

Streptococcus cremoris ML₄ 및 Streptococcus lactis ML₈의 생육중 질소원과 염농도가 세포내 및 세포외 프로테이나제 역가에 미치는 영향

장해춘 · 이형주
서울대학교 식품공학과

Effect of N-sources and NaCl Concentrations in Media on the Intra- and Extracellular Proteinase Activities of *Streptococcus cremoris* ML₄ and *Streptococcus lactis* ML₈

Hae-Choon Chang and Hyong-Joo Lee

Department of Food Science and Technology, Seoul National University, Suwon, Korea

Abstract

To investigate the effect of NaCl concentration and nitrogen sources in the medium for the Streptococci on the intra- and extracellular proteinase(ICP and ECP) which have been known as one of the major causes for the bitter peptide formation, *Streptococcus lactis* ML₈ and *Streptococcus cremoris* ML₄ strains were incubated at 0-4% NaCl in the medium and Na-caseinate as a nitrogen source 0-100%, and the cell growth, ICP and ECP activities were analyzed. As the concentration of the NaCl in the medium increased, the growth and ECP activity decreased but the ICP activity/10¹⁰ cells increased on the contrary. This implied that the NaCl in the medium affects only the ECP which is associated mainly to the cell wall and cell membrane but not the ICP activity. When the content of the caseinate instead of other low molecular nitrogen sources were increased in the medium, the cell growth was lowered while the ECP activities increased probably by induction of proteinase production.

Key words: Lactic acid bacteria, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*, Intracellular proteinase, Extracellular proteinase.

서 론

유산균의 단백질 분해효소계는 세포내의 위치에 따라 크게 “세포외” 및 “세포내” 효소로 구분된다. 이중 세포외 프로테이나제(extracellular proteinase, ECP)의 세포내 기능은 주로 세포 생육을 위한 세포외 단백질 분해로 알려져 있다. 이들 ECP는 아직 순수 분리된 보고가 없어 자세한 특성은 알 수 없으나 적어도 3종 이상 있는 것으로 추정되고 있다⁽²¹⁾. 또한 ECP의 유전자는 여러가지 크기의 플라스미드 DNA에 coding되어 있다는 보고가 있다⁽⁷⁾. 세포내 프로테이나제(intracellular proteinase, ICP)는 크로모솜 DNA에 coding되어 있는 것으로 추정되며⁽⁷⁾, 세포내에서의 기능으로는 변성 및 결합 단백질의 제거, 자이모젠의 활성화, 새로이 합성된 단

백질의 합성 종료 등에 관여하는 것으로 알려져 있다^(7,28). ICP는 순수 분리되어 그 특성에 관한 몇 건의 보고가 있다^(24,25,26,27).

유제품 발효 및 숙성시 우유단백질인 카제인 등은 펩타이드로 분해되고, 이때 생성된 펩타이드중 소수성이 높은 것은 쓴 맛을 나타내게 된다⁽²⁾. 이들 펩타이드는 세포내 펩티다제에 의해 아미노산 등으로 분해되어 쓴 맛이 없어질 수 있다. 그러므로 발효과정중 쓴 맛의 형성과 제거현상은 동시에 일어나게 되고, 제품의 쓴 맛 여부는 최종 발효 후 제품내에 남아 있는 쓴 맛 펩타이드 양에 따라 결정된다^(1,10,11).

단백질 발효중 쓴 맛 펩타이드를 형성하는 영향 요인은 유산균의 strain 종류, 종균의 bacteriophage의 오염 여부, pH, NaCl 농도, 종균농도, 우유의 조성 등이 있다^(5,6). 그러나 이러한 요인이 세포농도 즉 쓴 맛 펩타이드를 생성할 수 있는 프로테이나제의 총 역가에 영향을

Corresponding author: Hyong-Joo Lee, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Seoul National University, Suwon, 440-744

미치는 것인지, 아니면 세포농도 보다는 역가 자체에 영향을 미치는 것인지는 그 의견이 일치하지 않고 있다.

본 실험에서는 *Streptococcus lactis* ML₈과 *Streptococcus cremoris* ML₄를 NaCl 과 질소원의 조성을 달리한 배지에서 배양하여 이와 같은 조건이 세포생육 및 효소 역가에 미치는 영향을 실험하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

종균

강한 쓴 맛 균주로 알려진 *Streptococcus lactis* ML₈은 Hansen Lab(Milwaukee)의 것을 사용하였고, 중간정도의 쓴 맛 균주인 *Streptococcus cremoris* ML₄는 한국 야쿠르트 연구소에서 분양받아 사용하였다.

