

Polyvinyl alcohol 이용 공생균 *Pseudomonas* sp. J2W와 *Xanthomonas* sp. J2Y의 특성

조 윤 래

영남대학교 농축산대학 응용미생물학과

초록 : Polyvinyl alcohol(PVA)을 탄소원으로 이용할 수 있는 세균 J2W 균주와 J2Y균주를 토양으로부터 분리하였다. 분리된 이들 균주는 각각 별도의 순수배양으로는 PVA를 이용할 수 없었으나 이들 균주를 혼합배양 하였을 경우는 PVA를 분해 이용할 수 있었으며, 또한 PVA의 중합도(중합도 500, 1500, 2000)에 관계없이 이용할 수 있었다. 이들 두 균주는 다른 PVA 이용 공생균주 *Pseudomonas* PW와 *Pseudomonas* G5Y와 재구성하여 혼합배양 하였을 때 J2Y균주와 *Pseudomonas* PW, J2W 균주와 *Pseudomonas* G5Y 균주와의 혼합배양에서는 PVA를 이용할 수 있었다. 이들 두 균주는 동정 결과 J2W균주는 *Pseudomonas pseudomallei* 근연균으로, J2Y는 *Xanthomonas campestris* 근연균으로 동정되었다(1991년 12월 30일 접수, 1992년 2월 6일 수리).

석유화학 유래의 많은 고분자 유기합성 화합물은 그 이용도가 날로 증가 추세에 있으나 이들 고분자 유기 화합물은 자연중에서 분해가 어려운 난분해성 물질이 대부분을 차지하고 있어 이들이 자연에 유출되어 환경 오염을 가중시키고 있다. 이들 고분자 유기화합물 중에서 Polyvinyl alcohol(PVA)은 난분해성의 수용성 물질로 직물 가공제, 접착제 및 유화안정제 등의 용도로 널리 쓰이고 있으며, 이러한 PVA는 자연환경에 유출될 경우 공공수역의 수질오염의 원인이 되고 있다.

1936년 Nord에 의해 *Fusarium lini*가 PVA를 분해할 수 있다는 보고와 함께 *Pseudomonas*속,¹⁻⁴⁾ *Xanthomonas*속,⁵⁾ *Alcaligenes*속 등^{4,6)}이 분리되어 자연에 유출되는 PVA를 이들 미생물을 이용하여 제거하고자 하였다. 그러나 이들 미생물들은 PVA 분해에 상당한 시간이 소요되므로 PVA를 빠른 시간내에 제거하기 위해서는 PVA를 강력하게 분해하는 미생물이 요구되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 PVA를 강력하게 분해하여 탄소원으로 이용할 수 있는 미생물을 분리, 동정하고 그 성장특성을 조사하였다.

재료 및 방법

균분리용 시료 및 배지조성

PVA 분해균의 분리를 위한 시료는 PVA 폐수가 유

출되는 하천주위의 하수와 토양으로부터 20여점 채취하여 사용하였다. PVA 분해균의 성장배지는 탄소원으로 PVA(중합도 500, Yakuri pure chemicals, Japan)를 사용하였고, 그 조성은 Suzuki¹⁾가 사용한 것과 동일하였으며 1/당 그 조성은 PVA 5.0g, (NH₄)₂SO₄ 1.0g, KH₂PO₄ 1.0g, K₂HPO₄ 8.0g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2g, NaCl 0.1g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1g, CaCl₂ 0.02g, FeSO₄ 0.01g, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.5 mg, Na₂WO₄ · 2H₂O 0.5 mg, MnSO₄ 0.5 mg, Ca-pantothenate 0.4 mg, inositol 0.2 mg, niacin 0.4 mg, p-aminobenzoate 0.2 mg, pyridoxine 0.4 mg, thiamine 0.4 mg, biotin 2μg, Vitamin B₁₂ 0.5 μg이며, 증류수에 녹여 pH 7.5로 조정후 사용하였다.

