

암모니아 산화 세균 *Xanthomonas maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A에 의한 Nitrite 생성의 비교

최미경 · 한효영 · 정영희 · 민경희*

숙명여자대학교 생물학과, *서울대학교 분자미생물학 연구센터

암모니아를 NO_2^- 로 산화, 이용하는 미생물 균주들을 한강 주변의 토양에서 분리하여, 이들은 *Xanthomonas maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A로 동정하였다. 이 균주들을 암모니아가 첨가된 액체 최소 배지에서 2주 동안 배양한 후, 생성되는 NO_2^- 의 양을 측정하여 암모니아 산화의 활성을 조사하였다. 생장 최적 pH는 *Xanthomonas maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A 균주가 7.0~8.0이었으며, 생장에 필요한 무기질소원으로서 NH_4Cl 의 최적 기질 농도는 두 균주가 모두 10 mM이었다. 암모니아 산화 균주의 활성을 높이기 위하여 *Xanthomonas maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A를 12시간 배양한 후에 50 mM의 hydroxylamine을 배지에 첨가하였을 때 각각 467 $\mu\text{g/l}$, 641 $\mu\text{g/l}$ 의 NO_2^- 를 유도 생성하였다. Hydroxylamine oxidase의 활성에 미치는 기질의 영향을 규명하기 위하여 *Xanthomonas maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A를 8시간 동안 암모니아가 포함된 최소배지에서 배양한 후에, hydroxylamine을 첨가한 결과 hydroxylamine oxidase의 비활성은 109 units/mg protein와 132 units/mg protein으로 증가하였다. Hydroxylamine oxidase의 최적 pH는 7.5, 최적 온도는 30°C였으며, 열에 대한 안정성에서는 *Xanthomonas maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A는 50°C, 60분에서 각각 30%와 25%의 안정성을 보여주었다.

KEY WORDS □ *Xanthomonas maltophilia* SU6, *Achromobacter* sp. 12A, nitrification, nitrite production, hydroxylamine, hydroxylamine oxidase

암모니아는 특별한 화학독립 영양세균인 아질산 산화세균에 의하여 아질산염이나 질산염으로 생물학적으로 전환된다. 그러나 특별한 환경하에서는 Shimel 등 (23)과 Killhem (11, 12)은 질화작용에 heterotrophic 세균, 곰팡이, 그리고 어느 조류 등이 관여한다고 보고하였다. 특수한 환경으로는 산성 산림토양 (17)과, 중성 유기토양 (25) 등에서도 종속 미생물에 의하여 질화작용이 일어나고 있음을 보고 하였다. Heterotrophic 질화세균은 완전히 유기물질을 산화하여 생장하며, 이들 질화세균들은 암모니아와 유기화합물의 질소가 아질산염이나 질산염으로 전환하게 된다 (4, 15, 26).

여러가지의 heterotrophic 질화세균들은 질산을 환원하여 탈질화 작용을 하지만 질화작용도 함께 하고 있다 (15). *Thiosphaera pantotropha*는 urea, 암모니아, hydroxylamine으로부터 호기성 상태에서 아질산염을 생성하지만, 한편 아질산을 환원할 수도 있다 (22). 이들 미생물의 배양에 있어서, nitrite reductase 활성이 억제될 때만 아질산염이 생성된다. 암모니아 산화세균의 에너지 대사는 *Nitrosomonas europaea*에서 잘 연구되었으나 그 외에도 그람 음성 세균 (27, 28, 29) 등에서도 보고 되었다.

암모니아 산화의 과정은 두 단계로 1) 암모니아가 hydroxylamine으로 전환되는 과정과 2) hydro-

xylamine으로부터 아질산염으로 바뀌는 과정이 있다. 첫번째 과정을 촉매하는 효소는 ammonia monooxygenase로 아직 부분적으로 정제 되었으며 *N. europaea*의 효소는 막 구조내에 존재하고 있다 (10). 두 번째 과정을 촉매하는 효소는 hydroxylamine oxidase로 hydroxylamine 산화의 주요 효소이며, 이 효소는 periplasmic space에 분포하고 있다 (20, 8). 암모니아 산화와 hydroxylamine의 산화 사이의 기본적인 coupling system으로 이루어지고 있으나 완전한 기작과정은 아직 자세히 알려지지 않고 있다.

본 연구에서는 토양과 하천의 저질 토양에서 강력한 ammonia 산화 세균을 분리하여 그의 생장 특성 및 기본적인 암모니아에서 아질산염으로 전환되는 hydroxylamine의 oxidase에 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리

암모니아 산화세균의 분리를 위하여 수도권을 중심으로 한강 주변의 토양과 하수의 저면에서 시료를 채취하였다.

