

Pseudomonas aeruginosa JRT-4에 의해 생산된 Biosurfactant의 계면활성 및 환경적 특성

황경아* · 이정래 · 김상종¹ · 김윤석 · 안호정
LG화학 생활과학연구소, ¹서울대학교 미생물학과

Surface-activity and Environmental Characteristics of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4. Hwang, Kyung-A*, Jeong-Rae Lee, Sang-Jong Kim¹, Yun-Seog Kim, and Ho-Jeong Ahn. LG Household and Personal Care Products, Research and Development Institute (Microbiol. Team), Jang-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-343, Korea, ¹Department of Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea - *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4 strain was used as a biosurfactant-producing microorganism in this study. It was one of the microorganisms isolated from the sewage sludge, the main and branch streams of Han river. The surface tension of the culture broth of *P. aeruginosa* JRT-4 decreased to 30 mN/m. The crude biosurfactant was obtained from the culture broth by acid precipitation, solvent extraction, evaporation, and freeze drying. The CMC value of the crude biosurfactant was 0.006% (w/v). From analysis of the chemical structure of biosurfactant, it was determined as rhamnolipid 1 and 3 structures by FAB mass spectrometer. In the washing test for artificially contaminated textiles, the biosurfactant showed better bleachness than the two chemically synthesized surfactants, LAS and SLES. Finally, the biodegradation and ecotoxicological tests showed that the biosurfactant was readily biodegradable in the environment and a mild material for microorganisms and green algae.

Key words: biosurfactant, *Pseudomonas aeruginosa*, rhamnolipids, biodegradation

계면활성제란 분자내에 친수기와 소수기를 함께 지니고 있는 양친매성 분자로서 계면에 선택적으로 배향흡착하여 계면의 성질을 변화시키는 물질을 말한다. 계면활성제는 유수(oil-water)계와 같이 극성이 서로 다른 계의 표면 및 계면장력을 낮춤으로써 습윤, 침투, 기포, 유화, 가용화, 분산 및 세정 등의 작용을 나타내며 이와 같은 특성들로 인해 이미 여러산업 및 생활분야 전반에 걸쳐 가장 많이 사용되는 화학물질 중의 하나가 되었다. 현재 전세계적으로 계면활성제의 시장은 연간 94억 달러 수준에 이르며[15] 2000년도까지 35%의 성장율을 보일 것으로 전망하고 있다[5]. 한편 지금까지 개발된 대부분의 계면활성제는 석유로부터 화학적으로 합성된 화학합성 계면활성제들인데 이들에 대한 소비가 늘어날수록 공해문제 또한 심각하게 대두되고 있는 실정이다. 특히 합성계면활성제를 주원료로 하는 합성세제의 과소비로 자연환경으로 방출된 계면활성제의 양이 늘고 있는데 대부분의 합성계면활성제는 자연분해가 늦고 환경에 미치는 독성이 강하게 나타나 하수나 폐수처리시에 큰 문제가 되고 있다[4]. 합성계면활성제가 일으키는 이러한 단점에 대

한 해결책의 하나로 미생물 유래의 계면활성제인 biosurfactant에 대한 연구가 1970년대에 탄화수소를 발효 원료로 한 "석유발효"의 연구 도중 미생물이 비교적 다량으로 다양한 종류의 계면활성물질을 생산한다는 것이 알려지면서 시작되어 최근까지 꾸준히 이루어지고 있다. 미생물이 생산하는 biosurfactant는 합성계면활성제와는 전혀 다른 생산경로 및 화학구조와 분자형태로 되어 있어 종류와 성질이 다양하고 자연 생태계에 미치는 독성이 거의 없는 것으로 알려져 있다. 또한 생분해능이 우수하기 때문에 환경오염을 감소시켜 산업적, 환경적인 측면에서 합성계면활성제의 단점을 해결할 수 있는 대체물질로서 기대가 모아지고 있다. 초기의 biosurfactant에 대한 연구는 주로 biosurfactant의 성질, 생합성 및 화학적인 특성에 중점을 두었었고 최근에는 발효를 통한 대량생산, 유전공학적인 측면 및 상업적 응용에 관한 연구들이 행해지고 있다[1-3, 17]. 그러나 biosurfactant의 생분해 및 독성에 대한 실제적 평가 및 biosurfactant를 이용한 제품개발 연구는 아직 많이 이루어지지 못한 실정이다. 본 연구에서는 자연계로부터 분리한 biosurfactant 생산균주인 *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4를 이용하여 biosurfactant의 생산특성, 생산된 biosurfactant의 계면활성능 측정 및 구조분석을 수행함과 동시에 실제 bio-

