

## Methylosinus trichosporium PP358에 의한 트리클로로에틸렌의 분해 동력학

김경태 · 황재웅\* · 강정미 · 박성훈†

부산대학교 공과대학 화학공학과

\*서울대학교 공과대학 응용화학부

(1998년 9월 12일 접수, 1999년 2월 10일 채택)

## Degradation Kinetics of Trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* PP358

Kyong-Tae Kim, Jae-Woong Hwang\*, Jeong-Mee Kang and Sunghoon Park†

Department of Chemical Engineering, Pusan National University, Pusan

\*School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul

(Received 12 September 1998; accepted 10 February 1999)

### 요 약

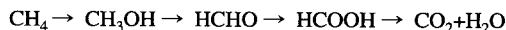
메탄자화균 *M.trichosporium* PP358을 이용하여 대표적인 난분해성 유기염소화합물인 트리클로로에틸렌(TCE)의 분해 동력학에 대한 연구를 수행하였다. 환원제로 20 mM의 formate가 첨가된 경우 TCE 분해는 Michaelis-Menten 동력학을 따랐고, 이때 최대 비분해속도( $V_{max}$ ) 및 포화상수( $K_m$ )는 각각 14.0 nmol/min · mg cell과 124  $\mu$ M로 측정되었다. 메탄과 메탄올은 TCE 분해에 경쟁방해를 하였고 각각의 저해상수( $K_i$ )는 107  $\mu$ M과 3.4 mM이었다. Formate가 환원제로 첨가되지 않은 경우 TCE 분해에 미치는 메탄과 메탄올의 영향은 좀 더 복잡한 양상을 나타내었다. 먼저 낮은 농도에서는 메탄과 메탄올의 첨가가 TCE 분해를 촉진하였으나, 고농도에서는 저해제로 작용하였다. 촉진제로 작용하는 영역에서 TCE 최대 비분해속도는 formate 첨가시 분해속도의 60%(메탄 첨가시) 및 80%(메탄올 첨가시)이었다. 메탄 및 메탄올의 첨가에 따른 복잡한 분해양상을 동력학적으로 설명하기 위해 수학적 모델을 도입하였고, 모델식은 실험값과 잘 일치함을 알 수 있었다.

**Abstract** – Degradation kinetics of trichloroethylene(TCE) by the resting-cell of the methanotroph *Methylosinus trichosporium* PP358 was studied. When 20 mM formate was present in the reaction mixture as a reducing agent, the rate of TCE degradation followed the Michaelis-Menten kinetics and the maximum specific degradation rate( $V_{max}$ ) and saturation constant ( $K_m$ ) were 14.0 nmol/min · mg cell and 124  $\mu$ M, respectively. Methane and methanol inhibited the TCE degradation in a competitive mode and their inhibition constants( $K_i$ ) were estimated to be 107  $\mu$ M and 3.4 mM, respectively. In the absence of formate, methane and methanol showed a more complex effect on the TCE degradation. At low concentrations, both substrates stimulated the degradation, while at high concentrations, they inhibited the degradation. The maximum specific degradation rate with methane or methanol was about 60 % or 80 % of the maximum specific degradation rate obtainable with added formate. Kinetic equations describing the complex effect of methane or methanol were proposed and the relevant kinetic constants were determined.

Key words : Degradation Kinetics, Trichloroethylene, *M. trichosporium* PP358

### 1. 서 론

C<sub>1</sub> 화합물인 메탄으로부터 탄소와 에너지를 얻어 자라는 미생물을 메탄자화균이라고 부른다. 이들의 중심대사는 다음과 같다.



이런 일련의 산화과정에서 에너지가 생성되며, 생체 내 탄소 골격의 합성은 포름알데히드로부터 시작된다고 알려져 있다. 위 반응 중 첫번째 반응, 즉 메탄을 메탄올로 산화시키는 반응은 특히 많은 주목을 받아왔는데, 그 이유는 메탄이 기체인데 비해 메탄올이 액체이므로 값싼 기체 연료(주로 천연가스)로부터 액체 연료인 메탄올을 생

산하는 공정의 개발에 이용될 가능성이 있고[2-4], 또한 이 반응을 촉매하는 메탄산화효소(methane monooxygenase, MMO)는 산소 및 NADH의 도움을 받아 각종 염소화 유기용매를 효과적으로 분해하기 때문이다[1, 5-7].

Trichloroethylene(TCE)을 포함한 염소계 지방족 화합물(chlorinated aliphatic hydrocarbons, CAHs)은 발암물질로 알려져 있으며[8], 식수로 공급되는 지하수를 오염시키는 주범으로 생각되고 있다[9]. 이들 중 TCE의 분해는 Wilson과 Wilson[10]이 1985년에 천연가스(natural gas)와 공기의 혼합물에 노출된 soil column에서의 유산소 분해를 보고한 이래 많은 연구가 진행되고 있다. Oldenhuis 등[5]은 1986년 메탄자화균이 메탄의 산화 과정에 사용하는 효소(MMO)를 이용하여 TCE를 분해한다고 제안하였고, 그 이후 Tsien 등[6]은 배지 중에 구리가 결핍될 때 메탄자화균이 생성하는 soluble MMO(sMMO)가 TCE분

†E-mail : shpark@hyowon.pusan.ac.kr

해에 중심역할을 한다고 보고하였다. 이 sMMO는 대부분의 효소와는 달리 기질 특이성이 낮아 탄소원과 에너지원으로써 사용되는 메탄뿐만 아니라 유해 물질인 TCE 등과 같은 CAHs도 공동대사 기작(cometabolism)에 의해 분해한다고 알려져 있다[12]. 따라서 제1의 기질인 메탄과 공동대사물(cometabolite)인 CAHs 모두 MMO에 의해 분해되므로 경쟁 방해가 예상되며 이로 인해 산화속도가 감소할 것이라 예상된다[13].

