

Pseudomonas sp. 의한 Benzoate와 *m*-Toluate 혼합물의 생분해

정준영* · 김교창¹ · 조재민²

농업과학기술원, ¹충북대학교 식품공학과, ²충주산업대학교 식품공학과

Biodegradation of Mixture of Benzoate and *m*-Toluate with *Pseudomonas* sp. Jeong, Jun Young*, Kyo Chang Kim¹, and Chae Min Cho². *National Institute of Agriculture Science and Technology, Suwon 441-707, Korea. ¹Department of Food Science and Technology, ChungBuk National University, Cheong-Ju 361-763, Korea. ²Department of Food Engineering, Chung-Ju National University, Chung-Ju 383-702, Korea - Biodegradation of benzoate and *m*-toluate was investigated using a *Pseudomonas* sp. isolated in a continuous culture for 45 days with a step-wise increase of the substrates. The optimum mixture ratio of benzoate and *m*-toluate was 75% and 25%, respectively. During 45-day culture, removal of benzoate and *m*-toluate, which was replaced 2,000 ppm on the 30th day were 94% and 79%, respectively, when COD removal rate was 80%. The enzymatic activity of catechol 1,2-dioxygenase increased and that of catechol 2,3-dioxygenase decreased as the concentration of *m*-toluate was increased. These results suggested that *m*-toluate induced enzyme activity for degradation of benzoate. The shape of isolated strain in the continuous culture was investigated with SEM and the results showed that the cell shape was more damage according to the higher concentration of aromatic hydrocarbons. Therefore, we suggested that the tolerance against aromatic hydrocarbons was related to not only enzymatic activity but also characteristic of cell membrane or cell wall.

Key words: biodegradation, mixed hydrocarbon, catechol 1,2-dioxygenase, catechol 2,3-dioxygenase, continuous culture

방향족 탄화수소들은 인체 및 생태계에 미치는 독성으로 인해 매우 심각한 보건상의 문제점을 발생시키고 있다[12]. 따라서 이들 화합물 분해를 위한 연구가 활발히 수행되고 있으나[4-8] 거의 대부분은 단일 방향족화합물의 분해 연구[4]에 머물러 있으며 여러 화합물이 혼재되어 있는 실제 조건에서의 분해 연구는 몇몇의 연구[4, 14]를 제외하면 거의 수행되어 있지 않은 실정이다. 또한 방향족 화합물을 분해하는 대다수의 미생물들은 각각 제한된 종류의 화합물만을 분해 할 수 있으며 기질 농도가 일정 이상이 되면 분해 활성의 현저한 저하와 함께 균체의 증식이 저하되는 것이 일반적 현상이다[18].

따라서 다양한 방향족 화합물이 혼재 되어 있는 실제 조건에 미생물을 적용하기 위해서는 다양한 화합물 분해능을 갖는 균주의 개발이 요구되나 이에 대한 연구가 아직 미비한 실정이다. 한편 Leadbetter[13] 등은 1959년 서로 다른 방향족 화합물이 전 기질로 존재할 때 다른 화합물의 분해가 촉진된다는 cooxidation의 개념을 처음으로 정립한 이래 이에 대한 연구가 수행되고 있다. Arvin[2]은 toluene이나 *p*-xylene의 첨가에 의해 benzene의 분해 촉진 효과를 보고하였으며 Vogel[19] 등은

benzene, toluene 및 *p*-xylene 혼합배양시 toluene을 2차 기질로 첨가하였을 때 benzene 단독 배양보다 분해율이 향상되었고 이와 같은 결과는 toluene 분해효소의 유도에 영향을 미침으로써 미생물의 활성을 유도하였기 때문이라고 보고하여 이의 가능성을 제시하였다.

그러나 국내에서는 전 기질 첨가에 의한 방향족 화합물의 분해에 대한 연구가 미흡한 실정이며 특히 전 기질로 방향족 화합물을 첨가하였을 때 두 화합물의 분해효과나 이들의 분해 효소의 작용에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 다양한 방향족 화합물이 혼재되어 있는 실제 폐수의 생물학적 처리를 위한 기초적인 연구의 일환으로 benzoate와 *m*-toluate의 혼합물의 분해 효율과 *m*-toluate 첨가 효과를 검토하여 몇가지 결과를 얻었다.

