

체다치즈에서 분리한 내생성미생물의 단백질분해효소의 특성

김은아 · 이경옥 · 부원백 · 이형환* · 광해수

서울우유협동조합 기술연구소, *건국대학교 생물학과

Characterization of Extracellular Proteolytic Enzyme of Isolated Psychrotrophic Bacteria from Cheddar Cheese

Eun-Ah Kim, Kyung-Wook Lee, Won-Back Boo, Hyung-Hoan Lee* and Hae-Soo Kwak

Seoul Dairy Co-op, Institute of Dairy Food Research

*Department of Biology, Kon Kuk University

Abstract

Psychrotrophs producing protease were isolated during ripening periods of Cheddar cheese and one of them containing the highest protease activity was identified as *Pseudomonas fluorescens* 65. The extracellular proteolytic enzyme was partially purified from *P. fluorescens* 65 through the Sephadex G-100 gel filtration. The protease was eluted between 190 ml and 230 ml of elution volume of sodium phosphate buffer. The purified protease showed a single band in SDS-PAGE and its molecular weight was 47,000. The composition of amino acid for the protease was determined and the most abundant amino acids were glutamic acid (14.96%) and serine (13.86%). The optimum temperature and pH for the activity was 45~50°C and 6.0, respectively.

Key words: Cheddar cheese, ripening period, psychrotrophs, protease activity, *P. fluorescens*

서 론

치즈의 숙성이란 미생물학적, 생화학적 및 화학적인 변화에 의해서 치즈 특유의 풍미, 성질 및 조직 등을 형성하는 것으로 starter 미생물 및 치즈 제조시 오염에 의한 미생물이 생산하는 효소, 첨가된 응유효소(rennet) 그리고 우유 자체내의 효소 등에 의해 치즈 성분이 분해작용을 받아 숙성이 진행되며 응유효소의 종류와 농도, starter 미생물 및 숙성조건에 따라 치즈의 품질이 영향을 받는 것으로 알려져 있다⁽¹⁾. 치즈숙성 중에 rennet에 의한 1차 분해에 이어 starter로 사용된 젖산균으로부터 용균되어 유리되는 protease, peptidase, transaminase, decarboxylase 및 phosphatase 등과 기타 세균에 의한 효소 등에 의해서 숙성이 진행되어 치즈의 풍미 및 조직에 영향을 미치는데 특히 단백질의 분해는 조직을 부드럽게 하고⁽²⁾ 지방분해효소는 유지방을 분해하여 유리지방산을 생성⁽³⁾ 치즈 특유의 풍미를 형성한다. 치즈의 자연숙성 중 microflora에 대해서는 Stadhouders⁽⁴⁾가 보고한 바와 같이 젖산균이 주종을 이루고 대장균과 내생성세균과 같은 숙성 중이나 제조과정 중에 오염된

기타 오염미생물이 존재하고 있는데 일반적으로 제품의 부패에 관여하는 오염미생물이 어느 정도 존재하여도 치즈숙성에 해로운 영향을 주지 않는 것을 고려해 본다면 이들 기타 미생물 중 대다수를 차지하는 내생성미생물도 젖산균의 역할과 마찬가지로 효소를 분비해 숙성 중 풍미와 조직형성에 기여한다고 볼 수 있다.

체다치즈의 숙성 중에 존재하는 내생성세균은 일반적인 원유의 오염원으로 냉장보관 중 증식 가능하고 단백질, 지방, 탄수화물 등을 분해하는 세포와 효소를 합성하기 때문에 원유나 유제품의 품질과 수율에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다⁽⁵⁾. 분류학적으로 내생성균에 속하는 주된 그람음성균으로는 *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium* sp., *Achromobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Enterobacter* sp. 등이 있으며 원유나 유제품(치즈) 중 내생성 미생물이 차지하는 총 세균수에 대한 비율은 8~20% 정도이고 그 중 80%가 내열성의 단백질분해효소 및 지방분해효소를 생산하며 이 중 30~40% 이상이 *Pseudomonas* sp.인데 이는 그람음성균으로 세포의 효소를 생성하는 호기성 간균이다⁽⁶⁾.

본 연구에서는 체다치즈 숙성 촉진연구의 기초연구로서 정상적인 체다치즈 숙성기간 중에 일정한 수를 유지하며 치즈 내에 존재하는 내생성세균을 분리해 내어 단백질분해효소를 생산하는 우량균주를 선발 extracellular protease를 정제하고 이 효소의 특성을 조사하는데 그 목적을 두었다.

