

Burkholderia cepacia G4를 이용한 기상의 트리클로로에틸렌의 공대사적 분해를 위한 2단계 CSTR/TBF 시스템 개발

†이 은 열 · ¹박 성 훈
경성대학교 공과대학 식품공학과, ¹부산대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2001. 10. 10., 게재승인 : 2001. 10. 25.)

Development of Two-stage CSTR/TBF System for the Cometabolic Degradation of Gas-phase TCE by *Burkholderia cepacia* G4

Eun Yeol Lee† and Sunghoon Park¹

Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea
¹Department of Chemical Engineering, College of Engineering, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
(Received : 2001. 10. 10., Accepted : 2001. 10. 25.)

In this paper, we developed and operated a two-stage continuous stirred tank reactor (CSTR) / trickling biofilter (TBF) system for the long-term continuous treatment of trichloroethylene (TCE) using *Burkholderia cepacia* G4. In this reactor system, CSTR with cell recycle from TBF was coupled to the TBF for the reactivation of the cells deactivated during TCE degradation. The critical elimination capacity was determined to be 25.3 mg TCE/L · day and the reactor has been stably operated for more than 1 months, which clearly represented that CSTR/TBF system can be used for long-term treatment of TCE.

Key Words : *Burkholderia cepacia* G4, cometabolism, trichloroethylene, trickling biofilter

서 론

염소화 탄화수소 (Chlorinated hydrocarbon) 계열의 대표적인 휘발성 유기화합물(volatile organic compound, VOC)인 trichloroethylene (TCE)은 chloroform, vinyl chloride, dichloroethane 등과 더불어 인화성이 없는 유기용매로 드라이클리닝제, 그리스제거제 등의 용도로 사용되어 왔다. 그러나, 지금까지 사용된 많은 양의 TCE는 난분해성 및 휘발성으로 인하여 대기, 지하수 및 토양 등 광범위한 환경오염을 유발시키고 있다(1,2). 특히, TCE는 유전자변이 및 암을 유발하는 등 인체에 강한 독성을 주는 것으로도 알려져 있다(3). 미국환경보호국 (Environmental Protection Agency, EPA)에서는 TCE 등을 특정유해물질 (Priority Pollutants)로 규정하여 기존의 오염물질 (Conventional Pollutants)과는 특별히 구분하여 취급하고 있으며, SDWA (Safe Drinking Water Act)에 의해 규제되는 음용수 관련 유해물질 중에서 'Volatile Organic Chemicals'

항목으로 지정되어 관리되고 있다(4). 우리나라 역시 그 중요성을 인정하여 1993년부터 이들에 대한 규제를 강화하고 있어 보다 효율적인 TCE 처리 시스템 개발은 매우 중요하다.

기존의 물리화학적 처리 방법인 활성탄 흡착법 등은 단순히 물리적으로 오염물질을 이동시키는 것에 불과하므로 사후 처리가 다시 요구된다는 문제점이 있으며, 초기설비비와 운전비가 높은 단점이 있다. 따라서, 경제성도 있으면서 환경친화적인 TCE 처리 기술인 미생물 생축매를 이용한 생분해의 중요성이 부각되고 있다(5-11). 일반적으로 미생물을 이용한 TCE의 생분해에 있어서 TCE 자체가 미생물에 대한 독성이 높으므로 성장 기질로는 사용되지 못하므로 다른 성장 기질의 존재 하에서 주로 oxygenase 계열의 효소에 의해 공대사 (cometabolism) 과정을 통해 분해된다(12,13). 이러한 공대사 과정에서 성장 기질과 TCE 사이에는 경쟁적 저해관계가 존재하여 반응기 운전 효율을 저하시킬 수 있으며(14-16), 성장 기질 없이 계속적으로 TCE 분해만 진행하는 경우 효소 및 세포 불활성화로 인한 장기간의 안정된 반응기 운전이 어렵다는 결과를 얻을 수 있으므로 이에 대한 보다 효율적으로 극복할 수 있는 방법의 개발이 요구된다. 본 연구에서는 *Burkholderia cepacia* G4 균주를 생축매로 이용한 기상의 TCE 처리용 생물막 반응기 시스템 개발을 위하여, TCE 분해 과정 동안 불활성화된 생축매의 효과적인 재활성화를 위

†Corresponding Author : Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea
Tel : +82-51-620-4716, Fax : +82-51-622-4986
E-mail : eylee@star.ksu.ac.kr

