

폐광지역에서 분리한 quinoline 분해 세균인 *Pseudomonas* sp. NFQ-1의 특성연구

윤경하 · 황선영 · 권오성 · †오계헌
순천향대학교 자연과학대학 생명과학부
(접수 : 2003. 3. 15., 게재승인 : 2003. 6. 25.)

Characterization of the Quinoline-Degrading Bacterium, *Pseudomonas* sp. NFQ-1 Isolated from Dead Coal Pit Areas

Kyung-Ha Yoon, Seon-Young Hwang, O-Sung Kwon and Kye-Heon Oht
Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O. Box 97, Asan, Chungnam 336-600, Korea
(Received : 2003. 3. 15., Accepted : 2003. 6. 25.)

The bacterium NFQ-1 capable of utilizing quinoline (2,3-benzopyridine) as the sole source of carbon, nitrogen and energy was enriched and isolated from soil samples of dead coal pit areas. Strain NFQ-1 was identified as *Pseudomonas nitroreducens* NFQ-1 by BIOLOG system, and assigned to *Pseudomonas* sp. NFQ-1. *Pseudomonas* sp. NFQ-1 was used with the concentration range of 1 to 10 mM quinoline. Strain NFQ-1 could degrade 2.5 mM quinoline within 9 hours of incubation. Initial pH 8.0 in the culture was reduced to 6.8, and eventually 7.0 as the incubation was proceeding. 2-Hydroxyquinoline, the first intermediate of the degradative pathway, accumulated transiently in the growth medium. The highest concentration of quinoline (15 mM) in this work inhibited cell growth and quinoline degradation. *Pseudomonas* sp. NFQ-1 was able to utilize various quinoline derivatives and aromatic compounds including 2-hydroxyquinoline, *p*-comaric acid, benzoic acid, *p*-cresol, *p*-hydroxybenzoate, protocatechuic acid, and catechol. The specific activity of catechol oxygenases was determined to approximately 184.7 unit/mg for catechol 1,2-dioxygenase and 33.19 unit/mg for catechol 2,3-dioxygenase, respectively. As the result, it showed that strain NFQ-1 degraded quinoline via mainly *ortho*-cleavage pathway, and in partial *meta*-cleavage pathway.

Key Words : Quinoline, *Pseudomonas* sp. NFQ-1, 2-hydroxyquinoline, catechol dioxygenases

서론

N-헤테로고리화합물인 quinoline(2, 3-benzopyridine)은 콜 타르(coal tar), 원유, 그리고 bone oil 등에 포함되어 있는 화합물로서(1, 2), 약제합성, 살충제, 그리고 여러 합성 화합물의 제조를 위한 화학공업에서 용매와 중간물로서 널리 사용되어 왔다(3). 일부 quinoline의 유도체인 5-hydroxyquinoline, 4-methylquinoline, 5-nitroquinolinol, quinaldic acid, quinuronium 들은 항말라리아 (anti-malaria), 항아메바성 (anti-amoebic), 항구균성 (anticoccidal) 그리고 항진균성 (antifungal)의 활성을 갖는 것으로 알려져 있으며(4), 특히 quinuronium은 소에 기생하는 바베시아 원충을 치료하는데 이용되고 있다. 그러나

quinoline의 경우 생태계에서 독성을 갖는 것으로 알려져 있으며, 동물과 미생물에 대하여 암과 돌연변이를 유발시키는 것으로 보고되어 있다(3, 5-10). 또한 quinoline과 그 관련 유도체들은 토양에 유출되었을 경우에 높은 수용성과 잠재적 이동성으로 인하여 지하수를 오염시키는 것이 보고된 바 있다(8, 11-13).

Quinoline을 미생물학적 방법으로 제거하려는 연구가 진행되어왔다(14-16). 미생물을 이용하는 대부분의 연구는 quinoline 분해하는 미생물을 토양과 폐수에서 분리·동정하고, 그의 생물학적 특성과 분해경로를 밝히는데 집중되었다(15-18). 몇몇의 연구자들은 호기성과 혐기성의 조건 아래에서 quinoline의 미생물학적 전환 또는 분해가 일어난다는 것을 증명하였다. Quinoline을 분해하는 세균은 대표적인 미생물로서 *Pseudomonas* 종이 알려져 있으며, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Moraxella*, 그리고 *Desulfobacterium* 등도 quinoline을 분해하는 세균으로 보고되었다(14-15, 18-20). Grant 등(1)은 quinoline을 유일 탄소원 및 질소원, 그리고 에너지원으로 이용하는 세균을 토양으로부터 분리하였으며, 이 세균을 이

† Corresponding Author : Department of Life Science, Soonchunhyang University, P. O. Box 97, Asan, Chungnam 336-600, Korea

