

## 고등어에서 분리된 부패성 효모

오은경 · 박미연\* · 장동석\*  
국립부산수산진흥원, \*부경대학교 식품공학과

# Proteolytic Yeasts Isolated from Mackerel (*Scomber japonicus*)

Eun-Gyong OH, Mi-Yeon PARK\* and Dong-Suck CHANG\*

National Fisheries Research & Development Institute, Pusan 619-900, Korea

\*Department of Food Science & Technology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Microbiological spoilage of marine fish is complex process occurring by bacteria, yeasts and molds. There have been rare study for saprophytic yeasts although having enormous numbers of bacteriological studies on the spoilage of marine fish.

The 14 genera of yeasts isolated from mackerel (*Scomber japonicus*) with high frequency of occurrence were *Candida* sp., *Rhodotorula* sp., *Torulopsis* sp., *Cryptococcus* sp. and *Tricosporon* sp..

Among these ones *Candida lipolytica* was identified as the strongest proteolytic yeast, then named *Candida lipolytica* FM5 (*C. lipolytica* FM5). *C. lipolytica* FM5 showed optimum growth at 25°C, pH 7.0 and could grow at 5°C and in medium containing 10% sodium chloride.

To evaluate the saprophytic activity of the selected strain, *C. lipolytica* FM5 and *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17571 which is one of representative spoilage bacteria were individually inoculated into the sterilized fish muscle homogenates, and then pH changes and volatile basic nitrogen (VBN) values were checked during the storage at various temperatures.

According to the experimental results, the productions of VBN by *C. lipolytica* FM5 in the fish muscle homogenates were 50 mg-N/100 g at 5°C, 152 mg-N/100 g at 15°C and 379 mg-N/100 g at 25°C for 1 week storage, respectively. Above results were nearly same as in case of *Ps. fluorescens* ATCC 17571 inoculation. It suggest that saprophytic yeasts also have important role in spoilage of marine fish.

Key words: proteolytic activity, saprophytic yeast, *Candida lipolytica* FM5

### 서 론

식품의 부패 또는 변질은 그 식품의 화학적 조성, 조직의 상태, pH, 수분활성(Aw)등 식품 본래의 성질과 미생물상 및 환경의 조건에 의하여 결정된다. 이 중에서도 식품의 부패에 가장 큰 영향을 미치는 것은 미생물이다.

우리나라 국민들의 동물성 단백질 공급원으로서 중요한 어류는 그 조직학적인 특성과 유통과정의 어려움으로 인하여 미생물에 의한 부패가 상당히 문제시 되며, 실제로 세균에 의한 오염 및 부패에 관한 연구보고(Shewan et al., 1971; Hamid et al., 1976, 1977; Sakada et al., 1980 a, 1980b; Chang and Lee, 1983; Cho, 1985)는 많으며 최근에는 어육과 장기에 분포하고 있는 단백질분해효소에 의한 어육의 사후변화에 관한 연구(Nonake, 1987; Ueno et al., 1988; Haard, 1992; Pyeun et al., 1996)도 많이 보고되고 있다.

한편, 효모는 각종 보존료와 방사선조사, 동결 등에 대한 저항성이 세균보다 강하기 때문에 어류의 장기보존에 있어서는 세균보다 오히려 효모가 심각한 영향을 미칠수

있음에도 불구하고(Erklund et al., 1966; Hukushima et al., 1967) 효모가 어류의 부패에 어떤 영향을 미치는지에 관해서는 외국에서도 보고가 드물뿐만 아니라 국내에서는 거의 보고되어 있지 않다(Kobatake and Kurata, 1980; Kobatake et al., 1987).

따라서, 본 연구에서는 우리나라 남해안의 다핵성 어종인 고등어에서 효모를 분리·동정하여 단백질 분해성 효소의 존재를 확인하고 멸균어육에 접종하여 부패능을 조사한 결과를 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 1. 균의 분리 및 동정

##### 1) 시료

부산 공동어시장에서 고등어 (*Scomber japonicus*)를 구입하여 실험실까지 냉장운반한 후, 무균적으로 균질화하여 시료로 사용하였다.

