

프탈레이트 에스터 분해세균의 분리 및 분해효소의 최적 생성조건

김병오 · 김란숙 · 박 완 · 진익렬*

경북대학교 자연대 미생물학과

Isolation and Identification of a Phthalate Ester Degrading Bacterium and the Optimal Culture Conditions for Production of One Degrading Enzyme

Kim, Byung-O, Ran-Sug Kim, Wan Park, Ingyol Jin*

Department of Microbiology, College of National Sciences
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

A strain degrading phthalate ester was isolated from a sludge of Taegu area and identified as a strain of *Klebsiella*. The optimum culture conditions for the protocatechuate dioxygenase production were also investigated. This strain produced the enzyme in question under the shaking cultivation at 30°C for the 48 hrs in the medium containing 0.1% protocatechuate as the sole carbon source, 0.1% ammonium sulfate and 0.1% yeast extract as the nitrogen source and mineral salt mixture of magnesium sulfate, sodium chloride, calcium chloride, ferric chloride, manganese sulfate, zinc sulfate and cupric sulfate. This enzyme was intracellularly localized and probably linked to cell membrane, and induced by protocatechuate.

급속한 인구증가와 고도의 산업발달로 인해서 대량의 폐기물 방출을 야기시켰고 해가 거듭될수록 폐기물의 종류 역시 다양해지고 있어, 환경은 더욱 심각하게 오염되어 가고 있다. 그 결과로써 환경정화문제는 매우 중대한 문제가 되고 있다(1).

Phthalate ester는 plastic 가소제로서 화학합성공업에 다량 이용되고 있으며 폐수에 대량 유입되고 있다. 그 중 dibutylphthalate(DBP)는 한때 chewing gum 등에도 사용된 적이 있으나 사용금지되었고, 지금은 plastic 및 wrap 등의 가소제로 가장 많이 사용되고 있다. 지난 89년 10월 중앙일보에 발표된 바 있는 DOP(dioctyl phthalate)는 그 유독성 때문에 사용금지되었다. 이 phthalate ester는 자연분해가 어려워 토양과 하천에 축적되어 환경오염의 원인물질일 뿐만 아니라 벽이

사슬에 따라 생체에 독성을 나타내서 발암을 야기시킨다(2, 14).

이와 같은 유독한 난분해성 유기합성 물질의 미생물에 의한 분해는 환경정화를 위하여 지극히 중요한 일이다(9, 10). 다행히 DBP는 미생물에 의해서 intermediate인 protocatechuate(PCA)로 분해되고 다시 PCA는 aromatic ring이 open된 cis-cis muconate로 분해되어 최종적으로 TCA cycle로 전달되므로써 완전 분해되어진다는 보고가 있다(4-8). 그러나 우리나라에서는 아직도 phthalate ester 분해(자화) 미생물에 대한 연구가 전무하다.

최근 저자들은 우리나라 화학합성공업에 해마다 사용량이 증가되고 있는 DBP를 분해 자화할 수 있는 균주를 토양 또는 sludge로부터 분리하고 동정하였던 바 기존의 보고된 것과 다른 균주임을 알았다(3-6, 14). 그래서 동정된 균의 여러 특성을 조사하고, 본 균의 DBP 분해 관련 효소에 대한 기초연구를 한 결과를 보고하고자 한다.

Keywords: Phthalate ester, protocatechuate dioxygenase, protocatechuate (PCA)

*Corresponding author

재료 및 방법

분리용 배지

대표적인 phthalate ester인 DBP를 유일 C원으로 하여 자화할 수 있는 세균의 분리 및 배양을 위한 배지 조성은 다음과 같다.

1차 분리용 고체배지

C-source : DBP (dibutylphthalate, one of phthalate esters) 0.1%

N-source : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%

mineral : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%

CaCl_2 0.025%

NaCl 0.025%

MnSO_4 0.0002%

FeCl_3 0.002%

CuSO_4 0.0002%

ZnSO_4 0.0002%

Agar 1.5%, pH 7

2차 분리용 고체배지

1차 분리용 배지와 거의 같으나 C-source의 DBP 대신 PCA를 사용했다.

3차 분리용 액체배지

N-source로서 yeast extract (final conc 0.1%)를 첨가한 것 외에는 2차 분리용 배지조성과 같았다.

