

Dimethyl sulfide (DMS) 분해균주인 *Gordonia sihwaniensis* PKL-1의 생물학적 분해특성

정인경 · 이일현 · 박창호
경희대학교 산학협력기술연구원, ¹경희대학교 화학공학과
(접수 : 2004. 1. 27., 게재승인 : 2004. 4. 25.)

Biodegradation Characteristics of Dimethyl sulfide (DMS) by Isolated *Gordonia sihwaniensis* PKL-1

In-Gyungn Jung, Il-Hyun Lee¹, and Chang-Ho Park^{1†}
Industrial Liaison Research Institute,

¹Department of Chemical Engineering, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

(Received : 2004. 1. 27., Accepted : 2004. 4. 25.)

Biodegradation of dimethyl sulfide (DMS) was studied in a batch culture using *Gordonia sihwaniensis* PKL-1 isolated from a compost biofilter after 100 days of operation for the removal of volatile organic compounds. Optimal pH and temperature for the removal of DMS were 7 and 25°C, respectively. The Michaelis-Menten kinetic constants for DMS removal, v_{max} and K_s , were 0.0016 mg/(mg-protein) · hr, and 8.05 mg/L, respectively.

Key Words : Biofilter, biodegradation, dimethyl sulfide, *Gordonia sihwaniensis* PKL-1

서 론

Hydrogen sulfide (H₂S), methanethiol (MT), dimethyl disulfide (DMDS), dimethyl sulfide (DMS) 등의 휘발성 황화합물은 강한 악취를 유발하고 인체에 유해하며 이중 특히 DMS는 다른 가스들에 비해 생물학적으로 난분해성이다(1). DMS는 주로 원유정제, 제철, 제지산업 등에서 사용되고 있고 오, 폐수 처리 과정 중에 발생되며 호흡기와 피부 질환을 유발시키는 것으로 알려져 있다(2). 이러한 DMS 분해 미생물은 자연계에 존재하나 이들을 실제 생물학적 제거에 적용하여 높은 제거효율을 얻기 위해서는 안정적이고 효율적인 균주의 개발과 이러한 균주에 유리한 각종 환경조건을 적절하게 유지해 주어야 한다. DMS 분해 미생물에 대한 연구는 자가 영양 미생물인 *Thiobacillus* sp.(3-6)에 대한 연구가 주로 이루어졌으며 *Hyphomicrobium* sp.(7)와 *Xanthomonas* sp.(1)에 대한 정도만이 연구되어지고 있다.

본 연구에서는 황화합물 중 생물학적으로 난분해성으로 알려진 DMS에 대한 분해능이 뛰어난 미생물을 확보하여 그 기질분해 기작의 검토를 통하여 정확한 분해율을 예측하고 산업현장에서 이 균주를 이용한 생물학적 제거 공정을 효율적으로 적용할 수 있도록 하는데 그 목적을 두었다. 이를 위해 휘발성유기화합물 제거에 사용된 바이오필터(8)에서 우수한 DMS 분해능을 보이는 균주를 순수분리·동정하여 이 균주의 특성 및 DMS 분해특성을 검토하였고, 기질농도, pH 및 온도 변화가 기질분해에 미치는 영향을 살펴보았다.

재료 및 방법

DMS 분해균주 순수분리 · 동정

100일 동안의 운전기간 동안 9가지 휘발성유기화합물에 대해 높은 제거효율을 보인 생물여과기(8, 9) 내로부터 DMS 분해균주를 분리하였다. 1 g의 매체를 멸균된 증류수 10 mL에 넣고 교반한 후 1 mL을 취하여 9 mL의 증류수와 섞어 10 mL로 희석된 시료를 제조하였다. 이와 같은 희석법을 이용하여 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵의 시료를 만들어 각 시료 0.1 mL를 취하여 Nutrient Agar (NA) (trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, Agar 15 g, water 1 L) 배지에 도말하였다. 도말한

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Kyung Hee University, Yongin-si, Kyunggi-do 449-701, Korea
Tel : +82-31-201-2531, Fax : +82-31-202-1946
E-mail : chpark@khu.ac.kr

plate를 배양기를 이용하여 32℃에서 3일간 배양한 뒤 균락체 형태, 색깔, 크기, 표면질감에 따라 선별하여 다시 plate 접종하여 3~5일 간격으로 3차례 더 계대배양을 실시하였다. 배지 내에서의 성장과 시간에 따른 DMS 분해능이 가장 우수한 균주를 한국 미생물 보존센터 (KCCM)에 의뢰하여 16S rDNA 분석에 의하여 동정하였다. 순수 분리된 균주의 생태학적 특성을 확인하기 위하여 형태적, 배양학적, 생화학적 특성을 조사하였고, 제반 실험은 Difco Manual(10)을 참고하여 실시하였다.

