

# 저식염멸치젓에서 분리한 단백질분해력이 강한 세균 및 생산된 단백분해효소의 특성

車 庸 準 · 李 應 昊\* · 李 燭 熙\* · 張 東 錫\*\*

昌原大學 化學科

## Characterization of the Strong Proteolytic Bacteria Isolated from Low Salt Fermented Anchovy and of Protease Produced by that Strain

Yong-Jun CHA, Eung-Ho LEE\*, Kang-Hee LEE\*, and Dong-Suck CHANG\*\*

Department of Chemistry, Changwon National University,

Changwon 641-240, Korea

For the purpose of producing low salt fermented anchovy by accelerated method with a strong proteolytic bacteria, in this study, a strong proteolytic bacterium was isolated from low salt fermented anchovy and its bacteriological characteristics and properties of protease were experimented. The results obtained were as follows : three proteolytic bacteria, *Aeromonas anaerogenes*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus saprophyticus* were isolated from low salt fermented anchovy(4% of salt, 4% of KCl, 0.5% of lactic acid, 6% of sorbitol and 4% of alcohol extract of red pepper) after 40 days fermentation. Among these strains, which grow best at 30°C, pH 7.0, *B. subtilis* was found the best proteolytic strain and benefit for industrial use as shown 0.95 hr<sup>-1</sup> of specific growth rate, 89µg-Tyr/hr. ml of maximum activity after 12 hrs culture in TPY broth. The protease produced by *B. subtilis* showed maximum activity at 35°C, pH 7.0, and molecular weight was estimated to be 23,000 by Sephadex G-100 filtration, and it was supposed to be a kind of metal chelator sensitive neutral protease from the results of strong sensitivity against EDTA, o-phenanthroline and metal ions such as Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>. Km value of that by method of Lineweaver-Burk was determined to be 0.73% for casein as a substrate.

### 서 론

발효란 유기물이 호기적 또는 혐기적으로 인간이 유용하게끔 분해되는 작용으로서 옛부터 우리나라에서 즐겨 먹어오고 있는 대표적인 수산발효식품으로는 젓갈류나 어장유등을 들 수 있다. 본 저자들은 이러한 수산발효식품의 품질개선을 위한 연구로서 우선 과다 식염섭취에 의하여 야기되는 성인병예방

을 목적으로 식염함량을 줄여 재래식젓갈에 비해 풍미면에서 별 손색이 없는 저식염젓갈의 제조를 계속적으로 수행하여 오고 있다(李등, 1983 ; 車등, 1983 ; 車·李, 1985 ; 車등, 1983 ; 車·李, 1985). 그러나 젓갈은 자연발효에 의하여 제조되므로 그 제조기간이 어중에 따라 다르나 육질이 약한 멸치젓의 경우 2개월 정도나 소요되고 있는 실정이다(車·李, 1985). 따라서 본 저자들은 재래식젓갈에

\* 釜山水產大學 食品工學科

(Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea)

\*\* 釜山水產大學 微生物學科

(Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea)

비하여 품미면에서 별 손색이 없으면서 단시간에 속성발효를 시킬 목적으로 젓갈 숙성과정에서 단백질분해능이 강한 몇몇 균주를 분리하여 본 연구를 착수하게 되었으며 우선 본보에서는 분리된 균주 및 그 균체의 단백질분해효소의 특성에 관하여 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

Table 1. Medium for the isolation of proteolytic bacteria

A) Skim milk	20g
Distilled water	500ml
	pH 7.0
B) Bacto peptone	5g
Yeast extract	1g
Sodium chloride	30g
Bacto agar	15g
Distilled water	500ml
	pH 7.0

After autoclaved at 121°C for 15 min., cooled to 50~60°C and then mixed A) and B)

균주의 분리 및 동정 : 단백질분해능이 강한 균주의 분리 방법은 식염농도가 낮은 멸치젓(車·李, 1985) (식염 4%, KCl 4%, lactic acid 0.5%, sorbitol 6%, 고추가루 알코올추출물 4%) 숙성 40일째의 시료를 20g 취하여 3% 멸균생리식염수 180ml를 가하고 균질화한 다음 10진 희석하였으며 이 희석액을 단백질분해세균 선별배지(Table 1)상에 Conradi법으로 도말하여 30±0.5°C, 48시간 배양하여 배지상의 colony 주위에 투명한이 나타난 것을 단백질 분해 양성균으로 하였으며 이중 HC ratio (투명환의 크기 / colony의 크기)가 높은 균을 선별하였다. 균주의 동정을 위한 실험은 Harrigan and McCance(1976), Collins and Lyne(1976)의 방법에 따랐으며 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology 8판(Buchanan and Gibbone, 1974), Gibbs and Skinner(1966) 및 清水의 분류방법(清水, 1978)에 의하였다.

