

〈총 설〉

미생물의 탈염소화 작용에 의한 난분해성 염화방향족 오염물질의 분해

채 중 찬 · 김 치 경*

(충북대학교 자연과학대학 미생물학과)

적 요 - 난분해성 유기화합물의 일종인 염화 방향족화합물은 냉각제, 소화제, 페인트, 용매, 플라스틱류, 유압제, 제초제, 농약, 그리고 화학합성에 필요한 전구물질 등에 널리 사용된다. 이들은 친지질 특성을 가지므로 생물체의 세포막에 쉽게 흡착되며 먹이사슬에 의한 생물학적 농축과정을 통해 인간을 포함하는 각종 생물체에 축적된다. 그 결과 생물체의 세포막 구조가 변화되고 기능이 저해될 뿐더러 암과 돌연변이를 유발하고 「환경호르몬」으로서 생물체의 내분비계 기능을 교란하는 등 심각한 보건학적 그리고 환경생물학적 문제를 일으키고 있다. 염화 방향족화합물들은 벤젠고리 구조와 벤젠고리에 염소가 치환된 탄소-염소 결합을 공통적으로 가지고 있으며 벤젠고리에 치환된 염소의 수와 같은 수의 염소라도 붙어 있는 위치에 따라 난분해 특성이 결정된다. 염화 방향족화합물들의 분해를 위해서는 미생물에 의한 벤젠 구조의 개환과정과 함께 벤젠 고리구조로부터 염소 치환기를 제거하는 탈염소화 과정이 반드시 일어나야만 한다. 호기적 환경에서 미생물에 의한 탈염소화는 분해 초기단계에서 dehalogenase라는 효소에 의해 촉매되는 oxygenolytic, reductive, 그리고 hydrolytic catalysis에 의해 일어나거나, 분해 대사과정 중에 저절로 염소치환기가 떨어져 나가는 경우도 있다. 탈염소화 과정을 거쳐 분해하는 미생물들을 이용한 염화 방향족 오염물질의 생물학적 분해방법은 이미 사용되고 있는 물리·화학적 방법보다 경제적이며 2차 오염의 부작용 없이 그 오염물질들을 매우 효과적으로 처리할 수 있다. 따라서 탈염소화 기작을 포함한 분해과정의 이해는 생물학적 분해의 기본적인 정보를 제공할 뿐더러 난분해성 환경 오염물질의 분해처리를 위하여 보다 집중적으로 연구해야 할 과제라고 할 것이다.

서 론

현대사회에는 중화학공업 뿐 아니라 유기합성 기술의 발달과 함께 그에 따른 수많은 유독성 오염물질들의 출현으로 토양과 수계 생태계의 환경오염이 문제시되고 있다. 각종 화석연료제품이나 농약, 세제 그리고 유기용매로 유용하게 사용되고 있는 각종 xenobiotic 물질들의 생산은 유기합성 화학기술의 발달에 기인하게 된 것이다. 또한 할로젠족 원소와 같은 치환기를 이용한 합성은 xenobiotic 화합물들의 사용범위와 효과를 더욱 증대시켰다.

자연계에는 인위적으로 생산된 할로젠화 유기합성화합물 이외에 700여종 이상의 할로젠화 천연 유기물질들이 존재한다. 이들은 수억년 동안 지구상에 존재해 왔으며 진화적으로 분해능을 갖게된 미생물들에 의해 분해되어왔다. 그러나 유기합성 화합물들은 사용목적에 따라

천연 유기물질과는 다른 구조를 가지게 되므로 토착미생물들에 의해 분해가 잘 이루어지지 않고 자연계에 축적되는 것이다 (Häggbloom 1992).

할로젠화 유기합성화합물의 일종인 할로젠화 방향족 화합물들은 최근 50여년 사이에 다양으로 생산되고 자연생태계에 유출되면서 주된 환경오염원으로 대두되었다. 특히 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT), polychlorinated biphenyls (PCBs) 등에 의한 환경 및 보건학적 문제로 인하여 염화 방향족화합물에 대해서 가장 많이 연구되었다 (Abramowics 1990; Häggbloom 1992; Kim *et al.* 1994; Reineke 1988). 염화 방향족화합물에는 Table 1과 같이 PCB, DDT를 포함한 염화 다고리 방향족화합물 (chlorinated polycyclic hydrocarbon)과 chlorophenol, chlorobenzoate, chlorobenzene, chloroaniline 등과 같이 하나의 벤젠 구조를 기본으로 하는 화합물이 포함된다. 이들은 냉각제, 소화제, 페인트, 용매, 플라스틱류, 유압제, 제초제, 농약, 그리고 화학합성

* 교신저자 : Tel: 0431-261-2300, E-mail: environ@trut.chungbuk.ac.kr

Table 1. Several kinds of recalcitrant chlorinated aromatic compounds

Structural	Chlorinated aromatic hydrocarbons
Polycyclic compounds	1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis(4-chlorobiphenyl) ethane (DDT) polychlorinated biphenyls (PCBs) chlorodibenzofuran
Phenol	monochlorophenol 2, 5-dichlorophenol pentachlorophenol
Phenoxyalkanoate	2, 4-dichlorophenoxyacetate (2, 4-D) 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetate (2, 4, 5-T) 4-chloro- <i>z</i> -methyl phenoxyacetate (MCPA)
Benzoate	monochlorobenzoate 2, 4-dichlorobenzoate 3, 5-dichlorobenzoate 2, 4, 6-trichlorobenzoate
Benzene	monochlorobenzene 1, 2-dichlorobenzene 1, 3-dichlorobenzene 1, 2, 4-trichlorobenzene
Phenylamide	N-(3, 4-dichlorophenyl) propionamide (propanil) N-(3, 4-dichlorophenyl) methacrylamide (dicryl) N-(3, 4-dichlorophenyl)-2-methyl pentanamide (karsil)
Aniline	monochloroaniline 3, 4-dichloroaniline 2, 6-dichloro-4-nitroaniline

에 필요한 전구물질 등에 사용된다.

이 화합물들은 소수성 특징으로 인해 지질에 쉽게 흡착되는 친지질성을 가지므로 생물체의 세포막에 쉽게 흡착된다 (Hooper *et al.* 1990). 그러므로 자연생태계에 오염된 이들 물질들이 자연정화기능의 농도를 넘었을 때, 먹이사슬에 의한 생물학적 농축과정을 통해 인간을 포함하는 각종 생물체에 축적된다. 그 결과 생물체의 세포막 구조가 변화되고 이온이나 기질의 전달, 전위차 생성과 같은 세포막 기능의 저해가 초래된다. 또한 암과 돌연변이를 유발하고 환경호르몬으로서 생물체의 기능을 교란하는 등 심각한 보건학적 그리고 환경생물학적 문제를 일으키고 있다 (Atlas & Bartha 1993; Sikkema *et al.* 1995). 이와 같이 독성을 나타내는 화합물들은 구조적으로 난분해 특성을 가지고 있기 때문에 자연환경에 분해되지 않고 쉽게 축적된다. 따라서 자연계에 오염된 화합물들의 정화를 위해서는 화합물 구조를 보다 분해

되기 쉬운 형태로 변환시키는 것이 가장 중요하다.

