

페놀분해 효모 *Candida tropicalis* PW-51의 분리 및 분해특성

김성빈 · 김치경¹ · 김희식 · 이창호 · 신기선 · 권기석 · 윤병대 · 오희목*
한국과학기술연구원 생명공학연구소, ¹충북대학교 미생물학과

Isolation and Characterization of a Phenol-Degrading *Candida tropicalis* PW-51. Seong-Bin Kim, Chi-Kyung Kim¹, Hee-Sik Kim, Chang-Ho Lee, Ki-Sun Shin, Gi-Seok Kwon, Byung-Dae Yoon and Hee-Mock Oh*. Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea ¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea - For the biological treatment of phenolic resin wastewater containing phenol and formaldehyde, a phenol-degrading yeast was isolated from the papermill sludge, and then identified as *Candida tropicalis* PW-51 according to morphological, physiological and biochemical properties. The strain was able to degrade high phenol concentrations up to 2,000 mg/l within 58 hours in batch cultures. Phenol-degrading efficiency by the strain was maximum at the culture conditions of a final concentration of 9×10^6 cells/ml, 30°C and pH 7.0. The mean degradation rate of phenol was highest at 45.5 mg/l/h in 1,000 mg/l phenol from 500 mg/l to 2,000 mg/l phenol. Because the enzyme activity of catechol 1,2-dioxygenase increased in the course of degradation of phenol, it seems that this strain degrades phenol via the *ortho*-cleavage of benzene ring. The isolate *C. tropicalis* PW-51 could be effectively used for the biological treatment of phenolic resin wastewater.

화학공업의 발달에 따라 각종 공정에서 방향족화합물의 사용량이 증가하고 있다. 이러한 방향족화합물은 벤젠고리를 갖는 구조적 특징으로 대부분이 생물체에 독성을 나타낼 뿐만 아니라, 자연계에서 분해가 어려워 주요 환경오염 물질로 대두되고 있다(1). 그중 페놀은 미국 환경보호청(E. P. A.)이 주요 오염물질로 지정한 화합물로서 석유정제, 석유화학, 석탄전환 공장 그리고 제약, 페놀계 수지, 전자산업 공장 등의 방류수로부터 다량 유출되며(2), 200 mg/l 이하의 농도에서도 미생물의 생장을 저해하여 폐수처리를 어렵게 한다.

페놀분해에 관련된 연구는 주로 세균을 이용한 것으로, Rehm(3)은 *Pseudomonas putida*를 활성탄에 고정화시켜 페놀 1,000 mg/l까지 분해하였으며, Pai 등(4)은 *Rhodococcus*를 활성탄과 calcium alginate에 고정화시켜 1,000 mg/l의 페놀까지 분해됨을 보였다. 이처럼 페놀분해는 세균 중에서 *Pseudomonas*속(5), *Alcaligenes*속(6), *Acinetobacter*속(7), *Bacillus*속(8)을 대상으로 많이 연구되었다. 그러나 효모나 곰팡이를 이용한 페놀 분해에 관한 연구는 그리 많지 않은 실정으로 Katayama 등(9)이 *Rhodotorula*를 이용해 200 mg/l의 페놀을 분해하였고, Anta와 Crawford(10)은 *Streptomyces setonii*가 1,000 mg/l의 고농도 페놀을 분해함을 보고한 바 있다. 페놀분해에 있어 세균은 catechol에서 catechol 1,2-dioxygenase을 이용한 *ortho*-pathway와 catechol 2,3-dioxygenase을 이용한 *meta*-pathway의 두 가지 경로에 의해 페놀을 분해한다고 보고되었으나(11), 효모의

경우는 catechol 1,2-dioxygenase에 의하여 *ortho*-pathway만을 갖는 것으로 알려져 있다(10). 한편, 국내에서 페놀분해에 관한 연구는 근래에 정 등(12)과 이 등(13)에 의한 보고가 있으나 페놀계 수지 산업폐수를 처리하기 위해서는 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구는 페놀과 포름알데히드를 포함하고 있는 페놀계 수지 산업폐수의 생물학적 처리에 이용할 목적으로 자연계로부터 페놀분해 효모를 분리하여, 포름알데히드의 존재하에서도 페놀 분해능이 우수한 균주를 최종 선발·동정하였으며, 선발된 균주의 생육특성과 catechol분해 효소의 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

페놀분해 균주의 분리 및 선발

각종 산업폐수 처리장 부근의 토양 및 sludge를 시료로 하여 미생물을 분리하였다. 시료 0.1 g을 생리식염수(NaCl 0.85%) 9.9 ml에 현탁시킨 후 페놀 1,000 mg/l가 첨가된 액체 최소배지 즉, 증류수 1 l에 NH₄NO₃ 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 1.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, NaCl 0.5 g, CaCl₂ 0.02 g, FeSO₄ 0.02 g, trace element solution(14)을 첨가한 배지에 접종하여 2회 계대 배양한 후 배양액을 PDA(potato 20%, dextrose 2%, agar 1.5%) 배지에 도말하여 나타나는 집락상을 분리하였다. 순수 분리된 균주는 100-ml flask에 유일한 탄소원 및 에너지원으로 1,000 mg/l의 페놀을 포함한 최소배지에 접종하여서 분해능이 있는 효모를 분리하였다. 페놀에 대해 분해능을 갖는 효모를 다시 1,000 mg/l 페놀에 포름알데히드 100 mg/l가 포함된

*Corresponding author.

Key words: Biodegradation, phenol, *Candida tropicalis* PW-51, *ortho*-cleavage

액체 최소배지에 접종하여 30°C에서 2일간 배양한 후 페놀 분해능과 균체생육이 우수한 균주를 최종 선발하였다.