##### 2) 효모의 분리 및 동정

효모의 배양은 YM배지 (Yeast-Mold medium, pH 7.0)을 사용하였고 효모의 분리는 YM평판배지에 conradi법

으로 행하였다. 시료 20g과 멸균생리식염수 180ml를 섞어 마쇄한 후 적절히 희석하여 YM평판배지에 도말하고 25°C에서 5일간 배양한 후 순수분리하여 사면한천배지에 보관하면서 형태학적 및 생리·생화학적 특성을 조사하였다(後藤·會根田, 1975).

## 2. 효모의 증식에 영향을 미치는 인자

### 1) 온도

YM액체배지(pH 7.0)에 균을 접종하고 10~40°C의 온도범위에서 48시간 배양하여 540nm(spectronic 20, Bausch & Lomb, U.S.A.)에서의 흡광도를 측정하여 균의 증식도를 조사하였다.

한편, 저온생육능은 YM평판배지에 효모를 접종하고 5°C에서 4일간 배양하면서 생육정도를 육안으로 관찰하여 판별하였다.

### 2) pH

0.1M 시트르산 완충용액(pH 4.0~5.5), 0.1M 인산완충용액(pH 6.0~7.5), 0.1M Tris완충용액(pH 8.0~9.0) 그리고 0.1M 탄산완충용액(pH 9.5~10.0) 등을 사용하여 각각 4.0~10.0의 범위로 pH를 조절한 YM액체배지(pH 7.0)에 효모를 접종하고 25°C에서 48시간 배양하여 540nm에서의 흡광도를 측정하였다.

### 3) 식염

YM액체배지(pH 7.0)에 식염농도를 0~10.0% 첨가하여 25°C에 4일까지 배양하면서 균의 증식도를 육안으로 관찰하여 판별하였다.

## 3. 단백질분해능 시험

효모의 단백질분해능 시험은 Lee and Pfeifer(1975)의 방법에 따라 2.0% skim milk를 첨가한 YM평판배지에 효모를 접종하여 25±0.5°C에서 4일간 배양한 다음, colonies주위에 투명환이 나타나는 것을 단백질분해능 양성균주로 하였다.

## 4. 어육의 부패도 측정

신선한 고등어의 육부분만을 취하여 4배의 생리식염수(v/w)를 가한 다음, waring blender로 2분간 마쇄한 후 121°C에서 20분간 고압멸균하고 다시 2분간 무균적으로 마쇄한 후 멸균 삼각플라스크에 동량씩 분주하여 멸균어육을 조제하였다. 여기에 고등어에서 분리된 *C. lipolytica* FM5와 대표적인 어육부패세균 *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17571을 각각 2~5×10<sup>8</sup>접종하고 5°C, 15°C 및 25°C에 1주일간 방치하여 부패를 진행시킨후 부패의 정도를 pH와 휘발성 염기질소(volatile basic nitrogen,

VBN)의 량으로써 나타내었다. 휘발성 염기질소의 정량은 conway unit를 사용하는 미량확산법(Conway, 1950; 日本厚生省環境衛生局監修, 1978)으로 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 어류로부터 분리된 효모의 특성

#### 1) 저온생육능

고등어에서 총 14균주(Y-1~Y-14)의 효모가 분리되었으며, 14균주 중 Y-6과 Y-8균주를 제외한 12균주(86%)가 5°C에서 배양 2일째 부터 육안으로 관찰할 수 있을 정도의 colonies를 형성하므로써 저온생육능이 있는 것으로 나타나 어체에 부착하고 있는 효모는 대부분이 저온성임을 알 수 있었다(Table 1).

Kobatake and Kurata(1980)는 시판냉장어패류에 오염된 효모를 조사한 바 식품의 종류에 따라 약간의 차이는 있었으나 분리효모 37균주 중 35균주(94.6%)가 5°C에서 2주일 이내에 생육하므로써 저온성이었다고 밝히고 있어 본 실험의 결과와 유사하였다.

#### 2) 단백질분해능

단백분해능은 어패류의 부패에 큰 영향을 미친다(Jeong, 1982; Chang and Lee, 1983; Kobatake et al., 1987). 고등어에서 분리된 효모 14균주에 대한 단백질분해능을 조사한 결과, 6균주(43%)가 단백질분해능을 나타내

**Table 1.** The growth patterns of yeasts isolated from mackerel (*Scomber japonicus*) on YM medium plate at 5°C

Strains	Incubation time (day)			
	1	2	3	4
Y - 1	± *	+	++	++
Y - 2	±	+	+	+
Y - 3	±	+	+	++
Y - 4	±	+	++	++
Y - 5	±	+	+	++
Y - 6	-	-	-	-
Y - 7	+	+	++	++
Y - 8	-	-	-	-
Y - 9	±	+	++	++
Y - 10	±	+	++	++
Y - 11	±	+	+	+
Y - 12	-	-	±	±
Y - 13	±	+	+	+
Y - 14	±	+	++	++

\*- : no growth, ± : slightly growth.