균주의 배양적특성 실험 및 효소의 생산 : 단백질분해능이 강한 균주의 배양적 특성과 최적 효소생산 조건을 알기 위하여 각 온도별, pH별 및 식염농도별에 따라 TPY broth(tryptone 0.5%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%)에 균을 접종하여 12시간 진

탕배양한 후 균의 농도 및 효소활성을 측정하였으며 이렇게 해서 구명된 최적 조건에서 연속 진탕배양하면서 배양 시간에 따른 균의 증식도, 효소의 활성 및 pH를 측정하여 효소생산 최적시간을 조사하였다.

조효소의 추출 및 정제 : TPY broth에 단백질분해균주를 접종후 최적 배양조건에서 배양한 다음 효소생산이 최대 일때의 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 20min)하였으며 상층액을 취하여 0.45µm filter에 통과시켜 조효소액으로 하였다. 이 조효소액에 황산암모늄을 80% 포화될 때까지 첨가하여 4°C에서 하룻밤 염석을 하였으며, 염석후 원심분리하여 모은 침전물을 0.1M NaCl을 함유한 0.01M phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 다음 투석막에 넣어 동일한 완충액으로 충분히 투석시켰다. 다음으로 상기의 완충액으로 평형화시킨 Sephadex G-100 column(3×95cm)에 얹어 20ml/hr 당 유속으로 용출시켜 tube당 10ml씩 분획하였다. 그리고 최고 활성의 50% 이상의 활성을 나타내는 분획을 한데 모아 aquacide powder로 적당히 농축시킨 다음 효소특성 실험용 시료로 하였다.

효소활성 측정 및 단백질 농도 : 단백질분해효소의 활성측정은 萩原의 방법(赤掘, 1956)에 의해 반응액의 흡광도(660nm)를 측정하여 대조와의 차를 표준곡선에서 tyrosine함량(µg/ml. hr)으로 환산하여 표시하였으며 단백질농도는 bovine albumin(Sigma제)을 표준단백질로 하여 Lowry등의 방법(Lowry et al., 1951)에 따라 660nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다. 그리고 효소반응에서 pH조정에 쓴 완충용액은 Dawson등의 방법(Dawson et al., 1974)에 따라 pH별로 조제하여 사용하였다.

효소특성 실험 및 분자량 측정 : 정제효소의 활성 최적 pH, 온도 그리고 금속이온과 효소저해제에 의한 영향등을 조사하였으며 분자량 측정은 Andrews법(Andrews, 1964)에 의한 Sephadex G-100 겔여과법에 의하였다. 또 Hammarsten milk casein의 농도에 따른 효소활성을 측정하여 Lineweaver-Burk식에 의해 기질친화도(Km)를 구하였다.

### 결과 및 고찰

단백질분해능이 강한 미생물의 분리 및 동정 : 젓갈의 숙성은 일반적으로 어육 자가소화 효소 및 환경적 천이에 의한 미생물 특히 단백질분해효소 생산능이 강한 미생물에 의하여 지배되므로(李, 1969)

Table 2. Characteristics of the proteolytic strains isolated from low salt fermented anchovy

Test items	Strains			Test items	Strains		
	p-14	p-22	p-54		p-14	p-22	p-54
Cell morphology	rod	rod	coccus	Utilization of			
Gram reaction	-	+	+	citrate	-	±	+
Spore formation	-	+	-	sucrose	+	-	+
Motility	+	+	+	lactose	+	-	-
Indole	-	-	-	mannitol	-	+	+
V-P test	-	+	±	arabinose	∓	-	±
Methyl red	∓	-	+	xylose		+	±
Nitrate reduction	+	+	+	maltose		+	-
Production of				raffinose		-	-
oxidase	+	+	+	glucose	+	+	+
catalase	±	+	+	Gas from glucose	-	-	-
H <sub>2</sub> S	+	-	-	Salt tolerance at 30°C			
urease	-	-	-	0%	-	+++	+++
ammonia from arginine		+	-	3%	++	++	++
arginine decarboxylase	-			15%	++	±	+
lysine decarboxylase	-			20%	±	-	±
Hugh-Leifson(glucose)				pH range for growth at 30°C			
fermentative	+	+	±	5.5	+	+	+
oxidative	+	+	+	9.6	-	+	+
Growth in S-110 medium	-	-	+	Temp. range for growth			
Coagulase	-	-	-	10°C	-	-	-
Casein hydrolysis	+	+	+	45°C	∓	+	+
Starch hydrolysis	+	±	-	HC ratio*	3.0	3.2	2.6
Tween 80 hydrolysis	+	+	+				
Gelatin liquefaction	-	+	+				
Supposed species	<i>Aeromonas</i> <i>anaerogenes</i>	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i>				

