

회전원판 반응조를 이용한 *Pseudomonas sp.* KS-96에 의한 gallic acid로부터 pyrogallol의 전환

안성만 · 김동석 · 정영기* · 임복규** · 이홍수*** · 류병호†

경성대학교 식품공학과

*동의대학교 미생물학과

**부산지방식품의약품청

***사상보건소

Bioconversion of Pyrogallol from Gallic Acid by *Pseudomonas sp.* KS-96 using Rotating Disc Contactor

Seung-Man An, Dong-Suck Kim, Young-Kee, Jeong*, Bock-Gu Lim**,
Heung-Su Lee*** and Beung-Ho Ryu†

Department of Food Science and Biotechnology Pusan, 608-736, Korea

**Department of Microbiology, Donggeui University, Pusan, 614-714, Korea*

***Pusan Regional Food and Drug Administration Office, Pusan 608-080, Korea*

****Sasang Health Center, Pusan, Korea*

Abstract

In previous paper *Pseudomonas sp.* KS-96 isolated from the soil to bioconversion into pyrogallol from gallic acid. Continuous bioconversion of pyrogallol was carried out using rotatory disc contactor immobilized *Pseudomonas sp.* KS-96. Enzyme activity of gallate decarboxylase released from *Pseudomonas sp.* KS-96 were shown at the highest activity on 24h incubation. Culture media containing gallic acid supplied on the flow rate of 20ml/h until thickness of cells wall reached steady state. Bioconversion rate of pyrogallol from gallic acid showed at highest level ranging from 18hr to 36h according to time courses. Continuous bioconversion of pyrogallol using rotating disc contactor was about 81% and 80% between 6 and 8 days at the feeding rate of 30ml per hour in the medium containing 15g/l gallic acid.

Key words : Pseudomonas sp., bioconversion, pyrogallol, rotating disc contactor

서 론

Pyrogallol은 냄새가 없는 백색의 결정 또는 분말로 화학

식은 $C_6H_2(OH)_3$ 이며 분자량은 126로서 용점(融點)은 133~136°C이며 비점(沸點)은 309°C이다. 공기나 알칼리성 용액 중에서 쉽게 산화되기 때문에 금, 은, 수은 등의

† Corresponding author

정량시 환원제 등으로 사용된다. 또한 산업적으로는 사진현상, 석판 인쇄에 많이 사용되며, 양모 등의 착색제, 가죽 및 모피의 염색제, 페인트의 광택제, 가솔린의 환원제 등으로 사용된다.¹⁻⁴⁾

Pyrogallol의 생산에 대한 생물학적 기초연구로는 *Penicillium patulum*에 의해 gallic acid에서 pyrogallol이 생성된다고 보고 된 이후⁴⁾, *Penicillium sp.*가 분비하는 tannase에 의해 gallotannin이 gallic acid로 전환되고, 이 gallic acid는 동균주의 gallate decarboxylase에 의해 pyrogallol로 전환된다고 보고되었으며 (Fig. 1), gallate decarboxylase의 활성은 *Penicillin*속 등의 곰팡이에 존재한다고 보고하였다⁴⁻⁵⁾. 토양으로부터 gallotannin을 이용하는 균주로는 *Citrobacter sp.* 64-1가 분리되어 gallic acid로부터 6.05g/l의 pyrogallol이 생산되었다⁶⁾. 그리고 *Klebsiella*속, *Erwinia*속 및 *Aeromonas*속 등의 세균에서도 gallate decarboxylase의 활성이 보고되었으며, 이에 따라 gallic acid로부터 pyrogallol의 전환에 대한 연구가 다소 있다⁷⁻¹⁴⁾. 본 연구에서는 gallic acid로부터 pyrogallol을 생산하기 위하여 토양으로부터 gallic acid를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 세균을 선별하여 *Pseudomonas sp.* KS-96을 분리동정하였다¹⁵⁾. 따라서 본 연구에서는 *Pseudomonas sp.* KS-96을 이용하여 gallic acid로부터 pyrogallol을 전환하기 위하여 회전원판 반응조(Rotating Disc Contactor, RDC)를 이용하여 연속적 전환을 시도하여 약간의 결과를 얻었으므로 보고하고자 한다.

