



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0022289
(43) 공개일자 2010년03월02일

(51) Int. Cl.

C07H 19/00 (2006.01) C12P 7/64 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0080896

(22) 출원일자 2008년08월19일

심사청구일자 2008년08월19일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김은기

서울특별시 강남구 대치동 316 은마아파트 8-212

신재동

경기도 안양시 동안구 호계동 923번지 신성미소지
움 104-601

(74) 대리인

이원희

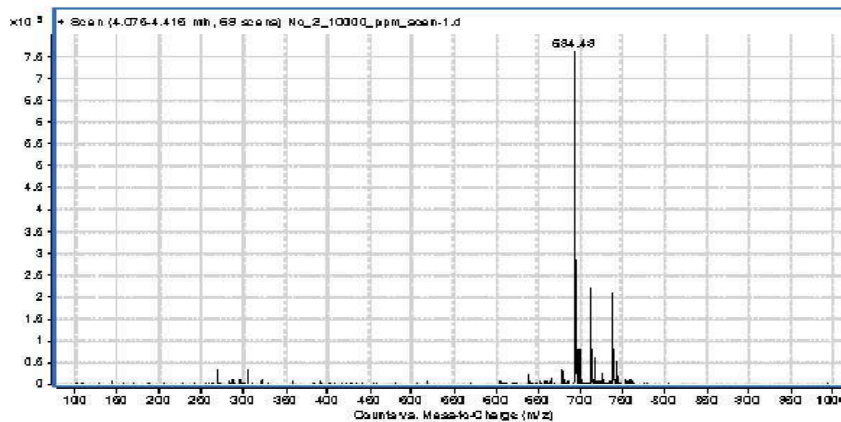
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) C-22 소포로리피드 유도체 화합물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 화학식 1 또는 2로 표시되는 C-22 소포로리피드 유도체 화합물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 소포로스 당에 연결된 지방산의 탄소수가 22개인 신규한 소포로리피드 화합물 및 C-22 지방산 함유 오일을 탄소원으로 하여 효모균으로부터 C-22 소포로리피드 유도체 화합물을 생성하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물은 생산성이 높고, 기포발생량, 분산력, 세척력 및 생분해도와 같은 계면활성 특성이 우수하여, 세제 등에서의 계면활성제로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 단일 탄소수를 갖는 소포로리피드를 보다 간단하게 제조할 수 있는바, 소포로리피드의 분리에 따른 비용을 절감할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 38048-01

부처명 한국과학재단

연구사업명 국가지정연구실 사업

연구과제명 미백 신규타겟 및 소재개발

주관기관 인하대학교

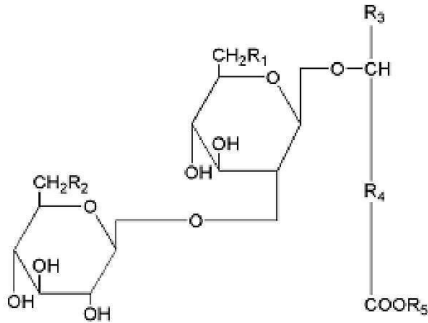
연구기간 2008년 7월 01일 ~ 2009년 6월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

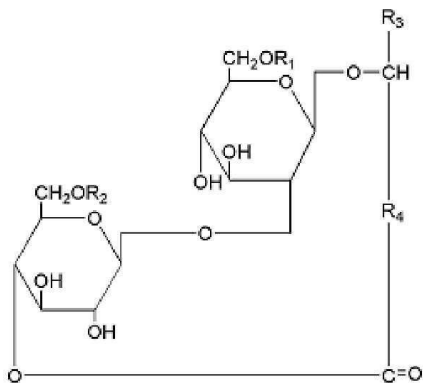
하기 화학식 1로 표시되는 산형(acidic form) 또는 하기 화학식 2로 표시되는 락톤형(lactonic form)의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는 아세틸이고; R_3 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소 또는 메틸이며; R_4 는 R_3 이 메틸일 때, 탄소수가 19인 포화 또는 불포화 탄화수소기이고, R_3 이 수소일때, 탄소수가 20인 포화 또는 불포화 탄화수소기이다)

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는 아세틸이고; R_3 은 수소 또는 메틸이며; R_4 는 R_3 이 메틸일 때, 탄소수가 19인 포화 또는 불포화 탄화수소기이고, R_3 이 수소일 때, 탄소수가 20인 포화 또는 불포화 탄화수소기이다)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 C-22 소포로리피드 유도체 화합물은

- 1) 6'-6''-디하이드록시메틸-22-L-글루코피라노실-도코세노익산;
 - 2) 6'-6''-디하이드록시메틸-22-L-글루코피라노실-도코사다이에노익산; 및
 - 3) 6'-아세톡시메틸-6''-하이드록시메틸-22-L-글루코피라노실-만노피라노시드-사이클릭 도코사노익산
- 으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 C-22 소포로리피드 유도체 화합물.

청구항 3

C-22 지방산이 함유된 오일을 포함하는 배지에서 칸디다 속 효모균을 배양시키는 단계(단계 1); 및

상기 단계 1의 효모균 배양액에 에틸 아세테이트를 처리하여 소포로리피드를 추출한 후, 헥산을 처리하여 잔류

오일을 제거하는 단계(단계 2)를 포함하는 제1항 내지 제3항 기재의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 단계 1의 오일은 C-22 고체지방산, C-22 증가 유채유 또는 이들을 메틸에스테르화한 것임을 특징으로 하는 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 C-22 고체지방산은 C-22 지방산 함량이 95% 이상이고, C-22 증가 유채유는 C-22 지방산 함량이 50% 이상인 것임을 특징으로 하는 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 제조방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 단계 1의 칸디다 속 효모균은 칸디다 봄비콜라(*Candida bombicola*)인 것을 특징으로 하는 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 제조방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 단계 2의 에틸 아세테이트는 단계 1의 효모균 배양액에 대하여 100 내지 200 부피%(v/v)로 처리되며, 헥산은 10 내지 50 부피%(v/v)로 처리되는 것을 특징으로 하는 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 제조방법.

청구항 8

제1항의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물을 유효성분으로 함유하는 세제 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 C-22 소포로리피드 유도체 화합물은 높은 생분해도로 인하여 화학적 계면활성제를 대체하는 것을 특징으로 하는 세제 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 C-22 소포로리피드 유도체 화합물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 소포로스 당에 연결된 지방산이 탄소수 22를 갖는 신규한 소포로리피드 화합물 및 C-22 지방산 함유 오일을 탄소원으로 하여 효모균으로부터 C-22 소포로리피드 유도체 화합물을 생성하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 계면활성제는 묽은 용액 속에서 계면에 흡착하여 그 표면장력을 감소시키는 물질로서, 전세계 계면활성제 시장은 엄청나게 성장하고 있으며, 그 수요 역시 해마다 증가하는 추세에 있다. 그러나, 시판 중인 계면활성제는 대부분 화학합성 계면활성제로서 자체적으로 생분해가 안되어 환경오염의 원인이 되는 바, 이를 대체하기 위한 미생물 계면활성제에 대한 관심이 증가되고 있다.