분리균주의 동정

균주의 동정은 Kreger-Van Rij(15)와 Barnett 등(16)의 방법에 따라 형태학적 및 생리 생화학적 특징을 조사하여 수행하였다. 선발된 효모 균주의 형태학적 특징으로서 YPD(yeast extract 0.5%, peptone 1%, dextrose 2%) 고체배지에서 생육한 집락의 크기, 모양과 색깔 등을 관찰하였고, 광학현미경(Nikon FK-IIA)으로 균사체 및 자낭포자의 형성 유무, 단세포의 형태 등을 관찰하였으며, 정밀한 외형을 관찰하기 위하여 전자현미경(Philips SEM 515)을 이용하였다. 또한, 균주의 탄소원 이용능, 질소원 이용능, 비타민 요구성, 온도별 성장능, 전분 발효능, 요소 분해능, coenzyme Q type 등의 생리 생화학적 특징을 조사하였다.

배양 방법

페놀 500 mg/l가 포함된 YPD 배지 50 ml를 250-ml Erlenmeyer flask에 넣고 분리균주를 1 백금이 접종하여 30°C에서 24시간 전 배양하였다. 전 배양액을 14,480×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 얻은 다음, 식염수에 2회 세척한 후 9×10^6 cells/ml로 접종하였다. 본 배양은 1,000 mg/l의 페놀이 포함된 최소배지 50 ml를 250-ml Erlenmeyer flask에 넣은 후 균체를 접종하여, 30°C에서 진탕(150 rpm) 배양하면서, 배양 시간별로 균체생육, 페놀농도, pH 등을 측정하였다. 균체생육에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 초발 pH를 각각 4.2로부터 8.2까지 조절하였으며, 온도에 의한 영향은 초발 pH를 6.0으로 조절하고 각각 20, 25, 30, 35와 40°C에서 조사하였다. 페놀 분해조건을 플라스크 상에서 조사한 후 배양시간에 따른 대사활성의 변화를 알아보기 위하여 fermentor 배양을 실시하였는데, 배양조건은 운전용량 3l, 통기량 0.5 vvm, 교반속도 300 rpm과 pH 6.4~6.6으로 배양시간에 따른 균체량, 배지내 페놀농도, catechol dioxygenase의 활성 등을 측정하였다.

효소활성 측정

배양액을 14,480×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 균체를 0.05 M phosphate buffer(pH 6.8)로 2회 세척한 후 균체가 10배 농축되도록 0.05 M phosphate buffer에 현탁시켰다. 초음파분쇄기를 이용하여 현탁액중의 균체를 파쇄하였으며, 파쇄되지 않은 균체 및 debris는 10분간 원심분리(14,480×g)하여, 그 상등액을 조효소로 사용하였다. Catechol 1,2-dioxygenase(EC 1.13.1.1)의 활성은 Hegeman(17)의 방법에 따라 균체 추출물을 조효소로 이용하고 catechol을 기질로 하여 260 nm에서

흡광도를 측정하여 계산하였다. Catechol 2,3-dioxygenase(EC 1.13.1.2)의 활성은 Nozaki(18)의 방법에 따라 375 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 효소의 활성은 실온에서 반응액의 흡광도 증가를 측정하여 분당 catechol 1 μl을 촉매하는 양을 1 unit로 정하였다.

균체량 측정

균체량은 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하여 그 흡광도에 상당하는 건조균체중량(g/l)으로 표시한 표준곡선에 의해 결정하였다. 표준곡선은 균체농도가 높은 배양액을 증류수로 단계별로 희석한 후 희석된 배양액의 건조균체중량을 105°C에서 24시간 건조한 다음 측정하여 작성하였다.

페놀농도 측정

페놀농도 측정은 홍 등(19)의 colorimetric assay 방법에 따라 1 ml의 시료를 Effendorf tube에 옮기고 50 μl의 2 N NH₄OH와 25 μl의 2% 4-aminoantipyrine을 첨가하여 잘 섞은 후 8%의 K₃Fe(CN)₆ 25 μl를 넣고 원심분리하여 균체를 제거시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선에서 계산된 농정식에 의해 결정하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정

분리균주 PW-51의 집락은 유백색을 띠며, 광학현미경으로 관찰했을 때에는 주로 구형을 이루고 있었으나, YPD 배지의 슬라이드 배양에서는 균사체를 형성하였다. 구형의 세포로부터 çıkar되는 모양은 Fig. 1의 전자현미경 사진과 같이 다극출아(multibudding) 형태이었고, 크기는 2.3~2.4 μm×2.7~2.9 μm이었다. 그리고 다양한 탄소원에 대하여 성장능을 조사해본 결과 Table

