

Biosurfactant의 생산을 위한 *Nocardia* sp. L-417균주의 배양조건 최적화

김순한 · 임이종 · 이태호[†]

부산대학교 미생물학과

Optimization of Culture Condition of *Nocardia* sp. L-417 Strain for Biosurfactant Production

Soon-Han Kim, Ee-Jong Lim and Tae-Ho Lee[†]

Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

The strain producing biosurfactant was isolated from soil samples. The isolated strain was identified as the genus *Nocardia* through its morphological, cultural and physiological characteristics. A high concentration of the biosurfactant by *Nocardia* sp. L-417 was obtained after 4 days of cultivation in the culture medium containing 3% n-hexadecane, 0.1% NaNO₃, 0.02% K₂HPO₄, 0.01% H₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.01% CaCl₂, 0.02% yeast extract, and 0.02% tryptone. The optimum pH and temperature for biosurfactant production were pH 6.0 and 30°C, respectively. Furthermore, most biosurfactants were produced during the exponential growth phase, and this fact indicated that the biosurfactants production was growth-associated. The biosurfactant showed the good emulsification activities on various emulsifying substrates such as bunker A, paraffin, corn oil and olive oil which are used widely in industries.

Key words: biosurfactant, microbial emulsifier, emulsifying activity

서 론

계면활성제(surfactant, emulsifier)는 분자내에 소수성부분과 친수성부분을 함께 가지며 계면상의 장력을 감소시키는 능력을 소유하고 있는 양극성분자들을 말한다(1,2). 이러한 특성들에 의해 우수한 세정력, 유화력, 분산력 등을 가지게 되며, 의약품, 식품, 화장품, 농약, 세제 등의 산업 전반적인 분야에서 이용되고 있다(3). 계면활성제의 시장은 매년 94억불 정도인 것으로 추산되며(4), 그들의 수요도 꾸준히 증가될 것으로 기대하고 있다(5). 현재 산업화되고 있는 계면활성제는 거의가 석유화학제품을 원료로하여 화학적으로 합성된 것들이며(6,7), 그 응용범위가 넓기는 하지만, 실제 사용되고 있는 계면활성제 중에서 많은 종류가 독성이 있고 쉽게 생분해되지 않기 때문에 1980년대부터 선진국에서는 합성계면활성제품의 많은 품목들에 대해 사용 및 생산금지조치를 취하고 있으며 alkylbenzolsulfate (ABS)가 그중 하나이다. 그러나 생물유래의 계면활성

제(biosurfactant)는 화학구조의 다양성, 환경친화성, 대량생산 가능성, 인체안전성 등의 특성들 때문에 상당한 관심의 대상이 되고 있다(8-10).

1947년 Zobell에 의해 미생물유래 계면활성제의 존재가 확인된 후(11), 많은 종류의 미생물에서 이러한 계면활성제의 생산이 가능하게 되었으며(12-14), 1960년대 말에는 합성계면활성제에 의한 환경오염문제 등이 표면화되어 높은 안전성과 생분해성을 가진 계면활성제의 개발이 요구되었다. 이러한 상황에서 1960년대 후반에 시작된 탄화수소를 원료로 한 석유발효의 연구에서 미생물이 비교적 다량으로 계면활성제를 생산하는 것이 알려졌고 생물자원을 활용하여 고등기술을 개발하려는 선진기술적 측면에서 biosurfactant 개발이 중요한 연구분야로 대두되었다(15,16).

미생물유래의 계면활성제(microbial surfactant) 중 상품화되어 있는 대표적인 것은 미국의 Petroleum가 생산하는 Emulsan으로써, 현재 기름에 오염된 탱크의 처리, 전자기판의 3차 세척용 등으로 사용되고 있다. 그

[†]To whom all correspondence should be addressed

외에도 다양한 미생물 계면활성제가 특허, 상품화되고 있으나 산업체 간의 경쟁 및 보안관계로 일부만이 보고되고 있는 실정이다(17).

