

*Nocardia amarae*를 이용한 석유 유상액의 탈유화

† 이 기 영 · ¹이 진 중 · ²김 동 운 · ³나 건 · ³이 재 찬

전남대 생물화학과, ³공업화학과, ¹전남 전남대 환경과학과, ²광양전문대 석유화학과
(접수 : 1997. 12. 20., 게재승인 : 1998. 3. 30.)

De-emulsification of Petroleum Emulsion Using *Nocardia amarae*

Ki-Young Lee[†], Jin-Jong Lee¹, Dong-Woon Kim², Kun Na³, and Jae-Chan Lee³
Dept. of Biochemical Engineering,

³Dept. of Chemical Technology, Chonnam Nat'l Univ., Kwangju 500-757, Korea

¹Dept. of Environ. Technology, Chonnam Junior College, Chonnam 549-910, Korea

²Dept. of Petrochemistry Kwangyang Junior College, Chonnam 545-800, Korea

(Received : 1997. 12. 20., Accepted : 1998. 3. 30.)

The characteristics of de-emulsification of petroleum emulsion by *Nocardia amarae* were investigated. Insoluble medium containing n-hexadecane was more effective than soluble medium in de-emulsification of emulsion containing diesel and bunker C as the organic phase. Emulsion made by the addition of xanthan or bioemulsifier was de-emulsified by *N. amarae*, and longer culture age was effective. In low viscosity range, organic phase with longer carbon chain was more effective. The contact angle between bacterial film and water droplet in air increased from 16 degree for 4 day culture age to 26 degree for 15 day. The contact angle between bacterial film and water droplet in kerosene, n-hexane or n-hexadecane also increased to greater than 100 degree after 3 day culture age. The hydrophobicity of bacterial film increased according to the culture age.

Key Words : de-emulsification, *Nocardia amarae*, emulsion, contact angle, hydrophobicity

서 론

원유의 회수나 유류의 해양유출, 유조차의 전복사고, 석유공장 내의 종말폐수, 그리고 정비공장 등의 유류세척폐수 등에서 기름-물 유상액이 만들어진다. 이 유상액들은 환경을 오염시키는 역할을 하므로 환경으로의 배출시에는 유류농도가 기준치 이하로 낮아져야 한다. 이에 대한 대책으로 미생물에 의한 유류분해가 제안 되었지만 비용은 절감되나 자원 재활용면에서 최선의 방법은 아니다.

다른 대안으로 화학 탈유화제를 사용하는 유수분리기가 제시되고 있으나 병커C유(B/C)와 같이 점성이 있는 물질이 포함된 경우에는 별 효과가 없고 유수분리장치는 공정개선의 여지가 많다.

생 탈유화제(bio-deemulsifier)의 경우는 환경친화적이고 개발 여하에 따라서는 경제적으로도 경쟁력이 있을 것으로 생각된다. 생 탈유화제와 관련된 연구는 주로 캐나다에서 이루어졌다. 캐

나다 앨버타에 있는 tar sand 중에 함유된 석유량은 전 아라비아 반도의 석유매장량 이상인데 이 tar sand에서 기름을 회수하기 위해 생 탈유화제를 활용하는 연구가 Cairns 등(1-3)에 의해 활발히 진행되었다.

Cairns 등(1)은 *Nocardia amarae*가 간단하고 잘 정의된 모델 O/W 유상액의 잠재적인 탈유화제임을 보고했다. L92 유상액에 대한 탈유화능은 여러 화학제품, pH변화(3~10), NaCl농도 (0~1 mM), 그리고 열(탈유화능의 감소없이 120°C에서 20분)에 견딘다고 보고 되었는데, 이는 산업적인 적용면에서 중요한 성질이다. 또한 Stewart 등(2)은 *Nocardia* 뿐만 아니라 *Corynebacterium petrophilum*도 W/O 석유 유상액에 대해 효과적인 탈유화제임을 밝혔다. 그리고 각 미생물에는 최적 탈유화능을 갖는 특별한 성장기가 있다고 판단하였다. Gray 등(3)은 앨버타 기름모래 기술연구소에서 공급받은 O/W 유상액이 *Nocardia*에 의해 탈유화되고 배양기간이 길수록 박테리아 표면의 소수성은 증가하고 O/W 유상액의 탈유화가 촉진된다고 보고하였다.

