Korean Journal of Microbiology (2014) Vol. 50, No. 1, pp. 67-72
DOI http://dx.doi.org/10.7845/kjm.2014.4009
Copyright ⓒ 2014, The Microbiological Society of Korea

| 보 문 |

니코틴 분해세균 *Arthrobacter* sp. NU11과 NU15의 분리 및 특성

정연주 · 오지성 · 노동현*

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Isolation and Characterization of Nicotine-Degrading Bacterium *Arthrobacter* sp. NU11 and NU15

Yeonju Jeong, Ji-Sung Oh, and Dong-Hyun Roh*

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

(Received February 5, 2014 / Accepted March 13, 2014)

Minimal broth containing nicotine as a sole carbon source (MB/N) was used to isolate novel nicotine-degrading bacterial strains from tobacco plants and field soils. Comparative analysis of 16S rRNA gene sequence, phenotypic test and morphological tests showed that the position of these isolates were in the genus *Arthrobacter* of the family *Micrococcaceae*. The highest 16S rRNA gene sequence similarity of the isolate NU11 and NU15 to type strains in the genus *Arthrobacter* were *Arthrobacter equi* (98.2%) which was presumably a novel strain and *Arthrobacter nicotinovorans* (99.8%), respectively. Both strain NU11 and NU15 showed rod shaped, Gram-positive characteristics and catalase activity, but did not show oxidase activity. The novel strain NU11 was found to degrade efficiently nicotine in MB/N medium by the analysis of UV absorption spectra and could be used as an organism in bioremediation technique.

***Keywords*:** *Arthrobacter* sp. characterization, nicotine degrading bacteria

담배(*Nicotiana tabacum*)에는 구조적으로 비슷한 여러 종류의 알칼로이드들(alkaloids)이 존재하며, 이들은 담배의 품질 및 유용성에 기여하는 것으로 널리 알려져 있다(Andersen *et al*., 1991). 현재까지 알려진 저 분자량의 질소-함유 염기화합물인 알칼로이드의 화학구조는 12,000여 종에 달하며, 식물에서 terpenoid 다음으로 다양한 것으로 알려져 있다(Croteau *et al*., 2000). 담배는 알칼로이드 20여 종을 포함하고 있으며, 90% 정도를 차지하는 주요 알칼로이드가 nicotine (3-{[2S]-1-methylpyrrolidin-2-yl}pyridine)이며(Jeffrey and Eoff, 1955), 담배 건조중량의 약 0.6−3.0%을 차지한다(Armstrong *et al*., 1998).

니코틴 생합성은 가지과(*Solanaceae*) 작물에서 약리학적 활성을 가진 tropane 알칼로이드와 같은 진화학적 기원을 가지고 있으며, 염기성 아미노산인 arginine이나 이의 분해산물인 ornithine에서 putrescine을 중간체로 하여 만들어 진다(Katoh *et al*., 2005). 니코틴의 최종합성은 nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) salvage 경로 내 중간체와 ornitinine과 putrescine을 경유하여 유도된 methylpyrrolinium cation과의 축합에 의해 만들어 진다. 따라서 니코틴은 pyrrolidine ring과 pyridine ring으로 구성되고 뿌리에서 합성되어 xylem을 통하여 공기와 접촉부(aerial part)인 잎과 다른 조직의 액포(vacuole)에 축적된다(Shoji *et al*., 2000; Katoh *et al*., 2005). 이러한 니코틴은 코카인보다 강한 독성화학물질로 알려져 있으며, 쥐(rat)에 대한 LD_{50} 값이 50 mg/kg, 생쥐 (mouse)는 3 mg/kg이며, 성인에 대한 치사농도는 40−60 mg (0.5−1.0 mg/kg) 보고되어 왔으나(Okamoto *et al*., 1994; Solarino *et al*., 2010), 최근에는 성인의 치사농도가 750 mg이라는 보고도 있다(Mayer, 2014).

담배의 제조과정과 담배에 관련된 다른 활동들은 니코틴을 포함하는 많은 양의 폐기 오염물을 발생시킨다(Novotny and Zhao, 1999). 만약 이러한 오염물질들이 아무런 처리 없이 생태계로 바로 유입된다면, 그것들은 환경을 오염시킬 뿐만 아니라 인간의 건강과 생태계의 밸런스를 위태롭게 할 것이다(Chen *et al*., 2008). 따라서, 담배제품과 그것과 관련된 오염물들의 니코틴 성분을 줄이기 위해서 많은 노력이 필요하다.

