

유류오염방제를 위한 *Pseudomonas* sp. SW1로부터 생물계면활성제의 생산

손흥주¹ · 석완수 · 이 건¹ · 이상준*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹환경문제연구소

본 연구에서는 유류로 오염된 환경을 생물학적으로 정화하는 방법의 확립을 위하여 생물계면활성제를 생산하는 세균을 유류오염지역으로부터 분리한 후, 생물계면활성제의 생산에 미치는 각종 환경요인과 분리세균의 hydrocarbon 이용능 등을 조사하였다. 유류로 오염된 해수 및 토양시료로부터 crude oil을 기질로 하여 생물계면활성제를 생산하는 172개의 균주를 순수분리하였다. 이들중에서 표면장력 감소능이 가장 우수한 SW1을 공시균주로 선정한 후, 형태학적, 배양적 및 생화학적 제반 특성을 조사하여 그 분류학적 위치를 검토한 결과 *Pseudomonas* 속으로 판명되어, 편의상 *Pseudomonas* sp. SW1로 명명하였다. 각종 탄소원을 이용하여 유화활성 및 표면장력 감소능을 조사한 결과, crude oil과 *n*-hexadecane에서 비슷한 유화활성 및 표면장력 감소능을 나타내었다. 생물계면활성제 생산을 위한 배지 및 배양조건은 *n*-hexadecane 2.0%, yeast extract 0.04%, K₂HPO₄ 0.02%, KH₂PO₄ 0.03%, MgSO₄ · 7H₂O 0.04%, 30°C 및 pH 7.0이었다. 상기실험에서 결정된 조건하에서 공시균을 배양한 결과, 배양 2일 후인 정지기 초기에 생물계면활성제가 가장 많이 생산되었으며, 이때 minimum surface tension은 32 mN/m이었다. 또한 본 공시균은 Bunker oils, *n*-alkanes, branched alkanes 등을 기질로 하여 생육할 수 있었다.

KEY WORDS □ Bioremediation, biosurfactant, crude oil, hexadecane, *Pseudomonas* sp. SW1

계면활성제(surfactant)는 동일 분자내에 친수성 부분과 친유성 부분을 동시에 가지고 있는 양친매성 물질로서, oil/water 또는 air/water 등의 계면에 흡착되어 표면장력이나 계면장력을 낮추어 주는 물질이다. 이러한 특성으로 인하여 계면활성제는 우수한 detergency, emulsifying activity, foaming activity, dispersing activity를 나타내어 의약품, 화장품, 농약, 세제 등의 산업에 널리 사용되고 있으며, 특히 유류저장탱크의 정화, 유류의 회수와 같은 환경산업에 그 응용성이 점차 확대되고 있다(10). 현재까지 상품화되어 있는 대부분의 계면활성제는 석유화학합물로부터 제조된 것으로, 그 자체가 난분해성 혹은 독성을 가지며, 생물학적 분해가 가능한 물질이라도 분해중간산물이 원물질보다 더 큰 독성을 나타내고, 폐수처리과정에서 제거가 되지않는 실정인어서 수계에 유출될 경우 심각한 환경오염을 야기하고 있다. 따라서 최근 생물계면활성제(biosurfactant)에 대한 관심이 고조되고 있는데, 특히 미생물유래 계면활성제는 환경친화성 물질로서 발효를 통한 대량생산이 가능하고, 공중보건 향상효과도 있으며 식품가공공정 등 다양한 산업에 이용가능하다(2, 3, 7).

이러한 생물계면활성제는 많은 미생물에 의하여 합성되며, 구조적으로 다양한 그룹을 포함한다. 이들은 특히 불포화탄화수소의 혼합용액에서 표면장력과 계면장력을 감소시키는 성질이 우수하기 때문에 유류오염지역으로부터 유류의 회수와 deemulsification process를 향상시킬 수 있는 잠재적인 가능성을 가지고 있다(4, 18). 또한 화학적으로 합성된 계

면활성제에 비하여 생분해성, 환경적합성, 극한조건에서의 안정성, 재생기질로부터의 생합성 및 낮은 독성 등과 같은 많은 장점을 가지고 있다(5, 8, 12). 따라서 오염된 환경에 잘 적응된 미생물군집으로부터 생물계면활성제를 생산하는 미생물을 분리하여 생물계면활성제를 대량생산함으로써 합성계면활성제를 대체할 필요가 있다.

현재까지 미생물로부터 생산되는 생물계면활성제로는 rhamnolipid, trehalolipid, sophorolipid와 같은 당지질, surfactin과 같은 lipopeptide, emulsan과 같은 polymeric biosurfactant 등이 알려져 있다(5). 그중 특히 crude oil을 분해하는 미생물로부터 연구된 생물계면활성제로서는 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1(이전에는 *Arthrobacter* sp. RAG-1)이 생산하는 emulsan이 보고되었는데, 아직 그 화학구조도 정확하게 밝혀지지 않은 상태이다(16). 이처럼 생물계면활성제는 그 중요성에 비하여 연구나 개발된 제품이 거의 없는 실정이다. 따라서 유류에 대한 환경오염 방제뿐만 아니라 식품, 직물, 피혁, 제지 및 화장품공업 등에 사용될 수 있는 생물계면활성제의 개발은 대단히 중요한 의의를 지닌다.