염화 방향족화합물의 난분해성

염화 방향족화합물들은 phenol, toluene, benzene, aniline 등과 같이 벤젠고리를 가지고 있는 탄소-탄소결합(C-C bond)과 염소가 벤젠고리의 수소와 치환된 탄소-염소 결합을 공통적으로 가지고 있다. 일반적으로 탄소-염소 결합은 치환기의 electronegativity를 증가시켜 구조상 불활성화된 안정상태로 만들어주고 염소치환기가 방향족 고리구조의 공명구조에 영향을 줌으로서 특정부위의 electron density를 변화시킨다 (Hardman 1991). 그러므로 치환기의 위치에 따라 효소와 기질사이의 친화력에 대한 stereochemical effects를 주기때문에 천연 유기물질을 분해하는 토착미생물들은 유기합성 화합물을 잘 분해하지 못하는 것이다. 결과적으로 벤젠고리에 치환된 염소의 수, 그리고 같은 수의 염소라도 어느 위치에 붙어 있는가에 따라 난분해 특징이 결정된다. Furukawa 등(1978, 1979)은 *Alcaligenes*와 *Acinetobacter* strain들을 이용하여 1~5개의 염소이온이 치환되어 있는 polychlorinated biphenyl (PCB) isomers의 구조와 난분해성 정도의 상관관계를 다음과 같이 보고하였다. ① 염소치환기가 많을수록 분해가 어렵다. ② 염소가 한쪽 또는 양쪽 환구조의 *ortho* 위치에 치환되어있는 경우보다 난분해성 특징을 보인다. ③ 한쪽 환구조에 염소가 치환된 경우가 양쪽 환구조에 치환된 경우보다 더 빨리 분해된다. ④ 염소치환기의 수가 적을수록 개환과정이 쉽게 일어난다. 따라서 염화 방향족화합물들의 분해를 위해서는 벤젠 고리구조로부터 염소 치환기를 제거하는 과정이 매우 중요하다.

호기적환경에서 염화 방향족화합물들은 산소가 최종 전자수용체로, 또 분해초기에는 reactant 역할을 함으로서 탈염소화 반응과 함께 종국적으로는 이산화탄소로 완전 분해되는 것이다. 이와 같은 분해기작은 같은 벤젠고리 구조라도 염소치환기의 수와 위치에 따라 서로 다르다. 그러나 공통적으로 extradiol-과 intradiol-type dioxygenase에 의해 벤젠고리가 개환되어야 하며, 또 염소치환기를 떨어뜨리는 탈염소화과정이 반드시 일어나야만 한다.

염화 방향족화합물들은 이상에서 열거한 바와 같은 구조적 특징 때문에 난분해 특성을 나타내지만, 자연계로부터 탈염소화반응을 통해 탄소 및 에너지원으로 사용하는 미생물들이 분리되고 있다. 이에 따라 오염물질을 처리하기 위하여 분해미생물들을 이용하는 생물학적 분해방법이 연구되고 있다. 또한 미생물과 효소에 의한

탈염소화 작용을 이용한 생물학적 촉매반응은 기존의 화학적 방법으로는 3차 공명구조 때문에 비용이 많이 드는 중간 대사산물의 생성이나 새로운 물질을 생산하는 방법으로도 활용된다(Fetzner & Lingens 1994). 이와 같은 응용산업을 위해서는 그 작용기작에 대한 연구가 생화학적 그리고 분자생물학적으로 수행되어야 한다. 그러나 일부 염화 방향족화합물들에 대해서만 탈염소화 기작이 밝혀졌으며 호기적 조건에서는 다음과 같이 크게 4가지 기작이 보고되었다.

미생물에 의한 탈염소화 작용

호기적 환경에서 탄소-염소 결합의 절단은 분해 초기 단계에서 dehalogenase라는 효소에 의해 촉매되는 oxygenolytic, reductive, 그리고 hydrolytic catalysis에 의해 일어난다. 그러나 분해대사과정 중에 일어나는 개환과정에서 생성된 대사물질의 불안정한 구조적 특성 때문에 저절로 염소치환기가 떨어져 나가기도 한다(Chaudhry & Chapalamadugu 1991; Häggblom 1992; Reineke *et al.* 1988).

Oxygenolytic dechlorination

Oxygenolytic cleavage에 의한 탈염소화 과정은 monooxygenase나 dioxygenase에 의해 촉매되며 1개 또는 2개의 oxygen atom이 aromatic nucleus로 삽입되는 과정과 동시에 이루어진다.

Pseudomonas sp. CBS3(Markus *et al.* 1986; Schweizer *et al.* 1987)는 Fig. 1에서와 같이 벤젠의 개환과정이 일어나기 전에 4-chlorophenylacetate (4CPA)를 3,4-dihydroxyphenylacetate로 변환시킨다. 이 과정은 reductase (35 kDa)와 dioxygenase (114 kDa)의 2-component enzyme system에 의해 촉매되며 2개의 산소원자가 수산기로 삽입되면서 동시에 탈염소화가 일어난다. Reductase는 monomer로서 NADH로부터 dioxygenase로 전자를 전달하는 기능을 한다. Homotrimeric iron-sulfur protein인 dioxygenase는 3개의 Rieske-type iron-sulfur cluster와 mononuclear iron center로 구성되어 있다. Mononuclear iron에 의해 iron-sulfur cluster로부터 전자가 산소분자로 전달되어 iron-peroxo complex로서 활성화된 dioxygenase가 4CPA에 작용하여 dihydroxylated product를 생성한다.