[0003] 미생물 계면활성제(Microbial surfactant, Biosurfactant)는 효모, 곰팡이, 박테리아 등 미생물에 의해 생산되는 생분해성 계면활성제를 의미하며, 균주에 따라 세포외 또는 세포내에서 생성된다. 상기 미생물 계면활성제는 기존의 합성계면활성제에 비해서 많은 장점을 가지고 있다. 예를 들면 독성이 적은 점, 생분해가 잘 되는 점, 여러 종류의 화학구조에 따라 각각의 특이성이 있어서 적용분야가 넓은 점, 쉽게 구할 수 있는 원료로부터 미생물에 의해 낮은 가격으로 생산할 수 있는 점 등을 들 수 있다. 따라서, 세제, 식품, 석유관련제품, 의약품, 화장품공업, 페인트공업 등에서 유화제, 분산제 또는 세제 등의 용도로 광범위하게 응용될 수 있다.

[0004] 이러한 많은 장점과 응용성을 가진 미생물 계면활성제 중에서 상품화가 되어 있는 대표적인 것으로는 미국의 Petroferm 회사에서 생산하는 Emulsan을 들 수 있는데, 상기 제품은 기름에 오염된 탱커의 처리, 전자기관의 3

차 세척용 등으로 사용되고 있다. 그 외에 약 20여종의 미생물 계면활성제가 특허화되고 산업화되었으나, 화학 계면활성제에 비해서는 턱없이 부족한 상황이다.

[0005] 상기 미생물 계면활성제가 산업화되기 위해서는 특수한 용도를 갖도록 개발하거나, 기존의 화학 계면활성제에 비하여 낮은 가격으로 생산될 수 있어야 한다. 구체적으로는 원료물질의 비용, 분리 및 그의 생산성을 높이는 것이 요구된다. 그리하여 종래에 탄수화물(Klekner, et al., Biotechnol. Letter, 13:345-348, 1991), 야채오일(Zhou, et al., j. Am. Oil. Soc. 69:89-91, 1992), 동물지방(Deshpandle and Daniels, Biores. Technol. 54:143-150, 1995), n-알칸(Davila, et al., J. Ind. Microbiol. 13:249-257, 1994) 및 단일세포 오일(Daniel et al., Biotechnol. Lett. 20:1153-1156, 1998)과 같은 다양한 물질로부터 미생물 계면활성제를 생산하기 위한 연구가 있었다.

[0006] 소포로리피드(sophrolipid)는 소포로스(sophorose, 2 '-O-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노스) 당과 다양한 불포화도의 16 내지 18개의 탄소를 갖는 히드록시 지방산으로 이루어진 글리코리피드(glycolipid)의 일종으로서, 효모인 칸디다 봄비콜라(Candida bombicola)로부터 생성되는 미생물 계면활성제이다. 기타의 효모균, 구체적으로 칸디다 보고리엔시스(Candida bogoriensis), 칸디다 마그놀리에(Candida magnolie), 칸디다 그로펜기세리(Candida gropengisseri), 칸디다 아피콜라(Candida apicola)에 의해서도 그 배양액 중에 비교적 다량으로 생산되는 것이 보고되어 있다(R. Hommel, Biodegradation, 1: 107, 1991).

[0007] 일반적으로 소포로리피드는 산형(acidic form) 소포로리피드와 락톤형(lactonic form) 소포로리피드가 존재하며, 락톤형은 비듬방지제(antidandruff), 세균발육 저지제(Bacteriostatic agent) 및 방취제(deodorant)와 같은 화장품(Mager, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54:625-633, 1987) 및 피부 섬유아세포(skin fibroblast)의 대사를 자극하는 인자(WO 제9,964,279호)로서 사용되고 있다. 산형 소포로리피드는 특히 섬유소 분해(fibrinolysis), 치료(healing), 각질, 탈색 및 마트르코아지 활성을 위한 인자와 같은 피부치료제로 이용되고 있다(미국특허등록 제5,981,497호)

[0008] 상기 소포로리피드는 소포로스 당에 결합된 지방산에 따라 계면활성제의 특성이 달라지는 것으로 알려져 있다. 이에 상기 소포로리피드의 산업적 이용가능성을 높이기 위하여 소포로리피드를 변형하고자 하는 많은 시도가 있었다(Davila et al. 1994, Bisht et al. 1999, Rau et al. 1999, Nunez et al. 2003).

[0009] 종래, 소포로리피드를 탄화수소, 유지 등의 비수용성 탄소원을 이용하여 생산한 바 있었다. 하지만, 탄화수소, 유지 등에 포함된 다양한 탄소수로 인하여 그로부터 생성되는 소포로리피드의 탄소수가 일정치 않은 바, 계면활성제로서의 특성 역시 일정치 않은 문제점이 있었다. 또한, 생성된 소포로리피드 중에서 일정한 탄소수의 소포로리피드를 분리할 수 있으나, 이 역시 비용 및 시간이 많이 소요되는 문제점이 있었다.

[0010] 이에 본 발명자는 우수한 계면활성 특성을 갖는 소포로리피드를 제조하기 위하여 각고의 노력을 거듭한 결과, 탄소원의 탄소수를 일정하게 함으로써 일정한 탄소수를 갖는 소포로리피드의 제조방법을 개발하고, 이에 의해 생산된 C-22 소포로리피드가 생산성이 높고, 기포발생량이 적으며, 분산력이 우수하고, 세척력이 높으며, 생분해도가 높아 계면활성제로서의 효과가 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 일정한 탄소수를 가지며, 계면활성이 높은 소포로리피드를 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 소포로리피드의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0013] 나아가 본 발명의 목적은 상기 소포로리피드를 유효성분으로 함유하는 세제 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 산형(acidic form) C-22 소포로리피드 유도체 화합물 또는 화학식 2로 표시되는 락톤형(Lactonic form) C-22 소포로리피드 유도체 화합물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 C-22 지방산 함유 오일을 포함하는 배지에서 효모균을 배양하고 이로부터 소포로리피드를 분리하는 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0016] 나아가 본 발명은 상기 C-22 소포로리피드 유도체 화합물을 유효성분으로 함유하는 세제 조성물을 제공한다.

효 과

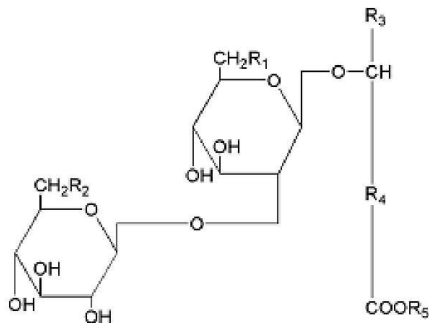
[0017] 본 발명은 C-22 소포로리피드 유도체 화합물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 화학식 1 내지 2로 표시되는 화합물은 생산성이 높고, 기포발생량, 분산력, 세척력 및 생분해도와 같은 계면활성 특성이 우수하여, 세제 등에서의 계면활성제로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 단일 탄소수를 갖는 소포로리피드를 간단하게 제조할 수 있는바, 소포로리피드의 분리에 따른 비용을 절감할 수 있는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 산형(acidic form) C-22 소포로리피드 유도체 화합물 또는 하기 화학식 2로 표시되는 락톤형(Lactonic form) C-22 소포로리피드 유도체 화합물을 제공한다.