본 연구는 crude oil을 분해하는 미생물로부터 유화능과 표면장력 감소능이 우수한 균주를 분리하여 그들이 생산하는 생물계면활성제를 동정한 후, 물리화학적 특성을 규명함으로써 유류오염 정화에 응용가능성이 높은 새로운 생물계면활성제의 개발을 시도하고자 계획되었다. 먼저 생물계면활성제를 생산하기 위한 선행연구로서 만성적 유류오염지역에서 crude oil에 대한 분해능을 가지는 미생물을 분리한 후, 석유탄화수소의 구조적 특성에 따른 각 crude oil 성분

*To whom correspondence should be addressed

함으로써 유용가치가 높은 생물계면활성제 생산 미생물자원을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

생물계면활성제 생산균주의 검색

Crude oil을 유화시키면서 분해하는 균주중에 생물계면활성제를 생산하는 균주를 분리하기 위하여 주유소 일대와 부산의 항만수역 등 만성적인 유류오염지역의 토양 및 해수를 임의로 200여 곳을 선정하여 시료를 채취하였다. 이때 사용한 분리용 배지는 NaCl 200 mM, MgSO₄ · 7H₂O 50 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ · 2H₂O 10 mM의 조성을 갖는 인공해수에 Tris-HCl 100 mM, NH₄Cl 19 mM, K₂HPO₄ 0.33 mM, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 mM이 함유된 인공해수 무기염배지(19)와 K₂HPO₄ 2.0 mM, NH₄Cl 18.7 mM, KNO₃ 19.8 mM, CaCl₂ 2H₂O 6.8 × 10⁻³ mM, MgSO₄ · 7H₂O 6.8 mM, FeSO₄ 6.6 × 10⁻⁴ mM의 조성을 갖는 토양분리용배지(pH 7.0)였으며, 탄소원 및 에너지원으로 0.2~2.0%의 쿠웨이트산 crude oil[황함량 0.06%(w/w)]을 첨가하여 사용하였다. 각 시료 일정량을 분리용 액체배지에 넣고 30°C, 180 rpm에서 일주일간 회전진탕배양한 후, 유화활성과 표면장력 감소능을 나타내는 것만을 선별하여 crude oil이 첨가된 고체배지에 도말했다. 이때 일정량의 접종물을 고체배지에 도말하여 30분간 방치하였으며, 멸균된 여과지를 원유에 적시고 이것을 고체배지상에 1시간 정도 올려둠으로서 원유가 고체배지상에 비교적 골고루 퍼지도록한 후 제거하였으며, 한천은 Bacto-agar (Difco)를 사용하였다. 형성된 단일 colony를 다시 crude oil이 첨가된 액체배지에 접종하여 유화활성과 표면장력 감소능이 있는지를 확인함으로써 균주를 최종선정하였다.

분리균의 분류 및 동정

분리균의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양적 및 생화학적 제반 특성을 Manual of methods for general bacteriology(9) 및 Biochemical tests for identification of medical bacteria(14)에 준하여 검토하였으며, 이에 따른 분류와 동정은 Bergey's manual of systematic bacteriology(13)에 준하여 실시하였다. 동시에 API 20E, API 20NE 등 동정용 kit를 병행사용하였다.

생물계면활성제 생산조건 검토

생물계면활성제의 생산조건을 알아보기 위하여 250 ml Erlenmeyer flask에 배지 50 ml를 넣고, 전배양액 2.0%를 접종하여 200 rpm으로 4일간 회전진탕배양한 후에 균체생육, 유화도, dilution factor(Fcmc), minimum surface tension 등을 측정하였다. 이때 조사한 환경조건은 배양온도, 초기 pH, 탄소원, 질소원, 각종 무기염의 농도였다. 또한 배양시 통기량이 생물계면활성제의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 500 ml Erlenmeyer flask에 상기실험에서 결정된 배지를 각각 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 ml씩 넣어 30°C, 200 rpm에서 4일간 회전진탕배양하였다.

Hydrocarbon 이용능 조사

Crude oil의 구성성분인 각종 hydrocarbon 이용능을 조사하기 위해 생물계면활성제 생산배지에 탄소원 및 에너지원으로 crude oil 외에 다양한 hydrocarbon을 첨가하여 공시균의 hydrocarbon에서의 생육특성을 조사하였다. Oil류로는 Bunker-A, B, C oil에 대한 이용능을 조사하였고, *n*-alkane으로 pentane, hexane, octane, hexadecane 등을, branched alkane으로 isooctane, isopropyl alcohol, isopropyl ether를, cyclic alkane으로는 cyclopentane, cyclohexane을, aromatic hydrocarbon으로 benzene, toluene, phenol에 대한 이용능을 조사하였다. Oil류는 생물계면활성제 생산최적배지에 각각 1.0%씩 첨가하였으며, 그 외의 hydrocarbon은 먼저 균주를 최적배지에 접종한 후, 여과지에 각 기질을 적셔 페트리접시의 뚜껑에 올려 놓고 sealing하여 배양하였다.

