

*Pseudomonas aeruginosa*가 생산하는 biosurfactant의 분리 및 특성

김대원 · 김민주 · 강상모*
건국대학교 미생물공학과

Purification and Properties of Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* KK-7

Dae-Weon Kim, Min-Joo Kim and Sang-Mo Kang*

Department of Microbiological Engineering, Kon-Kuk University, Seoul 93-1, Korea

Abstract — Biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* KK-7 were purified and their properties were studied. The bacterial surfactant was separated into two sorts of biosurfactants (Type I, II) by silica gel column chromatography. On the basis of physicochemical analysis, Type I was found to be mixture of two glycolipids with M.W. 800, and Type II was peptide with M.W. 1300. The Type II biosurfactant was composed of glutamic acid, proline, glycine, leucine, histidine. The crude extract was used to determine some properties as a surfactant. The biosurfactant had the properties as stronger emulsification agent and a stronger stabilizing agent emulsion than any other surfactants tested.

미생물이 생산하는 biosurfactant의 종류는 극히 다양하며, 그 물성과 특징 또한 다양하다. 이들은 구조에 따라 분류할 수 있는데 glycolipid 계통의 biosurfactant가 가장 많이 알려지고 있으며 많은 속의 미생물에 의해서 생산된다(1-3). 또한 *Bacillus* sp.에서 생산되는 peptidolipid 계통의 surfactin(4)과 그외 yeast에서 생산되는 lipopeptide가 있다(5). 그리고 microbiol enhanced oil recovery(MEOR) 등에 사용 가능한 polysaccharide 계통의 emulsan(6-8) 등으로 나눌 수 있다. 또한 각 균주에서 생산되는 특징적인 형태의 biosurfactant 외에도, 양은 적으나 이 균주들에서 공통적으로 보이는 phospholipids(9, 10)와 neutral lipids(11, 12) 등이 있다. 이 물질도 주 biosurfactant와 더불어 전체적인 표면활성에 어느 정도 영향을 끼치고 있다(13).

Pseudomonas sp. 균주는 두가지 형태의 biosurfactant를 생산한다고 보고되었다. *Pseudomonas aeruginosa*에서 생산되는 biosurfactant는 rhamnolipids 계통으로, rhamnose와 β -hydroxydecanoic acid가 친수성과 친유성을 가지며 이들의 조합에 따라 2종 이상의 물질이 생산된다(2-3, 14-19). 이 rhamnolipid는 여

러 곳에서 분리되고, 다른 성질을 가진 같은 종의 균주에 거의 유사하게 나타나고 있다. Rhamnolipid 이외에도 hydrophobic protein-like 물질이 생산된다(20, 21). *Pseudomonas fluorescens*에서는 주성분이 carbohydrate와 protein인 고분자의 biosurfactant가 생산된다고 보고된 것이 있다(22-25).

본 연구는 이전의 보고(32)에서 분리한 biosurfactant 생산균주 *Pseudomonas aeruginosa* KK-7를 이용하여, 이 균주에서 생산되는 biosurfactant를 분리하여 그 성분을 조사하고 biosurfactant 응용의 기초 조사로서, 계면활성제의 일반특성 중에서 표면장력, 유화도, 유화안정도, 기포력, 세척력 등을 조사하였다. 또한 이미 생산되고 있는 다른 합성계면활성제들과 비교하여 이 균주가 생산하는 biosurfactant의 상대적 물성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용한 균주는 이전에 보고한(32) *Pseudomonas aeruginosa* KK-7를 이용하였다.

배양 방법

전의 보고(32)에 있는 medium 2를 1/3 삼각 flask에 400 ml을 분주하여 멸균 후 1일 배양한 전배양액을

Key words: Biosurfactant, *Pseudomonas aeruginosa*, glycolipids, surface-tension, emulsion, hydrophobic peptide

*Corresponding author

2.0%(V/V) 되도록 접종하고 30°C에서 2일간 왕복진탕배양하였다.

표면장력의 측정 표면장력의 측정은 한국 공업규격의 합성세제 시험방법(26)에 명시되어 있는 비표면장력 계산법을 이용하였다.

유화도의 측정 유화도의 측정은 Zuckerberg 등(27)의 방법으로 다음과 같이 측정하였다. Hexadecane과 2-methyl naphthalene 동량 혼합물 0.1 ml에 시험액 2.5 ml을 첨가하고, 50 mM Tris-HCl buffer 7.4 ml로 pH를 8.0으로 조절하였다. 이 반응액을 150 rpm, 25°C에서 1시간 동안 왕복진탕시킨 후, 10분간 정지한 다음 620 nm에서 흡광도를 측정하고 유화도로 환산하였다. O.D. 값 0.1을 유화제 활성단위 1로 정하고 이를 기준으로 비교하였다.

유화안정도의 측정 유화안정도의 측정은 Cirigliano 등(8, 30)의 방법으로 다음과 같이 측정하였다. 계면활성제 시료용액 5 ml에 0.5 ml의 oil을 첨가한 후 220 rpm, 25°C, 2분간 왕복진탕한 후, 10분간 정지한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하고 10분 간격으로 50분간 흡광도를 측정하였다. 시간에 대한 흡광도의 log 값의 기울기(decay constant, Kd)를 계산하였다.

기포력의 측정 한국공업규격의 합성세제 시험방법(26) 중 기포력측정 방법을 기준으로 하여 측정하였다. 기포력 측정장치를 이용하여 시료수용액 200 ml을 실온에서 990 mm의 높이에서 30초간 액면 위에 낙하시켰을 때, 생성되는 거품의 높이를 정수자리까지 구하여 거품의 발생력을 측정하였다. 몇 회의 측정값을 평균하여 정수자리까지 구하여 거품발생력으로 하였다.

세척력의 측정 한국공업규격의 합성세제 시험방법(26) 중 주방용 합성세제의 세척력 측정방법을 변형하여 실험하였다. 기준 오염욕(우지와 대두유를 부피비 1:1로 혼합한 유지 20 g, monoolein 0.25 g 및 oilred 0.1 g을 동시에 chloroform 60 ml에 녹임) 일정량을 유리편에 부착시킨 후 계면활성제 시료액 속에서 150 rpm, 3분간 진탕시켜 오염을 제거한 후 남은 오염을 500 nm에서 흡광도를 측정하여 세척된 오염을 측정하였다. 표준곡선에서 O.D. 값당 오염의 농도를 구하여 계산하였다.

Biosurfactant의 농도 측정

조건이 같은 액 중에서의 biosurfactant의 상대적 농도 측정은 Santos 등(14), Parra 등(15), Reiling 등(16)의 방법을 이용하였다. CMC(Critical Micelle Concentration)를 이용하는 biosurfactant의 농도 측정은

biosurfactant가 녹아 있는 액의 pH, 이온강도, 기타 화합물의 조성이 유사한 액 중에서만 비교될 수 있다. 그러므로 biosurfactant의 절대량은 시료액을 감압농축하여 완전히 건조시킨 후 건조중량으로 측정하였다. 이를 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 녹여 표면장력과 기타 특성을 조사하였다.

Biosurfactant의 정제

배양액에서 Fig. 1과 같은 과정을 통하여 biosurfactant를 분리정제 하였다. 먼저 지질분리에 일반적으로 많이 사용되는 유기용매(28)(chloroform : methanol = 2 : 1)를 이용한 치환과정을 거쳐 배양액에서 지질을 분리하고, 이 조(粗)정제물질을 crude biosurfactant로 하여 -20°C에서 보관하고 시료로 사용하였다.

First Silica gel column chromatography 위의 시료를 chloroform에 녹인 후 chloroform으로 충전된 Silica gel column(2.5×40 cm)에 흡착시켰다. 2 bed volume의 chloroform으로 비극성물질과 흡착되지 않은 물질을 용출시킨 후 acetone으로 60 ml/hr의 속도로 용출하여 분획을 감압농축하였다. 이를 다시 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 녹인 후 표면장력을

