

Thiodiglycol를 분해하는 *Cupriavidus* sp.의 분리와 특성

박종덕¹ · 김지천³ · 윤기홍^{1,2*}

우송대학교 ¹식품영양식품과학부, ²생물소재 응용연구센터, ³국방과학연구소 제 5 기술개발본부

탄소원으로 thiodiglycol (TDG)을 함유한 배지에서 농후배양하여 인삼토양으로부터 TDG 분해균을 분리하였다. 분리균 WS-32의 형태적, 생화학적, 유전학적 특성을 조사한 결과 분리균이 *Alcaligenes faecalis*와 유사한 생화학적 성질을 지니고 있으며, 16S rRNA 서열이 *Cupriavidus* 속 균주와 유사도가 높은 균주로 판명되었다. WS-32는 33°C~37°C, pH 6.0~8.0에서 성장이 우수하였으며, TDG에 의해 성장에 약간의 저해를 받지만, 배양후기에서는 이를 탄소원으로 이용하는 현상을 보였다. HPLC를 통해 배양액내 잔존하는 TDG를 분석한 결과 2일 배양하였을 때 배지내 잔존하는 TDG가 상당량 감소한 것으로 확인되었다. 분리균 WS-32의 균체 파쇄상등액은 TDG의 산화활성을 보였으며, pH 8.0과 45°C에서 산화활성이 가장 높았다.

Key words □ *Cupriavidus* sp., enrichment culture, oxidation activity, thiodiglycol

Thiodiglycol (TDG)은 미란성 독가스인 sulfur mustard (SM)의 분해산물이며 동시에 SM 합성의 전구체 물질로 작용하며(12), 또한 산업적으로 직물의 염색과 인쇄 용매로도 사용된다. 이러한 TDG는 자연환경과 토양에서 생물에 의해 thiodiglycolic acid (TDGA)로 전환되고 혐기적 조건하에서 서서히 분해되어 무기질화 되지만 분해속도는 매우 느려 토양 중에 축적된다. TDG의 독성은 SM 보다 낮으며 rat에서 경구 LD₅₀이 5 g/kg 이상이며, 약한 피부자극성과 안구 자극성이 있다. SM에 비해 저독성이지만 TDG도 화학무기 협정에 따라 무기질화 하여 폐기되어야 한다. SM을 화학적 방법(알칼리조건에서 반응, 산화금속과 반응)으로 가수분해하고 생성된 TDG를 소각하거나 불활화하여 묻는 물리·화학적 방법이 개발되고 있으나, 고비용이고 안전성의 문제점이 해결되지 않고 있다. 특히 공정과정 중에 SM 오염시에는 인체를 보호할 수 있는 대책이 강구되어야 한다. 따라서 생물학적 방법을 이용한 SM과 TDG의 분해 방법을 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있다.

TDG를 완전히 분해하여 무기물화하는 미생물은 농후배양에 의해 미국, 러시아, 스페인에서 주로 분리되었다. 미국에서는 TDG를 주요 탄소원으로 이용하여 상업성이 있는 화학전구체인 2-hydroxyethylthio acetic acid (HETA)와 TDGA를 생산하는 *Alcaligenes xylosoxydans* ssp. *xylosoxydans* SH91이 분리되어(7) 그 반응특성이 연구되었으며(8), poly(vinyl) alcohol cryogels 담체에 고정화 시킨 균체가 TDG 분해에 이용되었다(5). 러시아 Shikhany 마을의 유기합성연구소 부근에 있는 SM 폐기산물로 오염된 토양으로부터 TDG 분해균인 *A. xylosoxydans* ssp.