*Corresponding author
Tel. 82-42-860-8731, Fax. 82-42-863-2076
E-mail: kahwang@mail.rnd.lgchem.co.kr

surfactant의 생분해도 및 환경독성을 평가하였다. 또한 biosurfactant에 대한 유화력 시험 및 인공오염포에 대한 세정력 평가를 통해 환경친화적인 세제로의 개발 가능성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

P. aeruginosa JRT-4의 배양

본 연구에 사용된 균주는 한강수계 및 하수종말처리장 등에서 채집한 미생물 시료 중 성장능력 및 계면활성이 우수한 미생물로 oxidase positive, Gram negative 세균이며 자동동정기기(Vitek System)를 이용한 동정 결과 *Pseudomonas aeruginosa*로 판명되었다. 이 균주는 잠정적으로 *P. aeruginosa* JRT-4로 명명되었다. *P. aeruginosa* JRT-4의 배양을 위한 배지조성은 다음과 같다: NH_4NO_3 , 4.0 g/L; KH_2PO_4 , 4.0 g/L; Na_2HPO_4 , 6.0 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001 g/L; yeast extract, 1.0 g/L; glucose, 20.0 g/L; 미량원소 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20.0 $\mu\text{g/L}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 70.0 $\mu\text{g/L}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50.0 $\mu\text{g/L}$; H_3BO_3 , 10.0 $\mu\text{g/L}$. 0.2 μm membrane filtration을 통해 멸균된 glucose 용액 및 미량원소들은 나머지 배지 성분이 멸균된 후 일정 비율로 배지에 첨가되었다. Flask scale로 전배양된 *P. aeruginosa* JRT-4의 배양액은 본 배양액에 1%(v/v) 농도로 접종되어 5 L 및 30 L jar fermentor(한국발효기) 내에서 통기교반하면서 3일간 배양하였다. 배양온도는 37°C로 유지되었다. 배양시간에 따라 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 배양상등액에 대해 KRUSS Processor Tensiometer(KRUSSE GmbH, Germany)의 ring method를 이용하여 표면장력을 측정하였다. 또한 배양 시간에 따른 균수 및 pH의 변화도 함께 측정하였다.

Biosurfactant의 분리 및 TLC 분석

Fermentation과정을 거쳐 *P. aeruginosa* JRT-4로부터 생산된 biosurfactant는 배양액으로부터 원심분리(15,300×g, 30 min.)과정을 거쳐 균체를 제거한 배양상등액으로부터 회수하였다. 배양상등액에 conc.HCl을 첨가하여 pH를 2정도로 저하시켜 침전을 형성시킨 후 침전물을 원심분리하여 0.5M phosphate buffer(pH 7.0)에 현탁시켜 ethyl acetate로 3번 추출하는 과정을 거쳤다. 다시 ethyl acetate층을 모아 evaporation하면 노란색의 oily residue가 남게 되는데 이를 소량의 phosphate buffer에 녹여 동결건조하면 노란색의 biosurfactant powder를 얻게 된다. 회수된 biosurfactant powder의 순도를 알아보기 위해 TLC profile을 확인하였다. 전개용매로는 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}=65:25:4$ 의 혼합용액을 사용하였고 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck) plate를

TLC plate로 사용하였다. 전개가 끝난 plate는 일반적인 유기물들의 분석을 위해 sulfuric acid-molybdate 시약을 분무한 후 80°C에서 1분간 가열하였고, 환원당 성분을 갖는 물질을 detection하기 위해 anthrone 시약을 분무한 후 110°C에서 10분간 가열하여 분리된 spot들을 관찰하였다. 또한 유리 아미노산을 detection하기 위하여 ninhydrin 시약을 분무하였다.

CMC(critical micelle concentration) 측정

Biosurfactant의 CMC는 biosurfactant용액을 연속적으로 일정비율(2-fold dilution)로 희석하여 표면장력을 측정 후 희석비율 vs. 표면장력을 plotting하여 표면장력이 갑자기 증가하는 지점의 희석비율로부터 계산하였다.

구조분석

회수된 biosurfactant시료의 분자량 분석을 위해 FAB(fast atom bombardment) mass spectrometer를 이용하였다. Mass scan range는 m/z 40-2000이었고 ion voltage는 70 eV였다. FAB gas로는 xenone을 사용하였다. Biosurfactant시료의 친수기와 소수기 성분에 대한 화학구조 분석을 위해 75°C, 2N HCl/MeOH에서 15시간 동안의 산분해과정을 실시하였다. 산분해 후 methyl ester형태의 소수성 part는 hexane으로 추출하여 GC-MS(gas chromatography-mass spectrometer)로 분석하였다. 친수성기는 산분해후 diethyl ether로 소수성기를 제거한 후 TMCS(trimethylchlorosilane)과 반응시켜 TMS(tetramethylsilane) 유도체로 만든 후 hexane으로 추출, GC-MS로 분석하였다.