미생물에 의한 니코틴 분해는 이러한 담배 오염물을 처리하는 과정에서 중요한 역할을 할 수 있다. 미생물을 사용하는 생물학적인 방법은 효율성과 비용이라는 측면에서 물리적 또는 화학적 방법 보다 선호된다. 현재까지 *Arthrobacter*와 *Pseudomonas* 속(Ruan *et al*., 2005; Wang *et al*., 2007), *Rhodococcus* 속(Gong *et al*., 2009), *Aspergillus orizae* (Meng *et al*., 2010) 등의 미생물들이 니코틴 분해에 의해 생산되는 부산물을 탄소원, 질소원, 에너지원 등으로 취하는 것으로 알려져 있다. 이외에도 *Bacillus* 속,

*For correspondence. E-mail: dhroh@chungbuk.ac.kr; Tel.: +82-43-261-3368; Fax: +82-43-264-9600

Achromobacter nicotinophagum, *Microsporum gypseum*의 세 균류와 더불어 곰팡이류도 니코틴을 분해할 수 있다고 보고되었다 (Brandsch, 2006). 니코틴 분해의 대사경로는 50여 년 전부터 두 가지의 미생물을 사용하여 연구되었다. Decker 그룹과 Rittenberg 그룹은 *Arthrobacter nicotinovorans*를 이용하였고, Wada 그룹은 *Pseudomonas* 속의 미생물을 이용하여 연구하였다 (Brandsch, 2006). 니코틴 분해의 시작은 pyridine ring (pyridine pathway, *Arthrobacter*)에서 시작되거나, pyrrolidine ring (pyrrolidine pathway, *Pseudomonas*), 또는 탈메틸화(demethylation)으로 시작된다.

본 실험에서는 담배식물과 그 재배 토양 및 담배의 잎, 줄기, 뿌리에서 니코틴을 분해하는 세균을 분리하였고, 그 중 한 균주가 *Arthrobacter* 속의 새로운 균주일 가능성이 있는 NU11을 대상으로 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

배지 및 시약

니코틴 분해 박테리아 분리를 위해 사용한 MB/N 배지는 최소배지에 미량원소와 니코틴을 각각 0.1%씩 첨가하여 만들었다. 최소배지는 1 L의 증류수에 0.3 g KH_2PO_4, 0.7 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0.3 g $(NH_4)H_2PO_4$, 0.7 g $(NH_4)_2HPO_4$, 0.1 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.05 g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$를 첨가하여 제조하였다. 미량원소는 1 L의 증류수에 3.0 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.5 g nitrilotriacetic acid, 1.0 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.0 g NaCl, 0.5 g $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 0.18 g $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.18 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.025 g $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.02 g $KAI(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, 0.01 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.01 g H_3BO_3, 0.01 g $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.3 mg $Na_2SeO_3 \cdot 5H_2O$를 첨가하여 제조하였다. 니코틴은 Alfa Aesar (A Johonson Metthey 사)의 순도 99% (S)-(-)-Nicotine을 이용하였다.

시료 채취와 니코틴 분해 박테리아의 분리

본 실험에 사용된 토양 시료는 2010년 6월에 충청북도 청주시 흥덕구 충북대학교 특용식물학과의 담배재배 하우스(36°37'49″N, 127°27'7″E)에서 채취하였다. 토양의 채취시 수분을 함유하고 있었으며, 담배 뿌리 주변토양과 담배의 잎, 줄기, 뿌리를 무균적으로 채취하여 멸균된 conical tube에 담아 운반하였다. 채취한 시료는 보관 기간 없이 바로 실험에 사용하였다.

채취한 시료들은 각각 1 g씩 20 ml의 증류수에 넣고 5분간 교반현탁시켜, 연속 희석을 통해 10^7배까지 희석하였다. 10^5배와 10^7배 희석한 용액 100 µl를 MB/N 배지에 도말하고 30℃에서 호기적 상태로 3일간 배양하였다. 3일간 배양시킨 후 자란 콜로니를 다시 새로운 MB/N 고체배지로 옮겨 30℃에서 3일간 4번의 계대배양을 통하여 순수분리를 하였다. 이 때, 배지에 색 변화를 보이는 콜로니들을 니코틴 분해 박테리아로 추정하고 이후의 실험을 진행하였다.

