

사료폐수를 이용한 Alkaline Protease 생산균의 동정 및 효소생산 조건*

申錫雨 · 丁奎珍 · 金星祐 · 朴勝熙
麗水水産大學 食品工學科

Identification of the Protease Producing Bacteria to Use Fish Meal Wastewater and the Producing Conditions for the Enzyme

Suk-Woo SHIN, Kyoo-Jin JUNG, Seong-Woo KIM, and Seung-Hee PARK*

Department of Food Science and Teachnology, National Fisheries University of Yeosu, Kuk dong Yeosu, 195 Korea

This experiment was conducted to utilize the water soluble protein from the fish meal in wastewater as nitrogen source by alkaline protease producing bacteria and to investigate the culture condition of the production. G-12 and G-14 strains having the strong activity of the alkaline protease were isolated from sea water. These strains were identified as *Pseudomonas chlororaphis* and *Pseudomonas alcaligenes* according to physiological characteristics, respectively.

In enzyme production, galactose and casein for G-12 strain, and raffinose and the water soluble protein of the fish meal wastewater for G-14 strain was favorable as carbon and nitrogen source. An action of inhibition appeared in all of the metal salts used.

The optimal temperature of enzyme production was 30°C for all strains. Optimal initial pH for the enzyme formation in G-12 and G-14 strains was pH 10.0 and 8.0. When these two strains were incubated for 30~35 hours in the optimal production medium, the enzyme production reached at maximum.

緒 論

麗水周邊 海域은 南海岸의 水産業 要衝地帶로서 水産物의 漁獲 및 그 加工에 있어 重要한 一翼을 차지하고 있다.

특히 最近 五川團地를 中心으로 한 麗水, 麗川地 域內에 水産物을 利用한 家畜 및 養魚用 大單位 飼料工場이 자리잡고 있어 이들 工場으로 부터 1日 約 250~300톤의 水溶性 蛋白質이 流出되고 있기

때문에 廢水處理에 莫大한 經費가 所要되고 있는 實情이다.

이와 같은 廢水는 微生物 生育에 利用할 수 있는 水溶性 蛋白質로서 高濃度의 菌體를 얻을 수 있어, 食糧으로 利用possible한 SCP 生産은 물론 Fish Soluble 製造, 食肉의 軟化劑, 酒類 및 과일주스의 混濁 防止劑, 消化劑等에 利用되는 protease는 그 用途가 多樣해 産業的 價値가 높다. (Underkofler, 1976)

Protease는 活性과 機能面에서 serine protease,

*이 연구는 1988년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 수행되었음.

cysteine protease, metallic protease 및 aspartic protease로 나누고 (Chung, 1984), 작용 pH에 따라酸性, 中性, 알칼리성 protease로 나뉘어진다(Lee and Chung, 1980), 이 가운데서 알칼리성 protease는 洗劑(Aunstrup, 1978; 1980), leather tanning(Cowan, 1983), 抗生物質과 함께 火傷과 傷處의 治療劑(Christie, 1980), 濃縮魚類蛋白質의 呈味增進劑(Noguchi et al., 1975), 및 쓴맛 除去劑(Umetsu and Ichishima, 1985), 細菌細胞의 溶解에 利用되는 lytic proteinase(Nakagawa et al., 1985) 등에 利用되고 있다.

微生物을 利用한 이들 protease 生産에 있어서 nitrogen source로 peptone, casein, soybean meal, yeast extract, beef extract 등의 多樣한 有機物과 (NH₄)₂SO₄, NaNO₃, NH₄NO₃, NH₄Cl, (NH₄)₂HPO₄, KNO₃ 등의 無機物을 使用하여 酵素生産條件을 實驗한 例(Chung, 1984; Lee and Chung, 1980; Nam and Seu, 1987)는 많으나 fish meal廢水を 질소원 으로 利用한 實驗報告는 그렇게 많지 않다.

따라서 菌體收率이 높고 蛋白質 分解力이 강한 菌株를 分離하여 魚類飼料工場廢水を 窒素原으로 한 酵素의 生産條件을 檢討해서 産業에 應用하고자 本 實驗을 行해 몇가지 結果를 얻었으므로 여기에 報告한다.

