

Pseudomonas sp. HW-103 변이주에 의한 Benzene 으로부터 Catechol 생산

황기철 · 이상협 · 방원기*

고려대학교 농화학과

Production of Catechol from Benzene by a Mutant of *Pseudomonas* sp.

Hwang, Ki-Chul, Sang-Hyub Lee and Won-Gi Bang*

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Korea Univ., Seoul 136-701, Korea

For the production of catechol from benzene, bacteria capable of assimilating benzene as a sole carbon and energy source were isolated from soils. Among them, newly isolated strain, KY-114 having the best ability of producing catechol from benzene was selected and a mutant *Pseudomonas* sp. HW-103 was developed from *Pseudomonas* sp. KY-114 by using mutagenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. The catechol production from benzene by *Pseudomonas* sp. HW-103 was investigated under various conditions. The highest catechol concentration (0.61 g/l) was obtained in the growth medium (pH 6.5) containing 1% sodium citrate, 0.75% (NH₄)₂SO₄, 0.15% benzene and other minerals at 30°C after incubating of 15hrs. In the catechol production through the reaction with resting cells, 2.5 g/l of catechol was produced from 4 g/l of benzene after incubation of 10 hrs under the optimum conditions, which corresponds to 45% of theoretical catechol yield.

Catechol은 石炭酸醜을 지니고 단맛과 쓴맛을 지닌 결정체 화합물로서 모피염색, 가죽이기기, 사진 현상액, 중합반응저해제의 제조, 의약품 및 농약 등의 제조에 사용되며, 특히 vanillin 과 같은 화학합성 향료의 제조에 주로 사용된다(1).

현재, catechol은 주로 화학적 방법에 의해 생산되고 있으나(1, 2), 1913년 söhngen(3)이 benzene을 분해할 수 있는 미생물의 존재를 보고한 이래, 미생물에 의한 catechol의 생산이 시도되고 있다. Catechol은 미생물이 benzene을 분해하는 과정에서 생성되는 것으로 알려져 있으며, 그 분해기작에 관한 연구가 계속 진행되고 있다(4-9). 최근에는 catechol 분해작용이 차단된 변이주를 이용한 catechol의 생산이 연구되고 있다(10).

본 실험에서는 토양에서 분리된 benzene 자화성 세균으로부터 catechol 생산능이 우수한 변이주의 개발을 시도하였으며, 이 변이주의 증식세포와 휴지세포에 의한 benzene 으로부터 catechol 생산의 최적화를 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 *Pseudomonas* sp. HW-103 균주는 토양으로부터 분리한 benzene 자화성 세균으로부터 NTG 돌연변이 유발원에 의해 개발된 변이주였다.

균주의 분리 및 선별

토양으로부터 benzene 자화성 세균을 분리하기 위하여 Shirai(10)가 사용한 분리용 배지에 토양시료를 가하고 30°C에서 진탕배양으로 3회에 걸쳐 24시간 간격으로 enrichment culture을 수행한 후, pour plate 법에 의해 benzene 자화능을 지닌 colony들을 순수분리하였다.

Catechol 생산능이 우수한 균주를 선별하기 위하여 10 ml의 상기배지를 함유하는 50 ml 용 삼각플라스크에 각각의 분리주를 한 백금니씩 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양하였다. 배양액을 원심분리하

Key words: Catechol, catechol 1, 2-oxygenase, *Pseudomonas* sp., benzene

*Corresponding author

여 얻어진 상등액중의 catechol 량을 측정하여, 가장 catechol 생산능이 우수한 균주를 선별하였다.

변이주의 분리

Shirai(10)가 사용한 방법에 따라 돌연변이 유발원으로 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG)을 이용하였다. 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 NTG을 함유하는 50 mM phosphate 완충용액 (pH 7.5)를 30°C에서 30분간 처리하여 변이를 유도한 후, Ornston(11) 등의 방법에 따라 D-cycloserine과 penicillin G를 이용한 enrichment 방법에 의해 변이주를 농축하였다. Catechol 생성능이 우수한 변이주의 선별은 前記의 방법에 따라 수행하였다.

