한국생물공학회지 제18권 제2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 18, No. 2, 145-148(2003)

생물계면활성제 생산증가를 위한 *Pseudomonas aeruginosa* F722의 최적배양조건

오 경 택 · [1]강 창 민 · † 정 선 용
전남대학교 환경공학과, [1]초당대학교 환경공학과
(접수 : 2003. 3. 5., 게재승인 : 2003. 4. 25.)

The Optimum Culture Condition for the Increasement of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* F722

Kyung-Taek Oh, Chang-Min Kang[1], and Seon-Yong Chung†
Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
[1]Department of Environmental Engineering, Chodang University, Muan, Chonnam 534-701, Korea
(Received : 2003. 3. 5., Accepted : 2003. 4. 25.)

Pseudomonas aeruginosa F722 produces biosurfactant (BS) while degrading hydrocarbons. BS production was 0.78 g/ℓ on the C-medium. However, BS production increased by 1.66 g/ℓ on the condition of 0.05% (w/v) NH_4Cl + 0.1% (w/v) yeast extract and 3.0% (w/v) glucose, which was proved to be advantageous to BS production. In the condition of aeration of 1.0 liter per minute (LPM), BS production was increased 20% (1.94 g/ℓ) more than 1.66 g/ℓ produced when the air was not supplied. Moreover, the velocity of glucose degradation at both of log and stationary growth phases increased from 0.25 and 0.18 h^{-1} to 0.33 and 0.29 h^{-1} respectively when the air was supplied.

Key Words : *Pseudomonas aeruginosa* F722, hydrocarbon, biosurfactant (BS)

서 론

생물계면활성제(biosurfactant, BS)를 생산하는 미생물로는 *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* 속(genus)들이 있다(1). 이들 중 *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Acinetobacter*는 glucose, glycerol, ethanol 및 *n*-hexadecane 등과 같은 기질을 분해하며 성장하는 과정에서 glycolipids, fatty acids, neutral lipids, phospholipids, polymeric surfactants와 같은 BS를 생산한다. 생산된 BS들은 화장품, 의약품, 식품, 세제, 폐유처리, 석유정제, 섬유산업 등 다양하고 폭넓은 산업분야에 이용되고 있다(2). 최근의 연구에 의하면 원유 및 원유제품으로 오염된 지역을 정화시키는데 있어 BS를 첨가하여 소수성 물질들의 용해도를 증가시킬 때, 토착미생물에 의한 생분해가 촉진된다고 보고되고 있다(1, 3). 원유 및 원유제품을 분해하면서 BS를 생산하는 genus들은 탄화수소로 오염된 토양복원(bioremediation)에 다양하게 활용되고 있다(4). 토양복원에 많이 사용되는 *Pseudomonas* spp.는 소수성 탄소원 뿐만 아니라 친수성 탄소원을 이용하여 BS를 생산한다(2, 3, 5, 6). *Pseudomonas* spp.로부터 생산되는 BS특성은 탄소원 및 배양조건에 따라 달라진다. 따라서 미생물로부터 생물계면활성제 생산량을 증가시키기 위해서는 최적의 무기·유기질소원(7, 8), C/N ratio(5), air(9), 탄소원(6, 7) 등의 선행적인 조사가 이루어져야 한다(2).

본 연구에서 사용되는 *P. aeruginosa* F722(10, 11)는 원유 및 원유제품과 같은 소수성의 탄화수소 물질을 탄소원으로 활용할 수 있고, 또 자연계에 폭넓게 존재한다는 점에서 토양복원에 이용될 수 있다. 본 연구에서는 *P. aeruginosa* F722를 이용하여 BS를 생산할 때 생산량 증가에 적합한 배양조건을 조사하였다.

