

페놀 분해 *Rhodococcus* sp. DGUM 2011의 분리 및 특성

오정석¹ · 한영환*

¹동국대학교 대학원 응용생물학과, 자연과학대학 생물학과

Isolation and Characterization of Phenol-degrading *Rhodococcus* sp. DGUM 2011. Jung-Suk Oh¹ and Yeong-Hwan Han*. ¹Department of Applied Biology, Graduate School, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea, Department of Biology, College of Natural Science, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea - A bacterium DGUM 2011 has been selected from various samples of industrial wastewater and soil. Based on the morphological and physiological characteristics, the isolate DGUM 2011 was identified as *Rhodococcus* sp. and named as *Rhodococcus* sp. DGUM 2011. The optimal temperature and pH for the cell growth of *Rhodococcus* sp. DGUM 2011 were 37°C and 7.6, respectively. When phenol was added to the minimal media as a sole source of carbon and energy, the concentrations of maximum and optimum for cell growth was 0.10% and 0.08%, respectively. When 0.05% phenol was given in the minimal media, *Rhodococcus* sp. DGUM 2011 completely utilize it within 24 hrs. The isolate could utilize benzoic acid, p-hydroxybenzoate, p-cresol, tyrosine and phloroglucinol. The isolate possessed both catechol 1,2-dioxygenase and 2,3-dioxygenase activity. However, the activity of catechol 1,2-dioxygenase was much higher than that of 2,3-dioxygenase, which suggests that the isolate might degrade phenol via both ortho- and meta-cleavage, mainly via ortho-cleavage.

페놀은 방향족 화합물로 석유정제, 페놀계수지, 제약, 전자산업, 사진현상제 등의 광범위한 산업분야에서 사용되어왔으나, 미국 환경보호청(EPA)이 지정한 주요 오염 물질이다(10). 페놀의 처리는 화학적 산화, 용매추출, 활성탄에 의한 흡착 등의 화학적 방법이 이용되어 왔으나(16), 근래에는 미생물을 이용한 생물학적 처리가 빈번히 시도되고 있다. 그러나, 처리농도의 한계(15)에 따르는 문제점을 극복하고자 고농도의 페놀 처리를 위한 미생물의 분리 및 균주의 향상과 이를 이용한 처리방법 등에 관한 연구가 중점적으로 이루어져 왔다.

페놀의 생물학적 처리에 사용되어온 미생물은 주로 *Pseudomonas* 속(5, 8, 16, 17, 21), *Acinetobacter* 속(14), *Alcaligenes* 속(2, 9), 및 *Bacillus* 속(4)을 대상으로 많이 연구되어왔다. 대부분의 연구가 주로 *Pseudomonas* 등의 Gram-음성 세균에 대해 연구되어 왔으며, Gram-양성 *Rhodococcus*속의 세균에 대하여는 몇몇 국외 연구(1, 19)를 제외하고 국내에서의 연구는 거의 없는 실정이다. 본 연구는 폐수의 생물학적 처리를 위한 페놀 분해 균주를 토양 및 산업폐수에서 분리하여 분해능이 우수한 *Rhodococcus* 균주를 분리하였다. 분리균의 형태 및 생리화학적 특성과 각종 방향족 화합물의 이용성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

사용 배지 및 시약

균주의 분리를 위해 사용한 배지는 최소배지(0.3% NH₄Cl, 0.3% KNO₃, 0.1% K₂HPO₄, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.001% FeSO₄ · 7H₂O, 0.05% NaCl, pH 7.2±0.2)를 사용하였으며, 보존을 위하여 Luria-Bertani 배지(Yeast extract 0.5%, Tryptone 1.0%, NaCl 1.0%)를 사용하였다. 페놀은 최소배지 멸균 후 첨가하였다. 실험에 사용된 배지 및 시약은 특급 및 일급을 사용하였다.

페놀 분해균의 분리 및 동정

경상북도 경주시의 토양 및 유기폐수 시료를 채취하여 생리식염수(0.85% NaCl)로 현탁한 후 여과(Whatman No. 2)하였다. 여액을 0.05% 페놀을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 하는 최소한천배지에 도말하였다. 30°C에서 72시간 동안 배양 후 나타난 20여종의 Colony 중 페놀 자화성이 우수한 DGUM 2011 균주를 선별하였다. 분리세균의 형태 및 생리화학적 특성에 따라 Bergey's manual of systematic bacteriology(7)를 기준으로 동정하였다.

분리균주의 형태 및 생리학적 특징

분리세균의 형태적 특징은 전자현미경(Hitach H-7100)을 이용하여 관찰하였으며, 일반적 생리화학적 특성은 Methods for general and molecular bacteriology(6)의

*Corresponding author

Tel. 82-561-770-2213, Fax. 82-561-770-2515

E-mail: yhhan@mail.dongguk.ac.kr

Key words: Phenol, Degradation, *Rhodococcus* sp.

