

폐수내 페놀의 생물학적 분해공정 Model 에 관한 연구

이상영 · 박부길 · 이현용

강원대학교 식품공학과
(1989년 7월 11일 접수, 1990년 1월 18일 채택)

Cometabolism Process for Biodegradation of Phenolic Substances

Sang Y. Lee, Boo K. Park and Hyeon Y. Lee

Department of Food Engineering, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea
(Received 11 July 1989; accepted 18 January 1990)

요 약

폐수내 존재하는 적은 양의 유해물질이 미생물에 의해 분해시 cometabolism 과정에 의해 분해됨이 연속 및 회분배양으로 입증됐으며, phenol 분해시 유도된 bioenergetic 수율 model에 의해 0.1026(1/h)의 cometabolism coefficient와 0.587의 glucose 최대 전환수율이 계산됐다. *Pseudomonas* sp.의 생육을 저해하지 않는 phenol의 농도는 20 $\mu\text{g/ml}$ 이하였으며, phenol 유사체인 m-cresol로 미리 배양시킨 경우 phenol 분해능이 우수했으며 전체 균체량도 증가했다.

Abstract—A bioenergetic model has been developed to estimate cometabolism coefficient along with maintenance coefficient for cometabolism process where small amounts of toxic materials exist with major carbon and energy source (eg. glucose) in the waste water. Cometabolism coefficient and maximum bioenergetic yield were estimated as 0.1026 (1/h) and 0.585, respectively for the growth of *Pseudomonas* sp. under aerobic continuous cultivation. It also turned out that phenol was utilized as a cometabolic substrate where its concentration was below 20 $\mu\text{g/ml}$. Pre-cultivation with a phenol analog, m-cresol enhanced biodegradation rates of phenol and also increased total biomass concentration along with the extension of stationary phase.

1. 서 론

산업의 발달로 공장에서 유출되는 폐수에 인체에 유해한 독성 물질의 함유량이 많아지고 있어, 전 세계적으로 이의 대처에 관한 연구가 여러 방면에서 다양하게 수행되고 있다[1-21]. 그 중 미생물을 이용한 유해물질의 분해가 각광을 받고 있다. 그 이유는 이 분해공정 system은 기존의 폐수처리 방법에 비해 설치비 및 유지비가 극히 적으며, 공정의 연속화가 가능한 장점이 있기 때문이다[4, 5]. 하지만 특이한 독성물질을 분해

할 수 있는 미생물의 분리 및 분해능의 향상을 위한 유전적 개량이 필요하며, 분해공정의 효율적인 조절에 관한 연구가 선행되어야 하는 어려운 점들이 있다.

일반적으로 미생물에 의한 유해물질의 분해에 관한 연구시 미생물이 목적유해물질을 균체성장의 주 기질(main substrate) 혹은 glucose 같은 탄소원과 함께 고농도로 존재하는 dual substrate system[6-8]에 중점을 두어왔다. 하지만 실제의 폐수내에는 독성물질의 양이 다른 탄소원에 비해 극히 적은 경우가 많은데[9], 이 경우 미생물은 주 탄소원에 의해 균체성장이 되고

독성물질은 균체성장과 관계없이 다른 metabolic pathway 에 의해 분해된다. 이런 과정을 넓은 의미에서의 cometabolism 으로 정의되지만[10, 11], 아직 이 cometabolism 의 정확한 정의는 확립되어 있지 않은 상태다. 따라서 본 연구는 여러 독성물질 중 페수내 가장 광범위하게 존재하는 phenol 의 cometabolism process 에 의한 분해과정을 분석하고자 한다.