Corresponding author: Hae-Soo Kwak, Seoul Dairy Co-op, Institute of Dairy Food Research, Banwol Industrial Complex, Kyonggi-do 425-110, Korea

재료 및 방법

사용치즈 및 배지

본 실험에 사용된 치즈는 서울우유 협동조합에서 생산하는 체다치즈를 8~10°C에서 12개월 동안 숙성시키면서 매달 시료채취한 것을 사용하였다. 내냉성세균의 분리를 위한 기초배지로는 nutrient agar(Difco Laboratories, Co. 이하 모두 동일)를 사용하였고 효소활력 우량균주 선발을 위해서는 nutrient broth(NB)와 10% 환원탈지유 용액을 사용하였다. 치즈숙성 중 미생물의 변화를 관찰하기 위해서 Richardson⁽⁷⁾의 방법에 따라 유산균은 BCP agar, 대장균군은 desoxycholate agar, 효모·곰팡이는 potato dextrose agar, 총 균수는 standard plate count agar를 사용하였다. 이들 배지는 121°C, 15 lb에서 15분간 가압숙윤 멸균하여 사용하였다.

내냉성세균의 분리 및 동정

체다치즈를 분쇄한 후 적당한 배율로 희석하여 pouring plating하여 숙성기간 중 미생물(총 균수, 유산균수, 대장균수, 효모·곰팡이수, 내냉성세균수)의 변화를 관찰하였는데 총 균수는 30°C에서 2일, 유산균수는 37°C에서 3일, 대장균군은 37°C에서 18시간, 효모·곰팡이는 30°C에서 3일, 내냉성세균은 7°C에서 15일 각각 배양한 후에 균수를 측정하였다. 이 중 내냉성세균은 7°C에서 15일간 배양한 후 형성된 colony 중에서 직경 5 mm 이상으로 생육이 잘된 균주 200개를 선발하여 nutrient agar slant에 냉장보관하였다. 선발된 200개의 내냉성세균을 NB에 접종하여 25°C, 18시간 배양한 것을 효소액으로 사용하여 protease activity 측정을 하여 20개를 선발하였고 20개 균주의 protease를 partial purification하여 protease activity가 가장 높은 3개의 균주를 선발하였다. 분리된 내냉성미생물의 형태학적 특성과 분류학적 특성은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology⁽⁶⁾에서 사용된 방법을 이용하여 조사하였고 생화학적 특성은 Cowan and Steel⁽⁸⁾의 생화학적 검사방법을 이용하여 동정하였다.

단백질분해효소의 활력측정

분리된 내냉성세균의 단백질분해효소의 활력측정은 Hull's method⁽⁹⁾를 부분 수정하여 사용하였는데 다음과 같다. 10% 환원탈지유 5 ml에 효소액 1 ml을 첨가한 후 30°C에서 2시간 반응시킨 후 0.7 N trichloroacetic acid (TCA) 10 ml을 첨가하고 잘 혼합한 후 10분간 방치하였으며 이를 Toyo No. 2 여과지로 여과한 후 여과액 2.5 ml을 취하고 여기에 sodium carbonate reagent(75g sodium carbonate anhydrous, 10g sodium tetraphosphate in 500 ml distilled water) 5 ml을 첨가하고 vortex한 후 1.5 ml의 Folin's reagent(4 : 2=D.W. : phenol reagent)를 첨가하여 10,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상정액을 취해 650 nm에서 흡광도(O.D.)를 측정하여

tyrosine의 농도를 측정하였다. Tyrosine solution을 농도별로 분석하여 작성한 standard curve를 이용하여 흡광도에 따른 tyrosine의 농도를 구하였으며 protease activity는 효소액 1 ml을 30°C에서 2시간 반응시켰을 때 생성되는 $\mu\text{g TE}$ (tyrosine equivalent)를 말한다.

단백질분해효소의 추출과 gel filtration chromatography

선정된 내냉성세균으로부터 extracellular protease(이하 protease-65)의 추출은 Akuzawa and Yokoyama⁽¹⁰⁾ 방법에 따라 실시하였는데 10% 환원탈지유 용액에 25°C에서 48시간 배양한 후 20,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 침전물을 제거한 조효소액을 ammonium sulfate(35~60%)로 분획 침전하여 투석하였다. Protease-65의 분리는 Sephadex G-100(Sigma Chemicals, Co.) column(2.5×100 cm)을 사용하여 실시하였다. 시료 10 ml을 colum sodium phosphate buffer 0.2 M(pH 7.2)로 용출하였으며 10 ml씩 분획하여 분별수집기(fraction collector, Vision Co.)로 채취한 후 단백질농도와 extracellular protease의 활력을 측정하였는데 단백질농도는 분광광도계(UV-VIS Recording Spectrophotometer, Shimadzu UV-265)를 사용하여 280 nm에서 O.D.를 측정하였다. 이 중 단백질분해력이 있는 분획을 수거 동결 건조하여 농축한 다음 SDS-polyacrylamide gel 전기영동과 효소 반응조건 실험에 사용하였다.

