

Permeabilized *Paracoccus denitrificans*의 탈질 특성연구

†송 주 영 · 황 심 연 · 김 덕 술
창원대학교 공업화학과
(접수 : 2001. 5. 14., 게재승인 : 2001. 6. 25.)

A Study on the Denitrification Characteristics of Permeabilized *Paracoccus denitrificans*

Ju Yeong Song†, Sim Yeon Hwang, and Duck Sool Kim
Department of Chem. Tech., Changwon National University, Changwon 641-773, Korea
(Received : 2001. 5. 14., Accepted : 2001. 6. 25.)

The removal of nitrogen compounds from waste water is essential and is often accomplished by biological processes. The denitrifying bacterium, *Paracoccus denitrificans* (KCTC 2530), was employed to study the characteristics and the denitrification differences of Permeabilized strains and untreated strains. The permeabilization rate increased with increasing toluene concentration, but some part of the toluene contributed to denaturing the detachment of proteins from the plasma membrane. Permeabilized *Paracoccus denitrificans* had long lag phase and high specific growth rate in cultivation, and showed excellent denitrification characteristic compared with untreated strains. But, in both cases, the denitrification ability was significantly reduced after 4 or 5 denitrifications. It seems that the strains fall into the death phase when the nutrient was exhausted. When the nutrient recovered to its initial level, the denitrification ability also recovered to the normal level. The results obtained were encouraging enough to apply to practical water treatment situation.

Key Words : *Paracoccus denitrificans*, permeabilization, denitrification

서 론

하천의 주 오염원은 인간 활동에 의해 생긴 생활하수와 곳곳에 산재한 축산농가로부터 나오는 축산폐수이다. 이들은 많은 유기물을 포함하며 특히, 질소나 인이 많이 포함되어 있어 하천이나 연안바다의 부영양화의 원인이 되기도 한다(1).

질소를 제거하기 위한 처리과정 중 효율적인 면이나, 경제적인 측면에서 볼 때 생물학적 처리가 많이 이용되며 *Paracoccus denitrificans* (KCTC 2530, *P. denitrificans*)를 이용하여 기질, 온도변화 등의 조건에 따른 효율적인 탈질 방법이 연구되어져 왔다(2-5).

본 연구에서는 *P. denitrificans*를 이용하여 permeabilization 처리하고 처리균주와 미처리 균주의 탈질역가를 비교한 후 회분식 반응기 내에서 처리균주의 반복 탈질역가 특성을 비교하였다. 처리균주는 미처리 균주에 비하여 우수한 탈질능력을 보였으며, 미처리 균주에 비하여 배지액 내에서의 성장

시 적응기는 길었지만 지수성장기는 짧은 것으로 나타났다. 회분식 반응기에서 탈질반응을 수행할 때 주기적으로 영양소의 공급이 이루어지면 처리된 균주에서도 지속적인 탈질능력을 보였다.

재료 및 방법

균주의 배양

고압 멸균된 배지가 7 mL씩 들어있는 시험관 2개에 4°C 냉장고에 사면배지로 보관되어있던 *P. denitrificans*를 접종시켜서 1차 배양하였으며, 배지의 구성은 Table 1과 같다(7).

1차 배양된 균이 2일에서 3일 정도 자랐을 때 500 mL 플라스크에 고압멸균기(KMC1221 Vison, Kor.)에서 120°C, 30

Table 1. Composition of culture medium for *P. denitrificans*

Composition	Quantity(g/L)
polypeptone	4.0
yeast extract	2.0
K ₂ HPO ₄	10.0
glucose	10.0

†Corresponding Author : Department of Chem. Tech., Changwon National University, Changwon 641-773, Korea
Tel : +82-55-279-7585, Fax : +82-55-283-6465
E-mail : jusong@sarim.changwon.ac.kr

분간 멸균된 액체배지 140 mL를 넣고, 상온까지 식힌 후 이 플라스크에 1차 배양된 균주액 14 mL를 주입시켜 2차 배양시킨다.