본 연구에서는 산업적으로 적용범위가 넓은 미생물 유래의 새로운 계면활성제의 개발을 위해, 토양으로부터 표면장력 감소능과 유화활성을 동시에 나타내는 균주를 순수 분리하여, 그 균주의 동정 및 최적 생산조건을 검토한 결과에 대해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

Biosurfactant 생산균주의 분리

Biosurfactant를 생산하는 균주를 분리하기 위해 부산근교 및 경남일대에서 채취한 토양시료 약 1g을 멸균수 10ml에 현탁시켜 20분간 방치한 후 그 상등액을 분리용 고체배지(4% *n*-hexadecane, 0.2% NaNO₃, 0.01% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.01% CaCl₂, 0.01% yeast extract, 2% agar, pH 6.0)에 희석평판법으로 배양하여 생성 colony를 순수분리하였다. 순수분리된 균주들은 동일배지 10ml에 1주간 진탕배양하여 그 상등액을 대상으로 균의 생육과 표면장력을 측정하였으며, 이들 중 표면장력 감소능이 우수한 균주를 분리하여 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

균주의 동정

공시균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 생화학적, 생리학적 특성을 조사하였으며, 이에 따른 공시균의 분류와 동정은 Bergy's manual of systematic bacteriology(18)와 Biochemical tests for identification of medical bacteria(19)에 준하여 실시하였다.

생육도 측정

순수분리된 biosurfactant 생산균을 500ml shaking flask에 접종하여 30°C에서 진탕배양(Vision Co. Ltd.)을 220rpm에서 행하면서 일정한 시간별로 생육도를 측정하였다. 이때 사용한 방법은 배양액을 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액은 버리고 남은 균체를 증류수와 세척액(chloroform : methanol=2 : 1, v/v)을 사용하여 세척한 후, 남은 균체를 105°C에서 5시간 건조하여 균체량을 측정하였다.

표면장력 및 계면장력의 측정

표면장력 및 계면장력의 측정은 CSC-DuNouy Ten-

siometer를 이용한 ring method(20)로서 측정하였다. 계면장력은 각 농도의 biosurfactant수용액과 *n*-hexadecane과의 계면에서 측정하였다.

Biosurfactant의 농도측정

Biosurfactant의 상대적 양의 측정은 Santos 등(21)의 dilution factor(Fcmc) 방법에 의해 측정하였다. 즉, 배양액 10ml을 대상으로 1ml씩의 증류수를 단계적으로 희석하여 표면장력이 증가하는 시점의 희석배수를 곱하여 Fcmc로 나타내었다.

Biosurfactant의 생산조건

공시균의 biosurfactant 최적 생성조건을 설정하기 위하여, 탄소원, 질소원, 무기염, 통기량 및 배양 온도의 영향 등을 30°C에서 5일간 배양시켜 표면장력, dilution factor(Fcmc) 및 건조균체량을 측정하여 서로 비교 검토하였다. 접종 균체량은 biosurfactant의 생산배지에서 사흘간 전배양한 배양액 1%씩을 100ml의 배지에 일정하게 접종하였다.

유화활성 측정

유화활성의 측정은 Rosenberg 등(22)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉 0.01M MgSO₄ · 7H₂O를 함유하고 있는 0.05M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 7.5ml에 유화기질인 *n*-hexadecane 0.1ml를 혼합한 후, 배양상등액 0.2ml를 넣고 1분간 vortex하여 유화시킨 다음 10분간 정치시킨 뒤, 액의 하층부에서 1ml를 뽑아내어 540nm에서 흡광도를 측정하여 탁도로서 유화활성을 나타내었다. Blank로는 유화기질을 넣지 않은 것(blank-1; 배양상등액 자체의 탁도를 제거하기 위한 것)과 배양상등액 대신 biosurfactant 생산배지를 넣은 것(blank-2; 배지 자체의 유화활성치를 제거하기 위한 것)을 사용하여 sample의 탁도에서 blank의 탁도를 뺀값을 유화활성값으로 정하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