Romanov와 Hausinger (1994)는 *Pseudomonas aeruginosa* 142가 *ortho*-halobenzoate 1,2-dioxygenase에 의한 oxygenolytic dechlorination과정을 거쳐 2-chlorobenzoate를 분해한다고 보고하였다. 3개의 component로

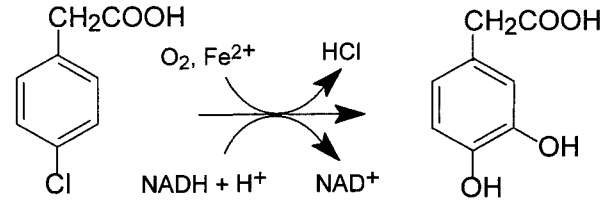


Fig. 1. Oxygenolytic dechlorination of 4-chlorophenylacetate (4CPA) to 3,4-dihydroxyphenylacetate catalyzed by 3,4-dioxygenase of *Pseudomonas* sp. CBS3

구성된 dioxygenase는 NADH-dependent ferredoxin reductase로부터 ferredoxin을 거쳐 dioxygenase의 terminal component로 전자를 전달한다. 이 과정에서 2CBA는 decarboxylation되는 동시에 catechol로 탈염소화 된다. 3-chlorobenzoate (3CBA)에 대한 탈염소화 반응은 혐기적 조건에서의 reductive dechlorination이 많이 알려져 있다(Mohn & Tiedje 1992). 그러나 호기적 조건에서의 탈염소화 기작도 *Alcaligenes* sp. strain BR60을 통해 보고되었다(Nakatsu & Wyndham 1993). BR60 균주의 3CBA dioxygenase는 3CBA의 3,4번 위치를 산화시켜 oxygenolytic dechlorination에 의해 protocatechuate를 생성하거나 4,5번 위치에 반응하여 5-chloroprotocatechuate를 생성하는 2가지의 효소반응 기작을 보인다. 따라서 이 효소를 3CBA 3,4-/4,5-dioxygenase라고 명명한다.

Monooxygenase에 의한 탈염소화 반응은 pentachlorophenol (PCP)를 분해하는 *Arthrobacter* sp. strain ATCC 33790(Schenk *et al.* 1990)과 *Flavobacterium* sp. strain ATCC 39723(Xun *et al.* 1992a)에서 보고되었다. PCP는 Fig. 2에서 처럼 PCP 4-monoxygenase에 의해 산소분자가 삽입되면서 수산화되어 tetrachloro-*p*-hydroquinone으로 변환된다. 이 효소는 monomer로서 NADPH-dependent flavoprotein으로 밝혀졌다.

Reductive dechlorination

Reductive dechlorination은 2개의 전자가 전달되면서 염소이온이 수소이온에 의해 치환되는 과정이다. 대부분 혐기성환경에서 일어나는 이 과정은 분해 초기과정에서 PCBs, hexachlorobenzene 등과 같은 다염화 방향족화합물들을 염소치환기의 수가 적은 화합물로 전환시키는데 관여하지만, 호기성 조건에서도 reductive dechlorination이 보고되었다. Coryneform strain NTB-1과 *Corynebacterium sepeidonicum* KZ-4는 2,4-dichlorobenzoate (2,4-DCBA)를 reductive *ortho* dechlorination시켜 분해

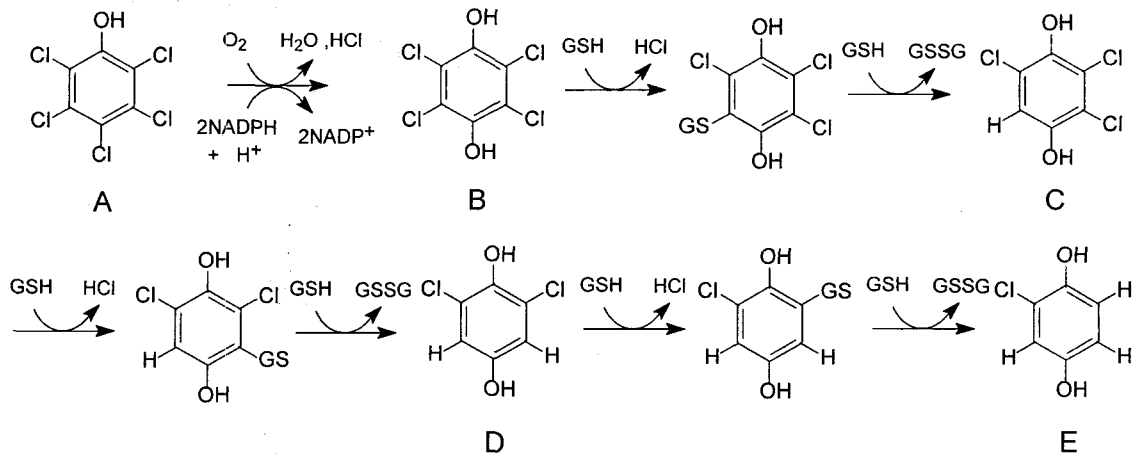


Fig. 2. Degradation of pentachlorophenol (PCP) by *Flavobacterium* sp. strain ATCC 39723 via oxygenolytic (A to B) and reductive (B to E) dechlorination. A. PCP; B. tetrachloro-*p*-hydroquinone; C. 2,3,6-trichloro-*p*-hydroquinone; D. 2,6-dichloro-*p*-hydroquinone; E. 2-chloro-*p*-hydroquinone; GSH, glutathione.

한다 (Romanov & Hausinger 1996; van den Tweel *et al.* 1987; Zaisev *et al.* 1991). 이 과정은 Mg^{2+} , ATP, coenzyme A가 cofactor로 작용하는 NADPH-dependent 반응이며 중간대사산물인 2,4-dichlorobenzoyl CoA로부터 4-chlorobenzoyl CoA로 reductive dechlorination된다.

절대 호기성세균인 *Flavobacterium* sp. strain ATCC 39723은 PCP를 oxygenolytic dechlorination과 reductive dechlorination에 의해 분해한다. Monooxygenase에 의한 분해 대사산물인 tetrachloro-*p*-hydroquinone은 glutathione *S*-transferase (GST)에 의해 3개의 염소가 수소이온으로 치환되면서 2,3,6-trichloro-*p*-hydroquinone, 2,6-dichloro-*p*-hydroquinone, 2-chloro-*p*-hydroquinone로 전환된다 (Fig. 2). 이 탈염소화 과정에 관여하는 GST는 reducing agent로 glutathione을 사용하며 electrophilic carbon site에 작용하는 30 kDa의 단위체로 구성된 homodimer이다 (Orser *et al.* 1993; Xun *et al.* 1992b).

Hydrolytic dechlorination

Hydrolytic dechlorination은 화학적으로 강알칼리 조건에서 nucleophilic substitution에 의해 일어나므로 자연계에서는 화학반응이 쉽게 일어나지 않는다. 따라서 미생물과 효소에 의한 반응이 초점의 대상이 되었다 (Thiele *et al.* 1987). Halidohydrolase-type dehalogenase에 의해 촉매되는 hydrolytic dechlorination에서는 염소 이온의 위치에 치환되는 수산기가 산소분자 대신 물분자로부터 유래된다. 따라서 reductive dechlorination과 함께 호기성 조건과 혐기성 조건 모두에서 나타날 수 있는 기작이다.