SDS-PAGE와 아미노산 분석

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis 실험방법은 Laemmli⁽¹¹⁾의 방법을 약간 수정하여 전기영동하였으며 Weber and Osborn⁽¹²⁾ 방법에 따라 분자량을 계산하였다. Gel filtration으로 정제한 protease-65 15 mg을 산화방지제인 sodium sulfite를 사용한 acid hydrolysis 방법⁽¹³⁾으로 110°C에서 24시간 가수분해시킨 후 아미노산 분석 장치(Amino acid analyzer, Varian 9010 Solvent Delivery System, Varian Fluorichrom II Detector)로 분석한 다음 17가지 표준 아미노산(Pierce II)과 비교하여 protease-65의 아미노산조성을 조사하였다.

성장곡선 및 효소반응 최적조건 조사

*P. fluorescens*를 10% 환원탈지유에 접종하여 25°C에서 24시간 배양한 후 10% 환원탈지유 40 ml에 1% 접종하여 48시간 까지 2시간 마다 생균수와 pH를 측정하였고 남은 배양액을 20,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 상정액을 조효소액으로 사용하여 활력 측정을 한 후 성장곡선을 작성하였다.

10% 환원탈지유 용액 5 ml을 10°C에서부터 55°C까지 5°C 간격으로 조정된 항온수조에서 예비 가온시킨 다음 protease-65와 반응시킨 후 활력측정을 하여 최적온도를 측정하였고 최적 pH의 측정은 pH 5.5에서 pH 8.5까지 0.5 간격으로 조정된 다음 50°C에서 2시간 반응시킨 후 시험하였다. 또한 반응시간 경과에 따른 활력의 변화를

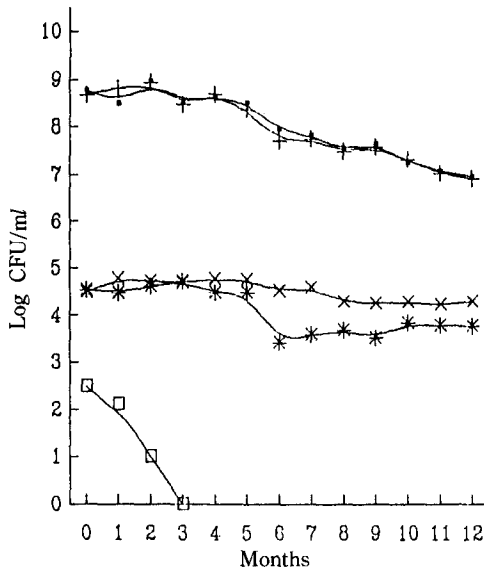


Fig. 1. Microflora in Cheddar cheese during ripening periods

*; Psychrotrophic bacteria, □—□; Yeast & Mold, *; Coliform bacteria, +; Lactic acid bacteria, ■—■; Total bacteria

측정하기 위하여 10% 환원탈지유 용액을 pH 6.0으로 조정하고 반응온도는 50°C에서 효소활력을 측정하였는데 0.5에서 4시간까지는 0.5시간 그리고 24시간까지는 4시간 간격으로 반응시간을 조정하여 활력을 측정하였다.

결과 및 고찰

치즈숙성기간 동안의 미생물의 변화

체다치즈 숙성기간 중의 미생물의 변화는 Fig. 1과 같다. 총균수는 숙성개시에 5.9×10^8 CFU/ml에서 숙성 12개월에는 9.9×10^6 CFU/ml로 전반적으로 균수가 조금씩 감소하는 경향을 보이고 있었으며 젖산균도 비슷한 수치와 경향을 보이는 것으로 보아 총 균수의 대부분이 젖산균인 것으로 생각된다. 내냉성세균은 3.0×10^4 CFU/ml에서 2.0×10^4 CFU/ml로 숙성 12개월 동안 일정한 균수를 유지하며 존재하고 있었고 대장균군은 숙성 초기에는 내냉성세균보다 수치가 높은 7.5×10^4 CFU/ml을 보였으나 숙성 5개월부터 감소하여 12개월에는 6.0×10^3 CFU/ml을 나타내었고 효모와 곰팡이는 숙성 개시에 3.1×10^2 CFU/ml였으나 계속 감소하여 숙성 3개월부터는 존재하지 않았다. Stadhouders⁽⁴⁾는 유제품 중의 미생물의 분포와 종류에 대한 연구에서 젖산균과 내냉성세균 이외에도 coliform bacteria와 yeast 등이 존재하고 있다고 보고하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 치즈숙성기간동안 starter로 사용된 젖산균(*Lactococcus lactis*, *L. cremoris*)와 더불어 내냉성 세균도 일정수 존재함을 알

