

환경오염 유해색소의 미생물학적 분해

하 영 칠 · 홍 순 우 · 한 흥 의*

(서울대학교 자연대학 미생물학과 · *서울대학교 자연과학 종합연구소)

The Degradation of Pigment-Producing Furfural in Aquatic Waste

Hah, Yung-Chil, Soon-Woo Hong and Hong-Eui Han*

(Department of Microbiology, Seoul National University,

*Research Institute for Basic Sciences.)

ABSTRACT

Isolated Gram-negative bacteria, being capable of degrading toxic, recalcitrant, and pigment-producing furfural, were tentatively identified as *Pseudomonas testosteroni*, *Pseudomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas fluorescens*.

They exhibited synergistic effects between *P. testosteroni* and the others in the degradation of colour-producing furfural. Synergistic effects and possible sequence of its degradation were attempted by manometric technique.

P. testosteroni could degrade furfural to decolourize it and produce ninhydrin-reaction positive substance (NPS) which could be utilized by *P. maltophilia* and *K. pneumoniae* and the latter two bacteria could degrade furfural to 2-furoic acid as an oxidized form. Finally 2-furoic acid was further oxidized by *P. fluorescens*. Once NPS and 2-furoic acid were produced, the degradation efficiency was enhanced by competing four bacteria against furfural and 2-furoic acid.

서 론

당을 원료로 사용하는 공장폐수에는 상당량의 푸르푸랄이 포함되어 있다. 또한 푸르푸랄은 화학공업과 석유공업에서는 유기용매로, 식품공업에서는 식품첨가제로 사용되고 있다.

이와같은 푸르푸랄은 당을 산무수화 반응을 시키거나(Wolfrom, et al., 1949), 열분해 시키면 생성된다(Ogata, et al., 1978). 그리고 공기중에 노출시키거나 혹은 당처리 과정에서 Glycine과 같은 아미노산과 축합반응이 일어날 때는 암갈색을 띄운 화합물로 변화된다(Wolfrom, et al., 1949). 따라서 푸르푸랄은 미생물에 대하여 난분해성 물질이 될 뿐 아니라 색소 형성으로 인하여 폐수의 처리과정에서 부차적인

문제로 대두되고 있다. 즉 수권 생태계로 방류 되면 수표면을 암갈색으로 덮어버림으로써 광선을 차단하여 광합성 생물의 생육을 저해하게 되며, 아울러 생태계의 순환을 정지시킬 수 있는 문제가 초래된다고 볼 수 있다.

그러나 1970년대 후반부터 계속되어온 푸르푸랄의 연구는 주로 여러 미생물 및 포유동물에 대한 독성효과에 관한 보고 뿐이다. 즉 이 물질은 포유동물의 생장을 지연시키고(Ferron, 1979), 간과 콩팥의 조직화학적 변화를 일으키며(Jonek, 1964; Kaminska, 1978), 미생물에 대하여서는 돌연변이 유발물질이며(Zdzienicka, 1978), 포자의 활성화, 그리고 질화과정의 억제 등의 효과가 있다고 보고되었다(Sharawat, 1977; Thevelin, 1979).

이 화합물로 부터 기인되는 색소를 미생물에

* 본연구는 1981년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 수행되었다.

의한 완전산화 및 분해에 관한 연구는 극소에 지나지 않는다. Morimoto 등 (1968)은 *Saccharomyces cerevisiae*에 의하여 오히려 푸르푸랄이 푸르푸릴 알콜로 환원된다고 보고 하였다. 변등 (1979)은 *Zoogloea* sp.에 의하여 2-푸로인산으로 산화된다고 하였다. 푸르푸릴 알콜과 2-푸로인산은 완전히 산화되지 못한 중간 대사 물질로 세포외에 축적되기 때문에 이 화합물의 성질상 옅은 황색을 띄우게 된다. 그러나 한등 (1979)은 *Pseudomonads*에 의한 혼합 배양에서 푸르푸랄이 2-푸로인산을 거쳐서 완전히 산화 된다고 보고 하였다.