분석방법

생육도 측정 : 분리균의 생육도는 배양액에 클로로포름을 첨가하여 잔존기질을 추출제거한 후, 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었다.

표면장력 측정 : 생물계면활성제의 활성을 조사하기 위하여 표면장력을 측정하였다. 기질을 첨가하여 강하게 교반시키고 1시간동안 정지한 후, Tensiometer(Fisher Scientific, Surface Tensiomat[®]21)를 이용하여 ring method로 측정하였다(20).

유화활성 측정 : 유화활성은 Zuckerberg 등의 방법(21)을 약간 변형하여 사용하였다. 0.5 M NaCl이 첨가된 20 mM Tris-HCl(pH 7.8) 2.5 ml에 배양액을 원심분리(5,000 × g, 10 min, 4°C)하여 얻은 상층액 0.5 ml를 가한 후, 기질로서 2.0%의 crude oil이나 hexadecane을 첨가하여 강하게 교반하였다. 이것을 30°C로 유지한 water bath에서 180 rpm으로 1시간동안 진탕시키고 다시 10분 동안 정지시킨 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

생물계면활성제의 농도측정 : 생물계면활성제의 상대적인 농도는 dilution factor(Fcmc)로 나타내었다(17). 즉 배양액 10 ml에 증류수를 각각 1 ml씩 단계적으로 첨가하여 희석하면서 표면장력이 증가하는 시점의 희석배수를 dilution factor(Fcmc)로 나타내었다. 이 방법은 생물계면활성제가 critical micelle concentration(CMC) 이하의 농도에서 표면활성을 상실함으로써 표면장력이 증가된다는 것에 기초한다. 따라서 dilution factor의 증가는 생물계면활성제 농도의 증가를 나타낸다.

결과 및 고찰

생물계면활성제 생산균주의 분리 및 동정

각 시료를 분리용배지에 접종하여 30°C에서 180 rpm으로 회전진탕배양한 결과, 유화활성을 가진 172개의 균주를 순수분리하였다. 해수에서 분리한 균주들의 경우 유화활성은 대체로 높았으나, 표면장력은 72~48 mN/m 정도로 표면장력의 감소가 그다지 높은 편이 아니었다. 토양으로부터 분리된 균주중 SW1 균주는 배양 5일후 표면장력이 40 mN/m로, SW2 균주는 44 mN/m로 현저히 감소하였고, 유화활성도 타 균주에 비해서 월등히 높았다. 특히 SW1은 생물계면

Table 1. Effect of cultivation temperature on the production of biosurfactant

| Temperature (°C) | Cell growth (OD at 660 nm) | Emulsifying activity (OD at 550 nm) | Dilution factor (Fcmc) | Minimum surface tension (mN/m) |
|------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 15 | 0.468 | 0.507 | 2.0 | 39 |
| 20 | 0.905 | 0.923 | 3.2 | 38 |
| 25 | 0.953 | 1.010 | 3.2 | 38 |
| 30 | 1.163 | 1.198 | 3.8 | 38 |
| 35 | 0.589 | 0.597 | 3.0 | 38 |
| 40 | 0.132 | 0.210 | 2.4 | 42 |

활성제가 정제되지 않은 상태에서도 표면장력의 감소능이 상당히 높았으므로 SW1을 공시균으로 선정하였다.

공시균 SW1은 운동성이 없는 그람음성균으로 포자를 형성하지 않았다. 또한 oxidase test, β -galactosidase, indole production 등에 음성반응을, catalase test, arginine dehydrolase test, citrate utilization 등에 양성반응을 나타내었으며, O/F test에서 oxidation을 보여주었다. 이와같은 형태학적, 배양적, 생화학적인 여러가지 특성들을 종합하여 Bergey's manual of systematic bacteriology와 비교한 결과, 본 공시균은 *Pseudomonas* 속으로 동정되어 편의상 *Pseudomonas* sp. SW1으로 명명하여 실험에 사용하였다.

생물계면활성제 생산조건

배양온도 및 초기 pH의 영향: 배양온도에 따른 생물계면활성제의 생산조건을 검토한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 균체생육, 유화활성, 생물계면활성제 생산량 모두 30°C에서 가장 높았으며, 15°C 및 40°C에서는 유화활성, 생물계면활성제 생산량 모두 미약하였다. 특히 40°C에서 균체는 거의 생육하지 못하였다. 배양온도는 생물계면활성제의 조성은 변화시키나 표면장력이나 유화능에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 보고되었다(1). 본 균주의 경우, 15°C 이하와 35°C 이상에서 유화능의 감소는 뚜렷하였으나 표면장력의 감소능은 거의 차이가 나지 않아 다소 상이한 결과를 나타내었다.

