

Biosurfactant 생산균주 *Pseudomonas aeruginosa* F722의 배양특성

오경택 · 강창민¹ · Motoki Kubo² · 정선용*

전남대학교 환경공학과, ¹초당대학교 환경공학과, ²입명관대학교 이공학부 화학생물공학과

Cultural Characteristics of a Biosurfactant-Producing Microorganism *Pseudomonas aeruginosa* F722. Oh, Kyung-Taek, Chang-Min Kang¹, Motoki Kubo², and Seon-Yong Chung*. Department of Environmental Engineering, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea, ¹Department of Environmental Engineering, Chodang University, Muan, Channam 534-701, Korea, ²Department of Bio Science and Technology, Faculty of Science and Engineering, Ritsumeikan University 525-8577, Japan – Productivity of biosurfactant (rhamnolipid) by *Pseudomonas aeruginosa* F722 was investigated in the several culture conditions and culture composition. Biosurfactant production by *P. aeruginosa* F722 was amounted to 0.78 g/l as the result of the nitrogen sources and carbon sources without investing of optimum conditions. As for that one was investigated, biosurfactant production by *P. aeruginosa* F722 was amounted to 1.66 g/l. Biosurfactant production increased twofold because the composition of a modified C-medium was investigated efficiently. NH₄Cl or NaNO₂ inorganic nitrogens and yeast extract or trypton organic nitrogens were effective, but others inorganic nitrogens and organic nitrogens tested were not efficient for biosurfactant production by *P. aeruginosa* F722. The optimum concentration of NH₄Cl; inorganic nitrogen and yeast extract; organic nitrogen were 0.05% and 0.1%, respectively. In various carbon sources, others with the exception of hydrophobic property substrate (*n*-alkane) and hydrophilic property substrate (glucose, glycol) were not found to be effective for biosurfactant production, and 3.0% was better in yield than other concentration of glucose. This yielded C-to-N ratios between 17 and 20. In our experiment, the highest biosurfactant production by *P. aeruginosa* F722 were observed in 5 days cultivation, containing glucose 3.0%, NH₄Cl 0.05%, and yeast extract 0.1% and C-to-N ratio was 20. Optimal pH and temperature for biosurfactant production were 7.0 and 35°C, respectively. Under the optimal culture conditions with glucose, biosurfactant production was amounted to 1.66 g/l. Velocity of biosurfactant production and strain growth increased after nitrogen depletion. The average surface tension of 30 mN/m after the 3 days of incubation under optimal culture condition was measured by ring tensionmeter.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* F722, biosurfactant, rhamnolipid, tensionmeter

Biosurfactants의 특성은 소수성 물질이 수용액상에서 잘 용해될 수 있도록 계면장력과 표면장력을 저하시켜준다 [6, 7, 27]. 이러한 특성으로 인하여 biosurfactant는 석유화학, 토양복원, 화장품, 농업, 의약, 청정세제, 도장산업 등 많은 분야에서 이용되고 있으며 [6], 최근에는 환경에 대한 인식이 증가하면서 화학계면활성제를 생물계면활성제로 대체하고 있는 경향이다 [3, 7]. 대표적으로 미국 Petroferm사에서 생산하는 생물계면활성제인 Emulsan이 기름에 오염된 탱크의 처리, 전자기판의 3차 세척용 등으로 사용되고 있다. 최근에는 해양사고에 의한 기름 유출시 유류 오염정화의 한 방법 [6]으로 미생물을 응용한 신기술의 개발이 시도되고 있다. 특히 에너지 활용 방안의 하나로, 원유를 회수하는 EOR (Enhance Oil Recovery), MEOR (Microbial Enhanced Oil

Recovery) 산업부분에서의 잠재적인 응용 가능성으로 인해 biosurfactant에 대한 관심이 급증하고 있다 [4]. 또한, 송유관을 통한 원유 이송 시에 emulsan을 이용한 마찰력을 최소화시키는 연구도 꾸준히 진행되고 있다. 최근까지 계면활성제를 사용하여 고분자 구조의 탄화소수 분해, 난분해성 물질인 phenanthrene 분해, 중금속 제거 등 넓은 분야에서 생물정화 도입 [8, 16, 21-25]의 가능성이 보고되고 있다.

