

Toluene Monooxygenase의 Peroxide shunting에 의한 TCE와 PCE 분해 특성

류두현, 김형수, 최용욱*, 김용미**, 이경애, 유재수, 조 현

전주대학교 과학기술부 환경시스템전공, *전주대학교 과학기술부 화학전공, ** (주)동명엔터프라이즈
(dhy@jj.ac.kr)

<요약문>

TCE and PCE, suspected carcinogens, are the most common groundwater pollutant from extensive use as a solvent and degreaser. *Escherichia coli* TGI pBSKAN TOM Green and *E. coli* TGI pBSKAN ToMO, which were used DNA shuffling technique, produce Toluene-o-monooxygenase(TOM) and toluene-o-xylene- monooxygenase(ToMO). These cells and enzymes are degrading TCE and PCE. TOM and ToMO are needed to cofactor, such as NADH, NADPH and other cofactors.

Used TCE and PCE degrading microorganisms experiment the contaminated material removal efficiency. A shunting test used NAD and Hydrogen peroxide,

key word : TCE, PCE, TOM, ToMO, shunting test, NAD, Hydrogen peroxide

1. 서론

현재 세계적으로 지하수 및 토양의 주요오염원으로 주목받고 있는 물질은 PCB, dioxins, chlorophenol 등의 염화방향족화합물과 TCE, PCE, chlorinated alkanes와 같은 휘발성 염화지방족화합물 등이 있다. 이들 중 TCP와 PCE는 드라이클리닝, 금속, 기계, 전자 및 화학 등 여러 산업분야에 광범위하게 사용되어 왔으나, 관리·보관시설로부터의 누출 등으로 인하여 토양 및 지하수 등이 많이 오염되어 있는 현실이다. 국내에서도 전국적으로 실시된 폐기물 매립지 주변(260곳)의 지하수에서 TCE와 PCE의 경우 각각 83.04mg/L, 0.24mg/L 까지 검출되었고, 그 오염도가 점차 증가하고 있음을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서는 DNA shuffling을 통하여 산화효소를 발현하는 미생물을 이용하여 TCE, PCE를 분해하는 정도를 알아보고, 이 미생물에 의하여 생산된 toluene monooxygenase가 효소반응을 유지하기 위하여 필요한 cofactor를 대신해 H₂O₂를 첨가했을 때의 TCE, PCE의 분해능을 알아보고, 적정 첨가량을 알아보기 위하여 실시하였다.

2. 본론

미생물의 TCE, PCE의 분해능을 알아보기 위하여 지방족 염화유기탄소의 분해능이 개선시키기 위해 DNA shuffling을 통하여 얻어진 *Escherichia coli TGI pBSKAN Tom*과 *E. coli TGI pBSKAN ToMo*를 kanamycin에 대한 내성이 생기도록 LB 배지에 첨가한 후, 37°C, 170rpm에서 overnight(16~18hr) 배양하여 이를 각각 OD₆₀₀에서 0.7, 1.5, 3이 되도록 조절하였다. OD₆₀₀의 조절은 pH 7.0, 0.1M phosphate buffer를 이용하여 4°C, 8,000rpm, 10min동안 원심분리를 3회 실시하여 잔류배양액을 세척하였다. OD₆₀₀에 대한 미생물 세포의 농도는 LB agar plate에 희석한천평판배양법을 이용하여 미생물의 colony를 계수하였다.

Cofactor에 대한 오염물질의 제거율을 알아보기 위하여 위의 두 미생물을 sonication 등에 의한 세포의 파괴로 얻어진 crude enzyme에 cofactor로 작용할 수 있는 NAD(sigma, USA)와 H₂O₂(showa, Japan)의 농도 변화를 주어 첨가하였다. 산화효소의 TCE, PCE의 제거율을 알아보기 위하여 NAD와 H₂O₂를 실험 대상 농도가 되도록 한 후 최종 실험 용액의 부피가 10mL가 되도록 60mL 부피의 serum vial에 첨가한 후 테프론으로 코팅된 실리콘 셉텀(septum)과 알루미늄 seal을 이용하여 밀봉한 후 TCE와 PCE를 실험 용량의 대해 200uM이 되도록 첨가하여 기밀된 serum vial을 37°C, 170rpm으로 overnight 동안 접촉시켰다. 이후 serum vial 내의 기상 오염물질을 gas tight syringe를 이용하여 GC-FID(Shimadzu, GC-17A AFW, Japan)로 분석하였다. TCE 및 PCE의 GC 분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. The analytical condition of GC for the measurement of TCE, PCE