Phthalate ester 분해균의 분리

대구 근교의 토양과 하수 오폐수에서 채취해온 시료들을 멸균수에 현탁 희석한 다음, 유일 C원으로 DBP 함유 agar 배지에 도말하여 30°C에서 배양하여 agar 배지 위에 자란 균을 육안으로 1차적으로 선택하였다. 선택된 균주들을 PCA 함유 agar 배지에 도말하여 30°C에서 배양하여 자란 균을 2차적으로 선택하고, 2차 선택된 균주들을 PCA를 유일 C원으로 하는 액체배지에서 배양하여 효소역가가 가장 높은 1주를 최종적으로 순수분리하였다.

분리균의 동정

분리균의 형태학적, 생리학적 및 생화학적 성질을 기존의 방법(15, 16)에 따라 검사한 것을 기초로 하여 Bergey's Manual에 따라 분류 동정하였다(11).

생육도 측정

균의 생육도는 Spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서의 탁도로서 나타내었다.

조효소액 조제

배양액을 원심분리하여 침전하고 lysozyme으로 처리

하여 ultrasonication 한 다음, 그의 상등액을 조효소액으로 취하였다.

효소활성 측정

PCA dioxygenase의 활성은 PCA를 기질로 사용하여 효소를 작용시킨 후 Spectrophotometer로 248 nm에서 PCA가 소모되어지는 O.D 값으로 그 활성도를 측정하였다. 효소활성도의 단위(unit)는 1분 동안에 반응액 1 ml 당 PCA 1 μM 을 분해하는 enzyme의 양으로 하였다.

단백질의 정량

Bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Lowry 등의 방법에 따라 540 nm에서 비색 정량하였다(12).

PCA dioxygenase의 존재위치 확인

본 균이 생성하는 PCA dioxygenase의 존재위치는 Takizawa 등의 방법(13)을 변형하여 측정하였다. 즉, 배양액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 extra-cellular 효소로 사용하였다. 침전물은 50 mM phosphate buffer (containing lysozyme 0.5 mg/ml, pH 7.0)에 현탁하여 37°C에서 1hr 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 periplasmic 효소로 사용하였다. 침전물은 다시 buffer에 현탁시킨 후 초음파 처리하여 이 용액을 cytoplasmic 효소로 사용하였다.

효소 합성 양상

PCA dioxygenase가 유도적인 효소인지, 구성적인 효소인지를 알아보기 위해서 C원을 달리하여 배양한 후 enzyme activity를 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리와 동정

DBP 분해세균의 분리 : 채취한 시료를 DBP 함유 고체 배지에 도말하고 30°C에서 4일간 배양하여 생긴 colony들을 1차적으로 150여주 분리하여, 이들을 다시 PCA 함유 agar 배지에서 배양하여 생긴 colony들을 2차적으로 10여주 분리하였다. 이들을 다시 PCA 함유 액체배지에서 배양하고 효소역가를 측정하여 효소활성이 가장 높은 1주(KBO-222)를 최종적으로 분리하였다.

분리균의 분류학적 성질 : 분리된 KBO-222는 Gram Staining, EMB agar, McConkey agar, KOH test 결과

Table 1-1. Morphological and biochemical characteristics of the isolated bacterium

Characteristics	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Isolated KBO-222
Gram staining	-	-	-
Eosin-methylene blue agar			+(growth)
MacConkey's agar			+(growth)
KOH method for determination of Gram reactions			-
Cell shape	rod	rod	rod
Flagella	+	+	+
Facultative anaerobic	+	+	+
Growth at 5% NaCl			+
Hydrolysis of Casein			+
Hydrolysis of Starch			-
Hydrolysis of Gelatin	-	-	-
Indole production	-	+	+
H ₂ S production	-	-	-
Acetoin production			+
Voges-Proskauer test	+	+	+
Methyl red	-	d	+
Citrate utilization	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+
β -Galactosidase	+	+	+
Arginine dehydrolase	-	-	-
Lysine decarboxylase	+	+	+
Ornithine decarboxylase	+	-	-
Catalase			+w
Oxidase	-	-	-
Urease	-	+	+
Coagulase test			-
Fluorescent pigment test			+

Symbol: +, 90% or more strains positive; -, 90% or more strains negative; d, 26-75% positive; +w, weak positive

Gram 음성균이고, 균의 형태는 전자현미경으로 관찰시 young age (5 hr 이내 배양) 시는 rod 이고, stationary phase (24 hr 이후) 에서는 coccus 이었다. KBO-222 는 nitrate 를 환원시켰으며, urease 와 catalase (weak) 을 생산하였으나 oxidase 는 생산하지 못했다. 그외 KBO-222 의 여러 가지 생화학적 특성은 Table 1-1 및 1-2 와 같았다. 이상의 성질로 미루어 보아 분리한 세균은 *Klebsiella oxytoca* 의 특성과 거의 일치하는 것으로 나타났으며 따라서 본 균주를 *Klebsiella* spp. KBO-222 로 동정했다. 본 균을 기존의 phthalate ester 분해 미생물들 (4, 5, 7, 13, 14) 과 비교해본 결과, 새로 분리한 것임

을 알았다.

