J. Fd Hyg. Safety 11(3), 165 - 170(1996)

Pseudomonas sp.에 의한 Benzoate의 생분해

정준영 · 김교창†
충북대학교 식품공학과

Biodegradation of Benzoate by *Pseudomonas* sp.

Jun-Young Jeong and Kyo-Chang Kim†
Dept. of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chungbuk National Univ., Cheongju, 360-763, Korea

ABSTRACT— The biodegradation of high concentration of benzoate by enrichment culture with *Pseudomonas* sp. was investigated. During 50 days continuous culture, average of removal rate of benzoate and COD were 90% and 83%, respectively. And the enzymatic activity of catechol 2,3-dioxygenase was determined in the continuous culture but not Catechol 1,2-dioxygenase. On the other hand, *Pseudomonas* sp in the culture was investigated with SEM and the result was revealed that the cell shape was more demage according the higher concentration of benzoate.

Key words □ Enrichment culture, *Pseudomonas* sp., COD, SEM, Catechol 2,3-dioxygenase,

현재 화학공업, 약품공업, 농약공업등에서 발생되는 xylene, salicylate, benzene, toluene, phenol 등은 그 구조적 안정성으로 인해 난 분해성일 뿐 만 아니라 독성작용을 나타내는 환경오염 물질로, 특히 benzene은 세계 보건 기구의 음료수 기준에 10 μg/*l* 이하로 엄격히 규제 되어 있는 발암물질 중의 하나로 알려져 있다.[1] 이러한 방향족 화합물들이 다량 함유되어 있는 유기합성공업, 농약공업, 약품공업 등에서 발생하는 폐수와 폐기물의 처리는 종래 물리, 화학적 처리법이 주로 사용됨에 따라 이들 화합물에 의한 2차 오염과 처리시의 에너지 및 비용 과다 등의 문제점[2]이 있어 2차 오염의 우려가 없고 보다 경제적인 처리 방법으로 평가된 미생물에 의한 생물공학적 처리법에 관한 연구가 진행되고 있으며 현재 분리 동정된 미생물중 Aerobic Pseudomonads 균주들은 다양한 생화학적 이용성 및 생물적 다양성을 나타내는 대표적 토양 미생물로,[3] 그 중 *Pseudomonas*속 세균은 유일 탄소원으로 인공적이나 자연적으로 발생하는 방향족, 지환족 화합물 등을 포함한 많은 종류의 탄소원을 이용하여 생장할수 있는 것이 밝혀져[4] 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

한편 미생물의 방향족 화합물 분해능은 chromosome상의 유전 인자와 관련된 특성이기도 하지만 혹종의 균주는 plasmid 내에 이러한 유기화합물 분해유전자가 있는 것으로 알려져 있어[5,6] 유전공학에 의한 다기능 균주개발이 관심의 대상이 되고 있다.

그러나 개발된 새로운 균주들은 자연환경내에서의 안전성의 평가와 이들의 적용시 분해 용이한 물질과 공존할 경우 chromosomal DNA에 지배되는 대사 작용이 활발해져 전이된 plasmid DNA의 분해능이 상실되는 현상이 나타나는 것으로 알려져 있다.[7]

따라서 이들 난 분해성 방향족 화합물의 분해를 위해 유전자를 인위적으로 조작하는 것 보다는 자연적으로 새로운 plasmid DNA를 생성하거나 점차 고농도의 기질에 순화 시켜 보다 높은 농도에서 뿐만 아니라 다양한 종류의 기질 분해능을 갖는 균주의 개발이 요구되고 있는 실정이므로 본 연구에서는 고농도의 benzoate를 분해할 목적으로 연속배양에 의한 기질 분해율 및 효소활성 그리고 전자현미경에 의한 균 형태변화를 검토하였다.

실험재료 및 방법

사용균주

Benzoate를 유일 탄소원으로 이용하여 생장할 수 있는 균은 전보[8]에서 분리, 동정된 *Pseudomonas* sp.(Ben-2)를 이용하였으며 사용한 균주의 특성은 Table 1과 같다.

배 지

균 분리 및 배양배지로 탄소원을 제거한 Table 2와 같은 조

† Author to whom correspondence should be addressed.