접종된 균주는 진탕 배양기(KMC-8408SR Hansung, Kor.)에서 30℃, 300 rpm으로 2~3일간 배양시킨다.

화학적 permeabilization

*P. denitrificans*는 gram negative 균주로서 세포벽은 outer membrane, periplasmic space 및 inner membrane으로 구성되어 있고, 탈질처리에 필요한 효소는 주로 periplasmic space에 존재하는 것으로 알려져 있다. 따라서 유기용매로서 outer membrane을 처리하면 outer membrane의 두께가 얇아지고 물질전달 저항이 줄어들게 되며 기질이 outer membrane을 통과하여 효소가 존재하는 부분에 접근하기가 용이하게 된다(9).

2차 배양된 균주를 고압멸균기에서 멸균된 15 mL 원심분리관 4개에 각각 10 mL씩 주입하고, 원심분리기(HMR-160IV, Kor)에서 5,000 rpm의 속도로 원심분리시킨 후 상층액은 버리고, 멸균된 완충용액 (0.2 M KOH 40 mL + 0.2 M KH₂PO₄ 60 mL, pH 7.4)으로 수세시킨 다음 다시 5,000 rpm의 속도로 원심분리시킨다(6). 이런 수세과정을 2번 거친 후 균주액 (50 mg/L)을 유기용매의 종류별, 농도별, 처리 시간별로 permeabilization 처리하였으며, 처리된 균주액은 다시 5,000 rpm으로 원심분리시켰다. 사용한 유기용매는 아세톤과 톨루엔으로서 아세톤은 물에 용해되지만 톨루엔은 용해되지 않을 뿐만 아니라, 밀도도 물에 비해 작아서 원심분리시키면 상층에 계면을 형성한다. 따라서 원심분리 후 단백질 정량 및 탈질실험 시 중층액을 사용하였다. 톨루엔의 농도는 각각 1, 5, 10, 20(v/v%)농도로 변화시켜가면서 실험하였고, 처리 시간을 10초에서 10분까지 변화시켜가면서 실험하였다.

Permeabilized cells과 free cells의 성장특성

Permeabilization 처리된 균주와 미처리 균주의 성장특성을 보기 위하여 성장곡선을 그어서 비교하고자 하였다. 미처리 균주는 2번의 수세과정을 거친 후 무균실에서 500 mL 플라스크에 담겨진 멸균된 배지 140 mL에 3 mL (10 mg/L)를 주입시키고, 배양기에서 30℃, 300 rpm의 조건으로 배양시켰다. 처리 균주는 원심분리 후 중층액 3 mL를 주입시키고, 동일 조건에서 배양시켰다. 성장곡선은 약 2시간마다 흡광광도계 (UV 1201 SHIMADZU, Jap.)를 이용하여 600 nm에서 O.D를 측정하여 시간에 따른 균주의 농도 변화를 측정하였다.

Permeabilized cells과 free cells의 탈질특성

처리된 균주와 미처리 균주의 탈질능력의 차이를 측정하기 위하여 회분식 반응기를 이용하여 실험하였다. Figure 1과 같이 만들어진 반응기에 질산성질소의 유입농도는 공정시험법에 의해 만들어진 질산성질소 100 mg/L용액을 희석시켜 20 mg NO₃⁻-N/L의 농도로 공급하였다. 균주의 농도는 약 10 mg/L의 농도로 공급하였고, 탄소원으로 메탄올을 1 g/L의 농도로 공급하였으며 효모추출물은 0.1 w/v%의 농도로 공급하였다. 용존산소 농도를 1-2 ppm으로 유지시켜주기 위하여 질소가스를 8.57 mL/min의 유속으로 폭기시켰다. 항온조 안에서 반응기를 30℃로 유지되게 하였고, 2시간마다 시료를 약 2~3

