Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 23, No. 3, 255-262 (1995)

Acinetobacter sp. T5-7에 의한 Phenol과 Trichloroethylene 分解特性

홍성용 · 이숙희 · 이정해 · 하지홍*
경북대학교 유전공학과

Characterization of Trichloroethylene and Phenol Degradation by *Acinetobacter* sp. T5-7

Sung-Yong Hong, Suk-Hee Lee, Jung-Hae Lee and Ji-Hong Ha*
Department of Genetic Engineering, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

Abstract — Intact cells of *Acinetobacter* sp. T5-7 completely degraded trichloroethylene (TCE) following growth with phenol. This strain could grow on at least eleven aromatic compounds, e.g., benzaldehyde, benzene, benzoate, benzylalochol, catechol, caffeic acid, 2.4-D, p-hydroxybenzoate, phenol, protocatechuate and salicylate, and did grow on alkane, such as octane. But except phenol, other aromatic compounds did not induced TCE degradation. Phenol biotransformation products, catechol, was identified in the culture media. However, catechol-induced cells did not degrade TCE. So we assumed that phenol hydroxylase was responsible for the degradation of TCE. The isolate T5-7 showed growth in MM2 medium containing sodium lactate and catechol rather than phenol, but did not display phenol hydroxyalse activity, suggesting induction of enzyme synthesis by phenol. Phenol hydroxylase activity was independent of added NADH and flavin adenine dinucleotide but was dependent on NADPH addition. Degradation of phenol produced catechols which are then cleaved by meta-fission. We identified catechol-2.3-dioxygenase by active staining of polyacrylamide gel.

자연계를 오염시키는 무수히 많은 xenobiotics 중에서도 TCE는 탈지제, 기계공업의 세정제, 드라이클리닝용제, 연화제 등으로 폭 넓게 이용되는 유기염소물질로써 그 사용량의 증가와 더불어 실제로 지하수와 토양오염의 주물질로 등장하고 있다(1, 2). TCE는 동물실험에서 발암성 등 인체에 대한 위험성이 높은 물질로 분류되어 미국 환경보호청의 우선규제 대상물질로 선정되어 있으며 혐기적 분해시에는 발암성이 있는 vinyl chloride를 생성하므로 우리나라에서도 1993년부터 음용수 규제대상물질로 선정하고 있다(3).

자연계에서 TCE가 분해되지 않고 지속적으로 존재하는 것은 TCE를 분해할 수 있는 잠재력을 가진 미생물이 자연계에 있으나 분해효소를 유도할 수 있는 적당한 조건이 부족해서이며 적절한 기질을 이용하여 TCE 분해에 필요한 효소를 유도해 주었을 때 난분해성인 TCE가 cometabolism 됨을 보여 주었다(4).

방향족 화합물과 TCE 분해에 관한 연관성은 Nelson *et al.*(5, 6)이 자연계에서 분리한 균이 TCE를 분해하는데 phenol이 관계함을 발견한 이후로 많은 연구가 행하여져 왔다. *Pseudomonas cepacia* G4의 경우 phenol로 균을 배양시켰을 때 TCE를 잘 분해하였으며 phenol 외에도 toluene, *o*-cresol, *m*-cresol 등과 cometabolism 시킬 경우 TCE를 CO_2, Cl$^-$, 밝혀지지 않은 비휘발성 물질로 완전분해하였으며, 이 균으로 toluene *ortho*-monooxygenase가 block 된 돌연변이주를 만들어 TCE 분해에 toluene monooxygenase가 직접 관여함을 밝혔다(7). Wackett 등의 *Pseudomonas putida* F1의 경우 TCE 분해에 toluene dioxygenase가 관계함을 밝혔으며(8, 9), *Pseudomonas mendocina*의 경우 gene cloning 실험을 통해서 toluene monooxygenase가 TCE 분해에 관계함을 밝혔다(10).

특히 phenol 분해의 첫단계 분해효소로 알려진 phenol hydroxylase는 이미 yeast 인 *Trichosporon cutaneum*(11)과 *Pseudomonas* sp. CF600(12), *Bacillus stearothermophilus*에서 단지 phenol 분해효소로만 부분적으로 밝혀졌으나, TCE 분해에 대한 연관성은 *Pseudomonas cepacia* G4(13)에서 보고된 것 이

Key words: *Acinetobacter* sp., TCE degradation, phenol hydroxylase
*Corresponding author

외에는 다소 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 TCE 분해균주인 *Acinetobacter* sp. T5-7 균주의 특성과 metabolism의 이해를 위해 다양한 aromatic compound의 분해능에 대한 검토를 하였고, 이들로 유도된 균에 의한 TCE 분해 관련성에 대해 조사하였다. 또한 기본적인 자료로 phenol의 분해경로에 관련된 효소의 TCE 분해 관련성에 대해 조사하였으며 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

본 연구에 사용된 균주는 이(14) 등이 분리한 *Acinetobacter* sp. T5-7 균주로 공단지역 폐수유입지의 하수에서 분리되었다. 배양은 complex media로는 LB 배지를, 최소기본배지로는 MM2 배지를 이용하였다(15). 배양조건은 30℃, 200 rpm으로 진탕배양하였고, 최소배지에서 균을 배양할 때는 각각의 단일 탄소원을 기본적으로 2 mM 첨가하였다.

방향족 화합물의 분해능 검증

Benzaldehyde, benzene, benzoate, *p*-hydroxy benzoate, catechol, cresol, phenol, toluene, xylene 등의 화합물을 각각 유일탄소원으로 하는 MM2 배지에서 30℃, 200 rpm으로 24시간 진탕배양한 후, 생육도와 기질 감소량을 측정하였다. 또한 alkane 계열인 octane의 분해능에 대해서도 조사하였다. 생육도는 spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, 흡광도에 따른 건조중량 검량 곡선을 작성하고, 이 곡선을 이용하여 건조균체로 환산하였다.

