

Biosurfactant의 합성과 생산

충남대 김인호

1. 서론

계면활성제는 유화제와 함께 농업, 식품 분야를 포함하여 모든 산업분야에서 사용되고 있다. 화학합성된 계면활성제의 소모량은 막대하여, 1990년 통계로 130억 \$이며 매년 6%의 증가율이 보이고 있다. 화학합성된 계면활성제들의 원료는 석유이며 원료값이 비교적 싸므로 생물유래 계면활성제는 석유유래 계면활성제와 비교하여 가격 경쟁력이 없어 아직 잘 사용되고 있지 않다. 생계면활성제가 경쟁력이 약한 이유는 비효율적인 생물공정, 낮은 균주의 생산성, 그리고 비싼 기질을 사용하는 발효공정에 의존하기 때문이다. 생계면활성제가 화학 합성 계면활성제와 경쟁하기 위한 선결조건은 다음과 같다:

- (1) 균주가 계면활성제를 생성하는 생리학적 지식의 확대
- (2) 저렴한 발효 기질의 개발
- (3) 생산 공정의 개선

광범한 생계면활성제가 알려졌으며⁽¹⁾ 계속 새로운 종류가 발견되고 있다. 생계면활성제는 종류가 다양하며 응용목적에 맞는 다양한 구조와 화학적 성질을 기대할 수 있다. 유전공학의 진보에 따라 균주의 유전자 조작이 용이하여지고 대사작용을 조절하여 생산성 증가를 위한 연구가 활발하다⁽²⁾. 생계면활성제의 환경친화성-생분해가 용이-을 고려하면 생계면활성제의 연구 노력의 확대와 화학계면활성제를 대체하기 위한 생계면활성제의 관심 증가가 이해될 것이다.

본 보문에서는 생계면활성제의 생합성과 생산공정의 연구동향을 정리하여 설명하고자 한다.

2. 정의 및 분류

생계면활성제는 생명체에 의해 합성되는 표면장력을 조절하는 물질이다⁽³⁾. 주로 미생물에 의해 생산되며 생물분자로 친수기와 소수기를 지니고 있다. 생계면활성제는 마이셀이나 역마이셀을 형성하고 Fig. 1과 같이 막대기, 이중층, 소포체를 만든다. 생계면활성제는 계면에 축적되며 기름/물, 공기/물, 물/고체 등의 계면의 성질을 변화시킨다. 계면의 표면장력을 바꾸며, 물 분자의 배열, 수소결합, 친수기와 소수기의 상호작용의 변화로 표면장력이 감소된다.

생계면활성제는 3개의 군으로 크게 나뉜다. 소수기는 지방산의 탄화수소 사슬, 친수기는 중성지방의 에스테르와 알콜기, 또는 지방산이나 아미노산의 카르복실기, 또는 인산리피드의 인산기, 또는 glycolipid의 탄화수소 잔기이다. Table 1은 주요 미생물 유래의 생계면활성제이다.

2.1 Glycolipid계

Sophrose-, rhamnose-, trehalose-, sucrose-, 그리고 fructo-lipid가 이 군에 포함되고 *Torulopsis*, *Pseudomonas*, 또는 *Arthrobacter*에 의해 생성된다. 또 mannosyl erythritol lipid와 cellobiose lipid가 *Candida*, *Shizonella*, 그리고 *Usilago zaeae*에 의해 생합성된다. 이 중 *P. aeruginosa*와 *P. fluorescens*에 생성된 rhamnolipid가 가장 많이 연구되었고(Fig. 2) 본 부분에서도 rhamnolipid의 생산공정에 대해 주로 설명하고자 한다. Rhamnolipid는 1개 또는 2개의 당이 1개 또는 2개의 caprillic acid과 당결합을 하고 있다⁽⁴⁾.

2.2 아미노산 함유 지질계

이 생계면활성제중 활성이 가장 큰 *Bacillus subtilis*에서 생산되는 surfactin은 7개의 아미노산 링구조를 포함한다(Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu): 아미노산 링은 3-hydroxy-13-methyl tetradecanoic acid와 연결되어 있다. 이 물질은 항생제 활성을 갖고 있다. 기타 *Pseudomonas rubescens*가 생산하는 오르니친 함유 지질, *Agrobacterium tumefaciens*가 생성하는 라이신함유 지질 등이 있다.

2.3 다당류-지질계

3번째 군에 포함되는 다당류-지질 계면활성제중 대표가 되는 물질은 emulsan이다⁽⁵⁾. Emulsan은 탄화수소를 기질로 하여 yeast 종류를 증식시킬 때 생성되며 대표균주는 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1이다. 이 군에 속하는 물질은 그람-음성 균의 외부 벽에 존재하며 탄화수소를 분산시켜 세포내로 수송시키기 위해 미생물이 생성한다.

2.4 단백질 유사물질

단백질과 유사한 물질로 계면활성능을 갖는 serraphobin은 분자량이 70kDa이고 *Serraphobin marcescens*이 생성한다. 그밖에 *Candida lipolytica*는 분자량 28kDa의 liposan을 합성하며 liposan의 83%는 탄수화물이다.

