

## 여러 배양방법하에서 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1에 의한 Emulsan의 생산

강 병 철 · \*\*이 필 경 · \*장 호 남  
한국과학기술원, 생물공정연구센터, \*화학공학과  
\*\*(주) 유공 울산연구소

### Production of Emulsan by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 under Various Culture Modes

Byung Chul Kang, Phil Kyung Lee\*\* and Ho Nam Chang\*  
Bioprocess Engineering Research Center and

\*Department of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science  
and Technology, Daedok Science Town, Taejon 305-701, Korea.

\*\*Products Development Lab., Ulsan Research Center, Yukong Ltd., 110,  
Kosa Dong, Nam Gu, Ulsan, Kyongnam, Korea.

#### ABSTRACT

Emulsan is an extracellular emulsifying agent produced by the hydrocarbon-degrading *Acinetobacter* species RAG-1. In this study emulsan production of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 was investigated under various culture modes such as batch, fed-batch, membrane cell recycle, and continuous culture. The productions of emulsan under both ethanol-sufficient fed-batch and membrane cell recycle cultures were all 15.0 U/ml, which was 53% increase in emulsan activity compared to that of pH controlled batch culture. Emulsan production was found to be strongly dependent on the residual ethanol concentration. In continuous culture the emulsan productivity increased with dilution rate.

#### 서 론

생계면활성제(bioemulsifier)는 미생물 성장생리의 관점(1-4)과 잠재적인 상업가능성(5-7)으로 많은 주목을 받아왔다. Hydrocarbon을 분해하는 박테리아의 일종인 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1은 세포밖으로 계면활성제를 생산하는데 이것을 emulsan이라 한다(8, 9). Emulsan의 화학적 구조는 아직 밝혀지지 않았지만 fatty acid 사슬을 가진 D-galactose-amine을 포함하는 polysaccharide 골격을 가지고 있다고 알려졌다(10, 11). Emulsan은 탄화수소와 물의 계면상에서 강한 박막을

형성함으로써 유화(emulsion) 상태를 안정화시킨다(12). Emulsan은 다른 세포의 polysaccharide와 조금 달리 난의 성장과 밀접한 관계를 가지면서 생성되어진다고 보고되었다(13).

지금까지의 연구는 대부분 회분식 방법으로 행해져 왔는데 본 연구에서는 여러 종류의 배양방법으로 emulsan 생산에 대한 장단점을 살펴보고자 한다. 특히 탄소원으로 사용된 에탄올의 농도를 계속 측정하면서 emulsan의 생산과의 관계를 조사하였다. 그리고 본 연구실에서 많이 연구된 막재순환식 배양방법(14)도 적용하여 난의 농도를 증가시켰을 때 emulsan의 생산에 대한 연구

도 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

본 연구에 사용된 균주는 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (ATCC 31012)였다.

### 배양배지

배양배지는 EL배지인데 liter당 조성은 다음과 같다. 7.26 g  $K_2HPO_4$ , 22 g  $KH_2PO_4$ , 4 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.2 g  $MgSO_4$ , 그리고 20 g 에탄올을 사용하였다.

### 배양방법

회분식배양은 2L 발효조(Eyela M-100, Japan)에 1L의 배양액을 채운 다음 250ml flask에 50ml 배양액으로 300 rpm, 30°C로 키운 배양액을 접종하고 600 rpm, 30°C로 하였다. 유가식배양은 배지의 공급을 peristaltic pump(Cole Patmer, U.S.A.)를 통해 일정한 속도로 공급하였다. 에탄올을 제한적으로 공급하는 배양에서는 reservoir의 에탄올 농도를 4.74 g/l로 했고 공급속도는 60ml/h로 하였다. 에탄올을 충분히 공급하는 배양에서는 reservoir의 에탄올 농도를 75.0 g/l로 했고 공급속도는 30ml/h로 하였다. 막 재순환 방법은 Lee와 Chang (14)과 같은 방법으로 하였는데 회분식 배양으로 약 20시간 조업한 다음 막 재순환 배양을 시작하였다. 연속 배양은 배양부피 1L로 하여 배지는 peristaltic 펌프로 공급하였고 reservoir의 에탄올 농도는 8.0 g/l였다.

