

Pseudomonas putida F1과 *Burkholderia cepacia* G4에 의한 BTEX, trichloroethylene의 분해

이 승 우 · 이 준 명 · †장 덕 진

명지대학교 화학공학과

(접수 : 1998. 6. 23., 게재승인 : 1998. 10. 13.)

Degradation of BTEX and Trichloroethylene by *Pseudomonas putida* F1 and *Burkholderia cepacia* G4

Seungwoo Lee, Junmyoung Lee, and Deokjin Jahng†

Research Institute for Clean Technology and Department of Chemical Engineering, Myongji University,
Yongin, Kyonggi 449-728, Korea

(Received : 1997. 6. 23., Accepted : 1998. 10. 13.)

Two cometabolic trichloroethylene (TCE) degraders, *Pseudomonas putida* F1 and *Burkholderia cepacia* G4, were found to catabolize phenol, benzene, toluene, and ethylbenzene as carbon and energy sources. Resting cells of *P. putida* F1 and *B. cepacia* G4 grown in the presence of toluene and phenol, respectively, were able to degrade not only benzene, toluene and ethylbenzene but also TCE and *p*-xylene. However, these two strains grown in the absence of toluene or phenol did not degrade TCE and *p*-xylene. Therefore, it was tentatively concluded that cometabolic degradation of TCE and *p*-xylene was mediated by toluene dioxygenase (*P. putida* F1) or toluene-2-monooxygenase (*B. cepacia* G4). Maximal degradation rates of BTEX and TCE by toluene- and phenol-induced resting cells of *P. putida* F1 and *B. cepacia* G4 were appeared to be 4-530 nmol/(min·mg cell protein) when a single compound was solely served as a target substrate. In case of double substrates, the benzene degradation rate by *P. putida* F1 in the presence of toluene was decreased up to one seventh of that for the single substrate. TCE degradation rate was also linearly decreased as toluene concentration increased. On the other hand, toluene degradation rate was enhanced by benzene and TCE. For *B. cepacia* G4, degradation rates of TCE and toluene increased 4 times in the presence of 50 μ M phenol. From these results, it was concluded that a degradation rate of a compound in the presence of another cosubstrate(s) could not be predicted by simply generalizing antagonistic or synergistic interactions between substrates.

Key Words : BTEX, TCE, degradation rates, substrate interactions

서 론

다양한 원인에 의하여 원유유래 탄화수소(petroleum hydrocarbon)가 자연환경으로 방출되는 사고는 매우 광범위하게 퍼져 있는 사건으로서, 이에 수반된 심각한 문제중의 한가지는 지하수와 토양의 오염이다. 특히 독성이 있고 물에 다소 녹으며 따라서 이동성이 있는 원유성분들인 benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes(BTEX)는 주유소의 휘발유(gasoline) 저장탱크로부터 누유되어 인근토양을 오염시키고 나아가 지하수를 오염시킬 수 있다. BTEX는 미국 EPA(the Environmental Protec-

tion Agency)의 최우선감시물질(top priority pollutant list)에 포함되어 있으며(1), 우리 나라를 비롯한 각국의 음용수 기준에도 포함되어 있다. Trichloroethylene(TCE)은 지하수 및 토양에서 가장 흔히 검출되는 물질로서 그 발암성과 독성으로 말미암아 BTEX와 마찬가지로 미국 EPA가 지정한 최우선감시물질이며(2), TCE 역시 음용수 기준에 포함되어 있을 뿐만 아니라, 폐수처리장의 배출수에도 포함되어서는 안되는 물질로 지정되어 있다. 그러나 최근 창원지역의 지하수에 다량 오염되어 있음이 밝혀진 바 있어(3) 그 위험성이 점차 부각되고 있다.

오염물질들은 그 분해능을 지닌 미생물의 대사과정에서의 역할에 따라 크게 성장기질(growth substrate)와 비성장기질(non-growth substrate)로 나눌 수 있는데(4), 오염물질이면서 성장기질로 작용할 수 있는 물질의 대표적인 예로는 phenol이나 toluene을 들 수 있으며 비성장기질에는 TCE를 비롯한 많은 지방족 할로겐화합물(halogenated aliphatic compounds)가 있다. 미생물에 의한 비성장기질의 분해를 흔히 공대사(com-

† Corresponding Author · Department of Chemical Engineering, Myongji University, San38-2 Namdong Yongin Kyonggi 449-728, Korea

Tel : 0335-330-6340, Fax : 0335-337-1920

e-mail: djahng@wh.myongji.ac.kr

etabolism)라고 하며 균체의 성장과 흔히 NADH로 표현되는 환원력(reducing power)의 생산을 위해서는 별도의 탄소/에너지원을 공급해 주어야 한다. Wilson 과 Wilson에 의해 최초로 보고된 이후(5), TCE를 공대사에 의해 분해할 수 있는 몇 가지의 호기성 미생물이 발견되어 왔는데, 이들 미생물 내에서 TCE 분해반응의 첫 번째 단계를 담당하는 효소들은 대개 mono- 또는 di-oxygenase로서, methane, propane, ammonia, isoprene, toluene, phenol 등에 의하여 이들 효소의 발현이 유도된다고 알려져 있다(6)