방법에 따라 실험하였다. 분리균 세포막의 지질 및 quinone의 조성은 생명공학연구소에 의뢰하여 분석하였다. 분리균의 생육에 미치는 산소의 영향은 gas exchange system이 부착된 Oxoid anaerobic jar를 이용하여 실시하였고 혐기적조건의 판정은 Resazurine 지시지를 이용하였다.

배양조건 및 생육측정

분리균의 배양은 250 ml 플라스크(최소배지; 50 ml)를 사용하여 37°C에서 24시간 진탕배양(120 strokes/min)하였으며, 생육은 흡광도계(UV-160A spectrophotometer, Shimadzu)를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

폐놀 농도의 측정

폐놀 농도는 Kim 등(11)의 방법을 사용하였다. 배양액을 5,000×g에서 5분 동안 원심분리(Vision Co., VS 15000-CF)하여 상등액을 240-300 nm의 파장에서 Scanning한 후 Standard curve와 비교하여 측정하였다.

Catechol 1,2 및 2,3-dioxygenase의 활성도 측정

최소배지에서 배양(37°C, 48시간)된 분리균을 5,000×g에서 5분간 원심분리(Vision Co., VS 15000-CF)하였다. Pellet을 50 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 현탁한 후, French press(Cover Laboratory Press, Model C)로 파쇄(15,000 psi×3회)하여 효소활성 측정용 조효소액으로 사용하였다. Catechol 1,2-dioxygenase의 활성도는 Kim 등(12)의 방법을 사용하여 실시하였다. 생성된 *cis, cis*-muconic acid는 260 nm에서 흡광도 증가량으로 결정하였으며, 흡광상수는 16,800 M⁻¹cm⁻¹을 이용하였다. 1 Unit는 1분간 1 μmol의 *cis, cis*-muconic acid를 생성하는 효소량으로 정의하였다. Catechol 2,3-dioxygenase 활성도는 Nozaki(18)의 방법을 사용하였다. 375 nm에서 α-hydroxymuconic ε-semialdehyde의 생성되는 흡광도의 증가량으로 측정하였으며, 흡광상수는 44,000 M⁻¹cm⁻¹를 사용하였다. 1 Unit는 1분간 1 μmol의 α-hydroxymuconic ε-semialdehyde acid를 생성하는 효소량으로 정의하였다.

단백질 농도의 측정

단백질 농도의 정량은 Bradford(3)의 방법을 이용하였으며, Bovine serum albumin(BSA)을 표준물질로 사용하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 특성 및 동정

