

**Bacillus subtilis JK-1의 생물계면활성도를 위한 최적 배지 조성**주명훈<sup>1</sup> · 김지연<sup>2\*</sup><sup>1</sup>인제대학교 대학원 분자의생명공학과, <sup>2</sup>인제대학교 기초대학**Optimization of Medium Components for the Production of Crude Biosurfactant by *Bacillus subtilis* JK-1**Myeong Hoon Joo<sup>1</sup> and Ji Yeon Kim<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Graduate School of Molecular and Biomedical Technology, Inje University, Gimhae 621-749, Republic of Korea<sup>2</sup>College of General Education, Inje University, Gimhae 621-749, Republic of Korea

Received December 29, 2010; Accepted January 17, 2011

*Bacillus subtilis* JK-1 showed degradation activity against crude oil, gasoline, kerosene, and light oil, and this strain was used as a crude biosurfactant producing microorganism in this study. To optimize the culture medium for production of crude biosurfactant, the influences of various carbon, nitrogen and mineral sources were assessed. The highest biosurfactant production by *B. subtilis* JK-1 was observed after 96 h cultivation, containing 1.0% (w/v) soluble starch as a carbon source and 0.5% (w/v) skim milk as a nitrogen source, and carbon to nitrogen concentration (C/N) ratio was 2.0. For the biosurfactant production 0.1% (w/v) of KNO<sub>3</sub> was the most effective mineral source. Comparison of biosurfactant production indicates that *B. subtilis* JK-1 produces more biosurfactant in the optimum medium established in this study than LB and TSB. Under the optimum medium, the surface tension of culture broth of *B. subtilis* JK-1 was decreased from 47.3 dyne/cm to 24.0 dyne/cm after cultivation of 48 h.

**Key words:** *Bacillus subtilis* JK-1, biosurfactant production, C/N ratio, carbon source, medium optimization, mineral source, nitrogen source, surface tension

유류 유출로 인한 자연환경의 오염이 빈번하게 발생하면서 해양과 토양 복원에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 최근에는 해양사고에 의한 유류 유출 시 유류 오염 정화의 한 방법으로 미생물을 응용한 생물학적 정화기법이 시도되고 있다. 생물학적 정화기법은 석유를 분해할 수 있는 미생물을 활성화시켜 오염지역의 유류를 분해하는 방법, 즉 미생물들이 탄화수소(hydrocarbon)를 탄소원이나 에너지원으로 사용하여 제거하는 방법이다. 유류분해 과정에는 온도와 산소공급, 질소, 인 등 영양물질의 농도가 매우 중요한 요소로 작용하므로 이 방법에서는 미생물이 살아갈 적절한 환경을 조성하는 것이 필요하다 [Cubitto 등, 2004; Lai 등, 2009; Amani 등, 2010].

현재까지 현장에 적용된 미생물들은 유류분해를 위한 물질을 생산하는데, 이러한 물질들을 총칭하여 생물계면활성제(biosurfactant)라고 한다. 생물계면활성제는 친수성 부분과 소수성 부분을 동시에 가지는 양친매성 물질로서 물과 탄화수소의

혼합 용액에서 표면장력(surface tension)과 계면장력(interfacial tension)을 감소시키며, 유화 안정성도 우수하다. 생물계면활성제의 대표적인 물성으로는 유화, 분산, 침습, 습윤, 용해, 기포 형성, 기포방지, 부식방지 등이 있다[Desai와 Banat, 1997]. 또한 생물계면활성제의 항균 활성, 항종양 활성, 혈전용해 활성 등 다양한 생리 활성 기능도 보고되고 있다[Cameotra와 Makkar, 2004]. 이러한 성질로 인하여 생물계면활성제는 의약품, 식·음료, 화장품, 농약, 세제, 환경정화, 피혁, 제지 및 금속공업 등의 산업에 널리 사용되고 있으며, 유류저장탱크 정화, 유류 회수와 같은 환경산업에 그 응용이 점차 확대되고 있다.

지금까지 보고된 생물계면활성제는 대부분 세균(bacteria)과 곰팡이(mold), 효모(yeast) 등 미생물 유래의 것이 대부분인데, 균주에 따라 세포 외 또는 세포 내에 생성이 된다. 그 중에서도 특히 세균 유래의 것이 그 대부분을 차지하고 있다. 유류분해 능력을 지니면서 생물계면활성제를 생산하는 미생물로는 *Azotobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Corynebacterium*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Streptococcus* 속(genus)들이 보고되었으며, 미생물 유래 생물계면활성제는 화학합성 계면활성제와는 달리 다양한 화학 구조를 갖고 있고, 구조에 따라 glycolipid와 lipoproteins-lipopeptides, fatty acids, neutral lipid,

\*Corresponding author

Phone: +82-55-320-3737; Fax: +82-55-339-3734

E-mail: biokjy@inje.ac.kr

phospholipids, lipopolysaccharides 등으로 분류된다[Banat 등, 2000; Maier 등, 2001].

생물계면활성제는 넓은 지역의 처리가 가능하고 신속한 대응이 가능하나 현재 사용 중인 대부분의 유화제는 주로 화학합성 계면활성제(chemical surfactant)이기 때문에 과다 사용 시 2차 오염과 독성 문제가 야기되어 현재 국내에서는 그 사용을 기피하고 있다. 따라서 화학합성 계면활성제를 대체할 수 있는 새로운 생물계면활성제의 개발이 시급한 실정이다.

생물계면활성제의 공업적인 생산은 주로 미생물 기술에 의존하고 있는데, 그 이유는 다른 동·식물 세포에 비해 다루기 쉽고, 미생물 종(species)에 따라 다양한 종류의 계면활성물질을 얻을 수 있으며, 생육도가 다른 생물체에 비해 높아 단시일 내에 비교적 간단한 장치를 이용하여 다량의 생물계면활성제를 생산해 낼 수 있기 때문이다. 또한 배양과정이 비교적 간단하고, 포도당, hydrocarbon, 식품성 유류 등 단순 원료를 이용하여 쉽게 생산이 가능하며, 유전공학이나 생화학적 기법을 응용하여 유용한 변이주를 만들 수도 있다[Lang, 2002].

미생물에서의 계면활성제 생산 특성은 배양조건에 영향을 받으며, 계면활성의 증가 정도는 표면장력의 감소능 혹은 유화능을 지표로 추정한다[Mukherjee 등, 2006]. 우리나라에서는 외래종과 유전자 변형 미생물은 승인되지 않으므로 생물계면활성제 생산 미생물들은 유전자 조작으로 만든 것들이 아닌 자연 생태계에 이미 존재하고 있는 것으로 개발해야 한다.