Hydrolytic dechlorination은 4-chlorobiphenyl (4CB)를 포함한 PCBs와 제초제인 bidisin의 중간 대사산물로서 알려져 있는 4CBA의 분해기작에서 가장 많이 연구가 되어있으며 (Löffler *et al.* 1991; Thiele *et al.* 1987) 4CBA를 탄소원과 에너지원으로 이용할 수 있는 *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, 그리고 *Pseudomonas* 등의 균주들이 자연체로부터 분리되었다. 이들은 Fig. 3에서와 같이 몰로부터 공급된 수산기가 4CBA-CoA ligase, 4CBA-CoA dehalogenase, 그리고 4HBA-CoA thioesterase에 의해 염소이온과 치환되며 cofactor로서 coenzyme A, ATP, Mg^{2+} 이온이 필요하다는 것이 밝혀졌다 (Chang *et al.* 1992; Löffler *et al.* 1991; Scholten *et al.* 1991).

Dechlorination after ring-cleavage

염소치환기의 spontaneous elimination은 호기적 조건에서 여러 종류의 염화 방향족화합물들이 분해될 때, 개환과정 후에 나타나는 분해 기작이다. Chlorobenzoate, chlorobenzene, chloroaniline, chlorophenol, chlorophenoxyacetate 등은 대표적인 중간 대사산물로서 chlorocatechol을 거쳐 분해되며 이 화합물로부터 생성되는 개환산물은 구조적 불안정성 때문에 염소 치환기가 떨어져 나간다.

Pseudomonas sp. strain B13 (Schmidt & Knackmuss 1980)은 Fig. 4에서와 같이 비특이적 산화반응을 거쳐 3-chlorobenzoate를 3-, 4-chlorocatechol로 변환시킨다. 그리고 *ortho*-cleavage 산물인 2-, 3-chloro-*cis*-*muconate*가 lactonization되면서 탈염소화 된다.

제초제인 2,4-dichlorophenoxyacetate (2,4-D)도 개

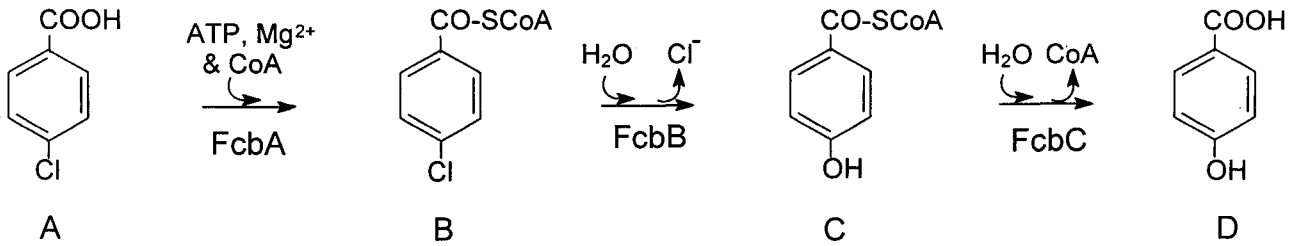


Fig. 3. Hydrolytic dechlorination of 4-chlorobenzoate (4CBA) to 4-hydroxybenzoate (4HBA) by *Pseudomonas* sp. DJ-12, *Pseudomonas* sp. CBS3, *Arthrobacter* sp. SU and *Arthrobacter* sp. TM1. A, 4CBA; B, 4-chlorobenzoyl CoA; C, 4-hydroxybenzoyl CoA; D, 4HBA; FcbA, 4CBA-CoA ligase; FcbB, 4CBA-CoA dehalogenase; FcbC, 4HBA-CoA thioesterase.

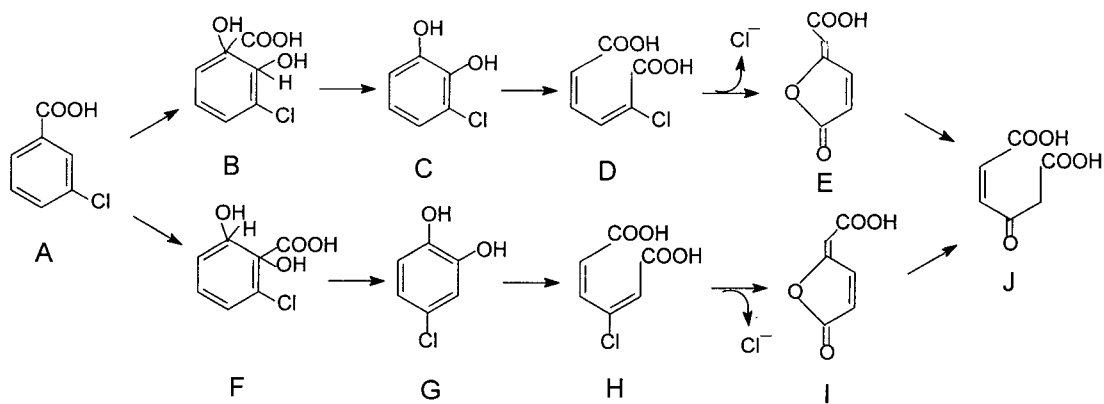


Fig. 4. Dechlorination after ring-cleavage of 3-chlorobenzoate in *Pseudomonas* sp. B13. A, 3-chlorobenzoate; B, 3-chloro-3,5-cyclohexadiene 1,2-diol-1-carboxylate; C, 3-chlorocatechol; D, 2-chloro-*cis,cis*-muconate; E, *cis*-4-carboxymethylenebut-2-en-4-olide; F, 5-chloro-3,5-cyclohexadiene 1,2-diol-1-carboxylate; G, 4-chlorocatechol; H, 3-chloro-*cis,cis*-muconate; I, *trans*-4-carboxymethylenebut-2-en-4-olide; J, maleylacetate.

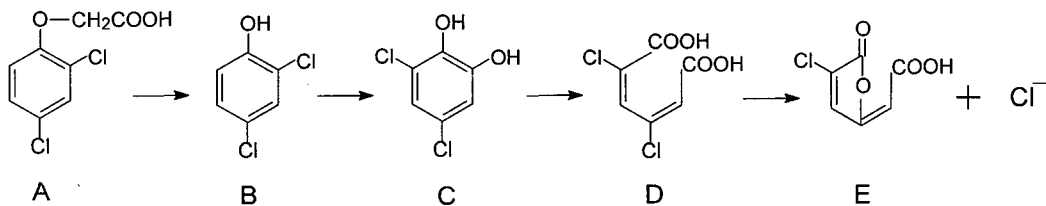


Fig. 5. Dechlorination after ring-cleavage of 2,4-dichlorophenoxyacetate in *Pseudomonas aeruginosa* PAO4032. A, 2,4-dichlorophenoxyacetate; B, 2,4-dichlorophenol; C, 3,5-dichlorocatechol; D, 2,4-dichloromuconate; E, *cis*-2-chlorodiene lactone.

