

## Terephthalic Acid를 分解하는 *Pseudomonas* sp. T-1의 分離 및 特性

서 승 교

신일전문대학 환경관리과

## Isolation and Characterization of *Pseudomonas* sp. T-1 Degrading Terephthalic Acid

Seung-Kyo Suh

Department of Environment Management, Shinil Christian College

### ABSTRACT

26 bacterial strains capable of growing on Terephthalic acid (TPA) in minimal medium were isolated from soil and wastewater by selective enrichment culture, and among them, one isolate which was the best in the cell growth and TPA degradation was selected and identified as *Pseudomonas* sp. T-1 by its characteristics. Cell growth almost revealed a stationary phase at 24 hrs after cultivation. Cell growth dramatically increased in a minimal medium containing 0.1% of TPA as a sole carbon source and TPA was not detected any more at 80 hrs after cultivation. Therefore, it is suggested that *Pseudomonas* sp. T-1 could be effectively used for the biological treatment of wastewater containing TPA.

**Keywords:** *Pseudomonas* sp. T-1, Terephthalic acid.

### I. 서 론

섬유공업의 발달로 천연섬유에서 화학섬유에 이르기까지 다양한 염색가공법이 개발되었으며 초기에는 단순가공 공정에 그쳤으나, 최근에는 Polyester감량가공 및 새로운 염색가공 재료의 생산 보급으로 새로운 가공법이 급속도로 확산되고 있으며 발생하는 염색가공폐수 역시 고농도의 합성유기물질과 난분해성물질을 함유하고 있어 폐수처리공정에 많은 문제점을 일으키고 있는 실정이다.

일반적으로 염색공장폐수의 특성은 색도, pH, 알칼리도, 유기물농도가 높고 고온이며 염료에 따라 독성이 있을 때도 있다.

따라서 염색 가공공장 폐수는 고부하, 다변성, 약성폐수로서 Polyester 감량 공정에서 배출되는 주 성분은 Terephthalic acid (TPA)와 Etylene glycol이며 이들은 중량비로 약 7:3 비율로 용해되어 있으며, 호발공정중에는 Polyvinyl alcohol (PVA)과 같은 물질을 다량 함유하고 있어 생물학적 공정에 의한 처리시 거의 제거되지 않고 유출수에 함유되어

자연환경에 배출되므로 공공수역의 수질에 상당한 영향을 미치고 있다.

Polyester 감량폐수의 처리를 위하여 최근에는 Polyester 감량폐수를 황산으로 처리하여 pH 4로 중화시켜 TPA를 석출시킨 다음 탈수 건조시켜 폐기물을 처리하는 방법이 연구되고 있으나 석출 침전된 TPA slurry는 80%의 수분을 함유하고 있어 탈수여액이 고농도 폐수로 이의 처리에 많은 문제점을 가지고 있는 것으로 지적되었다. 그리고 김과 조<sup>1)</sup>에 의해 고정화미생물 공정의 개발에 관하여 연구되었으며, 박 등<sup>2,3)</sup>은 산소활성오니공정과 응집공정결합에 의한 처리에 관해서, 정 등<sup>4)</sup>은 전처리공정에서 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하여 최적 주입량에 따른 pH, 유기물질의 농도변화 등을 조사하였다.

한편, 생물학적 방법에 의해 PVA를 제거하고자 하는 연구가 행해져 PVA 분해균으로 *Pseudomonas*속 등이 분리<sup>5-10)</sup>되었으며 국내에서도 *Pseudomonas* 속에 의한 PVA 분해에 대하여 연구가 보고<sup>11-13)</sup>된 바 있다.

그러나 Polyester 감량폐수를 활성슬러지법에 의

한 처리효과를 증가시키기 위하여 TPA 분해에 대한 연구가 국내에서는 거의 없는 실정이기에 본 연구에서는 TPA를 빠른 시간내에 분해하여 자화합으로써 염색공장 폐수중의 TPA를 분해할 수 있는 균을 토양으로부터 분리한 후 그 분해능 및 생리학적 특성을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 배지 및 배양조건

미생물의 분리 및 배양에 사용한 최소배지의 조성은 증류수 1l에  $\text{NaNO}_3$  1g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g, KCl 0.5g을 녹였으며 pH는 7.0으로 조절하였다. 균배양은 30°C에서 120 strokes/min으로 진탕 배양하였으며 유일탄소원으로 Terephthalic acid (TPA) 1g을 첨가하였다. 균체량은 분광광도계를 사용하여 660 nm에서 측정하여 나타내었다.

