

Biosurfactant 생산균주 *Pseudomonas aeruginosa* F722의 배양특성

오경택, 고명진, 박혜영¹, 안길원¹, 김환범¹, 이지현¹, 강창민², 정선용²
전남대학교 환경공학과, 전남보건환경연구원¹, 초당대학교 환경공학과²
전화 (062) 530-1858, FAX (062) 530-0742

Abstract

P. aeruginosa F722 produces biosurfactant (BS) while degrading hydrocarbons. BS production was 0.78 g/l on the C-medium. However, BS production increased by 1.66 g/l on the condition of 0.05% (w/v) NH₄Cl+0.1% (w/v) yeast extract and 3.0% (w/v) glucose, which was proved to be advantageous to BS production. In the condition of aeration of 1.0 liter per minute (LPM), BS production was increased 20% (1.94 g/l) more than 1.66 g/l produced when the air was not supplied. Moreover, the velocity of glucose degradation at both of log and stationary growth phases increased from 0.25 and 0.18 h⁻¹ to 0.33 and 0.29 h⁻¹ respectively when the air was supplied. Besides, BS activity was more stabilized on the condition of air supply.

서론

토양복원에 많이 사용되는 *Pseudomonas* spp.는 소수성 탄소원 뿐만 아니라 친수성 탄소원을 이용하여 BS를 생산한다.¹⁾ *Pseudomonas* spp.로부터 생산되는 BS특성은 탄소원 및 배양조건에 따라 달라진다. 따라서 미생물로부터 생물계면활성제 생산량을 증가시키기 위해서는 최적의 무기·유기 질소원²⁾, C/N ratio⁵⁾, air⁴⁾, 탄소원³⁾ 등의 선행적인 조사가 이루어져야 한다.¹⁾

본 연구에서 사용되는 *P. aeruginosa* F722^{6,7)}는 원유 및 원유제품과 같은 소수성의 탄화수소 물질을 탄소원으로 활용할 수 있고, 또 자연계에 폭넓게 존재한다는 점에서 토양복원에 이용될 수 있다. 본 연구에서는 *P. aeruginosa* F722를 이용하여 BS를 생산할 때 생산량 증가에 적합한 배양조건을 조사하였다.

재료 및 방법

유류분해 및 BS 생산균주 *P. aeruginosa* F722 배양

본 실험에서 사용된 *P. aeruginosa* F722는 토양복원에 적용시킬 목적으로 토양계로

부터 분리하여 유류분해 특성에 대한 선행 조사가 수행된 균주이다. *P. aeruginosa* F722는 국내특허미생물로 한국농용미생물센터에 기탁번호(기탁번호: KACC 91006)를 부여 받았다. *P. aeruginosa* F722를 본 배양에 접종하기 전 LB배지에 백금으로 일회 접종하여 35°C, 150 rpm, pH 7.0에서 12시간 동안 진탕 배양 후, 성장된 균주를 본 배양 배지인 C-배지에 1.0% (w/v)로 접종하고 탄소원으로 원유 및 원유제품을 첨가하여, 35°C, pH 7.0, 150 rpm에서 5일간 배양하였다.

BS 생산조건

BS 최적 생산조건을 검토하기 위하여 무·유기 질소원, 소·친수성 탄소원 등의 영향은 선행 연구의 유류분해 배양조건(22,23)을 바탕으로 실시하였다. 그리고 BS 생산균주 *P. aeruginosa* F722의 성장 측정은 12시간마다 배양액을 일정량 취하여 간접계수 방법으로 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용한 O.D_{600nm} (Optical Density) 과 건조 균체량을 측정하였으며, 직접계수 방법인 colony-forming units (cfu/ml)를 병행하여 수행하였다. 또한, 탄소원으로 사용되는 glucose의 잔존량 측정은 Glucose-E Kit (BC 103-E, 영동)을 사용하여 수행하였다.

생물계면활성제 추출 및 활성 조사

BS 활성 측정은 Masaaki 등⁸⁾의 생물계면활성제 생성균주 검색방법을 착안하여 응용하였다. 생물계면활성제 활성 측정방법은 먼저 petri-dish (90 × 15 mm)에 수돗물 30 ml씩을 분주한 후 50 μ l Eleuthera를 수돗물 또는 증류수가 분주 되어 있는 petri-dish에 떨어뜨려 유막을 형성시킨다. 본 배양에서 35°C, 150 rpm, pH 7.0 조건하에서 12시간 간격으로 얻어진 *P. aeruginosa* F722 배양액을 원심분리(12,000 × g, 4°C, 15 min)하여 균체를 제거한 후, 상등액 50 μ l를 취해 유막 위에 떨어뜨려 clear zone의 직경을 측정하였다. 그리고 표면장력 측정¹⁾은 Du Nouy tensionmeter (Model No. 3010, Japan)를 이용하여 실온에서 측정하였다.

