

Characteristics of Biosurfactant Producing *Pseudomonas* sp. Z1

Dong Ho Chang, Eun Jung Ko and Kyeong Ryang Park*

Department of Biotechnology, Hannam University, 461-6 Jeonmin-dong, Yuseong-gu, Daejeon, Korea 305-811

Received November 29, 2010 / Accepted December 28, 2010

One hundred forty five bacterial colonies which were able to degrade crude oil were isolated from soil samples that were contaminated with oil in the Daejeon area. Among these colonies, 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. Z1 through physiological-biochemical tests and analysis of its 16S rRNA sequence. *Pseudomonas* sp. Z1 showed a high resistance to antibiotics such as chloramphenicol and ampicillin, as well as heavy metals such as lithium, manganese, and barium. It was found that the optimal pH and temperature for biosurfactant production of *Pseudomonas* sp. Z1 were pH 6.0-7.0 and 30°C, respectively. After ten hours of inoculation, the biosurfactant activity of the culture broth decreased rapidly, and had maximum surface tension (28 dyne/cm) after twenty-one hours incubation. The biosurfactant activity of the culture broth was also decreased up to 2% NaCl concentration.

Key words : Biosurfactant, *Pseudomonas* sp. Z1, surface tension

서 론

우리나라는 1960년대 이후 경제개발과 함께 공업사회로 변화하는 과정에서 에너지 소비가 계속 증가하고 있다. 이에 따라 석유가 생산되지 않는 우리나라는 석유 수입 양을 계속 늘리고 있고, 석유 수입 양이 늘어나는 만큼 수송과정과 산업 부산물로 인해 자연환경에 누출되는 석유 양도 계속 증가하고 있다. 이렇게 다양한 경로로 자연계로 누출된 유류성분 중 저비등점 성분들은 대기 중으로 휘발하지만, 수용성 성분들은 해양 및 토양에 녹아 들고, 그 외 성분들은 피막을 형성하여 넓은 지역에 오랫동안 잔존하게 된다[14]. 즉, 유류는 매우 강한 소수성 물질이라 물에 대한 용해도도 낮고, 토양에 흡착될 경우 미생물에 의한 생분해가 잘 진행되지 않아 환경을 오염시킨다. 따라서 자연계에 오염된 유류의 생분해도를 증가시키기 위해 계면활성제(surfactant)를 사용하기도 한다.

계면활성제(surfactant; detergent)란 한 분자내에 친수성기(hydrophilic)와 소수성기(hydrophobic)를 함께 갖는 양극성 분자(amphipatic compound)로, 표면이나 계면의 성질을 변화시켜 표면장력을 감소시키는 물질을 일컫는다. 따라서 기포 형성, 분산성, 습윤성, 유화성, 침투성 등의 계면활성제 특성때문에 전기, 전자, 건설, 기계, 인쇄, 제지, 섬유 등 각종 산업에 계면활성제가 폭 넓게 이용되고 있고, 또 석유탄화수소 용해도 증가 현상을 이용해 미생물의 석유탄화수소 생분해에 계면활성제를 이용하기도 한다[9,11]. 이와같이 다양한 분야에 활용되고 있는 계면활성제는 현재 복잡한 제조과정을 거쳐 석유

로부터 생산된다. 그러나 석유에서 생산되는 화학합성 계면활성제(chemical surfactant)는 사용 후 물 위에 거품을 형성하여 햇빛과 산소를 차단시킬 뿐 아니라 세척력을 높이기 위하여 계면활성제에 첨가하는 인으로 인해 부영양화 현상을 발생시키므로, 전체적으로 화학합성 계면활성제는 물 속 생태계에 심각한 환경문제를 야기시킨다.

