

## ***Pseudomonas aeruginosa* YPJ80에 의한 생물유화제의 생산**

정 용린, 양 지원, 박 창호\*  
한국과학기술원 화학공학과, 경희대학교 화학공학과\*

### **Bioemulsifier Production by *Pseudomonas aeruginosa* YPJ80**

Yong Leen Jeong, Ji-Won Yang, Chang Ho Park\*  
Department of Chemical Engineering, KAIST,  
Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University\*

#### **서론**

계면활성제는 친수기와 소수기의 공존에서 유래한 양친성으로 인하여 유화제, 가용화제, 분산제, 기포형성제, 습윤제 등으로 산업에 널리 이용되고 있다. 그러나, 화학 합성 계면활성제의 독성과 난분해성으로 하천이나 바다의 환경이 훼손되고 있는 바, 높은 생분해도와 저독성, 고기능성을 갖는 미생물 유래 계면활성제에 대한 관심이 증가하고 있다. 그런데, 이러한 생물계면활성제는 생물 유래 물질들이 가지는 취약한 경제성으로 인하여 특수 용도로의 활용과 생산성의 향상이 요구되고 있는 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 유화제로서의 생물계면활성제의 생산과 관련한 배양 인자들의 최적화를 시도하였다.

#### **이론**

생물계면활성제는 서로 섞이지 않는 두 개의 상이 존재하게 되면, 양친성으로 인하여 두 상의 계면으로 이동하는 계면 선택성을 나타낸다. 이러한 계면 선택성은 섞이지 않는 두 개 이상의 상을 유화나 가용화 상태로 존재하게 하며, 용매에 용해되면 표면장력(또는 계면장력)을 감소시킨다. 그런데, 표면장력의 감소나 유화정도는 생물계면활성제(생물유화제)의 농도와 밀접한 관계가 있으므로, 이러한 성질을 측정함으로써 생물유화제의 생산성을 정량적 또는 정성적으로 평가할 수 있다(1,2).

#### **실험방법**

**실험 균주의 선택 및 동정:** 토양 시료를 생리식염수로 희석하여 0.4%의 Xanthan으로 원유를 분산시킨 agar 배지I에 도말한 후 3일 동안 배양하였다. 형성된 colony를 분리하여 기름 첨가 액체배지I에서 배양하였을 때 기름을 유화시키는 미생물을 선별한 후, 포도당 액체배지에서 가장 많은 생물유화제를 생산하는 미생물을 최종 선택하여 본 실험에 이용하였다. Bergey's manual of systematic bacteriology와 Biochemical tests for identification of medical bacteria에 준하여 동정한 결과 *Pseudomonas aeruginosa*로 판명되었다.

**배지 제조:** 배지 II의 조성을 갖는 액체배지를 A, B, C로 나누어 멸균 후 상온에서 혼합하였다. pH는 1N NaOH로 조절하였다.

**배양방법:** 250ml flask에 액체배지(배지 II)를 50ml 분주하여 9시간 동안 배양한 전배양액을 OD660에서 1.0기준으로 4% 접종하였다. 배양의 초기 조건은 30°C, 250rpm으로 하였다.

**표면장력 측정:** 균체를 제거하지 않은 배양액을 20mM citrate-phosphate buffer(pH=5.3)로 10배 희석하여 De Nouy 고리법으로 측정하였다(Digital Tensiometer K10ST, KRÜSS, FRG).

Table 1. Medium composition for screening bioemulsifier producing bacteria (medium I) and bioemulsifier production by *Pseudomonas aeruginosa* YPJ80 (medium II)

Medium I (g/l)		Medium II (g/l)	
Carbon source:	30.00	(A)	
crude oil or soybean oil or hexadecane or glucose		Glucose	20.00
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.00	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.50
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.60	(B)	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.40	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.00
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50
Yeast Extract	0.10	Yeast extract	1.00
Soytone	0.10	(C)	
Tryptone	0.10	NaCl	0.10
(Xanthan	4.00)	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01
(Agar	17.00)	MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01
		FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01

**유화능 측정:** 배양액을 20mM citrate-phosphate buffer(pH=5.3)로 60배 희석한 시료액 10ml에 hexadecane과 2-methyl naphthalene 동량 혼합물 0.1ml을 첨가하고 150rpm, 25°C의 조건에서 1시간 동안 왕복진탕시킨 후, 10분 정지후 620nm에서 흡광도를 측정하였다(2).

**균체량 측정:** 660nm에서 흡광도를 측정하였는데, 기름 첨가 배지의 경우 배양액 10ml을 동일 부피의 hexane으로 3회 추출 후 흡광도를 측정하였다.

### 결과 및 토론

**pH에 따른 표면장력의 변화(Fig. 1):** 산성 영역에서 염기성 영역으로 갈수록 계면활성이 감소함을 알 수 있는데, 이는 음이온성 계면활성제임을 시사한다. 생물계면활성제를 생산하는 수십 종류의 *Pseudomonas aeruginosa*가 알려져 있으며, 이러한 *Pseudomonas aeruginosa*들은 예외없이 음이온성 계면활성제인 rhamnolipid를 생산한다고 보고되어 있다(3,5). 그러므로, 표면장력과 유화능의 측정은 산성영역의 citrate-phosphate buffer로 배양액을 희석하여 측정하였다.