배 지

Mineral salt medium의 조성은 증류수 1/당 NH_4Cl 0.535 g, KH_2PO_4 0.054 g, KCl 0.074 g,

MgSO₄·7H₂O 0.049 g, CaCl₂·2H₂O 0.147 g, NaCl 0.584 g, 1 ml의 0.05% cresol red solution, 그리고 1 ml의 미량원소를 넣어 pH 7.8로 조절하여 멸균하여 사용하였다. 미량원소 용액의 조성은 0.1 M-HCl l/당 MnSO₄·2H₂O 44.6 mg, H₃BO₃ 49.4 mg, ZnSO₄·7H₂O 43.1 mg, (NH₄)₂Mo₇O₂₄·4H₂O 37.1 mg, FeSO₄·7H₂O 173 mg, CuSO₄·5H₂O 25.0 mg가 포함된 용액이다. 그리고 pH를 7.0과 8.0 사이로 유지하기 위하여 배지 1l당 11.9 g HEPES를 첨가 하였다(14). 암모니아 산화균을 확인하기 위하여는 mineral salt medium에 NH₄Cl을 첨가한 배지를 사용하였으며, hydroxylamine에 의한 NO₂ 생성과 hydroxylamine oxidase의 유도를 위한 실험에는 mineral salt medium에 NH₄Cl과 0.05% yeast extract를 넣은 배지를 사용하였다. 완전배지로는 Luria-Bertani (LB) 배지를 사용하였으며, 배지조성은 Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 10 g이고, 이 성분을 1l에 용해 후 멸균하여 사용하였다. 고체배지는 최소배지 혹은 완전배지에 Bacto-agar를 1.5% 첨가하여 사용하였다.

암모니아 산화균의 분리 및 선별

암모니아 산화균을 분리하기 위하여 수도권을 중심으로한 한강주변의 토양 및 하수의 저질토를 채취하여 시료를 10⁻³까지 희석하여 LB 평판 배지에 도말하여 배양한 후, 단일 colony가 형성되면 그것을 다시 암모니아가 첨가된 고체 최소 배지에 도말하여 2주일간 배양한 후 분리하였다. 분리된 이 균을 다시 액체 최소 배지에 접종하여 암모니아 산화능이 우수한 균주만은 선별하였다.

분리균의 동정

본 실험에 사용된 균주는 암모니아 산화 균주로 본 실험실에서 분리 동정된 *Xanthomonas maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A를 사용 하였다.

분리균의 배양 및 생장측정

500 ml 삼각 플라스크에 100 ml의 최소 배지를 넣고 분리균을 접종하여 30°C에서 2주 동안 진탕배양(180 rpm)하여 호기적 배양을 하였다. 균 생장은 접종한 균의 농도는 O.D.로 0.05로 맞추었으며 균 생장은 spectrophotometer로 600 nm에서 O.D.를 측정하였다.

균주의 NO₂⁻ 생성량 측정

균주에 의하여 생성된 NO₂⁻의 농도는 diazotization and coupling reactions 방법에 의해 측정하였다(19). 1% sulfanilamide 시약을 0.5 ml 첨가하고 발색을 위하여 0.02% N-(1 naphthyl)ethylenediamine hydrochloride를 0.5 ml 첨가하여 최종부피를 2.3 ml로 하였다. 10분 반응시킨 후 540 nm에서 NO₂⁻ 생성을 흡광도로 측정하여 분석하였다.

분리 균주의 활성

분리 균주의 활성인 최적 생장 조건은 1, 10, 100 mM의 NH₄Cl 농도와 여러가지 pH에 따라 액체 최소 배지에서의 *Xanthomonas maltophilia* SU6와

Achromobacter sp. 12A의 암모니아 산화 정도 즉, NO₂⁻ 생산량을 측정하였다.

무세포 추출액의 조제

암모니아 산화균주의 배양은 500 ml 삼각 플라스크에 yeast extract가 0.05% 포함된 100 ml의 mineral salt medium을 넣고, 같은 액체 배지에서 이미 12~16시간 배양된 균액 1 ml을 Tris-HCl (pH 7.5) buffer로 한번 세척한 후에 접종하였다. 30°C에서 12시간, 180 rpm으로 진탕배양하였다. 여기에 hydroxylamine oxidase를 유도하기 위하여 중간 산물인 hydroxylamine을 50 mM 되도록 첨가한 후 24시간 동안 30°C에서 180 rpm으로 진탕배양하였다.