\* Diameter of clear zone to that of colony on the skim milk medium

완숙 직전의 상태인 숙성 40일 부근의 시료(아미노 질소 : 213mg%)(車·李, 1985)를 취하여 skim milk 배지상에 접종한 다음 HC ratio가 2.5이상인 3균주를 선별하였으며 이들 균의 형태학적 및 생화학적 특성을 조사한 결과는 Table 2와 같다. HC ratio 3.0인 p-14균은 gram음성, 간균으로서 포자를 형성하지 않고 운동성이 있으며 Hugh-Leifson배지에서 포도당을 발효시키고 oxidase, catalase양성, nitrate 환원력, H<sub>2</sub>S생성능, 전분가수분해능 및 포도당과 자

당을 이용하는 반면에 lysine decarboxylase음성, indole, V-P test 및 urease음성이고 식염 3% 이상에서 자라는 점으로 보아 *Aeromonas anaerogenes* 유사균으로 추정되었으며(이하 *A. anaerogenes* p-14), p-22균은 gram양성, 간균으로 포자를 생성하고 oxidase, catalase양성, V-P test양성, nitrate 환원력, gelatin 액화능, 전분가수분해능이 있고 포도당을 발효 및 산화하고 arginine에서 암모니아를 생성하며 식염내성, 약산성 및 알칼리성에도 잘 자라고 특히 45°C에

서 잘 자라는 점으로 보아 *Bacillus subtilis* 균으로 추정되었다(이하 *B. subtilis* p-22). p-54균은 gram 양성, 구균으로 운동성이 있고 Hugh-Leifson배지에서 포도당을 발효시키며 nitrate 환원력, oxidase, catalase 양성 그리고 전분 가수분해능이 없으면서 20% 식염농도에서도 자라는 점등과 특히 S-110배지에서 황색 colony를 생성하는 것으로 보아 *Staphylococcus* 속으로 추정되었으며 coagulase 음성인 것으로 보아 비병원성인 *Staphylococcus saprophyticus* 유사균으로 추정되었다(이하 *S. saprophyticus* p-54). 森 등(1979)은 오징어젓 숙성과정에서 분리된 균주는 *Staphylococcus* 속등과 *Micrococcus* 속등이 호기성 세균의 대부분을 차지하고 있다고 보고하였으며, 車 등(1983)도 저식염 정어리젓 숙성과정에서 *Bacillus*의 7종류의 미생물이 검출되었다고 하였다.

분리된 미생물의 배양적특성 및 효소 생산: 분리된 *A. anaerogenes* p-14, *B. subtilis* p-22 및 *S. saprophyticus* p-54 균을 각각 전배양시켜 배양액 0.1 ml씩을 pH 7.0으로 조절한 TPY broth 100ml에 넣어 진탕배양에 의해 균의 증식 및 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 1에서와 같이 3균주 모두 30°C에서 가장

양호하였는데, *S. saprophyticus* p-54균의 경우 증식은 가장 큰데 반해 효소활성은 *B. subtilis* p-22보다 낮았다. 따라서 30°C로 고정한 후 pH변화에 따른

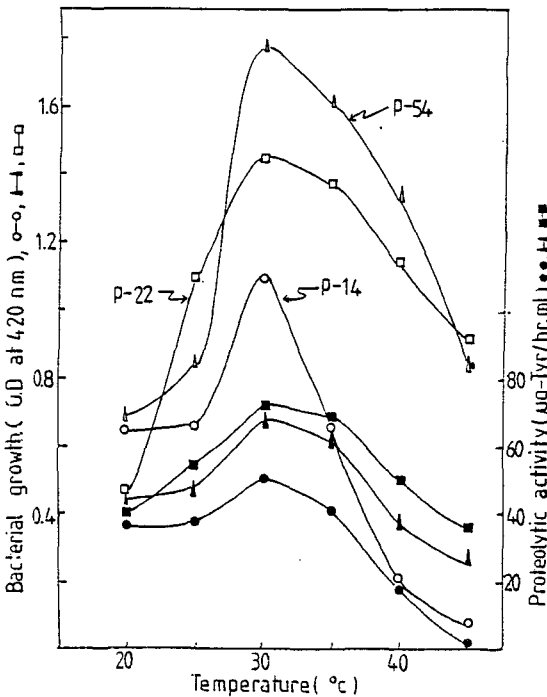


Fig. 1. Effect of temperature on bacterial growth and activity of produced enzyme by the 12 hrs culture in TPY broth (pH 7.0).