분석방법

균체량은 분광광도계 (Hitachi Model 200-20)를 사용하여 배양액의 흡광도를 610 nm에서 측정하여 구하였다.

Catechol 량은 Shirai(10)가 사용한 방법에 따라 aminoantipyrine 시약을 사용하여 515 nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다.

Catechol의 정성분석은 Nair(12) 등의 방법에 따라 paper chromatography 법으로 수행하였다.

Catechol 1,2-oxygenase (EC 1.13.11.1) 활성은 Hegaman(13)의 방법에 따라 측정하였다.

단백질 정량은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry(14) 등의 방법에 따라 수행하였다.

균주의 동정

분리균주인 KY-114의 동정은 20NE 동정용 키트(15)를 사용하여 수행하였다.

배 양

분리균주인 *Pseudomonas* sp. HW-103을 前記의 한천평판배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양하여 활성화시킨 후, 한 백금니를 취하여 peptone 0.5% 및 beef extract 0.3%의 조성을 지닌 전배양배지 10 ml을 함유하는 50 ml 용 삼각플라스크에 접종하고 30°C에서 24시간 진탕배양하여 접종용 배양액으로 사용하였다.

본 배양은 sodium citrate 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.75%, Na_2HPO_4 1.5%, KH_2PO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, corn steep liquor 0.5% 및 benzene 0.15%의 조성을 지닌 catechol 생산배지 (pH 6.5) 100 ml를 500 ml 용 삼각플라스크에 전배

Table 1. Cell growth and catechol production from benzene by the isolated strains.

Strains	Growth (OD at 610nm)	Catechol (mg/l)
KY-107	0.71	1.31
KY-109	0.49	1.76
KY-110	0.45	1.10
KY-111	0.54	1.06
KY-112	0.64	1.22
KY-114	0.79	2.13
KY-117	0.50	1.59
KY-125	0.83	1.18

양액을 1% (v/v)가 되게 접종하고, 30°C에서 진탕교반 (120 strokes/min) 배양하였다.

휴지세포에 의한 catechol 생산 반응조건

Catechol 생산배지를 사용하여 30°C에서 14시간 진탕배양하여 얻어진 균체를 50 mM phosphate 완충액 (pH 6.5)으로 2회 세척한 후, 생균체로 8 mg/ml의 농도가 되게 같은 완충액에 현탁시킨 후, benzene을 4g/l의 농도로 공급하고 고무전을 사용하여 밀폐시킨 다음, 30°C에서 진탕교반 배양하였다.

결과 및 고찰

Catechol 생성균의 분리 및 선별

前記의 방법에 따라 토양시료로부터 benzene을 유일한 탄소원과 에너지원으로 이용하는 60 균주를 순수분리하였다. 이들 분리균주로부터 benzene 상에서의 상대적 생육속도가 빠르고 배양액중에 1 mg/l 이상의 catechol을 생산할 수 있는 균주들을 선별하였다. Table 1에서 볼 수 있듯이 KY-114 균주는 다른 균주에 비하여 catechol 생산능이 가장 우수하였을 뿐만 아니라 상대적 생육속도도 좋았기 때문에 최종 선별하여 본 실험의 공시균주로 사용하였다.

분리균주(KY-114)의 동정

KY-114 분리균은 Gram 음성의 간균으로서 (Fig.1), Table 2와 같은 생리적, 생화학적 특성을 나타내었다. 동정표를 사용하여 분석한 결과 KY-114 분리균은 *Pseudomonas* sp.로 부분 동정되었다.

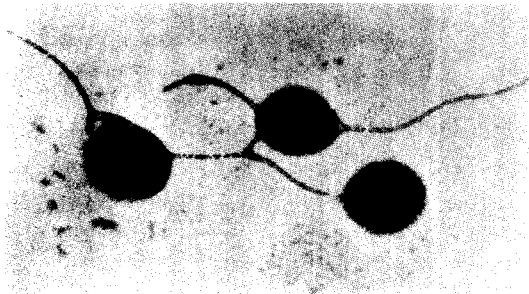
변이주의 분리

일반적으로 benzene 자화성 세균에 있어서

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain KY-114.

