한국생물공학회지 제 15권 제 1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 15, No. 1, 27-34(2000)

남해안 해수로부터 원유 분해 세균의 분리 및 특성

김 학 주 · 김 봉 조 · †공 재 열 · [1]구 헌 서
부경대학교 식품생명공학부, [1]동명대학 공업화학과
(접수 : 2000. 1. 8., 게재승인 : 2000. 2. 18.)

Isolation and Characterization of Oil Degrading Bacteria from Southern Sea of Korea

Hak-Ju Kim, Bong-Jo Kim, Jai-Yul Kong†, Hoen-Seo Koo[1]
Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea
[1]Dept. of Industrial Chemistry, TongMyong College, Pusan 608-740, Korea
(Received : 2000. 1. 8., Accepted : 2000. 2. 18.)

A marine bacterium having a high oil-degrading activity was isolated from the oil-polluted southern sea of Korea, and was identified as *Pseudomonas aeruginosa* and was named *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2. The optimal temperature, culture time, pH and NaCl concentration for biosurfactant production and cell growth showed 25℃, 48h, 7.0 and 0%(w/v), respectively. After cultivation at 25℃, 180 rpm in 250 mL erlenmeyer flask for 7days, 1%(w/v) arabian light crude oil and bunker C oil which are considered to be hardly degradable compounds were degraded 92.1%(w/w) and 76%(w/w) respectively. And then, the cell adherence was measured on various carbon sources. The cell adherence indicated over 80% on hydrocarbons(arabian light crude oil, kuwait crude oil, bunker C oil, n-paraffine, n-hexadecane, n-tetradecane) as carbon sources. Lecithin among fatty acids(oleic acid, olive oil, lecithin) showed highest cell adherence of 91.5%. The cell adherence of sugars(arabinose, trehalose, dextrose, galactose, lactose, fructose, maltose, sorbitol, sucrose) observed to be less than 70% except for arabinose, galactose, sorbitol and sucrose.

Key Words : *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2, biosurfactant, crude oil, cell adherence, oil-degrading activity

서 론

전세계적으로 해양운송의 증대, 유조선의 좌초, 해저유전의 개발 및 기상악화 등으로 인한 일반선박의 좌초, 그리고 각종 폐유의 방출 등으로 말미암아 매년 엄청난 량의 유류가 유출되고 있는 실정이다. 실제로 유류의 연안물동량은 최근 10년간 13% 이상 증가하였고, 유류의 수출입 물동량은 16% 이상 증가하였으며, 1994년 기준 국내 연안의 유조선은 238척으로, 척당 평균 톤 수는 1,457 G/T이며, 20년 이상의 노후 선은 전체 37%를 차지하고 있어 항상 해양오염의 우려를 가지고 있다.

'79-'96년 말까지 16년간 우리 나라 연안에서 발생한 해양오염사고는 총4,256건으로 유류에 의한 오염사고는 3,862건으로 90.7%를 차지하였고, 폐기물 및 유해액체물질에 의한 오염사고는 397건(9.3%)으로 해양오염사고의 거의 대부분이 유류에 의한 오염사고였다. 이 기간동안 유출되었던 유류의 총유출량은 49,837 KL이며 1 KL 이상 유출사고중 유조선에 의한 것이 90건으로 유출량은 38,404 KL(77%)의 유출량을 차지하였으며, 이중 1,000 KL 이상 사고는 11건으로 유출량은 33,205 KL(67%)였다. 그리고 화물선에 의한 1 KL이상의 유류유출 사고는 95건으로 유출량은 5,488 KL이며 거의 대부분이 대형유조선에 의한 유출사고였다. 연도별 오염사고 발생 추이를 살펴보면 '79년의 사고 발생건수가 128건이던 것이 '96년에는 375건으로 293%가 증가하였으며 매년 발생건수가 증가하는 추세이다. 해역별로는 '79-'96년 사이는 1 KL이상 유출사고 185건중 남해동부권역에서 29%, 남해서부권역에서 19%로 남해권역이 48%, 서해권역이 27%, 동해권역이 25%로 어장분포가 많고 수산양식이 가장 활발한 남해지역에서 유류유출 사고가 가장 많이 발생하였다. 계절별로는 185건 중 44%가 여름에 발생하였으며, 겨울이 27%, 봄이 17%, 가을이 12%로 기상조건이 나쁜 여름과 겨울에 사고가 집중되었다(1).

해양에 유출된 유류는 물리적 성질(유류의 비중, 점성, 휘발성 등), 화학적 성질(유류의 성분) 기상상태(해양상태, 태양광선, 대

†Corresponding Author : Faculty of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University, 599-1 Daeyeon-Dong, Nam-Gu, Pusan 608-737, Korea.
Tel & Fax · 051-620-6181
E-mail kongjy@mail.pknu.ac.kr

기온도 등) 그리고 해수의 성상(유속, 온도, 박테리아, 용존산소, 부유물질 등) 등에 따라 변한다. 해상의 파고상태가 정상적일 경우, 자연적인 원유증발은 최초 6시간만에 20%, 72시간만에 29%가 증발되며, 경질유의 경우 온화한 기후조건에서 24시간 이내에 자연적으로 증발하는 것으로 알려져 있다. 그러나 대부분의 유출유는 원유 및 bunker C 유와 같은 난분해성 유류로 자연증발과 경시 변화가 느리기 때문에 저독성 찌꺼기는 해양생물을 질식시키고, 복사열을 흡수하여 이들에게 스트레스를 유발시키는 등 자연생태계를 파괴시킨다(1). 따라서 해양에 유류유출 사고가 발생하였을 때는 최대한 신속하게 그 피해를 줄일 수 있는 합리적인 유처리 방법이 필요한 실정이다.

