

## 미생물 탈황 공정 중 *Rhodococcus sp. strain* IGTS8에 의하여 생성되는 Biosurfactants의 성분 분석 및 계면특성

박기돈·오성근·\*박홍우  
한양대학교 공과대학 화학공학과  
(접수 : 2002. 6. 4., 게재승인 : 2002. 6. 25.)

### Chemical Analysis and Interfacial Characterization of Biosurfactants formed by *Rhodococcus sp. strain* IGTS8 during the Biodesulfurization Process

Ki Don Park, Seong Geun Oh, and Hong Woo Park\*  
Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Seoul 133-791, KOREA  
(Received : 2002. 6. 4., Accepted : 2002. 6. 25.)

The chemical analysis and surface chemical properties of biosurfactant formed by *Rhodococcus sp. strain* IGTS8, which is widely used in biodesulfurization process, in hexadecane/water mixture have been studied. For the chemical analysis, TLC technique was employed. The surface tension, CMC, and emulsion stability of biosurfactant solution were also investigated. The major components of biosurfactant formed by *Rhodococcus sp. strain* IGTS8 were glucose mycolate and trehalose monomycolate. The CMC of aqueous biosurfactant solution was 0.1~0.15 g/100 mL of water at pH 6.0-6.5 and pH 10~10.5. But the demulsification was faster at pH 10 than at pH 6.3.

**Key Words** : biosurfactant, *Rhodococcus sp. strain*, TLC, hexadecane

#### 서론

Hexadecane을 포함한 모든 알칸류와 미생물 탈황공정에 이용되는 미생물인 *rhodococci*가 만나게 되면 수용액의 표면장력을 26~28 dyn/cm, 그리고 오일/물간의 계면장력을 2~5 dyn/cm 감소시킬 수 있는 계면활성물질을 생성하는 것으로 보고되었다(1). 미생물을 이용한 탈황 공정에 있어서 공정 후 오일상과 물상이 완전하게 분리되어야 하나 실제로는 탈황 공정 중 미생물이 biosurfactant를 생리대사 부산물로 생성함으로써 오일과 물이 서로 유화되어 이들 분리를 위한 별도의 공정이 필요하게 된다(2). 유화계에서 오일과 물을 서로 분리하기 위하여는 원심력과 같은 외부 힘을 가하거나 유화계에 에탄올과 아세톤 같은 용제를 가하여 오일/물 계면에 존재하는 계면활성제들을 물상으로 이동시켜 유화계를 파괴시켜 오일과 물로 상분리가 일어나게 된다(3).

본 연구에서는 미생물 탈황공정 후 오일과 물상을 서로 분리하는 유화과정에 관한 연구로써 미생물 스스로가 생산해 내는 생체 계면활성제인 biosurfactant의 성분 분석 및 특성을 이용하여 유화되어 있는 system상의 oil과 수상인 배지를 분리해 내는데 목적이 있다. 유화된 시료의 유화과도 방법은 미생물에 가장 민감한 pH를 변화시켜 biosurfactant의 유화력을 측정해 보는 방법과 순수 oil을 첨가하여 밀도차와 Ostwald Ripening힘에 의하여 유화과도가 일어나는 시간을 측정하는 방법을 선택하여 연구하였다(4). TLC (Thin Layer Chromatography) 분석 방법을 이용하여 정성적으로 hexadecane과 배지 수용액의 혼합물에서 미생물 탈황공정에 많이 이용되는 *Rhodococcus sp. Strain* IGTS8에 의하여 생성되는 biosurfactant의 주성분을 분석하였다(5). 또한 이 biosurfactant의 계면물성을 조사하기 위하여 hexadecane/수용액 혼합물에서 생성된 biosurfactant를 추출하여 농도 변화에 대한 표면장력의 변화와 임계 미셀 농도를 측정하였다. 이와 아울러 biosurfactant로 형성된 hexadecane/수용액 유화계에서 유화과도 속도를 용액의 pH를 변화시키면서 전기 전도도를 측정하여 연구하였다.

\* Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea  
Tel : +82-2-2290-0487, Fax : +82-2-2299-9496

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용된 methanol, ethyl acetate(HPLC grade), chloroform 및 acetone은 Duck San Pure Chemical Co.에서 구입하여 사용하였고, 발색시약으로 이용한 anisaldehyd는 Junsei Chemical Co.에서 구입하였고 acetic acid는 Sam Chun Chemical Co.에서 구입하였으며 황산(97%)은 Mtsunoen Chemical co.에서 구입하여 사용하였다.

분석에 이용된 실험기기는 biosurfactant의 추출에는 ultra centrifuge, rotatory evaporator와 vacuum freeze dryer (Advantec Co.)를 이용하였으며 생체 계면활성제의 성분 분석에는 유리판 위에 silica가 코팅된 silica gel 60 TLC (Sigma Chemical Co.)판을 이용하여 분석했으며 biosurfactant의 특성으로 surface tension 측정에는 tensio meter(KRSS Co. K-12)을 이용하여 측정하였고 유화과피 속도 측정에는 유화계의 전기 전도도 변화를 측정하여 연구하였다.

### 실험 방법

#### Biosurfactant의 추출

Oil/cell/fortified BSM으로 구성된 system에서 bioreactor를 이용하여 7일간 배양된 sample을 ultracentrifuge(Beckman/XL-90)을 이용하여 20000 rpm으로 배지만을 선택적으로 분리한 후 pH 6.3으로 고정된 배지를 1N HCl 용액을 이용하여 pH를 2~2.5로 적정한다. 이렇게 준비된 배지는 ethyl acetate와 1:1(v/v)로 혼합시키고 separation funnel을 이용하여 정치시킨다. 24시간 정치된 sample은 ethyl acetate만을 선택적으로 분리시킨 후 회전 증발기를 이용하여 ethyl acetate만을 기화시킨다. 기화시킨 후 남아 있는 sample은 진공 동결 건조기를 이용하여 미량이 존재하는 ethyl acetate를 기화시키고 biosurfactant만을 추출하였다.

#### TLC (Thin Layer Chromatography)를 이용한 정성 분석

본 실험은 biosurfactant가 몇 가지 성분으로 구성되어있는지를 알아보기 위한 실험으로 TLC판은 유리판 위에 silica가 코팅된 silica gel 60을 이용하였다. 5 mg의 추출된 biosurfactant sample을 chloroform과 methanol이 2:1(v/v)의 비로 조성된 solution에 녹인 후 microcapillary를 이용하여 silica판 위에 점적한 다음 건조시킨다. TLC에 이용되는 전개용매는 chloroform/methanol/acetone/acetic acid가 90:10:6:1(v/v)로 구성되어 있으며 이 전개용매는 TLC chamber내에서 약 1시간 가량 포화시킨다. 포화가 되면 점적한 TLC판을 TLC chamber에 담근 후 판의 끝 부위에서 2~4 cm 떨어진 부위 근처에 오기 전까지 계속해서 전개시킨다. 그런 다음 미리 제조한 진단 시약(Anisaldehyd/sulfuric acid/acetic acid = 0.5/1/50 (v/v/v))을 실리카 판 위에 골고루 뿌려 준다. 그런 다음 오븐을 이용해서 100°C에서 약 10분 가량 건조시키면 녹색 점이 2군데 관찰되는데, 이것이 glycolipids이다. 96시간 발효 후 생산되는 glycolipid는 대략 2가지 정도의 구조를 가지는데 이는 TLC 판에서 용매가 전개한 높이와 시료가 전개한 높이의 비를 통해 구하는 전개율 ( $R_f$ )을 통하여 판독할

수 있다. 전개율의 식은 아래와 같다.

$$R_f = \text{Height of developed sample} / \text{Height of developed solvent}$$

#### Bioreactor에서 pH변화에 따른 유화과피 속도 측정

미생물의 대사 활동에 의하여 생산된 biosurfactant와 미생물의 활동에 영향을 미치는 pH 변화와의 관계를 알아보기 위한 실험으로 pH 변화에 따른 biosurfactant의 효과 및 그 결과로 발생하는 층 분리 시간을 측정하는 것을 목적으로 실험했다.

