

## *Micrococcus* sp.의 생육 및 casein 분해에 미치는 배양조건의 영향 : (II) 배양시간에 따른 casein 분해 형태에 관한 연구

이시경 · 백문화 · 주현규\*

두산기술원, \*건국대학교

**초록 :** Cheddar 치즈의 숙성기간을 단축시키고 flavor를 증진시킬 목적으로 단백분해력이 있는 *Micrococcus* sp. LL3를 Cheddar 치즈에 첨가하기 위하여 본 균의 균체생산을 위한 최적배양 온도와 pH 및 배양시간에 따른 casein의 분해형태를 관찰하였다. 본 균주의 생육을 위한 최적 배양온도는 30°C, 단백분해 효과의 최적 배양온도는 37°C 이었으며, 초기 배양 pH 7.0에서 균의 생육과 단백분해 효과가 가장 좋았다. 배양기간 중 정지기 초기의 세포에서 aminopeptidase의 효소활성이 가장 높았으며, 본 효소의 열 안정성이 높아 50°C에서 20분간 열처리 후에도 높은 효소활성을 보였다. Casein의 분해속도는 배양 24에서 36시간에서 가장 높았으며, 전기영동을 통한 casein hydrolysis patterns는  $\alpha$ -casein 뿐만 아니라  $\beta$ -casein도 본 균주에 의해 완전히 분해되었다. 특히 본 균주는  $\beta$ -casein의 분해력이 더욱 우수하였다(1992년 11월 2일 접수, 1992년 11월 17일 수리).

대부분의 치즈가 소비자의 손에 가기 전에 flavor의 형성이 이루어지기 위해서는 최소한의 숙성기간이 필요하다. 따라서 치즈 flavor의 손상없이 숙성기간을 단축시킨다는 것은 치즈산업에 상당한 원가 절감을 가져다 준다. 그러나 지금까지의 속성 치즈숙성에 관한 연구에서는 주로 starter로서 이용되는 *Streptococci*나 non-starter bacteria중 *Lactobacilli*를 중심으로 이루어져 치즈제조에 응용되었다.<sup>1,2)</sup> 체다치즈의 major secondary microflora인<sup>3)</sup> *Micrococcii*는 분류학적으로는 *Micrococcaceae* family에 속하는 그람 양성의 non-starter non-lactic acid bacteria로서 Cheddar cheese의 non-starter population 중 16~68%를 차지하는 것으로 보고되고 있다.<sup>4)</sup>

*Micrococcii*는 저온 살균에서도 살아남을 수 있어 pasteurized milk에도 존재하며, 치즈제조시 이의 첨가에 의해 Cheddar cheese의 flavor를 증가시켰다는 보고<sup>5)</sup>가 있으며 *Micrococcii*에 의한 cheese flavor 증진효과는 이 균이 갖고 있는 proteolytic, lipolytic enzyme activity에 기인하는 것으로 알려져 있다.<sup>6)</sup> 지금까지 *M. caseolyticus*, *M. sodonensis*, *Micrococcus* sp. MCC315, *M. lysodeikticus* 등이 생성하는 extracellular proteinase가 보고되었으나,<sup>7)</sup> 치즈 숙성과정 중 치즈내에 있는 *Micrococcii*에 의한 extracellular proteinase의 분비를 증명할 만한 확실한 보

고가 아직까지는 없다. 그러나 *M. freudenreichii* 325가 생성하는 intracellular proteinase가 보고되었으며, 이 균주를 치즈제조시 첨가하였을 때 치즈 숙성중 proteolysis가 증가하였다고 보고하였다.<sup>8)</sup> 또한 intracellular proteinase, endopeptidase, aminopeptidase, dipeptidase 등의 효소가 여러 *Micrococcus* sp.에 존재하는 것으로 최근 보고되었다.<sup>9)</sup>

한편 Cheddar 치즈의 숙성과정중  $\beta$ -casein은  $\alpha$ -casein보다 분해가 잘 이루어지는 것으로 알려져 있다.<sup>10)</sup> 그러나 *Micrococcus* sp.의 cell free extract에 의해  $\beta$ -casein이 short peptide와 아미노산으로 분해된다고 보고되었다.<sup>11)</sup> Cheese milk에  $\alpha$ -casein 뿐만 아니라  $\beta$ -casein도 분해할 수 있는 균주의 첨가는 치즈숙성을 촉진시키는데 도움이 될 것으로 생각된다.

