

Pseudomonas 속 세균에 의한 방향족화합물 생분해

정윤창¹·김경남²·최용진²·양한철^{1*}·송준상³·서운수³

¹고려대학교 농과대학 식품공학과, ²유전공학과, ³국립환경연구원 수질연구부

Biodegradation of Aromatic Compounds by Strains of *Pseudomonas*

Jeong, Yun-Chang¹, Kyung-Nam Kim², Yong-Jin Choi², Han-Chul Yang^{1*}
Jun-Sang Song³ and Yun-Su Seo³

¹Department of Food Technology, ²Department of Genetic Engineering
College of Agriculture, Korea University, Seoul 136-701, Korea

³Division of Wastewater Engineering, National Institute of Environmental Research

Thirty-six aromatic compound biodegraders; 10 strains for benzoate, 10 for salicylate, 6 for *m*-toluate, and 10 for DL-camphor were isolated and taxonomically characterized. A mutant *Pseudomonas* strain, Ben 6-2, derived from Ben 6 revealed remarkably improved ability to metabolize benzoate. Thus enhancement of the average substrate removal rate from 5.2 to 11.0 mg/l/hr was attained by the mutant. Both of strains Sal 7 and Tol 2, degraders of salicylate and *m*-toluate respectively, were classified as *Pseudomonas* spp. Both strains were found to be extremely effective in metabolizing each aromatic substrates. The average substrate degradation rates in minimal salt media containing 2,200 mg/l of the substrate were calculated to be 40.1 mg/l/hr for strain Sal 7 and 33.0 mg/l/hr for Tol 2. Cam 10, a camphor degrading strain was demonstrated to be capable of mineralizing benzoate, phenol, toluene, octane, cyclohexane and xylene as well as camphor. Strain 1040 isolated from Cam 10 after repeated adaptation to 1,000 mg/l *m*-toluate gained the ability to utilize toluate as a sole carbon source. The mutant grew actively at the expense of a mixture of carbon sources; camphor, *m*-toluate, benzoate and phenol (each: 200 mg/l) and utilized the substances in the preferential order of camphor, phenol, benzoate, and *m*-toluate. Among the biodegraders examined Cam 1040 and Tol 2 were detected to harbor plasmid. The plasmid from Cam 1040 was determined to be about 98Kb, and evidenced to encode the enzyme(s) for the degradation of camphor. For the further diversification of the metabolic potentials of Cam 1040, the NAH 2 plasmid of *Pseudomonas putida* NCIB 9816 was transferred to Cam 1040 by conjugation. The exconjugant obtained, Cam 1043, proved to gain an additional ability to metabolize salicylate and naphthalene.

오늘날 우리 인류가 직면하고 있는 급속한 인구증가와 고도의 산업 발달 이면에는 인간의 생존활동으로 인한 대량의 폐기물 방출을 초래함과 동시에 그 종류 역시 해가 거듭될수록 더욱 다양해지고 있는 실정이다. 따라서 우리의 환경은 날이 갈수록 더욱 심각하게 오염되고 있으며 그 결과 환경정화 문제는 우리 스스로가 해결하지 않으면 안되는 매우 중대한

당면과제가 되고 있다(1). 한 예로서 화학공업에서 다량 이용, 방출되고 있는 여러가지 유기화합물 역시 중요 환경오염의 원인물질이 되고 있는 것이다. 특히 우리나라에서도 해마다 그 사용량이 증가일로에 있는 방향족 탄화수소는 대다수가 생체에 독성을 나타낼 뿐만 아니라 자연분해가 어려워 토양과 하천에 축적되어 농수산물에 대한 오염으로까지 발전할

Key words: *Pseudomonas*, biodegradation, aromatic compound, benzoate, salicylate, *m*-toluate, camphor

*Corresponding author

수 있으리라고 예상된다(2, 3).

선진 각국에서는 근래에 와서, 이와 같은 난분해성 독성 유기화합물을 효과적으로 분해, 제거할 수 있는 방법, 특히 물리화학적 처리법에 비해 2차 오염의 가능성이 적을 뿐만 아니라 경우에 따라서는 보다 경제적이고 보다 효율적인 처리방법이라고 평가되고 있는, 미생물을 이용한 생물공학적인 처리법에 대한 연구가 환경정화 차원에서 매우 활발하게 진행되고 있다(4).

난분해성 각종 방향족 탄화수소를 자화할 수 있는 미생물은 대부분 *Pseudomonas* 속에 속하는 균종이며 그밖에 *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Alkaligenes*, *Moraxella*, *Bacillus* 등이 보고되고 있다(5-8). 이들 세균의 독성 유기화합물 분해능은 염색체상의 유전인자와 관련된 특성이지만 plasmid에 기인되는 예도 적지 않다(9-17). 대표적 분해계 plasmid로서는 P₂ incompatible group에 속하는 camphor 분해 plasmid(CAM), actane 분해 plasmid(OCT), 등과 P₁ incompatible group의 toluene 분해 plasmid(TOL), salicylate 분해 plasmid(SAL), naphthalene 분해 plasmid(NAH) 등이 있으며 이들 대다수 분해계 plasmid는 conjugation에 의해 쉽게 전달될 수 있는 특성을 가지고 있다. 그러나 xylene 분해 plasmid(XYL)나 OCT 등과 같은 소수의 plasmid는 nonconjugative plasmid인 것으로 알려지고 있다(18-20).

