

Pseudomonas fluorescens PD101이 생산하는 생물유화제 특성

윤홍목 · 문성훈¹ · 송영환*
부경대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹화학과

Characterization of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas fluorescens* PD101

Hong Mook YOON, Sung Hoon MOON¹ and Young Hwan SONG*
Department of Microbiology,
¹Department of Chemistry
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Biosurfactant-producing bacteria, showing strong crude oil degrading activity, were isolated from the caverns of National Oil Storage Basement. From the results of biochemical and molecular biological tests, the isolate was identified as *Pseudomonas fluorescens* PD101. It grows well on liquid media at temperature range from 20°C to 37°C, but it does not produce biosurfactant when grown at 37°C or at higher temperature. The biosurfactant was stable at broad pH range from 5 to 11 and under heat treatment condition of 100°C for 30 min. The biosurfactant produced dark blue halo around the colony when grown on SW agar plates, which could confirm the biosurfactant as one of rhamnolipid group. The 700 bp of PCR product could be amplified from DNA of *P. fluorescens* PD101 by using PCR primers designed from *rhlA* gene of *P. aeruginosa*, and it showed 99% of sequence homology with *rhlA* gene of *P. aeruginosa* encoding rhamnolipid synthase 1.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, *RhlA* gene, Biosurfactants

서 론

생물유화제 (biosurfactant) 는 친수성부분과 소수성부분으로 구성되며 극성과 수소결합의 정도가 다른 액체상사이의 표면장력을 감소시키는 작용을 하며 유류의 회수, 소수성 오염물질의 환경복원 등에 적용될 수 있다. 생물유화제의 이러한 특성으로 의약품제조분야, 식품제조분야, 화장품제조분야, 석유 및 석유화학 제품 생산분야, 섬유 제조분야 등 여러 분야에 이용되고 있다 (Georgiou et al., 1992). 그러나 상업적으로 이용되고 있는 합성 유화제들은 생물체에 독성을 나타내며 생분해가 쉽게 되지 않는 등 여러 가지 문제를 가지고 있다. 생물유화제들은 독성이 적고 쉽게 생분해가 일어나며 특히 유류 유출사고 시 생물학적 방제 (bioremediation)와 분산 (dispersion) 등의 환경적인 적용에 적합하다. 생물유화제들은 여러 종의 미생물에 의해 생산되어 다양한 구조를 가지고 있으나 기본적인 구조를 바탕으로 세부적인 화학적 구조의 차이에 따라 glycolipids 계열, lipopeptides 계열, 그리고 고분자 biopolymer계열의 세 가지로 분류할 수 있다 (Fiechter, 1992; Sullivan, 1998). Glycolipid biosurfactant 중 *Pseudomonas aeruginosa*로부터 생산되는 생물유화제인 rhamnolipid는 caprillic acid 부분에 하나 혹은 두개의 rhamnose가 결합되어 있다 (Burger et al., 1963).

*P. aeruginosa*에서 rhamnolipid의 생합성 경로가 이미 알려

져 있고 (Burger et al., 1966), rhamnolipid 의 생합성에 관여하는 효소인 rhamnolipid synthase 1을 암호화하는 *rhlAB* 유전자가 밝혀졌으며 (Ochsner et al., 1994a) *RhlA* 단백질 (32.5 KDa) 은 periplasm에 위치하며 *RhlB* 단백질 (47 KDa) 은 두개의 membrane-spanning domain을 가지는 구조적인 특성은 밝혀졌으나 각 단백질의 명확한 분자수준에서의 기능에 대한 연구 결과는 없는 실정이다. Rhamnolipid synthase 1은 TDP-rhamnose (thymidinediphospho-rhamnose)에서 rhamnose를 β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate에 전달하여 rhamnose가 1분자 결합한 rhamnolipid 2 (L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate)를 형성한다. Rhamnolipid 2에 TDP-rhamnose로부터 rhamnose 분자가 하나 더 추가되는 반응은 다른 효소인 rhamnolipid synthase 2가 관여하여 rhamnolipid 1 (L-rhamnosyl-L-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate)을 형성하는 것으로 알려져 있다. Rhamnose가 2분자 결합되어 있는 dirhamnolipid를 생산에 관여하는 *rhlC* 유전자도 밝혀졌으며 (Rahim et al., 2001), rhamnolipid의 생합성에 필요한 전사 활성인자 (transcription activator)를 암호화하는 *rhlR* 유전자에 대한 기능도 밝혀졌다 (Ochsner et al., 1994b). 또한 rhamnolipid의 생합성을 조절하는 *rhlI* 유전자가 autoinducer의 기능을 갖는 *RhlI* 단백질을 생산하며 (Ochsner and Reiser, 1995) *RhlR*-*RhlI* 복합체는 단지 rhamnolipid의 생합성 뿐만 아니라 alkaline protease,

*Corresponding author: yhsong@pknu.ac.kr

elastase, haemolysin, pyocyanin, lectin, chitinase 및 superoxide dismutase 등 다양한 물질의 생합성에 작용하는 quorum-sensing system을 조절하는 물질로 알려져 있다 (Pearson et al., 1997; Whitehead et al., 2001; Whitehead et al., 2002).

본 실험에서는 국가 원유비축 기지의 저장 동공으로부터 채취한 시료에서 원유분해 미생물을 분리하고, 분리한 균주 중에서 활성이 강하게 나타난 *Pseudomonas fluorescens* PD101을 선택하여 최적 성장조건과 최대 생산조건에 대하여 조사하고 생산된 생물유화제의 특성을 확인하였다. 생산된 생물유화제가 rhamnolipid 임을 SW agar plate에서 진한 청색환이 형성되는 것으로 확인할 수 있었다. *P. aeruginosa*의 *rhlA* 유전자의 염기서열 정보로부터 primer를 제작하고 *P. fluorescens* PD101의 genomic DNA를 이용하여 PCR을 실시하여 rhamnolipid 생산에 관여하는 유전자에 대한 비교 분석을 하고자 하였다. 또한 rhamnolipid 생산에 대한 기작이 잘 알려진 *P. aeruginosa*와 본 실험에서 분리된 *P. fluorescens* PD101의 rhamnolipid 생산에 관여하는 유전자를 비교하여 *P. fluorescens* PD101의 특성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 채취

시료는 국가 원유 비축기지의 원유 저장 동공으로부터 인입수, 유출수, 유수경계층등에서 멸균된 시료병을 이용하여 실시하였고, 채취한 시료는 4°C로 유지시켜 실험실로 운반하였다.