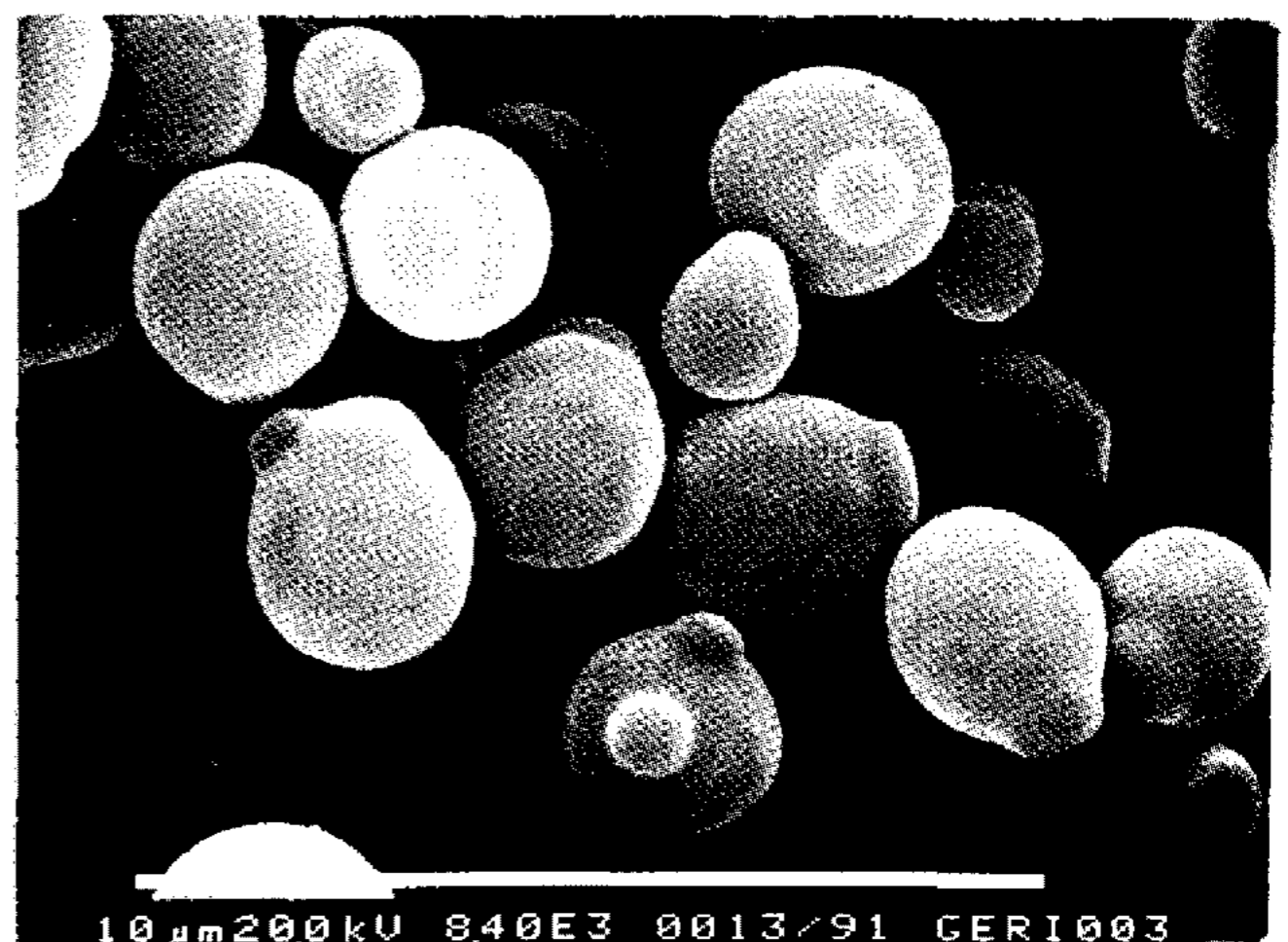


Fig. 1. Scanning electron microscopic photograph (×8,400) of the isolate PW-51 cultured on YPD medium.

Table 1. Assimilation of carbon sources by *C. tropicalis* PW-51

Carbon source	Growth	Carbon source	Growth
D-galactose	+	Maltotriose	+
L-sorbose	-	Palatinose	+
N-acetyl-D-glucosamine	+	2-keto-D-gluconic acid	+
D-ribose	-	D-sorbitol	+
D-xylose	+	Eruthritol	-
L-arabinose	-	Ribitol	+
L-rhamnose	-	Xylitol	-
Sucrose	+	L-arabinitol	-
D-maltose	+	D-glucitol	-
D-trehalose	+	D-mannitol	+
α-methyl-D-glucoside	+	Galactitol	-
Cellobiose	-	Myo-inositol	-
Salicin	-	D-glucono-1,5-lactone	-
Arbutin	-	D-gluconate	-
Melibiose	-	D-glucuronate	-
Lactose	-	DL-lactose	-
Raffinose	-	Acetic acid	-
Melezitose	-	Formic acid	-
Inulin	-	L-glutamic acid	+
Starch	-	α-keto-glutaric acid	-
Glycerol	+	L-malic acid	+
Dextrin	-	Propionic acid	-
Adonitol	+	Succinate	+
D-arabitol	+	Citrate	+
Gentobiose	-	Methanol	-
Maltitol	+	Ethanol	+
L-proline	+		

1에서 보는 바와 같이 D-galactose, D-xylose, D-maltose, D-trehalose, D-mannitol 등을 탄소원으로 이용하였다. PW-51 균주는 nitrate, nitrite, L-lysine, creatinine 그리고 creatine을 첨가한 Bacto yeast carbon base에서 모두 성장하였으며, 특별한 비타민 요구성은 없었다. 기타 생화학적 특성으로 Table 2에 요약된 바와 같이 PW-51 균주는 37°C까지 생육할 수 있었고 42°C에서는 생육하지 못하였으며, 0.01%~0.1% cyclohexamide 존재하에서 성장하였다. 전분 형성능은 없었으며, glucose로부터 acetic acid를 형성하였고, 요소 분해능은 없었다. 이러한 결과로부터 본 균주를 *Candida tropicalis*로 동정하였고, 최종적으로 *C. tropicalis* PW-51로 명명하였다.

***C. tropicalis* PW-51의 페놀분해**

접종량의 영향 페놀을 500, 750, 1,000, 1,250 그리고 1,500 mg/l로 첨가한 최소배지에 1.6×10^7 , 6.1×10^7 , 4.5×10^8 cells/ml의 균체를 각각 2%로 접종한 후 3일간 배양하였을 때의 페놀분해 결과는 Fig. 2와 같다. Fig.

