한국생물공학회지 제6권 제4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 6. No. 4. 363-368(1991)

Polyvinyl Alcohol 분해자화균의 성장특성과 최적 배양조건

김 정 목 · 조 무 환 · *조 윤 래 · *정 선 용
영남대학교 공과대학 화학공학과
*농과대학 응용미생물학과

Growth Characteristics and Optimal Culture Conditions of PVA-Degrading Strains

Jeong M. Kim, Moo H. Cho, Youl L. Jo* and Seon Y. Jeong*
*Dept. of Chemical Engineering and *Appl. Microbiology,*
Yeungnam University, Gyongsan 712-749

ABSTRACT

PVA degrading bacteria were isolated from water system, and identified as *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas pseudomallei,* which were named as *Pseudomonas* sp. G_5Y and *Pseudomonas* sp. PW. It was found out that those two kinds of bacteria have a symbiotic relationship to degrade PVA. For the mixed culture of these bacteria, the optimal conditions of pH, temperature, nitrogen source, and polymerization degree of PVA were found to be 7.5, 35℃, ammonium sulfate, and 500, respectively. Also, the growth of these bacteria was promoted by trace elements such as vitamin B_1, B_{12}, pyridoxine, and p-aminobenzoate, respectively.

The specific growth rate of mixed bacteria was inhibited when the concentration of PVA was more than 20 g / l . The substrate inhibition kinetics of the mixed culture was

$$\mu = \frac{0.065\ S}{2.56 + S + (S^2/156)}\ hr^{-1}$$

서 론

최근에 여러 합성고분자들이 생산되어 폭넓게 이용되고 있으나 자연계에서 분해가 어렵기 때문에 이와같은 고분자들의 일반적인 처리문제가 발생하였다.

PVA(Polyvinyl Alcohol)는 물에 용해되는 난분해성 고분자 물질로서 경사호제, 직물가공제, 접착제 및 유화안정제 등의 용도에 널리 쓰인다. 특히 섬유의 호부시 사용된 PVA는 호발공정중 폐수에 함유되어 배출된다. 따라서 염색 가공 공장 폐수는 생물학적 난분해성 물질인 PVA를 다량 함유하고 있어 생물학적 공정에 의한 처리시 거의 제거되지 않고 유출수에 함유되어 배출되므로 공공수역의 수질에 상당한 영향을 미치고 있다.

PVA는 순양되지 않은 미생물에 의해서는 30일을 경과해도 거의 분해될 수 없으며, Suzuki등(1,2)은 토양중에서 PVA를 분해하는 세균을 분리하였다. Watanabe 등(3)은 PVA 분해 기작에 관한 것을 밝혔다. 그러나, 분해산물의 자화기구는 알려지지 않았으며 더 많은 연구가 요구되고 있다(4, 5).

또한 Sakazawa등(6, 7, 8)은 *Pseudomonas* sp. VM15A와 *Pseudomonas* sp. VM15C의 공생적 관계에 의하여 PVA가 분해되며 VM15C는 공생관계에 있는 VM15A가 생산하는 성분이 존재할 때만 PVA를 분해한다고 보고하였다.

최근에는 특수한 분해능을 가진 미생물의 분리와 변이주의 개발에 의하여 이제까지 미생물 분해가 어렵다고 생각 되었던 유기물도 분해가능한 경우가 다수 보고되었다.

본 연구는 PVA를 다량 함유한 폐수를 효과적으로 처리하기 위하여 PVA를 선택적으로 분해할 수 있는 균주를 분리하였으며, 성장특성과 최적 배양조건을 조사하였다.

재료 및 방법

PVA 분해균주의 분리 및 동정

PVA 분해균을 자연계로부터 분리하기 위하여 염색폐수처리장의 폐수 및 폐수가 유출되는 하천주위의 물과 토양를 채취하여 시료로 사용하였으며, 배지로는 탄소원 및 에너지원으로 PVA를 넣은 배지를 사용하였다. 그 조성은 Table 1. 에서 보는 바와 같다. 시료를 멸균 증류수로 현탁한 후 상층액 10ml를 취하여 PVA 액체배지 25ml와 멸균 증류수 15ml를 혼합하여 30℃에서 7일간 200 RPM으로 진탕 배양하였다. 진탕 배양이 끝난 삼각 Flask로부터 배양액 0.1ml씩을 취해 PVA agar 평판배지에 도말하여 30℃에서 평판 배양하였다. 평판배지상에서 형성된 여러 colony를 1 백금이씩 취하여 다시 PVA 평판배지에 획선 배양하였다.