본 연구에서는 Cheddar cheese의 숙성기간을 단축시킬 목적으로 *Micrococcus* sp. LL3를 adjunct로서 첨가하기 위하여 본 균주의 생육을 위한 배양조건과 배양 시간에 따른 casein의 분해형태를 관찰하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주

미국 Univ. of Wisconsin-Madison, Dept. of Food Scie-

nce에서 제공받은 *Micrococcus* sp. LL3 균주를 사용하였다.

#### 사용 배지 및 배양

균 성장 배지는 glucose 0.2%, tryptone 1%, yeast extract 0.2%, glutamic acid 0.2%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 1%의 조성으로 하였다. 이를 멸균하여 종균 1%씩을 접종후 30°C에서 진탕 배양(120 rpm)하면서 일정시간별로 균의 성장을 관찰하였다. 또한 단백 분해용 배지는 casein 1.5%, glucose 0.2%, tryptone 0.5%, yeast extract 0.2%, glutamic acid 0.2%, MgSO<sub>4</sub> 0.05%, NaCl 1%의 조성으로 하였다. 이를 멸균하여 종균 1%를 접종후 30°C에서 36시간 진탕 배양(120 rpm) 후의 유리되는 tyrosine 양으로서 단백분해를 측정하였다.

#### Caseinolysis 측정

Casein 용액의 단백분해 정도는 Vaidyanathan 등<sup>12</sup>의 방법을 변형하여 유리되는 tyrosine 함량으로 표시하였다.

#### 균체량 측정

각 배양시간 별로 배양액을 일정량 취하여 분광 광도계(spectrophotometer)로 660 nm에서 O.D(optical density)값을 측정하였다.

#### Cell free extract조제

24시간 배양된 배양액을 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척 원심분리한 균체를 세포분해용 alu-

mina를 첨가하여 분쇄하고 배양액의 10%에 해당하는 0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)를 넣고 냉장 원심분리하여 상동액을 cell free extract로 사용하였다.

#### Aminopeptidase activity 측정

Soda 등<sup>13</sup>의 방법을 변형하여 측정하였다. Leucine-*p*-nitroanilide(LNA)를 기질로 하여 35°C water bath상에서 20분간 반응시킨 후 410 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Specific activity는 1분간에 효소 단백질 1 mg에 의한 흡광도 0.01의 증가로 하였다.

#### Electrophoresis

단백 분해용 배지에 배양한 배양액을 여과하여 여액 0.3 ml와 7% SDS 0.35 ml, protein solvent 0.35 ml를 넣고 mercaptoethanol 100 μl를 가하여 수조상에서 5분간 중탕하였다. 이를 실온에서 냉각시켜 0.1% bromophenol blue dye용액 0.4 ml를 가한 후 phast system(pharmacia) 기기를 이용하여 전기영동을 행하였다.

#### 결과 및 고찰

##### 배양온도의 영향

*Micrococcus* sp. LL3 균주의 최적 성장온도를 조사하기 위하여 전보<sup>14</sup>에서 검토된 최적 배지를 조제하여, 배양온도에 따른 균의 성장을 측정한 결과 Fig. 1에서와 같이 30°C에서 균의 성장이 가장 높았으며, 37°C에서 배양시는 30°C에서 보다 다소 성장이 늦었다.

