

Pseudomonas sp. SW10이 생산하는 Biosurfactant의 조성 및 특성

석완수 · 임은경 · 손홍주¹ · 이 건 · 이상준*
부산대학교 미생물학과, ¹밀양대학교 생물공학과

Compositional Analysis and Some Properties of Biosurfactant from *Pseudomonas* sp. SW1. Suk, Wan-Su, Eun-Gyoung Lim, Hong-Joo Son¹, Geon Lee, and Sang-Joon Lee*. Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea, ¹Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea - A tentative composition and some properties of biosurfactants, type I and type II, from *Pseudomonas* sp. SW1 are described. Biosurfactant type I and II are soluble in water, dichloromethane, chloroform, and a mixture of chloroform and methanol, respectively. The UV absorption spectrum of biosurfactants showed three characteristic peaks in the range of 212, 250 and 365 nm, respectively. As a result of IR spectroscopy, GC/MS analysis and biochemical analysis, biosurfactant type I was a polymeric biosurfactant containing carbohydrate, lipid and protein. The carbohydrate was characterized as rhamnose. The lipid part consists of C₁₄-C₂₃ fatty acid when analyzed by GC/MS. The biosurfactant type II was a rhamnolipid consisting of carbohydrate and lipid.

Key words: biosurfactant, composition, *Pseudomonas* sp. SW1, IR, GC/MS

계면활성제는 동일 분자내에 친수성 부분과 친유성 부분을 가지는 양친매성(amphipathic) 물질로서, 계면에 흡착되어 계면활성을 부여하고, 이로서 계면의 표면장력을 낮추는 성질을 가진 표면활성물질이다[4]. 이러한 성질로 인하여 계면활성제는 의약품, 화장품, 세제, 유류회수 등의 산업과 일상생활에 이르기까지 다양하게 사용되고 있으며, 산업적 수요도 높다. 그러나 현재 사용되는 대부분의 표면활성물질들은 석유로부터 화학적으로 합성된 것들로서[4], 난분해성 또는 독성을 가지기 때문에 수 생태계에 유출되어 많은 환경오염을 야기하고 있다. 또한 최근들어 유류유출에 의한 해양오염을 해결하기 위해 합성계면활성제를 이용한 유화 및 분산에 관한 연구가 진행중이나, 합성계면활성제를 이용한 방제법은 2차 오염을 유발하므로 이것을 대체할 수 있는 물질의 개발이 시급한 실정이다[5]. 이에 따라 미생물이 생산하는 계면활성제에 대한 연구가 전세계적으로 활발히 이루어지고 있다[6]. 생물계면활성제(biosurfactant)는 계면활성능이 우수할 뿐만 아니라 생분해성이며, 재생가능한 기질로부터 발효생산이 가능하고 독성이 없는 등 화학적으로 합성된 계면활성제를 대체하기에 충분한 성질을 가지고 있는 산업적 이용성이 높은 생물소재이다[7].

본 연구는 해양유류오염을 환경친화적으로 방제하기 위해서 새로운 생물계면활성제의 분리 및 대량생산을 최

종목표로 설정되었으며, 이미 이러한 연구의 일환으로 유류가 함유된 용액의 표면장력을 효과적으로 감소시키는 동시에 유화활성이 뛰어난 두 종류의 생물계면활성제(biosurfactant type I, II)를 생산하는 세균을 분리하여 생산을 위한 최적조건, 생물계면활성제의 정제 및 물리화학적 특성 등에 관한 결과를 보고한 바 있다[8, 9]. 따라서 본 연구에서는 정제된 생물계면활성제의 구성성분에 대한 조사를 수행하였으며, 생물계면활성제의 일부 기기분석학적 특성에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 유류로 오염된 토양시료로부터 분리, 동정된 *Pseudomonas* sp. SW1[8]이었다. 생물계면활성제 생산을 위한 최적배지의 조성은 KH₂PO₄ 0.3 g/l, K₂HPO₄ 0.2 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.4 g/l, NH₄NO₃ 4.0 g/l, CaCl₂ · 2H₂O 0.0001 g/l, MnSO₄ · 5H₂O 0.0001 g/l, FeCl₃ · 6H₂O 0.0001 g/l 및 ZnSO₄ · 7H₂O 0.0001 g/l(pH 7.0)이었다. 최적배지에 탄소원으로 3% hexadecane을 첨가하여 30°C, 200 rpm에서 6일간 회전진탕배양 하였다.