실험재료 및 방법

시용균주

본 실험에 사용한 균주는 토양과 하천수 및 공단지역 하천 지질층에서 방향족 화합물을 유일 탄소원으로 이용할 수 있는 균주를 선별하여 보관중인 *Pseudomonas* sp.

*Corresponding author
Tel. 82-331-290-0209

Table 1. Characteristic of *Pseudomonas* sp. used in the this study

Strain/Plasmid	Relevant Characteristics	Source
<i>Pseudomonas</i> sp.	Benzoate ⁺ , Cm ^r , Km ^r , Ap ^r , Tc ^s Catechol 1,2-dioxygenase ⁺ Catechol 2,3-dioxygenase ⁺	This study
Cured strain ¹⁾	Benzoate ⁺ , Cm ^s , Km ^s , Ap ^s , Tc ^s Catechol 1,2-dioxygenase ⁺ Catechol 2,3-dioxygenase ⁻	This study
BpL ²⁾	BpL (Benzoate ⁺ , Cm ^r , Km ^r , Ap ^r , Tc ^s) Catechol 1,2-dioxygenase ⁻ Catechol 2,3-dioxygenase ⁺	This study

1) Cured strain of *Pseudomonas* sp. with mitomycin-C. 2) Plasmid DNA (120 kb) of *Pseudomonas* sp.

를 사용하였으며 균주의 특성은 Table 1과 같다.

배양 배지

균 배양 및 합성 폐수로 사용한 배지는 탄소원을 제거한 basal salt medium[10](BSM: K₂HPO₄ 5.8 g, KH₂PO₄ 4.5 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, MgCl₂ 0.16 g, CaCl₂ 0.02 g, NaMoO₄ 0.002 g, FeSO₄ 0.001 g, MnCl₂ 0.001 g/l, pH 7.0)를 사용하였으며 미량 원소들은 별도로 stock solution을 제조하여 membrane filter(0.25 μm)를 이용하여 사용전에 첨가하였다.

혼합기질 배양의 benzoate와 *m*-toluate 혼합비 조건

Benzoate와 *m*-toluate 혼합기질 배양에 있어 본 균주의 활성과 2차 기질에 대한 증식 및 분해능을 검토하기 위해 benzoate, *m*-toluate 그리고 농도를 달리한 이들 혼합물의 최종 기질 농도가 500 ppm이 되도록 조절한 250 ml의 BSM broth에 전배양액 0.1%를 접종하여 30℃에서 진탕 배양하면서 OD와 COD 제거율을 조사하였다.

혼합기질 배양

혼합기질 배양은 benzoate와 *m*-toluate 혼합비 실험에서 우수한 것으로 조사된 혼합비에 따라 최종 혼합기질 농도를 1,000 ppm으로 조절한 1,500 ml의 BSM broth를 2.5 l의 배양조에서 다음과 같이 수행하였다. 즉, 전배양액 0.1%를 배지에 접종한 후 균의 생육이 정상기에 도달할 때까지 적응시킨 후 수리적 체류시간(HRT: hydraulic retention time)을 15일로 하여 실시하였다. 이때 첨가되는 기질량은 방향족 화합물에 의한 균의 생육 저해를 최소화하기 위해 1,000 ppm, 2,000 ppm, 3,000 ppm으로 순차적으로 높여주면서 배출액의 pH, OD, COD 및 기질제거율과 효소활성을 조사하였다. 한편 본 실험에 사용한 배양기는 pH meter, agitation speed controller, air pump gauge, temperature 및 recorder 등을 갖춘 2.5 l의 배양조(Korea Fermentator Co. Ltd., Korea)로 실험조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Experimental conditions of the mixed substrate culture

Working volume	1,500 ml
Temp.	30℃
Air flow rate	1 kg/cm ² (20℃)
Agitation rate	300 rpm
HRT (hydraulic retention time)	15 day
Input and output rate of mixture	100 ml/day

기질제거

기질 제거율은 benzoate와 *m*-toluate 표준물질의 최대 흡광도를 이용하여 각 화합물의 농도에 따른 검량선을 작성하여 실제 시료의 흡광도를 측정하여 기질량으로 환산하였다.