16S rRNA 유전자 서열을 통한 분자계통학적 분류

선별된 균주의 계통분류학적 위치를 알아보기 위하여 콜로니 PCR을 수행하였다. 콜로니를 20 µl의 멸균 증류수에 현탁시키고, 세균의 16S rRNA 유전자의universal primer인 27F (5′-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3′)와 1492R (5′-TGA GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3′)을 사용하여 균주의 16S rRNA 유전자를 증폭시켰다. PCR 반응은 1X 반응용액 (20 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 50% Glycerol)에 2.5 mM dNTP, 각 primer 2 µl, 상기 콜로니 현탁용액(template DNA) 1 µl, Taq polymerase 1 unit을 첨가하여 최종 부피를 20 µl로 하여 반응하였다. 반응조건은 95℃에서 2분간 predenaturation을 거친 후 95℃에서 30초, 50℃에서 30초, 72℃에서 45초로 30회 반복 후 72℃에서 5분 동안 마지막 신장과정을 수행하였다. 증폭된 산물은 PCR purification kit (Real Biotech corp., Korea)를 이용하여 정제한 후 Solgent사 (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다.

분석된 16S rRNA 유전자의 부분적인 염기서열은 SeqMan 소프트웨어(DNASTAR)를 사용하여 조합하여 완성된 염기서열을 이용하여 근연관계의 미생물 종을 EzTaxon server (Kim *et al.*, 2012)을 이용하여 찾았다.

선별균주와 근연종들의 16S rRNA 유전자 서열의 alignment는 Clustal X프로그램을 이용하였으며, 유전자 사이의 차이는 BioEdit 프로그램을 사용하여 편집 하였다. 계통도는 MEGA 3 프로그램(Kumar *et al.*, 2004)에서 neighbor-joining 방법(Saitou and Nei, 1987)으로 작성하였으며 branch의 신뢰도(bootstrap value)는 1,000회의 재구성된 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다.

형태학적 특성 조사

일반적인 세포 형태를 관찰하기 위해 30℃에서 3일 동안 MB/N 배지에서 배양한 세균균주를 증류수에 적당량 희석하여 위상차 현미경(Nikon 80i, Japan)으로 1,500배 배율에서 관찰하였다. Gram 염색은 멸균된 20 µl의 증류수를 slide glass에 떨어뜨리고 멸균된 이쑤시개를 이용하여 MB/N 배지에서 3일간 배양한 균주의 콜로니를 취해 현탁시켜 준 다음 건조시켜 약한 화염에 2-3회 열 고정을 시켰다. 염색은 BD 사에서 제공하는 Grams staining kit (BD, USA)을 사용하여, 사용설명서에 따라 수행하였다.

생리 및 생화학적 특성 분석

Catalase와 oxidase 시험은 MB/N 배지에서 30℃에서 3일간 배양한 NU11 균주를 이용하여 콜로니 위에 3% (v/v) H_2O_2를 떨어뜨린 후 기포발생 유무 관찰을 통해 catalase 시험을 수행하였고, oxidase 시험은 콜로니 위에 oxidase reagent를 떨어뜨려 콜로니의 색이 보라색으로 변화하는지를 확인하여 조사하였다.

균주의 산 생산 유무, 탄소원 확인 및 여러 효소 생산의 확인을 위해 API 20NE, API 32GN을 사용하였다. 실험 방법과 결과 해석은 API kit 제조사에서 제공하는 사용 설명서를 따라 실행하였으며, 결과판독은 30℃에서 24시간과 48시간 때의 관찰을 바탕으로 이루어졌다.