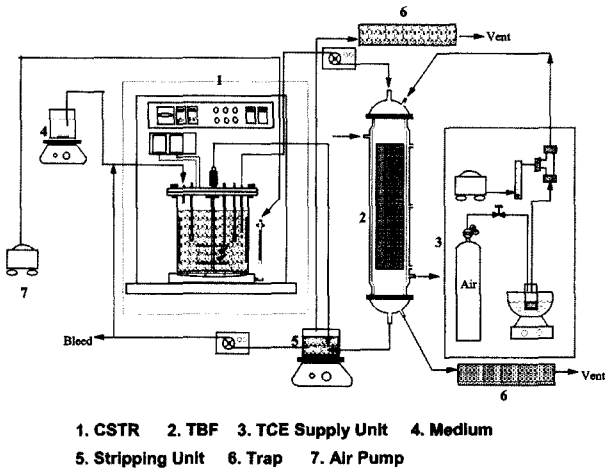


Figure 1. Schematics of a two-stage CSTR/TBF system for the continuous degradation of TCE.

한 미생물 성장 반응기를 CSTR (continuous stirred tank reactor, 연속교반탱크형반응기)형태로 결합시켜 장기간 안정적으로 TCE를 처리할 수 있는 2단계 CSTR/TBF 시스템을 개발하고자 한다. *B. cepacia* G4 세포 성장 및 TCE 분해효소인 toluene monooxygenase (TMO)를 효율적으로 발현할 수 있는 CSTR 운전 조건을 결정하였으며, 유입 TCE 농도가 TCE 전환율 및 분해속도에 미치는 영향을 분석하고 elimination capacity 분석을 통해 2단계 CSTR/TBF 시스템을 평가해 보았다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

TCE 분해용 미생물인 *B. cepacia* G4를 배양하기 위한 배지로는 M9 배지를 사용하였다(15). 플라스크 배양은 300 mL 용량의 마개 달린 플라스크를 사용하여 먼저 glucose (0.4 % (w/v))가 들어있는 M9 배지에 seed culture한 후 12~15시간 배양한 후, 이 배양액의 1~2% (v/v) 정도를 5 mM의 phenol이 들어있는 M9 배지에 접종하여 진탕 배양기(Model KMC-8480sf, VISION과학, 서울)를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도 30°C에서 배양하였다.

세포농도 측정

세포농도는 spectrophotometer(Lamda 20, Perkin Elmer Co. USA)를 이용하여 optical density(O.D₆₀₀) 값을 측정하고 검량곡선을 이용하여 결정하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법에 근거한 Bio-Rad Protein Assay Kit(Hercules, California)를 이용하여 결정하였다.

TCE, phenol 농도분석 및 toluene monooxygenase(TMO) 효소 활성측정

TCE농도는 100 μ L gas-tight syringe로 30 μ L의 gas sample을 채취하여 전자포집검출기(ECD)를 이용하여 분석하였다. 가스크로마토그래프 (Hewlett Packard 5890 II plus, USA)의 오븐, 검출기 및 주입구 온도는 각각 100, 200 및 250°C이었다. Phenol 농도는 modified colorimetric assay 방법으로 결정하였

고, TMO 활성은 modified naphthalene oxidation assay 방법을 이용하여 측정하였다(16).

TBF 제작 및 운전

TCE 처리용 TBF의 크기는 내경 5 cm, 전체길이 약 77 cm로서 미생물막 형성을 위한 충전층으로는 TCE 흡착능이 없는 다공성 세라믹 담체를 사용하였다. 충전층의 높이는 약 25 cm 정도로 부피는 약 0.5 L이다. 담체의 크기는 0.5 cm³과 1 cm³ 정도로 제작하여 사용하였다. TBF로 연결되는 모든 재질은 TCE 흡착 및 소실을 최소화시키기 위하여 viton tubing을 사용하였다. TCE는 syringe pump를 사용하여 일정속도로 공기와 함께 반응기내로 공급하였다. 생물막을 형성시키기 위하여 성장기질로 phenol이 들어있는 M9 배지를 일정한 속도로 계속 공급하였으며, 공기 체류시간은 약 5분으로 하였다.

