

微生物에 의한 *n*-alkanes의 資化와 乳化

식품가공과 교 수 마 상 조
식품영양과 부 교수 김 동 필
식품가공과 교 수 조 덕 봉
외래강사 최 옥 범

I. 서 론

長鎖 alkane의 미생물 분해법은 여러가지 유용물질 생산에 이용될 뿐 아니라, 석유 유출에 의한 환경오염의 防除의 관점에서도 중요한 문제로 생각된다.

石油系 炭化水素의 미생물 분해에 관해서는 현재까지 많은 수의 보고가 되어 있다.^{1~8)} Miget et al.⁵⁾은 sea water와 crude oil을 포함하는 침전물로부터 50개의 oil-degrading culture를 분리했으며, 대다수의 active preparation중에서 40~55%의 oxidized crude oil이 60시간내에 enriched sea water를 분해했다고 보고하였다.

형태학적 면에서부터 탄화수소의 미생물 분해에 대한 여러가지 연구가 진행되었으며, 몇개가 *n*-paraffin에서 자랄 수 있는 미생물의 분리가 행해졌다. 특별하게 몇몇의 시도가 미생물에 의해 석유로부터 단백질을 생성하고, *n*-paraffin을 제거하기 위하여 진행되었다.^{9~11)}

Miller and Johnson^{12~14)}은 C₂₂~C₂₈의 고체 paraffin과 paraffin wax와의 혼합물에서 *Candida intermedia*와 *C. lipolytica*의 높은 성장을 확인하였다.

Yamada and Yogo¹⁵⁾는 C₂₅~C₃₇ 범위의 *n*-alkane을 함유하는 paraffin wax에서 *Corynebacterium hydrocarboclastus*와 *Candida tropicalis*를 배양하는 데 성공하였다. 그러나 C₃₀ 이상의 고체 hydrocarbon에서의 성장을 시도한 경우는 거의 없다.

한편, Sakai등¹⁶⁾은 土壤分離株 *Acinetobacter* sp. M-1이 長鎖 *n*-alkane(C₁₃~C₄₄)을 빠른 속도로 분해한다고 보고하였다.

많은 탄화수소 발효에 있어, 배양기에 첨가된 탄화수소가 단순한 기계적 교반보다는 일련의 현상에 의해서 乳化된다는 것은 잘 알려져 왔다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 水性狀(aqueous phase)에서 액체 탄화수소의 용해도에 영향을 주는 surface active properties를 가지는 extracellular material은 미생물의 이용도를 개선시켜 준다. 일반적으로 degradation은 emulsification에 의하여 수행되며 oil-water의 界面을 증가시키는 결과를 가져온다. 이것은 oil-water의 界面이 크면 클수록 미생물에 의하여 oil이 분해되는 속도가 빠르다는 것을 증명하는 것이다.^{2,20,21)}

탄화수소 자화성균은 그 세포 표층이 친유성으로 탄화수소와 좋은 親化인 것이나 탄화수소를 유화시킬 수 있는 것이 많기 때문에 유화제로서의 계면활성제의 첨가는 반드시 필요치 않다. 계면활성제를 첨가한 배지에서 균을 분리하면, 탄화수소 배지에서의 생육에 계면활성제를 필요로 하는 균이 분리되는 것이 있다. 미생물에 의한 탄화수소의 質化는 계면활성제의 첨가에 의하여 촉진되고, 합성계면활성제를 첨가함으로써 그 목적을 달성할 수 있다. 그러나 일반적으로 탄화수소에서 미생물이 증식하는 경우, 합성계면활성제의 첨가없이 양호한 생육을 보이고, 이 경우 균 스스로가 계면활성물질을 생산한다. 이들 emulsifier는 화학적인 조성이나, 기질특이성, 2가 양이온에 대한 반응, 최적 pH, 최적온도 등이 다르게 나타난다.²²⁾

