

## Phenol을 분해하는 *Acinetobacter* sp. GEM2의 분리 및 특성

이창호 · 오희목 · 권태종<sup>1</sup> · 권기석 · 이성기 · 서현호 · 윤병대\*

한국과학기술연구원 유전공학연구소, <sup>1</sup>건국대학교 미생물공학과

### Isolation and Characterization of a Phenol-Degrading Strain, *Acinetobacter* sp. GEM2

Lee, Chang-Ho, Hee-Mock Oh, Tae-Jong Kwon<sup>1</sup>, Gi-Seok Kwon,  
Sung-Gie Lee, Hyun-Hyo Suh and Byung-Dae Yoon\*

Genetic Engineering Research Institute, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

<sup>1</sup>Department of Microbial Engineering, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

**Abstract** — A bacterial strain which formed a distinct colony on agar plate containing phenol as a vapor phase and grew well in a liquid minimal medium was isolated and identified as *Acinetobacter* sp. GEM2. The optimal temperature and initial pH for the growth of *Acinetobacter* sp. GEM2 were 30°C and 7.0, respectively. Cell growth was inhibited by phenol at the concentration over 1500 ppm. Cell growth dramatically increased from 10 hours after cultivation and almost showed a stationary phase within 24 hours at which 95% of phenol was concomitantly degraded. *Acinetobacter* sp. GEM2 was capable of growing on aromatic compounds, such as benzoic acid, phenol, *m*-cresol, *o*-cresol, *p*-cresol, catechol, gentisic acid, and toluene, but did not grow on benzene, salicylic acid, *p*-toluic acid, and *p*-xylene. By the analysis of catechol dioxygenase, it seemed that catechol was degraded through both *meta*- and *ortho*-cleavage pathway. The growth-limiting log P value of *Acinetobacter* sp. GEM2 on organic solvents was 2.0.

Phenol은 정유공장, 석유화학공업, phenol계 수지 공장 등의 방류수로부터 유출되어 광범위하게 분포된 환경오염물질이다. 미생물에 대하여 독성을 나타내어 200 mg/l 이하의 저농도에서도 미생물 생육을 저해하며 폐수처리를 어렵게 한다(1). 폐수로부터 phenol의 제거는 화학적 산화, 용매추출, 활성탄에 의한 흡착 등으로 이루어진다(2). 그러나 오늘날 생물학적 방법이 더 중요하게 받아들여지며 특히, 방류수에서 저농도의 phenol과 중간 대사산물의 경우에 더욱 그러하다. Phenol을 분해할 수 있는 균주로는 *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Trichosporon cutaneum* 등이 보고되었다(3). Phenol의 분해기작은 hydroxylation에 의하여 catechol로 전환되고, 이어서 *ortho*-또는 *meta*-분해기작에 따라 분해가 이루어진다(4, 5). 한편 대부분의 독성 유기화합물 분해균주는 각각 제한된 종류의 화합물만을 분해하며 일정농도 이상의

기질농도에서는 활성이 현저히 저하된다. 그러므로 다양한 유기화합물이 함유된 폐수의 처리를 위해서는 기질의 종류에 따라서 여러가지 분해균주의 혼합배양 또는 다기능 분해균주의 개발이 필요하다. Morsen과 Rehm(6)은 활성탄의 흡착에 의한 혼합균주의 고정화 방법으로 phenol 분해에 관하여 보고하였으며, Ehrhardt와 Rehm(7)은 *Pseudomonas putida*를 이용하여 반연속 및 연속배양을 통하여 phenol의 분해에 관하여 보고한 바 있다. 국내에서는 박 등(8)과 정 등(9)이 *Pseudomonas* sp.에 의한 방향족화합물의 생분해에 관하여 보고한 바 있다. 본 연구에서는 폐수의 생물학적 처리에 이용될 수 있는 phenol 분해균주를 토양 및 폐수로부터 분리하여, 분해능이 우수한 균주를 최종 선발·동정하였으며, 선발된 균주의 생육 특성과 catechol 분해효소의 활성을 측정하였고, 아울러 각종 방향족 화합물의 이용성을 조사하였다.

#### 재료 및 방법

**Key words:** *Acinetobacter* sp. GEM2, phenol, aromatic compounds

\*Corresponding author

배지 및 시약

균주의 분리와 보관을 위한 완전배지는 tryptone (Difco) 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g을 증류수 1l에 녹여 pH 7.0으로 조정된 후 121°C에서 15분간 가압숙운 멸균하여 사용하였다. 균주의 배양 및 특성 조사를 위한 배지는 고 등(10)이 사용한 최소배지를 사용하였다. 즉,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  4.35 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3.9 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.48 g,  $\text{CaCl}_2$  0.03 g,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g,  $\text{MnCl}_2$  0.01 g,  $\text{CoCl}_2$  0.001 g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.001 g, 증류수 1l이며 pH는 6.8로 조절되었다. Phenol은 최소배지 멸균 후 첨가하였으며, 평판 고체배지는 Bacto agar(Difco)를 1.5%(w/v) 농도로 혼합하여 사용하였다. 실험에 사용한 시약은 특급 또는 일급을 사용하였으며, 배지류는 Difco 제품, catechol은 Sigma 제품을 사용하였다.

### 균주의 분리 및 선발

전국 각지에서 채집한 하천수, 폐수, 토양 등의 균원시료를 멸균된 증류수로 희석한 후 희석액을 LB 평판 고체배지에 도말하여 나타난 colony를 tooth-pick을 이용하여 고체 최소배지에 접종하고 phenol을 증기상태로 공급하면서 25°C 항온기에서 약 5일간 배양한 후 colony를 관찰하여 자화능이 우수한 균주를 분리하였다(Fig. 1). 균주분리를 위한 또 다른 방법은 희석된 균원시료를 phenol이 첨가된 액체 최소배지에 접종하여 2회 계대 배양한 후 배양액을 고체 최소배지에 도말하여 나타나는 colony를 분리하였다. 순수

분리된 균주는 100-ml flask에 유일한 탄소원 및 에너지원으로 1000 ppm의 phenol을 포함한 최소배지를 첨가하고 순수분리된 균주를 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양한 후 배양액의 흡광도를 분광광도계(Shimadzu UV-160A)로 측정하여 생육이 우수한 균주를 선발하였다.