Oil/cell/fortified BSM로 구성된 system은 28°C, pH 6.3, 400 rpm으로 7일간 배양한 후 bioreactor의 pH를 6.3, 8.0, 10으로 변화 시켜 가면서 배지 상의 층이 80% 분리되는 시간을 측정하여 유화과피 과정에서 pH가 미치는 영향을 실험하였다.

#### Biosurfactant의 pH변화에 따른 CMC (Critical Micelle Concentration) 측정

본 실험은 pH변화에 따른 biosurfactant의 유화력을 측정하는 실험으로 biosurfactant의 농도를 wt.%로 하여 0.2~0.001% sample을 제조 한 후, tensio-meter를 이용하여 표면장력을 측정하였다. 표면장력 측정에는 백금 ring을 이용하여 매 실험 시 acetone과 초순수 증류수를 이용하여 세척하며 실험을 행하였다.

#### 전기 전도도 측정을 이용한 유화과피 연구

본 실험은 물리적 방법인 oil첨가에 따른 효과적인 oil의 층 분리를 알아보기 위한 실험으로 이 실험에 이용된 전기 전도도 측정기기(DALCON co.)는 실시간으로 시료의 상층부분(oil phase)과 하층부분(water phase)의 전도도를 측정하는 기기로서 이것을 바탕으로 두 부분의 전위차를 이용해 시간에 따른 유화과피가 이루어지는 시간을 측정할 수 있다. 7일간 bioreactor에서 배양된 시료 18 mL을 취하여 유리 vial에 넣은 후 미생물 탈황공정과 동일한 조건인 28°C에서 전도도를 측정하였다.

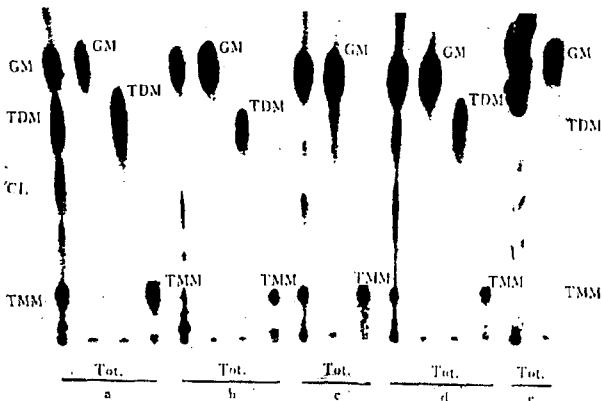
Oil의 증가에 따른 유화과피 속도 측정은 전체 시료의 양을 18 mL로 하고 bioreactor에서 유화된 시료(oil:fortified BSM = 50:50(v/v))를 16 mL, 14 mL, 12 mL를 유리 vial에 취한 후 DBT가 1000 ppm이 포함된 순수 oil을 2 mL(5%), 4 mL(10%), 6 mL(15%)를 넣어준 후 전도도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### TLC 정성 분석

TLC를 이용한 정성 분석 방법은 혼합물의 성분을 알아 볼 수 있는 가장 간단한 방법중의 하나이다. 이 실험에 이용된 진단 시약인 Anisaldehyd는 biosurfactant의 여러 가지 lipid성분 중 glycolipid에 반응하여 녹색의 점을 형성시키는 특징을 가지고 있다(6).

Sawai는 여러 종류의 미생물을 이용하여 biosurfactant를 추출한 후 TLC 및 여러 가지 분석방법을 이용하여 성분 분석을 하였다(7). TLC 분석시 용매는 chloroform : methanol = 2 :



**Figure 1.** Thin Layer Chromatograms of chloroform-methanol extractable lipid from various species of *Nocardia* and *Rhodococcus* (a) *Nocardia salmonicolor*, (b) *Nocardia corallina*, (c) *Rhodococcus rhodochrous* 13161 (d) *Nocardia opaca*, (e) *Rhodococcus* sp. 13165 (7).