材料 및 方法

1. Protease活性 菌株의 分離

Protease活性이 강한 菌株를 分離하기 위해 潮水, 海水, 下水, 廢水等 水界의 微生物을 菌原試料로 하여 三段稀釋法에 의해 標準寒天平板培地에서 分

離된 菌을 增菌하여 Table 1의 基礎培地(李, 1985)에 接種, 30℃에서 3~6日間 培養해서 clear zone을 크게 형성한 菌體를 一次 選別하였다.

2. 選別菌의 同定

菌原試料에서 分離한 49菌株 中 protease活性이 강한 두 菌株(G-14菌株는 飼料廢水を 窒素原으로, G-12菌株는 casein을 窒素原으로 하여 酵素活性이 강한 菌株)에 對해 菌 同定을 行했다.

菌株들의 運動性, oxidase, catalase 試驗, 炭水化合物 分解能, 色素生産能 등의 諸 試驗은 堀江 등 (1972)의 方法에 준했고 同定은 Shewan(1971)과 Bergy's manual of systematic bacteriology (Krieg and Holt, 1984)의 方法을 기준으로 하여 分類同定 했다.

3. 粗酵素液의 調製

100ml Erlenmeyer flask에 기초배지 40ml을 넣어 121℃, 15分間 滅菌한 後 選別된 菌을 1白金耳 接種해서 30℃, 48시간 진탕배양(80 rev/min)한 것을 2℃ 10,000rpm에서 20分間 遠心分離하여 그 上清液을 粗酵素液으로 하였다. 但 粗酵素液의 調製溫度 範圍는 30~35℃였으나 酵素生産에 차이가 없었으므로 本 實驗에서는 酵素生産을 위한 溫度를 30℃로 했다.

4. 酵素活性 測定

Protease活性은 Hammarsten casein을 基質로 하여 Anson-Ogihara改良法(江上, 1977)에 따라 Fig. 1에 나타낸 바와같이 酵素活性을 測定하였다.

酵素活性 單位는 上記 條件下에서 1分 동안에

Table 1. Isolation and production medium

Strain	G-12		G-14	
Isolation-medium			Glucose	2.0 %
			Casein	0.5 %
			K ₂ HPO ₄	0.1 %
			MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 %
			NaCl	3.0 %
			pH	7.0
Production-medium	Galactose	1.0 %	Raffinose	3.5 %
	Casein	1.0 %	Water soluble protein from the fish meal waste-water	1.5 %
	K ₂ HPO ₄	0.1 %	K ₂ HPO ₄ 0.1 %	
	NaCl	3.0 %	NaCl	3.0 %
	pH	10.0	pH	8.0

酵素基質反應液 1ml로 부터 유리되는 tyrosine 1 μ g에 상당하는 吸光度를 나타내는 酵素量을 1 unit로 하였다.

Addition	Sample	Control
Buffer solution	0.4ml	0.4ml
2% Casein solution	0.5ml	0.5ml
Preincubation at 30 $^{\circ}$ C for 5 min.		
Enzyme solution	0.1ml	—
Incubation at 30 $^{\circ}$ C for 20 min.		
0.44M T.C.A solution	1.0ml	1.0ml
Enzyme solution	—	0.1ml
Stabilization at 30 $^{\circ}$ C for 30 min.		
Filtration		
Filtrate	1.0ml	1.0ml
0.55M Na ₂ CO ₃ solution	2.5ml	2.5ml
Folin reagent(\times 3)	0.5ml	0.5ml
Coloration at 30 $^{\circ}$ C for 30 min.		
Measured optical density at 660nm		

Fig. 1. Assay of enzyme activity

5. 酵素的 生産條件

酵素生産에 미치는 各種 成分의 影響을 調査키 위해 炭素原(2%), 窒素原(0.5%), 無機鹽(0.1%)을 基礎培地에 添加하여 酵素活性의 變化를 測定하고 各各의 至適原에 따른 濃度別 酵素生産能을 檢討하는 한편 酵素生産을 위한 最適 pH, 溫度, 培養時間等を 調査하였다.

蛋白質原으로서 使用한 廢水는 Table 2와 같은 特性을 가진 正어리飼料廢水의 乾燥重量으로 測定해서 基礎培地에 濃度別로 添加해서 實驗했다.