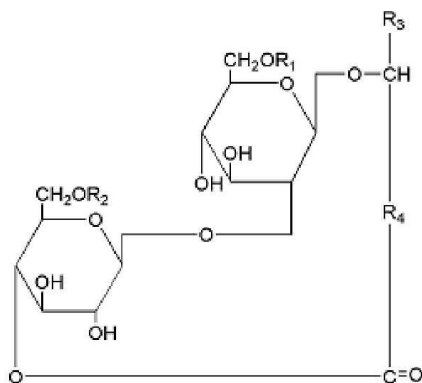
화학식 1



[0020]

[0021] (상기 화학식 1에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는 아세틸이고; R_3 및 R_5 는 각각 독립적으로 수소 또는 메틸이며; R_4 는 R_3 이 메틸일 때, 탄소수가 19인 포화 또는 불포화 탄화수소기이고, R_3 이 수소일 때, 탄소수가 20인 포화 또는 불포화 탄화수소기이다)

화학식 2



[0022]

[0023] (상기 화학식 2에서 R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소 또는 아세틸이고; R_3 은 수소 또는 메틸이며; R_4 는 R_3 이 메틸일 때, 탄소수가 19인 포화 또는 불포화 탄화수소기이고, R_3 이 수소일 때, 탄소수가 20인 포화 또는 불포화 탄화수소기이다)

[0024] 본 발명의 명세서에서 “C-22 소포로리피드”라 함은 소포로스(sophorose) 당과 탄소수가 22인 지방산이 결합된 형태의 소포로리피드를 가리킨다. 종래 알려진 소포로리피드는 소포로스 당에 결합된 지방산의 탄소수가 11 내지 16개로서, 본원발명의 소포로리피드와는 구조적 차이를 나타낸다.

[0025] 구체적으로, 본원발명의 상기 C-22 소포로리피드 유도체 화합물은 하기와 같다.

[0026] 1) 6'-6'''-디하이드록시메틸-22-L-글루코피라노실-도코세노익산;

- [0027] 2) 6'-6''-디하이드록시메틸-22-L-글루코피라노실-도코사다이에노익산;
- [0028] 3) 6'-아세톡시메틸-6''-하이드록시메틸-22-L-글루코피라나실-만노피라노 시드-사이클릭 도코사노익산;
- [0029] 락톤형의 소포로리피드는 비듬방지제(antidandruff), 세균발육 저지제(Bacteriostatic agent) 및 방취제(deodorant)와 같은 화장품(Mager, et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54:625-633, 1987) 및 피부 섬유아세포(skin fibroblast)의 대사를 자극하는 인자(WO 제9,964,279호)로서 사용되고 있다. 산형 소포로리피드는 특히 섬유소분해(fibrinolysis), 치료(healing), 각질, 탈색 및 마트로파아지 활성을 위한 인자와 같은 피부치료제로 이용되고 있다(미국특허등록 제5,981,497호).
- [0030] 본 발명은 상기 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 제조방법을 제공한다.
- [0031] 구체적으로, 상기 C-22 소포로리피드 유도체 화합물은
- [0032] C-22 지방산이 함유된 오일을 포함하는 배지에서 칸디다 속 효모균을 배양시키는 단계(단계 1); 및
- [0033] 상기 단계 1의 효모균 배양액에 에틸 아세테이트를 처리하여 소포로리피드를 추출한 후, 헥산을 처리하여 잔류 오일을 제거하는 단계(단계 2)를 포함하는 방법으로 제조된다.
- [0034] 상기 제조방법 중 단계 1은 C-22 지방산이 함유된 오일을 탄소원으로 하는 배지에 칸디다 속 효모균을 배양하는 단계이다.
- [0035] 효모에서의 소포로리피드 생산은 기질로 사용되는 리피드 기질에 의해 강하게 영향을 받는다(Hu and Ju, Enzyme Microbial Technol., 83: 189-198, 2000).
- [0036] 상기 단계에서, 오일은 탄소원 기질로서 C-22 지방산이 함유된 것이면 어느 것을 사용하여도 무방하나, 소포로리피드 생산량을 높이기 위하여는 C-22 지방산 함량이 높은 것이 바람직하다.
- [0037] 일례로 고체지방산("C-22 고체지방산"이라 함)의 경우, C-22 함량이 95% 이상 포함되어 있는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 98% 이상 포함될 수 있다. 유채유("C-22 증가 유채유"라 함)의 경우에는 C-22 함량을 50% 이상 함유한 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 54% 이상 함유할 수 있다. 또한, 이들을 각각 메틸에스테르화한 것을 사용할 수 있다.
- [0038] 상기 메틸에스테르화는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여도 무방하나, 바람직하게는 메탄올과 아세틸클로라이드를 이용하여 고온, 고압상태에서 메틸에스테르화하는 방법을 이용할 수 있다.
- [0039] 한편, 상기 단계 1의 칸디다 속 효모균은 칸디다 봄비콜라(*Candida bombicola*), 칸디다 아피콜라(*Candida apicola*) 및 칸디다 페트롤리움(*Candida petrollium*)으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 1종일 수 있으나, 바람직하게는 칸디다 봄비콜라(*Candida bombicola*)일 수 있다.
- [0040] 상기 칸디다 속 효모균의 배양은 온도 30℃, 교반속도 550rpm, pH 3.5(± 0.2), 통기량 1vvm 하에서 유가배양(Fed-batch)하는 것이 바람직하다.
- [0041] 상기 단계 2는 상기 단계 1의 효모균 배양액을 에틸 아세테이트로 처리하여 소포로리피드를 추출한 후 헥산을 처리하여 잔류오일을 제거하는 단계이다. 이때, 본 발명의 소포로리피드를 순수 분리하기 위하여, 단계 2의 에틸아세테이트는 단계 1의 효모균 배양액에 대하여 100 내지 200 부피(v/v)로 처리하며, 헥산은 10 내지 50 부피(v/v)로 처리하는 것이 바람직하다.
- [0042] 본 발명은 C-22 소포로리피드 유도체 화합물을 유효성분으로 함유하는 계면활성제를 제공한다.
- [0043] 상기 계면활성제는 세제, 비듬방지제, 방취제, 화장품, 비누, 샴푸 등에 응용될 수 있다.
- [0044] 본 발명자들은 제조예 1 내지 3에서 3종의 각기 다른 오일을 이용하여 C-22 소포로리피드를 생산하였다. 7일 동안 칸디다 봄비콜라를 유가배양하여 C-22 고체지방산(메틸에스테르 형태)의 경우 47 g/L, C-22 증가 유채유의 경우는 105 g/L, C-22 증가 유채유(메틸에스테르 형태)의 경우 105 g/L의 소포로리피드를 수득하였고(표 2 참조), LC-MS를 이용하여 지방산 구조를 파악한 결과 탄소수 22를 갖는 산형(acidic form) 또는 락톤형(lactonic form) 소포로리피드 유도체 화합물이 생성되었음을 확인할 수 있었다.
- [0045] 또한, 상기 생성된 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 계면활성제로서의 특성을 알아보기 위하여, 표면장력, 임계미셀농도(CMC), 분산력, 보습력, 유화능·유화 안정성, 기포력, 세척력, 생분해도를 측정하였다.
- [0046] 측정결과, 본 발명의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물은 화학계면활성제에 비하여 분산력, 세척력 및 생분해도

가 뛰어난 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물은 낮은 생분해도로 인하여 환경오염의 주요인이 되고 있는 종래의 화학 계면활성제를 효과적으로 대체할 수 있을 것으로 판단되었다.

