

## 논 토양에서 분리한 *Pseudomonas* sp. JK-7에 의한 Acrylamide의 생분해에 영향을 미치는 물리화학적 요인

천재우 · 호은미 · 오계현\*

순천향대학교 자연과학대학 생명과학부

논 토양에서 acrylamide의 분해능이 탁월한 세균 *Pseudomonas* JK-7를 분리하여 acrylamide의 생분해에 영향을 미치는 물리화학적 요인을 조사하였다. 초기 실험에서 acrylamide를 유일 탄소원과 질소원으로 하여 호기적 조건에서 성장할 수 있는 세균 JK-7을 논 토양표본에서 분리하였다. BIOLOG system을 이용한 생리학적 분석으로 *Pseudomonas* 속(genus)임을 확인하였고, 이 세균을 *Pseudomonas* sp. JK-7로 명명하였다. 분리 균주 JK-7은 50 mM acrylamide를 배양 72시간 이내에 완전히 분해하였다. 배양기간 중에 acrylamide 분해 중간대사 물질로서 acrylic acid가 나타나는 것을 HPLC를 통해 확인하였으며, 배양 초기에 배양액에 존재하지 않았던 ammonia가 배양기간 중에 관찰되었다. 배양 초기 pH는 7.0이었으나 acrylamide가 완전히 분해된 후 배양액의 최종 pH는 8.7이었다. Acrylamide 분해와 JK-7의 성장에 대한 pH의 영향을 조사한 결과, pH 5, pH 7 그리고 pH 9에서 성장과 분해가 이루어졌으나, pH 3과 pH 11에서는 거의 관찰되지 않았다. 부가 탄소원의 존재 하에서 JK-7에 의한 acrylamide 분해에서 glucose, fructose, citrate 또는 succinate를 각각 첨가하여 조사한 결과, 부가 탄소원이 없을 때보다 acrylamide 분해와 JK-7의 성장은 가속화되었다. 또한 부가 질소원 첨가에 따른 영향 조사 실험에서, yeast extract는 acrylamide 분해와 JK-7의 성장을 촉진시켰다. 그러나 다른 질소원인  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  그리고 urea는 성장과 분해에 본질적으로 큰 영향을 미치지 않았다. 금속이온에 대한 영향으로 배지내에  $\text{ZnSO}_4$ 를 첨가하였을 때 분해와 성장이 진행되었으나,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$  또는  $\text{HgCl}_2$ 를 첨가하였을 때 acrylamide 분해와 JK-7의 성장이 이루어지지 않았다.

**Key words** □ acrylamide, biodegradation, *Pseudomonas* sp. JK-7

Acrylamide는 무색의 투명 결정체이며 각종 화합물의 중합체와 산업 화합물의 첨가제로서 사용량이 크게 증가하고 있다. 특히 세계 각국의 연구기관에서 단백질의 구조와 기능을 연구하는데 사용되는 전기영동의 원료인 polyacrylamide의 중간체나 단일체로서 많이 사용되고 있으며, 플라스틱 제조와 석유 첨가제인 acrylonitrile의 생산 원료로도 널리 사용되고 있다(8, 9). Acrylamide는 acrylonitrile, methyl vinyl sulfone, *N,N*-dimethylacrylamide와 함께 구조적으로 관련이 있는 vinyl 화합물이다. 산업이 발달함에 따라 이런 종류의 vinyl 화합물들은 그 사용 범위가 점차 확대되고 있다(2). Vinyl 화합물들은 그들의 화학적 구조가 안정하며 자연에서 분해가 어려운 난분해성 물질로 화학적 독성이 강할 뿐 아니라 물에 대한 용해도와 이동성이 높기 때문에 자연 환경에 노출되었을 때 강우나 유실수에 의해 지하수, 하수, 하천 그리고 식물들을 오염시킬 수 있는 환경오염물질로 인식되고 있다(3, 14). Acrylamide는 polyacrylamide와 더불어 음용수 정화, 하수나 폐수 처리, 염료, 플라스틱, 접착제, 종이, 화장품, 렌즈 그리고 섬유 제조시에 들어가는 첨가제일 뿐만 아니라 방수제, 시멘트 결합제, 폭발물, 농약, 전기영동, 그리고 겔 크로마토그래피

등에서도 널리 사용되는 것으로 알려져 있다(9, 14, 16). Smith 등(17, 18)은 농약 계면 활성제로 사용되는 polyacrylamide가 자연 환경에 노출되었을 경우 자연적인 환경, 즉 온도, 빛, pH 등에 의해 acrylamide로 분해되어 지하수와 하천 등을 오염시킨다고 보고한 바 있다. Acrylamide는 스웨덴의 식품규격청(Swedish National Food Administration), 영국의 식품표준청(British Food Standard Agency) 그리고 세계보건기구(World Health Organization) 등에서 탄수화물이 풍부한 특정 식품을 120°C 이상에서 조리할 경우 Maillard 반응에 의해 높은 농도로 생성되어 식품 내에 축적되어진다고 보고하였다(12, 13, 19). 최근 연구에 따르면 acrylamide는 독성을 나타내어 인체에 섭취 및 흡입되면 중추신경계의 마비와 DNA 손상을 일으킬 수 있는 신경독소 물질로서 작용하여 동물에서 암을 유발시킬 수 있는 것으로 조사되었다(4, 5, 15). 이러한 결과를 바탕으로 국제 암 연구 협회(International Agency for Research on Cancer, IARC)는 acrylamide가 인간에서도 암을 일으킬 가능성이 있는 물질(probable human carcinogen)로 규정해 놓았다(3, 20).

