P224

해양생물 유래 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)로부터 biosurfactant 생산성 향상을 위한 fed-batch 배양

이정미, 황선희, 하순득, 김학주, 공재열
부경대학교 식품생명공학부 생물공학전공
Tel & Fax (051) 620-6181

Abstract

In order to maximize the cell growth and the biosurfactant production by the *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P), in the fed-batch fermentation processes were performed varying the feeding medium concentrations and the feeding rate. Fed-batch culture was performed with the optimal agitation speed of 200rpm and the aeration rate of 0.67vvm in a 7L Jar fermentor containing 3L of modified medium and 2.0-2.5%(v/v) fish oil as a carbon source. Addition of fish oil(2.5mL/100mL modified medium), when fish oil was depleted, the cell and biosurfactant concentration were 6.1g/L and 22.7g/L, respectively.

서 론

유류의 대부분은 휘발과 미생물에 의해 제거되는데 1946년 Zo Bell[1]에 의해 매우 다양한 미생물이 유류분해에 관여하며, 이러한 미생물이 자연계에 많이 분포하고 있다는 사실이 밝혀진 이후로 유류오염문제를 미생물학적 측면에서 해결하려는 노력들이 계속되어 왔다. 현재 전 세계적으로 화학계면활성제 대신 생분해로 인한 2차 오염 피해가 적은 생물유화제 생산기술에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 유류오염문제 뿐만 아니라 제약, 화장품, 식품 산업등 여러 산업분야에서도 생물유화제의 사용이 점차 증가되어, 대량화 및 산업화가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 생물유화제 생산성을 향상시켜 산업화하기 위해 회분배양을 통하여 교반속도, 통기량 및 접종량에 따른 균체량, 생물유화제 생산성에 대한 연구를 기초로 유가배양에서 기질 소모속도에 따른 공급배지의 농도, 공급량, 공급속도에 변화를 주어 균체량과 생물유화제 생산에 미치는 영향을 비교 · 검토하였다.

재료 및 방법

(1) 균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 남해안 유류오염지역으로부터 김 등[2]이 분리한, 생물유화제 생산능이 우수한 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(KCTC 18012P)를 사용하였

다. 보관용 배지로는 MLBM(modified Luria broth medium)을 사용하였고, 유가식 배양의 기본 배지 및 feeding 배지는 modified medium($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01g/L, KH_2PO_4 1.0g/L, K_2HPO_4 0.5g/L, $NaNO_3$ 2.0g/L, $CaCl_2$ 0.01g/L, KCl 0.1g/L, urea 0.1g/L)을 사용하였다.

(2) 배양 조건

접종용 균주 배양은 modified medium 50mL에 1% fish oil을 첨가하여 250mL erlenmeyer flask에서 25℃, 180 rpm으로 40시간동안 진탕배양하였다. 유가식 발효조는 7L Jar fermentor(BEST KOREA Co., Ltd.)를 이용하였고, 초기 working volume 3L, 온도 25℃, 교반속도 및 통기량은 200rpm과 0.67vvm의 조건에서 회분 배양을 실시하다가 fish oil의 농도가 떨어질 때 기질 공급농도 및 공급속도를 달리하여 발효조에 주입하였다. 초기 배양액 및 공급배양액은 기질로 fish oil을 첨가한 modified medium을 사용하였고, 공급배양액의 경우 수용성인 배지와 지용성인 fish oil의 비혼합성 해소방안으로 기본배지와 fish oil을 따로 따로 공급하였다.

결과 및 고찰

생물유화제의 생산성을 높이기 위하여 세포를 고농도로 회분 배양한 후, fish oil의 농도가 5g/L 이하로 떨어지는 시점에서 fish oil 농도 및 공급량을 달리하여 발효조에 주입하였다. Fig.1은 공급배지를 2.5% fish oil을 사용하여 배양4일째부터 공급을 시작하여 24시간마다 기질을 2.5mL씩(100mL medium) 공급하였다. 최대 균체량과 생물유화제 생산량은 각각 6.1g/L, 22.7g/L(264h)이였다. 배양이 끝난 이후에도 균체 및 생물유화제 생산량은 계속 증가하였으나, 14일 이후부터 다소 감소하였다. Fig.2에서는 공급배지를 Fig.1에서와 같은 농도의 2.5% fish oil을 사용하였고 공급량을 10배로 늘여 25mL fish oil(1L medium)을 공급하였다. 이때 최대 균체량과 생물유화제 생산량은 각각 5.5g/L, 12.9g/L(240h)이였다. Fig.3에서는 공급기질의 농도를 낮게하여, 발효조의 기질농도가 떨어질때마다 기질을 공급하기 위해, 1.0% fish oil을 10mL(1L medium) 넣었다. 배양시간이 288h일 때 최대 생물유화제 생산량은 15.7g/L이고, feeding 했을 때 균체량 및 생산량이 감소하는 경향이 나타났는데 이는 낮은 농도의 공급배지에 의해 균체량과 생산량이 희석된 것으로 판단된다[3]. 균체의 희석효과를 감소시키기 위하여 고농도의 fish oil을 일정하게 공급하는 continuous fed-batch[3][4]를 실시하였다(Fig.4). 그 결과 최대 균체량과 생물유화제 생산량은 각각 6.0g/L, 19.3g/L(384h)였다. 고농도의 공급배지로 인해 균체량은 계속 증가하였지만, 다량의 기질로 인해 물질전달과 산소공급이 제한되어 Fig.1보다 생물유화제 생산량이 감소되었다.

