

Pseudomonas aeruginosa BYK-2의 균체고정화법을 이용한 생물유화제의 생산

정혜선, 김학주, 하순득, 황선희, 구현서¹, 공재열
부경대학교 생물공학과, 동명대학 공업화학과¹
전화 & FAX (051) 620-6181

Abstract

The optimal conditions and properties for the immobilization of marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 have been determined. For the high production of biosurfactant, Na-alginate, PVA, modified PVA were used as a carrier. The optimal emulsifying activity on immobilized *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 showed 1036Unit (about 2.2g/L biosurfactant) in Basal salt medium(B.S.M.) at 25°C, 100rpm. Ca-alginate was selected the optimal bead among PVA, modified PVA and Ca-alginate. The optimal cell load in alginate bead was 10 gCWW/100g carrier.

As the results of incubation of immobilized 5g Ca-alginate bead (conditions: 3% alginate, bead diameter: 2.3mm, 10% cell load) in 50ml production medium, The emulsifying activity of 1407Unit, about 3.0g/L biosurfactant was obtained from immobilized cell after cultivation of 92hr at 25°C, 100rpm.

서 론

미생물로부터 생산되는 생물유화제는 화학합성유화제에 비해 독성이나 2차오염을 거의 유발하지 않고 생분해되기 때문에 현재 석유화학, 제약, 식품산업등 여러 산업분야에서 사용되고 있다. 생물유화제는 화학구조에 따라 glycolipids, phospholipids and fatty acids, lipopeptides and lipoproteins, polymeric surfactants, particle biosurfactant로 분류되고 있으며 *Pseudomonas aeruginosa*가 생산하는 생물유화제는 주로 Glycolipid인 Rhamnolipid로 보고되고 있다. 본 연구에서는 이러한 생물유화제를 미생물에 안정성이 있고 재사용이 가능한 고정화 지지체를 이용하여 생산성을 향상시키고자 한다. 여러 지지체 중에서 산, 온도에 대한 안정성이 높고 무독성등의 특징을 가지고 있으며 최적 생물유화제 지지체로서 보고된 alginate를 이용하여 실험을 행하였다.

재료 및 방법

1) 사용균주

국내 남해안 유류 오염 지역으로부터 김 등이분리한 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2를 사용하였다(1).

2) 고정화 지지체

미생물을 고정화하기 위한 지지체로서 천연고분자인 Na-alginate와 합성고분자인 PVA(Av. M.W. 70,000 -100,000), modified PVA를 사용하였다.

3) 사용배지

Ca-alginate bead 지지체의 경우 0.05mM FeSO₄, 5mM CaCl₂, 0.01% Urea에 1%(v/v) Olive oil이 첨가된 배지를 사용하였으며, PVA 및 modified PVA 지지체에는 0.05mM FeSO₄, 3.5mM KH₂PO₄, 1.4mM K₂HPO₄, 0.01%(w/v) Urea에 1%(v/v) Olive oil을 첨가하여 사용하였다.

4) 생물유화제의 생산

생물유화제 생산은 Rosenberg 등(2)에 의한 유화활성도 측정법을 사용하였다. 유화활성은 원심분리 (15,000g × 10 min)하여 얻은 배양상층액 1.25ml와 n-hexadecane : 2-methyl naphthalene을 1: 1로 혼합한 기질 0.05ml, 그리고 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 3.7ml를 넣은 후 vortex로 1분간 강하게 교반하여 10분간 정치시킨 후 O.D. 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

유화활성도 단위는 배양상층액 1.25ml에 대한 유화흡광도 0.1을 1 unit로 정의하였다.

결과 및 고찰

Olive oil 1%(w/v)를 기질로 사용한 최소배지에 해양으로부터 분리한 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2를 Na-Alginate, PVA, modified PVA등의 지지체를 사용하여 고정화 한 후 25°C, 100rpm에서 배양한 결과 Ca-alginate bead의 경우 B.S.M.배지에서 최대 1036Unit, 약 2.2g/L의 생물유화제가 생산됨을 알 수 있었다.

Ca-alginate bead와 PVA bead와 Modified PVA를 비교하여 배양한 결과 Ca-alginate bead에서 가장 높은 유화활성도를 나타내었으며(Fig. 1), 이러한 Ca-alginate를 각각 2, 5, 10, 15 (g Cell Wet Weight / 100 g carrier)로 지지체에 사용했을 경우 cell 농도가 증가함에 따라 최대 유화활성도는 높아지는 경향을 보였으나 10%이상의 Cell load에서는 거의 유사한 유화활성도를 나타냄을 알 수 있었다. 3 % Ca-alginate(bead diameter: 2.3mm, cell load: 10 %

) beads 5 g을 50ml 배지에 넣고 진탕 배양한 결과 free cell에 비해 초기 생산량이 매우 높았으며, 유화활성도도 1407Unit으로 약 3.0g /L에 상당하는 생물유화제를 생산하였다(Fig. 2).

참고문헌

1. 김학주, 정혜성, 김정선, 김종덕, 구헌서, 공재열. "해양에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2가 생산하는 생물유화제의 최적생산" 한국생물공학회 춘계학술발표대회 p 297 - 300, 1999. 4. 9.
2. Zuckerberg, A., A. Diver, Z. Peeri, D. L. Gutnick, and E. Rosenberg. (1979), Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 414-420.
3. 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.

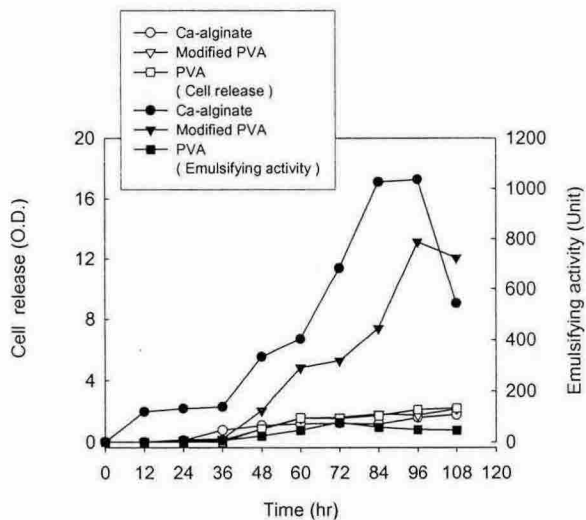


Fig. 1. Comparison of cell release and emulsifying activity on different carriers of Ca-alginate, Modified PVA, PVA under 1%Olive oil at 25°C, 100rpm.

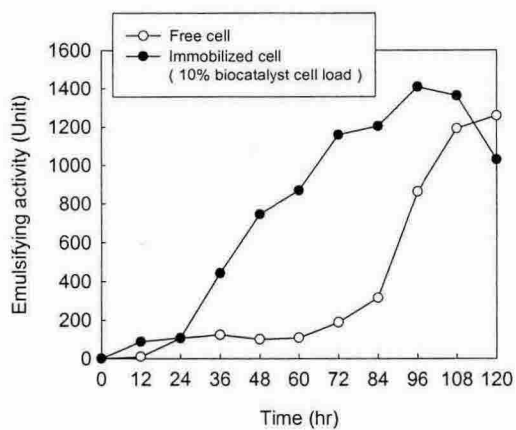


Fig. 2. Emulsifying activity with free and immobilized cells of *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2.