현재 사용중인 유처리 방법에는 물리적 방법(유회수기, 오일펜스, 유흡착제 등)과 화학적 방법(화학유화제, 유응집제 등) 그리고 생물학적 방법(bioaugmentation, biofertilizer, biosurfactant)이 있다. 물리적 처리방법의 경우 유회수 능력에 많은 문제점이 제기되고 있으며, 화학적 방법의 경우 대부분이 화학합성유화제로서 독성과 2차오염을 유발시키며, 생분해능이 떨어져 해양생태계를 파괴하고 있는 실정이다(2-3). 따라서 본 연구에서는 생물학적 유처리방법을 개발하기 위하여 남해안 유류오염지역으로부터 유류분해세균의 지역별 분포를 조사하고 유류분해세균의 분리법을 확립한 후 생물유화제 생산을 위한 생육특성과 유류 분해특성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료 수집

국내 남해안 유류 오염 지역인 경남 통영, 거제도, 마산, 진해, 남해와 전남 여천, 여수, 고흥, 완도, 해남 등지의 해수를 채취하여 screening oil 배지(비멸균 해수, 50 mL; 비멸균 arabian light 원유, 0.5 g, yeast extract, 5.0 mg; K_2HPO_4, 0.5 mg; $(NH_4)_2SO_4$, 50 mg)에 50 mL 해수를 넣고 ice box에 보관한 상태로 실험실에 옮긴 후, 진탕배양기를 이용하여 25℃, 180 rpm으로 배양하였다(Figure 1).

Figure 1. Map of sampling stations in southern sea of Korea. **Kŏgedo :** 1, Kŏge bridge; 2. Changsungpo; 3, Hakdong; 4,Tappo; **Tongyong:** 5, Tonamdong; 6, Tala, 7, Samduck; 8, Tangdong, **Namhaedo :** 9, Changsŏndo; 10, Munm, 11, Mijo, 12. Tanghang, **Yosu :** 13, LG oil refinery; 14, Kukdong, 15, Tolsando; 16, Yŏchun-hang; **Kohung :** 17, Naenarodo, 18, Yaenarodo; 19, Ok-gang; 20, Toyang; **Wando :** 21, Shinjido; 22, Mangnam; 23, Passenger ship terminal, 24, Kugyedŭng, 25, Tang-in; **Haenam** : 26, Lands end; **Chindo :** 27, Kŭmgae, 28, Chupdo. 29, Chisan, 30, Nokjin

균주의 분리

채취한 시료는 7일간 배양한 후 가장 유류분해능이 우수한 플라스크를 선별하였다. 선별된 플라스크 배양액은 121℃에서 1.2 기압으로 10분간 가압멸균된 50 mL screening oil 배지에 2%(v/v) 접종한 후 3일간 배양하였으며, 3일 간격으로 2회 연속 반복 실험을 행하였다. 그 중 유류 분해능이 가장 우수한 배양액을 멸균된 인공해수(NaCl, 23.4 g; KCl, 0.7 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 10.6 g; $CaCl_2$, 1.1 g; Na_2SO_4 3.9 g; $NaHCO_3$, 0.2 g; $(NH_4)_2SO_4$, 1.0 g; K_2HPO_4, 0.01 g; Tris, 6.05 g; D.W, 1.0 L; pH 7.0)로서 희석한 후 희석액 0.1 mL를 1.3%(w/v) agar가 첨가된 변형된 해수배지(peptone, 5.0 g; yeast extract, 1.0 g; ferric citrate, 0.1 g; NH_4NO_3, 1.6 mg; Na_2HPO_4, 8.0 mg; agar, 0.13 g; sea water, 1.0 L; pH 7.0)에 도말 하였다 도말된 petridish는 25℃ 항온 배양기에서 24시간 배양하였으며, 이 petridish로부터 단일 colony를 분리하였다. 분리된 colony는 50 mL screening oil 배지에 접종하여 7일간 25℃, 180 rpm으로 진탕 배양하였으며, 그 중 유류분해능이 가장 우수한 균주를 선정하였다(Figure 2).

균주의 동정

유류분해능이 우수한 균주에 관한 동정은 먼저 그람염색을 통한 현미경상에서의 형태학적 관찰과 API 20NE kit를 이용한 생화학적 특성을 검사하였으며, 분리 균의 형태는 전자현미경(SEM, DSM940A, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

배지의 선정

생물유화제 생산 및 유류분해와 관련된 기본배지의 선정을 위하여 자연해수, 인공해수, basal salts 배지($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 g;

Sea water
↓
Culture of screening oil medium
↓
Incubation at 25℃, 180 rpm for 1 week
↓
Selection of oil dispersing flask
↓
Inoculation of 2% (v/v) mixed culture broth
in sterile screening oil medium
↓
Incubation at 25℃, 180 rpm for 3-days
↓
Serial transfer to fresh medium at 3-days interval
↓
Isolation of oil degradation bacteria in modified marine medium
↓
Inoculation of single colony in screening oil medium
↓
Incubation at 25℃, 180 rpm for 1 week
↓
Isolation of oil degrading bacteria

Figure 2. Isolation method of oil degrading marine bacterium.