Xanthomonas maltophilia SU6와 *Achromobacter* sp. 12A의 세포들을 6,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 수확하였으며, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 완충용액으로 한번 세척하였다. 모아진 세포 200 mg과 같은 부피의 glass bead (0.1 mm)를 섞은 다음 동일한 완충용액을 1 ml 넣어 얼음속에서 30초씩 30분 동안 vortex에서 분쇄하였다. 4°C에서 12,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 취하여 무세포 추출액을 조제하였으며, 이것을 즉시 효소 활성 측정에 사용하였다.

효소 활성 측정

Hydroxylamine oxidase 활성은 무세포 추출액 700 µl와 0.2 µM NH₂OH, 12.6 µM cytochrome C, 83 µM Tris-HCl buffer (pH 7.5)를 각각 100 µl씩 넣고 22°C에서 15분간 반응시킨 후, 0.5 ml의 1% sulfanilamide와 0.5 ml의 0.02% naphthylethylenediamine을 첨가하였다. 10분 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 NO₂⁻를 분석하였다. 효소 활성 1 unit은 15분 반응 동안에 1 µM의 nitrite 형성을 촉매하는 양으로 정했다(3).

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 방법(16)에 따라 실시하였으며, 표준 단백질로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

결과 및 고찰

분리균의 동정

암모니아를 산화시켜 NO₂⁻ 생성량이 우수한 균주를 대상으로 동정을 실시하였다. 본 실험실에서 분리된 암모니아염 질소 산화세균을 Bergey's manual of systematic bacteriology에 의하여 동정한바, 균주는 Gram-negative rod type으로서 *Xanthomonas maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A로 동정되었다. 이들 균주의 여러가지 생리, 생화학적 특성은 Table 1, 2에서 보여주는 바와 같다.

분리균주의 활성도

선별된 암모니아 산화균이 생장하면서 중간산물을 이용해 최종산물인 NO₂⁻를 생성함을 이용하여 생장 조건을 규명하고자 하였다. 분리 동정된 *Xanthomonas*

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of the isolate.

Test	SU6
Oxidase production	—
Catalase production	+
Carbohydrate (O\F)	O\F
Arginine dihydrolase production	—
Lysine decarboxylase production	+
Ornithine decarboxylase production	—
Phenylalanine utilization	—
Proteolysis of gelatin	+
Urease production	—
Nitrate reduction	+
Carbohydrates utilization	
D-xylose	—
D-mannitol	—
D-lactose	—
D-trehalose	+
D-maltose	+
D-arabinose	—
inositol	—
sorbitol	—
D-raffinose	—
D-rhamnose	—
D-sucrose	—
ONPG hydrolysis	+
Growth on MacConkey agar	+
Growth on <i>Salmonella-Shigella</i> agar	—
KIA production	K\K
H ₂ S formation	—
Voges-Proskauer production	—
Indole production	—

+, positive; —, negative; O\F, oxidative and fermentative; K\K, alkali/alkali.

Xanthomonas maltophilia SU6와 *Achromobacter* sp. 12A를 최소 액체 배지에서 배양하면서, 2~3일 간격으로 시료를 취하여 NO_2^- 생성물을 측정하는 결과는 Fig. 1에서 보여주는 바와 같다.

X. maltophilia SU6는 5일에서 8일 사이에 NO_2^- 생성물이 급격히 증가하며 14일째에 NO_2^- 양이 최대 생성된 후 서서히 감소하는 경향을 보여주었다. 그러나 *Achromobacter* sp. 12A는 5일까지 서서히 NO_2^- 양이 증가하다가 5~8일 사이에 NO_2^- 생성물이 급격히 증가하였고 14일째에 최대 생성된 후 감소하였다.

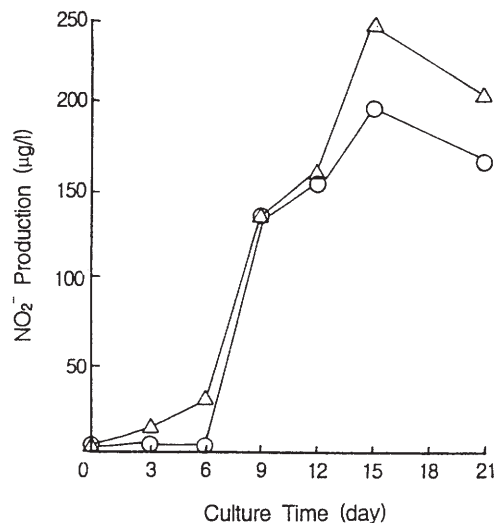
이러한 결과로 보아 *X. maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A는 20일 동안 생장하면서 암모니아를 산화시켜 NO_2^- 를 생성하는 것으로 보아 이 두 균주는 heterotrophic nitrifier로 사료된다.

