

## ***Thiobacillus neapolitanus* R-10으로 부터 산화 효소의 분리 정제와 특성**

원용돈 · 김동석\* · 류병호\*

부산공업대학교 고분자공학과, \*경성대학교 식품공학과  
(1995년 10월 12일 접수)

### **Purification and Characterization of Oxidase Induced from *Thiobacillus neapolitanus* R-10**

Yong-Don Weon, Dong-Suck Kim\* and Beung-Ho Ryu\*

Dept. of poly. Eng. Pusan National University of Technology, Pusan, 608-739, Korea  
\*Dept. of Food Sci. and Biotechnology, Kyung Sung University, Pusan, 608-736, Korea  
(Manuscript received 12 October 1995)

#### Abstract

*Thiobacillus neapolitanus* R-10, which produces a active thiosulfate oxidase, was isolated from nightsoil. The optimal culture conditions of *Thiobacillus neapolitanus* R-10 for the production of enzyme was determined as followed: 0.8%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.04%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2ml trace elements solution, and pH 6.5 at 30°C and 72hr cultivation. The oxidase was successively purified 83 folds yield by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation, DEAE-Cellulose, Sephadex A-50 column chromatography and gel Sephadex G-150 gel filtration with yield of 5.9%. The molecular weight of purified enzyme was estimated to be 43,000 dalton by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and gel filtration column chromatography.

The enzyme activity was highest at 40°C and pH 7.0. The enzyme activity was relatively high by  $\beta$ -mercaptoethanol but strongly inhibited by cysteine.

Key Words : *thiobacillus neapolitanus*, thiosulfate oxidase

#### 1. 서 론

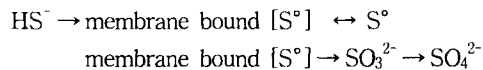
유황을 함유하고 있는 악취는 공장폐수, 분뇨, 돈사나 계사(金川貴博:1992) 및 가정에서 나오는 쓰레기 등에서 발생하고 있다. 악취는 감각 수용기를 매개로 하는 공해로서 그 심각성은 우려되지만 인체에 미치는 영향에 대하여 아직 밝혀져 있지 않기 때문에 그 방지 대책은 대기 및 수질 오

염에 비하여 미비한 실정이다.

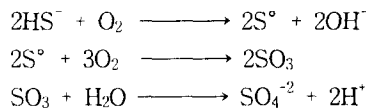
유황 함유 악취물질의 제거는 화학적으로 탈취하는 여러가지 방법이 있으나 2차적 오염을 유발하기 쉽고 에너지가 많이 들며 처리약품 및 고정처리비 등이 많이 소요되므로 이를 개선하기 위한 방법의 하나로 미생물학적 처리법이 많이 이용되고 있다(Kelly; 1985; 金川貴博 등 1986; 福山丈二 등 1981).

미생물에 의한 유황물질의 제거는 유황세균에

의하여 산화시켜 제거를 시도한 이래(金川貴博,1992,1991;Gibson,1984) *Thiobacillus* sp. 및 *Thiomicrospira* sp. 로서 무기질층의 유황물질을 산화시켜 제거하는 것이 가능하였다. 이와 같이 유황의 산화는 Kelly(1985)와 Moriarty *et al.*(1970)은 *Thiobacillus* sp.에 의한 2단계의 생물학적 유황을 제거하는 연구 결과를 보고하였다.



또 Kuenen(1975) 과 Kuenen *et al.*(1982)은 초기에 미생물로서 생물학적인 유황제거 이론을 보고한 바 있다.



