

폴리비닐 알콜 분해균주의 분리 및 특성

정선용 · 조윤래* · 조무환¹ · 김정목¹

영남대학교 응용미생물학과, ¹영남대학교 화학공학과

Isolation and Characteristics of Polyvinyl Alcohol Degrading Bacteria

Jeong, Seon-Yong, Youl-Lae Jo*, Moo-Whan Cho¹ and Jeong-Mog Kim¹

Department of Applied Microbiology, Yeongnam University, Kyongsan 712-749, Korea

¹Department of Chemical Engineering, Yeongnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract — Two strains of polyvinyl alcohol (PVA) utilizing bacteria were isolated from the waste water and soil. These strains, G5Y and PW, were able to utilize PVA symbiotically as a carbon source, but could not utilize PVA separately. In the mixed culture of these strains, 0.5 percent of PVA was almost completely degraded in 3 days. Effect of degree of PVA polymerization on the its utilization was examined, and there was no remarkable difference among three kind of PVA (PVA 500, 1500, and 2000). These bacteria were able to utilize PVA in the desizing waste water of factory as well as enrichment PVA medium. These strains, G5Y and PW, were identified as *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas pseudomallei*, respectively, based on morphological and biological characteristics.

Polyvinyl alcohol(PVA)은 난분해성 고분자 화합물로서 경사호제, 직물가공제, 접착제 및 유화 안정제 등의 용도에 널리 쓰이고 있으며 이러한 PVA는 자연환경에 유출되어 공공 수역의 수질오염을 크게 가중시키고 있다.

PVA는 높은 결정성과 수용성 물질로 자연적 분해·제거는 매우 어렵고 오존 산화법 등의 화학적 방법은 많은 비용이 들어 경제적 어려움이 있다. 따라서, 생물학적 방법에 의해 PVA를 제거하고자 하는 연구는 1936년 Nord에 의해 *Fusarium lini*가 PVA를 분해할 수 있다는 보고가 있는 후 많은 연구가 행해져 PVA 분해균으로 *Pseudomonas*속(1-4), *Xanthomonas*속(5), *Alcaligenes*속(4, 6) 등이 분리되었다. 그러나 이들 대부분의 미생물은 PVA를 분해하는데 비교적 많은 시간이 소요되고 있다. 그러므로, 본 연구에서는 PVA를 빠른 시간내에 강력하게 분해하여 자화함으로써 실제 공장 호발폐수 중의 PVA도 잘 분해할 수

있는 우수한 균을 분리 동정하고 그 성장특성 등을 조사하였다.

실험재료 및 방법

시료 및 배지의 조성

PVA 분해균을 자연계로부터 분리하기 위하여 폐수처리장의 폐수 및 폐수가 유출되는 하천 주위의 하수와 토양시료를 10여점 채취하여 분리용 시료로 사용하였다.

배지는 PVA 분해균만이 생육이 가능한 배지로서 탄소원 및 에너지원으로 PVA(중합도 500)을 0.5% 넣은 배지를 사용하였으며, 그 조성은 Suzuki(1)가 사용한 배지와 동일하였다. 분리된 PVA 분해균의 보존용 배지로서는 PVA broth 배지에 1.5% agar를 첨가한 고체 사면배지를 사용하였다.

PVA 분해균의 분리

각각 채취한 토양 및 하수를 멸균증류수로 현탁한 후 상층액 10 ml를 취하여 PVA broth 배지 25 ml와

Key words: PVA degradation, *Pseudomonas* sp., symbiont

*Corresponding author

멸균증류수 15 ml를 혼합하여 30°C에서 7일간 200 rpm에서 진탕배양하였다. 진탕배양이 끝난 삼각 flask로부터 배양액 0.1 ml씩을 취하여 PVA agar 평판배지에 도말하여 30°C에서 배양한 다음 평판배지 상에서 형성된 여러 colony들을 1백금이씩 취하여 다시 PVA 평판배지에 획선하여 배양하였다. 획선하여 얻은 여러가지 colony들을 PVA broth 배지에 1백금이씩 접종하여 균 성장상태와 PVA 분해능을 조사하였다. Colony에 따라 균 성장율과 PVA 분해능에 많은 차이를 보였으며, 균 성장율과 PVA 분해능이 가장 우수한 colony를 실험균으로 선정하였고 이들 균을 삼단 희석법에 의해 다시 순수분리하였다.

균주의 성장 측정과 PVA의 정량

균의 성장은 spectrophotometer를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였고, PVA 정량은 Finley의 방법(7)에 준하여 행하였다. 실제 공장 호발폐수 중의 PVA 정량은 폐수 중에 포함된 starch가 PVA와 같이 정량되기 때문에 순수 PVA의 정량을 위하여 0.5 N HCl로 90분간 100°C에서 열처리하여 starch를 가수분해한 후 측정하였다.

