

계절에 따라 여러 지역의 원유에서 분리된 내냉성 미생물의 효소 활성

신용국¹ · 오남수¹ · 이현아¹ · 남명수*

충남대학교 농업생명과학대학 동물바이오시스템학과, ¹서울우유협동조합 중앙연구소

Enzyme Activity of Isolated Psychrotrophic Bacteria from Raw Milk of Different Regions on Season

Yong Kook Shin¹, Nam Su Oh¹, Hyun Ah Lee¹, and Myoung Soo Nam*

Division of Animal Science & Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹R&D Center, Seoul Dairy Cooperative, Ansan 425-839, Korea

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of season and location on activities of enzyme produced by psychrotrophic bacteria isolated from raw milk located in Kyunggi region of South Korea. Agar diffusion and colorimetric methods were used for the lipase and protease activities of psychrotrophic bacteria. Intensities of dark blue and transparent ring around colony were compared for activity measurement. Nutrient agar with 1% skim milk added was employed for measuring protease activity. 14 strains of *Arthrobacter ruscicus* with lipase activity and 19 strains of *Chryserobacterium shigense* with protease activities were found to be present. It was found that *Acinetobacter* genomospecies 10 (match %: 99.90) isolated from B region in fall was the most lipolytic species, whereas *Serratia liquefaciens* (match %: 99.39) isolated from the same region in spring was the most proteolytic species. Growth curve of *Acinetobacte* and *Serratia liquefaciens* was a typical sigmoidal form. Lipase activity increased with incubation time, but its activity began to drop at stationary to motality phase. Optimum condition for incubation time, pH and temperature for extracellular lipase from *Acinetobacter* genomospecies 10 (match %: 99.90) was 12 h, 8.5, and 45°C, respectively. Extracellular protease from *Serratia liquefaciens* (match %: 99.39) had the same optimum incubation time and pH as extracellular lipase, but optimum temperature was 35°C.

Key words: psychrotrophic bacteria, lipolytic species, proteolytic species

서 론

원유 내의 내냉성 미생물은 냉장저장 중 증식하여 균체 외로 내열성 효소를 생산하며, 이는 대부분 미생물의 생장곡선 중 정지기(stationary phase)에서 생성된다(McKellar, 1989). 이러한 효소는 주로 지방분해효소나 단백질분해효소로서 저온살균 또는 초고온살균과 같은 시유의 살균과정 이후에도 균체는 사멸되지만 효소의 활성은 잔존하여 유제품의 품질과 수율의 저하를 유도하게 된다(Cousin, 1982; McKellar, 1989; Witter, 1961). 대표적인 내냉성 미생물인 *Pseudomonas* 균종으로부터 분리되는 단백질분해효소는 1 몰당 하나의 아연 원자와 최대 8개까지의 칼슘원자를 포함하는 metalloenzyme이며, 대부분이 κ -, α_{s1} - 및 β -casein을

분해하여 우유응고 활성을 가지고 있는 반면 유청단백질에서는 낮은 활성을 나타내는 것으로 보고되었다. 또한 *Pseudomonas* 균종으로부터 분리되는 지방분해효소는 유지방을 포함한 지용성의 기질에 활성을 나타내는 반면, 이로부터 분리되는 esterase의 경우 균체내에 존재하여 유지방의 가수분해에 유의적인 영향을 주지 않는 것으로 보고되었다(McKellar, 1989). 지방분해효소의 기질 특이성은 상반된 연구결과가 보고(Cousin, 1982; McKellar, 1989)되었는데 내냉성 미생물의 지방분해효소가 위치 특이성이 없는 lipoprotein lipase와 같은 역할을 한다고 보고한 반면, Makhzoum 등(1996)은 triglyceride의 sn-1과 sn-3에 위치하는 지방산에 효소활성의 특이성이 있는 것으로 보고하였다. 본 연구는 원유에서 분리한 내냉성 미생물이 생산하는 단백질분해효소와 지방분해효소의 활성을 측정하여 효소활성이 높은 균주를 선발하고 이로부터 생산된 효소의 생화학적 특성과 조효소의 활성을 조사하여 원유의 품질에 영향을 미치는 기초자료를 제공하는데 있다.

*Corresponding author: Myoung Soo Nam, Division of Animal Science & Resources, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea. Tel: 82-42-821-5782, Fax: 82-42-823-2766, E-mail: namsoo@cnu.ac.kr

재료 및 방법

원유의 시료 채취

원유의 시료는 Shin(2013)의 보고에 따라 지역별로 채취하여 실험에 사용하였다.

내냉성 미생물의 동정

내냉성 미생물은 Shin(2013)의 보고에 따라 동정하여 실험에 사용하였다.