각 화합물의 최대 흡광도의 파장은 다음과 같다.

benzoate: 269 nm, *m*-toluate: 276 nm

균 증식 및 COD(Chemical Oxygen Demand)

균 생육은 spectrophotometer를 이용 660 nm에서 측정하였으며 COD_{Mn}는 수질오염공정시험법[1]에 준하여 분석하였다.

전자현미경 관찰

혼합기질 배양과정 중 균체의 현미경 관찰은 Campbell[3] 등의 방법에 준하여 주사형 전자현미경(SEM: scanning electron microscope, Hitachi-570, Japan)으로 관찰하였다.

Catechol 1,2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase 측정

혼합기질 배양 중 catechol 1,2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase는 Hegeman[8] 등과 Sala-Trepate[17] 등의 방법을 보정하여 측정하였다. 여기서 효소 1 unit는 분당 1 μmol catechol 산화량으로 정의하였으며 specific activity는 단백질 mg당 unit로 표시하였

다. 단백질은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 사용하여 Lowry[15]법으로 정량하였다.

결과 및 고찰

Benzoate와 *m*-toluate 혼합비 조건

Benzoate와 *m*-toluate 혼합기질로 사용할 때 이들 두 화합물의 적정 혼합비율을 검토하기 위해 benzoate와 *m*-toluate 그리고 소정의 비율로 조절한 혼합물의 최종 기질 농도가 500 ppm이 되도록 조절하여 OD에 의한 균 생육 및 COD를 측정된 결과는 Fig. 1과 2와 같다.

첨가되는 benzoate와 *m*-toluate의 혼합비에 따른 균주의 생장율은 Fig. 1에서와 같이 *m*-toluate를 첨가하지 않은 benzoate 단독 배양에서 60시간에 O.D. 0.68로 가장 우수하였으며 *m*-toluate를 25%, 50%, 75% 첨가한 모든 시료구에서는 80시간 만에 각각 0.39, 0.32, 0.29의 O.D.를 나타내었다. 그러나 *m*-toluate의 첨가농도가 50% 이상이 되는 시료구에서는 본 균주의 생장율이 급격히 감소하기 시작하여 benzoate를 제거하고 *m*-toluate만을 첨가한 시료구에서는 배양 100시간 만에 약 0.23의 O.D.로 다른 시료구에 비해 매우 낮았다. 따라서 본 균주는 *m*-toluate에 의해 유도기간이 길어지고 균 생육이 억제되는 것으로 추측되며 유도기간이 길어지는 것은 새로운

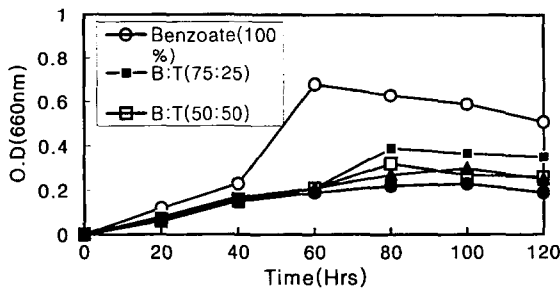


Fig. 1. Growth rate of the isolated strain according to mixing ratio of benzoate and *m*-toluate.

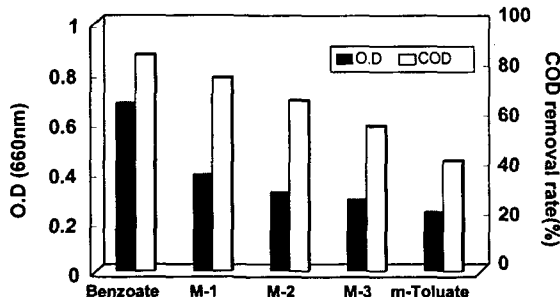


Fig. 2. Growth rate and COD removal of the isolate strain at the maximum growth time. Benzoate (100%), M-1 (B:T=75:25), M-2 (B:T=50:50), M-3 (B:T=25:75), *m*-Toluate (100%).

기질에 적응하기 위한 것으로 생각된다[19].

