

*Pseudomonas fluorescens*에 의한 Furfural의 분해대사 조절물질에 관하여

이병웅 · 유병설 · 이계준 · 하영철

서울대학교 자연과학대학 미생물학과

Purification and Characterization of the Regulatory Substance of Furfural Biodegradation in *Pseudomonas fluorescens*

Lee, Byung-Ung, Byung-Sul Yu*, Kye-Joon Lee and Yung-Chil Hah

Department of Microbiology, College of Natural Sciences

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul Korea

The objectives of this study were to isolate and identify ninhydrin positive substance(s) produced in the culture broth of *Pseudomonas fluorescens*. It was found that the NPS could stimulate bioconversion of furfural into furoic acid. In order to isolate the NPS from the culture broth, cell free filtrate was subjected to ion-exchange chromatography, gel-permeation and finally to cellulose column chromatography. The purified NPS was white amorphous powder and very soluble in water, slightly soluble in methanol and very insoluble in organic solvents. UV, and IR absorption spectra. ^1H and ^{13}C -NMR were measured in order to identify the chemical structure of the NPS.

Furan 유도체물질은 식물이나 균류에 의해 다양한 종류가 생합성된다. 생물학적 독성이 강한 furan 유도체의 생화학적 중요성은 오래전부터 알려져 왔으나(Dean, 1963), 미생물에 의한 분해에 관한 연구는 매우 드문 상태이다. Furan 유도체의 분해에 관한 연구는 간단한 구조를 갖는 furan 유도체의 분해에 관하여 최초로 Kakinuma 등(1964)은 *Pseudomonas* sp. 가 유일한 탄소원으로 2-furoic acid를 이용 하여 L-glutamate를 축적함을 발견하였고 Morimoto 등(1968)은 furfural이 *Saccharomyces* spp.에 의해 대사되어 furfuryl alcohol로 전환됨을 알았다. Trudgill(1969)은 *Pseudomonas* sp.에 의하여 2-furoic acid가 2-oxoglutarate로 분해되는 대사과정을 보고하였다. 근래에

와서 furfural의 직접 분해에 관해서는 Han 등(1979)은 *Pseudomonas* sp.가 furfural을 유일한 탄소원으로 첨가한 배지에 성장 하였음을 보고하였고, Byun(1981)은 *Zoogloea* sp.에 의해 furfural이 2-furoic acid로 전환 된다고 보고하였다. 미생물의 혼합배양에 의한 furfural의 분해시 Han(1982)은 *Pseudomonas testosteroni*가, Hong 등(1983)은 *Pseudomonas fluorescens*가 생성한 ninhydrin반응에 양성인 대사물(Ninhydrin Positive Substance; NPS)에 의해 furfural의 분해가 촉진된다고 보고하였다.

본 연구는 Hong 등(1983)이 보고한 NPS를 분리, 정제하여 그 화학적 구조를 규명하고자 하였다.

* 본 연구는 1984년도 문교부 기초과학육성 연구비의 지원에 의한 것임.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 Han (1982)이 분리한 *Pseudomonas fluorescens*를 사용하였다. 액체 배양시에 사용한 액체 furoic acid 배지의 조성은 다음과 같다. KH_2PO_4 , 2.0g; K_2HPO_4 , 1.0g; CaCl_2 , 0.02g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g; KNO_3 , 1.0g; NaCl , 0.2g; FeCl_3 , 0.01g; Furoic acid, 2.0g; Distilled Water, 1l; 배지의 pH는 2N-NaOH를 사용하여 6.5로 조절하였다. 보존용 배지는 위의 액체 furoic acid 배지에 agar를 1.8%로 첨가한 고체 furoic acid 사면배지를 사용하였다.

배양방법 및 조건

온도 25°C, pH 6.5~6.8, 교반수 150rpm, 통기량 5l/min, 배지량 15l의 조건으로 발효조(Marubishi MSJ-U301, Marubishi, Japan)를 사용하여 배양하였다. 배양중의 pH 변화는 1N-HCl을 사용하여 조절하였으며, HPLC에 의해 배지중의 furoic acid가 검출되지 않을 때까지 배양하였다.