효소의 최적 생성조건

KBO-222 가 PCA dioxygenase 생산을 하기 위한 최적조건을 여러 가지로 검토했는데 다음과 같은 결과를 얻었다.

pH 의 영향 : 본 균이 효소를 생성하는데 미치는 pH 의 영향을 조사하기 위하여 액체배지를 pH3 에서 pH10 까지 조절하여 KBO-222 을 접종 배양한 후 효소역가를 조사하였던 바, 효소생성을 위한 균의 배양초기 최적 PH 는 5 에서 7 로 나타났었다 (Fig. 1).

Table 1-2. Additional biochemical characteristics of the isolated bacterium

Characteristics	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Isolated KBO-222
Assimilation			
Glucose	+	+	+
Arabinose			+
Mannose	+	+	+
Mannitol			+
N-Acetylglucosamine			+
Maltose			+
Gluconate			+
Carprate			-
Adipate			-
Malate			+
Citrate			+
Phenyl-acetate			+
Fermentation			
Glucose	+	+	+
Mannitol	+	+	+
Inositol	+	+	+
Sorbitol	+	+	+
Rhamnose	+	+	+
Sucrose	+	+	+
Melibiose			+
Amygdaline			+
Arabinose	+	+	+
Fructose			+
Lactose	+	+	+

