

PVA 등 조염제 분해균주의 분리 및 생물학적

활성증진 기술 개발 <1>

임연택
국립환경연구원 수질공학과장

목차

I. 서론

II. 재료 및 방법

1. 균주 분리용 시료와 사용 시약
2. 사용배지 및 배양조건
3. 균주분리
4. 균주 동정
5. Cell Growth 측정
6. PVA 분석
7. 화학적 산소 요구량(CODMn) 측정
8. 고온 분해 균주의 선별
9. 혼합 배양시 PVA 분해균의 선별 실험

III. 결과 및 고찰

1. 시료 채취 및 PVA 분해균의 분리
2. 균주동정
3. PVA 분해를 위한 최적 배양조건
4. 혼합 배양시 KMG1과 KMG5 균주의 세포증식
5. KMG1과 KMG5 공생균주중 PVA 분해균의 확인
6. 혼합배양의 Kinetics 조사
7. 고온성 PVA 분해 변이주의 개발

IV. 결론

I. 서론

Polyvinyl alcohol(PVA)은 식물공업의 사이징제, 제지공업의 코팅제, 접착제, 중합촉진제, 플라스틱 산업의 주형 합성제, PVA 섬유 제조 등 각 방면에 널리 이용되는 합성 고분자 화합물이다(Suzuki 등, 1973a; Suzuki 등, 1977). 우리나라에서도 최근 석유화학공업의 급속한 발달로 PVA와 같이 석유를 원료로 하는 합성고분자화합물을 대량 생산하여 광범위하게 사용하는데, 이런 고분자 화합물은 천연 고분자 화합물과는 달리 자연계의 물질 순환계로 쉽게 유입되지 않기 때문에 자연분해가 매우 어렵다. PVA는 우리나라에서 그 사용량이 매년 증대되고 있으나, 높은 결정성과 수용성 때문에 역시 생분해가 매우 어려워, 경우에 따라서는 하천 및 토양오염의 주요 원인물질이 될 수가 있다.

특히, 식물가공공단 폐수 중에는 각종 색소 화합물과 함께 조염제 내지는 사이징제로 사용된 PVA가 다량 함유되어 있으며(Suzuki 등, 1973a), 더욱이 섬유 염색 공업은 다량의 공업용수를 사용함으로써 우리나라 전체 산업폐수의 약 4.39%, 방류량으로서는 전체의 약 16.61%에 해당하는 엄청난 양의 폐수를 방출하여 식품품 산업에 이어 두번째로 많은 폐수량을 나타내고 있다. 한편 하절기에 위의 공단폐수는 수온이 40℃이상으로 상승되어 포기조의 anoxic state를 유발, 슬러지 미생물의 처리 활성이 현저히 저하됨과 동시에 원생생물의 생활 환경도 극히 불리하게 되어 결국에는 Floc형성의 불량 등으로 이어져 폐수처리 효율의 심각한 저하를 초래하는 등 식물가공 공단 폐수는 산업폐수 중에서도 많은 문제점을 가지고 있는 처리가 어려운 폐수인 것으로 보고되고 있다(Suzuki 등, 1973a; Suzuki 등, 1977).

따라서, 상기 문제의 염색 및 나염 공업폐수를 효과적으로 처리할 수 있는 효율이 극히 우수한 새로운 처리 기술의 개발, 확립은 우리나라 수자원 보존을 위한 중요하고 시급한 과제 중의 하나라고 생각된다. 폐수 중에 함유된 PVA 제거방

법에 대한 연구로는 주로 생물학적인 처리방법을 중심으로 해서 국내외적으로 활발히 진행되고 있다.

지금까지 연구된 것을 보면 ① PVA 분해균주의 광범위한 검색내지는 분리 균주의 균학적특성 조사(Suzuki 등, 1973a; 강, 1990; 정 등, 1992; Teranishi 등, 1974), ② Pseudomonas와 Xanthomonas 속으로 알려진 대다수의 분리한 분해 균주에 의한 PVA 분해 특성 규명(Suzuki 등, 1973a; Suzuki 등, 1977; 정 등, 1992; Suzuki 등, 1973b), ③ 공생에 의한 PVA 제거(Watanabe와 Morita, 1977; Sakazawa 등, 1984; Sakazawa 등, 1981; Masayuki와 Nobuo, 1985), ④ 분리 분해균주에 의한 PVA 분해기구의 규명(Haines와 Alexander, 1975; Kuwahara와 Matsubara, 1988; Suzuki, 1978; Watanabe 등, 1975; Sakai 등, 1986), ⑤ PVA 생분해와 관련된 Key Enzyme의 분리 정제 및 정제 효소의 효소학적 특성 규명 내지는 실제 활성슬러지법에 의한 PVA 함유폐수의 처리조건 확립 등 PVA의 생물학적 처리와 관련된 많은 연구가 보고되고 있다(Teranishi 등, 1974; Suzuki 등, 1973b; Watanabe와 Morita, 1977; Masayuki와 Nobuo, 1985; Suzuki, 1978; Watanabe 등, 1975; Suzuki, 1976; Watanabe 등, 1976).