분리균주의 생장조건을 규명하기 위하여 NO_2^- 생성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 *X. maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A를 각각 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0로 맞춘 액체 최소 배지에서

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolate.

Characteristics	12A
Gram-negative small rods	+
Motile (polar flagella)	—
Gelatin liquefaction	—
Nitrate reduction	+
Indole	—
Voges-Proskauer	—
Citrate	—
Starch hydrolysis	—
Acid produced from	
glucose	—
mannose	—
arabinose	—
xylose	—
rhamnose	—
sucrose	—
maltose	—
trehalose	—
inulin	—
raffinose	—
mannitol	—
Growth at 6°C	+

+, positive; —, negative.

**Fig. 1.** NO_2^- production by *Xanthomonas maltophilia* SU6 (○) and *Achromobacter* sp. 12A (△) on mineral salt medium contained 10 mM NH_4Cl .

7일간 배양한 다음, NO_2^- 생성물을 측정하였다. Fig. 2에서 볼 수 있듯이 *X. maltophilia* SU6는 pH 7.0~8.0에서 NO_2^- 생성물이 가장 높았으며, *Achromobacter* sp. 12A 균주는 pH 8.0에서 가장 높았다. Hofman과 Lees (5)와 Meyerhof (18)는 *Nitrosomonas* sp.를 사

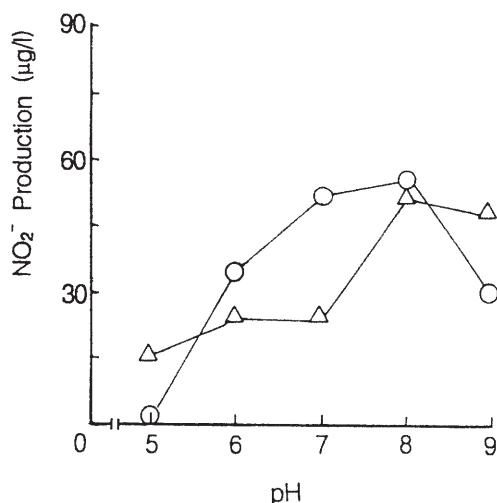


Fig. 2. pH Effect on the production of NO₂⁻ by *Xanthomonas maltophilia* SU6 (○) and *Achromobacter* sp. 12A (△) on mineral salt medium contained 10 mM NH₄Cl.

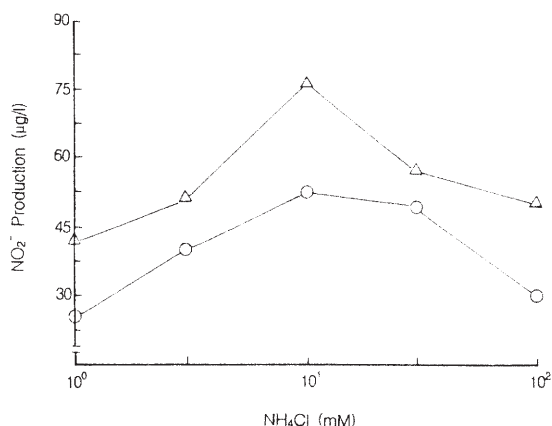


Fig. 3. NO₂⁻ production by *Xanthomonas maltophilia* SU6 (○) and *Achromobacter* sp. 12A (△) from NH₄Cl on mineral salt medium.

용하여 3 ml의 cell suspension을 Warburg vessel에 넣고 산소의 흡수를 측정할 때 pH 8.0~9.0에서 최고의 산소를 흡수하였다. 본 연구의 결과와 비교하여 보면 *X. maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A 균주의 생장은 pH 8.0이므로 Hofman과 Lees의 결과(5)와 일치하고 있다.

또한 암모니아를 산화시키는 균주들은 최소배지내의 NH₄Cl 농도에 따라 그 생장과 산화능이 영향을 받을 것인가를 조사하였다. 1, 10, 100 mM의 NH₄Cl을 최소배지에 첨가하여 두 균주를 배양하였을 경우, NH₄Cl이 10 mM일 때 NO₂⁻ 생성물이 가장 높았

Table 3. Growth curve of *Xanthomonas maltophilia* SU6 and *Achromobacter* sp. 12A on mineral salt medium contained 10 mM NH₄Cl and 0.05% yeast extract.

