

## Ethylene Glycol 분해균주의 순수분리 · 동정 및 배양특성

류원률 · 최장승 · 조무환

영남대학교 화학공학 및 공업화학부, <sup>1</sup>한국염색기술연구소 환경보전부  
 (접수 : 1998. 5. 4., 게재승인 : 1998. 6. 26.)

## Pure Isolation, Identification and Culture Characteristics of Ethylene Glycol Degrading Bacteria

Won Ryul Ryu, Jang Seung Choi<sup>1</sup>, and Moo Hwan Cho<sup>†</sup>

School of Chemical Engineering & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Environment Preservation, Korea Dyeing Technology Center, Taegu 703-010, Korea

(Received : 1998. 5. 4., Accepted : 1998. 6. 26.)

A large quantity of ethylene glycol(EG) is remained in the effluent after pretreating polyester weight-loss wastewater physicochemically in the first stage and must be treated biologically in the second stage. Therefore, an excellent EG-utilizing bacteria strain was isolated from the natural system and the optimal culture conditions of the strain were investigated. The optimal culture conditions of temperature, pH, and nitrogen source were found to be 35°C, 7.5 and ammonium chloride, respectively, when COD<sub>Cr</sub> removal efficiency was more than 90%. The growth of strains and EG removal efficiency was slightly improved by adding elements such as niacin and biotin. With increasing inoculation size in a batch culture, the removal efficiency of EG was conspicuously increased. Growth rate was inhibited when the initial concentration of EG was more than 30g/L. The strain was identified as *Pseudomonas* sp. based on morphological and biological characteristics and named as *Pseudomonas* sp. EG1.

Key Words : *Pseudomonas*, ethylene glycol, isolation, polyester weight-loss wastewater

### 서론

Polyester 감량가공 공정은 일반적으로 100~110°C, 5% NaOH수용액에 polyester 섬유를 투입하여 반응시키면, TPA-2Na(DST)와 ethylene glycol(EG)이 가수분해된다. 이 때 감량율은 공정에 따라 20~30% 정도이고 손실된 NaOH를 보충하면서 10~30회 정도 감량하여 polyester oligomer의 침전물이 생기면 전량 배출한다. Polyester 섬유의 외표면에 알칼리가 작용하여 고액 반응에 의해 침식작용이 일어난다(1~4). 일반적으로 polyester 섬유의 염색 가공공정은 Figure 1과 같이 호발, 정련, 셋팅, 감량, 염색과정을 거치는 데 그 중 감량공정은 polyester 섬유가 가수분해되어 TPA-2Na(DST)염과 EG가 NaOH와 함께 생성되며, 그 속도는 처리액의 온도 및 alkali 농도에 따라 변한다. 이와 같은 가수분해는 섬유표면에서부터 순차적으로 진행되며 알칼리 처리에 의한 염색성과 흡수성의 변화는 보이지 않고 단지 유연성만 증가한다고 알려져 있다.

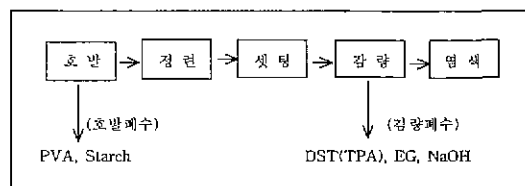


Figure 1. Dyeing process of polyester textile(PVA : Polyvinyl Alcohol, DST : Disodium terephthalate, EG : Ethylene glycol).

이러한 감량공정은 회분식과 연속식이 있으며, 과거에는 회분식을 많이 사용하였으나 현재는 연속식을 많이 사용하고 있다. 연속식에 비해서 회분식의 농도가 현저히 높은 것으로 알려져 있다.

이 때 발생하는 polyester 감량폐수는 감량율에 따라 수질변동이 심하고 고농도, 강알칼리 폐수로서 주성분은 EG, DST, NaOH이고 EG와 DST는 2.72 : 7.28의 무게비로 포함되어 있다.

