

Terephthalic Acid 분해 세균의 분리 및 특성

김재화 · 이창호 · 우철주 · 주길재¹ · 서승교² · 박희동*
경북대학교 식품공학과, ¹농화학과, ²대구산업정보대학 환경관리과

Isolation and Characterization of Terephthalic Acid-degrading Bacteria. Kim, Jae-Hwa, Chang-Ho Rhee, Cheol-Joo Woo, Gil-Jae Joo¹, Seung-Kyo Seo², and Heui-Dong Park*. Department of Food Science and Technology, ¹Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, ²Department of Environmental Management, Taegu Polytechnic College, Taegu 706-022, Korea - A bacterial strain, designated T116, degrading terephthalic acid (TPA) was isolated from the soil around Taegu industrial area into which dye works wastewater flow. The isolate was identified as *Pseudomonas* sp. based on its morphological and physiological characteristics. Degradation of TPA by the strain T116 was confirmed with UV scanning and HPLC. About 90% and 98% of TPA were degraded after 36 and 60 hours, respectively, during the culture in a liquid medium containing 0.1% TPA. Addition of KH_2PO_4 at a final concentration of 100 ppm enhanced the chemical oxygen demand (COD) removal rate about 50% from dye works wastewater by *Pseudomonas* sp. T116. Optimum pH and temperature for COD reduction from wastewater were 7.0 and 30°C, respectively. The bacterium was applied to the continuous culture for the treatment of dye works wastewater whose TPA concentration and COD_{Mn} were 2,200 ppm and 1,620 ppm, respectively. It was observed that 90-95% of COD was eliminated after 4 days culture in the continuous culture with a retention time of 37 or 43 hours.

Key words: terephthalic acid (TPA), *Pseudomonas* sp., degradation, dye works wastewater

최근 고도의 산업발달과 기술혁신 그리고 경제사회의 급격한 발전에 따른 인간활동의 도시집중으로 자원의 집중적 활용에 의한 폐기물 등의 오염원이 크게 증가하게 되었다. 이로 인하여 많은 양의 폐수와 오염물이 자연계로 배출되어 생태계의 심각한 불균형 및 자정능력의 부족현상을 초래하였으며, 그 중 폐수에 의한 수질오염은 오늘날 커다란 환경오염 문제로 대두되고 있다[9]. 대구 지역은 섬유공업의 발달로 천연섬유에서 화학섬유에 이르기까지 다양한 염색가공법이 개발되었으며, 초기에는 단순가공 공정에 그쳤으나 최근에는 polyester 감량가공 및 새로운 염색가공 재료의 생산 보급으로 새로운 가공법이 확산되고 있다. 따라서 발생하는 염색가공 폐수 역시 고농도의 합성 유기물질과 난분해성 물질을 함유하고 있어 폐수처리 공정에 많은 문제를 일으키고 있는 실정이다. 일반적으로 염색 가공공장 폐수의 특성은 색도, pH, 알칼리도, 유기물 농도가 높고 고온이며 염료에 따라 독성을 함유하고 있기 때문에 고부하, 다변성, 악성폐수로서 알려져 있다[4]. 염색가공 공장의 polyester 감량 공정에서 배출되는 주 성분은 terephthalic acid(TPA)와 ethylene glycol(EG)로서 이들이 중량비로 약 7:3 비율로 용해되어 있으며, 호발공정에서 배출되는 성분 중

