

## Bacillus subtilis JK-1의 생물계면활성제 생산을 위한 배양 특성

김 지 연\*

인제대학교 기초대학

### Characteristics of Culture Conditions for the Production of Crude Biosurfactant by *Bacillus subtilis* JK-1

Ji Yeon Kim\*

College of General Education, Inje University, Gimhae 621-749, Republic of Korea

Received August 9, 2011; Accepted September 9, 2011

**Optimal culture conditions were characterized for production of crude biosurfactant of *Bacillus subtilis* JK-1. During incubation of *B. subtilis* JK-1, the bacterial growth pattern, changes of the surface tension at variable temperatures, pH and NaCl concentrations in bacterial culture medium were studied. The strain was able to grow and produce biosurfactant at 15-45°C, in the pH range of 6-10, and at 0-10% (w/v) NaCl. In case, culture broth pH was gradually changed to neutral or weak alkaline. Optimal culture conditions for crude biosurfactant production were at 35°C and pH 7.0 after 48 h incubation and the surface tension of biosurfactant was 24.0 mN/m. Besides, as the concentration of NaCl was increased from 0 to 10% (w/v), the growth was decreased, pH of the culture broth was converted from weak alkaline to acidic, and the surface tension rised.**

**Key words:** *Bacillus subtilis* JK-1, biosurfactant, culture conditions, optimization, production, surface tension

#### 서 론

해양 원유 운송선의 사고, 해저 유전과 유류 저장고, 정유소로부터의 유류 유출, 여러 종류의 폐유와 폐수 등에 의해 유류가 유입되면 심각한 환경오염을 유발하게 된다. 2007년 '태안 원유 유출 사고'와 같은 대규모의 해양 원유 유출 사고가 발생한 경우 해상에서 유회수기 등으로 직접 회수할 수 있는 원유량은 전체 유출량의 30% 이내에 불과하며, 남은 원유는 수층으로 용해되어 주변 해역의 오염을 일으키고, 증발과 용해 과정을 거친 분획은 잔류 물질이 되어 해안에 영향을 미친다[Cha 등, 1999]. 따라서 유출된 원유를 회수하고, 생태계를 복원하기 위하여 다양한 방법으로 접근이 시도되고 있으며 물리적, 화학적, 생물학적 방법이 적용된다[da Cunha 등, 2006]. 특히, 생물학적 방법은 미생물의 생분해 능력을 높여 오염물질을 제거하는 기술로서 생물활성화법(biostimulation)과 생물접종법(bioaugmentation)이 있다. 이 중 생물접종법은 오염된 지역에 분포하는 미생물의 유류 분해 능력이 낮거나 유류에 난분해성 물질이 다량 함유되어 있을 때 외부에서 유류 분해 능력이 뛰

어난 미생물을 추가로 접종하여 분해 속도를 높이는 방법이다[Balba 등, 1998]. 유류분해 미생물은 유류를 탄화수소 기질로 사용하여 분해하고, 그 과정에서 세포 밖으로 계면활성제(surfactant)를 생산하여 유류에 대한 유회능을 가짐으로써 분해를 촉진시킨다[Cameotra와 Singh, 2008].

계면활성제란 한 분자 내에 친수성기(hydrophilic)와 소수성기(hydrophobic)를 모두 갖는 양친매성 물질(amphipatic compound)로서 표면이나 계면의 성질을 변화시켜 표면장력을 감소시키는 물질이다. 표면장력은 성격이 다른 두 상이 서로 인접하고 있을 때, 액체의 자유표면에서 표면을 작게 하려고 작용하는 장력을 말한다[Kim 등, 2000]. 계면활성제는 초기에는 유지로부터 소량 합성되었으나 현재에는 석탄, 석유 등에서 화학합성 계면활성제(chemical surfactant)가 산업적으로 대량 생산되고 있다. 그러나 화학합성 계면활성제는 사용 후 물 위에 거품을 형성하여 햇빛과 산소를 차단시킬 뿐 아니라 세척력을 높이기 위하여 첨가하는 인으로 인해 부영양화 현상을 발생시키고, 그 자체의 독성 및 난분해성으로 인해 생태계에 심각한 환경오염을 야기시킨다. 이러한 화학합성 계면활성제를 대체하기 위하여 최근에는 생물계면활성제(biosurfactant)에 대한 연구가 주목을 받고 있다[McKew 등, 2007]. 현재 진행 중인 생물계면활성제의 공업적 생산은 동·식물 세포에 비해 다루기 쉬운 미생물에 의존하고 있다. 미생물이 생산하는 생물계면활성제는 비교적 간단한 배양과정과 기질을 이용하여 쉽게 대량생

