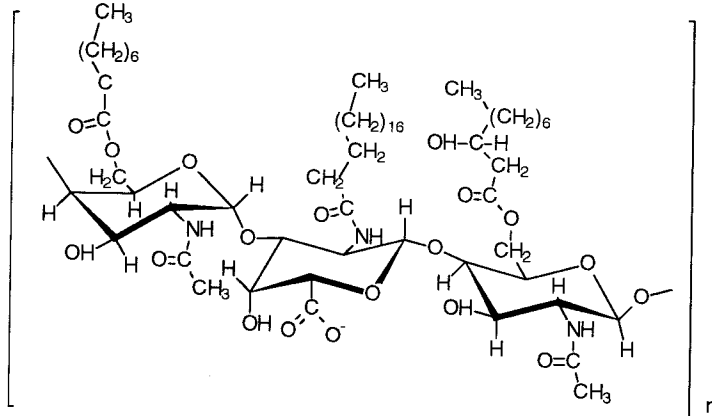
R = H or Cholin or Ethanolamine etc.
 X1, X2 = Fatty acid

Lipopeptide



Surfactin and its derivatives

Lipopolysaccharide



Emulsan

그림 1-B. Structure of biosurfactants

구성성분으로 볼 때 생물계면활성물질은 당, 아미노산 그리고 단백질과 지방질의 복합형태로 이루어져 있음을 알 수 있으며 이에 따라 Glycolipid, Lipopeptide(Amino-peptide), Fatty acid 또는 Phospholipid, 기타로 구분할 수 있다. 가장 잘 알려진 물질로는 Rhamnolipid, Sophorose lipid, Surfactin, Phosphatidylethanol amine, Emulsan등을 들 수 있다. 이들 계면활성물질의 성능을 보면 표면장력 저하능이나 계면장력 저하능면에서 합성계면활성제와 비교하여 매우 유사한 값을 보여 주고 있다. 그러나 표 2에서 볼 수 있듯이 임계미셀농도(CMC)는 합성계면활성제보다 훨씬 우수하기 때문에 계면활성제로서 효율이 매우 높을 것으로 예측된다.

이에 반해서 Emulsan과 같이 분자량이 약 100만KD에 달하는 lipopolysaccharide계 생물고분자의 경우는 표면장력이 약 55mN/m 그리고 계면장력 약 35mN/m로 장력저하능력은 매우 약하나 일단 에멀전을 형성하면 대단히 안정하기 때문에 중질유의 점도강하 및 연소효율 증가 그리고 원유의 2차 채유회수율 증가등에 응용가능성이 매우 높은 것으로 보고되고 있다.

표 2. Comparison of Biosurfactants with Synthetic Surfactants

Producing organism	Surface tension (mN/m)	Critical micelle concentration (mg/l)	1990 Cost (\$/kg)
<i>R.erythropolis</i>	37	15	12.20
<i>P.aeruginosa</i>	29	15	5.90
<i>T.bombicola</i>	37	82	2.80
<i>B.subtilis</i>	27	11(0.01mM)	20.32
Anionic synthetics			
Detergent alkylate dodecylbenzen(LABS)	47	590(1.2mM)	1.03
Sodium lauryl sulfate (SLS or SDS)	37	2023-2890 (7-10mM)	0.95(30%) 26.00(98%)

생물계면활성물질의 생합성 경로

생물계면활성물질은 다양한 미생물로부터 생산되는 물질이므로 각각에 대한 정확한 반응경로는 잘 알려져 있지 않다. 또한 동일한 생물계면활성물질이라 하더라도 분비하는 미생물마다, 원료물질이 되는 탄소자원의 종류에 따라 합성되는 경로가 조금씩 다르다. 그러나 일반적으로 원료물질은 몇단계의 효소반응을 거쳐 중앙대사(central pathway)인 해당과정(glycolysis)과 Tricarboxylic

acid(TCA)대사경로로 들어가게 되며, 이로부터 생물계면활성물질을 합성하는데 필요한 기본중간물질들이 제공된다. 당지질의 경우 여러가지 당과 지방산의 결합으로 이루어져 있으며, 이때 전구체가 되는 당과 지방산은 중심대사인 TCA를 거쳐 합성된다. 원료물질이 탄수화물인 경우 당과 지방산을 합성하는 경로는 그림 2와 같다.

