

# 원유로 오염된 지역으로부터 분리한 생물계면활성제 생산균주, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3의 특성조사

조수희 · 오계현\*  
순천향대학교 생명공학과

## Characterization of the Biosurfactant-Producing Bacterium, *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 Isolated from the Crude-Oil Contaminated Areas

Su-Hee Cho and Kye-Heon Oh\*

Department of Biotechnology, Soonchunhyang University, Asan 336-600, Republic of Korea

(Received December 3, 2010/Accepted December 20, 2010)

The purpose of this work was to investigate the characteristics of a biosurfactant-producing bacterium isolated from crude-oil contaminated soils. During the incubation of strain HK-3 with 1% crude-oil, bacterial growth pattern, the amount of biosurfactant production, and pH changes were monitored. In order to examine the effect of supplemented carbons on the production of biosurfactant, cultivation of HK-3 cells in BH media with different carbons (e.g. glucose, dextrose, mannitol, citrate, or acetate) revealed that the production of biosurfactant reached the maximal level at the 72 h incubation with mannitol, which the area of clear zone was measured to approximately 7.64 cm<sup>2</sup>. Identification test using the BIOLOG system, morphology study based on scanning electron microscopy and the 16S rRNA sequence-based phylogenetic analysis assigned strain HK-3 to a *Pseudoalteromonas* species, designated as *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 which was registered in GenBank as [FJ477041].

**Keywords:** biosurfactant, biosurfactant-producing bacterium, crude-oil, HK-3, *Pseudoalteromonas* sp.

해양에서의 원유 유출사고는 유조선에 의한 석유수송, 석유 채굴을 위한 시추과정에서, 또는 내륙수로의 선박이나 바지선 (barge)에 의하여 간헐적으로 발생한다. 대규모의 해양원유 유출사고가 발생한 경우에 해상에서 유회수기 등으로 직접 회수 할 수 있는 원유량은 전체 유출량의 30% 이내에 불과한 것으로 알려져 있다. 유출된 원유는 자연에서 주로 확산(spreading), 증발(evaporation), 용해(solubilization), 그리고 잔류물질(residual material) 등으로 분획되는데 확산과정에서 원유가 풍속이나 조류 등에 의하여 물리적으로 희석되어지고 분자량이 작은 탄화수소 순으로 원유의 약 30-50% 정도가 증발되며, 남은 원유는 수층으로 용해되어 인근 해역의 오염을 일으키며, 증발과 용해 과정을 거친 분획은 잔류 물질이 되어 해안에 영향을 미친다(4).

유출된 원유를 회수하고, 생태계를 복원하기 위하여 다양한 방법으로 접근이 시도되고 있으며 물리적, 화학적, 생물학적

방법이 수반된다(6, 15). 그러나 물리적인방법은 기상조건이나, 유출정도와 유출된 원유의 성상에 따라 제약이 크고, 소각의 경우 효과적이지만 비용이 많이 들고 대기 오염을 발생시키며, 기계적인 방법은 처리 비용이 비싸기 때문에 비경제적이다. 화학적 방법인 계면활성제와 유화제의 살포는 빠른 시각적 효과로 원유제거에는 우수하지만, 일시적인 처리방법에 불과하며, 탄화수소의 탄소수가 많은 벙커 A유 또는 벙커 C유의 경우 유화제와 섞일 경우 비중이 높아져 해저로 침전되어 유해성분이 그대로 장시간 잔존하기 때문에 유화제 자체가 갖는 독성과 잔존 원유의 독성으로 2차 오염을 유발할 수 있다(1, 2). 원유분해 미생물은 원유를 탄화수소 기질로 사용하여 분해하고, 그 과정에서 세포 밖으로 계면활성제(surfactant)를 방출하여 원유에 대한 유화능을 나타내 분해를 촉진시킨다(3, 14). 계면활성제는 친수성과 소수성의 성질을 모두 가지고 있어 계면의 장력을 줄이고 물속의 탄화수소를 가용화시켜 세척력과 유화능을 나타낸다. 계면활성제는 빠른 가시적 효과를 보이기 때문에 과거에 발생하였던 크고 작은 원유오염 관련 사고에서 널리 사용된 바 있다. 대표적 원유유출 사고로 알려진 Torrey Canyon호

\* For correspondence. E-mail: kyeheon@sch.ac.kr; Tel: +82-41-530-1353; Fax: +82-41-530-1350

사고에서는 약 1만 톤의 화학적 계면활성제가 사용되었는데 가시적 효과는 우수하였지만 독성이 강하고 자체적으로 분해되지 않아 해변 및 연안 생태계에 미치는 독성효과를 크게 증가시켰다고 보고된 바 있다(9). 이러한 화학적 계면활성제의 문제점을 극복하기 위하여 최근에는 미생물이 생산하는 생물계면활성제(biosurfactant)에 대한 연구가 주목을 받고 있다(19).