에는 polyvinyl alcohol(PVA)과 같은 물질을 다량 함유하고 있다[6, 7]. 이들 물질은 생물학적 폐수처리 공정에 의해서도 거의 제거되지 않고 유출수에 함유되어 자연환경에 배출되므로 공공수역의 수질에 상당한 영향을 미치고 있다. 염색가공 공장의 폐수 중에 함유되어 있는 PVA 분해 미생물의 분리 및 특성에 관하여는 몇몇 연구 보고가 있다[1-3, 5, 10, 12, 13, 15]. 현재까지 PVA를 분해할 수 있는 미생물로서 *Pseudomonas* sp.[12, 13, 15], *Xanthomonas* sp.[10], *Alcaligenes* sp.[3] 등이 알려져 있으며, 국내에서도 *Pseudomonas* sp.에 의한 PVA 분해에 대한 연구가 이미 보고된 바 있다[1, 2, 5]. 또한 TPA의 분해에 관하여는 최근 polyester 감량폐수의 처리를 목적으로 황산을 처리하여 폐수를 약산성으로 변화시킴으로써 TPA를 석출시킨 다음 탈수건조시켜 폐기물을 처리하는 방법이 연구된 바 있다[5]. 그러나, 석출 침전된 TPA slurry는 80%의 수분을 함유하고 있기 때문에 탈수여액에는 고농도의 TPA를 함유하고 있어 이들의 처리에 또한 많은 문제점이 있다[5]. 최근, 미생물 배양에 의한 EG와 TPA 함유 용액의 COD 감소[6] 및 이들의 고정화에 관한 보고가 있을 뿐[7] TPA를 분해할 수 있는 미생물에 관한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 활성 슬러지법에 의한 polyester 감량폐수의 처리효과를 증가시키기 위한 일환으로 TPA를 분해하여 염색공장 폐수중의 TPA의 처리에 이용할 수 있는 세균을

*Corresponding author
Tel. 82-53-950-5774, Fax. 82-53-950-6772
E-mail: hpark@kyungpook.ac.kr

토양에서 분리한 후 그 분해능 및 생리학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료 및 배지

Terephthalic acid(TPA) 분해균주의 분리를 위한 시료는 대구공단 염색폐수가 유입되는 지역의 토양을 채취하여 사용하였다. TPA 분해균의 분리 및 배양조건을 조사하기 위하여 사용한 배지로는 0.1% TPA(Sigma Co., USA), 0.1% NaNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.05% KCl을 함유하는 배지(이하 TPA 배지라 약함)를 사용하였다. TPA 분해균의 보존은 TPA 액체배지에 2%의 한천을 첨가하여 만든 고체 사면배지에 2주마다 계대배양하면서 4℃에서 보관하였다.

TPA 분해균의 분리

TPA 분해균의 집식배양을 위하여 토양시료를 멸균증류수에 현탁한 후 상등액 1 ml을 TPA 액체배지 25 ml에 접종한 다음 30℃에서 120 strokes/min의 속도로 7일간 진탕배양하였다. 배양액 0.1 ml을 취하여 TPA 평판배지에 도말하고 30℃에서 배양한 후 형성된 콜로니를 TPA 배지를 사용하여 삼단 희석법으로 순수분리하였다. 분리된 균들을 TPA 액체배지에 30℃에서 120 strokes/min의 속도로 진탕배양한 후 660 nm에서의 균의 증식도와 230 nm에서의 흡광도를 측정하여 TPA 분해능을 조사하였다. 분리된 균주들 중 생육도와 TPA 분해능이 가장 우수한 한 균주를 최종적으로 선별하여 공시균으로 사용하였다.

공시균의 동정

최종선별된 TPA 분해균의 형태 및 생리학적 성질을 기초로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [14]에 준하여 동정하였다.

배양방법

종배양은 TPA 배지에 사면배지로부터 한 백금이의 균을 접종하여 30℃에서 24시간 동안 120 strokes/min의 속도로 진탕배양하였으며 본 배양은 TPA 배지에 종배양액을 1% 되게 접종한 후 종배양과 동일한 방법으로 행하였다. 균의 생육도를 조사하기 위하여는 660 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

공시균의 TPA 분해능 확인

공시균의 TPA의 분해능을 확인하기 위하여 TPA 배지에 균을 배양하면서 UV/VIS spectrophotometer (PYE UNICAM PU8600, PHILIPS Co., USA)로 UV

Table 1. Operating conditions of HPLC for the assay of terephthalic acid content

Items	Conditions
Column	Novapak C18 (3.9×300 nm)
Detector	Waters 410 Differential Refractometer
Mobile phase	H ₂ O:MeOH/Propionic acid=80:20/0.1 (v:v/v%)
Flow rate	0.8 ml/min
Injection volumn	10 µl
Wavelength	230 nm
Chart speed	0.25 cm/min

scanning 및 HPLC(Water Associate 2700 PSI, UK)를 사용하여 경시적으로 TPA 분해정도를 조사하였다. TPA의 함량을 조사하기 위한 HPLC의 분석조건은 Table 1과 같다.