한편 casein 용액을 각 온도에서 36시간 진탕배양시켜

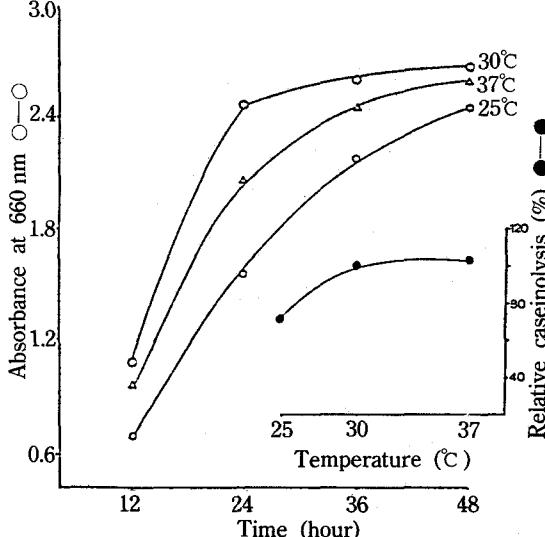


Fig. 1. Effect of incubation temperature on cell growth and caseinolysis.

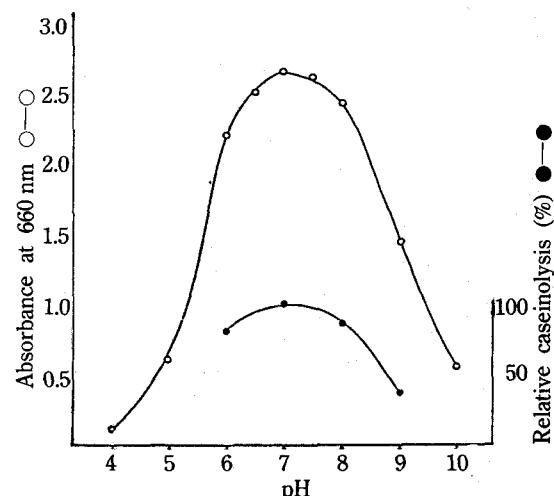


Fig. 2. Effect of culture pH on cell growth and caseinolysis.

유리된 tyrosine 함량은 37°C에서 배양시켰을 경우 가장 높았다. 이는 본 균주가 갖고 있는 단백분해 효소의 최적 반응온도와 관계가 있는 것으로 생각된다. 이상의 실험에서 균성장 최적온도와 caseinolysis 최적 온도가 다른 것을 알 수 있었다.

Husain 등<sup>15)</sup>과 Mills 등<sup>16)</sup>은 각각 *M. freudenreichii*, *M. sodonensis*의 proteinase 생산을 위하여 배양온도를 30°C로 한 결과와 본 균의 최적온도는 일치하였으며, Vaidyanathan 등<sup>12)</sup>도 *M. caseolyticus*를 이용한 실험에서 배양온도 28°C와 37°C 사이에서 균성장이 좋았다고 하여 비교적 넓은 범위의 최적온도임을 보고하였다. 한편 Prasad 등<sup>3)</sup>은 *Micrococcus* sp.의 protease 생산을 위하여 배양온도에 영향을 주었을 때, 즉 25°C에서 12시간 배양 후 30°C로 상승시킨(shift up) 경우와 30°C에서 12시간 배양 후 25°C로 내려 배양한 경우(shift down) 모두 최적온도 30°C에서의 효소활성보다 낮았다고 하여 배양온도의 변화는 효소 생성에 의미가 없는 것으로 생각된다.

