

유류오염 토양에서 분리한 *Acinetobacter* sp. 2-3A의 유화활성

임지현 · 정성윤*

국립수산과학원 수산공학과, *대구가톨릭대학교 의생명과학과
(2009년 6월 21일 접수; 2009년 7월 13일 수정; 2009년 7월 24일 채택)

Emulsification Activity of *Acinetobacter* sp. 2-3A Isolated from Petroleum Oil-Contaminated Soil

Ji-Hyun Lim and Seong-Yun Jeong*

Fisheries Engineering Division, NFRDI, Busan 619-902, Korea

*Department of Medical Life Science, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea

(Manuscript received 21 June, 2009; revised 13 July, 2009; accepted 24 July, 2009)

Abstract

Fifty hydrocarbon-metabolizing microorganisms were isolated from soil samples polluted by the petroleum oils in Gamman-dong, Busan. Among them, strain 2-3A, showing strong emulsification activity, was selected by oil film-collapsing method. This bacterium was identified as *Acinetobacter* sp. and designated as *Acinetobacter* sp. 2-3A. The optimum temperature and pH on the growth of *Acinetobacter* sp. 2-3A were 25°C and pH 7.0, respectively. The carbon and nitrogen sources for the most effective emulsification activity were 3.0% olive oil and 0.5% peptone, respectively. The 0.15% potassium phosphate was the most effective emulsification activity as a phosphate source. The optimum emulsification activity condition was 20°C, pH 7.0, and 2.0% NaCl. The optimum time for the best production of biosurfactant was 27 hrs. The emulsification stability was maintained at the temperature range from 4°C to 100°C, pH range from 6.0 to 10.0, and NaCl range from 0% to 10%. For the oil resolvability of the biosurfactant, the residual oils were investigated by gas chromatography. As a result, it was verified that the biosurfactant decreased and decomposed crude oils from nC_{10} to nC_{32} .

Key Words : *Acinetobacter* sp., Biosurfactant, Emulsification activity, Oil-contaminated soil, Oil-degradation

1. 서 론

산업화에 따른 유류소비의 증가와 2007년 ‘태안 원유유출사고’와 같은 대규모 유류오염사고 등에

의해 토양으로 유류가 유입되면 심각한 환경오염을 유발하게 된다. 토양이 유류오염에 노출되면 자연 상태에서 스스로 정화하는데 수십 년이 걸린다.

오염토양을 복원하는 방법에는 크게 물리화학적 방법과 생물학적 방법으로 나눌 수 있다. 물리화학적 방법에는 토양 증기추출법, 토양 세척법, 소각, 열분해, 고형화 안정화법, 화학유화제법 등이 있고, 생물학적 방법에는 bioaugmentation (외부미생물의

Corresponding Author : Seong-Yun Jeong, Department of Medical Life Science, Catholic University of Daegu, Gyeongbuk 712-702, Korea
Phone: +82-53-850-3772
E-mail: jsymicro@cu.ac.kr

공급), biofertilizer, biopile, bioreactor, bioremediation, biostimulation (영양분 및 전자수용체의 공급), land-farming, phytoremediation 등이 있다^{1,2}). 물리적 처리 방법의 경우 많은 비용이 소요되고 유희수 능력에 많은 문제점이 제기되고 있으며, 화학적 방법의 경우 대부분이 화학합성 유화제로 인한 독성과 2차 오염을 유발시키며, 생분해능이 떨어지는 단점이 있다³). 생물학적 방법은 자연환경으로부터 분리한 균주를 이용하여 유출유 처리에 응용하기 때문에 생태계 보호는 물론 무독성 등의 친환경적 장점이 있어 1970년대부터 연구가 활발히 진행되고 있다.

미생물은 토양생태계에서 유기물의 분해, 영양소 순환 및 토양의 입단화 등에 관여하고 있다. 실제로 Exxon Valdez호의 유류유출 사고 시 Alaska 해안의 자갈이나 모래를 오염시킨 상당량의 hydrocarbon을 *Pseudomonas aeruginosa* 등을 이용하여 제거한 예가 있다⁴). 지금까지 알려진 난분해성 유류분해 미생물로는 *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Corollospora*, *Corynebacterium*, *Dendryphiella*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Norcardia*, *Pseudomonas* 속 등이 보고되어 있다⁵⁻⁷). 이와 같이 유류오염 토양을 정화하는데 있어 생물학적 복원기술은 경제적이고 친환경적인 기술로서 적용가능성이 매우 높으며, 실제로 유류오염 토양복원에 성공적으로 적용되고 있는 기술이다⁸). 특히 유류오염 토양을 정화하는 과정에서 유류오염물질을 분해하는 토착 미생물의 생분해 활성이 bioremediation 과정에서 매우 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다⁹).

본 연구는 유류오염 토양에서 분리한 유류분해 미생물 중 유화활성(emulsification activity)이 뛰어난 *Acinetobacter* sp. 2-3A를 분리, 동정하고 최적 성장조건, 이 균주가 생산하는 생물계면활성제(biosurfactant)의 유화활성과 안정성 등에 대해 조사한 결과이다.

2. 재료 및 방법

2.1. 유류분해 미생물의 분리

부산 감만동의 유류오염 토양을 채취하여 멸균한 0.85% 생리식염수에 십진법으로 희석하여 원유(arabian light crude oil)를 유일한 탄소원으로 함유한 탄화수소용 배지((NH₄)₂SO₄ 0.3%, Na₂HPO₄ 0.332%, KH₂PO₄ 0.083%, MgSO₄ · 7H₂O 0.04%, MnCl₂ ·

2H₂O 0.0002%, CaCl₂ · 2H₂O 0.0002%, crude oil 2.0%)에 도말, 접종한 후 30℃에서 48시간 배양하여 유류분해 균주를 1차 선별하였다. 상기 탄화수소용 배지에 분리균주들을 접종하여 25℃, 150 rpm에서 진탕 배양하면서 16일 동안 시간에 따른 균주별 증식 정도를 분광광도계(Shimadzu, UV-160)로 흡광도(640 nm)를 조사하여 분해능이 우수한 균주를 2차로 선별하였다. 이들 균주를 다시 탄화수소용 배지에 4일간 진탕배양한 후 oil film-collapsing assay¹⁰)를 이용하여 배양액의 oil film-collapsing 활성을 측정하여 분해능을 확인하였다. 즉, petri-dish에 증류수 5 ml를 넣고, 그 위에 원유 20 μl를 떨어뜨려 oil film이 형성되면 배양액 5 μl를 oil film 중앙에 떨어뜨려 형성된 clear halo의 지름을 측정하였다.