### 균주의 동정 및 보존

분리균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(11)와 Manual for the Identification of Medical Bacteria(12)에 준하여 수행하였다. Coenzyme Q는 Yamada 등(13)의 방법에 따라서 HPTLC(Merk, 10×10 cm)를 이용하여 분석하였으며, 전개용매는 acetone-acetonitrile(80 : 20)를 사용하여 254 nm의 UV lamp 하에서 분석하였다. DNA 염기 조성(G+C 함량)은 Tamaoka와 Komagata(14)의 방법에 따라 reversed-phase HPLC에 의해 분석하였다. DNA는 nuclease P1과 bacterial alkaline phosphatase를 이용하여 nucleosides로 가수분해하여 사용하였다. 분리균주의 균체 지방산 분석은 TSBA(Tryptic Soy Broth Agar ; Difco)에 배양된 colony 중 후기 대수증식기에 있는 습균체 약 40~50 mg에서 균체 지방산을 추출하여 microbial identification system (MIS, Hewlett-Packard 5890A)에 의해 gas liquid chromatograph(GLC)를 사용하여 분석하였다(15-17). 분리균주는 최소배지에 계대배양하여 보존하였고, 또

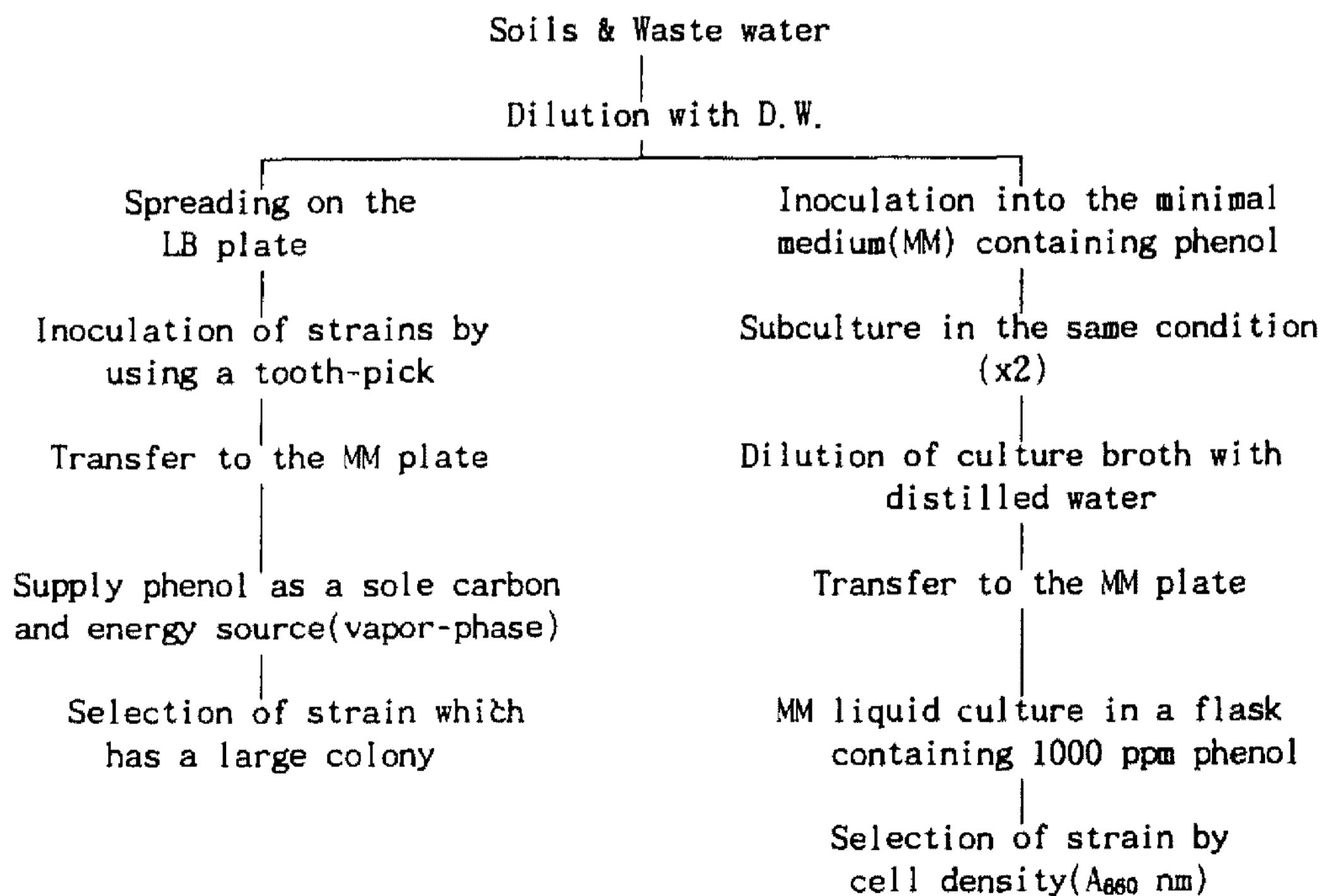


Fig. 1. Scheme of primary screening procedures.

한 ampoule에 동결건조하여 4°C에서 보관하였다.

### 균주의 배양조건

Phenol 분해균주는 액체 최소배지에서 배양하여 종균으로 이용하였다. 즉, 250-ml 삼각 flask에 50 ml의 최소배지를 넣고 500 ppm의 농도로 phenol을 첨가한 후 균주를 접종하여 30°C에서 36시간 진탕배양(120 strokes/min)하였다. 균생육 및 분해능은 같은 배지에 1000 ppm의 phenol을 첨가한 후 종균을 2% (v/v)되게 접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양하면서 배양 시간별로 조사하였다.

### 분석방법

균체증식은 분광광도계(Shimadzu UV-160A)를 사용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 나타내었다. 시료중의 phenol은 fused-silica capillary column(30 m×0.32 mm I.D.)과 불꽃이온화 검출기를 장착한 gas chromatograph(Varian 3300)로 분석하였으며, 분석조건으로 column 온도는 90°C였으며, injector, detector의 온도는 각각 200°C, 250°C였고, 운반기체(N<sub>2</sub>)의 유속은 30 ml/min로 조절하였다. 배양액에서 시료를 취하여 membrane filter(Millipore; pore size, 0.45 μm)로 여과한 후 GC 분석에 이용하였다.

### Catechol oxygenase 활성 측정

Catechol 1,2-dioxygenase의 활성은 Hegeman(18)의 방법에 따라 cell free extracts를 조효소로 하여 260 nm에서 측정하였고, catechol 2,3-dioxygenase의 활성은 Nozaki(19)의 방법에 따라 cell free extracts를 조효소로 하여 375 nm에서 측정하였다. 효소의 unit는 실온에서 반응액의 흡광도의 증가치를 측정하여 분당 catechol 1 μM을 산화하는 양으로 정하였다.

### 유기용매에 대한 내성

분리균주의 유기용매에 대한 내성을 측정하기 위하여 hydrophobicity가 서로 다른 유기용매를 25% (v/v) 첨가한 LB 배지에서의 생육 여부를 660 nm에서 흡광도로 측정하였다(20, 21).