PVA 분해율 측정

PVA 분해율은 배지 중의 PVA 초기농도에 대한 균 접종 후의 감소된 PVA 농도를 백분율로 나타내었다. 실제 호발폐수에 대한 PVA 분해율은 염직공장의 호발폐수를 사용하였고 질소원으로는 urea를, 인원으로는 H₃PO₄를 첨가하여 BOD : N : P 비율을 100 : 5 : 1로 조정한 후 실험하였다.

동정

폐수에서 분리된 PVA 분해균을 전자현미경에 의한 형태학적 관찰과 배양적, 생리적, 생화학적 및 영양적 특성 등을 조사하였다. 각 균의 동정은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"(8)에 따랐으며, "Microbiology a laboratory manual" 2판(9) 및 "Manual of Methods for General Bacteriology"(10) 등의 실험방법에 준하여 행하였다.

결과 및 고찰

PVA 분해균의 분리

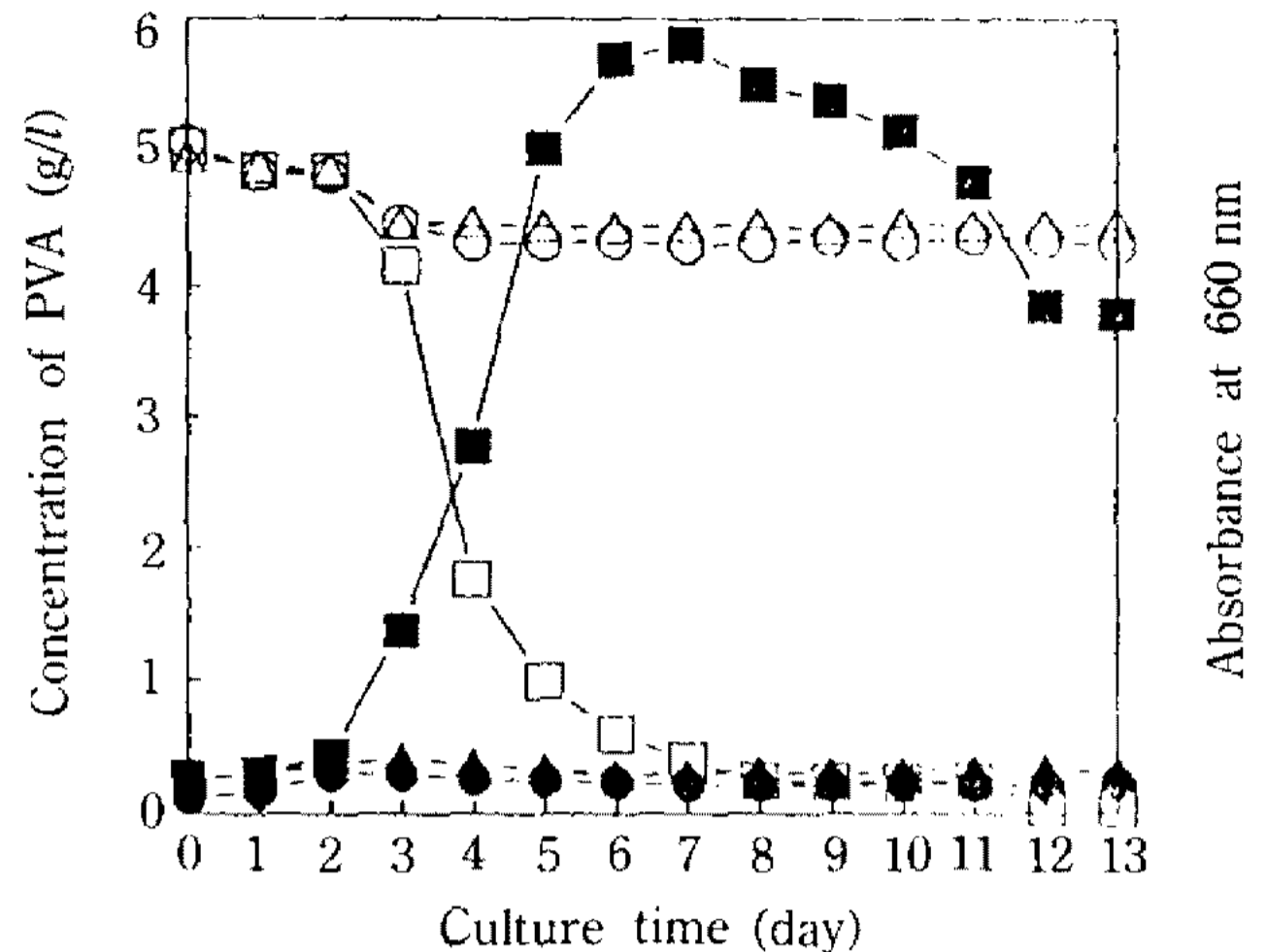


Fig. 1. Growth of the pure culture and mixed culture of G5Y strain and PW strain and degradation of PVA. Symbols, ●: Growth of G5Y strain; ▲: Growth of PW strain; ■: Growth of the mixture of G5Y and PW strain; ○: PVA concentration on the pure culture of G5Y strain; △: PVA concentration on the pure culture of PW strain; □: PVA concentration on the mixed culture of the mixture of G5Y and PW strain).