본 연구자들은 생물계면활성제 개발을 위한 기초 자료를 확보할 목적으로 7가지 *Bacillus* 균주들을 순수 분리한 바 있으며, sheep blood agar 배지와 polymerase chain reaction (PCR) 선별 방법을 이용하여 생물계면활성제 생산 균주를 확인하였다[Joo 등, 2007]. 이들 중 최종 선별된 *Bacillus subtilis* JK-1의 성장과 생물계면활성도에 영향을 미치는 다양한 탄소원, 질소원, 탄소원과 질소원의 비율, 무기염을 변화시키면서 각종 인자에 따른 생물계면활성 양상을 조사하여 최적 배지 조성을 결정하였다.

## 재료 및 방법

**사용 균주 및 배지.** 본 연구에서는 생물계면활성제 생산 균주로 *B. subtilis* JK-1을 사용하였다[Joo 등, 2007]. *B. subtilis* JK-1은 Luria-Bertani [1.0% (w/v) NaCl (BioShop® Canada, Burlington, Ontario), 1.0% (w/v) tryptone (Difco, Detroit, MI), and 0.5% (w/v) yeast extract (BioShop® Canada)] 배지에서 배양하였다. 생물계면활성을 위한 배지로는 무기염류 배지인 A-medium을 사용하였다[Hur 등, 2002]. 또한 배지 종류에 따른 생물계면활성도를 비교하기 위하여 Tryptic Soy Broth (Biolife, Milano, Italy)와 LB 액체배지를 사용하였다.

**배양 조건.** 생물계면활성을 위해 *B. subtilis* JK-1을 LB 액체 배지(pH 7.0)에 접종하여 35°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 종 배양(seed culture)하였다. 성장된 균주는 A-medium에 1.0% (v/v)되게 접종하고, 35°C에서 200 rpm으로 96시간 동안 배양하였다.

**균주 성장 측정.** *B. subtilis* JK-1의 성장 측정은 간접계수 방

법으로 BioPhotometer 6131 spectrophotometer (Eppendorf AG, Eppendorf, Germany)를 이용한 흡광도(optical density)를 600 nm에서 측정하였다.

**유류 분해 조사.** *B. subtilis* JK-1의 유류 분해 여부를 조사하였다. 실험에 사용된 유류는 ‘(주) SK에너지’에서 제공한 Kuwait산 원유(crude oil)와 시중 주유소에서 판매되고 있는 휘발유(gasoline), 등유(kerosene), 경유(light oil)를 사용하였다. *B. subtilis* JK-1을 각종 oil이 3.0%(v/v) 첨가된 LB 고체 배지에 접종하여 35°C에서 2-3일간 배양하고, 잘 자란 집락(colony) 주위에 각종 oil에 대하여 투명환(emulsified halo)을 형성하는 지 조사하였다.

**Crude 생물계면활성제 분리.** 종 배양액을 2 L의 배양배지에 접종하여 35°C에서 4일간 진탕 배양하였다. 배양액을 원심분리(4°C, 10,000 rpm, 20분)하여 균체를 제거한 후 상등액을 여과(0.45 µm, Minisart, Sartorius Stedium Biotech GmbH, Goettingen, Germany)하여 crude 생물계면활성제로 사용하였다.

**표면장력 측정.** 생물계면활성을 측정하기 위하여 표면장력을 측정하였다. 표면장력은 Surface Tensiomat® 21 tensiometer (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA)를 사용, Du-Nuoy's ring 방법으로 25°C에서 측정하였다[Pagilla 등, 2002].

**최적 탄소원 검토.** 생물계면활성도에 대한 탄소원의 효과를 조사하기 위해 A-medium에 각종 탄소원으로 당류(sugars) 또는 탄수화물(carbohydrates)인 arabinose, carboxymethyl cellulose (CMC), dextrose, fructose, galactose, glucose, glycerol, lactose, maltose, mannitol, mannose, raffinose, rhamnose, soluble starch, sucrose, trehalose, xylose와 hydrocarbon류인 pentane (C<sub>5</sub>), hexane (C<sub>6</sub>), heptane (C<sub>7</sub>), octane (C<sub>8</sub>), nonane (C<sub>9</sub>), decane (C<sub>10</sub>), tetradecane (C<sub>14</sub>), hexadecane (C<sub>16</sub>), crude oil (produced in Kuwait), polyaromatic hydrocarbons (PAH)류인 paraffin, toluene, benzene을 각 1.0% (w/v 또는 v/v) 농도로 첨가하여 35°C, 200 rpm으로 초기 pH에서 96시간 동안 배양하여 균주의 성장과 최종 배지의 pH, 표면장력을 측정하였다. 또한 최적 탄소원의 농도를 각 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0% (w/v)로 변화시키면서 35°C, 200 rpm으로 초기 pH에서 96시간 동안 배양하여 균주의 성장과 최종 배지의 pH, 표면장력을 측정하였다.

**최적 질소원 검토.** A-medium에 결정된 최적 탄소원을 넣고 각종 유기 질소원(beef extract, casein, malt extract, peptone, skim milk, soytone, tryptone, urea, yeast extract)과 무기 질소원[(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>]을 각 0.5% (w/v)씩 첨가하여 35°C, 200 rpm으로 초기 pH에서 96시간 동안 배양하여 균주의 성장과 최종 배지의 pH, 표면장력을 측정하였다. 또한 최적 질소원의 농도를 각 0.1, 0.3, 0.5, 1.0% (w/v)로 변화시키면서 35°C, 200 rpm으로 초기 pH에서 96시간 동안 배양하여 균주의 성장과 최종 배지의 pH, 표면장력을 측정하였다.

**최적 탄소원과 질소원의 농도 비율 검토.** 생물계면활성도에 적합한 최적 탄소원과 질소원의 농도 비율을 검토하였다. 최적 탄소원의 농도를 1.0% (w/v)로 고정하고, 최적 질소원의 농도를 0.03, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5% (w/v)로 달리하여 첨가한 배지에 *B. subtilis* JK-1을 35°C, 200 rpm으로 초기 pH에서 96시간 동

안 배양하여 균주 성장과 최종 배지의 pH, 표면장력을 측정하였다.

**최적 무기염 검토.** 최적 탄소원과 질소원이 첨가된 배지에 각종 무기염류(CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, MnSO<sub>4</sub>, NaCl, ZnCl<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>)를 각 0.1% (w/v) 첨가하여 35°C, 200 rpm으로 초기 pH에서 96시간 동안 배양하여 균주의 성장과 최종 배지의 pH, 표면장력을 측정하였다. 또한 최적 무기염의 농도를 각 0.01, 0.03, 0.05 0.1% (w/v)로 변화시키면서 35°C, 200 rpm으로 초기 pH에서 96시간 동안 배양하여 균주의 성장과 최종 배지의 pH, 표면장력을 측정하였다.