지금까지 메탄산화균에 의한 TCE 분해 동력학 연구를 살펴보면, Henry와 Galic[14]은 여러 *Methylomonas*속에서 세포 내 지질저장 granule이 메탄 고갈조건에서 TCE 분해에 환원력을 공급할 수 있음을 보였고, Cohen과 McCarty[7]는 클로로포름과 TCE의 동시산화 실험에서 이들은 서로에 대해 경쟁방해 관계에 있다는 것을 확인하였다. 또한 정지기 세포에서 TCE 분해속도나 메탄소모속도는 세포 용액에 산소를 공급하는 조건에서 더욱 급격히 감소하므로 무산소 상태를 유지하는 것이 매우 중요하다고 보고하였다. 또한 Newman과 Wackett[15]은 *M. trichosporium* OB3b, *Methylococcus capsulatus*, *Methylosinus sporium* #27, *Methylosporovibrio methanica* 81Z, *Methylomonas methanica* 중 *M. methanica*를 제외한 메탄산화균은 모두 TCE를 분해하는 능력이 있으며, 분해산물로 chloral hydrate와 trichloroethanol이 생성되는 것을 밝힘으로써 TCE는 epoxide나 chloral 두 가지 경로로 분해될 수 있다고 주장하였다. 하지만 이러한 연구는 주로 TCE 분해경로에 초점이 맞추어져 있어, 실제 이들을 산업적으로 이용하는데 필요한 분해 동력학 및 관련 상수의 측정은 소홀히 다루어져 왔다.

본 연구는 메탄산화균 중에서 *Methylosinus trichosporium* PP358을 이용하여 TCE의 분해에 관한 반응속도 기작을 조사하고 이를 모사할 적절한 수학적식과 관련상수를 측정하는 것이 목표이다. *M. trichosporium* PP358은 지금까지 알려진 메탄산화균 중에서 TCE 분해속도가 가장 빠른 *M. trichosporium* OB3b의 변이주로 배양 중 구리 이온의 유무에 관계없이 항상 sMMO를 발현한다는 특징이 있다[16-17]. 우선 내부환원력(NADH) 공급체인 formate가 존재하는 조건에서 TCE 분해기작을 조사하고, 또 TCE의 경쟁방해제로 알려진 메탄이나 메탄올이 formate와 공존할 때 분해속도의 변화를 측정하였다. 아울러 formate가 존재하지 않는 조건에서도 메탄올이나 메탄이 TCE 분해속도에 미치는 영향을 조사하였다. 마지막으로 이러한 결과를 모사하는 속도식을 제안하고 매개변수들을 계산하였으며, 제안된 속도식이 실험치와 일치함을 보였다. 이러한 연구는 whole-cell에 의한 TCE 분해 기작 자체를 이해하는데 도움이 될 뿐 아니라 생물반응기 설계 시 TCE의 분해속도를 최대로 향상시키는 조건 등을 예측할 수 있는 기초적인 자료로 사용될 것이다.

## 2. 실험

### 2-1. 균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 *M. trichosporium* PP358은 미국 Texas 주립대학의 Georgiou 교수로부터 제공받았으며 균체 배양에 사용된 배지는 Higgins 무기 질산염 최소배지(Higgins nitrate minimal salt medium)로[4] 구리 이온의 농도는  $10 \mu\text{M}$ 이었다. 균체 배양은 진탕배양기(Model KMC-8480sf, Vision과학, 서울)를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도  $30^\circ\text{C}$ 에서 행하였다. 홀라스크는 300 ml용량의 가지 달린 마개 홀라스크(screw-cap flask)를 사용하였고 배양액 부피는 30 ml, 균체의 접종량은 2 ml이었다. 기체 기질(메탄과 공기)은 gas proportioner(II60648, Cole-Parmer, USA)를 통해 3:7의 비율로 섞은 후 홀라스크의 시료 채취용 가지를 통해 주입하였다.

### 2-2. 세포 농도의 측정

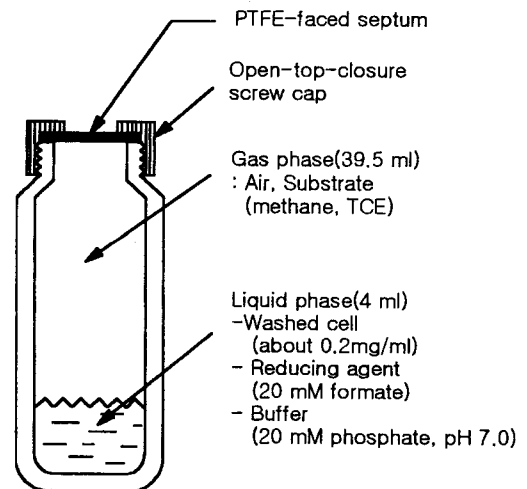


Fig. 1. 40 ml glass vial used for the measurement of TCE degradation rate.

