

Benzoate와 Catechol을 분해하는 *Pseudomonas putida* Z104의 분리 및 분해특성

김기필 · 김준호 · 김민욱 · 박정아 · 정원화¹ · 김치경*

충북대학교 생명과학부 환경 및 분자미생물학연구실 · 유전공학 연구소,
¹보령신약(주)

적 요 - 석유화학 공업으로부터 생산되는 방향족 탄화수소 화합물들은 여러 가지 산업과정에서 널리 활용되고 있으나, 자연계에 오염될 때에는 쉽게 분해되지 않는다는 점에서 환경 오염물질로 주목받고 있다. 방향족 탄화수소 물질의 미생물 분해는 산화반응에 의한 benzene 고리의 개환으로부터 시작되기 때문에 이 개환 작용을 갖는 미생물의 분리와 함께 그 분해 기능을 연구하는 것은 매우 중요한 일이다. 본 연구에서는 여천 화학공업단지 폐수로부터 benzoate와 catechol 등의 방향족 탄화수소에 대하여 분해능이 우수한 균주를 분리하여 생화학적 특성과 세포 지방산 분석에 의하여 동정한 결과 *Pseudomonas putida*로 밝혀졌다. 따라서 이 균주를 *Pseudomonas putida* Z104라 명명한 후, benzoate와 catechol의 분해과정을 검토하였다. *Pseudomonas putida* Z104의 catechol 분해능에 대하여 환경요소의 영향을 실험한 결과, 30°C와 pH 7.0 그리고 0.5 mM의 농도에서 왕성한 세포의 생장과 catechol의 분해능을 보였다. 그러므로 Z104 균주는 benzoate를 연속적으로 완전분해시키는 유전자를 모두 가지고 있다는 점에서 활용가치가 있는 균주라고 판단된다.

서 론

유기합성 기술에 의하여 생산되는 수많은 유독성 방향족물질들이 자연계 방출됨으로서 토양과 수계의 생태 환경이 오염되고 각종 생물체에 미치는 보건학적 문제는 심각한 사회문제로 대두되고 있다(Fogarty and Tuovinen 1991). 자연계에 오염된 이들 방향족 화합물들은 그들의 난분해 특성때문에 오랜 시간동안 생태 환경에 잔류하게 된다. 하지만 자연계에는 이 환경오염물질을 미약하게나마 분해할 수 있는 미생물들이 존재하기 때문에, 이 미생물들을 분리하여 그들의 분해능을 증폭시켜 활용한다면 이 미생물의 생분해 작용을 통하여 오염물질을 보다 경제적이며 효과적으로 처리할 수 있을 것이다(Chaudhry and Chapalamadugu 1991).

자연계에 오염된 난분해성 방향족 탄화수소에는 phenol, toluene, benzene, phenanthrene 등과 같이 벤젠고리로 구성된 화합물뿐만 아니라 이들 구조에 염소가 치

환된 화합물로 chlorophenol, PCBs, chlorobenzene 등과 같은 염소화 방향족 탄화수소 물질들이 있다. 방향족 탄화수소에 치환되어 있는 염소의 수와 위치에 따라 분해성에 차이는 있으나, 일반적으로 염소화 탄화수소는 분해가 잘 되지 않고 독성을 띄는 것이 특성이다(Reineke 1988). 방향족 탄화수소 화합물들은 미생물의 산화반응을 통한 생분해에 의하여 catechol이나 benzoate와 같은 단핵 고리 구조로 된 중간대사산물로 변환된 후, 이 대사산물은 다시 benzene 고리의 개환작용에 의하여 분해되면서 탄소원 및 에너지원으로 사용된다(Marks et al. 1984; Thiele 1987; Zylstra et al. 1989; Harayama et al. 1991; Häggblom 1992).

