

남극에서 분리한 저온성 세균 유래 단백질 분해 효소

조기웅* · 방지현 · 홍해원 · 박승일 · 이윤호

한국해양연구원 해양천연물 연구실

저온에서 최적 생육을 보이는 저온성 균주를 남극해양에서 분리하여 생화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열로부터 *Shewanella* sp.에 속하는 균주로 동정하고 *Shewanella* sp. L93으로 명명하였다. 본 균주에서 생산되는 저온성 세포의 단백질 분해 효소(extracellular protease)를 ammonium sulfate precipitation, High-Q column chromatography, 일차 gel permeation chromatography, BioScale Q2 ion exchange chromatography 및 gel permeation chromatography를 통하여 purification fold 19.3, yield 0.7 %로 정제하였고 그 특성을 조사하였다.

Key words □ antarctica, extracellular protease, marine bacteria

단백질 분해 효소는 식품, 세제 산업 등 산업적인 용도가 높은 효소로서 현재 주로 생산되는 단백질 분해 효소는 동물 유래인 것이 많고 미생물 유래 단백질 분해 효소의 이용이 점차 증가하고 있다. 산업적인 용도에는 내열성 효소나 저온성 효소의 필요성이 증대되고 있으며 이러한 이유에서 해양 세균 유래, 세포외 분비 단백질 분해 효소가 주목받고 있다(1).

세균 유래의 세포의 단백질 분해 효소는 해당 세포의 영양 공급이 주된 목적이며 단백질 기질을 분해하여 흡수에 용이한 펩타이드나 단위 아미노산으로 전환시킨다(6). 뿐만 아니라 감염 과정에서 매우 중요한 역할을 수행하는데 해양에서는 *Aeromonas hydrophila* (12), *Vibrio anguillarum* (13), *Vibrio vulnificus* (10), *Aeromonas salmonicida* (8), *Flexibacter columnaris* (7) 그리고 *Flexibacter psychrophilus* (2) 등에서와 같이 어병 유래 세균들에서 나타나는 세포의 단백질 분해 효소는 어류의 아가미나 체표면에 부착된 후 표면 단백질을 분해하여 수포 발생 등을 유도하는 중요한 감염기작의 일환인 경우도 있다.

남극해는 연중 온도가 4°C 이하로 안정하고 대형 서식 동물이 풍부하여 단백질이나 고분자 탄화수소 등의 분해활성이 높은 저온성 해양 세균의 존재가 기대되는 곳이다. 본 연구에서는 남극해의 해양환경에 서식하고 있는 해양생물에 공생 혹은 공존하는 미생물과 단독으로 서식하는 미생물들을 대상으로 균주를 순수 분리, 보존하고 이들을 대상으로 산업적으로 활용도가 높은 효소들의 생산 여부를 검색하고 배양량 당의 효소 역가 검사를 통하여 활성도가 높은 효소원을 확보하였다. 한편 이렇게 확보된 효소원을 이용하여 효소생산의 최적 조건을 수립하고 해당 효소를 분리 정제하고 그 응용분야를 개발하고자 한다. 이렇게 분리 확보된 균주들은 현단계에서는 신물질 및 유용물질의 생산자로서 유용하며 동시에 비교적 보존이 용이하므로 장래에 현재 여건에

서 검색할 수 없는 새로운 유용물질의 원천으로서 소중한 자산의 의미를 지니고 있다. 효소를 분리하는 원료는 여러 가지가 있을 수 있으나 미생물의 경우 순수한 형태로 분리된 균주는 일단 배양 조건만 수립되면 원하는 시기에 신속하게 필요한 양의 균체를 유용물질의 원료로서 공급할 수 있으며 생산 작업의 규모도 발효공정 및 균주개량 등을 통하여 생산량을 증대시킬 수도 있다. 또한 미생물 특히 세균의 경우 유전자 검색 및 조작 기술이 비교적 잘 확립되어있으며 그 genome 크기가 작아 고난도의 기술 없이도 유전자 조작의 가능성도 열려있다는 점도 장점으로 꼽을 수 있다.

