

고정화 효소를 이용한 염소계 유기화합물의 분해

류두현, 김형수*, 최용욱, 김진명

전주대학교 환경시스템학과, *전주대학교 자연과학종합연구소

(dry@jj.ac.kr)

요 약 문

Suspected carcinogen, TCE and PCE, are the most common groundwater pollutants extensively used as a solvent and degreaser. In this study, oxygenases were immobilized in Ca-alginate and chitosan bead. TCE degradation by the immobilized enzyme beads were measured for various size, enzyme addition volume and TCE contact time. The degradation was decreased as increasing the bead size. For overnight, more than 20% of TCE was degraded. The variation of enzyme activity was tested for the repeated use of enzyme beads.

key word : TCE, PCE, oxygenase, Ca-alginate bead, chitosan bead

1.서론

산업계 용제로 흔히 사용되고 있는 염소계 유기화합물(PCB, dioxins, chlorophenol 등의 염소계 방향족화합물과 TCE, PCE, chlorinated alkanes와 같은 휘발성 염소계 지방족화합물)들은 지하수 및 토양의 주요오염원으로 알려져 있다. 특히 이들 중 TCP와 PCE는 여러 산업분야에 광범위하게 사용되어 왔으나, 관리·보관시설에서의 취급 부주의로 인한 누출 등으로 인하여 토양 및 지하수 등이 많이 오염되어 있다. 국내에서는 공단, 폐기물매립지, 오염하천, 금속광산 등 오염우려지역의 경우 총 조사건수 1493개 지점 중 TCE가 32개 지점(36%), PCE가 14개 지점(16%)으로 나타났으며, 대상지역 중 폐기물매립지역과 공단지역이 다른 지역보다 초과율이 높은 것으로 분석되었으며 그 오염도가 점차 증가하고 있음을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서는 TCE, PCE를 분해하는 것으로 알려져 있는 미생물의 산화효소를 이용하여 오염물질의 분해 정도를 알아보고, 산화효소를 Ca-alginate와 chitosan에 고정화 시켜 bead를 제조한 후, bead의 크기 변화, 산화효소의 첨가량 변화 및 접촉시간에 따른 TCE, PCE의 제거율을 확인하였다.

2.본론

TCE, PCE를 분해하는 미생물의 오염물질 분해능을 알아보기 위하여 kanamycin 내성을 갖고 있는 *Escherichia coli* TGI pBSKAN Tom과 *E. coli* TGI pBSKAN ToMo를 LB/KAN 배지에서 37°C, 170rpm에서 overnight(16~18hr) 배양하여 이를 OD₆₀₀ 2.3~2.5까지 배양한 후, 원심

분리 하여 pH 7.0, 0.1M phosphate buffer solution(PBS, pH 7)으로 4°C, 8,000rpm, 10min동안 원심분리를 3회 실시하여 세척한 후, 미생물 세포를 수거하였다. 이를 다시 PBS를 이용하여 희석한 것을 희석한천평판배양법을 이용하여 개체수를 확인하였다. 실험에 사용한 산화효소는 *E. coli Tom* 및 *E. coli ToMo*내에 존재하는 효소를 초음파추출법을 이용하여 얻었다.

산화효소의 고정에는 sodium alginate 2%(wt/vol) solution에 산화효소를 첨가한 후 1.5% sodium alginate solution이 되도록 제조하여, 0.25M CaCl₂ solution에 떨어뜨려 구형의 Ca-alginate bead를 제조하였다. 또한 chitosan bead는 chitosan(Medium molecular weight) 3% solution에 산화효소를 첨가한 후 chitosan의 농도가 2%가 되도록 조절하여, 0.5M NaOH solution에 떨어뜨려 구형의 chitosan bead를 제작하였다. 각 bead의 직경은 micrometer를 이용하여 20개를 측정 후 평균값을 취하였다.

고정화 효소의 TCE, PCE의 제거율을 알아보기 위하여 DW 7.6mL,와 H₂O₂ 2.4mL를 첨가하여 최종 실험 용액의 부피가 10mL가 되도록 60mL 부피의 serum vial에 첨가하고 teflon septum으로 밀봉한 후, TCE와 PCE를 실험 용량의 대해 200uM이 되도록 오염시켰다. 기밀된 serum vial을 37°C, 170rpm으로 overnight 및 각 실험 시간별로 접촉시킨 후, serum vial 내의 기상 오염물질을 gas tight syringe를 이용하여 GC-FID(Shimadzu, GC-17A AFW, Japan)로 분석하였다. TCE 및 PCE의 GC 분석 조건은 Table 1과 같다.

