

동해 심층수로부터 *Pseudoalteromonas* sp. HJ 47의 분리 및 체외단백질분해효소 특성

차인태 · 임형준 · 노동현*

충북대학교 자연과학대학 생명과학부 및 기초과학연구소

Received Decemver 4, 2006 / Accepted December 29, 2006

Isolation of *Pseudoalteromonas* sp. HJ 47 from Deep Sea Water of East Sea and Characterization of its Extracellular Protease. In-Tae Cha, Hayung-Joon Lim and Dong-Hyun Roh*. *Division of Life Sciences, College of Natural Sciences and Institute for Basic Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Chungbuk, Korea* - Proteases are enzymes that break peptide bonds between amino acids of other proteins and occupy a crucial position with respect to their applications in both physiological and commercial fields. In order to screen new source of protease, bacteria producing extracellular proteases at low temperature were isolated from deep sea water of East Sea, Korea. A bacterium showing the best growth rate and production of an extracellular protease at low temperature was designated HJ 47. The DNA sequence analysis of the 16S rRNA gene, phenotypic tests and morphology led to the placement of this organism in the genus *Pseudoalteromonas*. Although maximal growth was observed at 37°C, enzyme production per culture time was maximum at 20°C. At this temperature, extracellular protease production was detected from the end of the exponential phase to stationary phase, and maximal at 15 hours after initial production. The optimum temperature and pH of the protease were found to be 35°C and 8.

Key words - extracellular protease, *Pseudoalteromonas* sp. psychrotolerant strain

서 론

단백질분해효소는 전 세계적으로 공업효소 판매량의 60%를 차지하고 있으며 조미료 제조, 식육의 연화, 맥주 및 청주의 혼탁방지, 치즈숙성, 제빵, 대두산물의 생산, 단백질 가수분해산물의 쓴맛 제거와 단백질분해의 역반응을 이용한 효소적 aspartam의 생산 같은 식품산업 및 소화제, 소염진통제 등의 제약산업과 세제, 피혁, 환경에 관련된 각종 산업분야 뿐만 아니라 단백질 구조와 기능예측 등 기초연구분야에서도 그 요구도가 증가하고 있는 실정이다[7,26].

단백질분해효소는 아미노산으로 구성된 단백질의 peptide 결합을 가수분해하는 효소로 Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology에 따르면 group 3 (가수분해효소)의 subgroup 4에 분류되어 있지만[14], 효소의 작용과 구조의 다양성 때문에 효소명명법이 일반적체계법을 잘 따르지 않고 있다. 현재 일반적인 단백질분해효소의 분류는 다음과 같은 세 가지의 주요기준으로 분류된다. 첫째, 촉매 되는 반응형, 둘째, 촉매부의 화학적 성질, 셋째, 단백질 구조에 근거를 둔 진화학적 연관으로 분류되어 진다[2]. 단백질분해효소의 작용부위에 따라 기질의 말단 부에 인접한 peptide 결합을 절단하는 exopeptidase와 내부를 절단하는 endopeptidase로 크게 분류된

다. 그리고 각각의 효소는 활성부위에 존재하는 주요 기능기에 따라 serine proteases를 포함하여 aspartic proteases, cysteine proteases, metalloproteases로 다시 분류 된다[13]. 아미노산 서열에 의한 단백질분해효소는 다른 군(family)으로 분류되어 지고[1], 공통조상으로부터 분기된 효소를 포함하기 위하여 클랜(clans)으로 세분화 된다[27]. 또 다른 구분방식으로서 효소의 최적 pH에 따라 산성, 중성, 알칼리성 단백질분해효소로 나누기도 한다.

현재 산업적으로 사용되는 대부분의 단백질분해효소는 생물 공학적 응용에 필요한 모든 특성을 만족시켜 주는 미생물 유래의 효소이다[12]. 비록 다양한 종류의 단백질분해효소가 균류(fungi)에서 생성되나 대부분의 상업적 단백질 분해효소는 *Bacillus* 속의 세균으로부터 생산되는 중성 또는 알칼리성 효소들이다. 세계산업에 적합한 알칼리성 효소들은 최적온도가 60°C인 반면, 미생물 유래의 중성효소들은 낮은 열안정성과 반응속도가 빠르지 않아 동물성 단백질분해효소보다 식품단백질의 가수분해에 있어서 쓴맛을 적게 내고, 단백질의 가수분해정도를 조절할 수 있어 식품공업에서 중요한 효소의 하나로 인식되어 진다[26].

