

유류오염토양에서 분리된 *Pseudomonas aeruginosa*를 이용한 생물계면활성제 glycolipid 생산

임영경, 오영숙, 정옥진*

명지대학교 환경생물공학과, 청정기술원*

전화 (0335) 321-3773, FAX (0335) 337-2902

Abstract

A biosurfactant producing bacteria strain, D2D2 was selected from diesel-contaminated soil, and identified as *Pseudomonas aeruginosa*. A glycolipid produced by *P. aeruginosa* D2D2 was purified by ethyl acetate extraction and adsorption chromatography. The biosurfactant was identified as glycolipid which has two types of biosurfactants as a results of TLC analysis. The purified glycolipid biosurfactant reduced the surface tension of water to 27 dyne/cm. In time course studies of growth and rhamnolipid production in a minimal salts medium containing 1.5% glucose and 1.5% olive oil, a maximum rhamnolipid yield of 11.45gL^{-1} was obtained after 5 days.

서론

현재 사용되고 있는 화학적 계면활성제들은 자연계에서 쉽게 분해되지 않은 특성과 생물체들에 대한 독성에 있어 심각한 환경오염을 유발하고 있다. 이에 생분해가 가능하고 독성이 적은 생물계면활성제로 대체하려는 추세이다. 그러나, 생물계면활성제들이 대부분 가격이 고가이므로 경제적인 면에서의 이용은 현저히 낮은 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 유류오염토양을 채취하여 유류분해균주를 분리한 후 그 중 우수한 생물계면활성제 생산균주를 선정하여 생산단가를 최소화 할 수 있는 최적의 생산조건을 결정하고자 하였다. 또한, 생산된 생물계면활성제의 분리와 정제, 성분분석을 수행하여 생산된 생물계면활성제 종류를 규명하였다.

실험방법

Biosurfactant 생산균주의 분리 및 선별

본 연구에서는 전국 4군데의 유류오염토양을 채취하여 유류분해균주 112종을 순수 분리하였으며, 액체배지에서 3일간 배양 후 3차레에 걸쳐 표면장력 저하능이 우수한 균주를 선별하여 동정하였다.

배지조성 및 배양조건

본 연구에서 사용된 유류분해 균주 선별배지의 조성은 최소배지(MSM:minimal

salts medium; NH_4NO_3 1g/L, K_2HPO_4 1.5g/L, NaH_2PO_4 0.2g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, NaCl 0.5g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05g/L, yeast ext. 1.0g/L)에 탄소원으로 glucose와 hexadecane, olive oil을 1:1:1 중량비(농도는 3%, v/v)로 혼합첨가하여 30°C, 3일 배양하였고, oil collapsing activity에 의해 1차 생물계면활성제 우수균주를 분리하였고, 표면장력저하능을 측정하여 최종적으로 우수한 생물계면활성제 생산균주를 선정하였다.

생물계면활성제 생산

생물계면활성제의 생산조건을 선정하기 위하여 탄소원, 질소원에 따른 표면장력 측정과 660nm에서의 OD(Optical density)값, 유화도를 측정하였다..

1) 탄소원의 영향

탄소원의 영향을 검토하기 위하여 250mL Erlenmyer flask에 NB배지 20mL에 탄소원으로는 glucose, hexadecane, olive oil, G+H(1:1), G+O(1:1), H+O(1:1), G+H+O(1:1:1)을 사용하였으며, 탄소원의 농도는 균일하게 3%로 하였다. 배양조건은 30°C, 150rpm에서 3일 동안 배양하였다.

2) 질소원의 영향

질소원에 의한 생물계면활성제 생산영향을 검토하기 위하여 무기질소로는 NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 을 선정하였고, 유기질소로는 Beef ext., soyton, pepton, trypton, yeast ext., malt ext.를 사용하여 배양하였고, 3일 배양 후 표면장력을 측정하여 효율이 좋은 무기질소, 유기질소를 각각 선정하였다.

실험결과 및 고찰

생물계면활성제 생산균주 분리 및 선정

본 연구에서 분리한 유류분해균주 총 128종 중 표면장력 저하능이 우수한 균주를 2차 선별한 결과 4종의 생물계면활성제 생산균주(D2D2, D2D3, D4G1, I2G1)를 선별하였다. 선별된 4종의 균주를 가지고 glucose와 olive oil을 탄소원으로 하여 30°C에서 3일간 배양한 결과, 표면장력 저하능이 가장 우수한 D2D2 균주를 최종 선정하였다. 선정한 균주를 MIDI로 동정한 결과 본 균주는 *Pseudomonas aeruginosa*와 유사한 것으로 동정되었으며, 최종적으로 *P. aeruginosa* D2D2로 명명하였다.