Table 2. Additional physiological tests for the identification of *C. tropicalis* PW-51

Test	Growth of <i>C. tropicalis</i> PW-51
Growth at 25°C	+
30°C	+
35°C	+
37°C	+
42°C	-
Growth with 0.01% (w/v) cyclohexamide	+
0.1% (w/v) cyclohexamide	+
50% (w/v) D-glucose	+
60% (w/v) D-glucose	-
Starch formation	-
Acetic acid production	+
Urea hydrolysis	-
Diazonium blue B reaction	-
Filament	+

2(a)는 1.6×10^7 cells/ml의 균체를 2% 접종한 것으로 750 mg/l의 페놀은 배양 60시간에 모두 분해되었다. Fig. 2(b)에서와 같이 6.1×10^7 cells/ml를 2% 접종하였을 때 페놀 1,250 mg/l까지 분해되었으며, 약 70시간이 소요되었다. Fig. 2(c)는 4.5×10^8 cells/ml을 2%로 접종한 경우로서 Fig. 2(b)에서와 같이 1,250 mg/l의 페놀농도까지 분해가 가능하였고, 완전분해에 소요된 시간은 46시간으로 단축되었다. 즉, 접종량의 증가에 따라 동일한 농도의 페놀을 분해하는데 소요되는 시간은 단축됨을 알 수 있다. 페놀계 화합물의 생분해에 미치는 접종량의 영향으로 Balfanz와 Rehm(6)은 1.5×10^7 cells/ml의 접종으로 4-chlorophenol 60 mg/l가 분해되지 않았으나, 균체량을 10배 증가시킨 1.5×10^8 cells/ml의 접종으로 70 mg/l의 4-chlorophenol이 분해됨을 보였다. 따라서, 고농도의 페놀을 빠른 시간에 처리하기 위하여 본 실험에서는 균체 4.5×10^8 cells/ml을 2% 접종하여 최종 접종량이 9.0×10^6 cells/ml이 되게 하였다.

온도의 영향 *C. tropicalis* PW-51 균주의 배양온도가 페놀분해에 미치는 영향을 알아보기 위해 페놀이 1,000 mg/l로 포함된 최소배지에 균체를 접종하여 페놀 분해효율과 균체농도를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 본 균주는 배양 24시간에 35°C에서 생육이 빠르나 배양 48시간에는 30°C에서 페놀 분해효율과 균체농도가 가장 높았다. 그리고 25°C 이하나 40°C 이상에서는 균체생육이 극히 낮았다. 따라서 *C. tropicalis* PW-51의 균체생육 및 페놀분해의 최적온도는 30°C로 판단되었다. 이러한 결과는 Stephenson(2)이 밝힌 *C. tropicalis*의

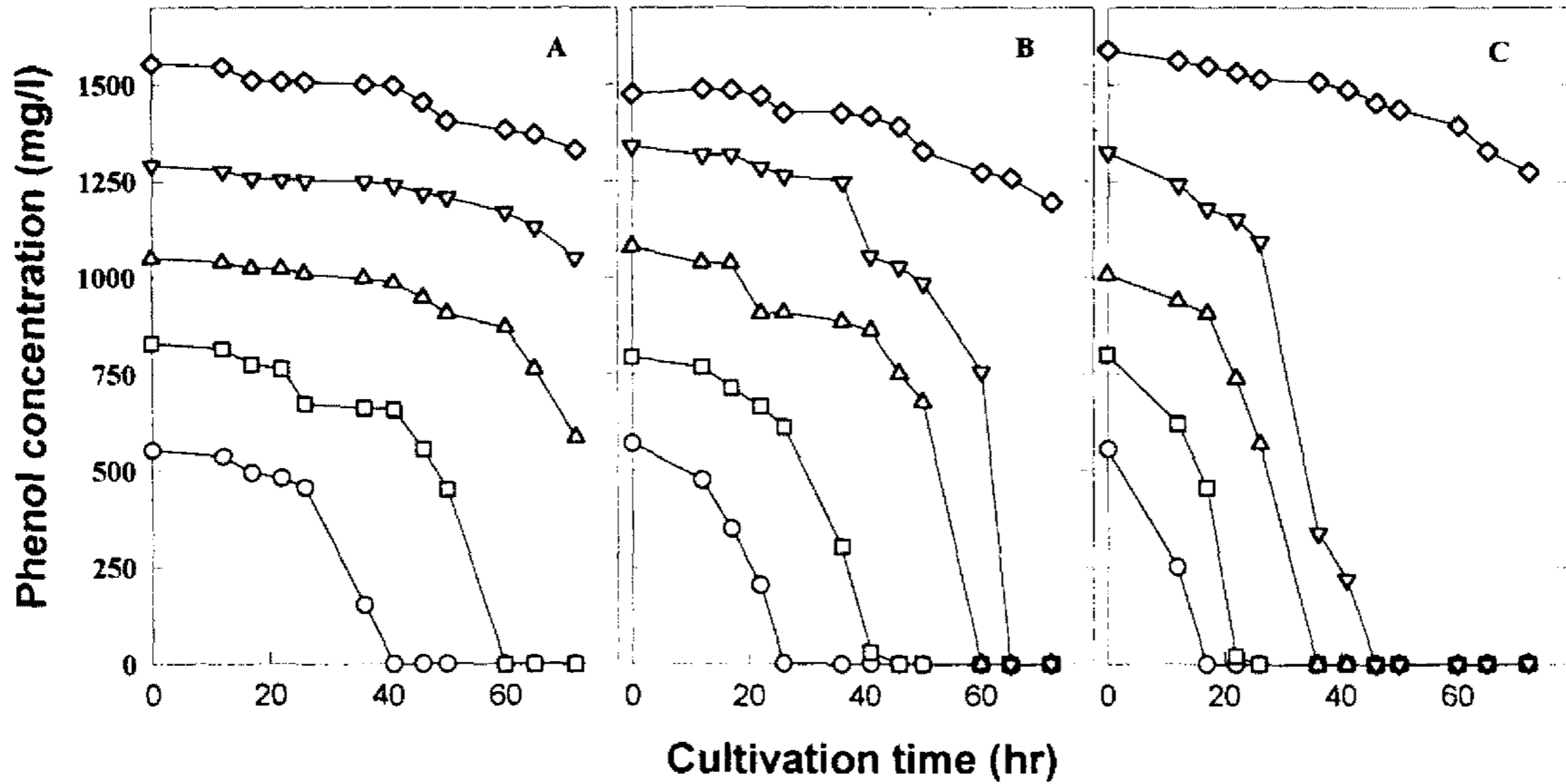


Fig. 2. The effect of inoculum size on phenol degradation by *C. tropicalis* PW-51. The cell suspensions of A (1.6×10^7 cells/ml), B (6.1×10^7 cells/ml) and C (4.5×10^8 cells/ml) were inoculated to be a concentration of 2.0% (v/v). Symbols are: ○, 500; □, 750; △, 1,000; ▽, 1,250; ◇, 1,500 mg/l phenol.