한편 대다수의 독성 유기화합물 분해균주는 각각 특정의 극히 제한된 종류의 화합물만을 분해하며 또 기질농도가 일정수준 이상이 되면 분해활성의 현저한 저하와 더불어 균체증식이 중단되는 것이 일반적인 현상이다. 그러므로 각종 유기화합물이 다양하게 혼합되어 있는 실제의 오염환경의 정화를 위해서는 오염기질의 종류에 따라 서로 다른 여러가지 분해균주를 혼합사용해야만 하는 난점이 있다고 하겠다(21). 그러나 분해계 plasmid의 종내 또는 종간 전달특성을 효과적으로 이용하면 다양한 분해능을 갖는 효율적인 다기능 분해균주 개발이 가능할 것으로 생각된다(22).

따라서 본 연구에서는 우리나라 화학공업에서 해마다 그 사용량이 증대되고 있는 각종 방향족 난분해 탄화수소를 자화할 수 있는 균주를 토양으로부터 분리, 균주동정과 함께 분해활성을 증진시킨 고활성 균주를 개발, 이미 보고한 바 있으며(23) 본 보에서는 관련 plasmid를 분리 그 특성을 조사, 활용하여 여러가지 방향족 탄화수소를 다같이 분해, 자화할 수 있는 다기능 균주를 개발하여 그 결과를 보고한

다.

재료 및 방법

토양시료 채취

분해균주 분리를 위한 토양시료는 서울, 경기 및 전라도 지방의 농경지, 임야, 폐기물 매립지, 오염하천의 저질과 화학공업공장의 폐수시설의 오니 등에서 전보(2)에 상술한 방법에 따라 채취, 사용하였다.

균주분리 및 동정

전보(2)에 상술한 과정에 따라 일정량의 분해기질을 첨가한 기초배지를 사용, 2차의 증식과 3차의 분리과정을 거쳐 토양시료로부터 방향족 화합물 분해균주를 분리하였다. 토양분리균은 Laboratory Manual of General Bacteriology(24)와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(25)를 주로 참고하면서 형태적, 생화학적 특성을 조사 균주동정을 실시하였다.

사용균주 및 배지

본 연구에 사용한 중요 균주는 Table 1에 표시한 각종 방향족 화합물을 분해하는 분리균과 이들의 변이주 및 SAL, TOL, NAH, Rms 등의 plasmid를 보유하고 있는 균주들이다. 균주의 분리 및 보존과 분해활성 측정을 위한 실험에는 주로 기본배지(BSM)를 사용하였으며 이의 조성은(g/l); K₂HPO₄, 5.8; KH₂PO₄, 4.5; (NH₄)₂SO₄, 2; MgCl₂, 0.16; CaCl₂, 0.02; NaMoO₄, 0.002; FeSO₄, 0.001; MnCl₂, 0.001; pH 7.0이다.

BSM의 각종 탄소원중에서 benzoic acid, salicylic acid 및 *m*-toluic acid 등은 이들 수용액을 70°C로 가열한 다음 1N-NaOH를 가해 가용성 염으로 전환시킨 후 pH를 7.4±0.2로 조정, 사용하였으며 camphor와 naphthalene은 평판배지 체적의 약 0.46% 상당하는 양의 결정을 petri-dish 뚜껑에 올려 놓아 증기상태로 공급하였다. 또 toluene, xylene 및 benzene은 petri-dish 뚜껑에 부착시킨 Durham 관을 이용, 공급하였으며 cyclohexane과 octane은 평판배지 중앙의 배지를 1cm² 정도 떼어 낸 공간에 1~2ml의 기질을 추가, 공급하였다(26).

분해활성 측정

500 mg/l의 탄화수소 기질이 첨가된 BSM에 분

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain/Plasmid	Characteristics	Source
<i>Pseudomonas</i> sp.		
Ben 6	wild type isolated from soil (Ben ⁺)	this study
Sal 7	" (Sal ⁺)	"
Tol 5	" (Tol ⁺)	"
Cam 10	" (Cam ⁺)	"
Cm 104	mutant of Cam 10	"
Cam 1040	mutant of Cam 104	"
Cam 1041	cured derivative of Cam 1040	"
Cam 1042	"	"
Cam 1043	exconjugant (Nah ⁺ , Cam ⁺)	"
<i>Pseudomonas putida</i>		
mt-2/pWWO	wild type/pWWO(Tol ⁺)	William and Murray (1974)
KU801/pKU801	wild type/pKU801(Sal ⁺)	Yung-Nok Lee (1986)
AC101/pAC101	wild type/pAC101(Sal ⁺)	A.M. Chacrabarty (1972)
NCIB9816/pNAH2	wild type/pNAH2(Nah ⁺)	NCIB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO303/Rms148	Arg ⁻ /Rms148(Sm ^r)	Sagai <i>et al.</i> (1975)

해균주를 접종, 30°C에서 2일간, 170 rpm으로 진탕 배양한 배양액을 중균으로 이용, 일정량의 기질을 첨가한 BSM 1.2l에 OD가 약 0.1(600 nm)이 되도록 상기 중균을 접종하고 전배양에서와 같은 조건에서 진탕배양하면서 배양시간에 따른 균체증식, 기질 감소량 및 화학적 산소요구량(COD) 등의 변화를 측정, 분해활성을 결정하였다.

