

Polyethylene Glycol의 미생물학적 분해

이종근 · 이상준 · 이재동 · 박승희 · 박재림*

부산대학교 자연과학대학 미생물학과 *부산여자대학

Microbial Degradation of Polyethylene Glycol

Lee, J.K., S.J. Lee, J.D. Lee, S.H. Park, and J.R. Bahk*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University
*Pusan Women's University

Abstract: The bacteria capable of utilizing polyethylene glycol(PEG) 6,000 as a sole carbon source were isolated from soil and sewage water connected to factory area. The isolate designated as EL-033 had high biodegradability on PEG 6,000, and was identified as *Micrococcus* sp. *Micrococcus* sp. EL-033 could grow on and degrade di-, tri-, tetraethylene glycols and PEGs with molecular weight up to 6,000 and very slowly utilize PEG 20,000 as sole carbon source, but not degrade ethylene glycol. The growth rate of isolate was increased in the higher molecular weight PEGs. The optical culture medium was established to be as follow: PEG 6,000, 0.2% (w/v); K_2HPO_4 , 0.1% ; $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$, 0.1% ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% ; polypeptone, 0.1% in distilled water, pH7.5. About 90% of PEG 6,000 was degraded in exponential phase of 48 h culture and PEG 6,000 was completely degraded during 72h.

Key words: *Micrococcus*, polyethylene glycol, biodegradation

Polyethylene glycol(PEG)는 $H(OCH_2CH_2)_nOH$ 의 구조식을 가진 ethylene glycol의 중합체로서 산업적 용도가 매우 다양한 화합물이다. 특히 화학공업에 있어서 용매, 윤활제, 부동액, 합성세제, 플라스틱, 화장품, 수성페인트 및 제지공업 등에서 널리 이용되고 있으며 그 중합도에 따라 용도가 달라 PEG사용량은 날로 급증하고 있는 실정이다. 이러한 합성 polymer들은 분자량이 높을수록 biodegradation에 대한 저항성이 강한 난분해성 물질로 알려져 있으며 산업폐수로 인한 PEG의 자연계로의 유입은 환경오염과 생태계에 심각한 문제를 제기하고 있다. PEG분해에 관한 연구로써 Fincher 등(1962)과 Watson등(1977)은 PEG 400의 세균학적 이용에 대해 보고하였으며, Harada

등(1975)은 분자량 1,000 이하의 PEG가 activated sludge에 의해 분해된다고 하였다. Cox(1978)는 분자량 1,000 이상인 PEG는 bioresistant하다고 보고하였으며, Koich등(1975)과 Fusako등(1977)은 PEG 6,000 이상의 higher polymer는 *Pseudomonas* sp.와 *Flavobacterium* sp.의 mixed culture에 의해서 분해되며 이들중 어느 한 균주만의 pure culture에 의해서는 분해되지 않는다고 보고하였다. Daryl 등(1983)과 Bernhard(1983)는 혐기적 조건하에서 PEG 20,000의 분해에 관하여 연구한 바 있다. 그러나 호기적 조건하에서 단일균주에 의한 PEG 6,000 이상의 higher polymer의 분해에 관한 연구는 매우 희소하다. 그러므로 본 연구에서는 호기적 조건하에서 PEG 6,000의

* 이 논문은 한국학술진흥재단의 1985년도 연구비에 의하여 연구 되었음.

분해능이 우수한 균주를 공장폐수로 부터 분리 동정 하였으며, 분리균주의 생육특성, 분해조건, PEG분해율 및 분해시 생성되는 생성물에 대해서도 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

분리용 시료 및 배지조성

산업폐수의 유입이 많은 부산지역의 하천수와 하천주변 토양을 분리용 시료로 채취하였다. PEG 6,000분해균주를 분리하기 위한 배지의 조성은 증류수 1,000ml당 K_2HPO_4 1.0g, $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 1.0g, NH_4Cl 2.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, yeast extract 0.02g으로 하였다. 또한 PEG 6,000분해균주의 증식에 사용된 기본배지의 조성은 증류수 1,000ml당 K_2HPO_4 1.0g, $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 1.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, polypeptone 1.0g으로 하였다. 상기 분리용배지와 기본배지에 탄소원 및 에너지원으로 PEG 6,000을 0.2% 첨가하여 본 실험에 사용하였다.

