

## 경기도에서 분리된 terephthalic acid 분해균의 phthalic acid 이성질체 분해

이유진 · 이종훈\*  
경기대학교 식품생물공학과

**Degradation of Phthalic Acid Isomers by Terephthalic Acid Degrading Bacteria Isolated from Kyonggi Area.** Lee, Yujin and Jong-Hoon Lee\*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea – Eleven bacterial strains which were able to utilize terephthalic acid as a carbon and an energy source for growth were isolated from the soil of 7 water quality evaluation points in Kyonggi area of Korea. According to the report from the authorities, biochemical oxygen demands of the water at 4 points were reported over 20 ppm but those of 3 points were reported less than 2 ppm in 1997. Optimum temperatures of growth and terephthalic acid degrading activity of some isolates were not identical but optimum growth temperature was 30°C. Most of the isolates utilized one or two of the phthalate isomers as a carbon source for growth and the isolates from the 4 contaminated points showed higher terephthalic acid degrading activity than those from the 3 clean points.

**Key words:** Terephthalic acid, phthalic acids degradation

경제발전에 따른 인구집중화 및 생활수준의 향상은 환경 오염원의 대량 방출을 초래하였을 뿐만 아니라 화학합성의 발달로 지금까지 자연계에 존재하지 않았던 합성유해화학물질(xenobiotics)에 의한 환경오염이 급증하여 인류보건 및 생태계에 커다란 위협요소가 되고 있다.

플라스틱과 비닐 제조의 성상변형제(plasticizer)로 사용되는 phthalic acid ester들은 합성수지제품의 증가로 그 수요가 날로 증가하고 있다. 이들 화합물들은 성상변형제의 용도 외에도 방충제, 화장품, 살충제의 캐리어 등에 사용되고 있다[7]. 따라서 이러한 유도체 합성을 위한 phthalic acid 이성질체들도 대량 생산되어 플라스틱 생산을 위한 유도체 합성에 쓰이고 있다. ortho-phthalic acid의 diester는 polyvinyl chloride 제조의 성상변형제로 사용되고, para-phthalic acid (terephthalic acid)와 그 dimethyl ester는 poly-ester 섬유와 polyethylen terephthalate의 제조에 사용되고 있다. ortho-와 para-phthalic acid보다는 생산량이 많지 않지만 meta-phthalic acid (isophthalic acid)도 특수화합물 제조에 사용되고 있다[5].

한편 이들 화합물은 공업적 사용 후, 환경 중에 다량 방출되고 폐기된 플라스틱제품으로부터도 상당량 토양과 하천에 유입되어 환경오염의 문제를 야기하고 있다[3]. 인체에 심각한 독성을 나타내지 않는 것으로 보고되었으나, 최근 들어 내분비계장애물질로 알려지면서 관심의 대상이 되고 있다[8,13,16].

토양과 하천에 존재하는 phthalic acid 이성질체와 그 유도체들은 미생물의 phenanthrene 분해과정 중 소량 발생한다는 보고가 있기는 하지만 대부분이 인위적인 요인에 의해 대량 발생하고 미생물에 의해서 분해되는 것으로 알려져 있다[16]. 토양, 하천, 해양으로부터 호기적 또는 혐기적으로 phthalic acid 이성질체를 분해하는 미생물들이 분리되어, 분해미생물의 phthalic acid 대사경로와 관련 효소 및 유전자에 대한 연구가 진척되어 있고 이들 미생물을 이용한 생물복원에 대해서도 상당히 진척된 상태이다[1,2,4,9-11,14,15,17]. 지금까지 보고된 연구 결과로 보아 환경 중에서 phthalic acid 이성질체 및 그 유도체를 분해, 대사하는 미생물을 분리하는 것은 어렵지 않은 일이지만 대상 기질의 존재 유무와 농도에 따라서 분리되는 미생물의 분해활성에는 상당한 차이가 있을 것으로 추측된다.