2. 이론 및 방법

Xenobiotics 의 분해능이 강한 *Pseudomonas* sp. 중[12, 13] *Pseudomonas* sp. *Sethunathan* (ATCC 29354, USA)를 Glucose 10g/L, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.6g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.0g/L, Tryptone 5.0g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.04g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0013g/L, ZnCl_2 0.06g/L, H_3BO_3 0.053g/L를 pH 7.1로 조정된 배지 250mL가 있는 flask에 접종해 30°C에서 150rpm으로 진탕 회분배양(batch cultivation)시키면서, 매 시간마다 건조 균체량과 잔류 glucose 및 phenol 농도를 측정했다. 회분배양시 phenol의 농도를 0.5-50 $\mu\text{g/mL}$ 까지 변화시키면서 배양했다. 건조 균체량은 105°C에서 3시간 후의 무게를 측정했으며, glucose는 HPLC(Waters MKL-2134)로 phenol은 Gas chromatograph(Backman, USA)로 농도를 측정했다. 연속배양시 1L bubble aeration 형태의 연속배양조(NBS, USA)에 동 배지에 5 $\mu\text{g/mL}$ 의 phenol을 첨가해 매 3시간마다 균체량을 측정해, 변화가 없을 때를 정상상태(steady state)로 간주해 이 때의 균체량, 잔류 glucose 및 phenol 양을 위에서 언급된 방법으로 측정했다. 가장 느린 회석률의 경우($D=0.161$ 1/h), system이 안정되는데 약 3일이 소요됐다.

Cometabolism의 일반적인 기질의 소비 속도는 다음 식들과 같이 표시될 수 있다.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{V_{max}SB}{(K_m+S)} \quad (1)$$

여기서 S는 glucose의 농도(g/L), V_{max} 는 최대 성장속도(1/h), K_m 는 half saturation constant(g/L), t는 배양시간(h), B는 population density, 즉 균체농도[14]이다. 이와 유사한 형태로

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_s} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

로도 표시될 수 있다[9]. 여기서 Y_s 는 glucose에 대

한 균체수율이며, X는 균체량(g/L)이다.

하지만 실제 cometabolism process에서는 제이의 기질(유해물질)도 소비되므로 위 식 (1)과 (2)는 다음과 같이 표시되어야 할 것이다.

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{max}} \frac{dX}{dt} + m_1X + m_2X \quad (3)$$

이같이 균체 성장에는 영향을 안 주지만 세포의 생리반응과정에서 한 변수로 작용됨을 포함시켜야 될 것이다. 식 (3)에서 m_2 가 cometabolism coefficient(1/h)로서 이 부분을 함축하고 있으며, m_1 은 maintenance coefficient(1/h)이고 Y_{max} 는 true growth yield이다. 또한 균체 성장속도는 substrate inhibition이 존재하는 growth model이 잘 적용됨이 여러 실험결과에서 입증됐다[15, 16]. 즉

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max}SX}{K_s+S+(S^2/K_i)} \quad (4)$$

로 나타내질 수 있다. 식 (4)는 $\mu=(1/X)(dX/dt)$ 의 정의에 의해[17] 다음과 같이 전환된다.

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{1+K_s/S+K_i/S} \quad (5)$$

이와 더불어 주 탄소원에 의한 biomass energetic yield의 정의에 의해[18, 19]

$$\eta = \frac{D\Delta XV \sigma_b \gamma_b Q_o}{D\Delta SV \sigma_s \gamma_s Q_o} \quad (6)$$

과 같이 계산된다. 여기서 D는 회석률(1/h), V는 working volume(L), σ 는 weight carbon fraction, γ 는 reductance degree, Q_o 는 energy content(Kcal/available electrons)이며, subscript b와 s는 각각 균체와 기질을 의미한다. 식 (6)을 식 (3)에 대입하면 다음과 같이 된다.

$$\frac{\mu}{\eta} = \frac{\mu}{\eta_{max}} + m_1 + m_2 \quad (7)$$

여기서 η_{max} 는 maximum bioenergetic yield이며, m_1 과 m_2 는 각각 maintenance coefficient와 cometabolism coefficient이다. 이 식 (7)을 다시 정리하면,

$$\frac{1}{\eta} = \frac{1}{\eta_{max}} + \frac{m_1+m_2}{\mu} \quad (8)$$

로서 이 식을 Form I으로 정의하며, 양변을 μ 로 곱한 식을 Form II로 정한다[19]. 따라서 식 (8)로부터 m_1 과 m_2 의 합을 구할 수 있으며, 사용균주인 *Pseudomonas* sp.를 glucose만으로 배양해 m_1 , 즉 main-