세포농도는 분광광도계(Spectronic 20, Milton Roy Inc., USA)를 이용, 파장 660 nm에서 흡광도(Absorbance,  $A_{660}$ )를 측정하고 미리 구한 검량선으로 보정하여 결정하였다[18]. 세포농도가 낮을 때는 세포배양용 300 ml 홀라스크에 부착된 직경 11 mm 유리관을 통해 시료의 채취없이 바로 흡광도를 측정하였고, 고농도에서는 rubber septum으로 밀봉된 시료 채취용 가지를 통해 주사기로 배양액을 취한 후 회석하여 10 mm cuvette으로 측정하였다.

### 2-3. TCE 분해 속도 측정

실험에 사용된 40 ml 유리병과 내용물은 Fig. 1에 나타내었다. 홀라스크에서 키운 세포를 실온에서 Eppendorf microcentrifuge(Model HST-8, 한일 기계, 인천)를 이용하여 5분간 12,000 rpm으로 원심분리 후 상등액을 버리고 40 mM 인산 완충용액( $15.3 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4 + 24.0 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7)으로 현탁하여 2 ml를 분석용 유리병에 주입한다(Formate를 배제한 실험에서는 1번의 세척을 거쳤다). 이어서 0.8 M formate용액을  $100 \mu\text{l}$  투입하고 5 mM TCE stock 용액을 70-1,000  $\mu\text{l}$  투입한 후 전체 용액의 부피가 4 ml이 되게 3차 증류수를 넣어(이로 인해 인산 완충액은 2배 희석되고, formate는 40배 희석되어 두 경우 다 20 mM의 농도가 된다) 평형 후 액상의 TCE 농도가 3-200  $\mu\text{M}$ 이 되도록 하였다. 5 mM TCE stock은 40 ml 갈색 유리병(정확한 전체 부피는 43.5 ml)에 head space 없이 0.1 mM HCl 용액으로 TCE 원액을 희석하여 PTFE-faced rubber septum으로 밀봉한 후 vortex하여 제조하였다. 메탄 첨가시에는 gas syringe를 이용하여 주입하고 그 농도는 GC로 분석하였고 분석전에 반응이 일어나는 것을 방지하기 위해서는 기질로 사용되는 TCE나 메탄 및 메탄올은 다른 성분들을 넣은 후 제일 나중에 첨가하고 진탕 전에는 분석용 vial을 항상 얼음통에 넣어  $0^\circ\text{C}$ 로 유지하였다. TCE 분해 반응은  $30^\circ\text{C}$ 의 진탕수조(Model SWB 02, JEIO TECH, 서울)에서 분당 180 회 왕복시키면서 500  $\mu\text{l}$  gas syringe로 rubber septum을 통하여 200-400  $\mu\text{l}$ 의 gas sample을 채취하여 불꽃이온검출기(FID)가 장착된 가스 크로마토그래프(Hewlett Packard 5890, U.S.A.)로 분석하였다. TCE 분석에 사용된 관은 직경 1/8 inch에 길이가 6 ft인 stainless steel 관으로 0.1% AT 1000을 담지한 80/100 mesh의 graphac C 분말(Alltech Inc., U.S.A.)로 충전시켰다. 오븐, 검출기 및 주입부의 온도는  $150^\circ\text{C}$ ,  $190^\circ\text{C}$ ,  $170^\circ\text{C}$ 였으며 운반기체로는 질소 30 ml/min을 사용하였다(체류시간: 1.5-2 min). 한편, 기상 내 메탄의 농도는 porapak Q(Alltech, U.S.A.)를 담지한 6 ft인 stainless steel 관을 이용하여 가스

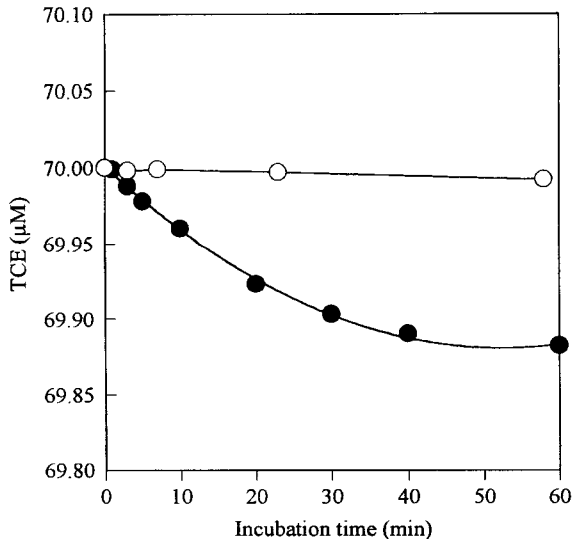


Fig. 2. TCE degradation(●) by *M. trichosporium* PP358. No degradation (○) was observed without cells.

크로마토그래프(680 D, 영인과학, 서울)의 열전도 검출기(TCD)로 분석하였다. 이때 오븐, 검출기 및 주입부의 온도는 40 °C, 80 °C, 80 °C였으며 운반기체로는 헬륨 30 ml/min을 사용하였다(체류시간: 0.5-0.6 min).