생물계면활성제의 정제

배양액 2 l를 Cooper 등의 방법[3]을 약간 변형하여 조 정제한 후, silica gel 60 column chromatography, Sephadex G-150 column chromatography에 의하여

*Corresponding author
Tel. 82-51-510-2268, Fax. 82-51-518-1688
E-mail: sangjoon@hyowon.cc.pusan.ac.kr

biosurfactant type I, II를 정제하였다[9].

Ultraviolet 및 Infrared spectrum 분석

UV spectrum은 증류수를 용매로 하여 Unikon 922 spectrophotometer로 측정하였고, infrared(IR) spectrum은 Matson사의 FT-IR spectrometer를 사용하여 정제된 생물계면활성제와 KBr을 혼합한 후, resolution 4 cm^{-1} 및 16 scans의 조건으로 조사하였다.

생화학적 분석

생물계면활성제의 당, 지질, 아미노산, esterified fatty acid, aminosugar 등에 대한 발색반응은 Chaplin과 Kennedy의 방법[2]에 의하여 실시하였다.

생물계면활성제의 알칼리 가수분해

생물계면활성제 100 mg을 Suzuki 등[10]의 방법에 따라 알칼리 가수분해하였다. 구성당 분석을 위하여 수층을 증화한 후, 표준물질로서 α -(L)- rhamnose를 사용하여 gas chromatography(GC)를 실시하였다. 이때 표준물질 및 모든 시료는 hexamethyldisilazane과 trimethylchlorosilane을 사용하여 TMS 유도체로 만들었다 [1]. 지방산 분석을 위하여 유기용매층을 감압농축하여 용매를 완전히 제거한 후, BF_3 -methanol법[11]에 의하여 methylation시킨 후, GC/MS로 조사하였다.

GC 및 GC/MS 작동조건

GC 분석에 사용된 기기는 HP 5890A이었으며, HP-5 column을 사용하여 oven temperature 180°C , injector temperature 300°C , detector temperature 280°C 및 N_2 carrier gas 32 ml/min 의 조건에서 FID로 검출하였다. GC/MS 분석에 사용된 기기는 Kratos HV-3이었으며, ultra-2 capillary column을 사용하여 EI 70 eV , mass range $30\text{-}600\text{ m/e}$ 및 resolution 600의 조건에서 분석하였다.

결과 및 고찰

생물계면활성제의 이화학적 특성

정제된 생물계면활성제들의 용해도를 알아보기 위하여 각종 유기용매를 사용하여 용해도를 살펴본 결과는 Table 1과 같다. 본 균주에서 생산되는 생물계면활성제 type I, II는 유사한 용해도를 가지고 있었다. 즉, dichloromethane, chloroform, methanol, acetone 그리고 물과 같은 단일용매 및 chloroform/methanol이나 dichloromethane/methanol과 같은 혼합용매에서 잘 용해되는 특징을 가지고 있었다. Isopropyl alcohol, cyclohexane, xylene 등에서는 용해보다는 분산되는 것으로 나타났다. Hexane, ethyl ether 등에서는 전혀 용해되지

Table 1. Survey for solubility of the purified biosurfactant

Solvent	Solubility	
	Biosurfactant type I	Biosurfactant type II
Benzene	WS ¹	WS
Ethyl ether	US ²	US
Cyclohexane	D ³	D
Isopropyl alcohol	D	D
Ethyl acetate	US	US
Hexane	US	US
Acetone	S ⁴	S
Water	S	S
Methanol	S	S
Isoamyl alcohol	D	D
Toluene	WS	WS
Xylene	D	D
Chloroform	S	S
Trichloroethylene	D	D
Dichloromethane	S	S
Pentane	WS	WS
Butanol	WS	WS
Chloroform/methanol (1:1)	S	S
Chloroform/methanol (2:1)	S	S
Dichloromethane/methanol (1:1)	S	S
Dichloromethane/methanol (2:1)	S	S

¹WS, weakly soluble; ²US, insoluble; ³D, dispersion; ⁴S, soluble.