**각종 배지 검토.** LB 배지와 TSB [1.5% (w/v) tryptic casein bios D, 0.5% (w/v) soy peptone, 0.5% (w/v) NaCl], 본 실험에서 확립한 생물계면활성도를 위한 최적 배지에 종 배양액을 각각 1.0% (v/v) 접종하여 35°C와 초기 pH 7.0에서 200 rpm으로 진탕 배양한 후 균주 성장과 배양액의 최종 pH, 표면장력을 12시간 간격으로 측정하였다.

### 결과 및 고찰

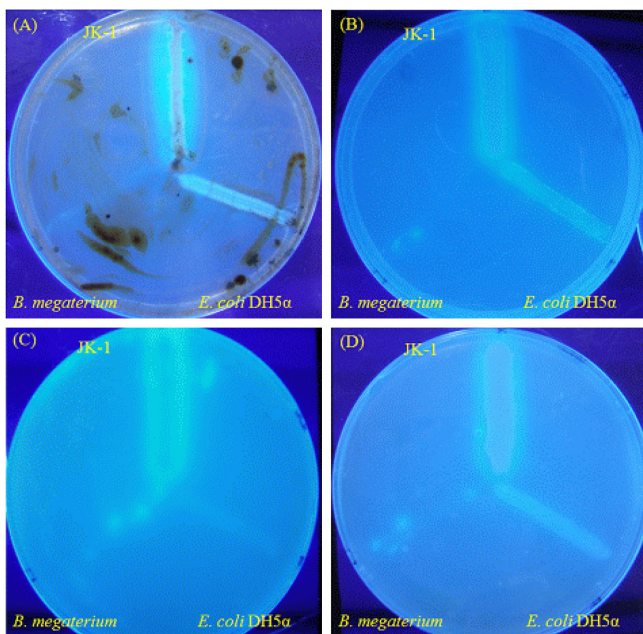
**유류 분해 조사.** Fig. 1에서 보는 바와 같이 생물계면활성제를 생산하는 *B. subtilis* JK-1은 대조구(control)로 사용한 *B. megaterium*과 *Escherichia coli*와는 달리 3.0% (v/v) 원유와 휘발유, 등유, 경유를 잘 분해하는 것으로 확인되었다.

**생물계면활성도를 위한 최적 탄소원 조사.** 생물계면활성도를 위한 최적 탄소원을 결정하기 위해 A-medium에 각종 탄소원을 1.0% (w/v 또는 v/v)씩 첨가하여 *B. subtilis* JK-1의 성장과

배양액의 최종 pH, 표면장력을 조사하였다. Xylose를 제외한 나머지 탄소원에서의 OD<sub>600</sub> 값은 1.0 이하로 나타났다. 이는 질소원이 결핍된 환경에서 균주의 생장이 제한된 것으로 사료된다. 각종 배양액의 최종 pH는 6.2-7.5이었다. 특히, hydrocarbon류를 첨가하였을 때 대부분 배양액의 최종 pH는 약 7.4-7.5로 중성이었다. 한편, 각 탄소원에 따라 초기 표면장력 값이 다르므로 표면장력 측정 후, 배양 전 초기 표면장력 값과 배양 후 최종 표면장력 값의 차이 즉, 표면장력 감소율을 계산하여 표기하였다. 그 결과 mannose, soluble starch, sucrose, xylose, trehalose, hexadecane (C<sub>16</sub>), crude oil을 탄소원으로 첨가하였을 때 표면장력 감소율이 높았으며, 그 중에서도 soluble starch는 표면장력 감소율이 48.0%로 가장 높아 생물계면활성도를 위한 최적 탄소원으로 결정하였다. 반면에 CMC는 표면장력 감소율이 “-6.9%”이었으며, arabinose와 mannitol, hexane (C<sub>6</sub>), octane (C<sub>8</sub>)은 표면장력 감소율이 각각 3.0, 1.6, 7.7, 6.9%로 조사되었다. 특히, crude oil의 표면장력 감소율은 46.8%로 hydrocarbon류 중에서는 가장 높은 표면장력 감소율을 나타내었으며, hexadecane (C<sub>16</sub>)은 42.6%의 표면장력 감소율을 보였다 (Table 1).

생물계면활성도를 위한 최적 탄소원으로 결정된 soluble starch의 최적 농도를 조사하였다. 그 결과 soluble starch의 농도가 높을수록 OD<sub>600</sub> 값은 증가하였다. 배양액의 최종 pH는 전반적으로 중성이었으나 soluble starch의 농도가 높을수록 7.8에서 7.4로 감소하였다. 그리고 soluble starch의 농도를 1.0% (w/v)로 첨가하였을 때 표면장력 감소율은 가장 높게 나타남에 따라 이후 진행된 실험에는 1.0% (w/v)의 soluble starch를 사용하였다(data not shown).

많은 연구자들은 *B. subtilis*의 성장과 생물계면활성도에 영향을 미치는 탄소원에 대해 보고한 바 있다. *B. subtilis* C9는 탄소원으로 glucose 또는 sucrose를 사용하였을 때 생물계면활성도가 증가하였다[Kim 등, 1997]. 이 때 표면장력 감소율은 sucrose보다 glucose를 첨가한 경우 더 높았으며, 4% (w/v) glucose가 최적 탄소원으로 표면장력은 72.8 dyne/cm에서 28.2 dyne/cm로 감소하였다. Crude oil과 hexadecane (C<sub>16</sub>)은 *B. subtilis* C9의 생물계면활성도에 적합하지 않은 것으로 보고되었다. Makkar와 Cameotra [1998]는 탄소원인 glucose와 sucrose, starch, sodium pyruvate가 *B. subtilis* MTCC1427의 생물계면활성도에 효과적임을 보고하였다. 이들 중 2% (w/v) sucrose를 사용한 경우 생물계면활성도가 가장 높았으며, 이 때 표면장력은 68 dyne/cm에서 34 dyne/cm로 감소하여 표면장력 감소율은 50%로 나타났다. 반면에 sodium acetate나 hydrocarbon류는 *B. subtilis* MTCC1427의 성장과 생물계면활성도에 효과적이지 않았다. *B. subtilis* 20B는 sugars와 alcohols, hydrocarbon류와 같은 다양한 탄소원을 사용하여 생물계면활성제를 생산하였다[Joshi 등, 2008]. 특히, molasses와 glucose같은 sugars를 첨가한 경우 생물계면활성도가 더 증가하였으며, 2% (w/v) molasses와 glucose에서 표면장력 감소율은 각각 45%와 39%로 보고되었다. *B. subtilis* 20B는 cotton seed oil을 탄소원으로 사용하였을 때 생물계면활성이 없었으며, cheese whey와 molasses, cotton seed oil에서는 잘 성장하는 것으로 나타났다.



