

미생물을 이용한 저식염 멸치젓의 속성발효에 관한 연구

1. 젓갈에서 분리한 단백질분해균 및 단백질분해효소의 생화학적 특성

車庸準 · 李應昊*

昌原大學 化學科

Studies on the Processing of Rapid Fermented Anchovy Prepared with Low Salt Contents by Adapted Microorganism

1. Biochemical Characterization of Proteolytic Bacteria and their Extracellular Protease Isolated from Fermented Fish Paste

Yong-Jun CHA and Eung-Ho LEE

Department of Chemistry, Changwon National University,
Changwon 641-240, Korea

In this study, the biochemical characterization of strong proteolytic bacteria and their extracellular protease isolated from fermented fish paste were experimented for the purpose of industrial large scale-production by accelerated fermentation. The results obtained were as follows: Among 4 strains isolated from fermented fish paste, *B. subtilis* p-4 and *B. licheniformis* p-5, which grow well at 40°C, pH 7.0 and 1% of salt contents, were the best proteolytic bacteria and were shown 0.48 hr⁻¹, 0.49 hr⁻¹ of specific growth rate in TPY medium, respectively. Maximum enzyme activity of *B. subtilis* p-4 was 335nmole-Tyr/min.ml after 30 hrs and that of *B. licheniformis* p-5 was 300nmole-Tyr/min.ml after 28 hrs of shaking culture. Purified protease produced by *B. subtilis* p-4 and *B. licheniformis* p-5 showed maximum activity at 50°C, pH 7.0 and molecular weight were estimated to be 18,000, 30,000 by sephadex G-100 gel filtration, respectively. These were supposed to be a kind of metal chelator sensitive neutral protease from the result of high sensitivity against EDTA, o-phenanthroline and metal ions such as Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺.

본 연구는 1987년도 한국과학재단 학술연구비의 지원에 의하여 수행된 연구의 일부입니다.

*부산수산대학 식품공학과

Department of Food Science & Technology, National University of Pusan, Pusan, Korea

서 론

우리나라에서 젓갈은 옛부터 단백질 공급원으로 서 수산발효식품을 대표할 만큼 널리 알려져 왔으나 근래에는 가공식품의 발달로 인하여 영양 공급이 원활함에 따라 우리의 기호에서 점점 멀어져 가고 있으며, 또 장기간의 자연 발효에 의하여 젓갈이 제조됨으로 산업적 활용 가능성도 기피되어 있는 실정이다. 이에 부응하여 본 연구자들은 기존 재래식 젓갈에 비하여 식염농도가 낮은 저식염 젓갈을 멸치를 원료로 단백질분해력이 강한 미생물을 이용하여 속성으로 제조한다면 산업적 대량생산이 가능하며 아울러 식염농도를 인위적으로 조절할 수 있어 풍미 개량 및 성인병예방에 어느 정도 기여할 것으로 기대되어 연구를 착수하게 되었으며 본 보에서는 분리된 단백질분해균 및 그 분해효소의 생화학적 특성에 관하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 선별 및 동정: 단백질분해능이 강한 균주의 분리 방법은 시중 젓갈제조업체에서 담근지 2개월 정도 경과한 멸치젓을 전보(車 등, 1988)와 같은 방법으로 처리하여 우량 단백질분해균을 선별하였다. 또한 균동정 실험 및 분류도 전보(車 등, 1988)와 같은 방법으로 하였다.

균주의 배양적 특성 실험과 조효소의 추출 및 정제: 각 온도, pH 및 식염농도별에 따라 TPY broth(tryptone 0.5%, peptone 0.5%, yeast extract 0.3%)에 균을 접종시켜 24시간 진탕배양한 후 균의 농도 및 효소활성을 측정하였다. 이렇게 해서 구명된 최적조건에서 진탕배양(TPY broth, pH 7.0, 40℃, 45 strokes/min) 하면서 효소생산 최적시간을 조사하였고, 이 최적조건에서의 배양액을 전보(車 등, 1988)와 같은 방법으로 조효소액을 추출 및 정제하였으며, 최고활성의 50% 이상을 나타내는 희분을 모아 농축시킨 다음 효소특성 실험용 시료로 하였다.