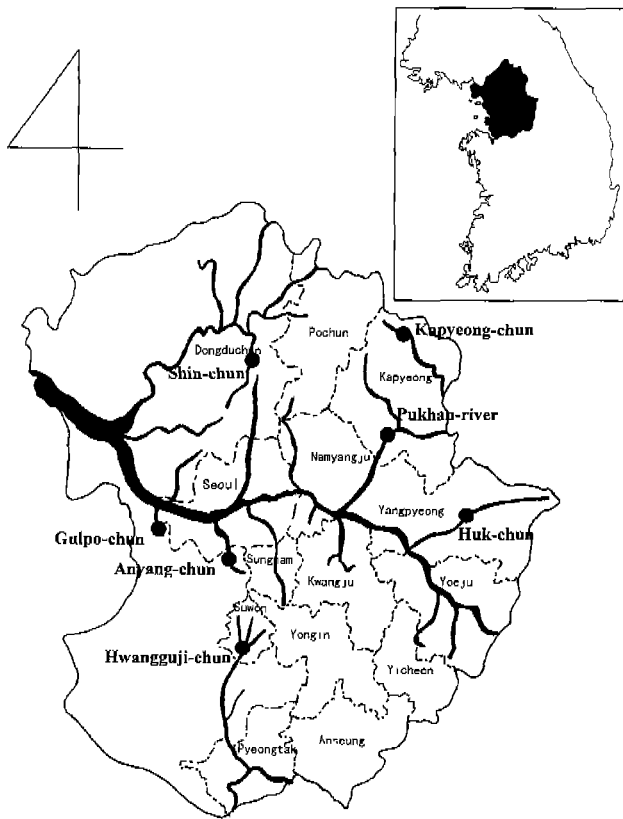
본 연구에서는 경기도 지역의 예상 오염지역과 청정지역 하천의 토양시료로부터 phthalic acid 이성질체 중, 가장 수요가 많은 terephthalic acid를 분해, 대사하는 미생물을 분리하여 이들이 보유한 분해활성의 비교를 통해 phthalic acid 이성질체에 의한 오염척도로써의 적용 가능성을 타진해 보기 위해, 분리균들의 분해활성과 phthalic acid 이성질체의 분해능력을 비교해 보았다.

### 재료 및 방법

#### 시료 채취 및 배지

Terephthalic acid를 분해하는 균주의 선별을 위한 토양시료는 Fig. 1에 표시된 7개 지역 소하천에서 1998년 11월에 채취하였고 채취 지점은 수질측정조사기관에서 수질측

\*Corresponding author  
Tel. 031-249-9656, Fax. 031-253-1165  
E-mail: jhl@kuic.kyonggi.ac.kr



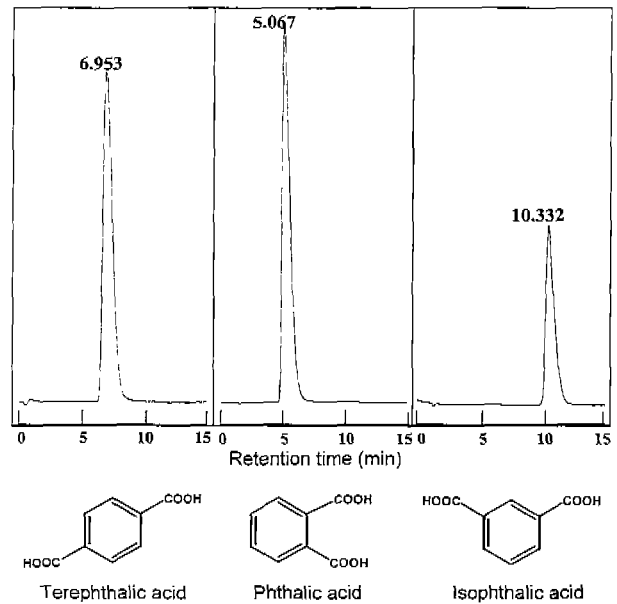
**Fig. 1. Sampling sites for the isolation of terephthalic acid degrading bacteria in Kyonggi area.**  
Soil samples from the each water quality evaluation point of rivers and tributaries were used for the isolation of bacteria. The names of rivers and tributaries are written in bold characters and sampling sites are indicated.