이와 같은 조성을 가진 감량 농폐액은 COD<sub>Mn</sub> 20,000mg/L, BOD<sub>5</sub> 100,000mg/L로 BOD<sub>5</sub>/COD<sub>Mn</sub> 비가 5배 정도의 대단히 농도 편차가 심한 고농도 유기성 폐수이다.

따라서 polyester 감량가공시 발생하는 감량폐수는 고부하, 다변성 악성폐수로 이를 처리하는 데는 어려움이 많다. 그리고 현

<sup>†</sup> Corresponding Author : School of Chemical Engineering & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea  
 Tel : 053-810-2517, Fax : 053-814-8790  
 e-mail : mwcho@ynucc.yeungnam.ac.kr

재 대구염색공단에 polyester 감량가공업체는 36개 업체로 40%를 차지하고 있고 전체 COD오염부하의 68%, BOD오염부하의 84%를 차지함으로써 대구염색공단 폐수처리장에 유입되는 폐수의 대부분을 차지하고 있다. 그러나, 호빌폐수, 감량폐수 및 염색폐수 등의 혼합폐수가 공단 종합폐수처리장으로 유입되고 있기 때문에 polyester 감량폐수만의 연구가 거의 이루어지지 않았으며 염색종합폐수에 관한 연구가 대부분이었다(5~7). 또한 감량폐수 중 DST만의 처리를 위한 연구는 현재 많이 이루어졌지만(8~14), Ethylene glycol(EG)의 분해에 대한 연구는 이루어지지 않고 있다. 특히 EG는 일반적인 활성오니공정에서는 그 처리효율이 낮으며 방류수 기준에 적합한 처리수를 얻기 힘들다. 따라서 본 연구의 목적은 성상이 다르고 난분해성이 포함된 혼합폐수 중 고부하, 다변성 악성폐수로 일러진 polyester 감량폐수만을 따로 분리하여 처리하기 위한 기초연구로서 감량폐수 중 DST를 물리·화학적으로 처리하고 EG를 빠른 시간내에 분해 소화할 수 있는 균주를 순수 분리하여 생물학적 처리공정에 적용하는데 있다.

**재료 및 방법**

**시료 및 배지의 조성**

Polyester 감량폐수의 주성분인 EG를 분해하는 균주를 자연계로부터 분리하기 위하여 EG가 다량으로 유입되는 종합 염색폐수 처리공정의 폭기조, 반응오니, 방류 하천 및 주변토양으로부터 시료를 채취하여 분리원으로 사용하였다.

EG 분해균의 분리용 배지(enrichment medium)는 EG 분해균만이 생육이 가능한 배지로서 탄소원 및 에너지원으로 EG를 사용하였으며, 나머지 조성은 Table 1과 같다. 이 배양액을 EG 한천 배지에 도말하여 성장 가능한 균주를 선별하였고 배양온도는 35℃, pH는 7.5를 유지하였다.

Table 1. EG broth medium

Constituents	Weight or Volume
Ethylene glycol	5.0g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.0g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2g
NaCl	0.1g
Stock solution*	10ml
Distilled water	990ml
pH	7.5

\* Stock solution was made of following agents ;

FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1 g	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.02g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.5mg	MnSO <sub>4</sub>	0.5mg
Ca-pantothenate	0.5mg	inositol	0.2mg
P-aminobenzoate	0.2mg	niacin	0.4mg
pyridoxine	0.4mg	thiamine	0.4mg
biotin	2 μg	vitamin B <sub>12</sub>	0.5 μg
distilled water	100ml		

**EG 분해균주의 순수분리 및 동정**

각각 채취한 토양 및 하수를 멸균 증류수로 현탁한 후 그 상등액을 10ml를 취하여 EG broth 배지 25ml, 멸균 증류수 15ml를 혼합하여 35℃에서 10일간 회전속도 180rpm으로 진탕 배양하였다. 진탕배양후 그 배양액을 0.1ml씩 취하여 EG agar 평판배지에 도말하여 35℃에서 평판배양하였다. 평판배지상의 여러 colony를 1백금이씩 취하여 다시 EG 평판배지에 희석하여 배양하였다. 희석하여 얻은 여러 가지 colony들을 EG broth 배지에 1백금이씩 접종하여 균의 성장상태와 EG 분해능을 조사하였다. Colony에 따라 균 성장율과 EG 분해능에 많은 차이를 보였으며, 균 성장율과 EG 분해능이 가장 우수한 colony를 실험균으로 선정하였고 이들 균을 삼단희석법에 의해 다시 순수 분리하였다.