따라서, 공급 농도 2.5% fish oil을 사용하여 적은 공급량(2.5mL fish oil/100mL

medium)으로 배양액내의 fish oil이 거의 고갈되었을 때마다 기질을 공급하여 배양한 결과 최대 생산량 22.7g/L를 얻을 수 있었다.

참고 문헌

1. Zo Bell, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons(1946). Bacteriol. Rev. 10, 1-49

2. CIM, H. J., B. J. CIM, J. Y. Kong, H. S. Koo. Isolation and characterization of oil degrading bacteria from southern sea of Korea (2000), Korea J. Biotechnol. Bioeng. 15, 27-34

3. Son, H. J., Lee, S. J. Fed-batch Culture for Polyhydroxyalkanoate Overproduction by *Pseudomonas* sp. (1996). Korea J. Biotechnol. Bioeng. 11(2), 201-209

4. Park, C. Y., Ryu, Y. W. High Concentrated Spore Production of *Bacillus thuringiensis* by Fed-Batch Processes (2000). Korea J. Biotechnol. Bioeng. 15(3), 219-224

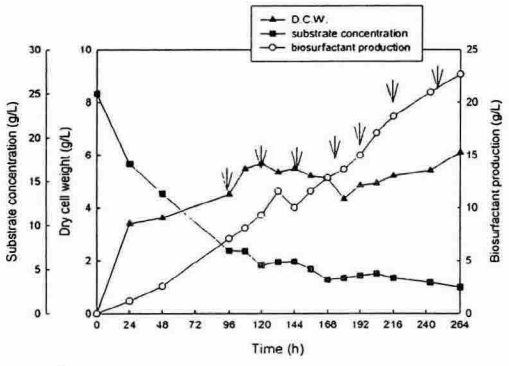

Fig. 1. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) during a fed-batch fermentation on 200rpm and 0.67vvm. The arrow indicates the start of medium feeding (2.5mL fish oil/100mL medium).

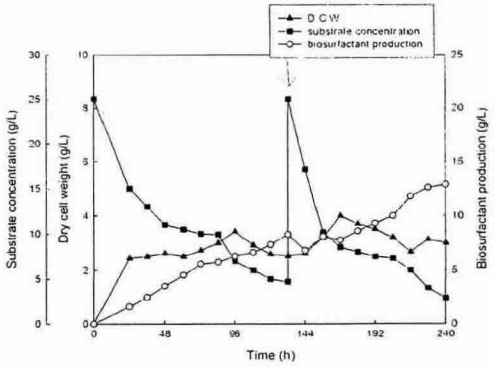

Fig.2. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) during a fed-batch fermentation on 200rpm and 0.67vvm. The arrow indicates the start of medium feeding (25mL fish oil/1L medium).

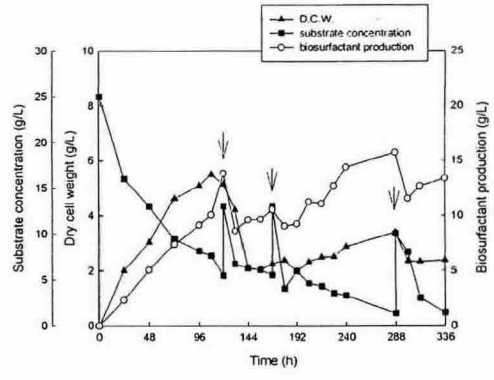

Fig.3. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) during a fed-batch fermentation on 200rpm and 0.67vvm. The arrow indicates the start of medium feeding (10mL fish oil/1L medium).

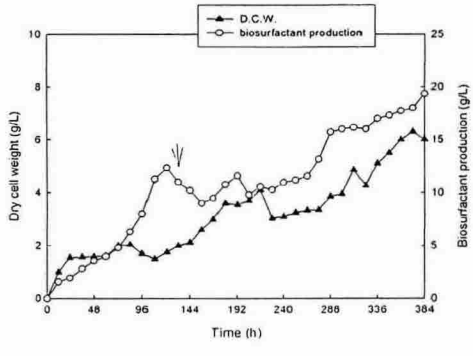

Fig.4. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (KCTC 18012P) during a continuous fed-batch fermentation on 200rpm and 0.67vvm. The arrow indicates the start of medium feeding.