

## PEG 분해균주의 분리, 동정 및 PEG Film 상용성에 관한 연구

이제혁 · 이준열<sup>1</sup> · 전억한\*  
경희대학교 식품가공학과, <sup>1</sup>섬유공학과

### Studies on the Isolation and Identification of PEG-Degradable Strains and Physical Characteristics of PEG-Films

Lee, Je-Hyuk, Joon-Youl Lee<sup>1</sup> and Uck-Han Chun\*

Department of Food Technology and Science, Kyung Hee University, Korea

<sup>1</sup>Department of Textile Engineering, Kyung Hee University, Korea

**Abstract** — Several strains capable of degrading PEGs(Polyethylene Glycols) were isolated and investigated for their biodegradation ability of PEGs. Microorganisms screened for the biodegradation studies were those grown on the PEG used as a sole carbon and energy source. It was known that the number of microorganisms decreased when grown on the high molecular weight of PEG. A biodegradation of PEG was investigated with such microorganisms in the reactor and resulted in the decrease in PEG concentration meaning that PEG was degraded in the reactor. This microorganism was identified as *Flavobacterium* sp. The biodegradability was found to be about 18.8% for PEG-8000 and 25.4% for PEG-10,000, respectively. For the manufacture of biodegradable PEG film, EMAA/PEG and EAA/PEG blending ability was investigated with IR spectrum and showed that it was possible to produce blending film.

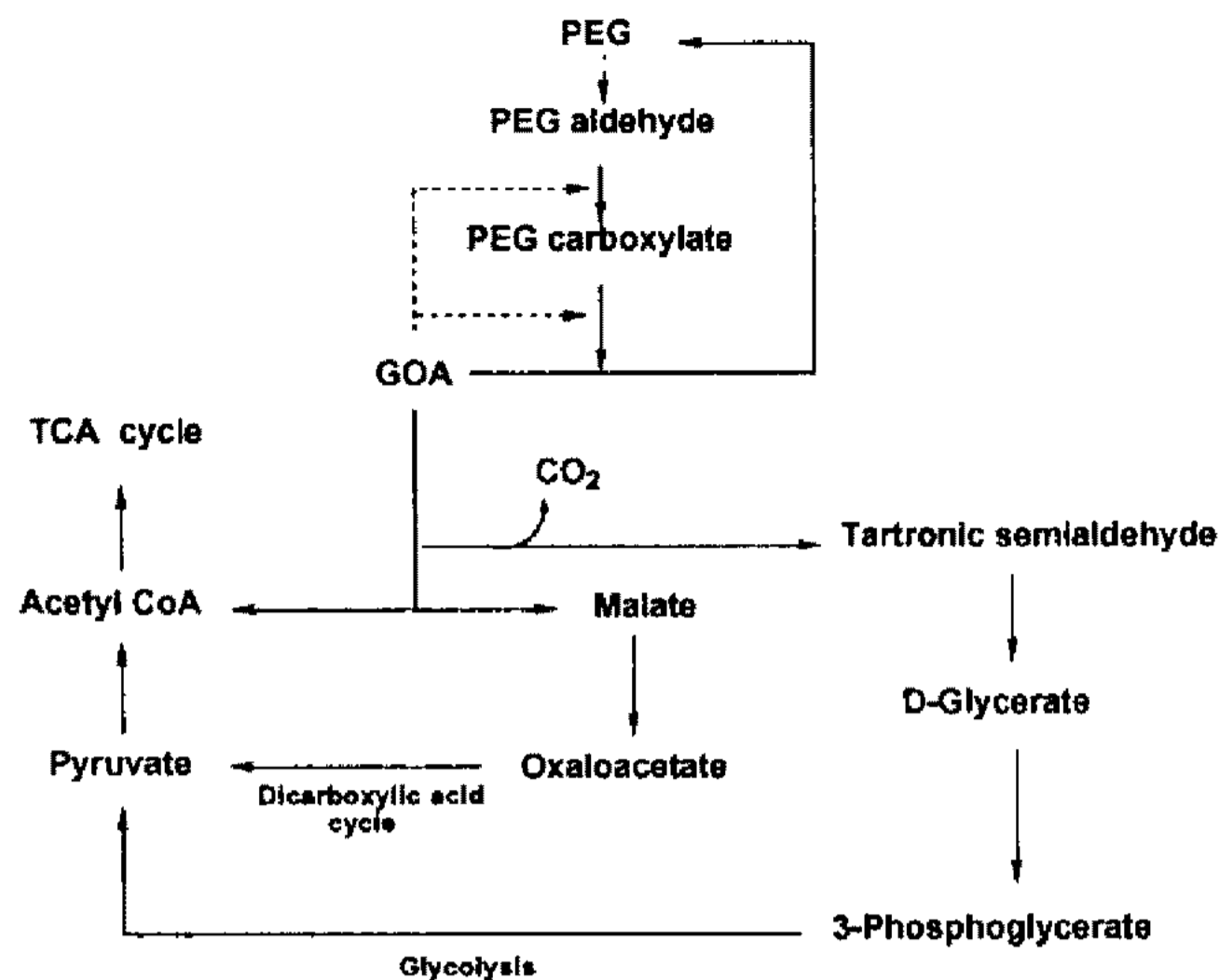
합성고분자 재료중에서 PEG(polyethylene glycol)는 ink, 세제, 용매등의 원료로 사용된다(1). 세제등의 원료로 사용되는 PEG가 제거되지 않고 그대로 방류될 경우, PEG의 계면활성(hydrophobic and hydrophilic)작용으로 수생환경을 크게 변화시킬 것으로 우려된다(1). 따라서, Kawai 등(2-4)은 액체배양으로 PEG를 *Flavobacterium*과 *Pseudomonas species*의 혼합배양으로 분해하였고, PPG(polypropylene glycol)도 토양과 활성오니에서 분리한 *Corynebacterium*으로 분해되었다고 보고하였다. 이 밖에도 acetic acid bacteria, 효모, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter* sp. 등의 많은 미생물들이 PEG를 dicarboxylic acid cycle과 glycolysis의 두 경로를 통해서 acetyl CoA를 거쳐 궁극적으로 TCA cycle로 대사분해한다고 보고된 바 있으며(Fig. 1)(5), Bernhard 등(6)은 해양으로부터 PEG 분해균주를 분리하여 PEG를 발효분해하였고, *Pelobacter venetianus* sp. nov.로 동정하였다.