효소특성 실험 및 분자량 측정: 단백질분해효소 활성 및 단백질 농도는 전보(車 등, 1988)와 같은 방법으로 하였다. 그리고 효소특성 실험으로서 활성 최적 pH, 온도, 금속이온과 효소저해제에 의한 영향 등을 조사하였으며, 분자량측정은 Andrews (1964)법으로, 아미노질소는 동염법(Spies and Chamber, 1951)으로 측정하였다.

결과 및 고찰

단백질분해력이 강한 미생물의 선별 및 동정: 담근지 2개월 정도 된 시중 멸치젓을 시료로 skim milk 배지상에 접종하여, 이중 단백질분해 양성이며 HC ratio(colony 크기에 대한 투명환 크기의 비) 3.0 이상인 균주들을 분리하여 각각 독립 배지상에서 증식시킨 다음 냄새가 양호한 것을 선택한 결과 4종이 우수하였으며 이는 모두 간균으로서 gram양성균이 3종, gram음성균이 1종으로 판명되었는데 이들의 생화학적 특성은 Table 1과 같다. p-1 균은 포자생성과 운동성이 있고 포도당을 산화 및 발효시키며 oxidase, catalase 양성, citrate를 이용하며 10% 식염에서도 잘자라는 점으로 보아 *Bacillus pumilus* 유사균(이하 *B. pumilus* p-1)으로 추정되었으며, p-4 균은 p-1 균과 유사하나 nitrate 환원력, 전분가수분해능 및 식염내성이 강한 것으로 보아 *Bacillus subtilis* 균(*B. subtilis* p-4)으로 추정되었다. 그리고 p-5 균은 p-4 균과 유사하나 Hugh-Leifson 배지에서 당을 발효시키지 못하는 점으로 보아 *Bacillus licheniformis* 균(*B. licheniformis* p-5)으로 추정하였다. p-3 균은 gram음성, 간균으로 운동성이 없고 nitrate 음성, Hugh-Leifson 배지에서 당을 발효 및 산화하지 않고 식염내성이 있는 것으로 보아 *Moraxella atlantae* 유사균(*M. atlantae* p-3)으로 추정되었다.

단백질 분해균의 배양적특성 및 효소생산: 기질(멸치젓)에 대한 분리균의 적응 정도를 알기 위하여 우선 선별된 균주를 각각 TPY 배지에서 증균하여 20 ml씩 조제한 멸치젓에 접종한 다음 속성 발효시킬 때 배양시간에 따른 아미노질소 함량을 측정한 결과 Table 2와 같이 생멸치에서 40.3 mg/100g이던 것이 배양 12시간 후에 대조구의 경우 143.6 mg/100g으로서 어육자체의 자가산화효소에 의한 효과를 무시할 수는 없었으나, *B. subtilis* p-4 또는 *B. licheniformis* p-5 배양액을 첨가한 경우는 각각 215.5 mg/100g, 208.0 mg/100g으로서 대조구에 비해 70 mg/100g 정도가 많아 단백질분해균의 첨가 효과를 확실히 알 수 있었다. 그리고 *B. pumilus* p-1 (163.9 mg/100g) 및 *M. atlantae* p-3 (173.1 mg/100g)의 경우는 배양기간 동안 대조구와 비교하여 볼 때 아미노질소 함량에는 큰 차이가 없었다. 이러한 결과는 skim milk 배지상에서 비록 HC ratio가 높다 하더라도, 어육을 기질로 하여 분해시킬 때는 미생물의 종류에 따라 선택성이 큰 것을 알 수 있었다. Ok et al.(1982)도 어장유에서 분리한 호염성균 중에서 protease 활성이 강한 균은 *Bacil-*

Table 1. Characteristics of the proteolytic strains isolated from commercial fermented anchovy

