

### 저염 오징어젓갈 제조 방법 및 향미 성분 3. 오징어젓갈에서 분리한 *Pseudomonas* D2가 생성하는 Protease의 효소학적 특성

허성호<sup>1</sup> · 이호재 · 김형선\* · 최성희\* · 김영만\*

동의공업전문대학 식품공업과

\*동의대학교 식품과학연구소

### Processing Conditions of Low-Salt Fermented Squid and Its Flavor Components 3. Characterization of Protease Produced by *Pseudomonas* D2 Isolated from Squid Jeotkal

Sung-Ho Hur<sup>1</sup>, Ho-Jae Lee, Hyung-Sun Kim\*, Sung-Hee Choi\* and Young-Man Kim\*

Dept. of Food Technology, Dongeui Technical Junior College, Pusan 614-715, Korea

\*Institute of Food Science, Dongeui University, Pusan 614-714, Korea

#### Abstract

Proteolytic activities were compared using three species involving in squid jeotkal fermentation and showing positive reaction upon casein test : *Pseudomonas* D2, *Flavobacterium odoratum* and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Pseudomonas* D2 produced highest activity of protease at 72h when incubated in our own modified medium (polypeptone, 0.5% ; tryptone, 0.5% ; NaCl, 3% ; pH, 7.5). Thus, this specie was selected for the further study. The growth pattern was coincided with the production of protease. Thus purification of protease was proceeded by ethanol precipitation, sephadex G-100 gel filtration, and DEAE sepharose ion exchange chromatography. The purified protease showed highest activity at pH 7.0 and 50°C. The enzyme was very stable over the wide ranges of the temperature ; even with one hour heat treatment at 70°C, the enzyme showed substantial amount of the activity toward casein. In addition, the enzyme was stable over the wide range of pH. Molecular weight of the protease was determined to be 17.4 kD by SDS-PAGE.

Key words : fermented squid, squid jeotkal, *Pseudomonas* D2, protease characterization

#### 서 론

수산물이 풍부한 우리나라에서 제조되고 있는 젓갈류는 약 160 여종으로 알려져 있으며 이 중 일반 젓갈과는 달리 가공 비율이 상대적으로 높은 양념 젓갈류는 1년간 생산량이 1992년 기준으로 약 2,000톤에 달하였고 또한 제품 별 생산 순위는 명란, 성계알, 오징어젓갈 순으로 오징어젓갈은 약 230톤 정도 생산되었다(1,2). 오징어젓갈은 오징어 육을 잘게 썰어 식염을 첨가하여 원료의 자가소화효소와 숙성 미생물의 효소에 의하여

발효 숙성된 독특한 풍미와 맛을 갖는 수산 발효식품이다. 오징어젓갈의 숙성에 관여하는 것으로 알려진 세균은 *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* 및 *Halobacterium*속 등으로 보고 되었다(3-10). 오징어젓갈에서 분리한 세균의 단백질분해효소에 대한 연구는, 이(5)의 오징어젓갈을 포함한 4종류의 젓갈에서 분리한 미생물이 생산하는 단백질 분해효소의 특성에 관한 것과 안 등(9,10)의 오징어젓갈에서 분리한 *Halobacterium*이 생산하는 단백질 분해효소의 정제 특성에 대한 보고가 있다. 또한 민(11)은 고도호염균인 *Halobacterium*이 생산하는 protease

<sup>1</sup>To whom all correspondence should be addressed

에 관한 정제 특성을 보고하였다.

최근 오징어젓갈의 소비가 증대됨에 따라 오징어젓갈의 숙성기간 단축과 저염화 및 향미 개선에 대한 종합적인 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 오징어젓갈의 품질 개선을 목적으로 오징어젓갈에서 분리한 균주 중 단백질 분해효소의 생산능이 강한 *Pseudomonas* D2를 선정하여 이 균이 생산하는 protease의 효소학적 특성을 조사하여 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배지

Kim 등이 저염 오징어젓갈에서 분리한 casein 시험 양성 균주 (*Pseudomonas* D2, *Flavobacterium odoratum* 및 *Acinetobacter caicoaceticus*) 중 H/C 비율(투명환의 크기/colony의 크기)이 높고 효소 활성이 양호하다고 판단된 *Pseudomonas* D2를 사용하였다(7).

