

생물 계면활성제를 생산하는 *Pseudomonas* sp. G314의 특성

심소희 · 박경량*

한남대학교 생명나노과학대학 생명공학과

대전일원의 유류오염 지역의 토양으로부터 원유를 단일 탄소원으로 이용하는 총 322균주를 순수분리 하였고, 이중 생물 계면활성제(biosurfactant) 생성능이 가장 우수한 한 균주를 최종 선별하여 형태 및 생리·생화학적 특성을 조사하고 16S rRNA 염기서열을 분석을 통하여 동정한 결과 *Pseudomonas* sp.로 확인되어 *Pseudomonas* sp. G314라 명명하였다. 최종 선별된 *Pseudomonas* sp. G314는 암피실린, 클로람페니콜, 스펙티노마이신, 스트렙토마이신 등의 항생제와 Li, Cr, Mn 등의 중금속에 대해 강한 내성을 갖고 있었고, 최적 온도와 pH는 각각 30°C와 pH 7.0으로 확인되었다. *Pseudomonas* sp. G314가 생성하는 생물 계면활성제의 초기 표면장력은 72 dyne/cm이었으나, 배양 7시간 후 부터는 표면장력이 최대 25 dyne/cm 까지 감소되었다. *Pseudomonas* sp. G314가 생산하는 생물 계면활성제를 회수하고 농축하기 위해, 산 침전 후에 유기용매로 배양액을 추출하고 이를 감압농축하여 얻은 시료를 crude biosurfactant로 사용하여 CMC (critical micelle concentration) 값을 측정 한 결과 20 mg/L로 확인되었다.

Key words □ biosurfactant, critical micelle concentration(CMC), *Pseudomonas* sp. G314, surface tension

계면활성제란 한 분자 내에 친수성기와 소수성기를 함께 갖는 양친매성분자로서 표면이나 계면의 성질을 변화시켜 표면장력을 감소시키는 물질이다. 표면장력은 액체, 기체와 같은 성격이 다른 두 상이 서로 인접하여 있을 경우 액체의 계면이 수축하려는 힘을 말한다. 이때, 그 상이 물인 경우 계면활성제는 물 분자의 결합을 약화시키며 계면활성제의 농도가 증가함에 따라 외측에 친수성부위, 내측에는 소수성 부위를 가진 마이셀(micelles) 구조를 형성하게 되고, 탄화수소와 같은 소수성용액에 존재할 경우에 에멀전(emulsion)을 형성하기도 한다. 이러한 특징으로 인하여 계면활성제는 분산성, 유화성, 침투성, 습윤성, 기포형성 등이 나타난다. 따라서 계면활성제는 석유탄화수소의 탈착과 용해도를 증가시켜 미생물에 의한 생분해를 가능하게 한다(8, 11).

계면활성제는 초기에는 유지로부터 소량 합성되었으나 현재에는 석탄, 석유 등에서 화학합성 계면활성제(chemical surfactant)가 산업적으로 대량 생산되고 있고, 이들은 전기·전자, 건설, 기계, 인쇄, 제지, 섬유 등 각종 산업에 폭 넓게 이용되고 있다. 그러나 화학합성 계면활성제는 제조과정이 복잡하고, 물 위에 거품을 형성하며 햇빛과 산소를 차단하여 물 속 생태계를 위협할 뿐 아니라, 세척력을 높이기 위하여 첨가하는 인은 인산염이 되어 부영양화 현상을 발생시켜 물을 오염시키고, 또 난분해성으로 생분해도가 극히 낮기 때문에 생태계에 축적되어 강한 독성을 나타내므로 심각한 환경문제를 야기시킨다. 이에 반해 효모, 곰팡이, 박테리아 등 미생물 균주에 따라 세포 외 또는 세포 내에

생산되는 생물 계면활성제(17)는 화학합성 계면활성제에 비해 무독성으로 생분해가 용이한 친환경적 물질이다. 뿐만 아니라 생물 계면활성제는 기존의 방법으로는 합성하기 어려운 복잡한 화학 구조를 갖고 있어 특수한 목적으로 사용될 수 있고, 표면장력 저하능력, 온도, pH에 대한 안정성 등 계면활성제의 물리·화학적 면에서 기존의 화학합성 계면활성제와 거의 대등한 효과를 갖고 있어 사용가치가 매우 높은 물질이다. 실제 생물 계면활성제는 의약품, 식품, 화장품, 세제, 원유의 2차 회수, 펄프와 제지 산업, 육상과 해상의 유류 오염 정화, 처리조의 유지방 분해 등 화학합성 계면활성제가 사용되는 대부분의 다양한 산업분야에서 사용되고 있다(15, 26).

따라서 이와 같은 장점을 갖는 생물 계면활성제에 대한 연구가 전 세계적으로 활발하게 진행되어 많은 종류의 생물 계면활성제가 보고되었다. 이들 생물 계면활성제 중 *Pseudomonas* sp.가 생산하는 rhamnolipid 계열의 계면활성제(14, 27)와, *Bacillus subtilis*가 생산하는 surfactin (2) 그리고 *Acinetobacter calcoaceticus*가 생산하는 emulsan (25) 등이 가장 잘 알려져 있다. 이들 중 상용화된 가장 대표적인 것은 미국의 Petroferm사가 생산하는 Emulsan으로, 이 제품은 원유 회수, 송유관을 통한 원유의 이송 그리고 전자 기관의 3차 세척 등 많은 분야에서 다량 사용되고 있다(26). 또 *Torulopsis* sp.로부터 생산되는 생물 계면활성제는 강력한 보습효과가 있어 화장품 산업에 응용되고 있다(15).