Test items	Strains				Test items	Strains			
	p-1	p-3	p-4	p-5		p-1	p-3	p-4	p-5
Cell morphology	rod	rod	rod	rod	Tween 80 hydrolysis	+	+	+	+
Gram reaction	+	-	+	+	Utilization of				
Spore formation	+	+	+	+	citrate	+	-	+	+
Motility	+	-	+	+	glucose	+	-	+	+
Indole	-	-	-	-	arabinose	+	+	+	+
V-P test	+	±	±	+	xylose	+	+	+	+
Methyl red	-	-	-	-	mannitol	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	+	+	Gas from glucose	-	-	-	-
Oxidase test	+	+	+	+	Salt tolerance at 30°C				
Catalase test	+	+	+	+	10%	+	+	++	+
Hugh-Leifson(glucose)					pH range for growth				
fermentative	+	-	+	-	5.0	+	+	+	+
oxidative	+	-	+	+	9.0	+	+	+	+
Casein hydrolysis	+	+	+	+	HC ratio*	3.0	3.0	3.5	3.8
Starch hydrolysis	-	+	+	+					

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

Table 2. Amino-nitrogen contents of rapid fermented anchovy with proteolytic strains isolated from commercial fermented anchovy* (mg/100g)

	Incubation time(hrs)		
	3	8	12
Control	72.7	115.6	143.6
p-1	102.4	128.8	163.9
p-3	82.1	128.8	173.1
p-4	88.6	171.0	215.5
p-5	89.7	144.3	208.0

* Amino-nitrogen content of raw fish is 40.3 mg/100 g

속이라고 하였으며, 劉(1977)도 해삼내장젓에서 분리한 미생물 중 *Bacillus*속이 식염농도 1~7% 정도에서 protease활성이 가장 높았다고 하였다. 따라서 *B. subtilis* p-4 및 *B. licheniformis* p-5 균을 선정하여 배양적 특성을 조사하였다. 예비실험에서 TPY 배지의 pH를 달리하면서 균의 증식 및 효소활성을 측정한 결과 두 균주 모두 pH 7.0, 40°C에서 가장 양호하였다. 또 p-4 균의 경우는 식염 1~10% 범위에서 잘 자랐고 특히 3%에서 가장 양호하였으나, 효소활성은 식염 1% 부근에서 좋았으며, p-5 균의 경우는 식염 1% 부근에서 균증식 및 효소활성이 양호하였다. 본 실험에서는 미생물의 효소를

이용한 속성발효가 목적이므로 효소활성이 양호한 조건에서 진탕배양한 결과는 각각 Fig. 1과 Fig. 2와 같다. 두 균주 모두 증식 초기에 약간의 pH 감소가 있었으나 효소활성이 증가함에 따라 pH는 7.0 부근으로 도달하였다. 이때 p-4 균은 비증식속도가 0.48/hr, p-5 균은 0.49/hr으로서 최대 증식요구시간은 모두 12시간이었으며, 최대 효소활성농도는 p-4 및 p-5 균 각각 335nmole-Tyr/min.ml, 300nmole-Tyr/min.ml로 이때 요구되는 시간은 각각 30시간과 28시간이었다.

효소의 정제: *B. subtilis* p-4 및 *B. licheniformis* p-5 균체의 protease를 정제하기 위하여 sephadex G-100으로 충전한 칼럼에서 젤여과를 실시한 결과는 Fig. 3과 4와 같다. 효소활성이 나타난 희분 중 최대활성의 50% 이상을 나타내는 효소액을 취하여 농축한 후 효소특성 실험용 시료로 하였으며, 일부는 동일 조건으로 재 column chromatography를 행한 결과 단일 피크를 확인하였다. 이때의 효소정제과정을 보면 Table 3과 같다. 정제도는 조효소액의 비활성을 1로 보았을 때 p-4 및 p-5 균 효소정제도는 각각 25.4배 및 8.6배 증가하였다.

정제효소의 특이성: *B. subtilis* p-4 및 *B. licheniformis* p-5 균의 protease는 Fig. 5, 6에서 처럼 모두 pH 7.0 및 50°C에서 활성이 가장 높았으며 30~45°C 범위에서도 p-4 균 protease는 최대활성의 70~80%, p-5 균 protease는 80~90%의 잔존율을 보였다.