지방분해효소와 단백질분해효소의 활성 측정 및 균주 선발

내냉성 미생물이 생산하는 효소 활성은 agar 확산법과 colorimetric 법으로 측정하였다. 지방분해효소의 agar 확산법은 Sprit blue agar(Becton, Dickson and Company, USA)를 이용하여 colony 주변의 진한 푸른색의 환을 확인하여 활성 정도를 비교하였으며, 단백질분해효소의 경우 1% skim milk(Becton, Dickson and Company, USA)를 첨가한 nutrient agar(Becton, Dickson and Company, USA)에서 투명한 환을 확인함으로써 활성 정도를 비교하였다(Ramesh and Sudesh, 2007). Agar 확산법으로 지방분해효소와 단백질분해효소 활성이 높은 균을 선발하여 각각 colorimetric 법으로 활성 정도를 비교하였다. 지방분해효소의 colorimetric 법은 Shamsher 등(2005)의 방법을 변형하여 수행하였다. 0.05 M Tris buffer(pH 8.5) 2.85 mL에 75 μ L의 20 mM *p*-nitrophenyl palmitate(*p*-NPP) stock solution과 enzyme solution 75 μ L을 혼합하여 45°C의 항온수조에서 20분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, ethanol과 acetone을 1:1의 비율로 혼합하여 -20°C에서 보관한 solution을 1 mL 첨가하여 반응을 완전히 종료시켰다. 이 반응물을 0.45 μ m syringe filter로 여과시켜 410 nm에서 UV spectrophotometer로 *p*-nitrophenol (*p*-NP)의 농도를 측정하여 지방분해효소 활성을 비교하였다. 단백질분해효소의 colorimetric 법은 Hull(1947)의 방법을 변형하여 수행하였다. 5 mL의 10% skim milk와 1 mL의 enzyme solution을 30°C 항온수조에서 2시간 동안 반응시킨 후, 0.7 N trichloroacetic acid 10 mL을 가하여 혼합한 후 10분 동안 상온에 방치하였다. Whatman filter paper No. 2(Whatman, UK)를 이용하여 여과한 여과액 2.5 mL와 sodium carbonate reagent 5 mL를 혼합하여 1.5 mL의 Folin's reagent와 반응시켰다. 10,000 rpm/min에서 5분 동안 원심분리시켜 상정액을 650 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 tyrosine의 양으로 단백질분해효소 활성을 측정하였고, 생성된 tyrosine의 양은 μ g/mL로 나타내었으며, tyrosine의 양으로 작성한 표준곡선에 따라 활성을 비교하였으며, 지방분해효소 활성과 단백질분해효소 활성이 가장 높은 균주를 선발하였다.

선발된 균주의 생물학적 특성 및 조건별 조효소의 활성 비교

효소활성이 높은 균주로 선발된 균은 생물학적 특성을 측정하기 위해 1 colony를 3 mL의 nutrient broth(Becton, Dickson and Company, USA)에 접종하여 12시간 동안 배양한 후, 99 mL의 nutrient broth에 배양액 1 mL을 계대배양하여 0시간부터 배양시간별로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 성장곡선을 작성하였으며, 효소는 pH, 반응온도 및 배양시간에 따라 활성을 비교하였다. pH에 따른 효소활성은 pH 2.5에서 pH 13.5 사이에서 측정하여 비교하였고, 반응온도에 따른 효소활성은 5°C에서 75°C 사이에서 측정하여 활성을 비교하였다.

통계분석

본 실험은 3반복으로 수행하였으며 실험결과는 SAS 프로그램(2010)을 이용하여 분산분석을 실시하고 Duncan의 다중검정법을 통해 5% 수준에서 처리구 평균값 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

단백질분해효소 및 지방분해효소 활성 균주의 분리

동정한 psychrotrophic bacteria (Shin *et al.*, 2013)를 계절별로 분류하고 지방분해효소 활성과 단백질분해효소 활성을 agar 확산법으로 측정하여 그 결과를 육안으로 관찰한 뒤, 분해능이 높은 순서대로 +++, ++, +로 표시하고 활성이 없는 균주의 경우 O으로 표시하였다(Table 1). 분리된 균주 일부는 지방분해효소 활성 또는 단백질분해효소 활성을 나타내지 않았고, 지방분해효소 활성을 나타내는 균주 모두가 또한 단백질분해효소 활성을 나타내지도 않았다. Table 1에 나타난 것처럼 지방분해효소의 활성이 강력한 균주(+++)는 *Arthrobacter ruscicus*를 포함한 14개 균주, 단백질분해효소의 활성이 강력한 균주(+++)는 *Chryseobacterium shigense*를 포함한 19개 균주로 확인되었다.

지방분해효소와 단백질분해효소의 활성

Table 1에 나타난 바와 같이 Agar 확산법으로 지방분해효소와 단백질분해효소 활성정도를 측정하여 높은 활성을 나타낸 24개의 균주를 선발한 후, colorimetric 법으로 효소 활성을 측정하였다. 지방분해효소 활성측정 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 가을철 B 지역에서 공급받은 원유로부터 분리한 20번 균주(B20_F, *Acinetobacter* genomospecies 10, match %: 99.90)가 3.41 μ g/mL의 *p*-NP를 생성하면서 가장 높은 활성을 나타내었고, 그 다음으로 2.21 μ g/mL을 생성한 D 지역의 겨울철 원유로부터 분리한 3번 균주(D3_W, *Psychrobacter maritimus*, match %: 99.90)가 높은 지방분해효소 활성을 나타내었다($p < 0.05$). 반면에 가을철 D지역 원