Furoic acid와 Furfural의 정량

균 배양액을 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 Hong등(1981)의 방법대로 Solvent; 70% methanol (v/v), column; μ -Bondapak C_{18} , Solvent flow rate; 1.0ml/min, UV wavelength; 254nm의 조건으로 HPLC (Waters Associates, Milford, Mass., U. S. A.)를 사용하여 정량하였다.

NPS의 정량

시료용액을 ninhydrin 반응시킨 후 spectrophotometer (CE 272 Linear Readout UV spectrophotometer, Cecil Instruments, England)를 사용하여 570nm에서 흡광도(O. D.)로서 측정하였다. Ninhydrin 반응은, 시료용액 0.2ml에 증류수 0.8ml를 가하고 여기에 ninhydrin 시약 1.0ml를 가하여, 끓는 물 속에서 10분간 반응시켰으며, 여기에 증류수 2ml를 가하여 진탕한 후 흡광도를 측정하였다. Ninhydrin은 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였으며, ninhydrin 반응 시약은 Moore등(1954)의 방법으로

조제하였다.

NPS의 분리

균 배양액을 원심분리기(Hitachi Automatic Refrigerated Centrifuge 20PR-5, Hitachi, Japan)를 사용하여 10,000rpm에서 연속 원심분리하여 균체를 제거하였다. 이 여액을 ion 형태가 H^+ -form인 Amberlite IR-120 양이온 교환수지가 충전된 column에 통과시킨 후 column을 증류수로 세척한 후 1N-HCl을 전개액으로 사용하여 100ml씩 분획하였다. 각 분획을 ninhydrin 반응을 시켜 NPS 함유 분획만을 합하여 50°C에서 감압회전 농축기(Rotavapor-R, Büchi, Swiss)를 사용하여 건조시킨 후 순수 methanol을 사용하여 NPS를 추출하였다. 이 추출 methanol 용액을 여과지를 사용하여 여과한 후 이 여액을 50°C에서 감압회전 농축기를 사용하여 methanol을 증발시켰다.

NPS의 정제

Dowex-50에 의한 ion exchange chromatography; 분리된 건조시료를 증류수에 녹여 ion 형태가 H^+ -form인 Dowex-50W-2X (Dow Chemical Co.)가 충전된 column (3.6 \times 24cm)에 통과시켜 0.5N-HCl 1l로 세척한 후 1.5N-HCl 400ml와 0.5N-HCl 400ml를 사용하여 0.5~1.5N의 linear gradient로 전개하여 분획하였다. 전개속도는 30ml/hr로 하였고, 10ml씩 분획하였다. 분획중 NPS 함유 분획만을 합하여 50°C에서 감압회전 농축기를 사용하여 건조시킨 후, 순수 methanol로서 NPS를 추출하여 이 추출액을 감압농축하여 건조시켰다.

Sephadex G-10에 의한 gel permeation chromatography; 건조시료를 증류수 8ml에 녹여 sephadex G-10 (Pharmacia Fine Chemical Co.)으로 충전된 column (2.5 \times 50cm)에 걸고 증류수를 20ml/hr의 속도로 전개하여 10ml씩 분획하였다. NPS 함유 분획만을 합하여 감압농축하여 건조시켰다. Bio-Gel P-2에 의한 gel permeation chromatography; 위의 건조시료를 증류수 8ml에 녹여 Bio-Gel P-2 (Bio-Rad Co.)가 충전된 column (2.5 \times 45cm)에 걸고 증류수를 25ml/hr의 속도로 전개하여 5ml씩 분획하여 NPS 함유 분획만을 감압농축

하여 건조시켰다.

Cellulose에 의한 column chromatography는 건조시료를 이 chromatography에 전개용매로 사용한 n-butanol: pyridine: water=1:1:1(v/v)인 용매에 녹여 column chromatography용 cellulose(E. Merck Co.)가 충전된 column(2.5×80 cm)에 걸고, 위의 전개용매를 20 ml/hr의 속도로 전개하여 10 ml씩 분획하여 앞의 방법으로 건조시켰다.

