

당 지질계 미생물 계면활성제에 관한 연구(제2보) - *Pseudomonas sp.* 13에 의한 Rhamnolipid의 생성 및 분리 -

이선주 · 남기대 · 박흥조*

충북대학교 공과대학 공업화학과
* 충주산업대학 화학공학과

Studies on the Glycolipid Biosurfactant(2) - The Rhamnolipid Production and Isolation by *Pseudomonas sp.* 13 -

Lee, Sun - Ju · Nam, Ki - Dae · Park, Heung - Jo

Dept. of Industrial Chemistry, Chungbuk National University
* Dept. of Chemical Engineering, Chung ju Industrial Collegy

ABSTRACT

A microorganism, isolated from soil and designated *Pseudomonas sp*13, produced two kinds of rhamnolipid in the medium containing glucose as carbon source. There were both rhamnolipid contain *L*-rhamnose and β -hydroxydecanoic acid. Coumpound A and B elucted chloroform-methanol mixed solution of silicic acid column chromatography and recrystallized from a mixture of ether and n-hexane.

Studies on the structure of these products reveled that compound A is *L*-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid and coumpound B is *L*-rhamnopyranosyl-*L*-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid.

I. 서 론

계면활성제는 한 분자내에 친수기와 친유기가 공유하는 양친매성 물질을 말하는 것으로 그의 기능은 생물학적으로나 근대 공업사회에 있어 빼 놓을 수 없는 중요한 물질이다. 유지화학 기술과 석유화학 기술에 있어 개발 제조되고 있는 현재의 합성계면 활성제는 의·식·주의 가정생활과 여러가지 각종 공업분야에 직·간접적으로 널리 이용되고 있다. 또한 근대 사회의 발전에 중요한 기능과 역할을 하고 있으며, 계면활성제 공업에 대해서도 고도의 새로운 기능을 갖는 미생물 계면활성제에 대한 개발 요청이 제기되

고 있지만, 미생물 종류에 대한 제약이나 제조기술의 곤란 등으로 이의 요구에 대해 충분히 만족시켜 주지 못하고 있다. 또한 미생물 세포의 구성 물질 중 약 70%가 수분으로 이루어져 있어 생물체는 이 많은 물의 환경 아래에서 다종 다양한 생체 물질군이 정밀한 구성에 따라 질서있게 생명을 이어가고 있다. 그 복잡하고 다양한 계면 질서에 따라 없어서는 안되는 물질로 계면활성물질이 중요한 기능과 역할을 맞고 있다.

생물계에는 현재 쓰이고 있는 합성 계면활성제와는 구조적으로나 기능적으로 전혀 다른 계면활성물질이 많이 존재하고 있다고 보고되고 있으며¹⁻³⁾, 생물계는 계면활성물질의 연구에 있어서는 아직 커다란 미지의 세계이다. 고등 동식물에 있어 계면활성물

질의 존재량이 적고, 분리 제조 등의 어려움으로 인해 얼마 안되는 레시틴, 사포닌, 담즙산 등 겨우 몇 가지만 이용되고 있어 아직 요원한 연구과제이다.¹⁾

미생물계면활성제란 넓은 의미에서 미생물이 세포 내 외부에서 생산하는 계면활성제 전체에 대한 총칭이지만, 일반적으로 균체의 물질을 가르킨다. 이 미생물 계면활성제는 합성 계면활성제에서는 볼 수 없는 구조와 기능을 갖고 있어 전혀 다른 성향을 보여 주고 있으며, 생분해성이 좋고 독성이 아주 낮은 것이 그의 특징이다.

*Pseudomonas aeruginosa*에서 처음으로 rhamnolipid를 분리한 사람은 Jarvis⁵⁾로 보고 되었으나 이를 개발하기에는 오랜 시간 경과하지 않으면 안되었다. 그 후 Burger⁶⁾와 Hisatsuka⁷⁾ 등이 *P. aeruginosa*의 발효 연구 중에 n-alkane을 유화 분산시키는 계면활성 물질이 배양액에서 축적되는 것을 분리하여 구조 분석한 결과 Jarvis가 분리한 물질과 같음을 알았다. 이후의 여러 연구에서 *P. aeruginosa*는 rhamnolipid를 생산한다는 것이 밝혀 졌다.^{8, 9)}

최근에는 석유의 삼차회수(Microbiol Enhanced Oil Recovery)에 대한 관심이 고조되고 있으며^{10, 11)} 이것은 유정에 절대 혐기성 미생물을 투입하여 남아 있는 원유를 발효시키거나 점도를 감소시켜 채취하는 것으로 많은 연구가 진행되고 있다.

본 연구는 탄소원으로 물에 유화되기 어려운 탄화수소는 공학적인 면에서 정교한 설비와 많은 에너지가 필요하므로, 물에 유화되기 쉬운 글루코스를 사용하고, 토양으로부터 분리한 *Pseudomonas sp.* 13을 이용하여 rhamnolipid A와 B를 분리하고 확인하였다.

II. 실험방법

1. 미생물

토양으로부터 분리한 미생물 *Pseudomonas sp.* 13을 nutrient agar plate에 평판 배양시킨 후 이것을 nutrient broth에 1일 회분 배양시키고 0.85%의 글리세린을 첨가하여 교반한 뒤 deep freezer에 -30°C 로 고정시킨 후 보관하였다.

2. 배 양

기본배지로 NaNO_3 1.5g, K_2HPO_4 1.1g, KCl 50

mg, NaCl 50mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20mg을 증류수 1l에 용해시키고 1N-KOH를 이용하여 pH 6.3으로 조정하였다.¹²⁾ 탄소원으로는 글루코스(for Bacteriology, Fluka, Swiss)를 이용하여 1l 당 20g으로 최적조건으로 얻었다. 이 용액을 500ml 플라스크에 250ml에 넣고 *Pseudomonas sp.* 13이 배양된 nutrient broth를 5ml 접종하였다. 이 용액을 진탕배양기에 넣고 속도를 rpm 130으로 고정시킨 후, 온도를 30°C 로 조정하고 96hr 동안 배양시켰다.

3. 당지질의 분리 및 정제

당지질의 분리방법을 Fig. 1에 표시하였다. 즉 배양이 끝난 배양액을 원심분리하고(rpm 8000, 15 min), 상등액을 여과한 후(Whatman membrane filter, Pore size $0.2\mu\text{m}$), 황산으로 pH 2로 조절한 후에 테르로 추출하여, 탈수, 농축 후 silicic acid(Aldrich, USA) column($25 \times 500\text{mm}$)을 이용하여 hexane 및 chloroform으로 불순물을 제거한 후 chloroform-methanol(95:5, v/v) 혼합액으로 용출하여 2종류의 당지질 A와 B를 분리 회수하였다. 각 용출액을 농축 후 rhamnolipid A와 B는 ether-n-hexane(8:2, v/v)혼합액에서 재결정 하였다.