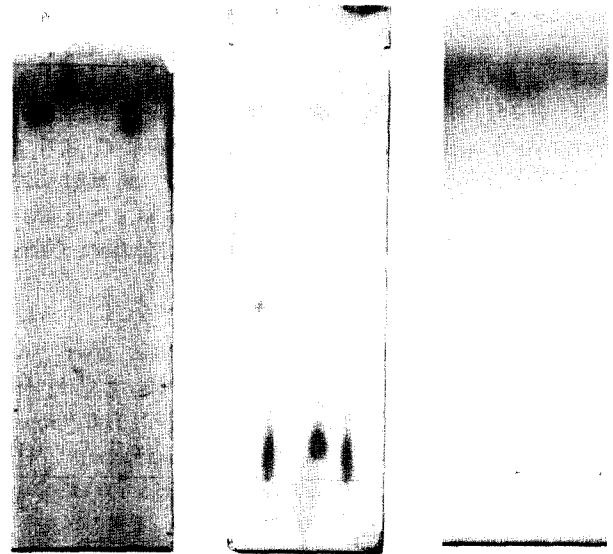
1(v/v)로 하였고 전개용매는 chloroform / methanol / acetone / acetic acid의 조성으로 90 : 10 : 6 : 1(v/v)로 하여 실험하였다. 그의 결과로 Figure 1과 같이 다양한 미생물을 동일한 전개용매를 이용하여 전개율을 비교해 볼 때  $R_f$  값이 0.93 근처에서 GM(glucose mycolate)으로 판명된 spot이 형성되었고 0.74 근처에 나타난 spot은 TDM(Trehalose Dicolate)으로 0.26 근처에서 나타난 spot은 TMM(Trehalose MonoMycolate)로 분석되었다. 이 연구 결과를 기준으로 동일한 solvent와 전개용매를 이용하여 전개율을 비교하여 분석하였다.

Figure 2는 3가지 조건에 따른 TLC 결과를 나타낸 그림이다. 조건에 따른 정성 분석의 결과 각각의 spot들은 모두 녹색을 띄게 됨으로써 biosurfactant 중 glycolipid 성분임을 알 수 있었다.

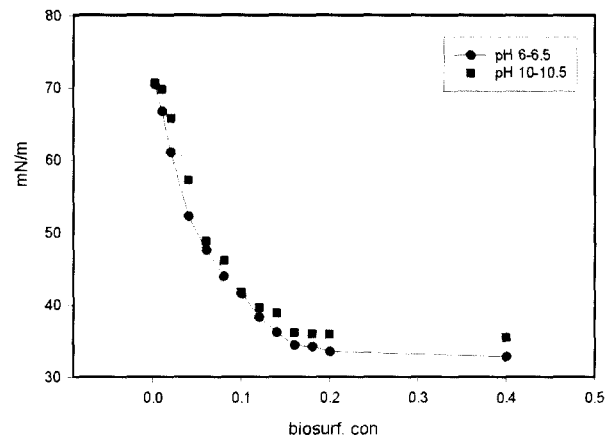
Figure 2(a)는 강화 배지에 세포만을 배양시키고 난 후 생체 계면활성제 추출하여 분석한 결과로 하나의 spot 만이 존재한 결과를 나타냈는데, 전개율인  $R_f$ 값을 비교해 볼 때 0.93으로 GM이 생성된다는 것을 추정할 수 있었고, 그림 (b)는 oil/cell/fortified BSM으로 구성된 system에서 추출한 생체 계면활성제를 분석한 것으로 전개율 값이 0.18과 0.92로 2가지 성분인 TMM과 GM으로 추정된 biosurfactant가 생산됨을 알 수 있었다. 특히 이러한 결과를 가지고 (a)와 (b)를 비교해 볼 때 TMM은 미생물이 modeling oil인 hexadecane의 영향으로 생산됨을 알 수 있었다. 그림 (c)는 미생물에 의한 탈황 공정의 결과에서 탈황 효율에 가장 크게 영향을 끼친 pH를 7일 간의 배양 후 1 N NaOH 용액을 이용하여 pH 6.3에서 pH 10으로 적정 후 biosurfactant를 추출하는 과정에서 생성된 침전물을 성분 분석한 결과이다. 이 추출물에서는 하나의 spot 만이 존재했는데 그 성분의 전개율값은 0.91로써 GM으로 추정된 물질이 나타나는 결과를 알 수 있었다.