해양심층수는 태양광이 도달하지 않는 수심 200 m 이상의 깊은 해수를 말하며 전체 해수의 95%를 차지하고 있다. 최근의 연구결과에 의하면 심층수 중에 존재하는 미생물들은 소수의 종이 우점을 하고 있지만 다수의 많은 종들이 존재하므로[30] 새로운 미생물을 발견할 수 있는 원천이 될 수 있다. 심층수는 유기물이 거의 없으며 연중 안정한 저온을 유지하고 있다[21]. 저온에서 자라는 미생물들은 빙점에 가

*Corresponding author

Tel : +82-43-261-3368, Fax : +82-43-264-9600

E-mail : dhroh@chungbuk.ac.kr

같은 온도에서 생육할 수 있지만 20°C 이상의 온도에서 최적의 성장을 보이는 저온내성균(psychrotolerant strain)과 최적 온도가 15°C 이하이며 20°C 이상에서는 생육하지 못하는 저온균(psychrophile)으로 구분 된다[4]. 저온성 세균은 일반적으로 고온성 세균에 비해 성장이 느리고 다루는데 어려움이 있기 때문에 연구가 미흡한 실정이다[22]. 이에 본 연구는 저온특성을 유지하는 동해 심층수로부터 단백질분해효소를 분비하는 저온내성 또는 저온 세균을 분리하고, 분리된 균주의 동정과 단백질분해효소의 생산 및 그 조효소의 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

배지 및 시약

체의단백질분해효소를 생성하는 균을 분리하는데 사용한 액체배지는 0.5 X marine broth (Difco, USA) 에 0.01% skim milk (Difco, USA)를 첨가하여 만든 MBS배지를 사용 하였으며, 고체평판배지의 경우는 1%의 skim milk와 1.5% Bacto agar (Difco, USA)를 첨가하여 만든 MSBA를 사용하였다. 체외단백질 분해효소의 활성측정을 위한 기질은 azocasein (Sigma, USA)을 사용하였다.

체의단백질분해효소를 생산하는 균 분리 및 생육 특성조사

본 실험에 사용된 동해의 심층수는 2005 년 7 월에서 2006 년 3 월 까지 강원도 고성군에 소재한 한국 해양심층연구센터로부터 수심 200 m에서 500 m 사이의 동해 심층수를 제공 받아 사용하였다. 무균적으로 채취된 심층수 0.1 ml을 MSBA 에 도말 한 후 17°C에서 5 일 이상 배양하여 콜로니 주변에 투명환을 형성하는 독립 콜로니를 얻었다. 이 콜로니를 순수 분리하기 위하여 고체평판배지에서 단일균주로 판명될 때까지 3 회 이상 희석법을 사용하였다.

선별된 균주의 온도별 생육곡선은 25°C에서 48 시간 동안 종배양한 균을 200 ml의 MBS 배지에 1%가 되도록 접종하였다. 균체 성장은 10°C에서는 3 시간 간격, 20°C에서는 2 시간 간격, 30°C와 37°C에서는 1 시간 간격으로 각각의 온도 조건에서 배양된 액을 spectrophotometer (Biochrom, England)를 이용하여 흡광도 600 nm 에서 측정하였다. 세대시간은 대수기인 흡광도 600 nm 값이 0.1 이상에서 1.0 이하를 나타내는 구간의 값을 최소 5 개 이상 선택하여 보정한 일차함수의 기울기를 구한 다음, 0.301/기울기로 표시하였다[18].