합성 고분자 재료인 PEG는 그 중합 정도에 따라 다양한 분자량(400~20000)의 PEG로 구분될 수 있는데(1), 미생물에 의한 분해율은 분자량이 높을수록 낮아지고 분해하는 미생물도 희박하여(1), 8000 이상의 분자량을 갖는 PEG가 효과적으로 분해되었다고 보고된 바는 거의 없다. 따라서, PEG중에서도 분자량이 높은 PEG 배출이 문제시되고 있다.

PEG film을 제조하기 위해, PEG만으로는 film을 형성시킬 수 없기 때문에 포장재료 생산에 널리 이용되는 카르복실산을 함유한 에틸렌 공중합체인 EMAA(ethylmetacrylic acid)와 EAA(ethylacrylic acid)와의 상용성을 조사하였는데, PEG의 에테르기와 강한 수소결합이 예상되어 상용성이 있을 것으로 기대된다. 그 상용성의 여부에 따라서 PEG film을 제조하였으며, PEG 분해균주에 의한 분해 정도를 조사하기 위하여, PEG를 대사분해하는 균주를 분리하고 그 분해특성을 조사하며, PEG film을 제조하여 그 분해를 조사하고자 하였다. 우선 PEG를 에너지원과 탄소원으로 사용하는 균주를 분리하여, 형태학적, 생화학적 실험을 행하여 동정하였고, 액체배양에서의 PEG 분해율을 조사하였으며, 분해균주의 PEG 분해특성을 조사하였다.

**Key words:** PEG(polyethylene glycol), EMAA(ethylmetacrylic acid), EAA(ethylacrylic acid), biodegradation of PEG

\*Corresponding author



**Fig. 1. Metabolism of PEG by aerobic bacteria.**  
 GOA=glyoxylic acid, —: metabolic pathway, ----: inhibitory pathway

**재료 및 방법**

**실험에 사용된 화합물**

사용한 PEG는 평균분자량(M.W)이 300, 400, 1450, 8000, 10000, 18500인 것을 사용하였다. PEG와의 블랜드 필름을 만들기 위하여 EMAA(Ethylmetacrylic acid, DuPont, U.S.A.)는 26%(w/w)의 아크릴산을 함유한 에틸렌-메타크릴릭 공중합체를 사용하였다. EAA(Ethylacrylic acid, Scientific Polymer Product, U.S.A.)는 20%(w/w)의 아크릴산을 함유한 에틸렌-아크릴산 공중합체를 사용하였다.

**PEG분해 균주의 분리**

탄소원과 에너지원로서 PEG를 이용하는 미생물을 분리하기 위하여 Kawai 등(3)이 사용한 배지인 NH<sub>4</sub>Cl 2 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/l, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/l, yeast extract 0.5 g/l와 탄소원 및 에너지원으로 평균분자량이 300, 400, 1450, 8000, 10000, 18500의 PEG를 사용하였으며, 이 배지의 pH는 7.2로 조정하여 고체배지를 제조하였다. 자연상태에서 각각의 PEG를 이용하는 균주를 분리하기 위하여 대기중에 방치하여, 여기서 생육한 미생물을 각각 순수분리 하였다.

**분리균주의 배양**

PEG 분해를 위한 균주의 배양은 Kawai 등(3)이 PEG 분해균주의 분리를 위해 사용한 배지조성으로 액체배지를 제조하여 분리된 균주의 액체배양에 사용하였다.

액체배양은 상기 조성의 배지 150 ml를 함유한 250

ml 삼각플라스크에 전 배양액 10%(v/v)를 접종한 후, 30°C 에서 150 rpm으로 교반하면서 20일간 배양하였다. 전 배양액은 에너지원으로서 glucose를 15 g/l 함유한 배지에서 24시간 배양시켜 사용하였다.

**균주의 동정**

분리된 균주의 동정은 형태적, 생리적, 생화학적 특성을 조사하여(7, 9), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(8)와 Biochemical Test of Identification of Medical Bacteria(9)의 방법에 준하여 동정하였고, 미생물 자동동정 system인 API 20NE kit(10)를 사용하여 동정하였다.

**세포성장 및 PEG 농도 측정**

배양액 중의 세포의 생육정도는 UV-spectrophotometer(Model 220S, Hitachi, Ltd. Tokyo)를 사용하여 550 nm에서 O.D(Optical density)로서 측정하였다(11).

PEG의 분석은 이 등(12)이 색소분해균주의 분리시 사용한 실험방법과 류 등(13)의 방법을 응용하여 실시하였다. 우선 각 분자량(8000, 10000, 18500)의 PEG를 0.5%의 용액으로 제조하여, UV-spectrophotometer로 185~340 nm로 scanning하여 PEG의 흡광도를 조사하였으며, PEG의 농도감소는 흡광도의 감소로 측정하였다.