### 2. 균주의 분리 및 선별

TPA 분해균주를 분리하기 위하여 염색공장부근의 하천 및 토양 등의 균원시료를 멸균된 증류수로 희석한 뒤 최소배지에 TPA를 0.1% 첨가하여 배양하였다. 이 배양액을 분리원으로부터 enrichment culture를 한 뒤 고체최소배지에 도말하여 배양한 후 나타나는 colony를 순수분리하였다. 순수분리된 균주중 TPA 분해능이 우수한 균주를 최종선발하였다.

### 3. 균주의 동정

균주의 형태학적, 생리적, 생화학적 특징을 조사한 뒤 미생물의 분류 및 동정<sup>14)</sup>에 따라 분류학적 성질을 조사하였으며, Bergey's manual of systematic bacteriology의 기준에 준하여<sup>15)</sup> 동정하였다.

### 4. TPA의 분석

배양액중 TPA의 정성은 배양액을 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 250 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 정량을 위하여서는 HPLC (Water Associate 2700 PSD)를 사용하여 Table 1과 같은 조건에서 분석하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 균주의 분리 및 선별

TPA를 유일 탄소원으로 첨가한 최소배지 및 최소고체배지를 이용하여 TPA분해균주를 분리한 결과

**Table 1.** The operating condition of HPLC for the TPA analysis

Item	Conditions
Column	Novapak C18 (3.9 × 300 mm)
Detector	Water 410 Differential Refractometer
Mobile phase	$\text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} : \text{Propionic acid} = 80 : 20 : 0.1$
Flow rate	0.8 ml/min
Injection volume	10 $\mu\text{l}$
Wavelength	250 nm
Chart speed	0.25 cm/min

**Table 2.** Characteristics of the selected strains

Strain	Cell growth (660 nm)
T-1	0.55
T-2	0.42
T-3	0.38
T-4	0.37
T-5	0.28
T-6	0.41

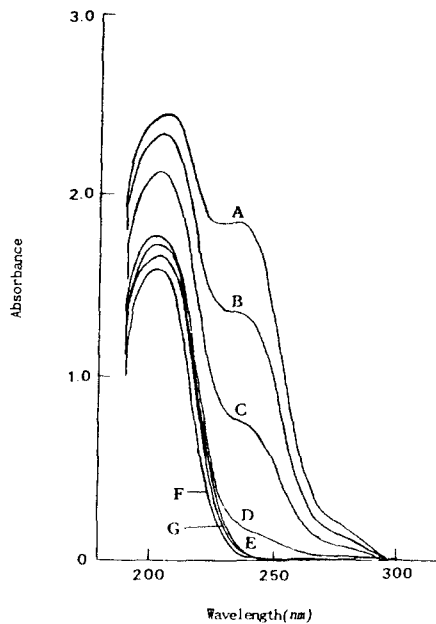
26균주가 얻어졌다. 분리된 균주중 6개의 균주를 선별해서 TPA분해능 및 생육정도를 비교검토한 결과 Table 2에서와 같이 T-1 균주가 생육도 및 분해능이 가장 좋은 것으로 나타나 T-1 균주를 실험 공시균으로 사용하였다.

### 2. TPA의 분해 검정

TPA분해 세균중에서 선별된 T-1균주의 TPA분해능을 UV-Spectrophotometer로 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 최소배지에 TPA를 단일탄소원 및 에너지원으로 첨가하였을 때 200 nm에서와 250 nm에서 최대흡광도를 나타내는 2개의 peak가 나타났다. 이중에서 200 nm에서의 peak는 TPA가 알칼리 용액에서 용해하기 때문에 NaOH로 알칼리로 한 뒤 TPA를 녹인 후 HCl로 중화하는 과정에서 생성된 NaCl염의 peak로 확인되었으며, 250 nm에서의 peak가 TPA의 peak인 것으로 확인되었다. 그러므로 TPA 분해능을 조사하기 위하여 TPA함유 배지에서 3일간 배양하였을 때 250 nm에서 최대흡광도를 나타냈던 TPA는 급격히 감소하였다.

### 3. 균주의 동정

분리된 균주 T-1의 현미경 사진은 Fig. 2와 같으며, 그 형태적, 생리적 및 생화학적 특성 등을 조



**Fig. 1.** UV-Scanning spectra of terephthalic acid during degradation by *Pseudomonas* sp. T-1. A, B, C, D, E, F, and G represent the culture time. A: 0 hr, B: 12 hr, C: 24 hr, D: 36 hr, E: 48 hr, F: 60 hr, G: 72 hr.



