

해양세균 *Pseudomonas* sp. CHCS-2에 의한 원유분해 및 생물유화제의 성분 분석

김 학 주 · 김 봉 조 · 하 순 득 · 황 선 희 · †공 재 열

부경대학교 생물공학과

(접수 : 1998. 12. 19., 게재승인 : 1999. 3. 12.)

Biodegradation of Crude oil by Marine Bacterium *Pseudomonas* sp. CHCS-2 and Composition of the Biosurfactant

Hak-Ju Kim, Bong-Jo Kim, Soon-Duck Ha, Sun-Hee Hwang, and Jai-Yul Kong†

Dept. of Biotech. & Bioeng., Pukyong National University, 599-1, Deayeon-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-737, Korea

(Received : 1998. 12. 19., Accepted : 1999. 3. 12.)

Marine bacterium *Pseudomonas* sp. CHCS-2 produced the biosurfactant in the culture broth which contained 2%(w/v) arabian light crude oil and the productivity of biosurfactant was increased with the addition of glucose. The crude oil in the culture broth was degraded by this strain and carbon chain of $nC_{12} \sim nC_{22}$ was completely degraded during the incubation for 196 h. The crude biosurfactant was purified by Amberlite XAD-7, Sepharose CL-4B and DEAE-Sepharose CL-6B column chromatography. Therefore, 0.21g/L of the purified biosurfactant was obtained. The purified biosurfactant was a type of lipoprotein and the molecular weight was estimated as 67kDa by SDS-PAGE. The lipid composition was identified as octadecanoic acid by gas chromatography/mass spectrometry. And then, the N-terminal amino acid sequence of the protein was determined as Ser-Val-Ile-Asn-Thr-Asn-Ile-Thr-X-Met-Ile-Gly-Gln-Gln- and the sequence did not show homology to any other known lipoprotein. Therefore, the purified lipoprotein was predicted novel biosurfactant.

Key Words : *Pseudomonas* sp. CHCS-2, Biodegradation, Biosurfactant, Lipoprotein

서 론

생물유화제란 미생물, 동물, 식물과 같은 생물소재로부터 얻어지는 양친매성 물질로서, 표면장력을 감소시키며, 서로 다른 두 상간의 계면장력을 감소시킴으로써 유화 분산을 촉진시키는 물질로 정의되고 있다. 지금까지 보고된 생물유화제는 대부분 미생물유래이며 그 중에서도 특히 bacteria 유래의 것이 그 대부분을 차지하고 있다. 미생물유래 생물유화제는 기존의 화학유화제에 비하여 독성이 낮고, 미생물에 의해 다양하게 합성되어지며, 온도 및 pH에 대한 안정성이 클 뿐 아니라, 생분해가 가능하기 때문에 매우 환경 친화적인 물질이다. 이와 같은 특성으로 말미암아 생물유화제는 현재 유희수 관련산업, 제약, 화장품, 직물, 식품, 펄프등과 같은 여러 산업분야에서 널리 사용되고 있다(1)

생물유화제를 생산하는 미생물은 세포 주위에 alkane 계열의 탄화수소화합물이 존재할 경우, 이들을 영양원으로 이용하기 위하여 세포밖으로 유화제를 생산하며, 생산된 유화제에 의해 분

산된 유화물은 세포벽에 존재하는 양극성 수용체에 의해 유화제를 분리한 후 alkane 화합물의 방울만을 세포내로 유입시켜, 이것을 탄소원으로 이용하는 기작을 가진다(2). 이러한 미생물들이 생산하는 생물유화제의 종류를 살펴보면, 그 구조에 따라 glycolipid, lipopeptide와 lipoprotein, fatty acids, neutral lipids와 phospholipids 그룹, polymenc surfactants, 그리고 particulate biosurfactant 그룹 등으로 분류할 수 있다. glycolipid 그룹에는 *Pseudomonas aeruginosa*가 생산하는 rhamnolipid, *Rhodococcus erythropolis*가 생산하는 trehalolipid, *Torulopsis apicola*가 생산하는 sophorolipid등이 있으며, lipopeptide 와 lipoprotein 그룹에는 *Bacillus subtilis*가 생산하는 surfactin이 대표적이며, 그외에도 *Pseudomonas fluorescens*가 생산하는 carbohydrate-protein-lipid 복합체등이 있다. 또한 fatty acids, neutral lipids, phospholipids 그룹에는 *Candida lepus*가 생산하는 fatty acids, *Mycobacterium* sp.가 생산하는 neutral lipids, *Thiobacillus thiooxidans*가 생산하는 phospholipids등이 있으며, polymeric surfactants에는 *Acinetobacter calcoaceticus*가 생산하는 emulsan, 그리고 particulate biosurfactant 그룹에는 *Acinetobacter calcoaceticus*가 생산하는 vesicles와 fimbriae 등이 있다(3).