그러나 현재까지 분리 · 보고되고 있는 대부분의 PVA 분해 균주는 30°C 전후에서 최대의 활성을 보이지만 40°C 이상의 온도에서는 현저한 활성저하를 나타내는 것으로 보고(Suzuki 등, 1973a; Suzuki 등, 1977; Suzuki 등, 1973b; Kuwahara 등, 1988; Shimao 등, 1985) 되고 있으며, 또한 본 연구자 등이 조사한 바로는 분해 균주의 활성 증진과 관계된 분자수준에서의 연구 보고는 거의 없는 것으로 나타났다. 그러므로 특히 하절기 폐수처리를 효과적으로 담당할 수 있는 고온성 분해 미생물의 분리, 확보 미생물자원의 분자 생물학적 내지는 유전 공학적 최신 기술을 동원한 처리 활성 증진, 개발한 고효성 우수균주를 실제 폐수 처리 시스템에 효과적으로 적용하기 위한 체계적인 연구가 절대적으로 필요하다고 본다.

따라서, 2차년도 연구에서는 1차년도에 3차에 걸친 분리 검색 과정을 통해 최종분리한 분해능이 가장 우수했던 시료로부터 PVA 분해균을 순수 분리하고 분리균주의 특성, 분해 특성 및 최적의 배양 조건을 조사하여 가장 효율적인 공정 개발과 아울러 고온에서도 PVA 분해능을 갖고 있는 고온성 분해균을 선발, 하절기 실제 폐수 처리에 효과적으로 적용할 수 있도록 하고자 하였다.

또한, 이 PVA 이용 균주의 분해 기구를 분자 수준에서 분석하고 이를 바탕으로 하여 고온에 높은 적응력이 있고 분해력이 특히 우수한 고효성 균주 개발을 위한 연구를 수행하고자 하였다.

하절기 폐수처리를 효과적으로 담당할 수 있는 고온성 분해 미생물의 분리, 확보 미생물자원의 분자 생물학적 내지는 유전 공학적 최신 기술을 동원한 처리 활성 증진, 개발한 고효성 우수균주를 실제 폐수 처리 시스템에 효과적으로 적용하기 위한 체계적인 연구가 절대적으로 필요하다고 본다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 분리용 시료와 사용시약

1차년도 연구 사업에서 채취한 총 189점의 전국 각 지 식물 가공 공단의 주변 토양과 산간지 토양 시료중에서 PVA의 분해 활성이 가장 높은 미생물균을 분리할 수 있었던 의정부 소재 식물 가공 공장 염색 폐수 처리용 Sludge를 PVA 분해 관련 순수 균주 분리를 위한 2차년도사업의 균주 분리용 시료로 사용하였다. 균주 분리용 배지에 탄소원으로 사용한 PVA는 중합도 1500의 SHINYO사의 제품을 사용하였고, 비교분석하기 위해 사용한 PVA는 KATAYAMA사의 중합도 500과 2000의 공업용 PVA, 그리고 중합도 30000의 SIGMA사 제

품을 사용하였다. 기타 본 연구에 사용된 시약은 일반시약 시판 일급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

2. 사용 배지 및 배양조건

PVA 분해 균주의 분리에 이용한 배지는 Suzuki 등 (1973)이 이용한 표 4-1과 같은 조성을 가지고 있는 배지를 사용하였으며 균주 배양은 특별한 경우를 제외하고는 37°C에서 약 200 strokes/min의 속도로 진탕 배양하였다.

3. 균주분리

상기 시료 1g에 0.8% 멸균 식염수 10ml을 첨가, 잘 혼합하여 시료 현탁액으로 만든 다음, 본 시료 현탁액 3ml을 50ml의 살균한 분리 배지에 첨가하여 진탕 배양 하면서 배양중 균주 생육 정도와 PVA 분해 정도를 비교 분석하였다. PVA 분해정도가 가장 높은 배양액으로 부터 일정량의 시료를 무균적으로 취하여 PVA minimal agar medium과 nutrient agar medium을 사용하여 PVA 분해 관련 균주를 순수 분리 하였다.