이와 같이 미생물에 의한 유황악취 물질의 제거 메카니즘은 완전히 알려져 있지 않으나, 유황물질을 기질로 사용하여 자화하거나, 미생물에서 분비하는 산화 효소 (oxidized enzyme)에 의하여 탈취되는 것으로 판단된다. 이를 뒷받침하는 연구로는 De Bont *et al.*(1981)은 *Hyphomicrobium* sp.에서, Suylen과 Kuenen(1986) 및 Suylen *et al.*(1987)등은 유황 함유 오염물질을 미생물이 분비하는 산화 효소에 의하여, Gould와 Kanagawa(1992)는 *Thiobacillus thioparus*에서 분비하는 thiosulfate oxidase에 의하여 유황 화합물질들이 분해된다고 하였다. 또 Kula *et al.*(1982)은 *Thiobacillus* A<sub>2</sub>의 균체에서 악취의 분해를 촉진하는 산화 효소를 분리 정제한 바 있고 Lu와 Kelly(1988)는 *Thiobacillus* sp.에서 유황 함유 물질의 제거 oxidase를 분리 정제한 바 있으며 Sklodowska(1990)는 *Thiobacillus neopolitanus*로부터 산화 효소를 정제 하였다.

따라서 본 연구는 *Thiobacillus neopolitanus* R-10을 이용하여 유황 함유 악취물질의 탈취 메카니즘을 규명하기 위한 방법의 하나로 이 균주로부터 유황을 분해하는 산화 효소를 분리 정제하고 효소의 특성을 조사하여 보고하는 바이다.

## 2. 재료 및 실험방법

### 2.1. *T. neapolitanus* R-10으로 부터 Thiosulfate 산화 효소의 추출 정제

#### 2.1.1. *T. neapolitanus* R-10의 생육

*T. neapolitanus* R-10을 BVM 기본 배지 (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 8g, KHPO<sub>4</sub> 2g, K<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.4g, NaCl 0.4g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g 및 basal mineral 혼합액 2ml을 증류수 1l에 녹여 사용)로 30° C 에서 3일간 배양한 후 원심분리한 다음 균체를 sonicator로 파쇄시킨 후 0.1M Tris-HCl buffer(pH 6.5)을 가하여 희석한 다음 원심분리시킨 상정액을 사용하였다 (원용돈의,1995)

#### 2.1.2. 황산암모늄 분획

배양액에 황산암모늄을 30%포화시켜 3시간 방치한 다음 12,000 × g 에서 20분 동안 원심분리하여 얻은 상정액에 다시 황산암모늄을 80% 포화가 되도록 가하여 4°C에서 12 시간 정지한 후 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이를 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 6.5)에 용해시켜 24 시간 동일한 완충용액에 투석한 다음 polyethylene glycol (PEG)6,000으로 농축하여 조효소액으로 하였다.

#### 2.1.3. DEAE-Cellulose 크로마토그래피

0.1M Tris-HCl buffer(pH 6.5)으로 평형시킨 DEAE-Cellulose 칼럼(3.2 × 30 cm)에 투석 농축된 조효소액을 가한 후 DEAE-Cellulose에 결합되지 않은 물질을 280 nm에서 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 씻어내고 결합되어 있는 물질은 0~0.1 M NaCl의 염농도까지 linear gradient로 용출시켰으며 이때 용출속도는 시간당 15ml로 조절하였고 시험관에 4.0ml씩을 받아 효소 활성이 있는 분획들을 모았다.

2.1.4. DEAE-Sephadex A-50 크로마토그래피

DEAE-Cellulose 크로마토그래피에서 얻은 활성 분획을 농축한 후 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 6.5)으로 투석하여 동일 완충액으로 평형화시킨 DEAE- Sephadex A-50 칼럼(1.8 × 40 cm)에 흡착시킨 다음 0~0.4 M NaCl의 염농도 까지 linear gradient로 효소활성 부분을 용출(4 ml/tube)하였다.

2.1.5. Sephadex G-150 gel 크로마토그래피

DEAE-Sephadex A-50 크로마토그래피로부터 얻은 활성분획을 농축한 후 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 6.5)으로 평형화시킨 Sephadex G-150 칼럼(2.0 × 80 cm)에 충전하고 동일 완충액으로 gel 크로마토그래피를 행하였다. 이상의 정제과정을 도시하면 Fig. 1과 같다.

