

*Rhodococcus erythropolis*를 통하여 얻어진 생계면활성제에 의한 phenanthrene의 용해도 및 생분해능력 향상

Enhancement of Phenanthrene Solubilization and Biodegradation with Biosurfactants Produced by *Rhodococcus erythropolis*

장재수¹ · 송창수^{2,*} · Daniel K. Cha¹

Chang, Jae-Soo¹ · Song, Changsoo^{2,*} · Cha, Daniel K.¹

1 미국 Univ. of Delaware 토목환경공학과

2 호남대학교 토목환경공학과

(2004년 7월 23일 논문 접수: 2004년 11월 9일 최종 수정논문 채택)

Abstract

Effects of the biosurfactant produced by *Rhodococcus erythropolis* on the solubilization and biodegradation of phenanthrene were investigated. Based on surface tension measurements, the average critical micelle concentration of the biosurfactant was estimated to be about 16mg TOC/L. The apparent solubility of phenanthrene increased linearly with the addition of biosurfactants above the CMC, and the concentration of solubilized phenanthrene was 38.9mg/L in 322mg TOC/L biosurfactant solution. The weight-solubilization ratio of biosurfactants for phenanthrene was approximately 118.8mg/g, this value was over 5 times greater than that of sodium dodecyl sulfate.

Using a known phenanthrene degrader, batch phenanthrene biodegradation experiments were conducted with and without biosurfactants in liquid culture. The rate and extent of phenanthrene mineralization by the phenanthrene degrader with biosurfactants were much greater than those without biosurfactants. The greater phenanthrene mineralization observed in the presence of biosurfactants is attributed to the increased phenanthrene concentration in the aqueous culture due to the partitioning of the compound to biosurfactant micelles. The biosurfactant did not exhibit any toxic effect on mineralization of glucose by the phenanthrene-degrader.

Key words: biosurfactant, phenanthrene, solubility, biodegradation

주제어: 생계면활성제, phenanthrene, 용해도, 생분해

*Corresponding author Tel: +82-62-940-5467, FAX: +82-62-940-5080, E-mail: cssong@honam.ac.kr (Song, C.S.)

1. 서론

오염된 지역에서 소수성 유기탄소가 오랜 기간동안 존재하는 이유는 물에 대한 용해도가 낮으므로 생분해 능력을 가지고 있는 미생물에의 이용성이 제한되기 때문이다. 이에 대한 해결책으로 생분해성을 높이기 위한 접근으로 화학계면활성제나 생계면활성제를 투입하여 소수성 유기탄소의 용해도를 증가시키는 방법이 도입되고 있다(Boldrin 등, 1993; Stucki와 Alexander, 1987). 화학 비이온성 계면활성제에 대한 연구는 용해도를 높이는 기구와 계면활성제, 유기탄소의 상호관계를 규명하기 위하여 여러 연구가 진행되었다(Grimmberg 등, 1995). Volkering 등(1995)에 의하면, Triton X-100 등과 같은 화학계면활성제는 나프탈렌과 phenanthrene의 용해도를 높여서 생분해성을 높인 것으로 보고하고 있다. 아울러 고분자의 PAH는 비이온계 계면활성제로 생분해율을 높인 보고도 있다(Boonchan 등, 1998). 그런데 화학계면활성제는 자연에 잔류하여 독성을 지닌 경우가 있으며, 생분해성이 낮고, 낮은 농도에서 제한된 효용성을 가지므로 그 적용이 한계를 노출시키고 있다. 아울러 오염물질을 제거하기 위하여 폐수에 또 다른 오염물질을 첨가하는 것으로서 용해성분의 증가 등을 유발하기도 한다.