시험 균주를 장 등(12)이 사용한 단백질 분해능을 가지는 균의 분리용 배지인 skim milk plate에 도달하여 30°C에서 48시간 배양한 후, 집락 주위에 투명환이 생성되는 것을 단백질 분해활성이 있는 것으로 간주하였고 protease 생산 배지는 장 등(12)의 방법을 변형한 polypeptone(0.5%), tryptone(0.5%) 및 3% NaCl을 첨가하여 pH 7.5로 조절하여 사용하였고, 배양은 30°C에서 하였다.

### 균의 생육도 측정

사용균의 증식 정도는 spectrophotometer (Hitachi Co., U-2000, Japan)를 사용하여 660nm에서의 흡광도로 표시하였다.

### 효소활성 측정

단백분해효소의 활성은 Hagihara 등의 방법에 준하여 측정하였다(13). 즉 효소액 1.0ml를 1.2% casein 기질용액(0.05M Phosphate buffer solution, pH 7.0) 5ml를 가하여 30°C 수조 내에서 반응시켰다. 반응 30분 후 trichloroacetic acid를 가한 다음 실온에서 30분간 정치시키고 여과한 여액의 흡광도를 275nm에서 측정하였다. 활성단위 1unit는 30°C에서 반응 1분당 1 $\mu$ mole의 tyrosine을 생성하는 효소의 양에 해당된다.

### 효소 단백질의 정량

단백질의 정량은 Bradford의 dye binding assay 방법에 준하였는데, 0.8ml의 시료용액에 coomassie blue용

액(Bio-Rad) 0.2ml를 가하여 교반한 후 595nm에서 흡광도를 측정하는 small scale 방식으로 측정하였다(14) 이 두가지 방법의 표준 물질은 bovine serum albumin을 사용하였고, chromatography를 이용한 효소의 분리 정제 시에는 280nm에서의 흡광도로 단백질 농도를 표시하였다.

### 효소의 정제

*Pseudomonas* D2를 30°C에서 72시간 배양한 후 배양액을 원심분리(10,000 $\times$ g, 20분)하여 얻은 상청액에 알코올 침전, gel filtration과 ion exchange column chromatography를 이용하여 효소를 정제하였다. 배양액을 원심분리(10,000 $\times$ g, 20분)하여 얻은 상청액에 ethanol을 동량 가한 후 원심분리하여 얻은 침전 단백질을 0.1M 인산완충용액(pH 7.0)에 용해시키고 0.1M 인산완충용액(pH 7.0, 0.2M NaCl 포함)으로 평형된 sephadex G-100 column(2.5 $\times$ 50cm)을 이용하여 30ml/h의 속도로 5ml씩 분획하였다. 활성분획은 DEAE-sepharose column(2.5 $\times$ 37cm)을 이용하여 재 정제하였으며 이동상은 0.1M 인산완충용액 중 NaCl 농도를 linear gradient로 0.2M에서 0.5M 까지 증가시키면서 용출하였으며 유속은 30ml/h로 5ml씩 분획하였다.

### 효소의 분자량 측정

정제 효소의 순도와 분자량을 측정하기 위하여 Laemmli 등의 방법(15)에 따라 7.5% acrylamide를 사용하여 전기영동하였다. 즉, 정제효소 5 $\mu$ g을 loading하여 20 mA로 2시간 전기영동한 후 silver staining법으로 염색하였다(16). 이때 분자량 측정을 위한 표준 물질은 lysozyme(14.3K),  $\beta$ -lactoglobulin(18.4K), trypsinogen(34.7K) 및 bovine serum albumin(66K)을 사용하였다.

### 정제 효소의 특성 조사

pH의 영향은 효소의 활성 측정방법에 준하여 실시하고 기질용액은 인산완충용액(pH 6~8)과 Tris-HCl 완충용액(pH 7.5~8.5)으로 제조하여 사용하였다. 온도의 영향 또한 효소의 활성 측정방법에 준하였고 다만 반응 온도를 20~70°C로 10°C 간격으로 반응시켰다. pH 안정성은 효소를 인산완충용액(pH 6~8)과 Tris-HCl buffer(pH 8~8.5) 및 Glycine-NaOH buffer(pH 9~10)에 용해시켜 5°C에서 24시간 저장한 뒤 효소 활성 측정법으로 잔존 활성을 측정하였다. 열 안정성은 pH 7.0인 인산완충용액으로 희석한 효소액을 60분간 일정 온도에서 정치한 후 효소 활성 측정법으로 30°C에서 잔존 활