Fig. 2는 배양기간 중 본 균주의 최대 증식 시간에서의 COD 제거율을 조사한 결과로 benzoate 만을 단독 기질로 사용한 시료구에서 약 88% 정도로 가장 높았고 *m*-toluate 만을 첨가한 시료구에서 약 45%로 가장 낮은 것으로 조사되었다.

m-toluate의 첨가 농도가 높아질수록 COD 제거율도 낮아졌는데 *m*-toluate에 의해 본 균주의 생육이 저해를 받았기 때문인 것으로 추측된다.

한편 benzoate와 *m*-toluate 배양을 위한 기질 혼합물은 균 생육과 COD 제거율이 다른 첨가구에 비해 비교적 높은 benzoate:*m*-toluate=75:25 비율로 조절하여 혼합기질 배양을 수행하였다.

혼합기질 배양

혼합기질 배양은 benzoate와 *m*-toluate 혼합비 실험에서 우수한 것으로 조사된 benzoate:*m*-toluate=75:25 비율로 하여 최종 혼합기질 농도를 1,000 ppm으로 조절한 1,500 ml의 BSM broth를 2.5 l의 배양조에서 수행하였다. 한편 첨가되는 기질량은 방향족 화합물에 의한 균의 생육저해를 최소화하기 위해 1,000 ppm, 2,000 ppm, 3,000 ppm으로 순차적으로 높여주면서 매일 100 ml의 배양액을 배출하고 동량을 주입하면서 배출액의 pH, OD, COD 및 기질제거율과 효소활성 그리고 농도에 따른 균 형태 변화를 관찰하였다.

Fig. 3은 benzoate와 *m*-toluate의 혼합비를 75:25 비율로 하여 최종 혼합기질농도를 1,000 ppm으로 조절한 연속배양 중의 pH 및 O.D.에 의한 균 증식을 조사한 결과이다.

Fig. 3에서와 같이 배양초기의 pH는 약 6.9 정도로 배양 30일 까지 거의 일정한 수준을 보였으나 최종농도가 3,000 ppm의 혼합기질을 첨가하기 시작한 30일 이후 부터 급격한 저하를 보였다. 이와 같은 결과는 기질량이 높아짐에 따라 기질의 대사가 원활히 이루어지지 않아 산

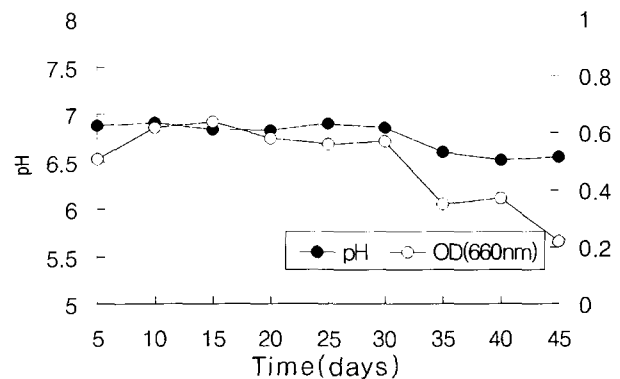


Fig. 3. Changes of pH and O.D. in mixed substrate culture.

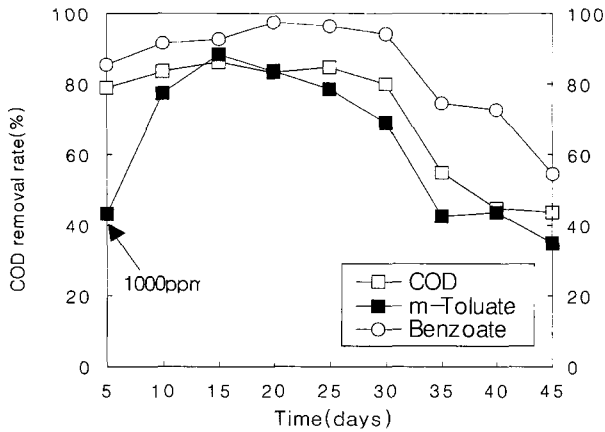


Fig. 4. Changes of COD and substrate removal rate in mixed substrate culture.