환 후에 탈염소화 작용이 일어난다는 것이 *Pseudomonas aeruginosa* PAO4032 등에서 보고되었다(Kaphammer *et al.* 1990). 2,4-D는 monooxygenase와 hydroxylase의 촉매작용에 의해 2,4-dichlorophenol과 3,5-dichlorocatechol로 변형된다. 그리고 Fig. 5와 같이 chlorocatechol 1,2-dioxygenase에 의해 개환이 된 2,4-dichloromuconate가 cyclisomerase에 의해 lactone 화합물이 형성되면서 동시에 탈염소화가 일어난다.

탈염소화 유전자의 분자생물학적 연구

미생물들은 자연환경에서 염화 방향족화합물을 비롯하여 여러가지 새로운 xenobiotic 화합물을 접하게 되면 환경에 적응하기 위해 다른 미생물로부터 화합물의 분해에 관여하는 유전자를 형질전환이나 접합 등의 방법으로 도입받아 진화해 간다. 그리고 돌연변이를 이용한

재조합 방법에 의해 분해 유전자가 변형되며 기질에 따른 분해능이 달라지게 된다. 이와 같이 진화해 온 각종 분해미생물들의 유전자들은 DNA 유사성에 따라 그 효소의 기능도 매우 유사하다는 것이 알려져 있다.

4-Chlorobenzoate (4CBA)의 hydrolytic dechlorination에는 위에서 언급한 바와 같이 4CBA-CoA ligase (*fcba*), 4CBA-CoA dehalogenase (*fcbb*), 그리고 4HBA-CoA thioesterase (*fcbc*)가 관여한다. 이들 *fcba* 유전자는 *Pseudomonas* sp. DJ-12 (Chae *et al.* 1997), *Pseudomonas* sp. CBS3 (Savard *et al.* 1986), *Arthrobacter globiformis* KZT1 (Tsoi *et al.* 1991), *Arthrobacter* sp. strain SU와 TM1 (Schmitz *et al.* 1992)으로부터 클로닝되었으며 유전자의 발현이 4CBA에 의해 유도된다는 것이 CBS3와 SU균주에서 밝혀졌다.

이 유전자군의 전체 염기서열은 CBS3, SU, TM1균주로부터 밝혀졌으며 DJ-12로부터 *fcbb* 유전자의 염기서열이 보고되었다. *fcba*와 B 유전자는 *Pseudomonas* sp.와 *Arthrobacter* sp. 사이에서 45~85%의 아미노산 유사성을 보였으나 *fcbc* 유전자는 유사성이 나타나지 않았다. 또한 유전자 구조에 있어서도 Fig. 6에서 처럼 DJ-12와 CBS3균주는 B-A-C의 순서로 배열되어 있는 반면, SU와 TM1은 A-B-C의 유전자 순서를 가진 하나의 operon으로 구성되어 있다 (Chae *et al.* 1998). 이와 같은 결과는 두 종간의 탈염소화 유전자가 서로 다르게 진화되었다고 볼 수 있다.

2,4-D에 대한 분해유전자는 전이 특성을 가지고 있는 플라스미드에 존재하며 다양한 분해능을 가지는 재조합 균주인 Genetically Engineered Microorganisms (GEMs)를 개발하는 연구에 있어서 표준모델로 많이 사용되었다. 이 유전자군은 *Pseudomonas cepacia* CSV90 (Bhat *et al.* 1994), *Flavobacterium* (Chaudry & Huang 1988), *Alcaligenes paradoxus*, *Alcaligenes eutrophus* (Don & Pemberton 1981; 최근 *Ralstonia eutropha*로 학명이 변경되었음) 등에서 보고되었으며 *Alcaligenes eutrophus* JMP134로부터 분리된 pJP4에 대한 연구가 가장 많이 되었다. 이 플라스미드에 존재하는 분해 유전자군은 2,4-D로부터 2-chloromaleylacetate로 분해하는데 관여하는 *tfdABCDEF*와 조절유전자인 *tfdR*과 *tfdS*로 구성되어 있다. Chlorocatechol 1,2-dioxygenase, chloromuconate cycloisomerase, chlorodiene lactone isomerase, chlorodiene lactone hydrolase를 암호화하는 *tfdCDEF* 유전자는 *tfdR*에 의해 조절받으며 2,4-D dichlorophenol hydroxylase를 암호화하는 *tfdB* 유전자는 *tfdS*에 의해 조절받는다 (Kaphammer *et al.* 1990; Kaphammer & Olsen 1990). 이들이 암호화하고 있는 효소들

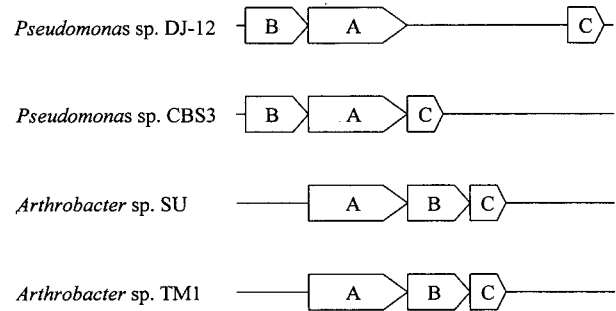


Fig. 6. Organization of the genes responsible for hydrolytic dechlorination of 4CBA. A, 4CBA-CoA ligase; B, 4-CBA-CoA dehalogenase; C, 4-HBA-CoA thioesterase

의 촉매작용에 의해 방향족 구조의 개환이 일어나며 lactone 구조가 형성되면서 염소이온이 떨어져 나오게 된다.

2-Chlorobenzoate (2CBA)의 oxygenolytic dechlorination에 관여하는 2-halobenzoate 1,2-dioxygenase는 2개의 효소로 구성되어 있으며 2개의 수산기를 치환시키면서 탈염소화 시키고 catechol을 형성하게 한다. 2개의 dioxygenase 단위체와 NADH: acceptor reductase로 구성된 dioxygenase를 암호화하는 *cbdABC* 유전자가 *Pseudomonas cepacia* 2CBS로부터 클로닝되어 염기서열이 밝혀졌다 (Haak *et al.* 1995). *cbdABC* 유전자는 *Acinetobacter calcoaceticus*의 benzoate 1,2-dioxygenase와 *Pseudomonas putida* mt-2의 toluate 1,2-dioxygenase를 암호화하는 *benABC*, *xyLXYZ* 유전자와 높은 상동성을 보였다. 이 두 유전자군도 산소분자를 화합물에 삽입시켜 2개의 수산기를 치환시키는 기능을 한다. 따라서 이들 유전자들은 공통의 유전자로부터 진화해오면서 기질에 대한 특이성을 가지게 된 것으로 판단된다.