균 성장율과 PVA 분해능이 우수한 colony로부터 삼단 희석법에 의해 yellow colony와 white colony를 형성하는 두 균주가 분리되었으며, 이들은 PVA agar 평판배지상에서 그 성장이 매우 좋지않아 7일 이상 경과 후에야 colony의 생성을 확인할 수 있다. 그리고 이들을 PVA broth 배지에 접종하였을 때 균 성장도 좋지않고 PVA 분해능도 보이지 않았다. 그러나 이들 yellow colony와 white colony를 형성하는 균주를 서로 혼합하여 배양하였을 때는 PVA 분해능이 회복되었다. 이렇게 해서 각 colony 유래의 균주를 서로 혼합배양했을 때 가장 우수한 분해능을 나타낸 균주 G5Y 균주와 PW 균주를 실험 공시균으로 선별하였다.

G5Y 균주와 PW 균주에 의한 PVA 분해능

G5Y 균주와 PW 균주의 순수배양 및 혼합배양에 의한 균 성장과 PVA 분해능은 Fig. 1에 나타내었다. 이 결과에서 알 수 있듯이 G5Y 균주나 PW 균주 단독으로는 PVA를 거의 분해할 수 없고 반드시 이들 두 균주가 혼합배양되어야만 PVA 분해가 가능하였다. 균 성장율과 PVA 분해율은 정비례의 관계를 나타내었으며, 이러한 현상은 Sakazawa 등(3, 4, 11)이 보고한 바와 같다. G5Y 균주와 PW 균주의 혼합배양에 의한 PVA 분해능은 아주 우수하여 7일 배양한 전배