성을 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 선정

젓갈의 숙성은 일반적으로 어육의 자기소화 및 미생물이 생성하는 단백분해 효소에 의하여 지배되므로(5,17) 분리용 배지에 접종한 3균주 중 *Pseudomonas* D2는 H/C 비율의 평균값이 3.0 이상으로 비교적 높게 나타났으며, Fig. 1은 식염 농도 별 배양 시간에 따른 3균주의 protease 활성을 조사한 것이다. 식염 3%를 첨가한 배지에서는 배양 48시간 이후 *Pseudomonas* D2의 효소 활성이 다른 균주에 비하여 높게 나타나는 경향을 보이기 시작하여 배양 72시간에 최대 활성을 나타냈다. 그러나 식염 6%를 첨가한 배지에서는 3균주 모두 낮은 효소 활성을 나타냈다. 따라서 *Pseudomonas* D2를 이후의 실험균주로서 사용하였다.

Fig. 2는 *Pseudomonas* D2의 생육도와 효소 활성 및 pH의 변화를 배양 시간 별로 조사한 것인데 균의 생육도와 효소 활성은 비교적 비례하는 경향을 나타내었으

며 배양 72시간에 균의 생육과 효소의 활성이 최대값을 나타내었고, pH는 배양 초기에 다소 저하된 후 배양 시간의 경과에 따라 초기 pH에 근접하는 결과를 나타내었다.

효소의 정제 및 분자량

*Pseudomonas* D2를 30°C에서 72시간 배양한 다음 배양액의 원심분리 상청액에 동량의 ethanol을 가하여 효소를 침전시켰다. 침전물을 0.1M 인산완충용액 (pH 7.0)에 용해시킨 다음 0.45μ membrane filter로 여과하여 sephadex G-100으로 gel filtration하였다. 효소의 활성은 61번에서 77번 회분에 걸쳐 용출되었으며 (Fig. 3a) 이 활성 회분을 모아 음이온교환 크로마토그래피 (DE-

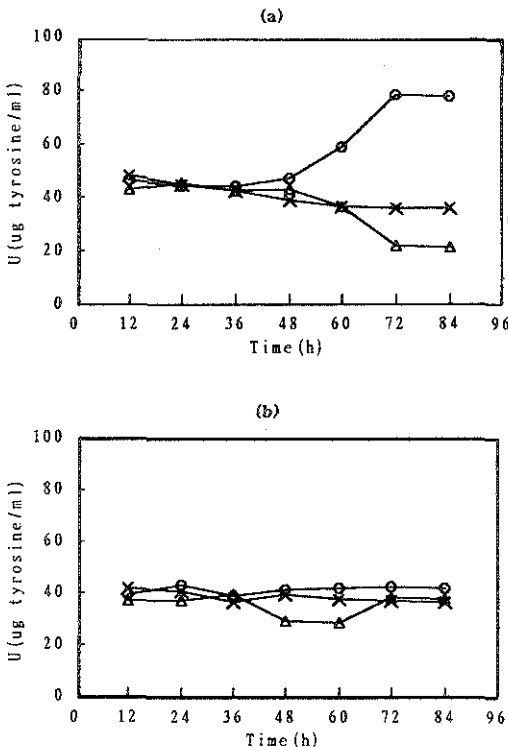


Fig. 1. Production of protease by *Pseudomonas* D2(○), *Acinetobacter calcoaceticus*(△), *Flavobacterium odoratum* (×), with 3% NaCl (a) and 6% NaCl (b).

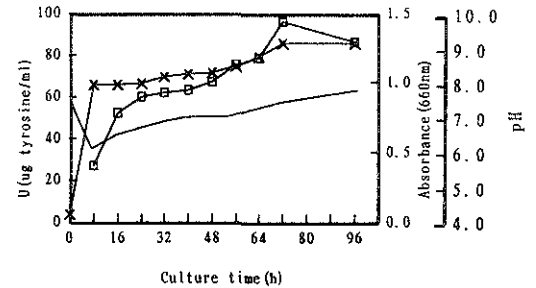


Fig. 2. Production of protease (□), growth curve (×) and pH changes (—) of *Pseudomonas* D2.

