

## *Rhodococcus* sp. TK6가 생산하는 Cyclohexanol Dehydrogenase의 동위효소

김태강 · 이인구\*

경북대학교 농과대학 농화학과

**Cyclohexanol Dehydrogenase Isozymes Produced by *Rhodococcus* sp. TK6. Kim, Tae-Kang and In-Koo Rhee\***. Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea - *Rhodococcus* sp. TK6 was able to produce NAD<sup>+</sup> dependent cyclohexanol dehydrogenase(CDH). The production of CDH was increased rapidly at the logarithmic phase and maintained constantly after that. In order to investigate the inductive production of CDH by various substrates, the bacteria were grown in the media containing alicyclic hydrocarbons and various alcohols as a sole carbon source. CDH was induced most actively by cyclohexanol. Cyclohexanone and cyclohexane-1,2-diol also induced remarkable amount of CDH but it was induced weakly by 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 2-propanol, and 2-methyl-1-propanol. The dehydrogenase of the bacteria grown in the media containing cyclohexanol were weakly active for various alcohols, but the dehydrogenase activity for cyclohexane-1,2-diol was twice as much as that for cyclohexanol. Activity staining on PAGE of the cell free extract of *Rhodococcus* sp. TK6 grown in the media containing cyclohexanol reveals at least seven isozyme bands of CDH and we nominated the four major activity bands as CDH I, II, III, and IV. CDH I was strongly induced by cyclohexanol, cyclohexane-1,2-diol, and 1-pentanol, but its activity was specific to cyclohexanol and 1-pentanol. CDH II was induced by cyclohexanol and cyclohexane-1,2-diol, and its activity was specific to cyclohexanol and cyclohexane-1,2-diol. CDH III was induced by cyclohexanol and cyclohexane-1,2-diol, but its activity was specific to cyclohexane-1,2-diol and 1-pentanol. CDH IV was strongly induced by cyclohexanol and cyclohexane-1,2-diol, and its activity was very specific to cyclohexane-1,2-diol.

**Key words:** cyclohexanol dehydrogenase, cyclohexane-1,2-diol dehydrogenase, cyclohexanol degradation, isozyme

난분해성이며 독성이 강한 cyclohexanol이 미생물에 의해 분해되기 위한 첫 단계반응에 관여하는 효소인 cyclohexanol dehydrogenase(CDH)는 cyclohexanol을 cyclohexanone으로 산화시키는 alcohol dehydrogenase (ADH)의 일종이다[4]. Cycloparaffin계 화합물의 분해에 관여하는 효소에 관한 연구로는 Donoghue와 Trudgill[4] 및 Rhee 등[12]이 cyclohexanol에서 자란 *Acinetobacter* sp.에서, Stirling 등[8]은 *Nocardia* sp.에서 이 효소의 존재를 확인하고 그 반응 생성물이 cyclohexanone이라는 것을 확인하였다. 그리고 이 효소의 조효소는 균에 따라 NAD<sup>+</sup>를 필요로 하는 것[4, 10, 12]과 NADP<sup>+</sup>를 필요로 하는 것[8]이 있다. Cyclohexane 유도체의 분해에 관한 최근의 연구로는 Trower 등[10, 11]이 cyclohexane을 분해할 수 있는 *Xanthobacter* sp.를 분리하여 이 화합물의 대사과정을 규명하고 cyclohexanone의 산화에 관여하는 cyclohexanone monooxygenase를

분리 정제하여 그 성질을 밝힌 바 있다. 또 Trickett 등[9]은 cyclohexane 분해 균주인 *Xanthobacter* sp.로부터 cyclohexane hydroxylase의 특성을 조사한 바 있다. 그렇지만 cyclohexanol의 산화에 관여하는 효소인 CDH의 특성에 관한 연구는 상세하게 이루어져 있지 않은 실정이다.