Assimilation of carbon compound:			
glucose	+	arabinose	-
mannitol	-	maltose	-
caprate	-	adipate	-
citrate	-	mannose	-
malate	-	gluconate	-
Reduction of nitrates to nitrites: +			
Reduction of nitrites to nitrogen: -			
Indole production from tryptophan: -			
Acidification of glucose: -			
Arginine dihydrolase: -			
Urease: -			
Hydrolysis of aesculin: +			
Hydrolysis of gelatin: +			
β -Galactosidase: -			
Oxidase: +			

Symbols: +, positive; -, negative

**Fig. 1. Electron micrograph of *Pseudomonas* sp. KY-114 by TEM (Transmittance Electron Microscope: Sorvall TEM, 100CX-II 80KV, Japan) after staining with 2% phosphotungstic acid (pH 6.8). Magnification, 10,000 X**

benzene은 중간체인 catechol을 통하여 대사되는 것으로 보고되어 있으며(16), catechol의 분해에 관여하는 효소는 catechol 1,2-oxygenase인 것으로 알려져 있다(8, 17). 따라서, 본 실험에서는 benzene으로부터 catechol 생산성을 향상시키기 위하여 KY-114 분리균을 모주로 하여 catechol 1,2-oxygenase의 활성이 부분적으로 결여된 변이주를 구하였으며, 4 mg/l 이상의 catechol을 생성하는 변이주를 선별하였고, 이들 변이주의 생육속도와 catechol 생성능을 조사한 결과는 Table 3과 같았다. 따라서, catechol의 생성이 최고 2.38 배 증가된

Table 3. Comparison of cell growth and catechol production by the mutant strains.

Strains		Growth (OD at 610nm)	Catechol (mg/l)
Wild type	KY-114	0.79	2.13
	HW-101	0.73	4.04
	HW-102	0.79	4.82
Mutant	HW-103	0.62	5.06
	HW-104	0.63	4.08
	HW-105	0.72	4.24

Table 4. Effect of carbon sources on catechol production by *Pseudomonas* sp. HW-103.

Carbon sources	Concentration (g/l)	Growth (OD at 610nm)	Catechol (g/l)
Sodium citrate	5	1.27	0.36
	10	1.58	0.47
	15	1.65	0.44
	20	1.58	0.41
	30	1.33	0.38
Glucose	10	0.81	0.06
Glycerol	10	0.61	0.03
Sodium succinate	10	1.91	0.37
Xylose	10	0.22	0.01
Mannitol	10	0.21	0.01

변이주인 HW-103을 catechol 생산에 사용하였다. 변이주 HW-103에 있어서 catechol 1,2-oxygenase의 특이적 활성은 0.76 unit/mg · protein으로서 모주인 KY-114의 2.39 unit/mg · protein에 비하여 69.1%가 저해된 것으로 나타났다.

증식세포에 의한 benzene으로부터 catechol 생산

Catechol 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 catechol 생산배지의 탄소원을 Table 4와 같이 변화시키면서 균체의 생육속도와 catechol 생성량을 비교 검토한 결과, 탄소원으로 sodium citrate을 사용한 경우에 균의 생육은 sodium succinate에 비해 다소 낮았으나, catechol의 생성량은 0.471g/l로서 가장 높았다. 따라서 catechol 생산을 위한 탄소원으로는 sodium citrate가 최적이었으며, 최적 sodium citrate의 농도는 10g/l이었다. 이들 결과는 Shirai(10)가 *Pseudomonas* strain BE-81을 사용한

Table 5. Effect of nitrogen sources on catechol production by *Pseudomonas* sp. HW-103.

