

## 세균 *Pseudomonas* sp. YK-32 균주에 의한 Formaldehyde 분해 최적조건

김영목 · 이윤경 · 김경란<sup>1</sup> · 이은우<sup>2</sup> · 이명숙<sup>1\*</sup>  
부경대학교 식품공학과, <sup>1</sup>부경대학교 미생물학과, <sup>2</sup>동의대학교 생명응용학과

## Optimum Conditions of Formaldehyde Degradation by the Bacterium *Pseudomonas* sp. YK-32

Young-Mog KIM, Yun-Kyoung LEE, Kyoung-Lan KIM<sup>1</sup>, Eun-Woo LEE<sup>2</sup>  
and Myung-Suk LEE<sup>1\*</sup>

Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

<sup>2</sup>Department of Life Biotechnology, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

Formaldehyde, an indoor volatile organic compound, is considered toxic due to its carcinogenic risk. Recently, we isolated a formaldehyde-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. YK-32. A crude enzyme prepared from YK-32 also degraded formaldehyde, suggesting that YK-32 cells have formaldehyde hydrogenase activity which is one of the important factors in formaldehyde degradation. The formaldehyde hydrogenase activity was increased 1.25 fold by adding 0.1% glucose and formaldehyde to the culture medium. In addition, treatment with 1 mM EDTA as a permeabilizer promoted the degradation of formaldehyde and increased the enzymatic activity.

Key words: Degradation, Formaldehyde, Formaldehyde dehydrogenase

### 서 론

최근 경제성장과 더불어 산업화와 도시화가 빠르게 진행되면서 산업시설의 증가와 인구 집중화, 교통량의 증가 등은 도시의 대기오염을 악화시키고 있다 (Tobin et al., 1992). 또한 현대인들은 사무실, 가정 등의 실내생활공간에서 오랜 시간 생활하게 되는데 일반적으로 실내공기 중에는 휘발성 유기화합물, 일산화탄소, formaldehyde, 부유분진, 질소산화물 등의 여러 가지 오염물질들이 실외보다 높은 수준으로 존재한다 (Lee, 1997). 특히, 이와 같은 실내오염물질 중 발암성 및 자극성을 띠는 formaldehyde의 유해성이 알려지면서 주요 관리대상으로 다루어지고 있으며 (Schoenberg and Mitchell, 1975), 또한 formaldehyde는 주로 일반주택 및 공공건물에 많이 사용되는 단열재인 건축자재, 실내용구의 칠, 가스난로 등에서의 연소과정, 접착제, 흡연 등에서 발생될 뿐만 아니라, 약, 화장품 및 음식물의 방부제 등으로 그 사용범위가 광범위함은 이미 조사 보고되고 있다 (Obee and Brown, 1995; Pawel et al., 1999; Kim et al., 2000; Jeon et al., 2006). Formaldehyde는 잠재적인 발암성 추정물질이며 새집증후군 (sick house syndrome), 빌딩증후군 (sick building syndrome), 화학물질과민증 (multiple chemical syndrome) 등의 주요 원인물질로 부각되고 있다 (Tepper et al., 1995; Ha, 2004). 또한 관련 증상으로는 농도가 1 ppm 또는 그 이상에서 눈, 코, 목의 이상 증상을 초래하는

것으로 보고되어지고 있으며 (Schoenberg and Mitchell, 1975), 두통, 어지러움, 눈물을 흘리게 되고 장기간 노출된 경우는 피부에 알레르기성 접촉성 피부염 및 습진을, 호흡기에는 기침, 천식, 가래, 만성기관지염 등을 일으키며, 생식기에 대한 영향으로는 자연유산과 저체중아 출산, 임신 중독증 등을 유발하게 된다 (Shim and Kim, 2006). 현재 우리나라에서는 2004년 5월에 기존 지하생활공간 공기질 관리법이 다중 이용시설 등의 실내 공기질 관리법으로 전문 개정·시행됨에 따라 실내 공기질 중 formaldehyde 단기 최대 허용치를  $120 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (약 100 ppb)로 재정하여 이미 formaldehyde에 대한 관리를 시작했으나 (Jeon et al., 2006), 이러한 규제조치에도 불구하고 밀폐된 작업장과 실내생활공간에서의 formaldehyde에 대한 노출이 빈번히 발생하고 있다.