4. 당지질의 가수분해

산 가수분해는 시료 0.5~1%를 함유한 dioxane-2-N- H_2SO_4 (1:1, v/v)을 끓는 물에서 2시간 동안 행하였다.

5. 당지질의 과요오드산화

당지질의 과요오도산화는 Edwards¹³⁾와 같은 방법에 의해 행하였다. 즉 시료 약 150mg을 100ml의 NaHCO_3 용액에 녹이고 0.02M- NaIO_4 100ml를 혼합하여 pH 5.6~5.8로 조정하고 5°C 에서 어두운 곳에서 144시간 동안 반응시켰다. 이 반응액 3ml에 포화 NaHCO_3 수용액 10ml, 0.01M- NaAsO_2 , 5ml, 20% KI 1ml를 순서적으로 첨가하고 15분간 방치한 후 0.01M- I_2 로 적정하였다.

6. 얇은막 크로마토그래피

당지질의 분석은 silicagel plate($3 \times 10\text{cm}$)를 이

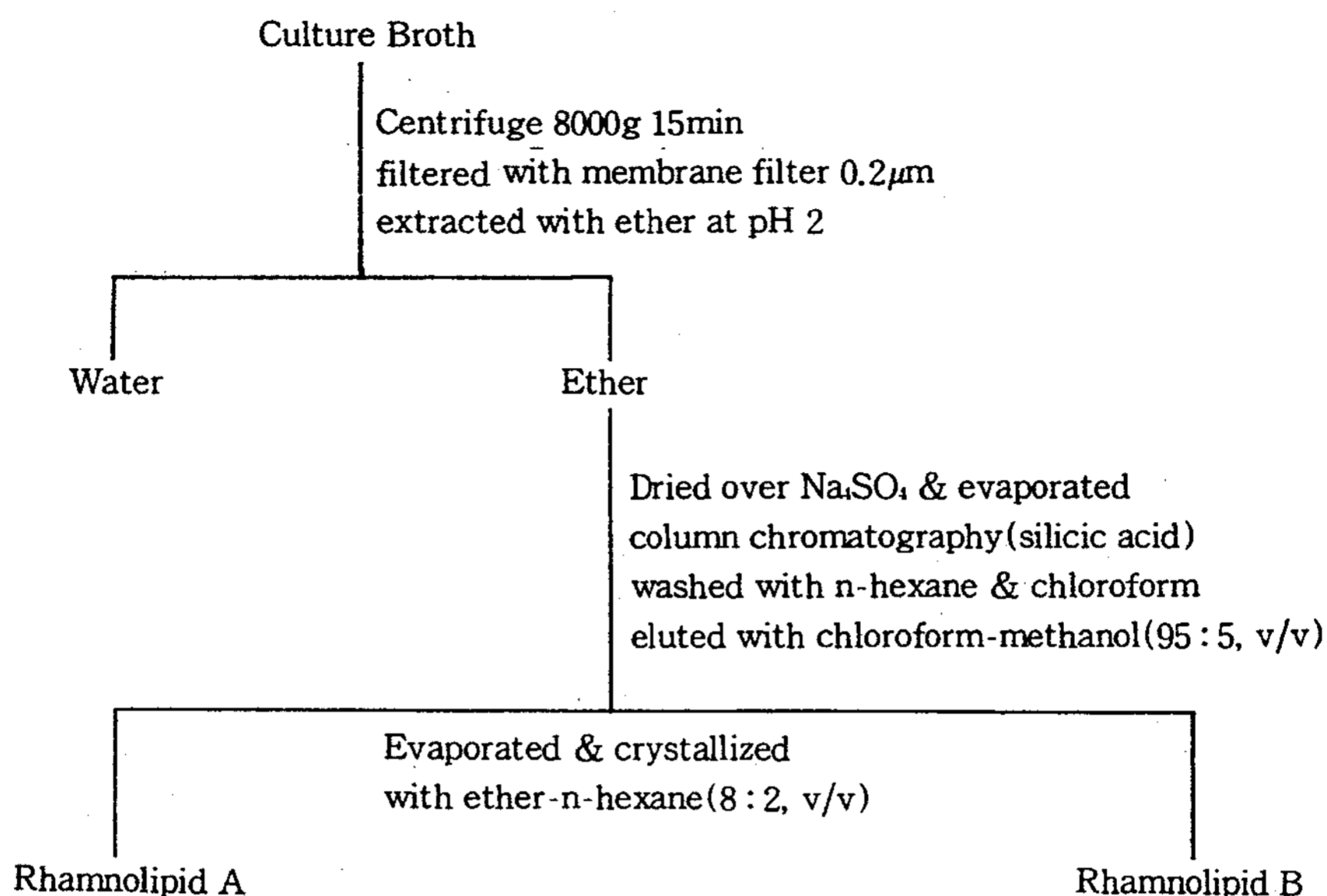


Fig. 1. Isolation of rhamnolipid.

용하여 benzene-acetone-methanol-6N-NH₄OH(3:3:3:0.5, v/v) 및 chloroform-methanol-t-butanol-6N-NH₄OH(6.5:2:1:0.4, v/v)를 전개용매로 사용하였으며, anthrone 0.2g을 황산100mL에 녹인 후 분무하여 발색시켰다. 또한 과요오드산 산화 후 분해생성물의 분석은 silicagel plate를 이용하여 n-butanol과 ethyl acetate-pyridine(10:3, v/v)을 전개용매로 사용하여, 과요오드산, benzidine순으로 분무하여 발색시켰다.

7. 적외선 스펙트럼(IR)

적외선 스펙트럼은 Javisco IR Report 100(Japan)을 사용하여 측정하였다.

8. 핵자기 공명스펙트럼(NMR)

핵자기 공명스펙트럼은 Varian EM-360(¹H NMR 60MHz)를 이용하여 행하였다.

III. 실험결과 및 고찰

1. 당지질의 생성

미생물 *Pseudomonas sp.* 13을 이용하여 글루코스

2%의 기본 배지를 사용하여 96hr 배양하였다. 배양액이 배양되기 시작하여 24hr 경과 후 기포가 생성되었으며 96hr 후에는 플라스크 상부까지 기포가 발생하였다. 이 배양액을 원심분리 한 후 황산을 사용하여 pH 2로 적정하고 에테르로 추출하여 TLC로 분석하였다. Fig. 2에 anthrone 황산으로 분무하여 두개의 푸른색 점적이 나타나므로 2종류의 당지질이 생성된다는 것을 확인하였다.