생물유화제를 생산하는 미생물의 분리

시료를 순차적으로 10배씩 희석한 후 100°C를 LB 고형배지 (bacto-tryptone 10 g, bacto-yeast extract 5 g, NaCl 10 g, agar 16 g/L in D.W.)에 도말하고, 그 위에 원유 200 μ L를 첨가하여 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 원유가 첨가된 LB 배지에서 투명환을 나타내는 균체를 형태별로 분류하여, 이를 LB배지에서 배양하여 생물유화제를 생산하는 미생물을 분리하였다. 시료 중의 전체 미생물 수가 적을 경우 증균시키기 위하여 시료를 N2K 최소배지 (NH₄Cl 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NaH₂PO₄ 0.1 g, 원유 100 μ L/L in D.W.)에 접종한 후 30°C에서 1주일 간 진탕 배양하여 위와 동일한 방법으로 생물유화제를 생산하는 미생물을 분리하였다.

생유화제를 생산하는 세균의 동정

분리한 생유화제 생산균주들을 간단한 생화학적 분석과 16S rRNA를 이용한 동정하였으며 보다 정확한 분석을 위하여 ID 32 GN (Automatic Identification System for Gram Negative Rods) Kit를 이용하여 분석하였다. PCR (polymerase chain reaction)을 이용하여 각 미생물의 DNA로부터 16S rRNA 유전자 일부를 증폭한 뒤 PCR 산물을 직접 염기서열

분석을 실시하였다. 얻어진 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST search로부터 이미 알려진 다른 미생물종의 16S rRNA 염기서열과 유사성을 조사하여 유사성이 높은 균주를 조사하였다. Eubacteria의 16S rRNA 유전자의 염기서열간의 유사성을 조사하여 잘 보존된 부분의 염기서열로 나타난 *E. coli*의 16S rRNA 유전자에서 각각 49-68 nt, 1510-1492 nt에 해당하는 부분의 DNA를 합성하여 primer로 PCR에 이용하였다.

각각의 PCR을 위한 primer의 염기서열은 다음과 같다.

Forward primer (21 mer):

5'-TNTANACATGCAAGTCGAICG-3'

Reverse primer (19 mer):

5'-GGYTACCTTGTACGACTT-3'

균체를 백금이를 이용하여 채취하고 멸균증류수에 분산시킨 뒤 98°C에서 2분간 가열하여 세포를 터뜨린 후 미량원심분리기에서 12,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 PCR 반응을 위한 기질로 사용하였다. 반응 용액은 1.5 mM MgCl₂가 포함된 10X PCR 반응용액을 이용하였으며, 1 mM dNTP, 100 pM forward primer, 100 pM reverse primer를 첨가하였다. 여기에 Taq polymerase를 2.5U 첨가하여 PCR반응을 유도하였다. 반응조건은 94°C에서 2분간 반응한 후 94°C에서 1분간, 50°C에서 1분 30초간, 72°C에서 3분간의 반응을 40회 연속 반응시켰으며 72°C에서 최종적으로 20분간 반응하여 PCR을 종결하였다. 증폭된 DNA는 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

생물유화제 생산량 (biosurfactant productivity)의 측정 배양액으로 생산된 생물유화제 생산량의 측정은 hexadecane/2-methylnaphthalene 방법을 이용하여 측정하였다 (Van Dyke et al., 1993). 배양액을 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 0.45 μ m 여과지에서 여과하여 시료로 이용하였다. 시험관에 20 mM Tris 완충용액/10 mM MgSO₄ (pH 7.0) 4.4 mL, hexadecane/2-methyl-naphthalene 혼합액 (1:1 v/v) 0.1 mL, 시료 0.5 mL를 넣고 30초간 혼합한 뒤 30분간 정치시킨다. 이 혼합용액의 탁도를 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 측정한다. 이때 생산량 1 unit는 흡광도 1.0을 나타내게 하는 생물유화제의 양으로 정의한다.

Pseudomonas fluorescens PD101의 최적 성장조건 및 생물유화제의 최적 생산조건 조사

P. fluorescens PD101의 최적 성장온도를 측정하기 위하여 LB배지를 기본 배지로 하여 4개의 온도 (20°C, 25°C, 30°C 및 37°C) 구간에서 진탕 배양하였다. 30°C에서 진탕 배양된 배양액을 새로운 배지에 2% 접종하여 각각의 온도에서 배양하였다. 증식정도는 각 시간마다 시료를 채취하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였으며 배양이 끝난 후에 위의 hexadecane/2-methylnaphthalene 방법을 이용하여 생물유화제 생산량을 측정하였다. 증식곡선을 측정하기 위하여 위에서 준비한 접종액

을 영양배지인 LB배지와 *Pseudomonas* spp.의 생물유화제 최적생산용 최소배지로 알려진 4 M 최소배지 (K_2HPO_4 0.65 g, KH_2PO_4 0.17 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $NaNO_3$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, $CaCl_2$ 0.02 g, Glucose 20 g/liter in D.W., pH 6.8, crude oil 0.5%, DMSO 0.02%)에 2%씩 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 진탕하면서 배양하였다 (Guerra-Santos et al., 1986). 시간에 따른 증식 정도와 생물유화제 생산량은 위의 방법과 동일하게 측정하였다. Rhamnolipid 생산을 위해 P source가 한정요인으로 설정된 PPGAS 배지 (NH_4Cl 20 mM, KCl 20 M, Tris-Cl 120 mM, Glucose 0.5%, Proteose peptone 1%, $MgSO_4$ 0.16 mM in D.W., pH 7.2), Rosenberg의 최소배지 (Rosenberg et al., 1979) 및 *P. aeruginosa*의 최소배지 (Wild et al., 1997)를 사용하여 최적 생산조건을 비교하였다.