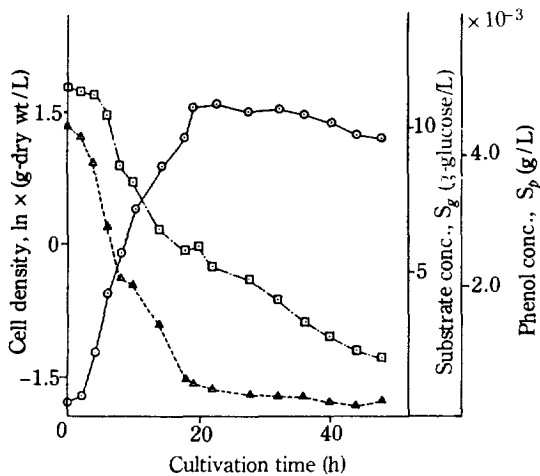


Fig. 1. Growth behavior of *Pseudomonas* sp. on two different substrates under aerobic cultivation: \circ , —, cell density, (g-dry wt/L); Δ , —, glucose conc. (g/L); \square , —, phenol conc. (g/L).

tenance coefficient를 구할 수 있으므로 phenol 소비에 의한 cometabolism coefficient를 계산할 수 있다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 *Pseudomonas* sp.를 회분배양시키면서 시간에 따라 균체량 증가, 기질 소비 및 phenol의 소비 속도를 측정된 것이다. 배양 후 약 20시간 후에 정지기에 도달했으며, 이에 대응하게 glucose가 소비됐으며, 약 0.4 g/L 정도가 잔류하고 있는데 이는 phenol의 소비에 의해 영향을 받은 것으로 추정된다. Phenol의 소비는 배양 후 약 6시간 후부터 소비되기 시작했으며, 소비속도도 glucose에 비해 극히 낮음을 보이고 있는데, 이 현상이 기질 친화성에 의한 diauxic effect에 의해 phenol이 나중에 소비되면서 균체량의 증가에 영향을 주었는지를 확인하기 위해 phenol의 농도를 변화해 배양시킨 결과가 Fig. 2이다. 4 μ g/mL와 0.5 μ g/mL의 phenol은 양에 관계없이 균체량은 유사하게 증가했으며, 이 때 phenol 소비의 lag 기간이 다른 농도에 비해 짧았다. 특히 20 μ g/mL의 경우 최대 균체증식이 이루어졌으나, 대수 증식기에서의 소비속도는 0.5와 4 μ g/mL의 경우보다 느렸다. 이는 저농도에서의 phenol은 균체성장의 기질로 작용하지 못하며, 고농도로 존재하는 경우는 주 유기탄소원(glucose)이 소

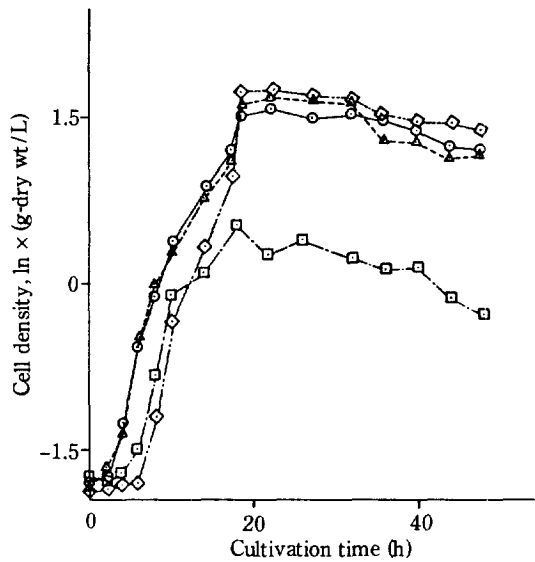


Fig. 2. Effect of initial phenol concentrations on cell growth under aerobic batch cultivation with 9.8 g/L of initial glucose concentration: Δ , —, 0.5 μ g/mL of initial phenol conc.; \circ , —, 4 μ g/mL; \diamond , —, 20 μ g/mL; \square , —, 50 μ g/mL.

