

Bacillus sp.에 의한 생물계면활성제의 생산 및 그의 성질

김진숙 · 송희상 · 정남현 · 방원기*

고려대학교 생명환경과학대학 생명유전공학부

Optimization of Production Conditions of Biosurfactant from Bacillus sp. and its Purification

Jin Sook Kim, Heesang Song, Namhyun Chung and Won-Gi Bang*

Division of Biotechnology and Genetic Engineering,
College of Life and Environmental Sciences, Korea University, Seoul 136-701

Received December 28, 2004; Accepted April 6, 2005

A bacterium capable of emulsifying hydrocarbon, n-hexadecane, and decreasing surface tension of the culture media using oil collapsing method was isolated. The bacterium was partially identified as *Bacillus* sp. and named BJS-51. n-Hexadecane was the most effective carbon source for production of biosurfactant. Surface tension was decreased from 76 dyne/cm to 31 dyne/cm and CMD (critical micelle dilution) had the highest value of 5.7 at 3% n-hexadecane. Ammonium phosphate was the most effective nitrogen source, when C/N ratio was 60, surface tension and CMD were 29 dyne/cm and 9.2, respectively. Optimum pH and temperature were 7.2 and 30°C, respectively. Produced biosurfactant was extracted and purified using organic solvent extraction method and preparative HPLC systems. After analysis by various color reaction, this biosurfactant was identified as lipopolysaccharide. Surface tension and CMC (critical micelle concentration) of purified biosurfactant were 27 dyne/cm and 0.08 g/l, respectively. CMD was 9.2, so the yield of biosurfactant was about 0.74 g/l at the optimal conditions. The biosurfactant was very stable at wide range of pH 2~12 with surface tension 29~31 dyne/cm and showed 29~30 dyne/cm of surface tension after heat treatment at 100°C for 60 min.

Key words: biosurfactant, bioemulsifier, *Bacillus* sp.

서 론

계면활성제는 양친매성 물질로서, 표면장력을 감소시키며, 서로 다른 두 상간의 계면장력을 감소시킴으로써 유화 분산을 촉진시키는 물질이다.^{1,2)} 우수한 세정력, 유화력, 분산력 등으로 인해 의약품, 식품, 화장품, 농약, 세제 및 각종 공업 생산 공정 뿐만 아니라,³⁾ 최근에는 microelectronics, 자기 기록 매체, 고급 전지, 전자 인쇄용 액체 인쇄제 등의 개발과 연구에도 활용되고 있다.^{4,5)} 또한, 계면활성제 시장은 현재 연간 100만톤 이상으로 매년 94억불 정도인 것으로 추산되며,⁶⁾ 수요도 꾸준히 증가하고 있다. 그러나, 현재 산업화되어 있는 화학 합성 계면활성제는 거의가 석유화학 제품을 원료로 하여 화학적으로 합성된 것들로서, 그 응용 범위가 넓기는 하나, 대부분이 독성을 가지고 있고 쉽게 생분해되지 않는 단점을 가지고 있다.⁷⁾

생물계면활성제(biosurfactant)는 미생물, 동물, 식물과 같은 생물 소재로부터 얻어지는 계면활성제로서 저독성이며, 생태계에 의한 분해가 용이하기 때문에 주목을 받고 있다.⁸⁾ 미생물에 의한 계면활성제의 생산은 1947년 Zobell에 의해 최초로 보고되었으며,⁹⁾ 1960년대 후반에 시작된 미생물이 탄화수소를 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 연구에서 탄화수소에서 비교적 다량으로 생물계면활성제를 생산하는 것이 알려졌다.^{10,11)} 현재 진행 중인 생물계면활성제의 공업적인 생산은 주로 미생물에 의존하고 있는데, 그 이유는 다른 동, 식물 세포에 비해 다루기가 쉽고, 종에 따라 다양한 종류의 계면활성제를 얻을 수 있으며, 성장 속도가 다른 생물체보다 훨씬 빨라 단시일 내에 다량의 생물계면활성제를 생산할 수 있기 때문이다.

생물계면활성제는 위에 설명한 바와 같이 우수한 생분해도, 낮은 독성, 환경친화성 같은 장점이 있으나, 실제적으로 이용되는 예는 드물다. 그 이유는 생산 가격이 비싸기 때문이다.¹²⁾ 이를 극복하기 위해서 미생물과 배지 개발을 통한 수율 증가, 유화능, 가용성, 습윤성 등의 고도의 특성과 선택성을 갖는 물질 합성, 저렴한 발효공정 개발, 우수한 계면활성 능력을 갖는 물질

*Corresponding author
Phone: +82-2-3290-3022; Fax: +82-2-923-8183
E-mail: agrchem@korea.ac.kr

개발 등이 필요하다.