2.2. 균주의 동정

유류분해 활성이 가장 뛰어난 2-3A 균주의 생화학적 검사는 Vitek Systems (BioMerieux, VITEC & VIDAS)를 이용하였으며, MacFaddin¹¹)과 Gerhardt 등¹²)의 방법을 참고하여 형태학적, 생화학적 특성을 조사하여 1차적으로 분류학적 유사성을 검토하였다.

또한 보다 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene을 이용한 sequencing을 행하였다¹³). AccuPrep™ Genomic DNA extraction kit (Bioneer)를 사용하여 total genomic DNA를 추출하여 template로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 증폭에 이용된 primer들은 Table 1과 같다. 이때 forward primer의 5'에는 제한효소 *EcoRI*의 인식부위를, reverse primer의 5'에는 *BamHI*의 인식부위를 첨가하였다. PCR 반응은 AccuPower PCR Premix (Bioneer)를 사용하여 Minicycler (MJ Research, USA)로 PCR 반응을 실시하였다. 먼저 94℃에서 5분간 변성시킨 후, 94℃에서 1분, 61℃에서 1분, 72℃에서 1분씩 30회 반복하여 DNA를 증폭시키고, 마지막으로 72℃에서 5분간 extension시켜 PCR 반응을 종결시켰다. 정제된 16S rDNA의 PCR 반응물을 pGEM-T vector (Promega)에 ligation시켜 반응물을 미리 준비한 200 μl의 XL1-blue competent cell에 transformation 시킨 후 alkaline lysis mini-prep 방법¹⁴)으로 plasmid를 mini-prep하였다. 이와 같이 16S rDNA 분석을 통하여 염기서열을 결정한 후, National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 GenBank 데이터베이스에서 가장 상동성이 높은

Table 1. Oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence	Description
16S rRNA-F	5'-AGAATICTNANACATGCAAGTCGAICG-3'	Forward primer for PCR
16S rRNA-R	5'-GTGGATCCGGYTACCTTGTACGACTT-3'	Reverse primer for PCR
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	Sequencing
SP6	5'-ATTAGGTGACACTATAGAAT-3'	Sequencing

N: degenerate including 4 nucleotides

Y: degenerate including pyrimidines

균주들과 염기서열을 비교하였으며, MEGA 2.1 package¹⁵⁾를 이용하여 계통도를 그렸다.

2.3. 유류분해 균주의 최적 성장조건

분리균주 2-3A의 최적 성장조건을 조사하기 위하여 온도, NaCl 농도 및 초기 pH에 따른 성장을 측정하였다. 즉, 4°C~42°C, pH를 2~10, NaCl 농도를 0~10%로 각각 조정후, 25°C에서 150 rpm으로 24시간 진탕 배양하였다. 균주의 증식은 분광광도계(Shimadzu, UV-160)로 흡광도(640 nm)를 측정하였다.

2.4. 생물계면활성제의 추출 및 유화활성 측정

생물계면활성제(biosurfactant)를 추출하기 위하여 전 배양한 용액을 LB broth (tryptone 1.0%, yeast extract 0.5%, sodium chloride 1.0%)에 재접종하여 25°C, 150 rpm에서 진탕배양하였다. 배양용액을 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 균체를 제거한 상등액에 진한 염산을 서서히 가하면서, pH 2.0으로 조정하여 4°C에서 하룻밤 방치하여 생물계면활성제를 침전시켰다. 침전된 생물계면활성제를 원심분리(13,000 rpm, 20 min, 4°C)하여 침전물을 회수하고, 알칼리성 수용액(pH 8.0, NaOH)에 용해하여 동결건조 시켰다. 건조된 물질을 메탄올로 3회 추출한 다음 evaporator를 이용하여 농축한 것을 생물계면활성제로 사용하였다.

유화활성(emulsification activity) 측정은 Rosenberg 등¹⁶⁾의 방법을 변형하여 사용하였다. 0.01 M MgSO₄ · 7H₂O를 함유하고 있는 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 7.5 ml에 유화기질인 n-hexadecane 0.1 ml를 혼합한 후, 상기 생물계면활성제 0.2 ml를 넣고 1분간 vortex하여 유화시킨다. 10분간 정치시킨 뒤, 액의 하층부에서 1 ml를 뽑아내어 분광광도계(Shimadzu, UV-160)로 흡광도(540 nm)를 측정하여 유화활성을

측정하였다.

2.5. 유화활성 최적조건

2-3A 균주의 유화활성 최적조건을 조사하기 위해 배양온도, 초기 pH, NaCl 농도, 탄소원, 질소원, 인산염의 영향을 조사하였다. LB broth에 one colony를 접종하여 25°C, 150 rpm으로 24시간 배양한 전배양액으로 실험을 행하였다. 먼저 유화활성 최적 생산 온도를 측정하기 위해 상기 전배양액을 새로운 배지에 1%가 되게 접종하여 20°C, 25°C, 30°C, 37°C에서 24시간 진탕배양하여 유화활성을 측정하였다. 최적 초기 pH와 NaCl 농도를 측정하기 위해 pH 6, 7, 8 및 NaCl 0%, 1%, 2%, 3%로 각각 조정된 배지에 상기 조건으로 배양하여 유화활성을 측정하였다.

