

## 정어리 內臟細菌의 特性和 菌體外 蛋白分解酵素에 관한 研究\*

張 東 錫 · 趙 鶴 來 · 崔 承 泰

釜山水產大學 食品工學科

### Characteristics of Intestinal Microflora and Their Extracellular Protease of Sardine, *Sardinops melanosticta*

Dong-Suck CHANG, Hak-Rae CHO and Seung-Tae CHOI

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan,  
Namgu, Pusan, 608 Korea.

Sardine, *Sardinops melanosticta*, has been caught more than fifty thousand metric tons every year in adjacent sea of Korea, but most of them used for uneatable fish meal because of their rapid spoilage. Usually it is known that the main reason of putrefaction of foods is caused by the microorganisms included in them. Therefore, this experiment was carried out to identify the microorganisms isolated from the intestine of fresh sardine and characterize their proteolytic enzymes produced from them.

Aerobic cell count ranged from  $1.7 \times 10^4$  to  $3.6 \times 10^5$ /g, while anaerobic cell count, from  $2.9 \times 10^4$  to  $5.5 \times 10^5$ /g. Most of the isolated strains were psychrotrophic mesophiles. Among the two hundred and eighty strains isolated from the fresh samples, fifty-six strains (20.0%) were proteolytics, one hundred and seventy-five strains (62.5%) were lipolytics and twenty-nine strains (10.5%) had the ability to produce hydrogen sulfide. The most predominantly isolated microbial groups from the fresh sardine were *Moraxella* (31.4%) and *Pseudomonas* spp. (28.6%). *Flavobacterium-Cytophaga*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Micrococcus* spp. and *Enterobacteriaceae* appeared from 7.9% to 5% out of total tested strains.

The average bacterial count in the spoiled samples (stored at about 18°C for 48 hours) was increased to the level of  $2.9 \times 10^8$ /g for aerobes,  $1.5 \times 10^8$ /g for anaerobes, then one hundred and ten strains, corresponding to 52%, out of two hundred and thirteen strains submitted to the test were proteolytics.

The strongest proteolytic bacterium among the two hundred and eighty strains was identified as *Pseudomonas* 101 which grew best at 25°C. The optimum condition for the activity of the proteolytic enzyme produced by *Pseudomonas* 101 appeared 35°C and pH 9.0, but the activity was relatively unchanged between 5.0 and 11.0 of pH and between 30°C and 50°C of temperature.

\* 本 研究는 1983年度 文敎部 學術研究 助成費로 이루어졌음.

緒 論

水産動物 장내에서는 自家消化가 극히 빠르게 일어나고, 자연 면역이 육상동물에 비하여 약하며, 세균의 부착 기회가 많기 때문에 自家消化酵素 및 미생물이 생성한 효소에 의하여 부패가 쉽게 일어난다. 海水에棲息하는 魚類에 있어서 細菌이 存在하는 部位는 魚體表面, 아가미, 소화관등이다. 그런데 魚體表面, 아가미등은 物理的으로 外界와 接觸하고 있기 때문에 그 microflora는 外界에 직접 影響을 받고 있지만, 臟管内에서는 魚種에 따라 어느정도 특징있는 microflora가 形成되어 있으며 魚類의 腐敗는 이 臟管内의 microflora의 作用에 크게 影響을 받는다. 따라서 각종 魚類의 臟管内의 microflora의 組成을 밝히고, 특히 蛋白質分解性이 강한 菌株을 分離하여 菌의 培養의 特徵 및 그 菌이 生成하는 蛋白分解酵素에 대한 性質을 밝히는 것은 鮮度管理에 重要的인 參考資料가 된다. 魚貝類別로 臟內細菌의 分布樣狀이나 이들 細菌이 生産하는 蛋白質 分解酵素에 관한 研究는 많다. Lee와 Pfeifer(1975)는 게에서 分離되는 細菌의 種類를 밝힌바 있으며, Hamid 등(1976, 1977, 1979)은 송어 內臟에 存在하는 微生物의 種類와 酵素의 活性에 관한 研究를 實施하였고, 또 Sakada 등(1977, 1978, 1980)의 海産魚 消化管内의 微生物 相이나 蛋白質 分解酵素에 관한 報告가 있고, 이 밖에도 東條 등(1975), Sheeran과 Smith(1981) 등의 報告가 있다. 우리나라에서는 貝類에 汚染되어 있는 細菌의 種類에 관한 研究는 있으나, 魚類에 관한 研究는 적으며 腐敗細菌이 生成하는 酵素에 관한 研究는 거의 없다.