균의 성장에 따른 니코틴 분해 조사

균의 성장에 따른 니코틴 분해 조사는 Meng 등(2010)을 변형

Table 1. Phenotypic characteristics of strain NU11 and NU15.
Both strains could assimilate L-alanine, citrate, D-glucose, L-histidine, inositol, 2-ketogluconate, 5-ketogluconate, DL-lactate, D-maltose, D-mannitol, D-melibiose, potassium gluconate, L-proline, salicin, L-serine, and D-sucrose. Acetate, N-acetyl-D-glucosamine, L-fucose, glycogen, 3-hydroxy-butyrate, itaconate, malonate, propionate, rhamnose, D-ribose, D-sorbitol, and suberate were weakly assimilated. Negative reaction were found in arginine dihydrolase, *β*-galactosidase(PNPG), assimilation of capric acid and adipic acid, fermentation of glucose, hydrolysis of esculin and gelatin, indole production, and reduction of nitrate to nitrite or nitrogen. +, positive; -, negative; w, weak reaction.

Characteristics	NU11	NU15
Urease	+	-
Assimilation of		
L-Arabinose	w	+
4-Hydroxy benzoate	w	+
Malic acid	w	+
D-Mannose	+	w
Phenylacetic acid	-	w
Valeric acid	+	w

하여 다음과 같이 조사하였다. MB/N 고체배지에서 30℃에서 3일 동안 배양한 NU11을 5 ml의 MB/N 액체배지에 접종하여 30℃에서 4일간 종배양하였다. 그 후 200 ml의 MB/N 액체배지에 종배양액 1% 접종하고 30℃ 진탕 배양하였다. 배양하는 동안 2시간 마다 배양액 1 ml을 19,000 × g에서 10분간 원심 분리한 다음 상등액과 침강물을 분리하였다. 침강물은 1 ml의 증류수를 이용해 재현탁 시킨 다음 UV spectrophotometer (Optizen 3220, Mecasys, Korea)로 흡광도 600 nm값을 측정하여 균의 증식을 확인하였고, 상등액은 100 µl를 2.9 ml 0.1 N HCl에 희석한 다음 파장 간격 1 nm로, 200–350 nm 사이의 흡광도를 스캔하여 260 nm 파장대에서 니코틴 분해특이 파장을 확인하였다.

결과 및 고찰

니코틴 분해 박테리아의 분리

니코틴을 포함한 액체배지에서 니코틴 분해 세균은 균의 성장에 따라 유백광이나 녹색, 회색으로 변화된다고 보고되어 있다. 이러한 니코틴 포함배지의 색 변화는 니코틴 분해에 관련된 서로 다른 대사경로 형태를 반영한 것일 거라 추정했다(Chen *et al*., 2008). *Arthrobacter nicotinovorans*는 니코틴을 대사하여, 배지의 색을 노란색으로 바꾸고, 나아가 진홍색으로 바뀐다고 보고하였으며(Giovannozzi-Sermanni, 1959), *Pseudomonas* 속 균주 HF-1는 녹색을 띤 색소를 생산하는 다른 경로를 통해 니코틴을 분해된다고 보고하였다(Ruan *et al*., 2005).

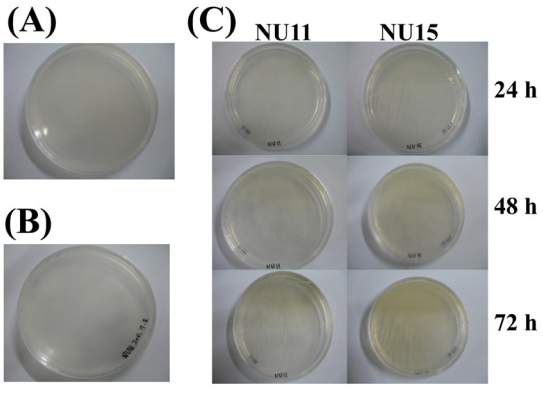

Fig. 1. Color changes on nicotine containing medium during the bacterial growth. Strain NU11 and NU15 isolated from tobacco field were capable of converting the medium color to faint yellow at early stage and then to dark yellow. (A) MB/N medium without cell, (B) cells grown MB medium without nicotine, (C) time course color changes of isolate NU11 and NU15.

이러한 기존보고를 바탕으로 담배재배 토양과 담배의 잎, 줄기, 뿌리로부터 니코틴 분해 미생물을 분리하기 위하여 담배 재배지에서 채취한 샘플을 현탁하고, 희석하여 고체배지에서 색 변화를 보이는 균주들을 니코틴 분해능력을 가진 균주로 생각하여 분리하였다. 뿌리 주변의 토양에서 분리된 두 균주가 니코틴을 포함한 MB/N 한천배지 상에서 시간의 경과에 따라 무색에서 연한 노란색을 나타내다 최종 황색으로 변화를 보였고, 이들 균주를 각각 NU11, NU15라고 명명하였다(Fig. 1).