Table 1. Characterization of *Pseudomonas* sp.(Ben-2)

Strain/Plasmid	Relevant characteristics	source
Ben-2	Ben^{+} [1], Cm^{r}, Km^{r}, Ap^{r}, Tc^{s} Catechol 1,2-dioxygenase^{+} Catechol 2,3-dioxygenase^{+}	This study
BpC[2]	Ben^{+}, Cm^{s}, Km^{s}, Ap^{s}, Tc^{s} Catechol 1,2-dioxygenase^{+} Catechol 2,3-dioxygenase^{-}	This study
BpL[3]	/BpL(Ben^{+}, Cm^{r}, Km^{r}, Ap^{r}, Tc^{s}) Catechol 1,2-dioxygenase^{-} Catechol 2,3-dioxygenase^{+}	This study

1: Benzoate,
2: Cured strain of *Pseudomonas* sp.(Ben-2) with Mitomycin-C
3: Plasmid DNA(120 kb) of *Pseudomonas* sp.(Ben-2)

Table 2. Composition of Basal Salt Medium

Component	Content(g/l)
K_2HPO_4	5.8
KH_2PO_4	4.5
$(NH_4)_2SO_4$	2
$MgCl_2$	0.16
$CaCl_2$	0.02
Na_2MoO_4	0.002
$FeSO_4$	0.001
$MnCl_2$	0.001

* pH was adjusted 7.0 before autocleave.

성의 Basal Salt Medium(BSM)[9]을 주로 사용하였고 $CaCl_2$ 등의 미량원소는 별도로 stock solution을 제조하여 첨가하였다.

전배양

반연속배양의 초기 기질 농도를 결정하기 위해 benzoate의 농도를 800, 1000, 1200 ppm으로 조절한 BSM배지 500 m*l*에 전배양한 Ben-2균주를 접종하여 30°C에서 교반배양하면서 시간에 따른 균생장능과 기질 제거율을 측정하였다.

본배양

Benzoate를 단독기질로 사용하여 실시한 반연속배양은 Edward 등[10]의 방법을 참고하여 pH meter, argitation speed controller, air pump gage, temperature 및 anti-foam controller, recorder 등을 갖춘 2.5L 배양조(Korea Fermentor Co. Ltd. Korea)로 수행 하였다.

초기의 benzoate 배양농도를 1,000 ppm으로 조절한 1500 m*l*의 BSM broth를 2.5L 배양조에 가하여 살균한 다음, 전배양액 0.1%를 접종하고 균 생육 상태가 정상 상태에 도달할 때까지 적응시킨 후 수리적 체류기간(HRT; Hydraulic retention time)을 15일로 하여 반연속배양을 실시하였다.

Table 3. Culture condition of pure semi-continuous culture

Working Volume	1,500 m*l*
Temp.	300°C
Air flow rate	1 kg/cm^2 (200°C)
Agitation rate	300 rpm
HRT (Hydraulic retention time)	15 day
Substrate flow rate	100 m*l*/day

이때 첨가되는 기질량은 benzoate에 의한 독성을 최소화시켜 주기 위해 1,000, 2,000, 3,000, 4,000 ppm으로 순차적으로 높여 주면서 매일 100 m*l*의 배양액을 배출하고 동량을 주입하면서 일정기간의 시료를 취하여 pH, O.D, COD 및 기질 제거율을 검토 하였다.

본실험에 사용한 배양조의 조건은 Table 3과 같다.

분해율 측정

Spectrophotometer법 — Benzoate의 최대흡광도를 이용하여 농도에 따른 검량곡선을 작성하고 이 곡선에 따라 실제 시료의 흡광도를 측정하여 기질량으로 환산하였다.[11]

여기서 배양액의 기질분해율 측정은 각 배양을 8,000 rpm에서 10분간 원심분리로 균체를 제거한 다음 상등액을 취하여 시료로 사용 하였다.

Chemical Oxygen Demand(COD) — COD측정은 환경오염공정시험법[12]에 준하여 측정하였다.