본 실험실에서 분리한 *Rhodococcus* sp. TK6은 cyclohexanol 및 cyclohexane-1,2-diol과 같은 cycloparaffin계 알코올 뿐만 아니라 ethanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 2-propanol, 2-butanol, 2-methyl-1-propanol 및 3-methyl-1-butanol 등의 알코올류를 유일 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있으며 이중에서 가장 좋은 탄소원은 cyclohexanol이었다[6]. 그러므로 본 균은 cyclohexanol 이외에 cyclohexane-1,2-diol을 비롯한 다양한 알코올을 분해하기 위한 첫 단계 반응에 관여하는 효소로서 여러종의 ADH를 생산할 것으로 추정된다. 또 cyclohexanol을 유일 탄소원으로 배양한 *Rhodococcus* sp. TK6 균체는 cyclohexanol에 작용하는 CDH 이외에 다양한 알코올에 작용하는 CDH의 동위효소들을 생산할 수 있었다. 본 연구에서는 cyclohexanol 이용성 세균인

\*Corresponding author  
Tel. 82-53-950-5718, Fax. 82-53-953-7233  
E-mail: ikrhee@bh.kyungpook.ac.kr

*Rhodococcus* sp. TK6로 부터 CDH의 유도 생산 및 그 동위효소(isozyme)의 유형을 조사한 바를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에 사용한 균주는 본 실험실에서 분리 보관하고 있는 *Rhodococcus* sp. TK6를 사용하였다[6].

### 배지 및 배양 방법

공시균의 배지로는 전보에서 검토해 놓은 최적 배양조건인 배지(이하 COH 배지라 약함)를 이용하였다[6]. 즉, 0.13%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  및 0.05% yeast extract에 pH 7.7로 조정된 COH 기본배지에 각종 탄소원을 0.2%가 되게 첨가하여 사용했다. 효소의 유도 생산을 위한 배양은 위 조건의 배지 100 ml를 500 ml용 삼각플라스크에 분주하여 121°C에서 15분간 살균한 후 각종 탄소원을 여과 제균하여 첨가한 뒤 COH 배지에서 2일간 배양한 종배양액을 3% 접종하여 30°C에서 2일간 배양하였다. 완전배지에서의 생육 및 효소의 생산을 확인하기 위해서 LB배지 [1] 100 ml를 500 ml용 삼각플라스크에 분주하여 121°C에서 15분간 살균 후 COH 배지에서 2일간 배양한 종배양액을 3% 접종하여 30°C에서 2일간 배양하였다.

### 생육도 측정

균의 생육도는 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 세척균체의 105°C 건조중량으로 환산하여 나타냈다.

### CDH의 추출

COH 기본배지에 각종 기질을 첨가한 후 배양한 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심 집균한 뒤 50 mM 인산완충액(pH 7.0)으로 3회 세척하여 배지성분을 제거한 후 균체를 다시 소량(배양액의 10%)의 동일 완충액에 현탁하고 이를 초음파 파쇄기(Ultrasonic社, type 4523; England)로 파쇄하여 CDH를 추출하였다. 이때 파쇄 조건은 90  $\mu\text{A}$ 에서 조율하여 ice bath에서 2분간 초음파 파쇄 후 1분간 방치시키는 과정을 5회 반복하여 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 상정액을 -20°C에 보관하면서 조(粗)효소액으로 사용하였다.

배양 시간별로 CDH의 활성을 조사하기 위해서는 균체에 toluene으로 처리하여 효소를 추출하였다. 즉 배양액 1 ml를 10,000 rpm에서 10분간 원심 집균 하여 100 mM triethanolamine-HCl 완충액(pH 7.5)으로 3회 세척하여 배지성분을 제거한 후 균체를 동일 완충액으로 600 nm에서 흡광도 1.0이 되게 희석한 균체 현탁액 1 ml에 10  $\mu\text{l}$ 의 toluene을 가하여 37°C에서 30분간 120

rpm으로 진탕시킨 후 ice bath에서 냉각시켜 15,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 효소를 추출하였다.

