

닫힌 바이얼 안에서 *Pseudomonas putida*에 의한 톨루엔 분해

김희정·*김인호
충남대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2001. 6. 30., 게재승인 : 2001. 8. 22.)

Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* in Closed Vial

Hee Jeong Kim and In Ho Kim†
Department of Chemical Engineering Chungnam National University, Taejon 305-764
(Received : 2001. 6. 30., Accepted : 2001. 8. 22.)

The ability of *Pseudomonas putida* to degrade toluene was studied in toluene-containing vials. The strain grows anaerobically in toluene as a sole source of carbon. When the initial toluene concentrations injected in the vial are varied, the changes of headspace toluene concentration and cell density are observed. We set a model for this vial and simulated the vial reactor using Matlab. With a variation of model parameters, simulated results were compared with the experiment.

Key Words : *Pseudomonas putida*, biodegradation, toluene, VOC, modeling

서론

최근 급격하게 증가하고 있는 자동차와 각종 유기 용제의 사용량 증가로 인해 대기 중의 휘발성 유기 화합물 (Volatile Organic Compound) 오염이 심각한 문제가 되고 있다. 휘발성 유기 화합물의 제거를 위해 미생물을 이용하는 생물학적인 방법이 최근 많이 각광을 받고 있다(1). VOC의 대표적인 화합물로 벤젠, 페놀과 디벤조퓨란과 같은 지방족 화합물을 들 수 있는데, *Pseudomonas putida*는 이를 분해할 수 있는 대표적인 미생물 중 하나이다. 단일 성분의 분해보다는 벤젠, 톨루엔과 그 밖의 여러 화합물들의 기질간의 상호 작용에 대한 연구가 많이 이루어졌다(2,3). 단일 성분에 관해서도 대부분 대수층 슬러리(2), 혼합 배양액(4), 토양 또는 바이오 필터(5) 등의 공정 스케일에서 이루어진 연구들이 대부분이다.

톨루엔은 23.5°C에서 물에 0.067%(w/w)만이 용해되어 다른 유기 화합물에 비해 낮기 때문에(6), 순수 배지에서 호기적 조건으로 톨루엔을 분해하는 실험을 수행하는데 어려움이 있다. Resting cell의 경우 용존 산소가 매우 낮아도 *P. putida*에서 BTEX(Benzene, Toluene, Ethylene and Xylene)분해를 개시하는 효소인 Toluene oxygenase가 발현될 수 있다는 연구 보고가 있었다(7). 따라서, 본 연구에서는 resting cell을 이용하여 톨루엔이 첨가된 배지를 포함한 닫힌 계를 선택하여 실험을 수행하였다.

실험에 이용된 vial은 Figure 1과 같이 미생물을 포함한 액체 상태의 배지, 기상 톨루엔이 존재하는 headspace 부분과 물에 용해되지 않고 액적 상태로 존재하는 톨루엔 방울로 나누어 생각할 수 있다.

액상으로 주입된 톨루엔이 물에 용해되지 않고 액적 상태로 존재한다고 가정하였다. 시간이 지남에 따라 톨루엔 액적으로부터 일부는 액체 배지에 용해되며, 일부는 증발한다. 이를 용해 속도 상수와 증발 속도 상수로 시간에 따라 변한다고 가정하였다. 또한, vial이 닫힌 계이므로, headspace 상에 있는 톨루엔이 다시 액체 배지로 녹아 들어가는데, 이를 응축 속도 상수로 가정하였다. 미생물 성장 속도는 Monod식을 따른다고 생각하였다.

Vial 안에 녹아 있는 액상 톨루엔, headspace에서의 기상 톨루엔과 미생물 농도에 대한 물질 수지식을 세워보면 다음과 같다.

