

Enhanced Biodegradation of Contaminated Soil by Biosurfactant, Sophorolipid

Seok-Whan Kang · Kwi-Joon Cho · Eun-Ki Kim*

Department of Bioengineering, In-ha University
TEL (032)872-2978 FAX (032)875-0827

ABSTRACT

Bioremediation techniques have proved to be effective for restoring petroleum-contaminated soils. however some limitations still exist, especially biodegradation of hydrophobic organic compounds(HOCs) in soil is limited by their low solubility and sorption to solid surfaces.

The principal objective of this study was to evaluate the effectiveness of biosurfactant sophorolipid on the biodegradation of hydrocarbons in soil.

Experimental results showed that sophorolipid was not toxic to the HOC-degrading bacteria and enhanced biodegradation of HOCs in soil better than synthetic surfactants. when these models were treated with 1000mg/soil kg sophorolipid.

Key words : biodegradation, biosurfactant, sophorolipid, HOCs, soil

I. Introduction

Hydrophobic organic compound(HOC)는 수용액상에서의 용해도가 낮고 환경문제를 일으키는 대표적인 hazardous compound이다. 이것은 주유소, 정유소 등 petroleum product가 생산되고 사용되는 많은 장소에서 높은 농도로 발견된다.

HOC는 미생물에 의해서 분해가 가능하다. 그러나 자연계 내에서는 많은 시간을 요구하므로 지하수 오염 등 2차 오염을 야기한다. 이는 수용액상에서의 낮은 용해도와 함께 토양에 대한 강한 결합, 흡착 등 HOC의 특성에 의하여 생분해에 제약을 받기 때문이다.

계면활성제는 micelle 또는 aggregate를 형성하여 수용액상에서의 HOC의 용해도를 증가시킬 수 있고, 토양에서 수용액상으로 옮겨진 HOC 또는 micellized HOC는 미생물에 의한 bioavailability가 증가된다. 즉 HOC의 미생물 분해에 중요한 영향을 미치는 요소인 물질 전달 속도를 증가시킴으로 생분해 속도를 증가시키게 된다.

생계면활성제는 solubilization, emulsification agent로의 계면활성제 특성을 가질 뿐만 아

나라 경제성, 낮은 독성, 환경친화성 등 많은 장점을 가지고 있다. 특히 미생물계면활성제는 구조적으로 다양하게 생산됨으로 다양한 범위의 organic compound의 수용액상 용해도를 증가시킨다고 보고되어졌다.¹

Sophorolipid는 대표적인 미생물계면활성제이다. 다양한 기질에서 높은 수율로 생산됨으로 매우 경제적이고 생산방법에 따라 다양한 구조의 sophorolipid가 생산되어 그 이용가치가 높다. 따라서 본 실험은 *Candida Bombicola*에서 생산된 sophorolipid를 토양정화 측면에서의 가능성을 실험하기 위하여 수용액상에서의 hydrocarbon 용해도 촉진, 토양에서의 hydrocarbon 세척능력 그리고 토양에서의 hydrocarbon 분해 능력을 연구하였다.

II. Materials and Methods

미생물계면활성제는 *Candida Bombicola* KCCM11858에서 생산된 sophorolipid를 사용하였고 화학계면활성제는 HLB값이 비교적 높은 Tween종류와 낮은 Span종류를 사용하였다.(table.1)

Table.1 화학계면활성제

계면활성제	구조	HLB
Tween20	Polyoxyethylene sorbitan monolaurate	16
Tween60	Polyoxyethylene sorbitan monostearate	14.9
Tween80	Polyoxyethylene sorbitan monooleate	15
Span20	Sorbitan monolaurate	8.6
Span80	Sorbitan monooleate	4
Span85	Sorbitan trioleate	1

Hydrocarbon은 aromatic hydrocarbon, linear aliphatic alkane 그리고 branched aliphatic alkane를 선택하여 실험하였다.(table.2)

Table.2 Hydrocarbons

2-Methylnaphthalene	Aromatic hydrocarbon	$C_{10}H_7CH_3$
n-Hexadecane	Linear aliphatic alkane	$C_{16}H_{34}$
Pristane(2,6,10,14-tetramethyl pentadecane)	Branched aliphatic alkane	$C_{19}H_{40}$

1. 오염된 토양의 세척 실험.

