

반응표면 분석법을 이용한 트리클로로에틸렌의 공대사적 분해조건 최적화

윤 성 준·¹예 병 대·¹박 성 훈·[†]이 은 열
경성대학교 공과대학 식품공학과, ¹부산대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2000. 7. 18., 개재승인 : 2000. 8. 17.)

Optimization of Cometabolic Trichloroethylene Degradation Conditions by Response Surface Analysis

Sung-Jun Yoon, ¹Byung-Dae Ye, ¹Sung-Hoon Park, and Eun Yeol Lee[†]

Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

¹Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

(Received : 2000. 7. 18., Accepted : 2000. 8. 17.)

The cometabolic biodegradation conditions of trichloroethylene (TCE) by *Burkholderia cepacia* G4 were optimized using response surface analysis. The experimental sets of phenol concentration, temperature, and pH were designed using central composite experimental design. The optimal conditions of phenol concentration, temperature, and pH were determined to be 0.91 ppm, 21.5°C, and 7.65, respectively, by the Ridge analysis of the contour plot for TCE biodegradation rates. The TCE biodegradation rate could be enhanced up to 2.43 nmol/mg protein · min by response surface methodology.

Key Words : trichloroethylene, phenol, response surface analysis, biodegradation, *Burkholderia cepacia*

서 론

염화 탄화수소 화합물인 trichloroethylene (TCE) 등은 그리스 제거제 등의 공업용 유기용매로 널리 사용되고 있으나, 사용 후 이들 화합물들에 대한 적절한 처리 기술이 개발되지 못하여 상당량이 대기, 지하수 및 토양 등으로 유출되어 환경 오염을 유발시키고 있다(1, 2). TCE는 난분해성 물질이면서 또한 유전자변이 및 암을 유발하는 등 강한 독성을 나타내는 것으로도 알려져 있어 효과적인 처리 기술의 개발이 요구되고 있다(3). 이와 같은 환경오염 문제와 인체에 미치는 독성으로 인하여 미국환경보호국 (Environmental Protection Agency, EPA)에서도 TCE 등을 특정유해물질 (Priority Pollutants)로 지정하여 관리하고 있다(4).

물리화학적으로 TCE를 처리하는 방법으로는 활성탄을 이용한 흡착·제거법, 고온 연소법 등이 있다. 흡착·제거시키는 방법은 TCE를 단순히 물리적으로 이동시키는 것에 불과하므로 일련의 뒤처리가 요구되며, 연소시에는 독성 부산물이 생성된다는 문제점과 초기설비비 및 운전비가 과도하다는 단점도 있다. 따라서 기존 처리기술에 비해 경제성이 있으며

환경친화적인 생물학적 처리법의 개발이 요구되고 있으며, 이 방법은 분해 죄종산물이 무해한 물질로 되는 완전무기화가 일어나기 때문에 2차 오염문제도 해결할 수 있다(5). 1985년 Wilson 등에 의해 TCE 등의 염소화합물이 호기적인 조건에서 미생물에 의해 무해한 물질로 완전 분해된 결과가 보고된 이후에(6), 메탄자화균(7-9), 프로판 산화 미생물(10), 암모니아 산화 미생물(11), 에틸렌 산화 미생물, 톨루엔, 페놀 혹은 크레졸 산화 미생물(12, 13) 등에 의해서도 염소화합물의 생분해가 가능함이 밝혀졌다. 이들 미생물들은 기질 특이성이 비교적 느슨한 oxygenase 계열의 산화효소를 이용하여 공대사(cometabolism) 과정을 통해 TCE를 생분해시키며 분해효소는 일반적으로 미생물의 성장에 필요한 기질의 공급에 의해 생활성이 유도된다.