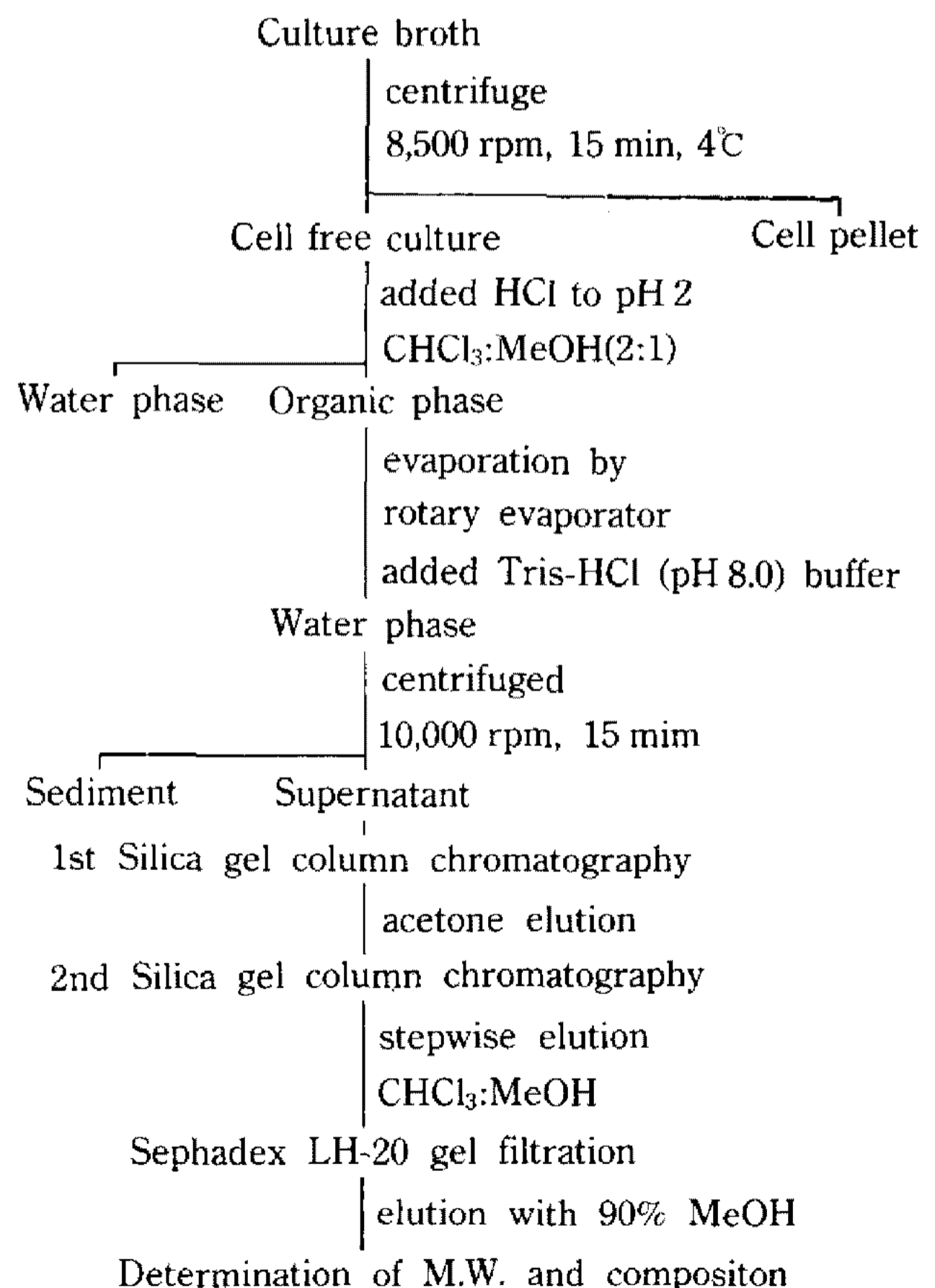


Fig. 1. Isolation steps of main biosurfactant from *Pseudomonas* sp. KK-7.

측정하였다.

Second Silica gel column chromatography 활성부위를 다시 Silica gel column(1.5×50 cm)에 흡착시킨 후, chloroform과 methanol의 stepwise 법으로 60 ml/hr의 속도로 용출시켰다. 이를 다시 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 녹인 후 표면장력을 측정하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography Silica gel에서 분리된 각기 극성이 다른 활성부분을 Sephadex LH-20 column(1.5×60 cm)에서 90% methanol로 20 ml/h의 유속으로 용출시켰다. 이 분획을 50 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 녹인 후 표면장력을 측정하였다.

Biosurfactant의 조성 및 분석

발색 반응 단백질은 Lowry 등의 방법에 따라 bovine serum albumin(BSA)를 표준단백질로 사용하여 분석하였고, 총 당량은 phenol-sulphuric acid를 이용하여 분석하였다. Free fatty acid의 분석은 Rhee 등(26)의 방법을 이용하였다. 그 외에 TLC에서의 물질에 대한 특이적인 반응(27)을 위하여 amino 기에 ninhydrin, lipids에 iodine과 Rhodamine 6 g, 당에 phenol-H₂SO₄와 anthrone 등으로 실험을 하였다.

TLC Silica gel G, Silica gel G F₂₅₄ plate(Merck Co.)를 이용하여 chloroform : methanol : water = 65 : 25 : 4의 전개용제에서 전개하였다(28).

분자량 측정 각기 극성이 다른 biosurfactant를 Sephadex LH-20 column(1.5×60 cm)에서 20 ml/h의 유속으로 용출시켰다. 분자량 4000, 2000, 1000, 300인 polyethyleneglycol(PEG)과의 분리 속도를 비교하

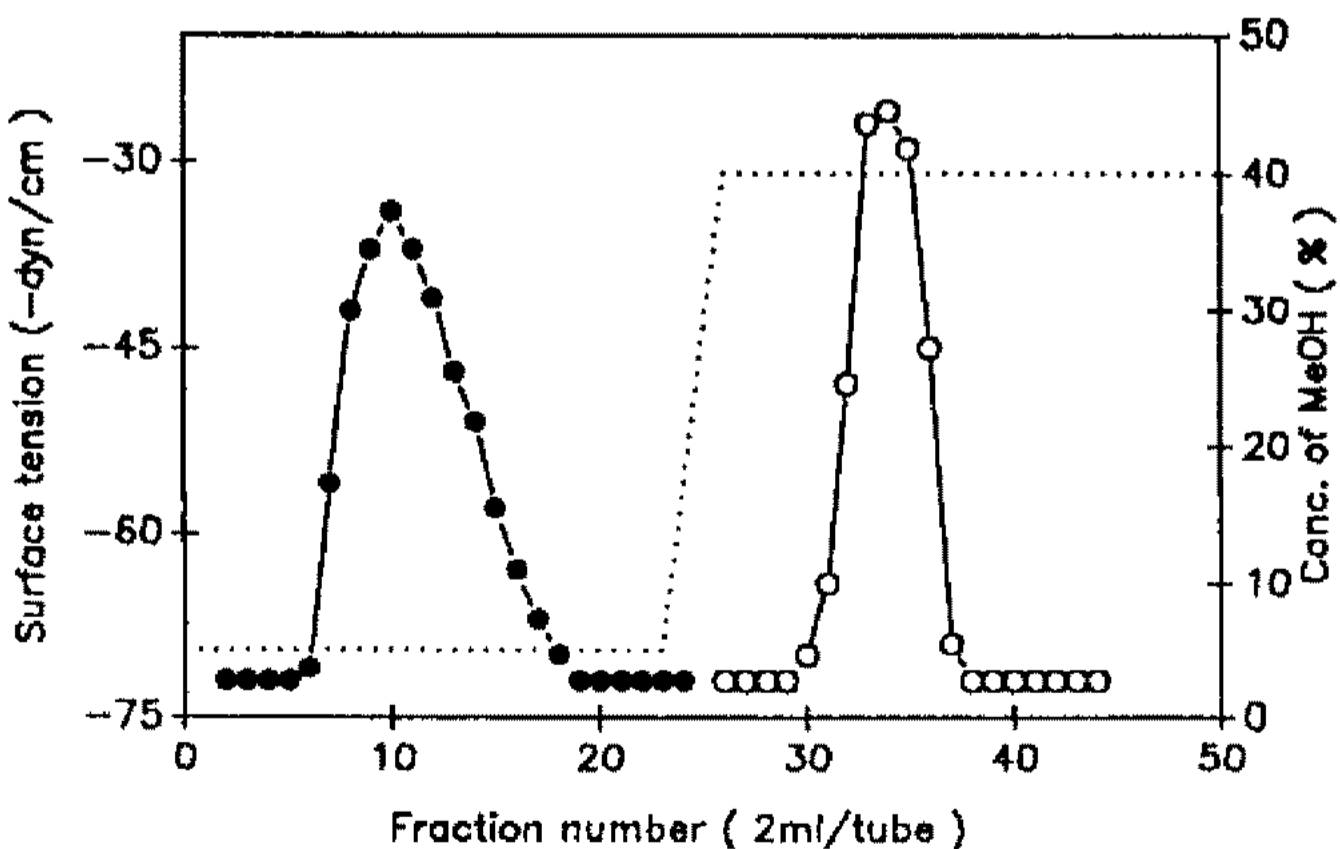


Fig. 2. Elution diagram for chromatography of biosurfactant on Silica gel G. Stepwise elution with CHCl₃: MeOH (●: 95:5, ○: 60:40).

Each column fraction was evaporated, dissolved in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and determined the surface tension.

여 분자량을 측정하였다.

Amino acid 분석 6 N HCl로 정제된 시료를 가수분해한 후 amino acid analyzer(Berkman system 6300)를 이용하여 amino acid의 분석을 하였다.

결과 및 고찰

Biosurfactant의 분리 및 정제

Fig. 1의 방법에 따라 배양액으로부터 biosurfactant를 정제하였다. 먼저 유기용매를 이용하여 추출한 조정제물을 Silica gel column에 흡착시킨 후 chloroform과 acetone으로 용출하여 활성물질의 분획을 얻었다. 이 활성부분을 다시 Silica gel column에 흡착시킨 후, chloroform과 methanol의 stepwise 법으로 60 ml/hr의 속도로 용출시킨 결과 Fig. 2에서와 같이 chloroform : methanol의 비율이 95 : 5(이하 Type I이라 한다)와 60 : 40(이하 Type II라 한다)에서 극성이 다른 두 부류의 biosurfactant로 나뉘어졌다. 분리된 두 종류의 biosurfactant를 같은 조건으로 2차 Silica gel column에서 용출하고, Fig. 3에서와 같이 Sephadex LH-20 column에서 90% methanol로 20 ml/h의 유속으로 각각 용출시킨 결과 Type I, Type II biosurfactant로 다시 분리되었다. 따라서 이 두 Type의 biosurfactant는 극성 뿐 아니라 분자량에 있어서도 다른 특성을 가진 것으로 보인다.

