

Protease 생성균 *Aeromonas hydrophila* PB16의 분리 및 합성폐수처리능

박형수* · 양선영 · 김무훈 · 이종광 · 유용호 · 박두현¹

삼성엔지니어링 기술연구소, ¹서경대학교 생물공학과

식품폐수처리장의 활성슬러지와 논, 밭의 토양에서 우수한 protease 생성 균주를 분리 선별하였다. 이 중 효소활성이 우수한 PB16은 그람 음성, 간균이며 protease activity는 6.49 U/ml 이었다. 생리, 생화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열분석을 실시한 결과, *Aeromonas hydrophila* (99.0%) 인 것으로 확인 되었다. Bioscreen C를 사용한 최적 성장조건 평가는 합성폐수에 vitamin과 mineral을 첨가한 배지의 증식속도(0.26 h⁻¹)가 무첨가배지(0.21 h⁻¹)보다 높았으며, 분리균주의 합성폐수 유기물 제거능 실험에서는 초기 soluble-CODcr 2,472 mg/l인 고농도 합성폐수를 1 일, 3 일 반응 후 각각 59, 87%의 제거율을 나타내었다.

Key words □ *Aeromonas hydrophila*, protease, wastewater treatment

*Aeromonas hydrophila*는 식품, 지하수, 하폐수로 분리가능한 미생물(15)이며, 이와 연관된 종들은 그람음성, 통성혐기성이며 인간과 수생 및 육상동물들에 병원성을 유발하는 원인균으로 알려져 왔다(4,9). 대부분의 환경에서 분리한 *Aeromonas*속 균주들은 수 많은 extracellular 물질들인 aerodin, enterotoxins, proteases 그리고 acetylcholinesterase등을 분비하며, 이러한 것들이 병독성 원인으로 밝혀지고 있다(5,13,16,20). 생화학적으로 *A. hydrophila*는 장내세균 균주 특히 *Escherichia*와 *Klebsiella* 속균과 유사하며, oxidase와 catalase를 생산하며, 당을 분해하여 산을 생성하는 특성을 갖는 균주이다.

또한, protease (EC 3.4.21.14)는 식품, 의약, 환경등의 각종 제조산업 분야등에서 매우 중요한 효소로 알려져 있으며, 단백질의 펩티드결합의 가수분해를 촉매하는 효소로서 최적 pH에 따라 산성, 중성 그리고 알칼리성 protease로 나누어지며, 또한 기능성에 따라 serine protease, metal protease, thio protease등으로 분류된다(10,12,17,23,27). 일반적으로 단백질분해효소 생성균주들은 *Bacillus*속 계통들이 주로 이용 되고 있다(1,2,18,19).

근래에 환경오염원인 중 생활하수 비율이 증가되고 있으며, 특히 세제의 사용에 의한 이차오염이 심각한 사회문제로 대두되고 있다(26). 따라서 효소성분(protease, lipase, amylase, cellulase등)이 함유된 생분해성 세제개발이 활발히 진행되고 있다. 특히 protease는 식품, 피혁가공, 제지공정에 다양하게 사용되고 있다. 또한, 환경복원에 대한 관심과 폐수처리공법과 공정개선으로 인하여 활성슬러지법에서 폐수처리효율이 증가되어 관리에 어려움이 없어져 가고 있으나, 고농도유기물폐수 특히, 지방성분과 단백질성분 함유폐수등의 신속하고 강력한 제거능이 요구된다. 이러한 제한된 처리기간내 폐수를 처리하기위한 유용한 미생물들

의 탐색과 이용이 계속 증가될 것으로 예상되고 있으며, 또한, 난분해성 폐수에 대한 생물학적처리에 대한 관심이 고조되고 있는 실정이다. 또한, 지금까지 protease생성균주에 대한 연구는 대부분 *Bacillus*속에 대한 연구로 알칼리조건, 중성조건등에 따라 증식하는 균주들로 이들이 생산하는 protease는 산업적으로 다양하게 이용되고 있다(14).