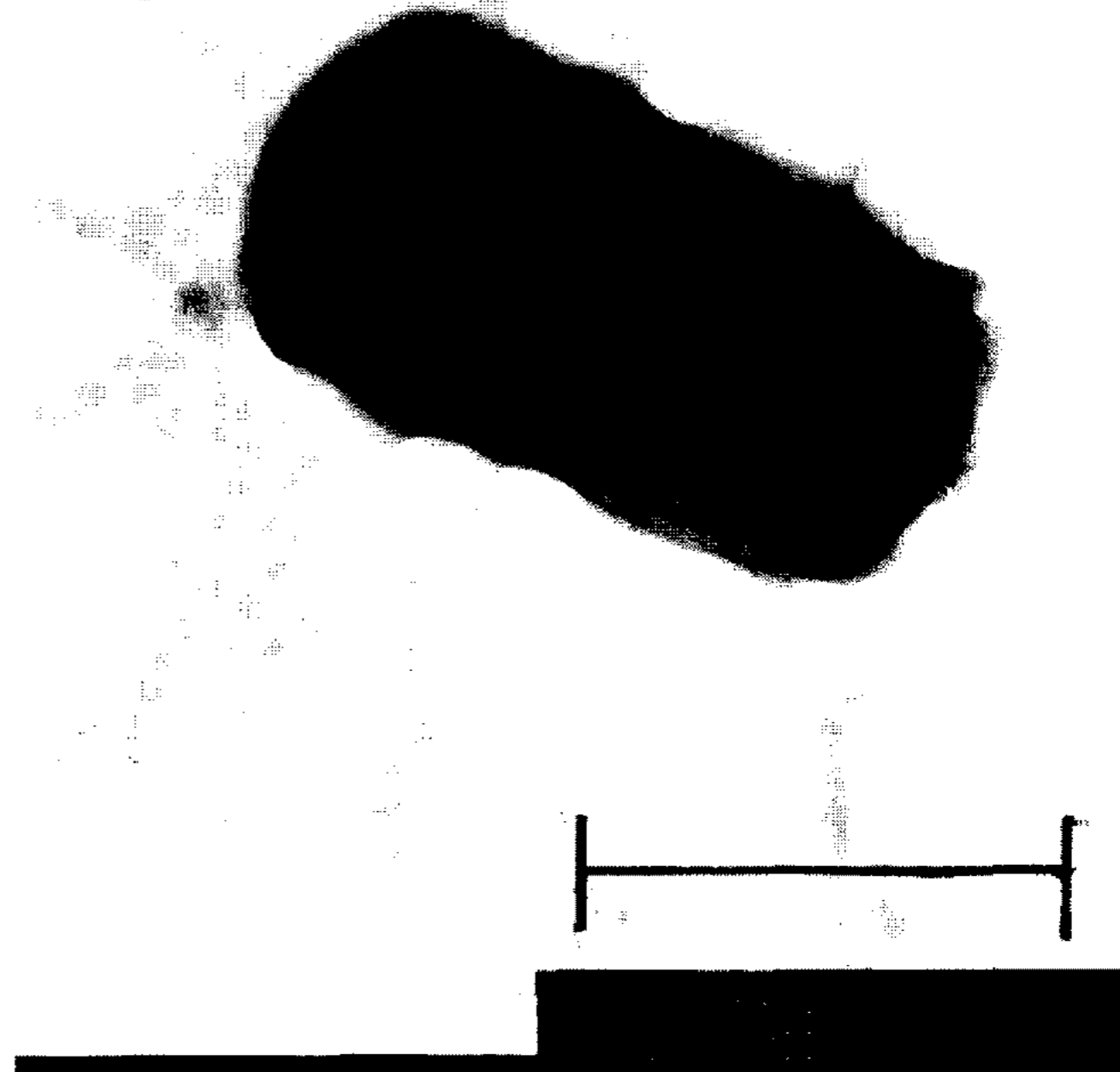


Fig. 1. Electron microscopic morphology of the isolate *Rhodococcus* sp. DGUM 2011.

The horizontal bar represent 1 μm.

폐놀을 유일 탄소원 및 에너지원으로 첨가한 최소한천 배지상의 20여종 집락 중 생육이 가장 우수한 DGUM 2011을 선별하였다. 분리 세균은 Gram-양성의 간균으로 운동성이 없었으며, 내생포자를 형성하지 않았다(Fig. 1). 호기성 세균으로 catalase-양성, oxidase-음성(TMPD oxidase)이었다. Coenzyme Q는 ubiquinone MK-8(H₂)이었으며, 분리균주의 지방산 조성비율은 16:0, 18:1 w9c, 16:1 w7c/15 iso 2OH 및 tuberculostearic acid (TBSA 10Me18:0)로 *Rhodococcus*속과 유사한 조성을 갖고 있었다(Table 1). 형태 및 생리화학적 특성에 따라 분리균 DGUM 2011은 *Rhodococcus* sp.로 동정하고 *Rhodococcus* sp. DGUM 2011로 명명하였다. 일반적으로 호기성 세균은 TMPD oxidase-양성(cytochrome c oxidase)으로 잘 알려져 왔으나(13), 분리균은 호기성 세균으로 TMPD oxidase-음성의 특징을 가지고 있어 이 세균의 전자전달계 구성요소에 관한 생리학적 연구는 추후 계속할 예정이다.

생육에 미치는 pH 및 온도

최소배지에 탄소원 및 에너지원으로 0.05%의 폐놀을 첨가하여 배양 pH와 온도에 따르는 생육을 본 결과, 분리균 *Rhodococcus* sp. DGUM 2011은 pH 7-8 사이에서 우수한 생육을 보여 주었으나, pH 5.0 및 10.0에서는 자라지 않았고 최적 pH는 7.6이었다(Fig. 2). 30-40°C의

Table 1. Morphological and physiological characteristics of *Rhodococcus* sp. DGUM 2011

Characteristics	<i>Rhodococcus</i> sp. DGUM 2011
Shape	Rod (Pleomorphic)
Size	Rod : 0.5-1.0 × 1.5-3.5 μm, Coccus : 0.5-1 μm in dia.
Spore	None
Colony shape and color	Round, smooth and convex; Pinkish orange
Gram reaction	Positive
Oxygen response for growth	Aerobic
Catalase activity	Positive
Oxidase activity	Negative
Indole production	-
Methyl red	-
Voges-Proskauer	-
Citrate utilization	-
Nitrate reduction	+
H ₂ S production	-
Urease activity	-
Growth on sole carbon source	-
Maltose	+
Mannitol	-
Rhamnose	+
Sorbitol	+
Sodium citrate	+
Sodium lactate	-
Sodium fumarate	+
Sodium pyruvate	+
Sodium succinate	MK-8(H ₂)
Quinone system	16:0, 18:1 w9c, 16:1 w7c/15
Fatty acid	iso 2OH and tuberculostearic acid (TBSA 10Me18:0)