이 중에서 toluene과 TCE를 모두 분해할 수 있는 미생물에는 toluene dioxygenase를 발현하는 *Pseudomonas putida* F1(7), toluene-2-monoxygenase를 생산하는 *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* G4(8), toluene-3-monoxygenase와 toluene-4-monoxygenase를 각각 생산하는 *Pseudomonas pickettii* PKO1(9)와 *Pseudomonas mendocina* KR1(10)이 알려져 있다 이들은 BTEX 성분과 TCE를 모두 분해할 수 있는 장점을 지니고 있어 복합오염처리에 적합하며 *P. pickettii* PKO1을 제외한 나머지 3가지 균주는 phenol 또는 toluene이 탄소/에너지원으로 첨가된 M9 최소배지에서 비성장속도(specific growth rate)가 0.35hr^{-1} 이상(11)인 사실에서 알 수 있듯이 성장속도가 빠르고 배양이 용이하며 현징적용시 여러 가지 이점이 기대된다. 이러한 이유로 phenol에 의해 TCE 분해효소가 유도되는 미생물이 현장시험에 처음으로 선택되어 TCE가 오염된 미국 California 주 Mountain View시에 위치한 Moffet Naval Air Station 토양(Moffet field)에 phenol을 투여하여 토착(indigenous) 미생물 중 TCE를 분해할 수 있는 미생물의 활성을 유도(biostimulation)하고자 시도한 바 있다(12). 현재 국내에서도 분해능을 지닌 특정한 미생물을 분리하고자 하는 노력이 진행중이며 특히 1991년 낙동강 phenol 사고의 여파로 phenol 분해균주에 대한 관심이 높다 예로서 정경훈 등에 의하여 phenol 분해균주가 분리, 동정된 바 있으며(13), 임성호 등도 phenol 분해균주를 분리하고 이 균주(*Alcaligenes xylooxidans* Y234)의 phenol 분해능이 benzene에 의해 유도됨을 밝혔다(14).

미생물에 의한 오염물질의 분해속도는 오염처리공정의 제반 변수중 가장 중요한 인자중 하나로서 공정에 사용될 균주의 선정시 최우선 고려되어야 한다. 현재까지의 연구는 주로 단일성분의 분해속도를 측정하고 이를 균주간의 우열비교나 공정설계시의 기초자료로 삼고자 하는 노력이 대부분이었으나, 토양과 지하수의 오염은 대개 복수의 물질이 동시에 오염된 복합오염인 경우가 많은 바, 실제상황에 근접한 조건에서의 분해속도에 관한 연구가 필요하다고 사료된다 한 예로서 미국의 Superfund site에서 발견되는 물질에는 toluene, benzene, ethylbenzene, TCE 등이 고농도로 검출되어 복합오염이 심각함을 알 수 있고(15), 주유소 휘발유 저장탱크 누유에 의한 오염이 발생했다면 인근의 토양이나 지하수가 BTEX에 의해 동시에 오염될 것임은 쉽게 짐작할 수 있다

BTEX 또는 그 일부 성분과 TCE가 동시에 오염되었을 때 이를 단일 균주로 처리하기 위해서는 앞서 언급한 toluene oxygenase를 발현하는 미생물의 사용을 고려할 수 있다 BTEX 성분과 TCE의 복합오염이 아니고 TCE에 의한 단일 성분오염이라 하더라도 toluene oxygenase의 발현유도를 위해서

는 앞서 언급한 미국의 Moffett field에서처럼 toluene이나 phenol과 같은 물질의 공급이 필요하게 된다. 따라서 이때에는 두 가지 이상의 기질이 공존하게 되어 단일 물질 존재시 관찰되었던 분해속도는 예상할 수 없게 된다 Alvarez와 Vogel은 *Pseudomonas* strain CFS-215의 경우 toluene 존재시 benzene과 *p*-xylene의 분해속도가 증가했으며 *Arthrobacter* sp. strain HCB의 경우에서도 benzene 존재시 toluene과 *p*-xylene의 분해속도가 증가함을 관찰한 반면 aquifer slurry에서는 *p*-xylene의 존재 하에서 benzene과 toluene의 분해속도가 감소함을 발견하고, 미생물의 대사 다양성 때문에 두 가지 이상의 기질 존재 하에서 각 성분의 분해속도가 증가하거나 감소한다고 일반화할 수 있음을 밝힌 바 있다(16). 즉, 일반적으로 두 가지 이상의 물질이 동일한 효소의 기질로 작용할 때에는 경쟁적 저해를 예상할 수 있으나 지금까지의 연구들에 의하면 복수 기질의 존재시 항상 상호 길항적(antagonistic)인 것은 아님을 알 수 있다.

본 연구에서는 toluene dioxygenase를 발현하는 *P. putida* F1과 toluene-2-monoxygenase를 생산하는 *B. cepacia* G4를 이용하여 BTEX와 TCE의 분해속도를 실험적으로 산출하고 두 가지 기질이 공존했을 때 각 단일물질의 분해속도가 어떻게 변화하는지 살펴보았다. 본 연구의 결과는 복합오염이 일어난 오염현장에서 미생물을 이용한 정화 처리시 기초적인 공정변수로 참조될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

Pseudomonas putida F1과 *Burkholderia cepacia* G4는 각각 미국 Iowa 대학의 Gibson 교수와(7) 미국 EPA의 Chapman 박사(8)로부터 입수하였다 액체배양시에는 LB나 포도당이 10 g/L 포함된 M9 최소배지를(17) 사용하였으며 30°C에서 300 rpm으로 진탕하였다(HK-S125C shaking incubator, 한국중합기기) 고체배양시에는 M9이나 LB에 15 g/L의 Bacto agar(Difco)를 첨가하여 사용하였다. 장기보전을 위해서는 대수 증식기의 액체배양액에 glycerol(15%, v/v)을 가하여 -30°C에서 냉동 보관하였다

탄소/에너지원 검색

P. putida F1과 *B. cepacia* G4의 성장시 탄소 및 에너지원으로 작용하는 물질을 알아보기 위하여 탄소원이 첨가되지 않은 M9 agar 매지에 두 균주를 접종하고 밀봉된 2 L 유리용기(silica gel이 없는 desiccator)에 넣었다. 이 용기의 바닥에는 시계침시에 0.5 mL의 phenol(Showa Chemicals), benzene(Matsunoene Chemicals), toluene(Matsunoene Chemicals), ethylbenzene(Junsei Chemicals), *p*-xylene(Junsei Chemicals)를 담아 휘발된 이들 물질이 고체매지로 전달되어 균의 성장을 유도할 수 있게 하였다.