재료 및 방법

유류분해 및 BS 생산균주 *P. aeruginosa* F722 배양

본 실험에서 사용된 *P. aeruginosa* F722는 토양복원에 적

† Corresponding Author : Dept. of Environmental Engineering College of Engineering Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1858, Fax : +82-62-530-0742
E-mail : sychung@chonnam.ac.kr

용시킬 목적으로 토양계로부터 분리하여 유류분해 특성에 대한 선행 조사가 수행된 균주이다. *P. aeruginosa* F722는 국내특허미생물로 한국농용미생물센터에 기탁번호(기탁번호: KACC 91006)를 부여받았다. *P. aeruginosa* F722를 본 배양에 접종하기 전 LB 배지에 백금이로 일회 접종하여 35℃, 150 rpm, pH 7.0에서 12시간 동안 진탕 배양 후, 생장된 균주를 본 배양 배지인 C-배지(증류수 1 ℓ당 $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 g, K_2HPO_4 2.0 g, KH_2PO_4 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 2.0 g, $CaCl_2$ 0.01 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, trace elements solution 2 ㎖, pH 7.0로 조성되었으며, trace elements solution은 증류수 1 ℓ당 MoO_3 1.0 ㎎, $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ 7.0 ㎎, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.5 ㎎, H_3BO_3 1.0 ㎎, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.0 ㎎, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.0 ㎎, $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.0 ㎎로 조성)에 1.0% (w/v)로 접종하고 탄소원으로 원유 및 원유제품을 첨가하여, 35℃, pH 7.0, 150 rpm에서 5일간 배양하였다.

BS 생산조건

BS 최적 생산조건을 검토하기 위하여 무·유기 질소원, 소·친수성 탄소원 등의 영향은 선행 연구의 유류분해 배양조건(10, 11)을 바탕으로 실시하였다. 그리고 BS 생산균주 *P. aeruginosa* F722의 생장 측정은 12시간마다 배양액을 일정량 취하여 간접계수 방법으로 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용한 OD_{600} (Optical Density)과 건조 균체량을 측정하였으며, 직접계수 방법인 colony-forming units (cfu/㎖)를 병행하여 수행하였다. 또한, 탄소원으로 사용되는 glucose의 잔존량 측정은 Glucose-E Kit (BC 103-E, 영동)을 사용하여 수행하였다.

생물계면활성제 추출 및 활성 조사

BS 추출은 Fig. 1의 절차에 따라 실시하였으며, 사용된 유기용매는 Kuyukina 등(12)의 보고를 참고하여 수행하였다.

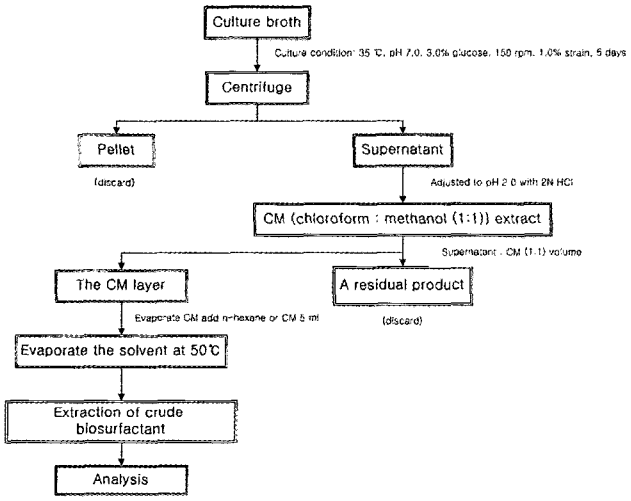


Figure 1. Flow chat for purification of microbial surfactant produced from glucose as the sole carbon source.

