

# PVA 등 조염제 분해균주의 분리 및 생물학적 활성증진 기술 개발 <3>

임연택  
국립환경연구원 수질공학과장

## 사. 질소원 영향

PVA 최소 배지에 질소원으로 첨가했던 0.1%의 ammonium sulfate 대신 다른 유기 및 무기 질소원을 각각 0.2% 농도로 첨가하여 균체증식 정도와 PVA 분해 이용율을 조사하여 그림 4-12에 나타내었다. Yeast extract를 첨가했을때 균체증식과 더불어 PVA 분해율도 가장 높았으나, urea, C.S.L 또는 skim milk를 질소원으로 첨가했을때는 균체 증식이 현저히 감소됨과 동시에 PVA도 거의 분해 되지 않았다. 한편 성장과 PVA 분해율에 가장 좋은 효과를 보였던 yeast extract의 첨가농도의 영향을 조사하여 그림 4-13과 같은 결과를 얻었다. Ammonium sulfate 대신 yeast extract를 0.2~0.4% 농도로 첨가했을때 균체증식과 PVA 분해율이 가장 높았으나 그 이상의 농도에서는 성장의 약간

### 목차

#### I. 서론

#### II. 재료 및 방법

1. 균주분리용 시료와 사용시약
2. 사용배지 및 배양조건
3. 균주분리
4. 균주 동정
5. Cell Growth 측정
6. PVA 분석
7. 화학적 산소 요구량(COD<sub>Mn</sub>) 측정
8. 고온 분해 균주의 선발
9. 혼합 배양시 PVA 분해균의 선별 실험

#### III. 결과 및 고찰

1. 시료채취 및 PVA 분해균의 분리
2. 균주 동정
3. PVA 분해를 위한 최적 배양조건
4. 혼합배양시 KMG1과 KMG5 균주의 세포증식
5. KMG1과 KMG5 공생균주 중 PVA 분해균의 확인
6. 혼합배양의 Kinetics 조사
7. 고온성 PVA 분해 변이주의 개발

#### IV. 결론

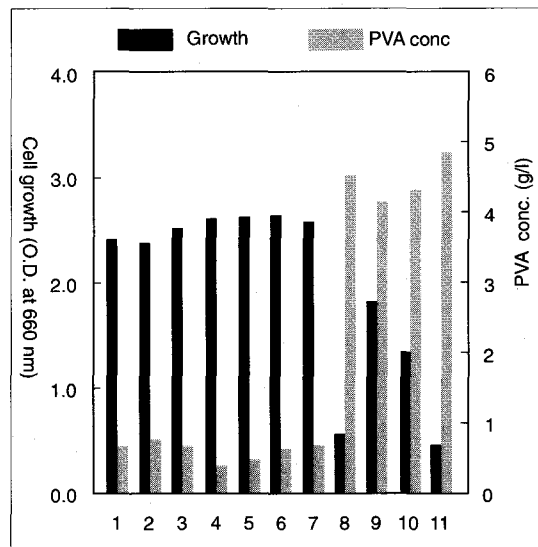


그림 4-12. Effect of nitrogen sources on PVA utilization by symbiotic mixed culture.

Cultivation was carried out at 37°C for 5 days.

1. Amm. sulfate, 2. Amm. nitrate, 3. Casamino acid
4. Yeast extract 5. Y.E.+Pepton, 6. Pepton, 7. Beef extract,
8. Urea, 9. Skim milk 10. Corn Steep Liquor, 11. None

의 감소와 동시에 PVA 분해율이 급격히 저하되는 특이한 현상을 보였다. 이는 PVA 분해와 관련해서 역할이 다른 두 균주가 관계된 혼합배양에 따른 현상이라고 생각할 수 있겠다.