### CDH의 활성측정

효소의 활성측정은 Rodriguez[7]의 방법을 조금 변형시켜 100 mM triethanolamine 완충액(pH 7.6) 0.6 ml에 3.16 mM INT(2-*p*-iodophenyl-3-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride)와 0.65 mM PMS(phenazine methosulfate)를 각각 5:1(v/v)의 비율로 혼합한 용액 0.4 ml, 3 mM  $\text{NAD}^+$  0.1 ml 및 100 mM의 각종 기질 용액 0.2 ml를 첨가하고 여기에 0.2 ml의 조(粗)효소액을 가하여 37°C에서 10분간 반응 시킨후 0.2 N HCl 1.5 ml를 넣어 반응을 정지시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질 mg당 흡광도의 증가량을 효소의 활성단위로 나타내었다.

배양 시간별로 CDH의 활성을 조사하기 위해서는 추출된 효소액 ml당 0.07 ml 상당의 1 M diethanolamine을 가한 효소액(pH 8.6) 0.8 ml를 사용하여 효소 생산성을 비교하였다. 즉, 상기 반응 조건 중 완충액 0.6 ml를 제외한 반응액에 pH를 조정된 효소액 0.8 ml를 가하여 위와 같이 반응시켰다. 단백질의 농도는 소의 혈청 알부민을 표준 단백질로 하여 Bradford[2] 방법에 따라 595 nm에서 비색 정량 하였다.

### Native polyacrylamide gel 전기영동(PAGE) 및 활성 염색

각종 기질에 의해 유도된 CDH의 동위효소에는 어떤 것들이 있는 가를 확인하기 위해 조(粗)효소액(효소량, 12.26  $\mu\text{g}$  단백질/well)을 10% polyacrylamide가 함유된 겔(6×8×0.1 cm)에서 전기영동하였다[3]. 활성 밴드의 염색은 활성 측정 때와 동일한 반응액 13 ml에 전기영동한 polyacrylamide 겔을 넣고 37°C에서 60분간 회전 진탕기(20 rev/min)에서 반응시킨 후 반응액을 버리고 겔을 4°C의 냉각 증류수 50 ml로 5회 세척하여 반응을 정지 시켰다. 또 겔내의 반응액을 완전히 침출시키기 위하여 다시 50 ml의 증류수에 침지시켜 4°C에서 하룻밤 방치 시킨 후 겔을 건조시켜 보관하였다.

## 결과 및 고찰

### CDH 활성과 조(助)효소

공시균은 cyclohexanol을 유일 탄소원으로 이용하여 생육할 수 있으므로 이를 산화시키는 효소인 CDH를 가지고 있을 가능성이 있다. 그래서 이 효소의 존재 및 작용에 관여하는 조효소가 어떤 것인가를 알기 위하여 재료 및 방법에서 설명한 바와 같이 이 효소를 추출하여 그 활성을 확인하여 본 결과는 Table 1에서와 같다. Cy-

**Table 1. Coenzymes for cyclohexanol dehydrogenase(CDH) of the cyclohexanol utilizing bacteria, *Rhodococcus* sp. TK6 grown in COH media contained 0.4% cyclohexanol as a sole carbon source**

Substrate (13.3 mM)	Coenzyme	CDH activity* (unit/mg)
None	NAD <sup>+</sup>	0.30
Cyclohexanol	NAD <sup>+</sup>	3.36
None	NADP <sup>+</sup>	0.22
Cyclohexanol	NADP <sup>+</sup>	0.22

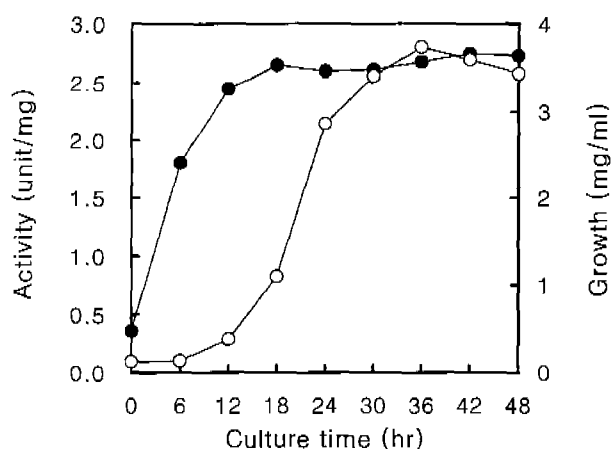
\*CDH was extracted from the cell with sonication.