Phenol disappearance assay

Phenol의 분해속도는 modified colorimetric assay (16) 법을 사용하여 phenol 농도의 변화를 측정하여 결정하였다. 10 m*l*의 MM2 배지에 균을 현탁시키고 최종농도 100 μM의 phenol을 첨가하고 30℃, 200 rpm으로 진탕배양하였다. 일정 시간 간격으로 1 m*l*의 sample을 Ephendorf tube(E-tube)에 옮기고 50 μ*l*의 2 N NH_4OH와 25 μ*l*의 2.0% aminoantipyrine을 첨가하여 잘 섞어준 후 25 μ*l*의 $K_3Fe(CN)_6$를 넣고 다시 섞은 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 흡광도 500 nm에서 그 값을 읽었다. 표준곡선에서 계산한 일차방정식에 의해 500 nm에서의 흡광도를 농도로 환산하였다. 고농도일 경우는 적정배수로 희석한 후 농도를 결정하였다.

Catechol determination

Catechol의 농도와 확인은 aminoantipyrine method(17)에 의해 결정하였다. Aminoantipyrine reagent(2 mg of 4-aminoantipyrine, 0.2 m*l* of 20% Na_2CO_3, 0.04 m*l* of 1 N NaOH) 2 m*l*와 reaction mixture (100 μM phenol, 1 mM NADPH, 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.6))에 enzyme extract 100 μ*l*를 첨가하고 30℃에서 30분간 반응시킨 반응용액 1 m*l*을 섞은 후 실온에서 20분간 방치하고 spectrophotometer를 이용하여 515 nm에서 값을 읽었다. 농도는 catechol을 이용하여 표준검량곡선을 작성하여 결정하였다.

TCE disappearance assay

TCE stock solution은 31 m*l* vial에 30 m*l*의 증류수를 넣고 TCE를 12.5 mM이 되도록 넣은 후 magnetic stirrer를 이용하여 완전히 포화시켜 사용하였으며 Standard bottle assay(18) 방법과 이(14) 등의 실험방법을 따랐다.

Gas chromatography 분석조건

GC는 detector로 ECD(electron capture detector)가 장착된 Hewrett Packard 사의 HP 5890 series II를 이용하였고 integrator 역시 동사의 model을 사용하였다. TCE에 대한 정량분석 조건은 이(14) 등의 조건에 근거하였다.

Cell-free extract

MM2 최소기본배지에 phenol과 catechol, sodium lactate를 각각 유일탄소원으로 하여 배양된 균액을 원심분리하여 균체를 얻은 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6)에 현탁시키고 다시 모았다. 일정량(약 15 g ; wet weight)의 균을 6.5 m*l*의 같은 buffer에 재현탁한 후 ultra-sonicator(Cole-Parmer 4710 series)에서 sonication 시켰으며 cell의 파쇄정도는 1,500배 배율의 현미경으로 관찰하였고 90% 이상의 세포가 파쇄되었을 때 23,000×g에서 15분간 원심분리 하여 상등액을 enzyme assay를 위해 이용하였다.

Phenol hydroxylase의 활성측정

Gurujeyalakshmi 등(19)이 행한 방법을 약간 변형하여 행하였다. Reaction mixture(100 μM phenol, 1 mM NADPH 또는 NADH, 0.5 mM FAD, 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.6)) 1 m*l*에 100 μ*l*의 enzyme extract를 첨가하고 30℃에서 30분간 incubation 시킨 후 상기한 phenol disappearance assay에

의해 잔류 phenol의 양을 조사하였다. Enzyme의 activity는 분당 1 nmol phenol을 분해하는 단백질량 1 unit으로 하였다.

Catechol 분해효소의 활성측정

Catechol-1,2-dioxygenase는 catechol의 분해산물로 cis.cis-muconic acid를 생성하며 260 nm에서 흡광도의 저하를 나타내므로 spectrophotometer를 이용하여 값의 변화를 관찰하였다(20). 공기로 포화시킨 0.1 M phosphate buffer(KH_2PO_4 : pH 7.0) 2 m*l*에 0.01 M EDTA와 cell-free extract 용액 0.4 m*l*를 첨가하고 2.7 m*l* H_2O에 희석한 후 0.3 m*l* catechol(0.001 M)을 첨가하였다. Catechol 첨가 직후 반응용액을 cuvette에 넣고 260 nm에서 매 30초 단위로 값을 읽었다.

Catechol-2,3-dioxygenase의 활성은 Gibson 등(20)의 방법에 따라 측정하였다. Whole protein solution 0.1 m*l*에 2.8 m*l*의 0.05 M potassium dihydrogen phosphate buffer(pH 7.5)를 섞은 다음, cuvette에 옮기고 0.01 M catechol 0.1 m*l*을 첨가하였다. Catechol 첨가 후 즉시 매 30초 간격으로 375 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질 정량

Cell-free extract 용액내의 단백질량은 Bradford 법(21)을 이용하여 정량하였고 표준물질로는 Bovine serum albumin을 사용하였다.

Protein electrophoresis

SDS-PAGE는 Laemmli 등(22)의 방법을, non-dissociating discontinuous system은 Davis의(23) 방법에 따라 10%, 또는 6% running gel과 4%의 stacking gel에서 전기영동하였다. 전기영동 후 gel은 0.1% Coomasie brilliant blue R-250 staining solution (water : methanol : glacial acetic acid = 41.7 : 41.7 : 16.7)으로 staining을 행하였고, 탈색용액(12.5% isopropanol, 10% acetic acid)으로 탈색시켰다. 또한 Davis gel은 0.1 M catechol solution에 담근 후 40℃로 유지된 shaking water bath 내에서 1시간 동안 active staining을 행하였다.

결과 및 고찰

방향족 화합물에 대한 분해능 검토

MM2 최소배지에 첨가된 다양한 방향족화합물의 이용성에 대해 조사한 결과는 Table 1과 같으며 23종의 화합물중 11종의 화합물을 분해하였다. 특히 toluene은 분해하지 못하였으나 toluene의 대사과정의 중간산물로 알려져 있는 benzylalcohol, benzaldehyde, benzoate를 carbon source로 이용하였다. Catechol로 분해가 되는 것으로 알려진 화합물 중 phenol 이외에 benzene과 salicylate를 분해하였으나 xylene을 분해하지 않았다. Catechol과 protocatechuate 또한 잘 이용하였다.