생물계면활성제를 생산하는 대표적인 미생물로는 *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Acinetobacter* 등이 알려져 있다. 생물계면활성제는 화학적 계면활성제에 비해 독성이 낮아 안전성이 높고, 자체적으로 생분해가 가능하기 때문에 환경 친화적이며, pH의 영향을 적게 받고, 해수의 염도에 크게 영향을 받지 않는다(5, 11, 20, 22). 현재 다양한 세균에 의해 생산되는 계면활성제는 rhamnolipid, trehalolipid, sophorolipid 등의 glycolipid를 포함하여, lipopeptide, lipoprotein, phospholipid, fatty acid 등의 성분을 포함하는 것으로 보고되고 있다(16). Kim 등(12)은 *Bacillus* 종에서 생산된 생물계면활성제가 표면장력을 최저 29 mN/m까지 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 *Pseudomonas* 종의 경우 생물계면활성제 생산 능력의 우수함이 여러 연구 사례를 통해 보고되었으며, 생물계면활성제 물질인 rhamnolipid를 생성하는 유전자의 염기서열은 이미 밝혀진 바 있다(7, 21).

본 연구는 원유에 오염된 지역의 토양시료로부터 분리한 생물계면활성제 생산균주의 특성을 조사하기 위하여 실시하였다. 원유 오염지역의 토양시료에서 생물계면활성제 생산 능력이 우수한 균주인 *Pseudoalteromonas* sp. HK-3를 분리하여, 탄소원에 따른 생물계면활성제 생산의 변화와 배양시간에 따른 생물계면활성제의 생산을 조사하였다. 또한 이 분리세균의 다양한 생리화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열에 근거한 계통수 분석을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 생물계면활성제 생성 균주의 분리 및 동정

충남 태안 원유 오염지역의 토양으로부터 농화배양 기법에 의하여 생물계면활성제를 생산하는 균주인 HK-3를 분리하였다. 농화배양에 사용된 Bushnell-Haas (BH) 배지는 탄소원이 결핍된 배지로 조성은 증류수 1 L당 0.2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02 g CaCl<sub>2</sub>, 1.0 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 g KNO<sub>3</sub>, 0.05 g FeCl<sub>3</sub>이었으며, 여기에 1% 원유를 첨가하여 사용하였다. 250 ml의 삼각 플라스크에 채취한 토양 5 g을 넣고 0.8 µm membrane filter (Advantec Co., Japan)로 여과시킨 해수 100 ml를 넣어 20°C 진탕 배양기에서 분당 150회의 속도로 1시간 교반시킨 후 꺼내어 10분 정지시킨 후에 1% 원유가 첨가된 BH 고체배지에 도말하였다. 도말 후 30일 경과 후에 집락 주위의 커다란 투명대를 형성하는 균주를 생물계면활성제 생산 우량균주로 간주하여 선별하였다. 분리세균은 GN2 Microplate™ Identification System (BIOLOG, USA)을 사용하여 동정하였다. MicroPlate의 결과는 직접 또는 Biolog MicroStation™을 사용

하여 확인하였으며, MicroLog™ database software를 통해 동정하였다.

### 배양시간에 따른 계면활성제의 측정과 pH의 변화

1% 원유가 첨가된 BH 액체배지 100 ml에 분리 균주를 접종하고 20°C의 진탕배양기에서 분당 150회의 속도로 배양시킨 후, 12시간 마다 시료를 채취하고 해수 LB 고체배지에 분리세균을 도말하여 집락을 계수하고, 생물계면활성제의 생산량, pH의 변화를 측정하였다. 생물계면활성제의 생산량은 변형된 orcinol method으로 측정하였다(8, 13). 배양 상등액 200 µl를 추출하여 1 ml diethyl-ether를 첨가하고 1시간 동안 실온에서 교반한 후, diethyl-ether만을 선택적으로 분리하고 진공 농축기 (CVE-2000, EYELA, Japan)를 이용하여 건조시켰다. 이 과정을 두 차례 반복하여 준비된 생물계면활성제에 100 µl 0.05 M sodium bicarbonate를 첨가하고 1시간 동안 교반하였다. 19% Orcinol이 첨가된 53% 황산 용액을 900 µl씩 첨가한 후, 80°C에서 30분 동안 가열하고 실온에서 15분 이상 충분히 냉각시켰다. 시료는 UV/Vis Spectrophotometer (Jenway, UK)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 생물계면활성제는 L-rhamnose의 농도를 0에서 50 µg/ml까지 조정하여 작성한 표준곡선을 토대로 하여 정량을 분석하였다.