이에 비해 효모, 곰팡이, 세균 등 다양한 미생물들이 세포 외 또는 세포 내에 생산하는 생물 계면활성제는 화학합성 계면활성제와는 달리 독성이 적고 생분해가 용이한 친환경적 물질이다[17]. 미생물이 생성하는 생물 계면활성제는 표면장력 저하능력, 온도, pH에 대한 안정성 등 물리·화학적 면에서 기존의 화학합성 계면활성제와 거의 대등한 효과를 갖고 있을 뿐 아니라, 균주에 따라 각기 다른 복잡한 구조의 계면활성제를 생산하는 다양성을 이용해 특수한 목적에 사용할 수 있어 그 사용가치가 매우 높다[3,8,23]. 즉, 생물 계면활성제는 세계, 원유의 2차 회수, 펄프와 제지 산업, 육상과 해상의 유류 오염정화, 처리조의 유지방 분해 등 기존의 화학합성 계면활성제가 사용되는 대부분의 산업분야뿐 아니라 의약품, 식품, 화장품 분야 등에서 다양하게 활용된다[18,22,24,25].

따라서 이와 같은 장점을 갖는 생물 계면활성제에 대한 연구는 전 세계적으로 활발하게 진행되어 많은 종류의 생물 계면활성제가 보고되고 있다. 이들 생물 계면활성제 중 *Pseudomonas* 종류가 생산하는 rhamnolipid 계열의 계면활성제[12,27]와, *Bacillus subtilis*가 생산하는 surfactin [1]과 surfactin은 성분이 다른 계면활성제[7] 그리고 *Acinetobacter calcoaceticus*가 생산하는 emulsan [26], *Candida lipolytica*가 생성하는 계면활성제[6] 등은 가장 많이 알려져 있는 생물계면활성제이다. 그리고 이들 생물계면활성제 중 상용화된 가장 대표

*Corresponding author

Tel : +82-42-629-8770, Fax : +82-42-629-8769
E-mail : krpark@hnu.kr

적인 것은 미국의 Petroferm사가 생산하는 Emulsan으로, 이 제품은 원유 회수, 송유관을 통한 원유의 이송 그리고 전자 기관의 3차 세척 등 많은 분야에서 다량 사용되고 있다[25]. 또 *Torulopsis* 종류로부터 생산되는 생물 계면활성제는 강력한 보습효과가 있어 화장품 산업에 응용되고 있다[13].

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·생화학적 특성과 최적의 생성 조건을 조사하고, 이 균주가 생산하는 생물 계면활성제의 특성을 파악하여 추후 상업적으로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 사용 배지

대전 지역의 세차장, 주유소, 자동차 정비소, 폐차장 등에서 유류로 오염된 토양을 채취하였다. 채취한 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 후, 총 145균주의 단일 콜로니를 분리하였다. 분리된 세균집락들은 1% tributyrin이 첨가된 고체배지(peptone 5 g/l, yeast extract 3 g/l, pH 7.0)에 접종하여 30°C에서 2-3일간 배양한 후, 세균집락 주위에 투명 환을 가장 넓게 생성하는 9균주를 일차 선별하였고, 일차 선별된 균주 중 Luria-Bertani (LB) 배지(trypitone 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 최종선별 하여 본 실험에 사용하였다.

생리, 생화학적 특성 조사

최종 선별된 균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology [16]와 Biochemical tests for identification of medical bacteria [19]에 의거해 형태, 생리 및 생화학적 특성을 조사하였고, 당 이용능과 발효능, 증식속과 항생제 내성 등의 균주 특성도 조사하였다.

16S rRNA 염기 서열 조사

최종 선별 균주의 정확한 동정을 위해 최종 선별균주의 genomic DNA를 CTAB방법[29]으로 추출하고, 이 DNA를 주형으로 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하여 16S rRNA 유전자 염기 서열을 조사하였다. 이때 선