\*Corresponding author

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

E-mail: biokjy@inje.ac.kr

<http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2011.026>

산 할 수 있고, 균주에 따라 각기 다른 다양한 구조의 계면활성제를 얻을 수 있다. 현재 구조에 따라 glycolipid와 lipoproteins-lipopeptides, fatty acids, neutral lipid, phospholipids, lipopolysaccharides 등으로 분류되는데, 각 구조마다 특이성이 있어서 세제, 원유의 2차 회수, 펄프와 제지 산업, 육상과 해양의 유류 오염 정화, 처리조의 유지방 분해 등 기존의 화학합성 계면활성제가 사용되는 대부분의 산업분야뿐 아니라 의약품, 식품, 화장품 분야 등에서 광범위한 용도로 사용되고 있다[Banat 등, 2000]. 특히, 화학합성 계면활성제와는 달리 생분해가 가능하고, 독성이 상대적으로 적어서 2차적인 오염을 발생시키지 않기 때문에 매우 환경 친화적인 물질이다[Deziel 등, 1996]. 그리고 표면장력 저하 능력, 온도 및 pH에 대한 안정성 등 물리·화학적면에서 기존의 화학합성 계면활성제와 거의 대등한 효과를 보인다는 장점을 가지고 있다[Bognolo, 1999]. 생물계면활성제를 생산하는 대표적인 미생물로는 *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Bacillus* 등이 알려져 있다[Thavasi 등, 2007; Amani 등, 2010; Sahoo 등, 2010]. 생물계면활성제를 생산하는데 영향을 미치는 주요 인자로는 각종 영양원의 종류, 온도, pH, 용존 산소의 양, 교반 속도, 다가이온의 공급, 성장 시기, 생산물에 의한 저해작용 등이 있으며, 표면장력의 감소능이나 유희능을 시험하여 그 영향 정도를 알 수 있다[Mukherjee 등, 2006].

본 연구자들은 생물계면활성제 생산 균주를 확보할 목적으로 청국장으로부터 *B. subtilis* JK-1을 분리하고, sheep blood agar 배지와 polymerase chain reaction (PCR) 선별 방법을 이용하여 생물계면활성제 생산 균주임을 확인한 바 있다[Joo 등, 2007]. 또한, 해양에 오염된 원유 제거 등 생물집중법에 활용하기 위한 연구의 일환으로 *B. subtilis* JK-1의 생물계면활성도 향상을 위해 최적 배지 조성을 결정하였다[Joo와 Kim, 2011]. 본 연구에서는 다양한 배양 온도와 pH, NaCl 농도에 따른 *B. subtilis* JK-1의 성장과 배양액의 pH, 표면장력의 변화 양상을 조사하여, 추후 유류로 오염된 지역에 적용 가능한 기초 데이터로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

**사용 균주 및 배지.** 본 연구에서는 생물계면활성제 생산 균주 *B. subtilis* JK-1을 사용하였다[Joo 등, 2007]. *B. subtilis* JK-1은 생물계면활성제 생산 최적 배지[1.0% (w/v) soluble starch (BioShop® Canada, Burlington, Ontario), 0.5% (w/v) skim milk (BioShop® Canada), and 0.1% (w/v) KNO<sub>3</sub> (BioShop® Canada)]에서 배양하였다[Joo와 Kim, 2011].

**배양 조건.** 생물계면활성제 생산을 위해 *B. subtilis* JK-1을 최적 배지(pH 7.0)에 접종하여 35°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 종 배양(seed culture)하였다. 배양된 균주는 최적 배지에 1.0% (v/v)되게 접종하고, 35°C에서 200 rpm으로 96시간 동안 진탕 배양하였다.

**균주 생육도 측정.** 배양시간에 따른 *B. subtilis* JK-1의 성장 확인을 위해 진탕 배양한 배양액을 12시간 간격으로 일정량 취하고 BioPhotometer 6131 spectrophotometer (Eppendorf AG,

Eppendorf, Germany)를 사용하여 600 nm에서 흡광도(optimal density)를 측정하였다.

**Crude 생물계면활성제 분리.** 진탕 배양한 균주의 배양액을 12시간 간격으로 일정량 채취하여 원심분리(4°C, 10,000 rpm, 2분)하였다. 균체를 제거한 상등액에 6.0 M HCl을 서서히 가하면서 pH가 2.0이 되게 조정하여 4°C에 하룻밤 방치하면서 생물계면활성제를 침전시켰다. 이를 원심분리하여 침전물을 회수하고, 알칼리성 수용액(0.1 N NaOH, pH 8.0)에 용해하여 동결 건조 시켰다. 건조된 물질을 10 mL의 methanol로 3회 추출하여 농축한 것을 crude 생물계면활성제로 사용하였다[Haddad 등, 2009].