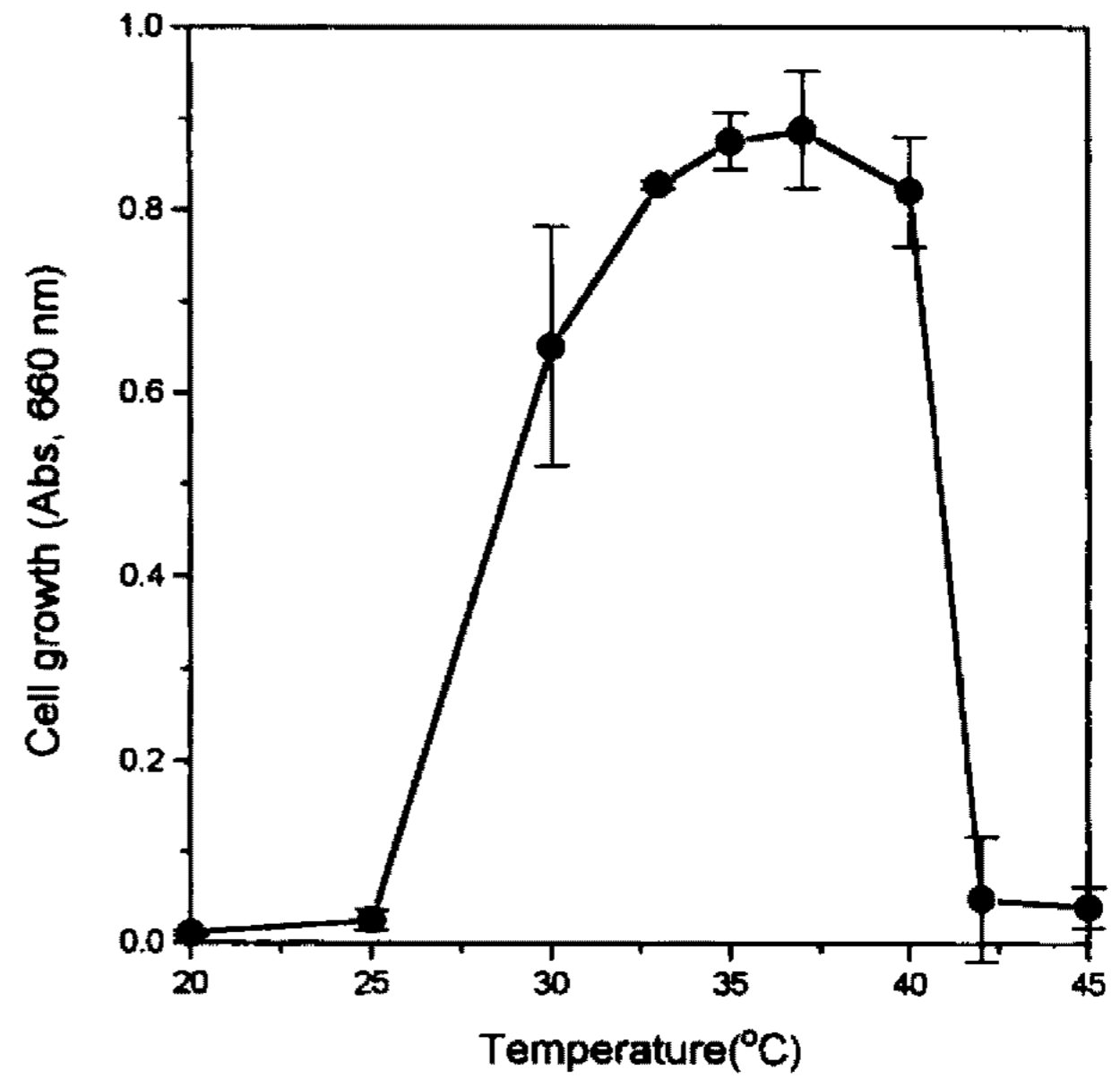


Fig. 3. Optimal temperature for the cell growth *Rhodococcus* sp. DGUM 2011.

Cells were grown at 37°C for 24 hr with shaking (120 rpm) in the minimal media (pH 7.2) supplemented with 0.05% phenol as a sole source of carbon and energy. The vertical bars represent standard deviations.

온도범위에서 우수한 생육을 보여 주었으나, 25°C와 42°C에서는 자라지 않았으며 최적 배양온도는 37°C이었다 (Fig. 3).