균주의 생육조건

MRS 배지에 NaCl 농도를 0~4%로 하여 24시간 30°C에서 배양하였다. 종균의 농도는 1%씩 접종하였다. 배지내의 질소원 조성 영향을 보기 위한 실험에서는 MRS 배지내의 질소원의 조성은 Table 1과 같이 조정하였고, 종균 1%를 가하여 30°C에서 24시간 동안 배양하였다.

Table 1. Composition of nitrogen sources in MRS medium used for the experiment of the effect of nitrogen sources on the proteinase activity

	% (W/W) caseinate in total nitrogen of the medium				
	0	24	48	72	100
			(g/l)		
Meat extract	10	7.6	5.2	2.8	0
Peptone	10	7.6	5.2	2.8	0
Yeast extract	5	3.8	2.6	1.4	0
Na-caseinate	0	6	12	18	25

균체의 회수 및 생육도 측정

각 조건에서 배양된 배양액은 5°C, 10,000×g에서 25분간 원심분리하고 0.05M, pH 7.0의 인산완충용액으로 두 번 씻은 다음 세균 현탁액을 만든 후, 580nm에서 흡광도를 측정하여 균의 생육도를 측정하였다.

조효소액의 조제

유산균 세포는 5°C, 30-40분간 sonicator로 파쇄시켰

다. 이를 27,000×g, 5°C에서 25분간 원심분리시켜 상정액을 세포내 프로테이나제 조효소액으로 사용하였다. 세포외 프로테이나제액의 조제를 위해서는 각 조건에서 배양된 배양액을 원심분리(10,000×g, 5°C, 25분)한 후 상정액을 ammonium sulfate의 50% 포화도에서 하룻밤 방치한 후 10,000×g, 5°C에서 25분간 원심분리하였다. 침전물에 0.05M 인산완충용액(pH 7.0)을 가하여 단백질 용액을 만들고, 이 용액을 5°C, 같은 인산완충용액으로 24시간 투석시켜 세포외 프로테이나제의 조효소액을 얻었다.

프로테이나제 역가의 측정

1% 카제인 용액 5ml에 효소액 1ml를 넣어 37°C에서 10시간 배양시켜 반응 후, 10ml의 12% Trichloroacetic acid(TCA)를 넣어 반응을 중지시켰다. 혼합물을 여과한 후(Whatman No. 1) 여액을 Hull^(3,4) 방법에 의해 분석하였다. 효소역가 1단위는 10시간 동안 1μg의 TCA 가용성 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

NaCl 농도에 따른 균체 생육도

Fig. 1에서 배지내의 NaCl 농도가 높아질 수록 세균 성장은 점차적으로 감소하였으며, *Str. lactis* ML₈은 4%에서도 성장하였는데, 이와 같은 내염성 특징은 이미

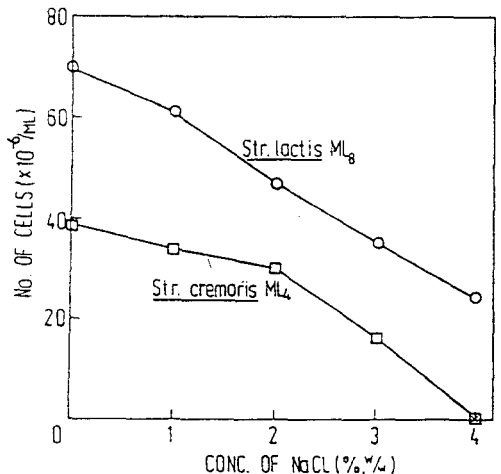


Fig. 1. Effect of NaCl concentration in the medium on the growth of the Streptococci.

잘 알려진 바와같다(6,10,11). 즉 염의 농도가 높아질수록 이 염에 의해 세포구조에 변화를 가져오고, 세포구조의 변화는 세포가 흡수할 수 있는 기질의 투과를 저해함으로써 세포 생육이 저하되는 것으로 알려져 있다.