PEG 6,000분해균주의 분리 및 분해특성조사

PEG 6,000분해균주는 채취된 시료로 부터 농화배양법(enrichment culture technique)에 의해 분리하였다. 분리된 균주들을 순수분리한 후 각균주의 PEG분해능을 확인하였다.

확인된 PEG분해균주들 중 분해능이 우수한 균주들의 분해특성을 조사하기 위하여 기본배지에 탄소원 및 에너지원으로 ethylene glycol의 oligomers, 분자량이 다른 PEG들을 각 0.2%씩 첨가한 후 48시간 진탕배양하여 610nm에서의 흡광도로 생육상태를 측정하였다(Koichi, 1975).

PEG 6,000분해균주의 선정 및 동정

PEG 6,000분해능이 가장 우수한 균주를 본 실험에 사용할 균주로 선정 하였다. 선정된 균주의 형태학적, 배양적 및 생화학적 제특징에 대해 실험하였으며 그 세균학적 성상을 기초로 하여 Bergey's manual of determinative bacteriology (8판), Manual for identification of medical bacteria (2판)와 Biochemical tests for identification of medical bacteria (2판)에 따라 분류학상의 위치를 검토하였다.

PEG분해균주의 성장조건 및 PEG분해율 조사

PEG 6,000분해균주의 성장조건 및 PEG분해율을 검토하기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 기본배지를 이용하여 pH별, 질소원별, 및 PEG농도별에 따른 PEG분해균주의 성장도를 측정하여 성장조건을 검토하였다.

성장도는 30°C에서 36시간 진탕배양한 후 610nm에서의 흡광도로 측정하였고, PEG분해율은 균체를 제거한 배양여액에서의 PEG 6,000잔존량을 측정하여 백분율로 환산하였다. 또한 성장최적조건하에서 PEG분해균주의 growth curve에 따른 PEG분해율도 측정하였다.

PEG 6,000정량분석

PEG 6,000을 함유한 기본배지에 PEG 6,000분해균주를 진탕배양하여 배양액을 centrifugation한 후 균체를 제거한 여액을 PEG 6,000의 정량분석 시료로 사용하였다. PEG정량은 Stevenson (1954)의 방법에 의해 470nm에서의 흡광도로 측정하였다.

PEG분자량별에 따른 분해특성조사

PEG분자량별에 따른 분해특성을 조사하기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 기본배지에 분자량이 다른 PEG들(PEG 200, 400, 600, 1,000, 2,000, 4,000, 6,000)을 각각 0.05%씩 첨가하여 기질혼합배지를 만들었다. PEG 6,000분해균주를 혼합배지에 배양하여 경시적으로 배양액을 취하여 균체를 제거한 후 농축하여 thin-layer chromatography 방법에 의해 PEG분자량별에 따른 분해특성을 조사하였다.

PEG 6,000분해산물의 검정

성장최적 조건하에서 PEG 6,000분해균주에 의한 PEG 6,000분해산물의 검정에는 다음의 방법을 사용하였다. 즉 일정시간별로 배양한 배양액에서 균체를 제거한 후 배양여액을 농축하여 thin-layer chromatography 방법에 의하여 분해산물을 추정하였다.

실험결과 및 고찰

PEG 6,000분해균주의 분리 및 분해특성 조사

PEG 6,000을 탄소원으로 이용하는 분해균

주를 공장폐수가 다량 유입되는 부산 동래지역의 하천수와 하천토양으로 부터 분리하였다.

이들 분리균주중 PEG 6,000의 분해능이 우수한 EL-033과 EL-031을 선택하여 ethylene glycol을 비롯한 oligomers, 분자량이 다른 P-EG들에 대한 분해특성을 조사하기 위하여 생장상태를 측정된 결과는 Table 1과 같다.

