

해양으로부터 분리한 *Pseudomonas* sp. CHCS-2가 생산하는 Biosurfactant의 정제 및 특성에 관한 연구

*류 병 호 · 김 학 주 · 배 승 권 · **김 종 덕 · †공 재 열
부산수산대학교 생물공학과 · *경성대학교 식품공학과 · **여수수산대학 생물공학과

Purification and Characterization of Biosurfactant from Marine *Pseudomonas* sp. CHCS-2.

Beung-Ho Ryu,* Hak-Ju Kim, Seung-Kwon Bae, Jong-Deog Kim **
and Jai-Yul Kong[†]

Dept. of Biotech. & Bioeng., National Fisheries University of Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Food Science and Technology, Kyung Sung University

**Dept. of Biological Engineering, Yosu National Fisheries University

ABSTRACT

A marine microorganism producing biosurfactant was isolated from the oil polluted coast of Chung-Mu in Korea, and was identified as *Pseudomonas* sp.. It produced the biosurfactant and its optimum culture conditions for pH and salt concentration were 8.0 and 3.0%, respectively. The productivity of biosurfactant from this strain was affected by the nitrogen source used. For the oil resolvability of the biosurfactant, the residual oil in the culture broth with 2% Kuwait crude oil at each time of 48, 96, and 132hr was investigated by gas chromatography. As result of this experiment, it was verified that the biosurfactant acted on C₁₀-C₁₄ of Kuwait crude oil and so the oil was decomposed. The biosurfactant isolated from the supernatant was purified by adsorption to Amberlitter XAD-7 and followed by gel chromatography(Sephadex G-100) and HPLC. The purified biosurfactant showed a high value of emulsifying activity at 40°C and the emulsifying stability was maintained at the temperature range of 30°C ~60°C. The purified biosurfactant reduced the interfacial tension of Kuwait crude oil remarkably and showed improved dispersing ability compared to those of commercial surfactants such as Tween 80, Tween 60 and SDS.

서 론

해양에 존재하는 탄화수소 분해 세균의 연구는 1940년경부터 Zobell을 중심으로 석유의 분해에 관한 미생물의 역할 및 탄화수소를 이용하는 미생물의

작용 기작을 중심으로 수행되어 왔다(1, 2). 또 해양 운송의 증대나, 유류저장고, 석유비축선의 사고, 해저유전 및 정유소로부터의 기름 유출, 여러 종류의 폐유 및 폐수 등에 의한 만성적인 환경오염은 해양 스스로의 정화 능력 및 석유 오염 정도를 판정하고, 감시해야 할 필요성을 제기하였고 이 때문에 탄화수

† Corresponding Author

소 분해 세균의 생태에 대한 연구가 많은 연구자들에 의해 활발히 진행되어 왔다(3).

한편, surfactant는 그 다양한 용도로 말미암아, 산업적으로 수요가 증가하고 있으나 현재까지 상품화되어 있는 대부분의 surfactant는 화학적인 합성에 의존하고 있기 때문에 사용시 2차 오염을 일으킬 수 있는 우려를 가지고 있다. 따라서 오염된 환경에 잘 적응된 미생물로부터 biosurfactant를 생산하는 미생물을 분리하여 biosurfactant를 대량생산함으로써 합성된 surfactant를 대체할 필요가 있다. 화학적으로 합성한 surfactant와 비교해서 biosurfactant가 갖는 중요한 장점은 구조적 특징과 물리적 성질 외에도 재생 기질로부터의 생산이 가능하며, 유전 공학이나 생화학적 기법을 응용하여 유용한 변이주를 만들 수 있고, 무엇보다도 생분해가 가능하다는 것을 특징으로 들 수 있다. 현재까지 연구된 bioemulsifier로서는 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1이 생산하는 emulsin이 보고되어 있을 뿐이며, 아직 화학적 구조도 정확히는 밝혀지지 않은 상태이다(4, 5). 단지 지방산 사슬을 가진 D-galactose-amine을 포함하는 다당의 골격을 가지고 있다고 보고되고 있다(6, 7). 이처럼 biosurfactant는 그 중요성에 비하여 연구나 개발된 제품은 거의 없는 실정이다. 따라서, 유류에 의한 환경오염뿐만 아니라 식품 산업, 음료 공업, 직물, 환경 정화, 피혁, 제지 및 금속공업, 화장품, 약품 공업 등에서 사용될 수 있는 biosurfactant의 개발은 대단히 중요한 의의를 지닌다고 할 수 있다.

