

Trichloroethylene(TCE)의 분해를 위한 메탄자화균총의 분리 및 배양

이 무 열 · ¹신 현 재 · 염 상 필 · †양 지 원
한국과학기술원 화학공학과
¹생명공학연구소 분자당생물학 Research Unit
(접수 : 1998. 2. 14., 게재승인 : 1998. 6. 29.)

Isolation and Cultivation of Methanotrophic Consortium for Trichloroethylene Degradation

Moo-Yeal Lee, Hyun-Jae Shin¹, Sang-Pil Yeom, and Ji-Won Yang[†]

Department of Chemical Engineering, KAIST, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, Korea

¹Molecular Glycobiology Research Unit, KRIBB, KIST, P.O. Box 115, Yusong-gu, Taejeon 305-600, Korea

(Received : 1998. 2. 14., Accepted : 1998. 6. 29.)

Two unidentified methanotrophic strains (MM-white and MM-red) secreting soluble methane monooxygenase (sMMO) involved in trichloroethylene biodegradation have been isolated from mixed methanotrophic consortium (MM) around Taejeon area. Subsequently four methanotrophic strains were isolated from MM and named according to their color: white (MS-white), yellow (MS-yellow), pink (MS-pink) and reddish brown (MS-rbrown). All strains except MS-yellow which can take glucose as well as methane, metabolized methane as a sole carbon source. They all showed symbiotic behavior when methane was used as the sole carbon source. Optimum conditions of cell growth for MM were pH of 6.8 - 7.2, temperature of 29 - 32 °C. and gas flow rate of 6 (for methane), 40 (for air), and 4 ml/min (for carbon dioxide). The sMMO activity was expressed as naphthalene oxidation rate ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{hr}$). The sMMO activity for MM grown in flask culture with 1 μM of CuSO_4 was 36, while it was 61 without copper. The activity for MM grown in the fermentor without CuSO_4 was 1077, but it was 197 after reaction with 5 ppm of TCE. The methanotrophs showed significantly high sMMO activity despite the presence of 1 μM of CuSO_4 , although most of other strains already known could not express sMMO activity under this condition.

Key Words : trichloroethylene (TCE), methanotroph, biodegradation, soluble methane monooxygenase (sMMO), mixed culture.

서 론

염소계 유기화합물 중의 하나인 trichloroethylene(TCE)은 전자부품, 반도체 기관의 세정 및 드라이클리닝, 금속 표면 세척, 고분자의 재료, 냉매의 전구체, 표백공정, 페인트 용제, 살충제, 윤활유 첨가제, 약품 첨가제 등으로 주로 사용되어 왔다(1-2). 그러나 TCE는 휘발성이 매우 강하고 밀도가 높아서 대기중으로 휘발되어 대기오염 문제를 유발하거나 대수층으로 유입되어 토양 및 지하수 오염을 일으킬 수 있다(1-3). 특히 수 ppm 이하의 미량만으로도 발암 및 돌연변이를 유발할 수 있으며 중추신경 억제작용, 급성간부전, 신장손상 등을 일으키기 때문에 세계 각국에서 세로계 규제치를 설정하거나 규제를 강화하

고 있는 실정이다(4). 이러한 TCE는 난분해성이며 독성을 지니고 있어서 일반적인 미생물들은 분해할 수 없으며, 성장기질(growth substrate)을 대사하면서 동시에 오염물질(nongrowth substrate)을 생분해 가능한 다른 물질로 변형 또는 분해시키는 "cometabolism"이라는 특수한 메카니즘을 이용하는 미생물을 통해서만 분해가 가능하다고 알려져 있다(5-8). 지금까지 TCE를 처리할 수 있는 것으로 알려진 여러 종류의 미생물 중에서 가장 뛰어난 성능을 보이며, 현장 적용 가능성이 높은 것으로 여겨지는 것중 하나는 메탄을 탄소원이나 에너지원으로 사용하는 메탄자화균(methanotrophs)이다(9). 메탄자화균은 여러 종류의 난분해성 물질의 분해효소인 soluble methane monooxygenase(sMMO)를 분비하는데, 이 효소의 넓은 기질 선택성과 호기적 조건에서의 빠른 분해능, 미생물 분리의 용이성 등으로 많은 연구가 진행되고 있다(10-16). 대표적인 균주는 *Methylosinus*(9, 12, 17-22), *Methylomonas* (23-25), *Methylococcus* (10), *Methylocystis*(26), *Methylosporobrio*(27) 등이 있다. 단일 메탄자화균 뿐만 아니라, 이들의 혼합배양을 통한 TCE 분해를 시도한 문헌들도 많이 보고되고 있다(6, 28-31). 그러나 메

† Corresponding author : Department of Chemical Engineering, KAIST, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, Korea
Tel : 042-869-3924, Fax : 042-869-3910
e-mail: jwyang@kaisLac.kr

탄산화균을 이용하여 TCE를 분해할 때 반드시 필요한 sMMO는 균주의 배양시 구리가 전혀 존재하지 않는 조건에서만 발현되는 문제점을 가지고 있다(17, 19-21)

본 연구에서는 TCE를 분해하기 위한 공정을 확립하기 위한 첫 단계로서 대전 근교에서 메탄산화균을 분리하였으며, 플라스크와 발효조에서 이들의 최적 혼합 배양 조건 및 배양 특성들을 조사하였다. 특히 현장 적용이 가능한 메탄산화균을 선별하기 위해서 구리의 존재하에서도 TCE를 분해할 수 있고 멸균되지 않는 상태에서 혼합 균종을 잘 유지하는 균주를 분리하는데 성공하였다.

