講 座

[入門講座・界面活性剤]

新しい界面活性剤の性質と応用**“バイオサーファクタント”**

木 村 義 晴・井 上 恵 雄

花王株式会社 栃木第 1 研究所 (栃木県芳賀郡市貝町大字赤羽 2606)

Surfactants**“Biosurfactants”**

Yoshiharu KIMURA and Shigeo INOUE

Tochigi Research Laboratories, Kao Corporation
(2606, Akabane, Ichikaimachi, Haga, Tochigi)**1 はじめに**

界面活性物質はその分子中に親水性基と疎水性基を併せもつ両親媒性物質と定義される物質であり、その機能は生物の営みや近代工業社会の運営において必ず(須)、欠くことのできないものである。

特に生物界では細胞構成物質の約 70% が水分であり、多種多様な物質が精妙な構成によって秩序だった営みを行っている。その界面秩序をつかさどる不可欠物質として界面活性物質が重要な役割を担っていることは周知の事実である。ここに、生体界面活性物質、いわゆるバイオサーファクタントの役割が注目される理由がある。

バイオサーファクタントは、その親水基の分類によって次の 5 つのグループに分類することができる。すなわち、(1) 糖を親水基とする糖脂質系バイオサーファクタント、(2) オリゴペプチドを親水基とするアシルペプチド系バイオサーファクタント、(3) リン酸基を親水基とするリン脂質系バイオサーファクタント、(4) カルボキシル基を親水基とする脂肪酸系バイオサーファクタント、及び、(5) 多糖、タンパク質及び脂質が結合した高分子系バイオサーファクタント (バイオポリマー) である。ただし、生体内バイオサーファクタントは、極めて複雑な生体物質群の中に微量に存在するものであり、その大量精製品の調製が困難なものが多く、界面活性物質として評価研究された事例は極めて少ない。

しかしながら、最近、微生物がその菌体外に比較的大量に生産・蓄積する、微生物サーファクタント (Microbial surfactant) が次々と見いだされつつあり、石油の 3 次回収剤、石油等の環境汚染の無公害除去剤、並び

に、機能性界面活性剤など、多くの分野にわたってその利用技術の開発が試みられている。

これらバイオサーファクタントは、合成界面活性剤にはみられない、構造上の特徴を有しており、新しい界面活性機能が発掘される可能性を多く秘めている。また、生分解性や安全性に優れていることが期待されるし、さらに、生理活性を有するものについてはその機能を利用することもできる。バイオサーファクタントとは、生物由来界面活性物質をすべて包含する術語であるが、ここでは今後開発が期待されている微生物起源の界面活性物質、いわゆる微生物バイオサーファクタントを中心に述べることにしたい。

2 バイオサーファクタントの分類**2.1 糖脂質系バイオサーファクタント**

糖脂質 (Glycolipid) は、リン脂質 (Phospholipid) とともに複合脂質 (Complex lipid) の一大分野を形成し、脂質と糖の世界を結ぶかけ橋となっている¹⁾。化学的構造の面からは「脂肪族アルコールまたは脂肪酸と結合した物質からなる複合脂質」として定義される²⁾。

この糖脂質は、その構造と分布から次の 4 つのグループに分類できる。

(1) スフィンゴ糖脂質 (Sphingoglycolipid)……動物

(2) フィトグリコリピド (Phytoglycolipid)……植物

(3) グリセロ糖脂質 (Glyceroglycolipid)……植物・微生物

(4) 構成単位として、スフィンゴシン、グリセリンを持たない、その他の糖脂質……微生物・植物

図-2 代表的サポニン類

2.4 その他のバイオサーファクタント

脂肪酸系バイオサーファクタントとしては、すべての脂肪酸類がこの領域に入ることになる。

動物体内の分泌液の中で胆汁中に存在する胆汁酸はその代表例である。

高分子系バイオサーファクタントとしては、炭化水素資化性細菌が生産する Bioemulsifier(構成成分は多糖タンパク質-脂質)⁷⁾や, Emulsan(構成成分は多糖-脂質)⁸⁾などが代表的なものとして知られている。