본 연구에서는 이상과 같은 배경 하에 한국 연안 지역으로부터 biosurfactant를 생산하는 해양 미생물을 분리, 동정하여 분리 균의 분류학상의 위치를 확인함과 동시에 biosurfactant 생산을 위한 특성을 조사하고, biosurfactant를 분리·정제한 후 그 물리·화학적 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험에 사용된 균주는 부산, 울산, 충무 등지의 유류 오염 지역으로부터 분리하였으며, 배지는 변형 해수 배지(peptone 5g, yeast extract 3g, ammonium nitrate 0.0016g, disodium phosphate 0.008g, sea water 1 liter)와 인공 해수(NaCl 23.5g, KCl 0.7g, MgCl₂·6H₂O 10.6g, CaCl₂ 1.1g, Na₂SO₄ 3.9g,

NaHCO₃ 0.2g, (NH₄)₂SO₄ 1.0g, K₂HPO₄ 0.01g, Tris 6.05g, D.W. 1 liter/pH 7.6)를 사용하였고, 탄화수소원으로 황 함량이 2.57%인 Kuwait crude oil(K.C.O), 0.11%인 Brunei champion crude oil(B.C.C.O)을 사용하였다.

균주의 분리 방법

탄화수소원이 각각 다른 2% crude oil(K.C.O, B.C.C.O)이 첨가된 변형된 해수 배지를 이용하여, 100ml 삼각 플라스크에 각각 20ml씩 넣고 수집해온 시료를 50ℓ 씩 접종하여, 28℃에서 150rpm으로 15일간 진탕 배양한 후, 살균된 시험관(15mm×180mm)에 살균된 여과지를 이용, 여과한 후 변형 해수 고체 배지에 도말, 28℃에서 7일간 배양하여 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 인공 해수에 2% crude oil이 첨가된 액체 배지에 1ml 접종하여, 28℃에서 150rpm으로 7일간 진탕 배양하여 가장 분해 능력이 뛰어난 균을 선별하였다.

균주의 동정

형태적 관찰은 광학현미경(Carl Zeiss Jenane-2, ×1,000배)과 TEM (JEOL 1200 EXII)으로 관찰하였다. 생화학적 검사는 rapid multi-test system인 AIP-20NE kit(Analytab product Inc.)를 이용하였다. 균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology에 의해 행하였다.

균주의 성장

Cell의 성장을 확인하기 위해 균을 5L Jar fermentor(KF-500)를 이용하여 변형 해수 배지 3L에 2% K.C.O를 첨가하여, 28℃ 180rpm, air blowing 1.5vvm으로 통기 배양하면서, 4시간 단위로 시료를 채취한 후, 560nm에서 흡광도를 측정하여 균주 성장을 측정하였다(8).

유화력

0.5M NaCl이 첨가된 20mM Tris·HCl 완충 용액(pH 7.8) 2.5ml에 배양액을 원심 분리(6000rpm×10min, 4℃)하여 얻은 상층액을 0.5ml를 가한 후, 기질로써 2% crude oil을 첨가하여 1분간 강하게 교반한 후 10분간 정치 시켜, 610nm에서 흡광도를 측정하였다(9). 정제된 biosurfactant의 온도에 대한 유화력 시험은 20mM Tris·HCl buffer(pH7.8)에 2% crude oil을 첨가하여, 각 온도(30, 40, 50,

60, 70°C)별로 30분간 150rpm으로 진탕한 후 10분간 정치시켜, OD 610nm에서 흡광도를 측정하여 유효력이 가장 높은 온도를 검토하였다. 이때 사용된 시료량은 1mg/ml이었다.