균체증식 측정

배양 중 균체증식 정도는 600 nm에서의 흡광도를 측정, OD 값으로 표시하였다.

기질분석

Spectrophotometer를 이용하는 방법 : 표준물질을 사용, 각 화합물의 최고 흡광도를 나타내는 파장을 구하고, 이 파장에서 각 화합물의 농도에 따른 검량 곡선을 작성한 후 이 곡선을 이용, 시료의 흡광도를 측정하여 기질량을 환산하였다.

Gas chromatography에 의한 분석법 : 전보(23)에 기술된 분석방법에 준해 각 시료를 전처리한 다음 Shimadzu사의 GC-7AG F.I.D. Model을 이용, 각 방향족 화합물을 분석하였다.

화학적 산소요구량(COD) 측정

COD 측정은 환경오염 공정시험법(27)에 따라

KMnO₄ 용액을 사용, 시료를 산화시킨 후 잔여 KMnO₄ 양을 분석, 소모된 산소량을 산출하여 COD_{Mn}값을 구하였다.

변이주 분리

분해활성이 증진된 변이주 선별은 shock load를 방지하기 위하여 처음에는 낮은 농도에서 시작하여 점차적으로 높은 농도의 기질에 분해균을 적응시킴으로써 분해력을 증진시키는 자연돌연변이 선별방법(14)을 이용하였다.

Plasmid 분리

분해균을 L-broth에 접종, 하룻밤 배양한 다음 10,000 rpm에서 8분간 원심분리하여 얻은 균체를 이용, Hansen과 Olsen 방법(28)에 따라 plasmid를 분리하였다.

Plasmid curing

Curing 시약으로는 mitomycin-C를 사용하여 전보(23)에 기술한 방법에 따라 curing 하였다.

전기영동 및 사진촬영

전기영동은 0.08 M Tris-phosphate buffer(pH 8.0)의 0.7% agarose gel을 이용, 100 V에서 약 1시간 정도 시료를 전기영동시켰다. Plasmid DNA는

EtBr 용액 (1.0 $\mu\text{g/ml}$)으로 염색하고 장파장의 UV light 를 조사하여 관찰하였으며 Kodak 적색 gelatin filter 23A 를 부착시킨 polaroid UV-5 카메라를 사용하여 사진촬영을 하였다.

항생제 내성시험

Conjugation 실험의 selective marker 로서 항생제 내성 marker 의 이용 가능성을 검토하기 위한 예비 실험으로서 각종 항생제 내성시험은 시험균주를 L-broth 에서 대수증식기까지 배양한 다음 배양액 0.1 ml 을 일정농도의 특정 항생제가 첨가된 Luria agar 에 도말, 30°C에서 3일간 배양하면서 생육상태를 관찰, 내성 여부를 판별하였다.

Gentamicin 내성 변이주 분리

Cam 1040 균주를 L-broth 에서 약 10 시간 배양한 후 이 배양액에 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 gentamicin 을 첨가하고 24 시간 더 계속 배양하였다. 상기 배양액 일정량을 동량의 gentamicin 이 함유된 Luria agar 에 접종, 30°C에서 2-3 일 배양, gentamicin 내성의 Cam 1040 변이주를 분리하였다.

Conjugation

Donor 와 recipient 균주를 공히 L-broth 에서 대수 증식 말기까지 진탕배양하고 donor cell 은 효과적인 pili 생성을 위해 mating 직전 30 분 동안 정지배양시켰으며 recipient cell 은 50°C에서 10 분간 가열, heat shock 처리를 하였다(24). Conjugation 은 Jeenes 와 Williams 의 방법(29)에 따라 전처리한 donor 와 recipient cell 을 1 : 2 로 혼합하고 membrane filter 로 여과한 다음 filter 를 Luria agar 에 접촉, 약 18 시간 배양시킨 후 생리식염수 0.5 ml 에 세포를 현탁시켜 일정량을 선택배지에 도말 접종하고 약 48 시간 배양시켰다.

결과 및 고찰

Benzoate 분해

균주분리 및 동정 : Benzoate 분해균주는 폐기물 매립지 토양에서 3주, 폐수처리시설 오니에서 2주, 나머지 각 토양시료에서 1주씩 총 10주를 분리하였다. 상기 benzoate 분해 분리균의 분해활성 비교시험 결과 *Pseudomonas* 속의 균종으로 동정된 Ben 6 균주가 가장 높은 분해활성을 나타내었다(Data not shown) 따라서 Ben 6 균주를 고활성 변이주 분리를 위한 공시균주로 선정 이용하였다.