+ : moderate growth, ++ : good growth

었으며, 이 중 Y-5균주는 배양 1일째부터 투명환을 생성하여 분리균주 중 단백분해능이 가장 강한 것으로 나타났다 (Table 2). 따라서 본 실험을 위한 공시균으로서 저온생육능이 있으면서 단백분해능이 가장 강한 Y-5균주를 선정하여, 이 균의 균학적 특성을 조사하였다.

3) 생화학적 특성

분리된 효모중 저온 생육능이 있으면서 단백분해능이 가장 강한 Y-5의 생화학적 성질을 Table 3에 나타내었다.

피막형성능, 균사형성능, 젤라틴 액화능, 포자, 티아민 요구성 및 당발효성 등을 조사한 결과와 현미경 (Nikon,

Ser No. 112739) 관찰을 행한 결과 타원형으로 나타나 (data is not shown), 최종적으로 이 균을 *Candida lipolytica* FM5 (*C. lipolytica* FM5)로 명명하고 특성을 조사하였다.

한편, *C. lipolytica* FM5 외에도 *Rhodotorula*속, *Torulopsis*속, *Cryptococcus*속, *Trichosporon*속 으로 추정되는 효모가 분리되었다 (data is not shown).

한편, Kobatake and Kurata (1980)에 의하면 시료에 따라 차이는 있으나 시판냉장어패류20개 시료 중 모든 시료에서 세균과 효모가 각각 100%와 90%정도의 빈도로 검출되며 상대적으로 곰팡이의 검출빈도는 50%정도로 검출빈도가 낮은 것으로 보고하고 있다. 그리고 효모중 검출빈도가 가장 높은 것이 *Rhodotorula* sp.과 *Candida* sp. 이며 그 외에도 *Trichosporon* sp. *Cryptococcus* sp. *Torulopsis* sp. 등이 거의 유사한 빈도로 검출된 것으로 보고하고 있어 시료의 상태에 따라 검출되는 미생물의 종류와 검출빈도가 다양함을 알 수 있었다.

Table 2. Appearance of proteolytic enzyme activities of yeasts isolated from mackerel (*Scomber japonicus*) on YM medium plate

Strains	Incubation time (day)			
	1	2	3	4
Y - 1	--*	-	-	-
Y - 2	-	±	±	+
Y - 3	-	-	-	-
Y - 4	-	±	±	+
Y - 5	+	++	++	++
Y - 6	-	±	±	±
Y - 7	-	-	-	-
Y - 8	-	-	-	-
Y - 9	-	±	+	++
Y - 10	-	±	+	++
Y - 11	-	±	±	±
Y - 12	-	±	±	±
Y - 13	-	-	-	-
Y - 14	-	+	+	++

\*- ; no growth, ± ; slightly growth, + ; moderate growth, ++ ; good growth

Table 3. Physiological characteristics of *Candida lipolytica* FM5 isolated from mackerel (*Scomber japonicus*)

Pellicle formation	+	Fermentation of	
Pseudo mycelium	+	glucose	-
True mycelium	+	galactose	-
Arthrospore	-	saccharose	-
Ascospore	-	maltose	-
Assim. of nitrate	-	lactose	-
Split. of arbutin	-	xylose	-
Liq. of gelatin	+	trehalose	-
Hydrolysis of urea	+	raffinose	-
Vitamins required	T*		

\*T ; thiamine

2. *C. lipolytica* FM5의 특성

1) 생육적온

*C. lipolytica* FM5의 생육온도범위를 조사하기 위하여 YM액체배지에 균을 접종하고 10~40°C의 온도범위에서 48시간 배양하여 균의 증식도를 비교한 결과, 생육최적온도는 25°C부근으로 저온에서도 비교적 잘 자라는 것으로 나타났다 (Fig. 1).