2.2. 단백질의 순도검정 및 분자량 측정

Laemmli(1970) 의 방법으로 sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel 전기영동을 행한 후 표준 단백질과의 상대적 이동거리로부터 분자량을 산정하였다. 즉 정제효소와 표준 단백질을 0.1% SDS 와 5% 2-mercaptoethanol을 함유한 0.0625 M Tris-HCl buffer(pH 6.8)으로 2 분간 비등 수욕에서 열처리한 다음 7.5% polyacrylamide gel을 사용하여 단백질을 분리하고 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. 이때 사용한 표준 단백질들은 phosphorylase b (M.W. 94,000), bovine serum albumin (M.W.67,000), ovalbumin (M.W.43,000), carbonic anhydrase (M.W.29,000), soybean trypsin inhibitor (M.W.20,000), α-lactalbumin (M.W.14,000)를 사용하였다.

2.3. 효소학적 성질

2.3.1. 최적 온도 및 열안정성

2mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>를 함유한 0.1M Tris-HCl

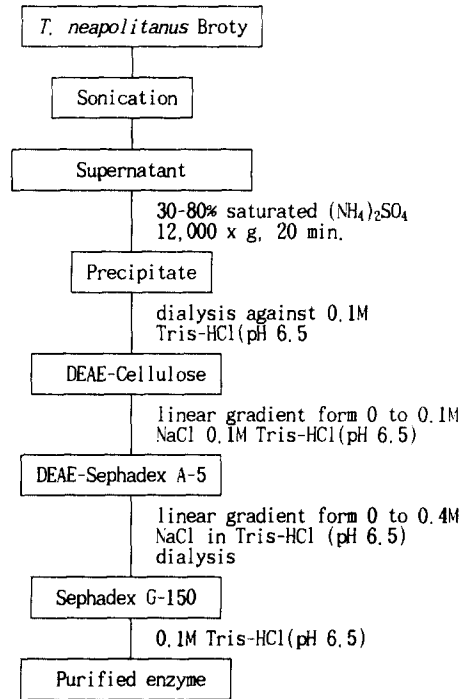


Fig. 1. Schematic diagram for purification of thiosulfate oxidase from *T. neapolitanus* R-10.

buffer (pH 6.5) 1ml에 정제 효소액을 가하고 10°C ~80°C의 온도에서 10분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하여 효소의 최적 온도를 조사하였으며, 동일한 완충액에서 정제 효소액을 10°C~80°C온도로 15 분간 처리한 다음 잔존활성을 측정하여 열안정성을 검토하였다.

2.3.2. 최적 pH 및 pH 안정성

2mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>를 함유한 pH 2.5~9.0까지의 완충액 1ml에 정제 효소액을 가하여 40°C에서 10 분간 반응시켜 효소활성을 측정하여 효소의 최적 작용 pH를 조사하였으며, 동일한 완충액에서 정제 효소액을 각 pH에서 처리시간에 따른 잔존활성을 측정하여 pH 안정성을 검토하였다.

2.4. Oxidase 활성의 측정

Oxidase 활성 측정은 tefron으로 덮은 산소 전

극 cell (Teflon covered Clark oxygen electrode cell, Crank Brothwer, Bottisham, U.K.)로서 30°C에서 산소 소비량을 측정하여 분석하였다.

이 효소 반응계에서 산소의 농도는 Robinson과 Cooper(1970)의 방법으로 측정하였다. 즉, 반응용액은 2  $\mu$ mol thiosulfate, 50  $\mu$ M 인산 완충액(pH 7.5)에 0.5mg dry, weight, cells 또는 5mg enzyme protein을 전체 1ml로 만들어 반응시켰다. 이 반응은 Hamilton microsyringe로 thiosulfate용액을 주입시켜 반응시켰다. 효소활성은 (mg, protein)/min 또는 (mg, dry, wt)/min로 cell이 소비하는 산소량이며 nmol 또는  $\mu$ mol로 나타내었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. *T. neapolitanus* R-10의 균체로부터 thiosulfate의 산화