3. Biosurfactant의 생산

3.1 발효에 의한 생산

미생물이 성장하고 계면활성제를 합성할 때 성장기와 합성기의 시각이 일치할 때와 불일치 할 때가 있다. 일치할 때 1차 대사산물 또는 성장연관 산물로 불리우고 불일치 할 때는 2차 대사산물로 지칭한다(Fig. 3, Table 2). 탄화수소를 기질로 이용하는 미생물은 탄화수소를 섭취하기 위해 이온성 계면활성제를 분비하고 탄화수소를 분산시켜 세포벽으로 흡수한다. 세포벽에 탄화수소 분해 효소가 존재하므로 *Pseudomonas*이나 *Torulopsis*은 탄화수소를 분산시켜 용해도를 증가시키고 세포벽으로 이송한다. 한편 세포벽의 구조를 변경하여 탄화수소 배지를 이용하는 *Candida*는 지질 다당류나 비이온성 계면활성제를 세포벽에 축적한다. 비이온성 물질의 소수기는 세포벽에 부착되어 있고 지질 잔기는 배지쪽으로 향하여 있어 미생물은 oleophilic 상태이다. 이런 미생물이 기름방울과 접촉하게 되면 세포벽과 기름상의 표면장력이 감소하게 된다. 따라서 단분자층 기름이 미생물을 둘러싸고 기름 분자의 확산이 세포쪽으로 일어난다. 이렇게 기름과 직접 접촉하는 미생물이 생산하는 생계면활성제는 성장연관 산물이다.

Rhamnolipid를 생성하는 *Pseudomonas*는 탄소원으로 n-알칸, 글리세롤, 포도당, 에탄올 등을 사용하는데 이중 n-알칸을 기질로 사용하였을 때 rhamnolipid가 가장 많이 생성된다. 한편 성장이 제한되는 조건에서 (질소원이나 다가 양이온이 부족한 상태)에서 *Pseudomonas aeruginosa*는 정지상에서 rhamnolipid를 과량 생성한다. Fig. 4는 질소원이 부족한 상태에서 rhamnolipid가 생성되는 자료를 보여주고 있다. 생계면활성제가 2차 대사산물로서 생성된다면 세포 증식기와 생산물 생성기를 분리하는 발효법을 개발할 수 있다. 이때 세포성장 조건을 최적화하여 세포량을 최대로 하고 세포수확 후 생산물 생성 배지에 세포를 넣어 계면활성제를 2차 대사물질로 생성할 수 있게 한다.

3.2 고정화 세포에 의한 생산⁽⁶⁾

정지기에 도달한 세포를 이용하여 rhamnolipid를 생산할 때 다 자란 *Pseudomonas* 세포를 수확하여 n-알칸 + 소금용액에 현탁시켜 일정한 온도를 유지한다(Fig. 5). 세포 축매는 온도에 따라 다른 생산성을 보이며 정지기 세포는 rhamnolipid II와 IV를 생성하며 증식기 세포가 rhamnolipid I과 III를 형성하는 것과 다른 현상을 보인다. 정지기 세포가 생계면활성제를 생성하므로 정지기 세포를 고분자 물질에 고정화시켜 세포를 반복 사용할 수 있게 하면 경제적 이점을 다음과 같이 고려할 수 있다.

- (1) 세포가 용액상에서 많은 거품을 내어 발효조 상층으로 모이는 것을 방지할 수 있다.
- (2) 고정화 세포의 생산성이 높다.
- (3) 연속공정을 쉽게 개발할 수 있다.

고정화에 사용되는 고분자 물질로 alginate, chitosan, agar, carrageenan, polyacrylamide 등이 있고, 이중 alginate를 이용하여 가장 높은 rhamnolipid 생산성을 얻었다. 고분자 젤 내부에 세포를 고정화하여 rhamnolipid를 생산할 때 고려해야 할 변수로 단위젤 당 고정화 세포의 양(Fig. 6), 고분자 젤의 크기, 고정화하기 위한 세포의 수확시기 들이다. 특히 고정화 세포는 젤안에 존재하기 때문에 젤 외부

의 용질농도와 젤 내부의 용질농도의 차이로 세포가 이용하는 기질이 부족하게 된다(Fig. 7). 이 문제점을 해결하기 위해 젤의 표면 부근에서만 세포가 고정되도록 하는 방법이 있다. Fig. 8은 표면 부근에서만 *Pseudomonas*가 고정되도록 배양 시에 투입한 젤에 부착되는 세포와 부유 세포를 shaking flask에서 키울 때 세포농도의 증가를 보여주고 있다. 젤에 세포가 부착하여 자랄 경우 물질전달저항으로 세포 농도가 빨리 포화상태에 도달함을 볼 수 있다.