#### 초기 배양 pH의 영향

본 균의 성장 및 casein 분해효과에 미치는 초기배양 pH의 영향을 조사한 결과 Fig. 2와 같이 30°C에서 진탕 배양시켰을 때 초기배양 pH가 7.0에서 가장 높은 균의 성장과 casein 분해효과를 보였으며, pH 6.5와 7.5에서

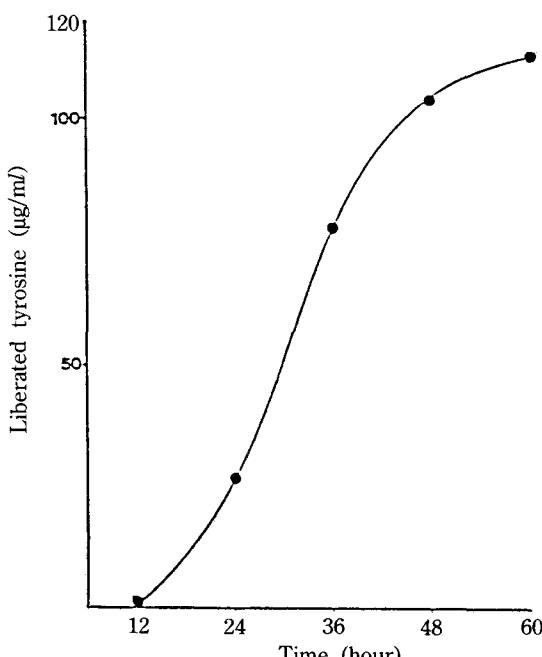


Fig. 3. Amount of tyrosine liberated from casein during incubation at 30°C.

배양시에도 이들의 변화가 거의 없었다.

그러나 pH 5.0에서 배양시 균의 성장이 급격히 저하되었으며, pH 10.0에서도 같은 결과를 보였다. 이상에서 본 균은 초기생육 최적 pH가 7.0인 중성균임을 알 수 있었다. *Micrococcus* sp. ATTC No. 407<sup>17)</sup> 및 *Micrococcus* sp. MCC315<sup>3)</sup>의 최적 pH가 모두 6.5로 보고되었으나, Desmazeud 등<sup>18)</sup>은 *M. caseolyticus*의 protease 생산을 위한 최적 pH는 7.0이었다고 하여 본 균주와 유사한 결과를 보였다.

#### 배양시간에 따른 casein의 분해

단백분해용 완전매지를 이용하여 30°C에서 진탕배양 시키면서 배양시간에 따른 *Micrococcus* sp. LL3에 의한 casein의 분해는 Fig. 3과 같이 균의 초기 대수기인 배양 12시간 까지는 tyrosine이 용출되지 않았다. 배양 24시간 후에는 casein 용액 1.0 mL당 27 μg의 tyrosine이 용출되었으며, 배양 48시간과 60시간에는 각각 104 μg 및 113 μg이 유리되었다. 특히 배양 24시간부터 36시간에 casein분해 속도가 가장 높게 나타났다.

이는 배양 시간의 경과에 따라 균의 autolysis에 의한 균체내에 존재하는 proteinase, dipeptidase, aminopeptidase 등 일련의 단백분해 효소 시스템(proteolytic enzyme system)의 분비에 기인하며 배양시간에 따른 세포의 효소 활성과도 밀접한 관계가 있는 것으로 생각된다.

#### 배양기간 중 casein의 분해형태

배양시간에 따른 casein hydrolysis pattern을 SDS-PAGE로 조사한 결과는 Fig. 4와 같았다. 즉 배양 12시간

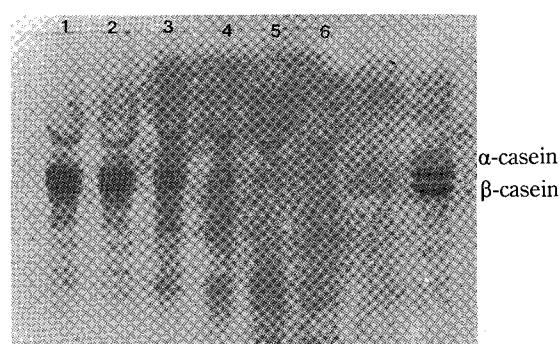


Fig. 4. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of casein hydrolysis by *Micrococcus* sp. LL3 during incubation.