Acrylamide의 생물학적 분해에 관한 연구는 많이 보고되어 있지 않다. 미생물에 의한 acrylamide의 분해는 *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. 또는 *Xanthomonas* sp. 등에서 연구되었다(9, 10). 그러나 세균이 고농도의 acrylamide에 노출되었을 경우에 세

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 041-530-1353, Fax: 041-530-1350  
E-mail: kyeheon@sch.ac.kr

균에 독성으로 작용하여, 3차 단백질을 안정화시키는데 관여하는 sulfhydryl protein의 활성을 저해하여 생장에 영향을 미치는 것으로 보고되었다(11). Acrylamide를 분해하는 미생물은 acrylamide를 유일 탄소원과 질소원으로 이용하며, acrylic acid와 ammonia로 분해되어 미생물 대사에 이용되는 것으로 알려져 있다(11, 16). 지금까지 미생물에 의한 acrylamide의 분해에 영향을 미치는 환경 요인에 대한 연구는 거의 이루어지지 않은 상태이다.

본 연구에서는 농화배양 기법으로 acrylamide의 분해능이 탁월한 *Pseudomonas* sp. JK-7을 분리하여 기질로서 acrylamide가 포함된 배지에서 이 균주의 생장과 acrylamide의 분해를 조사하였다. 분리 세균에 의한 acrylamide의 효율적인 분해와 분해의 최적화를 위한 목적으로 분해에 영향을 미치는 물리화학적 요인들로서 부가 탄소원 및 질소원, 여러 가지 금속 이온의 첨가, pH 등이 acrylamide의 분해능에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### Acrylamide 분해 세균의 분리 및 동정

충남 아산시 신창면 소재 논으로부터 채취한 토양 표본으로부터 농화 배양기법을 이용하여 acrylamide를 분해할 수 있는 미생물컨소시움을 획득하였다. 농화 배양에 사용된 배지는 증류수 1 L당 7.25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.74 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.81 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.14 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.8  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0.5  $\mu\text{M}$   $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2  $\mu\text{M}$   $\text{MoO}_3$ 에 50 mM의 acrylamide를 첨가한 배지를 사용하였다. 준비된 배지는 1 N NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 조절한 후, 고압 멸균하였다. 농화된 미생물컨소시움을 접종한 후 25°C에서 분당 160회로 회전하는 진탕 배양기에서 배양하였고, 미생물컨소시움으로부터 acrylamide를 포함하는 고체 평판 배지에 수 차례에 걸친 도말을 통하여 순수 배양을 분리하였다. 분리 세균의 생장은 분광광도계(V-550 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco Co., Japan)를 사용하여 파장 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

분리세균의 동정을 위하여 nutrient agar (Difco, Detroit, USA) 배지에 도말하여 단일 집락을 대상으로, 그람 염색 후 위상차 현미경으로 세균의 형태학적 특징 조사와 GN2 MicroPlate™ Identification System (BIOLOG, Hayward, USA)를 이용하여 동정하였다.

### Acrylamide와 Acrylic acid 분석 및 Ammonia 측정

Acrylamide와 acrylic acid의 분석을 위하여 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하였다. HPLC system은 SPD-10A UV/vis detector가 부착된 Shimadzu사의 LC-10AT 제품이었으며, DuPont사의 ZORBAX reverse phase ODS 컬럼 ( $\text{C}_{18}$ , 250 mm × 4.6 mm, 입자크기 5  $\mu\text{m}$ )을 사용하였다. Acrylamide와 acrylic acid 분석에 사용되는 UV/vis detector는 파장 220 nm에 맞추어 사용하였고, mobile phase는 HPLC용 증류수(Fisher Scientific Co., Pittsburgh, USA)와 methanol (Fisher Scientific Co., Pittsburgh,

USA)을 19:1(vol/vol)의 비율로 혼합하여 사용하였다. 이들 화합물의 표준용액은 pore 크기가 0.45  $\mu\text{m}$ 의 syringe filter로 여과하였으며, 20  $\mu\text{l}$  Hamilton syringe를 이용하여 HPLC injector내로 주사하였다. 배양액의 잔존 acrylamide의 분해를 측정하기 위하여 채취시료를 2,000 × g에서 10분간 원심분리한 후, HPLC용 증류수에 적당한 비율로 희석하여 pore 크기가 0.45  $\mu\text{m}$ 의 syringe filter로 여과하여 분석하였다.

Ammonia의 측정은 indophenol blue 방법(1)을 사용하였다. 채취 시료를 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과한 후 2.5 ml를 취하여, 100  $\mu\text{l}$ 의 페놀 용액과 100  $\mu\text{l}$ 의 sodium nitroprusside 용액을 첨가하였다. 여기에 100 ml의 alkaline citrate와 25 ml의 sodium hypochlorite solution을 혼합하여 만든 oxidizing solution을 250  $\mu\text{l}$  첨가하여 빛이 차단된 곳에서 1시간 동안 반응시킨 후, 흡광도 640 nm에서 측정하여 미리 작성한 검량선을 이용하여 ammonia의 양을 결정하였다.