본 연구는 이와 같이 여러 분야에 친환경적이며 다양한 용도로 사용될 수 있는 생물 계면활성제를 산업적으로 활용하기 위한 연구의 일환으로, 생물 계면활성제 생성이 우수한 *Pseudomonas* sp.를 자연계에서 분리, 동정하여 이 균주의 생리·화학적 특성과 최적의 생성 조건을 조사하고, 이 균주가 생산하는 생물 계면활

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-629-7626, Fax: 042-629-8355
E-mail: krpark@hannam.ac.kr

성제의 특성을 파악하여 추후 상업적으로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 사용 배지

대전 지역의 자동차 정비소, 세차장, 주유소, 폐차장 등 유류에 오염된 토양을 채취하여 각각의 토양 1 g을 멸균 생리식염수 100 ml이 들어있는 250 ml 삼각 플라스크에 넣고 30°C에서 1시간 진탕한 후, 단일 탄소원으로 2% crude oil이 첨가된 bushnell-hass (magnesium sulfate 0.2 g/L, calcium chloride 0.02 g/L, monopotassium phosphate 1.0 g/L, ammonium phosphate dibasic 1.0 g/L, potassium nitrate 1.0 g/L, ferric chloride 0.05 g/L pH 7.0) 최소 평판배지에 현탁액을 접종하여 2-3일 배양한 다음 총 322 균주의 단일 콜로니를 분리하였다. 분리된 세균집락들은 1% tributyrin이 첨가된 고체 배지(peptone 5 g/L, yeast extract 3 g/L, pH 7.0)에 접종하여 30°C에서 2-3일간 배양한 후, 세균집락 주위에 투명환을 넓게 생성하는 11균주를 일차 선별하였고, 일차 선별된 균주 중 Luria-Bertani (LB) 배지(tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, sodium chloride 5 g/L, pH 7.0)에서 배양 후, 가장 낮은 표면장력을 갖는 한 균주를 최종 선별하여 본 실험에 사용하였다.

생리·생화학적 특성 조사

최종 선별된 균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology (16)와 LWW's Organism Central (23) 및 Biochemical tests for identification of medical bacteria (19)에 의거하여 형태, 생리 및 생화학적 특성을 조사하고, 당 이용능, 증균속과 항생제 내성 등의 균주 특성도 조사하였다.

16S rRNA 염기 서열 조사

최종 선별 균주의 정확한 동정을 위해 최종 선별균주의 genomic DNA를 CTAB 방법(29)으로 추출하고, 이 DNA를 주형으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 조사하였다. 이때 선별 균주의 16S rDNA를 증폭하기 위해 forward primer; 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' (27F)와 reverse primer; 5'-GGT TAC CTT TGT TAC GAC TT-3' (1492R)를 사용하고 (BIONEX), 염기서열은 ABI 310 (Applied Biosystem, USA)을 사용하여 분석하였다. 이렇게 분석된 rDNA 염기서열은 BLAST search (www.ncbi.nih.gov/BLAST/)를 사용하여 비교, 분석하였다.

생육조건 조사

LB 영양배지에 균을 접종하여 각각 25°C, 30°C, 37°C, 42°C로 조정된 배양기에서 진탕 배양하면서 각각의 표면장력과 균체 생성량을 측정하였다. 이때, 균체량의 측정은 배양액의 일정량을 분취한 후 UV-spectrophotometer (SmartSpec3000, Bio-Rad, USA)를 이용하여 600 nm에서 측정하였다. 최적 pH는 LB 영양

배지에 1 N HCl과 1 N NaOH를 각각 첨가하여 pH 2-12로 조정된 후, 전배양한 균액을 일정량 접종하여 진탕 배양하며 초기 pH 차이에 따른 표면장력과 균체 생성량을 측정하였다. 또한, 배양시 용존산소가 생물 계면활성제 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 영양액배지 양을 250 ml 삼각 플라스크에 각각 30 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml, 150 ml로 달리하여 전배양액을 일정량 접종하고, 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양한 후 균체의 생육도와 표면장력을 측정하였다. 그리고 NaCl의 농도에 따른 최종 선별균주의 성장과 생물 계면활성제 생산에 대한 영향 조사는 NaCl의 농도가 각각 1%, 2%, 3%, 4%, 5%가 되도록 첨가한 LB 영양배지에 전배양한 배양액을 일정량 접종하고 30°C에서 진탕배양하며 표면장력과 균체 생성량을 측정하여 조사하였다.

표면장력 측정

LB 영양배지에서 OD₆₀₀=1.0까지 전배양한 균주 5 ml을 500 ml LB 배지에 접종한 후 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양하며 배양시간에 따라 시료를 일정량 채취하였다. 채취한 시료는 원심분리기(supra22K, Hanil Science, Korea)로 원심분리(13,000×g, 10분)하여 균체를 제거한 후, surface tensiometer (CBVP-A3, FACE, Japan)를 사용하여 plate 방법(3)으로 25°C에서 3회 반복하여 표면장력을 측정하였다.