유화력 시험

소수성 탄화수소와 화장품 제조시 많이 이용되는 oil성분에 대해 biosurfactant 시료의 유화 및 유화안정성 test를 Makkar와 Cameotra의 방법[9]에 따라 실시하였다. 탄화수소 및 oil성분 6 ml과 0.5M phosphate buffer에 1 mg/ml의 농도로 녹인 biosurfactant 용액 4 ml을 graduated tube내에서 섞어 2분간 최고속도로 vortex mixing을 한 후 24시간 정치한 다음 혼합물의 총높이에 대한 유화층의 높이비인 $E_m(\%)$, emulsification index를 계산하였다.

세척력 시험

Terg-O-tometer method[10]를 이용하여 biosurfactant 시료 및 LAS(linear alkylbenzene sulfonate), SLES(sodium lauryl ether sulfate) 등에 대한 세척력 시험을 실시하였다. 세척조건은 다음과 같다. 인공오염포는 유성오염(greasy soils, carbon black, iron oxide, kaolin 등)이 도포된 cotton, pc(polyester+cotton) 및

PBV(혼방, Henkel, Germany)포를 이용하였고 각 계면활성제의 농도는 일반세제의 계면활성제 active농도인 0.02%(w/v)로 하였으며 세척시간은 10분, Terg-O-tometer의 교반속도는 200 rpm으로 하였다. 세척력은 세척 후 spectrophotometer(Nippon Den Shoku, Ind., Japan)로 세척된 오염포의 표면반사율을 측정한 후 Kubella-Munk식[10]에 따라 표백력을 계산하였다.

생분해도 평가

Primary biodegradation test(KS M 2714법)[7] 하수처리장에서 활성오니를 채취하여 배양배지내에서 biosurfactant 시료와 함께 순화배양 및 8일간의 본 배양을 실시하면서 거품용량법에 따른 생분해도를 측정하였다. 즉 시료액 50 ml을 마개달린 시험관에 취하고 50회 상하로 크게 흔들어 섞어 30초간 정치한 후 거품용량을 측정하였다.

Ultimate biodegradation test (OECD, 1992)[11] 하수처리장의 2차 방류수를 미생물원으로 사용하여 biosurfactant 시료와 함께 28일간 배양하면서 생분해도를 측정하는 방법으로 OECD 301D closed bottle test 및 OECD 301E, modified OECD screening test를 이용하였다.

환경독성 평가

활성오니 미생물에 대한 독성 평가[16] 활성오니 미생물을 전배양과 본배양과정을 통해 대수성장기에 다다르게 한 후 biosurfactant시료를 일정농도별로 첨가하여 일정시간 후 배양액의 O.D.를 측정하였다. 대조구와 비교하여 미생물의 성장을 50% 감소시키는데 필요한 biosurfactant 시료의 농도(EC₅₀)를 구하였다.

녹조류에 대한 독성 평가(OECD,1992)[11] 초기 세포농도가 10⁴/ml인 녹조류(*Scenedesmus subspicatus*) 배양액에 biosurfactant시료를 일정농도별로 첨가하여 항온진탕배양하면서 24, 48, 72시간마다 세포농도를 측정하였다. 녹조류의 성장을 대조구와 비교하여 50% 감소시키는데 필요한 biosurfactant 시료의 농도(EC₅₀)를 구하였다.

결과 및 고찰

배양특성

Fermentation 기간 동안 배양시간에 따른 세포성장, 배양액의 표면장력 및 pH의 변화는 Fig. 1과 같다. 전배양을 거친 *P. aeruginosa* JRT-4는 본배양 초기부터 세포 성장이 지수적 성장기에 들어가며 12시간 이후에는 휴지기 상태로 들어간다. 배양액의 표면장력은 처음부터 급격히 떨어지다가 12시간 이후부터는 30 mN/m로 유지되었다. 한편 배양액의 표면장력이 최저치를 기록한 때부

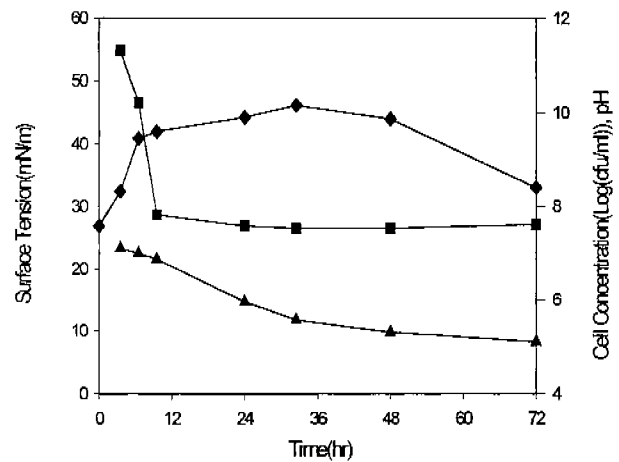


Fig. 1. Growth behavior of *P. aeruginosa* JRT-4 and change of surface tension of culture medium (■—■ : surface tension, ◆—◆ : cell concentration, ▲—▲ : pH)