생계면활성제는 살아있는 세포로부터 추출되는 표면활성 물질로서, 박테리아, yeast와 fungi 등이 표면활성물질을 만들어낸다. Gerson과 Zajic(1978)은 미생물 균주로서 *Corynebacterium lepus*를 이용하여 생계면활성제를 연구하였다. 생계면활성제의 투입으로 매질의 표면장력은 72dyne/cm에서 30dyne/cm로 감소하였는데, 이러한 표면 활성은 corynomycolic산이 가지는 lipopeptid와 여러 개의 phospholipid에 의한 작용으로 인한 것으로 제시하였다. Macdonald 등(1981)은 단일 탄소원으로 hexadecane을 사용하여 *Nocardia erythropolis*으로부터 표면 활성물질을 만들고, 70시간 성장하는 동안 29dyne/cm로 표면장력을 줄인 것으로 보고하였다. Falatko와 Novak(1992)는 활성슬러지와 가솔린을 이용하는 미생물에서 석유계 탄화수소의 용해도를 높일 수 있는 물질을 추출하였다. Park 등(1998)은 난분해성 유기화합물의 용해도를 높이기 위

하여 *Nocardia erythropolis*에서 추출한 물질을 사용하였으며, 추출된 생계면활성제는 *p*-xylene에 대하여 화학계면활성제인 sodium dodecyl sulfate보다 10배 이상 높은 용해도를 보여주었다.

이 연구는 생계면활성제를 만들 수 있는 미생물중에서 저렴한 비용으로 배양할 수 있는 *Rhodococcus erythropolis*에 의하여 만들어지는 생계면활성제에 의한 phenanthrene의 용해도와 생분해성에 대한 효과를 검증하고자 하였다. 아울러 *R. erythropolis*를 통하여 만들어진 생계면활성제가 phenanthrene 분해 미생물에 대한 독성 검증을 통하여 이의 적용가능성을 검토하였다. 생계면활성제에 의하여 phenanthrene의 용해도가 증가함으로써 phenanthrene의 생분해성을 높이는 것으로 가정하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 실험재료

Phenanthrene(순도 > 98%), [9-¹⁴C]-phenanthrene(비활성도 13.3mCi/mmol)과 *n*-hexadecane은 시약전문업체에서 구입하였으며, scintillation cocktail(Scintisafe Econo 1)은 시약전문취급업체로 구입하였다. 생계면활성제를 만드는 *Rhodococcus erythropolis*(ATCC 4277)은 American Type Culture Collection으로부터 구입하였다.

2.2. 생계면활성제의 추출

단일 탄소원으로 4%(v/v) *n*-hexadecane과 mineral salt 매질 500mL을 가지고 있는 1L 희분식 반응기에서 성장하는 *R. erythropolis*에 의해서 생계면활성제를 만들었다. Mineral salt 매질은 1L의 증류수에 2.0g NaNO₃, 1.0g K₂HPO₄, 0.5g KH₂PO₄, 0.1g KCl, 0.5g MgSO₄ · 7H₂O, 0.01g CaCl₂과 0.01g FeSO₄ · H₂O를 용해시켜 만들었으며, 측정된 pH는 7.08 ± 0.3이었다. 매질을 소독한 후, *n*-hexadecane으로 순용된 *R. erythropolis* 5%(v/v)을 접종시켰다. 희분식 반응기는 자석 교반기를 통하여 완전히 교반하였다.

접종한 매질은 6일 동안 배양한 후, Ramsay 등(1988)이 클로로포름과 메탄올을 이용하여 제안한 방법에 따라 trehalose lipid를 추출하였는데, 이 방법은 다음과 같다. 우선적으로 배양액을 20분 동안 원심

분리한 후, hexadecane층은 제거하였다. 미생물층을 1:1 클로로포름-메탄올(v/v)과 부피비로 1:1로 혼합한 후, 5시간 동안 계속해서 혼합하였다. 혼합액 100 mL에 0.2M KCl 25mL와 1:2 클로로포름-메탄올(v/v) 100mL을 투입하여 5시간 동안 혼합한 후 separatory funnel을 이용하여 용액으로부터 lipid를 추출하였다. 추출되어진 lipid를 농축시키기 위하여 용매를 증발시킨 후, acetone에 녹인 후 유리섬유로 여과하였다.