재료 및 방법

메탄산화균의 분리 및 배양

채취한 토양샘플을 nitrate mineral salt(NMS, Table 1) 배지와 섞어 10%(v/v) 메탄 존재하에서 1주일 배양한 다음, 다시 상등액을 NMS 한천배지에 도말하여 메탄산화균의 존재여부를 확인하였다(18, 32). 한천배지는 1 μ M의 황산구리가 포함된 NMS 배지에 1.7% 한천을 혼합하여 만들었으며, 도말 후 30°C, 1 : 1 메탄/공기(v/v)로 채워진 gas-tight jar내에서 배양하였다. 그리고 sMMO의 발현능은 naphthalene 산화법으로 측정하였다(33). 이렇게 하여 분리된 메탄산화균을 NMS 배지가 들어 있는 밀폐된 가지달린 플라스크에 접종한 후 메탄, 공기, 이산화탄소를 각각 10, 40, 4 ml/min로 30분간, 12시간 마다 공급하면서 30°C, 300 rpm의 진탕배양기 내에서 계대배양하였다. 플라스크에서 메탄산화균이 자라면 계대배양시 다른 우수한 메탄산화균의 배양액을 10%(v/v) 투입하여 혼합 균종을 안정화시켰다.

Table 1. Composition of NMS medium (g/L).

Salt solution (10 \times)	NaNO ₃	8.5
	K ₂ SO ₄	1.7
	MgSO ₄ 7H ₂ O	0.37
	CaCl ₂ 2H ₂ O	0.07
Phosphate buffer solution (10 \times)	KH ₂ PO ₄	5.3
	Na ₂ HPO ₄	8.6
Trace metal solution (1000 \times)	ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.574
	MnSO ₄ 7H ₂ O	0.446
	H ₃ BO ₃	0.124
	NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.096
	CoCl ₂ 6H ₂ O	0.096
	KI	0.166
	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25
Iron solution (1000 \times)	FeSO ₄ 7H ₂ O	11.2

Add 1 and 5 mL of 1 mM H₂SO₄ in 1 L trace metal and 100 mL iron solution, respectively

Dilute and mix all the solutions before use

플라스크 및 발효조에서의 메탄산화균의 배양

플라스크에서의 최적 배양 조건을 찾기 위하여 200 ml의 가지달린 플라스크에 50 ml의 NMS 배지를 넣은 후 메탄산화균을 접종하였다. 기체의 공급량은 메탄/공기비로 각각 2/40, 6/40, 12/40, 20/30, 40/10 (ml/min)으로 하루에 2번씩 30분간 공급하며, 이산화탄소는 공기 양의 10%(v/v)로 하였다. 밀봉한 다음 30°C, 300 rpm으로 유지되는 진탕배양기내에서 배양하였으며, 하루에 한번씩 배양액의 흡광도와 sMMO 활성을 측정하였다. 메탄산화균의 농도는 NMS 배지를 맹김(blank)으로 잡아 spectrophotometer(HP 8452A)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였다.

분리된 메탄산화균 혼합 균종은 pH와 온도, 교반 속도가 조절 가능하며 기체가 공급되는 2 l 발효조(MultiGen사, 미국)에서 대량 배양되었다. NMS 배지 부피의 10%에 해당하는 배양액을 접종하였으며, 배양온도는 29~32°C, 350~400 rpm, pH는 6.8~7.2, 기체는 메탄 5~6, 공기 45~50, 이산화탄소 4~6 ml/min를 혼합하여 연속적으로 공급하였다. 한천배지에서의 실험을 제외한 모든 배양 실험은 멸균하지 않은 상태에서 혼합배양함을 원칙으로 하였다. 그리고 분리된 메탄산화균은 고정화하여 순금코팅한 후 주사전자현미경(Philips 535M)으로 관찰하여 형태와 외관상의 특징들을 살펴보았다(23, 25).

메탄산화균의 탄소원에 따른 성장과 구리의 영향

분리된 메탄산화균이 메탄만을 탄소원으로 사용하는 균주인지 확인하고, 다른 복합 유기물을 이용하는 미생물이 존재하는지를 파악하기 위해서 NMS 한천배지 외에도 여러가지 탄소원의 한천배지(Yeast-Malt 및 Bacto nutrient 한천배지, Difco) 및 액체배지(글루코스와 Yeast-Malt 배지, Difco)에서 혼합 메탄산화균을 배양하여 균종의 변화도 관찰하였다. 플라스크 배양의 경우는 먼저 메탄 존재하의 NMS 배지에서 배양한 다음 각각의 메탄산화균을 여러 가지 복합 탄소원으로 O.D. 0.2로 희석한 후 배양하였다.

각 균주들의 구리에 대한 영향을 보기 위하여 플라스크 및 발효조에서 1 μ M의 황산구리가 들어 있거나 없는 배지에서 배양한 메탄산화균들의 sMMO 활성을 구하였다. 그리고 TCE와 반응한 후 감소되는 sMMO의 활성을 일러보기 위하여 발효조에서 배양한 MIM을 5 ppm의 TCE와 3시간 동안 반응시킨 후 sMMO의 활성을 측정하였다.

sMMO의 활성 및 TCE 분해능의 측정

sMMO의 활성은 메탄산화균 내의 sMMO가 naphthalene을 산화시켜 생성되는 naphthol이 azo 염료와 반응할때 보라색으로 발색되는 것을, 525 nm에서 흡광도를 측정하여 간접적으로 구하는 naphthalene 산화법을 사용하였다(25, 33-35). OD 0.2로 희석한 메탄산화균을 0.1 mm zirconium bead로 세포벽을 깬 후 15,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 취하였다. 234 μ M naphthalene을 수일 동안 교반시키면서 증류수에 녹여 포화시킨 다음 걸러 사용하였다. 1 mL의 메탄산화균 상등액과 1 mL의 naphthalene 용액을 시험관에 넣고 25°C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 시험관에 100 μ L의 4.21 mM tetrazotized-*o*-dianisidine 용액을 첨가하여 반응시킨 다음 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질의 양은 bicinchoninic acid 법(Sigma)을

이용하였다.