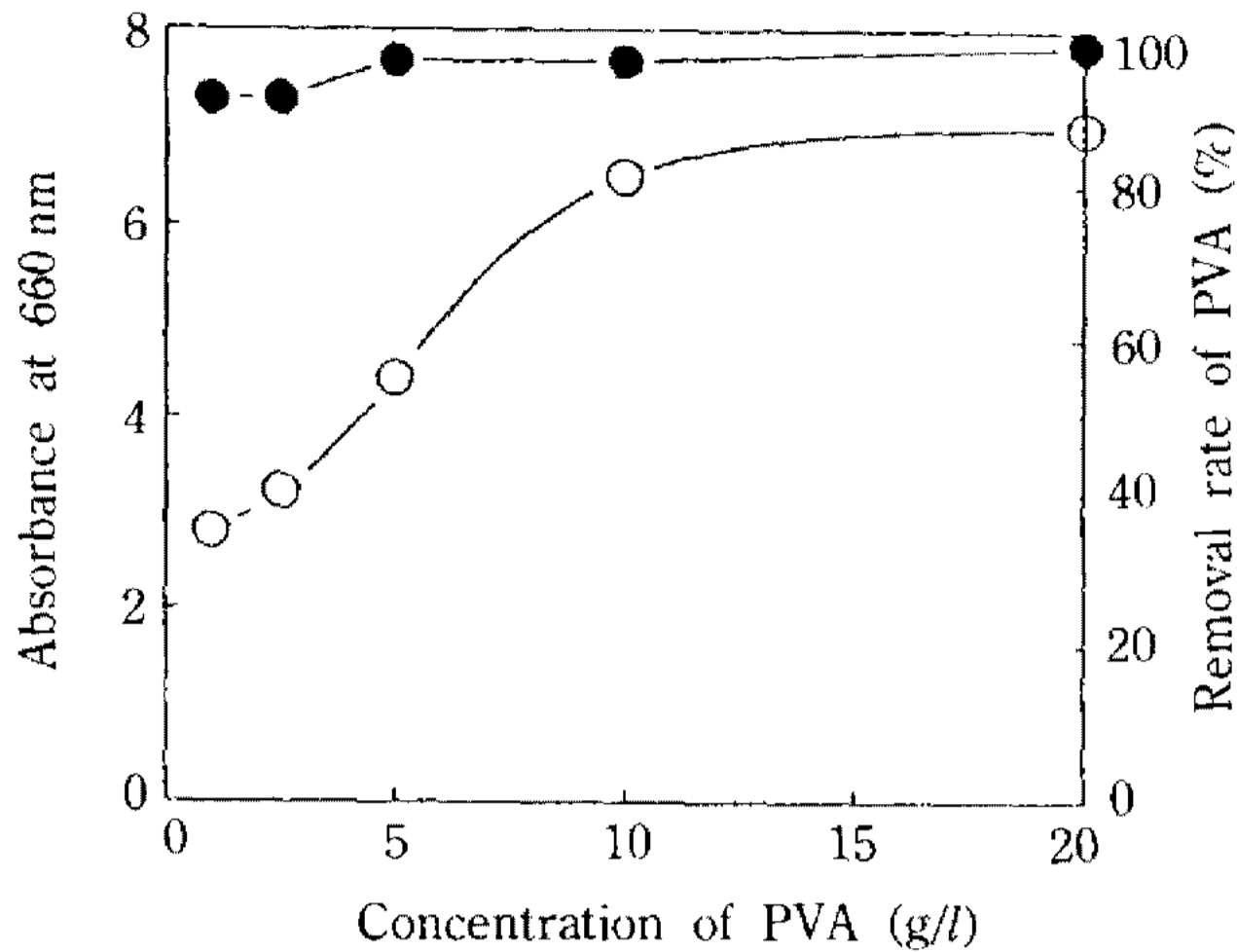


Fig. 2. Effect of PVA concentration on growth of the mixed culture of G5Y strain and PW strain and degradation rate of PVA.

Symbols, ○: Growth; ●: Removal rate of PVA

양액을 0.1%(v/v) 접종시 6일내에 90% 이상의 분해율을 보였으며, Fig. 3에서와 같이 10%(v/v) 접종시에는 3일내에 PVA를 완전히 분해하였다.

G5Y 균주와 PW 균주의 순수배양에 의해서도 약간의 성장을 나타내는 것은 PVA 배지에 포함된 PVA와 다른 성분 즉, sodium acetate 등에 의한 것이라 사료된다. 실제로 PVA 대신 탄소원으로 sodium acetate를 첨가하여 배양시 균의 생육을 확인할 수 있었다.

PVA 분해에 대한 기작은 아직 잘 알려지지 않았으나 그 분해효소가 Suzuki(12), Watanabe(13-16), Sakazawa(17, 18) 등에 의해 보고되었으며, 특히 Watanabe 등은 2차 알콜 oxidase에 의한 산화가 일어나고, 다시 hydrolase의 작용에 의해 PVA의 분해가 일어난다고 보고하였다(16). G5Y 균주와 PW 균주의 공생관계에 의한 PVA 분해는 각각 균주에 의한 이들 효소의 제공에 기인하는 것인지, 성장인자의 제공(19)에 의한 것인지는 더 연구할 과제이다.

PVA 농도에 따른 영향

배지내에 첨가되는 PVA(중합도 500)의 농도에 따른 G5Y 균주와 PW 균주의 혼합배양시의 균 생육특성 및 PVA 분해율은 Fig. 2에서 보는 바와 같다. PVA 농도를 1 g/l에서 20 g/l까지 증가시켰을 때 균 성장율은 저농도에서 다소 낮았으며, 농도가 10 g/l 이상에서는 일정하였다. 그러나 농도에 관계없이 PVA 분해율은 거의 일정하였다.

Table 1. Effect of degree of PVA polymerization on growth of the mixed culture of G5Y strain and PW strain and degradation rate of PVA

PVA (degree of polymerization)	Growth (O.D. at 660 nm)	Degradation rate
PVA 500 (500)	4.85	98%
PVA 1500 (1500)	4.20	82%
PVA 2000 (2000)	3.85	72%

PVA 중합도에 따른 영향

배지에 첨가되는 PVA의 중합도를 500, 1500 및 2000으로 달리하였을 때 중합도의 차이에 따른 생육과 분해율을 보기 위해 혼합배양액 10%(v/v)를 접종한 후 3일간 배양하였으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 이들 혼합균주에 의한 PVA 분해에 있어서 중합도에 따라 큰 차이는 보이지 않았다. 배양 초기에는 중합도가 큰 경우에는 균 성장을 및 PVA 분해율이 상당히 낮았으나 배양시간이 길어질수록 그 차이가 줄었다. 3일 경과 후 PVA 500은 98% 정도 완전분해되었다. PVA 2000은 72% 분해로 약간의 차이를 나타내는 것은 PVA 중합도에 대한 분해특이성이라기 보다는 PVA에 함유된 sodium acetate에 의한 영향이라 사료된다. Suzuki 등은 *Pseudomonas*속 균주에 의한 PVA 분해시 PVA 중합도에 대한 특이성은 없었다고 보고한 바가 있다(1).