3.3 연속공정에 의한 Rhamnolipid의 생산공정개발

3.3.1 유동층 반응기

앞서 언급한 바와 같이 생계면활성제의 배양에서 거품이 문제되기 때문에 고정화 젤이 사용되며 배양기의 형태를 유동층 배양기로 설계한다. 유동층 배양기는 액체의 교반을 공기로 하므로 고정화 젤은 기계적 교반에 의하지 않고 부유될 수 있다. Fig. 9는 유동층 배양기의 모식도이며 구멍이 있는 밀판, 젤이 빠져 나가지 않게 하는 상층부의 체, 거품을 제거하는 scrubber 등이 장치되어 있다. Fig. 9의 유동층에서 고정화 세포를 부유시켜 rhamnolipid를 생산하며 이를 그 자리에서 분리하는 외부 XAD-2 칼럼을 부착한 공정의 모식도를 Fig. 10에 보이고 있다. 고정화 세포가 생성한 rhamnolipid는 유동층의 상층부에서 부유되고 이 계면활성제는 XAD-2 칼럼에서 흡착되어 제거된다. 생계면활성제를 분리하는 방법은 추출, 침전, 결정화와 같은 종래의 방법과 Fig. 10의 흡착, 부유와 같이 즉석에서 분리하는 방법이 있다.

Fig. 11은 실제 Fig. 9의 유동층을 포함하여 설계한 즉석분리 공정도이다. 출구 10에서 배출된 rhamnolipid는 4의 침전조에서 제거되고 7의 밸브를 통해 XAD-2 칼럼에 유입된다. 7에 유입되는 rhamnolipid의 양을 photometer(9)로 측정된 칼럼 8의 용출액의 흡광도로써 제어한다.

3.3.2 삼상유동층 반응기

Braunschweig 대학의 최근 개발 반응기인 삼상유동층 반응기⁽⁷⁾는 Fig. 12와 같은

공정도에 포함되어 있다. 유동층안에 static mixer를 설치하여 공기와 액체의 혼합을 개선하였고 rhamnolipid는 거품형태로 유동층 상단에서 제거되고 pH변화에 의해 침전되도록 설계되었다. 탑의 여러 위치에서 pH, O₂, T가 측정되어 자료가 컴퓨터에 저장되고 유량, 온도 등이 자동제어 되도록 되어있다.

3.3.3 막 반응기에서 Rhamnolipid의 연속생산

발효조에서 rhamnolipid를 생산할 때 거품문제를 해결하고 세포를 순환시켜 재사용하기 위해 Swiss의 ETH 대학에서 막을 사용하는 배양기를 개발하였다⁽⁸⁾. Fig. 13과 같이 배양기에서 펌프로 한외여과막이나 정밀여과막장치로 세포를 보내 세포를 거르고 여과액으로 rhamnolipid를 배출한다. 걸러진 세포는 2번째 막 장치로 보내져 가스가 교환된다. 2번째 막 장치에 사용된 막은 구멍이 없는 확산막이고 산소가 세포로 공급되고 이산화탄소가 제거된다. 이산화탄소는 다른 용도로 재생하여 사용할 수 있는 자원이 된다. 막을 통하여 가스교환이 일어나기 때문에 직접 공기를 배양액에 폭기하여 생기는 거품문제를 해결할 수 있다. Fig. 13의 배양기에서 일부 배양액이 bleed로 제거되어 *Pseudomonas*의 성장속도를 조절한다.

Rhamnolipid의 분자량은 650dalton 이하로 한외여과막을 사용하여 30% 이상의 retention을 얻을 수 있다(Fig. 14). 한외여과막에서 구멍크기를 줄이면 retention이 증가하지만 650dalton의 단분자 크기로 retention이 정해지는 것이 아니고 막의 오염도, rhamnolipid의 양쪽성에 따른 응집도에 따라 정해진다. 따라서 rhamnolipid의 실제 분자량은 micell 수준으로 커지며 0.1 μ m의 정밀여과막에 의해서도 걸린다. 전자현미경으로 촬영한 micell의 크기는 80~200nm로 용액의 pH, rhamnolipid의 농도에 따라 크기가 변한다.

가스교환에 사용되는 막은 Fig. 15와 같이 실관형으로 지지체는 polysulphone, 가스확산막은 polydimethylsiloxane 물질로 내벽에 발라져 있다. 확산막 두께는 2~4 μ m이고 이산화탄소의 투과도가 산소의 투과도의 30배 정도이다. 가스교환막은 주로 이산화탄소의 제거에 사용되며 산소는 막과 배양액 양쪽으로 공급된다.

참고문헌

1. 김원경, 김은기, “*Candida bombicola*로부터 미생물 계면활성제 생산시 관여 인자에 관한 연구”, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 7(2), pp.102-106 (1992).
2. 강상모, 김태원, 김혜자, “Biosurfactant를 생산하는 *P. aeruginosa* KK-7의 분리 및 Biosurfactant의 생산”, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22(1), pp.92-98 (1994).
3. 이선주, 남기대, “당지질계 미생물 계면활성제의 특성과 그의 응용”, *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.*, 4(1), pp.26-40 (1993).
4. 이선주, 남기대, “당지질계 미생물 계면활성제에 관한 연구(제1보) *Pseudomonas* sp.13에 의한 Rhamnolipid의 생성에 있어 배지의 최적효과”, *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.*, 4(1), pp.41-45 (1993).
5. 황경아, 김윤석, 안호정, 최호석, “Biosurfactant를 생산하는 *Acinetobacter calcoaceticus* CL의 분리 및 Biosurfactant의 생산과 응용”, *J. Kor. Ind. & Eng. Chem.*, 6(4), pp.562-570 (1995).
6. Kosaric, N., Cairns, W.L., and Gray, N.C.C(eds.), “Biosurfactants and Biotechnology”, *Surfactant Sci. Ser.*, Vol. 25, Marcel Dekker, New York (1987).
7. Siemann, M. and Wagner, F., “Prospects and Limits of Biosurfactants Using Immobilized Biocatalysts” in *Biosurfactants*, N. Kosaric(ed.), *Surfactant Sci. Ser.* Vol. 48, Marcel Dekker, pp.117-130 (1993).
8. Fiechter, A., “Biosurfactants: Moving towards Industrial Application”, *Trends Biotechnol.*, 10, pp.208-217 (1992).