멸균(121°C 30min) 토양(sieve #4 이하) 5g를 hydrocarbon 혼합물 (n-hexadecane : pristane : 2-methylnaphthalene ; 1:1:1) 0.1ml로 오염시킨 후 5-25g/L 계면활성제용액 25ml를 이용하여 회전식상에서(30ml vial) 25°C, 12시간 동안 교반하였다. 세척 후 토양입자를 제거하기 위하여 3000rpm, 30분 동안 원심분리하였다. hydrocarbon 분석은 stainless steel column(silicon OV-101)을 사용한 gas chromatography를 이용하였다

2. 계면활성제에 따른 오염된 토양의 생분해 실험.

500ml shake flask에 50g 토양(sieve #12 - sieve #30)을 넣고 0.3ml hydrocarbon 혼합물 (n-hexadecane : pristane : 2-methylnaphthalene ; 1:1:1)로 오염시켰다. nutrient(g/L)로 0.25 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.00 Na_2HPO_4 , 0.50 KH_2PO_4 , 0.50 NH_4NO_3 , 0.10 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.20 citrate acid, 0.20 glucose, 0.005 yeast extract를 넣고 1g/L 계면활성제 용액 150ml로 반응시켰다. sampling은 48시간 주기로 하였으며 분석 전 hexane으로 추출하였고 토양입자 분리와 층분리를 위하여 4500rpm, 20분 동안 원심분리하였다. 분석 방법은 전 실험과 동일하게 실시하였다.

III. Results and Discussion

2-Methylnaphthalene으로 오염된 토양의 세척에서 화합계면활성제인 Tween80이 가장 우수한 결과를 보여주었고 HLB값이 8에서 15사이의 계면활성제의 세척효율이 다른 계면활성제보다 높았으며, HLB값이 16인 Tween20, 4인 Span80 그리고 1인 Span85는 낮은 세척효율을 보여주었다. sophorolipid는 Tween80을 제외한 다른 화합계면활성제보다 높은 세척효율을 보여주었고. 물보다 25-60배 큰 세척효율을 보였다. 이것은 Kurt D. Pennell이 계면활성제를 이용한 토양세척효율에 영향을 미치는 주요한 요소는 HLB, cloud point temperature, macroemulsion formation 뿐만 아니라 specific surfactant-organic interactions 라고 보고(3)하였듯이 다양한 구조로 생산되는 sophorolipid가 넓은 범위의 유기물질과 반응하여 세척효율을 증가시킬 수 있음을 보여주고 있다. (fig.1, fig.2)

Hydrocarbon 혼합물의 생분해에서는 sophorolipid의 첨가가 모든 다른 화합계면활성제보다 가장 우수한 결과를 보여준다.(fig.3, fig.4) pristane의 분해에 있어서는 토양세척효율이 sophorolipid보다 높았거나 유사하였던 Tween80, Span20보다도 sophorolipid가 우수하였다. 화합계면활성제중에서는 Tween80의 첨가가 생분해에 가장 우수한 결과를 보였으며, Span 계열의 첨가는 다른 hydrocarbon보다도 pristane의 분해에 있어서 그 효과가 떨어졌다. hexadecane의 분해에서도 sophorolipid의 첨가가 가장 우수한 결과를 보여주었으며 Tween80과 Span20이 비교적 좋은 결과를 보여주었다(fig.5, fig.6). 그리고 2-methylnaphthalene의 분해에서는 2-methylnaphthalene의 물리적 현상, 즉 휘발성에 의하여 모든 실험결과에서 빠른 제거를 보여주지만, 미생물의 생분해가 함께 이루어지는 계면활성제의 첨가에서 보다 빠른 결과를 보여주며, sophorolipid의 첨가에서 가장 우수한 결과를 보여준다(fig.7, fig.8). 이 모든 결과는 sophorolipid가 hydrocarbon의 수용액상의 용해도를 증가시키는 계면활성제의 특징뿐만 아니라 glycolipid 계열로서 생계면활성제의 특징을 가지고 있기 때문이다. 즉 sophorolipid는 미생물에 의한 분해가 잘 이루어져 미생물의 cosubstrate으로 사용되어질 수 있으며 그 구조가 다양하여 여러 범위의 hydrocarbon과 상호작용하여 미생물에 의한 이용을 증가시킬 수 있다.