Table 1. Biochemical and cultural characteristics of the psychrotrophic bacteria isolated from Cheddar cheese

Characteristics	Isolates		
	65	71	95
Gram staining	G(-) rod	G(-) rod	G(-) rod
Shape of cell			
diameter(μm)	0.7	0.7	0.7
length(μm)	1.5	1.5	1.2
Catalase production	+	+	+
Oxidase production	+	+	+W ^a
O/F test	0	0	-
Motility	+	+	+
Growth at 45°C	-	-	-
KCN	Nr ^b	NR	+W
Nitrate reduction	-	-	+
Indol production	-	-	-
Methylred test	-	-	-
Voges-prokauer test	NT ^c	NT	-
Simmon's citrate	+	+	+
Esculine	-	-	+
Malonate utilization	+	+	+
Urease production	-	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-	-
Lysine decarboxylase	-	-	+W
Arginine decarboxylase	+	+	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Hemolysis	-	-	+
Acid from glucose	-	-	-
lactose(in peptone water)	-	-	-
mannose(in OFBM ^d)	+	+	NT
sucrose	-	-	-
mannitol	-	-	-
inositol	-	-	-
sorbitol	-	-	-
raffinose	-	-	-

Final identification *Pseudomonas Pseudomonas Alcaligenes*

^aWeak positive ^bNo reaction ^cNot tested

^dOxidation fermentation basal medium

수 있었으며 이 사실로 미루어 보아 내냉성세균이 젖산균과 더불어 정상 체다치즈 숙성에 기여함을 관찰할 수 있었다.

내냉성세균의 분리 및 동정

체다치즈 숙성기간 12개월 동안 분리한 내냉성세균 200개에서 단백질분해 활력이 우수한 3개의 균주를 선발하였는데 선발된 균주의 형태학적 및 생화학적 특성은 Table 1과 같다. 선발균주 3개는 모두 그람음성균으로 polar flagellar를 지닌 운동성이 있는 간균으로 0~30°C에서 생육이 가능한 내냉성세균이었다. 45°C에서는 세균주 모두 생육하지 않았으며 최적성장온도는 25°C였다. 생화학적 특성을 살펴보면 Isolates 65, 71은 catalase와 oxidase를 생산하고 citrate, malonate, arginine을 이용하여 Isolate 95는 65와 71과는 달리 nitrate, esculine,

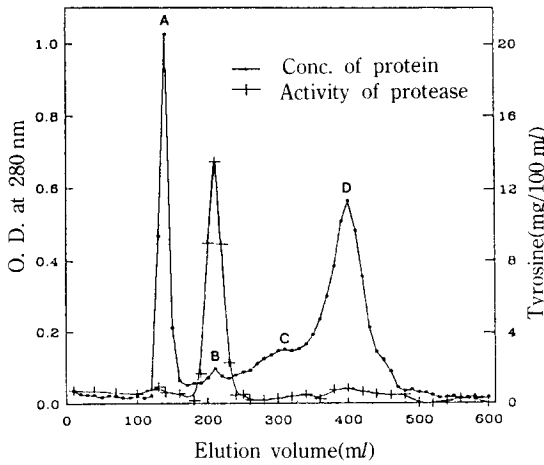


Fig. 2. Elution pattern of the protease preparation of *P. fluorescens* 65 from Cheddar cheese on Sephadex G-100

lysine을 이용하였고 hemolysis 현상을 나타내었다. Kwan⁽⁴⁾에 의하면 유제품 내의 저온성세균의 53% 이상이 *Pseudomonas*속인 것으로 나타났으며 Malik⁽¹⁵⁾은 유제품 중에서 단백질분해효소를 생산하는 내냉성세균을 분리 동정하였는데 *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* 등임을 보고하였다. 65와 71번 균주는 fluorescent pigment를 생산하는 전형적인 *P. fluorescens*로 95번은 *Alcaligenes denitrificans*로 각각 동정되었고 효소특성조사에 사용된 균주는 단백질분해활력이 가장 높은 65번 균주이다.

