

## 재조합 생촉매를 이용한 Diazinon 제거

최석순<sup>†</sup> · 서상환 · 강동균\* · 차형준\* · 권인찬\*\*

세명대학교 바이오환경공학과, \*포항공과대학교 화학공학과, \*\*버지니아대학교 화학공학과  
(2011년 7월 12일 접수, 2011년 8월 2일 심사, 2011년 8월 3일 채택)

### Removal of Diazinon Using Recombinant Biocatalyst

Suk Soon Choi<sup>†</sup>, Sang Hwan Seo, Dong Gyun Kang\*, Hyung Joon Cha\*, and Inchan Kwon\*\*

Department of Biological and Environmental Engineering, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

\*Department of Chemical Engineering, Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, Korea

\*\*Department of Chemical Engineering, University of Virginia, VA 22904, U.S.A.

(Received July 12, 2011; Revised August 2, 2011; Accepted August 3, 2011)

본 연구에서는 대장균 세포 표면에서 발현되는 유기인분해효소(organophosphorus hydrolase; OPH)를 이용하여 난분해성 및 환경독성물질로 알려진 diazinon의 효과적 처리가 이루어졌다. 이 실험에서는 25 °C 배양 온도와 배지에 0.2 mM ethylenediamine tetraacetate (EDTA) 첨가 조건이 유기인분해 효소 생산에 효과적임을 알 수 있었다. 이 조건에서 성장한 대장균을 이용하여 초음파 파쇄공정이 수행되었을 때, 25, 50 mg/L diazinon는 각각 4.5, 7.2 mg/g · min의 diazinon 제거 속도를 나타내었고, 두 농도(25, 50 ppm) 모두 90% 이상 제거 효율을 구할 수 있었다. 따라서 이러한 실험 결과들은 diazinon과 같은 독성 화합물을 친환경적으로 처리할 수 있는 생물학적 처리 시스템으로 활용될 수 있을 것이다.

In the present work, diazinon which is known as nondegradable and environmental toxic material was efficiently treated by the cell surface-displayed organophosphorus hydrolase (OPH) biocatalyst. The culture temperature of 25 °C culture temperature and the addition of 0.2 mM ethylenediamine tetraacetate (EDTA) were effective conditions for the production of recombinant OPH in *Escherichia coli*. 25 and 50 ppm diazinon were treated with removal rate of 4.5 and 7.2 mg/g · min, respectively and with all over 90% removal efficiencies using recombinant cell lysates through ultrasonication disruption process. Thus, these experimental results could be utilized in environmental friendly biological treatment system for toxic chemicals such as diazinon.

**Keywords:** diazinon, organophosphorus hydrolase, cell surface display, removal rate of diazinon, *Escherichia coli*

### 1. 서 론

살충제 화합물은 독성물질로서 구분되며, 실제적으로 자연에서 잘 분해가 되지 않는 특징을 가지고 있다. 이러한 특징으로 인하여 살충제 화합물은 바람직하지 않은 화학물질과 잔류물질로서 축적되거나, 환경에 많은 부담을 주게 된다[1]. 특히, 유기인계 살충제 화합물의 과도한 사용으로 인하여 음용수로 사용되는 지표수를 크게 오염시키는 환경 문제를 유발시키고 있다. 유기인계 화합물 중 하나인 diazinon은 phosphorothioate계 살충제로서 농업과 비농업 분야에서 광범위하게 사용되며[2], World Health Organization (WHO)에 의하여 “moderately hazardous” 등급 II로 분류되었고[3], 그리고, diazinon 독성으로 인하여 acetylcholinesterase 효소 생산 저해가 이루어진다고 보고되었다 [4,5].

살충제 화합물의 처리에는 크게 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 나누어진다. 물리적 방법으로서 매립은 짧은 기간에 적절히 처리할