접종량에 따른 영향

G5Y 균주와 PW 균주를 혼합하여 PVA broth 배지에 전배양을 충분히 한 후 새로운 배지에 재접종할 때 그 접종량을 변화시킴으로써 시간에 따른 성장과 PVA 분해에 많은 차이가 있었으며 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 접종량이 적을 때는 유도기가 상당히 길었으며, 접종량에 비례하여 균 성장 및 PVA 분해시간이 단축되었다. 이러한 결과에서 균체농도가 PVA 분해에 크게 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.

공장 호발폐수 중의 PVA 분해

실제 공장에서 배출되는 호발폐수에 있어서의 혼합균의 균 성장을 및 PVA 분해율을 Fig. 4에 나타내었다. 초기 균접종량은 10%(v/v)였으며, 초기 PVA 농도는 5 g/l로 조정하여 실험하였다. Fig. 4에서와 같이 3일 후 실제 공장 호발폐수 중의 PVA 분해율은

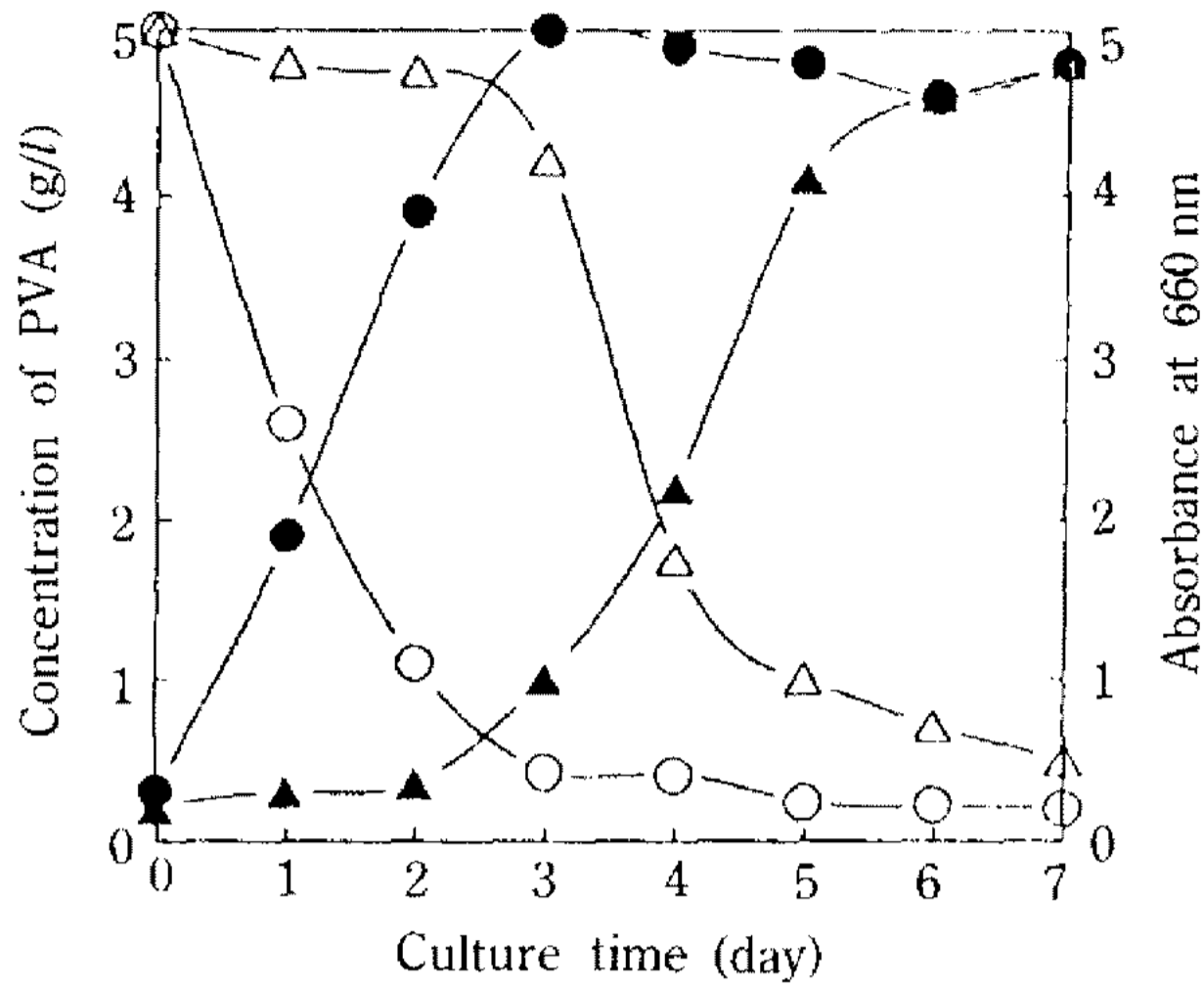


Fig. 3. Effect of inoculation size on growth of the mixed culture of G5Y strain and PW strain and degradation rate of PVA.