Jajic and Knettig²³⁾는 직쇄상 탄화수소의 혼합물인 정유에서 분리한 *Corynebacterium hydrocarboclastus*는 emulsifying agent를 생산하는 것을 확인하였다. Jajic et al.²⁴⁾은 *Corynebacterium hydrocarboclastus*는 glucose, fructose, mannitol의 3개의 sugar에서 성장할 수 있고, extracellular polymer를 생산할 수 있었으며 이 균에 좋은 기질은 $n-C_{12}$ 에서 $n-C_{17}$ 범위에 있는 순수 직쇄상 탄화수소로 나타났고, cell과 polymer의 최대 건조중량은 $n-C_{12}$, $n-C_{13}$, $n-C_{14}$ 에서 얻어졌다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 n -paraffin 質化 微生物의 분리, 이 미생물의 成長能 그리고 탄화수소에서 자랄 때 extracellular emulsifying agent를 생산하는 가를 실험하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. Substrate source

n -alkane 質化 微生物의 분리를 위한 배지는 $(NH_4)_2SO_4$ 5g, K_2HPO_4 5g, NaCl 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, vitamin mixture 1g, hexadecane(C_{16} 의 n -alkane, Tokyo Kasei Organic Chemicals, Tokyo) 1g을 1 liter의 deionized water에 녹이고 pH 7.5로 조절했다.

배지에 표면장력제 Plysurf A210G(Daichi Kogyo Seiyaku, Kyoto)가 기질의

3%(w/w) 농도로 가해졌고, 그리고 이 용액을 hexadecane이 녹을 때 까지 water bath에서 가열하고 나서 혼합물을 sonication(20 KHz, 1분)에 의하여 균질화했다.

