

Benzene, toluene, ethylbenzene 그리고 세가지 xylene isomer를 분해하는 유기용매 내성세균 *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106의 분리 및 분해 특성

김종수, 박형철, 조수동*, 이승환**, 배윤위**, 문자영***, 정영기****, 주우홍**
창원대학교 유전공학연구소, 창원대학교 기초과학연구소*, 창원대학교 생물학과**,
창원대학교 보건생화학학과***, 동의대학교 미생물학과****
전화 (055) 279-7443, FAX (055) 279-8212

Abstract

Organic solvent tolerant bacterium, designated as strain BCNU 106 is a gram negative, rod-shaped aerobe and grows on benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) as a sole carbon source. According to 16S rDNA analysis and fatty acid analysis, strain BCNU 106 showed highest similarity to *Pseudomonas syringae* var. *savastanoi* (*Pseudomonas savastanoi*). Strain BCNU 106 was able to utilize toluene, ethylbenzene, both *o*-, *m*-, *p*-xylene, *m*-cresol and *o*-cresol. The degradation of *o*-, *m*-, *p*-xylene by strain BCNU 106 is particularly important, since *o*-xylene is a compound of considerable environmental interest, owing to its recalcitrance; and very few microorganism have been reported to utilize both *o*-, *m*-, *p*-xylene as a sole carbon source.

1. 서론

생체 유래 화합물은 통상 수용액 상태에서 활성을 나타내고, 현재 대부분의 생체 반응은 수용액 상태에서 진행되고 있다. 그러나 물에 불용성이며 유기용매에 가용적인 화합물도 많이 존재하는데, 이들을 사용한 유기 변환에 의한 물질의 생산은 실험실에서 뿐 아니라 산업적으로 중요한 의미를 가진다. 그런 효소와 같은 생체촉매가 수용성 화합물의 반응에만 적용되면 그 용도가 제한될 수밖에 없고, 효소가 가진 특성을 살린 효율적인 변화반응은 한정된 범위 안에서만 이용 가능할 뿐이다.

최근 미생물 유래의 효소와 같은 생체 촉매의 반응범위가 확대됨에 따라 지용성 또는 용해도를 높이기 위하여 반응체에 유기용매를 사용하는 경향이 늘어나고 있으며, 유기용매 내에서 활성을 유지시키기 위한 연구와 다양한 생체촉매의 탐색과 개발에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 또한 환경호르몬의 피해가 커지고 있는 현 시점에서 유기용매 내성 및 분해능을 가진 균주의 탐색은 필수적이며, 이를 이용한 bioremediation도 꾸준히 연구되어야 할 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 유기

용매에 내성을 가진 균주를 선별하여 동정하였고 여러 가지 유기용매에 대한 분해능에 대해 조사하였다.

2. 실험 및 방법

균주탐색

유기용매에 대한 내성을 가지는 균주를 분리하기 위하여 공업단지에서 유출되는 폐액과 토양을 채취하였다. 유기용매 내성 균주를 screening하기 위하여, 채취한 폐액 및 토양을 LB (Luria-Bertani) broth에서 3일간 배양하고 적용시켰다. 내성을 가진 균주를 분리하기 위하여 배양액에서 백금을 이용하여 10%의 유기용매를 함유한 LB agar plate에 접종하고 3일 후 single colony를 유기용매 내성을 가진 균주로 판단하고 분리하여 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

배지조성

각종 유기용매에 대한 내성을 관찰하기 위하여 LB 배지 (1% tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract)를 사용하였다. 각종 유기용매에 대한 분해능을 관찰하기 위하여 최소배지인 mineral salts (MS) 배지가 사용하였다. MS 배지의 조성은 solution A (136 g/l KH_2PO_4 , 141.2 g/l Na_2HPO_4), solution B (10.0 g/l nitilotriacetic acid, 14.45 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.33 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9.25 mg/l $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99.0 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, metal 44 solution 50.0 ml), metal 44 solution (2.5 g/l EDTA, 1.1 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.55 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5.0 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.39 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/l $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.18 g/l $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)이고, solution C (20% ammonium sulfate)로 구성하였다.

균주 동정

분리 균주의 동정을 위하여 API 20NE를 사용하였고, 그 외 Gram 염색 및 운동성 검사를 실시하였으며 scanning electron micrography를 이용하여 그 형태를 확인하였다. 세포막에 존재하는 quinone을 분석하여 분류의 지표로 이용하였다.

Fatty-acid analysis

Microbial Identification System (MIDI, Newark, Del)의 방법에 준하여 fatty-acid methyl ester (FAMES)를 추출하였으며, HP 5890 A Gas chromatograph를 이용하여 분석하였으며, 0.2 mm methylphenyl silicone (25 m)으로 coating된 silica capillary column을 사용하였다.

16S rRNA gene isolation, sequencing, and analysis

BCNU 106의 genomic DNA를 분리한 후, 준비된 두 개의 primer를 사용하여 16S rRNA gene을 증폭하였다. Forward primer는 9F [5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', position 9-27 (E.coli 16S rRNA numbering)]이고 Reverse primer는 1542R

(5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3', position 1542-1525)를 사용하였다. 16S rRNA sequences는 CLUSTAL W software를 사용하여 align 하였고, 16S rRNA similarity value는 alignment로부터 산출되었다. Phylogenetic tree는 CLUSTAL W에 의해 산출된 distance matrix를 이용하여 neighbor-joining method로부터 구축되었다.