재료 및 방법

균주분리

남극 저서 퇴적물은 SCUBA를 이용하여 최대 깊이 32 m의 수심에서 채집되었으며 채집된 해역은 한국해양연구원 남극세종기지 앞 Marian cove에서 얻어졌으며 채집당시 수온은 0.5~0.8°C였다. 해면 및 해조류 등 해양생물 및 퇴적물에서 균주 분리는 채집한 현장에서 시료를 약 1 g 씩 취한 후 2.2 ml polypropylene tube에 넣고 여기에 미리 준비된 멸균된 해수를 1 ml씩 가하여 일회용 homogenizer로 잘게 분쇄한 뒤 상층액을 평판배지에 순차적으로 도말하는 방법으로 해양생물 공생 미생물 등 생물체내에 함유된 균주를 분리하였다. 균주를 분리하기 위한 배지로서는 주로 ZoBell 배지 (0.5% peptone, 0.1% yeast extract, agar 15 g/l, 속성해수 50%, pH 7.0) 및 sea water complete 배지 (0.5% Bacto tryptone, 0.3% yeast extract, 0.3%(v/v) glycerol, agar 15 g/l, 속성해수 70%, pH 7.0)를 사용하였다. 분리된 균주는 야외 Igloo chamber (임야 실험용 간이 실험실, 평균 온도 2-5°C)에서 10 일간 배양하였다. 형성된 균체 집락들을 육안으로 그 집락 형태를 관찰하여 특성에 따라 새로운 고품 배지에 접종하여 동일 형태의 순수 집락을 형성하도록 7 일간 10°C에서 배

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-400-6171, Fax: 031-408-4493
E-mail: kwcho@kordi.re.kr

양한 후 순수 분리하였다. 분리된 균주는 glycerol을 20% 함유한 멸균 해수에 현탁하여 영하 70°C에 보관하였다.

배양 기간 후 각 plate를 검사하여 균체 군집이 생성된 plate에서 각 colony를 멸균된 loop로 따서 새로운 milk casein agar plate 2 장에 옮기고 한 장은 실외에서 또다른 한장은 실내에서 배양하여 매일 관찰하면서 colony의 형성을 모니터링하여 저온(실외)에서의 성장 및 단백질 분해 활성이 뛰어난 균주를 선발하였다.

균주의 동정

분리된 균주의 생화학적 특징의 조사는 API-20NE kit를 사용하였다. 본 kit는 원래 장내 세균의 동정을 위한 것으로서 해양 세균의 경우 동정 결과는 그 신빙도는 떨어지지만 kit화 되어있어 단시간에 각 균주의 특징을 분석하는데는 유용하다.

16S rRNA의 variable domain sequence을 분석하기 위하여 L93로부터 chromosomal DNA 분리하여 이를 template로 사용하여 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) 및 342R PCR (5'-CTGCTGCSYCCCGTAG) primer set를 이용하여 PCR을 수행하였다. Bioneer (Changwon, Korea)의 Premix PCR kit를 사용하였고 기기는 Perkin-Elmer PCR-480(Foster City, USA)을 사용하여 30 cycle 반응결과 agarose gel electrophoresis에서 340 bp에 해당되는 band를 얻어 이를 PCR sequencing 방법으로 염기서열을 결정하였다. Automatic DNA sequencer (ABI prism-377)와 big-dye termination kit (Perkin-Elmer)를 사용하여 서열을 결정하고 밝혀진 염기 서열의 분석은 GenBank의 16S rRNA sequence database와 비교하여 균주의 동정을 수행하였다.

단백질 분해 효소의 분리 정제

단백질 분해 효소 활성의 분석

대조 실험용으로 사용된 microsomal leucine aminopeptidase (AP-N)와 L-leu-p-nitroanilide · HCl은 Sigma (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다. 배양 분리된 균주를 소량 (5 ml) 액체 배양하여 균체를 제거한 배양액을 96 well micro-plate의 각 well에 L-leu-p-nitroanilide · HCl stock solution (15 mg/ml in DMSO) 0.1 ml를 사용 직전에 10 ml의 0.1 M Tris buffer (pH 7.0)로 희석하여 이용액 0.16 ml를 가한 후 세균 배양액 100 μ l를 첨가하여 microplate reader (model 3550, BioRad, Hercules, USA)으로 초기 흡광도를 405 nm에서 측정 후 30 분간 반응시키고 다시 405 nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 형성된 p-nitroaniline ($\epsilon_{405\text{nm}}=8.8\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH 5.5-10.5, Sigma-Aldrich)을 정량하였다(Fig. 1).