*T. neapolitanus* R-10의 균체로부터 thiosulfate의 산화과정을 조사하기 위하여 *T. neapolitanus* R-10을 3일간 배양한 후 균체로부터 측정하였다. Fig. 2의 (A)에서 보는 바와 같이 protein의 농도를 각 4, 8, 12 및 16mg/ml씩 조절하여  $S_2O_3^{2-}$ 의 산화를 측정한 결과 8mg/ml에서 산화속도가 높았으며 10, 12mg/ml에서는 약간 낮았다. 단백질의 농도가 일정하게 증가하면 thiosulfate의 산화 속도도 증가하였다가 일정량이 증가하면 다시 감소하였다. Fig. 2의 (B)는 완충 용액의 농도에 따른 산화 속도를 나타낸 것으로서 thiosulfate의 산화 속도는 비활성을 측정하여 구하였는데 Tris-HCl buffer의 농도와 단백질의 농도와는 상관관계가 있었다. Tris-HCl buffer (pH 7.0)의 농도가 10~30mM에서는 비활성이 거의 비슷하게 나타내었다. Kular *et al.* (1982)은 *Thiobacillus* A2의 균체에서 산화 효소의 활성을 측정하였던 바, 효소의 활성이 불안정하였고, Lu와 Kelly(1988)는 *Thiobacillus* A2에서 thiosulfate의 산화는 전자공여체와 에너지가 요구된다고 하였다. Sklodowska(1990)는 *T.*

*neapolitanus*에서 thiosulfate 산화효소를 분리 정제하였는데 그 균주의 특성은 본 연구 결과와 비슷하였다.

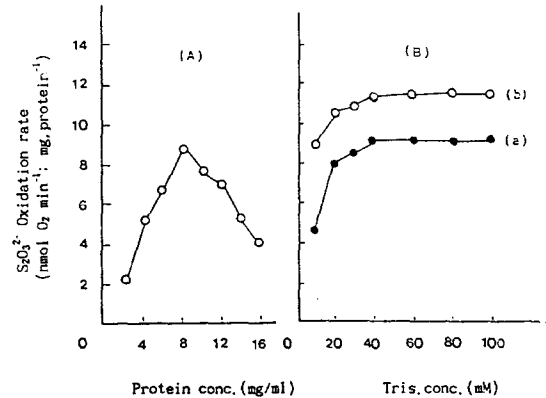


Fig. 2. Thiosulfate Oxidase production from *T. neapolitanus* R-10.

(A) Effect of concentration of crude extract on specific activity of thiosulfate oxidation.

(B) Effect of concentration of Tris-HCl extracts, 50mg protein/ml(a) and 10mg protein/ml(b) oxygen uptake was determined as described in methods.

#### 3.2 Thiosulfate 산화효소의 정제

본 실험에서 사용된 배지를 이용하여 *T. neapolitanus* R-10을 접종한 후 배양 3일에서 효소의 활성이 가장 높았으므로 이 균체를 모아 효소를 추출 정제하였다.

*T. neapolitanus* R-10의 균체를 sonicator로 세포막을 파쇄한 다음 황산 암모늄, DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex A-50 및 Sephadex G-150 등을 이용하여 thiosulfate 산화효소를 정제한 결과 Table 1과 같다.

