

# 당지질계 미생물 계면활성제에 관한 연구(제 1 보) *Pseudomonas* sp. 13에 의한 Rhamnolipid의 생성에 있어 배지의 최적효과

이 선 주 · 남 기 대

충북대학교 공과대학 공업화학과  
(1992년 6월 4일 접수, 1992년 11월 17일 채택)

## Studies on the Glycolipid Biosurfactant(1) The Optimum Effect of Medium of Rhamnolipid by *Pseudomonas* sp. 13

Lee, Sun-Ju and Nam, Ki-Dae

Department of Industrial Chemistry, Chungbuk National University, Cheong ju 360-763, Korea  
(Received June 4, 1992, Accepted November 17, 1992)

**Abstract:** Recently we are interested in the biosurfactant. Biosurfactant have a low toxicity and easily biodegradable compound. *Pseudomonas* sp. 13 was isolated from soil. This microorganism produced biosurfactant that consists of glycolipid R-1 and R-2. A time course study of fermentation indicated that the appearance of glycolipid in the fermentation broth the commencement of the stationary phase with the respect to biomass. The effect of variation of the media components such as amount of glucose, nitrogen, phosphate and metal ions has been investigated. The following values found to be optimum for biosurfactant production (glucose, 20 g/l; carbon to nitrogen ratio, 40; carbon to phosphate, 18;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20mg/l ).

### 1. 서 론

미생물 계면활성제(biosurfactant)는 보통 합성 계면활성제가 갖지 못한 여러 가지의 분자구조로 많은 잠재적인 응용 가능성이 있으며, 또한 인체에 대한 독성이 없고 미생물에 의해 생 분해 되어 공해를 줄일 수 있어[1] 요즈음 이에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 미생물 계면활성제의 응용에 있어서 석유의 제 3 차 회수(Microbiol Enhanced Oil Recovery)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데 이것은 암석의 습윤성 증가, 유화, 탈유화, 원유의 점도 감소 등으로 이용할 수 있기 때문이다[2].

계면활성제를 생산하는 미생물로 알려진 것은 trehalose lipid를 생산하는 *Rhodococcus erythropolis*[3],

*Arthrobacter paraffineus*[4], sophorose lipid를 생산하는 *Torulopsis bombicola*[5]와 다당류를 생산하는 *Acinetobacter calcoaceticus*[6], rhamnolipid를 생산하는 *Pseudomonas aeruginosa*[7] 등이 알려져 있다. 미생물 계면활성제를 생산하는데 있어 보통 기질의 탄소재료로 탄화수소를 사용하는데, 공학적인 입장에서는 정교한 설비와 분산시키는데 여러가지 힘든 점이 있는 탄화수소보다는 탄수화물이 훨씬 우수한 재료가이다[8].

미생물 계면활성제를 생산하는 미생물을 선택하는 가장 쉽고 효과적인 방법은 배양액의 표면장력을 측정하는 것이다[9] 배양액의 표면장력이 40dyne/cm 이하로 낮추는 것이 유망할 것이며, 높은 수율로 계면활성제를 생산하기 위해서는 35dyne/cm 이하로 되

어야 할 것이다. 가장 효과적으로 표면장력을 낮추는 미생물 계면활성제는 *Bacillus subtilis*로 부터 생산되는 surfactin으로 알려져 있는 표면장력이 27dyne/cm이다[9].

*Pseudomonas aeruginosa*로 부터 처음 rhamnolipid를 얻은 것은 1949년 Jarvis가 글리세린을 탄소원으로 하여 2.5g/l를 얻었으며 결핵균에 항균작용을 한다고 보고되었으며[10], 그와 관련된 여러가지 연구들이 있다[11-12]. 그 후 여러 논문들이 rhamnolipid 생산에 관해 발표되었으며[7, 13, 14, 15] 배양액의 최소 계면장력은 40dyne/cm이었다. 계면활성은 항상 당지질 부분인 rhamnolipid와 관련되어있었으며, *Pseudomonas aeruginosa*로부터 두 종류의 rhamnolipid가 얻어졌다. 하나는 R-1으로 rhamnose 2분자와  $\beta$ -hydroxydecanoic acid로 이루어져 있다[12]. 후에 R-2가 확인되었는데 R-1과 비슷하였으나 분자내에 하나의 rhamnose를 만을 갖고 있었다[15]. R-1과 R-2는 *Pseudomonas aeruginosa*에서 필수적으로 생산된다는 것을 보여 주고 있다.