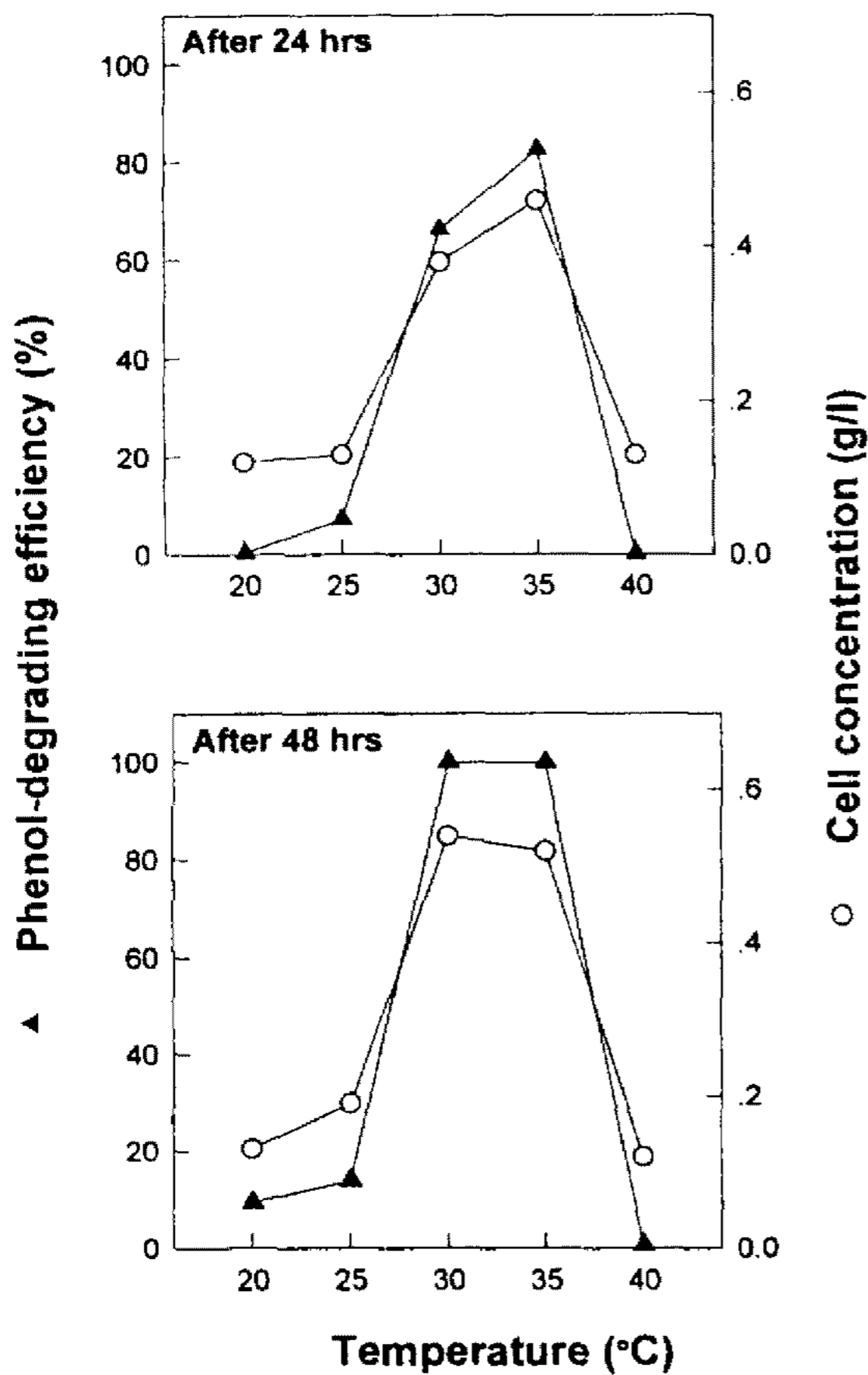


Fig. 3. The effect of temperature on growth and phenol degradation by *C. tropicalis* PW-51. Cultivation was carried out for 48 hr at pH 6.0 in mineral salts medium containing 1,000 mg/l phenol.

phenol oxidation시 최적온도가 32°C이며, 김과 서(20)가 보고한 페놀분해 효모의 생육 최적온도는 30°C라는 사실과 유사하였다.