그러나 생 탈유화제에 대한 연구는 주로 등유같은 저점성 유 기장에서 이루어졌기 때문에 적용분야가 극히 제한된다. 이에 본 연구에서는 점성이 높은 병커C유와 경유의 혼합물로 이루어진 유상액은 물론 생유화제로 만들어진 유상액의 탈유화 특성을 연구 대상으로 삼았다.

† Corresponding Author : Dept. of Biochemical Engineering,
Chonnam Nat'l Univ., Kwangju 500-757, Korea
Tel : 062-530-1843, Fax : 062-530-1849
e-mail : kilee@orion.chonnam.ac.kr

재료 및 방법

결과 및 고찰

회분발효배양, 표면장력 및 점착각 측정

본 연구에는 유화활성이나 탈유화활성 혹은 기름분해활성이 있는 것으로 알려진 *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1(4-5), *Acinetobacter* sp. M-1(6), *Pseudomonas putida* ATCC 17484 (7-8), *Nocardia amarae* 균주(1-3)가 시험되었는데 이중 탈유화능이 뛰어난 *Nomrdia amarae* ATCC 27808 균주가 탈유화 특성실험에 주로 사용되었다. 각 균주들은 발효조(NBS Bioflow II 2.5 L, 26°C, 300 rpm)와 진탕배양기(KMC-8480SF, 26°C, 180 rpm)를 통해 회분배양 되었다.

*N. amarae*의 탈유화 특성을 위한 배양실험에 사용되는 가용성배지는 포도당 1 g/L와 효모추출물 1 g/L로 구성되었고, 불용성배지는 비수용성 기질인 n-hexadecane을 4 g/L 만큼 첨가한 것이다.

배양액의 표면장력은 실온(25°C)에서 motor로 된 sample stage와 백금 고리에 연결된 strain gauge가 부착된 표면장력계(NIMA ST9002, England)를 이용하여 산으로 세척한 100 mL의 유리 beaker 안에서 측정하였고, 세포표면의 소수성-친수성은 박테리아 필름 위에 여러 유기상을 넣고 그 속에 물방울을 떨어뜨린 다음 물방울이 박테리아 필름과 이루는 접촉각을 측정하는 장치(ERMA G-1, Japan)를 통해 결정하였다.

유상액 제조와 유화활성 및 탈유화활성 측정

각종 유화제를 사용하여 유상액을 제조하고 탈유화제를 첨가하여 탈유화활성을 측정했다.

표준 유상액은 Pluronic L92 유화제(BASF Wyandott)가 들어있는 물 400 mL에 등유 600 mL를 넣고 더 이상의 유화가 일어나지 않을 때까지 homogenizer(IKA T25, Germany)를 사용해 최고속도로 혼합하여 제조하였다. 실험목적에 따라 유화제나 유기상의 종류를 바꾸어 실험하였다.

유화제인 Span 80, Tween 20, xanthan과 n-hexane, n-hexadecane, crystal violet, oil red O는 Sigma제품을 사용하였고, gasoline, kerosene, diesel, bunker C유(B/C)는 인근 주유소에서 구입하여 사용하였다.

유상액 형태(water-in-oil[W/O] 또는 oil-in-water[O/W])는 1차적으로 염료(친수성인 crystal violet와 친유성인 oil red O)를 통하여 판단하였으며, 이 방법으로 판단되지 않을 때는 전기전도도계(Checkmate 90 Corning, USA)를 사용하였다. 유화활성은 Zuckerberg의 방법(9)을 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 125mL 플라스크에 배양액 1 mL, hexadecane:2-methylnaphtalene [1:1(vol/vol)] 혼합물 0.1 mL, 그리고 Tris-Mg 완충액(20mM Tris-HCl, 10mM MgSO₄, pH 7.2)을 혼합하여 26°C에서 1시간 동안 150 rpm으로 반응시킨 다음 10분 동안 정지시킨 후, 620nm에서 탁도를 측정하여 결정하였다(9).