본 연구에서는 환경내에서 분리한 우수한 중성 protease생성균주를 분리하여 효소활성과 균주의 특성을 조사하고, 기존의 protease생성균주인 *Bacillus*속 균주와의 활성비교 및 폐수처리공정에 이용가능성 조사를 위해 최적성장조건과 인공합성폐수에 대한 처리능을 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료채취 및 균주 분리

경기도 인근의 식품 폐수 처리장 반송슬러지와 논, 밭토양 시료에서 채취하여 멸균 생리 식염수(0.85% NaCl용액)에 연속희석하였다. 희석한 시료를 protease 고체배지에 도말한 후 37°C 배양기에서 24 시간 배양하여 생성된 colony 주변에 직경 10 mm 이상의 clear zone을 생성하는 colony를 protease 생성균으로 1 차선별 하고, protease activity test를 통해 우수한 활성을 나타내는 것을 최종적으로 선별하였다. protease 고체배지(11)는 glucose 5 g, yeast extract 2 g, polypeptone 10 g, NaCl 2 g, agar 15 g, D.W 1 l를 혼합하고 pH 7.0으로 조절하여 가압 멸균한 후 casein 2%와 skim milk 0.5%를 첨가하여 제조하였고, 액체배지는 agar성분을 제거하여 사용하였다. 합성폐수는 glucose 2 g, yeast extract 10 mg, NaCl 0.1 g, (NH₄)₂SO₄ 10 g, KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄ 7H₂O 0.2 g, FeCl₂ 5 mg, CaCl₂ 50 mg으로 구성된 공통성분에 peptone 3 g을 1 l 증류수로 제조하여 멸균 후 사용하였다. 분리된 균주들은 glycerol-nutrient broth에 현탁시켜 -70°C

*To whom correspondence should be addressed.
Tel. 031-260-6051, Fax: 031-260-6008
E-mail: Jacob671.park@samsung.com

냉동고에 보관하였다. 대조군으로 생명공학연구원 유전자은행에서 분양받은 *Pseudomonas* sp. KCTC1397, *Bacillus* sp. KCTC 1730을 사용하였다.

효소 활성 측정

1차로 선별된 균주들을 LB 배지(tryptone peptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g)에서 30°C, 150 rpm 교반배양기로 24 시간 동안 배양시킨 후 8,000×g에서 3 분간 원심분리하여 균체를 완전히 제거하고, 상등액을 crude enzyme solution으로 사용하였다. 효소활성은 상등액만을 따로 분리하여 Leighton 방법(12)을 변형하여 측정하였다. 효소액 0.1 ml에 1 mM CaCl₂가 포함된 0.2 M Tris-HC (pH 7.5) 완충용액에 용해시킨 5.0% azocasein (Sigma, USA) 0.2 ml, 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM, CaCl₂ 0.1 ml, 증류수로 1 ml를 혼합한 반응액을 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 10% (w/v) trichloroacetate 1.0 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 0°C에서 10 분간 정치한 후 침전된 단백질을 제거하기 위해 원심분리하여 상등액을 Millipore filter (0.45 µm)로 여과하였다. 여과액 1.2 ml에 1.8 N NaOH 0.3 ml를 첨가하여 발색시킨 후 spectrophotometer (Beckman DU-530, USA)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성은 1.0 µg의 azocasein을 가수분해할 수 있는 효소량을 1 unit로 하였다.

형태학적 관찰

균주는 LB 배지에서 배양 후 그람염색 후 광학현미경 (Olympus BS51TR-32000, Tokyo, Japan)으로 그람염색, 양성의 판별과 균주의 형태, 크기, 배열상의 특징 등을 관찰하였다. 또한, 주사전자현미경(FE-SEM, HITACHI-S4500II Hitachi, Tokyo, Japan)으로 균주의 세부적인 형태와 크기 등을 관찰하였다(21).

생리 및 생화학적 특성

균주의 oxidase, catalase test 및 Gram 염색은 Collins 등의 방법(7)을 바탕으로 하였고, API 20NE kit (bioMerieux, France)와 Bergey's manual of Systematic Bacteriology (8)의 자료를 참조하여 생리, 생화학적특성을 조사하였다. 결과판독은 APILAB plus software version 4.0을 사용하여 similarity %로 환산하여 나타내었다.