그러나 미생물에 의한 방향족 화합물의 생분해는 benzene 고리의 개환반응은 미생물의 종류에 따라 *extra*-diol-type dioxygenase에 의한 *meta*-cleavage 또는 *intra*-diol-type dioxygenase에 의한 *ortho*-cleavage에 기작으로 진행된다(Adriaens et al. 1989; Arensdorf and Focht 1995; Carrington et al. 1994; Löffler et al. 1991). 그러므로 미생물에 의한 방향족 탄화수소의 분해 과정에서는 catechol이나 benzoate의 개환에 의한 분해특성

* Corresponding author: Chi-Kyung Kim, Tel. 043-261-2300,
Fax. 043-264-9600, E-mail. environ@trut.chunbuk.ac.kr

을 연구하는 것이 중요하다. 이와 같은 연구를 통해 환경생명공학적인 방법으로 분해능이 우수한 미생물균주를 개발하면 오염현장에 적용할 수 있을 때 이 오염물질들은 생태계에서 탄소원으로 재활용될 수 있는 것이다.

그러므로 자연계에 존재하는 여러 가지 단핵 구조의 방향족 탄화수소 화합물에 대하여 분해능이 우수한 균주를 자연계로부터 분리하고 그들의 분해과정을 밝히는 연구는 복잡한 구조의 방향족 탄화수소 오염물질을 분해처리하기 위한 첫 단계로서 필수적이고 기초적인 연구과제이다. 이러한 배경으로 본 연구에서는 benzoate와 catechol의 단핵 방향족 탄화수소를 분해하는 균주를 분리 동정하였고 그 분해 특성을 밝혔다.

재료 및 방법

1. 균주의 분리 및 배양

전남 여수의 여천 공업단지에서 폐수가 유입되는 하천의 침전물로부터 시료를 채취하여 100 ml의 LB (Luria-Bertani) 배지 (Trypton, 10 g l⁻¹; yeast extract, 5 g l⁻¹; NaCl, 5 g l⁻¹)에 접종하여 30°C에서 24시간동안 진탕 배양하여 농화시켰다. 분해 기질로 3-chlorocatechol (3CC), 4-chlorocatechol (4CC)을 포함하여 catechol 유도체 화합물, 2-chlorobenzoate (2CBA), 3-chlorobenzoate (3CBA), 4-chlorobenzoate (4CBA)와 2, 4-dichlorobenzoate (24DCBA), 3, 4-chlorobenzoate (34DCBA)를 포함하는 benzoate 유도체 화합물, 그리고 2-chlorophenol (2CP), 3-chlorophenol (3CP), 4-chlorophenol (4CP)을 포함하는 phenol 유도체 화합물질들에 대하여 분해능을 검사하였다.

분해균주의 분리를 위해서는 MM2 최소배지 (FeSO₄ · 7H₂O, 1 μM; (NH₄)₂SO₄ · 7H₂O, 1 mM; CaCl₂ · 2H₂O, 100 μM; NaCl, 8.5 mM; 10 mM phosphate buffer; pH 7.0)에 각각의 화합물을 단일 탄소원으로 첨가하여 배양하였다. 영양배지로서는 LB 배지를 사용하였고, 고체배지에는 agar를 1.5%로 첨가하였다. 배양조건으로는 30°C의 항온기에서 150 rpm의 진탕속도를 유지하였다.

2. Biolog 검사

분리균주의 생화학적 검사는 Johnsen *et al.* (1996)의 보고에서와 같이 따라 Biolog 방법에 준해서 실시하였다. 균체를 배양한 plate와 microplate (Biolog GP Microplates, Biolog GN Microplates, Biolog YT Microplates), 그리고 saline (0.85% NaCl, pH 5.5~7.0, 20 ml) 용액을

준비하여 실시하였다. 먼저 saline 용액과 microplate를 26°C, 28~35°C에서 예열시킨 후, 접종하지 않은 tube를 사용해 turbidimeter의 투과도를 100%로 맞추어 표준 혼탁액을 만들었다. 동정할 균주를 균일한 상태로 현탁시켜 접종 농도를 맞춘 후, 균주 현탁액을 microplate에 접종하여 배양하였다. Microplate reader를 590 nm으로 맞추어 30분 정도 예열한 후 MicroLog 3 computer software를 가동하였고, MicroLog data base를 이용하여 동정하였다.