안정성

정제된 biosurfactant의 온도에 대한 안정성 test는 20mM Tris·HCl 완충 용액(pH 7.8)에 2% crude oil을 첨가하여, 각 온도(30, 40, 50, 60, 70°C)별로 30분간 150rpm으로 shaking한 후, 10분간 정치시켜 OD 610nm에서 흡광도를 측정한 후 유효력이 지속되는 온도를 검토하여 해당 온도에서의 값으로, 유효의 안정도를 나타내는 Kd값을 산출하였다.

$$Kd = (\log X_2 - \log X_1) / 10$$

(X_1 : 진탕 직후의 흡광도값,

X_2 : 진탕후 10분간 정치시킨 후의 흡광도값)

Biosurfactant 생산의 최적 조건

기질로 crude oil을 함유하는 변형 해수 배지를 이용하여 세균의 성장과, 유탁도의 변화와 pH변화, NaCl 농도 등에 따른 변화를 관찰하여 biosurfactant 생산의 최적 조건을 검토하였다.

계면장력

0.5M NaCl이 첨가된 20mM Tris·HCl 완충 용액(pH 7.8) 5ml에 Sephadex G-100으로 정제된 biosurfactant와 Triton X-100, Tween 60, Tween 80, SDS 등의 surfactant와의 계면장력을 비교하였으며, 이때 surfactant량은 10mg/ml을 사용하였다. 기질로 4% crude oil을 첨가하여 1분간 강하게 교반한 후 1시간 동안 정치시켜, 계면장력계(Fisher Model 20)를 이용하여 계면장력을 측정하였다.

잔류 Oil 분석

5L Jar fermenter(KF-500)를 이용하여 변형 해수 배지 3L에 2% Kuwait산 crude oil을 첨가하여, 28°C, 180rpm, air blowing 1.5vvm에서 배양하여 0, 48, 96 및 132시간별로 채취한 시료를 원심분리(6000rpm×10min, 4°C)하고, 상층액에 n-hexane을 가하여 잔류 crude oil을 녹인 후 무수 Na_2SO_4 을 이용하여 수분을 제거한 후 gas chromatography(HP 5890A)를 이용하여 분석하였다.

Biosurfactant의 분리 및 정제

Amberlite XAD-7수지가 충전된 column(5×40cm)을 이용하여 배양액으로부터 crude biosurfactant를 물과 메탄올을 이용하여 분리·정제하였고, 투석하여 동결건조하였다. 이 시료로써 Sephadex G-100이 충전된 column(2×50cm)으로 부터 0.5M NaCl이 첨가된 20mM Tris·HCl(pH 7.8)완충 용액을 이용하여 분리·정제한 후, 투석하여 동결건조하였다. 이렇게 정제된 biosurfactant는 HPLC(Pharmacia LKB)를 통하여 최종 정제하였는데, 여기에 사용된 column은 YMC-Pack A-014 SIL column(300×4.6)으로, acetonitrile과 물을 70:30으로 혼합한 용매를 사용하였으며, detector는 U.V detector($\lambda=254\text{nm}$)를 사용하였고, 유량은 분당 0.5ml로 흘려 정제하였다.

결과 및 고찰

사용균주의 분리 및 동정

유류에 의해 오염된 지역으로부터 분리된 균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology에 의해 동정하였으며, 간균의 형태를 가지는 *Pseudomonas* sp.로 판명되어 *Pseudomonas* sp. CHCS-2로 명명하였다(Fig. 1, Table 1).