초기 pH에 따른 생물계면활성제의 생산조건을 검토한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. pH 7.0~8.0의 영역에서 균체생육, 유화활성, 생물계면활성제 생산량이 높았으며, 특히 pH 7.0에서 가장 많은 생물계면활성제가 생산되었다. 그러나 산성과 알칼리성 영역에서는 거의 생물계면활성제를

생산하지 못하였을뿐 아니라 균체생육도 미약하였다. *Pseudomonas* spp는 pH 7.0 이상에서 rhamnolipid를 생산하지 않으나 *Nocardia corynbacteroides*는 pH 8.0에서도 생물계면활성제를 생산한다고 알려져 있어(5), 본 균주는 *N. corynbacteroides*와 비슷한 양상을 보여주었다.

탄소원의 영향: Crude oil 외의 각종 다른 탄소원으로부터 생물계면활성제의 생산을 검토한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. Glucose, fructose 등의 수용성 당류의 경우 유화능은 높았으나 표면장력 감소능은 매우 저조하였으며, alkane과 방향족 화합물의 경우 대체로 유화능, 표면장력 감소능 및 생물계면활성제의 생산량이 모두 저조하였다. 그러나 *n*-tetradecane, *n*-hexadecane 등의 C₁₂ 이상의 alkanes에서는 유화능, 표면장력 감소능 및 생물계면활성제 생산량이 모두 높았다. 그리고 soybean oil, corn oil 등의 식이성 유지의 경우, 대체로 유화능과 표면장력 감소능이 양호하였다. 또한 crude oil을 포함한 Bunker oils 역시 유화활성과 표면

Table 3. Effect of various carbon sources on the production of biosurfactant

| Carbon source (0.2%) | Cell growth (OD at 660 nm) | Emulsifying activity (OD at 540 nm) | Dilution factor (Fcmc) | Minimum surface tension (mN/m) |
|-----------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| Glucose | 1.255 | 1.546 | 2.0 | 68 |
| Fructose | 0.964 | 1.264 | 1.5 | 70 |
| Sucrose | 0.783 | 1.086 | 2.0 | 69 |
| <i>n</i> -Pentane | 0.213 | 0.546 | 1.0 | 68 |
| <i>n</i> -Hexane | 0.423 | 0.643 | 1.0 | 71 |
| <i>n</i> -Isooctane | 0.224 | 0.554 | 1.09 | 70 |
| <i>n</i> -Octane | 0.287 | 0.598 | 1.0 | 62 |
| <i>n</i> -Nonane | 0.154 | 0.123 | 1.0 | 60 |
| <i>n</i> -Decane | 0.235 | 0.245 | 1.1 | 54 |
| <i>n</i> -Undecane | 0.758 | 0.972 | 1.4 | 58 |
| <i>n</i> -Dodecane | 0.684 | 0.764 | 1.2 | 46 |
| <i>n</i> -Tetradecane | 1.032 | 1.115 | 3.2 | 44 |
| <i>n</i> -Hexadecane | 1.035 | 1.354 | 4.0 | 39 |
| <i>n</i> -Octadecane | 0.564 | 0.874 | 1.4 | 45 |
| Cyclohexane | 0.684 | 0.824 | 1.2 | 56 |
| Benzene | 0.210 | 0.211 | 1.1 | 54 |
| Ethylbenzene | 0.203 | 0.143 | 1.0 | 60 |
| Hexylbenzene | 0.198 | 0.201 | 1.0 | 68 |
| Toluene | 0.102 | 0.104 | 1.0 | 65 |
| Paraffin | 0.546 | 0.598 | 1.1 | 68 |
| Olive oil | 0.764 | 0.867 | 2.0 | 48 |
| Soybean oil | 0.845 | 1.125 | 2.0 | 45 |
| Corn oil | 0.984 | 1.235 | 2.0 | 46 |
| Peanut oil | 0.531 | 0.658 | 2.0 | 45 |
| Caster oil | 0.654 | 0.674 | 1.4 | 52 |
| Methanol | 0.213 | 0.213 | 1.0 | 50 |
| Ethanol | 0.254 | 0.246 | 1.0 | 65 |
| Stearic acid | 0.451 | 0.554 | 1.2 | 68 |
| Oleic acid | 0.542 | 0.334 | 2.0 | 60 |
| Crude oil | 1.561 | 1.798 | 2.4 | 38 |
| Bunker-A | 1.235 | 1.245 | 2.0 | 46 |
| Bunker-B | 1.124 | 1.132 | 1.4 | 48 |
| Bunker-C | 1.354 | 1.365 | 1.8 | 48 |