[0047] 이하 본 발명이 구체적인 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만, 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

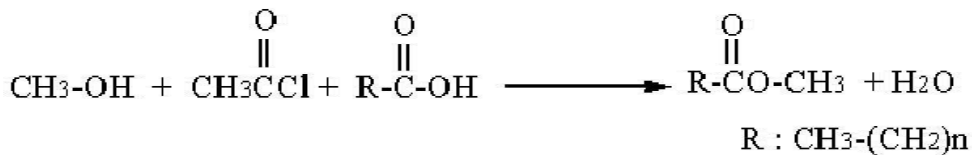
[0048] 본 발명의 C-22 소포로리피드 제조를 위하여, 하기 3종의 탄소원 기질을 준비하였다: 1) C-22 고체지방산(메틸 에스테르화), 2) C-22 증가 유채유(메틸에스테르화) 및 3) C-22 증가 유채유.

[0049] 제조예 1: C-22 고체 지방산(메틸에스테르화)의 제조

[0050] 메틸에스테르화된 C-22 고체 지방산을 제조하기 위하여, C-22 고체지방산을 (주)KCI(인천, 대한민국)에서 구입한 후, 메탄올과 아세틸클로라이드를 이용하여 메틸에스테르화하였다.

[0051] 구체적으로, 밀폐된 용기 속에 C-22 지방산, 메탄올 및 아세틸클로라이드를 넣은 후, 오토클레이브를 이용하여 100℃, 고압 상태(0.3kgf/cm²)에서 1시간 반응시켜 하기 반응식 1과 같이, 기질의 메틸에스테르화 과정을 수행하였다. 이후, 메틸에스테르화된 오일만을 얻기 위하여, 헥산을 첨가하여 층 분리 후, 회전 증발기(제조사:EYELA, 모델명:N-1000)를 이용하여 용매를 제거하여 메틸에스테르화된 기질을 수득하였다. C-22 고체 지방산의 C-22 지방산 함량을 GC로 분석한 결과 C-22 고체지방산이 98% 이상인 것으로 나타났다.

반응식 1



[0052]

[0053] 제조예 2: C-22 증가 유채유의 준비

[0054] (주)KCI에서 C-22 지방산 함량이 54% 이상인 유채유(이하, “C-22 증가 유채유” 라고 함)를 구입하였다. 일반 유채유의 C-22 지방산 함량은 2%이하로서, C-22 증가 유채유에 비하여 훨씬 적다.

[0055] 제조예 3: C-22 증가 유채유(메틸에스테르화)의 제조

[0056] 상기 제조예 2의 C-22 증가 유채유를 대상으로, 제조예 1의 메틸에스테르화 방법을 동일하게 수행하여 메틸에스테르화된 C-22 증가 유채유를 제조하였다.

[0057] 상기 3종의 C-22 지방산 함유 오일을 기질로 이용하여 C-22 소포로리피드를 제조하였고, 이를 하기 실시예 1 내지 3에서 설명한다.

[0058] **실시예 1: C-22 고체 지방산(제조예 1)을 이용한 C-22 소포로리피드(sophorolipid)의 생산(1)**

[0059] 균주의 배양

[0060] 캔디다 봄비콜라(*Candida bombicola* ATCC22214) 효모균을 YM 배지에서 30℃, 150 rpm으로 7일간 배양하였다. 상기 배양 상등액 1.5%(v/v)를 1L의 효모 배양용 배지가 담긴 2.5 L의 jar 발효기(Kobiotech, Korea)에 접종하였다. 상기 효모 배양용 배지의 구체적인 성분 및 함량은 하기 표 1에 나타내었다. 상기 배지에 효모균을 접종한 후 온도 30℃, 교반속도 550rpm, pH 3.5(± 0.2), 통기량 1vvm 하에서 7일간 유가배양(Fed-batch)하였다.

표 1

[0061] 효모 배양용 배지의 성분 및 함량

성분	함량
글루코스	100g
효모추출물	5g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.5g

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1g
NaCl	0.1g
펩톤	0.7g
제조예 1의 C-22 고체지방산(메틸에스테르 형태)	110g
증류수	최종 부피 1L로 맞춤

[0062] C-22 소포로리피드의 분리

[0063] 효모균의 배양 종료 후, 배양액을 에틸 아세테이트로 3회 반복추출하고, 진공 증발기(Eyela, Tokyo Rikakikai, Japan)를 이용하여 추출에 사용된 에틸 아세테이트를 제거하여 미정제된 소포로리피드를 얻었다. 상기 미정제 소포로리피드에 다시 헥산을 첨가하여 잔류오일을 제거하고, 클로로포름으로 용액 중의 소포로리피드를 추출하여 최종적으로 정제된 소포로리피드(생성량: 47 g/L)를 수득하였다.

[0064] 실시예 2: C-22 증가 유채유(메틸에스테르 형태)를 이용한 C-22 소포로리피드(sophorolipid)의 생산(2)

[0065] 실시예 1에서 배지 중에 기질로서 제조예 1의 C-22 고체지방산(메틸에스테르 형태) 대신에 제조예 2의 C-22 증가 유채유를 110 g 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 최종적으로 정제된 소포로리피드(105 g/L)를 수득하였다.

[0066] 실시예 3: C-22 증가 유채유를 이용한 C-22 소포로리피드(sophorolipid)의 생산(3)

[0067] 실시예 1에서 배지 중에 기질로서 제조예 1의 C-22 고체지방산(메틸에스테르 형태) 대신에 제조예 3의 C-22 증가 유채유(메틸에스테르 형태)를 110g 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 최종적으로 정제된 소포로리피드(생성량: 105 g/L)를 수득하였다.

[0068] 상기 실시예 1 내지 3에서 사용한 기질 및 이에 따라 생성된 소포로리피드의 수득량을 하기 표 2에 정리하여 나타내었다.

표 2

[0069] 본 발명의 사용기질 및 소포로리피드의 수득량

	사용 기질	소포로리피드 수득량 (g/L)
실시예 1	C-22 고체 지방산 (메틸에스테르 형태)	47
실시예 2	C-22 증가 유채유	105
실시예 3	C-22 증가 유채유(메틸에스테르 형태)	105
[참고] 일반 유채유(C-18)의 경우 95~100 g/L 수득.		

[0070] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, C-22 증가 유채유를 기질로 사용시 리터 당 105 g의 소포로리피드가 생성됨을 알 수 있었다. 이는 종래 C-18 지방산을 갖는 일반 유채유를 기질로 하는 경우 리터 당 95 내지 100 g의 소포로리피드를 수득할 수 있는 것에 비하여 현저하게 증가된 생성량이다.

[0071] 따라서, 종래 소포로리피드가 높은 생산 단가로 인하여 그 사용이 제한되어 온 점을 개선할 수 있고, 상기 높은 생산성으로 생산 단가를 낮출 수 있어 화학적 계면 활성제와 가격 경쟁력을 갖출 수 있을 것으로 판단된다.

[0072] 다만, C-22 고체지방산을 사용한 경우 일반 유채유에 비하여 생성량이 줄어들었는데, 이는 아마도 효모균이 액체에 비하여 고체성분을 이용하는데 어려움이 있기 때문일 것으로 추측된다.

