

미생물이 생산하는 Biosurfactant의 생산과 응용

LG 화학 생활·건강 연구소 응용과학 연구팀

오 성 근

(1) 서론

계면활성제란 한 분자 내에 친수기와 소수기를 함께 갖는 양친매성 분자로서 계면에 선택적으로 배향흡착하여 계면의 성질을 크게 변화시키는 물질이다. 계면활성제는 계면의 성질을 변화시킴으로써 유화, 가용화, 분산, 응집, 세정, 기포, 대전방지 및 윤활 등의 다양한 작용을 나타내므로 이미 여러 산업 및 생활분야에 널리 사용되고 있다.

현재 연간 100만톤 이상의 합성계면활성제가 상업적으로 사용되고 있는데 표 1의 계면활성제 발달 과정에 나타난 바와같이 1960년대 말부터 합성계면활성제가 일으키는 환경오염, 공해문제 및 자연 생태계에 미치는 강한 독성에 대한 문제 등이 표면화되면서 안전성이 높고 생분해성이 우수한 계면활성제에 대한 연구가 활발히 전개 되었다.

따라서 기존의 탄화수소와 같은 비재활성 자원으로부터 화학합성에 의해서 계면활성제를 생산하는 방법에서 천연물 및 생물체로부터 계면활성제를 생산하려는 연구가 시작되었고 특히 1960년대 후반에 시작된 탄화수소를 발효원료로 한 “석유발효”의 연구 도중 미생물이 비교적 다량으로 다양한 종류의 계면활성제를 생산한다는 것이 알려지면서부터 생물계면활성제 즉 biosurfactant에 대한 본격적인 연구개발이 시작 되었다.

현재 진행중인 biosurfactant의 공업적인 생산은 주로 미생물 이용기술에 의존하고 있는데 그 이유는 다른 동·식물 세포에 비하여 미생물은 다루기가 쉽고 미생물종에 따라 다양한 종류의 계면활성물질을 얻을 수 있으며 성장속도도 다른 생물체에 비하여 훨씬 빨라 단시일내에 비교적 간단한 장치를 이용하여 다량의 biosurfactant를 생산해 낼 수 있는 장점이 있기 때문이다.

보통 biosurfactant라 하면 미생물에 의하여 생산되는 계면활성제를 지칭하며 현재 biosurfactant의 생산이 가능한 미생물은 세균(bacteria), 효모(yeast), 곰팡이(fungi) 등으로 그 종류도 수십종에 이르고 있다. 지금 현재 많이 연구중인 대표적인 biosurfactant로는 표 2에 나타난 바와같이 glycolipid류로 *ustilago*에 의

TABLE 1. 계면활성제 발전과정

시대	주요 사용 계면활성제	특 징
1910이전	SOAP	
1910	NAPHTHALENE SULFONATE	최초의 합성계면활성제 등장
1940	ALKYLBENZENE SULFONATE (ABS. 경성)	본격적인 합성계면활성제의 등장
1950 -1960	LINEAR ALKYLBENZENE SULFONATE (LAS. 연성)	ABS의 난 생분해성 및 고기포성 으로 인하여 연성세제로 바뀜
1970	ALKYL SULFATE (석유계) ALKYL ETHER SULFATE (석유계) α -OLEFINE SULFONATE (AOS)	OIL SHOCK로 인한 석유계 자원의 한계성 대두 및 천연 유지 산업의 성장
1980	FATTY ACID ISETHIONATE ALCOHOL계 계면활성제 (천연계) (AE, AES, AS)	계면활성제의 생분해성 및 환경에 대한 안전성 문제 대두
1990이후	당류계의 ALKYL POLYGLYCOSIDE 단백질계 계면활성제등의 저공해 계면활성제	BIOSURFACTANT의 성능을 지닌 계면활성제의 출현 예상. 생분해성 및 생체에 대한 무독성 및 안전성을 갖는 계면활성제