적정 air 공급량 조사

BS 생산 증가를 위한 air 공급량 조사는 Figure 2와 같은 방법으로 수행하였으며, air 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 LPM (liter per minute)를 공급해 주었다.⁴⁾

결과 및 고찰

Air 공급량 조사

BS 생산량을 증가시키기 위해서 장치를 고안하여 배양 기간동안 공기를 공급해 주었으며, BS 생산에 적합한 배지(일명: BS-배지)를 사용하였다. 공기 공급량에 따른 탄소원으로 분해속도, BS 생산량, 그리고 표면장력을 측정된 결과를 Table 1로 나타내었다.

Table 1. The velocity of degrading glucose, biosurfactant production, and Surface tension on the supplied air

Volume of supplied air (LPM)	Lag phase (h ⁻¹)	Log growth phase (h ⁻¹)	Stationary growth phase (h ⁻¹)	BS production (g/l)	Cultivation time (hr)	Surface tension (mN/m)
0	0.17	0.25	0.18	1.66	144	31.27
0.5	0.31	0.33	0.25	1.54	108	30.46
1.0	0.10	0.33	0.29	1.94	108	30.46
1.5	0.18	0.40	0.38	1.64	90	30.27
2.0	0.16	0.38	0.38	1.45	84	30.58
2.5	0.33	0.27	0.38	1.22	84	30.91

Table 1에 따르면 air를 주입함으로써 air를 주입하지 않을 때보다 배양기간이 모두 짧아졌으며 air 2.0 LPM 이상에서 1.4배 짧아진 84시간으로 조사되었다. 하지만, air 1.0 LPM를 공급한 실험에서만 BS 생산량이 0.3 g/l 증가되었다. 그리고 배양액을 원심분리 하여 표면장력을 측정된 결과 공기를 주입하지 않은 실험에서는 31.27 mN/m이었으며, 공기를 주입하면서 배양한 배양액의 표면장력은 이보다 낮은 30.27-30.91 mN/m로 측정되었다. BS를 추출하여 표면장력을 측정하였을 때는 air 주입과 관계없이 모두 비슷한 결과로 조사되었다. 이러한 결과들은 Desal 등¹⁾에 의해서 보고된 *Pseudomonas* spp.으로부터 유래된 BS 표면장력 25-30 mN/m과 비슷하였다. 그리고 air 공급량이 BS 활성에 영향을 미칠 수 있다는 Kim 등⁴⁾의 연구결과와 일치되었다. 하지만, air 공급은 실험 용기의 부피와 배지량의 부피에 따라 적합한 air 공급이 필요하며 포화량 이상의 air가 공급될 경우에는 BS 활성과 BS 생산량을 억제시킬 수 있다는 것을 본 실험에서 알 수 있었다.

Air를 주입하지 않는 실험과 1.0 LPM으로 주입하여 실험에 대해 *P. aeruginosa* F722의 성장, glucose 분해, pH, 표면장력 및 clear zone 측정된 결과를 Figure 1과 Figure 2에 각각 나타내었다. Air를 공급한 Figure 2에서는 pH의 변화가 air를 공급하지 않은 Figure 1보다 심하였으며, 대수증식기와 정지기에서 air를 공급해주었을 때가 glucose 분해율이 0.08, 0.11 h⁻¹ 정도 높게 나타났다. 또한, Figure 2에서 *P. aeruginosa* F722는 짧은 유도가

를 거치면서 대수증식기와 정지기에서 지속적인 생장이 조사되었다.

요 약

P. aeruginosa F722는 탄화수소를 분해하는 과정에 biosurfactant (BS)를 생산한다. 탄화수소 분해에 사용되는 C-배지에서 BS 생산량은 0.78 g/l 이었으나, 질소원과 탄소원을 각각 0.05% (w/v) NH₄Cl + 0.1% (w/v) yeast extract과 3.0% (w/v) glucose로 조정하면 경우는 BS 생산량이 1.66 g/l로 증가하였다. 최적의 BS 생산조건으로 배양하는 동안 air 1.0 LPM를 공급해 주었을 때는 공기를 공급하지 않을 때의 1.66 g/l보다 약 20% 증가한 1.94 g/l이었다. 뿐만 아니라, glucose 분해속도는 대수증식기와 정지기에서 air를 공급하지 않은 경우 0.25, 0.18 h⁻¹였으나, 1.0 LPM를 공급한 경우 0.33, 0.29 h⁻¹로 조사되었다. 또한, air를 공급하면서 BS 생산 실험을 수행하였을 때, BS 활성이 더 안정적이었다.