TCE의 공대사적 분해속도는 pH, 온도 등을 포함한 분해환경인자들에 의해 영향을 받으며, 따라서 이들 환경 조건들의 최적화를 통한 높은 분해 속도 확보는 상업화 공정 개발에 있어서 중요하다. 여러가지 실험 인자들의 상호 작용에 따른 종속변수의 변화에 대하여 최적 조건을 구하는 방법으로 반응 표면 분석법 (response surface analysis)을 응용할 수 있다(14). 반응 표면 분석을 위한 실험 계획법으로는 주로 중심합성계획법 (central composite design)이 사용되는데, 기존의 회귀모형에 오류가 있는 경우 기존 실험치에 새로 구한 실험값만 추가시키면 된다는 장점 등이 있기 때문이다(15). 따라서 본 연구에서는 TCE 분해 활성이 우수한 *Burkholderia cepacia* G4를 이용해 염화합물중에서 난분해성으로 알려진

*Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

Tel : 82-51-620-4716, Fax : 82-51-622-4986

E-mail : eylee@star.ksu.ac.kr

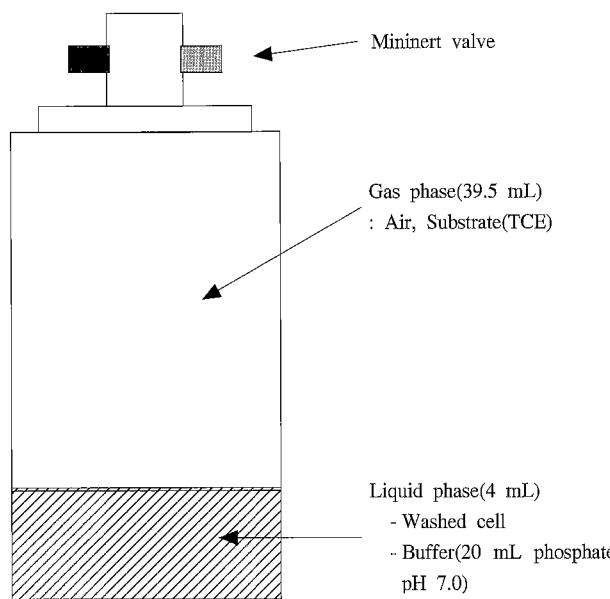


Figure 1. Reaction vial for the measurement of TCE biodegradation rates.

TCE를 대상으로 공대사적 분해 조건에 대한 반응표면 분석법을 통하여 TCE 분해조건 최적화를 실시하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

TCE 분해를 위한 미생물 균주는 *Burkholderia cepacia* G4를 사용하였으며 M9 medium을 이용하여 균체를 배양하였다(16). 0.4 % (w/v) glucose를 첨가한 M9 medium에서 24시간 seed culture 한 후, 이 배양액의 1~2 % (v/v) 정도를 5 mM phenol이 있는 M9 medium에 접종하여 진탕배양기(VS-8480SR, Vision)를 사용하여 교반속도 250 rpm, 온도 30°C에서 배양하였다.

세포농도 측정

세포 농도측정은 분광광도계 (Spectrophotometer, UV-1201, Shimadzu)를 이용하여 파장 600 nm에서 흡광도 (Absorbance, A600)를 측정하여 검량곡선을 사용해 결정하였으며, 세포의 단백질 농도는 Optical Density(O.D.)가 1.0 일 때 0.259 mg/mL를 기준으로 계산하였다(17).

TCE 분해능 평가

TCE 분해능 평가에 사용된 40 mL amber vial을 Fig. 1에 나타내었다. 배양한 세포를 실온에서 미량 고속 원심 분리기

(VS-15000, Vision)를 이용하여 5분간 12000 rpm에서 원심분리 한 후 상동액은 버리고 20 mM 인산 완충용액 (pH 7.0)으로 두 번 washing 한 후 O.D.가 1.0이 되게 조정하고 2 mL을 분석용 vial에 주입하였다. 1 mM TCE stock 용액을 198 μ L 투입한 후 전체용액의 부피가 4 mL이 되게 3차 중류수를 넣고 평형에 도달된 뒤의 액상의 농도가 10 μ M이 되도록 하였다(18). 1 mM TCE stock은 40 mL amber vial (정화한 체 부피는 43.5 mL)에 head space 없이 0.1 mM HCl 용액으로 TCE 원액을 희석하여 PTFE-faced rubber septum으로 밀봉한 후 vortex하여 제조하였다. 분석전에 반응이 일어나는 것을 방지하기 위해서 기질로 사용되는 TCE는 다른 성분들을 넣은 후 제일 나중에 첨가하였고, 진탕 전에는 분석용 vial을 항상 얼음통에 넣어 0°C로 유지하였다. TCE 분해 반응은 중심합성 계획법 상의 여러조건에서 진탕형온수조를 이용하여 분당 180회 왕복시키면서 진행하였다.