한편, 생물유화제는 유출 유류에 의한 육·해양지역에 있어서 방제제로서도 이용되고 있는데, 1989년 Alaska의 Prince

† Corresponding Author : Dept. of Biotech. & Bioeng., Pukyong National University, 599-1, Deayeon-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-737, Korea
Tel. & Fax. . +82-51-620-6181
e-mail : kongjy@dolphin.pkn.ac.kr

william란의 Exxon valdez호 유류 유출사고시에 사용된 경우를 대표적인 예로 들 수 있다(4). 국내의 경우, 연·근해에서 발생되었던 선박사고와 이로 인한 유류유출 및 그 피해에 관한 실태를 살펴보면, 지난 18년간(1979년~1996년) 유조선과 일반 선박에 의한 사고 발생건수는 총 4,256건이었으며, 유류 유출량은 약 49,837톤으로 어민들의 어장피해 요구액은 약 8,000억원으로 추산되고 있다(5). 이에 대한 방제대책으로서는 오일펜스를 설치한 후, 이동식 skimmer를 이용하여 유류를 회수하거나, 유흡착포를 이용하여 유류를 제거하고 있으며, 유화제를 이용한 방법을 사용하고 있다. 그러나 이러한 방법으로는 넓은 오염지역을 담당할 수 없을 뿐만 아니라, 막대한 인력과 시간, 경비 등이 소요되며, 더욱이 대용량의 유수분리기를 장착한 전문 방제선은 아직 국내에서는 보유하고 있지 않은 실정이다. 이에 비해 생물유화제의 경우에는 넓은 지역의 처리가 가능하고, 신속한 대응도 가능하기는 하지만 현재 사용중인 대부분의 유화제는 주로 화학합성유화제로, 이들은 파다 사용시 2차 오염 및 독성 문제가 야기되어 현재 국내에서는 그 사용을 기피하고 있는 실정이다. 따라서 기존의 유화제가 지니는 단점을 개선한 새로운 생물학적 유처리제의 개발이 요구되고 있다. 이에 본 연구자 등은 지금까지 우리나라 남해안 유류 오염지역을 중심으로 유류 분해능이 뛰어난 다수의 해양세균을 분리하여 연구를 진행 중에 있으며, 그 중에서도 *Pseudomonas* sp. CHCS-2로 명명된 해양세균에 대하여 그 기본 특성을 이미 보고한 바 있다(6).

본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. CHCS-2의 배양액 중에 난분해성인 원유를 첨가하여, 본 균주의 유류분해 특성을 조사하였으며, 배양액 중에 생산된 생물유화제를 분리·정제하여 그 구성성분을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

생물유화제 생산균주로서 우리나라 남해안 통영근해 유류오염 지역의 해수로부터 분리하여 우수한 유류분해능을 지닌 것으로 확인된 *Pseudomonas* sp. CHCS-2를 사용하였다(6). 본 실험에 사용된 배지는 기존에 사용된 변형 해수배지와 YGA배지(3g peptone, 3g 포도당, 1L 인공해수, pH 8.0)를 사용하였으며, 기질로 2%(w/v) arabian light 원유를 사용하였다.

배양조건

2%(w/v) arabian light 원유가 첨가된 변형 해수배지와 YGA배지를 각각 200mL씩 500mL baffie flask에 넣고 가압멸균(121°C, 15분)을 하였으며, 14시간 동안 종균배양된 균을 1%(v/v)농도로 접종한 후, 30°C에서 180rpm으로 48시간동안 진탕 배양하였다. 균체 성장은 배양 시료를 시간별로 채취하여, 5분간 정지시킨후 상층액의 유류 성분을 제거하고 각각의 흡광도를 UV-VIS spectrophotometer(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech Co.)로 측정하여($\lambda=610\text{nm}$) 확인하였다.

표면장력

2%(w/v) arabian light 원유가 첨가된 변형 해수배지와 YGA배지를 이용하여 균주를 배양한 후, 각 배양 시간별로 배양액을 채취하여 원심분리(5,000×g, 4°C, 10분)를 행하였다. 그

리고 이때에 얻어진 배양상층액의 표면장력을 표면장력계(Lauda Co., TD-1)로 측정하였다.