Symbols, ●: Growth by 10% inoculation; ▲: Growth by 0.1% inoculation; ○: PVA concentration by 10% inoculation; △: PVA concentration by 0.1% inoculation

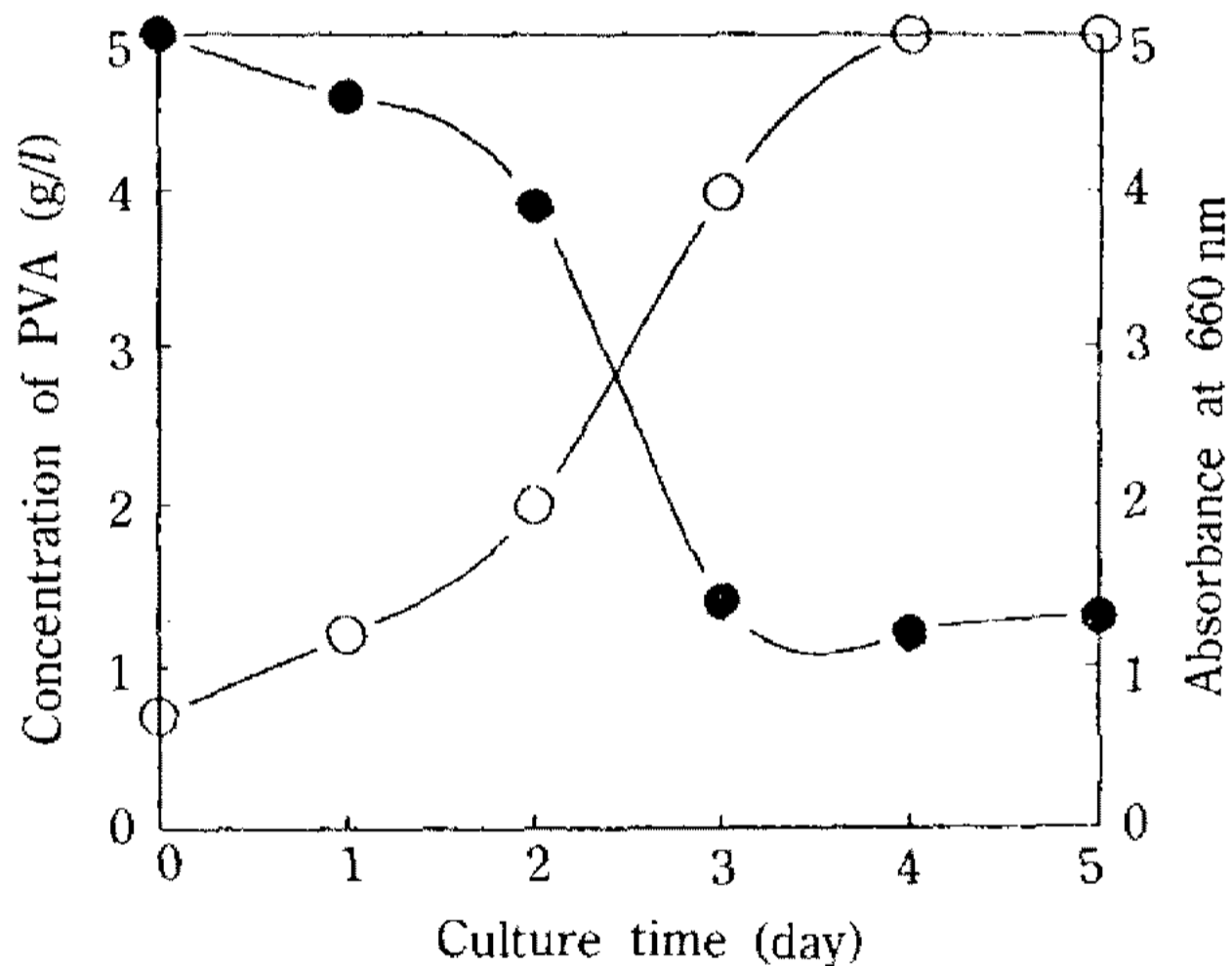


Fig. 4. Growth of the mixed culture of G5Y strain and PW strain and degradation rate of PVA in the desizing waste water of factory.

Symbols, ○: Growth; ●: PVA concentration

약 70% 정도이며, 이 결과는 합성배지의 PVA 분해율인 98%에 비해 다소 차이가 있었으나 매우 효과적으로 분해할 수 있었다.