체의단백질분해효소 활성측정

체의단백질분해효소 활성은 25°C에서 30 시간 동안 종배양한 균을 200 ml의 MBS에 최종농도가 1%가 되도록 접종하여 10°C, 20°C, 30°C, 그리고 37°C 에서 배양하였다. 효소활성 측정은 배양 상등액을 사용하여 Windle과 Kelleher의 방법

[32]에 따라 다음과 같이 실행하였다. 배양 개시부터 6 시간 간격으로 배양액을 취하여 균의 성장을 흡광도 600 nm 에서 측정하고 균체 배양액을 4°C, 15,000 × g에서 5 분간 원심 분리하여 균을 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액 100 μl에 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 녹인 동량의 0.5% (w/v) azocasein을 가하여 vortex mixer 혼합하고 30°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위해 10% (w/v) trichloroacetic acid 400 μl을 효소 반응액에 가하여 최종 농도는 6.7%를 맞추었다. 2 분간 정치한 다음 4°C, 19,000 × g 에서 5 분간 원심 분리하여 상등액에 525 mM NaOH 700 μl을 가하여 혼합한 후 흡광도 440 nm 에서 흡광을 측정하였다. 효소 활성의 단위는 30°C에서 1 시간 지난 후 흡광도 440 nm 의 0.01 증가를 1 unit/ml로 정하였다[29]. 효소의 활성은 3 회 측정의 평균값과 표준편차로 표시하였다.

효소의 최적온도와 pH를 알아보기 위해 20°C에서 30 시간 배양한 균의 조효소액을 사용하여 0°C부터 5°C간격으로 60°C까지 반응온도를 달리하여 측정하였다. 이때 대조군으로는 심층수에서 분리한 균 중에서 체외단백질분해효소 활성을 가지지 않는 균주 HJ 56의 조효소액과 함께 측정하였다. 효소의 활성에 대한 pH의 영향을 보기위하여 pH 5에서 6까지는 0.1 M citrate 완충용액을 사용하였고, pH 6에서 8까지는 0.1 M phosphate 완충용액, pH 8에서 9까지는 0.2 M Tris-HCl 완충용액을 사용하였으며 30°C에서 반응시켰다.

균주의 형태 및 생화학적 특성

선별된 균주를 MBS 배지에 배양하여 위상차 현미경 (Nikon 80i, Japan)을 이용하여 형태를 관찰하였다. Gram 염색은 Gram stain kit (BD, USA)를 사용하여 제조자의 지시에 따라 실험하였으며 이외에도 Buck가 기술한 비염색 방법을 사용하였다[3]. Oxidase 실험은 bioMerieux 사의 Oxidase reagent (bioMerieux, France)를 사용하여 제조자의 지시대로 사용하여 판단하였으며, catalase 활성은 3% H₂O₂를 사용하였다. 다른 생체고분자 chitin, starch, xylan의 분해 특성은 skim milk 대신에 이들 기질을 고체평판배지에 1%로 넣어 조사하였다.

16S rRNA gene의 PCR 증폭 및 염기서열 결정

분리균의 16S rRNA gene을 증폭하기 위하여 콜로니 PCR 방법을 사용하였다. 30 μl의 초순수에 고체배지에 자란 콜로니를 소량 취해 100°C에서 10 분간 가열하였다. 그 후 얼음에 5 분간 정치한 다음 19,000 × g에서 1 분간 원심분리하고 그 상등액 1 μl를 PCR 주형 DNA로 사용하였다.

16S rRNA gene을 증폭하기 위하여 primer는 27F (*E. coli*; 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (*E. coli*; 5'-TGA GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하였다. PCR 반응은 1 X 반응용액 (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 100

mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween 20, 0.5% Nonidet P-40, 50% Glycerol)에 2.5 mM dNTP, 각 primer 2 pmol, 상기의 주형 DNA 1 μ l, TaKaRa Ex Taq polymerase (Takara Biomedicals, Japan) 1.25 unit을 첨가하여 최종 50 μ l 로 반응 혼합액을 만들었다. PCR 반응은 MJ Mini™ Thermal cycler (Bio-Rad, USA)을 이용하였고, 반응 조건은 94°C에서 30 초, 50°C에서 30 초, 72°C에서 1 분 30 초로 35 회 반복 후 72°C에서 10 분 동안 final extension을 수행하였다. 증폭된 산물은 PCR purification kit (Real Biotech Corp., Taiwan)을 사용하여 정제한 후 Solgent 사 (Korea)에 의뢰하여 염기 서열을 결정하였다.