Culture time (hrs)	Growth (at 600 nm)	
	<i>Xanthomonas maltophilia</i> SU6	<i>Achromobacter</i> sp. 12A
4	0.02	0.15
8	0.18	0.24
12	0.24	0.36
16	0.31	0.38
20	0.27	0.29

으며, 두균주 중에서는 *Achromobacter* sp. 12A 균주가 10 mM의 NH₄Cl에서 NO₂⁻ 생성물이 더 높게 나타났다(Fig. 3). Hofman과 Lees(5)는 *Nitrosomonas* sp.에서 cell suspension을 사용하여 암모니아의 농도와 산소흡수율을 비교 실험한 바, ammonium sulfate가 10 mM일 때 가장 높은 산소를 흡수 하였다. 본 실험에서는 암모니아와 NO₂⁻ 생성을 비교한 바 암모니아 농도가 10 mM일 때 최대의 NO₂⁻ 생성을 보여 주었으므로 위의 결과와 일치하였음을 알 수 있었다.

호기적 조건에서의 질화작용

호기적 조건에서의 질화작용을 측정한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 *X. maltophilia* SU6는 접종 후 4~8시간 사이에 급격히 증식하였고 16시간까지는 완만히 증식하였다. *Achromobacter* sp. 12A는 접종 후 6~10시간 동안 급격히 증가하였고 12시간 후에는 완만히 증식되었고 모두 20시간 이후 증식이 떨어졌다. 따라서 전반적인 성장정도는 *X. maltophilia* SU6보다 *Achromobacter* sp. 12A 균주가 높게 나타났음을 알 수 있었다.

암모니아 산화율을 높이기 위해서 암모니아에서 NO₂⁻로 산화되는데 유도 역할을 하는 중간산물인 hydroxylamine을 50 mM 되도록 배양초기에 첨가하고 배양 후 8, 12시간 후에 첨가한 다음, 24시간 계속하여 배양하였다. Hydroxylamine은 자체가 용액중에서 unstable하므로 자연적인 산화에 의해서 생성된 NO₂⁻ 값을 빼어주었다. 이 때에 NO₂⁻ 생성물을 diazotization and coupling reactions 방법으로 비교 관찰한 결과는 Table 4에서 보여주는 바와 같다.

그 결과 *X. maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A 모두 12시간 후에 중간산물인 hydroxylamine을 첨가했을 때가 첨가하지 않은 대조구보다 NO₂⁻ 생성물이 가장 높게 나타났다. 이 때 *Achromobacter* sp. 12A 균주가 NO₂⁻를 더 많이 생성하였음은 대단히 흥미있는 결과로 강력한 암모니아 산화균으로 사료된다. 이와 같은 결과로 보아 두균주가 완전히 성장한 후에 hydroxylamine을 첨가했을 경우가 NO₂⁻ 생

Table 4. Nitrite production by ammonia oxidizing bacteria on mineral salt medium.

Addition time of hydroxylamine after incubation (hrs)	NO ₂ ⁻ production (μg/l)	
	<i>Xanthomonas maltophilia</i> SU6	<i>Achromobacter</i> sp. 12A
Control	375	389
0	247	172
8	322	360
12	467	641

Culture condition was carried out on the mineral salt medium contained 10 mM NH₄Cl for 24 hrs.

Table 5. Specific activity of hydroxylamine oxidase in extracts of ammonia oxidizing bacteria.

Strains	Enzyme activity (units)	Protein (mg)	Specific activity (units/mg protein)
<i>Xanthomonas maltophilia</i> SU6	3.26	0.111	29.36
<i>Achromobacter</i> sp. 12A	5.43	0.105	51.76

Culture condition was carried out on the mineral salt medium contained 10 mM NH₄Cl for 24 hrs.

성률이 높게 유도됨을 알 수 있다.

Hydroxylamine oxidase의 효소 활성의 특성 및 유도

암모니아에서 NO₂⁻로 산화될 때 두번째 단계를 촉매하는 hydroxylamine oxidase의 활성 및 유도에 관하여 조사하였다. 즉 암모니아 산화의 중간산물인 hydroxylamine이 어떻게 hydroxylamine oxidase를 유도하는지를 그 활성을 측정하여 비교 검토하였다. *X. maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A 균주를 yeast extract가 0.05% 되도록 첨가된 액체 배지에서 배양한 후, 무세포 추출액을 조제하여 hydroxylamine oxidase의 활성을 측정하였다 (Table 5).