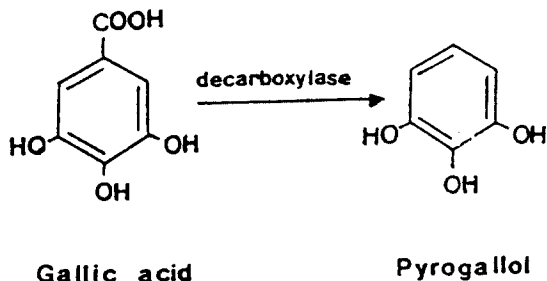


Fig. 1. Decarboxylation of gallic acid into pyrogallol.

재료 및 방법

미생물

미생물은 *Pseudomonas sp.* KS-96을 사용하였다¹⁵⁾.

배지

본 실험에 사용된 배지는 2g gallic acid, 5g peptone, 5g meat extract, 2g yeast extract, NaCl, 5g KH₂PO₄, 1g NH₄Cl, 0.5g NaCl, 0.01 CaCl₂, 0.05g MgSO₄ · 7H₂O를 증류수 1l에 녹여 사용하였다.

효소활성의 측정

효소활성은 배양균체를 수확한 후 50mM potassium phosphate buffer(pH 6.0)에 현탁한 다음 원심분리하여 조효소액의 gallate decarboxylase의 활성을 측정하여 활성이 가장 우수한 균주를 선별하였다. Gallate decarboxylase의 활성은 Grant와 Patel의¹⁶⁾ 방법에 따라 효소활성 1 Unit는 1분당 gallic acid로부터 μmole의 pyrogallol의 양으로 하였다.

Pyrogallol 양의 측정

Pyrogallol의 정성분석은 Pastusk의 방법¹⁷⁾에 따라 실시하였고 정량은 시료 1ml에 1% (w/v)의 vanillin이 함유된 70% (v/v) 황산 2ml를 가하여 18분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 백분율로 환산하였다.

회전원판 반응조의 조건

회전원판 반응조(Rotating disc contactor, RDC)의 장치 회전원판 반응조는 Fig. 2에 나타낸 바와 같다. 반응조는 5mm 두께의 투명한 아크릴 판으로 제작하였으며 disc는 베크라이트를 사용하였고 각 반응조는 4단으로 구분하였으며 각 단의 구분은 2mm 아크릴판으로 baffle을 설치하여 분리하였다¹⁸⁻²⁰⁾.

RDC의 설계는 단위면적당 용적비(G값)은 1~2단에서 5.0, 3~4단에서 3.0을 유지하였으며 회전원판 상호간격은 1~2단에서 1.5cm, 3~4단에서 1.0cm가 되도록 하였다. 반응조의 벽 및 기저부는 회전원판과의 간격을 원판지름의 10%로 유지하도록 설계하였으며 반응조의 바닥은 원판에서 탈리된 미생물이 축적되지 않도록 하기 위해 반원형으로

하였고 잔여균체를 제거할 수 있도록 drain valve를 설치하였다.

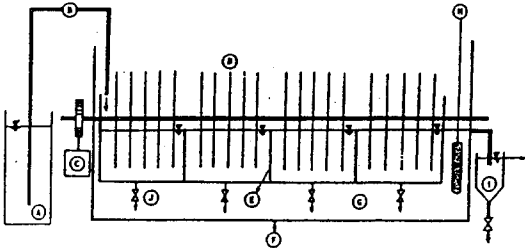


Fig. 2. Schematic diagram of rotating disc contactor

- (A) Storage tank
- (B) Peristaltic pump
- (C) Reduction motor
- (D) Disc
- (E) Baffle
- (F) Contactor
- (G) Water bath
- (H) Heater
- (I) Clarifier
- (J) Drain valve

반응조내의 온도를 일정하게 유지하기 위하여 온도자동 조절장치(water bath thermostat, type WTH-50)를 사용하였으며 수욕조 옆면에 순환펌프를 사용하여 수욕조내의 물이 잘 순환하도록 하였다. Gallic acid를 함유하는 기질의 주입은 peristaltic pump로 유량을 조절하였다.