2단계 CSTR/TBF 시스템 구성 및 운전

TCE 처리용 반응기 시스템은 유일 탄소원인 phenol이 들어 있는 M9 배지가 연속적으로 공급되어 미생물이 성장할 수 있는 CSTR과 성장반응기에서 재활성화된 미생물과 충전층에 형성되어 있는 미생물막에 의해 TCE 분해가 일어나는 TBF를 연결시켜 구성하였다(Figure 1). 성장반응기로는 5 L 발효조(KFC-5L, 코바이오텍, 인천)를 사용하였으며, 온도 30°C, 교반속도 300 rpm, 배양액 부피는 3 L로 하였다. CSTR에서 성장 및 재활성화된 미생물 배양액은 연동펌프를 이용하여 20 mL/min의 속도로 TBF 상단부로 공급되며, 세포 배양액은 분해반응기를 거친 후 재순환되며 일부는 bleeding 된다. 모든 반응기의 연결관은 viton tubing 및 teflon tape을 이용하여 TCE 소실을 최소화하였다.

결과 및 고찰

2단계 CSTR/TBF 시스템 개발의 필요성

일반적으로 생물학적 TCE 처리는 다공성 담체에 TCE 분해능을 가진 미생물을 부착 성장시킨 생물막 반응기인 TBF를 주로 사용하는데, 이는 반응기 단위부피당 높은 세포농도를 얻을 수 있으므로 분해 속도를 높일 수 있으며 일반적으로 shock loading에 대한 저항성이 우수하다는 장점이 있기 때문이다. 그러나, TCE 및 TCE 분해산물은 세포 및 효소에 대한 독성이 매우 높기 때문에 단순한 1단계 TBF 시스템의 경우 세포 및 효소의 불활성화가 일어나서 장기간 운전이 어렵다. 이렇게 불활성화된 생물막을 재활성화시키기 위하여 포도당과 같은 성장 기질을 공급하는 경우 TCE 분해효소인 oxygenase가 발현되지 못하므로 TCE 분해능을 기대할 수 없다. 또한, phenol, toluene 등을 성장기질로 공급하는 경우 TCE 분해효소 발현 유도는 가능하나 성장기질과 TCE 사이에 경쟁적 저해가 유발되어 급격한 분해 속도 저하가 일어난다. 이러한 문제점들을 극복하기 위하여 경쟁적 저해를 최소화하면서 TCE 분해효소 발현 및 재활성화를 유도할 수 있는 최적 농도의 phenol 등의 성장기질을 공급하여 TCE 분해능을 향상시킨 연구 결과들이 보고되었으나, 이들 반응기 시스템을 이용하여 장기간 연속적으로 TCE를 처리한 결과를 보

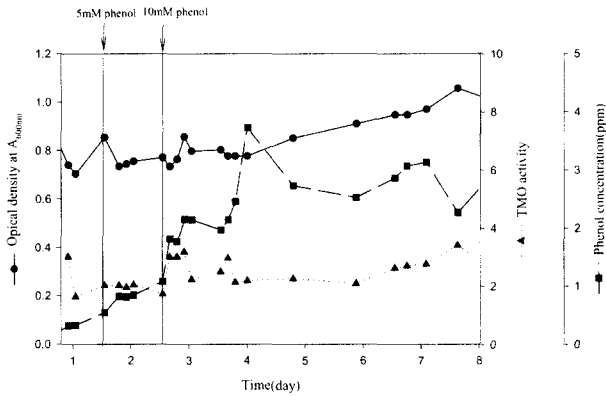


Figure 2. Continuous culture of *B. cepacia* G4 with phenol as a sole carbon source.

여주지는 못했다. 따라서, 이러한 문제점을 극복하기 위한 반응기 시스템으로 TCE 분해를 위한 TBF와 TCE 분해과정에서 불활성화된 세포 및 효소를 재활성화 시키기 위한 CSTR을 연결시킨 2단계 CSTR/TBF 시스템의 개발은 매우 중요하다. *B. cepacia* G4의 TMO를 이용하여 장기간 안정적으로 TCE를 처리하기 위한 2단계 CSTR/TBF 시스템의 구성은 TBF 단위 반응기에서 폐가스에 포함된 기상의 TCE를 공기와 함께 공급하여 미생물막에 의해 TCE가 분해되며, 이때 불활성화된 세포는 유일 탄소원인 phenol과 공기 및 배지가 연속적으로 공급되는 CSTR에서 재활성화된 후 다시 TBF 단위 반응기로 재순환될 수 있도록 구성하였다(Figure 1).