Nitrogen sources	Concentration (g/l)	Growth (OD at 610nm)	Catechol (g/l)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.5	1.28	0.41
	5.0	1.59	0.49
	7.5	1.86	0.51
	10	1.89	0.43
	12.5	1.73	0.40
NH ₄ Cl	5.0	1.61	0.47
Urea	5.0	1.61	0.47
Glutamate	5.0	1.89	0.24

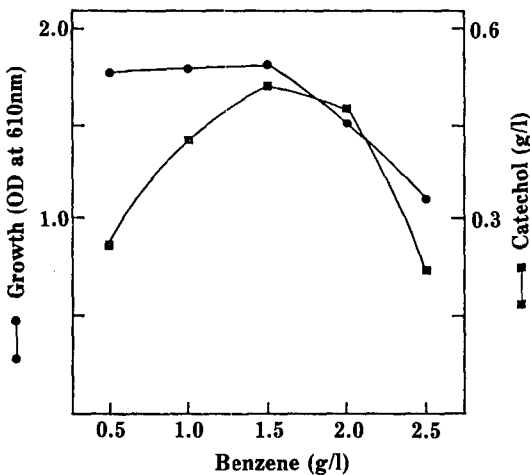


Fig. 2. Effect of benzene concentration on catechol production by *Pseudomonas* sp. HW-103

catechol 생산실험에서 탄소원으로 sodium citrate 가 균의 생육에는 가장 좋으나, catechol 생산에는 sodium succinate 가 최적이었다는 보고와는 상이한 것이었다. 이상에서 TCA 회로의 중간물질인 citrate 나 succinate 가 탄소원으로 좋은 것으로 사료되었다.

Catechol 생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위해서 catechol 생산배지의 탄소원을 sodium citrate 로 고정시키고, Table 5 와 같이 질소원을 변화시키면서 균의 생육과 catechol 생산량을 비교 검토한 결과, (NH₄)₂SO₄와 NH₄Cl 를 사용하였을 경우 균의 생육과 catechol 생산량은 좋았으나, (NH₄)₂SO₄ 경우 catechol 생산량은 0.483g/l 로서 NH₄Cl 보다 더 좋았다. 따라서, 본 실험에서는 질소

Table 6. Effect of initial pH on catechol production by *Pseudomonas* sp. HW-103.

Initial pH	Final pH	Growth (OD at 610nm)	Catechol (g/l)
6.0	6.37	1.83	0.53
6.5	6.80	1.93	0.57
7.0	7.10	1.85	0.54
7.5	7.25	1.76	0.53
8.0	7.30	1.72	0.49

Table 7. Effect of temperature on catechol production by *Pseudomonas* sp. HW-103.

Temperature (°C)	Growth (OD at 610nm)	Catechol (g/l)
26	1.88	0.55
28	1.93	0.56
30	1.94	0.58
32	1.86	0.54
34	1.75	0.48

원으로 (NH₄)₂SO₄ 을 사용하였으며, 최적의 (NH₄)₂SO₄ 농도는 7.5g/l 이었다. 이 결과는 Shirai(10)가 *Pseudomonas* strain BE-81 에서 보고한 NH₄Cl 과는 상이한 것이었다.

기질로 사용되는 benzene 의 농도가 catechol 생산에 미치는 영향을 검토하기 위하여 benzene 의 농도를 0.5g/l 부터 2.5g/l 까지 변화시키면서 균의 생육과 catechol 생성량을 비교 검토한 결과, Fig.2 에서 볼 수 있듯이 catechol 생성량은 benzene 의 농도가 1.5g/l 에 이를 때까지는 계속적으로 증가되었으나, 이 이상의 benzene 농도에서는 균의 생육과 catechol 생성이 크게 억제됨을 알 수 있었다. 따라서 최적 benzene 농도는 1.5g/l 이었으며 이때 최대의 catechol 이 축적되었다 이 결과는 Shirai 가 *Pseudomonas* strain BE-81 에서 보고한 1.5g/l 의 benzene 농도와 잘 일치하는 것이었다.

Catechol 생산에 미치는 초기 pH 의 영향을 조사하기 위하여 catechol 생산배지의 초기 pH 를 Table 6 과 같이 변화시키면서 균의 생육과 catechol 생산량을 비교 검토한 결과, 초기 pH 가 6.5 일 때 균의 생육과 catechol 생산성이 가장 좋았다. 이 결과는 Shirai 가 *Pseudomonas* strain BE-81 에서 보고한 최적 pH 6.5 와 잘 일치하는 것이었다.