2.3. Phenanthrene의 용해도 향상 실험

Phenanthrene의 용해도를 구하기 위하여 방사성동위원소로 표시된 것과 표시되지 않은 phenanthrene에 다양한 농도의 생계면활성제를 주입하였으며, control로 생계면활성제를 주입하지 않은 것도 함께 준비하였다. Phenanthrene을 주입한 25mL 유리병은 테프론으로 처리된 뚜껑으로 완전히 밀봉한 후 상온(20 ± 2°C)에서 150rpm의 회전 교반기에서 24시간 동안 연속적으로 혼합하였다. 혼합이 끝난 후 유리섬유를 이용하여 고체형태의 phenanthrene을 제거한 후 액체형태의 phenanthrene을 liquid scintillation counter(1218 Rackbeta)를 이용하여 측정하였다.

Phenanthrene의 분해를 측정하기 위하여 flask로부터 얻어지는 ¹⁴CO₂의 양을 측정하였다. 125mL flask에 50mL의 미네랄염 매질, 0.1mM의 방사성동위원소로 표시되지 않은 phenanthrene과 0.05 μCi[9-¹⁴C]-PHE를 넣었으며, 미네랄염은 1L의 증류수에 0.1g CaCl₂ · 2H₂O, 0.1g MgSO₄ · 7H₂O, 0.01g FeCl₃, 0.1g NH₄NO₃, 0.2g KH₂PO₄과 0.8g K₂HPO₄로 구성하였다. Phenanthrene 분해 미생물은 충분한 분해 능력을 갖도록 순용시켰으며, phenanthrene 분해에 대한 생계면활성제의 영향을 평가하기 위하여 3배수의 반응기를 준비하였다. 각 반응기는 125rpm으로 교반시켰으며, 발생되어지는 ¹⁴CO₂를 포집한 후 liquid scintillation counter를 이용하여 측정하였다.

3. 실험 결과 및 토의

3.1. Biomass의 성장과 생계면활성제의 생산

미생물 균주 *R. erythropolis*를 *n*-hexadecane을 탄소원으로 하여 회분식 반응기에서 배양시킬 때, 시간에

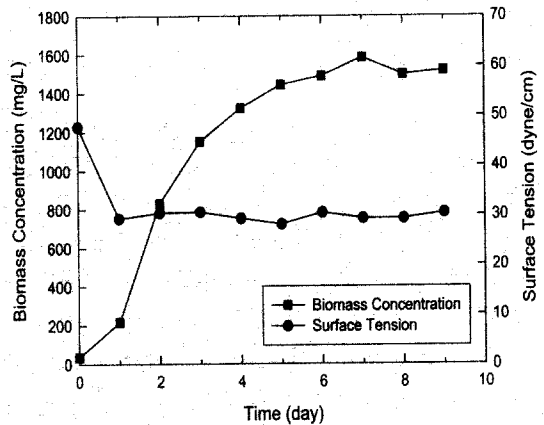


Fig. 1. Growth of *Rhodococcus erythropolis* and Surface Tension of Culture Broth.

따른 배양액의 Biomass 생산과 표면장력의 변화는 Fig. 1과 같다. Biomass의 농도는 순용기간인 1일이 경과됨에 따라 증가하기 시작하였으며, 7일이 되었을 때 최대값인 1600mg/L에 도달한 후 지속적인 증가는 없었다. 생계면활성제의 생산은 배양액의 표면장력 감소를 통하여 확인할 수 있는데, 배양액의 표면장력은 처음 1일 동안 48dyne/cm에서 30dyne/cm로 급격히 감소함으로써 생계면활성제의 생산을 확인할 수 있었다. 1일 이후부터 배양액은 일정한 표면장력을 가지고 있는 것으로 나타났는데, 이는 배양액이 CMC(Critical Micelle Concentration)값 이상으로 계면활성제를 갖고 있음을 나타낸다.