Table 2. Analytical values of sardine wastewater for the fish meal

Assay	Analytical values (ppm)
NH ₄ -N	32.0
NO ₂ -N	13.0
NO ₃ -N	5.1
Protein	15,200
Fat	218
Reducing sugar (glucose)	85

6. 生菌數測定

酵素生産培地를 利用하여 試驗菌을 接種 30 $^{\circ}$ C, 80 rev/min으로 진탕배양한 것을 段階稀釋해서 5時間 間隔으로 3% 食鹽을 加한 標準寒天平板培地에 接種 30 $^{\circ}$ C에서 3日間 培養하여 測定했다.

結果 및 考察

1. Protease活性菌의 分離 및 同定

試料의 protease活性菌으로 海水에서 14菌株을 分離하여 二次選別에 依해 分離菌 가운데서 protease活性이 強한 G-12, G-14 두 菌株을 選別했다. 選別菌에 對한 生化學的 性狀은 Table 3과 같다.

Table 3. Characteristics of tested strains

Factor	Characteristics	
	G-12	G-14
Gram-stain	Negative	Negative
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Carbohydrate metabolism	Oxidative	Oxidative
Gas production	—	—
Motility	+	+
Optimal pH for growth	10.0	8.0
Optimal temp. for growth	30 $^{\circ}$ C	35 $^{\circ}$ C
NaCl tolerance	10.0%	7.0%
Carbon sources growth;		
D-glucose	+	—
D-xylose	—	±
D-galactose	++	++
D-fructose	+	—
L-arabinose	—	—
D-mannitol	++	+
Sucrose	++	+
Lactose	—	—

G-12, G-14菌株 모두 運動性이 있고 oxidase와 catalase試驗 陽性이며 炭水化合物을 酸酵酵하는 gram陰性 桿菌으로 Shewan의 分類方法(Shewan, 1972)에 따라 *Pseudomonas sp.*로 同定되었다. 두 菌의 差異點으로 最適 pH가 G-12, G-14菌株 各各 pH 10.0, pH 8.0이었고 食鹽에 對한 耐性은 G-12菌株에 있어서 10.0%, G-14菌株에 있어서 7.0%였다.

炭水化合物 分解能은 G-12菌株에서 glucose, xylose, lactose, arabinose, fructose, sucrose, starch에서 + - - - + + - 로 *Pseudomonas chlororaphis*(G-12), G-14菌株는 glucose, fructose, galactose, xylose, mannitol, arabinose에서 - - + - + - 로 *Pseudomonas alcaligenes*(G-14)로 同定되었다.

2. 分離菌의 酵素生産條件

1) 窒素原의 影響

基礎培地에 0.5%의 無機 및 有機窒素化合物을 添加하여 30℃에서 2日間 진탕배양(80 rev/min)한 實驗結果는 Table 4와 같다.

G-12菌株의 protease活性은 casein이 141%, 廢水에서 114%로 窒素原으로서 casein이 優秀함을 알 수 있었고, G-14菌株에서는 casein에서는 전혀 活性이 없었으나 albumin과 廢水에서 各各 114%, 185%로 廢水가 窒素原으로 適合한 것으로 나타났

으며 培地에 添加한 大部分의 有機窒素原이 두 菌株의 酵素生産을 阻害하였다. 特히 G-14菌株에서는 有機窒素原이 無機窒素原보다 현저하게 阻害하는 傾向을 보여 주었고, 두 菌株 모두 窒素原으로 飼料廢水에서 좋은 活性을 나타낸 것은 酵素의 生産 原價를 節減키 위해 注目할만한 價値가 있는 것으로 생각된다.

이상의 實驗結果에 따라 G-12菌株는 窒素原으로 效果가 높은 casein에 對해, G-14菌株는 廢水を 窒素原으로서 濃度別 酵素活性을 測定한 結果는 Fig. 2와 같다.

G-12菌株에서는 casein濃度 0.7~1.0%였고, G-14菌株는 廢水 1.5%일 때 가장 우수하였다.