3 微生物起源のバイオサーファクタント

微生物の産生するバイオサーファクタントの研究には大きく分けて、次の3つに分類される研究の流れが存在する。すなわち、(1) 微生物の *n*-アルカン取り込みメカニズム研究に端を発した、バイオサーファクタントの発見とその機能研究の流れ、(2) として、石油の環境無公害処理技術の開発、及び、石油の微生物利用強制3次回収法(MEOR)等の経済的マイクロ技術の開発に端を発したバイオサーファクタント利用技術の研究の流れ、及び、(3) として、生物の多種多彩な界面秩序をつかさどる界面活性様物質の構造と機能に学び、新しい機能性界面活性剤の開発を目指した、生物界面活性物質の研究から端を発したバイオサーファクタント研究の流れである。微生物からのバイオサーファクタントの開発は、植物や動物のそれとは違って、その機能、製造技術、及び、経済性等の種々の側面から有利な点を有しており、大量調製の可能性を高く秘めている。

3.1 糖脂質系バイオサーファクタント

3.1.1 ラムノリピド

微生物が産生する界面活性様物質、いわゆる、狭義のバイオサーファクタントとして最初に明らかとなったものはこのラムノリピドであった。1949年に、Jarvisら⁹⁾は *Pseudomonas aeruginosa* No. 141, 142 の産生する抗微生物活性を有する糖脂質の研究を行い、その物質が糖基として、ラムノース、2 mol と脂肪酸基として、 β -ヒドロキシデカン酸、2 mol から構成された、エステル結合型の糖脂質、ラムノリピド(Rhamnolipid II)であることを明らかにした(図-5)。このラムノリピド-IIはその後、抗生物質として、グラム陽性菌には効力を有するが、グラム陰性菌には無効であることが明らかになり、抗生物質としての開発研究は棚上げになった。

一方、これとは別に、Hisatsukaら¹⁰⁾は、炭化水素を有する *P. aeruginosa* S1B 7 株の炭化水素資化性を研究していたところ、この S1B 7 株は、炭化水素発酵において、自身の培養終了液を少量添加することにより、その増殖速度が顕著に促進される現象を見いだした。この増殖促進物質は、Jarvisらがすでに見いだしていた、ラムノリピド-IIであった。S1B 7 株は、工業用界面活

図-5 ラムノリピド系糖脂質

性剤である Tween 20 やポリオキシエチルノニルフェノールエーテル(Noigen EA 141)などによっても同様の促進作用が認められたので、このラムノリピド-IIの増殖促進作用は、その界面活性剤的構造から考え、界面化学的作用によるものであらうと推測された。Tween 20, Noigen EA 141 及びラムノリピド-IIの炭化水素乳化能はほぼ同じ能力を有しており、この点からも支持されるものであった。

このラムノリピド-IIの増殖促進作用は *Pseudomonas* 属に限定された性質であるが、炭化水素発酵における微生物の炭化水素取り込みに、バイオサーファクタントが関与しているのではないかと1つの仮説に対する具体的実証の契期となった重要な研究と評価できる。

その後、ラムノリピド-IIのほかに、いずれも炭化水素資化性 *Pseudomonas* 属が産生するのであるが、図-5に示した数種のラムノリピドが見いだされた。これら

べて、増殖促進作用を有していた。

これらラムノリピドの生産量は 0.013 g~10.2 g/l の範囲であり、まだ、実用的生産量に達しておらず、その工業的利用技術の可能性は乏しいのが現状である。

3.1.2 トレハロースリピド

Suzuki ら¹¹⁾は、炭化水素資化性微生物からの生理活性物質の探索研究の過程で、*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, 及び、*Mycobacterium* 属にわたる炭化水素資化性細菌が、乳化能の強い新しいタイプの糖脂質、トレハロースリピド-I (trehaloselipid-I) を産生することを見いだした。その中でも、特に、*Arthrobacter paraffinens* KY 4303 は、その生産量が大きく、1.3 g/l に達していた。図-6 に構造を示したが、エステル結合型の糖脂質である。乳化能が非常に強く、乳化剤用の界面活性剤として有効で