생계면활성제의 CMC값은 Fig. 2와 같이 각각의 회석배수에 대한 표면장력을 그래프로 표시함으로써 구할 수 있는데, CMC값은 근사적 수평선과 회석배수에 따라 증가되는 표면장력의 회귀직선식 기울기와 교차점이 계면활성제의 농도이다(Park 등, 1998). 시료를 채취한 후 증류수를 이용하여 적절한 양만큼 희석한 후 tensionmeter(Statham SC1000 Precision Readout)를 이용하여 각 회석배수의 표면장력을 측정하였다. 결정된 회석배수에서 CMC값을 구하기 위하여 TOC 분석기(Dohrman DC-190)를 이용하여 TOC농도를 측정하였는데, CMC값은 16.1 ± 0.5mg TOC/L이었으며, 이때의 표면장력은 29dyne/cm이다. 생계면활성제의 CMC값은 비균질한 계면활성제의 성질 때문에 화학계면활성제에서와 같이 뚜렷한 천이점이 나타나지 않으므로 분명한 확정적인 CMC

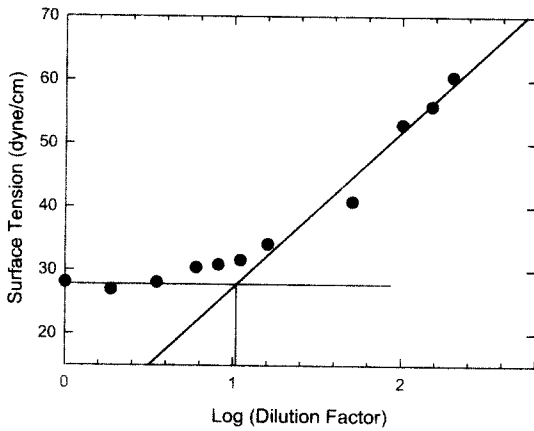


Fig. 2. Graphical Estimation of CMC.

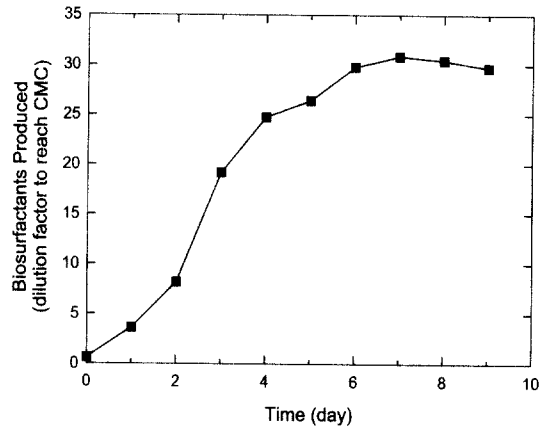


Fig. 3. Biosurfactant Production (expressed in dilution factor to reach CMC).

값을 나타내지는 않았다(Kile과 Chiou, 1989). 이 CMC값은 화학계면활성제등과 비교할 때는 낮은 값을 갖지만, *Sphingomonas yanoikuyae*를 통하여 만들어진 생계면활성제의 값인 4mg/L 값보다는 높은 값을 보여준다(Schippers 등, 2000).

생계면활성제 생산량은 CMC값에 도달하기 위한 희석배수로 표현할 수 있는데, Fig. 3은 배양시간에 따른 생계면활성제 양을 희석배수로 표현한 것이다. 배양조에서 계면활성제의 양은 적응이 이루어진 2일부터 급격히 증가하며, 7일에 최대값인 30 CMC만큼 생산되어진다. 관찰되어진 자료를 통하여 최대 수율을 얻을 수 있는 기간은 6일에서 8일 사이이다. Park 등(1998)이 *Nocardia erythropolis*가 *n*-hexadecane을 이용하여 생계면활성제를 생산할 때, 최대값이 이루어지는 기간이 4일을 보인 것과 비교할 때 다소 느린 생산 결과를 보여준다.