고활성 변이주 분리 : Ben 6 는 benzoate 농도가 500 $\mu\text{g/ml}$ 이하의 배지에서는 잘 증식하나 그 이상의 농도에서는 현저한 생육저해를 받아 600 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 완전한 생육정지를 나타내었다. 따라서 “방법”란에 기술되어 있는 변이주 선별과정에 따라 고활성 변이주를 분리하여 Ben 6-2로 명명하였다

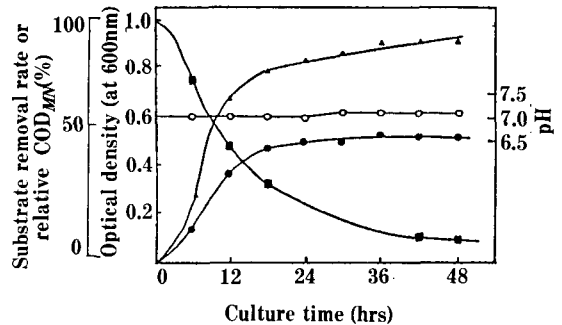


Fig. 1. Benzoate degradation by strain Ben 6-2. The initial benzoate concentration was 790 mg/l, and cultivation was carried out at 30°C with reciprocal shaking.

- ; Cell growth
- ; pH
- ▲ ; Substrate removal rate
- ; Relative COD_{MN}

Table 2. Utilization of aromatic compound as a sole carbon and energy source by the degraders.

Strain	BSM	BSM + Glucose	Conc. of the aromatic compound added to BSM ($\mu\text{g/ml}$)				
			500	600	700	1000	2000
Ben 6	-	+	+++	-			
Ben 6-2	-	+++	+++	+++	+++	+++	-
Cam 10	-	+++	+++	++	+	NT	NT
Cam 104	-	+++	+++	+++	++	-	-
Sal 7	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Tol 2	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++

- : No growth, + : Poor growth, ++ : Moderate growth, +++ : Good growth, NT : Not tested.

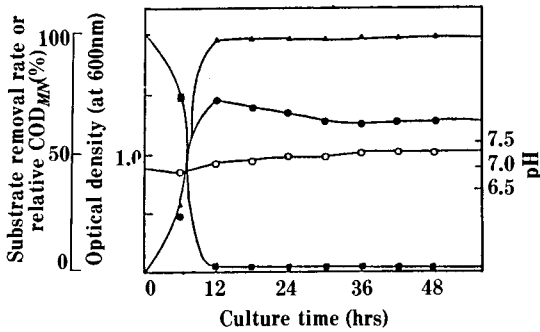


Fig. 2. Salicylate degradation by strain sal 7.
The initial concentration of salicylate in the pure media was 2,200 $\mu\text{g/ml}$, and the cells were cultured at 30°C with reciprocal shaking.

- ; Cell growth
- ; pH
- ▲ ; Substrate removal rate
- ; Relative COD_{MN}

(Table 2). Ben 6-2 균주를 790 $\mu\text{g/ml}$ 의 benzoate가 첨가된 기초배지에 접종, 진탕배양하면서 균체증식과 기질 분해활성을 측정된 결과 배양 초기에는 균체증식에 비례해서 기질 분해율도 증가하여 배양 12시간 후에는 약 70%의 기질이 분해 제거되었으나 그 이후부터는 비교적 완만한 분해율 증가를 나타내었다. 그러나 배양 48시간 전후에서는 90%에 가까운 높은 기질 제거율을 보였고 이와 비례해서 COD 값도 현저히 감소되었다(Fig. 1).

Salicylate 분해

균주분리 및 동정 : 폐수처리시설 오니에서 3주, 폐기물 매립지에서 2주, 기타 하천수를 제외한 각 시료에서 1주씩 총 10주의 salicylate 분해균주를 분리하였으며 10주 모두가 *Pseudomonas* 속에 속하는 균주로 동정되었다.

분해활성 측정 : Salicylate 분해균 특히 Sal 7 균주는 Table 2와 같이 2,000 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 높은 기질 농도에서도 활발한 분해활성을 유지하였다. 따라서 별도의 고활성 변이주 선별과정을 거치지 않고 Sal 7 균주를 그대로 2,200 $\mu\text{g/ml}$ salicylate가 첨가된 배지에 접종, 진탕배양하면서 기질 분해율을 조사하였다. Fig. 2와 같이 기질 분해율이 균체증식 초기 지체기에 해당하는 배양 12시간 전후에서 약 98%를 나타내고 있어 Sal 7 균주는 매우 효율적인 salicylate 분해균주임을 알 수 있었다.

Toluate 분해

균주분리 및 동정 : 논, 밭, 산림 및 폐기물 매립지

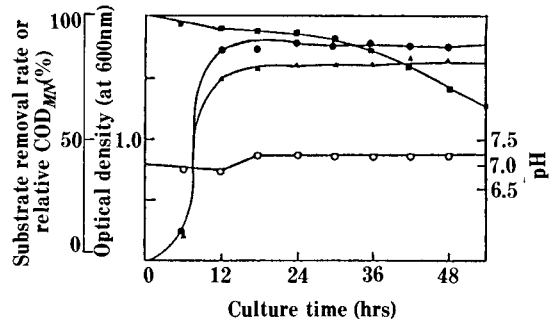


Fig. 3. m-Toluate degradation by strain Tol 2.
The initial concentration of m-toluate in the pure media was 2,200 $\mu\text{g/ml}$, and the cells were cultured at 30°C with reciprocal shaking.