연속배양에 의한 염색폐수의 처리

실험에 사용한 폐수는 대구광역시 T 염색공장 폐수를 사용하였으며 폐수의 일반 성분은 환경오염 공정시험법 [8]에 의하여 측정하였다. BOD 함량은 20℃에서 5일간 소비된 용존산소량을 측정하였으며, 부유물질 함량은 시료를 GF/C여지로 흡인여과한 후 105℃에서 항량이 될때까지 건조하여 계산하였고 TPA 함량은 표준물질을 사용하여 230 nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다. 사용된 염색공장 폐수의 특성은 TPA 2,200 ppm, COD_{Mn} 1,620 ppm, COD_{Cr} 5,400 ppm, BOD₅ 3,500 ppm, SS 49.2 ppm, 총 질소 150.5 ppm, 총 인함량 9.4 ppm, pH 10.5이었다. 연속 배양을 위하여 Fig. 1과 같은 실험실적 규모의 배양장치를 제작하여 폭기조내의 DO 농도 2-3 ppm, MLSS 농도 4,000 ppm, SV₃₀ 30%로 유지하면서 분리균 첨가에 의한 TPA 함유 염색폐수의 처리효과를 관찰하였다. 연속조건으로 수리적 체류시간(HRT: hydraulic retention time)을 37 또는 43시간으로 조절하여 행하였으며

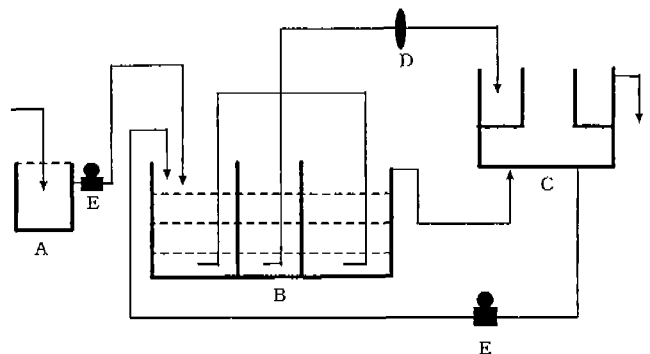


Fig. 1. Flow diagram of the continuous activated sludge process for the treatment of dye works wastewater.

A: Neutralization tank, B: Aeration tank, C: Precipitation tank, D: Aeration pump, E: Peristaltic pump.

폭기조 용적은 12.5 l로 연속흐름식 방법으로 하였다.

결과 및 고찰

Terephthalic acid(TPA) 분해균의 분리 및 동정

대구일대 염색공장의 폐수가 유입되는 지역의 토양으로부터 TPA를 유일한 탄소원으로 이용하여 증식이 가능

Table 2. Morphological and physiological characteristics of the isolated strain T116

Morphological characteristics	
Form	rod
Gram stain	negative
Motility	motile
Nutrient broth	membraneous
Optimum temperature	30°C
Optimum pH	7.5
Colony color	brown
Physiological characteristics	
Oxidase test	-
Indole production	-
Gelatin liquefaction	+
V-P test	-
Nitrate reduction	+
Urease test	-
Hydrogen sulfide production	-
O-F test	Oxidative
Catalase test	+
Starch hydrolysis	+
Acid from glucose	+
Lysine dehydrolase	-
Ornithine decarboxylase	-
Arginine dehydrolase	+
β-galactosidase	+
Fluorescent pigments	+
Carbon utilization	
Arabinose	±
Mannose	+
Glucose	+
Rhamnose	-
Melibiose	±
Maltose	+
Sucrose	+
Mannitol	+
Sorbitol	-
Inositol	-
Gluconate	+
Citrate	+
Phenylacetate	-
N-acetylglucosamine	+

*+ : positive, - : negative.