유화활성 및 유화 안정성 조사

일반적으로 사용되는 유류성분인 소수성 탄화수소에 대한 생물 계면활성제의 유화활성 및 유화안정성 실험은 Cirigliano와 Carman (7)의 방법에 따라서 실시하였다. 이때, 생물 계면활성제의 용액으로는 배양용액의 원심분리(13,000×g, 10분)를 통하여 균체를 제거한 배양 상등액을 이용하였다. 상등액 2 ml를 시험관에 넣고, 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 2 ml과 혼합한 후 각각의 기질을 1 ml 넣고 1분간 강하게 교반하여 유화시킨 다음 10분간 정지한 후 540 nm에서 현탁도를 측정하였다. 유화안정성은 유화활성 측정 시와 동일한 방법으로 처리한 후에, 실온에서 방치하면서 매 10분마다 60분간 540 nm에서의 현탁도를 측정하여 Log 값으로 환산하여 나타내고, 그 때의 기울기를 유화활성의 안정도 상수 Kd (시간당 붕괴되는 유화활성의 기울기 값)로 나타내었다.

생물 계면활성제 정제

최종 선별된 균의 전 배양용액을 1 L의 영양배지에 접종하여 30°C에서 진탕 배양한 후 아래와 같이 추출 및 정제하였다. 배양 용액은 원심분리(13,000×g, 10분)를 통하여 균체를 제거한 상등액에 1 N HCl 용액을 서서히 가하면서 pH가 2.0이 되도록 조정하였다. pH를 조정된 상등액을 동량의 chloroform : methanol (2 : 1)을 가하여 저어주면서 4°C에서 하룻밤 방치하여 추출하였다. 그 후에 분액 깔대기를 통하여 유기용매층만을 회수하여 rotary vacuum evaporator (N-N series, Eyela, Japan)로 농축하여 생물 계면활성제를 부분 정제하였다. 전체적인 과정은 Fig. 1에 표시하였다.

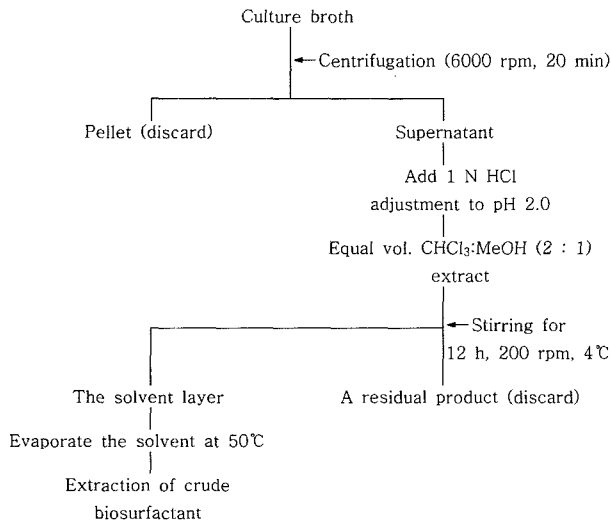


Fig. 1. Isolation and purification steps of biosurfactant from culture broth.

생물 계면활성제의 CMC (Critical micelle concentration) 측정

생물 계면활성제의 CMC는 부분 정제된 생물 계면활성제 분말을 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)에 일정 농도씩 희석하면서 표면장력을 측정하였다. 이때, 희석비율에 따라 표면장력이 갑자기 증가하는 지점의 농도를 CMC 값으로 결정하였다.

생물 계면활성제의 용해도 측정

각종 유기용매를 이용하여 각 유기용매에 대한 부분 정제된 생물 계면활성제의 용해도를 측정 하였다. 부분 정제된 생물 계면활성제를 각종 유기용매에 소량씩 첨가하여 강하게 교반한 후 용해된 정도를 육안으로 확인하여 결정하였다.

결 과

최종 선별 균주의 특성 및 동정

대전 지역의 자동차 정비소, 세차장, 주유소, 폐차장 등 유류에 오염된 토양에서 총 322균주의 단일 콜로니를 분리한 후, 1% tributyrin이 첨가된 고체배지에 접종하여 세균집락 주위에 투명환을 넓게 생성하는 11균주를 일차 선별하고, 선별된 균주 중 가장 낮은 표면장력을 갖는 한 균주를 최종 선별 하였다. 최종 선별된 균주는 형태학적 특성 조사 결과 이 균주는 포자를 생성하지 않는 호기성 그람 음성 간균으로 citrate를 단일 탄소원으로 이용할 수 있었고, gelatin 분해능, oxidase와 catalase의 생성능, starch와 casein 분해능이 있었음을 확인하였다(Table 1). 당 이용능 실험 결과 최종 선별균주는 fructose, glucose, mannitol, mannose, ribose를 이용할 수 있었으며, arabinose, glucose, mannitol, mannose, ribose, xylose는 발효할 수 있음도 확인하였다(Table 2). 이상의 생리·생화학적 결과와 최종 선별균주의 정확한 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 조사한 결과, 본 실험에서 최종 선별된 균주는 *Pseudomonas sp.*와 98%의 상동성

Table 1. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of *Pseudomonas sp.* G314

Characteristics		Characteristics	
Gram	-	Gelatin	+
Spore	-	Oxidase	+
Shape	rod	Catalase	+
Colony color	yellow	Starch	+
Colony Form	circular	Urease	-
Colony Elevation	convex	Hydrogen sulfide	-
Colony Margin	entire margin	Casein	+
Motility	+	Methyl red	-
Indole	-	Voges-proskauer	-
Citrate	+	Macconky's	-
Nitrate	-	Eosin methylene blue	-
		Fluorescence	-