황산암모늄으로 염색한 후 DEAE-Cellulose 크로마토그래피를 향한 결과 비활성은 4.32  $\mu$ mol / min/mg, protein이었고 활성 분획을 DEAE-Sephadex A-50 column을 이용하여 0.1~0.4M NaCl의 linear gradient로 효소를 용출시켰을 때 Fig. 3과 같았으며 이때의 비활성은 14.88  $\mu$ mol / min/mg, protein 이었다. 상기 DEAE-Sephadex A-50 크로

Table 1. Summary of purification steps of *T. neapolitanus* thiosulfate oxidase.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity $\mu$ mole/min	Specific Activity [ $(\mu$ mole, min <sup>-1</sup> ) (mg, protein <sup>-1</sup> )]	Yield (%)	Purification (fold)
Crude homogenate	6,925,000.0	1,662,000	0.24	100	1.0
30-80%(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fractionation	1,575,437.5	1,512,420	0.96	91	4.0
DEAE-Cellulose	284,694.4	1,229,880	4.32	74	18
DEAE-Sephadex A-50	72,600.8	1,080,300	14.88	6.5	62
Sephadex G-150 gel filtration	49,225.9	980,580	19.92	5.9	83

마토그래피의 결과 활성 분획을 모아 투석 농축하여 Sephadex G-150으로 겔 크로마토그래피 한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 이때 비활성은 19.92  $\mu$  mol / min/mg, protein이었고 수율은 5.9%, 정제도는 83배이었다.

Lu와 Kelly(1988)는 *Thiobacillus* A2 균주에서 thiosulfate 산화효소를 정제하였던 바 thiosulfate의 산화효소는 시험관에서 horse heart cytochrome C에 의하여 활성화 되었다고 하였고 Sklodowska (1990)는 *T. neapolitanus*로부터 sulfate oxidase를 정제하였는데 이 효소도 역시 cytochrome C에 의하여 활성을 갖는다고 하였다.

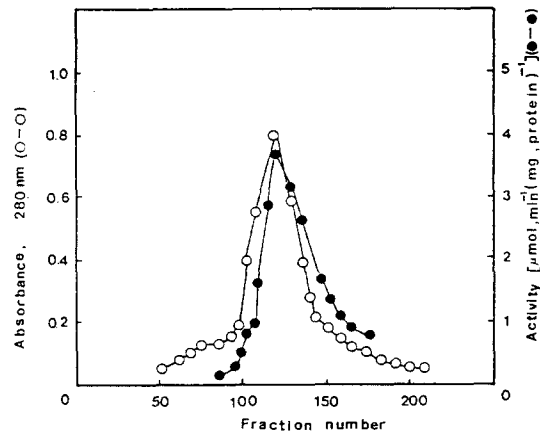


Fig. 4. Gel filtration of thiosulfate oxidase on Sephadex G-150.

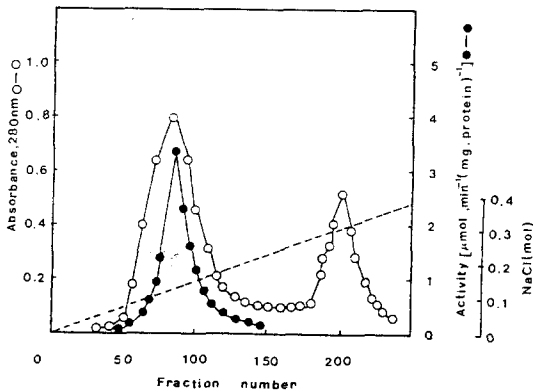


Fig. 3. DEAE-Sephadex A-50 chromatogram of thiosulfate oxidase fraction obtained from DEAE-Cellulose chromatography.

### 3.3 Thiosulfate 산화효소의 분자량

*T. neapolitanus* R-10에서 정제한 효소를 SDS-PAGE 전기영동한 결과 본 정제효소는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 하나의 주된 band로 나타났으며 표준 단백질들의 분자량과 정제효소 단백질의 상대적 이동속도를 측정하여 분자량을 산정한 결과는 Fig. 6과 같이 *T. neapolitanus*의 thiosulfate oxidase의 분자량은 43,000이었다. Lu와 Kelly(1988)는 *thiobacillus* A2 균주의 thiosulfate 산화효소의 분자량은 16,000이라고 하였고, Fukumori et.al.(1989)은 *T. novellus*에서

thiosulfate 절단효소의 분자량은 38,000이라고 하였다.