분리균의 형태학적, 생리 · 생화학적 특성

분리된 NU11과 NU15의 콜로니는 아이보리 색과 광택을 가지고 있으며, 가장자리는 완만한 형태를 가지고 있었다. 액체배지에서 3일간 배양한 NU11 및 NU15를 위상차 현미경으로 관찰한 결과 짧은 간균 또는 구균의 형태를 보여주었으며, Gram 염색 한 결과 두 균주 모두 보라색을 띠는 것으로 보아 Gram 양성 균으로 확인되었다(자료 미제시). *Arthrobacter* 속의 type species인 *Arthrobacter globiformis*은 배양초기의 젊은 세포는 Gram 음성의 간균, 배양 후기의 세포는 Gram 양성의 구균으로 보고 되어 있으며(Conn and Dimmick, 1947), *A. nicotinovorans*은 Gram 양성의 간-구균으로 보고되어 있다(Kodama *et al*., 1992).

분리된 두 균주의 생리화학적 특성분석 결과, NU11 균주가 urease의 활성을 가지는 반면, NU15 균주는 urease 활성이 없었다 (Table 1). 반대로 phenylacetic acid의 경우 NU11은 이용할 수 없는 반면, NU15는 약하게 이용할 수 있었다. 이외에 L-arabinose, D-mannose, malic acid, 4-hydroxy benzoate와 valeric acid의 이용에 있어 두 균주간 약간의 차이가 있었지만 그 외의 대부분은 유사하였다. NU15의 경우 D-glucose, L-arabinose, propionate, citrate, L-histidine, D-ribose, inositol, malonate, 3-hydroxy-benzoate

를 이용할 수 있었고, nitrate의 환원이 불가능하고 adipic acid를 이용하지 못하는 *A. nicotinovorans* 과 유사하였다(Kodama *et al*., 1992). Catalase와 oxidase 활성여부를 확인한 결과 두 균주 모두 거품을 발생시켜 catalase 양성이였지만, oxidase의 경우 색 변화를 관찰할 수 없어 음성인 것을 확인 할 수 있었다.