Lane 1: Before culture, Lane 2: 12 hours after culture, Lane 3: 24 hours after culture, Lane 4: 36 hours after culture, Lane 5: 48 hours after culture, Lane 6: 60 hours after culture.

후에는 배양액의 casein이 전혀 분해되지 않았으나, 48시간 후에는  $\beta$ -casein이 완전히 분해되었으며, 또한 60시간 배양 후에는 casein의 주요 성분인  $\alpha$ -casein과  $\beta$ -casein이 모두 분해되었다.

이상의 결과로 부터 *Micrococcus* sp. LL3가 생성하는 proteinase는  $\alpha$ -casein 뿐만 아니라  $\beta$ -casein도 완전히 분해하였으며, 특히  $\beta$ -casein을 우선적으로 분해한다는 것을 알 수 있었다. 이는 Bhowmik 등<sup>9)</sup>이 다양한 *Micrococcus* sp.를 이용한 실험에서 skim milk에 이들을 각각 배양하였을 때 대부분의 균이  $\beta$ -casein의 분해를 선호하였다는 보고와 일치하였다. 또한 Moreno 등<sup>11)</sup>이나 Nath 등<sup>10)</sup>도 이와 유사한 결과를 보고하였다.

일반적으로 Cheddar cheese 숙성 중  $\beta$ -casein보다는  $\alpha$ -casein이 더 빨리 분해되는 것으로 알려져 있다. Oh-miya 등<sup>20)</sup>도 *L. bulgaricus*나 *L. helveticus*와 같은 lactic acid bacteria의 cell free extract에 의해  $\beta$ -casein보다는  $\alpha$ -casein의 분해가 더 높았다고 하였다. 그러나 이상에서 같이  $\beta$ -casein 뿐만 아니라  $\alpha$ -casein도 완전히 분해하는 proteolytic enzyme system을 생산하는 *Micrococcus* sp. LL3를 치즈에 첨가하므로, 치즈의 숙성 과정 중 단백분해를 촉진시킬 것으로 생각된다.

#### 배양시기에 따른 aminopeptidase의 활성 변화

검토된 배지조성과 배양조건을 이용하여 치즈숙성시 고분자의 peptide 성분을 aminopeptidase에 의하여 저분자의 peptide와 아미노산으로 분해시키는 효소활성을 균의 성장상태에 따라 조사하였다.

Table 1과 같이 intracellular aminopeptidase의 활성이 초기 정지기까지는 균의 성장과 함께 증가하여 초기 정지기의 세포에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으나, 정지기 후반부에는 효소 활성이 감소하였다. 이는 Ezzat 등<sup>21)</sup>이 다양한 *Lactobacillus*속의 균주를 이용한 실험에

서나, *L. casei*를 이용한 Soda 등<sup>22)</sup>의 실험에서 균의 성장이 증가함에 따라 intracellular aminopeptidase 활성은 증가하여 초기 정지기에 있는 세포에서 가장 높았으며, 정지기 후기의 세포에서는 감소하였다는 결과와 일치하고 있다.

그러나 Soda 등<sup>23)</sup>은 *L. plantarum*이 생성하는 aminopeptidase는 대수기 초기부터 정지기 초기까지 일정하였으며 정지기 후기에 있는 세포에서는 심하게 감소하였다고 하였다. 이와 같은 배양기간의 결과에 따른 intracellular enzyme의 활성감소 현상은 cytoplasm의 pH가 배지의 pH에 의존하고 있으며 이는 결국 intracellular enzyme의 활성에 영향을 미친다는 Kashket 등<sup>24)</sup>의 보고와 같이 세포 cytoplasm의 pH 변화에 기인하는 것으로 생각된다.