생물계면활성물질의 전구체 당은 glucose-6-phosphate로부터 각기 특정효소의 작용에 의하여 여러가지형태의 당으로 변환하게 되며, 전구체 지방산은 해당과정과 TCA를 통해 생성된 acetyl-CoA가 중합되어 얻어진다. 이렇게 생성된 전구체 당과 지방산은 주로 에스테르화반응에 의해서 중합되어 glycolipid를 형성하게 된다.

초기 원료물질이 석유화합물인 경우는 그림2에서 도시된 대사의 역반응으로 진행된다. alkane으로부터 생성된 지방산은 β -oxidation에 의해 acetyl-CoA까지 분해된후 TCA와 gluconeogenesis (glycolysis의 역반응)경로를 통해 전구체인 당을 합성하게 된다. (그림 3.)

이때 서로 다른 원료물질로부터 생산되는 전구체의 종류와 양은 중앙대사에 관여하는 몇가지 핵심효소에 의해 정교하게 조절받는다.

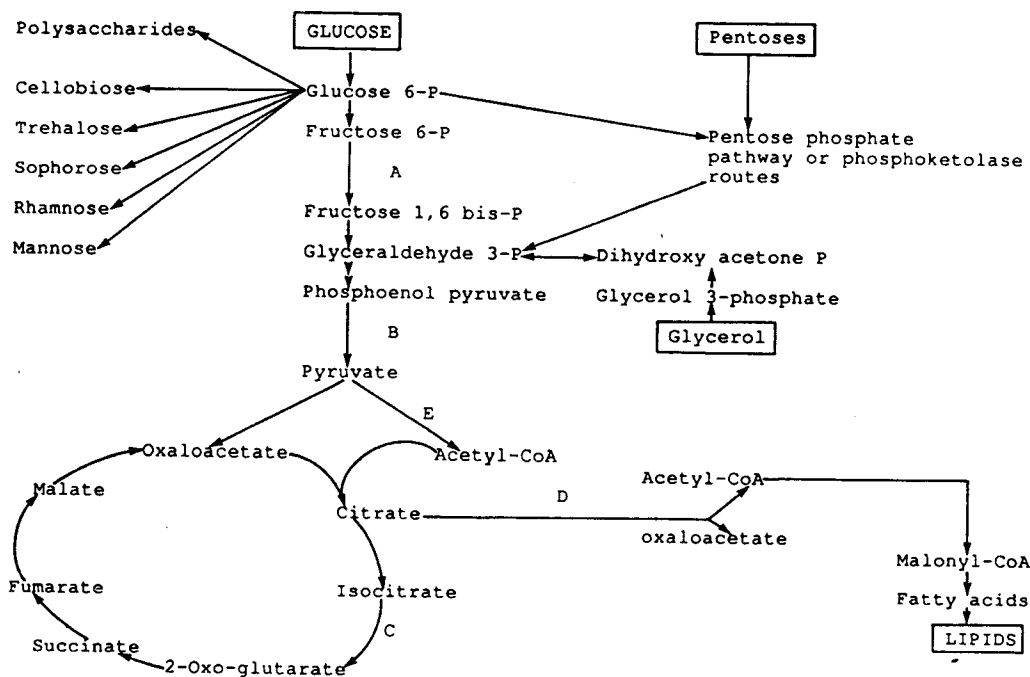


그림 2. Intermediary metabolism relating to biosurfactant precursor synthesis from carbohydrate

