

Tsukamurella sp. 26A에 의한 생물계면활성제의 생산

최경숙 · 김순한 · 정영기¹ · 장경립 · 이태호*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹동의대학교 자연과학대학 미생물학과

토양으로부터 biosurfactant를 생산하는 미생물을 분리하여 *Tsukamurella* sp. 26A로 동정하였다. Biosurfactant 생산을 위한 최적 배지 조성은 n-hexadecane 7%, NaNO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.001%, K₂HPO₄ 0.02%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, CaCl₂ · 2H₂O 0.02%, yeast extract 0.02% (pH 6.8-7.0, 30°C)이었으며 배양액의 최저 표면장력과 계면장력은 각각 30 mN/m, 1.5 mN/m 였다. 유화기질로서 hydrocarbon류, edible oil류, 그리고 petroleum oil등에 작용시켰을 경우 비교적 높은 유화활성과 유화 안정도를 나타내었다.

KEY WORDS □ Biosurfactant, bioemulsifier, *Tsukamurella* sp., surface tension

계면활성제(Surfactant, Emulsifier)는 소수성부분과 친수성부분을 함께 가지는 화학구조적 특징이 있어 보통 물-공기(액체-기체), 기름-물(액체-액체), 물-고체(wetting과정) 상에서 계면의 표면장력을 낮추는 능력을 소유하고 있는 물질을 말한다(16, 19). 계면활성제는 이러한 성질때문에 각 계면에서의 물질의 반응과 이동을 촉진시킬 수 있는 성질이 있어, 의약품, 식·음료, 화장품, 농약, 세제 등의 산업분야에서 뿐만 아니라 일반 생활품에 이르기까지 그 용도는 실로 다양하다(10).

그러나 기존의 계면활성제는 석유계 계면활성제가 주종을 이루고 있고, 특히 이들의 제조시 부산물로 아황산, 일산화탄소, 이산화탄소, 아미노옥사이드, 다이옥산, 니트로졸아민 등이 배출되어, 환경오염 및 인체안전성에 문제를 야기시키고 있다(20, 29). 따라서 환경 및 인체안전성 측면에서 고려해 볼때 미생물유래 계면활성제는 여러가지 장점을 가지고 있기 때문에 상당한 관심의 대상이 되고 있다. 즉, 미생물에 의해서도 대량생산이 가능할 뿐만 아니라 독성이 적으며 생분해가 잘되고, 화학구조에 따른 다양한 특이성을 가지고 있어 적용범위가 넓다는 점 등이 미생물유래 계면활성제의 유리한 점이라 할 수 있다(17, 23, 30). 그러나 이러한 미생물유래 계면활성제가 산업화되기 위해서는 특수용도에 사용될수 있는 특이 성질을 가지거나 또는 여러가지 용도 개발과 아울러 기존의 화학합성 계면활성제에 비하여 낮은 가격으로 생산될 수 있어야 한다(14, 15).

현재 알려져 있는 대부분의 미생물 계면활성제는 exolipid로서 이들의 분비는 세포의 대사주기에 의존하며 생육기간 중 특정시기(대수증식기 말기나 정지기)에 이루어 진다고 알려져 있다(1). n-alkane을 탄소원으로 하여 생육하는 미생물(6, 7, 18, 24, 25, 31)의 경우 이들에 의해 생산된 계면활성제는 배지중의 n-alkane 화합물을 미세한 기름입자로 유화시켜 세포와 기질과의 접촉면을 넓힘으로서 보다 쉽게 분해할 수

있도록 하며, 이러한 사실은 유류 유출에 의한 해양오염의 경우에도 응용될 수 있음을 시사한다(9, 22). 따라서 계면활성제 중 그 응용성이 가장 큰 이와같은 bioemulsifier는 현재까지 문제시 되어온 합성제품의 대체물질로서 그 사용이 앞으로 확대될 것으로 생각되며, 또한 폐수처리, 토양의 재활성화, 유류 유출에 의한 해양의 오염문제, 잔류유류회수(2, 8, 18) 등에도 그 응용성이 크게 기대된다고 할 수 있다.