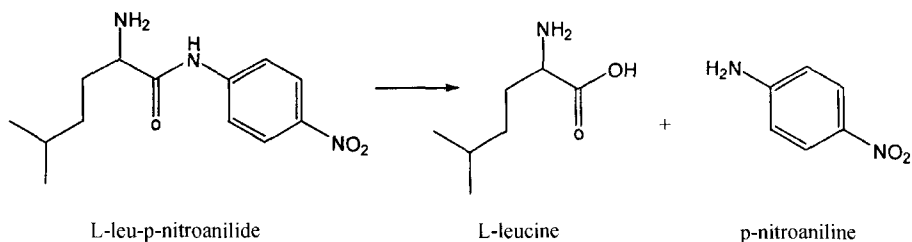


Fig. 1. Protease assay.

배양액에서 extracellular protein의 분리정제

Late exponential phase에 도달한 균주를 0.2 μ m pore size of tangential flow filter (3,500 cm² surface area, Amicon, Beverly, USA)를 이용하여 2 l로 농축시키고 high speed centrifuge (Vision Science, Korea)로 15000 \times g에서 20 분간 원심분리하여 균체를 제거하였다. 균체가 제거된 배양액은 우선 50 ml 용량의 소형 stirred cell ultrafiltration unit (Amicon, USA)를 이용하여 여러 종류의 MWCO 값을 갖는 UF membrane을 이용하여 효소 활성이 나타나는 fraction을 결정하여 대략적인 효소의 분자량을 구하고 이를 바탕으로 대량 여과를 수행하였는데 배양액을 ultrafiltration tangential filter (3,500 cm² surface area, MWCO 10,000 dalton)를 사용하여 한외여과법으로 enzyme을 농축하였다. Masterflex peristaltic pump를 사용하였고 압력은 20 psi를 유지하였으며 flow rate는 120 ml/min으로 조절하였다. 작업시 방안 온도는 10°C로 유지하였으며 효소용액의 온도는 ice-water bath에 담아 10°C 이하를 유지하였다. 적정 수준까지 농축시킨 배양액에 ammonium sulfate powder를 포화도 35%, 55%, 80%로 각각 포화시키고 단백질을 salt-out시켜 원심분리로 각 분획을 분리하여 활성을 조사하였다.

활성분획을 desalting column (DG-10, Bio-Rad, Richmond, USA)을 사용하여 SWC 배지에 함유된 염분과 배지 성분을 제거하고 50 mM Tris buffer (pH 8.0, 0.1 M NaCl 포함)으로 buffer를 교환하였다.

Sample 10 ml를 High-Q cartridge (5 ml vol., Bio-Rad) 3 개를 직렬로 연결한 column에 가하여 흡착시키고 이를 다시 15 ml의 20 mM Tris buffer (pH 8.0)로 washing 하여 binding 되지 않은 protein을 제거하고 난 뒤 0~0.4 M의 NaCl을 포함하는 동일한 Tris buffer 1 차 gradient로 흡착된 단백질을 용출하였다(Flow rate, 1 ml/min). 다시 0.4~1.2 M NaCl 2 차 gradient로 강하게 흡착된 단백질을 용출하였다. 사용한 기기는 Bio-Rad의 biologic protein purification system을 사용하였고 각각 1.0 ml 씩의 fraction을 받아 각 fraction의 활성을 검사한 후 활성분획을 모아 다시 한외여과법으로 농축하였다.

High-Q ion exchange column chromatography에서 가장 높은 활성을 보인 분획인 0.4 M NaCl eluting fraction을 Bio-Rad GPC column (Sec-250, 0.75 \times 30 cm)을 사용하여 분리하였다. 동일한 50 mM Tris buffer (50 mM NaCl 포함)를 사용하였으며 flow rate는 1.0 ml/min으로 설정하였다.

