

## Bacillus sp. TBM40-3에 의해 생성된 Biosurfactant의 유류분해 특성

김선희 · 이상철 · 유주순 · 주우홍<sup>1</sup> · 정수열<sup>2</sup> · 최용락\*

동아대학교 응용생명공학부, <sup>1</sup>창원대학교 생물학과, <sup>2</sup>동주대학 식품과학계열

(2004년 2월 18일 접수, 2004년 5월 12일 수리)

환경친화적이며 원유 분해능이 강력한 균주를 얻기 위하여, 태백산의 토양 일부를 채취하였다. 채취한 토양 sample로부터 crude oil을 탄소원으로 이용하는 수십 종의 균주를 분리하였으며, 분리된 균주 중 원유분해능 및 biosurfactant 생성능이 가장 우수한 균주를 선별하였다. 또한 분리된 균주의 형태학적 특성을 관찰하고 16S rDNA sequence를 통하여 *Bacillus* sp. TBM40-3로 동정하였다. 또한 phylogenetic tree를 이용하여 이미 동정된 다른 균주들과의 유연관계를 파악하였다. *Bacillus* sp. TBM40-3의 배양액의 표면장력은 최저 29 mN/m까지 감소되었고, 생산된 biosurfactant의 유효활성은 soybean oil에서 최대였으며, crude oil에서도 높은 편이었다. 유효안정성은 합성계면활성제와 비슷하거나 우수하였다. 따라서 TBM40-3에서 추출한 biosurfactant는 합성계면활성제를 대체할 수 있는 환경친화적인 생물 계면활성제로 사용될 수 있는 가능성을 보여준다.

**Key words:** *Bacillus* sp. TBM40-3, biosurfactant, emulsification activity, emulsification stability

### 서 론

석유 탄화수소 화합물을 포함하는 기름 오염은 심각한 환경 오염과 인간의 건강을 해치는 원인으로 관심의 대상이 되고 있다.<sup>1)</sup> 일반적으로 석유 탄화수소 화합물들은 토양 구성성분과 결합하고 있으며, 이들은 제거되기 힘들고, 잘 분해되지 않는다.

Biosurfactants(BS)는 탄화수소 화합물을 유화할 수 있고, 탄화수소 화합물의 물에 대한 친화성을 증가시켜서 표면장력을 감소시키고, 토양으로부터 유성의 기질을 배제시키는 능력을 증가시킬 수 있으며, 기름 회수 시에 독성이 없다. 또한 탄화수소 화합물의 생체 이용률을 증가시키므로써 비교적 쉽게 용해할 수 있는 오염물질들의 생물분해의 속도를 증가시킨다.<sup>2)</sup> 현재 사용되고 있는 화학합성 계면활성제들 대부분은 자체적으로 생분해가 안되어 환경오염의 원인이 되고 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 이러한 문제점을 무독성이며 생물분해가 용이한 환경 친화적 biosurfactant로 대체함으로써 환경오염을 감소시킬 수 있다. 그리고 더 나아가 biosurfactant는 화장품, 의약품, 식품, 세제, 펄프 및 제지, 원유의 2차 회수 및 토양의 환경 친화적인 정화 등 다양한 분야에서 광범위하게 응용될 수 있을 것이다.

Biosurfactant가 화학합성 계면활성제에 대해 가지는 장점은 첫째, 무독성이며 생분해가 용이하고 따라서 이를 사용 시 이차오염원이 안 된다는 것이다. 둘째, 기존의 방법으로는 합성하기 어려운 복잡한 화학구조로 인해서 특수한 목적으로 사용될 수 있다는 점이다. 셋째, 표면장력 감소능력, 온도, pH에 대한 안정성 등 계면활성제의 물리·화학적 성능면에서 기존의 화