PVA분해균의 분리

PVA 분해균 분리용 시료와 멸균증류수를 현탁 방치 후, 상층액 10 ml를 PVA 액체배지 40 ml와 혼합하여 30℃에서 7일간 180 rpm으로 진탕배양하였다. 이 배양액 0.1 ml를 PVA agar 평판배지에 도말하여 30℃에서 배양한 후, 형성된 여러 colony를 다시 PVA agar 평판배지에 획선하여 배양하였다. 이렇게 획선배양에 의해 형성된 PVA 분해능이 우수한 colony를 선별하였다. 이들 colony는 3단 분리법으로 순수분리하여 공시균주로 선정하였다.

Key words : PVA utilization, symbiont, *Pseudomonas* sp., *Xanthomonas* sp.
Corresponding author : Y. L. Jo

균 배양 및 성장 측정

균을 250 ml-Erlenmeyer flask중의 50 ml PVA broth 배지에 접종하여 7일간 30°C에서 180 rpm으로 진탕한 전배양액을 접종원으로 사용하였으며, PVA 이용 및 분해력 측정을 위한 배양은 전배양액 5 ml를 250 ml-Erlenmeyer flask중의 50 ml PVA broth배지에 접종하여 배양하였다. 이때 배양은 30°C에서 180 rpm 회전 진탕으로 행하였다. 균의 성장은 spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

PVA 정량과 PVA 분해도 측정

PVA 정량은 boric acid의 존재하에서 PVA500(Yakuri pure chemicals, Japan)와 iodine과의 반응을 정량하는 방법으로 Finley의 방법⁷⁾에 준하여 행하였다. PVA 분해율은 배지중의 PVA 초기농도에 대한 균 접종 후의 감소된 PVA 농도의 백분율로 나타내었다.

균의 동정

분리된 PVA 분해균은 전자현미경에 의한 형태학적 관찰과 함께 생리적, 생화학적, 배양 및 영양적 특성을 조사하였으며 “Bergey’s manual of systematic bacteriology”⁸⁾에 따라서 동정하였다.

결과 및 고찰

PVA 분해균의 분리

균 성장과 PVA 분해능이 우수한 colony로부터 3단 희석법에 의해 형성된 single colony들은 yellow colony와 white colony를 형성하는 두 균주가 분리되었다. 그러나, 이들 균주는 각각 순수배양할 경우는 그 성장이 매우 좋지 않았으며 PVA 분해능이 보이지 않았다. 그러나, 이들 yellow colony와 white colony를 형성하는 균주를 서로 혼합하여 배양하였을 때 이들 균주의 성장도 양호하였으며, 또한 PVA를 분해할 수 있었다. 그래서, 이와같이 PVA 분해능이 우수한 white colony를 형성하는 균주를 J2W로, yellow colony를 형성하는 균주를 J2Y로 각각 명명하고 실험 공시균으로 선정하였다.

J2W 균주와 J2Y 균주에 의한 PVA의 공생적 이용

Fig. 1에서와 같이 J2W 균주와 J2Y 균주는 각각 별도의 순수배양에서는 불량한 균성장을 보였으며, 또한 PVA 분해능은 거의 확인할 수 없었다. 그러나, 이들 두 균주를 혼합하여 배양할 경우 PVA 분해능은 매우 우수하여 6일 만에 0.5%의 PVA를 거의 98% 이상 분

해하였고, Fig. 3에서와 같이 초기 전 배양액을 10%(v/v)로 집중하였을 때는 거의 60시간 만에 98% 이상의 분해율을 보였다. 이때 배지의 pH는 Fig. 2에서와 같이 초기의 7.5에서 5일 후 6.4로 큰 변화는 없었다. 여기서 J2W 균주와 J2Y 균주의 각각 별도의 순수배양에서 Fig. 1에서와 같이 어느 정도의 생육을 나타내는 것은 배지에 첨가한 PVA에 함유된 sodium acetate의 영향으로 생각되어진다. PVA시약 중에 sodium acetate의 함유에 대해서는 Suzuki 등¹¹⁾에 의해서 보고된 바 있으며, 또한 탄소원으로 PVA 대신에 sodium acetate를 첨가 하였을 때 J2W 균주와 J2Y 균주는 각각 별도의 순수 배양에서 생육할 수 있었다. 이와 같은 PVA 분해 및 공생적 이용에 대해 Sakazawa 등^{9,10)}에 의하면 두 균주 중 한 균주가 직접 PVA를 PVA oxidase로 산화하여 PVA hydrolase로 분해하며, 다른 한 균주는 이 균주에 생육인자(growth factor)를 제공함으로써 PVA를 분해하는 것으로 보고하였다. J2W와 J2Y의 공생적 이용에도 이와 같은 기작에 의해 분해가 되는지, 각각 PVA 분해에 관련된 효소를 독자적으로 제공하는지는 확실히 알 수 없으며 앞으로의 풀어야 할 문제이다.