정용 시료를 채취하는 조사지점을 선택하였다. 굴포천, 안양천, 북한강은 한강환경관리청이 관할하고 있고, 신천, 황구지천, 가평천은 경기도가, 흑천은 원주지방환경청이 각각 담당하고 있다.

균주 배양을 위한 배지는 무기염으로 구성된 기초배지에 탄소원으로 terephthalic acid 또는 phthalic acid, isophthalic acid를 각각 5 mM 첨가하고, 1 N NaOH로 pH 7이 되도록 조정하여 사용하였다[6,12]. 기초배지는 1 liter 증류수에 NH<sub>4</sub>Cl 1.0 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, KCl 0.5 g, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.01 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1 g, EDTA 0.1 g, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 5 µg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1 µg, MnCl<sub>2</sub> 1 µg을 녹여 제조하였다. terephthalic acid, phthalic acid, isophthalic acid가 탄소원으로 각각 첨가된 기초배지를 TPA 배지, PA 배지, IPA 배지로 하였다.

**Terephthalic acid 분해균의 분리 및 배양방법**

토양시료를 생리식염수에 현탁한 후, 상등액 1 ml를 TPA 배지 30 ml에 첨가하여 25°C, 160 rpm의 호기적 조건에서 3일간 집적배양한 다음, 증균된 배양액을 적당히 희석하여



**Fig. 2. HPLC profiles of terephthalic acid, phthalic acid, and isophthalic acid.**

TPA 한천배지에 도달하고 25°C에서 48시간 배양하여 생육이 빠른 colony를 분리하였다. 분리한 colony는 생리식염수에 현탁한 후, TPA 한천배지를 사용하여 계속적으로 가장 생육이 빠른 colony를 순수분리하였다. 순수분리된 균들은 TPA배지, 호기적 조건에서 2일간 전배양한 후, 본배양하여 분해능과 생육을 측정하였다.

**분해활성 측정**

분리균의 phthalic acid 이성질체 분해활성은 배양액 중의 각 기질의 감소를 HPLC를 이용하여 측정하였다. 채취한 시료 1 ml를 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 회수한 후, 동량의 methanol을 첨가해 0°C에서 30분간 방치한다. 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 침전물을 제거한 다음, membrane filter (0.2 µm, cellulose acetate filter)로 여과하고 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석은 Symmetry C<sub>18</sub> column (5-µm pore size; 3.9×150 mm; Waters)을 사용하였고 이동상은 물, methanol, phosphoric acid를 70:29.5:0.5의 체적비로 혼합하여 사용하였다. 이동상의 흐름은 1.0 ml/min의 속도로 하였고 시료는 5 µl 투입하였다. Peak는 UV detector를 사용하여 260 nm에서 검출하였다. Fig. 2에는 phthalic acid 이성질체들의 retention time을 나타내었다.

**결과 및 고찰**

**Terephthalic acid 분해균의 분리**

서울의 주변을 둘러싼 경기도의 서해안 지역은 인구밀도가 높고 공업단지가 위치하고 있어 하천오염이 심각하지만 강원도와 인접한 동쪽지역은 비교적 환경이 좋다고 할 수

있다. 따라서 오염이 심각한 4개 지역과 비교적 청정한 3개 지역에서 terephthalic acid를 탄소원으로 생육하는 미생물을 분리하여 오염도에 따른 분리군의 phthalic acid 이성질체 분해능력을 조사해 보았다.

수질측정조사기관에서 보고한 토양시료 채취지점 하천의 1997년 11월의 생화학적 산소요구량(BOD)은 굴포천이 59.4 ppm, 안양천 43 ppm, 황구지천 32.1 ppm, 신천 21 ppm, 북한강 1.1 ppm, 흑천 0.9 ppm, 가평천 0.4 ppm으로 나타났다(경기개발연구원 자료).