Table 2. Effect of initial pH on the production of biosurfactant

| Initial pH | Cell growth (OD at 660 nm) | Emulsifying activity (OD at 550 nm) | Dilution factor (Fcmc) | Minimum surface tension (mN/m) |
|------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 4.0 | 0.389 | 0.457 | 1.2 | 42 |
| 5.0 | 0.594 | 0.629 | 2.0 | 40 |
| 6.0 | 0.621 | 0.758 | 2.4 | 38 |
| 7.0 | 1.025 | 1.144 | 4.0 | 38 |
| 8.0 | 0.955 | 1.019 | 3.8 | 38 |
| 9.0 | 0.441 | 0.529 | 1.4 | 50 |

장력 감소능이 높았으나 생물계면활성제의 생산량은 hexadecane에 비하여 저조하였다. 따라서 본 실험에서는 유화능, 표면장력 감소능 및 생물계면활성제의 생산량이 모두 우수한 hexadecane을 탄소원으로 선정하였으며, 그 농도에 따른 생물계면활성제의 생산능을 검토한 결과 2.0%에서 균체생육, 유화활성, 생물계면활성제의 생산량 및 표면장력 감소능이 가장 높았다(미제시). 일반적으로는 alkane과 같은 불용성 기질이 생물계면활성제의 생산에 많이 이용되나 *Pseudomonas* spp.는 대부분 glycerol, glucose 등의 수용성 기질로부터 rhamnolipid를 생산하는 것으로 알려져 있다(5). 본 실험에서는 수용성 기질보다 alkane에서 생물계면활성제의 생산량이 높아 전자와 비슷한 결과를 보여주고 있다. 본 균주를 glucose, sucrose 등의 당류에서 배양했을 때 유화능과 표면장력 감소능이 서로 비례하지 않았다. 이것은 본 균주에서 생성되는 활성물질이 하나 이상으로서 각기 다른 유화능과 표면장력 감소능을 가지고 있기 때문인 것으로 추정된다. 즉 특정 탄소원에서는 생물계면활성제와 생물유화제가 동시에 생성되는 것으로 판단되나, 이에 대한 실험은 앞으로 계속되어야 할 것이다.

질소원의 영향: 생물계면활성제의 생산에 미치는 질소원의 영향을 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 무기질소원보다 유기질소원이 대부분 표면장력 감소효과가 컸으며, 특히 yeast extract의 경우 표면장력 감소능과 생물계면활성제의 생산량이 가장 높았다. 일반적으로 미생물에 의한 생물계면활성제의 생산에 주는 질소원의 종류는 다양하다. 즉 *Athrobacter paraffineus*는 ammonium salt와 urea(6)를 선호하나 *Pseudomonas* spp.와 *Rhodococcus* strain ST-5는 nitrate를 더 선호하는 것으로 알려져 있으며, *Nocardia* sp., *P. aeruginosa* 등은 질소원이 결핍된 조건에서 더 많은 생물계면활성제를 생산한다(5). 본 균주는 무기질소원보다 yeast extract, peptone, tryptone 등의 유기질소원에서 생물계면활성제의 생산량이 우수하여 상기의 보고와 다른 결과를 나타

내었다. 이것은 yeast extract를 구성하는 성분중에는 질소성분 뿐만 아니라, 본 균주의 생육에 필요한 기타 성분도 함유되어 있어 세포활성의 증가에 따라 생물계면활성제의 생산도 향상된 것으로 판단되므로 yeast extract를 구성하는 질소성분 외의 다른 성분에 대한 실험도 뒤따라야 할 것이다. 최적질소원으로 선정된 yeast extract의 농도에 따른 생물계면활성제의 생산능을 검토한 결과, 0.03~0.04%의 농도범위에서 균체생육, 표면장력 감소능, 생물계면활성제 생산량이 가장 우수하였으며, 특히 0.04%에서 유화활성 및 생산량이 가장 높았다(미제시). 또한 yeast extract의 농도가 0.04% 이상일 때 오히려 표면장력 감소능이 저하되었는데, 이 경우는 배지에 영양원이 풍부함으로 균체생육을 위하여 균이 유도성 물질인 생물계면활성제를 생산할 필요가 없기 때문인 것으로 추정된다(11). 그러나 탄소원인 hexadecane(2.0%)에 비하여 상대적으로 적은 양의 질소원(0.04%)에서 생물계면활성제의 생산량이 우수하였으므로 C/N ratio에 대한 연구도 실시되어야 할 것으로 사료된다.