현재 유기독성 물질로 오염된 지역의 환경 친화적인 복원 방법으로는 미생물 또는 미생물이 생산하는 효소를 이용한 생물학적 분해 방법 (bioremediation)이 가장 친환경적인 방법으로 여겨지고 있다 (Kim et al., 2004; Choi et al., 2006; Kim et al., 2007). 따라서 본 연구에서는 작업장 및 실내 환경에서 가장 문제가 되고 있는 formaldehyde 방출의 문제점을 개선하기 위한 방안중의 하나로서 미생물을 이용한 친환경적인 분해 방법을 통한 formaldehyde에 오염된 작업장 및 실내 환경의 환경 복원 기술을 제시하기 위하여 실시하였다. 이를 위해서 환경으로부터 분리된 formaldehyde의 분해력이 높은 미생물을 이용하여 formaldehyde 분해를 위한 최적조건을 조사하였다.

\*Corresponding author: mslee@pknu.ac.kr

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

부산시 기장군 기장읍 인근의 하천저질에서 분리한 formaldehyde 분해능이 우수한 *Pseudomonas* sp. YK-32를 실험에 사용하였다. 분리된 세균의 formaldehyde 분해를 알아보기 위하여 10 g peptone, 5 g beef extract, 1 g  $K_2HPO_4$ , 5 g NaCl 및 1 mL trace element [L당 0.5 g  $B(OH)_3$ , 0.04 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0.2 g  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.04 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ]를 증류수 1 L에 녹인 배지를 기본배지 (basal medium: BM)로 사용하였다. BM배지에 glucose, formaldehyde 등과 같은 첨가물을 여과멸균 ( $0.45 \mu m$ )하여 첨가하였다.

### 분리 균주의 formaldehyde dehydrogenase 활성 측정

Formaldehyde의 분해에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 formaldehyde dehydrogenase 활성을 조사하기 위해 먼저 조효소액을 준비하였다. 조효소액은 formaldehyde를 함유한 배지에서 배양한 균체를 원심 집균하고, 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 세척하여 동일 buffer에 재현탁한 다음, 초음파 세포 파쇄기 (Ultrasonics Ltd., UK)로 30초씩 2회 파쇄한 후, 12,000×g에서 원심분리하여 얻은 상등액을  $0.2 \mu m$  filter로 여과한 액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액 500  $\mu L$ 에 100  $\mu L$ 의 12.5 mM NAD와 100  $\mu L$ 의 10 mM glutathione을 첨가하여 30초간 배양한 후, formaldehyde를 12.5 mM이 되도록 첨가하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 조효소액의 비활성 (specific activity, Unit)은 1분 안에 1  $\mu mol$ 의 NAD를 환원시킬 수 있는 효소의 양으로 정의하였고 Bradford 법 (1976)으로 단백질 농도를 조사하였다.

### 분리균주의 조효소액에 의한 formaldehyde 분해능 조사

0.1%의 formaldehyde가 첨가된 BM배지에서 30°C, 30시간 배양한 세포를 파쇄하여 얻은 조효소액 500  $\mu L$ 에 100  $\mu L$ 의 12.5 mM NAD와 100  $\mu L$ 의 10 mM glutathione을 첨가하여 30초간 배양한 후, formaldehyde를 0.04%가 되도록 첨가하여 340 nm에서 흡광도를 측정하여 formaldehyde의 감소 여부를 확인하였다.

### 배양조건 별 formaldehyde의 분해도 측정

분리균 *Pseudomonas* sp. YK-32에 의한 formaldehyde의 분해는 BM배지에 균주를 일정 농도의 formaldehyde 및 첨가물을 첨가한 조건별로 배양하면서 조사하였다. 일정한 시간 간격으로 배양액을 무균적으로 꺼내어  $0.45 \mu m$  여과막으로 여과한 후 acetylacetone method를 사용하여 다음과 같이 측정하였다. Nash reagent (L당 30 g ammonium acetate, 0.4 mL acetylacetone 및 0.6 mL glacial acetic acid) 2 mL에 배양여액 0.1 mL를 첨가하여 60°C에서 5분 간 배양한 다음 증류수를 넣어 전체 양을 10 mL로 조절한 후, 412 nm에서 흡광도를 측정하여 formaldehyde 분해 정도를 조사하였다.