탈유화는 유상액에 일정부피의 세포현탁액 또는 배지성분만 있는 대조구를 넣고 30초 동안 shaking 하여 일으켰으며, 탈유화활성은 유상액이 깨지는 반응이 1차반응이라는 가정하에 유상액의 부피가 절반으로 줄어드는 시간(half-life(t_{1/2}))으로 결정하였다(1). 그리고, 생 탈유화제의 활성을 비교하기 위해 합성탈유화제인 N-7733(Nalco, USA)을 사용하였다.

회분 발효

Figure 1은 가용성 배지로 배양된 *N. amarae* 발효액의 특성을 나타낸 것이다. 발효도중 거품이 많이 나와 교반속도는 300 rpm 이상으로 높이지 못하였다. 발효 4일후 정지상에 도달하였고 2~3일 사이에 표면장력은 최대값 60 mN/m이 되었다. 3일 이후의 발효액에서는 최대 0.3 정도의 유화력을 보였고 발효액 1 mL을 원심침강시켜 얻은 세포농축액을 10 mL의 표준유상액에 첨가했을 때의 t_{1/2}은 1분 이내의 아주 작은 값을 보였다.

Table 1은 유화, 탈유화 및 기름분해와 관련된 몇 가지 균주 발효액의 유화활성과 탈유화활성 그리고 점착각을 나타낸 것이다. 상업화된 생유화제인 에멀산을 생산하는 *A. calcoaceticus* RAG-1이 높은 유화활성을 보였지만 탈유화활성이 큰 *N. amarae*가 유화활성을 보이는 것은 주목할 만하다. 한편 박테리아 필름이 등유안에 있는 물방울과 이루는 접촉각이 *Nocardia* 보다 비슷하거나 큰 *Acinetobacter* sp. M-1이나 *P. putida*가 탈유화활성이 없다는 것은 탈유화를 일으키는 주요인자가 박테리아의 소수성 이외의 다른 것도 있음을 의미한다.

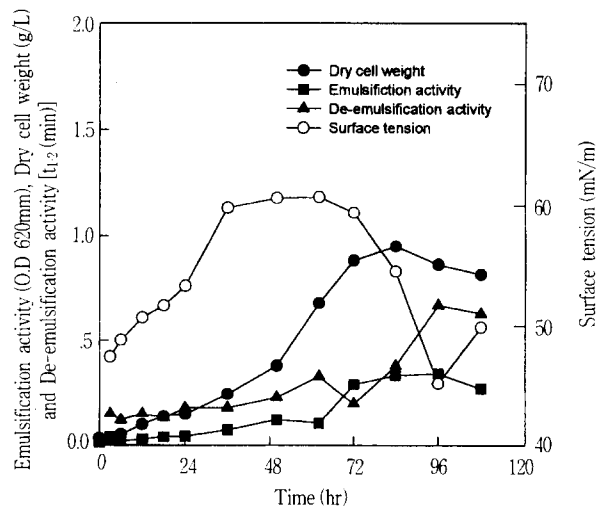


Figure 1. Characteristics of *N. amarae* cultures grown on soluble medium.

Table 1. Emulsification and de-emulsification activity of various strains.

Strain	Maximum emulsification activity(O.D 620nm)	Contact angle (degree)	t _{1/2}
<i>Acinetobacter</i> sp. M-1	0.1	60	> 100 hr
<i>A. calcoaceticus</i> RAG-1	0.45	17	> 100 hr
<i>P. putida</i>	0.2	90	> 100 hr
<i>N. amarae</i>	0.3	72	< 1 min

생 탈유화 (bio-deemulsification)

Figure 2는 화학적 탈유화제인 N-7733과 생 탈유화제인 *N. amarae*의 탈유화활성을 비교한 것이다.

N-7733를 2~10% 첨가하였을 때 유화층이 탈유화되는데 5~17분이 소요되었지만 4일간 배양한 박테리아 발효액을 같은 농도로 주입하였을 때는 10~40분이 소요되었다. 또한 발효액을 원심침강 시킨 발효농축액을 주입했을 때는 2.5~10분으로 원 발효액인 경우의 1/4로 줄었다. 이는 Table 1의 결과에 비추어 탈유화활성을 방해하는 유화활성이 발효액을 원심분리시켰을 때의 상층액에 존재하였을 것으로 판단된다.