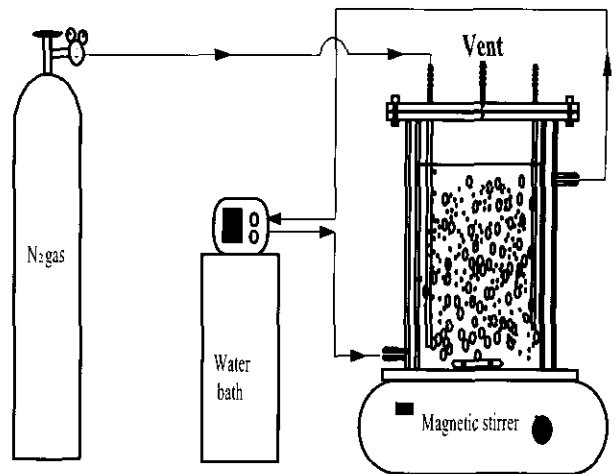


Figure 1. Schematic diagram of experimental apparatus for batch system.

mL를 주사기로 취하여 0.2 μm의 필터로 여과한 다음 질산성 질소와 아질산성질소의 농도를 측정하였다.

반복 탈질 능력실험

Permeabilization 처리한 균주로서 1회 탈질실험 이후 처리된 균주가 연속적으로 탈질능력을 가지는지 여부와 가진다면 탈질역가는 미처리 균주와 어느 정도 차이를 보이는지를 측정하기 위하여 질소의 농도가 5 mg/L의 농도 이하가 되면 100 mg/L의 질산성질소 용액을 주입시켜 반응기 내의 질산성질소의 농도가 약 20~30 mg NO₃⁻-N/L의 농도가 되게 하였으며, 다른 조건은 탈질특성 실험조건과 동일하게 유지시켰다. 또, 탈질공정을 4~5회 수행한 균주가 기질의 고갈로 인하여 사멸기에 접어 들어간다고 판단될 때 기질의 농도를 초기의 조건으로 회복시켜 주면 다시 탈질공정을 수행하는지를 알아보기 위해 100시간 이후에 질산성질소와 메탄올, 효모추출물을 초기 조건으로 회복시켜 반복 탈질능력실험을 하였다.

분석방법

*P. denitrificans*의 permeabilization의 정도를 측정하기 위하여 Lowry법(8)에 의한 단백질 정량법을 적용하였다. 시료의 흡광도는 흡광광도계를 사용하여 750 nm에서 측정하였다. *P. denitrificans*의 탈질실험에서 질산성질소와 아질산성질소의 농도분석은 이온크로마토그래피(DX-120 Dionex, U.S.A)를 사용하였다. Effluent flow rate는 1.2 mL/min, 적용압력은 1340 psi, purge gas는 질소가스를 사용하였고, column은 AS-14를 사용하였으며, 이동상은 3.5 mM Na₂CO₃와 1.0 mM NaHCO₃를 초순수 1 L로 녹여 사용하였다.

결과 및 고찰

화학적 permeabilization

톨루엔에 의한 permeabilization은 Figure 2에서처럼 1% 톨루엔으로 처리하였을 때 가장 높은 흡광도 차이인 약 0.1 정도의 흡광도 차이를 보이는 시간이 대략 10분 정도임을 알 수 있다. 5% 톨루엔으로 처리하였을 때 흡광도 차이를 0.1정

Table 2. Specific growth rate μ of each strains.