NaCl 농도에 따른 프로테이나제 역가

Fig 2에서 *Str. cremoris* ML₄의 ICP의 총 역가는 성장율과 비슷한 경향으로 감소하였으나, *Str. lactis* ML₈ 균주의 1~4% NaCl 농도에서의 역가는 크게 차이 나지 않았다. 두 균주 모두 단위 균체당 효소 역가는 1% 또는 1~2%에서 가장 낮았으며 농도가 높아질 수록 증가하는 것으로 나타났다. Fig 3에서 ECP의 역가는 NaCl 농도가 높아질 수록 감소했으며 이는 NaCl 존재 시 프로테이나제의 분비가 감소한다는 보고(12)와 일치한다. 단위 균체당 효소역가 역시 농도의 증가에 따라 *Str. cremoris* ML₄는 조금씩 감소하고 *Str. lactis* ML₈은 약간 증가하는 것으로 나타났으나 그 경향은 ICP와는 달리 대체로 균체의 생육도와 같은 경향으로 나타나고 있다.

유산균 발효중 쓴 맛 품미에 대한 NaCl의 영향은 쓴

맛 펩타이드의 생성과 분해과정에서 각기 다르게 나타나 는 것으로 알려져 있다. 먼저 쓴 맛 펩타이드의 생성과정 에서는 NaCl이 쓴 맛 펩타이드 생성요인의 하나인 레넷 과 세포벽 프로테이나제의 역가를 저하시키거나(8,14), 이 온 강도를 높임으로써 소수도가 높은 β-카제인의 un-folding을 방해하고 가수분해를 억제함으로써 평균 소수 도가 높은 쓴 맛 펩타이드가 덜 생성된다고 설명되었 다(15). 한편 쓴 맛 펩타이드 분해과정에서는 NaCl이 세 포벽이나 세포막의 수축등 구조변화를 일으킴으로써 주 로 세포의 프로테이나제에 의해 형성된 쓴 맛 펩타이드가 세포내로 흡수되어 균체내 펩티다제에 의해 분해되는 것 을 방해하는 것으로 알려져 있다(11,16). 또한 NaCl에 의 한 이온 강도의 증가가 쓴 맛 펩타이드간의 소수작용을 증가시켜 세포벽 및 세포막 투과를 저해한다고 설명되었 다(17). 이와 같은 사실을 Fig 2, 3의 결과와 연관시켜 보 면 ECP의 경우 NaCl의 농도증가와 함께 대체로 감소 하나(Fig 3), ICP의 경우는 크게 영향을 받지 않고 단 위 균체당 역가는 오히려 고농도 NaCl에서 높아진 것으 로 나타나(Fig 2), 배지중의 NaCl이 균체의 세포막 세 포벽 및 그것들에 연관된 세포의 프로테이나제 역가에만

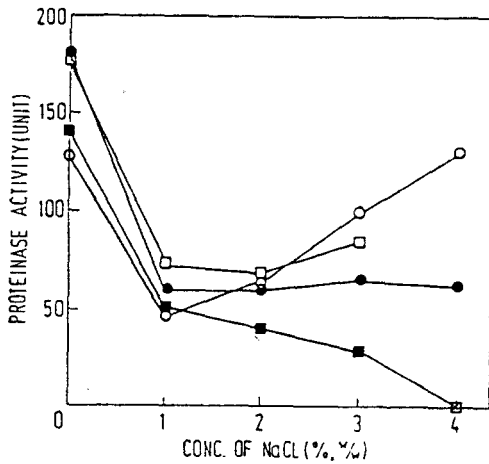


Fig. 2. Effect of NaCl concentration in the medium on the intracellular proteinase activity of the Streptococci. ●—● Intracellular proteinase activity of the total number of *Str. lactis* ML₈. ■—■ Intracellular proteinase activity of the total number of *Str. cremoris* ML₄. ○—○ Intracellular proteinase activity of calculated for the 10¹⁰ cells of *Str. lactis* ML₈. □—□ Intracellular proteinase activity of calculated for the 10¹⁰ cells of *Str. cremoris* ML₄.