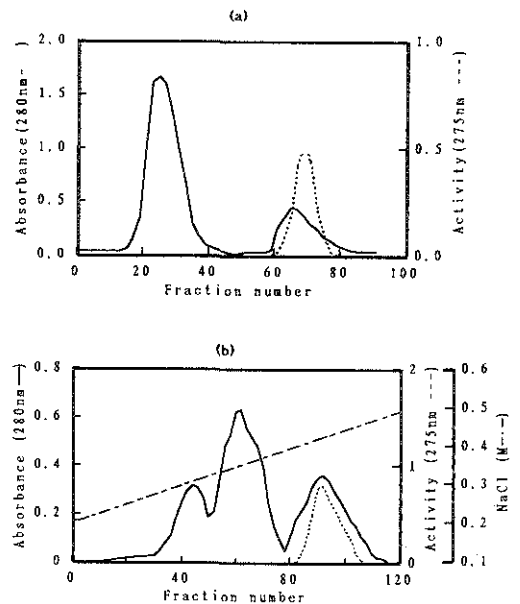


Fig. 3. Purification of protease using (a) Sephadex G-100 gel filtration chromatography and (b) DEAE-Sepharose ion exchange chromatography.

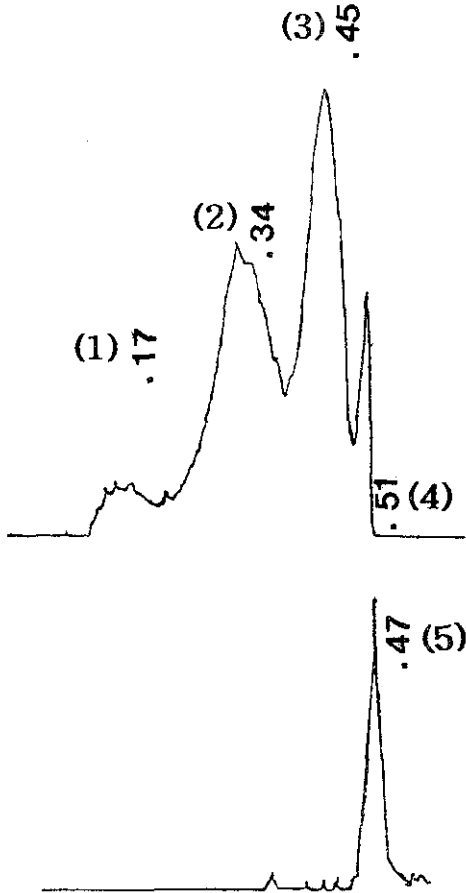


Fig. 4. Densitogram of SDS-PAGE with (1) bovine serum albumin (66K), (2) trypsinogen (34.7K), (3)  $\beta$ -lactoglobulin (18.4K), (4) lysozyme (14.3K) and (5) purified protease.

AE-sepharose)로 정제한 결과 NaCl 농도 0.39~0.45M에서 protease 활성이 나타났다 (Fig. 3b).

정제된 protease의 순도 검정을 SDS-PAGE로 조사한 결과 그 분자량은 17.4kD로 확인 되었다 (Fig. 4).

활성 최적조건

효소의 반응 최적 pH를 0.05M phosphate buffer (pH 6.0~8.0)와 Tris-HCl buffer (pH 7.5~8.5)로 hammerstein casein 기질용액을 pH 별로 조절하여 30°C에서 활성을 측정한 결과 효소 활성의 최적 pH는 7.0이었다 (Fig. 5). 따라서 이 효소는 김 (18)의 멸치 어장유에서 분리한 세균이 생성하는 단백분해효소의 최적 pH 10.0, 이(19)의

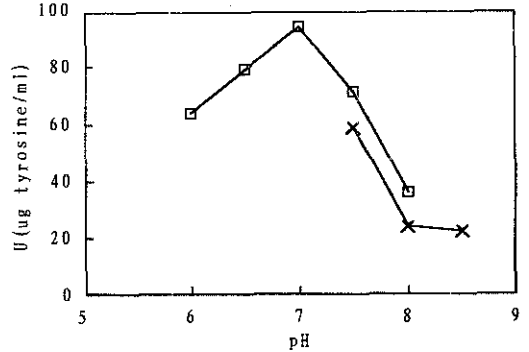


Fig. 5. Effect of pH on the activity of purified protease at 30°C. Phosphate buffer (□ : pH 6.0~8.0) Tris-HCl (× : pH 7.5~8.5)

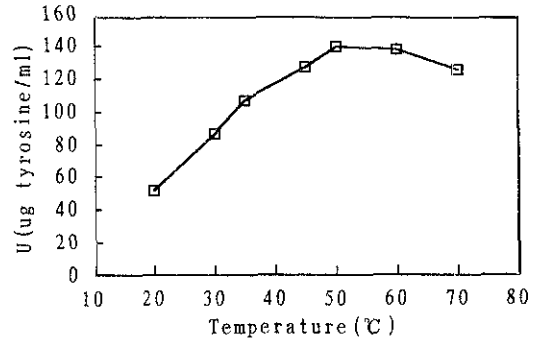


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of purified protease at pH 7.0.

