

## 미생물 생촉매를 이용한 Trichloroethylene 연속처리용 생물반응기 시스템 평가

- 총 설 -

이 은 열<sup>\*</sup>

### Evaluation of Biocatalyst and Bioreactor System for the Continuous Treatment of Trichloroethylene

Eun Yeol Lee<sup>\*</sup>

Environmental Science and Technology Research Center, Kyungshung University, Busan 608-736, Korea

#### Abstract

Microbial trichloroethylene (TCE) degradation using trickling biofilter (TBF) is a cost-effective treatment method, in which monooxygenase (MO) fortuitously transforms TCE via cometabolism. Simple TBF, however, could not be stably operated for long-term treatment of TCE due to the contradictory characteristics of cometabolism. In this paper, microbial biocatalyst and biofilm reactor system, a two-stage continuous stirred tank reactor (CSTR)/TBF system using *Burkholderia cepacia* G4 and *Methylosinus trichosporium* OB3b, are evaluated for the long-term continuous treatment of TCE. The maximum TCE elimination capacities were in the range of 28 and 525 mg TCE/l·day. The reactor systems were stably operated for more than 3~12 months.

**Key words** – *Burkholderia cepacia*, biofilm, cometabolism, *Methylosinus trichosporium*, trichloroethylene, trickling biofilter

#### 서 론

Trichloroethylene (TCE)은 용매 특성이 우수하여 공업 용 유기용매, 그리스 제거제, 드라이클리닝 제제로 널리 사용되어 왔으나, 적절한 처리 방법이 개발되지 못하여 대기, 토양 및 지하수 등 광범위한 영역에서 검출되고 있는 독성 환경오염 물질이다[2,12]. TCE 처리기술로는 활성탄을 이용하여 흡착 제거시키는 물리적 처리 방법이 있다. 이 방법은 짧은 체류시간에 효율적인 제거가 가능하나, 단순히 TCE를 활성탄으로 이동시킨 것이므로 재처리가 요구되며 높은 설비투자비가 요구된다. 소각은 고농도의 TCE를 처

리할 수 있고 처리효율이 높으나, 독성 부산물이 발생되며 초기설비비 및 운전비가 높다는 단점이 있다.

미생물을 이용한 생분해법은 TCE를 무해한 최종산물로 완전히 분해시키는 환경친화적 처리기술이다[4]. 또한, 운전비 및 설비비도 낮아 기존 기술에 대한 상업적 대체 기술로써도 중요하다. 미생물은 주로 막을 형성시켜 이용하는데, 단위 부피당 처리 효율을 높일 수 있고 shock loading에 대한 안정성도 높기 때문이다. 사용되는 생물반응기 시스템 선택에 있어서 TCE가 물에 대한 용해도가 낮으므로 contacting unit에서 효과적인 물질전달이 어려운 bioscrubber 보다는 biofilter 형태가 좋다. Biofilter 중에서도 TCE 및 독성 분해 산물로 인해 불활성화된 생물막의 재활성화를 위해 영양분을 살수시키는 trickling biofilter (TBF) 시스템이 TCE 처리에 가장 적합하다.

<sup>\*</sup>To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 82-51-620-4716, Fax: 82-51-622-4986  
E-mail : eylee@ksu.ac.kr

실제 처리에 있어서 가장 중요한 것은 연속적으로 배출되는 폐가스를 처리할 수 있어야 한다는 점이다. 그러나, 단순 TBF를 이용하는 경우 미생물막의 불활성화로 인하여 안정적인 연속분해에 한계가 있으며[11], 미생물막 재활성화를 위해 성장기질을 공급하는 경우 경쟁적 저해로 인한 TCE 분해속도 저하가 문제가 될 수 있다[3,8,13,14]. 본 논문에서는 미생물막을 이용한 TCE 처리와 관련하여 주로 사용되는 매탄자화균, *Pseudomonads* 등의 미생물 생축매와 장기간 연속처리를 위해 개발된 2단계 continuous stirred tank reactor(CSTR)/TBF 생물반응기 시스템의 특성을 실험 결과를 중심으로 분석하고, 미생물의 공동대사를 이용한 실규모의 연속적 TCE 처리 기술성을 평가하고자 한다.