**생물 반응기에서 pH변화에 따른 유화파괴**

이 실험은 앞서 실험한 pH 10에서 GM으로 추정된 생체 계면활성제가 침전물에 포함되어 침전되는 결과를 보고 이러한 것이 oil과 강화 배지의 층을 분리하는데 어떤 영향성을 보이는지 알아보기 위하여 실험하였다. 오서 7일이 배양되

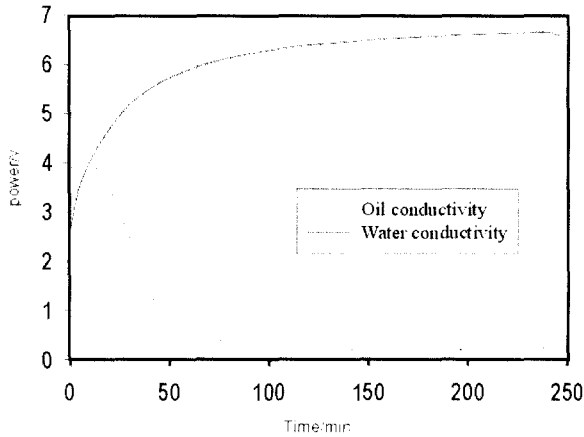


**Figure 2.** TLC(Thin Layer Chromatograms) analysis results; (a) TLC result of cell/fortified BSM system, (b) TLC result of oil/cell/fortified BSM system, (c) TLC result of a sediment which was created by changing pH to pH 10 in oil/cell/fortified BSM system.

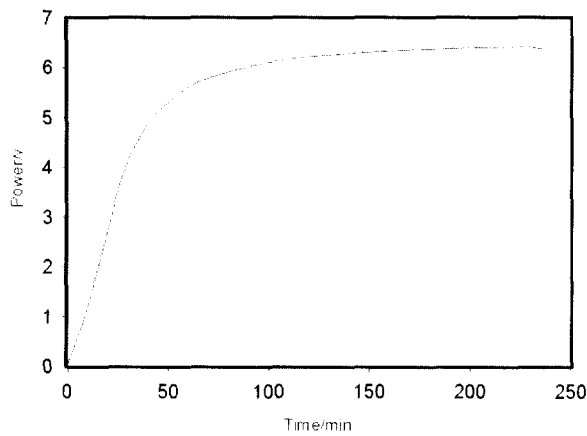


**Figure 3.** Surface tension of aqueous biosurfactant solution at different pHs.

system에서 pH 6.3일 때 reactor를 멈추고 층 분리 시간을 측정해 본 결과 배지상의 80%가 분리되는데 걸린 시간은 1시간 20분이 소요되었다. 이렇게 실험한 bioreactor내의 시료는 다시 pH 8과 10에서 반응기를 1시간 가량 작동시킨 후 pH 6.3과 동일한 방법으로 측정결과 pH 8과 pH 10 모두 배지상의 80% 분리가 일어나는데 1시간이 소요됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 pH값이 높을 때 생성되는 침전물에 biosurfactant 성분 중 GM이 포함되어 침전됨에 따라 유화력이 감소되는 영향으로 인해 생긴 결과라 생각할 수 있다. 비록 시간은 20분 밖에 차이가 나지 않았지만 reactor의 크기가 5L라는 것을 감안하고 또 계면에 가까워질수록 유화파괴 속도가 감소된다는 것을 생각해 볼 때 pH를 8내지 10으로 변화시켜 층을 분리하는 것은 효과적일 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다.



(a) A graph of top and bottom conductivity at oil : fortified BSM = 50 : 50



(b) A graph of top and bottom conductivity difference

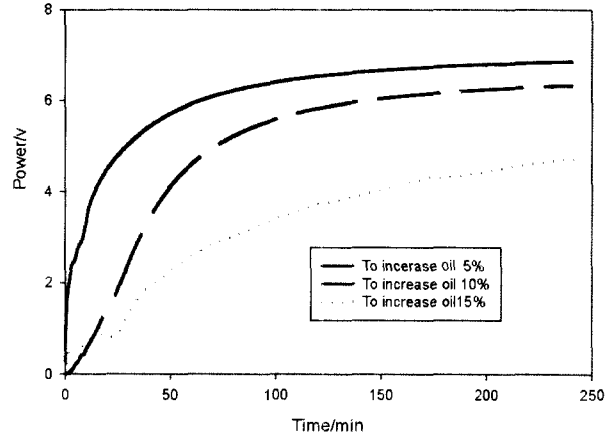
**Figure 4.** The Change in the conductivity when oil : fortified BSM = 50 : 50 (v/v).