16S rDNA 동정

분리세균의 유전자기법을 통한 동정을 위하여 16S rDNA gene 분석을 실시하였다. Genomic DNA는 Sambrook 등의 방법(25)을 이용하여 추출하였고, PCR 증폭의 주형으로 사용하였다. 16S rDNA를 증폭하기 위하여 forward primer 27F (5'-AGACTT TGATCMTGGCTCAG-3')와 reverse primer 1492R (5'-GGT TACCTTTGTTACGACTT-3')을 각각 oligonucleotide primer로 사용하였다.

PCR 반응은 10 Han Omni PCR buffer (GENENMED, Korea), 각각의 10 mM deoxynucleoside (Takara, Tokyo, Japan)와 10 pmol primer를 각각 첨가하고, 10 ng template DNA,

2.5 U Han Taq polymerase (GENENMED)를 첨가하고 최종 PCR 반응물을 50 µl되게 제조하여 thermal cycler (GeneAmp PCR system 9700, Perkin-Elmer, Foster City, USA)로 수행하였다.

첫 반응은 94°C에서 7 분 동안 DNA를 변성시키고, 각 단계에서는 94°C에서 1 분, 58°C에서 1 분, 72°C에서 1 분 동안 DNA를 증폭하는 반응을 30 회 수행하고 마지막으로 72°C에서 10 분 동안 DNA를 증폭한 후 4°C에서 보관하였다. PCR 증폭산물은 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 16S rDNA는 자동염기서열분석기 MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, Piscataway, USA)을 이용하여 직접적으로 염기서열을 분석하였고 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST network service를 이용하여 염기서열의 계통분류학적 유연관계를 분석하였다(3). 또한 염기서열은 DNASIS MAX 1.0 (MiraiBio, Japan) program을 이용하여 분석하였고, neighbor-joining method (24)를 이용하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성하였다.

균주 최적 성장조건

분리균주를 LB 배지에 24 시간 30°C 배양후 균체 1 ml를 microcentrifuge tube에 넣어 원심분리(8,000×g)을 한 후, 멸균 증류수로 2-3번 세척하여 OD (600 nm) 1로 조정된 균주를 Bioscreen C (LabSystems, Finland)에 5% 접종하였다. 배지의 조건은 크게 네 가지로 protease 합성페수 360 µl와 phosphate buffer 40 µl, 이 성분에 vitamin solution 4 µl과 trace mineral solution 4 µl을 첨가한 배지(6), 추가로 protease 액체배지 360 µl와 phosphate buffer 40 µl에 vitamin solution 4 µl, trace mineral solution 4 µl을 첨가한 배지로 조사하였다. 흡광도는 600 nm에서 30 분 간격으로 흡광도를 측정하여 균체의 성장을 측정하였다(22).

합성페수 제거능 실험

분리균주를 이용한 합성페수의 유기물 제거능을 조사하였다. 합성페수의 초기 Soluble-CODcr 값은 2,472 mg/l이었다. 분리 균주를 LB배지에 접종시켜 25°C, 100 rpm 교반배양기에서 1 일 배양한 후, 3 ml를 원심분리기(Hanil, Korea) 8,000×g으로 2분간 원심분리하였다. 상등액은 버리고 멸균수로 균주를 2-3 번 세척한 후 3 ml를 50 ml의 합성페수에 넣고 24 시간 동안 100 rpm, 25°C 교반배양기에서 반응시켰다. 반응 후 pH, 균체량을 UV-spectrophotometer (Beckman DU-530)로 660 nm에서 측정하였고, 유기물감소량은 반응초기, 1 일과 3 일 후에 COD측정용 vial (HACH, USA)중 1500 mg/l까지 측정가능한 vial로 시료를 희석하여 CODcr변화량을 측정하였고, pH meter (DP-880P, 동아과학, Korea)로 수소이온농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