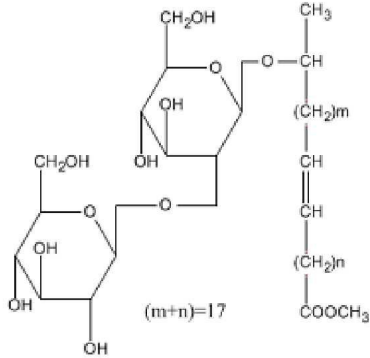
[0073] 실험예 1: 본 발명의 C-22 소포로리피드 구조 규명

[0074] 실시예 1, 2 및 3을 통하여 수득한 소포로리피드의 구조를 살펴보기 위하여 LC-MS를 수행하였다. 실시예 1, 2 및 3의 소포로리피드를 시린지 펌프(syringe pump)를 이용하여 주입하여, 각각의 광범위한 질량 스펙트럼(mass spectra)을 획득하였다. 오일과 당을 기질로 하여 생산되어지는 소포로리피드는 산형(acidic type)과 락톤형(lactonic type)으로만 구성되며, 따라서, LC-MS에 나온 분자량으로 이 두 가지 형태를 기초로 구조를 명확하게 규명할 수 있다.

[0075] 제조예 1의 C-22 고체지방산(메틸에스테르)을 탄소원으로 사용한 경우

[0076] 상기 분석 결과, 탄소원으로 제조예 1의 C-22 고체 지방산(메틸에스테르 형태)을 사용한 경우(실시예 1), 도 1의 질량 스펙트럼을 얻을 수 있었으며, 이로부터 하기 화학식 3의 산형 소포로리피드(C 22:1, $m/z=694.49$)가 생성되었음을 확인할 수 있었다. 상기 생성된 소포로리피드는 소포로스 당에 탄소수 22개, 불포화 결합 1개를 갖는 히드록시 지방산으로 이루어져 있었다.

화학식 3

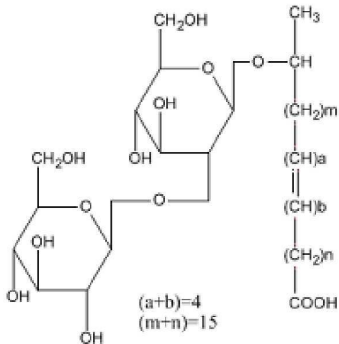


[0077]

[0078] 제조예 2의 C-22 증가 유채유를 탄소원으로 사용한 경우

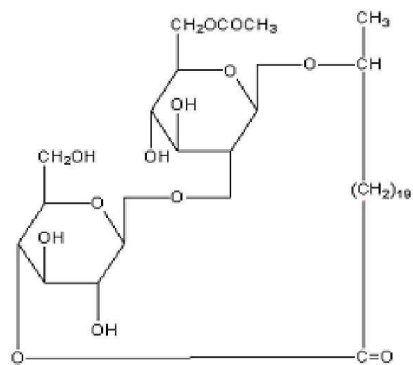
[0079] 탄소원으로 제조예 2의 C-22 증가 유채유를 사용한 실시예 2의 경우, 도 2의 질량 스펙트럼을 얻을 수 있었으며, 이로부터, 하기 화학식 4 및 화학식 5의 산형 소포로리피드(C22:2 with $m/z=678.39$)와 락톤형 소포로리피드(C22:0 with $m/z=706.39$)가 생성되었음을 확인할 수 있었다.

화학식 4



[0080]

화학식 5



[0081]

[0082] 제조예 3의 C-22 증가 유채유(메틸에스테르 형태)를 탄소원으로 사용한 경우

[0083] 탄소원으로 제조예 3의 C-22 증가 유채유(메틸에스테르 형태)를 사용한 실시예 3의 경우, 제조예 1의 도 1과 동일한 질량 스펙트럼을 얻을 수 있었으며, 이로부터 화학식 3의 산형 소포로리피드가 생성되었음을 확인할 수 있

었다.

[0084] 상기 수득한 각각의 소포로리피드의 계면활성제로써 특성을 알아보기 위해, 표면장력(surface tension), 임계미셀농도(CMC), 분산력(dispersion power), 보습력(water uptake), 유화능·유화 안정성(emulsifying power), 기포력(foaming power), 세척력(detergency power), 생분해도(biodegradability)를 측정하였다.

[0085] 실험예 2: 표면 장력 및 마이셀 형성 농도(CMC) 측정

[0086] 표면 에너지가 높아 젖음성(wetting property)이 우수한 백금 링(platinum ring)을 이용하여 두 누오이 텐지오미터(*du Nuoy tensiometer*)(Surface Tensiomat 21, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, U.S.A)로 소포로리피드의 표면 장력(Surface Tension) 및 CMC를 측정하였다. 상기 CMC(Critical Micelle Concentration)란, 계면활성제가 마이셀(micelle)을 형성하기 시작하는 농도를 말한다.

[0087] 측정결과 도 3에 나타내었다. 도 3에서 C-22 고체 지방산(메틸에스테르 형태)의 측정된 CMC 값은 47.5 mg/L, 43.0 mN/m로서, C-18 증가 유채유(메틸에스테르 형태; 70mg/L, 46.5mN/m)에 비하여 낮았다. 이로부터 탄소 사슬이 증가함에 따라, CMC 값이 줄어듦을 알 수 있었다.

[0088] 또한, 최소 표면장력(minimum surface tension) 역시 사슬 길이가 증가함에 따라 감소하는데, 이는 계면활성제의 소수성이 증가하기 때문이다. 즉, 탄소사슬 길이가 증가함에 따라, 계면활성제는 보다 표면 활성도가 높아진다.

[0089] 실험예 3: 분산력의 측정

[0090] 분산력을 측정하기 위해, 0.1g 소포로리피드와 0.3g 산화제2철(Ferric Oxide)을 100 mL 증류수에 25분간 활발하게 교반한 후, 상기 현탁액을 100 mL 매스실린더에 넣은 후, 20분 동안 방치하였다. 매스실린더 80 mL 부분에서 2 mL를 취하여, 다시 25 mL의 증류수에 넣은 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 측정은 3회 반복 수행하였다.

[0091] 측정결과 도 4에 나타내었다. 도 4에서 보는 바와 같이, 다양한 종류의 기질에 의해 생산된 소포로리피드(실시에 1 내지 3)는 화학적 계면활성제(SDS)보다 10배 이상의 분산력을 나타내었다. 한편, C-22증가 유채유와 C-22증가 유채유(메틸에스테르 형태)를 비교해 볼 때, 기질의 메틸에스테르화는 분산력을 오히려 저해시키는 결과를 보여주었다. 또한, 고체 지방산으로부터 생산된 소포로리피드의 경우에는 분산 능력이 유채유에 비해서 낮아지기는 하였으나, 화학적 계면활성제에 비하여 우수하였다.

[0092] 따라서 본 발명의 소포로리피드의 경우 화학적 계면활성제에 비하여 분산력(Dispersion Power)이 매우 우수하여, 고체 입자를 물에 더욱 균일하게 분산시켜 줄 수 있으므로, 화학적 계면활성제를 대체하여 세척제 및 화장품에 널리 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

[0093] 실험예 4: 보습력의 측정

[0094] 보습력 측정은 25℃, 밀폐된 용기 속에 각각 염화나트륨(상대습도 75.0~76.5%)과 염화마그네슘(상대습도 32.7~33.2%)으로 포화 시킨 후, 진공 오븐으로 건조된 소포로리피드 1 g을 넣은 후, 일정한 무게에 도달 시까지 무게를 측정 하였으며, 100 g 으로 환산하여 보습력을 나타냈다. 모든 측정은 3회 반복하여 수행하였다.