### 3. 결과 및 토의

#### 3-1. 진탕시간 및 세포농도의 영향

Fig. 2는 sMMO를 갖는 균체에 있어서 진탕시간에 따른 TCE의 분해 profile을 보여준다. Control과 비교하여 TCE의 분해정도를 확인할 수 있었다. 진탕시간이 증가함에 따라 분해속도가 점차 감소하는데 이는 TCE가 분해됨에 따라 생성되는 중간산물의 독성과 탄소원이 없는 상태에서의 배양 및 효소자체 활성의 감소가 원인이라 생각된다[18]. 따라서 TCE의 최대분해속도를 얻기 위해서는 진탕을 시작

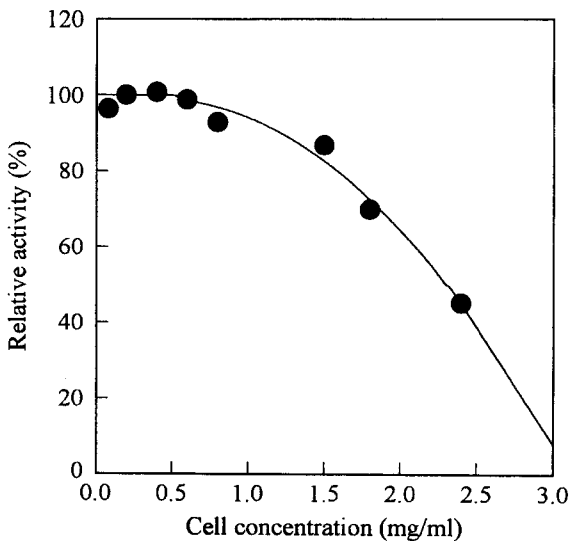


Fig. 3. Effect of cell concentration on the relative TCE degradation rate. Relative activity is the % activity calculated from the maximum degradation rate(2.0 nmol/min · mg cell) at the cell concentration below 0.5 mg cell/ml.

한 후 20-30분 이내에 실험을 마쳐야 함을 알 수 있었다.

반응물 내의 세포농도가 TCE 비분해속도에 미치는 영향을 Fig. 3에 나타내었다. 1.5 mg/ml 이상에서 세포농도의 증가에 따라 TCE 비분해속도가 감소하는 것은 기체기질인 산소 등의 물질전달 저항때문으로 여겨진다. 즉 세포농도가 낮은 범위에서는 유리병 내의 TCE 분해속도가 반응속도에 의해 제한되지만(reaction rate limited), 세포농도가 너무 높을 경우에는 물질전달에 의해 제한된다는 뜻이다(mass-transfer limited). 이러한 결과는 강 등[19]의 연구결과에서 프로필렌을 이용한 MMO activity 측정시 2.0 mg/ml에서 기체기질인 산소 등의 물질전달 저항에 의해 activity가 감소되는 결과와 유사하다. 본 연구의 목적을 고려할 때 최대분해속도를 얻기 위해 반응액 내의 세포농도를 낮추는 것이 좋지만, 세포농도가 너무 낮을 경우 고농도의 TCE 분해실험시 TCE 분해량이 너무 적어 실험의 재현성이 떨어지므로 적정 세포 농도를 0.2-0.6 mg/ml로 선택하였다. 만일 본 실험에 사용한 유리병과 다른 유리병을 사용하거나 진탕수조에서의 왕복운동속도를 변화시키면(재료 및 방법참조), 적정 세포농도가 증가될 수 있으나 본 연구에서는 40 ml vial이 다루기 편리하고 실험에 사용된 조건에서 실험값의 재현성이 좋았으므로 다른 조건을 시도해 보지는 않았다.

#### 3-2. TCE 분해속도론

TCE의 농도에 따른 분해속도를 Fig. 4에 나타내었다. 분해속도는

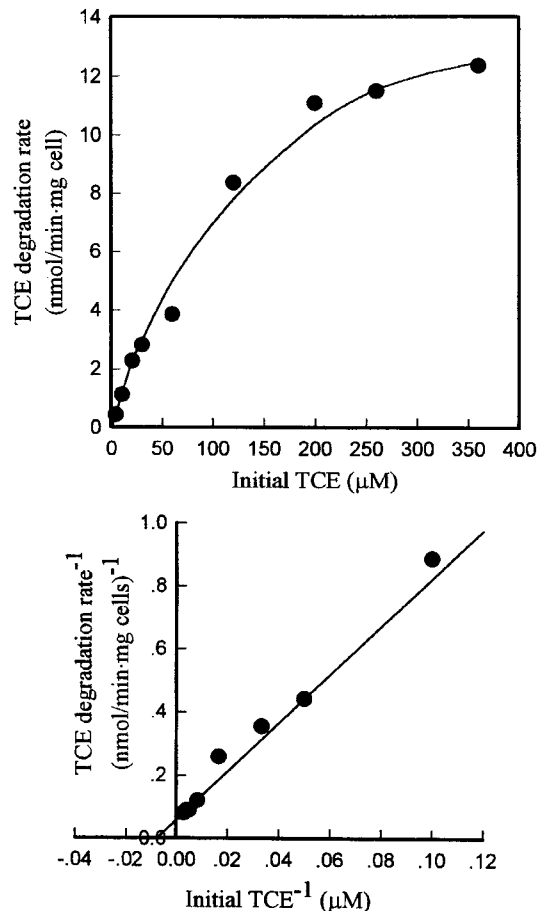


Fig. 4. Effect of TCE concentration on its degradation rate(A) and Lineweaver-Burke plot for the determination of kinetic parameter (B). The solid line in (A) is calculation from Michaelis-Menten equation.