학합성 계면활성제와 거의 대등한 또는 우수한 결과를 보인다는 점이다.<sup>3)</sup> 이러한 biosurfactant는 glycolipids, lipopeptides, lipoproteins, neutral lipids, phospholipids, substituted fatty acids와 lipopolysaccharides 등으로 분류된다.<sup>17,19)</sup> 매우 효과적인 lipopeptide type의 biosurfactant인 surfactin이 *Bacillus subtilis* 종에서 최초로 보고 되었으며, 그 후로 여러 종류의 표면활성과 항균활성을 가지는 lipopeptide가 *Bacillus*속에서 발견되고 있다.<sup>4,5)</sup> 토양 및 해양의 유류오염 제어를 위한 탄화수소 처리 방법 중의 하나인 생물학적 방법으로는 해양의 유류 오염물질인 cyclo-alkane 계열의 탄화수소원과 원유(crude oil) 및 경유, 중유 등의 석유제품에 대한 다양한 탄화수소원의 기질을 분해시키는 균주를 분리, 동정하여 실제로 오염현장에 적용되고 있다.<sup>9,10,13,20)</sup> 이러한 유류 분해 능력을 가진 해양 미생물로서는 *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corollospora*, *Dendryphiella*, *Pseudomonas* 등이 대부분을 차지하고 있으며,<sup>10,15,21)</sup> 또한 이들 균주가 생산하는 유화제 등은 분리·정제되어 실제로 이용되고 있다.

본 연구에서는 해양 원유 오염제거용 등의 다양한 용도에 사용할 생물유화제 개발을 위한 기초 자료를 얻을 목적으로 biosurfactant 생성능력이 우수한 균주를 분리, 동정하여 분류학상의 위치를 확인하고, 원유 분해 균주의 biosurfactant 생산 특성, 균체 생육도 및 생성되는 유화제의 특성에 대하여 검토하였다.

### 재료 및 방법

**Biosurfactant 생성 미생물의 분리.** 배지 중에 탄소원이 결핍된 C-배지(carbon-minimal medium)를 사용하여 biosurfactant를 생산하는 미생물을 분리하였으며, 사용된 배지의 조성은 NaCl 30 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g/l, yeast extract 0.2 g/l, CaCl<sub>2</sub> 10 mg/l,

\*연락처

Phone: 82-51-200-7585; Fax: 82-51-200-6536

E-mail: ylchoi@daunet.donga.ac.kr

FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 10 mg/l 및 trace element 용액 2 ml(7H<sub>2</sub>O 7 mg/l, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 6 mg/l, MoO<sub>3</sub> 1 mg/l, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1 mg/l, NiSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1 mg/l, ZnSO<sub>4</sub> · CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.5 mg/l)이고, 배지의 pH를 7.0으로 조정하여 사용하였다.<sup>1)</sup> 위와 같은 조성의 배지에 탄소원으로 crude oil 또는 soybean oil을 1% 첨가한 다음 채취한 샘플 희석 액을 1% 첨가하여 7일간 진탕배양하였으며, 이때 생육된 균을 새로운 C-배지에 균주 및 원유를 각각 1%로 첨가하여 다시 배양하였다. 이렇게 3회 반복하여 생육한 균주를 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 배양하였다. 선별된 단일 콜로니를 LB 액체배지에서 각각 전 배양시킨 후, tributyrin이 2% 첨가된 배지에 배양한 후 투명한이 생성되고, 표면 장력 저하능이 우수한 것을 biosurfactant 생성능이 우수한 균주로 보아 선별하였다.