16S rRNA gene의 염기서열을 이용한 계통분석

결정된 염기서열의 상동성 검사는 GenBank의 database에 등록된 정보를 대상으로 Blast 프로그램 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)으로 수행하였다. 계통분석은 Clustal X의 multi-alignment program을 이용하여 정렬하였다. Genbank에 등록된 다른 균주들의 16S rRNA gene 염기서열 정보와 MEGA 프로그램을 이용하여 neighbor-joining method[28]에 의해 염기서열간의 유전적 거리와 phylogenetic tree를 얻었다. Branch의 신뢰도 (bootstrap 값)

는 500 회의 재구성된 자료로부터 새로운 tree를 작성하여 계산하였다[9].

결과 및 고찰

균주의 분리 및 배양에 따른 체외단백질분해효소 생산특성

저온의 특성을 가진 동해의 심층수로부터 저온내성을 가지며 체외단백질 분해효소를 분비하는 미생물을 분리하기 위하여 skim milk를 첨가한 평판한천배지에 심층수를 도말하여 배양하였다. 배양에 따라 투명환을 형성하는 콜로니 9 종을 선별하고, 이중 저온에서 잘 자라고 체외단백분해효소 활성이 강한 순수 분리된 균주를 선택하여 HJ 47이라고 명명하였다.

분리균주 HJ 47을 10°C, 20°C, 30°C, 그리고 37°C에서 각각 배양하면서 대수기 동안에 세대시간을 측정한 결과 10°C에서 약 380 분이었으며 20°C에서는 140 분 정도로 단축되었다. 30°C와 37°C에서는 100 여분으로 20°C보다 조금 단축되었다(Fig. 1). HJ 47의 이러한 생육특성은 기존에 보고된 *Hafnia alvei* AS 20[25]와 *Buttiauxella* sp. HS 39[26]와 유사한 생육특성을 보였다. 대장균과 같은 중온균의 경우 10°C에서 거의 생육하지 못하는데 반해 분리균 HJ 47은 비교적 잘 자

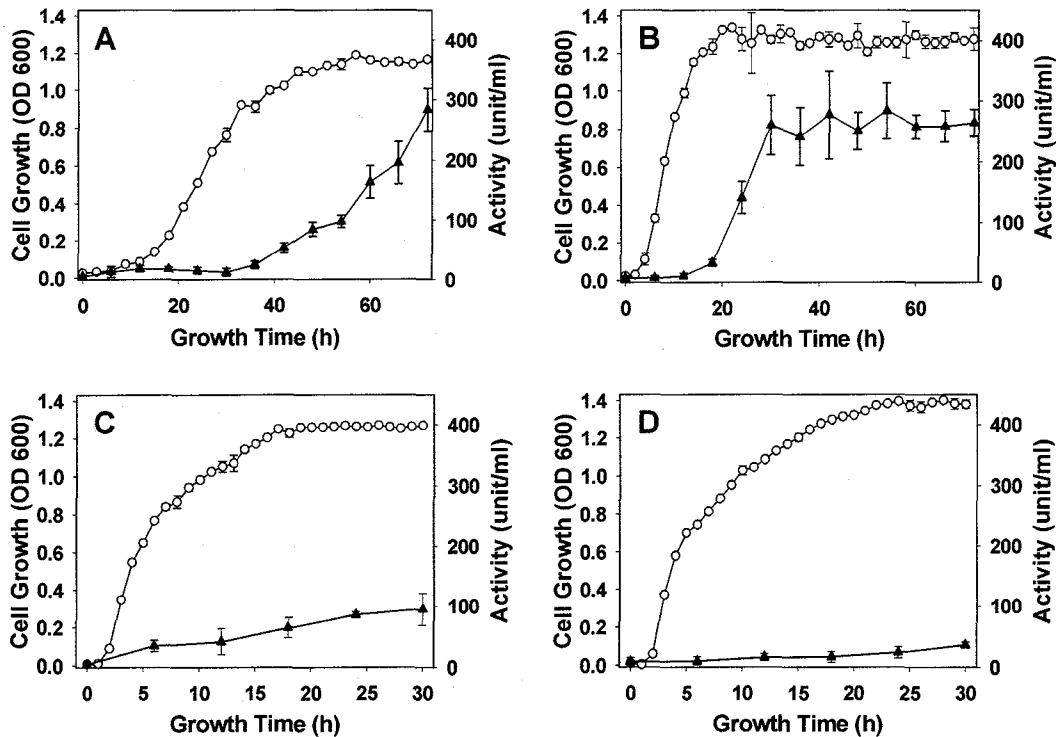


Fig. 1. Growth curve and extracellular protease production of the isolated bacterium HJ 47. The cells were cultured at 10°C (A), 20°C (B), 30°C (C), and 37°C (D) by shaking at 150 rpm in the medium of 0.5 X marine broth supplemented with 0.01% skim milk and enzyme activity was determined at 30°C for 1 hr. Open circle(○-○) and close triangle(▲-▲) represent cell growth and protease activity of HJ 47, respectively. Standard deviations from the mean of three independent assays are indicated by error bars.