Biosurfactant의 조성 및 분석

이제까지 보고된 *Pseudomonas aeruginosa*에서 생산되는 biosurfactant에 대한 결과(15, 17, 20, 29, 30)를 참고로 하여, column chromatography에서 분리된 Type I과 Type II biosurfactant에 대하여 여러 반응과 분석을 행하였다. TLC 상에서의 반응은 Fig. 4와 Ta-

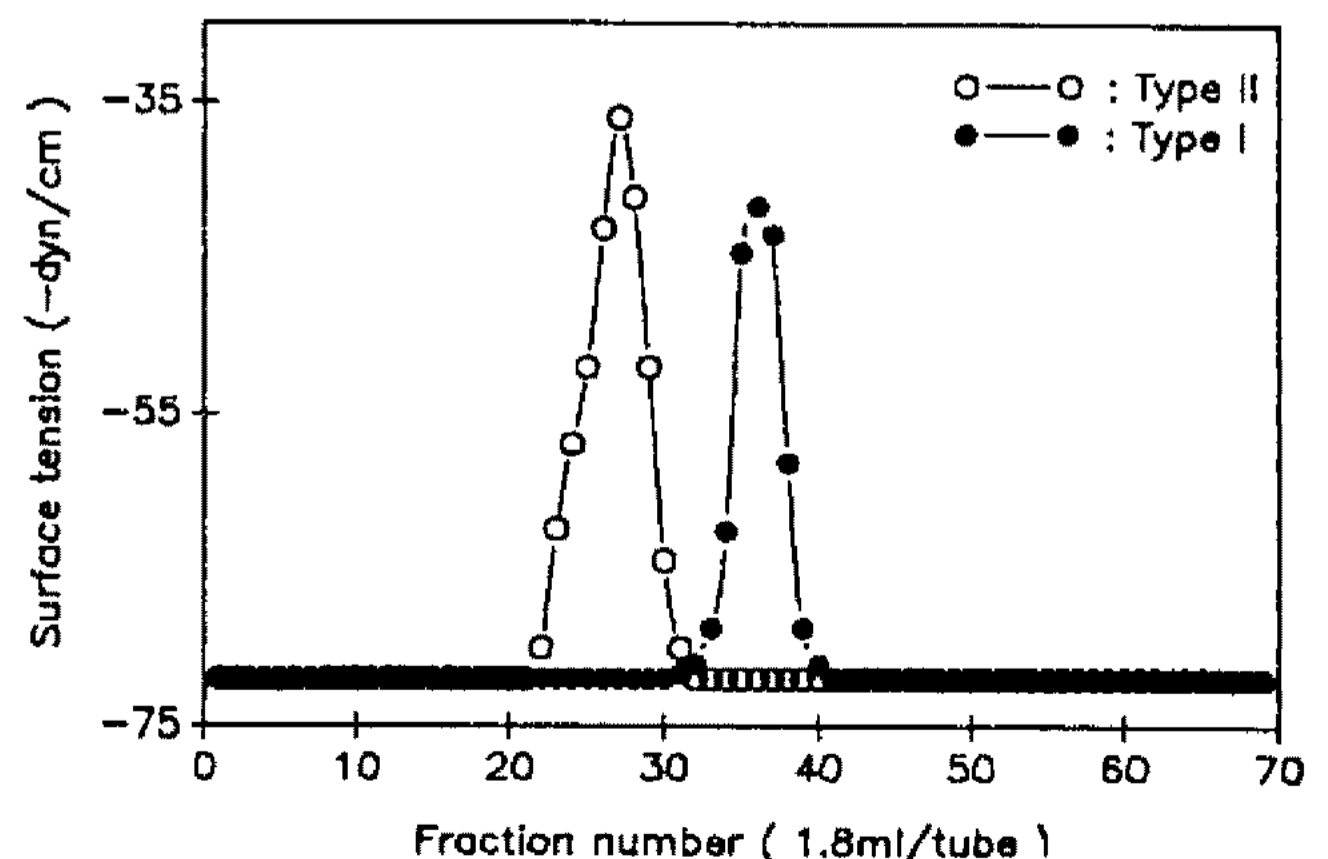


Fig. 3. Elution diagram for chromatography of Type I, II biosurfactant on Sephadex LH-20. Elution with 90% methanol.

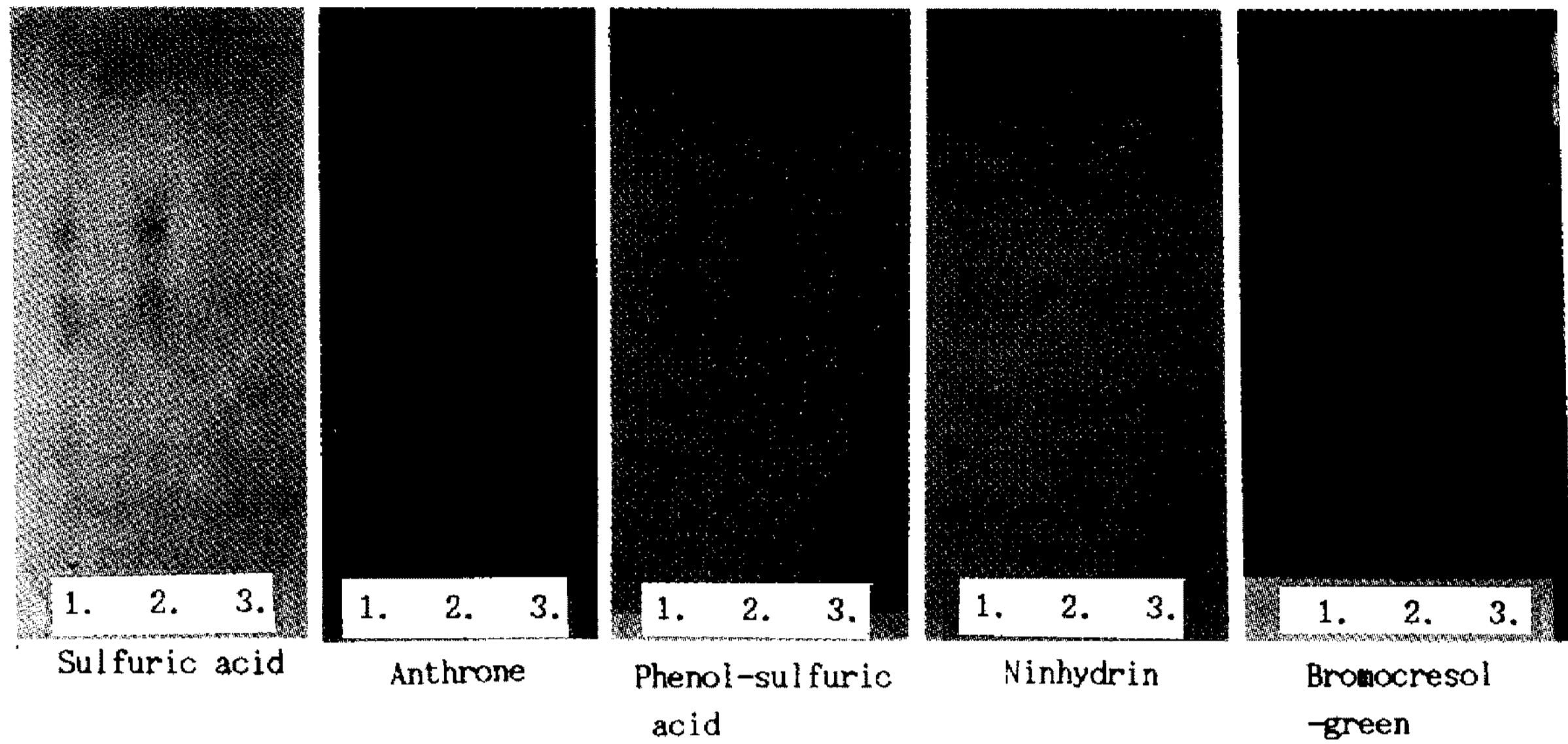


Fig. 4. Color reactions of biosurfactants seperated by TLC.

Table 1. Color reaction of the biosurfactant on TLC

Biosurfactant	Rf	1	2	3	4	5	6
Type I a	0.8	+	+	+	+	+	+
b	0.7	+	+	+	+	+	+
Type II	0.4	+	+	-	-	+	+

reagent 1: sulfuric acid, 2: iodine vapor, 3: anthrone, 4: phenol-sulfuric acid, 5: ninhydrin, 6: bromocresol-green

Table 2. Identification of biosurfactant Type I, II

Component	Type I	Type II
Protein	-	+
Carbohydrate	+	-
Fatty acid (before hydrolysis)	-	-
(after hydrolysis)	+	-

ble 1에서와 같은 결과를 볼 수 있었다.

Type I은 Rf=0.7, 0.8인 두가지의 주요 물질(Table 1의 a, b로 칭하였다)로 발색반응 결과 두 물질이 모두 anthrone, phenol-sulfuric acid, bromocresol-green에 양성반응을 나타냈고, ninhydrin에 음성반응을 나타냈다. 이는 Parra 등(15)이 보고한 *Pseudomonas aeruginosa*에서 생산되는 두가지 glycolipids의 Rf(=0.8)와 TLC 상에서의 anthrone, phenol-sulfuric acid, bromocresol-green, ninhydrin 반응 결과와 동일한 결과로 Type I의 두 물질이 서로 유사한 구조의 당을 포함하는 산성물질로 추정되었다.