**EMAA/PEG 및 EAA/PEG 블랜드 필름의 상용성 조사**

EAA, PEG 및 EAA/PEG 블랜드 필름의 적외선 분광 분석은 Infrared Spectrophotometry(FT-IR 2000, Perkin-Elmer, U.S.A.)을 사용하였으며, 모든 시료는 1%(w/v)의 용액을 KBr window에 casting 하여 80°C 의 진공오븐에서 24시간 건조시킨 후 측정하였다. 사용한 scan 수는 100이었으며, 분해능은 2 cm<sup>-1</sup>이었다.

PEG와 EMAA를 혼합하여 필름을 제조하였다. 이 블랜드 필름의 제조를 위하여 두 물질의 상용성을 조사하였다. 적외선 분광(IR) 스펙트럼을 사용하여 그 화학구조 특유의 peak를 조사함으로써, 그 상용성 여부를 결정하였다.

PEG 및 EMAA/PEG 블랜드 필름의 용점을 구하기 위하여 시차주사열분석을 사용하였는데, DSC(Differential Scanning Calorimeter)-IV(Perkin-Elmer, U.S.A)를 사용하였으며, 질소분위기 하에서 측정하였다. 모든 시료에 대해서 20°C 의 승온 속도로 30~100°C 까지 승온시키면서 열분석 곡선을 얻었고, 시료를 100

**Table 1. Growth of cells from plate containing PEG as a sole carbon and energy source**

Microorganisms	Growth
PEG300 A	+++
PEG400 A	++
PEG400 B	+++
PEG400 C	+
PEG400 D	+
PEG400 E	+
PEG1450 A	+
PEG1450 B	+
PEG1450 C	++
PEG1450 D	+
PEG1450 E	++
PEG8000 A	+++
PEG8000 B	++
PEG8000 C	(+)
PEG8000 D	+
PEG8000 E	++
PEG8000 F	++
PEG8000 G	+
PEG8000 H	+
PEG8000 I	(+)
PEG8000 J	+
PEG8000 K	++
PEG8000 L	++
PEG8000 M	+
PEG8000 N	++
PEG8000 O	+++
PEG8000 P	+++
PEG8000 Q	+++
PEG8000 R	++
PEG8000 S	++
PEG10000 A	++
PEG10000 B	+++
PEG10000 C	+
PEG10000 D	+
PEG10000 E	+
PEG10000 F	++
PEG18500 A	++
PEG18500 B	++
PEG18500 C	+++
PEG18500 D	+
PEG18500 E	+++
PEG18500 F	++

※ Microorganisms grown on the PEG contained plates were named after PEG used and differentiated alphabetically.

(+): poor growth, +: growth, ++: well growth, +++: excellent growth

℃에서 10분간 유지하여 PEG 결정을 완전히 용융시킨 후 설정되어진 결정화 온도까지 320℃/min의 속도로 냉각시킨 후 DSC 곡선을 얻어 용점을 조사한 후 두 물질의 상용성을 검토하여, 필름의 제조 여부를 판단하였다.

## 결과 및 고찰

### PEG분해 균주의 분리

탄소원과 에너지원으로 PEG(M.W. 300, 400, 1450, 8000, 10000, 18500)만이 함유된 agar plate를 각각 대기중에 3일간 방치하여 42개 균주를 순수분리하였다. Table 1에 분리된 미생물들의 생육정도를 나타내었다. Cox(1)에 의하면 분자량이 큰 PEG(10,000 이상)의 분해도는 아주 미약하다고 보고하였으나, 분자량이 비교적 큰 18,500에서도 많은 미생물이 성장하였다.

편의상 각 plate에서 성장한 미생물을 구분하기 위하여 PEG 분자량에 따라 명명하였으며, 이 미생물들을 -20℃에서 냉동보관하여 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

### PEG를 함유하는 액체배지에서의 균주배양

PEG(M.W. 8000, 10000, 18500)를 유일한 탄소원과 에너지원으로 사용한 액체배지에서 Table 1에 열거한 미생물들 중 PEG 8000, 10000, 18500을 분해하는 미생물들을 20일간 배양하였다. 실험에 사용된 미생물은 모두 생육하였으나, 그 중에서 PEG 농도가 비교적 많은 감소를 보인 미생물은 Table 2와 같다. PEG 8000보다는 분자량이 큰 PEG 18500이 함유된 배지에서 분해미생물의 성장이 어느 정도 감소하였으며 (data not shown), 분해율은 18.8%를 보였다. 이는 분자량이 18000 이상의 PEG가 분해될 수 있는 것을 의미한다. Kawai 등(3)은 5 g/l의 PEG 6000이 배양

**Table 2. Strains capable of degrading PEGs and degree of biodegradability represented as %**

PEG Compounds	Microorganisms grown well in Table 1	Mark of Microorganisms	Degradability (%)
PEG 8000	PEG 8000 A	EA-1	18.8
	PEG 8000 O	EA-4	13.6
	PEG 8000 Q	EA-6	11.4
PEG 10000	PEG 10000 C	EB-3	14.6
	PEG 10000 D	EB-4	25.4
	PEG 10000 F	EB-6	12.8
PEG 18500	PEG 18500 B	EC-2	18.8
	PEG 18500 E	EC-5	13