한등(1979)의 연구에서 이들 균주의 종(species)은 밝히지 못하였고, 아울러 푸르푸랄의 분해산물인 NPS(ninhydrin-reaction positive substance)의 양적 변화와 푸르푸랄의 분해와의 관계도 언급하지 않았다. 따라서 본 연구는 균주의 재동정, NPS와 푸르푸랄 분해 관계 그리고 푸르푸랄에 대한 미생물의 작용에 관한 연구의 결과를 보고 한다.

재료 및 방법

가. 균주의 분리 및 동정

1. 균주의 분리

균 동정에 사용한 균주는 한등(1979)에 의하여 이미 분리된 *Pseudomonas* S1, *Pseudomonas* FS1, *Pseudomonas* O1 그리고 *Zoogloea* A8를 사용하였다.

2. 균주배양배지

증류수 1l에 KH_2PO_4 , 1.0g; K_2HPO_4 , 2.0g; NaCl , 0.2g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g; KNO_3 , 1.0g; furfural, 0.5g을 용해 시킨 후 121°C 에서 15분 간 멸균하여 기초배지로 사용하였다. *Pseudomonas* FS1과 *Zoogloea* A8를 배양할 때는 기초배지에 yeast extract 0.3g를 첨가 하여 사용하였으며, *Pseudomonas* O1일 경우는 furfural 대신에 2-푸로인산을 대치하여 사용하였다. 각 균주의 푸란유도체의 분해 실험에서 기초배지에 포함되어 있는 푸르푸랄 대신에 2-푸로인산 혹은 푸르푸릴 알콜을 사용하였다.

3. 균주의 보관

영양 사면 배지(Nutrient agar slant)에 균주를

접종하여 3일간 30°C 에서 배양한 후 4°C 냉장고에서 보관하였다. 계대배양은 약 15일 간격으로 실행하였다.

4. 균주의 동정

Analytical Profile Index(API) 20E kit를 사용하여 예비적으로 균을 동정한 후 *Bergey's manual* (Buchanan, et al., 1974)에 의하여 확인 동정하였다.

형태학적 특징과 생화적 성질에 관한 실험은 *Manual of methods for general bacteriology* (Gerhardt, et al., 1981)에 준하였다. 그중 혐기성 배양은 Aaronson(1970) 법에 준하였다. 그리고 Acetamide의 알카리성화 실험은 Pickett법(1970)에 의하여 행하였다. 탄소원 이용 실험에 사용한 기질의 농도는 기초배지의 푸르푸랄 대신에 각 기질을 0.1% 첨가하여 사용하였다. 당 종류는 막여과($0.45\mu\text{m}$ pore size, Millipore Co., Bedford, USA)를 하여 별도로 첨가하였다. 이것은 당의 열처리로 생기는 푸르푸랄에 의한 생장억제 효과가 있기 때문이다.

나. 푸르푸랄과 2-푸로인산 측정

홍등(1981)의 방법에 따라 HPLC (Waters Associates, Inc., Milford, U.S.A.)로써 측정하였다. 측정 조건은 μ -Bondapak C_{18} column 상에서 70% Methanol 용매를 사용하여 254nm에서 푸르푸랄과 2-푸로인산을 동시에 측정하였다.

다. 균체량 측정

균체량은 분광광도계(Gilford, U.S.A.)를 사용하여 610nm에서 흡광도를 측정하여 균체량으로 표시 하였다.

라. 대사 활성도 측정

대사 활성도(Metabolic activity)는 Yanaco manometer(Yanaco, Japan)에서 측정된 산소 소비량으로 표시하였다(Umbreit, et al., 1957). 측정조건은 18ml Warburg flask에 각각 2ml의 시료를 main compartment에, 0.5ml의 균의 현탁액을 side arm에, 0.4ml의 20% KOH를 center well에 각각 분주하여 30°C 에서 대조구와 함께 실행하였다.