PVA 분해에 대한 집중량의 영향

J2W 균주와 J2Y 균주를 혼합하여 7일간 전배양한 후 집중량을 Fig. 3에서와 같이 1%, 10%(v/v)로 달리 하였을 때 균의 성장과 PVA 분해에 상당한 차이를 보였다.

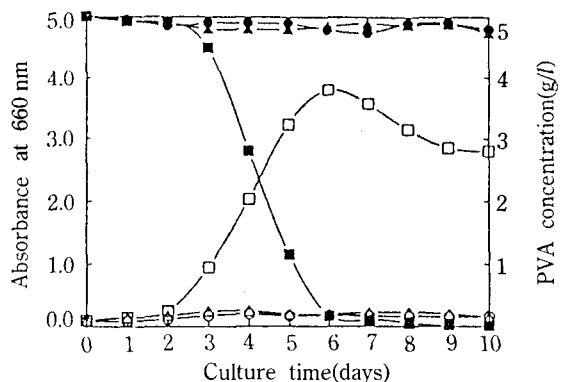


Fig. 1. Growth of the pure culture and mixed culture of J2W strain and J2Y strain on the PVA medium. ○-○ : Growth of J2Y strain, △-△ : Growth of J2W strain, □-□ : Growth of the mixture of J2W and J2Y strain, ●-● : PVA concentration on the pure culture of J2Y strain, ▲-▲ : PVA concentration on the pure culture of J2W strain, ■-■ : PVA concentration on the mixed culture of the mixture of J2W strain and J2Y strain

Fig. 1에서와 같이 0.1%(v/v) 접종시 PVA가 50% 분해 되는데는 약 100시간 소요되었으며, 1% 접종시는 약 60 시간 정도 소요된 반면 10% 접종시는 약 30시간이 소요되었다. 또한 균 성장에 있어서는 접종량이 적을수록 유도기가 상당히 길었다. 이와같이 균체농도 자체가 PVA 분해에 크게 영향을 미친다는 사실을 알 수 있었다.

PVA 분해 관련효소 중 PVA oxidase는 Sakazawa 등¹¹⁾에 의해 *Pseudomonas* VM15C세균의 세포 배양액에서 뿐만 아니라 periplasmic space membrane 분획에서도 그 활성이 확인된 바 있다. 그래서 균체농도의 증가는 PVA 산화효소의 증가 효과를 가져올 수도 있다고 추측되어 진다.

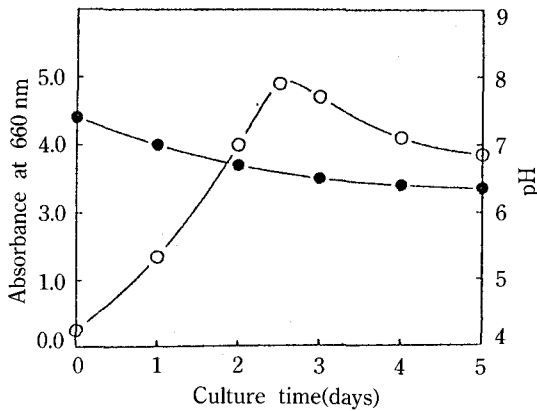


Fig. 2. Changes of pH of the inoculation medium during mixed cultivation of J2W strain and J2Y strain. ○—○ : Growth of the mixture of J2W and J2Y strain ●—● : pH of the inoculation medium