미생물유래 계면활성제중 상품화가 되어 있는 대표적인 것으로는 미국의 Petroleum사에서 생산하는 Emulsan으로서 기름에 오염된 탱크의 처리, 전자기관의 3차 세척액 등으로 사용되고 있다. 그 외에 다양한 미생물 계면활성제가 특허화 되어 현재 상품개발의 수준까지 와 있으나, 산업체사이의 경쟁 및 보안관계로 극히 일부만이 보고되고 있는 실정이다(14).

본 연구는 이러한 많은 장점을 지닌 미생물유래의 계면활성제를 개발하기 위해 계획되었으며 현재 유화활성을 나타내는 몇종의 균주를 토양에서 순수 분리하여 그 배양특성 및 성질을 보고 한바 있다(12, 13, 27). 그러나 이들 분리 미생물에 의해 생산되는 물질은 그 생산량 및 유화활성에 있어 다소 미흡한 점이 발견되고 실제 산업적 응용성이 부족하여 보다 우수한 특성을 가진 새로운 미생물을 분리하고자 하였다. 이하 새로 분리된 균주의 동정 및 배양조건에 대해 검토한 결과에 대해 기술하고자 한다.

재료 및 방법

Biosurfactant 생산균주의 screening

Biosurfactant를 생산하는 균을 분리하기 위해 부산, 경남 및 강원도 등에서 채취한 토양시료 약 1g을 10 ml의 분리용 배지(n-hexadecane 4%, NaNO₃ 0.1%, K₂HPO₄ 0.03%, KH₂PO₄ 0.001% MgSO₄ · 7H₂O 0.03%, CaCl₂ · 2H₂O 0.01%, yeast extract 0.02%, tryptone 0.02%, pH 6.8-7.0)에 현탁한 뒤 30°C에서 1주일간 배양하였다. 그 중에서 표면 장력

*To whom correspondence should be addressed

감소와 유화 활성을 보이는 배양액을 분리용 고체 배지에 희석 평판법으로 도말하여 30°C 항온 배양기에 배양시킨 후 각 colony를 분리하고 각 colony별로 biosurfactant 생산능을 조사하였다. 그 중 유화 활성과 표면 장력 감소능이 뛰어난 것을 biosurfactant 생산균으로 선별하였다.

균주의 동정

공시균으로 선정된 biosurfactant 생산균의 분류학상의 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양학적, 생화학적 제반 특성을 검토하였으며 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (28)와 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (11) 제9판을 참고로 하여 분리균을 분류 동정하였다.

표면장력 및 계면장력의 측정

표면 및 계면 장력의 측정은 CSC-DuNouy Tensiometer (U.S.A.)를 이용하여 Ring method(4, 21)로 측정하였다. 계면장력은 biosurfactant의 농도별로 물과 n-hexadecane의 계면에서 측정하였다.

Biosurfactant의 농도 측정

Biosurfactant의 상대적 양의 측정은 Santos 등의 Dilution factor(Fcmc)법(26)에 의하여 행하였다. 즉, 배양액을 표면 장력이 증가할 때까지 단계적으로 계속 희석하여 활성을 나타내는 최대 희석배수때의 ditution factor(Fcmc)를 구하였다. 이때 Fcmc vlaue의 증가는 active compound의 농도가 증가함을 의미한다.

본 biosurfactant가 여러 가지 발색반응에 의해 일종의 glycolipid 임이 밝혀졌기 때문에 물질의 정제과정중 biosurfactant의 정량은 Cheplin과 Kennedy의 phenol-sulfuric acid 법(3)에 의하여 구하였다. 즉, glycolipid 10-100 µg을 함유하는 시료 0.5 ml에 5% phenol solution(w/v)을 첨가하고 2.5 ml의 진한 황산을 가하여 10분간 방치한 후 다시 25°C의 water bath에서 15분 동안 incubation 한 다음 488 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

생산균주의 생육도 측정

순수 분리된 biosurfactant 생산균은 50 ml의 배지를 넣은 500 ml shaking flask에 접종하여 30°C에서 진탕 배양(Vision Co. LTD, 220 rpm)하면서 배양 12시간마다 생육도를 측정하였다. 즉 배양액을 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 침전균체를 증류수로 세척한후 그 pellet을 105°C에서 12시간 건조하여 균체량을 측정하였다.

