

## 아닐린 생분해 균주의 분리 및 특성

조경연·하일호<sup>+</sup>·배경숙·고영희\*

한국과학기술원 유전공학센터

### Isolation and Characterization of Aniline Degrading Bacteria

Cho, Kyung Yun, Il Ho Ha<sup>+</sup>, Kyung Sook Bae, and Yung Hee Kho\*

Korea Advanced Institute of Science and Technology, Genetic Engineering Center,  
Seoul 130-650, Korea

**Twenty-nine bacterial isolates capable of growing on aniline as a sole source of carbon and nitrogen were obtained. Ten of these isolates were identified. Nine isolates were identified as *Pseudomonas* spp. and one was *Acinetobacter* sp.. Five strains among 29 isolates had one or several plasmids. Four of these five strains utilized aniline through *meta* pathway and one through *ortho* pathway. *Pseudomonas acidovorans* 4A1 which utilized aniline through *meta* pathway harbored a plasmid of ca. 230 kilobases shown to be involved in aniline metabolism.**

아닐린(aniline)은 염료나 제초제 합성공업의 원료 또는 다른 화학합성의 용매로써 널리 쓰이는 중요한 화합물의 하나로 해마다 다량 생산 이용되고 있으며 그 과정에서 많은 양이 여러 형태로 환경에 유입되고 있다(1-3). 환경에 유입된 아닐린은 중합, 산화, 광산화, 니트로화합물의 형성, 그리고 흡착 등과 같은 여러 복잡한 반응을 거치게 되는데(4-6) 이러한 과정에서 환경내에 축적되는 여러 형태의 아닐린 및 아닐린 유도체들은 그 자체에 발색과 독성 뿐만 아니라 난분해성 물질이 되어 직접 간접으로 생물에 대해 여러 해를 끼치게 된다.

최근 여러 실험실에서는 아닐린의 이러한 여러가지 피해 가능성 때문에 미생물을 이용한 아닐린의 생분해에 대해 연구하게 되었고, 이들의 조사에 따르면 *Alcaligenes*(7), *Rhodococcus*(8), *Acinetobacter*(9), *Pseudomonas*(10), *Frateruria*(11), *Moraxella*(12), *Nocardia*(13) 등이 아닐린을 유일한 탄소, 질소, 에너지원으로 이용하여 자랄 수 있는 것으로 나타났다. 아닐린 분해의 일반적 경로는 먼저 aniline dioxygenase에 의해 아닐린으로부터 catechol과 암모니아가 형성되고, catechol이 *ortho*

대사경로에 의해 분해 이용되는 방식인데(12, 14), 드문 경우로 *meta* 대사경로를 통해 분해 이용되는 경우가 있고, 이런 균주는 plasmid상에 아닐린 분해 유전정보가 수록되어 있을 가능성이 보고되어 있다(15).

본 실험에서는 유해한 환경오염물질의 하나인 아닐린에 대하여 분해능이 뛰어난 균주를 선별하고 그 균주들의 아닐린 분해특성, plasmid에의 아닐린 분해 유전 정보수용 여부 등을 살펴보았다.

#### 재료 및 방법

##### 시 약

실험에 사용된 염류 종류의 시약은 일급 또는 특급의 것을 사용하였으며, 배양에 사용된 배지류의 시약은 Difco 제품을 사용하였다. 아닐린은 Hanawa 제품이었고 아닐린 유도체는 Aldrich, 다른 방향족 화합물, 탄화수소, 아미노산, 항생제와 아닐린 정량을 위한 N-1-naphthylethylenediamine은 Sigma 제품이였다.