### Formaldehyde dehydrogenase 활성에 미치는 기질 농

### 도의 영향

Formaldehyde dehydrogenase의 활성에 영향을 미치는 기질 농도의 영향을 조사하기 위하여 BM배지에 glucose 및 formaldehyde를 조건별로 첨가한 후, 분리균을 접종하여 30°C에서 30시간 배양한 다음 조효소액을 만들어 효소활성을 측정하였다.

### Formaldehyde의 분해에 영향을 미치는 투과제 처리

Formaldehyde의 세포내 투과성을 높여 분해를 촉진시키기 위해 분리된 세균에 투과제를 처리하였다. 사용된 투과제는 EDTA와 triton X-100 그리고 toluene/ ethanol (v/v, 1:4)을 사용하였으며 처리방법은 다음과 같다. 먼저 formaldehyde가 첨가된 BM배지에서 30°C에서 30시간 배양한 배양액 50 mL를 원심분리하여 균체만 모은 후 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)로 씻어낸 다음 같은 buffer 10 mL에 재현탁시켰다. 이 현탁액에 500  $\mu L$ 의 toluene/ethanol (v/v, 1:4), 100  $\mu L$  triton X-100 및 1 mM의 EDTA를 각각 첨가하여 10분간 vortex 하였다. 반응 후에 동일 buffer로 세척하여 투과제가 완전히 제거된 균체를 모아 0.04% formaldehyde가 첨가된 동일 buffer에 접종하여 formaldehyde 농도의 변화 및 formaldehyde dehydrogenase 활성 변화를 측정하였다. 또한 투과제 처리가 균체의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 formaldehyde 측정이 끝난 시료의 생균수를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### *Pseudomonas* sp. YK-32의 조효소액에 의한 formaldehyde 분해

세포내에서 formaldehyde는 formaldehyde dehydrogenase의 분해작용에 의해 formate로 전환되고 formate는 다시 formate dehydrogenase의 작용에 의하여  $CO_2$ 로 분해되는 것으로 알려져 있다 (Dorsey and Actis, 2003). 따라서 분리균 YK-32균주에 의해 formaldehyde가 분해된다는 결과를 보다 정확하게 판단하기 위하여 *Pseudomonas* sp. YK-32로부터 얻은 조효소액을 0.04%의 포름알데히드가 첨가된 buffer에 넣고 농도변화를 조사하였다. 그 결과 반응 3시간 만에 formaldehyde의 농도는 약 50% 정도 감소되었으며 6시간 후에는 약 75% 감소되었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 분리균 YK-32가 formaldehyde의 분해에 중요한 역할을 담당하는 formaldehyde dehydrogenase 활성을 보유하고 있다는 것을 의미한다.

### Formaldehyde dehydrogenase 활성에 미치는 formaldehyde의 영향

이상의 결과에서 분리균 YK-32가 formaldehyde의 분해에 중요한 역할을 담당하는 formaldehyde dehydrogenase 활성을 보유하고 있는 것으로 추정되어 이 효소의 활성의 증가는 formaldehyde 분해활성의 증가를 의미한다. 따라서 분리균 YK-32균주에서 formaldehyde dehydrogenase의 활성 증가에 미치는 기질의 영향을 조사하였다. 우선, 분리균 YK-32균주

Table 1. Effects of formaldehyde and glucose on the activity of formaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas* sp. YK-32. Cells were cultured at 30°C for 30 hrs in the basal medium containing each substrate. Data are the averages of duplicate experiments. \*FA, formaldehyde

	Concentration of substrate					
	0.1% Glucose			0.5% Glucose		
	0.04% FA*	0.1% FA	0.2% FA	0.04% FA	0.1% FA	0.2% FA
Absorbance at 340 nm	0.939	1.266	0.978	1.407	1.298	0.991
Protein conc. ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	1,965.2	4,400.5	3,450.5	5,069.5	4,438.0	3,307.0
Specific activity (Unit)	27.1	33.8	28.6	18.4	32.3	33.6

