

난분해성 할로겐 치환 Phenol의 분해

이 건 · 이상준 · 이종근

부산대학교 미생물학과

Biodegradation of Recalcitrant Halogen Substituted-Phenol

Geon Lee, Sang Joon Lee and Jong Kun Lee

Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University

ABSTRACT : Halogen substituted-phenol and analog phenol degrading strains were identified as *Aeromonas*, *Moraxella*, and *Flavobacterium* genus. Optimal degrading condition was generally 50~100 μ M substituted-phenol as carbon source, NH_4NO_3 as nitrogen source, 30°C, and initial pH 7.2. *p*-Chlorophenol degrading strain of *Aeromonas* sp. C4 had biodegradability to the various substituted-phenols. *Flavobacterium* sp. M9 had substrate specificity to methyl substituted-function. Catechol was cleaved by catechol 1,2-dioxygenase in *Aeromonas* sp. C4, *Moraxella* sp. N7, and *Flavobacterium* sp. M9.

Keywords : Halogen substituted-phenol, *Aeromonas*, *Moraxella*, *Flavobacterium*, Catechol 1,2-dioxygenase

I. 서 론

농약에 사용되는 대개의 화합물들은 인간이 자연계에 없던 새로운 화합물(xenobiotics)을 합성하여 사용하는데, 그 중 할로겐화 화합물은 자연 환경에 유출시 이들의 난분해성, 독성 및 유독한 중간대사산물로 변환됨에 따라 환경오염원으로 작용하여 자연 생태계 파괴와 인간의 건강을 위협하고 있다.¹⁻³⁾

할로겐화 화합물은 주로 제초제, 플라스틱제품, 용매 및 degraders 등으로 광범위하게 사용된다. 그 중 대표적으로 문제시된 염화 화합물(chlorinated compounds)을 보면 1,1,1-trichloro-2,2-bis(β -chlorophenyl) ethane(DDT), 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid(2,4,5-T), pentachlorophenol(PCP)이며 이외의 농약 및 수 많은 산업용매 등에 할로겐화 화합물이 사용되고 있다.⁴⁾ Phenol 관련화합물 오염의 예를 들면, 최근 경북 구미에서 발생되었던 phenol 유출 사고로 인해 낙동강에 서식하는 어패류의 폐사와 수생생태계의 항상성 유지에도 어려움을 주며, 낙동강을 상수원으로 하는 하류일대의 수도수에 불쾌한 맛과 악취를 주었으며 잠재적 발암위험성까지

내포하고 있다.⁵⁾ 그의 발암성 물질인 trichloroethylene(TCE)의 지하수 오염문제 등도 있다.⁴⁾ 이러한 할로겐화 유기화합물이 자연계에 유출되면 생물분해의 경우에는 미생물의 분해능에 의존하고 있으나 난분해성 물질들의 대량 유출과 새로운 치환체 화합물들이 계속 생성됨으로 인해 문제의 심각성이 더해진다.

따라서 이러한 물질들의 생분해에 관한 연구를 통한 생물학적 처리 및 생물전환(biotransformation)의 기초과학적 자료를 얻고자 하는 노력들이 진행되고 있다. 따라서 본 연구는 할로겐화 유기화합물 중에서 독성 및 난분해성을 야기하는 할로젠족 원소들이 치환된 phenol(halogen-substituted phenol) 및 기타 유사체인 *p*-methylphenol과 *p*-nitrophenol에 대한 생분해능을 가진 균주를 토양 및 수계에서 분리하여 이들 균주의 분류학적인 위치, 생물반응조에서의 최적 분해조건, 치환체별에 대한 분해특성과 치환 phenol의 개환에 관여하는 catechol dioxygenase 활성 등을 검토하여 이런 난분해성 물질의 분해를 위한 기초자료를 얻고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 치환체 phenol 분해균의 분리 및 배지

본 논문은 91년도 부산대학교 대학부설연구소 학술연구조성비에 의하여 연구된 것임.

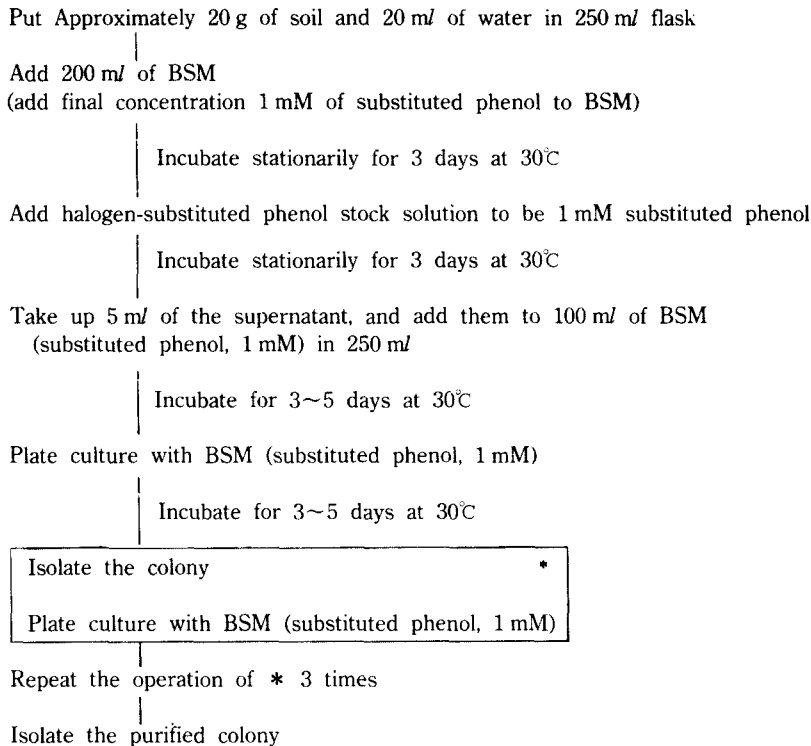


Fig. 1. Isolating method of halogen substituted-phenol degrading strains.