탈염소화 유전자에 관한 연구는 최근에 활발하게 이루어지고 있지만 몇가지 한정된 기질에 대해서만 보고되고 있으며 혐기적 조건에서 이루어지는 reductive dechlorination에 관여하는 유전자에 대한 연구는 아직까지 보고되지 않았다. 위와 같이 탈염소화를 포함한 염화 방향족화합물의 분해에 관여하는 유전자의 구조와 발현기작을 규명하는 것은 각종 오염물질의 기질 특이성을 증가시키고 분해능이 향상된 균주를 개발하는데 꼭 필요한 선행연구라고 할 수 있다.

미생물에 의한 염화 방향족화합물의 분해

미생물에 의한 염소화 방향족화합물의 분해에 있어서 문제점은 화합물 자체의 난분해 특성 뿐만 아니라 중간

대사산물이 축적될 수 있다는 것이다. 축적된 산물들은 미생물에 독성 또는 항생제 기능을 함으로서 생물학적 분해처리를 저해하므로 중간 대사산물의 축적없이 화합물을 완전 분해하는 것이 미생물학적 분해처리의 과제가 되었다(Blasco *et al.* 1997).

재조합 균주를 이용한 처리

미생물마다 분해할 수 있는 기질 특이성은 차이가 있으며 같은 기질이라도 그 분해경로가 다르다. 따라서 분해할 수 있는 기질이 다른 균주들의 혼합배양이나 분자생물학적 방법에 의해 여러기질에 대한 분해능이 증가되거나 분해경로를 재조합한 균주(GEMs)를 제조하여 생물학적 분해에 이용하는 방법이 대두되고 있다.

Adriaens 등(1989)은 4, 4'-dichlorobiphenyl (4, 4'-DCB)의 분해를 위해 4, 4'-DCB로부터 중간 대사산물인 4CBA로 분해할 수 있는 *Acinetobacter* sp. P6와 4CBA 분해균주인 *Acinetobacter* sp. 4CB1을 혼합배양시켰다. 그 결과 중간 대사산물인 4CBA의 축적없이 4, 4'-DCBA가 분해되었다. 그리고 접합방법에 의해 재조합된 균주들을 이용하여 Aroclor 1221 (Havel & Reineke 1993), 3-chlorobiphenyl (Mokross *et al.* 1990)을 분해하였다는 연구보고들이 있다.

3-Chlorobenzoate (3CBA)를 탈염소화시켜 분해하는 *Pseudomonas* sp. B13은 기질특이성이 좁은 benzoate-1, 2-dioxygenase로 인해 4CBA와 3, 5-dichlorobenzoate (3, 5-DCB)를 분해하지 못한다. 그러나 TOL 플라스미드에 존재하는 toluate 1, 2-dioxygenase (*xylXYZ*)는 보다 넓은 기질 특이성을 가지고 있다. 따라서 *xylXYZ* 유전자를 broad-host-range vector에 실어 B13균주로 형질전환시킴으로써 3CBA, 4CBA, 3, 5-DCB를 분해하는 재조합균주를 만들었다(Lehrbach *et al.* 1984). 그리고 Springael 등(1993)은 PCB 분해균주인 *Alcaligenes eutrophus*에 중금속내성 유전자를 도입시켜 PCB와 중금속이 오염된 지역에 사용할 수 있는 재조합균주를 제조하였다.

환경조절에 의한 처리

이미 자연생태계에 오염된 화합물들의 난분해 특성은 실험실 조건과는 다르게 미생물의 분해능 이외에 여러 요인들의 영향을 받는다(Hägglom 1992). 온도, pH, 염도, 산소량, 영양물질 등의 환경요인이 작용하며 오염된 지역의 기질농도가 분해되기에 너무 높거나 낮아 미생물에 의한 분해능을 유도하지 못할 수도 있다. 또한 포식자(protozoa 등)와 분해 미생물들과의 관계와 토양의 경우 토양입자에 기질이 흡착되어 오염물질들이 이용되지 못하기도 한다. 따라서 이런 문제점들을 해결하고 자

연환경에 오염되어 있는 염화 방향족오염물질들을 제거하기 위해서 생태계에 직접 적용하는 생물학적 분해방법들이 고안되고 있다(Timmis 1994).

Bioaugmentation은 자연생태계에 서식하는 다양한 미생물 종류 중에서 오염물질을 분해하는 균주들을 우점종으로 만들어줌으로서 자연정화가 될 수 있도록 하는 것이다. 따라서 영양분이나 유사기질(substrate analog)을 오염지역에 주입함으로써 토착 미생물들을 자극시키거나 토착미생물을 제거하고 혼합배양된 분해미생물들과 재조합균주를 접종하여 우점종을 만드는 방법이 사용된다. Hickey 등(1993)은 PCBs의 분해를 증대시키기 위해 chlorobenzoate를 분해하는 *P. aeruginosa* JB2와 *P. putida* P111, 그리고 biphenyl을 분해하는 *Pseudomonas* sp. PB133을 토양에 접종함으로써 PCBs의 분해율이 증가되었음을 보고하였다. 이와같은 토착미생물의 분해능을 자극하거나 분해미생물들의 접종을 이용한 분해방법은 미국과 유럽에서 일부 사용되고 있다(Pflug & Burton 1988; St. John & Sikes 1988).

생물체반응기 (bioreactor)를 이용한 처리

오염된 지하수나 하천, 그리고 오염된 토양을 세척한 후 배출된 물의 정화를 위해 미생물을 alginate, polyurethane, 활성탄소 등에 고정하거나 생물막(biofilm)을 이용한 생물체반응기가 고안되었다. Valo 등(1990)은 2, 4, 6-trichlorophenol, 2, 3, 4, 6-tetrachlorophenol, PCP가 섞여있는 혼합물을 분해하기 위해 polyurethane에 고정화된 *Rhodococcus*를 사용하였다. 그 결과 phenol 혼합물은 이산화탄소와 염소 이온으로 분해되었으며 4개월 이상 분해능을 유지하였다. 그리고 목재 보존재로 오염된 지하수를 처리하기 위해 *Flavobacterium*을 이용한 결과, 93,000 ppb였던 유입수의 PCP 농도가 51 ppb로 감소되었다고 Pflug와 Burton(1988)이 보고하였다.