2. Shake flask experiments

광주의 여러지역으로부터 수집한 토양시료는 100ml의 배지를 포함하는 shaking

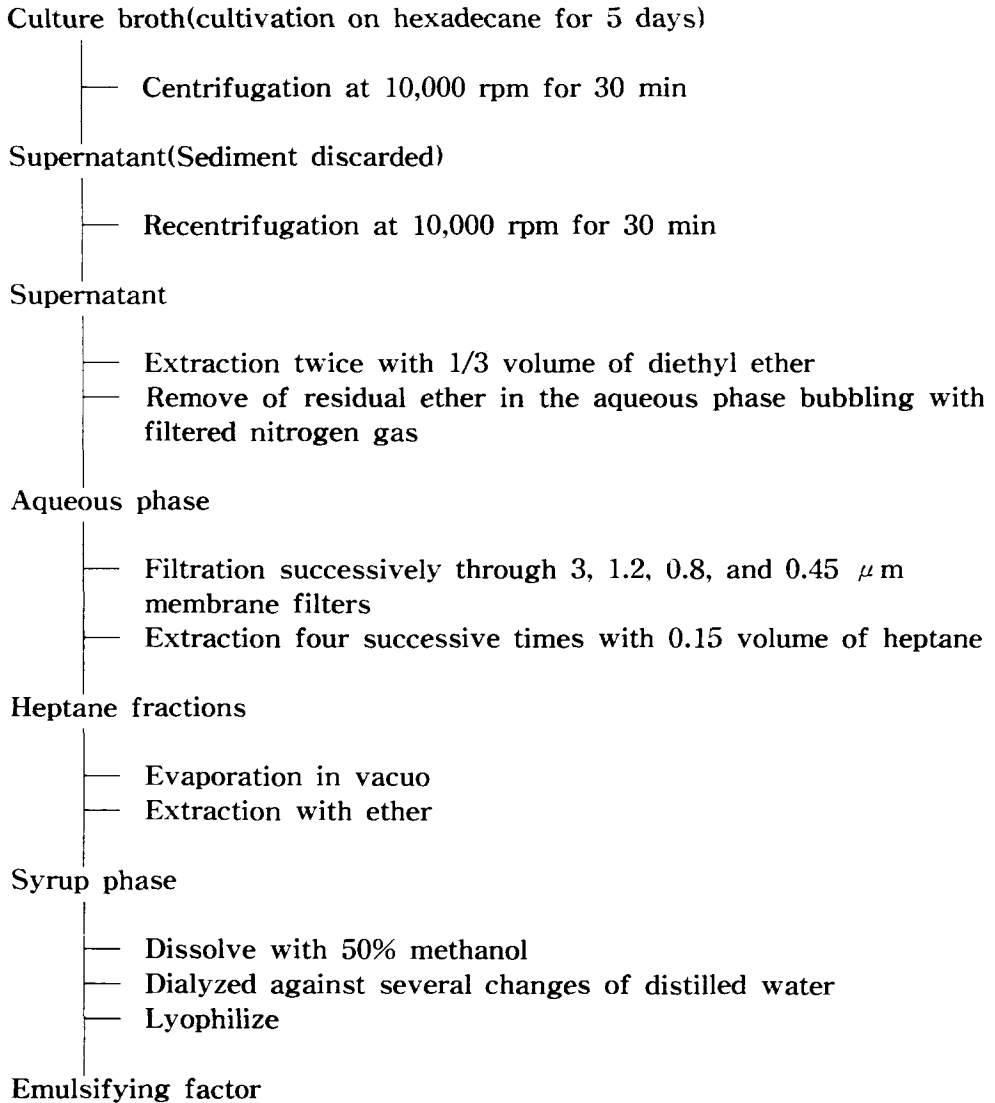


Fig. 1. Isolation scheme for hydrocarbon emulsifying factor.

flask(500 ml)에 넣고 진탕배양기(Iwashiya Bio-Science Co. LTD..

RLR-No.4)에서 300 rpm으로 28℃, 7일간 배양했다. 미생물 분리는 glycerol 10g, Bacto peptone 3g, yeast extract 1g, K₂HPO₄ 4g, NaCl 1g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, Babco agar 18g을 deionized water 1 liter에 녹이고 pH 7.0으로 조절한 agar 배지에서 실시했다. Cells는 여러가지 carbon length의 *n*-alkane(0.3%, w/v)을 함유하는 glycerol medium에서 28 °C에서 호기적으로 배양되었다. Cell-growth는 dilution method에 의해 spectrophotometer (Shimadzu UV 160)로 610 nm에서 O.D.를 측정함으로써 결정했으며, 잔존 기질량은 gas chromatography[Shimadzu GC 14B, glass column(1.6m x 3mm), 5% silicon OV-17 on 80/100 mesh chromosorb; carrier gas, helium 50 ml/min]에 의하여 분석했다.

Cell과 polymer 회수의 과정은 Fig.1에 나타냈다. 배양기내에 잔존하는 hexadecane은 chloroform-methanol(2:1, v/v)의 같은 양으로 추출했다. 610 nm에서 optical density의 측정을 위해 배지내의 cells는 Plysurf A210G로 균질화시키고, 회수해서 petroleum ether로 씻었다.²⁵⁾

3. Preparation of the emulsifying substance

hexadecane-growth culture 4.5 liter를 냉각하고, cell을 Hitachi SCR 20B centrifuger에서 원심분리에 의해 제거했다. 상층액은 재증류한 diethyl ether 1/3 volume으로 2번 추출했다. 水性狀에 있는 잔존 ether는 여과된 nitrogen gas로 bubbling함으로써 제거했다. 水性狀은 단계적으로 3-, 1.2-, 0.8-, 0.45 μm membrane filters(Millipore Corp.)으로 여과했고, 그리고 clear filtrate은 heptane 0.15 volume으로 4번 연속 추출했다. Heptane fraction이 합쳐졌고, 그리고 진공에서 yellow syrup으로 농축했다. Ether로 추출한 후, syrup은 50% aqueous methanol 100 ml에 녹였다. 남아 있는 viscous 용액은 증류수와 동결 건조의 몇가지 변화에 대해서 투석했다. 동결건조된 emulsifier의 수율은 4.5 liter로부터 0.2g이었고, specific activity 90 μg/ml이었다.

III. 결과 및 고찰

1. Use of long-chain *n*-alkanes(C₁₃~C₄₄) by an isolate Ma-1.

12개의 분리된 것중 3개의 bacteria 균주가 hexadecane을 이용한 것으로 나타났다. 3개 균주 모두는 5일내에 배양기에 첨가한 hexadecane 50~100%를 소비하였다. 이 분리된 것중 하나만 계속해서 Ma-1으로 이름을 붙였고, Ma-1 균주는 hexadecane에서 가장 빠른 성장을 보였다. 이 균주가 다음의 실험에 이용되었

다.