Tel : +82-41-530-1353 Fax : +82-41-530-1350

E-mail : kyeheon@sch.ac.kr

용하여 quinoline 전환의 첫 단계에는 헤테로방향족 고리의 2번째 위치에서 하이드록시화(hydroxylation)가 일어나는 것을 밝혔다. Shukla 등(21)은 quinoline 분해에서 나타나는 두 개의 경로에 대해 연구하여, 양쪽의 경로가 모두 2-hydroxyquinoline을 형성하는 것을 밝혔으며, 하나의 경로는 2-hydroxyquinoline을 거쳐 2, 6-dihydroxyquinoline을 형성하고, 또 다른 경로는 2-hydroxyquinoline을 거친 후에 2, 8-dihydroxyquinoline과 8-hydroxycoumarin을 형성한다는 것을 확인하였다. Quinoline은 환경오염원으로서 많은 문제의 원인이 되고 있으나 이의 효율적인 제거에 대한 연구는 여전히 미진한 상태에 있다.

본 연구에서는 폐광지역으로부터 농화배양 기법을 이용하여 quinoline의 분해능이 탁월한 세균인 *Pseudomonas* sp. NFQ-1를 분리하고 동정하였으며, 이 세균의 quinoline 분해능을 조사하였다. Quinoline 유도체와 방향족 화합물에 대한 분리 세균의 다양한 기질 이용 능력을 조사하였다. 또한 분해 세균 NFQ-1의 quinoline 분해경로를 알아보기 위하여 catechol dioxygenases를 분리하여 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

분해세균의 농화배양 및 분리

충남 보령에 위치하는 석탄 폐광지역으로부터 채취한 10 g의 토양을 250 ml Erlenmeyer flask에 넣고 100 ml의 B-배지에서 7일간 배양하여 quinoline을 분해하는 미생물 컨소시엄을 확보하였다. 사용된 B-배지는 증류수 1 L에 0.79 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0.2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.02 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g NaCl, 그리고 1 ml 미량원소 혼합액이 포함되어 있으며(17), 여기에 대상 기질로서 유일 탄소원 및 질소원으로 2.5 mM quinoline (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하였다. 미량원소 혼합액은 증류수 1 L에 0.5 g H_3PO_4 , 0.04 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.1 g KI, 0.2 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0.4 g $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.4 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 0.1 g biotin, 0.03 g vitamin B_{12} 를 포함하며 최종 pH는 7.2였다. 미생물컨소시엄은 10^7 까지 집진 희석하여 100 μ l의 희석배양액을 B-고체배지(2% agar)에 접종하여 30°C에서 7일간 배양한 후 고체 배지 상에 나타난 3개의 집락을 순수 분리하였으며 이 가운데 quinoline의 분해능이 탁월한 균주 NFQ-1을 선별하여 본 연구에 사용하였다.

분리 균주의 동정은 여러 가지 생리생화학적 시험과 GN2 MicroPlate™ (Biolog, Hayward, CA, USA, Identification System)을 이용한 조사를 실시하였으며, Bergey's Manual of Systemic Bacteriology(22)를 토대로 하여 동정하였다.

Quinoline 분해 측정

배양액에 존재하는 quinoline과 분해 중간대사 산물인 2-hydroxyquinoline의 농도는 HPLC로 측정하였다. HPLC 시스템은 SPD-10A UV/vis detector가 부착된 Shimadzu사의 LC 10AT 제품을 사용하였다. 컬럼은 Waters사의 μ -Bondapak (C_{18} -reverse phase, particle size 10 μ m) column (3.9 x 300 mm)을 사용하였고, UV-detector 254 nm에서 분석하였다. 이동상(mobile-phase) 용매는 HPLC용 methanol (Fisher

Scientific Co., USA)과 HPLC용 water (Fisher Scientific Co., USA)를 각각 70%와 30%의 비율로 혼합하여 사용하였으며 HPLC 내로의 이동상 용매 flow rate는 1.0 ml/min 이었다.

분리 세균의 기질 이용 특이성조사

분리세균의 quinoline 이외의 다른 기질 이용 특이성을 알아보기 위해서 여러 가지 quinoline 유도체와 유사한 방향족 고리화합물에서 대한 분해능을 조사하였다. 고리 내에 질소를 포함하는 화합물의 분해는 별도의 부가 질소원이 첨가되지 않은 채로 수행되었으며, 질소를 포함하지 않는 화합물은 질소원으로 7.6 mM의 $(NH_4)_2SO_4$ 를 첨가하였다. B-배지에 여러 가지 quinoline 유도체와 방향족 고리화합물을 1 mM의 동일한 농도로 첨가하여 실시하였고, 48시간 진탕 배양한 후, 균주의 생장을 측정하였다.