동정

분리된 PVA 분해 자화균인 G5Y 균주와 PW 균주의 형태학적 특성과 배양적 특성을 Table 2에 나타내었으며 생리 및 생화학적, 영양적 특성은 Table 3, 4와 같다.

Table 2. Morphological and culture characteristics of the isolated strains G5Y and PW

Characteristics	G5Y	PW
Cell form	Rod	Rod
Cell diameter (μm)	0.6~0.7	0.5~0.6
cell length (μm)	1.2~1.6	1.0~1.4
Flagella arrangement	Polar	Polar
Number of flagella	>1	1
Motility	+	+
Growth at 4°C	-	-
Growth at 41°C	±	+
Growth at pH 3.6	-	-
Need at least 12~15% NaCl for growth	-	-
Requirement for growth factors	-	-

+: positive, -: negative, ±: doubtful

Table 3. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strains G5Y and PW

Characteristics	G5Y	PW
Gram stain	Negative	Negative
Oxidase reaction	+	+
Catalase reaction	+	+
Yellow cellular pigment	+	-
PHB accumulation	+	+
Fluorescent pigment	-	-
Pyocyanin pigment	-	-
Hydrolysis of:		
starch	-	+
gelatin	-	+
Tween 80	+	+
casein	-	-
Lecithinase reaction (Egg yolk)	+	±
Arginine dihydrolase reaction	-	+
Denitrification	-	+
Nitrate reductase test	±	+
Maximum NaCl tolerance (%)	2	5~10

+: positive, -: negative, ±: doubtful

G5Y 균주는 PVA agar 배지상에서 노란색의 colony를 형성하는 Gram 음성균으로 극성의 편모를 가진 간균이었다. Growth factor를 요구하지 않으며, 세포내 PHB(Poly-β-Hydroxybutyrate)를 축적하고, catalase, oxidase 등의 효소를 생산하였다. Starch, gelatin을 분해할 수 없으나 Tween 80은 분해하였다.

Table 4. Nutritional characteristics of the isolated strains G5Y and PW

Characteristics	G5Y	PW
Utilization of:		
D-Glucose, D-fructose, D-galactose, sorbitol, inositol, cellobiose, glycerol, ethanol, L-histidine, α -ketoglutarate, glutarate, L-serine, fumarate, L-alanine, L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-arginine, L-leucine, L-isoleucine, β -hydroxybutyrate	+	+
D-Xylose, mannitol, pyruvate	+	\pm
D-Arabinose, lactose	\pm	\pm
L-Arabinose, malonate, L-methionine, L-proline	+	-
L-Turanose, creatine, glycine, L-tryptophan, L-lysin, L-valine, maltose, starch, propionate	-	+
n-Butanol, sucrose	-	-

+: utilized, -: not utilized, \pm : doubtful

이와같은 성질과 함께 세포의 크기와 형태, 많은 종의 영양물질 이용성 등이 *Pseudomonas cepacia*와 동일하였으며, 영양물질 중 L-tryptophan, sucrose, propionate의 이용성은 차이를 보였다. 이와같은 결과에 따라 G5Y 균주는 *Pseudomonas cepacia*로 동정하였다.

PW 균주는 크림색의 퍼짐성있는 colony를 형성하는 Gram 음성 간균으로 극성의 편모를 가졌다. 41°C에서 생육 가능하고 growth factor를 요구하지 않으며, 세포내 PHB를 축적하고, catalase, oxidase, arginine dihydrolase 등의 효소를 생산하였다. Starch, gelatin, Tween 80을 분해하였으며, 탈질반응은 양성을 나타내었다. 이와같은 성질과 함께 많은 종의 영양물질 이용성에서도 *Pseudomonas pseudomallei*와 동일하였으며, L-proline, glycine, sucrose의 이용성은 차이가 있었다. 이러한 실험결과에 따라 PW 균주는 *Pseudomonas pseudomallei*로 동정하였다.

*Pseudomonas*속의 균들은 여러가지 다양한 유기산, 아미노산, 당 등 여러가지 유기물을 에너지 및 탄소원으로 이용할 수 있으며, 특히 난분해성 물질의 분해에도 많이 관여하는 것으로 알려져 왔다. 지금까지 PVA 분해균으로 주로 *Pseudomonas*속, *Xanthomonas*속, *Alcaligenes*속의 세균들에 의한 공생적 PVA

분해가 보고되었으나, 분리된 PVA 분해 자화균인 G5Y 균주와 PW 균주는 이들과 다른 새로운 균이라 사료된다.

요 약

폐수중의 PVA를 생물학적 처리방법에 의한 제거를 위해 자연계로부터 PVA를 분해할 수 있는 세균을 분리하였으며, 그 중 균 성장율이 높고 PVA를 강력하게 분해, 자화할 수 있는 G5Y 균주와 PW 균주를 선별하여 동정 및 생육 특성을 조사하였다.