균주 선별

경기도 인근의 식품폐수처리장내 슬러지와 논, 밭토양에서 분

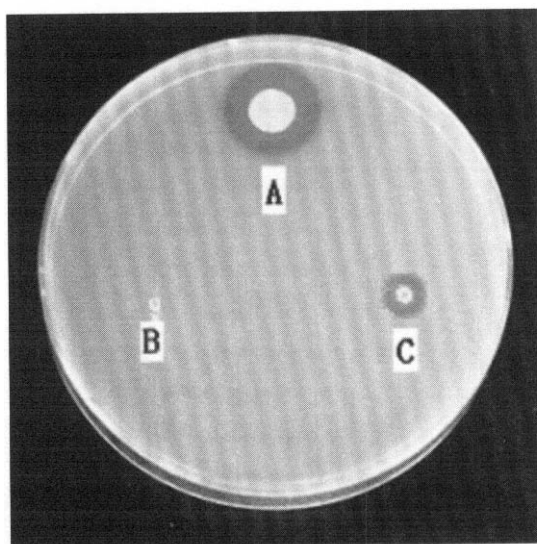


Fig. 1. Formation of clear zone on protease agar medium. A, Isolate PB16; B, *Pseudomonas* sp. KCTC 1397; C, *Bacillus* sp. KCTC 1730.

Table 1. The cell growth and protease activity of the isolated PB16 and *Bacillus* sp. KCTC 1730

| Strains | Clear zone (mm) | Cell growth (660 nm) | Protease activity (U/ml) |
|------------------------------|-----------------|----------------------|--------------------------|
| PB16 | 12 | 4.66 | 6.49 |
| <i>Bacillus</i> sp. KCTC1730 | 7 | 4.11 | 1.29 |

리한 균주(1500 여개) 중 protease 고체 배지에서 나타난 clear zone의 직경 10 mm 이상이고(Fig. 1) 균체량(OD 660 nm)이 2 이상인 균주들 1 차적으로 360 개 균주를 선별하였고, 이들 균주를 중심으로 protease activity test (Table 1)결과, 2 이상인 균주를 2 차 우수균주로 선별하였다. 그 결과 14 개 균주 중 가장 높은 protease activity를 나타낸 PB16을 분리하였다.

균주의 동정 및 특성

그람 염색한 sample을 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰한 결과 PB16은 그람 음성균이며 길이는 약 2.6~3.0 μm , 폭은 약 0.88~1.0 μm 인 간균에 불규칙한 배열을 이루고 있었다(Fig. 2). Oxidase test는 양성인 것으로 나타났으며, 이러한 결과로 API 20NE kit test를 실시하였다(Table 2). 분리균주의 생리,생화학적 특성들은 *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654의 특성과 동일하게 나타났다. Indole 생성능, arginine dihydrolase 존재유무와 protease생성능은 양성, urease, citrate 이용능등은 음성으로 판명되어 API Kit을 사용한 동정에서는 *Aeromonas hydrophila*과 특성이 일치하였다. 또한, API 반응 종료 후 API LAB PLUS software (version 4.0)을 실시한 결과 PB16 균주는 *Aeromonas* sp. (99.9%) 인 것으로 확인 되었다. 또한 16S rDNA의 분석결과 *A. hydrophila* (99% 유사도)로 동정되어 *A. hydrophila* PB16으로 명명하였으며(Fig. 3), 이는 생리,생화학적 조사실험과 일치

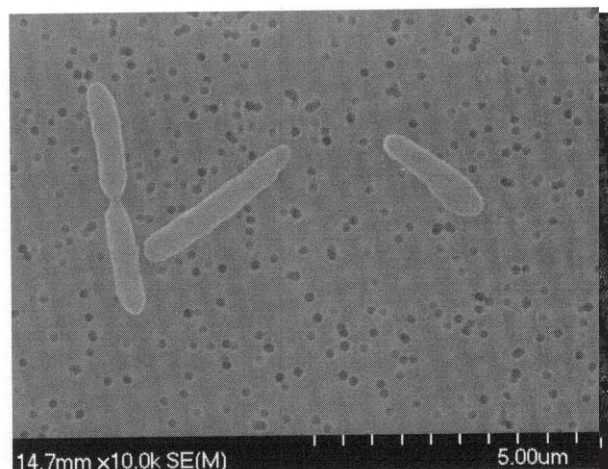


Fig. 2. Scanning electron microscopic photograph of the isolated, *Aeromonas hydrophila* PB16.