Catechol dioxygenase의 활성 측정

Catechol 1, 2-dioxygenase의 활성 측정은 Nakazawa(23) 등의 방법에 따라 분리세균의 crude extract를 조효소로 사용하여 260 nm에서 측정하였다. 또한 catechol 2, 3-dioxygenase의 활성은 Nozaki(24)의 방법에 따라 crude extract를 조효소로 하여 375 nm에서 측정하였다. 효소 1 U는 실온에서 반응액의 흡광도의 증가치를 측정하여 분당 catechol 1 μ M를 산화하는데 이용된 효소의 양으로 정하였으며, specific activity는 단백질 mg당 U로 표시하였다. 시료는 Lowry 방법(25)으로 단백질 정량을 실시하였으며, bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 정량 기준 곡선을 만들어 측정에 사용하였다.

결과 및 고찰

분해 균주의 분리 및 동정

Quinoline을 유일한 탄소원과 질소원, 그리고 에너지원으로 이용하는 단일 균주 NFQ-1이 농화 배양 기법으로 분리되었다. 분해세균 NFQ-1은 9시간 이내에 배양액 내의 quinoline을 완전 분해하였다.

분리 균주 NFQ-1은 그람음성의 호기성 간균으로 운동성을 나타내었다. 분리 세균은 GN2 MicroPlate™ (Biolog, Inc., Hayward, CA, USA)에 접종하여 다양한 기질의 이용 여부를 확인한 결과를 통하여 동정을 실시하였다(Table 1). Biolog 시험 결과에서 분리 균주 NFQ-1는 *Pseudomonas nitroreducens*로 동정되었으며, 본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. NFQ-1으로 명명하였다.

분리세균의 분해와 성장

B-배지에서 균주 NFQ-1의 성장 및 Quinoline의 분해, 그리고 배양기간 중의 pH 변화와 분해중간대사 산물인 2-hydroxyquinoline의 변화 등을 관찰하였다(Fig. 1). 배지 내의 quinoline 초기 농도는 2.5 mM이었고, 초기 pH는 8.0이었다. 배양 6시간에서 9시간까지 분해세균의 급격한 성장과 quinoline의 감소를 나타내었으며, 배양 9시간에 quinoline을 완전 분해하였다. 배지 내의 pH는 초기 8에서 서서히 6.8까지 감소하다가 배양 10시간에는 7.0으로 약간의 증가를 나타내었다. Quinoline의 분해중간대사 산물인 2-hydroxyquinoline

은 배양 초기에 생성되기 시작하여 배양 7시간에 최대로 증가하였다가 급격히 감소되어 배양 10시간에는 사라졌다. 배양기간 중에 2-hydroxyquinoline의 일시적인 생성과 감소는 이 대사물질이 화학적으로 가지는 특성과 분해중간대사물질로서 세균에 의해 쉽게 이용되기 때문으로 사료된다. 또한 성장 배지내의 NH₄⁺이 계속 증가하는 것으로 나타났다. 이것으로 보아 quinoline의 heterocyclic ring이 깨지면서 고리(ring)에 있던 질소가 유리되어 축적되는 것으로 보여진다(1).

Table 1. Physiological and Biological characterization of the isolate NFQ-1 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests		Physiological & biochemical tests	
Water	-	p-hydroxy phenylacetic acid	-
α-cyclodextrin	-	Itaconic acid	+
Dextrin	-	α-keto butyric acid	v
Glycogen	-	α-keto glutaric acid	+
Tween 40	+	α-keto valeric acid	-
Tween 80	+	D,L-lactic acid	+
N-acetyl-D-galactosamine	-	Malonic acid	-
N-acetyl-D-glucosamine	-	Propionic acid	v
Adonitol	-	Quinic acid	+
L-arabinose	-	D-saccharic acid	-
D-arabitol	-	Sebacic acid	v
Cellobiose	-	Succinic acid	+
i-erythritol	-	Bromo succinic acid	+
D-fructose	v	Succinamic acid	-
L-fucose	-	Glucuronamide	-
D-galactose	-	L-alaninamide	v
Gentiobiose	-	D-alanine	+
α-D-glucose	+	L-alanine	+
m-Inositol	-	L-alanyl-glycine	v
α-D-lactose	-	L-asparagine	+
Lactulose	-	L-aspartic acid	+
Maltose	-	L-glutamic acid	+
D-mannitol	-	Glycyl-L-aspartic acid	-
D-mannose	-	Glycyl-L-glutamic acid	-
D-melibiose	-	L-histidine	-
β-methyl D-glucoside	-	Hydroxy-L-proline	+
D- Psicose	-	L-leucine	-
D-raffinose	-	L-ornithine	v
L-Rhamnose	-	L-phenylalanine	-
D-Sorbitol	-	L-proline	+
Sucrose	-	L-pyrogutamic acid	-
D-trehalose	-	D-serine	-
Turanose	-	L-serine	+
Xylitol	-	L-threonine	v
Methylpyruvate	+	D,L-carnitine	+
Mono-methylsuccinate	+	γ-aminobutyric acid	+
Acetic acid	+	Urocanic acid	+
Cis-aconitic acid	+	Inosine	-
Citric acid	-	Uridine	-
Formic acid	v	Thymidine	-
D-galactonic acid lactone	-	Phenylethylamine	-
D-galacturonic acid	-	Putrescine	+
D-gluconic acid	+	2-aminoethanol	+
D-glucosaminic acid	-	2,3-buthanediol	-
D-glucuronic acid	-	Glycerol	-
α-hydroxybutyric acid	v	D,L-α-glycerolphosphate	-
β-hydroxybutyric acid	+	Glucose-1-phosphate	-
γ-hydroxybutyric acid	-	Glucose-6-phosphate	-