#### Aminopeptidase의 열안정성

0.01 M phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 효소액 1.0 ml씩을 13×48 mm borosilicate glass vial에 넣은 후 각각 water bath에서 열처리를 하여 경시적으로 효소액을 얻어 35°C에서 20분간 반응시켜 효소활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다.

본 효소는 모든 온도에서 thermal inactivation rate는 달리 나타났지만, 그들의 inactivation profiles는 유사한 것으로 나타나 각 온도에서의 열처리후 잔여 효소활성은 점진적으로 감소하고 있음을 알 수 있었다. 40°C에서 20분간 열처리시에 95%의 효소활성을 나타내었으며 50°C의 경우에도 69%의 효소활성을 유지하고 있었다.

그러나 70°C에서 열처리시에는 효소활성이 급격히 감소하여 10분간 열처리하였을 경우 잔존 효소력은 10%정도였다.

한편 60°C에서 열처리하였을 경우 pH에 따른 효소의 열안정성을 조사한 결과 pH 5.0의 효소 용액을 20분간

Table 1. Aminopeptidase activities of cells after growth as a function of culture age

Physiological age of the cells	Culture time	Specific activity (unit/min/mg)
Cells in lag phase	6 hr	0.90
Cells at the beginning of exponential growth	10 hr	1.47
Cells in exponential growth	16 hr	2.30
Cells in the early stationary phase	24 hr	2.82
Cells in the late stationary phase	48 hr	2.12

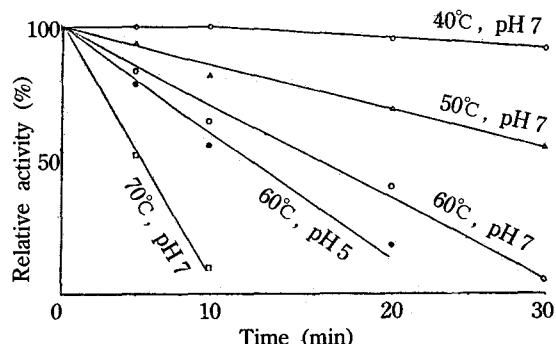


Fig. 5. Rate of the thermal inactivation of aminopeptidase at selected temperature.

열처리시 18%의 잔존 효소활성을 보였으나, pH 7의 효소용액은 40%의 잔존 효소활성이 나타나 pH 5.0의 효소용액에서 보다 pH 7.0에서 열안정성이 높았다. 그러나 Eggiman 등<sup>25)</sup>의 *L. lactis*가 생성하는 aminopeptidase의 특성에 관한 연구에서 pH 5.5에서 보다도 pH 7.0의 효소용액을 열처리시 효소활성이 급격히 저하되었다고 하였다.

이상의 실험에서 *Micrococcus* sp. LL3의 최적배양 온도와 pH는 각각 30°C 및 7.0이었다. 배양중 정지기 초기의 세포에서 aminopeptidase의 효소활성이 가장 높았으며, 본 효소의 열안정성도 높았다. 특히 본 균주의 proteolytic enzyme system에 의해  $\beta$ -casein 뿐만 아니라  $\alpha$ -casein도 완전히 분해되어, Cheddar cheese 제조시 *Micrococcus* sp. LL3의 첨가는 숙성중 casein의 분해를 촉진시킴으로서 치즈 저장기간을 단축시킬 수 있을 것으로 생각된다.

### 감사의 글

본 논문에 사용된 균주와 실험기구를 제공해 주신 미국 University of Wisconsin-Madison, Department of Food Science의 Dr. E. H. Marth 교수께 깊은 감사를 드립니다.