생물유화제의 특성조사

P. fluorescens PD101이 생산하는 생물유화제의 특성을 조사하기 위하여 pH의 영향을 조사하였다. 측정용 완충용액은 10 mM citrate-phosphate buffer (pH 3.0-6.0), 10 mM Tris-HCl (pH 7.0-8.0), 10 mM glycine-NaOH buffer (pH 9.0-11.0)로 조정하고 측정용액 500 μ L를 첨가하여 상온에서 30분간 방치시킨 후 생물유화제의 생산량을 측정하였다. 생물유화제 생산량의 온도에 대한 영향을 조사하기 위하여 10 mM Tris-HCl/10 mM $MgSO_4$ (pH 7.0)에 측정용액을 첨가한 다음 4°C, 25°C, 50°C, 100°C에서 30분간 정치시킨 후 생물유화제 생산량을 측정하였다.

Rhamnolipid의 확인

생산되는 생물유화제가 rhamnolipid임을 확인하기 위하여 rhamnolipid 확인용 배지인 SW agar plate를 이용하였다 (Siegmond and Wagner, 1991; Wild et al., 1997). 최소배지에 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 0.02%와 methylene blue를 0.0005% 첨가하여 SW agar plate를 준비하고 여기에 생물유화제를 생산하는 균을 접종하여 배양한다. 계면활성제인 CTAB 존재시 약한 음이온성을 띄게 되

는 rhamnolipid가 양이온성 염색시약인 methylene blue와 결합하여 복합체를 이루게 되며, rhamnolipid를 생산하는 균체 주위에 진한 청색환을 형성하게 된다.

Pseudomonas fluorescens PD101의 DNA 분리 및 *rhIA*B (rhamnosyltransferase) 유전자의 PCR 증폭

P. fluorescens PD101에서도 rhamnosyltransferase에 의한 생합성 과정에 의해서 생물유화제가 생산되는지를 조사하기 위하여 *P. fluorescens*의 DNA를 분리하고 (Festl et al., 1986) PCR을 이용하여 *rhIA* 및 *rhIB* 유전자를 증폭시키고, 증폭된 유전자의 DNA 염기서열을 확인하였다. NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Entrez nucleotide database에서 *rhl* 유전자를 검색하여 *P. aeruginosa*의 *rhl* 유전자의 염기서열을 확보하였다 (Ochsner et al., 1994a). *rhIA* 유전자와 *rhIB* 유전자를 증폭시키기 위하여 GENETYX-MAC program (SDC software Development Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 primer들을 설계하고 합성하였다. PCR 혼합용액은 준비된 DNA를 기질로 하여 10X 반응용액 (10 mM $MgCl_2$ 포함), 1 mM dNTP, 100 pmole primer, 2.5U Taq polymerase에 넣고 증류수로 50 μ L를 맞추었다. 기본적인 PCR 반응은 먼저 94°C에서 5분간 반응한 후 94°C에서 1분, 62°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초를 40회 반복하여 반응하였으며 95°C에서 5분간 반응한 후 반응을 종결하였다. 이때 annealing 온도 조건은 사용하는 primer에 따라서 바꾸어 사용하였으며 반응이 끝난 후 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. *rhIA* 및 *rhIB* 유전자의 단편을 증폭하기 위하여 사용한 primer의 염기서열은 Table 1에 기술하였다.

PCR 산물의 염기서열 확인

ABI 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였으며 ABI PRISM™ Dye Terminator Kit을 이용하여 반응하였다. PCR 혼합액은 terminator ready reaction mix 8 μ L, double stranded DNA (0.2 μ g/mL) 1.5-2.5 μ L, primer를 3.2 pmole되게 첨가한 후, 전체 반응용량을 20 μ L되게 증류수를 첨가하였다. 준비된 반응용액을 thermal

Table 1. Primers used for PCR amplification for rhamnosyltransferase gene, *rhIA* and *rhIB*

Primer name	Sequence	
Af1	5'CGGCGCGAAAGTCTGTTGGTATCG3'	<i>rhIA</i> forward direction
Af2	5'CATGTCGAGCGCGTTGGGCAGGAT3'	
Ar1	5'CGTCCTCGGCGGTGGTGTATTTCGTC3'	<i>rhIA</i> reverse direction
Bf1	5'TGCACGCCATCCTCATCGCCATCGG3'	
Bf2	5'CCGGCGACGTATTTCCCTTCATCGGC3'	<i>rhIB</i> forward direction
Bf3	5'CGGAATTCATGCACGCCATCCTCATCGC3'	
Br1	5'GGGAAGCCGGTCATGTGCAGGGGTTG3'	
Br2	5'GGACGCAGCCTTCAGCCATC3'	<i>rhIB</i> reverse direction
Br3	5'CCTTAAGTCAGGACGCAGCCTTCAGCC3'	

cycler (GeneAmp PCR Systems 2400, Perkin Elmer)에 넣고 96°C (10초), 50°C (5초), 60°C (4초)의 반응을 25회 반복하여 핵산을 증폭시켰다. PCR이 끝난 뒤, 반응이 되지 못한 dye terminators 등을 제거하기 위하여 에탄올로 침전시킨 후 70% 에탄올로 다시 세척하여 진공 건조기에서 건조하였다. 여기에 25 µL의 template suppression reagent를 첨가하여 건조된 핵산을 잘 녹인 후 95°C에서 2분간 가열하여 사용 전까지 4°C에서 보관하였다. 염기서열결정은 ABI 310 Genetic Analyzer의 표준방법에 따라서 실시하였다.

결과 및 고찰

생물유화제 생산 미생물의 분리 및 동정

채취한 원유시료를 LB 고형배지에 도말한 다음 원유를 첨가하여 30°C에서 24시간 배양한 후, 균체주위에 원유가 유화되어 투명환을 나타내는 30여 종의 세균들을 분리하였다. 분리된 세균에 대한 생화학적인 분석으로 *Pseudomonas* spp. 14종, *Bacillus* spp. 8종 및 *Acinetobacter* spp., *Corynebacterium* spp. 등의 미생물이 검출되었다. 선별된 4 종의 미생물과 *E. coli*를 대조군으로 사용하여 LB 고형배지 상에서의 유화제 생산량을 비교하였다. LB 고형배지 상에 균들을 접종하여 6시간, 12시간 후의 유화제 생산량을 관찰하였을 때 PD101 균주가 다른 균주에 비하여 유화능이 높게 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 1). PD101균주의 경우 접종 후 6 시간에서 원유가 유화되어 나타나는 투명환을 관찰할 수 있었으며, 12시간 후에는 PD201 (*Corynebacterium* spp.), PD701 (*Bacillus* spp.), PD801 (*Acinetobacter* spp.) 등에서도 투명환이 관찰되었으나, *E. coli*에서는 투명환은 관찰되지 않았다. PD101 균주의 동정을

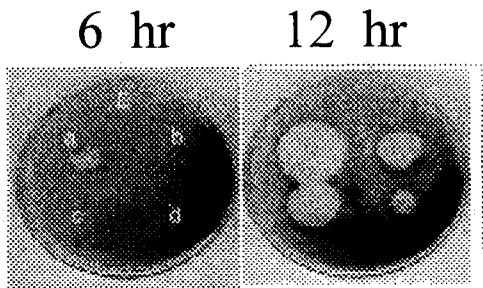


Fig. 1. Comparison of biosurfactant-producing activity on LB agar plate after inoculation from 6 hrs to 12 hrs. (E: *E. coli* strain as control, a: PD101, b: PD201, c: PD701, d: PD801).