소수성 특성을 나타내는 crude oil을 분해할 수 있는 미생물 중에는 *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Acinetobacter* 등 많은 genera가 있다 [1, 2, 17]. 이들 genera에서 *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Bacillus*, *Acinetobacter*는 glucose, glycerol 또는 ethanol, *n*-hexadecane 등과 같은 기질을 분해하고 성장과정에서 glycolipids, fatty acids, neutral lipids, phospholipids, polymeric surfactants와 같은 biosurfactant를 생산한다 [29]. Biosurfactant의 공업적인 생산은 주로 미생물을 이용하는 기술에 의존하고 있는데 그 이유는

*Corresponding author
Tel: 82-62-530-1858, Fax: 82-62-530-0742
E-mail: sychung@chonnam.co.kr

다른 생물체에 비해 다루기 쉽고 미생물 종에 따라 다양한 종류의 계면활성물질질을 얻을 수 있으며 성장속도도 빨라 단 시일 내에 다량의 biosurfactant를 생산해 낼 수 있기 때문이다. 이용 균주 중에서는 *Pseudomonas* sp.의 rhamnolipid 생산에 대해서 폭넓게 보고되고 있다[9, 10, 12]. 최근에는 *Pseudomonas* sp.를 이용하여 유류성분으로 오염된 토양을 정화시키는데 많이 적용하고 있다. Noordman 등[17]은 *Pseudomonas aeruginosa*를 이용하여 hexadecane을 생분해 시키는데 rhamnolipid 또는 surfactants를 첨가하여 오염물질의 분해속도에 미치는 영향을 조사하였다. Stelmack 등[26]과 Van Hamme 등[28]은 유류분해능을 지닌 미생물과 유류 분해를 촉진하기 위해서 사용되는 계면활성제의 종류에 따라 유류 분해에 미치는 영향이 다르므로 미생물 제제로 사용하기 앞서 미생물과 계면활성제와의 상호관계에 대하여 면밀히 조사할 필요성을 보고하기도 하였다. *P. aeruginosa* F722는 유류분해 특성을 지닌 미생물로서 탄화수소 분해에 관하여 보고되어 있다[19, 20].

그 밖에도 Liposan 등 수 십종에 이르는 미생물 기원의 계면활성제가 특허화 되어 상품으로 개발되고 있으나, 사업체간의 경쟁과 보안유지로 인하여 그 연구내용이 극히 일부만이 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 소수성 지질을 분해할 수 있는 *P. aeruginosa* F722의 생물계면활성제 생산에 적합한 질소원과 탄소원 검토를 통하여 생물계면활성제 생산량을 증가시키는 적정 배양조건을 파악하는데 있다.

재료 및 방법

Biosurfactant 생산균주 및 사용배지

본 연구에서 사용된 생물계면활성제 생성균주는 토양으로 분리된 *Pseudomonas aeruginosa* F722(KACC 91006)에 초점을 맞추어 실험을 수행하였다. Strain F722를 본 배양에 접종하기 전 영양배지인 LB(Luria Bertani, 배지조성: 증류수 1L당 trypton; 10g, yeast extract; 5g, NaCl; 10g, bacto agar; 15 g/L)에 백금으로 일회 접종하여 35°C, 150 rpm, pH 7.0에서 12시간 동안 진탕 배양하였다. 영양배지에서 성장된 균주를 본 배양 배지인 C-배지[19, 20]에 1.0%(v/v) 접종, 사용된 탄소원으로 crude oil인 Eleuthera(OMAN), L-Zakum (AFRICA), 시중에 시판되고 있는 원유제품인 등유, 경유를 사용하여 2.0%(w/v) 첨가, 35°C, pH 7.0, 150 rpm, 5일간 배양하여 초기 생물계면활성제 생성조사를 수행하였다.

Biosurfactant 생산균주의 생장조사

미생물의 생장 측정은 간접계수 방법으로 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용한 O.D.(Optical Density)를 600 nm에서 측정했고, 동시에 기질과 미생물 사체, 미생물의 분비물에 의한 영향을 배제하여 실질적으로 살아있는 미생물만을 측정할 수 있는 CFUs(Colony-forming Units) 측

정법인 직접계수 방법을 병행하여 수행하였다.

생물계면활성제 생산배지 조사

질소원 검토 - 생물계면활성제 생산량과 활성에 관한 질소원의 효과를 관찰하기 위해서 생산배지에 무기질소원(NaNO₃, NaNO₂, NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄)과 유기질소원(yeast extract, beef extract, malt extract, trypton)을 각각 0.01, 0.05, 0.1, 0.5%(w/v)씩 첨가하여 균의 성장과 생물계면활성의 활성을 조사하였다.