2. 당지질의 분리 정제

Fig. 1의 분리과정으로 당지질을 분리하였다. Fig. 3에 silicic acid column에 의한 당지질의 검량곡선을 표시하였다. 각각의 용출액의 일부를 anthrone 황산으로 가열발색 하여, 620m μ 의 흡광도로 측정하였다. Fraction No 40까지는 rhamnolipid A가 용출되었으며 fraction No 40 이후 100까지 rhamnolipid B가 용출되었다. Column에서 용출한 용출액을 정제하여 rhamnolipid A와, 후에 용출된 용출액으로 rhamnolipid B의 백색 결정(Mp. :81~82 $^{\circ}$ C)을 얻었다. 배양액 1L 당 rhamnolipid A는 1.2g, rhamnolipid B는 2.1g을 정제하여 얻었다.

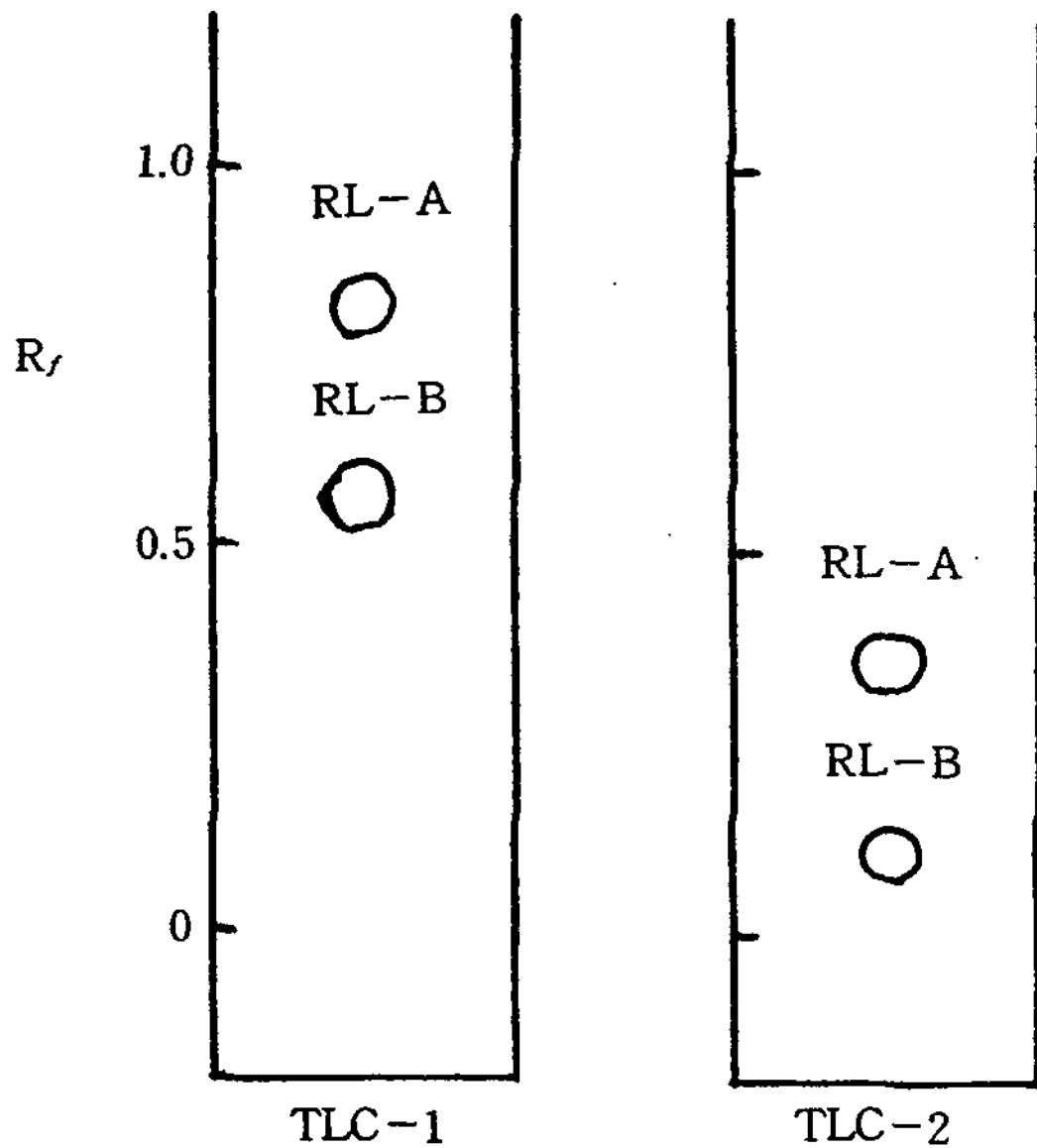


Fig. 2. Thin layer chromatogram of rhamnolipid.
Thin layer : silica gel
Developer : for TLC-1, benzene-acetone-MeOH-6N-NH₄OH (3:3:3:0.5, v/v)
for TLC-2, CHCl₃-MeOH-t-BuOH-6N-NH₄OH (6.5:2:1:0.4, v/v)
Spray : anthrone-H₂SO₄

