

해양세균 *Achromobacter* sp. M-1220 균주를 이용한 생물유화제 물질의 생산

박중연 · 홍용기*

부산수산대학교 생물공학과

Production of Bioemulsifier from a Marine Bacterium *Achromobacter* sp. M-1220

Park, Jung-Youn and Yong-Ki Hong*

Department of Biological Science and Technology,
National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

A marine bacterium which was isolated from the enrichment culture for the emulsification of Bunker-C oil produced a bioemulsifier potently. The strain identified as an *Achromobacter* sp. M-1220. The bioemulsifier was produced during mid-logarithmic phase in hexadecane oil medium at 18°C. It appeared to be a cationic peptidolipid substance and showed an active stabilizing effect on the emulsion of crude oils and a few vegetable oils.

생물유화제 (Bioemulsifier)는 주로 미생물이 생성하는 물질로서 각종 유류 (Oil)를 수용액에 유화 (Emulsion)시키는 일종의 계면활성제로서 무독성 유화제의 장점과 잔존 석유회수 등의 이유로 1970년대부터 많은 연구들이 이루어지고 있다. 이들은 주로 세균(1~7) 및 효모(8)로부터의 유화물질 생산과 특성 등에 대한 연구이며 이같은 유화제는 주로 탄수화물, peptide 혹은 인산 등과 지방산과의 복합체(9)로서 이루어져 있으며 고분자로서 쉽게 가수분해되어 질 수 있으므로 잔존독성이나 환경오염의 문제를 야기시키지 않는 장점을 갖고 있다. 그러나 지금까지 해양세균에 의한 해양환경조건에서의 유화제물질 생산에 대한 연구는 거의 찾아 볼 수 없었으므로 저자 등은 Bunker-C 유의 해양환경에서의 생물분해(10~12)실험 도중 이들 석유회수의 생물분해에 유화제물질의 생성이 필수적이라는 점을 고려하여 이의 관련 연구로서 유화제물질의 생산에 대한 연구를 하게 되었다.

재료 및 방법

균 분리

균원 시료는 부산항, 울산항, 충무항 등지의 해수 및 해저질을 채취하여 hexadecane oil 배지(0.1% Hexadecane, 0.1% NH₄Cl, 0.001% K₂HPO₄, pH 7.6 in sea water)에서 5일 간격으로 5회 집식배양시켜 변형된 marine agar(12)상에서 균분리하였다.

배양조건

분리균은 hexadecane oil 배지를 사용하여 28시간 동안 18°C에서 120 rpm 조건으로 진탕배양시켰다.

유화제 활성 측정

Zukerberg 방법(13)에 따라 hexadecane 과 2-methyl naphthalene 동량혼합물의 0.1 ml 용액에 유화제 2.5 ml를 첨가한 후 50 mM Tris buffer 7.4

Key words: Bioemulsifier, peptidolipid, marine bacterium

*Corresponding author

ml로 pH를 8.0으로 조정된 반응액을 150 rpm 왕복진탕조건으로 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 10분 정지 후 620 nm에서 나타난 흡광도 값을 측정하여 O.D. 0.1 값을 유화제 활성 1 단위로 규정하였다.

유화제 정제

배양액을 4°C에서 10분간 10 kg로 원심분리하여 균체와 잔존 hexadecane을 제거한 후 pH를 0.8로 조정하여 -20°C에서 4시간 이상 침전시켰다. 그 후 4°C에서 30분간 17300g의 원심분리로 침전되는 것을 증류수에 현탁하여 조정제 시료로서 대부분의 실험에 사용하였다. 그리고 최종정제는 이 산 침전물을 건조시킨 후 methanol에 용해하는 분획만을 회수하여 최종 정제시료로 사용하였다.

유화안정값

각종 oil에 유화제를 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 150 rpm으로 진탕유화시켜서 10분간 방치시킨

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of marine bacterium M-1220 strain.

Test	Results
Form	Coccobacillus
Flagella	Peritrichous
Op.pH	9
Pigment	-
Motility	+
Gram stain (Hucker's method)	-
Gram stain (KOH method)	-
Fermentation (Hugh-Leifson medium)	-
Kovacs oxidase test	+
Indole test	-
Catalase test	-
VP reaction	+
Methyl red test	-
Spore formation	-
H ₂ S production	-
Urease test	-
Casein hydrolysis	+
Starch hydrolysis	-
Lipase production	+
Citrate utilization	+
Fructose utilization	+

후부터 50분까지 그 흡광도 변화를 측정하여 Cirigliano 등(8)과 같이 이의 log 값을 시간에 대하여 plot할 때 생기는 기울기값 등 Decay constant (Kd)를 구하였다.