Gel filtration column chromatography에서 활성을 보인 분획을 모아 Bio-Scale Q2 column (Bio-Rad, bed volume, 5 ml)을 이용

하여 2차 ion exchange column chromatography를 수행하였다. Column을 2 column volume의 50 mM Tris buffer (20 mM NaCl 포함)로 평형을 이루게한 뒤 1차 GPC column에서 용출된 protease 시료 10 ml를 천천히 (flow rate, 0.5 ml/min) 가하여 column에 흡착시킨 뒤 2 column volume의 초기 buffer (50 mM Tris buffer, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mM NaCl)로

BioScale Q-2 column을 세척하여 (flow rate, 1 ml/min) 흡착되지 않은 단백질을 제거하고 column 부피의 약 8 배에 해당되는 부피의 20~1,000 mM NaCl 농도구배를 사용하여 흡착된 단백질들을 용출하였다.

결과 및 고찰

Table 1. Biochemical and physiological properties of *Shewanella* sp. L93

Characteristics	L93
Gram staining	-
Shape	rod
Color of colony	Light orange
Motility	+
Size	0.4×1.3 μm
Temperature range for growth	4-20°C
Optimum temperature for growth	10-15°C
Catalase	+
Oxidase	+
Oxidation/fermentation test	Oxidation
Voges-Proskaur test	+
Citrate utilization	+
Enzyme activity of	
β-galactosidase	-
arginine dehydrolase	+
lysine decarboxylase	-
ornithine decarboxylase	-
tryptophane deaminase	+
Hydrolysis of	
urea	-
gelatin	+
lipid	-
casein	+
Production of	
indole	-
H ₂ S	+
NO ₂	+
Carbon utilization	
glucose	-
mannitol	-
inositol	-
sorbitol	-
rhamnose	-
sucrose	-
melibiose	-
arabinose	-

우수 균주 선발 및 균주 특성

본 연구 수행 결과 총 분리 세균 수는 549 균주였으며 이들중 저온성 균주는 273 균주가 얻어졌다. 이들중 저온성 protease 생산 우수 균주로는 저온에서의 생장이 우수한 균주 번호 Y2K-AL93 (L93) 균주 외 5 종을 선택하였으며 이들 중 최종적으로 L93 균주를 대상으로 동정 및 protease 분리 정제를 수행하였다. 본 균주는 현미경 하에서(1,000×) 막대 모양의 균주로 5~10°C에서 ZoBell 액체 배양시 18 시간 만에 cell density가 660 nm에서의 흡광도 6 이상으로 증가하는 매우 우수한 저온성 균주이며 Gram 음성 세균으로서 agar 평판 배지에 배양할 경우 집락의 색깔은 옅은 오렌지 색깔이며 배양시간이 지날수록 자외선 하에서 형광을 나타낸다. 그러나 생체 발광 현상은 관찰되지 않았다. 또 편모를 가지고 있어 이동성이 있으며 투과전자현미경으로 관찰된 길이는 약 1.3 μm 수준이었다. 생존 가능온도는 4~20°C 범위이고 가장 잘 자라는 온도는 10~15°C 범위이다. V/P test에서는 양성이고 citrate를 이용할 수 있었으며 catalase, oxidase, arginine dehydrolase, tryptophan deaminase 활성을 가지고 있었으나 β-galactosidase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase의 활성은 검출되지 않았다. 최소배지에서 단일 탄소원의 이용은 glucose 등 실험에 사용된 8 종의 단당류 모두를 이용하지 못해 복합 배지를 필요로 하는 균주로 여겨진다(Table 1). 본 균주에서 total DNA를 분리하여 *E. coli*의 16S rRNA의 27F와 342R primer set를 사용하여 16S rRNA의 변이 부위를 PCR로 증폭한 후 염기 서열을 결정하고 이의 염기서열을 GenBank data base와 비교하여 균주명을 동정한 결과 *Shewanella gelidimarina* 종과 99.2%, *Shewanella hanedai*와 98.5%의 유사성을 보이는 등 *Shewanella* 속에 해당되는 것으로 동정되어 본 균주를 *Shewanella* sp. L93으로 명명하였다.

본 균주의 최적 배양 온도는 10°C 근처로 나타났다. 배양 후 6 일째까지 지속적인 성장을 보이고 있으며(cell density, 4.13~5.31) 7 일째 가서야 다소간의 감소를 보이고 있다. 이 온도는 남극 세종기지 근처의 연중 최고 온도에 해당된다. 반면에 일반적인 배양온도로 초기에 설정하였던 4°C에서도 10°C에서 거의 유사한 성장 형태를 보이고 있다. 본 실험으로 L93 균주는 psychrotolerant가 아니고 psychrophilic 균주임을 확인하였다. 단백질 분해 효소의 검출은 casein 함유 평판배지에서 casein의 분해에 따라 불투명하던 배지가 해당 균주 주위로 맑은 halo를 형성하게 되는 것으로 확인할 수 있었다(Fig. 2).