BS 활성 측정은 Masaaki 등(13)의 생물계면활성제 생성균주 검색방법을 착안하여 응용하였다. 생물계면활성제 활성 측정방법은 먼저 petri-dish (90 × 15 mm)에 수돗물 30 ㎖씩을 분주한 후 50 ㎕ Eleuthera를 수돗물 또는 증류수가 분주되어 있는 petri-dish에 떨어뜨려 유막을 형성시킨다. 본 배양에서 35℃, 150 rpm, pH 7.0 조건하에서 12시간 간격으로 얻어진 *P. aeruginosa* F722 배양액을 원심분리(12,000 × g, 4℃, 15 min)하여 균체를 제거한 후, 상등액 50 ㎕를 취해 유막 위에 떨어뜨려 clear zone의 직경을 측정하였다. 그리고 표면장력 측정(2)은 Du Nouy tensionmeter (Model No. 3010, Japan)를 이용하여 실온에서 측정하였다.

적정 air 공급량 조사

BS 생산 증가를 위한 air 공급량 조사는 Fig. 2와 같은 방법으로 수행하였으며, air 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 LPM (liter per minute)를 공급해 주었다(8,9).

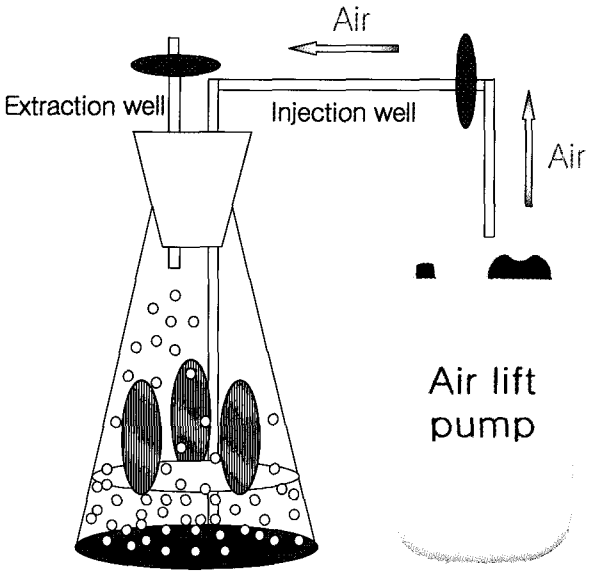


Figure 2. A schematic diagram of the air-supplied experiment equipped with an aeration pump.

결과 및 고찰

BS 생산조건

P. aeruginosa F722는 유류분해 특성조사에 적합한 C-배지상에서 원유를 소수성 탄소원으로 하여 35℃, 150 rpm, 5일간 배양하였을 때 BS 생산량은 0.78 g/ℓ이었다. 그래서 BS 생산량 증가를 위해서 질소원과 탄소원을 우선적으로 검토하였다(5-8).

무기 질소원으로 NH_4Cl, $NaNO_3$, $NaNO_2$, $(NH_4)_2SO_4$를 사용하였으며, 유기 질소원으로 yeast extract, beef extract, malt extract, trypton을 사용하였다. 그 결과, 무기 질소원은 $NaNO_2$, NH_4Cl, 유기 질소원은 trypton, yeast extract에서 *P. aeruginosa* F722의 생육이 높게 나타났다(Table 1). Oh 등(14)에 의하면 무기 질소원과 유기 질소원을 혼합하여 BS 생산에 최적의 질소원을 조사한 결과 무기 질소원으로 0.05% (w/v) NH_4Cl,과 유기 질소원으로 0.1% (w/v) yeast extract를

동시에 사용할 때가 가장 적합한 것으로 조사되었다. Luis 등(5)은 BS 생산에 주로 사용되는 yeast extract가 복잡성 때문에 유익하지 않은 질소원으로 보고하였으나, 많은 BS 생산 연구에서 아직까지 사용되고 있는 것은 yeast extract를 대체할 적합한 유기 질소원이 없기 때문으로 사료된다.