**Key words:** Aniline degrading bacteria, isolation, plasmid detection

<sup>†</sup>Present address; Department of Biochemistry, Rutgers, The State University, New Brunswick, NJ 08903, U.S.A

\*Corresponding author

**배 지**

균분리 및 배양을 위한 최소배지는 Kho 등(16)에 의한 배지조성과 같은 것을 pH 6.5로 조정하여 사용하였으며 완전배지로는 Luria broth를 사용하였다. 효소활성 유도배지로는 5 mM aniline과 0.15% peptone이 첨가된 최소배지를 사용하였고 이중기질 배지(dual substrate media)는 최소배지에 3 mM aniline과 2-3 mM의 다른 탄소원을 첨가한 것을 사용하였다.

**아닐린 이용균주의 분리 및 동정**

한강의 지천인 안양천, 탄천, 중랑천 등지로부터 토양시료 및 물시료를 채취하여, 0.05% 아닐린을 첨가된 최소배지에 1%로 첨가해주고 30°C에서 3일 동안 1차 진탕배양한 후 새로운 아닐린 최소배지로 2회 더 옮겨가며 농화배양하였다. 최종농화배양된 액을 적당히 희석하여 0.1% aniline이 함유된 최소 아닐린 고체 평판배지에 도말하여 30°C에서 3일 배양시켰고, 생성된 균총(colony)들을 색과 형태에 따라 순수 분리하였다.

분리된 미생물들의 동정은 일반적인 동정방법(17)과 API-20E, API-20NE kit (Analytical Products Inc., New York) (18, 19)를 사용하여 실시하였다.

**아닐린의 정량**

아닐린은 주로 diazo coupling reaction을 이용 정량하였다(20). 0.5 ml의 시료에 NaNO<sub>2</sub>를 함유한 1N HCl 1 ml을 첨가하여 3분동안 실온에 정치한 후 2% ammonium sulfite 0.5 ml을 넣어 과량의 NaNO<sub>2</sub>를 분해시켰다. 2분후 0.6% N-naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride를 함유한 95% ethanol 0.5 ml을 첨가하여 섞어주고 15분뒤에 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 아닐린 농도는 0-20 μM의 aniline에 대한 standard curve로부터 계산하였다.

**효소의 활성 측정**

Aniline dioxygenase의 활성은 휴지세포(resting cell)에 의한 아닐린 제거속도를 측정함으로써 계산하였다(14). 50 mM 인산완충용액(pH 7.0) 10 ml과 10 μmoles 아닐린, 1.5 mg chloramphenicol, 그리고 단백질량으로 0.6 mg에 해당되는 휴지세포를 100 ml 삼각플라스크에 넣고 30°C에서 진탕시키면서 10 분간격으로 0.5 ml씩 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 바로 35%(w/v) formaldehyde 17 μl와 섞어 더 이상의 아닐린 분해를 막은 상태에서 원심분리하여 균체를 제거하고, 상등액에 대하여 아닐린 농도

를 측정하였다.

Catechol 1, 2-dioxygenase의 활성측정은 Dorn과 Knackmuss에 의해 보고된(21) molar extinction coefficient를 사용하여 Hegeman의 방법(22)에 의해 측정하였으며, catechol 2, 3-dioxygenase는 Nozaki

**Table 1. Identifications of five isolates which have harbored one or several plasmids by conventional test methods, and API-20E and 20NE kit.**

Tests	4A1	6B2	6B3	6E2	6F1
Gram staining <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
McConkey	+	+	+	+	+
Oxidative/Fermentative	-	0	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Mobility	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	-
Fluorescence pigment	-	-	-	-	-
Denitrification	-	-	-	-	-
Growth at 42 C	-	-	-	-	-
Growth at 4 C	-	-	-	-	-
Nitrate reduction <sup>b</sup>	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-
Glucose(fermentative)	-	-	-	-	-
Arginine dehydrate	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Esculine utilization	-	-	-	-	-
Gelatine liquefaction	-	-	-	-	-
β-Galactosidase	-	-	-	-	-
Glucose utilization	-	-	+	-	-
Arabinose utilization	-	-	-	-	-
Mannose utilization	-	-	-	-	-
Mannitol utilization	+	-	-	-	-
N-Acetyl-glucosamine	-	-	-	-	-
Maltose utilization	-	-	-	-	-
Gluconate utilization	+	+	+	+	+
Caprate utilization	+	+	+	+	+
Adipate utilization	+	+	+	+	-
Malate utilization	+	+	+	+	+
Citrate utilization	-	+	+	+	+
Phenylacetate	+	-	-	-	-
Lysine decarboxylase <sup>c</sup>	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-	-
Hydrogen sulfide	-	-	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-	-	-
Acetoinine	+	+	+	+	+
Inositol utilization	-	-	-	-	-
Sorbitol utilization	-	-	-	-	-
Rhamnose utilization	-	-	-	-	-
Sucrose utilization	-	-	-	-	-
Melibiose utilization	-	-	-	-	-
Amygdaline	-	-	-	-	-