않았으나 약간의 열을 가해 줄 경우에 소량 용해되었다. 생물계면활성제 중에서 비이온계 glycolipid인 trehalose-6,6'-dicorynomycolates는 chloroform에 잘 녹으며, trehalose tetraester와 같은 구성의 glycolipid의 경우에는 chloroform/methanol 등의 혼합용매에 잘 녹는다. Lactonic sophorose lipids, 아미노산계 lipids는 ether, hexane 및 chloroform에 잘 녹으며, acetone과 methanol에서는 약간의 열을 가하여야 잘 녹는다. Surfactin은 알칼리수용액, methanol, chloroform, dichloromethane 등에 녹으나 물, petroleum ether, hexane에는 녹지 않는다. Rhamnolipids는 methanol, chloroform, ethyl acetate, ethyl ether에는 잘 녹으나 hexane에서는 녹지 않는다[4-7]. 따라서 본 생물계면활성제는 용해도에 있어 다른 생물계면활성제와 약간 다른 양상을 보여주었다.

생물계면활성제들의 농도에 따른 최대흡수파장을 확인한 결과는 Fig. 1과 같이 type I, II 모두 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 즉 212 nm , 250 nm 및 365 nm 에서 최대흡광도를 나타내었으며, 생물계면활성제의 농도별로 파장의 확실한 증감이 나타났다.

FT-IR spectrometry analysis

생물계면활성제내에 존재하는 functional group의 결

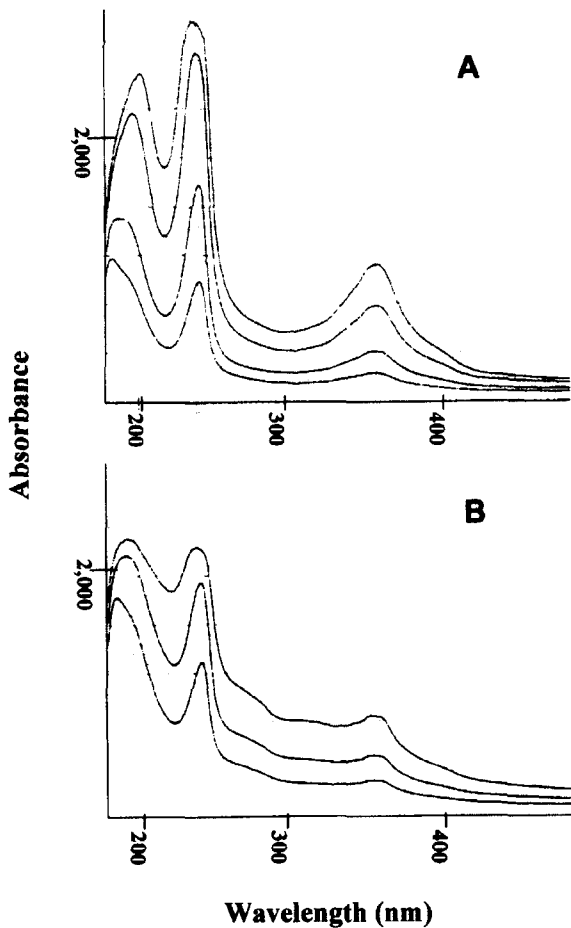


Fig. 1. UV spectrum of the biosurfactants.
 A, biosurfactant type I; B, biosurfactant type II. The biosurfactant concentrations were from 2 to 5 $\mu\text{g/ml}$.