휴지세포(resting cell)의 제조

영양물질이 배제되어 성장이 정지된 상태에서 균주의 순수한 분해능력을 비교하기 위하여 휴지세포를 이용하였으며, 휴지세포 제조시에는 먼저 유도물질(inducer) 존재 하에서 *P. putida* F1과 *B. cepacia* G4를 배양하였다. *P. putida* F1의 경우에는

500 mL 삼각 플라스크에 탄소원이 결핍된 M9 최소배지를 50 mL 넣고 플라스크의 위 부분에 1.0 mL micropipet용 tip을 매단 후 여기에 0.2 mL의 toluene 원액을 넣었다. *P. putida* F1을 접종한 후 플라스크의 입구를 고무전으로 밀봉하여 진탕배양기에서 배양함으로써 피펫 tip으로부터 휘발된 기상의 toluene이 액상의 균체에 전달되게 하였다. *B. cepacia* G4의 경우에는 살균이 끝나고 냉각된 M9 배지에 직접 phenol 원액을 더하여 액상내 농도가 5 mM가 되게 하였으며, phenol의 Henry 상수 (4.07×10^{-4} L atm/mol, 25°C)가(18) 매우 낮은 관계로 플라스크를 밀봉하지 않았다. 30°C, 200 rpm에서 배양된 배양액을 대수 증식기에서 원심분리하여(5,000 rpm x 10 min, 상온; Union 55R, 한일과학산업) 균체를 수거하고 다시 0.1 M 인산완충용액 (pH7.0)으로 두 번 세척한 후 동일한 완충용액에 균체를 현탁시켜 600nm에서의 흡광도(Smart Plus 3255, 영우기기)가 2.0($A_{600}=2.0$)이 되도록 하였다.

분해실험

제조된 휴지세포 현탁액 10 mL을 43 mL 용량의 갈색 vial에 분주한 후 Teflon이 입혀진 실리콘-고무막(silicon rubber septum)이 부착된 마개(screw cap)(Fisher Scientific)로 밀봉하였다. 가스밀봉주사기(gas-tight syringe)(Hamilton)를 이용하여 phenol, benzene, toluene, ethylbenzene, *p*-xylene, trichloroethylene을 필요량만큼 septum을 통하여 vial내로 주입한 후에는 vial을 뒤집어 마개 쪽이 아래로 향한 상태에서 진탕하였다(30°C, 200rpm). 일정시간 간격으로 headspace의 기체 50 µL를 가스밀봉주사기로 취하여 gas chromatograph(GC-14B, Shimadzu)에 주입하여 각 물질의 분해정도를 분석하였다. 주입구(Injector)와 검출기(Flame Ionization Detector)의 온도는 각각 220, 250°C였으며 column으로는 AT-502 2(30 m x 0.25 mm i.d. x 1.4 µm, Alltech)를 사용하였고 온도는 35-60°C에서 출발하여(4 min 유지) 2-3°C/min의 속도로 상승시킨 후 220°C에서 5 min 동안 유지시켰다. 운반가스(carrier gas)로는 질소(JC Gas)를 사용하였다. 분해정도 측정시 대조군(control)으로는 살균된 *P. putida* F1이나 *B. cepacia* G4를 사용하였다.

액상내 물질 농도 계산

본 연구에서 사용한 오염물질들은 phenol을 제외하고는 모두 휘발성이 강한 VOC(volatile organic compounds)들이므로 Teflon으로 밀봉된 vial을 배양용기로 사용하여 휘발과 흡착에 의한 손실을 막는다 하더라도 vial내로 주입된 물질들은 액상(배

지)과 head space의 기상으로 분배하게 된다. *P. putida* F1과 *B. cepacia* G4는 액상에 존재하므로, vial내로 주입된 물질의 총량으로부터 식(1)[19]과 Henry상수(K_H)를 이용하여 변형 Henry상수(K_H')를 계산하고(Table 1) (2)식으로부터 액상내 농도를 구하였다.

$$K_H' = K_H/RT \tag{1}$$

$$K_H' = C_g/C_l \tag{2}$$

- 단, K_H' : modified Henry's constant (dimensionless)
- K_H : Henry's constant (L atm/g-mole)
- C_g : concentration in the gas phase (headspace) (µM)
- C_l : concentration in the liquid phase (cell suspension) (µM)
- R : gas constant (0.082067 L·atm/g-mole K)
- T : temperature (K)

분해속도의 계산

각 물질의 분해반응은 Michaelis-Menten kinetics를 따른다고 간주하였으며, 실험에 의하여 얻어진 각 물질의 초기분해속도(v_0 , initial degradation rate)와 식(3)의 Lineweaver-Burk reciprocal plot(20)으로부터 최대분해속도(v_{max} , maximal degradation rate)를 구하였다. 반응속도의 계산시, 반응에 참여한 균체량 대신에 세포단백질(cell protein) 양(11)으로 대체하였다.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{v_{max}} \tag{3}$$

- 단, v : 초기분해속도 [nmol/(min·mg cell protein)]
- v_{max} : 최대분해속도 [nmol/(min·mg cell protein)]
- K_m : Michaelis 상수 (µM)
- S : 기질 농도 (µM)

결과 및 고찰

Toluene oxygenase 발현 유도

P. putida F1과 *B. cepacia* G4는 각각 phenol과 toluene 존재 하에서 성장한다고 알려져 있으나(6), 그 외의 BTEX 성분(benzene, ethylbenzene, *p*-xylene)도 탄소/에너지원으로 작용할 수 있는지 검토한 결과(Table 2), 두 균주 모두 *p*-xylene 하에서만 성장이 일어나지 않았다. 성장이 확인된 물질 중에서도 *P. putida* F1의 경우에는 toluene, benzene, ethylbenzene에서의 성장이 phenol에 비하여 우수한 반면 *B. cepacia* G4의 경우에는 phenol의 경우가 가장 양호한 colony 성장을 유도하였다. Cruden 등에 의하면(21), *P. putida* F1은 benzene 하에서는 매우 미약하게 자라나 *p*-xylene하에서는 광성한 성장을 보인다고 하였으나 본 연구의 결과는 이와 다르게 나타났다. *B. cepacia* G4의 경우에는 분해능의 유무는 알려지지 않았으나 *p*-xylene이 탄소/에너지원으로 사용될 수 없음이 알려져 있는 바 그 결과와 일치하였다(22). Toluene 및 phenol이 탄소/에너지원으로 작용할 수 있는 것은 두 균주에서 발현 유도되는 toluene dioxygenase와 toluene-2-monooxygenase에 의한 대

Table 1. Henry's constants of organic compounds used in this study.