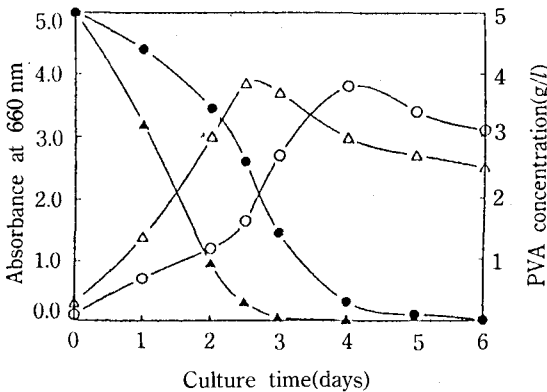


Fig. 3. Effect of inoculation size on PVA utilization. ○—○ : Growth by 1% inoculation, △—△ : Growth by 10% inoculation, ●—● : PVA concentration by 1% inoculation, ▲—▲ : PVA concentration by 10% inoculation

PVA 분해에 대한 PVA 농도의 영향

배지에 첨가되는 PVA 농도를 달리 하였을 때 J2W 균주와 J2Y 균주의 혼합 배양에서의 생육 특성은 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 PVA 농도 10 g/l 이상 첨가시 PVA 분해율은 다소 감소되다가 20 g/l 이상 첨가시는 급격히 PVA 분해율이 감소하였다. 이러한 현상은 *Pseudomonas* sp. PW 균주와 *Pseudomonas* sp. G5Y 균주의 혼합배양에서의 PVA 농도 20 g/l까지는 PVA 분해율이 일정한 것과 다소 차이가 있었다.¹²⁾

PVA 분해에 대한 PVA 중합도의 영향

배지에 첨가되는 PVA의 중합도는 500, 1500, 2000으로 달리 하였을 경우 PVA 분해율은 거의 차이가 없이 일정하였다. 즉, PVA 분해에 대한 중합도에 의한 기질의 특이성은 보이지 않았다. 이와 같은 현상은 Suzuki¹³⁾ 등의 *Pseudomonas* 0~3 균주에 의한 PVA 분해에서도 중합도에 대한 특이성은 없었다는 보고와 일치하고 있다.

PVA 분해에 대한 공생균주의 재구성 효과

앞서 본 연구실에 의해서 분리된 PVA 분해 균주 *Pseudomonas* sp. PW 균주와 *Pseudomonas* sp. G5Y 균주도

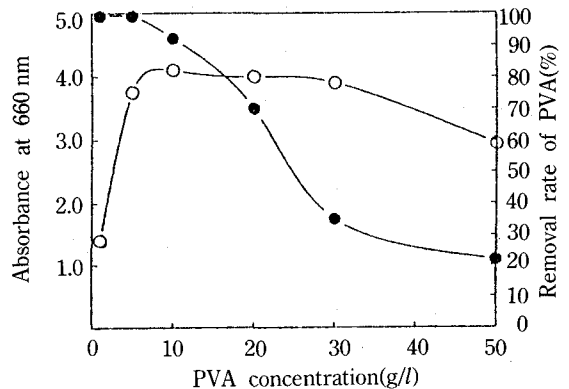


Fig. 4. Effect of PVA concentration on PVA utilization.

○—○ : Growth of the mixture of J2W and J2Y strain ●—● : Removal rate of PVA

Table 1. Effect of degree of PVA polymerization on PVA utilization

PVA(degree of polymerization)	Growth (OD at 660nm)	Degradation rate(%)
PVA 500(500)	3.93	98
PVA1500(1500)	4.03	99
PVA2000(2000)	3.60	96

J2W 균주와 J2Y 균주와 마찬가지로 혼합배양에 의해 PVA를 이용할 수 있는 공생 관계에 있다.¹²⁾ 그래서 *Pseudomonas* sp. PW, *Pseudomonas* sp. G5Y의 공생 균주와 J2W, J2Y의 공생 균주를 서로 재구성시켜 PVA 분해에 대한 효과를 조사하였다. Fig.5에서 보는 바와 같이 공통적으로 white colony를 형성하는 *Pseudomonas* sp. PW 균주와 J2W균주의 혼합배양에서와, yellow colony를 형성하는 *Pseudomonas* sp. G5Y 균주와 J2Y 균주의 혼합배양에서는 PVA를 분해할 수 없으나, 서로 다른색의 colony를 형성하는 J2W 균주와 *Pseudomonas* G5Y 균주, J2Y 균주와 *Pseudomonas* PW 균주들은 혼합배양에 의해 강력하게 PVA를 분해할 수 있었다. 이것으로 PVA 분