7일 후 거의 분해되었다고 보고하였는데, 본 실험에서 PEG의 분해율이 다소 떨어지는 것은 사용된 PEG의

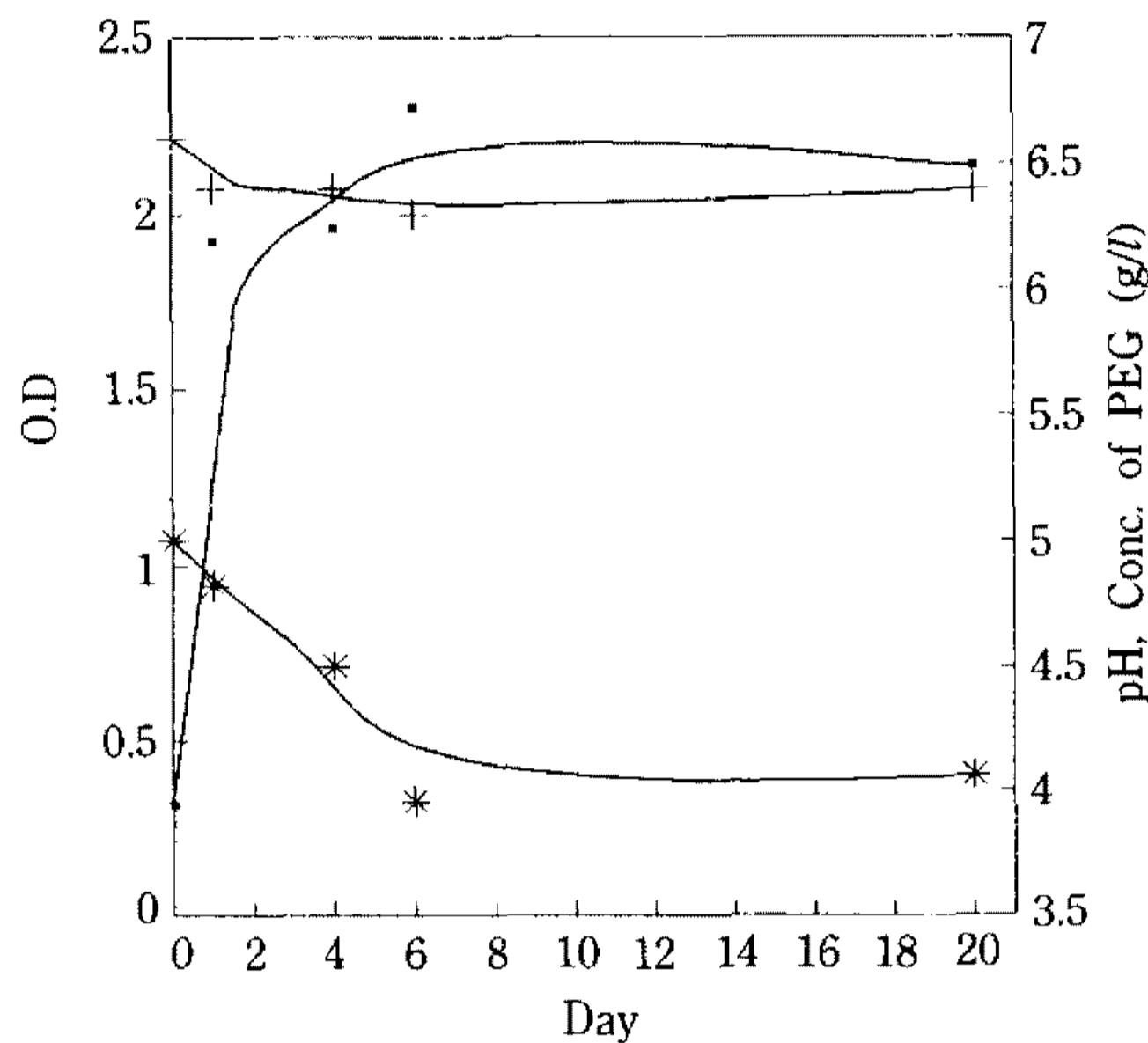


Fig. 2. Biodegradation of PEG by microorganism of EC-2 in the flask containing PEG 18500 at 30°C. -■-; Cell, -+-; pH, -\*-\*; PEG conc.

분자량(M.W)이 10000, 18500 등으로 훨씬 컷으며 사용된 미생물에 의한 PEG 분해의 최적 조건이 아직 설정되어 있지 않기 때문인 것으로 생각된다. PEG 18500을 함유한 고체배지에서 가장 성장이 우수한 균주인 EC-2를 PEG 18500 액체배지에서 배양하였다. 30°C의 온도에서 플라스크 배양으로 세포의 성장, PEG의 분해, pH의 변화 등은 Fig. 2와 같다. 6일 동안 배양 후 PEG 18500의 분해율은 18.8%를 보였으며, 이는 PEG 분해균주로서 우수하다고 사료된다.

균주의 동정

실험에 사용된 균주인 EC-2와 EC-5의 동정을 하기

Table 4. Identification of EC-2 with API 20NE kit(Bi-tek Co.)

Materials	Results
DP3	-
URE	+
MLT	+
INO	-
ARA	-
TLA	-
OFG	+
CIT	-
MAN	-
ADO	-
GLU	-
GC	+
MAL	-
XYL	-
COU	-
ARG	-
ACE	-
TDA	-
RAF	-
H2S	-
LYS	-
ESC	+
PXB	+
SOR	-
ONP	-
ORN	-
PLI	-
LAC	-
SUC	-
RHA	-
OXI	+

Symbols are abbreviation of materials used for identification.