Table 1은 同定된 Ma-1株의 형태학적, 생화학적 특성을 나타냈다. 이 分離株 Ma-1은 Gram음성으로 절대호기성이다. Colony는 착색이 되지 않았으며, 둥글고 빛나고 그리고 부드러웠다. oxidase는 negative 였고, catalase는 positive 였다. gelatin은 水和되었고, starch는 수화되지 않았다. glucose, maltose, lactose, sucrose로부터 酸은 생성되지 않았고, 최적온도는 30~35 °C였다. 이러한 성질들은

Table 1. Bacteriological Properties of Strain Ma-1.

Morphological characteristics	
Form	coccus
Gram strain	-
Motility	-
Cultural characteristics	
Colony pigment	-
OF test	-
Growth at 37°C	+
44°C	-
Nitrate reduction	-
Aesculin hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	+
Biochemical characteristics	
Oxidase	-
Catalase	+
Urease	-
Arginine dihydrolase	-
Indole production	-
Acid from glucose	-
Carbon compound assimilation	
Caprate, malate, citrate, phenylacetate	
Carbon compound non-assimilation	
Glucose, arabinose, mannose, mannitol	
N-acetylglucosamine, maltose, gluconate, adipate	
Cytochrome oxidase	-
Haemolysis(horse blood)	-
Simmon's citrate	+
Utilization of	
Arginine, lactate, phenylalanine, histidine	

Ma-1이 *Acinetobactor*속의 한 균주임을 나타내는 특징이다. 일반적으로

Acinetobacter sp.은 *n*-alkane(C_{10} ~ C_{20})에서 생육가능한 균으로 알려져 왔다.²⁸⁾

균주 Ma-1은 28 °C에서 mineral salt medium에서 호기적으로 성장했다.(Table 2). A인 cell-growth는 spectrophotometer (Shimadzu UV 160)으로 610nm 에서 optical density를 측정 한 것이며, B인 기질소비량(%)은 gas chromatography (Shimadzu GC14B)에 의하여 측정했다. %는 첨가한 기질에 대한 detergent의 농도 (w/w)로 정의되었으며, 0 %는 bacteria가 detergent 없이 배양된 것이다.

Ma-1株는 단일탄소원(0.3%, w/v)으로서 C_{10} 에서 C_{34} 까지 빠른 속도로 분해해서 소비했다 (Fig.2). 배양 48시간에서 균체량은 최대에 도달하고, 배양 72시간에 *n*-alkane은 거의 완전히 소비되었다.

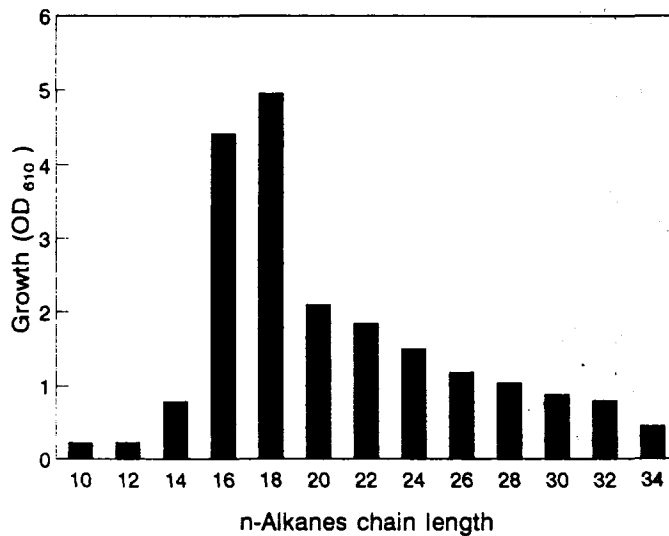


Fig 2. Growth and *n*-alkane degradation by Ma-1.

Fig.3은 C_{16} 의 *n*-alkane에 생육하는 과정에서의 C_{16} 의 소비상태를 보여준다. 배양기내의 hexadecane의 잔존량은 시간에 따라 직선적으로 감소했다. 배양 48시간동안 배양기내에 남아 있는 hexadecane은 처음양의 32.9%로 줄어들었으며, 72시간에는 0.57%로 거의 완전히 소비되었다.