이 축적되었기 때문인 것으로 추측된다[16]. 한편 배양기간 중의 O.D.에 의한 균 증식은 배양초기의 0.48를 나타내어 이 기간이 유도기인 것으로 추측되며 그 후 10일째 부터 혼합기질량이 완전히 2,000 ppm으로 대체된 30일째 까지 비교적 우수한 성장율을 보였다. 한편 Haigler[7] 등은 혼합배양에 있어서 분해 효소가 유도될 수만 있다면 기질이 혼합되어 있어도 생육이 가능하며 배양중 세포 밀도의 유지는 성장 기질로 이용할 수 없었던 기질이 분해되고 있다는 것을 나타낸다고 보고한 바 있다. 따라서 배양 10일 부터 30일 까지 본 균주의 증식 경향이 안정하게 유지 되고 있다는 것은 2차 기질인 *m*-toluate가 분해되고 있다는 추측을 가능하게 한다.

한편 3,000 ppm의 혼합기질을 첨가하기 시작한 30일 이후 부터 균 증식이 감소하기 시작하여 3,000 ppm으로 거의 대체되기 시작한 40일 째에는 균 증식이 급격히 감소하였다. 이와 같은 결과로 볼 본 균주는 일정한 benzoate와 *m*-toluate 농도 이상에서는 균 증식이 억제되며 특히 Fig. 1에서 나타난 것처럼 *m*-toluate에 의해 큰 영향을 받는 것으로 추측된다.

Fig. 4는 benzoate와 *m*-toluate 혼합기질 배양과정 중의 COD와 각 기질 제거율의 변화를 조사한 결과이다.

COD는 배양초기 약 79%의 분해율을 보였고 균체의 증식이 비교적 안정하게 유지된 배양 10일 부터 30일 까지 약 20일 동안 평균 약 83.5%의 높은 분해율을 보였다. 그러나 3,000 ppm의 혼합기질을 첨가하기 시작한 30일째 부터 40일 까지 COD 제거율은 급격히 감소하기 시작하여 평균 약 50%의 분해율을 보였으며 40일 이후는 43.7%를 나타내어 배양 초기의 78.8%에 비해 약 55%의 감소율을 보였다.

한편 기질 제거율은 배양 초기 benzoate와 *m*-toluate는 각각 85.5%와 43.2%를, 균 생육이 활발한 20일에서

Table 3. Specific activities of catechol 1,2-dioxygenase mixed substrate culture

Days	catechol 1,2-dioxygenase
5	0.1*
15	0.7
30	1.9
45	1.4

*: specific activity unit(μ mol/min/mg of protein). Expressed as enzyme unit per milligram of protein, where 1 unit is the amount of enzyme required to convert 1 μ mol of substrate in 1 min.

30일째 까지의 평균 제거율은 각각 94.5%와 79.4%로 본 연구자[9]가 동일 균주를 사용한 benzoate 단독 배양시의 benzoate 제거율 93%에 비해 오히려 높은 제거율을 보였다. 이와 같은 결과는 benzoate의 분해율이 *m*-toluate 존재에 의해 비록 유도기는 연장되었으나 그 분해율은 증가[19] 되며 이는 *m*-toluate 분해 효소가 benzoate 분해 효소 유도에 영향을 미침으로써 미생물의 활성을 유도하였기[6] 때문인 것으로 생각된다.

한편 3,000 ppm 농도의 혼합기질을 첨가하기 시작한 30일 부터 40일 까지의 benzoate와 *m*-toluate의 평균 분해율은 각각 74%와 48%를 보였으나 3,000 ppm으로 거의 대체된 40일 이후에는 균 생육의 저하와 함께 기질 분해율도 감소하였다.

효소 분석

혼합기질 배양 중 *m*-toluate 분해 효소의 측정에 의한 benzoate 분해 효소의 활성에 대한 영향을 검토하기 위해 benzoate와 *m*-toluate 분해의 대표적 효소인 catechol 1,2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase를 조사하였다.

Table 3은 45일간의 혼합기질 배양 중의 혼합기질에 의한 catechol 1,2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase 활성을 조사한 결과이다.