공시균주 L-417을 Bergy's manual of determinative bacteriology 제8판과 Bergy's manual of systematic bacteriology Vol. 2에 따라 동정실험을 행한 결과는 Table 1과 같다. Gram양성으로서 미발달된 균사체와 1.5~3.0μm 크기의 fragments가 관찰되고 있으며, sorbose

Table 1. Taxonomical characteristics of the isolated strain L-417

1. Morphological characteristics	
Shape of cell	Mycelium and rod
Cell size(μm)	1.5~3.0
Gram stain	Positive
Motility	Nonmotile
Acid-fast stain	Positive
2. Cultural characteristics	
Colony on meat extract agar(30°C, 2~3days)	
Colonies	Circular, convex and dried
Surface	Rough
Color	White to yellow
Opacity	Opaque
3. Physiological characteristics	
Catalase	Positive
Cytochrome oxidase	Negative
Oxidase-fermentation test	Positive
Gelatin liquefaction test	Negative
Formation of	
Indole	Negative
H ₂ S	Negative
Urease test	Positive
Citrate utility test	Positive
Nitrate reduction test	Positive
β -Galactosidase test	Positive
Ornithine decarboxylase test	Negative
Lysine decarboxylase test	Negative
Arginine dihydrolase test	Negative
Esculin hydrolysis test	Positive
N-Acetylglucosaminidase test	Positive

와 inositol을 제외한 대부분의 탄수화물에 대하여 이용능을 보이며, catalase test 양성, oxidase test 음성 등의 여러 특성들로 부터 분리균주는 *Nocardia*속으로 판단되었다.

Biosurfactant의 생산조건

탄소원

Biosurfactant 생산배지의 *n*-hexadecane 대신 각종 탄소원을 4%씩 첨가하여 30°C에서 5일간 진탕배양한 후, 전술한 측정법에 따라 건조 균체량, 표면장력 및 Fcmc를 측정하였다. Table 2에 나타난 것과 같이 탄소원으로 *n*-dodecane, *n*-tetradecane, *n*-hexadecane과 같은 탄소수가 12개 이상인 aliphatic hydrocarbon들을 사용했을 경우에 표면장력의 현저한 감소를 보였으며, 이외에 식용성 oil들과 oleic acid의 경우도 현저한 표면장력의 감소와 함께 비교적 높은 Fcmc값을 나타내었다. 따라서 그들 중 현저한 표면장력 감소와 함께 Fcmc값이 가장 높은 *n*-hexadecane을 탄소원으로 선택하였다.

통상 탄소원으로서 많이 사용되는 glucose, fructose

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

Carbon source (4%)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (dyne/cm)
Glucose	1.1	1.0	66
Sucrose	1.2	1.0	57
Fructose	0.5	1.0	68
<i>n</i> -Pentane	0.2	1.0	68
<i>n</i> -Hexane	1.1	1.0	70
<i>n</i> -Heptane	0.3	1.0	72
<i>n</i> -Octane	0.4	1.0	70
<i>n</i> -Nonane	0.2	2.5	72
<i>n</i> -Decane	0.4	1.0	68
<i>n</i> -Undecane	0.8	1.7	51
<i>n</i> -Dodecane	1.5	1.2	27
<i>n</i> -Tetradecane	2.1	1.4	29
<i>n</i> -Hexadecane	6.3	6.0	28
<i>n</i> -Octadecane	0.9	1.2	28
Soybean oil	8.4	2.0	33
Olive oil	3.5	2.4	29
Oleic acid	2.4	1.7	39
Bunker A	1.6	1.4	35
Bunker B	4.2	1.0	31
Bunker C	1.8	1.0	39
Cyclohexane	0.5	2.2	55
Benzene	0.9	1.0	70
Ethylbenzene	0.7	1.0	64
Hexylbenzene	0.8	2.2	59
Toluene	0.5	1.0	70
Paraffin	6.8	1.2	29

Each carbon source was added to the basal medium containing 0.2% NaNO₃, 0.01% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7 H₂O, 0.01% CaCl₂, and 0.01% yeast extract(pH 6.0). Seed culture(1ml) was inoculated into a 500ml shaking flask containing 50ml of medium and cultivated at 30°C for 5 days on a reciprocal shaker.