TCE 분해능은 원심분리하여 모은 메탄자화균을 NMS 배지로 OD 10 까지 희석한 다음, 초기 5 ppm의 TCE 농도가 되도록 주입하여 3시간동안 반응시켰다. 반응에는 8 ml의 PIFE/silicone septa를 가진 bial이 사용되었으며, head space가 없이 메탄자화균을 포함한 배양액을 채운 다음 미세 주사기로 TCE를 주입하여 TCE가 기상으로 분배되는 것을 막았다. 분해능 확인은 주사기를 이용하여 3 ml의 배지를 뽑아낸 다음 1 ppm의 1,3-dibromopropane(DBP)가 포함된 2 ml의 hexane을 주입하여 TCE를 역추출하여 분석하였다. 오차를 줄이기 위해 모든 실험은 평기를 잡고 3회 이상 반복실험을 행하여 평균을 산출하였다. TCE의 분석은 가스크로마토그래피(HP 5890II)로 하였으며, 칼럼은 내경이 0.53 mm인 VOCOL capillary column, detector는 electron captured detector(ECD), 내부 표준물질로는 1,3-DBP가 사용되었다. 오븐 온도는 80℃ 부터 160℃ 까지 10℃/min의 속도로 상승시켰으며, injector와 ECD detector의 온도는 각각 180과 200℃로 설정하였다.

결과 및 고찰

메탄자화균의 분리

문헌에 의하면 지금까지 보고된 대부분의 메탄자화균은 C₁ 화합물인 메탄만을 호기적으로 이용하는 obligatory methanotrophs이었다(13, 14, 16, 32, 36). 이들은 대개 비교적 간단한 배지 조성과 무난한 배양조건(30℃, pH 7.0)에서 7~10 시간의 doubling time을 보인다. 본 연구에서도 NMS 한천배지에 도달하여 탄소원으로 메탄만 존재하는 gas-tight jar 내에서 메탄자화균을 분리하였다. 우선 한천배지 위에서 메탄자화균을 분리할 때에는 콜로니가 나타내는 색깔과 모양에 의해 그들의 혼합 균층을 크게 흰색을 나타내는 MM-white, 붉은색을 나타내는 MM-red로 분류하였다. 이 두 균층은 성장률, TCE 분해능 등에는 다소 차이가 있었지만 모두 sMMO의 발현능을 지니고 있었다(37). 이들 균층은 한천배지 위에서 1주일 내에 완전히 성장하며, 먼저 MM-white가 성장한 후 MM-red가 나타나기 시작하였다. 그리고 MM-white의 주된 종은 다시 완전히 흰색의 단일균주인 MS-white와 노란색의 단일균주인 MS-yellow로 분리되었으며, MM-red의 경우에는 분홍색의 MS-pink와 주황색의 MS-rbrown으로 분리되었다. 전체 분리과정을 아래 식(1)에 자세히 나타내었다.

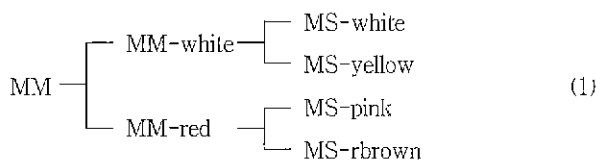


Figure 1 (A) 에서 MS-white는 한쪽이 들어간 구형을 띤 것이고 MS-yellow는 사진 뒤쪽으로 보이는 약간 휘어진 막대형이었다. 그 중, MS-yellow는 한천배지 배양시 그 수가 적었으나, 발효조 배양시에는 초기에 급격한 성장속도를 보였다. Figure 2 (A)는 발효조에서 3일 배양한 후의 것으로 배양 초기에 대부분이 MS-yellow로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 이

두 균주는 표면이 비교적 매끈하여 고분자 물질을 생산하지 않는 것으로 보이지만, 막대형의 MS-pink(Figure 1 (B))는 많은 양의 세포외고분자 물질을 분비하였다. 그리고 MS-rbrown(Figure 1 (C))은 고분자 물질을 분비하지는 않았지만 타원형의 머리와 편모(flagellum)를 가지고 있었다. 다른 메탄자화균 가운



(A)



(B)



(C)

Figure 1. Scanning electron microscope (SEM) micrographs of the methanotrophic strains on NMS agar plates. (A) MM-white (B) MS-pink and (C) MS-rbrown Bars are 1 μm.

때 *Methylomonas albus*와 *Methylomonas methanica* 중의 일부가 하나의 편모를 가지는 것으로 보고된 바 있다(32). 한편 플라스크 배양에서 MS-rbrown는 독자적으로 성장하지 못하며

MS-pink와 혼합 배양해야만 자라는 특징이 있었다. 분리된 균주들의 기본적인 특징을 Table 2에 실었다.

Table 2. Basic characteristics of major isolates in the methanotrophic consortium.