Thin layer-paper chromatography로 NPS의 확인

시료를 methanol에 녹여 상향식 1차원 paper chromatography와 TLC를 행하였다. 전개용매로는 용매 A; n-butanol: acetic acid: water=63:27:10(v/v), 용매 B; n-butanol: pyridine: water=1:1:1(v/v) 그리고 용매 C; pyridine: isoamylalcohol: water=35:30:30(v/v)를 사용하였고, 흡착재로는 TLC에서는 cellulose layer(Eastman chromagram cellulose sheet)와 silica gel layer(TLC plastic sheet silica gel 60, E. Merck Co.)를, paper chromatography에서는 Whatman NO. 1 paper를 사용하였으며, ninhydrin시약을 사용하여 발색시켰다.

NPS의 생물학적 활성 조사

액체 furoic acid배지의 furoic acid를 furfural 300ppm으로 대체하고, 여기에 분리된 NPS의 농도가 300ppm이 되게 가하여 조제한 액체배지 40 ml가 든 100 ml Erlenmeyer flask에 Han(1982)이 분리한 *Klebsiella pneumoniae*를 접종하여 30°C에서 진탕배양하면서 48시간마다 시료를 채취하여 furfural과 furoic acid의 농도변화를 조사하였다.

NPS의 화학구조분석

분리된 NPS를 증류수에 녹여 Shimadzu UV 210A Spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 사용하여 350 nm에서 210 nm까지 scanning하여 UV spectrum을 조사하였고, Shimadzu IR-435 IR spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 사용하여 KBr disc 방법으로 IR spectrum을 조사하였다. 분리된 NPS 20 mg을 500 μ l의 D₂O에 녹여 FT NMR spectrometer

(Bruker CXP 200 System, Bruker-Physik AG, W. Germany)을 사용하여 50.32 MHz에서 14,814회 scanning하여 ¹³C-NMR spectrum을 조사하였고, 분리된 NPS 20 mg을 500 μ l의 D₂O와 deuterated dimethylsulfoxide(DMSO-d₆)에 녹여 Varian FT-80 A NMR spectrometer(Varian, U. S. A.)를 사용하여 80 MHz에서 ¹H-NMR spectrum을 조사하였다. D₂O는 Sigma Chemical Co. 제품, DMSO-d₆는 Aldrich Chemical Co. 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

NPS의 분리 및 정제

NPS는 물에는 매우 잘 용해되나 methanol에는 소량이 용해되고, ethanol, ethylacetate, ether 등과 같은 비극성 유기용매에는 거의 용해되지 않았다. 따라서 NPS를 유기용매 추출법에 의한 정제는 불가능하였다. NPS와 함께 존재하는 다량의 무기염을 제거하기 위하여 각 분리 과정의 건조시료를 methanol로 추출하였다.

NPS는 어떤 pH 조건에서도 음이온 교환수지에는 결합하지 않았고, pH가 약 7.0인 조건에서 양이온 교환수지에는 결합하였음을 알았다. 즉 Dowex-50W 양이온 교환수지 column에 의한 NPS의 분획 결과는 Fig. 1과 같다. Dowex-50W 교환수지에 결합된 NPS는 0.5N-HCl로는 용출되지 않았으나 약 0.75N 정도에서 용출되기 시작하여 1N 정도의 농도에서 대

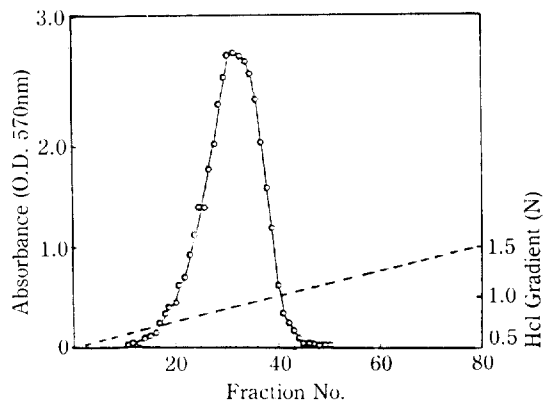


Fig. 1. Dowex-50W ion exchange chromatography of crude NPS.

