

## *Pseudomonas putida* H-5에 의한 포름알데히드의 생분해

류병호 · \*임복규 · 김동석 · \*\*원용돈 · \*\*\*정수자  
경성대학교 식품공학과, \*국립부산검역소,  
\*\*부산공업대학 고분자공학과, \*\*\*부산여자전문대학 식품영양학과

### Biodegradation of Formaldehyde by *Pseudomonas Putida* H-5

Beung Ho Ryu, \*Bok Gyu Lim, Dong Seuk Kim, \*\*Yong Don Weon and \*\*\*Soo Ja Jung

Department of Food Science and Technology, Kyung Sung University

\*National Pusan Quarantine Station

\*\*Department of Polymer Engineering, Pusan National University of Technology

\*\*\*Department of Food and Nutrition, Pusan Women's Junior College

#### ABSTRACT

This study was designed to reveal the characteristics of the strains degrading formaldehyde isolated from mud of waste water. A strain H-5 showed the highest ability of formaldehyde biodegradation among isolated strains. According to identification, the strain H-5 was ascribed to be *Pseudomonas putida* H-5. The optimal conditions of *Pseudomonas putida* H-5 were 30°C and pH 7.0. The highest level of formaldehyde degradation was demonstrated at the concentration of 0.02~0.04% in a glucose containing medium. Formaldehyde biodegradation by *Pseudomonas putida* H-5 indicated that this reaction was converted to the methanol and formic acid. However, methanol and formic acid did not show any effect on the growth of viable cells.

#### 서 론

포름알데히드는 식품, 의약품 및 화학약품의 합성, 플라스틱 제품 및 가솔린, 디젤유 등에서 부수적으로 생성되는 독성이 강한 물질로 알려져 있으며 공해 오염원의 하나이다.

포름알데히드는 고농도에서 오랫동안 노출되어 있을 경우 인체에 미치는 영향이 크며(1) DNA와 단백질의 결합을 절단하고, DNA의 수선을 억제하며(1-3), 또 호흡기계의 강한 발암성 물질로 알려져 있다(4).

한편 포름알데히드는 미생물의 정균작용이 있음에도 불구하고 어떤 종류의 미생물은 저농도의 포름알

데히드 존재하에서 생육된다. 미생물에 의한 포름알데히드는 산화메카니즘에 대한 연구로 *Pseudomonas putida*는 0.2% 포름알데히드 용액에서 산화하며 이때 작용한 효소를 formaldehyde dismutase라고 하였다(5, 6). 일반적으로 포유동물의 alcohol dehydrogenase는 NAD<sup>+</sup>에 의하여 촉매되어 활성이 있으나 *Pseudomonas putida*는 포유동물의 효소특성과는 다르게 electron acceptor도 없이 dismutation을 촉매한다(7).

현재까지 알려져 있는 formaldehyde dismutase의 특유의 성질은 서로 다른 포름알데히드의 이외의 알데히드로 촉매한다(6).

Kato 등(6)은 *Pseudomonas putida*를 이용하여

포름알데히드를 dismutation 시키는 formaldehyde dismutase을 분리정제하고 그 특성을 보고하였다. 한편 Adroer 등(7)은 formaldehyde dismutase을 분비하는 *Pseudomonas putida*을 배양하여 포름알데히드를 분해하는 연구를 보고한 바 있다.

본 연구는 포름알데히드를 분해하는 균주를 하천의 진흙에서 분리한 후 분해능이 우수한 균주를 동정하여 이 균주에 의한 포름알데히드의 분해를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 시료

본 실험에서 사용한 균주는 부산시내 하천의 진흙으로부터 분리 사용하였다.

### 배지

포름알데히드의 분해세균을 분리하기 위한 배지는 10g pepton, 5g beef extract, 1g  $K_2HPO_4$ , 5g NaCl 및 1ml trace element를 물 1l 에 녹여 사용하였다.

Trace element로는 0.5g  $B(OH)_3$ , 0.04g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.2g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.4g  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.2g  $(NH_4)_2Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$  및 0.4g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 물 1l 에 녹여 사용하였다. 포름알데히드의 분해를 하기 위한 배지로는 1g glucose와 1ml trace element를 물 1l 에 녹이고 0.02% 및 0.04%의 포름알데히드를 각각 첨가한 배지를 사용하였다. 이때 사용된 포름알데히드는 적정농도를 만들어 막여과지(0.45 $\mu$ m)로 여과멸균한 후 멸균한 배지에 첨가하였다.