BTEX 분해분석

기상과 액상의 비가 9:1이 되도록 유지하기 위하여 밀봉가능한 600 ml serum bottle에 MSB medium 60 ml을 첨가한 후, 각 BTEX에 전배양한 균체와 각 BTEX 화합물(10 mM benzene, 10 mM toluene, 10 mM ethylbenzene, 2 mM *o*-xylene, 10 mM *m*-xylene, 10 mM *p*-xylene)을 첨가하여 Teflon-coated rubber stoppers로 밀봉시켜 37°C에서 150 rpm으로 진탕배양하였다.

가스상에 존재하는 BTEX의 양은 250 μ l gas-tight syringe를 이용하여 headspace에서 150 μ l를 취해서 GC에 주입하였다. 시료중의 양은 CarboWax capillary column으로 흘려 FID 로 검출하였다. 분석조건은 injector 온도 230°C, detector 온도 250°C이며 oven 온도는 50°C에서 5분간 유지한 후 120°C까지 5°C/min 씩 상승시켰으며 120°C에서 1분간 유지하였다.

3. 실험결과 및 고찰

균주의 동정

BCNU 106은 운동성이 있는 Gram 음성균으로 포자를 형성하지 않는 간균이었다. 여러 가지 생화학적 특성을 통해서 BCNU 106은 *Pseudomonas* 속임을 알 수 있었다. BCNU 106의 세포막에 존재하는 Quinone을 분석한 결과 Q9이 91.25%를 차지하여 Q9이 주요성분임을 알게 되어 Approved list of Baterial Names에서 *Pseudomonas* 속 중의 group1에 속하는 것으로 판명되었다. FAME의 분석결과 전체적으로 non-hydroxy fatty acid가 88.4%, hydroxy fatty acid가 11.6%가 포함되어 있었으며, 주요 fatty acid는 hexadecenoic acid (C16:0), cis-7-hexadecenoic acid (C16:1 cis7), octadecenoic acid (C18:1)이었으므로 *Pseudomonas savastanoi*일 것으로 추정되었다. 최종적으로 16S rRNA sequence 분석을 통해서 strain BCNU 106을 *Pseudomonas savastanoi*로 확인하여 *Pseudomonas savastanoi* BCNU 106으로 명명하였다.

유기용매 내성

유기용매에 대한 내성을 검토한 결과 11종의 유기용매(toluene, *o*-xylene, *m*-xylene, *p*-xylene, benzene, phenol, propylbenzene, ethylbenzene, *n*-hexane, heptanol, cyclohexane) 모두에 대한 내성을 가지고 있는 것으로 나타났다.

유기용매에 대한 분해능

상기 11종의 유기용매와 *o*-, *m*- 및 *p*-cresol에 대한 BCNU 106의 분해능을 알아보기

위하여 BCNU 106을 최소배지인 mineral salt (MS) agar 배지에 접종한 후 유일한 탄소원인 유기용매를 vapor 상태로 공급한 후 37°C에서 배양하였다. 그 결과 *n*-hexane 과 cyclohexane을 제외한 모든 유기용매에 대해서 분해능을 나타내었다.

참고문헌

1. Lee, J.Y., J.R. Roh, and H.S. Kim. "Metabolic Engineering of *Pseudomonas putida* for the simultaneous biodegradation of benzene, toluene and *p*-xylene Mixture." (1994) *Biotechnol. Bioeng.* vol.43, 1146-1152.
2. Lee, S.B., and S.K. Lee. "Isolation and characterization of a thermotolerant bacterium *Ralstonia* sp. strain PHS1 that degrades benzene, toluene, ethylbenzene and *o*-xylene." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol. 56, 270-275.

Table 1. Morphological characterization of strain BCNU 106

Gram staining	Negative
Shape	Rods
Cell length (μ m)	1.0-2.0 \times 2.0-4.0
Motility	+
No. of flagella	1-3, polar
Formation of flocs with dendritic outgrowths	-

Table 2. Fatty acid composition of strain BCNU 106

Fatty acid	Systematic name	%	
Non-hydroxy	C 12:0	Dodecanoic acid	4.06
	C 14:0	Tetradecanoic acid	0.43
	C 16:0	Hexadecanoic acid	25.45
	C 16:1 cis 7	Cis-7-Hexadecanoic acid	27.81
	C 17:0 cyclo	Cis-9,10-Methylene Hexadecanoic acid	1.04
	C 18:0	Octadecanoic acid	1.19
	C 18:1	Octadecanoic acid	23.80
	C 18:1 trans 7	Trans-7-Octadecanoic acid	4.63
2-Hydroxy	C 12:0 2OH	2-Hydroxydecanoic acid	3.21
3-Hydroxy	C 10:0 3OH	3-Hydroxydecanoic acid	3.87
	C 12:0 3OH	3-Hydroxydecanoic acid	0.55
	C 12:0 3OH	3-Hydroxydecanoic acid	3.96

Table 3. Quinone composition of strain BCNU 106

Quinone type	%
Quinone 8	5.732
Quinone 9	91.251
Quinone 10	0.541