**Fig. 2.** The picture microphotograph of isolated strain T-1.

사하여 Table 3, Table 4, Table 5에 나타내었다. T-1 균주는 일반적으로 gram 염색에서 음성, 반유동성배지에서 운동성이 있었으며 집락의 색은 갈색이었다. Oxidase test, indol 생성능, H<sub>2</sub>S 생성능, urease test, lysine dehydrolyase 및 ornitin decar-

**Table 3.** Morphological and culture characteristics of the isolated strain T-1

Characteristics	Strain
Gram staining	negative
Motility	motile
Form	Rod
Nutrient	Membraneous
Colony color	Yellow-Brown
Opt. Temperature	30C
Opt. pH	7.5

**Table 4.** Carbohydrate utilization of the isolated strain T-1

Characteristics	Strain
Assimilation	
Arabinose	+ -
Glucose	+
Mannose	+
Maltose	+
Melibiose	+ -
Rhamnose	-
Sucrose	+
Inositol	-
Sorbitol	-
Mannitol	+
Gluconate	+
Citrate	+
Phenylacetate	-
N-acetylglucosamine	+

+: positive, -: negative.

**Table 5.** Physiological characteristics of the isolated strain T-1

Characteristics	Strain
Arginine dehydrolyase	+
Catalase test	+
Galactosidase	+
Fluorescent pigments	+
Gelatin liquefaction	+
H <sub>2</sub> S production	-
Indol production	-
Nitrate reduction	+
Lysine dehydrolyase	-
Ornithin decarboxylase	-
O-F test	o
Oxidase test	-
Starch hydrolysis	+
Urease test	-
V-P test	-

+: positive, -: negative, o: oxidative.

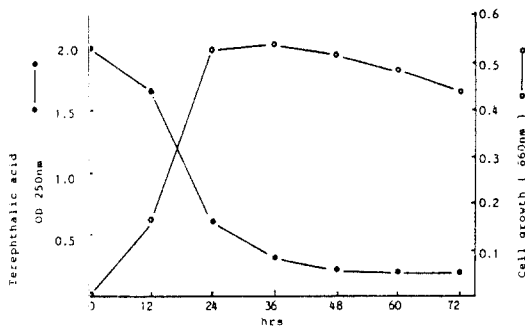


Fig. 3. Time course of cell growth and degradation of terephthalic acid in a minimal medium containing terephthalic acid as a sole carbon source.

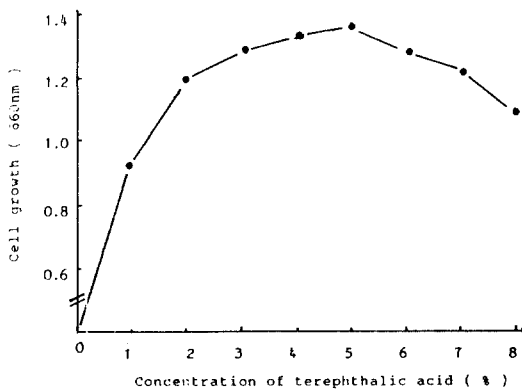


Fig. 4. Effect of terephthalic acid concentration on growth of the isolated strain.

boxylase의 생성능은 음성이었고, gelatin liquefaction, nitrate 생성능, catalase test, fluorescent pigment 생성능, 전분가수분해능,  $\beta$ -galactosidase 생성능 및 arginine dehydrolase 생성능은 양성이었으며 O-F test에서는 oxidation으로 나타났다.

이상의 분류학적 성질을 종합해 볼 때 공시균 T-1 균주는 gram 염색 및 V-P test가 음성, catalase test, gelatin liquefaction이 양성이고, 호기성이며 운동성이 있으며, Fig. 2에서와 같이 간균인 점으로 보아 *Pseudomonas* sp.속과 가장 유사한 미생물로 밝혀져 분리균주를 최종적으로 *Pseudomonas* sp. T-1로 명명하였다.

#### 4. 분리균주의 특성

*Pseudomonas* sp. T-1균을 TPA을 유일 탄소원으로 첨가한 최소배지에서 배양하여 배양시간의 경과

에 따른 TPA의 분해, 균체증식에 대한 변화를 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 균의 생육은 배양후 24시간에 정지기에 들어서면서 배양액의 흡광도는 0.55로 나타났다. 이때 배양액의 TPA는 약 98% 이상 분해되었다. 또한 72시간 경과후에는 TPA의 농도가 10 mg/l 정도만이 잔류하였다.