3.2. phenanthrene의 용해도

겉보기 용해도는 생계면활성제의 주입에 따른 용해되어진 고질상태의 화합물 농도로 정의할 수 있다(Wang 등, 1998). Fig. 4는 생계면활성제를 주입함에 따른 phenanthrene의 겉보기 용해도 변화를 나타내고 있다. Laha 등(1995)이 제시한 것과 같이 CMC값 이하에서는 생계면활성제의 주입에 따른 용해도에 대한 효과가 나타나지 않지만, CMC값 이상에서 생계면활성제의 주입에 따라 phenanthrene 용해도가 선형적으로 증가함을 보여준다. 생계면활성제 322mg TOC/L

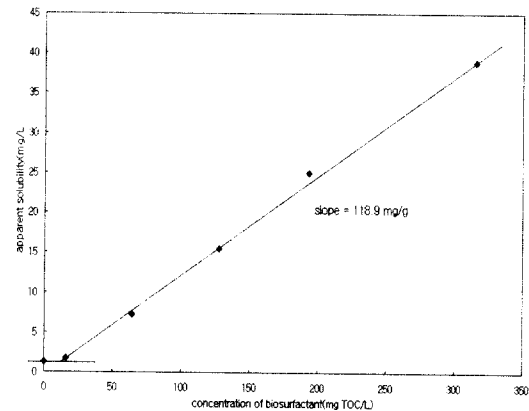


Fig. 4. Solubilization of Phenanthrene by Biosurfactants.

를 주입함에 따라 phenanthrene의 용해도가 38.9mg/L를 보이는데, 이 값은 phenanthrene의 용해도 1.29 mg/L인 자료와 비교하여 볼 때 30배 이상의 용해도 증가 효과를 나타낸 것이다.

화합물의 용해도에 대한 계면활성제의 효용성은 주입되는 단위 계면활성제 농도에 대하여 용해되는 화합물의 농도증가로 표시할 수 있는데, 이를 질량용해도비(weight solubilization ratio, wtSR)로 표시할 수 있다(Edwards 등, 1991; Tiehm, 1994). Fig. 4에서 CMC값 이상에서 질량용해도비는 근사적으로 118.9 mg/g이며, 이 값은 Tiehm(1994)의 sodium dodecyl sulfate에서 제시한 값의 5배를 보여주고 있다.

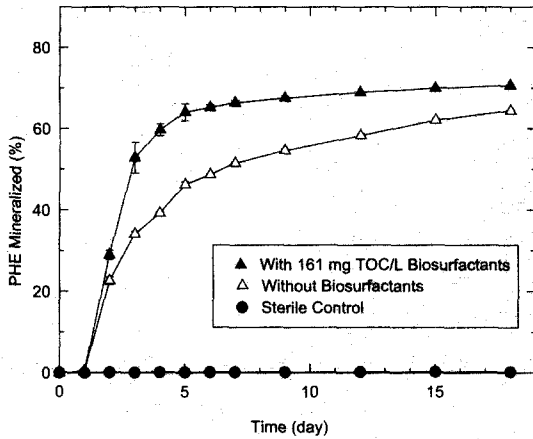


Fig. 5. Effect of Trehalose Lipids on Mineralization of Phenanthrene in Liquid Culture. Data points are averages of determinations from triplicate biometers and vertical bars represent range of the average.

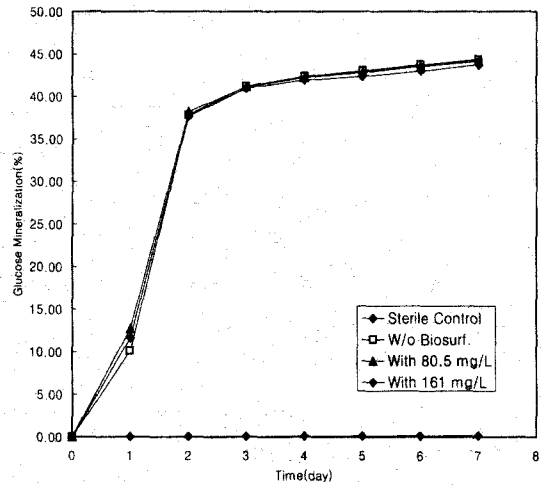


Fig. 6. Glucose Mineralization by Isolate P5-2 in the Presence of Trehalose Lipids at Various Concentrations.