### 분석 방법

균 성장은 610nm에서 Spectrophotometer(Beckman, U.S.A)로 배양액의 탁도를 측정하였다. 대수성장기 배양액의 탁도 1 O.D.는 균의 건조중량 0.40 g/l에 해당했다. 에탄올 농도는 FID detector를 가진 gas chromatograph(Gow Mac, Model 7509)로 측정하였다. Emulsifying activity의 측정은 Rosenberg 등의 방법(13)을 사용하였다. 탄화수소 혼합물(0.1 ml, n-hexadecane과 2-methylnaphthalene)을 1에서 25 U/ml(3에서 75 $\mu$ g/ml) emulsan이 포함된 7.5 ml의 Tris-Mg buffer에 넣고 30°C water bath에서 30분간 왕복 shaking에 의해 나타나는 탁도(turbidity)로 표준곡선을 구한다. 이때 600 nm에서 optical density 1.0에 해당하는 것을 1.0 U/ml이라고 정의한다.

## 결과 및 고찰

### 탄소원에 대한 영향

Fig. 1은 emulsan을 생산한다고 알려진 몇 종류의 탄소원에 대한 회분식배양에서 시간에 따른 emulsan 생산의 변화를 나타낸 것이다. 이때 emulsan의 생산은 탄소원을 에탄올로 했을 경우 9.5 U/ml로 가장 높게 나타났고 sodium acetate나 hexadecane의 경우에는 5.0 U/ml 정도로 비슷하게 나타났다. Hexadecane의 경우는 배양상태가 불균일하기 때문에 균농도를 측정하기 힘들고 산소전달이 문제가 된다고 보고되었다(9). 포도당을 사용했을 때는 균은 성장하였지만 emulsan은 전혀 생산되지 않았다. 따라서 본 실험의 탄소원으로 균의 성장과 emulsan의 생산에 유리한 에탄올을 사용하였다.

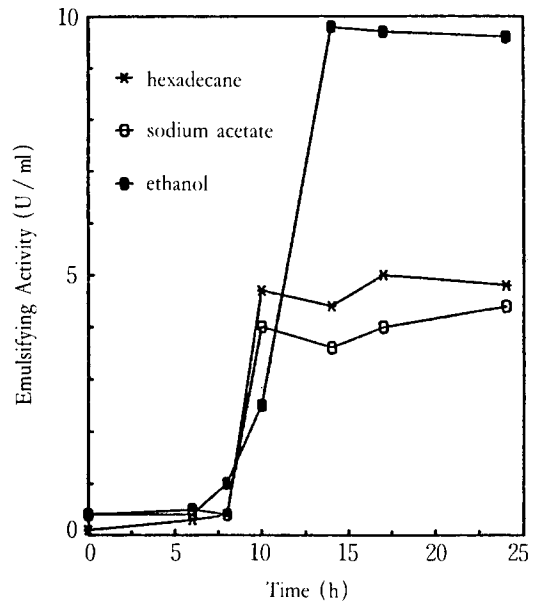


Fig. 1. Effect of carbon sources on emulsifying activity.

### 회분식 배양에서 pH에 대한 영향

Fig. 2(a)는 pH를 조절하지 않은 상태에서 초기 ethanol 농도 16 g/l일 때 회분식 배양의 결과를 본 것이다. 균 성장은 7시간의 lag를 가진 다음 대수성장이 시작되었고 이때 emulsan의 생산도 함께 시작되는데 균의 성장이 멈추는 정지기에서 7.0 U/ml의 최고값을 나타내었다. pH는 대수성장기에서 감소하기 시작하여 정지기로 갈 때 5.1까지 떨어졌는데 이것은 질소원의 감소에서 기인한 것이다. Fig. 2(b)는 2N NaOH로 pH를 조절한