한편, 정어리는 매년 5만톤 이상씩 漁獲되고 있으나, 그 鮮度低下 速度가 빨라서 대부분 魚粉등 非食用으로 消費되고 있는 實情이다. 이와같은 정어리의 빠른 腐敗에 대한 微生物學의 原因糾明을 위한 研究의 일환으로 정어리 內臟에 分布하고 있는 細菌을 分離同定하고 강한 蛋白質分解酵素를 生産하는 菌株을 選別하여 細菌學의 特性 및 蛋白質 分解酵素에 대한 實驗結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 試 料

實驗에 提供된 정어리, *Sardinops melanosticta*는 1983년 6월, 4차체에 걸쳐 제 112-9 海區에서 漁獲

된 것을 바로 特別 容器에 氷藏하여 實驗室로 運搬하였으며, 漁獲부터 實驗까지는 40시간이 초과하지 않았다. 試料의 크기, pH 등은 Table 1 과 같다.

Table 1. Condition of sample examined

Samples	Average
Size (cm)	21
Weight of total (g)	76
intestine (g)	9.6
pH of muscle	5.98
intestine	6.54

Average data of four times experiments

2. 生菌數 測定

정어리 內臟을 無菌的으로 30g 取하여 滅菌 生理食鹽水 270 ml 를 加하여 90 秒間 均質化한 것을 試料原液으로하여 5°C, 15°C, 25°C 및 35°C의 溫度別로 生菌數를 測定하였으며, 嫌氣性 菌數의 測定은 25°C로 조절된 anaerobic incubator(Forma Scientific Inc., No.3159)에서 培養하였다.

3. 菌株의 分離 및 同定

Corlett *et al.* (1965)이 考案했고 Lee와 Pfeifer (1975)등이 모방한 replica plating method를 活用하였다. 試料原液을 TPY agar (peptone 0.5%, tryptone 0.5%, yeast extract 0.25%, glucose 0.1%, NaCl 0.5%, agar 1.5%) plate에 conradi 棒으로 塗抹하여 25°C±0.5°C에서 3일간 培養한 다음, 같은 희석단계에서 平板當 50~100個의 獨立 colony를 含有하는 平板을 擇하여, TPY agar master plate에 화염멸균한 replicator로 미리 표시한 지점에 滅菌한 이쑤시개를 使用하여 한 master plate에 30 colony씩 옮긴다. master plate의 colony가 적어도 2 mm 정도의 크기로 자랄때까지 24~72 時間 培養한 다음 각종 選擇 및 分離培地에 replicator로 옮겨 培養하였다.

- ① TPY agar.....현미경적 형태검사 및 cytochrome oxidase 검사용
- ② TPY agar.....Ultraviolet fluorescence 및 집락색소 관찰용
- ③ Hugh-Leifson glucose medium .....Glucose 산화분해 검사용
- ④ Hugh-Leifson glucose medium.....嫌氣培養하

여 glucose 발효분해 검사용  
 ⑤ Peptone iron agar.....H<sub>2</sub>S 생성 검사용  
 ⑥ Penicillin agar(3.0 I.U of penicillin G in TPY agar).....*Pseudomonas*, *Moraxella* 및 *Acinetobacter* 분리 동정용  
 ⑦ Staphylococcus 110.....NaCl (7.5%) 耐性試驗용  
 ⑧ EMB agar.....腸內細菌科의 分類용  
 ⑨ Potato dextrose agar(10% lactic acid로 pH 3.5로 조정).....효모 분리용  
 ⑩ TPY agar.....移植確認 試驗 및 追加試驗용  
 이밖에 motility, indole, methyl red, gelatin 液化 반응, citrate 이용試驗, starch 나 casein 加水分解 반응, catalase 생성등을 조사하였고, 分離細菌의 檢索同定은 주로 Bergey's manual of Determinative Bacteriology 8th ed. (1974)과 Gibbs와 Skinner(1966) 및 長谷川 武治(1975)의 分類方法을 參考하였다. 蛋白質 分解性이 強한 菌株은 Lee(1966)가 提案한 standard method with caseinate agar를 사용하여 選擇하였고, 脂肪分解能은 Harrigan과 McCance(1976)의 方法으로 確認하였다.