수 있지만, 토양과 지하수에 침출이 일어나는 문제점을 가지고 있다. 또한 소각은 잠재적 독성물질 방출과 많은 비용이 요구된다고 알려졌다[6]. 그리고 화학적 방법으로서 Advanced oxidation processes (AOP)에 대한 관심이 최근 증대되고 있으나[7,8], UV 램프, 오존과 같은 장비 사용으로 인하여 높은 에너지 소모가 이루어지고 있다[9]. 최근에는 생물학적 방법으로서 *Pseudomonas diminuta Flavobacterium sp.*를 이용하여 유기인분해효소(organophosphorus hydrolase; OPH)에 관한 연구가 이루어지고 있으나[10,11], 살충제 독성으로 인하여 미생물의 비활성화가 이루어지는 문제점들이 나타나게 되었다[12]. 그러나 diazinon과 같은 유기인 살충제를 제거하고자 재조합 대장균(*Escherichia coli*)으로부터 생산된 OPH를 이용한 연구는 아직까지 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 diazinon 화합물을 효과적으로 제거할 수 있는 생물학적 처리시스템을 개발하기 위하여 대장균 세포 표면(cell surface)에서 발현되는 OPH를 이용하였다. 또한 OPH를 효과적으로 사용하고, 재조합 균주에 초음파 파쇄 공정을 도입함으로써 diazinon과 같은 독성 물질을 처리하고자 하였다.

<sup>†</sup> 교신저자(e-mail: sschoi@semyung.ac.kr)

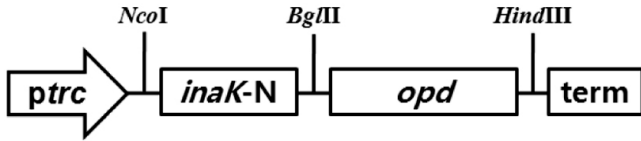


Figure 1. Gene map of recombinant plasmid harboring truncated *inaK* and *opd* fusion construct. Abbreviations: *Ptrc*, *trc* promoter; *inaK*-N, N-terminal domain of ice nucleation protein gene; *opd*, organophosphorous hydrolase gene; *term*, termination sequence.

### 2. 실험 재료 및 방법

본 실험에서는 대장균 BL21 (DE3) (*F ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>) gal dcm*)에 재조합 플라스미드 pINPN-OPH[13]를 형질전환시켜서 OPH가 세포 표면에서 발현이 이루어지는 재조합 균주를 사용하였다(Figure 1 참조). 이 대장균은 M9 배지(12.8 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/L NaCl, 1 g/L NH<sub>4</sub>Cl, 3 mg/L CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>)를 사용하여 37 °C의 Shaking incubator (J-S11, Jisico, Korea)에서 12 h 균주를 배양하였다. 그리고 배양 3 h에 도달하였을 때, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O를 첨가하였으며, cell surface에서 OPH의 발현을 유도하였다.

균주의 농도는 UV/VIS Spectro-photometer (UV-1601PC Shimadzu, Japan)를 사용하였으며, 600 nm의 파장에서 optical density (OD)를 측정하였다. 여기서 얻은 OD를 이용하여 미생물 건조 질량을 구할 수 있었다. 그리고 균주의 파쇄 공정은 초음파 분쇄기(Branson 450, USA)를 사용하여 수행되었다. 또한, OPH 효소의 농도 분석은 400 nm 파장에서 UV/VIS Spectrophotometer를 이용한 분석법[14]을 사용하였다. 그리고 시료를 원심분리 한 후, 상등액은 0.45 μm micro filter (MFS, Japan)를 이용하여 여과하였으며, 이때 얻어진 여과액은 50% 아세톤을 사용하여 희석하였다. 그리고 이 희석액은 UV detector와 C18 column (4.6 mm × 150 mm)를 가진 HPLC (Waters 2487, USA)를 이용하여, 254 nm 파장에서 diazinon 농도 분석이 이루어졌다.

### 3. 결과 및 고찰

대장균의 세포 내 간극, 세포질 또는 세포표면에서 OPH가 발현될 때, 각각의 경우에서 효소생산을 위한 최적의 조건은 구별되어지며, cell growth curve 또한 다르게 나타내어진다. 본 연구에서는 세포 표면에서 생산된 유기인분해효소를 효과적으로 얻기 위한 균주의 배양 조건을 고찰하였다. Figure 2(B)에 나타난 것과 같이, 배양 온도가 높을수록 균주 성장은 활발하게 이루어졌으며, 35도에서 성장한 균주가 타 온도와 비교하여 배양 전체시간에서 높은 미생물 농도를 나타내었다. 그리고 이 온도에서 13 h 배양시켰을 때, 1.85 g/L의 높은 미생물 농도를 나타내었으며, 그 이후에는 거의 비슷한 level의 세포농도를 유지하였다.