- ; Cell growth
- ; pH
- ▲ ; Substrate removal rate
- ; Relative COD_{MN}

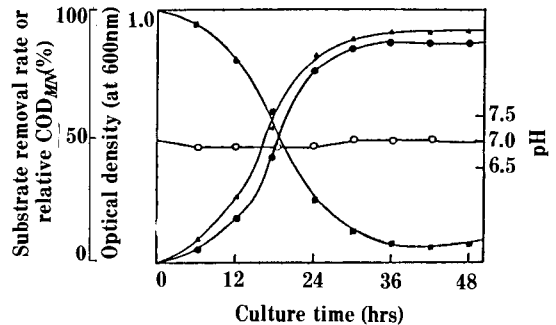


Fig. 4. Camphor degradation by strain Cam 104.
The initial concentration of camphor was 700 $\mu\text{g/ml}$, and the cells were cultured at 30°C with reciprocal shaking.

- ; Cell growth
- ; pH
- ▲ ; Substrate removal rate
- ; Relative COD_{MN}

토양, 폐수처리·시설의 오니와 하천 저질 등의 각 시료에서 1주씩 총 6주의 m-toluate 분해균주를 분리하였으며 이들도 모두 *Pseudomonas* 속 균종으로 판정되었다.

분해활성 측정 : m-Toluate 분해균주 역시 분리균 모두가 매우 높은 분해활성을 보이고 있어 별도의 변이주 분리과정을 거치지 않았다(Table 2).

Tol 2 균주를 2,200 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 m-toluate 배지에 접종, 기질 분해율을 조사한 결과 Fig. 3과 같이 배양 12시간 전후에서 약 75%의 기질 감소율을 나타내었다.

Camphor 분해

균주분리 및 동정 : Camphor 분해균주는 폐수처리 시설 오니에서 5주, 폐기물 매립지 토양에서 2주, 그리고 밭, 임야, 하천 저질시료에서 각 1주씩 총 10주를 분리하였다. 10주 중 분해활성이 가장 높았던 Cam 10 균주를 공시균으로 선정, 동정시험을 행한 결과 *Pseudomonas* 속으로 확인되었다.

고활성 변이주 분리 : “재료 및 방법” 항에 기술되어 있는 과정에 따라 Cam 10 균주로부터 분해활성이 증진된 Cam 104 변이주를 선별하였다(Table 2). Cam 104 변이주는 700 µg/ml의 camphor가 첨가된 배지에서도 잘 생육하였으며 36시간 진탕배양했을 때 약 92%의 기질 소비율을 보였다(Fig. 4).

다기능 균주개발 : Cam 10 균주는 다른 방향족 화합물 분해균주와는 달리 camphor 이외의 다른 방향족 화합물, 즉 benzoate, benzene, *m*-toluate 및 phenol 등도 분해 이용하는 다양한 기질 자화능을 가지고 있음을 발견하였다. 따라서 Cam 10 균주가 다목적 균주개발에 가장 적합한 균주라고 판단되었으나 Cam 10 균주가 *m*-toluate 만은 전혀 분해 이용하지 못하므로 우선 Cam 104 변이주를 고농도의 *m*-toluate 배지에 반복 적용시켜 *m*-toluate 자화능이 뛰어난 변이주 분리에 성공, 이 변이주를 Cam 1040 이라고 명명하였다(Table 3). 실제로 Cam 1040 균주를 camphor, phenol, benzoate 및 *m*-toluate가 각각 200 µg/ml 농도로 첨가된 기초배지에 접종, 진탕배양하면서 균체증식과 COD 감소량 및 기질 소비량 등을 조사한 결과 Fig. 5와 같이 균

체증식과 더불어 COD가 비례적으로 감소되었으며 증식과정중 불가피한 에너지원 교체에 기인되는 것으로 믿어지는 diauxic growth의 특징을 보여주고 있다. 또한 gas chromatography에 의한 배양액 분석결과는 Cam 1040 균주가 혼합 탄소원을 camphor, phenol, benzoate, *m*-toluate의 순서로 분해 이용하고 있음을 보여주었다. 이상과 같이 Cam 1040 균주는 높은 *m*-toluate 분해활성을 나타내고 있으나 그 반면에 Cam 10 균주가 원래 가졌던 극히 낮은 salicylate와 naphthalene 분해능을 완전 상실한 변화를 나타내었다(Table 3). 그러므로 Cam 1040 균주 세포에 SAL이나 NAH 특히 naphthalene/salicylate 산화에 관계되는 모든 유전정보를 가지고 있는 NAH 2(30)를 도입시킨다면 더욱 다양한 기능을 가진 Cam 1040 계 분해균주를 얻을 수 있으리라 사료된다.