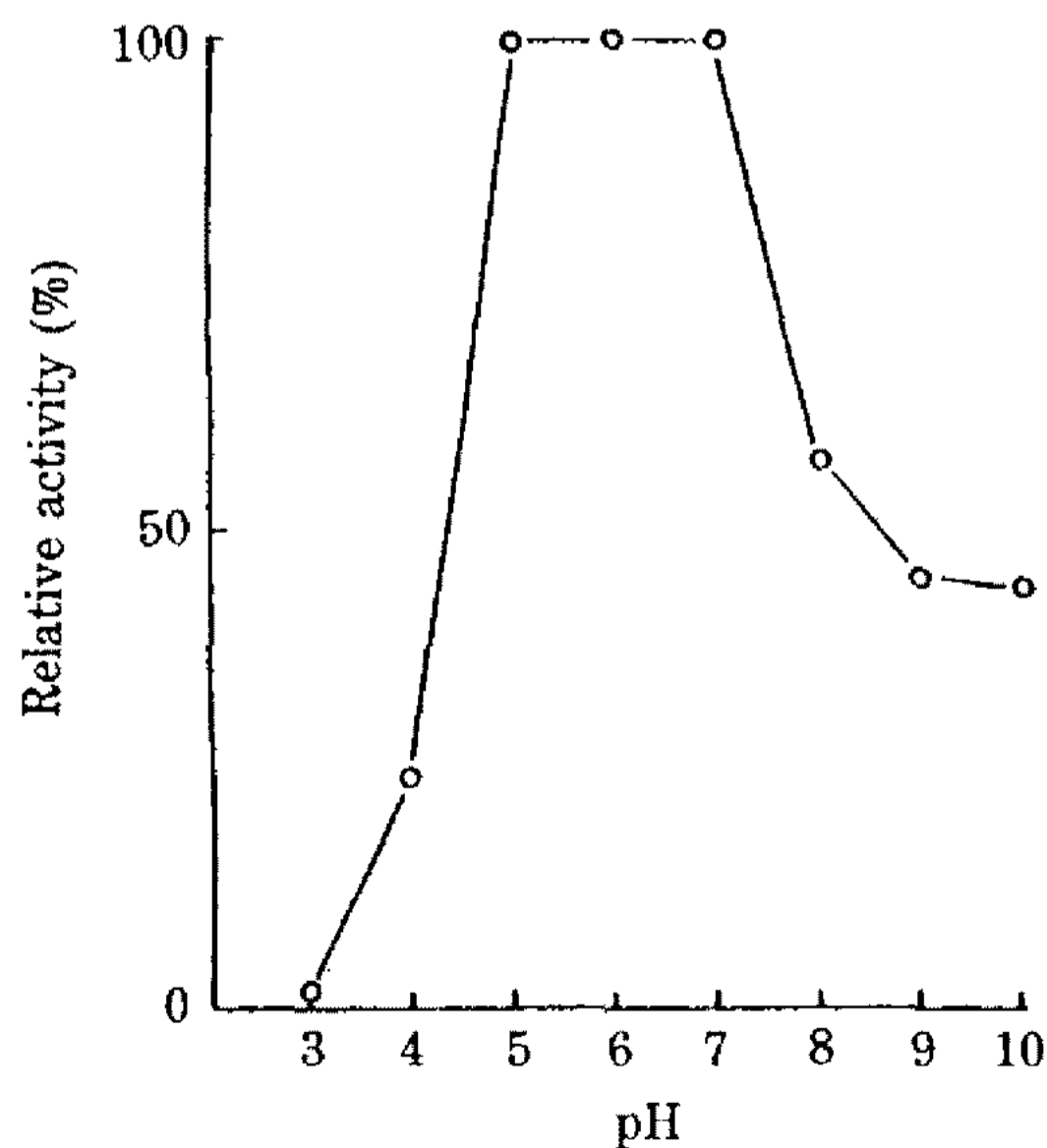


Fig. 1. Effect of pH on production of protocatechuate dioxygenase.