Table 1. Kinetic constants of TCE degradation by *Methylosinus trichosporium* PP358

Parameters	Symbols	Values
Maximum specific degradation rate	$V_{max}$ (with formate)	14.0
(nmol TCE/min · mg cell)	$V_{max}$ (without formate)	4.5
Half saturation constant	$K_m$	124
( $\mu$ M TCE)		
Inhibition constant( $\mu$ M)	$K_i$ (methane)	107
	$K_i$ (methanol)	3400
Stimulation constant(min · mg cell/	$k$ (methane)	$1.0 \times 10^{-3}$
nmol TCE · $\mu$ M inhibitor)	$k$ (methanol)	0.67

TCE의 농도가 낮을 때는 선형적으로 증가하지만 높을 때는 점차 감소하여 점진적으로 최대치에 도달하는 경향이므로 미생물 반응에서 잘 알려진 속도식인 Michaelis-Menten 식[식 (1)]을 적용하였다.

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_m + S} \quad (1)$$

여기서  $V_{max}$ ,  $K_m$ 은 각각 최대분해속도 및 포화상수(saturation constant)이고  $S$ 는 TCE 농도이다. 식 (1) 양변의 역수를 취하면 식 (2)가 얻어지고, 이를 도시하면(Lineweaver-Burke plot) 기울기  $K_m/V_{max}$  및 y절편  $1/V_{max}$ 로부터  $V_{max}$ 와  $K_m$ 을 얻을 수 있다.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

$V_{max}$ 와  $K_m$ 은 각각 14.0 nmol/min · mg cell, 124  $\mu$ M이 얻어졌고 (Table 1), 상관계수(correlation coefficient,  $r$ )는 0.9950이었다. Fig. 4에서 점은 실험값을, 실선은 이론값을 나타낸다. 본 실험의  $V_{max}$ 와  $K_m$ 은 몇몇 문헌치와 비교가 가능하다. 야생균주인 *M. trichosporium* OB3b를 이용한 Taylor와 Hanna[20]의 경우  $V_{max}$ =82 nmol/min · mg cell,  $K_m$ =104  $\mu$ M이라고 보고하였고, Oldenhuis 등[11]은 동일한 균주를 이용한 실험에서  $V_{max}$ =290 nmol/min · mg cell,  $K_m$ =145  $\mu$ M이라고 보고하였는데, 본 실험과  $K_m$  값은 거의 비슷하지만  $V_{max}$ 는 다소 차이를 보인다. 하지만 이러한 차이는 야생균주와 변이주의 차이에 기인하는 것으로 판단된다.

### 3.3. TCE 분해에 미치는 메탄의 영향

메탄이 TCE 분해에 대해 경쟁방해기작을 보인다는 것은 여러 문헌 [20, 21]에 보고되고 있다. 그러나 Speitel 등[21]이 TCE 분해속도의 TCE 농도 의존성을 1차 반응으로 가정하고 좁은 TCE 농도범위에서 방해상수를 계산한 것 외에는 정량적으로 방해기작을 연구한 예는 없다. 이에 본 연구에서는 보다 넓은 TCE 농도범위에서 메탄의 저해정도를 조사하고 Michaelis-Menten kinetic model을 사용하여 메탄의 저해상수( $K_i$ )를 측정하고자 하였다.

Formate가 존재할 때 메탄이 TCE 분해에 미치는 영향을 Fig. 5에 나타내었다. 메탄의 유무에 상관없이 Michaelis-Menten kinetic model (그림에서 실선)을 잘 만족함을 알 수 있었고, 상관계수는 메탄을 첨가하지 않은 경우 0.9950, 54  $\mu$ M 메탄의 경우 0.9920, 그리고 132  $\mu$ M 메탄의 경우 0.9933이었다. 메탄의 농도가 커질수록  $K_m$ 은 커지는 반면  $V_{max}$ 는 거의 일정한 값을 가짐을 알 수 있었다. 이러한 현상은 경쟁방해기작의 전형적인 특성으로 Lineweaver-Burke plot(Fig. 5(B))에서 더욱 자세히 나타난다. 즉 메탄의 농도가 증가할수록 직선의 기울기는 커지지만 y절편은 거의 동일하였고, 아래의 식 (3)[22]에 의해  $K_i$ =107  $\mu$ M로 얻어졌다(Table 1).