2. Emulsifying properties of the fermentation broth

n-alkane의 미생물 분해에는 기질인 *n*-alkane의 乳狀化가 중요한 인자이다.^{29,30)} 따라서 물에 녹지 않는 탄화수소를 배지중에 유화 분산시킬 목적으로 여러가지 계면활성제를 검토했다. 그중에서 nonionic surface-active agent(Plysurf A210G)를 배양기에 첨가하였을 때 균체의 생육 및 *n*-alkane의 분해효율이 향상되었음을 나타내고 있다. Table 2는 배양기내에서의 여러 농도의 Plysurf A210G의 효과

를 보여준다. hexadecane양의 3%(w/w) detergent가 *n*-alkane에서의 성장에 가장 효과적이었다. 한편, Ma-1 균주는 계면활성제를 첨가하지 않아도 C₁₀에서 C₃₆까지의 *n*-alkane에 생육 가능하다. 이것은 계면활성제를 첨가하지 않아도 Ma-1 균주가 스스로 계면활성제를 생산하고, 長鎖 *n*-alkane에서도 생육 가능한 것을 나타내고 있다. 특히 C₁₆~C₁₈에는 양호한 생육 상태를 보였다.(Fig.2)

Table 2. Effects of Plysurf A210G Concentration on (A)Growth, (B)Substrate Consumption of Strain Ma-1.

Concentration of Plysurf A210G* (%, w/w)	Cultivation time(days)					
	1		3		5	
	A	B	A	B	A	B
0	0.1	8	0.5	24	0.6	40
1	1.5	64	1.0	88	0.6	97
3	2.8	78	2.2	94	1.7	98
5	1.5	58	2.0	79	0.9	96
10	1.0	17	2.5	73	1.8	95

*; Percent was defined here as concentration(w/w) of the detergent against the substrate added.

0%; The bacterium was cultured without detergent.

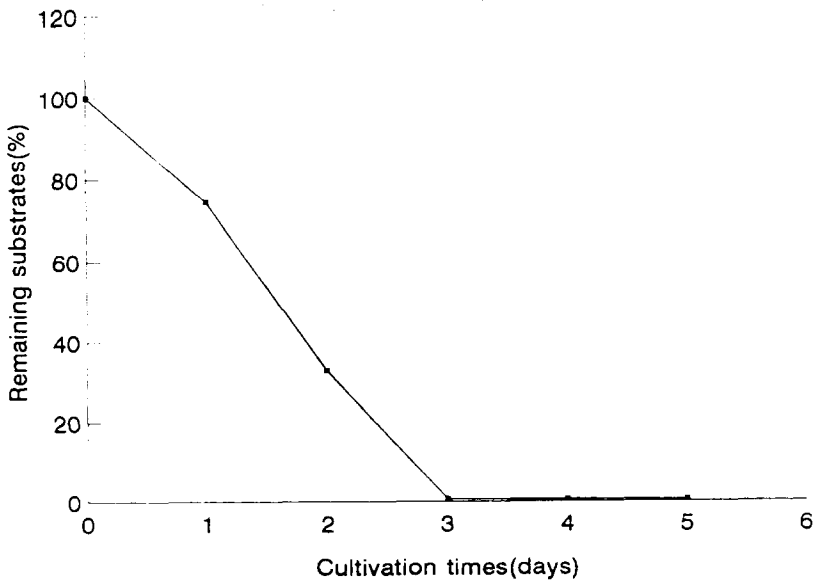


Fig 3. Remaining substrates in cultures.

emulsifying factor concentration의 기능으로서 emulsion은 7.5~150 $\mu\text{g/ml}$ 의 emulsifying factor를 함유하는 0.1 ml의 hexadecane과 10 ml의 Tris-Mg buffer (0.02M tris-hydrochloride, pH 7.2, added 10 mM MgSO_4)를 사용해서 결정했다 (Fig.4). 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간동안 진탕배양한 후에, flask의 내용물을 10분간 정치한 후 아랫층의 것을 620 nm에서 흡광도로서 탁도 측정을 위해 test tube에 옮겼다. emulsifying activity는 OD_{620} 으로 나타냈다.