**표면장력 측정.** 미생물이 생물계면활성제를 생산하면 표면장력은 떨어진다. 이 사실을 이용해 표면장력 값으로 미생물이 생산하는 생물계면활성제의 표면장력 활성을 확인하였다[Lang, 2002]. 표면장력은 Surface Tension Analyzer DST-60 (Surface Electro Optics Co., Suwon, Korea)을 사용, Ring 방법으로 25°C에서 3회 반복하여 측정하고, 그 평균값을 계산하였다[Pagilla 등, 2002].

**온도의 영향 조사.** 다양한 배양 온도에 따른 생물계면활성제 생산을 조사하기 위하여 *B. subtilis* JK-1 종 배양액을 최적 배지에 1.0% (v/v) 접종하여 각각 15-50°C까지 5°C 간격으로 96시간 동안 200 rpm으로 진탕 배양하면서 12시간 마다 균주의 성장과 배양액의 pH, crude 생물계면활성제의 표면장력을 측정하였다.

**pH의 영향 조사.** 배지의 다양한 초기 pH에 따른 생물계면활성제 생산을 조사하기 위하여 최적 배지에 1.0 N HCl과 1.0 N NaOH를 각각 첨가하여 pH 4.0-10.0까지 각각 pH 1.0 간격으로 조정하였다. 종 배양한 배양액을 다양한 pH 범위의 배지에 각각 1.0% (v/v) 접종하여 생물계면활성제 생산을 위한 최적 온도에서 진탕 배양하면서 12시간 간격으로 균주의 성장과 배양액의 pH, crude 생물계면활성제의 표면장력을 측정하였다.

**NaCl 농도의 영향 조사.** 다양한 NaCl 농도에 따른 생물계면활성도제 생산을 조사하기 위하여 최적 배지에 NaCl의 농도가 각각 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10% (w/v)가 되도록 첨가하였다. 종 배양한 배양액을 다양한 NaCl 농도의 배지에 각각 1.0% (v/v) 접종하여 생물계면활성제 생산을 위한 최적 온도와 pH에서 진탕 배양하면서 12시간 간격으로 균주의 성장과 배양액의 pH, crude 생물계면활성제의 표면장력을 측정하였다.

## 결과 및 고찰

***B. subtilis* JK-1의 생물계면활성제 생산에 미치는 온도의 영향.** 미생물의 유류 분해 활성은 적정 온도 이하나 이상의 온도에서는 감소하기 때문에 생분해 효율이 온도 변화에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다[Dibble과 Bartha, 1979]. *B. subtilis* JK-1은 비교적 넓은 범위의 온도(15-50°C)에서 성장하였으며, 그 중 35°C에서 가장 잘 성장하였다. 그리고 30, 40, 45°C에서는 유사한 성장 패턴을 나타내었으며, 15, 20, 50°C에서는 상대적으로 낮은 생육도를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 각 온도에 따른 배양액의 pH 변화를 조사한 결과, 30, 35, 40,

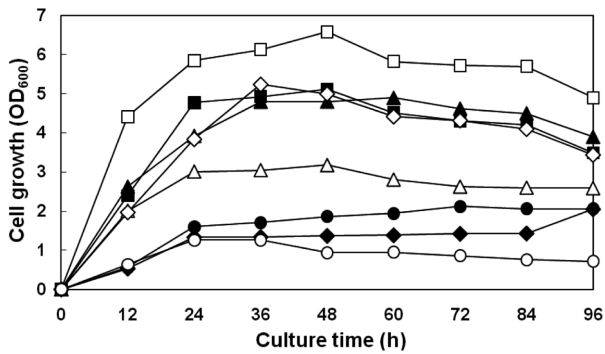


Fig. 1. Effect of culture temperature on cell growth by *B. subtilis* JK-1. Cultivation was carried out on the optimal medium [1.0% (w/v) of soluble starch, 0.5% (w/v) of skim milk and 0.1% (w/v) of KNO<sub>3</sub>, pH 7.0] for 96 h, 200 rpm at various temperatures. Symbols: ○, 15°C; ●, 20°C; △, 25°C; ▲, 30°C; □, 35°C; ■, 40°C; ◇, 45°C; ◆, 50°C