TABLE 2. Biosurfactants Produced by Microorganisms

Group	Compounds	Properties	Microorganisms
Glycolipids	Cellobioselipids	Anionic, extracellular	<i>Ustilago maydis</i> . <i>Ustilago zeae</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-di-mycolates	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>

TABLE 3 (Continued)

Group	Compounds	Properties	Microorganisms
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>
Lipopolysaccharides	Protein emulsifiers	Extracellular	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida petrophilum</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i>
	Emulsan	Polyanionic, extracellular	<i>Acinetobacter tumefaciens</i>
	Lipoteichoic acid	Extracellular	<i>Streptococcus sanguis</i>
Ornithinlipids/lysine-lipids	Lipopolysaccharides of different structures	Cell wall-bound	<i>Candida</i> , <i>Pseudomonas</i>
	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

*maydis*에 의해 생산되는 cellobioselipid, *torulopsis sp.*에 의한 sophorolipid, *pseudomonas sp.*에 의한 rhamnolipid등이 있다. 또한 lipoprotein류로 *bacillus subtilis*에 의해 생산되는 surfactin과 lipopolysaccharide 류로 *acinetobacter tumefaciens*에 의해 생산되는 emulsan등이 있다.

일반적으로 biosurfactant를 생산 할 수 있는 미생물은 수불용성 탄화수소류에 대하여 분해능을 갖는 미생물에서 발견되기 쉽다. 이는 수불용성 탄화수소를 분해하는 효소들이 미생물의 세포질내에 존재하므로 이러한 수불용성 탄화수소가 세포질 내로 들어가기 위해서 친수성 세포벽을 통과해야 되는 데 biosurfactant의 생산이 가능한 미생물들은 이온성 계면활성제를 생성, 세포외로 방출하여 배지 내에 존재하는 수불용성 탄화수소를 분산 또는 유화시켜 세포질 내로 유입되기 용이한 상태로 변화시키거나 또는 세포벽에 당지질이나 혹은 비이온성 계면활성제를 생성, 부착시켜 세포벽의 구조를 바꾸는 방법으로 수불용성 탄화수소가 세포질 내로 들어올 수 있도록 한다.

이와같이 화학적 합성계면활성제와는, 전혀 다른 생산경로 및 화학구조와 분자형태를 갖는 biosurfactant는 합성계면활성제보다 종류와 성질이 다양하고 자연 생태계에 미치는 독성이 거의 없는 것으로 알려져 있다. 또한 생분해성이 우수하기 때문에 오염 가능성을 감소시켜 산업적, 환경적 측면에서 합성계면활성제를 대체 할 수 있는 물질로서 기대되고 있다.

실제 biosurfactant는 석유에 의한 환경오염의 무공해 처리, 고갈된 유전으로부터 석유의 3차 회수, 타르산과 oil shell로부터 아스팔트 유분 회수등의 분야에 적용되어 공해방지 및 자원이용 측면에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 농업 및 식품분야, personal care products 등의 분야에서도 합성계면활성제를 대체 응용 할 수 있을 것으로 기대된다.

(2) Biosurfactant들의 계면물성

2.1 계면 에너지

Biosurfactant들의 산업적 응용과 관련하여 계면물성에 대한 많은 연구가 보고되었으며 표 3에 나타난 바와같이 synthetic deposit water (NaCl: 100 g/L, CaCl₂: 28 g/L, MgCl₂: 10 g/L)에서 *pseudomonas sp. DSM 2874*에 의하여 생산된 rhamnolipid나 *rhodococcus erythropolis DSM 43215*에 의하여 생산된 trehalose lipid등은 최대로 표면장력을 25-30 mN/m까지 감소 시킬 수 있으며 n-hexadecane과의 계면장력은 1 mN/m까지도 감소 시킬 수 있다. 또한 임계미셀 농도(CMC)도 5-200 mg/L 범위에 존재한다.

Table 3. Surface active properties of glycolipid from *Rhodococcus erythropolis* and *Pseudomonas sp.* in synthetic deposit water at 40 °C.