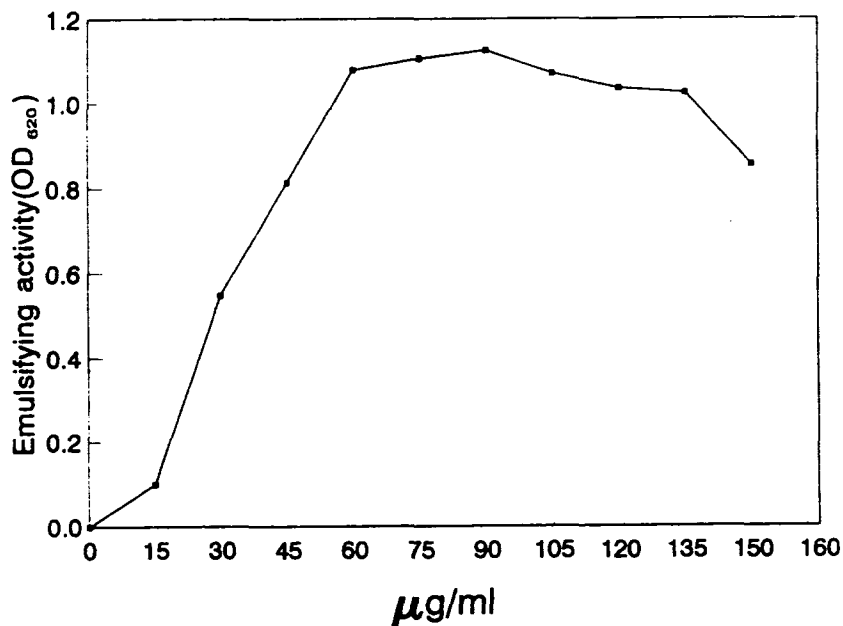


Fig 4. Standard emulsifying factor assay.

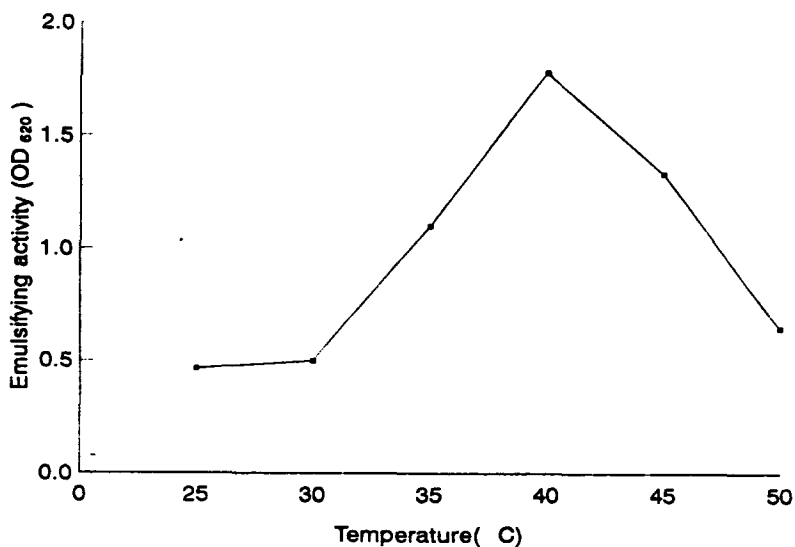


Fig 5. Influence of the temperature on the emulsifying activity.

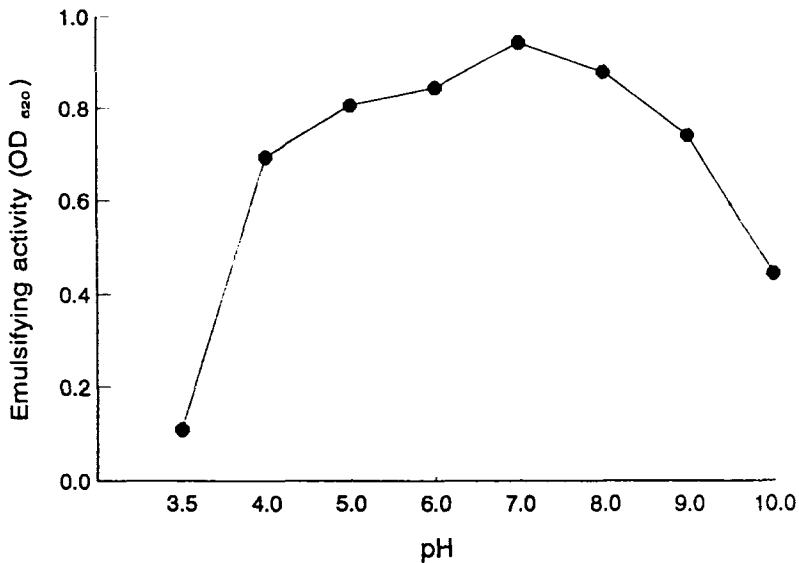


Fig 6. Emulsification of hexadecane by emulsifying factor as a function of pH.