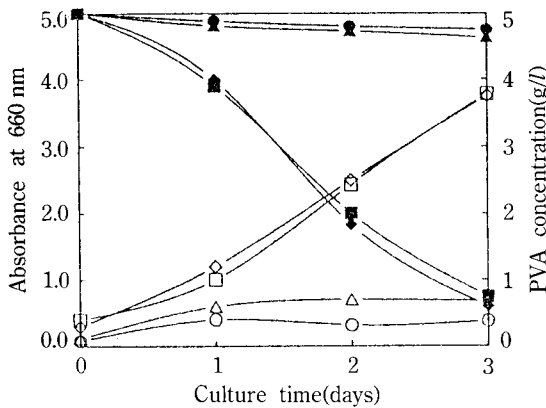


Fig. 5. Growth of mixed culture of reconstructed PVA utilizing symbionts.

Open : Growth, Closed : PVA concentration; ○, ● : Mixture of J2W and PW strain; △, ▲ : Mixture of J2Y and G5Y strain; □, ■ : Mixture of J2Y and PW strain; ◇, ◆ : Mixture of J2W and G5Y strain

Table 2. Morphological and culture characteristics of the J2W strain and J2Y strain

Characteristics	J2W	J2Y
Cell form	Rod	Rod
Cell diameter(μm)	0.5~0.7	0.4~0.6
Cell length(μm)	1.5~1.8	1.7~2.0
Flagella arrangement	Polar	Polar
Number of flagella	1	1
Motility	+	+
Growth at 4℃	-	-
Growth at 41℃	±	±
Growth at pH 3.6	-	-
Need at least 12~15% NaCl for growth	-	-

+ : Positive, - : Negative, ± : Doubtful

Table 3. Physiological and biochemical characteristics of the J2W strain and J2Y strain

Characteristics	J2W	J2Y
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	2~5
Carbohydrate O/F test :		
D-glucose	0	0
Galactose	0	0
Lactose	0	0
Maltose	-	0
Sucrose	0	0
Fructose	0	0

+ : Positive, - : Negative, ± : Doubtful

Table 4. Nutritional characteristics of the J2W strain and J2Y strain

Characteristics	J2W	J2Y
Utilization of :		
D-Glucose, D-fructose, D-galactose, lactose, sucrose, cellobiose, D-xylose, L-arabinose, glycerol, D-turanose, pyruvate, propionate, fumarate, β-hydroxy butyrate, lactate, sodium acetate, acetate, succinate, peptone, L-alanine, L-proline, L-serine, L-asparagine, L-glutamine	+	+
Starch, manitol, L-isoleucine	+	±
L-Methionine	±	±
D-Arabinose, n-butanol, citrate, α-ketoglutarate, glutrate, L-leucine, glycine, L-tryptophan, L-valine	+	-
Ethanol, maltose	-	+
Sorbitol, L-lysine	±	-
Inositol	-	±
Creatine, malonate, tartrate, D-malate	-	-

+ : Utilized, - : Not utilized, ± : Doubtful

해에 있어서 J2W 균주의 혼합배양과 *Pseudomonas* PW 균주와 *Pseudomonas* G5Y 균주의 혼합배양 사이에는 공통의 PVA 분해기작에 의해 PVA를 이용함이 강력하게 시사되었다. 이러한 공통의 PVA 분해 기작에는 Sakazawa 등^{9,10)}에 의한 Pyrroloquinoline Quinone 관련 가능성에 대해서는 좀 더 조사해야 할 것이다.