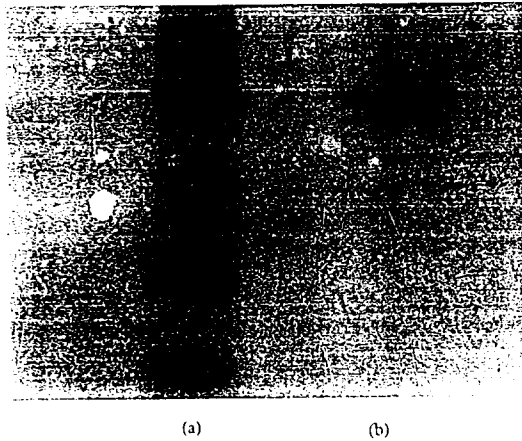


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of thiosulfate oxidase purified from *T. neapolitanus* R-10. (a) standard marker protein. (b) purified enzyme

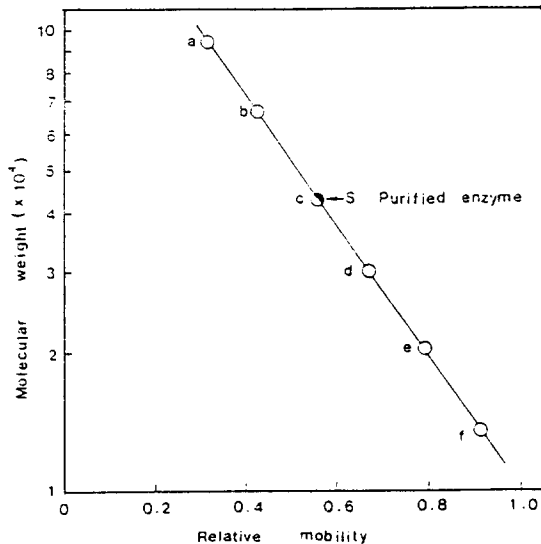


Fig. 6. Determination of molecular weights of thiosulfate oxidase purified from *T. neapolitanus* R-10 by SDS-PAGE.

- (a) phosphorylase b (M.W.94,000)
- (b) bovine serum albumun (M.W.67,000)
- (c) ovalbumin (M.W.43,000)
- (d) carbonic anhydrase (M.W.29,000)
- (e) soybean trypsin inhibitor (M.W.20,100)
- (f)  $\alpha$ -lactalbunin (M.W.14,000)

### 3.4 Thiosulfate 산화효소의 특성

#### 3.4.1 온도 및 pH의 영향

*T. neapolitanus* R-10에서 정제한 thiosulfate 산화효소의 반응 최적 온도는 40°C 이었으며 50°C 에서는 82%, 30°C에서는 76%의 효소 활성이 나타났다(Fig. 7).

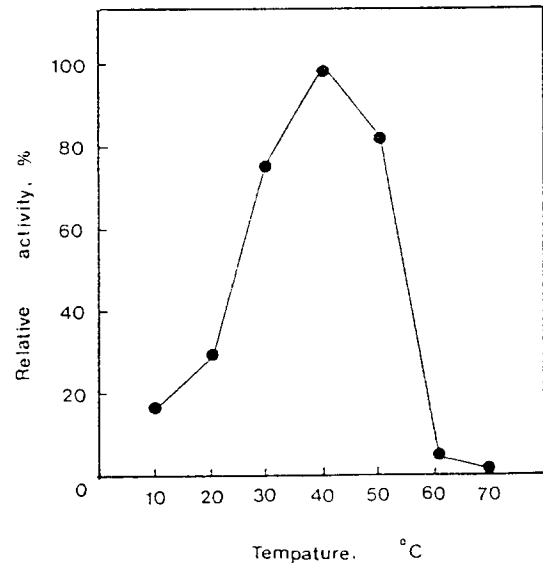


Fig. 7. Effect of temperature on thiosulfate oxidase activity purified from *T. neapolitanus* R-10.