### Acrylamide 분해에 미치는 다양한 환경요인 조사

Acrylamide의 분해에 미치는 다양한 환경요인을 알아보기 위하여 농도, 부가 탄소원 및 질소원, 금속이온, 그리고, pH의 변화에 따른 조사를 실시하였다. 먼저 acrylamide의 농도에 대한 JK-7의 분해능을 알아보기 위하여 각각 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM의 농도로 액체무기 배지를 제조하여 분해세균을 접종한 후, 배양기간동안 acrylamide의 농도에 대한 분해능과 생장을 관찰하였다. 부가 탄소원의 첨가에 따른 JK-7 생장과 acrylamide의 분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 50 mM의 acrylamide를 포함하는 배지에 glucose, fructose, citrate 또는 succinate를 최종 농도가 5 mM이 되도록 각각 첨가하여 acrylamide의 분해능과 균주의 생장을 관찰하였다. 또한 부가 질소원의 첨가에 따른 영향을 조사하기 위하여  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , urea 또는 yeast extract를 acrylamide가 포함된 배지에 최종 농도가 2 mM이 되도록 각각 첨가하여 acrylamide의 분해능과 생장을 비교 관찰하였으며, 금속이온에 따른 영향을 조사하기 위하여 acrylamide를 포함하는 배지에  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$  또는  $\text{ZnSO}_4$ 를 최종 농도가 0.1 mM이 되게 각각 첨가하고 acrylamide 분해능과 JK-7의 생장을 조사하였다. pH의 변화에 따른 영향을 알아보기 위하여 초기 pH를 1 N HCl과 1 N NaOH를 사용하여 pH를 각각 3, 5, 7, 9, 또는 11로 맞춘 후, 분해 세균을 접종하여 배양기간동안 초기 pH에 대한 acrylamide의 분해능과 균주의 생장을 비교 관찰하였다.

## 결과 및 고찰

### 분해세균의 분리 및 동정

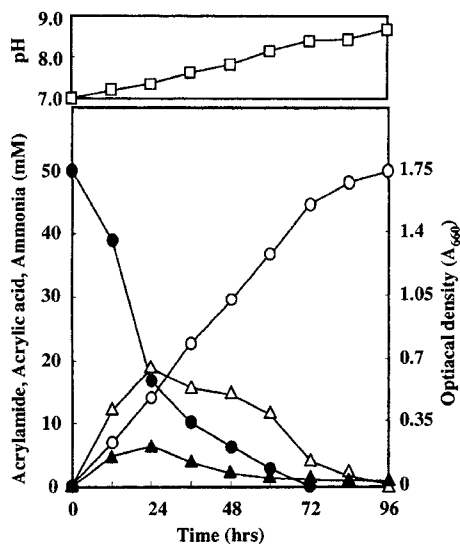
논에서 채취한 토양 표본으로부터 농화 배양기법으로 acrylamide를 분해하는 단일 세균을 분리하였다. 분리된 세균은 acrylamide를 포함하는 액체배지로 옮겨 배양온도 25°C에서 분당 160회로 회전하는 진탕 배양기에서 배양하며 생장과 acrylamide 분해를 확인하였다. 분리된 분해 세균은 짧은 간균의 형태이고,

그람 염색 결과 음성으로 판명되었으며, 집락의 색깔은 연노란색으로 불투명하였다.

이 세균의 자세한 특성은 BIOLOG Identification System에서 그람음성 세균의 동정에 사용되는 GN2 MicroPlate™를 이용하여 분석하였다(Table 1). 분석된 결과를 MicroLog™ database software를 이용하여 비교 분석하였고, 그 결과 분리된 균주는 *Pseudomonas* 속(genus)으로 동정되었으며, 본 연구에서는 이 분리 세균을 *Pseudomonas* sp. JK-7이라 명명하였다.

**분리세균의 성장과 acrylamide 분해**

Acrylamide를 포함하는 배지내에서 *Pseudomonas* sp. JK-7에 의한 acrylamide의 분해와 세균의 성장을 관찰하였다. 또한 배양 기간 중에 일어나는 pH 변화와 acrylic acid와 ammonia 생성을 관찰하였다. 배지내의 acrylamide 초기 농도는 50 mM 이었으며, 배양 3일만에 acrylamide는 완전히 분해되었다. 배양 24시간 이내에 acrylamide는 약 64% 감소하였으며, 이와 관련하여 이 기간 중에 배지 내 초기에 나타나지 않았던 acrylic acid와 ammonia가 관찰되었다. 중간대사산물로서 acrylic acid는 acrylamide의 분해가 진행되는 동안 점차 증가하기 시작하여 24시간이 경과된 후, 16.24 mM로 가장 높게 관찰되었고, 시간이 경과함에 따라 점차 감소하여 배양 후 96시간 이내에 배양액 내에서 완전히 사라졌다. Ammonia도 acrylic acid의 생성과 마찬가지로 같은 배양기간에 관찰되었으며, 24시간이 경과된 후 5.86 mM로 가장 높게 관찰되었으며, 이후 점차 감소하였으나, acrylic acid와는 달리 배양 기간 중에 완전히 사라지지 않았다. 배지내의 초기 pH는 7.0이었으나, 배양이 진행됨에 따라 계속 증가하여 acrylamide와 acrylic acid가 완전 분해된 96시간 후의 최종 pH는 측정 결과 8.7로 나타났다(Fig. 1). 배양에 따른 pH의 증가는 acrylamide가



**Fig. 1.** Growth of test culture, *Pseudomonas* sp. JK-7, measured as cell density at 660 nm (○), associated with degradation of 50 mM acrylamide (●), formation of acrylic acid (△) and ammonia (▲), and pH (□).