Isolates	Color	Carbon Source	Morphology	ECP ¹ Production	TCE Degradation
MS-white	white	methane	circle	-	+
MS-yellow	yellow	C-C	rod	-	-
MS-pink	pink	methane	rod	+	+
MS-rbrown	reddish brown	methane	sperm	-	+

All isolates were grown under aerobic condition.

+ : possible, - : impossible and C-C : multi-carbon compound¹ extracellular polysaccharides



(A)



(B)

Figure 2. Scanning electron microscope (SEM) micrographs of the mixed methanotrophs (MM). MM with (A) white color after 3 day culture and with (B) red color after 12 day culture in the fermentor. Bars are 1 μm. Growth conditions for MM in the fermentor were pH of 6.5~7.5, temperature of 30~35°C and flow rate of 4~6, 45~50 and 4~6 ml/min for methane, air and carbon dioxide, respectively.

탄소원에 따른 메탄자화균의 생장

처리대상이 되는 TCE로 오염된 지하수나 폐수 등에 여러 가지 탄소원이 존재할 경우 고농도로 매양하려고 하는 메탄자화균 이외에 잡균들이 대량으로 성장할 가능성이 매우 높기 때문에 분리된 균주들이 메탄만을 탄소원으로 이용하는 obligatory 인지 다른 복합 탄소원도 대사하는 facultative methanotroph인지를 확인하는 것은 매우 중요하다 먼저 MM-white와 MM-red를 YM과 Bacto 한천배지에 도달했을 때 형성된 콜로니를 메탄 존재하의 NMS 한천배지 위로 옮겼을 경우는 콜로니 생성이 빈약하였다. 그러므로 YM이나 Bacto 한천배지 위에서 콜로니를 형성하는 균주는 메탄자화균이 아님을 알 수 있었다. MS-white, MS-yellow, MS-pink, MS-rbrown을 메탄이 없는 조건에서 YM과 Bacto nutrient 한천배지 위에 도달했을 경우, 오직 MS-yellow만이 콜로니를 형성하였다. 특히, MS-yellow는 메탄이 없는 조건에서 NMS 한천배지 상에서도 콜로니를 형성하였다. 이와 유사한 예로 facultative methanotrophs 중의 일종인 *Mycobacterium* 중의 일부는 메탄, 메탄올 및 복합탄소원을 모두 대사할 수 있는 것으로 보고된 바 있다(16). 즉 MS-white, MS-pink, MS-rbrown은 메탄만을 이용하는 obligate methanotroph로 보이며, MS-yellow는 메탄이 없을 때는 다른 복합 유기물질을 탄소원으로 이용하는 facultative methanotroph인 것으로 보인다(Table 3). 또한 혼합 메탄자화균을 매양할 때 메탄자화균들 이외에도 복합 유기물질을 탄소원으로 이용하는 여러 가지 다른 균주들이 약간씩 섞여서 동시에 자란다는 것을 확인하였다

앞의 한천배지 배양에 이어서, 메탄 존재하에서 NMS 한천배지 위에 형성된 콜로니를 메탄 존재하의 NMS 배지에서 매양한 후, 다시 여러 가지 복합 탄소원에서 액체 배양하여 TCE 분해능을 살펴보았다. 먼저 MS-white, MS-pink, MS-rbrown의 경우에는 글루코스 함유 배지나 YM 배지에서 전혀 성장하지 않았다. 또한 MM-white와 MM-red의 경우는 성장이 빈약했지만, MS-yellow의 경우는 성장이 양호하였다(Table 4). 각각의 균주들을 복합 탄소원에서 1주일씩 배양한 다음 원심분리하여

Table 3. Effect of culture media on the growth of methanotrophs

Isolates	Type of Agar Plates			
	NMS (w/ CH ₄)	NMS (w/o CH ₄)	YM	Bacto Nutrient
MM-white	+ -	-	+	+
MM-red	+ -	-	+	+
MS-white	+ -	-	-	-
MS-yellow	++	+	+	+
MS-pink	++	-	-	-
MS-rbrown	++	-	-	-

++ : more than 50 colonies per an agar plate, + : 10 ~ 50 colonies, - : less than 10 colonies, w/ : with and w/o : without

O.D. 1.0까지 희석한 후 TCE 분해능을 조사한 결과, 메탄을 탄소원으로 해서 배양한 MM에 비해 TCE 분해능이 대폭 감소함을 알 수 있었다. 또한 글루코스타 YM 배지에서 잘 성장하는 MS-yellow의 경우도 TCE를 분해하지 못했다. 따라서 MS-yellow가 메탄 이외의 탄소원에서도 자라지만 TCE의 분해에는 기어를 하지 못하고, 다른 균주들도 메탄 이외의 탄소원에서는 TCE 분해능이 현저히 저하되므로 메탄을 유일한 탄소원으로 하여 배양하는 것이 좋을 것으로 사료된다. MS-yellow는 비록 TCE에 대한 분해능은 없지만 복합 탄소원을 이용할 수도 있으므로 메탄자화균들을 장기간 혼합배양시킬때 다른 유기물질들의 유입으로 인한 잡균들의 번식을 막아 줄 수 있기 때문에 함께 배양하는 것이 유리할 것으로 사료된다. 문헌에 의하면 모든 메탄자화균이 sMMO를 발현하여 TCE를 분해할 수 있는 것은 아니며, type I methanotroph 중에서는 *Methylomonas methanica* 68-1, type II와 type X 중의 일부가 구리가 제한된 조건에서만 sMMO를 발현하는 것으로 알려져 있다(25).