Tests were performed by conventional methods(a), API-20E(b), and API-20NE(c).

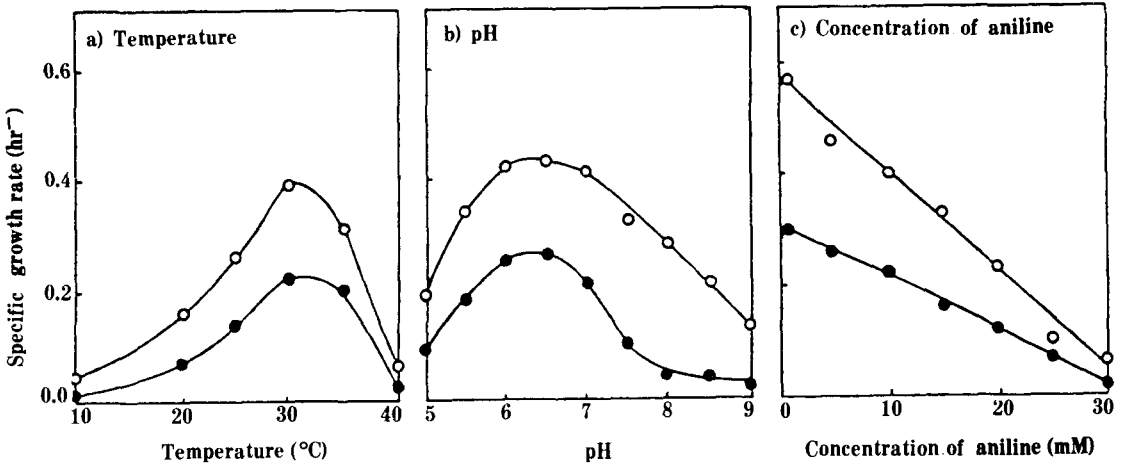


Fig. 1. Specific growth rate of *P. testosteroni* strain 6F1 and *P. acidovorans* strain 4A1 according to the temperature, pH and the concentration of aniline.

○-○ *P. testosteroni* strain 6F1  
●-● *P. acidovorans* strain 4A1

와 Hegemon의 방법(23)에 의해 실시하였다. 이때 사용된 균체 추출물을 다음과 같이 준비하였다. 각 배지에서 배양한 균체를 원심분리하여 catechol 1, 2-dioxygenase는 50 mM 인산완충용액 (pH 7.0)으로, catechol 2,3-dioxygenase는 100 mM 인산완충용액 (pH 7.5)으로 각각 세척한 다음 다시 분산시켜 sonicator로 균체를 파쇄하였다. 파쇄는 30초간격으로 30초씩 처리하여 전체 파쇄시간을 3분으로 하였다. 이렇게 얻어진 세포파쇄물을 4°C에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상등액을 효소활성측정용으로 사용하였다.

**Plasmid의 검출, 접합에 의한 형질전환 및 curing 실험**

Plasmid의 검출은 Kado와 Liu 방법을 사용하였으며(24), 형질전환은 Pickup 등(25)에 의한 평판접합, 시험관접합, 여과막접합 등을 이용하였다. Plasmid curing은 완전배지에서 mitomycin-C를 처리하여 아닐린 분해능을 상실한 균주를 얻은 후 plasmid 검출을 통하여 curing된 균주를 찾았다(25).