* Symbols : + ; Positive, - ; Negative

** Abbreviation : V ; variable

Quinoline 농도와 pH에 따른 분해효과

Quinoline의 농도에 따른 균주의 성장과 분해를 측정하기 위하여 B-배지에 quinoline을 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 그리고 15 mM의 농도로 각각 첨가하여 균주를 배양하였다. 1 mM과 2.5 mM의 quinoline 농도에서는 각각 6시간과 9시간 내에 quinoline을 완전히 분해하였으며, 5 mM의 quinoline 농도에서는 12시간 내에 quinoline을 완전히 분해하였다. 또한 10 mM의 quinoline은 20시간에 완전히 분해하였으나, 15 mM에서는 생장이 완전히 억제되었다(Fig. 2). Quinoline의 농도에 따른 균주의 성장 유도기는 배지 내에 주어진 quinoline 농도에 비례하여 길어졌고, 이와 더불어 균의 성장과 기질의 분해가 지연되었으며, 일반적으로 알려진 농약이나 폭약 등을 포함하는 여러 가지 방향족 화합물들이 미생물에 대하여 나타내는 독성효과와 마찬가지로 quinoline

의 농도가 15 mM 이상에서 독성으로 인하여 균주의 생장이 억제되는 것으로 나타났다.

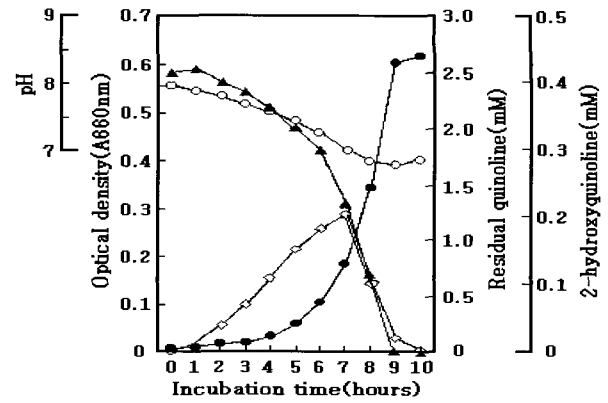


Figure 1. Cell growth (●) of *Pseudomonas* sp. NFQ-1 and degradation (▲) of quinoline, and the associated changes of residual 2-hydroxyquinoline (◇) and pH (○).

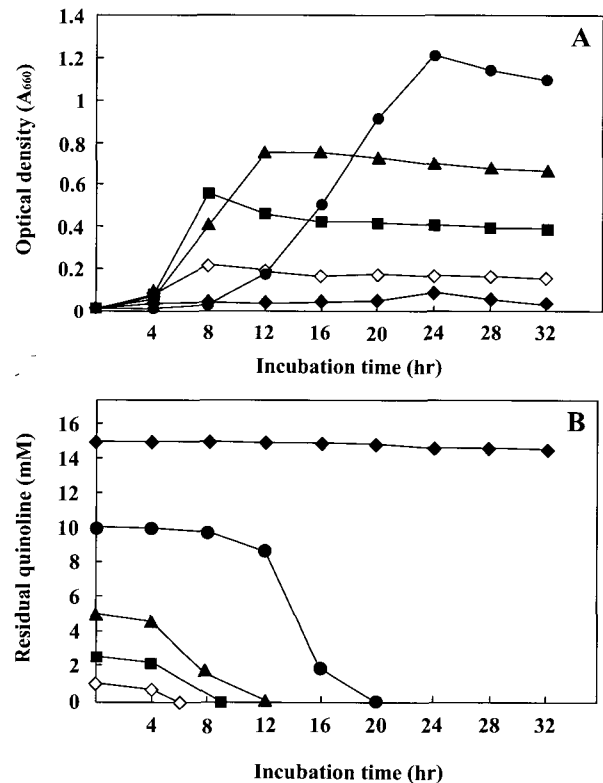


Figure 2. Growth (A) of test culture, *Pseudomonas* sp. NFQ-1, and degradation (B) of quinoline. The media contained 1 mM (◇), 2.5 mM (■), 5 mM (▲), 10 mM (●) and 15 mM (◆) quinoline as a target substrate, respectively.

