

PVA 분해용 균주 분리·동정 및 특성 연구

최광근, 신종철, 전현희, 김상용*, 이진원

광운대학교 화학공학과 생명공학연구실, 한국생산기술연구원 신에너지환경팀*

전화 (02) 940-5172, FAX (02) 909-0701

Abstract

Through the PVA degrading test, 8 species of microbes were finally isolated, and two species among them were identified. To search PVA degrading rate by using 8 species of microbes, single species of microbes and combination of each species were tested. As a result, single species of microbes showed 96% of PVA degrading rate, and the similar result was obtained by using combination of two species. And 78% of PVA degrading rate was obtained by using enzyme which was secreted from good PVA degrading microbes. As a result of identification, this good PVA degrading microbes were *Paenibacillus* sp. and *Microbacterium barkeri*.

서 론

염색폐수에 포함된 PVA를 생물학적으로 제거하고자 많은 연구가 국내·외에서 진행되어, *Pseudomonas* sp.^{1,2)}, *Xanthomonas campestris*³⁾, *Pasteurella haemolytica*⁴⁾ 등의 효율적 균주가 분리되어 왔다. 보고된 연구 결과를 보면 단일균주에 의해 PVA를 분해하는 경우도 있으나 대부분의 분리 균주는 공생관계를 가질 때에만 PVA를 효율적으로 분해할 수 있으며, 장시간의 PVA 분해시간이 필요한 것으로 보고되고 있다. 또한, PVA의 중합도에 따라 그 분해도에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 지금까지 보고된 PVA 분해용 균주를 표 1에 보였다.

표 1. 현재까지 연구·보고된 PVA 분해용 균주

연구 년도	연구자	분리균주	참고문 헌
1975	Yasuto Watanabe <i>et al</i>	<i>Pseudomonas boreopolis</i>	5)
1982	Masayuki Shimao <i>et al</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	6)
1985	Kiyofumi Sakai <i>et al</i>	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Alcaligenes</i> sp.	7)
1992	조무환, 김정목 등	<i>Pseudomonas cepacia</i>	8)
1996	Tatsuma Mori <i>et al</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	9)

현재까지 분리된 PVA 분해용 균주의 특성은 공생작용 및 낮은 중합도에서 높은

활성과 효율적인 PVA 처리 결과를 보이지만 단일균주만을 사용하거나 중합도가 높을 때는 PVA 분해율이 낮게 나타나고 있는 것으로 알려지고 있다. 또한 분리된 PVA 분해용 균주를 사용하여 PVA를 분해하는데 많은 처리 시간을 필요로 하고 있는 것으로 보고 되고 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 여러 연구자들에 의해 연구되고 있으나, 최근 들어서는 효율적인 새로운 균주 분리를 시도하기 보다는 mixed culture에 대한 연구가 더욱 많으며, 중합도에 의한 PVA 분해율 감소 억제, PVA 분해 시간 단축, 그리고 단일균주만을 사용한 우수한 분해 효율 등에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이다.

이에 본 연구에서는 염색폐수로부터 PVA 분해용 균주를 분리한 후 PVA 분해 실험을 통해 효율적인 균주를 분리하여 동정하고자 한다. 또한, 단일균주만으로 단시간 내에 우수한 분해효율을 얻을 수 있는 균주를 분리하여 PVA 처리에 적용하고자 하며, 최종 분리된 우수 균주의 효소를 분리·농축을 통해 PVA 분해능을 향상시키고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 사용 균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 군산에 위치한 D화학의 염색폐수에서 분리하여 사용하였으며, 균주의 배양 및 PVA 분해 실험에 사용된 배지는 T. Suzuki¹⁾가 사용한 배지를 변형하여 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. 균주 분리

PVA를 유일 탄소원으로 사용하여 반연속 배양을 실시한 후 염색폐수를 고체배지 상에 도말하여 균주를 분리하였다. 균주 분리 시, Finley¹⁰⁾ 법을 고체배지에 적용하여 투명한 지역을 보이는 곳에서 성장한 균주를 분리하여 PVA 분해 시험에 사용하였다.