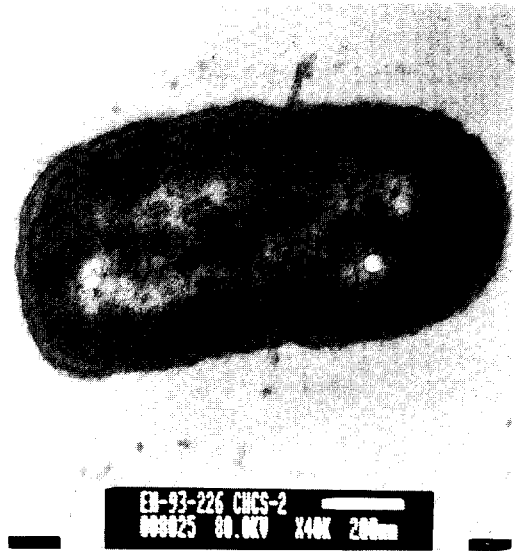


Fig. 1. TEM(Transmission Electron Microscopy) microphotograph of *Pseudomonas* sp. CHCS-2(×40,000).

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of *Pseudomonas* sp. CHCS-2.

(Unit : g/ℓ)

Characteristics	Results
Gram stain	(-)
Cell size	1.0-1.2μm
Mobility	(+)
Morphology of colony	rod type
Pigmentation of colony	No or yellow white
TCBS	(-)
MacConkey agar	(+)
MR·VP	(+)
Catalase reaction	(+)
Oxidase reaction	(+)
Reduction of nitrate(NO ₃ -NO ₂ -N ₂)	(-)
Indol formation from tryptophane	(-)
Glucose fermentation	(-)
Arginine dehydrogenase	(-)
Urase	(+)
Esculine	(-)
Gelatinase	(+)
P-nitrophenyl-glucosamine	(+)
Glucose	(-)
Arabinose	(-)
Mannose	(+)
Mannitol	(+)
N-acetyl glucosamine	(-)
Maltose	(+)
Gluconate	(+)
Caprate	(-)
Adipate	(+)
Malate	(+)
Citrate	(-)
Phenyl-acetate assimilation	(-)
Sucrose	(+)
Lactose	(-)
Fructose	(-)
Starch	(-)

균주 성장

Pseudomonas sp. CHCS-2를 5L Jar fermentor (KF-500)를 이용하여 배양하였으며, 4시간 단위로 시료를 취한 후 세포의 성장율과 유효도를 측정해 본 결과, 12시간 이후부터 대수기에 들어갔으며, 유효도는 20시간 이후부터 가장 높았다.

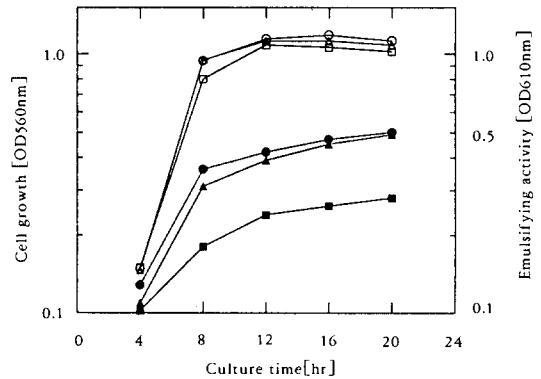


Fig. 2. Effects of organic nitrogen sources on the cell growth and the emulsifying activity of biosurfactant cell growth:

- modified marine medium,
- △ peptone, □ yeast extract.
- modified marine medium,
- ▲ peptone, ■ yeast extract.

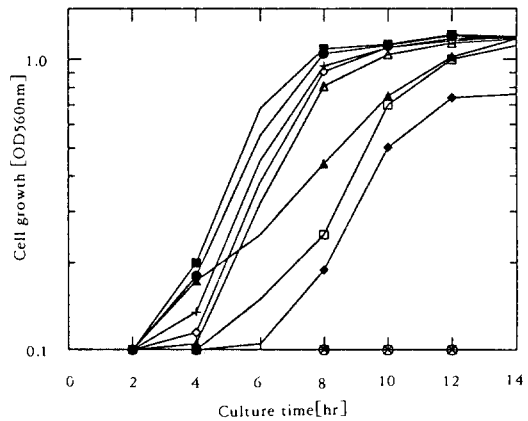


Fig. 3. Effect of pH on the cell growth.