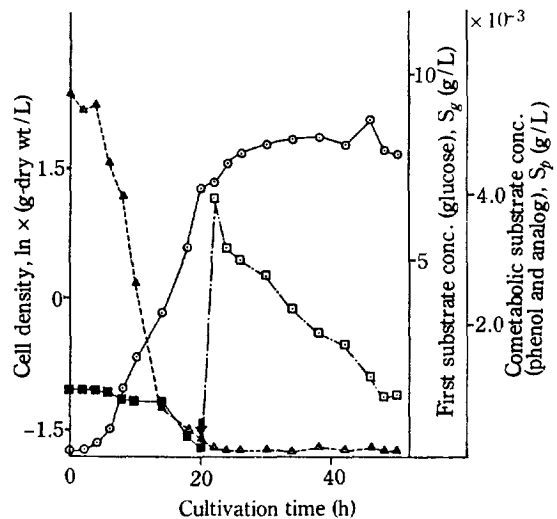


Fig. 3. Effect of initially feeding phenol analog on cell growth and glucose consumption rates under batch operation. An arrow indicates the point of adding 4 μ g/mL of phenol into the system: \circ , —, cell density (g-dry wt/L); Δ , —, glucose conc. (g/L); \blacksquare , —, phenol analog conc. (g/L); \square , —, phenol conc. (g/L).

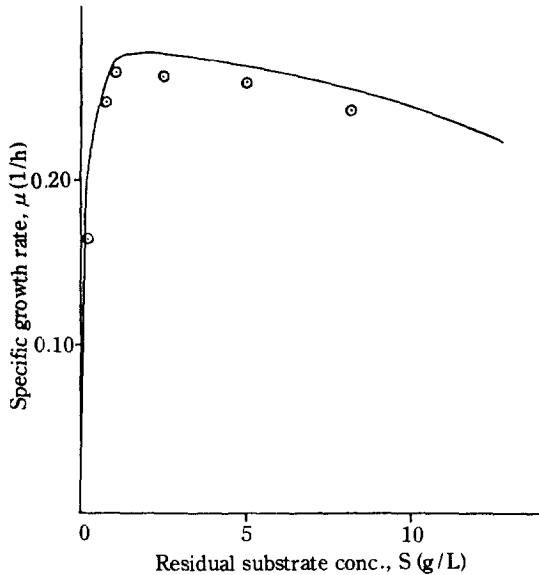


Fig. 4. Growth kinetics of *Pseudomonas* sp. for chemostat cultivation on glucose as carbon and energy source. Solid line is the result of fitting to Eq. (5).

비된 후 균체가 phenol 유사체에 적응이 되어 phenol의 분해능이 향상되었기 때문인 것으로 추정된다. 하지만 phenol의 양이 $50 \mu\text{g/mL}$ 의 경우는 *Pseudomonas*의 분해한계농도를 초과해 균체생육을 저해하고 있다.

Fig. 3은 배양초기에 *Pseudomonas* sp.가 분해할 수 있는 phenol 유사체인 $1 \mu\text{g/mL}$ 의 m-cresol에 배양한 후[20] 약 20시간 후 주 기질이 거의 다 소비됐을 때, Fig. 2로부터 cometabolism이 일어나는 농도인 $4 \mu\text{g/mL}$ 의 phenol을 첨가시킨 결과다. Fig. 1과 2에 비교해 phenol의 소비속도가 증가했으며(Fig. 1과 2에서는 약 50시간 동안 phenol이 분해됐지만 Fig. 3에서는 30시간만에 소비됐음) 이를 확인하기 위해 비 phenol 분해속도(specific phenol consumption rate, Q_p)를 계산한 결과 Fig. 3에서 phenol 첨가 후 약 20시간 동안의 소비속도가 $6.06 \times 10^{-4} (\text{g-phenol/g-cell/h})$ 이며, Fig. 1에서는 동 기간 동안 약 2.23×10^{-4} 로 phenol 유사체를 첨가하는 것이 phenol의 분해속도를 증가시켰음을 입증하고 있다. 또한 전체 균체량의 증가도 있으며 정지기의 지속적인 유지가 가능했다. 이는 phenol 유사체에 의한 phenol 분해경로 및 효소의 유도에 의한 균체량의 증가가 있었기 때문으로 추정된다.