Table 1. Biosurfactants produced by microorganisms.

Group	Compounds	Properties	Microorganisms
Glycolipids	Cellobioselipids	Anionic, extracellular	<i>Ustilago maydis</i> , <i>Ustilago zae</i>
	Mannosylerythritol lipids	Nonionic, extracellular	<i>Candida</i> sp.
	Mycolates of mono-, di-, and trisaccharides as glucose, fructose, sucrose	Nonionic, cell wall-bound	<i>Arthrobacter</i> sp., <i>Nocardia</i> sp., <i>Corynebacteria</i> , <i>Brevibacteria</i>
	Rhamnolipids	Anionic, extracellular	<i>Pseudomonas</i> sp.
	Sophorolipids	Nonionic or anionic, extracellular	<i>Torulopsis</i> sp. <i>Candida bogoriensis</i>
	Trehalose coryno-mono- and -dimycolates	Nonionic, cell wall-bound	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacteria</i>
	Trehalose tetra-esters	Anionic, extracellular and cell wall-bound	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium hydrocarbonclastus</i>
Lipoproteins, lipopeptides, peptidoglycolipids, protein emulsifiers	Surfactin, subtilisin	Extracellular	<i>Bacillus subtilis</i>
	Siolipin	Cell wall-bound	<i>Streptomyces sioyaensis</i>
	Peptidoglycolipid	Extracellular	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Lipoproteins of different structures	Cell wall-bound and extracellular	<i>Corynebacteria</i> , <i>Endomycopsis lipolytica</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	Protein emulsifiers	Extracellular	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida petrophilum</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i>
Lipopolysaccharides	Emulsan	Polyanionic, extracellular	<i>Acinetobacter tumefaciens</i>
	Lipoteichoic acid	Extracellular	<i>Streptococcus sanguis</i>
	Lipopolysaccharides of different structures	Cell wall-bound	<i>Candida</i> , <i>Pseudomonas</i>
Ornithinlipids/lysine-lipids	Ornithin or lysine as polar compound	Cell wall-bound	<i>Gluconobacter cerinus</i> , <i>Pseudomonas rubescens</i> , <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
Other products	Phospholipids, fatty acids, neutral lipids, glycerides, alcohols	Cell wall-bound or extracellular	All microorganisms; enrichment during growth on hydrocarbons

Table 2. Possibilities of biosurfactants productions.

-
1. Cell growth-associated production of biosurfactants
 - 1.1 Induction of production by lipophilic substrates
 - 1.2 Increase of production by optimization of medium composition
 - 1.3 Increase of production by optimization of environmental influences as pH, temperature, aeration, agitation speed, etc.
 - 1.4 Increase of production by addition of reagents, which cause a change of cell wall permeability as penicillin, ethambutol, EDTA, etc.
 - 1.5 Increase of production by addition of reagents which cause a detachment of cell wall-bound biosurfactants into the medium as alkanes, kerosene, EDTA, etc.
 2. Biosurfactant production by growing cells under growth-limiting conditions
 - 2.1 Production under N-limitation
 - 2.2 Production under limitation of multivalent cations
 - 2.3 Increase of production under growth-limiting conditions by a change of environmental conditions as pH or temperature
 3. Biosurfactant production by resting cells
 - 3.1 Production by resting free cells
 - 3.2 Production by resting immobilized cells
 - 3.3 Production by resting immobilized cells with simultaneous product removal
 4. Biosurfactant production by growing, resting free, and resting immobilized cells with addition of precursors
-

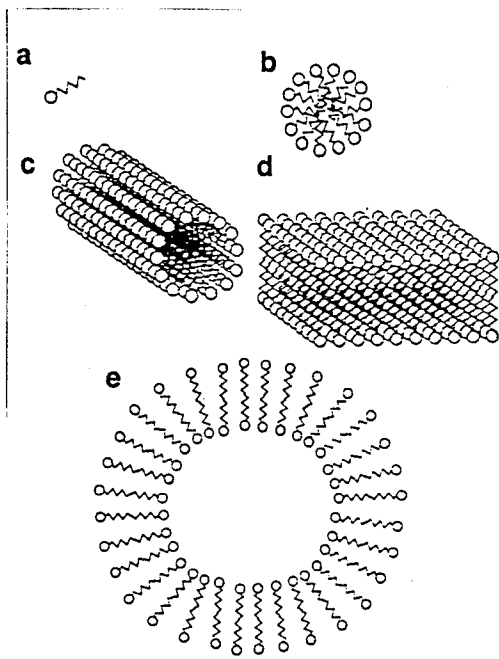


Fig. 1. Surfactant structure.