*Pseudomonas fluorescens* P-22가 생산하는 protease의 활성 최적 pH인 8.0 보다는 최적 pH가 낮았고 차등 (17)이 보고한 *Bacillus* P-22가 생산하는 protease의 최적 활성 pH 7.0과는 비슷하였다. 일반적으로 젓갈에서 분리된 미생물이 생산하는 protease는 비교적 alkaline protease가 많이 보고되었는데, 이는 젓갈이 숙성되면서 대부분 pH가 떨어지는 것을 감안하면 특이한 현상이라고 생각된다. 또한 젓갈의 발효시 protease의 활성이 지나치게 높으면 단백질의 과다한 가수분해로 짧은 peptide 등이 다량 생성되어 쓴맛을 낼 수 있을 뿐 아니라 젓갈의 조직감에도 나쁜 영향을 줄 수 있다는 점을 고려한다면 어느 정도 타당성이 있는 것으로 보여진다.

한편 pH 7.0인 기질을 사용하여 반응 최적 온도를 조사한 결과 효소 활성은 50°C에서 최대였으며 70°C에서도 최대 활성의 90%를 나타내었다 (Fig. 6). 이는 일반적으로 세균성 protease의 반응 최적 온도가 50°C 부근인 것과 유사하였다.

## 효소의 온도와 pH 안정성

냉장 보존 시에 적합한 pH를 선정할 목적으로 정제 효소를 각기 다른 pH의 완충용액에 희석하여 pH를 조절한 다음, 5°C에서 24시간 방치한 후 표준 활성 측정 조건에서 잔존 활성을 측정한 결과는 Fig. 7과 같았으며 대체로 pH 8.0~9.5 까지는 잔존 활성이 높았고 pH 10.0에서는 크게 감소하였다.

한편, 효소의 열 안정성을 조사한 결과 50°C에서는 80% 이상 70°C에서는 75% 이상의 잔존 활성을 나타내었다(Fig. 8). 젓갈에서 분리한 균이 생산한 protease의 경우 이렇게 특이하게 높은 열 안정성을 나타내는 경우는 보고된 바가 없었다. 그러나 당화 공정에 사용되는 amylase의 경우 최적 온도가 80°C를 넘는 경우가 있는 점을 고려한다면 본 실험에서 정제한 효소의 열 안정성도 가능성이 있는 것으로 생각된다. 다만 이에 대하여 효소의 구조 특성에 대한 연구가 더욱 깊이 이루어져야 될 것으로 사료된다.

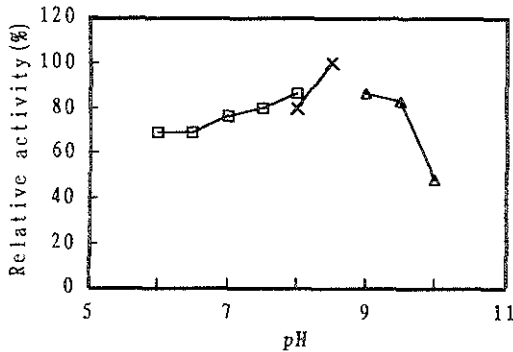


Fig. 7. Effect of pH on the stability of purified protease.

□ : Phosphate buffer  
 × : Tris-HCl  
 △ : Glycine-NaOH

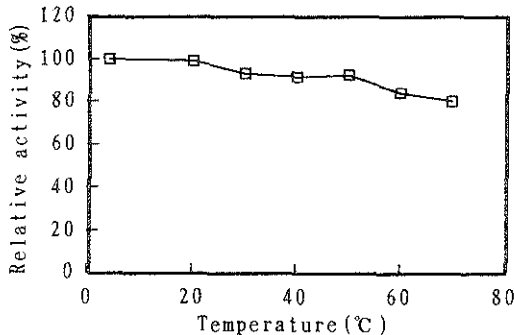


Fig. 8. Effect of temperature on the stability of purified protease.