이와 같은 현상은 田島 등(1984)이 *Aeromonas salmonicida* Ar-4를 利用한 protease 生産에 있어서 窒素原에 對한 基質特異性에 對해 檢討한 結果에 따르면 casein, gluten, albumin등 大部分의 有機窒素原에서 分離活性을 가지고 있다는 報告와는 相異한 것으로 G-12, G-14菌株 모두 窒素原에 對해 選擇性이 높은 것으로 나타났다.

2) 炭素原의 影響

炭素原이 酵素生産에 미치는 影響을 調査하기 위해 各種 炭素原을 基礎培地에 2% 되게 添加하여 酵素活性을 測定한 結果는 Table 5와 같다.

Table 4. Effect of nitrogen sources on enzyme production

	G-12		G-14	
	Relative activity(%)	pH(final)	Relative activity(%)	pH(final)
None	100	6.9	100	6.9
Peptone	27	8.6	20	8.5
Casein	141	6.1	0	6.8
Yeast-ext.	41	8.8	24	7.0
Malt-ext.	82	6.6	2	6.8
Beef-ext.	0	8.5	7	8.3
L-asparagine	23	6.7	0	8.9
Urea	70	7.5	48	7.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	82	6.9	80	6.7
NH ₄ Cl	23	6.5	77	6.6
NH ₄ NO ₃	30	6.6	82	6.6
KNO ₃	91	6.8	0	6.8
Albumin	22	6.9	114	6.7
NaNO ₃	71	6.8	12	6.8
Water soluble protein from the fish meal wastewater	114	7.1	185	7.0

Basal medium

G-12, G-14; Glucose 2.0%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, NaCl 3.0%, pH 7.0

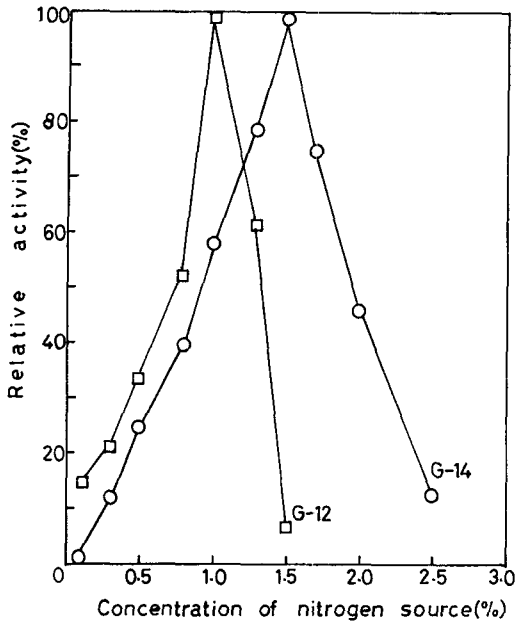


Fig. 2. Effect of nitrogen source concentration on enzyme production

*Nitrogen source G-12; Casein

G-14; Water soluble protein of the fish meal waste-water

Basal medium

G-12, G-14; Glucose 2.0%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 3.0%, pH 7.0

Table에서 보는 바와 같이 G-12菌株에서는 炭素原으로서 galactose에서 活性을 나타냈을 뿐 使用한 炭素原 모두 酵素生産을 阻害하여 炭素原에 對한 基質選擇性이 다른 微生物의 protease生産菌에 比해 대단히 높은 것을 알 수 있었고 G-14菌株에서는 raffinose에서 가장 높은 酵素活性을 보였으며 다음으로 xylose, sucrose, rhamnose의 순서였다. 다만 本 實驗에서 이들 菌株들의 炭素原 利用에 Table 3과 相異한 점이 나타났으나 生育과는 다르게 酵素生産에 있어서 炭素原에 따라 酵素生産阻害 또는 活性劑로 利用한 것이 아닌가 생각된다.

이상에서와 같이 G-12菌株에서는 galactose, G-14菌株에서는 raffinose를 酵素生産을 위한 炭素原으로 利用하여 이들에 對한 最適濃度別로 實驗한 結果는 Fig. 3과 같다.

G-12菌株에서 酵素生産을 위한 가장 좋은 galactose의 濃度는 1.0% 였고, G-14菌株에서는 raffinose 3.0~3.5% 였다.