Compounds	Log K_H (L·atm/g-mole) ^a	K_H' (dimensionless)
Phenol	-3.39	1.64×10^{-5}
Benzene	0.74	0.22
Toluene	0.83	0.26
Ethylbenzene	0.90	0.32
<i>p</i> -Xylene	0.84	0.28
Trichloroethylene	1.03	0.43

^aHenry's constants, K_H , were obtained from the reference 18.

Table 2. Growth of *P. putida* F1 and *B. cepacia* G4 on solid media containing phenol and BTEX as carbon and energy sources.

Carbon source	Growth	
	<i>P. putida</i> F1	<i>B. cepacia</i> G4
None (control)	-	-
Phenol	+	++
Benzene	++	-
Toluene	++	+
Ethylbenzene	+-	+
<i>p</i> -Xylene	-	-

- : No growth until 8 days
 + : Colony growth after 2 days
 ++: Colony growth before 2 days

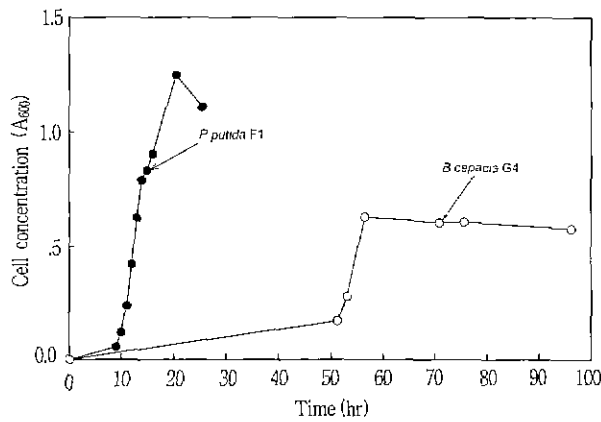


Figure 1 Growth of *P. putida* F1 and *B. cepacia* G4 in M9 minimal media containing toluene and 5 mM phenol.

사 작용에 의한 것임이 이미 밝혀져 있으므로 benzene과 ethylbenzene의 이화작용(catabolism)도 이들 toluene oxygenase 들에 의한 것이라고 추측하였으며, 고체배양시 가장 왕성한 colony 성장을 보였던 toluene과 phenol을 *P. putida* F1과 *B. cepacia* G4의 액체배양에 각각 사용하였다.

Figure 1에서 볼 수 있는 바와 같이, *P. putida* F1의 배양을 위하여 50 mL의 M9 최소배지에 0.2 mL의 toluene을 공급하였을 때 약 10시간의 지연기(lag phase)를 보인 후 0.543 hr⁻¹의 비성장속도를 보였고 흡광도(600 nm) 값이 약 1.3에 도달한 후에는 성장이 정지하였으며, *B. cepacia* G4는 5 mM의 phenol이 포함된 M9 최소배지에서 배양했을 때 50 시간 이상의 긴 지연기를 보인 후 비성장속도 0.252hr⁻¹를 나타낸 후 흡광도 0.6에서 성장이 정지하였다. *B. cepacia* G4의 좀더 왕성한 성장을 유도하기 위하여 phenol의 농도를 여러 가지로 변화시켜 보았으나 5 mM가 최적인 것으로 나타났다.

휴지세포에 의한 BTEX, TCE 분해

Toluene 존재 하에서 성장한 *P. putida* F1과 phenol 존재 하에서 성장한 *B. cepacia* G4의 균체를 대수증식기에서 수거후, 100 mM 인산완충용액(pH7.0)으로 세척하고 동일한 용액에 균체를 재현탁하여 흡광도 값이 20 근처가 되도록 하였다. 균체현탁액 10 mL을 43 mL vial에 넣고 Teflon이 입혀진 septum으로 밀봉후 BTEX와 TCE를 농도별로 주입한 후 진탕하면서 시간별로 headspace내의 물질의 양을 GC로 정량 하였다. Figure 2의 예에서 볼 수 있는 바와 같이, 주입된 모든 물질들은 전형적인 1차반응 양상을 보이며 감소했으며, 특히 균체성장을 유도하지 못한 *p*-xylene과 TCE도 분해되는 것으로 확인되어, 이 두 가지 물질도 *P. putida* F1과 *B. cepacia* G4에 의해 제거될 수 있음을 알 수 있었다. 균주는 다르나 *Pseudomonas* sp. strain CFS-215는 benzene 및 toluene을 성장기질로 사용할 수 있으나 *p*-xylene은 공대사에 의해서만 분해가 가능함이 알려져 있는 바(16) 본 연구의 결과는 이와 유사하였다. 한편, LB나 포도당이 탄소/에너지원으로 포함된 M9 최소배지에서 이 두 균주를 배양하여 얻어진 휴지세포에 의해서는 *p*-xylene과 TCE의 분해가 일어나지 않음을 확인하였는데, 이들 결과로부터 *P. putida* F1과 *B. cepacia* G4에 의한 *p*-xylene과 TCE의 분해 반응은 공대사에 의한 것이며 반응의 핵심효소(key enzyme)가 toluene dioxygenase와 toluene-2-monooxygenase임을 추측할 수 있었다.

각 물질의 분해속도를 계산하기 위하여 Figure 2에서와 같은 분해 결과의 첫 번째 측정치로부터 초기분해속도(initial degradation rate)를 구하였다(Table 3). BTEX, TCE 5가지 물질

Table 3. Initial rates of BTEX and TCE degradation by resting cells of *P. putida* F1 and *B. cepacia* G4 grown in the presence of toluene and phenol as carbon and energy sources.