**Table 1.** Physiological and biological characterization of the strain JK-7 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests	Physiological & biochemical tests	
Water	- P-Hydroxyphenylacetic acid	+
α-Cyclodextrin	- Itaconic acid	+
Dextrin	- α-Ketobutyric acid	+
Glycogen	+ α-Ketobutaric acid	+
Tween 40	+ α-Ketovaleric acid	+
Tween 80	+ D,L-Lactic acid	+
N-Acetyl-D-galactosamine	- Malonic acid	+
N-Acetyl-D-glucosamine	- Propionic acid	+
Adonitol	- Quinic acid	+
L-Arabinose	+ D-Saccharic acid	+
D-Arabitol	+ Sebacic acid	-
Cellobiose	- Succinic acid	+
i-Erythritol	- Bromo succinic acid	+
D-Fructose	+ Succinamic acid	+
L-Fucose	- Glucuronamide	+
D-Galactose	- Alaninamide	+
Gentiobiose	- D-Alanine	+
α-D-Glucose	+ L-Alanine	+
m-Inositol	- L-Alanyl glycine	+
α-D-Lactose	- L-Asparagine	+
Lactulose	- L-Aspartic acid	+
Maltose	- L-Glutamic acid	+
Maltose	- L-Glutamic acid	+
D-Mannitol	+ Glycyl-L-aspartic acid	-
D-Mannose	- Glycyl-L-glutamic acid	-
D-Melibiose	- L-Histidine	+
β-Methyl D-glucoside	- Hydroxy-L-proline	-
Psicose	- L-Leucine	+
D-Raffinose	- L-Ornithine	-
L-Rhamnose	- L-Phenylalanine	+
D-Sorbitol	- L-Proline	+
Sucrose	- L-Pyroglutamic acid	+
D-Trehalose	- D-Serine	-
Turanose	- L-Serine	+
Xylitol	- L-Threonine	+
Methylpyruvate	+ D,L-Carnitine	+
Mono-methylsuccinate	+ γ-Aminobutyric acid	+
Acetic acid	+ Urocanic acid	-
cis-Aconitic acid	+ Inosine	-
Citric acid	+ Uridine	-
D-Galactonic acid lactone	- Phenylethylamine	-
D-Galacturonic acid	+ Putrescine	+
D-Gluconic acid	+ 2-Aminoethanol	+
D-Glucosaminic acid	- 2,3-Buthanediol	-
D-Glucuronic acid	+ Glycerol	+
α-Hydroxybutyric acid	+ D,L-α-Glycerolphosphate	-
β-Hydroxybutyric acid	+ Glucose-1-phosphate	-
γ-Hydroxybutyric acid	+ Glucose-6-phosphate	-

분해되면서 생성되는 중간 대사물질인 ammonia에 의한 작용인 것으로 여겨진다.

Shanker 등(16)은 *Pseudomonas* sp.를 이용한 연구에서 7.8 mM의 acrylamide를 6일 동안 분해하여 acrylic acid와 ammonia가 생성됨을 확인하였고, acrylamide 분해 과정 중에 생성된 acrylic acid와 ammonia는 30일 내에 모두 분해되어진다고 보고하였다. 또한 Wang 등(21)은 *Pseudomonas stutzeri*를 이용한 acrylamide 분해 연구에서 4.2 mM의 acrylamide를 23시간 동안 분해한다고 보고한 바 있다. 이러한 연구를 비교하여 볼 때, 본 연구에서 사용된 균주 JK-7은 50 mM acrylamide를 96시간동안 완전히 분해함으로써 acrylamide의 분해능이 매우 탁월한 것으로 판단된다.

**Acrylamide 분해에 영향을 미치는 환경요인**

(1) 농도에 따른 영향

다양한 농도에 따른 acrylamide의 분해능을 측정하기 위하여 각각 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM의 acrylamide가 첨가된 배지에서 배양하여 JK-7의 성장과 acrylamide의 분해를 조사하였다. 25 mM과 50 mM의 acrylamide 농도에서는 각각 36시간과 72시간 이내에 acrylamide를 완전히 분해하였으며, 75 mM의 acrylamide 농도에서는 132시간 이내에 acrylamide를 모두 분해하였다. 그러나 동일한 조건에서 100 mM의 acrylamide는 주어진 배양기간 동안 약 10%정도 분해되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 JK-7이 acrylamide를 분해할 수 있는 능력에도 불구하고, 높은 농도에서는 acrylamide의 독성으로 인하여 생존율이 감소할 수 있음을 제시해 주고 있다.

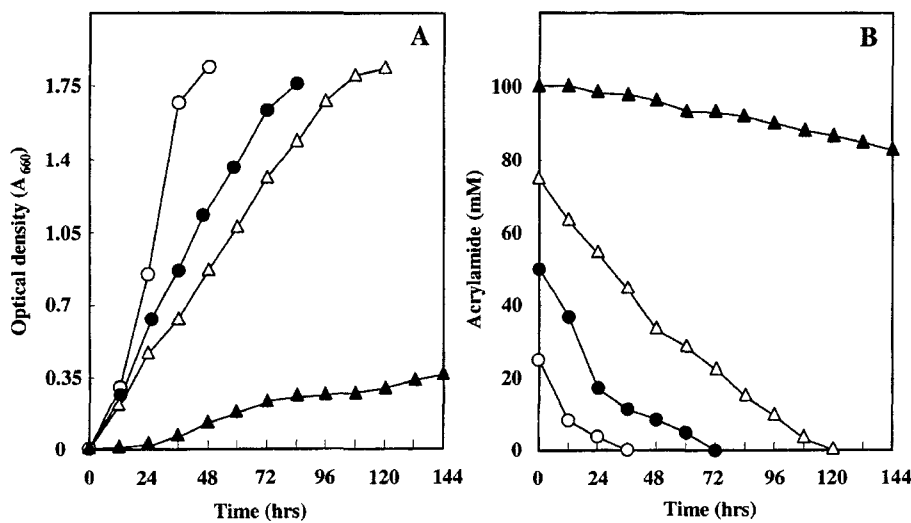
(2) pH 변화에 따른 영향

Acrylamide를 포함하는 배지에서 균주 JK-7의 성장과 acrylamide의 분해에 pH가 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 균주 JK-7은