Table 1. Effect of nitrogen sources on biosurfactant production with crude oil as the sole carbon source

Inorganic nitrogen sources	Growth (OD_{600})	Organic nitrogen sources (0.5%)	Growth (OD_{600})
0.05% NH_4Cl	1.58	Yeast extract	0.61
0.5% $NaNO_3$	0.62	Beef extract	0.44
0.1% $NaNO_2$	1.88	Malt extract	0.22
0.5% $(NH_4)_2SO_4$	0.69	Trypton	0.70

Benincasa 등(7)은 BS 생산량 증가에 미치는 탄소원의 중요성에 관하여 보고 하고있다. 따라서 탄소원으로 용해성 기질(glucose, glycerol), 비용해성 기질(*n*-alkanes), 원유제품(경유)을 각각 선정하여 수행하였다. 그 결과를 Table 2로 나타내었다.

Table 2. Effect of carbon sources on the production of biosurfactant Nitrogen sources were 0.05% (w/v) NH_4Cl and 0.1% (w/v) yeast extract

Substrates (2.0%)	Growth (OD_{600})	Clear zone (cm)
Glucose	2.53	9.0
Glycerol	2.68	8.8
n-C_{10}	2.89	5.7
n-C_{12}	1.50	1.0
n-C_{14}	1.17	1.2
n-C_{16}	1.22	3.7
n-C_{18}	2.87	8.5
n-C_{22}	1.98	0.2
Diesel	1.99	2.1

Table 2에서 보면 용해성 탄소원을 사용하였을 때 *P. aeruginosa* F722의 생육과 BS 활성이 높게 나타났으나, 비용해성 탄소원을 사용하였을 때는 *n*-C_{18}을 제외한 탄소원에서 *P. aeruginosa* F722의 생육과 BS 활성은 매우 낮게 나타났다. Glucose, glycerol, 그리고 *n*-C_{18} 중에서 분석의 용이성과 BS 생산에 효과적인 glucose를 BS 생산 기질로 결정하였다.

BS 생산에 미치는 질소원과 탄소원의 비율에 관하여 Luis 등(5)은 C/N 비율이 18일 때 BS 생산에 최적이며, 11이하에서는 BS 생산이 억제 될 수 있다고 보고 하였다. 본 실험에서는 C/N 배율을 고려하여 1, 2, 3, 4% (w/v) glucose 농도에 따른 균의 생육과 BS 활성을 조사한 결과, Table 3에 나타낸 것과 같이 glucose 농도 증가에 따라 균체량도 증가하였으나, BS 활성은 2, 3% glucose 농도에서 높게 조사되었다. 이러한 결과로부터 BS 생산에 적합한 C/N 비율은 20으로 조사되었다.

Table 3. Effect of glucose concentration on the production of biosurfactant. Nitrogen sources were 0.05% (w/v) NH_4Cl and 0.1% (w/v) yeast extract

Carbon source (%)	Growth (g/ℓ)	Clear zone (cm)	C/N ratio
1.0	1.91	8.8	7
2.0	2.30	9.0	13
3.0	2.98	9.0	20
4.0	3.38	8.9	27