Type II는 Rf=0.4로 ninhydrin, bromocresol-

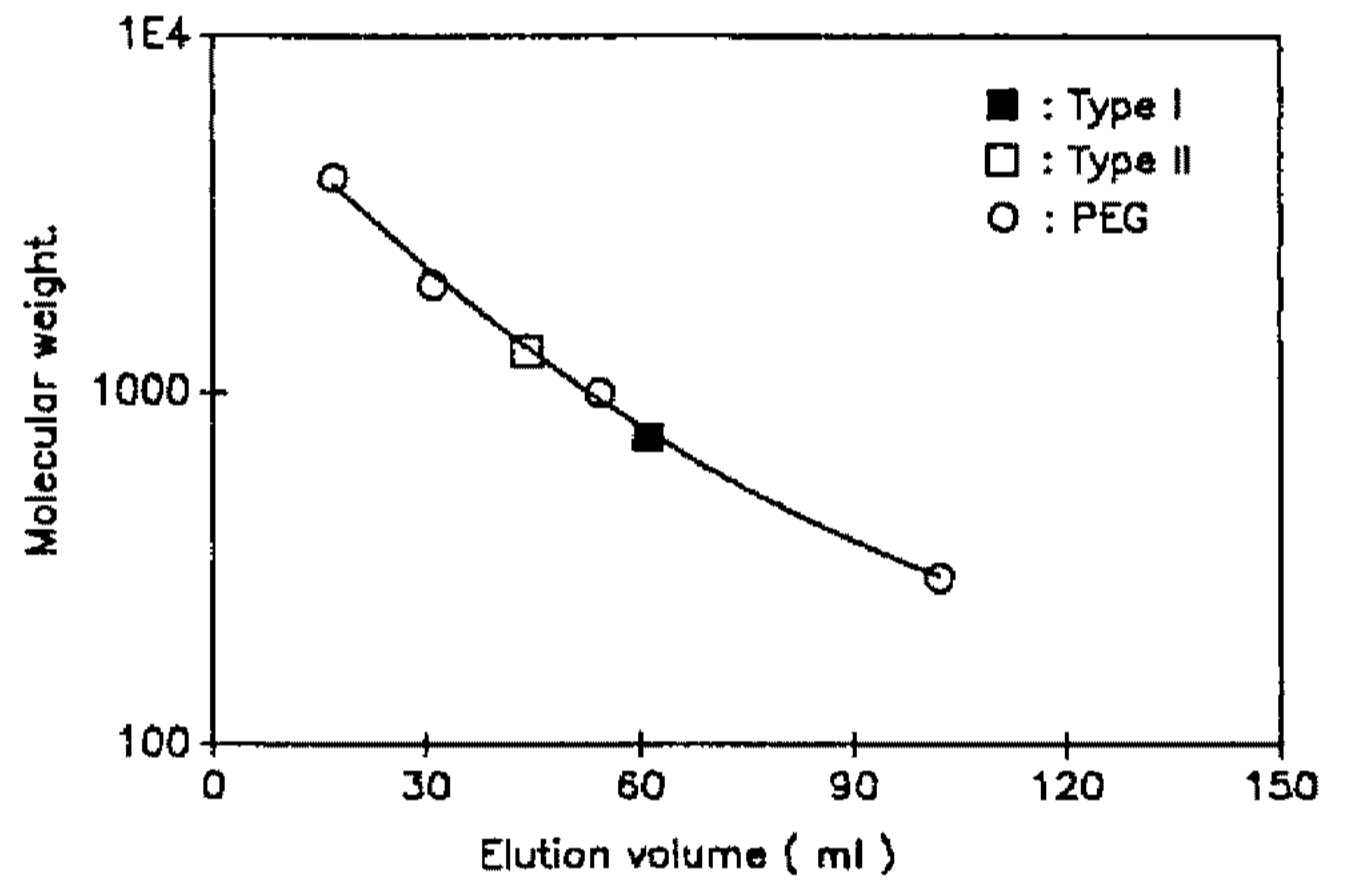


Fig. 5. Determination of molecular weight of the Type I, II biosurfactant on the Sephadex LH-20 chromatography.

PEG (MW. 4000, 2000, 1000, 300) was used for standard material.

green에 양성반응을 보였고 그 외에는 음성반응을 보여, amine 기를 가진 산성물질로 추정된다. Hisatsuka 등(20), Cooper 등(21)은 *Pseudomonas aeruginosa*로부터 glycolipid와 더불어 강한 유화능을 가진 hydrophobic protein-like 물질이 생산된다 보고한 바 있는데, 이와 유사한 물질로 추정되었다.

이외에 액상에서의 물질반응은 Table 2와 같았는데 Type I은 당반응이 나타났고 Type II는 protein 반응이 나타났다. HCl을 이용한 산가수분해 후에는 Type I에서 fatty acid 반응이 나타나 Type I 분자내에 fatty acid를 함유하고 있는 것으로 보인다.

Sephadex LH-20 gel chromatography를 이용하여 PEG와의 비교 분자량을 측정한 결과(Fig. 5) Type I은

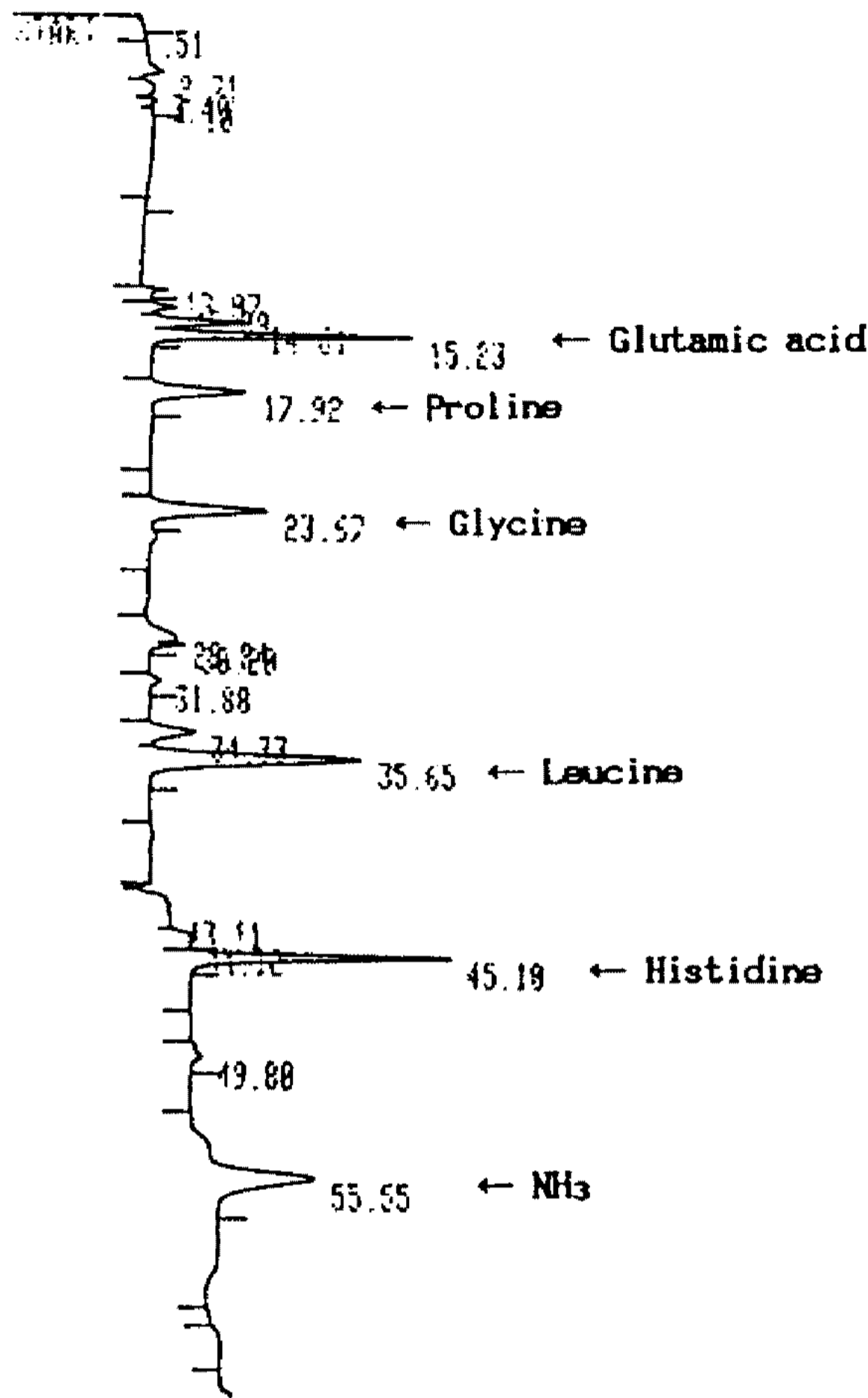


Fig. 6. Amino acid analyzer elution pattern of Type II biosurfactant.

Column: Beckman 2.6×200 mm, ion exchange resin No. 338076, flow rate: buffer solution-0.33 ml/min, ninhydrin-0.17 ml/min, analysis cycle time: 60 min, column pressure: 147 kg/cm², ninhydrin pressure: 7 kg/cm², column temperature: 50~70 gradient, N₂ gas pressure: 2.8 kg/cm², reaction batch temperature: 230°C, wave length: 440 nm, 540 nm, detector: tungsten

약 800, Type II는 약 1300의 분자량을 가진 것으로 추정된다. Type I은 Itoh 등(17), Hisatsuka 등(30), Parra 등(15)이 보고한 *Pseudomonas aeruginosa*에서 생산되는 분자량 600~900인 glycolipid의 분자량과 유사하였다.

분자량 약 1300의 acidic peptide성 물질로 추정되는 Type II의 amino acid의 조성을 분석한 결과(Fig. 6) glutamic acid, proline, glycine, leucine, histidine 등이 검출되어 이들 아미노산이 Type II의 주 성분이라고 추정되었다.