**균주의 염색체 DNA의 분리 및 동정.** 선별된 균주의 동정을 위하여 형태학적, 생리학적, 생화학적 특징을 조사한 후 Bergey's manual of systematic bacteriology를 근거로 하여 동정하였다.<sup>8)</sup> 또한 정확한 동정을 위하여 TBM40-3의 염색체 DNA를 다음과 같이 분리하였다. 염색체 DNA를 얻기 위하여 pre-culture한 균주를 LB배지 3 ml에 접종하여 37°C shaking incubator에서 4-6시간 동안 배양하였다. 배양된 균주를 집균하여 1X TEN buffer(Tris-HCl, EDTA, NaCl)로 washing하였다. 500 µl SET buffer(20% sucrose, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl(pH 7.6, 1 mg/ml lysozyme)로 suspension하고, 37°C에서 10분 동안 incubation 후에 protease K(20 mg/ml)를 소량 첨가한다. 동시에 SDS를 최종 1%되도록 첨가하여 37°C에서 30분간 lysis하고, 1 M NaCl을 첨가하여 phenol 처리하였다. Phenol 처리한 sample은 99% Et-OH로 침전시켜(-70°C, 10분), chromosomal DNA를 회수하였다. 이렇게 분리된 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR반응을 수행하였으며, TBM40-3의 16S rDNA를 획득한 다음 16S rDNA의 염기서열을 결정하였다. 이때 PCR 반응에 사용된 primer는 *E. coli* 16S rDNA의 upstream 9-27 bp와 downstream 1,542-1,525 bp의 영역을 oligonucleotide로 작성하여 사용하였다(primer 1: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', primer 2: 5'-AGAAAGGAGGTGAICCAAGCC-3'). TBM40-3의 16S rDNA의 염기서열을 결정한 다음 GeneBank Database에서 상동성을 비교하였으며, *Bacillus* sp. TBM40-3과 유사한 *Bacillus*종들과의 유연관계를 알아보기 위하여, ClustalX program<sup>21)</sup>을 이용하여 phylogenetic tree를 제작하였다<sup>15)</sup>(Fig. 2).

**균주의 생육도 측정.** 선별된 균주의 생육정도를 조사하기 위하여, LB액체배지 500 ml에 전배양시킨 균주(10 ml, 37°C, 200 rpm O/N)를 접종하여 37°C에서 90시간 동안 200 rpm으로 진탕배양하였다. 배양시간에 따른 균체의 성장은 진탕배양한 배양액을 6시간 간격으로 일정량 (1 ml) 취하고 UV-VIS spectrophotometer(U-1100, Hitachi, Japan)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다.

**표면장력 측정.** LB 액체배지에서 배양한 균주의 배양액을 6시간 간격으로 취하여 원심분리하였다. 균체를 제거한 배양 상층액을 Millipore 0.2 µm을 이용하여 여과한 후, DeNouy Tensiometer(Itoh Seisakusho, Japan)의 ring method를 이용하여

표면장력을 3회 반복하여 측정하고 그 평균값을 표시하였다.<sup>2)</sup>

**유화활성 및 안정성 측정.** 일반적으로 사용되는 화학합성 계면활성제와 *Bacillus* sp. TBM40-3에 의해 생산된 biosurfactant의 다양한 소수성 탄화수소들과 oils 성분에 대한 유화활성 및 유화안정성 시험은 Cirigliano와 Carman의 방법<sup>2,3)</sup>에 따라서 실시하였다. 균주 배양액을 Millipore 0.2 µm 여과막을 통과시켜 멸균한 것을 crude biosurfactant 용액으로 사용하였다. 여과액 2 ml를 마개 있는 시험관에 넣고, pH 3.0의 0.1 M sodium acetate 원충액 2 ml와 혼합한 용액에 1 ml의 다양한 기질을 넣고 2분간 최고속도로 vortex mixing한 후 10분간 정지한 후 540 nm에서의 현탁도를 측정하였다. 사용된 기질은 soybean oil, crude oil, kerosene 등을 포함한 8가지 종류의 탄화수소 화합물을 사용하였으며, 화학합성 계면활성제는 Tween 류, Span 류, Triton X-100, SDS를 사용하였다.

유화안정성은 유화활성 측정 시와 동일한 방법으로 처리한 후에, 실온에 방치하면서 60분 동안 10분간으로 540 nm에서의 현탁도를 측정하여 log 값으로 환산하여 나타내고, 그 때의 기울기를 유화활성의 안정도, 상수 K<sub>d</sub>(시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)으로 나타내었다.