### 참 고 문 현

1. Law, B. A. and Castanon, M. J. and Sharpe, M. E.: *J. Dairy Res.*, 43 : 301(1976)
2. Peterson, S. D. and Marshall, R. T.: *J. Dairy Sci.*, 73 : 1395(1990)
3. Prasad, R., Malik, R. K. and Marthure, D. K.: *Asian J. Dairy Res.*, 3 : 25(1984)
4. Feagan, J. T. and Dawson, D. J.: *Aust. J. Dairy Tech.*, April, 59(1959)
5. Alford, J. A. and Frazier, W. C.: *J. Dairy Sci.*, 33 : 107(1950)
6. Marth, E. H.: *Dairy Sci.*, 46 : 869(1963)
7. Bhowmik, T. and Marth, E. H.: *J. Dairy Sci.*, 73 : 1675(1990)
8. Baribo, L. E. and Foster, E. M.: *J. Dairy Sci.*, 35 : 149(1952)
9. Bhowmik, T. and Marth, E. H.: *J. Dairy Sci.*, 71 : 2358(1988)
10. Ledford, R. A., A. C. O'Sullivan and Nath, K. R.: *J. Dairy Sci.*, 49 : 1098(1966)
11. Moreno, V. and Kosikowski, F. I.: *J. Dairy Sci.*, 56 : 39(1972)
12. Vaidyanathan, A., Pawse, A. W. and Tamhane, D. V.: *Indian J. Dairy Sci.*, 28 : 119(1975)
13. El. Soda, M and Desmazeaud, M. J.: *Can. J. Microbiol.*, 28 : 1181(1982)
14. Lee, S. K., Joo, H. K. and Pek, U. H.: *J. Kor. Agr. Chem. Soc.*, 34 : 327(1991)
15. Husain, I. and McDonald, I. J.: *Can. J. Microbiol.*, 4 : 237(1958)
16. Mills, C. and Campbell, J. N.: *Can. J. Microbiol.*, 20 : 81(1974)
17. McDonald, J.: *Can. J. Microbiol.*, 7 : 111(1961)
18. Desmazeaud, M. and Hermier, J.: *Ann. Biol. Ani. Bioch. Biophys.*, 8 : 419(1968)
19. Nath, K. R. and Ledford, R. A.: *J. Dairy Sci.*, 55 : 1424(1972)
20. Ohmiya, K. and Sato, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 33 : 669(1969)
21. Ezzat, N., El. Soda, M., Desmazeaud, M. J. and Ismail, A.: *Milchwissenschaft*, 37 : 666(1982)
22. El. Soda, M., Bergere, J. and Desmazeaud, M. J.: *J. Dairy Res.*, 45 : 519(1978)
23. El. Soda, M., Said, H., Desmazeaud, M. J., Mashaly, R. and Ismail, A.: *Le Lait*, 63 : 1(1983)
24. Kashket, E. R. and Wong, P. T. S.: *Biochimica ET Biophysica Acta*, 193 : 212(1969)
25. Eggimann, B. and Bachman, M.: *Appl. and Env. Microbiol.*, 40 : 876(1980)

**Effects of cultural conditions on growth of *Micrococcus* sp. and casein hydrolysis : (II)**

**Studies on patterns of casein hydrolysis with time during culture**

Si Kyung Lee, Un Hua Pec and Hyun Kyu Joo\* (Doosan Technical Center, Kyunggido 449-840, Korea, \*Department of Agricultural Chemistry, Kon Kuk University, Seoul 133-701, Korea)

**Abstract :** This study was undertaken to determine the effects of cultural conditions on cell growth and casein hydrolysis for cell production in order to add *Micrococcus* sp. LL3 as a potential agent for industrial application with aim of shortening ripening period and improving flavor. Optimum temperature for cell growth and caseinolysis was 30°C and 37°C, respectively, and optimum pH was 7.0. The enzyme remained stable up to 50°C. Hydrolysis patterns of casein were also observed on SDS-PAGE. Both  $\alpha$ -casein and  $\beta$ -casein were totally hydrolysed by enzymes from *Micrococcus* sp. LL3 during culture. A preferential attack on  $\beta$ -casein was observed. Production of aminopeptidase which cleaved polypeptides was the highest in early stationary phase during cell growth.