분류동정

균의 형태 및 flagella 염색은 marine agar(12)상에서 배양된 세포를 Leifson 방법(14)에 따라 행하였으며 탄수화물의 이용성은 해양 최소배지(15)를 이용하였다. 염색체의 G+C 함량은 Sato 방법(16)에 따라 추출한 후 Tm 측정법(17)에 의거 대장균 ATCC 11229와 비교 계산하였다.

결과 및 고찰

선정균의 동정

집식배양에서 분리된 128개 집락중 Bunker-C 유의 유화활성이 가장 높은 M-1220 균주의 형태 및 생화학적 성질을 조사한 바 Table 1과 같이 그람 음성, 당발효 음성, Kovacs oxidase 양성반응을 나타내고 또 Fig.1과 같이 주행성 편모를 지닌 무색소 coccobacillus 형태로 보였다. 그리고 해양 최소배지에서 arabinose, glucose, xylose 등에서 산생성 반응을 보였다. 또 염색체의 melting temperature는 90.7°C로 나타나서 대장균과 비교 측정한 결과 G+C 함량이 50.6%인 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 결과들로 미루어 보아 M-1220 균주는 해양세균 *Achromobacter* 속(18~20) 세균으로 추정할 수 있었다.

유화제의 생성

Hexadecane 배지에서의 균성장 및 유화제 생산력

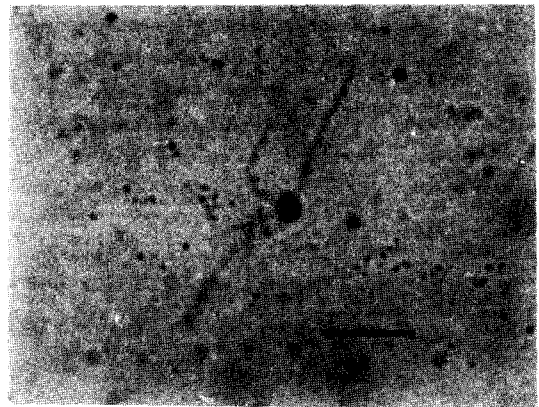


Fig. 1. Morphology of the isolated strain M-1220. Bar=5 μm.

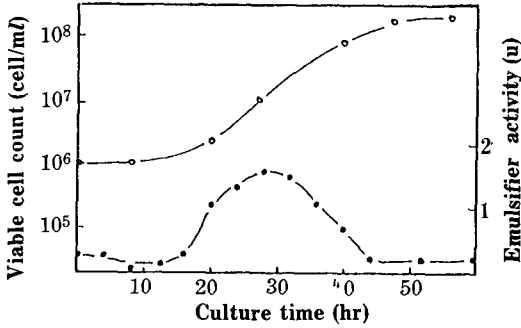


Fig. 2. Extracellular prouction of the bioemulsifier on hexadecane medium.

Cell count (○-○) was done on marine agar and the emulsification activity (●-●) was measured as described in the materials and methods.

을 조사하기 위하여 인공해수(21)에 녹인 800 ml 배양액을 60 시간까지 통기배양하면서 생균수와 유화제 활성을 측정된 결과 Fig.2와 같이 배양 28 시간 전후 즉 대수증식기 초기 및 증기 사이에서 최대의 유화제 생성량을 보였다.

탄소원의 영향

배지성분중 hexadecane 대신에 각종 탄소원을 1% 및 0.1% 농도로 첨가하여 배양한 후 유화제 생성량 및 균체량을 비교 측정된 결과 Table 2와 같이 1%의 hexadecane 및 ethanol이 가장 우수하였으며 이는 Panchal(2) 및 Margaritis(4) 등의 결과와 일치하였다.

유화물질의 정제

배양액을 원심분리시켜 미분해 hexadecane 과 균체를 제거한 후 우선 pH별로 등전점 침전시킨 결과 Fig.3과 같이 pH0.8부근에서 유화물질이 가장 많이 침전회수되었으며 pH 안정성은 pH4에서 9 정도까지 중성범위에서 안정값을 나타내었다. 그리고 처리온도를 4°C 혹은 -20°C로 두어 비교 실험하여 본 결과 Fig.4와 같이 pH0.8로 조정된 후 -20°C에서 4시간 이상 침전시켜두는 것이 비교적 안정하게 유화물질을 회수할 수 있는 것으로 나타났다. 이와 같이 pH0.8의 산침전 유화제를 완전 정제하기 위하여 각종 유기용매로 추출하여 본 결과 Table 3과 같이 n-buthanol, ethanol, methanol 등에만 용출되는 medium polar compound의 특성(22)을 가진 것으로 알 수 있으며 그중 용출력이 비교적 강하다고 여겨지는 methanol로 추출한 후 건조시켜 TLC로 단일물질의 여부를 확인하여 본 결과 산침전 시료는