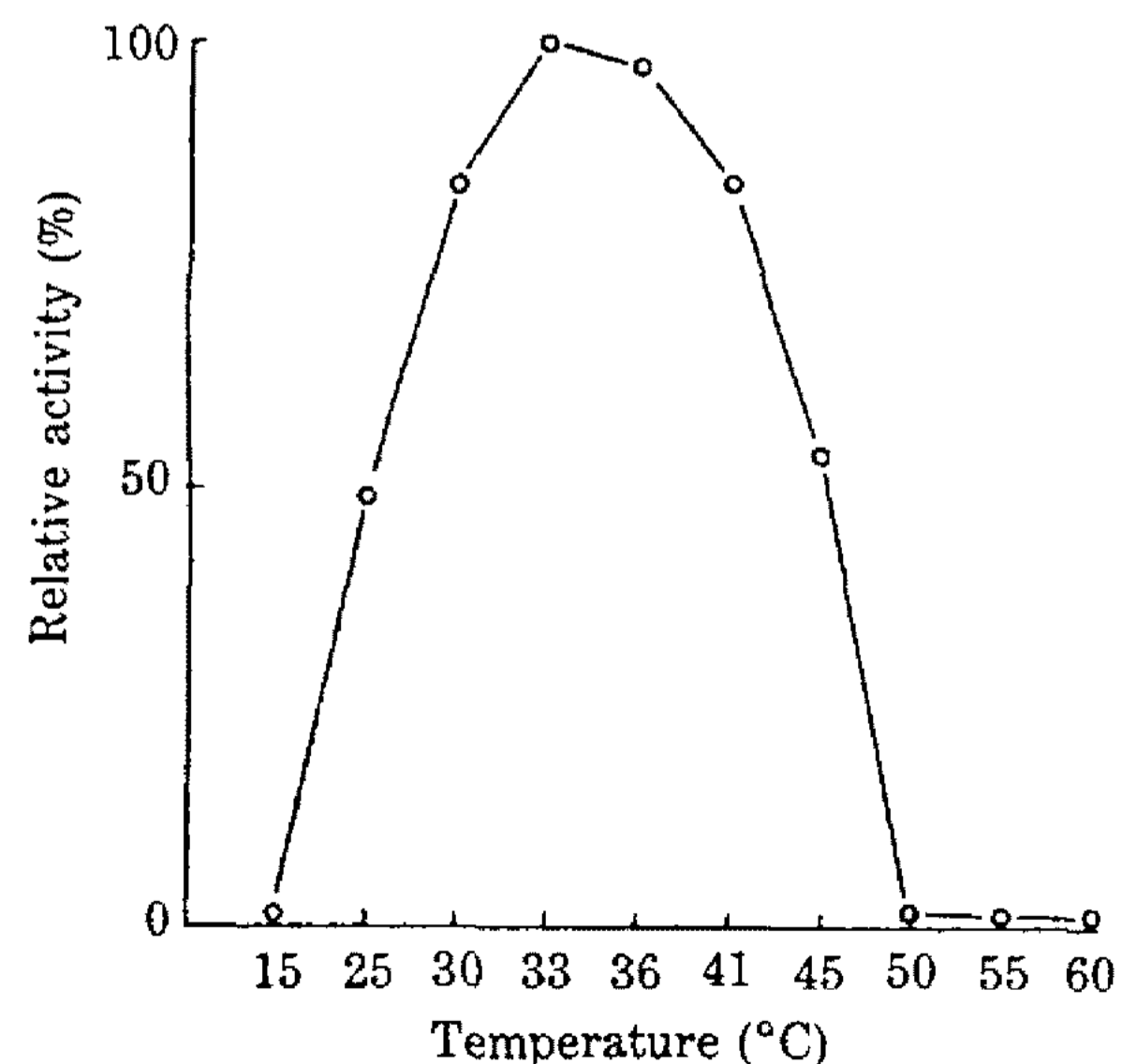


Fig. 2. Effect of temperature on production of protocatechuate dioxygenase.

Table 2. Effect of carbon sources on the production of PCA dioxygenase by the isolated KBO-222

Carbon source ^{*1}	Relative activity (%)
PCA	100 ^{*2}
Glucose	0
Sucrose	2
Strach	0
Lactose	0
PCA + Glucose	98
PCA + Sucrose	97
PCA + Strach	98
PCA + Lactose	102
no carbon source	0

*1 0.1% Concentration per each C source

*2 Specific activity; 23 μ mole/min/mg**Table 3. Effect of PCA concentration on the production of PCA dioxygenase**

PCA concentration	Relative activity (%)
0 %	3
0.1 %	100*
0.5 %	33
1 %	0
1.5 %	0
2 %	0

*Specific activity; 20 μ mole/min/mg

온도의 영향 : 본 균이 효소를 생성하는데 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 배양온도를 10°C에서 60°C까지 조절하여 배양시킨 후, 효소역가를 비교 검사한 결과, 30°C에서 40°C까지 배양한 것이 높은 효소역가를 나타내었다. 그러나 50°C 이상에서 배양했을 때는 효소활성이 거의 인정되지 않았다(Fig. 2).

Carbon source의 영향 : 균의 효소생성을 위한 C 원 및 그의 농도에 대해 조사한 결과는 다음과 같았다 (Table 2, 3).

실험결과로 알 수 있듯이 본 균이 PCA dioxygenase를 생성하는데는 C 원으로서 PCA만을 요구하고, 이의 농도는 0.1%에서만 효소활성이 최대로 나타나며 그외에서는 거의 활성있는 효소를 생성하지 못했다.

아울러 본 효소는 PCA 첨가시에만 PCA 활성을 나타내었으므로 유도 효소임을 알 수 있었다.

Nitrogen source의 영향 : 균의 효소생성에 대한 N 원

Table 4. Effect of nitrogen sources on the production of PCA dioxygenase

Nitrogen source ^{*1}	Relative activity (%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0
Yeast extract	89
Peptone	0
NaNO ₃	0
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Yeast extract	100 ^{*2}
(NH ₄) ₂ SO ₄ + Peptone	41
(NH ₄) ₂ SO ₄ + NaNO ₃	0
Yeast extract + Peptone	102
Yeast extract + NaNO ₃	90

*1 0.1% Concentration per each N source

*2 Specific activity; 19 μ mole/min/mg**Table 5. Effect of nitrogen source concentration on the production of PCA dioxygenase**

(NH ₄) ₂ SO ₄	+	Yeast extract	Relative activity (%)
0 %	+	0 %	0
0.1 %	+	0.1 %	100*
0.2 %	+	0.2 %	103
0.5 %	+	0.5 %	99
1.0 %	+	1.0 %	123
1.5 %	+	1.5 %	11
2 %	+	2 %	0