+, positive; -, negative

Table 2. Utilization and fermentation of various carbon sources in *Pseudomonas sp.* G314

Carbon source	Utilization	Carbon source	Fermentation
Arabinose	-	Arabinose	+
Cellobiose	-	Cellobiose	+
Fructose	+	Fructose	+
Galactose	-	Glucose	+
Glucose	+	Lactose	+
Glycine	-	Maltose	-
Lactose	-	Mannitol	-
Maltose	-	Mannose	-
Mannitol	+	Rhamnose	+
Mannose	+	Ribose	+
Rhamnose	-	Sucrose	+
Ribose	+ ^w	Trehalose	-
Sucrose	-	Xylose	-
Trehalose	-		
Xylose	-		

Utilization: +, growth; -, no growth; W, weak growth

Fermentation : +, positive; -, negative

을 보여(Accession No. AY689030), *Pseudomonas sp.* G314라 명명하였다. 그리고 최종 선별된 *Pseudomonas sp.* G314의 항생제와 중금속 내성을 조사한 결과 *Pseudomonas sp.* G314는 streptomycin, spectinomycin, chloramphenicol 그리고 ampicillin 항생제에서 비교적 강한 내성을 나타냈고, 또 Co, Ba, Cu, Ni, Mn, Cr과 Li의 중금속에서 비교적 높은 내성을 갖고 있음을 확인하였다(Table 3).

생육 특성

Pseudomonas sp. G314의 배양학적 특성을 조사한 결과, 30°C에서 성장이 가장 우수하였고, 온도에 따른 표면장력 활성은 15°C에서 30°C 사이에서 가장 우수하였다. 따라서 *Pseudomonas sp.* G314의 배양의 최적 온도는 30°C로 확인되었다(Fig. 2). 그리고 배지의 초기 pH에 따른 생물 계면활성제의 생산을 조사한 결과, pH 5부터 9까지 동일하게 우수한 표면장력 활성이 확인되

Table 3. Susceptibility of *Pseudomonas* sp. G314 to various antibiotics and heavy metals

Antibiotics	MIC (µg/ml)	Heavy metals	MIC (µg/ml)
Ampicillin	700	Ba	800
Chloramphenicol	400	Cd	50
Kanamycin	5	Co	400
Spectinomycin	200	Cr	1600
Streptomycin	300	Cu	800
Tetracycline	10	Hg	50
		Li	12800
		Mn	1600
		Ni	800

어(Fig. 3) 본 균주가 생성하는 생물 계면활성제는 넓은 pH 범위에서 활성이 있음을 알 수 있었다. 또한 배양시 플라스크 내 배지 양에 반비례하여 표면장력이 낮아지고 균체생성량이 많아지는 것으로 보아, 배지 내에 용존산소가 많을수록 생물 계면활성제 생성이 우수함을 알 수 있었다(Table 4). 그리고 *Pseudomonas* sp. G314를 해양지역에서의 계면활성제나 유화제로 사용할 수 있는 적용 가능성을 검토하기 위하여 영양액체배지에 NaCl의 농

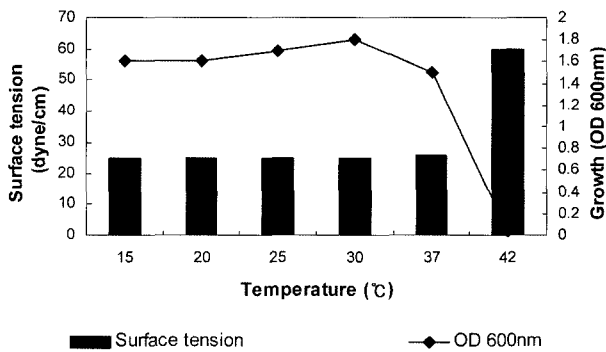


Fig. 2. Effect of temperature on the production of biosurfactant. Cells were cultured for 24 hr at 25°C, 30°C, 37°C, and 42°C.

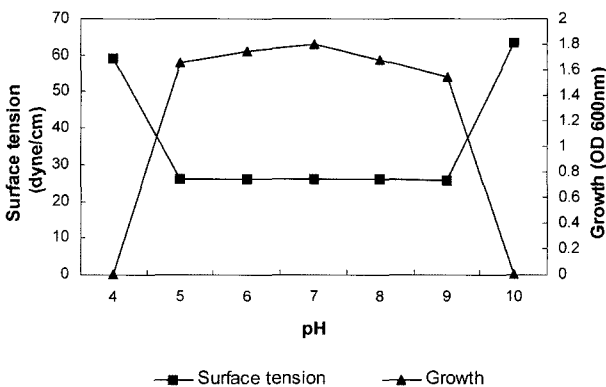


Fig. 3. Effect of pH on the production of biosurfactant and growth by *Pseudomonas* sp. G314. The pH values of media were adjusted by addition of 1 N HCl or 1 N NaOH. Surface tension and growth were determined after reciprocal shaking (200 rpm) at 30°C for 24 hr.

Table 4. The effect of aeration on the production of biosurfactant

Medium volume (ml) ^a	Growth (g/L) ^b	Surface tension (dyne/cm)
30	1.835	25.7
50	1.335	26.3
75	1.000	26.6
100	0.650	26.7
150	0.650	27.0

^aMedium volume (ml) in 250 ml shaking (200 rpm) flask.