터 배양상등액을 일정비율로 연속적으로 희석하여 표면장력을 측정하여 표면장력이 갑자기 증가하는 지점의 희석배수를 조사해 본 결과 시간이 경과될수록 희석배수가 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 본 균주의 경우 세포의 지수적 성장과 함께 계면활성물질을 생성할 뿐만 아니라 휴지기에 가서도 CMC(critical micelle concentration)값 이상으로 계면활성물질을 생성하는 것으로 판단되었다. 또한 배양 3일 이후에는 희석배수의 증가비율이 둔화되는 것으로 나타나 배양 후 3일 이후에는 더 이상 계면활성물질이 생성되지 않는 것으로 판단되었다. 일부 *Pseudomonas* sp.에 의한 rhamnolipid의 생산 및 *P. fluorescens* 378에 의한 glycoprotein AP-6의 생산도 세포의 성장과 관련된 형태(growth-associated production)로 나타난다고 보고되어 있다[13, 14].

TLC profile

TLC plate상에 전개된 일반적인 유기물들을 detection하는 sulfuric acid-molybdate 시약 분무 후 $R_f=0.68$ 의 두꺼운 청색 spot과 $R_f=0.78$ 의 얇은 청색 spot을 확인할 수 있었다. 또한 환원당 성분을 포함하는 물질을 선택적으로 detection하는 anthrone 시약 분무시 $R_f=0.72$ 에서 갈색의 두꺼운 spot, $R_f=0.78$ 에서 옅은 갈색의 spot이 관찰되었다. 그 밖의 다른 spot들은 detection되지 않았고, ninhydrin 시약 분무 후 아무런 spot도 관찰되지 않았다. 따라서 본 biosurfactant는 최종적으로 ethyl acetate층으로 추출된 oily한 성분으로서 당부분을 포함하는 두 종류의 물질로 구성되어 있는 것으로 추정되었다.

CMC

배양액으로 부터 산침전 및 용매추출을 통해 얻어진 biosurfactant 시료에 대한 CMC는 Fig. 2에서와 같이

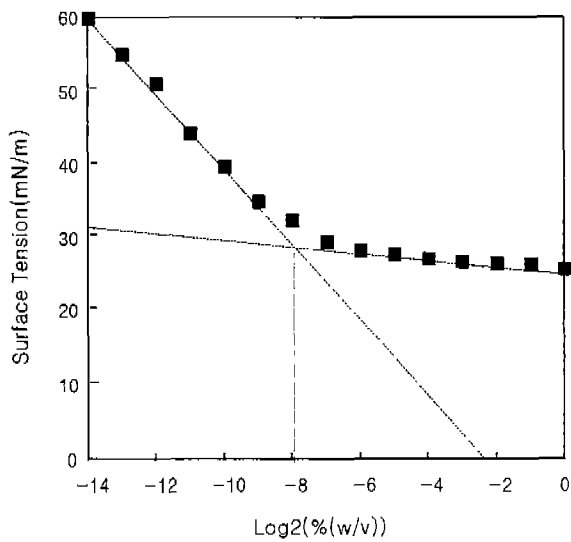


Fig. 2. Surface tension of biosurfactant solution on concentration.

0.006% (w/v)인 것으로 나타났다. 이 때의 최소 표면장력은 30.4 mN/m였다. 지금까지 알려진 *Pseudomonas* sp.들의 표면장력 저하능은 25-30 mN/m이며 정제된 rhamnolipids의 CMC는 0.1-10 ppm수준인 것으로 알려

져 있다[6, 12].