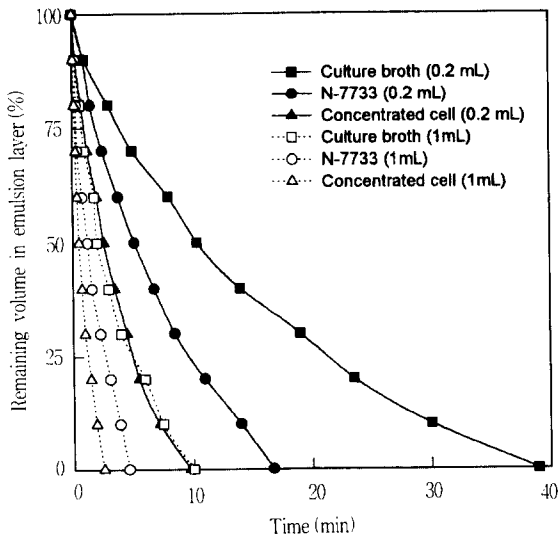


Figure 2. A comparison of de-emulsification activity between bio-deemulsifier and N-7733.

Table 2. De-emulsification activity ($t_{1/2}$, min) of emulsions with various emulsifier.

Culture age (day)	Emulsifiers				
	L92	T/S	S80	S80-2	Xanthan
1.5	20.4	2.9	0.3	3.1	25.3
3	12.6	1.6	13.5	0.7	23.5
5	2.6	1.5	10.0	0.6	12.3
8	2.3	1.2	8.7	0.5	5.0
12	1.4	1.3	7.1	0.3	9.2
Conductivity(μ S)	19.4	0.6	0.4	0.5	39.0

L92 : 0.1% Pluronic L92, T/S : 0.072% Span80 and 0.028% Tween 20, S80 : 0.1% Span 80, S80-2 : 0.2% Span 80, Xanthan : 0.1% Xanthan

Table 3. De-emulsification activity($t_{1/2}$) of (O/W) emulsions with various organic phase.

Culture age(day)	Culture broth					Concentrated cell			Supernatant		
	C6	C16	G	K	D	C6	K	D	C6	K	D
1.5	>100hr	174min	>100hr	500min	0.5min	0.1min	0.4min	0.3min	>100hr	>100hr	>100hr
3	200min	15min	>100hr	60min	0.3min	0.2min	0.4min	0.6min	>100hr	>100hr	>100hr
5	68min	13min	65min	50min	0.4min	0.3min	0.3min	0.9min	>100hr	>100hr	>100hr

C6 : Hexane, C16 : Hexadecane, G : Gasoline, K : Kerosene, D : Diesel

Table 2는 여러 유화제로 유화시킨 유상액을 박테리아를 이용해 탈유화시켜 측정된 결과이다. 증류수의 전기전도도는 2.6μ S이고 증류는 0.1μ S이므로 L92나 xanthan을 이용한 유상액은 O/W 유상액이고 T/S, S80, S80-2을 이용한 유상액은 W/O 유상액으로 판단된다. Xanthan의 경우 수용성 다중전해질 이므로 분산상의 전기전도도가 증류수보다 상당히 큰 것이 확인되었다. 한편 L92 유상액은 염료를 통해서도 O/W 유상액임이 확인되었다. 유상액 형태에 별 차이없이 배양기간이 오래된 세포가 탈유화에 효과적인 것을 나타냈다. 이 경향은 생 유화제인 xanthan 으로 유화된 유상액에서도 확인되었다.

또한 배양초기의 발효액이 W/O인 경우보다는 O/W인 경우에 탈유화효과가 좋을 수 있었다. 한편 Stewart 등(1983)은 oil well head W/O 유상액에 *N. amarae*나 *C. petrophilum*을 첨가하여 탈유화시킬 때 성장초기의 세포들(지수 및 정지상 초기)이 정지상 후기의 세포들보다 효과적이라고 보고했지만 본 실험에 사용된 W/O 유상액에서는 상반된 결과를 보였다. 이것을 설명하기 위해서는 또 다른 연구실험이 필요하다.