100 ml flask에 emulsifying factor 90 μ g/ml, 0.1 ml의 hexadecane, Tris-Mg buffer를 넣었다. 탁도는 60분동안 40 $^{\circ}$ C (Fig.5)에서 150 rpm으로 진탕한 후에 측정하였다.(Fig.6). Maximum activity가 pH 7.0에서 얻어졌다. pH 7.0보다 높거나 낮은 pH는 emulsification에 특별히 바람직하지 않았다.

emulsifying에 대한 MgSO₄, CaCl₂, NaCl의 영향은 pH7.0에서 측정했다.(Fig.7).

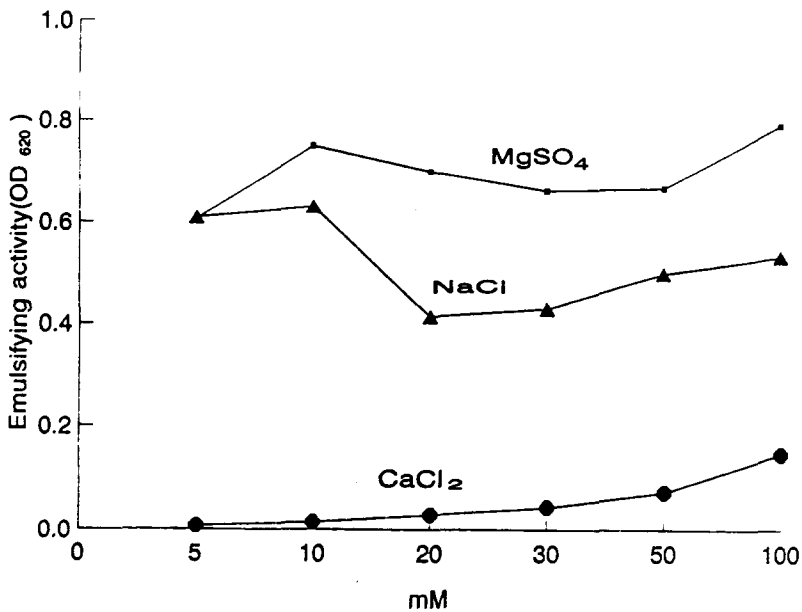


Fig 7. Emulsification of hexadecane by emulsifying factor as a function of salt concentration.

maximum activity는 100 mM MgSO₄, NaCl, CaCl₂에서 얻어졌으며, NaCl의 경우는 10 mM에서 얻어졌고 금속이온의 첨가는 emulsion formation을 증가시켰다.

IV. 결 론

長鎖 *n*-alkane을 이용하는 미생물을 토양으로부터 분리하고, *Acinetobacter*속임을 동정하였다. 이 균주 Ma-1은 단일 탄소원으로서 C₁₃~C₄₄의 탄소수를 갖는 *n*-alkane에서 성장했다. 이 균주는 어떤 detergent 첨가없이 고체 탄화수소에서 성장할 수 있었다. 성장과 탄화수소의 이용은 Plysurf A210G라는 표면활성제의 첨가로 증가하였다.

우리들 실험실에서 분리된 Ma-1 균주의 배양은 직쇄상 탄화수소 혼합물에서 자랄 때 emulsifying 특성을 갖는 extracellular biopolymer를 생산하는 것을 보여주었다. 성장을 잘 촉진하는 기질은 좋은 polymer를 생산한다. 기질로부터 회수한 polymer는 complex molecule 또는 단백질, 지질, 그리고 탄수화물인 것으로 확인되었다.

▶ 본 연구는 1995년도 광주보건대학 학술연구비 지원에 의하여 수행되었음을 밝힙니다.