분리 및 분석결과를 종합하여 볼 때 crude biosurfactant에서 분리한 Type I과 Type II는 본 연구에서 분리된 *Pseudomonas aeruginosa*에서 생산되는 main biosurfactant로 이들의 조성 비율은 건조중량으로

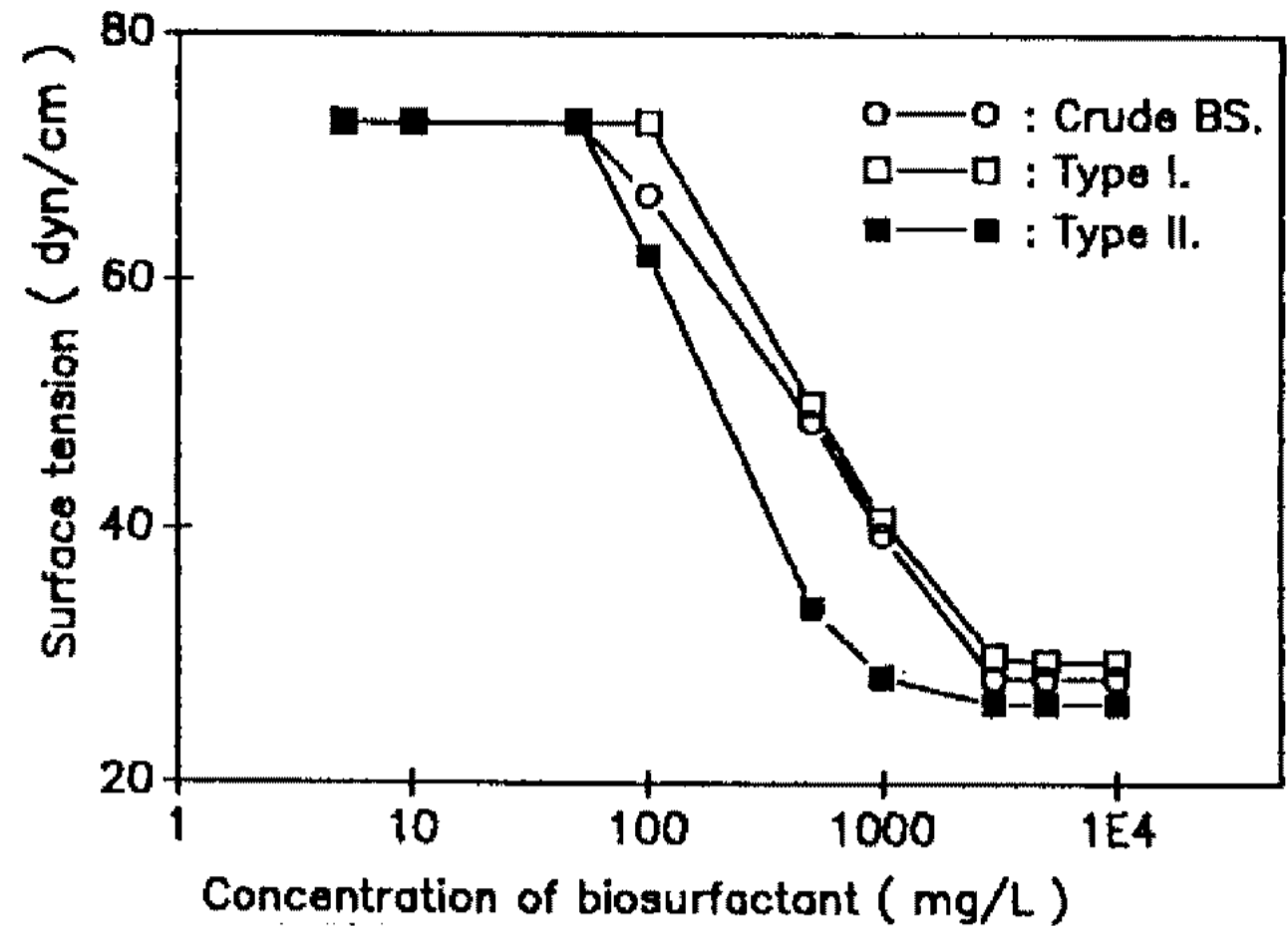


Fig. 7. Effect of concentration on surface tension.

비교할 때 4 : 1이었다. 두가지의 물질로 나타난 Type I은 분자량 800 정도의 carbohydrate와 fatty acid를 함유한 glycolipid이었다. 이제까지 보고된 바로는 *Pseudomonas aeruginosa*에서 특징적으로 생산되는 glycolipid(2-3, 14-19)는 rhamnolipids로 rhamnoscs와 β-hydroxydecanoic acids로 구성되었고 그 조합에 의하여 4종 이상이 생성된다. Type I은 이 rhamnolipid로 추정되며 차후 분자성분의 carbohydrate와 fatty acid에 대한 분석이 요구된다.

Type II는 정확한 아미노산 함량은 측정되지 않았으나 보고된 *Pseudomonas aeruginosa*에서 생산되는 hydrophobic protein-like 물질(20, 21-31)은 분자량이 10⁶ dalton의 강한 유화능을 가진 물질로, 본 균주에서 분리된 peptide의 분자량과는 크게 다르다. 그러므로 Type II는 이제까지 *Pseudomonas aeruginosa*에서 보고된 바 없는 새로운 biosurfactant로 보인다.

Biosurfactant의 물리적 성질

Crude biosurfactant와 Type I, II의 물성을 조사하기 위해 농도·pH에 따른 표면장력과 유화도의 변화를 조사하였다. 5 mg/l~10 g/l의 농도에서 표면장력의 변화를 비교한 결과(Fig. 7) 최저 표면장력은 crude biosurfactant의 경우 28 dyn/cm, Type I은 29 dyn/cm, Type II는 26 dyn/cm이었다. Crude biosurfactant 내의 Type I과 II의 함량이 4 : 1인 것을 감안할 때 crude biosurfactant 내에 비활성물질의 양은 극히 적다고 보인다.

pH의 변화에 따른 표면장력의 특성을 조사한 결과는 Fig. 8로 pH 6을 기준으로 pH가 감소하면서 Type I은 표면장력의 저하, Type II는 표면장력의 증가가 나타났다. 이 현상은 Type I, II의 구조성의 차이에서 기인하는 것으로 생각된다. 그러나 pH의 저

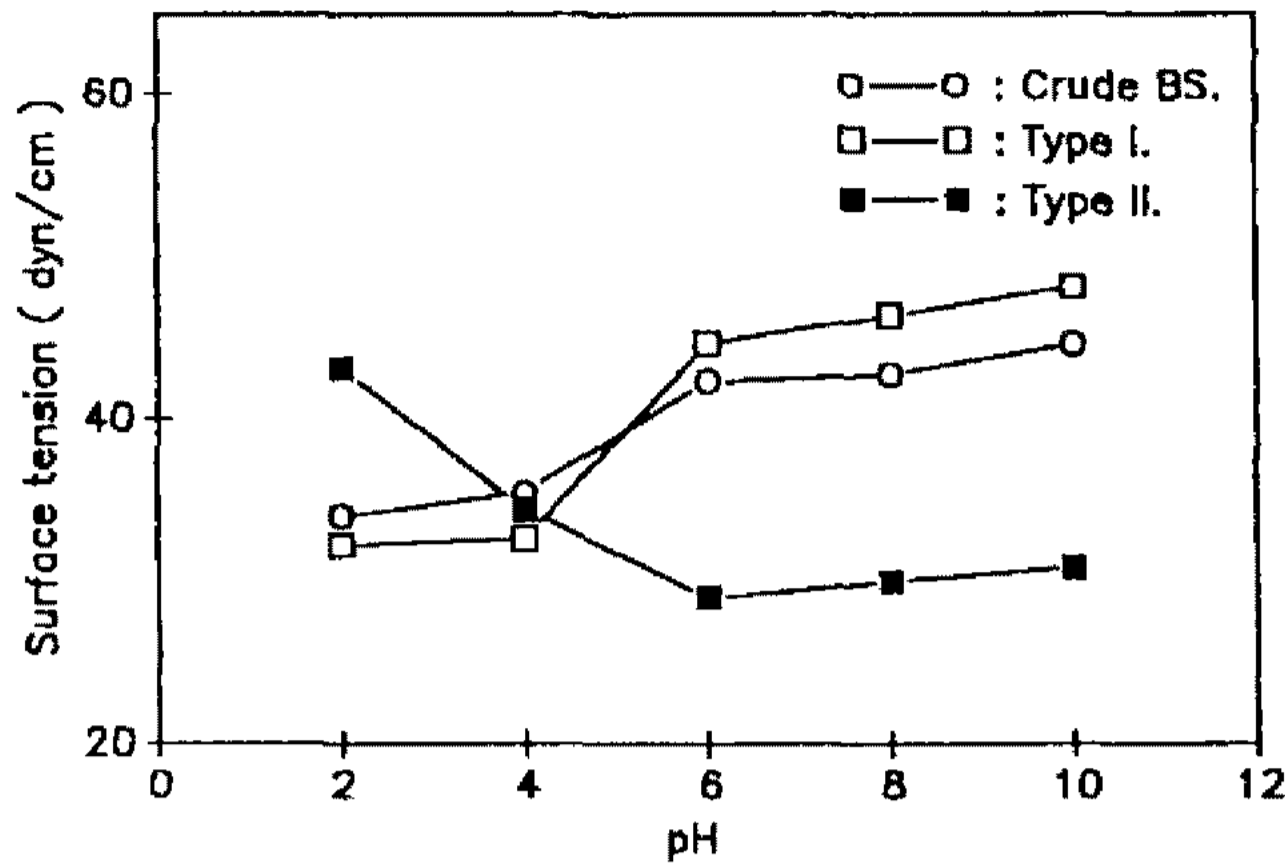


Fig. 8. Effect of pH on surface tension.