Table 1. Utilization of aromatic compounds as a sole carbon and energy source by *Acinetobacter* sp. T5-7

Substrates	cell mass increase (mg/*l*)
Anthranilate	NG
Benzaldehyde	4.01
Bezene	4.30
Benzoate	16.80
Benzylalchol	2.60
Catechol	16.44
Camphor	NG
Cinnamic acid	NG
Caffeic acid	0.59
p-Cresol	NG
2.4-D	1.65
2.4-D-phenol	NG
m-Hydroxybenzoate	NG
p-Hydroxybenzoate	17.36
DL-Mandelate	NG
Naphtol	NG
Octane	4.61
Phenol	21.50
Protocatechuate	17.60
Phenoxyacetate	NG
Salicylate	15.00
Toluene	NG
m-Xylene	NG
p-Xylene	NG

Each culture contains 2 mM concentration substrate.
NG: no growth

제초제이며 난분해성물질로 알려져 있는 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)에 대한 이용성을 보였으나 일반적으로 다음 대사산물로 알려져 있는 2,4-dichlorophenol에 대한 이용성은 보이지 않았다. 특이적으로 방향족 화합물 이외에 alkane 계열인 octane을 이용할 수 있음을 보여주었는데 이는 alkane 계열의 또 다른 화합물을 분해할 수 있다는 가능성을 제시하는 것이다. 기존에 보고된 octane 분해균의 대부분의 원유분해능을 가지며(24, 25), 주로 *Acinetobacter* sp. 라는 점을 감안할 때 T5-7 역시 alkane

Table 2. TCE degradation activities of *Acinetobacter* sp. T5-7 grown on different carbon sources

Compound added	Relative % TCE remaining
None	100
Benzene	94.5
Benzylalchol	99.5
Benzaldehyde	96.6
Catechol	97.4
Phenol	9.8
p-Hydroxybenzoate	99.1
Protocatechuate	96.7
Salicylate	98.7

Each experiment used 25 μM of TCE and 2 m*l* of culture of strain *Acinetobacter* sp. T5-7 grown on 5 mM sodium lactate. Incubation time: 2 hrs. Experiment conducts triplicate case. A typical control with a sterile inoculum contained 25 μM TCE.

계열과 원유를 분해할 수 있으리라 사료된다.

TCE 분해 효소의 유도

Table 2에서 나타난 바와 같이 이용할 수 있는 방향족화합물을 단일기질로 MM2 배지에 첨가하여 log phase까지 배양한 균체를 이용하여 TCE 분해능을 조사하였다. 표에서 보는 바와 같이 phenol에서 배양한 균체만이 TCE를 분해하였다.

기존에 보고된 toluene과 TCE의 cometabolism 균인 *Pseudomonas putida* F1이 TCE를 분해하기 위해서는 toluene dioxygenase라는 효소가 발현되어야 한다(8, 9). 이 효소는 toluene이 benzylalcohol로 산화되는 반응을 촉매하는 효소이며 TCE 산화에 관여함이 밝혀졌다. 하지만 T5-7 균주는 toluene을 이용할 수 없었으며, benzylalchol, benzaldehyde, benzoate에서 배양한 균체 역시 TCE를 분해하지 못하였다. benzene이나 salicylate는 phenol 처럼 분해경로가 catechol로 이어지므로 만일 이들에서 유도되는 oxygenase가 방향족화합물에 대해 비특이적이라면 TCE 분해에 어느 정도의 연관성을 보일 것으로 생각하였으나 이들에서 자란 균체는 TCE를 분해하지 않았다.

Catechol의 확인

Phenol은 hydroxylase에 의해 catechol로 산화된다. Phenol을 균체현탁액으로 처리하면서 phenol과 catechol의 농도변화를 Gibson(20)의 방법으로 확인한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이 결과는 phenol이 catechol을 통해 분해되는 것을 나타낸다.

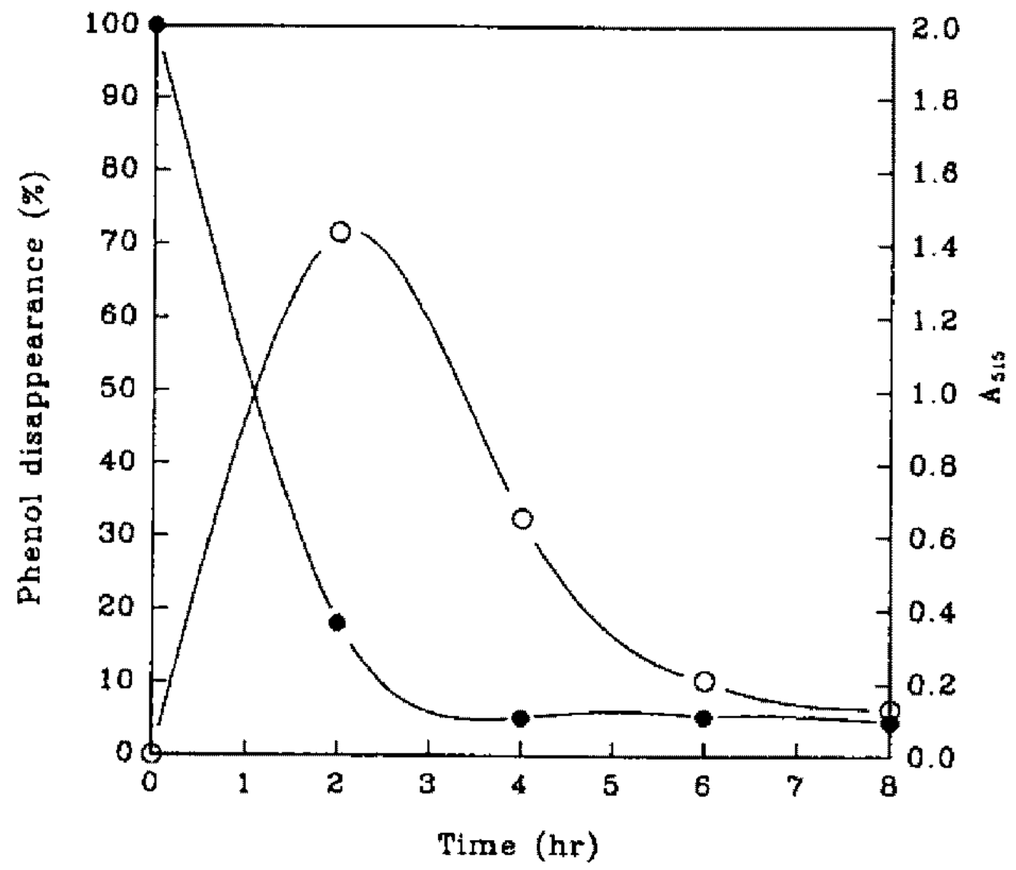

Fig. 1. Time course of phenol degradation and catechol production.
Incubation was done at 30℃ for 8 hours. Catechol was determined at 515 nm. Phenol initiation concentration was 2 mM.
●: Phenol, ○: Catechol