## 요 약

오징어젓갈의 숙성 과정에서 바람직한 맛과 풍미를 형성하는데 직접 관여하는 세균 중 casein 시험 양성인 *Pseudomonas* D2, *Flavobacterium odoratum* 및 *Acinetobacter calcoaceticus*를 protease 생산용 배지에 식염을 3% 첨가하여 72시간 배양한 결과 *Pseudomonas* D2의 protease가 다른 두 균주에 비하여 활성이 높았기 때문에 *Pseudomonas* D2를 선정하여 protease를 정제하고 그 특성에 대하여 조사한 결과는 다음과 같다. *Pseudomonas* D2가 생성한 protease를 알코올 침전과 sephadex G-100 및 DEAE-sepharose를 이용한 크로마토그래피 방법으로 정제하여 그 특성을 조사한 결과, pH 7.0과 50°C에서 활성이 가장 우수하였으며 분자량은 17.4kD로 추정되었다. 정제 효소는 비교적 낮은 온도에서 안정성이 높았으며, 70°C에서 1시간 열처리에도 활성의 변화는 별로 없었다. pH 안정성은 pH 8.0 부터 9.5 까지는 잔존 활성이 대체로 높았으나 pH 10.0에서는 활성이 크게 감소하였다.

## 감사의 글

본 논문은 1993년 한국학술진흥재단의 대학부설연구소 연구비 지원으로 수행된 연구 결과의 일부이며, 이에 깊이 감사드립니다.

## 문 헌

1. 한국식품개발연구원 : 전통식품의 현대화 전략. 한식연 전통식품연구실(1992)
2. 한국식품개발연구원 : 젓갈류 제조기술교육. 한국식품개발연구원(1993)
3. Mori, K., Shinano, H. and Akiba, M. : Studies on the microorganisms in salted and ripened squid of "Ika-Shiokark". *Bull. of the Jap. Soc. of Sci. Fish.*, **43**, 1425 (1977)
4. Mori, K., Shinano, H. and Akiba, M. : The aerobic bacteria in the ripening process of "Ika-Shiokara". *Bull. of the Jap. Soc. of Sci. Fish.*, **45**, 771 (1979)
5. 이계호 : 젓갈등숙의 정미성분에 관한 미생물학적 및 효소학적 연구. *한국농화학회지*, **11**, 1 (1969)
6. Zenitani, B. : Studies on fishery-fermentation products-I on the aerobic bacteria in "Shiokara". *Bull. of the Jap. Soc. of Sci. Fish.*, **21**, 280 (1955)
7. Kim, Y. M., Jeong, Y. M. and Hong, J. H. : Processing conditions for low-salted squid Jeotkal. *Bull. of the Kor. Fish. Soc.*, **26**, 312 (1993)
8. Norberg, P. and Hofsten, B. V. : Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.*

- 55, 251 (1969)
9. 안영석, 김찬조, 최성현 : 고도 호염성 *Halobacterium* sp.가 생산하는 protease의 특성. 한국농화학회지, 33, 247(1996)
  10. 안영석, 김찬조, 최성현 : 고도 호염성 *Halobacterium* sp.에 의한 protease의 생산. 한국농화학회지, 33, 337 (1990)
  11. 민윤식 : *Halobacterium halobium*의 생육조건 및 protease에 관한 연구. 한국영양식량학회지, 23, 856 (1994)
  12. 장동식, 조학래, 최승태 : 정어리 내장세균의 특성과 균체의 단백질분해효소에 관한 연구. 한국수산학회지, 17, 184 (1984)
  13. Hagihara, B., Matsubara, H., Nakai, M. and Okunuki, K. : Crystalline protease : 1. Preparation of crystalline protease of *Bac. subtilis*. *J. Biochem.*, 45, 185 (1958)
  14. Bradford, M. M. : A rapid sensitive method for quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976)
  15. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*, 227, 680 (1970)
  16. Hames, D. D. : One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. In "Gel electrophoresis of proteins" Hames, B. D. and Rickwood, D. (eds.), 2nd ed., Oxford University Press, New York (1990)
  17. 차용준, 이용호, 이강희, 장동식 : 저식염 멸치액젓에서 분리한 단백질 분해력이 강한 세균 및 생산된 단백질 분해효소의 특성. 한국수산학회지, 21, 71 (1988)
  18. 김영명 : 멸치 어장유의 염도 및 발효온도 조건이 품질특성 및 단백질 분해효소 활성에 미치는 영향. 고려대학교 대학원 박사학위논문 (1993)
  19. 이태식 : 정어리 젓갈에서 분리한 *Pseudomonas fluorescens* P-3의 amine dehydrogenase와 protease의 특성 및 이용성. 경상대학교 대학원 박사학위논문 (1992)

(1995년 5월 16일 접수)