Table 4. Effect of carbon sources on TCE degradation

Isolates	Carbon Source	Growth	Residual TCE Conc (ppm)
Blank	-	-	20.0
MM	methane	++	5.5
MM-white	Glucose	-	17.5
MS-yellow	Glucose	+	19.6
MM-red	Glucose	-	15.6
MM-white	Yeast-Malt	-	18.3
MS-yellow	Yeast-Malt	+	20.6
MM-red	Yeast-Malt	-	16.6

+ - : more than O.D.₆₆₀ 4.0; + : O.D.₆₆₀ 1.0~4.0; - : less than O.D.₆₆₀ 1.0.

All isolates were grown under aerobic condition.

All data were from flask culture except MM whose data were from fermenter culture.

Initial TCE concentration was 20 ppm and reaction time was 5 hr.

메탄자화균의 혼합 배양

MM-white와 MM-red의 배양액을 부피비로 1 : 1로 넣고 발효조에서 배양한 MM은 배양 초기 단계인 6일 정도까지는 흰색의 MM-white(특히 MS-yellow)가 우점종으로 자라고 10일 이후 부터 서서히 붉은 색으로 변해가기 시작하여 배양말기에는 완전히 붉은색으로 변하였다. 그리고 배양초기에는 균주들이 잘 현탁된 상태로 성장하여 교반을 시키지 않아도 부유되어 있지만, 색깔이 붉게 변한 안정기 이후에는 MS-pmk가 생산한 고분자 물질에 의해 균주들이 엉겨 붙어 교반을 시키지 않으면 쉽게 침전되고 배양시 발효조의 벽에 0.5 cm 내외의 두꺼운 층을 형성하며 달라붙는 특성을 보였다(Figure 2). 또한 MM을 발효조에서 배양할 때가 각각의 균주들을 따로 플라스크 배양시킬 때 보다 좀더 높은 sMMO 발현능을 보였다(Figure 5) 문헌에 의하면 혼합 배양시에는 균주들이 서로의 대사산물을 이용하여 메

탄의 산화에 의해 생성되는 메탄올과 같은 독성물질을 효과적으로 이용하는 공생 관계를 잘 유지한다고 한다(13, 15, 16). 공기/이산화탄소의 최적비는, 메탄자화균이 비교적 높은 호기성 상태를 좋아하는 균주이고 serine cycle에서 2 mole의 포름알데히드가 동화될때 1 mole의 이산화탄소가 필요하므로(16, 21, 22) 본 발효조 배양에서는 그 비를 10 : 1로 공급하였다. 추후 메탄자화균에 의한 TCE 분해공정을 확립하기 위해서는 메탄의 공급원을 가격이 저렴한 천연가스에서 찾지 않으면 안되기 때문에 메탄만을 기질로 하여 자라는 한가지 종류의 메탄자화균을 배양하는 것 보다 혼합 배양하여 여러 종을 적절히 유지하는 것이 바람직할 것으로 사료된다

플라스크 및 발효조 배양에서의 성장률과 sMMO 발현능

플라스크에서의 MM을 배양해본 결과 최대의 성장률을 얻을 수 있는 기체의 공급 속도는 pH 6.8~7.2, 30°C에서 메탄 6, 공기 40, 이산화탄소 4 ml/min이었다(Figure 3). 이때 메탄공급속도를 증가시키면 기질 저해에 의해 성장률이 저하되고, 최적의 기체 공급 속도 보다 낮은 메탄 농도로 공급하면 탄소원의 부족으로 인해 성장률이 저하되었다. 최대의 성장률을 보이는 조건인 메탄, 공기, 이산화탄소가 각각 6, 40, 4 ml/min에서 sMMO의 활성도인 naphthalene 산화 속도는 평균 60 μ M/mg protein/hr를 보였다. TCE 분해 실험은, 발효조 증에서 배양액을 채취한 후 흡광도를 측정하고 흡광도 1.0 까지 희석한 후 공기를 폭기하여 메탄을 날려버린 후, TCE를 5 ppm 투입하여 3시간 동안 반응시켰다. 발효조에서의 배양 초기에 비교적 낮은 TCE 분해능을 보이다가 안정기 이후에 TCE 분해능이 높아졌다(Figure 4). 이러한 결과는 진술한 바와 같이 초기에 TCE 분해능을 지니지 못한 MS-yellow가 우점종으로 존재하기 때문인 것으로 보인다. 종합하면 발효조 안에서는 기질인 메탄의 공급이 원활하며 고농도의 산소가 존재하므로 메탄자화균의 상태가 좋아서 sMMO의 발현능, TCE의 분해능, 메탄자화균의 성장률 등이 모두 플라스크 배양 보다 뛰어났다. 또한 혼합배양을 하는 경우 미생물의 상승작용에 기인하여 대사경로 중간에 생성되는 메탄올 등의 독성물질을 상보적으로 분해하고 효소의 활성을 촉진시켜 sMMO의 TCE 분해능을 향상시키는 것으로 사료된다. 발효조에서는 4일 정도의 배양에서 흡광도 5 이상의 높은 메탄자화균 농도를 유지할 수 있었다(Figure 4).