^bThe cell pellet was washed once with distilled water, dried at 105°C for at least 24 h, and weighed.

도를 1%, 2%, 3%, 4%, 5%로 조정하여 표면장력을 조사한 결과 1%에서 3%까지의 NaCl 농도에서 25.8 dyne/cm에서 27.5 dyne/cm의 표면장력을 나타내 본 실험에 사용된 균주는 해양에서도 활용할 수 있음을 확인하였다(Fig. 4).

생물 계면활성제의 유화능

Pseudomonas sp. G314의 증식과 생물 계면활성제 생성과의 상관관계를 알아보기 위해 배양시간에 따른 생물 계면활성제의 표면장력을 측정된 결과, 배양 후 균주의 생육이 대수 증식기에 이르는 3시간 이후부터 표면장력이 급격히 감소하여 7시간 후에는 배지의 표면장력이 최대 25 dyne/cm 까지 저하되었으며, 저하된 표면장력은 30시간 이상 장기간 유지됨을 확인하였다(Fig. 5).

기질에 따른 유화 활성 및 유화 안정성

생물 계면활성제에 소수성 탄화수소인 여러 종류의 oil을 기질로 사용하였을 때의 유화활성 및 유화안정성을 조사한 결과(Fig. 6, Table 5), 여러 유화기질 중에서 olive oil을 기질로 할 때 유화활성이 540 nm에서 1.632로 가장 좋았으며, 안정성 또한 높았다. 탄수소에 따른 유화활성은 C₈-C₁₄까지의 유화활성이 각각 흡광도 540 nm에서 0.349, 0.345, 0.36으로 비슷하였으며 C₈과 C₁₀은 유화안정성도 비슷하였다. 전체적으로 모든 기질에 대하여

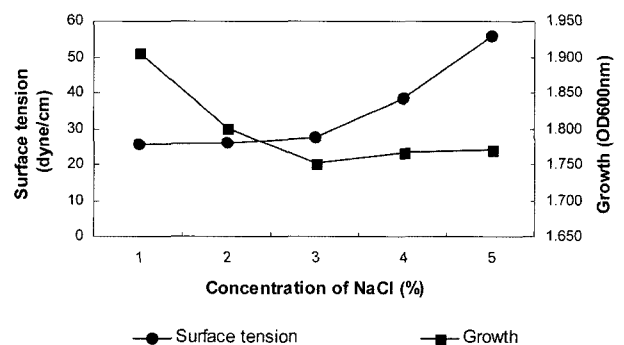


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on the production of biosurfactant and growth by *Pseudomonas* sp. G11. Surface tension and growth were determined after reciprocal shaking (200 rpm) at 30°C for 24 hr.

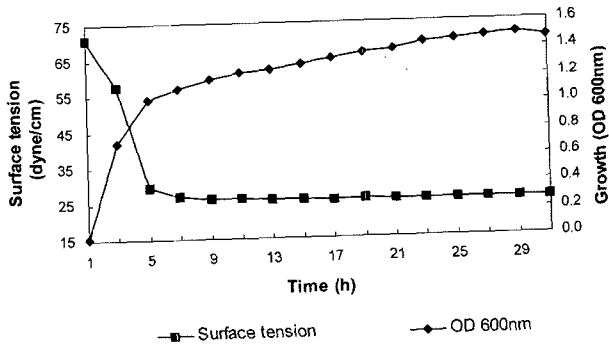


Fig. 5. Time course growth and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. G314. The cell was cultured in LB medium at 30°C.

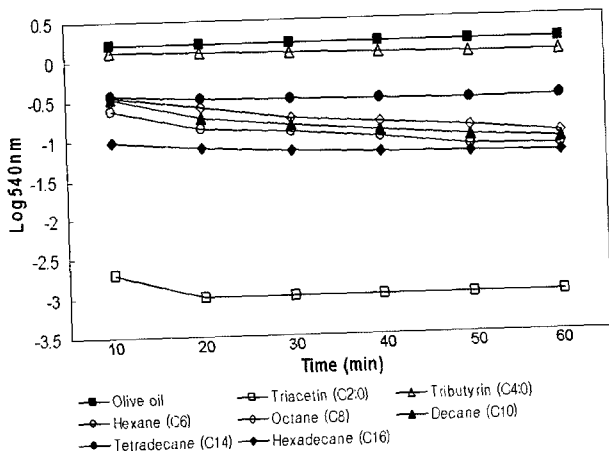


Fig. 6. Emulsification stability of various substrates by biosurfactant solution. The absorbance (OD 540 nm) of the emulsion was determined at the indicated times. After the initial 10 min holding period, absorbance readings were measured every 10 min for 60 min. The log of the absorbance was then plotted versus time.

Table 5. Emulsification activity and stabilization of various substrates by biosurfactant solution.

Substrates	Emulsification activity (OD 540 nm) ^a	Decay constant (Kd, 10 ⁻²) ^b
Olive oil	1.632	-0.30
Triacetin (C2:0)	0.002	-4.30
Tributylin (C4:0)	1.338	-1.63
Hexane (C ₆)	0.235	-9.91
Octane (C ₈)	0.349	-10.27
Decane (C ₁₀)	0.345	-11.18
Tetradecane (C ₁₄)	0.360	-1.60
Hexadecane (C ₁₆)	0.095	-4.06

The sample mixture was shaken vigorously in a vortex mix. The absorbance (A540 nm) of the emulsion was determined after the 10 min.