denitrificans TD1가 분리되었다. 이로부터 성장속도가 빠른 안정한 변이주 TD2가 개발되어 TDG 오염토양의 생물학적 복원을 위한 응용성이 검토되었다(3, 11). 스페인에서도 산업용과 농업용 폐수가 흐르는 마드리드의 Jarama강 유역에서 TDG를 탄소원과 에너지원으로 사용할 수는 없으나, 복합배지나 최소배지에서 성장한 휴지세포가 TDG를 분해하여 중간산물로 HETA와 TDGA를 생성하면서 대사할 수 있는 *A. xylosoxydans* PGH10 균주가 분리되었다(4). 이 균주는 말기대수기와 정지기에서 배지내 탄소원의 종류와 고갈 상태와는 관계없이 TDG를 분해하므로 TDG가 없는 상태에서 48시간 정지기까지 배양된 배양균액을 TDG 분해에 사용함으로써 TDG를 감지할 수 없는 수준으로 저감시키는데 요구되는 시간을 줄일 수 있는 특성을 지니는 것으로 보고되었다. 최근 이와 같은 *A. xylosoxydans*에 속하는 균주외에 TDG를 분해하는 *Pseudomonas* 속 균주도 분리되었다(10). 본 연구에서는 국내 토양을 대상으로 TDG 분해균을 탐색하고 분리된 TDG 분해균의 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

TDG 분해균의 탐색

국내 토양시료를 채취하여 50 mM TDG가 첨가된 MY 배지에 접종하여 30°C에서 약 4~7일간 진탕배양하고 동일한 배지에 3번의 계대배양을 실시하였다. 이때 사용된 MY배지의 조성은 배지 1리터에 yeast extract (0.1 g), Na₂HPO₄ · 7H₂O (12.8 g), KH₂PO₄ (3 g), NaCl (0.5 g), NH₄Cl (1 g), H₃BO₃ (0.3 g), ZnCl₂ (50 mg), MnCl₂ · 4H₂O (30 mg), CoCl₂ · 6H₂O (0.2 g), CuSO₄ · 5H₂O (20 mg), NiCl₂ · 2H₂O (20 mg), Na₂MoO₄ · 2H₂O (30 mg), MgSO₄ · 6H₂O (2 g)로 구성되었다. 계대배양액을 50 mM TDG가 첨가된 nutrient 평판배지(bacto peptone, 5 g; beef extract, 3 g;

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-630-9742, Fax: 82-42-636-2676
E-mail: ykh@lion.woosong.ac.kr

agar, 15 g; water, 1 liter)에 도달하여 30°C에서 배양하였다. 서로 다른 형태의 콜로니를 선별하여 TDG가 첨가된 MY 액체배지에서 순수 배양하여 TDG를 탄소원으로 이용하여 성장하는 미생물을 선별하였다.

분리균주의 동정

분리균의 형태적 관찰을 위해서는 그람염색과 포자염색을 실시하였으며, 생화학적 특성은 API 20NE kit (Biomereux, France)로 분석하였다. 분리균의 16S rRNA의 염기서열을 분석하기 위해서 분리균의 16S rRNA 유전자 단편을 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의해 증폭한 후, 증폭된 16S rRNA 유전자 단편을 정제하여 염기서열을 결정하였다. 반응에 주형으로 사용한 분리균의 유전체는 콜로니를 1% Chelex (Fluka, Switzerland) 용액에 현탁하여 끓는 물에서 5분간 방치한 후 이를 원심분리하고 그 상등액을 취해 제조하였다. Primers와 PCR 반응조건은 Lee 등 (6)이 실시한 방법과 동일하게 실시하였다.

배양온도와 pH 조사

분리균의 배양온도를 조사하기 위해서는 LB 액체배지(yeast extract, 5 g; tryptone, 10 g; NaCl, 5 g; water, 1 liter)에 전배양한 균을 1% 접종하여 여러 온도에서 배양하면서 배양시간에 따라 600 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 성장도를 조사하였다. 배지의 pH가 균의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 LB 액체배지에서 전배양한 균액 0.1 ml를 채취하여 50 mM 완충용액을 첨가하여 pH를 조절한 LB 평판배지에 한 줄로 접종하고 배양한 후 성장한 정도를 육안으로 관찰하였다. 이때 배지에 첨가한 완충용액으로 pH 4.0~6.0 범위는 sodium citrate, pH 6.0~8.0 범위는 sodium phosphate, pH 8.0~9.0 범위는 Tris, pH 9.0~10.5 범위는 glycine-NaOH를 각각 사용하였다.