각 지역에서 채취한 토양시료를 TPA배지에서 집적배양한 후, TPA한천배지 상에서 가장 큰 colony를 한개 또는 두개 선발하였다. TPA한천배지를 이용한 순수분리 과정에서도 계속적으로 가장 큰 colony를 선발하여 최종적으로 11개의 colony를 획득하였다. 안양천에서 분리한 균을 AY3로, 굴포천에서 분리한 균을 GP1, GP2로 각각 명명하였고, 황구지천에서 분리한 균을 HG1, HG2로 명명하였다. 신천에서 분리한 균은 DD1, DD2로 가평천에서 분리한 균은 KP2, 북한강에서 분리한 균은 DS2, DS3, 흑천에서 분리한 균은 YP2로 각각 명명하였다(Table 1).

**탄소원에 따른 생장**

7지역 소하천 토양에서 순수분리한 terephthalic acid를 탄소원으로 생장하는 11개 균주를 대상으로 phthalic acid의 이성질체에 따른 생장 정도를 각 탄소원을 첨가한 한천배

지에서의 colony 크기로 비교해 보았다. 한천배지에 도달한 균들은 25°C에서 배양하면서 6일간 생장을 관찰하였다(Table 1). 11개 균주는 terephthalic acid가 첨가된 TPA한천배지에서 선발되었기 때문에 TPA한천배지 상에서는 모두 우수한 생장을 나타내었다. 한편 phthalic acid를 탄소원으로 한 PA한천배지 상에서는 AY3, GP1, GP2, KP2 균주가 좋은 생장을 나타냈다. Isophthalic acid를 탄소원으로 첨가한 IPA한천배지 상에서는 AY3, GP2, DD2, YP2 균주가 좋은 생장을 나타냈다. 3가지 탄소원을 모두 양호하게 이용하는 균주는 AY3와 GP2로 나타났다.

**온도에 따른 생장 및 terephthalic acid 분해**

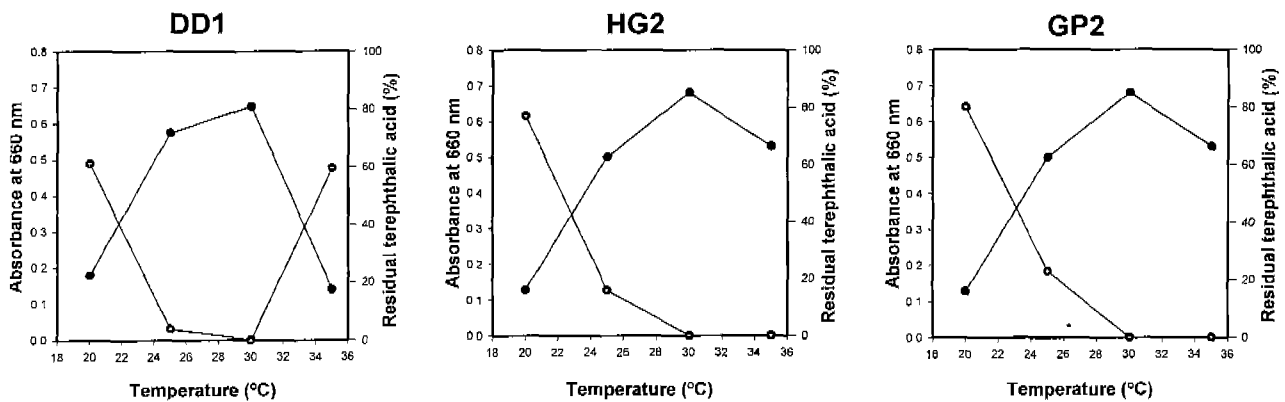
비교적 terephthalic acid를 잘 대사하는 DD1, HG2, GP2 균주를 대상으로 온도를 달리한 TPA배지에서 15시간 배양하여 생장온도가 terephthalic acid의 분해에 미치는 영향을 알아보았다(Fig. 3). 3균주의 생장은 30°C에서 가장 높게 나타났고 35°C에서는 다소 감소하였다. Terephthalic acid의 분해는 DD1 균주의 경우 30°C와 비교해 35°C에서 낮게 나타났지만, GP2, HG2 균주의 경우는 35°C에서도 높은 분해활성을 보였다. 이들 두 균주의 균체 생장은 30°C에서 최적이지만 분해효소의 최적활성은 30°C보다 높은 온도라고 추측된다.