진류오일 분석

2%(w/v) arabian light 원유가 첨가된 멸균된 YGA배지 50mL를, 250mL baffie flask에 넣은후, 14시간 종균배양된 배양액을 1%(v/v) 점종하고, 30°C에서 180rpm으로 진탕 배양하여, 배양시간별(48, 96, 196시간)로 하나씩 플라스크를 회수하였으며, 회수한 배양액에 50mL n-hexane을 첨가하여 잔존유류를 추출하였다. 추출된 시료는 무수 Na_2SO_4 를 첨가하여 수분을 제거한 후, gas chromatography(Hewlett Packard 5890 series II)로 분석하였다. 분석에 사용된 column은 HP-5 (Crosslinked 5% Ph-Me silicone; 내경, 0.32mm; 막막, 0.25 μm ; 길이, 30m; 상비, 320)로, 시료량은 1 μL 사용하였다. 이동상으로는 N_2 가스를 사용하였으며, column에 전달되는 이동상의 분배비는 100:1로 하였고, 검출기는 불꽃이온화 검출기(FID)를 사용. 공기와 H_2 가스는 30psi, 20psi로 흘려주었다. 시료 분석을 위하여 주입구 및 검출기 온도는 150°C와 320°C로 하였으며, column oven의 초기 온도는 80°C로 3분간 등은 시킨 후, 분당 4°C씩 215°C까지 승온시켜 분석하였다.

생물유화제의 분리·정제

원유를 기질로하여 배양된 배양액을 원심분리(5,000×g, 4°C, 10분)한 후 n-hexane과 chloroform으로 잔존유류를 제거하였다. 유류가 제거된 상층액에 CM (chloroform : methanol = 1 : 1, v/v)혼합용매를 1 : 1(v/v)로 섞어 1시간동안 교반한 후 분액 깔때기를 사용하여 crude 생물유화제를 추출하였고, 진공회전증발기(EYELA Ca)를 사용하여 45°C에서 농축하였다. Crude 생물유화제의 정제를 위하여 Amberlite XAD-7(Rohm and Hass Co.) 흡착수지가 충전된 column(2.5×100cm)을 이용하여 methanol과 물로 분리·농축하여 동결 건조하였으며, 이것을 다시 Sepharose CL-4B(Pharmacia Biotech Co.)수지가 충전된 column(2×50cm)을 이용하여, 0.5M NaCl 이 첨가된 20mM Tris·HCl(pH 8.0) 완충용액으로 30mL/h 유속으로 분별수집기(Pharmacia Biotech Co)를 사용하여 각 시험관(10×50mm)마다 80방울(약 4mL)씩 분취하고, 254nm에서 흡광도를 측정하였다. 유화력을 가지는 분획은 투석하고 동결 건조한 후, DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia Biotech Co.) 음이온 교환수지가 충전된 column(2×30cm)으로, 20mM Tris·HCl (pH 7.8) 완충용액에 NaCl을 0.1M에서 0.7M까지 단계별로 첨가하여 30mL/h 유속으로 분별수집기를 사용하여 각 시험관(10×50mm)마다 80방울(약 4mL)씩 분취하고, 254nm에서 흡광도를 측정하여 유화활성을 가지는 분획을 투석, 동결 건조하여 정제하였다.

생물유화제의 분자량

생물유화제의 분자량은 12% polyacrylamide gel을 이용하여 SDS-PAGE를 행하였으며, 분자량은 lysozyme(14,400Da), trypsin inhibitor (21,500), bovine carbonic anhydrase (31,000), ovalbumin (45,000), bovine serum albumin (66,200), phosphorylase b (97,400)이 함유된 protein marker(Bio-Rad Co.)를 사용하여 확인하였다.

생물유화제 구성성분

생물유화제의 성분을 분석하기 위하여 TLC와 gas chromatography/mass spectrometry(GC/MS)를 사용하였다. TLC 분석에는 silica gel 60 F₂₅₄ glass plate (Merck Co.)와 hexane : diethylether : acetic acid가 70 : 30 : 2(v/v)로 혼합된 전개 용매를 사용하였으며(7), 검출시약으로 iodine vapor, ceric sulfate, ninhydrin, α -naphthol을 사용하여 각종화합물과, 지질, 단백질, 탄수화물을 분석하였다. 또한 지질을 분석하기 위하여 protease(Sigma Co.)로 단백질을 제거한 후, diethylether로 추출하여 얻은 시료를 diazomethane을 처리, methyl ester화시킨 후 HP-Innowax column(내경, 0.2mm; 길이, 50m; 막막두께, 0.2 μ m)으로 GC/MS(Profile HV-3, Kratos Co. U.K.)분석을 행하였다.