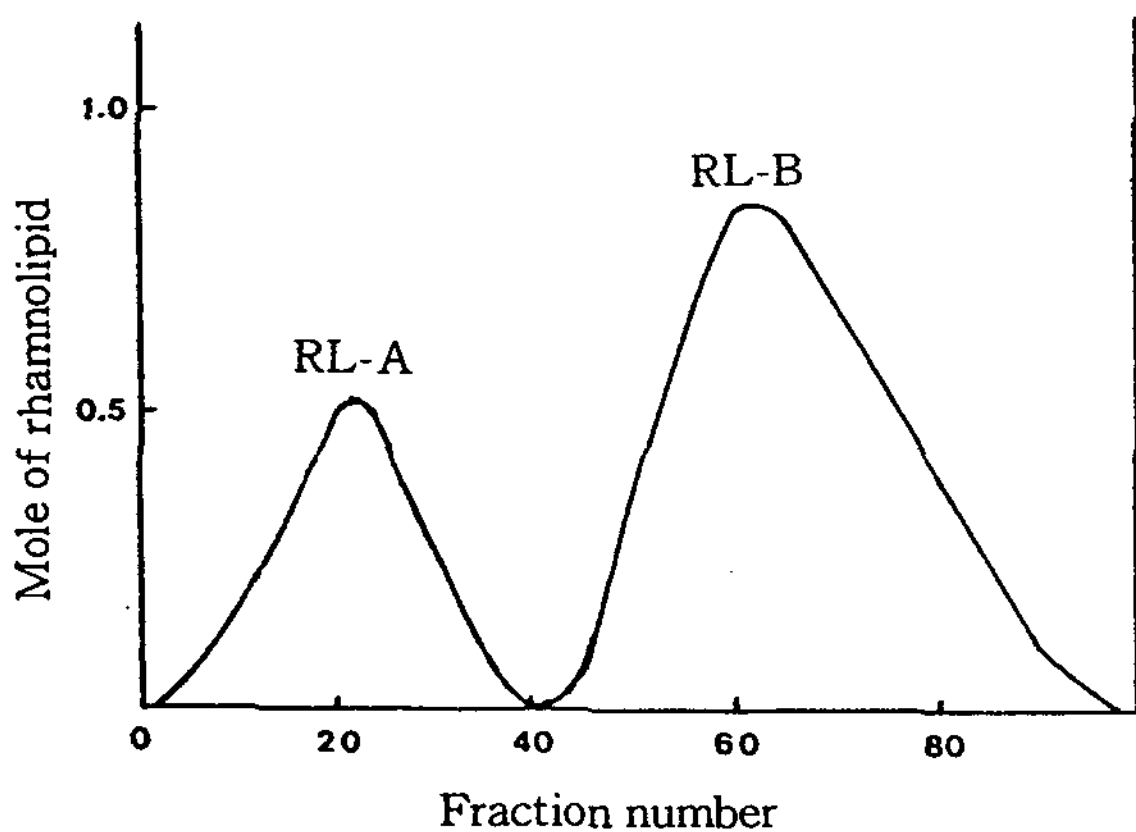


Fig. 3. Fraction of rhamnolipid on silicic acid column.
Column size ; 2.5×500mm
Developer : chloroform-methanol (95:5, v/v)

3. 구성성분의 분리 확인

2종의 당지질의 구성성분을 분리하기 위한 실험을

Fig. 4에 표시하였다. rhamnolipid A와 B를 2N H₂SO₄-dioxane(1:1, %)으로 2hr 동안 끓는 물에서 산 가수분해하여 배당체결합을 절단한다. 이 산 가수분해한 용액을 에테르로 추출하여 농축 건조시켜 결정을 석출한다. 이 결정의 IR, NMR의 결과 β-hydroxydecanoic acid임을 확인하였다. 이 결과를 Fig. 5와 6에 도시하였다.

에테르로 추출하고 남은 용액을 농축 후 Ba(OH)₂로 중화시키고 이온교환수지 amberlite IR-120(H⁺)와 IR-4B(OH⁻)을 통과시켜 불순물인 염을 제거시킨다. 이온교환수지를 통과한 용액을 감압농축하여 백색 결정을 얻었다. 이 결정의 녹는 점과 표준 L-rhamnose와 같이 TLC와 IR spectra를 이용하여 L-rhamnose임을 확인하였다. 이 결과를 Fig. 7에 도시

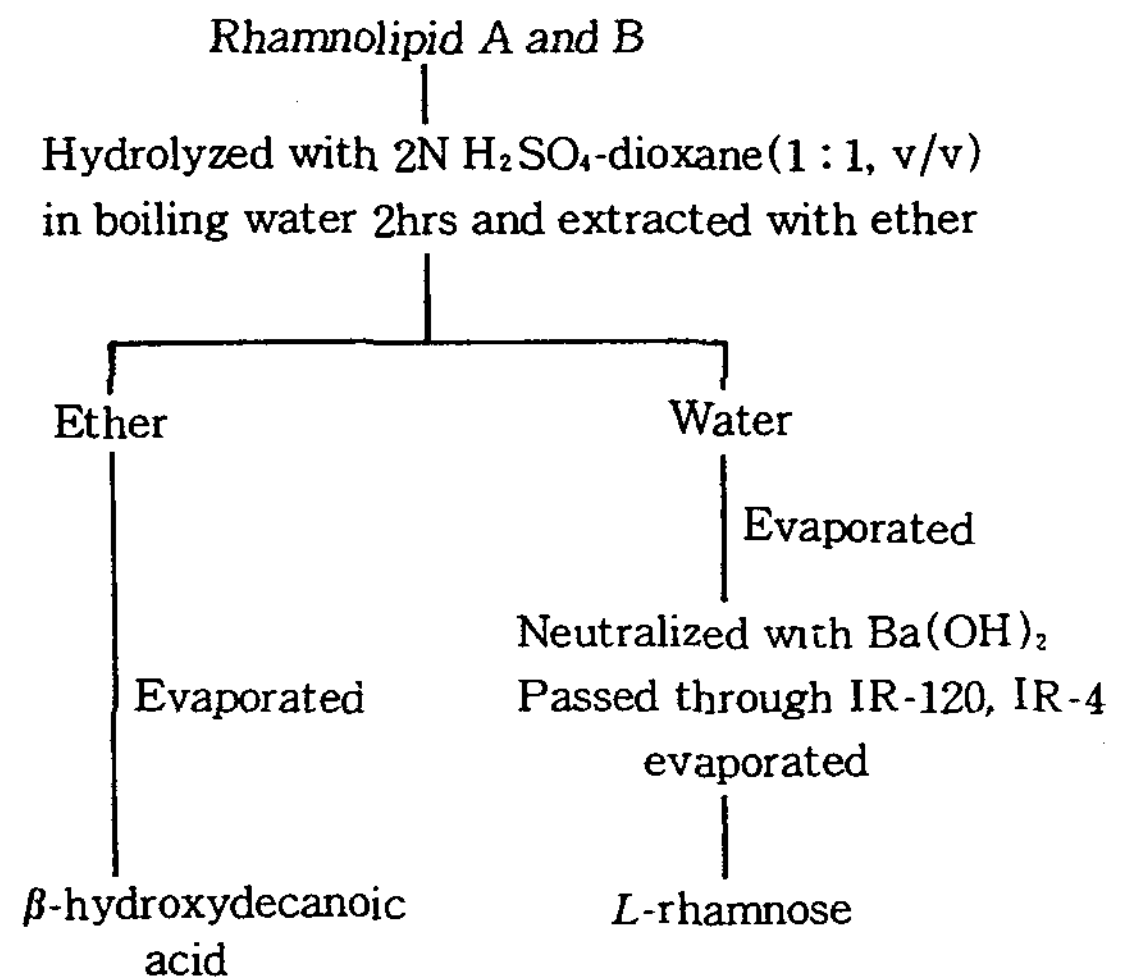


Fig. 4. Isolation of rhamnolipid component.