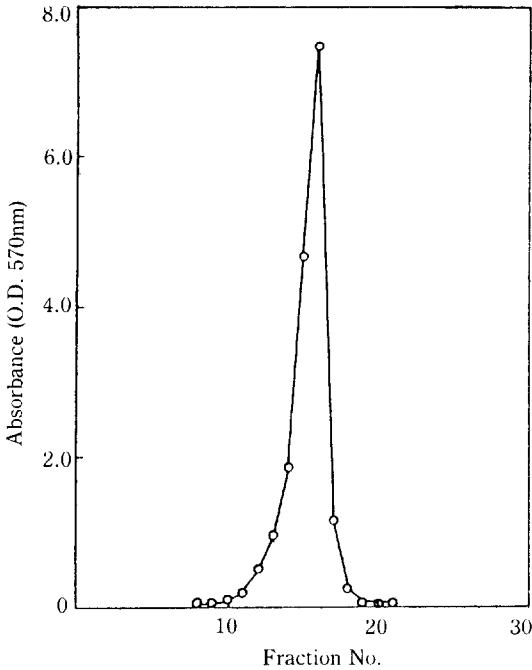


Fig. 2. Sephadex G-10 gel permeation chromatography of crude NPS.

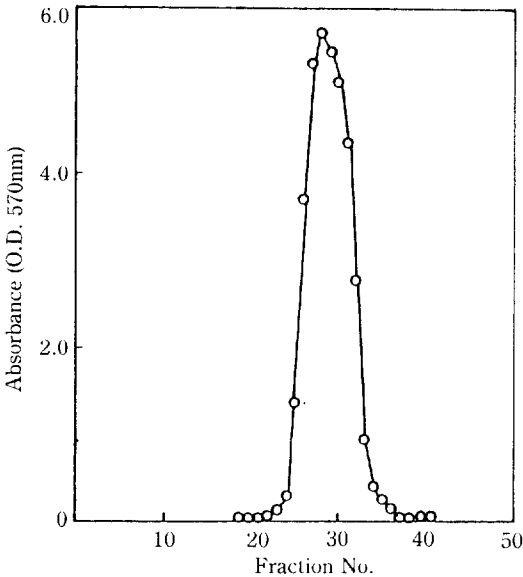


Fig. 3. Bio-Gel P-2 gel permeation chromatography of crude NPS.

부분이 용출되었다. 양이온 교환수지 column을 이용하여 분리한 NPS를 더 정제하기 위하여 Sephadex G-10, Bio-Gel P-2 그리고 cellulose column을 사용하여 분회하였으며 이 결

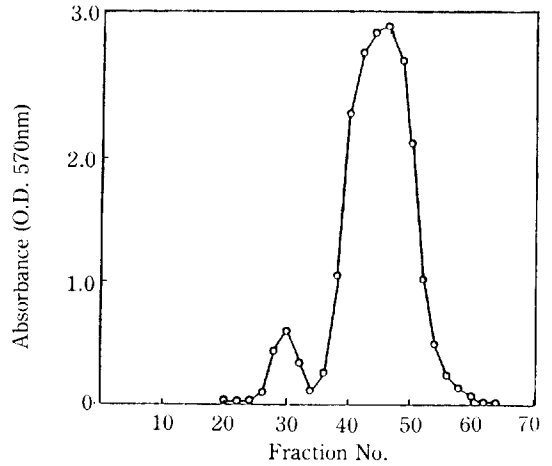


Fig. 4. Cellulose column chromatography of crude NPS.