2) 생육최적 pH

*C. lipolytica* FM5의 생육최적 pH는 7.0이었으며, pH

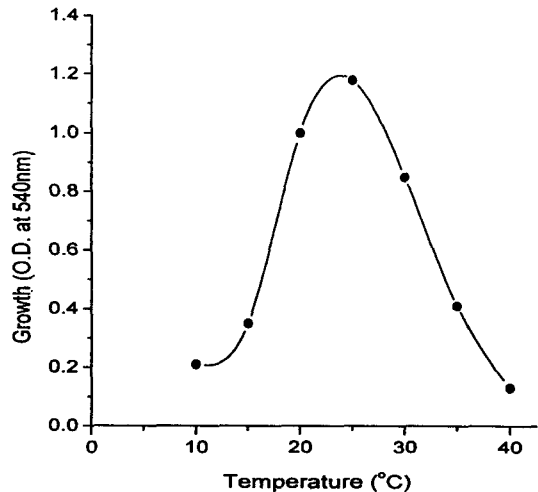


Fig. 1. Effects of temperature on the growth of *Candida lipolytica* FM5 in YM broth medium for 48 hrs.

6.5~7.5의 중성대 부근에서 비교적 잘 자라고 pH 7.5 이상에서는 균의 증식이 급격히 감소됨을 알 수 있었다 (Fig. 2).

일반적으로 어류의 육질부위 pH가 중성인 것을 고려한다면, 이 효모는 어류의 육질에서 아주 잘 증식할 것으로 생각된다.

3) 식염농도의 영향

0~10%의 식염농도 범위에서 *C. lipolytica* FM5의 증식 정도를 조사한 결과, 식염농도 7.0%까지는 배양 2일째부터 균의 증식이 시작되었으며, 배양4일째가 되면 식염농도 10.0%에서도 생육이 가능한 것으로 나타났다 (Table 4).

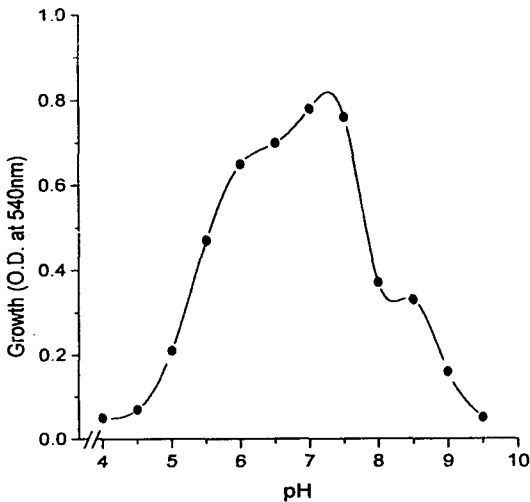


Fig. 2. Effects of pH on the growth of *Candida lipolytica* FM5 in YM broth medium at 25°C for 48 hrs.

Table 4. Effects of sodium chloride on the growth of *Candida lipolytica* FM5 in YM broth medium at 25°C

Conc. of NaCl (%)	Incubation time (day)			
	1	2	3	4
0.0	--*	±	+	++
1.0	-	±	+	++
1.0	-	±	+	++
2.0	-	±	+	++
3.0	-	±	+	++
4.0	-	±	+	++
5.0	-	±	+	++
6.0	-	±	+	++
7.0	-	±	+	++
8.0	-	-	±	+
9.0	-	-	±	+
10.0	-	-	±	+

\*- ; no growth, ± ; slightly growth, + ; moderate growth, ++ ; good growth

한편, 우렁쟁이에서 분리된 *Flavobacterium*속 (Jeong, 1982) 이나 정어리에서 분리된 *Pseudomonas* Fu101 (Cho, 1985) 등도 25°C와 pH7.5의 조건에서 가장 잘 자라는 것으로 보고되고 있어 어패류의 부패에 관여하는 것은 주로 저온성세균이나 효모인 것으로 추측할 수 있었다.

이상, 본 연구에서 분리된 *C. lipolytica* FM5의 생육 최적조건은 25°C, pH 7.0이었으며, 식염농도 10.0%에서도 생육하여 강한 내염성을 나타내었고 5°C의 저온에서도 생육이 가능하였으므로 본 연구에서 분리된 효모 *C. lipolytica* FM5는 어패류의 부패에 주요한 영향을 미치는 것으로 추정할 수 있었다.

3. 효모와 세균에 의한 어육의 부패

고등어로부터 분리된 부패성효모 *C. lipolytica* FM5와 어류의 주된 부패세균으로 알려진 *Ps. fluorescens* ATCC 17571의 부패력을 비교하였다.