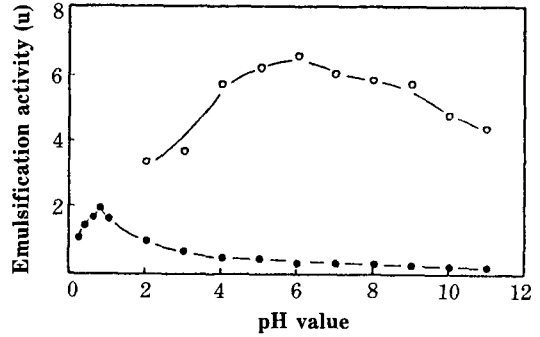


Fig. 3. Precipitation and stability of the bioemulsifier at different pH.

The precipitant of culture fluid was obtained after 4hrs at different pH on 4°C and the emulsification activity (●-●) was assayed. The pH stability (○-○) of bioemulsifier was tested after 2days' pH treatment at 30°C.

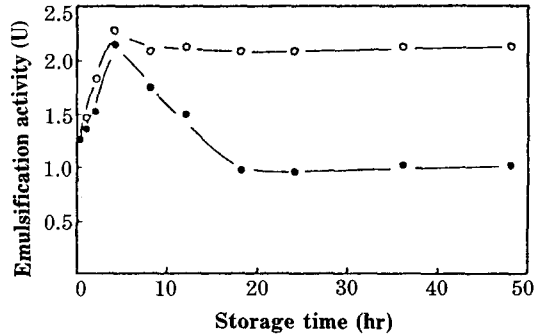


Fig. 4. Effect of storage time for the precipitation of bioemulsifier at pH 0.8.

The storage temperature was at -20°C (○-○) and 4°C (●-●).

Table 2. Effect of carbon sources on the production of bioemulsifier and biomass.

	Emulsifier (u)		Biomass (OD ₆₀₀)	
	1%	0.1%	1%	0.1%
Hexadecane	2.30	1.84	0.021	0.007
Ethanol	2.10	0.99	0.003	0.003
Na-Acetate	0.43	0.80	0.011	0.016
Kerosene	0.40	0.32	0.005	0.019
Paraffin	0.33	0.44	0.010	0.004
Crude oil (Brunei Champion)	0.35	0.62	0.010	0.003
Crude oil (Kuweit)	0.75	0.53	0.005	0.001
Bunker-C oil (4% sulfur)	0.21	0.28	0.001	0.004

Table 3. Solubility of the bioemulsifier by several solvents.

Solvents	Solubility
Acetone	-
Benzene	-
n-Buthyl alcohol	+
Carbon tetrachloride	-
Chloroform	-
Dichloromethane	-
Ether	-
Ethyl alcohol	+
n-Heptane	-
n-Hexane	-
Methyl alcohol	+
n-Pentane	-
Toluene	-
H ₂ O	+

Table 4. Identification of the bioemulsifier.

Coloring Reagents	Reaction
Bromocresol purple	-
Iodine	+
Molybdenum blue	-
α -Naphthol-Sulfuric acid	-
Ninhydrine	+
Rhodamine B	+
Sulfuric acid	+
UV	near-UV fluorescence

최소 2개 이상의 spot 을 가진 것으로 나타났지만 Methanol 추출시료는 단일 spot 으로 나타났다.

유화제의 물질조성

TLC 상에서 단일물질로 확인된 유화제의 물질조성을 조사하기 위하여 Table 4 와 같은 발색반응을 하여 본 결과 Rhodamine B 와 Ninhydrine 에만 동일 spot 에서 동일반응을 나타내므로 Peptidolipid 성 물질로 추정이 가능하였다. 또 Amberite IRC-50 양이온교환수지에 흡착하는 것으로 보아 본 물질은 양이온하전을 띄는 것으로 생각된다. 그러나 유사물질로 구성된 Surfactin(6)이나 Biosurfactant(7)의 경우 Table 5의 Rf 값과 많은 차이를 가지므로 이들과는 서로 다른 조성비율을 가진 Peptidolipid 성 물질

Table 5. Rf value of the bioemulsifier.

Sovent System	Solvent Ratio	Rf
CHCl ₃ :CH ₃ OH:Acetone:H ₂ O	25:15:4:2	0.41
CHCl ₃ :CH ₃ OH:28% NH ₄ OH	65:25:10	0.14
CHCl ₃ :CH ₃ OH:H ₂ O	65:25:4	0.11

Table 6. Stabilization of various oil emulsions by the bioemulsifier.