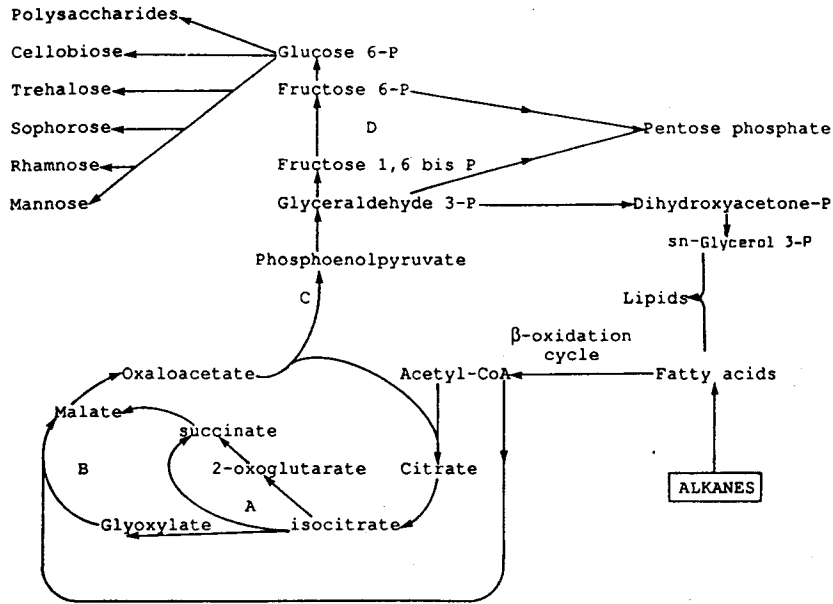
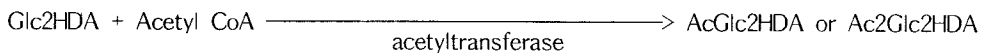
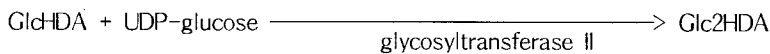
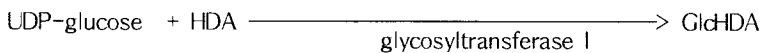


그림 3. Outline of intermediary metabolism relating to biosurfactant precursor synthesis from hydrocarbon substrate.

앞에서도 언급했듯이, 동일한 생물계면활성물질이라도 생합성경로가 서로 다를수 있다. 이것은 생물의 다양성에 기인한 것이다. sophoros lipid의 경우를 그 예로 설명하겠다. *Candida bogoriensis*의 경우 sophoros lipid합성에는 크게 3종류의 효소가 관여한다고 알려져 있다. 활성형인 UDP-glucose는 glycotransferase I,II에 의해 연속적으로 glucose잔기를 HDA(13-Hydroxy Docosanoic acid)에 전달하여 각각 GlcHDA (13- (β-glucopyranosyl)- hydroxydocosanoic acid)와 Glc2HDA (13-(2'-β- glucopyranosyl- β-glucopyranosyl) oxy-docosanoic acid)를 형성한다.



계속해서 acetyltransferase에 의해 acetyl-CoA로부터 acetyl잔기가 전달되어 AcGlc2HDA 또는

Ac2Glc2HDA가 형성된다. *Torulopsis bombicola*에 의해 생산되는 경우는 precursor가 sophorose와 17-OH-octadecanoic acid이며 각각 중합후 lactonization, acetylation이 일어나서 sophorose lipid가 생성된다고 알려져 있다.(그림4)