EL-033은 ethylene glycol을 제외한 oligomer들과 모든 PEG들을 생장기질로 이용하여 분해할 수 있었으며, EL-031은 ethylene glycol을 포함한 모든 oligomer들과 PEG들에 대해 분해능을 가지고 있었다. Cox (1978)는 일반적으로 중합도가 높은 PEG일수록 bioresistant하다고 하였다. 그러나 이들 균주들은 모두 oligomer의 중합도가 높을수록, 그리고 P-EG들에서도 PEG 6,000까지는 분자량이 높을수록 생장도가 높은 분해특성을 나타내어 비교적 분자량이 높은 PEG처리에 효율적인 균주로 사료된다. 그러나 이들 균주의 생장도가 PEG 20,000에 있어서는 매우 낮아 PEG 6,000 이상의 higher polymer에 대해서는 그 분해정도가 점차 낮아질 것으로 생각된다.

PEG 6,000분해균주의 선정 및 동정

분리된 분해균주의 PEG 6,000에 대한 생장

Table 1. Growth substrate specificity of PEG-utilizing strains.

Substrates	Strains	Growth(OD at 610nm)	
		EL-033	EL-031
None		0.25	0.16
Ethylene glycol		0.09	0.23
Diethylene glycol		0.64	0.71
Triethylene glycol		0.69	0.83
Tetraethylene glycol		0.71	0.87
PEG	200	0.64	0.87
	400	0.84	1.00
	600	1.08	1.08
	1000	1.23	1.08
	2000	1.23	1.20
	4000	1.25	1.20
	6000	1.25	1.20
	20000	0.28	0.21

Table 2. Morphological, cultural and biochemical characteristics of the isolated strain EL-033.

Items	Characteristics
Morphological characteristics	
Shape	Cocci, 0.3µm diameter
Motility	Non-motile
Spore	Not-formed
Gram stain	Positive
Cultural and biochemical characteristics	
Nutrient agar colonies	Round, convex, wetted
Colonies color	Yellow
Colonies surface	Smooth
Gelatin	No-liquefaction
Oxidase	Positive
Catalase	Positive
Voges-Proskauer reaction	Negative
Nitrate reduction	Positive
Oxidation & fermentation	Oxidation

특성, 분해조건, 분해율 및 분해산물에 대한 특성을 규명하기 위하여 실험 편의상 EL-033을 선정하여 본 실험에 사용하였다.

선정된 EL-033의 형태학적, 배양적 및 생화학적 제특징을 실험한 결과(Table 2) 본 균주는 구균으로써 gram반응 양성이며, 운동성을 나타내지 않는 비포자형성균이었다. 또한 catalase, oxidase test 및 nitrate reduction 검사에는 양성, V-P반응에는 음성, 산화발효 검사에는 산화반응을 나타내었다.

이상과 같은 제실험 결과를 Bergey's manual of determinative bacteriology (8판) 과 Manual for identification of medical bacteriology (2판)에 따라 조사한 결과 본 균주는 *Micrococcus*속으로 동정되었으며, 편의상 *Micrococcus* sp. EL-033으로 명명하였다. *Micrococcus* sp. EL-033의 분류학적인 위치를 검토한 결과 *Micrococcus luteus*의 근연종으로 사료되었으나 확실한 종의 결정은 보다 자세한 세균학적 성상의 검토를 필요로 하므로 추후의 과제로 남겨 두었다.

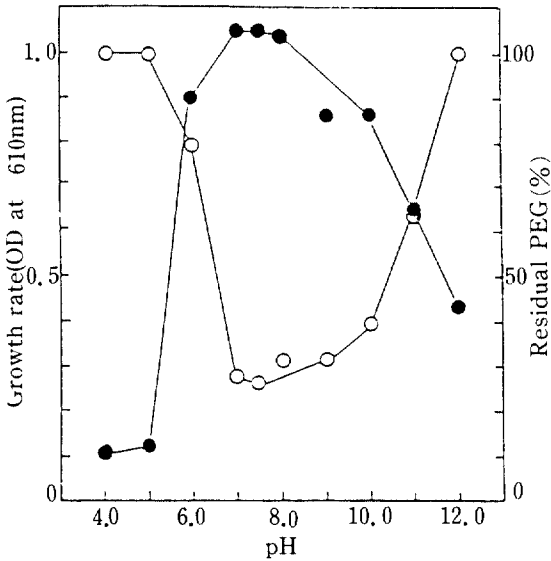


Fig. 1. Effect of pH on growth and biodegradability of PEG of *Micrococcus* sp. EL-033.