기상 톨루엔의 물질 수지식

$$\frac{d y_A}{dt} = \frac{V}{V_H} x_A - \frac{C}{V_H} y_A \quad (1)$$

액상 톨루엔의 물질 수지식

$$\frac{d x_A}{dt} = \frac{D}{V_L} - \frac{V}{V_L} x_A - \frac{\mu}{Y} X_A + \frac{C}{V_L} y_A \quad (2)$$

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering
Chungnam National University, Taejon 305-764
Tel : +82-42-821-5685, Fax : +82-42-822-8995
E-mail : ihkim@hanbat.chungnam.ac.kr

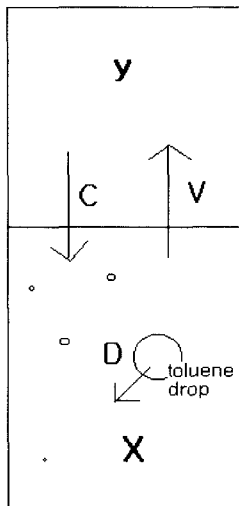


Figure 1. The simple model of a reaction vial.

미생물 물질 수지식

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \tag{3}$$

본 연구에서는 톨루엔이 첨가된 배지를 포함한 닫힌 계에서의 미생물의 거동과 headspace의 톨루엔 농도를 관찰하고, Matlab Version 5.1의 ode함수를 이용한 전산 모사치와 실험치를 비교하면서 타당한 모델 방정식을 수립하였다. 또한, 초기 톨루엔 농도를 변화시켜 톨루엔이 첨가된 배지를 포함한 닫힌 계에서의 모델 파라미터를 고찰함으로써, *Pseudomonas putida*의 톨루엔 분해능과 영향을 미치는 변수들을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

실험에 이용된 미생물은 *Pseudomonas putida*(ATCC 12633)이고 4℃, 고체 한천 배지에서 보관하였다. 미생물 배양에 사용된 액체 배지 조성은 증류수 1ℓ 당 Glucose 1.1 g, Yeast extract 1 g, NH₄Cl 0.1 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, FeSO₄·7H₂O 0.0005 g, CaCl₂ 0.00375 g, 0.1 M phosphate buffer (pH=7) 18 mL이었다.

실험 방법

미리 멸균한 500 mL 플라스크에 100 mL의 배지를 준비하고 백금이를 사용하여 보존된 균주를 접종하고, 진탕 배양기에 30℃, 150 rpm으로 교반하여 8시간 동안 종균 배양하였다. 이 종균 배양 5%를 탄소원으로 톨루엔을 사용하도록 글루코스가 없는 배지에 접종하고 12시간 동안 배양한다. 이때 톨루엔 1000 ppm을 함께 넣어주는 유도 과정을 거친다(8). 이는 톨루엔의 유도 과정을 거칠 때 톨루엔 분해가 더 잘 이루어진다는 문헌에 의한 것이다(7,8). 또한, 배양 시간이 종균 배양에서보다 길어진 것은 톨루엔을 첨가했을 때 유도 시간이 더 길어지기 때문이다.

유도된 세포들은 6000 rpm에서 2분간 원심분리하여 수확하였고, 0.1 M phosphate buffer solution(pH=7)으로 두 번 세척하였다. 얻은 펠렛들을 글루코스가 없는 배지 100 mL에 재현탁하고, 실리콘 고무 마개가 있는 5 mL의 serum vial에 3 mL씩 나누어 넣는다. 각각의 vial에 톨루엔을 액상으로 주입하고 150 rpm, 30℃에서 진탕 배양한다. 이 때 주입하는 톨루엔 농도가 실험 변수이다. 매 시간 vial을 하나씩 꺼내어 배양액의 pH, 균체 농도, headspace에서의 톨루엔 농도를 측정한다. 매시간 3개의 vial을 측정하여 재현성을 확인하였다.

실험에 사용된 닫힌 계인 vial에 초기에 주입한 미생물 균체 농도는 대략 0.4에서 0.5 정도의 흡광도를 갖도록 하였다. 톨루엔은 액상으로 주입하였으며, 주입량은 290, 580과 870 ppm의 농도로 변화시켰다.