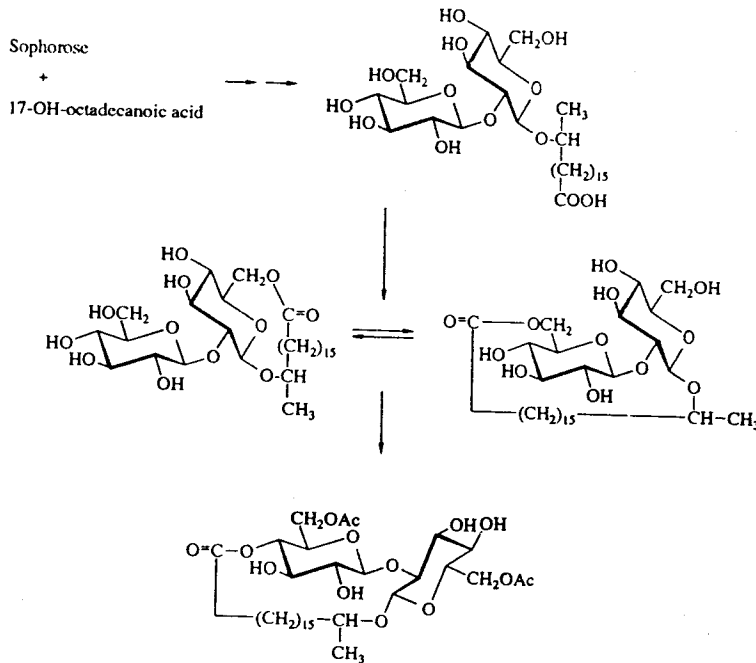


그림 4. Sequence of last synthesis steps of sophorose lipid from *Torulopsis bombicola*

생물계면활성물질의 발효생산공정

생물계면활성물질의 대량생산을 위하여는 미생물을 이용한 고생산성 발효공정의 개발이 필수적이다. 일반적으로는 회분식 배양법(Batch culture)이 많이 이용되고 있으나 최종생산되는 계면활성물질의 농도와 생산성이 낮기 때문에 최근에는 고농도 세포배양기술을 이용한 고생산성 발효공정의 개발을 목적으로 유가식 배양법(Fed-batch culture)또는 연속식 배양법(Continuous culture)등이

제안되고 있다. 본고에서는 본 연구실에서 수행된 sophorose lipid를 중심으로 회분식 배양법과 유
가식 배양법의 실험결과를 비교, 검토코자 한다.

미생물에 의한 어떤 물질의 생산경우 생합성 대사가 환경인자(탄소원의 종류 및 농도, 영양원의
종류 및 농도, 온도, pH등)에 의하여 정교한 조절을 받고 있기 때문에 조절기작을 잘 이해하여야
한다. 즉, 어떤 대사산물은 탄소원으로서 탄수화물이나 alkane 또는 oil로부터 생산될 수 있으나 그
대사산물의 생산량이나 수율은 크게 다를 수 있다.

*Torulopsis bombicola*를 이용한 sophorose lipid의 생산경우에도 원료물질인 탄소원의 영향을 크게
받는다. 탄소원을 10% glucose로 한 경우와 10% soybean oil에서 생산한 경우를 비교해 보겠다(그
림 5).

두가지 탄소원에서의 균체 성장속도(그림 5-A)와 탄소원의 이용속도(그림 5-C)는 거의 유사하지
만, sophorose lipid의 생산량에 있어서는 큰 차이를 보이고 있다(그림 5-B). 탄소원의 sophorose
lipid로의 전환비율도 glucose의 경우 9.4%로, soybean oil의 37.2%보다 크게 낮다(표 3).

표 3. Summary of carbon mass balance in batch cultures

Product (Carbon fraction)	Culture 1			Culture 2		
	Conc. (g/l)	TCC (g-C/l)	Ratio (%)	Conc. (g/l)	TCC (g-C/l)	Ratio (%)
Cell (0.50)	23.0	11.5	27.0	20.0	10.0	12.6
Sophose lipid (0.57)	7.0	4.0	9.4	52.0	29.6	37.2
CO ₂ (0.27)	85.1	23.3	54.8	137.8	37.2	46.8
Total Carbon Input		38.8			76.8	
Total Carbon Output		42.5			79.5	

Culture 1 : Medium containing 10% glucose as a sole carbon source
 Culture 2 : Medium containing 10% soybean oil as a sole carbon source
 TCC : total carbon content
 Ratio : carbon content in each product/total input carbon

이를 바탕으로 하여 높은 전환율로 sophorose lipid를 생산하기 위한 발효공정을 제안할 수 있었
다. Control로는 11% glucose와 10% soybean oil을 초기배지에 첨가하여 배양하였고, Culture A는
10% glucose를 초기에 첨가한 후 9% oil을 발효기간중 간헐적으로 첨가하였다. 그리고 Culture B는
3%의 glucose를 초기에 넣고 나머지 7%의 glucose와 9% soybean oil을 간헐적으로 첨가하였다(표
4).