N-말단 아미노산배열분석

생물유화제의 구성단백질에 대한 N-말단 아미노산배열분석은 Protein sequencer (Model Milligen 6600B)로 행하였다.

결과 및 고찰

균체 배양 및 생물유화제의 생산

포도당을 탄소원으로 사용하여 생물유화제를 생산하는 연구는 Santos(8)와 Kaplan (9)등 여러 연구자들로부터 *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* 등의 균주들을 이용한 많은 보고가 있다. 실제로 이러한 탄소원으로부터 생물유화제를 생산할 경우, 원유등과 같은 난분해성 유류를 기질로 사용할 때보다 생물유화제의 분리·정제 및 회수가 용이하기 때문에 시간과 비용이 절감되는 등의 많은 장점이 있다. 따라서 본 연구에는 변형 해수배지 및 포도당이 첨가된 YGA배지에 2% (w/v) arabian light 원유를 각각 첨가하여 균체 생육조건과 생물유화제의 생산능을 추정하였

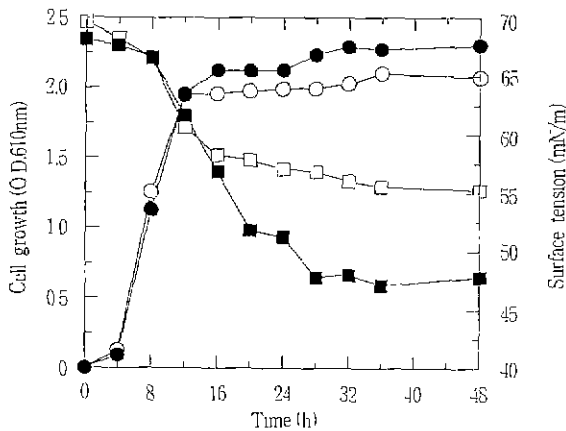


Figure 1. Productions of the biosurfactant by *Pseudomonas* sp. CHCS-2 in culture mediums Each medium containing 2% arabian light crude oil

Cell growth : -○-, modified marine medium;
 -●-, YGA medium
 surface tension : -□-, modified marine medium;
 -■-, YGA medium

다 균체 배양은 48시간 동안 행하였으며, 표면장력의 저하능으로 생물유화제의 생산정도를 비교하였다. 그 결과 이전 보고(6)에서 사용된 최적배양조건인 변형된 해수배지 보다는 포도당이 첨가된 YGA배지에서 배양할 경우 균체 성장이 증가되었으며, 포도당이 첨가된 YGA배지의 경우 배양액의 표면장력(47.2mN/m)이, 변형된 해수 배지의 배양액의 표면장력(57mN/m)보다 감소하여 유화제의 생산이 증가되었음을 알 수 있었다(Figure 1) 한편, Santos(8)등의 연구 보고에서처럼 기질인 원유를 첨가하지 않고도 생물유화제의 생산이 가능한지를 알아보기 위하여 0.3%(w/v) 포도당만을 첨가한 YGA배지와 0.3%(w/v) 포도당 및 원유를 동시에 첨가한 YGA 배지상에서 균체 성장과 생물유화제의 생산을 비교 검토하였다(Figure 2) 그 결과, 균체 성장에 있어서는 48시간 배양 시 원유를 첨가한 배지나 첨가하지 않은 배지 모두 거의 유사한 성장을 보였으나, 생물유화제 생산에 있어서는 원유를 첨가하지 않은 배양액에서의 표면장력이 61.8mN/m로 원유를 첨가한 배양액의 값(47.2mN/m) 보다 높게 나타나 원유를 첨가하였을 때 생물유화제의 생산이 증가한 것으로 확인되었다.

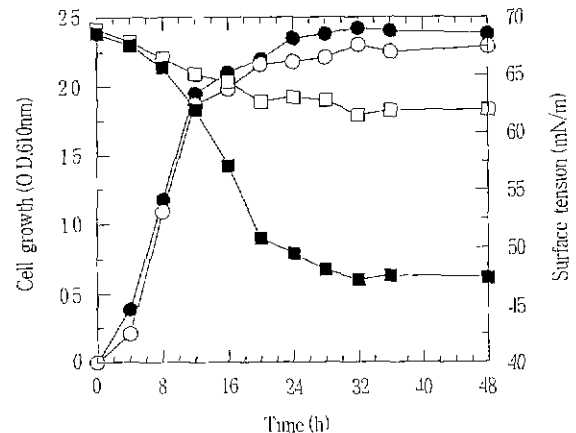


Figure 2. Effect of the 2% crude oil on the production of biosurfactant from *Pseudomonas* sp. CHCS-2 in the YGA medium.