유전학 및 분자생물학적 특성

분리 균주들의 16S rRNA 유전자를 증폭하여 단편의 염기서

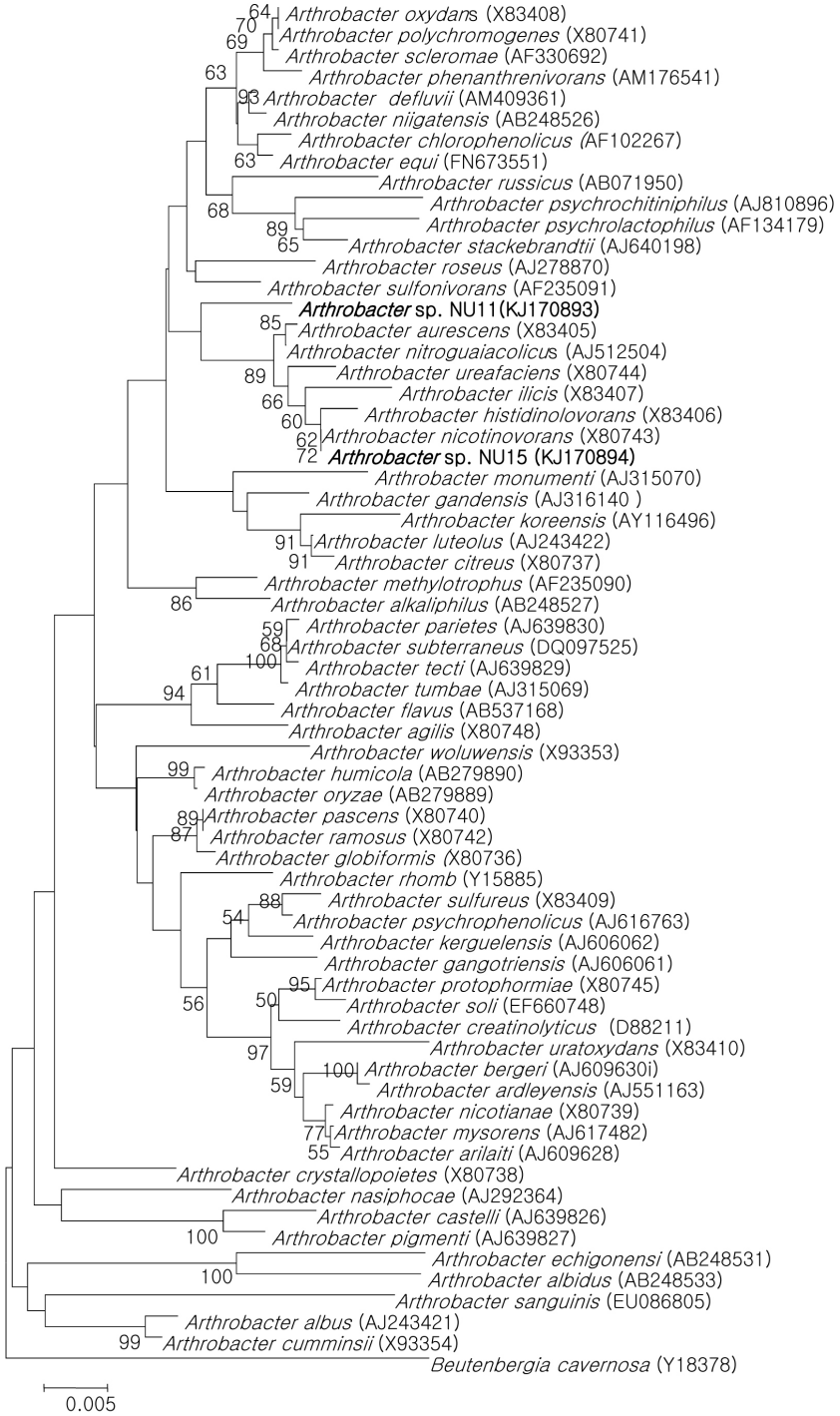

Fig. 2. Neighbour-joining tree based on the 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic position of strain NU11 and NU15. The sequence of *Beutenbergia cavernosa* (Y18378) was used as an outgroup. Bootstrap values (expressed as percentages of 1,000 replications) greater than 50% are given at nodes. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

열을 결정한 결과 NU11은 1,387 bp, NU15는 1.386 bp의 염기서열을 얻었고, GenBank에 각각 KJ170893, KJ170894로 등록하였다. 이들 서열을 이용하여 EzTaxon을 이용하여 type strain을 대상으로 상동성 조사를 한 결과 NU11은 *Arthrobacter equi*와 98.23%, *A. ramosus*와 98.17%, *A. nitroguajacolicus*와 98.09%의 결과를 보여주었으며, 97% 이상의 상동성을 보인 type strain은 상기균을 포함하여 21종이었다. NU15는 *A. nicotinovorans*과 99.78%, *A. histidinolovorans*와 99.64%, *A. nitroguajacolicus*와 98.76%의 상동성을 보였으며 97% 이상의 상동성은 상기 균주를 포함 23주의 type strains이 존재하였다.

본 실험을 통해 분리된 NU11 및 NU15 균주의 분류학적 위치를 알아보기 위해 NU11 및 NU15 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 이용하여 이 속(genus)에 속하는 type strain들과 근연 관계에 있는 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 얻어 계통수를 작성하였다(Fig. 2). 그 결과 NU11 및 NU15 균주는 *Arthrobacter nitroguaiacolicus* (AJ512504), *Arthrobacter histidinolovorans* (X83406), *Arthrobacter aurescens* (X83405), *Arthrobacter ureafaciens* (X80744), *Arthrobacter ilicis* (X83407), *Arthrobacter nicotinovorans* (X80743)와 하나의 cluster를 형성하였으며 NU15는 *Arthrobacter nicotinovorans*와 가장 가까운 관계를 보였으며, NU11은 이들 cluster에서 단일로 분류되었다.

이러한 상동성 및 계통 분석결과와 더불어 상기의 생리, 생화학적 시험결과를 종합해 보면 NU15는 *A. nicotinovoran*로 동정될 수 있다. 최근의 세균 종 분류는 두 종의 16S rRNA 유전자의 염기서열 차이가 1.0–1.3%일 경우에는 DNA-DNA 혼성화 시험을 통해 종을 구분할 수 있으므로(Stackebrandt and Ebers, 2006) NU11은 신종의 가능성이 있으나, 신종의 유무를 판단하기 위해서는 표준균주들과 DNA-DNA 혼성화 시험, 지방산 분석 등의 자세한 연구가 요구된다.