순수 분리한 EG 분해균을 전자현미경에 의한 형태학적 관찰과 배양적, 생리적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그리고 각 균의 동정은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(15)에 따랐으며, "Microbiology a laboratory manual"(16) 및 "Manual of Methods for General Bacteriology"(17) 등의 실험방법에 준하여 행하였다.

**분석방법**

균의 성장은 UV-Spectrophotometer(UV-160A, Shimadzu)를 사용하여 660nm에서 흡광도를 측정하였고, EG의 분해능은 COD<sub>Cr</sub>법에 의해 간접적으로 측정하였으며 Figure 2에 EG와 COD와의 상관관계를 나타내었다. EG 1,000 mg/L는 COD<sub>Mn</sub>, COD<sub>Cr</sub>의 값이 각각 1,100 mg/L, 1,280 mg/L로 나타났다. 그리고 모든 실험은 공해공정 시험법(18)과 Standard method(19)에 준하였다.

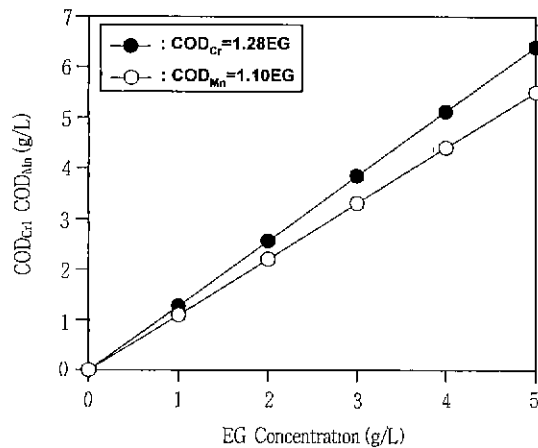


Figure 2. Relation of EG concentratin with COD.

**EG 분해균주의 성장 특성 조사**

순수 분리한 균주 중 가장 우수한 균주에 대하여 EG가 완전히 분해될 때까지 시간에 따른 분해율을 조사하였다. 또한 EG를 균주가 분해하는데 온도가 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위하여 배양온도를 25℃에서 45℃까지 단계별로 조절하여 2일간 배양시킨 후 각 온도에서 균주의 성장과 분해율을 조사하여 비교하였다.

그리고, 위의 최적 조건에서 EG의 분해에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 초기 pH를 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 및 NaOH로 5.0에서

10.0까지 단계별로 조절하여 균주의 성장과 분해율을 조사·비교하였다. 또한, 질소원의 영향을 조사하기 위하여 분리용 배지로 사용된 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 대신 각종 유기·무기 질소원을 첨가하여 균주의 성장과 분해율을 조사·비교하였다.

그리고, stock solution에 들어간 여러 가지 미량원소가 균주의 성장에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하기 위해 분리용 배지에 미량원소를 하나씩 제거해 가며 실험을 하여 균주의 성장과 분해율을 조사하였다. 또한, 접종량에 따른 영향을 알기 위해서 완전히 성장한 전 배양액의 초기 접종농도를 0.1%, 1%, 10%로 하여 균주의 성장과 분해율을 조사·비교하였다.

**비성장 속도**

기질의 농도가 미생물의 성장에 어떠한 영향을 미치는지를 알기 위하여 회분배양시 EG의 초기농도를 100mg/L에서 100,000mg/L까지 단계적으로 변화시켜 균주의 비성장속도( $\mu$ )값을 구하였다.