Table 1. Lipase and protease activities of isolated bacteria over four seasons

Season	Closest relative in MicroSeq Library	Lipase Activity	Protease Activity
Spring	<i>Chryseobacterium shigense</i>	○	+++
	<i>Rahnella aquatilis</i>	○	○
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	○	○
	<i>Sphingobacterium faecium</i>	+	○
	<i>Pseudomonas poae</i>	○	○
	<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	○	○
	<i>Acinetobacter genomospecies 10</i>	○	○
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	○	++
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM=43933	+	○
	<i>Chryseobacterium scopthalmum</i>	○	++
	<i>Pseudomonas marginalis</i>	○	+++
	<i>Arthrobacter russicus</i>	+++	○
	<i>Microbacterium liquefaciens</i>	○	+
	<i>Yersinia kristensenii</i>	○	○
	<i>Obesumbacterium proteus</i>	○	○
	<i>Janthinobacterium lividum</i>	○	○
	<i>Raoultella omithinolytica</i>	○	+
	<i>Acinetobacter genomospecies 3</i>	○	++
	<i>Pedobacter heparinus</i>	○	○
	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	+++	○
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+++	○
	<i>Serratia grimesii</i>	○	+
	<i>Yersinia aldovae</i>	○	+
	<i>Pseudomonas asplenii</i>	○	○
	<i>Serratia liquefaciens</i>	○	+++
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC=13525	○	+++
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A(bt) ATCC=17554	○	++
	<i>Psychrobacter faecalis</i>	○	○
	<i>Raoultella planticola</i>	○	○
	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	○	++
	<i>Pseudomonas fragi</i>	○	○
	<i>Psychrobacter maritimus</i>	++	○
<i>Pseudomonas brenneri</i>	○	++	
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	○	○	
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	++	○	
Summer	<i>Pseudomonas brenneri</i>	○	++
	<i>Pseudomonas asplenii</i>	○	○
	<i>Sphingobacterium faecium</i>	○	○
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	○	○
	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	○	++
	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	○	+
	<i>Enterobacter amnigenus</i>	○	+
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	+++	○
	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	○	++
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A(bt) ATCC=17554	○	+++
	<i>Pseudomonas fragi</i>	○	○
	<i>Azorhizophilus paspali</i>	○	+++
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	○	+++
	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>	+	○
	<i>Raoultella planticola</i>	○	○
	<i>Pantoea agglomerans</i> ATCC=27155	○	○
<i>Hafnia alvei</i>	○	+	
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	+	+++	
<i>Acinetobacter genomospecies 9</i>	++	○	

Table 1. Lipase and protease activities of isolated bacteria over four seasons (Continued)

Season	Closest relative in MicroSeq Library	Lipase Activity	Protease Activity
Summer	<i>Acinetobacter</i> genomospecies 11	++	○
	<i>Acinetobacter</i> genomospecies 10	+++	○
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+++	○
	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+++	○
	<i>Acinetobacter</i> genomospecies 9	++	○
	<i>Acinetobacter</i> genomospecies 10	+++	○
	<i>Acinetobacter</i> genomospecies 11	++	○
	<i>Hafnia alvei</i>	○	+
	<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	+++	+++
	<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	○	++
	<i>Enterobacter amnigenus</i>	○	+
	<i>Pantoea agglomerans</i> ATCC=27155	○	○
	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	○	++
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	○	○
	<i>Janthinobacterium lividum</i> ATCC=12473	○	○
	<i>Escherichia coli</i> ATCC=35382	○	○
Fall	<i>Pseudomonas lundensis</i>	○	+
	<i>Sphingobacterium faecium</i>	○	○
	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ATCC=35586	+	○
	<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	○	○
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	○	○
	<i>Chryseobacterium wanjuense</i>	○	○
	<i>Chryseobacterium shigense</i>	○	○
	<i>Chryseobacterium gleum</i>	○	++
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	○
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	○	++
	<i>Gordonia terrae</i>	++	○
	<i>Pseudomonas asplenii</i>	+	○
	<i>Rahnella aquatilis</i>	○	○
	<i>Raoultella terrigena</i>	○	+
	<i>Pseudomonas poae</i>	○	++
	<i>Acinetobacter</i> genomospecies 3	○	○
	<i>Pseudomonas fulva</i>	+	+
	<i>Pseudomonas brenneri</i>	○	++
	<i>Brevundimonas diminuta</i>	○	○
	<i>Pantoea dispersa</i>	○	+++
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	○	+++	
<i>Serratia quinivorans</i>	+	+++	
Winter	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+++	○
	<i>Sphingobacterium faecium</i>	○	○
	<i>Serratia fonticola</i>	○	○
	<i>Chryseobacterium joostei</i>	○	○
	<i>Chryseobacterium shigense</i>	○	+++
	<i>Serratia liquefaciens</i>	○	○
	<i>Acinetobacter</i> genomospecies 9	○	○
	<i>Acinetobacter</i> genomospecies 11	++	○
	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	ī	○
	<i>Pseudomonas extramorientalis</i>	++	+++
	<i>Acinetobacter</i> genomospecies 10	+++	○
	<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	+	○
	<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	○	○
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	○	+++
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC=4277	○	○	
<i>Janthinobacterium lividum</i> ATCC=12473	○	○	

Table 1. Lipase and protease activities of isolated bacteria over four seasons (Continued)