별 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 model 310 (Applied Biosystems, 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 20°C, 30°C, 37°C, 42°C로 조정된 배양기에서 진탕 배양하면서 각각의 표면장력과 균체 생성량을 측정하였다. 균체 생성량의 측정은 배양액의 일정량을 분취한 후 UV-Spectrophotometer (SmartSpec3000, Bio-Rad, USA)를 이용하여 600 nm에서 측정하였다. 최적 pH는 LB 영양배지에 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. 또 배양 시 용존산소가 생물 계면활성제 생산에 미치는 영향을 알아보기 위해 영양액체배지 양을 250 ml 삼각 플라스크에 각각 30 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml, 150 ml로 각기 달리하여 전배양액을 일정량 접종하고, 30°C에서 200 rpm으로 진탕 배양한 후 균체 생성량과 표면장력을 측정하였다. NaCl의 농도에 따른 최종 선별균주의 성장과 생물 계면활성제 생산에 대한 영향 조사는 NaCl의 농도가 각각 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7%가 되도록 첨가 한 LB 영양배지에 전배양한 배양액을 일정량 접종하고 30°C에서 진탕배양하며 표면장력과 균체 생성량을 측정하여 조사하였다. 상온과 냉장 보관 시의 계면활성제의 안정성 조사는 표면장력이 최대일 때 균체를 제거한 배양액의 일정량을 분주한 후 하나는 상온보관하고 다른 하나는 4°C에서 보관하며 매일 배양액의 표면장력을 측정하여 비교하였다.

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[4]으로 25°C에서 3회 반복하여 표면장력을 측정하였다.

결과 및 고찰

최종 선별 균주의 특성 및 동정

대전 지역의 세차장, 주유소, 자동차 정비소, 폐차장 등 유류로 오염된 토양에서 총 145균주의 단일 콜로니를 분리하였다.

분리 균주들은 1% tributyrin이 첨가된 고체배지에 접종하여 세균 집락 주위에 투명 환을 넓게 생성하는 9균주를 일차 선별하였고, 선별된 균주 중 가장 낮은 표면장력을 갖는 한 균주를 최종선별 하였다. 최종 선별된 균주의 형태학적 특성 조사 결과 이 균주는 운동성을 갖는 호기성 그람 음성 간균으로 포자를 형성하지 않고, citrate를 단일 탄소원으로 이용할 수 있으며 oxidase와 catalase를 생성하고 형광성을 나타냄을 확인하였다(Table 1). 그리고 선별균주의 당 이용경로가 호흡인지 발효인지 확인하기 위해 단일 탄소원으로서의 당 이용능과 발효능을 조사한 결과, 선별 균주는 glucose만을 단일 탄소원으로 이용하고, arabinose, fructose, glucose, lactose, mannitol, mannose, ribose, xylose를 발효할 수 있어 선별 균주의 당 이용경로는 발효임을 확인하였다(Table 2). 최종 선별균주의 정확한 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열 분석을 통해 조사 (Accession No. HQ645013)하고, 생리·생화학적인 결과를 종합한 결과 최종 선별된 균주는 *Pseudomonas* sp.와 99% 이상의 상동성을 보여 *Pseudomonas* sp. Z1 이라 명명하였다.

최종 선별된 *Pseudomonas* sp. Z1의 항생제 내성 조사 결과,

Pseudomonas sp. Z1는 chloramphenicol에 3,200 µg/ml, ampicillin에 1,200 µg/ml 그리고 streptomycin과 spectinomycin에 각각 200 µg/ml까지의 minimum inhibitory concentration (MIC)값을 나타내 비교적 높은 농도까지 내성을 갖고 있음을 확인하였다(Table 3). 따라서 *Pseudomonas* sp. Z1은 석유탄화수소가 오염된 토양에서 분리한 균이라 일반적으로 항생제에 대한 내성이 약할 것이라는 예상을 뛰어넘을 뿐 아니라, 비슷한 조건에서 분리된 *Acinetobacter lwoffii* I6C-1 [15]와

Table 3. Susceptibility of *Pseudomonas* sp. Z1 to various antibiotics

Antibiotics	MIC (µg/ml)
Ampicillin	1200
Chloramphenicol	3200
Kanamycin	20
Spectinomycin	200
Streptomycin	200
Tetracycline	10

Table 1. Morphological, physiological and biochemical characteristics of *Pseudomonas* sp. Z1

Characteristics		Characteristics	
Gram	-	Oxidase	+
Spore	-	Catalase	+
Shape	Rod	Starch	-
Colony color	Cream	Urease	-
Colony Form	Circular	Hydrogen sulfide	-
Colony Elevation	Convex	Casein	-
Colony Margin	Entire margin	Methyl red	-
Motility	+	Voges-proskauer	-
Indole	-	Macconky's	-
Citrate	+	Eosin methylene blue	-
Nitrate	-	Fluorescence	+
Gelatin	-		