이 논문에서는 위에서 언급한 문제를 극복하고, 우수한 계면활성제를 생산하기 위하여, 유류 오염지역, 광산지역 및 일반지역 등의 토양에서 계면활성능이 뛰어난 균주를 분리, 선별하여 생산에 필요한 최적 조건을 조사하였다. 또한 선별한 균주에서 생산된 생물계면활성제를 분리, 정제하여 그 구성 성분을 밝히고, 계면활성제로서의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

생물계면활성제의 생산 균주. 여러 지역의 토양시료를 일반적인 희석 방법을 이용하여 희석하고 희석액을 최소배지(20 ml// *n*-hexadecane, 4 g/l Na_2HPO_4 , 1.6 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l NH_4Cl , 0.2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g/l ferric ammonium citrate, 0.01 g/l CaCl_2 , pH 7.2)에 접종한 다음, 30°C에서 2~4일간 배양하였다. 이를 2회 반복하여 집적배양하였다. 그 후 배양액을 평판 최소배지에 도말하여 30°C에서 72시간 배양하였다. 이 때 *n*-hexadecane은 배양접시의 뚜껑에 도말하였다. 이 때 생성된 균락을 각각 액체배지에서 2~3일 배양 후 배양액의 oil film-collapsing 활성을 측정하여 생물계면활성제 생산 균주를 선별하였다. 선별한 균주를 이용한 생산배지로는 30 ml// *n*-hexadecane, 4 g/l Na_2HPO_4 , 1.6 g/l KH_2PO_4 , 1.56 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g/l ferric ammonium citrate, 0.01 g/l CaCl_2 , 0.2 g/l yeast extract, pH 7.2와 같은 조성의 배지를 사용하였다.

Oil film-collapsing 측정법은 다음과 같이 수행하였다. 페트리 접시(지름 50 mm)에 증류수 5 ml를 넣고, 그 위에 pennzoil 10-40W 20 μl 를 떨어뜨렸다. 곧 oil film이 형성되면 배양액 5 μl 를 oil film의 중앙에 떨어뜨렸다. 이 때 형성되는 투명대의 지름을 빛 아래서 측정하였다.¹³⁾ 선별된 균주의 생리적, 생화학적인 검사는 Vitek Systems(BioMerieux, USA)를 이용하였으며, 균주의 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology에 따라 수행하였다.¹⁴⁾ 균체의 생육은 spectrophotometer(IKB사, Novaspec II)를 사용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도(O.D., optical density)로서 측정하였다.

사용 시약. 실험에 사용된 *n*-alkane, 2-methylnaphthalene은 Sigma사(St. louis, USA)의 특급 시약이었으며, 균주 배양에는 Difco사(Detroit, Michigan, USA)의 시약을 사용하였다. 등유와 콩기름, 올리브유는 일반적인 제품을 사용하였으며, 그 밖의 다른 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

생물계면활성제의 유효도, 표면장력, 농도의 측정. 유효도는 Rosenberg의 표준방법을 사용하였다.¹⁵⁾ 검사할 시료 2.5 ml를 100 ml 삼각 플라스크에 넣은 후 50 mM Tris-Cl 완충액(pH 8.0) 7.4 ml를 첨가하고, *n*-hexadecane과 2-methylnaphthalene의 1:1(v/v) 혼합물 0.1 ml를 첨가하였다. 이 반응액을 28°C에서 1 시간 동안 진탕배양기(160 rpm)에서 왕복 진탕운동으로 반응시킨 뒤, 620 nm에서 흡광도(O.D.₆₂₀)를 측정하였다. 1 단위는 분석 반응시 O.D.₆₂₀이 0.1 증가할 때 필요한 생물계면활성제의 양으로 정의하였다. 배양액 및 생물계면활성제 용액의 표면장력은 Ring method에 따라,¹⁶⁾ 상온에서 Surface tensiometer

(Fisher, model 20)을 이용하여 측정하였다. 시료 10 ml를 취해 3회 반복 측정한 평균값을 사용하였다. 생물계면활성제의 농도는 CMC에 도달할 때까지 배양액을 희석하여 측정하였다.¹⁷⁾ 배양액 내의 생물계면활성제가 희석되어 CMC에 도달하면 그 후 표면장력은 급격히 증가하기 시작한다. 이 표면장력이 급격히 증가하는 시점의 희석 배수를 CMD(critical micelle dilution)라 하는데, 배양액 10 ml에 증류수를 1 ml씩 첨가하여 측정하였다.