**결과 및 고찰**

**EG 분해균의 분리**

순수분리 결과 4종류의 분해균을 얻었으며 각각의 성장과 분해율을 Table 2에 나타내었다. EG 분해균은 노란색의 colony가 연회색의 colony보다 성장과 분해율이 우수하였으며, 간균으로 나타났다. Strain EG3보다 EG1이 분해율이 약간 우수하여 strain EG1을 최종 실험균으로 선정하였고 이 균은 EG가 다량으로 유입되는 감량폐수 처리공정의 폭기조에서 순수 분리한 균주였다. Figure 3은 가장 우수한 균주인 strain EG1의 시간에 따른 분해곡선을 나타내었다. 성장 2일 후 80%이상의 우수한 분해율을 나타내었다.

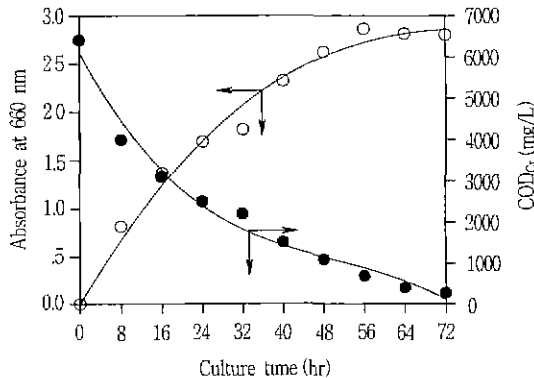


Figure 3. Growth and biodegradation rate of the EG1 strain (Initial pH : 7.5, temp. : 35°C, initial COD<sub>Cr</sub> : 6,413mg/L)

Table 2. Characteristics of EG strains.

Strains	Colony shape	Colony color	Cell shape	Degradation rate(%)
EG1	Smooth	Yellow	Rod	82.8
EG2	Smooth	Bright grey	Coccus	52
EG3	Entire	Yellow	Rod	77
EG4	Entire	Bright grey	Coccus	42.3

**균주 동정**

순수 분리한 EG 분해균주인 EG1의 형태학적 특성과 배양학적 특성을 Table 3과 Figure 4에 나타내었으며 생리학적 특성은 Table 4에 나타내었다. EG1 균주는 EG agar 배지상에서

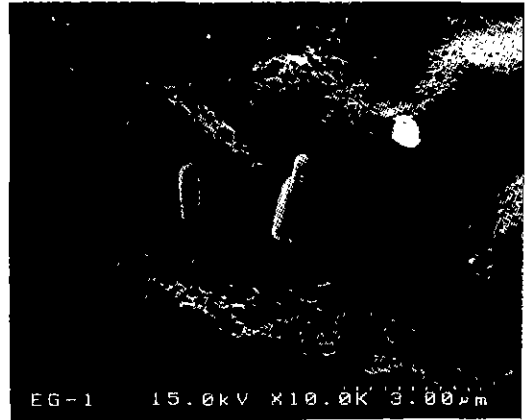


Figure 4. Scanning electron micrograph of the EG1 strain ( $\times 10,000$ ).

Table 3 Morphological and culture characteristics of the isolated strain EG1

Characteristics	Strain EG1
Cell form	Rod
Cell size ( $\mu$ m)	1~2 $\mu$ m
Flagella	○
Motility	+
Growth at 41°C	+
Growth at 4°C	-
Growth at pH 3.6	-
Growth at pH 4	-
Need at least 12~15% NaCl for growth	-
Requirement for growth factors	-

+ : positive - : negative

Table 4. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain EG1

Characteristics	Strain EG1
Gram stain	-
Oxidase reaction	+
Catalase reaction	+
Hydrolysis of	
starch	-
casein	-
Tween 80	+
Fluorescence pigment	-
Pyocyanin pigment	-

+ : positive - : negative

노란색의 colony를 형성하는 Gram 음성균으로 편모를 가진 간균이며 growth factor를 요구하지 않았다. 또한 catalase, oxidase 등의 효소를 생산하였고 starch, casein을 분해할 수 없었으나 Tween 80은 분해하였다. 이와 같은 성질과 함께 세포의 크기와 형태, 영양물질 이용성 등이 *Pseudomonas*속과 동일하였다. 이러한 동정 결과를 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"에 의해 고려해 볼 때 EG1균주는 *Pseudomonas* sp. 로 추정되어 *Pseudomonas* sp. EG1으로 명명하였다.