과는 Fig. 2, 3 그리고 4와 같다. 이 분리정제된 NPS가 단일 물질임을 알아보기 위하여 T-LC와 paper chromatography를 행하였다. T-LC의 경우 흡착제로서 silica gel layer를 사용하고 전개용매 A를 사용한 경우는 tailing이 많이 일어나 분리가 되지 않았으나, 전개용매 B를 사용한 경우는 분리가 잘 되었다. 흡착제로서 cellulose layer를 사용한 경우는 전개용매 A, B 그리고 C의 세 경우 모두 분리가 좋았으며, Whatman No. 1 paper를 사용한 paper chromatography의 경우에도 전개용매 A, B 그리고 C의 세 경우에도 모두 분리는 잘되었다. 분리된 각 chromatogram의 spot는 모두 단일 spot였으며, 각 spot의 Rf치는 Table 1과 같다. 이 결과로 분리된 NPS는 한 종류의 ninhydrin 반응 양성 물질임을 알 수 있었다. 분리된 NPS가 첨가된

Table 1. TLC and paper chromatography of NPS.

	Rf value		
	Whatman No. 1	cellulose plate	silica gel plate
solvent A	0.20	0.25	n. a.
solvent B	0.43	0.41	0.50
solvent C	0.39	0.25	n. d.

n. a. ; not available

n. d. ; not determined

solvent A ; n-butanol : acetic acid : water = 63 : 27 : 10

solvent B ; n-butanol : pyridine : water = 1 : 1 : 1

solvent C ; pyridine : isoamylalcohol : water = 35 : 30 : 30

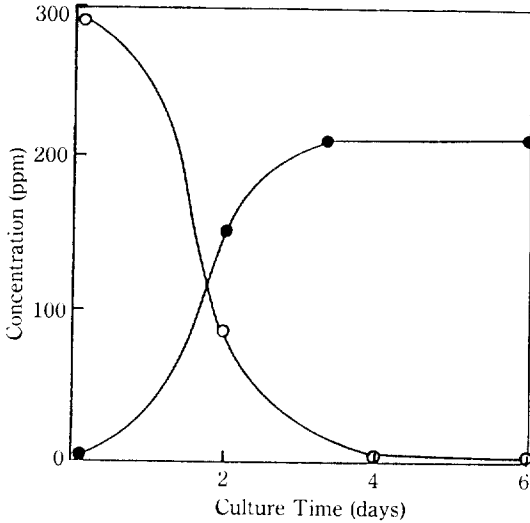


Fig. 5. Effect of NPS on furfural bioconversion into furoic acid by *Kl. pneumoniae*.
 -○-○-: furfural -●-●-: furoic acid

furfural 배지에서 Han (1982) 이 분리한 *Kl. pneumoniae* 에 의한 furfural 의 생물학적 전환 양상은 Fig. 5와 같다. 이로 보아 NPS는 Hong 등 (1983) 이 보고한 NPS와 같은 활성을 나타내는 것이 확인되었다.

NPS의 화학적 구조 규명

NPS는 대부분의 유기용매에 거의 용해되지 않고, methanol에 소량이 용해되고, 물과 DMSO에만 용해가 매우 잘되는 백색의 분말로 된 물질이었다. 이 NPS의 uv spectrum은 350nm에서 210nm까지의 uv 범위내에서 뚜렷한 흡광대가 존재하지 않았다. 이 결과로 NPS는 conjugated double bond나 aromatic ring을 갖고

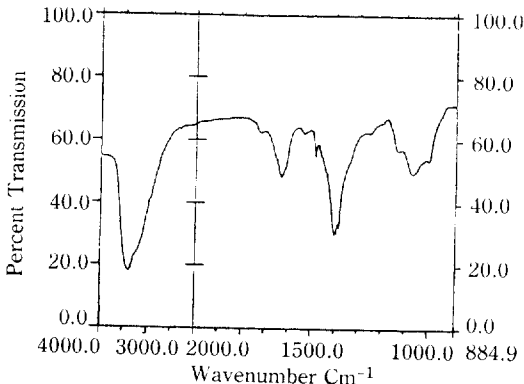


Fig. 6. IR spectrum of isolated NPS.