3. 주사전자현미경 관찰

분리균주를 LB 배지에서 대수기까지 성장시킨 후 균체를 회수하여 Ng *et al.* (1985)의 방법에 따라 100 mM의 인산완충액의 만든 2.5% glutaraldehyde 용액에서 2시간 동안 전고정한 후 동일 완충액 (pH 7.2)으로 1% osmium tetroxide 용액에서 3시간 동안 후고정하였다. 그리고 30%에서 95%까지의 ethanol 농도에서 15분씩 탈수시킨 후 100%에서 20분씩 2회 탈수시키고 isoamyl acetate로 치환시켜 건조시켰다. Sputter coater (IB-3, Giko Engineering Co., Japan)를 사용하여 두께가 300Å이 되도록 gold coating하여 주사전자현미경 (S-2500C, Hitachi, Japan)으로 관찰하였다.

4. 세포 지방산의 분석

세포의 지방산 분석은 각 균주를 LB 배지에서 배양한 후 균체를 회수하고 MIDI Microbial Identity System (Newark, USA)의 사용지침에 따랐다. 지방산을 회수하기 위하여 Reagent 1 (sodium hydroxide, 45 g; methanol, 150 ml; H₂O, 150 ml)을 1 ml 처리하여 100°C에서 35분간 방치한 후 냉각시켰다. 이 시료에 다시 Reagent 2 (6 N hydrochloric acid, 325 ml; methanol, 275 ml)를 2 ml 첨가하여 현탁시키고 80°C에서 1분간 열 처리를 한 후 냉각시키고 Reagent 3 (hexane, 200 ml; MPDE, 200 ml)를 1.25 ml 첨가하여 10분간 혼합시킨 후 두 층으로 분리되면 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액은 다시 Reagent 4 (sodium hydroxide, 10.8 g; H₂O, 900 ml)로 세척한 후 gas chromatography (HP6890, Hewlett Packard, Delaware, USA)로 분석하였다.

5. Growing cell assay에 의한 분해

LB 배지에서 12시간 배양한 균주를 10 mM 인산 완충액으로 3회 세척한 다음 기질이 포함된 MM2 배지에서 48시간 동안 30°C에서 진탕배양 하였다. 각 균주들의 분해능은 일정 시간별로 배양액을 채취하여 원심분리한 후 상등액에 잔류하는 화합물의 흡광도를 spectrophoto-

meter (LKB4060, Phamacia, Sweden)로 200 nm부터 500 nm까지 scanning하여 측정하였다.

6. Catechol 분해능에 미치는 환경요소의 영향

LB broth에서 12시간 배양한 후 균체를 회수하여 catechol의 분해능과 성장에 미치는 환경요소의 영향을 실험하였다. 배양온도, 배양액의 pH 및 기질 농도를 다르게 한 MM2 배지에 균주를 접종하여 배양하는 동안 일정량을 채취하여 생장에 의한 혼탁도를 600 nm에서 측정하였고, catechol 분해능은 273 nm에서 잔유기질을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 분해 균주의 분리 및 동정

각 시료로부터 catechol을 우수하게 분해하는 균주들을 분리 선발하였고, 그 중 Z104 균주에 대하여 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. Z104 균주는 그람음성균으로 oxidase, catalase 등에 양성 반응을 보이며, 최적 성장 온도는 30°C였고, 최적 pH는 7.0이었다. 이 균주의 형태를 주사전자현미경으로 관찰한 결과,



Fig. 1. Scanning electron micrograph of *Pseudomonas putida* Z104.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 막대균 형태를 나타내고 있었다.

이 균주의 동정을 위하여 지방산을 분리하여 gas chromatography로 분석한 결과는 Table 2에 나타낸 바와 같이 palmitic acid가 25.7%로 가장 높은 조성을 보였다. 이 세포 지방산 조성을 database로 분석한 결과 *Pseudomonas putida*와 97.8%의 상동성을 보였다. 그러므로 Z104 균주는 세포지방산 조성결과와 함께 생화학적 특성에 따라 *Pseudomonas putida*로 동정되었으며, *Pseudomonas putida* Z104로 명명하였다.