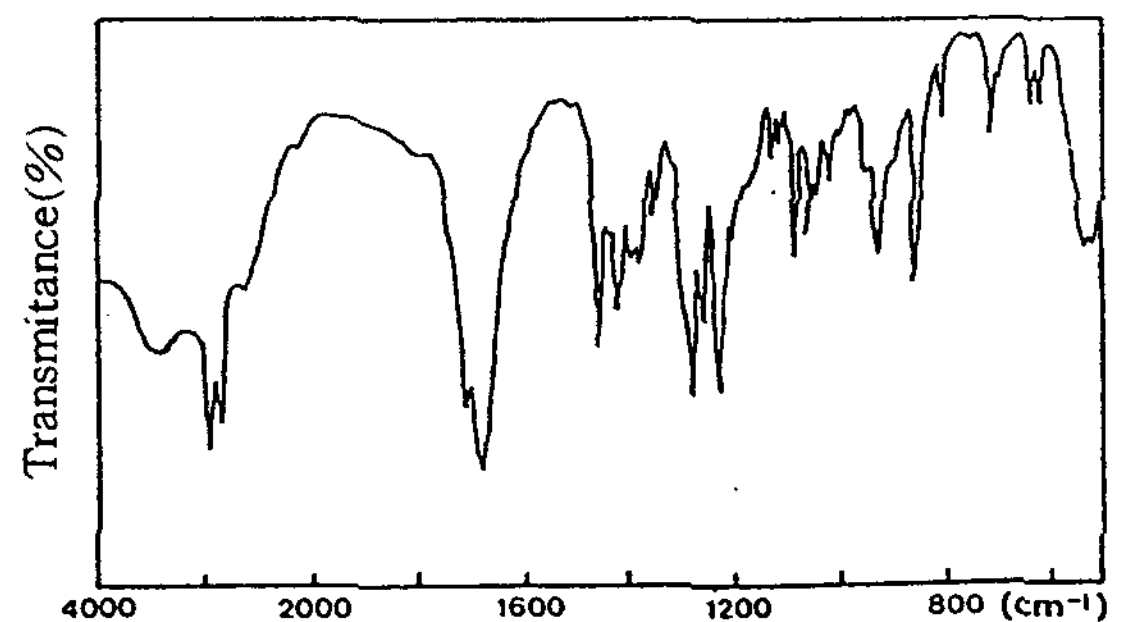


Fig. 5. IR of β-hydroxydecanoic acid from rhamnolipid.

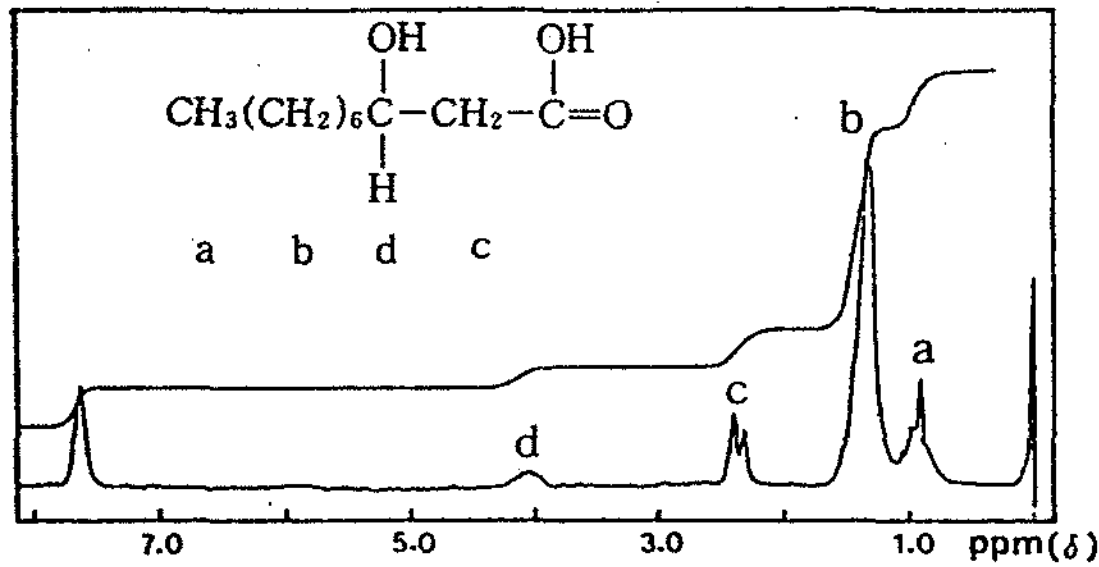


Fig. 6. ¹H NMR of β-hydroxydecanoic acid from rhamnolipid.