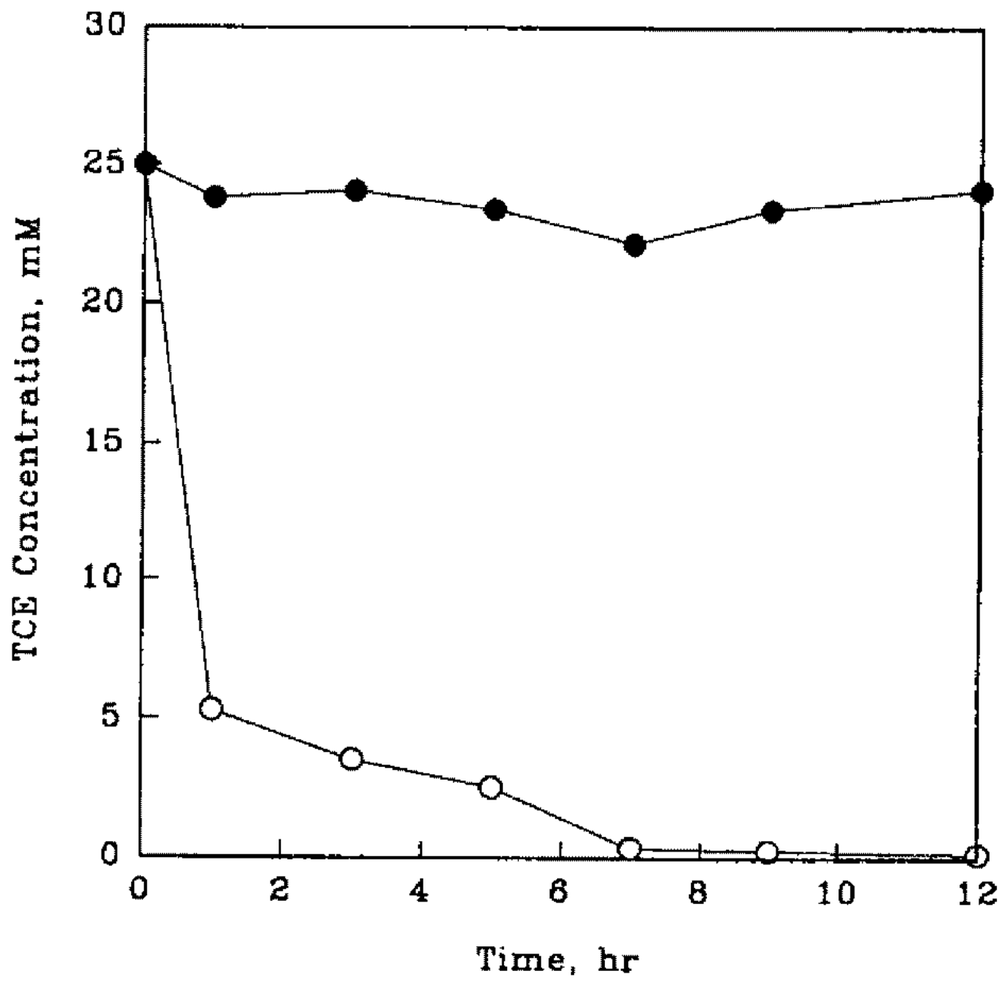

Fig. 2. Time course of TCE degradation by cell suspension grown on phenol (○) and on catechol (●).
Condition; Initial phenol and TCE Conc.: 2 mM, 12.5 μM, pH 7.0, 30℃, 200 rpm and 12 hours

Phenol hydroxylase의 TCE 분해에 대한 연관성

Phenol과 catechol에서 각각 배양한 균체를 이용하여 TCE 분해능을 조사한 결과 phenol에서 자란 균만이 TCE의 분해가 일어나므로 phenol 분해 효소의 관련성을 추정할 수 있었으며, Fig. 2에서 보는 바와 같이 catechol로 유도된 균에 의해서는 TCE의 분해능이 보이지 않는 바 phenol에서 catechol로의