#### 4. 酵素의 活性度 測定

蛋白質 分解性이 強한 菌株로 選定된 細菌에 대하여 發育 最適溫度 및 pH를 調査하고, 菌을 TPY broth에 接種하여, 100 rpm으로 조절된 shaking incubator (Lab-Line Instruments Inc. Model 359 5)에 培養하면서 培養時間에 따른 菌의 增殖度와 酵素의 活性를 測定하여 酵素生産 最適時間을 먼저 調査하였다.

蛋白質 分解酵素의 活性은 Rinderknecht *et al.* (1968)이 開發하고, Canhos(1981)가 modify한 不溶性의 hide powder azure (HPA, Calbiochem. U.S. A.)를 利用하는 dye release method에 準하였다. 菌株을 TPY broth에 接種하여 optimum condition

에서 30時間 培養한 後, 培養液을 10,000 rpm, 4°C에서 15分間 遠心分離 한후, 0.45 μ millipore filter paper로 濾過한 濾液을 粗酵素液으로 하였다. 酵素活性度의 測定은 0.05 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.2 at 25°C) 9ml에 HPA 30 mg을 넣고 30分間 preheating한 後, 粗酵素液 1 ml를 加하여 25°C, 100 rpm으로 調整된 shaking incubator에서 60分間 반응시킨 다음, 東洋濾紙 No.5C로 濾過하여 酵素의 反應을 정지시킨후, spectrophotometer (ANA-75, Tokyo photoelectric Co.)로 595 nm에서 absorbance를 測定하였다.

## 結果 및 考察

### 1. 生菌數

新鮮한 정어리의 內臟에 대한 溫度別 生菌數 測定 結果는 Table 2와 같다.

5°C에서 14일간 배양한 결과  $1.3 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^5$  /g 정도로 平均  $7.5 \times 10^4$  /g 이었고 15°C에서 96시간 培養한 結果  $1.9 \times 10^4 \sim 5.3 \times 10^5$  /g 정도로 平均  $2.4 \times 10^5$  /g으로 5°C에서 보다 조금 많은 菌數가 檢出되었다. 25°C에서 72시간 培養한 結果는 15°C 때와 비슷한 結果였다.

Okuzumi와 Horie(1969)는 yellow tail, mackerel, horse mackerel의 臟內容物에 대하여 20°C에서 生菌數를 測定한 結果,  $6.0 \times 10^4 \sim 4.3 \times 10^7$  /g으로 報告하였는데, 菌數에서는 정어리에서의와 비슷하였으며, 各 溫度別로 分離菌株을 培養한 結果, 대부분 中溫菌이었다고 報告한바 있다. 本 實驗에 提供된 정어리에서는 15°C와 25°C에서 培養된 結果가 5°C나 35°C에서 보다 많은 菌數가 檢出되어, 대부분 低溫細菌으로 推定되었다. 25°C에서 培養한 嫌氣性菌數는  $2.9 \times 10^4 \sim 5.5 \times 10^5$  /g로 平均  $1.9 \times 10^5$  /g으로 好氣性菌數와 비슷하여 정어리 腐敗에 큰 影響을 미칠것으로 생각된다. 35°C에서 培養한 結果는 5°C에서의와 비슷하였다. 정어리는 內臟이 전 체증의 약

Table 2. Viable cell count/g of the intestine of fresh sardine cultured at various temperature

Temp. (°C)	Incubation time	1	2	3	4	Average
5	14 days	$1.3 \times 10^4$	$1.4 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$3.5 \times 10^4$	$7.5 \times 10^4$
15	96 hours	$1.9 \times 10^4$	$5.3 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$	$1.2 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$
25	72 hours	$1.7 \times 10^4$	$3.6 \times 10^5$	$2.1 \times 10^5$	$6.0 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$
35	48 hours	$1.1 \times 10^4$	$2.2 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$	$2.4 \times 10^4$	$9.1 \times 10^4$
25*	72 hours	$5.5 \times 10^5$	$6.9 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$	$2.9 \times 10^4$	$1.9 \times 10^5$

\* Anaerobes

Table 3. Viable cell count/g of the intestine of spoiled sardine cultured at various temperature