^aThe emulsification assay was performed in the presence of biosurfactant as described in the material and methods.

^bThe log of the absorbance was then plotted versus time and the slope (decay constant, Kd) of the line was calculated.

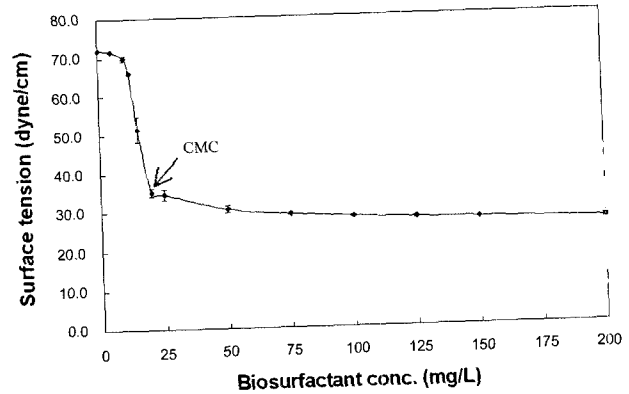


Fig. 7. Effect of increasing biosurfactant concentrations on surface tension. Biosurfactant solution were prepared in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) Surface tension was measured at 25°C. Symbols average of triplicate vial, error bars maximum and minimum values.

Pseudomonas sp. G314는 유화 안정성이 있음이 확인되었다.

생물 계면활성제의 CMC (Critical micelle concentration)

CMC 측정은 *Pseudomonas* sp. G314를 부분 정제한 분말을 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시켜 일정 농도씩 희석 하면서 표면장력을 측정하여 결정하였다. 생물 계면활성제가 포함되지 않았을 때의 표면장력 72 dyne/cm에서 생물 계면활성제 농도가 20 mg/L일 때에 표면장력이 30 dyne/cm로 급격히 감소 하였다. 따라서 생물학적 계면활성제 농도가 20 mg/L일 때 표면 장력이 급속하게 감소하는 지점의 농도를 CMC 값으로 결정하였다(Fig. 7). 그리고 20 mg/L보다 생물 계면활성제의 농도가 증가할수록 점차 표면장력이 감소하여 100 mg/L일 때는 표면장력이 27 dyne/cm이며, 400 mg/L일 때에는 최대 감소 표면장력인 25 dyne/cm이었다.

생물 계면활성제의 용해도

부분 정제한 생물 계면활성제의 용해도 시험결과 acetone, 물, methanol, chloroform 그리고 dichloroform과 같은 단일 용매 및 chloroform/methanol이나 dichloromethane/methanol과 같은 혼합 용매에서 잘 용해되었고 benzene, ethyl acetate, toluene 그리고 butanol에서는 약한 용해도를 나타냈고 ethyl-ether와 isoamyl alcohol에서는 용해보다는 분산되는 것으로 나타났다. 그러나 cyclohexane, hexane, xylene 그리고 pentane에서는 전혀 용해되지 않는 것으로 확인되었다(Table 6).

고 찰

일반적으로 유류 물질 등의 난분해성 물질의 제거를 위해 계면활성물질이 사용되는데 현재까지 많이 알려진 계면활성물질은 화학적으로 합성된 계면활성제이다. 그러나 이들은 자연환경에 유입되면 거품을 형성하여 햇빛과 산소를 차단함으로써 수중 생

Table 6. Survey for solubility of the partial purified biosurfactant

Solvent	Solubility
Benzene	WS
Ethyl ether	D
Cyclohexane	US
Ethyl acetate	WS
Hexane	US
Acetone	S
Water	WS
Methanol	S
Isoamyl alcohol	D
Toluene	WS
Xylene	US
Chloroform	S
Dichloromethane	S
Pentane	US
Butanol	WS
Chloroform : Methanol (1:1)	S
Chloroform : Methanol (2:1)	S
Dichloromethane : Methanol (1:1)	S
Dichloromethane : Methanol (2:1)	S

D, dispersion; WS, weak soluble; US, insoluble; S, soluble

태계를 위협하게 된다. 그러므로 화학합성 계면활성제가 사용된 대부분의 분야에 응용이 가능한 대체 물질로써 미생물을 이용한 생물 계면활성제 개발에 관심이 집중되고 있다(24).

미생물로부터 생산된 생물 계면활성제를 얻기 위하여 유류로 오염된 대전 일원의 토양에서 유류 분해 세균을 분리한 결과 332균주를 순수분리 하였고, 이 중 tributyrin이 첨가된 배지에서 생물학적 계면활성제 활성을 나타내는 11균주를 일차 선별한 후, 표면장력이 가장 우수한 단일균을 최종 선별하였다. 최종 선별된 균은 *Pseudomonas* sp.로 동정되어 *Pseudomonas* sp. G314로 명명하였다.