### 부가탄소원에 따른 생물계면활성변화

Glucose, dextrose, mannitol, citrate, 또는 acetate를 BH 액체배지배지에 부가탄소원으로 각각 2%로 첨가하고 분리 균주 HK-3를 접종한 후, 20°C 진탕배양기에서 분당 150회의 속도로 3일 배양하였다. HK-3 배양액은 1%의 원유를 포함하는 BH 고체배지에 10 µl 접종하고 접종한 배지는 20°C 배양기에서 24시간 동안 배양 후, 생물계면활성제가 생성됨에 따라 생긴 투명대의 면적을 비교·관찰하였다.

### 분리세균의 생리화학적 특성조사

분리세균의 생리화학적 특성을 조사하기 위하여 인돌(indole) 생성여부, methyl red-voges proskauer (MR-VP) 시험, 녹말과 gelatin의 이용 여부, catalase와 oxidase 활성 시험, citrate의 이용 여부, Klingler iron agar (KIA) 시험, glucose와 lactose의 이용여부, 리트머스 우유(litmus milk) 시험 등을 실시하였다.

### 16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

분리세균의 계통수(phylogenetic tree)를 작성하기 위하여 16S rRNA 유전자 PCR을 수행하였다. Genomic DNA Extraction kit (Intron, Korea)를 이용하여 template로 사용할 DNA를 추출한 후, 8F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') primer를 사용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다(18). PCR의 수행조건은 denaturation (94°C, 30초), annealing (60°C, 30초), extension (72°C, 45초) 단계를 33회 반복한 후, 72°C에서 5분 동안 배양하였다. PCR에 의하여 증폭된 DNA 단편을 전기영동 한 다음, Agarose Gel Extract kit (Intron)를 이용하여

gel 상에서 회수하고, (주)솔젠트에 의뢰하여 염기서열을 결정하였으며, 이 결과를 GenBank database에 등록하였다.

**주사전자현미경에 의한 형태학적 관찰**

분리세균을 대수기까지 성장시킨 후, 13,000×g의 속도로 원심분리하여 균체를 회수하고 10 mM의 phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척 후, 균체를 1% O<sub>5</sub>O<sub>4</sub> (osmium tetroxide)로 1 시간 30분 동안 고정하고, 13,000×g에서 1분간 원심분리하여 균체를 회수하고, 다양한 농도의 에탄올(50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%)을 준비하여, 저농도로부터 점차 고농도로 높여가면서 각 농도별로 10분씩 연속적으로 탈수시켰다. 마지막으로 100% 에탄올에 30분간 2회 탈수하고, 탈수된 균체를 HMDS (hexamethyldisilazane) 원액으로 30분간 2회 처리하여 공기 중에서 건조시켰다. 건조된 시료는 sputter coater (IB-3, Giko Engineering Co., Japan)를 사용하여 3 mA로 3분간 gold coating한 후, 주사전자현미경(LEO 1455VP, ZEISS, Germany)으로 관찰하였다.

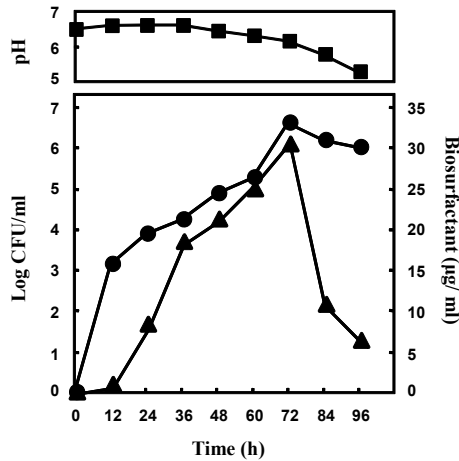
**결과 및 고찰**

**생물계면활성제 생산 균주의 분리**

충남 태안의 원유 오염지역에서 채취한 토양으로부터 농화 배양의 방법으로 세 개의 균주 HK-1, HK-2, HK-3를 분리하였으며, 이들 분리세균 가운데 1%의 원유가 첨가되어 있는 BH 고체배지에서 가장 우수한 투명대를 보이는 균주 HK-3를 선별하였으며, 이 균주를 생물계면활성제 생산능이 우수한 균주로 보고 생물계면활성제의 생산을 위한 대상균주로 사용하였다.