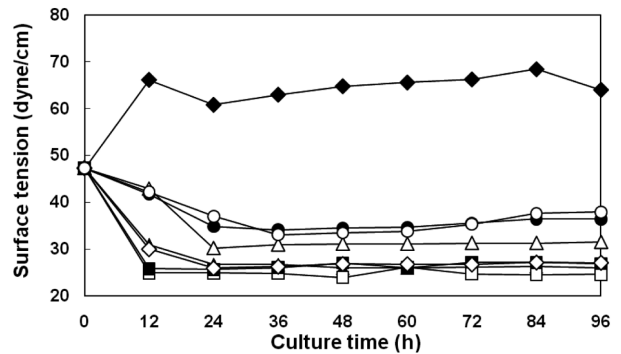


Fig. 3. Effect of culture temperature on surface tension of the crude biosurfactant produced by *B. subtilis* JK-1. The cultivation was the same as Fig. 1. Symbols: ○, 15°C; ●, 20°C; △, 25°C; ▲, 30°C; □, 35°C; ■, 40°C; ◇, 45°C; ◆, 50°C

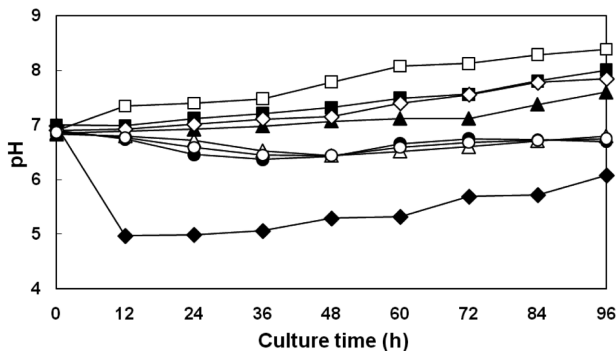


Fig. 2. Effect of culture temperature on final pH of the culture broth by *B. subtilis* JK-1. The cultivation was the same as Fig. 1. Symbols: ○, 15°C; ●, 20°C; △, 25°C; ▲, 30°C; □, 35°C; ■, 40°C; ◇, 45°C; ◆, 50°C

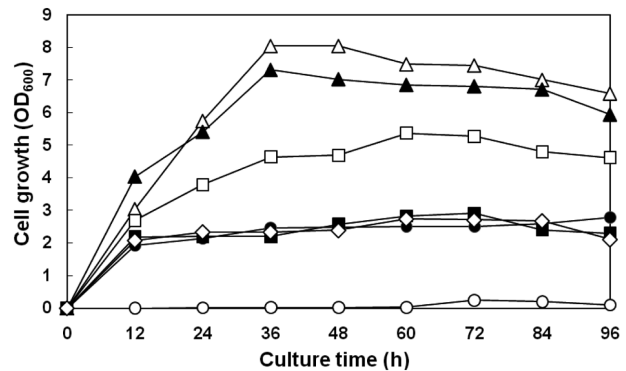


Fig. 4. Effect of initial pH of medium on cell growth by *B. subtilis* JK-1. Cultivation was carried out on the optimal medium with various pH for 96 h, 200 rpm at 35°C. Symbols: ○, pH 4; ●, pH 5; △, pH 6; ▲, pH 7; □, pH 8; ■, pH 9; ◇, pH 10

45°C에서의 pH는 접종 후 96시간 이내에 중성에서 약알칼리(pH 7.60-8.39)로 점차 상승하였다. 한편, 15, 20, 25°C에서는 큰 pH 변화 없이 중성을 유지하였다. 이외는 달리 50°C에서는 접종 후 12시간 만에 pH 4.97로 급격히 낮아졌으며, 이후 배양이 진행되면서 pH가 상승하여 96시간에 pH 6.08을 나타내었다(Fig. 2). 배양 온도에 따른 표면장력을 시간대별로 조사한 결과, 균주 생장이 좋은 30, 35, 40, 45°C에서 표면장력 활성은 높게 나타났다. 특히, 35°C에서의 표면장력은 배양 48시간에 24.0 mN/m로 측정되어 가장 우수한 표면활성을 나타내었다. 또한, 15와 20, 25°C에서의 최저 표면장력 값은 33.0 mN/m (36 h)와 34.1 mN/m (36 h), 30.2 mN/m (24 h)로 각각 측정되었다. 반면에 50°C에서는 표면장력 값이 상승하여 생물계면활성제 생산에 적합하지 않은 온도로 확인되었다(Fig. 3).