**Biosurfactant의 추출 및 정제.** Biosurfactant를 추출하기 위하여 *Bacillus* sp. TBM40-3을 전 배양한 용액을 1 l의 LB 액체배지에 재접종하여 37°C에서 4일간 진탕 배양하였다. 배양용액으로부터 원심분리(10,000 rpm, 10 min, 4°C)하여 균체를 제거한 상등액에 진한 염산을 서서히 가하면서, pH 2.0이 되게 조정하여 4°C에서 하룻밤 방치하여 biosurfactant를 침전시켰다. 침전된 biosurfactant를 원심분리(10,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 침전물을 회수하고, 알칼리성 수용액(pH 8.0, NaOH)에 용해하여 동결건조시켰다. 건조된 물질을 methanol 10 ml로 3회 추출한 다음 evaporator를 이용하여 농축한 것을 biosurfactant로 사용하였다.<sup>6)</sup>

## 결과 및 고찰

**균주의 선별.** 태백산의 토양 sample에서 biosurfactant 생성능이 우수한 미생물을 분리하기 위하여 탄소원이 결핍된 C-배지 200 ml에 탄소원으로 crude oil 및 soybean oil이 1% 되게 첨가하여 37°C, 200 rpm으로 7일간 진탕배양하였다. 이를 3회 반복하여 생육한 균주를 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 배양하였으며, 생성된 단일 콜로니를 LB 액체배지에서 각각 전 배양시킨 후, tributyrin이 1%첨가된 고체배지에 접종하여 투명한이 형성되는 균주를 다수 확보하였으며, 이 중에서 분해능이 강력한 TBM40-3 균주에 대하여 계속하여 실험하였다.

**선별된 균주의 동정과 phylogenetic analysis.** 선별된 TBM40-3은 그램 염색법에 의해서 그램 양성균으로 확인되었으며, 전계방사형 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, JSM-6700F, Jeol, Japan) 관찰에 의하여 rod type의 형태가 관찰되었다(Fig. 1). 선별된 균주를 동정하기 위하여 균주의 염색체 DNA를 분리하였으며, 이를 주형으로 한 PCR반응을 수행하여 약 1.5 kb의 단편을 얻었다. 얻어진 16S rDNA 일부영역단편은 pGEM T-easy vector(promega)를 사용하

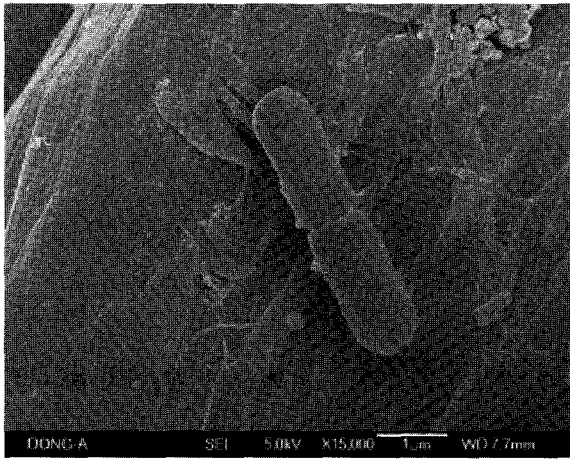


Fig 1. Field emission scanning electron microscopic observation of the isolated *Bacillus* sp. TBM40-3 (×15,000).

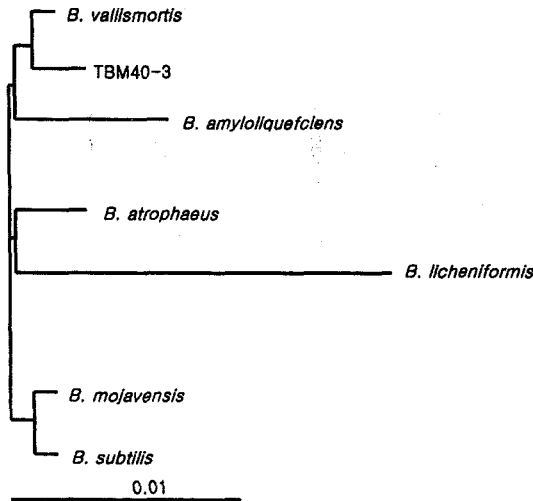


Fig. 2. Unrooted phylogenetic tree constructed from analysis of the 16S rDNA sequence of isolated the strain TBM40-3. The accession numbers of the sequences of the microbial strains used in the phylogenetic analyses are *B. vallismortis*, AB021198, *B. amyloliquefciens*, AF489591, *B. atrophaeus*, AB021181, *B. licheniformis*, X68416, *B. mojavensis*, AB021191 and *B. subtilis*, AB110598.

여 클로닝한 후 양방향으로 염기서열을 결정하였다.