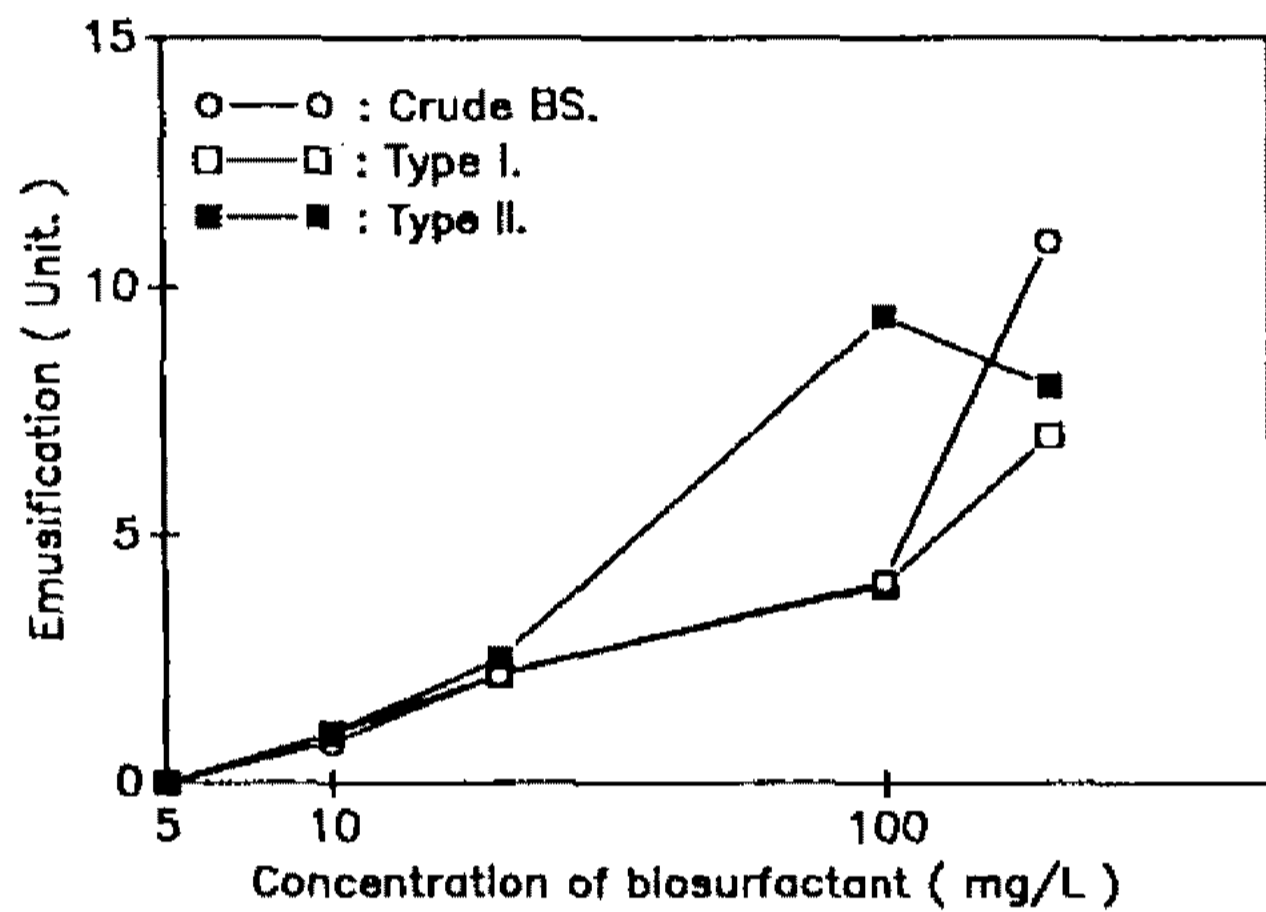


Fig. 9. Effect of concentration on emulsification power.

하에 따라 용액의 탁도 증가가 관찰되었다.

5~500 mg/l의 농도 변화에 대한 유화도는 Fig. 9와 같았다. Type II가 전체적으로 강한 활성을 나타냈으나 100 mg/l 이상의 농도에서는 유화층이 수층과 완전히 분리되는 상태가 되었다. 이 농도에서 crude biosurfactant가 Type I, II의 활성보다 강한 활성을 보이므로, 이는 Type I과 II가 섞여 있는 공존상태인 crude biosurfactant가 유화의 안정효과를 가져온다고 생각된다.

Biosurfactant가 soybean oil, olive oil, kerosene, hexadecane의 유화안정도에 끼치는 영향은 Table 3과 같다. 이 K_d 값은 유화도의 시간에 대한 변화의 기울기로 10^{-3} 의 수치로 나타낸다. 이 기울기가 작을수록 유화도의 변화가 적고 안정도는 높다고 볼 수 있다. 여러 oil들 중에서 soybean oil에 있어서의 biosurfactant 첨가에 의한 유화안정도가 가장 높았다.

기타 계면활성제와의 비교

Pseudomonas aeruginosa KK-7에서 분리한 biosurfactant의 계면활성제 일반 특성을 이해하기 위하여

Table 3. Stabilization of oil emulsion by crude biosurfactant of *Pseudomonas aeruginosa* KK-7

Oil	Decay constant (K_d) (10^{-3})		Difference
	Without BS ^a	With BS	
Soybean oil	-6.0	-1.2	4.8
Olive oil	-2.1	-0.7	1.4
Kerosene	-6.3	-3.5	2.8
Hexadecane	-5.1	-2.9	2.2

BS^a: biosurfactant

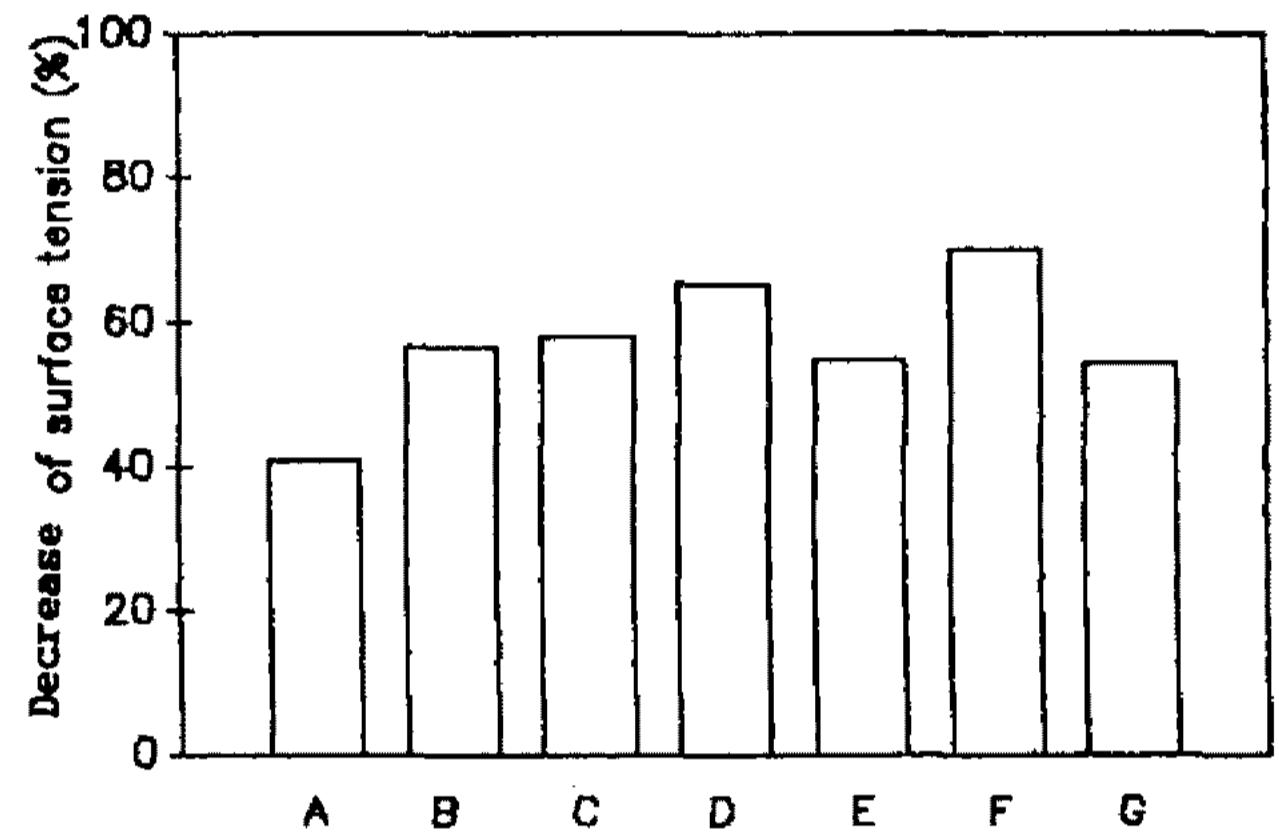


Fig. 10. Decrease of surface tension by surfactants. A: AEO, B: AES, C: AOS, D: Tween 20, E: detergent A, F: standard detergent, G: biosurfactant from KK-7

AEO, AES, AOS, Tween 20 등의 계면활성제와 시판 중인 세제, 공업규격의 세척력 시험 공시세제를 비교시료로 선택하였다. AEO, AES, AOS는 대부분의 세제류에 들어가는 주 계면활성제이고 Tween은 유화능이 강한 계면활성제, 시판세제와 세척력 시험 공시세제는 계면활성제와 여러 물질들이 함유되어 있는 복합물질이다(26). 이 시료들을 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 녹여 0.1%(w/v) 용액을 만든 후 각 계면활성제 특성을 비교하였다. 시료 biosurfactant는 crude biosurfactant를 사용하였다. 계면활성제 특성 중에서 표면장력, 유화도, 유화안정도, 세척력, 기포력 등을 비교하였다.

표면장력 물의 표면장력(약 72 dyn/cm)을 100%로 하였을 때 각기 시료의 표면장력 저하율을 나타냈다. 각 시료의 표면장력 저하율은 Fig. 10에서와 같이 AEO 40%, AES 57%, AOS 58%, Tween 20~66%, 시판세제 55%, 세척력공시세제 70%, biosurfactant 55% 정도의 표면장력 저하율을 나타냈다. Tween 20과 세척력공시세제를 제외하고 그 외의 시료는 50% 정도의 표면장력 저하를 나타냈다.