Surfactant	Minimum surface tension (mN/m)	CMC (mg/L)	Minimum Interfacial Tension (mN/m)	CMC (mg/L)
Trehalose-6-corynomycolate	32	3	16	2
Trehalose-6, 6'-dicorynomycolate	36	4	17	2
Trehalose-2,3,4,2'-tetraester	26	15	<1	10
Rhamnolipid RL1	27	10	<1	5
Rhamnolipid RL2	26	20	4	40
Rhamnolipid RL3	30	200	<1	200
Rhamnolipid RL4	25	200	<1	200

* Interfacial tensions were measured against n-hexadecane.

또한 *Arthrobacter sp.* DSM 2567에 의해 생산되는 mannose, glucose, maltose, cellobiose, maltotriose의 corynomycolates의 표면장력, n-hexadecane과의 계면장력 CMC등이 표 4에 표시되었다. *Arthrobacter paraffineus*에 의하여 생산되는 fructose-6-corynomycolates 와 sucrose-6-corynomycolate 는 30 mg/L의 농도에서 계면장력을 각각 25, 2 mN/m까지 감소 시킬 수 있는 것으로 보고되었다.

Table 4. Surface active properties of glycolipids from *Arthrobacter* sp. in synthetic deposit water at 40 °C.

Surfactant	Minimum surface tension (mN/m)	CMC (mg/L)	Minimum Interfacial Tension (mN/m)	CMC (mg/L)
Mannose-6-corynomycolate	40	5	19	50
Glucose-6-corynomycolate	40	10	9	20
Maltose-6-corynomycolate	33	1	1	20
Maltose-6, 6'-dicorynomycolate	46	10	13	10
Cellobiose-6-corynomycolate	35	3	1	4
Maltotriose-6,6',6''-tricorynomycolate	44	20	19	10

* Interfacial tensions were measured against n-hexadecane.

2.2 Biosurfactant의 유화력

계면활성제는 친수성과 소수성의 상대적인 세기를 나타내는 HLB (Hydrophile-Lipophile Balance)에 따라 그 용도가 다음과 같이 결정된다.

Surfactant solubility in water	HLB number	용도
No dispersibility	0 - 2	
Poor dispersibility	2 - 4	w/o 유화제
Milky dispersion	6 - 8	wetting agent
Translucent	10 - 14	o/w 유화제
Clear solution	16 -	가용화제

표 5에 대표적인 biosurfactant들의 HLB수와 응용 가능한 분야에 대하여 표시 되었다. 표에서와 같이 glyceride류는 w/o 유화제, rhamnolipid류 등은 o/w 유화제 및 가용화제 등에 응용이 가능하다.

유화란 서로 섞이지 않는 두 액체가 계면활성물질 혹은 고체입자들의 작용에 의하여 한 액체가 다른 액체내에 작은 입자 형태로 분산 되는 현상을 말한다. 이러한 유화 현상은 식품, 화장품, 농약, 페인트, 의약품 등 여러 공업분야에 광범위 하게 사용된다. Emulsion은 열역학적으로 불안정하므로 최종에는 상분리가 일어나며 분산된 입자의 크기에 따라 외형이 변한다. 입자의 크기가 1 μm 이상일 때는 milky white, 0.1-1.0 μm 까지는 bluish white, 0.03-0.1 μm 까지는 half transparent이고 0.03 μm 에서는 투명한 외관을 갖는다.

형성된 emulsion은 다음과 같은 aging process를 거쳐 상분리가 일어난다. 그 첫단계로 비중차에 의하여 분산된 입자들이 가벼운 액체가 위로 뜨는 creaming, 액체의 identity를 유지하며 서로 뭉치는 flocculation과 입자들이 완전히 합쳐지는 coalescence 과정을 거친다.