본 논문은 *Pseudomonas* sp. 13을 이용하여 탄소기질로 포도당을 사용하여 배지에 들어 있는 철, 인, 질소들의 함량이 rhamnolipid의 최대 생산에 어떤 관계가 있는가를 보고한다.

## 2. 실험 방법

### 2.1. 미생물

토양으로부터 분리한 미생물 *Pseudomonas* sp. 13을 nutrient broth에 희분배양시키고, 0.85%의 글리세린을 첨가하고 교반시킨 후 deep freezer를 -40°C로 교정시킨 후 보관하였으며 배지의 조성은 Table 1에 표

시한 바와 같이 초기의 배지와 최적화 후의 배지를 사용하였다.

### 2.2. 배양조건

미생물의 배양은 1ℓ 삼각 플라스크에 400ml의 용량으로 배양액을 조성하고, pH는 초기 배지는 7이었으나 최적화 후 1-N KOH로 6.3으로 고정하였다. 진탕 배양기의 회전속도를 150rpm으로 고정시키고 온도는 20~45°C 범위의 일정 온도로 조절하였다.

### 2.3. 분석방법

생물량은 0.2 $\mu$ m membrane filter(Whatman membrane filter, England)를 사용하여 여과지의 무게를 재고, 배양액을 여과 시킨다음 여과지를 50°C에서 24hr 건조한 후 생물량을 건조 중량법으로 결정하였으며, 여액에 대한 포도당의 양과 표면장력을 측정하였다.

여액은 1-N HCl로 pH를 2.0으로 적정한 후 같은 양의 에테르로 2회 추출한 후 vacuum dryer에서 50°C로 에테르를 증류 제거한 후 당지질의 양을 phenol-sulfuric acid 방법으로[16] 측정하였으며, 포도당은 dinitrosalicylic acid 방법으로[17] 정량하였다.

당지질은 Itoh[15]가 보고 했듯이 silicic acid column chromatography를 사용하여 정제 하였다. 즉 에테르에서 추출한 당지질을 클로로포름에 녹이고 silicic acid로 충전된 크로마토그램(30cm×2cm)으로 전개 시켰다.

당지질은 R-1은 chloroform-methanol(93:7, v/v)로 용출시켰고, 당지질 R-2는 chloroform-methanol(93:3, v/v)로 용출시켰다.

## 3. 실험 결과 및 고찰

### 3.1. 초기 배지 조건의 결정

*Pseudomonas* sp. 13에 의한 초기 배지의 조건에 의한 배양액의 표면장력은 38dyne/cm이었으나, 최적화 후에 28dyne/cm로 저하되었다. 초기의 배지를 사용하여 rhamnose와 생물량의 관계를 살펴보았다. 이 결과를 Fig. 1에 도시하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 생물량은 24hr 정도의 유도기에서 점차적으로 증가하는 지수기를 지나 약 48hr에서 정지기를 나타내었다. 그러나 rhamnose의 양은 정지기에서 점차 증가하기 시작하여 약 96hr에서 최고치를 나타내었다.

Table 1. Media for the Cultivation of *Pseudomonas* sp. 13

Component	Medium	
	Initial Condition	After Optimization
Glucose(g)	10~100	20
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	0.8	
NaNO <sub>3</sub> (g)	0.7	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	1.0	1.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g)	0.5	
KCl(mg)	50	50
NaCl(mg)	50	50
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O(mg)	10	10
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O(mg)	10	10
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O(mg)	30	20