TBM40-3의 16S rDNA 염기서열은 NCBI BLAST를 통해 상동성을 조사하였으며, ClustalX program<sup>21)</sup>을 이용하여 유사한 *Bacillus* 종과의 유전학적인 연관성을 조사하였다. 그 결과 *Bacillus* sp. TBM40-3의 16S rDNA 염기서열은 *Bacillus*속의 종들과 99%이상 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 2). 우리나라 및 외국의 경우 유류 분해 및 유화제생성 균주로 분리되고 있는 것으로는 *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Acinetobacter* sp., *Klebsiella* sp. 및 *Arthrobacter* sp. 등이 보고 되어 있으며,<sup>1,9,19)</sup> 매우 효과적인 lipopeptide 유형의 biosurfactant인 surfactin이 *Bacillus subtilis* 종에서 보고되었다.<sup>4,5)</sup>

**Biosurfactants의 표면장력 측정.** *Bacillus* sp. TBM40-3이 생산하는 biosurfactant의 특성을 알아보기 위하여 배양 시간대 별로 표면장력을 측정한 결과(DeNouy Tensiometer: Itoh

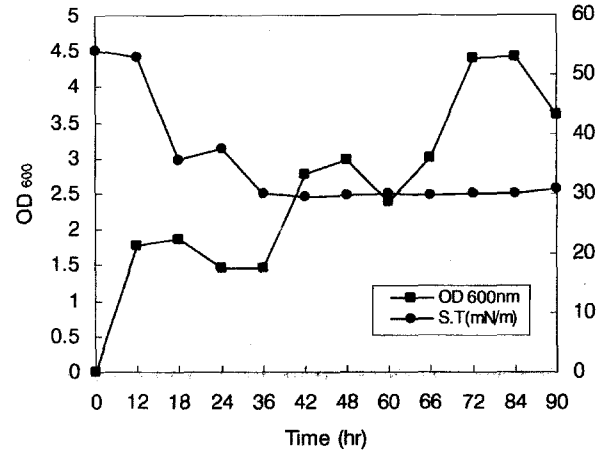


Fig. 3. Change of cell growth and patterns of biosurfactant production by cultivation times. The *Bacillus* sp. TBM40-3 was cultured in LB medium at 37°C, 200 rpm for 90 h.

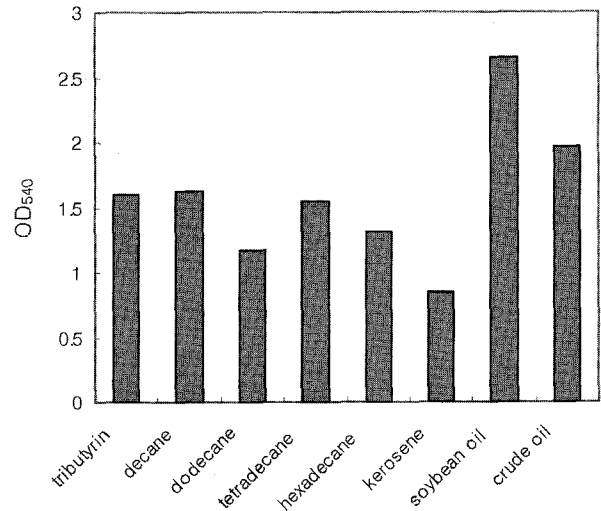


Fig. 4. Emulsification activity of various substrates by the biosurfactant solution. The sample mixture was shaken vigorously in a vortex mix. The absorbance ( $A_{540}$ ) of the emulsion was determined after the 10 min.