분석 방법

건조 세포 중량(Dry cell weight)은 정해진 시간에 채취한 시료의 흡광도를 측정 후 건조시켜 건조중량과 흡광도와의 검량선을 작성하여 결정하였다. 이 때, 흡광도는 분광광도계(CE1020, CECIL)를 사용하여 600 nm에서 측정하였다.

톨루엔의 농도는 gastight syringe (Hamilton 81330)로 1 mL의 headspace의 기상 샘플을 채취하여 불꽃 이온화 검출기(FID)가 장착된 가스 크로마토그래피(SRI 8610C)를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 5% diphenyl 95% dimethyl polysiloxan capillary를 사용하였고, 운반 기체로 사용된 헬륨의 유속은 6 psi였다. FID에서의 오븐과 검출기 온도는 140℃, 250℃였다.

결과 및 토론

초기 톨루엔의 농도를 변화시켰을 때, headspace의 톨루엔 농도와 세포 농도 변화를 실험을 통해 관찰하였다. 실험치들 식(1)~(3)의 물질 수지식으로 전산모사하는 과정에서 매개 변수를 결정해야 하는 필요성이 있다. Matlab을 이용하여 전산 모사하고 이를 실험값과 비교하면서, 사용되는 매개 변수 값들을 결정해보았다.

우선, 실험에 사용한 매개 변수들 중 고정될 수 있는 값들을 대입하였다. 실험에 사용된 headspace의 부피(V_H)와 액체 배지의 부피(V_L)는 각각 2와 3이다. 기상과 액상에서의 톨루엔 초기 농도는 0으로 주어지며, 시간이 지남에 따라 변화한다. 액체 배지에 접종된 미생물의 초기 균체 농도와 수율은 실험에 의해 결정하였다. 비성장 속도 상수는 균체의 성장이 변하는 시간에 따라 나누어 실험값으로 구한 수 대입하였다. 증발, 응축과 용해 속도 상수는 시간에 따라 변화시켰다.

처음 vial에 액상으로 주입한 톨루엔 농도를 290, 580과 870 ppm으로 변화시켰을 때, headspace에서의 톨루엔 농도 변화에 대한 실험값에 맞추어 전산 모사한 결과를 나타내면 Figure 2와 같다.

여러 가지 실험의 매개 변수들 중에서 용해 속도 매개 변수 D의 변화는 주목할만하였다. 전산 모사 과정에 있어 초기 주입 톨루엔의 농도는 주로 용해 속도 상수 값으로 고려되었다. 용해 속도 매개 변수는 톨루엔 농도와 시간에 따라 변화하였다. 초기 톨루엔 주입 농도에 따라, 용해 매개 변수의 초기값을 정한 후에 용해 매개 변수의 변화를 예측하였다. 초

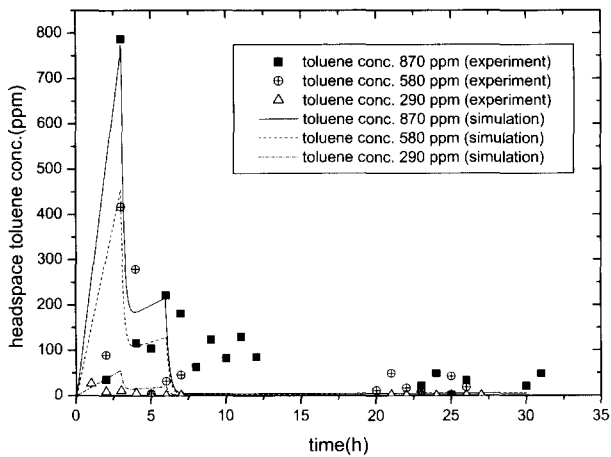


Figure 2. Time-course changes of toluene concentrations in headspace under various initial toluene concentrations.