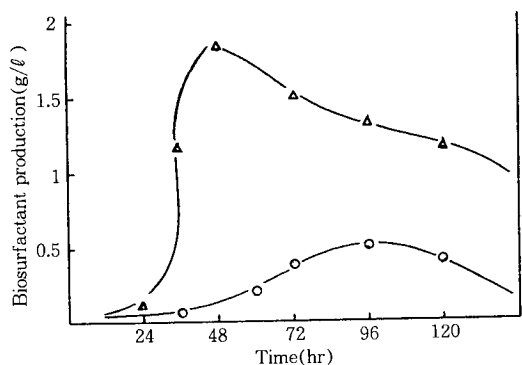


Fig. 1. Time course of biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. 13 (Incubated at 30°C, pH 7)  
○ : rhamnose. △ : biomass.

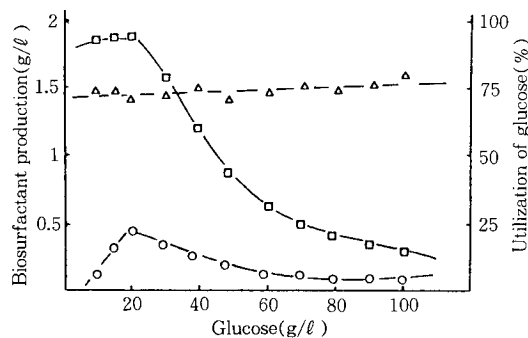


Fig. 2. Effect of glucose on biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. 13 (Incubated for 96hr, at 30°C, pH 7)  
○ : rhamnose. □ : biomass.  
△ : utilization of glucose.

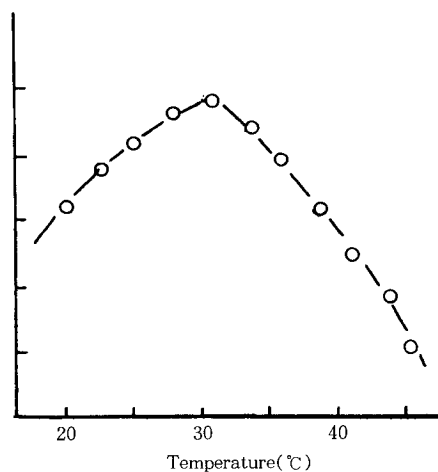
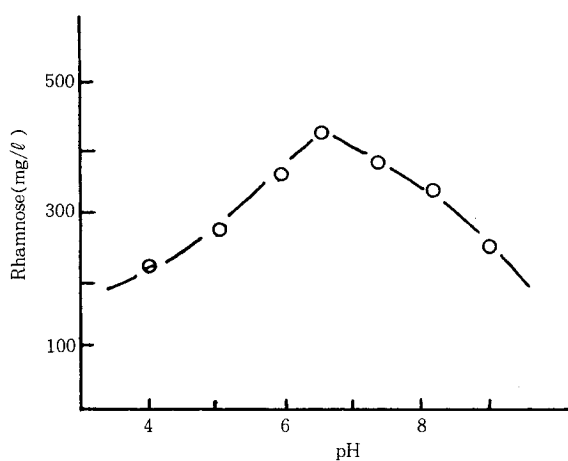


Fig. 3. Effect of pH and temperature on biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. 13 (Incubated for 96hr, Glucose: 20.0g/l) ○ : rhamnose. □ : biomass. △ : utilization of glucose.

포도당의 함량 변화는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 10~100g/l의 범위로 변화시키면서 관찰하였는데 약 20g/l에서 rhamnose의 양이 최고치를 나타내었으며 생물량의 변화는 큰 변화를 보이지 않았고 포도당의 이용도는 25g/l 이상일 때에는 급격히 감소하였다. 이 결과로 보아 20g/l 이상의 농도에서 *Pseudomonas* sp. 13의 배양활성이 점차 감소하는 경향을 가져왔다. 그리고 배양조건에서 pH 범위 4~10까지를 변화시키면서 rhamnose의 생성량을 검토한 결과

Fig. 3과 같다. Fig. 3을 보면 pH가 약 산성인 경우가 가장 활성이 좋은 결과를 얻어 *Pseudomonas* sp. 13을 사용하였을 때에는 pH 6.3에서 최적화를 얻었다. 한편 배양온도는 20~45°C 범위에서 2°C 차이로 일정온도를 유지하면서 배양시킨 결과 rhamnose의 생성량의 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3을 보면 당류중 포도당인 경우 *Pseudomonas* sp. 13으로 배양시킬 경우 30°C 온도에서 가장 좋은 최적화를 가져옴을 알았다.

