

해양 유래 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)가 생산하는 Biosurfactant의 구조분석

이경미, 김학주, 하순득, 강양순¹, 공재열

부경대학교 생물공학과, ¹국립수산진흥원 남해수산연구소 통영분소

TEL & FAX (051) 620-6181

Abstract

The *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P) produced three kinds of glycolipids on olive oil as a substrate and purified two types of major glycolipids(Rf=0.48, BS-1; Rf=0.65, BS-2) using silica gel chromatography, TLC, HPLC, etc. From the analysis of the chemical structure, the glycolipid of BS-1 was estimated as rhamnolipid(2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid; M.W. 650) and BS-2 was detected as rhamnolipid methyl ester(2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoic acid methyl ester; M.W. 664) by FT-IR, FAB Mass spectrometry, ¹H-NMR, ¹³C FT-NMR, DEPT, 2D-NMR (TOCSY, RELAY, NOESY, HSQC, HMBC). In particular, It was found that a marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P) remarkably produced rhamnolipid and rhamnolipid methyl ester simultaneously.

서론

Biosurfactant의 종류에는 크게 당지질(glycolipids), 인지질과 지방산(phospholipids and fatty acids), 지단백질(lipopeptides and lipoproteins), 고분자 biosurfactant(polymeric surfactants)로 분류할 수 있다. *Pseudomonas aeruginosa*가 생산하는 rhamnolipid(RL)는 1949년 Jarvis와 Johnson에 의하여 최초로 보고되었으며, 또한 생산되는 RL의 형태는 미생물 종과 배양조건에 영향을 받는 것으로 밝혀졌다. 본 연구에서는 해양미생물을 대상으로 화학 유화제를 대신할 새로운 형태의 환경친화적인 biosurfactant 개발을 위하여 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)가 생산하는 biosurfactant를 분리·정제 하였고, 구성성분 및 구조분석을 하였다.

재료 및 방법

①시료의 분리·정제

Biosurfactant의 구조를 분석하기 위하여 1% (w/v) olive oil을 기질로 배양하여 얻은 배양상층액으로부터 유기용매 추출법과 silica gel chromatography, sep-pak silica cartridge (2cm, Waters Co., USA)로 분리하였으며, 순도 검증은 TLC와 HPLC로 하였다.

②구조 분석

FT-IR spectrum 분석

수분을 제거한 시료를 KBr법으로 조제한 후 FT-IR(Genesis Series, ATI matson Co., USA)로 측정하였다.

FAB-Mass spectrometry 분석

생물유화제의 분자량을 측정하기 위하여 시료면에 고속의 중성원자(Ar등)를 충돌시켜 시료분자를 이온화시키는 FAB(Fast Atom Bombardment) Mass Spectrometry (JMS-SX 102 A, Jeol Co., Japan)를 이용하여 정제된 biosurfactant의 분자량을 분석하였다.

NMR 분석

정제된 시료 100mg을 CD₃OD에 녹여 high field NMR sample tube(5×180mm)에 넣은 후 750MHz NMR(unity INOVA 750MHz, Varian, Australia)로서 ¹H-NMR, ¹³C FT-NMR, DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) 분석과 2D-NMR인 NOESY(Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), RELAY(Relayed Correlation Spectroscopy), TOCSY(Total Correlation Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC(Heteronuclear Multiple-bond Correlation) 분석을 통하여 구조를 해석하였다.

결과 및 고찰

구조분석에 사용된 시료

olive oil을 기질로하여 생산된 3종류의 glycolipid (Rf 0.48, 0.65, 0.82)를 silica gel chromatography와 HPLC로 분석하였다. HPLC 결과 RT(retention time)가 15.52와 18.99의 두 물질을 분리하였으며, 이 두 물질은 Rf값이 0.65(BS-2)와 Rf값이 0.48(BS-1)인 당지질로 확인되었다. 또한 두 물질의 순도는 각각 95.1%와 96.2%였다.

FT-IR 분석

정제된 BS-1과 BS-2의 흡수파장은 3450cm^{-1} , 2920cm^{-1} , 1750cm^{-1} , 1450cm^{-1} , $1050\text{--}1120\text{cm}^{-1}$ 로 확인되었으며, 이들의 관능기는 각각 hydroxyl group(-OH), long chain hydrocarbon(-CH₂-), esters(-CH₂-CO-O-R), methyl(-CH₃), vibration (-CH₂-)로 밝혀졌다.

FAB-Mass Spectrometry 분석

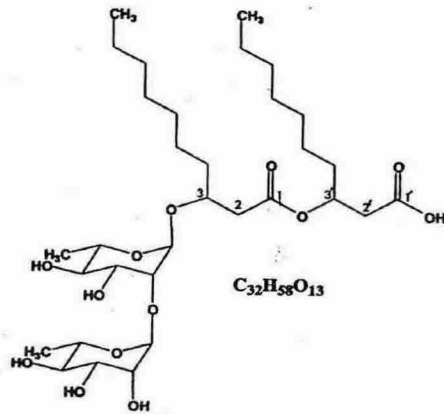
시료주입은 direct inject법으로 하였고, 분석 결과 BS-1의 분자량은 650.37로 화학식은 C₃₂H₅₈O₁₃였으며, BS-2의 분자량은 664로 화학식은 C₃₃H₆₀O₁₃으로 밝혀졌다.

NMR

¹H-NMR, ¹³C-FT-NMR, 2D NMR등의 결과로부터 BS-1의 구조는 2개의 α-L-rhamnose와 2개의 β-hydroxydecanoic acid가 결합되어 있는 2-O-α-L-rhamnopyranosyl-α-L-rhamnopyranosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoic acid로 밝혀졌다. 그리고 glycolipid BS-2의 구조는 2개의 α-L-rhamnose와 1개의 β-hydroxydecanoic acid, 1개의 β-hydroxydecanoic acid methyl ester가 결합된 2-O-α-L-rhamnopyranosyl-α-L-rhamnopyranosyl-β-hydroxydecanoyl-β-hydroxydecanoic acid methyl ester로 밝혀졌다.

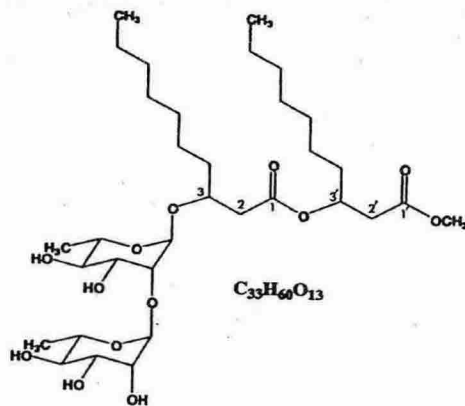
참고문헌

1. 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.
2. Desai J. D., and A. J. Desai, 1993. In Biosurfactant: Production; Properties; Application, Surfactant Science Series Vol. 48(N. Kosaric), pp 65-97. Marcell Dekker, Inc.
3. Hirayama, T., and I. Kato, 1982. Novel Methyl Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.*, 139(1), 81-85.



2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate

Fig.1. Structure of biosurfactant BS-1(rhamnolipid) produced by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P).



2-O- α -L-rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate methyl ester

Fig.2. Structure of biosurfactant BS-2(rhamnolipid methyl ester) produced by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P).