아. 비타민과 미량원소의 영향

PVA 분해 균주 분리 목적으로 Suzuki 등이 확립한 PVA 최소 배지에 첨가되는 각종 비타민과 미량원소가 KMG1과 KMG5 혼합 배양에 의한 PVA 분해 이용률에 미치는 효과를 각 영양소 하나씩을 제거한 배지를 이용하여 조사해 보았다(표 4-9 참조). Vitamin B12를 제거한 배지에서 균체 증식률과 PVA 분해률이 약간 감소된 값을 보일뿐 기타 비타민

표 4-9. Effect of Trace Elements of Cell Growth and PVA Degradation.  
(cultivation was Carried out at 37℃ for 6 Days.)

Eliminated trace element	Cell growth (O.D. at 660 nm)	PVA degradation(%)
none	2.603	100
Ca-pantotheine	2.581	100
inocitol	2.593	100
niacin	2.579	100
biotin	2.583	100
P-aminobenzoate	2.569	99
pyridoxine	2.545	99
thiamine	2.575	99
vitamin B <sub>12</sub>	2.495	96
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.601	100
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.584	100
MnSO <sub>4</sub>	2.530	99
All	2.462	96

과 미량원소는 뚜렷한 첨가효과를 나타내지 않았다.

4. 혼합배양시 KMG1과 KMG5 균주의 세포 증식

KMG1과 KMG5 두 균주를 PVA최소 배지에 접종, 배양 시간에 따른 두 균주의 증식속도를 분석하여 그림 4-14와 같은 결과를 얻었다. 초기 접종량은 2%였으며 두 균주 모두 배양 8일째 가장 높은 증식도, 즉 KMG1 균주가 2.0×10<sup>9</sup> cells/ml, KMG5는 4.5×10<sup>9</sup> cells/ml의 값을 나타내면서

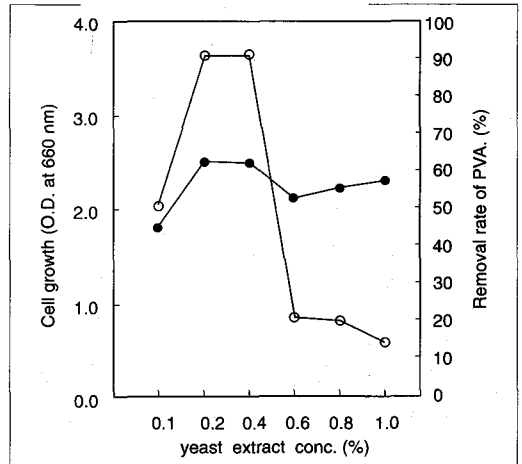


그림 4-13. Effect of yeast extract concentrations on PVA utilization by symbiotic mixed culture.  
(Cultivation time-4 days ;  
○ Cell growth ; ● Degradation rate of PVA)

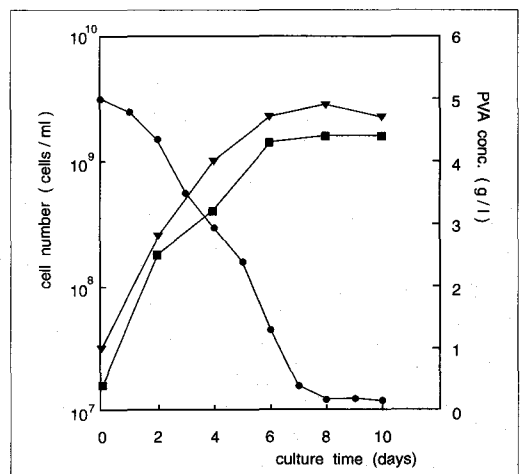


그림 4-14. Kinetics of cell growth in the mixed culture.  
(■ KMG1, ▼ KMG5, ● PVA concentration)

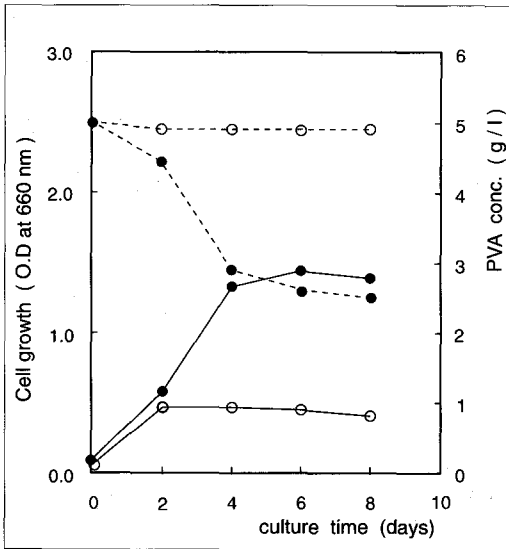


그림 4-15. Selection of PVA degrading stain in the Symbiotic mixed culture.