CSTR 운전 조건 최적화

CSTR 운전 조건 결정에 있어서 가장 중요한 점은 CSTR에서 세포 농도를 높이고 TCE 분해효소인 TMO의 활성을 최대화시킬 수 있으며, 또한 CSTR에서 TBF로 유입되는 배양액에 포함되어 있는 phenol의 양이 TBF에서 TCE 분해를 최대화시킬 수 있는 최적 농도로 유지될 수 있는 조건을 결정하는 것이다. CSTR의 초기 운전은 회석속도 0.02 hr^{-1} , 공기 공급 속도 0.33 vvm , 교반속도 300 rpm , 배양온도 30°C , 그리고 3 mM 의 phenol 공급농도에서 시작하였으며, TCE 분해효소 유도 및 세포성장을 위한 유일 탄소원인 phenol 농도 변화에 따른 세포농도 변화(O.D.), CSTR에서의 phenol 농도 및 TMO 활성을 측정하였다 (Figure 2.). Phenol 농도를 3 mM 에서 5 mM , 그리고 10 mM 로 증가시켜 본 결과, 세포 농도는 phenol 농도 증가에 따라 서서히 증가하는 경향을 보였으며, CSTR 배양액에서의 phenol 농도 역시 3 ppm 미만의 낮은 농도 범위내에서 증가하는 경향은 관측할 수 있었다. 그러나, phenol 비분해 속도 측정을 해 본 결과 TMO의 활성은 phenol 농도 변화에 상관없이 거의 일정한 수준을 유지하고 있음을 알 수 있었다. CSTR에서의 세포 농도 증가를 통해 전체 TMO 활성을 증가시키기 위하여 phenol을 20 mM 수준으로 높여보았는데, 세포 농도는 약간 증가하였으나 CSTR에서 나와 TBF로 공급되는 세포 배양액에 포함되어 있는 phenol 농도가 TCE 분해 반응을 저해할 수 있는 수준으로 높아지는 문제점이 있었다 (data not shown). 따라서, CSTR에서 TBF로 공급되는 세포배양액에서의 phenol 농도가

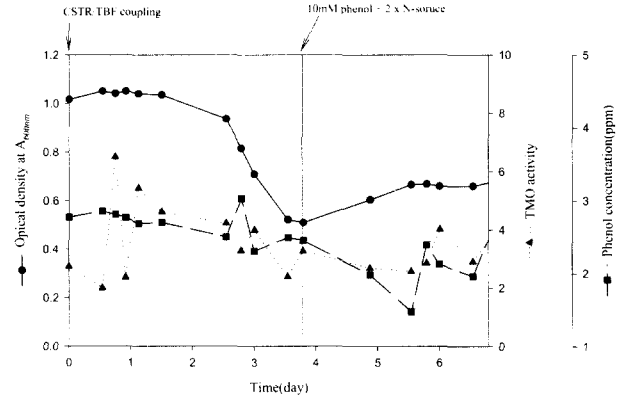


Figure 3. Start-up of the CSTR/TBF system.

TBF내에서 TCE 분해능을 향상시켜줄 수 있는 농도 범위인 3 ppm 미만이며, 전체 TMO 활성도 높이기 위해서는 5 mM 에서 10 mM 이하 정도의 phenol을 공급하는 것이 필요함을 알 수 있었다.

2단계 CSTR/TBF 구성 및 반응기 start-up

2단계 CSTR/TBF 시스템을 start-up 시키기 위하여 CSTR에서 나오는 세포배양액을 *B. cepacia* G4의 생물막이 형성되어 있는 TBF에 연결시켜 재순환시켰다. 그림 3에 나타난 바와 같이 TBF와의 연결 후 CSTR에서 세포농도의 감소 현상을 관측할 수 있었다. 이것은 장기간 진행되었던 TBF 반응기 운전과정에서 TCE 분해와 더불어 반응기 내에 축적되어 있던 TCE 분해산물 등과 같은 독성물질 일부분이 세포배양액의 재순환과 더불어 CSTR 반응기 내부로 유입되었기 때문으로 판단된다. CSTR에서 TBF로 재순환되는 세포배양액에서의 세포농도가 높을수록 TBF의 생물막 재형성 및 세포배양액 자체에서의 TCE 분해능 향상에 도움을 줄 수 있으므로 CSTR에서의 세포 농도를 높이기 위하여 phenol 농도를 10 mM 수준으로 향상시키고 동시에 M9 배지에 포함되어 있는 질소원의 농도도 2배로 증가시켜 공급하였다. 그 결과, CSTR에서의 세포 농도를 다소 향상시킬 수 있는 결과를 얻을 수 있었으나, TBF와의 연결로 인한 세포 농도 저하를 100% 방지하기는 어려웠다. 세포 농도를 높이기 위한 다른 방법으로 phenol 이외에 10 mM 수준의 lactate를 공급해 준 경우, 세포 농도 증가는 얻을 수 있었으나 TMO 활성이 크게 떨어지는 결과가 유발되어 phenol만을 유일 탄소원으로 계속적으로 공급하기로 하였다.