그리고 금속이온 및 화학약제에 대한 특이성을 보면 Table 4와 같이 p-4 균 protease는 Fe^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Na^{+} , K^{+} 이온에 의해 효소활성이 오히려 증가되었으며 Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} 이온에 의해서는 저해되었다. p-5 균 protease는 Fe^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , K^{+} 이온에 의해 활성이 증가되었고 Ni^{2+} , Cu^{2+} 이온에 의해 저해되었다. 그리고 두 균주의 protease는 EDTA 및 o-phenanthroline 1 mM 농도에 의해 강하게 저해받았는데, Morihara(1974)의 보고, Yasunobu와 McConn(1970)의 보고와 비교하여 볼 때, 본 실험에서의 두 protease는 metal che-

lator sensitive neutral protease에 속하는 것으로 추정되었다. 다음으로 표준단백질인 bovine serine albumin(M. W. 66,000), carbonic anhydrase(M. W. 29,000), horse heart cytochrome C(M. W. 12,400)를 이용하여 sephadex-G 100 겔여과에서 분리위치를 비교한 결과 Fig. 7에서와 같이 p-4, p-5 균 protease의 분자량은 각각 18,000, 30,000으로 추정되었다. 이는 張 등(1986)과 車 등(1988)이 보고한 어패류와 젓갈에서 분리된 단백질분해균의 metal chelator sensitive neutral protease의 분자량과 비교하여보면 거의 비슷한 결과를 보였다.

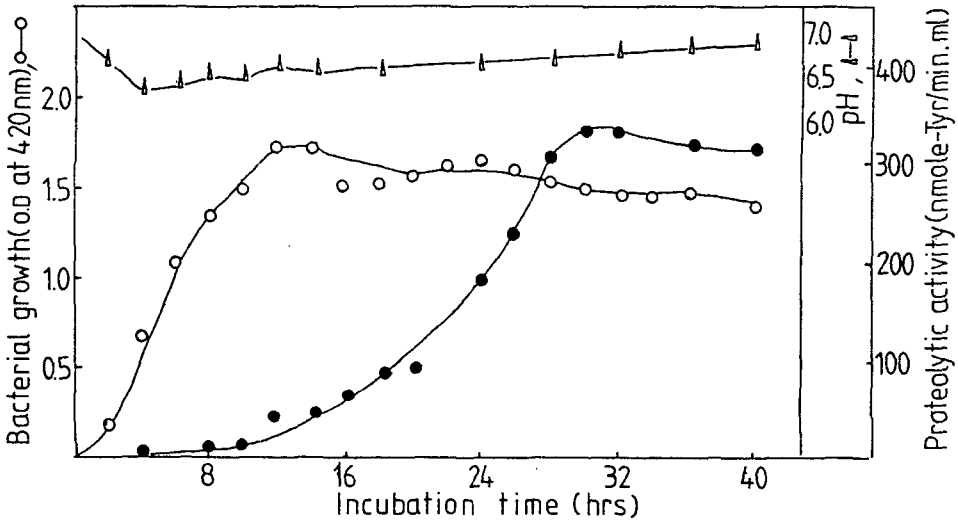


Fig. 1. Changes of bacterial growth, pH and proteolytic activity of produced crude enzyme by *B. subtilis* p-4 during the shaking culture at 40°C in TPY broth(pH 7.0).