### 실험 및 재료

#### 균주 및 배양조건

*B. cepacia* G4 배양 배지로는 M9 배지를 사용하였으며 [13,14], *M. trichosporium* OB3b 배양용 배지는 Higgins nitrate minimal salt medium에 구리 이온의 농도를 조정하여 사용하였다[1]. 플라스크 배양은 진탕 배양기를 이용하여 교반속도 250 rpm, 온도 30°C에서 행하였다.

TCE, phenol 농도 분석 및 toluene monooxygenase, soluble methane monooxygenase 효소 활성측정

TCE농도는 100  $\mu$ l gas-tight syringe로 30  $\mu$ l의 gas sample을 채취하여 전자포집검출기(ECD)를 이용하여 GC로 분석하였다. 가스크로마토그래프(Hewlett Packard 5890 II plus, USA)의 오븐, 검출기 및 주입구 온도는 각각 100, 200 및 250°C에서 실시하였다. Phenol 농도는 modified colorimetric assay 방법으로 결정하였고, toluene monooxygenase (TMO) 활성은 modified naphthalene oxidation assay 방법으로, soluble methane monooxygenase (sMMO) 활성은 propylene을 기질로 propylene oxide의 생성속도로 결정하였다[1].

#### 2단계 CSTR/TBF 시스템 구성 및 운전

2단계 CSTR/TBF 시스템은 TCE가 분해되는 TBF와 미생물이 재활성화되는 CSTR을 연결하여 구성하였다 (Fig. 1).[1,5]. CSTR에서 성장 및 재활성화된 미생물 배양액은

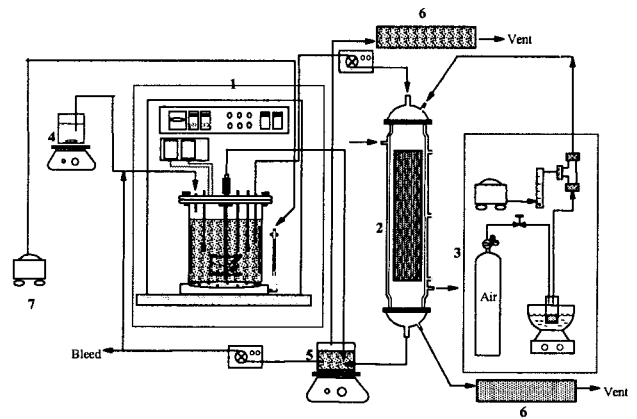


Fig. 1. Schematic diagram of the two-stage CSTR/TBF system for the continuous degradation of TCE (1, continuous stirred tank reactor; 2, trickling bio-filter; 3, trichloroethylene supply unit; 4, medium; 5, stripping unit; 6, trap; 7, air pump).

연동펌프에 의해 TBF 상단부로 공급되며, TBF에서 유출되는 세포 배양액은 다시 CSTR로 재순환되며 일부는 bleeding 하였다. 모든 반응기의 연결관은 viton tubing 및 teflon tape을 이용하여 TCE 소실을 최소화하였다.