화학구조

Biosurfactant에 대한 FAB mass spectrometer의 mass spectrum에서 m/z 689.4, 727.4 그리고 543.5의 주요 peak를 얻었다(Fig.3). 이는 각각 $(M_1+K)^+$, $(M_1+2K)^+$, $(M_2+K)^+$ 에 해당되며 M_1 과 M_2 는 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 기존의 rhamnolipids의 구조 중 R3와 R1의 분자량과 일치하는 것으로 판단되었다. 산분해된 biosurfactant 시료에 대한 GC-MS 분석 결과 소수성 부분은 3-hydroxydecanoic acid인 것으로 나타났다. 이는 3-hydroxydecanoic acid의 mass library spectrum과 일치하는 것이었다. 친수성 부분은 6-deoxy-L-mannose로 나타났는데 이것 역시 rhamnose standard와 일치하였다. 위의 결과로부터 M_1 은 친수기에 두분자의 rhamnose와 소수기에 두분자의 3-hydroxydecanoic acid가 ester 결합으로 연결된 rhamnolipid 3(R3,분자량)의 구조와 일치하며 M_2 는 한분자의 rhamnose와 두분자의 3-hydroxydecanoic acid로 이루어진 rhamnolipid 1(R1, 분자량)의 구조와 일치하는 것으로 판단되었다(Fig. 4).

유화력

```

[ Mass Spectrum 1
Data : Bio]                               Date : 28-Nov-96 13:48
Sample: Biosurfactant(96.11.17), hka
Note : GL
Inlet : Direct                             Ion Mode : FAB
Spectrum Type : Regular (HF-Linear)
RT : 0.14 min                               Scan# : (1,2)
BP : m/z 689.4402                           Int. : 16.16
Output m/z range : 500.0200 to 800.3330    Cut Level : 0.00 %
    
```

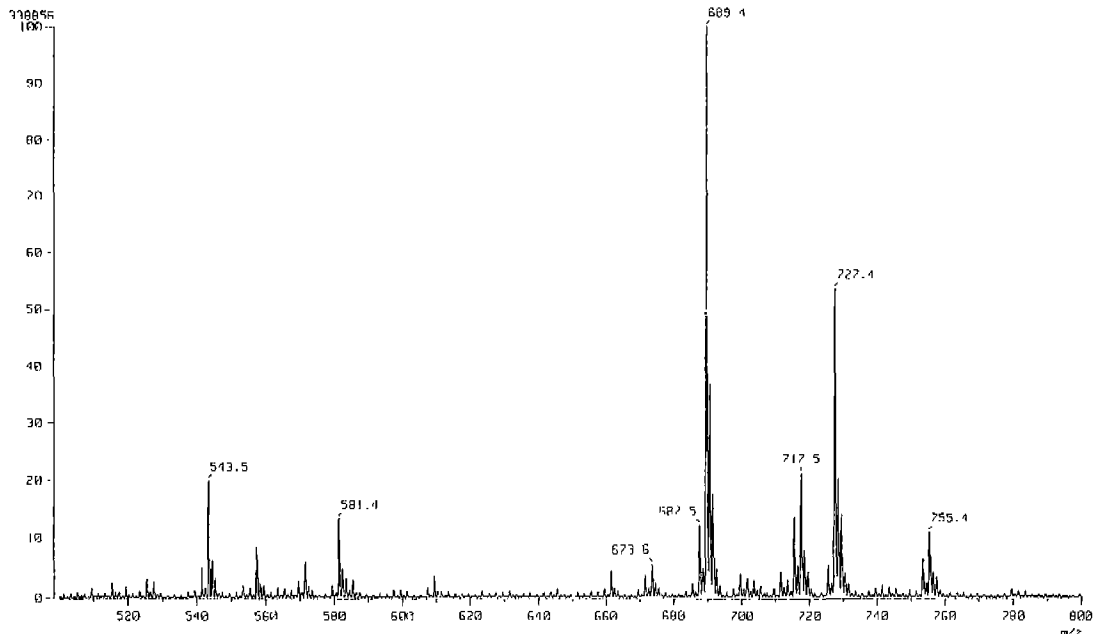


Fig. 3. FAB/Mass spectrum of biosurfactant.

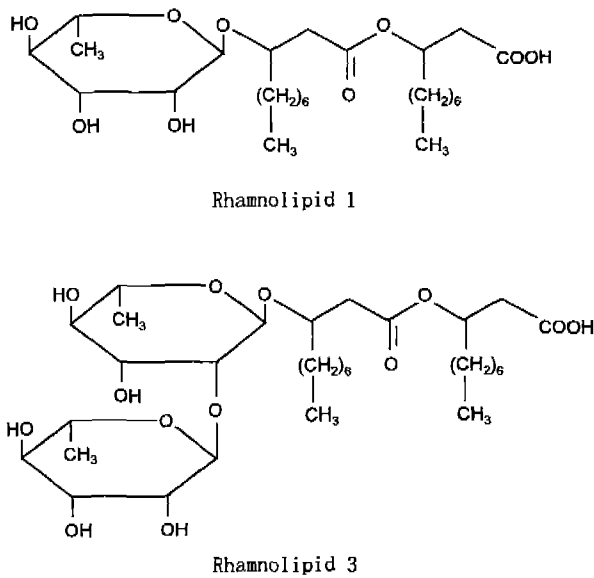


Fig. 4. Chemical structures of rhamnolipids.