Table 2. Physiological characteristics of the isolated strain *Aeromonas hydrophila*. PB16 and the registered strain *Aeromonas hydrophila* ATCC 35654

| Substrates | Reactions / Enzymes | Characteristics | |
|-----------------|------------------------------------|-----------------|------------|
| | | PB16 | ATCC 35654 |
| NO ₃ | Reduction of nitrates to nitrites | + | + |
| | Reduction of nitrates to nitrogen | + | + |
| TRP | Indole production | + | + |
| GLU | Acidification | + | + |
| ADH | Arginine dihydrolase | + | + |
| URE | Urease | - | - |
| ESC | Hydrolysis (β -glucosidase) | + | + |
| GEL | Hydrolysis(protease) | + | + |
| PNG | β -galactosidase | + | + |
| GLU | Glucose assimilation | + | + |
| ARA | Arabinose assimilation | + | + |
| MNE | Mannose assimilation | + | + |
| MAN | Mannitol assimilation | + | + |
| NAG | N-acetyl-glucosamine assimilation | + | + |
| MAL | Maltose assimilation | + | + |
| GNT | Gluconate assimilation | + | + |
| CAP | Caprate assimilation | + | + |
| ADI | Adipate assimilation | - | - |
| MLT | Malate assimilation | + | + |
| CIT | Citrate assimilation | - | - |
| PAC | Phenyl-acetate assimilation | - | - |
| OX | Cytochrome oxidase | + | + |

하였다.