해양세균 *Shewanella* sp. L-93 에서 protease의 분리 정제

본 균주의 일반적인 배양에는 sea water complete (SWC) 배지



Fig. 2. Examples of halo formation by extracellular protease using milk casein agar plate.

를 사용하였다. 그러나 본 배지는 ZoBell 배지와 함께 일반적인 해양 미생물에 전반적으로 많이 사용되기는 하나 특정 목적물의 대량생산에는 별개의 최적 배지를 필요로 한다. 본 효소의 대략적인 분자량을 알기 위하여 Microcon centrifugal ultrafiltration kit (Microcon-10, Microcon-30, Microcon-50, Amicon Co., USA) 를 이용하여 분획을 나누고 각 분획의 효소 활성을 측정하였다. 실험 결과 95%이상의 효소활성이 분자량 30,000 이상에서 50,000 사이의 fraction에서 검출되어 본 효소의 분자량은 30,000과 50,000 dalton 사이인 것으로 판명되었다.

Ultrafiltration은 효소활성의 농축에 효율적이기는 하나 용량이 크지 않고 비용이 많이 들어 효소활성의 농축을 위한 다른 방법들의 효율성을 비교하였다. 우선 가장 흔히 사용되는 ammonium sulfate에 의한 침전방법을 수행하였는데 ammonium sulfate의 최적 포화 농도를 결정하기 위하여 fractional $(NH_4)_2SO_4$ 침전방법을 사용하였다. 원액과 30% 포화 시, 50% 포화 시, 그리고 80% 포화 시의 각 침전물을 회수하여 최소량의 Tris buffer (50 mM, pH 8.0)에 녹여 활성을 비교한 결과 대부분의 효소활성은 30-50% 포화도의 침전물에서 나타나 0-50% 포화도를 사용할 경우 대부분의 효소활성을 침전시킬 수 있는 것으로 판명되었다.

Shewanella sp. L-93 균주를 SWC 배지를 이용하여 4/를 4 일간 배양한 후 본 배양액에서 저온성 균주 L93이 생산하는 세포의 단백질을 분해 효소를 한외여과 농축법, fractional ammonium sulfate 침전법, High-Q ion exchange column chromatography,

gel filtration column chromatography 그리고 Bio-Scale-Q2 ion exchange column chromatography 등을 통하여 purification fold 19.3, yield 0.7%로 정제하였다(Table 2). 본 효소는 extracellular enzyme으로서 정제과정에서 손실이 비교적 크게 나타나는 등 분리 정제 과정 중에 많은 효소 활성의 손실이 있었는데 저온성 효소의 특징의 하나로 사료된다.

Basic characterization of Extracellular Protease from L93

본 효소는 해양세균에서 생산되는 체외 분비 효소로서 중성인 pH 7에서 optimal activity를 보이는 효소로서 일반적인 바닷물의 pH인 pH 8에서보다 1.3 배가 넘는 활성을 보였으며 온도 변화에 따른 활성도에서는 25°C에서 가장 높은 활성을 보였다(Fig. 3, 4). 열에 대한 안정성에서는 비교적 낮은 열 안정성을 보여 30°C에서 2 시간 정치 후에도 활성의 60% 이상이 소실되었으며 45°C에서는 불과 1 시간안에 활성의 대부분이 소멸되었다(Fig. 5). 약 25°C에서 최대 활성을 보이는 본 효소는 다른 저온성 세균에서 보고된 바 있는 cold-adapted enzyme임을 보여준다. Cold-adapted enzyme은 낮은 activation energy를 보이며 열안정성이 매우 낮다는 특징을 가지는데 이러한 예는 Choo 등 (4)에 의하여 *Pseudomonas* sp.에서 분리된 lipase (4), 일본 근해 해저 퇴적물에서 분리된 저온성 균주의 amylase (9), 혹은 *Moraxella* (5)나 *Acinetobacter* (3) 등 다른 저온성 균주들에서 발견된 효소들과 유사한 특성을 보여주고 있다.