분리된 두 균주 G5Y와 PW는 혼합배양에 의해서만 PVA를 분해, 자화할 수 있으며, 두 균은 PVA 분해에 있어서 공생관계에 있음을 확인하였다. G5Y 균주와 PW 균주의 형태학적, 생화학적 등 제특성에 따라 각각 *Pseudomonas cepacia*와 *Pseudomonas pseudomallei*로 동정되었다. 이들 두 균주에 의한 PVA 분해에 있어서 PVA의 농도는 큰 영향을 미치지 않았으며, PVA 중합도에 따른 PVA 분해율도 큰 차이가 없었다. 또한 혼합균주가 접종량의 증가에 따라 균 성장 및 PVA 분해속도는 현저히 증가하였으며, 10% 접종시 48시간만에 80% 이상의 매우 높은 PVA 분해율을 나타내었다.

감사의 말

본 연구는 (주)풍국건설 환경사업부에서 지원하여 주신 기초연구비의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Suzuki, T., Y. Ichihara, M. Yamada and K. Tomomura. 1973. Some characteristics of *Pseudomonas* O-3 which utilizes polyvinyl alcohol. *Agric. Biocl. Chem.* 37(4): 747-756.
2. Watanabe, Y., N. Hamada, M. Morita and Y. Tsujisaka. 1976. Purification and properties of a polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by a strain *Pseudomonas*. *Arch. Biochem. Biophys.* 174: 575-581.
3. Sakazawa, C., M. Shima, Y. Taniguchi and N. Kato. 1981. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 41(1): 261-267.
4. Shimao, M., H. Saimoto, N. Kato and C. Sakazawa. 1983. Properties and roles of bacterial symbionts of polyvinyl alcohol-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**(3): 605-610.
 5. Nishikawa, H. and Y. Fujita. 1975. Polyvinyl alcohol degradation techniques using microorganisms. *Chem. Econ. Eng. Rev.* **7**(4): 33-416.
 6. 이건, 이상준, 이종근. 1988. *Pseudomonas* sp. EL-041LY와 *Alcaligenes* sp. EL-041LW에 의한 polyvinyl alcohol의 분해에 관한 연구. 부산대학교 환경문제연구소 환경연구보 제 6권.
 7. Finley, J.H. 1961. Spectrophotometric determination of polyvinyl alcohol in paper coatings. *Anal. Chem.* **33**: 1925-1927.
 8. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.
 9. Cappuccino, J.G. and N. Sherman. 1986. *Microbiology a Laboratory Manual*. 2nd ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co., INC., Menlo Park.
 10. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
 11. Shimao, M., I. Fukuta, N. Kato and C. Sakazawa. 1984. Mixed continuous cultures of polyvinyl alcohol-utilizing symbionts *Pseudomonas putida* VM 15A and *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(4): 751-754.
 12. Suzuki, T. 1976. Purification and some properties of polyvinyl alcohol-degrading enzyme produced by *Pseudomonas* O-3. *Agric. Biol. Chem.* **40**(3): 497-504.
 13. Watanabe, Y., M. Morita, N. Hamada and Y. Tsujisaka. 1975. Formation of hydrogen peroxide by a polyvinyl alcohol degrading enzyme. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 2447-2448.
 14. Morita, M., and Y. Watanabe. 1977. A secondary alcohol oxidase: a component of a polyvinyl alcohol degrading enzyme preparation. *Agric. Biol. Chem.* **41**: 1535-1537.
 15. Sakai, K., N. Hamada and Y. Watanabe. 1985. A new enzyme, β -diketone hydrolase: a component of a poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme preparation. *Agric. Biol. Chem.* **49**(6): 1901-1902.
 16. Sakai, K., N. Hamada and Y. Watanabe. 1986. Degradation mechanism of poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and β -diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* **50**(4): 989-996.
 17. Shimao, M., Y. Taniguchi, S. Shikata, N. Kato and C. Sakazawa. 1982. Production of polyvinyl alcohol oxidase by a symbiotic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**(1): 28-32.
 18. Shimao, M., Y. Nishimura, N. Kato and C. Sakazawa. 1985. Localization of polyvinyl alcohol oxidase produced by a bacterial symbiont, *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(1): 8-10.
 19. Shimao, M., H. Yamamoto, N. Kato, O. Adachi, M. Ameyama and C. Sakazawa. 1984. Pyrrolo-quinoline quinone as an essential growth factor for a poly(vinyl alcohol)-degrading symbiont, *Pseudomonas* sp. VM15C. *Agric. Biol. Chem.*, **48** (11): 2873-2876.

(Received November 11, 1991)