Temp. (°C)	Incubation time	1	2	3	4	Average
5	14 days	$2.0 \times 10^6$	$3.3 \times 10^7$	$6.3 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	$2.0 \times 10^8$
15	96 hours	$1.5 \times 10^7$	$3.2 \times 10^8$	$6.2 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$	$2.9 \times 10^8$
25	72 hours	$1.3 \times 10^7$	$3.5 \times 10^8$	$5.5 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	$2.9 \times 10^8$
35	48 hours	$1.4 \times 10^7$	$3.9 \times 10^8$	$5.2 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8$	$2.8 \times 10^8$
25*	72 hours	$3.8 \times 10^7$	$3.3 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$	$2.2 \times 10^8$	$1.5 \times 10^8$

\* Anaerobes

13%나 차지하고, 内臟 1g당 細菌數가  $10^5$  이상이었으며, 内臟이나 筋肉의 pH가 中性에 가까와 細菌發育에 좋은 條件을 갖추고 있는 점은 정어리가 빨리 腐敗하는 重要한 原因으로 해석되어진다. 한편 新鮮한 정어리를 18~20°C에 48시간 放置한 後의 生菌數 測定結果는 Table 3과 같다.

培養溫度에 따른 差異는 거의 없었으며, 好氣性菌이나 嫌氣性菌 모두  $2.6 \times 10^6 \sim 6.2 \times 10^8/g$ 으로 平均  $10^8/g$ 이었으며 심한 악취를 내었다. 이상의 結果로 미루어 보아 이들 細菌은 대부분이 耐冷性 中溫細菌임을 推定할 수 있었다.

## 2. Microflora의 組成

試料에서 分離된 總 280 菌株에 대한 試驗結果 *Moraxella* spp.와 *Pseudomonas* spp.가 각각 31.4%, 28.6%로 主種을 이루고, *Flavobacterium-Cytophaga*, spp. *Vibrio* spp. *Acinetobacter* spp. *Micrococcus* spp. *Enterobacteriaceae*가 각각 7.9~5.0%를 차지하였고, 이밖에 *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, yeast 등이 少數 存在하였다(Table 4).

Table 4. Generic composition of isolates from fresh sardine

Species	Number of strains	%
<i>Moraxella</i>	88	31.4
<i>Pseudomonas</i>	80	28.6
<i>Flavobacterium-Cytophaga</i>	22	7.9
<i>Vibrio</i>	20	7.2
<i>Acinetobacter</i>	17	6.1
<i>Micrococcus</i>	16	5.7
<i>Enterobacteriaceae</i>	14	5.0
<i>Staphylococcus</i>	6	2.1
<i>Arthrobacter</i>	6	2.1
<i>Aeromonas</i>	4	1.4
Yeast	3	1.1
Unknown strains	4	1.4
Total	280	100.0

한편 Shewan(1971)은 北洋에서 漁獲된 魚類에서 細菌調査 結果, *Moraxella* spp.가 40%로 제일 많았고, 다음이 *Pseudomonas* spp.로서 22%였으며, Sera와 Ishida(1972)는 海産魚의 消化管内의 主種 細菌은 *Vibrio* spp.라고 報告한 바 있으며, Horie(1973)는 海産魚에서의 主種 細菌이 *Pseudomonas* spp.로 53%였다고 하였고, Lee와 Pfeifer(1975)는 Dungeness crab의 内容物에서는 *Moraxella* spp.가 으뜸이고 다음이 *Pseudomonas* spp.였다고 보고하였는데, 이상의 結果는 本 研究結果와 비슷한 傾向이었다.

Table 5. Distribution of the strains isolated from the fresh sardine by their characteristics

Check items	Number of tested strains	Positive result	
		No. of strains	%
Gram reaction	280	31	11.1
Proteolysis 1)	280	56	20.0
2)	213	110	52.0
Lipolysis	280	175	62.5
H <sub>2</sub> S production	280	29	10.5

1) In fresh samples

2) In samples stored at about 18~20°C for 48 hours.

分離된 280 菌株中에서 249 菌株인 약 90%가 Gram 음성균이었으며, 脂肪分解能에 있는 菌株는 175 菌株로 62.5%나 되었고, H<sub>2</sub>S를 生産하는 것은 10.5%였다(Table 5). 蛋白質 分解能에 있는 菌株數는 新鮮할 때에는 56 菌株로 20%이던 것이 18~20°C에서 48시간 경과한 후에는 급격히 증가하여 213 菌株中에서 110 菌株로 52%나 되었다. 이상의 結果를 綜合해 보면, 정어리 内臟에 分布하고 있는 대부분의 細菌은 無孢子 Gram 陰性 桿菌인데 15°C에서 25°C까지는 溫度에 그다지 影響을 받지 않고 잘 자라며, 또 蛋白質 分解性이나 脂肪 分解性 細菌의 分布比率이 높은 것이 정어리의 腐敗 速度가 빠른 原因이라고 여겨진다.