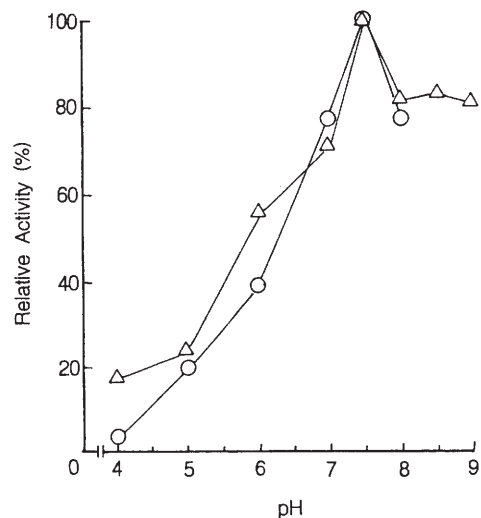
그 결과 *Achromobacter* sp. 12A 균주의 hydroxylamine oxidase의 specific activity가 *X. maltophilia* SU6보다 현저하게 높게 나타났다. 이와 같은 결과로 비추어 보아 *Achromobacter* sp. 12A 균주는 강력한 암모니아 산화균으로 사료된다.

또한 같은 배양액에 접종시에 중간산물인 hydroxylamine을 첨가한 것과 8시간 배양한 후, 12시간 배양한 후에 50 mM hydroxylamine을 첨가하여 hydroxylamine oxidase의 활성을 유도하였다 (Table 6). 그 결과 *X. maltophilia* SU6는 배양 후 hydroxylamine을 8시간 후에 첨가한 경우가 hydroxylamine oxidase의 활성이 가장 높았다. 반면에 *Achromobacter* sp. 12A 균주는 8시간 후 hydroxylamine을 첨가했을 때 활성이 가장 높았다. 이와 같은 결과로 보아, 두 균주 모두 배양후 8시간 후에

Table 6. Specific activity of hydroxylamine oxidase in extracts of ammonia oxidizing bacteria.

Addition time of hydroxylamine after incubation	Specific enzyme activity (units/mg protein)	
	<i>Xanthomonas maltophilia</i> SU6	<i>Achromobacter</i> sp. 12A
Control	29	52
0	29	85
8	109	132
12	85	95

Culture condition was carried out on the mineral salt medium contained 10 mM NH₄Cl for 24 hrs.

**Fig. 4.** Optimal pH on the activities of hydroxylamine oxidase from *Xanthomonas maltophilia* SU6 (○) and *Achromobacter* sp. 12A (△).

hydroxylamine을 첨가하면 hydroxylamine oxidase의 활성을 유도할 수 있었다.

Hydroxylamine oxidase의 효소학적 특성

효소 활성에 대한 최적 pH : Hydroxylamine oxidase의 효소 활성에 대한 최적 pH를 알아보기 위해 pH 4.0~6.0에서는 0.1 M acetate buffer를, pH 6.0~7.5에서는 0.1 M phosphate buffer를, pH 7.5~9.0에서는 0.1 M Tris-HCl buffer를 사용하였다.

X. maltophilia SU6와 *Achromobacter* sp. 12A 두 균주 모두는 산성인 pH 5.0 이하에서는 hydroxylamine oxidase의 활성이 30% 이하였고, pH 7.0에서는 70% 정도, pH 8 이상인 알칼리성 조건에서는 70%를 넘는 효소 활성을 보였다. 이와 같은 결과로 보아 두 균주의 효소 활성의 최적 pH는 7.5~8.0임을 알 수 있다 (Fig. 4). Hooper 등 (9)은 *Nitrosomonas europaea*의 hydroxylamine oxidoreductase의 성질

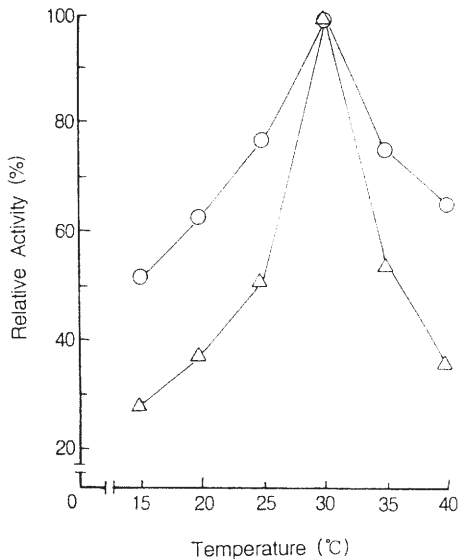


Fig. 5. Optimal temperature on the activities of hydroxylamine oxidase from *Xanthomonas maltophilia* SU6 (○) and *Achromobacter* sp. 12A (△).

을 조사한바 pH 7.5에서 효소활성이 가장 높은 것으로 보고하였다. 본 실험실에서 *X. maltophilia* SU6와 *Achromobacter* sp. 12A의 동일효소의 최적 pH도 7.5인 것으로 보아 위 결과와 일치함을 알 수 있었다.

효소 활성에 대한 최적 온도: 효소 활성에 대한 최적온도를 조사하기 위해 15, 20, 25, 30, 35, 40°C에서 효소 반응액을 15분간 반응시킨 후, 효소 활성을 측정하였다.