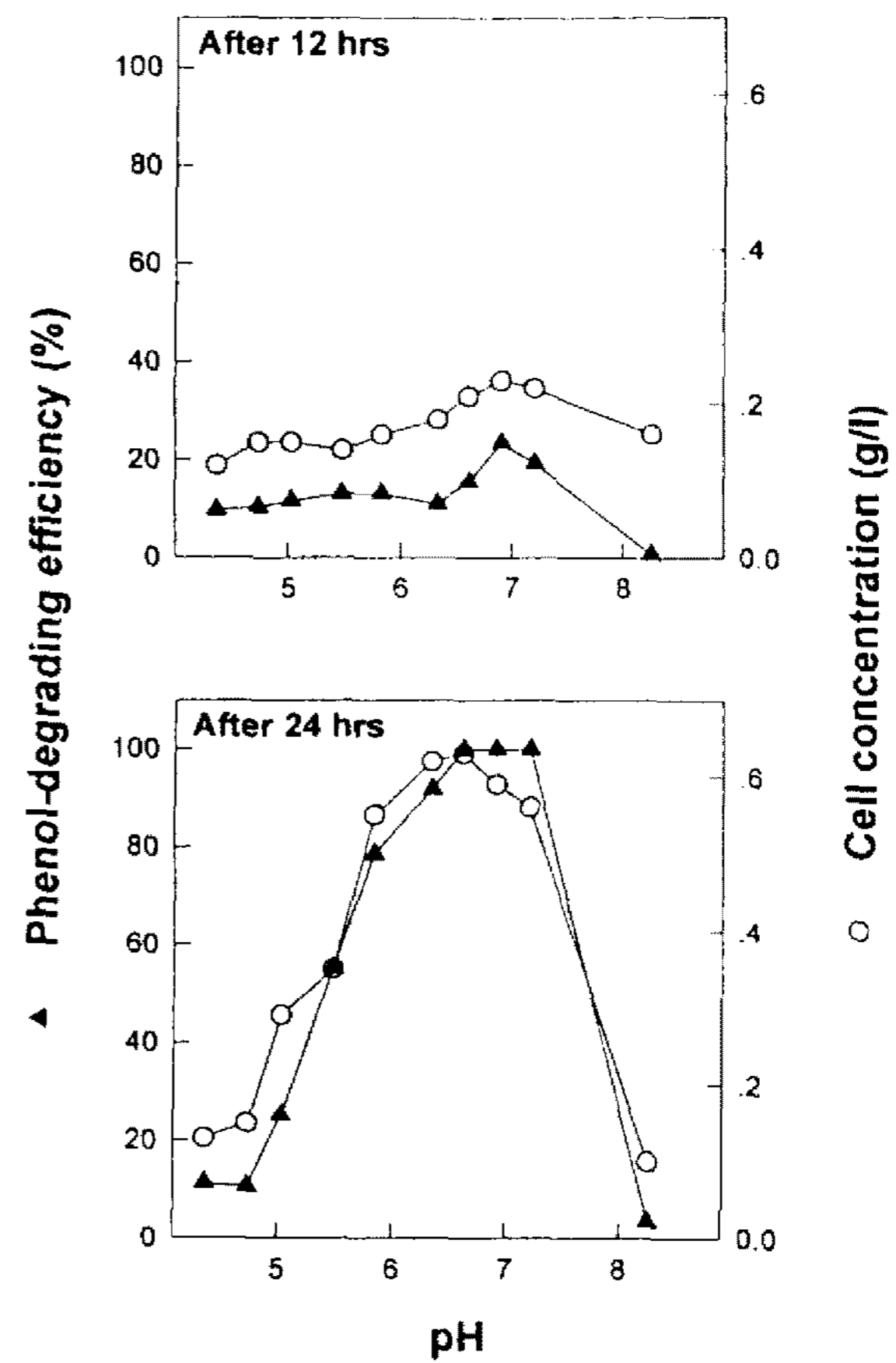


Fig. 4. The effect of initial pH on growth and phenol degradation by *C. tropicalis* PW-51. Cultivation was carried out for 24 hr at 30°C in mineral salts medium containing 1,000 mg/l phenol.

초기 pH의 영향 페놀분해시 균체생육을 위한 초기 최적 pH를 조사하기 위하여 pH 4.2~8.2의 범위에서 페놀 분해효율과 균체 농도를 조사하였다(Fig. 4). C.

Table 3. Phenol-degrading activity in batch culture of *C. tropicalis* PW-51

Initial concentration of phenol (mg/l)	Time for complete degradation (hrs)	Mean degradation rate (mg/l/h)
500	12	41.7
1,000	22	45.5
1,200	31	38.7
1,400	38	36.8
1,700	43	39.5
2,000	58	34.5

tropicalis PW-51 균주는 배양 24시간에 초기 pH 6.6에서 균체의 생육이 최대에 달하였다. 페놀 분해효율은 초기 pH 6.6~7.2의 범위에서 최대를 보였다. 이와 같은 결과는 Krug와 Straube(21)가 보고한 *C. tropicalis* HP15의 최적 pH가 7.5인 것과 유사하였으나, 김 등(22)이 보고한 *C. tropicalis*에 의한 페놀분해에 있어서 최적 pH가 5인 것과는 다른 것이다.

페놀농도의 영향 일반적으로 페놀은 미생물의 세포막에 손상을 주어 생육을 저해하는 독성물질로서 고농도의 페놀 존재하에서 미생물은 생육할 수 없다. *C. tropicalis* PW-51 균주의 페놀농도에 따른 분해능을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 배양온도 30°C와 pH 7.0에서 2일간 배양하였을 때 페놀 500 mg/l은 12시간내에 완전히 분해되었으며, 페놀이 1,000 mg/l과 2,000 mg/l의 고농도로 함유되어 있는 경우에도 각기 22시간, 58시간내에 완전히 분해되었으나, 2,000 mg/l보다 높은 농도의 페놀은 분해되지 않았다. 500~2,000 mg/l의 페놀농도에서 조사된 *C. tropicalis* PW-51 균주의 페놀에 대한 평균 분해율은 1,000 mg/l의 페놀농도에서 45.5 mg/l/h로 가장 높았으며, 페놀농도가 높을수록 lag time이 길어지면서 페놀의 독성이 증가하여 페놀 분해율이 낮아지는 경향을 보였다. 지금까지의 연구에서 밝혀진 *Rhodotorula*속(9), *Fusarium*속(23), *Candida*속(2)의 균주에 의해 각각 200, 1,000과 1,500 mg/l의 페놀을 분해하는 것과 비교해 볼 때 본 실험에서 사용한 *C. tropicalis* PW-51 균주의 페놀 분해한계는 2,000 mg/l로 매우 높은 것으로 판단되었다. 또한, Zache와 Rehm(24)이 세균과 효모의 혼합 배양으로 페놀 1,150 mg/l의 농도를 60여 시간만에 분해한 것을 고려할 때 *C. tropicalis* PW-51 균주는 페놀 1,000 mg/l을 22시간에 완전히 분해함으로써 빠른 분해속도를 보였다.