図-6 トレハロースリピド-II

あると報告されている。これ以外に、Wagner らによって見いだされた、脂肪酸部分がミコール酸であるトレハロースリピド-II も知られている¹²⁾。トレハロースリピドも、その生産微生物の炭化水素生育を促進する作用を有すると言われている。

炭化水素資化性細菌によって生産されるバイオサーファクタントは、その生産量は低く、実用的生産量レベルに達しておらず、いわゆる、工業用界面活性剤の開発という意味では量的な大きな壁が存在する。また、エステル結合タイプの糖脂質では、発酵生産されたそれら糖脂質を出発物質とし、有機化学的に、さらに有用な性質をもつと考えられる誘導体に変換調製することは、現状の技術では困難であり、多角的工業的利用には多くの制約がある。

3.1.3 ソホロリピド

炭化水素資化性酵母の糖脂質系バイオサーファクタントとして、Spencer と Tulloch らによって、野草の花みつ(蜜)から分離された、好浸透圧性酵母、*Torulopsis bombicola* ATCC 22214 (CBS 6009) の産生する、ソホロリピド-I (Sophorolipid-I) がある(図-7)¹³⁾また、Inoue らによって分離された、*T. bombicola* KSM-36 の生産する糖脂質も、ソホロリピド-I であった¹⁴⁾。

ソホロリピド-I と脂肪酸鎖長構造の異なるソホロリピド-II (脂肪酸として、12-ヒドロキシドコサン酸) が *Candida bogoriensis* によってグルコースから産生され

I R ₁ =R ₂ =COCH ₃	VI R ₁ =R ₂ =COCH ₃
II R ₁ =COCH ₃ , R ₂ =H	VII R ₁ =COCH ₃ , R ₂ =H
III R ₁ =H, R ₂ =COCH ₃	VIII R ₁ =H, R ₂ =COCH ₃
IV R ₁ =R ₂ =H	IX R ₁ =R ₂ =H

V Isomeric lactones

図-7 ソホロリピド-I

ることが報告されている¹⁵⁾。

ソホロリピドは微生物産生糖脂質の中では、例外的に、糖基と脂肪酸基が化学的に安定な、グリコシルエーテル結合で構成されている。そこで、反応性に富む末端カルボキシル基、及び、ソホロースのヒドロキシル基を利用した、各種アルキルエステル誘導体、あるいは、各種のポリオキシアルキレン付加誘導体を製造技術的に調製することが可能である。

Inoue らの *T. bombicola* KSM-36 によるソホロリピドの発酵生産量は、条件によって 100 g/l 以上のレベルであり、工業用界面活性剤として開発における、実用的可能性のレベルに達している。

もちろん、炭化水素増殖促進作用も有しており、さらに、属間を越えて、その作用を示すという、適用の幅広さを示唆されている¹⁶⁾。

このように、ソホロリピド-I は、構造的安定性があり幅広い誘導体の調製が可能であること、製造技術的可能性があること、及び、その発酵生産性が高いなどの諸点からみて、糖脂質系バイオサーファクタントの中で、最も応用の可能性を有しているのものであると考えられる。

3.1.4 その他の糖脂質

Nakahara らによって、*Candida* sp. B-7 が産生する糖脂質、マンノシルエリスリトールリピド (Mannosyl erythritol lipid, 図-8) が見いだされた¹⁷⁾。

生産量は数 10 g/l であるが、エステル結合タイプの糖脂質であり、酸・アルカリ条件下で容易に脂肪酸基が脱離してしまい、化学的に不安定であるとともに、これ

図-8 マンノシルエリスリトールリピド

を出発原料として、新しい有用な界面活性剤誘導体を調製することは困難であると考えられる。

また、カビ、*Ustilago nu-*
da PRL 627 がグルコースから、抗微生物活性を有する糖

脂質，ウスチラジン酸 (Ustilagic acid) を生産することが知られている。生産量は 15 g/l である¹⁸⁾。

3.2 アシルペプチド系バイオサーファクタント

3.2.1 サーファクチン系

血栓溶解物質として研究された，*Bacillus subtilis* の産生するサーファクチン [Surfactin (Subtilysin)] 系の物質が有名である (図-9)⁸⁾。その界面化学的性質は，代表的工業界面活性剤である SDS (sodium dodecyl sulfate) に準じるか，それを越える優れた性質を有し，界面活性剤として利用開発が期待されたが，生産量の低さ，及び，毒性の強さ等によってその開発は断念されている。