인산염 및 Mg의 영향: 먼저 K_2HPO_4 의 농도가 생물계면활성제의 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, 0.01~0.04%에서 우수한 유화능과 생물계면활성제 생산능을 보여주었으며 특히, 0.02%에서 가장 많은 생산량을 나타내었다. K_2HPO_4 를 첨가하지 않은 경우, 거의 생물계면활성제가 생산되지 않았으며, 균체생육 역시 미약하였다(미제시). 이것으로 보아 공시균에 의한 생물계면활성제의 생산에는 K_2HPO_4 의 첨가가 필수적임을 알 수 있었다. K_2HPO_4 의 농도를 0.02%로 고정시킨 후, KH_2PO_4 의 농도를 다양하게 변화시켜 생물계면활성제의 생산능을 검토한 결과, 0.005~0.05%의 농도범위에서 대체로 우수한 유화능과 생물계면활성제 생산능을 보여주었다(미제시). $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 의 농도에 따른 생물계면활성제의 생산성을 검토한 결과, 0.03~0.05%의 범위에서 균체생육, 유화능 및 생물계면활성제의 생산능이 가장 우수하였다(미제시). $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 전혀 첨가하지 않았을 경우에는 생물계면활성제가 생산되지 않아, 본 공시균에 의해 생물계면활성제를 생산할 때에는 반드시 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 첨가해야 함을 알 수 있었다. 현재 각종 무기염의 10% 농도에서도 아무런 영향을 받지 않는 생물계면활성제가 보고되었다(1). 그러나 본 균주의 경우, 생물계면활성제의 생산에 최적인 무기염 농도가 각각 존재하였다. 이것은 각종 무기염이 세포활성에 영향을 미침으로서 결국은 생물계면활성제의 생산에 영향을 미친 것으로 추정된다.

통기량의 영향: 통기량이 균체생육과 생물계면활성제의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 500 ml 용량의 Erlenmeyer flask에 최적배지를 각 volume별로 첨가하여 배양한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. 즉, 생물계면활성제의 생산량은 통기량이 작을수록 감소하는 경향을 나타내었다. 배지의 양이 50 ml일 때 가장 우수한 유화능과 생물계면활성제 생산능을 보여주었으며, 그 이상의 배지가 첨가되었을 경우 점차적으로 생산량이 감소하였다. 따라서 본 균주는 호기적 조건하에서 생물계면활성제를 더욱 효과적으로 생산함을 알 수 있었다. *Nocardia erythropolis*의 경우, agitation speed나 통기량을 증가시킴으로써 생물계면활성제의 생산은 감소하나 일부 효소에 있어서는 반대로 생산량이

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

| Nitrogen source (0.2%) | Cell growth (OD at 660 nm) | Emulsifying activity (OD at 550 nm) | Dilution factor (Fcmc) | Minimum surface tension (mN/m) |
|------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| NH ₄ Cl | 0.565 | 0.635 | 1.2 | 60 |
| NH ₄ NO ₃ | 0.330 | 0.472 | 1.0 | 56 |
| NaNO ₂ | 0.872 | 0.907 | 2.1 | 48 |
| NaNO ₃ | 0.833 | 0.942 | 3.0 | 46 |
| KNO ₃ | 0.913 | 1.067 | 3.0 | 50 |
| CH ₃ COONH ₄ | 0.810 | 0.890 | 2.8 | 48 |
| Urea | 0.520 | 0.605 | 2.0 | 60 |
| Casamino acid | 0.688 | 0.663 | 2.2 | 52 |
| Yeast extract | 1.137 | 1.196 | 4.8 | 38 |
| Beef extract | 0.865 | 0.976 | 2.8 | 46 |
| Malt extract | 0.925 | 0.938 | 2.0 | 42 |
| Tryptone | 0.799 | 0.826 | 2.4 | 40 |
| Bactopeptone | 0.926 | 1.049 | 3.2 | 40 |
| Polypeptone | 0.941 | 1.078 | 2.8 | 42 |
| Proteose peptone | 0.688 | 0.752 | 1.2 | 48 |

Table 5. Effect of the aeration on the production of biosurfactant

| Volume of medium (ml/500 ml Erlenmeyer flask) | Cell growth (OD at 660 nm) | Emulsifying activity (OD at 550 nm) | Dilution factor (Fcmc) | Minimum surface tension (mN/m) |
|-----------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 25 | 1.390 | 1.464 | 4.2 | 38 |
| 50 | 1.435 | 1.598 | 4.8 | 38 |
| 75 | 1.031 | 1.189 | 3.8 | 38 |
| 100 | 1.021 | 1.037 | 3.8 | 38 |
| 125 | 0.839 | 0.973 | 3.2 | 38 |
| 150 | 0.529 | 0.629 | 2.8 | 40 |
| 200 | 0.402 | 0.438 | 2.0 | 42 |

증가한다(15). 결국 미생물의 종류에 따라 생물계면활성제의 생산에 최적인 통기량이 존재하며, 생물계면활성제 생산 공정을 scale-up시킬 때 이것은 대단히 중요한 기준이 된다. 따라서 통기량에 대한 정확한 정보 즉, oxygen transfer rate에 대한 구체적인 실험이 병행되어야 할 것으로 사료된다.