Seisakusho, Japan) 배양 후 36시간 되는 때에 표면장력이 급격히 감소하여 48시간 후에 배지의 표면장력이 58 mN/m에서 최대 29 mN/m 정도까지 저하되었으며, 저하된 표면장력은 그 이후에도 계속 유지되어 TBM40-3이 생산하는 biosurfactant의 표면장력 저하능이 우수한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 해양 유류 분해 세균인 *Pseudomonas* sp.으로부터의 생산된 생물 계면활성제의 생산이 배양 2일 후인 정지기 초기에 가장 많이 생산되는 결과와 유사한 것이다.<sup>14)</sup>

따라서 표면장력이 최대로 감소된 36시간 배양액 중에 최대량의 biosurfactant가 존재할 것으로 생각되어 이 배양액으로 다양한 소수성 탄화수소류와 oils을 기질로 사용하여 유화활성을 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. *Bacillus* sp. TBM40-3의 표면장력은 *Bacillus licheniformis* BAS50에서 분리·정제된 lipopeptide인 lichenysin A의 표면장력과 거의 동등한 값을 나타내며<sup>22)</sup>, *Bacillus* sp. LSC11보다 낮은 값을 나타

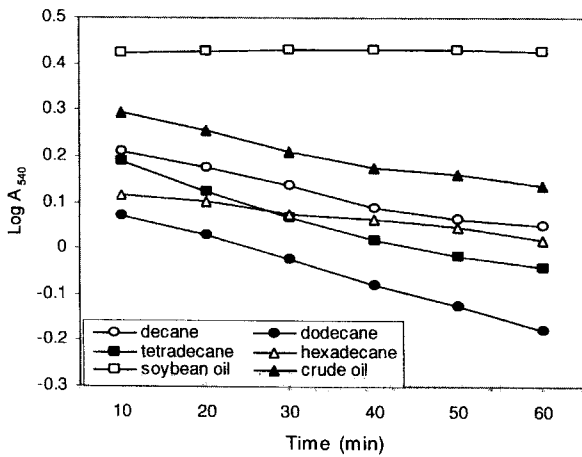


Fig. 5. Emulsification stability of various substrates by biosurfactant solution. The absorbance ( $A_{540}$ ) of the emulsion was determined at the indicated times. After the initial 10 min holding period, absorbance readings were taken every 10 min. The log of the absorbance was then plotted versus time.

Table 1. Emulsification activity and stabilization of various substrates by biosurfactant solution

Substrates	Emulsification activity ( $OD_{540}$ )	Decay constant ( $K_d, 10^{-3}$ ) <sup>a</sup>
Soybean oil	2.65	-0.00
Kerosene	0.84	2.89
Tributylin	1.59	1.70
Crude oil	1.96	-3.48
Hexadecane( $C_{16}$ )	1.30	-1.86
Tetradecane( $C_{14}$ )	1.54	-4.66
Dodecane( $C_{12}$ )	1.17	-5.03
Decane( $C_{10}$ )	1.62	-3.39

<sup>a</sup>The emulsification assay was performed in the presence of biosurfactant as described in the text. After the initial 10 min holding period, absorbance readings were taken every 10 min for 60 min. The log of the absorbance was then plotted versus time and the slope(decay constant,  $K_d$ ) of the line was calculated.

낸다<sup>18)</sup>. 그러므로 기존에 보고된 *Bacillus* 속 종들과 비교하여 표면장력 저하능이 유사하거나 더 우수함을 보여준다.

**Biosurfactant의 유화활성.** TBM40-3이 생산하는 biosurfactant는 crude oil에 상당한 유화력을 보였으며, soybean oil에서는 유화활성이 약 2.65로서 가장 높은 활성을 보였다. 또한 tributyrin, decane, crude oil도 비교적 높은 활성을 보이는 반면에 dodecane, kerosene 등의 탄화수소를 기질로 사용한 경우는 상대적으로 낮은 편이었다. 이와 같은 탄화수소류를 기질로 사용한 결과는 *Pseudomonas aeruginosa*가 생산하는 계면활성제의 경우와는 상반되는 활성을 보이는 것이다.<sup>6)</sup>

**기질에 따른 유화 안정성.** 분리된 균주에 의해 생산된 biosurfactant의 소수성 탄화수소계 및 각종 oils을 기질로 한 유화활성 및 유화안정성을 Fig. 5와 Table 1에 나타내었다. 유화활성의 안정도는 상수  $K_d$ (시간당 붕괴되는 유화력의 기울기 값)로 나타내었으며, 여러 가지의 탄화수소류를 기질로 사용하여 측정하였다.  $K_d$  값이 0에 가까울수록 유화안정성이 우수하며, soybean oil을 기질로 사용한 경우 가장 우수한 유화안정성