PVA 분해능은 Finley(9)의 방법에 준하여 실험하였다.

Table 1. Medium composition

PVA 500		5.0 g	
$(NH_4)_2SO_4$		1.0 g	
KH_2PO_4		1.0 g	
K_2HPO_4		8.0 g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		0.2 g	
NaCl		0.1 g	
Stock solution*		10ml	
Distilled water		990ml	
pH		7.5	
* Stock solution:			
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1 g	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.02 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.5mg	$MnSO_4$	0.5mg
Ca-pantothenate	0.5mg	inositol	0.2mg
p-aminobenzoate	0.2mg	niacin	0.4mg
pyridoxine	0.4mg	thiamine	0.4mg
biotin	2μg	vitamine B_{12}	0.5μg

균주의 동정은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (10)에 준하였다.

순수배양과 혼합배양에 의한 성장특성

분리 동정된 균들의 성장 특성을 조사하기 위하여 균주를 단독배양과 혼합배양하여 성장특성과 PVA 분해율을 조사하여 이들 균주의 상관관계를 조사하였다.

PVA 중합도에 따른 영향

30℃에서 PVA의 중합도를 500, 1500, 2000으로 변화시켰을 때 분리된 균주의 PVA 분해율을 조사하였다.

온도 및 pH의 영향

온도의 영향을 조사하기 위하여 배양온도를 25℃에서 40℃로 조절하여 6일간 배양시킨후 각 온도에서 성장과 PVA 분해율을 조사 하였다.

또한 배지의 최적 pH를 결정하기 위하여 배양온도 30℃에서 pH를 5.0에서 9.0까지 각 단계별로 조절된 분리용 배지를 사용하여 성장특성을 조사하였으며 최적 pH에서 PVA 분해에 따른 pH의 변화를 조사 하였다.

질소원 및 미량원소의 영향

질소원의 영향을 조사하기 위하여 분리용 배지에 각종 무기, 유기 질소원을 0.1%씩 첨가하였으며, 또한 vitamin 등 여러 미량원소가 성장에 중요한 영향을 미치는지를 조사하기 위하여 분리용 배지의 미량 원소를 하나씩 제거한 배지를 사용하여 분리균의 성장특성을 조사하였다.

결과 및 고찰

분리 및 동정

분리된 여러 균주들의 성장과 PVA 분해능을 조사한 결과 많은 차이가 있었으며 비교적 PVA 분해능이 우수한 균주를 선정하여 PVA soft agar 배지(agar 0.6%)를 사용한 삼단 희석법으로 실험한 결과 yellow colony를 형성하는 균과 white colony를 형성하는 균주가 밀접하게 연관되어 있음을 알 수 있었다.

이 균들은 *Pseudomonas cepacia* 와 *Pseudomonas pseudomallei* 의 유사균으로 동정되어 이들을 각각 *Pseudomonas* sp. G_5Y, *Pseudomonas* sp. PW로 명명하였다.

순수배양과 혼합배양에 의한 성장특성

분리 동정된 균들을 단독배양과 혼합배양에 의하여

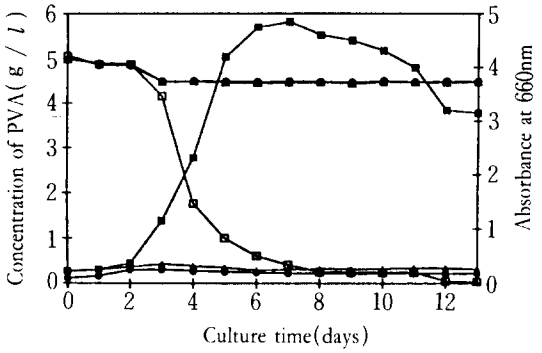

Fig. 1. Difference of growth and biodegradation rate between mixed culture and pure culture.