Table 1. Biochemical characteristics of *Pseudomonas putida* Z104

Characteristics	Reaction
Gram reaction	-
Oxidase	+
Catalase	+
β -galactosidase	-
Arginine dihydrolase	+
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	+
H ₂ S production	-
Urease production	-
Tryptophane deaminase	-
Indole production	-
VP reaction	-
Gelatin liquefaction	-
Flourescent pyoverdin	+
Growth at 4°C	-
Growth at 41°C	-
Fermentation:	
Glucose	+
Mannitol	-
Inositol	-
Sorbitol	-
Rhamnose	-
Sucrose	-
Melibiose	+
Amygdalin	-
Arabinose	-
Degradation:	
Benzoate	+++
2-Chlorobenzoate	-
3-Chlorobenzoate	-
4-Chlorobenzoate	-
2, 4-Dichlorobenzoate	-
3, 4-Dichlorobenzoate	++
Catechol	+++
3-Chlorocatechol	-
4-Chlorocatechol	-
Phenol	-
3-Chlorophenol	-
4-Chlorophenol	-

Table 2. Composition of major cellular fatty acids of *Pseudomonas Putida* Z104

Fatty acid	Content (%)
10:0 3OH	6.4
12:0	3.0
12:0 2OH	10.4
12:0 3OH	8.5
14:0	—
15:0	—
14:0 3OH/16:1 iso I	—
16:1 w7c/15:0 iso 2OH	12.5
16:0	25.7
17:0 cyclo	17.6
18:1 w7c/w9t/w12t	14.2

2. *Pseudomonas putida* Z104의 benzoate 및 catechol 분해

Pseudomonas putida Z104 균주의 benzoate 및 catechol에 대한 분해특성을 resting cell assay로 실험한 결과는 Table 1과 같다. *Pseudomonas putida* Z104는 benzoate과 catechol에 강한 분해능을 보였으며, 3,4-dihydroxybenzoate에도 분해능이 나타났다. Benzoate에 대하여 이 균주의 분해능을 농도 및 시간별로 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 1.0 mM의 benzoate에 대한 분해는 30시간 이내에 모두 분해 되었다. Fig. 3에서와 같이 Catechol은 분해된 후 380 nm에서의 대사산물이

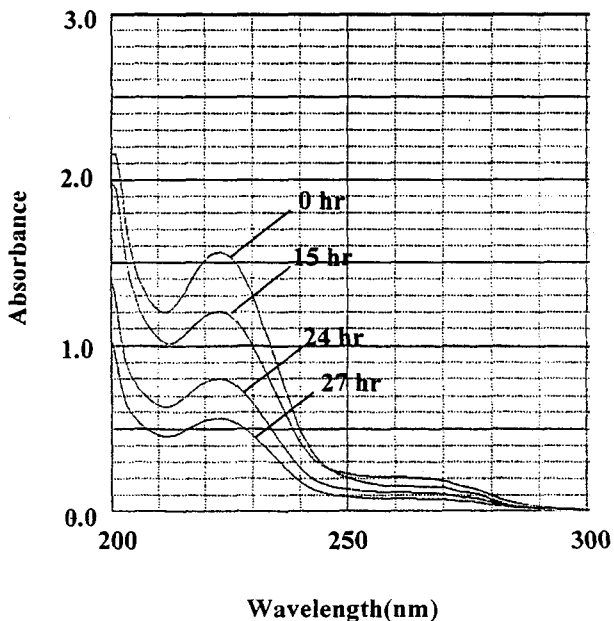


Fig. 2. Biodegradation of benzoate by *Pseudomonas putida* Z104. The degradation was assayed with resting cells in 10 mM potassium phosphate buffer containing 1 mM benzoate.

검출되지 않았다. 이는 catechol이 meta-cleavage에 의하여 분해가 이루어지는 것이 아님을 입증하는 것이다 (Neidle *et al.* 1987; Carrington *et al.* 1994). 그 반면에 265 nm에서의 흡광도를 나타내는 2-hydroxy 2,4-dienoate가 생성되는데, 이는 Seo *et al.* (1997)의 보고에서와 같이 catechol이 ortho-cleavage를 거쳐 2-hydroxy 2,4-dienoate가 생성되는 과정을 따라 분해가 이루어진다는 것을 의미하는 것이다 (Harayama *et al.* 1991). 일반적으로 catechol은 여러 가지 방향족 탄화수소로부터 생성되는 중간 대사산물이기 때문에 방향족 탄화수소 물질을 분해하는 미생물들은 catechol을 모두 분해하는 것으로 보고되어 있다 (Neidle *et al.* 1987; Harayama *et al.* 1991; Kikuchi *et al.* 1994). 따라서 *Pseudomonas putida* Z104는 benzoate를 benzoate dioxygenase에 의하여 분해할 수 있는 균주로서 Fig. 4에서 보는 바와 같이 catechol을 생산한 후 다시 catechol dioxygenase에 의하여 ortho-cleavage 과정을 거쳐 2-hydroxy-2,4-dienoate로 계속 분해하는 것으로 해석된다. 이는 benzoate를 2-hydroxy-2,4-dienoate로 연속적인 분해에 관여하는 유전자를 모두 갖고 있다는 점에서 이들의 분해 유전자와 분해효소에 대하여 더 깊이 연구 할 필요가 요구된다.