및 sucrose의 경우 균체의 생육과 배양액의 표면장력 감소능이 극히 저조하여, 본 공시균주인 *Nocardia* sp. L-417주는 탄소수가 비교적 긴 탄화수소 화합물을 기질로 이용할 경우에만 biosurfactant를 생산하는 미생물로 판단되었다.

이와 더불어 *n*-hexadecane의 농도에 따른 균의 생육과 Fcmc를 조사한 결과, Table 3에 나타난 것과 같이 *n*-hexadecane 농도가 3%일 경우에 활성이 가장 우수하였다.

질소원

0.2% NaNO₃와 0.01% yeast extract 대신 다른 여러 가지 무·유기 질소원을 0.2%가 되도록 첨가하여 건조 균체량, 표면장력 및 Fcmc를 측정하였다. 그 결과 Table 4에 나타난 것과 같이 NaNO₃, KNO₃와 유기질소원을 함께 사용했을 때와 유기질소원 중 Bacto peptone과 poly-

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

<i>n</i> -Hexadecane (%)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (dynes/cm)
1.0	1.1	3.0	29
2.0	1.8	5.0	29
3.0	6.3	7.3	28
4.0	4.9	6.0	27
5.0	2.6	4.0	28
6.0	4.2	6.0	28

n-Hexadecane as carbon source was added to the basal medium containing 0.2% NaNO₃, 0.01% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.01% CaCl₂, and 0.01% yeast extract (pH 6.0). The culture conditions are the same as Table 2.

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

Nitrogen source	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (dynes/cm)
NH ₄ Cl	2.6	1.0	33
NH ₄ Cl + Yeast extract	4.2	2.7	33
NH ₄ NO ₃	5.9	2.2	42
NH ₄ NO ₃ + Yeast extract	6.6	1.0	52
NaNO ₂	3.7	1.5	32
NaNO ₂ + Yeast extract	4.9	1.7	30
NaNO ₃	2.9	1.4	29
NaNO ₃ + Yeast extract	6.2	6.0	29
KNO ₃	3.3	2.3	30
KNO ₃ + Yeast extract	5.0	4.0	29
CH ₃ COONH ₄	5.2	1.0	33
CH ₃ COONH ₄ + Yeast extract	6.4	2.7	33
Urea	3.1	1.0	35
Urea + Yeast extract	4.6	2.8	31
Bactopeptone	4.4	4.5	28
Polypeptone	4.9	4.8	29
Beef extract	2.5	1.8	28
Malt extract	2.8	1.3	29
Yeast extract	4.7	2.5	30
Tryptone	7.1	4.0	29

Each nitrogen source was added as concentration of 0.2 % for inorganic compounds and 0.01% for organic compounds to the basal medium containing 3% *n*-hexadecane, 0.01% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.01% CaCl₂ (pH 6.0). The culture conditions are the same as Table 2.

peptone을 사용하였을 때 균의 증식과 Fcmc에서 양호한 결과를 나타내었다. 이 중에서도 균의 증식과 Fcmc 값이 가장 높은 NaNO₃와 yeast extract을 질소원으로 선택하였다.

NaNO₃와 yeast extract 각각의 농도에 따른 균의 생육과 Fcmc값은 Table 5에 나타내었다. NaNO₃의 농도가 0.1%일 때 가장 우수한 활성을 보이고 있으며, 유기

질소원인 yeast extract는 0.02~0.04%일 때 좋은 활성을 보이고 있으나, 그 차이가 그리 크지 않아 본 실험에서는 균의 증식과 Fcmc값의 양 측면에서 모두 우수한 결과를 보인 0.02%를 최적 농도로 결정하였다.