를 암호화하는 유전자에 대한 PCR 증폭 및 증폭된 유전자의 염기서열 분석을 통하여 재확인 할 수 있었다. 분리된 *P. fluorescens* PD101 DNA로부터 16S rRNA 유전자 부위를 증폭하였을 때, 약 1.5 kb에 해당하는 단편이 증폭되었으며 위하여 생화학적인 분석을 통하여 *Pseudomonas fluorescens*

Table 2. Biochemical characteristics of *Pseudomonas fluorescens* PD101

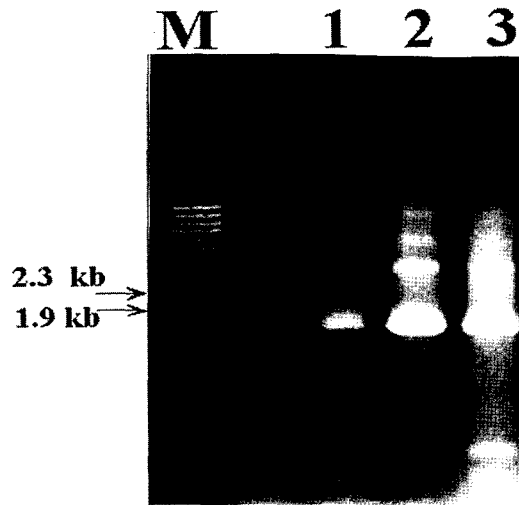
Characteristics	Results	Characteristics	Results
Gram stain	-	Glycogen	-
Shape	rod	L-Serine	+
Motility	+	Mannitol	+
Indol	-	D-Glucose	+
MR	-	Salicine	-
VP	-	D-Melibiose	-
Oxidase	+	L-Fucose	-
Catalase	+	D-Sorbitol	-
Gelatinase	+	L-Arabinose	+
Rhamnose	-	Propionate	+
N-Acetyl Glucosamine	+	3-Hydroxy benzoate	-
D-Ribose	+	Caprate	+
Inositol	-	Valerate	+
D-Sucrose	-	Citrate	+
Maltose	-	Histidine	-
Itaconate	-	5-Ketogluconate	-
Suberate	-	3-Hydroxy-Butylate	+
Maltose	+	4-Hydroxy-Benzoate	+
Acetate	+	L-proline	+
DL-Lactate	+	Growth at 4°C	+
L-Alanine	+	Growth at 41°C	-
2-Ketogluconate	+	Spore	-

로 결정할 수 있었으며 (Table 2), 이러한 결과는 16S rRNA (Fig. 2-A) PCR 반응물의 3배, 6배 증가하여 전기영동하였을 때 비특이적인 단편도 나타나나 1.5 kb에 해당하는 단편이 주된 PCR 생성물임을 알 수 있었다 (Fig. 2-A, lane 2 및 3) 1.5 kb에 해당하는 단편에 대한 염기서열을 조사하여 이를 BLAST 염기서열 데이터베이스로부터 유사성이 높은 염기서열을 조사한 결과 *Pseudomonas* 속의 여러 종과 높은 유사성을 보였으며, 특히 *P. fluorescens*와 가장 높은 유사성을 나타내었다 (Fig. 2-B). 본 실험에서 얻어진 *P. fluorescens* PD101의 16S RNA의 염기서열은 Nazaret 등이 NCBI database에 등록한 *P. fluorescens* 16S ribosomal RNA 유전자 (등록번호 AF511433.1) 과 97%의 유사성을 보였다 (unpublished data). 이러한 결과로 본 연구에서 분리한 생물유화제를 생산하는 미생물을 *Pseudomonas fluorescens* PD101으로 명명하였다.

P. fluorescens PD101의 최적 성장조건 및 생물유화제 최적 생산조건 조사

최적 성장온도를 조사하기 위하여 LB 액상배지에 균체를 접종하고 20°C, 25°C, 30°C 및 37°C로 온도를 달리하여 배양하였다. 4시간 간격으로 증식정도를 측정하고 배양이 끝난 후의 생물유화제 생산량을 측정된 결과 증식곡선은 모든 조건에서

(A)



(B)	PD101: 1	gcggacgggtgagtaatgcctag-aatctgcttgtagtgggggacacgcttcgaaagg	59
	AF511433.1: 75	gcggacgggtgagtaatgcctaggaatctgcttgtagtgggggacacgcttcgaaagg	134
	PD101: 60	aacgctaataccgatacgtcctacgggagaaagcaggggaccttcgggccttgcgctat	119
	AF511433.1: 135	aacgctaataccgatacgtcctacgggagaaagcaggggaccttcgggccttgcgctat	194
	PD101: 120	cagatgagcctaggtcggattagcta-ttggtgaggtaatggctcaccaaggctac-atc	177
	AF511433.1: 195	cagatgagcctaggtcggattagctattggtgaggtaatggctcaccaaggcgcgacgatc	254
	PD101: 178	cgtaactggtctgagaggatgatcattcacactggaactgagacacgggtcca	229
	PD101: 178	cgtaactggtctgagaggatgatcagtcacactggaactgagacacgggtcca	306

Fig. 2. Identification of *Pseudomonas fluorescens* PD101 using PCR amplification of 16S rRNA gene and BLAST search analysis. Panel (A) shows the electrophoresis pattern of PCR product. M is the size marker and the arrow indicates the 1.5 kb of PCR product. Panel (B) is the result of DNA sequence homology search.