경남 및 부산 근교의 화폐 및 채소단지의 토양 표면을 걷어내고 깊이 2~8 cm 가량의 지표토부분 토양을 플라스틱의 원통용기를 사용하여 간이법인 대각선상 등간격 채토법⁶⁾으로 7개소의 토양을 약 1 kg씩 채토하고 채취한 토양시료와 낙동강 하구연 하류수계, 도시하수 및 공장폐수가 혼입되는 합류 지점에서의 물을 약 200 ml씩 채수하여 분리용 시료로 사용하였다. 분리용 배지는 K_2HPO_4 , 1.6 g; KH_2PO_4 , 0.4 g; NH_4NO_3 , 0.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.025 g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.0023 g; 증류수, 1/l로 조성된 기본배지(basal salts medium, BSM)¹⁾에 탄소원 및 에너지원으로 Sigma제품의 p -chlorophenol, Fluka제품의 p -bromophenol, p -iodophenol과 다른 치환체 phenol인 p -methylphenol 및 p -nitrophenol을 여과멸균(0.45 μ m, Whatman membrane filter) 하여 최종농도가 1 mM되게 무균적으로 첨가한 각각의 분리용 배지를 사용하여 농화배양법으로(Fig. 1) 분리하였다.⁵⁾

2. 치환체 phenol의 정량분석

치환체 phenol 분해균주의 치환기별 분해능을

조사하기 위하여 각 치환체 phenol 화합물의 정량 방법은 다음과 같이 실시하였다. BSM 기본배지 10 ml가 든 시험관에 여과멸균된 stock solution(0.1 M)을 농도별로 첨가하여 30°C, 4일간 진탕배양(180 rev/min)한 후, 배양액을 원심분리(10,000×g, 10 min) 하여 얻은 상등액을 spectrophotometer(Shimadzu UV-240)를 사용하여 얻은 흡광도 값을 보정용 공시험액과 비교하여 백분율(%)로 환산하였다. 분해능의 측정은 p -chlorophenol, p -bromophenol, 그리고 p -iodophenol은 278 nm에서 흡광도로 측정하였으며, 기타 유사체인 p -methylphenol은 276 nm, p -nitrophenol은 317 nm에서 측정하였다.

3. 공시균주의 선정 및 동정

순수분리된 분해균주중 분해능이 우수한 균주를 선별하여 치환기별의 분해 공시균주로 선정하였다.

분리균의 분류 및 동정의 제반 실험방법은 Manual of Method for General Bacteriology⁷⁾와 Microbiology, a Laboratory Manual⁸⁾에 준해 실시하였으며, 또한 Api-E 20 동정 kit에 의한 생리·화학적 성장과 그외 나타난 형태적, 배양적, 생화학적 제

성질을 기초로 Bergey' Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1, 2^{9,10)} 및 Manual of Microbiological Method for Identification of Medical Bacteria¹¹⁾에 준해 분류, 동정하였다.

4. 최적 분해조건 검토

할로겐 치환 phenol과 유사체 phenol을 100 μ M 첨가한 기본배지에 각종 질소원별, pH별, 온도별 그리고 탄소원으로 치환체 phenol의 농도별에 따른 생육 및 분해능 측정하였다. 생육도는 30 $^{\circ}$ C, 180 rpm에서 4일간 진탕배양 후, 냉동원심분리(10,000 \times G, 10 min)하고 상등액을 취해 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

5. 치환체 phenol에 대한 분해특성

치환체 phenol 분해균주의 최적 분해조건하에서 치환체 phenol의 평균구배(0~100 mg/l) 배지를 사용하여 평판배지상에서 분해균주의 구배별 생육능으로 각 치환기에 대한 분해균주들의 분해능 및 특성을 조사하였다.

6. 치환체 phenol 분해균주의 ring-cleavage 효소 활성에 따른 분해경로

(1) 배지 및 배양조건

40 mM glucose를 첨가한 분리용 최소배지 1000 ml에 substituted phenol을 100 μ M씩 첨가하여 30 $^{\circ}$ C, 180 rpm에서 각 치환체 phenol 화합물 분해균주들을 2일간 진탕배양하여 실험하였다.

(2) Cell free extract의 조제

진탕배양 후 4 $^{\circ}$ C에서 냉동원심분리(10,000 \times g, 15 min) 하여 균체를 분리하고, 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.2)로 3회 세척하고 다시 냉동원심분리(10,000 \times g, 15 min) 하여 50 mM potassium phosphate(pH 7.2)를 50 ml 첨가하여 균체를 현탁하였다. 이 현탁액을 4 $^{\circ}$ C로 유지하면서 초음파 파쇄(180 W, 30 min)한 후 초원심분리(20,000 \times g, 30 min) 하여 상등액인 cell free extract를 crude enzyme로 사용하였다.¹²⁾

(3) 단백질 정량

효소의 단백질은 Layne 등¹³⁾의 방법으로 측정하였으며 그 농도 결정은 식 (1)과 같이 하였다.

$$\text{단백질 농도(mg/ml)} = 1.55A_{280} - 0.76A_{260} \quad (1)$$

(4) Crude enzyme의 활성측정

1) Catechol 2,3-dioxygenase

Reineke 등¹⁴⁾의 방법을 사용하였다. 총 반응액 3

ml : potassium phosphate buffer(pH 7.2), 100 μ M; catechol, 1 μ M; 단백질(crude enzyme), 0.1~0.2 mg의 반응액을 30 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시킨 후, 이 효소의 반응으로 생성되는 2-hydroxymuconic semialdehyde의 최대 흡수파장인 375 nm에서 흡광도로 활성을 측정하였다.