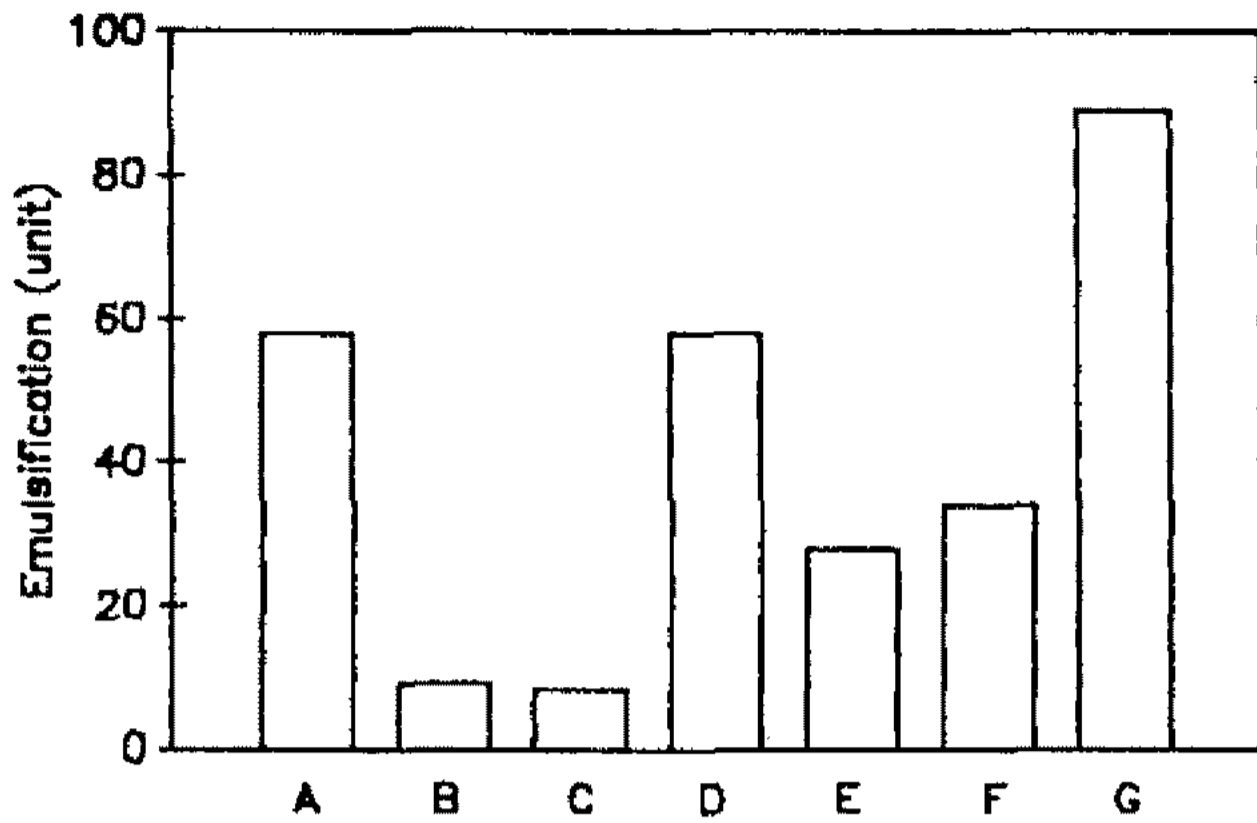


Fig. 11. Emulsification power of surfactants.
 A: AEO, B: AES, C: AOS, D: Tween 20, E: detergent
 A, F: standard detergent, G: biosurfactant from KK-7

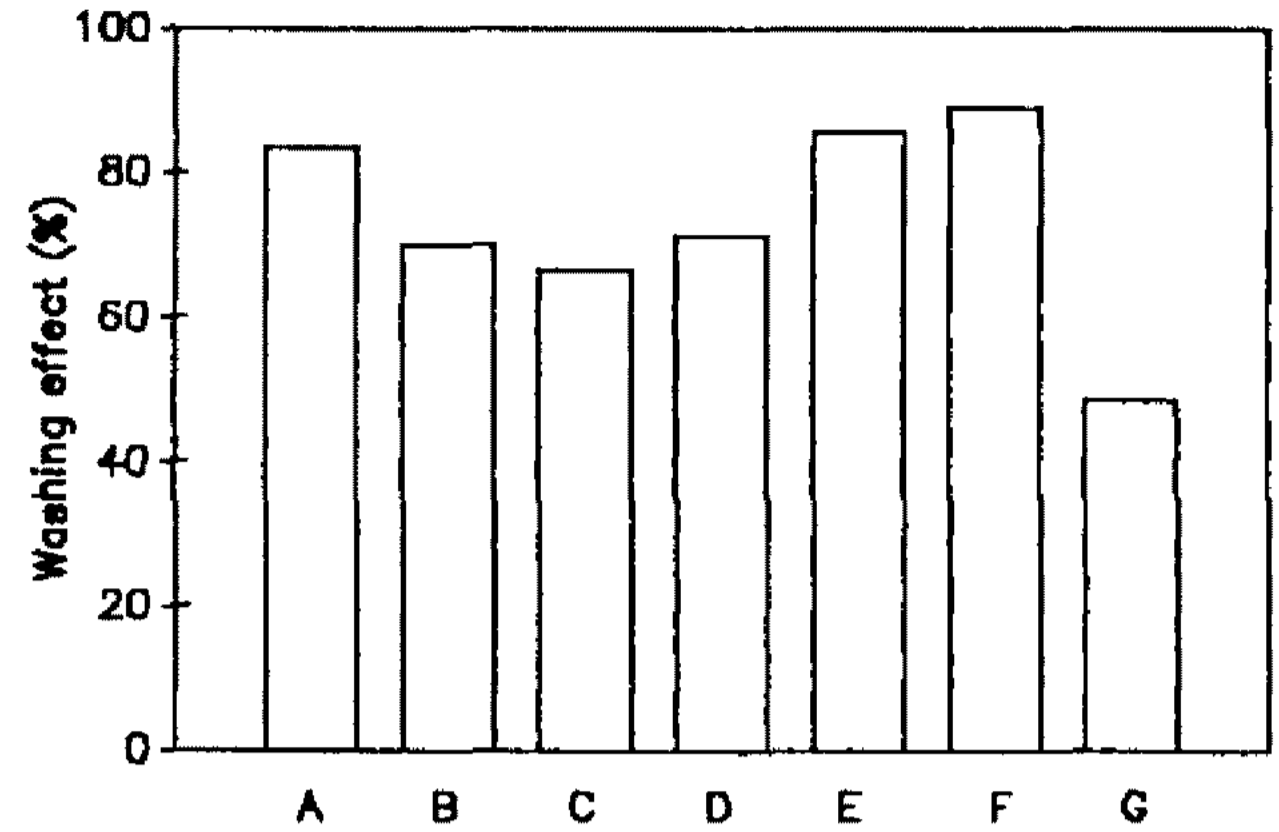


Fig. 12. Washing effect of surfactants.
 A: AEO, B: AES, C: AOS, D: Tween 20, E: detergent
 A, F: standard detergent, G: biosurfactant from KK-7

Table 4. Differences of soybean oil emulsion by surfactants

Surfactants	Decay constant (K_d) (10^{-3})		Difference
	Without sample	With sample	
AEO	-6.0	-7.0	-
AES	-6.0	-14	-
AOS	-6.0	-	-
Tween 20	-6.0	-5.0	1
Sale detergent	-6.0	-10	-
Standard detergent	-6.0	-3.0	3
Biosurfactant	-6.0	-1.2	4.8

-: not determined

유화도 0.1% 시료용액 유화도를 측정할 후 unit를 비교하였다(Fig. 11). 각 시료의 unit는 AEO 58 unit, AES 9.3 unit, AOS 8.4 unit, Tween 20~58 unit, 시판세제 28 unit, 세척력공시세제 34 unit, 생체계면활성제 88.9 unit였다. 다른 비교시료에 비하여 biosurfactant가 강한 유화도를 나타냈다.

유화안정도 각 시료의 soybean oil에 대한 유화안정도를 비교하였다(Table 4). 각 시료의 K_d 값은 Tween 20은 -5, 세척력공시세제는 -3, biosurfactant는 -1.2, AEO는 -7, AES는 -14, 시판세제는 -10 등으로 biosurfactant의 유화안정도가 높았으며 AEO, AES는 유화안정이 매우 약하고 oil-유화층이 분리되는 경향이 높았다. 이 이유는 합성 계면활성제는 단일한 구조로 이루어져 있기 때문에 기타 활성을 가진 복합물질들과는 다른 micelle을 형성하기 때문이라고 사료된다.

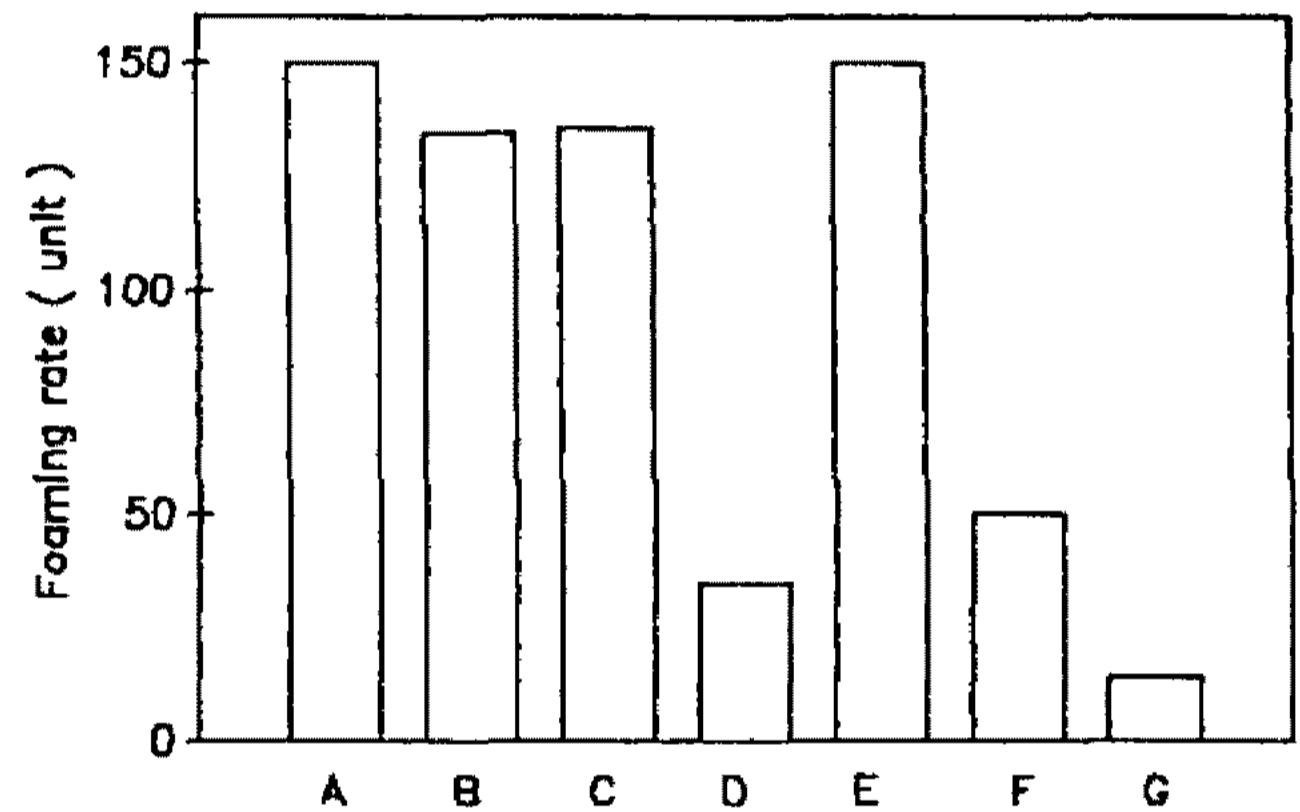


Fig. 13. Foaming rate of surfactants.
 A: AEO, B: AES, C: AOS, D: Tween 20, E: detergent
 A, F: standard detergent, G: biosurfactant from KK-7