이 최적화 실험의 결과로 얻은 모든 조건을 포도당의 양은 20g/l, 온도는 30°C, pH는 6.3으로 고정시켰다.

3.2. 미생물 계면활성제 생성에 있어 질소의 영향

질소재료로 NaNO<sub>3</sub>와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 써서 포도당의 배지에 사용된 NaNO<sub>3</sub> 및 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 각각의 중량비(이하 C/N으로 표시)를 10~100까지로 변화시키면서 실험한 결과를 Fig. 4에 일괄 도시하였다.

생물량은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 NaNO<sub>3</sub> 보다 전반적으로 우수하였으나 rhamnose의 생성량에서는 NaNO<sub>3</sub>가 유리하였다. 포도당과 NaNO<sub>3</sub>의 최적비는 40에서 최고치를 얻었다. 최적비 이상이나 이하로 농도가 변화할 때에는 rhamnose의 양이 떨어진 것은 Luis의 연구 결과[8]와 거의 일치하였다.

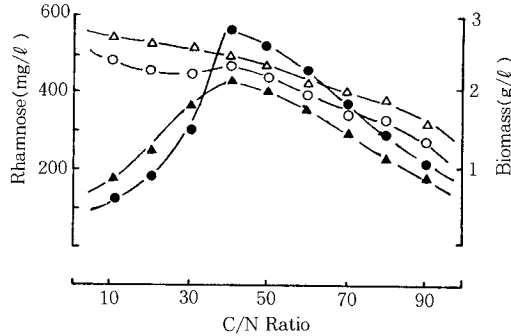


Fig. 4. Effect of nitrogen on biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. 13 (Incubated for 96hr, Glucose 20.0g/l, pH 6.3 and 30°C)  
Rhamnose : ●, KNO<sub>3</sub> ▲, (KH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
Biomass : ○, NaNO<sub>3</sub> △, (KH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

3.3. 미생물 계면활성제의 생성에 있어 인의 영향

인은 일반적으로 미생물의 물질대사에 있어 중요한 요소로서 미생물 계면활성제의 생성에 어떠한 영향이 있는가를 알아보기 위하여 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 각각 사용하였다. 포도당과 인의 화합물의 중량비는 (이하 C/P로 표시) 10~40까지 변화를 시키면서 실험한 결과가 Fig. 5이다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 rhamnose의 경우에는 C/P의 최적비가 약 20에 나타났고, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 쓴 것이 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 쓴 것 보다 약 3배의 높은 수율로 rhamnose를 얻을 수 있었다. 생물량의 변화에 있어서는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>는 거의 변화가 없었으나 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>인 경우는 최적비 30일 때 까지

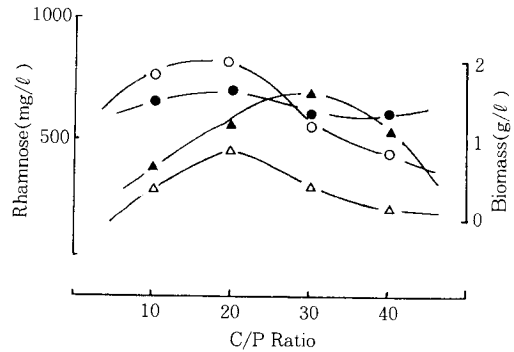


Fig. 5. Effect of phosphate on biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. 13 (Incubated for 96hr, Glucose 20.0g/l, pH 6.3)  
Rhamnose : ○, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, △, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
Biomass : ●, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, ▲, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

점차 증가하다가 별 변화를 가져오지 않는 것이 pH의 영향이 있는 것으로 본다.