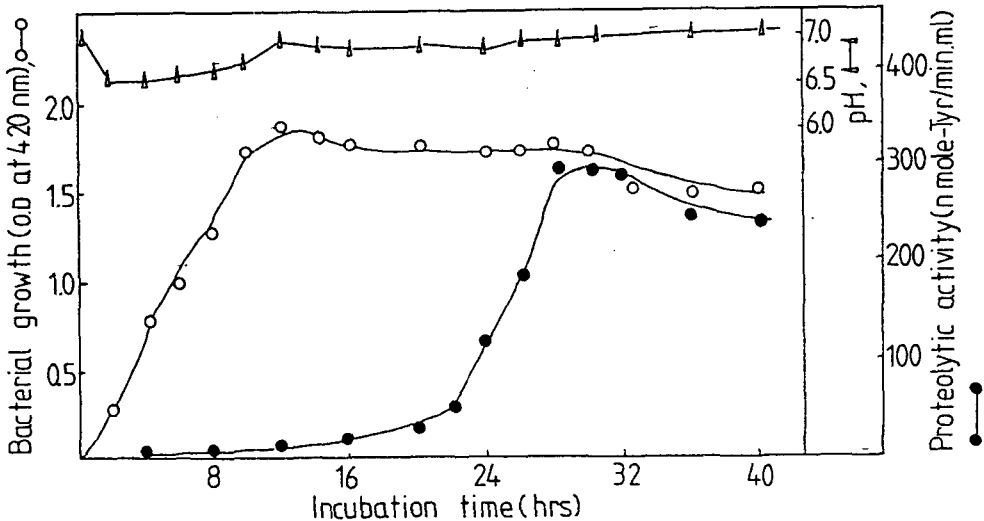


Fig. 2. Changes of bacterial growth, pH and proteolytic activity of produced crude enzyme by *B. licheniformis* p-5 during the shaking culture at 40°C in TPY broth(pH 7.0).

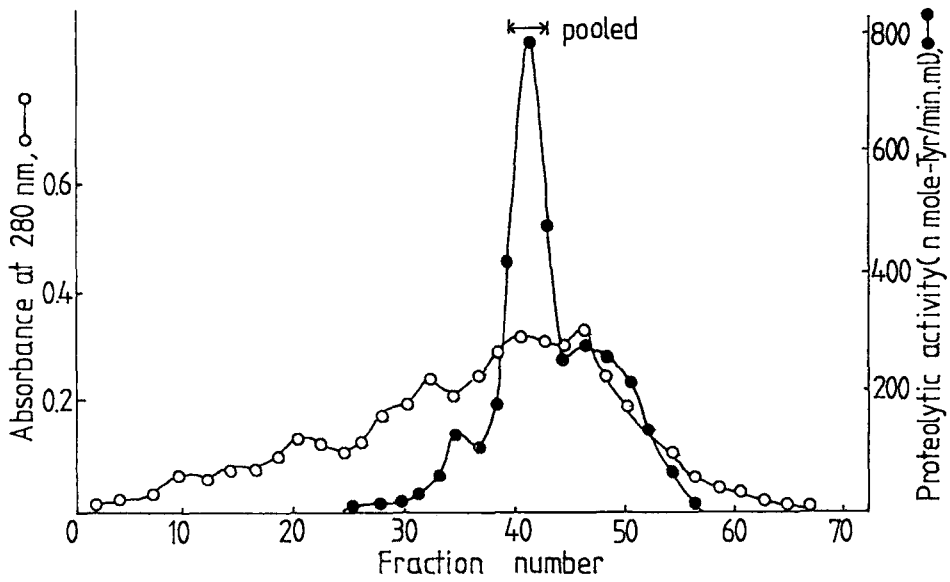


Fig. 3. Gel filtration of protease produced by *B. subtilis* p-4 on sephadex G-100 column(0.01M phosphate buffer, pH 7.0, mixed 0.1M NaCl).

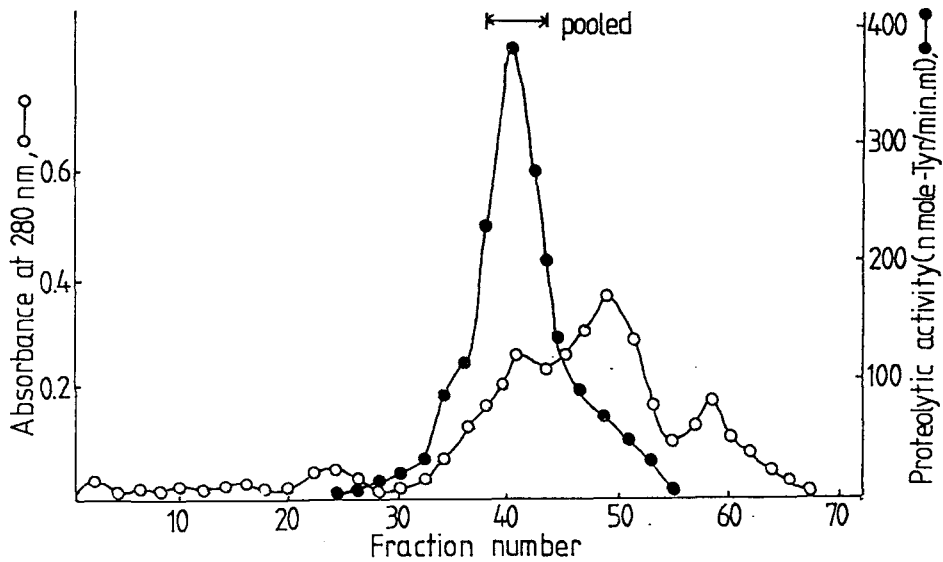


Fig. 4. Gel filtration of protease produced by *B. licheniformis* p-5 on sephadex G-100 column(0.01M phosphate buffer, pH 7.0, mixed 0.1M NaCl).