pH7에서 빠르게 성장하였고, acrylamide의 분해도 pH7에서 72시간 내에 가장 빠르게 이루어졌다. pH5와 9에서는 중성의 pH보다 성장과 분해가 오래 걸렸지만 각각 84시간과 108시간 이내에 acrylamide를 완전히 분해하였다. 그러나 강산성인 pH3과 강염기성인 pH11에서는 균의 성장과 분해가 모두 이루어지지 않았다. 따라서 균주 JK-7은 pH7에서 성장과 분해능이 뛰어난 것으로 확인되었다(Fig. 3). Nawaz 등(11)은 *Rhodococcus* sp.를 이용하여 acrylamide 분해에 미치는 pH 영향 조사에서 pH7인 경우에 약알칼리인 pH8이나 8.5보다 더 빠르게 acrylamide를 분해한다고 보고한 바 있는데 이는 본 연구에서 얻어진 결과와 유사하였다.

(3) 부가 탄소원 첨가에 따른 영향

부가 탄소원으로 glucose, fructose, citrate, 또는 succinate를 acrylamide가 포함된 액체 무기 배지에 최종 농도가 5 mM이 되도록 첨가하여 acrylamide 분해와 균주의 성장에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 4). 부가 탄소원으로 fructose가 첨가된 경우, 부가 탄소원이 첨가되지 않은 상태보다 24시간이 빠른 48시간 이내에 acrylamide를 완전히 분해하였다. 또 glucose, citrate 또는 succinate를 부가 탄소원으로 첨가하였을 경우, 부가 탄소원이 첨가되지 않은 상태보다 12시간 빠른 60시간 이내에 acrylamide를 완전히 분해하였다. 본 연구에서 부가 탄소원이 첨가되었을 때 나타나는 공통된 현상으로 24시간내의 acrylamide 분해는 약 23-26% 정도였지만, 부가 탄소원을 첨가하지 않은 경우는 68%의 acrylamide가 감소하는 것으로 조사되었다. 또한 부가 탄소원이 첨가된 경우 24시간이후부터 acrylamide는 급격히 감소하는 것으로 관찰되었다. 이는 부가 탄소원이 첨가되었을 경우, 일차적으로 부가 탄소원을 이용하여 분해세균이 성장하고, 그 후 개체수가 증가한 분해세균이 acrylamide를 신속하게 분해하는 것으로 판단된다.



**Fig. 2.** Growth of the test culture of *Pseudomonas* sp. JK-7 (A) and the degradation of acrylamide (B) at different acrylamide concentrations. The media were adjusted at 25 mM (○), 50 mM (●), 75 mM (△), and 100 mM (▲), respectively.

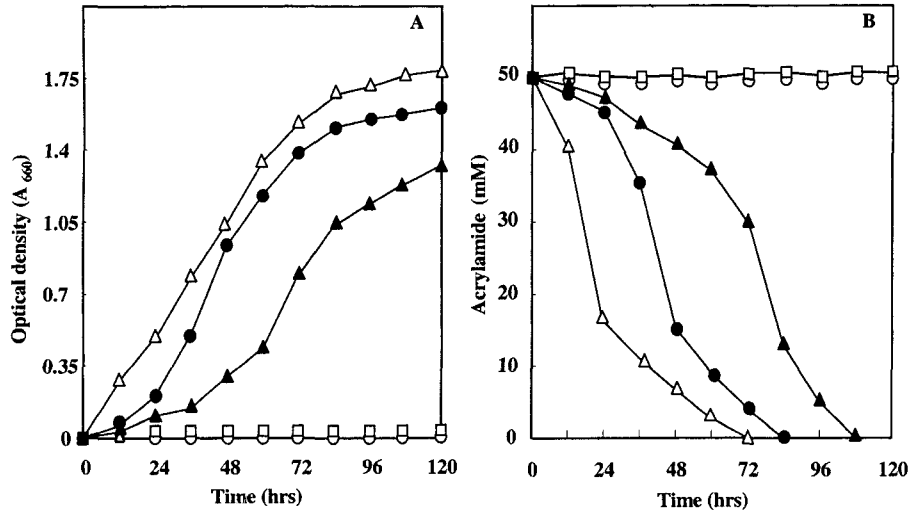


Fig. 3. Growth of the test culture of *Pseudomonas* sp. JK-7 (A) and the degradation of acrylamide (B) at different pHs. The media were adjusted at the pH 3 (○), pH 5 (●), pH 7 (△), pH 9 (▲) and pH 11 (□), respectively. Initial concentration of acrylamide was 50 mM.