균의 생육에 미치는 TPA의 농도를 조사하기 위하여 TPA를 농도별로 첨가하여 배양한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 그 결과 5%까지는 TPA의 농도가 증가할수록 생육효과가 좋아졌으나 5% 이상에서는 균 생육이 저해를 받는 것으로 사료되었다. 따라서 고농도의 TPA자화성의 특성을 나타내어 TPA의 농도가 높은 폐수의 생물학적 처리에 유용한 균주로 이용될 수 있다고 판단된다.

## IV. 결 론

토양 및 폐수등의 균원시료로부터 Terephthalic acid (TPA)를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 26주의 균을 분리하였으며, 분리된 균주중에서 분해능 및 생육속도가 우수한 균주를 선발 동정하여 *Pseudomonas* sp. T-1로 명명하였다. 균 생육은 배양후 거의 24시간에서 정지기에 도달하였다. *Pseudomonas* sp. T-1는 유일탄소원으로 TPA가 첨가된 배지에서 급격한 균체 증식을 나타내었으며, TPA는 배양후 80시간에 배양액에서 검출되지 않았다. 그러므로 *Pseudomonas* sp. T-1은 TPA가 함유된 폐수의 생물처리에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

- 1) 김정목, 조무환 : Polyester감량폐수의 처리를 위한 새로운 고정화 미생물 공정의 개발, 대한환경공학회지, **15**(6), 743-753, 1993.
- 2) 박영규, 이철희, 김동일 : 산소활성오니공정과 응집 공정결합에 의한 염색공단종합폐수처리, *J. KSWQ.*, 187-192, 1993.
- 3) 박영규, 이철희, 윤태완, 장일현 : 부유메디아생물막공정에 의한 염색공단 종합폐수처리 (응집공정으로 처리한 유출수의 생물학적처리), 대한환경공학회지, **16**(1), 43-50, 1994.
- 4) 정운진, 양태두, 김용하 : 폴리에스테르 감량가공폐수의 최적처리방안에 관한 연구, 대한상하수도학회지, **1**, 20-28, 1993.
- 5) Tomoo Suzuki, Yoshihiro Ichihara, Masaru Yamada and Kenzo Tonomura : Some Characteris-

- tics of *Pseudomonas* 0-3 which utilize Polyvinyl Alcohol, *J. Agr. Bio. Chem.*, **37**(4), 747-756, 1973.
- 6) Masayuki Shimao, Syuji Onishi, Nobuo Kato and Chikahiro Sakazawa : Pyrroloquinoline Quinone-Dependent Cytochrome Reduction in Polyvinyl Alcohol Degrading *Pseudomonas* sp. Strain VMI5 C, *Applied and Environmental Microbiology*. 275-278, 1989.
- 7) Tomoo Suzuki : Purification and some Properties of Polyvinyl Alcohol Degrading Enzyme Produced by *Pseudomonas* sp. *Journal Agr. Bio. Chem.*, **40** (3), 497-504, 1976.
- 8) Kiyofumi Sakai, Nobutake Hamada and Yasuto Watanabe : Degradation Mechanism of Polyvinyl Alcohol by Successive Reaction of Secondary Alcohol Oxidase and Diketon Hydrolase from *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.*, **50**(4) 989-996, 1986.
- 9) Chikahiro Sakazawa, Masayuki Shimao, Yoshifumi Tanifumi and Nobuo Kato : Symbiotic Utilization of Polyvinyl Alcohol by Mixed Cultures, *Journal Applied and Environmental Microbiology.*, 261-267, 1981.
- 10) Nishikawa. H. and Y. Fujita : Polyvinyl Alcohol Degradation Techniques Using Microorganism, *Chem. Econ. Eng. Rev.*, **7**(4), 33-41, 1975.
- 11) 정선용, 조윤래, 조무환, 김정목 : 폴리비닐 알콜분해균주의 분리 및 특성, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 20. No. 1, 96-101, 1992.
- 12) 김정복, 조무환, 조윤래, 정선용 : Polyvinyl Alcohol 분해 자화균의 성장 특성과 최적 배양조건, *한국생물공학회지*, 제6권 4호, 363-368, 1991.
- 13) 조윤래 : Polyvinyl Alcohol 이용 공생균 *Pseudomonas* sp. J2W와 *Xanthomonas* sp. J2Y의 특성, *한국농화학회지*, **35**(1), 30-35, 1992.
- 14) 長谷川武治 편저, 微生物の分類と同定, 學會出版.
- 15) Krieg, N. R. and J. G. Holt : *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*. 1984.