●—●—●—● : Growth
○—○—○—○ : Residual PEG

PEG 분해균주의 생장조건 및 PEG 분해율

선정된 PEG 분해균주 *Micrococcus* sp. EL-033의 생장 최적조건 및 분해율을 조사한 결과는 다음과 같다. pH 별에 따른 생장율은 pH 7.0~8.0 사이에서 좋은 생장율을 보여 대체로 약 alkali 성에서 생장율이 높았으며, 최적 pH는 7.5 이었고, 분해율도 이때가 가장 높은 결과를 나타내었다 (Fig. 1).

질소원에 따른 생장 및 분해율을 실험한 결과는 Table 3 과 같다. 무기질소원 중에서는 (NH₄)₂HPO₄가 가장 높은 생장율과 분해율을 나타내었으며, 유기질소원 중에서는 polypeptone, yeart extract, casamino acid 등에서 좋은 생장율과 분해율을 나타내었고, 특히 casa-mino acid의 경우가 가장 높았다. 그러나 본 실험에서는 PEG 분해에 따른 경제적 및 실험적 편의성을 고려하여 polypeptone 을 최적 질소원으로 결정하였다.

상기 실험결과를 기초로 하여 pH 7.5, 질소원으로는 polypeptone 이 사용된 기본배지 조건 하에서 유일한 탄소원인 PEG 6,000의 농도별에 따른 *Micrococcus* sp. EL-033의 생장상태

Table 3. Effect of nitrogen sources on growth and biodegradation of *Micrococcus* sp. EL-033.

Nitrogen sources	Growth (OD at 610nm)	Biodegradation (%)
None	0.11	17.0
NH ₄ Cl	0.71	37.1
(NH ₄)HPO ₄	1.15	37.1
NH ₄ NO ₃	0.73	37.1
(NH ₄)SO ₄	0.62	16.7
KNO ₃	0.64	26.3
NaNO ₃	0.54	25.0
Polypeptone	1.06	72.4
Bactopeptone	0.89	43.9
Beef extract	0.30	0
Yeast extract	1.20	66.7
Yeast extract nitrogen base	0.98	66.7
Casein	0.12	0
Casamino acid	1.40	100
Urea	0.11	0

를 측정 한 결과는 Fig. 2 와 같다. PEG 0.2% 까지의 농도에서는 PEG 농도 증가에 비례하여 생장율이 증가하여 0.2%에서 최대 생장상태에 도달되었으며 이러한 최대 생장상태는 PEG 0.2%의 10배인 2%까지 지속되었다. 이와같은 실험결과에서 고농도 PEG가 본 분해균주

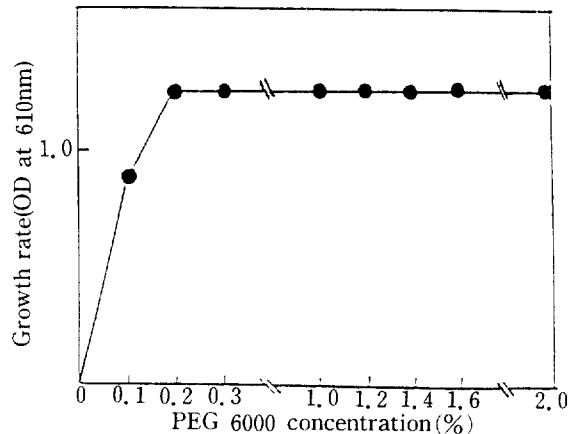


Fig. 2. Effect of PEG 6000 concentration on Growth of *Micrococcus* sp. EL-033.

인 *Micrococcus* sp. EL-033의 생장에 저해작용을 나타내지 않는 것으로 보아 본 균주는 고농도 PEG 처리에 효과적인 것으로 생각된다.

따라서 탄소원으로써의 PEG 최적농도를 0.2%로 하여 *Micrococcus* sp. EL-033의 생장 곡선에 따른 PEG 분해율을 경시적으로 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 최적생장조건 하에서 유도기는 거의 나타나지 않았으며 배양 24시간 만에 약 50%의 PEG 분해율을 나타내었으며, 거의 90% 이상의 PEG가 대수증식기 동안에 분해되었다. 정지기에 도달되면서 PEG 분해속도는 점차 감소되어 72시간 만에 PEG가 거의 완전히 분해되었다.