또한 탄소원과 질소원의 종류, 인산염 농도에 따른 생물계면활성제의 유화활성을 측정하기 위해 basal medium(carbon source 4.0%, NaNO₃ 0.2%, KH₂PO₄ 0.01%, MgSO₄ · 7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, yeast extract 0.01%, final pH 7.0)을 기본조성으로 하여 각각의 탄소원과 질소원 및 다양한 농도의 인산염을 추가하여 상기 조건으로 배양하여 유화활성을 측정하였다. 또한 이상과 같이 유화활성의 최적 조건을 선정후, 균의 생육에 따른 유화활성도 측정하였다. 즉 균의 성장에 따라 배양액 중에 분비되는 생물계면활성제의 유화활성을 측정하였다.

2.6. 분리균주 2-3A가 생산하는 생물계면활성제의 안정성

Acinetobacter sp. 2-3A가 생산하는 생물계면활성제의 온도에 따른 유화안정성을 측정하기 위해 상기의 방법으로 생물계면활성제를 준비하였다. Tris/10 mM MgSO₄ (pH 7.0) buffer에 상기의 생물계면활성제를 첨가한 다음 각각 4°C, 10°C, 25°C, 37°C, 50°C, 75°C, 100°C에서 30분간 반응시킨 후 유화활성을 측

정하였다. 또한 pH에 대한 안정성을 조사하기 위해, citrate-phosphate buffer (pH 3.0~6.0), Tris-Cl buffer (pH 7.0~8.0), glycine-NaOH (pH 9.0~10.0)를 사용하여 pH를 조정하였다. 여기에 생물계면활성제를 500 μ l 첨가하여 상온에서 30분간 방치한 후 pH에 따른 유화안정성을 측정하였다. 또한 Tris/10 mM MgSO₄ (pH 7.0) buffer의 염농도를 각각 0%, 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%로 조정하고 생물계면활성제를 첨가한 후 상온에서 30분간 방치한 후 염농도에 따른 유화안정성을 측정하였다.

2.7. 타균주 및 합성 계면활성제와의 유화활성 비교

2-3A 균주가 생산하는 생물계면활성제와 타 균주 및 합성 계면활성제와의 유화활성을 비교하였다. 생물계면활성제를 생산하는 표준균주 *Acinetobacter* sp. (ATCC 31012)와 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-1 (KCTC 18012P)은 상기의 2-3A 균주의 배양조건과 동일하게 배양하였으며, 생물계면활성제의 추출은 전술한 추출법에 준 하였다. 또한 이들 표준균주들의 생물계면활성제와 유화능이 강한 화학합성 계면활성제인 tween 20 및 tween 80 원액과 유화활성을 비교하였다. 즉 0.01 M MgSO₄ · 7H₂O를 함유하고 있는 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 7.5 ml에 유화기질인 n-hexadecane 0.1 ml를 혼합한 후, 준비한 생물계면활성제들을 0.2 ml씩 넣고 전술한 유화활성 측정법에 따라 유화활성을 비교 분석하였다.

2.8. 유류분해 활성측정

유일한 탄소원 및 에너지원으로서 arabian light crude oil을 공급하여, 미생물 작용에 의해 분해되고 남은 유류 잔류량을 추출하고, 추출물질을 gas chromatography로 분석함으로써 유류분해 활성을 측정하였다. 잔류 crude oil을 추출하기 위해 균주 배양액 50 ml가 담긴 삼각 flask에 1 ml의 원유(2%, v/v)를 첨가하여 배양한 후, 시간별로 채취하여 conc. HCl을 2 ml 첨가하여 반응을 고정시킨 뒤, oil 잔류분을 추출하였다. 배양액을 분액깔때기에 옮긴 후 추출 용매로 hexane (Mallinckrodt, HPLC grade)을 25 ml 첨가하여 세 번 반복 추출하였다. Hexane 10 ml로 분액깔때기를 세척한 후, 각 fraction들을 합하여, Na₂SO₄에 통과시켜 수분을 제거하였다. Hexane 10

ml로 Na₂SO₄를 세척, 합한 후 rotary evaporator를 이용하여 hexane을 제거하고 oil 잔류분을 농축하였다. 농축된 시료에 hexane 2 ml를 첨가하여, 이중 1 μ l를 취하여 microsyringe를 이용하여 gas chromatography에 injection하여 분석하였다.

GC는 GC-17AAFV2 (Shimadzu)를 사용하였고 검출기는 FID (flame ionization detector)를, column은 HP-1 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m; length × id × film thickness)을 사용하였다. 온도 조건은 injector temperature 250°C, detector temperature 250°C, oven temperature 75°C~300°C, 승온 속도 3°C/min으로 하였고, initial time 0 min, final time 15 min으로 하여 90 min 단위로 프로그램화하여 사용하였다. Carrier gas는 N₂를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유류분해 미생물의 분리 및 동정

유류를 분해하는 약 50여종의 균주를 분리하여, oil film-collapsing assay법에 의해 분해능이 가장 우수한 2-3A 균주를 선별하였다(Fig. 1). 이 균주의 형태적, 생화학적 특성들을 조사한 결과는 Table 2에 나타내었다. 2-3A 균주는 Gram 음성, catalase test 양성으로 Vitek Systems를 이용하여 동정한 결과 *Acinetobacter* 속과 가장 유사하였다. 보다 정확한 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열(1,603 bp)을 분석하여 NCBI GenBank에 등록된 상동성이 높은 균주들과 유전자간의 상관성을 알아본 결과, *Acinetobacter junii*와 99% 이상의 가장 높은 상동성을 나타내어 (Fig. 2), 본 균주를 *Acinetobacter* sp. 2-3A라 명명하였다.