합양상을 알아보기 위하여 infrared spectrum을 조사한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 생물계면활성제 type I의 경우에는 2450 cm^{-1} 과 2470 cm^{-1} 에서 $-\text{NH}=\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$ -의 activated ester화된 것을 확인할 수 있었으나, 생

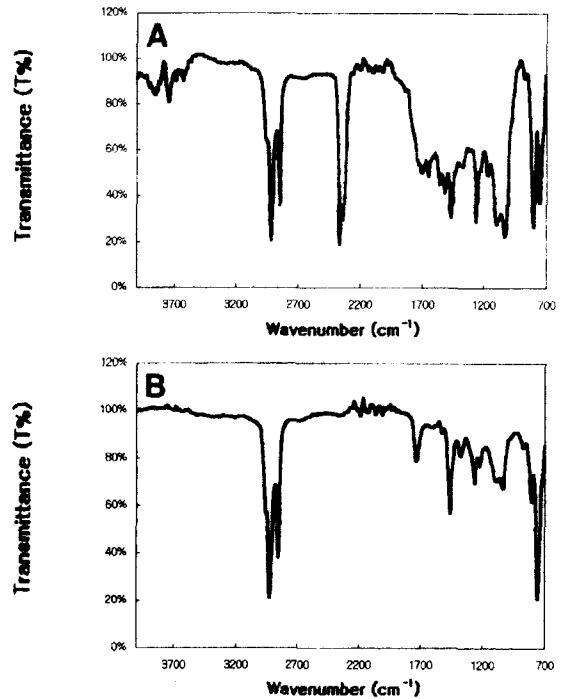


Fig. 2. The infrared spectrum of the biosurfactants.
 A, biosurfactant type I; B, biosurfactant type II.

물계면활성제 type II는 그 부위에서 아무런 peak도 나타나지 않았다. 주요 wave number로는 2900 cm^{-1} 에서 aliphatic chain의 $-\text{CH}_2$ group, 2856 cm^{-1} 에서 methoxy group, $2225\sim 2000\text{ cm}^{-1}$ 에서 $-\text{NH}=\text{CO}-$ bond, 그외 1737 cm^{-1} 에서 ester화된 $-\text{C}=\text{O}-$ bond 등을 확인할 수 있었다.

생화학적 분석

Silica gel F₂₅₄ plate상에서 chloroform/methanol/acetic acid(65/25/4, v/v/v)의 전개용매를 사용하여 각종 발색반응을 실시한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 생물계면활성제 type I은 phenol-sulfuric acid 반응,

Table 2. Identification of biosurfactant by colorimetric method

Substrate	Detection	Results	
		Biosurfactant type I	Biosurfactant type II
Carbohydrate	Diphenylamine reagents	-	-
	α -Naphthol-sulfuric acid	-	-
	Phenol-sulfuric acid	+	+
	Anthrone	+	+
	Somogyi-Nelson arsenomolybdate	-	-
Esterified fatty acid	Elson-Morgan reagent	+	-
	Hydroxylamine-ferric chloride reagent	+	+
Lipid	Rhodamine 6G	+	+
Amino acid	Ninhydrin	+	-
Protein	Lowry Method	+	-

anthrone 반응에서 양성을 나타내었으며, glycolipid 발색시약인 diphenylamine reagent, α -naphthol-sulfuric acid 및 Somogyi-Nelson arsenomolybdate에 의한 환원당 측정법에서 음성을 나타내었다. 아미노당의 발색시약인 Elson-Morgan reagent와 lipid 발색시약인 rhodamine 6G에서 양성을 나타내었다. 또한, esterified fatty acid에 특이적으로 반응하는 hydroxylamine-ferric chloride reagent에서도 자주색의 양성반응을 보였으며, 아미노산 특이 발색반응인 ninhydrin과 Lowry method에 의한 발색반응에서도 양성을 보였다. 따라서 생물계면활성제 type I은 당, 지질, 단백질을 동시에 가지는 물질로 추정되었다. 생물계면활성제 type II는 type I과 비슷한 양상을 보였으나 ninhydrin과 Lowry method에 의한 발색반응과 Elson-Morgan reagent 반응에서 음성을 보였다. 이로서 생물계면활성제 type II는 당과 지질이 ester 결합을 하고 있는 물질로 추정되었다.