배양액을 8,000 rpm에서 10분간 원심분리로 균체를 제거한 다음 0.025 N-$KMnO_4$ 용액으로 시료를 산화시킨 후 잔여 $KMnO_4$양을 0.025 N-Na_2SO_3로 적정하여 소모된 량으로 환산하였다.

전자현미경 관찰

균체의 전자현미경 관찰은 배양액을 취하여 Campbell 등[13]의 방법에 따라 주사형 전자현미경(Scaning Electron Microscopy, Hitachi-570, Japan)으로 관찰하였다.

효소분석

Cell Extract 조제 — 효소 분석을 위한 Cell extract는 Austen 등[14]의 방법을 변형하여 수행하였는데 각각의 배양액을 2°C에서 10,000 rpm 원심분리로 집균하고 0.85% KCl용액으로 두번 세척한 다음 10% acetone을 함유하는 50 mM phosphate buffer(pH 7.5)에 현탁하였다. 이 현탁액을 Ultrasonicator(Inc. Ultrasonics processor)를 사용하여

0°C에서 5분간 100 W로 세포를 파쇄한 다음 5°C에서 20,000 rpm의 원심분리로 Cell extract를 조제하였다. Cell extract는 효소 분석에 바로 사용하거나 -15°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Catechol 1,2-dioxygenase — catechol 1,2-dioxygenase의 활성은 Hegeman 등[15]의 방법에 따라 cell extarct중에 잔존해 있는 catechol 2,3-dioxygenase의 실활을 유도하기 위해 효소활성 측정전에 H_2O_2를 반응시켜 수행하였다.

여기서 Enzyme 1 unit는 분당 1 μmole catechol 산화량으로 정의 하였으며 specific activity는 단백질 mg당 unit로 표시하였다. 단백질은 bovine serium albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry법[16]으로 정량하였다.

Catechol 2,3-dioxygenase — Catechol 2,3-dioxygenase 활성은 Sala-Trepate 등[17]의 방법에 따라 catechol 1,2-dioxygenase 실활을 위해 cell extract를 55°C에서 10분간 열처리하여 375 nm에서 흡광도를 측정하여 수행하였다.

결과 및 고찰

전배양

분해균의 기질분해능을 측정하기 위해 benzoate의 농도를 800, 1000, 1200 ppm으로 조절한 BSM배지 200 ml에 전배양한 Ben-2균주를 접종하여 30°C에서 교반배양하면서 시간에 따른 균생장능과 기질 제거율을 측정한 결과는 Fig. 1, 2와 같다.

Fig. 1에서와 같이 800 ppm을 첨가한 시료구에서는 60시간에 1,000 ppm 및 2,000 ppm을 첨가한 시료구에서는 이보다 늦은 80시간에 최대 생장능을 보였다. 한편 각시료구에서의 기질 제거율을 보면 전 시료구에서 60시간에 최대 기질 제거율을 나타내었는데 800 ppm 첨가구에서 최대 균증식 시간보다 다소 느리게 나타나 1,000 ppm 이상의 농도에서 본 균주의 기질 분해율이 보다 좋을 것으로 추측된다.

본배양

Ben-2균주를 이용한 고농도의 benzoate를 분해하기 위하여 수행한 benzoate 본배양은 초기의 benzoate 농도를 1000 ppm으로 조절하여 2.5L 배양조(Korea Fermentor CO. LTD. KOREA)로 수행하였다.

Fig. 3은 benzoate의 농도를 달리 하면서 50일간 배양과정 중 5일 간격으로 배출된 시료의 pH와 O.D(660 nm) 측정 결과로 pH는 1,000 ppm의 기질농도를 첨가한 5일째 pH 6.9를 나타낸 후 경미하게 저하되기 시작하여 2,000 ppm의 기질 농도를 첨가하기 시작한 15 일에 pH 6.7을, 20일에는 전 배양기간에서 가장 낮은 pH 6.55를 나타내었다.