멸균어육에 두 균주를 각각 접종하고 5°C, 15°C 및 25°C에 저장하면서 시료의 pH와 휘발성 염기질소량의 변화를 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. 멸균어육의 초기 pH는 6.0 그리고 VBN은 20 mg-N/100 g이었으며, 저장온도가 높을수록 효모접종어육과 세균접종어육의 부패는 빠르게 진행되었다.

효모접종어육은 5°C, 15°C 및 25°C에서 저장 7일째의 pH가 각각 6.2, 7.1 그리고 7.8을 나타내었고, 세균접종어육은 각각 6.4, 7.3 그리고 7.9로 나타나 효모접종어육과 세균접종어육은 유사한 변화를 나타내었다.

한편, 휘발성 염기질소의 양은 5°C저장에서는 그다지 큰 변화가 없었으나 저장 1주일만에 효모접종어육은 15°C와 25°C에서 각각 152 mg-N/100 g과 379 mg-N/100 g이었으며, 세균접종어육은 각각 192 mg-N/100 g과 395 mg-N/100 g의 값을 나타내어 부패정도가 아주 유사하게 진행되는 것으로 나타났다.

이상, pH와 VBN을 측정하므로써 고등어에서 분리된 효모 *C. lipolytica* FM5와 부패세균 *Ps. fluorescens* ATCC 17571의 부패력을 비교조사한 결과, 두 미생물은 거의 대등한 부패력을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

한편, Kobatake et al. (1987)은 효모나 세균 균종에 따라 단백질해능이나 지질분해능은 상당한 차이가 있으나 어패류에서 분리된 효모 *C. lipolytica*의 단백질해능이 *Pseudomonas fluorescens*나 *Bacillus subtilis*의 단백질해능 보다 우수하다고 보고한 바 있다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 효모도 세균못지 않게 어류의 부패에 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다.

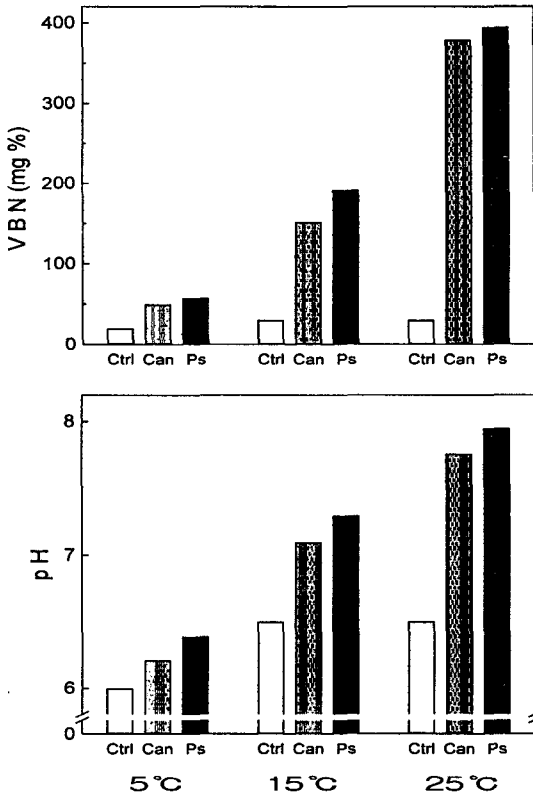


Fig. 3. Comparisons of pH and VBN in fish muscle homogenate inoculated with *Candida lipolytica* FM5 or *Pseudomonas fluorescens* FM59, and incubated at 5, 15, and 25°C for 1 week. Ctrl, control; Can, *C. lipolytica* FM5; Ps, *P. fluorescens* FM59

요 약

우리나라 남해안의 다핵성 어종인 고등어로부터 부패 활성이 강한 효모를 분리하여 그 균학적 특성을 조사하고 어육의 부패에 미치는 영향을 조사한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 고등어로부터 분리된 효모 14균주 중 12균주 (86%)가 저온성 효모였으며, 6균주 (43%)가 단백질분해성을 가지는 것으로 나타났다.

2. 분리된 효모 14균주 중 저온생육능 및 단백질분해능이 가장 강한 Y-5가 *C. lipolytica*로 동정되어 *C. lipolytica* FM5로 명명하였다.