炭素原에 있어서 G-12菌株는 galactose를 利用한 酵素活性이 108%로 거의 영향이 없었으나 G-14菌

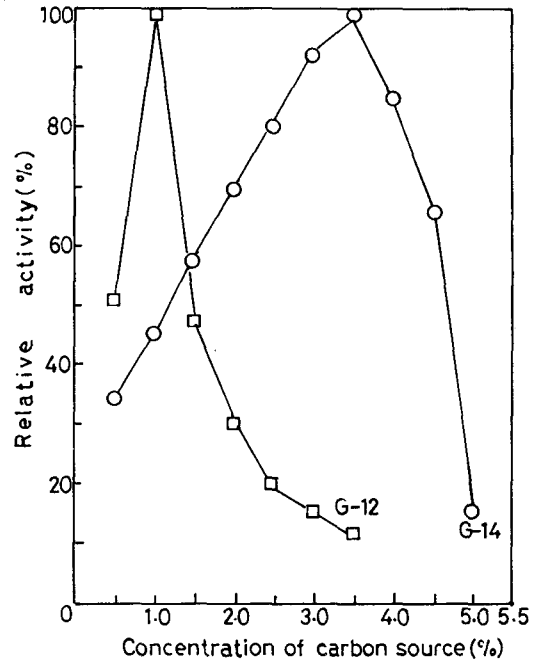


Fig. 3. Effect of carbon source concentration on enzyme production

*Carbon source G-12; Galactose

G-14; Raffinose

Basal medium

G-12; Casein 1.0, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 3.0%, pH 7.0

G-12; Water soluble protein of the fish meal waste-water 1.5%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 3.0%, pH 7.0

株는 raffinose에서 174%로 同一 *Pseudomonas*原으로 炭素原에 顯저히 差異가 있었다.

Kanai와 Wakabayashi(1984)는 *Aeromonas hydrophila*를, Chang과 Lee(1989)는 *Streptococcus cremoris* ML4 및 *Streptococcus lactis* ML8을 利用한 protease生産에 炭素原을 除外한 窒素原만의 protease生産에서 좋은 結果를 보인 것과 G-12菌株와는 相 異한 것으로 생각된다.

2) 金屬鹽의 影響

基礎培地에 各種 金屬鹽을 1mM되게 添加하여 30℃에서 2日間 培養한 後 酵素活性을 測定한 結果는 Table 6과 같다.

使用한 金屬鹽 모두가 G-12菌株와 G-14菌株의 酵素生産을 阻害하였고 특히 G-12菌株에서는 $BaCl_2$, $Pb(NO_3)_2$, $HgCl_2$ 에서, G-14菌株에서는 $CoCl_2$, $CaCl_2$, $BaCl_2$, $AgNO_3$ 에서 酵素活性을 強하게 阻害하였다.

Table 5. Effect of carbon sources on enzyme production

Carbon-sources	G-12		G-14	
	Relative activity(%)	pH(final)	Relative activity(%)	pH(final)
None	100	7.8	100	7.5
D-glucose	68	6.7	28	6.3
D-galactose	108	7.1	0	6.7
D-fructose	0	6.7	0	6.7
D-mannose	98	7.1	3	6.7
D-xylose	0	6.6	159	7.2
L-arabinose	41	7.1	71	7.3
L-rhamnose	0	6.7	106	7.5
D-mannitol	13	6.4	0	6.7
Sucrose	23	6.7	141	6.9
Maltose	0	6.6	43	6.7
Lactose	0	6.6	0	6.7
Raffinose	22	6.7	174	7.1
Soluble starch	0	6.7	0	6.8
Inulin	4	6.7	0	6.8
α -cellulose	0	6.6	19	6.9

Basal medium

G-12; Casein 1.0%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 3.0%, pH 7.0

G-14; Water soluble protein from the fish meal waste-water 1.5%, K_2HPO_4 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 3.0%, pH 7.0

Table 6. Effect of metal salts on enzyme production

Metalsalt	G-12		G-14	
	Relative activity(%)	pH(final)	Relative activity(%)	pH(final)
None	100	7.1	100	7.2
$MgSO_4$	13	6.9	16	7.3
$CoCl_2$	11	6.9	1	8.0
$CaCl_2$	79	6.9	0	6.2
$BaCl_2$	0	6.9	0	7.2
$CuSO_4$	19	6.6	4	5.8
$Pb(NO_3)_2$	3	6.9	28	7.1
$ZnSO_4$	63	7.0	17	6.4
$FePO_4$	11	6.9	12	5.8
$AgNO_3$	11	7.0	0	6.9
Li_2SO_4	7	7.1	12	6.9
$MnSO_4$	47	6.8	7	7.0
$HgCl_2$	1	6.7	8	6.5