이 효소는 기질의 아미노산 잔기에 대한 특이성은 확인되지

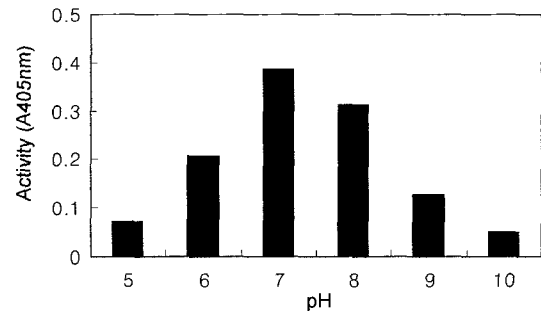


Fig. 3. The pH dependence of enzymatic activity of extracellular protease of *Shewanella*, sp. L93 assayed at room temperature.

Table 2. Purification of protease produced by *Shewanella* sp. L-93 strain

Fraction	Vol (ml)	A ₂₈₀ *	Total Protein (mg)	protease activity (dA ₄₀₅ /ml)	Total Activity (dA ₄₀₅)	Specific Activity (dA405/mg*)	yield (%)
Broth	4000	5.3	21200	44.6	178400	8.41	100
Ultrafiltration (MWCO;10K)	300	12.3	3690	82.5	24750	6.70	15.4
Ammonium sulfate (30-50 % Sat)	75	4.5	337.5	77.2	5790	17.2	3.21
High-Q	34	3.3	112.2	102	3468	30.9	1.94
GPC/UF(50K)	25	0.7	17.5	72	1800	102.8	1.00
BioScale-Q2	19	0.4	7.6	65	1235	162.5	0.7

*Protein sample (A₂₈₀=1) was assumed to be 1 mg/ml protein.

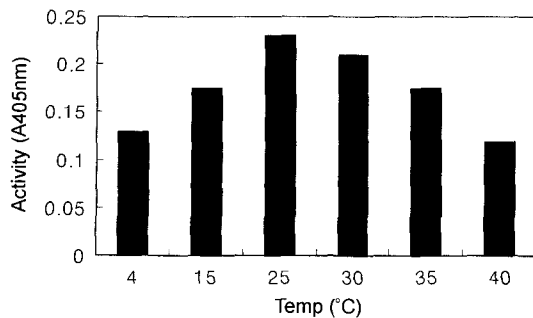


Fig. 4. The temperature dependence of enzymatic activity of extracellular protease of *Shewanella. sp. L93*.

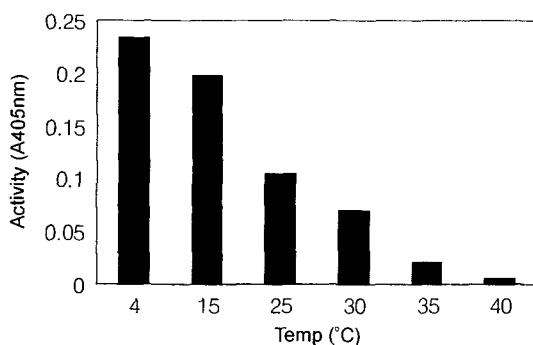


Fig. 5. Stability of extracellular protease of *Shewanella. sp. L93* at different temperature, assay after incubation for 2 hrs at given temperatures.

않았으나 현재 exopeptidase로 추정되고 있으며 이 경우 쉽게 구할 수 있는 일반적인 단백질로부터 amino acid를 생산할 때 등 수단으로서의 가치가 있다고 사료된다. 그러나 정제도가 높아질수록 autocatalysis가 일어나는 것으로 여겨지는 현상이 나타난다. 즉, 효소들이 순도가 높아짐에 따라 스스로를 기질로 인식하여 분해하는 현상이 일어나 High-Q를 통한 정제이후에는 단순한 방식에 의하여서도 활성의 감소가 매우 빠르게 나타났다. 이러한 현상은 대부분의 protease에서 일어나는 현상으로 이를 극복하기 위하여서는 적절한 protease inhibitor를 이용한 affinity chromatography의 수행이 권장된다.