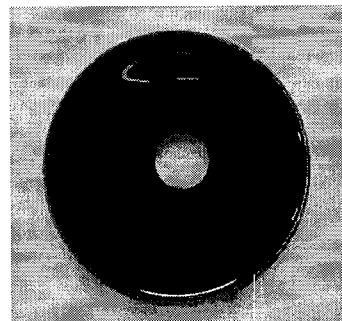


Fig. 1. Emulsification activity of strain 2-3A.

Table 2. Biochemical characteristics of *Acinetobacter* sp. 2-3A

Test	Result	Test	Result
Gram staining	-	Lactose	-
Catalase	+	Mannitol	-
Peptone base	-	Raffinose	-
Bacitracin	-	Salicin	-
Optochin	-	Sorbitol	-
Hemicellulase	-	Sucrose	-
Growth at 6% sodium chloride	+	Trehalose	-
10% Bile	-	Arabinose	-
40% Bile	-	Pullulan	-
Esculin	-	Inulin	-
Decarboxylase base control	+	Melibiose	-
Arginine	-	Melezitose	-
Urea	-	Cellobiose	-
Tetrazolium red	-	Ribose	-
Novobiocin	-	Xylose	-
Dextrose	-	Pyruvate	-

3.2. *Acinetobacter* sp. 2-3A의 최적 성장조건

Acinetobacter sp. 2-3A의 최적 성장조건을 조사한 결과, 최적 온도는 25℃로 30℃에서도 잘 증식하였으며 20℃와 37℃에서도 성장을 하였으나, 4℃, 10℃, 42℃에서는 거의 성장하지 못했다. 최적 pH는 7.0이

었으며, NaCl 무첨가 시 가장 잘 성장하였으며 2.0%까지는 비교적 잘 성장하였으나, 5~10%에서는 거의 성장하지 못 하였다(Fig. 3).

3.3. 유화활성 최적 조건

3.3.1. 유화활성에 미치는 온도, pH, NaCl의 영향

Acinetobacter sp. 2-3A가 생산하는 생물계면활성제의 유화활성에 미치는 온도, pH, NaCl의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 20℃에서 가장 높은 유화활성을 보였으며, 25~37℃에서는 50%이하의 유화활성을 보였다. 한편 *Acinetobacter* sp. BE-254¹⁷⁾와 *Nocardia* sp. L-417¹⁸⁾의 경우 30℃에서 가장 높은 유화활성을 나타낸다고 보고된 바가 있다. 유화활성에 미치는 초기 pH의 영향은 중성인 pH 7.0에서 유화활성이 가장 높았다. NaCl 농도의 영향은 2.0% NaCl 농도에서 유화활성이 가장 높았다(Fig. 4). 이상의 결과에 따라 이후의 실험은 20℃, 초기 pH 7.0, 2.0% NaCl 농도에서 행하였다.

3.3.2. 유화활성에 미치는 탄소원, 질소원, 인산염 농도의 영향

생물계면활성제의 최적생산을 위한 탄소원의 선정을 위해 basal medium을 기본조성으로 하여 각각

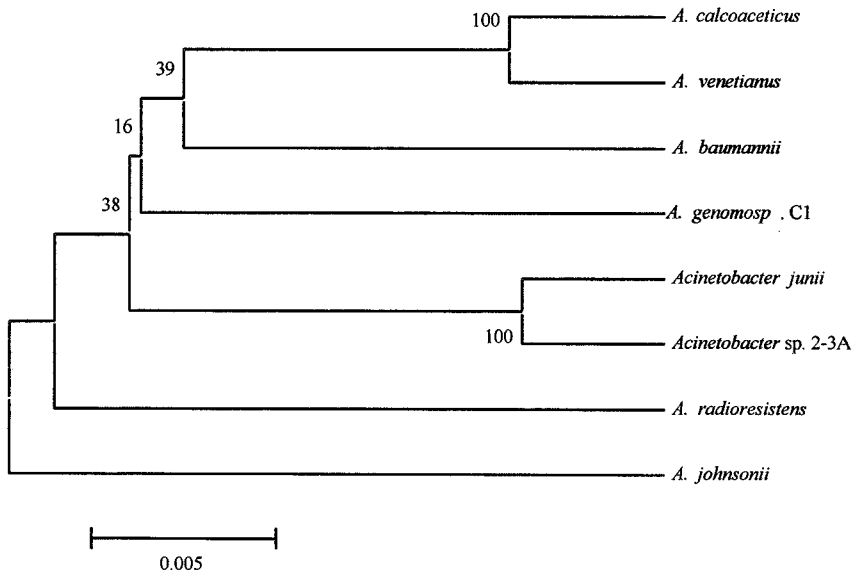


Fig. 2. Phylogenetic tree based on comparison of the 16S rDNA sequence indicating the position of *Acinetobacter* sp. 2-3A. The phylogenetic tree was generated using the neighbor-joining method. Bootstrap values, expressed as percentages of 1000 replications, are given at branching points.

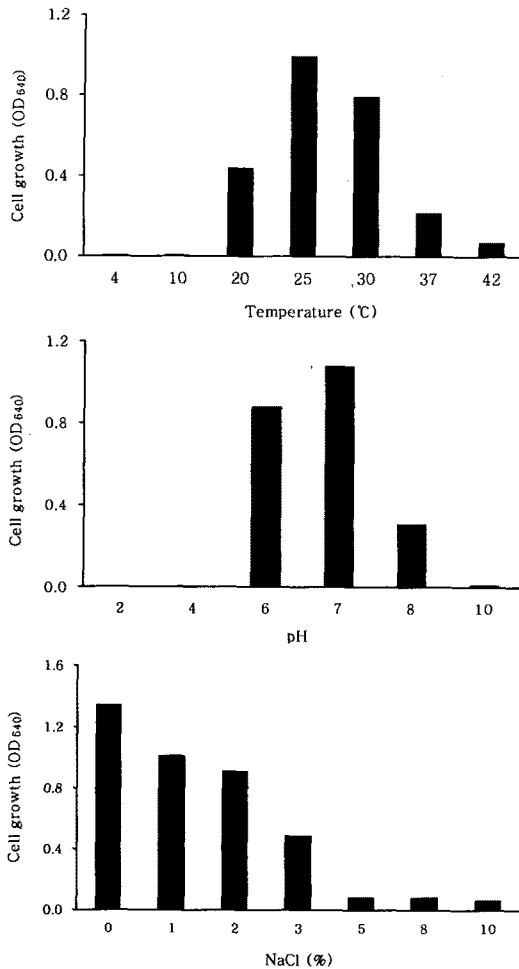


Fig. 3. Effects of temperature, initial pH, and NaCl concentration on the growth of *Acinetobacter* sp. 2-3A.