* Specific activity; 23 μ mole/min/mg

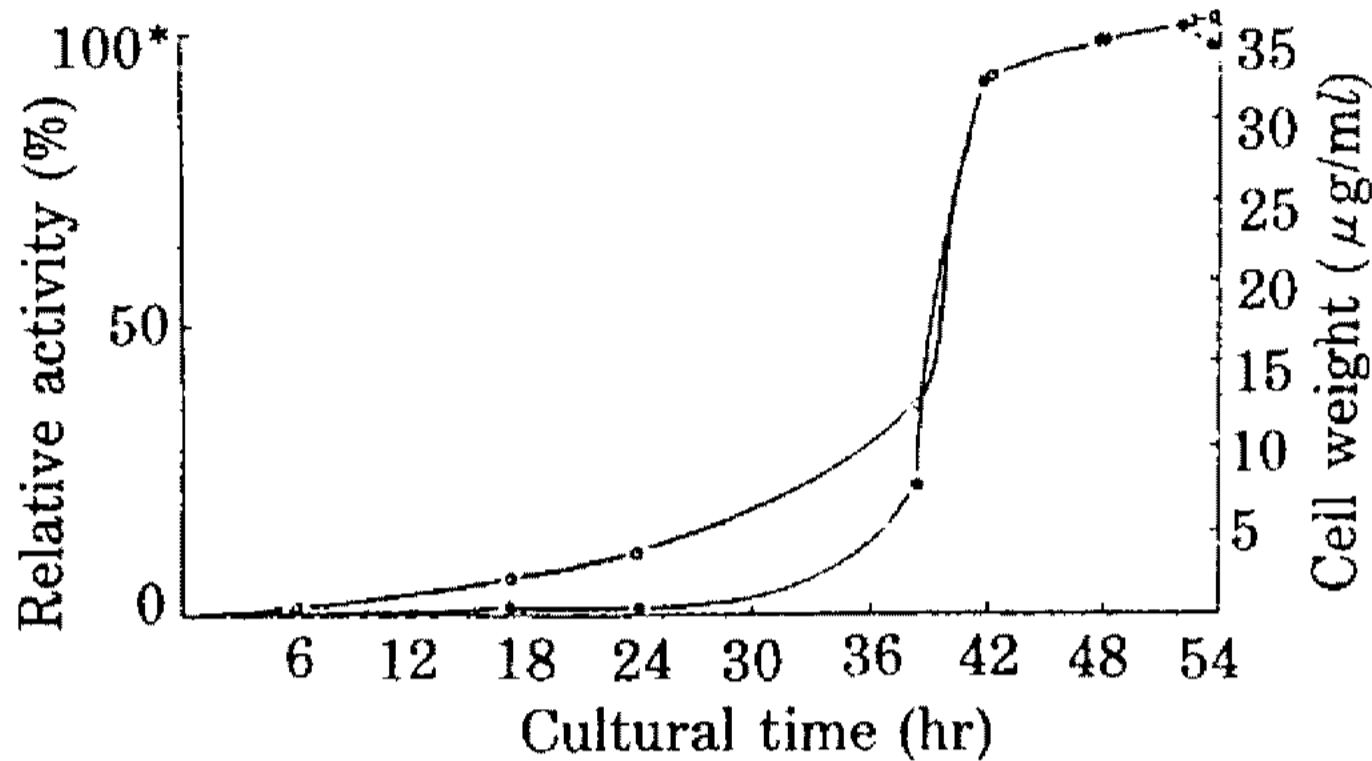
의 영향을 알아보기 위해서 유일 C 원으로서 0.1% PCA 함유의 액체배지에 여러 가지 N 원을 첨가하여 조사한 결과는 다음과 같았다 (Table 4, 5).

Table 4에서 알 수 있듯이 본 효소의 생성을 위해서는 (NH₄)₂SO₄와 yeast extract를 동시에 첨가하는 경우가 좋았다. 아울러 동시 첨가되는 각각 0.1%-1%씩 넣을 때가 효소생성에 기여했다 (Table 5). 그러나 이들을 단독으로 사용했을 때는 효소활성이 그다지 좋지 못했으나, yeast extract만을 넣을 때는 비교적 높은 효소 활성을 나타내었다.

균주 분리시 고체배지내에 유일 N 원으로 ammonium

Table 6. Cellular localization of PCA dioxygenase

	Relative activity (%)
Extracellular	0
Periplasmic	31
Interacellular	100

**Fig. 3. Time course of the bacterial growth and enzyme production.**

○-○, bacterial growth; ●-●, enzyme activity.

* Specific activity; 22 μmole/min/mg

sulfate 만을 넣고 4일간 배양한 후 몇 colony가 보였는데, 이를 액체배지로 옮겨 배양했을 때는 yeast extract의 첨가를 요구했다. 이 사실과 Table 4 및 5의 결과를 종합검토해 봐서 yeast extract는 N원으로서만이 아니라 yeast extract 구성 성분의 어떤 factor가 본 균의 PCA dioxygenase 생합성에 관여하는 듯하다.