Table 3. Morphological and physiological characteristics of EC-2 and EC-5

Characteristics	EC-2	EC-5
<b>*Morphological test</b>		
Gram staining	-	-
Cell type	rod	rod
<b>*Physiological test</b>		
Oxidase test	-	(+)
Catalase test	+	+++
<b>Pigment test</b>		
<sup>a</sup> KB medium(10)	+++	+++
<sup>b</sup> PAF medium(10)	+++	+++
MacConkey agar growth	++	+
<b>Temperature sensitivity</b>		
0~4°C	-	-
44°C	(+)	+++
54°C	-	-
<b>Utilization of :</b>		
Sorbitol	+	+
Glycerol	(+)	+
Fructose	-	-
Glucose	+	+
Inulin	+	-

<sup>a</sup>KB medium: proteose peptone 20.0 g/l, agar 15.0 g/l, glycerol 10.0 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g/l, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/l at pH 7.2, <sup>b</sup>PAF medium: trypton 10.0 g/l, proteose pepton 10.0 g/l, glycerol 10.0 g/l, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g/l, Aagar 25.0 g/l at pH 7.0.

위해 형태학적, 생화학적 실험을 한(7, 9) 결과는 Table 3과 같다. 또한, API 20NE kit(Bitek, U.S.A)(10)를 사용한 동정실험결과는 Table 4와 같다. 형태학적 실험결과 EC-2와 EC-5는 모두 그램 음성의 짧은 간균이었으며, Oxidase test(9)에서는 음성을, Catalase test(9)는 양성의 성향을 보였으며, KB medium와 PAF medium를 사용한 Pigment test(10)에서는 모두 양성의 성향을 나타내었다. 또한, 그램 양성균주에 저해를 일으키는 MacConkey agar(14)에서는 모두 양성을 보여 그램 음성인 것으로 다시 확인되었으며, 온도에 의한 내성 실험에서는 0~4°C, 54°C에서 미생물의 성장은 없었고, 여러 영양물질의 이용가능성을 실험한 결과, Table 3과 Table 4와 같이 여러 물질의 이용가능성이 확인되어, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(8)에 준하여 *Flavobacterium species*로 동정하였다.

**EMAA/PEG 및 EAA/PEG blend의 상용성 조사**

Fig. 3와 4은 상온에서 얻은 EMAA(Ethylmetacrylic acid)와 PEG의 적외선 분광(IR) 스펙트럼이며, Fig. 3의 1600~1800 cm<sup>-1</sup> 영역에서 메타크릴산의 acid carbonyl에 해당하는 C=O peak가 1700 cm<sup>-1</sup>에서 나

타나는 것으로 보아 공중합체 내에서의 카르복실산들은 대부분 이중합체형태로 존재하는 것을 알 수 있다. Fig. 5에 EMAA/PEG 50/50(%, w/w) blend의 1600~1800 cm<sup>-1</sup> 영역의 IR 스펙트럼(Fig. 5A)을 EMAA의 동일 흡수파장 영역에서의 스펙트럼(Fig. 5B)과 함께 나타내었다. EMAA/PEG 50/50 blend의 스펙트럼(Fig. 5A)에서 새로 나타난 1730 cm<sup>-1</sup>의 peak는 PEG의 에테르기와 EMAA의 카르복실산기와의 분자간 수소결합에 의해서 산 이중합체로 유리되어진

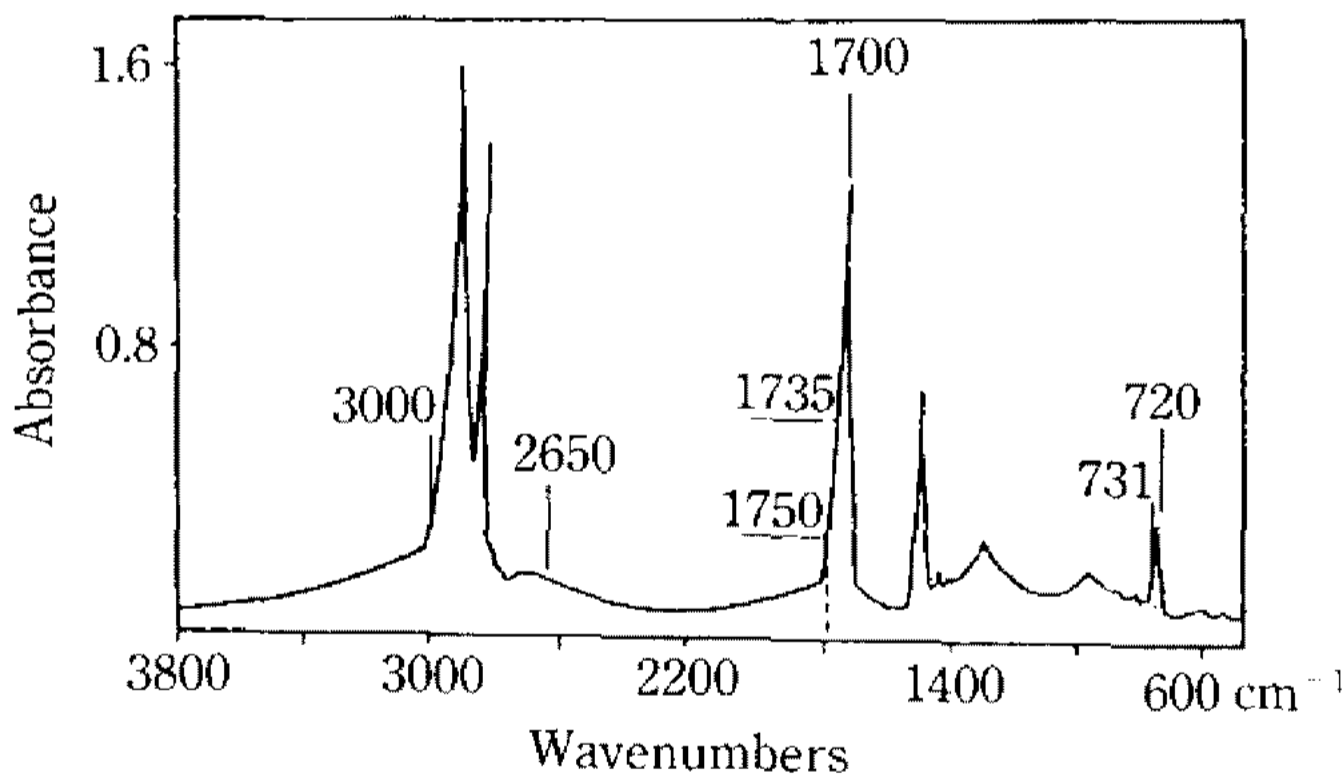


Fig. 4. IR spectrum of PEG.