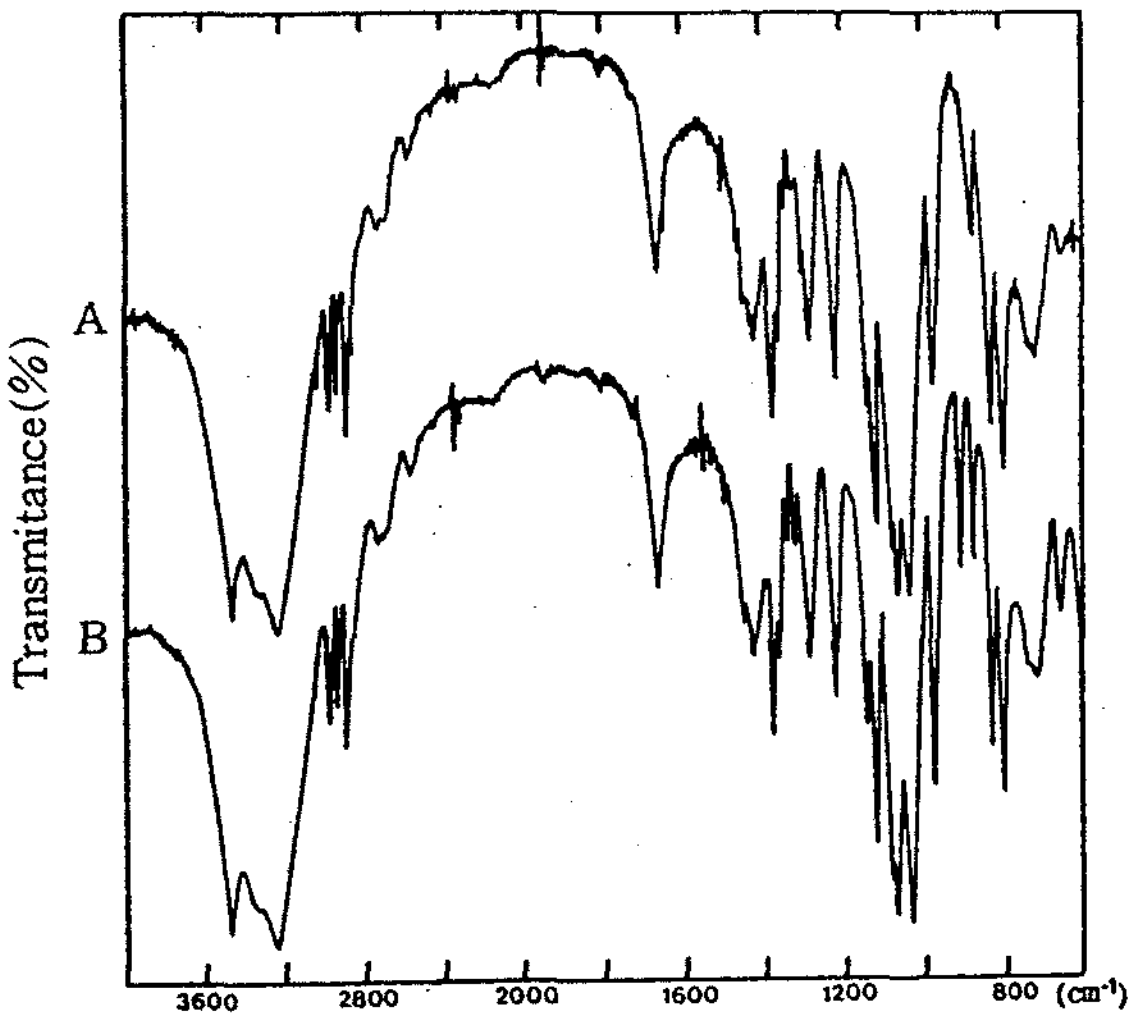


Fig. 7. IR of *L*-rhamnose from rhamnolipid and authentic *L*-rhamnose monohydrate.

A: *L*-rhamnose from rhamnolipid.
 B: Authentic *L*-rhamnose monohydrate.

하였다.

4. 당지질의 구조

2종류의 당지질 rhamnolipid A와 B의 구조를 밝히기 위하여 산 가수분해 후 환원력의 변화하는 결과를 알아 보았다. Rhamnose의 환원력은 小林達吉법¹³⁾에 의해 구하였다. 약 2hr의 가수분해에 의해 rhamnolipid A는 1mol의 rhamnose를, rhamnose B는 1.9mol의 rhamnose를 유리하였다. 이 결과를 Fig. 8에 도시하였다. 이 결과로 보아 rhamnolipid A는 하나의 rhamnose기를 rhamnolipid B는 두개의 rhamnose기를 갖고 있음을 알 수 있다.

배당체결합 이외의 지방산의 결합위치를 알기 위하여, 또한 rhamnose 2분자의 결합상태를 알아보기 위하여 두개의 당지질을 과요오드산염화한 결과를 Fig. 9에 도시하였다. 과요오드산의 소비는 처음 24 hr 동안 급속히 진행되었으나 이후에는 완만히 소비되다가 72hr 이후에는 정지하였다. Rhamnolipid A는 약 0.8mol, rhamnolipid B는 약 1.6mol의 과요오

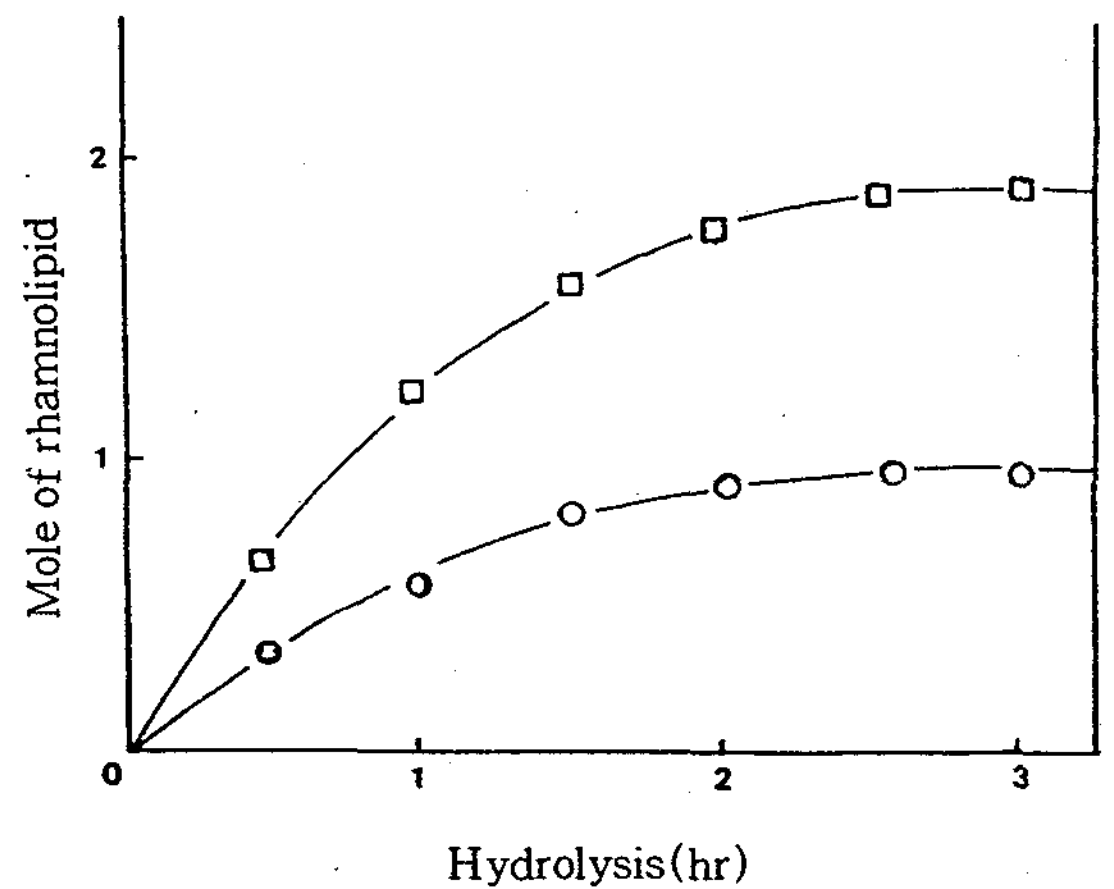


Fig. 8. Reducing power of rhamnolipids during acid hydrolysis.