Table 3. Purification of the protease produced by *B. subtilis* p-4 and *B. licheniformis* p-5

Purification step	Enz.	Total ¹⁾ activity	Protein ²⁾	Specific ³⁾ activity	Yield (%)	Purified fold
Culture	p-4	108.45	1.12	0.22	100	1
filtrate	p-5	101.25	1.09	0.21	100	1
Ammonium sulfate precipitation	p-4	61.14	2.31	2.65	56.3	12.3
	p-5	60.20	2.22	3.01	59.4	14.6
Sephadex G-100 column chromatography, pooled sample	p-4	19.71	0.12	5.48	18.1	25.4
	p-5	21.56	0.27	1.77	21.3	8.6

¹⁾ Total activity (μ mole-Tyr.eq/min) = protein x pooled volume x specific activity

²⁾ Protein (mg/ml) was calculated with standard curve of bovine albumin (values at 660 nm \times regression equation)

³⁾ Specific activity (μ mole-Tyr.eq/min.mg-protein); proteolytic activity/concentration of protein

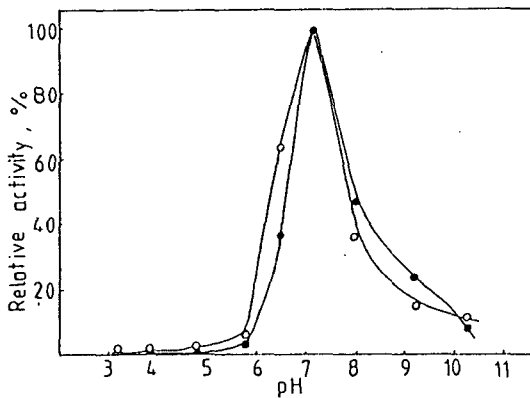


Fig. 5. Effect of pH on the activity of protease produced by *B. subtilis* p-4 (○—○) and *B. licheniformis* p-5 (●—●).

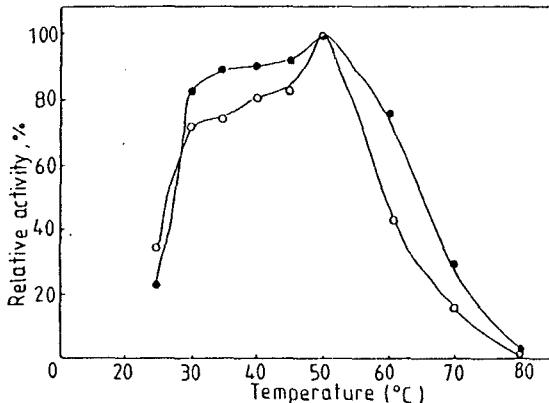


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of protease produced by *B. subtilis* p-4 (○—○) and *B. licheniformis* p-5 (●—●).

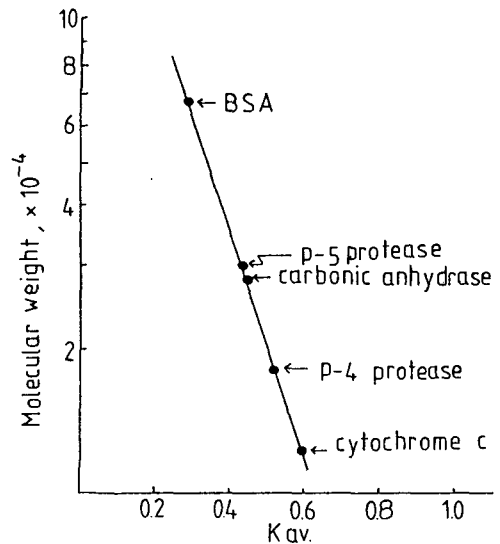


Fig. 7. Estimation of molecular weight of the protease produced by *B. subtilis* p-4 and *B. licheniformis* p-5 with sephadex G-100 gel filtration. Kav.; volume of protein flow/ volume of tracking dye flow