의 탄소원을 4%씩 되게 첨가하여 20°C, 150 rpm으로 4일간 배양하였다. 배양 후 유화활성을 측정된 결과 Table 3과 같이 n-alkane에서의 유화활성은 대체로 낮았고, olive oil에서 가장 높은 유화활성을 나타내었다. *Acinetobacter* sp. BE-254¹⁷⁾나 *Nocardia* sp. L-417¹⁸⁾의 경우 탄소가 비교적 긴 탄화수소 화합물인 n-dodecane, n-tetradecane, n-hexadecane 등의 aliphatic hydrocarbon을, *Acinetobacter calcoaceticus* CL¹⁹⁾의 경우 glucose를 탄소원으로 사용했을 때 우수한 유화활성을 보여 본 균주 *Acinetobacter* sp. 2-3A와 차이를 보였다. 이후의 실험은 olive oil을 탄소원으로 사용하였다.

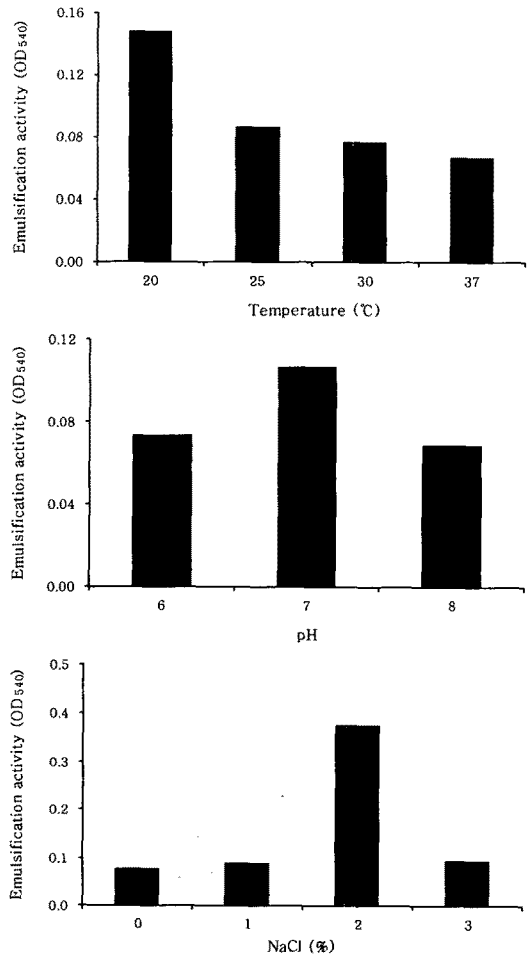


Fig. 4. Effects of temperature, initial pH, and NaCl concentration for emulsification activity of *Acinetobacter* sp. 2-3A.

유화활성에 미치는 질소원의 영향을 알아보기 위해 basal medium에 NaNO₃와 yeast extract 대신 각종 질소원을 0.01%씩 첨가하여 20°C, 150 rpm에서 4일간 배양하였다. 배양 후 유화활성을 측정된 결과 Table 4와 같이 유기질소원인 peptone에서 가장 높은 유화활성을 나타내었으며, 유기질소원인 beef extract와 무기질소원인 KNO₃도 높은 유화활성을 나타내었다. 한편 *Acinetobacter* sp. BE-254¹⁷⁾도 대체로 유기질소원에서 높은 유화활성을 나타내었다. 이후의 실험에서는 peptone을 질소원으로 사용하였다.

한편 유화활성을 높이기 위해 최적 탄소원인

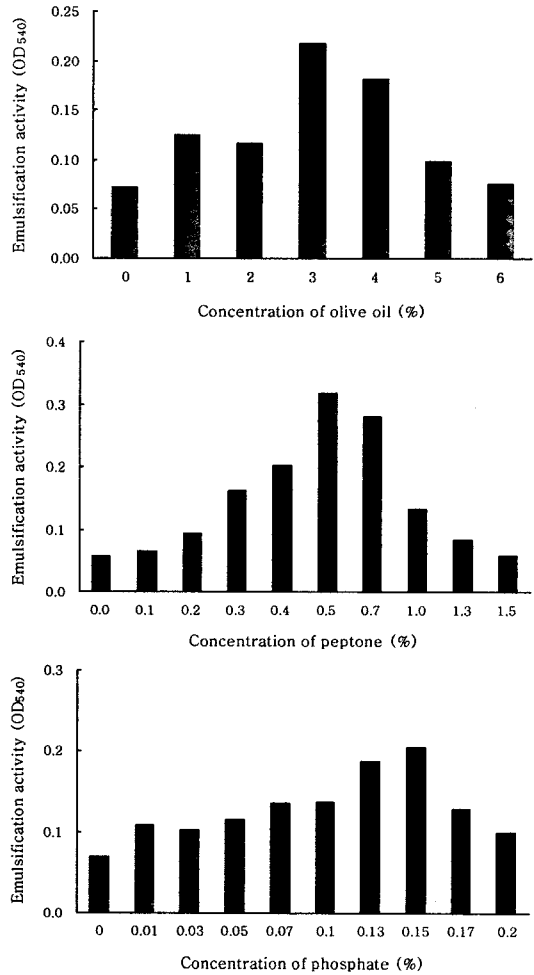
Table 3. Effect of carbon sources for emulsification activity of *Acinetobacter* sp. 2-3A