균주 배양

배양액 50 mL을 넣은 250 mL 플라스크에 분리 균주를 접종하고 진탕배양기를 이용하여 교반속도 120 rpm, 온도 32℃에서 배양하였다. 미생물 배양에 사용된 배양액 1 L에는 Na₂HPO₄ 4 g, KH₂PO₄ 1.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, CaCl₂ 0.01 g, FeNH₄-citrate 0.005 g를 포함하였으며, 0.1 N NaOH 와 1 N HCl을 이용하여 이 배지의 pH를 7로 보정하고 여기에 DMS는 플라스크 head space에 장착한 유리튜브로부터 확산에 의해 기상으로 공급하였다. 배양된 균주는 4500 rpm에서 4분간 원심 분리하여 회수한 후 pH 7.2의 인산완충용액으로 세정한 후 배양액에 현탁하여 DMS 분해 특성 실험에 사용하였다.

DMS 분해능에 미치는 초기 기질 농도, pH 및 온도의 영향

DMS 분해능에 대한 실험은 균주를 포함한 배양액 (OD_{600nm}=1.0) 25 mL를 나머지 head space는 공기를 채운 후 butyl rubber, sealing film 그리고 aluminium crimp cap으로 밀폐한 120 mL glass serum bottle에서 수행하였다. DMS 분해율에 미치는 초기 DMS 농도의 영향을 살펴보기 위하여 2, 5, 10, 20, 30 mg/L로 실험하였으며 DMS (Sigma Aldrich, USA) 액체시약을 주입하여 원하는 기상의 농도를 맞추었다. 이 때 온도는 25℃, pH 7, 120 rpm에서 진탕배양을 시키면서 6시간마다 head space 가스를 취하여 농도를 측정하였다.

온도에 변화 따른 분해 실험은 배양온도 조건을 18, 25, 32℃로 맞추고 기상 DMS 농도 10 mg/L, pH 7, 120 rpm에서 pH에 변화에 따른 분해 실험은 1 N의 HCl과 NaOH로 배양액을 pH 6, 7, 8로 보정 후 기상 DMS 농도 10 mg/L, 25℃, 120 rpm에서 진탕배양을 시키면서 6시간마다 head space 가스를 취하여 농도를 측정하였다. 모든 실험은 두 번 이상 하였다. 또한 동일한 조건으로 무균 실험하여 미생물에 대한 분해 이외의 DMS 감소를 측정하였으며 모든 실험에서 DMS의 감소량은 5% 이내로 유의한 영향을 미치지 않는 수준이었다.

미생물 생장

1 L의 삼각플라스크에 배양액 300 mL를 넣고 pH 7로 보정한 후 121℃에서 15분간 고압증기멸균을 실시하였다. 상온에서 냉각시킨 후 균주를 접종하여 초기 OD_{600nm} 값을 0.27로 맞추고 실리콘 마개와 sealing film를 이용하여 나머지 head space를 공기로 채운 후 밀폐하였다. 영양원으로서의 DMS 공급은 head space에 장착된 glass tube로부터 확산에 의해 기상으로 공급하였다. 배양액을 6시간마다 test tube에 7

mL씩 취하여 분광광도계를 이용 OD_{600nm}값을 측정하였다.

DMS 분해균주와 toluene 분해균주의 기질과 균주에 대한 상호작용

균주배양, 분해실험, 및 분석방법은 2.3의 실험과 동일하였다. DMS 분해균주로는 *Gordonia sihwaniensis* PKL-1을 toluene 분해균주로는 benzene, toluene, 및 m-xylene에 대해 분해능을 가지고 있는 *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1을 사용하였다(11). *G. sihwaniensis* PKL-1에 의한 DMS 분해시 toluene 농도 및 *R. pyridinovorans* PYJ-1 균주의 영향을 실험하였다. 이 때 DMS 농도는 2 mg/L로 고정하였고 toluene 첨가농도는 5 및 10 mg/L이었다. 또한, *R. pyridinovorans* PYJ-1에 의한 toluene 분해시 DMS 농도 및 *G. sihwaniensis* PKL-1 균주의 영향을 실험하였으며, 이 때 toluene 농도는 5 mg/L로 고정하였고 DMS 첨가농도는 5 및 10 mg/L이었다. 온도 32℃, 배양액 pH 7, 120 rpm인 진탕배양기에서 DMS는 6시간, toluene은 2시간 간격으로 기상농도를 측정하였으며 구체적인 실험조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Interaction of supplemented substrate and co-culture in DMS and toluene degradation