2) Catechol 1,2 -dioxygenase

상기와 같은 방법으로 총반응액 3 ml : Tris-hydrochloride buffer(pH 8.0), 100 μ M; catechol, 1 μ M; EDTA, 4 μ M; 단백질, 0.1~0.2 mg의 반응액을 30 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시키고난 후 효소반응으로 생성되는 cis, cis-muconic acid의 최대 흡수파장인 260 nm에서 흡광도로 측정하였다.

효소 unit는 반응액의 OD값을 0.1 증가시키는 데 필요한 효소량을 1 unit로 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 공시균주의 선정

ρ -Chlorophenol 분해균주는 전부 그람음성 간균 형태의 세균이 4균주가 분리되었으며 그 중 분해능이 우수한 C4 균주를 선정하였고 그 외 ρ -bromophenol과 ρ -iodophenol균주는 분리되지 않았다. ρ -Nitrophenol 분해균주는 7균주가 분리되었는데 그람양성 간균형태의 세균이 4균주이었고 그람음성 간균형태의 세균이 3균주가 분리되었다. 그 중 분해능이 우수한 N7 균주가 공시균주로 선정되었다. ρ -Methylphenol 분해균주는 9균주가 분리되었는데 그람양성인 구균형태의 세균이 2균주이었고 그람음성인 구균형태의 세균이 5균주이고 간균형태의 세균이 2균주가 분리되었다. 그 중 분해능이 우수한 M9 균주를 선정하였다.

2. 분해균의 동정

공시균주로 선정된 분해균의 형태학적, 배양적 특성을 살펴보면 Table 1에서와 같이 그람음성의 간균들로서 통성혐기성 세균들이었으며 ρ -nitrophenol 분해균주는 내산성과 내알칼리성을 나타내었으며 그 외 균주는 중성에서 생육이 가능함을 보였다.

생화학적 특성을 살펴보면, Table 2에서와 같이 ρ -chlorophenol 분해균주인 C4균주가 당의 이용능이 높았으며, 그 외 분해균주는 당의 이용능이 저조함을 나타내었다. 유기산 이용능은 Table 3에서와 같이 전체 균주에서 toluene, glycerol 및 butanol의 이용능이 높음을 알 수 있었다.

이상의 실험결과를 검토하여 ρ -chlorophenol 분

Table 1. Morphological and cultural characteristics of substituted-phenol degraders

Strain	Gram stain	Cell shape	Motility	Colony shape	pH		Temperature (°C)	
					4.5	9.5	4	44
C4	-	Rod	+	CI, FL, CR, W, R	-	-	-	-
N7	-	Rod	+	CI, PUL, CR, W, S	+	+	-	-
M9	-	Rod	-	IR, FL, YE, W, R	-	-	-	-

Symbols : gram stain (-, negative); motility (-, non motile; +, motile); pH (-, no growth; +, growth); temperature (-, no growth; +, growth); IR, Irregular; CI, circular; PUL, pulvinate; FL, flat; YE, yellow; CR, cream; W, wet; S, smooth; R, rough; C4, *p*-chlorophenol degrader; N7, *p*-nitrophenol degrader; M9, *p*-methylphenol degrader.

Table 2. Biochemical characteristics of substituted-phenol degraders

Contents	Strain		
	C4	N7	M9
Decarboxylase and dehydrolyase of amino acid tests			
Lysine	-	-	+
Ornithine	-	-	-
Arginine	+	-	+
Biochemical characters			
H ₂ S production	-	-	-
Urease	-	-	-
Indole	+	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Methyl red	+	+	+
Catalase	-	+	+
Cytochrome oxidase	+	+	+
Acid production from carbohydrates			
Arabinose	+	-	-
Xylose	-	-	-
Glucose	+	-	-
Fructose	+	-	-
Lactose	+	-	-
Maltose	+	-	-
Sucrose	+	-	-
Trehalose	-	-	-
Salicine	+	-	-
Manitol	+	-	-
Sorbitol	-	-	-
Growth on simmon citrate agar	+	+	+
Growth on KCN	+	+	+
Oxidation/Fermentation	F	-	-

Symbols : -, negative; +, positive; F, fermentation utilization on glucose, lactose, and saccharose; C4, *p*-chlorophenol degrader; N7, *p*-nitrophenol degrader; M9, *p*-methylphenol degrader.

해균주인 C4는 *Aeromonas* 속으로 동정되어 편의상 *Aeromonas* sp. C4로 명명하였으며, *p*-nitrophenol

분해균주인 N7은 *Moraxella* 속으로 동정되어 *Moraxella* sp. N7 그리고 *p*-methylphenol 분해균주는 *Flavobacterium* 속으로 동정되어 *Flavobacterium* sp. M9로 각각 명명하였다.