생물계면활성제의 추출 및 정제. 배양액을 15분 동안 원심분리(8000 rpm, 4°C)하여 균체를 제거하였다. 상층액에 1 N HCl를 첨가하여 pH 2가 되도록 산성화시킨 후, 유기용매(chloroform : methanol = 2 : 1, v/v)를 넣어 혼합하였다. 그 후 5분 동안 원심분리(2000 rpm, 4°C)하여 두 개의 층으로 분리한 후, 상층액은 제거하고, 아래의 chloroform 층을 취하였다. 이를 3번 반복하여 조 생물계면활성제를 추출하였고, 감압증류기를 사용하여 45°C에서 농축하였다. 추출된 생물계면활성제를 chloroform에 녹인 후 chloroform으로 포화된 silica gel column(230-400 mesh)에 흡착시켰다. 충전 물질의 2배 부피의 chloroform으로 비극성물질과 흡착되지 않은 물질을 용출한 뒤, chloroform : methanol(3 : 1, v/v)로 용출하여 분획을 감압 농축했다. 이를 증류수에 녹인 후 표면장력을 측정하였다. 위의 정제 과정을 거친 생물계면활성제를 역상판(reverse-phase) column(SymmetryPrep™C₁₈, 7 μm , 7.8 × 300 mm, Waters)을 이용한 HPLC system(TSP사)으로 순수 정제하였다. 이동상으로는 acetonitrile/water = 95 : 5 용액을 3.0 ml/min의 속도로 사용하였고, UV detector로 215 nm에서 확인하였다.

생물계면활성제의 성분 분석. 정제한 생물계면활성제를 silica gel 60 F₂₅₄ plate 상에서 chloroform : methanol : water(65 : 25 : 4, v/v/v)의 전개용매를 사용하여 전개한 후 각종 발색 반응으로 생화학적 성질을 조사하였다.^{18,19)}

당 분석에는 탄수화물 시험에 사용되는 10% sulfuric acid, phenol-sulfuric acid, aldose나 ketose를 검출할 수 있는 diphenylamine reagent와 α -naphthol-phosphoric acid, ketohexose를 검출할 수 있는 orcinol-trichloroacetic acid, sugar alcohol를 검출할 수 있는 bromocresol green reagent를 이용해 발색한 뒤에, 생물계면활성제 분자내 당의 존재여부와 종류를 판단하였다. 아미노산 분석에는 ninhydrin 시약을 이용하여 발색한 뒤에, 생물계면활성제 분자내의 아미노산 존재여부를 판단하였다. 지질 분석에는 Rhodamine 6G 시약을 이용하여 발색한 뒤에, 생물계면활성제 분자내의 지질 존재여부를 판단하였다.

결과 및 고찰

생물계면활성제 생산 균주의 분리 및 선별. 경기도 광명시 산 19번지에 위치한 가학 광산과 그 밖의 여러 지역의 토양에서 채취한 토양 시료에 유일한 탄소원으로 *n*-hexadecane을 사용하여, 2회 집적 배양을 하여 우선적으로 *n*-hexadecane을 탄소원으로 이용할 수 있는 20여종의 균주를 분리하였다. 그 중 oil film-collapsing 방법을 이용해 지름이 15 mm 이상인 균주를 일차적으로 선별하였으며, 이 중 지름이 크고 표면장력이 낮은 균주인 BJS-51을 최종적으로 선택하였다(Table 1). 순수분리한

Table 1. Isolated microorganisms from various soil samples

Strain	Diameter (mm)	Surface tension (dyne/cm)
BJS-11	20	40.8
BJS-32	40	43
BJS-41	22	39.4
BJS-51	42	31.4
BJS-52	16	34
BJS-53	38	39.3
BJS-62	48	37.4
BJS-71	45	38

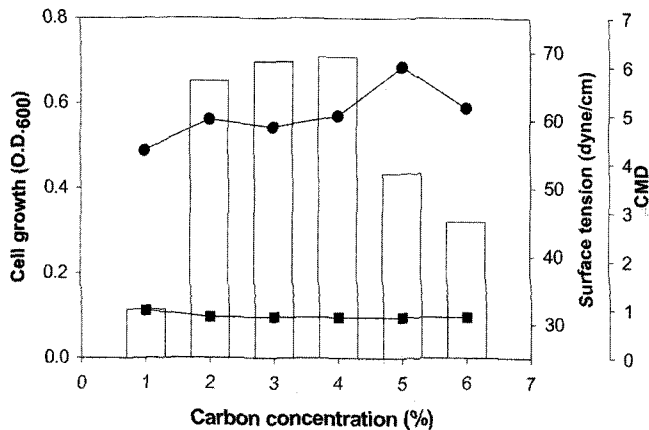


Fig. 1. Effect of carbon concentration on bisurfactant production. Cultivations were carried out for 4 days at 30°C in the medium containing 0.1% of NH₄Cl and various concentrations of *n*-hexadecane. Symbols: Cell growth (O.D. 600 nm) (●); Surface tension (dyne/cm) (■); CMD (Critical micelle dilution) (□).