**Fig. 1.** Degradation of oil in agar plates by *B. subtilis* JK-1. The cells were grown on LB agar plates supplemented with 3.0% (v/v) of various oil at 35°C for 16 h. *E. coli* DH5α and *B. megaterium* are shown as controls. (A) crude oil (B) gasoline (C) kerosene (D) light oil

**Table 1. Growth of cells, final pH of the culture broth, and surface activity of the crude biosurfactant produced by *B. subtilis* JK-1 with various carbon sources**

Carbon source (1.0%, w/v or v/v)	Cell growth (OD <sub>600</sub> )	Final pH	Surface tension of culture supernatant (dyne/cm)		Surface tension reduction (%)
			Initial	Final	
None (control)	0.161±0.003 <sup>a</sup>	7.66±0.02 <sup>a</sup>	65.0±0.06 <sup>a</sup>	56.7±0.32 <sup>a</sup>	12.8
Sugars and Carbohydrates:					
Arabinose	0.327±0.001	6.41±0.07	56.0±0.21	54.3±0.15	3.0
Carboxymethyl cellulose (CMC)	0.117±0.003	7.51±0.04	42.0±0.12	44.9±0.35	-6.9
Dextrose	0.410±0.005	6.58±0.04	51.0±0.00	37.2±0.06	27.1
Fructose	0.408±0.010	6.47±0.06	53.0±0.10	44.7±0.15	15.7
Galactose	0.472±0.002	6.93±0.09	55.6±0.06	41.0±0.06	26.8
Glucose	0.357±0.008	6.19±0.00	54.1±0.06	45.7±0.15	15.5
Glycerol	0.497±0.001	6.61±0.02	58.0±0.40	41.2±0.36	29.0
Lactose	0.338±0.004	7.15±0.04	60.0±1.20	43.5±0.36	27.5
Maltose	0.433±0.001	6.69±0.04	48.5±0.49	38.6±0.36	20.4
Mannitol	0.335±0.003	6.59±0.03	52.1±0.12	51.3±0.25	1.6
Mannose	0.453±0.011	6.35±0.04	56.0±0.31	32.3±0.00	42.3
Raffinose	0.352±0.002	7.39±0.01	59.9±0.06	38.0±0.40	36.6
Rhamnose	0.564±0.007	7.14±0.03	59.0±0.21	43.0±1.11	27.1
Soluble starch	0.318±0.003	7.48±0.04	60.0±0.31	31.2±0.20	48.0
Sucrose	0.418±0.005	6.55±0.02	60.0±0.06	34.1±0.31	43.2
Trehalose	0.701±0.012	7.12±0.03	59.8±0.26	33.9±0.06	43.4
Xylose	1.029±0.004	6.78±0.08	64.0±0.15	35.0±0.00	45.3
Hydrocarbons:					
Pentane (C <sub>5</sub> )	0.446±0.010	7.43±0.02	60.8±0.21	53.5±0.06	12.0
Hexane (C <sub>6</sub> )	0.547±0.002	7.44±0.01	60.4±0.75	55.8±0.29	7.7
Heptane (C <sub>7</sub> )	0.309±0.006	7.42±0.01	59.8±0.10	50.3±0.06	15.9
Octane (C <sub>8</sub> )	0.304±0.006	7.43±0.03	58.8±0.15	54.8±0.29	6.9
Nonane (C <sub>9</sub> )	0.253±0.003	7.44±0.06	59.9±0.12	52.8±0.67	11.9
Decane (C <sub>10</sub> )	0.409±0.002	7.46±0.04	60.8±0.35	48.1±0.10	20.9
Tetradecane (C <sub>14</sub> )	0.576±0.008	7.46±0.05	61.2±0.06	39.1±0.06	36.1
Hexadecane (C <sub>16</sub> )	0.403±0.003	7.47±0.07	60.8±0.97	34.9±0.06	42.6
Crude oil (Kuwait)	0.260±0.006	7.31±0.06	60.5±0.47	32.2±0.45	46.8
Polyaromatic hydrocarbons					
Paraffin	0.299±0.002	7.45±0.05	60.5±0.64	47.9±0.06	20.9
Toluene	0.330±0.003	7.43±0.07	59.9±0.12	48.0±0.15	19.9
Benzen	0.342±0.001	7.42±0.01	60.0±0.35	48.0±0.12	20.0

Seed culture (1 mL) was inoculated into 100 mL of A-medium as a control and A-medium containing 1.0% (w/v or v/v) of each carbon source. Cultivations were carried out for 96 h at 35°C, 200 rpm.

<sup>a</sup>Results represent the average of three independent experiments (±standard deviations).

한편, *B. subtilis* HOB2는 glucose와 maltose, mannitol, starch, sucrose에서 생물계면활성도가 증가한다고 보고하였다[Haddad 등, 2009]. 이들 중 1.0% (w/v) sucrose가 생물계면활성도에 가장 적합하였으며, 표면장력 감소율은 58.5%이었다. 그러나 hydrocarbon류는 생물계면활성을 저해하는 것으로 나타났다. *B. subtilis* HOB2는 glucose와 maltose, starch에서 최고의 생장을 보였으며, hexadecane (C<sub>16</sub>)과 crude oil에서는 거의 성장하지 못하였다. 이와 같이 균주들에 따라서 각종 탄소원에 대한 생장과 생물계면활성도가 상이한 것으로 확인되었다.

Desai와 Banat [1997]은 생물계면활성도에 영향을 미치는 몇몇 sugars를 포함한 다양한 탄소원들을 보고한 바 있다. 대부분의 연구에서는 hydrocarbon류가 균주의 생장과 생물계면활성도에 부적합하다고 보고하였다. 그러나 본 연구에 사용된 *B. subtilis* JK-1은 다른 *B. subtilis*에 비해 탄소원으로 hydrocarbon

류를 이용하는 능력이 뛰어나므로, 유류 오염 지역으로부터의 유류 회수와 유화 공정의 향상 등 그 응용성이 크게 기대된다.

**생물계면활성도를 위한 최적 질소원 조사.** 생물계면활성도를 위한 최적 질소원을 결정하기 위하여 상기 실험에서 결정된 최적 탄소원 즉, 1.0% (w/v) soluble starch가 첨가된 A-medium에 각 질소원을 0.5% (w/v) 되게 첨가한 뒤 *B. subtilis* JK-1의 생장과 배양액의 최종 pH, 표면장력을 조사하였다(Table 2). 균주의 생장은 skim milk에서 OD<sub>600</sub> 값이 5.577로 가장 높았으며, yeast extract (OD<sub>600</sub>=4.693), tryptone (OD<sub>600</sub>=4.433), beef extract (OD<sub>600</sub>=3.875), peptone (OD<sub>600</sub>=3.534) 순으로 나타났다. Casein과 malt extract, soytone을 질소원으로 사용한 경우 균주 생장은 OD<sub>600</sub>에서 약 1.5-2.0이었으며, 무기 질소원인 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>3</sub>에서는 거의 성장하지 않았다. 배양 후 배양액의 최종 pH는

**Table 2. Growth of cells, final pH of the culture broth, and surface activity of the crude biosurfactant produced by *B. subtilis* JK-1 with various nitrogen sources**