Cell growth : -○-, without crude oil; -■-, with crude oil
 surface tension : -□-, without crude oil; -■-, with crude oil

배양시간에 따른 원유의 분해능

Arabian light 원유에는 saturates(61%), aromatics(33%), resin(4%), asphaltene(2%)등이 함유되어있는 것으로 Harayama등(10)의 연구자들에 의하여 보고되고 있다. 본 실험에서는 이러한 원유의 성분 중 약 61%를 차지하고있는 paraffine계 탄화수소(saturate)를 배양시간별(48h, 96h, 196h)로 hexane처리하여 녹여낸 후 gas chromatography로서 분석하였다. 그 결과 잔존유류중에 포함되어 있는 paraffine계 탄화수소는 196시간 배양 중에 carbon chain이 nC₁₂에서 nC₂₂까지 거의 대부분 분해가 일어남을 알 수 있었다(Figure 3) 이러한 결과는 동일한 균주에 대한 이전의 보고(carbon chain이 nC₁₀~nC₁₄ 분해)(6)에 비하여 분해능이 훨씬 향상된 것으로 이것은 포도당의 첨가에 따른 영향으로 보여진다.

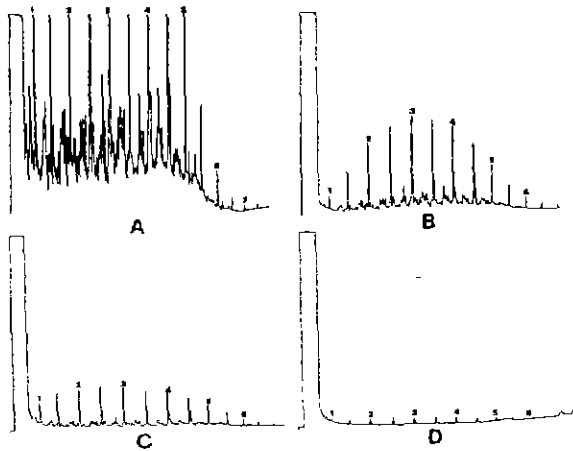


Figure 3. Gas chromatographic analysis of the residual oil in the culture broth containing of 2% arabian light crude oil of *Pseudomonas* sp. CHCS-2. A, saturated fraction of sterile control arabian light crude oil; B, residual oil after 48h of incubation; C, residual oil after 96h of incubation. D, residual oil after 196h of incubation(1,nC₁₂; 2,nC₁₄; 3,nC₁₆; 4,nC₁₈; 5,nC₂₀; 6,nC₂₂)

생물유화제의 정제

배양액으로부터 원심분리하여 얻어진 배양 상층액에 n-hexane과 chloroform을 처리하여 잔존유류를 제거하고, CM (chloroform: methanol = 1 : 1, v/v)으로 추출·농축하여 8.5g/L의 crude 생물유화제를 얻었다. Crude 생물유화제는 Amberlite XAD-7 수지를 사용하여 유화활성을 가지는 분획을 회수, 72시간 투석·동결건조한 후 2.63g/L의 생물유화제를 얻었다. 또한 이렇게 회수된 생물유화제는 Sepharose CL-4B를 사용하여 유화활성을 가지는 첫 번째 peak 분획을 회수하여 투석·동결건조한 후 1.05g/L의 생물유화제를 얻었다(Figure 4). Sepharose CL-4B로부터 회수된 생물유화제는 DEAE-sepharose CL-6B로서 정제하였으며, 0.4M NaCl농도에서 분리되어 유화활성을 갖는 분획을 투석·동결 건조하여 최종적으로 0.21g/L의 정제된 생물유화제를 얻었다(Figure 5). 또한, 분리·정제된 각 단계별 회수율은 crude 생물유화제를 100%로 보았을 때, Amberlite XAD-7 흡착수지를 사용했을 경우 30.9%, Sepharose CL-4B수

Table 1 Total purification yields of biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp. CHCS-2

Purification step	g/L	Recovery yield(%)	Purification fold(-)
Crude biosurfactant	8.50	100.0	1.0
Amberlite XAD-7 chromatography	2.63	30.9	3.2
Sepharose CL-4B gel chromatography	1.05	12.4	8.1
DEAE-Sepharose CL-6B ion exchange chromatography	0.21	2.5	40.5