BJS-51 균주를 그림 염색한 결과 양성으로 판명되었다. 그 외의 생리적, 생화학적 특성들을 비교한 결과 BJS-51 균주는 *Bacillus* sp.로 부분동정되었다(자료 미제시).

생물계면활성제 생산에 미치는 탄소원의 영향. 생물계면활성제 생산 배지의 *n*-hexadecane 대신 수용성 또는 불용성의 각종 탄소원을 2%씩 첨가하여 30°C에서 4일간 진탕배양한 후 균체의 흡광도, 표면장력, CMD를 측정하였다. Table 2에 나타난 것과 같이 탄소원으로 *n*-tetradecane, *n*-hexadecane, *n*-octadecane의 탄소수가 12개 이상인 탄화수소를 사용하였을 경우 표면장력이 현저히 감소하였으며, 광유나 액상 파라핀을 사용하였을 경우에도 표면장력이 감소하였다. 이중 표면장력이 낮고 CMD 값이 높은 *n*-hexadecane을 탄소원으로 선택하였다. 일반적으로 탄소원으로 많이 사용하는 포도당의 경우 균체의 생육은 좋으나 배양액의 표면장력이 감소하지는 않았다. 생물계면활성제의 최적 생산을 위해 질소원의 농도는 고정하고, 위의 결과에 따라 선택된 *n*-hexadecane의 농도를 1~6%까지 변화시켜 생물계면활성제의 생산량을 조사하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. *n*-Hexadecane 농도 3%와 4%일 때 표면장력과 CMD가 유사하여 이후 *n*-hexadecane의 농도는 3%를 계속 사용하였다.

생물계면활성제 생산에 미치는 질소원의 영향. 탄소원인 *n*-hexadecane의 농도를 3%로 고정하고, NH₄Cl 이외의 다른 여러 무기 질소원을 C/N율이 75가 되도록 첨가하여 균체의 흡광도, 표면장력 및 CMD를 측정하였다. 그 결과 Table 3에서 나타난

Table 2. Effect of various carbon sources on biosurfactant production

Carbon Source	Cell growth (O.D. ₆₀₀)	Surface tension (dyne/cm)	CMD ^a
Water-soluble			
Glucose	6.76	72	1
Ethanol	2.02	71	1
Water-insoluble			
Hydrocarbon			
<i>n</i> -Tetradecane	0.760	31	4.2
<i>n</i> -Hexadecane	0.561	31	5.7
<i>n</i> -Octadecane	0.473	32	3.1
Oil			
Soybean oil	0.488	56.5	1.1
Olive oil	0.740	49	1
Corn oil	1.15	48	2.1
Mineral oil	0.523	37	2.5
Liquid paraffin	0.325	38	2.2

^aCMD: Critical micelle dilution
*Cultivations were carried out for 4 days at 30°C in the medium containing 0.1% of NH₄Cl and 2% of various carbon sources.

Table 3. Effect of nitrogen source on biosurfactant production

Nitrogen source	Cell growth (O.D. ₆₀₀)	Surface tension (dyne/cm)	CMD ^a
NH ₄ Cl	0.570	31	6.1
NH ₄ NO ₃	0.521	31.2	4
CH ₃ COONH ₄	0.465	35	2.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.585	31.5	1.4
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.582	31	6.6
NaNH ₂ HPO ₄ · 4H ₂ O	0.387	37	3.4
KNO ₃	0.292	32	1.2
NaNO ₃	0.179	31	3.9

^aCMD: Critical micelle dilution
*Cultivations were carried out for 4 days at 30°C in the medium containing various nitrogen sources and 3% of *n*-hexadecane.

것과 같이 (NH₄)₂HPO₄를 사용하였을 때 생물계면활성제 생산이 가장 우수하였다. 탄소원인 *n*-hexadecane의 농도를 3%로 고정하고, 위의 결과에 따라 (NH₄)₂HPO₄의 농도를 조절하여 C/N율을 변화시킨 후 생물계면활성제 생산의 최적 조건을 조사한 결과, Fig. 2에서 나타난 것과 같이 C/N율이 60일 경우 CMD가 가장 높게 나타났다. 따라서 이 이후의 실험은 C/N율을 60으로 하였다.