분리된 균주의 성장조건에 따른 sMMO 발현능을 비교해 보기 위해 여섯가지의 실험을 수행하였다(Figure 5). 구리를 넣지 않고 배양한 MM의 sMMO 발현능은 플라스크와 발효조의 경우 각각 약 61과 1077 μ mol/mg protein/hr를 보였다. 동일한 방법으로 측정된 다른 연구 결과(25)에 의하면 *Methylomonas methanica* 68-1인 경우 551 \pm 27 nmol/mg protein/hr이고 *Methylosinus trichosporium* OB3b의 경우는 321 \pm 16 nmol/mg protein/hr의 최대 naphthalene 산화 속도를 보였다. 그리고 플라스크 안에서 배양한 MM-white와 MM-red를 비교해보면 각각 43과 21 μ mol/mg protein/hr로 MM-white가 더 우수하다는 것을 알 수 있었다 또한 1 μ M의 황산구리를 넣고 플라스크에서 배양한 MM의 경우도 36 μ mol/mg protein/hr로 비교적 sMMO의 감소가 적음을 알 수 있었다. 배지 내에 구리이온이 존재하면 particulated monooxygenase(pMMO)의 생성이 유도되어 sMMO에 의한 TCE 분해를 방해하는 것으로 알려

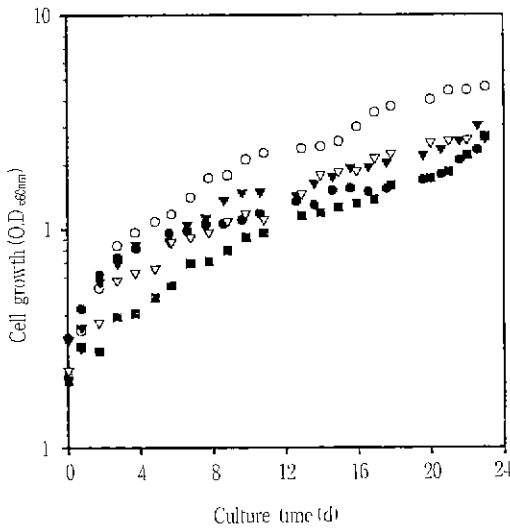


Figure 3 Growth curves of MM with different concentration of methane in flask culture. Growth conditions for MM without copper in the NMS medium were pH 6.8~7.2, 30°C and 2(●), 6(○), 12(▼), 20(▽) and 40(■) ml methane/min for 30 minutes twice a day

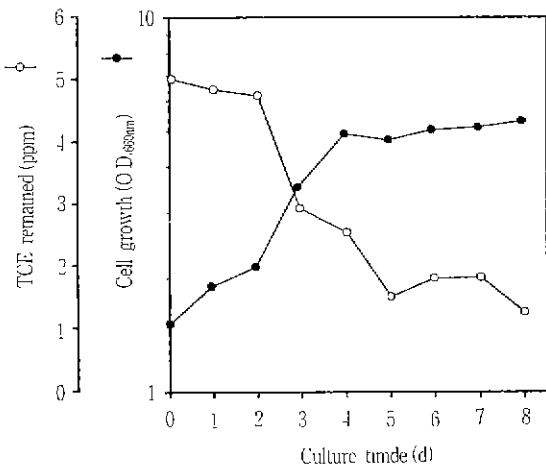


Figure 4. Growth curves of MM in the fermentor and degradability of TCE. Growth conditions for MM without copper were pH of 6.5~7.5, temperature of 30~35°C and flow rate of 4~6, 45~50 and 4~6 ml/min for methane, air and carbon dioxide, respectively. In addition, initial 5 ppm TCE was degraded by MM (O.D.₆₆₀ 1.0) within 3 hours in a batch mode.

져 있다(19-21, 38, 39). *Methylosinus trichosporium* OB3b의 경우에는 0.25 μM 이상의 CuSO₄에서는 전혀 sMMO를 발현하지 못한다고 알려져 왔다(20, 34). 그러므로 구리의 존재하에서도 sMMO를 발현시키는 균주를 찾아내는 것이 매우 중요하다. 본 연구에서 분리된 메탄자화균이 구리가 존재함에도 불구하고 sMMO를 발현시키고 있는 것은, 균주 자체가 구리에 대한 내성을 가지며 sMMO를 발현하기 때문일 수도 있고 MS-pink가 외부로 분비하는 다량의 고분자 물질에 구리가 흡착되어서 미처 메탄자화균 내부로 흡수되지 못했기 때문일 수도 있는데 정

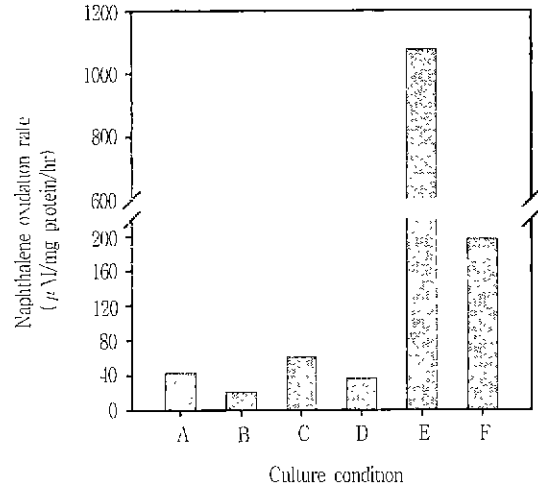


Figure 5 Effect of culture conditions on sMMO activity. For flask culture : (A) MM-white without copper, (B) MM-red without copper, (C) MM without copper, (D) MM with 1 μM copper sulfate. For fermentor culture : (E) MM without copper, (F) MM (without copper) after contact with 5 ppm TCE for 3 hours

확한 메커니즘은 아직 불명확하다. 발효조에서 다양한 MM을 5 ppm의 TCE와 반응시킨 후 sMMO의 발현능을 측정해보면 197 μmol/mg protein/hr로 떨어졌으나 플라스크 배양의 경우와 비교하여 여전히 높은 발현능을 보였다. 결론적으로 본 연구에서 분리된 메탄자화균은 우수한 구리내성으로 실제공정에서의 사용가능성이 높을 것으로 사료된다.