생물 계면활성제가 유화제로써 작용할 때 가장 큰 환경적 요인이 되는 것은 온도이다(1, 10, 20). 따라서 *Pseudomonas* sp. G314의 온도에 따른 활성 변화를 조사한 결과 15°C부터 37°C까지 표면장력이 25 dyne/cm로 동일하게 유지되었고, 또한 중성 pH를 중심으로 약알칼리성과 약산성에서도 동일한 최대의 표면장력 활성을 나타내었다. 그리고 NaCl의 농도가 1%와 2%일 때 까지는 최대 감소 표면장력 값인 25 dyne/cm을 유지하였고, 3% NaCl 농도에서는 표면장력 값이 27 dyne/cm을 나타내었다. 일반적으로 유류가 유출된 지역에 미생물을 사용하기 위해서는 그 지역의 온도에서 활성을 유지해야 할 필요성이 있다. 우리나라 해양의 연평균 해양수온은 15.8°C이며, 토양의 경우 25°C 내외이다. 그리고 일반적인 해수의 pH는 약알칼리성이고, Walker와 Cowell (30)이 조사한 해수의 평균 NaCl 농도가 3.5% - 3.7%라고 보고한 것을 감안하면, 본 실험에 사용된 *Pseudomonas* sp. G314는 해수나 토양의 유류오염 정화에 사용 가능성이 높다고 생각된다. 또 *Pseudomonas* sp. G314의 생물 계면활성제 생성시 용존산소량에 따른 생물학적 계면활성제의 활성 변화를 조사한

Table 7. Surface tensions and critical micelle concentrations (CMCs) of various surface-active compounds in aqueous solution

Compound	Surface tension (dyne/cm)	CMC (mg/L)	Reference
Sodium dodecylsulphate	37	2000-2900	21
Alkylate dodecylbenzene	47	590	21
Dihydroamine fluoride	35	475	4
Oleyamine fluoride	30	270	4
<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2 (lipopeptide)	27	10	18
<i>Bacillus subtilis</i> (surfactin)	27	11	21
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (rhamnolipids)	29	15	21
<i>Torulopsis bombicola</i> (sophorolipids)	37	82	21
<i>Pseudomonas</i> sp. G314	25	20	This study

결과, 250 ml 용량의 삼각 플라스크 내 배지량이 적을수록 높은 균체생성량과 생물 계면활성제의 활성의 우수한 것으로 나타나 *Pseudomonas* sp. G314도 *Pseudomonas* sp. EL-G527의 통기량 실험 결과(5)와 같이 호기적으로 유기물을 분해하여 생물 계면활성제를 생산하는 것으로 생각된다. 따라서 오염된 토양이나 담수 등에 이 균을 이용할 경우 지속적인 산소 주입이 필요할 것으로 사료된다.

부분 정제된 *Pseudomonas* sp. G314의 생물 계면활성제의 여러 기질에 대한 용해도는 acetone, methanol, chloroform, dichloromethane과 같은 단일용매 및 chloroform/methanol이나 dichloroform/methanol과 같은 혼합용매에서 잘 용해되는 특징을 갖고, ethyl ether와 isoamyl alcohol에서는 용해보다는 분산되는 것으로 나타났다. 또 benzene, ethyl acetate, toluene, butanol, 물에서는 소량 용해되고, cyclohexane, hexane, xylene, pentane은 전혀 용해되지 않는 것으로 나타났다. 일반적으로 glycolipid는 유기용매는 잘 용해되나 물에 매우 소량 용해되는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에 사용된 *Pseudomonas* sp. G314가 생성하는 생물 계면활성제는 glycolipid계의 용해 특징을 나타내어 glycolipid계의 생물 계면활성제인 것으로 추정된다. 그러나 glycolipid 계열의 생물 계면활성제 중 trehalose-6,6'-dicorynomycolates는 chloroform에 잘 녹고, trehalose, tetraester와 같은 극성의 glycolipid는 chloroform/methanol 등의 혼합용매에 잘 녹으며, lactonic sophorose lipids, 아미노계 lipids는 ether, hexane 및 chloroform에 잘 녹고 acetone과 methanol에서는 약간의 열을 가해야 잘 녹는 것으로 알려져 있고, 또 surfactin은 알칼리수용액, methanol, chloroform, dichloromethane 등에 녹으나 물, petroleum ether, hexane에는 녹지 않고, rhamnolipids는 methanol, chloroform, ethyl acetate, ethyl ether에는 잘 녹으나 hexane에서는 녹지 않는다고 알려져 있다(9, 12, 13, 22). 따라서 이와 같은 실험 결과들과 본 실험에 사용된 *Pseudomonas* sp. G314의 용해도를 비교하면 지금까지 알려진 glycolipid와는 다르게 surfactin

과 rhamnolipid과 비슷한 양상을 나타내는 새로운 종류의 glycolipid인 것으로 추정된다.