clohexanol을 기질로 사용하고 NAD<sup>+</sup>를 조효소로 사용한 경우에만 그 활성이 높게 나타났고 NADP<sup>+</sup>를 조효소로 사용한 경우에는 그 활성이 거의 없었다. 이 반응 조건에서 조효소를 사용하지 않을 경우 전혀 반응이 일어나지 않았다. 이 결과로 본 균의 CDH는 *Acinetobacter* NCIB 9871[4], *Acinetobacter calcoaceticus* C-10[12]과 C-15[5], 그리고 *Xanthobacter* sp.[10]의 경우와 마찬가지로 NAD<sup>+</sup>의존성임을 확인할 수 있었다.

#### CDH의 유도 생산

배양 시간에 따른 CDH의 유도 생산 본 균이 어느 생육기에 가장 많은 CDH를 생산하는가를 확인하기 위해 배양 시간별로 CDH 활성을 조사한 결과 Fig. 1에서와 같이 대수 증식기인 배양 18시간까지 CDH의 비활성이 증가하였으며 그 이후에는 활성이 일정하게 유지되었다. 이 결과로 본 균은 대수 증식기 중기 이후부터는 균체량에 비례하여 CDH를 생성함을 알 수 있었다.

각종 기질에 의한 CDH의 유도 생산 공시균이 각종기



**Fig. 1. Effect of culture time on the induction of cyclohexanol dehydrogenase(CDH) by *Rhodococcus* sp. TK6 grown in COH media.**

○—○, growth; ●—●, activity. CDH activity was determined with crude enzyme solution extracted from toluene treated cells as described in Material and Methods.

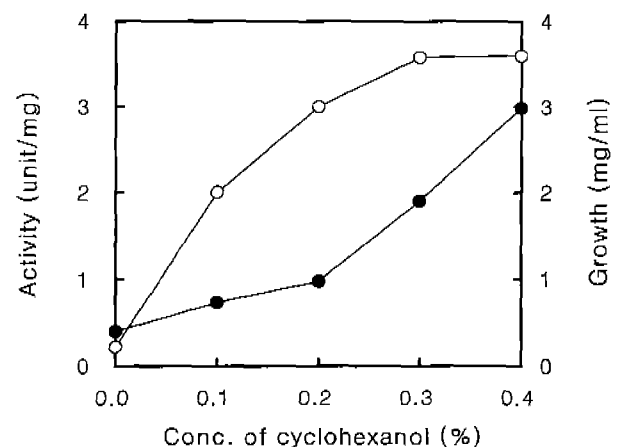
**Table 2. Effect of various carbon source on the induction of cyclohexanol dehydrogenase (CDH) in *Rhodococcus* sp. TK6 grown for 48 hours**

Carbon source (0.2%)	CDH activity (unit/mg)	Growth (mg/ml)
1-Propanol	0.55	2.39
1-Butanol	0.39	2.21
1-Pentanol	0.49	2.19
1-Hexanol	0.56	2.34
2-Propanol	0.48	1.53
2-Methyl-1-propanol	0.55	2.10
Cyclohexanol	0.98	2.99
Cyclohexanone	0.96	2.52
Cyclohexane-1,2-diol ( <i>cis</i> , <i>trans</i> mixture)	0.68	2.81
LB*	0.36	4.94

\*Luria Broth media was used as a control without any inducers.

질에 의해 CDH가 유도 되는 정도를 확인하기 위해 COH 기본배지에 cyclohexanol, cyclohexanone 및 cyclohexane-1,2-diol 등의 cyclohexanol 유도체를 비롯하여 각종 알코올류를 0.2%가 되게 첨가하여 48시간 동안 배양 후 CDH 활성을 조사하였다. 그 결과 Table 2에서와 같이 cyclohexanol에 의해서 가장 강한 CDH의 활성이 유도되었으며 cyclohexane-1,2-diol이나 cyclohexanone에 의해서도 상당량이 유도되었다. 그러나 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 2-propanol 및 2-methyl-1-propanol은 탄소원으로 이용하여 생육할 수 있으나, 이들 알코올류에 의해서는 CDH가 약하게 유도되었다.