또한 지금까지 주로 protease를 생성하는 균주는 대부분 *Bacillus*속에 속한 균주(2,18,19)들 이었으며, 표준균주인 *B.*

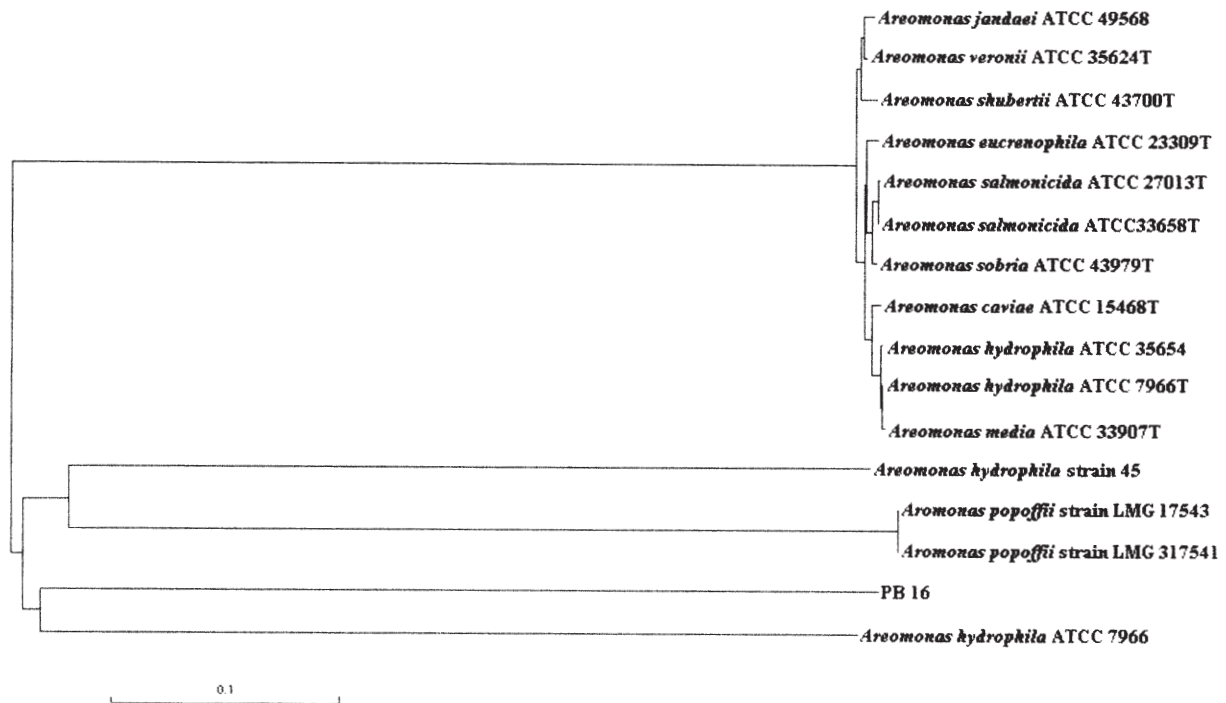


Fig. 3. The phylogenetic position of strain PB16. The scale bar represents the expected number of changes per sequence position

Table 3. Comparison of cell growth rate (μ) depend on media

| Condition | Isolated strain | Registered strain |
|--|-------------------------------------|----------------------------------|
| | <i>Aeromonas hydrophila</i> PB16 | <i>Bacillus</i> sp. KCTC 1730 |
| Synthetic waste water | 2.25 | 1.21 |
| Synthetic waste water (Vitamin, Mineral sol) | 2.65 | 1.20 |
| Protease liquid medium | 3.63 | 1.43 |
| Protease liquid medium (Vitamin, Mineral sol) | 3.15 | 1.77 |

* μ is the cell growth rate from 0 h to 3 h (exponential phase) on the growth curve.

subtilis KCTC 1730보다 균체성장률이나 protease 효소 활성에서 모두 PB16이 우수한 것으로 나타나 산업적 이용에 활용할 수 있는 우수한 효소활성능을 지닌 균주로 사료된다.

최적 균주 성장조건

Bioscreen C를 이용한 실험에서 분리균주의 성장속도는 합성폐수의 경우 0.21 h^{-1} 이고, 미량성분으로 vitamin과 mineral용액을 첨가한 배지에서 0.26 h^{-1} 으로 나타났으나, 비교균주인 *Bacillus* sp. KCTC 1730의 경우 0.12 h^{-1} 이었으며, 액상배지에서도 $0.14\text{--}0.17 \text{ h}^{-1}$ 으로 상대적으로 분리균주에 비해 낮게 성장하였다. 미량성분에 대한 실험 조건에서 KCTC 1730보다 2 배 정도 높은 성장능을 나타냄으로써, 동일한 성장 조건일 때 상대적인 protease 생성능이 기존의 균주보다 우수한 것으로 나타났다(Table 3). 특

히, 단백질을 주 성분으로 하여 제조된 합성폐수를 기본 배지로 한 경우에서도 *Bacillus* sp. KCTC 1730보다 2 배 정도 높은 균체 성장을 보여 단백질 성분이 다량 함유 하고 있는 육류 가공 폐수와 유사공정에서 방출되는 폐수에 대한 생물학적 처리에 이용할 경우 높은 유기물 제거효율을 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

합성폐수 유기물 제거능 실험

A. hydrophila PB16를 실제폐수의 생물학적 처리에 이용하기 전에 유기물제거능을 조사하기 위해 합성폐수를 제조하였는데 COD $1,000 \text{ mg/l}$ 이하의 저농도 폐수보다는 $2\text{--}3,000 \text{ ppm}$ 의 이상의 고농도 폐수에 대한 제거효율을 측정하였다. 주 성분이 단백질인 합성폐수를 제조하여 균주를 5% (v/v) 접종한 후 24 시간 동안 25°C , 100 rpm 으로 반응시켰다. 그 결과 초기 합성폐수의 S-CODcr 제거율이 분리균주의 경우 1 일 반응 시 약 60%의 제거율을 나타내었고, 3 일 반응 후에는 87%이상의 제거율을 나타내었다(Fig 4). 그러나 protease 우수 생성균인 *Bacillus* sp. KCTC1730의 경우 1 일과 3 일 반응시 각각 39%와 68%의 제거율을 나타내었다. 이 결과를 통해서 분리균주는 기존균주보다 protease 생성능이 우수할 뿐 아니라 실제폐수에서도 우수한 제거능을 나타낼것으로 사료된다. 또한 *Bacillus* sp. KCTC 1730의 경우 균주 성장률이나 protease activity 값에서 *A. hydrophila* PB16 이 KCTC 1730보다 우수한 결과와 일치하는 결과이다. 그러나 실제폐수에서의 저해물질이나 다양한 성분에서의 생존능 및 환경요인(온도, 이온농도, 무기질 농도등)에 대한 적응성 실험을 통해 현장적용성 여부를 조사해야 할 것이다. 또한, 실제폐