랐기 때문에 저온 내성을 가지는 것으로 생각되어 졌다.

각 온도에서 배양에 따른 체외단백질분해효소의 활성을 조사한 결과 생육온도가 높을수록 생육속도는 빨라졌지만, 효소의 최대 활성은 오히려 감소하는 특성을 보여주었다 (Fig. 1). 10℃와 20℃에서는 대수기 후반과 정지기에 도달한 이후 체외단백질분해효소의 생산이 급격하게 증가되었다. 10℃에서 72 시간 배양한 경우와 20℃에서 30 시간 배양한 경우 약 300 unit/ml의 최대효소활성을 보여주었다. 이에 반하여 30℃와 37℃에서는 생육단계와 관계가 없는 특성을 보여 주었다. 즉, 30℃에서는 효소활성이 30 시간까지 조금씩 증가하여 98.3 unit/ml (± 18.6)을 보였고 그 이후에는 평균 105.0 unit/ml (± 12.5)을 나타내었다. 37℃에서는 30 시간에서 36.3 unit/ml (± 4.2)로 거의 생산되지 않았고 30 시간 이후에도 평균 69.0 unit/ml (± 8.1)을 유지하였다.

*Yersinia ruckeri*에서도 저온에서는 체외단백분해 효소가 분비되나 생육최적온도에서는 효소의 활성이 없는 특성을 보여주었으며[29] *Aeromonas hydrophila*의 경우에도 단백질분해효소의 생산에 온도가 영향을 준다고 보고되어 있다[19, 23]. 장내에 존재하는 다른 *Yersinia* sp.은 이와 반대로 37℃에서 단백질을 발현하고 26℃에서는 발현하지 않는다고 보고되어 있다[5,6]. 이와 같이 특정온도에서 단백질 분해효소

가 분비되는 것은 이들 균이 자라는 환경조건에서 영양분 섭취를 위한 적응과정으로 생각된다.

분리균주의 형태 및 생리생화학적 특성

분리된 HJ 47은 그람 염색 및 비염색 방법 모두에서 그람 음성균의 특성을 나타냈으며(테이더 미제시) 끈은 간균의 형태를 가졌다. MBSA 배지 상의 콜로니는 베이지색으로 특이한 색소를 함유하지 않았고, 20℃에서 5 일간 배양한 경우 직경이 4~5 mm에 다다랐다. 몇 가지 생화학적 특성은 표 1과 같았으며 skim milk의 생체고분자인 chitin도 분해하는 특성을 보여주었다 (Table 1).

Table 1. Phenotypic properties of an isolated strain HJ 47

Characteristics	Strain HJ 47
Gram staining	-
Catalase	-
Oxidase	+
Hydrolysis of xylan	-
chitin	+
starch	-