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 g; KH_2PO_4, 1.0 g; K_2HPO_4, 0.5 g; $NaNO_3$ 2.0 g; $CaCl_2$, 0.01 g; KCl, 0.1 g; D.W., 1.0 L, pH 7.0), 3M 배지($MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.022 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.275 g; $NaNO_3$ 138 mg; $CaCl_2$, 2.8 mg; KCl, 55 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0825 mg; $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.0826 mg; H_3BO_3, 0.0165 mg, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.0083 mg, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.0083 mg; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.0055 mg; NaCl, 55 mg; H_3PO_4(ρ=1.71), 0.55 mL; D.W., 1.0 L; pH 7.0)(4)와 여기에 유기질소원인 변형된 해수배지, LB배지(tryptone, 10.0 g; yeast extract, 5.0 g; D.W., 1 L)를 각각 첨가하여 사용하였다. 기질로는 1%(w/v) n-hexadecane을 사용하였으며, 균 접종 량은 1%(v/v)로 48시간 동안 배양한 후 균성장과 유화활성도를 측정하였다. 균성장은 O.D. 660nm에서 흡광도를 측정하였으며, 유화활성도는 Rosenberg 방법(5)에 의하여 측정하였다.

유화활성도(Emulsifying activity)

n-Hexadecane을 기질로 하여 균주를 배양한 배양액을 원심분리(15,000g× 10 min)한 후, 배양상층액 1.25 mL에 n-hexadecane : 2-metylnaphtalene을 1:1로 혼합한 기질 0.05 mL와 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 3.7 mL를 넣고, 1분간 vortex로 강하게 교반하여 10분간 정치시킨 후 O.D. 620nm에서 흡광도를 측정하였다.

유화활성도 1 unit는 배양상층액 1.25 mL에 대한 유화흡광도 0.1을 1 unit로 환산하였으며, 흡광도 2.0 이상에서는 20mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 희석하여 사용하였다.

배양온도 및 시간

균 생육 및 생물유화제 생산에 영향을 미치는 배양온도 및 최적배양시간을 조사하기 위하여, 각 온도별(25℃, 30℃, 37℃)로 180 rpm에서 배양하였으며, 4시간별로 sampling하여 균 성장은 UV/VIS spectrophotometer(Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech Co, Sweden)로 O.D. 660nm에서 흡광도를 측정하였으며, 생물유화제 생산은 유화활성도로서 측정하였다.

초기 pH의 영향

균 생육 및 생물유화제의 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 기본 배지의 pH를 2N-HCl 및 2N-NaOH로 pH 3.0~10.0까지 조제하였고, 25℃에서 180 rpm으로 48시간 배양한 후 균 성장과 유화활성도를 측정하였다.

NaCl 농도의 영향

NaCl 농도가 균성장 및 생물유화제 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 변형된 LB 배지에 NaCl 농도를 0~9%(w/v)까지 넣고 균체를 48시간 배양한 후 균성장과 유화활성도를 측정하였다.

난 분해성 유류의 분해 특성

유류분해능이 우수한 균주를 이용하여 난분해성 유류인 arabian light 원유와bunker C oil을 쌍용정유로부터 구입하였으며, 변형된 LB 배지에 각각 1%(w/v)씩 첨가하여 배양한 후 유류분해 특성을 조사하였다.

(1) Gas chromatography법을 이용한 유류분해 특성(6)

1%(w/v) arabian light 원유가 첨가된 멸균된 변형된 LB배지(50 mL를 250 mL 삼각플라스크에 넣은 후 14시간 전 배양된 배양액을 1%(v/v) 접종하고, 25℃에서 180 rpm으로 진탕 배양하여, 배양시간별(24, 48, 72시간)로 하나씩 플라스크를 회수하였다. 회수한 배양액은 50 mL n-hexane을 첨가하여 잔존 유류를 추출하였으며, 추출시료는 무수 Na_2SO_4를 첨가하여 수분을 제거한 후, gas chromatography (Hewlett Packard 5890 series II)로 분석하였으며, 표준물질로는 Sigma Co.(USA)로부터 구입한 gas chromatography용 hydrocarbons(saturated)을 사용하였다

분석에 사용된 column은 HP-5(crosslinked 5% ph-Me silicone, 내경, 0.32 mm, 박막, 0.25 μm ; 길이, 30 m; phase ratio, 320)로 시료량은 1 μL를 사용하였다. 이동상으로 N_2 가스를 사용하였으며 column에 전달되는 이동상의 분배 비는 100:1로 하였고 검출기는 불꽃이온화 검출기(FID)를 사용, 공기와 H_2 가스는 30 psi, 20 psi로 흘려주었다 시료분석을 위하여 injector 및 detector 온도는 150℃와 320℃로 하였으며 column oven의 초기온도는 80℃로 3 분간 등온시킨 후, 분당 4℃씩 215℃까지 승온시켜 분석하였다.

(2) Gravimetric 법(7)

250 mL 삼각플라스크에 1%(w/v) arabian light 원유와 bunker C oil이 첨가된 멸균된 변형된 LB 배지(tryptone, 10.0 g; yeast extract, 5.0 g; basal salts 배지, 1 L; pH 7.0) 50 mL를 넣은 후 14시간 전 배양된 배양액을 1%(v/v) 접종하고 25℃에서 180 rpm으로 진탕 배양하였다. 유류의 생분해능을 조사하기 위하여 배양시간별(24, 48, 72시간)로 50 mL 배양액이 든 250 mL 삼각플라스크를 회수하였다. 회수된 삼각플라스크에 50 mL benzene을 가한 후 잔존유류를 추출하였으며, 무수 Na_2SO_4으로 수분을 제거하여 정량분석에 이용하였다.