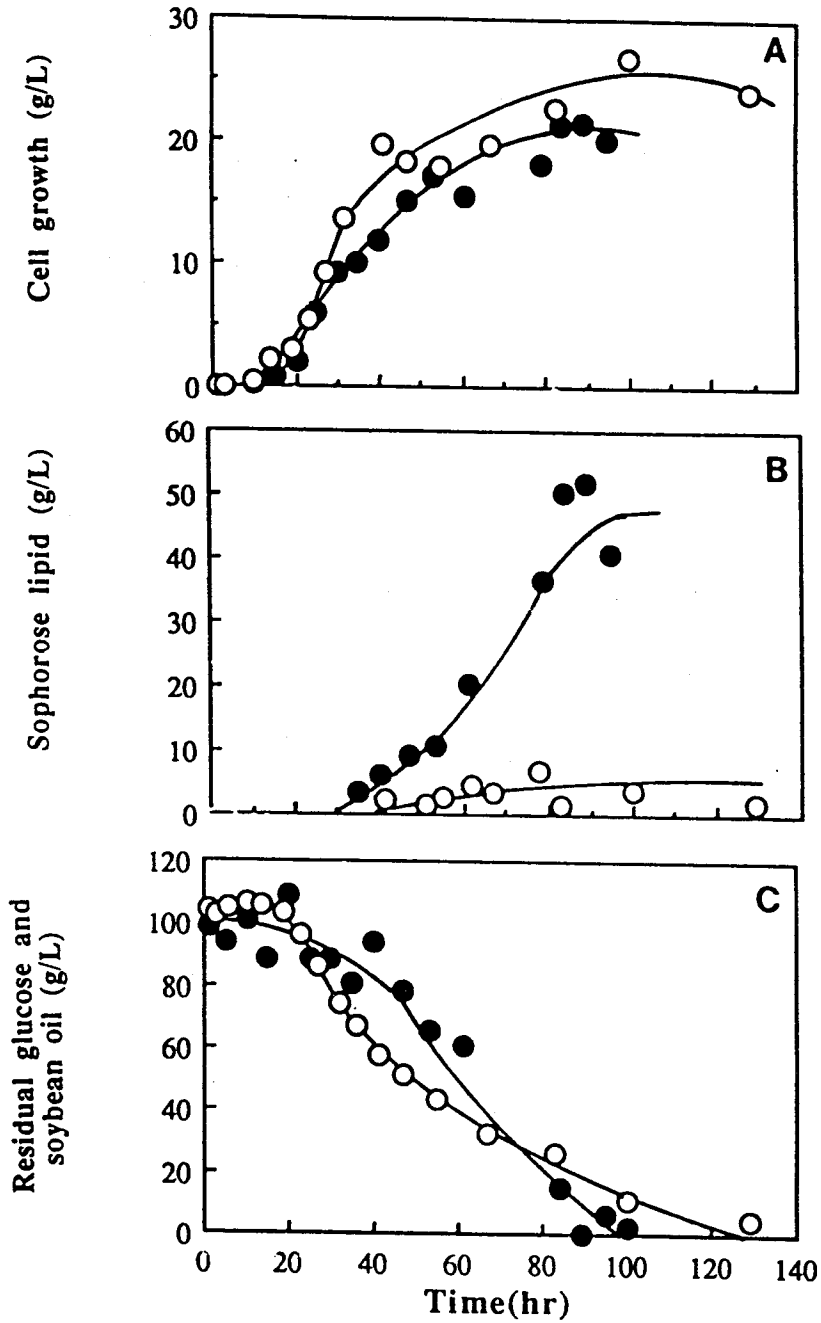


그림 5. Effect of each carbon source on profiles of cell growth, sophorose lipid production and carbon source consumption in batch culture containing glucose or soybean oil. Culture1 : 10% glucose as a sole carbon source(○), Culture 2 : 10% soybean oil as a sole carbon source(●)