**온도 및 pH의 영향**

Figure 5는 분리된 균이 EG를 분해하는 데 미치는 온도의 영향을 나타내었으며, 접종 2일 후의 결과이다. 그림에서 보는 바와 같이 대체적으로 고온에서 양호한 성장을 보였으며 35°C에서 가장 우수한 성장과 분해율을 나타내므로 최적온도를 35°C로 선택하였다. 그리고 최적 온도인 35°C에서 초기 pH를 5.0에서 10.0까지 단계적으로 변화시켜 실험한 결과 pH 7과 8사이에서 양호한 성장과 분해를 보였으며 최적 pH는 7.5였다(Figure 6). 또한, EG분해균의 성장과 함께 초기 pH는 7.5에서 6.9로 변화하였다.

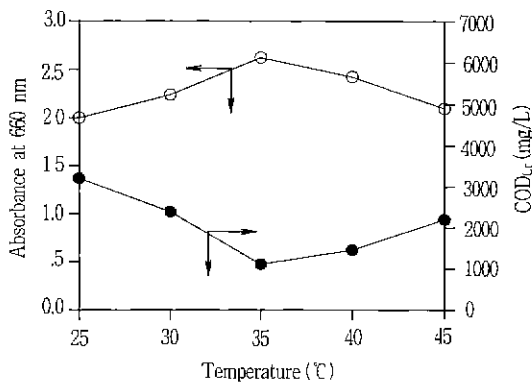


Figure 5. Effect of temperature on growth and biodegradation rate for the EG1 strain after 2 day culture (Initial pH : 7.5, initial COD<sub>Cr</sub> : 6,413mg/L).

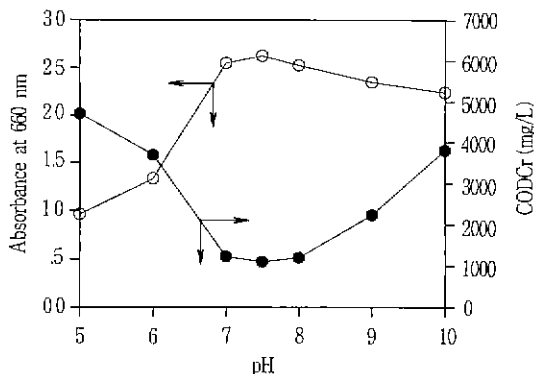


Figure 6. Effect of initial pH on growth and biodegradation rate for the EG1 strain after 2 days culture (Temp : 35°C, initial COD<sub>Cr</sub> : 6,413mg/L).

**질소원 및 미량원소의 영향**

분리용 배지에 사용된 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 대신 여러 가지 유·무기 질소원을 각각 첨가하여 성장과 분해율을 측정된 결과 일반적인

로 유기 질소원인 Urea에서 다른 균들은 양호한 성장을 보이나 본 연구에서 분리한 EG1균은 urca에서 성장이 저조하였으며 무기 질소원인 NH<sub>4</sub>Cl에서 가장 우수한 결과를 나타내었으며 이때 EG의 제거율은 92%로 아주 우수하였다(Table 5). 그리고, 분리용 배지에 사용된 stock solution의 미량원소를 하나씩 제거하면서 성장과 분해율을 측정한 결과 niacin과 biotin이 균주에게 가장 큰 영향을 미쳤으며 각각 71%, 74%의 EG 제거율을 보였다(Table 6).

Table 5. Effect of nitrogen sources on the cell growth and COD removal efficiency for EG1 strain after 48h culture (Initial pH : 7.5, temp. : 35°C, initial COD<sub>Cr</sub> : 6,413 mg/L).

Nitrogen sources	Cell growth (O.D. <sub>660</sub> )	Removal efficiency of COD <sub>Cr</sub> (%)
None	0.34	17.4
NH <sub>4</sub> Cl	2.89	92.0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.62	82.8
Urea	1.48	50.0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2.71	82.1
NaNO <sub>3</sub>	2.14	75.0

Table 6 Effect of trace elements on the cell growth and COD removal efficiency for strain EG1 after 48h culture (Initial pH : 7.5, temp. : 35°C, initial COD<sub>Cr</sub> : 6,413 mg/L).