Table 3은 유화제로 Pluronic L92를 사용하고 유기상을 달리하였을 때 제조되는 유상액의 탈유화활성의 정도를 나타낸 것이다. 미생물의 배양기간이 길수록 $t_{1/2}$ 이 감소하였다. 또한 발효액을 원심분리하여 얻은 상층액은 탈유화효과가 없었으나 침전된 세포농축액은 탈유화효과가 높았다. 이는 탈유화특성이 세포 표면에 의한 것이라는 Cairns의 보고(1982)를 뒷받침 해준다. 한편 점성이 높지 않은 범위에서 탄소수가 많은 것이 탈유화에 효과적이었음을 보이는데 이는 탄소수가 많은 것이 그만큼 불안정한 때문인 것으로 판단된다. 일반적으로 사용되는 gasoline, kerosene, diesel에 경우에서도 탄소수가 많은 diesel이 kerosene 이나 gasoline에 비해 효과적이었다.

석유공장내에는 점성이 높은 병커C유와의 혼합유기상이 만든 유상액이 많다. Figure 3은 병커C유의 비율을 10, 20, 30%로 조정하고 나머지는 경유로 이루어진 유기상으로 유상액을 만들어 탈유화활성을 측정된 결과이다. 또한 n-hexadecane과 같은 비수용성 기질을 첨가시킨 불용성 배지에 의한 효과를 가용성 배지의 경우와 비교하였다. n-hexadecane이 첨가된 불용성배지는 가용성배지에 비해 경유와 병커C유의 혼합물의 탈유화 효과면에서 비효과적이었고 병커C유가 30%일 때는 탈유화활성이 상당히 작았는데 이는 높은 점성때문인 것으로 판단된다.

Table 4는 박테리아 필름 위에 놓여 있는 물방울이 박테리아 필름과 이루는 접촉각이다.

가용성 배지에서 자란 박테리아 필름이 배양기간이 4일에서 15일로 증가함에 따라 접촉각이 16° 에서 26° 로 증가하였다. 이 경향은 n-hexadecane이 첨가된 불용성 배지에서 자란 박테리아 필름에서도 확인되었다.

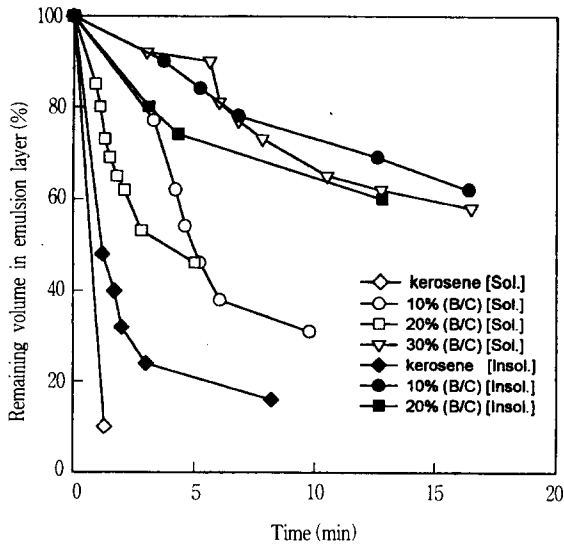


Figure 3. Effect of de-emulsification in various organic phases.

Table 4. Contact angle of water droplet on the bacterial film.

Medium	Culture age (day)	Contact angle (degree)
Soluble	4	16
	8	20
	15	26
Insoluble	4	18
	8	18.5
	15	28

N. amarae의 접촉각

Fig.4는 박테리아 필름 위에 여러 유기상을 넣고 그 속에 들어 있는 물방울이 박테리아 필름과 이루는 접촉각을 조사한 결과이다. 유기상의 종류와 별 차이없이 배양기간에 따라 접촉각이 증가하여 7일째에는 100°에 도달하였다. 즉 박테리아 표면의 소수성이 배양기간에 따라 증가한 것을 말해준다. 또한 (O/W)유상액에서 배양기간에 따라 탈유화활성이 증가한다는 Table 2와 Table 3의 실험결과를 뒷받침 해준다.