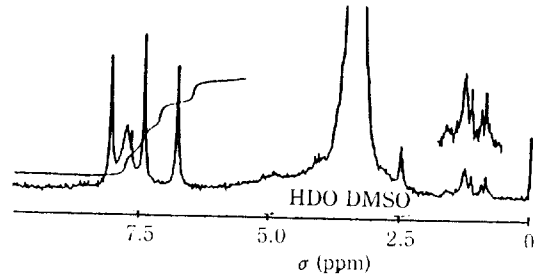


Fig. 7. ¹H-NMR spectrum of isolated NPS in DMSO-d₆.

있지 않음을 추정할 수 있다. NPS의 IR spectrum은 Fig. 6과 같다. 이 IR spectrum은 각 band가 예리하게 분리되지는 않았지만, 주요한 band 위치에 가능한 functional group을 추정하여 보면 다음과 같다. 3395 cm⁻¹의 band; O-H, 1633 cm⁻¹의 band; conjugated C=C of Coramine의 N-H, 1401 cm⁻¹의 band; alkyl group의 C-H, 1000 cm⁻¹와 1200 cm⁻¹ 사이의 band; alcohol의 C-O 또는 amine의 C-N에 의한 것이라 추정된다. NPS는 ninhydrin 반응에 양성이므로 amino N-H band도 O-H band와 비슷한 위치에서 나타나므로 N-H band는 broad band인 O-H band 속에 포함되어 나타난 것으로 추정할 수 있다. 이 IR spectrum에서 aromatic ring에 의한 band는 나타나지 않는 것으로 추정된다.

NPS의 ¹H-NMR spectrum은 Fig. 7, 8과 같다. DMSO-d₆를 용매로 사용하여 얻은 Fig. 7의 spectrum에서는 DMSO-d₆에 포함된 H₂O에 의한 3.43ppm의 큰 peak 외에 8.09, 7.78, 7.46 그리고 6.82 ppm의 4 개의 peak가 나타났다. 이 spectrum을 얻은 시료에 D₂O를 가하여 새로운 spectrum을 얻으면 8.09, 7.78, 7.46 그

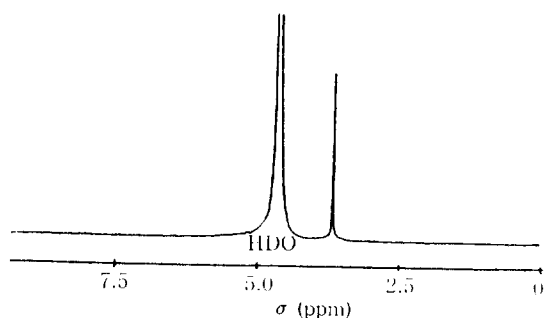


Fig. 8. ¹H-NMR spectrum of isolated NPS in D₂O.

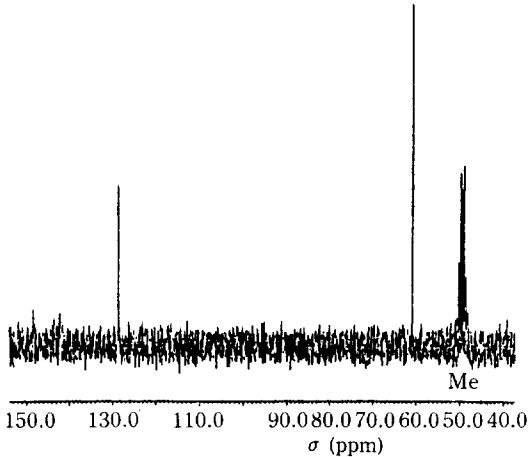


Fig. 9. ^{13}C -NMR spectrum of isolated NPS
Me: deuterated methanol (d_4)

리고 6.82 ppm의 4 peak는 크기가 많이 감소하였다. 이 결과로 보아 이들 4 peak는 heteroatom에 결합된 exchangeable proton임을 알 수 있었다. 이들 peak 중 8.09, 7.46 그리고 6.82 ppm의 3 개의 sharp peak는 O-H에 의한 peak로, 7.78 ppm의 broad peak는 N-H에 의한 peak로 추정된다. D_2O 를 용매로 사용하여 얻