균 동정

PVA 이용균 J2W 균주와 J2Y 균주는 형태학적, 배양적 특성, 생화학적, 영양적 특성에 따라 동정하였으며, 그 결과는 Table 2, 3, 4와 같다. J2W 균주는 PVA agar 평판배지 상에서는 백색의 colony를 형성하는 Gram 음성균으로 극성의 편모를 가진 간균이었다. 세포내에 poly- β -hydroxybutyrate를 축적하였고, starch와 gelatin, Tween 80을 분해하였으며, arginine dihydrolase 반응과 탈질 반응은 양성이었다. 이와 같은 특성과 함께 많은 종류의 영양물질의 이용성이 *Pseudomonas pseudomallei*와 동일하였으며, L-arabinose, ethanol, D-malate, glycine 등의 이용성에서는 다소 차이가 있었으나, J2W 균주는 *Pseudomonas pseudomallei* 근연균으로 동정하였다. 앞서 본 연구실에서 분리된 *Pseudomonas* sp. PW도 *Pseudomonas pseudomallei*로 동정 되었으나 J2W 균주와는 casein의 분해와 urease 반응 등의 몇가지 성질상에서 차이를 보였다. J2W 균주는 노란색의 colony를 형성하는 Gram음성의 간균으로 극성의 편모를 가졌다. 세포내 poly- β -hydroxy butyrate를 축적하지 않았으며, starch는 분해할 수 없었으나 gelatin과 casein은 분해하였다. 이와같은 특성과 함께 그 외 세포의 크기, 생리적·생화학적 성질이 *Xanthomonas campestris*와 동일하였으며 영양물질 이용성에서도 citrate, malate를 제외

하고는 많은 종류의 영양물질 이용성에서도 *Xanthomonas campestris*와 동일하였다. 그러므로 J2Y 균주는 *Xanthomonas campestris* 근연균으로 동정하였다.

참 고 문 헌

1. Suzuki, T., Y. Ichihara, M. Yamada and K. Tonomura : Agric. Biol. Chem., 37(4) : 747(1973)
2. Watanabe, Y., N. Hamada, M. Norita and Y. Tsujisaka : Arch. Biochem. Biophys., 174 : 575(1976)
3. Sakazawa, C., M. Shima, Y. Taniguchi and N. Kato : Appl. Environ. Microbiol., 41(1) : 261(1981)
4. Shima, M., H. Saimoto, N. Kato and C. Sakazawa : Appl. Environ. Microbiol., 46(3) : 605(1983)
5. Nishikawa, H. and Y. Fujita : Chem. Econ. Eng. Rev., 7(4) : 33(1975)
6. 이 건, 이상준, 이종근 : 부산대학교 환경문제연구소 환경연구보, 제 6권(1988)
7. Finley, J.H : Anal. Chem., 33 : 1925(1961)
8. Krieg, N.R. and J.G. Holt : Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A.(1984)
9. Shima, M., H. Yamamoto, N. Kato, O. Adachi, M. Ameyama and C. Sakazawa : Agric. Biol. Chem., 48 (11) : 2873(1984)
10. Shima, M., I. Fukuta, N. Kato and C. Sakazawa : Appl. Environ. Microbiol., 48(4) : 751(1984)
11. Shima, M., Y. Nishimura, N. Kato and C. Sakazawa : Appl. Environ. Microbiol., 49(1) : 8(1985)
12. Seon-Yong Jeong, Youl-Lae Jo, Moo-Whan Cho, Jeong-Mog Kim : Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech., in press(1992)

Characteristics of the symbionts *Pseudomonas* sp. J2W strain and *Xanthomonas* sp. J2Y strain which utilize polyvinyl alcohol

Youn-Lae Jo(Department of Applied Microbiology, Yeongnam university, Kyongsan 712-749, Korea)

Abstract : Two strains J2W and J2Y which were isolated from soil can utilize polyvinyl alcohol(PVA) as a sole carbon source. PVA was utilized symbiotically by the mixed culture of these two strains which could not utilize PVA in each respective pure culture. Effect of degree of PVA polymerization on the its utilization was examed, and there was remarkable difference among three kind of PVA(PVA 500, 1500 and 2000). The reconstruction of there two strains was carried out with other symbionts *Pseudomonas* sp. PW and *Pseudomonas* sp. G5Y which were able to utilize PVA. PVA utilization occured in each remixed culture of J2Y strain with *Pseudomonas* sp. PW J2W strain with *Pseudomonas* sp. G5Y, respectively. Identification of bacteria was based on morphological and biological chatacteristics, J2W and J2Y strain were similar to a strain of *Pseudomonas pseudimallei* and *Xanthomonas campestris*, respectively.