생물계면활성제 생산에 미치는 초기 pH와 온도의 영향. 생물계면활성제의 최적 생산을 위해 배양액의 초기 pH를 5에서 9까지 변화시켜 배양후 표면장력과 CMD를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3(a)에서 나타난 것처럼, pH 7.2일 때 표면장력이 가장 낮으며, CMD는 가장 높은 결과를 얻어 이 pH를 생물계면활성제 생산의 최적 pH로 결정하였다. 생물계면활성제의 최적 생산을 위해 배양 온도를 25~35°C 범위에서 배양하여 표면장력과 CMD를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3(b)에서 나타난 바와같이 30°C에서 가장 높은 CMD값을 얻어 생물계면활성제 생산의 최적 온도를 30°C로 결정하였다.

생물계면활성제 생산에 미치는 배양 시간의 영향. 상기 최적

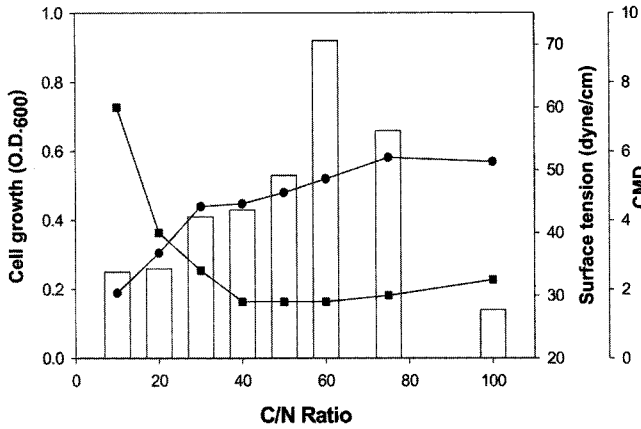


Fig. 2. Effect of C/N ratio on biosurfactant production. Cultivations were carried out for 4 days at 30°C in the medium containing various concentrations of (NH₄)₂HPO₄ and 3% of n-hexadecane. Symbols are the same as Fig. 1.

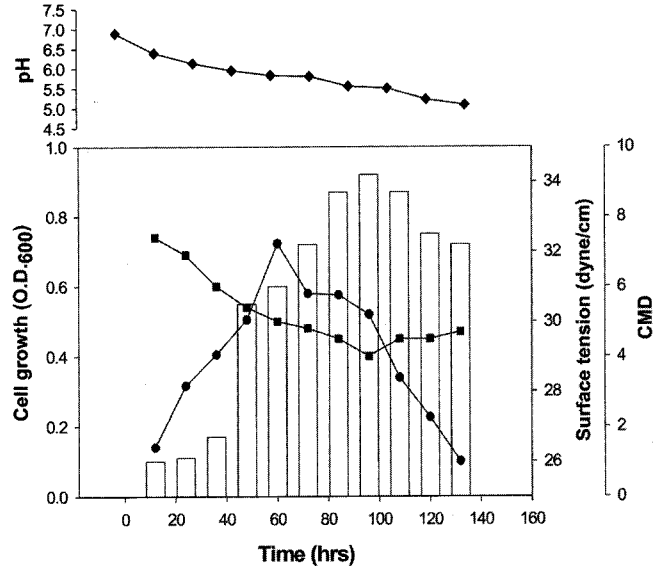


Fig. 4. Time course of biosurfactant production. Cultivations were carried out at 30°C containing 0.156% of (NH₄)₂HPO₄ and 3% of n-hexadecane. Symbols are the same as Fig. 1.