**결과 및 고찰**

**균주의 분리 및 동정**

한강의 여러 지점에서 채취한 여러 시료들로부터 아닐린을 유일한 탄소, 질소, 에너지원으로 이용하여 자라는 미생물 29종을 분리 선발하였다. 분리균

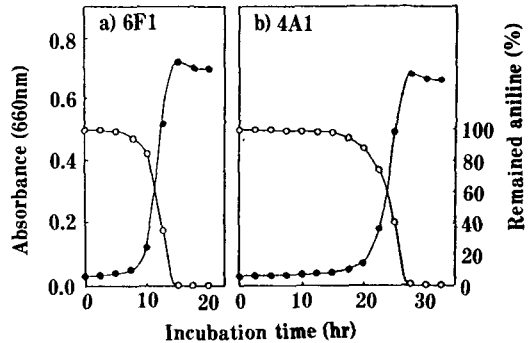


Fig. 2. Growth and aniline utilization curves of *P. testosteroni* strain 6F1 and *P. acidovorans* strain 4A1.

●-● Growth curve (OD<sup>660</sup>)  
○-○ Remained aniline (%)

주중 분해능이 뛰어난 10종에 대해 일반적인 동정 실험 및 API-20E와 API-20NE kit를 사용하여 동정하여 본 결과 아홉 균주는 *Pseudomonas*속으로 그리고 한 균주는 *Acinetobacter* 속으로 판정되었다.

전체 29균주중 Kado와 Liu의 plasmid 검색방법에 의해 plasmid를 갖고 있는 것으로 나타난 균주는 4A1, 6B2, 6B3, 6E2, 6F1 5종이었는데, 이들중 meta 경로를 통해 아닐린을 분해하는 경우가 6B2, 6B3, 6E2, 4A1 4종이었고 ortho 경로를 이용하는 균주는 6F1 하나였다. 따라서 본 실험에서는 아닐린 분해능이 뛰어나면서도 plasmid를 가지며 각각 ortho 경로와 meta 경로를 통해 아닐린을 분해 이용하는 두 균주 4A1과 6F1을 최종 선발하여 실험하였

는데 6F1은 *P. testosteroni*로 동정되었으며 4A1은 *P. acidovorans*로 동정되었다(Table 1).

**분리균주 4A1과 6F1의 특성**

*P. testosteroni* 6F1과 *P. acidovorans* 4A1의 성장최적온도와 pH는 모두 동일하게 30°C와 6.5이었고, 성장최적 아닐린 농도는 1 mM 이하였다(Fig. 1). 아닐린 농도가 높아질수록 성장속도가 감소하여 30 mM 이상에서는 자라지 못하였는데 이러한 현상은 아닐린 그 자체의 독성 때문이라 생각된다.

4A1은 최소배지에서 아닐린을 이용하기 위하여 최소한 16시간의 유도기간(lag tme)을 필요로 하였고 최대 비성장속도(maximum specific growth rate)는 0.30 hr<sup>-1</sup>로 나타났다. 6F1은 단지 7시간의 유도기간만을 필요로 하고 최대 비성장속도는 0.58 hr<sup>-1</sup>로 높게 나타났다(Fig. 2). 이러한 성장속도는 얼마나 빨리 아닐린을 이용하느냐에 의해 결정되고 이것은 속도결정단계(rate limiting step)로 판단되는 aniline dioxygenase에 의해 관여되어진다고 사료되어 이를 간접으로 나타내는 휴지균체에 의한 아닐린 제거속도를 측정하였다. 그 결과 4A1은 1 mg 단백질에 해당하는 휴지균체가 분당 0.019 μmole의 속도로 아닐린을 제거하는데 비해 6F1은 동일한 조건에서 0.11 μmole의 속도로 아닐린을 제거하였다.