**배양시간에 따른 계면활성제의 측정과 pH의 변화**

분리세균 HK-3를 BH 액체배지에 접종하여 배양시간에 따른 성장, 생물계면활성제의 생산량, 그리고 pH 변화를 관찰하였다(Fig. 1). 생물계면활성제의 양은 HK-3의 생균수의 증가와

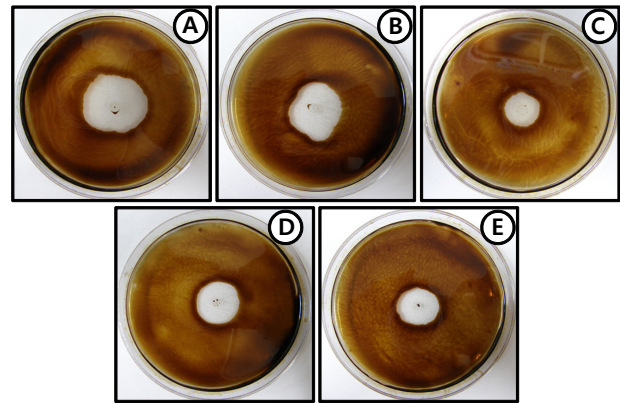


**Fig. 1.** Growth of *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 in BH medium with 2% mannitol (●), biosurfactant level (▲), and pH (■). Biosurfactant levels are expressed as rhamnose equivalent.

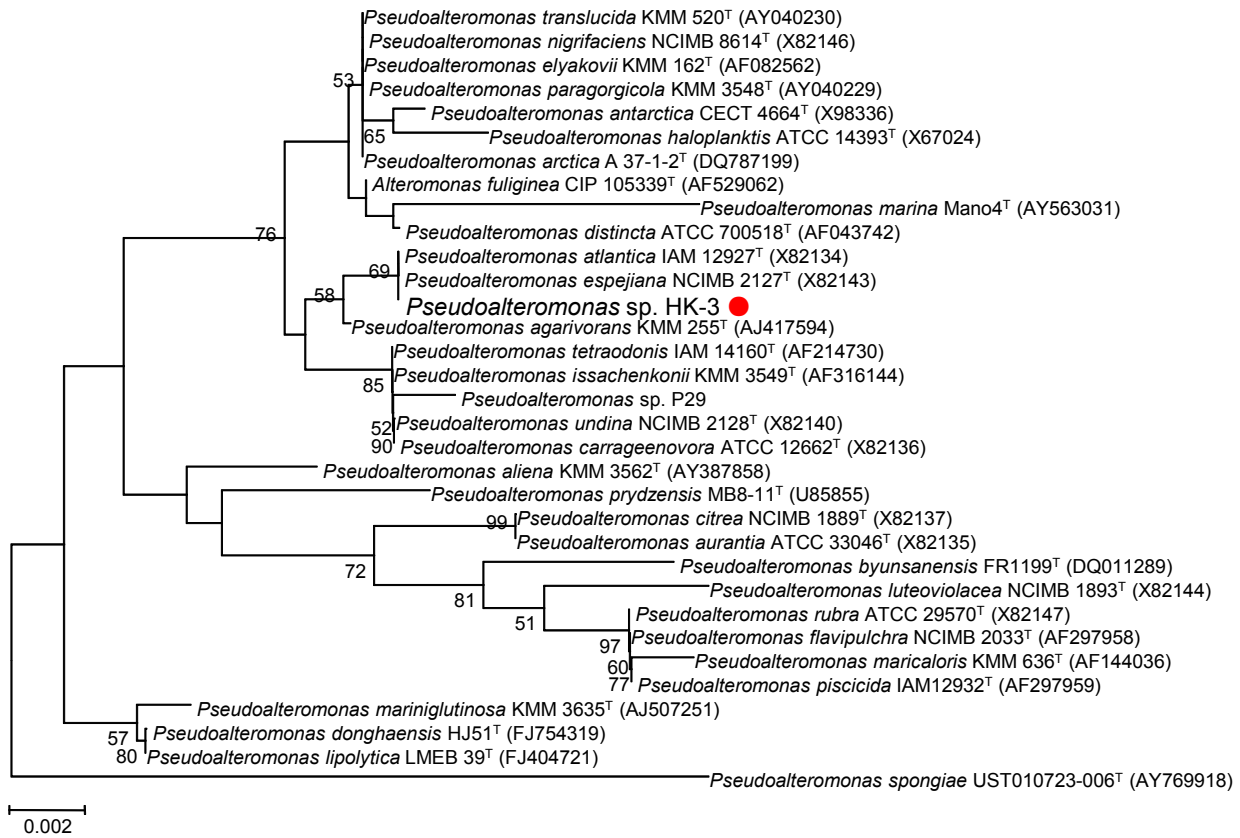
함께 빠른 속도로 증가하다가 정지기에 접어들면서 생산이 줄어드는 것을 알 수 있었다. 생물계면활성제 생산량은 분리 세균의 성장에 비례하여 함께 증가하여 72시간에서 성장과 생물계면활성제 생산량이 30.65 µg/ml로 최고치를 보였으며, 이후 생산이 감소함에 따라 생물계면활성제의 양이 급격하게 감소하는 것이 관찰되었다. 이것으로 생물계면활성제는 HK-3가 성장하는 과정에서 생산되는 물질이며 생산이 정지하게 되면 생산이 감소됨을 알 수 있다. 배양액의 pH는 접종후 96시간 이내에 6.5에서 5.3으로 점차 감소하였다. Deziel 등(8)은 *P. aeruginosa* 19SJ를 이용하여 배양시간에 따른 세균의 성장과 생물계면활성제의 생산량을 측정하였는데, HK-3는 배양 후 12 시간 경과부터 빠르게 증가하는데 비하여, *P. aeruginosa* 19SJ는 접종후 30시간이 경과하면서 증가하였다. 이것은 *P. aeruginosa* 19SJ는 성장과 생물계면활성제의 생산에 있어서 비교적 긴 유도기를 필요로 하는데 비하여, HK-3는 상대적으로 매우 짧아 효율적인 것으로 사료된다. 또한 HK-3의 생물계면활성제 생산량은 Koch 등(13)이 보고한 *P. aeruginosa*가 생산하는 rhamnolipid의 양과 비교하였을 때, 이 균주의 생물계면활성제 생산량이 10 µg/ml인데 비해 HK-3의 생산량은 30.65 µg/ml로 더 우수함을 확인하였다.