비슷하게 나타났으나, 37°C에서의 성장은 다른 온도에 비해 약간 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 3). 그러나 배양이 끝난 후 생물유화제 생산량을 측정한 결과 20-30°C에서는 비슷한 생산량을 나타내었으나 37°C에서는 거의 생산되지 않았다. 이러한 결과는 *P. aeruginosa*의 경우에는 26°C에서 40°C까지 증식이 가능하며 biomass의 양도 비슷하게 나타났으며 40°C까지도 rhamnolipid가 생산되는 것으로 보고한 것과는 차이가 있다 (Guerra-Santos et al., 1986). *P. aeruginosa*와 *P. fluorescens* PD101의 생물유화제의 생산 및 성장온도 상에서 차이가 있으며, *P. fluorescens* PD101의 경우 37°C에서 성장에는 큰 영향이 없으나 37°C에서 생물유화제의 생산이 거의 되지 않은 것은 생물유화제를 생산하는 대사과정 중의 특정한 유전자가 온도에 대해 민감하다고 사료된다.

한편 배양시간에 따른 균주의 성장속도와 생물유화제의 생산량을 측정하기 위하여 영양배지인 LB 액상배지와 4M 최소액상배지에 균체를 접종하고 성장온도를 30°C로 설정하여 5

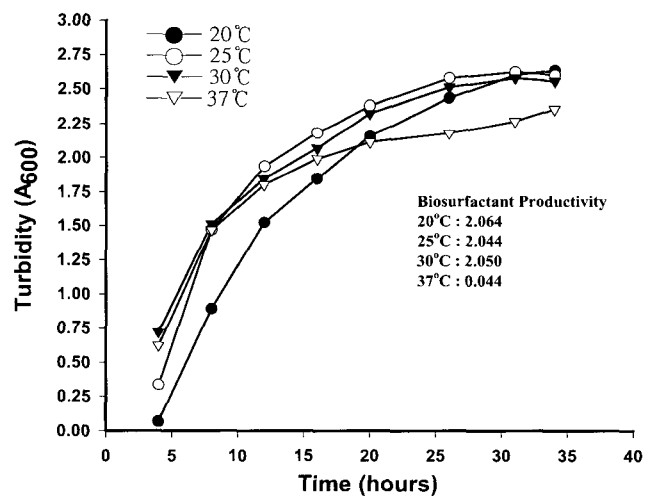


Fig. 3. Influence of temperature on growth and bio-surfactant productivity of *Pseudomonas fluorescens* PD101.

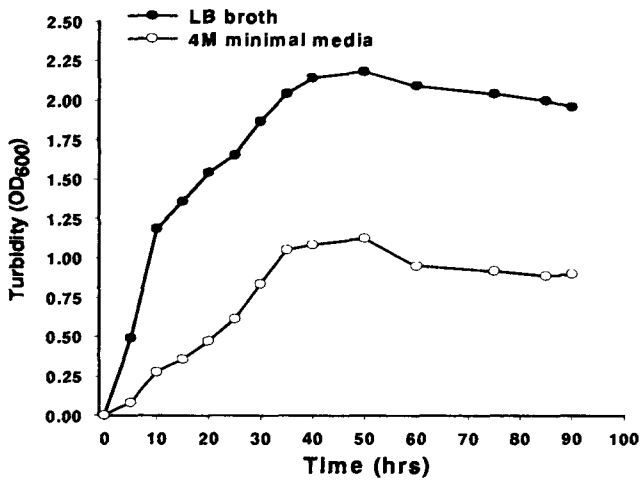


Fig. 4. Growth curve of *Pseudomonas fluorescens* PD101 on LB broth and 4M minimal media.

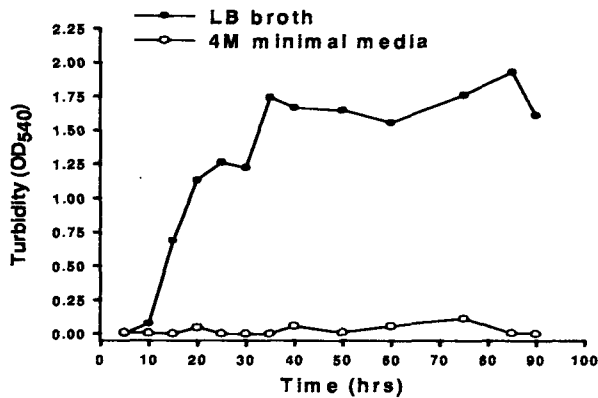


Fig. 5. Comparison of biosurfactant productivity of *Pseudomonas fluorescens* PD101 cultivated on LB broth and 4M minimal media.

시간 간격으로 균의 증식과 생물유화제 생산량을 측정하였다. 균의 증식은 두 배지에서 모두 50시간 정도까지 대수 증식기를 나타내었으며, LB 액상배지에서 더욱 좋은 성장을 나타내었으며 약 20시간부터 blue pigments가 형성되기 시작하였다 (Fig. 4). 생물유화제 생산량은 LB 액상배지에서 매우 높게 나타났으나, 4M 최소배지에서는 거의 나타나지 않았다 (Fig. 5). *P. aeruginosa*에서 생산되는 생물유화제인 rhamnolipid는 4M 최소배지에서 최적생산조건을 보였으나 *P. fluorescens* PD101의 경우는 *P. aeruginosa*와는 차이가 있음을 알 수 있다. 탄소원으로 이용되는 기질의 종류와 균의 성장 시에 질소원의 이용유무에 따라 생산균주의 생물유화제의 생산능이 달라진다고 보고된 예가 있으나 (Zhang and Miller, 1994), 본 실험에 사용한 균주인 *P. fluorescens* PD101의 경우는 4M 최소배지에서 성장은 가능하지만 생물유화제를 생산하기 위한 기질로서는 적합하지 못하여 생물유화제가 생산되지 않는 것으로 사료된다.