측정에 사용된 용기는 먼저 100℃ 건조기에서 1시간 건조시켰으며, 0.1 mg까지 정량이 가능한 저울로서 측정하였다. 수분이 제거된 benzene 추출물은 80℃ 항온건조기에서 6시간 동안 건조시켜 잔류오일량을 측정하였다.

$$\textit{Biodegradation of oil} = \frac{\textit{mg of oil (control)} - \textit{mg of oil (test)}}{\textit{mg of oil (control)}} \times 100$$

탄화수소에 대한 세포부착능

변형된 LB배지에 각종 탄소원(arabian light 원유, kuwait 원유, bunker C 유, n-paraffine, n-hexadecane, n-tetradecane, oleic acid, olive acid, lecithin, arabinose, trehalose, dextrose, galactose, lactose, fructose, sucrose)을 기질로 1%(w/v) 첨가하여 48시간 배양한 후, 세포부착능을 Rosenberg 방법으로 측정하였다(8). 배양액으로부터 원심분리(10,000g × 10 min, at 4℃)하여 얻은 균체를 PUM buffer(22.2 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 7.26 g KH_2PO_4, 1.8 g urea, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$/ L, pH 7.0)로 2회 세척하고 다시 PUM buffer로 녹인 후, 400nm에서 초기 흡광도를 약 1.5로 맞추었다. 1%(v/v) n-hexadecane이 첨가된 2 mL 세균 혼탁용액을 10분간 25℃ 항온배양기에 방치한 후 1 분간 강하게 vortex하여 15분간 실온에 방치하여 400nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 oil/water의 계면에 부착된 세포를 현미경으로 관찰하였다. Arabian light 원유를 기질로 하여 25℃, 180 rpm으로 48시간 배

양한 배양액을 1방울 slide glass에 적하시킨 후 광학 현미경(×400)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

유류분해 세균의 분리

남해안 유류오염지역 등 남해안 30여 곳의 지역 해수를 채취하여 screening oil 배지에 넣고 25℃, 180 rpm으로 1주일간 배양한 결과 모든 지역의 해수로부터 arabian light 원유가 분해되었다. 따라서, 남해안 전지역에는 유류분해 세균이 고르게 분포되어 있는 것으로 확인되었으며, 이러한 세균들에 의해 유출유가 자연 정화되는 것으로 나타났다(Table 1).

특히, 배양 2일 만에 arabian light 원유가 완전히 분해된 지역(경남 통영의 도남항, 거제도 장승포, 전남 여수 국동항)의 해수로부터 유류 분해세균을 분리하였으며, 그들 지역의 해수로부터 각각 10 균주씩 분리하였다. 분리된 colony는 screening oil 배지에 접종하여 7일간 배양하여 유류분해능이 뛰어난 균주를 선별하였으며, 배양 2일 만에 arabian light 원유를 완전히 분해시킨 BYK-2 균주를 분리하였다(Table 2). 균주의 보관을 위하여 분리된 BYK-2 균주는 변형된 해수배지에서 18시간 배양한 후 그 배양액 800 μL에 glycerol 200 μL를 넣고 혼합하여 -75℃ 초저온냉동고에 보관하여 사용하였다

Table 1. Distribution of oil-degrading bacteria in southern sea of Korea

Number		Stations	Oil degradability
1	**Kŏgedo**	Kŏge bridge	++
2		**Changsungpo**	+++
3		Hakdong	++
4		Tappo	++
5	**Tongyong**	**Tonamdong**	+++
6		Tala	++
7		Samduck	++
8		Tangdong	++
9	**Namhaedo**	Changsŏndo	++
10		Murim	++
11		Mijo	++
12		Tanghang	++
13	**Yosu**	LG oil refinery	++
14		**Kukdong**	+++
15		Tolsando	++
16		Yŏchŏnhang	++
17	**Kohung**	Naenarodo	++
18		Yaenarodo	++
19		Okgang	++
20		Toyang	++
21	**Wando**	Shinjido	−−
22		Mangnam	−−
23		Passenger ship terminal	++
24		Kugyedŭng	++
25		Tang-in	++
26	**Haenam**	Lands end	++
27	**Chindo**	Kŭmgae	++
28		Chupdo	++
29		Chisan	++
30		Nokjin	++

+++, Profuse growth; ++, moderate growth; +, a little growth as evidenced by turbidity, −, no growth

분리된 균주의 동정

분리된 BYK-2 균주의 각종 형태, 생리, 생화학적 특성을 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다 분리된 균주는 그람 음성이고, 운동성을 가지며, rod type으로 cell size는 1.4~1.7 μm, catalase, oxidase는 양성반응을 나타내었다(Figure 3). 그 외 여러 가지 특징들을 Bergey's mannual of systematic bacteriology를 근거로 조사한 결과, 신뢰도 96%의 *Pseudomonas aeruginosa*로 동정되어 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2로 명명하였다

Table 2. Oil-degrading capabilities of isolated strains from southern sea of Korea(Kŏge Changsungpo. Tongyong Tonamdong. and Yosu Kukdong)

Strain number	Stations		
	Kŏge Changsungpo	Tongyong Tonamdong	Yosu Kukdong
1	+	+	−
2	−	++	+++
3	+	++	+
4	++	+	−
5	−	−	+
6	−	−	+
7	++	+	++
8	−	−	+
9	++	+	+
10	−	++	++

+++, Profuse growth; ++, moderate growth; +, a little growth as evidenced by turbidity, −, no growth.