요 약

산업적으로 속성젓갈을 대량 생산하기 위하여, 우선 시중 젓갈에서 단백질분해력이 강한 균주 4종을 분리하여 속성 분해정도와 분해 생성물의 풍미를 비교 검토한 결과 *B. subtilis* p-4 및 *B. licheniformis* p-5 균이 가장 양호하였으며, 이들 균주와 그

Table 4. Effect of metal ions and chemicals on the activity of protease produced *B. subtilis* p-4(p-4) and *B. licheniformis* p-5(p-5)

	Concentration	Relative activity(%)***			Concentration	Relative activity(%)	
		p-4	p-5			p-4	p-5
Control		100	100	Control		100	100
FeCl ₂	1 mM	112	103	EDTA-2Na	1 mM	24	17
CoCl ₂	1 mM	117	93	o-phenanthroline	1 mM	2	0
CaCl ₂	1 mM	111	101	2-mercaptoethanol	1 mM	96	114
MgCl ₂	1 mM	110	99	SLS*	1 mM	91	81
BaCl ₂	1 mM	108	109	DTNB**	1 mM	113	111
NaCl	1 mM	107	91	Ethanol	0.1 M	117	100
KCl	1 mM	107	101	Lactic acid	0.1 M	77	100
AgNO ₃	1 mM	76	80				
NiCl ₂	1 mM	58	67				
ZnCl ₂	1 mM	54	93				
CuSO ₄	1 mM	48	56				

* SLS: Sodium Lauryl Sulfate ** DTNB: 5, 5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

*** Regarding as proteolytic activity of control was 100%, expressed that of a sample added metal ions and chemicals, respectively

protease의 특성은 다음과 같다. pH 7.0, 40℃, 식염 1% 농도에서 균체 및 조효소 활성이 가장 양호하였으며, 이때의 비증식속도는 p-4 균 및 p-5 균이 각각 0.48/hr, 0.49/hr이었고, 최대 효소활성 농도는 p-4는 30시간 후 335nmole-Tyr/min.ml, p-5는 28시간 후 300nmole-Tyr/min.ml이었다. 그리고 sephadex G-100 겔여과에 의한 효소 정제도는 조효소에 비해 비활성이 p-4 및 p-5 균 protease의 경우 각각 25.4배, 8.6배씩 증가하였으며, pH 7.0, 50℃에서 활성이 가장 높았다. 또한 겔여과에 의한 분자량은 p-4가 18,000, p-5 protease가 30,000이었고, 저해제의 효과에서는 두 protease 모두 Ni²⁺, Cu²⁺ 이온과 EDTA, o-phenanthroline에 의해 강하게 활성이 소실되는 것으로 보아 metal chelator sensitive neutral protease에 속하는 것으로 추정되었다.

문 헌

- Andrews, P. 1964. Estimation of the molecular weight of proteins by sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91, 222~233.
- Moriyama, 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* 29(10), 618~622.
- Spies, T. R. and D. C. Chamber. 1951. Spectrophotometric analysis of amino acid and peptides with their copper salt. *J. Biol. Chem.* 191, 787~797.
- Yasunobu, K. T. and J. McConn. 1970. *Methods in Enzymology*. Vol. 19, 569~575.
- 劉太鍾. 1977. 해삼내장젓에 관한 연구. *고려대 농림논집* 15, 209~221.
- 張東錫, 卞在亨, 金亨洛, 趙鶴來. 1986. 어패류중에 분포하는 단백질분해효소의 분리 및 정제에 관한 연구. *부산수대연보* 26(1,2), 123~139.
- 車庸準, 李應昊, 李燭熙, 張東錫. 1988. 저식염멸치 젓에서 분리한 단백질분해력이 강한 세균 및 생산된 단백질분해효소의 특성. *한수지* 21(2), 71~79.

1989년 11월 15일 접수
1989년 12월 19일 수리