Season	Closest relative in MicroSeq Library	Lipase Activity	Protease Activity
Winter	<i>Pantoea agglomerans</i> ATCC=27155	○	○
	<i>Pseudomonas lundensis</i>	○	○
	<i>Pseudomonas brenneri</i>	○	+++
	<i>Pseudomonas fluorescens A(bt)</i> ATCC=17554	○	+++
	<i>Arthrobacter sulfureus</i> ATCC=19098	○	○
	<i>Chryseobacterim balustinum</i>	+++	○
	<i>Pseudomonas marginalis</i>	+	++
	<i>Arthrobacter russicus</i>	+++	○
	<i>Psychrobacter faecalis</i>	+	○
	<i>Hafnia alvei</i>	○	○
	<i>Pedobacter heparinus</i>	○	○
	<i>Psychrobacter maritimus</i>	+++	○
	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	+	○
	<i>Pseudomonas veronii</i>	+	○
	<i>Serratia grimesii</i>	++	+++
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	○	○
	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	○	++
	<i>Chryseobacterium scophthalmum</i>	○	○
	<i>Yersinia intermedia</i>	○	○
	<i>Arthrobacter pascens</i>	○	○
<i>Serratia plymuthica</i>	○	+++	
<i>Lactococcus lactis cremoris</i> ATCC=19257	○	○	
<i>Streptococcus parauberis</i>	○	○	

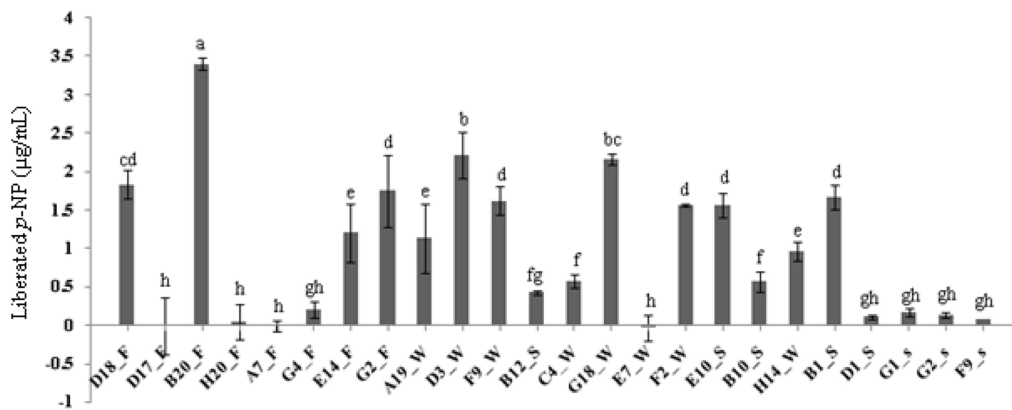


Fig. 1. Lipase activities of isolated bacteria from different location over four seasons. A~H: different locations, F: fall, W: winter, S: summer, s: spring. Significant differences indicated by different letters were analyzed using Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

유의 17번 균주(D17_F, *Lactococcus raffinolactis*, match %: 99.94), 가을철 H 지역 원유의 20번 균주(H20_F, *Exiguobacterium oxidotolerans*, match % : 96.79), 가을철 A 지역 원유의 7번 균주(A7_F, *Acinetobacter johnsonii*, match %: 99.58), 겨울철 E 지역 원유의 7번 균주(E7_W, *Arthrobacter russicus*, march %: 93.19)의 경우에는 지방분해효소 활성이 거의 나타나지 않았다($p < 0.05$). Elionora와 Malka(2007)에 따르면, Bacillales 강에 속하는 *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactococcus* 속의 경우 지방분해효소 또는 단백질분해효소의 활성이 거의 나타나지 않으며, Alphaproteo-

bacteria 강에 속하는 *Brevundimonas* 속, Betaproteobacteria 강에 속하는 *Delftia* 속, Gammaproteobacteria 강에 속하는 *Pseudomonas* 속과 *Acinetobacter* 속, Flavobacteria 강에 속하는 *Chryseobacterium* 속, Sphingobacteria 강에 속하는 *Sphingobacterium* 속이 가장 대표적인 지방분해효소 활성을 갖는 내냉성 미생물이라고 보고하였다. Table 1에서도 지방분해 효소활성이 높은 미생물로 Gammaproteobacteria 강에 속하는 *Acinetobacter* 속, *Psychrobacter* 속이 선발되었으며, Bacillales 강에 속하는 *Lactococcus* 속과 *Exiguobacterium* 속, Gammaproteobacteria 강에 속하는 *Acinetobacter*