TDG 산화효소 활성 측정

10 mM 반응 기질(TDG 또는 alcohols), 1 mM NAD⁺와 50 mM 완충용액을 포함하는 반응액에 분리균의 균체 파쇄상등액을 조효소액으로 첨가하여 일정온도에서 1시간 반응을 실시한 후

340 nm에서 흡광도가 증가된 정도를 측정하였다.

HPLC 분석

TDG 분석은 HPLC (Model Agilent 1100, Hewlett Packard, USA)를 수행하여 UV detector로 214 nm에서 측정하였다. 분리균의 배양액을 원심분리한 후 상등액을 PVDF filter (pore size; 0.2 μm)로 여과하여 불순물을 제거하였다. 이를 20 μl 취해 Zorbox Eclipse XDB-C₁₈ (4.6×250 mm) column에 주입하고 column의 온도는 40°C로 하여 전개용매인 3 mM 인산용액로 추출하였다(8). 이때 전개용매의 유출속도는 0.8 ml/min로 하였다.

결과 및 고찰

농후배양을 통한 TDG 분해균의 탐색

TDG 분해균으로 알려진 *A. xylosoxydans*는 TDG 오염토양이나, 인위적으로 TDG를 장기간 처리한 토양시료에서 분리되었다(4, 11). 국내 토양에서는 TDG 분해균이 분리된 보고가 없어 농약과 같은 난분해성 물질의 인위적 투여가 있는 토양으로부터 TDG 분해균을 분리하기 위해 인삼밭 토양시료를 사용하였다. 인삼밭 토양시료를 탄소원으로 50 mM TDG를 첨가한 MY배지에 접종하고 30°C에서 3차 계대 배양하였다. 이때 1차 배양에서는 토양에 존재하는 유기물이 함께 배지에 혼입되므로 대부분의 토양시료에서 균이 성장하였지만, 계대배양이 되면서 균의 성장은 급격히 저하되었고, 3차 계대배양은 약 10일간 실시하였는데 토양시료에 따라 전혀 균의 성장을 보이지 않는 것이 있었다. 균의 배양이 일어나지 않는 계대배양액을 제외하고, 균의 성장을 보인 배양액 시료만을 골라 50 mM TDG를 첨가한 nutrient 평판배지에 희석 도달하였다. 그리고 30°C에서 3일간 배양한 후 콜로니의 모양이 서로 다른 균을 선별하였다. 선별된 콜로니가 TDG를 이용하는지 확인하기 위해 이들을 다시 탄소원으로 TDG를 첨가하거나 첨가하지 않은 MY 액체배지에 각각 접종하여 진탕배양한 후, TDG를 첨가하지 않은 배지에서는 성장하지 않으나 TDG를 첨가한 배지에서 성장하는 균을 1주 선별하였다. 이로써 TDG가 첨가된 액상 농후배지에서 계대배양하여 단시간에 토양

Table 1. Biochemical properties of the isolate, WS-32

Test	Result	Test	Result
Reduction of nitrates to nitrites	+	Mannose assimilation	-
Indole production	-	Mannitol assimilation	-
Glucose acidification	-	N-Acetyl-glucosamine assimilation	-
Arginine dihydrolase	-	Maltose assimilation	-
Urease	-	Gluconate assimilation	+
β-Glucosidase	-	Caprate assimilation	+
Protease	-	Adipate assimilation	+
β-Galactosidase	-	Malate assimilation	+
Glucose assimilation	-	Citrate assimilation	-
Arabinose assimilation	-	Penylacetate assimilation	-

에 존재하는 TDG를 분해하는 균의 분리가 가능하였다.