3.3. phenanthrene 분해에 대한 생계면활성제의 영향

phenanthrene 분해에 대한 생계면활성제의 영향을 검토하기 위하여 영향여부에 대한 확신을 갖기 위하여 적용시 최대값으로 예상되는 CMC값의 10배가 되는 161mg TOC/L를 주입하여 이에 따른 phenanthrene의 분해율을 측정하였다. 분해율을 측정하기 위하여 $^{14}\text{CO}_2$ 를 이용하였으며, 반응조 내부에서 방사성동위원소로 식별된 것과 식별되지 않는 것은 분해과정에서 동일한 비율을 유지한다고 가정하였다. 폐수에 생계면활성제를 주입함에 따른 phenanthrene 분해의 영향은 Fig. 5와 같다. 지체기간인 1일이 지난 후 생계면활성제가 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우에 있어서 phenanthrene 분해가 일어나기 시작하는데, 생계면활성제가 있는 경우에 더 높은 분해율을 나타내었다. 생계면활성제가 존재하는 경우에 반응 초기에는 phenanthrene이 빠른 분해가 일어나지만, 생계면활성제가 없는 경우에는 phenanthrene 분해가 전체의 배양기간 18일 동안 느리게 진행되었다. 생계면활성제를 주입한 경우 반응초기인 5일에 분해율이 64.1%를 보인 후 분해율이 정체현상을 보여준다. 이것은 생계면활성제가 phenanthrene의 분해를 촉진한 것으로 볼 수 있다.

3.4. 생계면활성제의 미생물에 대한 영향

Laha와 Luthy(1991)는 비이온성 계면활성제를 투여하였을 때, phenanthrene의 교질화로 인하여 분해에 억제 요인이 된다고 발표하였으며, 아울러 생계면활성제가 미생물에 의하여 사전에 분해됨으로서 phenanthrene 분해 촉진을 할 수 없다는 보고도 있다 (Tiehm, 1994). 생계면활성제의 미생물에 대한 영향을 시험하기 위하여 phenanthrene에 대한 분해 능력이 있는 P5-2 미생물을 이용하여 glucose를 분해할 때의 생계면활성제의 독성 효과를 실험하였다. Fig. 6에 나타난 것과 같이, 생계면활성제의 존재유무 및 생계면활성제의 농도에 관계없이 Isolate P5-2에 의하여 glucose의 분해가 동일한 것으로 관찰되었다. 즉, 실험과정에 이용된 생계면활성제는 phenanthrene의 생분해를 촉진하지만, 독성은 나타내지 않는다.

4. 결론

*Rhodococcus erythropolis*에 의하여 만들어지는 생계면활성제에 의한 phenanthrene의 용해도와 생물분해성에 대한 효과를 검증한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

*R. erythropolis*를 통하여 배양조에서 얻어지는 생계면활성제의 양은 적용이 이루어진 2일부터 순차적으로 증가하며, 7일째 30 CMC의 최대값에 도달하게

된다. 관찰되어진 자료를 통하여 최대 수율을 얻을 수 있는 기간은 6일에서 8일 사이이다.

측정되어진 CMC 값은 $16.1 \pm 0.5 \text{mg TOC/L}$ 이었으며, 이때의 표면장력은 29dyne/cm 이다.

CMC 값 이하에서는 생계면활성제의 주입에 따른 phenanthrene 용해도에 대한 효과가 나타나지 않지만, CMC 값 이상에서 생계면활성제의 주입에 따라 phenanthrene의 용해도가 선형적인 증가를 보여주었으며, 생계면활성제 322mg TOC/L 을 주입하였을 때 phenanthrene의 용해도가 38.9mg/L 로서 30배의 용해도 증가를 보여주었다. 생계면활성제의 질량-용해도 비는 118.9mg/g 으로서 sodium dodecyl sulfate와 같은 화학계면활성제에 나타난 값의 5배이다.

*R. erythropolis*를 통하여 만들어진 생계면활성제는 phenanthrene의 생분해 능력을 향상시키는 것으로 나타났다.