3.2.2 リポアミノ酸系

単純なリポアミノ酸として，オルニチンリピド (Ornithine lipid)¹⁹⁾ とセリリピンリピド (Cerilipin lipid)²⁰⁾ が知られている (図-9)。これらは *Pseudomonas* 属，*Thiobacillus* 属や *Gluconobacter* 属が産生するものである。

さらに，また，炭化水素資化性酵母の *C. petrophilum* の産生する Emulsifying factor (詳細な構造は不明であるが，5種類のアミノ酸と脂肪酸で構成されている)²¹⁾

サーファクチン (Surfactin, Subtilysin)

サーファクチンアナログ (Surfactin analog)

オルニチンリピド
(Ornithine lipid)

セリリピンリピド
(Cerilipin lipid)

と，*Corynebacterium lepus* が産生する Lipopeptide (ペプチド分 35%，脂肪酸分 65%)²²⁾ が知られている。いずれも，炭化水素の乳化能が優れ，若干の炭化水素増殖促進作用があると報告されているが，その利用開発は行われていない。

3.3 リン脂質系バイオサーファクタント及び脂肪酸系バイオサーファクタント

リン脂質では，すでに，大豆かすや卵黄から分離調製されたレシチンが食品用乳化界面活性剤として利用されているが，微生物が菌体外に産生するリン脂質としては，硫黄細菌である *Thiobacillus thiooxidans* の各種タイプのリン脂質²³⁾と炭化水素資化性 *Coryne. lepus* のリン脂質が知られている²⁴⁾。これらは，前者では硫黄の取り込み，後者では炭化水素の取り込みに寄与していると考えられている。生産量は小さく，レシチンの製造技術が確立されているので，利用開発は行われていない。

脂肪酸系バイオサーファクタントとしては，Cooper らの *Coryne. lepus* のケロシン発酵から得られたコリノミコール酸 (Corynomycolic acid)²⁵⁾ と Tabuchi らの *Penicillium spiculosporum* からのグルコース発酵で 110 g/l という大量に生産される，ヒドロキシ三塩基酸 (Spiculosporic acid) が知られている (図-10)²⁶⁾。

Zajic と Cooper によると，タールサンドやオイルシェールからアスファルト油分を分離回収する界面活性剤として，このコリノミコール酸が特異的に有効であると報告されており，石油分の分離回収用の界面活性剤としての応用開発が精力的に試みられている。

コリノミコール酸
(Corynomycolic acids)

スピクリスボール酸
(Spiculosporic acid)

図-9 アシルペプチド系バイオサーファクタント

図-10 脂肪酸系バイオサーファクタント

一方、スピクリスポール酸 (spiculisporic acid) は、その一ナトリウム塩の cmc (臨界ミセル濃度) として 3.92×10^{-3} M, 表面張力は 32 dyn/cm であると報告されており, SDS 程度の界面活性を持つ。非常に低泡性であり, 表面張力低下剤としての応用が期待されており, 各種の金属のさび止め剤, 帯電防止剤, 防曇剤, 油膜除去剤, あるいは, 酵素の透過剤等の用途分野に, その応用開発が試みられている。

3.4 高分子系 バイオサーファクタント

Zajic らの *Coryne. hydrocarboclastus* の炭化水素発酵で得られた Bioemulsifier⁷⁾, 及び, Rosenberg らの *Acinetobacter* sp. RAG-9 が炭化水素発酵で産生する Emulsan⁸⁾ などが知られている。

Bioemulsifier は糖含量 20~70%, タンパク質 5%, 脂質は不明の Crude polymer であり, その界面活性も, 2段階の表面屈折点が表れている。このものは, 枯渇した油田からの石油 3 次回収剤, あるいは, 環境の油汚染の除去剤として有効であるとして, 精力的に研究が行われている。