기초배지에서 *P. testosteroni*를 진탕배양기(Environmental incubator shaker, New Brunswick Scientific Inc., Edison, U.S.A.)에 의하여 배양하면서 대수 증식기(logarithmic phase)를

세 단계로 구분하여 초기 대수 증식기(20hr), 중기 대수 증식기(35hr), 그리고 후기 대수 증식기(40hr)의 배양액과 정지기(stationary phase)를 두 단계로 구분하여 초기 정지기(55hr)와 후기 정지기(65hr)의 배양액을 각각 회수하여, 7,000rpm에서 50분간 원심분리(Hitachi Automatic Refrigerated Centrifuge, 20PR-5, RPR 9-2-464 Rotor)한 후, 막여과를 하여 그 여과액을 시료로 사용하였다.

각 균주의 현탁액은 균주배양배지에서 30°C에서 3일간 배양한 후 회수 하였다. 그리고 일차 원심분리한 후 0.02M인산 완충액(pH7.0)으로 2~3회 반복 세척하여 배양배지를 제거하여 사용하였다. 균량은 인산 완충액의 흡광도가 $A_{610}^{1cm} = 0.5$ 가 되도록 현탁하여 사용하였다. 모든 조작은 무균적으로 실행하였다.

마. NPS 측정

NPS(Ninhydrin-reaction Positive Substance)는 Moore et al.(1954)의 방법에 따라 ninhydrin으로 반응시킨후 570nm에서 측정한 흡광도로써 그 농도를 표시하였다.

결과 및 고찰

가. 균주의 동정

S1, FS1, A8, O1의 네 균주는 모두 Gram 음성 세균이었으므로 API 20E kit를 이용할 수 있었다. API 20E kit에 의하면 S1은 *Pseudomonas* sp., FS1은 *Pseudomonas maltophilia*, A8는 *Klebsiella pneumoniae*로 재동정 되었고, O1은 *Pseudomonas fluorescens* group으로 동정되었다(Table 1).

Bergey's manual에 따른 실험에 의하면 A8와 FS1은 API 20E kit에 의한 결과와 매우 유사하였다(Table 2). 따라서 이 두 균주는 각각 *K. pneumoniae*와 *P. maltophilia*로 동정하였다.

그리고 S1은 *Pseudomonas*속에 속하며 특히 testosterone을 탄소원으로 이용하였다. Stanier et al. (1966)는 testosterone을 이용하는 *Pseudomonads*를 *P. testosteroni*로 분류하였다. 따라서 S1은 *P. testosteroni*로 동정하였다.

O1은 *Pseudomonas fluorescens* gr.에 속하나 gelatin을 역화하고, lecithinase효소를 갖고, 형

Table 1. Responses of isolated organisms on the Enterobacteriaceae identification tests of API 20E

Tests	Isolates			
	S1	O1	FS1	Ao
β -galactosidase				+
Arginine dihydrolase		+		
Lysine decarboxylase			+	+
Ornithine decarboxylase				
Citrate utilization	+	+	+	+
H ₂ S production				
Urease				+
Tryptophan deaminase				
Indole production				
Voges-Proskauer				+
Gelatinase			+	
Glucose utilization		+		+
Mannitol utilization				+
Inositol utilization				+
Sorbitol utilization				+
Rhamnose utilization				+
Saccharose utilization				+
Melibiose utilization		+		+
Amygdalin utilization				+
Arabinose utilization		+		+
Oxidase	+	+		+
Nitrate reduction	+	+		+
N ₂ production				
Motility	+	+	+	
Growth in MacConkey agar		+	+	
Oxidation		+		
Fermentation				

광물질을 생성하는 성질에 의하여 *P. fluorescens*로 동정하였다.

변등(1979)에 의하여 분리된 *Zoogloea* A8가 *Klebsiella pneumoniae*로 재동정된 이유는 *Zoogloea* sp.는 여상반응(flocculation)을 하기 때문에 다른 세균(아마 본 실험에서는 *K. pneumoniae*)과 순수분리가 되지 못한 상태로 있다가 상당기간(약 1년) 동안 영양사면배지에서 계대배양을 하는 과정에서 소수로 존재하고 있던 *K. pneumoniae*가 우세하게 되어 이 균주가 계속 배양되어 온 것으로 믿어진다.

그 원인으로서는 *K. pneumoniae*와 *Zoogloea* sp.