+, positive reaction; -, negative reaction

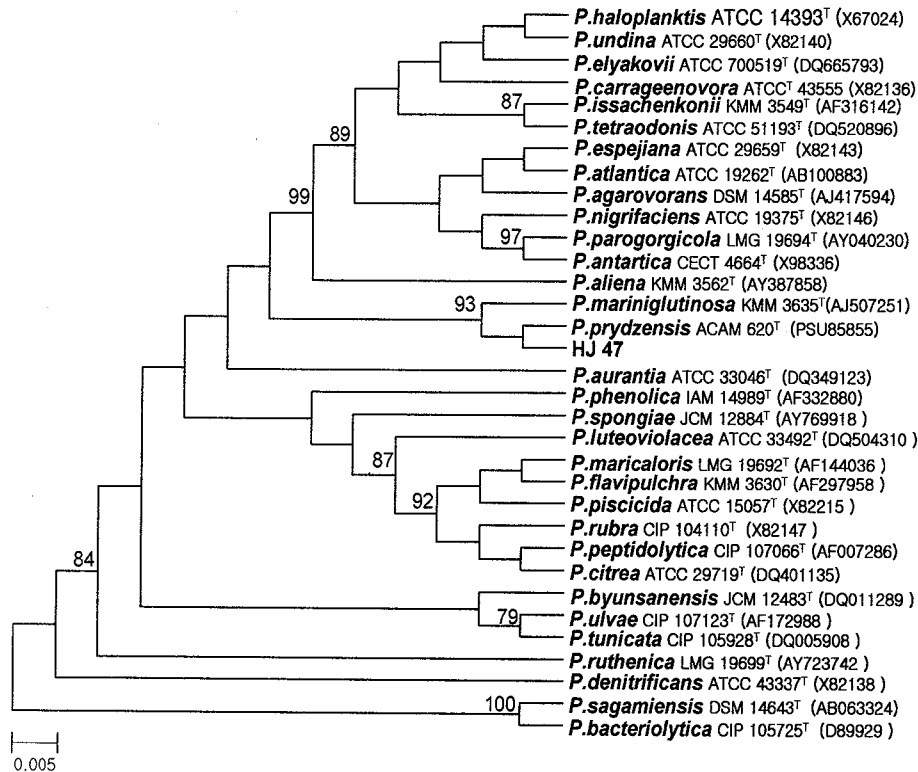


Fig. 2. Phylogenetic dendrogram of 16S rRNA gene sequences of the HJ 47 and other genus *Pseudoalteromonas*. The figure shows the position of HJ 47 within phylogenetic tree of *Pseudoalteromonadaceae* family. The tree was rooted from a neighbor-joining method with bootstrap analysis (500 replication) of 16S rRNA gene sequencing from the HJ 47 and related species. Genbank accession number is shown in parentheses.

16S rRNA gene의 염기서열 분석 및 계통적 유연관계

분리된 균주 HJ 47의 동정과 계통적 유연관계를 알아보기 위하여 PCR 로 증폭 생산된 1,507 bp의 16S rRNA gene으로부터 833 bp의 염기서열을 결정하여 염기서열분석을 시도하였다[11,15,31]. 먼저 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Blastn 검색을 통해 유사도를 조사한 결과 분리균인 JH 47은 *Pseudoalteromonas ganghwensis*와 100% 일치하였으나 이 종의 특성에 관한 보고는 찾을 수 없었다. *Pseudoalteromonas* sp.은 해양미생물로 상기의 생리생화학적 결과와 같은 특성을 가지고 있으며, 인간에 대한 병원성에 대한 보고가 없으며 생육을 위해 해수를 필요로 하는 특성을 가지고 있다[10]. 상기의 형태 및 생리생화학적 결과와 16S rRNA gene의 염기서열로 미루어 HJ 47은 *Pseudoalteromonas* sp.의 한 종으로 생각되었다. 결정된 염기서열과 *Pseudoalteromonas* sp.의 type strain들과의 유연관계를 조사한 결과 *Pseudoalteromonas* sp. JH 47은 *Pseudoalteromonas prydzensis*와 가장 가까웠고, *P. mariniglutinosa*와 같이 계통학적인 클렌을 형성하였다 (Fig. 2).

효소활성에 대한 온도와 pH의 영향

분리된 *Pseudoalteromonas* sp. HJ 47은 Fig. 1에서와 같이 20℃에서 배양 했을 때 최적의 활성을 보여 주어 20℃에서 30 시간 배양한 조효소액을 사용하여 효소의 최적온도와 pH를 조사하였다. 반응온도에 대한 효소의 활성은 10℃부터 온도와 비례적으로 증가하여 35℃에서 최적의 활성인 약 400 unit/ml의 활성을 나타내었다(Fig. 3). 최적온도 이후 55℃까지 약 60%의 활성을 유지하다가 60℃에서는 단백질의 변성으로 급격히 불활성화 되는 것을 알 수 있었다.