화학공학 제37권 제3호 1999년 6월

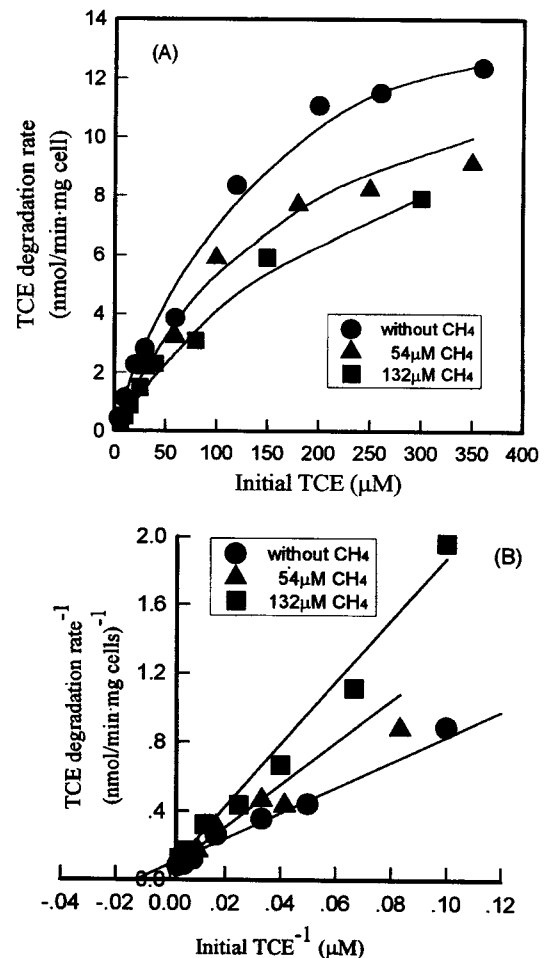


Fig. 5. Effect of methane concentration on TCE degradation in the presence of 20 mM formate (A) and Lineweaver-Burke plot for the determination of kinetic parameters (B). In (A), symbols represent experimental data and solid lines represent calculated values by using Eq. (3).

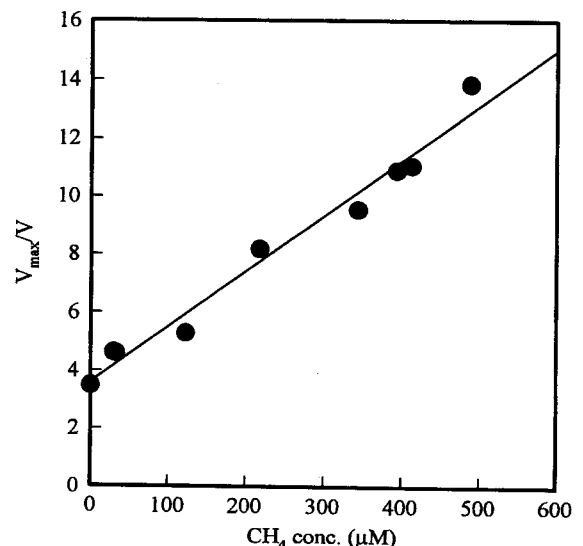


Fig. 6. Effect of  $CH_4$  concentration on TCE degradation rate in the presence of 20 mM formate.  $V_{max}/V$  is plotted against methane concentration(Dixon plot) at 68  $\mu$ M TCE and 0.19 mg cell/ml. Inhibition constant( $K_i$ ) was determined as 107  $\mu$ M according to Eq. (4).

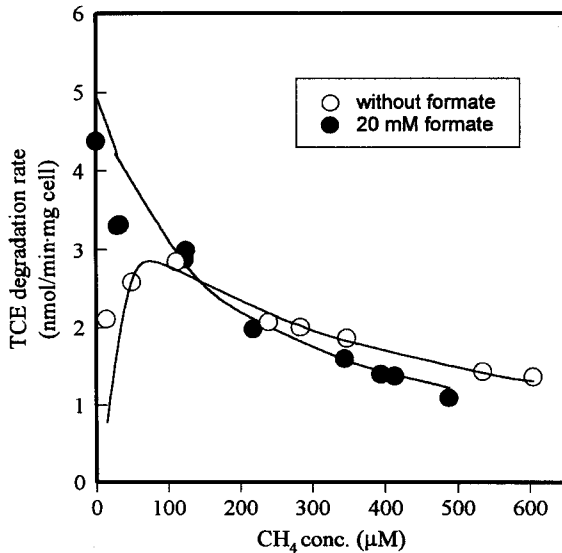


Fig. 7. Effect of methane concentration on TCE degradation in the presence and absence of formate. Symbols represent experimental data and solid lines represent calculated values by using Eq. (3)(without formate) and Eq. (6)(with formate).

$$V = \frac{V_{max} \cdot S}{K_{m,app} + S}; K_{m,app} = K_m \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) \quad (3)$$

Fig. 5의 결과를 재확인하기 위해 TCE의 농도는 60  $\mu\text{M}$ 로 고정하고 메탄의 농도를 0-600  $\mu\text{M}$ 로 변화시키며 TCE 분해 속도를 조사하였다(Fig. 6). 이 때는 Eq. (4)[23]를 이용하여  $K_i$ 를 구할 수 있으며,  $K_i$ 는 107  $\mu\text{M}$ 로 Eq. (3)을 이용하여 구한 값과 같았다.

$$\frac{V_{max}}{V} = \left(\frac{K_m}{S} + 1\right) + \frac{K_m}{K_i} \cdot I \quad (4)$$