회전원판 반응조에 의한 연속적 전환

회전원판 반응조에 의한 pyrogallol의 연속적인 전환은 먼저 균주를 3l jar fermentor(Model, HDF-300, Marubishi, Japan)에서 배양시킨 후 이 배양액을 미리 멸균된 회전원판 반응조에 넣어 28°C에서 24시간 동안 균체가 원판에 균체막을 형성하도록 원판을 회전시켰다^{21,22}.

균체막 형성이 완료된 후에 gallic acid가 포함된 기질액을 peristaltic pump로 일정량씩 연속적으로 공급하면서 pyrogallol로 전환시켰다.

결과 및 고찰

Pseudomonas sp. KS-96의 생육 및 효소활성

Pseudomonas sp. KS-96의 생육조건은 0.2% gallic acid, 0.5g pepton, 0.2% meat extract, 0.5% yeast extract, 0.3% Na₂HPO₄, 0.3% KH₂PO₄, 0.5% NaCl, 0.01% CaCl

2, 0.005% MgSO₄ · 7H₂O을 함유한 배지에서 생육이 좋았으며, 생육의 최적온도는 30°C였고 이때 최적 pH는 5.0이었다. 이러한 조건하에서 *Pseudomonas sp.* KS-96을 배양하면서 gallate decarboxylase의 활성을 측정한 결과는 Fig. 3에 나타내었다.

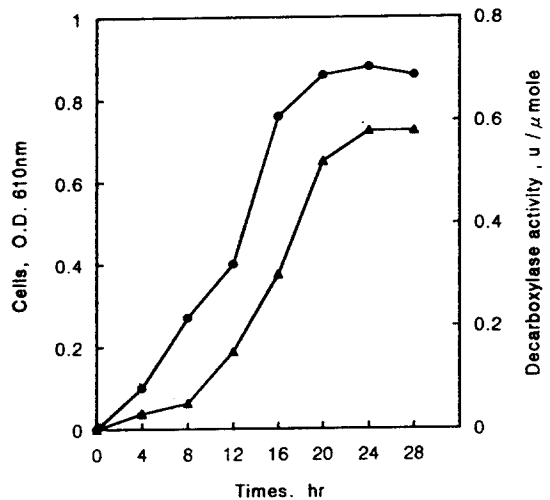


Fig. 3. Growth curve and gallate decarboxylase activity by *Pseudomonas sp.* KS-96. cell; ●-●, decarboxylase activity; ▲-▲.

Pseudomonas sp. KS-96을 배지에 접종하여 배양시간에 따른 gallate decarboxylase의 활성을 조사한 결과 배양 20시간에 decarboxylase의 활성이 증가하기 시작하여 24시간에서는 가장 높았으며 28시간 이후부터 약간 감소하였다.

Pseudomonas sp. KS-96 균체의 회전원판 부착 및 균체막의 두께

회전원판 반응조의 원판에 균체를 부착시키기 위하여 *Pseudomonas sp.* KS-96을 Jar fermentor(3l)에서 배양한 배양액은 회전원판반응조에 넣어 원판을 회전시키면서 별도로 배양액을 시간당 20ml씩 공급하면서 회전원판 반응조의 원판에 균체의 부착을 시도하였다. 회전원판 반응조에서 pyrogallol의 전환이 잘 되게 하기 위해서는 원판에 균체가 일정하게 부착되어야 한다. 즉 gallic acid에서 pyrogallol의 전환은 미생물막의 두께가 steady state(active thickness)에 도달하게 되면 일정수준으로 유지하게 된다. 이

active thickness는 기질인 gallic acid의 농도가 증가함에 따라 증가한다. 일단 미생물막의 두께가 기질이 확산되는 active thickness보다 두꺼워지게 되면 기질의 확산에 미치지 못하는 곳에 있는 미생물은 기질 전환에 관여할 수 없게 되므로 두께가 증가 하더라도 전환율에는 영향을 주지 않게 된다²⁵⁾. 그리고 Hoehn과 Ray²¹⁾는 미생물막은 기질의 부하율, 미생물의 증식단계, 기질의 유속에 따라 달라지며, 또한 미생물막의 두께가 400 μ m 이상일 때 준 정상상태(quasi-steady state)로 안정상태를 유지한다고 하였다. Mair²⁶⁾는 미생물막의 두께는 약 300 μ m에서는 기질제거율에 변화가 없고, 이는 고속유속과 고농도의 기질에도 적당하다고 하였다. 본 실험에서는 미생물막의 두께가 active thickness에 도달할때까지 균체를 원판에 고정시킨 후 pyrogallol의 전환을 시도하였다.