Effect of toluene addition and the presence of <i>Rhodococcus pyridinovorans</i> PYJ-1 on the degradation of DMS (2 mg/L) by <i>Gordonia sihwaniensis</i> PKL-1		Effect of DMS addition and the presence of <i>Gordonia sihwaniensis</i> PKL-1 on the degradation of toluene (10 mg/L) by <i>Rhodococcus pyridinovorans</i> PYJ-1	
Pure culture 1 (Control)	<i>Gordonia</i> sp. PKL-1 : 5 mg(protein)	Pure culture 4 (Control)	<i>Rhodococcus</i> sp. PYJ-1 : 5 mg(protein)
Pure culture 2	Toluene : 5 mg/L <i>Gordonia</i> sp. PKL-1 : 5 mg(protein)	Pure culture 5	DMS : 5 mg/L <i>Rhodococcus</i> sp. PYJ-1 : 5 mg(protein)
Pure culture 3	Toluene : 10 mg/L <i>Gordonia</i> sp. PKL-1 : 5 mg(protein)	Pure culture 6	DMS : 10 mg/L <i>Rhodococcus</i> sp. PYJ-1 : 5 mg(protein)
Co-culture 1	Toluene : 5 mg/L <i>Gordonia</i> sp. PKL-1 : 5 mg(protein) <i>Rhodococcus</i> sp. PYJ-1 : 5 mg(protein)	Co-culture 2	DMS : 5 mg/L <i>Rhodococcus</i> sp. PYJ-1 : 5 mg(protein) <i>Gordonia</i> sp. PKL-1 : 5 mg(protein)

분석방법

미생물 단백질농도는 분광광도계 (spectronic 20 D, Milton Roy, USA)를 이용 (파장 600 nm)하여 시료의 Optical Density (OD)를 측정하고 미리 구한 OD와 단백질농도와의 검량선으로 보정하여 결정하였다.

DMS의 농도측정은 실험용기의 head space에서 250 µL gas tight 실린저 (Hamilton, USA)로 100 µL의 가스를 취하여 가스크로마토그래피 (HP 5890 series II, Hewlett Packard, USA)로 분석하였다. 시료의 정성 및 정량분석은 DMS의 표준시약으로 보정한 결과와 비교하여 분석하였다. 가스크로마토그래피에 사용된 칼럼은 Ultra-I capillary column (HP, USA)이고 운반가스는 질소 (99.999%)를 사용하였다, 분석조건에서 주입부 온도는 200℃로 유지하고 검출기는 FID (Flame Ionization Detector)를 사용하였다. 검출기 온도는 250℃로 유지하였고 오븐온도는 초기 35℃에서 3분간 유지하고

3°C/min으로 70°C까지 상승하도록 하였다. 정성분석은 체류 시간으로 정량분석은 피크 면적을 측정하여 HP Chemstation 프로그램으로 분석하였다.

결과 및 고찰

***Gordonia sihwaniensis* PKL-1의 분리·동정 및 생태학적 특징**

100일 동안의 운전기간 동안 휘발성유기화합물에 대해 높은 분해효율을 보인 biofilter system의 compost 매체 내에 존재하는 미생물을 순수 분리한 결과 균락체 (colony)를 색깔, 형태, 크기, 표면의 질감에 따라 8가지 균주를 분리해 냈다. 이 중 DMS에 가장 높은 분해능을 보이는 균주를 선별하여 한국미생물보존센터에 16S rDNA 분석과 지방산 조성분석을 의뢰하였다.

Table 2. Characteristics of the isolated strain

Contents	Characteristics
Shape	Long rod
Cell size (µm)	1.5~2.0
Colony color	Ivory
Colony surface	Rough
Gram strain	Positive
Catalase test	Positive
Oxidase test	Negative
Citrate	Positive
Urease test	Negative
MR test	Negative



Figure 1. Scanning electron microscopy of *Gordonia sihwaniensis* PKL-1 (×50000).