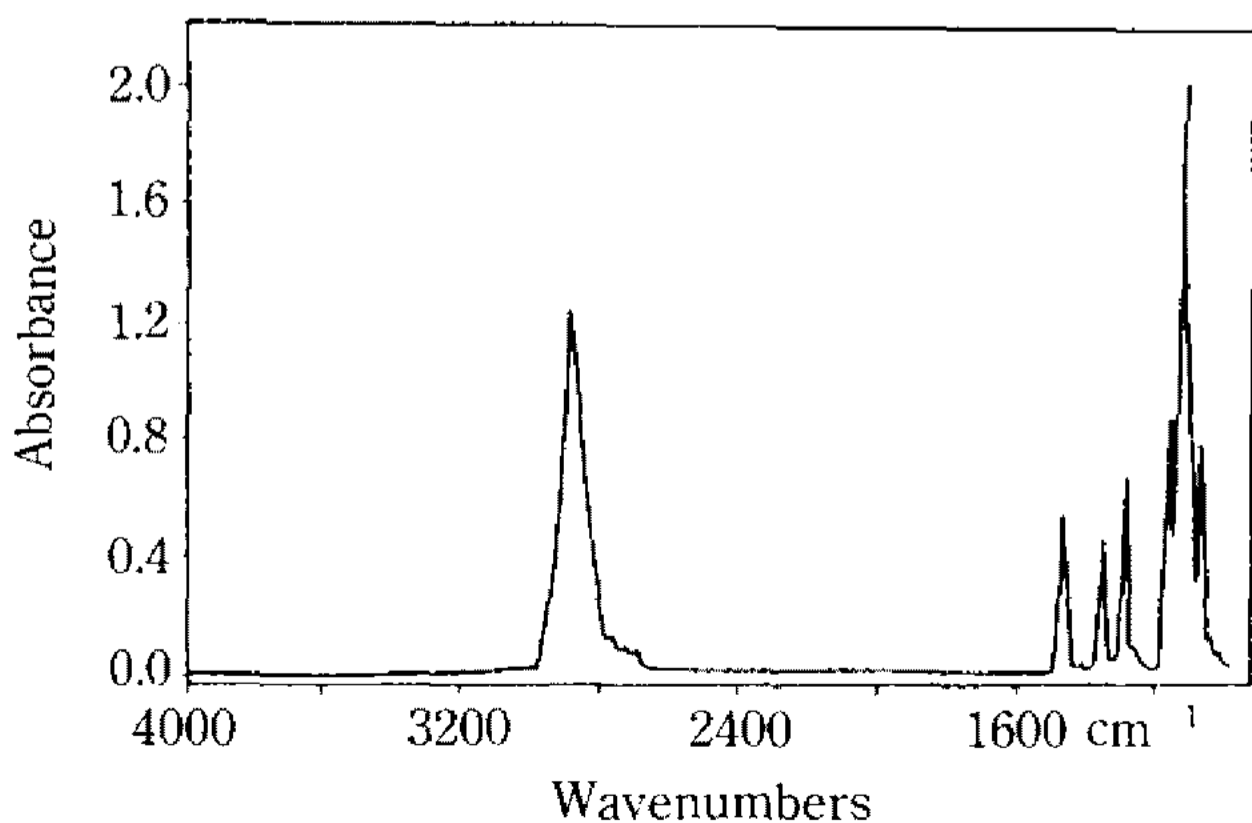


Fig. 3. IR spectrum of EMAA.