Hydrocarbon의 생분해에 대한 계면활성제의 영향은 여러 기작으로 설명되어진다. 첫째 micellized HOC에 의한 미생물의 bioavailability 증가, 둘째 nonaqueous phase와 수용액상 사이의 계면장력의 감소에 의한 nonaqueous phase liquid hydrocarbon의 dispersion 증가, 셋째 solid interface와 계면활성제의 상호작용과 계면활성제와 오염원의 상호작용에 따른 "facilitated transport" 넷째 계면활성제가 탄소원으로 이용되어지고 cosubstrate으로 작용하

므로 분해하고자하는 오염원의 분해를 강화하는 bacterial enzyme의 생산 다섯째 계면활성제의 이용에 의하여 system속의 biomass가 빠른 속도로 성장하고, 증가된 전체 biomass에 따른 증가된 hydrocarbon uptake 등 많은 기작이 존재한다.

Sophorolipid의 첨가는 인위적으로 hydrocarbon에 오염된 토양의 정화에 있어서 우수한 결과를 줌으로서 실제 원유로 오염된 현장적용의 가능성을 보여주었다.

Reference

- 1) A. Oberbremer, R. Muller-Hurtig, and F. Wagner 1990. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:485-489
- 2) Zhongbao Liu, Annette M. Jacobson and Richard G Luthy. 1995. Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. *Applied and Environmental Microbiology.* 61:145-151
- 3) Frank Volkering, Anton M. Breure, Johan G. van Andel and Win H. Rulkens. 1995. Influence of nonionic surfactant on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology.* 61:1699-1705
- 4) Shonali Laha and Richard G. Luthy. 1992. Effect of nonionic surfactants on the solubilization of phenanthrene in soil water systems. *Biotechnology and Bioengineering* 40:1367-1380
- 5) Zhongbal Liu, Shonali Laha and Richard G. Luthy. 1991. Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon compound in soil water suspensions. *Wat. Sci. Tech.* 23:475-485
- 6) Wouter H. Noordman, Wei Ji, Ma가 L. Brusseau, and Dick B. Janssen. 1997. Effects of rhamnolipid biosurfactants on removal of phenanthrene from soil. *Environ. Sci. Technol.* 32:1806-1812.
- 7) Yimin Zhnang, Walter J. Maier, and Raina M. Miller. 1997. Effects of rhamnolipid on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. *Environ, Sci. Technol.* 31:2211-2217.
- 8) C. Rocha, C. Infante. 1997. Enhanced oily sludge biodegradation by a tensio-active agent isolated from *Pseudomonas aeruginosa* USB-CS1. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 47:615-619.
- 9) F. Volkering, A. M. Breure, J. G. van Andel. 1993. Effects of micro-organisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40:535-540

Soil Washing (2-Methylnaphthalene)