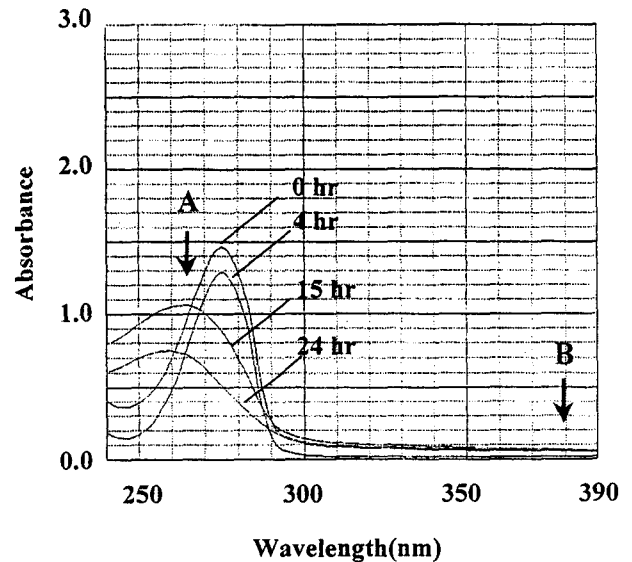


Fig. 3. Biodegradation of catechol by *Pseudomonas putida* Z104. The degradation was examined with resting cells in 10 mM potassium phosphate buffer containing 0.5 mM catechol. The arrow-marked A and B are the wavelengths for 2-hydroxy 2,4-dienoate and 2-hydroxy muconic semialdehyde to be absorbed.

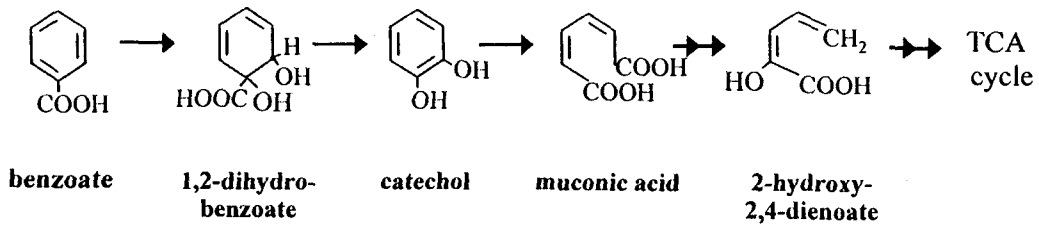


Fig. 4. A proposed pathway for benzoate and catechol degradation by *Pseudomonas putida* Z104.