이들 두 균주는 단지 aniline만을 이용 성장할 수 있어 아닐린 유도체나 다른 방향족 화합물은 이용할 수 없었는데, 특히 6F1은 benzoate와 catechol에서

성장 가능하였으나 4A1은 이 둘 다 이용하지 못하였다(Table 2).

6F1과 4A1의 항생제 내성은 다른 *Pseudomonas*의 경우와 거의 비슷한 양상을 나타내어 100 μg/ml 이상의 ampicillin, cycloserine, streptomycin에 대해 저항성을 보였고 tetracycline에 대해서는 전혀 내성이 없는 것으로 나타났다.

**분리균주들의 아닐린 분해 대사 경로**

서론에서 이미 언급했듯이 방향족 화합물은 미생물에 의해 생분해될시에 방향족 고리의 1,2위치가 절단되는 *ortho* 경로와 2,3위치가 절단되는 *meta* 경로 둘중에 어느 한 경로에 의해 일반적으로 분해 이

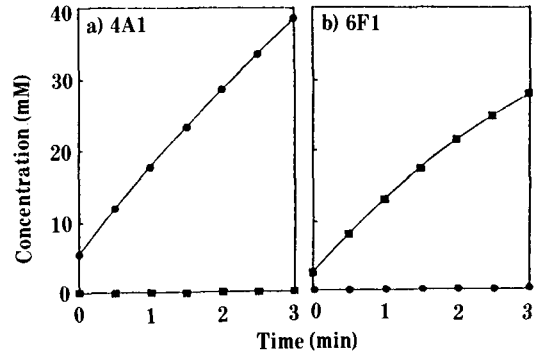


Fig. 3. Determination of activity of catechol-oxygenases in cell-free extracts of isolates.

■ - ■ *cis, cis*-muonic acid  
● - ●  $\alpha$ -hydroxy muonic semialdehyde

Table 2. The characteristics of the representative isolates.

Chacteristics	4A1	6F1
Identification	<i>P. acidovorans</i>	<i>P. testosteroni</i>
Aniline uptake rate <sup>a</sup>	0.019	0.11
Catechol 1,2-dioxygenase	0.0	0.17
Catechol 2,3-dioxygenase	0.26	0.0
Ring cleavage	<i>meta</i>	<i>ortho</i>
Plasmid number	1	4
Coding on plasmid	(+)	(-)
Growth on benzoate	-	+
Lag time(hour)	16	7
Max. sp. growth rate (hr <sup>-1</sup> )	0.30	0.58
Growth on aniline <sup>b</sup> derivatives	-	-

a unit: μmole/min/mg protein of cell

b 2-, 3-, 4-, and 3,4-dichloroaniline, 2-, 3-, and 4-methylaniline, 4-carboxylaniline, and 4-methylaniline.

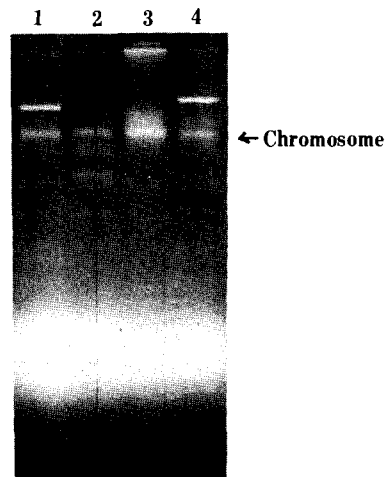
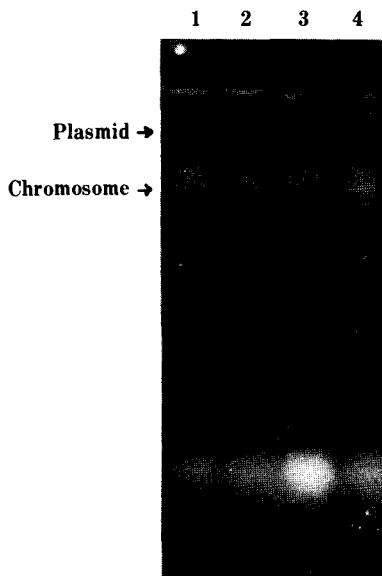


Fig. 4. Agarose gel electrophoretic pattern of plasmids in *P. putida* CSTA (lane 1), *P. testosteroni* 6F1 (lane 2), *P. acidovorans* 4A1 (lane 3) and *P. putida* KCTC 1643 (lane 4).