Flocculation kinetics은 구형 입자들이 확산에 의해 만나는 속도는

Table 5. The Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) Scale and the Calculated HLB for Some Biosurfactant Classes^{a, b}

Biosurfactant Class	HLB Values	Representative Producing Microbes
Trehalose dimycolate and diacyl trehaloses	32 18 14 (-12)	<i>Arthrobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i>
Diglycerides	16 14	<i>Acinetobacter</i> , <i>Mycobacterium</i>
Diglycosyl diglycerides	18 16 14	<i>Lactobacillus</i>
Mycolic and carboxylic acids (ionized)	60 45 35 18 14	<i>Acinetobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> , <i>Mycobacterium</i>
Monoglycerides	18 14	<i>Torulopsis</i> yeasts
Sophorose lipids	21 16	<i>Arthrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>
Rhamnolipids	R1 R2	<i>Arthrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>
Diacyl phosphatidic acids	20 18	<i>Corynebacterium</i>

^a Numbers for each class indicate carbon chain length of the hydrophobic moiety

^b Typical producing organisms are shown; see COOPER and ZAJIC (1980) for other producing species and biosurfactant structures

$$R = 16 \pi D r n^2$$

으로 주어지며 r 은 입자의 반경, D 는 확산 계수이다. 또한 Stokes-Einstein식에 의하여

$$D = \frac{kT}{6 \pi \eta r}$$

이며 만일 합일이 일어나기 위하여 에너지 장벽 E^* 가 존재한다면 단위 부피당 입자 수 n 의 변화속도는 다음과 같이 된다.

$$\frac{dn}{dt} = -kn$$

이고

$$k = \frac{8kT}{3\eta} e^{(-E^*/kT)}$$

여기서 dn/dt 는 입자들의 합일 속도이며 적분에 의하여

$$\frac{1}{n} = \frac{1}{n_0} + kt$$

와 같은 식으로 표현된다.

여러가지 천연계면활성제와 *Acinetobactor*를 이용하여 생산한 biosurfactant를 다음과 같은 조성으로 emulsion을 만들어 안정도를 측정하였다.

유화조성:

cetostearyl alcohol	: 3.0 %
arlacel 165	: 0.5 %
isopropyl palmitate	: 4.0 %
liquid paraffin	: 20.0 %
water(5.0 % PG 용액)	: to 100 %

surfactant (commercial name)	source of surfactant	1 day	7 days
Mucrossi ext.	Ext. of mucrossi	0/9	0/9
Sun-lecithin	Lecithin	0/9.5	0/9.5
TENSAMI 4/07	Soy protein xanthan gum	0/9.3	0/9.3
TENSAMI 3/06	Milk protein xanthan gum	0/9.3	0/9.3
TENSAMI 1/05	Lecithin xanthan gum	0/9	0/9
Ethoxylated sitosterol E5	Sitosterol (EO) 5	0/9.2	0/9.2
Ethoxylated sitosterol E50	Sitosterol (EO) 50	0/9.2	0/9.2
Lyso lecithin	Lyso lecithin	0/9	0/9
Ecolome DN-4	Sugar ester+polymer	0/9	0/9
TENSAMI 8/09	Egg york extract	0.3/9.2	0.8/9.2
Amigel powder		0.3/9.2	1/9.2
Biosurfactant	Microbial surfactant	0.9/8.4	1/8.4
Thio-glycyrrhizinic acid	Glycyrrhizinic acid	0.8/9.2	1.5/9.0
TENSAMI 10/06	Saponins xanthan gum	1/8.7	1.5/8.
Kirayanin P-20	Saponins	1.5/9.	1.8/9.
Primal sitosterol	Wood-derived phytosterol	1.7/9.	2.5/9.
Glycyrrhizinic acid	Glycyrrhizinic acid	2.8/9.	3.3/9.
Lecinol S-10M	Hydrogenated lecithin	0.3/9.	3.8/9.

$$\text{안정도} = \frac{\text{height of water phase separated}}{\text{total height of emulsion}}$$