Emulsan は糖基として *N*-acetylgalactosamine, *N*-acetylgalactosamineuronic acid, 及び, 不明のアミノ糖で構成された多糖に脂肪酸がエステル結合した, 分子量約 100 万の乳化能を有する lipopolysaccharide である。この Emulsan は炭化水素を特異的に乳化する作用があり, 石油汚染の除去洗浄剤として極めて有効であると報告されている。また, タンカー等の石油貯槽, 燃料庫の無公害洗浄剤として, 米国の Petroferm USA 社が, 米国環境保護局 (EPA) の承認を得て, 精力的に技術開発がなされている。

大部分のバイオサーファクタントは, その生産量が小さいなど, 多くの課題を残しているのが現状である。今後の微生物産生バイオサーファクタント研究の発展には大量発酵生産技術の開発, 及び, その機能・性質の明確な把握, 評価研究が必ずであると考えられる。

4 ソホロリピドの応用開発

T. bombicola KSM-36 が生産するソホロリピドは発酵生産時には混合糖脂質として得られるが, 酸やアルカリ試薬で容易に, 化学的に安定なグリコシルエーテル結

図-11 ソホロリピド誘導体の合成法

合を持った単一の糖脂質, Acid-SL に化学変換される (図-7, 右図)。この Acid-SL は糖脂質系工業界面活性剤である Span, Tween, 及び, シュガーエステルに比べ, はるかに高い HLB 値を示し, 洗浄剤として使用されているアニオン界面活性剤の HLB 値領域に達していた。そこでまず, Acid-SL とその脂肪酸基の末端遊離カルボキシル基をメタノールやエタノール等の低級アルコールでエステル化した Methyl-SL 及び Ethyl-SL の洗浄剤としての応用開発を行った。その結果, シュガーエステルよりも優れた洗浄性能を有することが認められた。

次に, ソホロリピドはカルボキシル基, 及び, ヒドロキシル基を有しているので, そのカルボキシル基に長鎖脂肪族アルコールをエステル化したアルキル-SL 誘導体, あるいは, 糖のヒドロキシル基にエチレンオキシドやプロピレンオキシド等のアルキレンオキシドを付加重合させた, ポリオキシアルキレン誘導体等が容易に調製できることを見いだしたので, ソホロリピド系界面活性剤の界面化学的性質をそれらの誘導体で任意に調製することに着目し, より幅広い, 可溶化剤, 湿潤剤, 乳化剤等の分野の界面活性剤としての応用開発の可能性を探究した (図-11)²⁷⁾。

C₁ から C₁₈ のアルキル-SL 誘導体は HLB 値として, 7 から 20~45 までの幅広い HLB 領域をカバーすることがわかった (表-1)¹⁶⁾。

また, プロピレンオキシドを数モル以上付加重合した誘導体 (P-SL) は, アルキル-SL 誘導体とはその物性が異なり, アルキル-SL が界面活性剤的性質を多分に有

表-1 アルキル-SL の界面活性

Alkyl-SL	Surface tension (Dyn. cm ⁻¹)	cmc (wt%)	HLB
Acid-SL	34.8	3.2×10^{-2}	>25~45
Methyl-SL	38.0	5.4×10^{-3}	>25~45
Ethyl-SL	40.0	2.9×10^{-3}	≥20~45
Propyl-SL	39.5	1.4×10^{-3}	19.2
Butyl-SL	37.5	7.6×10^{-4}	18.5
Amyl-SL	36.5	4.6×10^{-4}	17.7
Hexyl-SL	36.5	3.2×10^{-4}	17.0
Octyl-SL	35.8	2.8×10^{-4}	15.5
Decyl-SL	38.5	5.3×10^{-4}	14.0
Myristyl-SL	48.8	6.9×10^{-3}	11.0
Oleyl-SL	—	—	7~8
satd. Methyl-SL	49.9	5.8×10^{-3}	>25~45
satd. Ethyl-SL	43.5	2.9×10^{-3}	≥20~45
Ethyl(α-type)-SL	42.0	2.9×10^{-3}	≥20~45
Rhamnolipid-1	32.0	5.4×10^{-3}	12.1*
Rhamnolipid-2	32.0	5.0×10^{-3}	8.2*