페놀 농도의 영향

유일 탄소원 및 에너지원으로 0.05% 페놀을 첨가한 최

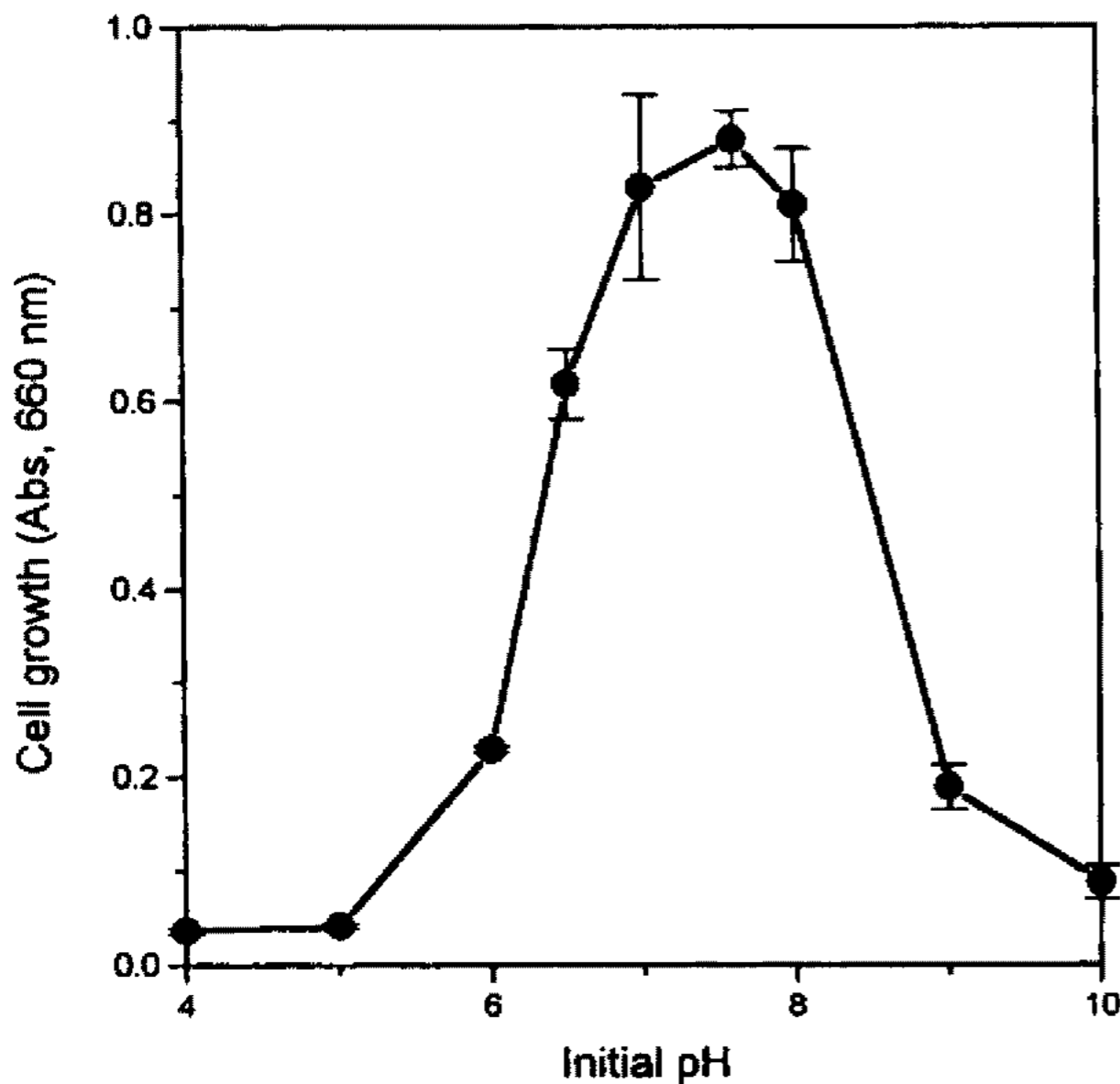


Fig. 2. Optimal pH for the cell growth of *Rhodococcus* sp. DGUM 2011.

Cells were grown at 37°C for 24 hr with shaking (120 rpm) in the minimal media supplemented with 0.05% phenol as a sole source of carbon and energy. The vertical bars represent standard deviations.