- pH2.0, □ pH3.0, △ pH4.0,
- ◇ pH5.0, | pH6.0, ● pH7.0,
- pH8.0, ▲ pH9.0, ◆ pH10,
- × pH11.

Biosurfactant 생산의 최적 조건

Peptone만을 함유하는 배지와 yeast extract만을 함유한 배지 그리고 peptone 과 yeast extract를 모두 첨가한 변형 해수 배지의 3가지 배지에서 균의 성장 및 유효력을 측정 한 결과, 전체의 성장은 비슷

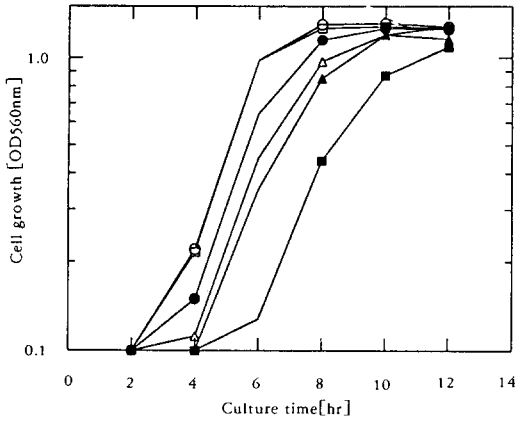


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on the cell growth.

△ 0%, □ 1%, ○ 3%,
● 5%, ▲ 7%, ■ 9%.

하였으나, 유화력은 변형 해수 배지에서 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. 2). 본 결과에서 나타내고 있는 유화력은 균주의 biosurfactant 생산량에 기인하는 것으로 peptone과 yeast extract를 별도로 첨가한 경우에 비하여 이들 성분이 동시에 존재할 경우, 보다 높은 유화력을 보인 것은 주 질소원으로 사용되는 peptone에 비하여 vitamin성분을 포함하고 있는 yeast extract가 생장 촉진 인자로 작용한 것으로 사료된다. 균주의 성장에 영향을 미치는 pH의 영향을 조사한 결과에서는 최적 pH의 값이 약 8.0으로 나타났다(Fig. 3).

본 균주는 해수로부터 분리되었기 때문에 그 성장에는 일정 농도의 염이 필요할 것으로 기대되어, NaCl 농도가 균주 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 해수의 염농도와 동일한 NaCl 농도 3%에서 가장 높은 성장률을 보였다(Fig. 4).

유화력 및 안정성

Pseudomonas sp. CHCS-2가 생산하는 biosurfactant의 특성을 살피기 위하여, biosurfactant의 유화력에 미치는 온도의 영향을 조사하였으며, 그 결과 최적온도는 40℃로 확인되었다. 또한, biosurfactant 안정성을 나타내는 Kd 값이 30℃~60℃에서 비교적 높은 값을 나타내어, 넓은 온도 범위에서의 biosurfactant의 안정성을 확인하였다(Fig. 5).

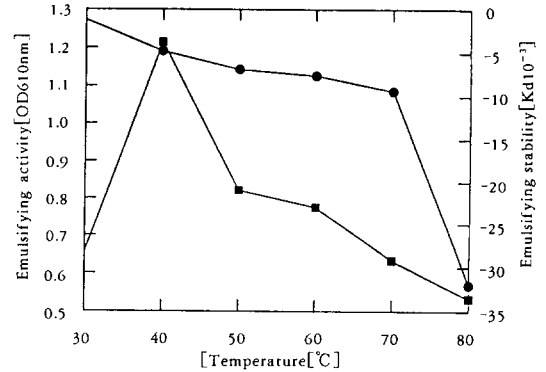


Fig. 5. Effects of temperature on the emulsifying activity and the emulsifying stability(Kd 10⁻³) of the biosurfactant.