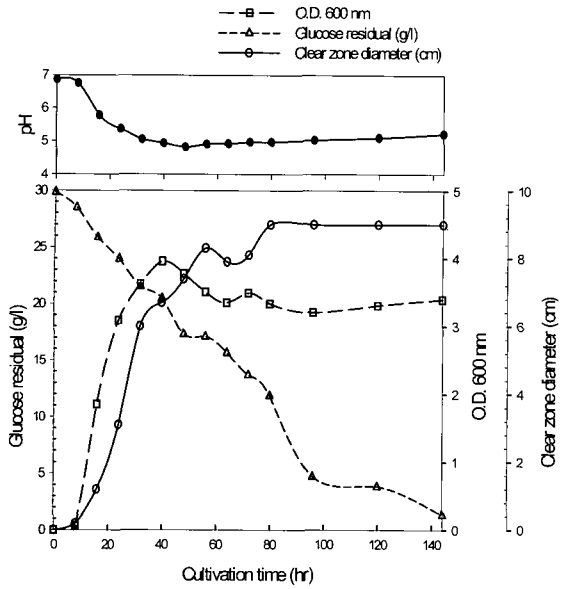
Air 공급량 조사

BS 생산량을 증가시키기 위해서 Fig. 2와 같은 장치를 고안하여 배양 기간동안 공기를 공급해 주었으며, BS 생산에 적합한 배지(일명: BS-배지)를 사용하였다. 공기 공급량에 따른 탄소원으로 분해속도, BS 생산량, 그리고 표면장력을 측정한 결과를 Table 4로 나타내었다. Table 4에 따르면 air를 주입함으로서 air를 주입하지 않을 때보다 배양기간이 모두 짧아졌으며 air 2.0 LPM 이상에서 1.4배 짧아진 84시간으로 조사되었다. 하지만, air 1.0 LPM을 공급한 실험에서만 BS 생산량이 0.3 g/ℓ 증가되었다. 그리고 배양액을 원심분리 하여 표면장력을 측정한 결과 공기를 주입하지 않은 실험에서는 31.27 mN/m이었으며, 공기를 주입하면서 배양한 배양액의 표면장력은 이보다 낮은 30.27-30.91 mN/m로 측정되었다. Fig. 1과 같은 방법으로 BS를 추출하여 표면장력을 측정하였을 때는 air 주입과 관계없이 모두 비슷한 결과로 조사되었다. 이러한 결과들은 Desal 등(2)에 의해서 보고된 *Pseudomonas* spp.으로부터 유래된 BS 표면장력 25-30 mN/m과 비슷하였다. 그리고 air 공급량이 BS 활성에 영향을 미칠 수 있다는 Kim 등(8)의 연구결과와 일치되었다. 하지만, air 공급은 실험 용기의 부피와 배지량의 부피에 따라 적합한 air 공급이 필요하며 포화량 이상의 air가 공급될 경우에는 BS 활성과 BS 생산량을 억제시킬 수 있다는 것을 본 실험에서 알 수 있었다.

Table 4. Effect of supplied air on the velocity of degrading glucose, biosurfactant production, and Surface tension

Volume of supplied air (LPM)	Lag phase (h^{-1})	Log growth phase (h^{-1})	Stationary growth phase (h^{-1})	BS production (g/ℓ)	Cultivation time (hr)	Surface tension (mN/m)
0	0.17	0.25	0.18	1.66	144	31.27
0.5	0.31	0.33	0.25	1.54	108	30.46
1.0	0.10	0.33	0.29	1.94	108	30.46
1.5	0.18	0.40	0.38	1.64	90	30.27
2.0	0.16	0.38	0.38	1.45	84	30.58
2.5	0.33	0.27	0.38	1.22	84	30.91

Air를 주입하지 않는 실험과 1.0 LPM으로 주입한 실험에



대해 *P. aeruginosa* F722의 생장, glucose 분해, pH, 표면장력 및 clear zone 측정한 결과를 Fig. 3과 Fig. 4에 각각 나타내었다. Air를 공급한 Fig. 4에서는 pH의 변화가 air를 공급하지 않은 Fig. 3보다 심하였으며, 대수증식기와 정지기에서 air를 공급해주었을 때가 glucose 분해율이 0.08, 0.11 h^{-1}정도 높게 나타났다(Table 4). 또한, Fig. 4에서 *P. aeruginosa* F722는 짧은 유도기를 거치면서 대수증식기와 정지기에서 지속적인 생장이 조사되었다.

Figure 3. The characterization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* F722 in biosurfactant (BS)-medium without air supply.

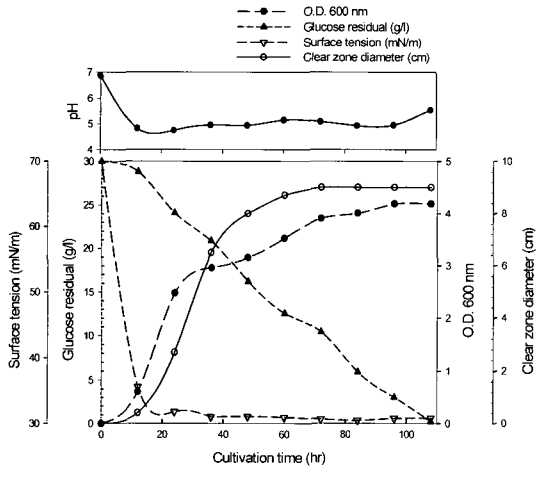


Figure 4. The characterization of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* F722 in biosurfactant (BS)-medium with 1.0 LPM air.