[0095] 측정결과 도 5에 나타내었다. 밀폐된 용기에 염화나트륨으로 상대습도를 75.0~76.5%로 유지시킨 경우, C-22 증가 유채유(메틸에스테르화)로부터 얻은 소포로리피드는 9.6 g의 보습력을 보였고, 고체 지방산(메틸에스테르화)으로부터 얻은 소포로리피드는 5.4 g의 보습력을 보였다. 상대습도를 32.7~33.2%로 유지시킨 경우에도 C-22 증가 유채유(메틸에스테르화)로부터 얻은 소포로리피드가 가장 높은 보습 능력을 나타내었다. 참고적으로 일반 유채유의 경우, 8.14 g(상대습도 75.0~76.5%) 및 2.77 g(상대습도 32.7~33.2%)을 나타내는 바, 이와 비교하여 보아도 C-22 증가 유채유(메틸에스테르화)로부터 얻은 소포로리피드가 우수함을 확인할 수 있었다.

[0096] 따라서, 본 발명의 소포로리피드는 높은 보습력을 나타내므로, 피부의 급격한 보습력의 저하로 인한 아토피 등의 피부질환의 치료제 또는 화장품 등으로 응용될 수 있을 것으로 판단된다.

[0097] 실험예 5: 유화력 측정

[0098] 본 발명의 소포로리피드의 유화력 측정을 위해, Rosano 및 kimura method을 변형하여 수행하였다(H. L. Rosano, D. John, and J. H. Whittam, J. Amer. Oil Chem. Soc., 59, 360(1982); 木村, 柏谷, 油化學, 24, 121(1975)). 구체적으로, 덮개가 있는 유리 튜브에 10 mL 수용액(1 중량% 소포로리피드)와 10 mL 해바라기 오일

을 최고 속도로 20분간 교반하여 유화시킨 후 25 ± 0.5 °C 항온수조에 유화상을 유지시켜 1~10시간 동안 일정시간마다 유화상의 부피를 관찰하여 전체부피에 대한 비율을 유화력으로 나타내었다.

[0099] 측정결과는 도 6에 나타내었다. 기질로 C-22 증가 유채유(메틸에스테르 형태)로부터 생산한 소포로리피드(실시예 3)의 경우에는 유화력은 우수하였으나 유화상이 불안정하여 시간이 지남에 따라 상분리가 계속 일어나는데 비해, C-22 고체 지방산(메틸에스테르 형태)으로부터 생산한 소포로리피드(실시예 1)의 경우 유화력은 떨어졌으나 유화 안정성에는 대체로 안정한 상태를 보였다.

[0100] 유화란 기름과 물처럼 서로 잘 섞이지 않는 두 액체를 교반하여, 한 액체를 미립자 상태로 다른 액체에 균일하게 분산 시키는 것을 말하며, C-22 고체 지방산(메틸에스테르 형태)의 경우 안정한 유화제로서의 특성을 가지므로 식품 및 화장품 공업에서 유화제로서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

[0101] 실험예 6: 기포력 측정

[0102] 기포력과 기포 안정성 측정을 위해, 계량된 Ross and Miles(1989)인 KS M ISO 696법(산업자원부 기술표준원)등을 실험 방법에 이용하였다.

[0103] 소포로리피드를 3차 증류수에 0.02 중량%로 녹여 용액을 만들어 리시버(receiver)에 50 cm^3 를 넣은 후, 일정 높이(450 mm)에서 뷰렛(burette)을 이용하여 200 cm^3 용액을 일정 속도로 리시버로 떨어 드린 후, 기포 높이를 측정하였다. 또한, 기포 안정성을 측정하기 위해, 5분 후에 높이를 측정하였으며 실험 온도는 50 ± 1 °C로 유지시켰다.

[0104] 측정결과는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0105] 계면활성제 용액의 기포 높이(cm)

용액 농도 (중량 %)	T- 80 ¹		X-100 ²		F-A(M) ³		C-22(M) ⁴		C-22 ⁵	
	초기	5분후	초기	5분후	초기	5분후	초기	5분후	초기	5분후
0.02	3.20	2.95	5.83	3.95	0.14	0.05	0.21	0.19	0.20	0.03
[주] 1: 트윈80(tween-80), 2: 트리톤 X-100, 3: 고체 지방산(메틸에스테르 형태), 4: C-22 증가 유채유(메틸에스테르 형태), 5: C-22 증가 유채유										

[0106] 상기 표 3에서 알 수 있는 바와 같이, 화학적 계면 활성제(트윈-80, 트리톤 X-100)에 비해 소포로리피드의 기포력이 15 ~ 42배 낮은 것으로 나타났으며, 친유성 부분의 탄소 사슬 길이에겐 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 비누나 합성 계면활성제처럼 한 분자에 한 개의 소수기와 한 개의 히드록시기를 갖는 일쇄형 계면활성제는 표면흡착이 긴밀하기 때문에 기포성이 큰 것을 알 수 있다.

[0107] 기포력이 낮은 경우, 반도체 및 LCD(Liquid Crystal display)에서의 각 공정 후에는 많은 잔류물 또는 오염물이 표면에 남게 되는데 이것들을 제거하는 세정공정(cleaning process)에 사용될 수 있다. 이 때 사용되는 세정제에 기포가 생성 될 경우, 소자의 구조적 형상의 왜곡과 전기적 특성(electrical characteristics)을 저하시킴으로써 그 소자의 성능 및 수율 등에 큰 영향을 미치기 때문에, 본 발명의 소포로리피드는 세정제의 계면활성제로 효과가 뛰어난 것으로 판단된다. 또한, 본 발명의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물은 화학적 계면 활성제에 비하여 기포발생량이 적으므로 수질 오염을 줄이는데 크게 기여할 수 있을 것으로 판단되었다.

[0108]

[0109] 실험예 7: 세척력 측정

[0110] 세척력 실험을 위해, 하기 표 4에 나타난 4가지 종류의 오염포를 이용하였으며, 섬유 종류에 대한 세척력을 보기 위해 혼방섬유(폴리에스테르/면)와 면을 비교하였다.

표 4

[0111] 본 발명에서 사용한 오염포 종류별 오염원

종 류	오 염 포	섭 유	오 염 원
복합 때	일본 오염포 (JIS 오염포)	면	올레인산, 트리올레인, 올레인산콜레스테롤, 유동파라핀, 스쿠알렌, 콜레스테롤, 젤라틴, 적황색토, 카본블랙
찌든 때	CFT AS 10	면	색소, 오일, 우유
기름때	WFK 10D	면	색소, 피지(sebum)
기름 때	WFK 20D	폴리에스테르/면	색소, 피지(sebum)

[0112] 식물성 오일(Palm oil)에 함유된 라우르산(Lauric acid)으로부터 합성되는 비교적 강한 올레오케미컬(oleochemical) 계면활성제인 소디올라우릴설페이트(Sodium Lauric Sulfate; SLS)와 소포로리피드를 전형적인 세척 조건인 30 ℃, 10분, 120 rpm, 세척수 부피 1.5 L의 세척기에서 실험을 실시하였으며, 백도계를 통해 세척물(soil removal)을 측정하였다. 화학적 계면활성제인 소디올라우릴설페이트(SLS)는 일반적으로 세제에 첨가되는 농도인 0.15 g(0.01%)으로 실험하였고, 본 발명의 소포로리피드는 0.15 g, 0.3 g 및 0.45 g으로 나누어 실험하였다.

