

## 酵母에 의한 phenol 性 物質의 資化에 關한 研究

金 相 達 · 徐 正 墳

慶北大學校 農科大學 農化學科  
(1978년 10월 10일 수리)

## Studies on the Utilization of Phenolic Substance by Yeast

Sang Dal Kim · Jung Hwn Seu

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyung Pook  
National University, Taegu, Korea  
(Received Oct. 10, 1978)

### Abstract

Phenol utilizing yeast No. 558 isolated from soil sewage sediment was able to use substantial amount of phenol as the sole carbon source, and the biomass productivity by this organism was very excellent. This organism could grow well in 1000 ppm of phenol concentration, the maximum specific growth rate obtainable at pH 5.0, 30°C was 0.27/hr., and the biomass yield coefficient Y vs. consumed phenol was 3.2. Maximum production rate of biomass was observed at 35°C, pH 3.5 to pH 4.5, and the addition of the 0.005~0.01% yeast extract was the most effective. Addition of HgCl<sub>2</sub> and phenyl hydrazine, inhibitors of oxido-reductase, in the phenol containing cultural liquid caused this organism no-growth at the concentration of 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-3</sup>M respectively. This organism could utilize not only phenol but catechol, resorcinol and benzidine.

### 緒 論

Phenol 및 aromatic ring compound를 含有하고 있는 廢液의 生化學的 處理로서 活性汚泥法과 特殊한 微生物에 依한 處理法等이 있으며, 微生物로서는 bacteria와 yeast 등이 主로 利用된다. 細菌에 依한 phenolic compound의 分解 利用菌으로서는 *Pseudomonas*, *Micrococcus* 屬 등이 알려져있다. 이들의 代謝經路는 Evans and Happold,<sup>(1)</sup> Sleeper and Stainer<sup>(2)</sup> 등에 依하여 알려져졌으며, 最近 酵母에 依한 phenol 및 유도체의 處理 可能性이 밝혀져 있다<sup>(3-5)</sup>. 한편 이때 수확된 酵母菌體의 利用에 대

한 Wicken<sup>(6)</sup> 등의 보고가 있다.

이런 Phenol 資化 酵母로서는 *Oospora*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*<sup>(6,7)</sup> 屬이 알려져있으며 Neujahr and Varga<sup>(8)</sup>는 *Trichosporon cutaneum* 을 使用하여 phenol 및 그 유도체의 代謝經路를 調査하였고, Neujahr<sup>(9)</sup>와 Hashimoto<sup>(10,11)</sup>는 *Candida tropicalis* 를 使用하여 phenol의 酸化作用을 調査한 바 있다. Nisaburo, Nei<sup>(12)</sup> 등은 酵母菌을 使用하여 phenol로부터 catechol의 生産에 對하여 이미 연구하였으며 benzene, alkyl benzene, naphthalene, anthracene, phenanthrene 등의 轉換反應에 對해서도 多數의 報告가 있다<sup>(13,14)</sup>.

本報에서는 phenol 資化菌의 aromatic ring comp-

ound의 轉換反應 實驗의 基本資料로서 酵母菌의 유일한 炭素源인 phenol의 利用性과 그 菌體生産에 對한 몇가지 實驗의 結果를 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 菌의 分離

大邱近郊의 工場廢水가 流入되는 河川流域에서 菌源을 採取하여 Table 1의 基本 배지를 사용하여 炭素源으로서 phenol을 500 ppm 添加하여 이를 資化할 수 있는 酵母를 分離하여 phenol 資化성의 各種 實驗을 하였다.

Table 1. Basal Medium for Isolation and Culture of Phenol Utilizing Yeast.

NH <sub>4</sub> Cl	0.2(%)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01
NaCl	0.01
Yeast extract	0.02
Final pH	5.0

### 2. 菌의 培養

分離된 酵母들은 上記의 基本培地에 phenol 1000 ppm을 添加하여 pH 5.0으로 調節한 後 30°C에서 30時間 왕복진탕(80 stroke/min. 진폭 7 cm) 培養하였다.