Carbon sources	Emulsification activity (540 nm)
None	0.07
Glucose	0.104
Sucrose	0.086
Fructose	0.075
Hexane	0.092
Octane	0.08
Decane	0.075
Dodecane	0.118
Hexadecane	0.098
Soybean oil	0.116
Olive oil	0.251
Paraffin	0.077
Glycerol	0.072

Table 4. Effect of nitrogen sources for emulsification activity of *Acinetobacter* sp. 2-3A

Nitrogen sources	Emulsification activity (540 nm)
None	0.099
NH ₄ Cl	0.126
NH ₄ NO ₃	0.119
NaNO ₃	0.104
NaNO ₂	0.104
KNO ₃	0.231
Urea	0.115
Yeast extract	0.134
Tryptone	0.167
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.100
Peptone	0.462
Polypeptone	0.189
Beef extract	0.222
Malt extract	0.124

olive oil의 농도를 0%에서 6%까지 변화시키면서 유화활성을 조사하였다. 그 결과 Fig. 5와 같이 3.0%의 농도에서 유화활성이 가장 높아 이후의 실험에서는 탄소원으로 사용하는 olive oil의 농도를 3.0%로 하였다. 또한 유화활성을 높이기 위해 최적 질소원인 peptone의 농도를 알아보기 위해, 탄소원인 olive oil의 농도를 3.0%로 고정하고 peptone의 농도를 0%에서 1.5%까지 변화시키면서 유화활성을 측정하였다. 그 결과 0.5%의 농도에서 유화활성이 가장 높았으며(Fig. 5), 이후의 실험에서는 질소원으로 사용하는 peptone의 농도를 0.5%로 하였다. 미생물에 의한 생

**Fig. 5.** Effect of olive oil, Peptone, and potassium phosphate concentration for emulsification activity of *Acinetobacter* sp. 2-3A.

물계면활성제의 생산에 관여하는 인자는 C, N원 이외에도 여러 인자가 작용한다. 이와 관련하여 C/N 비율, P 농도, 금속이온의 농도 등 많은 연구가 이루어져 왔다. 아울러 *Acinetobacter* sp. 2-3A의 유화활성을 위한 최적 인산염을 조사한 결과 높이기 위한 최적 인산염을 조사한 결과 potassium phosphate가 선정이 되었으며(자료 미제시), potassium phosphate는 0.15%에서 가장 높은 유화활성을 나타내어(Fig. 5), 이후의 실험에서는 인산염으로 사용하는 potassium phosphate의 농도를 0.15%로 하였다.

3.3.3. 균의 성장에 따른 생물계면활성제의 유효활성

생물계면활성제의 최적 생산을 위해 olive oil 3.0%, peptone 0.5%, potassium phosphate 0.15%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $CaCl_2$ 0.01%, 초기 pH 7.0, NaCl 2.0%를 함유한 최적배지를 준비하여 20°C, 150 rpm으로 14일간 배양하면서 시간별로 균의 성장과 유효활성을 측정하였다. 그 결과 Fig. 6과같이 대수증식기에 접어들면서 유효활성이 증가하여 27시간 배양 시 가장 높은 유효활성을 보였으며, 정지기로 들어가면서 그 활성이 점차 감소하였다. 이는 *Nocardia* sp. L-417¹⁸⁾의 경우와 같이 대수증식기에 균의 증식과 더불어 생물계면활성제의 생산량이 증가하다가 정지기에 들어가면서 감소하는 경향과 유사하였다.

3.4. *Acinetobacter* sp. 2-3A가 생산하는 생물계면활성제의 안정성

온도에 따른 안정성을 조사한 결과 Fig. 7과 같이 4°C~100°C까지 넓은 온도 범위에서 안정하였다. 특히 100°C에서 30분간 가열해도 유효활성이 떨어지지 않았다. pH에 대한 안정성을 조사한 결과 pH 6~10에서 안정하였고, NaCl 0%~10%에서도 비교적 안정성을 나타내었다(Fig. 7).

3.5. 타균주 및 합성 계면활성제와의 유효활성 비교

Acinetobacter sp. 2-3A와 생물계면활성제를 생산

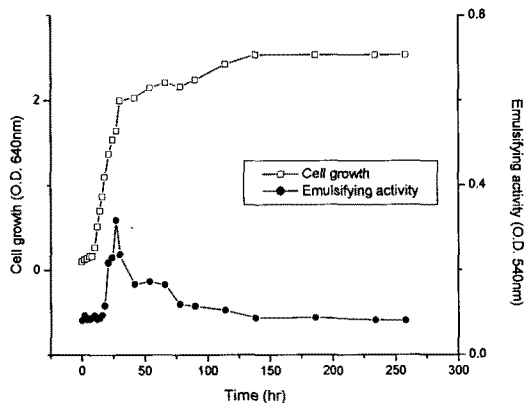


Fig. 6. Growth curve of *Acinetobacter* sp. 2-3A at the optimum culture conditions and change of emulsification activity.