P. aeruginosa D2D2의 생물계면활성제 생산

1) 탄소원의 영향

Table 1에서 보는 바와 같이 *P. aeruginosa* D2D2는 MSM배지에서는 hexadecane과 olive oil을 탄소원으로 첨가된 배지에서 배양액의 표면장력이 37.7 dyne/cm로

가장 낮았으며, NB배지에서는 탄소원으로 glucose와 olive oil을 1:1의 중량비로 혼합 첨가된 배지에서 표면장력이 27.9까지 감소시켰다. 이 결과로부터 *P. aeruginosa* D2D2에 의한 생물계면활성제 생산시 carbohydrate인 glucose와 vegetable oil인 olive oil을 첨가한 배지에서 표면장력 저하능이 매우 뛰어난 것으로 판명되었다.

Table 1 Effect of carbon source on the biosurfactant production from *P. aeruginosa* D2D2

Carbon source (3%)	OD _{660nm}	minimal surface tension ³ (dyne/cm)	emulsifying activity (Unit/mL)
Glucose	1.78	28.2	9.37
Hexadecane	0.135	56.1	1.1
Olive oil	3.65	29.1	3.12
G+H (1:1)	2.205	29.4	2.9
G+O (1:1)	4.4	27.9	56.8
H+O (1:1)	2.95	29.8	8.4
G+H+O (1:1:1)	3.6	29.6	8.78

1: Diluted culture broth(10 times)

2: Emulsifying activity was represented with unit per mL of culture broth

3: Diluted culture broth(6 times)

2) 질소원의 영향

Table 2에서 보는 바와 같이 *P. aeruginosa* D2D2는 무기질소 (NH₄)₂SO₄와 유기질소 Beef ext. 1:1의 중량비로 혼합 첨가시 표면장력이 31.6 dyne/cm까지 저하되었으며, 유기질소 Beef ext. 사용할 때에는 표면장력이 31.5 dyne/cm로 가장 낮게 측정되었고 OD_{660nm} 값도 가장 높게 측정되었다. 다른 무기질소나 유기질소들의 혼합시 균주 성장도 낮고 표면장력도 높게 측정되는 것으로 보아 *P. aeruginosa* D2D2 균주는 성장에 있어 질소제한을 받음을 알 수 있었다.

Table 2 Effect of nitrogen source on the biosurfactant production from *P. aeruginosa* D2D2

Inorganic-N (2g/L)	Organic-N (2g/L)	OD _{660nm}	Surface tension ¹ (dyne/cm)
NH ₄ NO ₃	Beef ext.	0.574	49.5
(NH₄)₂SO₄	Beef ext.	3.312	31.6
NaNO ₃	Beef ext.	0.345	40.9
NH ₄ NO ₃	Soyton	0.754	38.1
NH ₄ NO ₃	Pepton	1.824	47.6
NH ₄ NO ₃	Trypton	1.021	48.3
NH₄NO₃	Yeast ext	2.819	33.7
NH ₄ NO ₃	Malt ext.	0.901	48.7
NH ₄ NO ₃	none	0.695	52.3
none	Beef ext.	3.549	31.5

1: Diluted culture broth(6 times)

요약

유류오염토양에서 분리한 유류분해균주 중 계면장력 저하능이 우수한 균주를 분리하여 동정한 결과 *Pseudomonas aeruginosa* D2D2로 판명되었다. 탄소원으로 glucose와 olive oil을 각 1.5%씩 첨가하였을 때 표면장력이 27.9 dyne/cm로 표면장력 저하능이 가장 우수한 것으로 나타났다. 생산된 biosurfactant로 ethyl acetate 추출하여 crude biosurfactant를 얻었으며, TLC 분석한 결과 glycolipid계열의 biosurfactant임을 확인하였다.

참고문헌

1. D. K. Jain, D. L. Collins et. al., A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms, J. of Microbiological Methods 13, 271-279(1991)
2. John, G.H., N. R. Krieg, P.H.A. Sneath, Bergey's manual of determinative bacteriology(9th ed.)(1994)
3. MacFaddin, J. F., Biochemical test for identification of medical bacteria, 2nd ed., Williams & Wilkins Co.(1984)
4. Trevors, J. T., Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil, J. Indust. Microbiol., 11:163(1993)
5. Michele I. Van Dyke, Environmental application of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants, UMI(1994)
6. Rosenberg, E., Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 : Isolation and emulsifying properties, Appl. Environ. Microbiol., 37(3) : 402(1979)