GC/MS 분석

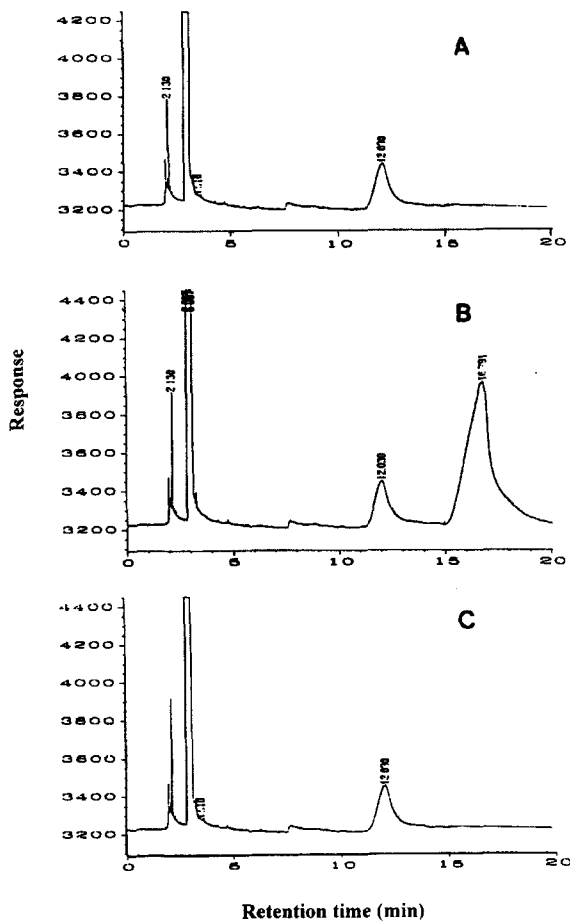


Fig. 3. Gas chromatogram of trimethylsilylation derivative of biosurfactants after alkaline hydrolysis. A, α -(L)-Rhamnose; B, biosurfactant type I; C, biosurfactant type II.

정제된 생물계면활성제의 구성당 분석을 위하여 알칼리 가수분해후의 수층을 GC로 확인하여 본 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 생물계면활성제 type I의 경우에는 두 개의 peak가, type II의 경우에는 하나의 peak가 나타났다. 생물계면활성제 type I, II 모두 표준물질인 α -(L)-rhamnose와 동일한 retention time을 나타내는 peak (12.03분)를 확인하였으나 type I의 경우 16.79분에서 미확인된 peak가 더 생성되었다. 따라서 다양한 당 표준물질을 이용한 peak 동정이 필요할 것으로 판단된다. 지방산 분석을 위하여 알칼리 가수분해후의 유기용매층을 GC로 분석한 결과, 여러개의 peak들이 나타났으며(Fig. 4), 이 peak들을 GC/MS로 분석하여 본 결과 C_{14} ~ C_{23} 의 지방산으로 추정되었다(미제시).

본 균주에서 생산된 생물계면활성제는 넓은 pH 안정성, 열 안정성 및 NaCl 안정성 등[9] 기존의 다른 생물계면활성제들[4] 보다 물리화학적 성질이 우수하였으므로 대량배양이 성공적으로 진행될 경우, 유류탱크의 세척이나 미생물적 유류회수 등에 이용될 수 있을 것으로 전망된다.