은 Fig. 8의 spectrum에서 4.69 ppm의 큰 peak는 H_2O 에 의한 peak이고, 3.72 ppm의 peak는 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ 의 탄소원자에 결합된 proton에 의한 peak라 추정된다. NPS의 decoupled ^{13}C -NMR spectrum은 Fig. 9와 같다. 이 spectrum에는 128 ppm과 60 ppm 그리고 reference로 가한 methanol peak가 나타나 있다. 60 ppm의 peak는 sp^3 orbital을 가진 탄소로, 128 ppm의 peak는 sp^2 orbital을 가진 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}'$ 의 구조를 갖는 탄소로 추정된다. 60 ppm의 peak를 나타내는 탄소원자는 Fig. 8에서 3.72 ppm의 peak를 나타내는 proton이 결합된 탄소원자라 생각된다. 이상의 UV, IR 그리고 NMR spectrum을 종합하여 보면, NPS는 aromatic ring은 가지고 있지 않으며 $-\text{NH}_2$ 와 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}'$ 그리고 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ group을 갖는 유기물질로 추정된다.

위의 실험들 외에 mass spectrometry와 elemental analysis를 행하여 더 많은 정보를 얻으면 NPS의 구조를 완전히 규명할 수 있을 것이다.

적 요

*Pseudomonas fluorescens*에 의해 세포외에 생산된 furfural의 furoic acid로의 생물학적 전환을 촉진시키는 ninhydrin 반응에 양성인 대사물(Ninhydrin positive Substance=NPS)을 ion exchange chromatography와 gel permeation chromatography 그리고 cellulose column chromatography에 의하여 분리, 정제하였다. IR spectrophotometry와 ^1H -NMR spectrometry 그리고 ^{13}C -NMR spectrometry에 의해 이 NPS는 $-\text{NH}_2$ 와 $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-\text{R}'$ 그리고 $-\text{CH}_2-\text{OH}$ group을 갖는 유기물질로 추정된다.

사 사

^1H -NMR은 서울대학교 생약연구소에서, ^{13}C -NMR은 한국과학원에서 수행되었다. 본 연구를 위해 시설의 편의를 제공해 주신 양기관의 관계 여러분들에게 깊은 감사를 드립니다. 또한 본 연구를 지원해 주신 문교부 관계분께 감사드리며 기기분석등 많은 조언을 해주신 강사옥교수께 심심한 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Byun, K.H., 1981. Bioconversion of furfural into 2-furoic acid by *Zoogloea* sp.. *M.S.*

Thesis, S.N.U., Seoul, Korea.

2. Dean, F.M., 1963. Naturally occurring oxygen ring compounds, p 1-135. Butterworth and Co., London.
3. Han, H.E., 1982. Microbial interactions in degradation of furfural and its derivatives. *Ph.D. Thesis, S.N.U., Seoul, Korea.*
4. Han, H.E., S.W. Hong, and Y.C. Hah, 1979. Symbiotic biodegradation of furfural by soil bacteria. *Kor. J. Microbiol.*, 17(4), 198-202
5. Hong, S.W., H.E. Han, and K.S. Chae, 1981. Detection of furfural and 2-furoic acid in bacterial cultures by HPLC. *J. Liquid*

Chromatography, **4**(2), 285-295

6. Hong, S.W., Y.C. Hah, H.E. Han, and B.U. Lee, 1983. Purification and characterization of stimulating substance which participates in furfural biodegradation. *Kor. Biochem. J.*, **16**(4), 327-335
7. Kakinuma, A., and S. Yamatodani, 1964. L-Glutamic acid formation from 2-furoic acid by soil bacteria. *Nature*, **201**, 420-421
8. 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**, 909-913
9. Morimoto, E., T. Hirashima, and M. Ohashi, 1968. Studies on fermentation products from aldehyde by microorganisms. *J. Ferment. Technol.*, **46**(4), 276-287
10. Trudgill, P.W., 1969. The metabolism of 2-furoic acid by *Pseudomonas* F2. *Biochem. J.*, **113**, 577-587

(Received August 20, 1985)