그리고 두 배양온도(30, 35도)에서는 OPH 효소 생산은 배양 13 h까지 크게 향상되었으나, 그 이후 급격히 감소하는 경향을 보였으며, 배양 29 h에 도달하였을 때 30과 35도에서는 각각 31.2, 8.25 unit/L의 매우 낮은 효소를 생산하였다. 그러나 20, 25도에서 배양시킨 경우에는 전체 배양 시간에서 낮은 수준(level) 이지만, OPH 효소가 지속적인 증가가 이루어졌다. 또한, 25도에서 배양시킨 균주는 20도와 비교하였을 때, 전체 반응시간 중 후반부에 갈수록 OPH 생산이 크게 향상되었으며, 배양 29 h에 도달하였을 때 40.4 unit/g의 높은 specific

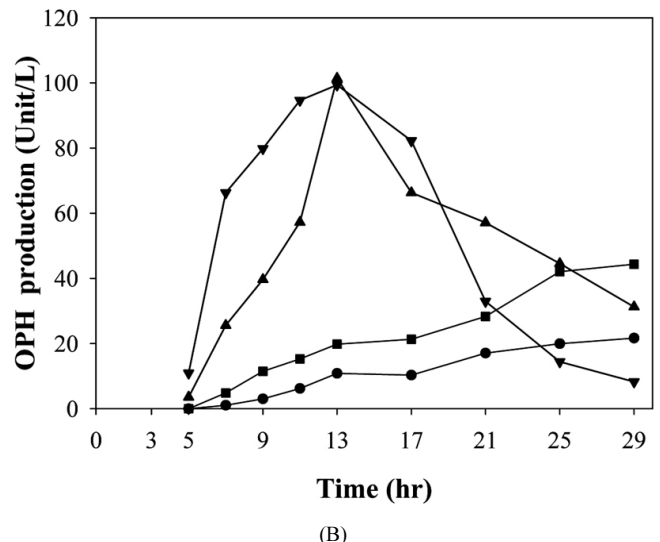
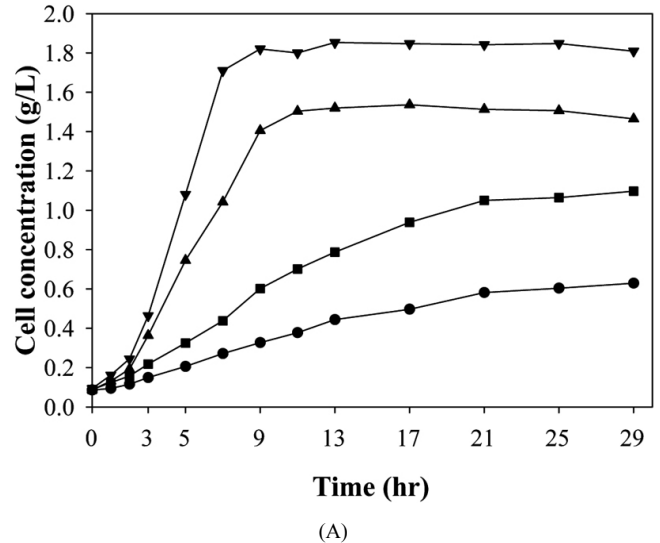
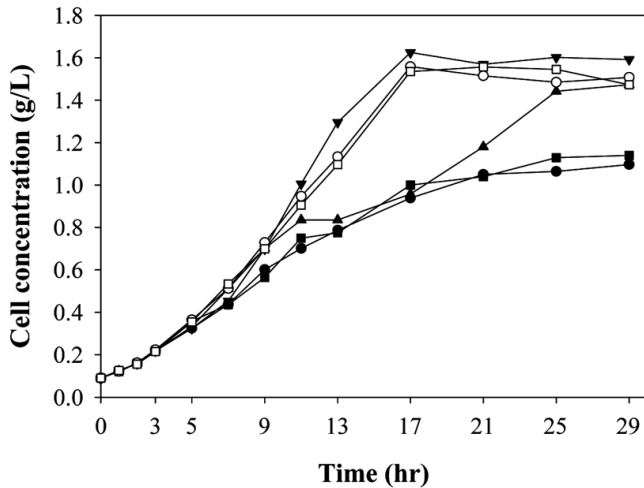