## 결과 및 고찰

### 균주의 분리 및 선발

Phenol을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 하여 증기상태와 액체상태로 공급하면서 배양한 후 나타난 50여개의 colony를 순수분리하였다. 순수분리된 균주

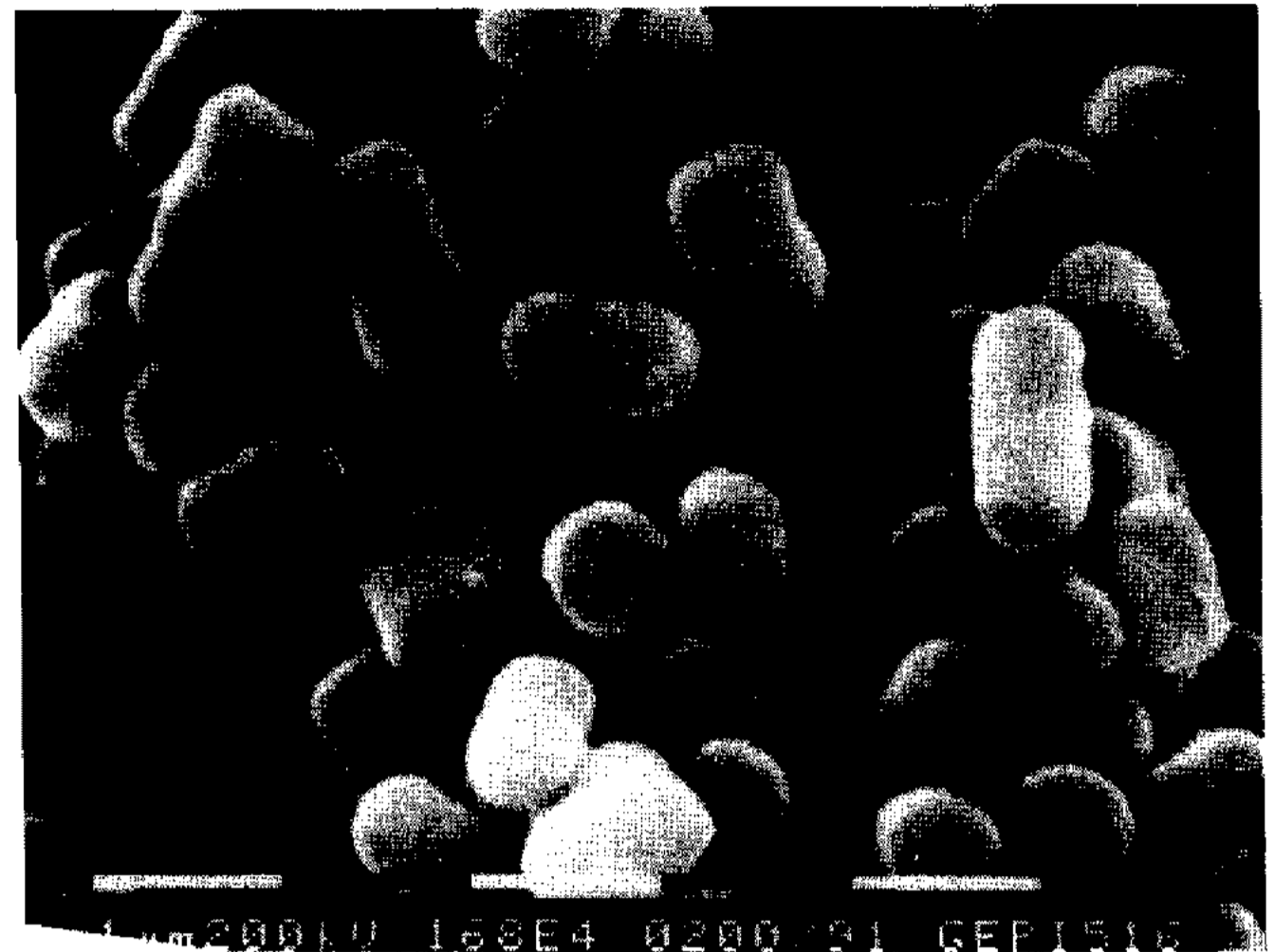


Fig. 2. Scanning electron microscopic photogram of strain GEM2(×16,800) cultured on LB medium for 36 hours at 30°C.

를 phenol 1000 ppm이 첨가된 액체 최소배지에서 배양하여 균체증식이 빠르고, 자화능이 우수한 GEM2 균주를 최종 선발하였다.

### 균주의 동정

분리균주 GEM2의 전자현미경 사진은 Fig. 2와 같으며, 형태적, 생리적 및 생화학적 특성을 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다. GEM2는 Gram 음성균으로서 짧은 간균의 호기성 세균이었으며 운동성을 지니고 있었다. Catalase가 양성이며, oxidase는 음성, glucose에서 산을 형성하지 못하였고, 탄소원으로 이용할 때 fermentation을 하였다. Citrate와 nitrate는 이용하지 못하였으며, methyl red 반응과 Voges-proskauer 반응 그리고 indole production은 음성 반응이었다. Urease, arginine, ornithine, 그리고 lysine에는 양성 반응이었다. 탄수화물의 이용성은 lactose, maltose, xylose, 그리고 sucrose에서 산을 형성하지 못하였다. Coenzyme Q는 ubiquinone Q-7이고, DNA의 G+C 함량은 41.3%로서, *Acinetobacter* sp.의 38~47%에 거의 일치하였다. 또한, 분리균주의 균체 지방산의 조성 비율은 Table 2에 나타내었다. Oleic acid(18:1<sub>w9</sub> cis, 32.81%), palmitoleic acid(16:1<sub>w7</sub> cis, 26.85%), palmitic acid(16:0, 17.30%)의 우점순으로 나타났으며, 이러한 결과는 *Acinetobacter* 속과 거의 유사한 조성으로서 MIS(17)의 type strain과 dendrogram에 의한 분리균주와의 유사성을 비교한 결과 *Acinetobacter johnsonii*에 근접하였다(Fig. 3). 따라서 상기 형태적, 생리적 및 생화학적 특성과 균체 지방산 분석에 의한 균주 동정이 일치하여 분리균주를

**Table 1. Morphological, physiological, and biochemical characteristics of the isolate GEM2**

Characteristics	GEM2
Shape	short rod
Size	0.6~0.7×0.8~1.4 μm
Gram stain	-
Optimum temp.	30°C
Growth in air	+
Growth at 42°C	+
Growth on MacConkey	+
Motility	+
Catalase	+
Oxidase	-
Carbohydrate(glucose) (F/O/-)	F
Citrate utilization	-
Nitrate induction	-
MR test	-
VP test	-
Indole production	-
Urea hydrolysis	+
Arginine	+
Ornithine	+
Lysine	+
Carbohydrate utilization (acid production)	
Glucose	-
Lactose	-
Maltose	-
Xylose	-
Sucrose	-
Coenzyme Q	Q-7
G+C mol %	41.3%

Symbols: +; positive, -; negative

Abbreviation: F; fermentative, O; oxidative, MR; methyl red, VP; Vogesproskauer

최종적으로 *Acinetobacter* sp. GEM2로 명명하였다.