Strain	Conc. (μM) ^a	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	<i>p</i> -Xylene	TCE
<i>P. putida</i> F1	20	13.70 ^b (11.59) ^c	3.06(10.76)	3.27(9.73)	3.18(10.40)	1.01(8.27)
	40	29.20(23.17)	4.59(21.53)	5.35(19.46)	6.58(20.79)	2.31(16.54)
	60	39.14(31.76)	8.03(32.29)	9.56(29.18)	8.48(31.19)	2.45(24.80)
	80	51.03(46.35)	8.35(43.06)	12.08(38.91)	8.88(41.58)	3.12(33.07)
<i>B. cepacia</i> G4	20	2.87	2.04	0.94	1.41	1.72
	40	5.53	4.17	2.28	3.27	2.43
	60	8.37	6.28	2.63	4.22	3.26
	80	10.49	7.70	3.84	4.73	3.18

^aConcentration : Concentrations when all of the molecules added into vials are assumed to be present in the aqueous phase.

^bInitial degradation rates are in nmol/(min·mg cell protein).

^c(μM) : Actual aqueous concentrations calculated from modified Henry's constants in the Table 1 and the equation (2).

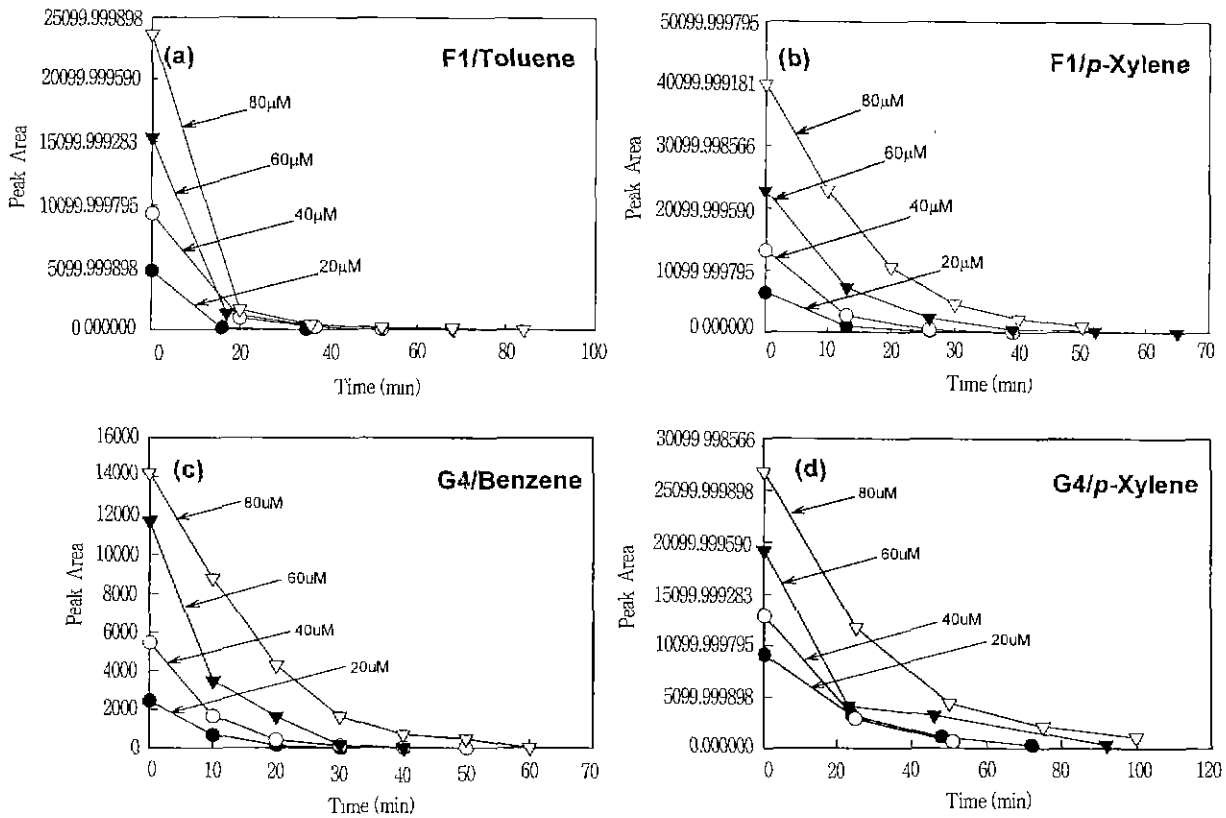


Figure 2. Degradation of toluene, benzene, and *p*-xylene by resting cells of *P. putida* F1 and *B. cepacia* G4 grown in the presence of toluene and phenol.

Table 4. Maximal degradation rates of BTEX and TCE by *P. putida* F1 and *B. cepacia* G4.

	<i>P. putida</i> F1		<i>B. cepacia</i> G4	
	V_{max} [nmol/(min·mg cell protein)]	K_m (μ M)	V_{max} [nmol/(min·mg cell protein)]	K_m (μ M)
Benzene	529.1	267.2	73.08	181.7
Toluene	17.86	27.7	51.97	145.1
Ethylbenzene	52.63	87.9	58.96	418.6
<i>p</i> -Xylene	20.83	32.3	7.42	15.8
TCE	6.67	41.8	4.32	7.2

모두에 대해 물질의 초기분해속도는 기질의 농도가 증가하면 같이 증가하는 전형적인 Michaelis-Menten 반응 양상을 보였으며 농도가 증가할수록 분해속도의 증가폭은 점차 감소하였다. 다시 이들 초기속도로부터 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 Table 4에 나타낸 최대분해속도(maximal degradation rates)를 구하였다. *P. putida* F1의 경우, 고체배양에서 가장 왕성한 성장을 유도하였던 toluene의 분해속도가 benzene이나 ethylbenzene에 비하여 오히려 낮았으며 공대사에 의해 분해되는 *p*-xylene의 분해속도가 toluene의 분해속도와 유사한 수준을 나타내었다. 특히 benzene의 분해속도는 다른 화합물에 비하여 월등히 높았다. *B. cepacia* G4의 경우에는 공대사 분해 물질인 *p*-xylene과 TCE의 분해속도가 다른 물질에 비하여 낮았으며

benzene의 분해속도는 *P. putida* F1에서와는 달리 다른 물질과 유사하거나 오히려 낮았다. 전반적으로 *P. putida* F1의 분해속도가 *B. cepacia* G4에 비하여 높았으며, Figure 1의 메양결과를 함께 고려했을 때 BTEX나 TCE가 단독 오염된 경우를 처리할 때는 *P. putida* F1이 유리할 것으로 사료된다.