Plasmid 분리 및 특성조사

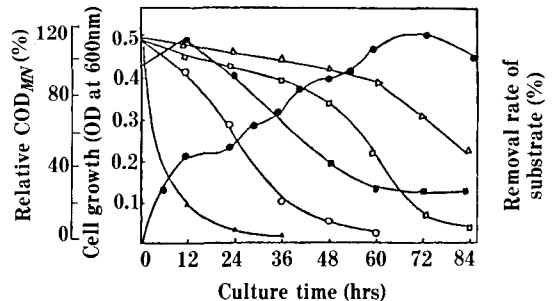


Fig. 5. Degradation of aromatic hydrocarbons by strain Cam 1040.

The cells of Cam 1040 were grown at 30 °C with reciprocal shaking in the basal salt medium supplemented with a mixture of camphor, toluate, benzene and phenol (each; 200 mg/l) as a sole source of carbon and energy.

- ; Cell growth
- ; Relative COD_{MN}
- △ ; Benzoate
- ; *m*-Toluate
- ; Phenol
- ▲ ; Camphor

A. Column and columnpacking material

1. Camphor and phenol analysis; 2.5m × 3φmm stainless column Chromosorb W AW-DMCS + 5% PPE
2. Benzoate and *m*-toluate analysis; 3m × 3φmm stainless column 5% therman-1000 + 0.5% H₃PO₄ + chromosorb W

B. Temperature.

1. Camphor and phenol analysis; 180 °C
2. Benzoate and *m*-toluate analysis; 200 °C (1min.) (3min.) 230 °C (8min.)

C. Carrier gas.

1. Camphor and phenol analysis; N₂ (50 ml/min.)
2. Benzoate and *m*-toluate analysis; N₂(50 ml/min.)

Table 3. Growth characteristics of strain Cam 104 and Cam 1040.

Growth substrate	Growth	
	Cam 104	Cam 1040
Benzoate	+	+
Benzene	+	+
Camphor	+	+
Toluene	+	+
Phenol	+	+
Octane	+	+
Cyclohexane	+	+
<i>m</i> -Toluate	-	+
Xylene	+	+
Salicylate	±	-
Naphthalene	±	-

+ : Good growth ± : Poor growth - : No growth

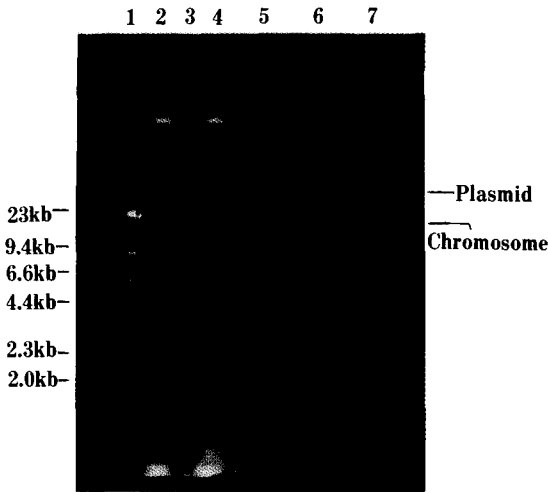


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from the aromatic hydrocarbon degrading strains.

Samples on the gel were as follows;

1. λ DNA/HindIII
2. Cam 1041
3. Cam 1042
4. Cam 1040/pCam 1040
5. Tol 5/pTol 5
6. Sal 6
7. Ben 6

Table 4. Effect of concentration of mitomycin C on the phenotype of Cam 1040.

Strain	Conc. of mitomycin C (μ g/ml)	Total No. of colonies examined	Number of colonies examined	Frequency (%)
Cam 1040	1	300	14	4.6
	1.5	200	20	10

각 방향족 화합물 분해 분리균의 분해기능이 plasmid에 기인되는 특성인가를 조사하기 위하여 분해균 세포의 plasmid 존재를 확인한 결과 Fig. 6과 같이 Cam 1040과 Tol 5 균주에서만 plasmid band가 확인되었다. 또한 Cam 1040 균주의 plasmid를 curing에 의해 제거시킨 균주를 분리하고 (Cam 1041과 Cam 1042로 명명) 이 균주의 phenotype을 조사 비교함으로써 Cam 1040 plasmid가 camphor 자화능과 관련된 유전정보를 가지고 있는 plasmid란 것을 확인할 수 있었다 (Table 4, Fig. 7).

또 camphor 분해기능이 상실된 cured cell의 분리 빈도는 curing 시약으로 사용한 mitomycin C의 농도에 비례적인 관계를 보이고 있어 Cam 1040

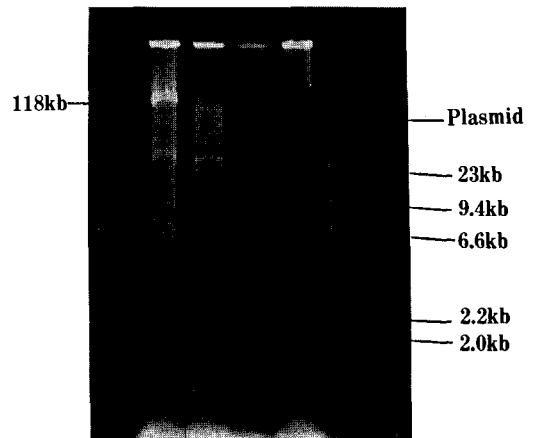


Fig. 7. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from strains of *Pseudomonas*.