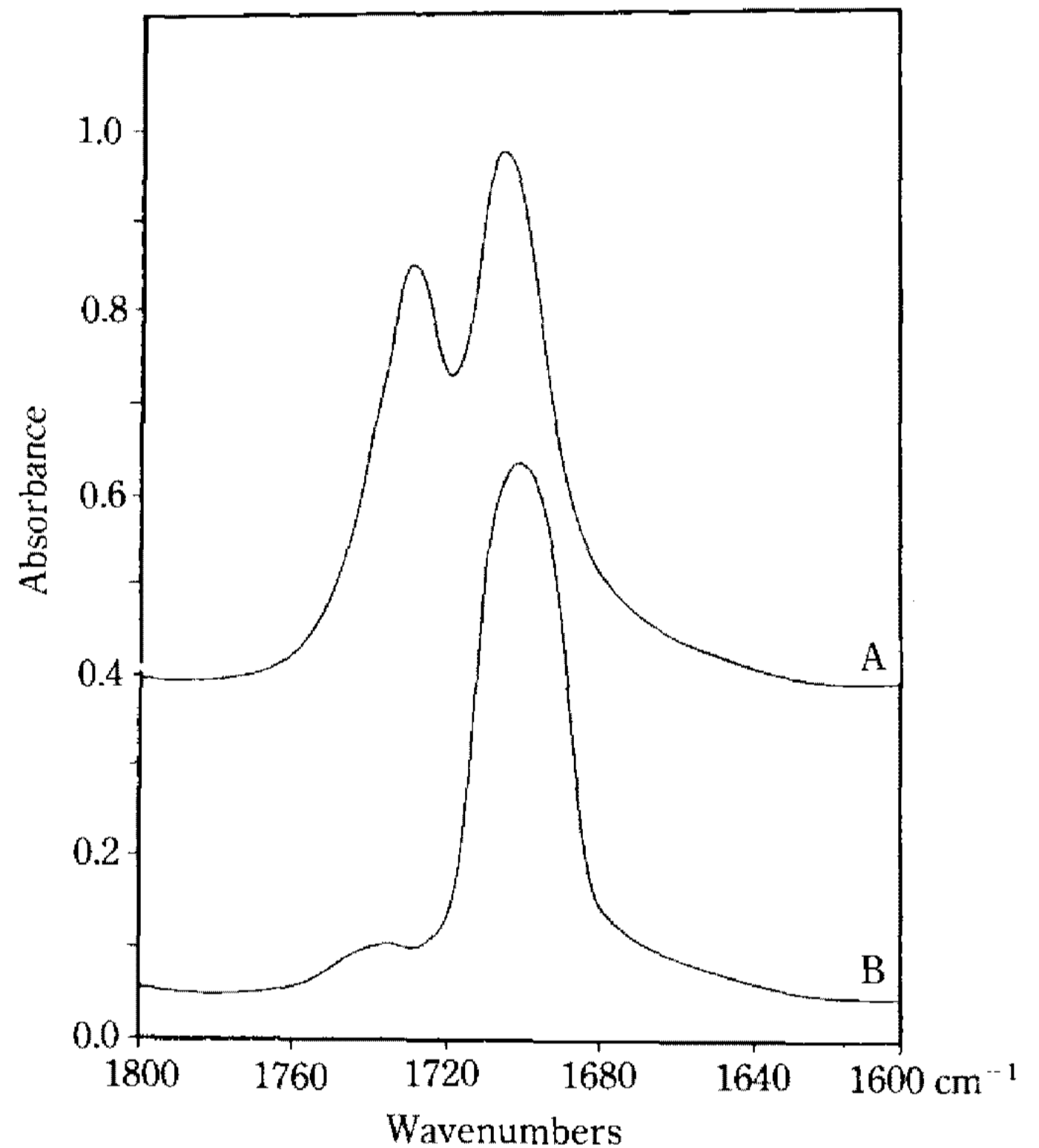


Fig. 5. IR spectrum of EMAA/PEG 50/50 and EMAA.

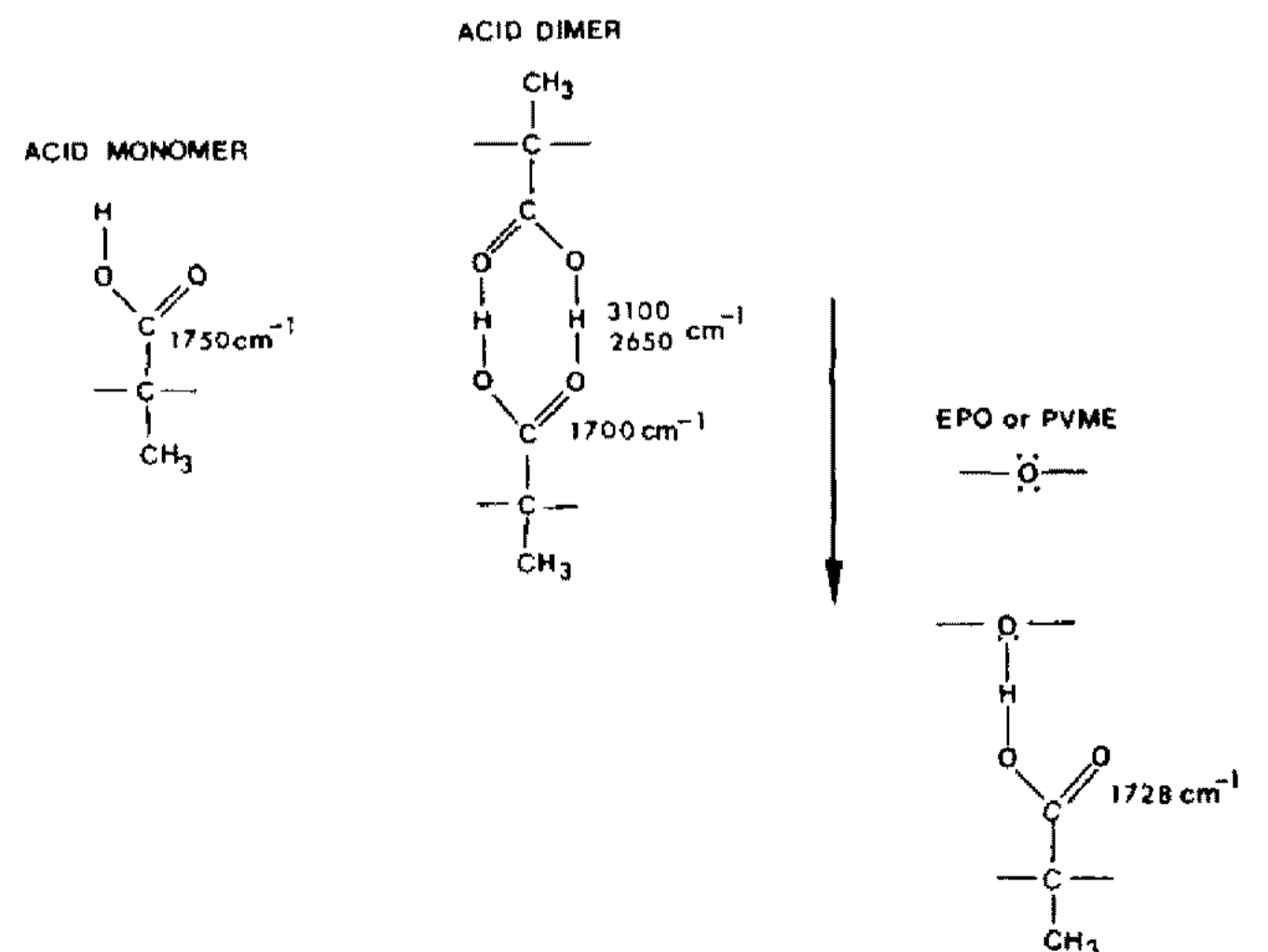


Fig. 6. Diagram of chemical reaction between EMAA and PEG.