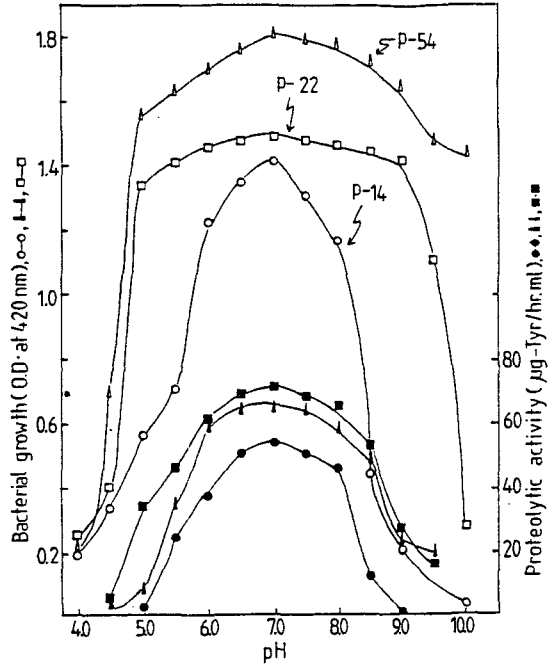


Fig. 2. Effect of pH on bacterial growth and activity of produced enzyme by the 12 hrs culture at 30°C in TPY broth.

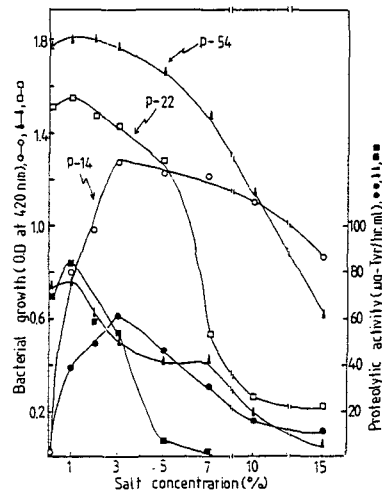


Fig. 3. Effect of salt concentration on bacterial growth and activity of produced enzyme by the 12 hrs culture at 30°C in TPY broth (pH 7.0).

Table 3. Cultural characteristics of proteolytic bacteria isolated from low salt fermented anchovy, cultured at 30°C in TPY broth with shaking

Species	Generation time (hr)	Specific growth rate (hr <sup>-1</sup> )	Max. growth		Max. proteolytic activity	
			Absorbance at 420nm	Time required (hr)	Max. activity (μg-Tyr/hr.ml)	Time required (hr)
<i>Aeromonas</i>						
<i>anaerogenes</i> p-14	1.54	0.45	1.21	12	68	16
<i>Bacillus</i>						
<i>subtilis</i> p-22	0.73	0.95	1.47	8	89	12
<i>Staphylococcus</i>						
<i>saprophyticus</i> p-54	0.60	1.15	2.11	11	85	14

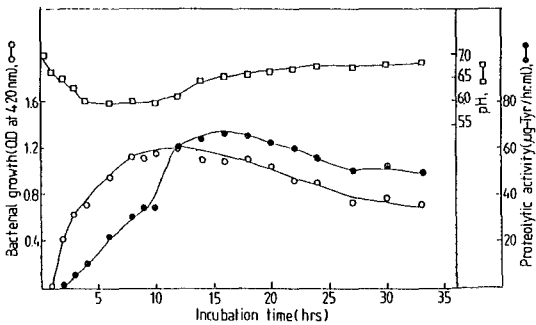


Fig. 4. Changes of bacterial growth, pH and proteolytic activity of produced crude enzyme by *A. anaerogenes* p-14 during the shaking culture at 30°C in TPY broth (pH 7.0).

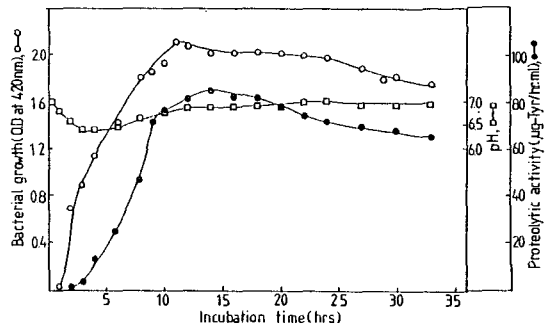


Fig. 6. Changes of bacterial growth, pH and proteolytic activity of produced crude enzyme by *S. saprophyticus* p-54 during the shaking culture at 30°C in TPY broth (pH 7.0).