Fig. 4는 저농도의 phenol($4 \mu\text{g/mL}$)이 존재할 때,

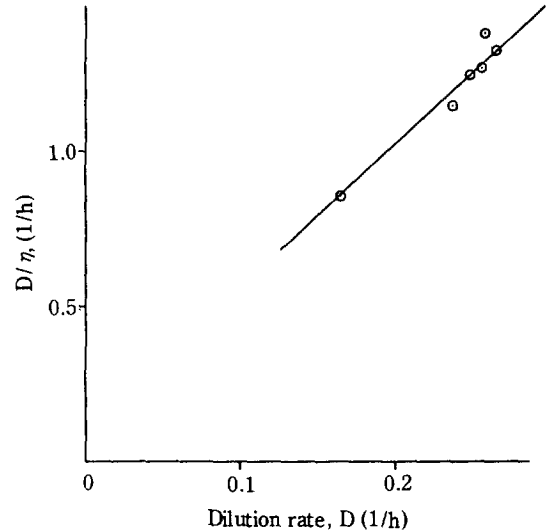


Fig. 5. Correlation between specific growth rate and bioenergetic yield for the growth of *Pseudomonas* sp. by modifying Eq. (7) as Form II. Solid line is the result of linear regression analysis.

식 (5)의 타당성 및 cometabolism process를 확인하기 위해, 주 유기탄소원인 glucose를 성장제한요소로 연속배양시킨 결과다. 이 때 phenol이 제이의 탄소원으로 작용한다면 Fig. 4와 같은 기질저해현상과는 다른 두 개의 탄소원에 의한 mixed 형태의 성장곡선을 나타낼 것이다. 곡선은 원형으로 표시된 자료를 식 (5)에 least square 방법으로 비직선 회귀분석한 결과로, 상관계수가 약 0.84로 잘 적용됨을 알 수 있다. 이 때 식 (5)의 변수들, 즉 최대 비성장속도, μ_{max} 는 $0.291 (1/h)$, half-saturation constant, K_s 는 $0.058 (\text{g/L})$, inhibition constant, K_i 는 $0.017 (\text{g/L})$ 로 계산됐다. 또한 이 경우 적은 잔류 기질농도에서, 매우 낮은 maintenance energy 상태로 유지됨을 알 수 있다. 실제 *Pseudomonas* sp.를 glucose와 naphthalene에 배양해 maintenance coefficient, m_1 을 계산해 본 결과 $0.00357 (1/h)$ 였으며 [9], 이 때 최대 비성장속도는 $0.283 (1/h)$ 였다.

Fig. 5는 폐수내 존재하는 phenol이 cometabolic substrate로 작용할 경우, 이 때 phenol의 cometabolism coefficient를 계산하기 위해, biomass energetic yield model[19]을 적용한 식 (7)을 도식화한 것이다. 식 (7)과 (8)은 균체성장시 체외 생성물이 없다고 가정한 것으로, Fig. 5의 절편값이 m_1 과 m_2 의 합

으로 약 0.1061 (1/h)다. 이는 maintenance 와 cometabolism 이 동시에 고려된 수치로, phenol 이 없는 상태에서 배양해 m_1 값을 산출해 위 수치에서 빼면 순수 cometabolism coefficient 를 알 수 있을 것이다. Fig. 4 에서 나타났듯이 이 process 는 낮은 maintenance energy 를 갖고 있으므로, 본 실험에서 사용한 유사균주를 배양해 얻은 maintenance coefficient 값인 0.00357 (1/h) 를 고려한다면, cometabolism coefficient 는 약 0.1025 (1/h) 로 계산될 수 있을 것이다. 이같이 식 (7)의 적용에는 maintenance term, m_1 을 따로 계산해야 하는 문제점이 따르기도 한다. 또한 Fig. 5 의 직선의 기울기로부터 maximum bioenergetic yield, η_{max} 는 약 0.583 으로 계산됐다. 이는 일반 미생물의 최대 수율보다는 약간 낮은 수치다[21]. 본 실험에서 낮은 희석률에서의 자료가 없어 식 (7)의 적용에 어려운 점이 있었는데, 낮은 희석률에서의 자료가 보강된다면 보다 정확히 식 (7)과 (8)의 타당성을 입증할 수 있을 것이다.