**Fig. 5.** Detection of plasmid from the mutants of *P. acidovorans* 4A1 which lost abilities to dissimilate aniline

1,2: mutant (aniline<sup>-</sup>, mutated by mitomycin-C)

3: cured strain (aniline<sup>-</sup>)

4: wild strain (aniline<sup>+</sup>)

용된다. 분리된 두 균주에 대해 아닐린이 어느 경로를 통해 분해되는지를 알아보기 위하여 균체추출물에 catechol을 첨가해 보았더니 4A1의 경우에는 *cis*, *cis*-muconic acid 만을 생산하고 6F1은  $\alpha$ -hydroxyruconic semialdehyde만을 생산하는 것으로 나타나, 4A1은 catechol 2,3-dioxygenase에 의한 *meta* 경로를 통해, 6F1은 catechol 1,2-dioxygenase에 의한 *ortho* 경로를 통해 아닐린을 분해 이용하는 것으로 나타났다(Fig. 3). *Pseudomonas* 속 중에 아닐린을 *meta* 경로로 분해하는 균주는 현재까지 3종류만이 알려져 있으며 (9), Lyons(27) 등의 조사에 의하면 그들이 대상으로 하여 조사한 연못의 아닐린 분해 균주의 대부분이 *ortho* 경로를 통해 아닐린을 이용하는 것으로 나타났다. 따라서 분리균주 4A1이 *meta* 경로를 통해 아닐린 분해 이용하는 것은 특이한 경우이며, 또 큰 plasmid까지 가지고 있으므로 이 plasmid에 아닐린의 *meta* 분해 경로가 수록되었을 가능성이 높을 것으로 사료된다.

#### 분리균주들의 plasmid

6F1은 4개의 plasmid를 갖고 있었으나(Fig. 4) 이 균주가 아닐린 분해를 *ortho* 경로를 통해 한다는 점과 또 여러 다른 균주에 대해 접합을 시도하여 보았

으나 아닐린 분해능이 전혀 이동되어지지 않는다는 점에서 이 균주의 아닐린 분해효소의 유전자는 plasmid와 상관없는 것으로 보여진다.

4A1은 1개의 plasmid를 갖고 있는 것으로 나타났는데(Fig. 4), 불안정하지만 *P. putida* KCTC 2403에 접합으로 아닐린 분해능이 이동된다는 점과 mitomycin-C 처리에 의해 아닐린 분해능이 상실된 균주중에서 plasmid가 상실된 균주가 발견되었다는 점에서 4A1의 경우 아닐린 분해효소의 유전자가 plasmid상에 수록되어 있을 수 있다는 가능성을 확인하였다(Fig. 5). 특히 transposon을 이용한 돌연변이를 위해 suicide vector pGS9(28)을 4A1에 접합 이동시킬 경우 아닐린을 이용 못하는 돌연변이주들이 생겼고 이들은 대부분 plasmid가 손실된 것으로 밝혀져 plasmid와의 관련성을 더욱 확실히 해주었다. 다른 크기가 큰 plasmid와 함께 전기영동하여 본 결과 이 plasmid는 크기가 230 Kb 정도인 것으로 계산되었으며 이러한 크기는 John(29) 등이 보고한 아닐린 분해 plasmid가 100 Kb인 것에 비하여 아주 큰 것으로 나타났다.