GC model	Shimadzu GC-17A AFW		Temperature
Column	DB-1	Column	160
Detector	FID	Injector	200
Injection volume[μL]	50μL	Detector	250

산화효소의 첨가량에 따른 오염물질의 제거율을 알아보기 위하여 위 실험에서 선정된 H₂O₂의 적정 농도를 첨가한 후 각 산화효소의 농도를 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%가 되도록 첨가한 후 최종 용량을 10mL가 되도록 하여 60mL serum vial에 첨가한 후 cofactor 첨가에 따른 오염물질의 제거율 실험방법과 동일하게 진행하였다.

3. 결론

실험에 사용한 두 균주의 TCE와 PCE에 대한 오염물질 제거율을 알아본 결과 *E. coli TGI pBSKAN TOM Green*에 의한 TCE의 제거율은 실험 초기에 주입한 미생물 개체수가 증가할수록 높은 제거율을 보였는데 4.93 X 10⁹CFU/mL로 주입하였을 때가 제거율이 97%로 가장 높았고, PCE의 제거율은 10 ~ 13% 정도로 적게 제거되었다. 또다른 실험 미생물인 *E. coli TGI pBSKAN ToMO*의 경우는 미생물 개체수를 7.5 X 10⁷ CFU/mL에서 4.92 X 10⁹CFU/mL까지 증가시켜 제거율을 확인하였으나 TCE는 5 ~ 14.3%, PCE의 경우 10 ~ 13.5%가 제거되었다.

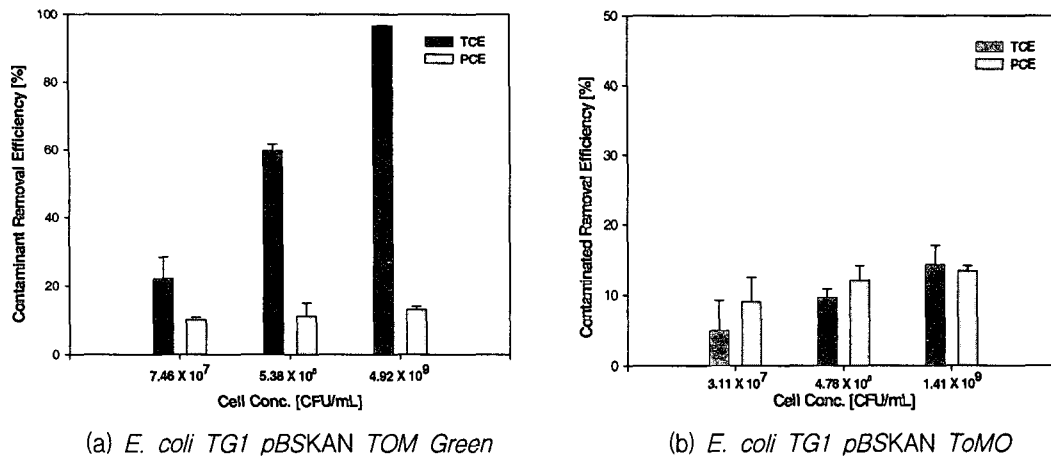


Fig. 1. Comparison of contaminant removal efficiency of *E. coli* TG1 pBSKAN TOM Green with *E. coli* TG1 pBSKAN ToMO

산화효소의 활성을 유지할 수 있도록 첨가하는 cofactor로서 NAD와 H₂O₂를 서로 비교하고 최적의 농도를 설정하기 위하여 행한 실험의 결과를 Fig. 2에 나타내었다. TCE의 제거율은 TOM에 첨가한 NAD 800uM에서 가장 높은 23%의 제거율을 나타냈고, PCE의 경우 ToMO에 첨가한 H₂O₂ 40mM에서 가장 높은 제거율 25.2%를 보였다. 그러나 TCE와 PCE를 동시에 제거하기 위한 처리 공정을 위한 적절한 cofactor 및 주입 농도는 H₂O₂ 120mM일 때가 가장 효과적일 것으로 판단된다.