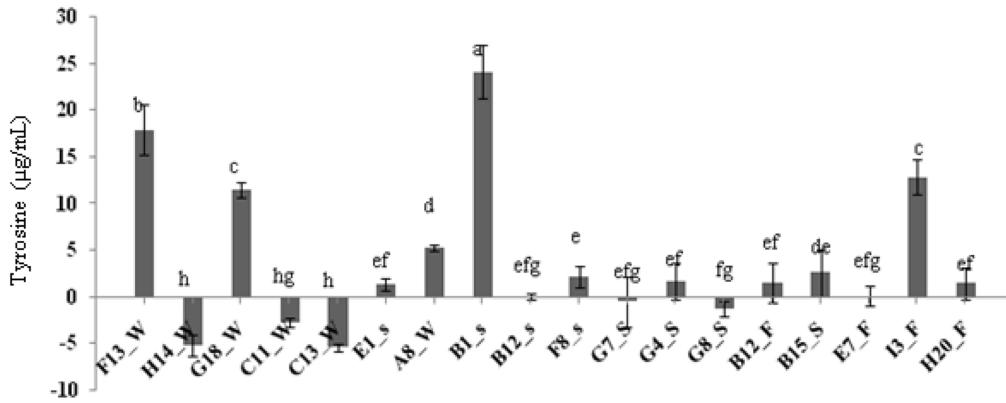


Fig. 2. Protease activities of isolated bacteria from different location over four seasons. A~C, E~H: different locations, W: winter, S: summer, s: spring, F: fall. Significant differences indicated by different letters were analyzed using Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

속, Actinobacteridae 강에 속하는 *Arthrobacter* 속의 경우 지방분해효소 활성이 거의 나타나지 않았다. 이와 같이 Gammaproteobacteria 강에 속하는 *Acinetobacter* 속이지만 *Acinetobacter* genomospecies 10(B20_F, match %: 99.90)의 경우 지방분해효소 활성이 가장 높게 측정된 반면, *Acinetobacter johnsonii*(A7_F, match %:99.58)의 경우는 지방분해효소 활성이 거의 없는 것으로 보아 같은 속의 종 간에도 효소활성 정도에는 차이가 있는 것으로 판단되며, 이는 Elionora와 Malka(2007)가 보고한 내용과도 일치하였다. *Acinetobacter* 속에 속하는 균종은 그램 음성 균종으로 여러 병원성 감염을 유발하며 균혈증, 요로감염, 뇌막염의 원인이 되고 있다(Constantinju *et al.*, 2004). *Acinetobacter johnsonii*(genomospecies 7)를 비롯하여 *Acinetobacter lwoffii*(genomospecies 8) 등 현재까지 32종의 균종이 보고되었고, 특히 *Acinetobacter baumannii*에 의한 감염이 90% 이상을 차지하고 있다(Bergogne-Bérézin and Towner, 1996).

단백질분해효소 활성측정은 colorimetric 방법으로 반응시킨 후 18개 균주의 단백질분해효소 활성을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다. 이 중 가장 높은 활성을 나타낸 균주는 봄철 B 지역에서 공급받은 1번 균주(B1_s, *Serratia liquefaciens*, match %: 99.39)로 24.17 µg/mL의 tyrosine을 생성하였다. 겨울철 F 지역의 원유에서 분리한 13번 균주(F13_W, *Serratia plymuthica*, match %: 89.53)가 17.92 µg/mL의 tyrosine을 생성하여 그 다음으로 높은 단백질분해효소 활성을 나타내었다. 이와 반면에 겨울철 H 지역의 원유에서 분리한 14번 균주(H14_W, *Pseudomonas extremorientalis*, match %: 99.82), 겨울철 C 지역의 원유에서 분리한 11번 균주(C11_W, *Pseudomonas fluorescens* A(bt) ATCC=17554, match %: 100.00), 13번 균주(C13_W, *Pseudomonas brenneri*, match %: 100.00), 여름철 G 지역의 원유에서 분리한 7번 균주(G7_S, *Pseudomonas chlororaphis*, match %: 99.82)와 8번 균주(G8_S, *Azorhizophilus paspali*, match %: 99.96)의 경

우 활성이 나타나지 않았다. Elionora와 Malka(2007)의 보고에서는 단백질분해효소 활성이 높은 내냉성 미생물로 Flavobacteria 강에 속하는 *Chryseobacterium* 속과 Actinobacteria 강에 속하는 *Microbacterium* 속을 대표적인 균으로 명시하였다. 본 연구에서는 Gammaproteobacteria 강에 속하는 *Serratia* 속이 가장 높은 단백질분해효소 활성을 나타내었고, *Pseudomonas* 속과 *Azorhizophilus* 속의 경우 단백질분해효소 활성이 거의 나타나지 않았다. Morales(2003)등의 연구에서도 *Serratia* 속이 단백질분해 효소활성이 매우 높은 균주라고 보고하였다. 본 연구에서 단백질분해 효소활성이 가장 높게 나타난 균주인 *Serratia liquefaciens*는 그램음성균으로 Enterobacteriaceae 과에 속한다.

지방분해효소와 단백질분해 효소 활성이 높은 균주의 성장과 조효소의 특성

지방분해효소 활성이 가장 높게 나타난 균주인 *Acinetobacter* geno- mospecies 10(match %: 99.90)의 성장곡선은 Fig. 3(A)와 같다. 배양 시작 후 2시간까지 균수가 서서히 증가하는 유도기(lag phase)였으며, 그 이후로 6시간까지 급격하게 균수가 증가하는 지수기(exponential phase)를 거쳐, 21시간까지 정지기(stationary phase)를 거친 후, 21시간이 지난 후부터는 균수가 감소하는 사멸기(death phase)로 접어들었다. 이는 미생물의 성장곡선의 전형적인 시그모이드(sigmoid) 곡선의 형태를 보여주었다.