symbols:

○: PVA concentration of the G_5Y

□: PVA concentration of the G_5Y & PW

△: PVA concentration of the PW

▲: Growth of the PW

●: Growth of the G_5Y

■: Growth of the G_5Y & PW

성장특성을 조사한 결과 Fig. 1에서 보는 바와같이 단독 배양시에는 성장과 PVA 분해율이 혼합배양에 비하여 현저히 낮았으며 이와같은 결과에서 *Pseudomonas* sp. G_5Y와 *Pseudomonas* sp.PW는 서로 공생관계에 있으며 이러한 사실은 Sakazawa등(6)이 보고한 바와 비슷한 현상이다. 따라서 두 균주를 혼합배양 하였을 때의 성장 특성을 조사 하였다.

중합도의 영향

배지에 첨가되는 PVA의 중합도를 500. 1500 및 2000으로 하였을때 PVA 분해율을 조사하기 위하여 혼합배양액 10%(V/V)를 접종한 후 3일간 배양 하였으며, 각각 98%, 82%, 72%로 약간의 차이를 보였다. 그러나 Suzuki등(1,2)은 중합도가 영향을 미치지 않는다고 보고하였다.

온도 및 pH의 영향

Fig. 2, 3은 PVA500을 사용한 혼합배양에서 온도 및 pH의 변화에 따른 성장과 PVA 분해율을 나타낸다.

30℃와 35℃에서 성장이 양호하였으며, 최적 온도는 35℃로 나타났다. 또한 배지의 초기 pH 7.0과 8.0 사이에서 대체로 높은 성장과 분해율을 보였으며 최적의 pH는 7.5로 나타났다.

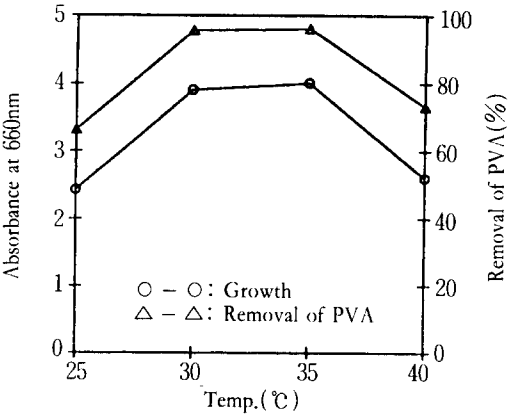

Fig. 2. Effect of temperature on growth and PVA removal efficiency by G_5Y & PW.

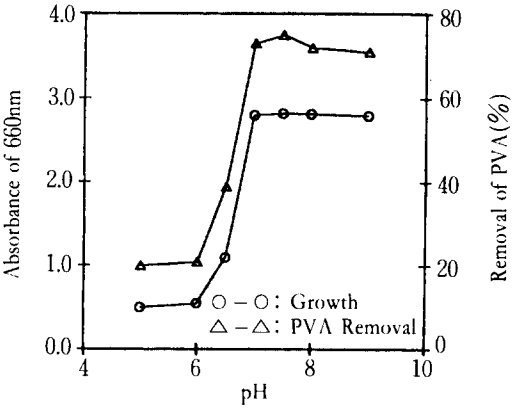

Fig. 3. Effect of pH on growth and PVA removal efficiency by G_5Y & PW.

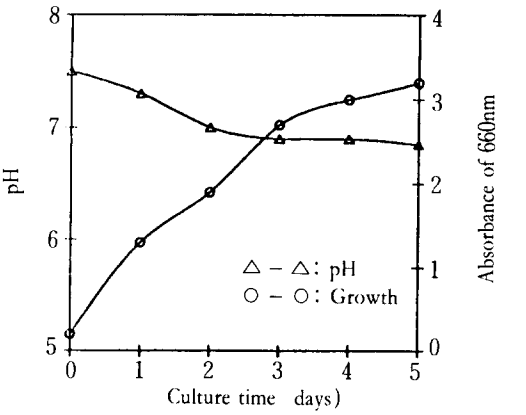

Fig. 4. Profiles of pH and growth for the mixed culture of G_5Y & PW.