Biosurfactant의 최적 생산 조건 검토

공시균에 의한 biosurfactant 최적 생산조건을 설정하기 위해 탄소원, 질소원, 무기염, 통기량 및 배양온도등이 표면장력감소능, dilution factor(Fcmc) 및 건조 균체량등에 미치는 영향을 측정하여 서로 비교 검토하였다.

Biosurfactant의 유화활성 측정법

유화활성은(5) 0.01 M MgSO₄ · 7H₂O를 함유하고 있는 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 7.5 ml에 유화기질인 n-hexadecane

0.1 ml를 섞은 후, 배양상등액 0.2 ml를 넣고 1분간 vortexing하여 유화시킨 다음 10분간 정치시킨 뒤, 유화액의 밑부분에서 1 ml를 뽑아내어 540 nm에서의 탁도를 유화활성으로 나타내었다. Blank로는 유화기질을 넣지않은 것(blank-1; 배양상등액 자체의 탁도를 제거하기 위한 것)과 배양상등액 대신 bioemulsifier 생산배지를 넣은 것(blank-2; 배지자체의 유화활성치를 제거하기 위한 것)을 사용하여 sample의 탁도에서 blank-1과 blank-2의 탁도를 뺀 값을 유화활성값으로 정하였다.

Biosurfactant의 유화 안정도 측정법

위의 유화활성 측정법으로 유화시킨 유화액을 실온에서 방치하면서 10 min 간격으로 흡광도를 측정하여 시간에 따른 흡광도의 차이를 log 값으로 plot 한후 그 기울기(Decay constant, Kd)를 유화안정도로 나타내었다

결과 및 고찰

공시균 26A 균주의 분류와 동정

공시균 26A를 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"와 "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 제9판에 따라 동정실험하여 그 결과를 Table 1과 Fig. 1에 나타내었다. 분리균은 gram 양성, acid fast stain 양성으로써 포자를 형성하며 세포벽 peptidoglycan의 주성분으로 meso-DAP를 가지고 있고 MK-9의 menaquinone type과 지방산으로는 여섯개까지의 이중 결합을 가진 직선상의 포화, 불포화, 10-methyl branched fatty acid이 검출되는 것으로 보아 본 공시균주는 *Tsukamurella* 속에 해당되는 것으로 판단되었다.

탄소원의 영향

Biosurfactant 생산균주의 분리용 배지중 n-hexadecane 대신 각종 탄소원을 4%씩 첨가하여 30°C에서 1주일간 진탕배양한 후, 앞에서 설명한 측정법에 따라 건조 균체량, 표면장력 및 Fcmc를 측정하였다. Table 2에 나타난 결과와 같이 탄소원으로 n-tetradecane, n-hexadecane 등의 탄소수가 14개 이상인 aliphatic hydrocarbon을 사용했을 경우에는 표면장력의 현저한 감소와 함께 높은 유화활성을 나타냈으나 n-octadecane과 soybean oil, olive oil 등에서는 표면장력 감소능은 보여 주었으나 유화 활성은 그렇게 높게 나타내지는 않았다. 이와같이 기질에 따라 유화활성과 표면장력 감소능이 서로 다르게 나타나는 것은 배양액중에 다른 특성을 갖는 두종류 이상의 biosurfactant가 존재하는 것으로도 생각할수 있으나 이후의 연구에서 물질을 정제한 결과에 의해 한종류의 물질이 동시에 두가지 기능을 나타낸다는 것이 확인되었다.