Strains	Specific growth rate μ (1/Hr)
untreated	0.049
permeabilized for 30 sec	0.104
permeabilized for 1 min	0.085
permeabilized for 10 min	0.061

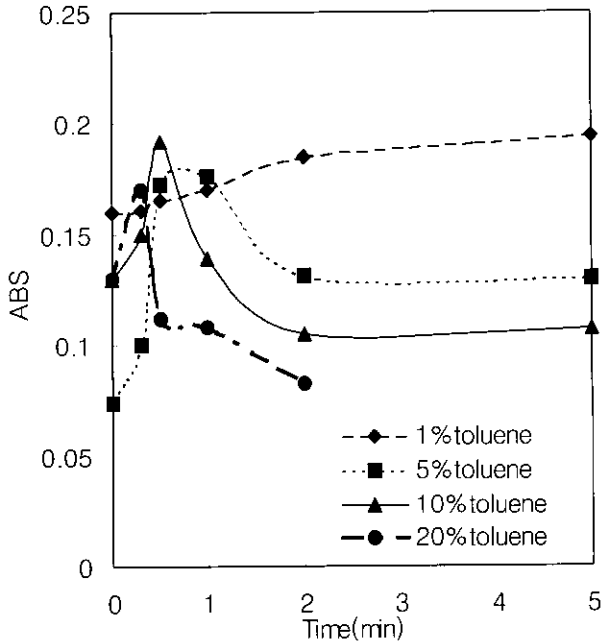


Figure 2. Absorbance of permeabilized cells by each concentration.

도로 보이는 시간이 30초 정도이며, 1% 톨루엔으로 처리했을 때에 비해 높은 흡광도를 보이는 시간이 짧아짐을 알 수 있다. 10% 톨루엔으로 처리하였을 때 높은 흡광도를 보이는 시간은 20초 정도임을 확인 할 수 있었고, 20% 톨루엔으로 처리하였을 때 높은 흡광도를 보이는 시간은 10초를 전후에서 확인 할 수 있었다. 이 결과로서 톨루엔의 농도가 높을 경우에는 permeabilization은 잘 이루어지지만 일정 시간이 경과한 후 흡광도가 떨어지는 경향을 보임으로서 용출된 단백질이 침전되는 것으로 보이고, 시간이 1분 이상 경과되었을 경우에는 흡광도가 초기흡광도에도 미치지 못하는 결과를 보여서 과잉 톨루엔으로 인하여 균주의 세포벽 permeabilization과 단백질 침전이 심한 것으로 판단하였다. 따라서 permeabilization의 척도인 단백질 용출 정도는 흡광도 차이를 0.1 정도 보이는 5%의 톨루엔으로 처리시 무리없이 permeabilization 처리가 된다고 판단하고 이후의 실험은 이 조건에서 처리하였다.

Permeabilized cells과 free cells의 성장특성

미처리 균주와 5% 톨루엔으로 처리시간을 달리하면서 처리한 균주의 성장곡선으로부터 계산된 비성장속도를 Table 2에 나타내었다. 표에서 보듯이 5% 톨루엔 용액으로 30초에서 1분간 처리한 균주의 비성장속도가 미처리 균주의 비성장속도보다 약 2배 정도로 나타나 균주의 빠른 성장에는 유기 용매 처리가 도움이 되는 것으로 나타났다.

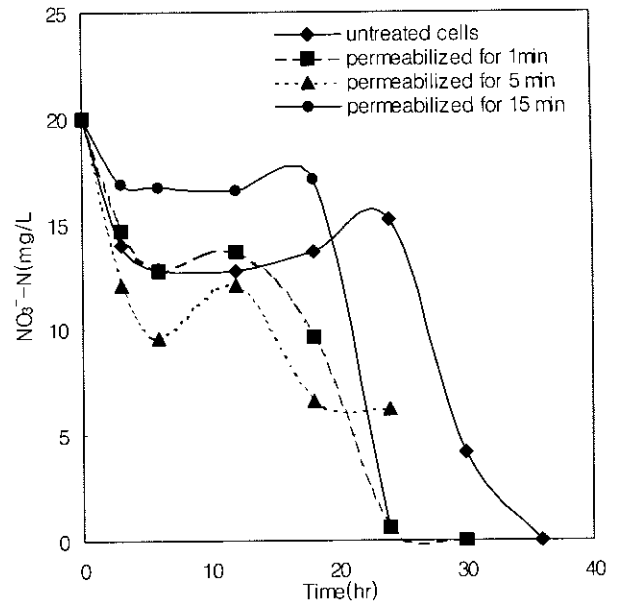


Figure 3. Denitrification rate of free cells and permeabilized cells treated with 5 v/v % of toluene for each time in a batch reactor.