### 3. 菌體量 測定

菌體量은 spectrophotometer를 使用하여 波長 610 nm에서 培養液의 optical density를 測定하였으며, 한편 이 培養의 菌體를 모아 110°C에서 15時間 乾燥한 後 그 乾燥重量을 濁度와 상관곡선을 그려서 이에따라 菌體量을 測定하였다.

### 4. Phenol의 定量

Phenol의 U.V 흡광성을 利用하여 UV-spectrophotometer (Perkin-Elenmyer 139)를 使用하여 波長 270nm에서 그 吸光度를 測定하고 표준곡선으로부터 換算하여 나타내었다.

## 結果 및 考察

### 1. 生育곡선

本 酵母菌의 生育度를 調査하기 위하여 phenol

1000 ppm을 유일한 炭素源으로 添加한 培地에서 振盪培養하여 經時的으로 菌體量을 測定한 結果는 Fig. 1과 같다.

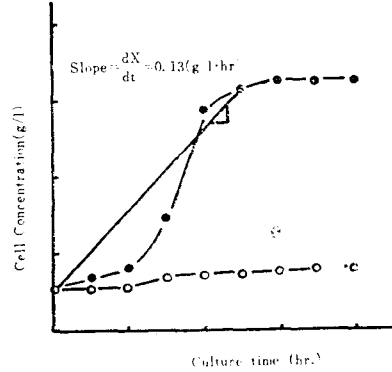


Fig. 1. Growth Curve and Biomass Productivity.

—●— : Phenol 1000 ppm added  
—○— : Phenol no added as control

1000 ml 삼각플라스크를 使用하여 培養할 때 pH 5.0, 溫度 30°C에서의 maximum specific growth rate는  $0.17hr^{-1}$ , biomass productivity는 約  $0.13g \cdot cell/l \cdot hr$ . 정도였다. 그러나 500 ml 들이 Sakaguchi flask를 使用하여 培養할 경우 maximum specific growth rate는  $0.31hr^{-1}$ 였고, 이는 Nisaburo Nei<sup>(12)</sup>의 *Candida tropicalis*에 對한  $\mu_m$ 보다 더 빠른 성장 속도를을 나타내었다.

### 2. 培養 vessel 內의 培地容量化에 對한 影響

本 酵母菌의 phenol 資化에 미치는 最適容量을 調査하기 위하여 500 ml Sakaguchi flask에 上記의 培地를 容量別로 넣어 진탕배양한 結果는 Fig. 2와 같다.

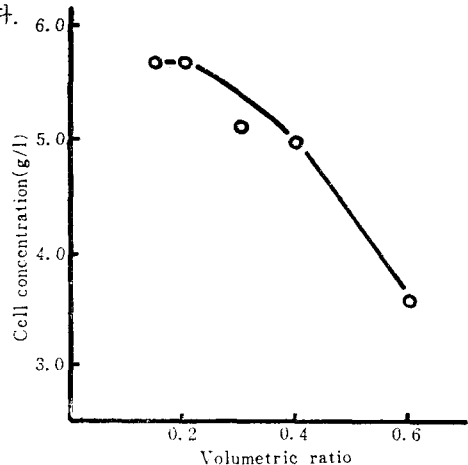


Fig. 2. Effect of the Volumetric Ratio on the Biomass Productivity.

菌體收率は volumetric ratio 가 0.2, 즉 100 ml 이하의 培地量을 添加할 때 가장 높은 菌體量을 얻었으므로 phenol 質化는 0.2 以下에서 가장 有效적인 것을 알 수 있다.

### 3. Phenol 濃度의 影響

最初 phenol 濃度를 달리하여 菌體增殖 程度를 調査한 結果는 Fig. 3 와 같다.

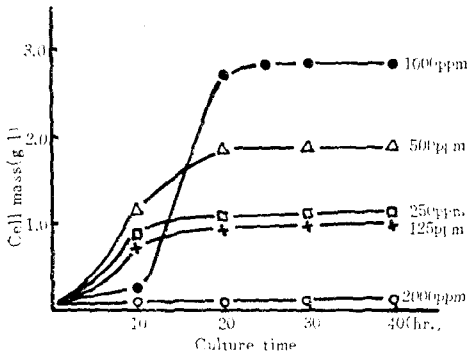


Fig. 3. Effect of Phenol Concentration on the Cell Growth.