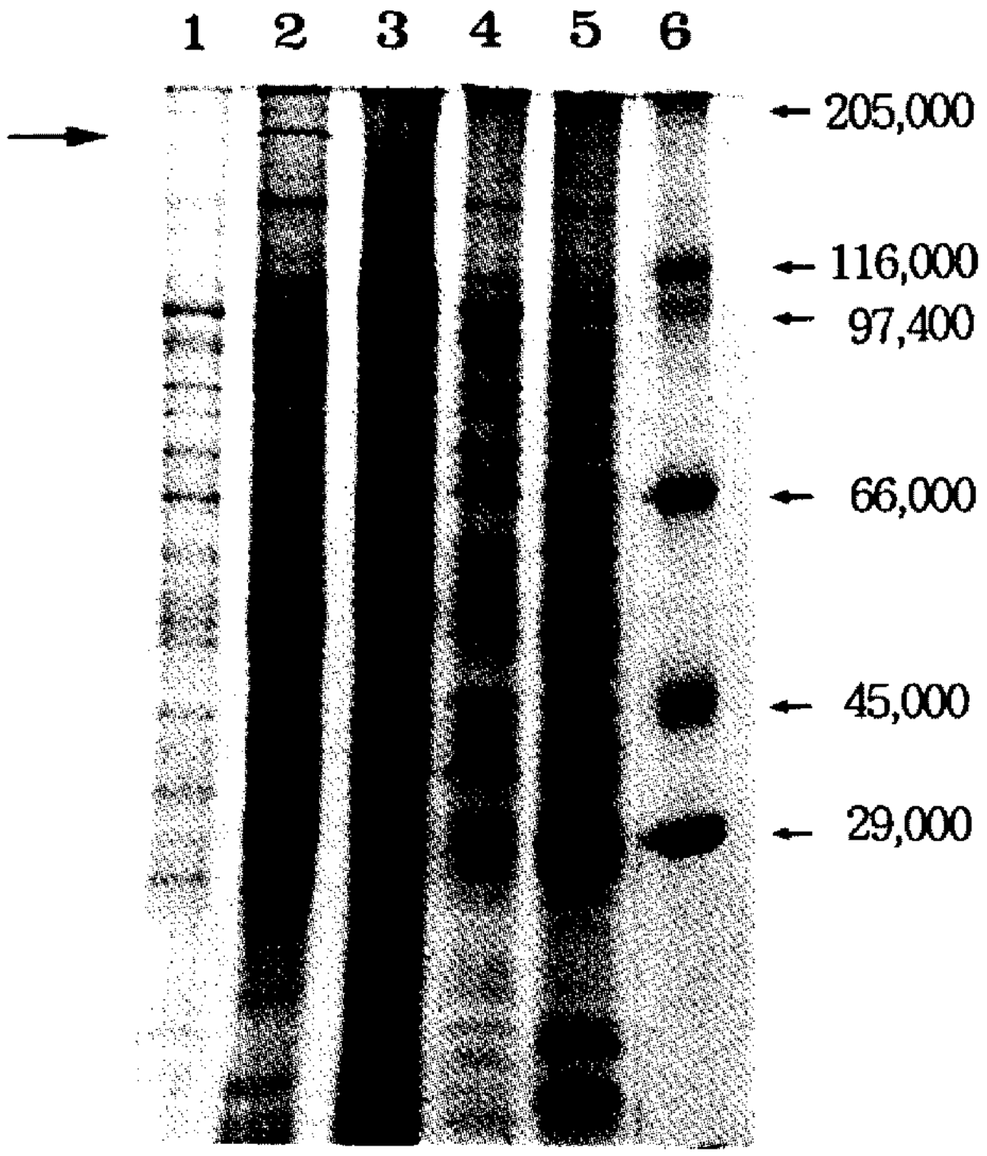

Fig. 3. SDS-PAGE analysis of cell-free extracts of *Acinetobacter* sp. T5-7.
Cell-free extracts were resolved on 10% SDS-denaturing polyacrylamide gel. Gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250 staining solution. Arrow points to the suspected phenol hydroxylase. *Acinetobacter* sp. T5-7 grown sodium lactate (lane 1, 4), phenol (lane 2), catechol (lane 5), containing MM2 medium and LB medium (lane 3).

촉매를 하는 효소인 phenol hydroxyase가 TCE 분해에 관련되었다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다.

Phenol hydroxylase가 TCE 분해에 관련함은 *Pseudomonas cepacia* G4에서 보고되었으나(13), 실제로 분리정제된 효소에 의한 결과가 아니라 균 자체를 이용한 결과이며 효소에 대한 규명은 아직 되지 않았다.

Phenol hydroxylase의 검증

Phenol에 의해 유도된 효소의 존재를 알아내기 위하여 상기한 protein electrophoresis 법에 의해 phenol, catechol, sodium lactate 등이 포함된 MM2 최소배지와 LB 배지에서 자란 균의 cell free extract를 SDS-PAGE로 전기영동하여 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Gel 상에서 phenol에서만 유도된것으로 보이는 비교적 큰 크기의 분자량을 가진 단백질 band를 확인할 수 있었으며 이는 기존에 보고된 phenol hydroxylase의 분자량과는 다소 차이를 보이나 유사한 크기의 high molecular weight의 단백질이 phenol에 의해 유도됨을 알 수 있었다. 또한

Table 3. Effect of cofactors on phenol hydroxylase activity

Cofactor added	Percentage of remaining phenol (%)	Enzyme activity (μM/min per ml)
Enzyme	100	0
Enzyme + NADH	97.8	0.0244
Enzyme + NADPH	61.5	0.4280
Enzyme + NADH + FAD	98.3	0.0189
Enzyme + NADPH + FAD	77.6	0.2490
Enzyme + FAD	98.8	0.0133

catechol과 LB, sodium lactate에서 자란 균의 전기영동 양상에서는 같은 위치의 band를 보이지 않는 바, phenol hydroxylase라고 추정할 수 있었다. 이로서 T5-7은 phenol hydroxylase의 광범위한 기질특이성에 기인하여 phenol을 분해하고 TCE를 분해한다고 추정할 수 있었다.

Phenol hydroxylase의 activity를 위한 cofactor에 대한 검증

기존에 알려진 hydroxylase 계열의 효소들이 대부분 활성을 위해서 NADH, NADPH, $FADH_2$ 등의 조효소가 필수적으로 활성에 필요하거나 또는 부수적으로 활성의 정도를 높인다고 보고된 바 본 균주의 whole cell protein에 포함된 hydroxylase의 활성을 위해 어떠한 조효소가 필요한 지를 우선적으로 검토하여 reaction buffer의 조성을 결정하였다.

Table 3에서의 결과로 볼 때 순수분리된 효소는 아니지만 whole cell protein 상에서 phenol 분해는 cofactor로서 NADPH가 필수적이었으며 NADH 역시 약간의 활성은 보였으나 FAD 첨가에 의한 활성증가는 나타나지 않았다. 하지만 *Trichosporon cutaneum*에서 분리된 phenol hydroxylase는 NADPH를 cofactor로 이용하고 FAD에 의해 활성이 증가한다고 하였다(11). 본 결과가 정제된 효소에 의한 것이 아닌 만큼 정제된 효소에 의한 분석결과에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다. Fig. 4은 whole cell protein 상에서의 NADPH의 이용성을 나타내었고 1시간 후 NADPH의 소모량과 phenol의 분해속도가 거의 유사한 양상을 보이며 분해됨을 알 수 있었다. 또한 Fig. 5는 *Acinetobacter* sp. T5-7에 의한 phenol 분해의 첫 단계를 결과를 근거로 하여 모식화 하였다.