#### 요 약

한강의 지천으로부터 채취한 시료에서 29종의 아닐린 분해 균주를 분리선발하였다. 분리 균주중 10균주에 대하여 동정 시험하여 본 결과 9균주는 *Pseudomonas* 속이었고 한 균주는 *Acinetobacter* 속이었다. 전체 29균주중 plasmid를 갖고 있는 균주는 모두 5종이었으며 이들 5균주중 4균주는 *meta* 경로를 통하여 아닐린을 분해 이용하였고 나머지 한 균주는 *ortho* 경로를 통하여 아닐린을 분해하였다. *meta* 경로 이용 균주의 하나인 *Pseudomonas acidovorans* 4A1은 230 Kb 크기의 plasmid를 갖고 있었으며, 접합실험과 curing 실험을 통하여 이 plasmid에 아닐린 분해 유전 정보가 수록되었을 가능성을 확인할 수 있었다.

#### 참고문헌

1. Sitting, M., "Handbook of toxic and hazardous chemicals," Noyes publications (1981).
2. Bartha, R., *J. Agric. Food Chem.*, **16**, 602 (1968).
3. Bartha, R. and D. Pramer, *Adv. Appl. Microbiol.*, **13**, 317 (1970).
4. You, I.S. and R. Bartha, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 274 (1982).
5. Carolyn, D.L., S. Katz, and R. Bartha, *Appl. En-*

- viron. Bacteriol.*, **48**, 491 (1984).
6. Kaufman, D.D., J.R. Plimmer, J. Iwan, and U.I. Klingebiel, *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 916 (1972).
  7. Surovtseva, E.G. and A.I. Volnova, *Mikrobiologiya*, **49**, 49 (1980).
  8. Aoki, K., R. Shinke, and H. Nishira, *Agri. Biol. Chem.*, **47**, 2569 (1983).
  9. Wyndham, R.C., *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 781 (1986).
  10. You, I.S. and R. Bartha, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 678 (1982).
  11. Akoi, K., K. Ohtsuka, R. Shinke, and H. Nishira, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 865 (1984).
  12. Zeyor, J., A. Wasserfallen, and K.N. Timmis, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 447 (1985).
  13. Bachofer, R., F. Lingens, and W. Schafer, *febs Letters*, **50**, 288 (1975).
  14. Helm, V. and H. Reber, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 191 (1979).
  15. Latorre, J., W. Reineke, and H.J. Knackmuss, *Arch. Microbiol.*, **140**, 159 (1984).
  16. 고영희, 하일호, 배경숙 : 한국산업미생물학회지, **16**(3), 199(1988).
  17. Gerhardt, P., *et al.*, "Manual of Methods for General Bacteriology," Am. Soci. Microbiol., Washington, (1981).
  18. Krieg, N.R. and J.G. Holt, "Bergey's manual of Systematic Bacteriology," vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 140, (1984).
  19. Robertson, E.A. and J.D. MacLowery, *Appl. Microbiol.*, **28**, 691 (1974).
  20. Thmpson, J.F. "Methods in Enzymology," 17A, ed. by H. Tabor and C.W. Tabor, Academic Press, New-York, p. 894, (1970).
  21. Hegeman, G.D., *J. Bacteriol.*, **91**, 1140 (1966).
  22. Dorn, E. and H.J. Knackmuss, *Biochem. J.*, **174**, 85 (1978).
  23. Nozaki, M., "Methods in Enzymology," 17A, ed. by H. Tabor and C.W. Tabor, Academic Press, New-York, p. 522, (1970).
  24. Cado, G.I. and S.-T. Liu, *J. Bacteriol.*, **145**, 1365 (1981),
  25. Pickup, R.W., R.J. Lewis, and P.A. Williams, *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 153 (1983).
  26. Rheinwald, J.G., A.M. Chakrabarty, and I.C. Gunsalus, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**, 885 (1973).
  27. Lyons, C.D., S. Katz, and R. Bartha, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 491 (1984).
  28. Selvarai, G. and V.N. Iyer, *J. Bacteriol.*, **156**, 1292 (1983).
  29. John G.A. and G. Mackinnon, *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 869 (1984).

(Received September 15, 1988)