혼합기질 배양 초기의 catechol 1,2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase의 활성은 각각 0.1과 3.1 unit 였고 2,000 ppm의 혼합기질을 첨가하여 배양한 15일째는 각각 0.7과 3.6 unit을 보였다. 그러나 3,000 ppm의 혼합기질을 첨가하기 시작한 30일째와 3,000 ppm으로 완전히 대체된 45일째의 catechol 1,2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase의 활성은 각각 1.9, 0.7 unit 그리고 1.4와 0.02 unit로 조사되어 기질의 농도가 증가할수록 효소의 활성이 낮아졌다.

한편 catechol 1,2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase 활성의 변화를 보면 여기에는 나타나 있지 않지만 본 연구자[9]가 45일간의 benzoate 단독 연속배양기간 중에는 나타나지 않았던 catechol 1,2-dioxygenase의

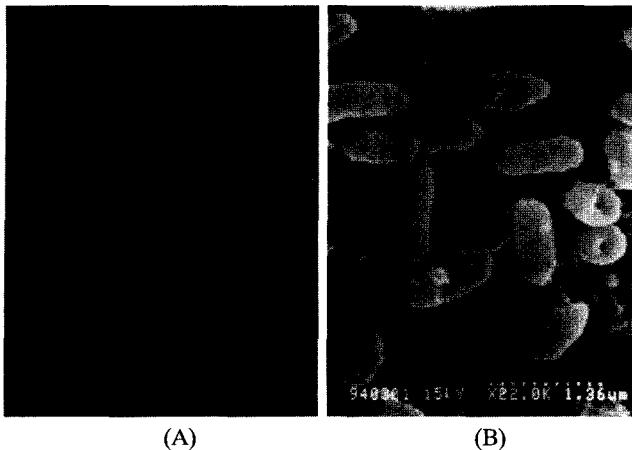


Fig. 5. Scanning electron microscopy of mixed substrate culture.

(A) The cell was grown for 10 days with shaking in BSM broth containing 1,000 ppm benzoate as sole carbon source.

(B) Mixed substrate culture for 45 days.

활성이 측정되었는데 Table 3에서와 같이 배양 기간이 길어지고 *m*-toluate의 농도가 높아질수록, catechol 2,3-dioxygenase의 활성은 감소하고 catechol 1,2-dioxygenase는 증가 하였다. 또한 배양 15일을 전후하여 catechol 1,2-dioxygenase의 활성이 catechol 2,3-dioxygenase의 활성보다 높아지기 시작하여, 배양 45일째에는 배양 초기에 비해 약 65배 정도의 활성을 보였다. 이와 같은 결과로 볼 때 본 균주의 benzoate 분해효소는 다양한 기질 분해 특이성을 갖는 *m*-toluate의 toluate dioxygenase에 의해 유도되어 미생물의 성장 활성을 촉진[6]시켜 Fig. 4에서와 같이 분해율이 향상된 것으로 생각된다.

전자현미경 관찰

혼합기질 배양과정 중 기질 농도에 대한 영향을 검토하기 위해 주사형 전자현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다.

여기서 본 균주의 대조구로는 1,000 ppm의 benzoate를 첨가한 BSM broth에서 10일간 배양시킨 균체를 이용하였다.

혼합기질 배양과정 중에 있어서 균 형태는 균체의 생장이 왕성하고 이에 따라 기질 분해율도 높게 조사된 10일 째 Fig. 5에서와 같이 대조구(A)와 거의 유사한 것으로 나타나 이 농도에서는 균의 형태에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 그러나 혼합기질 농도가 3,000 ppm으로 완전히 교체된 배양 45일째의 균 형태는 B에서와 같이 불규칙하고 세포 표면이 거칠어진 형태의 변화가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 일정 농도 이상에서(본 실험에서는 3,000 rpm이상) 본 균주의 방향족 화합물에

대한 내성은 대사에 관련된 효소 활성화에 기인할 뿐만 아니라 세포벽 또는 세포막 특성[19]에 기인할 수도 있는 것으로 추측된다.