한 수종의 균주를 분리하였다. 이들을 TPA 액체배지에 배양한 후 균의 생육도와 TPA의 분해능을 비교하여 가장 우수한 것으로 나타난 균주 T116을 최종선별하였다. 이 균의 형태적 및 생리적 특성을 조사한 결과 간균으로서 Gram염색에서 음성, 반유동성 배지에서 운동성이 있었으며 집락의 색이 갈색이었고 oxidase test, indole생성능, H₂S 생성능, urease test 및 lysine dehydrolase의 생성은 음성으로 나타났다. 또한 젤라틴 액화력, 질산 생성능 및 catalase test 등은 양성으로서 *Pseudomonas* 속의 주요특성을 나타내어 *Pseudomonas* sp. 유연균으로 동정하였다(Table 2). 균의 생육에 대한 최적조건을 조사한 결과 최적온도는 30°C, 최적 pH는 7.5이었다.

공시균의 TPA 분해능 확인

공시균의 TPA 분해능을 확인하기 위하여 0.1%의 TPA를 함유하는 액체배지에 공시균을 배양하면서 배양 전, 24시간 배양 및 60시간 배양 후 배양액의 UV scanning 및 HPLC를 행한 결과는 Fig. 2와 같다. 배양시간이 경과함에 따라 흡광도 곡선의 높이가 급격히 낮아짐을 알 수 있으며 특히 TPA의 정량에 사용되는 230 nm에서의 흡광도가 급격히 감소하는 현상을 나타내었다. 동일한 배양액내의 TPA 감소현상을 HPLC로 확인한 결과 UV scanning의 결과와 거의 동일하게 배양시간이 경과함에 따라 TPA의 peak가 급격히 낮아짐을 알 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 보아 본 연구에서 분리한 *Pseudomonas* sp. T116은 TPA를 분해할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 UV spectrophotometer와 HPLC에 의한 TPA 분해능의 조사 결과가 거의 동일한 결과를 나타내었으므로 간단히 230 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 TPA를 손쉽게 정량할 수 있을 것으로 추측된다.

공시균의 배양시간에 따른 균의 생육 및 TPA 분해

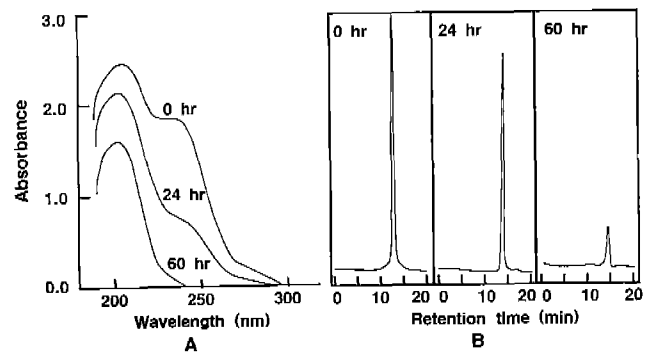


Fig. 2. UV scanning spectra (A) and HPLC profiles (B) of terephthalic acid in the culture broth of *Pseudomonas* sp. T116.

Samples were taken after culture for 0, 24, and 60 hours in a medium containing 0.1% terephthalic acid and the filtrate of each sample was used for the UV scanning and HPLC.

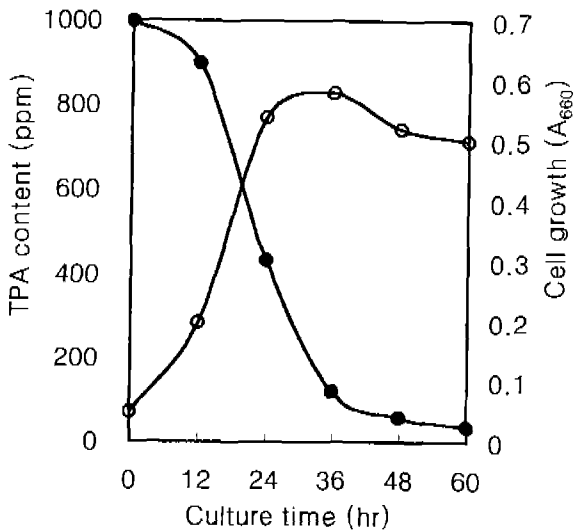


Fig. 3. Time course of the growth of *Pseudomonas* sp. T116 and the degradation of terephthalic acid in a medium containing 0.1% terephthalic acid.