두 균주의 hydroxylamine oxidase 활성에 대한 최적 온도를 측정한 결과 Fig. 5에서 볼 수 있듯이 30°C에서 효소 활성이 가장 높은 것으로 측정되었다. *Achromobacter* sp. 12A의 경우는 30°C에서 효소 활성이 급격히 증가하였고, *X. maltophilia* SU6는 10~30°C까지는 *Achromobacter* sp. 12A보다 완만히 증가하였으며 35, 40°C의 경우는 급격히 감소하였다.

효소 안정성에 대한 온도의 영향: 열에 대한 효소의 안정성을 검토하기 위하여 효소 반응액을 35, 40, 50, 60, 70°C를 유지시키면서 30분 간격으로 3차례 효소 활성을 측정하였다.

열에 대한 hydroxylamine oxidase의 활성은 두 균주 모두 비슷한 결과를 보여 주었으나 35°C에 대한 효소의 안정성은 *X. maltophilia* SU6가 *Achromobacter* sp. 12A보다 높게 나타났다 (Table 7). 그러나 50°C나 40°C에 대한 효소의 안정성은 *Achromobacter* sp. 12A 균주가 보다 높게 나타난 결과를 보여 주었다. 따라서 위의 결과로 보아 두 균주의 hydroxylamine oxidase의 활성에는 약간의 차이를 보여 주고 있으며

Table 7. Thermostability of hydroxylamine oxidase from two strains.

Reaction temp. (°C)	Reaction time (min)	Relative activity (%)	
		<i>Xanthomonas maltophilia</i> SU6	<i>Achromobacter</i> sp. 12A
35	30	84	68
	60	81	64
	90	32	53
40	30	43	57
	60	31	48
	90	22	46
50	30	29	54
	60	25	28
	90	14	21
60	30	24	41
	60	0	0
	90	0	0
70	30	0	0
	60	0	0
	90	0	0

Achromobacter sp. 12A 균주가 더 열에 대하여 안정성이 높게 나타났다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터 (서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 연구비 지원에 의하여 수행되었다.

참고 문헌

1. Anderson, J.H., 1965. Estimation of the nitric oxide formed from hydroxylamine by *Nitrosomonas*. *Biochem. J.* **94**, 236.
2. Bedard, C. and R. Knowles, 1989. Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol. Reviews* **53**, 68-84.
3. Falcone, A.B., A.L. Shug, and D.J.D. Nicholas, 1963. Some properties of a hydroxylamine oxidase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* **77**, 199.
4. Focht, P.D. and W. Verstraete, 1977. Biochemistry ecology of nitrification and denitrification. *Adv. Microbiol. Ecol.* **1**, 135-214.
5. Hofman, T. and H. Lees, 1953. The biochemistry of the nitrifying organisms. *Biochem. J.* **54**, 579-583.
6. Hollocher, T.C., M.E. Tate, and D.J.D. Nicholas, 1981. Oxidation of ammonia by *Nitrosomonas europaea*. *J. Biol. Chem.* **256**, 10834-10836.
7. Hooper, A.B., 1968. A nitrite-reducing enzymes from *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys.*