3. 蛋白質 分解性이 強한 細菌의 細菌學 的 · 培養의 特性

Standard method with caseinate agar plate 에서 蛋白質 分解能이 強한 두 菌株를 選擇하여 細菌學 的 特性을 調査한 結果는 Table 6 과 같다. 101 番

Table 6. Characteristics of strong proteolytic bacteria isolated from the fresh samples

Test	#101	#102
Cell morphology	rod	rod
Gram reaction	—	—
Spore formation	—	—
Motility	+	—
Production of oxidase	+	+
catalase	+	+
H <sub>2</sub> S	+	—
Pigmentation	—	Yellow
Fluorescent	—	—
Hugh-Leifson(glucose) fermentative	—	±
oxidative	—	—
Gelatin liquefaction	+	+
Nitrate reduction	+	—
Growth in S <sub>110</sub>	—	—
Penicillin medium (3 I. U.)	+	+
Indole	—	—
V-P	—	—
Methly red	—	—
Citrate utilization	—	—
Starch hydrolysis	±	+
Casein hydrolysis	+	+
Growth at		
5°C	very slow	very slow
45°C	very slow	—
50°C	—	—
Clear zone size on the caseinate agar medium (HC ratio)*	2.3	2.0
Supposed species	<i>Pseudo-</i> <i>monas</i>	<i>Flavobacterium-</i> <i>Cytophaga</i>

\* HC ratio: size of clear zone/colony size, cultured for 38 hrs.

菌株는 *Pseudomonas* spp. 로, 102 番 菌株는 *Flavobacterium* spp. 로 同定되었으며, 편의상 *Pseudomonas* 101 과 *Flavobacterium* 102로 정했다. 두 菌株 모두 發育 最適 pH는 中性 附近인 7.5였으며, 適溫은 25°C 였다.

分離된 菌株中에서 제일 強한 蛋白分解能을 가지고 있는 *Pseudomonas* 101 菌株를 pH 7.5로 調整된 TPY broth에 接種하여 25°C, 100 rpm으로 調節된 shaking incubator에서 培養하면서 時間 경과

에 따른 pH變化, 菌의 增殖度 및 이에 따른 酵素의 活性을 測定한 結果는 Fig.1 과 같다. 細菌培養時間에 따른 pH變化는 거의 없었다.

또 420 nm에서 absorbance를 測定하여 菌의 增殖을 測定한 結果, 培養 6時間 後에 對數增殖期에 돌입하였으며, 이때 generation time은 76분이었는데, 21時間 培養後에 maximum growth에 到達하였다. 酵素의 生成은 18時間 培養後부터 서서히 시작되어 培養 30時間 경에 最高에 達하였고, 培養 36時間까지 別變化를 나타내지 않았다.

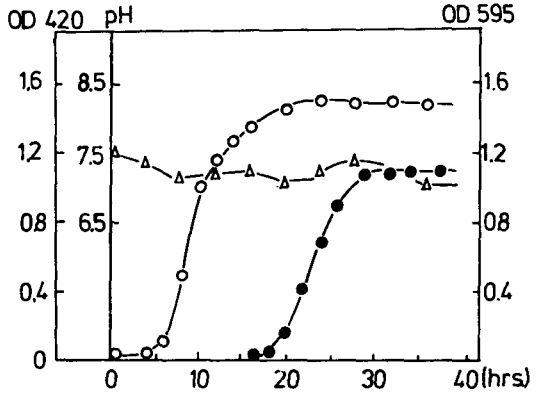


Fig. 1. Changes of bacterial growth, pH and proteolytic activity of produced enzyme by *Pseudomonas* 101 during the shaking culture

○—○ Bacterial growth, OD 420nm  
●—● Proteolytic activity, OD 595nm  
△—△ pH

4. *Pseudomonas* 101 菌株가 生成한 protease의 特性

*Pseudomonas* 101 菌株를 제대 배양하여 활성화시킨 다음, TPY broth에 接種하여 發育 最適條件에서 30時間 振盪培養한 다음, 菌體를 除去한 培養液을 粗 酵素液으로하여 酵素作用의 最適 pH와 溫度를 測定한 結果는 Fig 2, 3 과 같다. pH에 따른 酵素活性은 pH 4.5이하의 酸에서는 매우 不安定하였으나, pH 5.0~11.0 사이에서는 비교적 安定하여, 最適 pH인 9.0에서의 活性에 比하여 80% 이상의 活性을 유지하고 있었다. 그리고 pH 8.0~11.0 사이에서는 最高活性의 90% 정도를 나타냄으로써, 本 *Pseudomonas* 101 菌株가 生成한 酵素는 alkaline protease임을 알수 있었다.