3. 최적 분해조건 검토

(1) 치환체 phenol 농도별 분해특성

p-Chlorophenol은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 배양시간 4일만에 저농도(50 μ M 이하)에서 90% 이상 분해되었으며, 고농도군(100~1,000 μ M)에서는 분해율이 20% 이하로 낮게 나타났다. 본 분해균주 *Aeromonas* sp. C4는 *p*-chlorophenol 농도가 100 μ M 이상에서는 생육이 크게 저해되었으므로 50 μ M이 최적 탄소원 농도로 설정되었다.

p-Nitrophenol은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 배양시간 3일만에 저농도(50, 100 μ M)에서는 90% 이상 분해되었으며, 고농도(500, 1,000 μ M)에서는 분해율이 20% 이하로 낮게 나타났다. 본 분해균주 *Moraxella* sp. N7은 *p*-nitrophenol 농도가 500 μ M 이상에서는 생육이 저해됨을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 100 μ M의 *p*-nitrophenol이 최적 탄소원 농도로 설정하였다.

p-Methylphenol 농도에 대한 분해특성은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 배양시간 4일만에 저농도(50 μ M 이하)에서는 90% 이상 분해되었으며, 100 μ M에서는 70% 그리고 고농도(500, 1,000 μ M)에서는 분해율이 20% 이하로 낮게 나타났다. 그러므로 본 분해균주 *Flavobacterium* sp. M9균주는 *p*-methylphenol 농도가 500 μ M 이상에서는 생육이 저해되어 분해능이 저하됨을 알 수 있었다. 따라서 분해율이 높은 50 μ M *p*-methylphenol을 최적 탄소원농도로 설정하였다.

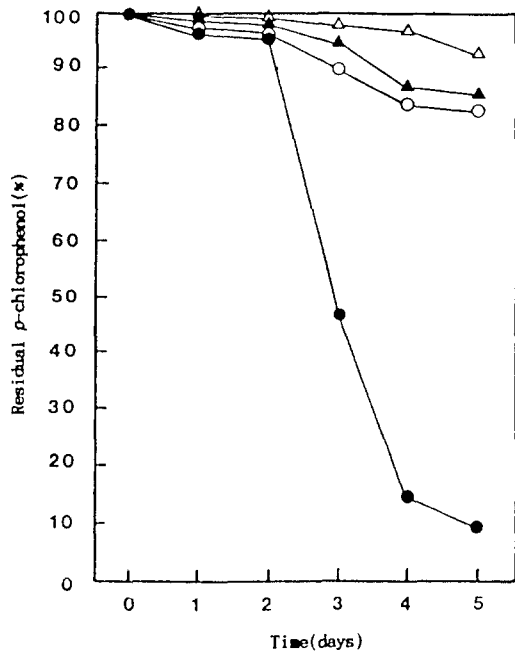
(2) 배양온도별 생육특성

배양온도별 각 phenol 치환체에 대한 각 균주들을 접종하여 2일간 배양하여 살펴본 결과 *p*-nitrophenol

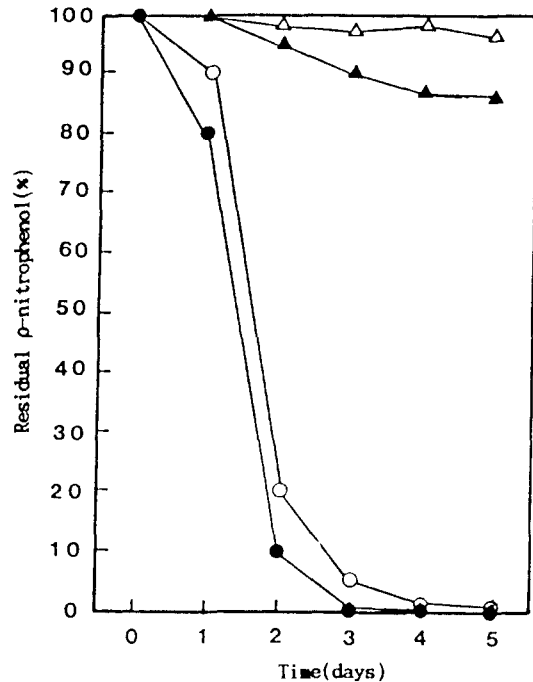
Table 3. Growth on the organic acid and solvent of substituted-phenol degraders

Str.	Acetic acid	Adipic acid	Oxalic acid	Propionic acid	Toluene	Glycerol	Butanol
C4	-	-	+	W	+++	++	+++
N7	-	+	-	-	+	+	+
M9	-	-	-	W	++	+	++

Symbols : str, strain; -, growth; W, weakly growth; +, growth; ++, good growth; +++, excellent growth; C4, *p*-chlorophenol degrader; N7, *p*-nitrophenol degrader; M9, *p*-methylphenol degrader.

**Fig. 2.** Patterns of biodegradation of *p*-chlorophenol by *Aeromonas* sp. C4.

Symbols : ●, *p*-chlorophenol 50 μ M; ○, *p*-chlorophenol 100 μ M; ▲, *p*-chlorophenol 500 μ M; △, *p*-chlorophenol 1,000 μ M.

**Fig. 3.** Patterns of biodegradation of *p*-nitrophenol by *Moraxella* sp. N7.

Symbols : ●, *p*-nitrophenol 50 μ M; ○, *p*-nitrophenol 100 μ M; ▲, *p*-nitrophenol 500 μ M; △, *p*-nitrophenol 1,000 μ M.