균주의 지방산 주성분은 hexadecanoic acid (16 : 0)이 38.26%, octadecanoic acid w9c (18 : 1 w9c)가 29.87%였고 16S rDNA 분석 결과 *Gordonia sihwaniensis*와 99% 일치됨을 확인하였다. 99% *G. sihwaniensis*로 확인된 균주를 신킴주 *Gordonia sihwaniensis* PKL-1라 명명하였다.

순수분리·동정된 균주의 형태학적, 배양적, 생화학적 특징은 Table 2와 같다. 균주의 균락체는 상아색에 표면이 거칠

면서 마른 형태를 하고 있다. 그람염색에서는 보라색을 띠는 그람양성균으로 Fig. 1의 SEM 사진에서도 알 수 있듯이 길이 1.5~2.0 µm의 가늘고 긴 형태의 간균이다. 생화학적 특성으로는 Catalase, Citrate test에서는 양성, Oxidase, Urease, MR test에서는 음성으로 판정되었다.

Table 2. Characteristics of the isolated strain

Contents	Characteristics
Shape	Long rod
Cell size (µm)	1.5~2.0
Colony color	Ivory
Colony surface	Rough
Gram strain	Positive
Catalase test	Positive
Oxidase test	Negative
Citrate	Positive
Urease test	Negative
MR test	Negative

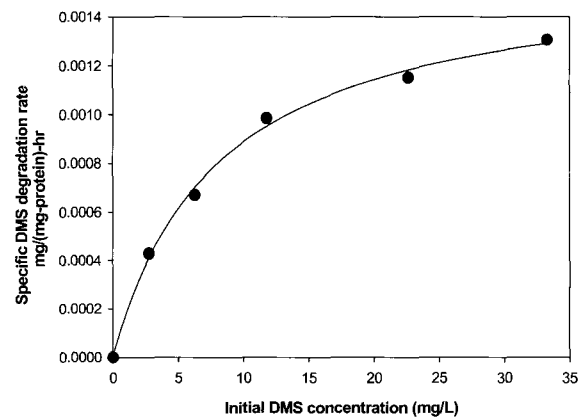


Figure 2. Effect of initial DMS concentration on the DMS specific degradation rate by *Gordonia sihwaniensis* PKL-1.

DMS 분해능에 미치는 초기 기질농도의 영향

DMS의 초기 농도에 따른 비분해속도의 변화는 Fig. 2에서와 같이 40 mg/L까지 전반적인 증가하는 경향을 보였으나 10 mg/L 이상의 농도에서는 비분해속도 증가율이 현저하게 떨어짐을 알 수 있다.

초기 기질농도와 비분해속도는 식 (1)의 Michaelis-Menten 속도식(12)으로 표현할 수 있으며, 식 (1)에 적용하여 구한 최대 비분해속도 k_{max} 는 0.0016 mg/(mg-protein) · hr이었고, 반속도 상수 K_s 는 8.05 mg/L이었다(Table 3).

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_s + [S]} \tag{1}$$

여기서 v : 비분해속도 (mg/mg-protein · hr)

v_{max} : 최대 비분해속도 (mg/mg-protein · hr)

K_s : 반속도 상수(mg/L)

S : DMS 농도 (mg/L)

Table 3. Biokinetic parameters for DMS degradation by *Gordonia sihwaniensis* PKL-1

Kinetic parameter	Value
μ_{max}	0.025 hr ⁻¹
U_{max}	0.0016 mg/(mg-protein)·hr
K_s	8.05 mg/L

또한, 부유배양상태에서 구한 *G. sihwaniensis* PKL-1의 최대 생장을 μ_{max} 은 0.025 hr⁻¹이었고 세포중식이 두 배가 되는 배가시간은 28.06 hr이었다.

DMS 분해능에 미치는 pH 및 온도의 영향

Fig. 3은 DMS 농도가 10 mg/L일 때 균주의 온도에 따른 비분해속도를 나타낸 것이다. 18℃ 이상에서 비분해속도는 계속 증가하여 25℃에서 최대 비분해속도를 보였다. 32℃까지 비교적 높은 분해능을 유지하였으나 40℃에서는 비분해속도가 급격히 저하되었다.