Nitrogen source (0.5%, w/v)	Cell growth (OD <sub>600</sub> )	Final pH	Surface tension of culture supernatant (dyne/cm)		Surface tension reduction (%)
			Initial	Final	
None (control)	0.318±0.001 <sup>a</sup>	7.48±0.03 <sup>a</sup>	60.0±0.31 <sup>a</sup>	31.2±0.20 <sup>a</sup>	48.0
Complex nitrogen sources:					
Beef extract	3.875±0.003	8.92±0.01	43.0±0.06	27.9±0.06	35.2
Casein	1.490±0.010	9.04±0.02	42.3±0.45	29.3±0.21	30.8
Malt extract	1.491±0.002	7.18±0.06	44.5±0.20	37.9±0.16	14.9
Peptone	3.534±0.007	8.92±0.06	45.8±0.10	27.2±0.12	40.6
Skim milk	5.577±0.005	8.25±0.02	53.2±0.20	26.2±0.06	50.7
Soytone	1.961±0.001	8.38±0.04	55.0±0.10	28.0±0.06	49.1
Tryptone	4.433±0.002	9.08±0.03	52.8±0.06	28.2±0.00	46.6
Urea	0.040±0.004	8.84±0.01	58.2±0.20	40.2±0.68	30.7
Yeast extract	4.693±0.002	9.03±0.02	48.1±0.10	28.9±0.10	39.9
Inorganic nitrogen sources:					
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.000±0.000	5.84±0.01	43.0±0.06	48.3±2.35	-12.3
NH <sub>4</sub> Cl	0.019±0.001	6.60±0.04	50.0±0.40	44.8±1.23	10.5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.036±0.001	6.99±0.05	57.0±0.06	40.2±0.96	29.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.052±0.001	7.04±0.04	56.3±0.06	38.5±0.06	31.7
KNO <sub>3</sub>	0.246±0.004	7.51±0.00	46.9±0.06	38.3±0.06	18.4
NaNO <sub>3</sub>	0.149±0.001	7.59±0.02	47.0±0.06	39.9±0.06	15.1

Seed culture (1 mL) was inoculated into 100 mL of A-medium containing 1.0% (w/v) soluble starch as a control and A-medium containing 1.0% (w/v) soluble starch supplemented with 0.5% (w/v) of each nitrogen source. Cultivations were carried out for 96 h at 35°C, 200 rpm.

<sup>a</sup>Results represent the average of three independent experiments (±standard deviations).

**Table 3. Effect of the C/N ratio on cell growth, final broth pH, and surface activity of the biosurfactant produced by *B. subtilis* JK-1**

C:N (C/N)	Cell growth (OD <sub>600</sub> )	Final pH	Surface tension of culture supernatant (dyne/cm)		Surface tension reduction (%)
			Initial	Final	
1:0.03 (33.3)	0.496±0.006 <sup>a</sup>	4.41±0.04 <sup>a</sup>	47.2±0.05 <sup>a</sup>	51.0±0.06 <sup>a</sup>	-8.1
1:0.05 (20.0)	0.885±0.002	5.34±0.05	48.1±0.15	34.9±0.89	27.5
1:0.1 (10.0)	1.499±0.007	4.62±0.08	46.1±0.17	34.8±1.04	24.5
1:0.3 (3.3)	2.447±0.004	6.05±0.02	45.9±0.06	33.1±0.72	27.9
1:0.5 (2.0)	2.669±0.002	8.42±0.03	47.0±0.10	32.6±0.06	30.7

*B. subtilis* JK-1 was inoculated into the optimum carbon and nitrogen sources-containing culture medium. The concentration of optimum carbon source was maintained at a constant 1.0% (w/v) and the concentrations of the optimum nitrogen source changed: 0.03, 0.05, 0.1, 0.3, and 0.5% (w/v), corresponding to the C/N ratio of 33.3, 20, 10, 3.3, and 2, respectively. Cultivation was carried out for 96 h at 35°C, 200 rpm.

<sup>a</sup>Results represent the average of three independent experiments (±standard deviations).

5.8-9.1로 다양하였다. 그 중 casein과 tryptone, yeast extract에서는 pH가 9.0 이상(9.0-9.1)이었다. 한편, 각 질소원의 종류에 따라 초기 표면장력 값은 다양하므로 표면장력 측정 후, 배양 전 초기 표면장력 값과 배양 후 최종 표면장력 값의 차이, 즉 표면장력 감소율을 계산하여 표기하였다. 질소원으로 skim milk를 사용한 경우 표면장력 감소율은 50.7%로 가장 높았으며, soytone (49.1%), tryptone (46.6%), peptone (40.6%) 순으로 나타났다. 무기 질소원 중 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>에서는 표면장력 감소율이 “-12.3%”이었다. Table 2에서 보는 바와 같이 생물계면활성도에는 무기 질소원보다 유기 질소원이 더 적합한 것으로 조사되었으며, 그 중에서 skim milk를 최적 질소원으로 결정하였다.

Skim milk의 최적 농도를 조사하였다. 균주의 생장은 skim milk의 농도가 증가할수록 높게 나타났다. 반면에 표면장력 감소율은 0.5% (w/v)의 skim milk에서 가장 높아 최적 농도로 결정하였다(data not shown).

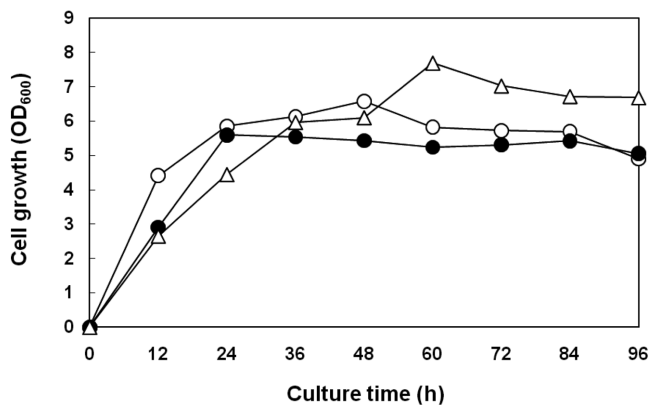
배지 조성 중 질소원은 생물계면활성도에 많은 영향을 미치는 중요 인자로 알려졌다. Kim 등[1997]은 *B. subtilis* C9가 1.35% (w/v) NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>을 질소원으로 첨가한 배지에서 균주 생장과 생물계면활성도가 가장 높았다고 보고하였다. 또한 NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>에 0.05% (w/v) yeast extract를 첨가한 경우 생물계면활성도는 현저히 증가하였다. Makkar와 Cameotra [1998]는 *B. subtilis* MTCC1427의 생물계면활성도에 있어서 NaNO<sub>3</sub>와 KNO<sub>3</sub>를 첨가한 경우 증가하였으며, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>와 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 의해서는 감소한다고 보고하였다. Fonseca 등[2007]은 질소원의 종류에 따라 *B. subtilis* YRE207의 생물계면활성도는 매우 다양하다고 보고하였는데, 이 때 각 배양액의 최종 pH 변화는 거의 없었으며, pH 6.0-7.0의 유사한 수준을 나타내었다. 그리고 생물계면활성도에 있어서 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>가 최적 질소원으로 알려졌다. 본 연구 결과와는 달리 Haddad 등[2009]은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>가 *B. subtilis* HOB2의 생물계면활성도를 증가시켰다고 보고하였다.