Cyclohexanol 농도에 따른 CDH의 유도 Cyclohexanol의 농도가 CDH의 유도에 어떤 영향을 미치는가를 확인하기 위해 COH 기본 배지에 cyclohexanol을 농도



**Fig. 2. Effect of cyclohexanol concentration on the induction of cyclohexanol dehydrogenase in *Rhodococcus* sp. TK6 grown for 2 days.**

○—○, growth; ●—●, activity.

**Table 3. Relative dehydrogenase activities of the cell free crude extract of *Rhodococcus* sp. TK6 grown in COH media contained 0.4% cyclohexanol as a sole carbon source**

Substrate (13.3 mM)	Relative activity (%)
Ethanol	12
1-Propanol	11
1-Butanol	17
1-Pentanol	22
2-Propanol	16
2-Methyl-1-propanol	11
3-Methyl-1-butanol	10
2-Methyl-2-propanol	10
Cyclohexane-1,2-diol ( <i>cis, trans</i> mixture)	228
Cyclohexanol	100
None	6

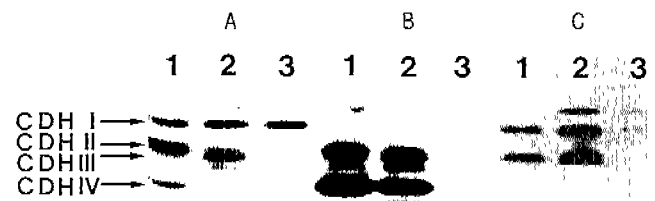
별로 첨가하여 CDH를 유도시켜 본 결과 Fig. 2에서와 같이 본 균의 생육 최고 농도인 0.4%까지[6] 유도 기질의 농도가 높을수록 CDH가 더 많이 유도되었다.

#### 무세포 추출액의 각종 ADH 활성

0.4% cyclohexanol로 유도한 무세포 추출액의 CDH 활성을 100으로 하여 각종 기질에 대한 상대 활성을 조사해 본 결과는 Table 3에서와 같다. Ethanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 2-propanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol 및 2-methyl-2-propanol에 대해서는 비교적 약한 활성을 나타내었으며 이 중에서 1-pentanol에 대해서 22%로 약간 높은 활성을 나타냈다. 그러나 cyclohexane-1,2-diol에 대해서는 2배 이상의 높은 활성을 나타내었다. Cyclohexanol 이용성 균인 *Rhodococcus* sp. TK6는 cyclohexanol 이외에 각종 alcohol과 cyclohexane-1,2-diol을 유일 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있다[6]. 그러므로 cyclohexanol에 의해 유도 생산된 본 균의 CDH는 cyclohexane-1,2-diol과 각종 알코올에 작용할 수 있는 폭 넓은 기질 특이성을 가지고 있거나 아니면 CDH 이외에도 cyclohexane-1,2-diol dehydrogenase(CDDH)를 비롯한 각종 ADH를 생산할 가능성이 높다.

#### CDH 동위효소의 생성 확인

Table 3의 결과에서 볼 때 cyclohexanol에 의해 유도되는 CDDH가 별도로 존재하던가 아니면 CDH가 cyclohexane-1,2-diol에 더 높은 친화력을 가지고 있는지, 또 CDH가 다른 알코올류에도 작용하는지, 아니면 별도의 ADH들이 유도되는지 조사해 볼 필요가 있다. 그래서 본 균이 CDH의 동위효소를 생산할 가능성을 확인해 보기 위해 cyclohexanol, cyclohexane-1,2-diol 및 1-pentanol을 각각 유일 탄소원으로 넣어 유도 시킨 후 효소를



**Fig. 3. Enzyme activity staining of cyclohexanol dehydrogenase isozymes in the cell free extract of *Rhodococcus* sp. TK6 which was induced by 0.3% cyclohexanol(1), cyclohexane-1,2-diol(2), and 1-pentanol(3).**

The isozymes on PAGE gel were stained with PMS(phenazine methosulfate) and INT(2-*p*-iodophenyl-3-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride). A, 13.3 mM cyclohexanol for substrate; B, 13.3 mM cyclohexane-1,2-diol for substrate; C, 13.3 mM 1-pentanol for substrate.