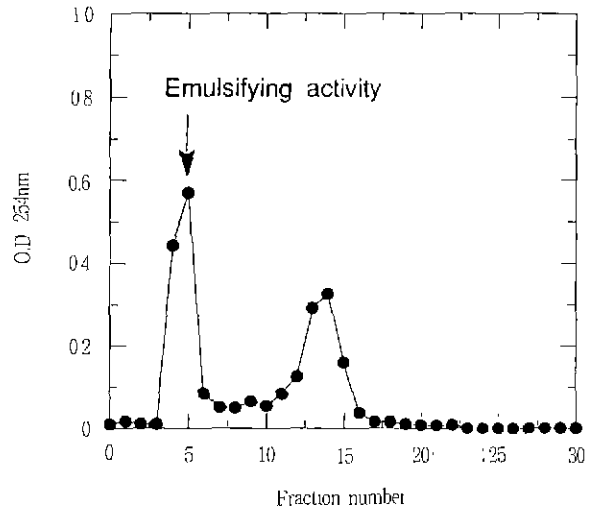


Figure 4. Gel chromatography profile of the crude biosurfactant on a column(20×50cm) of Sepharose CL-4B. The eluent is 20mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) with 0.5N NaCl.

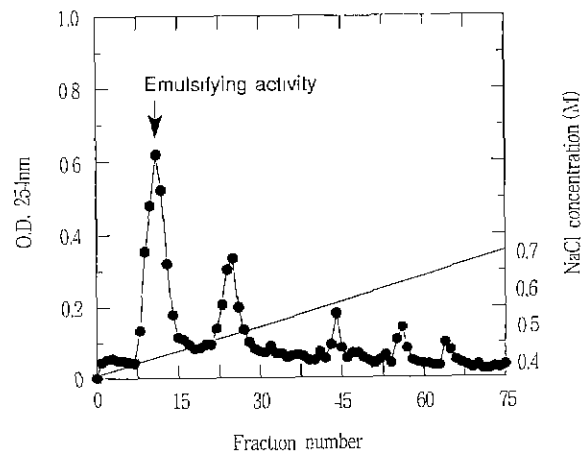


Figure 5. Ion exchange chromatography profile of crude biosurfactant on a column(20×15cm) of DEAE Sepharose-CL 6B. The eluent was 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) with linear gradient of NaCl from 0M to 0.7M

지를 사용했을 경우 12.4%, DEAE-Sepharose CL-6B 이온교환수지를 사용했을 경우 2.5% 회수율을 보였으며, 정제배수는 각각 1.0, 3.2, 8.1 그리고 40.5배로 나타났다(Table 1).

생물유화제의 분자량

본 균주가 생산하는 생물유화제의 분자량은 SDS-PAGE를 사용하여 protein marker로서 상대 비교하여 확인하였다. 그 결과 정제된 생물유화제의 분자량은 약 67KDa으로 확인되었다(Figure 6).

생물유화제의 성분

생물유화제의 구성성분을 TLC 및 GC/MS로 분석하였다. 정

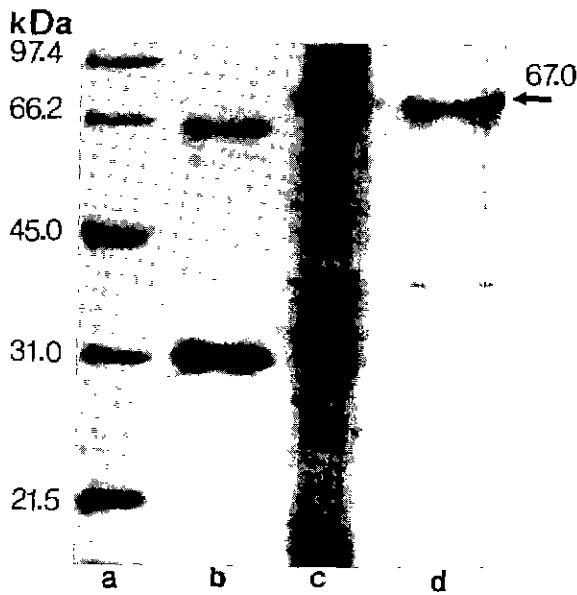


Figure 6. 12% SDS-PAGE photograph of the purified biosurfactant produced by *Pseudomonas* sp CHCS-2. a, protein marker; b, lipase; c, purified biosurfactant by Amberlite XAD-7 adsorption chromatography; d, purified biosurfactant by Sepharose CL-4B gel chromatography