TCE 및 phenol 분석

TCE 분석에는 50 μ L gas-tight syringe로 30 μ L의 sample을 취하여 불꽃이온 검출기 (FID)가 장착된 가스크로마토그래프 (GC-17A, Shimadzu)를 사용했으며, 분석에 사용된 컬럼은 HP-5 capillary(column length : 30 m, diameter : 0.32 mm) column 이었다. 오븐과 검출기, 주입부의 온도는 각각 100, 220, 250°C였으며 운반기체로는 1.2 mL/min의 질소를 사용하였다. Phenol 농도는 modified colorimetric assay법을 이용하여 결정하였다(19).

결과 및 고찰

반응표면분석법을 이용한 TCE 분해조건 최적화

중요 실험인자인 phenol 농도, 온도, pH 등의 독립변수 변화가 TCE 분해속도에 미치는 영향을 반응표면 분석법 (Response Surface Analysis)을 이용하여 분석하였다. 반응 표면 분석의 중요한 목적은 각각의 독립 변수들인 phenol 농도, 온도, pH가 종속변수인 TCE 분해속도와의 상관관계를 구해 어떠한 영향을 주는지를 모니터링하고 가장 높은 TCE 분해 속도를 줄 수 있는 최적조건을 결정하기 위함이다. 각각의 실험인자 변화에 따른 TCE 분해속도의 반응표면이 곡선으로 나타날 것으로 예상되어 2차 회귀모형을 사용하기로 하였으며, 반응표면 분석을 위한 실험계획법으로는 중심합성 계획 (Central Composite Design)법을 사용하였다. 독립변수인 phenol 농도, 온도, pH에 대해 -2, -1, 0, 1, 2 등 5단계로 부호화하고(Table 1), 15가지 종류의 실험점을 결정하였다. 중심 점은 (0, 0, 0)으로 설정하였고, 축점의 수는 실험조건의 수에 따라 (- α , 0, 0), (α , 0, 0), (0, - α , 0), (0, α , 0), (0, 0, - α)

Table 1. Levels of TCE biodegradation conditions in experimental design.

X_n	Cultivation conditions	Level				
		-2	-1	0	1	2
X_1	Phenol conc. (ppm)	0	0.5	1	1.5	2
X_2	Temperature(°C)	10	17.5	25	32.5	40
X_3	pH	4	5.5	7	8.5	10

Table 2. Experimental data for TCE biodegradation rates under different conditions of phenol concentration, cultivation temperature, pH.

Exp. No.	Cultivation conditions			Data value
	Phenol conc. (ppm)	Temp. (°C)	pH	
1	-1	-1	-1	1.98
2	1	-1	-1	1.66
3	-1	1	-1	1.39
4	1	1	-1	1.05
5	-1	-1	1	2.16
6	1	-1	1	1.84
7	-1	1	1	0.88
8	1	1	1	1.39
9	0	0	0	2.10
10	-2	0	0	1.45
11	2	0	0	0.90
12	0	-2	0	1.89
13	0	2	0	0.77
14	0	0	-2	1.22
15	0	0	2	1.11

Table 3. Analysis of variance for regression model.

Cultivation condition	F-Ratio
Phenol conc. (ppm)	5.883
Temperature (°C)	13.776
pH	3.251

α), (0, 0, α) 등 여섯개를 설정하였다. 8개의 요인 실험점으로는 (-1, -1, -1), (-1, -1, 1), (-1, 1, -1), (-1, 1, 1), (1, -1, -1), (1, -1, 1), (1, 1, -1), (1, 1, 1)을 사용하였다. 각각의 실험점에서 3번씩 반복 실험하여 구한 평균값을 사용하였으며, 각각의 실험인자와 TCE 분해속도와의 관계를 결정짓기 위해 아래와 같은 2차 회귀모형을 사용하였다.