최적생산을 위한 최소영양배지조사

생물유화제의 생산에 영향을 미치는 다양한 영양조건들을 조사하여 최소영양배지를 조사하여야 한다. *Pseudomonas* spp.의 생물유화제의 최적생산을 위하여 이용한 최소배지를 이용하여 성장속도와 생물유화제의 생산정도를 측정하였다 (Fig. 6). N source가 한정요인으로 작용하는 *P. aeruginosa* 최소배지에서 가장 좋은 성장을 나타내었고 그 다음으로 P source가 한정요인으로 작용하는 PPGAS 배지에서 좋은 성장을 나타내었다. 그러나 N₂K 배지와 Rosenberg의 최소배지에서는 거의 성장을 나타내지 않았다. 배양이 끝난 후 생물유화제 생산량을 측정된 결과, *P. aeruginosa*의 최소배지에서는 좋은 성장을 나타내었으나 생물유화제는 생산되지 않았으며 PPGAS 배지에서는 생물유화제의 생산량이 높게 측정되었다. 분리된 *P. fluorescens* PD101은 *P. aeruginosa*가 N source가 한정된 조건하에서 생물유화제를 최적 생산하는 것 (Deziel et al., 1996)과는 달리 P source가 한정된 환경에서 생물유화제를 최적 생산하여 생물유화제의 생산에 이용하는 기질의 특이성에서 차이를 나타내었다.

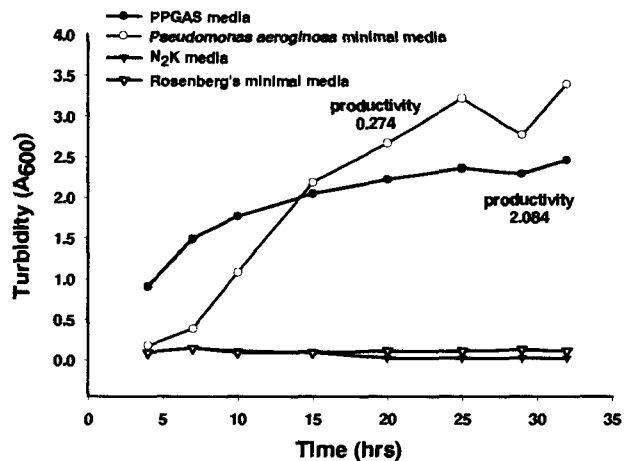


Fig. 6. Growth pattern and biosurfactant productivity of *Pseudomonas fluorescens* PD101 on several minimal media.

생물유화제의 특성조사

생물유화제의 pH에 대한 안정성을 조사한 결과 pH 6에서 최대 활성을 나타내었으며 pH 5-10까지 안정된 활성을 나타내었다 (Fig. 7). pH 4 이하부터 활성이 13% 정도로 감소하였으며 이는 생물유화제가 pH 4에서 산에 의한 침전이 일어나기 때문이다. *Arthrobacter* RAG-1이 생산하는 생물유화제인 emulsan의 경우 pH 6에서 최대 활성을 나타내고 pH 5 이하, pH 7 이상에서는 급격하게 활성이 감소하는 것으로 보고되었고 (Rosenberg et al., 1979), *Acinetobacter radioresistens*가 생산하는 lipopeptide 계열의 생물유화제인 alasan은 pH 5에서 최대 활성을 나타내고, 산성조건 (pH 3.3-4.5)과 약산과 염기조건 (pH 5.5- 9.3)에서는 활성이 감소하나, Mg²⁺ 첨가 시에는 활성감소 정도가 크게 줄어드는 것으로

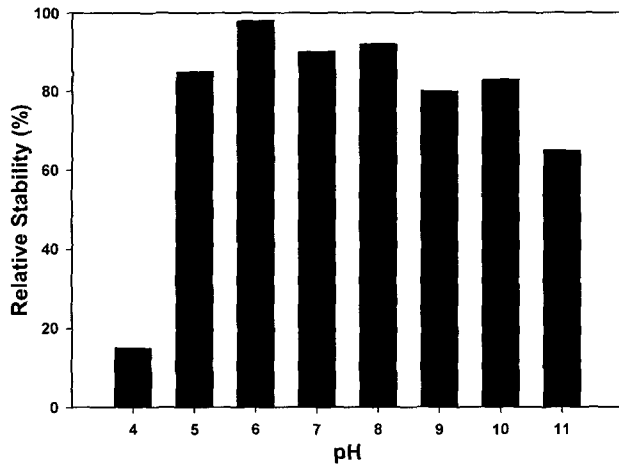


Fig. 7. Effect of pH on the stability of biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* PD101.

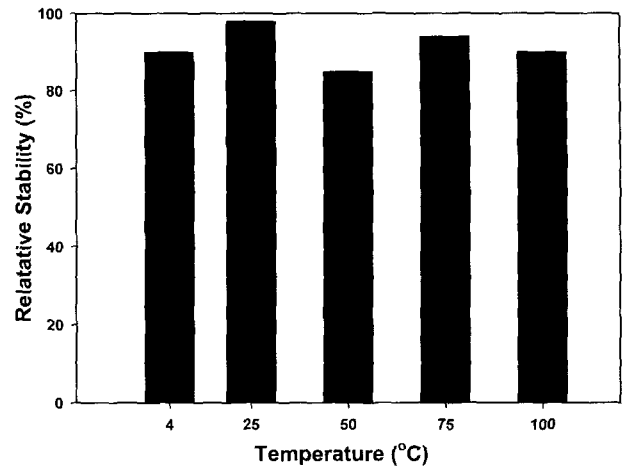


Fig. 8. The effect of temperature on the stability of biosurfactant solution.

보고되었다 (Navon-Venezia et al., 1995). 또한 *Acinetobacter* spp. BE-254에서 생성되는 당지질계열의 생물유화제 경우 pH 4-8 까지는 안정된 활성을 나타내나 pH 9부터 활성이 감소하는 것으로 보고되었다 (Kim et al., 1996). 생물유화제들이 산성 또는 중성에서 안정된 활성을 나타내는 반면 본 연구에서 분리된 *P. fluorescens* PD101의 경우는 약산성 (pH 5.0)에서 알칼리성 (pH 11.0)까지 넓은 pH 범위에서 높은 활성을 나타내고 있다. 이러한 특성으로 인하여 다양한 자연 환경에 적용을 가능하게 하는 장점을 가지게 된다. pH에 대한 안정성은 *P. aeruginosa*에서 생성되는 당지질계열의 생물유화제인 rhamnolipid의 pH에 대한 안정성과 유사하다 (Zhang and Miller, 1992).