+, positive; -, negative

Table 2. Utilization and fermentation of various carbon sources in *Pseudomonas* sp. Z1

Carbon source	Utilization	Carbon source	Fermentation
Arabinose	-	Arabinose	+
Cellobiose	-	Cellobiose	-
Fructose	-	Fructose	+ ^w
Glucose	+ ^w	Glucose	+ ^w
Lactose	-	Lactose	+
Maltose	-	Maltose	-
Mannitol	-	Mannitol	+ ^w
Ribose	-	Ribose	+
Sucrose	-	Sucrose	-
Xylose	-	Xylose	+

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

Fermentation : +, positive; -, negative

Pseudomonas sp. G314 [28] 보다 항생제 내성이 높아 석유탄화수소로 오염된 환경에 서식하는 미생물도 항생제에 어느 정도 내성을 갖는 것으로 추측된다. 또 일반적으로 유류로 오염된 토양은 Pb, Cd, Cu, Cr, Ni, Fe, Hg, Zn 등의 중금속이 포함되어 있다는 Mulligan [21]의 보고처럼, 최종 선별된 *Pseudomonas* sp. Z1의 중금속 내성조사에서 Ni는 3,200 µg/ml, Ba과 Mn은 각각 800 µg/ml, Li과 Cr과 Cu는 각각 400 µg/ml까지의 MIC 값을 나타내고, Hg도 100 µg/ml까지의 높은 농도에서도 내성을 갖는 것으로 확인되었다(Table 4). 이 결과는 비슷한 조건에서 분리된 *Acinetobacter Iwoffii* I6C-1 [15]와 *Pseudomonas* sp. G314 [28]의 중금속 내성과 비슷하거나 약간 낮은 값으로, 유류로 오염된 토양에 존재하는 세균들은 비교적 높은 중금속 내성을 갖고 있음을 다시 한번 확인할 수 있었다.

생육 특성

Pseudomonas sp. Z1의 배양 특성을 조사한 결과, 이 균은 20°C와 30°C에서 성장이 우수하고, 37°C와 42°C에서는 거의 성장하지 않음을 확인하였다. 온도에 따른 표면장력 활성은 균주 성장이 거의 없는 37°C와 42°C에서는 초기 배지가 갖는 표면 장력 활성 59-62 dyne/cm을 계속 유지 하였고, 성장이 비교적 좋은 20°C에서도 표면장력 활성은 52 dyne/cm을 유지하여 균주의 성장과 계면활성제 생성은 일치되지 않음을 확인하였다. 그러나 30°C 배양에서의 표면장력은 28 dyne/cm으로 가장 우수하여 *Pseudomonas* sp. Z1의 계면활성제 생성과 생육의 최적 온도는 30°C임이 확인되었다(Fig. 1). 또 배지의 초기 pH에 따른 생물 계면활성제의 생성과 성장을 조사한 결과, pH 5부터 9까지 성장은 비슷하게 유지되어 약산성에서 약 알칼리성 범위까지 성장함을 확인하였으나 생물 계면활성제의 활성은 pH 6과 pH 7에서 배양하였을 때에만 28 dyne/cm으로 표면장력 활성이 최대임이 확인되어, *Pseudomonas* sp. Z1가 생성하는 생물 계면활성제는 약산성과 중성 pH 범위에서 생성됨을 알 수 있었다(Fig. 2). 또한 배양시 플라스크내 배지 양에 반비례하여 균체 생성량은 증가하지만, 표면장력은 큰 차이를 보이지 않아, 배지내 용존 산소량과 생물 계면활성제

Table 4. Susceptibility of *Pseudomonas* sp. Z1 to various heavy metals

Heavy metals	MIC (µg/ml)
Ba	800
Cd	100
Cr	400
Ni	400
Cu	400
Co	200
Li	3200
Hg	100
Mn	800