(— cell growth, --- PVA conc., ○KMG1, ● KMG5)

KMG5 균주 증식이 약간 우세함을 보였다. 따라서 두 공생 균주 중 실제 PVA 분해 균주는 KMG5 균주일 가능성이 크다고 판단되었다.

### 5. KMG1과 KMG5 공생균주중 PVA 분해균의 확인

KMG1과 KMG5 두 공생 균주중 어느 균주가 실질적인 PVA분해 균주인가를 알아보기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다.

0.1% Glucose를 첨가한 PVA 배지에 두 균주를 각각 단독으로 배양해 보았으나, 예상했던 바와 같이 두 균주 어느 것도 PVA를 분해하지 않았으나 glucose를 탄소원으로 이용하여 약간의 균체증식을 나타내었다. 따라서 상기배양액을 원심분리하여 균체를 완전분리 제거하고 상층액을 가압 가열 살균한 후, 이것을 배지로 사용해서 서로 교차 접종, 진탕 배양하여 그림 4-15와 같은 결과를 얻었다. KMG1 균주는 성장이 극히 저조함과 동시에 PVA가 전혀 분해 되지 않음을 관찰할 수 있었음에 반해, KMG5 균주는 비록 혼합 배양시와 비교하면 훨씬 낮은 수준이었으나 뚜렷한 균체증식과 아울러 PVA 감소를 보이고 있는 점으로 미루어 두 공생 균주 중에서 실제 PVA 분해균은 KMG5 인 것으로 확인하였다. Shimao 등(1985)은 Pseudomonas 속의 두 PVA 공생균주인 VM15A와 VM15C 중에서 VM15C균은 PVA분해효소를 그리고 VM15A균은 VM15C균의 성장 인자로 밝혀진 Pyrroloquinoline Quinone(PQQ)을 생산 공급하면서 상호 공생 관계를 이루고 있다고 보고하고 있으나, 본 연구의 실제 PVA 분해균인 KMG5균은 혼합 배양 대신 배지중 PQQ를

KMG1과 KMG5는 공생에 의해 PVA를 분해 이용하고 있는 것으로 확인되었으며 두 균주 중 실제 PVA분해균은 KMG5이며 KMG1은 KMG5균주 생육에 필수적인 역할을 함과 동시에 자신도 KMG5 생육하에서만 활발하게 증식하는 것으로 관찰되었다. 실제로 두 균주 특히 KMG5 균주는 다른 일반 세균과는 달리 영양이 풍부한 배지에서 성장속도가 매우 느린 극히 예외적인 특이한 생육특성을 나타내었다.

첨가하더라도 성장 인자로서 효과를 나타내지 않았다. 따라서 본 연구에서 분리한 두 공생 균주는 Shimao 등(1985)의 균주와는 다른 기구에 의한 공생 관계인 것으로 판단되어 앞으로 KMG1과 KMG5 공생 균주의 PVA분해와 공생 기구에 대한 분자 수준의 연구를 계속 진행할 예정이다.

### 6. 혼합 배양의 Kinetics 조사

지금까지 조사 연구한 바를 토대로 KMG1과 KMG5 두 균주의 공생에 의한 PVA분해 이용을 위한 최적 배양 조건에 두 균주를 7일간 진탕 배양하면서 배양시간에 따른 균체증식, PVA 분해율, 배양액의 COD 및 pH 변화 등을 분석 조사하여 그림 4-16과 같은 결과를 얻었다. 균체 증식은 배양 2일째부터 급격히 증가하면서 6일째 정체기에 도달하였으며 균체 증식에 비례하여 배지중 PVA가 감소되어 배양 6일째는 거의 완전히 제거됨을 볼 수 있었다. 또한, PVA 감소와 더불어 예상대로 배양액의 COD도 비례적으로 감소되고 있음을 확인할 수 있었으며, 배양액의 pH는 배양 종료시 약 1.0 정도가 떨어져 있음을 관찰하였다. 따라서 배양중 pH 조절이 균체 증식과 PVA 분해율에 큰 도움이 되리라고 판단된다.