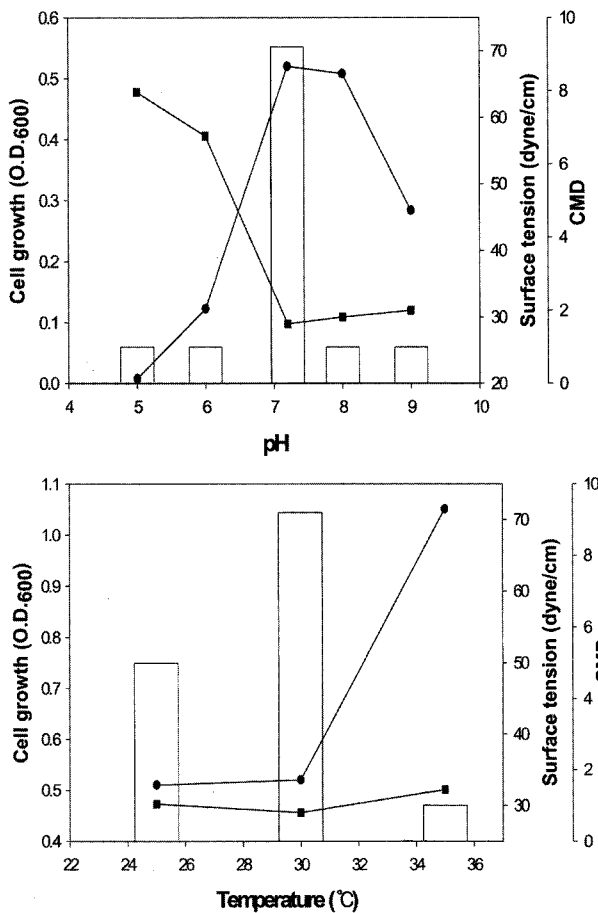


Fig. 3. Effect of pH (a) and temperature (b) on biosurfactant production. Cultivations were carried out for 4 days in the medium containing 0.156% of (NH₄)₂HPO₄ and 3% of n-hexadecane. Symbols are the same as Fig. 1.

배양 조건하에서 *Bacillus* sp. BJS-51에 의한 생물계면활성제 생산의 배양시간에 따른 영향을 조사하여 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 96시간 배양시 표면장력이 29 dyne/cm로 가장 감소하였으며, 이 때 CMD 값은 9.2로서 가장 크게 나타났다.

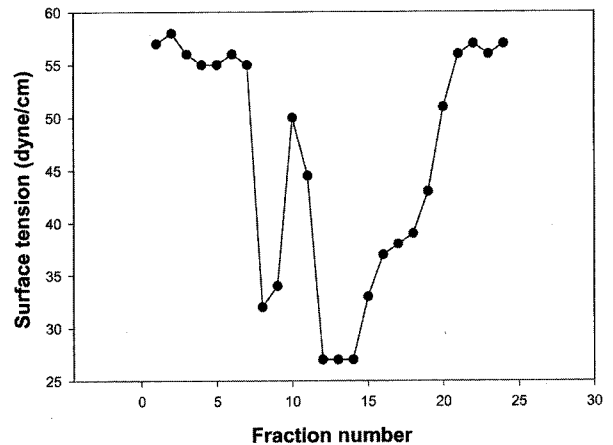


Fig. 5. Elution diagram of silica gel column chromatography for biosurfactant.

생물계면활성제의 추출 및 정제. 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이, 감압 증류기를 이용하여 45°C에서 농축하여 얻어진 액상 침전물을 silica gel(230-400 mesh)에 흡착 후, 각 분획당 10 ml씩 용출하였다. 각 분획을 감압 농축한 후 증류수 10 ml에 녹여 표면장력을 측정하였다. 그 결과 활성 분획은 8과 12~14로 나타났다(Fig. 5). 분획 12~14가 활성이 더 좋으므로 최종적으로 이를 선택하였다. 선택한 생물계면활성제를 모아서 감압 농축한 뒤, preparative HPLC를 이용하여 더 순수하게 정제하였다. 정제된 생물계면활성제는 단일 peak를 나타내었다(자료 미제시).

생물계면활성제의 구성 성분. 정제된 생물계면활성제의 구성 성분을 알아보기 위해 chloroform : methanol : water(65 : 25 : 4)의 전개용매를 사용해 silica gel 60 F₂₅₄ 판에 전개하였다. 그 결과 R_f 0.47에서 점이 나타났으며, 각종 발색 시약을 이용하여 생화학적 반응을 살펴본 결과(Table 4), 10% sulfuric acid, phenol-sulfuric acid의 경우 발색 반응에 양성으로 나타났으나,

Table 4. Identification of biosurfactant by colorimetric method

Compound	Detection reagent	Result
Carbohydrate	10% Sulfuric acid	(+) ^a
	Phenol-sulfuric acid	(+)
	Diphenylamine reagent	(-)
	α -Naphthol-phosphoric acid	(-)
	Orcinol-trichloroacetic acid	(-)
	Bromocresol green reagent	(-)
Lipid	Rhodamine 6G	(+)
Amino acid	Ninhydrine	(-)

^aSymbols: +, positive; -, negative

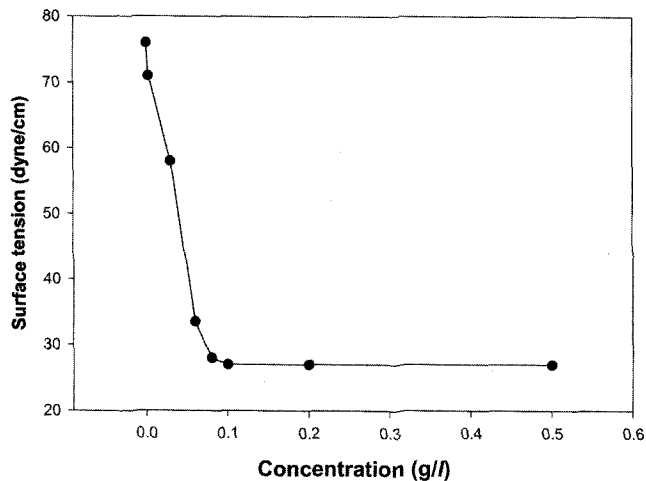


Fig. 6. Plot of surface tension versus concentration of the purified biosurfactant. Surface tensions are measured by surface tensiometer with the ring method at room temperature. Biosurfactant was dissolved in distilled water to the indicated concentrations.