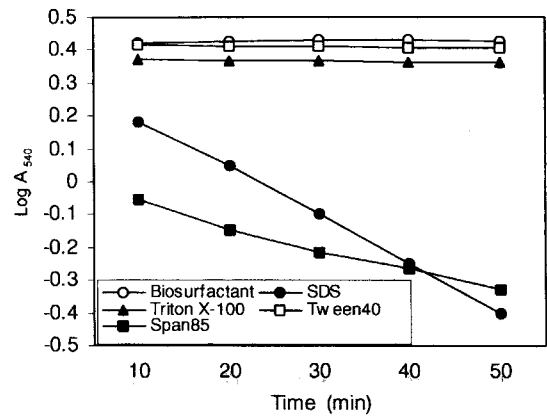


Fig. 6. Compare stabilization of emulsion from the biosurfactant solution with various chemical surfactants. Emulsifying substrate was soybean oil. The absorbance ( $A_{540}$ ) of the emulsion was determined at the indicated times. After the initial 10 min holding period, absorbance readings were taken every 10 min. The log of the absorbance was then plotted versus time.

Table 2. Comparison of emulsification and stabilization properties of biosurfactant solution and commercial surfactants

Surfactant	Emulsification activity ( $OD_{540}$ )	Decay constant ( $K_d, 10^{-3}$ )
Biosurfactant	2.65	-0.00
Tween 20	2.71	-0.14
Tween 40	2.63	-0.12
Tween 80	2.60	-0.14
Span 40	1.80	-0.43
Span 85	0.88	-5.68
Triton X-100	2.36	-0.18
SDS	1.51	-16.05

The indicated stabilizer was analyzed for emulsification activity by using soybean oil as described in the text. The decay constant ( $K_d$ ) was calculated as described in footnote a, Table 1.