용액상의 오염물질을 분해하는 생물체반응기는 휘발성의 오염물질을 용해시켜 분해하는 데도 사용되며 생물막을 이용하는 경우에는 독성오염물질의 농도변화에 내성을 가질 수 있다는 장점이 보고되었다(Fetzner & Lingens 1994).

결 론

유기합성 화합물들은 농업과 임업과 같은 1차 산업과 중화학공업을 비롯한 2차 산업에서 매우 유용하게 사용되어왔다. 그러나 이 물질들이 인간을 포함한 모든 생물체와 자연환경에 유해한 영향을 줌으로서 오염물질로서 인식되었으며 염화 방향족화합물은 그 피해 사례들이

보고됨에 따라 가장 큰 관심의 대상이 되었다.

환경오염을 방지하는 가장 효과적인 방법은 난분해성인 이 물질들의 사용을 규제하고 분해가 용이한 대체물질을 사용하는 것뿐만 아니라 오염된 자연환경을 정화시키는 것이다. 염화 방향족화합물은 염소 치환기에 의해 난분해성과 독성을 나타나게 된다. 따라서 이 물질들의 분해를 위해서는 미생물에 의한 탈염소화 과정이 매우 중요하다.

미생물에 의한 각종 화합물의 탈염소화 기작을 이해하기 위해서는 생화학, 생리학, 분자미생물학적으로 밝혀져야 한다. 이것은 혼합배양을 하거나 재조합균주 등을 이용한 생물학적 분해방법으로 자연환경에 오염된 물질을 제거하는 데 매우 중요한 자료가 될 것이다.

본 총설에서 언급했던 생물학적 분해에 대한 보고는 대부분이 bench-scale의 연구였으며 사용된 기질의 종류도 매우 제한적이다. 따라서 model system의 규모를 분해효율의 감소 없이 확대하고 다양한 기질특이성을 획득하게 함으로서 오염현장에 적용시키는 생물학적 분해방법이 앞으로 해결해야 할 과제일 것이다.

사 사

이 논문은 한국학술진흥재단의 학술연구비(98-015-D00215) 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Abramowicz DA (1990) Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* **10** : 241-251.
- Adriaens P, HPE Kohler, D Kohler-Staub & DD Focht (1989) Bacterial dehalogenation of chlorobenzoates and coculture biodegradation of 4, 4'-dichlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 887-892.
- Atlas RM & R Bartha (1993) Microbial interactions with xenobiotic and inorganic pollutants, pp. 383-412. *In* Microbial Ecology (3rd Ed.). The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood City.
- Bhat MA, M Tsuda, K Horiike, M Nozaki, CS Vaidyanathan & T Nakazawa (1994) Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSSV90. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 307-312.
- Blasco R, M Mallavarapu, R-M Wittich, KN Timmis & DH Pieper (1997) Evidence that formation of protoanemonin from metabolites of 4-chlorobiphenyl degradation negatively affects the survival of 4-chlorobiphenyl-cometabolizing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 427-434.
- Chae J-C & C-K Kim (1997) Dechlorination of 4-chlorobenzoate by *Pseudomonas* sp. DJ-12. *J. Microbiol.* **35** : 290-294.
- Chae J-C, K-J Ahn & C-K Kim (1998) Hydrolytic dechlorination of 4-chlorobenzoate specified by *pcbABC* of *Pseudomonas* sp. DJ-12. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8** : 692-695.
- Chang KH, PH Liang, W Beck, JD Scholten & D Dunaway-Mariano (1992) Isolation and characterization of the three polypeptide components of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. strain CBS3. *Biochemistry* **31** : 5605-5610.
- Chaudhry GR & S Chapalamadugu (1991) Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* **55** : 59-79.
- Chaudhry GR & GH Huang (1988) Isolation and characterization of a new plasmid from *Flavobacterium* sp. which carries the genes for degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetate. *J. Bacteriol.* **170** : 3897-3920.
- Don RH & JM Pemberton (1981) Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **145** : 681-686.
- Fetzner S & F Lingens (1994) Bacterial dehalogenases: Biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol. Rev.* **58** : 641-685.
- Furukawa K, K Tonomura & A Kamibayashi (1978) Effect of chlorine substitution on the biodegradability of polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **35** : 223-227.
- Furukawa K, N Tomizuka & A Kamibayashi (1979) Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **38** : 301-310.
- Haak B, S Fetzner & F Lingens (1995) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the plasmid-encoded genes for the two-component 2-halobenzoate 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas cepacia* 2CBS. *J. Bacteriol.* **177** : 667-675.
- Häggblom MM (1992) Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **103** : 29-72.
- Hardman DJ (1991) Biotransformation of halogenated compounds. *Crit. Rev. Biotechnol.* **11** : 1-40.
- Havel J & W Reineke (1993) Degradation of Aroclor 1221 in soil by a hybrid pseudomonad. *FEMS Microbiol. Lett.* **108** : 211-218.