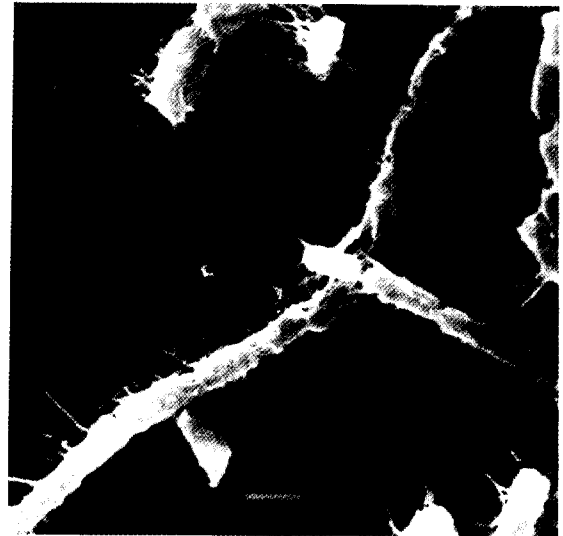
한편 n-hexadecane의 농도에 따른 균의 생육과 Fcmc에 대해 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. 그 결과 n-hexadecane의 농도가 7%일때 표면장력 감소능이 가장 우수하게 나타나 본 실험에서는 탄소원으로서 7%의 n-hexadecane 사용하였다.

질소원의 영향

Table 1. Taxonomical characteristics of the isolated strain 26A

Morphological characteristics	
Colony surface	velvety
Spore chain	rectiflexible
Spore size	1.0~1.2 μ m
Spore surface	rugose
Gram stain	positive
Acid fast stain	positive
Cultural characteristics	
Tyrosine agar	
Sporulation	abundant
Mycelium color	pink
Reverse side color	dark brown
Soluble pigment	brown
Physiological characteristics	
Enzyme activity	
Nitrate reduction	positive
H ₂ S production	negative
Catalase	positive
β -galactosidase	negative
Degradation activity	
Casein	negative
Gelatin	positive
Starch	negative
Resistance to antibiotics(μ g/ml)	
Penicillin G(10 i.u.)	positive
Rifampicin(50)	positive
Streptomycin(100)	negative
Cephaloridine(100)	positive
Growth in the presence of inhibitory compounds(% W/V)	
Crystal violet(0.0001)	positive
Phenol(0.1)	negative
Sodium azide(0.02)	negative
Sodium chloride(7)	negative
Melanine pigment production	
Peptone yeast extract iron agar	negative
Tyrosine agar	positive
Cell wall component	meso-DAP
Cell wall sugar	No diagnostic sugar
Menaquinone type	MK-9
Fatty acids	mycolic acids with 62~78 carbon atoms and up to six double bond, major proportion of straight chain saturated,unsaturated, and 10-methyl tuberculoistic branched fatty acids.

분리용 배지에 탄소원으로 7%의 n-hexadecane을 첨가하고 배지중 질소원인 NaNO₃ 대신에 각종 유기 및 무기 질소원을 0.1% 되게 첨가하여 30°C에서 일주일간 배양한후 이때의 균체량, 표면 장력 및 Fcmc를 측정하여 Table 4에 나타내었다. 그 결과 무기 질소원에서는 NaNO₂, NaNO₃, KNO₃, urea에서 표면 장력 감소 및 유화 활성이 비교적 우수하게 나타났으며 그중 가장 많은 양의 biosurfactant를 생성하는

**Fig. 1.** Scanning electron micrograph of strain 26A. The strain was cultured on tyrosine agar at 30°C for 2 weeks(indicated bar : 1 μ m).