추출하여 polyacrylamide 젤 전기영동(PAGE)을 한 후 cyclohexanol, cyclohexane-1,2-diol 및 1-pentanol을 기질로하여 반응시켜 활성밴드를 염색한 결과는 Fig. 3과 같다. 여기서 7개의 활성 밴드를 확인할 수 있었으며 이중 활성이 강한 4개의 동위효소를 각각 CDH I, II, III 및 IV로 구분하여 밴드의 강도를 조사한 결과 각 효소의 유도정도 및 기질특이성이 다르게 나타남을 알 수 있었다. CDH I의 경우 cyclohexanol, cyclohexane-1,2-diol 및 1-pentanol에 강하게 유도되었으나, 기질 특이성은 cyclohexanol과 1-pentanol에만 높게 나타났고 cyclohexane-1,2-diol에는 낮았다. CDH II는 cyclohexanol과 cyclohexane-1,2-diol에만 유도되었으며, 기질특이성은 cyclohexanol과 cyclohexane-1,2-diol에 높게 나타났다. CDH III은 cyclohexanol과 cyclohexane-1,2-diol에만 약하게 유도될 뿐 1-pentanol에는 유도가 되지 않았으며 기질특이성은 cyclohexane-1,2-diol과 1-pentanol에 높게 나타났지만 cyclohexanol에는 낮게 나타났다. CDH IV는 cyclohexanol 및 cyclohexane-1,2-diol에만 매우 강하게 유도되었고 1-pentanol에는 유도되지 않으며 기질특이성은 cyclohexane-1,2-diol에 매우 높게 나타났고 cyclohexanol에는 낮게 나타났다. 이 결과로 CDH I은 cyclohexanol과 1-pentanol에 기질 특이성이 높고 cyclohexane-1,2-diol에 상대적으로 낮은 기질특이성이 있는 효소이고, CDH II는 cyclohexanol과 cyclohexane-1,2-diol에 기질특이성이 높지만 cyclohexanol에 더 강하게 유도되므로 major CDH로 추정된다. 또 CDH III은 cyclohexanol과 cyclohexane-1,2-diol에 의해 유도되지만 cyclohexane-1,2-diol과 1-pentanol에 잘 작용하는 dehydrogenase이며, CDH IV는 cyclohexanol과 cyclohexane-1,2-diol에 의해 유도되지만 cyclohexane-1,2-diol에 높은 기질특이성이 있는 것으로 보아 major CDDH일 것으로 추정된다. 조정제한 CDH II 및 CDH

IV의  $K_m$ 치를 측정된 결과 CDH II는 cyclohexane-1,2-diol(8.29 mM) 보다 cyclohexanol(3.29 mM)에 친화력이 높고 CDH IV는 cyclohexanol(5.72 mM) 보다 cyclohexane-1,2-diol(4.52 mM)에 더 높은 친화력을 갖고 있었다. 이상의 결과에서 볼 때 *Rhodococcus* sp. TK6의 CDH 동위효소 중 CDH II가 major CDH이며, CDH IV는 major CDDH일 것으로 생각된다. 앞으로 이 효소들을 정제하여 각각의 기질 특이성 및 효소의 특성을 밝히 고자 한다.