[0113] 실시예 1의 C-22 고체지방산으로부터 생산된 소포로리피드의 세척률 측정 결과는 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0114] 실시예 1의 소포로리피드의 세척률

	SLS 0.15g	실시예 1		
		0.15g	0.3g	0.45g
복합 때	12.89%	8.50%	6.79%	6.31%
찌든 때	8.50%	8.84%	8.52%	10.70%
기름 때	13.35%	8.96%	11.67%	10.28%
기름 때	15.48%	3.72%	1.15%	0.96%

[0115] 상기 표 5에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 소포로리피드는 현재 상업적으로 사용되는 화학적 계면활성제(소디올라우릴설페이트)와 비슷한 수준의 세척력을 나타내었다. 특히, 찌든 때의 오염포(세제로 제거되기 힘든 오염원)에서는 C-22 고체 지방산(메틸에스테르 형태)으로부터 생산된 소포로리피드(실시예 1)가 화학적 계면활성제에 비하여 뛰어난 세척률을 보였는데, 이는 소수성 부분의 탄소 사슬이 길어 오염포의 오염원인 오일, 우유와 같은 소수성 부분에 쉽게 붙어 높은 세척효과를 나타내는 것으로 추측된다.

[0116] 상기 결과로부터, 본 발명의 소포로리피드는 합성세제 대비 유사 또는 동등한 수준의 세척률을 나타내는데, 합성세제 대체용 천연세제로서 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 특히, 화학적 계면활성제에 대한 규제가 있는 유럽 등에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.

[0117] 실험예 8: 생분해도(Biodegradability) 측정

[0118] 생분해도를 측정을 위하여, 분해속도를 비교할 수 있는 실험 방법인 표면장력 측정 방법을 이용하였다. 측정 방법은 인하대학교 내에 위치한 인경호 호수물을 이용하여, 본 발명의 소포로리피드와 석유 유래 계면활성제인 LAS(Linear Alkyl benzene Sulfonate)를 200ppm(200 mg/L)의 비율로 혼합한 후, 각각의 CMC(Critical Micelle Concentration)를 측정하였고, 이후 교반배양기로 180rpm, 37℃ 및 4℃에서 배양하면서 일자에 따라 표면장력계(Surface Tensiometer 21, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, U.S.A)로 표면장력 값을 측정하고 이를 이용하여 생분해도를 측정하였다

[0119] 측정결과는 도 7에 나타내었다. 측정 대상 모두 배양일자에 따라 생분해도가 증가함을 알 수 있었다. 본 발명의 소포로리피드와 화학적 계면 활성제(LAS)를 비교해보면, 본 발명의 소포로리피드가 훨씬 우수한 생분해도를 나타내었고, 그 중에서도 특히 계면 활성제의 메틸에스테르화한 친유성기가 길수록 높은 생분해율(biodegradability)을 나타냈다. 온도의 경우, 온도가 낮을수록 분해속도는 급격히 저하 되었으며 특히, 화학적 계면 활성제인 LAS는 20일이 지나도 더 이상 생분해가 일어나지 않는 것으로 나타났다.

[0120] 따라서, 본원발명의 소포로리피드는 화학적 계면활성제에 비하여 생분해속도가 빠르므로, 화학적 계면활성제를

효과적으로 대체할 수 있을 것으로 판단된다. 한편으로는 화학적 계면활성제의 사용을 규제하는 유럽 등에서도 환경적합형 세척제로서 전자산업용 세제, LCD기판 세제 등에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0121] 도 1은 실시예 1에서 수득한 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 질량스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이다.

[0122] 도 2는 실시예 2에서 수득한 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 질량스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이다.

[0123] 도 3은 본 발명의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 CMC 및 표면장력 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0124] 도 4는 본 발명의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 분산력 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

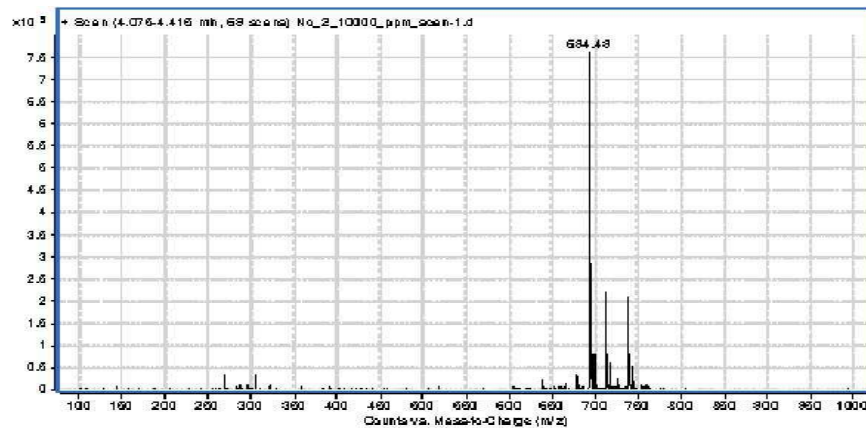
[0125] 도 5는 본 발명의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 보습력 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0126] 도 6은 본 발명의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 유화력 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0127] 도 7은 본 발명의 C-22 소포로리피드 유도체 화합물의 생분해도 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

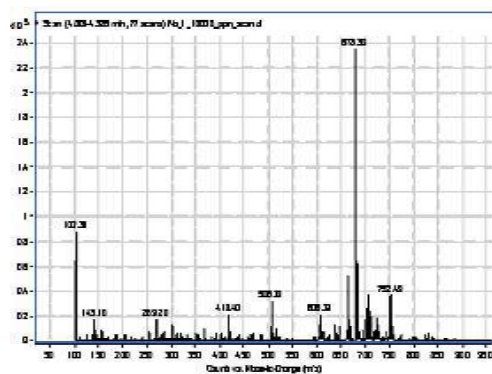
도면

도면1

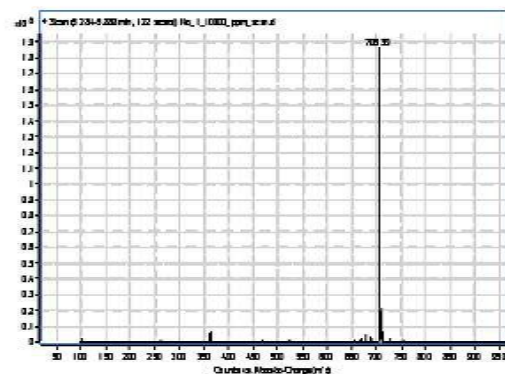


도면2

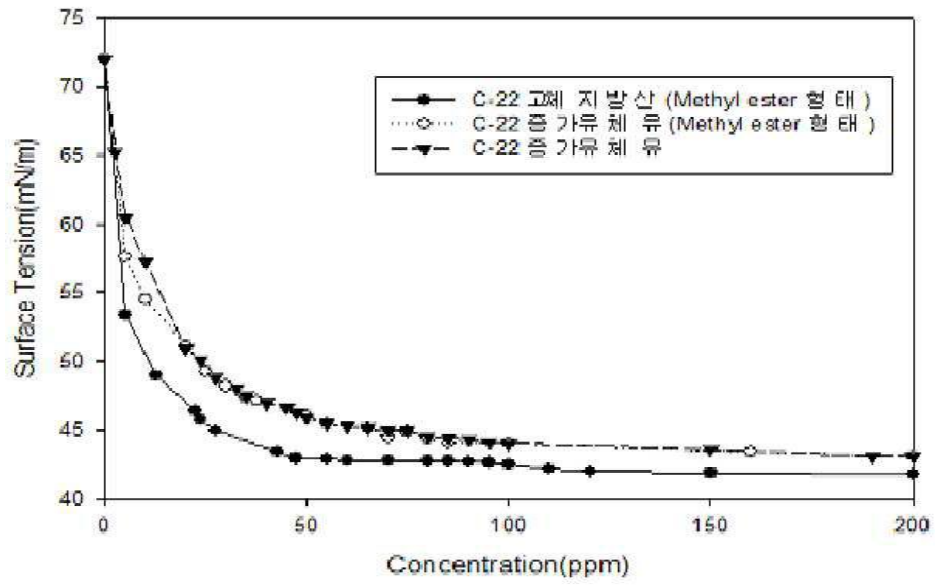
(Acidic C-22 sophorolipid)