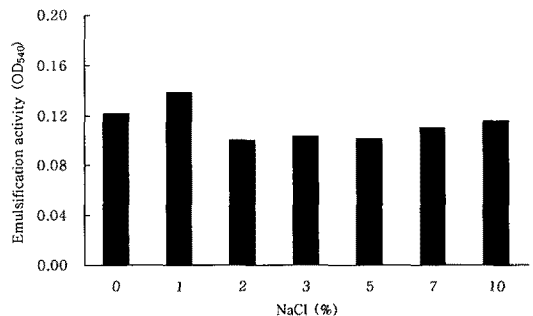
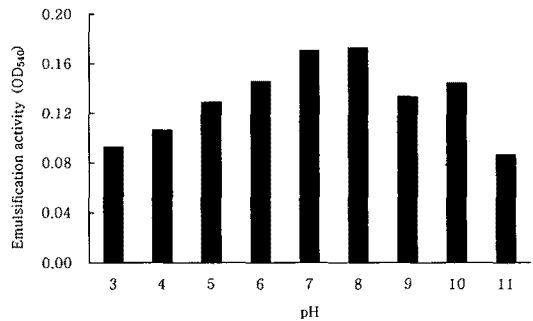
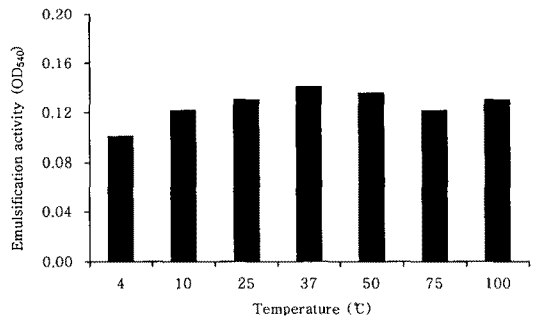


Fig. 7. Effect of temperature, initial pH, NaCl concentration on the stability of emulsification activity of *Acinetobacter* sp. 2-3A.

하는 표준균주 *Acinetobacter* sp. (ATCC31012)와 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-1 (KCTC 18012P) 및 유효능이 강한 화학합성 계면활성제인 tween 20, tween 80의 유효활성을 비교한 결과는 Fig. 8과 같았다. 본 균주 *Acinetobacter* sp. 2-3A는 화학합성 계면활성제나 생물계면활성제를 생산하는 타균주들보다 2배 이상 유효활성이 우수하였다.

3.6. 유류분해 활성

균주의 배양시간에 따른 원유 속의 paraffine계 탄화수소를 분석한 결과, Fig. 9와 같이 배양 5일 이후에는 기질로 사용된 원유에 함유된 paraffine계 탄화

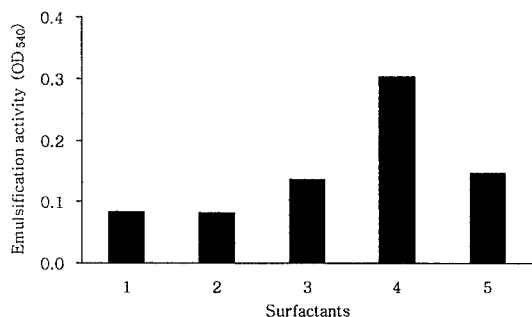


Fig. 8. Comparison of emulsification activity (1, tween 20; 2, tween 80; 3, *Pseudomonas aeruginosa* BYK-1 (KCTC 18012P); 4, *Acinetobacter* sp. 2-3A; 5, *Acinetobacter* sp. (ATCC 31012)).

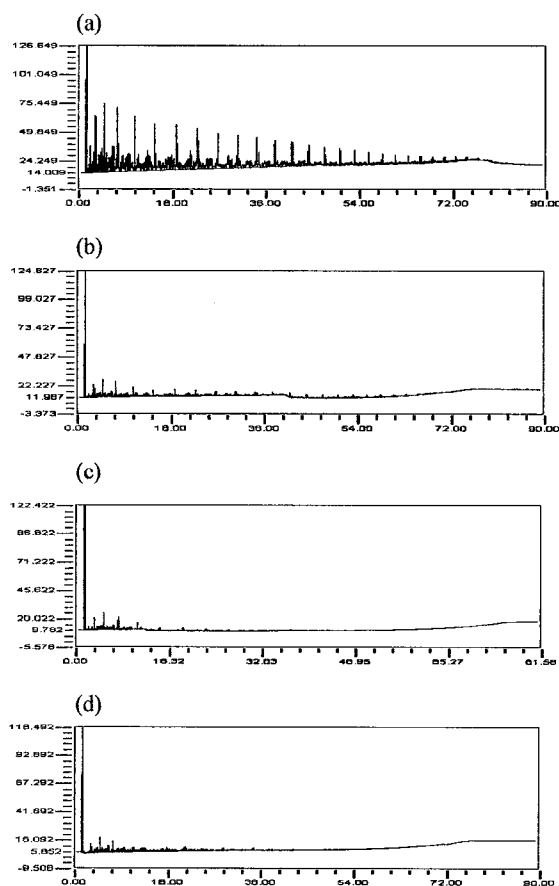


Fig. 9. Gas chromatographic analysis of residual oils in the culture broth containing 2.0% arabian light crude oil (a, 1 day; b, 5 days; c, 10 days; d, 20 days).

수소의 carbon chain이 nC_{10} 에서 nC_{32} 까지 거의 대부분이 80%이상 분해되었다. 배양 10일 이후에는 nC_{12} 와 nC_{14} 를 제외한 탄화수소가 거의 완전히 분해되었으며, 20일 이후에는 nC_{10} 을 제외한 거의 대부분이 완전히 분해되었다. *Acinetobacter* sp. A54²⁰⁾가 1.0% (v/v)의 arabian light crude oil을 완전히 분해하는데 걸린 96시간과 *Pseudomonas* sp. BCK-1²¹⁾이 2.0% (v/v)의 arabian light crude oil를 분해하는데 걸린 72시간에 비해 본 균주 *Acinetobacter* sp. 2-3A는 2.0% (v/v) arabian light crude oil을 분해하는데 5일이 소요되었다. Carbon chain이 긴 nC_{28} 과 nC_{32} 의 경우 본 균주 *Acinetobacter* sp. 2-3A는 5일 이후에 약 90% 이상을 분해하였으며, 10일 이후 완전히 분해하였다. *Pseudomonas* sp. CHCS-2²²⁾가 Kuwait산 crude oil의 nC_{10} 에서 nC_{14} 부위를 완전히 분해하는데 134시간이 걸린 반면, 본 균주 *Acinetobacter* sp. 2-3A는 arabian light crude oil의 nC_{10} 에서 nC_{14} 부위를 완전히 분해하는데 120시간이 걸렸다.