○—○: Cell growth (A₆₆₀), ●—●: Terephthalic acid content (ppm).

0.1%의 TPA를 함유하는 TPA 배지에 균을 60시간 동안 배양하면서 정시적으로 660 nm에서의 생육도와 230 nm에서의 TPA 분해도를 HPLC로 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 균의 생육은 배양 24시간 후에 정지기에 도달하였으며 36시간 이후에는 오히려 다소 감소하는 현상을 나타내었다. TPA의 잔존량은 균의 생육이 진행됨에 따라 급격히 감소하는 경향을 보이다가 배양 24시간이 경과하여 정지기에 도달한 후 완만한 감소현상을 보였다. 그리고 배양 36시간 후 60시간까지 TPA의 잔존량은 거의 일정한 값을 나타내었다. TPA의 초기농도 1,000 ppm에서 36시간 배양 후 TPA 잔존량은 100 ppm으로서 분해효율 90%, 60시간 배양 후 잔존량은 20 ppm으로서 분해효율 98%를 나타내어 거의 대부분의 TPA가 36시간 배양으로 분해되는 것으로 나타났다.

회분배양에 의한 TPA 함유폐수의 처리조건

TPA를 함유하는 염색공장의 폐수를 사용한 회분배양에 있어서 처리조건에 따른 COD 제거율을 조사하였다. 본 연구에서 사용한 염색공장 폐수의 pH가 10.5로서 알칼리성이기 때문에 HCl을 첨가하여 pH를 7.0으로 조절한 후 공시균을 24시간 배양하여 행하였다. 원폐수의 영양조성비는 BOD:N:P가 100:4.3:0.3으로 질소원은 비교적 충분하였으나 인산염이 부족하였으므로 인산염으로서 H₃PO₄, KH₂PO₄, K₂HPO₄ 등을 농도별로 첨가하여 COD 제거율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 인산염의 종류에 따른 COD 제거율에는 큰 차이가 없었으나 KH₂PO₄가 다른 인산염에 비하여 다소 우수하였으며 첨가 농도가 100 ppm일 때 가장 우수한 것으로 나

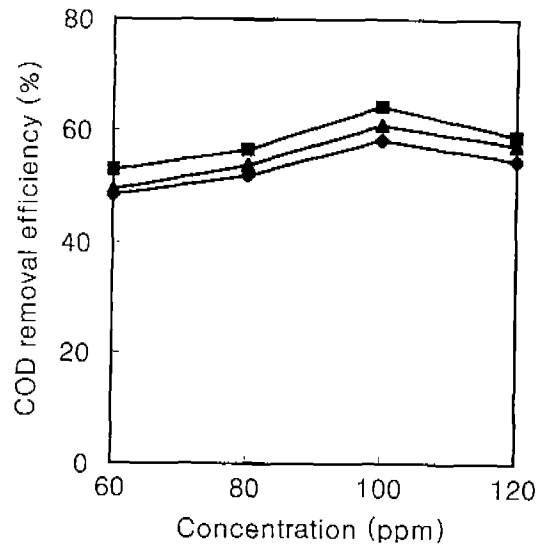


Fig. 4. Effects of phosphorus sources addition on the chemical oxygen demand (COD) removal efficiency from dye works wastewater by *Pseudomonas* sp. T116 in the flask culture.

After the bacteria were cultured for 24 hours in dye works wastewater supplemented with the concentration of various phosphorus sources shown in the figure, COD_{Mn} was assayed using culture filtrate. The initial terephthalic acid content and COD_{Mn} of the wastewater were 2,200 and 1,560 ppm, respectively. ◆◆: H₃PO₄, ■—■: KH₂PO₄, ▲—▲: K₂HPO₄.