**부가탄소원에 따른 계면활성변화**

Glucose, dextrose, mannitol, citrate, 또는 acetate를 BH 액체 무기배지에 2% (w/v)가 되도록 부가탄소원으로 첨가하여 생물계면활성제의 생산에 미치는 영향을 실험하였다. 각각 5가지의 탄소원이 포함된 배지에서 배양된 배양액은 1% 원유가 포함된 BH 고체배지에서 공통적으로 투명대를 형성하였으나 그 면적은 대략 glucose 2.31 cm<sup>2</sup>, dextrose 5.50 cm<sup>2</sup>, mannitol 7.64 cm<sup>2</sup>, citrate 2.98 cm<sup>2</sup>, acetate 2.86 cm<sup>2</sup>로 측정되었으며, 단일 탄소원으로 mannitol을 2% 첨가하였을 때 가장 커다란 투명대를 생성하는 것을 확인하였다(Fig. 2). Siegmund 등(23)은 mannitol, glycerol, citrate, peptone, glucose의 5가지 단일 탄소원이 포함된 blue agar 배지에 *Pseudomonas* 종을 접종하



**Fig. 2.** Effect of supplemented carbon sources on the production of biosurfactant in the cultures of *Pseudoalteromonas* sp. HK-3; (A) mannitol, (B) dextrose, (C) glucose, (D) citrate, (E) acetate.



**Fig. 3.** Phylogenetic relationship between *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 (●) and its related species based on 16S rRNA gene sequence analysis. Bootstrap percentage (based on 100 replicates) greater than 50% are shown at branch points. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

여 탄소원에 따른 생물계면활성제의 생산을 정량분석하여 비교하였다. 그 결과, 부가탄소원으로 mannitol을 첨가하였을 경우에 지름 3 cm의 가장 커다란 dark halo를 생성하였으며, 가장 많은 생물계면활성제를 생산하는 것을 관찰하였다. 또한 Deziel 등(8)은 *Pseudomonas* 종에서 dextrose와 mannitol을 각각 부가탄소원으로 사용하여 생물계면활성제 생산량을 비교하였을 때, mannitol이 가장 우수한 것을 보고하였다. 이들 결

과를 비교분석한 결과는 생물계면활성제의 생산량은 배양에 첨가된 부가탄소원의 종류에 따라 차이가 있었으며, 그 가운데 mannitol이 가장 우수한 것으로 입증되었다.