3. *C. lipolytica* FM5의 최적 생육조건은 25°C, pH 7.0 이었으며, 염농도 10%에서도 생육이 가능하여 강한 내염성을 나타내었다.

4. 멸균어육을 이용한 부패실험에서 *C. lipolytica*

FM5를 접종한 경우 5°C, 15°C, 25°C에서 저장 1주일만에 VBN생성량이 각각 50 mg-N/100 g, 152 mg-N/100 g, 379 mg-N/100 g를 나타내어, 대표적인 어류부패세균인 *Ps. fluorescens* ATCC 17571을 접종한 경우와 유사한 속도로 부패가 진행되었다.

참 고 문 헌

Chang, D. S. and J. S. Lee. 1983. Characterization of Proteolytic *Streptococcus* sp. Isolated from Market Foods. *J. Kor. Fish. Soc.*, 16 (3), 225~230.

Cho, H. R. 1985. The studies on the extracellular protease produced by *Pseudomonas* Fu101 isolated from intestine of Sardine (*Sardinops melanosticta*). Pukyong National University. M.S. Thesis. pp. 1~48.

Conway, E. J. 1950. In microdiffusion analysis and volumetric error, 3rd ed. Crosby Lockwood and Son Ltd., London.

Eklund, M. W., J. Spinelli, D. Miyauchi and J. Dassow. 1966. Development of yeast on irradiated pacific crab meat. *J. Food Sci.*, 31, 424~431.

Haard, N. F. 1992. A review of proteolytic enzymes from marine organisms and their application in the food industry. *J. Aqua. Food Produc. Tech.*, 1, 17~31.

Hamid, A. T. Sakada and D. Kakimoto. 1976. Microflora in the alimentary tract of Gray Mullet-1. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 25 (1), 59~65.

Hamid, A. T. Sakada and D. Kakimoto. 1977. Microflora in the alimentary tract of Gray Mullet-3. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 26, 79~87.

Hukushima, K., T. Nakase and K. Komagata. 1967. Yeast Isolated from "Kamaboko". *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 33 (8), 763~768.

Jeong, I. C. 1982. Microfloral Distribution and Their Extracellular Protease Activity of Sea Squirt, *Halocynthia rotetzi* (Drasche). Pukyong National University. M.S. Thesis. pp. 1~42.

Kobatake, M. and H. Kurata. 1980. Yeast Contamination of Chilled Raw Seafoods. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 21 (3), 197~206.

Kobatake, M., Y. Tonogai, K. Kobayashi and Y. Ito. 1987. Comparison of Spoilage Degree of Seafoods Inoculated with Yeasts or Bacteria Singly. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 28 (1), 19~29.

Lee, J. S. and D. K. Pfeiffer. 1975. Microbiological Characteristics of Dungeness Crab. *Canser magister*. *Appl. Microbiol.*, 30, 72~78.

Nonaka, J. 1987. Objective of fishery processing and characteristics of fishery raw materials. In "Seafood materials for utilization". Koseisha Koseigaku, Tokyo, Japan, 9~15 (in Japanese).

- Pyeun, J. H., D. S. Lee, D. S. Kim and M. S. Heu. 1996. Activity Screening of the Proteolytic Enzymes Responsible for Post-mortem Degradation of Fish Tissues. *J. Korean Fish. Soc.* 29 (3), 296~308.
- Sakada, T., M. Nakaji and D. Kakimoto. 1980a. Microflora in the digestive tract of marine fish. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 27, 65~78.
- Sakada, T., J. Okabayashi and D. Kakimoto. 1980b. Variation in the intestinal microflora of Tilapia reared in fresh and sea water. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46 (3), 313~317.
- Shewan, J. M. 1971. *The Microbiology of fish and fishery products a progress report.* *J. Appl. Bact.*, 34, 299~315.
- Ueno, R., K. Sakanaka, S. Ikeda and Y. Horoguchi. 1988. Purification of pepstatin insensitive protease from mackerel white muscle. *Nippon Suisan gakkaiishi*, 54, 691~697.
- 厚生省環境衛生局監修. 1978. 食品衛生検査指針2. 日本食品衛生協會, pp. 204~213.
- 後藤昭二·會根田正己. 1975. 酵母の分類と同定, 東京大學出版會, pp. 67~137.

---

1998년 2월 6일 접수

1998년 7월 3일 수리