기에 주입한 톨루엔의 양이 클수록 용해 속도 매개 변수의 초기값은 다음과 같이 선형적으로 커진다.

$$D_0 = -246.7 + 1.07 x_{A_0} \quad (4)$$

여기서 x_{A_0} 는 초기에 주입한 톨루엔 농도이고, D_0 는 용해 매개 변수 초기값이다. 톨루엔 용해 속도 상수는 초기에는 크고 그 후 급격히 감소하다가 시간이 감에 따라 서서히 감소한다. 이는 시간이 지남에 따라 vial 내의 톨루엔이 포화되어 용해 속도 상수가 서서히 줄어든다는 것을 의미한다. 초기 톨루엔의 주입 농도가 300 ppm 이하일 때는 시간의 변화에 따라 식(5)에서와 같이 용해 매개 변수의 값이 지수적으로 감소한다.

$$D_t = 74.1 e^{-0.14t} \quad (5)$$

이 때, D_t 는 시간에 따른 용해 속도 상수이다. 그러나, 초기 톨루엔의 주입 농도가 높아지면, 용해 속도 상수는 6시간까지는 100의 order로 급격히 줄어들다가, 이 시간 이후에는 1-10의 order 정도로 서서히 줄어든다. 또한, 초기 주입 톨루엔의 양이 늘어가면, 6시간까지는 0.22의 기울기로 증가하다가 이 시간 이후에는 0.0086 정도의 기울기로 증가함을 볼 수 있다. 톨루엔이 물에 대략 670 ppm 정도가 용해되므로, 초기에 주입한 톨루엔의 농도가 높아지면 용해 속도 상수를 예측함에 있어서 시간에 따른 영향 뿐 아니라 톨루엔 주입 농도에도 영향을 받는 것으로 생각되어진다. 이상에서와 같이, 식(4)에서 초기의 용해 속도 상수를 결정할 후 이후 시간과 농도에 따른 용해 속도 상수의 감소율을 고려하면 매개변수를 결정할 수 있다.

Figure 2와 같이 headspace에서의 톨루엔 농도가 변화하는 동안 미생물 균체 농도 변화에 대한 실험값과 전산 모사한 결과를 나타내면 Figure 3과 같다.

Figure 2에서 살펴보면, headspace에서의 톨루엔 농도는 3시간 후에 최대가 되었다. 이는 액상으로 주입한 톨루엔이 vial 내에서 증발하면서 headspace에서의 톨루엔 농도가 증가

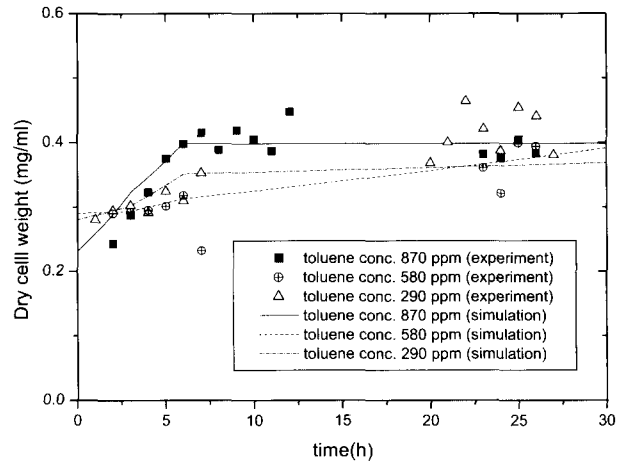


Figure 3. The effect of initial toluene concentrations on the cell growth in vials under various initial toluene concentrations.

되어 3시간 이후에 포화되는 것으로 생각된다. 톨루엔 농도의 최대 피크는 처음에 주입한 톨루엔의 농도보다 낮게 나타나며, 물에 대한 톨루엔 용해도가 낮기 때문이다.