**Table 4. Growth of cells, final pH of the culture broth, and surface activity of the crude biosurfactant produced by *B. subtilis* JK-1 with various mineral sources**

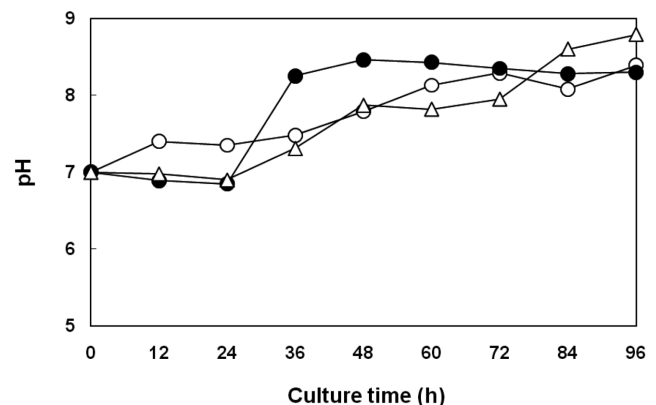
Mineral sources (0.1%, w/v)	Cell growth (OD <sub>600</sub> )	Final pH	Surface tension of culture supernatant (dyne/cm)		Surface tension reduction (%)
			Initial	Final	
None (control)	2.669±0.001 <sup>a</sup>	8.42±0.03 <sup>a</sup>	47.0±0.10 <sup>a</sup>	32.6±0.06 <sup>a</sup>	30.7
CaCl <sub>2</sub>	2.654±0.003	6.21±0.05	49.2±0.25	39.1±0.04	20.5
CaCO <sub>3</sub>	4.513±0.001	6.69±0.04	45.2±0.45	30.6±0.04	32.3
CoCl <sub>2</sub>	0.625±0.003	6.29±0.07	46.5±0.75	52.6±0.05	-13.2
CuSO <sub>4</sub>	4.627±0.009	4.84±0.04	48.2±0.06	51.9±0.35	-7.7
FeSO <sub>4</sub>	4.769±0.001	3.88±0.05	52.5±0.40	51.7±0.04	1.5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	5.487±0.006	3.82±0.04	52.1±1.00	36.4±0.00	30.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.388±0.002	6.52±0.08	45.5±0.55	29.5±0.06	35.2
KCl	1.948±0.007	7.48±0.03	46.2±0.06	31.4±0.08	32.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.767±0.004	5.83±0.02	47.0±0.80	25.9±0.06	45.0
KNO <sub>3</sub>	4.790±0.005	7.06±0.06	46.5±0.06	24.7±0.06	46.9
MgSO <sub>4</sub>	2.500±0.004	7.13±0.02	44.5±0.65	26.1±0.12	41.4
MnSO <sub>4</sub>	0.893±0.006	6.32±0.07	46.9±0.00	54.4±0.06	-16.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.043±0.002	7.60±0.02	48.1±0.06	29.7±0.02	38.3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	3.612±0.007	6.65±0.01	46.0±0.06	29.9±0.04	35.0
NaCl	3.356±0.005	8.21±0.04	45.1±0.06	26.5±0.21	41.3
ZnCl <sub>2</sub>	2.784±0.004	5.35±0.02	49.9±1.96	54.7±0.06	-9.8

Seed culture (1 mL) was inoculated into 100 mL of 1.0% (w/v) soluble starch and 0.5% (w/v) skim milk containing culture broth as a control and 1.0% (w/v) soluble starch and 0.5% (w/v) skim milk containing culture broth supplemented with 0.1% (w/v) of each mineral source. Cultivations were carried out for 96 h at 35°C, 200 rpm.

<sup>a</sup>Results represent the average of three independent experiments (±standard deviations)



**Fig. 2. Changes in growth by *B. subtilis* JK-1 with culture time in different media.** Cultivation was carried out for 96 h at 35°C, 200 rpm. Media used were as described in the Materials and Methods section. Symbols: ○, optimum medium; ●, LB; △, TSB



**Fig. 3. Changes in final pH of the culture broth by *B. subtilis* JK-1 in different media.** Cultivation was carried out for 96 h at 35°C, 200 rpm. Media used were as described in the Materials and Methods section. Symbols: ○, optimum medium; ●, LB; △, TSB

**생물계면활성도를 위한 탄소원과 질소원의 농도 비율 조사.** 상기에서 결정된 최적 탄소원과 질소원의 결과를 통해 생물계면활성도에 적합한 탄소원과 질소원의 농도 비율을 검토하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 soluble starch와 skim milk의 농도 비율이 33.3 (1:0.03)인 경우 OD<sub>600</sub>값이 0.496으로 생육도가 가장 낮았으며, 비율이 낮아질수록 균주 생장은 점차 증가하였다. 이 때 soluble starch와 skim milk의 농도 비율이 2.0 (1:0.5)인 경우 OD<sub>600</sub>값이 2.669로 가장 높았다. 그리고 배양액의 최종 pH는 농도 비율 33.3에서 pH 4.4로 산성이었으며, 비율이 낮아질수록 배양액의 최종 pH는 상승하였다. 특히, soluble starch와 skim milk의 농도 비율 2.0에서 배양액의 최종 pH는 8.4로 알칼리성을 나타내었다. Crude 생물계면활성제의 표면장

력은 농도 비율 33.3인 경우 “-” 값을 나타내었다. 반면에 탄소원과 질소원의 비율이 20 이하로 낮아질수록 표면장력 감소율은 증가하였다. 특히, soluble starch와 skim milk의 농도 비율이 2.0에서 표면장력 감소율은 30.7%로 가장 높게 나타났다. 따라서 생물계면활성도를 위한 soluble starch와 skim milk의 최적 농도 비율은 2.0 (1:0.5)으로 조사되었다.