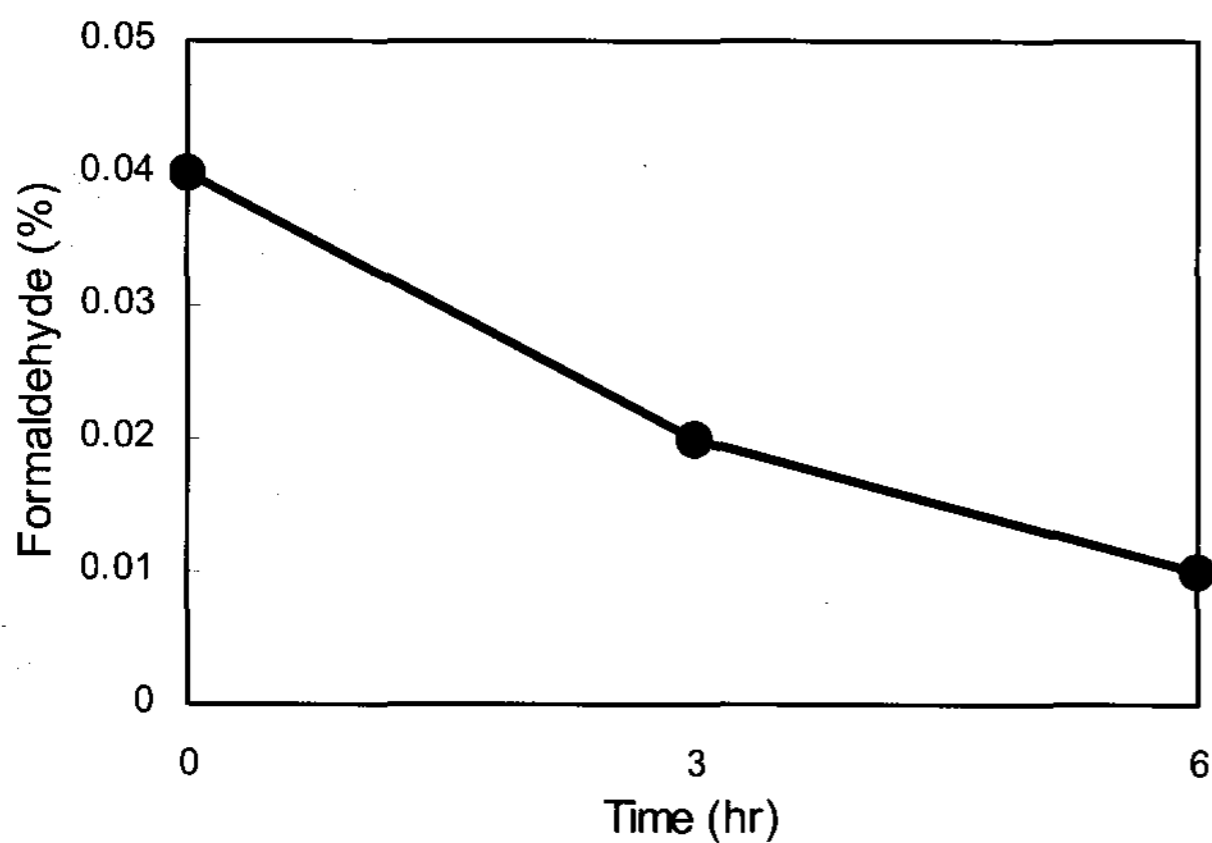


Fig. 1. Formaldehyde degradation by crude enzyme prepared from *Pseudomonas* sp. YK-32. Crude enzyme prepared from cells, which were cultured at 30°C for 30 hrs in the basal medium containing 0.1% formaldehyde. Reaction mixture was consisted with 500  $\mu\text{L}$  of crude enzyme, 100  $\mu\text{L}$  of 12.5 mM NAD, 100  $\mu\text{L}$  of 10 mM glutathione, and 0.04% of formaldehyde. After 30 sec reaction, samples were taken at the indicated times. The formaldehyde concentration was then measured by monitoring spectrophotometrically at 340 nm. Data are the averages of duplicate experiments.