생계면활성제의 존재유무 및 농도에 관계없이 Isolate P5-2에 의한 glucose 분해가 동일한 결과가 관찰되었다. 이것은 생계면활성제가 phenanthrene의 생분해를 촉진하지만, phenanthrene 분해 미생물에 대한 독성은 가지고 있지 않다는 것을 나타내는 것이다.

감사의 글

이 논문은 한국과학재단의 해외 Post-doc. 연수지원 및 호남대학교의 연구지원에 의하여 연구되었다.

참고문헌

- Boldrin, B., Tiehm, A., and Fritzsche, C. (1993) Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, pp. 1927-1930.
- Boonchan, S., Britz, M. L. and Stanley, G. A. (1998) Surfactant enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*, *Biotechnology and Bioengineering*, **59**, pp. 482-494.
- Edwards, D.A. Luthy, R. G. and Liu, X. (1991) Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions, *Env. Sci. Tech.*, **25**, pp. 127-133.
- Gerson, D. F. and Zajic, J. E. (1978) Surfactant production from hydrocarbons by *Corynebacterium lepus*, sp. Nov. and *Pseudomonas asphaltenicus*, sp. Nov. *Dev. Ind. Microbiol.*, **19**, p. 577.
- Hisatsuka, K., Nakahara, T. Sano, N. and Yamada, K. (1971) Formation of Rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation, *Agric. Biol. Chem.*, **35**, p. 686.
- Kile, D. E. and Chiou, C. T. (1989) Water solubility enhancements of DDT and trichlorobenzene by some surfactants below and above the critical micelle concentration, *Env. Sci. Tech.*, **23**, pp. 832-838.
- Laha, S. and Luthy, R. G. (1991) Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems, *Env. Sci. Tech.*, **25**, pp. 1920-1930.
- Laha, S. Liu, Z., Edwards, D., Luthy, R. (1995) Surfactant solubilization of phenanthrene in soil-aqueous systems and its effects on biomineralization, *Adv. Chem. Ser.* **244**, pp. 339-341.
- MacDonald, C. R., Cooper, D. G. and Zajic, J. E. (1981) Surface-active lipids from *N. erythropolis* grown on hydrocarbons, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, p. 117.
- Park, A. J., Cha, D. K. and Holsen, T. M. (1998) Enhancing solubilization of sparingly soluble organic compounds by biosurfactants produced by *Nocardia erythropolis*, *Water Environment Research*, **70**, pp. 351-355.
- Rapp, P. Bock, H. Wray, W. and Wagner, F. (1979) Formation, Isolation and characterization of Trehalose Dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes, *J. Gen. Microbiol.*, **115**, p. 491.
- Ramsay, B., McCarty, J., Guerra-Santos, L., Kappeli, O. and Fiechter, A. (1988) Biosurfactant production and diauxic growth of *Rhodococcus aurantiacus* when using n-alkanes as the carbon source, *Can. J. Microbiol.*, **34**, pp. 1209-1212.
- Schippers, C., Ge ner, K., M ller, T. and Scheper, T. (2000) Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorolipid mixture, *Journal of Biotechnology*, **83**, pp. 189-198.
- Stucki, G. and Alenxander, M. (1987) Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds, *Appl. Env. Microbiol.*, **53**, pp. 292-297.
- Tiehm, A. (1994) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants, *Appl. Env. Microbiol.*, **60**, pp. 258-263.
- Volkering, F., Breure, A. M., Andel, J. G. and Rulkens, W. H. (1995) Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Appl. Env. Microbiol.*, **61**, pp. 1699-1705.
- Wang, J. M., Marlowe, E. M., Miller-Maier, R. M. and Brusseau, M. L. (1998) Cyclodextrin-enhanced biodegradation of

- phenanthrene, *Env. Sci. Tech.*, **32**, pp. 1907-1912.
- Zhang, Y., Maier, W. J. and Miller, R. M. (1997) Effect of Rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene, *Env. Sci. Tech.*, **31**, pp. 2211-2217.