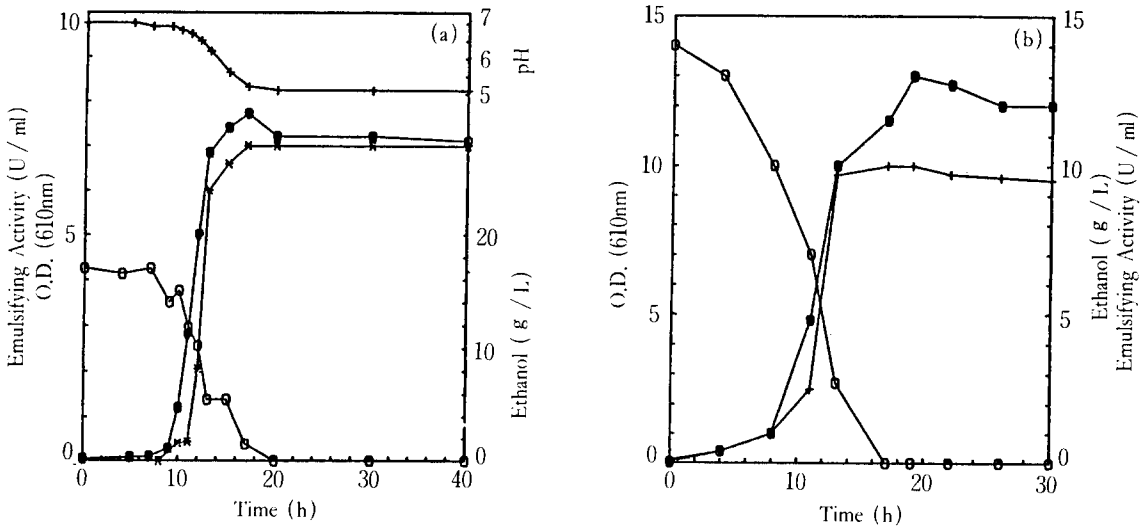


Fig. 2. Batch cultures of *A. calcoaceticus* RAG-1 (a) without pH control, and (b) with pH control. Symbols: O.D. (●); Ethanol (○); Emulsifying activity(×); pH(+).

것을 나타내었는데 균의 성장경향은 Fig. 2(a)와 비슷하였고 emulsan은 9.5 U/ml의 최고 유효역가를 나타내었다. pH를 조절하지 않는 경우나 조절한 경우에 균의 비정상속도는 각각 0.326 l/h와 0.331 l/h로 비슷하였고 emulsan의 생산은 pH를 조절한 경우가 35% 정도로 높았다. 질소원의 감소로 인한 pH의 변화는 emulsan 생산에 좋지 않은 작용을 함을 알 수 있었고 이하의 모든 실험은 pH 7.0로 조절하였다.

**에탄올 첨가에 대한 emulsan의 생산의 영향**

Fig. 3은 기질인 에탄올의 농도가 감소하는 대수성장의 마지막 지점에서 에탄올을 첨가했을 때 균주의 성장과 emulsan의 생산을 본 것이다. 처음 투입했을 때는 균도 성장하였고 emulsan의 생산도 13.0 U/ml로 향상되었는데 두번째 투입했을 때는 균은 성장하지 않았지만 emulsan의 생산은 그대로 유지되었다. 따라서 에탄올이 제한되는 지점에서 기질의 첨가 방법은 회분식 배양보다 emulsan의 생산이 36% 증가되었다. 이 결과로 부터 emulsan의 생산은 배지에서 에탄올이 제한될 때보다는 균 성장에 영향을 주지않을 정도로 충분히 존재하는 것이 좋다는 것을 알 수 있다.

**유기식 배양**

유기식 배양방법은 균주의 대량생산과 이차대사산물의 생산에 유용한 방법으로(15) 본 실험에서는 탄소원인 에탄올이 제한된 상태와 충분한 상태에서 연속적으로

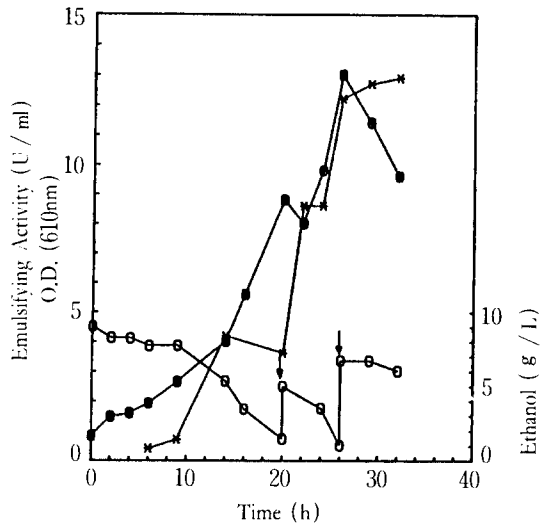


Fig. 3. Effect of intermittent ethanol feeding on cell growth and emulsifying activity. Symbols: O.D. (●); Ethanol (○); Emulsifying activity(×).