- Acta* **162**, 49-65.
8. **Hooper, A.B.**, 1984. Ammonia oxidation and energy transduction in the nitrifying bacteria, p. 133-167. In W.R. Strohl and O.H. Tuovinen (ed.), *Microbial chemoautotrophy*. Ohio State University Press, Columbus.
 9. **Hooper, A.B., P.C. Maxwell, and K.R. Terry**, 1978. Hydroxylamine oxidoreductase from *Nitrosomonas*: Absorption spectra and content of heme and metal. *Biochemistry* **17**, 2984-2989.
 10. **Hyman, M.R. and M. Wood**, 1985. Suicidal inactivation and labelling of ammonia monooxygenase by acetylene. *Biochem. J.* **227**, 719-725.
 11. **Killham, K.**, 1986. Heterotrophic nitrification, p. 117-126. In J.I. Prosser (ed.), *Nitrification*. IRL Press, Oxford.
 12. **Killham, K.**, 1987. A new perfusion system for measurement and characterization of potential rates of soil nitrification. *Plant and Soil* **97**, 267-272.
 13. **Knowles, G., A.L. Dowling, and M.J. Barrett**, 1965. Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture, with the aid of an electronic computer. *J. Gen. Microbiol.* **38**, 263-278.
 14. **Koops, H.P., B. Bottcher, U.C. Moller, A.P. Roser, and G. Stehr**, 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1689-1699.
 15. **Kuenen, J.G. and L.A. Robertson**, 1987. Ecology of nitrification and denitrification, p. 162-218. In J.A. Cole and S. Ferguson (ed.), *The nitrogen and sulfur cycles*, 42 Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge University Press, Cambridge.
 16. **Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall**, 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 17. **Martikainen, P.J.**, 1985. Numbers of autotrophic nitrifiers and nitrification in fertilized forest soil. *Can. J. Microbiol.* **31**, 190-197.
 18. **Meyerhof, O.**, 1917. *Pflg. Arch. ges. Physiol.* **166**, 240.
 19. **Nicholas, D.J.D. and A. Nason**, 1957. Determination of nitrate and nitrite. *Methods Enzymol.* **3**, 981-995.
 20. **Olson, T.C. and A.B. Hooper**, 1983. Energy coupling in the bacterial oxidation of small molecules: An extra cytoplasmic dehydrogenase in *Nitrosomonas*. *FEMS Microbiol. Lett.* **19**, 47-50.
 21. **Ritchie, G.A. and D.J.D. Nicholas**, 1974. The partial characterization of purified nitrite reductase and hydroxylamine oxidase from *Nitrosomonas europaea*. *Biochem. J.* **138**, 471-480.
 22. **Robertson, L.A. and J.G. Kuenen**, 1988. Heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotrophica*: oxygen uptake and enzyme studies. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 857-863.
 23. **Schimel, J.P., M.K. Firestone, and K.S. Killham**, 1984. Identification of heterotrophic nitrification in a Sierran forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 802-806.
 24. **Susuki, I., U. Dular, and S.C. Kwok**, 1974. Ammonia or ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas europaea* cells and extracts. *J. Bacteriol.* **120**, 556-558.
 25. **Tate, R.L.**, 1980. Variation in heterotrophic and autotrophic nitrifiers populations in relation to nitrification in organic soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 75-79.
 26. **Verstrate, W. and M. Alexander**, 1973. Heterotrophic nitrification in samples of natural ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* **7**, 39-42.
 27. **Watson, S.W. and M. Mandel**, 1971. Comparison of the morphology and deoxyribonucleic acid comparison of 27 strains of nitrifying bacteria. *J. Bacteriol.* **107**, 563-569.
 28. **Watson, S.W., F.W. Valois, and J.B. Waterbury**, 1981. The family Nitrobacteraceae, p. 1005-1012. In M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel (ed.), *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York.
 29. **Watson, S.W., E. Bock, H. Harms, H-P. Koops, and A.B. Hooper**, 1989. Nitrifying bacteria, p. 1808-1834. In J.G. Holt, N.R. Krieg, J.W. Moulder, N. Pfennig, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S. Williams (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 3. Williams & Wilkins Co., Baltimore.

(Received November 25, 1994)

(Accepted December 9, 1994)

ABSTRACT: A Comparison of Nitrite Production by Ammonium Oxidizing Bacteria *Xanthomonas maltophilia* SU6 and *Achromobacter* sp. 12A

Choi, Mi-Kyung, Hyo-Young Han, Young-Heui Jung, and Kyung-Hee Min*
(Department of Biology, Sookmyung Women's University, Seoul 140-132, and
Molecular Microbiology Research Center, Seoul National University, Seoul
151-742, Korea)

Ammonia oxidizing bacteria were isolated from soil samples collected in the area of Han River, and identified as *Xanthomonas maltophilia* SU6 and *Achromobacter* sp. 12A. Nitrite production in mineral salt media containing ammonia for two weeks by both strains was examined for the activity of ammonia oxidation and hydroxylamine oxidase. The optimal pH for the activity of *Xanthomonas maltophilia* SU6 and *Achromobacter* sp. 12A was 7.0-8.0, and the optimal concentration of substrate as a nitrogen source was 10 mM ammonium chloride. The inductions of oxidizing activity and hydroxylamine oxidase activity were done by the addition of 50 mM hydroxylamine. As results, the nitrite production was induced by the addition of hydroxylamine after 12 hrs incubation: 467 $\mu\text{g/l}$ for *Xanthomonas maltophilia* SU6 and 641 $\mu\text{g/l}$ for *Achromobacter* sp. 12A, respectively. Specific activity of hydroxylamine oxidase of *Xanthomonas maltophilia* SU6 was increased to 109 units/mg protein by the addition of hydroxylamine after 8 hrs cultivation and to 132 units/mg protein for *Achromobacter* sp. 12A in the same condition. The optimal conditions of hydroxylamine oxidase activity were pH 7.5 and 30°C. The thermostability of *Xanthomonas maltophilia* SU6 and *Achromobacter* sp. 12A at 50°C for 60 minutes were 30% and 25%, respectively.