### 분리균주의 생육 곡선

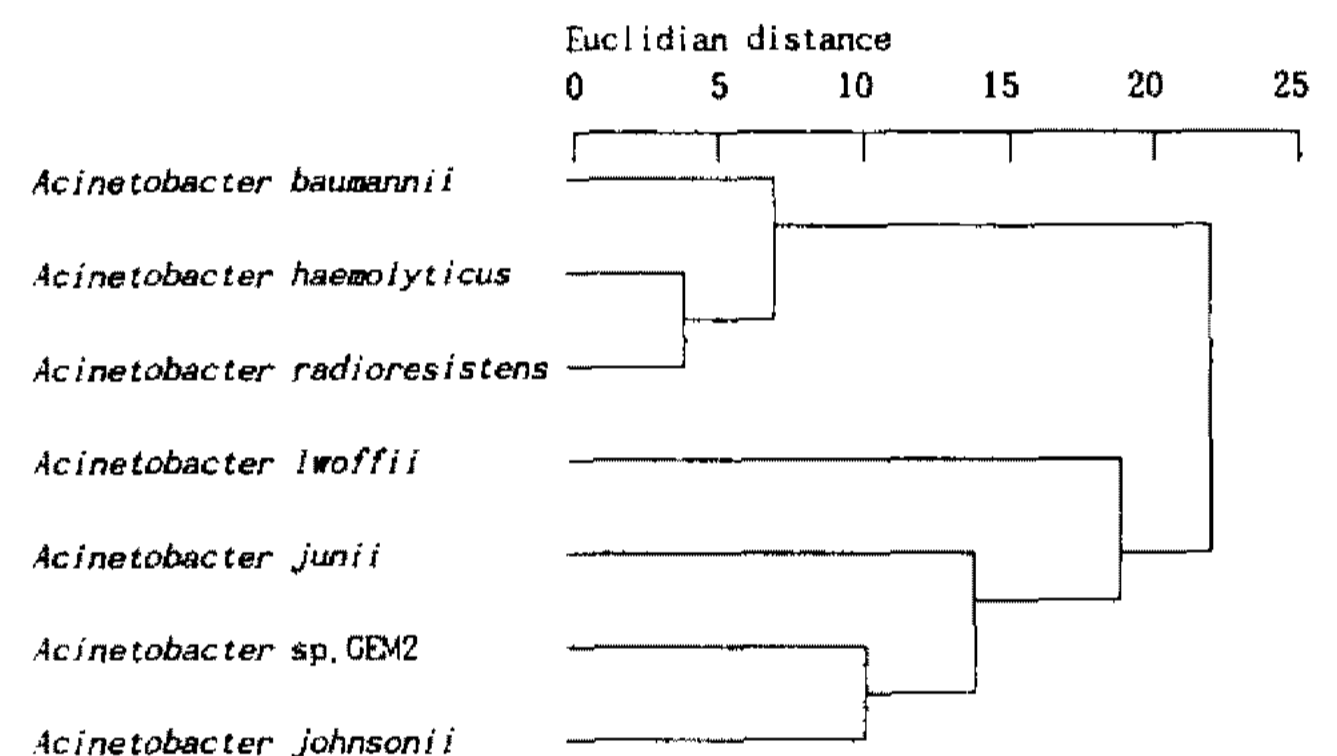
유일한 탄소원 및 에너지원으로서 phenol을 1000 ppm 첨가한 최소배지에 종균을 2%(v/v)되게 접종한 후 30°C에서 120 strokes/min으로 진탕배양하면서 시간에 따르는 균중식, phenol의 농도 그리고 pH 변화를 조사하여 Fig. 4에 나타내었다. *Acinetobacter* sp. GEM2는 거의 유도기가 없이 배양 10시간 이후부터 급속한 생육이 시작되어 배양 24시간 이후에 정지기에 도달하면서 흡광도가 1.45였다. Phenol의 농도는 배양초기에 약 40%가 휘발에 의해 감소된

**Table 2. Major fatty acid composition of *Acinetobacter* sp. GEM2 FAME**

Feature	Mean (%)
12 : 0	7.90
unknown 12.486	1.14
12 : 0 2OH	1.75
12 : 0 3OH	5.67
14 : 0	1.10
16 : 1 <sub>w7</sub> cis <sup>1)</sup>	26.85
16 : 0	17.30
18 : 1 <sub>w9</sub> cis <sup>1)</sup>	32.81
sum in feature 7 <sup>2)</sup>	3.51
18 : 0	1.97

<sup>1)</sup>There is currently a trend away from use of "systematic" names and toward the use of omega positions (eg. <sub>w7,w9</sub>) of double bonds.

<sup>2)</sup>18 : 1<sub>w7</sub> cis/<sub>w9</sub> trans/<sub>w12</sub> trans

**Fig. 3. Abridged dendrogram showing the relationship of *Acinetobacter* strains based on their cellular fatty acid profiles.**

것으로 추정되며 배양 24시간에 약 95%의 phenol이 소비되었다. 이때, pH는 6.78에서 6.38로 변화되었다. 또한 배양 27시간에 phenol이 소진되어 균중식이 정지되면서 pH는 약간 증가하였다. 한편, 박 등(8)이 분리한 *Pseudomonas* sp.는 500 ppm의 phenol을 배양 4일 후 90% 이상 분해하였다. 이와 비교해 볼 때 *Acinetobacter* sp. GEM2의 phenol 분해는 매우 신속히 진행되는 것으로 생각된다.

### 배양온도와 pH 변화에 따른 생육특성

최소배지에 1000 ppm의 phenol을 첨가하여 배양 온도에 따른 균생육을 Fig. 5에 나타내었다. *Acinetobacter* sp. GEM2는 30°C에서 가장 좋은 생육을 보였으며, 10°C에서는 거의 생육 하지 못하였다. 20°C와 25°C에서도 균생육이 좋았으며, 37°C에서는 다소 감소하였다. 배지의 초발 pH에 따른 *Acinetobacter* sp.