Fig. 4는 최적 pH 7.5에서 PVA분해균주의 성장에 따른 pH의 변화를 나타내었으며 시간의 경과와 함께 pH는 7.5에서 6.8로 감소하였다.

질소원 및 미량원소의 영향

Table 2는 분리용 배지에 여러 질소원을 각각 첨가하여 혼합균을 배양하였을 때 1주일 후 성장과 PVA 분해율을 나타낸 것이다.

분리용 배지에 사용된 $(NH_4)_2SO_4$가 최적의 질소원임을 알 수 있으며, 유기 질소원은 대체로 양호한 분해력을 보이고 있다.

Table 3은 Stock solution의 미량원소를 하나씩 제거하면서 1주일간 배양한 결과를 나타내었으며 vitamin B_1, B_{12}, pyridoxin 및 p-aminobenzoate가 분리된 균주의 성장에 영향을 미치고 있음을 알 수 있다.

기질저해 속도식

혼합균주의 회분배양에서 PVA 농도변화에 의한 분리된 균주의 비증식속도 μ값을 각각 구하였으며, Fig. 5에 나타내었다. PVA의 농도가 20 g / l 이상에서는 비증식속도가 감소하였으며, PVA가 균체의 증식에 저해작용을 하는 것으로 나타났다. 그리고, 실험에 의하여 S=20 g / l 일때 $\mu_{max}=0.065hr^{-1}$을 얻었으며 S에 대한 $1/\mu$의 Fig. 6에서 K_{1s}를 구할 수 있다. 따라서 비성장속도식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\mu = \frac{0.065\ S}{2.56+S+(S^2/156)}$$

Table 2. Effect of nitogen sources on the cell growth and PVA removal efficiency(%)

Nitrogen source	Cell density(abs. λ=660nm)	PVA removal efficiency(%)
none	0.330	5
NH_4NO_3	3.900	78
$NaNO_3$	1.200	19
KNO_3	1.150	18
$(NH_4)_2SO_4$	4.850	97
NH_4Cl	3.500	75
peptone	4.700	95
urea	4.290	89
yeast extract	4.000	80

Table 3. Effect of trace elements on the cell growth and PVA removal rate

Eliminated element	Cell denisty(abs. λ=660nm)	PVA removal efficiency(%)
none	4.860	98.1
$Na_2MoO_4.H_2O$	4.856	97.3
$Na_2Wo_4.H_2O$	4.820	97.5
$MnSO_4$	4.732	94.3
Ca-pantothenate	4.398	92.3
inositol	4.809	97.0
niacin	4.856	98.0
P-aminobenzoate	4.032	83.3
pyridoxine	3.987	88.8
thiamine(vitamine B_1)	4.056	87.1
biotine	4.198	91.8
vitamine B_{12}	3.202	71.4
All	3.092	71.2

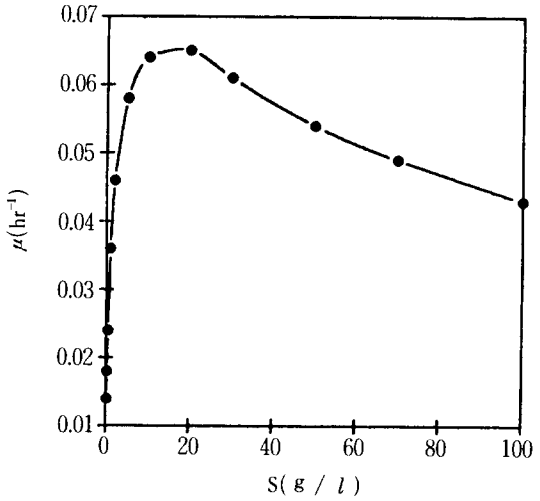

Fig. 5. Effect of PVA concentration on the specific growth rate of the mixed culture.

