

Pseudomonas aeruginosa BYK-2에 의한 생물유화제의 발효생산

김학주, 이경미, 정혜성, 김봉조, 강양순*, 공재열

부경대학교 식품생명공학부, 국립수산진흥원 남해수산연구소 통영분소*

Abstract

The purified biosurfactant 3.16g/ℓ was obtained after cultivation for 104hr at 25°C with an optimal agitation speed of 200rpm, an aeration rate of 2vvm in a 14ℓ fermenter containing 5.5ℓ of LB medium and 1%(w/v) olive oil as a carbon source. For the kinetic studies, the optimal substrate concentration was analyzed on different olive oil concentrations(0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%(w/v)) and optimal culture conditions(MLBM, 200rpm, 2vvm at 25°C) in a 14ℓ jar fermenter. The results obtained indicate that $K_s=0.0086$ g/ℓ, $q_s=0.664$ g/g·h, $q_p=4.2\times 10^{-3}$ g/g·h, and μ_{max} was determined as $0.1449h^{-1}$.

서론

Biosurfactant란 미생물에 의해 세포 표면에 생성되거나 세포 외로 분비되는 화합물로서 친수성인 부분(hydrophilic moieties)과 소수성인 부분(hydrophobic moieties)을 동시에 가지는 양친매성(amphiphiles) 물질이다. 이러한 biosurfactant는 air-water간 수용액 속에서 표면장력(surface tension)과 liquid-liquid(oil-water), liquid-solid(wetting phenomena)간 계면장력(interfacial tension)을 감소시키며 유화안정성이 우수하다(1). 지금까지 보고된 biosurfactant는 대부분 미생물 유래이며 그 중에서도 특히 bacteria 유래의 것이 그 대부분을 차지하고 있다. Biosurfactant는 기존의 화학유화제에 비하여 독성이 낮고, 미생물에 의해 다양하게 합성되어지며, 온도 및 pH에 대한 안정성이 클 뿐 아니라, 폐유나 식물성 유지 등 재생 가능한 원료로도 생산이 가능하고, 생분해능이 우수하기 때문에 매우 환경친화적인 물질이다(2). 또한 biosurfactant는 환경정화와 관련된 유처리제로서 뿐만 아니라 석유산업, 식품, 화장품, 제약, 세제, 섬유, 제지산업 그리고 농업 등 다양한 산업분야에서 이용되고 있다(3).

본 연구에서는 이러한 특성을 지닌 생물유화제를 대량생산하기 위하여 김 등(4)이 남해안 유류오염지역으로부터 분리한 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2를 이용하여 발효생산 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

남해안 유류오염지역으로부터 분리되어 생물유화제 생산능이 우수한 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2를 사용하였다.

종균 배양

보존용 고체배지로부터 단일 colony를 50ml MLBM(modified LB medium)가 담겨있는 250ml erlenmeyer flask에 접종하여 25℃, 180 rpm으로 16시간 동안 진탕 배양하여 사용하였다.

회분배양(batch culture)

Biosurfactant의 생산량을 증가시키기 위하여 14 l Jar fermentor (Bioflo 2000, NBS Co.)에 working volume을 5.5 l로 하여 회분 배양하였다. 회분 배양 조건은 flask 배양을 통하여 얻어진 최적 배양배지 조건을 사용하였다. 배양은 MLBM(pH 7.0)에 기질로 1% (w/v) olive oil를 넣고 25℃에서 배양하였으며, 교반속도 100~300 rpm, 통기량 1~3vvm의 범위에서 실시하였다. 그리고 시간별 biosurfactant의 생산량과 균성장을 조사하기 위해 4시간마다 25ml 씩 시료를 채취하였다.

건조 중량(dry cell weight)

Biosurfactant 생산균주의 biomass량을 구하기 위하여, 시간별로 sampling 한 시료 25ml를 원심 분리하여 (10,000g × 10min, at 4℃) pellet을 수집하였으며, 이 pellet은 25ml 증류수로 washing 한 후 다시 원심분리하여 상층 액은 버리고, pellet을 회수하였다. 이 과정은 2회 반복 실험하였으며, 회수된 pellet은 미리 건조하고 정량화된 알루미늄 컵을 이용하여, 100℃ dry oven에서 4시간 건조한 후 무게로서 정량 하였다.

기질소비량

배양과정 중 기질 소비량은 유기용매 추출에 의한 중량 법으로 계산하였다. 기질 소비량을 구하기 위해서 배양액 50ml에 n-hexane을 50ml 첨가하여 magnetic stirrer로 5분간 혼합한 후, 무수 Na₂SO₄으로 수분을 제거하였다. n-hexane 추출용액을 회전진공증발기(EYELA Co., Japan)로 농축한 후 미리 건조하여 정량화된 알루미늄 컵을 이용하여 농축시료를 dry oven에서 4시간 건조하여 0.1mg까지 정량이 가능한 저울을 사용하여 무게로 정량 하였다.