Table 2. Effect of various surfactants on the interfacial tension of Kuwait crude oil.

Samples(10mg/ml)	Interfacial tension of 4% Kuwait crude oil(dyne/cm)
Biosurfactant	0.79
Triton X-100	0.20
Tween 80	6.20
Tween 60	2.20
S. D. S	1.00
Buffer(control)	32.2

계면장력

Sephadex G-100 column에서 분리 정제된 biosurfactant와 일반적으로 널리 사용되고 있는 surfactant들(Triton X-100, Tween 80, Tween 60, SDS등)의 계면장력을 비교해 본 결과, Triton X-100을 제외한 다른 surfactant들 보다 계면장력을 저하시키는 능력이 뛰어난을 알 수 있었다 (Table 2).

잔류 오 분석

본 연구에서 사용된 균주가 생산하는 biosurfactant의 oil 분해능을 살펴보기 위하여, oil을 포함하는 배지 중에서 균의 성장과 동시에 분해되고 남은 잔류 oil중의 탄소량의 변화를 gas chromatography를 이용하여 조사하였다(Fig. 6). n-Hexane에 의하여 추출된 잔류 Kuwait산 crude oil은 균주의 배양 시간 경과에 따라 탄소수가 적은 부분(C₁₄이하)이 감소하는 결과를 나타내어, 탄소수 C₁₀-C₁₄부

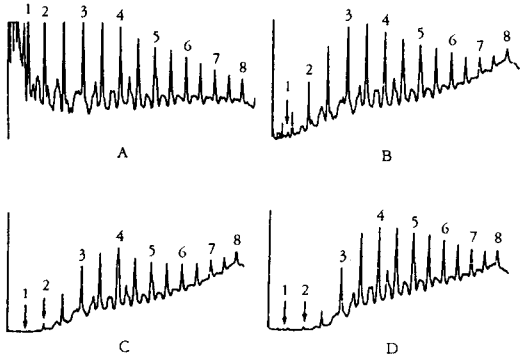


Fig. 6. Gas chromatography of Kuwait crude oil in the culture broth. (A, 0 hr; B, 48 hr; C, 96 hr; D, 132 hr cultivation; 1→8, C₁₀→C₂₄).

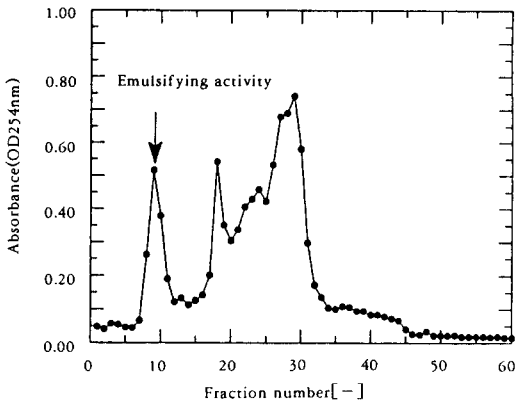


Fig. 7. Gel chromatography profile of the crude biosurfactant on a column(2.0×50cm) of Sephadex G-100. The eluent is 20mM of Tris·HCl buffer(pH 7.8) with 0.5N NaCl.

위를 분해하는 능력을 지니고 있음을 알 수 있었다. 또한, 분해된 탄소수가 적은 부분(C₁₀이하)은 배양 과정 중에 휘발되는 것으로 사료된다.

Biosurfactant의 분리 및 정제

Amberlite XAD-7수지가 충전된 column을 이용하여 배양액으로부터 crude biosurfactant를 물과 메탄올로써 분리한 후, 투석하여 동결건조 하였다. 이렇게 하여 얻어진 시료는 Sephadex G-100이 충전된 column에서 0.5M NaCl 이 첨가된 20mM