Catechol의 분해과정 분석

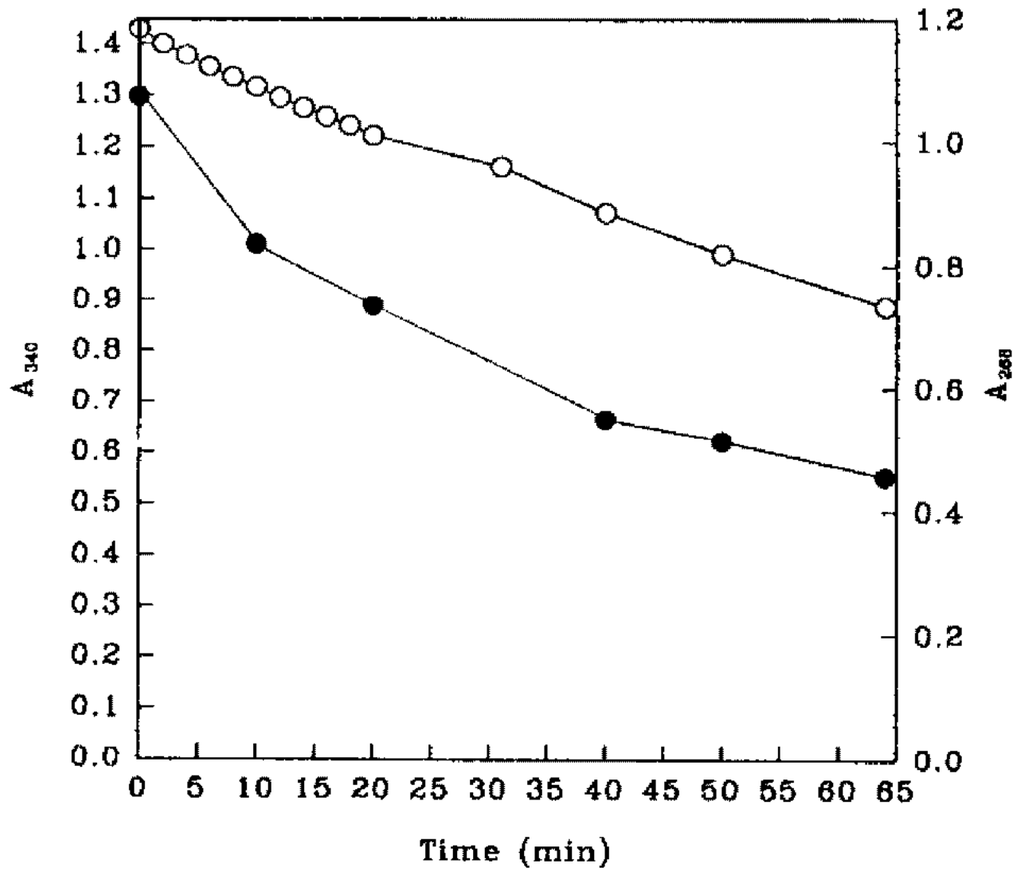

Fig. 4. Time course of NADPH oxidation by whole cell proteins of *Acinetobacter* sp. T5-7.
Condition; 1 mM NADPH, 100 μM phenol, pH 7.0, 30℃, 200 rpm and 2 hours
○: NAHPH, ●: Phenol

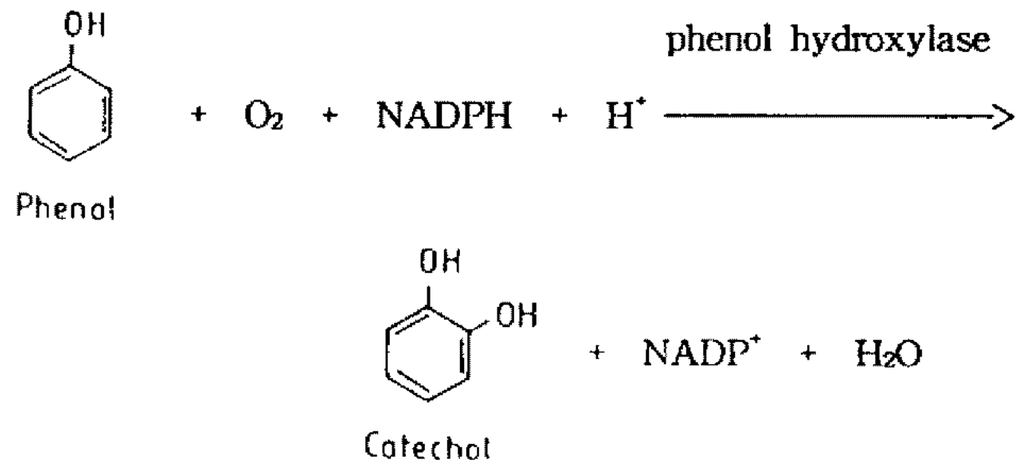

Fig. 5. Oxidation of phenol by *Acinetobacter* sp. T5-7 and relation of NADPH.

Phenol 분해의 초기생성물인 catechol의 분해경로를 이해하기 위해 catechol 분해에 관련된 효소에 대한 검증을 하였다. 본 실험 균주인 *Acinetobacter* sp. T5-7의 cell free extract를 catechol에 반응시키면서 2-hydroxymuconic semialdehyde(HMS)와 cis,cis-muconic acid의 변화를 관찰하였다. Fig. 6에서 나타난 바와같이 catechol-2,3-dioxygenase의 분해산물인 HMS의 흡수파장인 375 nm에서 평균적으로 분당 0.01의 흡광도 증가를 나타내었으나, cis,cis-muconic acid의 파장인 260 nm에서는 흡광도 값의 변화를 나타내지 않으므로 phenol 분해에 의해 생성된 catechol은 catechol-2,3-dioxygenase에 의해 HMS로 분해됨을 확인하였고, non-denaturing gel electrophoresis을 하였을 때 0.1 M catechol로 active stainig을 하여 위치를 확인할 수 있었다(Fig. 7). 또한 catechol oxygenase는 LB, sodium lactate 배지에서도 존재를 확인할 수 있었으므로 induction에 의해서라기 보다는 cons-