의 formaldehyde dehydrogenase 활성에 영향을 미치는 탄소원 (glucose 및 formaldehyde)에 대해 조사하였다 (Table 1). 여분의 탄소원으로 0.1% glucose를 첨가한 배양 조건에서는 0.1% 이하의 formaldehyde 농도는 YK-32의 증식에 영향을 미치지 않으나 0.2% formaldehyde는 오히려 생장을 억제시키는 것으로 나타났다. 또한 0.1%의 formaldehyde 농도에서 효소활성이 가장 높은 것으로 나타났고 0.2%로 formaldehyde 농도를 높이더라도 뚜렷한 활성 증가는 관찰되지 않았다. 0.5%의 glucose를 첨가한 배양 조건에서도 0.2% formaldehyde에서 상대적인 생육 저하가 관찰 되었으나 이 농도에서 효소활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합한 결과 *Pseudomonas* sp. YK-32에 의한 formaldehyde dehydrogenase 효소 생산을 위한 최적조건은 0.1% glucose와 0.1% formaldehyde인 것으로 나타났다 (약 1.25배 증가).

#### 투과제 처리에 의한 formaldehyde 분해능 향상

Formaldehyde는 세포막 수송에 의해 세포내로 수송된 다음 세포질에 존재하는 formaldehyde dehydrogenase의 작용에 의

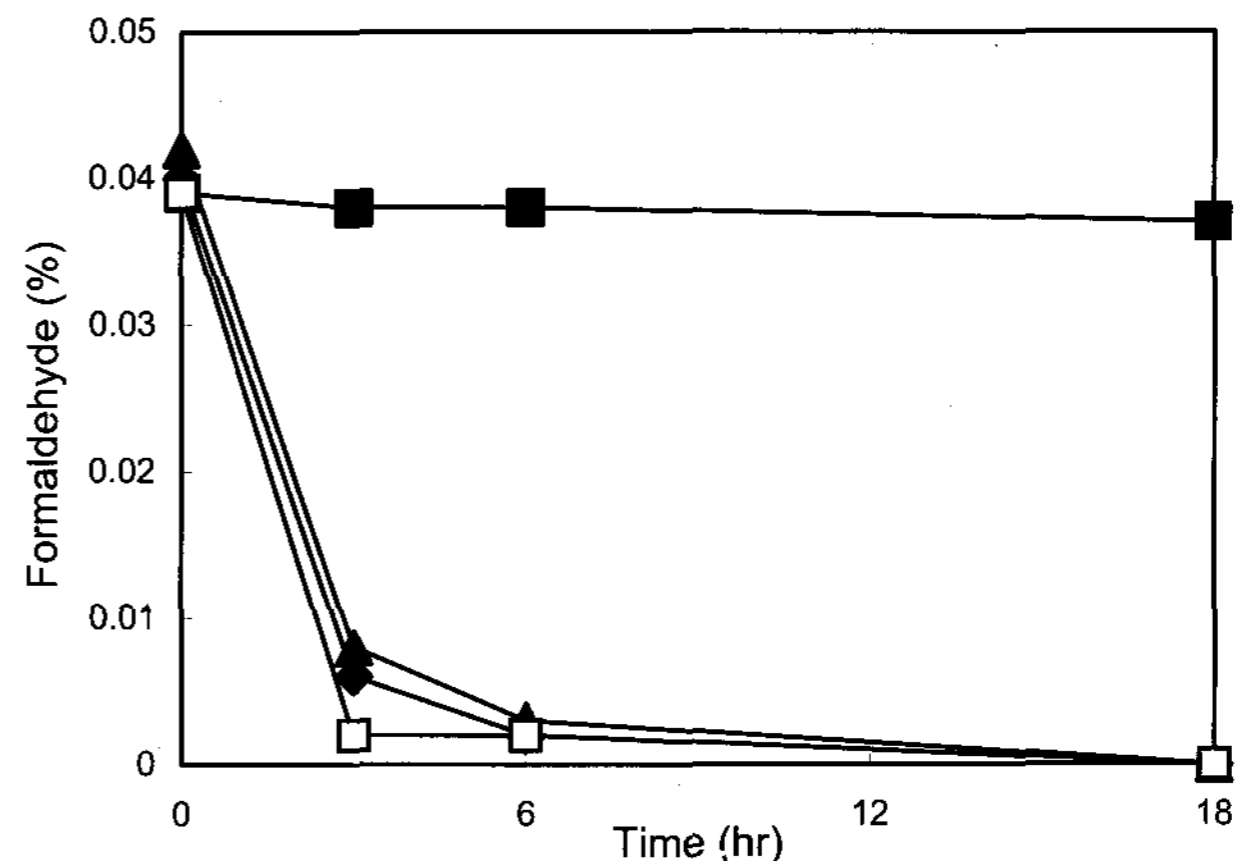


Fig. 2. Formaldehyde degradation by *Pseudomonas* sp. YK-32 treated with variable permeabilizers. Cells were cultured at 30°C for 30 hrs in the basal medium containing 0.04% formaldehyde. After harvest, cells were resuspended into 10 mL of 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5). Then, 500  $\mu\text{L}$  of toluene/ethanol (T/E; v/v, 1:4), 100  $\mu\text{L}$  of triton X-100 and 1 mM EDTA were added, and then treated for 10 min with vortex. After the treatment, the permeabilizers were removed by washing with the same buffer. The formaldehyde concentration was measured as described in Fig. 1. Data are the averages of duplicate experiments. -◆-, control; -■-, T/E; -▲-, triton X-100; -□-, 1 mM EDTA.