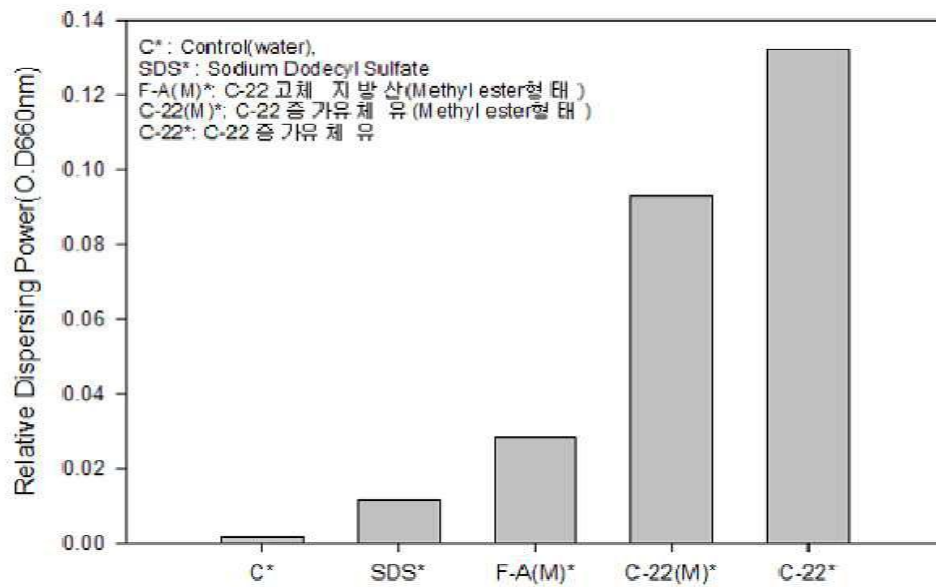
(Lactonic C-22 Sophorolipid)



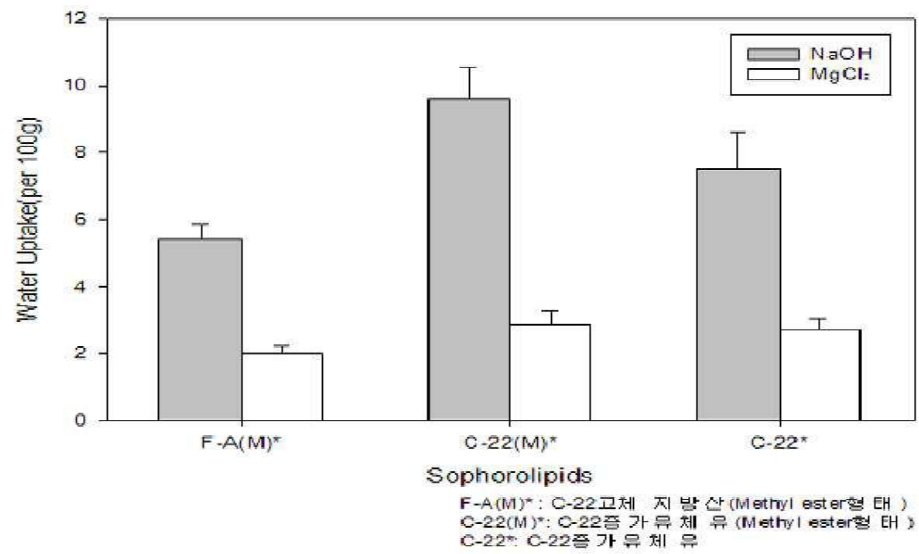
도면3



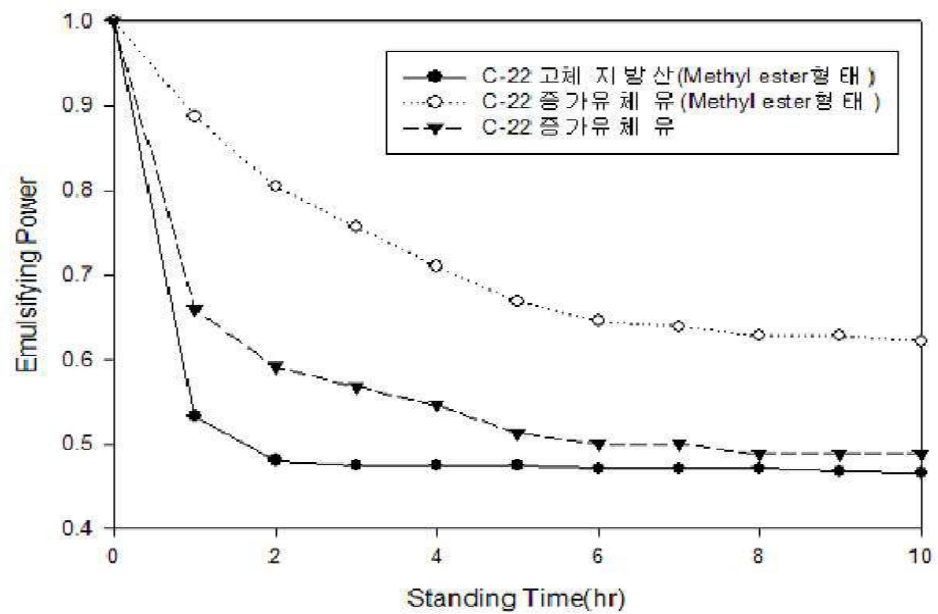
도면4



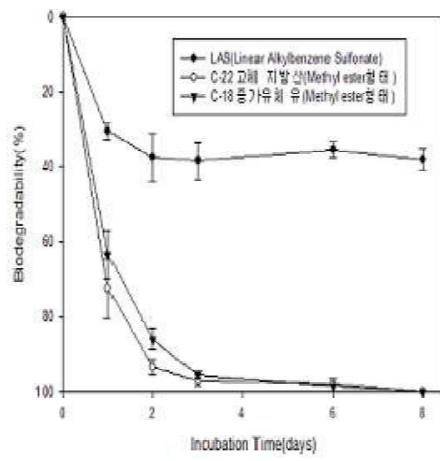
도면5



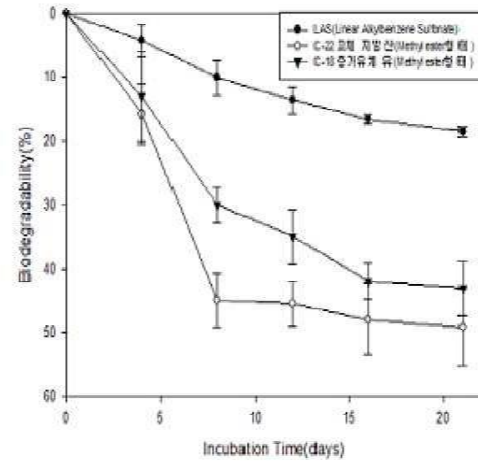
도면6



도면7



37°C



4°C