**배지상의 pH변화에 따른 biosurfactant의 CMC**

Figure 3은 배지상의 pH변화에 따라 추출된 biosurfactant의 특성 중 표면장력을 측정하여 임계 마이셀 농도를 비교하였다. pH변화에 관계없이 임계 마이셀 농도는 0.1~0.15 g에서 나타남을 알 수 있었다. 그러나 pH 10~10.5는 항상 pH 6.0~6.5보다 약간씩은 표면장력 값이 높게 나타나는 결과를 볼 수 있는데 이것은 pH가 10일 때 생성되는 침전물에 소량의 GM이 포함되어 있기 때문에 일어난다고 할 수 있다.

**전기 전도도를 이용한 유화 안정성 측정 결과**

유화 안정성을 측정하는 방법에는 가장 고전적인 방법으로 유화 된 시료를 메스실린더에 넣고 시간에 따른 층 분리를 확인하는 방법과 탁도를 이용하는 방법, 광학 현미경을 이용하여 시간에 따른 size distribution을 측정하는 방법 등 여러 가지가 있다. 그 중 이 연구에 이용된 방법은 전도도를 이용하여 stability를 측정하였다. 전도도를 이용하여 유화 안정성을 측정하는 방법은 전도도 tip이 top 부분과 bottom 부분에 존재하고 있는 상태에서 유화된 sample이 stable한 상태에서는 두 부분 모두 전도도 값이 0을 나타내게 되지만 stable한 상태에서 unstable한 상태로 갈수록 oil phase는 전도도 값이 0으로 일정하게 유지되고 water phase는 전도도 값이 증가하



**Figure 5.** A graph of conductivity difference with addition of oil when oil : fortified BSM = 50 : 50 (v/v).

다가 층 분리가 완전히 이루어지면 일정한 값을 유지하게 되는데 이러한 성질을 이용하는 방법이다.

Figure 4의 (a)는 bioreactor에서 pH 6.3, 28°C, 400 rpm으로 7일간 배양된 sample을 이용하여 oil phase와 water phase의 전도도를 시간에 따라 측정한 값이다. System 자체의 기계적 에너지가 400 rpm 밖에 되지 않기 때문에 측정 시작과 함께 unstable한 상태로 측정되었다. 그림 (b)는 oil 상과 water 상간의 전위차를 시간에 따라 나타낸 것으로 89분 이후부터 전위차 값이 6 volt로 일정해지는 것을 알 수 있었으며 완전히 층 분리가 일어난 시간은 109분이 됨을 알 수 있었다.

Figure 5는 oil을 5, 10, 15%씩 증가시킨 sample의 전도도 측정 후 oil phase와 water phase의 전위차를 나타낸 것으로 oil의 양을 증가시킬 때 얼마나 빨리 층 분리가 일어나는 지를 나타낸다.

Oil 증가에 따른 결과로써 전위차가 6 volt로 일정해지는 시간은 oil 5% 증가에서는 64분, oil 10% 증가에서는 142분의 시간이 소요되었으며 oil 15%에서는 245분의 시간동안 4.65 volt 만큼의 전위차를 보였다. 또한 전위차가 3 volt가 되는 t<sub>1/2</sub>값은 oil 0%에서 22분, oil 5%에서 9분, oil 10%에서 36분, oil 15%에서 79분으로 나타났으며 이러한 결과로 볼 때 가장 빠른 층 분리는 oil 5%에서 일어남을 알 수 있었다.

이러한 결과로 볼 때 oil의 양을 많이 증가시킨다고 해서 더욱 빠른 층 분리가 일어날 것이라는 예상과는 달리 최적의 oil양을 첨가할 때 더욱 빠른 층 분리를 시킬 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다.