## 요 약

*Rhodococcus* sp. TK6는 cyclohexanol 함유 배지에서  $NAD^+$  의존성 CDH를 생산하였다. 배양중 CDH 활성은 대수증식기 중기까지 증가하였으며 그 이후에도 일정 수준의 CDH 활성을 유지하였다. Cyclohexanol 유도체 및 각종 알코올을 유일 탄소원으로 배양했을 때 cyclohexanol에서 배양한 무세포추출액에서 CDH활성이 가장 높았다. Cyclohexanol을 유일 탄소원으로 배양한 무세포추출액을 조효소액으로 사용하여 각종 기질에 대한 dehydrogenase 활성은 ethanol, 1-propanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 2-propanol, 2-methyl-1-propanol, 3-methyl-1-butanol 및 2-methyl-2-propanol에서 약한 활성이 나타났으며 cyclohexane-1,2-diol에서는 cyclohexanol에서 보다 2배 이상의 높은 활성이 나타났다. 무세포 추출액의 PAGE에서 7개의 활성 밴드를 확인할 수 있었으며 이중 활성이 높은 4개의 동위효소를 각각 CDH I, II, III 및 IV로 구분하였다. CDH I의 경우 cyclohexanol, cyclohexane-1,2-diol 및 1-pentanol에 강하게 유도되었으나, 기질 특이성은 cyclohexanol과 1-pentanol에 높게 나타났다. CDH II는 cyclohexanol과 cyclohexane-1,2-diol에 의해 유도되었으며, 기질특이성은 cyclohexanol과 cyclohexane-1,2-diol에 매우 높게 나타나지만 cyclohexane-1,2-diol 보다 cyclohexanol에 더 강하게 유도되므로 이것이 major CDH인 것으로 추측된다. CDH III은 cyclohexanol과 cyclohexane-1,2-diol에 유도되었고 기질 특이성은 cyclohexane-1,2-diol 및 1-pentanol에 높게 나타났다. CDH IV는 cyclohexanol 및 cyclohexane-1,2-diol에만 강하게 유도되었고 기질특이성은 cyclohexane-1,2-diol에 매우 높게 나타나므로 major cyclohexane-1,2-diol dehydrogenase일 것으로 추정된다.

## 감사의 글

본 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 자유공모과제

(1997-001-G00054) 연구비에 의해 수행된 연구의 일부이며 연구비지원에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Bertani, G. and J. J. Weigle. 1953. Host controlled variation in bacterial viruses. *J. Bacteriol.* **65**: 113-120.
- Bradford, M. M. 1964. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Davis, B. J. 1964. Disc gel electrophoresis, II. Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- Donoghue, N. A. and P. W. Trudgill. 1975. The metabolism of cyclohexanol by *Acinetobacter* NCIB 9871. *Eur. J. Biochem.* **60**: 1-7.
- Kim, K. A., J. S. Park, and I. K. Rhee. 1985. Utilization of cyclohexanol and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* C-15. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 71-77.
- Kim, T. K. and I. K. Rhee. 1999. Isolation and characterization of cyclohexanol-utilizing bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **27**: 107-112.
- Rhodriguez, R. L. and R. C. Trait. 1983. *Recombinant DNA Techniques*, pp. 126-127. Addison-Wesley Publishing Co. Inc., Reading, Massachusetts.
- Stirling, L. A., R. J. Watkinson, and I. J. Higgins. 1977. Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons; Isolation and properties of a cyclohexane-degrading bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **99**: 119-125.
- Trickett, J. M., E. J. Hammonds, T. L. Worrall, M. K. Trower, and M. Griffin. 1991. Characterization of cyclohexane hydroxylase; A three-component enzyme system from a cyclohexane-grown *Xanthobacter* sp. *Microbiol. Lett.* **82**: 329-334.
- Trower, M. K., R. M. Buckland, R. Higgins, and M. Griffin. 1985. Isolation and characterization of a cyclohexane metabolizing *Xanthobacter* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1282-1289.
- Trower, M. K., R. M. Buckland, and M. Griffin. 1989. Characterization of an FMN-containing cyclohexanone monooxygenase from cyclohexane-grown *Xanthobacter* sp. *Eur. J. Biochem.* **181**: 199-206.
- Rhee, I. K. 1980. Isolation and characterization of cyclohexanone utilizing bacteria. *Res. Bull. Hyosung Women's Univ.* **23**: 1197-1210.

(Received January 29, 1999)