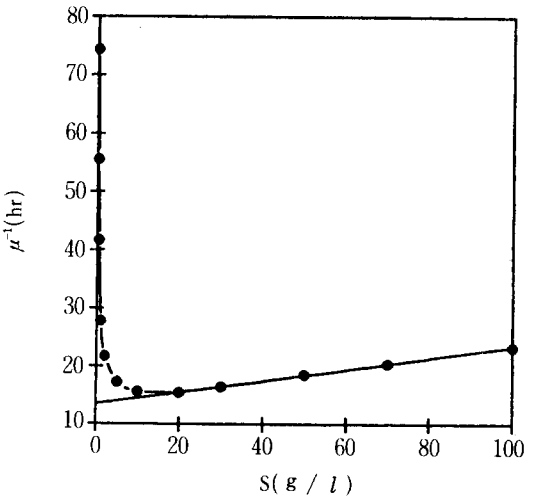

Fig. 6. Plot of μ^{-1} vs. S.

요 약

수계로부터 PVA분해균을 분리하여 *Pseudomonas cepacia* 와 *Pseudomonas pseudomallei*의 유사균으로 동정되어 이들을 각각 *Pseudomonas* sp.G_5Y, *Pseudomonas* sp.PW로 명명하였으며, 이 두균은 혼합배양에 의해서만 PVA를 분해·자화하며 이로서 두균은 공생관계에 있음을 확인하였다. 혼합배양의 최적조건은 pH 7.5, 온도 35℃, 질소원 $(NH_4)_2SO_4$ 및 PVA중합도 500이며 이와같은 bacteria의 성장은 미량원소 vitamin B_1, B_{12}, pyridoxine 과 p-aminobenzoate에 의해 각각 영향을 받는 것으로 나타났다. 회분배양시 PVA의 농도가 20 g / l 이상에서는 혼합균의 비성장속도 μ가 감소하였으며 기질 저해속도식에 대한 Model식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\mu = \frac{0.065S}{2.56 + S + (S^2/156)}$$

감 사

본 연구는 (주)풍국건설 환경사업부의 학술연구비로 수행되었으며 지면을 빌어 감사의 뜻을 표합니다.

참 고 문 헌

1. T. Suzuki, Y. Ichihara, M. Yamada, K. Tonomura(1973), *Agr. Biol. Chem.*, **37**(4), 747.
2. T. Suzuki(1976), *Agr. Biol. Chem.*, **40**(3), 497.
3. Y. Watanabe, M. Morita, N. Hamada, Y. Tsuiisaka(1975), *Agr. Biol. Chem.*, **39**(12), 2447.
4. K. Sakai, M. Morita, N. Hamada, Y. Watanabe(1981), *Agr. Biol. Chem.*, **45**(1), 63.
5. K. Sakai, N. Hamada, Y. Watanabe(1986), *Agr. Biol. Chem.*, **50**(4), 989.
6. C. Sakazaw, M. Shimao, Y. Tanjguchi, N Kato(1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**(1), 261.
7. M. Shimo, Y. Nishimura, N. Kato, C. Sakazawa(1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(1), 8.
8. M. Shimo, I. Fujita, N. Kato, C. Sakazawa(1985), *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**(6), 1389.
9. J. H. Finley(1961), Spectrophotometric Determination of Polyvinyl Alcohol in Paper Coating, *Anal. Chem.*, **33**, 1925.
10. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt(1986), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore.
11. S. Hashimoto, M. Fujita(1985), *J. Ferment. Technol.*, **63**(5), 471.
12. 橋本, 尾崎(1980), *下水道協會誌*, **17**(195), 24.
13. 橋本, 尾綺(1980), *下水道協會誌*,**17**(189), 28.
14. 橋本, 尾綺, 山川(1980), *下水道協會誌*, **17**(198), 19.
15. P. Pitter(1976), *Water Research*, **10**(3), 231.
16. 福永(1976), *化學工場*, **20**(12), 67.
17. P. Gerhardt(1981), Manual of Method for Gernal

Bacteriology, *Am. Soci. Microbiol.*, Washington.
18. J. Paige Straley(1984), *American Dyestuff Reporter*, September, 46.
19. AWWA(1971), Standard Method for the Examination of Water and Wastewater. 15th ed..

(Accepted; October 18, 1991, Revised; October 30, 1991, Accepted; November 7, 1991)