결과 및 고찰

Agitation speed에 대한 영향

14 l Jar fermentor에 working volume을 5.5 l로 하여 agitation speed (100 rpm, 200 rpm, 300 rpm) 별로 25°C, 1 vvm으로 회분배양을 실시하였다. 기질로는 1% (w/v) olive oil을 사용하였으며, 배양결과 200 rpm에서 가장 높은 유화활성을 가지는 것으로 확인되었다.

통기량의 영향

최적 교반속도를 200 rpm으로 하여 14 l Jar fermentor에서 working volume을 5.5 l로 하여 통기량별 (1.0 vvm, 2.0 vvm, 3.0 vvm)로 회분배양을 실시하였다. 기질로는 1% (w/v) olive oil을 사용하였고, 배양결과 2.0 vvm에서 가장 높은 유화활성을 나타내었다(Figure 1).

μ_{max} , K_s 의 결정

14 l Jar fermentor를 이용하여, 최적 배지 및 배양조건(MLBM, 200rpm, 2 vvm at 25°C) 하에서 탄소원인 olive oil을 농도별(0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 %(w/v))로 배지에 첨가하여 배양한 후 균성장에 따른 최적 기질량을 분석하였다. 0.1 %(w/v)에 대한 μ 는 0.0059 h⁻¹였으며, 0.5 %(w/v)는 0.0305 h⁻¹, 1.0 %(w/v)는 0.0679 h⁻¹, 1.5 %(w/v)는 0.0679 h⁻¹, 2.0 %(w/v)는 0.1250 h⁻¹이었다. μ_{max} 와 K_s 를 구하기 위하여 μ 와 S의 상관 관계를 Lineweaver-Burk plot를 작성하였다. 그 결과 상관 계수(r^2)는 0.9991 이었으며, $K_s = 0.0086$ g/l로 olive oil의 최적 기질 농도는 0.86 %(w/v)로 나타났다. 또한, $q_s = 0.664$ g/g · h, $q_p = 4.2 \times 10^3$ g/g · h, 그리고 $\mu_{max} = 0.1449$ h⁻¹로 나타났다(Figure 2). 이러한 결과는 균체량과 기질소비속도에 비해 biosurfactant의 생산량이 매우 낮은 것으로서, 향후 실험에서는 현재 배양에 사용되는 질소원과 각종 무기염류 등을 재차 고려하여 biosurfactant 생산 효율성을 높여야 할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Gerson, D. F., and J. E. Zajic, "Comparison of surfactant production from kerosene by four species of corynebacterium"(1979), *Antonie Van Leeuwenhoek*, 45(1), 81-94.
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. Kosaric, N., N. C. C. Gray, and W. L. Cairns. "In *Biosurfactants and Biotechnology*, Surfactant Science Series", Marcel. Dekker, New York. vol. 25 in pp 1-19.
4. 김학주, 정혜성, 김정선, 김종덕, 구헌서, 공재열. "해양에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2가 생산하는 생물유화제의 최적생산 한국생물공학회 춘계학술발표대회 p 297 - 300, 1999. 4. 9.

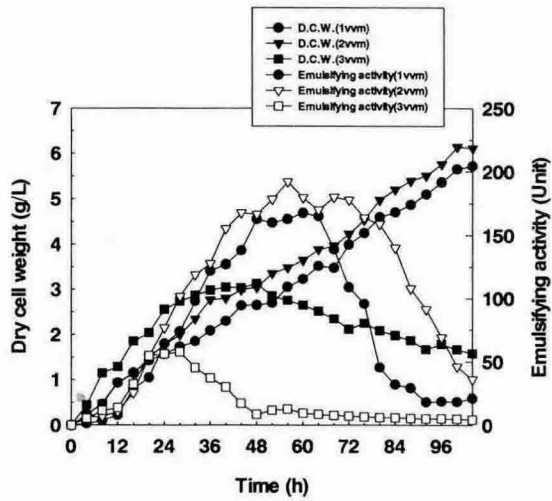


Fig. 1. Effect of aeration rate on the cell growth and emulsifying activity during a 14L batch cultivation.

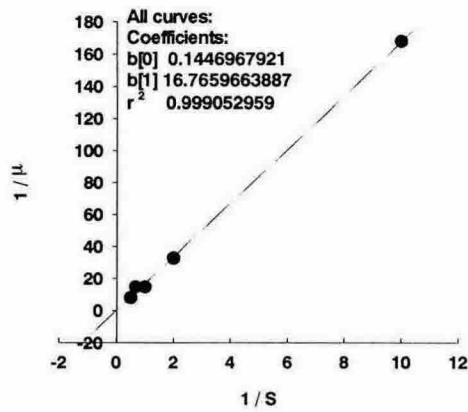


Fig. 2. Determination of μ_{\max} and K_s by Lineweaver-Burk plot.