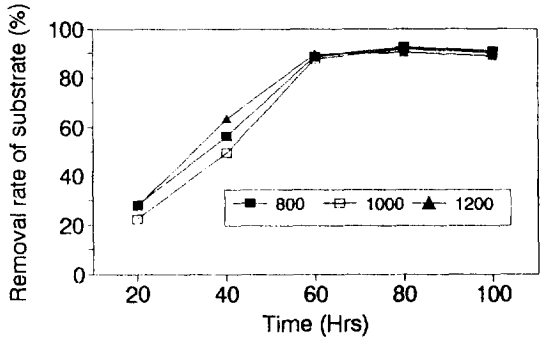


Fig. 2. Removal rate of benzoate by Ben-2 strain. The cells were grown for time course at 30 C with shaking in BSM broth containing 800, 1000, 1200 ppm benzoate.

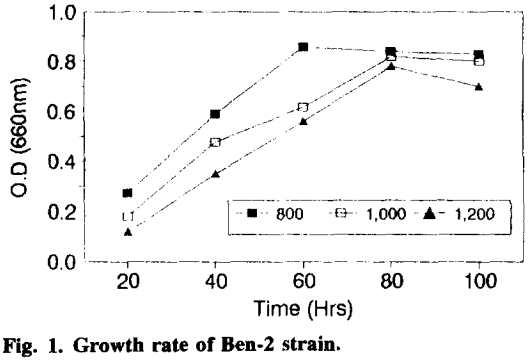


Fig. 1. Growth rate of Ben-2 strain. The cells were grown for time course at 30 C with shakin in BSM broth containing 800, 1000, 1200 ppm benzoate.

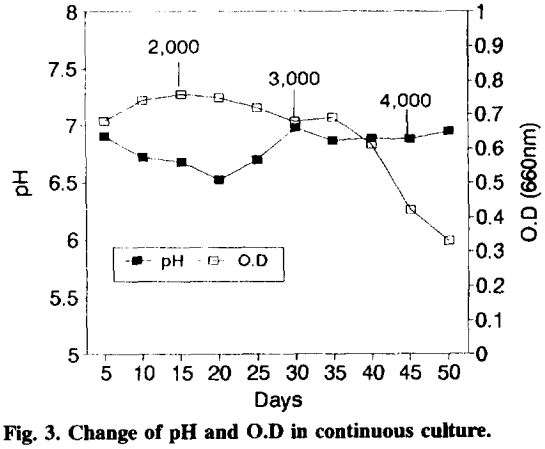


Fig. 3. Change of pH and O.D in continuous culture.

그후 pH는 서서히 증가하기 시작하여 3,000 ppm의 기질농도를 첨가하기 시작한 30일 pH 7.0을 보인 후 4000 ppm을 투여하기 시작하여 배양한 50일째에는 6.95의 pH를 나타내 일정 수준을 유지하였다.

한편 O.D에 의한 균체증식 측정 결과는 1,000 ppm의 기질 농도를 첨가하여 배양한 5일 0.68의 O.D를 나타낸 것으로 미루어 이 농도에서 유도기 없이 완전히 적응된 것으로 추측 되었으며 그 후 서서히 증가하여 2,000 ppm의 기질을 투여하기 시작한 15일 째에는 가장 높은 생육정도인 0.76의 O.D를 나타내었다.

기질의 농도를 3000 ppm으로 증가시켜 투여하기 시작한 30일째는 0.68로 경미하게 감소 하였으며 4000 ppm을 투여하여 배양한 45일 부터는 균주의 생육정도가 급격히 감소하여 0.43의 O.D를 나타내었다.

한편 배양과정중 가장 우수한 균 증식 정도를 나타낸 5일 째 부터 35일까지 첨가한 배지의 pH를 7.0으로 조절 하였음에도 불구하고 pH가 저하되는 것이 관찰 되었는데 이것은 균체의 증가에 비례하여 분해 산물로 산의 생성에 따른 결과로[18] 추측된다. 또한 배양 30일에서 부터 40일까지 5일간 기질량을 3,000 ppm으로 첨가할때 관찰되지 않았던 유도기가 나타났는데 이는 benzene 분해 과정중 농도 증가에 따른 여러 중간 대사산물의 생성으로 인한 것으로 추정된다.[19]

Fig. 4는 동기간 중 배출된 시료의 COD제거율과 spectrophotometer를 이용한 기질 제거율을 측정한 결과로 COD와 기질제거율은 각 기질농도에서의 COD를 를 측정한 값을 기준으로 하여 %로 환산하여 표시하였다.