탄소원 검토 - 생물계면활성제 생산량과 활성에 관한 탄소원의 효과를 관찰하기 위해서 생산배지에 glucose, glycerol, diesel, *n*-C(10, 12, 14, 16, 18, 22)을 앞서 조사된 유류 제품의 적정 기질농도[19, 20]를 바탕으로 각각 1.0, 2.0, 3.0, 4.0%(w/v)씩 첨가하여 균의 성장과 생물계면활성제의 활성을 조사하였다. 잔존량 glucose 측정방법; 포도당 측정용시약(효소법) Glucose-E Kit(BC 103-E, 영동)을 사용하여 배양액 20 μl, 표준 시료 20 μl에 발색시약 buffer 3 ml를 첨가한 후 37°C에 5분간 반응시켜 흡광광도계(505 nm)에서 흡광도를 측정하여 같은 식에 적용하여 glucose 잔존량을 측정하였다.

포도당(mg/100 ml)=200 × 검체의 흡광도/표준의 흡광도

C/N비 검토 - 질소원과 탄소원 실험결과를 통하여 생물계면활성제 생성과 활성에 적합한 생산배지상에서 C/N비를 검토하였다[13, 15].

생물계면활성제 생산량 및 활성 조사

표면장력 측정은 Du Nouy tensionmeter(Du Nouy 氏, model No. 3010, Japan)를 이용하여 실온에서 측정하였다. 표면장력의 비교를 위해 시료로는 물, 시중에 판매되고 있는 풍뽕 및 자연풍과 같은 합성세제(chemical surfactant-1, chemical surfactant-2), 화학계면활성제(Tween #20, Tween #80), 그리고 *P. aeruginosa* F722의 본 배양액을 사용하였다.

Biosurfactant의 정제는 배양상등액을 냉동 원심분리한 후 pellet을 제거한 후 2N HCl로 pH 2.0으로 조절하여 저온에서 12시간 보관한 후 Kuyukina 등[11]에 의하여 생물계면활성제 회수율이 높은 chloroform:methanol(1:1, v/v)을 이용하여 회수하였다. 회수된 유기용매층을 50°C에서 유기용매를 휘발시킨 후 잔존한 생물계면활성제의 생산량과 활성을 측정하였다(Fig. 1).

Biosurfactant 활성 측정은 Masaaki 등[14]의 생물계면활성제 생성균주 검색방법을 착안하여 응용하였다. 생물계면활성제 활성 측정방법은 먼저 petri-dish(90 × 15 mm)에 수돗물 30 ml씩 분주한 후 50 μl OMAN산 crude oil인 Eleuthera를 수돗물이 분주되어 있는 petri-dish에 떨어뜨려 유막을 형성시킨다. 본 배양에서 35°C, 150 rpm, pH 7.0 조건으로 5일간 성장한 strain F722 배양액을 원심분리(12,000×g, 4°C, 15 min)를 실시하여 균체를 제거한 후, 상등액 50μl를 취해

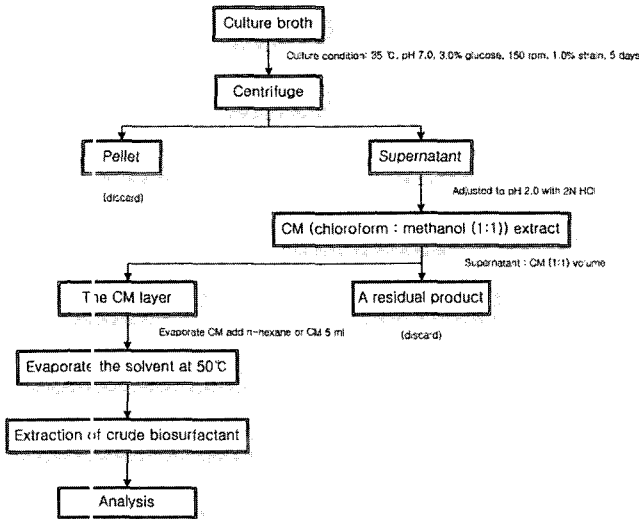


Fig. 1. Flow chart for purification procedure of microbial surfactant on glucose as the sole carbon source.