### 포름알데히드 분해균주의 분리

300ml의 flask에 50ml의 배지를 넣어 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 멸균한 후 0.04% 포름알데히드가 첨가된 배지에 시료를 선택적인 농화배양법(selective enrichment technique)으로 30 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양한 액을, 적당히 희석하여 한천배지에 도말하고 30 $^{\circ}$ C에서 3일간 다시 배양하였다. 이때 생성된 균주를 tooth pick로 2회 계대 배양한 다음 각각의 colony을 접종하여 30 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양한 후 포름알데히드의 함량을 측정하여 분해능이 가장 우수한 균주를 분리 선별하였다.

### 균주의 최적 성장조건

균주의 성장 최적조건은 pH 5~9, 온도 20~40 $^{\circ}$ C와 탄소원으로 첨가한 각 농도별 포름알데히드 최소

배지에서 생장속도를 측정하였다. 생장속도는 직접 배지<sup>6)</sup>, 대수기의 균주를 접종하여 정체기에 들어갈 때까지의 매시간 탁도를 660nm에서 측정하여 생육 곡선을 구한 후 대수기 동안의 균체량의 증가를 측정하였다.

### 균체에 의한 포름알데히드의 분해

균주를 30 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양한 후 40 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리(6,000 $\times$ g)하여 얻은 균체를 멸균된 생리식염수로 씻은 후 인산염 완충액(0.1M- $K_2HPO_4$ , 0.1M-NaOH, pH8.0)으로 현탁시켰다. 이 용액 200 ml에 30~180mg protein/l 되게 현탁시킨 후 포름알데히드 용액(250~500mg/l)이 되게 첨가하였다.

### 포름알데히드 및 분해물의 분석

배양액의 시료용액은 분석하기 전에 0.45 $\mu$ m 여과막으로 여과하여 사용하였다. Gas-chromatography의 분석조건은 Table 1과 같다.

### 생균수의 측정

생균수의 측정은 Hemacytometer로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리 및 동정

포름알데히드를 탄소원으로 이용하는 배지에 배양하여 분해능이 우수한 균주를 하천의 진흙에서 6종을 분리하여 이들을 각각 H-1에서 H-6로 명명하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 하천의 진흙에서 분리된 균주는 모두 Gram-negative로서 짧은 간균(bacilli)이고, 이들 균주를 Pickett scheme의 동정법(8)에 따라 분류한 결과 균주 H-1을 제외한 5종은 균주의 특성이 거의 유사하였다. 균주 H-1은 oxidation negative group으로서 비운동성이고 형광성

Table 1. Gas-chromatographic conditions for formaldehyde.

GC model	: Spectra physics, Japan
Column	: 6.6% Carbowax 20M-Carbopak B-AW 80-120mesh
Carrier gas	: $N_2$ (20ml/min)
Oven temperature	: 77 $^{\circ}$ C
Injection temperature	: 210 $^{\circ}$ C
Detection temperature	: 195 $^{\circ}$ C
Detector	: FID

Table 2. Characterization of the isolates with Pickett scheme.

	H-1	H-2	H-3	H-4	H-5	H-6	<i>P. putida</i> IFO 14164
Diameter of colonies(mm)	1-2	2	2	2	2	2	2
Gram staining	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey medium. growth	+	+	+	+	+	+	+
Oxidation/Fermentation	○	○	○	○	○	○	○
Oxidase	-	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
MN medium							
Motility	-	+	+	+	+	+	+
Nitrate-reduction	-	-	-	-	-	-	-
FLN medium;							
Fluorescence	-	+	+	+	+	+	+
Lactose utilization	+	-	-	-	-	-	-
Denitrification	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 42°C	+	-	-	-	-	-	-
Acetamide	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	+	+	-	+	+	+
Gluconate	-	+	+	-	+	-	-
Maltose	+	-	-	-	-	-	-
Tartrate	-	+	-	+	+	+	+

이 없으며, lactose와 maltose를 자화할 수 있으므로 *Acinetobacter*속으로 분류하였고, H-2, H-3, H-4, H-5 및 H-6 등 5종의 균주는 oxidase가 positive였으며 lactose를 자화할 수 없고 환원성이 없으며 형광성 색소를 생성하는 성질을 갖는 fluorescent 그룹으로 *Pseudomonas* 속으로 분류하였다. 이와 같이 분류한 6종의 균주중 실험의 편의상 특이한 성질을 갖는 H-1과 포름알데히드가 들어있는 최소배지에서 성장률이 가장 좋은 H-2, H-5를 선별하여 *Pseudomonas putida* IFO 14164와 비교하여 API 20 NE Kit로 동정하였다.