Hydrolysis was carried out in dioxane-1N HCl(2:1, v/v) in boiling water.
 ○ : Rhamnolipid A
 □ : Rhamnolipid B

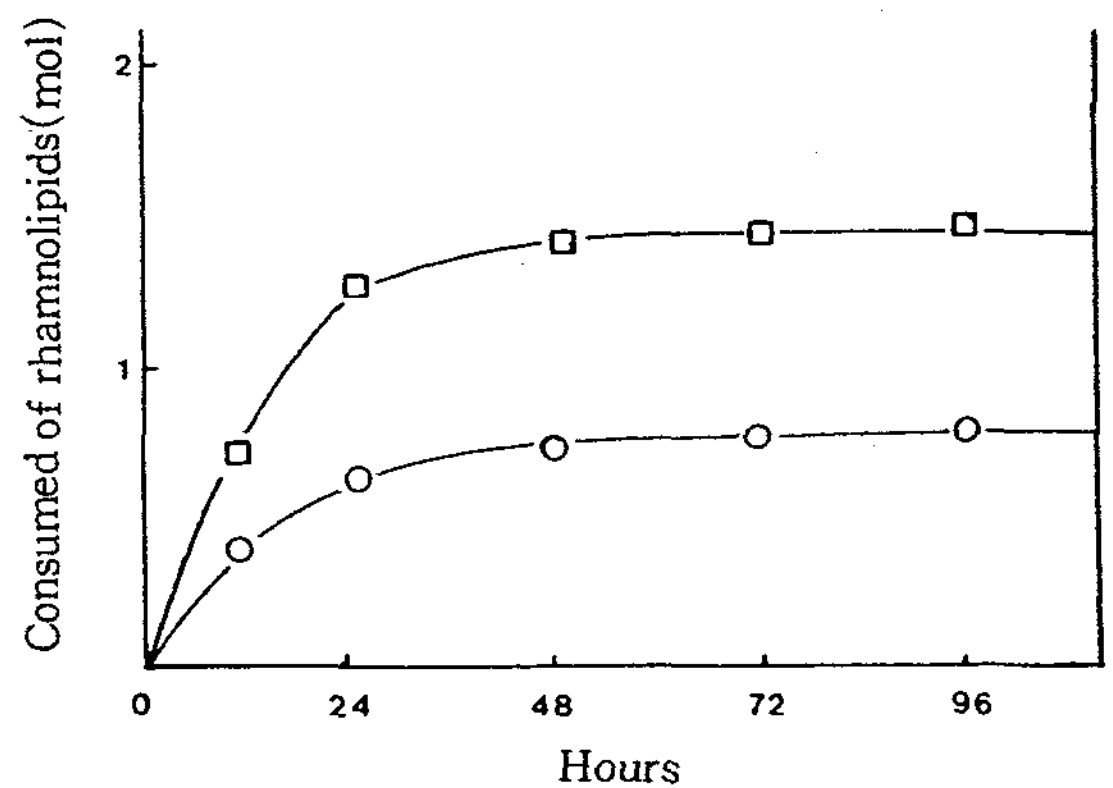


Fig. 9. Periodate oxidation of rhamnolipids.

NaIO₄, Temperature 5°C, pH 5.7.
 ○ : Rhamnolipid A
 □ : Rhamnolipid B

드산을 소비하였다. 또한 24hr 과요오드산으로 산화한 생성물을 Edward¹⁴⁾의 방법에 의해 NaBH₄로 환원가수 분해하여 생성된 polyol의 TLC 검출 결과를 Fig. 10에 도시하였다. Rhamnolipid A와 B는 24hr 동안에는 1, 2-propanediol과 1, 2, 4-butanetriol이 존재한다. 곧 이어 1, 2, 4-butanetriol은 사라지고 1, 2-propanediol만이 존재한다. 이러한 결과는 과요오드산이 소비된 후에는 rhamnose-rhamnose 결합이 1, 4- 보다는 1, 2- 라는 것을 나타내며, 1, 4- 결합은 같은 양의 1, 2-propanediol과 1, 2, 4-butanetriol이 존재하나, 1, 2- 결합은 다만 1,2-propanediol만이 존재하기 때문이다.

과요오드산 산화결과와 지금까지의 결과를 종합하여 보면 rhamnolipid A는 *L*-rhamnose가 β -hydroxydecanoic acid와 배당체결합을 하고 β -hydroxydecanoic acid 2분자가 에스테르결합을 하고 있으며, rhamnolipid B는 2분자의 *L*-rhamnose가 C₁→C₂ 결합을 하고 있고 rhamnolipid A와 같은 β -hydroxydecanoic acid 배당체결합과 에스테르결합을 이루고 있다. 그리하여 rhamnolipid A는 *L*-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid이고 rhamnolipid B는 *L*-rhamnopyranosyl-*L*-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid로 밝혀졌다. 이 결과를 Fig. 11에 도시하였다.

IV. 결 론

1. 토양으로부터 분리하여 얻어진 *Pseudomonas sp* 13의 미생물을 접종하고, 탄소원으로 단당류인 글루코스를 사용하여 배양 최적조건에서 배양한 결과 rhamnolipid 두 종류를 얻었고, 이들을 silicic acid column chromatography로 분리하고 ether-n-hexane 혼합용액으로 재결정하여 rhamnolipid A와 B를 분리하였다.

2. 두 종류의 rhamnolipid A와 B를 산가수분해하여 IR, H¹-NMR과, 과요오드산으로 산화한 결과를 분석하여 rhamnolipid A는 *L*-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid이고 rhamnolipid B는 *L*-rhamnopyranosyl-*L*-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid로 구조임을 밝혔다.