Gel filtration chromatography

분리된 *P. fluorescens* 65 배양액으로부터 원심분리하여 수거한 상정액을 35~60% ammonium sulfate로 염분획을 실시한 후 이 조효소액을 Sephadex G-100 gel filtration으로 분별한 결과는 Fig. 2와 같이 나타났다. 단백질은 A, B, C, D 4개의 분획으로 분별되었으며 각 분획의 protease activity를 측정할 결과 이중 중앙에 있는 190~230 ml 용출분획이 단백질분해력이 있는 것으로 보아 *P. fluorescens* 65은 한 개의 protease를 생산한다는 것을 알 수 있었다. 이 chromatogram은 Yan 등⁽¹⁶⁾이 원유에서 분리한 *P. fluorescens* LY13이 생산하는 protease의 chromatogram과 거의 일치하였고 분자량(4.5×10^4)은 유사한 범위였으며 최적 pH(pH 6.5~7.5)는 약간 높았다.

SDS-PAGE와 아미노산 분석

Sephadex G-100으로 분리한 단백질분해효소를 포함한 190~230 ml 분획 중 210 ml 분획 10 ml을 동결건조한 후 1 mg을 SDS sample buffer 20 μ l에 녹인 후 SDS-PAGE를 실시한 결과는 Fig. 3과 같았고 분자량을 계산한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같이 47,000이었다. Yan

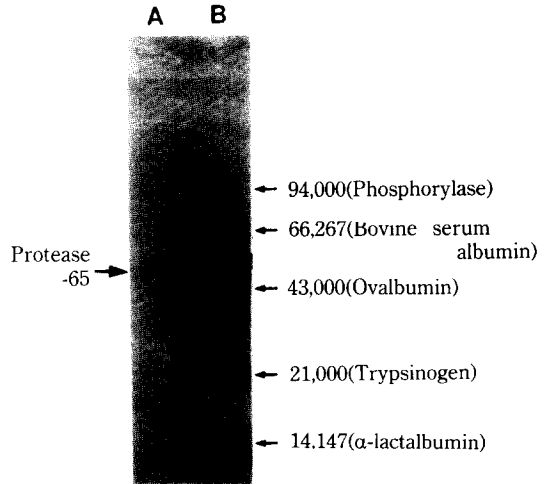


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophotogram of protease-65 from *P. fluorescens* 65 in Cheddar cheese A: Protease-65 B: Standard

등⁽⁶⁾은 LY13 효소의 분자량을 측정할 때 Sephadex G-200을 사용해서 측정한 것은 43,000이었고 SDS-PAGE로 측정한 결과는 45,000이었다고 보고한 것으로 보아 분자량 측정은 약간의 오차가 생길 수 있으므로 효소의 아미노산분석을 하여 효소특성을 조사하는 것이 바람직하다고 생각된다.

SDS-PAGE에서와 동일한 시료 15 mg을 아미노산 분석에 사용하였고 그 결과는 Fig. 5와 같았다. Tryptophane을 가수분해에 의해 파괴되어 존재하지 않았으며 protease 65의 특징은 methionine이 존재하지 않았다는 것이며 glutamic acid(14.96%)와 serine(13.83%)의 함량이 제일 높았으며 tyrosine(0.63%), phenylalanine(0.53%), histidine(0.43%)은 소량 존재하였다. Fairbairn과 Law⁽¹⁷⁾의 연구에서 *P. fluorescens* NCDO 2085는 glutamic acid(18.6%), glycine(14.5%), aspartic acid(11.1%), serine(11.1%)으로 본 실험결과와 유사하였다. Mayerhofer 등⁽¹⁸⁾에 의하면 *P. fluorescens* P 26이 생산하는 protease는 proline(17.9%)과 glycine(17.9%)의 함량이 높았으며 이 효소는 protease 65와 달리 cystidine이 존재하지 않았다.

성장곡선 및 효소반응 최적조건

P. fluorescens 65의 성장곡선은 Fig. 6과 같았다. *P. fluorescens* 65의 성장은 20시간 배양시 최고 균수인 5.0×10^8 CFU/ml을 보이면서 정지기로 접어 들었으며 이 시기의 단백질분해활력도 가장 높았다. pH는 배양시간이 경과하여도 일정한 것으로 보아 산을 생성하지 않는 것을 알 수 있었다. 대수증식기에 들어서서 효소활력이 급격히 증가하는 것으로 보아 대수증식기에 효소생산이 가장 활발한 것으로 생각된다. 결과적으로 대수증식기 말기인