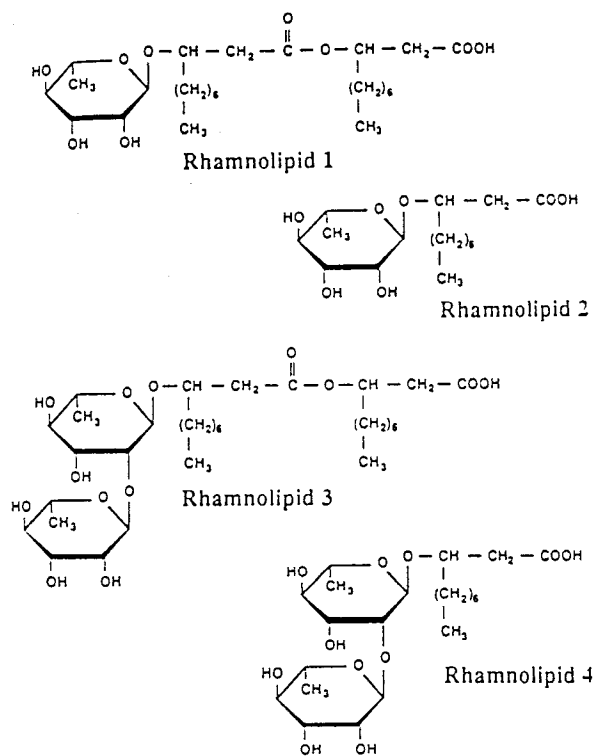


Fig. 2. Four different rhamnolipids.

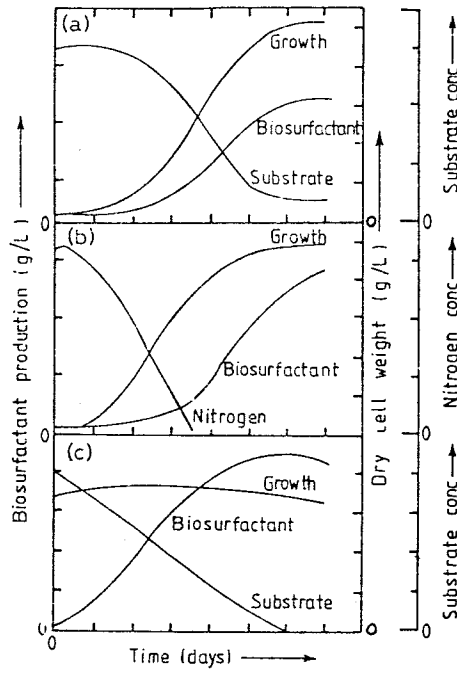


Fig. 3. Pattern of biosurfactant production.

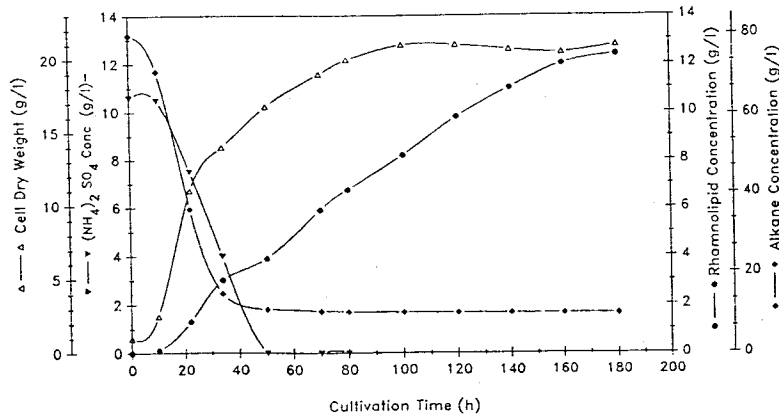


Fig. 4. Rhamnolipid production in a 30L fermenter.

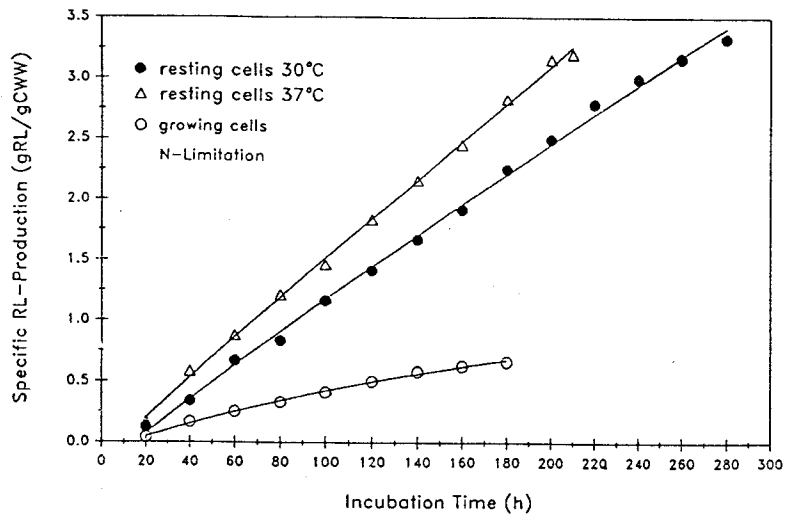


Fig. 5. Rhamnolipid production with resting cells.