이와 같은 결과로 미루어 볼 때 일정 농도의 quinoline은 균주 NFQ-1의 탄소원과 질소원 그리고 에너지원으로 효과적으로 이용될 수 있으나, 높은 농도의 quinoline은 균주에 독성을 나타내어 성장과 분해능을 억제하는 것으로 사료된다

(16, 26). Quinoline을 포함하는 배지에서 균주 NFQ-1의 생장과 quinoline의 분해에 pH가 미치는 영향에 대하여 조사하였다 (Fig. 3). 균주 NFQ-1은 pH 7-9 사이에서 빠르게 성장하였으며, quinoline의 분해도 왕성한 것으로 나타났다. 이 범위의 pH에서 quinoline은 9시간 이내에 완전히 분해되었다. 배지의 pH가 6 이하이거나 10 이상에서는 부분적으로 분해되거나 거의 분해가 이루어지지 않았다. 초기 균주 NFQ-1을 분리하기 위하여 사용된 토양표본의 pH는 8 내외의 약알칼리성의 토양이었기 때문에 본 연구에서 얻어진 quinoline 분해를 위한 최적의 pH는 이와 동일한 것으로 판단된다.

Table 2. Utilization of quinoline derivatives and aromatic compounds by *Pseudomonas* sp. NFQ-1

Quinoline derivatives and aromatic compounds	Utilization
2-Hydroxyquinoline	+
6-Hydroxyquinoline	-
8-Hydroxyquinoline	-
<i>p</i> -Coumaric acid ^a	+
Coumarin ^a	-
Indoline	-
Pyridine	-
Lepidine	-
Quinaldine	-
4-Hydroxycoumarin ^a	-
Benzene ^a	-
<i>p</i> -Hydroxybenzoate ^a	+
Catechol ^a	+
Protocatechuic acid ^a	+
Phenol ^a	-
Phthalate ^a	-
<i>p</i> -Cresol ^a	+
Salicylic acid ^a	-

^a With the absence of N-functional group(s) of the compound, 7.6 mM (NH₄)₂SO₄ was added as N-source. + : Utilization, - : No utilization

Quinoline 유도체 및 방향족 화합물의 분해능

분해세균 NFQ-1의 quinoline 유도체 및 방향족 화합물에 대한 분해능을 조사한 결과가 Table 2에 나타나 있다. 균주 NFQ-1은 2-hydroxyquinoline과 *p*-coumaric acid와 같은 N-heterocycle 화합물, 그리고 N-hetep-hydroxybenzoate, catechol, protocatechuic acid와 같은 방향족 화합물에 대해서 분해능을 보여주었다. 그러나 N-heterocyclic 화합물 중 quinaldine, pyridine, lepidine, indoline 6-hydroxyquinoline, 그리고 8-hydroxyquinoline과, o-heterocyclic 유도체인 coumarin과 4-hydroxycoumarin, 그리고 방향족 화합물인 salicylic acid와 phthalate에서는 분해가 일어나지 않았다. 지금까지 대부분의 연구에서 quinoline과 2-hydroxyquinoline은 동시에 분해되는 것이 보고되어왔다(1, 14, 17). Blaschke(15) 등이 분리한 *Rhodococcus* sp.는 quinoline과 quinoline 유도체인 2-carboxylquinoline, 3-carboxylquinoline, 2-hydroxyquinoline, 4-hydroxyquinoline, 그리고 2-methylquinoline을 분해하였다. *Nocardia* sp.는 quinoline, pyridine, 2- and 3-methylpyridine, 그리고 2, 6-dimethylpyridine을 분해하는 것으로 보고된 바 있다(27). Quinoline을 분해하는 세균의 기질특이성에 대한 정

보가 제한되어 있지만, 일반적으로 quinoline을 분해하는 대부분의 세균은 2-hydroxyquinoline을 분해하는 것으로 보고되었다(1, 14, 16-17). 본 연구에서 분리된 분해세균 NFQ-1은 quinoline과 2-hydroxyquinoline 뿐만 아니라 지금까지 보고된 발표에서 나타난 것보다 다양한 기질에 대하여 분해능을 가지는 것으로 밝혀졌다.

Table 3. Catechol oxygenase activity in cell free extracts of *Pseudomonas* sp. NFQ-1 grown on quinoline

Enzyme	Activity ^a (U)	Specific activity (U/mg protein)
Catechol 1,2-dioxygenase(C1,2O)	22.38	184.70
Catechol 2,3-dioxygenase(C2,3O)	3.95	33.19

^a One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount which produced 1 μmole of *cis, cis*-muconate(C1, 2O) and 2-hydroxymuconic semialdehyde (C2, 3O) per min at 24°C