단백질분해효소 활성이 가장 높게 나타난 봄철 B 지역에서 공급받은 1번 균주(*Serratia liquefaciens*, match %: 99.39)의 성장곡선은 Fig. 3(B)와 같다. 배양을 시작한지 3시간 동안 유도기(lag phase)를 유지하다가, 배양 8시간까지 급격하게 균수가 증가하여 지수기(exponential phase)를 거쳐, 24 시간까지 균수가 거의 일정하게 유지되는 정지기(stationary phase)에 도달한 후 부터는 균수가 급격하게 감소하는 사멸기(death phase)로 접어들었으며, 이는 앞의 *Acinetobacter*

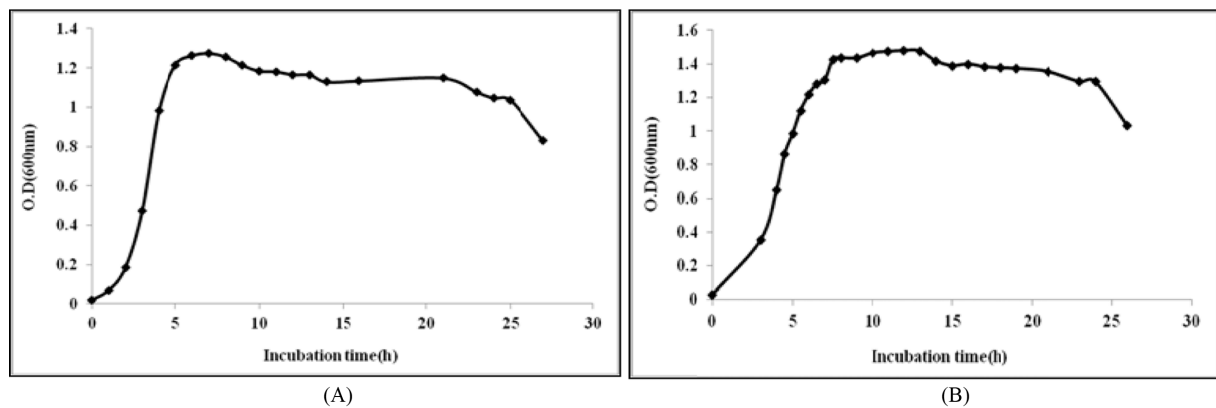


Fig. 3. Growth curve of psychrotrophic bacteria at 30°C. (A) *Acinetobacter* genomospecies 10, (B) *Serratia liquefaciens*.

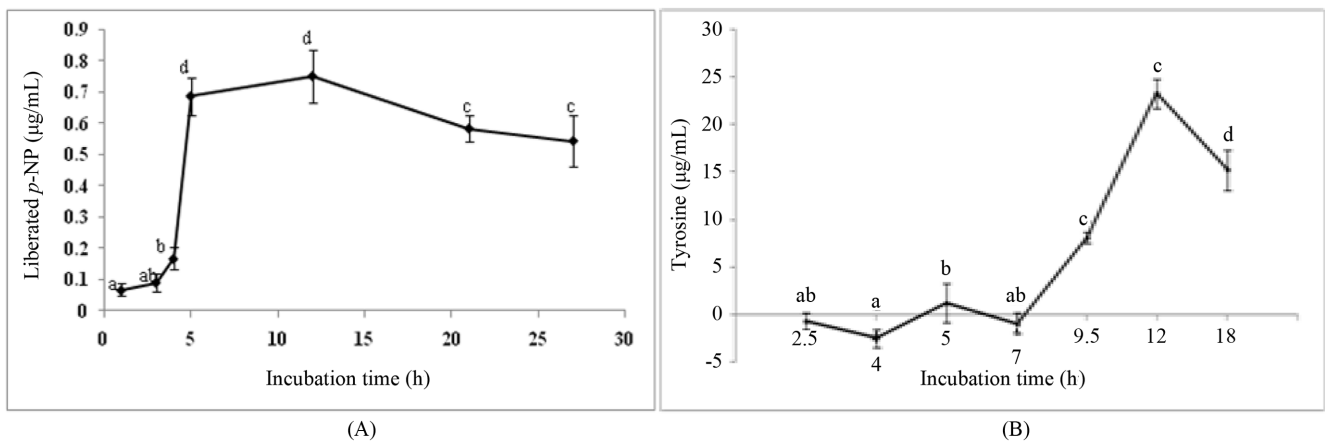


Fig. 4. Changes in lipase activities during incubation time. Significant differences indicated by different letters were analyzed using Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). (A) *Acinetobacter* genomospecies 10 (lipase), (B) *Serratia liquefaciens* (protease).

genomospecies 10(match %: 99.90)과 같이 전형적인 생장 곡선 형태인 시그모이드(sigmoid) 곡선임을 확인하였다.