- Hickey WJ, DB Searles & DD Focht (1993) Enhanced mineralization of polychlorinated biphenyls in soil inoculated with chlorobenzoate-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 1194–1200.
- Hooper SW, CA Pettigrew & GS Saylor (1990) Ecological fate, effects and prospects for the elimination of environmental polychlorinated biphenyls (PCBs). *Environ. Tox. Chem.* **9** : 655–667.
- Kaphammer B, JJ Kukor & RH Olsen (1990) Regulation of *tfdCDEF* by *tfdR* of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **172** : 2280–2286.
- Kaphammer B & RH Olsen (1990) Cloning and characterization of *tfdS*, the repressor-activator gene of *tfdB*, from the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid catabolic plasmid pJP4. *J. Bacteriol.* **172** : 5856–5862.
- Kim C-K, J-C Chae & J-J Han (1994) Cloning of dechlorination genes specifying biodegradation of toxic 4-chlorobiphenyl. *Kor. J. Microbiol.* **32** : 126–131.
- Lehrbach PR, J Zeyer, W Reineke, H-J Knackmuss & KN Timmis (1984) Enzyme recruitment in vitro: use of cloned genes to extend the range of haloaromatics degraded by *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol.* **158** : 1025–1032.
- Löffler F, R Müller & F Lingens (1991) Dehalogenation of 4-chlorobenzoate by 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3: an ATP/Coenzyme A dependent reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176** : 1106–1111.
- Markus A, D Krekel & F Lingens (1986) Purification and some properties of component A of the 4-chlorophenylacetate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas* species strain CBS. *J. Biol. Chem.* **261** : 12883–12888.
- Mohn WW & JM Tiedje (1992) Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Rev.* **56** : 482–507.
- Mokross H, E Schmidt & W Reineke (1990) Degradation of 3-chlorobiphenyl by in vivo constructed hybrid pseudomonads. *FEMS Microbiol. Lett.* **71** : 179–186.
- Nakatsu CH & RC Wyndham (1993) Cloning and expression of the transposable chlorobenzoate 3,4-dioxygenase genes of *Alcaligenes* sp. strain BR60. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 3625–3633.
- Orser CS, J Dutton, C Lange, P Jablonski, L Xun & M Hargis (1993) Characterization of a *Flavobacterium* glutathione S-transferase gene involved in reductive dechlorination. *J. Bacteriol.* **175** : 2640–2644.
- Pflug AD & MB Burton (1988) Remediation of multimedia contamination from the wood-preserving industry, pp. 193–201. In GS Omenn (ed.) Environmental biotechnology. Plenum Press, New York.
- Reineke W (1988) Microbial degradation of haloaromatics. *Ann. Rev. Microbiol.* **42** : 263–287.
- Romanov V & RP Hausinger (1994) *Pseudomonas aeruginosa* 142 uses a three-component *ortho*-halobenzoate 1,2-dioxygenase for metabolism of 2,4-dichloro- and 2-chlorobenzoate. *J. Bacteriol.* **176** : 3368–3374.
- Romanov V & RP Hausinger (1996) NADPH-dependent reductive *ortho* dehalogenation of 2,4-dichlorobenzoic acid in *Corynebacterium sepedonicum* KZ-4 and Coryneform bacterium strain NTB-1 via 2,4-dichlorobenzoyl coenzyme A. *J. Bacteriol.* **178** : 2656–2661.
- Savard D, L Peloquin & M Sylverstre (1986) Cloning of *Pseudomonas* sp. strain CBS3 genes specifying dehalogenation of 4-chlorobenzoate. *J. Bacteriol.* **168** : 81–85.
- Schenk T, R Müller & F Lingens (1990) Mechanism of enzymatic dehalogenation of pentachlorophenol by *Arthrobacter* sp. strain ATCC 33790. *J. Bacteriol.* **172** : 7272–7274.
- Schmidz E & HJ Knackmuss (1980) Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Conversion of chlorinated muconic acids into maleoylacetic acid. *Biochem. J.* **192** : 339–347.
- Schmitz A, KH Gartemann, J Fiedler, E Grund & R Eichenlaub (1992) Cloning and sequence of genes for dehalogenation of 4-chlorobenzoate from *Arthrobacter* sp. strain SU. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 4068–4071.
- Schweizer D, A Markus, M Seez HH Ruf & F Lingens. (1987) Purification and some properties of component B of the 4-chlorophenylacetate 3,4-dioxygenase from *Pseudomonas* species strain CBS. *J. Biol. Chem.* **262** : 9340–9346.
- Scholten JD, KH Chang, PC Babbitt, H Charest, M Sylverstre & D Dunaway-Mariano (1991) Novel enzymic hydrolytic dehalogenation of a chlorinated aromatic. *Science* **253** : 182–185.
- Sikkema J, JAM de Bont & B Poolman (1995) Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **59** : 201–222.
- Springael D, L Diels, L Hooyberghs, S Kreps & M Mergeay (1993) Construction and characterization of heavy metal-resistant haloaromatic-degrading *Alcaligenes eutrophus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 334–339.
- St. John WD & DJ Sikes (1988) Complex industrial waste sites, pp. 237–252. In GS Omenn (ed.) Environmental biotechnology. Plenum Press, New York.
- Thiele J, R Müller & F Lingens (1987) Initial characterization of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudo-*

- monas* sp. CBS3. *FEMS Microbiol. Lett.* **41** : 115-119.
- Timmis KN (1994) Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol.* **48** : 525-557.
- Tsoi TV, GM Zaitsev, EG Plotnikova, IA Kosheleva & AM Boronin (1991) Cloning and expression of the *Arthrobacter globiformis* *pcbA* gene encoding dehalogenase (4-chlorobenzoate-4-hydroxylase) in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **81** : 165-170.
- Valo RJ, MM Häggblom & MS Salkinoja-Salonen (1990) Bioremediation of chlorophenol containing simulated ground water by immobilized bacteria. *Water Res.* **24** : 253-258.
- van den Tweel WJJ, JB Kok & JAM de Bont (1987) Reductive dechlorination of 2,4-dichlorobenzoate to 4-chlorobenzoate and hydrolytic dehalogenation of 4-chloro-, 4-bromo-, and 4-iodobenzoate by *Alcaligenes denitrificans* NTB-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 810-815.
- Xun L, E Topp & CS Orser (1992a) Confirmation of oxidative dehalogenation of pentachlorophenol by a *Flavobacterium* pentachlorophenol hydroxylase. *J. Bacteriol.* **174** : 5745-5747.
- Xun L, E Topp & CS Orser (1992b) Purification and characterization of a tetrachloro-*p*-hydroquinone reductive dehalogenase from a *Flavobacterium* sp. *J. Bacteriol.* **174** : 8003-8007.
- Zaitsev GM, TV Tsoi, VG Grishenkov, EG Plotnikova & AM Boronin (1991) Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium sepedonicum* and *Pseudomonas cepacia* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **81** : 171-176.

Biodegradation of Recalcitrant Chlorinated Aromatic Compounds via Microbial Dechlorination

Jong-Chan Chae and Chi-Kyung Kim*

(Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea)

Abstract - Chlorinated aromatic compounds are one of the largest groups of environmental pollutants as a result of world-wide distribution by using them as herbicides, insecticides, fungicides, solvents, hydraulic and heat transfer fluids, plasticizers, and intermediates for chemical synthesis. Because of their toxicity, persistence, and bioaccumulation, the compounds contaminated ubiquitously in the biosphere has attracted public concerns in terms of serious influences to wild lives and a human being, such as carcinogenicity, mutagenicity, and disturbance in endocrine systems. The biological recalcitrance of the compounds is caused by the number, type, and position of the chlorine substituents as well as by their aromatic structures. In general, the carbon-halogen bonds increase the recalcitrance by increasing electronegativity of the substituent, so that the dechlorination of the compounds is focused as an important mechanism for biodegradation of chlorinated aromatics, along with the cleavage of aromatic rings. The removal of the chlorine substituents has been known as a key step for degradation of chlorinated aromatic compounds under aerobic condition. This can occur as an initial step via oxygenolytic, reductive, and hydrolytic mechanisms. The studies on the biochemistry and genetics about microbial dechlorination give us the potential informations for microbial degradation of xenobiotics contaminated in natural microcosms. Such investigations might provide biotechnological approaches to solve the environmental contamination, such as designing effective bioremediation systems using genetically engineered microorganisms. [Dechlorination, chlorinated aromatic compounds, bioremediation].