(1) Vitamin mixture contained the following(per liter of distilled water): Ca-pantothenate 400mg; inositol 200mg; niacin 400mg; p-aminobenzoate 200mg; pyridoxine 400mg; thiamine 400mg; biotin 2 mg; and vitamine B₁₂ 0.5 mg

4. 균주 동정

최종 분리한 PVA 분해균의 형태적인 모양을 전자현미경을 통해 관찰하였으며, 동정은 Manual of methods for general bacteriology(Gerhardt 등, 1981)와 Bergey's manual of systematic bacteriology(Krieg와 Holt, 1984)에 수록되어 있는 일반 세균 동정법에 따라 실시하였다.

[표4-1. Composition of the Medium used for Isolation of PVA Degrading Strains]

Ingredient	Content
PVA	5.0 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.0 g/l
KH ₂ PO ₄	1.0 g/l
K ₂ HPO ₄	8.0 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g/l
NaCl	0.1 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02 g/l
FeSO ₄	0.01 g/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.5 mg/l
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.5 mg/l
MnSO ₄	0.5 mg/l
Vitamin mixture ⁽¹⁾	1.0 mg/l

pH was adjusted to 7.5

[표4-2. Composition of Nutrient Agar Medium]

Bacto pepton	10 g	Yeast extract	5 g
NaCl	8 g	Agar	15 g
Distilled water	1000 ml	pH	7.5

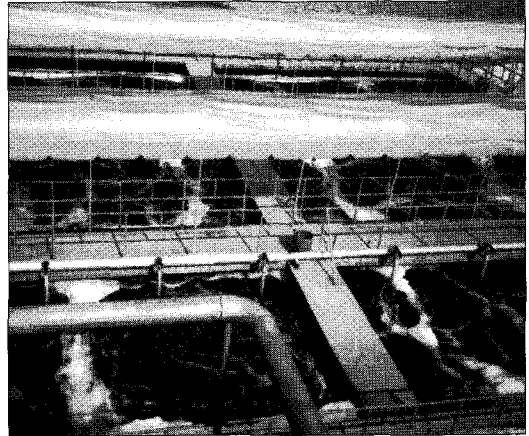
5. Cell Growth 측정

배양중 미생물 세포증식은 660nm에서의 흡광도를 측정하거나 또는 nutrient agar plate를 사용한 일반 생균수 측정법을 이용하여 세포 증식도를 조사하였다.

6. PVA 분석

배지중의 PVA 정량은 Boric acid 존재하에서 PVA와 Iodine 용액이 반응, 녹색의 반응 산물이 정량적으로 생성되는 반응 원리를 이용한 Finley의 방법(1961)에 따라 정량하였다.

즉, 일정량의 배양액을 4℃에서 12,000rpm으로 20분간 원심 분리한 후 상층액을 적절히 희석하여 준비한 시료 32ml에 15ml의 4% Boric acid 용액을 잘 혼합하면서 첨가한 후, 3ml Iodine 용액을 추가하여 반응액이 50ml가 되게 하였다. 상기 반응 혼합액을 25℃에서 20분간 진탕 반응시킨 후, 690nm에서 흡광도를 측정하고 그림 4-1의 표준곡선을 이용하여 시료중의 PVA량을 환산하였다.



7. 화학적 산소 요구량(COD_{Mn}) 측정

COD(화학적 산소 요구량) 측정은 수질 오염 공정시험법(환경처, 1991)에 따라 실시하였다. 즉, 균체를 제거한 배양액을 적절히 희석한 시료 일정량에 33% H₂SO₄ 용액 10ml을 첨가하여 산성으로 하고 0.025N KMnO₄ 용액 10ml을 넣은 후 30분간 가열 반응시켰다.

반응이 끝난 후 0.025N Na₂C₂O₄ 10ml을 추가하고 잔여 Na₂C₂O₄를 0.025N KMnO₄ 용액으로 역적정하여 소모된 산소량을 다음 식에 따라 산출하여 COD_{Mn}값을 구하였다.

$$\text{COD}_{\text{Mn}}(\text{mg/l}) = (B-A) \times F \times (1000/V) \times 0.2$$

A : 바탕 시험 적정에 소비된 0.025N KMnO₄

B : 본 시험 적정에 소비된 0.025N KMnO₄

F : 0.025N KMnO₄ 용액의 역가(Factor)

V : 시료의 양(ml)

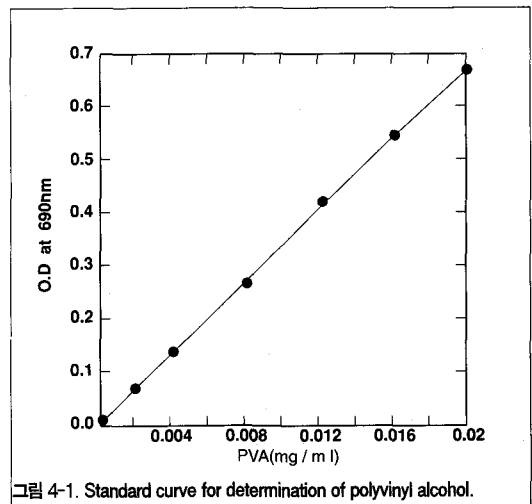


그림 4-1. Standard curve for determination of polyvinyl alcohol.