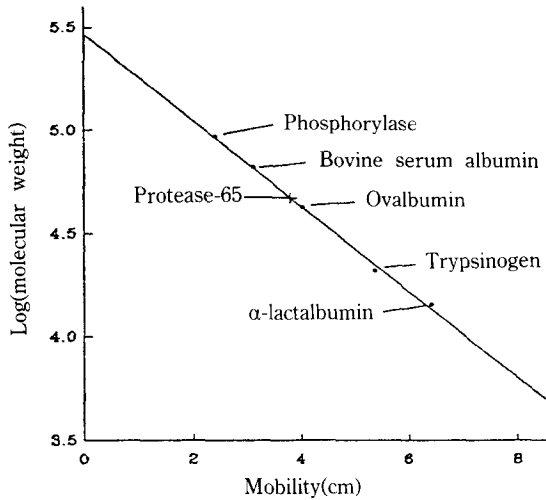


Fig. 4. Estimation of the molecular weight of protease-65 by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

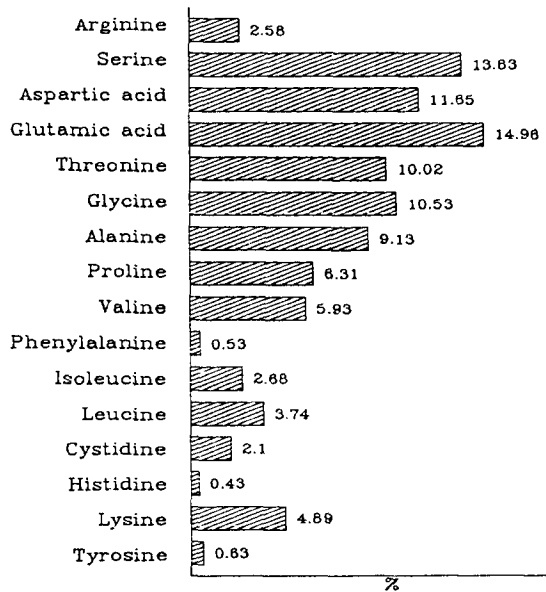


Fig. 5. Amino acid composition of protease from *P. fluorescens* 65 in Cheddar cheese

20~24시간 배양한 후 효소를 추출하는 것이 효율적이며 배양시간이 경과할수록 효소활력이 떨어지는 이유는 기존의 protease가 서로 분해하거나 새로 생산되는 protease를 분해하기 때문이라고 생각된다.

효소반응 최적온도와 최적 pH를 측정된 결과는 Fig. 7, 8과 같이 나타났다. Fig. 7을 보면 효소반응온도 10°C에서 효소활성 18%를 유지하고 있었으며 50°C 이상에서도 효소활성이 급격히 감소하고 있었다. Patel 등⁽⁹⁾에 의하면 *P. fluorescens* T16 protease의 최적온도는 45~50°C

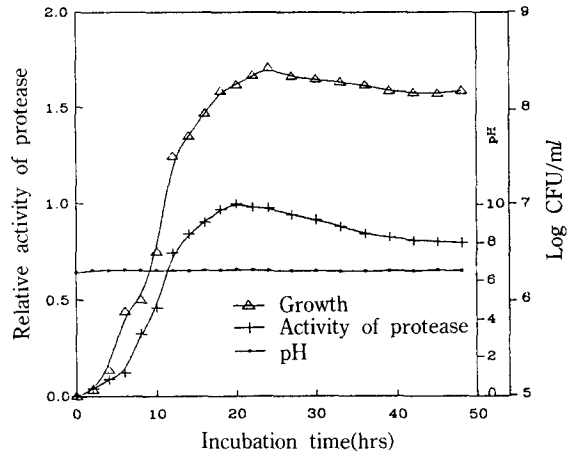


Fig. 6. Changes of protease production and pH during the growth in 10% reconstituted skim milk of *P. fluorescens* from Cheddar cheese

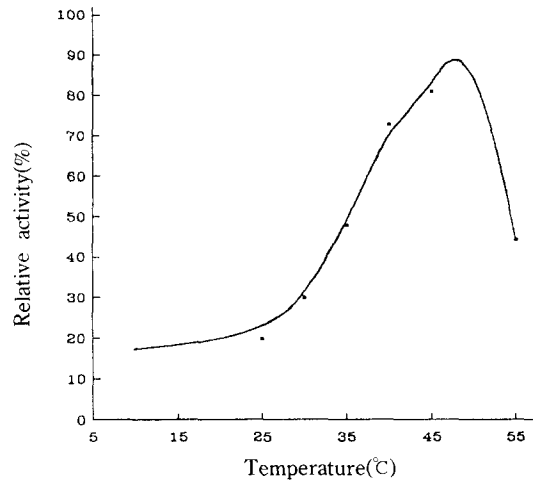


Fig. 7. Relative activities of protease of *P. fluorescens* 65 at different temperature in 10% reconstituted skim milk