**시간에 따른 생물유화제의 생산(Fig. 2):** 생물유화제의 생산과 균체 증식이 동시에 진행되며, 18시간 경과 후에는 배양액의 표면장력만이 조금 더 감소하고 유화능과 균체증식, pH의 변화는 거의 없었다. 이것은 *Pseudomonas aeruginosa* YPJ80이 2종 이상의 생물유화제를 생산함을 시사하는데, 실제로 *Pseudomonas aeruginosa*는 rhamnolipid이외에 peptide계통의 생물유화제를 생산하는 경우가 보고되어 있다(4). 또한, rhamnolipid는 4종류의 형태가 존재하며, 생산 조건에 따라 생산되는 rhamnolipid의 형태와 조성이 변함이 알려져 있다(1,3,5). 또한, 배양 초기에 균체 증식의 지연 시간에 비하여 생물유화제 생산의 지연 시간이 더 길었는데, 이는 질소원이나 인이 제한상태에 도달한 후 생물유화제를 생산하기 때문인 것으로 생각된다(1,6,7,8). 또한 이 후의 배양 시간은 18시간으로 고정하였다.

**초기 pH에 따른 생물유화제의 생산(Fig. 3):** 초기 pH가 8과 9사이에서 가장 많은 생물유화제를 생산하였는데, 산성으로 갈수록 생물유화제의 생산과 균체 증식이 급격히 감소하였다. 따라서 18시간이후에 균체 증식과 생물유화제의 생산이 정지하는 이유는, 배양액의 pH가 제한조건이 되기때문임을 알 수 있다. 또한, 균체의 증식과 생물유화제의 생산 형태는 동일하였다. 이 후의 배양 초기 pH는 8.0으로 고정하였다.

**배양 온도의 영향(Fig. 4):** 30°C에서 35°C사이에서 생물유화제의 생산량이 가장

많았으며, 이 온도 범위에서 생산량의 차이는 거의 없었다. 또한, 균체의 증식과 생물유화제 생산 형태는 일치하지 않았는데, 배양초기에 저온으로 배양한 후 균체 증식이 일정수준 이상이 되었을 때 고온으로 배양하면 생물유화제의 생산성을 증가시킬 수 있을 것으로 사료된다. 그러나, 본 실험에서는 배양을 간단하게 하기 위하여 32.5°C에서 이후의 실험을 수행하였다.

**접종량의 영향(Fig. 5-1, 5-2):** 12시간 경과 후의 균체 증식과 생물유화제 생산은 접종량의 영향을 거의 받지 않았으나 배양액의 pH는 뚜렷한 차이가 있었다. 또한 18시간 배양 후 생물유화제의 생산과 배양액의 pH 변화 형태는 일치하였으나 균체증식은 거의 차이가 없었고, 최적의 접종량은 OD660에서 1.00 기준으로 8%였다. 그러므로, 접종량의 변화가 생물유화제의 생산 kinetics에만 영향을 주는 것이 아니라, 미생물의 대사자체를 변화시키는 것으로 생각된다.

**탄소원에 따른 생물유화제의 생산(Table 2):** 최적의 탄소원은 문헌의 보고에서처럼 olive oil이었으며(1), soybean oil과 포도당에서도 많은 양의 생물유화제를 생산하였다. 그러나, hexadecane과 fructose는 거의 이용하지 못하였는데, *Pseudomonas aeruginosa*는 특정한 길이의 탄화수소만을 이용하여 생물계면활성제를 생산함이 보고되어 있다(1). 본 실험에서는 발효의 용이함으로 인해 포도당을 사용하여 이후의 실험을 수행하였다.

Table 2. Carbon source effect on bioemulsifier production

Carbon source	Emulsifying activity	Surface tension, mN/m		Cell growth	Final pH
		5 time dilu.	10 time dilu.		
Glucose	1.74	30.8	32.8	3.34	5.18
Fructose	0.03	45.4	56.8	1.34	6.69
Olive oil	3.37	31.7	32.1	5.68	5.86
Soybean oil	2.35	33.4	34.4	6.17	6.31
Hexadecane	0.01	48.0	55.0	0.48	7.97

\*Carbon source concentration = 2%

**질소원에 따른 생물유화제의 생산(Table 3):** 생물유화제 생산을 위한 최적의 질소원은 질산암모늄이었으나, 표면장력은 질산나트륨을 첨가하였을 때 최소가 되었다. 또한, 나트륨의 첨가는 생물유화제의 생산을 감소시키는 경향이 있었다. 실험결과로부터 질산 이온보다는 암모늄 이온이 유화제 생산에 유리한 질소원임을 알 수 있었다. 그러나, 몇몇 연구자들에 의하여 질산나트륨이 rhamnolipid 생산을 위한 최적의 질소원으로 보고되어 있는데(6,8), 이는 질소원에 의하여 생산되는 생물유화제의 형태가 변할 수도 있음을 의미한다.