유막 위에 떨어뜨려 clear zone의 직경을 측정하였다.

결과 및 고찰

생물계면활성제 생산배지 조사

무기질소원(NaNO₃, NaNO₂, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl) 중 NH₄Cl가 다른 무기질소원에 비해 *P. aeruginosa* F722의 생장이 우수하였고, NH₄Cl 농도 변화(0.01, 0.05, 0.1, 0.5%)에 따른 생물계면활성제 활성(crude oil로 유막이 형성된 petri-dish에 질소원 성분때 따른 배양액을 유막에 떨어뜨려 형성된 clear zone의 직경 측정)은 NH₄Cl 농도가 0.05%에서 가장 높게 나타났다. 유기질소원들(beef extract, malt extract, trypton) 중에서 yeast extract가 다른 유기질소원과 비교하여 *P. aeruginosa* F722의 생장과 생물 계면활성제 활성이 높게 나타났다. yeast extract 농도 0.1%에서 *P. aeruginosa* F722의 생장과 생물계면활성제 활성이 가장 높은 것으로 조사되었다.

무기질소원과 유기질소원을 혼합하여 생물계면활성제 생산량과 활성에 관한 질소원의 효과를 관찰하기 위한 생산배지 조사에서는 0.05% NH₄Cl과 0.1% yeast extract에서 O.D. 600 nm; 3.28, clear zone; 8.0 cm를 나타냈다(Table 1, Fig. 2-c).

Table 1. Effect of nitrogen sources.

Nitrogen sources		O.D. 600 nm	Clear zone (cm)
0.05% NH ₄ Cl	0.1% Y·E	3.28	8.0
	0.05% Y·E	3.14	6.4
0.1% Y·E	0.1% NH ₄ Cl	3.07	2.0
	0.05% NH ₄ Cl	3.28	8.0

*Y·E: Yeast Extract.

Table 2. Effect of carbon sources.

Carbon sources	O.D. 600 nm	Clear zone (cm)
2.0% Glucose	2.48	9.0
3.0% Glucose	2.56	9.0
4.0% Glucose	2.41	8.9
2.0% Glycerol	2.78	8.9
3.0% Glycerol	2.73	7.8
4.0% Glycerol	2.53	6.7
2.0% n-C ₁₈	2.87	8.5
3.0% n-C ₁₈	1.61	0.2
4.0% n-C ₁₈	3.14	7.3

생물계면활성제 생성배지에 사용되는 유기질소원은 주로 yeast extract를 사용하는 것에 비하여, 무기질소원으로는 NH₄Cl, NaNO₃, NaNO₂, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄ 등이 다양하게 사용된다[3, 15, 23, 27]. 하지만, Luis 등[13]의 연구에 의하면 유기질소원인 yeast extract는 복잡한 성분이므로 배지 조성에 가급적이면 피하는 것이 좋다고 보고하였다.

탄소원 중 glucose, glycerol, 및 n-C₁₈이 다른 탄소원(diesel, n-C₁₀, 12, 14, 16, 22) 보다 *P. aeruginosa* F722의 생장과 생물계면활성제 활성이 높게 나타난 것으로 조사되어 이들을 대상으로 생산배지에 적합한 탄소원을 검토하였다. 1차적으로 선택된 탄소원 중에서 glucose의 경우 3.0%(O.D. 600 nm; 2.56, clear zone; 9.0 cm), glycerol의 경우 2.0%(O.D. 600 nm; 2.78, clear zone; 8.9 cm), n-C₁₈의 경우 2.0%(O.D. 600 nm; 2.87, clear zone; 8.5 cm)에서 *P. aeruginosa* F722의 생장과 생물계면활성제 활성이 높게 나타났다(Table 2, Fig. 2). *P. aeruginosa* F722의 생장과 생물계면활성제 활성은 선별된 3가지 탄소원 중 3.0% glucose가 가장 효과적이나 다른 두 경우와 큰 차이는 보이지 않았다.