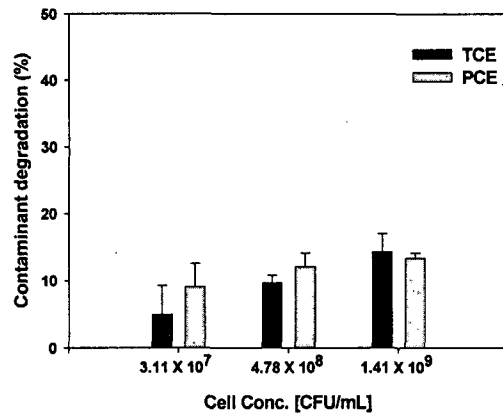
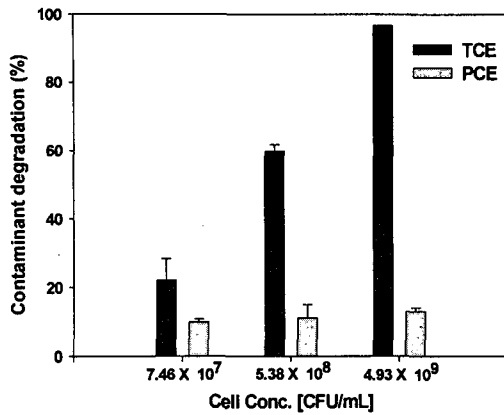
Table 1. The analytical condition of GC for the measurement of TCE, PCE

GC model	Shimadzu GC-17A AFW		Temperature
Column	DB-1	Column	160
Detector	FID	Injector	200
Injection volume[μL]	50μL	Detector	250

고정화 bead에 첨가되는 산화효소의 양에 따른 오염물질의 제거율을 알아보기 위하여, bead 제조시 산화효소의 첨가량을 변화시켜 각각의 bead를 제조한 후 위와 동일한 방법으로 오염물질의 제거를 알아보았다.

3. 결론

Fig. 1.에서 보는바와 같이 실험에 사용한 두 균주의 TCE와 PCE에 대한 오염물질 제거율은 *E. coli Tom*에 의한 TCE의 제거율의 경우, 미생물의 농도가 4.93×10^9 CFU/mL로 주입하였을 때 가 제거율이 96.7%로 가장 높았고, PCE의 제거율은 13% 정도로 TCE에 비해 적게 제거되었다. 또한 *E. coli ToMo*의 경우 TCE가 14.3%, PCE는 13.4%가 제거되었다. 따라서 산화효소를 이용하여 TCE의 제거를 위해 적용 가능한 산화효소는 *E. coli Tom*이 적합할 것으로 보여지며, 이후 실험에 적용하였다.



(a) *E. coli TGI pBSKAN TOM Green* (b) *E. coli TGI pBSKAN ToMO*
 Fig. 1. Comparison of contaminant degradation of *E. coli TGI pBSKAN TOM Green* with *E. coli TGI pBSKAN ToMO*

또한 각각의 bead의 직경을 변화시켜 TCE를 제거를 위한 실험을 실시한 결과 Fig. 2.와 같이 bead의 직경이 증가할수록 Ca-alginate bead와 chitosan bead 모두 오염물질의 제거율이 감소됨을 알 수 있었다. 이는 산화효소가 포함된 bead의 직경이 증가할수록 bead 내부에 고정화된 산화효소와 오염물질의 접촉이 이루어지지 않아 반응이 되지 않은 것으로 보여진다. 따라서 2.3mm 정도의 bead가 적당할 것으로 판단된다.