**Table 5. Melting temperature(Tm) of EMAA, PEG and EMAA/PEG blends measured by DSC(Differential Scanning Calorimetry)**

Films	1st run Tm(°C)	2nd run Tm(°C)
EMAA	55	—
PEG	—	68
EMAA/PEG 90/10	60	—
EMAA/PEG 80/20	61	62
EMAA/PEG 70/30	63	62
EMAA/PEG 60/40	62	63
EMAA/PEG 50/50	64	68

2nd test was run with time interval.

C=O에 기인한 것이며(Fig. 6), 이로부터 EMAA와 PEG 사이에는 상용성이 있는 것으로 확인되었다. EAA(Ethylacrylic acid)/PEG의 경우도 마찬가지로의 결과를 보였다.

EMAA, EAA, PEG 및 EMAA/PEG, EAA/PEG 블랜드 필름의 DSC 실험으로부터 얻은 결과를 Table 5에 요약하였다. 이 결과는 EMAA와 PEG의 상용성을 조사하기 위한 것으로 EAA/PEG blend의 조성비에 따라 블랜드 필름 내에서의 PEG 결정의 용융온도가 낮아짐을 보여주고 있다. 이와같은 결과는 EMAA 및 EAA의 카르복실산기와 PEG의 에테르기와의 강한 분자간 수소결합에 의해서 상용성을 나타내기 때문인 것으로 사료되며, 상기와 같이 PEG와 EMAA, EAA 블랜드 필름을 제조할 수 있으며, PEG의 분해로 인하여 공해를 감소시킬 수 있다고 사료된다.

## 요 약

PEG를 탄소원과 에너지원으로서 이용하는 미생물을 자연계에서 분리하였고, PEG의 분자량이 높아질수록 분해 미생물의 성장이 감소하였다. 또한, 액체 배양 실험에서도 PEG 농도가 감소하였다. 동정 실험 결과 *Flavobacterium* sp.인 것으로 조사되었다. 분해율은 PEG 18500이 약 18.8%였으며 PEG 10000은 약 25.4%인 것으로 조사되었다. PEG film의 제조를 위해 EMAA 및 EAA와의 상용성을 적외선 분광(IR) 스펙트럼을 사용하여 조사한 결과, EMAA와 EAA의 카르보닐기와 PEG의 에테르기와의 강한 수소결합의 형성으로 블랜드 필름의 제조시 상용성이 있는 것으로 확인되었다.

## 감사의 말

본 연구는 1992년도 한국과학재단 연구비 지원(KOSEF 921-9900-004-2)에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

- Cox D.P. 1983. The biodegradation of polyethylene glycols. *In Advanced in Appl. Microbiol.* **23**: 173-194.
- Kawai, F., T. Kimura, Y. Tani, K. Ogata, T. Ueno, and H. Fukami. 1978. Bacterial oxidation of polyethylene glycol. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 679-684.
- Kawai, F., M. Fukay, Y. Tani, and K. Ogata. 1977. Identification of polyethylene glycols (PEGs)-assimilable bacteria and culture characteristics of PEG 6000 degradation by a mixed culture. *J. Ferment. Technol.* **55**: 429-435.
- Kawai, F., T. Okamoto, and T. Suzuki. 1985. Aerobic degradation of polypropylene glycol by *Corynebacterium* sp. *J. Ferment. Technol.* **63**: 239-244.
- Kawai F. 1988. The biochemistry of degradation of polyethers. *CRC* **6**: 273-307.
- Bernhard, S. and M. Stieb. 1983. Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1905-1913.
- Christine L.C. and T.R. Johnson. 1984. *Laboratory Experiments in Microbiology*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, U.S.A.
- Peter, H.A.S., S.M. Nicholas, M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2, Waverly Press, Inc., Baltimore, U.S.A.
- Macfaddin, J.F. 1984. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 2nd ed. Williams & Wilkins, U.S.A.
- Harold J.B. 1990. *Microbiological Applications: a Laboratory Manual in General Microbiology*, Pp. 181-184. 5th ed. Wn. C. Brown Publishers, U.S.A.
- Hosoya H., M. Nobuyosi, S. Yuji, T. Eishi, T. Makoto, Y. Makari, and T. Gakuzo. 1978. Bacterial degradation of synthetic polymers and oligomers with the special reference to the case of polyethylene glycol. *Agric. Biol. Chem.* **42**: 1545-1552.
- Lee J.H., G.D. Whang, D.W. Cho, and U.H. Chun. 1993. Biodegradation of azo and reactive dyes with *Pseudomonas* strains. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **8**: 150-155.
- Ryu B.H. and S.H. Ju. 1992. Isolation and characterization of caffeine degradating bacteria. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**: 215-220.
- Paul S. and S. Diana. 1987. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, Pp. 516. 2nd ed. John Wiley & Sons, Great Britain.

(Received April 8, 1994)