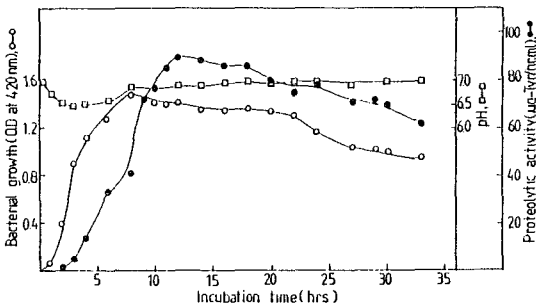


Fig. 5. Changes of bacterial growth, pH and proteolytic activity of produced crude enzyme by *B. subtilis* p-22 during the shaking culture at 30°C in TPY broth (pH 7.0).

균의 증식 및 효소활성 결과를 보면 Fig. 2와 같다. 균의 증식도는 *A. anaerogenes* p-14를 제외한 두균주의 경우 pH변화에 덜 민감하였고 효소활성은 pH 7.0이 가장 양호하였다. 그리고 식염농도의 경우는 Fig. 3과 같이 *B. subtilis* p-22 및 *S. saprophyticus* p-54균은 식염농도 1%에서 균 증식 및 효소활성이 우수하였으나 *A. anaerogenes* p-14균은 식염농도 3%에서 양호하였는데 효소의 활성 정도는 앞의 두균에 비하여 낮았다. 따라서 *A. anaerogenes* p-14균은 pH 7.0, 30°C, 식염농도 3%조건에서, *B. subtilis* p-22 및 *S. saprophyticus* p-54균은 pH 7.0, 30°C, 식염농도 1%조건으로 연속배양을 하였으며 배양중의 pH변화, 균의 증식 및 효소생성정도를 측정 한 결과는 각각 Fig. 4, 5, 6과 같으며 그 결과를 Table 3에 정리하였다. 3균주 모두 대수기에서는 pH의 감

Table 4. Purification of the protease produced by *B. subtilis* p-22

Purification step	Proteolytic activity ( $\mu\text{g/ml}$ )	Total activity ( $\times 10^3/\mu\text{g}$ )	Protein (mg/ml)	Specific activity ( $\mu\text{g/mg}$ )	Yield (%)	Purified fold
Culture filtrate	80	36.0	1.06	75.5	100	1
Ammonium sulfate precipitation	1283	14.1	2.32	553.0	39.1	7.3
Sephadex G-100 column chromatography pooled sample	210	6.3	0.28	750.0	17.5	10.0

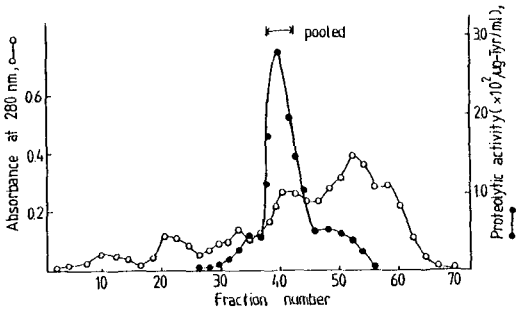


Fig. 7. Gel filtration of protease produced by *B. subtilis* p-22 on Sephadex G-100 column. The column was equilibrated with 0.01M phosphate buffer, pH 7.0. Elution was performed with this phosphate buffer mixed 0.1M NaCl, and fractions, 10ml each, were collected at flow rate of 20ml per hour.

소를 보였다가 그후 서서히 증가하여 효소활성이 최대인 이후부터는 거의 안정하였는데 *B. subtilis* p-22균의 경우 그 변화 폭이 가장 적었다. 그리고 비증식속도에 있어서는 *A. anaerogenes* p-14가 가장 낮았으며 배양 16시간이후 최대 효소활성도 68  $\mu\text{g-Tyr/hr.ml}$ 로서 가장 낮았다. 그리고 *B. subtilis* p-22균은 *S. saprophyticus* p-54균에 비하여 비증식속도가 약간 낮으나 효소활성은 89  $\mu\text{g-Tyr/hr.ml}$ 으로 오히려 높았고 또 최대활성을 나타내는데 요구되는 시간이 가장 짧은 것으로 보아 산업적 응용 가능성이 기대된다고 볼 수 있다. 劉(1977)도 해삼 찹자점에서 분리한 미생물중에서 단백질분해효소활성이 가장 높은 것은 *Bacillus*속이었으며 식염농도 1%에서 활성이 가장 높았고 식염농도 7%에서도

70  $\mu\text{g-Tyr/hr.ml}$  정도로 활성이 높았다고 하였다. 그리고 배양시 풍기는 냄새를 관능적으로 평가한 결과 *B. subtilis* p-22균 배양액의 냄새가 다른 균주의 것에 비해 구수하였다.