NaNO₃를 무기 질소원으로 선정하고 NaNO₃의 농도에 따른 균의 생육과 표면 장력 감소능을 검토하였다. Table 5에서 나타난 것과 같이 NaNO₃의 농도가 0.2%일 경우 표면장력 감소능이 가장 우수하게 나타났다. 실험에 사용한 유기 질소원 중에서는 beef extract, malt extract, yeast extract, trypt-

Table 2. Effect of carbon source on the production of biosurfactant

Carbon source (4%)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (mN/m)
Glucose	1.31	1.0	70
Sucrose	1.25	1.0	60
Fructose	0.71	1.0	68
n-Pentane	0.20	1.0	68
n-Hexane	0.80	1.0	69
n-Heptane	0.21	1.0	71
n-Octane	0.27	1.0	71
n-Nonane	0.15	1.0	60
n-Decane	0.23	1.0	67
n-Undecane	0.71	1.2	57
n-Dodecane	0.95	1.4	45
n-Tetradecane	1.36	4.0	30
n-Hexadecane	1.15	5.5	30
n-Octadecane	0.61	1.3	31
Soybean oil	0.97	2.0	32
Olive oil	0.95	2.0	32
Oleic acid	0.87	1.5	38
Bunker A	0.72	1.4	39
Bunker B	0.84	1.1	33
Bunker C	0.69	1.0	39
Cyclohexane	0.20	1.6	60
Benzene	0.25	1.0	71
Ethylbenzene	0.21	1.0	66
Hexylbenzene	0.21	1.7	61
Toluene	0.15	1.0	71
Paraffin	0.72	1.3	33

Table 3. Effect of concentration of n-hexadecane on the production of biosurfactant

n-Hexadecane (%)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface
1	0.50	1.6	31
2	1.85	3.5	30
3	1.07	4.5	30
4	0.89	5.0	30
5	1.21	5.0	30
6	1.25	5.0	30
7	0.92	6.5	30
8	0.57	5.3	30

Table 4. Effect of nitrogen source on the production of biosurfactant

Nitrogen source (0.2%)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (mN/m)
NH ₄ Cl	1.01	1.1	37
NH ₄ NO ₃	1.21	2.4	50
NaNO ₂	1.37	3.0	31
NaNO ₃	1.15	5.7	30
KNO ₃	1.20	3.2	31
CH ₃ COONH ₄	1.00	1.1	35
Urea	1.17	1.1	33
Bactopeptone	1.35	3.7	31
Polypeptone	1.05	3.8	32
Beef extract	1.12	2.1	30
Malt extract	1.17	2.0	31
Yeast extract	1.25	4.5	30
Tryptone	1.06	3.7	31

tone 등의 경우가 비교적 활성이 높게 나타났으며 그중에서 활성이 가장 좋은 yeast extract도 유망한 유기 질소원으로 판단되었다. Yeast extract의 농도에 따른 biosurfactant의 생산성을 검토한 결과 0.02%의 첨가시에 가장 활성이 높게 나타나(Table 6), 이후의 실험에서는 NaNO₃ 0.2%와 yeast extract 0.02%를 동시에 배지에 첨가하였다.

무기염의 농도에 따른 영향

배지에 K₂HPO₄와 KH₂PO₄농도를 0.001~0.05%까지 조절하여 건조 균체량과 biosurfactant 생성량을 검토한 결과 K₂HPO₄의 농도 0.02%, KH₂PO₄의 농도가 0.001% 일때 가장 양호한 물질의 생성을 보였으며 MgSO₄와 CaCl₂의 농도를 0~0.05%까지로 조절하여 균의 생육도 및 biosurfactant의

Table 5. Effect of concentration of NaNO₃ on the production of biosurfactant

Concentration (%)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (mN/m)
None	0.24	2.0	30
0.05	0.80	2.6	30
0.10	1.48	5.8	30
0.20	1.30	7.0	30
0.30	1.38	4.3	30
0.40	1.12	2.5	30
0.50	1.06	2.8	30

Table 6. Effect of concentration of yeast extract on the production of biosurfactant

Concentration (%)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (mN/m)
None	0.35	1.1	30
0.001	0.76	2.0	30
0.005	1.12	2.4	30
0.010	1.36	6.2	30
0.020	1.24	6.8	30
0.030	1.41	6.0	30
0.040	1.37	6.1	30
0.050	1.45	6.2	30
0.100	1.38	5.5	30
0.200	1.47	5.4	30

Table 7. Effect of cultivation temperature on the production of biosurfactant

Cultivation temperature (°C)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (mN/m)
20	0.97	5.5	31
25	1.36	6.1	31
30	1.21	8.0	30
35	1.09	6.7	30
40	0.53	2.4	36

생산량을 측정하였을 때는 모두 0.02%의 농도에서 가장 우수한 생산성 보였다(data not shown).