생성은 연관관계가 없음을 확인하였다(Table 5). *Pseudomonas* sp. Z1를 해양지역에서의 계면활성제나 유화제로 사용할 수 있는 적용 가능성을 검토하기 위하여 영양액배지에 NaCl의

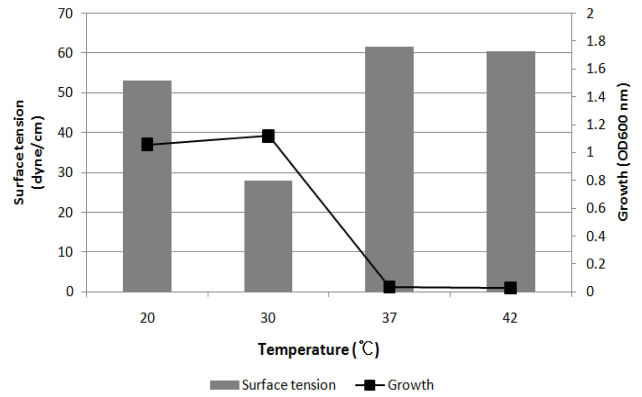


Fig. 1. Effect of temperature on the production of biosurfactant and growth by *Pseudomonas* sp. Z1. Cells were cultured for 24 hr at 20°C, 30°C, 37°C and 42°C, respectively.

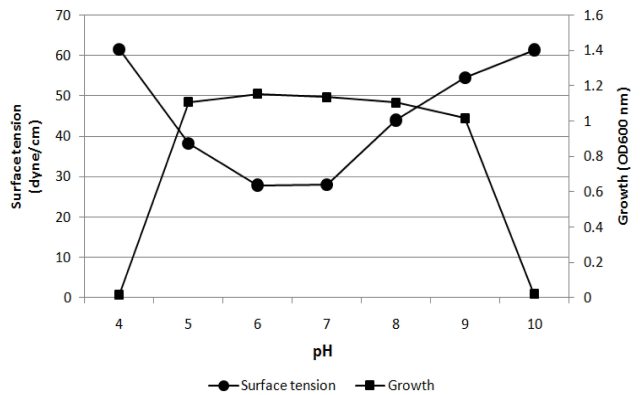


Fig. 2. Effect of pH on the production of biosurfactant and growth by *Pseudomonas* sp. Z1. The pH values of media were adjusted by addition of 1 N HCl or 1 N NaOH. Surface tension and growth were determined after reciprocal shaking (200 rpm) at 30°C for 24 hr.

Table 5. Effect of aeration on the production of biosurfactant by *Pseudomonas* sp. Z1

Medium volume(ml) ^a	Growth (g/l) ^b	Surface tension (dyne/cm)
30	1.512	26.75
50	1.372	26.60
75	1.319	26.25
100	1.281	26.35
150	1.202	26.40

^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 hr, and weighed.

Each value represents the average of two independent experiments.

농도를 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 7%로 조정하여 표면장력을 조사한 결과 0.5%와 1%까지의 NaCl 농도에서는 28 dyne/cm의 표면장력을 나타내었지만, 2% NaCl 농도 이상에서는 20°C에서 배양한 것처럼 균주가 어느 정도 생육하였음에도 불구하고 생물 계면활성제의 활성은 급격하게 감소됨을 확인하였다 (Fig. 3).

일반적으로 유류가 유출된 지역에 생물 계면활성제를 유효제로 활용할 때 가장 큰 환경적 요인이 되는 것은 온도이다 [2,10,20]. 즉, 미생물을 사용하여 오염물질을 정화하기 위해서는 활용 지역의 온도에서 활성을 유지해야 할 필요성이 있다. 우리나라 해양의 연평균 해양수온은 15.8°C이며, 토양의 경우 25°C 내외이다. 그리고 일반적인 해수의 pH는 약알칼리성이고, 해수의 평균 NaCl 농도가 3.5-3.7%라고 보고[30]한 것을 감안하면, 본 실험에 사용된 *Pseudomonas* sp. Z1는 0.5-1% NaCl의 농도에서만 최대의 표면장력 활성을 나타내어 해양의 유류오염 정화에는 사용할 수 없는 것으로 생각된다. 그러나 *Pseudomonas* sp. Z1는 30°C의 온도와 중성부터 약산성까지의 pH에서 최대 활성을 나타내고, 또 *Pseudomonas* sp. G314 [28]와 *Pseudomonas* sp. EL-G527의 통기량 실험 결과[5]와는 달리 용존 산소의 농도와 생물 계면활성제의 생성과 연관관계가 없어, 지속적인 산소 주입이 필요 없는 것을 고려하면 본 균주는 오염된 토양이나 담수의 유류오염 정화에 활용 가능성이 높다고 판단된다.