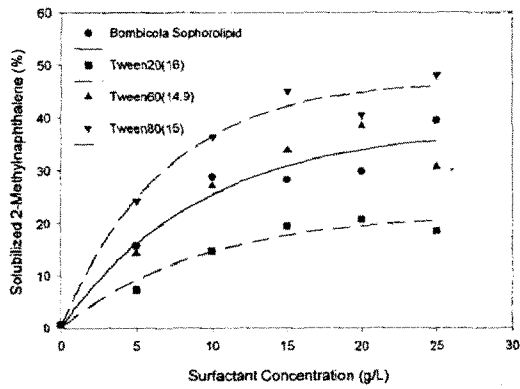


Fig.1 Comparison of sophorolipid and high HLB surfactants

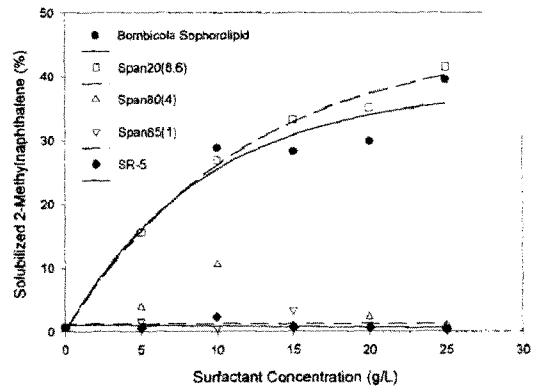


Fig.2 Comparison of sophorolipid and low HLB surfactants

Biodegradation (Pristane)

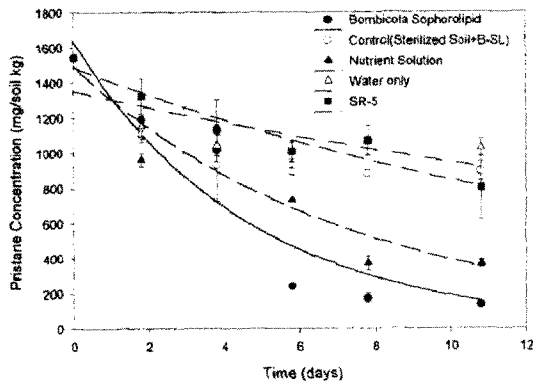


Fig.3 Effects of sophorolipid on the biodegradation of pristane from soil

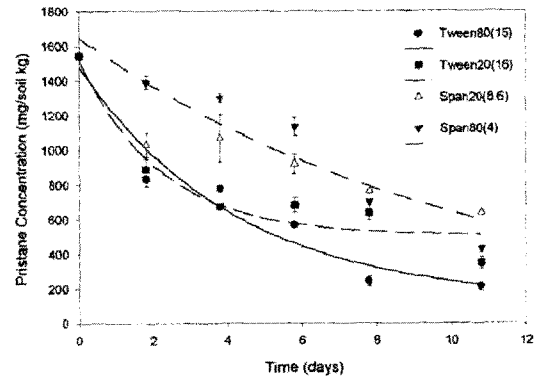


Fig.4 Comparison of sophorolipid and synthetic surfactants

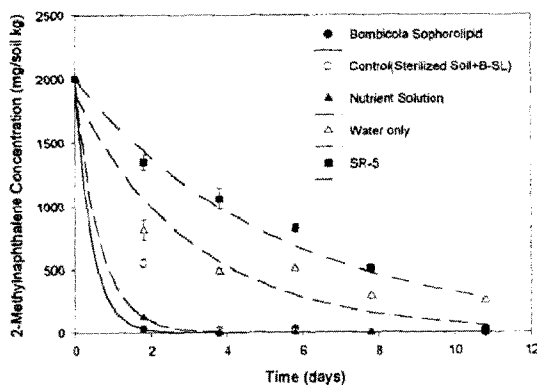


Fig.7 Effects of sophorolipid on the biodegradation of 2-methylnaphthalene from soil

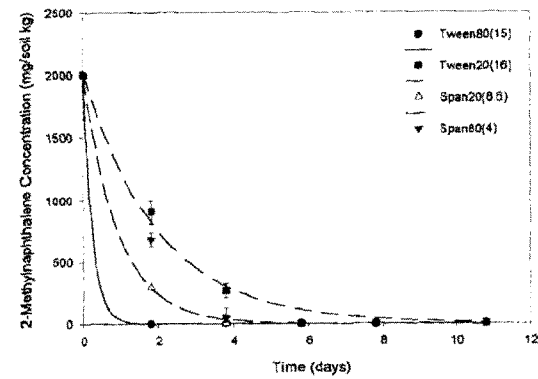


Fig.8 Comparison of sophorolipid and synthetic surfactants