그 외의 diphenylamine reagent, α -naphthol-phosphoric acid, orcinol-trichloroacetic acid, bromocresol green의 탄수화물 발색 반응은 음성으로 나타났다. Rhodamine 6G에 의한 lipid 발색의 경우에는 UV에 형광으로 나타났으며, ninhydrin에 의한 아미노산 발색은 음성으로 나타났다. 정제한 생물계면활성제를 산 가수분해하였을 경우, diphenylamine reagent에 양성반응을 나타내었다.

따라서 이 물질은 10% sulfuric acid와 phenol-sulfuric acid에 양성반응을 나타내었으므로 탄수화물을 포함하고 있다는 것을 알 수 있었으며, 그 외의 당 발색 시약에는 반응하지 않고, 산 가수분해시, diphenylamine reagent에 양성을 나타내었으므로 aldose나 ketose로 구성된 다당류를 포함함을 알 수 있었다. 아미노산은 포함하지 않으므로 이 생물계면활성제는 지질다당계열임을 알 수 있었다.

pH 및 온도 안정성. 배양 상층액의 pH를 다양하게 변화시킨 후 24시간 후 표면장력을 측정하였다. 생물계면활성제의 활성은 2~12의 pH범위에서 안정하였으며, 알칼리 pH에서 약간의 활성 감소가 있었다. 또한, 배양 상층액을 100°C에서 60분동안 시간별로 열을 가한 후 그 표면장력을 측정하였을 때, 계면활성은 열을 가하는 동안에도 유지되었으며, 121°C, 15 psi에서 15분간 열을 가했을 경우에도 활성이 유지되었다.

표면장력, CMC, 유효도. *Bacillus* sp.로부터 생산된 생물계면

활성제를 정제하여 표면장력과 CMC를 측정하였다. 그 결과 표면장력은 27 dyne/cm로 매우 우수한 활성능을 보였으며, 생물계면활성제의 농도가 0.06~0.08 g/l 사이에서 표면장력이 급격하게 감소하였으며, 그 이후의 농도에서는 더 이상 표면장력이 감소하지 않았다. 따라서 생물계면활성제의 CMC는 0.06~0.08 g/l의 값을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 6).

이는 기존의 화학합성 계면활성제의 표면장력이 25~50 dyne/cm 사이이며, CMC가 0.1~1.5 g/l의 값을 가진다는 사실과 비교해 보았을 때, 매우 활성이 높은 것을 알 수 있었다. CMC라는 효율적인 측면에서 보았을 때 *N. erythropolis*의 0.02,¹⁶⁾ *Nocardia* sp. 1-417의 0.02,²⁰⁾ *Candida* sp. SY16의 0.01²¹⁾에 비해 생산된 생물계면활성제의 효율이 다소 낮으나 그 밖의 다른 생물계면활성제보다는 높은 효율성을 갖는 것으로 나타났다. 그리고, Rosenberg의 표준 방법에 의해 배양액의 유효도를 측정한 결과 162 unit이었다. *Bacillus subtilis*에 의해 생산되는 surfactin이 물의 표면장력을 27 dyne/cm까지 낮춤으로서 매우 우수한 계면활성제로 알려져 있으며, 많은 분야에서 사용되고 있다.^{22,23)} 하지만, 본 연구에서 생산된 계면활성제 또한, 위에서 언급한 바와 같이 표면장력을 크게 낮추는 능력을 가지고 있으며, 기존의 surfactin이 lipopeptide인 것에 비해 지질다당계열의 계면활성제로서 서로 다른 구조를 가졌다는 점이 surfactin과는 차별되는 영역에서의 응용이 가능할 것으로 생각된다. 또한, 위에서 보인 바와 같이, 열과 pH에 대한 안정성이 매우 높은 것으로 확인되어 다양한 분야에의 적용을 더욱 가능하게 할 것이다.