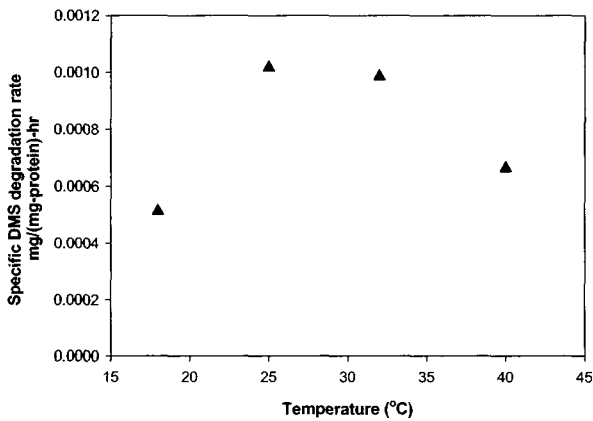


Figure 3. Effect of temperature on the specific degradation rate by *Gordonia sihwaniensis* PKL-1.

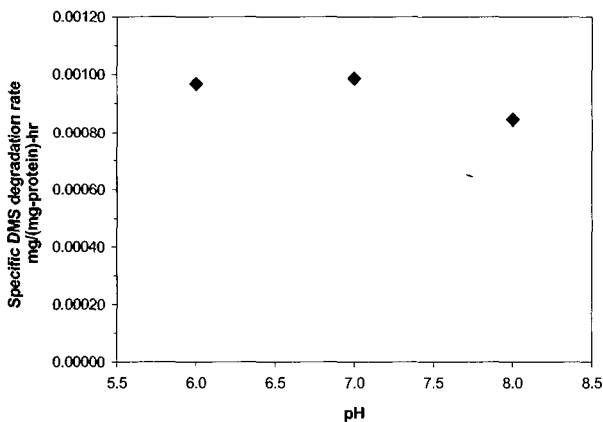


Figure 4. Effect of pH on the specific degradation rate by *Gordonia sihwaniensis* PKL-1.

DMS 분해에 미치는 배양액의 pH에 대한 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 균주는 pH 6~7에서 높은 비분해속도를 나타내

었으며 pH 8에서 약간 저하되었다. 일반적으로 미생물은 pH 7 주변의 중성값에서 분해활성과 생장이 가장 활발하게 이루어지고 pH의 산성화나 염기성화는 미생물의 분해활성을 떨어뜨리거나 심한 경우 분해 능력이 없어지는 경우도 발생된다.

***Gordonia sihwaniensis* PKL-1에 의한 DMS 분해시 toluene 첨가와 *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 co-culture의 영향**

대부분의 유해한 휘발성유기화합물은 단일성분이 아닌 혼합물로 존재하므로 DMS에 toluene이 혼합되었을 때 *Gordonia sihwaniensis* PKL-1 단일 균주 및 *Rhodococcus pyridinovorance* PYJ-1와의 co-culture가 DMS의 분해속도에 미치는 영향을 연구하였다. DMS 기질농도가 2 mg/L일 때 *G. sihwaniensis* PKL-1에 의한 DMS 분해에 미치는 toluene 첨가와 toluene 분해균주인 *R. pyridinovorance* PYJ-1 co-culture의 영향을 Fig. 5에 나타내었다. toluene 농도를 5, 10 mg/L까지 증가시켰을 때와 co-culture에 의하여 DMS 분해활성에 대한 유의한 변화는 없었다.

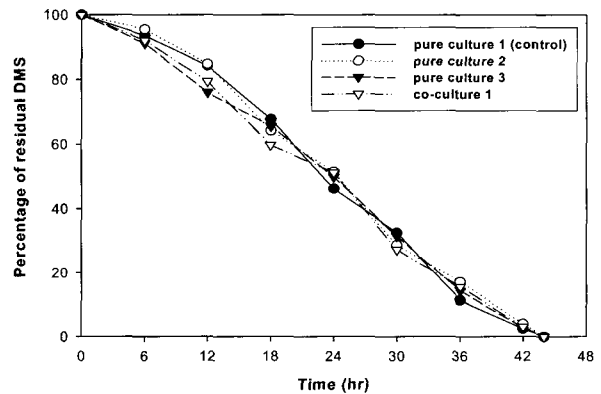


Figure 5. Effect of toluene addition and the presence of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 on the degradation of DMS by *Gordonia sihwaniensis* PKL-1.