분해균주가 37°C에서 생육도가 가장 높았고 그외 분해균주는 30°C에서 생육도가 높았다(Fig. 5~7).

(3) pH별 생육특성

pH별 생육특성은 Fig. 8, 9에서 보는 바와 같이 *p*-chlorophenol 분해균주인 *Aeromonas* sp. C4와 *p*-nitrophenol 분해균주인 *Moraxella* sp. N7은 초발 pH가 7.2에서 가장 생육이 양호하여 분해에 적합한 pH임을 알 수 있으며 *p*-methylphenol 분해균주인 *Flavobacterium* sp. M9균주는 Fig. 10에서 보는 바와 같이 pH 8이 적합한 초발 pH임을 나타내었다.

(4) 질소원별 생육 및 분해특성

질소원에 의한 영향(Table 4)은 *p*-chlorophenol의

경우는 무기질소원에서만 약간의 분해능을 나타내었다. *p*-Nitrophenol의 경우는 무기질소원 전반에서 우수한 분해능을 보였으나 유기질소원은 전혀 분해능에 영향을 미치지 못하였다. *p*-Methylphenol의 경우는 무기질소원으로 NaNO_3 만 분해능이 우수하였고 유기질소원은 전반적으로 분해능이 좋았으며 특히 polypepton에서 우수한 분해능을 보였다.

(5) 분해 최적조건의 설정

Aeromonas sp. C4 균주에 의한 *p*-chlorophenol의 분해 최적조건은 탄소원으로 *p*-chlorophenol 농도 100 μ M, 최적 질소원은 NH_4NO_3 , 배지의 초발 pH는

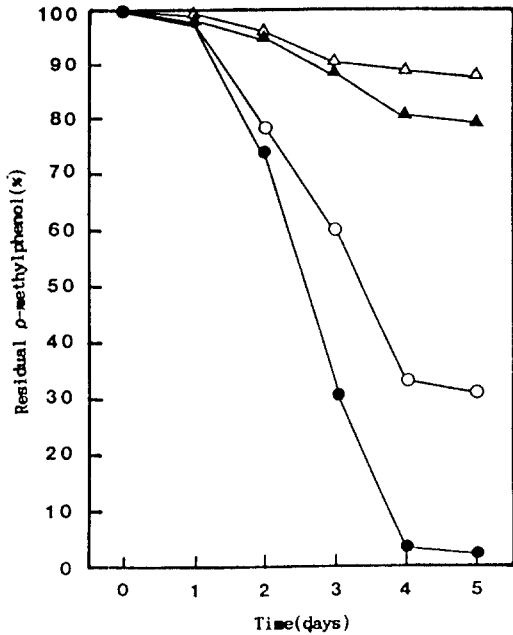


Fig. 4. Patterns of biodegradation of p-methylphenol by *Flavobacterium* sp. M9. Symbols : ●, p-methylphenol 50 μM; ○, p-methylphenol 100 μM; ▲, p-methylphenol 500 μM; △, p-methylphenol 1,000 μM.

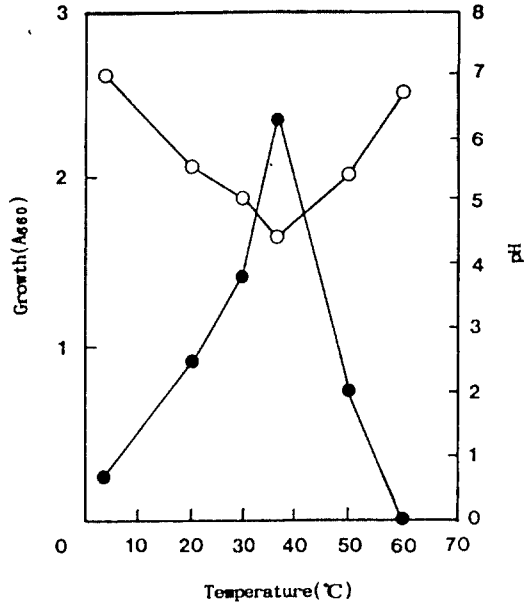


Fig. 6. Effect of temperature on the growth and final pH by *Moraxella* sp. N7. Symbols : ●, growth; ○, final pH.

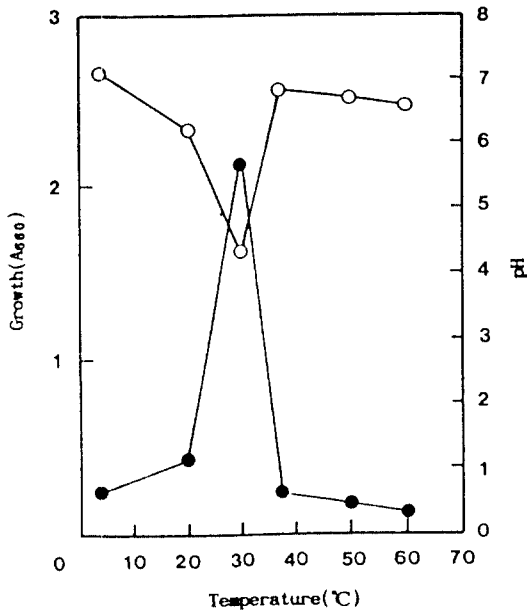


Fig. 5. Effect of temperature on the growth and final pH by *Aeromonas* sp. C4. Symbols : ●, growth; ○, final pH.