두 가지 물질 공존시 분해속도

P. putida F1의 경우 toluene dioxygenase의 발현 유도를 위하여 toluene을 공급하게 되면, 유도물질인 toluene과 분해대상 물질이 공존하게 된다. 이 경우 물질의 분해속도가 유도물질인 toluene의 농도에 따라 어떻게 저등하는지 검토하였다. Figure 3에서 보는 바와 같이 toluene 존재시 benzene의 최대분해속도는 거의 지수적으로 감소하였고 TCE의 분해속도도 직선적으로 감소함을 보였다. 이러한 반응속도 감소 현상을 효소반응의 경쟁적 저해(competitive inhibition), 비경쟁적 저해(uncompetitive inhibition), 또는 무경쟁적 저해(noncompetitive inhibition)의 관점에서 해석하려 시도하였으나 어느 경우도 정확하게 해당하지 않았던 바, 이는 toluene-benzene, toluene-TCE 사이의 상호작용이 효소반응에서와 같이 단순하지 않음을 반영한다고 사료된다. 한편, 동일한 조건하에서 다른 하나의 기질인 toluene의 분해속도는 오히려 증가하였다(Figure 4). 특히 분해속도의 증가가 TCE 또는 benzene의 농도 증가에 따라 지속적으로 증가하지 않고 어느 농도 이상에서는 분해속도가 오히려 감소하기 시작하여 일종의 최적점이 존재함을 보여주었다.

B. cepacia G4의 경우에는 phenol 존재 하에서 TCE와 toluene의 분해속도는 phenol 농도에 대해 Figure 4에서와 같은

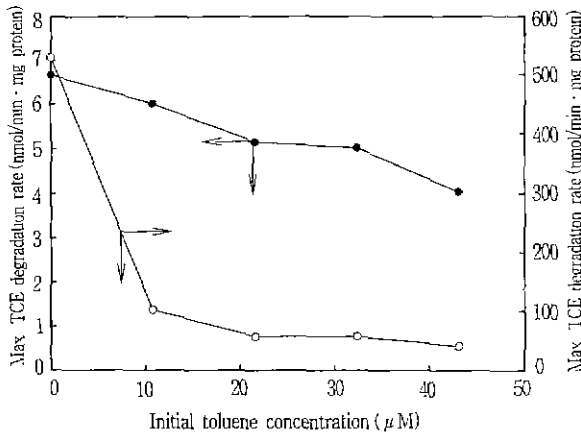


Figure 3. Maximal degradation rates of benzene and TCE in the presence of toluene by resting cells of *P. putida* F1.

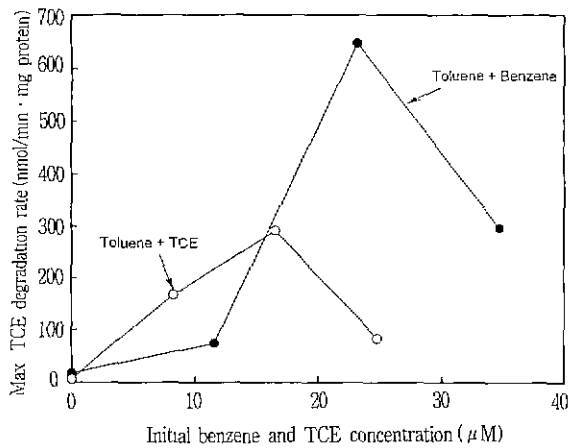


Figure 4. Maximal degradation rates of toluene in the presence of benzene or TCE by resting cells of *P. putida* F1.

생곡선의 경향을 보였는데(Figure 5), phenol의 초기농도가 50 μM까지는 TCE와 toluene 공히 그 분해속도가 증가하였고 그 이상에서는 감소하기 시작하였다 이러한 결과들은 앞서 언급한 바와 같이 동일한 효소가 복수의 기질이 참여하는 반응에 관여한다 하더라도 반응의 주체가 단일효소가 아닌 세포일 때에는 단순히 경쟁적저해 현상이 일어날 것으로 예상하는 것이 오류일 수 있음을 증명한다

본 연구와 앞서 언급한 Alvarez와 Vogel의 연구결과(16) 외에도 미생물의 방향족 화합물에 대한 분해능력의 다양성은 공기질(cosubstrate)의 존재 하에서 BTEX의 분해가 일어났을 때에도 다수의 상충적인 결과를 보여 왔다 Meyer 등은(23) mixed microbial population에서는 phenol에 의해 BTX의 분해가 저해됨을 보여준 바 있으나, 반면에 Arvin 등은(24) toluene이나 o-xylene에 의하여 benzene의 분해가 촉진되었다고 보고하였다

복수의 기질이 동시에 존재할 때에는 기질간의 상호작용이 발생하므로 각 물질의 분해속도를 단일물질 분해상수(V_{max} , K_m 등)로부터 예측하기 어려운 이유는 세포 내에서 물질에 따라 매우 다양한 대사과정에 관여할 수 있기 때문으로 사료된다. 예를 들어, 기질 중 어느 한 물질이 타물질의 분해에 필요한 효소의 발현을 유도한다면 그 물질의 분해속도는 증가할 수 있을 것이

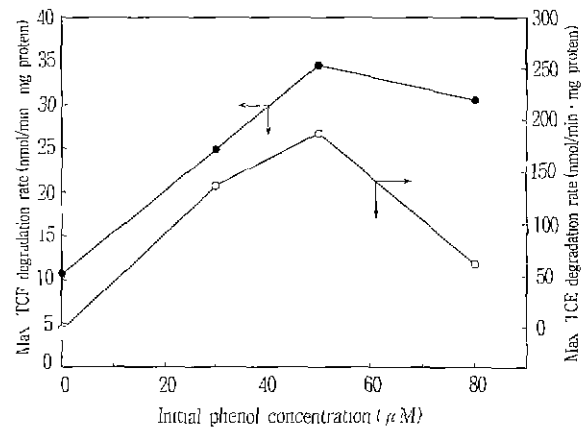
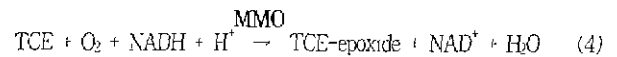


Figure 5. Maximal degradation rates of toluene and TCE in the presence of phenol by resting cells of *B. cepacia* G4.