Pseudoalteromonas sp. HJ 47 유래 조효소액의 효소활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 세 가지 완충용액에 가질을 녹여 pH를 5에서 9까지 변화시켜 조효소 용액과 반응시켰다 (Fig. 4). pH 6에서 9까지 비교적 좁은 pH 범위에서 높은 효소활성을 나타내었으며 이 효소의 최적 pH는 8로 나타나 중성 단백질분해효소의 특성을 보였다. 이와 같은 특성은 *Yersinia ruckeri*에서 보고된 체외단백질분해효소의 최적 온도 37℃, 최적 pH 8과 유사한 특성을 보여주었고[29] *Pseudoalteromonas* sp.에서 보고된 최적온도 30℃, 최적 pH 8.8과는 다소 상이하였다[16].

연구보고에 의하면 해양세균이 진행의 단세포 조류(algae)와 상호작용하며 경우에 따라 조류를 죽이는 살조제(algicide)의 특성을 나타낸다고 한다[8,20]. 본 연구에서 분리된 균주와 같은 *Pseudoalteromonas* sp.의 경우에도 살조제의 특성을 보이는 연구보고가 있으며[16,17] 그 원인이 체외단백질분해효소와 연관이 있다는 보고가 있다[16]. 분리된 *Pseudoalteromonas* sp. HJ 47도 현재 해양 오염을 심각하게 야기하고 있는 녹조 혹은 적조현상(harmful algal blooms)의 생물학적 방제 수단

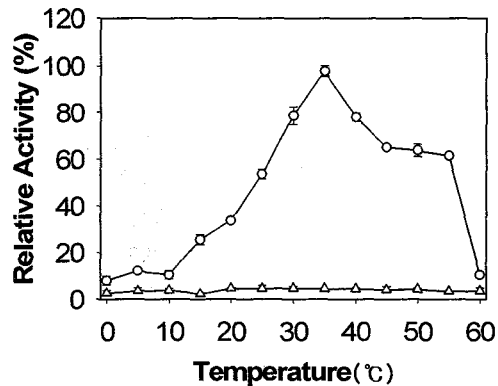


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of the extracellular protease from *Pseudoalteromonas* sp. HJ 47. The cells were cultured at 20℃ by shaking at 150 rpm in the medium of 0.5 X marine broth supplemented with 0.01% skim milk and enzyme activity was determined at respective temperature for 1 hr. Open circle(○-○) and open triangle(△-△) represent and protease activity of HJ 47 and protease-free strain HJ 56, respectively. Standard deviations from the mean of three independent assays are indicated by error bars.

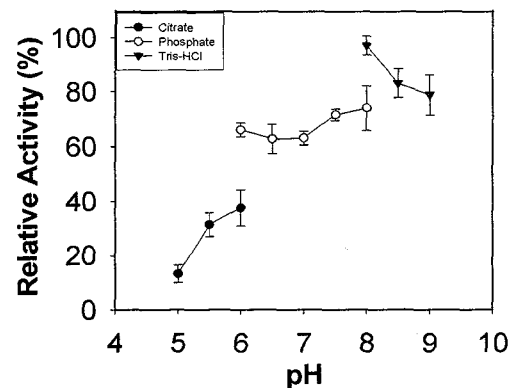


Fig. 4. Effect of pH on the extracellular protease activity of *Pseudoalteromonas* sp. HJ 47. All conditions are the same as Fig. 3. except that enzyme activity was determined at 30℃ with the indicated pH values. Standard deviations from the mean of three independent assays are indicated by error bars.

으로의 사용 가능성에 대해 앞으로 연구가 필요하다고 생각 된다.

요 약

단백질분해효소는 다른 단백질들의 아미노산 간에 존재하는 peptide 결합을 절단하며 생리학적, 상업적 측면에서 중요한 위치를 차지하는 효소의 한 부류이다. 이러한 단백질분해효소의 새로운 공급원을 찾기 위하여 비교적 저온에서 체

의단백질분해효소를 생산하는 세균을 동해심층수로부터 분리하였다. 분리된 균 중 저온에서의 생육정도와 높은 활성을 가지는 균주를 선별하여 HJ 47이라 명명하였다. 형태학적, 생리생화학적 특성과 16S rRNA gene의 염기서열을 조사한 후 *Pseudoalteromonas* sp.에 포함되는 것으로 나타났다. 분리된 *Pseudoalteromonas* sp. HJ 47은 10°C에서도 비교적 잘 자랐으며, 37°C에서 최적의 생육을 보여 주었다. 최적생육온도와는 달리 배양시간당 최대 체외단백질분해효소의 생산은 20°C에서 최대였고 대수기 후반과 정지기에 생산이 시작되어 15시간 경과 후 최대의 생산을 보여주었다. 효소활성의 최적온도는 35°C, 최적 pH는 8로 판명되었다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참고 문헌