**Phthalic acid 이성질체의 분해활성**

**Table 1. The influence of carbon sources on the growths of isolated strains**

Carbon sources	Strains										
	AY3	GP1	GP2	HG1	HG2	DD1	DD2	KP2	DS2	DS3	YP2
Terephthalic acid	+++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Phthalic acid	+++	++++	+++	+	++	+	+	+++	+	+	+
Isophthalic acid	++++	+	+++	++	+	++	+++	+	++	++	+++

All strains were cultured at 25°C and observed for 6 days on the basal agar plates supplemented with 5 mM each carbon source. ++++: best growth, +++: good growth, ++: growth, +: little growth



**Fig. 3. Effect of temperature on the growth and terephthalic acid degradation by strains DD1, HG2, and GP2. Growth of strains (●) and terephthalic acid degradation (○) were measured after 15 h culture.**

순수분리된 균주들의 액체배지에서의 phthalic acid 이성질체 분해활성을 비교해 보기 위해 TPA배지에서 30°C, 160 rpm의 속도로 2일간 전배양한 균주들을 탄소원을 달리 한 TPA, PA, IPA 액체배지, 30°C에서 배양하면서 시간에 따른 배지 중의 탄소원 감소를 정량적으로 측정하였다(Fig. 4).

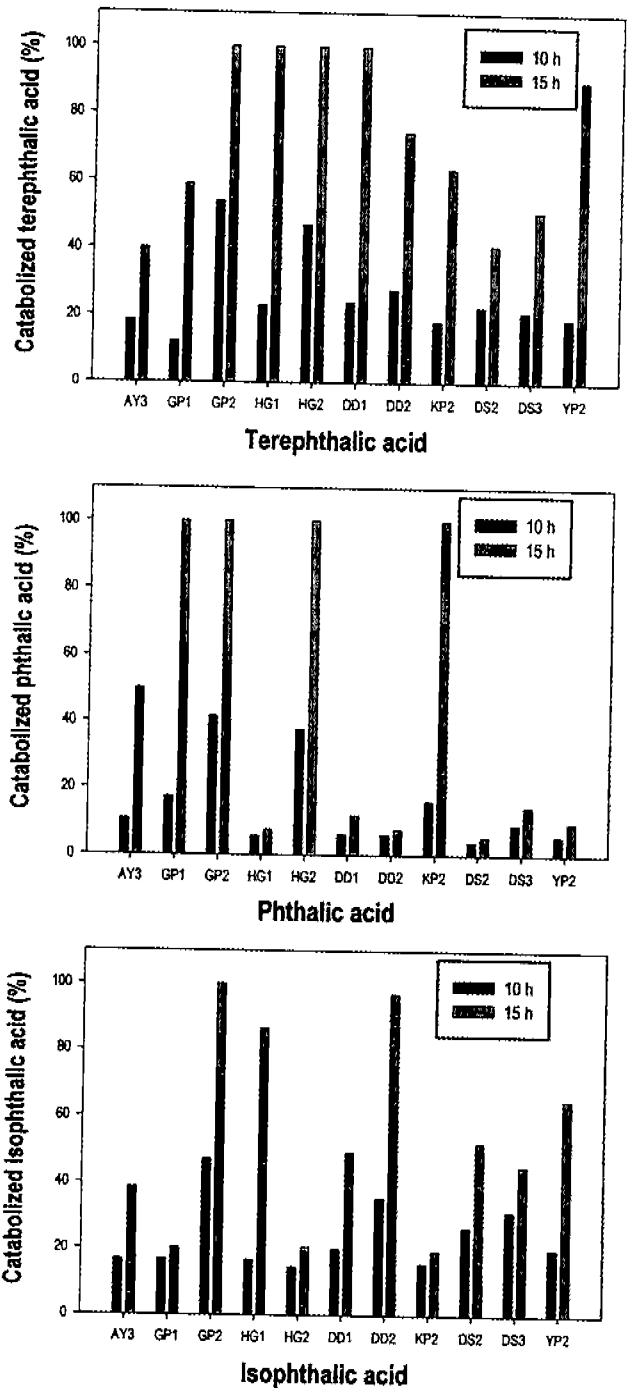
10시간까지 대부분의 균주 배양액에서 terephthalic acid 가 50% 이상 잔존해 있었지만 15시간 경과하였을 때, DD1, HG1, HG2, GP2 균주는 완전히 분해하였다. Phthalic acid의 경우는 15시간 후의 결과에서 GP1, GP2, HG2, KP2 균주가 높은 분해활성을 가지고 있는 것으로 나타났고, isophthalic acid의 경우에는 DD2, GP2 균주가 높은 활성을 가지고 있고 HG1균주의 경우에도 90% 이상 분해하는 것으로 나타났다. 액체배지에서의 각 탄소원의 분해활성 비교 결과 GP2 균주가 모든 기질에서 가장 뛰어난 것으로 나타났고 HG2 균주가 terephthalic acid와 phthalic acid에 대해 비교적 높은 활성을 가지는 것으로 나타났다. 액체배지에서의 탄소원의 분해활성은 고체배지 상에서의 colony의 크기와 비슷한 양상을 나타내었지만, AY3 균주의 경우, 고체배지 상에서의 빠른 성장과는 달리 액체배지에서는 높은 분해활성을 나타내지 못했다. GP2 균주는 3가지 이성질체에 대해 모두 우수한 분해활성을 갖는 균주로 나타났다. AY3 균주는 높은 분해활성은 나타내지 않았지만 3가지 이성질체를 모두 이용하는 것으로 나타났다. 하지만 대부분의 균주가 terephthalic acid를 제외한 다른 종류의 phthalic acid 이성질체에 대해 높은 분해활성을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 phthalic acid 이성질체에 작용하는 dioxygenase의 작용에 carboxyl기의 위치가 상당한 영향을 미치는 것의 미한다.