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

여기서 y 는 TCE 분해속도 ($\text{nmol}/\text{mg protein} \cdot \text{min}$)이며 X_1 , X_2 , X_3 는 각각 phenol 농도 (ppm), 온도(°C), pH이며 β_0 는 절편, β_n 은 회귀계수이다.

중심합성법에 의한 반응 표면 분석

중심합성법에 의거해 얻은 실험 결과는 SAS (Statistical Analysis System) program을 이용하여 분석하였다(Table 2). 전체 9개의 degrees of freedom에 대한 total regression을 분석한 결과, R-square 값이 0.9442로 10% 유의 수준에서 유의성이 인정되었고, 독립변수인 phenol 농도, 온도, pH 변화에 따른 TCE 분해속도 변화가 잘 설명 되고 있음을 알 수 있었다. TCE 분해속도에 대한 반응 표면 회귀식은 2차 회귀분석을 통해 다음과 같이 결정할 수 있었다.

$$y = 2.155 - 0.0981X_1 - 0.3231X_2 + 0.0375X_3 + 0.1013X_1 X_2 + 0.1063X_1 X_3 - 0.0663X_2 X_3 - 0.2381X_1^2 - 0.1994X_2^2 - 0.2013X_3^2$$

Burkholderia cepacia G4를 이용한 TCE 분해에서 가장 큰 영향을 주는 독립 변수를 결정하기 위하여 F-ratio 값을 분석한 결과, 온도의 F-ratio 값이 13.776으로 가장 높게 나타나 TCE 분해속도는 온도의 영향을 가장 많이 받고 있음을 알 수 있었다(Table 3). 그 다음으로 중요한 인자는 phenol 농도였고, pH변화에 따른 TCE 분해 속도가 가장 적은 영향을 받고 있음을 알 수 있었다. 또한 phenol 농도와 온도는 10% 유의 수준에서 유의성을 인정받았으나 pH에 대해서는 10% 이내에서 유의성을 인정받지 못 함을 알 수 있었다. 독립변수 중 가장 크게 영향을 미치는 변수인 pH를 최적값인 7.65로 정한 후 phenol 농도 및 온도 변화에 따른 TCE 분해속도 변화를 나타내 주는 3차원 반응표면 및 contour plot을 실시하였다 (Fig. 2). Fig. 2 (a)에서와 같이 2.13 nmol/mg protein · min 정도의 TCE 분해속도를 주는 온도 범위는 10.4 ~ 25°C 사이이고, phenol 농도는 0.4 ~ 1.3 ppm 범위임을 알 수 있었다. 같은 조건에서 반응 표면 회귀식을 이용한 TCE 분해 속도 변화에 대한 3차원 반응표면을 Fig. 2 (b)에서 나타내고 있다. TCE 분해효소 유도 및 에너지원으로 사용되는 phenol을 고농도로 공급해주는 경우 TCE와 경쟁저해 (competitive inhibition)로 인하여 TCE 분해속도 감소가 유발될 수 있다. 그러나, 적절한 농도로 공급하는 경우 NADH 등의 reducing power 제공과 같은 긍정적 효과로 인하여 TCE 분해능을 향상시킬 수 있는데 반응 표면 분석 결과, 그 최적 범위를 0.4 ~ 1.3 ppm으로 결정할 수 있었다. 온도의 경우 세포 배양에 최적인 온도보다 낮은 온도에서도 우수한 TCE 분해능을 보이고 있음을 알 수 있었는데, 이는 낮은 온도에서는 기상의 TCE가 액상으로 물질 전달되는 효율이 증가되어 향상된 TCE 분해능을 보인 것으로 판단할 수 있다.