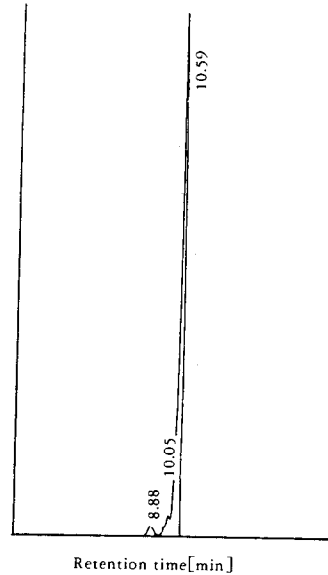


Fig. 8. HPLC chromatogram of the biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. CHCS-2. column, YMC-Pack A SIL(300×4.6); solvent, acetonitrile : water = 70 : 30; detector, U.V (λ=254nm); flow rate, 0.5ml/min.

Tris·HCl(pH 7.8) 완충용액을 이용하여 분리하였으며, 그 결과 얻어진 3개의 peak중 첫번째 peak에서 가장 높은 유화도를 보였다(Fig. 7). 가장 높은 유화도를 보이는 peak fraction을 회수하여 투석한 후, HPLC (Pharmacia LKB)를 통하여 최종 정제 하였는데, 여기에 사용된 column은 YMC-Pack A-014 SIL column(300×4.6)으로, acetonitrile과 물을 70 : 30으로 혼합한 용매를 사용하여, 정제된 하나의 peak를 얻을 수 있었다(Fig. 8).

요 약

해양의 유류유출이 잦은 지역으로부터 crude oil 분해능이 뛰어난 미생물을 분리하여 동정한 결과 *Pseudomonas* 속으로 판명되었으며, 이를 *Pseudomonas* sp. CHCS-2로 명명하였다. 이 균주가 배양 중에 생산하는 biosurfactant의 생성 최적 pH 및 NaCl 농도는 각각 8.0 및 3.0% 였으며, 질소원인 peptone에 영향을 받았다. 2% Kuwait crude oil이

첨가된 배양액을 48, 96, 132시간별로 gas chromatography를 이용, 잔류 oil을 분석한 결과 Kuwait crude oil의 C₁₀-C₁₄부위에 biosurfactant가 작용하여 분해하였으며, 배양 상층액으로부터 Amberlite XAD-7을 이용한 흡착 chromatography와 Sephadex G-100을 이용한 gel chromatography, 그리고 HPLC를 이용하여 biosurfactant를 분리·정제한 결과 유효력이 뛰어난 단일 peak를 얻었다. Bio-surfactant 유효력은 40℃에서 가장 좋았으며, 안정성은 30℃에서 60℃까지의 넓은 온도 범위에서 유지되었다. 또한, 정제된 biosurfactant를 이용하여 계면장력에 미치는 영향을 검토한 결과, 상업적으로 널리 판매되고 있는 Tween 80, Tween 60 그리고 SDS보다 표면장력 저하능력이 뛰어난 것으로 밝혀졌다.

감 사

본 연구는 한국과학재단의 특정기초연구과제 연구비(과제번호: 92-24-00-14)의 지원으로 수행하였으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. C. E. Zobell and J. F. Prokop(1966), *Zeit. Allg. Microbiol.*, **6**, 143.
2. C. E. Zobell(1966), "Proc. Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills", American Petroleum Institute, New York, 317-326.
3. 清水 潮(1978), 微生物の生態, 學會出版センタ, **5**, 197.
4. Reisfeld A., E. Rosenberg and D. Gutnick (1972), *Appl. Microbiol.*, **24**, 363.
5. E. Rosenberg, A. Zuckerberg, C. Rubinovitz and D. L. Gutnick(1979), *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 402.
6. I. Belsky, D. Gutnick and E. Rosenberg(1979), *FEBS Lett.*, **101**, 175.
7. A. Zuckerberg, A. Diver, Z. Peeri, D. I. Gutnick and E. Rosenberg(1974), *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 414.
8. Y. Shoham et al(1983), *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 573.
9. J. E. Zajic, H. Guignard and D. F. Gerson (1977), *Biotech. & Bioeng.* **19**, 1303.