요 약

Nocardia amarae 발효액의 탈유화 특성이 조사되었다. n-hexadecane이 첨가된 불용성배지는 가용성배지에 비해 경유와 병커C유의 혼합물의 탈유화 효과면에서 효과적이었다. 생유화제인 xanthan 또는 유화제를 첨가하여 만든 유상액이 *Nocardia amarae*에 의해 탈유화 되었다. 이 때 배양기간이 긴 것이 탈유화에 효과적이었다. 점성이 낮은 범위에서는 탄소수가 높은 유기상이 탈유화 면에서 효과적이었다. 박테리아막이 공기 및 물방울과 만드는 접촉각은 4일된 미생물에서는 16°인 것이 15일된 미생물에서는 26°로 증가하였고, 박테리아 막과 유기상 및 물방울이 만드는 접촉각도 배양기간에 따

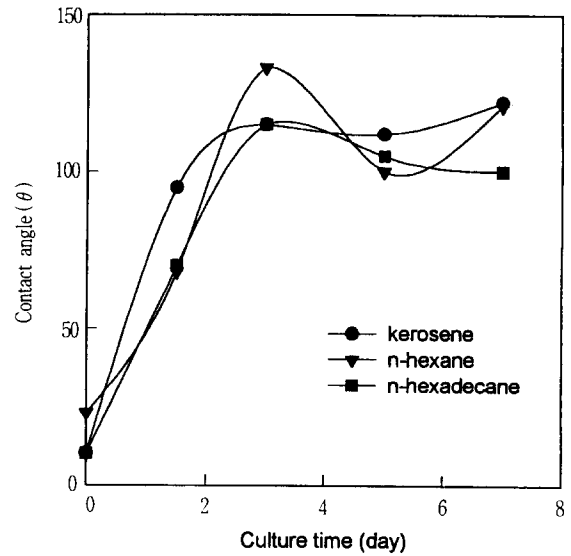


Figure 4. Contact angle of water droplet in various organic phase on bacterial film.

라 증가하여 7일째에 100°에 도달하였다. 즉 박테리아의 소수성이 배양기간에 따라 증가하였다.

감 사

본 연구는 96년 교육부 생물화공연구비의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Cairns, W. L., D. G. Cooper, J. E. Zajic, J. M. Wood, and N. Kosaric (1982), Characterization of *Nocardia amarae* as a Potent Biological Coalescing Agent of Water-Oil Emulsion, *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(2), 362-366.
2. Stewart, A. L. and W. L. Cairns (1983), Bacteria-induced De-emulsification of water-in-oil petroleum emulsions, *Biotechnology letters*, 5(11), 725-730.
3. Gray, N. C., A. L. Stewart, W. L. Cairns, and N. Kosaric (1984), Bacteria-induced De-emulsification of oil-in-water Petroleum Emulsion, *Biotechnology letters*, 6(7), 419-424.
4. Pines, O. and D. L. Gutnick (1986), Role for Emulsan in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on crude oil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 51(3), 661-663.
5. Zosim, Z., D. L. Gutnick, and E. Rosenberg (1982), Properties hydrocarbon-in-water Emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 Emulsan., *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 281-292.
6. Maeng, J. H., Y. Sakai, Y. Tani, and N. Kato (1996), Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1., *Journal of Bacteriology*, 178

- (13), 3695-3700.
7. 고영희, 하일호, 배경숙(1988), Naphthalene을 분해하는 *Pseudomonas putida* N3의 분리 및 특성, *한국산업미생물학회지*, 16(3), 199-204.
 8. 고영희, 전효곤, 조경연, 배경숙(1989), 방향족 탄화수소 분해 플라스미드의 n-alkane 자화성 *Pseudomonas putida*에
로의 전이, *한국산업미생물학회지*, 17(1), 51-55.
 9. Zuckerberg, A., A. Diver, Z. Perri, D. L. Gutnick and E. Rosenberg (1979) Emulsifier of *Acinetobacter* RAG-1 : Chemical and physical properties, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37(3), 414-420.