TDG 분해균의 특성과 동정

TDG 분해균으로 분리된 WS-32의 형태적 특성을 조사한 결과 무포자 그람음성 간균이었고, catalase와 cytochrome oxidase는 양성이었다. 따라서 API 20NE kit를 사용하여 분리균의 생화학적 특성을 조사하였다(Table 1). 생화학적 성질을 API database와 비교한 결과 분리균은 *Alcaligenes faecalis*와 유사도가 50%로 가장 높았다. 한편 분리균은 gelatin과 전분의 분해능이 없었으며 tributyrin은 분해하는 것으로 확인되었다.

분리균의 16S rRNA를 PCR로 증폭하여 결정된 1,401 bp 크기의 WS-32 16S rRNA 염기서열을 EzTaxon server (2)를 이용하여 다양한 세균들의 상응하는 염기서열과 비교한 결과, *Cupriavidus taiwanensis* (GenBank accession no. AF300324)와 상동성이 99% 이상으로 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 1). 한편 생화학적 특성이 유사한 *Alcaligenes faecalis*의 16S rRNA (GenBank accession no. AY131213)와는 약 90%의 유사도를 보여 분리균은 *Cupriavidus* 속에 속하는 균주로 추정되고 이를 *Cupriavidus* sp. WS-32로 명명하였다. 그러므로 기존에 농후배양을 통해 TDG 분해균으로 분리된 균이 *A. xylosoxydans* (4, 7, 11)와 *Pseudomonas* 속 균주인 데 비하여(10) 본 연구에서 분리된 균은 이들 균과는 다른 새로운 TDG 분해균으로 판단된다.

WS-32의 최적 배양온도를 조사하기 위해 27°C, 30°C, 33°C, 37°C에서 각각 진탕배양하면서 배양시간별로 배양액의 흡광도를 조사하였다. 그 결과 Fig. 2에 보인 바와 같이 33°C와 37°C에서

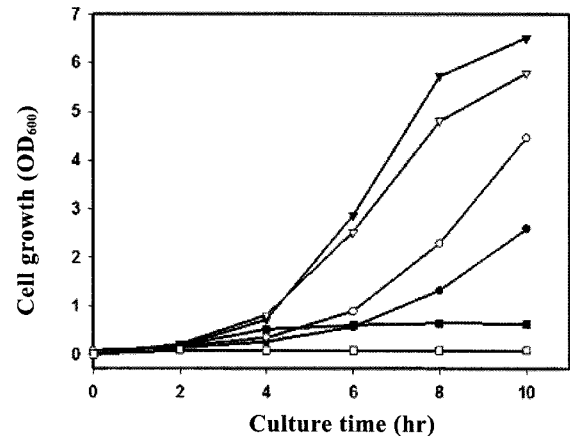


Fig. 2. Growth of the *Cupriavidus* sp. WS-32 at various temperatures. The cells were grown in LB broth with vigorous shaking. Cell growth was determined by measuring the optical density of culture. Symbols: ●; 27°C, ○; 30°C, ▼; 33°C, ▽; 37°C, ■; 40°C, □; 45°C.

초기 성장속도는 유사하였으나, 최대 성장정도는 33°C에서 높은 것으로 나타났다. 또한 40°C 이상에서는 균의 성장이 급격히 감소하였고, 45°C 이상에서는 전혀 성장하지 못하였다. 배지의 pH가 배양정도에 미치는 영향을 분석하기 위해 완충용액으로 pH를 조절한 LB 평판배지에 생리식염수로 세척한 배양균액을 접종하였다. 2일간 배양후 성장정도를 조사한 결과 pH 5.0~9.0 범위에서 균이 성장하였으나, pH 4.5 이하와 pH 10.0 이상에서는 전혀 성장하지 못하였으며, pH 6.0~8.0 범위에서 가장 성장이 우수하였다.