을 나타내었으며, hexadecane, crude oil도 비교적 좋은 유화안정성을 나타내었다. Tributyrin과 kerosene을 기질로 사용한 경우 다른 기질에서와는 다르게 그래프의 기울기가 양의 값을 나타내었다(결과 미제시). 또, 현재 상용되고 있는 유화제 및 안정제를 soybean oil을 기질로 사용하여 측정된 유화활성의 안정도를 비교 조사한 결과를 Fig. 6와 Table 2에 나타냈다. 유화안정도를 분리 균주의 생성물질과 현재 상용되고 있는 유화제 및 안정제를 비교한 결과, Tween류와 Triton X-100, surfactant와 비슷한 활성과 안정성을 유지했으며, Span류와 SDS에 비해서는 유화활성 및 안정성이 월등히 높은 것을 확인하였다. 이 결과는 *Nocardia* sp. L-417이 생산하는 biosurfactant와 매우 유사한 결과를 보여주었으며,<sup>11)</sup> *Bacillus* sp. LSC11이 보여주는 값보다 안정한 값을 나타내었다<sup>18)</sup>. 따라서 *Bacillus* sp. TBM40-3가 생산하는 biosurfactant는 현재 상용되고 있는 유화제 및 안정제와의 비교에서 매우 우수한 활성도와 안정도를 보여 주었으며, 산업적으로 이 물질을 이용하기 위해서 물리 화학적 특성, 특히 surfactin과의 화학 구조적 차이, 생분해도 및 환경독성 등의 조사를 수행하여야 할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Cha, J. Y., Kim, B. G., Chung, S. Y., Cho, Y. S., Choi, Y. L. and Lee, Y. C. (1999) Characterization of crude oil degradation by *Klebsiella* sp. KCL-1 isolated from sea water. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 452-457.
2. Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. (1984) Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 747-750.
3. Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. (1985) Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 846-850.
4. Cooper, D. G. and Zajic, J. E. (1980) Surface-active compounds from microorganism. *Adv. Appl. Microbiol.* **26**, 229-256.
5. Fiechter, A. (1992) Biosurfactant: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* **10**, 208-217.
6. Hwang, K. A., Lee, J. R., Kim, S. J., Kim, Y. S. and Ahn, H. J. (1999) Surface activity and environmental characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* JRT-4. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 159-165.
7. Hua, Z., Chen, J., Lun, S. and Wang, X. (2003) Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of n-alkanes. *Water Res.* **37**, 4143-4150.
8. John, G. H., Krieg, N. R. and Sneath, P. H. A. (1994) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (9th ed.), Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
9. Kim, H. J., Kim, B. J., Ha, S. D., Hwang, S. H. and Kong, J. Y. (1999) Degradation of crude oil and purification of biosurfactant from marine bacterium *Pseudomonas* sp. CHCS-2. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 192-197.
10. Kim, H. J., Kim, B. J., Hwang, S. H., Kim, D. J., Lee, H. W. and Kong, J. Y. (1997) Degradation of crude oil and purification of biosurfactant from marine bacterium *Aeromonas* sp. BES-741. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **24**, 443-448.
11. Kim, S. H., Lim, E. J., Lee, S. O., Lee, J. D. and Lee, T. H. (2000) Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 249-253.
12. MacFaddin, J. F. (1984) *Biochemical Tests for Identification for Medical Bacteria*, (2nd ed.), Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA.
13. Mibas, W. and Gutnick, D. L. (1993) Isolation, characterization, and sequences analysis of cryptic plasmid from *Acinetobacter calcoaceticus* and their use in the construction of *Escherichia coli* shuttle plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2807-2816.
14. Mulligan, C. N., Mahmoudides, G. and Giggs, B. F. (1989) The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biotech.* **12**, 199-210.
15. Roberts, M. S., Nakamura, L. K. and Cohan, F. M. (1996) *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 470-475.
16. Ron, E. Z. and Rosenberg, E. (2001) Natural roles of biosurfactant. *Environ. Microbiol.* **3**, 229-236.
17. Rosenberg, E. and Ron, E. Z. (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 154-162.
18. Lee, S. C., Jung, Y. J., Yoo, J. S., Cho, Y. S., Cha, I. H. and Choi, Y. L. (2002) Characteristics of biosurfactants produced by *Bacillus* sp. LSC11. *Kor. J. Life Sci.* **6**, 745-751.
19. Schulz, D., Passeri, A., Schmidt, M., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. and Gunkel, W. (1991) Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganism from the North Sea. *Z. Naturforsch.* **46**, 167-203.
20. Suk, W. S., Son, H. J., Lee, G. and Lee, S. J. (1999) Purification and characterization of biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. SW1. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 56-61.
21. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4876-4882.
22. Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray, V. (1995) Characterization of new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1706-1713.

---

**Characterization of Oil-Degradation Biosurfactant Produced by *Bacillus* sp. TBM40-3**

Sun-Hee Kim, Sang-Cheol Lee, Ju-Soon Yoo, Woo-Hong Joo<sup>1</sup>, Soo-Yeol Chung<sup>2</sup> and Yong-Lark Choi\* (*Department of Biotechnology Faculty of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, Dept. of Biology, Chang-Won University, Chang-Won 641-773, Korea, Dept. of Food Science, Dong-Ju College, Busan, 604-715, Korea*)

**Abstract:** In this paper we studied about *Bacillus* sp. TBM40-3 producing biosurfactants. The strains were isolated from Taebak Mountain soil and identified as *Bacillus* sp. by 16S rDNA nucleotides sequence analysis. The TBM40-3 was gram-positive and rod-shaped as observed by field emission scanning microscopy. After the cultivation TBM40-3 in LB broth for 90 h and the surface tension of supernatant was decreased to 29 mN/m. Emulsification activity and stability of crude biosurfactant was measured by using water-immiscible hydrocarbons and oil as substrate. Maximum emulsification activity and stability was obtained from soybean oil. Also, we confirmed that the TBM40-3 producing biosurfactant had an effect on crude oil while showing a superior effect as compared to chemically synthesized surfactants (SDS, Span85, Tween40, Triton X-100). As a result, the *Bacillus* sp. TBM40-3 producing biosurfactant had potent properties as an emulsifying agent and an emulsion stabilizing agent.

---

Key words: *Bacillus* sp. TBM40-3, biosurfactant, emulsification activity, emulsification stability

\*Corresponding author