공급한 결과를 각각 Fig. 4(a), (b)에 나타내었다. Fig. 4(a)와 같이 기질을 연속적으로 공급할 때 에탄올이 제한된 지점부터 emulsan의 생산은 일어나지 않았다. 유기식 배양에서 emulsan의 생산은 균의 비정상속도를

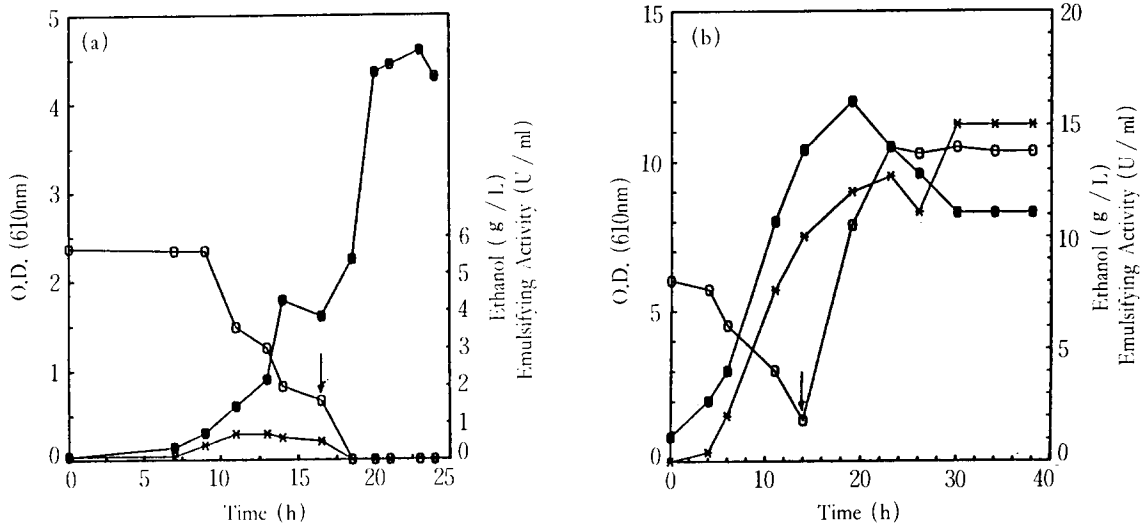


Fig. 4. Fed-batch culture of *A. calcoaceticus* RAG-1 (a) under ethanol-limited feeding condition (Reservoir ethanol concentration = 4.7 g/l; Flow rate = 30.0 ml/h), and (b) under ethanol-sufficient feeding condition (Reservoir ethanol concentration = 75.0 g/l; Flow rate = 30.0 ml/h). Arrow indicates to start fed-batch culture.

Symbols: O.D. (●); Ethanol (○); Emulsifying activity (✱).

늦추고 탄소원을 제한할 때는 일어나지 않았는데 이러한 경향은 penicillin과 같은 이차대사산물과는 다른 것이다. 따라서 emulsan의 생산은 non-growth-associated 라기 보다 growth-associated에 가깝다고 생각되어진다.

Fig. 4(b)는 에탄올을 충분한 상태로 공급해 주었을 경우에 균의 성장과 emulsan의 생산을 본 것이다. 에탄올을 공급해 준 지점에서 4시간동안은 균의 O.D.가 12까지 증가하였고 그 이후에는 균 농도는 감소하였다. 에탄올은 균의 흡수속도보다 빨리 공급했기 때문에 계속 증가하여 30시간 지점에는 14.0 g/l가 되었다. Emulsan의 생산은 기질을 공급한 지점부터 계속 증가하였고 균의 농도가 감소한 지점에서도 증가하여 15.0 U/ml까지 되었다. 이것으로 부터 에탄올을 충분한 상태로 공급한 유가식 배양은 회분식보다 53%의 emulsan 생산의 증가를 얻을 수 있었다.