TDG 이용능

분리균 WS-32의 TDG 이용능을 조사하기 위해서 TDG를 첨가한 LB 배지에서 배양정도를 분석하였다. Figure 3에 보인 바와 같이 TDG를 첨가하지 않은 배지보다 첨가한 배지에서 분리

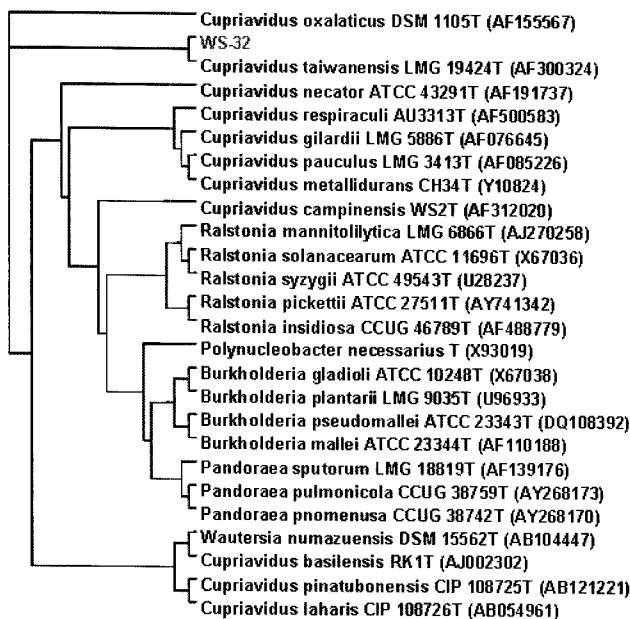


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA. The identification of phylogenetic neighbors and calculation of pairwise 16S rRNA gene sequence similarity were achieved using the EzTaxon server (<http://www.eztaxon.org/>).

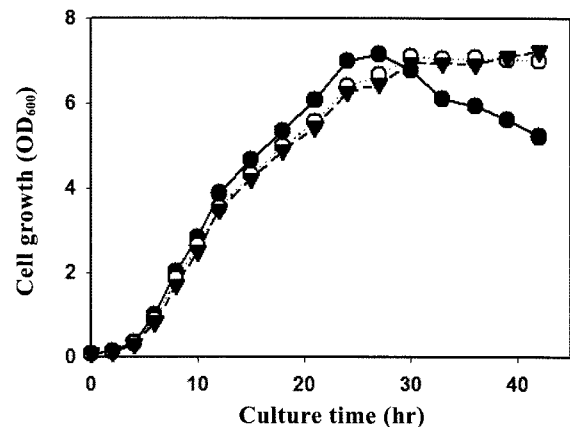


Fig. 3. Growth of WS-32 LB broth in the presence of TDG. The cells were cultivated on LB broth (●) supplemented with 25 mM (○) or 50 mM (▼) TDG at 33°C with vigorous shaking. Cell growth was determined by measuring the optical density of culture.

균의 초기성장이 늦었다. 배양시간이 24시간이 지난 후 부터는 TDG를 첨가하지 않은 배지에서 흡광도가 증가하지 않았고 약 30시간 이후 부터는 사멸기에 이르는 양상을 보였다. 그러나 25 mM과 50 mM의 TDG가 첨가된 배지에서는 30시간까지 흡광도가 꾸준히 증가하였고, 42시간까지 흡광도가 감소하지 않았다. TDG를 첨가한 배지에서 배양 후기에 높은 성장상태를 유지하는 것으로 보아 TDG는 배양 후기에 이용되는 것으로 여겨진다. *A. xylosoxyans* PGH10도 말기대수기나 정지기에 이르렀을 때 TDG를 분해하는 것으로 보고되었다(4). TDG를 첨가한 배지에서 초기성장이 느린 것은 TDG가 균의 성장을 저해하는 현상으로 여겨지는데 실제 100 mM~200 mM TDG를 첨가한 배지에서는 1일 배양시 LB에 비해 40~60% 정도의 성장저해가 일어났다(결과미제시). 한편 48시간 배양후 배양액의 pH를 측정된 결과 성장시 배지내 pH가 저하되는 *A. xylosoxyans* (3, 4, 11)와는 달리 첨가된 TDG 농도에 관계없이 pH에 변화가 거의 없었다.