Basal medium

G-12; Galactose 1.0%, Casein 1.0%, K_2HPO_4 0.1%, NaCl 3.0%, pH 7.0

G-14; Raffinose 3.5%, Water soluble protein from the fish meal waste-water 1.5%, K_2HPO_4 0.1%, NaCl 3.0%, pH 7.0

Nagagawa 등(1985)이 *Pseudomonas sp.*를 이용한 효소생産에 있어서 사용한 金屬鹽의 많은 種類가 효소活性을 촉진하였다는 結果와는 相異한 것으로 나타났다.

4) pH의 影響

pH가 효소생産에 미치는 影響을 檢討하기 위해 1N-HCl과 1N-NaOH를 利用하여 基礎培地를 pH 3에서 pH 12까지 조절하여 효소活性을 測定한 結果는 Fig. 4와 같다.

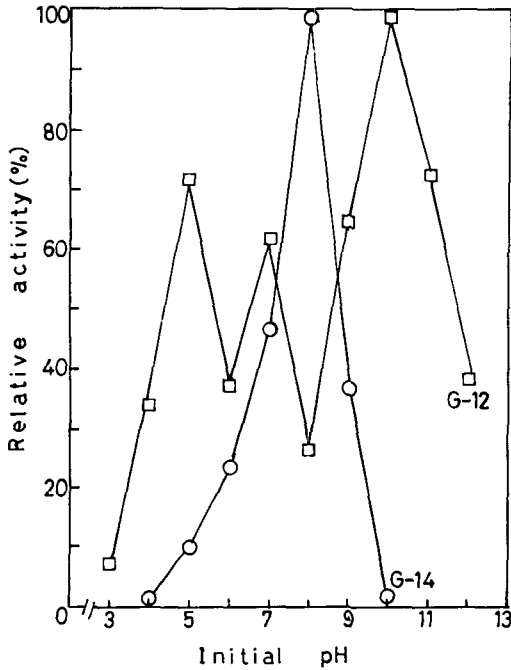


Fig. 4. Effect of initial pH on enzyme production
Basal medium
G-12; Galactose 1.0%, Casein 1.0%, K_2HPO_4 0.1%, NaCl 3.0%
G-14; Raffinose 3.5%, Water soluble protein from the fish meal waste-water 1.5%, K_2HPO_4 0.1%, NaCl 3.0%

G-14菌株는 pH 8.0부근에서, G-12菌株는 pH 5.0, pH 7.0, pH 10.0부근에서 효소活性이 最大에 달했다.

Lee와 Chung(1980)은 *Aspergillus oryzae* KC-15를 利用한 protease 生産에 對한 特性에서 同一菌이 酸性, 中性, 알카리性 protease가 生産되었다고 報告하였다. G-12菌株에서도 알카리性, 酸性, 中性 順으로 protease活性이 強하게 나타났다.

이러한 현상은 *Pseudomonas* G-12의 重要한 特性

으로 지적되며 特히 本 菌株가 窒素原으로 casein은 물론 廢水에서도 活性이 良好한 점으로 보아 酸性, 中性, 알카리性 protease中 어느 두 protease의 生産을 抑制할 수 있는 메카니즘을 研究한다면 單一菌株를 利用하여 目的하는 protease를 얻을 수 있어 産業적으로 價値있는 菌이라 생각된다.

5) 溫度에 依한 影響

Protease生産에 對한 最適溫度 範圍를 알아보기 위해 試料區에 種菌을 接種하여 各 溫度別로 培養한 後 효소活性을 測定한 結果는 Fig. 5와 같다.

효소生産에 關한 培養溫度는 G-12, G-14 兩 菌株 다같이 30℃에서 가장 적합한 것으로 나타났다.

따라서 調査된 여러가지 生産條件 즉 Table 1의 生産培地를 利用하여 30℃에서 培養時間에 따른 효소活性의 經時變化를 調査한 結果는 Fig. 6과 같다.