**효소의 정제:** 상기 분리한 3균주 중 산업적으로 이용 가능성이 기대되는 *B. subtilis* p-22균의 균체의 단백질분해효소를 정제하기 위하여 조효소액을 염석 및 투석을 행한 후 Sephadex G-100으로 충전한 칼럼 chromatography에서 겔여과를 실시한 결과는 Fig. 7과 같다. 효소활성은 분획 tube No. 26에서 56범위까지 나타났는데 이중 최대활성의 50% 이상을 나타내는 분획 tube No. 39~42까지의 효소액을 취하여 aquacide powder로 농축한 후 효소특성 실험용 시료로 하였으며 그중 일부를 취하여 동일 조건으로 재 칼럼 chromatography를 행한 결과 단일 피크를 나타내었다. 이때의 효소 정제과정을 보면 Table 4와 같다. 정제도는 조효소액의 비활성을 1로 보았을때 염석 및 투석을 행한 후에는 7.3배 그리고 겔여과후 최대활성의 50% 이상을 나타내는 부분을 포집한 경우에는 10배로 증가하였으며, 수율은 17.5%로 줄었고 단백질농도는 1.06mg/ml에서 0.28mg/ml로 상당히 정제된 것을 알 수 있었다.

**정제효소의 특이성:** *B. subtilis* p-22균주가 생산한 단백질분해효소의 최적 온도 및 pH에 대한 활성을 측정된 결과는 Fig. 8 및 9와 같다. 온도별에 따른 균체의 증식 및 조효소의 활성은 30°C에서 가장 높았으나 정제효소에서는 35°C에서 활성이 가장 높았다. 그리고 30~50°C 범위에서는 최대 활성의 75% 이상을 유지하였으며 고온쪽이 저온쪽보다 대체

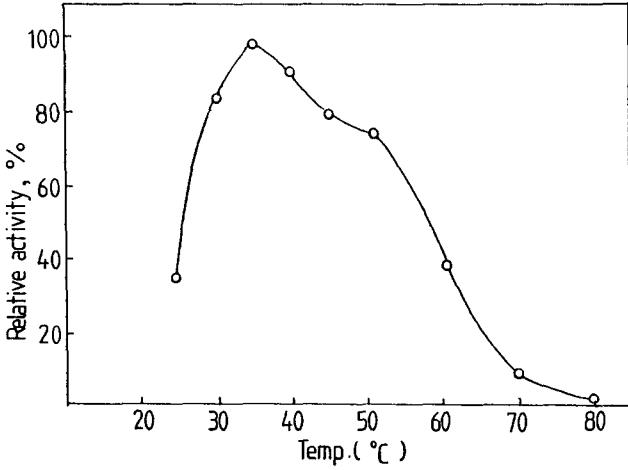


Fig. 8. Effect of temperature on the activity of protease produced by *B. subtilis* p-22.

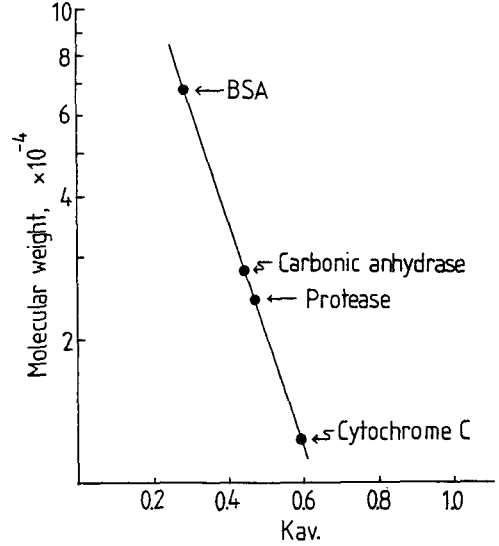


Fig. 10. Estimation of molecular weight of the protease produced by *B. subtilis* p-22 with Sephadex G-100 gel filtration.

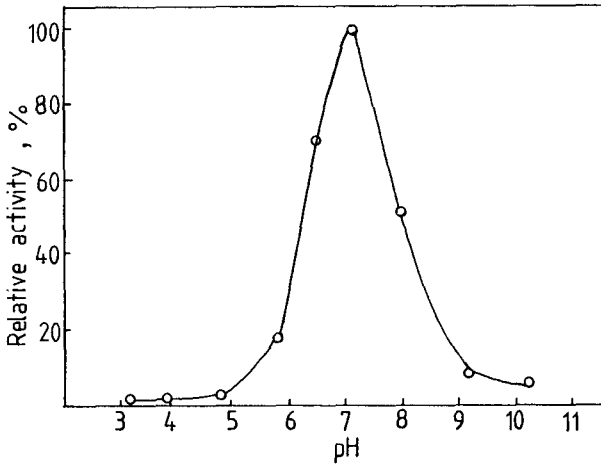


Fig. 9. Effect of pH on the activity of protease produced by *B. subtilis* p-22.