효소의 존재위치 확인: Takizawa 등의 방법(13)을 변형하여 효소의 세포내 존재위치를 확인한 결과 세포내 효소임을 알았다(Table 6). 또한 Table 6에서 알 수 있듯이 본 효소는 적어도 cell membrane과 관계하거나, periplasmic enzyme일지도 모른다.

균의 생육곡선과 효소생성의 관계: 최적 배양조건에서 배양했을 때, 배양시간에 따른 균의 증식과 PCA dioxygenase의 생성을 확인한 결과 KBO-222는 균 증식 시간에 따라 본 효소생성 또는 활성이 증가되었다(Fig. 3). 특히 40-48시간 배양으로 균의 최대 증식과 최대 활성의 효소가 생성됨을 알았다.

요 약

많은 관심이 집중되고 있는 환경오염의 대처방안의 일환으로, plastic 및 wrap 제조시 가소제로 가장 널리 사용되고 폐수 중에 대량 유출되어 인체에 유독한 난분해

성 고분자 유기합성 물질로서 문제가 되고 있는 phthalate ester의 일종인 dibutyl phthalate(DBP)를 분해 소화할 수 있는 미생물을 분리하고자 했다. 저자들은 대구 근교의 토양 및 sludge에서 DBP 분해 관련 효소인 protocatechuate dioxygenase을 생성하는 새로운 균주를 분리하여 동정하였다. 그 결과 통성혐기성균의 일종인 *Klebsiella oxytoca*와 형태적, 생화학적 특성이 거의 일치하는 새로운 균주임을 알게되어 *Klebsiella* spp. KBO-222로 동정했다. 본 효소를 생성하기 위한 최적조건으로서 배지조성은 C원으로서 PCA 0.1%, N원으로서 yeast extract와 ammonium sulfate를 각각 0.1% 되게 함께 넣었다. 배양 최초 pH가 7이 되게 하여 30°C에서 40-48시간 진탕배양했을 때가 가장 효소활성이 높았다. 또한 본 균이 생산하는 protocatechuate dioxygenase는 유도 효소이고, 또한 세포내 효소로서 적어도 cell membrane과 관계 있거나, periplasmic과 관계하는 듯 했다.

감사의 말씀

본 연구는 1989년도 문교부 유전공학분야 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었으며 연구 지원을 감사드립니다. 아울러 분리균의 동정을 위해 협조해 주신 KIST 유전자 은행실의 이정숙씨에게도 감사드립니다.

참고문헌

1. 환경오염물질 처리를 위한 생물공학적인 연구(I), 과학기술처(1986).
2. Cally, A.G.: Process in industrial microbiology, Elsevier Scientific Publishing Co. 14, 205 (1978).
3. Christopher, J.B., E. Lahale and D.P. Ballou: *J. Biol. Chem.* 262, 1510 (1986).
4. Christopher, B. and D.P. Ballou: *J. Biol. Chem.* 256, 12673 (1981).
5. Kurane, R., T. Suzuki, Y. Takahara and K. Komagata: *Agri. Biol. Chem.* 41, 1031-1038 (1977).
6. Kurane, R., T. Suzuki and Y. Takahara: *Agric. Biol. Chem.* 13, 907 (1979).
7. Nakazawa, T. and E. Hayashi: *J. Bacteriol.* 131, 42 (1977).
8. Dennis, D.A., P.J. Chapman and S. Dagley: *J. Bacteriol.* 113, 521 (1973).
9. Engelhardt, G., P.R. Wallnofer and O. Hutzinger: *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 13, 342 (1975).
10. Mayer, F.L., D.L. Stalling and J.L. Johnson: *Nature* (London). 238, 411 (1972).

11. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.I (1986).
12. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
13. Takizawa, N. and Y. Murooka: *Agric. Biol. Chem.* **48**, 1451 (1984).
14. 倉根 隆一郎: フタル酸エステル, 微生物の分離法(R & D プランニング), 655pp(1986).
15. Macfaddin, J.F.: *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, Williams & Wilkins, 2nd edition (1980).
16. Cappuccino, J.G. and N. Serman: *Micrology: A Laboratory Manual*. Addison-Wesley Publishing Co., Inc. (1983).

(Received August 13, 1990)