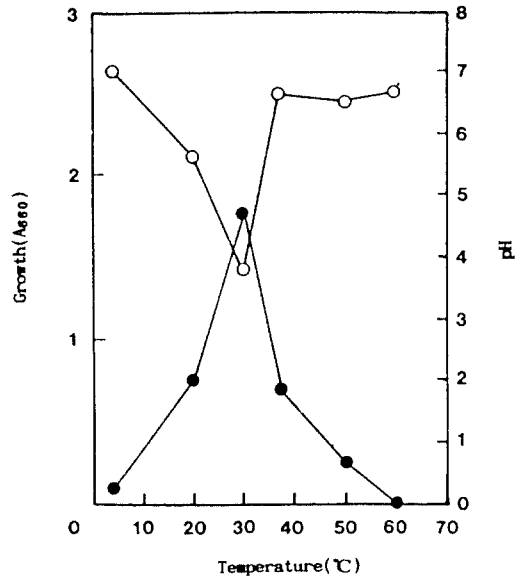


Fig. 7. Effect of temperature on the growth and final pH by *Flavobacterium* sp. M9. Symbols : ●, growth; ○, final pH.

7.2 그리고 온도는 30°C로 설정하였다. *Moraxella* sp. N7 균주에 의한 p-nitrophenol의 분해 최적조건은 탄소원으로 p-nitrophenol 농도 100 μM, 최적 질소

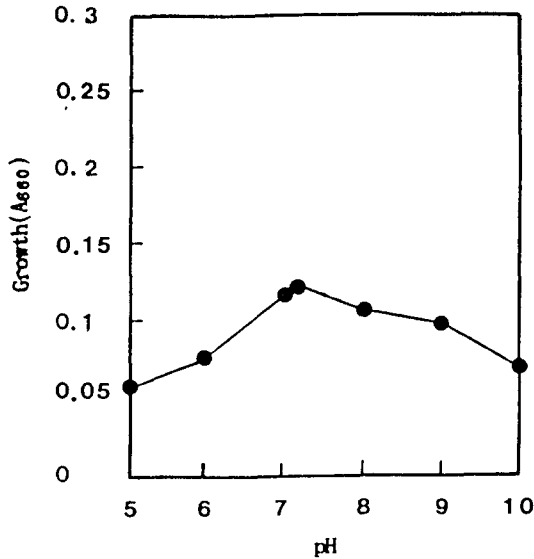


Fig. 8. Effect of initial pH on the growth by *Aeromonas* sp. C4.

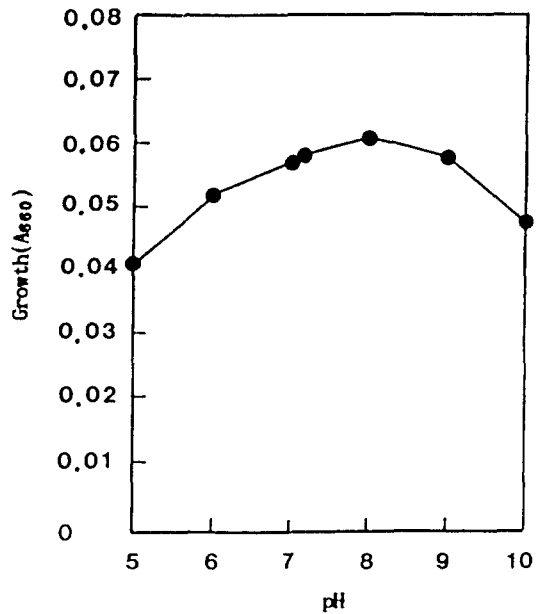


Fig. 10. Effect of initial pH on the growth by *Flavobacterium* sp. M9.

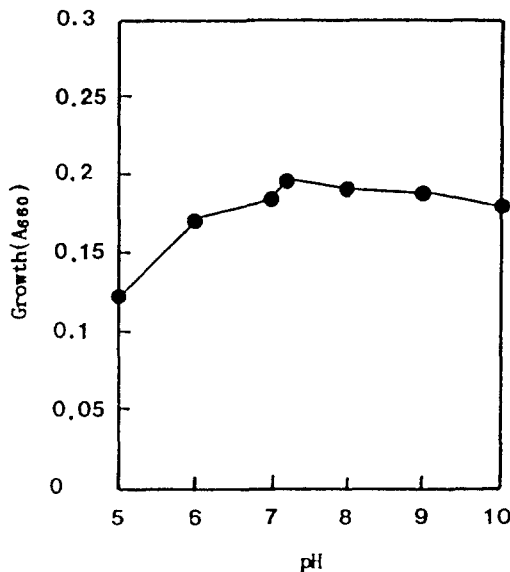


Fig. 9. Effect of initial pH on the growth by *Moraxella* sp. N7.

원으로 NH_4NO_3 , 배지의 초발 pH는 7.2 그리고 온도는 37°C 로 설정하였다. *Flavobacterium* sp. M9 균주에 의한 ρ -methylphenol의 분해 최적조건은 탄소원으로 ρ -methylphenol 농도 $50\ \mu\text{M}$, 최적 질소원으로 NH_4NO_3 , 배지의 초발 pH는 8 그리고 온도는 30°C 로 설정하였다.