이고 50°C 이상에서는 효소활력이 급격히 떨어진다고 했는데 이것은 본 실험결과와 유사하였다. 또한 Stepaniak 등⁽²⁰⁾은 *P. fluorescens* AFT 36이 생산하는 protease의 특성조사를 한 바 최적온도는 45°C이고 4°C와 7°C에서 각각 16, 30% 활성을 유지한다고 하였다. Fig. 8은 pH에 따른 효소활력을 측정된 결과인데 pH 5.5에서 7.0까지 비교적 완만한 활성변화를 나타내므로 pH 범위는 넓지만 연구된 다른 protease에 비해 최적 pH가 약산성인 것으로 나타났다. Stepaniak 등⁽²⁰⁾에 의하면 최적 pH는 6.5인데, 5.5~8.0에서도 50%의 활성을 유지한다고 하였다. 결과적으로 protease 65의 효소반응 최적온도는 45~50°C이고 최적 pH는 6.0으로 나타났다.

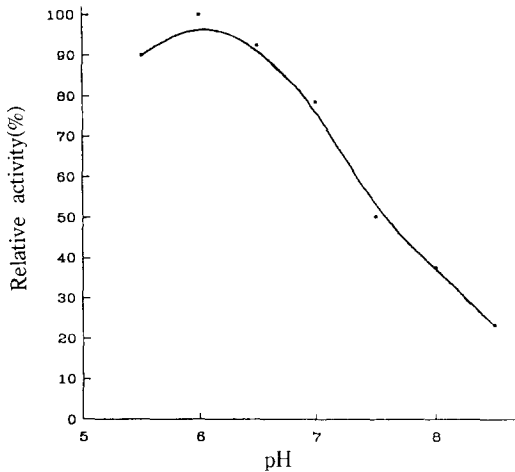


Fig. 8. Relative activities of protease of *P. fluorescens* 65 at different pH in 10% reconstituted skim milk

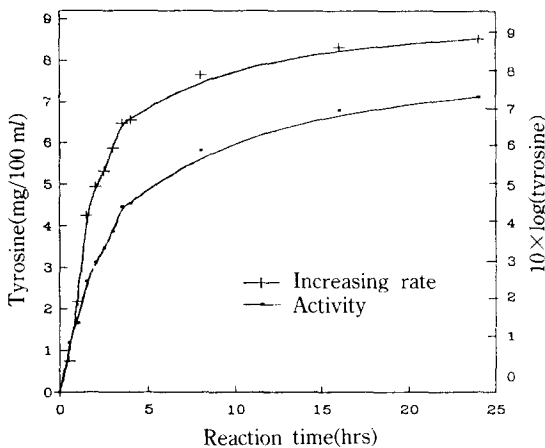


Fig. 9. Changes of enzyme activity by reaction time of extracellular protease of *P. fluorescens* 65 from Cheddar cheese in 10% reconstituted skim milk

*Pseudomonas*속이 생산하는 protease는 균종에 따라 여러 종류가 있으며 그들의 분자량, 효소반응 최적온도, 최적 pH, 열안정성, 아미노산 배열 등의 성질이 각각의 효소에 따라 상이한 것으로 생각된다.

반응시간 경과에 따른 효소활력 변화를 측정된 결과는 Fig. 9와 같은데 효소반응 3시간까지는 효소활력이 급격히 증가하고 있었고 그 이후는 완만한 증가추세를 보이고 있었다. Patel 등⁽¹⁹⁾과 Yan 등⁽¹⁶⁾은 25, 37°C에서 30분 그리고 Adams 등⁽²¹⁾은 45°C, 24시간 Gebre-Faz 등⁽²²⁾ 40°C, 24시간 효소반응을 시킨 후 활력측정을 한 것으로 보아 반응시간에 많은 차이가 있었다. Protease 65은 24시간까지 계속 증가하고 있었으나 효소활력 증가율이 제일 높은 3시간으로 단백질분해활력을 측정하는 것이 효율적이라고 생각된다.

본 실험에서는 체다치즈 숙성기간 중 분리한 내생성 미생물의 단백질분해효소의 특성을 조사하였으며, 이 단백질분해효소를 치즈숙성 시에 다른 효소들(lipase, peptidase, esterase)과 함께 첨가하므로서 숙성기간을 단축시킬 수 있을 것으로 기대되는 바이다.