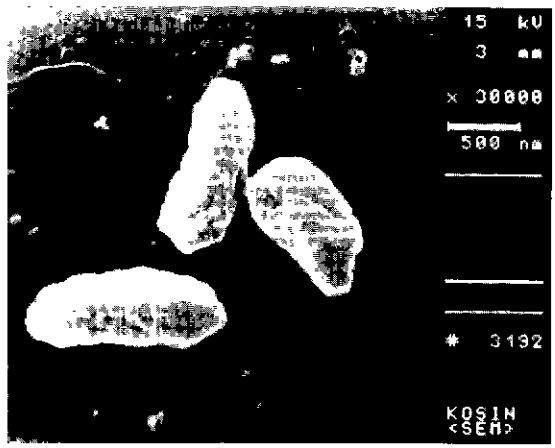

Figure 3. Scanning electron microscopy of *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (original magnification approximately ×30,000)

Table 3. Morphological and biochemical characteristics of marine bacterium *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2

Characteristics	Results
Gram stain	(−)
Cell size	1.4~1.7㎛
Morphology of colony	Rod
Oxidase	−
Rhamnose	−
N-acetylglucosamine	+
D-ribose	+
Inositol	−
Sucrose	−
Maltose	−
Itaconate	+
Suberate	−
Malonate	+
Acetate	+
D,L-lactate	+
L-alanine	+
5-ketogluconate	−
Glycogen	−
3-hydroxy-benzoate	+
L-serine	+
Mannitol	+
D-glucose	+
Salicine	−
D-melibiose	−
L-fucose	−
D-sorbitol	−
L-arabinose	−
Propionate	+
Caprate	+
Valerate	+
Citrate	+
Histidine	+
2-ketogluconate	+
3-hydroxy-butyhate	+
p-4-hydroxy-benzonate	+
L-proline	+

배지의 선정

생물유화제 생산을 위한 최적 배지를 선정하기 위하여 1%(w/v) n-hexadecane을 기질로 넣고, 48시간 동안 자연해수, 인공해수, basal salts 배지, 3M 배지, 변형된 해수배지 그리고 변형된 LB배지 등에서 배양한 결과 변형된 LB배지를 이용하여 배양하였을때 유화활성도가 111.4 unit로 가장 높게 나왔다. 유화활성도가 높은 것은 생물유화제의 생산이 많다는 것을 의미하는 것으로 이후 실험에서는 변형된 LB배지를 사용하여 각종 실험을 행하였다(Table 4).

Table 4. Selection of optimal culture medium of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(incubation for 48h at 25℃)

Medium	Cell growth (O.D.660nm)	Emulsifying activity(Unit)
A	0.15	4.4
AL	6.85	15.4
AM	3.60	4.4
B	0.15	4.0
BL	6.81	47.7
BM	3.26	5.7
C	0.17	5.7
CL	7.45	111.4
CM	2.52	8.2
D	0.15	2.3
DL	8.04	40.9
DM	1.89	22.1

A, Natural sea water(NSW); AL, NSW+LB(Luria broth); AM, NSW+Modified marine medium(MMM), B, Artificial sea water(ASW); BL, ASW+LB, BM, ASW+MMM; C, Basal salts medium(BSM); CL, BSM+LB; CM, BSM+MMM; D, 3M; DL, 3M+LB; DM, 3M+MMM

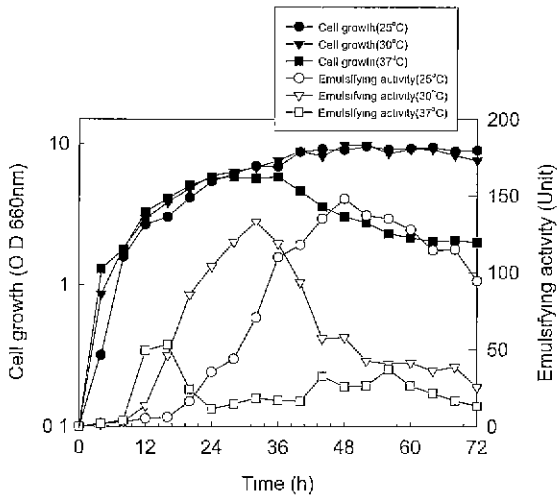

Figure 4. Effect of temperature on the cell growth and biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2.

최적배양온도 및 배양시간

배양온도에 따른 생물유화제 생산은 배양상층액의 유화활성도를 기준으로 측정하였으며, 온도는 25℃, 30℃, 37℃에서 각각 실험을 행하였다. 25℃에서 배양한 결과 유화활성도 및 최적배양 시간은 148 unit와 48시간이었으며, 30℃에서는 133 unit와 32시간, 37℃에서는 53.3 unit와 16시간이었다 따라서 최적배양온도 및 시간은 25 ℃, 48시간으로 확인되었으며, 이때 유화활성도는 148 unit로 이전 실험에서 얻은 111.4 unit의 유화활성도보다 36.6 unit가 높게 나왔다. 이것은 본 실험에 사용된 플라스크가 이전 실험에 사용된 250 mL 삼각플라스크 보다 4배 scale up된 1 L 삼각플라스크에 200 mL 배지를 넣고 배양한 결과에 따른 것으로 보여진다(Figure 4).

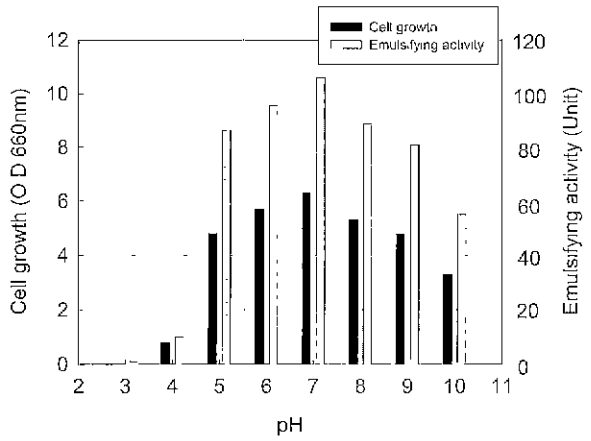

Figure 5. Effect of pH on the cell growth and biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (incubation for 48h) Each medium containing 1%(w/v) n-hexadecane