무기염

Biosurfactant 생산배지에 첨가되는 K₂HPO₄, KH₂PO₄와 MgSO₄ · 7H₂O 그리고 CaCl₂의 농도를 0.001~0.100 %까지 단계별로 조절하여 생육도, 표면장력 및 Fcmc 값을 측정 한 결과 0.02% K₂HPO₄, 0.01% KH₂PO₄, 0.01% CaCl₂ 그리고 0.01% MgSO₄ · 7H₂O에서 biosurfactant의 생산이 양호한 것으로 나타났다(data not shown).

배양온도

Biosurfactant 생산배지에서 배양온도를 20~40°C 범위의 온도별로 배양하여 균의 생육, 표면장력 및 Fcmc 값을 측정 한 결과 Table 6에서와 같이 30°C에서 가장 높은 활성을 보여, 이 온도를 bioemulsifier 생성에 필요한 최적 배양온도로 결정하였다.

통기량의 변화

공시균주의 생육과 biosurfactant 생성에 적합한 통기량을 얻기 위해 500ml shaking flask에 배지를 50ml에서 300ml까지 첨가하여 건조균체량과 biosurfactant

Table 5. Effect of NaNO₃ and yeast extract concentration on the production of the bioemulsifier

Concentration (%)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (dynes/cm)	
NaNO ₃	None	4.1	4.1	30
	0.05	4.8	4.8	29
	0.10	6.2	6.5	29
	0.20	6.7	5.3	30
	0.30	6.7	4.2	30
	0.40	6.9	3.7	30
	0.50	5.9	3.5	31
Yeast ext.	None	3.5	1.2	28
	0.001	3.1	2.5	28
	0.005	5.7	1.8	30
	0.010	3.8	6.4	30
	0.020	6.2	6.5	29
	0.030	6.6	5.6	28
	0.040	5.6	6.2	28
	0.050	7.6	6.3	29
0.100	8.9	5.8	30	

NaNO₃ and yeast extract as nitrogen source were added with the indicated concentration to the basal medium containing 3% *n*-hexadecane, 0.01% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, and 0.01% CaCl₂, (pH 6.0). The culture conditions are the same as Table 2.

Table 6. Effect of cultivation temperature on the production of the bioemulsifier

Cultivation temperature (°C)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (dynes/cm)
20	1.5	3.5	30
25	2.3	4.7	29
30	6.0	6.4	29
35	1.8	2.4	32
40	-	1.0	38

The culture medium contained 3% *n*-hexadecane, 0.1% NaNO₃, 0.01% KH₂PO₄, 0.01% MgSO₄ · 7H₂O, 0.01% CaCl₂, and 0.02% yeast extract(pH 6.0).

의 생성량을 측정하였으며, Table 7에서 보는 바와 같이 배양 배지를 50ml 첨가하였을 때 유화활성이 가장 높게 나타남에 따라 본 공시균은 호기적인 조건에서 biosurfactant를 보다 효율적으로 생산하는 것으로 나타났다.

이상의 배양조건을 검토한 결과, biosurfactant의 최적 생성조건을 Table 8과 같이 결정하였다.

Table 7. Effect of aeration on the production of the biosurfactant

Volume of medium (ml)	Growth (g/L)	Dilution factor (Fcmc)	Minimum surface tension (dynes/cm)
50	6.4	6.8	29
75	6.0	6.0	30
100	5.3	5.2	37
125	4.2	4.2	38
150	3.2	3.8	42

The culture medium and condition are the same as Table 6 and 8, respectively. The volume of medium was adjusted to each volume as indicated.