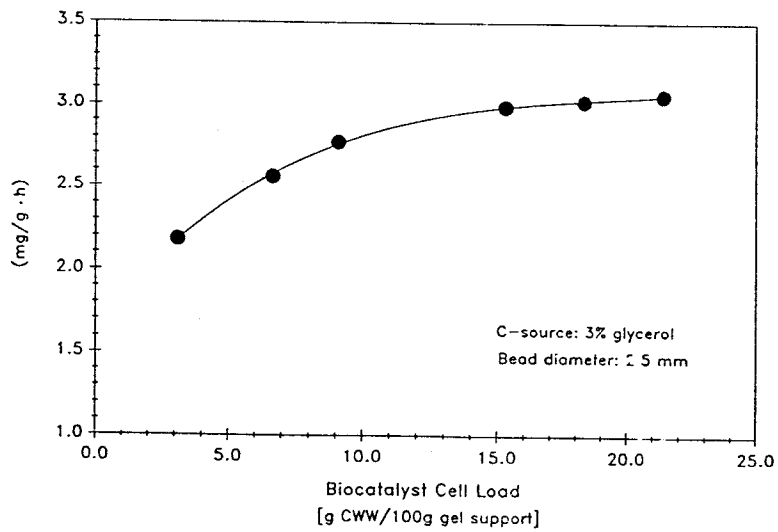


Fig. 6. Dependence of the specific rhamnolipid production rate on the cell loading.

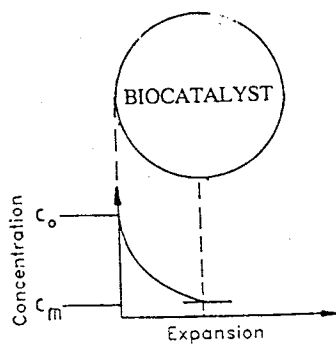


Fig. 7. Concentration profile inside a biocatalyst.

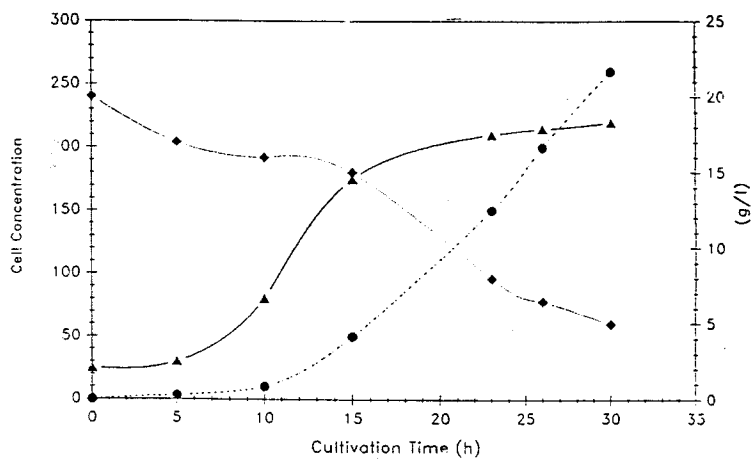


Fig. 8. Growing behavior of free and immobilized cells.

- : CDW(mg/100ml); ▲:CDW(mg/10g beads);
- ◆: Glycerol concentration(g/l)

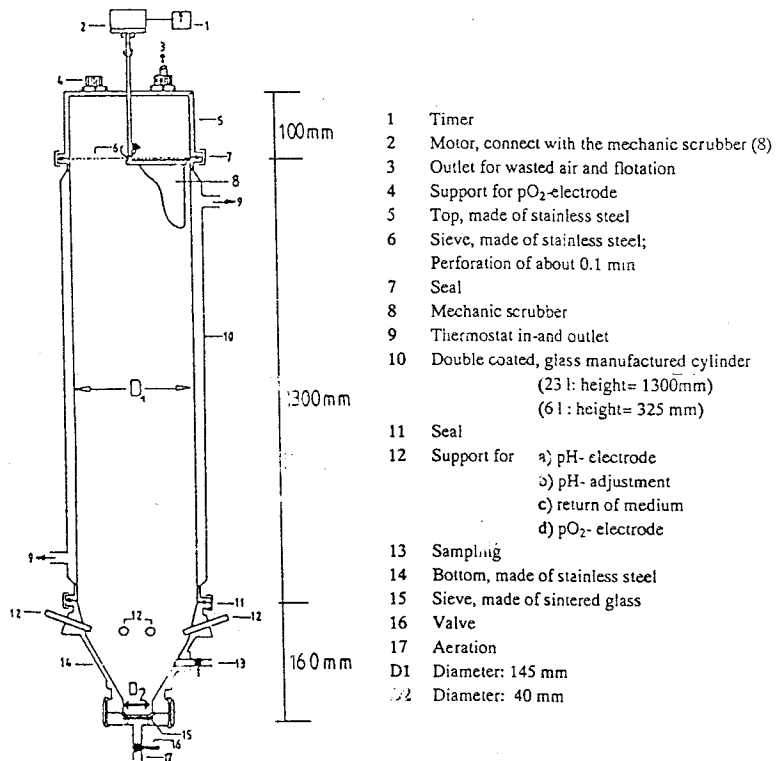


Fig. 9. Fluidized bed reactor.