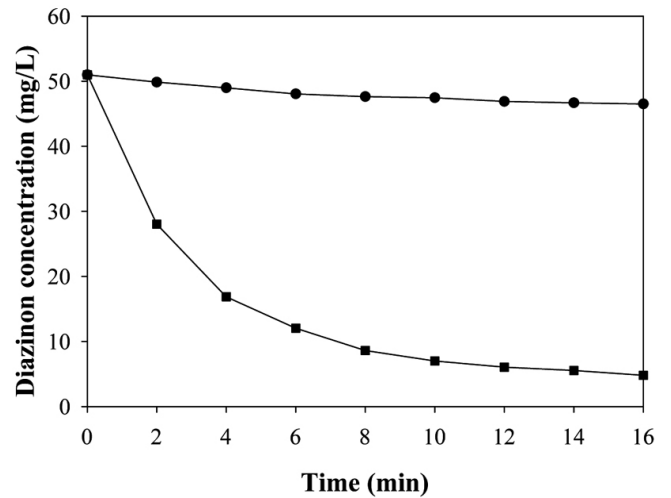
Figure 2. Effects of culture temperature on (A) cell growth and (B) OPH production in the cells harboring surface displayed-OPH (Symbols : ●, 20 °C; ■, 25 °C; ▲, 30 °C; ▼, 35 °C).

OPH activity를 구할 수 있었다. 따라서 세포표면에서 OPH가 발현되는 재조합 균주를 사용할 경우 효과적인 효소를 얻기 위해서는 25도의 배양 온도로 운전이 이루어져야 함을 알 수 있었다.

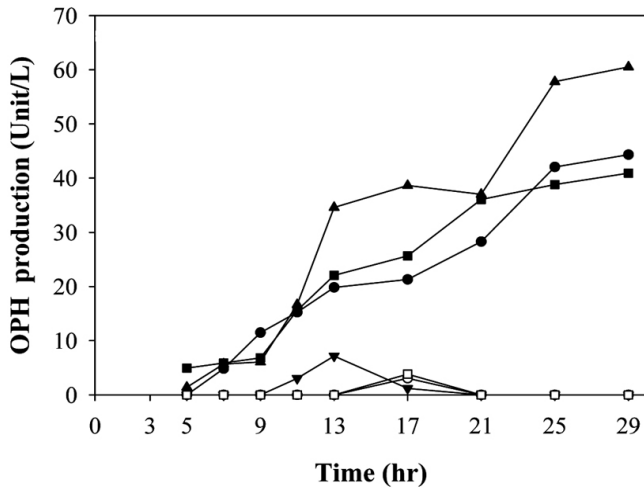
투과제(Permeabilizing Agents)로서 EDTA, tributyl phosphatate의 사용은 균주 물질저항 저항을 감소시킨다는 발표가 있었으나[6], 아직까지 투과제의 생물 반응 효과에 대하여 명확하게 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 세포 표면에서 유기인 분해효소가 발현되는 재조합 대장균의 성장 배지에 EDTA의 첨가 효과를 고찰하였다. Figure 3에 나타난 것과 같이, 0.4 mM 이상 EDTA를 주입한 경우가 저농도(0.1 0.2)와 첨가한 것과 비교하였을 때, 높은 level의 균주 농도를 나타내었으나, OPH 효소는 (0~3 unit/L)의 매우 낮은 농도의 효소 생산이 이루어졌다. 그러나 0.2 mM EDTA를 첨가한 조건에서 배양이 이루어질 때, 배양 13 h 이후부터 OPH 생산성이 향상되었으며, 배양 29 h에서는 최대 OPH 생산이 이루어졌다. 따라서 25도 배양온도와 0.2 mM EDTA 투과제 첨가가 OPH 효소 생산에 효과적임 필요함을 알 수 있었다.



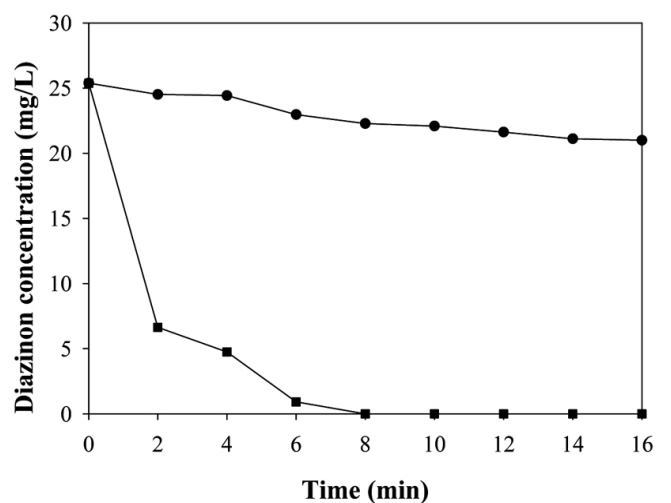
(A)



(A)



(B)



(B)

Figure 3. Effects of EDTA concentration on (A) cell growth and (B) OPH production in the cells harboring surface displayed-OPH (Symbols : ●, control; ■, 0.1 mM EDTA; ▲, 0.2 mM EDTA; ▼, 0.4 mM EDTA; ○, 0.8 mM EDTA; □, 1.0 mM EDTA).