지방분해효소 활성균주로부터 분리한 조효소의 특성을 조사하기 위하여 배양시간별로 지방분해효소 활성을 측정할 결과, 유도기에 속하는 배양 1시간 후부터 지수기를 지나 정지기의 중반 정도, 즉 배양한지 12시간까지 지속적으로 지방분해효소 활성이 증가하다가 배양 12시간 후에 지방분해효소 활성이 최대를 나타내었다(Fig. 4A). 하지만 그 이후로 정지기 후반부에서부터 사멸기에 도달하기까지는 배양시간이 증가할수록 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

이 균주가 생산한 조효소의 특성은 배양시간별로 단백질 분해효소의 활성을 측정할 결과, 배양 7시간까지는 활성을 나타내지 않다가 9.5시간부터 활성이 점진적으로 증가하여 12시간 후에 가장 높은 활성을 나타내었고, 18시간 후에는 다시 감소하는 양상을 나타내었다(Fig. 4B).

지방분해효소의 pH에 따른 활성 정도를 비교한 결과, pH 8.5에서 최대 활성을 나타내었으며 pH가 증가할수록 다시

감소하는 추세를 보였다(Fig. 5A).

pH에 의한 효소활성은 pH 2.5에서 가장 낮은 활성을 보였으며, pH 8.5까지는 pH가 높아질수록 활성이 점차 증가하다가 pH 8.5에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, pH 13.5로 증가할수록 다시 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 5B).

온도에 따른 활성은 45°C에서 2.76 µg의 *p*-NP를 생성하면서 가장 높은 활성을 나타내었고, 그 이상의 온도에서는 다시 활성이 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 6, A). Suzuki 등(2001)은 반응온도별 *Acinetobacter* sp. strain no.6의 지방분해효소 활성을 측정하였는데, 이 균주의 경우 20°C에서 가장 높은 분해활성을 나타내어 본 실험과 상이한 결과를 나타내었다. Kojima와 Shimizu(2003)는 *Pseudomonas fluorescens* HU380의 지방분해효소 활성을 측정하였는데, 반응 최적조건은 pH 8.5, 45°C로 나타났으며, 이는 본 연구의 *Acinetobacter* genomospecies 10(match %: 99.90)의 결과와 동일한 것을 알 수 있었다. 원유에서 분리한 내냉성 미생물인 *Pseudomonas* sp. YJ103의 지방분해효소 활성을 온도

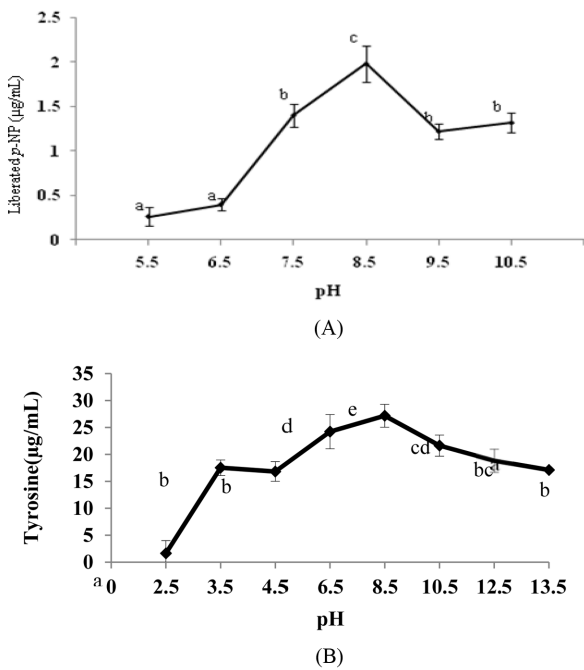


Fig. 5. Effect of pH on lipase activities at 45°C (A) and 30°C (B). Significant differences indicated by different letters were analyzed using Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). (A) *Acinetobacter genomospecies 10* (lipase), (B) *Serratia liquefaciens* (protease).

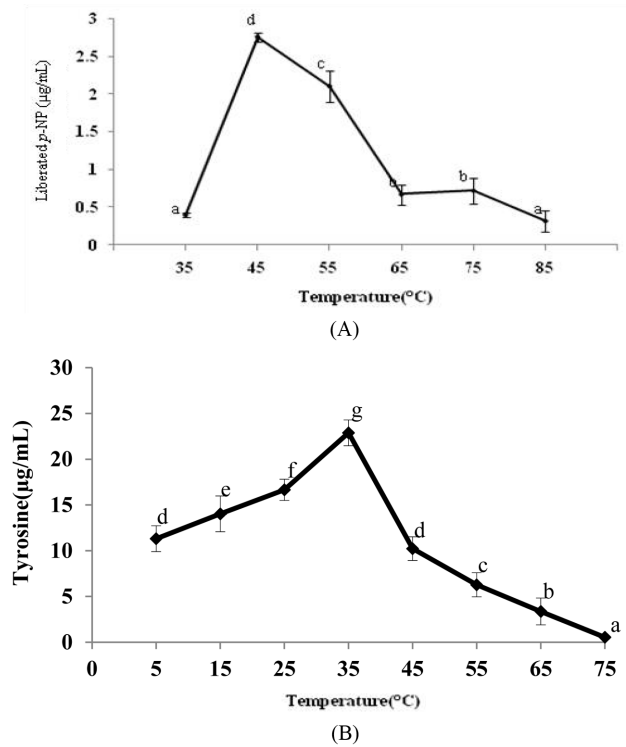


Fig. 6. Effects of temperature on lipase activities at pH 8.5. Significant differences indicated by different letters were analyzed using Duncan's multiple range test ($p < 0.05$). (A) *Acinetobacter genomospecies 10* (lipase), (B) *Serratia liquefaciens* (protease).