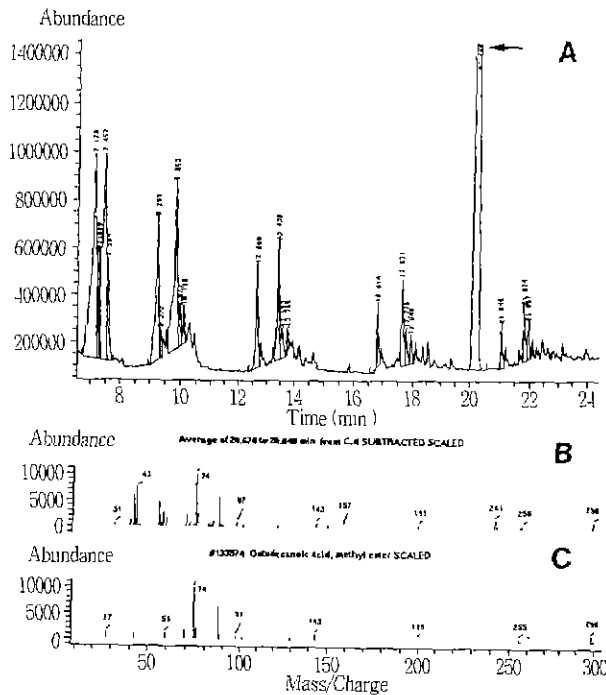


Figure 7. Gas chromatography/Mass spectrometry analysis of the isolated lipid from the purified biosurfactant. A, gas chromatogram of isolated lipid from biosurfactant, B, chemical shift of isolated lipid from biosurfactant, C, mass library of methylester octadecanoic acid

제된 생물유화제는 TLC로서 분석하였으며, 이들의 구성 성분은 nnhydri, cerc sulfate, α -naphtol로서 단백질, 지질, 당을 확인한 결과, 단백질과 지질로 구성된 lipoprotein임을 확인하였다

또한 lipoprotein에 결합된 지질을 분석하기 위하여 시료를 methyl ester화 시켜 GC/MS로 분석한 결과, 분자량이 298인 methyl ester화된 octadecanoic acid로 확인되었다(Figure 7). 따라서, 본 균주가 생산하는 생물유화제는 단백질에 octadecanoic acid가 결합된 lipoprotein계열의 생물유화제이며, 현재까지 알려진 lipopeptide와 lipoprotein계열의 생물유화제의 경우, C₁₀, C₁₃~C₂₁ 계열의 지방산과 β -OH 지방산등 다양한 종류의 지방산을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(11).

단백질의 N-말단 아미노산 배열 분석

본 균주가 생산하는 lipoprotein 생물유화제중 protein 성분만을 분리하여 N-말단 아미노산배열을 분석한 결과, 정제된 생물유화제는 Ser-Val-Ile-Asn-Thr-Asn-Ile-Thr-X-Met-Ile-Gly-Gln-Gln-의 배열을 가지는것으로 확인되었다.

현재까지 보고된 lipopeptide 및 lipoprotein계열의 생물유화제중에서 단백질 부분의 아미노산 배열 및 아미노산 조성이 알려져 있는 생물유화제의 예로는 *Bacillus subtilis*가 생산하는 surfactin과 *Corynebacterium lepus*가 생산하는 생물유화제가 있다. *Bacillus subtilis*가 생산하는 surfactin은 L Glu-L Leu-D Leu-L Val-D Asp-L Leu-L Leu의 7개 아미노산 배열에 지방산이 결합되어있는 구조로 알려져 있으며(12), *Corynebacterium lepus*가 생산하는 생물유화제는 Ala(17.4%), Glu(15.6%), Gly(13.6%), Leu(10.6%), Ser(8.4%), Thr(7.7%), Phe(6.4%), Asp(5.9%), Pro(5.5%), Met(3.0%), Ile(2.6%), Val(2.1%), Lys(1.8%)등으로 조성되어 있는 것으로 알려져 있다(13) 그러나 이들과 본 연구에서 조사된 생물유화제와의 유사성은 없으며, 그 밖의 분자량이 큰 생물유화제로서 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1이 생산하는 단백질-탄수화물-지질복합체인 emulsan(M.W 980kDa)과 *Pseudomonas fluorescens*가 생산하는 지질부분을 제외한 탄수화물-단백질복합체(M.W 300kDa), *Candida lipolytica*가 생산하는 탄수화물-단백질복합체(M.W. 27.6kDa)등(11)이 보고되어 있기는 하나, 단백질 조성 및 N-말단 아미노산 배열에 관한 연구는 이루어져 있지 않았다 또한 Medline으로 이미 보고된 lipoprotein계열의 단백질과 N-말단 아미노산 배열 검색결과에서도 유사성을 지닌 생물유화제는 확인되지 않았다 따라서 본 연구에서 분리된 생물유화제의 경우 구성성분이나 분자량 등을 고려해 볼 때, 현재까지 보고되지 않은 새로운 형태의 lipoprotein계열 생물유화제로 추정된다.