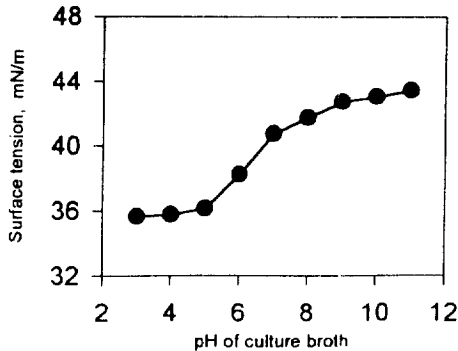


Fig. 1. Effect of pH on surface tension of culture broth  
Culture broth was incubated at initial pH 7.0 for 2 days and then was diluted 4 times with distilled water. pH was adjusted by N NaOH and HCl solution

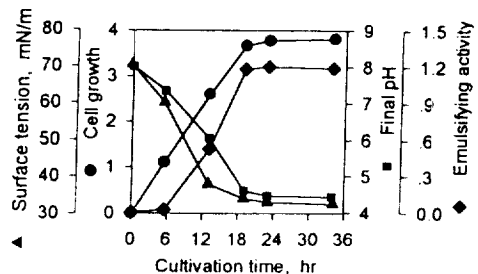


Fig. 2. Time profile of cell growth, pH, surface tension, emulsifying activity.

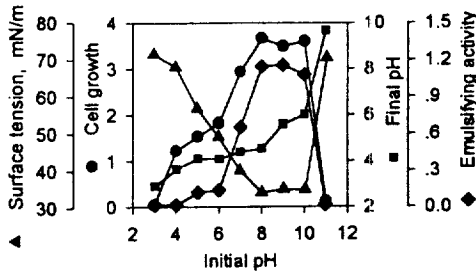


Fig. 3. Effect of initial pH on bioemulsifier production.

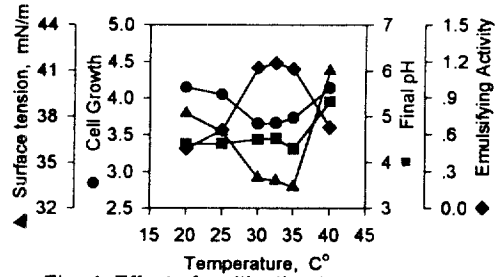


Fig. 4. Effect of cultivation temperature on bioemulsifier production.

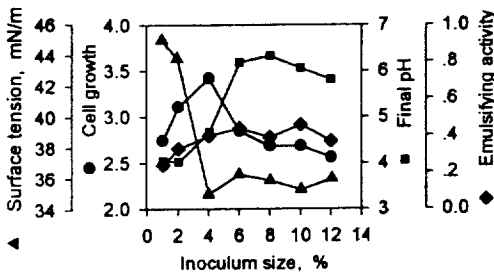


Fig. 5-1. Effect of inoculum size on bioemulsifier production. after 12 hr cultivation

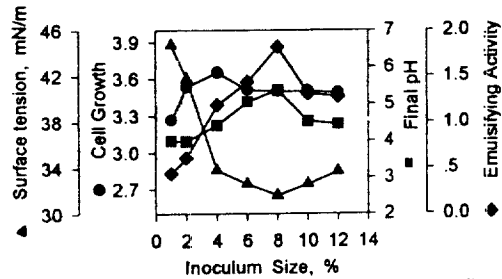


Fig. 5-2. Effect of Inoculum size on bioemulsifier production. after 18 hr cultivation.

Table 3. Nitrogen source effect on bioemulsifier production

Nitrogen source	Emulsifying activity	Surface tension, mN/m		Cell growth	Final pH
		5 time dilu.	10 time dilu.		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.78	30.8	33.1	3.28	5.52
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.44	30.7	33.3	3.25	5.25
NaNO <sub>3</sub>	0.76	30.2	31.5	2.07	3.95
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> + NaCl	1.01	31.3	34.1	3.13	5.45
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + NaCl	1.25	30.9	33.9	3.07	5.24

\* (Nitrate+Ammonium) concentration = 0.025M which corresponds to 1 g/l NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

\* NaCl concentration = 0.025M

참고문헌

1. Robert, M. et al.: *Biotechnology Letters*, 11(2), 871(1989)
2. Rosenberg, E. et al.: *Applied and Environmental Microbiology*, 37(3), 402(1979)
3. Kosaric, N.: "Biosurfactants", Marcel Dekker, INC.(1993)
4. Hisatsuka, K. et al.: *Agricultural Biological Chemistry*, 36, 1361(1972)
5. Parra, J.L. et al.: *JAOCS*, 66(1), 141(1989)
6. Manresa, M.A. et al.: *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 133(1991)
7. Mulligan, C.N. et al.: *Journal of Biotechnology*, 12, 199(1989)
8. Ramana, K.V. and Karanth, N.G.: *Journal of Chemical Technological Biotechnology.*, 45, 249(1989)