한편 온도에 대한 안정성을 조사한 결과 모든 온도에서 생물유화제 생산량이 높게 측정되었다 (Fig. 8). 특히 100°C에서 30분간 열처리한 후에도 활성이 안정되게 나타나 *Arthrobacter* RAG-1의 emulsan이나 *Candida lipolytica*가 생산하는 liposan (Cirigliano and Carmen, 1984) 과는 달리 열처리에 매우 안정하다는 것을 나타낸다. 본 실험에서 이용된 *P. fluorescens* PD101이 생산하는 생물유화제의 경우 넓은 영역의 온도 (4-100°C) 범위의 환경에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

생물유화제의 확인

P. fluorescens PD101이 생산하는 생물유화제가 동일한 *Pseudomonas* 속의 *P. aeruginosa*가 생산하는 생물유화제인 rhamnolipid인지를 확인하기 위하여 SW 고형배지에 균체를 접종하여 배양해 본 결과, 균체주위에 진한 청색환을 형성하는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 *P. fluorescens* PD101이 생산하는 생물유화제는 rhamnolipid와 같은 종류일 것으로 추측할 수 있으며, pH 및 온도에 대한 안정성의 결과도 rhamnolipid의 특성과 유사하였다. *P. fluorescens* PD101이

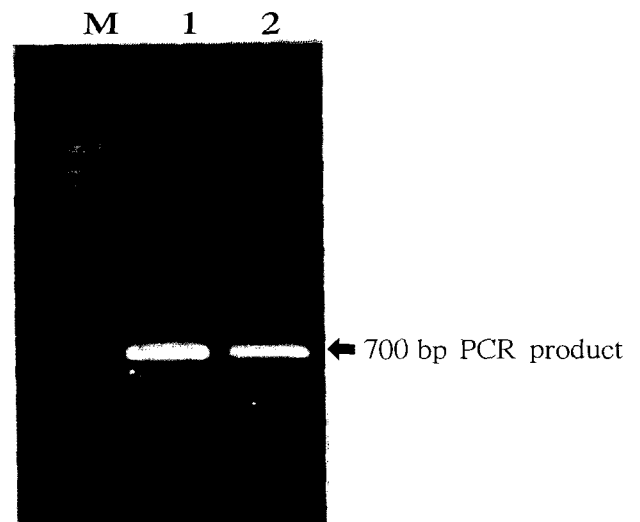


Fig. 9. PCR amplification of *rhlA* gene fragment of *Pseudomonas fluorescens* PD101. Lane M indicates DNA size marker (λ -HindIII cut). The size of PCR products as shown with arrow in lane 1 and 2 are about 700 bp.

생산하는 생물유화제의 자세한 구조를 밝히기 위하여 생물유화제를 TLC (Thin Layer Chromatography), HPLC (High Performance Liquid Chromatography)등을 이용하여 정제하여, 질량분광광도계 및 핵자기공명 등을 이용한 구조분석이 필요하다고 사료된다.

PCR을 이용한 *rhl* (rhamnosyltransferase) 유전자의 증폭 및 염기서열 분석

P. fluorescens PD101에서 추출한 genomic DNA를 기질로 하여 *P. aeruginosa*의 *rhlA* 유전자의 염기서열 정보로부터 합성한 Af1/Ar1 primer를 이용하여 PCR 반응을 통하여 약

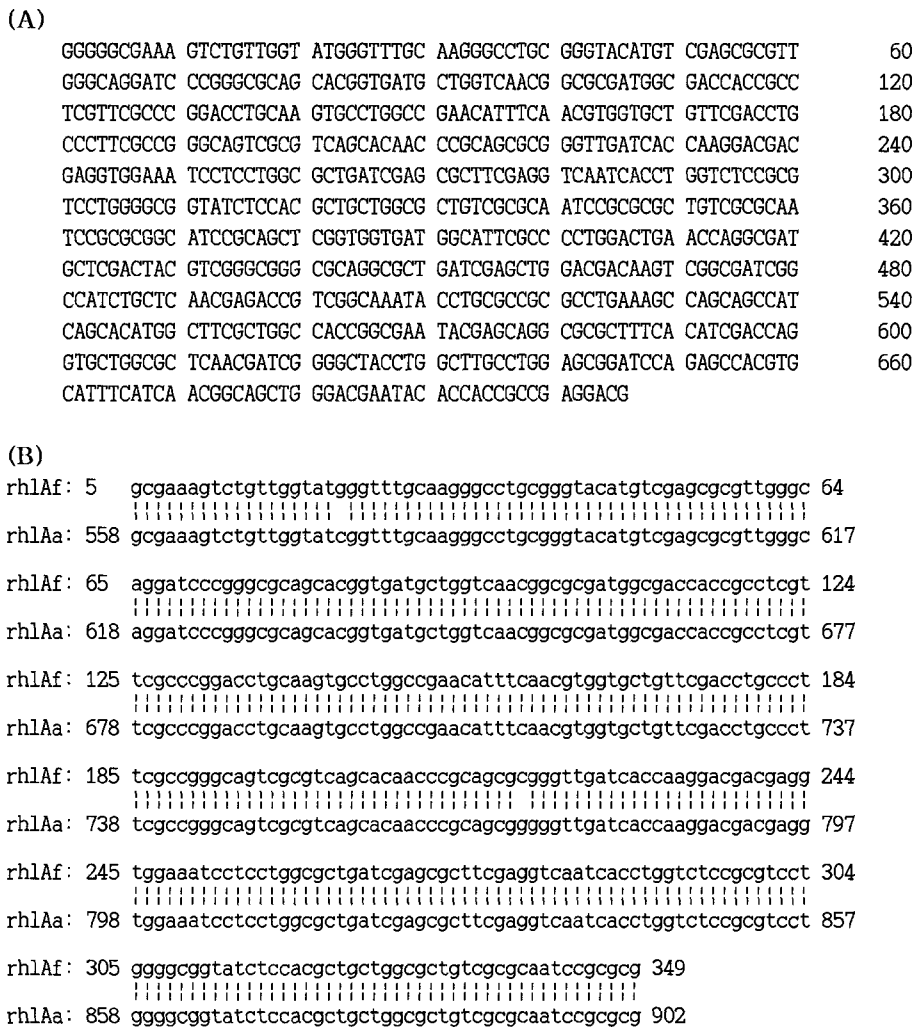


Fig. 10. The Nucleotide sequences of *rhIA* gene fragment obtained from *Pseudomonas fluorescens* PD101 (rhIAf) by PCR amplification and the alignment with *rhIA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* (rhIAa)