환경제로 작용하는 formate를 첨가하지 않았을 경우에 대해서도 앞서와 비슷한 방법으로 TCE 분해 실험을 행하였다(Fig. 7). 그 결과 앞서 formate를 첨가했을 경우와는 매우 다른 양상을 볼 수 있었다. 즉 20 mM formate를 첨가하였을 경우에는 메탄의 농도가 증가할 때  $V_{max}$ 는 변하지 않고  $K_{m,app}$ 만 증가했는데, formate를 첨가하지 않았을 경우에는 메탄의 증가에 따라  $V_{max}$ 도 변화하였으며 메탄이 저해작용 뿐만 아니라 낮은 농도에서는 오히려 분해 촉진 작용도 하는 것으로 관찰되었다.  $V_{max}$ 는 온도, pH, 세포 내 NADH 농도 등의 함수이나 실험 시에 온도와 pH는 각각 30  $^{\circ}\text{C}$ , 7.0으로 유지하였으므로, 이러한  $V_{max}$ 의 증가는 메탄의 대사에 따른 세포 내의 NADH 증가로 예상된다[4]. 메탄의 첨가에 따른  $V_{max}$ 의 변화는 다음 식으로 표현이 가능하였다.

$$V_{max,app} = V_{max,o} - \frac{1}{k \cdot M + \frac{1}{V_{max,o} - V_o}} \quad (5)$$

여기서  $V_{max,o}$ 는 최대 도달할 수 있는 TCE의 분해속도, 즉 formate를 첨가하였을 경우의  $V_{max}$ 이고, M은 메탄 농도, k는 곡선을 맞추기 위한 촉진상수(stimulation constant)로 값이 클수록 메탄에 의한 속도 촉진효과가 크게 된다.  $V_o$ 는 formate와 메탄이 없을 때의 TCE 분해속도이다. 이 식은  $V_{max,app}$ 가 메탄이 없을 때  $V_o$ 로, 메탄이 무한히 많을 때  $V_{max,o}$ 로 수렴하는 조건을 만족시킨다. 이 식을 식 (3)과 결합하면 다음과 같다.

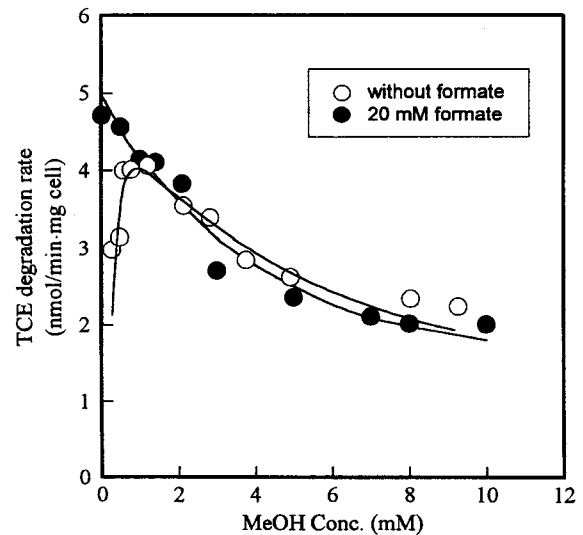


Fig. 8. Effect of methanol concentration on TCE degradation in the presence and absence of formate. Symbols represent experimental data and solid lines represent calculated values by using Eq. (3)(without formate) and Eq. (6)(with formate).

$$V = \frac{\left[ V_{max,o} - \frac{1}{k \cdot M + \frac{1}{V_{max,o} - V_o}} \right] \cdot S}{K_m \left(1 + \frac{M}{K_i}\right) + S} \quad (6)$$

Sigma Plot 3.0(Jandel Co., U.S.A.)의 nonlinear regression 방법을 이용하여 구한  $K_i$  및 k는 각각 108  $\mu\text{M}$   $\text{CH}_4$ ,  $1.0 \times 10^{-3} \text{ min} \cdot \text{mg cell/nmol TCE} \cdot \mu\text{M CH}_4$ 이었고, 상관계수는 0.707이었다. 식 (6)을 통해 계산된 이론값은 Fig. 7에 실선으로 나타내었다. Formate를 첨가하지 않았을 경우 TCE의 최대 분해속도는 약 70  $\mu\text{M}$   $\text{CH}_4$ 에서 관찰되었고, 이 값은 formate를 첨가했을 경우에 비해 약 60% 정도였으나 메탄이 전혀 첨가되지 않은 경우와 비교해 볼 때는 1.5배 이상 높았다. 메탄농도가 낮은 영역에서 식 (6)에 의해 계산된 이론값과 실험값 사이의 오차가 크게 나타나는데, 이는 저농도 메탄 영역에서 TCE 분해속도가 낮기 때문에 분석상의 문제가 있었고, 또한 내부 NADH 농도가 배양조건에 따라 변할 수 있기 때문인 것으로 판단된다.