배양시간에 따른 페놀분해와 catechol dioxygenase 활성의 변화

플라스크 수준에서 최적화된 배양조건을 바탕으로 fermentor 배양을 실시하여 *C. tropicalis* PW-51 균주의 배양시간에 따른 대사활성의 변화를 조사하였다. Fig. 5

Table 4. Specific enzyme activities of catechol dioxygenase in the culture broth of *C. tropicalis* PW51

Catechol dioxygenase	Specific enzyme activity (unit/g cell)
Catechol 1,2-dioxygenase	252.5
Catechol 2,3-dioxygenase	0

Enzyme activity was measured with the cell-free extracts obtained from the cell disruption by ultrasonication.

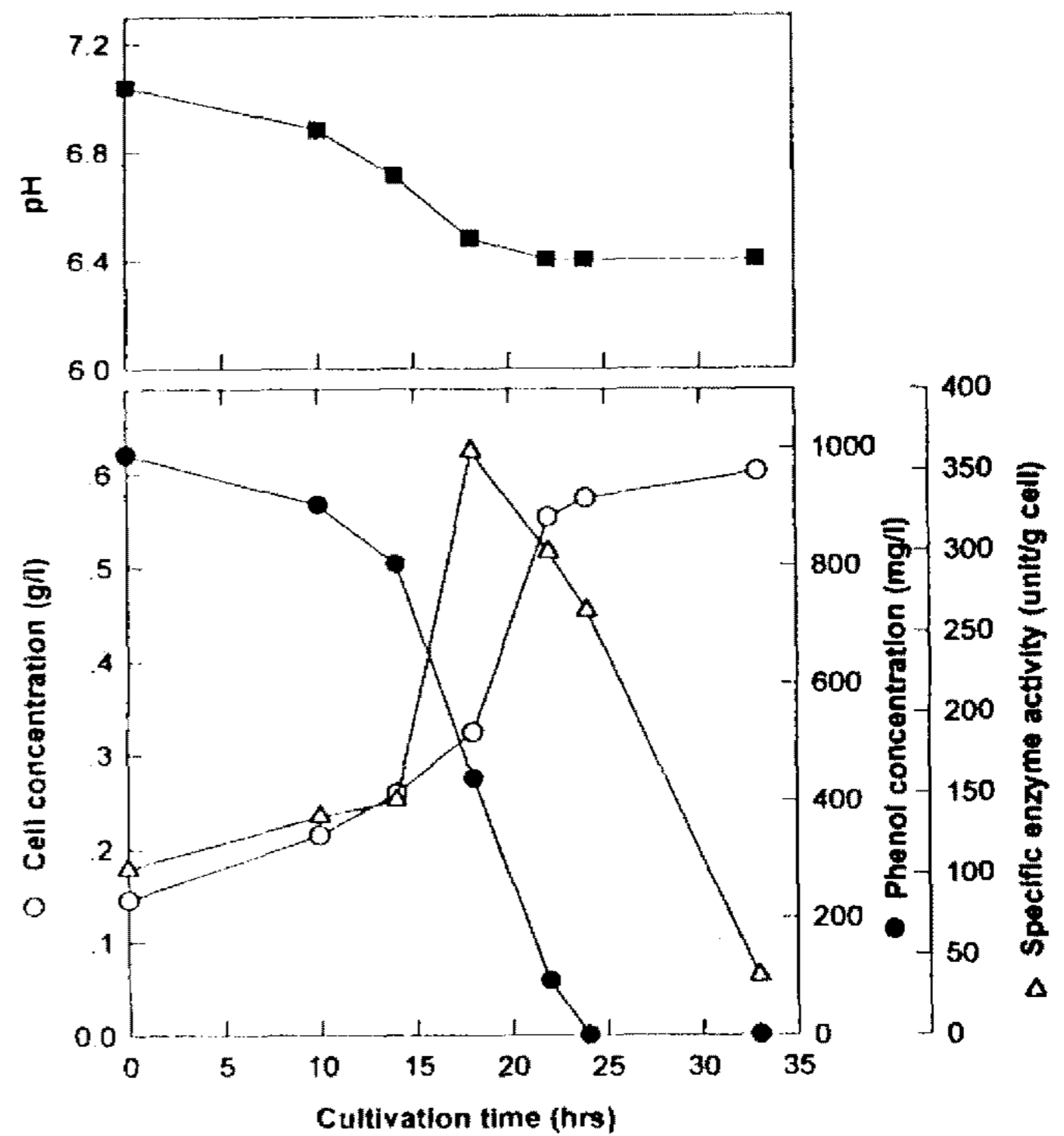


Fig. 5. Time course of phenol degradation by *C. tropicalis* PW-51.

Degradation experiments were carried out in a 3-l jar fermentor at 30°C, 300 rpm, 0.5 vvm and pH 6.4~6.6.

에서 보는 바와 같이 균체량 증가에 따라 배지내 페놀농도는 감소하였으며, 배양 24시간만에 1,000 mg/l의 페놀이 모두 분해되었다. 이때 *C. tropicalis* PW-51의 비증식속도(μ)는 0.11/시간이었으며 doubling time(dt)은 6.13시간이었다. 이는 김 등(22)이 보고한 페놀 1,000 mg/l을 분해할 때 최대 비증식속도인 0.17/시간보다는 낮은 값이다.