생물계면활성도에 있어서 탄소원과 질소원의 농도 비율은 많은 영향을 미치는 것으로 보고되었다[Amezcu-Vega 등, 2007]. 탄소원과 질소원의 다양한 비율(3.0, 9.0, 15.0) 상에서 *B. subtilis* YRE207의 생물계면활성도를 위한 최적 농도 비율은 3.0이었으며, 이 때 표면장력 감소율은 43%로 나타났다[Fonseca 등, 2007]. 그리고 탄소원과 질소원의 비율에 따른 배양액의 최



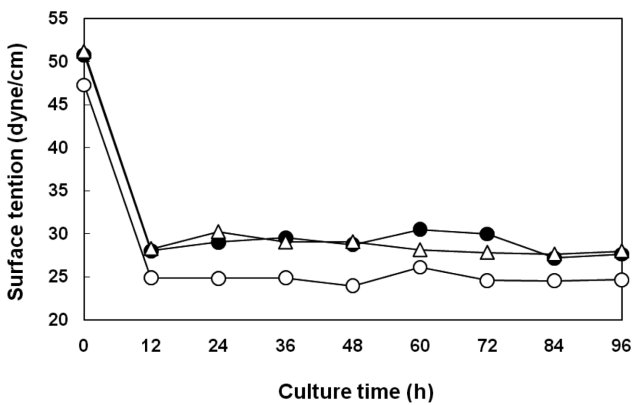


Fig. 4. Changes in surface activity of the crude biosurfactant produced by *B. subtilis* JK-1 in different media. Cultivation was carried out for 96 h at 35°C, 200 rpm. Media used were as described in the Materials and Methods section. Symbols: ○, optimum medium; ●, LB; △, TSB

중 pH는 거의 변화가 없었으며, pH 6.0-6.5의 수준을 유지한다고 보고하였다.

**생물계면활성도를 위한 최적 무기염 조사.** 생물계면활성도를 위한 최적 무기염을 결정하기 위하여 1.0% (w/v) soluble starch와 0.5% (w/v) skim milk가 함유된 배지에 각종 무기염류를 0.1% (w/v) 되게 첨가하여 균주 성장과 배양액의 최종 pH, 표면장력을 측정 하였다(Table 4). *B. subtilis* JK-1은  $\text{CoCl}_2$ 와  $\text{MnSO}_4$ 를 제외한 각종 무기염류가 첨가된 배지에서 잘 성장하였다. 그리고 배양액의 최종 pH는 첨가된 무기염류의 종류에 따라 다른 양상을 보였다.  $\text{CuSO}_4$ 와  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ 가 첨가된 배양액은 산성(pH 3.8-5.8)이었으며, NaCl이 첨가된 배양액의 최종 pH는 알칼리(pH 8.2)로 확인되었다. 그 외 무기염류들이 첨가된 배양액의 최종 pH는 약산성 혹은 중성 부근으로 나타났다. 첨가된 무기염류의 종류에 따라 초기 표면장력 값은 다르므로 표면장력 측정 후 배양 전 초기의 표면장력과 배양 후 최종 표면장력의 값의 차이, 즉 표면장력 감소율을 측정하였다.  $\text{KNO}_3$ 와  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , NaCl,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 이 첨가된 경우 표면장력 감소율은 각각 46.9, 45.0, 41.4, 41.3, 38.3%로 높게 나타났다. 반면에  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$ 가 첨가된 배지는 생물계면활성도에 부적합한 것으로 나타났다.

표면장력 감소율이 가장 높은  $\text{KNO}_3$ 의 농도를 달리하여 균주의 성장과 배양액의 최종 pH, 표면장력 감소율을 비교하였다. 균주 생장은 0.1% (w/v)  $\text{KNO}_3$ 에서 가장 높았으며, 배양액의 최종 pH는 중성인 7.1이었고, 표면장력 감소율도 가장 높게 조사되었다(data not shown). 따라서 균주 성장과 표면장력 감소율이 가장 높은  $\text{KNO}_3$ 의 농도는 0.1% (w/v)로 결정되었다.

무기염류는 균주의 성장과 생물계면활성도에 상당히 많은 영향을 미친다. Kim 등[1997]은  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 와  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 를 7:1의 비율로 사용하였을 때 *B. subtilis* C9의 생물계면활성도가 가장 높다고 보고하였다. 그리고 여기에  $\text{MnSO}_4$ 를 첨가하여 균주 성장과 생물계면활성을 증가시켰으며,  $\text{CaCl}_2$ 와 NaCl은 균주 성장과 생물계면활성을 저해하는 것으로 나타났다. 한편, *B. subtilis* ATCC21332는 철과 망간을 배지에 첨가한 결과 생물계면활성이 증가하였다[Wei 등, 2003].

**배지 종류에 따른 생물계면활성도 조사.** TSB와 LB 배지, 본 연구에서 확립한 생물계면활성도를 위한 최적 배지에 *B. subtilis* JK-1을 각각 접종하여 96시간 동안 배양하면서 배지 종류에 따른 생물계면활성을 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 *B. subtilis* JK-1은 배양 후 12시간 만에 최적 배지에서 최고의 생육도를 보였고( $\text{OD}_{600}=4.41$ ), 48시간까지 가장 잘 성장하였다. 반면에 TSB에서는 배양 48시간 이후부터 최적 배지와 LB 배지보다 더 높은 생육도를 나타내었으며, 배양 후 60시간 대에 최고의 생장( $\text{OD}_{600}=7.7$ )을 나타내었다. LB 배지는 최적 배지나 TSB에 비해 다소 낮은 생육도를 보였다. 그리고 최적 배지와 LB 배지, TSB에서 자란 배양액의 pH를 조사하였다. 배양 시간이 경과하면서 최적 배지와 TSB에서 자란 배양액은 pH가 상승하면서 알칼리성으로 변화하였다. LB 배지에서 자란 배양액의 pH는 24시간 이후 급격히 증가하여 배양 36시간부터는 거의 유사한 pH (8.3-8.5)를 유지하였다(Fig. 3). 표면장력은 배양 후 12시간 만에 최적 배지에서 낮게 측정되었으며(24.9 dyne/cm), 48시간에 가장 낮은 값(24.0 dyne/cm)을 나타내었다. LB 배지와 TSB에서의 표면장력 값은 배양 12시간 이후부터 약 28.0 dyne/cm를 유지하였다(Fig. 4). 각 배지에 따라 초기 표면장력 값이 다르므로 표면장력 감소율을 계산한 결과, 최적 배지와 LB, TSB 배지에서의 최고 표면장력 감소율은 50, 46, 45%로 유의성 있는 차이가 적은 것으로 조사되었다. 그리고 96 시간 동안 배양하면서 최고의 생물계면활성을 나타내는 시간은 본 연구에서 확립한 최적 배지가 좀 더 빠름을 알 수 있었다. 따라서 본 연구자들은 생물계면활성도를 위한 보다 경제적인 배지를 모색하기 위해 쌀겨나 폐옥수수, 깻묵 등과 같은 농산 부산물을 이용한 연구를 진행 중에 있다.