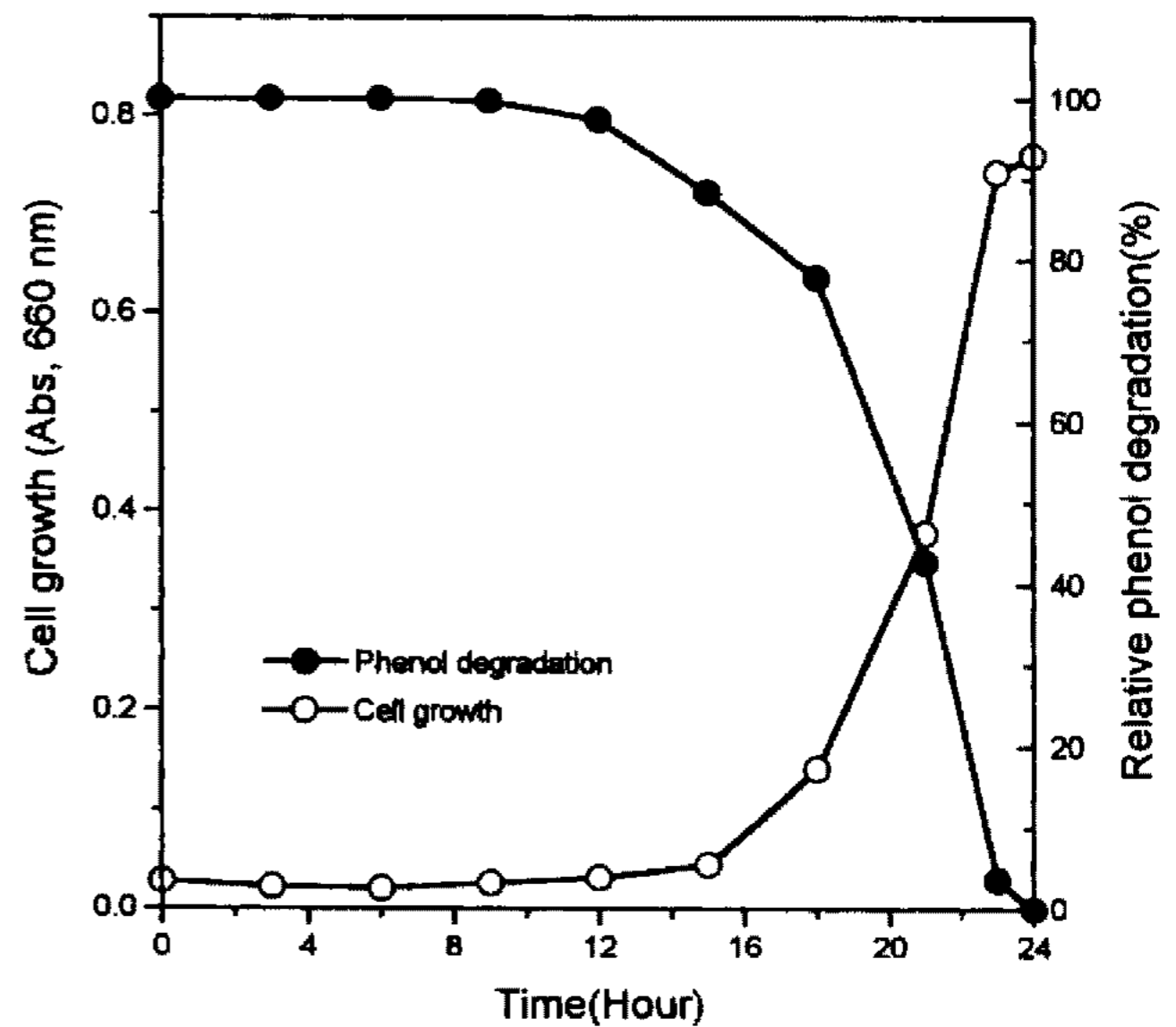


Fig. 4. Time profile of phenol degradation by *Rhodococcus* sp. DGUM 2011.

Cells were grown at 37°C for 24 hr with shaking (120 rpm) in the minimal media supplemented with 0.05% phenol as a sole source of carbon and energy.