**분해활성과 오염과의 상관 관계**

공업지역이 밀집한 수도권을 포함하고 있는 경기도의 오염도가 높은 하천 4개 지역과 비교적 청정한 3개 지역의 토양에서 terephthalic acid를 탄소원으로 생육하는 미생물을 분리하여 오염도와 분리균의 phthalic acid 이성질체의 분해활성과의 관계를 비교해 보았다. 오염의 기준은 확실하지 않으나 오염의 한 지표로 알려진 생화학적 산소요구량을 기준으로 하였다. 정확한 정량적 상관 관계의 결과를 제시할 수는 없으나 본 실험의 결과, 오염 수준이 높은 지역에서 분리한 균의 phthalic acid 이성질체 분해활성이 대체로 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 phthalic acid 이성질체 분해균의 분해활성과 오염과의 정량적 상관 관계의 연구를 위한 기초자료를 제공한다는 점에서 그 의의를 찾을 수 있다.

**요 약**

공업지역이 밀집한 수도권을 포함하고 있는 경기도의 하천을 대상으로 생화학적 산소요구량이 20 ppm 이상으로 오



**Fig. 4. Degradation of the phthalic acid isomers.** Each phthalic acid isomer (5 mM) was supplemented in a basal medium.

염도가 높은 하천 4개 지역과 2 ppm 이하로 비교적 청정한 3개 지역의 토양에서 terephthalic acid를 탄소원으로 생육하는 11개 균주를 분리하였다. 이들 균주들 중, 최적 생장온도와 최대 분해활성을 나타내는 온도가 일치하지 않는 균주도 존재하였지만 대부분은 30°C에서 최적 생장을 나타냈다. Phthalic acid 이성질체를 탄소원으로한 고체배지에서

의 성장과 액체배지에서의 이성질체 분해능력을 비교한 결과, 분리균들은 대체로 한 개 또는 두 개의 phthalic acid 이성질체를 이용하여 성장하는 것으로 나타났고, 오염도가 높은 지역에서 분리된 균들의 phthalic acid 이성질체 분해 활성이 오염도가 낮은 지역에서 분리된 균들에 비해 높은 것으로 나타났다.