Plasmid DNAs were isolated from the following strains;

1. *P. putida* mt-2/pWWO
2. Cam 1040/pCam 1040
3. Cam 1041
4. Cam 1042
5. λ DNA/HindIII

plasmid의 기능을 간접적으로 시사해주고 있다. 이와 별도로 Rms 148(144 Kb), pWWO(118 Kb) 및 RP₄(55 Kb)를 표준으로 사용한 전기영동법을 이용하여 Cam 1040 plasmid의 크기를 측정 한 결과, 약 98 Kb의 비교적 크기가 큰 plasmid인 것으로 밝혀졌다 (Fig. 8).

NAH 2 도입에 의한 분해기능의 다양화

Conjugation 실험에 효과적으로 이용할 수 있는 선택표지 개발을 목적으로 donor와 recipient 균주의 항생제 내성 spectrum을 조사 분석해본 결과 Cam 1040 균주는 거의 모든 항생제에 대하여 매우 예민한 반응을 보였다. 따라서 NAH 2 donor 균주의 생육도 동시에 억제할 수 있는 항생제인 gentamicin에 내성을 나타내는 Cam 1040 내성 변이주를 선별하고 이 특성을 이용하여 salicylate와 naphthalene 분해능이 없는 Cam 1040 균주에 NAH 2를 Gm^r marker와 naphthalene 자화능을 이중선택 표지로서 해서 conjugal transfer 시킨 결과, 비교적 높은 빈도로 exconjugant를 얻을 수 있었다. Cam 1043으로 명명한 exconjugant는 Cam 1040 균주의 분해능에 추가하여 NAH 2에 기인되는 salicylate와 naphthalene 자화능까지 보강되므로써 매우 유용한 다기능 분해균주가 되었다고 하겠다 (Table 5).

그러나 Cam 1043 균주는 Cam 1040에 비해 증식

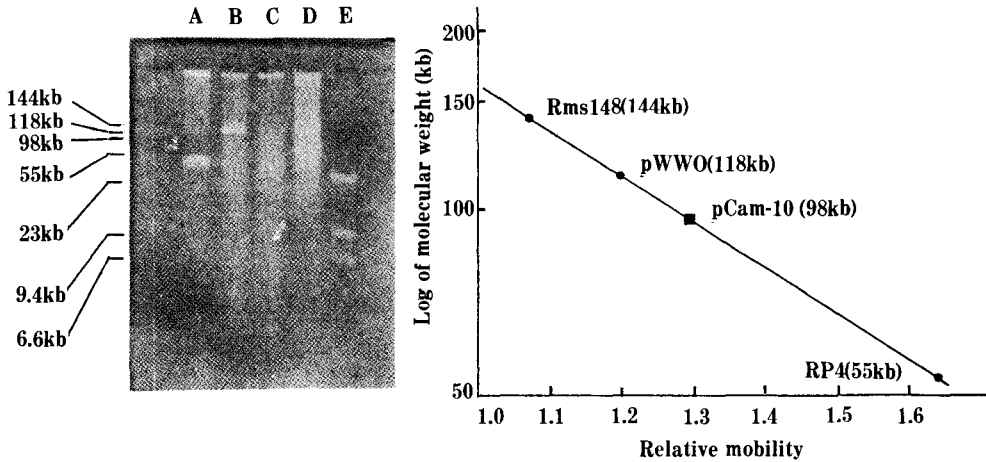


Fig. 8. Molecular weight of pCam 1040.

A. PAO303/Rms148 (144kb)

B. mt-2/pWWO (118kb)

C. Cam 1040/pCam 1040(98kb)

D. C600/RP4(55kb)

E. λDNA/HindIII

Table 5. Phenotype of the cured strain, Cam 1040.

Growth substance	Strain	
	Cam 1040	Cam 1041
Benzoate	+	+
Benzene	+	+
Camphor	+	-
Toluene	+	+
Phenol	+	+
Octane	+	+
Cyclohexane	+	+
<i>m</i> -Toluate	+	+
Xylene	+	+
Salicylate	-	-
Naphthalene	-	-

+ : Good growth - : No growth

속도가 현저히 저하된 예기치 않은 생육 특성의 변화를 가져왔다. 이와 같은 특이한 변화는 아마도 크기가 큰 NAH 2와 pCam 1040이 같은 세포내에 공존하게 됨으로서 초래되는 영향이라고 추측되나 앞으로 보다 구체적인 연구가 요구되는 과제라 생각된다.