Catechol 생산에 미치는 온도의 영향을 조사하기

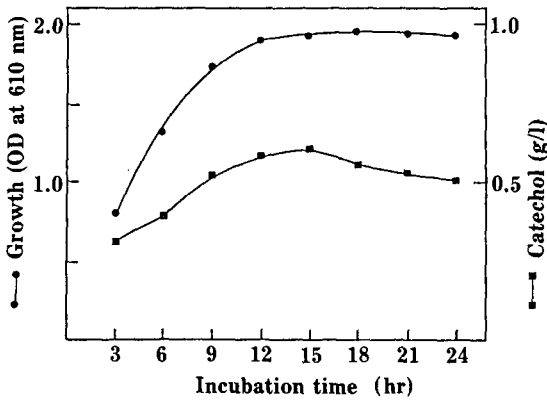


Fig. 3. Time course of catechol production by *Pseudomonas* sp. HW-103.

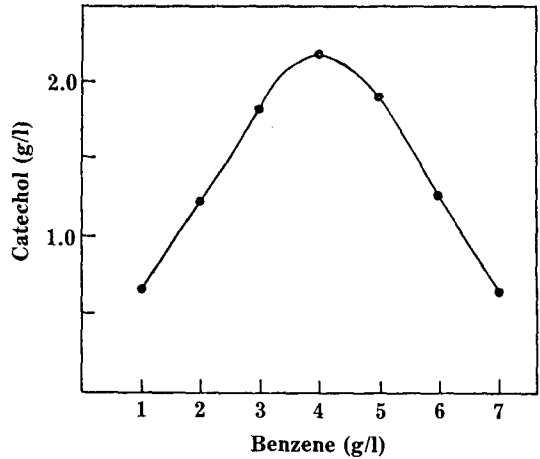


Fig. 5. Effect of benzene concentration on catechol production with resting cells.

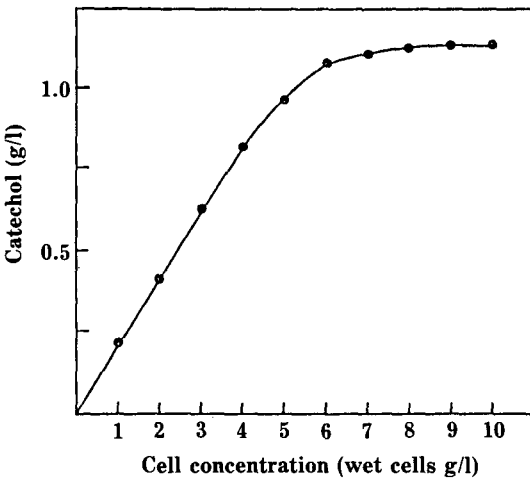


Fig. 4. Effect of cell concentration on catechol production with resting cells.

위하여, Table 7와 같이 배양온도를 변화시키면서 균의 생육과 catechol 생산량을 비교 검토하였다. 배양온도가 30°C에 이를 때까지 균의 생육과 catechol 생산량이 계속적으로 증가되나 이 이상의 온도에서는 감소함을 알 수 있었다. 따라서 최적배양온도는 30°C이었다.

이상의 결과들로부터 얻어진 최적조건하에서 *Pseudomonas* sp. HW-103의 증식세포에 의한 benzene으로부터 catechol 생성의 경시적인 변화를 Fig.3에 나타내었다. 배양 후 15시간까지는 균의 생육과 catechol 생산량이 계속적으로 증가되나, 이후에는 다소 감소되는 경향을 나타내었다. 배양 후 15시간내에 catechol 생산량은 0.61g/l로서 최대이었다.

휴지세포에 의한 benzene으로부터 catechol 생산
 휴지세포에 의한 catechol 생산에 있어서 생균체량과 catechol 생성량과의 관계를 검토한 결과, Fig.4에서 볼 수 있듯이 생균체량이 증가함에 따라 catechol 량도 증가함을 알 수 있었다. 생균체량이 4 mg/ml에 이를 때까지는 catechol 생성량도 거의 직선적인 비례관계를 나타내었으나, 생균체량이 8 mg/ml 이상일 때는 거의 catechol 생성량이 포화됨을 알 수 있었다. 이때의 catechol 생성량은 1.13g/l이었으며, 이 생균체량은 계속적인 실험을 위해 사용하였다.