요 약

방향족 화합물의 기본을 이루고 있는 benzoate와 *m*-toluate 혼합물 분해를 위한 45일간의 배양 결과 benzoate와 *m*-toluate 최적 기질 혼합비는 benzoate(75%):*m*-toluate(25%)일 때 가장 높은 균 생장율과 COD 제거율을 나타내었다. 또한 45일간의 배양 중 혼합기질의 농도가 2,000 ppm으로 교체된 30일째의 benzoate와 *m*-toluate의 기질 분해율은 각각 94%와 79%였고 이때의 COD 제거율은 약 80%였다.

한편 효소 활성측정 결과 초기에 거의 검출되지 않았던 catechol 1,2-dioxygenase의 활성이 검출되어 *m*-toluate에 의해 본 균주의 효소 대사계가 유도 되었음을 알 수 있었다. 또한 배양 중 기질 농도에 대한 본 균주의 형태변화를 전자현미경으로 관찰한 결과, 기질의 농도가 높을 수록 균 형태가 변화된 것으로 볼 때 일정 농도 이상의 방향족 화합물에 대한 내성은 대사에 관련된 효소 활성화에 기인할 뿐만 아니라 아니라 세포벽 또는 세포막의 특성에 기인할 수도 있는 것으로 추측된다.

REFERENCES

1. Apha, Awwa, and WFF. 1992. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 18th edition. American Public Health Association, Washington, D.C.
2. Arvin, E., B. K. Jensen, and A. T. Gundersen. 1989. Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3221-3225.
3. Campbell, J. D., D. D. Cass, and D. J. Peteya. 1987. Colonization and penetration of inaccanola seeding roots by an opportunistic fluorescence *Pseudomonas* sp. and the response of host tissue. *Phytopathology* **77**: 1166-1173.
4. Chang, M. K., T. C. Voice, and Criddle. 1992. Kinetics or competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 1057-1065.
5. Cho. B. N., I. S. Cho., S. Y. Choi., J. K. Ryu, and K. H. Kim. 1989. Characterization and incompatibility of transmissible TOL plasmid from *Pseudomonas cepacia*. *J. Kor. Microbiol.* **17**(4): 285-291.
6. Gibson, K. J. and J. Gibson. 1984. Potential early intermediates in aerobic benzoate degradation by *Rodopseudomonas palustris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 696-698.
7. Haigler, F. K. and D. D. Foht. 1992. Degradation of 2-methylbenzoic acid by *Pseudomonas cepacia* MB2. *Appl. Environ. Microbil.* **58**: 194-200.
8. Hegeman, G. D. 1966. Synthesis of the enzyme of the

- mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **9**: 1140–1154.
9. Jeong, J. Y. and K. C. Kim. 1996. Biodegradation of benzoate by *Pseudomonas* sp. *J. Fd. Hyg. Safety.* **11**(3): 165–170.
 10. Kho, Y. H., I. H. Ha, and S. B. Kyung. 1988. Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* N3 degrading naphthalene. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 1994–204.
 11. Kilbrane, J. J. 1981. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 72–78.
 12. Kobayshi, H. and B. E. Rirrmann. 1982. Microbial removal of hazardous organic compound. *Environ. Sci.* **16**: 179–183.
 13. Leadbetter, E. R. and J. W. Foster. 1959. Oxidation products formed from gaseous alkanes by Bacterium *Pseudomonas methanica*. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 491–492.
 14. Lee, C. H, H. M. Oh, *et al.* 1994. The biodegradation of mixture of benzene, phenol and toluene by mixed and monoculture of bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **22**(6): 685–691.
 15. Lowry, O. H., A. L. Farr, and R. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265–273.
 16. Omori, T., S. Horiguchi, and K. Yamada. 1967. Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganism. *Agri. Biol. Chem.* **31**: 1337–1342.
 17. Sala-Trepate, J. M. and W. C. Evans. 1971. The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* sp. *Appl. Microbiol. Biotech.* **20**: 400–413.
 18. Suh, Y. S. 1987. Biotechnological research on degrading bacteria of the treatment of the aromatic compound. Report of *NIER KOREA*: 287–296.
 19. Vogel, T. M and P. J. J. Alvarez. 1991. Substrate interaction of benzene, toluene and p-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**(10): 2981–2985.

(Received March 24, 1998)