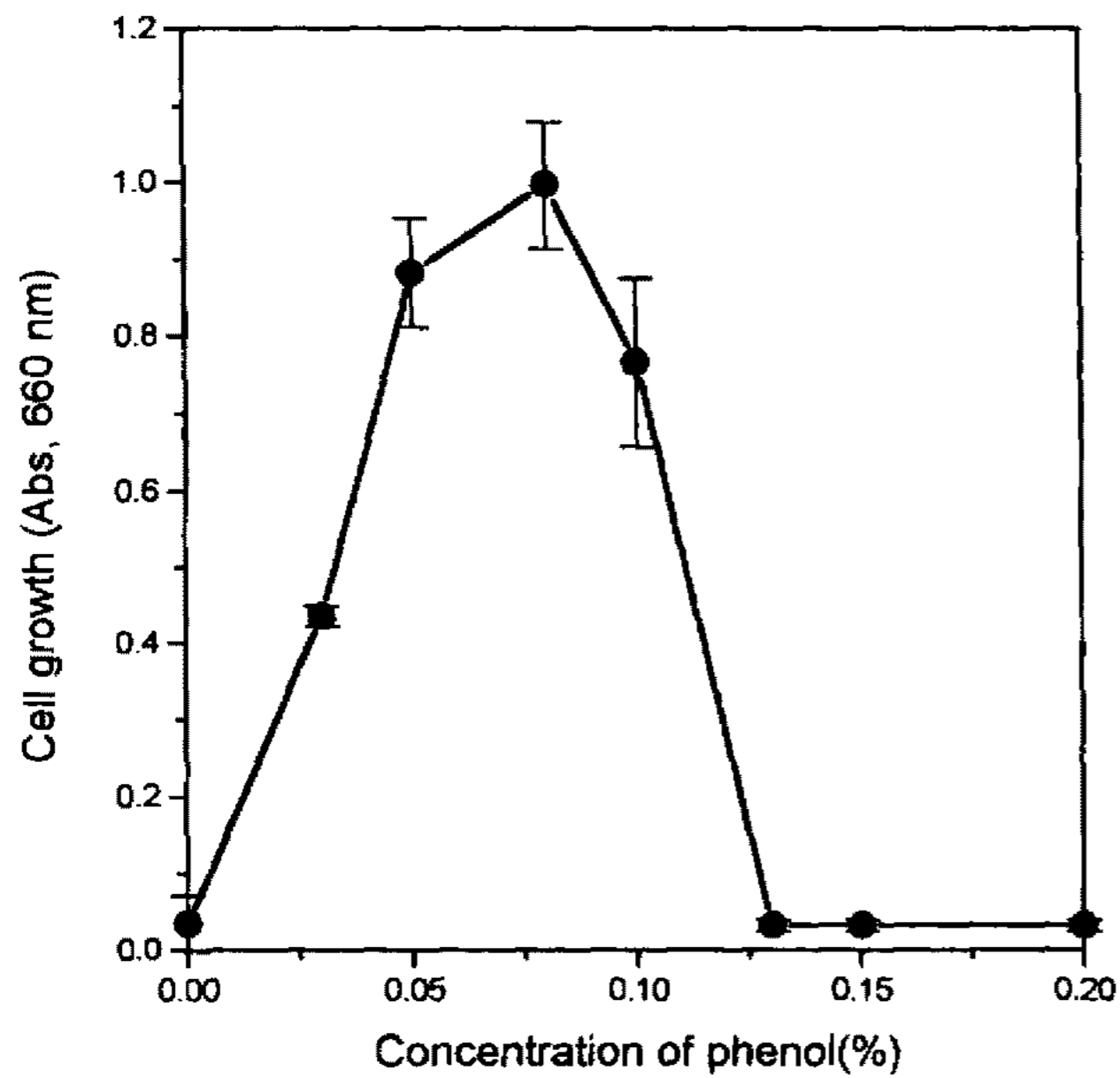


Fig. 5. Effect of phenol concentration on cell growth of *Rhodococcus* sp. DGUM 2011.

Cells were grown at 37°C for 48 hr with shaking (120 rpm) in the minimal media supplemented with 0.05% phenol as a sole source of carbon and energy. The vertical bars represent standard deviations.

소배지에서 분리된 *Rhodococcus* sp. DGUM 2011의 배양 시(접종량: 2%) 15시간 이후부터 급속한 생육이 시작되어 24시간에 이르러 정지기에 도달하면서 페놀을 완전히 이용하여 균체의 흡광도가 0.8에 이르렀다(Fig. 4). 이는

Table 2. Cell growth of *Rhodococcus* sp. DGUM 2011 with various aromatic compounds as a sole source of carbon and energy

Aromatic compounds	Cell growth (Abs, 660 nm)	
	24 hr	48 hr
Phenol	0.782±0.054*	0.803±0.001
Benzoic acid	0.615±0.037	0.587±0.031
p-Hydroxybenzoic acid	0.053±0.016	0.435±0.034
Ferulic acid	0.060±0.009	0.053±0.011
Anthranilic acid	0.010±0.002	0.020±0.012
p-Cresol	0.519±0.019	0.460±0.019
L-Tyrosine	0.673±0.056	0.673±0.023
Catechol	0.004±0.006	0.061±0.022
Protocatechuic acid	0.004±0.003	0.037±0.012
Toluene	0.006±0.002	0.004±0.000
Xylene	0.005±0.001	0.005±0.000
m-Hydroxybenzoic acid	0.040±0.013	0.010±0.006
Gentisic acid	0.006±0.013	0.014±0.010
Orcinol	0.002±0.000	0.010±0.007
Phloroglucinol	0.047±0.014	0.226±0.028
p-Toluic acid	0.008±0.001	0.007±0.002
Salicylic acid	0.014±0.012	0.039±0.033

*The values are the averages ± standard deviations for three to six replicates.

Table 3. Specific enzyme activities of catechol dioxygenase of *Rhodococcus* sp. DGUM 2011

Enzyme	Specific enzyme activity (μmole/min/mg protein)
Catechol 1,2-dioxygenase	4.9438 × 10 ⁻³
Catechol 2,3-dioxygenase	1.4824 × 10 ⁻⁵

*Cells were grown at 37°C for 24 hr in the minimal medium supplemented with 0.05% phenol as a sole source of carbon and energy.

Rhodococcus sp. DGUM 2011의 페놀 이용이 매우 신속함을 보여주고 있다. *Rhodococcus* sp. DGUM 2011에 대하여 페놀에 대한 기질의 저해 효과를 조사하기 위하여 0.20%까지 농도를 변화시켜 48시간 배양한 결과, 0.10%의 농도가 페놀 이용 농도의 한계치이었으며 이는 *Rhodococcus* sp.를 이용한 Pai 등(19)의 연구와 유사하였으며, 최적 페놀 농도는 0.08%이었다(Fig. 5).

방향족 화합물의 자화성

유일 탄소원 및 에너지원으로 다양한 방향족 화합물을 첨가한 최소배지에서 분리된 *Rhodococcus* sp. DGUM 2011을 37°C에서 48시간 배양한 결과, phenol, benzoic acid, p-cresol 및 L-tyrosine 등의 자화성이 우수하였으며, p-hydroxybenzoate 및 phloroglucinol은 48시간에서 생육이 관찰되었다(Table 2). 단일고리 방향족 화합물(phenol, toluene 및 xylene 등)은 방향족 화합물 분해과정의 catechol이나 protocatechuate를 통하여 이용된다고 알려져 왔다(20). 그러나 분리균은 최소배지에 페놀이 첨가되었을 때 생육하였으나, catechol 및 protocatechuate이 탄소원으로 첨가되었을 때 생육하지 못하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 분리균이 catechol과 protocatechuate의 산화에 관련된 효소의 활성이 있음에도 불구하고 그 화합물들을 이용하여 자라지 못하였다. 이는 catechol이나 protocatechuate가 세포내로 흡수되지 못하거나, 페놀이 주어졌을 때에만 catechol 산화효소가 유도되어 페놀을 탄소원으로 사용할 가능성이 있음을 내포하고 있다. 추후 *Rhodococcus* sp. DGUM 2011의 페놀 분해경로, catechol 및 protocatechuate의 세포막 투과성, 페놀산화에 관련된 효소의 유도 등에 관한 생리화학적 실험을 통하여 이 현상을 규명하고자 한다.