요 약

중요 난분해성 환경오염물질인 방향족 화합물들을 효과적으로 분해 이용할 수 있는 미생물 균주를 토

양에서 분리하여 효율적인 산업폐수처리제 제조의 기초 균주로 활용할 수 있도록 균주 육종을 통한 우수 분해균주 개발에 관한 연구를 실시하였다. 총 66점의 시료로부터 benzoate 분해균주, 10주; salicylate, 10주; *m*-toluate, 6주와 camphor, 10주 등 총 36주의 방향족 화합물 분해균주를 분리하였다. Benzoate 분해균주 중 *Pseudomonas* 속 균주로 확인된 Ben 6에서 유래된 고효능 변이주 Ben 6-2는 800 µg/ml의 benzoate 농도에서도 높은 분해활성을 유지, 48시간 진탕배양했을 때 시간당 평균 기질 분해율이 11 mg/l/hr 이었고 최종 기질 분해율은 89% 이었다. Salicylate와 *m*-toluate 분해균인 *Pseudomonase* 속 Sal 7과 Tol 2 균주는 2,200 µg/ml 이상의 기질농도에서도 높은 활성을 유지, 48시간 배양으로 각각 98.5%와 81.7%의 기질 분해율을 보였다. *m*-Toluate 자화능이 없는 camphor 분해 분리균인 Cam 10 *Pseudomonas* 속 균주로부터 1,000 µg/ml의 *m*-toluate가 첨가된 배지에서 생육할 수 있는 Cam 1040 변이주를 분리하였다. Cam 1040은 탄소원으로 각각 200 µg/ml의 *m*-toluate, benzoate, camphor 및 phenol이 혼합 첨가된 배지에서 진탕배양했을 때 균체중식에 비례적으로 COD 감소를 나타내었고 첨가 탄소원은 camphor, phenol, benzoate, *m*-toluate 순서로 분해 이용하였다. Cam 1040 균주는 약 98 Kb로 추정된 camphor 자화능과 관련된 plasmid를 보유하고 있음을 확인하였다. 또한 Cam 1040 균주에 NAH 2를 도입, salicylate와 naphthalene 자화능을 가하므로써 더욱 다양한 기질

분해능을 가진 Cam 1043 균주를 얻었다.

사 사

본 연구는 과학기술처 특정 연구사업비로 수행되었으며 이에 깊은 감사를 표하는 바입니다.

참고문헌

1. 환경오염물질 처리를 위한 생물공학적 연구 (I), 과학기술처 (1986).
2. 최용진, 유재근, 송준상, 서운수 : *J. Kor. Wat. Pollut. Res. Contr.* **2**, 26 (1986).
3. Cally, A.G.: *Process in industrial microbiology*, Elsevier Scientific Publishing Co. **14**, 205 (1978).
4. Suk, Y.S. and J.S. Song: *Genetic Engineering* **84**, 76 (1984).
5. Leisinger, T.: *Microbiol degradation of xenobiotic and Recalcitrant Compounds*. Academic Press (1981).
6. Dart, R.K. and R.J. Stretton: *Microbiological aspects of pollution control*. Elsevier Scientific Publishing Co. 216 (1980).
7. Chakrabarty, A.M.: *Science*, **21**(4), 1133 (1982).
8. Stanier, R.Y., N.J. Dallerroni and H. Dondoroff: *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159 (1966).
9. Fujiki, M.: *The transitional condition of minamata Bay and neighbouring sea polluted by factory waste containing mercury*. 6th Int. Conf., Water Pollut. Res. Paper No. 102 (1972).
10. Ghosh, M.M. and P.D. Zuggar: *J.W.P.C.F.* **45**, 424429 (1973).
11. Hallas, L.E. and J.J. Cooney: *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 446 (1982).
12. Rheinwald, J.G., A.M. Chakrabarty and I.C. Gunsalus: *Pro. Nat. Acad. Sci.* **70**, 885 (1973).
13. Chakrabarty, A.M.: *J. Bacteriol.* **112**, 815 (1972).
14. Worsley, M.J. and P.A. Williams: *J. Bacteriol.* **124**, 7 (1975).
15. Nakazawa, T. and T. Yokota: *J. Bacteriol.* **115**, 262 (1973).
16. Murray, K. and P.A. Williams: *J. Bacteriol.* **117**, 1153 (1974).
17. Wigmore, G.J., R.C. Bayly and Berardino: *J. Bacteriol.* **120**, 31-37 (1974).
18. Chakrabarty, A.M.: *Annu. Rev. Gen.* **10**, 7 (1976).
19. Bayley, Morris and Broda: *Nature*, **280**, 338 (1979).
20. Lehrbach and Broda: *Plasmid*, **9**, 112 (1983).
21. Keith, L.H. and W.A. Telliard: *Environmental Science & Tech.* **13**, 416 (1979).
22. Izaki, K.: *J. Bacteriol.* **131**, 696 (1977).
23. 환경오염물질 처리를 위한 생물공학적 연구 (II), 과학기술처 (1986).
24. Gehardt, P., G.E.G. Murray, R.N. Gostilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips: *Manual of Methods for Microbiology*, Washington (1981).
25. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, - illiams & Willkins, Baltimore / London (1984).
26. Zuniga, M.C., D.R. Duhram and R.A. Welch: *J. Bacteriol.* **147**, 836 (1981).
27. 양상현 : 환경오염공시법, 수질공학 (I), 학연사 (1983).
28. Hansen, J.B. and R.H. Olsen: *J. Bacteriol.* **135**, 227 (1978).
29. Jeenes, D.J. and P.A. Williams: *J. Bacteriol.* **150**, 188 (1982).
30. Connors, M.A. and E.A. Barnsley: *J. Bacteriol.* **149**, 1096 (1982).

(Received January 19, 1989)