요 약

체다치즈 숙성기간 중 존재하는 저온성세균을 분리하여 단백질분해능이 우수한 균주를 선발하였고 이 선발된 균주가 생산하는 효소의 특성을 연구하였다. 체다치즈 숙성기간 중 미생물의 변화를 관찰한 결과 내생성세균이 일정하게 유지되고 있었는데 그 중 200개의 균주를 1차 선발한 후 단백질분해능이 우수한 균주 3개를 분리, 동정한 결과 *P. fluorescens* 두 종과 *A. denitrificans*였다. 그 중 활력이 가장 높은 *P. fluorescens* 65가 생산하는 효소를 gel filtration에 의해 정제한 결과 190~230 ml elution volume에서 protease가 용출되었고 SDS-PAGE로 분석한 결과 분자량은 47,000인 것으로 나타났으며 아미노산 조성은 Glu(14.96%)와 Ser(13.83%)의 함량이 제일 높았고 Met, Trp은 존재하지 않았다. *P. fluorescens* 65의 성장곡선에 따른 효소활력을 실험한 결과 세포증식이 활발한 대수증식기에서 단백질분해효소를 많이 분비함이 나타났으며 pH는 변화가 없이 일정하였다. Extracellular protease 65의 반응 최적온도는 45~50°C 사이였으며 최적 pH는 6.0으로 나타났다.

문 헌

1. Marth, E.H.: Microbiological and chemical aspects of Cheddar cheese ripening. A review. *J. Dairy Sci.*, **46**, 869(1963)
2. Schormüller, J.: The chemistry and biochemistry of cheese ripening. *Adv. Food Res.*, **16**, 231(1968)
3. Kwak, H.S.: *The impact of lipase specificity on Cheddar cheese flavor development during cheese ripening*. Ph. D. Dissertation at Kansas State University, Manhattan, KS(1988)
4. Stadhouders, J.: Microbes in milk and dairy products. An ecological approach. *Neth. Milk Dairy.*, **29**, 104 (1975)
5. Cousin, M.A.: Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products. A review. *J. Food Prod.*, **45**, 172(1982)
6. Murray, R.G.E.: *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., The Williams & Wilkin's Co., Baltimore, MD.(1986)
7. Richardson, G.H.: *Standard methods for the examination of dairy products*, 15th. ed.(1985)
8. Cowan, S.R. and Steel, K.J.: *Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press (1976)
9. 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)
10. Akuzawa, R. and Yokoyama, K.: Purification crystallization and some properties of low-temperature active intracellular proteinase from *Streptococcus lactis*. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **53**, 814(1982)
 11. Laemmi, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680(1970)
 12. Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406 (1969)
 13. Swadesh, J.K., Thannhauser, T.W. and Scheraga, H.A.: Sodium sulfite as an antioxidant in the acid hydrolysis of bovine pancreatic ribonuclease A. *Anal. Biochem.*, **141**, 397(1984)
 14. Kwan, K.K. and Skura, B.J.: Identification of proteolytic Pseudomonads isolated from raw milk. *J. Dairy Sci.*, **68**, 1902(1985)
 15. Malik, R.K. and Mathur, D.K.: Isolation and identification of protease producing psychrophilic bacteria from dairy products in India. *J. Soc. Dairy Tech.*, **36**, 76 (1983)
 16. Yan, L., Langlois, B.E., O'leary, J. and Hicks, C.L.: Purification and characterization of four extracellular protease from raw milk Psychrotrophs. *J. Dairy Sci.* **68**, 1323(1985)
 17. Fairbairn, D.J. and Law, B.A.: Proteinases of psychrotrophic bacteria: Their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.*, **53**, 139(1986)
 18. Mayerhofer, H.J., Marshall, H.J. White, C.H. and Margaret, L.: Characterization of a heat-stable protease of *Pseudomonas fluorescens* P26. *J. Appl. Microbiol.*, **25**, 44(1973)
 19. Patel, T.R., Bartlett, F.M. and Hamid, J.: Extracellular heat resistant proteases of psychrotrophic Pseudomonads. *J. Food Prot.*, **46**, 90(1983)
 20. Stepaniak, L., Fox, P.F. and Daly, C.: Isolation and general characterization of a heat-stable proteinase from *Pseudomonas fluorescens* AFT 36. *Biochim. Biophys. Acta.* **717**, 376(1982)
 21. Adams, D.M., Barach, J.T. and Speck, M.L.: Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci.*, **58**, 828(1975)
 22. Gebre-Egziabber, A., Humber, E.S. and Blankenagel, G.: Heat stable proteases from psychrotrophs in milk. *J. Food Prot.*, **43**, 197(1980)

(1991년 4월 11일 접수)