Permeabilized cells과 free cells의 탈질특성

Figure 3은 미처리 균주로 탈질실험을 행하였을 때 질산성 질소 20 mg/L를 5 mg/L까지 처리하는데 대략 30시간이 소요된 결과를 보여준다. 5% 톨루엔으로 1분간 permeabilization 처리한 균주와 5분간 처리한 균주로 탈질실험을 하였을 때 5 mg/L까지 처리하는데 20시간 정도 소요되었다. 이는 미처리 균주에 비해 10시간 정도 단축된 것이다. 5% 톨루엔으로 15분간 처리시 약 20시간 정도에서 평형에 도달하는데 이것은 균주의 손상 정도가 심하여 탈질처리에 한계를 보이는 것으로 나타났다. 이상의 결과로서 5% 톨루엔으로 1분에서 5분간 permeabilization 처리 시 탈질 처리능력이 크게 차이를 보이지 않는 것은 일단 단백질이 30초에서 1분 정도의 시간에 용출되고 나면 톨루엔은 균주의 permeabilization 처리에 사용되기보다는 용출된 단백질의 소수성 부분에 작용하여 단백질은 denaturation 시키는데 사용된 것으로 보여진다.

반복 탈질 능력실험

미처리 균주의 탈질능력이 20 mg/L의 질산성질소를 처리하는데 약 30-40시간이 걸리는데 반하여 처리 균주는 동일 농도를 20-30시간 내에서 처리하였으며 처리 균주의 질산성 질소 탈질능력이 우수함이 입증되었다. permeabilization 처리 균주나 미처리 균주 모두 1회 탈질처리 후 반복 탈질 시는 상당히 빨리 처리하는 경향을 보이는데 이때는 균주가 지수 성장기를 지나서 균주의 농도가 최대일 때로 보여지며 아울러 적응기를 더 이상 가지지 않는 것으로 보여지고, 미처리 균주는 탈질처리 3회까지는 8시간 정도만에 1회 처리를 하는 반면 4회 처리 시는 처리능력이 떨어짐을 보이는데 반하여 처리 균주는 4회 처리시도 비슷한 처리능력을 보였고 5회부터 처리능력을 잃어 가는 것으로 보여진다. 이것은 균주의 농도가 지수성장기를 지나서 정지기에 이르러 최대의 농도를 보임에 반하여 배지액의 고갈로 인해 균주가 사멸하기 시작

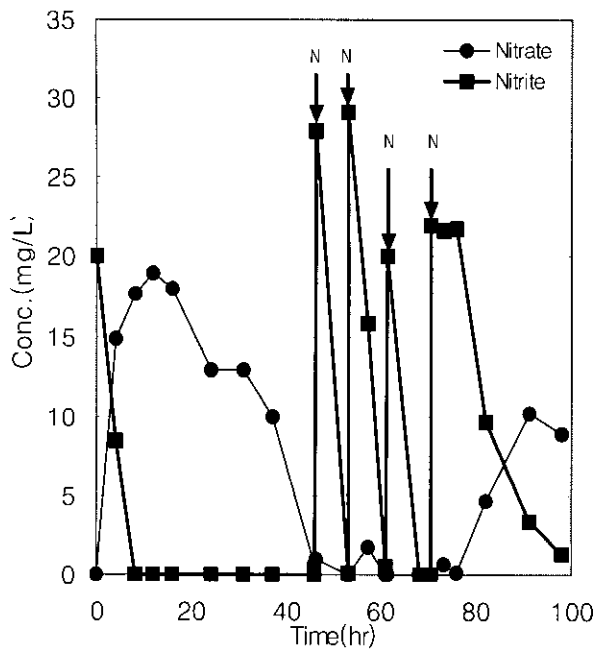


Figure 4. Denitrification ability of untreated strains with repeated recovery of initial NO_3^- -N concentration. (N: Recovery of initial nitrate concentration.)