타났다. 일반적으로 미생물의 증식과 활성을 유지하기 위해서는 탄소원 뿐만 아니라 질소원, 인산염 등의 영양성분이 필요하며 그 조성비에 의해서 증식이 영향을 받는데 미생물을 이용한 폐수 처리에서도 그 영양조성비에 따라 영향을 미친다. 폐수처리에 있어서 영양조성비가 불균일하면 *Spharotilus natans*, *Beggiatoa* sp. 등이 과도하게 증식되어 sludge bulking 현상이 발생되어 정상적인 처리가 곤란한 경우가 발생할 수 있다. 일반적으로 활성 슬러지에 의한 폐수처리에 있어서 영양조성비를 BOD:N:P의 비율을 100:5:1로 조절하여 처리하고 있다 [11]. 본 연구에 사용한 폐수의 총 질소와 인의 함량은 각각 150.5, 9.4 ppm으로서 KH₂PO₄를 100 ppm(인으로서 22.8 ppm) 첨가할 경우 총 인의 함량이 32.2 ppm이 되고 N:P가 5:1.07로서 영양조성비가 적당하여 폐수의 COD 제거율이 가장 우수한 것으로 추측할 수 있다.

폐수에 인의 함량이 32 ppm 되게 KH₂PO₄를 첨가하고 pH를 7.5로 조절한 후 공시균에 의한 폐수의 COD 제거율에 미치는 pH와 온도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 공시균에 의한 염색폐수의 COD 제거에 가장 적합한 pH와 온도는 각각 7.0, 30℃이었으며 COD 제거율은 최고 63%를 나타내었다.

연속 배양에 의한 TPA 함유폐수의 처리

이상의 결과를 기초로 염색폐수의 pH와 영양조성비를

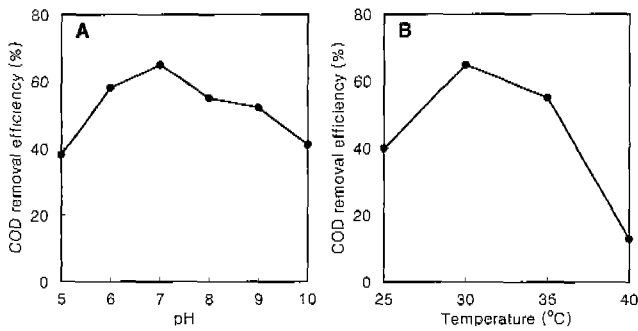


Fig. 5. Effects of pH (A) and temperature (B) on the COD removal efficiency from dye works wastewater by *Pseudomonas* sp. T116 in the flask culture.

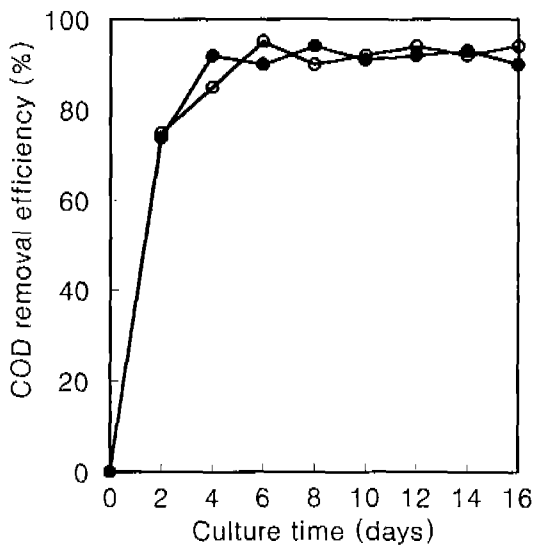


Fig. 6. Changes in the COD removal efficiencies in a continuous activated sludge process supplemented with *Pseudomonas* sp. T116 for the treatment of dye works wastewater. Hydraulic retention time was adjusted to 37 or 43 hours by the flow rate of the wastewater to aeration tank. ○—○ : 37 hours, ●—● : 43 hours.