Table 8. The optimum culture condition for the biosurfactant production

Composition (%)	
Medium(g/L)	<i>n</i> -Hexadecane 3
	NaNO ₃ 0.1
	KH ₂ PO ₄ 0.01
	CaCl ₂ 0.01
	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.01
	Yeast extract 0.02
Other conditions	pH 6.0
	Temperature 30°C
	Culture time 4 days
	Agitation 120 Rev. × 6cm stroke
	50ml of medium per 500ml flask

배양시간에 따른 균의 증식 및 biosurfactant의 생성

Table 8에 표시된 최적 배지 50ml를 첨가한 500ml shaking flask에 전배양액을 1%되게 접종하여 경시적으로 배양한 후, 그때의 균체량 및 biosurfactant 생성에서의 변화를 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 배양 4일째 균의 증식 및 biosurfactant생성이 가장 높게 나타남에 따라 본 biosurfactant 생산에는 4일 배양이 최적인 것으로 판단되었다.

공시균주의 배양시간에 따른 biosurfactant의 생성은 대수증식기에서 증식과 더불어 급격히 증가하다가 배양시간이 정지기를 경과하면서 감소하는 경향을 나타내고 있다. 따라서 본 공시균주가 생산하는 biosurfactant는 균의 생육과 밀접한 관련이 있는 것으로 보이며, 이러한 biosurfactant의 대량생산을 위해 유가식 또는 연속배양과 같은 배양방법상의 연구가 필요하다고 생각된다.

생성된 biosurfactant의 유화활성 평가

Biosurfactant생성 실험에서, 본 공시균주는 배양전과는 달리 4일간 배양한 후 배양기질로 첨가한 *n*-hexadecane을 유화시킴에 따라 유화활성능을 조사하였다.

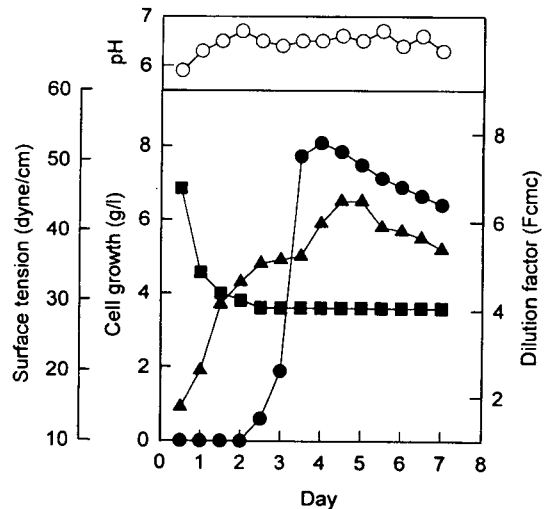


Fig. 1. Time course of growth, pH and biosurfactant production during the cultivation of *Nocardia* sp. L-419.

The culture medium was the same as Table 8. Seed culture(0.5ml) was inoculated into a 500ml shaking flask containing 50ml of the optimal medium and cultured at 30°C. The pH, cell growth and biosurfactant production during cultivation were measured with time interval.

▲: Cell growth, ○: pH, ●: Dilution factor, ■: Surface tension

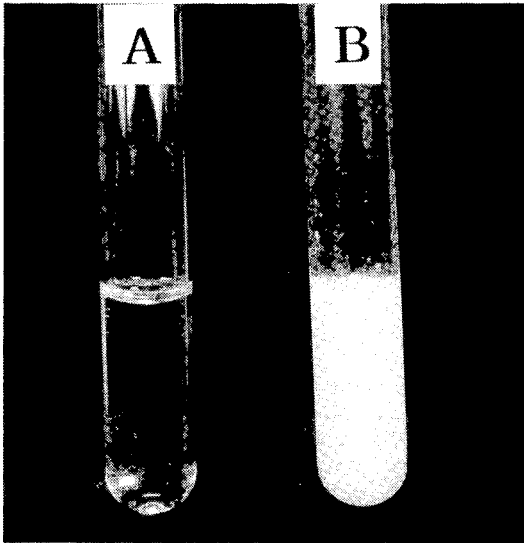


Fig. 2. Photograph of emulsion on *n*-hexadecane.
Experiment was performed as described in the text, using 0.1ml of *n*-hexadecane, 7.5ml of Tris-Mg buffer, and 0.2ml of culture broth containing the bioemulsifier. A: Without culture broth, B: With culture broth

Fig. 2는 본 공시균주의 배양여액 0.2ml에 대한 *n*-hexadecane의 유화정도를 가지적으로 나타낸 사진으로 배양여액을 첨가하지 않은 A는 control로서 유화기질층과 수층이 서로 분리되었으며, 배양여액을 첨가한 B는 층의 분리없이 완전히 유화된 상태를 유지하였다.