Table 1. Emulsification index, $E_{24}(\%)$, for various hydrophobic hydrocarbons and oils frequently used in cosmetic formulations

Hydrocarbons	$E_{24}(\%)$	Oils	$E_{24}(\%)$
Decane (C ₁₀)	67.5	Caprylic/capric triglyceride	66.7
Dodecane (C ₁₂)	62.5	Octyl dodecyl myristate	65.7
Tetradecane (C ₁₄)	56.6	Liquid paraffin (10)*	69.6
Pentadecane (C ₁₅)	52.5	Silicone (11)	71.7
Hexadecane (C ₁₆)	53.1	Silicone, cyclic (7-8)	66.7
Heptadecane (C ₁₇)	57.9	Ester oil	68.9
		Olive oil	66.7
		Jojoba oil (6-7)	71.7
		Squalene	68.9

*HLB(hydrophilic lipophilic balance) values: The higher the HLB value of a given emulsifier the more water soluble it is.

각종 탄화수소 및 오일류에 대한 biosurfactant 시료의 emulsification index, $E_{24}(\%)$ 는 Table 1과 같다. 탄화수소류에 대한 $E_{24}(\%)$ 는 decane(C₁₀)에서 pentadecane(C₁₅)까지 탄소수가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였고 hexadecane(C₁₆)과 heptadecane(C₁₇)에서는 다시 증가하였다. 화장품 제조시 많이 사용되는 오일류에 대한 유효력은 오일종류에 관계없이 전반적으로 biosurfactant의 유효력이 높은 것으로 나타났다. 특히 Jojoba oil, paraffin oil과 silicone oil에 대한 유효력이 높은 것으로 나타났다. 오일류의 극성 정도를 나타내는 parameter 중의 하나인 HLB(hydrophilic lipophilic balance) 값은 Jojoba oil의 경우 6-7, paraffin oil의 경우 10, silicone oil의 경우 11을 나타내며 HLB값이 클수록 계면활성제의 수용성이 증가된다. 유효는 화장품 제조시 계면활성제의 기능 중 가장 중요한 요소 중의 하나인데 오일성분의 HLB

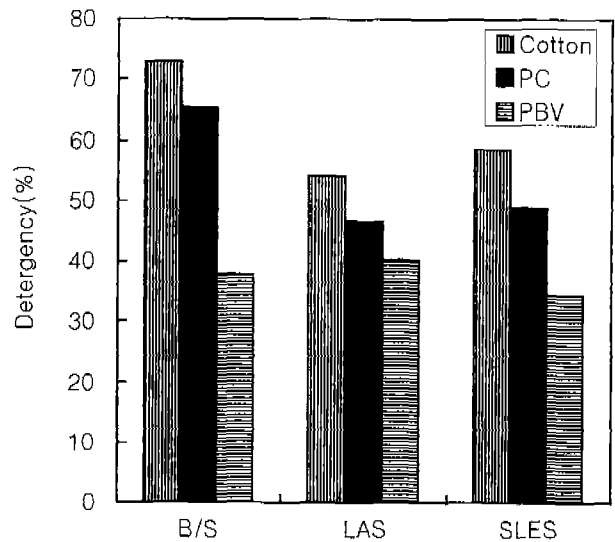


Fig. 5. Detergency activity of biosurfactant, LAS and SLES.

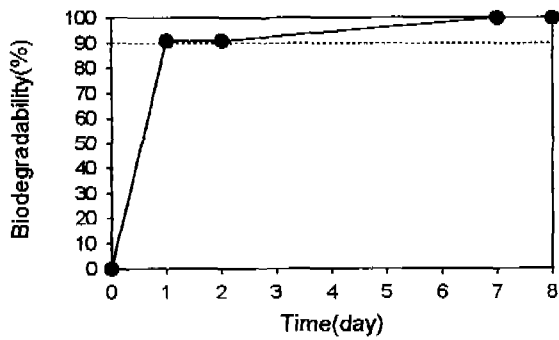
값에 관계없이 여러종류의 오일에 대한 biosurfactant의 유효능이 우수한 것으로 나타나 화장품제조로의 응용 가능성이 높다고 할 수 있다.