참고문헌

1. Claus, D., *J. Gen. Microbiol.*, 36, 107~122 (1964)
2. Davis, J.B., *Petroleum microbiology*, Elsevier Publ. Co., New York (1967)
3. Gibson, D.T., *Science*, 161, 1093~1097 (1968)
4. Izywrova, A.I., *Gig. Saint*, 7, 12~17 (1952)
5. Miget, R.J., C.H. Oppenheimer, H.I. Kator, and P.A. La Rock, *API/FWPCA Conference*, U.S. Dept. Interior, p.p.327~331 (1969)
6. Stone, R.W., M.R. Fenske, and A.G.C. White, *J. Bacteriol.*, 44, 169~178 (1942)
7. Zo Bell, C.E., *Bacteriol. Rev.*, 10, 1~49 (1946)
8. Zo Bell, C.E. and J.F. Prokop, *Z. Allg. Microbiol.*, 6, 143~162 (1966)

9. J. Takahashi, Y. Kawabata, and K. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, 29, 292~299 (1965)
10. I. Takeda, T. Iguchi, T. Kawamura, S. Horiguchi, S. Hayakawa, and S. Senih, *Agric. Biol. Chem.*, 29, 796~803 (1965)
11. R.J. Ertola, M.D. Lilly, and F.C. Webb, *Biotechnol. Bioeng.*, 7, 309~319 (1965)
12. T.L. Miller and M.J. Johnson, *Biotechnol. Bioeng.*, 8, 549~565 (1966)
13. T.L. Miller and M.J. Johnson, *Biotechnol. Bioeng.*, 8, 567~580 (1966)
14. R. Makula and W.R. Finnerty, *J. Bacteriol.*, 95, 2102~2107 (1968)
15. K. Yamada and M. Yogo, *Agric. Biol. Chem.*, 34, 296~301 (1970)
16. Y. Sakai, J.H. Maeng, Y. Tani, and N. Kato, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 2128~2130 (1994)
17. T. Iguchi, I. Takeda, and H. Ohawa, *Agric. Biol. Chem.*, 33, 1657 (1969)
18. A. Mimura, S. Watanabe, and I. Takeda, *J. Ferment. Technol.*, 49, 255 (1971)
19. J.E. Zajic and C. Panchal, *C.R.C. Rev. Microbiol.*, 5, 39 (1977)
20. Tawson, V.O., and S.L. Shapiro, *Mikrobiologiya*, 3, 78~87 (1934)
21. ZoBell, C.E., *API/FWPCA Conference*, U.S. Dept. Interior, p.p.317~326 (1969)
22. E. Rosenberg, A. Zuckerberg, C. Rubinovitz, and L. Gutinick, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 402~408 (1979)
23. J.E. Zajic and E. Knetting, *Development in Industrial Microbiology*, Amer. Inst. Biol. Sci., Washington, D.C., 12, 87~98 (1971)
24. Zajic, J.E., H. Guignord, and D.F. Gerson, *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1285~1301 (1977)
25. K. Arima, S. Ogino, K. Yano, and G. Tamura, *Agric. Biol. Chem.*, 29, 1004~1008 (1965)
26. J.E. Stewart, D.P. Sterenson, A.C. Jones, and D.O. Schissler, *J. Bacteriol.*, 78, 441~448 (1959)
27. A. Tanaka and S. Fukui, *J. Ferment. Technol.*, 49, 809~816 (1971)
28. D.A. Whitworth, M. Moo-Young, and T. Viswanatha, *Biotechnol. Bioeng.*, 15, 649~675 (1973)

Degradation and Emulsification of *n*-alkanes by Microorganisms

Ma, Sang-jo

Kim, Dong-pil*

Cho, Duk-bong

Choi, Ok-beom

Dept, of Food Technology

**Dept, of Food and Nutrition*

Kwangju Health College

> Abstract <

A long-chain *n*-alkane-using microorganism was isolated from a soil sample, and was identified to belong to genus *Acinetobactor*. This strain Ma-1 grew on *n*-alkanes ranging in carbon length from C₁₃ to C₄₄ as a sole carbon source. This strain could grow on the solid hydrocarbons without addition of any detergents. The growth and the hydrocarbon use were enhanced by the addition of a surface active agent, Plysurf A210G.

A strain Ma-1 culture isolated in our laboratory has been shown to produce an extracellular biopolymer with emulsifying properties when grown on a mixture of linear hydrocarbons. The substrates supporting good growth gave good polymer production. The polymers recovered from the substrates were found to be complex molecules or mixtures with a protein, a lipid, and a carbohydrate moiety.