Table 2. Characterization of isolated organisms through Bergey's determinative procedures

Tests	Isolates			
	S1	O1	FS1	A8
Morphology	rod	rod	rod	rod
Gram reaction	—	—	—	—
Oxygen requirement	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	+	—	—
Growth at 41°C	—	—	—	+
Flagellation	1	1	1 non-motile	
Nitrate reduction	+	+	—	+
Denitrification	—	—	—	—
Growth factors required	—	—	+	—
PHB accumulation	+	—	—	—
Fluorescent pigment	—	+	—	—
Gas from glucose	—	—	—	+
Gelatin liquefaction	—	+	+	—
Lecithinase		+		
Carbon source utilization				
arginine	—	+	+	
testosterone	+	—	—	
lactose	+			
glucose	—	+	+	+
fructose	—			+
acetamide	—			
citrate	+	+	+	+
ethanol	—			
Urease	—	—	—	+
S.S. medium	—	+	—	—
Salt tolerance (6%~5%)	—			

의 푸르푸랄의 분해양상은 같았다. 그러나 *Zoogloea* sp.의 전형적인 특성인 finger-like growth와 운동성은 없었고, *Klebsiella* sp.의 특성의 하나인 질산염 환원 능력은 양성이었던 것으로 보아 이와 같이 추정할 수 있다.

나. 푸란 유도체의 분해능력

분해능력(biodegradability)은 manometer에 의하여 소비된 산소량으로 비교하였다. 푸르푸릴 알콜과 푸르푸랄은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 세균주에 의한 산소 소비량은 오랜시간동안 약 30 μ l/mg/hr정도의 값을 보여주고 있다. 이 사실은 세 균주 모두가 이들 물질을 분해할 수 없음을 보여주고 있다.

2-푸로인산은 *P. fluorescens*만이 분해할 수 있었다. 500ppm에서는 서서히, 그리고 150ppm에서는 매우 빨리 분해 되었음을 보여 주었다 (Fig. 1.C).

이 결과는 한(1982)의 250ml배양 실험결과와 일치하였다.

따라서 *P. maltophilia*, *K. pneumoniae*, *P. fluorescens*는 푸르푸랄과 푸르푸릴 알콜을 분해시킬 수 없었고, *P. fluorescens*만이 2-푸로인산을 분해할 수 있었다. 그러나, *P. testosteroni*와 함께 푸르푸랄을 포함한 기초배지에서 배양하였을 때는 각 균주의 성장을 확인 할 수 있었다. 이 사실은 *P. testosteroni*의 성장에 따라 생성된 물질에 의한 것으로 볼 수 있다. 한동(1979)은 이 물질을 확정하지 못하고 Ninhydrin-reaction

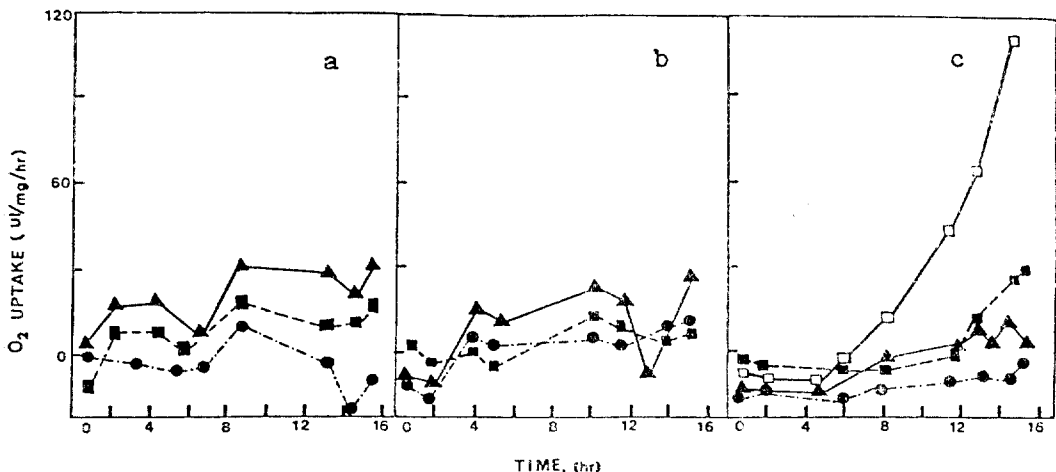


Fig. 1. Biodegradability of furan derivatives by isolated three bacteria: *P. maltophilia* (—●—), *K. pneumoniae* (—▲—), and *P. fluorescens* (—■—). The concentrations of furfuryl alcohol (a), furfural (b), and 2-furoic acid (c) were 500 ppm respectively. The open rectangles in (c) indicate 150 ppm of 2-furoic acid.