요 약

P. aeruginosa F722는 탄화수소를 분해하는 과정에 biosurfactant (BS)를 생산한다. 탄화수소 분해에 사용되는 C-배지에서 BS 생산량은 0.78 g/ℓ이었으나, 질소원과 탄소원을 각각 0.05% (w/v) NH_4Cl + 0.1% (w/v) yeast extract과 3.0% (w/v) glucose로 조정한 경우는 BS 생산량이 1.66 g/ℓ로 증가하였다. 최적의 BS 생산조건으로 배양하는 동안 air 1.0 LPM를 공급해 주었을 때는 공기를 공급하지 않을 때의 1.66 g/ℓ보다 약 20% 증가한 1.94 g/ℓ이었다. 뿐만 아니라, glucose 분해속도는 대수증식기와 정지기에서 air를 공급하지 않은 경우 0.25, 0.18 h^{-1} 였으나, 공기를 1.0 LPM으로 공급한 경우 0.33, 0.29 h^{-1}로 조사되었다.

REFERENCES

1. Ron, E. Z. and E. Rosenberg (2002), Biosurfactants and oil bioremediation, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 249-252.
2. Desal, J. D and I. M. Banat (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 47-64.
3. Bognolo, G. (1999), Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* **152**, 41-52.
4. Margesin, R. and F. Schinner (2001), Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3127-3133.
5. Luis, G. S., O. Käppeli, and A. Fiechter (1984), *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Appl. Environ. Micorbiol.* **48**, 301-305.
6. Matsufuji, M., K. Nakata, and A. Yoshimoto (1997), High production of rhamnolipis by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol, *Biotechnol. Lett.* **19**, 1213-1215.
7. Benincasa, M., J. Contiero, M. A. Manresa, and I. O. Moraes (2002), Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on growing on soapstock as the sole carbon source, *J. Food Eng.* **54**, 283-288.
8. Kim, S. H., E. J. Lim, K. S. Choi, Y. K. Jeong, K. L. Jang, and T. H. Lee (1996), Emulsifying agent production by *Acinetobacter* sp. BE-254, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 206-212.
9. Kim, H. S., B. D. Yoon, C. H. Lee, H. H. Suh, H. M. Oh, T. Katsuragi, and Y. Tani (1997), Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9, *J. Ferment. Bioeng.* **84**, 41-46.
10. Oh, K. T., Y. W. Lee, Motoki Kubo, S. J. Kim, and S. Y. Chung (2000), Isolation, identification and characterization of bacteria degrading crude oil, *Kor. J. Soc. Envrion. Eng.* **22**, 1851-1859.
11. Oh, K. T., G. H. Park, J. I. Lee, J. K. Lee, S. J. Kim, Kubo Motoki, and S. Y. Chung (2002), Biodegradation of crude oil and petroleum products by crude oil-degrading microorganism, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 247-254.
12. Kuyukina, M. S., I. B. Ivshina, J. C. Philp, Nick Christofi, S. A. Dunbar, and M. I. Ritchkova (2001), Recovery of Rhodcoccus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction, *J. Microbiol. Meth.* **46**, 149-156.
13. Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi, and T. Imanaka (1993), A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38, *J. Bacteriol.* **175**, 6459-6466.
14. Oh, K. T., S. J. Kim, M. Kubo, and S. Y. Chung (2002), Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* F722, In *Genetics of Industrial Microorganisms for 2002*, 9th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms 2002, Gyeongju, p166.