#### 막 재순환 반응기에서의 배양

좀 더 높은 균 농도를 얻기 위해서 막 재순환 반응기를 사용하여 균의 성장과 emulsan의 생산을 고찰한 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. 회분식 배양으로 20시간 키운 다음 기질을 공급하면서 균을 재순환시켰을 때 균의 O.D.은 30 (건조중량 = 12 g/l)까지 올라갔으며 emulsan은 10시간까지 15.3 U/ml까지 증가하였다. 10시간 이후

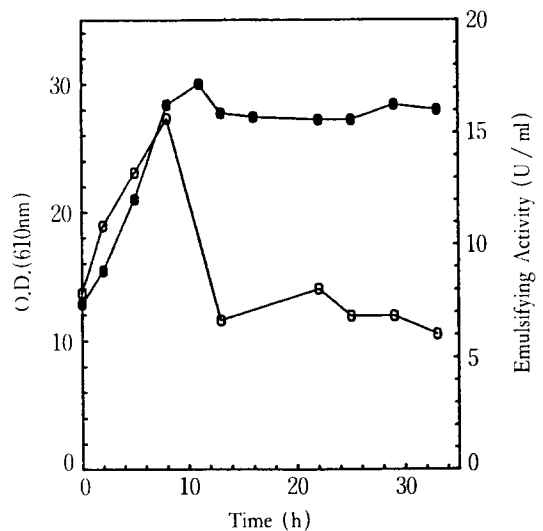


Fig. 5. Membrane cell recycle culture of *A. calcoaceticus* RAG-1. Symbols: O.D. (●); Emulsifying activity (○).

에는 균 농도는 O.D. 30으로 유지되었지만 emulsan은 급격하게 감소하여 6.0 U/ml로 되었다. 본 실험에서

사용한 molecular cutoff가 50,000인 hollow fiber를 통해 빠지는 filtrate에서는 emulsan은 거의 없었는데 이것은 emulsan의 높은 분자량 ( $1 \times 10^6$ )에 기인한 것이라고 생각된다. O.D. 30으로 유지된 상태에서 emulsan이 감소하는 이유는 유가식배양의 경우처럼 에탄올이 제한되기 때문이고 O.D. 30으로 유지되는 것은 공급되는 기질이 균의 성장과 생산으로 가는것이 아니라 maintenance energy로 소모되기 때문이다. 따라서 emulsan의 생산에서는 높은 농도의 균 농도못지 않게 배지에서 항상 에탄올이 제한되지 않게 해야 할 것이다.

**연속 배양**

Fig. 6은 에탄올이 충분히 공급한 상태에서 연속 배양을 통해서 회석률에 대한 균 성장, emulsan의 생산 그리고 에탄올의 농도를 살펴 본 것이다. 회석률이 증가함에 따라 균 농도는 조금씩 감소하였으며 emulsan의 생산은 3.0-4.0 U/ml의 값을 가지다가 회석률이 0.14/h에서 균 농도의 감소와 함께 2.0 U/ml의 값을 나타내었고 회석률이 0.14/h 이상에서는 wash-out이 일어났다. Table 1은 회석률에 대한 균의 성장수율과 emulsan의 생산율을 나타내었다. 균 성장수율은 회석률이 증가함에 따라 조금

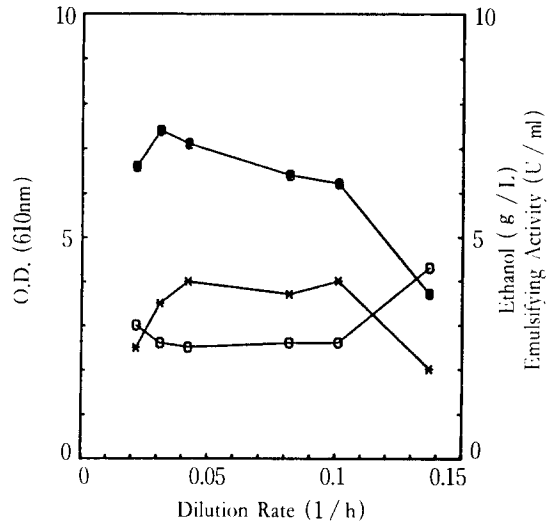


Fig. 6. Continuous culture of *A. calcoaceticus* RAG-1 under ethanol-sufficient condition. Reservoir ethanol concentration is 8.0 g/L. Symbols: O.D.(●); Ethanol (○); Emulsifying activity(\*).

