

Air lift 반응기를 이용한 생물유화제의 연속생산

정혜성, 김학주, 김봉조, 황선희, 공재열

부경대학교 생물공학과

TEL & FAX (051) 620-6181

Abstract

A marine bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P was immobilized in modified polyvinyl alcohol for the continuous production of rhamnolipids. The stability of rhamnolipids production, the mechanical strength of beads and the scanning electron microscope of immobilized cell were determined in a repeated batch culture. The rhamnolipids production was maintained 80~90% stability of initial production, and the mechanical strength also was stable during the repeated batch culture more than 14 cycles. In the case of SEM studies, the internal distribution pattern of the cell entrapped in modified PVA beads was observed. On the basis of optimal conditions, the continuous culture was investigated in 1.8L air lift bioreactor. The result suggested 0.1g/h rhamnolipids was obtained from 1%(v/v) fish oil continuously in conditions of 1.2L working volume, 0.5vvm and 20ml/h flow rate.

서 론

미생물로부터 생산되는 생물유화제는 화학합성유화제에 비해 독성이 거의 없고 생분해되며 보습, 기포, 유화, 분산 등의 특징을 가지고 있으므로 현재 유처리제 뿐만 아니라 식품, 화장품, 세제, 제지, 농업 등 다양한 산업분야에 이용되고 있다. 이러한 생물유화제를 연속생산하기 위한 방법으로 고정화 기술이 널리 이용되고 있다. 고정화 방법에는 크게 담체결합법, 가교법, 포괄법 등이 있으며 특히, 미생물 고정화의 경우에는 균체 유실이 적은 포괄법이 많이 이용되고 있다. 고정화법에 사용되는 지지체의 종류는 천연고분자, 합성고분자, 무기물등 여러 가지가 있지만, 본 연구에서는 미생물에 독성이 없으며 경제적이고 비드 강도 및 내구성이 우수한 합성고분자인 modified polyvinyl alcohol을 지지체로 하여 고정화 균체를 제조하였다. 제조된 고정화 균체를 이용하여 air lift 반응기에서 생물유화제를 연속 생산을 하고자 한다.

재료 및 방법

1) 사용 균주

국내 남해안 유류 오염지역으로부터 분리한 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P를 사용하였다⁽¹⁾.

2) 고정화 지지체

합성고분자인 modified polyvinyl alcohol(Av. M.W. 70,000~100,000)을 사용하였다. PVA에 alginate를 첨가하여 saturated boric acid와 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 이 혼합된 gelling solution에 주입하여 고정화하였다.

3) Bead 강도 측정

Bead의 강도의 경우 bead를 파괴하는데 필요한 힘을 texture analyser (TA-XT2i, Stable Micro systems, UK)를 사용하여 측정하였다. 이때 bead의 지름은 2.0mm, distance 70%, time 3sec로 실험하였다.

4) SEM 분석

Scanning electron microscopy (Hitachi S-2400 SEM, Japan)를 이용하여 측정하였다. 먼저 glutaraldehyde로 비드를 고정한 후 액체 질소를 이용해 비드를 절단하고 여러 농도의 에탄올을 이용하여 수분을 제거하여 금 코팅한 후 비드 내부의 세포 분포를 확인하였다.

5) 생물유화제 정량

- 유화활성도 측정

Rosenberg 등⁽³⁾에 의한 유화활성도 측정법을 사용하였다. 유화활성은 원심분리 (15,000g × 10 min)하여 얻은 배양상층액 1.25ml와 n-hexadecane : 2-metylnaphtalene을 1:1로 혼합한 기질 0.05ml, 그리고 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 3.7ml를 넣은 후 vortex로 1분간 강하게 교반하여 10분간 정치시킨 후 O.D. 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

(1Unit : 배양상층액 1.25ml에 대한 유화흡광도 0.1)

- Orcinol 정량법

Koch등에 의한 Orcinol assay법을 사용하였다.

결과 및 고찰

생물유화제의 연속생산을 위하여 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 KCTC 18012P 를 합성고분자인 modified PVA로 고정화 한 후, 회분배양으로부터 얻어진 최적조건(1% (v/v) fish oil, 25°C, pH 7.0)하에서 연속적으로 재 배양하여 생물유화제 생산 및 비드 강도의 안정성을 조사하였다. 생물유화제 생산의 경우 14회 이상 재 배양시에도 초기 생산량의 80~90%를 유지하였고, 비드 강도에 있어서도 고정화 직후와 비교하여 90%이상 유지되었다. 배양시간에 따른, 비드내의 세균분포를 SEM으로 관찰한 결과 고정화 직후부터 생물유화제 최대 생산량을 보이는 대수증식기까지는 균체량이 증가하였으나, 정지기에서는 거의 일정함을 알수 있었다. 이상의 결과를 바탕으로 1.8L air lift 반응기를 이용하여 통기량 0.5vvm, flow rate 20ml/h의 조건에서 0.1g/h의 생물유화제를 연속생산 할 수 있었다.

참고 문헌

1. 김학주, 정혜성, 김정선, 김종덕, 구헌서, 공재열 (1999), 해양에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2가 생산하는 생물유화제의 최적생산, 한국생물공학회 춘계학술발표대회 297 - 300.
2. Kim, H. J., B. J. Kim, J. Y. Kong, H. S. Koo (2000), Isolation and characterization of oil degrading bacteria from southern sea of Korea. *korea J. Biotechnol. Bioeng.* 15, 27-34
3. Zuckerberg, A., A. Diver, Z. Peeri, D. L. Gutnick, and E. Rosenberg (1979), Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 414-420.
4. Gordon F. Bickerstaff (1997), In Immobilization of Enzyme and cells. pp207-216, Humana Press Inc.