상기실험에서 결정된 배양조건에서 시간경과에 따른 균체생육, 유화능 및 표면장력 감소능을 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 즉, 균체생육은 18시간 이후부터 대수기에 접어들었으며, 40시간 이후에 정지기에 들어섰다. 유화능은 24시간이 지난 후부터 높아지기 시작하였으며, 48시간 이후부터 일정하였다. 표면장력은 배양 40시간까지는 완만하게 감소하였으나 배양 48시간만에 표면장력은 32 mN/m로 급격하게 감소하였다. 이것으로 보아 생물계면활성제는 대수증식기 말기나 정지기에 생산됨을 알 수 있었다. 일반적으로 *Pseudomonas* spp.는 growth-associated biosurfactant production을 나타내며, *Candida* sp., *Nocardia* sp., *Torulopsis apocola* 등은 growth-limiting condition하에서 생물계면활성제를 생산한다(5). 그러나 *Pseudomonas* spp. 중 예외적으로 *P. aeruginosa*는 growth-limiting condition하에서 생물계면활성제를 생산하기도 한다. 본 공시균인 *Pseudomonas* sp. SW1은 *P. aeruginosa*와 유사한 다소 예외적인 생산 타입을 나타내었다. 특히 Kjeldahl법으로 시간경과에 따른 배양액내의 질소량을 측정된 결과, 질소원이 고갈된 배양 42시간경부터 생물계면활성제가 생산(미제시)되어 많은 환

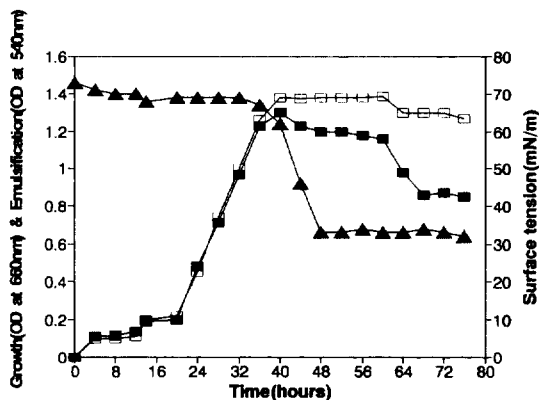


Fig. 1. Time course of biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. SW1. -■-, cell growth; -▲-, surface tension; -□-, emulsifying activity.

Table 6. Utilization of hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. SW1

| | Substrate | SW-1 |
|-----------------------|---------------------|------------------|
| Oils (2.0%) | Crude oil | +++ ^a |
| | Bunker-A | ++ ^b |
| | Bunker-B | + |
| | Bunker-C | ++ |
| <i>n</i> -Alkanes | <i>n</i> -Pentane | ++ |
| | <i>n</i> -Hexane | ++ |
| | <i>n</i> -Octane | ++ |
| | <i>n</i> -Isooctane | + |
| | <i>n</i> -Nonane | ++ |
| | <i>n</i> -Decane | ++ |
| | <i>n</i> -Dodecane | ++ |
| | <i>n</i> -Undecane | ++ |
| Branched alkanes | Isodecane | + |
| | Isopropyl alcohol | + |
| | Isopropyl ether | + |
| | | |
| Cyclic alkanes | Cyclopentane | + |
| | Cyclohexane | + |
| Aromatic hydrocarbons | Benzene | - ^d |
| | Toluene | - |
| | Phenol | - |

^agood growth, ^bgrowth, ^cpoor growth, ^dno growth.

경요인중 nitrogen-limited condition이 본 균주의 주된 production kinetic임을 알 수 있었다.

Hydrocarbon 이용능

공시균의 각종 hydrocarbon에 대한 이용능을 조사하기 위하여 상기실험에서 결정된 생물계면활성제 생산배지에 다양한 hydrocarbon을 첨가하여 배양함으로써 생육특성을 조사한 결과는 Table 6에서 보는 바와 같다. 즉 본 공시균은 각종 oils, *n*-alkane, branched alkane, cyclic alkane의 순서로 hydrocarbon을 자화할 수 있었으며, aromatic hydrocarbon은 전혀 자화할 수 없었다. 따라서 주로 alkane 계통의 화합물로 구성된 crude oil에 본 공시균을 적용할 경우, 계면활성 효과와 함께 crude oil의 구성성분에 대한 분해효과까지 나타날 것으로 추정되며, 이것은 유류오염지의 관리에 이용가능함을 시사한다.