Fig. 4에서와 같이 COD 분해율은 배양초기에 89.3 %의 비교적 높은 분해율을 나타내었다. 또한 2,000 ppm으로 기질 농도를 첨가하기 시작한 15일에 약 93%의 COD분해율을 보였고 이 농도의 기질을 첨가하여 배양한 30일까지의 15일간 평균 약 89.3%의 높은 분해율을 보였다.

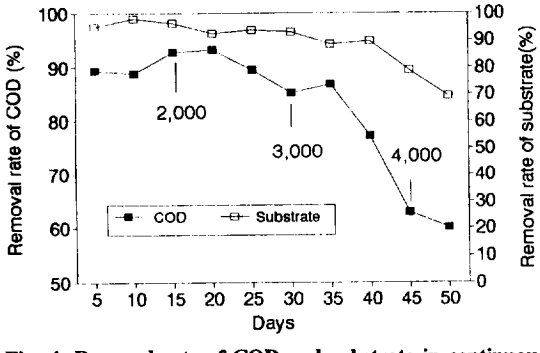


Fig. 4. Removal rate of COD and substrate in continuous culture.

3,000 ppm의 기질량을 첨가한 35일에서 45일까지는 평균 약 76%의 평균 제거량을, 4,000 ppm에서는 5일간 60.2%, 10일간에 평균 약 62%의 평균 COD 분해율을 나타내었다.

한편 최대흡수파장에 의한 기질분해율은 1,000 ppm을 투입한 배양초기에 94.7%의 기질 제거량을 보였으며 이 때의 평균 기질 제거량은 15일간 평균 96.2%를, 2,000 ppm를 가하기 시작한 15일 부터 30일까지는 평균 93%를, 3,000 ppm을 첨가하기 시작한 30일부터 45일까지는 평균 약 86%의 분해율을 나타내었고 4,000 ppm을 첨가하여 배양한 45일부터 50일까지는 69.3%의 기질 분해율을 나타내 배양 50일 동안 평균 89.4%의 높은 기질 분해율을 보였다.

이와 같은 결과는 서 등[11]의 *Pseudomonas* sp.의 고활성 변이주의 benzoate분해에 관한 연구에서 이들 균주가 790 ppm의 기질량에서 약 90%의 COD 분해율을, 동 연구자 등[20]은 농화배양법에 의해 활성화시킨 활성슬러지 내의 미생물을 이용한 80일간의 2,500 ppm benzene 반 연속실험에서 최종 94%의 COD 분해율을 나타내었다고 보고한 것에 비해 다소 우수한 결과였다.

위의 결과로 볼때 Ben-2균주를 이용한 반연속 배양에서의 COD 분해율과 기질분해율은 배양초기의 15일간 각각 약 90%와 96%의 높은 분해율을 나타낸 것으로 미루어 Ben-2균주가 완전하게 benzoate에 적응이 된것으로 추측되며 기질 농도를 2,000 ppm으로 조절하였을때 균의 생육증가와 더불어 이들의 분해율도 증가 하였다.

그러나 3,000 ppm 이상의 고농도에서는 COD 및 기질 제거율이 약간 감소하였는데 이와같은 결과는 benzoate의 독성에 의해 균의 형태 및 조직의 변화와 함께 이들 benzoate 분해 과정중 농도 증가에 따른 여러 중간 대사산물의 생성으로 인한 효소 활성의 저하에 기인한 것으로 추정된다.[19]