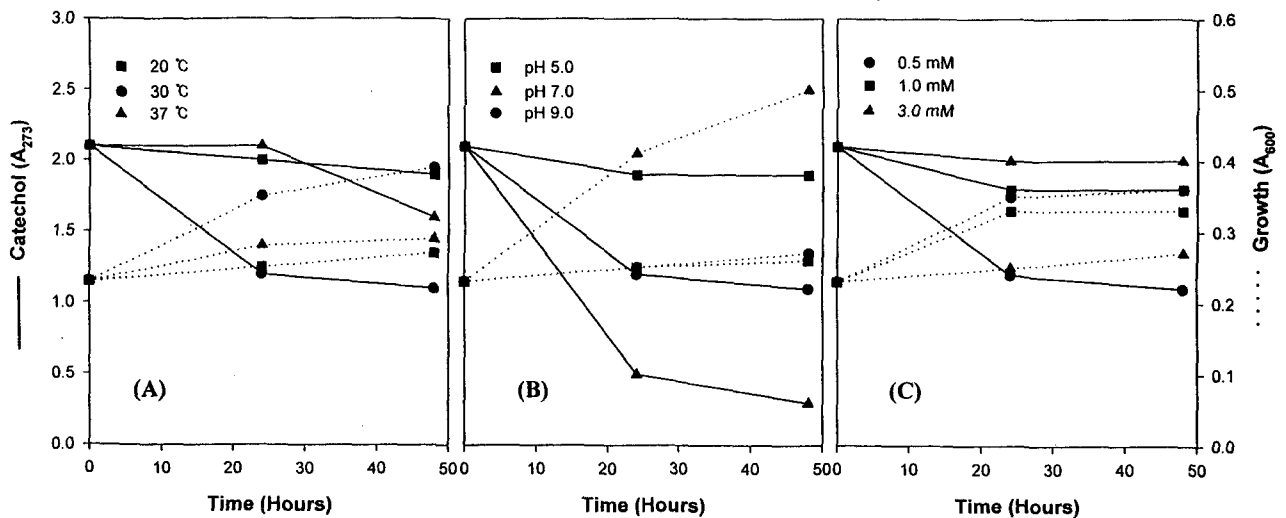


Fig. 5. Effects of environmental factors on growth and degradation by *Pseudomonas putida* Z104. A, temperatures; B, pH; C, catechol concentration.

3. Catechol의 분해에 대한 환경요소의 영향

Pseudomonas putida Z104의 catechol 분해에 미치는 환경요소의 영향을 배양온도, pH 그리고 기질의 농도에 따라 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. *Pseudomonas putida* Z104는 30°C의 온도에서 가장 왕성한 성장을 보였으며, catechol에 대한 분해능 또한 가장 높았다. 균주의 동정 결과에서 나타난 것처럼 *Pseudomonas putida* Z104의 경우 41°C의 온도에서는 성장하지 못하였다. 이는 일반적으로 catechol dioxygenase 효소들이 고온으로 올라가면 효소의 활성이 감소한다는 점으로 볼 때 37°C에서 성장과 분해능이 완만해졌다고 해석된다. 이 효소는 일반적으로 pH에도 민감한 것으로 보고 되어있듯이 (Kim *et al.* 1997) pH 7.0에서 그 활성이 가장 높았다. Catechol의 농도에 있어서 0.5 mM 가장 활발한 성장을 보였으며, 기질의 농도가 높아질수록 균주의 성장속도는 감소하였다. 이는 catechol의 분해산물인 2-hydroxy-2,4-dienoate의 분해저해작용 때문인 것으로 보고 되고있다. 이 화합물의 경우 2-hydroxy-2,4-dienoate로부터

생성된 후 화학적으로 enol-form과 keto-form (2-oxopent-3-enoate)이 존재하는데, 이 keto-form의 물질은 분해효소인 hydratase에 대하여 저항성을 지니며 이들은 균주에 의해 잘 분해되지 않는다 (Harayama *et al.* 1989). 특히 catechol의 분해능이 강한 경우 다량으로 생산되는 2-hydroxy 2,4-dienoate으로부터 2-oxopent-3-enoate의 생성도 증가되는 것으로 보고되어 있다.

사 사

본 연구는 충북대학교 지방대학특성화 사업중 제 3차 산학협력 연구과제(99R-L-7)의 연구비로 수행되었으며, 시험균주의 세포 지방산을 분석해주신 생명공학연구소의 배경숙 박사님과 이문수님의 배려와 수고에 대하여 감사드립니다.

참 고 문 헌

Adriaens P, HPE Kohler, D Kohler-Staub and DD Focht.