Table 1. Effect of dilution rate on growth yield and emulsan productivity in continuous culture

dilution rate (1/h)	growth yield (g dry cell mass / g ethanol)	emulsan productivity (U/ml/h)
0.022	0.52	0.055
0.031	0.54	0.109
0.042	0.51	0.168
0.082	0.47	0.300
0.101	0.46	0.400
0.137	0.40	0.274

Table 2. Effect of various culture modes on emulsifying activity and emulsan productivity

culture modes	operation conditions	emulsifying activity (U/ml)	emulsan productivity (U/ml/h)
batch	without pH control	7.0	0.29
	with pH control	9.8	0.40
fed-batch	intermittent feeding	13.0	0.50
	ethanol-limited	0.7	0.02
	ethanol-sufficient	15.0	0.65
membrane cell recycle		15.0	0.53
continuous	ethanol-sufficient	4.0	0.40

씩 감소하였고 이때 emulsan 생산율은 희석률이 0.10 l/h일때 0.40 U/ml/h로 최대였다.

#### 배양방법에 따른 emulsan의 농도와 생산성의 비교

여러종류의 배양상태에서 emulsan의 농도와 생산성을 비교해 보았다(Table 2). Emulsan 농도는 에탄올을 충분히 공급하는 유가식 배양과 막 재순환 배양에서 15.0 U/ml로 최고를 나타냈으며 emulsan 생산성은 에탄올을 충분히 공급한 유가식 배양에서 0.65 U/ml/h로 가장 높았고 막 재순환 배양도 비슷한 값을 나타냈지만 emulsan 활성이 감소하는 것을 고려하면 에탄올을 충분히 공급하는 유가식 배양방법이 가장 좋은 것이라고 생각된다.

### 요 약

에멀전은 유화작용제로서 박테리아인 *Acinetobacter* species RAG-1에 의해 세포 밖으로 배출된다고 알려져 있다. 본 연구에서는 여러가지 배양방법하에서 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1에 의해 에멀전생산에 대해서 조사하였다. 사용된 배양방법은 회분식, 유가식, 막 재순환, 연속 배양등 이었다. 탄소원인 에탄올이 충분히 공급된 유가식 배양이나 막 재순환배양에서는 에멀전의 생산은 15.0 U/ml를 얻을 수 있었는데 이것은 pH 조절한 회분식 배양과 비교해서 에멀전생산이 53%가 증가된 것이다. 그리고 에멀전생산을 잔여 에탄올농도와 강한 의존관계에 있음을 알 수 있었다. 연속배양에서는 에멀전생산은 희석률의 증가와 함께 증가하였다.

### 참 고 문 헌

1. I. E. Erickson and T. Nakahara (1975), *Process Biochem.*, **10**, 9.
2. K. Hisatsuka, T. Nakahara, N. Sano and K. Yamada (1971), *Agri. Biol. Chem.*, **35**, 686.
3. S. Itoh and T. Suzuki (1972), *Agri. Biol. Chem.*, **36**, 2233.
4. J. E. Zajic, H. Guignard and D. F. Gerson (1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1285.
5. D. G. Cooper, and J. E. Zajic (1980), *Adv. Appl. Microbiol.*, **26**, 229.
6. D. Gutnick and E. Rosenberg (1977), *Annu. Rev. Microbiol.*, **31**, 379.
7. J. E. Zajic and C. J. Panchal (1976), *Crit. Rev. Microbiol.*, **5**, 39.
8. A. Reifeld, E. Rosenberg and D. Gutnick (1972), *Appl. Microbiol.*, **24**, 363.
9. E. Rosenberg, A. Zuckerberg, C. Rubinovitz and D. L. Gutnick (1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 402.
10. I. Belsky, D. Gutnick and E. Rosenberg (1979), *FEBS Lett.*, **101**, 175.
11. A. Zuckerberg, A. Diver, Z. Peeri, D. L. Gutnick and E. Rosenberg (1974), *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 414.
12. Z. Zosim, D. L. Gutnick and E. Rosenberg (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 281.
13. A. Rosenberg, A. Zuckerberg, C. Rubinovitz and D. L. Gutnick (1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 402.
14. C. W. Lee and H. N. Chang (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, **29**, 1105.
15. S. J. Pirt (1975), *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Scientific Publications, London.

(Received; November 28, 1991, Revised; December 8, 1991,

Accepted; December 1991)