유입부 TCE 농도에 따른 반응기 효율 분석 및 elimination capacity 결정

TCE 분해 반응기인 TBF로 유입되는 폐가스에 포함되어 있는 TCE 농도 변화가 TCE 처리율에 미치는 영향을 분석하기 위하여 유입 TCE농도를 $7, 9, 12, 15 \text{ ppm}$ 로 변화시키면서 TBF에서 배출되는 TCE 농도 측정을 통해 TCE 전환율을 분석하였다 (Figure 4.). CSTR에서 TBF로 유입되는 세포 배양액의 재순환 속도는 20 mL/min , TCE를 포함한 기체의 유속은 100 mL/min , CSTR의 회석속도는 0.02 hr^{-1} , TBF의 온도는 30°C 를 유지하였다. 유입부 TCE 농도가 증가할수록

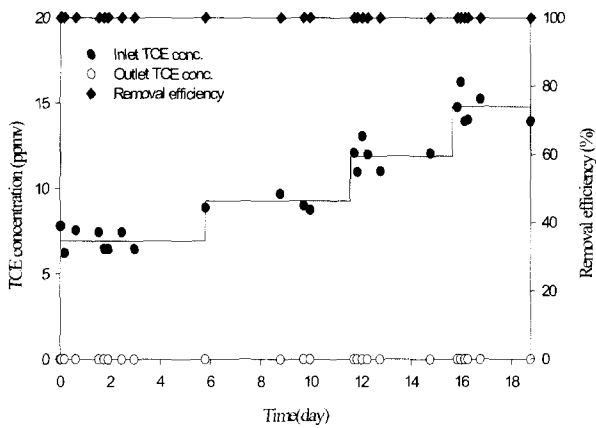


Figure 4. Effects of inlet TCE concentrations on removal efficiency of two-stage CSTR/TBF system.

TCE 분해속도도 증가되었으며, TCE 제거율을 보면 유입부의 TCE농도가 15 ppm_v까지는 100% 수준으로 처리되고 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과를 1단계 TBF 시스템과 비교해 보면(16), 1단계 TBF의 경우 7 - 10 ppm_v 정도의 유입 TCE 농도에서 약 58.1% 수준으로 처리되었으며, 반응기 운전도 1일 정도 안정되게 운전했던 결과와 비교해 보면 2단계 CSTR/TBF 시스템의 처리 효율과 안정성이 우수함을 알 수 있다. 또한, 두 개의 TBF를 병렬로 연결하여 TCE 분해와 생물막 재활성화를 교대로 실시함으로써 TCE를 장기간 안정적으로 처리할 수 있는 parallel TBF 시스템의 경우 5 ppm_v 이하의 TCE가 공급되는 경우 TCE 제거효율을 100%, 5 - 15 ppm_v 수준에서는 50 - 70% 정도로 얻을 수 있었던 결과와 비교해도 2단계 CSTR/TBF 시스템의 처리효율이 높음을 알 수 있다(17). Critical elimination capacity를 계산해보면, 2단계 CSTR/TBF 시스템은 약 25.3 mg/L·day 수준의 높은 TCE 처리 효율을 보여주어 *B. cepacia* G4를 이용한 TCE 처리 관련 다른 문헌 결과에 비해 우수한 TCE 처리능력을 보여 주었다(18,19). 또한, *B. cepacia* G4를 이용한 TCE 처리관련 기존 연구 결과 대부분이 불과 수일 수준의 반응기 운전 결과만을 얻은 것과 비교해서, 본 연구에서 개발한 2단계 CSTR/TBF 시스템의 경우 1개월 이상의 장기간 운전에서도 TCE 처리효율 변화 없이 안정적으로 연속적인 TCE 처리가 가능하여 향후 산업 폐가스 중의 TCE 처리에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