最初 phenol 濃度가 500 ppm 이하 일 때는 phenol 에 對하여 adaption period 가 觀察되지 않았으며, 1000 ppm 以上에서는 濃度의 增加에 따라 適應時間이 길어졌다. Phenol 2000 ppm 濃度에서는 5 日間 培養하였을 때 비로소 菌體增殖이 일어났다. 따라서 연속처리 process 에 의한 處理效率를 지배하는 要素로서 phenol 濃度, phenol 의 공급속도 等의 諸條件을 고려해야만 한다. Phenol 을 1000 ppm 씩 段階的 添加法으로 130 時間에 걸쳐 9 回 添加하면서 phenol 의 소비율 ( $-ΔS$ )과 菌體增殖率 ( $ΔX$ )과의 상관관계를 求한 結果는 Fig. 4 와 같으며, 이 직線의 기울기로부터 phenol 소비에 對한 菌體收率 定數 Y 값이 3.2 g·cell/g·phenol 이 된다.

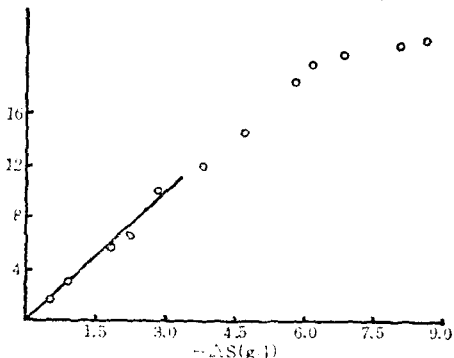


Fig. 4. Yield Factor of Growth by Yeast Strain 558.

### 4. 初發 pH 및 培養溫度의 影響

培地의 初發 pH 를 2.0 에서 6.0 까지 調整한 後 30°C 에서 30 時間 振盪培養하여 菌體 收得量을 測定한 結果는 Fig. 5 에서 보는 바와 같이 pH 3.5~4.5 사이에서 가장 좋은 菌體收得率을 얻었다. 또 pH 5.0 에서 最適 質化溫度를 測定한 바 Fig. 6 과 같이 35°C 에서 가장 높은 收率을 얻었다.

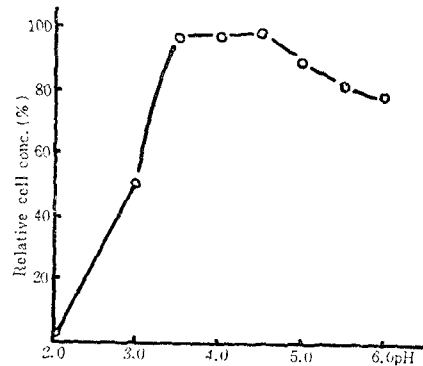


Fig. 5. Effect of Initial pH of Medium on the Cell Growth at 30°C.

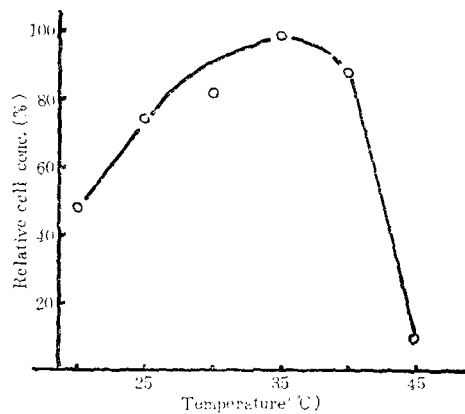


Fig. 6. Effect of Temperature on the Cell Growth at pH 5.0.

### 5. 各種 阻害劑의 影響

酸化還元系 酵素의 阻害劑로 알려진 몇 가지 inhibitor 를 培地內에 添加하여 培養한 結果는 Table 2 와 같다.