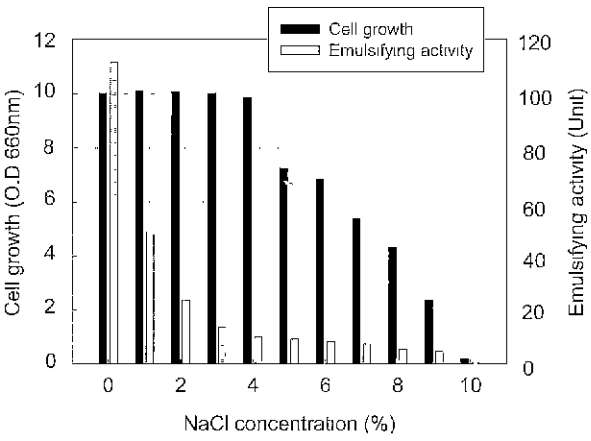

Figure 6. Effect of NaCl concentration on the cell growth and biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 (incubation for 48h) Each medium containing 1%(w/v) n-hexadecane.

초기 pH의 영향

생물유화제 최적생산 pH를 구하기 위하여 pH범위를 3.0~10.0까지 조정하여 48시간 배양하였다 균성장 및 생물유화제 생산에 영향을 미치는 최적 초기 pH는 7.0으로서 중성영역에서 가장 높은 활성을 나타냈으며, pH 5.0미만의 범위에서는 균성장 및 유화활성도가 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다(Figure 5).

NaCl 농도에 대한 영향

일반적으로 토양에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa*는 6.5% 이상의 NaCl농도에서는 균이 전혀 성장하지 않는 것으로 보고되고 있으나(9), 해양에서 분리한 본 균주의 경우 0~9%(w/v) 범위에서 균체가 성장하였으며, 생물유화제도 생산하였다. 생물유화제 생산과 관련해서는 NaCl을 전혀 첨가하지 않았을 때 균성장과 유화활성이 가장 높았으며, NaCl의 농도가 높아질수록 균성장과 유화활성이 감소됨을 알 수 있었다(Figure 6).

배양시간에 따른 난분해성 유류의 생분해 특성

난분해성 유류인 arabian light 원유와 황함량이 1.6%인 bunker C oil을 쌍용정유로부터 구입하였다. Arabian light 원유와 bunker C oil의 구성성분을 살펴보면, arabian light 원유에는

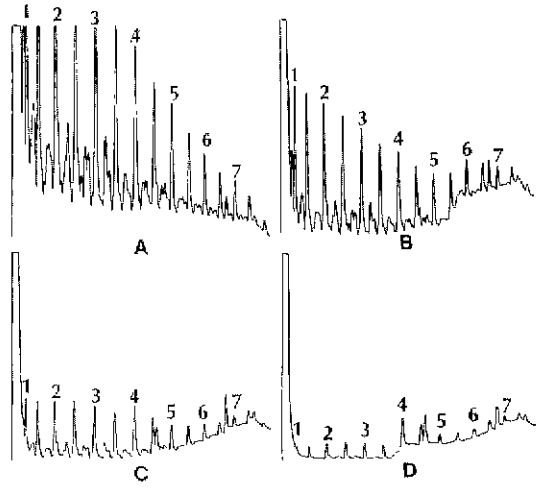

Figure 7. Gas chromatographic analysis of residual oil from sequential utilization of 2%(w/v) arabian light crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 A, saturated fraction of sterile control arabian light crude oil, B, residual oil after 24h of incubation, C, residual oil after 48h of incubation; D, residual oil after 72h of incubation (1, $_nC_{12}$, 2, $_nC_{14}$, 3, $_nC_{16}$, 4, $_nC_{18}$, 5, $_nC_{20}$, 6, $_nC_{22}$, 7, $_nC_{24}$)

saturates(61%), aromatics(33%), resin(4%), asphaltene(2%)를 함유하고 있는 것으로 보고되고 있으며(11), bunker C oil의 경우 비중이 0.8~0.97로서, 황함량 1~3.5%, saturate(34%), aromatics (38%), polar compound(19%), asphaltenes(3-9%), waxes(4-5%) 함유하는 것으로 보고되고 있다(2) 본 실험에서는 난분해 유류인 arabian light 원유와 bunker C oil을 기질로 이용하여 배양 시간에 따른 유류의 생분해능을 측정하였다 측정방법으로는 gas chromatography 법과 gravimetric 법을 사용하였다. 먼저 gas chromatography를 이용하여 원유속의 61%를 차지하고 있는 paraffine계 탄화수소(saturates)를 분석하였다. 분석을 위한 시료의 전처리 방법으로는 배양중인 배양액으로부터 paraffine계 탄화수소를 배양시간별 (24h, 48h, 72h)로 sampling하여 n-hexane으로 추출하였으며(11), 배양 후 72시간 동안 기질로 사용된 paraffine계 탄화수소의 carbon chain이 $_nC_{12}$에서 $_nC_{22}$까지 거의 대부분 분해되었다(Figure 7) 또한 arabian light 원유와 bunker C oil의 전체구성 성분에 대한 생분해능을 조사하기 위하여 1%(v/v) 유류를 배지에 첨가하여 7일간 배양하였다. Arabian light 원유의 경우 배양 후 1일부터 분해가 되기 시작하여 32.5%(w/w)가 분해되었으며, 배양 2일째는 71.4%(w/w)가 분해되었다. 이 시기는 균이 본격적으로 기질로서 원유를 이용하는 시점으로 보여지며, 이때 gas chromatography를 한 결과에서 보듯이 기질로 이용하기 쉬운 saturates를 우선적으로 분해하는 것으로 나타났다. 배양 7일째에는 92.1%(w/w)의 원유가 분해되는데, 92.1%(w/w) 생분해율은 원유 구성성분 중 saturates 뿐만 아니라 난분해성인 aromatics, resin asphalten 등도 분해되는 것으로 추정된다(Figure 8) 난분해성 유류인 bunker C oil의 경우에는 배양 후 3일째 43.6%(w/w)의 생분해율을 나타내었으며, 이때에 saturates는 거의 대부분 분해되는 것으로 보여진다 배양 7일째에는 76.2%(w/w)가 생분해되었으며, 이 분해율의 경우도 arabian light 원유처럼, 난분해성 aromatics와 asphaltenes, polar compound, wax 등을 일부 분해하는 것으로 추정된다(Figure 9)