정상 상태에서의 pyrogallol로의 전환율

원판에 부착된 미생물막의 두께에 따라 전환율에 영향을 미치게 된다.^{21,26)} 본 실험에서는 gallic acid가 들어있는 주입액의 농도를 일정하게 유입시킬 때 steady-state까지의 경과 일수와 유출액중의 pyrogallol의 전환율을 검토해본 결과를 Fig. 4에 나타내었다. *Pseudomonas sp.* KS-96를

jar fermentor(3 ℓ)에서 24시간 배양시킨 후 회전원판 반응조에 넣어 균체를 부착시킨 다음 steady state 상태에서 계속해서 기질을 유입시켰을 때 6시간에는 gallic acid로부터 pyrogallol의 전환율이 약 59%를 나타내었으나 12시간에는 약 76%였고 18시간에는 80% 및 24시간에는 82%으로 높은 전환율을 나타내었다. 시간이 경과함에 따라 pyrogallol의 전환율은 약간 떨어지기 시작하여 30시간에는 80%를 나타내었으며 42시간에는 79%의 전환율을 나타내었다. 이 때 *Pseudomonas sp.* KS-96의 생균수는 6시간에 1.2×10^6 /ml이었으나, 18, 24, 30 및 36시간에는 1.0×10^9 /ml로 생균수의 농도가 증가하는 경향이였다. 이와 같이 전환율이 18시간부터 36시간까지 높아진 후 42시간부터 전환율이 약간 떨어지는 것은 장시간 반응할 때 회전원판에 부착되어 있는 균체가 붕괴되고 균체와 기질의 접촉이 떨어져 전환효소의 활성이 상대적으로 저하되기 때문이다.

반응조의 각 단계에서의 전환율

Pyrogallol의 연속적 생산을 위해 gallic acid이 들어있는 기질의 유량을 변화시키면서 회전원판 반응조의 4단계(stage)에 의한 pyrogallol의 전환율을 측정하는 것이 필요하다.

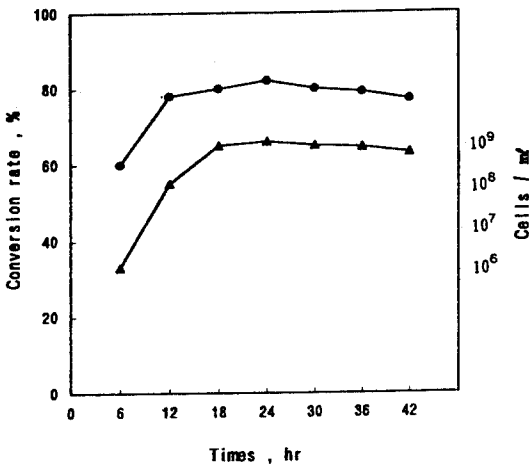


Fig. 4. Conversion rate of pyrogallol from gallic acid by *Pseudomonas sp.* KS-96 immobilized using rotating disc contactor. Viable cell, \blacktriangle - \blacktriangle , conversion rate, \bullet - \bullet .

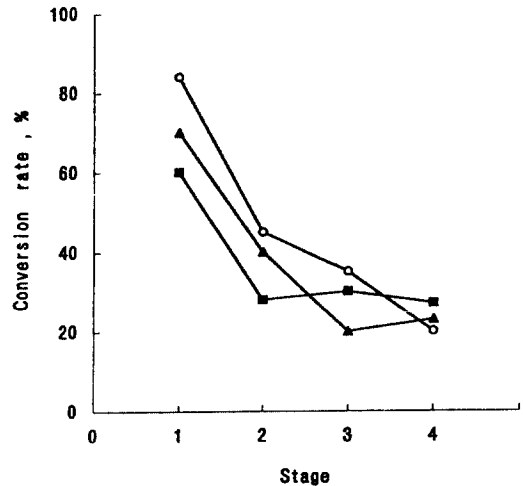


Fig. 5. Conversion rate of pyrogallol on the feeding rate of 20ml/h by *Pseudomonas sp.* KS-96 using the rotating disc contactor with gallic acid concentration. 10g/l; \circ - \circ , 15g/l; \blacktriangle - \blacktriangle , 20g/l; \blacksquare - \blacksquare .