*Pseudomonas* sp. G314는 30°C에서 가장 잘 성장하였고, 온도에 따른 표면장력 활성은 15-30°C에서 가장 우수하였다[Shim과 Park, 2006]. 그리고 Kim 등[2005]에 의하면 *Bacillus* sp. BJS-51의 생물계면활성제 생산을 위한 최적 온도는 30°C이었다. 일반적으로 유류가 유출된 지역에 미생물을 사용하여 오염 물질을 정화하기 위해서는 활용 지역의 온도에서 활성을 유지해야 할 필요성이 있다. 우리나라 해양의 수온은 1-28°C이며, 해양세균들은 일반적으로 생육온도가 20°C 전후이다. 따라서 본

실험에 사용된 *B. subtilis* JK-1은 해양의 유류오염 정화에 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

**B. subtilis JK-1의 생물계면활성제 생산에 미치는 pH의 영향.** 현장에 적용되는 미생물은 다양한 pH 환경을 접하게 된다. *B. subtilis* JK-1은 산성에서 알칼리성의 pH (5-10) 배지에서 성장하였다. pH 6-8의 배지에서 생육도가 높게 나타났으며, 그 중에서도 pH 6.0에서 가장 높았다. 반면에 초기 pH 4의 배지에서는 거의 성장하지 못하였다(Fig. 4). 배지의 초기 pH에 따른 배양액의 pH를 측정된 결과, 배양 96시간 동안 pH 6-8의 배지에서는 중성 혹은 약알칼리의 pH로 변화하였다. pH 4와 5의 배지에서는 배양 시간이 경과하여도 pH 변화 없이 초기 pH와 동일하게 산성을 유지하였다. 그 외 초기 pH가 9와 10인 배지에서는 균주 접종 후 12시간 만에 pH 6.5로 감소하였고, 배양시간이 경과하면서 pH 7.6으로 점차 상승하였다(Fig. 5). 배지의 초기 pH에 따른 표면장력을 측정된 결과, *B. subtilis* JK-1은 pH 6부터 10까지 넓은 pH 범위에서 높은 표면장력 활성을 나타내었다. 특히, pH 7.0에서는 배양 48시간에 24.0 mN/m로 가장 우수한 표면장력 활성을 확인할 수 있었다. 이외는 달리, pH 4와 5에서 배양한 경우 배양 시간이 경과할수록 표면장력 값이 상승하여 산성 조건은 생물계면활성제 생산에 적합하지 못하다고 사료된다(Fig. 6).

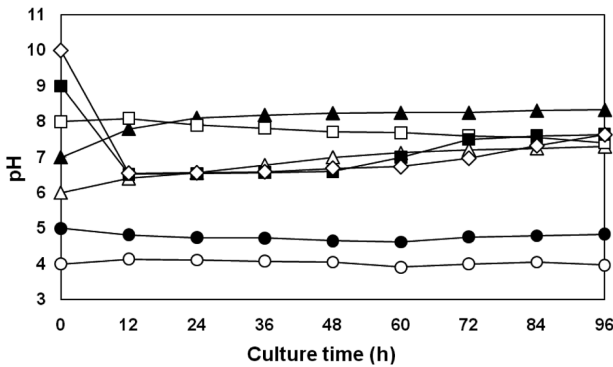


Fig. 5. Effect of initial pH of medium on final pH of the culture broth by *B. subtilis* JK-1. The cultivation was the same as Fig. 4. Symbols: ○, pH 4; ●, pH 5; △, pH 6; ▲, pH 7; □, pH 8; ■, pH 9; ◇, pH 10

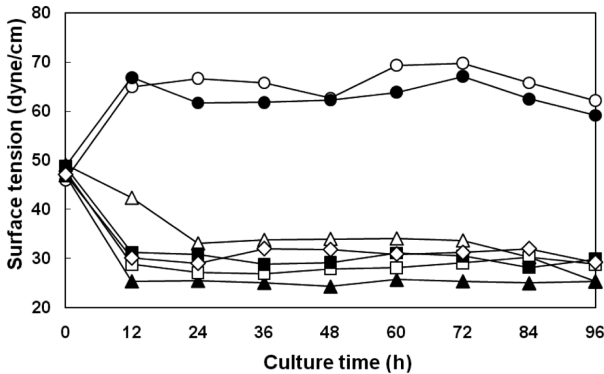


Fig. 6. Effect of initial pH of medium on surface tension of the crude biosurfactant produced by *B. subtilis* JK-1. The cultivation was the same as Fig. 4. Symbols: ○, pH 4; ●, pH 5; △, pH 6; ▲, pH 7; □, pH 8; ■, pH 9; ◇, pH 10

한편, *Bacillus* sp. BJS-51의 생물계면활성제 생산을 위한 최적 pH는 7.2이었다[Kim 등, 2005]. 그리고 Haddad 등[2009]은 *B. subtilis* HOB2의 생물계면활성제 생산을 위한 pH는 5.0-11.0이라고 보고하였다. Shim과 Park[2006]은 *Pseudomonas* sp. G314의 성장과 생물계면활성제 생산은 초기 배지의 pH가 5.0-9.0일 때 가장 효과적이라고 보고하였다. 일반적인 해수의 pH는 약알칼리성이며, 미생물이 생산하는 생물계면활성제에 의해서 해수의 pH는 거의 영향을 받지 않아야 하는 것[Walker와 Colwell, 1975]을 감안하면, *B. subtilis* JK-1은 해수의 유류 오염 정화에 활용 가능성이 높다고 판단된다.