세척력

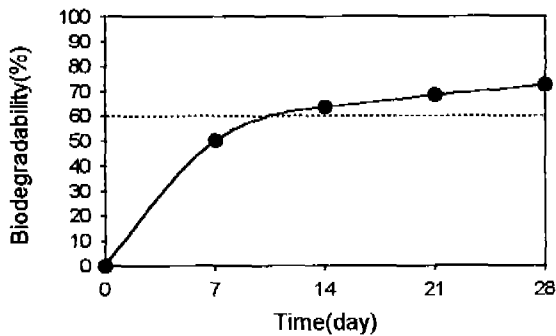
인공오염포에 대한 biosurfactant의 세척력은 LAS와 SLES에 비해 전반적으로 우수한 것으로 나타났다. 특히 cotton과 pc오염포에 대한 biosurfactant의 세척력이 우수하였고 PBV오염포에 대해서는 세 계면활성제의 세척력이 가장 낮으며 비슷한 수준인 것으로 나타났다. 유사한 유성오염성분임에도 불구하고 오염포의 종류에 따라 세척력면에서 차이가 나는 것을 알 수 있다(Fig. 5). Biosurfactant의 유성오염에 대한 세척력이 높게 나타난 것은 유효력 시험에서도 확인한 바와 같이 소수성 탄화수소 및 각종 오일성분에 대한 유효능이 우수하기 때문인 것으로 판단된다.

생분해도

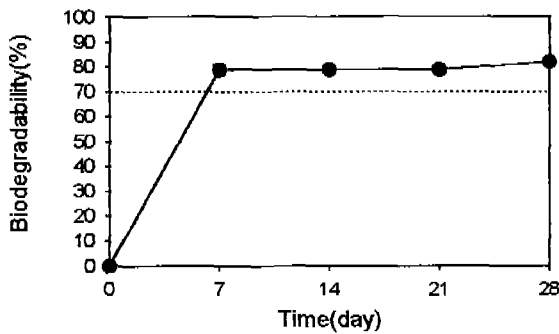
계면활성제가 계면활성능을 상실하기 까지 분해되는 정도를 평가하는 Primary biodegradation test인 KS M2714 생분해 시험 결과 biosurfactant시료의 생분해도는 1일 이내에 90%이상, 7, 8일 평균 100%인 것으로 나타났다. 이는 기존에 생분해도가 우수한 것으로 확인된 SLS(sodium lauryl sulfate)나 SLES(sodium lauryl ether sulfate)의 초기 생분해도와 비슷한 수준으로[8] 하수처리율이 낮고 강의 길이가 짧은 우리나라 환경에 적합한 생분해능을 가진 것으로 판단된다. CO₂와 H₂O로 최종 생분해되는 정도를 평가하는 ultimate biodegradation test의 결과 biosurfactant의 최종생분해도는 OECD 301D, closed bottle test에서 72.6%, OECD 301E, modi-



(a) Primary biodegradation test : KS biodegradation test



(b) Ultimate biodegradation test : closed bottle test



(c) Ultimate biodegradation test : modified OECD screening test

Fig. 6. Biodegradation test of biosurfactant.

fied OECD screening test에서는 82%인 것으로 나타났다(Fig. 6). 한편 Table 2에서 보면 biosurfactant의 최종생분해도가 SLS, SLES 및 AOS의 최종 생분해도에 비해서 약간 낮은 수치로 나타났는데 이는 합성계면활성제에 비해 biosurfactant의 분자량이 높고 상대적으로 부피가 큰 구조를 가지기 때문인 것으로 판단된다. 그러나 상기의 두가지 최종생분해 시험은 pass level을 통과하는 시험물질에 대해 자연환경에서 쉽고 빠르게 생분해되는 것으로 규정하는 ready biodegradation test로, 본 시험

Table 2. Biodegradability of biosurfactant and chemically-synthesized surfactants (%)

Surfactants	Biodegradability		Ultimate biodegradation
	Primary biodegradation 1 day	7, 8 days	
Biosurfactant	91.0	100.0	72.6
SLS (sodium lauryl sulfate)	99.6	99.9	88.0
SLES (sodium lauryl ether sulfate)	99.5	99.9	85.0
AOS (sodium alpha olefin sulfonate)	68.3	99.5	80.0
LAS (linear alkyl benzen sulfonate)	17.4	98.1	63.0

Table 3. Algal toxicity of biosurfactant and other chemically-synthesized surfactants (ppm)

	Biosurfactant	SLS	SLES	AOS	LAS
EC50*	52	36-52	6	17-20	79-105

*EC50: Effect concentration, the concentration of the test substance dissolved in water that results in a 50% reduction in reproduction.

에서 평가된 biosurfactant는 환경에서 빠르고 쉽게 생분해 되는(rapidly and ultimately biodegradable in the environment) 물질로 평가할 수 있다.