2.2. PVA 분해 실험

분리 균주 중 먼저 단일균주만을 사용하여 PVA 분해율을 조사한 후, 단일균주와의 비교를 위해, 공생작용에 의한 PVA 분해율을 조사하기 위해 분리된 균주들을 조합하여 PVA 분해 실험을 진행하였다. 또한, 효소를 적용하여 PVA 분해능을 조사하고자 우수균주로 선정된 균주에서 효소를 분리하여 PVA 분해율을 측정하였다. 분리한 효소를 PVA가 포함된 액체배지와 고체배지에 각각 적용하여 PVA 분해능을 조사하였고, 이와와의 비교를 위해 전배양 시 PVA가 포함되지 않은 배지에서 균주를 배양한 후

PVA 분해능을 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 균주 분리 및 동정

염색폐수로부터 50여가지 균주를 분리한 후 PVA 분해 실험을 통해 효율적인 8종의 균주를 분리하여 모든 실험에 사용하였고, 최종적으로 선별된 2종의 균주에 대해 동정을 실시하였다. 동정 결과 *Paenibacillus* sp.와 *Microbacterium barkeri*로 동정되었으며, 결정된 염기서열의 개수는 각각 666bp와 555bp이었다.

2. PVA 분해 실험

최종 분리된 8종의 균주 중 단일 균주만을 100 ppm의 PVA를 포함하는 합성폐수에 접종하여 PVA 분해율을 실험했을 때, 가장 높은 분해율을 보인 균주는 *Paenibacillus* sp.와 *M. barkeri*였고, 각각 95.4%와 96%의 분해율을 보였으며, 이 결과를 그림 1에 보였다. 이 결론은 단일균주만으로는 매우 높은 분해율을 보인 것이며, 현재까지 보고된 연구와 비교했을 때 PVA 분해에 있어 매우 효율적인 균주로 사료되며, 3일 경과 후 약 80%의 분해율을 보여 장시간이 걸리는 PVA 분해시간을 단축할 수 있는 균주로 사료된다. 단일균주를 사용했을 때와의 비교를 위해, 8종의 단일균주를 서로 다른 2종씩 조합하여 PVA 분해 실험을 진행한 후 그 결과를 그림 2에 보였다. 결과적으로 두 종씩 조합한 경우 단일균주 실험에서 95% 이상의 우수한 분해율을 보였던 두 균주가 포함되어 있는 조합에서는 우수한 분해율을 보인 반면 그 외 모든 조합에서는 낮은 분해율을 보였다. 따라서, 본 연구에서 최종 분리한 두 균주는 단일균주로서, 혹은 두 균주의 조합으로서 효율적인 PVA 분해율을 보이는 것으로 사료되며, 이에 따라 균주에서 PVA를 분해하는 효소를 분리하여 PVA 분해 실험을 진행하였다. PVA 분해 효소를 분리한 후 3일 동안 진행한 PVA 분해 실험 결과를 그림 3에 보였다. 그림 3에서 보면 단일균주를 PVA가 포함된 배지에서 배양한 후 PVA 분해 실험에 적용한 경우가 그렇지 않은 경우보다 약 50% 이상의 분해 효율 증가를 보였다. 즉, *Paenibacillus* sp.를 PVA가 포함된 배지에서 배양한 경우의 분해율은 72%, 그렇지 않은 경우는 18%이었으며, *M. barkeri*의 경우에는 각각 78%와 21.6%로 나타났다. 이 결과를 균주를 사용하여 얻은 분해율과 비교해보면 균주를 사용하여 얻은 분해율보다 *Paenibacillus* sp.의 경우 약 2% 상승, *M. barkeri*의 경우 약 15% 상승된 결과를 얻을 수 있다. 하지만, 이 결과는 농축되지 않은 분해효소를 적용한 것이므로 예상보다 낮은 분해율을 얻은 것으로 사료되며, 농축을 하여 적용한다면 더욱 높은 PVA 분해율을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

50여종의 PVA 분해용 균주를 분리한 후 PVA 분해 실험을 통해 8종의 균주를 최종 분리하였으며, 이 중 2종의 균주를 동정하였다. 분리 균주의 PVA 분해율을 살펴 보기 위하여 단일균주만을 이용한 실험과 단일균주들의 조합을 사용하여 실험을 진행하였는데, 단일균주를 사용했을 때는 최대 96%의 분해율을 얻었으며, 2 종의 조합을 사용했을 때는 최대 95%의 분해율을 얻어 단일균주만으로도 우수한 분해율을 얻을 수 있었다. 또한, 최종 분리군에서 PVA 분해효소를 분리하여 PVA 분해 실험을 진행한 결과 최고 78%를 보였다. 가장 우수한 분해능을 보인 2종을 동정하였는데, *Paenibacillus* sp.와 *Microbacterium barkeri*로 동정되었다.