***B. subtilis* JK-1의 생물계면활성제 생산에 미치는 NaCl 농도의 영향.** *B. subtilis* JK-1은 모든 NaCl 농도(0-10%, w/v)에서 성장하였다. 본 균주는 청국장에서 분리한 미생물임에도 불구하고 0-3% (w/v) NaCl 농도에서 배양하였을 때 가장 잘 성장하여, 배양 48시간에 최고의 생육도를 나타내었다(OD<sub>600</sub>=6.1-6.6). 배지 내 NaCl 농도가 높아질수록 균주 생장이 둔화되어 10% (w/v) NaCl에서는 최저로 확인되었다(Fig. 7). 배지에 첨가된 NaCl 농도에 따른 배양액의 pH 변화를 측정된 결과, NaCl 농도가 증가할수록 최종 배양액의 pH가 약알칼리(pH 8.29)에서 산성으로(pH 5.70) 낮아지는 것을 확인하였다(Fig. 8).

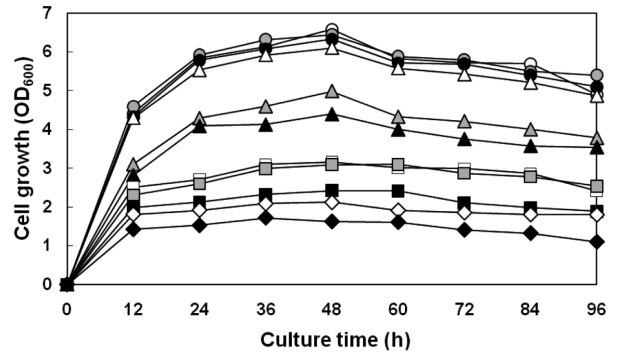


Fig. 7. Effect of NaCl concentration on cell growth by *B. subtilis* JK-1. Cultivation was carried out on the optimal medium (pH 7.0) with various NaCl concentrations for 96 h, 200 rpm at 35°C. Symbols: ○, 0%; ●, 1%; ●, 2%; △, 3%; ▲, 4%; ▲, 5%; □, 6%; ■, 7%; ■, 8%; ◇, 9%; ◆, 10%

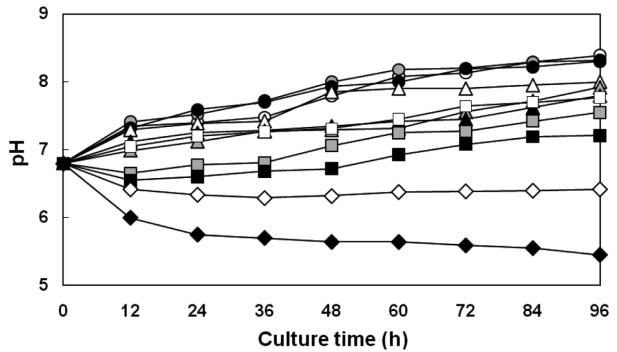


Fig. 8. Effect of NaCl concentration on final pH of the culture broth by *B. subtilis* JK-1. The cultivation was the same as Fig. 7. Symbols: ○, 0%; ●, 1%; ●, 2%; △, 3%; ▲, 4%; ▲, 5%; □, 6%; ■, 7%; ■, 8%; ◇, 9%; ◆, 10%

배지에 첨가된 NaCl 농도에 따른 균주의 성장과 생물계면활성제 생산은 일치함을 확인하였다. 또한 NaCl 농도는 *B. subtilis* JK-1의 생물계면활성제 생산에 영향을 미치는 것으로 조사되었다. NaCl을 첨가하지 않은 배양액의 표면장력 값은 배양 48시간에 24.0 mN/m였다. 그리고 1-3% (w/v)의 NaCl 농도에서는 최대 감소 표면장력 값 25.1-25.9 mN/m을 유지하였고, 4-5% (w/v) NaCl 농도에서는 27.3-28.7 mN/m을 나타내었다(Fig. 9). 이는 해수의 염 농도인 35‰ (31-35 g/L) 보다 높은 농도에서 균주의 성장과 표면장력 활성을 나타내는 것으로, *B. subtilis* JK-1은 해수에 적용 가능하다고 사료되었다. Haddad 등[2009]에 의하면 *B. subtilis* HOB2의 생물계면활성제는 25% (w/v) NaCl 농도에서도 안정하였다. *Pseudomonas* sp. G314는 1-3% (w/v)의 NaCl 농도에서 25.8-27.5 mN/m의 표면장력 값을 보였다[Shim과 Park, 2006].