배양 중 TDG의 분해가 일어나는 것을 확인하기 위해 20 mM TDG가 첨가된 LB 배지에서 WS-32를 33°C로 진탕 배양하였다. 대조실험을 위해서는 균을 접종하지 않은 배지를 동일한 조건에서 방치하였다. 균을 접종하지 않은 배지와 접종한 배지를 2일간 배양한 후 배양액을 채취하여 원심분리한 후 배양상등액을 PVDF filter (0.2 μ m)를 통과시켜 불순물을 제거하여 HPLC로 분석하였다. 그 결과 TDG는 retention time이 약 8-9분 사이로 나타났다으며, 균을 접종하지 않은 배지에서 보다 균을 배양한 배지

에서 TDG에 해당하는 peak가 현저하게 감소한 것으로 나타났고 나머지 다른 peak는 주목할만한 변화가 없었다(Fig. 4). 이로 보아 분리균 WS-32는 TDG를 분해한다는 것은 알 수 있었으나, 어떠한 경로로 분해하는지는 확인하지 못하였다.

분해균의 TDG 산화활성

A. xylosoxyans (3, 8)와 *Pseudomonas* sp. (10)에서 TDG의 분해경로 중의 하나는 butanol dehydrogenase가 작용하여 NAD⁺를 cofactor로 하여 TDG를 HETA로 변화시키고 이를 다시 TDGA로 전환시켜 완전 분해하는 것으로 알려져 있다. 또한 포유동물의 alcohol dehydrogenase에 의해서도 TDG는 HETA로 산화된다는 사실이 보고되었다(1). 따라서 WS-32의 LB 배지에서 배양한 분리균의 균체 파쇄상등액을 조효소액으로 하여 TDG의 산화활성을 조사하였다. TDG가 산화반응에서 반응액중의 NAD⁺는 NADH로 환원되어 340 nm에서 흡광도의 증가하게 된다. 중성 부근의 pH를 대상으로 효소활성을 조사하기 위해 반응액의 pH를 6.0, 7.0, 8.0으로 조절하여 반응을 실시한 결과 반응액 pH 8.0에서 가장 TDG 산화반응이 활발하였다(결과 미제시). 반응온도가 TDG 산화활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서는 반응 pH를 8.0으로 하고 반응온도를 25°C~60°C 범위에서 반응을 실시하였다. 그 결과 Fig. 5에 보인 바와 같이 35°C~45°C에서 반응활성이 가장 높았으나, 50°C 이상에서는 급격히 효소활성이 낮아지는 것으로 나타났다. 이는 분리균 WS-32가 45°C 이상에서는 성장할 수 없는 중온균이므로 균체내 효소가 50°C 반응온도에서 급격히 실활되어 그 활성이 낮아진 때문으로 판단된다.

WS-32의 균체 파쇄상등액에서 나타난 TDG 산화활성이 butanol dehydrogenase에 의해 나타났을 가능성이 높으므로 탄소수를 1~5개 갖는 알코올에 대한 반응성을 조사하였다. 그 결과 알코올을 산화하는 활성을 보였으며 Table 2에 나타낸 바와 같이 탄소수가 증가된 알코올에 대한 산화력이 더 높았다. Methanol에 대한 활성은 거의 없었으며, TDG와 같이 탄소수가 4개인 butanol에 대한 산화활성이 TDG 보다는 높은 것으로 나