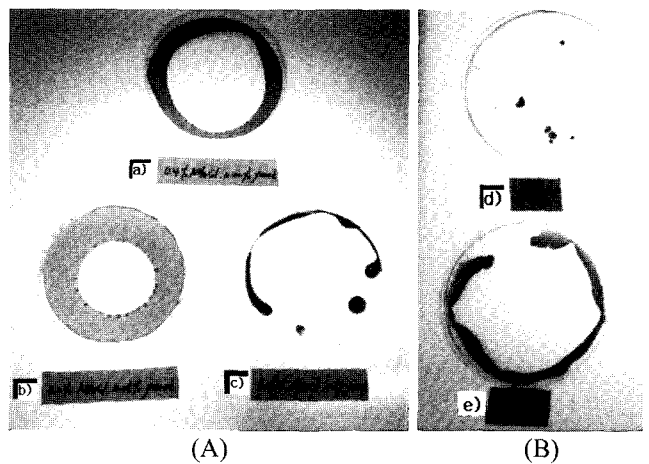


Fig. 2. The clear zone formation by nitrogen sources (A) and carbon sources (B). (a) 0.4% NH₄Cl + 0.02% yeast extract, (b) 0.2% NH₄Cl + 0.05% yeast extract, (c) 0.05% NH₄Cl + 0.1% yeast extract, (d) 3.0% glucose, (e) 0.2% n-C₁₈.

사용 질소원 및 탄소원의 적정 주입량을 검토하기 전의 생물계면활성제 생산배지에서는 생물계면활성제의 생산량이 0.75 g/l이었으나, 질소원과 탄소원을 검토한 후 최적의 생물계면활성제 생산배지에서는 생물계면활성제의 생산량이 2배 이상 향상된 1.66 g/l이 생산되었다. *P. aeruginosa* F722에 의하여 생산된 생물계면활성제 생산량은 Luis 등[13]의 1.5 g/l 보다는 다소 많으나 Matsufuji 등[15]의 32 g/l, Benincasa 등[3]의 15.9 g/l보다는 적었다.

Luis 등[13]에 의하면 C/N 비율이 약 18 정도이면 최적, 11이하 또는 22이상이면 생물계면활성제 생산량을 저해한다고 보고하였다. 본 실험에서는 C/N 비율 20이 생물계면활성제 생산에 적합하였다. *P. aeruginosa* F722의 생장에 적합한 배양조건 8시간마다 균의 성장, pH 변화, 기질로 사용된 glucose 잔존량, 생물계면활성제 활성을 측정하였다. 그 결과 배양 8시간부터 25시간까지 대수성장기였으며 생물계면활성제 활성은 배양 8시간부터 보이기 시작하였다. 균주의 성장과 더불어 급격하게 pH가 변화하였다. 이에 반하여 glucose 소모율은 완만하였다(Fig. 3). 배양 48시간 이후부터 pH 5.0에 가까웠으며 glucose 분해는 배양이 끝나는 시점까지 계속되었다. 생물계면활성제 활성은 배양 80시간에 최고에 달했고, 이후 일정한 활성은 120시간까지 지속적으로 유지했다. 이러한 결과로부터 *P. aeruginosa* F722의 배양시간을 120시간으로 정하였다.

질소원이 결핍된 시점에 탄소원을 첨가함으로써 생물계면활성제 생산율이 높아진다고 보고 되었다[3, 6, 13, 15]. 그러한 보고를 기초로 하여 *P. aeruginosa* F722의 배양초기에 탄소원을 첨가하지 않은 배양상에서 36시간 후에 3.0% glucose를 첨가하였다. 그 결과, 배양초기에 탄소원을 첨가하였을 때는 배양 40시간 때 O.D. 600 nm 값이 4.0에 가까웠으며 사멸기에 접어든 배양 80시간에 clear zone 직경은 9.0 cm으로 조사되었다. 반면, 질소원이 결핍된 시점에 탄소원을 첨가한 실험에서는 배양 72시간 때 O.D. 600 nm 값이

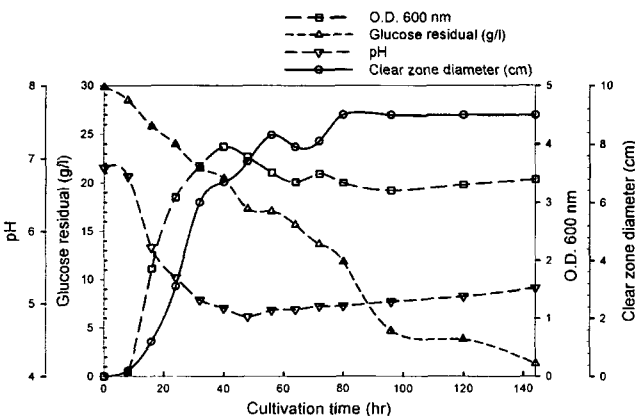


Fig. 3. The characterization of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* F722 in the modified C-medium with 3.0% glucose.