유류는 전세계적으로 매년 수천만톤 이상이 환경으로 유출되어 생태계를 파괴하고 있다. 현재 이러한 유류오염을 방제하기 위해 물리화학적 방법을 이용하고 있으나 기상에 따른 제한이나 2차오염 등이 발생할 수 있으므로 유류분해 미생물을 이용하는 것이 바람직하다. 다양한 미생물로부터 분리된 생물계면활성제들의 표면장력 감소능은 27~36 mN/m 정도이다(5). 따라서 본 연구에서 분리된 *Pseudomonas* sp. SW1가 생산한 계면활성제의 표면장력 감소능(32 mN/m)은 다른 생물계면활성제와 비슷하므로 발효조를 이용한 유가배양을 통하여 productivity를 향상시킬 수 있다면 다양한 유류오염지에 적용가능할 것으로 판단되며, 인체무독성인 것으로 밝혀지면 화장품, 식품산업 등에도 응용이

가능할 것이다. 현재 상기실험에서 결정된 생산조건을 바탕으로 생물계면활성제의 대량생산 및 생물계면활성제의 분리, 정제에 대한 실험을 진행중에 있으며, 향후 정제된 생물계면활성제의 구조분석을 시도하고자 한다.

감사의 말

본 논문은 환경기술·산업개발연구센터(RRC/IETI)의 지원에 의하여 연구되었으며, 깊은 감사를 드립니다(RRC 과제번호: 96A-10-01-02-3).

참고문헌

1. Abu-Ruwaida, A.S., I.M. Banat, S. Haditirto, S. Salem, and M. Kadri. 1991. Isolation of biosurfactant producing bacteria-product characterization and evaluation. *Acta Biotechnol.* **11**, 315-324.
2. Banat, I.M. 1993. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technol.* **51**, 1-12.
3. Banat, I.M. 1995. Characterization of biosurfactants and their use in pollution removal-state of the art. *Acta Biotechnol.* **15**, 251-267.
4. Cairns, W.L., D.G. Cooper, J.E. Zajic, J.M. Wood, and N. Kosaric. 1982. Characterization of *Nocardia amaree* as a potent biological coalescing agent of water-oil emulsions. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 362-369.
5. Desai, J.D. and I.M. Banat. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 47-64.
6. Duvnjak, Z., D.G. Cooper, and N. Kosaric. 1982. Production of surfactant by *Athrobacter paraffineus* ATCC 19588. *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 165-174.
7. Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* **10**, 208-217.
8. Georgiou, G., S.C. Lin, and M.M. Sharma. 1990. Surface active compounds from microorganisms. *Bio/Technology* **10**, 60-65.
9. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, and E.W. Wester. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology, NY.
10. Greek, B.F. 1991. Sales of detergents growing despite recession. *Chem. Eng. News* **69**, 25-52.
11. Kang, S.M., C.S. Lee, and Y.C. Kim. 1996. Isolation of biosurfactant-producing yeast *Rhodotorula* sp. G-1 and the biosurfactant production. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 185-190.
12. Kretschmer, A., H. Bock, and F. Wagner. 1982. Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on *n*-alkane. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 864-870.
13. Krieg, N.R., and J.G. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The William and Wilkins Co., U.S.A.
14. MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
15. Margaritis, A., J.E. Zajic, and D.F. Geerson. 1979. Production and surface active properties of microbial surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1151-1162.
16. Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz, and D. Gutnick. 1979. Emulsifier of *Athrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 402-408.
17. Santos, L.G., O. Kappeli, and A. Fiechter. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production on continuous cultures with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 301-305.
18. Singer, M.E. 1985. Microbial biosurfactants. *Microbes Oil Recovery* **1**, 19-38.
19. Starr, M.P., N. Stlop, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel. 1981. The Prokaryotes Vol. 2, Springer-Verlag.
20. Thomas, R.N., T. Härtner, and K. Poralla. 1990. Surface active properties of viscosin; a peptidolipid antibiotic. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 518-520.
21. Zuckerberg, A., A. Diver, and Z. Peeri. 1979. Emulsifier of *Athrobacter* RAG-1: chemical and physical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 414-420.

(Received June 4, 1997/Accepted August 12, 1997)

ABSTRACT: Production of Biosurfactant by *Pseudomonas* sp. SW1 for Microbial Remediation of Oil Pollution

Hong-Joo Son¹, Wan-Su Suk, Geon Lee¹ and Sang-Joon Lee* (Department of Microbiology, ¹Institute for Environmental Studies, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea)

Microorganisms capable of producing biosurfactant were isolated from oil-contaminated soils and seawater. Among them, the selected strain SW1 was identified as *Pseudomonas* sp. by taxonomical characteristic tests, and so tentatively named *Pseudomonas* sp. SW1. The optimal temperature and initial pH for biosurfactant production were 30°C and 7.0, respectively. The optimal medium composition for the production of biosurfactant by *Pseudomonas* sp. SW1 were hexadecane of 2.0%, yeast extract of 0.04%, K₂HPO₄ of 0.02%, KH₂PO₄ of 0.03% and MgSO₄ · 7H₂O of 0.04%, respectively. Under the above conditions, minimum surface tension was 32 mN/m after incubation of 2 days. The biosurfactant was produced during initial stationary phase in the optimal medium. *Pseudomonas* sp. SW1 utilized various hydrocarbons such as Bunker oils, *n*-alkanes and branched alkanes as a sole carbon source.