참고문헌

1. Desal, J. D and I. M. Banat (1997), Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 47-64.
2. Benincasa, M., J. Contiero, M. A. Manresa, and I. O. Moraes (2002), Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on growing on soapstock as the sole carbon source, *J. Food Engineering.* **54**, 283-288.
3. Matsufuji, M., K. Nakata, and A. Yoshimoto (1997), High production of rhamnolipis by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol, *Biotechnol. Lett.* **19**, 1213-1215.
4. Kim, S. H., E. J. Lim, K. S. Choi, Y. K. Jeong, K. L. Jang, and T. H. Lee (1996), Emulsifying agent production by *Acinetobacter* sp. BE-254, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 206-212.
5. Luis, G. S., Othmar Käppeli, and Armin Fiechter (1984), *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Appl. Environ. Micorbiol.* **48**, 301-305.
6. Oh, K. T., Y. W. Lee, Motoki Kubo, S. J. Kim and S. Y. Chung (2000), Isolation, Identification and Characterization of Bacteria Degrading Crude Oil, *Kor. J. Socie. Envrion. Engine.* **22**, 1851-1859.
7. Oh, K. T., G. H. Park, J. I. Lee, J. K. Lee, S. J. Kim, Kubo Motoki, and S. Y. Chung (2002), Biodegradation of Crude oil and Petroleum products by Crude

Oil-degrading Microorganism, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 247-254.

8. Masaaki Morikawa, Hiromi Daido, Toshifumi Takao, Satoru Murata, Yasutsugu Shimonishi, and Tadayuki Imanaka (1993), A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38, *J. Bacteriol.* **175**, 6459-6466.

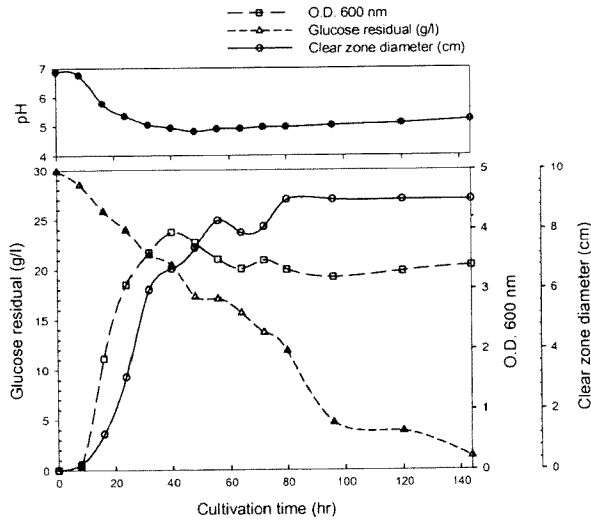


Figure 1. The characterization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* F722 in biosurfactant (BS)-medium.

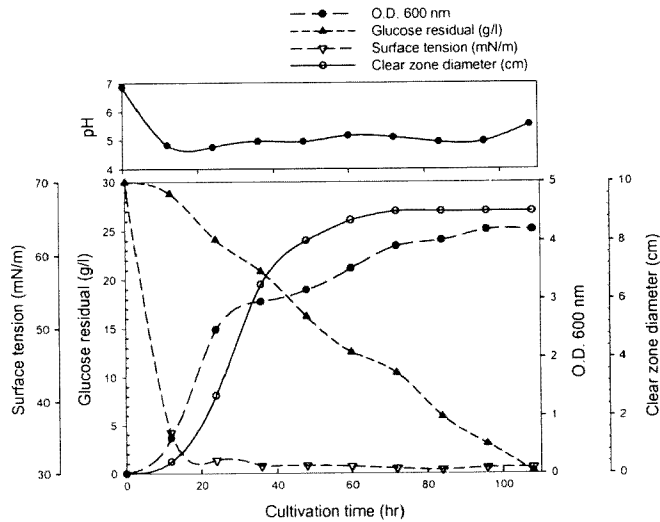


Figure 2. The characterization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* F722 in biosurfactant (BS)-medium with 1.0 LPM air.