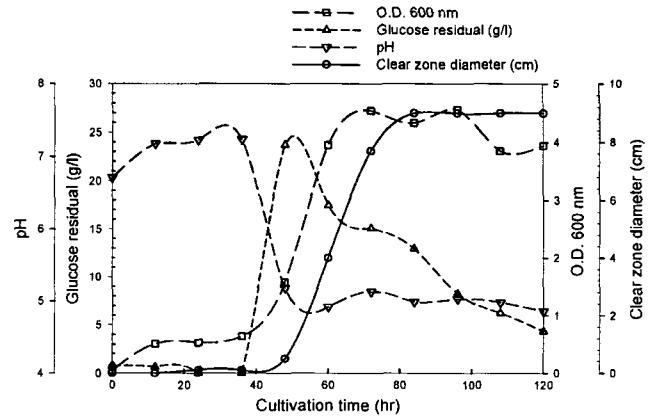


Fig. 4. Time course of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* F722 in the modified C-medium. Carbon source (glucose 30 g/l) was added after the 36 h.

4.5에 가까웠으며 clear zone 직경은 배양 80시간에 9.0 cm로 조사되었다. 이와 같은 실험을 통하여 질소원 결핍상태에서 탄소원을 첨가하였을 때 strain F722의 개체수를 증가시킬 수 있었으며 그에 따라 biosurfactant의 생성량을 증가시킬 수 있는 가능성을 보였다. 이는 Benincasa 등[3]이 보고한 결과와 유사한 경향을 나타내고 있다(Fig. 4). 그리고 소수성물질로 오염된 지역에 생물계면활성제 생성균주를 적용하고 biosensor 기술[8] 또는 분자생물학적 기법을 이용한 fluorescence *in situ* hybridization(FISH)[18]을 연계시킨다면 토양복원 현장에서 토착미생물 및 도입종을 monitoring하여 생태계내에서의 microflora를 이해하는데 많은 도움이 될 것으로 사료된다[5].

생물계면활성제 생산량 및 활성 조사

배양액에서 얻어진 생물계면활성제의 활성을 측정하기 위하여 3.0% glucose와 1.0% n-C₁₈을 각각의 기질로 이용하여 *P. aeruginosa* F722를 배양하여 원심분리하여 균을 제거

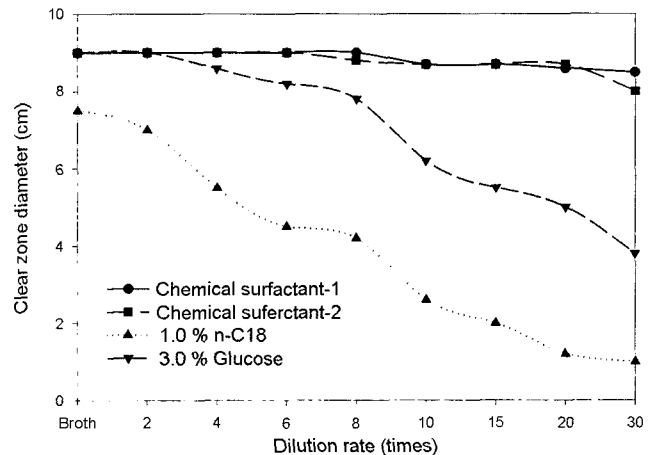


Fig. 5. Comparison between chemical surfactant and biosurfactant depend on the dilution rate.

Table 3. The measure of surface tension.

Substrates	Surface tension (mN/m)
Water	72
Chemical surfactant-1	31
Chemical surfactant-2	32
Tween #20	39
Tween #80	39
Biosurfactant	30

한 후 얻어진 배양액과 시판되고 있는 합성세제를 가지고 활성 비교 실험을 수행하였다. 3.0% glucose상에서 배양한 배양액에서 얻어진 생물계면활성제 원액을 50 µl Eleuthera (OMAN) crude oil로 유막이 형성된 petri-dish(90×15 mm)에 떨어뜨린 결과 즉시 9.0 cm의 clear zone이 형성되었는데 이는 합성세제의 clear zone 형성과 비슷한 결과를 나타내었다. 반면에 동일하게 실시한 1.0% *n*-C₁₈상에서 배양한 배양액에서 얻어진 생물계면활성제의 clear zone 직경은 7.5 cm로서 활성이 낮음을 보였다(Fig. 5). 생물계면활성제가 포함된 *P. aeruginosa* F722의 배양액에서 Fig. 1과 같은 방법으로 생물계면활성제를 정제하여 생물계면활성제의 활성을 측정할 결과, 10배까지 희석한 후에도 clear zone 직경이 6.2 cm로 조사되었다(Fig. 5).