### 결과 및 토론

#### 미생물 생축매 분해능 및 특성 평가

TCE 분해용 생축매로 가장 많이 사용되는 미생물로는 *Burkholderia cepacia* G4와 *Methylosinus trichosporium* OB3b가 있다[9]. *Burkholderia cepacia* G4와 다양한 pseudomonads 계열의 미생물들은 toluene, phenol 등을 성장기질로 제공하면 TCE 분해능이 있는 toluene monooxygenase (TMO)가 유도발현되며, TMO는 분해대사과정의 첫 번째 산화반응에서 기질과 함께 TCE를 공동대사로 분해한다. *B. cepacia* G4 유래 TMO의 TCE에 대한 최대 분해속도( $V_{max}$ )와 기질 친화도  $K_m$ 는 각각 10~20 nmol/min · mg protein과 3~10  $\mu$ M이다 (Table 1). Methane monooxygenase (MMO)는 메탄을 메탄올로 산화시킬 때 공동대사적으로 TCE를 산화시킨다. *M. trichosporium* OB3b는 배지내에 구리이온이 결핍된 조건에서 TCE 분해능이 우수한 soluble MMO가 생성되며[1], *M. trichosporium* OB3b의  $V_{max}$  및  $K_m$ 은 각각 450 nmol/min · mg protein 및 45  $\mu$ M 수준이다.

*B. cepacia* G4와 *M. trichosporium* OB3b의 TCE 생분해능

Table 1. Evaluation of TCE degradation kinetic parameters of *B. cepacia* G4 and *M. trichosporium* OB3b.

	<i>B. cepacia</i> G4	<i>M. trichosporium</i> OB3b
Degradation rate		
• $V_{max}$ (nmol/min · mg P)	10~20	250
• $K_m$ ( $\mu$ M)	3~10	145
Characteristics	Fast growth rate Need for toxic inducer	Slow growth rate Unstable sMMO Severe competitive inhibition High $K_m$
Applications	For low TCE conc. with low treatment efficiency and low operation cost	For high TCE conc. with high treatment efficiency and high operation cost

및 특성을 평가해 보면,  $V_{max}$ 는 *M. trichosporium* OB3b가 10배정도 높아 고농도의 TCE를 함유하고 있는 산업폐가스 처리에는 *M. trichosporium* OB3b가 효율적으로 사용될 수 있음을 알 수 있다. 반면에  $K_m$ 값 역시 *M. trichosporium* OB3b의 경우 145  $\mu$ M로 *B. cepacia* G4의 3~10  $\mu$ M에 비해 높아 오히려 낮은 농도의 TCE 처리에는 *B. cepacia* G4가 효과적으로 사용될 수 있다. *B. cepacia* G4는 TCE 독성에 덜 민감하기도 하고, 성장속도가 *M. trichosporium* OB3b에 비해 빠르므로 생분해능 재활성이 용이하다는 장점도 있으므로 낮은 농도의 TCE 처리에 이용될 수 있을 것으로 평가할 수 있다 (Table 1).

#### 공동대사를 이용한 TCE 처리에서의 문제점

미생물은 TCE를 성장기질로 사용하지 못하므로 다른 성장기질이 TMO 또는 sMMO에 의해 산화될 때 같이 산화되는 공동대사 과정을 거쳐야만 분해될 수 있다. 그러나, 이러한 공동대사는 공급되는 성장기질과 TCE 사이에 심한 경쟁저해가 유발되어 TCE 생분해 속도가 저하되어 반응기 효율이 낮아질 수 있다[4].

이러한 기질 경쟁저해를 막기 위하여 성장기질을 공급하지 않는 경우 TCE 분해과정에서 TCE 및 독성 분해산물에 의해 TMO 및 sMMO의 활성 저하와 세포 활성 저하가 일어나 시간이 경과함에 따라 TCE 분해 효율이 급격히 감소된다. TCE와의 경쟁적 저해를 최소화하는 최적 농도의 성장기질을 공급하여 TCE 분해능 및 반응기 운전 안정성

을 향상시킨 연구 결과들이 보고되었으나, 장기간 동안 TCE를 처리할 수는 없었다. 이러한 문제점을 극복할 수 있는 반응기 시스템으로 parallel TBF system을 들 수 있다 [7]. 이 시스템은 두 개의 TBF 반응기를 병렬로 연결하여, 한 쪽 TBF에서 TCE를 처리하는 동안 다른 쪽 TBF에서는 불활성화된 미생물막을 재활성화시키고, 이와 같은 반응기 운전을 교대로 반복적으로 운영함으로써 TCE 제거효율을 안정적으로 약 50%이상 유지할 수 있었으며, 비교적 낮은 농도(2~4 ppm<sub>v</sub>)에서는 100% 수준의 처리효율을 안정적으로 얻은 결과가 보고되었다[7]. 그러나, 이 시스템은 처리효율이 낮은 편이기 때문에 보다 높은 처리 효율을 가지면서 공동대사의 상반적 특성을 해결할 수 있는 반응기 시스템 개발이 필요하다고 평가할 수 있다.