G-12菌株에서는 30℃ 35時間 培養時 生菌數 7.8×10^7 으로 protease活性이 385 unit/ml로 最高에 달했다. 이와 같은 結果는 Kim(1985)이 25℃, 80時間

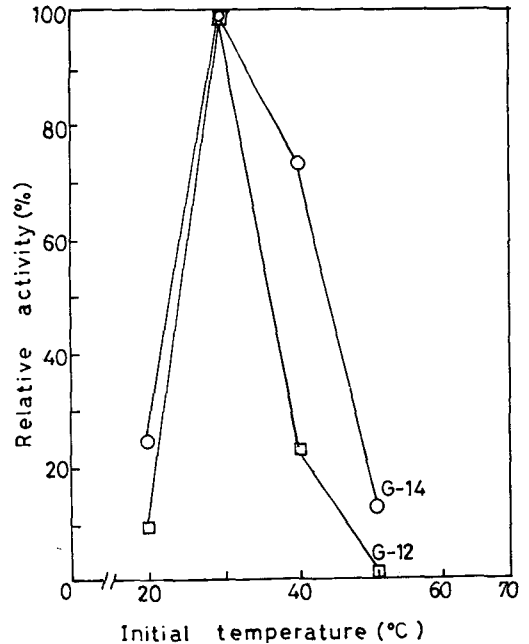


Fig. 5. Effect of initial temperature on enzyme production

Basal medium
G-12; Galactose 1.0%, Casein 1.0%, K_2HPO_4 0.1%, NaCl 3.0%, pH 7.0
G-14; Raffinose 3.5%, Water soluble protein of the fish meal waste-water 1.5%, K_2HPO_2 0.1%, NaCl 3.0%, pH 8.0

배양한 *Serratia sp.*를 이용한 protease 활성은 80 unit/ml였고, Chung(1984)이 20~40℃에서 48시간 배양한 *Rhizopus japonicus*의 acid protease 활성은 150 unit/ml였으며 추(1985)가 *Streptomyces*를 이용하여 25℃에서 3일간 배양 후의 alkaline protease의 활성은 256 unit/ml이었다. 이상의 여러 미생물에 비해 본菌株들의 protease 활성은 대단히 높은 것으로 나타나 향후 이들菌株들에 대한 酵素學의 特性은 물론 諸般事項을 研究糾明하여 産業에 應用할 수 있도록 해야 할 것으로 생각된다.

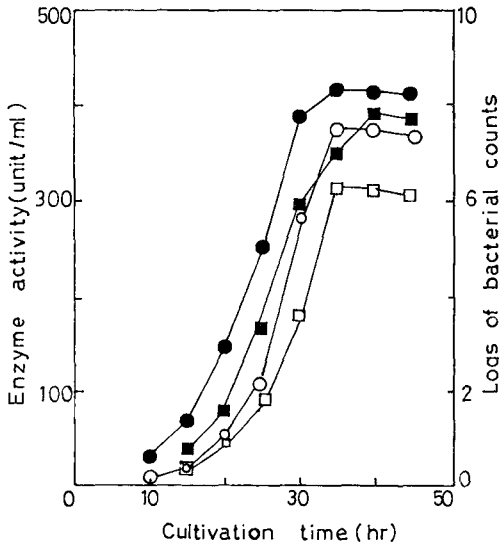


Fig. 6. Cultivation course of enzyme production

- ; Enzyme activity of G-12 strain
- ; Bacterial counts of G-12 strain
- ; Enzyme activity of G-14 strain
- ; Bacterial counts of G-14 strain

要 約

麗水五川工團을 中心으로 하여 魚粉飼料工場廢水가 一日 約 300톤 程度 流出되고 있어 그 處理에 莫大한 經費가 所要되고 있다.

이 廢水는 水溶性 蛋白質로서 微生物菌體生産 및 protease生産에 活用可能性이 많은 것으로 우선 水界의 alkaline protease 활성이 강한 菌株를 分離하여 分離菌(G-12, G-14菌株)의 酵素生産條件을 究明하고자 本 實驗을 行해 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 海水로 부터 分離한 alkaline protease 활성이 강한 G-12, G-14菌株는 生化學的인 性狀에 依해 各

各 *Pseudomonas chlororaphis*와 *Pseudomonas alcaligenes*로 同定되었다.