C. tropicalis PW-51 균주의 페놀분해 경로를 알아보기 위하여 catechol 1,2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase의 활성을 조사한 결과 Table 4와 같다. Catechol 2,3-dioxygenase의 활성은 전혀 없었고, catechol 1,2-dioxygenase의 활성이 252.5 unit/g cell로 나타났다. 단위 중량의 균체에 대한 catechol 1,2-dioxygenase의 비활성(specific activity)은 균체의 증식과 유사하게 대수기에 가장 높았으며(Fig. 5), 배지내 페놀농도가 크게 낮아짐에 따라 효소활성이 감소하였다. 이러한

결과로부터 catechol 1,2-dioxygenase는 페놀에 의해 유도되는 유도효소로 생각된다. 또한, *C. tropicalis* PW-51 균주는 catechol 1,2-dioxygenase의 작용으로 *ortho*-pathway를 통하여 catechol을 분해하는 것으로 판단되며, 이는 Mörsen과 Rehm(25)이 보고한 효모의 catechol 분해경로와 일치하는 것이다.

요 약

본 연구는 페놀과 포름알데히드를 포함하는 페놀계 수지 산업폐수의 생물학적 처리에 이용할 목적으로 포름알데히드의 존재하에서 페놀분해능이 우수한 효모를 sludge로부터 분리하여, 형태적 및 생리 생화학적 특징을 조사하여 *Candida tropicalis* PW-51로 동정하였다. 회분식 배양에서 *C. tropicalis* PW-51의 페놀 분해한계는 2,000 mg/l이며, 58시간내에 완전히 분해하였다. *C. tropicalis* PW-51은 초기접종량이 9×10^6 cells/ml, 배양온도는 30°C, pH는 7.0에서 페놀 분해효율이 높았으며, 500~2,000 mg/l의 페놀농도에서 조사된 페놀에 대한 평균 분해율은 페놀 1,000 mg/l에서 45.5 mg/l/h로 가장 높았다. *C. tropicalis* PW-51의 페놀분해시 catechol 1,2-dioxygenase의 활성이 크게증가하므로 *ortho*-pathway에 의해 페놀을 분해하는 것으로 판단되었다. 따라서, *C. tropicalis* PW-51는 페놀계 수지 산업폐수의 생물학적 처리에 효과적으로 이용될 수 있는 균주로 사료된다.

참고문헌

- Rand, G.M. and S.R. Petrocelli. 1985. Fundamentals of aquatic toxicology. Hemisphere Publishing Corporation, Washington.
- Stephenson, T. 1990. Substrate inhibition of phenol oxidation by a strain of *Candida tropicalis*. *Biotechnology Letters* **12**: 843-846.
- Rehm, H.J. 1984. Degradation of phenol by immobilized microorganisms. *Eur. Congr. Biotechnol.* **3**: 27-33.
- Pai, S.L., Y.L. Hsu, N.M. Chong, C.S. Sheu and C.H. Chen. 1995. Continuous degradation of phenol by *Rhodococcus* sp. immobilized on granular activated carbon and in calcium alginate. *Bioresource Technol.* **51**: 37-42.
- Mörsen, A. and H.J. Rehm. 1990. Degradation of phenol by mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 206-212.
- Balfanz, J. and H.J. Rehm. 1991. Biodegradation of 4-chlorophenol by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. A 7-2 in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 662-668.
- Johnson, B.F. and R.Y. Stanier. 1971. Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **107**: 468-475.
- Buswell, J.A. 1975. Metabolism of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **124**: 1077-1083.
- Katayama, H.K., S. Tobita and K. Hirayama. 1992. Aromatic degradation in yeast *Rhodotorula rubra*. *Water Sci. Technol.* **26**: 773-781.
- Anta, S.P. and D.L. Crawford. 1983. Degradation of phenol by *Streptomyces setonii*. *Can. J. Microbiol.* **29**: 142-143.
- Shingler, V., J. Powlowski and U. Marklund. 1992. Nucleotide sequence and functional analysis of the complete phenol 3,4-dimethylphenol catabolic pathway of *Pseudomonas* sp. strain CF600. *J. Bacteriol.* **174**: 711-724.
- 정윤창, 김경남, 최용진, 양한철, 송준상, 서윤수. 1989. *Pseudomonas*속 세균에 의한 방향족 화합물 생분해. *산업미생물학회지* **17**: 100-108.
- 이창호, 오회목, 권태종, 권기석, 이성기, 서현효, 윤병대. 1994. Phenol을 분해하는 *Acinetobacter* sp. GEM2의 분리 및 특성. *산업미생물학회지* **22**: 692-699.
- Pfennig, N. and K.D. Lippert. 1966. ber das vitamin B12-Bed rfnis phototropher schwefelbakterien. *Arch. Microbiol.* **55**: 245-256.
- Kreger-Van Rij, N.J.W. 1984. The yeasts (a taxonomic study). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Barnett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. 1983. Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge University Press, London.
- Hegeman, G.D. 1966. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. I. Syntheses of the enzymes by the wild type. *J. Bacteriol.* **91**: 1140-1154.
- Nozaki, M. 1970. Metapyrocatechase(*Pseudomonas*). Methods in Enzymology 17A. Academic Press, New York.
- 홍성용, 이숙희, 이정해, 하지홍. 1995. *Acinetobacter* sp. T5-7에 의한 phenol과 trichloroethylene 분해특성. *산업미생물학회지* **23**: 255-262.
- 김상달, 서정원. 1978. 효모에 의한 페놀성 물질의 자화에 관한 연구. *산업미생물학회지* **6**: 155-159.
- Krug, M. and G. Straube. 1986. Degradation of phenolic compounds by the yeast *Candida tropicalis* HP15. *J. Basic. Microbiol.* **26**: 271-281.
- 김우식, 염경호, 김응식. 1985. 유동층 반응기에서 *Candida tropicalis*균에 의한 페놀함유 폐수 처리에 관한 연구. *산업미생물학회지* **13**: 33-39.
- Anselmo, A.M. and J.M. Novais. 1992. Degradation of phenol by immobilized mycelium of *Fusarium flocciferum* in continuous culture. *Water Sci. Technol.* **259**: 161-168.
- Zache, G. and H.J. Rehm. 1989. Degradation of phenol by a coimmobilized entrapped mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 426-432.
- Mörsen, 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.

(Received 26 June 1996)