한편 최적 pH는 7이었으며, pH 8에서도 효소 활성이 96%정도로 높았으나 그의 pH에서는 효소의 활성이 50%이하로 급격히 저하되었다(Fig. 8). Fukum-ori *et al.*(1989)은 *Thiobacillus novellus* 에서 분리정제한 효소의 최적 pH는 7.0~8.5라고 보고한 바 있으며 본 실험결과와 유사하였다.

#### 3.4.2 Thiol 시약의 영향

*T. neapolitanus* R-10에서 분리정제한 thiosulfate 산화효소를 thiol시약인 2-mercaptoethanol과 L-cysteine 의 존재 하에서 기질에 반응시켜 본 결과는 Table 2에 나타내었다. 2-mercaptoethanol의 작용은 5mM 일때 효소활성의 잔존율은 88%로 높았고 10mM일

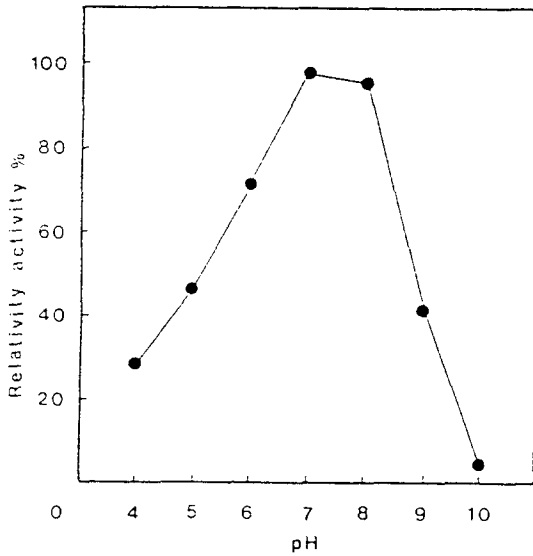


Fig. 8. Effect of pH on thiosulfate oxidase activity purified from *T. neapolitanus* R-10.

Table 2. Effect of thiol reagents on the activity of thiosulfate oxidase purified from *T. neapolitanus* R-10.

Thiol reagents	Concentration(mM)	Relative activity(%)
Control		100
2-mercaptoethanol	5	88
	10	75
	15	72
	20	60
	L-cysteineHCl	5
	10	0
	15	0
	20	0

The reaction mixture contained 0.1M Tris-HCl, pH 8.0, 50mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 20mM KCl and 2-mercaptoethanol, or L-cysteine in a total volume of 1.0 ml. The reaction was started by addition of 0.5mg enzyme.

때 75%, 15mM일때 72%, 20mM일때 60%로 효소의 잔존활성은 높은 편으로 2-mercaptoethanol에 는 비교적 안전하였다.

그러나 L-cysteine의 경우는 5mM일때 thiosulfate 산화효소의 활성은 겨우 5%이었을 뿐 10mM, 15mM 및 20mM에서는 효소 활성이 나타나지 않

았다.

Fukumori *et al.*(1989)은 *Thiobacillus novellus* 에서 분리정제된 thiosulfate절단효소는 5mM 2-mercaptoethanol과 L-cysteine 존재하에서 효소 활성이 높았으나 5mM L-cysteine에서는 효소활 성이 억제되었다고 보고하였다.

### 요 약

*Thiobacillus neapolitanus* R-10으로부터 유향을 함유하는 물질을 산화하는 효소를 정제하고 그 특성을 조사하였다. 효소생산을 위한 배양조건은 0.8% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 및 무기질 혼합액 2ml 등이 함유한 배지(pH 6.5)에서 30℃ 에서 72 시간 배양하였을 때 효소의 생성량이 가장 많았다. 효소의 정제는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 침전, DEAE-Cellulose 및 DEAE- Sephadex A-50 column chromatography, Sephadex G-150의 gel 여과과정을 거쳐 수율 5.9%, 정제도 83배의 정제 효소를 얻었다. 산화효소의 분자량은 43,000, 반응 최적 온도는 40℃, pH는 7.0이었다. 산화효소의 활성을 β-mercaptoethanol존재하에서는 비교적 높았으나 L-cystein의 존재하에서는 거의 억제되었 다.