또 溫度에 따른 酵素의 活性度를 測定한 結果 35°C에서 最高值를 나타내었다. 15°C에서는 最高值

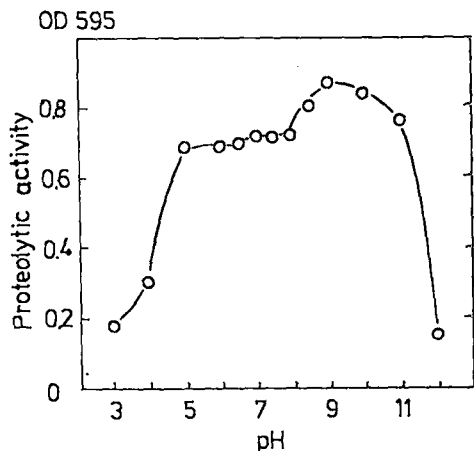


Fig. 2. Effect of pH on the activity of protease produced by *Pseudomonas 101*

Enzyme activity was showed by absorbance of 595 nm with HPA dye release method. The reaction mixture contained 1.0 ml enzyme solution and 30 mg HPA in 9.0 ml Tris-HCl buffer.

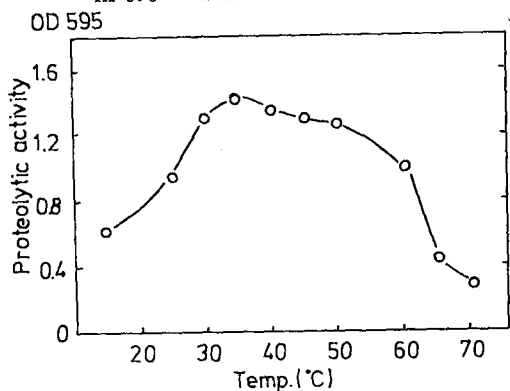


Fig. 3. Effect of temperature on the activity of protease produced by *Pseudomonas 101*

The reaction mixture contained 1.0 ml enzyme solution and 30 mg HPA in 9.0 ml Tris-HCl buffer. It was incubated at given temperature for 60 minutes, then the activity of enzyme was measured.

의 약 45%의 活性度를 가지고 있어 常溫에 放置하여둘때 정어리의 腐敗는 계속 빠른속도로 進行됨을 알 수 있었다. 酵素의 活性은 30°C에서 50°C까지는 큰 變化없이 最高 活性值의 93%를 나타내고 있었다.

### 要 約

毎年 정어리의 漁獲量은 많으나, 鮮度低下 速度가

떨라서 대부분 魚粉등 非食用으로 소비되고 있다. 따라서 정어리의 빠른 鮮度低下에 대한 細菌學의 原因解明의 일환으로 정어리 内臟細菌의 組成을 밝히고 蛋白質 分解能이 강한 細菌을 分離하여 그 菌의 培養學의 特性和 生成 酵素의 最適 活性條件을 實驗한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 新鮮한 정어리 内臟에서 分離된 細菌은 대부분 耐冷性 中溫細菌이었고, 生菌數는 25°C의 好氣의 條件下에서 培養했을때,  $1.7 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^5/g$ 이었고, 嫌氣의 條件下에서는  $2.9 \times 10^4 \sim 5.5 \times 10^5/g$ 이었으며, 18~20°C에서 48時間 放置한 試料에서는 好氣性菌이  $1.3 \times 10^7 \sim 5.5 \times 10^8/g$ 이었고, 嫌氣性菌은  $3.8 \times 10^7 \sim 3.3 \times 10^8/g$ 으로 나타났다.

2. 新鮮한 試料에서 分離된 280 菌株中에서 蛋白質 分解能이 있는것은 20%였고, 脂肪分解能에 있는 것은 62.5%,  $H_2S$ 를 生成하는 것은 10.5%였다. 또 常溫에서 48時間 放置한 試料에서는 213 菌株中 110 菌株가 蛋白質 分解能에 있었다.