HgCl<sub>2</sub> 는 10<sup>-5</sup>M, phenylhydrazine 은 10<sup>-3</sup>M 을 培地內에 添加할 때 완전히 菌體增殖을 볼 수 없었고, EDTA 는 10<sup>-3</sup>M 에서 約 48% 程度의 growth inhibitor 率을 보였다.

**Table 2.** Effect of Inhibitors on the Cell Growth.

Inhibitors	10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-5</sup> M
EDTA	1.71 (g/1)	3.75 (g/1)
KCN	2.43	3.09
HgCl <sub>2</sub>	0	0
phenylhydrazine	0	3.94
K <sub>2</sub> S	2.83	3.48
None	3.28	

\*O is no-growth at all.

### 6. 各種 窒素源의 影響

本 菌株의 phenol 資化를 위한 各種 窒素源을 달리하여 培養한 結果는 Table 3과 같다.

**Table 3.** Effect of Several Nitrogen Sources on the Cell Growth

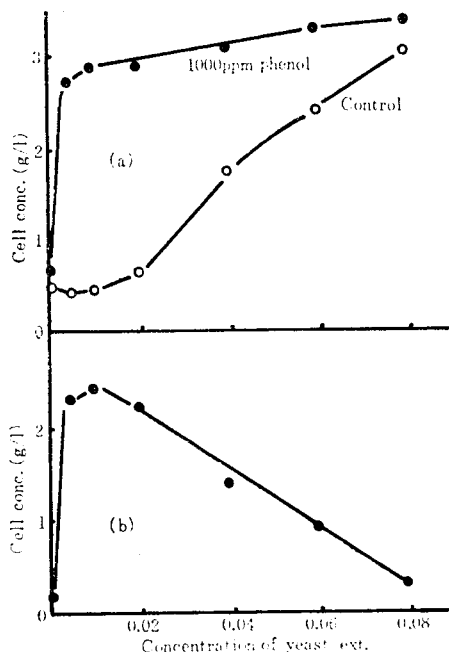
Nitrogen sources	Cell mass(g/1)	Final pH
NH <sub>4</sub> Cl	2.96	2.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.35	2.9
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.83	2.9
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	3.61	2.6
NaNO <sub>3</sub>	3.09	3.6
KNO <sub>3</sub>	4.40	5.0
NaNO <sub>2</sub>	0.23	6.0
(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO	4.60	5.4

窒素源의 濃度는 NH<sub>4</sub>Cl 0.2%의 N含量에 相當하는 각각의 濃度를 添加하여 그 效果를 比較한 바 urea가 NH<sub>4</sub>Cl 경우보다 約 1.5倍 程度의 더 좋은 收率을 얻어 가장 效果의 이며, 다음으로 KNO<sub>3</sub>가 NH<sub>4</sub>Cl 경우보다 約 1.4倍 程度의 좋은 效果를 나타내었다.

### 7. Yeast extract의 影響

Yeast extract가 本 菌株의 phenol 資化에 對하여 必需營養源으로서의 效果를 調査하기 위하여 yeast extract 濃度를 0~0.08%까지 添加 培養시켜 본 結果는 Fig.7과 같다.

Yeast extract 濃度가 처음 소량 增加함에 따라 菌體收率이 갑자기 增加하며 어느 濃度이상에서는 別로 效果를 미치지 못하므로 yeast extract가 phenol 資化에 必需營養源으로 必要하다는 것을 알수 있다. 이러한 本 菌의 phenol 資化에 必需營養源으로서의 yeast extract의 濃度는 0.005~0.01%이 程度 충분하다는 것을 알 수 있었다.



**Fig. 7.** a) Effect of the Yeast Extract Concentration on the Cell Growth.

b) Reveal the Balance from the Control.

### 8. Phenol 및 그 유도체의 資化

本 菌이 phenol을 비롯한 여러 aromatic ring compound의 資化能을 調査하여 보기 위하여 各各 1000 ppm씩 添加하여 진탕배양하였다. 그 結果는 Table 4에 나타나 있으며 本 酵母는 phenol 이외에 도 dihydroxyl radical을 가진 catechol, resorcinol을 資化할 수 있었으며 benzidine의 資化도 可能하였다.