최적 조건에서의 TCE 분해

실험인자인 phenol 농도, 온도, pH에 대한 TCE 분해속도의 반응 표면을 분석한 결과 최대치를 주는 stationary point 가 존재하였고, 이 점에서 결정된 최적조건이 Table 4에 제

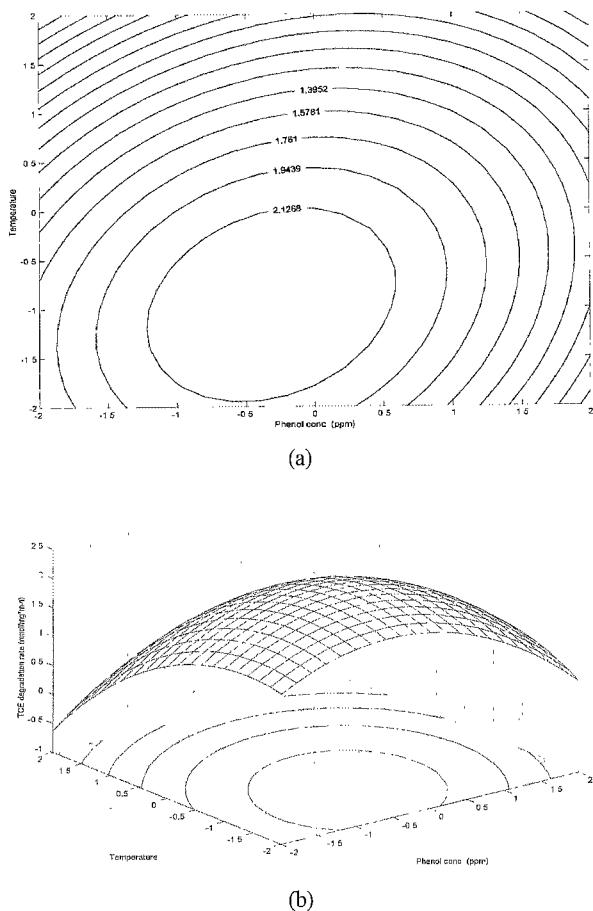


Figure 2. Contour map (a) and 3-D response surface (b) of TCE biodegradation rates as a function of phenol concentration and temperature.

Table 4. Analysis of response surface.

Cultivation conditions	Levels for optimum responses
Phenol conc. (ppm)	0.91
Temperature (°C)	21.5
pH	7.65
TCE degradation rate (nmol/mg [*] min)	2.326

시되어 있다. Phenol 농도 0.91 ppm, 온도 21.5°C 및 pH 7.65에서 가장 높은 TCE 분해속도를 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 분석 결과를 평가하기 위하여 반응표면 분석법을 통하여 얻은 최적조건에서 TCE 분해 실험을 실시하였다. 세포와 TCE가 포함된 vial을 3분정도 강하게 흔들어 주어 세포 혼탁액상과 기상사이에서 평형이 일어나도록 한 후 진탕 항온수조에 넣고 분해 실험을 실시하였으며, 초기 TCE 분해속도는 0 ~ 5 min 사이에서 결정하였다(Fig. 3). Phenol 농도 0.91 ppm, 온도 21.5°C, pH 7.65의 분해조건에서 약 2.43 nmol/mg protein · min 정도의 TCE 분해속도를 얻을 수 있었으며, 이는 기존 분해 실험조건인 phenol 농도 0 ppm, 온도 30°C, pH 7에서 얻은 분해속도 대비 약 61.4% 정도 향상된 결과이다. 또한, 약 100분 정도 지나면 TCE는 100% 무기질화가 진행

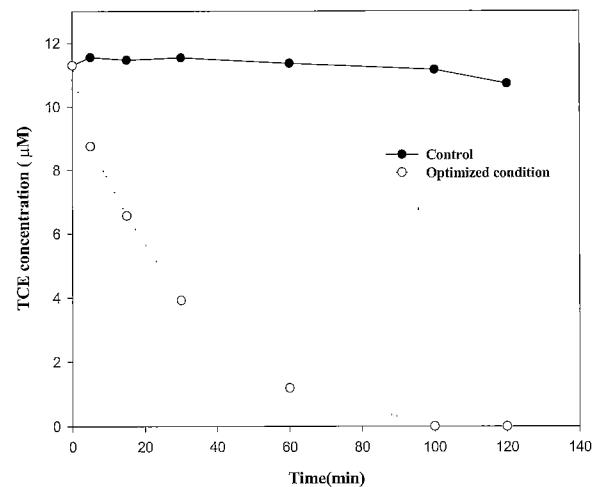


Figure 3. Extent of TCE biodegradation using *B. cepacia* G4 at the optimal condition determined by response surface analysis.

됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 본 연구에서 얻은 TCE 분해 조건 최적화 관련 결과들은 연속적 TCE 처리를 위한 trickling biofilm reactor의 효율 증대 등에 응용될 수 있을 것이다.

요약

Burkholderia cepacia G4에 의한 트리클로로에틸렌 (TCE)의 공대사적 분해조건을 반응표면 분석법을 이용해 최적화 하였다. 반응표면 분석을 위한 실험 계획법으로는 중심합성 계획법을 이용하였으며, 주요 실험인자로는 phenol 농도, 온도, pH를 사용하였다. SAS 프로그램을 이용한 TCE 분해속도에 대한 반응표면 분석 결과 phenol 농도, 온도, pH가 각각 0.91 ppm, 21.5°C, 그리고 7.65에서 최대치를 보였다. 결정된 최적조건에서 TCE 분해실험을 실시한 결과, 약 2.43 nmol/mg protein · min정도의 TCE 분해속도를 얻을 수 있었으며, 기존조건에서의 실험치 대비 약 61.4% 정도 향상시킬 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 한국과학재단 지정 환경기술·산업개발연구센터(RRC-IETI)의 지원 (과제번호: 99-10-03-02-A-3)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ensley, B. D. (1991), Biochemical diversity of trichloroethylene metabolism, *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 283-299.
- Westrick, J. J., J. W. Mello and R. F. Thomas (1984), The groundwater supply survey, *J. Am. Water Works Assoc.* **5**, 52-59.
- Fan, A. M. (1988), Trichloroethylene: Water contamination and health risk assessment, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. vol. 101. G.W. Ware, ed.,

- Springer-Verlag, New York, NY.
- 4. U. S. EPA. (1984), National Primary Drinking Water Standard. *Proposed*. Fed. Regist. **49**, 24329.
 - 5. 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.
 - 6. Wilson, J. T. and B. H. Wilson (1985), Biotransformation of trichloroethylene in soil, *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 242-243.
 - 7. Oldenhuis, R. L. vink, D. B. Janssen and B. Withholt (1989), Degradation of Chlorinated Aliphatic Hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b Expressing Soluble Methane Monooxygenase, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2819-2826.
 - 8. 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.
 - 9. Park, S., M. L. Hanna, R. T. Taylor and M. W. Droege (1991), Batch cultivation of *Methylosinus trichosporium* OB3b. I: Production of soluble methane monooxygenase, *Biotechnol. Bioeng.* **38**, 423-433.
 - 10. Wackett, L. P., G. A. Brusseau, S. R. Householder and R. S. Hanson (1989), Survey of microbial oxygenases: Trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2960-2964.
 - 11. Vannelli, T., M. Logan, D. Arciero and A. B. Hopper (1990), Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas europaea*, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1169-1171.
 - 12. Folsom, B. R. and P. J. Chapman (1991), Performance Characterization of a Model Bioreactor for the Biodegradation of Trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1602-1608.
 - 13. Nelson, M. J., S. O. Montgomery, W. R. Mahaffey and P. H. Pritchard (1987), Trichloroethylene Metabolism by Microorganisms that Degrade Aromatic Compounds, *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 604-606.
 - 14. Mudahar, G. S., R. T. Toledo, J. D. Floros and J. J. Jen (1989), Optimization of carrot dehydration process using response surface methodology, *J. Food Sci.* **54**, 714-719.
 - 15. Park, S. H. (1990), Modern experimental designs, p575-625, Min-Young Co.
 - 16. Landa, A. S., E. M. Sipkema, J. Weijma, A. A. C. M. Beenackers, J. Dolfig and D. B. Janssen (1994), Cometabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 in chemostat with toluene as the primary substrate, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3368-3374.
 - 17. Sun, A. K. and T. K. Wood (1996), Evaluation of trichloroethylene degradation and mineralization by pseudomonads and *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 248-256.
 - 18. Kim, K. T. (1998), Degradation of ethylene chlorides by *Methylosinus trichosporium* PP358, M. S. Thesis, Dept. of Chemical Eng., Pusan National University, Pusan.
 - 19. 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.