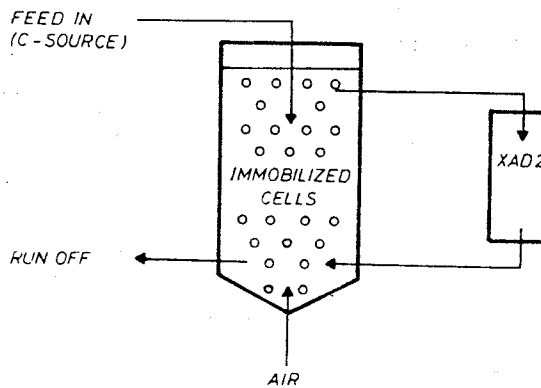


Fig. 10. Scheme of continual separation of rhamnolipids by XAD-2 column.

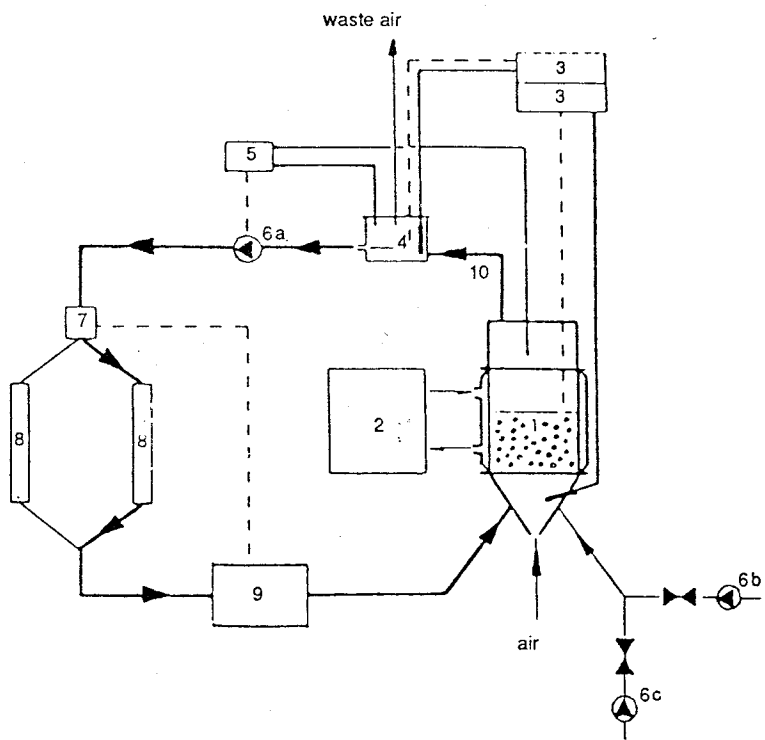


Fig. 11. Continuous production of rhamnolipids in a fluidized bed reactor and on-line separation of rhamnolipids.