8. 고온 분해 균주의 선별

PVA 분해 관련 두 균주 중 성장이 늦고 PVA 분해균으로 판단되는 KMG5의 세포 현탁액을 nutrient agar에 도말, 40℃에서 5일 배양하여 성장속도가 빠른 즉, 크기가 큰 colony들을 선별하였다. 선별된 colony들을 KMG1 균주의 colony와 혼합, PVA 최소배지에 접종하고 40℃에서 7일간 배양하여 이 중에서 균체성장과 PVA 분해능이 가장 우수한 혼합균주를 일차로 선별하였다. 일차 선별한 균주를 40℃에서 7일간씩 다섯 차례의 계대배양을 연속적으로 실시하는 고온에서의 순화(Acclimation)과정을 거쳐 최종적으로 40℃에서도 PVA를 효과적으로 분해 이용할 수 있는 고온성 변이 균주를 선별 분리 하였다.

[표 4-3. PVA Degradation by Microflora from Samples taken from a Textile Plant.]

Samples	PVA degrading activity after 5 days	Residual PVA * (mg/ l)	Residual PVA (mg/ l) after 7 days
포기조 1		3552	3552
포기조 2		350	1964
포기조 3		4070	1175
공장주변 토양		4780	4780
미생물조 1		2105	745
미생물조 2		2000	728
배수로 1		4395	4394
배수로 2		4535	4482
냉각수		4736	4736

* The initial PVA concentration in cultures was 5000 mg/l

[표 4-4. Pure and Mixed Cultures of Four Isolates]

Strains	Growth	PVA degradation
KMG1	+	< 5%
KMG2	+	< 5%
KMG3	+	< 5%
KMG4	+	< 5%
KMG1 + KMG2	+	< 5%
KMG1 + KMG3	+	< 5%
KMG1 + KMG4	+	< 5%
KMG2 + KMG3	+	< 5%
KMG2 + KMG4	+	< 5%
KMG3 + KMG4	+	< 5%
KMG1 + KMG2 + KMG3	+	< 5%
KMG1 + KMG3 + KMG4	+	< 5%
KMG1 + KMG2 + KMG4	+	< 5%
KMG2 + KMG3 + KMG4	+	< 5%
KMG1 + KMG2 + KMG3 + KMG4	++	< 10%

+ very poor growth ++ poor growth

9. 혼합 배양시 PVA 분해균의 선별 실험

PVA 분해관련 두 균주의 정확한 공생기구를 규명하기 위하여 0.5% PVA 최소배지에 0.1% glucose를 첨가한 배지에서 KMG5 균주는 7일, KMG1은 4일간 단독배양하였다. 배양 후 원심분리에 의해 균체를 분리 제거한 배양상층액을 고압 가열살균한 후, 이액을 배지로 사용, 두 균주를 교차 접종하고 배양시간에 따른 균체증식과 PVA 농도를 비교 분석 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 시료 채취 및 PVA 분해균의 분리

의정부 소재 직물 가공 공단 폐수, 폐수처리장 주변 토양 등에서 시료를 채취하여 현탁한 후, 살균한 PVA 배지에 접종하여 37℃에서 7일동안 진탕 배양 하였다. 시료 채취 장소 및 그 결과는 표4-3에 나타냈으며, 미생물조 2에서 채취한 시료를 사용한 실험에서 가장 높은 PVA 분해율을 나타내었다. 따라서 위의 가장 높은 분해율을 보였던 배양액으로부터 PVA 분해 이용에 직접 관계하는 균주 분리를 위하여 몇차례

의 계대배양을 거친 다음 배양액을 적절히 희석, nutrient agar 배지에 도말하고 48시간 배양하였다.

Nutrient agar 상에 나타난 colony들의 크기, 색깔, 또는 모양등을 참작하여 4가지의 서로 다른 균주를 분리하고 각각 KMG1, KMG2, KMG3 및 KMG4로 명명하였다. 순수 분리한 4가지 균주를 표4-4에 나타낸 바와 같이 단독 또는 혼합해서 PVA 배지에 접종, 배양해 보았으나 어느 배양액에서도 균체 증식과 PVA 감소 현상은 보이지 않았다.