### 감사의 말

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다 (HMP-00-CH-18-0017). 이에 감사 드립니다.

### REFERENCES

1. Afrin, R. P. and B. F. Taylor. 1981. Aerobic and anaerobic catabolism of phthalic acid by a nitrate respiring bacteria. *Arch. Microbiol.* **130**: 101-104.
2. Engelhardt, G., P. R. Wallnofer, and H. G. Rast. 1976. Metabolism of *o*-phthalic acid by different Gram-negative and Gram-positive soil bacteria. *Arch. Microbiol.* **109**: 109-114.
3. Giam, C. S., E. Atlas, M. A. Powers, Jr., and J. E. Leonard. 1984. Phthalic acid esters, pp. 67-140. In O. Hutzinger (ed.), *Anthropogenic compounds*, vol. 3, part C, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
4. Keyser, P., R. W. Pujar, R. W. Eaton, and D. W. Ribbons. 1976. Biodegradation of phthalates and their esters by bacteria. *Environ. Health Perspect.* **18**: 159-166.
5. Kleerebezem, R., L. W. Hulshoff Pol, and G. Lettinga. 1999. Anaerobic degradation of phthalate isomers by methanogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1152-1160.
6. Lee, J.-H., T. Omori, and T. Kodama. 1994. Identification of the metabolic intermediates of phthalate by Tn5 mutants of *Pseudomonas testosteroni* and analysis of the 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase gene. *J. Ferment. Bioeng.* **77**: 583-590.
7. Mayer, F. L., D. L. Stalling, and J. L. Johnson. 1972. Phthalate esters as environmental contaminants. *Nature* **238**: 411-413.
8. Moore, N. P. 2000. The oestrogenic potential of the phthalate esters. *Reproductive Toxicol.* **14**: 183-192.
9. Nakazawa, T. and E. Hayashi. 1977. Phthalate metabolism in *Pseudomonas testosteroni*: accumulation of 4,5-dihydroxyphthalate by a mutant strain. *J. Bacteriol.* **131**: 42-48.
10. Nomura, Y., N. Takada, and Y. Oshima. 1989. Isolation and identification of phthalate-utilization bacteria. *J. Ferment. Bioeng.* **67**: 297-299.
11. Nozawa, T. and Y. Maruyama. 1988. Denitrification by a soil bacteria with phthalate and other aromatic compounds as substrates. *J. Bacteriol.* **170**: 2501-2505.
12. Omori, T., M. Matsubara, S. Masuda, and T. Kodama. 1991. Production of 4,5-dihydro-4,5-dihydroxyphthalate from phthalate by a mutant strain of *Pseudomonas testosteroni* M4-1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 431-435.
13. Penalver, A., E. Pocerull, F. Borrull, and R. M. Marce. 2000. Determination of phthalate esters in water samples by solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J. Chromatogr.* **872**: 191-201.
14. Ribbons, D. W. and W. C. Evans. 1960. Oxidative metabolism of phthalic acid by soil pseudomonads. *Biochem. J.* **76**: 310-317.
15. Ribbons, D. W., P. Keyser, D. A. Kunz, B. F. Taylor, R. W. Eaton, and B. N. Anderson. 1984. Microbial degradation of phthalate, pp. 371-379. In D. T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.
16. Staples, C. A., D. R. Peterson, T. F. Parkerton, and W. J. Adams. 1997. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere* **35**: 667-749.
17. Taylor, B. F., R. W. Curry, and E. F. Corcoran. 1981. Potential for biodegradation of phthalic acid esters in marine regions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 590-595.

(Received Feb. 12, 2001/Accepted Mar. 14, 2001)