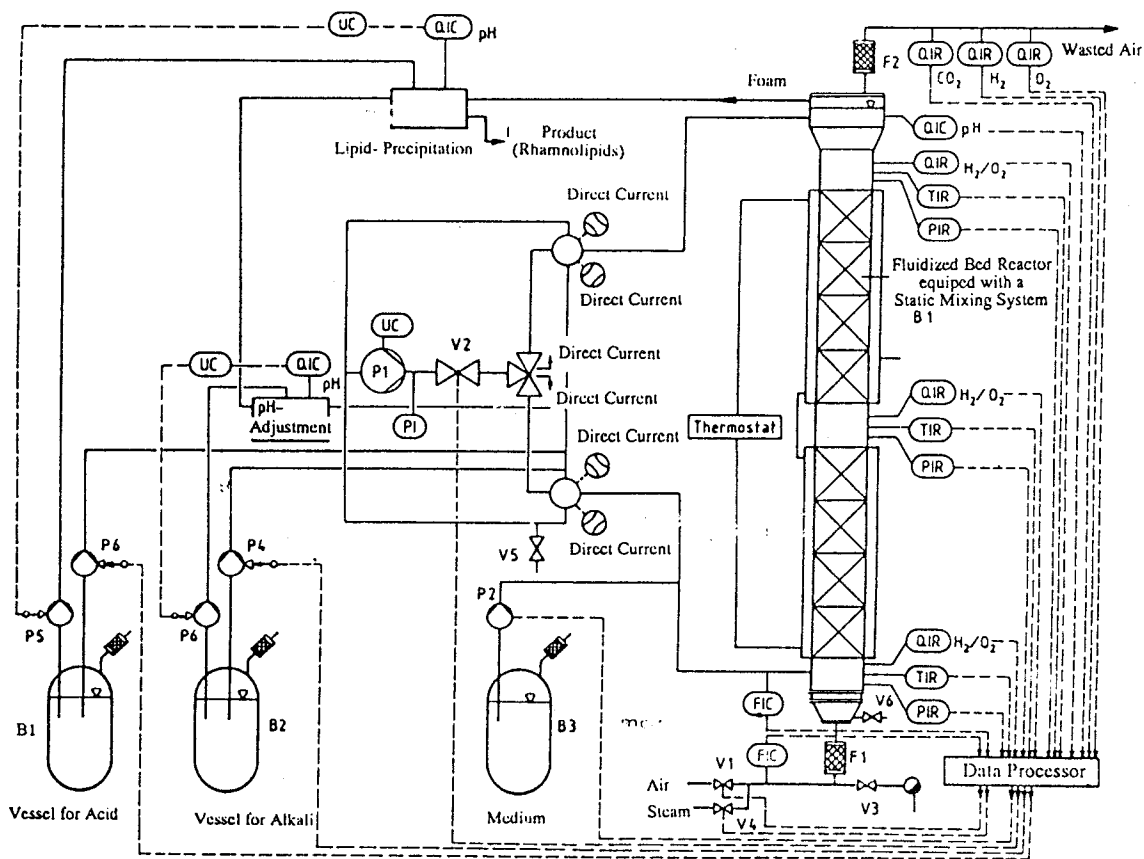


Fig. 12. Continuous three-phase fluidized bed process for rhamnolipid production.

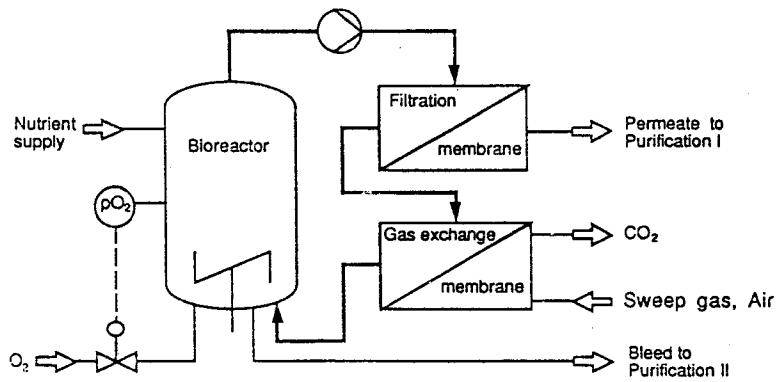


Fig. 13. Membrane bioreactor for rhamnolipid production.

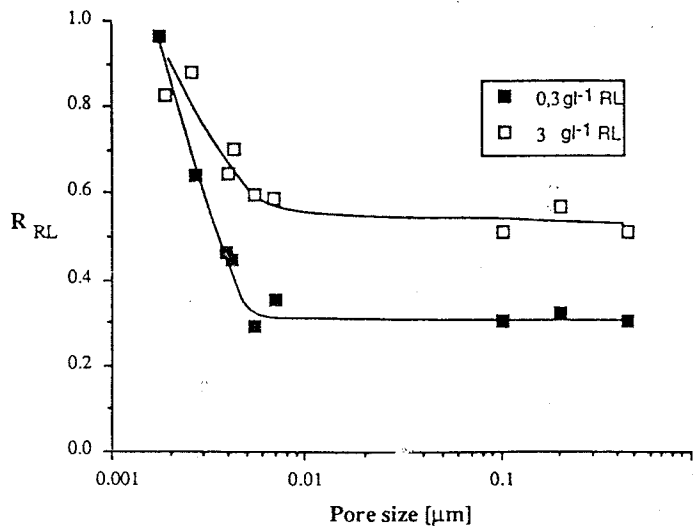


Fig. 14. Rhamnolipid retention characteristics.

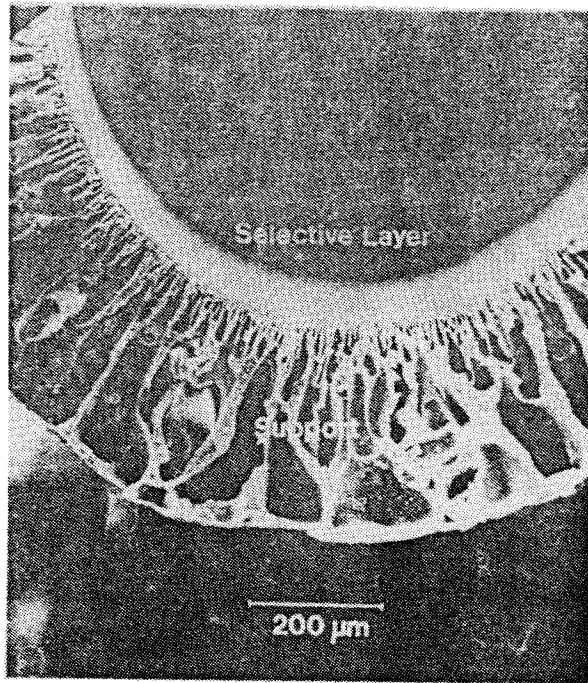


Fig. 15. Electron microscopic picture of the cross section of the gas exchange membrane.