배양 온도의 영향

이상에서 검토한 biosurfactant의 생산 배지를 사용하여 물질생산에 미치는 배양온도의 영향을 검토하였다. 즉 배양 온도를 20~40°C 범위로 하여 분리균주를 3일간 배양한 후 균의 생육도 및 biosurfactant 생산량을 측정하였다. 그 결과 Table 7에 나타난 바와 같이 30°C에서 가장 많은 물질의 생산량을 보여 이 온도를 biosurfactant 생산을 위한 최적 배양 온도로 결정하였다.

통기량의 변화에 따른 영향

Biosurfactant 생산을 위한 최적의 조건을 설정하기 위해 500 ml shaking flask에 배지를 25~150 ml까지 첨가하여 30°C에서 3일간 배양하여 건조 균체량과 biosurfactant 생산량을 측정하여 통기량의 영향을 검토하였다. 그 결과 Table 8에서 보는 바와 같이 배양 배지는 25 ml 첨가하였을 때 최

Table 8. Effect of the aeration on the production of biosurfactant

Volume of medium (ml) per 500 ml shaking flask	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (mN/m)
25	1.57	9.6	30
50	1.24	8.8	30
75	1.03	6.6	31
100	1.01	5.6	31
125	0.87	4.0	31
150	0.51	3.3	31

Table 9. The optimum culture condition for the biosurfactant production

Medium (g/L)	n-Hexadecane	70 ml
	NaNO ₃	2
	KH ₂ PO ₄	0.01
	K ₂ HPO ₄	0.2
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.2
	Yeast extract	0.2
	pH	7.0
Other conditions	Temperature	30°C
	Culture time	4 days
	Agitation	120 Rev. × 6 cm stroke

대의 물질 생성량을 보여 본 분리균주가 배양시 aeration이 잘 될수록 보다 효율적으로 물질이 생산되는 것으로 나타났다. 또한 본 균주의 배양시 respiratory inhibitor인 cyanide, azide 등을 배지에 첨가하거나 anaerobic condition에서 배양하였을 때는 biosurfactant 생산이 완전히 차단되는 결과를 나타내었다.

이상의 배양 조건을 검토한 결과 biosurfactant 생산을 위한 최적배양 조건을 Table 9와 같이 설정하였다.

배양시간에 따른 균의 증식 및 biosurfactant의 생성량

Table 9의 최적배지 50 ml를 첨가한 500 ml shaking flask에 전배양액 5%를 접종하여 경시적으로 배양한 후 균체량 및 생성량의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 배양시간이 경과함에 따라 유화활성이 대수증식기와 더불어 급격히 증가하다가 배양시간이 정지기를 경과하면서 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 본 공시균주가 생산하는 bioemulsifier는 균의 생육과 밀접한 관련이 있는 것으로 보여지며, 이러한 bioemulsifier의 대량생산을 위해 유가식 또는 연속배양과 같은 배양방법상의 연구가 필요하다고 생각된다. 한편 배양