(3) Biosurfactant의 생산

3.1 생산공정

Biosurfactant를 생산하기 위한 전형적인 공업적 process가 그림 1과 2에 표시되었다. 그림 1은 n-paraffin protein process, 그림 2는 gas-oil process를 위한 도식도이다. 위 두 process모두 BP에 의하여 개발 되었으며 그림 1은 sterile 조건하에 운전되며 mineral과 growth factor들이 열교환기를 통하여 연속적으로 투입되고 n-paraffin은 sterilization system 바로 앞에서 투입된다. 공기는 sterilization filter를 통하여 반응기 내로 유입되며 질소는 air supply내로 유입되는 암모니아 가스에 의하여 공급된다. 공정 중에 발생하는 열은 열교환기에 의하여 제거되며 product stream은 연속적으로 회수되어 15-20 %의 solid가 되도록 원심 분리 시킨다. 마지막으로 yeast cream은 살균 후 spary-dry 시켜 회수한다.

그림 2는 gas-oil process로서 non-sterile공정이므로 feed stream들이 살균 공정을 거치지 않는다. 그러나 non-metabilized hydrocarbon이 product로부터 분리되어야 하므로 harvesting route가 매우 복잡하다. 처음에 product stream이 용기내로 투입되어 yeast를 분리 시킨 후 원심분리하여 대부분의 residual gas-oil를 제거한다. 그리고 yeast를 건조 시키고 미량의 나머지 gas-oil은 연속식 추출기를 통하여 제거한다. 마지막으로 건조기 내에서 용매를 세포로부터 분리한 후 재사용을 위하여 증류로 회수한다.

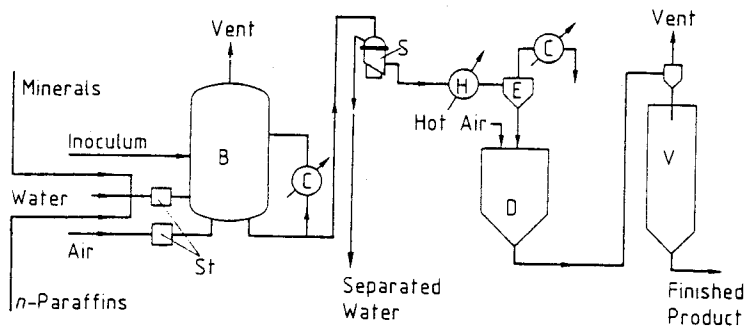


Figure 1. Flow diagram for BP n-paraffin protein process. S:separator, St:sterilizer, C:coller or condenser, H:heater, B:bioreactor, E:evaporator, D:dryer, V:storage vessel.

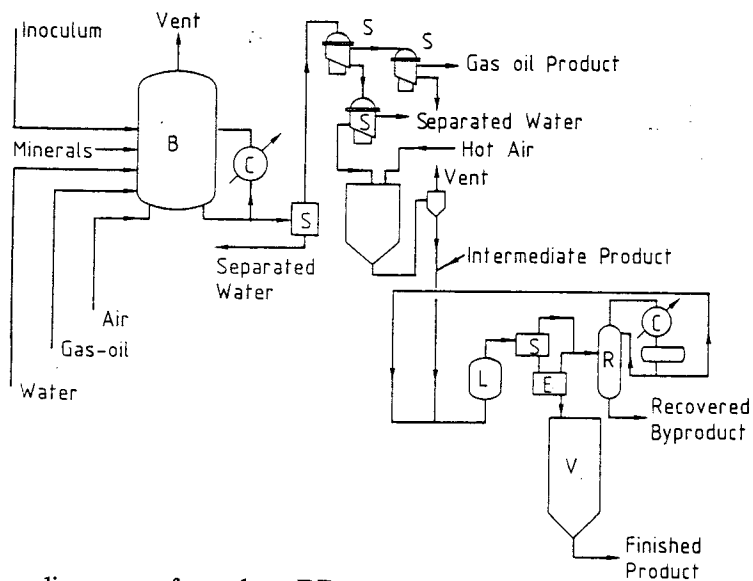


Figure 2. Flow diagram for the BP gas-oil protein process. L:leaching, R:recovery column.