Table 4. Effect of nitrogen sources on growth and biodegradation to substituted-phenols

Nitrogen source	ρ -CP		ρ -NP		ρ -MP	
	G	B	G	B	G	B
None	0.096	2	0.150	3	0.041	2
NH_4Cl	0.127	27	0.170	98	0.042	2
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.102	5	0.170	98	0.042	2
NH_4NO_3	0.134	34	0.170	97	0.210	92
KNO_3	0.112	16	0.151	56	0.040	2
NaNO_3	0.121	7	0.167	99	0.053	20
Polypepton	0.931	1	1.218	1	1.056	92
Bactopepton	0.670	1	1.045	2	0.800	70
Beef extract	0.306	1	0.661	1	0.467	60
Yeast extract	0.932	2	0.908	1	0.770	65
Casein	0.204	1	0.785	1	0.121	20
Casamino acid	0.948	2	0.871	1	0.742	56
Urea	0.152	2	0.137	0	0.039	2

Symbols : ρ -CP, ρ -chlorophenol; ρ -NP, ρ -nitrophenol; ρ -MP; ρ -methylphenol; G., growth (A660); B., biodegradation ratio (%).

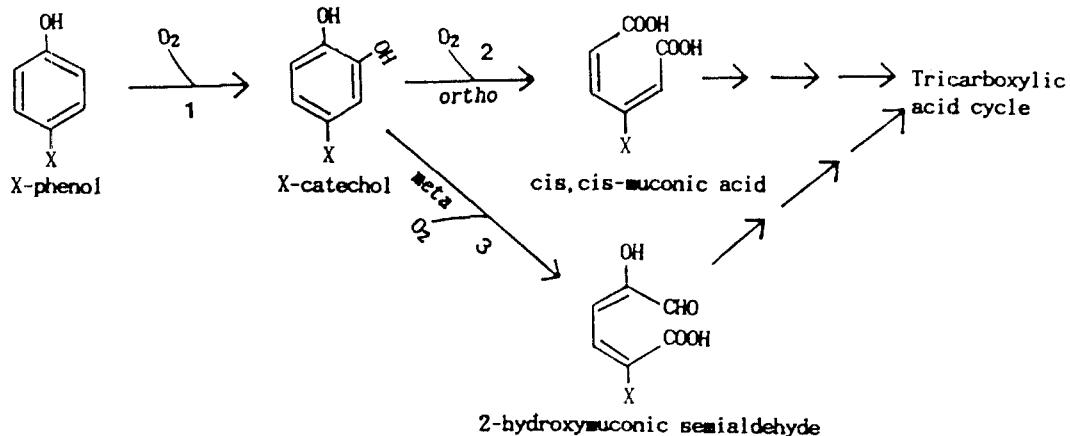
4. 치환체 phenol 분해균주의 치환기별 분해특성

각 치환체 분해균주별 분해특성 Table 5에서 보듯 바와 같이, ρ -chlorophenol 분해균주인 *Aeromonas*의 경우 ρ -methylphenol에도 양호한 분해능을 보이고 있어 chloro기에 대한 분해능이 있는 균주는

Table 5. Biodegradation ratio of each substituted phenol degrader (%)

Strain	p-CP	p-IP	p-BP	p-NP	p-MP
<i>Aeromonas</i> sp. C4	100	15	15	15	70
<i>Moraxella</i> sp. N7	10	10	10	100	15
<i>Flavobacterium</i> sp. M9	5	5	5	0	100

Symbols : p-CP, p-chlorophenol; p-IP, p-iodophenol; p-BP, p-bromophenol; p-NP, p-nitrophenol; p-MP, p-methylphenol.

**Fig. 11.** Modified *ortho* cleavage and *meta* cleavage pathway of phenolic compounds.

1. X-phenol oxygenase
2. Catechol 1,2-dioxygenase (pyrocatechase II)
3. Catechol 2,3-dioxygenase (pyrocatechase II)

다른 치환체 phenol도 분해 가능함을 알 수 있었으며, Karns 등¹⁵⁾의 보고한 바와 같이 방향족 화합물에 Cl 기가 치환된 물질의 분해균주는 다른 기가 치환된 난분해성 방향족 화합물을 분해할 수 있다는 결과와 일치하였다. 그의 분해균주는 자체 모치환체 phenol에만 분해능을 보여 기질특이성이 높은 결과를 보였다.

5. 치환체 phenol 분해균주의 ring-cleavage 효소 활성에 따른 분해경로

Ornston¹⁶⁾은 대부분의 방향족 화합물이 미생물에 의해 산화될 때 Fig. 11에 보는 바와 같이 catechol이나 catechol 화합물로 분해되며 catechol은 다시 서로 다른 분해대사경로를 거쳐 산화가 일어난다고 보고하였다. Sutherland 등¹⁷⁾은 phenol에서 생육한 cell-free extract에서는 phenol hydrolase와 catechol dioxygenase의 활성을 가지나 yeast extract 첨가배지에서 생육한 것에서는 이 두 효소의 활성이 없기 때문에 유도효소라고 보고하였다. 또한

Ornston 등¹⁸⁾은 *Streptomyces setonii*에서 phenol은 catechol과 cis, cis-muconic acid를 통해 분해되고 일련의 β -ketoacidic acid 경로를 통해 분해가 진행된다고 보고하였다. Zeyer 등¹⁹⁾은 ring-substituted anilines의 자화세균인 *Moraxella* sp. strain G에서 catechol을 기질로 하여 catechol 1,2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase의 활성을 검토하여 본 결과, catechol의 분해는 ortho 경로를 경유하여 개환됨을 보고하였다.