휴지세포에 의한 catechol 생산시에 benzene의 농도가 catechol 생성에 미치는 영향을 검토한 결과, Fig.5에서와 같이 benzene의 농도가 4g/l에 이를 때까지는 catechol 생성량은 계속적으로 증가되었으나, 이 이상의 농도에서는 catechol 생성이 억제됨을 알 수 있었다. 이때의 catechol 생성량은 2.18g/l이었으며, 계속적인 실험을 위해 4g/l의 benzene을 사용하였다.

휴지세포에 의한 catechol 생산에 있어서 catechol 생성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여, potassium phosphate 완충액의 pH 값을 5.5에서 8.5까지 변화시키면서 catechol 생성량을 비교 검토한 결과, Fig.6과 같이 catechol 생성에 있어서의 최적 pH 값은 6.5이었으며, pH 6.5 이하나 이상에서는 catechol 생성량이 급속히 감소됨을 알 수 있었다. 또한 50 mM phosphate 완충액을 사용하였을 때보다 100 mM phosphate 완충액을 사용하였을 경우는 낮은 catechol 생성량을 나타내었다. 위의 결과는 휴지

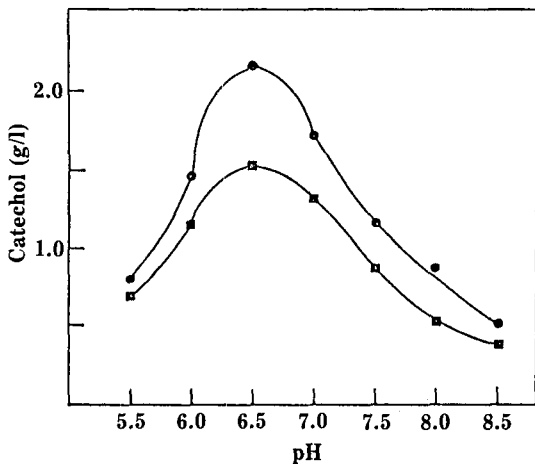


Fig. 6. Effect of pH on catechol production with resting cells.

The resting cell reaction was carried out in phosphate buffer at various pHs. ● - ●, 50mM phosphate buffer; ■ - ■, 100mM phosphate buffer.

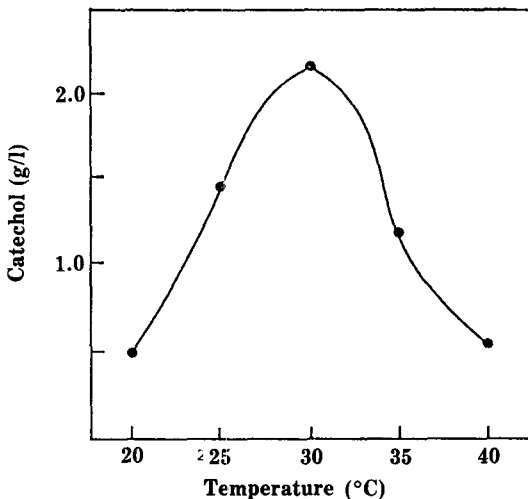


Fig. 7. Effect of temperature on catechol production with resting cells.

세포의 활성이 pH에 매우 민감하며, 또한 phosphate 완충액의 농도에도 크게 영향을 받는 것으로 사료되었다.

휴지세포에 의한 catechol 생산에 있어서 온도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응액 배양온도를 20°C에서 40°C까지 변화시키면서 catechol의 생성량을 비교 검토한 결과, Fig.7과 같이 catechol 생성의 최적온도는 30°C이었으며, 30°C 이하나 이상의 온도에서는 catechol 생성이 급속히 감소됨을 알 수 있었다. 이상의 결과들로부터 얻어진 최적조건하에

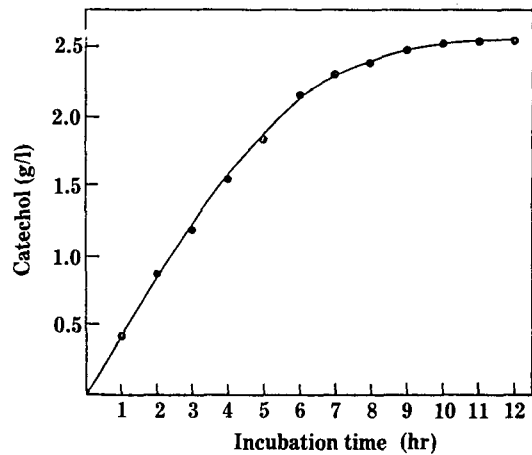


Fig. 8. Time course of catechol production with resting cells.