- Argos, P. 1987. A sensitive procedure to compare amino acid sequences. *J. Mol. Biol.* **193**, 385-396.
- Barett, A. J. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* **244**, 1-15.
- Buck, J. D. 1982. Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 992-993.
- Cavicchioli, R., K. S. Siddiqui, D. Andrews and K. R. Sowers. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 253-261.
- Cornelis, G. R. 1998. The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.* **180**, 5495-5504.
- Cornelis, G. R., A. Boland, A. P. Boyd, C. Geuijen, M. Iriarte, C. Neyt, M. P. Sory and I. Stainier. 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1315-1352.
- Cowan, D. 1983. Industrial applications: Proteins. pp. 353-374, In Godfrey, T. and S. West (ed.), *Industrial enzymology- The application of enzymes in industry*. The Nature Press, New York.
- Doucette, G. J. 1995. Interactions between bacteria and harmful algae: a review. *Nat. Toxins* **3**, 65-74.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limit on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Gauthier, G., M. Gauthier and R. Christen. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 755-761.
- Giovannoni, S. 1991. The polymerase chain reaction, pp. 177-204. In Stackebrandt, E. and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Godfrey, T. and S. West. 1996. *Industrial enzymology*. 2nd ed. Macmillan Publisher Inc., New York.
- Hartley, B. S. 1960. Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **29**, 45-72.
- International Union of Biochemistry. 1992. *Enzyme nomenclature*. Academic Press, Inc., Orlando, Fla.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. pp. 115-174. In Stackebrandt, E. and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Lee, S. O., J. Kato, N. Takiguchi, A. Kuroda, T. Ikeda, A. Mitsutani and H. Ohtake. 2000. Involvement of an extracellular protease in algicidal activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain A28. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4334-4339.
- Lovejoy, C., J. P. Bowman and G. M. Hallegraeff. 1998. Algicidal effects of a novel marine *Pseudoalteromonas* isolate (class *Proteobacteria*, gamma subdivision) on harmful algal bloom species of the genera *Chattonella*, *Gymnodinium*, and *Heterosigma*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2806-13.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko and J. Parker. 2003. *Brock biology of microorganisms*. pp. 142-145, 10th eds., Prentice Hall. Pearson Education, Inc, New Jersey.
- Mateos, D., J. Anguita, G. Naharro and C. Paniagua. 1993. Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.* **74**, 111-118.
- Mayali, X. and F. Azam. 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**, 139-144.
- Moon, D. S., D. H. Jung, H. J. Kim and P. K. Shin. 2004. Comparative analysis on resources characteristics of deep ocean water and brine groundwater. *J. of Korean Soc. Marine Environ. Eng.* **7**, 42-46.
- Morita, R. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **39**, 144-167.
- O'Reilly, R. and F. Day. 1983. Effects of culture conditions on protease production by *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1132-1135.
- Park, J. W., Y. S. Oh, J. Y. Lim and D. H. Roh. 2006a. Isolation and characterization of cold-adapted strains producing β -galactosidase. *J. Microbiol.* **44**, 396-402.
- Park, J. W., J. S. Yoo and D. H. Roh. 2006b. Identification of novel psychrotolerant bacterial strain and production of β -galactosidase. *The Korean J. of Microbiol.* **42**, 40-46.
- Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 597-635.
- Rawlings, N. D. and A. J. Barrett. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**, 205-218.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.*

- Biol. Evol.* **4**, 406-425.
29. Secades, P. and J. A. Gujjarro. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3969-3975.
30. Sogin, M. L., H. G. Morrison, J. A. Huber, D. M. Welch, S. M. Huse, P. R. Neal, J. M. Arrieta and G. J. Herndl. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12115-12120.
31. Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697-703.
32. Windle, H. J. and D. Kelleher. 1997. Identification and characterization of a metalloprotease activity from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **65**, 3132-3137.