조절하고 공시균을 첨가하여 30°C에서 16일간 연속배양을 행하면서 COD의 제거율을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 연속 배양은 용량 12.5 l의 폭기조에 활성슬러지와 균 배양액을 첨가한 후 체류시간을 37시간 또는 43시간으로 조절하였다. 처리 4일까지 COD 제거율이 급격히 증가하여 이후부터 제거율 90-95%로 일정한 값을 유지하였다. 따라서 본 연구에서 분리한 *Pseudomonas* sp. T116균을 TPA 화합물이 함유된 폐수에 사용함으로써 처리효율을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

대구인근 염색공장의 폐수가 유입되는 지역의 토양으로부터 terephthalic acid(TPA)를 유일한 탄소원으로

이용하여 증식이 가능한 수 종의 균주를 분리하였다. 그 중 TPA의 분해력이 가장 우수한 균주 T116의 형태 및 생리학적 성질을 조사하여 *Pseudomonas* sp.로 동정하였다. 0.1%의 TPA를 함유하는 배지에서 균을 배양하면서 정기적으로 TPA의 분해정도를 UV scanning과 HPLC로서 확인하였으며, 36시간 배양으로 90%, 60시간 배양으로 98%의 TPA가 분해됨을 알 수 있었다. 또한 0.2%의 TPA를 함유하는 염색공장 폐수에 초기 pH와 배양온도를 달리하여 공시균을 24시간 배양한 후 COD 제거율을 조사한 결과 초기 pH 7.0, 온도 30°C에서 COD 제거율이 가장 우수하였다. 염색공장 폐수를 사용하여 체류시간 37 또는 44시간으로 공시균의 연속배양을 행한 결과 처리 4일 후부터 90-95%의 효율로 COD가 제거되었다.

참고문헌

1. Jeong, S. Y., Y. L. Jo, M. W. Cho, and J. M. Kim. 1992. Isolation and characteristics of polyvinyl alcohol degrading bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 96-101.
2. Jo, Y. L. 1992. Characteristics of the symbionts *Pseudomonas* sp. J2W strain and *Xanthomonas* sp. J2Y strain which utilize polyvinyl alcohol. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **35**: 30-35.
3. John, E., L. Hughes, R. C. Bayly, and R. A. Skurray. 1984. Characterization of a TOL-like plasmid from *Alcaligenes eutrophus* that controls expression of chromosomally encoded *p*-cresol. *J. Bacteriol.* **166**: 73-78.
4. Kim, B. O., R. S. Kim, W. Park, and I. N. Jin. 1990. Isolation and identification of a phthalate ester degrading bacterium and the optimal culture conditions for production of one degrading enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 553-559.
5. Kim, J. M., M. H. Cho., Y. L. Jo, and S. Y. Jeong. 1991. Growth characteristics and optimal culture conditions of PVA-degrading strains. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **6**: 363-368.
6. Kim, J. M., J. H. Kim, and M. H. Cho. 1993. Growth characteristics and optimal culture conditions of bacterial strains degrading ethylene glycol and terephthalic acid in polyester weight wastewater. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **8**: 156-163.
7. Kim, J. M. and M. H. Cho. 1993. Development of a new immobilized microbial process for treating polyester weight loss wastewater. *J. Kor. Soc. Environ. Eng.* **15**: 743-753.
8. Korean Environmental Management Office. 1988. *Official Methods for the Environmental Pollution Analysis*, pp. 553-558. Seoul, Korea.
9. Lee, K. H., K. H. Lee, and S. O. Park. 1980. Elimination and utilization of pollutants. Part 1. Microbiological clarification of industrial waste and its utilization as feed resources. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.* **23**: 64-72.

10. Nishikawa, H. and Y. Fujita. 1975. Polyvinyl alcohol degradation techniques using microorganisms. *Chem. Econ. Eng. Rev.* **7**: 33–41.
11. Park, C. H., Y. K. Kim, H. J. Yu, and P. S. O. 1991. Microbial degradation of fats and oils in industrial wastewater. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 88–93.
12. Sakazawa, C., M. Shima, Y. Taniguchi, and N. Kato. 1981. Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 261–267.
13. Shima, M., S. Onishi, N. Kato, and C. Sakazawa. 1989. Pyroloquinoline quinone dependent cytochrome reduction in polyvinyl alcohol degrading *Pseudomonas* sp. strain VM15C. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 275–278.
14. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William & Wilkins, Baltimore, USA.
15. Suzuki, T., Y. Ichihara, M. Yamada, and K. Tonomura. 1973. Some characteristics of *Pseudomonas* o-3 which utilize polyvinyl alcohol. *Agr. Biol. Chem.* **37**: 747–756.

(Received November 9, 1998)