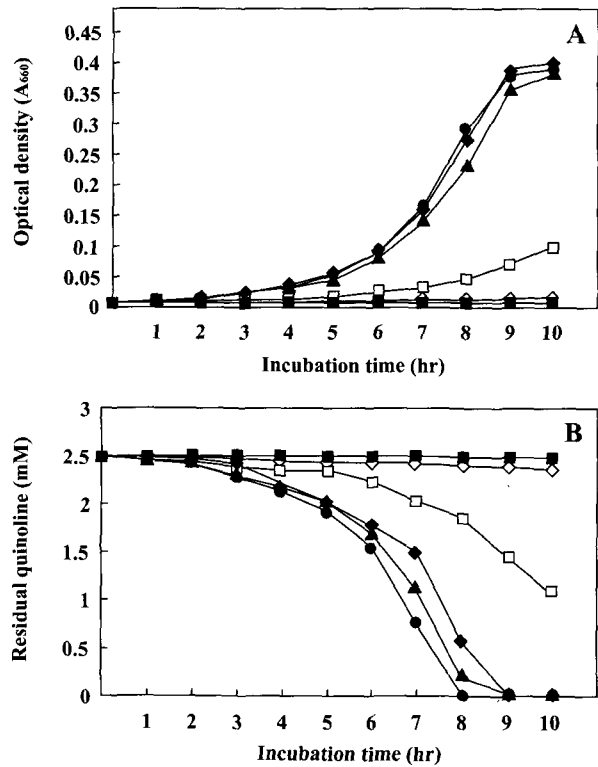


Figure 3. Growth (A) of the test culture, *Pseudomonas* sp. NFQ-1 and degradation of quinoline. (B). The cultures were adjusted to pH 5.0 (◇), 6.0 (□), 7.0 (▲), 8.0 (●), 9.0 (◆), or 10.0 (■), respectively.

Catechol dioxygenases 활성 측정

분해균주의 세포추출물을 조효소로 사용하여 catechol oxygenases 활성을 조사한 결과, catechol 1, 2-dioxygenase 활성과 catechol 2, 3-dioxygenase 활성을 모두 가지고 있는 것으로 확인되었다(Table 3). Catechol 1, 2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase의 specific activity는 각각 184.7 U/mg와 33.19 U/mg으로 나타났다. 여기에서 나타난 결과에서 보여주는 바와 같이 catechol 1, 2-dioxygenase의 specific

activity가 catechol 2, 3-dioxygenase의 specific activity보다 훨씬 높게 측정된 것은 quinoline의 생분해에서 중간대사 물질인 catechol의 분해는 주로 *ortho*-분해경로를 통하여 분해되는 것으로 보여진다. 본 연구에서는 quinoline 분해에서 *meta*-분해경로에 관여하는 catechol 2, 3-dioxygenase의 specific activity는 낮게 측정되었으나, 부분적으로 이 분해경로를 통하여 이루어지는 것으로 사료되며, 이러한 사실을 확인하기 위해서는 분해에서 생성되는 중간대사 물질들에 대한 GC-MS나 NMR 분석이 수행되어야 할 것이다. 본 연구에 사용된 균주 NFQ-1이 quinoline을 분해하는데 있어서 제안되는 *ortho*- 및 *meta*-분해경로는 Fig. 4에 보여주고 있다.

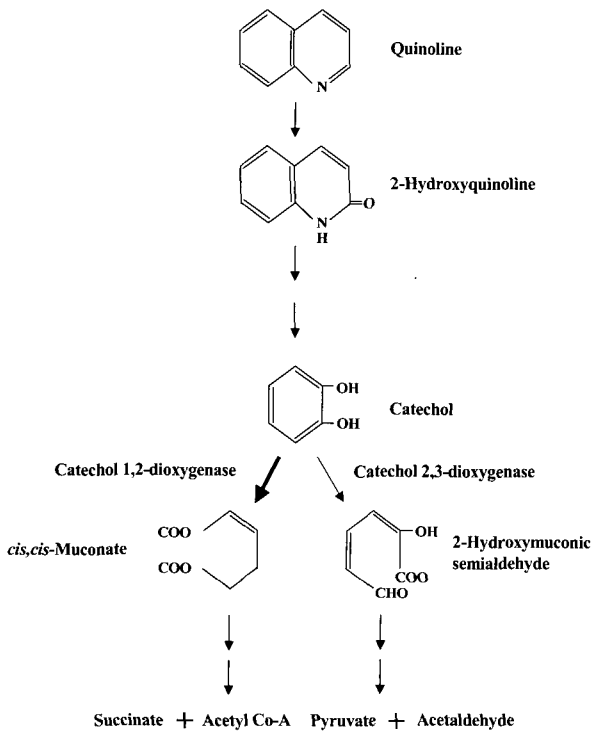


Figure 4. Hypothetical degradative pathways of quinoline by *Pseudomonas* sp. NFQ-1.