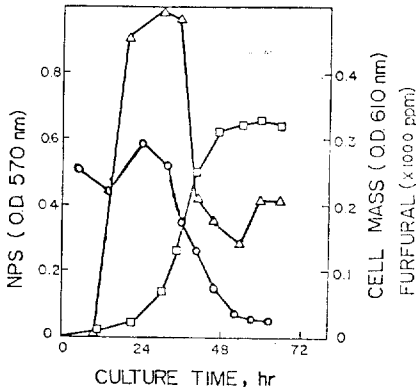


Fig. 2. NPS production(—△—) and furfural concentration(—○—) during the culture development of *P. testosteroni*(—□—)

positive substance (NPS)라 명명하였다.

다. NPS생성과 각 균주의 산소 소비량

NPS는 *P. testosteroni*의 성장과 함께 증가하며 증기 대수 증식기에서 최대가 되었다가, 정지기에서는 급속히 감소되었다(Fig. 2). 그리고 성장과정의 각 단계에서 각 균주의 산소 소비량을 측정하였다(Fig. 3). 푸르푸랄이 잔류되어있는 배양액에서 산소 소비량의 최대값은 *P. fluorescens*이었고 (210 μ l/mg/hr), 그 다음은 *P. maltophilia*와 *K. pneumoniae*이었다(20 μ l/mg/hr). 그리고 산소를 소비하였다는 것은 세 균주가 푸르푸랄을 분해할 수 있었다는 것을 의미한다. 즉 *P. testosteroni*가 푸르푸랄을 분해하여 생성한 NPS에 의하여 푸르푸랄을 분해할 수 없었던

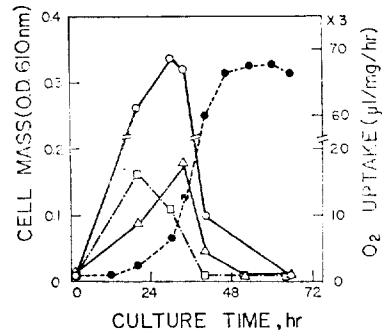


Fig. 3. The oxygen uptakes of NPS-dependent bacteria, *P. maltophilia* (—□—), *P. fluorescens* (—○—), and *K. pneumoniae* (—△—), in the filtrates of each growth phase of *P. testosteroni* (—●—)

세 균주들이 이를 분해하였다고 볼 수 있다. 이 결과는 한등 (1979)의 실험결과와 일치하였다,

특히, *P. fluorescens*는 성질상 푸르푸랄을 분해하지 못하고 단지 2-푸로인산을 분해할 수 있는 성질을 가지고 있으므로 *P. maltophilia*와 *K. pneumoniae*가 생성한 2-푸로인산을 이용하였다고 생각된다. 따라서 푸르푸랄의 완전분해(산화)는 우선 *P. testosteroni*가 성장을 하여 후기 대수 증식기전에 푸르푸랄의 분해와 동시에 NPS가 생성되면 *P. maltophilia*와 *K. pneumoniae*가 성장하게 되며, 이때 생성된 2-푸로인산을 이용하면서 *P. fluorescens*가 왕성하게 성장됨을 알 수 있다.

적 요

독성이 있으며 난분해성 색소물질의 일종인 푸르푸랄을 분해할 수 있는 4종의 Gram 음성 세균을 잠정적으로 *P. testosteroni*, *P. maltophila*, *Klebsiella pneumoniae* 그리고 *P. fluorescens*로 동정하였다.