3. 新鮮한 정어리의 内臟에는 *Moraxella* spp.와 *Pseudomonas* spp.이 각각 31.4%, 28.6%로 主種을 이루고 있었으며, 이외 *Flavobacterium-Cytophaga* spp., *Vibrio* spp., *Acinetobacter* spp. 등이 각각 6~8%로 비교적 많은 편이며, 이외 2% 内外로 차지하는 細菌種類가 數種이었다.

4. 分離된 280 菌株中에서 蛋白質分解能에 제일 강한 菌株는 *Pseudomonas 101*이었으며, 菌의 發育 最適條件은 25°C, pH 7.5 이었고 generation time 은 76分 이었다.

5. *Pseudomonas 101* 菌株가 生成한 酵素는 alkaline protease였으며, 酵素의 活性 最適條件은 pH 9.0, 53°C였으며 pH 5.0~11.0, 온도 30~50°C 範圍에서는 酵素活性이 強했다.

### 文 獻

- Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8th ed., p.217-382. The Williams & Wilkins Co.
- Canhos, V. P. 1981. Microorganisms isolated from sand filtered bay water and the proteolytic activity of a *Flavobacterium* isolate. Ph. D. thesis p.15-30. Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331. U. S. A.
- Corlett, D. A., J. S. Lee and R. O. Sinnhuber.

1965. Application of replica plating and computer analysis for rapid identification of bacteria in some foods. I. Identification scheme. *Appl. Microbiol.* 13, 808-817.
- Gibbs, B. M. and F.A. Skinner. 1966. Identification methods for microbiologist. p.1-6, Academic Press.
- Hamid Aleya, Taizo Sakada and Daiichi Kakimoto. 1976. Microflora in the alimentary tract of Gray Mullet-I. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 25(1), 59-65.
- Hamid Aleya, Taizo Sakada and Daiichi Kakimoto. 1977. Microflora in the alimentary tract of Gray Mullet-III. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 26, 79-87.
- Hamid Aleya, Taizo Sakada and Daiichi Kakimoto. 1979. Microflora in the alimentary tract of Gray Mullet-IV. Estimation of enzymic activities of the intestinal bacteria. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 45(1). 99-106.
- Harrigan, W.F. and M.E. McCance. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology, p.9-81. Academic Press.
- Horie Susumu. 1973. Bacterial Flora of Sea Fish. *Modern Media* 19(5), 9-20.
- Lee, J. S. 1976. Proteolytic microorganisms. In compendium of methods for the microbiological examination of foods. Marvin L. Speck, ed., Prepared by APHA. p.190-193.
- Lee, J. S. and D. K. Pfeifer. 1975. Microbiological characteristics of Dungeness crab, *Cancer magister*. *Appl. Microbiol.* 30, 72-78.
- 長谷川 武治. 1975. 微生物の分類と同定. (東京大學出版會), p.203-263.
- Okuzumi Masayo and Susumu Horie. 1969. Studies on the bacterial flora in the intestines of various marine fish. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 35(1), 93-100.
- Rinderknecht, H., M.C. Geokas, P. Silverman and B.J. Haverback. 1968. A new ultra sensitive method for the determination of proteolytic activity. *Clinica Chimica Acta*, 21, 197-203.
- Sakada, T., K. Ueda and D. Kakimoto. 1977. Studies on the proteases of marine bacteria. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, 26, 63-78.
- Sakada, T., M. Nakaji and D. Kakimoto. 1978. Microflora in the digestive tract of marine fish. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* 27, 65-78.
- Sakada, T., J. Okabayashi and D. Kakimoto. 1980. Variations in the intestinal microflora of Tilapia reared in fresh and sea water. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 46(3), 313-317.
- Sera, H. and Y. Ishida. 1972. Bacterial flora in the digestive tracts of marine fish-III. Classification of isolated bacteria. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 38(8), 853-858.
- Sheeran, S. and P. R. Smith. 1981. A second extracellular proteolytic activity associated with the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*, *FEMS Microbiology Letters*. 11, 73-76.
- Shewan J. M. 1971. The microbiology of fish and fishery products. *J. Appl. Bact.* 34(2), 299-315.
- 東條 敬, 徳山 龍明, 淺野 浩司. 1975. 海水棲のプロテアーゼ生成細菌に関する研究. 日本大學 農獸醫學部 學術研究報告, 32, 140-170.