이 결과 두 균주는 API index에서 각각 뚜렷한 성질을 갖는 균으로 판명되었다(Table 3). Table 3에서와 같이 glucose와 arabinose의 자화능이 있는 것으로 보아 *Acinetobacter calcoaceticus*로 동정하였다. H-2와 H-5는 API 20NE kit에 의한 실험결과에서 arginine dihydrolase의 양성반응 citrate 자화능 및 oxidase의 양성반응의 독특한 성질이 있으므로 *Pseudomonas fluorescens* 그룹으로 분류하였다. 분해능이 우수한 *Pseudomonas* 속인 H-5의 균명을 알기 위하여 표준 비교균주로서 *Pseudomonas putida* IFO 14160 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

25619 및 *Pseudomonas putida* IFO 14164을 이용한 4가지의 추가실험 결과 42°C에서 생육이 거의 되지 않으며 acetamide을 자화하지 못하는 등 상호 다른 뚜렷한 성질이 있어 H-5 균주를 *Pseudomonas putida*로 동정하여 *Pseudomonas putida* H-5로 명명하였다(Table 4).

#### *P. putida* H-5의 최적 성장조건

포름알데히드 분해능이 우수한 *P. putida* H-5의 성장곡선은 Fig. 1과 같다. *P. putida* H-5을 0.02% 포름알데히드가 들어있는 액체 배지에서 48시간 배양한 결과 배양 24시간 동안의 생균수는 ml당  $2.0 \times 10^6$  cells이었으며 그 이후에 정체기에 들어갔다. *P. putida* H-5의 생장의 최적온도는 20°C에서 40°C까지의 온도범위에서 흡광도를 측정된 결과 30°C에서 가장 생육도가 좋았으며 40°C에서는 거의 생육하지 않았다(Fig. 2). pH는 7.0에서 생장이 가장 좋았고 pH 5.0과 pH 9.0에서는 매우 낮았다(Fig. 3). *P. putida* H-5를 최소배지에 탄소원으로 포름알데히드를 첨가하여 배양시킨 결과는 포름알데히드의 농도가 낮을수록 균체의 생육에 좋고 포름알데히드 농도가 증가할수록 생장이 억제되었다(Fig. 4).

Table 3. Identification of the strains with API 20NE kit.

	H-1	H-2	H-5	<i>P. putida</i> IFO 14164
$\beta$ -Galactosidase	-	-	-	-
Arginine dihydrolase	-	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Citrate utilization	-	+	+	+
H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-
VP reaction	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	-	-
Utilization of				
Glucose	+	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-
Melibiose	+	+	+	+
Amygdalin	-	-	-	-
Arabinose	+	-	-	-
Oxidase	-	+	+	+

Table 4. Differentiation of the isolate with standard strains

	<i>P. fluorescent</i> IFO 14460	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25619	<i>P. putida</i> IFO 14164	isolate H-5
Growth at 42°C	-	+	-	-
0.5% NaCl	-	-	-	-
Acetamide	+	+	-	-
Lecithinase	-	-	-	-

Table 5. Effects of carbon source on the growth of *P. putida* H-5 in the medium.

Carbon sources	Amount added(%)	Dry cell weight(mg/ml)
Glucose	1.0	0.80
Fructose	1.0	0.62
Galactose	1.0	0.12
Lactose	1.0	0.12
maltose	1.0	0.54
Trehalose	1.0	0.12
Mannitol	1.0	0.12
Meso-inositol	1.0	0.12

Table 6. Formaldehyde degradation by growing cells of *Pseudomonas putida* H-5

Time	Formaldehyde (mg/l)	Formic acid (mg/l)	Methanol (mg/l)
0	250	0	0
24	36	138	115

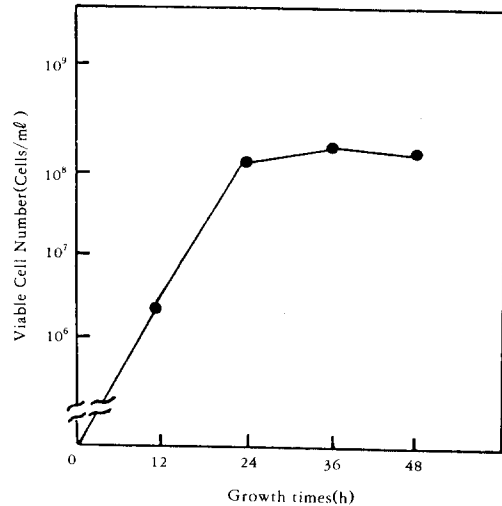


Fig. 1. Growth curve of *P. putida* H-5 containing 0.02% formaldehyde in the peptone-yeast extract liquid medium