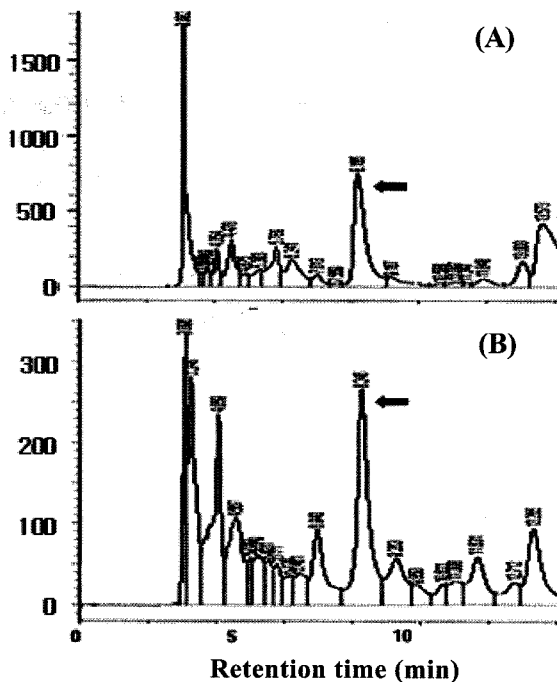


Fig. 4. HPLC of the WS-32 culture filtrates. Culture filtrates were prepared from LB containing 20 mM TDG after incubating for 2 days at 33°C without inoculum (A) or with inoculum (B) of WS-32. The arrows indicate a TDG peak.

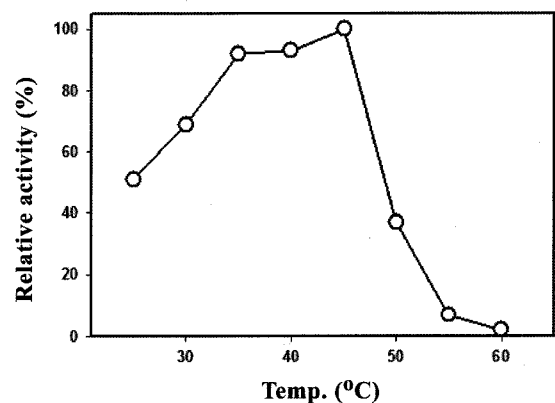


Fig. 5. Effect of reaction temperature on TDG-oxidizing activity of the cell-free extract. The curve represents the average of three independent experiments.

Table 2. Oxidizing activity of the WS-32 cell-free extract

Substrates	Relative activity (%)
Thiodiglycol	30
Methanol	3
Ethanol	14
Propanol	40
Butanol	63
Pentanol	100

타났다. 이로부터 WS-32의 균체 과쇄상등액이 TDG를 산화하는 활성은 butanol dehydrogenase에 의한 것으로 추측된다. 그러나 TDG 함유배지에서 균의 배양시 pH가 저하되지 않고 배양 2일이 지난 후에도 TDG가 배지에 잔존하는 것으로 보아(Fig. 4) WS-32의 butanol dehydrogenase 활성이 낮아 TDG를 산화하는 능력이 낮으므로 이로부터 생겨진 HETA와 thiodiglycolic acid의 양이 적어 배지내 축적되지 않고 그대로 다음 대사경로에 의해 산화되거나, TDG가 thiodiglycol sulphoxide로 산화되어 분해될 가능성도 있다고 여겨진다. 실제 TDG를 분해균에서 두 개의 경로가 모두 존재하는 것으로 보도되었다(9).

감사의 말

본 연구는 방위사업청과 국방과학연구소의 지원으로 수행되었습니다(UD060022AD).

참고문헌

1. Brimfield, A.A., M.J. Novak, and E. Hodgson. 2006. Thiodiglycol, the hydrolysis product of sulfur mustard: analysis of *in vitro* biotransformation by mammalian alcohol dehydrogenases using nuclear magnetic resonance. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 213, 207-215.
2. Chun, J., J.-H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B.K. Kim, and Y.W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of

- prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2259-2261.
3. Ermakova, I.T., I.I. Starovoitov, E.B. Tikhonova, A.V. Slep'kin, K.I. Kashparov, and A.M. Boronin. 2002. Bioutilization of thiodiglycol, the product of mustard detoxification: isolation of degradings strains, study of biodegradation process and metabolic pathways. *Prog. Biochem.* 38, 31-39.
4. Garcia-Ruiz, V., L.E. Martin-Otero, and A. Puyet. 2002. Transformation of thiodiglycol by resting cells of *Alcaligenes xylosoxydans* PGH10. *Biotechnol. Prog.* 18, 252-256.
5. Kim, J.-W., E.I. Rainina, E. Efremenko, C.R. Engler, and J.R. Wild. 1997. Degradation of thiodiglycol, the hydrolysis product of sulfur mustard, with bacteria immobilized within poly(vinyl) alcohol cryogels. *Biotechnol. Lett.* 19, 1067-1071.
6. Lee, E.-H., C.-J. Kim, and K.-H. Yoon. 2005. Characterization and xylanase productivity of *Streptomyces* sp. WL-2. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 178-183.
7. Lee, T.-S., M.Q. Pham, W.A. Weigand, S.P. Harvey, and W.E. Bentley. 1996. Strategies for the treatment of growth-inhibitory waste: an analysis of thiodiglycol degradation, the main hydrolysis product of sulfur mustard. *Biotechnol. Prog.* 12, 533-539.
8. Lee, T.-S., S.H. Chan, W.A. Weigand, and W.E. Bentley. 2000. Biocatalytic transformation of [(2-Hydroxyethyl)thio]acetic acid and thiodiglycolic acid from thiodiglycol by *Alcaligenes xylosoxydans* ssp. *xylosoxydans* (SH91). *Biotechnol. Prog.* 16, 363-367.
9. Lee, T.-S., W.A. Weigand, and W.E. Bentley. 1997. Observations of metabolic formation and variable yield in thiodiglycol biodegradation process impact on reactor design. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65, 743-757.
10. Medvedeva, N., Y. Polyak, T. Zaytseva, and S. Zinovieva. 2007. Soil bacterium *Pseudomonas* sp.: destroyer of mustard gas hydrolysis products. *Biotechnol. J.* 2, 1033-1039.
11. Tikhonova, E.B., I.T. Ermakova, A.V. Slep'kin, K.I. Kashparov, I.I. Starovoitov, and A.M. Boronin. 2002. The bioutilization of thiodiglycol (a breakdown product of mustard gas): isolation of degraders and investigation of degradation conditions. *Microbiology* 71, 211-216.
12. Yang, Y.-C., L.L. Szafraniec, W.T. Beaudry, and J.R. Ward. 1988. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of 2-chloroethyl sulfides. *J. Org. Chem.* 53, 3293-3297.

(Received December 4, 2007/Accepted December 18, 2007)

ABSTRACT : Isolation and Characterization of A Thiodiglycol-Degrading *Cupriavidus* sp.

Jong Deok Park¹, Jee Cheon Kim³, and Ki-Hong Yoon^{1,2*} (¹School of Food Science & Biotechnology, ²Bioresource and Application Research Center, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea, ³The Fifth R&D Institute-4, ADD, Daejeon 305-152, Korea)

A Gram-negative bacterium capable of degrading thiodiglycol (TDG), main hydrolysis product of sulfur mustard, was isolated from ginseng field in enrichment medium supplemented with TDG as carbon source. The isolate, WS-32, grew optimally at 30-37°C and pH 6.0-8.0. It was found to be similar to the genus *Cupriavidus* on the basis of 16S rRNA sequence, while its biochemical properties were highly homologous to *Alcaligenes faecalis*. The cell growth of WS-32 strain was slightly inhibited on LB broth by TDG, but the maximum level of

its growth was maintained stably in the presence of TDG. After incubation of inoculated LB medium or uninoculated LB medium containing TDG for 2 days, TDG amount of the culture filtrate was analyzed to decrease noticeably by HPLC. TDG and alcohols were also oxidized by cell-free extract of the isolate with maximum activities at pH 8.0 and 45°C.