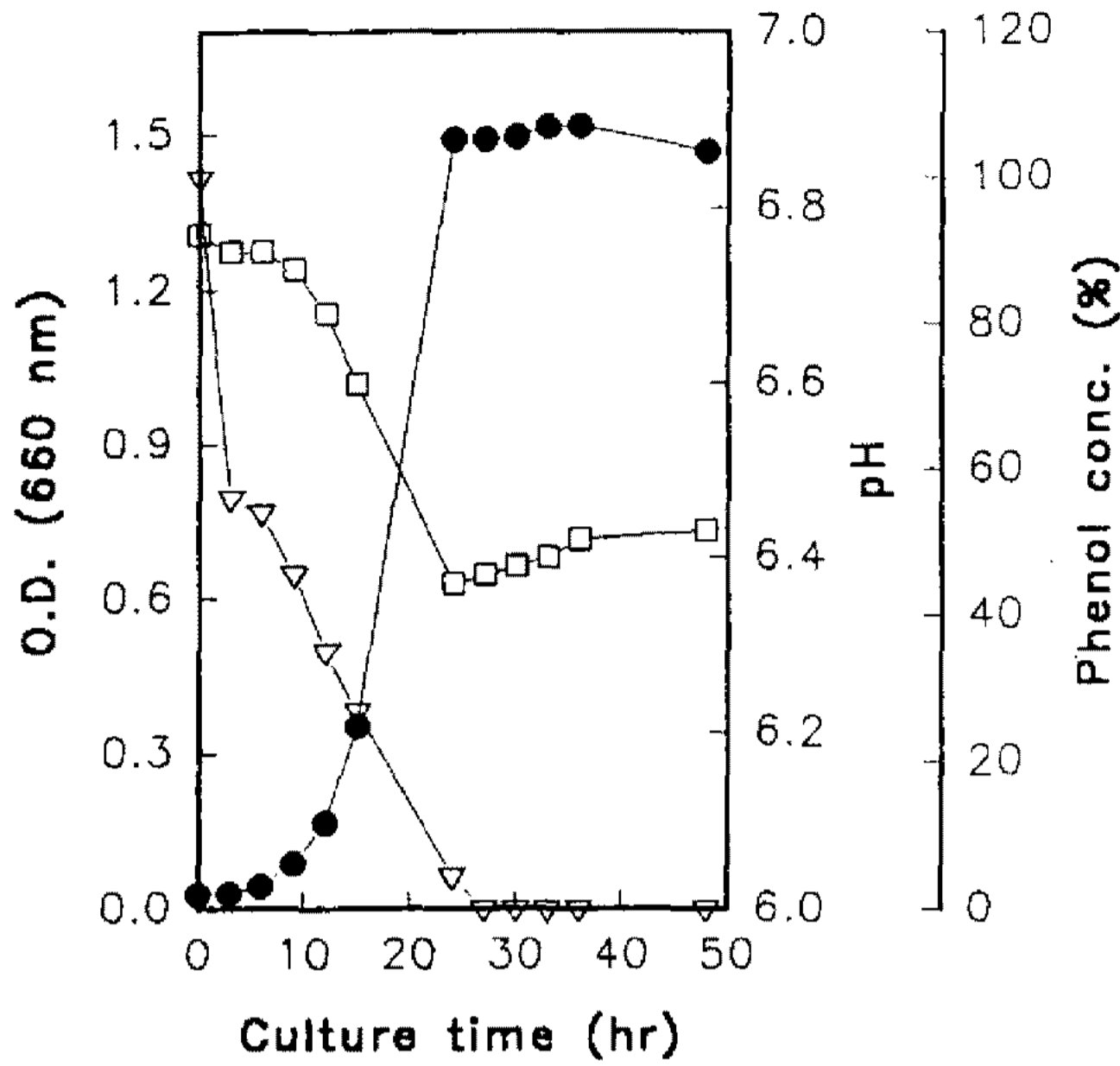


Fig. 4. Time course of cell growth, phenol concentration, and pH by *Acinetobacter* sp. GEM2 in a minimal medium containing phenol as a sole carbon source. ●; O.D., ▽; pH, □; Phenol concentration

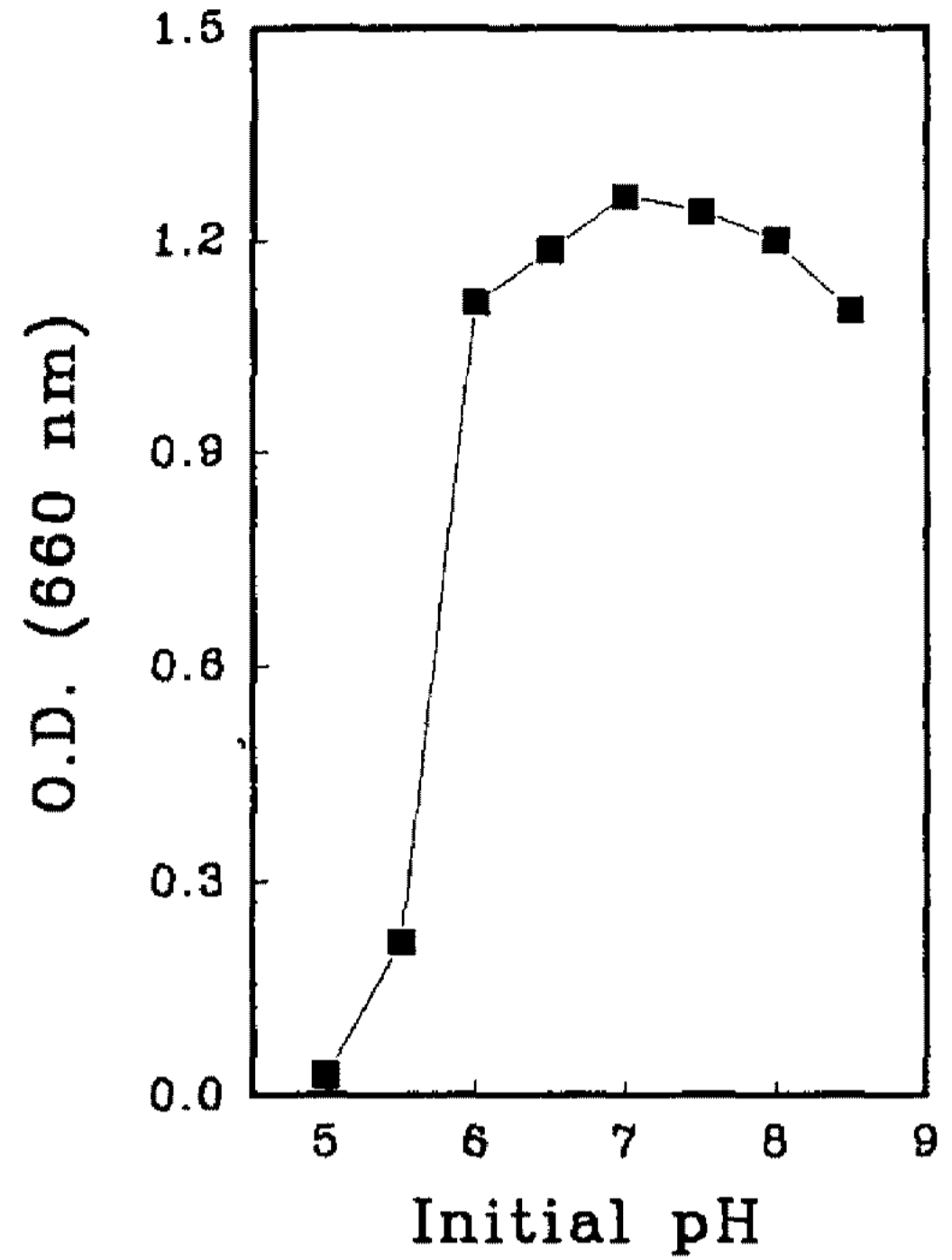


Fig. 6. Effect of initial pH on growth of *Acinetobacter* sp. GEM2.