니코틴 분해 능력

Meng 등(2010)은 니코틴이 260 nm 부근에서 특이적인 흡광을 한다고 보고하였다. 분리된 균주 NU11의 니코틴 분해 능력을 확인하기 위하여 니코틴을 포함한 배지에서 NU11 균주를 배양하면서 균의 성장에 따른 니코틴 분해를 분석하기 위해 UV 흡광스펙트럼을 조사하였다(Fig. 3). NU11 균주는 유도기인 배양 2시간대에 니코틴에 아무런 변화를 주지 못하다가, 대수 초기인 배양 8시간에서 260 nm 부근의 니코틴 특이 흡광 파장부가 감소되었다. 대수증식기 말기인 48시간에는 거의 절반의 니코틴이 분해되었고, 배양 72시간인 정지기 후기까지 지속적으로 흡광파장의 감소와 더불어 280–320 nm에서 분해된 니코틴의 대사산물 흡광이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 배양 120시간에는 모든 니코틴이 분해되었고, 이로 인해 생성된 대사산물에 의해 형성된 파장 부분도 사라지는 것을 알 수 있었다. 이에 반해 균주를 접종하지 않은 배지 내 니코틴은 120시간까지 안정하게 유지되는 것을 보고(자료 미제시) 상기의 니코틴의 특이 흡광파장 감소가 NU11의 성장에 의한 분해결과 임을 알 수 있었다.

본 연구에서 분리된 NU11 균주는 담배의 제조과정 중에 발생하는 니코틴 오염물을 생물학적으로 처리하는 데 사용할 수 있으며, 담배의 니코틴만을 선택적으로 감소시키는데 활용될 수 있을 것으로 생각되며, 기존의 종들과는 다른 새로운 종임을 입증하고 균주가 가진 니코틴 분해경로에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 생각된다.

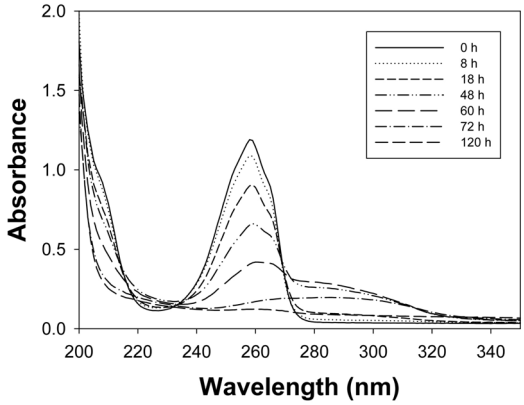

Fig. 3. UV absorption spectra of nicotine degradation by strain NU11. Seed culture solution of strain NU11 was inoculated into NB/N medium and incubated at 30℃. UV absorption spectra were measured at wavelengths from 200 to 350 nm with the wave intervals at 1 nm at each time after culture supernatant was diluted with 0.1 N HCl as 1:29 ratio.

적 요

담배식물과 담배재배 토양으로부터 최소배지에 유일 탄소원으로 니코틴을 첨가한 배지(MB/N)를 이용하여 니코틴을 분해하는 새로운 균주의 분리를 시도하였다. 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석과 표현형 시험 및 형태학적 시험으로 분리균주들은 *Micrococcaceae* 과의 *Arthrobacter* 속에 포함되는 균주로 판명되었다. NU15는 *Arthrobacter nicotinovorans*와 99.8%의 상동성을 보였고, NU11는 *Arthrobacter equi*와 98.2%의 상동성을 보여 신주일 가능성이 있었다. 두 균주 모두 양성의 간구균이며, catalase 양성, oxidase 음성이었다. 신주일 가능성이 있는 NU11 균주의 니코틴 분해를 확인하기 위하여 MB/N 액체배지에서 배양하면서 니코틴 특이적으로 나타내는 260 nm에서의 흡광도가 감소를 측정한 결과, 니코틴이 균주에 의해 특이적으로 분해되는 것을 확인 할 수 있었으며, 분해균들은 니코틴 오염을 복원하는데 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 말

이 논문은 2012년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다(This work was supported by the research grant of the Chungbuk National University in 2012).