생물 계면활성제의 유효능

Pseudomonas sp. Z1의 증식과 생물 계면활성제 생성과의 상관관계를 알아보기 위해 배양시간에 따른 생물 계면활성제의 표면장력을 측정된 결과, 균주의 생육이 후기 대수 증식기에 이르는 10시간 이후부터 표면장력이 급격히 감소하여 배양 13시간 후에 배지의 표면장력이 32 dyne/cm을 나타내고, 정지기에 들어간 배양 21시간 이후에 최대 28 dyne/cm을

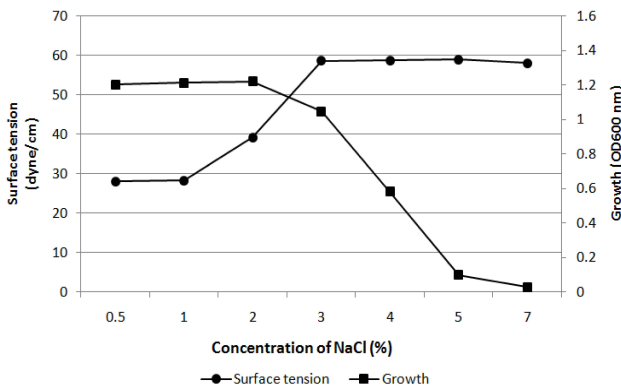


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the production of biosurfactant and growth by *Pseudomonas* sp. Z1. Surface tension and growth were determined after reciprocal shaking (200 rpm) at 30°C for 24 hr.

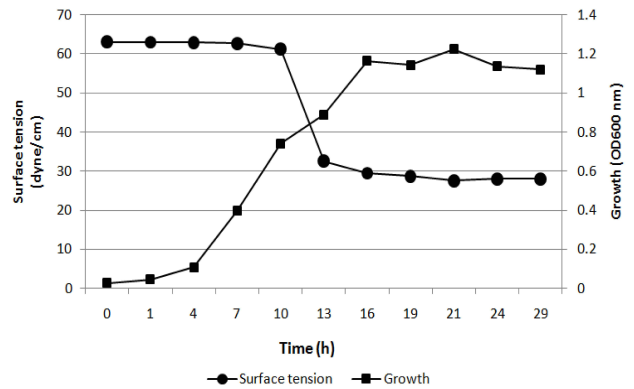


Fig. 4. Time course growth and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. Z1. The cell was cultured in LB medium at 30°C.

나타낸 후 배양 29시간 까지 계속 유지됨을 확인하였다(Fig. 4). 또 표면장력이 최대일 때 균체를 제거한 배양액의 계면활성제의 활성 유지 정도를 확인하기 위하여 일정량을 분주한 후 하나는 상온보관하고 다른 하나는 4°C에서 보관하면서 일정 시간 간격으로 계면활성제의 표면장력 측정된 결과, *Pseudomonas* sp. G314 [28]와 동일하게 상온과 냉장 보관한 시료 모두 9일 동안 표면장력이 안정되게 유지됨을 확인하였다(data not shown).