Desal 등[6]의 보고에 의하면 용해성 기질(glucose, glycerol)보다 비용해성 기질(diesel, *n*-C_(10, 12, 14, 16, 18, 22))을 탄소원으로 이용하였을 때에 biosurfactant 활성과 생성에 미치는 영향이 큰 것으로 보고되었다. 이러한 결과는 사용균주의 질소원, 탄소원 등 다양한 배양조건에 따라 달라질 수 있다는 것을 본 연구에서 보여주고 있다. 하지만, 1차 대사산물로서 biosurfactant와 2차 대사산물로서 biosurfactant는 차이점을 가지고 있다[6, 7]. 본 실험에서 strain F722는 소수성 기질보다 용해성 기질을 생물계면활성제 생성에 잘 이용한 것으로 조사된 것을 바탕으로 용해성 기질인 glucose를 대체할 수 있는 폐 탄소원 기질(옥수수, 콩, 깨 등을 이용하여 기름을 생산하고 남은 찌꺼기 또는 식용으로 불가능한 쌀 및 보리 등과 같은 물질)을 생물계면활성제 생성에 이용한다면 환경적인 측면과 자원리사이클링적인 측면에서 많은 이점이 있을 것으로 사료된다. 최적의 조건하에서 배양된 배양액을 가지고 링(ring) 형태의 Du Nouy 氏 tensionmeter를 이용한 표면장력 측정결과, 증류수의 표면장력은 72 mN/m, 생물계면활성제의 표면장력은 30 mN/m로서 chemical surfactant-1의 표면장력 31 mN/m 및 chemical surfactant-2의 표면장력 32 mN/m과 비슷한 표면장력을 나타냈으며 Tween #20, #80의 표면장력은 39 mN/m로 동일하게 조사되었다(Table 3).

요 약

생물계면활성제 생성균주, *Pseudomonas aeruginosa* F722

를 이용하여 다양한 배양조건과 배지조성에서 생물계면활성제 생산성을 검토하였다. 질소원과 탄소원을 검토하기 전에는 *P. aeruginosa* F722의 생물계면활성제 생산량은 0.78 g/l이었다. 하지만, 질소원과 탄소원을 검토한 후에는 생물계면활성제 생산량이 2배 증가한 1.66 g/l이었다. 무기질소원으로 NH₄Cl 또는 NaNO₂를 첨가하였을 때 생물계면활성제 활성에 효과적이었으며 유기질소원으로는 yeast extract 또는 tryptone을 첨가하였을 때 생물계면활성제 활성이 높았다. 이중 무기질소원으로 0.05% NH₄Cl, 유기질소원으로 0.1% yeast extract를 질소원으로 첨가하였을 때 가장 최적이었다. 탄소원으로 소수성 기질(*n*-alkane) 또는 친수성 기질(glucose, glycol)을 첨가하여 생물계면활성제 생산량을 조사하였는데 소수성 기질보다는 친수성 기질인 3.0% glucose를 첨가하였을 때 생물계면활성제 생산량이 높았다. 이때의 탄소원/질소원 비율은 17~20이었다. *P. aeruginosa* F722는 배양조건 3.0% glucose, 0.05% NH₄Cl, 0.1% yeast extract, 35°C, pH 7.0, C/N ratio 20, 5 days에서 생물계면활성제 생산량은 1.66 g/l이었다. 질소원이 결핍 후 탄소원을 첨가하여 배양하였을 때가 질소원과 탄소원을 함께 첨가하여 배양했을 때보다 생물계면활성제 생산속도 및 균체 성장속도가 높았다. 최적 배양조건하에서 얻어진 배양액의 표면장력은 30 mN/m이었다.