### 7. 고온성 PVA 분해 변이주의 개발

실제 식물 가공 공단 폐수 처리의 가장 큰 어려움 중의 하나는 앞에서 언급한 바와같이 특히 하절기의 폐수 수온이 40℃ 이상으로 상승, 폐수 처리 효과의 심각한 저하를 초래한다는 것이다. 따라서 고온성 PVA 분해 균주 개발은 실제 식물 가공 공단 폐수 처리를 위한 가장 절실한 과제라고 판단된다. 본 연구에서도 초기부터 고온성 균주 분리를 최종 목표로 하여 광범위한 균주 분리 작업을 실시하였으나 많은 노력에도 불구하고 만족스러운 결과를 얻지 못했다.

그래서 이미 분리한 PVA 분해균주로부터 고온성 분해 변이주를 얻기위한 목적으로 일차적으로 관계 두 균주를 nutrient broth에 접종, 40℃에서의 균체 증식도와 비교하였다. 그림 4-17에 표시되어 있는 바와 같이 KMG1균은 40℃

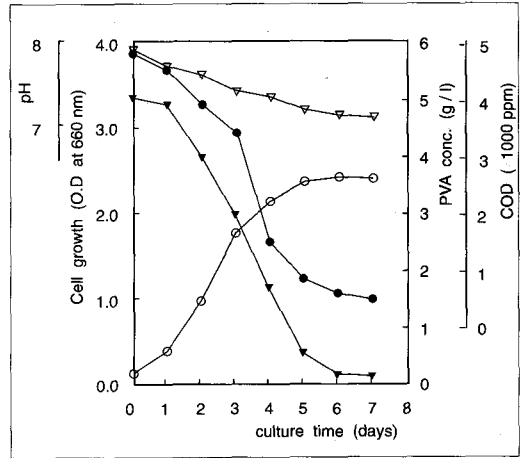


그림 4-16. Changes in cell growth, PVA removal rate, pH, and COD values during the mixed culture.  
(○ cell growth, ▽ pH, ▼ PVA conc., ● COD)

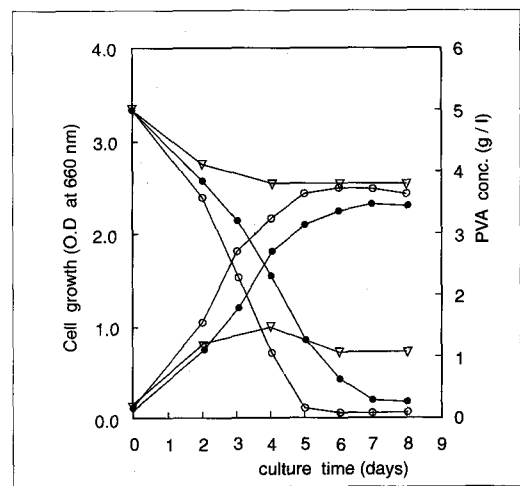


그림 4-17. Kinetics of cell growth of KMG5 and KMG1 strains at different temperatures.  
(A) KMG5, (B) KMG1 (● 37°C, ○ 40°C)