4. 결론

부산 감만동의 유류오염 토양을 채취하여 탄화수소 이용도가 높은 50여종의 유류분해 균주를 1차로 분리하였으며, oil-film collapsing assay를 이용해 계면활성능이 가장 높은 2-3A 균주를 선별하였다. 이 균주의 형태적, 생화학적 특성을 Vitek systems로 확인하고 16S-rDNA sequencing을 통해 동정한 결과 *Acinetobacter* sp. 2-3A로 명명하였으며, 이 균주는 25°C, pH 7.0, NaCl 0%에서 최적 성장을 나타내었다. 본 균주의 유화활성 최적조건과 석유분해 활성을 측정하여 유류오염 토양의 생물학적 복원을 위한 기초 자료를 제공하고자 연구한 결과는 다음과 같다.

1) *Acinetobacter* sp. 2-3A는 20°C, pH 7.0, NaCl 2.0%, 3.0% olive oil을 탄소원으로, 0.5% peptone을 질소원으로, 0.15%의 인산염을 이용했을 때 가장 높은 유화활성을 나타내었다.

2) 균의 성장에 따른 유화활성을 조사한 결과 27시간 배양 시 가장 높은 유화활성을 나타내었다.

3) *Acinetobacter* sp. 2-3A가 생산하는 생물계면활성제의 안정성을 조사한 결과 4°C ~ 100°C, pH 6 ~

10, NaCl 0%~10%의 광범위한 영역의 온도, pH, NaCl 농도에서 안정성을 보였다.

4) 생물계면활성제를 생산하는 표준균주 *Acinetobacter* sp. (ATCC 31012)와 *Pseudomonas aeruginosa* BYK-1 (KCTC 18012P), 화학합성 계면활성제인 tween 20 및 tween 80과 유화활성을 비교한 결과 *Acinetobacter* sp. 2-3A의 유화활성이 2배 이상 우수함을 알 수 있었다.

5) 균주의 배양시간 경과에 따른 원유의 잔류 탄화수소를 분석한 결과 5일 후 $^{14}C_{10}$ 에서 $^{14}C_{32}$ 까지 거의 대부분이 약 80% 이하로 분해되었으며, 10일 이후에는 거의 대부분이 완전히 분해되었다.

참고 문헌

- Kim J. Y. and K. S. Cho, 2006, Bioremediation of oil-contaminated soil using rhizobacteria and plants, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 185-195.
- 최병순, 국승욱, 김진한, 이동훈, 박철희, 2001, 토양오염 처리기술, 토양오염 개론, 동화기술, 237-244pp.
- Georgiou G., S. C. Lin and M. M. Sharma, 1990, Surface active compounds from microorganisms. *Bio. Technol.*, 10, 60-65.
- Bragg J. R., R. C. Prince, E. J. Harner and R. M. Atlas, 1994, Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill, *Nature*, 368, 413-418.
- Atlas R. M., 1981, Microbial degradation of petroleum hydrocarbon an environmental perspective, *Microbiol. Rev.*, 45, 180-239.
- Kim H. J., B. J. Kim, S. D. Ha, S. H. Hwang and J. Y. Kong, 1999, Biodegradation of crude oil by marine bacterium *Pseudomonas* sp. CHCS-2 and composition of the biosurfactant, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 14, 192-197.
- Roberts M. S., L. K. Nakamura and F. M. Cohan, 1996, *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 470-475.
- Ruberto L., S. C. Vazquez and W. P. Cormack, 2003, Effectiveness of the natural bacterial flora, bio-stimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil, *Int. Biodeterior. Biodeg.*, 52, 115-125.
- Vogel T. M., 1996, Bioaugmentation as a soil bioremediation approach, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 7, 311-316.
- Kim H. S., C. H. Lee and H. H. Suh, 1997, A lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* C9 selected through the oil film-collapsing assay, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 180-188.
- MacFaddin J. F., 1980, Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2nd ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore, 36-308.
- Gerhardt P., R. G. Murray, E. R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips, 1981, Manual of method for general bacteriology, 1st ed., Am. Soc. Microbiol., Washington D. C., 135-154.
- Dunbar J., L. O. Ticknor and C. R. Kuske, 2000, Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 2943-2950.
- Sambrook J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, 1989, Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 25-28.
- Kumar S., K. Tamura, I. B. Jakobsen and M. Nei, 2001, MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software, *Bioinformatics*, 17, 1244-1245.
- Rosenberg E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz and D. L. Gutnick, 1979, Emulsifier *Acinetobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 402-408.
- Kim S. H., E. J. Lim, K. S. Choi, Y. K. Jeong, K. L. Jang and T. H. Lee, 1996, Emulsifying agent production by *Acinetobacter* sp. BE-254. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 206-212.
- Kim S. H., E. J. Lim and T. H. Lee, 1998, Optimization of culture condition of *Nocardia* sp. L-417 strain for biosurfactant production, *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.*, 27, 252-258.
- Hwang K. A., Y. S. Kim, H. J. Ahn and K. S. Choi, 1995, Isolation of biosurfactant-producing *Acinetobacter calcoaceticus* CL and the biosurfactant production and application, *J. Kor. Ind. & Eng. Chemistry*, 6, 562-570.
- Lee C. H., H. S. Kim, H. H. Suh, S. H. Choi, H. M. Oh and B. D. Yoon, 1997, Microbial degradation of arabian light crude oil by *Acinetobacter* sp. A54, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 520-526.
- Koo H. S., 2001, Characterization of oil degradation bacterium *Pseudomonas* sp. BCK-1 isolated from the coastal water of Yosu, Korea, *J. Kor. Fish. Soc.*, 34, 145-150.
- Ryu B. H., H. J. Kim, S. K. Bae, J. D. Kim and J. Y. Kong, 1995, Purification and characterization of biosurfactant from marine *Pseudomonas* sp. CHCS-2, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 10, 582-588.