로 안정하였는데 80°C에서는 효소가 완전히 불활성화되었다. pH는 7.0에서 활성이 가장 높았으며 산성 및 알칼리성측으로 갈수록 활성이 떨어졌다. Ok et al. (1982)은 어장유에서 분리한 호염성이면서 단백질 분해력이 강한 *Bacillus*균의 효소 특성을 조사한 결과 pH 7.0, 온도 44°C가 최적이었다고 하였으며 Yasunobu and McConn(1970)에 의한 *B. subtilis* 증성프로테아제의 특성은 최적 pH 6.5~7.5, 온도 57°C였다고 한것과 비교해 보면 같은 범주에 속한다고 생각된다.

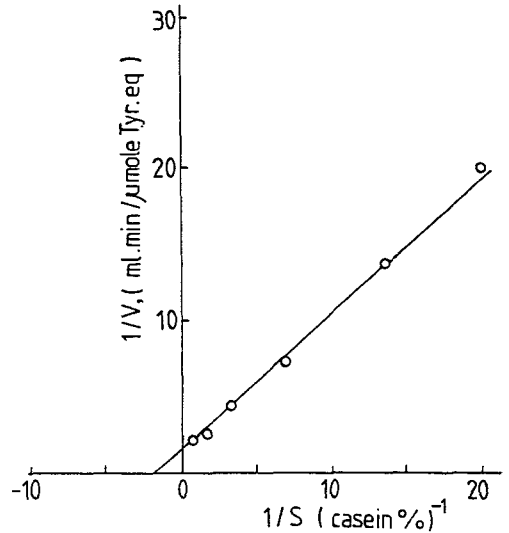


Fig. 11. Lineweaver-Burk plots for hydrolysis of casein by protease produced by *B. subtilis* p-22. Km value : 0.73%

다음으로 Table 5에서는 금속이온에 의한 효소활성 저해의 영향을 나타내었다. Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>이온에 의해서는 대조구에 비해 오히려 활성이 증가되었으며 특히 Ca<sup>2+</sup>이온에 의한 효과가 가장 컸다. 그리고 Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>에 의해서는 상당

Table 5. Effect of metal ions on the activity of the protease produced by *B. subtilis* p-22

	Concentration	Remaining activity(%)
Control		100
FeCl <sub>2</sub>	1mM	42
CoCl <sub>2</sub>	〃	96
CaCl <sub>2</sub>	〃	110
MgCl <sub>2</sub>	〃	102
BaCl <sub>2</sub>	〃	100
NaCl	〃	106
KCl	〃	107
AgNO <sub>3</sub>	〃	65
NiCl <sub>2</sub>	〃	47
ZnCl <sub>2</sub>	〃	57
CuSO <sub>4</sub>	〃	38

Table 6. Effect of chemicals on the activity of protease produced by *B. subtilis* p-22

	Concentration	Remaining activity(%)
Control		100
EDTA-2Na	1mM	20
o-Phenanthroline	〃	8
2-Mercaptoethanol	〃	95
Sodium lauryl sulfate	〃	84
DTNB*	〃	103
Ethanol	0.1M	92
Lactic acid	〃	67

\* DTNB : 5, 5-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

히 활성이 저해되었다. Table 6에 나타난 화학약제에 의한 효소활성 저해효과를 보면 EDTA 및 o-phenanthroline에 의해 거의 완전히 저해되었는데 특이성에 따라 미생물 프로테아제를 분류한 Morihara(1974)의 보고를 보면 EDTA, o-phenanthroline에 의해 강하게 저해를 받는 그룹은 metal chelator sensitive protease로 분류하였으며, 또 Yasunobu and McConn(1970)은 *B. subtilis* 중성프로테아제의 특성은 Ca<sup>2+</sup>이온 존재하에서 안정하며 Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>등에 의하여 억제된다고 보고 한것과 비교하면 본 실험의 *B. subtilis*가 생산한 프로테아제는 metal chelator sensitive neutral protease에 속하는 것으로 추정되었다. 그리고 저식염것갈 제조시 첨가된 에탄올에 대한 효소활성이 그렇게 저해되지 않는 것으로 보아 *B. subtilis* p-22균은 환경에 적응된 프로테아제를 생산하는 것으로 간주된다. 다음으로

정제효소의 분자량을 알기 위해 Fig. 10에서 처럼 표준단백질인 bovine serum albumin(M.W : 66,000), carbonic anhydrase(M.W : 29,000), horse heart cytochrome C(M.W : 12,400)을 이용하여 Sephadex G-100 겔여과에서 분리위치를 비교한 결과 23,000으로 추정되었다. 일반적으로 metal chelator sensitive neutral protease의 분자량은 대략 35,000~40,000으로 알려져 있으나(Morihara, 1974) 본 *B. subtilis* p-22균의 프로테아제는 이보다 적었는데 전기 영동법으로 분자량을 추정하여 상호 비교하여 보면 더욱 정확한 결과가 나올 것으로 생각되어 진다. 그리고 카제인을 기질로 하여 효소반응속도를 작도한 결과는 Fig. 11과 같다. 기질친화도(K<sub>m</sub>)는 0.73%를 나타내었는데 어육을 이용한 산업적 응용성을 기대한다면 앞으로 어육단백질에 대한 반응속도론을 고찰하여 보는 것이 바람직하다고 생각되었다.