4. 결 론

폐수내 존재하는 toxic wastes 의 하나인 phenol 의 생물학적 분해가 일어나는 현상을 설명하기 위해, 낮은 농도의 제이의 기질이 존재할 때 일어나는 cometabolism process 를 *Pseudomonas* sp.의 생육에 적용시켜 본 결과 잘 적용됨을 알 수 있었으며, 이는 실제 폐수처리시 일어나는 현상과 유사할 것으로 평가됐다. 특히 미생물이 분해할 수 있는 phenol 유사체로 미리 배양시킨 후 phenol 을 첨가한 경우, phenol 의 분해속도 및 생육 균체량이 증가됨을 알 수 있어, 폐수 처리공정시 phenol 분해능 향상에 응용될 수 있을 것이다. 고농도의 phenol (50 $\mu\text{g/mL}$)은 생육을 저해했으며, 수율 model 을 이용해 균체의 phenol 에 대한 cometabolism coefficient 를 측정할 수 있었다.

NOMENCLATURE

B	: population density [g/L]
D	: dilution rate [1/h]
K_m	: half-saturation constant [g/L]
K_i	: inhibition constant [g/L]
K_s	: substrate saturation constant [g/L]
S	: substrate concentration [g/L]
t	: cultivation time [h]
V	: working volume [L]

V_{max}	: maximum growth rate [1/h]
X	: cell concentration [g-dry cell/L]
Y_s	: growth yield on glucose
Y_{max}	: maximum growth yield
μ_{max}	: maximum specific growth yield [1/h]
η	: bioenergetic yield
σ	: weight carbon fraction
γ	: reductance degree of biomass, b and substrate, s
Q_o	: energy contents [Kcal/e.q. avail. electrons]

REFERENCES

1. Hansch, L.A. and Elkins, D.: *Chemical Rev.*, **71**, 601 (1971).
2. Howard, P.H. and Durkin, P.: "Sources of Contamination, Ambient Levels, and Fate of Benzene in the Environment", EPA report 560/5-75-005, Washington, DC. (1975).
3. Pawlowski, L., Klepacka, B. and Zalewski, R.: *Water Res.*, **5**, 1153 (1981).
4. Ghosal, D., You, I., Chatterjee, D.K. and Chakrabarty, A.M.: *Science*, **238**, 135 (1985).
5. Tong, R.M., Beck, M. and Latten, A.: *Automatica*, **16**, 659 (1980).
6. Stumm, Z.E.: *Appl. Microbio.*, **14**, 654 (1977).
7. Alexander, M.: *Science*, **211**, 132 (1981).
8. Papanostsiu, A. and Maier, W.: *Biotech. Bioeng.*, **24**, 2001 (1982).
9. Hsieh, J.H. and Wang, S.S.: *Enz. Microbiol. Tech.*, **2**, 299 (1982).
10. Dalton, H. and Stirling, D.I.: *Phil. Trans. R. Soc., London*, **297**, 481 (1982).
11. Hulbert, M.H. and Krawiec, S.: *J. Thero. Biol.*, **69**, 287 (1977).
12. Grunt, J.K. and Evans, W.C.: *Biochem. J.*, **79**, 25 (1961).
13. Kilpi, S., Backstron, V. and Korhola, M.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **18**, 1 (1983).
14. Schmidt, S.K., Simkins, S.K. and Alexander, M.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 323 (1985).
15. Pawlowsky, U. and Howell, J.A.: *Biotech. Bioeng.*, **15**, 889 (1973).
16. Edwards, V.H.: *Biotech. Bioeng.*, **12**, 679 (1970).
17. Pirt, S.J. (ed.): *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell Sci. Pub., London (1975).
18. Erickson, L.E.: *Biotech. Bioeng.*, **21**, 725 (1979).
19. Lee, H.Y., Erickson, L.E. and Yang, S.S.: *J. Fermt. Tech.*, **62**, 341 (1984).
20. Shimp, R.J. and Pfander, F.K.: *Appl. Envir. Micro.*, **49**, 394 (1985).
21. Erickson, L.E.: *Biotech. Bioeng.*, **22**, 1929 (1980).