이상의 결과 본 실험에서 사용된 *Pseudomonas* sp. Z1은 지금까지 연구된 생물 계면활성제에 비해 비교적 계면활성 능력이 우수하고, 온도에 대한 안정성, pH에 의한 계면활성제의 생성과 안정성 등 여러 가지 특성 또한 우수하여 토양이나 담수의 유류 오염 정화에 사용하기 적합한 균주인 것으로 판단된다. 그러나 대량 생산 및 자연환경에 실제 적용하기 위해서는 이 생물 계면활성제의 구조를 정확히 파악하는 추가 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 2010년도 한남대학교 학술연구 조성비 지원에 의하여 연구되었음.

References

1. 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.
2. Atlas, R. M. and R. Bartha. 1972. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperature. *Can. J. Microbiol.* **18**, 1851-1855.
3. Banat, I. M., R. S. Makkar, and S. S. Cameotra. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**, 495-508.

4. Barathi, S. and N. Vasudevan. 2001. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a contaminated soil. *Environ. Int.* **26**, 413-416.
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. Cirigliano, M. C. and G. M. Carman. 1984. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 747-750.
7. Dehghan-Noude, G., M. Housaindokht, and B. S. Bazzaz. 2005. Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *J. Microbiol.* **43**, 272-276.
8. Desai, J. D. and I. M. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 47-64.
9. 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.
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. 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.
13. 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.
14. Jobson, A., F. D. Cook, and D. W. S. Westlake. 1972. Microbial utilization of crude oil. *Appl. Microbiol.* **23**, 1082-1089.
15. Kim G. J., I. S. Lee, and K. R. Park. 1999. Characteristics of wasted lubricant degradation by *Acinetobacter Iwoffii* 16C-1. *J. Life Sci.* **9**, 76-81.
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. *Korean J. Life Sci.* **12**, 745-751.
18. Lourith, N. and M. Kanlayavattanakul. 2009. Natural surfactants used in cosmetics: glycolipids. *Int. J. Cosmet. Sci.* **31**, 255-261.
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, and N. Kosaric. 1993. Biosurfactants-production, properties, application, M. Dekker, New York, 329-372.
22. Poremba, K., W. Gunkel, S. Lang, and F. Wagner. 1991. Marine biosurfactants, toxicity testing with marine microorganisms and comparison with synthetic surfactants. *Z. Naturforsch C* **46**, 210-216.
23. Rahman, K. S. M., J. Thahira-Rahman, S. McClean, R. Marchant, and I. M. Banat. 2002. Rhamnolipid biosurfactants production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low cost raw materials. *Biotechnol. Prog.* **18**, 1277-1281.
24. Rodrigues, L., I. M. Banat, J. Teixeira, and R. Oliveira. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 609-618.
25. Rosenberg, E. 1982. Properties of hydrocarbon in water emulsions stabilized by *Acinetobacter* sp. RAG-1 emulsion. *Biotech. Bioeng.* **24**, 281-292.
26. Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinatoritz, and D. L. Gutnick. 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: Isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 402-408.
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. Shim, S. H., and K. R. Park. 2006. Characteristics of biosurfactant producing *Pseudomonas* sp. G314. *Korean J. Microbiol.* **42**, 286-293.
29. Wagner, D. B., G. R. Furnier, M. A. Saghai-Marroof, 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. U.S.A.* **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.

초록 : 생물 계면활성제를 생산하는 *Pseudomonas* sp. Z1의 특성

장동호 · 고은정 · 박경량*

(한남대학교 생명공학과)

대전일원의 유류오염 지역의 토양으로부터 원유를 단일 탄소원으로 이용하는 총 145균주를 순수분리 하였고, 이중 생물 계면활성제 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. Z1이라 명명하였다. 최종 선별된 *Pseudomonas* sp. Z1은 클로람페니콜과 암피실린 등의 항생제와 리튬, 망간, 바륨 등의 중금속에 대해 강한 내성을 갖고 있었고, 최적 온도와 pH는 각각 30°C와 pH 6.0-7.0으로 확인되었다. *Pseudomonas* sp. Z1이 생성하는 생물 계면활성제는 배양 10시간 이후부터 배양액의 표면장력이 급격히 감소해, 배양 21시간 후에 최대 28 dyne/cm까지 감소되었고, 2% 이상의 NaCl을 첨가한 경우 배양액의 생물계면활성제의 활성이 감소하였다.