Table 2. Viable cell count of *Pseudomonas* sp. YK-32 after the treatment of variable permeabilizers. Conditions of culture and treatment of permeabilizer were described in Fig. 2. After the treatment, the permeabilizers were washed by the same buffer. After 18 hrs incubation at 30°C, viable cells were counted by the standard plate method. Data are the average of duplicate experiments

Permeabilizers			
Control	Toluene/ethanol	Triton X-100	EDTA
$2.9 \times 10^4$	<30	$3.1 \times 10^4$	$2.6 \times 10^4$

해 formate로 분해된다. 따라서, 적절한 막 투과제를 병용해서 사용하게 된다면 formaldehyde의 세포내 수송이 증진 되어 빠른 시간내에 분해될 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 가능성을 조사하기 위해서 분리된 세균에 투과제를 병행 처리한 후, YK-32 균체에 의한 formaldehyde 분해 효과를 조사하였다 (Fig. 2). 대조구와 비교했을 때, EDTA의 처리는 formaldehyde

Table 3. Effect of EDTA concentration on the formaldehyde dehydrogenase activity of *Pseudomonas* sp. YK-32. Cells were cultured at 30 °C for 30 hrs in the basal medium containing 0.04% formaldehyde with or without EDTA as a permeabilizer. Conditions of culture and treatment of permeabilizer were described in Fig. 2. Data are the average of duplicate experiments

	EDTA concentration (mM)					
	0	0.5	1	3	5	10
Protein conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	2,667.3	2,748.5	2,809.1	2,607.6	2,175	2,466.7
Specific activity (Unit)	20.6	24.4	28.1	19.3	16.4	12.2

분해 효과를 증대시키는 것으로 나타났다. 반면, 균체를 toluene/ethanol (v/v, 1:4)으로 처리한 경우에는 formaldehyde를 전혀 분해시키지 못하였다. 이는 유기용매 처리가 균체 자체에 영향을 주어 균의 손상이나 사멸을 일으키는 것으로 여겨졌으며, Table 2에 나타난 생균수 결과는 이를 뒷받침하는 것으로 나타났다. 하지만 triton X-100이나 EDTA 처리의 경우에는 대조구와 비교하였을 때 생균수의 큰 차이가 없어 YK-32 균주의 생육에는 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다. 따라서 투과제로 formaldehyde 제거 효과가 가장 큰 EDTA를 병행 처리하여 사용하기로 결정하였고 이후 EDTA의 농도에 따른 영향을 조사하였다.