본 실험에서는 Table 6, 7에서 보는 바와 같이 본 실험에서 사용된 *Aeromonas* sp. C4 균주와 *Flavobacterium* sp. M9가 catechol의 -OH기 사이의 개환에 관여하는 catabolic enzyme중 하나인 catechol 1,2-dioxygenase에서 비교적 높은 활성을 보여 ortho 경로를 주로 하고 있음을 알 수 있으나 meta 경로에 관여하는 catechol 2,3-dioxygenase에서도 비활성이 낮게 나타나고 있음이 관찰되었다. 따라서, Karns 등¹⁵⁾의 ortho 경로만으로도 분해활성이 나타났다는 결과와는 약간 차이가 있다. 그러나 p-nitrophenol의

Table 6. Specific activities of catechol 1,2-dioxygenase in each crude extract of strains

Strain	Activity Protein (Unit) (mg/ml)	Specific activity (U/mg of protein)
<i>Aeromonas</i> sp. C4	0.32	0.0086
<i>Moraxella</i> sp. N7	0.30	0.1200
<i>Flavobacterium</i> sp. M9	0.66	0.0256

Table 7. Specific activities of catechol 2,3-dioxygenase in each crude extract of strains

Strain	Activity Protein (Unit) (mg/ml)	Specific activity (U/mg of protein)
<i>Aeromonas</i> sp. C4	0.02	0.0070
<i>Moraxella</i> sp. N7	0.01	0.1210
<i>Flavobacterium</i> sp. M9	0.16	0.0254

분해균주인 *Moraxella* sp. N7은 meta cleavage 효소활성이 아주 적어 ortho 경로를 경유하여 개환되는 것으로 추정되었다.

IV. 결 론

Halogen 치환 phenol 분해균주와 기타 유사체 phenol 분해균주로 *Aeromonas*, *Moraxella* 그리고 *Flavobacterium*이 분리, 동정되었다.

최적 분해조건은 탄소원인 치환체 phenol 농도가 50~100 μ M, 질소원은 NH_4NO_3 , 배지의 초발 pH는 7.2, 그리고 배양온도는 30°C 이었다.

Aeromonas sp. C4는 chloro기, nitro기 및 methyl기를 가진 치환체 phenol에서도 생육하는 다양한 분해능을 나타내었다. *Moraxella* sp. N7은 p-chlorophenol에 생육하는 특성을 나타내었으며, *Flavobacterium* sp. M9는 다른 치환체 phenol에 생육이 아주 낮아 methyl기에 대한 기질특이성을 나타내었다.

Catechol의 ring-cleavage 효소활성은 *Aeromonas* sp. C4, *Flavobacterium* sp. M9, 그리고 *Moraxella* sp. N7에서 ortho cleavage에 관여하는 catechol 1,2-dioxygenase 효소의 활성이 높게 나타나 ortho 경로를 통하여 개환되는 것으로 추정되었다.

참고문헌

- Alexander, M., Biodegradation: problems of molecular recalcitrant and microbial fallibility. *Advan. Appl. Microbiol.* 7, 35 (1965).
- Dart, R. K. and Stretton, R. J., Microbiological

aspects of pollution control, 2nd ed., Elsevier scientific Publishing Company, New York, 1980.

- Gehm, H. W. and Bregman, J., Handbook of water resources and pollution control, Van Nostrand Reinhold Co., New York, 1976.
- Chaudhry, G. R. and Chapalamadugu, S., Biodegradation of halogenated organic compounds, *Microbiol. Rev.* 55, 59-79 (1991).
- 윤혜정, 김혜영, 토양중에 있는 phenol분해균의 분리·동정 및 phenol 분해능에 관한 연구, 한국생물과학연구원 논총, 38,169 (1986).
- 신정래, 김영환, Sampling과 평가(물, 토양, 식품), 녹원출판사, 33-49 (1986).
- Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N. and Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B., Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, New York, 1981.
- Cappuccino, J. G. and Sherman, N., Microbiology, a laboratory manual, 2nd ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company, New York, 1987.
- Krieg, N. R. and Holt, J. G., Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore, Vol. 1, 1984.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G., Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1986.
- Macfaddin, J. F., Biochemical test for identification of medical bacteria, The William and Wilkins Co., Baltimore, 1980.
- Mishino, S. F., Spain, J. C., Belcher, L. A. and Lischfield, C. D., Chlorobenzene degradation by bacteria isolated from contaminated ground water, *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1719-1726 (1992).
- Layne, E., Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., Methods in Enzymology, Vol. III, Academic Press, New York, 447-454 (1957).
- Reineke, W. and Knachmuss, H. J., Microbial metabolism of haloaromatics: Isolation and properties of a chlorobenzene degrading bacterium, *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 395-402 (1984).
- Karns, J. S., Kilbane, J. J., Dutttagupta, S. and Chakrabarty, A. M., Metabolism of halophenols by 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid degrading *Pseudomonas cepacia*, *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 1176-1181 (1983).
- Ornston, L. N., Regulation of catabolic pathways

- in *Pseudomonas*, *Bacteriol. Rev.* **35**, 87 (1971).
- 17) Atlas, R. M., Microbiology-fundamentals, and applications, 2nd ed., Macmillan Publishing Co., New York, 352-353 (1988).
- 18) Ornston, L. N. and Stanier, R. Y., The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*, *J. Biol. Chem.* **241**, 3776-3786 (1966).
- 19) Zeyer, J., Wasserfallen, A. and Timmis, K., Microbial mineralization of ring-substituted anilines through an ortho-cleavage pathway, *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 447-453 (1985).

(Received August 30, 1992)