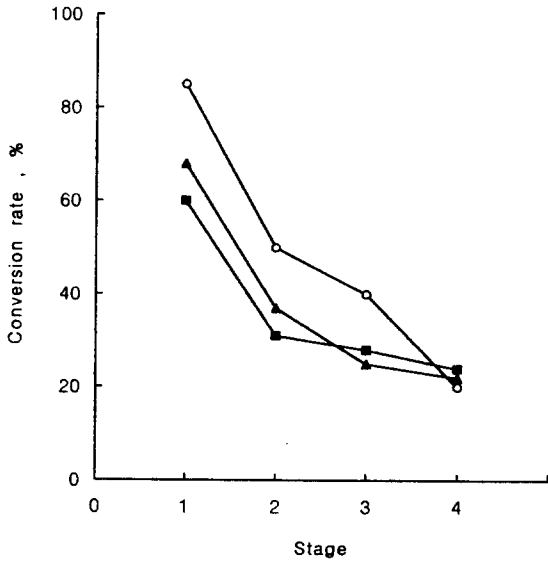


Fig. 6. Conversion rate of pyrogallol on the feeding rate of 30ml/h by *Pseudomonas sp.* KS-96 using the rotating disc contactor with gallic acid concentration. 10g/l; ○-○, 15g/l; ▲-▲, 20g/l; ■-■.

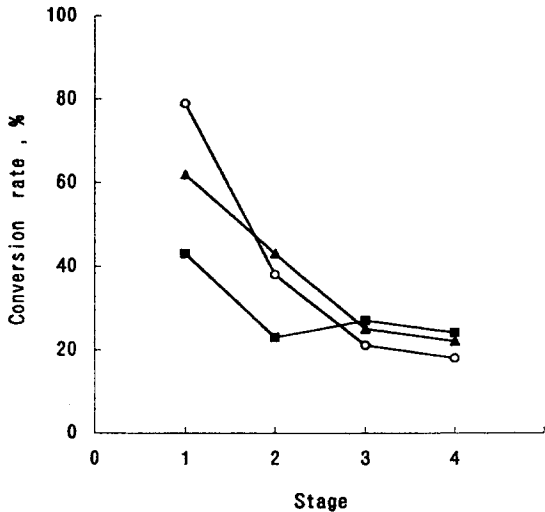


Fig. 7. Conversion rate of pyrogallol on the feeding rate of 40ml/h by *Pseudomonas sp.* KS-96 using the rotating disc contactor with gallic acid concentration. 10g/l; ○-○, 15g/l; ▲-▲, 20g/l; ■-■.

본 실험에서는 gallic acid의 농도를 각각 10, 15 및 20 g/l로 조절하여 배양액에 각각 넣은 후 배양액을 시간당 20ml, 30ml 및 40ml로 주입하면서 측정된 결과를 Fig. 5, 6 및 7에 나타내었다.

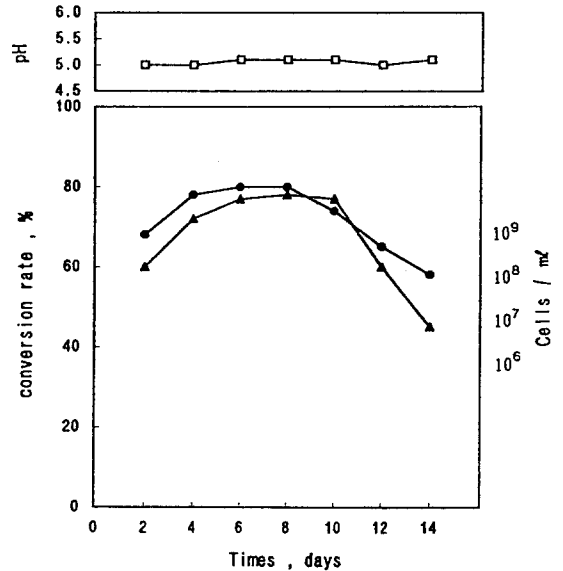


Fig. 8. Continuous conversion rate of pyrogallol from gallic acid on the feeding rate of 30ml/h by immobilized *Pseudomonas sp.* KS-96 using rotating disc contactor. Conversion rate; ●-●, cell; ▲-▲.