3.4. 미생물 계면활성제의 생성에 있어 철의 영향

철은 일반적으로 소량이 존재하며 미생물 계면활성제의 생성에서 많은 영향을 주기 때문에 철의 농도를 극소량으로 변화시키면서 실험하였다. 그 결과를 Fig. 6에 도시하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, 철의 농도가 20mg/l에서 최고치를 나타내었으나 50mg/l 이상에서는 rhamnose가 생성되지 않았다. 이것은 Ramana[18]의 보고와 비슷한 결과를 나타내었고, 생물량의 농도는 철의 농도가 증가함에 따라 점차적

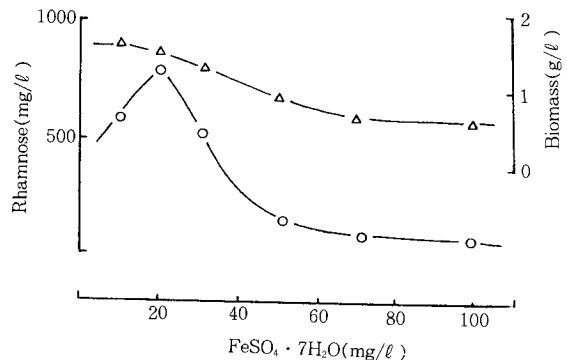


Fig. 6. Effect of iron on biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. 13 (Incubated for 96hr, Glucose 6.3g/l, and 30°C)  
Rhamnose : ○ Biomass : △

으로 감소하는 경향을 가져왔다.

#### 4. 결 론

포도당을 탄소기질로 사용하고, 미생물 *Pseudomonas* sp. 13을 이용하여 회분 배양시킨 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 당지질의 생성은 지수기가 끝난 정지기에서 다량으로 생성되기 시작하였다.

2. 당지질의 최적 생산을 위한 시간은 96hr이었으며, pH는 6.3으로 얻어졌으며, 포도당의 최적량은 20g/ℓ 이었다.

3. 당지질의 최적 생산을 위한 질소는  $\text{NaNO}_3$ 가 우수 하였으며 탄소와 질소의 최적비는 39이었고, 인은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 로 최적비는 18이었으며, 그리고 철은  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20mg/ℓ 로 얻어졌다.

#### 참고문헌

1. D. G. Gooper and J. E. Zajic, *Adv. Appl. Microbiol.*, **26**, 229 (1980).
2. W. R. Finnert and M. E. Singer, *J. Biotechnology*, **1**, 47 (1983).
3. T. Suzuki, K. Tanaka, I. Matsuhara and S. Kinoshita, *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 1619 (1969).
4. A. Kretschmer, H. Bock and F. Wagner, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 170 (1982).
5. D. G. Cooper and D. A. Paddock, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 173 (1984).
6. S. Goldman, Y. Shabtai, C. Rubinovitz, E. Rosenberg and D. L. Gutnick, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 167 (1982).
7. K. Hisatsaka, T. Nakahama, N.Sano and K. Yamada, *Agr. Biol. Chem.*, **35**, 686 (1971).
8. G. A. Luis, K. Othmar and F. Armin, *Appl. Environ. Microbiol.*, Aug. 301 (1984)
9. D. G. Cooper, *Microbiological Science*, **3**, 5 (1986).
10. E. G. Jarvis and M. J. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 4121 (1949).
11. G. Hause and M. L. Karnovsky, *J. Bacteriol.*, **68**, 645 (1961).
12. J. R. Edwards and J. A. Hayashi, *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**, 415 (1965)13. S. Itoch and T. Suzuki, *Agr. Biol. Chem.*, **36**, 2233 (1972).
14. 石上裕, 山口宗男, 油化學, **36**, 989 (1987).
15. S. Itoch and H. Homda, *J. Antibiotics*, **24**, 855 (1971).
16. M. Dubois, K. A. Gilles and J. K. Hamilton, *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
17. G. L. Miller, *Anal. Chem.*, **31**, 142 (1959).
18. K. V. Ramana and N. G. Karanth, *J. Chem. Tech. Biotechnology*, **45**, 249 (1989).