참고문헌

Andersen, R.A., Fleming, P.D., Burton, H.R., Hamilton-Kemp, T.R., and Sutton, T.G. 1991. Nitrosated, acylated, and oxidized pyridine

alkaloids during storage of smokeless tobaccos: Effects of moisture, temperature, and their interactions 1. *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1280−1287.

Armstrong, D.W., Wang, X., and Ercal, N. 1998. Enantiomeric composition of nicotine in smokeless tobacco, medicinal products and commercial reagents. *Chiriality* **10**, 587−591.

Brandsch, R. 2006. Microbiology and biochemistry of nicotine degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**, 493−498.

Chen, C., Li, X., Yang, J., Gong, X., Li, B., and Zhang, K.Q. 2008. Isolation of nicotine-degrading bacterium *Pseudomonas* sp. Nic22, and its potential application in tobacco processing. *Int. Biodet. Biodegr.* **62**, 226−231.

Conn, H.J. and Dimmick, I. 1947. Soil bacteria similar in morphology to *Mycobacterium* and *Corynebacterium*. *J. Bacteriol.* **54**, 291−303.

Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites), pp. 1250−1318. *In* Buchannan, B.B., Gruissem, W., and Jones, R.L. (eds), Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA.

Giovannozzi-Sermanni, G. 1959. *Arthrobacter nicotianae*, a new type of *Arthrobacter* causing nicotine degradation. *Coersta* **3**, 2595.

Gong, X.W., Yang, J.K., Duan, Y.Q., Dong, J.Y., Zhe, W., Wang, L., Li, Q.H., and Zhang, K.Q. 2009. Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. Y22 and its potential application to tobacco processing. *Res. Microbiol.* **160**, 200−204.

Jeffrey, R.N. and Eoff, W.H. 1955. Paper chromatographic method for determining alkloids in tobacco. *Anal. Chem.* **27**, 1903−1906.

Katoh, A., Ohii, H., Inai, K., and Hashimoto, T. 2005. Molecular regulation of nicotine biosynthesis. *Plant Biotechnol.* **22**, 389−392.

Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., and *et al.* 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* **62**, 716−721.

Kodama, Y., Yamamoto, H., Amano, N., and Amachi, T. 1992. Reclassification of two strains of *Arthrobacter oxydans* and proposal of *Arthorobacter nicotinovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 233−239.

Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. 2004. MEGA3: Integrate software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* **5**, 150−163.

Mayer, B. 2014. How much nicotine kills a human? Tracing back the generally accepted lethal dose to dubious self-experiments in the nineteenth century. *Arch Toxicol.* **88**, 5−7.

Meng, X.J., Lu, L.L., Gu, G.F., and Xiao, M. 2010. A novel pathway for nicotine degradation by *Aspergillus oryzae* 112822 isolated from tobacco leaves. *Res. Microbiol.* **161**, 626−633.

Novotny, T. and Zhao, F. 1999. Consumption and production waste: another externality of taboacco use. *Tob. Control* **8**, 75−80.

Okamoto, M., Kita, T., Okuda, H., Tanaka, T., and Nakashima, T. 1994. Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacol. Toxicol*. **75**, 1−6.

Ruan, A., Min, H., Peng, X., and Huang, Z. 2005. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. strain HF-1, capable of degrading nicotine. *Res. Microbiol.* **156**, 700−706.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*. **4**, 406−425.

Shoji, T., Yamada, Y., and Hashimoto, T. 2000. Jasmonate induction of putrescine N-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell Physiol*. **42**, 831−839.

Solarino, B., Rosenbaum, F., Rießelmann, B., Buschmann, C.T., and Tsokos, M. 2010. Death due to ingestion of nicotine-containing solution: case report and review of the literature. *Forensic. Sci. Int.* **195**, e19−e22.

Stackebrandt, E. and Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standard. *Microbiol. Today* **33**, 152−155.

Wang, S.N., Liu, Z., Tang, H.Z., Meng, J., and Xu, P. 2007. Characterization of environmentally friendly nicotine degradation by *Pseudomonas putida* biotype A strain S16. *Microbiology* **153**, 1556−1565