배양 최적 조건에서 4일 동안 배양한 배양여액을 각종 기질에 첨가하여 유화정도를 측정하였다. 이때 *n*-hexadecane에 대한 유화활성을 100으로 하여 각종 기질에 대한 유화활성을 측정한 후 비교하여 Table 9에 나타

Table 9. Relative emulsification activity of various emulsifying substrates by the culture broth

Emulsifying substrates	Relative emulsification activity(%)
<i>n</i> -Hexadecane	100
Toluene	77
Kerosene	191
Paraffin	187
Bunker A	269
Corn oil	204
Olive oil	185
Oleic acid	224

The culture broth of 0.2ml was mixed to 7.5ml of 0.05 M Tris-HCl buffer containing 0.1ml of each emulsifying substrate and was vigorously vortexed for 2min. The resulting uniform emulsion was allowed to stand for 10min after the emulsifying activity of its mixture was measured at 540nm.

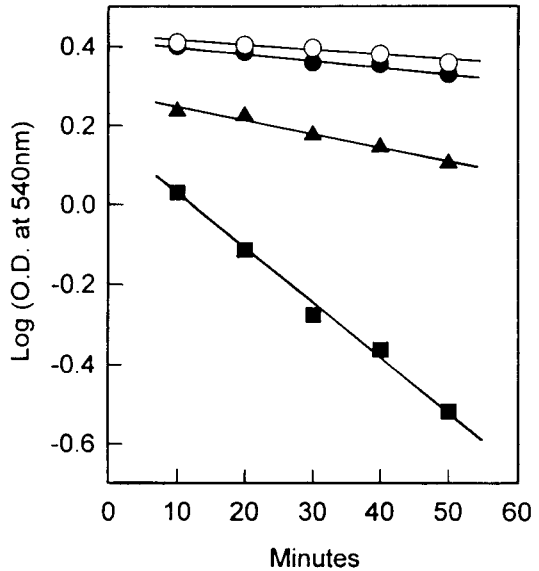


Fig. 3. Stabilization of emulsion of several surfactants.
Emulsifying substrate was *n*-hexadecane. After standing for 10min, the absorbance(A_{540}) of the emulsion was determined at 10min interval. The logarithms of the absorbance were then plotted versus time and the slope(decay constant, K_d) of line was calculated. ○: Triton X-100 ●: Biosurfactant ▲: Tween 60 ■: Span 85

내었다. 그 결과 toluene을 제외한 대부분의 기질에서 *n*-hexadecane보다 높은 활성을 나타내었으며, 산업적으로 쓰이는 bunker A와 식품산업에 이용되는 corn oil, olive oil, oleic acid 등에서 특히 높게 나타나 이들 물질과 관련된 산업부분에서 유화제로서 응용될 수 있음을 확인해 주었다. 한편 *n*-hexadecane에 대한 유화능 및 유화안정능을 시판되고 있는 기존제품의 몇몇 유화제와 비교하여 Fig. 3에 나타내었다. 실험에 사용한 4종류의 유화제 중 가장 우수하다고 알려져 있는 Triton X-100과 유화활성 및 유화 안정도가 거의 비슷하게 나타나 본 물질의 산업적 응용성을 확인해 주었다. 현재는 물질 정제를 시도하고 있으며, 이후 정제 물질의 물성 및 제 특성에 대해 검토하고자 한다.