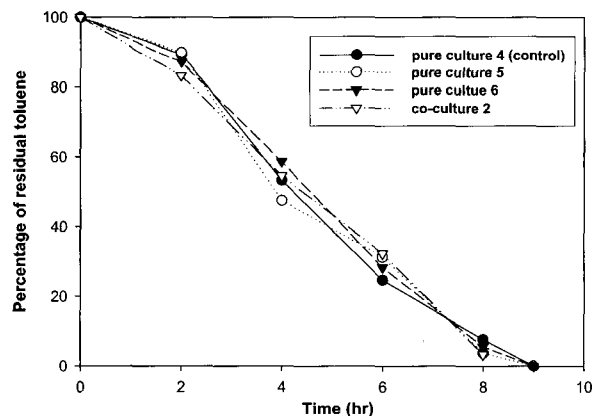


Figure 6. Effect of DMS addition and the presence of *Gordonia sihwaniensis* PKL-1 on the degradation of toluene by *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1.

Fig. 6은 toluene 기질농도가 10 mg/L일 때 *R. pyridinovorance* PYJ-1에 의한 toluene 분해에 미치는 DMS 첨가 및 DMS 분해균주인 *G. sihwaniensis* PKL-1의 co-culture 영향을 나타낸 것이다. 이 결과에서도 toluene 분해에 대한 DMS 첨가와 DMS 분해균주의 co-culture 영향은 없었다. 즉 각각의 균주는 첨가기질의 농도가 비교적 낮은 실험조건에서 각각의 기질만 선택적으로 분해하였고 상호영향은 없었다.

요 약

휘발성 황화합물 중 생물학적으로 가장 난분해성으로 알려져 있는 DMS에 대한 분해능이 우수한 신균주를 분리·동정하여 *Gordonia sihwaniensis* PKL-1로 명명하였다. 이 균주는 DMS 초기농도가 35 mg/L 이상일 때에도 우수한 분해능을 보였고, 회분식 배양에서 최대 비분해속도 v_{max} 는 0.0016 mg/(mg-protein) · hr이었고, 최적의 온도와 pH는 각각 25°C와 pH는 7이었다.

감 사

본 연구는 한국학술진흥재단의 중점연구소지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다(KRF-2001-E20007).

REFERENCES

1. Cho, K. S., M. Hirai, and M. Shoda (1992), Degradation of Hydrogen Sulfide by *Xanthomonas* sp. Strain DY 44 Isolated from Peat, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1183-1189.
2. Ram, S. T., K. S. Cho, H. Mitsuyo, and S. Makoto (1992), Biological Deodorization of Dimethyl Sulfide Using Different Fabrics as the Carriers of Microorganisms, *Appl. Biochem. Biotech.* **32**, 135-148.
3. Cho, K. S., M. Hirai, and M. Shoda (1992b), Enhanced Removal Efficiency of Malodorous Gases in a Pilot-Scale Peat Biofilter Inoculated with *Thiobacillus thioparus* DW 44, *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 46-5414.
4. Cho, K. S., M. Hirai, and M. Shoda (1991), Degradation Characteristics of Hydrogen Sulfide, Methanethiol, Dimethyl Sulfide and Dimethyl Disulfide by *Thiobacillus thioparus* DW44 Isolated from Peat Biofilter, *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 384-389.
5. Tanji, Y., T. Kanagawa, and E. Mikami (1989), Removal of Dimethyl Sulfide, Methyl Mercaptan, and Hydrogen Sulfide by Immobilized *Thiobacillus thioparus* TK-m, *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 384-389.
6. Wada, A., M. Shoda, H. Kubota, T. Kobayasi, Y. Katayama-Fujimura, and H. Kuraishi (1986), Characteristics of H₂S Oxidizing Bacteria Inhabiting a Peat Biofilter, *J. Ferment. Technol.* **64**, 161-167.
7. Suylen, G. M. H., G. C. Stefess, and J. G. Kuenen (1986), Chemolithotrophic Potential of a *Hyphomicrobium* Species, Capable of Growth on Methylated Sulphur Compounds, *Arch. Microbiol.* **146**, 192-198.
8. Yoon, I. -K. and C. -H. Park (2002), Effects of Gas Flow Rate, Inlet Concentration and Temperature on Biofiltration of Volatile Organic Compounds in a Peat-Packed Biofilter, *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 165-169.
9. Yoon, I. -K. and C. -H. Park (2000), Degradation of Volatile Organic Compound Mixtures Using a Biofiltration System, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 501-506.
10. Difco Laboratories (1998), Difco Manual, 11th ed., Becton Dickinson and Company, Maryland.
11. Cho, D. -W., I. -K. Yoon, and C. -H. Park (2003), Biodegradation of Volatile Aromatic Compounds by *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 Isolated from a Biofilter, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 30-34.
12. Shuler, M. L. and F. Kargi (1992), Bioprocessing Engineering, p64, Prentice-Hall Inc., New Jersey.