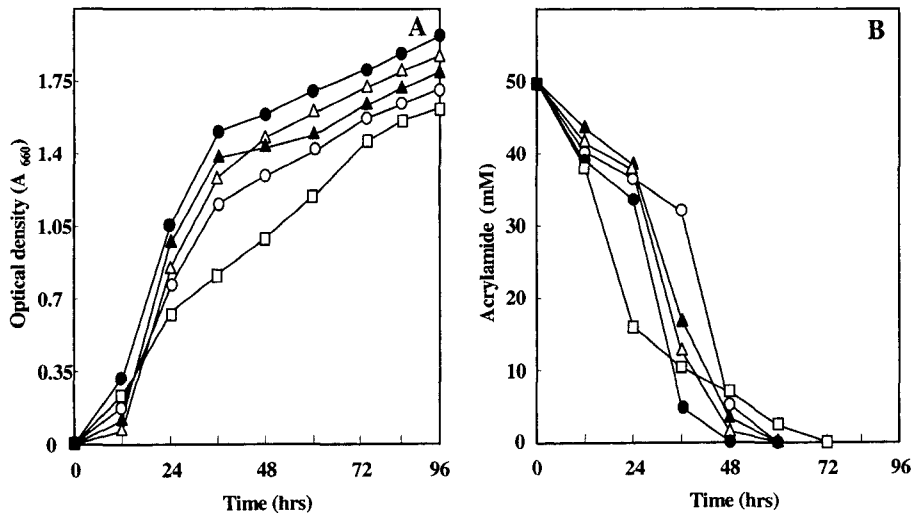


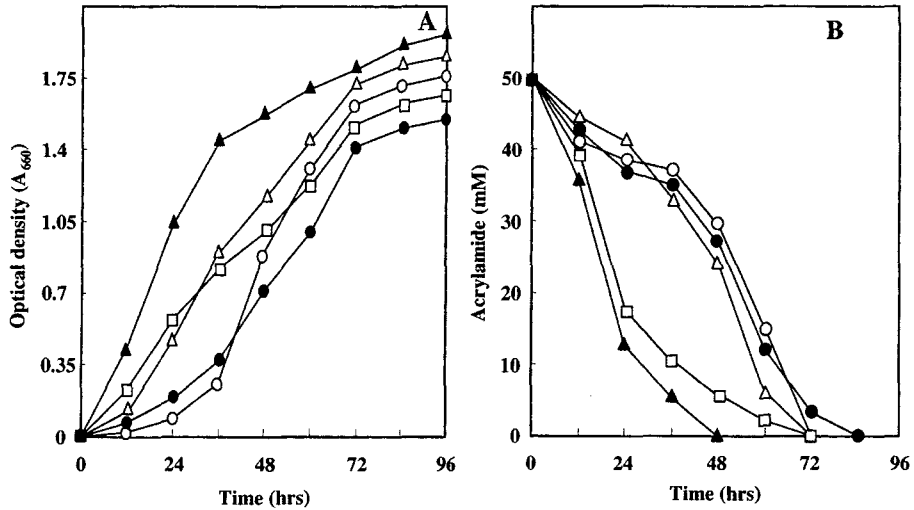
Fig. 4. Growth of the culture of *Pseudomonas* sp. JK-7 (A) and the degradation of acrylamide (B) in the presence of supplemented carbons - 5 mM each of glucose (○), fructose (●), citrate (△) and succinate (▲). No supplemented carbon source was added in the medium (□). Initial concentration of acrylamide was 50 mM.

(4) 부가 질소원 첨가에 따른 영향

Acrylamide가 포함된 액체 무기 배지에 부가 질소원으로  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $NH_4Cl$ , urea 또는 yeast extract를 최종 농도가 2 mM이 되도록 첨가하여 acrylamide 분해와 균주의 생장에 미치는 영향을 비교, 관찰하였다. Yeast extract가 부가 질소원으로 첨가된 경우, 부가 질소원이 첨가되지 않은 것보다 JK-7의 생장이 빠른 것으로 관찰되었으며, acrylamide도 yeast extract가 첨가되지 않은 것보다 24시간이 빠른 48시간 이내에 모두 분해되는 것으로 확인되었다. 부가 질소원으로 urea가 포함된 것과 부가 질소원이 포함되지 않은 것에서 JK-7의 생장은 비슷하게 나타났지만, acrylamide의 분해는 오히려 부가 질소원이 포함되지 않은 것에서 초기의 분해능이 더 뛰어난 것으로 관찰되었다.

$(NH_4)_2SO_4$  또는  $NH_4Cl$ 이 부가 질소원으로 포함된 배양에서 acrylamide의 분해는 거의 비슷하게 진행되었으나, 최종 분해된 시간은 각각 72시간과 84시간으로  $NH_4Cl$ 이 좀더 오래 걸리는 것으로 나타났다(Fig. 5). 부가 질소원의 첨가에 따른 acrylamide의 분해능에 대한 조사에서 yeast extract가 첨가된 배양에서는 acrylamide의 분해가 촉진되었고, 다른 부가 질소원이 첨가된 배양에서는 acrylamide 분해에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다.

Kahng 등(7)은 aniline을 유일한 탄소원과 질소원으로 이용하는 세균인 *Burkholderia* sp. HY1에 대한 실험에서 부가질소원으로 peptone을 첨가된 배양이 어떤 부가 질소원도 첨가하지 않은 배지에 비하여 약 1.7배의 분해능이 촉진되었음을 보고하였다.