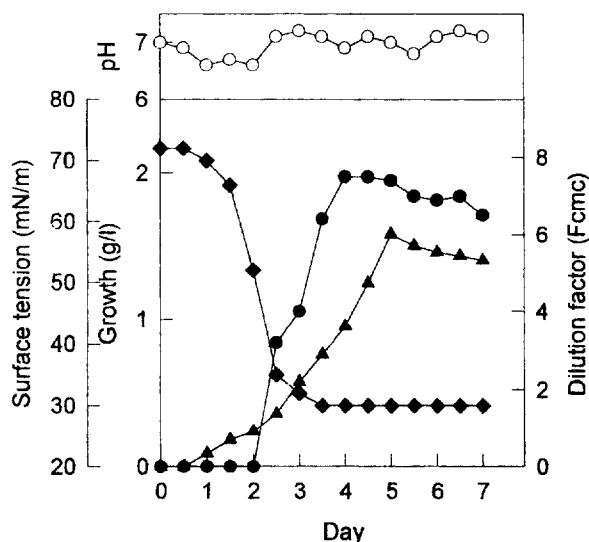


Fig. 2. Growth and production of biosurfactant from *Tsukamurella* sp. 26A on the optimum medium at 30°C. —●—, dilution factor; —◆—, surface tension; —▲—, cell growth; ○—, pH.

Table 10. Emulsifying activity and stabilization of substrate by biosurfactant

Substrate	Emulsifying activity	Decay constant (Kd, 10 ⁻³)
Soybean oil	2.314	1.0
Corn oil	2.351	- 9.5
Crude oil	2.966	- 0.6
Peanut oil	0.998	6.5
Olive oil	2.095	3.0
n-Hexadecane	2.150	1.0
Castor oil	1.588	1.0
2-Methylnaphthalene	2.542	- 1.1

액의 표면장력 감소능도 배양 1일째부터 크게 증가하다가 배양 3일째부터 일정하게 유지되어 물질의 소실은 일어나지 않았다.

유화기질에 따른 유화활성 평가

배양액에 생산되는 biosurfactant의 유화활성 및 유화시의 유화안정성을 검토하기 위해 n-hexadecane을 비롯하여 물과 섞이지 않는 각종 기질에 대한 유화활성을 측정하여, 그 결과를 Table 10에 나타내었다. 유화안정도는 유화(emulsion)의 붕괴선의 기울기를 decay constant(Kd, 10⁻³)로서 표시하여 기질에 대한 유화안정성으로 나타내었다. 이때 Kd값이 작을수록 유화안정도는 더 크다는 것을 의미한다. 결과에 나타난 바와 같이 biosurfactant는 aliphatic hydrocarbon과 aromatic hydrocarbon 모두에 높은 유화활성을 보여주고 있으며, 특히 petroleum oils에 대해서는 유화활성과 유화안정도가 매우 뛰어나 이들 물질에 대해 우수한 유화제로서의 응용 가능성을 제시해 주고 있다. 현재는 본 물질의 산업적 응용성을 모색하기 위해 물질의 정제와 불성 및 구조적인 특성을 조사하고 있다.

감사의 말

이 연구는 1996년도 교육부 기초과학육성연구비 지원에 의한 연구(BSRI-96-4410)로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김상중. 1988. 미생물과 산업, 14, 37-40.
2. Boyle, C.D. and A.E. Reade. 1983. Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 392-399.
3. Chaplin, M.F. and J.F. Kennedy. 1992. Carbohydrate analysis, a practical approach, Monosaccharide. pp. 1-36, IRL Press.
4. Chopineau, J., F.D. MacCaafferty, M. Therisod, and A. M. Klibanov. 1988. Production of biosurfactant from sugar alcohol and vegetable oils catalyzed by lipase in a nonaqueous medium. *Biotechnol. Bioeng.* 31, 208-214.
5. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 747-750.
6. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1984. Isolation of a

- bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 747-750.
7. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1985. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 847-850.
 8. Copper, D.G. and D.A. Paddock. 1984. Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 173-176.
 9. Gutnick, D.L. and E. Rosenberg. 1977. Oil tankers and pollution: a microbiological approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 379-396.
 10. Haferburg, D. and R. Hommel. 1986. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Advan. Biochem. Engineer. Biotechnol.* **33**, 53-93.
 11. John G. Holt, N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. *Bergey's Manual of Determinative bacteriology*, 9th ed. 1994. The William and Wilkams Co., U.S.A.
 12. 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.
 13. Kim, S.H., J.D. Lee, B.C. Kim, and T.H. Lee. 1996. Purification and characterization of bioemulsifier by *Acinetobacter* sp. BE-254. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 184-188.
 14. Kim, W.K. and E.K. Kim. 1992. Effects of culturing parameters on the production of microbial biosurfactant from *Candida bombicola*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **7**, 102-106.
 15. Kim, W.K. and E.K. Kim. 1992. Application of biosurfactant (sophorolipid) produced from *Candida bombicola*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **7**, 107-111.
 16. Kosaric, N., N.C.C. Gray, and W.L. Cairn. 1983. Microbial emulsifiers and de-emulsifiers. *Biotechnology*. Vol 3, pp. 575, Verlag Chemie.
 17. Kosaric, N. and W.L. Carins. 1987. Biosurfactant and biotechnology. Marcel Dekker Inc., New York.
 18. Kretschmer, A., H. Bock, and F. Wabner. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 864-870.
 19. Layman, P. 1985. Industrial surfactants set for strong growth. *Chem. Eng. News.* **63**, 23-48.
 20. Margaritis, A., J.E. Zajic, and D.F. Gerson. 1979. Production and surface-active properties of microbial surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1151-1162.
 21. Margaritis, A., K. Kennedy, J.E. Jajic, and D.F. Gerson. 1979. Biosurfactant production by *Nocardia erythropolis*. *Develop. Ind. Microbiol.* **20**, 623-630.
 22. Park, J.Y., I.S. Park, K.H. Suh, and Y.K. Hong. 1988. Emulsification of bunker-C oil by a marine bacterium *Achromobacter* sp. M-1220. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**, 384-388.
 23. Parkinson, M. 1985. Biosurfactants. *Biotechnol. Adv.* **3**, 65-72.
 24. Pines, O., E.A. Bayer, and D.L. Gutnick. 1983. Localization of emulsan-like polymers associated with the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Bacteriol.* **154**, 893-905.
 25. Powalla, M., S. Lang, and V. Wary. 1989. Penta- and disaccharide lipid formation by *Nocardia corynebacterioides* grown on *n*-alkanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 473-479.
 26. Satos, L.G., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1984. Pseudomonas aeruginosa biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 301-305.
 27. Sin, Y.M., S.H. Chung, J.Y. Park, and T.H. Lee. 1996. Synthesis of biodegradable emulsifier using lipase in anhydrous pyridine. *Biotech. Letters* **18**, 689-694.
 28. Standely, T.W., M.E. Sharpe, and J.G. Holt, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 4. 1984. The William and Wilkams Co., U.S.A.
 29. Yoon, Y.K. and K.S. Choi. 1994. Studies on physical behavior of alkyl polyglucosides (I) -Interfacial activities and detergency-. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* **5**, 451-456.
 30. Zajic, J.E. and C.J. Panchal. 1976. Bio-emulsifiers. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* Nov. 39-66.
 31. Zosim, Z., D. Gutnick, and E. Rosenberg. 1982. Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 Emulsan. *Biotech. Bioeng.* **26**, 281-292.

ABSTRACT: Production of Biosurfactant by *Tsukamurella* sp. 26A

Kyung-Sook Choi, Soon-Han Kim, Young-Ki Jeong¹, Kyung Lip Jang and Tae-Ho Lee*
(Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan, Korea, ¹Department of Microbiology, Dong-Eui University, Pusan, Korea)

The strain producing biosurfactant was isolated from soil. The isolated strain was identified as the genus *Tsukamurella* through its morphological, cultural, physiological, menaquinone type, fatty acid composition characteristics. The highest biosurfactant production by *Tsukamurella* sp. 26A was observed after 4 days cultivation in the culture medium containing *n*-hexadecane 7%, NaNO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.001%, K₂HPO₄ 0.02%, MgSO₄ · 7H₂O 0.02%, CaCl₂ · 2H₂O 0.02%, yeast extract 0.02%(pH 6.8-7.0, 30°C). The surface and interfacial tension of an aqueous solution reached 30 mN/m and 1.5 mN/m, respectively. The biosurfactant stabilized oil-in-water emulsion with a variety of hydrocarbons, edible oils and petroleum oils.