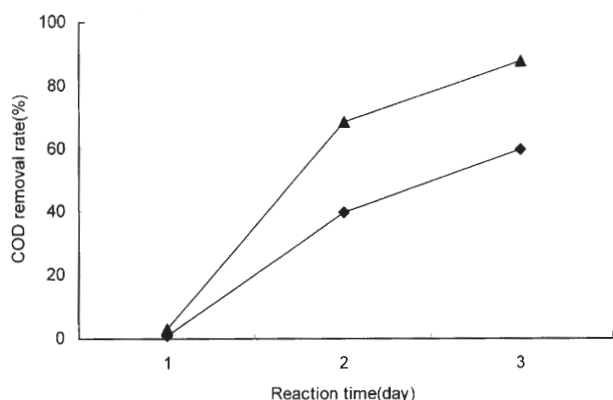


Fig 4. A comparison of CODcr removal rate (%) of synthetic wastewater depend on strains. The initial CODcr was 2,472 ppm. Symbols ; ◆ - *Bacillus* sp. KCTC 1730 ; ▲ - *Aeromonas hydrophila* PB16.

수의 생물학적 처리에서는 *Aeromonas hydrophila* PB16 이 사용된다면 *Bacillus* sp. KCTC 1730 등과 같은 다른 종의 protease 생성균 등과 혼합하며, 생물학적 처리시 미생물성장요소, 특히 질소와 인의 부족으로 인한 처리저하, 유입폐수의 pH, 독성물질과 난분해성물질의 혼입에 의한 성장저해, BOD 부하 변동에 의한 충격부하, 슬러지 팽화에 의한 침전불량등에 의한 처리효율이 낮아질 수 있으므로, 다양한 성장 저해물질들의 영향을 상호보완해 줄 수 있도록 다양한 미생물들을 주입하는 것이 생물학적 폐수처리에 중요하리라 사료된다. 향후 pilot 실험을 통해 고농도의 관련폐수처리에 대한 실증실험이 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 환경부 차세대핵심환경기술개발사업에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. 김태호, 박성희, 이동선, 김종국, 홍순덕. 1990. 호알칼리성 *Bacillus* 속 균주가 생산하는 alkaline protease의 특성. 산업미생물학회지 18, 159-164.
2. 배무, 박필련. 1989. 알칼리성 *Bacillus* sp. No. 8-16의 내열, 알칼리성 단백질 분해효소의 정제와 특성. 산업미생물학회지 17, 545-551.
3. Altschul, S.F., T.L. Madden., A.A. Schafer., J. Zhang., Z. Zhang., W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
4. Altwegg, M. and H.K. Geiss. 1989. *Aeromonas* a human pathogen, *Crit. Rev. Microbiol.* 16, 253-286.
5. Chakraborty, t., B. Huhle, H. Hof, H. Bergbauer, and W. Goebel. 1987. Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* demonstrates the role of aerolysin in *A. hydrophila*-associated systemic infections. *Infect. Immun.* 55, 2274-2280.
6. Chang I.S., D.H. Kim, B.H. Kim, P.K. Shin, H.C. Sung, and R.W.