TCE 및 TCE 분해산물의 높은 독성으로 인하여 TCE 분해 효소 및 세포 불활성화가 일어나서 장기간 안정되게 반응기 운전이 어렵다는 단점을 극복하고, TCE와 성장기질사이의 경쟁적 저해관계로 인한 처리효율 감소도 막기 위하여 TCE 분해단계와 세포 및 효소 재활성화 단계를 구분시킨 2단계 CSTR/TBF 시스템을 개발하였다. *B. cepacia* G4를 분해 미생물로 사용하였으며, 탄소원인 phenol과 공기 및 배지가 연속적으로 공급되는 CSTR에서 효소 및 세포 재활성화를 도모하고, TBF에서는 폐가스에 포함된 기상의 TCE를 공기와 함께

공급하여 *B. cepacia* G4 미생물막에 의해 TCE가 분해되도록 구성하였다. 2단계 CSTR/TBF 시스템은 유입 TCE 농도가 15 ppm_v까지도 100% 수준의 처리 효율을 보여주었으며, 고농도의 TCE를 안정적으로 장기간 처리할 수 있었다.

감 사

본 논문은 한국과학재단 지정 환경기술·산업개발연구센터(RRC-IETI)의 지원 (과제번호 : 99-10-03-02-A-3)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다. 연구조원으로 본 연구로도 와 준 설은희, 배현철, 김현숙 학생들에게도 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ensley, B. D. (1991), Biochemical diversity of trichloroethylene metabolism, *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 283-299.
2. Westrick, J. J., J. W. Mello, and R. F. Thomas (1984), The groundwater supply survey. *J. Am. Water Works Assoc.* **5**, 52-59.
3. 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. Jahng, D. and T. K. Wood (1994), Trichloroethylene and chloroform degradation by a recombinant pseudomonad expressing soluble methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2819-2826.
6. Shin, H. S. and J. L. Lim (1996), Performance of a packed-bed bioreactors for the cometabolic degradation of trichloroethylene by phenol-oxidizing microorganism, *Environ. Technol.* **17**, 1351-1359.
7. Oldenhuis, R. L. 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.
8. Tsien, H. C., G. A. Brusseau, R. S. Hanson, and L. P. Wackett (1989), Biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3155-3161.
9. Chang, H.-L. and L. Alvarez-Cohen (1995), Model for the cometabolic biodegradation of chlorinated organics, *Environ. Sci. Technol.* **29**, 2357-2367.
10. Wackett, L. P. and S. R. Householder (1989), Toxicity of trichloroethylene to *Pseudomonas putida* F1 is mediated by toluene dioxygenase, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2723-2725.
11. 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.
12. 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.
13. Kelly, C. J., P. R. Bienkowski, and G. S. Saylor (2000),

- Kinetic analysis of a *tod-lux* bacterial reporter for toluene degradation and trichloroethylene cometabolism, *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 256-265.
14. Choi, Y. B., E. Y. Lee, and S. Park (1999), Gas-phase TCE degradation in a two-stage CSTR/TBR system using *Methylosinus trichosporium* OB3b, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 452-459.
 15. Yoon, S. J., B. D. Ye, S. Park, and E. Y. Lee (2000), Optimization of cometabolic trichloroethylene degradation conditions by response surface analysis, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 393-397.
 16. Ye, B. D., S. J. Yoon, S. Park, and E. Y. Lee (2000), Effect of growth substrates on cometabolic biodegradation of trichloroethylene by *Burkholderia cepacia*, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 474-481.
 17. Ye, B. D. (2001), Development of trickling biofilm reactor system using *Burkholderia cepacia* G4 for the treatment of gas-phase trichloroethylene (TCE), M. S. Thesis, Dept. of Chemical Eng., Pusan National Univ., Pusan.
 18. Sipkema, E. M., W. de Koning, J. E. Van Hylckama Vlieg, K. J. Ganzeveld, D. B. Janssen, and A. A. Beenackers (1999), Trichloroethylene degradation in a two-step system by *Methylosinus trichosporium* OB3b. Optimization of system performance: use of formate and methane, *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 56-68.
 19. Sun, A. K. and T. K. Wood (1997), Trichloroethylene mineralization in a fixed film bioreactor using a pure culture expressing constitutively toluene *ortho*-monooxygenase, *Biotechnol. Bioeng.* **55**, 674-685.