### 3-4. TCE 분해에 미치는 메탄올의 영향

Fig. 8에서는 메탄올의 첨가가 TCE 분해속도에 미치는 영향을 나타내었다. 점은 실험값이고 실선은 식 (6)을 이용한 이론값이며, 상관계수는 formate를 첨가한 경우 0.9865, formate를 첨가하지 않은 경우 0.9228이었다. Formate가 없을 때 메탄올의 첨가에 따라 TCE 분해속도가 증가하였다가 감소하는 경향은 전체적으로 메탄의 경우와 유사하나 0.6 mM의 메탄올을 첨가시 최대 분해속도가 formate 존재 시 관찰되는 최대 속도의 약 80%에 미치는 높은 값을 보였다는 점에서 메탄보다 분해활성 촉진 효과가 크다고 하겠다. 이 결과는 추후 보다 정밀한 실험을 필요로 하지만 메탄과 비교해 볼 때 메탄올이 MMO에 대해 친화력이 낮다는 것(즉, 경쟁 저해 정도가 약함)과 메탄이 완전 산화될 때 1개의 NADH만을 생산하는데 비해 메탄올은 2개의 NADH를 생산할 수 있다는 것과 관련이 있을 것으로 추정된다[1,18]. Nonlinear regression을 통해 구한 메탄올의 저해상수  $K_i$  및 촉진상수 k는 각각 3.4 mM, 0.67  $\text{min} \cdot \text{mg cell/nmol TCE} \cdot \mu\text{M CH}_3\text{OH}$ 이었다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 formate, 메탄, 메탄올이 TCE 분해에 미치는 영향을 정량적으로 측정하고 실험값을 잘 만족하는 수학적 모델을 제시하였다. 특히 메탄이나 메탄올이 TCE 분해의 경쟁방해제로만 작용하는 것이 아니고 일정 농도 범위에서는 분해 촉진제로 작용할 수 있음을 최초로 밝혔다. 이 결과를 토대로 TCE 분해 반응기 운전시 적정량의 메탄이나 메탄올을 첨가함으로써 분해 반응기의 효율을 향상시킬 수 있으리라 예상된다. 뿐만 아니라 경쟁방해를 제거하면서 동시에 군주의 활성을 유지하기 위해 고가의 formate를 첨가하거나 이단 반응기를 사용하는 번거로움을 줄일 수 있게 하므로 TCE 분해 반응기의 경제적인 운전에 크게 기여할 것으로 기대된다.

#### 감 사

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구비(961-0100-001-2) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

#### 사용기호

$V$	: specific TCE degradation rate [nmol/min · mg cell]
$V_{max}$	: maximum specific TCE degradation rate [nmol/min · mg cell]
$V_{max,app}$	: apparent maximum specific TCE degradation rate [nmol/min · mg cell]
$V_{max,o}$	: maximum specific TCE degradation rate with formate [nmol/min · mg cell]
$K_m$	: half saturation constant [ $\mu$ M]
$K_{m,app}$	: apparent half saturation constant [ $\mu$ M]
$K_i$	: inhibition constant [ $\mu$ M]
$S$	: substrate concentration [ $\mu$ M]
$I$	: inhibitor concentration [ $\mu$ M]
$M$	: methane or methanol concentration [ $\mu$ M]
$k$	: stimulation constant [min · mg cell/nmol TCE · $\mu$ M inhibitor]

#### 참고문헌

1. Anthony, C.: "The Biochemistry of Methylophils," Academic, New York, NY(1982).
2. Ghisalpa, O. and Henzer, F.: *Experimentia*, **38**, 218(1982).
3. DOE office of policy, planning, and analysis: Jan. Department of Energy, U.S.A.(1988).

4. Park, S. and Choo, S. R.: *Korean J. Biotech. Bioeng.*, **8**(4), 341 (1993).
5. Oldenhuis, O., Vink, R. M. J. M., Jessen, D. B. and Withalt, B.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2819(1989).
6. Tsien, H. C., Brusseau, G. A., Hanson, R. S. and Wackett, L. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 228(1991).
7. Cohen, L. A. and McCarty, P. L.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 228(1991).
8. Fan, A. M.: "Reviews of Environmental Contamination Toxicology", Springer-Verlag, New York, NY(1988).
9. Westrich, J. J., Mello, J. W. and Thomas, R. F.: *J. American Wat. Works Asso.*, **5**(5), 52(1984).
10. Wilson, J. T. and Wilson, B. H.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(1), 242(1985).
11. Oldenhuis, R., Oedzes, J. Y., van der Waarde, J. J. and Janssen, D. B.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**(1), 7(1991).
12. Oldenhuis, R., Vink, R. L. J. M., Janssen, D. B. and Witholt, B.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**(11), 2819(1989).
13. Broholm, K., Christensen, T. H. and Jensen, B. K.: *Wat. Res.*, **26**(9), 1177(1992).
14. Henry, S. M. and Galic, D. G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 236 (1991).
15. Newman, L. M. and Wackett, L. P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2399(1991).
16. Phelps, P. A., Agarward, S. K., Speitel, G. E. and Georgiou, G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(11), 3701(1992).
17. Fitch, M. W., Speitel, G. E. Jr. and Georgiou, G.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(3), 1124(1996).
18. Kang, M. S., Hwang, J. W. and Park, S.: *Korean J. Biotech. Bioeng.*, **10**(2), 212(1995).
19. Kang, J. M., Song, H. H., Kim, K. T. and Park, S.: *J. Res. Inst. Ind. Technol.*, **50**, 147(1996).
20. Taylor, R. T. and Hanna, M. L.: "Bioaugmentation for Site Remediation," Battelle press(1995).
21. Speitel, G. E. Jr., Thompson, R. C. and Weissman, D.: *Wat. Res.*, **27**(1), 15(1993).
22. Shuler, M. L. and Kargi, F.: "Bioprocess. Engineering, Basic Concepts," Prentice Hall(1992).
23. Segel, I. H.: "Biochemical Calculations," 2nd ed, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY(1968).