초 록

토양 시료로부터 *n*-hexadecane 대사능을 가지며 배양액의 표면장력을 감소시키고, 탄화수소를 가장 잘 유화시키는 세균을 oil-film collapsing 방법을 통해 선별하였다. 세균은 *Bacillus* sp.로 부분동정되었으며, BJS-51로 명명하였다. 생물계면활성제의 최적 생산에는 *n*-hexadecane이 가장 효과적인 탄소원이었으며, 3%의 농도일 때 표면장력이 76 dyne/cm에서 31 dyne/cm로 감소하였다. 이 때, CMD(critical micelle dilution)가 5.7로 가장 높았다. 질소원으로는 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 가 가장 효과적이었으며, C/N ratio가 60인 경우 표면장력이 29 dyne/cm, CMD가 9.2로 가장 활성이 좋았다. 생산 최적 pH는 7.2였으며, 최적 온도는 30°C였다. *Bacillus* sp. BJS-51에 의해 생산된 생물계면활성제를 유기용매 추출법과 preparative HPLC systems을 통해 추출, 정제하였다. 각종 발색 시약으로 정제된 생물계면활성제의 생화학적 성질을 조사한 결과, 지질다당임을 확인 할 수 있었다. 생산된 생물계면활성제의 표면장력은 27 dyne/cm까지 감소하였으며, CMC(critical micelle concentration)는 0.08 g/l였다. 상기의 최적 조건에서 생물계면활성제의 생산량은 CMD값이 9.2이었으므로 약 0.74 g/l이었다. 생산된 생물계면활성제는 pH 2~12 사이에서 표면장력 29~31 dyne/cm로 안정하였으며, 100°C에서 60분간 열을 가한 후에도 표면장력 29~30 dyne/cm로 안정하였다.

Key words: biosurfactant, bioemulsifier, *Bacillus* sp.

감사의 글

본 연구는 2003년도 고려대학교 교수 특별연구비에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Kosaric, N., Gray, C. C. and Carin, W. L. (1983) Microbial emulsifiers and deemulsifiers. *Biotechnology* **3**, 575-592.
2. Layman, P. (1985) Industrial set for strong growth. *Chem. Eng. News* **63**, 23.
3. Lim, K. H. (1996) Their structure, properties, and applications. *J. Korean Oil Chemist's Soc.* **13**, 1-20.
4. Milton, M. J. (1987) Surfactants in engineering technology. *Surfactant Science Series*. 26. Marcell Dekker, New York.
5. Banat, I. M., Makkat, R. S. and Comeotra, S. S. (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 495-508.
6. Shaw, A. (1994) Surfactant-94. *Cosmat. Chem. Specialities*. **70**, 24-34.
7. Greek, B. F. (1991) Sales of detergents growing despite recession. *Chem. Eng. News* **69**, 25-52.
8. Magaritis, A., Zajic, J. E. and Gerson, D. F. (1979) Production and surface active properties of microbial surfactants. *Biotech. Bioeng.* **21**, 1151-1162.
9. Zobell, C. E. (1947) Bacterial release of oil from sedimentary material. *Oil Gas. J.* **46**, 62-67.
10. Boyle, C. D. and Reade, A. E. (1983) Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 392-399.
11. Copper, D. G. and Paddock, D. A. (1984) Production of a biosurfactant from *Torulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 173-176.
12. Desai, J. D. and Banat, I. M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* **61**, 47-64.
13. Lang, S. and Wulbrandt, D. (1999) Rhamnolipids- Biosynthesis, Microbial Production and Application Potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 22-47.
14. Singh, M. and Desai, J. D. (1989) Bergey's manual of synthetic bacteriology. Vol. 1.
15. Rogenberg, E., Zuckerberg, A., Ruminovitz, C. and Gutnick, D. I. (1979) Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 402-408.
16. Magaritis, A., Kennedy, A., Zajic, J. E. and Gerson, D. F. (1979) Biosurfactant production by *Nocardia erythropolis*. *Dev. Ind. Microbiol.* **20**, 623-630.
17. Zajic, J. E. and Seffens, W. (1984) Biosurfactants, *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **1**, 87-107.
18. Shirley C, C., Gunter, Z. and Joseph, S. (1986) Handbook of chromatography. Vol I, CRC Press. pp. 176-187.
19. Gunter, Z. and Joseph, S. (1977) Handbook of chromatography. Vol II, CRC Press. pp. 103-173.
20. 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. 1-417. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **31**, 249-253.
21. Kim, H. S., Yoon, B. D., Choung, D. H. and Oh, H. H. (1999) Characterization of biosurfactant, mannosylerythritol lipid produced from *Candida* sp. SY16. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 713-721.
22. Arima, K., Kakinuma, A. and Tamura, G. (1968) Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 488-494.
23. Cooper, D. G., Macdonald, C. R., Duff, S. J. B. and Kosaric, N. (1981) Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 408-412.