## 요 약

미생물에 의해 숙성 저식염젓갈을 제조할 목적으로 저식염멸치젓(식염 4%, KCl 4%, lactic acid 0.5%, 솔비톨 6% 및 고추가루 알코올추출물 4%)에서 단백질분해력이 강한 미생물을 분리하여 그 특성을 조사한 결과는 다음과 같다. 숙성 40일경의 시료를 취하여 skim milk배지상에서 HC ratio 2.5이상인 단백질 분해력이 강한 균주를 선별하여 동정한 결과 *A. anaerogenes*, *B. subtilis*, *S. saprophyticus* 3균주이었으며 모두 pH 7.0, 30°C에서 균증식 및 효소활성이 양호하였다. 이들 균 중 *B. subtilis*균이 비증식속도는  $0.95\text{hr}^{-1}$ 이었고, 12시간 배양후  $89\mu\text{g-TyC/hr. ml}$ 의 효소활성을 나타내어 분리된 균주 중 활성이 가장 좋았으며 산업적 응용성이 기대되었다. 그리고 gel여과법으로 정제한 *B. subtilis* 프로테아제의 특성은 pH 7.0, 35°C에서 활성이 가장 우수하였으며 분자량은 23,000으로 추정되었다. 또 카제인을 기질로 하여 효소반응 속도를 측정한 결과  $K_m$ 값이 0.73%이었다. 효소저해제의 효과에서는 EDTA, o-phenanthroline에 의하여 거의 실패되었으며, 금속이온으로는  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  이온등에 의해 강하게 저해되는 것으로 보아 metal chelator sensitive neutral protease로 추정되었다.

## 분 헌

- Andrews, P. 1964. Estimation of the molecular weight of proteins by sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91, 222~233.
- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbone. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Collins, C. H. and P. M. Lyne. 1976. *Microbiological methods*. 4th ed. Butterworths. London. 113~180.
- Dawson, R. M. C., D. C. Elliott, W. H. Elliott and K. M. Jones. 1974. *Data for biochemical research*. 2nd ed., 475~508.
- Gibbs, B. M. and F. A. Skinner. 1966. Identification

methods for microbiologist. Academic press. New York.

- Harrigan, W. F. and M. E. McCance. 1976. *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. Academic Press. New York. 9~81.
- 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.
- Morihara, K. 1974. Comparative specificity of microbial proteinase. *Adv. Enzymol.* 41, 181~204.
- Ok, T., T. Matsukura, Z. Ooshiro, S. Hayashi and T. Itakura. 1982. Protease formation by two moderately halophilic *Bacillus* strains isolated from fish sauce. *Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi* Vol. 29(10), 618~622.
- Yasunobu, K. T and J. McConn. 1970. *Methods in Enzymology* Vol. 19, 569~575.
- 劉太鍾. 1977. 해삼내장젓에 관한 研究. 고려대 농대 농림논집 15, 209~221.
- 李啓瑚. 1969. 젓갈等屬의 呈味成分에 관한 微生物學的 및 酵素學的 研究. 韓農化誌 11, 1~27.
- 李應昊·車庸準·李鍾壽. 1983. 低鹽정어리젓의 加工條件. 韓水誌 16(2), 133~139.
- 車庸準·朴香淑·趙舜榮·李應昊. 1983. 低鹽멸치젓의 加工. 韓水誌 16(4), 363~367.
- 車庸準·李應昊. 1985. 低食鹽멸치젓 및 조기젓의 加工條件. 韓水誌 18(3), 206~213.
- 車庸準·李應昊. 1985. 低食鹽멸치젓 및 조기젓의 呈味成分. 韓水誌 18(4), 325~332.
- 車庸準·鄭秀烈·河在浩·鄭仁措·李應昊. 1983. 低鹽정어리젓의 微生物相의 變化. 韓水誌 16(3), 211~215.
- 清水湖. 1978. 海洋學講座 No.11, 海洋微生物. 東大出版. 東京. 45~64.
- 赤堀四郎. 1956. 酵素研究法. Vol. II. 朝倉書店. 日本. 237~246.

1988년 1월 27일 접수

1988년 4월 11일 수리