표 4. Summary of carbon mass balance in oil intermittent fedbatch cultures

Product (Carbon fraction)	Culture A			Culture B			Culture C		
	Conc. (g/l)	TCC (g-C/l)	Ratio (%)	Conc. (g/l)	TCC (g-C/l)	Ratio (%)	Conc. (g/l)	TCC (g-C/l)	Ratio (%)
Cell (0.50)	28.0	14.0	12.4	27.0	13.5	12.0	30.0	15.0	13.3
Sophose lipid (0.57)	119.0	67.8	60.2	115.0	65.5	58.2	73.2	41.7	37.0
CO ₂ (0.27)	118.1	31.9	28.3	139.3	37.6	33.3	208.5	56.3	50.0
Total Carbon Input	113.7			116.6			112.6		
Total Carbon Output	112.6			112.6			112.6		

Culture A : 10% glucose was initially added and total 9% oil was intermittently added with an interval 7hr

Culture B : 3% glucose was initially added and total 7% glucose and 9% oil was intermittently added with an interval 7hr

Culture C : 11% glucose and 10% oil as a carbon source

TCC : total carbon content

Ratio : carbon content in each product/total input carbon

최종적으로 control의 경우 37%의 탄소전환율로 73.2g/l의 sophorose lipid를 얻었으나, 간헐적으로 오일을 첨가한 culture A, B는 각기 60.2%, 58.2%의 높은 탄소전환율로 119.0, 115.0g/l의 sophorose lipid를 얻음으로써 생산량이 크게 증가하였다. 이와 같은 결과의 이유는 배지중의 다량 오일로 인하여 metabolic pathway가 sophorose lipid 생합성보다 지방산의 산화쪽으로 shift되도록 미생물의 대사조절이 이루어졌기 때문이라고 생각된다.

결론

생물계면활성물질의 실용화를 위하여는 표면장력 및 계면장력의 저하능, 임계 미셀농도등에서 어느정도 우수한가의 측면과 계면활성물질의 발효생산수율 및 생산성에 근거한 경제성의 확보가 매우 중요하다. 이와 더불어 산업적 용도의 개발 또한 최종제품의 상품화라는 측면에서 매우 중요한 부분이며 1차적으로는 기존의 합성계면활성제의 대체용도를 고려할 수 있으며, 2차적으로는 생물계면활성물질의 저독성 및 생분해도의 우수성을 고려한 특수분야의 용도개발이 이루어져야 할 것으로 생각된다. 왜냐하면 생물계면활성물질의 생산단가가 약 3-15\$/kg로 매우 높기 때문에 기존의 합성계면활성제와 가격면에서는 경쟁력을 확보하기 어렵다. 그러므로 생물계면활성물질의 실용화 및 응용범위 확대를 위하여는 환경오염 및 환경파괴문제에 능동적으로 대처가능한 생물계면활성물질의 개발과 더불어 지속적인 특수목적의 고기능성 물질의 개발과 용도개발이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

- Ref) 1. Biosurfactants and Biotechnology, Naim Kosaric et al p21-45
2. Biosurfactants, Naim Kosaric
 3. "Biosurfactants : "moving towards industrial application", TIBTECH(1992), vol10, 208-217
 4. "Biosurfactant의 활용", 화학공업과 기술, 12권, 1호(1994) 37-45
 5. "Surface-active compounds from microorganism" Bio/Technology(1992) vol10, 60-65
 6. "Microbial surfactants", Chemtech, (1986) April. 239-243
 7. "Distribution of substrate carbon in a sophorose lipid production by *Torulopsis bombicola*" Lee & Kim, Biotechnol Lett., 16, 263-266