3시간 이후 headspace에서의 톨루엔 농도는 감소하는데, 이는 닫힌 계에 있는 기상 톨루엔들이 다시 배지 중으로 녹아 들어가는 것으로 생각된다. 액상으로 녹아들어간 톨루엔이 다시 기상으로 휘발되면서, 6시간 이후에 다시 약간 솟는 피크를 보이다가 다시 낮아진다. 이 시간 동안 균체의 비성장 속도가 증가하는 것으로 보아 미생물이 톨루엔을 탄소원으로 하여 성장한 것을 알 수 있다. Resting cell을 이용하여 비성장 속도가 free cell에서보다 낮지만, 870 ppm일 때의 비성장 속도는 0.058 h^{-1} 로 290, 580 ppm에서 보다 더 큰 값을 가지게 되는데, *Pseudomonas putida*가 톨루엔을 잘 분해할 수 있다는 증거가 된다.

요 약

톨루엔을 분해하는 대표적인 미생물로 알려진 *Pseudomonas putida*를 이용하여 생분해 특성을 살펴보고자 하였다. 톨루엔은 물에 대한 용해도가 매우 낮기 때문에, 호기적 조건으로 배양하는데 어려움이 있다. 톨루엔을 포함하는 배지를 포함한 닫힌 계를 이용함으로써, 반응기 내에서의 톨루엔 분해와 미생물 성장에 관해 살펴보았다. 초기에 액상으로 접종하는 톨루엔의 농도를 변화시켰고, 이에 따른 headspace에서의 톨루엔의 농도와 미생물 균체 농도 변화를 측정하였다. 닫힌 계에서의 톨루엔 생분해에 관한 물질 수지식을 세우고 이를 전산 모사함으로써, 실험 값과 비교 분석하였다. *Pseudomonas putida*의 resting cell을 이용하면 닫힌 계에서도 톨루엔을 분해할 수 있었고, 반응기 내에서 일어나는 현상을 매개 변수를 통해 고찰하였다.

사용 기호

y_A : Gas phase toluene concentration (mg toluene / l)

x_A : Liquid phase toluene concentration (mg toluene / l)

- X : The concentration of microorganisms (g cell/ ℓ)
 V_H : Volume of headspace (mL)
 V_L : Volume of liquid media (mL)
 C : Condensation rate constant (mL/h)
 V : Vaporization rate constant (mL/h)
 D : Dissolution rate constant ($\mu\text{g/h}$)
 μ : Specific growth rate (h^{-1})
 Y : Yield (g cell / mg toluene)

REFERENCES

1. Lesen, G. and A. M. winter (1991), Biofilter: an innovative air pollution control technology for VOC emissions, *J. Air Waste Magmt. Assn.* **41**, 1045-1054.
2. Alvarez, Pedro J. J. and Timothy M. Vogel (1991), Substrate Interactions of Benzene, Toluene, and *para*-Xylene during Microbial Degradation by Pure Cultures and Mixed Culture Aquifer Slurries, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(10), 2981-2985.
3. Arvin, Erik, Bjorn K. Jensen, and Anders Torp Gundersen (1989), Substrate Intereaction during Aerobic Bioderadation of Benzene, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(12), 3221-3225.
4. Moon, J. H., C. W. Kim, J. S. Park, K. J. Oh, and D. G. Kim (2001), Degradation of BTX by Aerobic Microbial Consortium, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**(1), 61-65.
5. Mallakin, A and OP Ward (1996), Degradation of BTEX Compounds in Liquid Media and in Peat Biofilters", *J. Ind. Microbiol.* **16**, 309-318.
6. Susan Budavari (1989), The Merck Index, 11th ed., p. 9459, Merck & Co., Inc. U. S. A..
7. Costura, Rebecca K. and Pedro J.J. Alvarez (2000), Expression and Longevity of Toluene dioxygenase in *Pseudomonas putida* F1 induced at Different dissolved oxygen concentrations, *Wat. Res.* **34**(11), 3014-3018.
8. Robertson, B. R. and D. K. Button (1987), Toluen Induction and Uptake Kinetics and Their Inclusion in the Specific-Affinity Relationship for Describing Rates of Hydrocarbon Metabolism, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**(9), 2193-2205.