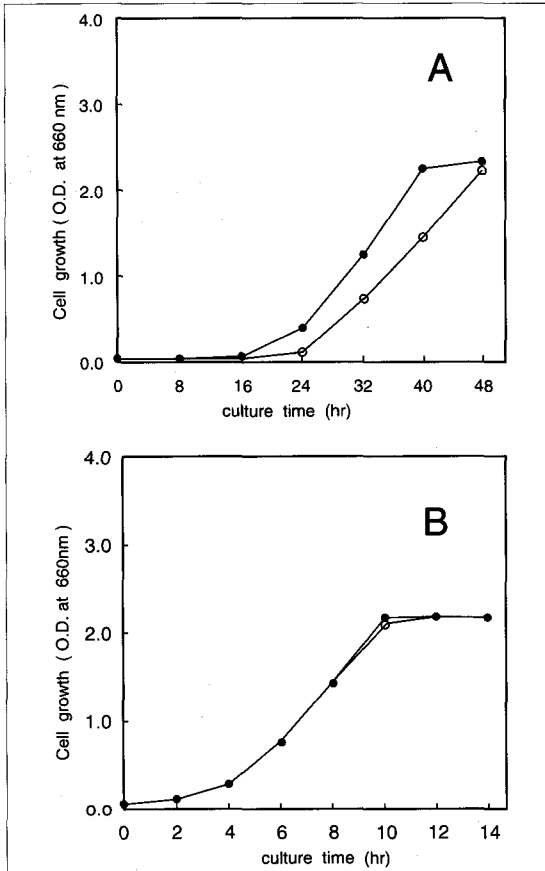


그림 4-18. Difference of xymbiotic PVA utilization between KMG5 strain and mutant KMG6 strain at 40°C.

▽ KMG5+KMG1 at 40°C ● KMG6+KMG1 at 40°C

○ KMG6+KMG1 at 37°C

에서도 잘 생육하였으나 KMG5 균주는 37°C에 비해 생육속도가 크게 떨어졌다. 따라서 KMG5 균주를 선택적으로 Monoclony분리법과 고온에의 순화 실험을 병행하여 고온에 적응시킨 결과, KMG6 변이주 분리에 성공하였다. 그림 4-18에 표시되어 있는 바와 같이 KMG6를 이용한 혼합배양시는 40°C배양에도 분해 속도는 다소 느리나 KMG5 균주를 이용한 37°C에서의 혼합배양과 거의 같은 수준의 분해율을 나타내고 있다. 따라서 KMG6 변이주는 40°C의 고온 폐수 처리에도 효과적으로 이용할 수 있는 우수한 PVA분해 균주임을 확인하였다.

#### IV 결론

의정부 염색공단 폐수처리장에서 채취한 시료로부터 실제 PVA 분해 균주를 순수 분리하여 관계 균주를 KMG1과 KMG5로 명명하였으며 현재 동정 실험이 마무리 단계에 있다. 동시에 두 분해 균주의 균주동정, PVA 분해 특성 및 최적 PVA 분해 조건 등도 조사 검토하였다.

KMG1과 KMG5는 공생에 의해 PVA를 분해 이용하고 있는 것으로 확인되었으며 두 균주 중 실제 PVA분해 균은 KMG5이며 KMG1은 KMG5균주 생육에 필수적인 역할을 함과 동시에 자신도 KMG5 생육하에서만 활발하게 증식하는 것으로 관찰되었다. 실제로 두 균주 특히 KMG5 균주는 다른 일반 세균과는 달리 영양이 풍부한 배지에서 성장속도가 매우 느린 극히 예외적인 특이한 생육특성을 나타내었다.

한편 두 공생 균주에 의한 PVA분해능은 pH 8의 배지 초기 수소 이온 농도와 37°C의 배양 온도에서 6일간 배양했을 때 두 균주가 거의 비슷한 증식속도를 보이면서 1.0% 농도의 PVA를 거의 완전 분해 이용하는 것으로 나타났다. 또한 본 PVA 분해 균주는 다른 PVA 분해 균주와는 달리 기질의 중합도에 상관없이 모든 종류의 PVA(PVA 500, 1000, 2000, 30,000)를 효과적으로 분해 이용할 수 있는 우수 PVA분해 균주인 것으로 판명되었다.

특히 본 연구에서는 KMG5균주로부터 40°C의 배양 온도에서도 PVA를 효과적으로 분해 이용할 수 있는 변이주 KMG6분리에 성공함으로써 하절기 직물 가공공단 폐수처리에 획기적인 도움이 될 수 있는 고온성 PVA 분해 균주를 확보 할 수 있게 되었다. ◀