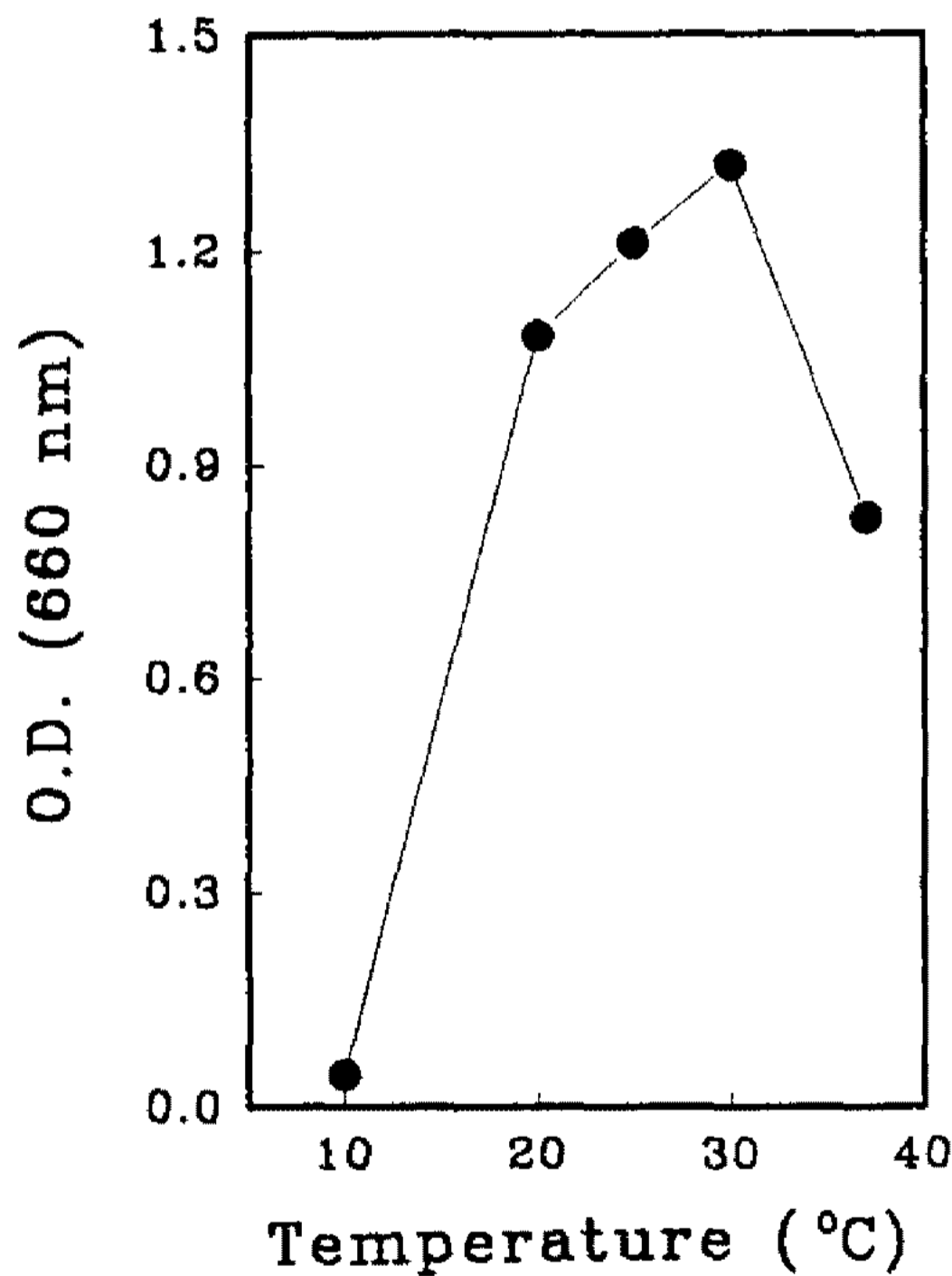


Fig. 5. Effect of temperature on growth of *Acinetobacter* sp. GEM2.