Quinoline은 다양한 산업에서 널리 사용되는 화학물질이지만 환경오염원으로서 많은 주목을 받아왔다. 특히 토양에 유출되었을 경우에 높은 수용성과 잠재적 이동성으로 인하여 지하수를 오염시키며 이것이 생물체에 축적되어 독성을 나타냄으로서 건강상의 문제를 일으키는 것으로 알려져 있다(8, 11). 따라서 quinoline을 효율적으로 제거할 수 있는 균주의 발굴과 이를 이용한 미생물학적 제거에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다. 본 연구를 통하여 폐광지역으로부터 분리된 quinoline을 분해하는 세균 NFQ-1은 대상 기질로서 고농도의 quinoline에 대하여 짧은 배양기간 중에 효과적인 분해능을 나타내었으며, 더욱이 quinoline 이외의 관련 유도체 및 방향족 화합물들에 대하여도 높은 분해능을 나타내기 때문에 이들 화합물과 동시에 노출된 지역에서도 분해에 영향을 받지 않고 효율적으로 제거가 이루어질 수 있을 것으로 사료된다. Quinoline 분해 경로를 규명하기 위한 catechol dioxygenases의 specific activity를 조사한 결과는 catechol

1,2-dioxygenase와 catechol 2, 3-dioxygenase의 두 효소를 동시에 가지고 있어 지금까지 quinoline 분해세균에서 보고된 이들 효소와 관련하여 독특한 것으로 생각된다. 향후 연구는 여기에서 얻어진 결과를 바탕으로 분리 세균 NFQ-1을 이용한 quinoline의 효율적 분해를 scale-up하여 적용하는 연구와 단일균주에 의한 *ortho*-와 *meta*-분해경로의 switch-on 및 switch-off와 관련하여 진행될 것이다.

요약

폐광지역으로부터 quinoline (2, 3-benzopyridine)을 유일한 탄소원, 질소원, 그리고 에너지원으로 이용하는 세균 NFQ-1을 농화 배양기법을 통하여 분리하였다. 분리된 세균은 그람 음성의 간균으로서 BIOLOG 시험을 통하여 *Pseudomonas nitroreducens*로 동정되었으며, 본 연구에서는 *Pseudomonas* sp. NFQ-1으로 명명하였다. Quinoline의 분해는 호기적 조건하의 B-배지에서 *Pseudomonas* sp. NFQ-1를 이용하여 실시되었다. 균주 NFQ-1 세균은 2.5 mM quinoline을 9시간 이내 완전히 분해하였다. 배양기간 동안 quinoline 분해의 중간대사산물인 2-hydroxyquinoline이 일시적으로 생성되었다가 배양기간 후반부에 사라졌다. 배양의 초기 pH 8.0은 6.8로 감소하다가 배양이 진행됨에 따라 7.0이 되었다. 대상 기질로서 quinoline의 농도가 증가함에 따라 생장곡선에서 유도기가 길어졌으며, 고농도의 quinoline (>15 mM)은 주어진 조건에서 균주의 생장과 quinoline의 분해를 억제하였다. 부가 질소원으로 7.6 mM (NH₄)₂SO₄의 첨가조건하에서 *Pseudomonas* sp. NFQ-1은 2-hydroxyquinoline, *p*-coumaric acid, benzoic acid, *p*-cresol, *p*-hydroxybenzoate, protocatechuic acid, catechol 등의 다양한 화합물을 이용할 수 있었으나 일부 화합물들 (예, 6-hydroxyquinoline, 8-hydroxyquinoline, coumarin, indoline, pyridine, lepidine, quinaldine, 4-hydroxycoumarin, benzene, salicylic acid, phenol, phthalate)은 탄소원으로 이용되지 못하였다. Quinoline의 분해경로를 규명하기 위하여 catechol dioxygenases의 specific activity를 결정하였다. 그 값은 catechol 1,2-dioxygenase에서 약 184.7 U/mg, 그리고 catechol 1,2-dioxygenase에서 약 33.19 U/mg이었다. 그 결과 균주 NFQ-1은 quinoline를 분해하기 위하여 주로 *ortho*-분해경로를, 그리고 부분적으로 *meta*-분해경로를 이용하는 것을 보여주었다.

감사

본 연구는 2000년도 순천향대학교 대학자체 학술연구조성비 지원 (과제번호: 2000-0045)에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Grant, D. J. W. and T. R. Al Najjar (1976), Degradation of quinoline by a soil bacterium, *Microbios* **15**, 1977-1989.
- Grunden, M. J. (1979), Quinoline alkaloids related to anthranilic acid. Academic Press, Inc., New York.
- Reinhardt, C. F. and M. R. Brittel (1981), Heterocyclic and miscellaneous nitrogen compounds, In *Patty's Industrial Hygiene and*