요 약

해양세균 *Pseudomonas* sp. CHCS-2는 배양과정 중에 포도당 첨가에 의해 생물유화제의 생산이 증가되었으며, 196시간 배양시 원유에 포함되어 있는 paraffine계 탄화수소 중에서 nC₁₂~nC₂₂까지 범위의 carbon chain이 거의 대부분 분해됨을 알 수 있었다. chloroform : methanol= 1 : 1(v/v)로 추출하여 얻은 8.5g/L의 crude 생물유화제를, Amberlite XAD-7, Sepharose CL-4B, DEAE-sepharose CL- 6B 수지를 사용하여 정제한 결과 최종적으로 0.21g/L의 정제된 생물유화제를 얻었다. 본 균주가 생산하는 생물유화제는 단백질과 octadecanoic acid가 결합된 분자량이 약 67kDa인 lipoprotein으로 확인되었으며, 정제된 생물유화제중 단백질성분만을 분리하여 N-말단 아미노산배열을

분석한 결과, Ser-Val-Ile-Asn-Thr-Asn-Ile-Thr-X-Met-Ile-Gly-Gln-Gln-의 배열을 가지는 것으로 확인되었다. 이는 기존에 보고된 lipoprotein과 다른 형태의 것으로, 본 균주가 생산하는 생물유화제의 경우 구성성분, 분자량 등을 고려해 볼 때 새로운 형태의 lipoprotein 계열 생물유화제로 추정된다.

감 사

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(해양수산과학 KIOS-97-F-14)에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Banat, I. M. (1993), Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution : a review. *Bioresource Technol.*, 51, 1-12
- Hommel R. F. and C. Ratledge(1993), Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactant and their precursor molecules, *Biosurfactant : Production, properties, applications*(N. Kosaric eds.), p. 3-63, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Haferburg, D., R Hommel, R. Claus and H P. Kleber (1986), Extracellular microbial lipids as biosurfactants, *Adv. in Biochem Biotechol.*, 33, 53-92.
- Swannel. R. P. J., K. Lee and M McDonagh(1996), Field evaluations of marine oil spill bioremediation, *Microbiol Rev.*, 60(2), 342-365.
- 해양경찰청(1997), 국가 방제제도 개선 및 방제능력 확충방안 연구, p. 36-46.
- 류병호, 김학주, 매승권, 김종덕, 공재열(1995), 해양으로부터 분리한 *Pseudomonas* sp. CHCS-2가 생산하는 Biosurfactant의 경제 및 특성에 관한 연구. *한국생물공학회지*, 10(5), 582-588.
- Rambeloarisoa, E., J. F. Rontani, G. Giusti, Z. Duvnjak and J. C. Bertrand (1984), Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams, *Marine Biology*, 83, 69-81.
- Santos, L. G., O. Kappeli and A. Fiechter(1984), *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 301-305.
- Kaplan, N. and E. Rosenberg(1982), Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413, *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 1335-1341.
- Harayama, S., K. Venkateswaran, H. Toki, S. Komukai, M. Goto, H. Tanaka and M. Ishihara(1996), Degradation of crude oil by marine bacteria, *J. Mar. Biotechnol.*, 3, 239-243.
- Cooper, D. G., J. E. Zanc and D. F. Gerson(1979), Production of surface active lipids by *Corynebacterium lepus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37(1), 4-10.
- Jenny, K., V. Deltrieu and O. Kappeli(1993), Lipopeptide production by *Bacillus licheniformis*, *Biosurfactant : Production, properties, applications*(N. Kosaric eds.), p. 135-156, Marcel Dekker, Inc, New York.
- Peypoux, F., J. M. Bonmatin, H. Labbe, B. C. Das, M. Ptak and G. Michel (1991), Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val]surfactin, *Eur. J. Biochem.*, 202, 101-106.