특히, 난분해성 유류인 bunker C 유에 대한 생분해능의 경우,

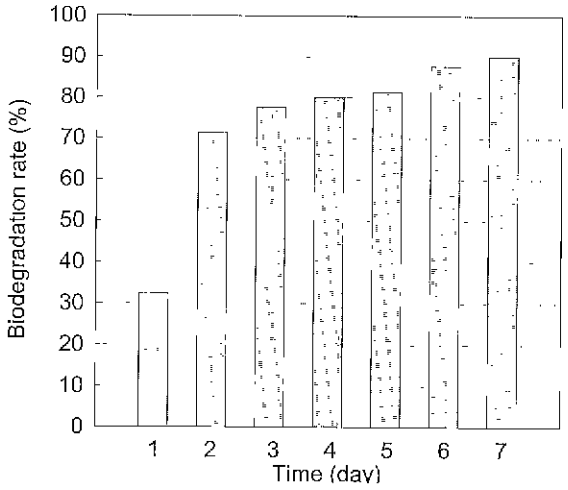

Figure 8. Biodegradation of 1%(w/v) arabian light crude oil in the culture broth of *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(incubation for 7days)

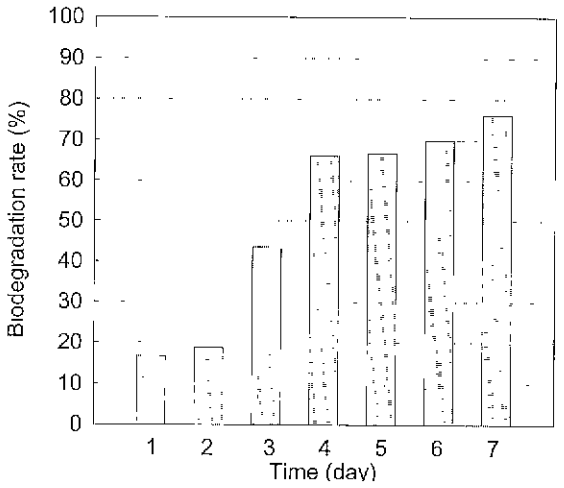

Figure 9. Biodegradation of 1%(w/v) bunker C oil in the culture broth of *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2(incubation for 7days)

Mulkins-Phillips 등(8)이 MA13 혼합균주를 이용하여 0.125% (w/v) bunker C 유를 기질로 7일간 배양하여 얻은 85%의 생분해율과 비교해보면, 본 균주의 경우 생분해율이 MA13 혼합균주를 이용하여 배양했을 때 보다 8.8% 가량 떨어지나, 기질사용량이 본 균주가 8배 많은 점을 감안하면, 같은 기간 내 bunker C 유의 생분해능은 본 균주가 더 우수한 것으로 보여진다.

Hydrocarbon에 대한 세포부착능

탄소기질별로 48시간 배양된 배양액을 원심분리하여 균체를 회수한 후, 탄화수소에 대한 세포부착능을 측정하였다. 그 결과 탄화수소화합물들(arabian light 원유, kuwait 원유, bunker C oil, n-paraffine, n-hexadecane, n-tetradecane)을 기질로 했을 경우 80% 이상의 높은 세포부착능을 나타냈으며, 지방산들(oleic acid, olive oil, lecithin) 가운데는 lecithin을 기질로 배양했을 때 91.5%로 가장 높은 세포부착능을 나타내었다. 당류들(arabinose, trehalose, dextrose, galactose, lactose, fructose, maltose, sorbitol, sucrose)은 arabinose, galactose, sorbitol, sucrose를 제외하고는 모두 70%이하의 세포부착능을 나타냈다(Figure 10). 탄화수소류에서 공통적으로 세포부착능이 높게 나타나는 것은 세포부착능 측정 이전에 이미 균체가 기질로 사용된 탄소원에 의해 induce된 결과에 의한 것으로 보여진다. 또한 oil/water의 계면에 부착된 세포를 400배 광학현미경으로써 관찰하였다(Figure 11) 둥근 모양의 큰 입자는 arabian light 원유가 생물유화제에 의해 잘게 부서져 있는 모습이며, 점모양은 균체가 arabian light 원유에 부착되어 있는 모습을 보여주고 있다. Koch 등(12)이 *Pseudomonaas aeruginosa* mutant를 모델로 제시한 이론에 의하면, 유류분해 세균은 탄화수소를 기질로 이용할 경우 세포내에서 합성된 생물유화제를 세포막을 통해 세포밖으로 내보낸 후 세포밖의 alkane과 aggregation되어 수용성 alkane 형태로 세포내로 확산되거나 능동적 수송형태로 받아들이게 된다. 이것을 탄소원으로 다시 생물유화제를 합성하여 세포 밖으로 내보내는 기작을 반복하면서 유류를 분해하고 생물유화제를 생산하는 것으로 보고하고 있다 따라서 본 균주의 경우도 같은 *Pseudomonas aeruginosa* 계열 균주로서 생물유화제를 생산하면서 기질로 사용된 원유가 배양시간에 따라 계속 감소하는 것으로 보아 Koch 등(12)이 제시한 oil uptake 모델과 유사한 기작에 의하여 원유분해와 생물유화제의 생산이 이루어지는 것으로 보여진다.