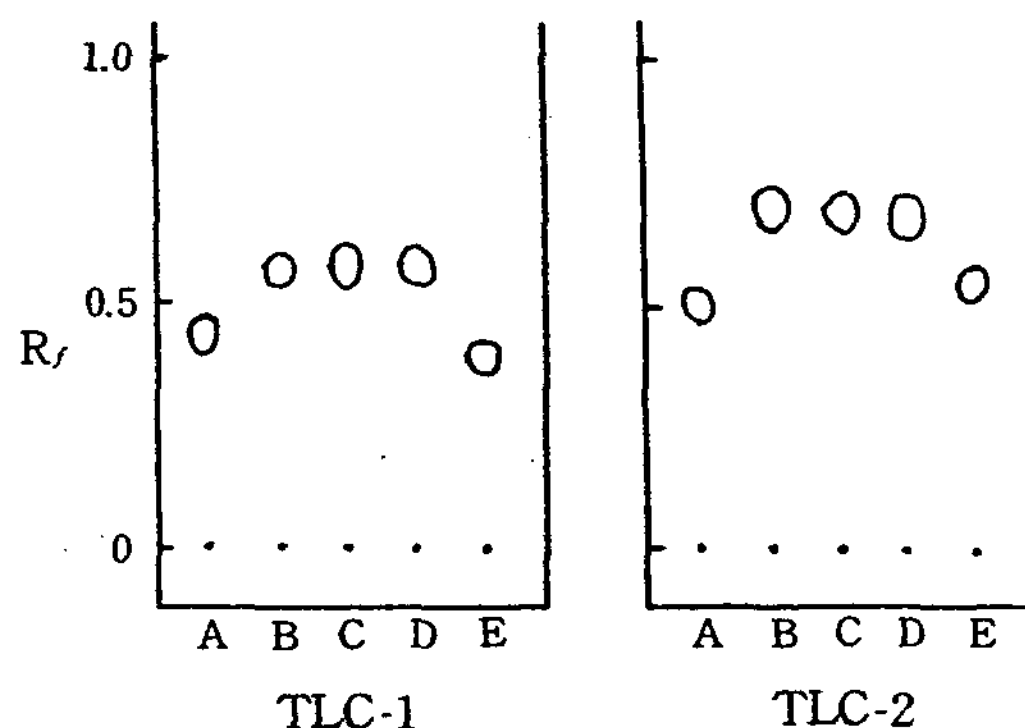
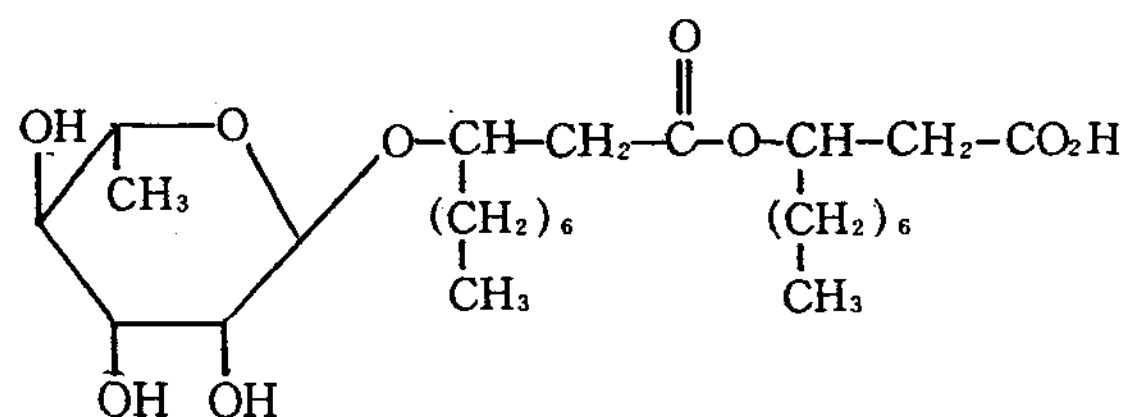
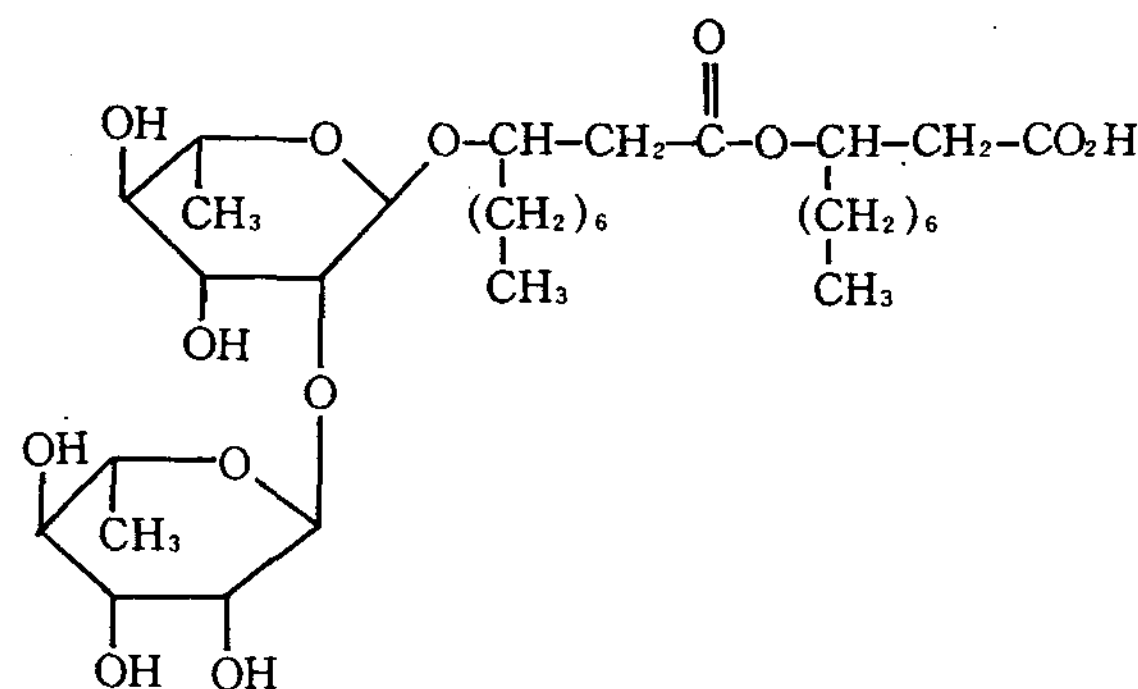


Fig. 10. Polyols produced from rhamnolipids.
Thin layer : silica gel.
Spray : periodate-benzidine.
Developer for TLC-1 ; n-butanol.
Developer for TLC-2 ; ethyl acetate-pyridine (10 : 3, v/v).
A : 1, 2, 4-butanetriol, B : Rhamnolipid A,
C : Rhamnolipid B, D : 1, 2-propanediol,
E : Rhamnose.



A. *L*-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid



B. *L*-rhamnopyranosyl-*L*-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid

Fig. 11. The structure of the rhamnolipid A and B from *Pseudomonas sp.* 13.

문 헌

1. D. G. Cooper and J. E. Zajic., *Adv. Appl. Microbiol.*, **26**, 229 (1980)
2. D. G. Cooper, *Microbiological Science*, **3**, 5 (1986)
3. De. Servo, *J. Bacteriol.*, **164**, 2 (1985)
4. Shgeo. Inoue., *Bio. Industry*, **2**, 8 (1985)
5. E. G. Jarvis and M. J. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 4121 (1949)
6. M. M. Burger, K. Glaser and R. M. Burton, *J. Bio. Chem.*, **238**, 9 (1963)
7. K. Hisatsuka, T. Nakahara, N. Sano and K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 5 (1971)
8. L. Guerra. Santos, O. Kappeli and A. Fiechter, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 3 (1984)
9. S. Itoch, H. Honda, F. Tomita and T. Suzuki, *J. Antibio.*, **14**, 12 (1971)
10. W. R. Finnerty and M. E. Singer, *Bio. Technology*, March (1983)
11. M. E. Singer., *Microbes and Oil Recovery*, **1**, 10 (1985)
12. 李·南, 韓國工業化學, **4**(1) 게재중 (1993)
13. 小林達吉, 田 武士, 農化., **28**, 171 (1954)
14. J. R. Edwards and J. A. Hayashi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 415 (1965)