PEG 분자량별에 따른 분해특성

Fusako (1977) 등은 분자량이 다른 PEG 들이 혼합된 PEG 혼합배지상에 *Pseudomonas* sp. 와 *Flavobacterium* sp. 를 mixed culture 할때 분자량이 낮은 PEG 부터 분해가 일어나 시간이 경과됨에 따라 분자량이 높은 PEG 분해가 일어난다고 하였다. 본 실험에서도 분자량이 다른 PEG 들에 대한 *Micrococcus* sp.

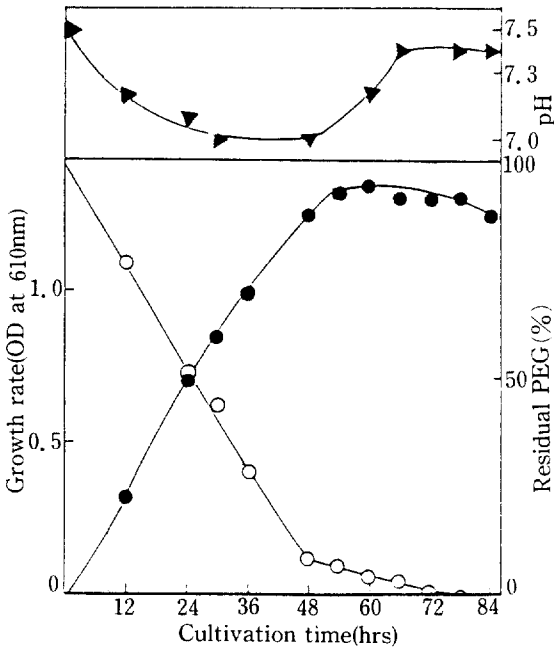


Fig. 3. Residual rate of PEG by growth curve.

- : Growth
- : Residual PEG
- ▲—▲—▲—▲—▲ : pH

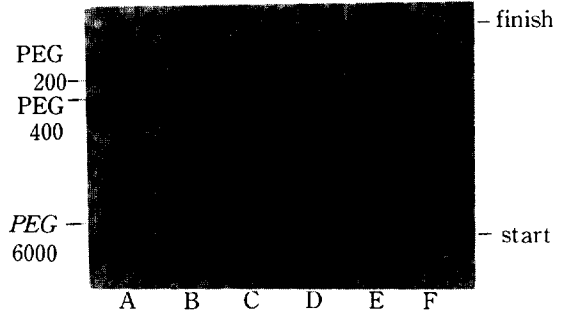


Fig. 4. Degradation of mixture of PEGs by *Micrococcus* sp. EL-033.

The medium was composed of PEGs (PEG 200, 400, 600, 1000, 2000, 4000 and 6000), each 0.5g (total 3.5g), K_2HPO_4 1g, $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, Polypeptone 1g in 1000ml distilled water; pH of the medium was adjusted to 7.5. The cultivation was carried out on 100 ml of the medium in a 500ml shaking flask with an inoculum of 5ml of a 2-day culture. The culture was subjected to thin-layer chromatography on a Kiesel gel GF₂₅₄ plate (E. Merck, 0.25mm thick). Solvent system: methanol 60-water 40. Detection: dragendorff reagent. Lane A, mixed of PEGs; B, culture incubated for 24h; C, culture incubated for 48h; D, culture incubated for 72h; E, culture incubated for 125h; F, culture incubated for 192h.

EL-033의 분해특성을 조사하기 위하여 탄소원으로 분자량이 다른 PEG 들 (PEG 200, 400, 600, 1000, 2000, 4000, 6000)을 각각 0.05%씩 기본배지에 첨가한 후 *Micrococcus* sp. EL-033을 접종 배양하였다. 배양시간의 경과에 따라 일정량의 배양액을 취하여 균체를 제거한 후 농축하여 thin-layer chromatography 하였다 (Fig. 4). 배양시간이 경과됨에 따라 분자량이 낮은 PEG 들의 분해가 먼저 일어나 TLC 상에 나타나지 않았으며 분자량이 높은 PEG 6,000이 가장 늦게 분해됨을 알 수 있었다. 이와같은 실험결과는 분자량이 낮은 PEG 들이 세포내로 용이하게 흡수된다는 Fusako (1977) 등의 실험결과와 일치하였다.