**Table 1.** Morphological and physiological characteristics of the isolate, HK-3

Morphological characteristic	
Gram Staining	Negative, Short rod
Physiological characteristics	
Indole production	+
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	-
Catalase	+
Oxidase	+
Simmon's citrate	+
H <sub>2</sub> S (KIA)	-
Glucose utilization	+
Lactose utilization	+

### 분리세균의 생리화학적 특성조사

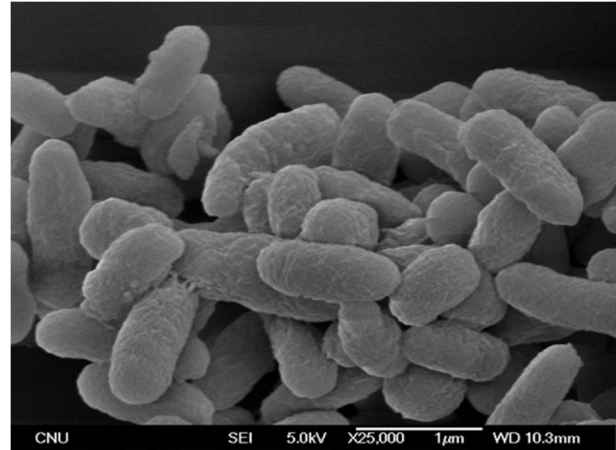
분리세균인 HK-3의 그람염색(gram staining)을 실시한 후 위상차현미경(phase contrast microscope)으로 관찰한 결과, 그람음성의 짧은 막대형으로 나타났다. HK-3 균주에 대한 다양한 생리화학적 특성조사를 실시한 결과 탄소원으로 1% glucose와 1% lactose를 첨가한 시험에서 모두 양성을 나타냈고, Simmon's citrate 이용에서도 양성을 나타내었다. 0.5% Glucose가 포함된 MR-VP 시험에서는 모두 음성을 나타내었으며, KIA 배지로 시험한 disulfhydrase에 의한 H<sub>2</sub>S의 형성시험에 있어서도 음성으로 확인되었다. Gelatinase와 catalase의 존재 여부 시험에서는 gelatinase는 음성, catalase는 양성을 나타냈다. Oxidase 시험과 Indole 생성 시험에서는 양성을 나타냈고, starch 실험에서는 음성을 나타냈다(Table 1). 또한 BIOLOG GN2 MicroPlate™ system을 이용하여 HK-3의 동정을 실시한 결과 *Pseudoalteromonas* 종으로 확인되었다.

### 16S rRNA 염기서열의 계통수 분석

분리세균인 HK-3의 유전적 계통수(phylogenetic tree)를

**Table 2.** Physiological and biochemical characterization of the isolate, HK-3 using the BIOLOG analysis system

Physiological & Biochemical tests		
water (A1)	-	p-Hydroxyphenyl acetic acid (E1) -
α-Cyclodextrin	-	Itaconic acid -
Dextrin	+	α-Ketobutyric acid -
Glycogen	+	α-Ketoglutaric acid +
Tween 40	+	α-Ketovaleric acid -
Tween 80	+	D,L-Lactic acid +
N-Acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid +
N-Acetyl-D-glucosamine	-	Propionic acid -
Adonitol	-	Quinic acid -
L-Arabinose	+	D-Saccharic acid -
D-Arabitol	+	Sebacic acid -
Cellobiose	-	Succinic acid -
i-Erythritol (B1)	-	Bromosuccinic acid (F1) +
D-Fructose	+	Succinamic acid -
L-Fucose	-	Glucuronamide -
D-Galatose	+	Alaninamide -
Gentiobiose	-	D-Alanine +
α-D-Glucose	+	L-Alanine +
m-Inositol	-	L-Alanylglycine +
α-D-Lactose	-	L-Asparagine +
Lactulose	-	L-Aspartic acid +
Maltose	+	L-Glutamic acid +
D-Mannitol	+	Glycyl-L-aspartic acid +
D-Mannose	+	Glycyl-L-glutamic acid +
D-Melibiose (C1)	-	L-Histidine (G1) -
β-Methyl D-galactoside	-	Hydroxy-L-proline -
D-Psicose	+	L-Leucine -
D-Raffinose	-	L-Ornithine +
L-Rhamnose	-	L-Phenylalanine +
D-Sorbitol	-	L-Proline +
Sucrose	-	L-Pyroglutamic acid +
D-Trehalose	-	D-Serine -
Turanose	+	L-Serine +
Xylitol	-	L-Threonine +
Methylpyruvate	-	D,L-Camitine +
Mono-methylsuccinate	-	γ-Aminobutyric acid +
Acetic acid (D1)	-	Urocanic acid (H1) +
Cis-aconitic acid	+	Inosine +
Citric acid	+	Uridine +
Formic acid	-	Thymidine -
D-Galactonic acid lactone	+	Phenylethylamine -
D-Galacturonic acid	+	Putrescine -
D-Gluconic acid	+	2-Aminoethanol -
D-Glucosaminic acid	-	2,3-Buthanediol -
D-Glucuronic acid	-	Glycerol +
α-Hydroxybutyric acid	-	D,L-α-glycerolphosphate -
β-Hydroxybutyric acid	+	Glucose-1-phosphate -
γ-Hydroxybutyric acid	+	Glucose-6-phosphate -