Gallic acid를 10g/l 함유한 배지를 시간당 20ml씩 공급 하였을 때 1단에서는 82%, 2단에서는 44%, 3단에서는 33% 그리고 4단에서는 22%의 전환율을 나타내었다. Gallic acid를 15g/l, 15g/l 및 20g/l을 시간당 30ml씩 주입하였을 때 1단계에서는 각각 84%, 67% 및 58%이었으나 2단계 및 3단계에서는 전환율이 점차 줄어들어, 4 단계에서는 10g/l, 15g/l 및 20g/l일 때 각각 19%, 20%, 22%로 감소되었다. 그러나 시간당 1단에서 40ml 주입 시 pyrogallol이 15g/l 농도에서는 79%, 20g/l에서는 60%가 전환되었고 4단에서는 18% 정도의 전환율을 나타내었으나 gallic acid가 20g/l에서는 전환율이 낮았다. Gallic acid의 농도가 낮을수록 분해율이 높은 것은 부착균체에 의한 전환작용이 원활이 일어나는 것으로 생각되며 농도가 높을수록 분해율이 낮은 것은 gallic acid의 농도에 비하여

균체의 전환작용이 낮은 것으로 생각된다. 그러므로 본 실험에서는 회전원판 반응조에 의한 연속적인 분해는 15g/ℓ의 gallic acid 함유액을 시간당 30ml씩 주입하는 것이 가장 효과가 있는 것으로 판단된다.

회전원판 반응조에 의한 연속적 전환

회전원판 반응조에 의한 pyrogallol의 연속적 전환조건은 앞의 실험결과에 따라 가장 전환율이 좋은 농도를 택하였다. Gallic acid의 농도를 15g/ℓ로 조절하고 기질의 주입량은 시간당 30ml씩 공급하면서 1단에서 4단을 통과하여 전환된 결과는 Fig. 8과 같다. Pyrogallol의 전환에 사용된 *Pseudomonas sp.* KS-96를 회전원판에 부착하여 균체가 steady state상태가 된 2일부터 전환율을 조사하였다. Gallic acid를 15g/ℓ의 농도를 첨가한 기질을 시간당 30ml 주입한 결과 회전원판 반응조를 통과하여 생성된 pyrogallol의 전환율은 2일째는 67%였으나, 4일째 77%, 6 및 8일째는 각각 81% 및 80%로 전환율이 가장 높았다. 그러나 10일째부터 전환율이 떨어지기 시작하여 12일째는 69%, 14일째는 55%로 나타났다. 유출수의 생균수는 6 및 8일째가 각각 1.0×10^9 /ml로 생육이 가장 왕성하였고, 14일째는 1.2×10^6 /ml로 생육이 급격히 낮았다. 이때 최적 pH변화는 5.0을 조절하여 시간에 따른 경시변화를 조사하였으나 큰 변화를 찾아볼 수 없었다.

요 약

Gallic acid로부터 pyrogallol로 전환하는 균주를 토양에서 분리 동정하여 얻은 *Pseudomonas sp.* KS-96의 균체를 회전원판 반응조에 고정화시킨 후 연속전환을 시도하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

Gallate decarboxylase의 활성은 배양 24시간에서 가장 좋았다. 반응조의 원판에 gallic acid가 함유된 액체 배양액을 시간당 20ml씩 공급하면서 균체막의 두께가 steady state에 도달할때까지 공급하였다. 균체를 고정화 시킨 후 시간 경과에 따른 전환율은 18시간부터 36시간에서 전환율이 높았다. 균체 고정화 후에 gallic acid를 15g/ℓ 함유하는 기질을 시간당 30ml씩 주입했을 때 pyrogallol의 전환율이 가장 좋았으며 회전원판 반응조에 의한 연속적 전환은 6일에서 8일까지가 각각 81%, 80%로써 가장 높았다.