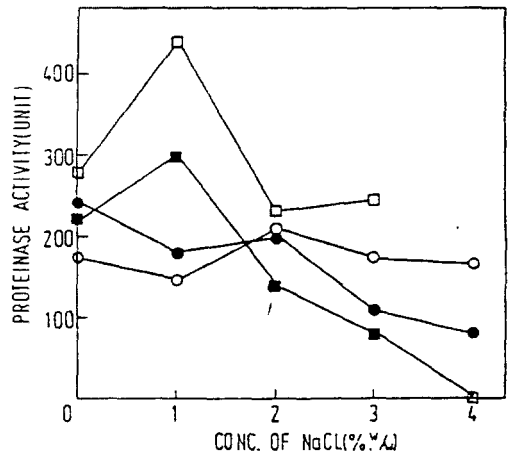


Fig. 3. Effect of NaCl concentration in the medium on the extracellular proteinase activity of the Streptococci. ●—● Extracellular proteinase activity of the total number of *Str. lactis* ML₈. ■—■ Extracellular proteinase activity of the total number of *Str. cremoris* ML₄. ○—○ Extracellular proteinase activity of calculated for the 10¹⁰ cells of *Str. lactis* ML₈. □—□ Extracellular proteinase activity of calculated for the 10¹⁰ cells of *Str. cremoris* ML₄.

영향을 미침을 알 수 있다.

배지내의 질소원 조성에 따른 균체생육도

Fig 4에서 보면 배지 질소원중 카제인의 비율이 0~48% 범위에서는 그 함량이 높아질 수록 세균 성장이 약간 증가하는 것으로 나타났다. 이는 0~48% 범위에서는 유산균이 성장하기 충분한 양의 Vitamin, 유리아미노산이 존재하고 48%에서는 0% 보다, 균의 생육에 따른 ECP의 분비로 카제인이 분해되어 보다 높은 펩타이드의 함량을 지니게 된다. 이러한 현상은 유산균의 영양원으로 동량의 유리아미노산과 펩타이드중 펩타이드가 더 높은 세균 성장율을 나타낸다는 보고와 일치한다^(9,18). 카제인 함량 48~100% 조건에서의 성장률 감소 현상은 대부분의 유산균주가 아미노산의 공급원으로 카제인만이 사용될 때는 잘 자라지 못하며, 생육 초기에 몇몇 특수 유리아미노산을 영양원으로 요구하는 특이성을 지니고, 배지내에 질소원으로 카제인에 유리 아미노산이나 펩타이드 첨가시 더 잘 자란다는 보고와 일치한다^(13,19,20).

배지내의 질소원 조성에 따른 프로테이나제 역가

여러가지 다른 질소원 조성에서 배양된 균체의 ICP 및 ECP 역가를 각각 Fig. 5와 6에 나타내었다. 단위 균체당 ECP, ICP 역가는 카제인 함량 0% 및 100%에서는 상당히 높고, 질소원 조성 24~77%에서는 그에 비해 낮게 나타났다. 이러한 결과는 유산균의 특수 배지의 조성

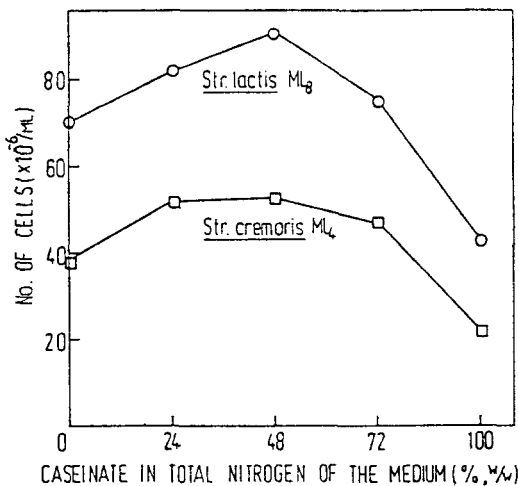


Fig. 4. Effect of nitrogen source composition in the medium on the growth of the Streptococci.

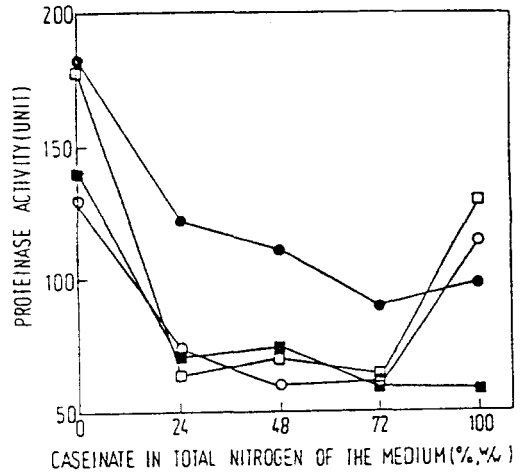


Fig. 5. Effect of nitrogen source composition in the medium on the intracellular proteinase activity of the Streptococci.
 ●—● Intracellular proteinase activity of the total number of *Str. lactis* ML₈
 ■—■ Intracellular proteinase activity of the total number of *Str. cremoris* ML₄
 ○—○ Intracellular proteinase activity of calculated for the 10¹⁰ cells of *Str. lactis* ML₈
 □—□ Intracellular proteinase activity of calculated for the 10¹⁰ cells of *Str. cremoris* ML₄