계면활성제가 표면에 흡착되면 표면장력의 강하가 일어난다. 따라서 계면활성제의 성능에 대해서 이야기할 때에는 반드시 표면장력 강하를 언급해야 한다. 일반적으로 계면활성제로 성능이 좋다고 말하려면 표면장력은 30 mN/m 정도로 낮출 수 있어야 하며[Lang, 2002], 화학적 계면활성제는 표면장력이 25-50 mN/m의 값을 가진다[Mulligan, 2005]. *Bacillus* sp. BJS-51

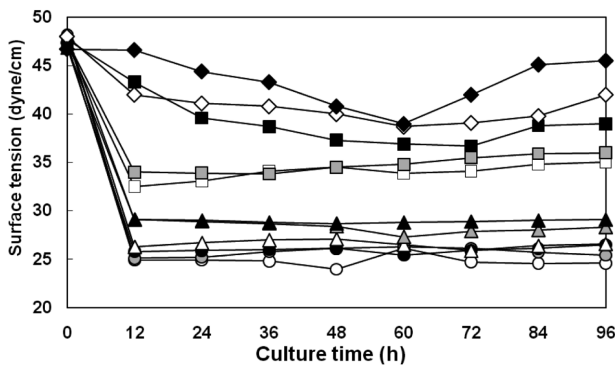


Fig. 9. Effect of NaCl concentration on surface tension of the crude biosurfactant produced by *B. subtilis* JK-1. The cultivation was the same as Fig. 7. Symbols: ○, 0%; ●, 1%; ●, 2%; ▲, 3%; ▲, 4%; ▲, 5%; □, 6%; ■, 7%; ■, 8%; ◇, 9%; ◆, 10%

의 최저 표면장력 값은 96시간 배양 시 29 mN/m로 확인되었다 [Kim 등, 2005]. 표면장력이 낮은 것이 생물계면활성제의 활성이 우수한 것임에 착안할 때, 24.0 mN/m까지 감소한 *B. subtilis* JK-1은 생물계면활성제 생산 균주로서 적용 가능하다고 판단된다. 또한, *B. subtilis* JK-1의 표면장력 값은 배양 12시간 이후 대수증식기부터 급격히 감소하여 정지기와 사멸기에서도 낮은 표면장력 값을 계속 유지하였다. 이것은 *B. subtilis* JK-1은 성장과 생물계면활성제의 생산에 있어서 비교적 짧은 유도기를 갖고 있어 효율적인 것으로 사료된다. 한편, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3의 생물계면활성제의 양은 성장 증가와 함께 빠른 속도로 증가하다가 정지기에 접어들면서 생산이 줄어들었으며, 배양액의 pH는 접종 후 96시간 이내에 6.5에서 5.3으로 점차 감소하였다 [Cho와 Oh, 2010]. 생물접종법을 이용할 경우 적용되는 미생물과 주위 환경에 의해 오염된 현장의 pH는 변화하게 되며, 특히 자연계에서는 이러한 환경 변화가 생태계에 매우 큰 영향을 미치는 것으로 알려졌다. 본 연구에서는 환경 조건에 따라서 *B. subtilis* JK-1 배양액의 pH는 상이한 변화 양상을 나타내었으며, 생물계면활성제 생산이 원활한 환경에서는 중성 혹은 약알칼리의 pH로 변화하였다. 이는 *B. subtilis* JK-1이 성장 환경에 따라 대사 물질의 영향을 받기 때문이라고 사료된다. 따라서 본 실험에 사용된 *B. subtilis* JK-1은 표면장력 활성이 지금까지 보고된 생물계면활성제에 비해 매우 우수하고, 광범위한 온도와 pH, NaCl 농도에서 생육과 생물계면활성제 생산성이 뛰어나 오염된 자연환경이나 해수에 적용시켜 환경정화에 사용하기에 우수한 균주임을 확인하였다. 이번 연구는 *B. subtilis* JK-1 생물계면활성제 생산을 위한 배양 조건에 대한 기초 데이터로서, 향후 오염된 환경에 적용하기 위해서 본 생물계면활성제의 정제 및 구조 분석, 대량 생산 등 추가적인 연구가 계속 진행되어야 할 것으로 생각되며, 현재 해수를 이용한 원유 분해 연구가 진행 중이다.