참 고 문 헌

1. Raymond, E. K. and Othmer, D. F. : Pyrogallol, pp. 315~320, In *Encyclopedia of chemical Technology*, Vol. 2, The Interscience Encyclopedia Inc., New York (1953).
2. Happel, J. and Cauley, S. P. : Tannins and allied chemicals in mercaptan removal processes, *Ind. Eng. Chem.*, **39**, 1655-1659(1947).
3. Philip, N. B., Tebbutt, P. and Tyrrell, C. H. : Electrochemical immobilization of enzymes. 3. Immobilization of glucose oxidase in thin films of electrochemically polymerized phenols, *Anal. Chem.*, **64**, 138-142(1992).
4. Tanenbaum, S. W. and Bassett, E. W. : The biosynthesis of patulin related aromatic substances from *Penicillium patulum* strain 2159A, *Biochim. Biophys. Acta*, **28**, 21-31(1958).
5. Nishira, H. : Degradative metabolism of tannin by molds, *Kagaku*, **29**, 42-43(1959).
6. Kumar, R. A., Jayaraman, A., Lakshmanan, M. and Gunasekaran, P. : Bioconversion of gallic acid into pyrogallol by immobilized, *Citrobacter freundii* TB3, *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 159-162(1992).
7. Descamps, A. M., Mahoudeau, G., Conti, M. and Lebeault, J. M. : Bacteria degrading tannic acid and related compounds, *J. Ferment. Technol.*, **58**, 93-97(1980).
8. Grant, W. D. : Microbial degradation of condensed tannins, *Science*, **193**, 1137-1139(1976).
9. Aoki, K., R. Shnke, and H. Nishira : Purification and some properties of yeast tannase, *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 79-85(1976).
10. Ramachandran, A., Subramanian, V., Sugumaran, M. and C. S. : Vaidyanathan, Purification and properties of pyrocatechuate decarboxylase from *Aspergillus niger*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **5**, 421-425(1979).
11. Yoshida, H., Tani, Y. and Yamada, H. : Isolation and identification of a pyrogallol producing bacterium from soil, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2539-2546(1982).
12. 菊地護, 湯淺克己, 水澤清 : ピロガロールの製造法, 日本公開特許公報(A), 昭61-108393(1986).
13. 山本英津子, 植田宏 : 微生物によるピロガロール ピロカテコールもしくはそれらの誘導体の製造方法, 日本公開特許公報(A), 昭63-49088(1988).
14. Yoshida, H. and Yamada, H. : Microbial production of pyrogallol through decarboxylation of gallic acid, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 659-663(1985).

15. 안성만, *Pseudomonas* sp. 에 의한 pyrogallol의 생산, 경성대학교 석사학위논문, p. 1-46(1997)
16. Grant, D. J. W. and Patel, J. C. : Determination of each constituent in mixtures of catechol and protocatechuic acid, quinol and gentisic acid, phenol, and p-hydroxybenzoic acid and pyrogallol and gallic acid, *Anal. Biochem.*, **28**, 139-149(1969).
17. Pautuska, G. : Silica gel layer chromatography of phenols and phenolcarboxylic acid, *Anal. Chem.*, **179**, 355-358(1961).
18. Antonie, R. L. : Rotating biological contactors for second wastewater treatment. CUIP/wesner, Seminar, South lake Tahoe stateline, Nevada, 27-44(1976).
19. Shieh, W. K. : Mass transfer in rotating biological contactor, *Water Res.*, **16**, 1071-1074(1992).
20. Jennings, P. A. : Theoretical model for a submerged biological filter, *Biotec. Bioeng.*, **18**, 1249-1273(1976).
21. Hoehn, R. C. and Ray. A. D. : Effect of thickness on bacterial film, *J. Water pollut. Contr. Fed.*, **45**, 2302-2320(1973).
22. William, K. J. and McCarty, P. L. : Verification studies of the biofilm model for bacterial substrate utilization, *J. W PCF*, **48**, 281-291(1976).
23. Williamson, K. and Mccarty, P. L. : A model of substrate utilization by bacterial films, *J. WPCF*, **48**, 1-8(1976).
24. 植村定治郎, 相田浩 : 醱酵微生物 I, 朝倉書店, 東京初版(1971).
25. Charaddis, W. G. : Fouling biofilm development : process analysis, *Biotech. Bioeng.*, **23**, 1923-1960(1981).
26. Maier, W. J., Behn, V. C. and Gates, C. D. : Simulation of the tricking Filter process, *J. Sanitary Eng. ASCE*, **93**, 91-112(1967).