**결 론**

Hexadecane과 수상인 배지로 구성된 혼합물에서 미생물 탈황공정에 많이 이용되는 *Rhodococcus sp. strain IGTS8*에 의하여 생성되는 biosurfactant의 성분 분석과 pH변화에 따른 배지상의 층분리와 oil 첨가에 따른 oil층 분리에 대하여 연구한 biosurfactant는 GM(glucose mycolate)과 TMM(trehalose monomycolate)로 추정되는 2가지 성분으로 구성되어 있었으며, pH변화에 따른 biosurfactant의 유화력 측정은 CMC 값이 0.1~0.15 g로 pH 6.0~6.5와 pH 10~10.5 동일한 결과를 보

였으나 항상 pH 10~10.5에서 표면장력 값이 높게 나타났다. 이것은 biosurfactant를 pH 10에서 추출할 때 GM에 포함된 침전물이 형성되어 유화력을 감소시키는 영향으로 나타난 결과이다. 배지 상의 층 분리는 pH변화에 따른 biosurfactant의 유화력 감소를 이용하여 배지상의 80% 분리시키는데 pH 10에서 pH 6.3보다 20분 정도 시간이 감소되는 결과를 얻을 수 있었다.

배지 상과는 상반되게 oil상의 층 분리는 배지 상보다 더 천천히 층 분리가 일어남을 관찰할 수 있었고 층분리의 효율을 높이기 위해 임의의 oil양을 첨가하여 층이 분리되는 것을 전위차로써 실험한 결과 oil 5%에서 가장 빠른 층 분리가 일어남을 알 수 있었으며 이러한 결과는 많은 oil의 양을 첨가한다고 해서 층의 분리가 빨리 이루어지는 것이 아니라 적당량을 첨가할 때 더욱 효과적인 층 분리가 일어남을 확인할 수 있었다.

## 요 약

탈황공정에 많이 이용되는 미생물인 *Rhodococcus sp. strain IGTS8*이 hexadecane과 배지 수용액 혼합물에서 생성하는 biosurfactant의 성분분석과 계면물성을 연구하였다. TLC를 이용한 정성적 성분분석 결과 생성되는 biosurfactant는 glucose mycolate와 trehalose monomycolate임을 확인하였고 임계 미셀농도는 pH 6~6.5와 pH 10~10.5에서 100 mL의 수용액에 biosurfactant가 0.1~0.15 g 첨가될 때였으며 유화과외 속도는 pH가 높을수록 증가하였다.

## 감 사

본 연구는 에너지관리공단의 청정에너지기술개발사업에 의한 지원으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Ivshina, I. B., M. S. Kuyukina, J. C. Philip, N. Christofi (1998), Oil Desorption from Mineral and Organic Materials using Biosurfactant Complexes Produced by *Rhodococcus* Species, *World J. of Microbiol. Biotechnol.* **14**, 711-717.
2. Desai, J. and A. Desai (1993), Production of Biosurfactants, in *Biosurfactants: Production, Properties, Applications*, ed. by N. Kosaric, Marcel Dekker, Inc., New York.
3. Rosen, M. J. (1989), *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
4. Aveyard, R., B. P. Binks, J. H. Clint, and P. D. I. Fletcher (1999), Foams and Emulsions: Their Stability and Breakdown by Solid Particles and Liquid Droplets, in *Foams and Emulsions*, ed. by J. F. Sadoc and N. Rivier, Kluwer Academic Press, Boston.
5. Itoneda, T. and E. T. de Almeida (1991), Time Course Dependent Changes in Contents and Physical Properties of Glycolipid Species in *Rhodococcus Rhodochrous*, *Chem. Phys. Lipids*, **59**, 225-231.
6. Schmitt, T. M. (2001), *Analysis of Surfactants*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York.
7. Sawai, H., Y. Sumi, S. Kurao, S. Gondaira, Y. Kato, I. Tomiyasu, S. Imaizumi, K. Kaneda, and I. Yano (1987), Granuloma Formation by the Glycolipids Containing Mycolic Acid in *Nocardia*, *Rhodococcus* and Related Actinomycetes and Their Structure Analysis, *YAKUGAKU ZASSHI*, **107**, 37-45.