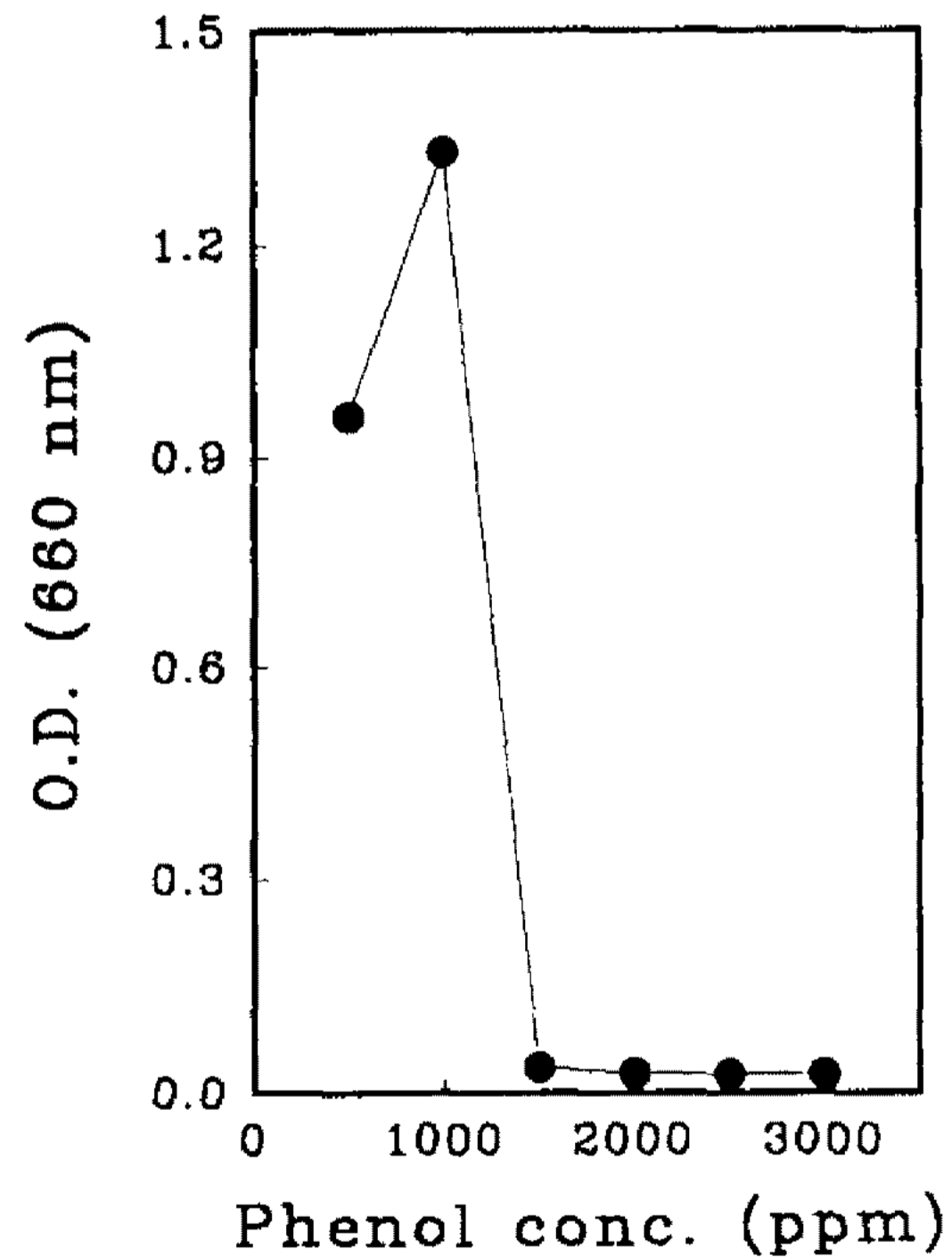


Fig. 7. Effect of phenol concentration on growth of *Acinetobacter* sp. GEM2.

GEM2의 생육을 Fig. 6에 나타내었다. pH 6.0~8.5의 범위에서 균의 생육이 우수하며, 최적 pH는 7.0이었다. pH 5.0과 5.5에서 균은 거의 생육하지 못하였다.

Phenol 농도에 대한 영향

일반적으로 벤젠고리를 가지는 방향족 화합물들은

균체에 독성을 나타내기 때문에 균체성장에 대하여 기질저해(substrate inhibition) 효과를 나타낸다(22). *Acinetobacter* sp. GEM2에 대하여 phenol에 의한 기질저해 효과를 조사하기 위하여 500 ppm부터 3000 ppm까지 농도를 변화시켜가며 이에 따른 균생육을 측정된 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Phenol 1500 ppm



**Table 3. Utilization of aromatic compounds by *Acinetobacter* sp. GEM2**

Aromatic compounds	Growth ( $A_{660}$ )	
	24 hrs	48 hrs
Benzene	—	—
Benzoic acid	0.395	0.409
Phenol	0.337	0.883
<i>m</i> -Cresol	0.406	0.340
<i>o</i> -Cresol	—	0.120
<i>p</i> -Cresol	0.215	0.192
Salicylic acid	—	—
Catechol	0.745	1.186
Gentisic acid	0.287	0.194
Toluene	—	0.508
<i>p</i> -Toluic acid	—	—
<i>p</i> -Xylene	—	—

Each value represents the absorbance of culture broth at 24 hrs and 48 hrs incubation at 30°C. The concentration of aromatic compounds was 500 ppm.

이상에서는 균생육이 완전히 저해를 받았으며, 1000 ppm에서 가장 좋은 균생육을 나타내었다. 이같은 결과는 Masque 등(2)이 보고한 *Pseudomonas* sp.와 Hinteregger 등(3)이 보고한 *Pseudomonas putida*가 phenol이 1000 ppm 첨가된 배지에서 생육이 가능하다는 보고와 유사하였으나, 박 등(8)이 분리한 *Pseudomonas* sp.의 성장한계농도인 2000 ppm에는 미치지 못하였다.

#### 방향족 화합물에 대한 이용성

분리균주 GEM2의 방향족 화합물에 대한 이용성을 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. Benzoic acid, phenol, *m*-cresol, *o*-cresol, *p*-cresol, catechol, gentisic acid 그리고 toluene 등의 8가지 방향족 화합물을 생육에 이용하였다. *o*-Cresol과 toluene을 공급하였을 때 배양 24시간까지는 균생육이 전혀 없다가 배양 48 시간에 균생육이 나타났다. 그러나 benzene, salicylic acid, *p*-toluic acid 그리고 *p*-xylene은 전혀 이용하지 못하였다. 이와같은 결과는 박 등(8)이 분리한 *Pseudomonas* sp.가 benzene, salicylate 그리고 2,4-D를 이용한다는 보고와는 다른 것이다.

#### Catechol oxygenase 활성 측정

*Acinetobacter* sp. GEM2의 catechol 분해경로를 조사하기 위하여 최소배지에 phenol을 기질로 하여 30°C에서 24시간 생육시킨 후 cell free extracts를 조효소로 하여 catechol oxygenase의 활성을 조사한

**Table 4. Enzyme activity of *ortho*- and *meta*-pathway in cell free extracts of *Acinetobacter* sp. GEM2 grown on phenol**

Enzyme	Activity (unit)
Catechol 1,2-dioxygenase	0.0068
Catechol 2,3-dioxygenase	0.0104

Each value is given in unit per minute at room temperature.

**Table 5. Solvent tolerance of *Acinetobacter* sp. GEM2**

Solvent	Log P	Growth*
n-Decane	5.6	+++
n-Octane	4.5	+++
n-Heptane	4.0	+++
Trimethyl-pentane	3.9	+++
Hexane	3.9	+++
Cyclohexane	3.4	+++
<i>p</i> -Xylene	3.1	—
n-Pentane	3.0	++
Toluene	2.5	+
1-Heptanol	2.4	+
Benzene	2.0	+
Chloroform	2.0	—
Phenol	1.5	—
1-Butanol	0.8	—

The strain was inoculated to LB broth containing organic solvent at the concentration of 25%(v/v), and the growth was measured.