#### Formaldehyde dehydrogenase 활성에 미치는 EDTA 농도의 영향

*Pseudomonas* sp. YK-32 균체에 다양한 농도의 EDTA로 처리한 후에 formaldehyde dehydrogenase 효소 활성을 측정하는 결과를 Table 3에 나타내었다. 1 mM 이하의 농도에서는 농도의존적으로 처리하지 않은 대조구에 비해 효소활성이 증가하는 것으로 나타났으나 1 mM 이상의 농도에서는 오히려 효소활성이 감소하는 것으로 나타났다. 즉, 1 mM EDTA로 균체를 처리했을 때 formaldehyde 분해 효과가 가장 좋은 것으로 나타났다. 단백질량의 경우 대조구와 EDTA 처리구 사이에 큰 차이가 없는 것으로 조사되어 1 mM 이상의 고농도의 EDTA는 formaldehyde dehydrogenase 효소활성을 감소시키는 요인으로 작용한 것으로 여겨진다. 본 연구에서 보고한 바와 같이 유해물질인 formaldehyde를 분해할 수 있는 미생물을 선발하고 그 특성을 잘 이용한다면, 건축 및 설비자재의 제조 과정에서 생성된 formaldehyde로 인해 오염된 실내공기를 완화시킬 수 있을 것으로 여겨진다

#### 사 사

이 논문은 2007년도 NURI 사업 (해양바이오식의약 전문인력양성사업)에 의하여 지원 되었으며 이에 감사드립니다. 또한 2007년도 Brain Busan 21사업의 지원에도 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

- Choi, J.H., T.K. Kim, Y.M. Kim, W.C. Kim, K. Park and I.K. Rhee. 2006. Cloning and characterization of a gene cluster for cyclohexanoneol oxidation in *Rhodococcus* sp. TK6. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 511-518.
- Dorsev, C.W. and L.A. Actis. 2003. Analysis of pVU3695, a plasmid encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase activity and formaldehyde resistance in the *Escherichia coli* VU3695 clinical strain. *Plasmid*, 51, 116-126.
- Ha, K.C. 2004. Characteristics of formaldehyde concentrations in the underground spaces in Gyeongnam Province. *Kor. J. Environ. Health*, 30, 353-375.
- Jeon, B.K., K.C. Choi and J.M. Suh. 2006. Development for UV/TiO<sub>2</sub> photocatalytic oxidation indoor air compound process. *J. Environ. Sci.*, 15, 855-864.
- Kim, Y.M., K. Park, G.J. Joo, E.M. Jeong, J.E. Kim and I.K. Rhee. 2004. Glutathione-dependent biotransformation of the fungicide chlorothalonil. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4192-4196.
- Kim, Y.M., K. Park, G.J. Joo, E.M. Jeong, J.E. Kim and I.K. Rhee. 2007. Cloning and characterization of a catechol-degrading gene cluster from 3,4-dichloroaniline degrading bacterium *Pseudomonas* sp. KB35B. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4722-4727.
- Kim, Y.S., J.D. Lee, C.M. Lee, S.W. Yoon and Y.S. Choi. 2000. A study air pollution in indoor gymnasiums. *Kor. J. Environ. Health Soc.*, 26, 3, 32-37.
- Lee, S.I. 1997. A study on airborne concentration of formaldehyde in underground environments in Taegu city. *J. Kor. Soc. Environ. Admin.*, 3, 49-66.
- Obee, T.N. and R.T. Brown. 1995. TiO<sub>2</sub> photocatalysis for indoor air application, effect of humidity and trace contaminants levels on the oxidation rate of formaldehyde, toluene and 1,3-butadiene. *J. Environ. Technol.*, 29, 5-9.
- Pawel, W., D.P. Wyon, Y.K. Baik, G. Clausen and P.O. Finger. 1999. Perceived air quality, sick building syndrome (SBS) symptoms and productivity in an office with two different pollution loads. *Indoor Air*, 9, 165-179.
- Schoenberg, J.B. and C.A. Mitchell. 1975. Airway disease

- caused by phenolics (phenol-formaldehyde) resin exposure. *Arch. Environ. Health*, 30, 572-577.
- Shim, S.H. and Y.S. Kim. 2006. Characterization and assessment of indoor air quality in newly constructed apartments-volatile organic compounds and formaldehyde. *Kor. J. Environ. Health*, 32, 275-281.
- Tepper, J.S., V.C. Moser, D.L. Costa and M.A. Mason. 1995. Toxicological and chemical evaluation of emission from carpet samples. *Am. Ind. Hyg. Assoc.*, 52, 158-170.
- Tobin, R.S., M. Bourgeau, R. Otson and G.C. Wood. 1992. Residential indoor air quality guidelines. *Indoor Environ.*, 2, 267-275.
- 
- 2008년 1월 8일 접수  
2008년 3월 31일 수리