Figure 4. Comparison of diazinon degradation using the cells harboring surface displayed-OPH. (A), 50 mg/L diazinon (B), 25 mg/L diazinon (Symbols : ●, whole cells; ■, cell lysate with ultrasonication treatment).

그리고 이 배양 조건에서 15 h 동안 배양한 균주에 초음파 파쇄공정을 수행하였으며, 이때 생산된 효소를 이용하여 25, 50 ppm diazinon 제거 속도를 고찰하였다. 그 결과, 25 ppm diazinon은 초음파 공정에서 얻어진 효소와 6 min 간 반응하였을 때, 4.53 mg/g · min의 diazinon 제거속도를 구할 수 있었다. 그러나 전 세포를 사용한 경우에는 0.44 mg/g · min의 매우 낮은 제거속도를 나타내었으며, 초음파 공정을 사용한 경우가 전세포를 사용한 것과 비교하여 약 10배가 향상된 diazinon 처리속도를 얻을 수 있었다. 또한, 50 ppm diazinon을 처리한 경우에서도 유사한 경향을 보였으며, 효소 반응 12 min에 도달하였을 때, 평형상태에 도달하였다. 결과적으로 25, 50 ppm diazinon은 모두 90% 이상의 매우 높은 제거효율을 구할 수 있었으며, 이러한 생물학적 처리는 diazinon과 같은 환경독성 화합물을 효과적으로 제거할 수 있는 활용 기술로 사용될 수 있을 것이다.

### 4. 결 론

대장균의 세포 표면에서 발현되는 유기인분해효소를 생산하였으며, 이 효소를 사용하여 diazinon 농약의 생물학적 제거가 이루어졌다. 이 균주를 사용하여 효소를 효과적으로 생산하기 위한 조건은 25도 배양 온도와 0.2 mM EDTA를 배지에 첨가하는 것이다. 이 조건에서 성장한 균주에 초음파 파쇄 공정이 이루어졌을 때, 25, 50 ppm diazinon은 각각 4.5, 7.2 mg/g · min의 diazinon 제거 속도를 나타내었다. 따라서 이러한 실험 결과들은 효소를 이용한 생물학적 처리 시스템으로서 diazinon을 효과적으로 제거 처리하는 기술로 사용될 수 있을 것이다.

### 참 고 문 헌

1. M. A. Matouq, Z. A. Al-Anber, T. Tagawa, S. Aljbour, and M. Al-Shannang, *Ultrasonics Sonochemistry*, **15**, 869 (2008).

2. A. A. Basfar, K. A. Mohamed, A. J. Al-Abdul, T. S. Al-kuraji, and A. A. Al-Shahrani, *Radiation Phys. Chem.*, **76**, 1474 (2007).
3. N. Daneshvar, S. Aber, M. S. Seyed Dorraji, A. R. Khataee, and M. H. Rasoulifard, *Separation and Purification Technology*, **58**, 91 (2007).
4. H. Shemer and K. G. Linden, *J. Hazardous Mater. B*, **136**, 553 (2006).
5. P. C. H. Li, E. J. Swanson, and F. A. P. C. Gogas, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **69**, 59 (2002).
6. W. Chen and A. Mulchandani, *Trends in Biotechnol.*, **16**, 71 (1998).
7. Y. Ku and H.-S. Lin, *Water Res.*, **36**, 4145 (2002).
8. M. I. Badawy, M. Y. Ghaly, and T. A. Gad-Allah, *Desalination*, **194**, 166 (2006).
9. S. Chen, D. Sun, and J.-S. Chung, *J. Hazardous Mater.*, **144**, 577 (2007).
10. C. S. McDaniel, L. L. Harper, and J. R. Wild, *J. Bacteriol.*, **170**, 2306 (1998).
11. W. W. Mulbury and J. S. Karns, *J. Bacteriol.*, **171**, 6740 (1998).
12. S. Chiron, A. Fernandez-Alba, A. Rodriguez, and E. Garcia-Calvo, *Water Res.*, **34**, 366 (2000).
13. L. li, D. G Kang, and H. J. Cha, *Biotechnol. Bioeng.*, **85**, 214 (2004).
14. J. K. Grimsley, J. M. Scholtz, C. N. Psce, and J. R. Wild, *Biochemistry*, **36**, 14366 (1997).