별, pH별로 비교측정한 Kim 등(1997)의 보고에서는 30°C와 pH 7.5에서 활성이 가장 높은 것으로 나타났다.

반응온도에 따른 효소활성은 5°C에서 35°C까지는 온도가 증가할수록 활성이 높아져 35°C에서 최고에 도달했고, 75°C까지는 온도가 높아질수록 감소하다가 75°C에서는 활성이 거의 나타나지 않았다(Fig. 6B). Lee(1993)는 원유에서 분리한 내냉성 미생물 중 *Pseudomonas* sp. K101의 단백질분해효소 활성을 측정한 결과, 최적활성 온도와 pH는 각각 30°C와 pH 7.5로 보고하였는데 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

높은 활성을 나타내었다. *Serratia liquefaciens*(match %: 99.39)의 생장곡선은 전형적인 시그모이드 형태를 나타내었고, 단백질분해효소 활성은 배양 12시간 후에 가장 높았고, 18시간 후에는 다시 감소하는 양상을 나타냈다. 단백질분해효소의 pH 영향은 2.5에서 활성이 가장 낮았고 pH 8.5에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 또한 반응온도에 의한 효소활성은 35°C에서 가장 높았다.

요 약

지방분해효소 활성이 가장 높은 균은 가을철에 집유한 B 지역의 원유로부터 분리한 *Acinetobacter genomospecies 10* (match %: 99.90)이었으며, 단백질분해효소 활성이 가장 높은 균은 봄철에 B 지역의 원유로부터 분리한 *Serratia liquefaciens*(match %: 99.39)였다. *Acinetobacter genomospecies 10*(match %:99.90)는 전형적인 생장곡선의 형태인 시그모이드 곡선의 형태를 나타냈으며, 배양시간별 조효소 활성은 배양시간이 증가할수록 지방분해효소 활성이 증가하다가 정지기 후반부에서부터 사멸기에 도달하기까지는 배양시간이 길수록 활성이 감소하였다. pH에 따른 지방분해효소 활성은 pH 8.5에서 가장 높았고 온도는 45°C에서 가장

참고문헌

1. Bergogne-Bérézin, E. and Towner, K. (1996) *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 148-165.
2. Constantinju, S., Romaniuc, A., Smaranda Iancu, L., Filimon, R., and Tarași, I. (2004) Cultural and biochemical characteristics of *Acinetobacter* spp. strains isolated from hospital units. *J. Prev. Med.* **12**(3-4), 35-42.
3. Cousin, M. A. (1982) Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy product, a review. *J. Food Prot.* **45**, 172-178.
4. Elionora, H. and Malka, H. (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lypolytic traits. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7162-7168.
5. Hull, M. E. (1947) Studies on milk proteins, II. Colorimetric

- determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.* **30**, 881-884.
6. Kim, J. W., Shim, Y. S., and Yoon, S. S. (1997) Isolation and purification of a lipase from *Pseudomonas* sp. YJ103 isolated from raw milk. *Korean J. Dairy Sci.* **19**, 17-24.
 7. Kojima, Y. and Shimizu, S. (2003) Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *J. Biosci. Bioeng.* **96**, 219-226.
 8. Lee, Y. Y. (1993) Purification and properties of protease produced from psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas* sp. K101. *Korean J. Environ. Biol.* **11**, 82-90.
 9. Makhzoum, A., Owusu-Apenten, R. K., and Knapp, J. S. (1996) Purification and properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* strain 2D. *Int. Dairy J.* **6**, 459-472.
 10. McKellar, R. C. (1989) Enzymes of psychrotrophs in raw food. CRC Press, pp. 102-118.
 11. Morales, P., Fernández-García, E., and Nuñez, M. (2003) Caseinolysis in cheese by Enterobacteriaceae strains of dairy origin. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 410-414.
 12. Ramesh, C. K. and Sudesh, K. Y. (2007) Isolation of a psychrotrophic *Exiguobacterium* sp. SKPB5(MTCC 7803) and characterization of its alkaline protease. *Curr. Microbiol.* **54**, 224-229.
 13. Shamsher, S. K., Rajeev, K. K., Arshad, J., Reena, G., and Swapandeep, S. C. (2005) Methods for inhibition of residual lipase activity in colorimetric assay: A comparative study. *Indian J. Biochem. Biol.* **42**, 233-237.
 14. Shin, Y. K., Lee, H. A., Oh, N. S., and Nam, M. S. (2013) Seasonal, regional distribution and identification of psychrotrophic bacteria in milk. *CNU J. Agri. Sci.* **40**, 27-34.
 15. Suzuki, T., Nakayama, T., Kurihara, T., Nishino, T., and Esaki, N. (2001) Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain No.6. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 144-148.
 16. Witter, L. D. (1961) Psychrophilic bacteria. A review. *J. Dairy Sci.* **44**, 983-1015.

(Received 2013.3.5/Revised 2013.11.12/Accepted 2013.11.14)