**Fig. 4.** Scanning electron micrograph of *Pseudoalteromonas* sp. HK-3 after 36 h of incubation. Scale bar, 1 μm.

작성하기 위하여, PCR을 통해 16S rRNA 유전자를 증폭하고, 부분적인 염기서열을 결정하였다. 이 분리세균 HK-3는 *Pseudoalteromonas* species와 98%의 유사성을 나타내었으며, 이 균주와 여러 종의 *Pseudoalteromonas* 종에 속하는 다른 종들과의 유사성을 Fig. 3에 나타내었다. National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Logical Alignment Search Tool (BLAST)을 통하여 상동성을 확인한 결과 그중 *Pseudoalteromonas agarivorans* KMM 255와 99%의 상동성을 보였으며 *Pseudoalteromonas atlantica* IAM 12927과 *Pseudoalteromonas espejiana* NCIMB 2127에서도 역시 99%의 높은 상동성을 나타냈다. 그 결과는 GenBank database에 [FJ477041]로 등록하였다. Lin 등(17)은 유류분해능을 가지는 *Pseudoalteromonas* sp. P29를 유류오염 지역에서 분리하였으며, 특히 *n*-alkane을 생분해하는데 우수함을 보고하였다. 이러한 보고는 본 연구에서 사용된 유류오염지역에서 분리된 *Pseudoalteromonas* sp. HK-3와 더불어 *Pseudoalteromonas* 종은 유류분해와 생물계면활성제 생산에 대한 생물적 환경정화에 기여한다는 가능성을 보여주었다.

#### 주사 전자현미경을 이용한 세포 외부 형태 관찰

분리세균인 *Pseudoalteromonas* sp. HK-3의 세포 외부 형태를 주사전자현미경으로 관찰하였다. Fig. 4에서 보여주는 바와 같이, 이 세균은 전형적인 짧은 막대형이었으며, 그 표면이 매끄럽지 않고 울퉁불퉁하였다. Iwona 등(10)은 *Pseudoalteromonas* 종을 주사전자현미경을 이용하여, HK-3에서와 마찬가지로 동일한 형상으로 관찰하였다.

미생물의 원유분해 능력에 대해서는 많이 연구되어 있는 실정이지만 빈번히 일어나고 있는 실제 해양의 원유유출 사고에 비하여 실 사례에서의 현장적용은 미미한 실정이다. 본 연구를 통하여 HK-3의 생물계면활성 물질의 생산을 확인하였으며, 향후 생물계면활성제를 생산하는 HK-3를 이용한 원유에 오염된 환경에 대한 벤치규모와 현장적용을 위한 연구가 진행될 것이다.

## 적요

본 연구의 목적은 원유에 오염된 지역의 토양시료로부터 분리한 생물계면활성제 생산균주의 특성을 조사하기 위하여 실시하였다. 1% 원유를 포함하는 배지에서 균주 HK-3의 배양기간 동안, 생장, 생물계면활성제의 생산, pH의 변화 등을 조사하였다. 생물계면활성제의 생산능력이 뛰어난 균주인 HK-3를 선별하여, 이 균주의 배양기간에 따른 생장 변화와 생물계면활성제의 생산량, 그리고 pH에 대하여 관찰하였다. HK-3는 배양 36시간이 경과하였을 때, 가장 많은 양의 생물계면활성제를 생산하였다. 생물계면활성제 생산에 대한 부가탄소원의 효과를 알아보기 위하여 HK-3를 다른 부가탄소원(예, glucose, dextrose, mannitol, citrate, acetate)과 함께 배지에서 배양하였다. 그 결과, 생물계면활성제의 최대생산량은 mannitol을 포함하는 BH 고체평판배지에서 관찰되었으며, 투명대의 면적은 직경은 약 7.64 cm<sup>2</sup>로 측정되었다. 분리균주의 생리학적 및 생화학적 특성을 조사하였으며, 주사전자현미경을 통하여 불규칙한 막대형의 세균으로 관찰되었다. BIOLOG 시스템과 16S rRNA 염기서열을 이용한 계통유전학적 분석을 통하여 동정하여 *Pseudoalteromonas* 종으로 확인되어 *Pseudoalteromonas* sp. HK-3로 명명하였으며, GenBank에 [FJ477041]로 등록하였다.