이 화합물을 분해할 때, *P. testosteroni*와 기타 세 균주의 분해 상승효과와 가능한 분해순서를 manometric technique에 의하여 시도 되었다. *P. testosteroni*가 푸르푸랄을 분해하면, 이때 생성된 미확인 물질 NPS를 *P. maltophilai*와 *K. pneumoniae*가 이용하면서 성장하게 되고, 동시에 이때 생성된 2-푸로인산을 분해하여 *P. fluorescens*가 성장하게 된다. 그러나 NPS와 2-푸로인산을 경쟁적으로 분해함으로써 푸르푸랄의 분해효과를 상승시킨다.

References

1. Aaronson, S., (1970), Experimental microbial ecology, p.34 Academic press, New York and

London.

2. Buchanan, R.E. and N.E.Gibbons, (1974), Berg-ey's manual of Determinative bacteriology, 8th ed. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

3. Byun, K.H., H.E. Han, S.W. Hong and Y.C. Hah, (1979), Bioconversion of Furfural into 2-furoic acid by *Zoogloea* A8, Kor. Jour. Microbiol., 17(4), 193-197.
4. Ferron, V.J., A. Kruysee, H.C. Dreef-Van der Meulen, (1979), Repeated exposure to furfural vapor, Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt., 1, 168(506), 442-451.
5. Gerhardt, P., (1981), Manual of Methods for General bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 20006.
6. Han, H.E., S.W. Hong and Y.C. Hah, (1979), Symbiotic biodegradation of furfural by some bacteria, Kor. Jour. Microbiol., 17(4), 198-202.
7. Han, H.E., (1982), Microbial interactions in the degradation of furfural and its derivatives, Ph.D. Thesis, Seoul National University
8. Hong, S.W., H.E. Han and K.S. Chae, (1981), Detection of furfural and 2-furoic acid in bacterial cultures by High Pressure Liquid Chromatography, J. Liq. Chromatogr., 4(2), 285-292.
9. Jonek, J.J., J. Konecki and M. Kaminski, (1975), Histoenzymic change in liver in acute poisoning with furfural, Rev. Roum. Morphol., Embryol., Physiol., Morphol. Embryol., 21(1), 41-51. Chemical abstracts, 1975, 83, 188973K
10. Kaminska, O., B.Grunszeka and M. Kaminski, (1978), Morphological and histoenzymic investigations of Kidney in chronic furfural poisoning, Patol. Pol., 29(1), 41-50.
11. Morimoto, S., T.Hirashima and M. Ohashi, (1968), Studies on fermentation products from aldehyde by microorganism, J. Ferment. Technol. 46(4), 276-287.
12. Moore, S. and W.H. Stein, (1954), A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds, J. Biol. Chem., 211, 907-913.
13. Ogata, H., T.Shibazaki, A. Ejiwa, T. Matzuura and F. Shiruada, (1978), Furfural as a new decomposition products of glucose solution under oxygen atmosphere, J. Pharm. Pharmac., 30, 668.
14. Pickett, M.J. and M.M. Pedersen, (1970), Characterization of saccharolytic nonfermentative bacteria associated with man, Can. J. Microbiol., 16, 351-362.
15. Sahrawat, K.L., S.K. Mukejee and K.C.Gulati, (1977), Nitrification inhibitors II studies with furano compounds, Plant and Soil, 47, 687-691.
16. Stanier, R.Y., V.J. Palleroni and M. Doudoroff, (1966), The aerobic Pseudomonads; a taxonomy study, J. Gen. Microbiol., 43, 159-271.
17. Thevelein, J.M., (1979), Heat activation of *Phycomyces blakesleeanus* spores; Thermodynamics and effect of alcohols, J. Bacteriol., 139(2), 478-485.
18. Umbreit, W.W., R.H. Burris and J.F. Atauffer, (1957), Manometric techniques, Burgess Publishing Co., Mineapolis, Minn.
19. Wolfrom, M.L., R.D. Schuez and L.F. Caralier, (1949), Chemical interactions of amino compounds and sugars; IV. Significance of furan derivatives in color formation, J. Am. Chem. Soc., 71, 3518-3523.
20. Zdzienicka, M., B. Tidek, M. Ziellenska and T. Szymczyk, (1978), Mutagenic activity of furfural in *Salmonella typhimurium* TA100, Mutation Research, 58, 205-209.