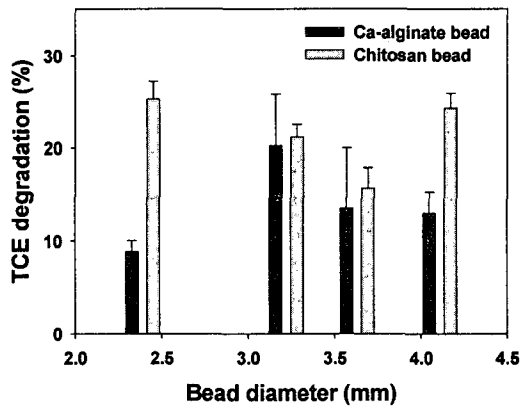


Fig. 2. TCE degradation of the difference to the bead diameter

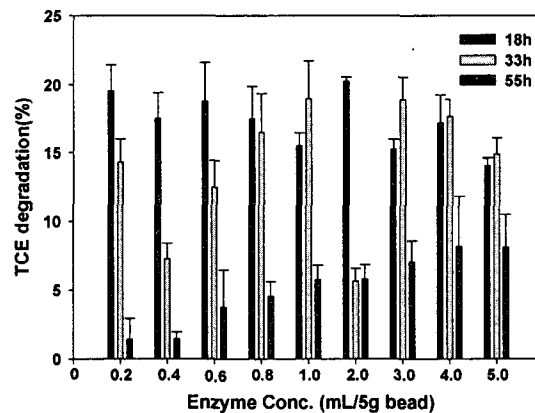


Fig. 3. TCE degradation of the various enzyme volume and the contact time at the chitosan beads

또한 bead에 첨가한 산화효소의 양을 변화시켜 bead의 직경을 2.3mm 정도가 되도록 제작하여 접촉시간에 따른 오염물질의 제거율을 확인한 결과를 Fig. 3.에 나타내었다. 실험 결과 18시간 동안 TCE와 접촉된 bead의 오염물질 제거율은 거의 20% 정도를 유지하였으나, 동일한 bead를 55시간 동안 접촉하였을 경우에는 TCE의 제거율이 10% 이하로 감소되었다. 그러나 접촉 시간이 길어질수록 bead의 제조시 첨가된 고농도의 산화효소가 포함된 bead가 높은 TCE의 제거율을 보였다. 이는 오염물질과 bead 간의 접촉을 원활하게하기 위해서 교반을 실시하였으나, 교반과정에서 산화효소

가 bead에서 세출되어 오염물질의 제거율이 떨어진 것으로 보인다.

따라서 향후 연구에서는 bead에 산화효소가 이전 실험에서 실시한 방법에 더 견고히 고정화 될 수 있는 방법을 첨가하여 실험하고, column test를 통해 오염물질을 연속처리가 될 수 있는 공정을 실험할 예정이다.

4. 참고문헌

- 1) 류두현, 김형수, 최용욱, 김용미, 이경애, 유재수, 조 현, "Toluene Monooxygenase의 Peroxide shunting에 의한 TCE와 PCE 분해 특성", 한국지하수토양환경학회 추계학술발표대회, 2004
- 2) Elisabetta de Alteriis, Giovanni Silvestro, Massimo Poletto, Vittorio Romano, Daniele Capitanio, Concetta Compagno, Palma Parascandola(2004), "Kluyveromyces laticells entrapped in Ca-alginate beads for the continuous production of a heterologous glucoamylase", Journal of Biotechnology, Vol. 109, 83-92.
- 3) KeeHoon Kim, Sangbum Kim, Kwang-Je Kim, Hong Woo Park, Sang-Jin Moon(2004), "Optimization of lipase entrapment in Ca-alginate gel beads", Process Biochemistry, Article of Press, DTD 5.
- 4) J.A. Trelles, J. Fernández-Lucas, L.A. Condezo, J.V. Siniterra(2004), "Nucleoside synthesis by immobilized bacterial whole cells", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 30, 219-227.
- 5) Min-Yun Chang, Ruey-Shin Juang, " Stability and catalytic kinetics of acetic phosphatase immobilizaed on composite beads of chitosan and activated clay(2004)", Process Biochemistry, Vol. 39. 1087-1091.
- 6) T.Y. Gou, Y. Q. Xia, G.J. Hao, M.D. Song, B. H. Zhang, "Adsoptive separation of hemoglobin by molecularly imprinted chitosan beads(2004)", Biomaterials, vol. 25, 5905-5912.

5. 감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신인력양성사업의 연구과제로 수행되었으며, 연구비를 지원해주신 산업자원부에 감사드립니다.