환경독성

Biosurfactant시료의 환경독성 평가를 위해 활성오니 미생물과 녹조류에 대한 독성평가를 실시한 결과 대수층 식기에 있는 미생물과 녹조류의 성장을 대조구와 비교하여 50% 감소시키는데 필요한 농도인 EC₅₀값은 활성오니 미생물의 경우 3,311 ppm, 녹조류에 대해서는 52.2 ppm으로 확인되었다. 일반 합성계면활성제들의 미생물에 대한 EC₅₀값은 수 ppm~수백 ppm 정도이나 biosurfactant의 경우 수천 ppm 수준으로 나타난 것은 합성계면활성제에 비해 분자량이 크고 미생물로부터 유래된 특성으로 인해 활성오니 미생물에 대해 낮은 독성을 나타내는 것으로 판단된다. 반면 녹조류에 대한 결과는 일반적인 화학합성 계면활성제의 경우와 비슷한 독성정도를 나타내는 값으로 평가되었다.

요 약

본 연구에서 계면활성제 생산균주로 사용된 *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4는 한강수계 및 활성오니에서 분리된 미생물 중의 하나이다. *P. aeruginosa* JRT-4의 배양액의 표면장력은 30 mN/m로 감소되었다. 배양액으로부터 biosurfactant는 산침전, 용매추출, 분별증류 및

동결건조 과정을 통해 분리되었다. 분리된 biosurfactant의 CMC값은 0.006% (w/v)인 것으로 나타났다. FAB mass spectrometer를 통한 화학구조 분석에서 본 biosurfactant는 rhamnolipid 1과 3의 구조를 갖는 것으로 나타났다. 인공오염포에 대한 세척력 시험에서 biosurfactant는 합성계면활성제인 LAS와 SLES에 비해 세척력이 우수한 것으로 나타났다. 생분해 및 환경독성 평가에서 본 biosurfactant는 환경에서 쉽게 분해되는 물질이며 미생물과 녹조류에 대한 독성이 낮은 물질인 것으로 평가되었다.

감사의 글

본 연구는 선도기술개발사업('95.8-'98.7) 중 신기능 생분소재 기술개발의 일환으로 이루어졌습니다.

REFERENCES

- Cooper, D. G. 1986. Biosurfactants. *Microbiol. Sci.* **3**: 145-149.
- Desai, J. D. 1987. Microbial surfactants: Evaluation, types and future applications. *J. Sci. Ind. Res.* **46**: 440-449.
- Desai, J. D. and A. J. Desai. 1993. Production of biosurfactants, pp. 65-67. In N. Kosaric(ed.), *Biosurfactants: Production, Properties, Applications*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Duvnjak, Z., D. G. Cooper, and N. Kosaric. 1982. Production of surfactant by *Arthrobacter paraffineus* Aicc 19558. *Biotechnol. Bioeng.* **24**: 165-17516.
- Greek, B. F. 1991. Sales of detergents growing despite recession. *Chem. Eng. News* **69**: 25-52.
- Hisatsuka, K., T. Nakahara, N. Sano, and K. Yamada. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: Its function in hydrocarbon fermentations. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 686-692.
- KS. 1992. Testing method for biodegradability of synthetic detergent. Korea Industrial Standard.
- Lee, M. H., D. W. Baek, J. R. Lee, and Y. K. Kim. 1993. Biodegradation of anionic surfactants in continuous activated sludge, semicontinuous sludge and shake culture. *Korean J. Limnol.* **26**: 101-104.
- Makkar, R. S. and S. S. Camcootra. 1997. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 37-42.
- Minakawa, M. 1987. *Senzai Senjounojiten*, chap. 8. Asakurashoten.
- OECD. 1992. Guideline for testing of chemicals. Organization for Economic Co-operation and Development.
- Parra, J. L., J. Guinea, M. A. Manresa, M. Robert, M. E. Mercade, F. Comelles, and M. P. Bosch. 1989. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **66**: 141-145.
- Persson, A., E. Oesterberg, and M. Dostalek. 1998. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: Growth and product characteristics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 1-4.
- Robert, M., M. E. Mercade, M. P. Bosch, J. L. Parra, M. J. Espuny, M. A. Manresa, and J. Guinea. 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T. *Biotechnol. Lett.* **11**: 871-874.
- Shaw, A. 1994. Surfactants-94. *Soap Cosmet. Chem. Specialities* **70**: 24-34.
- Strotmann, U. J., H. Eglsaer, and U. Pagga. 1994. Development and evaluation of a growth inhibition test with sewage bacteria for assessing bacterial toxicity of chemical compounds. *Chemosphere* **28**: 755-766.
- Syldatk, C. and F. Wagner. 1987. Production of biosurfactants, pp. 89-120. In N. Kosaric, W. L. Cairns, and N. C. C. Gray(eds.), *Biosurfactants and Biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

(Received September 27, 1998)