## 참고문헌

- Ahn, Y.H., B.G. Jung, N.C. Sung, and Y.O. Lee. 2009. Characterization of petroleum hydrocarbon degradation by a *Sphingomonas* sp. 3Y isolated from a diesel-contaminated site. *J. Science* 19, 659-663.
- Baek, K.H., H.S. Kim, I.S. Lee, H.M. Oh, and B.D. Yoon. 2003. Effects of oil contamination levels and microbial size on hydrocarbon biodegradation. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 408-412.
- Cameotra, S.S. and P. Singh. 2008. Bioremediation of oil sludge using crude biosurfactants. *Int. Biodeterio. Biodegrad.* 62, 274-280.
- Cha, J.Y., S.Y. Chung, Y.S. Cho, Y.L. Choi, B.K. Kim, and Y.C. Lee. 1999. Characterization of crude oil degradation by *Klebsiella* sp. KCL-1 isolated from sea water. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 452-457.
- Coulon, F., B.A. McKew, A.M. Osborn, T.J. McGenity, and K.N. Timmis. 2007. Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate. *Environ. Microbiol.* 9, 177-186.
- da Cunha, C.D., A.S. Rosado, G.V. Sebastian, L. Seldin, and I. von der Weid. 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.
- Das, K. and A.K. Mukherjee. 2007. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresour. Technol.* 98, 1339-1345.
- Deziel, E., G. Paquette, R. Villemur, F. Lepine, and J.G. Bisailon. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1908-1912.
- Freedman, B. 1995. Environmental ecology. 2<sup>nd</sup> ed. pp. 159-188. Academic Press, San Diego, California, USA.
- Iwona, B.B. and C.G. Christine. 1999. Recent advances in the study of biocorrosion-an overview. *Revista de Microbiologia* 30, 177-190.
- Joshi, S., C. Bharucha, S. Jha, S. Yadav, A. Nerurkar, and A.J. Desai. 2008. Biosurfactant production using molasses and whey thermophilic conditions. *Bioresour. Technol.* 99, 159-199.
- Kim, S.H., S.C. Lee, J.S. Yoo, W.H. Joo, S.Y. Chung, and Y.L. Choi. 2004. Characterization of oil-degradation biosurfactant produced by *Bacillus* sp. TBM40-3. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 47, 170-175.
- Koch, A.K., O. Kappeli, A. Fiechter, and J. Reiser. 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173, 4212-4219.
- Lal, B. and S. Khanna. 1996. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 355-362.
- Leacock, E. 2005. The Exxon Valdez oil spill. pp. 34-46. Facts on file Inc. New York, N.Y., USA.
- Lee, S.C., S.J. Lee, S.H. Kim, I.H. Park, Y.S. Lee, S.Y. Chung, and Y.L. Choi. 2008. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil. *Bioresour. Technol.* 99, 2288-2292.
- Lin, X., B. Yang, J. Shen, and N. Du. 2009. Biodegradation of crude oil by an arctic psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. P29. *Curr. Microbiol.* 59, 341-345.
- Longeon, A., J. Peduzzi, M. Barthelemy, S. Corre, J.L. Nicolas, and M. Guyot. 2004. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* Species Strain X153. *Mar. Biotechnol.* 6, 633-641.
- McKew, B.A., F. Coulon, M.M. Yakimov, R. Denaro, M. Genocese, C.J. Smith, A.M. Osborn, K.N. Timmis, and T.J. McGenity. 2007. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ. Microbiol.* 9, 1562-1571.
- Mukred, A.M., A.A. Hamid, A. Hamzah, and W.M. Wan Yusoff. 2008. Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. *J. Biol. Sci.* 8, 73-79.
- Ochsner, U.A., A.K. Koch, A. Fiechter, and J. Reiser. 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176, 2044-2054.
- Sathishkumar, M., A.R. Binupriya, S.H. Baik, and S.E. Yun. 2008. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. *Clean* 36, 92-96.
- Siegmund I. and F. Wagner. 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol. Tech.* 5, 265-268.