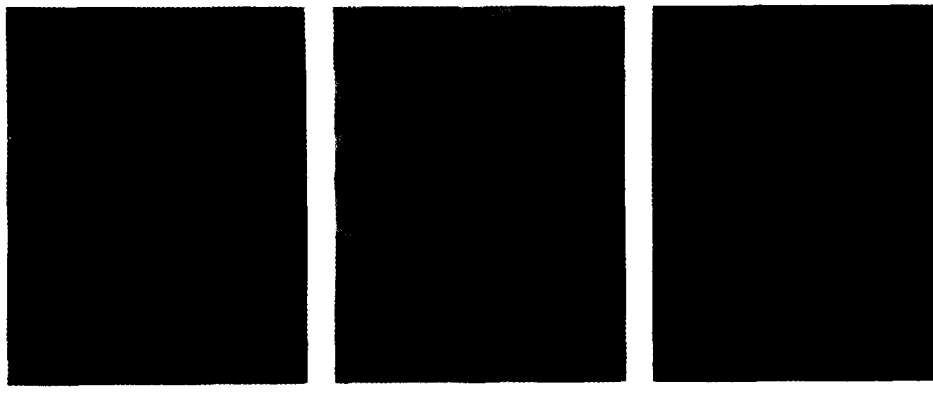
효소 분석

50일간의 benzoate 반연속배양 과정중에 기질농도를 점차 높여 감에 따라 균의 생육 정도와 이에 따른 기질분해율의 변화가 관찰 되었는데 이와 같은 결과를 효소 분석을 통해 규명하기 위해 각 배출액에서 Ben-2 균주의 catechol 1, 2-dioxygenase와 catechol 2,3-dioxygenase의 효소활성을 측정하여 비교 검토하였다.

Benzoate 연속 배양기간중 배양액의 효소활성 측정결과는 Table 4와 같다.

Table 4에서와 같이 1,000 ppm의 시료를 첨가한 배양 초기의 catechol 2,3-dioxygenase는 4.1(μmol/min/mg of protein)을 나타내었으며 2,000 ppm의 기질 농도를 첨가한 15일에는 5.2(μmol/min/mg of protein)를 보였다.

또한 3,000 ppm의 기질농도에서는 3.9(μmol/min/mg of



A B C

Fig. 5. Scanning electron micrography in continuous culture with *Pseudomonas* sp.
A: Atandard, B: Continuous culture for 10 days, C: Continuous culture for 45 days.

Table 4. Specific activities of catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-oxygenase in continuous culture

Days	catechol 1,2-dioxygenase	catechol 2,3-dioxygenase
1	ND	4.1*
15	ND	5.2
30	ND	3.9
45	ND	1.8

* : Specific activity unit(μmol/min/mg protein)
Expressed as enzyme unit per milligram of protein,where 1 unit is the amount of enzyme required to convert 1 μmol of substrate in 1 min.
ND : not detected

protein)를, 4,000 ppm을 첨가한 45일에서는 1.8(μmol/min/mg of protein)를 보였다.

한편 배양 전기간 중 시료에서의 catechol 1,2-dioxygenase의 활성은 측정되지 않았다.

전자현미경 관찰

Benzoate 연속배양과정 중 Ben-2균주의 기질농도에 대한 영향을 검토하기 위해 주사전자현미경으로 검경 하였고 이 때 Ben-2균주를 1,000 ppm의 benzoate를 첨가한 BSM 에서 3일간 배양시켜 대조구로 비교하였다.

Fig. 5는 50 일간의 benzoate 연속배양기간 중의 기질 농도에 따른 균형태변화를 관찰한 결과이다.

균 증식정도가 안정되게 유지되고 이에 따라 기질의 분해율도 왕성한 10일째의 본균주의 형태는 대조구와 거의 유사한 것으로 나타났으며 기질량을 4,000 ppm의 농도로 증가시켜 첨가한 45일째의 검경 결과 본 균주는 형태의 변화가 관찰되었다. 이와 같은 결과는 4,000 ppm의 기질농도에서 Ben-2균주의 생육이 억제되고 이에 따라 효소활성 역시 급격히 감소되는 결과와 일치하는 것으로 배양조 내의 순수 기질 농도가 3,000 ppm 이상에서는 본 균주의 생육이 억제된다는 것을 알 수 있었다.