REFERENCES

- Angelova, B. and H. P. Schmauder. 1999. Lipophilic compounds in biotechnology-interactions with cells and technological problems. *J. Biotechnol.* **67**: 13-32.
- Atlas, R. M. and C. E. Cerniglia. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *BioScience* **45**: 332-338.
- Benincasa, M., J. Contiero, M. A. Manresa, and I. O. Moraes. 2002. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on growing on soapstock as the sole carbon source. *J. Food Eng.* **54**: 283-288.
- Bognolo, G. 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **152**: 41-52.
- Demain, A. L. and J. E. Davies. 1999. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 629-714. 2nd ed. ASM Press, Washington, D. C.
- Desal, J. D and I. M. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 47-64.
- Garti, N. 1998. What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress?. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **152**: 125-146.
- Gu, M. B. and S. T. Chang. 2001. Soil biosensor for the detection of PAH toxicity using an immobilized recombinant bacterium and a biosurfactant. *Biosens, Bioelectron* **16**: 667-674.

9. Healy, M. G., C. M. Devine, and R. Murphy. 1996. Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling* **18**: 41-57.
10. Holden, P. A., M. G. LaMontagne, A. K. Bruce, W. G. Miller, and S. E. Lindow. 2002. Assessing the role of *Pseudomonas aeruginosa* surface-active gene expression in hexadecane biodegradation in sand. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2509-2518.
11. Kuyukina, M. S., I. B. Ivshina, J. C. Philp, Nick Christofi, S. A. Dunbar, and M. I. Ritchkova. 2001. Recovery of rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. *J. Microbiol. Methods* **46**: 149-156.
12. Lang, S. and D. Wulbrandt. 1999. Rhamnolipids - biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 22-32.
13. Luis, G. S., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 301-305.
14. Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimomishi, and T. Imanaka. 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. Strain MIS38. *J. Bacteriol.* **175**: 6459-6466.
15. Matsufuji, M., K. Nakata, and A. Yoshimoto. 1997. High production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* growing on ethanol. *Biotechnol. Lett.* **19**: 1213-1215.
16. Mulligan, C. N., R. N. Yong, and B. F. Gibbs. 2001. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *J. Hazardous Materials* **85**: 111-125.
17. Noordman, W. H., J. H. J. Wachter, Geert J. de Boer, and D. B. Janssen. 2002. The enhancement by surfactants of hexadecane degradation by *Pseudomonas aeruginosa* varies with substrate availability. *J. Biotechnol.* **94**: 195-212.
18. Oerther, D., J. Pernthaler, A. Schramm, R. Amann, and L. Raskin. 2000. Monitoring precursor 16S rRNAs of *Acinetobacter* spp. in activated sludge wastewater treatment systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2154-2165.
19. Oh, K. T., G. H. Park, J. I. Lee, J. K. Lee, S. J. Kim, Kubo Motoki, and S. Y. Chung. 2002. Biodegradation of crude oil and petroleum products by crude oil-degrading microorganism. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**: 247-254.
20. Oh, K. T., Y. W. Lee, Motoki Kubo, S. J. Kim, and S. Y. Chung. 2000. Isolation, identification and characterization of bacteria degrading crude oil. *Kor. J. Socie. Environ. Engine.* **22**: 1851-1859.
21. Providenti, M. A., C. A. Flemming, H. Lee, and J. T. Trevors. 1995. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol. Ecol.* **17**: 15-26.
22. Rahman. K. S. M., I. M. Banat, J. Thahira, Tha. Thayumanavan, and P. Lakshmanaperumalsamy. 2002. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresour. Technol.* **81**: 25-32.
23. Rocha, C. and C. Infante. 1997. Enhanced oily sludge biodegradation by a tensio-active agent isolated from *Pseudomonas aeruginosa* USB-CS1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 615-619.
24. Schippers, C., K. Geßner, T. Muller, and T. Scheper. 2000. Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture. *J. Biotechnol.* **83**: 189-198.
25. Swannell, R. P. J., K. Lee, and M. McDonagh. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* **60**: 342-365.
26. Stelmack, P. L., M. R. Gray, and M. A. Pickard. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 163-168.
27. Suk, W. S., E. G. Lim, H. J. Son, G. Lee, and S. J. Lee. 1999. Compositional Analysis and Some Properties of Biosurfactant from *Pseudomonas* sp. SW1. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 41-45.
28. Van Hamme, J. D. and O. P. Ward. 2001. Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 4874-4879.
29. Zobell, C. E. 1947. Bacterial release of oil from sedimentary materials. *Oil Gs J.* **46**: 62.

(Received Nov. 22, 2002/Accepted Apr. 22, 2003)