요 약

토양 및 산업 폐수로부터 최소배지에 페놀 첨가시 생육이 우수한 20균주의 집락을 분리하고, 액체배양에 의한 균생육과 페놀 분해능이 우수한 균주를 선별하여 *Rhodococcus* sp. DGUM 2011로 동정하였다. *Rhodococcus* sp. DGUM 2011의 생육을 위한 최적 온도 및 pH는

각 37°C 및 7.6이었다. 페놀을 유일 탄소원 및 에너지원으로 최소배지에 첨가시, 0.10%의 페놀 농도까지 생육하였으며 48시간 배양시의 최적 농도는 0.08%이었다. 0.05%의 페놀 첨가시 24시간에 완전히 분해되었다. Benzoic acid, p-hydroxybenzoate, p-cresol, L-tyrosine 및 phloroglucinol이 균생육을 위한 탄소원 및 에너지원으로 이용되었다. *Rhodococcus* sp. DGUM 2011은 catechol 1,2-dioxygenase 및 2,3-dioxygenase 활성이 있어 ortho- 및 meta-cleavage 분해경로가 모두 있는 것으로 판단되나, catechol 1,2-oxygenase 활성이 우수한 것으로 보아 페놀의 분해가 주로 ortho-cleavage를 통해 이루어지는 것으로 유추할 수 있다.

참고문헌

1. Apajalahti, J. H. A. and M. S. Salkinoja-Salonen. 1987. Dechlorination and para-hydroxylation of polychlorinated phenols by *Rhodococcus chlorophenolicus*. *J. Bacteriol.* **169**: 675-681.
2. 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.
3. 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.
4. Buswell, J. A. 1975. Metabolism of phenol and cresols by *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* **124**: 1077-1083.
5. Falson, B. R., P. J. Chapman, and P. H. Pritchard. 1990. Phenol and trichloroethylene degradation by *P. cepacia* G4: Kinetics and interactions between substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1279-1285.
6. Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg. 1994. *Methods for General and Molecular Bacteriology*, ASM, Washington. D.C.
7. Goodfellow, M. Genus *Rhodococcus*. 1986. Pp 1472-1481, In P. H. A. Sneath, N. S. Nicholas, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
8. 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.
9. Johnson, B. F. and R. Y. Stanier. 1971. Dissimilation of aromatic compounds by *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **107**: 468-475.
10. Keith, L. H. and W. A. Telliard. 1979. Priority pollutants. *Environ. Sci. and Tech.* **13**: 416-423.
11. Kim, J. W., C. K. Kim, Y. C. Kim, J. H. Yeoum, and J. G. Lee. 1987. Isolation and characterization of bacteria degrading chlorinated aromatic hydrocarbons. *Kor. J. Microbiol.* **25**: 122-128.
12. Kim, J. Y., S. T. Kim, S. O. Kang, and K. H. Min. 1994. Partial purification of catechol 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* SM25 and production of *cis,cis*-muconic acid by the purified enzyme. *Kor. J. Microbiol.* **32**: 409-416.
13. Krieg, N. R. and J. G. Holt (ed.) 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
14. Lee, C. H., H. M. Oh, T. J. Kwon, G. S. Kwon, S. G. Lee, H. H. Suh, and B. D. Yoon. 1994. Isolation and characterization of a phenol-degrading strain, *Acinetobacter* sp. GEM2. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 692-699.
15. Li, J. K. and A. E. Humphrey. 1989. Kinetics and fluorometric behaviour of a phenol fermentation. *Biotechnol. Lett.* **11**: 177-182.
16. Masque, C., M. Nolla and A. Bordons. 1987. Selection and adaptation of a phenol-degrading strain of *Pseudomonas*. *Biotechnol. Lett.* **9**: 655-660.
17. Mörsen, A. and H. J. Rehm. 1990. Degradation of phenol by mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 206-212.
8. Nozaki, M. 1970. Metapyrocatechase(*Pseudomonas*), P. 522. *Methods in Enzymology* 17A, Academic Press, New York.
19. 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.
20. Palleroni, N. J. 1984. Genus *Pseudomonas*, Pp 141-199, In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
21. Spain, J. C., G. J. Zylstra, C. K. Blake, and D. T. Gibson. 1989. Monohydroxylation of phenol and 2,5-dichlorophenol by toluene dioxygenase in *P. putida* F1. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2648-2652.

(Received 13 May 1997)