* Calculated from the-equation of Davies

しているのに反し、P-SL は油的性質を強く有するようになり、水に乳化する油という、特異的性質を示した。

以上のように、ソホロリピド系界面活性剤は、各種の界面化学的性質を有する広範囲な誘導体の調製ができる技術が確立されたことにより、一応の界面活性剤としての開発は終わったことになると考えられる。今後、適用の場での評価選択による実施が期待される。

一方、ソホロリピド、及び、その誘導体が皮膚に対して特異的親和性があり、皮膚の柔軟化、及び、保湿化に寄与している現象が、その応用開発研究の過程で認められた。現在、発酵によりソホロリピドを生産し¹⁴⁾、その誘導体である P-SL は化粧品原料として実用化されている。

5 おわりに

バイオサーファクタントは、合成界面活性剤にはない、構造上の特徴を有しており、かつまた新しい界面活性機能が発掘される可能性を大いに秘めている。最近、大量調製用の高速液体クロマトグラフィーの著しい発達など、生体内物質の大量、迅速かつ精密に分離精製する

ことのできる分離手段の開発が目覚ましく、バイオサーファクタントの物理化学的機能の解明が昔に比べはるかに容易に行われるであろう。今後、バイオサーファクタントの物理化学的性質の研究がますます盛んに行われることを期待したい。

(昭和 60 年 2 月 15 日受理)

文 献

- 1) 永井克孝, “多糖生化学(化学編) 1” 共立出版(昭和 44 年) p. 519,
- 2) J.H. Law, *Ann. Rev. Biochem.*, **29**, 131 (1960)
- 3) 山川民夫, “糖脂質物語”, 廣済社, 昭和 56 年
- 4) H.E. Cartner *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **35**, 335 (1958)
- 5) 庄司順三, フレグランスジャーナル, **60**, 67 (1983)
- 6) K. Arima *et al.*, *B.B.R.C.*, **31**, 488 (1968)
- 7) J.E. Zajic *et al.*, *Biotech. Bioeng.*, **19**, 1285, 1301 (1977)
- 8) E. Rosenberg *et al.*, *Appl. Env. Microbiol.*, **37**, 402 (1979)
- 9) F.G. Jarvis, M.J. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2**, 4124 (1949)
- 10) K. Hisatsuka *et al.*, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 686 (1971)
- 11) T. Suzuki *et al.*, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 190 (1969)
- 12) F. Wagner *et al.*, *J. Gen. Microbiol.*, **115**, 491 (1979)
- 13) J.F.T. Spencer *et al.*, *Can. J. Chem.*, **39**, 849 (1961)
- 14) 井上恵雄, 木村義晴, 日本農芸化学会講演要旨集, 3K-7, 昭和 55 年
- 15) A.P. Tulloch *et al.*, *Can. J. Chem.*, **46**, 345 (1968)
- 16) S. Inoue, S. Ito, *Biotechnol. Lett.*, **4**, 3 (1982)
- 17) T. Nakahara *et al.*, *J. Ferment. Technol.*, **61**, 143 (1983)
- 18) R.H. Haskins *et al.*, *Carbohydr. Res.*, **13**, 235 (1970)
- 19) S.G. Wilkinson, *Biochem. Biophys. Acta*, **270**, 1 (1972)
- 20) Y. Tahara *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 243, 1449 (1976)
- 21) T. Iguchi *et al.*, *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1657 (1969)
- 22) D.G. Cooper *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 41 (1979)
- 23) W.I. Schaefer, W.W. Umbreit, *J. Bacteriol.*, **85**, 492 (1963)
- 24) G.E. Jones, A.A. Benson, *J. Bacteriol.*, **89**, 260 (1965)
- 25) D.G. Cooper *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **58**, 77 (1981)
- 26) T. Tabuchi *et al.*, *J. Ferment. Technol.*, **55**, 37 (1977)
- 27) 井上恵雄, フレグランスジャーナル, **60**, 21 (1983)