#### 2단계 CSTR/TBF 시스템을 이용한 연속적 TCE 처리 기술 평가

일반적으로 산업체에서 발생하는 폐가스는 연속적으로 배출되며 농도가 높은 편이므로 장기간 안정되게 높은 농도의 TCE를 처리할 수 있는 생물반응기 시스템 개발이 요구되고 있다. 이러한 목적에 부합될 수 있는 반응기 시스템이 2단계 CSTR/TBF 시스템이라고 할 수 있다[1,5,6,10]. 2단계 CSTR/TBF 시스템은 TCE 분해를 위한 TBF unit와 TCE 분해과정에서 불활성화된 생축매를 재활성화시키는 CSTR을 연결시킨 시스템이다. 폐가스에 포함된 TCE는 공기와 함께 공급되면서 TBF 단위 반응기에서 미생물막에 의해 분해된다. 분해과정에서 불활성화된 생축매는 유일

탄소원으로 phenol(for *B. cepacia*) 또는 methane(for *M. trichosporium*)과 다른 배지 성분이 공급되는 CSTR에서 재활성화된 다음 다시 TBF 단위 반응기로 재순환될 수 있도록 구성되어 있다(Fig. 1). 성장기질은 CSTR반응기에만 공급되고 TBF에는 공급되지 않으므로 경쟁저해 현상을 막을 수 있어 TCE 분해 효율을 높일 수 있다.

*B. cepacia*를 생촉매로 사용한 2단계 CSTR/TBF 시스템의 성능을 평가해 보면, 유입부 TCE 농도가 15 ppm<sub>v</sub> 수준의 고농도에서도 100% 수준의 처리능력을 보여주고 있음을 알 수 있다 (Fig. 2). 유입부 TCE 농도가 18 ppm<sub>v</sub> 수준에서는 CSTR에서 TBF로 공급되는 세포 배양액 순환속도를 40 ml/min로 높여주거나, 또는 EBRT(empty bed residence time)를 9.8 min으로 높이면 18 ppm<sub>v</sub> 수준의 유입 TCE 농도에서도 100%의 효율을 얻을 수 있었다. 반응기 운전 기간과 관련하여 기존 연구 결과와 비교해 보면, 1단계 TBF는 수일 정도만 안정되게 운전되는 반면, 2단계 CSTR/TBF 시스템은 3개월 이상의 장기간 운전에서도 안정된 TCE 처리효율을 보여 주고 있어 연속적인 TCE 처리가 가능한 시스템으로 평가할 수 있다.

*M. trichosporium* OB3b를 생촉매로 사용한 2단계 시스템의 CSTR unit에서는 *M. trichosporium* 성장 및 sMMO 활성을 최대화시킬 수 있는 배지 및 조건에서 운전하였다. *M.*