3.2 Bioreactor Design

탄화수소를 c-source로 이용하여 biosurfactant의 생산에 이용되는 여러 종류의 bioreactor들이 그림 3에 표시되었다 (classical stirred tank reactor, stirred tank reactor with draft tube, air-lift design, Kanegafuchi-design, deep jet reactor, jet loop reactor). 이러한 bioreactor들의 설계시 중요시 되는 parameter 들은 (1) microbial system으로의 효과적인 산소전달, (2) alkane의 분해속도를 증진 시키기 위한 emulsification, (3) 생산 공정중에 발생하는 다량의 열을 제거 시킬 수 있는 효과적인 냉각 system 등 이다.

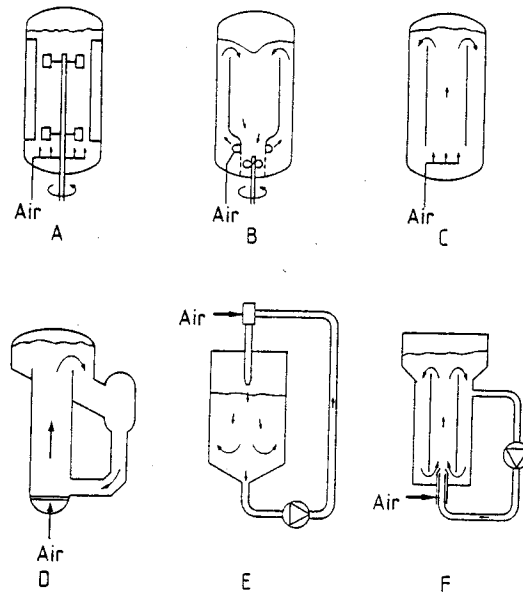


Figure 3. Bioreactor designs which have been used for the production of microbial biomass from hydrocarbon. (A) Stirred tank with baffle, (B) Circulation stirrer with emulsifying sieve plate, (C) Air-lift design, (D) Kanegafuchi air-lift design, (E) Deep jet aerator and (F) Loop-reactor.

3.3 Economic aspect

Biosurfactant가 효과적으로 산업에 이용되기 위하여는 다음 4가지 조건을 만족시켜야 된다.

- (1) cheap substrate
- (2) cheap process
- (3) high biosurfactant yield
- (4) highly surface active biosurfactant with specific properties for specific application.

다음 표는 범용 계면활성제와 biosurfactant의 단위 kg당 가격을 나타낸다.

product	price/kg (\$)
alkylbenzene sulfonate	0.6
paraffin sulfonate	0.7
oxethylates	1.0
Food surfactant	1.80
preseving surfactant	2.50
biosurfactant	≐10.0

참고문헌

1. N. Kosaric, W.L. Cairns and N.C.C. Gray, "Biosurfactant and Biotechnology (Surfactant science series vol. 25)", Marcel Dekker, Inc., New York (1987).
2. A. Einsele, "Biomass from higher n-alkane" in Biotechnology, H.J. Rehm and G. Reed ed., Verlag chemie.
3. 황경아, 김윤석, 안호정 and 최규석, J. of Korean Ind. & Eng. Chemistry 6, 562 (1995).
4. F. Wagner, Proc. world conf. Biotechnol. Fats Oils Ind., 189 (1988).
5. G. Georgiou, S.C. Lin and M.M. Sharma, Bio/Technology 10, 60 (1992).
6. D.G. Cooper and J.E. Zajic, in "Advances in Applied Microbiology" vol.26, 229 (1980).
7. D.G. Cooper, J.E. Zajic and C. Denis, J. of Am. Oil Chem. Soc., January, 77 (1981).
8. 고정삼, 고희환, 김권수, 양상호 and 강경수, Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20, 477 (1992).
9. Y. Zhang and R.M. Miller, Applied and Environmental Microbiology, October, 3276 (1992).