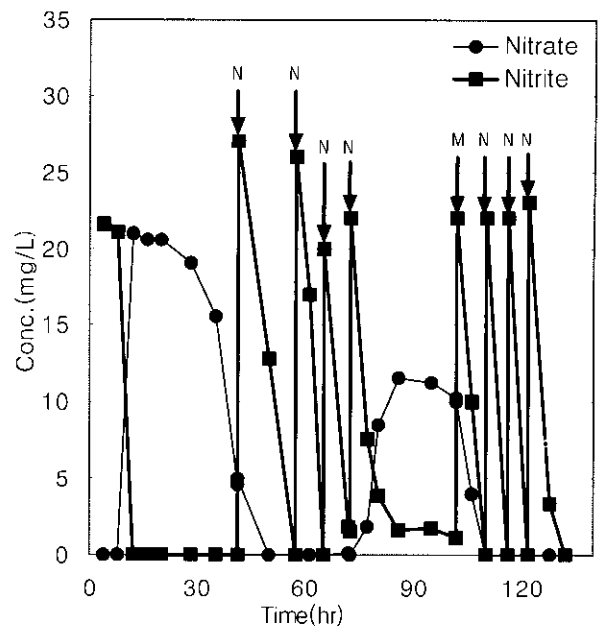


Figure 6. Denitrification ability of 1 min and 5 v/v% of toluene treated strains with repeated recovery of initial NO_3^- -N concentration and recovery of initial medium concentration. (N: Recovery of initial nitrate concentration, M: Recovery of initial medium concentration.)

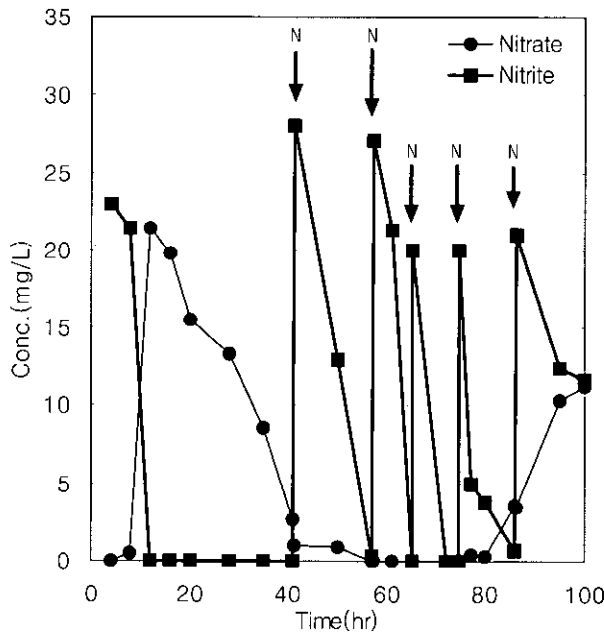


Figure 5. Denitrification ability of 1min and 5v/v% of toluene treated strains with repeated recovery of initial NO_3^- -N concentration. (N: Recovery of initial nitrate concentration.)

하는 것으로 보인다. 따라서 Figure 5에서 보듯이 배지액을 초기농도로 회복시켜 주면서 질산성질소의 농도를 초기농도로 회복시켜 주었을 경우는 5회 이후에도 계속 빠른 처리 능력을 보여 주어서 이것을 실제 수 처리에 적용할 경우에는 연속적으로 유기물이 공급되기 때문에 효율적으로 처리할 수 있으리라 기대된다.