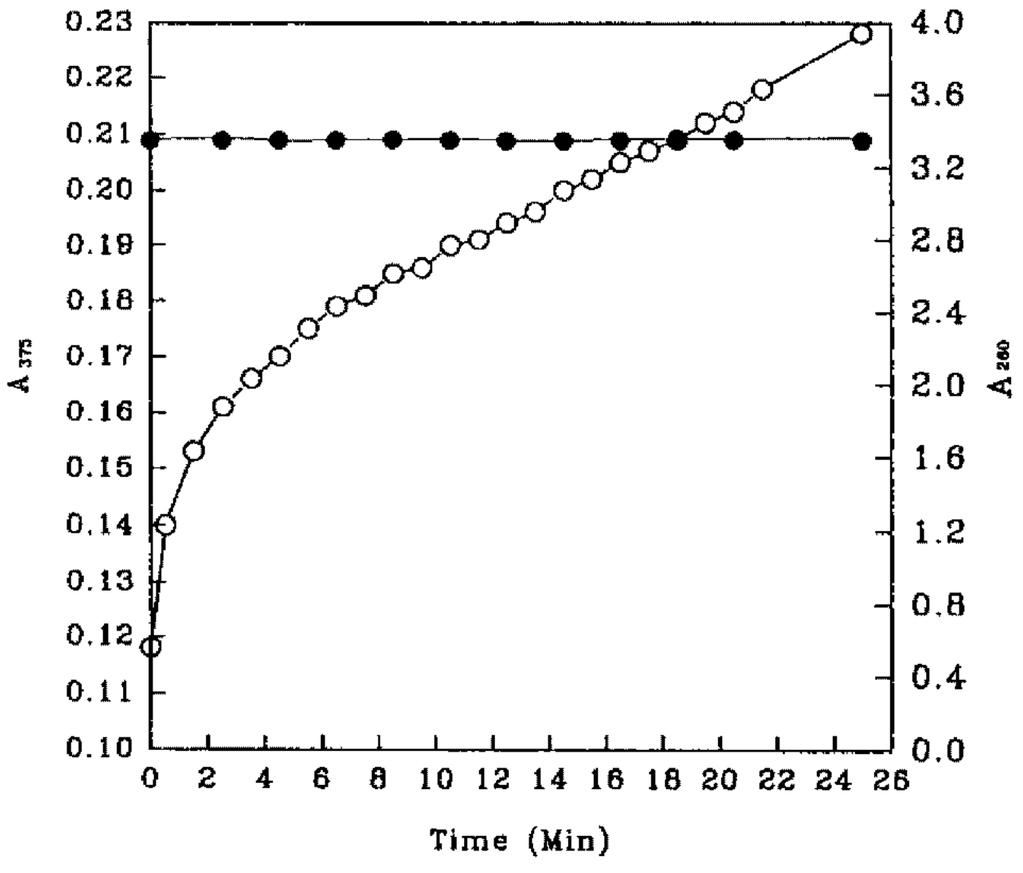

Fig. 6. Production of 2-hydroxymuconic semialdehyde (HMS) by catechol-2,3-dioxyge nase during a time course experiment.
Condition; Reaction buffer (Cell-free extracts 0.1 m*l*, 0.05 M potassium dihydrogen phosphate (pH 7.0) 2.8 m*l*, 0.01 M catechol 0.1 m*l*), HMS was determined at 375 nm in R/T
○: HMS, ●: cis, cis muconic acid

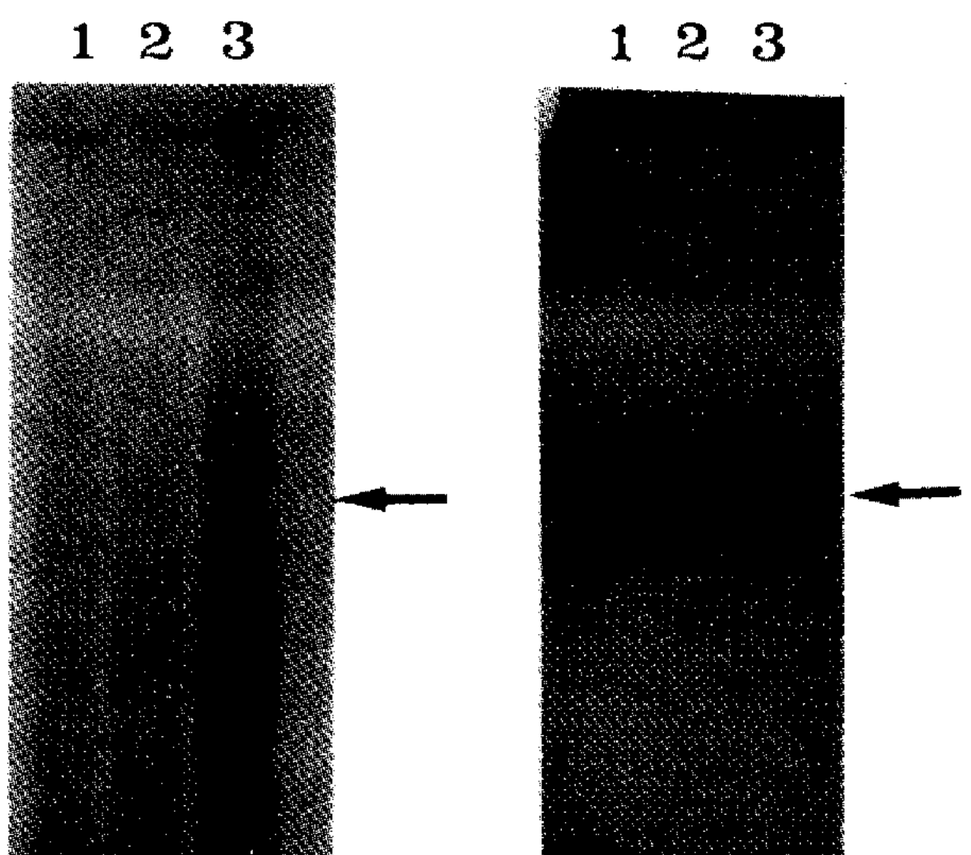

Fig. 7. Activity staining of catechol-2,3-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. T5-7.
Protein fractions were resolved on 8% non-denaturing polyacrylamide gel by electrophoresis. A gel was stained with Coomassie brilliant blue R-250 staining solutions and B gel was stained with 0.1 M catechol solution after electrophoresis. Phenol induced (lane 1), catechol induced (lane 2), LB grown (lane 3) cells. Arrows point to catechol-2,3-dioxygenase.

titutive enzyme으로 보인다. 따라서 본 T5-7 균주는 phenol 분해시 catechol을 경유하고 meta cleavage에 의한 ring cleavage mechanism을 이용하는 것을 알 수 있었다.