Oils	Decay Constant (Kd)(10 ⁻³)		Difference
	w/oEmulsifier	w/ Emulsifier	
Apricot oil	-7.4	-2.0	5.4
Castor oil	-6.3	-3.6	2.7
Corn oil	-6.7	-2.6	4.1
Cotton seed oil	-5.2	-1.7	3.5
Olive oil	-7.1	-5.1	2.0
Peanut oil	-7.4	-2.9	4.5
Perilla oil	-9.9	-7.2	2.7
Pupa oil	-6.8	-5.7	1.1
Soybean oil	-5.2	-0.7	4.5
Kuweit crude oil	-12.6	-3.0	9.6
Mexico crude oil	-12.4	-3.8	8.6
Bunker-C oil (1.6% S)	-193.6	-41.8	151.8*
Bunker-C oil (4.0% S)	-148.6	-56.8	91.8*

*Calculated during the first 5 min because of a sharp decrease of absorbance

인 것으로 여겨진다.

유화 안정능력

각종 Oil 에 대한 유화안정능력을 평가하기 위하여 유화탁도의 Log 값을 시간에 대하여 plot 한 결과 기울기값 즉 Decay constant(Kd)는 Table 6 과 같다. Kd 값이 0 에 가까워질수록 유화안정성이 크며 또 유화제를 첨가하지 않은 대조구와의 차이가 크면 클수록 효과적인 유화작용을 가진 것으로 알 수 있으므로 본 유화제는 원유, Bunker-C 유, 살구씨유, 두유, 땅콩유, 옥수수유 등에 비교적 강한 유화안정능력을 지닌 것으로 볼 수 있었다.

요 약

해수환경에서 Bunker-C 유를 가장 강력히 유화분

산시키는 *Achromobacter* sp. M-1220 균주를 대상으로 하여 생물유화제물질의 생성 및 그 성질을 조사하여 본 결과 유화제물질은 hexadecane oil 배지를 사용하여 18°C에서 대수증식기 중기때에 가장 많이 생성되었다. 그리고 이는 양이온성의 peptidolipid 물질인 것으로 여겨지며 원유와 몇종의 식용유에도 강한 유화안정능력을 보였다.

사 사

본 연구는 1988년도 한국과학재단의 연구비(881-0407-007-1)로 수행되었으며 당 재단에 감사드립니다.

참고문헌

- Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz, and D.L. Cutnick: *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 402 (1979).
- Panchal, C.J. and J.E. Jajic: *Dev. Ind. Microbiol.* **19**, 569 (1978).
- Cooper, D.G., J.E. Jajic, D.F. Gerson, and K.I. Marinin: *J. Ferment. Technol.* **58**, 83 (1980).
- Mzgaritis, A., K. Kennedy, J.F. Jajic and D.F. Gerson: *Dev. Ind. Microbiol.* **20**, 623 (1979).
- Cooper, D.G., J.E. Jajic, and D.F. Gerson: *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 4 (1979).
- Cooper, D.G., C.R. MacDonald, S.J.B. Duff and N. Kosaric: *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 408 (1981).
- Javaheri, M., G.E. Jennemum, M.J. McInerney, and R.M. Knapp: *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 698 (1985).
- Cirigliano, M.C. and G.M. Caman: *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 846 (1985).
- Cooper, D.G. and J.E. Zajic: *Adv. Appl. Microbiol.* **26**, 229 (1980).
- 박인식, 박중연, 서근학, 홍용기: 한국수산학회지 **26**, 152 (1987).
- 박인식, 박중연, 진덕희, 홍용기: 한국산업미생물학회지 **16**, 270 (1988).
- 박중연, 박인식, 서근학, 홍용기: 한국산업미생물학회지 **16**, 384 (1988).
- Zuckerberg, A., A. Diver, Z. Peeri, D.L. Gutnick, and E. Rosenberg: *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 414 (1979).
- Smibert, R.M. and N.R. Krieg: Manual of methods for general bacteriology. 414, ASM. (1981).
- Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel: The Prokaryotes. Springer-Verlag. N.Y. Vol. 2, 1308 (1981).
- Schleif, R.F. and P.C. Wensink: Practical methods in molecular biology. Springer-Verlag. N.Y. 98. (1981).
- Johnson, J.L.: Manual of methods for general bacteriology. 457. ASM (1981).
- 多賀伸夫: Marine microbiology. Tokyo University Press. Tokyo. Vol.2, 52 (1974).
- Walker, J.D. and R.R. Colwell: *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 198 (1975).
- Krieg, N.R. and J.G. Holt: Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins. London. Vol. 1, 305 & 361 (1984).
- Dawson, R.M., D.C. Elliott, W.H. Elliott, and K.M. Jones: Data for biochemical research. 3rd ed. Oxford Science Publications. Oxford. 448 (1981).
- Demain A.L. and N.A. Solomon: Manual of industrial microbiology and biotechnology. ASM. 436 (1986).

(Received April 21, 1989)