### 참고문헌

원용돈, 박상보, 이원구, 송승구, 1995, *Thiobacillus neapolitanus* R-10에 의한 유향계 악취 물질의 제거, 韓國環境科學會誌, 1(2), 215-221.

金川貴博, D. P. Kelly, 1986, *Thiobacillus thioeparus* による 硫化メチルの分解, 微工 研報告, 66, 37-45.

金川貴博, 1991, 廢水處理施設への微生物脱臭 法の適用, 水處理技術, 32(12), 625.

金川貴博, 1992, 生物脱臭法の概要, 月刊下水道,

- 16(2), 9-14.
- 金川貴博, 1992, 微生物で悪臭を消す, 工業技術, 33(7), 28.
- 福山丈二, 本多淳裕, 1981, 悪臭の生物學的處理法とその實例, 環境技術, 10(6), 49-58.
- De Bont. J. A. M., J. P. Vand Dijken and W. Harder, 1981, Dimethyl sulphoxide and dimethyl sulphide as a carbon, sulphur and energy source for growth of *Hyphomicrobium S*, *J. Gen. Microbiol.*, 127, 315.
- Fukumori, Y., K. Hoshiko and T. Yamanaka, 1989, Purification and some properties of thiosulfate-cleaving enzyme from *Thiobacillus novellus*, *J. microbiol. Letters*, 65, 159-164.
- Gibson, D. T., 1984, Microbial Degradation of Organic Compounds, Marcel Dekker Inc., New York.
- W. D. Gould and T. Kanagawa, 1992, Purification and properties of methyl mercaptan oxidase from *Thiobacillus thioparus* TK-m. *J. Gen. Microbiol.*, 138, 217.
- Kelly D. P., 1985, Physiology of the thiobacilli: elucidating the sulphur oxidation pathway. *Microbiol. Sci.* 2, 105-109.
- Kuenen J. G., 1975, Colorless sulphur bacteria and their role in the sulphur cycle, *Pl. Soil*, 43, 49-76
- Kuenen J. G. and R. F. Beudeker, 1982, Microbiology of thiobacilli and other sulphur-oxidizing autotrophs, mixotrophs and heterotrophs, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B298, 473-497.
- Kular, T. J., M. I. H. Aleem and D. F. Wilson, 1982, Oxidation-reduction potentials of respiratory chain components in *Thiobacillus A2*, *Biochimica et. biophysica Acta*, 680, 142-151.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T 4, *Nature* 227, 680-685.
- Lu, W. P. and D. P. Kelly, 1988, Purification and some properties of two principal enzymes of the thiosulfate-oxidizing multienzyme system from *Thiobacillus A2*, *J. Gen. Microbiol.*, 129, 3549-3564.
- Moriarty, D. J. and D. J. Nicholas, 1970, Products of sulphide oxidation in extracts of *Thiobacillus concretivorus*, *Biochim. biophys. Acta*, 197, 143-151.
- Robinson, J. and J. M. Cooper, 1970, Methods of determining oxygen concentration in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode, *Analytical Biochemistry*, 33, 390-399.
- Skłodowska, A., 1990, Partial purification of sulfite oxidase from *Thiobacillus neapolitanus*, *FEMS Microbiology Letters*, 67, 59-62.
- Suylen, G. M. H. and J. G. Kuenen, 1986, Chemostat enrichment and isolation of *Hyphomicrobium EG.*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 52, 281.
- Suylen, G. M. H., P. J. Large, J. P. Vnand Dijken and J. G. Kuenen, 1987, Methylmercaptan oxidase, a key enzyme in the metabolism of methylated sulphur compounds by *Hyphomicrobium EG.*, *J. Gen. Microbiol.*, 133, 2989.