인 MRS 배지조성과 같은 최적 조건에서는 활성이 좋은 유산균이 생성되고, 질소원을 모두 카제인으로 한 100%의 조건에서는 이러한 환경에서 생육할 수 있는 적은 수의 유산균만이 생육하게 되며⁽¹⁵⁾ ECP의 경우 이들은 배양시 기질도 카제인이고 여기서 분리된 효소의 역가 측정시 사용된 기질도 같은 카제인이므로 프로테이나제의 생산속진으로 그 역가가 높게 나타난 것으로 추정된다.

요 약

*Streptococci*의 배양중의 염의 농도나 배지내 질소원의 조성 등이 쓴 맛 펩타이드의 형성에 깊이 관여한다고 알려진 세포내 및 세포외 프로테이나제(ICP, ECP)의 역가에 미치는 영향을 조사하기 위해 *Streptococcus lactis* ML₈ 및 *Streptococcus cremoris* ML₄ 두 균주를 NaCl 농도 0~4%, 배지 질소원중 카제인 함량을 0~100%로 달리한 조건에서 배양하고 그 때의 생육도와 균체내 및 균체의 프로테이나제의 역가를 측정하고 또한 같은 균체수에서의 프로테이나제 역가를 비교하기 위해

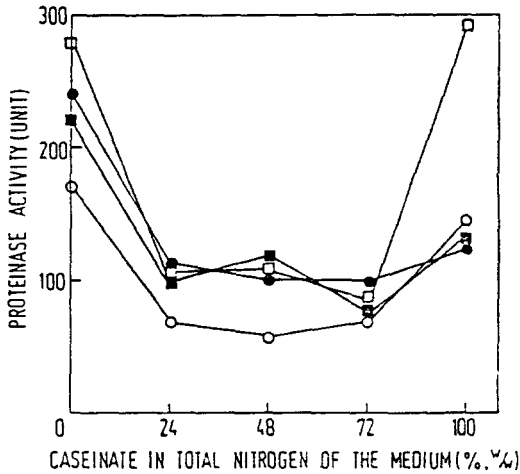


Fig. 6. Effect of nitrogen source composition in the medium on the extracellular proteinase activity of the Streptococci.

- Extracellular proteinase activity of the total number of *Str. lactis* ML₈
- Extracellular proteinase activity of the total number of *Str. cremoris* ML₄
- Extracellular proteinase activity of calculated for the 10¹⁰ cells of *Str. lactis* ML₈
- Extracellular proteinase activity of calculated for the 10¹⁰ cells of *Str. cremoris* ML₄

10¹⁰ 세포당 효소의 역가도 계산하였다. 배지중 NaCl 농도가 증가함에 따라 균체의 생육과 ECP의 역가는 감소했으나 ICP의 경우 10¹⁰ 세포당 역가는 오히려 증가하였다. 이는 배지중 NaCl이 세포벽과 세포막에 관련된 ECP의 역가에만 직접 영향을 미치고 ICP의 역가에는 큰 영향을 미치지 않음을 시사하는 것으로 생각되었다. 배지의 질소원중 미분해 단백질인 카제인의 함량을 높게 하였을 때 균체의 생육은 낮았으나 효소 생산에 촉진에 의해 ECP의 역가는 두 균주 모두 높아졌다.

문 헌

1. Schmidt, R.H., Morris, H.A., Castberg, H.B. and Mackay, L.L. : Hydrolysis of milk proteins by bacteria used in cheese making. *J. Agri. Food Chem.*, **24**, 1106(1976)
2. 김수호·이형주 : 치즈 및 된장에서의 쓴 맛 펩타이드 특성. *Korean J. Food Sci. Tech.*, **17**, 276(1985)
3. Hull, M.E. : Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis

- of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.*, **30**, 881(1947)
4. Citt, J.E., Sandine, W.E. and Ellier, P.R. : Some observation on the Hull method for measurement of proteolysis in milk. *J. Dairy Sci.*, **46**, 337(1963)
5. Emmons, D.B., Mcgugan, W.A. and Elliot, J.A. : Effect of strain of starter culture and of manufacturing procedure on bitterness and protein breakdown in cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, **45**, 332(1962)
6. Standhouders, J. : Machanism of the formation of the bitter flavor defect in cheese. XX. *Intern. Dairy Cong.*, Paris, 39ST(1978)
7. Law, B.A. and Kolstad, J. : Proteolytic system in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, **49**, 225(1983)
8. Standhouders, J. : The proteolytic activity of rennet and starter bacteria in cheese with reference to bitter flavor. *Proc. XVI. Intern. Dairy Cong.* B353(1962)
9. Reiter, B. and Moller-Madsen, A. : Reviews of the progress of dairy science. Section B. Cheese and butter starters. *J. Dairy Res.*, **30**, 419(1963)
10. Stadhouders, J., Hup, G., Exterkat, F.A. and Visser, S. : Bitter flavour in cheese. 1. Mechanism of the formation of the bitter flavour defect in cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, **37**, 157(1983)
11. Visser, S., Hup, G., Exterkate, F.A. and Stadhouders, J. : Bitter flavour in cheese. 2. Model studies on the formation and degradation of bitter peptides by proteolytic enzymes from calf rennet, starter cells and starter cell fractions. *Neth. Milk Dairy J.*, **37**, 169(1983)
12. Mill, O.E. and Thomas, T.D. : Release of cell wall associated proteinase from lactic streptococci. *N.Z. J. Dairy Sci. and Tech.*, **13**, 209(1978)
13. McDonald, I.J. : Utilization of sodium caseinate by lactic streptococci. *Can. J. Microbiol.*, **2**, 607(1956)
14. Stadhouders, J. and Hup, G. : Factors affecting bitter flavour in Gouda cheese. *Neth. Milk Dairy J.*, **29**, 335(1975)
15. Phelan, J.A., Guiney, J. and Fox, P.F. : Proteolysis of β -casein in cheddar cheese. *J. Dairy Res.*, **40**, 105(1973)
16. Ou, L.T. and Marquis, R.E. : Electromechanical interactions in cell walls of gram positive cocci. *J.*

- Bacteriol.*, 101, 92(1970)
17. Visser, S., Slangen, K.J. and Hup, G. : Some bitter peptides from rennet treated casein. A method for their purification, utilizing chromatographic separation on silica gel. *Neth Milk Dairy J.*, 29, 319(1975)
 18. Sharpe, M.E., Law, B.A. and Sezgin, E. : Amino acid nutrition of some commercial cheese starters in relation to their growth in peptone supplemented whey media. *J. Dairy Res.*, 43, 293(1976)
 19. Kihara, H., Ikawa, M. and Snell, E.E. : Peptides and bacterial growth. X. Relation of uptake and hydrolysis to utilization D-alanine peptides for growth of *Streptococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.*, 236, 172(1961)
 20. Anderson, A.W. and Elliker, P.R. : The nutritional requirements of lactic streptococci isolated from starter cultures. II. A stimulatory factor required for rapid growth of some strains in reconstituted nonfat milk solids. *J. Dairy Res.*, 36, 608(1953)
 21. Exterkate, F.A. : Comparison of strain of *Streptococcus cremoris* for proteolytic activities associated with the cell wall. *Neth. Milk Dairy J.*, 30, 95(1976)
 22. Gasson, M.J. : Plasmid compliments of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactis streptococci by protopalst-induced curing. *J. Bacteriol.*, 154, 1(1983)
 23. Perce, L.E., Skipper, N.A. and Jarvis, B.D.W. : Proteinase activity in slow lactic acid producing variants of *Streptococcus lactis*. *Appl. Microbiol.*, 27, 933(1974)
 24. Ohimiya, K. and Sato, Y. : Purification and properties of intracellular proteinase from *Streptococcus cremoris*. *Appl. Microbiol.*, 30, 738(1975)
 25. Desmazeud, M.J. and Zeraco, C. : General properties and substrate specify of an intracellular neutral protease from *Streptococcus diacetylactis*. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 16, 851(1976)
 26. Zeraco, C. and Desmazeud, M.J. : Hydrolysis of β -casein and peptides by intracellular neutral protease of *Streptococcus diacetylactis*. *J. Dairy Sci.*, 63, 15(1980)
 27. Cowman, R.A. and Speck, M.L. : Proteinase enzyme system of lactic streptococci. I. Isolation and partial characterization. *Appl. Microbiol.*, 15, 851(1967)
-
- (1988년 8월 24일 접수)