1989. Bacterial dehalogenation of chlorobenzoates and coculture biodegradation of 4, 4'-dichlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:887-892.
- Arensdorf JJ and DD Focht. 1995. A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:443-447.
- Carrington B, A Lowe, LE Shaw and PA Williams. 1994. The lower pathway operon for benzoate catabolism in biphenyl-utilizing *Pseudomonas* sp. strain IC and the nucleotide sequence of the *bphE* gene catechol 2, 3-dioxygenase. *Microbiology* 140:499-508.
- Chaudhry GR and S Chapalamadugu. 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* 55:59-79.
- Fogarty AM and OH Tuovinen. 1991. Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. *Microbiol. Rev.* 55:225-233.
- Hägglöf MM. 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 103:29-72.
- Harayama S, M Rekik, A Bairoch, EL Neidle and LN Ornston. 1991. Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *acinetobacte calcoaceticus* chromosomal *benABC* and *Pseudomonas putida* TOL pWW0 plasmid *xylXYZ*, genes encoding benzoate dioxygenases. *J. Bacteriol.* 173:7540-7548.
- Harayama S, M Rekik, K Ngai and LN Ornston. 1989. Physically associated enzymes produce and metabolize 2-hydroxy-2, 4-dienoate, a chemically unstable intermediate formed in catechol metabolism via meta cleavage in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 171:6251-6258.
- Johnsen K, S Andersen and CS Jacobsen. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas biovars*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3818-3825.
- Kikuchi Y, Y Yasukochi, Y Nagata and M Fukuda. 1994. Nucleotide sequence and functional analysis of the meta-cleavage pathway involved in biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. strain KKS102. *J. Bacteriol.* 176:4269-4276.
- Kim KP, DI Seo, KH Min, JO Ka, Y K Park and CK Kim. 1997. Characteristics of Catechol 2, 3-dioxygenase produced by 4-chlorobenzoate degrading *Pseudomonas* sp S-47. *J. Microbiol.* 35:295-299.
- Löffler F, R M Iler and F Lingens. 1991. Dehalogenation of 4-chlorobenzoate by 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3: an ATP/coenzyme A dependent reaction. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 176:1106-1111.
- Marks TS, ARW Smith and AV Quirk. 1984. Degradation of 4-chlorobenzoic acid by *Arthrobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:1020-1025.
- Neidle EL, MK Shapiro and N Ornston. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation. *J. Bacteriol.* 169:5496-5503.
- Ng LK, R Sherburne, DE Taylor and ME Stiles. 1985. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *J. Bacteriol.* 164:338-343.
- Reineke W. 1988. Microbial degradation of haloaromatics. *Ann. Rev. Microbiol.* 42:263-287.
- Seo DI, JY Lim, YC Kim, KH Min and CK Kim. 1997. Isolation of *Pseudomonas* sp. S-47 and its degradation of 4-chlorobenzoic acid. *J. Microbiol.* 35:188-192.
- Thiele J, R Müller and F Lingens. 1987. Initial characterization of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* sp. CBS3. *FEMS Microbiol. Lett.* 41:115-119.
- Zylstra GJ, RH Olsen and DP Ballou. 1989. Cloning, expression, and regulation of the *Pseudomonas cepacia* protocatechuate 3, 4-dioxygenase genes. *J. Bacteriol.* 171:5907-5914.

Isolation of *Pseudomonas putida* Z104 and Degradation Characteristics of Benzoate and Catechol

Ki-Pil Kim, Jun-Ho Kim, Min-Ok Kim, Jung-A Park, Won-Hwa Jeong¹ and Chi-Kyung Kim*

Lab. of Environmental and Molecular Microbiology, School of Biological Sciences, and Research Institute of Genetic Engineering, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, and ¹Boryung Biopharma Co., Ltd, Jinchon-kun 365-830 Korea

Abstract - Aromatic hydrocarbons are known to be recalcitrant, so that they have been concerned as pollutant chemicals. Microorganisms play a major role in the breakdown and mineralization of these compounds. However, the kinetics of the biodegradation process may be much slower than desired from environmental consideration. The biodegradation of aromatic hydrocarbons is conducted by oxidation to produce catechol as a common intermediate which is metabolized for carbon and energy sources. In this study, a bacterial isolate capable of degrading several aromatic hydrocarbons was isolated from the contaminated wastewater of Yecheon industrial complex. On the basis of biochemical characteristics and major cellular fatty acids, the

isolate was identified as *Pseudomonas putida* Z104. The strain Z104 can utilize benzoate and catechol as the sole carbon and energy sources via a serial degradative pathway. The strain degraded actively 0.5 mM catechol in MM2 medium at pH 7.0 and 30°C.

Key words : *Pseudomonas putida* Z101, benzoate, catechol, degradation, identification

(2000년 5월 22일 접수, 2000년 7월 14일 채택)