2. 酵素生産을 위한 *Pseudomonas chlororaphis*의 炭素原과 窒素原은 galactose와 casein이었고, *Pseudomonas alcaligenes*에 있어서는 raffinose와 정어리 飼料廢水의 水溶性 蛋白質이 가장 適合하였다.

3. 使用한 金屬鹽은 모두 沮害作用을 나타내었다.

4. 生産最適 initial pH는 G-12와 G-14菌株에 있어서 各各 8.0, 10.0이었고, 至適溫度는 30℃로 두 菌株가 同一하였다.

5. G-12, G-14菌株 모두 30℃ 35時間 培養時 酵素活性이 各各 310 unit/ml, 385 unit/ml로 最高에 달했다.

文 獻

- Aunstrup, K. 1978. Ann. Rep. Ferment. Proc., 2, 125.
- Aunstrup, K. 1980. Economic Microbiology. 5th ed., A. H. Rose, Academic Press, New York, p. 50.
- Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore, London, pp. 140~219.
- Chang, H. C. and H. J. Lee. 1989. Effect of N-sources and NaCl concentration in media on the intra-and extracellular proteinase activities of *Streptococcus cremoris* ML 4 and *Streptococcus lactis* ML 8. Korean J. Food Technol., 21(1), 86~91.
- Christie, R. B. 1980. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology, 4th ed., A. Wiseman, Ellis Horwood, Chichester, pp. 25~83.
- Chung, M. J. 1984. Studies on the production of acid protease by *Rhizopus japonicus* and purification of the enzyme. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 12(1), 45~50.
- Cowan, D. 1983. Proteins. In "Industrial Enzymology" (Ed. T. Godfrey and J. Reichelt). The Nature Press, pp. 352~374.
- Kanai, K. and H. Wakabayashi. 1984. Purification and some properties of protease from *Aeromonas hydrophila*. Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 50(8), 1367~1374.
- Kim, S. S. 1985. Studies on the production and

- purification of an extracellular protease from a nonpigmenting *Serratia sp.* Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 13(4), 321~327.
- Lee, M. J. and M. J. Chung. 1980. Studies on the production of protease by *Aspergillus oryzae* KC-15 and characteristics of the enzyme. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 8(2), 77~85.
- Nakagawa, T., F. Nagayama and S. Hories. 1985. Properties of the extracellular lytic proteinase of *Pseudomonas sp.* Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 51(1), 75~78.
- Nam, J. H. and J. H. Seu. 1987. Inhibitory substance by *Aspergillus sp.* on the snake proteinase-culture condition for the production of inhibitor. Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 15(2), 195~139.
- Noguchi, M., M. Yamashita, S. Arai and M. Fujimaki. 1975. On the bitter masking activity of a glutamic acid rich oligopeptide fraction. J. Food Sci., 40(2), 367~370.
- Shewan, I. M. 1971. The microbiology of fish and fishery products a progress report. J. Appl. Bact., 34, 299~315.
- Tajima, K., T. Takahahi, Y. Ezura and T. Kimura. 1984. Enzymatic properties of the purified extracellular protease of *Aeromonas salmonicida* Ar-4(EFDL). Bull. Japan Soc. Sci. Fish., 50(1), 145~150.
- Umetsu, H. and E. Ichishima. 1985. Mechanism of digestion of bitter peptide from a fish protein concentration by wheat carboxy peptidase. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 32(2), 281~287.
- Underkofler, L. A. 1976. Industrial Microbiology (Mi. 1-1). Ler. B. M. Litsky. McGraw-Hill Book Co., New York, p. 128.
- 江上不二夫 編. 1977. 標準 生化學實驗法. 文光堂. 東京, p. 643.
- 堀江 進. 奥積昌世. 大村正幸. 赤堀正光. 川前政幸. 1972. 冷凍海産漁の腐敗細菌, 食衛誌. 13, 410~417.
- 李東義. 1985. Alkaline protease生産 방선균의 同定 및 酵素의 生産條件. 建大附設産業技術研報. 10, 23~35.

1989年 5月 9日 접수

1989年 6月 21日 수리