요 약

Acinetobacter sp. T5-7에 의해 Trichloroethylene은 phenol과의 cometabolism으로 분해되므로 다른 유도기질로서의 다른 방향족화합물의 분해능과 TCE 분해와의 관계, TCE 분해에 관련되는 phenol 분해 효소의 검증을 행하였다. T5-7은 다른 방향족화합물들 가운데 toluene의 분해경로상의 toluene을 제외한 benzyl alchol, benzaldehyde, benzoate, catechol까지의 대사산물들을 이용하였고, benzene, salicylate, p-hydroxybenzoate, protocatechuate 등을 분해하였다. 또한 hydrocarbon인 octane에 대한 분해능도 관찰할 수 있었는데 이는 alkane 계열의 다른 화합물들을 분해할 수 있는 충분한 가능성을 제시하고 있다.

Phenol 이외의 benzene, benzylalchol, benzaldehyde 등의 방향족화합물에 의해 배양한 균체는 TCE를 분해하지 못하였다. 따라서 *Acinetobacter* sp. T5-7은 phenol의 유도에 의해서만 TCE를 분해함을 알 수 있었다. Phenol의 초기분해산물이 catechol 임을 확인할 수 있었으며, catechol로 유도된 균은 TCE를 분해할 수 없었으므로 phenol hydroxylase에 의해 TCE가 분해됨을 간접적으로 추정할 수가 있었다. 또한 단백질 전기영동상에서 phenol에 의해서만 유도되는 band를 확인할 수 있었으며, 이것이 phenol hydroxylase일 것으로 추정되며 지속적인 연구가 수행 중에 있다.

Whole cell protein의 검증에서 phenol에 의해 유도된 균의 protein extract에서 phenol 분해가 관찰되었으며, 효소활성을 위해 필수적으로 cosubstrate인 NADPH가 요구되었으나 FAD는 활성에 큰 영향을 미치지 않았다. 그리고 catechol의 분해경로는 meta-cleavage를 따랐으며, 단백질 전기영동 실험에서 catechol-2,3-dioxygenase의 존재를 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Strock, W. 1987. Chlorinated solvent use hurt by federal rules. *Chem. Eng. News* **65**: 11.
2. United States Environmental Protection Agency. 1985. National primary drinking water regulations: volatile synthetic organic chemicals. *Federal Register* **50**(219): 46880-46933.
3. 환경처. 1993. 공해대책 **1**: 25.
4. Alvarez-Cohen, L. and P.L. McCarty. 1991. Effects of toxicity, aeration, and reductant supply on trichloroethylene transformation by a methanotrophic mixe culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 228-235.
5. Nelson, H.J.K., S.O. Montgomery, W.R. Mahaffey, and D.H. Pitchard. 1987. Biotransformation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 949-954.
6. Nelson, H.J.K., S.O. Montgomery, E.J. O'Neill, and D.H. Pritchard. 1986. Aerobic metabolism of trichloroethylene by bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 383-384.
7. Shields, M.S., S.O. Montogomery, S.M. Cuskey, P.J. Chapman and P.H. Prichard. 1991. Mutants of *Pseudomonas cepacia* G4 defective in catabolism of aromatic compounds and trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1935-1941.
8. Wackett, L.P. and D.T. Gibson. 1988. Degradation of trichloroethylene by toluene dioxygenase in whole-cell studies with *pseudomonas putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1703-1708.
9. Fan. S. and K.M. Scow. 1993. Biodegradation of trichloroethylene and tolune by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1911-1918.
10. Winter, B.R., K.M. Yen, and B.D. Ensley. 1989. Efficient degradation of trichloroethylene by a recombinant *Eschrichia coli. Biotechnology* **7**: 282-285.
11. Halina Y. Neujahr and Andras Gaal. 1973. Phenol hydroxylase from Yeast, purification and properties of Enzyme from *Trichosporon cutaneum. Eur. J. Biochem.* **35**: 386-400.
12. Ingrid Nordlund, Justin Powlowski, and Victoria Shinger. 1990. Complete Nucleotide Sequence and Polypeptide Analysis of Multicomponent Phenol Hydroxylase from *Pseudomonas* sp. Strain CF600. *J. Bacteriol.* **172**: 6826-6833.
13. B.D. Ensley and P.R. Kurisko. 1994. A gas lift bioreactor for removal of contaminants from the vapor phase. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 285-290.
14. 이숙희, 홍성용, 하지홍. 1994. Phenol을 이용하는 균주에 의한 Trichloroethylene 분해. 산업미생물학회지 **22**: 203-209.
15. Kiyohara, H., N. Kazutaka, and Y. Keijj. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plate. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 454-458.
16. Martin, R.W. 1949. Rapid colorimetric estimation of phenol. *Anal. Chem.* **21**: 1419-1420.
17. T.A. LaRue. 1964. *Anal. Biochem.* 7: 315.
18. Folsom, B.R., P.J. Chapman, and P.H. Prichard. 1990. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: Kinetics and interac-

tions between substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1279-1285.
19. G. Gurujeyalakshmi and P. Oriel. 1989. Isolation of phenol-degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 500-502.
20. D.T. Gibson. 1971. Assay of enzymes of aromatic metabolism. *Methods in microbiology* **6A**: 462-478.
21. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
22. Laemmli, U.K. 1970. *Nature.* **277**: 680.
23. Davis, B.J. 1964. *Ann. NY Acad. Sci.* **121**: 404.
24. Chakrabarty, A.M. 1972. Genetic fusion of incompatible plasmids in *Pseudomonas. Proc. Natl. Acad. Sci.* **70**: 1641-1644.
25. 최순영, 김창숙, 이명혜, 황문옥, 민경희. 1991. OCT 플라스미드를 갖는 원유분해세균에 의한 Octane 분해능. 산업미생물학회지 **19**: 82-87.

(Received 8 March 1995)