요 약

Trichloroethylene(TCE)의 생분해능을 가진 메탄자화균을 색깔에 따라 분리하여 초기 균총 MM으로부터 MM-white와 MM-red를 나누었고 여기서 다시 흰색의 MS-white, 노란색의 MS-yellow, 분홍색의 MS-pink, 주황색의 MS-rbrown을 얻었다. 이들은 모두 메탄을 유일한 탄소원으로 대사하는 메탄자화균이었으며, MS-yellow는 글루코스도 이용할 수 있었다. 그리고 메탄만을 탄소원으로 하여 배양할 때 공생관계를 보였다. 혼합 메탄자화균을 구리를 넣지 않고 배양할 때의 최적 조건은 pH 6.8~7.2, 온도 29~32°C, 메탄, 공기, 이산화탄소의 공급속도는 각각 6, 40, 4 ml/min이었다. 발효조에서 혼합 메탄자화균을 배양할 때 1주일 만에 흡광도 5.5 까지 성장하였으며, 안정기에 보다 높은 TCE 분해능을 보였다. 분리된 메탄자화균의 sMMO 효소 활성은 naphthalene 산화 속도(μmol/mg protein/hr)로 구하였다. 구리가 첨가되지 않은 배지에서 MM 균총의 플라스크 배양시 sMMO 활성은 61 μmol/mg protein/hr이었으며, 1 μM의 황산구리를 첨가한 경우 36 μmol/mg protein/hr으로 감소하였다. 그리고 구리가 첨가되지 않은 배지에서 MM 균총의 발효조 배양시 sMMO 활성은 1077 μmol/mg protein/hr이었고, 5 ppm의 TCE와 반응 후에는 197 μmol/mg protein/hr로 감소하였다. 문헌에서 대부분의 메탄자화균이 1 μM의 황산구리가 있는 경우 sMMO를 발현하지 못하는데 비해 본 연구를

통해 분리된 메탄산화균은 상당히 높은 활성을 보였다.

감 사

본 논문은 93~95년도 환경부 "G-7 환경공학기술개발사업"의 연구비 지원에 의해 이루어졌습니다. 이에 감사드립니다. 또한 실험 수행에 도움을 준 전진숙 연구원께 진심으로 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 양지원 (1993), 할로젠화 지방족 화합물의 생물학적 분해, *생물공정 연구의 최근동향 논문집 2*, 183-197.
- 양지원 (1995), 수계 환경오염정화를 위한 bioremediation, *생물공정 연구의 최근동향 논문집 3*, 167-178.
- Storck, W (1987). Chlorinated Solvent Use Hurt by Federal Rules, *Chem. Eng. News* 65, 11
- Miller, R. E. and F. P. Guengerich (1983), Metabolism of Trichloroethylene in Isolated Hepatocytes, Microsomes, and Reconstituted Enzyme Systems Containing Cytochrome P-450, *Cancer Res* 43, 1145-1152.
- Vogel, T. M., C. S. Criddle, and P. L. McCarty (1987). Transformation of Halogenated Aliphatic Compounds, *Environ. Sci. Technol.* 21, 722-736.
- Little, C. D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lidstrom, R. L. Tyndall, and P. J. Gilmer (1988), Trichloroethylene Biodegradation by a Methane-oxidizing Bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 951-956.
- Bradford, M. L. and R. Krishnamoorthy (1991), Consider Bioremediation for Waste Site Cleanup, *Chem. Eng. Prog.* 87, 80-85.
- Mafarland, M., C. M. Vogel, and J. C. Spain (1992), Methanotrophic Cometabolism of Trichloroethylene in a Two Stage Bioreactor System, *Wat. Res.* 26, 259-265.
- Oldenhuis, R., J. Y. Oedzes, J. J. van der Waarde, and D. B. Janssen (1991), Kinetics of Chlorinated Hydrocarbon Degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and Toxicity of Trichloroethylene, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 7-14.
- Colby, J., D. I. Stirling, and H. Dalton (1977), The Soluble Methane Monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath) Its Ability to Oxygenate *n*-Alkanes, *n*-Alkenes, Ethers, Alicyclic, Aromatic and Heterocyclic Compounds, *Biochem. J.* 165, 395-403.
- Stirling, D. L., J. Colby, and H. Dalton (1979), A Comparison of the Substrate and Electron-donor Specificities of the Methane Mono-oxygenases from Three Strains of Methane-oxidizing Bacteria, *Biochem. J.* 177, 361-364.
- Best, D. J. and I. J. Higgins (1981), Methane-oxidizing Activity and Membrane Morphology in a Methanol-grown Obligate Methanotroph, *Methylosinus trichosporium* OB3b, *J. Gen. Microbiol.* 125, 73-84
- Anthony, C (1986), Bacterial Oxidation of Methane and Methanol, *Adv. Microb. Physiol.* 27, 113-210.
- Leak, D. J. and H. Dalton (1986), Growth Yields of Methanotrophs, *Appl. Microbiol. Biotech.* 23, 470-476.
- Lidstrom, M. E., and D. I. Stirling (1990), Methylophils: Genetics and Commercial Applications, *Annu. Rev. Microbiol.* 44, 27-58.
- Dijkhuizen, L. (1993), Methylophils, *Biotechnology* (H. J. Rehm and G. Reed, eds.), Vol. 1, p.266. VCH, Weinheim
- Scott, D., J. Brannan, and I. J. Higgins (1981), The Effect of Growth Conditions on Intracytoplasmic Membranes and Methane Mono-oxygenase Activities in *Methylosinus trichosporium* OB3b, *J. Gen. Microbiol.* 125, 63-72.
- Conish, A., K. M. Nicholls, D. Scott, B. K. Hunter, W. J. Aston, I. J. Higgins, and J. K. M. Sanders (1984), *In vitro* ¹³C-NMR Investigations of Methanol Oxidation by the Obligate Methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b, *J. Gen. Microbiol.* 130, 2565-2575
- Davis, K. J., A. Cornish, and I. J. Higgins (1987), Regulation of the Intracellular Location of Methane Monooxygenase during Growth of *Methylosinus trichosporium* OB3b on Methanol, *J. Gen. Microbiol.* 133, 291-297.
- Tsien, H. C., G. A. Brusseau, R. S. Hanson, and L. P. Wackett (1989), Biodegradation of Trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3155-3161.
- Park, S. H., M. L. Hanna, R. T. Taylor, and M. W. Droege (1991), Batch Cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b 1: Production of Soluble Methane Monooxygenase, *Biotech. Bioeng.* 37, 1037-1042
- Shah, N. N., S. H. Park, R. T. Taylor, and M. W. Droege (1992), Cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b 3: Production of Particulate Methane Monooxygenase in Continuous Culture, *Biotech. Bioeng.* 40, 705-712.
- Collins, M. L. P., L. A. Buchholz, and C. C. Remsen (1991), Effect of Copper on *Methylomonas albus* BG8, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1261-1264
- Henry, S. M. and D. Grbic-Galic (1991), Influence of Endogenous and Exogenous Electron Donors and Trichloroethylene Oxidation Toxicity on Trichloroethylene Oxidation by Methanotrophic Cultures from a Groundwater Aquifer, *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 236-244.
- Koh, S. C., J. P. Bowman, and G. S. Sayler (1993), Soluble Methane Monooxygenase Production and Trichloroethylene Degradation by a Type 1 Methanotroph, *Methylomonas methanica* 68-1, *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 960-967
- Uchiyama, H., O. Yagi, K. Oguri, and E. Kokututa (1994), Immobilization of Trichloroethylene-degrading Bacterium, *Methylocystis* sp. Strain M in Different Matrices, *J. Ferment. Bioeng.* 77, 173-177.
- Newman, L. M. and L. P. Wackett (1991), Fate of 2,2,2-