현재까지 알려져 있는 화학 계면활성제와 생물 계면활성제들과의 표면장력 및 CMC 값을 본 실험에 사용된 *Pseudomonas* sp. G314와 비교한 결과(Table 7), *Pseudomonas* sp. G314의 최대 표면장력 값이 25 dyne/cm로 현재까지 보고된 계면활성제중 가장 우수하였으며, 생물학적 계면활성제의 활성을 나타내기 위한 최소 농도인 CMC 값 또한 매우 우수한 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서 사용된 *Pseudomonas* sp. G314는 표면장력이 지금까지 연구되어진 생물 계면활성제에 비해 매우 우수하고, 온도에 대한 안정성, pH에 의한 생육 안정성 등 여러 가지 특성 또한 뛰어난 오염된 토양이나, 담수 그리고 해수에 적용시켜 환경정화에 사용하기에 우수한 균주임을 확인하였다. 그러나 대량 생산 및 자연환경에 적용하기 위해서는 그 구조를 정확히 파악할 필요가 있으며, 그 구조를 파악하기 위해서는 구체적인 당의 종류나 친수성인 당과 소수성인 지방의 결합양상, 전체 분자량의 측정 등 세부적인 연구가 추후 진행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 2005년도 한남대학교 학술연구 조성비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Atlas, R. M. and R. Bartha. 1972. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperature. *Can. J. Microbiol.* 18, 1851-1855.
2. Arima, K., A. Kakiunma, and G. Tamura. 1968. Surfactin a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 488-494.
3. Barathi, S. and N. Vasudevan. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a contaminated soil. *Environ. Int.* 26, 413-416.
4. Busscher, H.J., H.M. Uyen, G.A.M. Kip, and J. Arends. 1987. Colloids surfaces. 22, 161.
5. Cha, M.S., E.G. Lim., K.H. Lee, S.J. Cho, H.J. Son, and S.J. Lee. 2002. Optimal culture conditions for production of environment-friendly biosurfactant by *Pseudomonas* sp. EL-G527. *J. Environ. Sci.* 11, 177-182.
6. Christie, W.W. 1982. Lipids analysis: Isolation, separation, Identification and structural analysis of lipids. 2nd Edition Oxford. Pergaman Press.
7. Cirigliano, M.C. and G.M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 747-750.
8. Deshpande, S., B.J. Shiau, D. Wade, D.A. Sabatini, and J.H. Harwell. 1999. Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Water Res* 33, 351-360.
9. Desai, J.D. and I.M. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47-64.
10. Dibble, J.T. and R. Bartha. 1979. Effects of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 729-739.
11. Doong, R.A. and W.G. Lei. 2003. Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. *J. Hazard Mater.* 96, 15-27.
12. Falatko, D.M. and J.T. Novak. 1992. Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environ. Res.* 64, 163-169.
13. Fichter, A. 1992. Biosurfactants: Moving towards industrial application. *Biotech. Rev.* 10, 208-217.
14. Hisatsuka, K., T. Nakahara, Y. Sano, and K. Yamada. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: its function in hydrocarbon fermentations. *Agric. Biol. Chem.* 35, 686-692.
15. Inoue, S. 1998. Biosurfactant in cosmetic application. Proceedings of the World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils industry. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 206-210.
16. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams, Wikins and Baltimore.
17. Lee, S.C., Y.J. Jung, J.S. Yoo, Y.S. Cho, I.H. Cha, and Y.L. Choi. 2002. Characteristics of biosurfactants produced by *Bacillus* sp. LSC11. *Kor. J. Life Science.* 12, 745-751.
18. Lin, S.C., M.A. Minton., M.M. Sharma, and G. Georgiou. 1994. Structural and Immunological Characterization of a Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 31-38.
19. MacFaddin, J.F. 1984. Biochemical tests for identification for medical bacteria. 2nd ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
20. Mulkins-philips, G.J. and T.E. Stewart. 1974. Effect of environmental parameters on bacterial degradation of bunker C oil, crude oil, and hydrocarbons. *Appl. Microbiol.* 28, 915-922.
21. Mulligan, C.N. and B.F. Gibbs, in N. Kosaric. 1993. Biosurfactants-production, properties, application, M. Dekker, New York, 329-372.
22. Neu, T.R. 1996. Significance of bacterial surface active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60, 151-166.
23. Organism central. 2001. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia. Baltimore. New York, USA.
24. Poremba, K., W. Gunkel, S. Lang, and F. Wagner. 1991. Marine biosurfactants, toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. *Z. Naturforsch.* 14, 21-26.
25. Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinoiriz, and D. L. Gutnick. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 402-408.
26. Rosenberg, E. 1982. Properties of hydrocarbon in water emulsions stabilized by *Acinebacter* sp. RAG-1 emulsion. *Biotech. Bioeng.* 24, 281-292.
27. Santos, L.H., O. Kappeli, and A. Flechter. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 443-448.
28. Stahl, E. 1969. Thin-layer chromatography, 2nd edition.
29. Wagner, D.B., G.R. Furnier, M.A. Saghai-Marooof, S.M. Williams, B.P. Dancik, and R.W. Allard. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 2097-2100.
30. Walker, J.D. and R. R. Cowell. 1975. Some effects of petroleum on estuarine and marine microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 21, 305-313.

(Received November 13, 2006/Accepted December 7, 2006)

ABSTRACT : Characteristics of Biosurfactant Producing *Pseudomonas* sp. G314

Shim So Hee and Kyeong Ryang Park* (Depart. of Biotechnology, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea)

Three hundred thirty two bacterial colonies which were able to degrade crude oil were isolated from soil samples that were contaminated with oil in Daejeon area. Among them, one bacterial strain was selected for this study based on its low surface tension ability, and this selected bacterial strain was identified as *Pseudomonas* sp. G314 through physiological- biochemical tests and analysis of its 16S rRNA sequence. *Pseudomonas* sp. G314 showed a high resistance to antibiotics such as ampicillin, chloramphenicol, spectinomycin, and streptomycin, and heavy metals such as Li, Cr, and Mn. It was found that the optimal pH and temperature for biosurfactant production of *Pseudomonas* sp. G314 were pH 7.0 and 30°C, respectively. After seven hours of inoculated, the biosurfactant activity reached the maximum, and surface tension of the culture broth was decreased from 72 to 25 dyne/cm. The crude biosurfactant was obtained from the culture broth by acid precipitation, followed by solvent extraction, evaporation and then freeze drying. The CMC (critical micelle concentration) value of the crude biosurfactant was 20 mg/L.