Eliminated element	Cell growth (O.D. <sub>660</sub> )	Removal efficiency of COD <sub>Cr</sub> (%)
None	2.62	82.8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2.61	81.0
MnSO <sub>4</sub>	2.50	80.0
Ca-pantothenate	2.40	78.0
Inositol	2.59	80.0
Niacin	2.33	71.0
P-aminobenzoate	2.41	76.0
Pyridoxine	2.50	77.0
Thiamine	2.50	77.5
Biotin	2.31	74.0
Vitamin B <sub>12</sub>	2.60	79.0
All	2.21	71.0

**초기 접종량의 영향**

액체배지에서 충분히 성장한 배양액을 새로운 배지에 접종할 때 접종량을 0.1%, 1%, 10%로 각각 변화시켜 시간에 따른 균주의 성장과 분해율을 Figure 7에 나타내었다. 접종량의 증가에 따라서 EG 분해시간이 감소되었으며 배양 2일 후 각각 24.2%, 56%, 82.8%의 분해율을 나타내었다. 이것으로 볼 때 균체의 농도가 EG의 분해에 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다

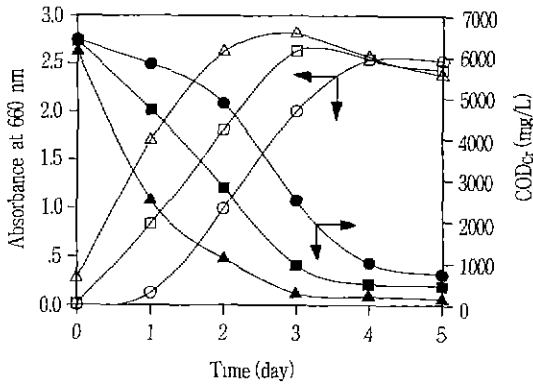


Figure 7. Effect of inoculation size on growth and biodegradation rate for the EG1 strain (Initial pH : 7.5, temp. : 35°C, initial COD<sub>Cr</sub> : 6,413mg/L)

**비성장 속도**

기질의 농도는 미생물의 성장에 많은 영향을 미친다. 대사과정에서 보면 필요 이상의 물질은 효소생성에 저해되고, 또한 효소의 feed back inhibition 등을 통해 기질이 필요 이상으로 대사되는 것을 막는다. 그래서 희분배양시의 농도변화에 따른 비성장 속도  $\mu$  값을 구하여 보았다(Figure 8). EG의 농도가 30g/L 이상에서는 EG가 균주의 성장에 저해작용을 하는 것으로 나타났다. 그리고 최대 비성장 속도  $\mu$ 는 0.081hr<sup>-1</sup>임을 알 수 있었다.

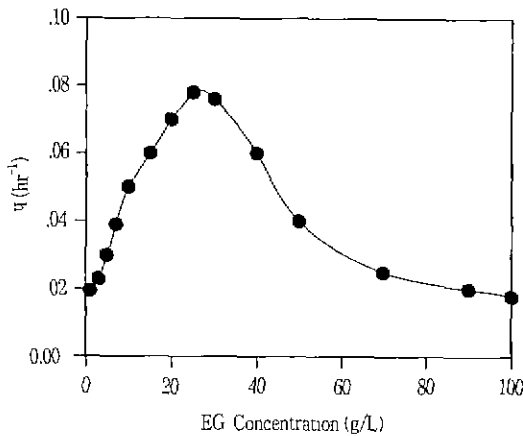


Figure 8. Plot of  $\mu$  vs. EG concentration.