- Trichloroacetaldehyde (Chloral Hydrate) Produced during Trichloroethylene Oxidation by Methanotrophs, *Appl Environ Microbiol.* **57**, 2399-2402.
28. Fogel, M. M., A. R. Taddeo, and S. Fogel (1986), Biodegradation of Chlorinated Ethenes by a Methane-utilizing Mixed Culture, *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 720-724
 29. Broholm, K., B. K. Jensen, T. H. Christensen, and L. Oisen (1990), Toxicity of 1,1,1,- Trichloroethane and Trichloroethene on a Mixed Culture of Methane-oxidizing Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2488-2493
 30. Alvarez-cohen, L. and P. L. McCarty (1991), Effects of Toxicity, Aeration and Reductant Supply on Trichloroethylene Transformation by a Mixed Methanotrophic Culture, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 228-235.
 31. Alvarez-cohen, L., P. L. McCarty, E. Boulygina, R. S. Hanson, G. A. Brusseau, and H. C. Tsien (1992), Characterization of a Methane-utilizing Bacterium from a Bacterial Consortium that Rapidly Degrades Trichloroethylene and Chloroform, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1886-1893.
 32. Whittenbury, R., K. C. Philips, and J. F. Wilkinson (1970), Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria, *J. Gen. Microbiol.* **61**, 205-218.
 33. Phelps, P. A., S. K. Agarwal, G. E. Spetel, and G. Georgiou (1992), *Methylosinus trichosporium* OB3b Mutants Having Constitutive Expression of Soluble Methane Monooxygenase in the Presence of High Levels of Copper, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3701-3708.
 34. Brusseau, G. A., H. C. Tsien, R. S. Hanson, and L. P. Wackett (1990), Optimization of Trichloroethylene Oxidation by Methanotrophs and the Use of a Colorimetric Assay to Detect Soluble Methane Monooxygenase Activity, *Biodegradation* **1**, 19-29.
 35. Tsien, H. C. and R. S. Hanson (1992), Soluble Methane Monooxygenase Component B Gene Probe for Identification of Methanotrophs that Rapidly Degrade Trichloroethylene, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 953-960
 36. Dalton, H. (1992), Methane Oxidation by Methanotrophs, *Biotechnology Handbooks* (J.C. Murrell and H. Dalton, eds.), Vol. 5, p85, Plenum Press, New York.
 37. 이무열, 신현제, 염상필, 양지원 (1998), 혼합 메탄산화균에 의한 Trichloroethylene의 분해, *대한환경공학회지*, **20**, 1207-1217
 38. Stanley, S.J., S.D. Prior, D.J. Leak, and J. Dalton (1983), Copper Stress Underlies the Fundamental Change in Intracellular Location of the Methane Monooxygenase in Methanotrophs, *Biotechnol. Lett.* **5**, 487-492.
 39. Oldenhuis, R., L.J.M.R. Vink, D.B. Janssen, and B. Witholt (1989), Degradation of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b Expressing Soluble Methane Monooxygenase, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2819-2826