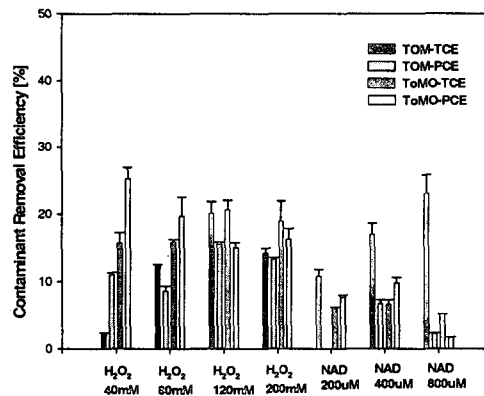
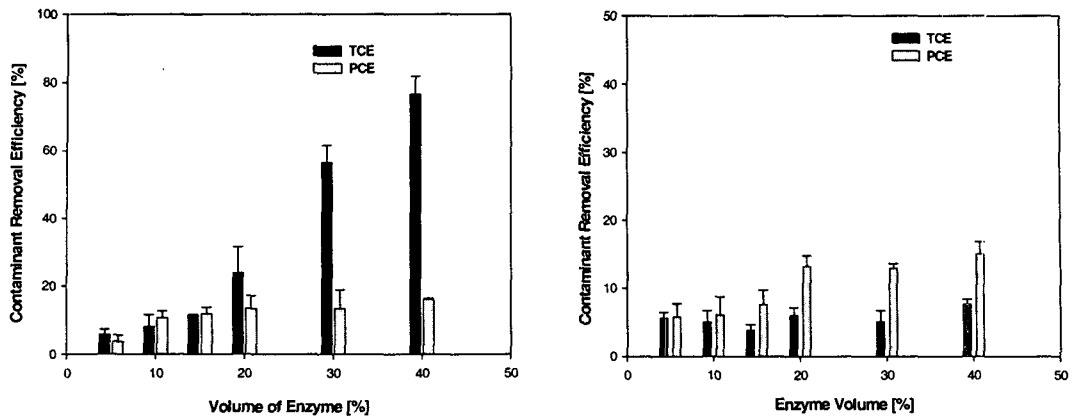


Fig. 2. Comparison of contaminant removal efficiency of various cofactors and concentration

산화효소의 첨가량에 따른 오염물질의 제거율 실험을 실시한 결과 TCE 제거를 위해 첨가한 TOM의 경우 40%[v/v]로 첨가한 경우 76.6%까지 TCE가 제거되었다. 그러나 PCE의 경우 20%[v/v]를 첨가하였을 경우 13.4%, 40%[v/v]를 첨가하였을 때 16%까지 제거되었다. ToMO의 경우 TCE의 제거율을 10% 미만으로 거의 분해되지 않았으며, PCE의 경우 20%[v/v] 주입시 13%의 제거율을 나타내었다.



(a) *E. coli* TG1 pBSKAN TOM Green

(b) *E. coli* TG1 pBSKAN ToMO

Fig. 3. Comparison of contaminant removal efficiency of various enzyme volume

위의 결과로 볼 때 수중에 오염된 TCE 및 PCE의 제거를 위해 미생물을 이용할 경우 TCE는 10^9 CFU/mL 이상을 유지해야 할 것으로 보이며, 산화효소를 이용한 TCE 및 PCE 제거시 H_2O_2 를 cofactor로 하여 산화효소와 같이 첨가하여 처리하는 것이 바람직 할 것으로 판단된다.

4. 참고문헌

- 1) 류두현, 김용미, 목지예, 최상일, Thomas Wood, "Shuffled toluene-o-xylene monooxygenase를 이용한 TCE 측정용 fluorescence biosensor", 한국지하수토양환경학회 추계학술발표대회, 2003.

5. 감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었음.