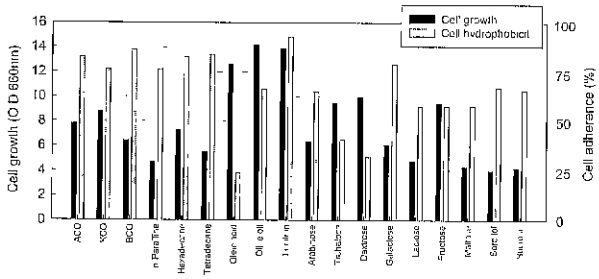

Figure 10. Comparison of cell adherence on the various carbon source by *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2. ACO, arabian light crude oil· KCO, kuwait crude oil, BCO, bunker C oil

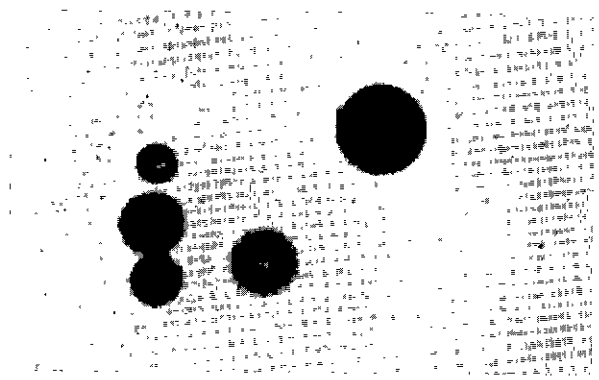

Figure 11. *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2 biosurfactant producing microbes, aggregation around arabian light crude oil droplets(approx 400× magnification).

요 약

남해안 유류 오염지역으로부터 유류분해능이 우수한 균주를 선별하여 동정한 결과*Pseudomonas aeruginosa*로 동정되었으며, *Pseudomonas aeruginosa* BYK-2로 명명하였다. 균 성장 및 생물

유화제 생산을 위한 최적배양온도, 시간, pH, NaCl 농도는 각각 25℃, 48시간, 7.0이었으며, NaCl은 첨가하지 않았을 때 가장 많은 양의 생물유화제가 생산되었다. 본 균주의 경우, 1%(w/v) arabian light 원유와 bunker C oil을 기질로 7일간 배양한 결과 92.1%(w/w)와 76.2%(w/w)가 생분해되었다. n-hexadecane에 대한 세포부착능의 실험에서는 탄화수소화합물들(arabian light 원유, kuwait 원유, bunker C 유, n-paraffine, n-hexadecane, n-tetradecane)을 기질로 배양했을때는 모두 80% 이상의 높은 세포부착능을 나타냈으며, 지방산들(oleic acid, olive oil, lecithin)중에는 lecithin을 기질로 배양했을 때 91.5%로 가장 높은 세포부착능을 나타내었다. 또한 당들(arabinose, trehalose, dextrose, galactose, lactose, fructose, maltose, sorbitol, sucrose)을 기질로 했을 경우 arabinose, galactose, sorbitol, sucrose를 제외하고는 대부분 70%이하의 세포부착능을 나타냈다

감 사

본 연구는 1999년도 동명대학 학술연구조성비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Kim, H. J.(1999), Characterization of biosurfactant produced by marine bacterium *pseudomonas aeruginosa* BYK-2, Ph. D. Dissertation, Dept. of Biotechnology and Bioengineering, Pukyung National University, Pusan.
2. Zajic, J. E. and B. Supplisson (1972), Emulsification and degradation of "Bunker-C" fuel oil by microorganisms, *Biotechnol. Bioeng.* **14**, 331-343.
3. Georgiou, G., S. C. Lin, and M. M Sharma (1990)., Surface active compounds from microorganisms, *Bio/Technology*, **10**, 60-65.
4. Guerra-Santos, L. H., O Kappeli, and A. Fiechter (1984), *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source, *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 301-305.
5. Rosenberg, M. A. Bayer, J. Delarea, and E. Rosenberg (1982), Role of thin fimbriae in adherence and growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane, *Appl. Environ. Microbiol.* **44**(4), 929-937.
6. Kim, H. J., B. J. Kim, S. H. Hwang, J. D. Kim, H W. Lee, and J. Y. Kong(1997), Degradation of crude oil and purification of biosurfactant from marine bacterium Aeromonas sp BES-74, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **12**(4), 443-448
7. Mulkins-phillips, G. J., and J. E. Stewart (1974), Effects of environmental parameters on bacterial degradation of bunker C oil, crude oils, and hydrocarbons, *Appl. Microbiol.* **28(6)**, 915-922.
8. Rosenberg, E. A. Zuckerberg, C. Rubinovitz, and D. L. Gutnick (1979), Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1 : Isolation and emulsifying properties, *Appl. Environ. Microbiol.* **37**(3), 402-408.
9. Kang, S. M, D. W. Kim, and H. J. Kim (1994), Isolation of biosurfactant producing *P. aeruginosa* kk-7 and the biosurfactant production, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22(1)**, 92-98
10. Hirayama, 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.
11. Venkateswaran, K., and S. Harayama (1995), Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation exhibiting enhanced biodegradation of crude oil, *Can J. Microbiol.* **41**, 767-775.
12. Koch, A. K, O. Kappeli, A Fiechter, and J. Reiser (1991), Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants, *J. bacteriol.* **173(13)**, 4212-4219