*B. subtilis* MZ-7은 생물계면활성제를 산업적으로 응용하기 위하여 시판되고 있는 Pharmamedia를 이용하여 대규모 배양을 시도하였다[Al-Ajlani 등, 2007]. *B. subtilis* MZ-7을 LB와 nutrient broth, brain heart infusion 배지, 최적 배지, 무기염류 배지, Cooper 배지, Landy 배지, Pharmamedia에서 배양한 결과 생물계면활성도는 brain heart infusion 배지와 최적 배지에서 최대였으며, Landy 배지 순이었다. 균주의 성장 양상은 각 배지 종류마다 상이하였으며, Landy 배지와 Pharmamedia에서 최고의 생육도를 보였다. 배양액의 pH 변화는 거의 일어나지 않았으며, pH 7.0-8.0 수준을 유지하였다. 한편, 본 연구에서는 *B. subtilis* JK-1의 최저 표면장력 값이 24.0 dyne/cm로 조사되었다. 이는 *B. subtilis* C9 (28.2 dyne/cm) [Kim 등, 1997], *B. subtilis* MTCC1427 (28.0 dyne/cm) [Makkar와 Cameotra, 1998], *B. subtilis* YRE207 (31.5 dyne/cm) [Fonseca 등, 2007]의 최저 표면장력 값 보다 더 낮은 것으로 확인되었다.

본 연구 결과에 의하면 배지에 첨가되는 탄소원과 질소원, 무기염은 *B. subtilis* JK-1의 생물계면활성도에 관련이 있는 것으로 나타났다. 특히, 질소원은 다른 인자에 비해 더 많은 영향을 미치는 것으로 조사되었다. 따라서 최적 질소원인 skim milk를 대체할 만한 경제적인 질소원을 확립하는 것이 필요하다고 판단된다. 생물계면활성도를 증가시키려는 노력에도 불구하고 일상생활에 사용되는 화학합성 계면활성제와 대체되지 못하고 있는 이유는 균주를 마다 상이한 환경을 요구하며, 탄소원과 질

소원, 무기염을 이용하는데 많은 비용이 소요될 뿐만 아니라 crude 생물계면활성제보다는 정제된 생물계면활성제가 사용되기 때문이다[Bognolo, 1999]. 따라서 생물계면활성도 증진을 위한 경제적인 최적 배지와 환경 조건(온도, pH, 통기량, 염 농도) 등 여러 방법을 통해 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

## 초 록

본 연구에서는 원유, 휘발유, 등유, 경유를 분해하면서 생물계면활성제를 생산하는 균주인 *B. subtilis* JK-1을 선별하여 생물계면활성제 생산에 관한 연구를 수행하였다. 생물계면활성제 생산을 위한 최적 배지를 결정하기 위해 다양한 탄소원과 질소원, 무기염류를 조사하였다. *B. subtilis* JK-1은 탄소원인 1.0% (w/v) soluble starch와 질소원인 0.5% (w/v) skim milk를 포함한 배지에서 96 시간 동안 배양한 결과 가장 많은 생물계면활성제를 생산하였으며, 이 때 탄소원과 질소원의 비율은 2.0이었다. 그리고 0.1% (w/v)의  $KNO_3$ 는 생물계면활성제 생산을 위한 최적 무기염류로 확인되었다. *B. subtilis* JK-1은 LB 배지와 TSB 배지보다 본 연구에서 확립한 생물계면활성제 생산 최적 배지에서 더 많은 생물계면활성제를 생산하였다. 생물계면활성제 생산 최적 배지에서 *B. subtilis* JK-1 배양액의 표면장력은 균주 접종 후 48시간 만에 47.3 dyne/cm에서 24.0 dyne/cm로 감소하였다.

**Key words:** *Bacillus subtilis* JK-1, 생물계면활성제 생산, 탄소원과 질소원의 비율, 탄소원, 배지 최적화, 무기염, 질소원, 표면장력

## 감사의 글

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2008-531-D00004).

## 참고문헌

- Al-Ajlani MM, Sheikh MA, Ahmad Z, and Hasnain S (2007) Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microb Cell Fact* **6**, 17-24.
- Amani H, Mehrnia MR, Sarrafzadeh MH, Haghghi M, and Soudi MR (2010) Scale up and application of biosurfactant from *Bacillus subtilis* in Enhanced Oil recovery. *Appl Biochem Biotechnol* **162**, 510-523.
- Amézcuca-Vega C, Poggi-Valardo HM, Esparza-García F, Ríos-Leal E, and Rodríguez-Vázquez R (2007) Effect of culture conditions on fatty acids composition of a biosurfactant produced by *Candida ingens* and changes of surface tension of culture media. *Bioresour Technol* **98**, 237-240.
- Banat IM, Makkar RS, and Cameotra SS (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* **53**, 495-508.
- Bognolo G (1999) Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **152**, 41-52.
- Cameotra SS and Makkar RS (2004) Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr Opin Microbiol* **7**, 262-266.
- Cubitto MA, Morán AC, Commendatore M, Chiarello MN, Baldini MD, and Siñeriz F (2004) Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. *Biodegradation* **15**, 281-287.
- Desai J and Banat I (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 47-64.
- Fonseca RR, Silva AJ, De França FP, Cardoso VL, and Sérvulo EF (2007) Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. *Appl Biochem Biotechnol* **137-140**, 471-486.
- Haddad NIA, Wang J, and Mu B (2009) Identification of a biosurfactant producing strain: *Bacillus subtilis* HOB2. *Protein Pept Lett* **16**, 7-13.
- Hur SH, Yang JS, and Hong JH (2002) Production of biosurfactant using *Bacillus* spp.. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **31**, 389-393.
- Joo MH, Hur SH, Han YS, and Kim JY (2007) Isolation, identification, and characterization of *Bacillus* strains from the traditional Korean soybean-fermented food, *Chungkookjang*. *J Appl Biol Chem* **50**, 202-210.
- Joshi S, Bharucha C, and Desai AJ (2008) Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresour Technol* **99**, 4603-4608.
- Kim HS, Yoon BD, Lee CH, Suh HH, Oh HM, Katsuragi T, and Tani Y (1997) Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *J Ferment Bioeng* **84**, 41-46.
- Lai CC, Huang YC, Wei YH, and Chang JS (2009) Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J Hazard Mater* **167**, 609-614.
- Lang S (2002) Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr Opin Colloid Interface Sci* **7**, 12-20.
- Maier RM, Neilson JW, Artiola JF, Jordan FL, Glenn EP, and Descher SM (2001) Remediation of metal-contaminated soil and sludge using biosurfactant technology. *Int J Occup Med Environ Health* **14**, 241-248.
- Makkar RS and Cameotra SS (1998) Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **20**, 48-52.
- Mukherjee S, Das P, and Sen R (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* **24**, 509-515.
- Pagilla KR, Sood A, and Kim H (2002) *Gordonia (nocardia) amarae* foaming due to biosurfactant production. *Water Sci Technol* **46**, 519-524.
- Wei YH, Wang LF, Changy JS, and Kung SS (2003) Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. *J Biosci Bioeng* **96**, 174-178.