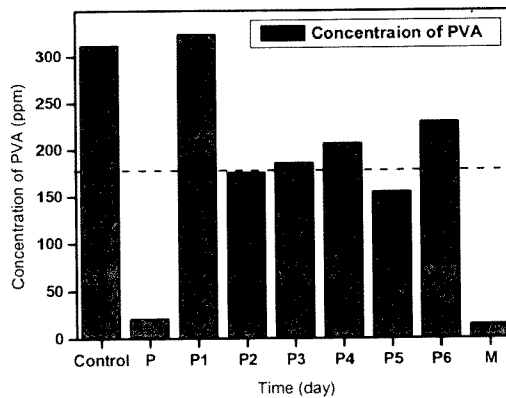


그림 1. 단일균주를 이용한 PVA 분해율
(P : *Paenibacillus* sp., M : *Microbacterium barkeri*, P1~P6 : 임의명명한 균주명)

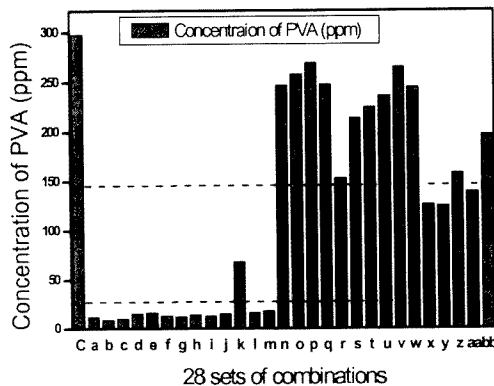


그림 2. 2 종의 조합을 이용한 PVA 분해율

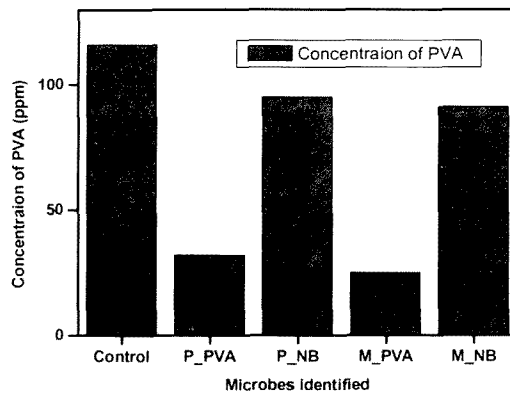


그림 3. 효소를 이용한 PVA 분해율

(P : *Paenibacillus* sp., M : *Microbacterium barkeri*, _PVA : PVA가 포함된 배지, _NB : Nutrient Broth)

참고문헌

1. T. Suzuki, Y. Ichihara *et al.*, "Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol"(1973), *Agr. Biol. Chem.* **37**, 747~756.
2. C. Skazawa, M. Simao *et al.*, "Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures"(1981), *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 261~267.
3. 조윤래, "Polyvinyl alcohol 이용 공생균 *Pseudomonas* sp. J2W와 *Xanthomonas* sp. J2Y의 특성" (1992), *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **35**, 30~35.
4. 김철기, 최용진, 이철우, 임연택, 류재근, "Polyvinyl alcohol 분해 공생 균주에 의한 염색 폐수 중의 PVA 제거" (1997), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 89~95.
5. Yasuto Watanabe, Makoto Morita, Nobutake Hamada, Yoshio Tsujisaka, "Formation of Hydrogen Peroxide by a Polyvinyl Alcohol degrading Enzyme" (1975), *Agr. Biol. Chem.* **39**, 2447~2448.
6. Masayuki Shima *et al.*, "Production of Polyvinyl Alcohol Oxidase by a Symbiotic Mixed Culture" (1982), *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 28~32.
7. Kiyofumi Sakai, *et al.*, "Degradation Mechanism of Poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and β -diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp." (1985), *Agri. Biol. Chem.* **50**, 989~996.
8. 정선용, 조윤래, 조무환, 김정목, "폴리비닐 알콜 분해균주의 분리 및 특성" (1992), *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 96~101.
9. Tatsuma Mori *et al.*, "Isolation and Characterization of a Strain of *Bacillus megaterium* That Degrades Poly(vinyl alcohol)" (1996), *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 330~332.
10. J. H. Finley, "Spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coatings"(1961), *Analytical chemistry*, **33**, 1925~1927.