초 록

본 연구에서는 *Bacillus subtilis* JK-1의 생물계면활성제 생산을 위한 배양 특성을 조사하기 위하여 다양한 배양 온도와 배

지의 pH, NaCl 농도에 따른 균주의 성장과 배양액의 pH, crude 생물계면활성제의 표면장력을 배양 시간대별로 측정하였다. *B. subtilis* JK-1은 15-45°C와 pH 6-10, 0-10% (w/v) NaCl 농도의 환경에서 성장과 생물계면활성제 생산이 가능하였으며, 배양액의 pH는 중성 또는 약알칼리성으로 점차 변화하였다. 생물계면활성제 생산은 pH 7.0의 초기 배지에서 35°C, 48시간 동안 배양했을 때 최대였으며, 이 때의 표면장력은 24.0 mN/m이었다. 그리고 배지 내 NaCl 농도가 0% (w/v)에서 10% (w/v)로 증가할수록 균주 생육도는 감소하였고, 최종 배양액의 pH는 약알칼리성에서 산성으로 변화하였으며, 표면장력 값은 증가하였다.

**Key words:** *Bacillus subtilis* JK-1, biosurfactant, culture conditions, optimization, production, surface tension

감사의 글

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

참고문헌

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.

Balba MT, Al-awadhi N, and Al-Daher R (1998) Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J Microbiol Methods* **32**, 155-164.

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 Singh P (2008) Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *Int Biodeterio Biodegrad* **62**, 274-280.

Cha JY, Chung SY, Cho YS, Choi YL, Kim BK, and Lee YC (1999) Characterization of crude oil degradation by *Klebsiella* sp. KCL-1 isolated from seawater. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* **27**, 452-457.

Cho SH and Oh KH (2010) Characterization of the biosurfactant-producing bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 isolated from the crude-oil contaminated areas. *Korean J Microbiol* **46**, 346-351.

da Cunha CD, Rosado AS, Sebastian GV, Seldin L, and von der Weid I (2006) Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 949-959.

Deziel E, Paquette, G, Villemur R, Lepine F, and Bisailon FG (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1908-1912.

Dibble JT and Bartha R (1979) Effect of environmental parameters on

- the biodegradation of oil sludge. *Appl Environ Microbiol* **37**, 729-739.
- Haddad NIA, Wang J, and Mu B (2009) Identification of a biosurfactant producing strain: *Bacillus subtilis* HOB2. *Protein Pept Lett* **16**, 7-13.
- Joo MH and Kim JY (2011) Optimization of medium components for the production of crude biosurfactant by *Bacillus subtilis* JK-1. *J Appl Biol Chem* **54**, 7-14.
- 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.
- Kim DH, Chang SK, and Park SW (2000) Surfactants. *Anal Sci Technol* **13**, 27-48.
- Kim JS, Song HS, Chung NH, and Bang WG (2005) Optimization of production conditions of biosurfactant from *Bacillus* sp. and its purification. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **48**, 109-114.
- Lang S (2002) Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr Opin Colloid Inter Sci* **7**, 12-20.
- McKew BA, Coulon F, Yakimov MM, Denaro R, Genocese M, Smith CJ, Osborn AM, Timmis KN, and McGenity TJ (2007) Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ Microbiol* **9**, 1562-1571.
- Mukherjee S, Das P, and Sen R (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* **24**, 509-515.
- Mulligan CN (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut* **133**, 183-198.
- Pagilla KR, Sood A, and Kim H (2002) *Gordonia (Nocardia) amarae* foaming due to biosurfactant production. *Water Sci Technol* **46**, 519-524.
- Sahoo S, Datta S, Biswas D, and Banik Choudhury R (2010) Biosurfactant production from *n*-paraffins by an air isolate *Pseudomonas aeruginosa* OCD1. *J Oleo Sci* **59**, 601-605.
- Shim SH and Park KR (2006) Characteristics of biosurfactant producing *Pseudomonas* sp. G314. *Korean J Microbiol* **42**, 286-293.
- Thavasi R, Jayalakshmi S, Balasubramanian T, and Banat IM (2007) Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. *Lett Appl Microbiol* **45**, 686-691.
- Walker JD and Colwell RR (1975) Some effects of petroleum on estuarine and marine microorganisms. *Can J Microbiol* **21**, 305-313.