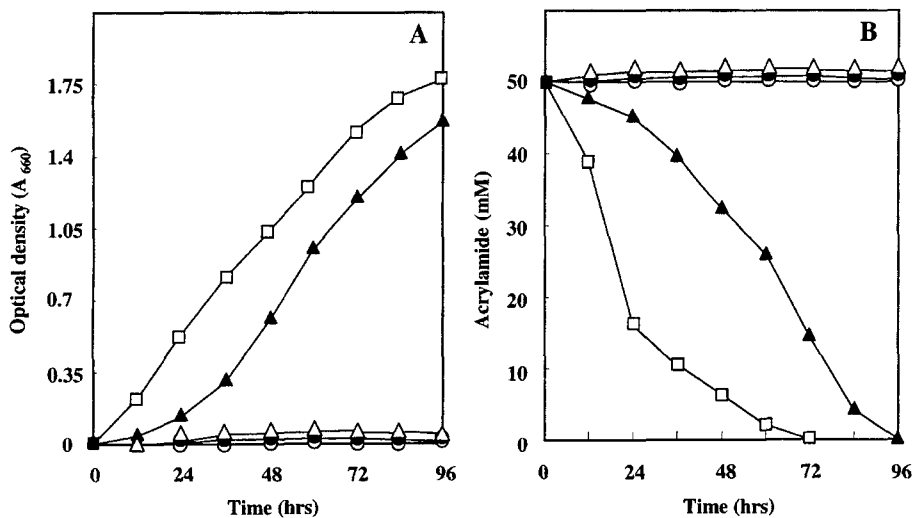
**Fig. 5.** Growth of the culture of *Pseudomonas* sp. JK-7 (A) and the degradation of acrylamide (B) in the presence of supplemented nitrogens - 2 mM each of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (○), NH<sub>4</sub>Cl (●), urea (△) and yeast extract (▲). No supplemented nitrogen source was added in the medium (□). Initial concentration of acrylamide was 50 mM.

본 연구에서 부가질소원 실험을 위하여 사용된 yeast extract는 peptone과 마찬가지로 질소성 화합물 뿐만아니라 아미노산과 비타민 등의 다양한 growth factor를 포함하여 분해세균이 성장과 대상 기질의 분해에 영향을 주는 것으로 사료된다.

(5) 금속 이온에 따른 영향

일반적으로 acrylamide 관련 산업폐수에는 여러 가지 금속 이온들이 포함되어 있어 분해세균 JK-7이 금속 이온으로서 0.1 mM의 AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub> 또는 ZnSO<sub>4</sub>가 각각 첨가된 배양액에서 나타내는 acrylamide의 분해와 JK-7의 성장에 미치는 영

향을 관찰하였다. ZnSO<sub>4</sub>를 첨가한 배양에서 JK-7의 생장은 첨가되지 않은 것보다 낮은 성장율을 나타냈고, acrylamide는 금속 이온이 첨가되지 않은 것보다 24시간이 지연된 96시간 내에 완전히 분해되었다. 그러나, AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub> 또는 HgCl<sub>2</sub>이 포함된 배양에서는 acrylamide가 전혀 분해되지 않았으며, JK-7의 생장이 모두 억제되는 것으로 나타났다(Fig. 6). Nawaz 등(11)은 *Rhodococcus* sp.를 이용하여 acrylamide 분해에 미치는 환경요인 조사에서 Fe<sup>2+</sup>과 Ba<sup>2+</sup>을 제외한 Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 그리고 Co<sup>2+</sup>와 같은 중금속이 acrylamide 분해를 완전히 억제한다고 보고한바 있다. 이는 본 실험에서 사용한 JK-7에서도 같은 결과가 나온 것으로



**Fig. 6.** Growth of the culture of *Pseudomonas* sp. JK-7 (A) and the degradation of acrylamide (B) in the presence of metal ions - 0.1 mM each of AgNO<sub>3</sub> (○), CuSO<sub>4</sub> (●), HgCl<sub>2</sub> (△), and ZnSO<sub>4</sub> (▲). No metal ion was added in the medium (□). Initial concentration of acrylamide was 50 mM.

일부 금속이 acrylamide의 분해와 JK-7의 생장을 억제하는 것으로 판단된다.

Acrylamide는 다양한 산업에서 널리 사용되어 자연환경에 유출시 잘 분해가 되지 않고, 물에 대한 용해성이 높기 때문에 하천이나 호수 등을 오염시켜 생물에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다(9, 17). 지금까지 acrylamide의 생분해와 관련된 연구는 매우 미흡한 상태이다. 본 연구를 통하여 농약에 오염된 토양에서 분리된 *Pseudomonas* sp. JK-7은 환경오염원으로 작용하는 acrylamide를 고농도에서도 분해할 수 있는 것으로 확인되었으며, acrylamide 생분해에 영향을 미치는 물리화학적 요인을 조사하여 acrylamide의 생분해에 대한 최적 조건을 조사하였다. 본 연구에서 얻어진 연구결과를 응용하여 acrylamide 뿐만 아니라 polyacrylamide의 생분해에 영향을 미치는 물리화학적 요인을 최적화시켜 오염된 토양이나 수계 환경에서 이들 화합물들을 효과적으로 제거할 수 있다고 기대된다. 향후 분리세균 *Pseudomonas* sp. JK-7에 대하여 acrylamide의 분해에 관여하는 유전자나 효소에 대한 연구를 통하여 그 특성 규명 실험이 진행될 것이다.