세계 효소시장 규모는 연간 1 조 6 천억원(1999 년 기준) 정도이며, 거의 세계 시장 전부를 덴마크 노보사, 미국 제넨코 등 몇몇 선진국 기업들이 장악하고 있다. 국내 세제용 효소시장의 경우도, 수요의 대부분을 수입에 의존하고 있으며 그 시장규모는 연간 수백억원에 달한다. 국내에서도 최근 갯지렁이나 무당거미 (*Nephila clavata*) 등에 공생하는 미생물(*Aranicola proteolyticus*)에서 개발된 저온성 단백질 분해효소가 개발되고 있으며 이들이 산업화될 경우 세제용, 의약품용, 산업소재가공용 및 학술연구용 등의 분야에서 광범위하게 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 수입 대체효과는 물론 수출을 통한 세계시장 점유율, 국가경쟁력 강화에 크게 기여할 것으로 예상된다. 공업용 효소의 세계 총 생산량은 1994 년에 약 10 억불로 추정되고 있으며 효소의 이용 용도 별

로 세제용 32%, 전분 가공용 15%, 유가공 14 %, 섬유 가공 10% 그리고 기타 29%로 집계되고 있으며 이러한 효소의 사용은 급격히 증가하여 2005년에는 17~20 억불 수준에 달할 것으로 추정된다(1).

감사의 글

본 연구는 해양수산부의 남극 자원 생물개발 과제(PM06800)의 지원을 받아 수행되었다.

참고문헌

1. 오평수 1997. 효소를 이용한 바이오산업의 전망, pp222-239, 현대의 생명공학과 생물산업, 바이오과학기술산업 연구회, 아카데미서적.
2. Bertolini, J. M., H. Wakabayashi, V. G. Watral, M. J. Whipple, and J. S. Rohovec. 1994. Electrophoretic detection of proteases from selected strains of *Flexibacter psychrophilus* and assessment of their variability. *J. Aquat. Anim. Health* 6, 224-233.
3. Brenil, C. and J. Kushner. 1975. Partial purification and characterization of lipase of a facultative psychrophilic bacterium (*Acinetobacter O16*). *Can. J. Microbiol.* 21, 434-441.
4. Choo, D., T. Kurihara, T. Suzuki, K. Soda, and N. Esaki. 1998. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas sp.* strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 486-491.
5. Feller, G., M. Thiry, J. L. Arpigny, M. Mergeay, and C. Gerday. 1990. Lipases from psychrotrophic antarctic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 66, 239-244.
6. Fiechter, A. 1986. Microbial proteinase, *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, pp29-35, Wiley-liss press, NY.
7. Griffin, B.R. 1987. Columnaris disease: recent advances in research. *Aquaculture* 13, 48-50.
8. Gunnlaugsdottir, B. and B.K. Gudmundsdottir. 1997. Pathogenicity of atypical *Aeromonas salmonicida* in Atlantic salmon compared with protease production. *J. Appl. Microbiol.* 83, 543-541.
9. Hamamoto, T. and N. J. Russell. 1988. Psychrophiles, p. 1-21. In K. Horikoshi, and W. D. Grant (ed.), *Extremophiles*. Wiley, New York, N.Y.
10. Kothary, M.H. and A.S. Kreger. 1985. Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.* 50, 534-540.
11. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 80-685.
12. 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.
13. Norqvist, A., B. Normman, and H. Wolf-Watz. 1990. Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.* 58, 3731-3736.

(Received November 1, 2002/Accepted November 15, 2002)

ABSTRACT: Purification and Characterization of Extracellular Protease from Psychrotrophic Antarctic Bacteria

Ki Woong Cho, Jiheon Bang, Heywon Hong, Seungil Park, and Younho Lee (Korea Ocean Research and Development Institute, Department of Marine Natural Products Chemistry, Kyunggido, Ansan 425-600, Korea)

A psychrotrophic bacterium was isolated from Antarctic marine sediment and identified as *Shewanella* sp. species based on the biochemical properties and 16S rRNA sequence, and designated as *Shewanella* sp. L93. Extracellular protease produced by this strain was purified through ammonium sulfate precipitation, High-Q column chromatography, first gel permeation chromatography, BioScale Q2 ion exchange chromatography and second gel permeation chromatography, and basic properties of this enzyme were investigated.