- Lovitt, 1998. CO fermentatin of *Eubacterium limosum* KIST612. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8, 134-140.
7. Collins, C.H., P.M. Lyne and J.M. Grange. 1995. Collins and Lyne's Microbiological Methods, 7th ed. Oxford, U.K.: Butterworth-Heinemann Ltd.
8. David R.B and W.C. Richard, 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer-Verlag, New York.
9. Janda, J.M. and P.S. Duffey. 1988. Mesophile aeromonads in human disease: current taxonomy, laboratory identification, and infectious disease spectrum. *Rev. Infect. Dis.* 10, 980-997.
10. Kageyama, K. 1955. Studies on *Aspergillus oryzae* strain for sake brewing. *J. Ferment. Technol.* 33, 53-57.
11. Kim, H.R and P.S. O. 1991. Isolation of neutral protease hyperproducing *Bacillus* sp. KN103N and some properties of the enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. biotechnol.* 19, 116-121.
12. Leighton, T.J., R.H. Doi, R.A.J. Warren, and R.A. Kelln. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 76, 103-122.
13. Leung, K.Y. and R.M.W. Stevenson. 1988. Tn5-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infect. Immun.* 56, 2639-2644.
14. Manachini, P.L., M.G. Fortima, and C. Parini. 1988. The mostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 409-413.
15. Monfort, P. and B. Baleux. 1990. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1999-2006.
16. Nieto, T.P., Y. Santos, L.A. Rodriguez, and A.E. Ellis. 1991. An extracellular acetylcholinesterase produced by *Aeromonas hydrophila* is a major lethal toxin for fish. *Microb. Pathog.* 11, 101-110.
17. Nunokawa, Y., Y. Namba, and S. Watanabe. 1961. A study of the rice koji protease. *J. Soc. Brew.* 53, 930-933.
18. Ok, M., M. Kim, W. Seo, J. Cha, and Y. Cho. 2000. Characterization of extracellular protease of *Bacillus* sp. WRD-1 isolated from soil. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 329-333.
19. Ottesen, M. and A. Spector. 1960. A comparison of two proteinases from *Bacillus subtilis*. *C.R. Trav. Lab. Calsberg.* 32, 63-74.
20. Panjagua, C., O. Rivero, J. Anguita, and G. Naharro. 1990. Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. *J. Clin. Microbiol.* 28, 350-355.
21. Park, H.S. B.H. Kim, H.S. Kim, H.J. Kim, G.T. Kim M.A. Kim, I.S. Chang, Y.K. Park, and H.I. Chang. 2001. A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a microbial fuel cell. *Anaerobe.* 7, 297-306.
22. Park, H.S., M.H. Kim, S.Y. Yang, M.Y. Cho, B.J. Ko and Y.K. Park. 2002. Isolation and characterization of α -amylase producing *Bacillus* sp. AIV 1940 and properties of starch synthetic wastewater degradation. *Kor. J. Microbiol.* 38, 1-6.
23. Rivero, O., J. Anguita, D. Mateos, C. Panjagua, and G. Naharro. 1991. Cloning and characterization of an extracellular temperature-labile serin protease gene from *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 81, 1-8.
24. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
25. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory,

- Cold Spring Harbor.
26. Swisher, R.D. 1970. Surfactant Biodegradation, New York. Marcel Dekker, Inc.
27. Ward, O.P. 1985. Proteolytic Enzymes, in Comprehensive Bio-

technology 1st ed. M.Y. Murray, Pergamon press. 789-792.

(Received November 1, 2002/Accepted November 29, 2002)

ABSTRACT: Isolation and Characterization of *Aeromonas hydrophila* PB16 and Properties of Synthetic Wastewater Degradation

Hyung-Soo Park*, Sun-Young Yang, Moo-Hoon Kim, Jong-Kwang Lee, Yong-Ho Yu, and Doo-Hyun Park¹ (Samsung Engineering R&D Center, Yongin 449-844, Korea, ¹Department of Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea)

Protease producing bacterium, PB16 was isolated from food processing wastewater sludge and paddy field soil samples and selected by the clear zone and enzyme activity test. The isolate was gram negative, rod type and its protease productivity was 6.49 U/ml. As a result of API 20NE kit test and 16S rDNA sequencing, the isolated PB16 was identified as *Aeromonas hydrophila* (99%). The growth rate (h^{-1}) was 0.21 in synthetic waste water only and 0.26 in synthetic waste water containing vitamin and mineral using a bioscreen C. Synthetic wastewater removal rate was 59 and 87%, respectively after 1 and 3 day reaction (initial CODcr was 2,472 mg/l).