### 참고문헌

- Aminot, A., D.S. Kirkwood, and R.K. Crouel. 1997. Determination of ammonia in seawater by the indophenol-blue method: Evaluation of the ICES NUTS I/C 5 questionnaire. *Mar. Chem.* 56, 59-75.
- Chapatwala, K.D., M.S. Nawaz, J.D. Richardson, and J.H. Wolfram. 1990. Isolation and characterization of acetonitrile utilizing bacteria. *J. Ind. Microbiol.* 5, 65-69.
- Friedman, M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of Acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4504-4526.
- Hagmar, L., M. Tornqvist, C. Nordander, I. Rosen, M. Bruze, A. Kautiainen, A. Magnusson, B. Malberg, P. Aprea, F. Granath, and A. Axmon. 2001. Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health* 27, 219-226.
- Kadry, A.M., M.A. Friedman, and M.S. Abdel-Rahman. 1999. Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rat. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 7, 127-133.
- Kagayama, T., and T. Ohe. 1990. Purification and properties of an aromatic amidase from *Pseudomonas* sp. GDI 211. *Agric. Biol. Chem.* 54, 2565-2571.
- Kahng, H.Y., J.J. Kukor, and K.H. Oh. 2000. Physiological and phylogenetic analysis of *Burkholderia* sp. HY1 capable of aniline degradation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 643-650.
- Nawaz, M.S., W. Franklin, W.L. Campbell, T.M. Heinze, and C.E. Cerniglia. 1990. Metabolism of acrylonitrile by *Klebsiella pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* 156, 231-238.
- Nawaz, M.S., W. Franklin, and C.E. Cerniglia. 1993. Degradation of acrylamide by immobilized cells of a *Pseudomonas* sp. and *Xanthomonas maltophilia*. *Can. J. Microbiol.* 39, 207-212.
- Nawaz, M.S., A.A. Khan, J.E. Seng, J.E. Leakey, P.H. Siltanen, and C.E. Cerniglia. 1994. Purification and characterization of an amidase from an acrylamide-degrading *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3343-3348.
- Nawaz, M.S., S.M. Billedeau, and C.E. Cerniglia. 1998. Influence of selected physical parameters on the biodegradation of acrylamide by immobilized cells of *Rhodococcus* sp. *Biodegradation* 9, 381-387.
- Mottram, D.S., B.L. Wedzicha, and A.T. Dodson. 2002. Food chemistry: acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* 419, 448-449.
- Mucci, L.A., P.W. Dickman, G. Steineck, H.O. Adami, and K. Augustsson. 2003. Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney, and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden. *Brit. J. Cancer* 88, 84-89.
- Lande, S.S., S.J. Bosch, and A.M. Abouzam. 1997. Degradation and leaching of acrylamide in soil. *J. Environ. Qual.* 8, 133-137.
- Paulsson, B., J. Grawe, and M. Tornqvist. 2002. Haemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or *N*-methylolacrylamide treatment. *Mutat. Res.* 516, 101-111.
- Sharker, R., C. Ramakrishna, and P.K. Sethi. 1990. Microbial degradation of acrylamide monomer. *Arch. Microbiol.* 154, 192-198.
- Smith, E.A., S.L. Prues, and F.W. Oehme. 1996. Environmental degradation of polyacrylamides I. Effects of artificial environmental conditions: temperature, light, and pH. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 121-135.
- Smith, E.A., S.L. Prues, and F.W. Oehme. 1997. Environmental degradation of polyacrylamides II. Effects of artificial environmental (outdoor) exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 37, 240-244.
- Stadler, R., I. Blank, N. Varga, F. Robert, J. Hau, P. Gay, M. Robert, and S. Riediker. 2002. Food chemistry: acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* 43, 419-450.
- Tareke, E., P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson, and M. Tornqvist. 2000. Acrylamide a cooking carcinogen? *Chem. Res. Toxicol.* 13, 517-522.
- Wang, C.C., and C.M. Lee. 2001. Denitrification with acrylamide by pure culture of bacteria isolated from acrylonitrile-butadiene-styrene resin manufactured wastewater treatment system. *Chemosphere* 44, 1047-1053.

(Received 9 February 2004, Accepted 8 March 2004)

---

**ABSTRACT : Effect of Several Physicochemical Factors on the Biodegradation of Acrylamide by *Pseudomonas* sp. JK-7 Isolated from Paddy Soil****Jae-Woo Chun, Eun-Mi Ho, and Kye-Heon Oh\*** (Department of Life Science, Soon-chunghyang University, P.O. Box 97, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea)

The purpose of this work was to investigate the relationships between acrylamide degradation by *Pseudomonas* sp. JK-7 and several relevant physicochemical environment parameters. In initial experiments, the bacterial culture, strain JK-7 isolated from paddy soil sample was developed to grow aerobically with acrylamide as the sole source of carbon and nitrogen. The bacterium was identified as genus *Pseudomonas* in the basis of use BIOLOG test, and designated as *Pseudomonas* sp. JK-7. Strain JK-7 could degrade 50 mM acrylamide completely within 72 hours of incubation. Major intermediates resulting from acrylamide degradation were not detected with the HPLC methodology except acrylic acid which appeared to accumulate transiently in the growth medium. The pH increased from 7.0 to 8.7 with complete degradation of the initial 50 mM acrylamide within 72 hours of incubation. pH control in the range of 5 to 9 influenced the growth of JK-7 and acrylamide degradation, whereas it was not examined the growth and degradation at pH 3 or pH 11, respectively. The effect of supplemented carbons (*e.g.*, glucose, fructose, citrate, succinate) on the acrylamide degradation by the test culture of JK-7 was evaluated. The results indicated that the addition of carbons accelerated the bacterial growth and acrylamide degradation compared to those in the absence of supplemented carbons. The effect of supplemented nitrogens on the degradation was monitored. Increasing concentrations of yeast extract resulted in higher growth yield, based on the turbidity measurement, and complete degradation of acrylamide. However, acrylamide degradation was essentially uninfluenced by the addition of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , or urea. Addition of  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4$  or  $\text{HgCl}_2$  except  $\text{ZnSO}_4$  in the test culture inhibited the degradation of acrylamide and growth of JK-7.