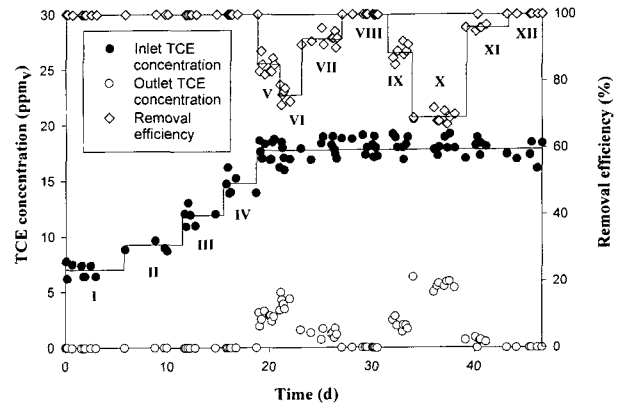


Fig. 2. Long-term continuous treatment of gas-phase TCE by the two-step CSTR/TBF system using *B. cepacia* (Inlet TCE concentration: 7 (I), 9 (II), 12 (III), 15 (IV) and 18 (V~XII) ppm<sub>v</sub>; broth recirculation rate: 20 ml/min (I~V), 10 ml/min (VI), 30 ml/min (VII, IX~XII), 40 ml/min (VIII); EBRT: 4.9 min (I~IX), 3.8 min (X), 6.1 min (XI), 9.8 min (XII)).

Table 2. Evaluation of reactor performance of the two-stage CSTR/TBF system compared to the literature data (modified from reference 14).

Stain	Carbon source	TCE ( $\mu$ M)	Duration (day)	TCE deg.rate (mgTCE/L of reactor/day)
<i>B.cepacia</i> G4PR1 <sub>23</sub> (fixed-film)	Glucose	0.3~18.3 (gas)	1~22 4~40	8.6~392.3 7~10
<i>B.cepacia</i> G4PR1 <sub>23</sub> (fixed-film)	Yeast extract, peptone, glucose	1.01.0~10.0 (gas)	4	0.7~2.1
<i>B.cepacia</i> G4 (suspended)	phenol	10~327 (liquid)	-14	28~78
<i>B.cepacia</i> G4 (suspended)	Phenol	2.3~30.4 (gas)	-14	10~156
<i>B.cepacia</i> G4 (suspended)	Toluene	1.9~87.7 (gas)	-	22~126
<i>P. putida</i> F1 and mixed culture	Phenol	-1.2 (liquid)	<1	1.7~3.0
<i>Alcaligenes Eutrophus</i> JMP13	Phenol	-40 (liquid)	7~14	6.7~9.5
Methanotrophs (fixed film)	Methane	3.5~320.4 (liquid)	7~21	2.8~90.7
Methanotrophs (fixed film)	Methane	6.8~8.4 (liquid)	-	2.4~13.8
Methane / propane oxidizers (packed)	Methane, propane	3.4~13.2 (liquid)	-	0.2~0.9
<i>M.trichosporium</i> OB3b (pp358)	Methane	1.5~7.6 (liquid)	18	0.2~3.0
Methanotrophs (suspended)	Methane	114~222 (liquid)	-3	33.8~41.4 (20mM formate)
Methanotrophs	Methane	0.1~38.8	170	0.5~15.4
<i>B. cepacia</i> G4 (this study)	Phenol	7~20.0 ppm <sub>v</sub> (gas)	> 100	11.8~28.0
<i>M.trichosporium</i> OB3b (this study)	Metnane	10~80 (gas)	> 1 yr	85~525

*trichosporium* OB3b가 *B. cepacia* G4보다 생촉매로써 TCE 최대 생분해능이 10배 이상이므로 TCE 처리효율도 높았는데, 기존 문헌 결과에 비해서도 매우 높은 수준인 525 mg TCE/l·day의 최대 TCE 분해속도를 얻을 수 있음을 알 수 있다 (Table 2). *M. trichosporium* OB3b의 2단계 CSTR/TBF 시스템은 1년 이상 장기간 동안 다양한 조건에서 운전되었으며, TCE의 shock loading에서도 안정된 처리효율을 보여주었다. *B. cepacia*를 사용한 2단계 시스템에서도 여러 운전조건이 TCE 처리효율에 미치는 영향을 분석한 실험을 수행한 후 반응기 운전을 멈추고 TBF에 있는 미생물막의 TMO 활성을 측정된 결과, 초기 반응기 운전때의 활성과 비슷한 수준을 보여주어 계속적으로 TCE 처리를 할 수 있는 시스템으로 평가할 수 있다. *M. trichosporium* OB3b의 2단계 CSTR/TBF 시스템 역시 반응기 운전 정지 후 TBF unit에서의 sMMO 활성을 측정된 결과, 초기 운전때와 유사한 수준의 활성을 보여주어 1년 이상의 장기간 운전도 가능함을 알 수 있다. 따라서, 2단계 CSTR/TBF 시스템이 1단계 TBF, parallel TBF 시스템보다 매우 안정된 시스템으로 평가할 수 있으며, 향후 산업 폐가스에 포함되어 있는 고농도의 TCE 처리에 응용할 수 있는 시스템으로 평가할 수 있다.