국문요약

방향족 화합물들의 기본을 이루고 있는 benzoate를 농화배양법을 이용 하여 분해시키고자 50일간의 연속배양 중 기질제거율과 COD제거율을 측정한 결과 각각 평균 약 90%와 83%의 높은 기질제거율을 보였다. 동기간중의 효소활성 은 3,000 ppm의 기질농도에서 3.9(μmol/min/mg of protein)를, 4,000 ppm을 첨가한 45일에서는 1.8(μmol/min/mg of protein)를 보였고 배양 전기간 중 시료에서의 catechol 1,2-dioxygenase의 활성은 측정되지 않았다. 한편 전자현미경에 의한 균체의 관찰결과 배양초기에는 대조구와 거의 유사한 것으로 나타났으나 기질량을 4,000 ppm의 농도로 증가시켜 첨가한 45일째 균의 퇴축이 관찰되었다.

참고문헌

1. W.H.O.: Guidelines for drinking watwer qiality, **1**, 6 (1984).
2. Kobayshi, H., B.E. Rirrmann: Microbial removal of hazardius organic compound, *ES&T* **16**, 170-183 (1982).
3. Holloway, B.W.: Genetics *Pseudomonas, Bacteriol. Rev.*, **33**, 419-443 (1969).
4. Stanier, R. Y.,: The aerobic Pseudomonads:a taxonomoic study, *J. Gen. Microbiol.*, **43**, 159-273 (1966).
5. Wheelis, M.L: The genetics of dissimilarity pathways in *pseudomonas, Ann. Rev. Microbiol.*, **29**, 505-524 (1975).
6. Chkrabarty, A.M.,: Genetic fusion of incompatible plasmid in *Pseudomonas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **700**, 1641-1644 (1973).
7. Furukawa, K., Tonomura, K., and Kamibayashi, A,: Effect of chlorine substitution in the biodegradability of polychlorinated biphenyls, *Appl. environ. Microbiol.*, **35**, 223-227 (1978).
8. Jeong, J.J., K.C. Kim : Biodegradative characteristics of benzoate and m-toluate by *Pseudomonas* sp., *J. Fd Hyg. Safety*, **9**,, 205-211 (1994).
9. Kilbrane, J.J. *et. al*, : Biodegradation of 2,4,5-Trichlorophenoxy-aceticacid by a pure culture of *P. cepacia, Appl. & Environ. Microbiol.*, **44**, 72-78 (1981).
10. Edward. T., M.H. Akhtar,: Identification and Characterization of a *P.sp.* capable of Metabolizing benzoate, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1294-1300 (1991).
11. Suh, Y.S., *et al.*,: Biotechnological research on degrading bacteria of the aromatic compound, *Report of NIER, Korea*, 10287-296 (1987).
12. Yang, S.H.,: 환경오염공시법(I), 수학사 (1983).
13. Campbell, J.D., Cass, D.D. and Peteya, D,J,: Colonization and penetration of inact canola seeding roots by an opportunistic fluorescent *Pseudomonas* sp. and the response of host tissue, *Phytopathology*,**77**, 1166-1173 (1987).
14. Austen, R.A. and N.W. Dunn,: A comparative study of the NAH and TOL catabolic plasmid in *P. putida, Aust. J. Biol. Sci.*, **30**, 357-366 (1977).
15. Hegeman, G.D.,: Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *P. putida*; I, Synthesis of enzyme of the wild type, *J. Bactiol.*, **9**, 1140-1154 (1966).
16. Lowry, O.H., J. rosebrough, A. L. Farr and R. Randall,: Protein measurement with Folin penol reagent, *J. Biol, Chem.*, **193**, 265-273 (1951).
17. Sala-Trepate, J.M., and W.C. Evans,: The meta cliavage of catechol by *Azotobacter* sp. 4-Oxalocrotonate pathway, *Appl. Microbiol. biotech* **20**, 400-413 (1971).
18. Morsen, A. and H.J. Rehm,: ,Degradation of phenol by mixed culture of *Pseudomonas putida* and *Cryptococcus elinovii* adsorbed on activated carbon, *Appl. Microbiol. biotech.*, **26**, 283-288, (1987).
19. Mackinney, R.E.,: Microbiology for sanitary enginners, *MacGraw-Hall Co.*, 66 (1982).
20. Suh, Y.S., *et al.*,: Biotechnological research on the microbial agent for the tretment of several industrial wastwaters, *Report of NIER Korea*, **8**, 261-276 (1986).