**Table 4.** Utilization of Phenol Derivatives by Yeast 558.

0.1% derivatives	Cell mass(g/1)	Final pH
Phenol	3.05	2.5
Catechol	2.66	2.4
Resorcinol	2.96	2.54
Pyrogallol	0	5.0
2,4-Dinitrophenol	0	4.7
Picric acid	0	5.1
Benzidine	1.60	5.4
p-Toluidine	0	4.7
Aniline acetate	0	5.3
Sulfanilic acid	0	5.4
Benzoic acid	0	4.4
Salicylic acid	0	4.5

## 要 約

분리된 효모에 의한 aromatic ring compound의 전환反應 實驗에 앞서 phenol 資化能에 對한 환경 인자의 影響을 調査하기 위하여 phenol 을 유일한 炭素源으로 使用하여 분리된 효모菌을 30時間, 30°C 에서 진탕배양하여 菌體增殖量을 測定하였다.

1) pH 3.5~4.5 온도 35°C 에서 가장 資化能이 우수하였으며 phenol 의 처음 濃度 1000 ppm 까지 는 쉽게 利用할 수 있었고 2000 ppm 에서는 5日 間 培養시켰을 때 비로소 菌體增殖이 나타났다.

2) pH 5.0, 배양온도 30°C 에서 本 菌의 maximum specific growth rate 는  $0.27\text{hr}^{-1}$  이었으며, phenol 을 1000 ppm 적 段階的으로 添加하면서 phenol 소비율에 對한 菌體收率 定數 Y 값을 구한 結果  $Y=3.2$  였다.

3) Yeast extract 를 必須營養源으로 添加할 때 0.005~0.01% 濃度에서 가장 效果的이었으며, 또 酸化還元系 酵素 阻害劑인  $\text{HgCl}_2$ , phenylhydrazine 을 各各  $10^{-5}\text{M}$ ,  $10^{-3}\text{M}$  을 培地內에 添加하면 분리된 효모菌의 增殖을 거의 볼 수 없었다.

4) Phenol 의 資化에 各種 窒素源의 效果를 比較해 본 結果 urea 가 가장 效果的이었고, 이 효모菌은 phenol 외에 catechol, resorcinol, benzidine 을 資化할 수 있다.

## 參 考 文 獻

1) Evans, W.C. and Happold, F.C.: *Biochem.*

- J.*, **41**, 373 (1947).  
2) Sleeper, B.P. and Stainer, R.Y.: *J. Bacteriol.*, **59**, 117 (1950).  
3) Rao, B.V. and Bhat, J.V.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **37**, 303 (1971).  
4) 清水, 宇野, 根井, 市川: *醸工*, **51**, 809 (1973).  
5) Harris, G. and Ricketts, R.W.: *Nature*, **195**, 473 (1962).  
6) Wiken, T.O.: *Proc. IV. IFS Ferment. Technol.*, Soc. Ferment. Technol. Japan, 569 (1972).  
7) Henderson, M.E.K.: *J. Gen. Microbiol.*, **26**, 155 (1961).  
8) Neujahr, H.Y. and Varga, J.M.: *Eur. J. Biochem.*, **13**, 37 (1970).  
9) Neujahr, H.Y. Lindsjo, S. and Varga, J.M.: *Antonie van Leeuwenhoek*, **40**, 209 (1974).  
10) Hashimoto, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **16**, 1 (1970).  
11) Hashimoto, K.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 171 (1973).  
12) 三郎, 田中, 高田: *醸工*, **52**, 28 (1974).  
13) 三村 務: *微生物の利用・應用技術資料集*, フジ・テクノシステム, 東京, p.483 (1975).  
14) Laskin and Lechevalier: *Handbook of Microbiology*, CRC Press, Vol. IV. p.45 (1974).  
15) 清水, 一瀬, 福智, 三郎, 市川: *醸工*, **51**, 803 (1973).