## 요 약

생촉매 및 생물막 반응기를 이용한 TCE 생분해는 TCE를 무해한 최종산물로 처리할 수 있는 환경친화적 방법이며, 초기 시설비와 운영비도 낮아 경제성도 우수한 기술로 평가할 수 있다. 그러나, TCE 및 독성 분해산물로 인하여 생촉매 불활성화가 일어나서 장기간 안정된 반응기 운전이 어렵고, TCE와 성장기질사이의 경쟁적 저해로 인하여 처리효율이 저하된다는 단점이 있다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 TCE 처리 단계와 생촉매 재활성화 단계를 구분시킨 2단계 CSTR/TBF 시스템에 대하여 TCE 연속처리용 시스템으로써의 실규모 적용 가능성을 평가해 보았다. *B. cepacia* 및 *M. trichosporium*을 생촉매로 사용한 2단계 CSTR/TBF 시스템은 고농도 유입 TCE와 다양한 운전조건에서도 28~525 mg TCE/l·day 수준의 높은 TCE 처리효율을 안정되게 유지할 수 있어 산업폐가스 처리를 위한 실규모 처리 시스템으로 적용 가능성이 높다고 평가할 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 2003년도 경성대학교 환경문제연구소 특별연구비를 지원받았음에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. 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.
2. Fan, A. M. 1988. Trichloroethylene: water contamination and health risk assessment, pp. 55-92. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol. 101*, G. W. Ware, Eds., Springer-Verlag, New York.
3. Kang, J., E. Y. Lee and S. Park. 2001. Cometabolic biodegradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* is stimulated by low concentrations of methane or methanol. *Biotechnol. Lett.* **23**, 1877-1882.
4. Lee, E. Y. 2001. Bioreactor systems for the cometabolic biodegradation of trichloroethylene. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 527-532.
5. Lee, E. Y. and S. Park. 2001. Development of two-stage CSTR/TBF system for the cometabolic degradation of gas-phase TCE by *Burkholderia cepacia* G4. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **16**, 511-515.
6. Lee, E. Y. 2003. Continuous treatment of gas-phase trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in a two-stage continuous stirred tank reactor/trickling biofilter system. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, in press.
7. Lee, E. Y., B. D. Ye and S. Park. 2003. Development and operation of a trickling biofilter system for continuous treatment of gas-phase trichloroethylene. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1757-1761.
8. Lee, E. Y., J. Kang and S. Park. 2003. Evaluation of transformation capacity for degradation of ethylene chlorides by *Methylosinus trichosporium* OB3b. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **8**, in press.
9. Lu, C. J., C. M. Lee and M. S. Chung. 1998. The comparison of trichloroethylene removal rates by methane- and aromatic-utilizing microorganisms. *Wat. Sci. Tech.* **38**, 19-24.
10. 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.
11. 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.
  12. Westrick, J. J., J. W. Mello and R. F. Thomas. 1984. The groundwater supply survey. *J. Am. Water Works Assoc.* **5**, 52-59.
  13. Ye, B. D., S. J. Yoon, S. Park and E. Y. Lee. 2000. Effect of growth substrates on cometabolic biodegradation of trichloroethylene by *Burkholderia cepaica*. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 474-481.
  14. Yoon, S. J., B. D. Ye, S. Park and E. Y. Lee. 2000. Optimization of cometabolic trichloroethylene degradation conditions by response surface analysis. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 393-397.

(Received October 13, 2003; Accepted November 24, 2003)