요 약

Biosurfactant를 생산하는 미생물을 토양으로부터 분리하였다. 그 중에서 표면장력 및 계면장력 감소능에서 가장 우수한 L-417주를 순수분리하여 동정한 결과, *Nocardia*속으로 판명되었다. Biosurfactant 생산을 위한 최적 배지조성은 3% *n*-hexadecane, 0.1% NaNO_3 , 0.02% K_2HPO_4 , 0.01% KH_2PO_4 , 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01

% CaCl₂, 0.02% yeast extract였으며, 최적 온도와 pH는 각각 30°C와 6.0이었다. 이러한 조건에서 500ml용 shaking flask에 최적 배지 50ml를 넣어 배양했을 경우 대수증식기 말기인 4일째에 균의 증식과 유화활성이 가장 높게 나타남에 따라 *Nocardia* sp. L-417에 의한 bio-surfactant의 생산은 균의 생육과 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다. 이계면활성제는 산업적으로 널리 사용되는 bunker A, paraffin, corn oil 및 olive oil 등에 대해서도 비교적 높은 유화활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비연구비(기초과학 BSRI-97-4410)에 의하여 연구되었음.

문헌

- Kosaric, N., Gray, C. C. and Cairn, W. L. : Microbial emulsifiers and deemulsifiers. *Biotechnology*, **3**, 575 (1983)
- Layman, P. : Industrial surfactants set for strong growth. *Chem. Eng. News*, **63**, 23(1985)
- Haferburg, D. and Hommel, R. : Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Advan. Biochem. Engineer. Biotechnol.*, **33**, 53(1986)
- Shaw, A. : Surfactants-94. *Soap Cosmet. Specialises*, **70**, 24(1994)
- Greek, B. F. : Sales of detergents growing desoite recession. *Chem. Eng. News*, **69**, 25(1991)
- Magaritis, A., Zajic, J. E. and Gerson, D. F. : Production and surface-active properties of microbial surfactants. *Biotech. Bioeng.*, **21**, 1151(1979)
- Yoon, Y. K. and Choi, K. S. : Studies on physical behavior of alkyl polyglucosides(I)-Interfacial activities and detergency. *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **5**, 451 (1994)
- Kosaric, N. and Carins, W. L. : *Biosurfactant and biotechnology*. Marcel Dekker Inc., New York(1987)
- Parkinson, M. : Biosurfactants. *Biotech Advs.*, **3**, 65 (1985)
- Zajic, J. E. and Panchal, C. J. : Bioemulsifiers. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, Nov., 39(1976)
- Zobell, C. E. : Bacterial release of oil from sedimentary materials. *Oil Gas. J.*, **46**, 62(1947)
- Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. : Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 747(1984)
- Cirigliano, M. C. and Carman, G. M. : Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 847(1985)
- Javaheri, M. and Jenneman, G. E. : Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 698(1985)
- Boyle, C. D. and Reade, A. E. : Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 392(1983)
- Copper, D. G. and Paddock, D. A. : Production of a biosurfactant from *Tolulopsis bombicola*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 173(1984)
- Kim, W. K. and Kim, E. K. : Effects of culturing parameters on the production of microbial biosurfactant from *Candida Bombicola*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **7**, 102(1992).
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. : *Bergy's manual of systematic bacteriology*. The William and Wilkams Co., U.S.A.(1984)
- Jwan, F. M. : Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd ed., The William and Wilkams Co., Baltimor(1980)
- Chopineau, J., MacCafferty, F. D., Therisod, M. and Klibanov, A. M. : Production of biosurfactants from sugar alcohol and vegetable oils catalyzed by lipases in a nonaqueous medium. *Biotechnol. Bioeng.*, **31**, 208 (1988)
- Satos, L. G., Kappeli, O. and Fiechter, A. : *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 301(1984)
- Rosenberg, E., Perry, A., Gilson, D. T. and Gutnick, D. L. : Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 : Specificity of hydrocarbon substrate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 409(1979)

(1997년 12월 17일 접수)