**요 약**

감량폐수를 물리화학적으로 전처리를 하고 나면 그 방류수는 다량의 ethylene glycol이 포함되어 있고 이를 생물학적인 방법으로 2차 처리를 하여야 한다. 따라서 우수한 EG 분해균주를 자연계에서 선별하여 최적 배양 조건을 조사하였다. 분리한 균의 최적온도, pH, 질소원은 각각 35°C, 7.5, NH<sub>4</sub>Cl로 나타났으며, 이 조건에서 COD<sub>Cr</sub>의 제거율은 90%이상이었다. 그리고 niacin, biotin과 같은 미량원소에 의해 균주의 성장과 분해율이 조금 증가하였다. 접종농도에 따른 영향을 조사한 결과 접종농도에 비례하여 제거율이 증가하였다. 비성장속도  $\mu$ 는 EG의 초기농도가 30g/L 이상일 때 저해를 받았다. EG를 분해하는 균주

는 형태학적, 생화학적 등 제특성에 따라 *Pseudomonas* sp.로 동정되었고, *Pseudomonas* sp. EG1으로 명명하였다.

**감 사**

본 연구는 1997년도 한국과학재단 지원 영남대학교 지역협력센터(RRC)의 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

**참 고 문 헌**

1. A. A. M. Gorrafa (1980), Caustic Treatment of Polyester Filament Fabrics. *Textile Chemical & Colorist*, 12(4), 83-91.
2. Yoon Hwan Kook and Chang Nam Choi (1984), A Study on the Weight Loss of Polyester Fabric in Caustic Soda Solution of Organic Solvent/Water, *J. Korean Society of Textile Engineers and Chemists*, 21(2), 13-20.
3. Suk Kyu Song, Sang Yool Kim (1983), A Study on the Weight Loss of Polyester Fiber by Alkali Treatment, *J. Korean Society of Textile Engineers and Chemists* 20(4), 9-15.
4. 김기원, 정의, 최창남 (1983), Polyester적물의 알칼리감량가공에 있어서 용매전 처리의 효과에 관한 연구, *전남대학교 공업기술연구*, 24, 73-81.
5. Yung Kyu Park, Chul Heui Lee, Jong Dal Rhee, Moo Kang Lee and Byeung Rak Cho (1981), A Systematic Treatment of Waste Water for Dyeing Industry Complex, *J. Environmental Research Institute, Yeungnam University*, 1(1), 24-38.
6. Yung Kyu Park, Chul Heui Lee and Moo Kang Lee (1982), Optimization of Activated Sludge Process Design for the Waste Water from the Large-Scale Dyeing Industrial Complex, *J. Environmental Research Institute, Yeungnam University*, 2(1), 25-32.
7. Yung Kyu Park and Jae Hyang Kang (1982), Ozonolysis of Acid Dyes in Aqueous Solutions, *J. Environmental Research Institute, Yeungnam University*, 2(1), 33-42.
8. 양용운 (1989), Polyester감량폐수의 효과적인 응집처리, *제명연구논총*, 7, 281-290
9. Mitsubishi Chemical Ind (1985), Japanese Patent 60, 233, 033.
10. Mitsubishi Chemical Ind (1985), Japanese Patent 60, 163, 844.
11. Tohoku Chemical Ind (1986), Japanese Patent 61, 43, 110.
12. Mitsubishi Chemical Ind (1986), Japanese Patent 61, 43, 139.
13. 이영길 (1989), Polyester 직물 알칼리 폐기물로 부터 고순도 테레프탈산의 회수에 관한 연구, *한국화학연구소*, 77-86.
14. 오세화 (1994), PET 알칼리 감량 가공 공정의 공해저감 연구, 1993년도 1차보고서, 과학기술처.
15. N R Krieg and J. G Holt (1984), *Bergey's Manuals of Systematics Bacteriology*, The Williams and Wilkins

- Co., Baltimore, U. S. A.
16. Cappuccino, J. G and N. Sherman (1986), Microbiology - a Laboratory Manual, 2nd ed., The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, California. U. S. A.
  17. Gerhardt, P., R. G. E Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Crieg, and G.B. Phillips (1981), Manual of Methods for General Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington D. C.
  18. 김남천, 환경오염공정시험법(수질분야)(1988), 동화기술, 229-240.
  19. AWWA (1971), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15th ed.
  20. Lubert Stryer (1981), Biochemistry, 2nd ed, W. H. Freeman and Company, N. Y U. S. A.