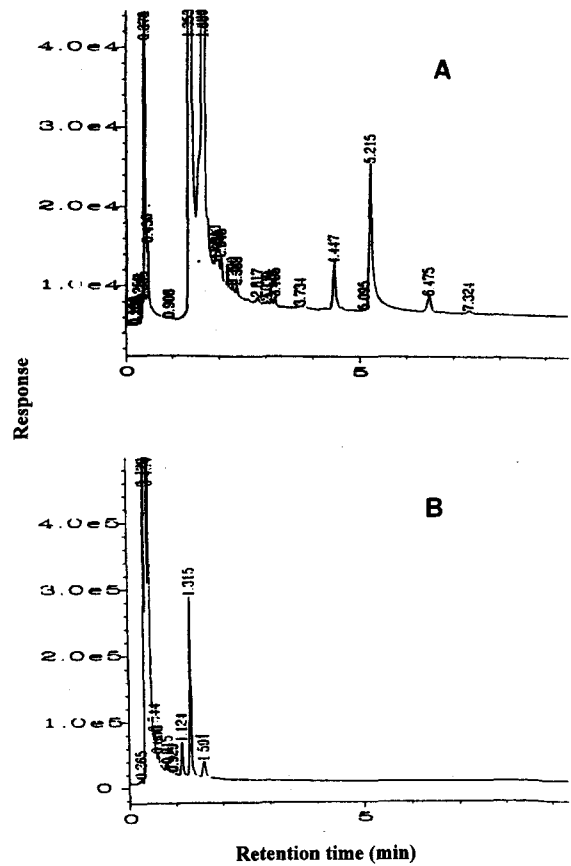


Fig. 4. Gas chromatogram of fatty acid methyl ester derivative of biosurfactants after alkaline hydrolysis. A, biosurfactant type I; B, biosurfactant type II.

요 약

본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. SW1로부터 분리, 정제된 생물계면활성제 type I, II의 용해도와 UV-spectrophotometer analysis, IR spectrometry analysis 및 각종 생화학적 분석을 실시하여 생물계면활성제의 기본 조성을 파악하였다. 생물계면활성제 type I, II 모두 dichloromethane, chloroform, water과 같은 단일용매 및 chloroform/methanol과 같은 혼합용매에서 잘 용해되었으며, hexane, ethyl ether 등에서는 용해되지 않았다. 정제된 생물계면활성제를 알칼리 가수분해하였을 때, 생물계면활성제 type I의 경우 $C_{14}\sim C_{23}$ 의 지방산이 확인되었으며, 당으로는 rhamnose가 확인되었다. 생물계면활성제 type II의 경우 역시 지방산과 rhamnose가 확인되었다. 생물계면활성제의 생화학적 발색반응 분석결과, 생물계면활성제 type I은 당, 지질, 단백질을 함유하고 있는 polymeric biosurfactant인 것으로 추정되었으며, 생물계면활성제 type II는 당과 지질이 결합된 rhamnolipid인 것으로 추정되었다.

감사의 말

본 논문은 환경기술·산업개발연구센터(RRC/IETI)의 지원에 의하여 연구되었으며, 깊은 감사를 드립니다(RRC 과제번호: 96A-10-01-02-3).

REFERENCES

1. Chaplin, M. F. 1963. Carbohydrate analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **86**: 342-432.
2. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy. 1986. *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*, pp. 97-214. IRL PRESS, Washington D. C.
3. Cooper, D. G., C. R. MacDonald, S. J. B. Duff, and N. Kosaric. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 408-412.
4. Desai, J. D. and I. M. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 47-64.
5. Falatko, D. M. and J. T. Novak. 1992. Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environ. Res.* **64**: 163-169.
6. Fichter, A. 1992. Biosurfactants: Moving towards industrial application. *Biotech. Rev.* **10**: 208-217.
7. Neu, T. R. 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* **60**: 151-166.
8. Son, H. J., W. S. Suk, G. Lee, and S. J. Lee. 1997. Production of biosurfactant by *Pseudomonas* sp. SW1 for microbial remediation of oil pollution. *Kor. J. Microbiol.* **33**: 193-198.
9. Suk, W. S., H. J. Son, G. Lee, and S. J. Lee. 1998. Purification and characterization of biosurfactant from *Pseudomonas* sp. SW1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**(1): 56-61.
10. Suzuki, T., H. Tanaka, and S. Itoh. 1974. Sucrose lipids of *Arthrobacter*, *Corynebacteria* and *Nocardia* growth on sucrose. *Agr. Biol. Chem.* **38**: 557-563.
11. Yakimov, M. M., K. N. Timmis, V. Wray, and H. E. Fredrickson. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1706-1713.

(Received September 2, 1998)