700 bp의 크기를 갖는 PCR 산물을 증폭할 수 있었다 (Fig. 9). *P. aeruginosa*의 rhamnolipid 생합성에는 rhamnosyltransferase 1 및 rhamnosyltransferase 2가 관여하며, rhamnosyltransferase 1을 암호화하는 유전자는 *rhIA* 및 *rhIB* 등의 2개의 유전자가 관여하며 rhamnosyltransferase 2를 암호화하는 또 다른 *rhIC* 유전자가 존재한다고 알려져 있다. *P. fluorescens* PD101의 rhamnolipid 생합성에도 *rhIA* 및 *rhIB* 등의 2개 유전자가 관여하는지를 확인하기 위하여 *rhIB* 유전자에 대한 primer (Bf1, Bf2, Bf3/Br1, Br2, Br3) 등을 합성하여 PCR 반응을 실시하였다. 그러나 *rhIB* 유전자의 경우 모든 primer 조합에서 증폭되지 않았다. PCR로 증폭된 *rhIA* 유전자 단편의 염기서열을 확인하기 위하여 증폭된 단편을 agarose gel에서 분리하여 정제한 후 pGEM-T vector에 클로닝하고 ABI Genetic Analyzer 310을 이용하여 염기서열을 분석하였다. M13 forward/reverse primer를 이용하여 염

기서열을 확인하였고 양방향의 염기서열이 상보적으로 일치할 때 까지 염기서열을 결정하여 706개에 해당하는 전체 염기서열을 결정하였다 (Fig. 10).

PCR 산물의 염기서열을 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 BLAST DNA database search service를 이용하여 분석하였다. 분석결과 PCR 산물은 *Pseudomonas aeruginosa*의 rhamnosyltransferase 1을 암호화하는 *rhIA* 및 *rhIB* 유전자 중 *rhIA*와 99%의 상동성을 나타내었다. 이는 *P. aeruginosa*의 *rhIA* 유전자가 *P. fluorescens* PD101 에도 존재함을 알 수 있었으며 *P. fluorescens* PD101에서 생산되는 생물 유화제가 rhamnolipid 계열임을 증명하여 준다. 그러나 *P. aeruginosa*에서는 *rhIA* 및 *rhIB* 유전자 등 2개의 유전자가 rhamnolipid 생합성에 관여하나 *P. fluorescens* PD101의 경우는 *rhIB* 유전자가 존재하지 않음을 PCR 분석을 통하여 밝혀낼 수 있었다.

사 사

본 연구는 학술진흥재단 학술연구조성비 (1997년 수해양 분야)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Burger, M.M., L. Glaser and R.M. Burton. 1963. The enzymatic synthesis of rhamnose-containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem., 238, 2595-2602.
- Burger, M.M., L. Glaser and R.M. Burton. 1966. Formation of rhamnolipids of *Pseudomonas aeruginosa*. Meth. Enzymol., 8, 441-445.
- Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol., 46, 747-750.
- Deziel, E., G. Paquette, R. Villemur, F. Lepine and J.G. Bisailon. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Environ. Microbiol., 62(6), 1908-1912.
- Festl, H., W. Ludwig and K.H. Schleifer. 1986. DNA hybridization probe for the *Pseudomonas fluorescens* group. Appl. Environ. Microbiol., 52(5), 1190-1194.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends Biotechnol., 10(6), 208-217.
- Georgiou, G., S.C. Lin and M.M. Sharma. 1992. Surfaceactive compounds from microorganisms. Biotechnol., 10(1), 60-65.
- Guerra-Santos, L., O. Kappeli and A. Fiechter. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl. Environ. Microbiol., 24, 443-448.
- Kim, S.H., J.D. Lee, B.C. Kim and T.H. Lee. 1996. Purification and characterization of bioemulsifier produced by *Acinetobacter* spp. BE-254. J. Microbiol. Biotech., 6(3), 184-188.
- Navon-Venezia, S., Z. Zosim, A. Gottlieb, R. Legmann, S. Carmeli, E.Z. Ron and E. Rosenberg. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl. Environ. Microbiol., 61, 3240-3244.
- Ochsner, U.A., A. Fiechter and J. Reiser. 1994a. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. J. Biol. Chem., 269(31), 19787-19795.
- Ochsner, U.A., A.K. Koch, A. Fiechter and J. Reiser. 1994b. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 176(7), 2044-2054.
- Ochsner, U.A. and J. Reiser. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A., 92(14), 6424-6428.
- Pearson, J.P., E.C. Pesci and B.H. Iglewski. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J. Bacteriol., 179(18), 5756-5767.
- Rahim, R., U.A. Ochsner, C. Olvera, M. Graninger, P. Messner, J.S. Lam and G. Soberon-Chavez. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. Mol. Microbiol., 40(3), 708-718.
- Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz and D.L. Gutnick. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties. Appl. Environ. Microbiol., 37(3), 402-408.
- Siegmund, I. and F. Wagner. 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. Biotechnol. Tech., 5, 265-268.
- Sullivan, E.R. 1998. Molecular genetics of biosurfactant production. Curr. Opin. Biotechnol., 9(3), 263-269.
- Van Dyke, M.I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee and J.T. Trevors. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbiol., 39(11), 1071-1078.
- Whitehead, N.A., A.M. Barnard, H. Slater, N.J. Simpson and G.P. Salmond. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 25(4), 365-404.
- Whitehead, N.A., J.T. Byers, P. Commander, M.J. Corbett, S.J. Coulthurst, L. Everson, A.K. Harris, C.L. Pemberton, N.J. Simpson, H. Slater, D.S. Smith, M. Welch, N. Williamson and G.P. Salmond. 2002. The regulation of virulence in phytopathogenic *Erwinia* species: Quorum sensing, antibiotics and ecological considerations. Anton. Van Leeuwen., 81(1-4), 223-231.
- Wild, M., Caro, A. D., Hernandez, A. L., Miller, R. M. and G. Soberon-Chavez, 1997. Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* monorhamnolipid deficient mutant, FEMS Microbiol. Lett., 153, 279-285.
- Zhang, Y. and R.M. Miller. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). Appl. Environ. Microbiol., 58(10), 3276-3282.
- Zhang, Y. and R.M. Miller. 1994. Effect of a *Pseudomonas rhamnolipid* biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. Appl. Environ. Microbiol., 60(6), 2101-2106.

2003년 3월 12일 접수

2003년 6월 7일 수리