따라서 PVA 분해 관련 균주는 nutrient agar에서 잘 자라지 않는 것으로 판단하고 PVA minimal agar에 비교적 높은 세포 농도의 배양 희석액(105, 106 dilution)을 도말하고 37℃에서 20일 이상 배양하였다니 다른 colony 주위에 상기 네 균주와 전혀 다른 노란색 색소를 생산하는 새로운 colony를 발견할 수 있었고 이를 KMG5 균주로 명명하였다.

KMG5 균주는 다른 네 균주에 비해 성장 속도가 매우 느려 생장이 빠른 균주로 부터 성장 저해를 받음으로써 nutrient agar에서는 분리가 되지 않았던 것으로 판단된다. 새롭게 분리한 KMG5 균주를 단독 또는 이전에 분리한 4가지 균주와 혼합하여 PVA 배지에서 배양해 본 결과 표4-5에 나타낸 바와 같이 KMG5 단독으로는 PVA 배지에서 전혀 생육을 하지 못하나, KMG1과 혼합배양 했을 때는 미생물조시료를 접종한 원배양과 거의 같은 수준의 세포 증식도와 PVA 분해도를 나타내었다. 따라서 KMG1과 KMG5 두 균주를 혼합배양하면서 배양시간에 따른 균체증식과 PVA 분해 이용률을 측정하여 그림4-2와 같은 결과를 얻었다. 표4-5의 결과와 마찬가지로 두 균주 단독으로는 PVA를 이용하여 생육하지 못하였으나 혼합배양을 하면 활발한 균주증식을 보이면서 배양 7일째에 균체증식의 정체를 나타내며 이와 비례해서 배지내의 PVA량이 감소됨을 볼 수 있었다. 이에 따라 KMG1과 KMG5 두 균주는 분명히 공생관계를 유지하면서 PVA를 탄소원으로 이용하고 있음을 확인하였다.

※ 알림

초점-「환경친화적 기업경영-한상욱-」
기사넘치는 관계로 이번호에는 쉽니다.

표 4-5. Reconstruction of Four Stains with KMG5 in PVA Broth)

Mixed culture	Cell growth (O.D. at 660 nm)	PVA degradation
KMG5	0.230	5%
KMG5 + KMG1	0.510	96%
KMG5 + KMG2	0.710	12%
KMG5 + KMG3	0.780	12%
KMG5 + KMG4	0.241	7%

* The initial PVA concentration of cultures was 5 g/l
Cultivation time : 6 days

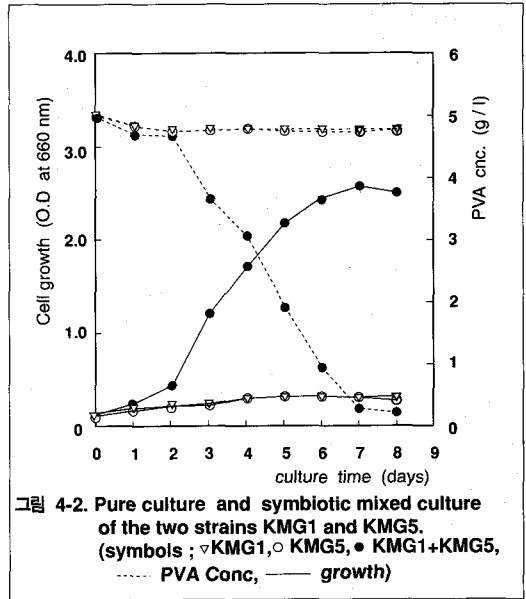


그림 4-2. Pure culture and symbiotic mixed culture of the two strains KMG1 and KMG5. (symbols ; ▽KMG1, ○ KMG5, ● KMG1+KMG5, ----- PVA Conc., ——— growth)

서울시 보건환경연구원
폐기물검사 시행

서울시 보건환경연구원 폐기물과에서는 업무과다로 인해 폐기물검사를 유관기관에서 관원으로 의뢰되는 시료에 대해서만 검사 통보하였으나, '97년 하반기부터 장비 등의 보강으로 폐기물매립 등에 필요한 일반 및 지정폐기물에 대하여 관원은 물론 민원 지참시료도 검사하여 성적서를 발급하고 있다.

검사대상 :

1. 폐기물관리법 시행규칙 제2조3항 관련 (오니, 소각재 등에 함유된 유해물 분석)등
2. 수수료 (10개항 : 용출시험, 120,700원)