세척력 제조한 오염의 농도를 측정하기 위해 500 nm에서 오염의 농도별 흡광도의 표준곡선을 작성하여 세척된 오염의 농도를 계산하였다. 각 시료의 세척력은 증류수를 0%로 기준하여 세척력 %로 나타냈다(Fig. 12). 각 시료의 세척력은 AEO 83.6%, AES 70%, AOS 66.6%, Tween 20~71.4%, 시판세제 85.9%, 세척력공시세제 89%, biosurfactant 48%이었다. 다른 시료에 비하여 biosurfactant의 세척력은 비교적 낮은 정도를 나타냈다. Kim 등⁴¹⁾은 *Candida* sp.에서 생산되는 biosurfactant의 세척력이 거의 없다는 보고를 하였는데 본 연구에서 분리된 biosurfactant는 어느 정도의 세척력을 나타냈다.

기포력 각 시료의 기포력을 unit로 표시하였다(Fig. 13). 각 시료의 기포력은 AEO 150 unit, AES 135 unit, AOS 136 unit, Tween 20~35 unit, 시판세제 150 unit, 세척력공시세제 50 unit, biosurfactant 14 unit이었다. 전체 시료와 비교할 때 biosurfactant의 기포력은 거의 없다고 판단되었다. Kim 등⁽³⁴⁾은 *Ca-*

ndida sp.에서 생산되는 biosurfactant의 기포형성력이 없다는 보고를 하였는데 이와 유사한 결과였다.

요 약

Biosurfactant의 분리에서 Silica gel column chromatography를 이용한 극성과 비극성 유기용매의 비율을 바꾸어 stepwise 용출을 한 결과, 두가지 형태로 분리되었다. 분리된 biosurfactant를 생화학 반응, TLC, U.V. spectrum, gel filtration 등의 방법으로 분석하였다. 이 조사에 의한 결과로는, Type I은 *Pseudomonas aeruginosa*에서 특징적으로 생성되는 두가지의 rhamnolipids로 분자량은 약 800이었고 Type II는 이제까지 보고된 바가 없는 새로운 형태의 biosurfactant로 분자량 1300가량의 peptide이며 glutamic acid, proline, glycine, leucine, histidine의 아미노산으로 구성되었다고 추정된다.

이들 두 부류의 물질과 유기용매 전이에 의한 crude biosurfactant의 표면장력과 유화도를 비교한 결과 Type I은 최저 표면장력이 29 dyn/cm로 전형적인 rhamnolipids의 값을 나타냈고 Type II는 26 dyn/cm의 최저 표면장력을 가졌다.

유화도는 Type I과 II가 섞여 있는 공존상태인 crude biosurfactant가 유화의 안정효과를 나타냈다. Biosurfactant의 응용에 대한 기초조사를 위한 계면활성제 일반 특성을 위해 1차 분리한 crude biosurfactant와 AEO, AES, AOS, Tween 20 등의 계면활성제와 시판세제, 공업규격의 세척력 시험 공시세제를 비교시료로서 표면장력, 유화도, 유화안정도, 세척력, 기포력 등을 비교하였다. 10 mM Tris-HCl(pH 8.0)에 녹인 0.1% 시료용액을 기준으로 각 검사를 실시한 결과, 유화도와 유화안정도는 다른 시료보다 강한 활성을 나타내었고 세척력, 기포력에 있어서는 비교적 저조한 활성을 나타내었다. 그러므로 본 연구에서 분리된 biosurfactant는 유화제로서의 이용가능성이 높다고 생각되며 현재 실제적인 적용을 위한 연구가 진행 중이다.

감사의 말

본 연구는 1991~1992년도 한국과학재단 목적기초연구비(과제번호, 913-0406-023-2) 지원의 일부로 수행되었으며, 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. J. Gorin, P.A. and J.F.T. Spencer. 1988. Hydroxy fatty acid glycosides of sorphorose from *Torulopsis magnoliae*. *Can. J. Chem.* **39**: 846-855.
2. Hisatsuka, K. 1971. formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and it's function in hydrocarbon fermentation. *Agri. Biol. Chem.* **35**(5): 686-692.
3. Itoh, S. and T. Suzuki. 1972. Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. *Agri. Biol. Chem.* **36**(12): 2233-2235.
4. Arim, K., A. Kakinuma, and G. Tamara. 1968. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**: 488-494.
5. Iguchi, T. and I. Takeda. 1969. Emulsifying factor of hydrocarbon produced by a hydrocarbon assimilating yeast. *Agric. Biol. Chem.* **33**: 1657-1658.
6. Zucherberg, A., A. Diver, and Z. Peeri. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**(3): 414-420.
7. 박중연. 1988. 해양세균 *Arthrobacter* sp. M-1220 균주에 의한 bunker-C 유의 유화. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**(5): 384-388.
8. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1985. Purification and characteristization of liposan a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(4): 846-850.
9. Beebe, J.L. and W.W. Umbreit. 1971. Extracellular lipids of *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol.* **108**: 612-614.
10. Jone, G.E. and A.A. Benson. 1965. Phosphatidyl glycerol in *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol.* **89**: 260-261.
11. Makula, R.A., P.J. Lockwood, and W.R. Finnelly. 1975. Comparative analysis of lipids of *Acinetobacter* species grown on hexadecane. *J. Bacteriol.* **121**: 250-258.
12. Suzuki, T. and K. Ogawa. 1972. Transient accumulation of fatty alcohol by n-paraffin grown microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **36**: 457-463.
13. David, G., Cooper, J.E., Jajic, and D.F. Gerson. 1979. Production of surface-active lipids by *Corynebacterium lepus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 4-10.
14. Santos, L.G., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continious cultures with glucose as carbon source. *Appl. Eviron. Microbiol.* **48**(2): 301-305.
15. Parra, J.L. and J. Guinea. 1989. Chemical characterization and physiochemicalm behavior of biosurfacant. *JAOCS.* **66**(1): 141-145.
16. Reiling, H.E., U. Thanei-wyss, L.H. and Guerrasantos, O. Käppeli. 1986. Pilot plant production of rhamnoliid biosurfactant by *Pseudomonas ae-*

- ruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**(5): 985-989.
17. Itoh, S., H. Honda, F. Tomita, and T. Suzuki. 1971. Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. *J. Antibiot.* **24**(12): 855-859.
 18. Mulligan, C.N., G. Mahmoudides, and B.F. Gibbs. 1989. Biosurfactant production by a chloramphenicol tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotech.* **12**: 37-44.
 19. Mulligan, C.N., G. Mahmoudides, and B.F. Gibbs. 1989. The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotech.* **12**: 199-210.
 20. Hisatsuka, K., T. Nagahara, and K. Yamada. 1972. Protein like activator for-alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa* S₇B₁. *Agri. Biol. Chem.* **36**: 1361-1369.
 21. Cooper, D.G. and D.A. Paddock. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 173-176.
 22. Persson, A. and G. Molin. 1987. Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and *Vibrionaceae* growing on carbohydrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 439-442.
 23. Persson, A., E. Österberg, and M. Dostalek. 1988. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 1-4.
 24. Persson, A., G. Molin, and C. Weibull. 1990. Physical and Morphological changes induced by nutrient limitation of *Pseudomonas fluorescens* 378 in continuous cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(3): 686-692.
 25. Persson, A., G. Molin, and N. Andersson. 1990. Biosurfactant yield and nutrient consumption of *Pseudomonas fluorescens* 378 studied in a microcomputer controlled multifermentation system. *Biotech. Bioeng.* **36**: 252-255.
 26. 한국공업규격 합성세제 시험법 KS M 2707, 1991.
 27. Zuckerberg, A., A. Diver, Z. Perri, D.L. Gutnick, and E. Rosenberg. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**(3): 414-420.
 28. W.W. Christie. 1982. *Lipids Analysis*. 2nd edition.
 29. D.S. Han, and J.S. Rh. 1986. Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT-isooctane reversed micelles. *Biotech. Bioeng.* **28**: 1250-1255.
 30. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(104): 747-750.
 31. Egon Stahl. 1969. *Thin-layer chromatography*. 2nd edition.
 32. 강상모, 김대원, 김혜자. 1994. Biosurfactant를 생산하는 *Pseudomonas aeruginosa* KK-7의 분리 및 biosurfactant의 생산. *한국산업미생물학회지* **22**(1): 92-98.
 33. Hisatsuka, K., T. Nagahara, Y. Minoda, and K. Yamada. 1977. Formation of protein-like activator for n-alkane oxidation and its properties. *Agri. Biol. Chem.* **41**: 445-449.
 34. W.K. Kim, and E.K. Kim. 1992. Application of biosurfactant (Sophorolipid) produced from *Candida bombicola*. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **7**(2): 102-106.

(Received 22 September 1994)