\*Symbols indicate turbidity values at 660 nm: + + +, >1.0 after 24 hrs; + +, 0.6 to 1.0 after 48 hrs; —, <0.2 after 48 hrs

결과를 Table 4에 나타내었다. Catechol 2,3-dioxygenase의 활성이 높은 것으로 보아 주로 *meta*-분해경로를 통하여 catechol이 분해되며, catechol 1,2-dioxygenase의 활성으로 보아 *ortho*-분해경로에 의해서도 분해되는 것으로 사료된다. 또한 Hinteregger 등(3)은 *Pseudomonas putida*가 *ortho*-와 *meta*-분해경로를 통하여 phenol을 분해한다는 유사한 결과를 보고하였다. 반면에 Johnson과 Stanier(5)에 의하면 *Alcaligenes eutrophus*는 phenol과 *p*-cresol 분해시 catechol *meta*-분해경로를 통하여 catechol을 분해하여 2-hydroxymuconic semialdehyde을 생성한 후 pyruvate와 acetaldehyde로 최종분해 한다고 한다. 즉, phenol 분해에 있어 중간산물인 catechol의 분해경로는 종(species)에 따라 다르게 나타남을 알 수 있다.

### 유기용매에 대한 내성

일반적으로 유기용매의 극성이 커질수록, 즉 n-octanol과 물 사이의 용매 분산계수의 상용 log 값인 log P가 작아질수록 독성이 증가되며 각 균주는 고유의 성장제한 log P 값을 갖으므로 성장제한 log P 값보다 낮은 log P 값의 유기용매에서는 생육이 불가능하다(20, 21). *Acinetobacter* sp. GEM2의 유기용매에 대한 내성을 조사하여 Table 5에 나타내었다. *Acinetobacter* sp. GEM2의 경우 비교적 유기용매에 대한 내성이 큰 것으로 나타났으나, *p*-xylene과 phenol에 대해서는 내성을 갖지 못하였다. 성장 제한 log P 값은 2.0 정도였다. 이와같이 방향족 화합물의 분해능이 있으며, 유기용매에 내성이 있는 균주는 폐수처리 뿐 아니라 이들물질로 오염된 오염지의 bioremediation(23)에도 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

### 요 약

Phenol을 증기상으로 공급하여 배양하면서 colony 형성이 우수하고, 액체배양에 의한 균생육과 분해능이 우수한 균주를 선발하여 *Acinetobacter* sp. GEM2로 동정하였다. *Acinetobacter* sp. GEM2의 생육을 위한 최적온도 및 초발 pH는 30°C, 7.0이었으며, phenol 1500 ppm 이상의 농도에서는 기질저해를 나타내었다. 배양 10시간 이후에 급속한 균생육을 보여 배양 후 24시간에는 거의 정지기에 도달하였으며, phenol 농도의 95% 이상이 분해되었다. *Acinetobacter* sp. GEM2는 benzoic acid, phenol, *m*-cresol, *o*-cresol, *p*-cresol, catechol, gentisic acid 그리고 toluene 등의 방향족 화합물을 이용하며, benzene, salicylic acid, *p*-toluic acid 그리고 *p*-xylene은 전혀 이용하지 못하였다. *Acinetobacter* sp. GEM2는 *ortho*-와 *meta*-분해경로를 통하여 catechol을 분해하며, 유기용매에 대한 성장제한 log P 값은 2.0 정도였다.

### 참고문헌

- Li, J.K. and A.E. Humphrey. 1989. Kinetics and fluorometric behaviour of a phenol fermentation. *Biotechnol. Lett.* **11**: 177-182.
- Masque, C., M. Nolla, and A. Bordons. 1987. Selection and adaptation of a phenol-degrading strain of *Pseudomonas*. *Biotechnol. Lett.* **9**: 655-660.
- Hinteregger, C., R. Leitner, M. Loidl, A. Fersch, and F. Streichsbier. 1992. Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 252-259.
- Bayly, R.C. and G.J. Wigmore. 1973. Metabolism of phenol and cresols by mutant of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **113**: 1112-1120.
- Johnson, B.F. and R.Y. Stanier. 1971. Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **107**: 468-475.
- Morsen, A. and H.J. Rehm. 1987. Degradation of phenol by a mixed culture of *Pseudomonas putida* and *Cryptococcus elinovii* adsorbed on activated carbon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 283-288.
- Ehrhardt, H.M. and H.J. Rehm. 1989. Semicontinuous and continuous degradation of phenol by *Pseudomonas putida* P8 adsorbed on activated carbon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 312-317.
- 박춘호, 김용기, 오평수. 1991. 방향족화합물이 함유된 폐수의 생물학적 처리. *산업미생물학회지* **19**: 631-636.
- 정운창, 김경남, 최용진, 양한철, 송준상, 서윤수. 1989. *Pseudomonas* 속 세균에 의한 방향족화합물 생분해. *산업미생물학회지* **17**: 100-108.
- 고영희, 하일호, 배경숙. 1988. Naphthalene을 분해하는 *Pseudomonas putida* N3의 분리 및 특성. *산업미생물학회지* **16**: 199-204.
- Krieh, N.R. and K.J. Steel. 1974. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The William Wilkins Co., Baltimore.
- Cowan, N.R. and K.J. Steel. 1974. *Manual for the Identification of Medical Bacteria* (2nd ed.), Cambridge University Press, London.
- Yamada, Y., T. Ohishi, and K. Kondo. 1983. The coenzyme Q system in strains of some yeasts and yeast-like fungi. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **29**: 51-57.
- Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase HPLC. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**: 125-128.
- Abel, K., H. de Schmetzing, and J.I. Peterson. 1963. Classification of microorganisms by analysis of chemical composition; I. Feasibility of utilizing gas chromatography. *J. Bacteriol.* **85**: 1039-1044.
- Goodfellow, M. and D.E. Minnikin. 1985. *Chemical Method in Bacteria Systematics*. Academic Press, New York.
- Miller, L.T. and T. Berger. 1985. Bacteria identification by gas chromatography of whole cell fatty acid, Pp. 228-248. *Hewlett-Packard Application Note*.
- Hegeman, G.D. 1966. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Synthesis of the enzymes by the wild type. *J. Bacteriol.* **91**: 1140-1154.
- Nozaki, M. 1970. Metapyrocatechase(*Pseudomonas*), Pp. 522. *Methods in Enzymology 17A*, Academic Press, New York.

- mic Press, New York.
20. Inoue, A. and K. Horikoshi. 1991. Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter Log P. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 194-196.
21. Rikizo, A., K. Aibe, A. Inoue, and K. Horikoshi. 1991. Preparation of organic solvent-tolerant mutants from *Escherichia coli* K-12. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1935-1938.
22. Gordon, A.H. and W.R. Compbell. 1975. Substrate inhibition kinetics; phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotech. Bioeng.* **17**: 1599-1615.
23. Cruden, D.L., J.H. Wolfram, R.D. Rogers, and D.T. Gibson. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with *p*-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2723-2729.

(Received August 16, 1994)