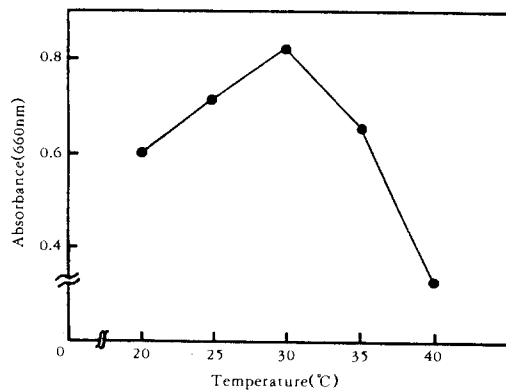


Fig. 2. Effects of temperature on the growth of *P. putida* H-5

*P. putida* H-5의 기질별 생육도

포름알데히드 분해균주인 *P. putida* H-5의 생육과 포름알데히드의 분해를 촉진시키기 위하여 기질인 당 및 당알코올에 대한 생육도에 대하여 검토하였

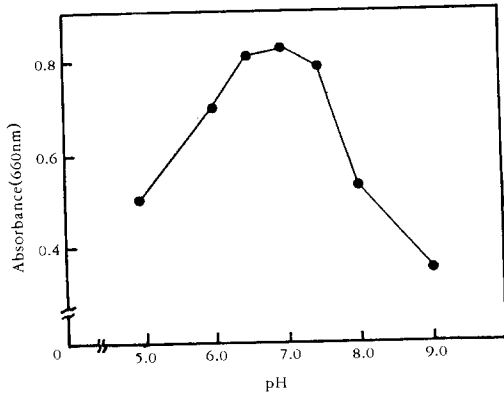


Fig. 3. Effects of pH on the growth of *P. putida* H-5

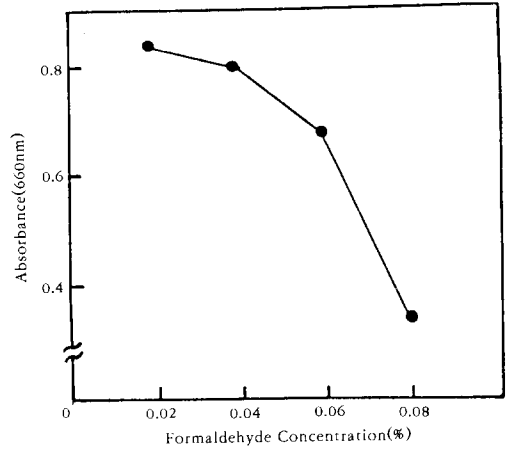


Fig. 4. Effects of formaldehyde concentration on the growth of *P. putida* H-5

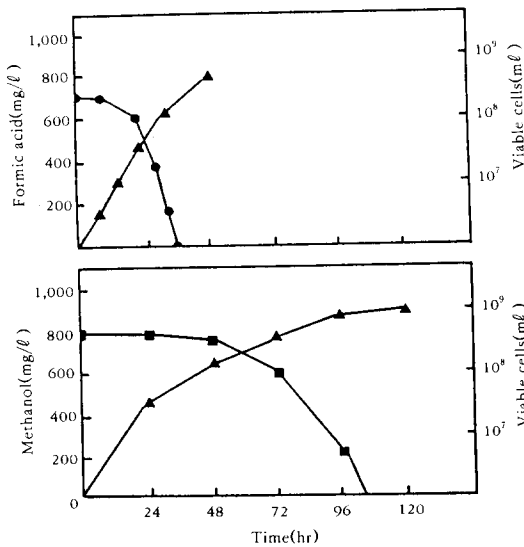


Fig. 5. Metabolism of the dismutation products, methanol and formic acid by *P. putida* H-5X  
Methanol; -■-, Formic acid; -●-,  
Viable cells; -▲-

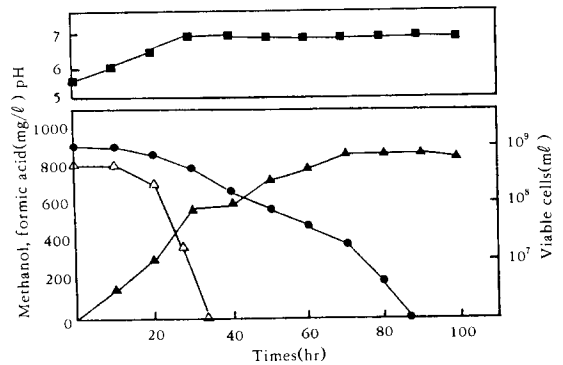


Fig. 6. Biphasic growth of *P. putida* H-5X on the dismutation products, methanol, formic acid and viable cells  
Methanol; -●-, Formic acid; -△-,  
Viable cells; -▲-