다 또한 어느 한 성분이 균주의 1차대사 기질로 작용하여 상대 물질의 공대사에 필요한 성분을 제공할 수 있다면 그 상대물질의 분해속도는 증가할 수 있을 것이다 이 경우에 해당하는 좋은 예는 메탄산화균(methanotroph) *Methylosinus trichosporium* OB3b에 의한 TCE 분해반응에서 찾아 볼 수 있다. 이 균주에 의한 TCE 분해는 공대사에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있는데, 담당효소인 methane monooxygenase(MMO)에 의해 TCE가 산화될 때에 아래와 같이 NADH가 참여한다(25).



위 반응의 속도는 NADH의 농도가 증가되면 상승할 것으로 예상할 수 있다. 따라서 이 균주에서 reducing equivalent에 해당하는 formate를 반응액에 공급하면 formate가 이산화탄소로 산화되면서 발생하는 NADH에(26) 의해 TCE의 산화속도는 증가하게 된다. 이를 이용하여 Oldenhuis 등은 20mM의 formate를 가하여 TCE 분해속도를 3배 이상 증가시킨바 있다(27).

반면에 어느 한 물질의 분해속도는 상대물질에 의한 독성, catabolite repression, 경쟁적 저해, 전자수용체의 소모 등의 기작에 의해 감소될 수 있고, 또한 많은 경우에 투여된 물질이 상대물질의 분해속도를 상승시키거나 하락시키는 두 가지 영향이 동시에 나타날 것을 예상할 수도 있다. *M. trichosporium* OB3b 내에서 메탄은 MMO의 기질이므로 TCE와 methane의 공존시 두 물질은 동일한 효소에 대하여 경쟁적으로 경쟁하게 된다. 그러나 한편으로는 메탄의 공급은 TCE의 산화에 필요한 NADH의 세포내 농도를 증가시키게 되므로 TCE의 분해속도는 예측할 수 없게 된다 실제로 *Methylosinus trichosporium* OB3b 휴지세포 현탁액에 메탄을 공급했을 때 TCE의 분해속도는 메탄의 농도에 대해 Figure 5에서와 같은 경향을 나타낸 바 있다(28) 또한 방향족 탄화수소는 대개 미생물에 대해 독성(toxicity)을 발휘한다고 알려져 있는데 그 독성은 toluene과 같은 화학물질이 세포막과 작용함으로써 Mg^{2+} 나 Ca^{2+} 와 같은 작은 분자가 세포로부터 소실되기 때문이라고 한다(21). 그러나 *P. putida* F1이 toluene을 탄소/에너지원으로 사용하여 성장할 수 있는 사실에서 알 수 있듯이 toluene의 세포내 산화는 NADH의 생성으로 이어질 것이 확실하므로 toluene과 다른 물질이 동

시에 존재했을 때 그 물질의 분해속도가 어떻게 영향받을 지를 예측하는 것은 사실상 불가능하게 된다.

본 연구에서는 BTEX 성분과 TCE를 모두 분해할 수 있는 기능을 가진 *P. putida* F1과 *B. cepacia* G4를 사용하여 각 물질이 단독으로 존재할 때의 분해속도를 구하고 두 가지 물질이 공존했을 때 각 물질의 분해속도가 어떻게 영향받는지 살펴보았다. 기질간의 상호 작용에 의해 발생하는 분해속도의 변화는 실험적으로 검토하기 전에는 선분리 판단할 수 없음을 알 수 있었고 다수의 물질이 동시 오염된 현장에서 특정한 미생물 균주를 사용하여 이를 처리하고자 할 때에는 기질간의 상호작용에 대하여 실험에 의한 사전 검토가 필요하다고 사료된다.

요 약

TCE를 공대사에 의해 분해할 수 있다고 알려진 *P. putida* F1과 *B. cepacia* G4의 phenol과 BTEX에 대한 자화능을 검사한 결과 두 균주 모두 phenol, benzene, toluene, ethylbenzene을 탄소/에너지원으로 사용하여 성장하였으며 *p*-xylene은 이용하지 못하였다. Toluene하에서 성장시킨 *P. putida* F1과 phenol 하에서 배양한 *B. cepacia* G4의 휴지세포에 의해 benzene, toluene, ethylbenzene은 물론 *p*-xylene과 TCE가 분해됨을 확인하므로써 TCE 뿐만 아니라 *p*-xylene도 공대사에 의해 분해됨을 밝혔고, TCE와 *p*-xylene 분해 반응의 핵심효소가 toluene dioxygenase(*P. putida* F1)와 toluene-2-monooxygenase(*B. cepacia* G4)임을 간접적으로 확인하였다. 각 물질이 단독으로 존재 했을 때 *P. putida* F1 휴지세포에 의한 BTEX에 대한 최대분해속도는 20-530 nmol/(min mg cell protein)이었으며 TCE의 최대분해속도는 6.67 nmol/(min mg cell protein)으로 나타났다. *B. cepacia* G4의 경우에는 4-73 nmol/(min mg cell protein)의 최대분해속도를 보여 주었다. Toluene 존재시 *P. putida* F1에 의한 benzene의 분해속도는 1/7 이하로 감소되었으며, TCE의 분해속도도 toluene의 농도가 증가될수록 감소하였다. 그러나 benzene이나 TCE는 toluene의 분해속도를 감소시키지 않았으며 특정 농도까지는 toluene의 분해속도가 10배 이상 증가하는 경향을 나타내었다. *B. cepacia* G4의 경우에는 phenol의 농도가 50 μ M까지는 toluene과 TCE의 최대 분해속도가 4배 이상까지 증가하였으나 그 이상에서는 감소하기 시작하였다. 이상의 결과로부터 복수의 기질 존재시 각 물질의 분해속도는 단순히 경쟁적 저해에 의한 분해속도의 감소가 나타나는 대신 기질간의 복잡한 상호작용에 의하여 분해속도의 감소뿐만 아니라 분해속도가 오히려 증가할 수 있음을 알 수 있었고 복수의 물질이 존재하는 오염현장에서는 사전에 각 물질의 분해속도가 어떠한 지를 실험을 통하여 검토해야함을 확인하였다.