서, *Pseudomonas* sp. HW-103의 휴지세포에 의한 benzene으로부터 catechol 생성의 경시적인 변화를 Fig.8에 나타내었다. 반응 후, 10시간째까지는 catechol 생성량이 계속적으로 증가하지만, 10시간 이후에는 catechol 생성량이 포화되는 경향을 나타내고 있다. 이때의 최대 catechol 생산량은 2.5g/l이었으며, 이론적으로 사용한 benzene에 대해 catechol의 수율은 45%이었다.

요 약

Benzene으로부터 catechol을 생산하기 위하여 토양으로부터 benzene을 유일한 탄소원과 에너지원으로 이용할 수 있는 세균을 분리하였다. 분리된 균주들 중에서 benzene 상에서 상대적 생육속도가 빠르며, catechol 생산능이 가장 좋은 균주인 KY-114를 선별하였고, *Pseudomonas* sp.로 부분동정하였다. 이 균주에 의한 catechol 생산성을 증대시키기 위하여 돌연변이에 의한 균주 개발을 시도하였으며, 개발된 변이주인 *Pseudomonas* sp. HW-103을 이용하여 benzene으로부터 catechol 생산의 최적조건을 검토하였다. Catechol의 최대생산은 초기 pH 6.5, 온도 30°C하에서 1% sodium citrate, 0.75% (NH₄)₂SO₄, 0.15% benzene 과 다른 무기염이 함유된 배지에서 이루어졌으며, 이때 최대 catechol 생산량은 0.61g/l이었다.

한편, 휴지세포를 이용한 catechol 생산을 위하여 4g/l의 benzene이 함유된 최적반응조건하에서 10시간 반응시킨 결과, 2.5g/l의 catechol이 생산되었으며, 이때의 이론적 전환률은 45%이었다.

References

1. Varagnat, J.: Hydroquinone, Resorcinol, and Catechol. Encyclopedia of Chemical Technology, V. **13**, 36 (1981)
2. Pierre-Etienne, B.: Hydroxylation of Aromatic Compounds. U.S. Patent 3, 943, 179 (1976)
3. Sohngen, N.L.: *Center. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. II*, **37**, 595 (1913)
4. Charles Evens, W. and B.S.W. Smith, *Nature* **168**, 772 (1951)
5. Evans, R.A., W.H. Parr. and W.C. Evans: *Biochem. J.* **44**, Proc. Biochem. Soc., viii (1949)
6. Gibson, D.T., J.R. Koch and R.E. Kallio: *Biochem.* **7**, 2653 (1968)
7. Dagley, S., W.C. Evans and D.W. Ribbons: *Nature*, 188, 560
8. Marr, E.K. and R.W. Stone: *J. Bacteriol.* **81**, 425 (1961)
9. Nakazawa, T. and T. Yokota: *J. Bacteriol.* **115**, 262 (1973)
10. Shirai, K.: *Agri. Biol. Chem.* **50**, 2875 (1986)
11. Ornston, L.N., M.K. Ornston and C. George. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 179 (1969)
12. Nair, P.M. and Vaidyanathan: *Anal. Biochem.* **7**, 315 (1964)
13. Hegman, G.O.: *J. Bacteriol.* **91**, 1140 (1966)
14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 264 (1951)
15. API System S.A.: *Analytical profile index* (1986)
16. Ornston, L.N. and R.Y. Stranier: *J. Biol. Chem.* **241**(16), 3776 (1966)
17. Hong, T. and L. Jaenicke: *Eur. J. Biochem.* **30**, 369 (1972)

(Received April 8, 1989)