결론

본 연구에서 탈질화 균인 *P. denitrificans*를 유기용매로 permeabilization시켰고, 성장 특성실험, 탈질실험, 반복 탈질 능력실험을 거쳐 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 톨루엔의 농도를 높일 경우 단백질이 용출되는 속도가 빨라지며 *P. denitrificans*의 경우 5% 톨루엔으로 30초에서 1분간 처리하였을 때 균주의 손상 없이 permeabilization처리가 무리 없이 이루어짐을 확인하였다.
2. 처리한 균주의 비성장속도가 미처리 균주에 비해 크며 처리한 균주의 경우 적응기는 오래가지만 지수성장기는 짧아서 빠른 성장에 유기용매 처리가 도움이 됨을 확인하였다.
3. permeabilization 처리된 균주는 미처리 균주에 비해 탈질능력이 우수하였으며, 반복적인 탈질처리능력에서도 permeabilization 처리된 균주가 미처리 균주보다 우수한 것으로 나타났다.
4. 처리된 균주로 실제 수처리에 적용할 경우 물 속에 녹아있는 영양소가 지속적으로 공급되면 지속적으로 사용할 가능한 시스템이라 기대된다.

요약

탈질화 균주인 *P. denitrificans*를 유기용매인 톨루엔으로 permeabilization 처리하는데, 톨루엔의 농도와 처리시간에 따른 영향을 관찰한 결과 톨루엔의 농도에 비례하여 permeabilization 처리는 잘 이루어지지만 일정농도 이상의 톨루엔 농도에서는 세포벽으로부터 탈리된 단백질의 denaturation에 톨루엔이 사용됨을 확인하였다. Permeabilization 처리된 *P.*

*denitrificans*는 미처리 균주보다 우수한 탈질능력을 보였고, 반복탈질 처리 시에는 처리균주와 미처리균주 공히 초기 탈질처리 시간보다 짧은 시간 내에 같은 농도의 질산성 질소를 처리하는 경향을 보였다. 3-4회의 반복탈질처리 후 질산성질소 농도와 영양물질을 초기농도로 회복시켜주었을 경우, 같은 속도와 경향으로 탈질처리 하는 능력을 보였다.

REFERENCES

1. Yun, D. I., J. T. Lee, D. J. Kim, and K. Y. Lee (1998), The effect of external carbon sources on batch denitrification process, *Kor. J. Appl. Microbiol.*, **2**, 96-101
2. Lee, S. I., S. K. Park, and W. H. Lee (1994), Temperature dependency of denitrification rate with addition of various electron donors, *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*. **16**, 677-683
3. Kim, I. C. and U. H. Chun (1992), Sorbitol production from Jerusalem artichoke by inulinase and permeabilized *Zymomonas mobilis*. *Korean J. Biotechnol. and Bioengg.*, **7**, 15-24
4. Choi D. J., W. K. Kim, and U. H. Chun (1990), Continuous production of sorbitol with permeabilized *Zymomonas mobilis* immobilized in alginate and chitin, *Korean J. Biotechnol. Bioengg.*, **5**, 223-232
5. Kucera, I., J. Lausik, and V. Dadak (1983), The function of cytoplasmic membrane of *P. denitrificans* in controlling the rate of reduction of terminal acceptors, *Eur. J. Bioche.* **136**, 135-140
6. Kim D. S. (1988), Structural properties of plasma membrane, *Biochemical Society of the Republic of Korea*, **2**, 187-197
7. Mieczyslaw, B. (1993), Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *P. denitrificans*, *Applied and Environmental Microbiology*, **59(11)**, 3951
8. Korea Institute of Biotechnology (1997), Experiments in Biochemistry, 3rd ed, p201, Tamgudang, Seoul
9. Song J. Y. and S. B. Chung (1997), Enzyme immobilized reactor design for ammonia removal from waste water, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **2**, 77-81