감 사

본 연구는 교육부 '96학술연구조성비(생물화학공학 F-6)에 의해 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

1. Kobayashi, H. and B. E. Rittman (1982). Microbial Re-

moval of Hazardous Organic Compounds, *Environ. Sci. Technol.*, **16**, 170-183.

2. Jahng, D. and T. K. Wood (1994), Trichloroethylene and Chloroform Degradation by a Recombinant *Pseudomonas* Expressing Soluble Methane Monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2473-2482.
3. 조선일보, 97년 1월 8일.
4. Ely, R. L., K. J. Williamson, R. B. Guenther, M. R. Hyman, and D. J. Arp (1995), A Cometabolic Kinetic Model Incorporating Enzyme Inhibition, Inactivation, and Recovery: I. Model Development, Analysis, and Testing, *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 218-231.
5. Wilson, J. T. and B. H. Wilson (1985), Biotransformation of Trichloroethylene in Soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 242-243.
6. Ensley, B. D. (1991), Biochemical Diversity of Trichloroethylene Metabolism, *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**, 283-299.
7. Wackett, L. P. and D. T. Gibson (1988), Degradation of Trichloroethylene by Toluene Dioxygenase in Whole-Cell Studies with *Pseudomonas putida* F1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1703-1708.
8. Folsom, B. R., P. J. Chapman, and P. H. Pritchard (1990), Phenol and Trichloroethylene Degradation by *Pseudomonas cepacia* G4. Kinetics and Interactions between Substrates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1279-1285.
9. Kukor, J. J. and R. H. Olsen (1991), Genetic Organization and Regulation of a meta Cleavage Pathway for Catecols Produced from Catabolism of Toluene, Benzene, Phenol, and Cresols by *Pseudomonas pickettii* PKO1, *J. Bacteriol.*, **173**, 4587-4594.
10. McClay, K., B. G. Fox, and R. J. Steffan (1996), Chloroform Mineralization by Toluene-Oxidizing Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2716-2722.
11. Sun, A. K. and T. K. Wood (1996), Trichloroethylene Degradation and Mineralization by *Pseudomonads* and *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**, 248-256.
12. Hopkins, G. D., J. Munakata, L. Semprini, and P. L. McCarty (1993), Trichloroethylene Concentration Effects on Pilot-Scale In-Situ Groundwater Bioremediation by Phenol-Utilizing Microorganisms, *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 2542-2547.
13. 정경훈, 차진명, 오인숙, 고한철, 정오진, 이용보 (1998), Phenol 분해균주의 분리 및 특성, *한국생물공학회지*, **13**, 119-124.
14. Yeom, S. H., S. H. Kim, Y. J. Yoo, I. S. Yoo (1997), Microbial Adaptation in the Degradation of Phenol by *Alcaligenes xylooxidans* Y234, *Kor. J. Chem. Eng.*, **12**, 37-40.
15. Josephson, J. (1986), Implementing Superfund, *Environ. Sci. Technol.*, **20**, 23-28.

16. Alvarez, P. J. J. and T. M. Vogel (1991), Substrate Interactions of Benzene, Toluene, and *para*-Xylene during Microbial Degradation by Pure Culture and Mixed Culture Aquifer Slurries, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2981-2985.
17. Rodriguez, R. L. and R. C. Tait (1983), Recombinant DNA Techniques: An Introduction, pp. 149-150, Addison-Wesley Publishing Company, London.
18. Schwarzenbach, R. P., P. M. Gschwend, and D. M. Imboden (1993), *Environmental Organic Chemistry*, pp. 617-625, John Wiley & Sons, New York.
19. 문승수 (1995), 하폐수처리의 이론과 실제, *첨단환경기술*, 6월호, 90-95
20. Segel, I. H. (1968), *Biochemical Calculations*, pp. 214-266, John Wiley & Sons, New York
21. Cruden, D. L., J. H. Wolfram, R. D. Rogers, and D. T. Gibson (1992), Physiological Properties of a *Pseudomonas* strain Which Grows with *p*-Xylene in a Two-Phase (Organic-Aqueous) Medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2723-2729.
22. Krumme, M. L., K. N. Timmis, and D. F. Dwyer (1993), Degradation of Trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the Constitutive Mutant Strain G4 5223 PR1 in Aquifer Microcosms, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 2746-2749.
23. Meyer, J., M. Marcus, and H. Bergman (1984), Inhibitory Interactions of Aromatic Organics during Microbial Degradation, *Environ. Toxicol Chem.*, **3**, 583-587.
24. Arvin, E., B. K. Jensen, and A. T. Gundersen (1989), Substrate Interactions during Aerobic Biodegradation of Benzene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3221-3225.
25. Fox, B. G., J. G. Borneman, L. P. Wackett, and J. D. Libscomb (1990), Haloalkene Oxidation by the Soluble Methane Monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b: Mechanistic and Environmental Implications, *Biochemistry*, **29**, 6419-6427
26. Cornish, A., K. M. Nicholls, D. Scott, B. K. Hunter, W. J. Aston, I. J. Higgins, and J. K. M. Sanders (1984), *In vivo* ¹³C NMR Investigations of Methanol Oxidation by the Obligate Methanotroph *Methylosinus trichosporium* OB3b, *J. Gen. Microbiol.*, **130**, 2565-2575.
27. Oldenhuis, R., R. L. J. M. 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
28. Brusseau G. A., H.-C. Tsien, R. S. Hanson, L. P. Wackett (1990), Optimization of Trichloroethylene Oxidation by Methanotroph and the Use of a Colorimetric Assay to Detect Soluble Methane Monooxygenase Activity, *Biodegradation*, **1**, 19-29.