다. *P. putida* H-5의 생육에 대하여 탄소원으로 당류 및 당알코올류 중 glucose을 첨가하였을 때는 균체의 증식이 좋았으나, 그외 galactose, lactose, trehalose와 mannitol 및 meso-inositol의 첨가시에는 생육되지 않았다(Table 5). Adroer 등(7)은 포름알데히드의 분해균인 *Pseudomonas putida* H-5는 glucose을 탄소원의 기질로 사용했을 때 분해력이 높았다고 보고하였으며, 본 실험 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

*P. putida* H-5에 의한 포름알데히드의 분해

포름알데히드를 분해하기 위하여 *P. putida* H-5를 glucose-trace element의 배지에 포름알데히드가 들어 있는 배양액에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 포름알데히드를 분해한 결과는 Table 6과 같다. 포름알데히드 첨가 배양액에 *P. putida* H-5를 접종하여 분해시킬 때 처음에는 균체의 증가가 느렸으나 배양시간이 길어짐에 따라 균체가 현저히 증가하였다. Kato 등(5, 6)은 포름알데히드는 분해시 메탄올과 개미산이 생성되는데 이는 균체에서 분비하는 dismutase에 의하여 생성된다고 보고하였다.

본 실험결과에서도 *P. putida* H-5에 의하면 메탄올과 개미산으로 분해하였으며 그 생성량은 115mg/ℓ, 138mg/ℓ 이었다.

#### 포름알데히드 분해물에 의한 균주의 영향

*P. putida* H-5에 의하여 포름알데히드가 분해할 때 메탄올과 개미산이 생성된다(7). 이때 생성된 분해산물인 메탄올과 개미산이 *P. putida* H-5에 의하여 다시 분해되는지 여부와 균체의 성장에 미치는 영향에 대하여 실험한 결과는 Fig. 5, 6과 같다. 무기염 배지에 메탄올 또는 개미산을 첨가한 배양액에 *P. putida* H-5를 각각 접종하였을 때 메탄올을 첨가한 배양액에서는 균체의 성장에는 아무런 영향이 없이 균수는 증가하였고, 메탄올을 약 96시간 배양 후에 거의 분해되었으며 개미산을 첨가한 배양액에서는 30시간 배양시 거의 분해되었다. *P. putida* H-5가 탄소원으로서 메탄올 또는 개미산의 첨가배지에 따라서 성장곡선이 다른데 이는 탄소원으로 사용된 메탄올과 개미산의 구조식에 따른 화학식 성질이 다르기 때문이라고 생각한다.

#### 요 약

본 연구는 포름알데히드를 분해하는 균주를 하천의 진흙에서 6종 분리하고 그 중에서 포름알데히드의 분해능이 가장 우수한 균주인 H-5을 분리동정하여 *Pseudomonas putida* H-5라고 명명하였다. *Pseudomonas putida* H-5의 최적 생장조건은 온도 30℃, pH 7.0이었고, 포름알데히드는 0.02~0.04%의 농도에서 가장 분해가 잘 되었고, 기질로는 glucose가 가장 우수하였다. *Pseudomonas putida* H-5에 의하여 포름알데히드는 메탄올과 개미산으로 분해되며 이는 균주의 생육에 아무런 영향을 미치지 않았다.

#### 참고 문헌

1. R. Alexanderson, G. Hedenstierna and B. Kolmodin-Hedman(1982). *Arch. Environ. Health* **37**, 279.
2. G. M. Marsh(1982), *Br. J. Ind. Med.* **39**, 313.
3. J. H. Olsen and M. Dossing(1982). *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, **43**, 366.
4. R. C. Grafstrom, R. D. Curren, L. Yang Li and C. C. Harris(1985), *Science*, **288**, 89.
5. N. Kato, K. Shirakawa, H. Kobayashi and C. Sakagawa(1983), *Agric. Biol. Chem.* **47**, 39.
6. N. Kato, H. Kobayashi, M. Shimao and C. Sakazawa(1984), *Agric. Biol. chem.*, **48**, 2017.
7. N. Adroer, C. Casas and C. Sola(1990), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 217.
8. Z. W. Koneman, S. D. Allen, V. R. Dowell and H. M. Sommers(1979), *Diagnostic microbiology*, p111-155, Lippincott Company, Philadelphia.
9. R. Y. Stanier, N. J. Palleroni and M. Doudoroff(1966), *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159.
10. R. Hugh and G. L. Gilardi(1980), *Pseudomonas*. In: E. H. Lennette, E. H. Spaulding, J. P. Truant, (eds) *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, pp 250-269.