- Toxicology Vol. 11A*, G. D. Clayton and F. E. Clayton, Eds., p2761-2763, John Wiley & Sons, Inc., New York.
4. Sims, G. K., L. E. Sommers, and A. Konopka (1986), Degradation of pyridine by *Micrococcus luteus* isolated from soil, *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 963-968.
 5. Hirao, K., Y. Shinohara, H. Tsuda, S. Fukushima, M. Takahashi, and N. Ito (1976), Carcinogenic activity of quinoline in rat liver, *Cancer Res.* **36**, 329-335.
 6. Matsumoto, T., D. Yoshida, M. Mizusaki, H. Tomita, and K. Koshinizu (1978), Structural requirements for mutagenic activity of nitrogen-heterocyclic bases in *S. typhimurium* test, *Agr. Biol. Chem.* **42**, 861-864.
 7. Matsuoka, A., M. Hayashi, and M. J. Ishidate (1979), Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mixture *in vitro*, *Mutat. Res.* **66**, 277-290.
 8. Schmelz, T. W., M. Casina-Quezada, and J. N. Doumont (1980), Structure toxicity relationship of selected nitrogen heterocyclic compounds, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **9**, 591-598.
 9. Tada, M., K. Takahashi, Y. Kawazoe, and N. Ito (1980), Binding of quinoline to nucleic acid in a subcellular microsomal system, *Chem. Biol. Interact.* **29**, 257-266.
 10. Talcott, R., M. Hollstein, and E. Wei (1976), Mutagenicity of 8-hydroxyquinoline and related compounds in the *Salmonella typhimurium* bioassay, *Biochem. Pharmacol.* **25**, 1323-1328.
 11. Godsy, E. M., D. F. Goerlitz, and D. Grbic-Galic (1992), Methanogenic biodegradation of creosote contaminants in natural and simulated ground-water ecosystems, *Ground Water* **30**, 232-242.
 12. Leenheer, J. A. and H. A. Stuber (1981), Migration through soil of organic solutes in an oil-shale process water, *Environ. Sci. Technol.* **15**, 1467-1475.
 13. Pereira, W. E., C. E. Rostad, T. J. Leiker, D. M. Updegraff, and J. L. Bennett (1985), Investigations of organic contaminants derived from wood-treatment processes in a sand and gravel aquifer near Pensacola, Florida. U.S. Geological Survey Water-Supply Paper 2290. U.S. Geological Survey, Denver, Co.
 14. Aislabie, J., A. K. Bej, H. Hurst, S. Othenburger, and R. M. Atlas (1990), Microbial degradation of quinoline and methylquinolines, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 345-351.
 15. Blaschke, M., Kretzer, A., Schafer, C., Nagel, M., and J. R. Andreesen (1991), Molybdenum-dependent degradation of quinoline by *Pseudomonas putida* Chin IK and other aerobic bacteria, *Arch. Microbiol.* **16**, 155-169.
 16. O'Loughlin, E. J., S. R. Kehmeyer, and G. K. Sims (1996), Isolation, characterization, and substrate utilization of a quinoline-degradation bacterium, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **38**, 107-118.
 17. Schwarz, G., E. Senghas, A. Erben, B. Schafer, F. Lingens, and H. Hoke (1988), Microbial metabolism of quinoline and related compounds I. Isolation and characterization of quinoline-degrading bacteria. System, *Appl. Microbiol.* **10**, 185-190.
 18. Schwarz, G., R. Bauder, M. Speer, T.O. Rommel, and F. Lingens (1989), Microbial metabolism of quinoline and related compounds. II. Degradation of quinoline by *Pseudomonas fluorescens* 3, *Pseudomonas putida* 86 and *Rhodococcus spec.* B1, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370**, 1183-1189.
 19. Shukla, O. P. (1986), Microbial transformation of quinoline by a *Pseudomonas* sp., *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1332-1342.
 20. Miehlung, R., V. Hecht, and W. D. Deckwer (1993), Microbial degradation of quinoline: Kinetic studies with *Comamonas acidovorans* DSM 6426, *Biotech. Bioeng.* **42**, 589-595.
 21. Shukla, O. P. (1987), Microbial transformation and biodegradation of quinoline : Isolation and characterization of quinoline-degrading bacteria and identification of early intermediates, *Biol. Memoirs.* **13**, 115-131.
 22. Krieg, N. R. and J. G. Holt (1984), *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology*, 1. The William & Willkins Co., Baltimore.
 23. Nakazawa, T. and A. Nakazawa (1970), Pyrocatechase (*Pseudomonas*), p518, *Methods in Enzymology 17A*, Academic Press, New York.
 24. Nozaki, M. (1970), Metapyrocatechase (*Pseudomonas*), p522, *Methods in Enzymology 17A*, Academic Press, New York.
 25. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951), The original method, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 26. Inou, A. and K. Horikoshi (1991), Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter log P, *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 194-196.
 27. Pandey, R. A. and S. Sandhya (1991), Degradation of heterocyclic bases 24 by mix *Nocardia* sp. isolation from soil, *J. Environ. Sci. Health Part A.* **26**, 1081-1103.