PEG 6,000 분해산물 검정

생장최적 조건하에서 *Micrococcus* sp. EL-033에 의해 PEG 6,000이 분해되는 과정에서

생성되는 분해산물을 검정하였다. 즉 일정시간 별로 배양한 배양액에서 균체를 제거한 후 배양여액을 농축하여 thin-layer chromatography에 의해 분해산물을 검정하였으나 PEG 6,000이 분해되는 과정에서 ethylene glycol의 oligomer들이나 분자량이 낮은 PEG들은 전혀 검출되지 않았으며, 다만 72시간 후의 배양여액에서 PEG가 전혀 검출되지 않아 PEG가 완전

히 분해되었음을 확인하였다. 이와같은 실험 결과에서 PEG 6,000의 분해는 세균세포 내에서 일어나는 것으로 추정된다(Bernhard S. 등 1983). 그러므로 PEG 6,000분해과정을 규명하기 위해서는 세포내에서 PEG 대사과정을 밝혀야 할 필요가 있는 것으로 사료되며 이에 대한 연구는 현재 준비중에 있다.

적 요

PEG 6,000을 유일한 탄소원으로 이용할 수 있는 세균을 하천수와 하천부근의 토양으로부터 분리하였으며 이중 분해능이 우수한 EL-033 isolate를 *Micrococcus* sp.로 동정하였다. *Micrococcus* sp. EL-033은 mono-ethylene glycol을 제외한 di-, tri-, tetra-ethylene glycol과 분자량 6,000까지의 PEG들을 분해하였으며 그 종합도가 높을수록 생장상태가 좋은 분해특성을 가지고 있었으며, PEG 20,000에 대해서도 약간의 분해능을 가지고 있었다. 최적 배지 조성은 PEG 6,000 0.2%, K_2HPO_4 0.1%, $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 0.1%, polypeptone 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05% (pH 7.5)이었다. 생장 최적 조건에서 PEG 6,000의 분해는 대수증식기인 48시간 배양하였을때 90%이상의 분해율을 나타내었으며, 72시간 후에 거의 완전히 분해되었다.

REFERENCES

- Bernhard S. and Marian Stieb, 1983. Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic Gram negative, non-spore forming bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(6), 1905-1913.
- Bergey's manual of determinative bacteriology, 1974, 8th ed., The Williams and Wilkins, Co., U.S.A.
- Cowan, S.T., 1973, Manual for the identification of medical bacteriology, 2nd. ed.
- Cox, D.P., 1978. The biodegradation of polyethylene glycols. *Adv. Appl. Microbiol.*, **23**, 173-194.
- Darly F. Dwyer and James M. Tiedje, 1983. Degradation of ethylene glycol and polyethylene glycol by methanogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(1), 185-190.
- Fincher, E.L., Payne, W.J., 1962. Bacterial utilization of ether glycols. *Appl. Microbiol.*, **10**, 542-547.
- Fusako K., Masahiro F., Yoshiki T. and Koichi O., 1977. Identification of polyethylene glycols(PEGs)-assimilable bacteria and culture characteristics of PEG 6000 degradation by a mixed culture. *J. Ferment. Technol.*, **55**(5), 429-435.
- Harada, T., Nagashima, Y., 1975. Utilization of alkylether compounds by soil bacteria. *J. Ferment. Technol.*, **53**(4), 218-222.
- Jean F. Mac Faddin, 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteriology. 2nd ed. The Williams and Wilkins, Co. Baltimore.
- Koichi O., Fusako K., Masahiro F. and Yoshiki T., 1975. Isolation of polyethylene glycol-assimilable bacteria. *J. Ferment. Technol.*, **53**(10), 757-761.
- Stevenson D.G., 1954. The absorptiometric determination of non ionic detergent. *Analyst.* **79**, 504-507.
- Watson G.K. and Jones N., 1977. The biodegradation of polyethylene glycols by sewage bacteria. *Water Research*, **11**, 95-100.

(Received May 29, 1986)