

최 중
연구보고서

수산발효식품의 기능성 향상을 위한 효소 및 starter 개발

2002. 12

연구기관
강릉대학교

해양수산부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “수산발효식품의 기능성 향상을 위한 효소 및 starter 개발”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2002년 12월

주관연구기관명 : 강릉대학교

총괄연구책임자 : 김 상 무

연 구 원 : 신일식, 손병일, 최근표,
박욱연, 황주연, 문성양,
김우재, 박종혁, 이정모

참 여 기 업 명 : 품미식품,

노보자임스코리아 (주)

참여기업책임자 : 정진순, 김병영

요 약 문

I. 제 목

수산발효식품의 기능성 향상을 위한 효소 및 starter 개발

II. 연구개발 사업의 목적 및 중요성

1. 연구개발 사업의 목적

최근 식품 관련 연구의 발전에 따라 식품에 존재하는 기능성 성분들이 속속 밝혀지고 있다. 미국에서는 이른바 식품성분과 건강과의 관계를 나타내는 Health Claim을 인정하고 있으며, 일본에서도 식품의 기능성에 대한 연구가 활발히 이루어져 특정보건용식품제도가 도입되었다. 여러 식품 성분 중에서 식품단백질 유래 peptide가 영양 가치 이외에 여러 가지 기능성(항암활성, 항산화활성, Opioid성, 면역증강활성, 항혈전활성, 혈압강화활성, 칼슘흡수촉진활성, 항콜레스테롤활성 등)을 나타내는 것이 밝혀짐에 따라 선진국에서는 암예방식품(미국)이나 특정보건용식품(일본)의 새로운 식품으로 등장하고 있다. 이에 따라 국내에서도 된장 및 대두단백질의 기능성 식품화 및 기능성 물질을 확인하는 연구가 최근에 이루어지고 있다. 또한, 최근에 수산물에 존재하는 기능성 물질의 동정에도 연구가 이루어지고 있는 실정이지만 아직 초보단계에 불과하다. 한편, 우리 전통 발효식품인 김치에는 항암작용을 비롯한 여러 가지 기능성 물질의 확인 및 작용기작이 밝혀지고 있으나 비슷한 젖산발효식품인 젓갈 및 어간장(액젓) 유래 항암펩타이드 등의 기능성에 관한 연구보고는 없는 실정이다. 젖산발효식품의 주 속성균인 유산균은 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 현재 유가공품 및 김치류 유래 유산균의 항암작용에 대한 연구는 많이 이루어지고 있으나 같은 젖산발효식품인 젓갈 및 어간장의 생리활성 연구는 찾아보기 힘들다. 생활수준의 향상으로 건강지향적인 삶의 추구를 모색하는 현대인의 욕구를 충족하기 위해서는 보건 의학적인(기능성) 식품의 개발은 피할 수가 없다. 수산발효식품인 젓갈 및 어간장(액젓)에도 여러 가지 고기능성 펩타이드가 많이 존재하는 것으로 추정되어지나 일부 수산물 또는 효소가수분해물에서 항산화 및 항혈전 작용 등만 보고되고 있을 뿐 천연발효 어간장 및 젓갈에 있어서의 항암작용을 비롯한 여러 가지 기능성 (항암활성, 항산화활성, Opioid성, 면역증강활성, 항혈전활성, 혈압강화활성, 칼슘흡수촉진활성, 항콜레스테롤활성

등)에 대한 연구보고는 아직까지 없다. 따라서, 수산발효식품의 경쟁력을 강화하기 위해서는 수산발효식품의 조미료 개념을 탈피하고 고기능성 식품으로 방향전환과 함께 여러 가지 기능성 물질을 생산하는 고기능성 효소 및 미생물을 Starter로 첨가하여 기능성 물질의 생산을 유도하는 기술의 확보가 절실히 요구되는 시점이다. 그리고, 현재 상업용으로 개발되어 있는 효소 및 미생물은 젓갈과 같은 고식염식품에서는 활성이 약하여 starter로서의 기능은 충분하지 못하다. 따라서, 내염성 및 내산성인 고기능성 효소 및 미생물은 반드시 개발되어야 하는 분야이다.

2. 중요성

고부가가치·고기능성 펩타이드를 생산하는 미생물 및 효소 개발에 요구되는 핵심 기술로는 효소공학, 분리 및 정제기술, 발효공학, 미생물학, 배양공학 등을 들 수 있으며 이러한 분야의 통합적이고 체계적인 연구체제로 기술의 진보를 가져올 수 있다. 특히 본 연구에서 시도하는 수산발효식품유래 기능성 펩타이드를 생산하는 효소 및 미생물개발은 선진국형 기술의 축적을 위한 중요한 기술이 될 것이다. 또한, 이런 미생물 및 효소를 이용하면 젓갈 및 어간장 생산공정 중 시급히 해결해야 하는 숙성기간 단축문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라 항고혈압작용을 비롯한 고기능성 펩타이드 및 미생물 함유 어간장, 젓갈 및 Fish Peptide Concentrate(FPC:어육농축펩타이드)를 생산할 수 있으므로 수산발효식품을 비롯한 식품산업에 폭넓게 활용할 수 있기 때문에 식품산업에 미치는 파급효과도 크다. 환경 및 사회변화와 함께 암, 성인병 등의 발생을 증가와 노령화 추세에 따른 건강 욕구를 충족시키는 특수식품의 수요가 급격히 증가할 것으로 예상된다. 또한 효능에서 과학적 근거를 가진 기능성식품은 기존의 건강식품에 대신하여 상당부분 대체되고 이와 함께 커다란 시장이 새롭게 형성될 것으로 추측된다. 선진국의 경우 건강에 미치는 식품의 중요성을 잘 인식하고 생리적 기능성 식품 연구와 제품개발에 몰두하고 있으나 국내인 경우 최근에야 농산품을 중심으로 그 중요성을 인식하기 시작하고 있다. 국내에서 다루어지고 있는 기능성 식품소재는 식이섬유, 올리고당, 다가불포화지방산, 녹차추출물, 야채류, 김치, 대두펩타이드 등이며, 그나마 생리활성에 대한 기본적인 연구자료가 극히 미비한 실정이다. 21세기의 풍요로운 사회에서 국민들이 요구하게 될 건강장수에의 요구충족을 위해서 식품에 대한 올바른 지식과 이해, 건전한 식품산업의 육성이 필요하다. 그 목표를 달성하기 위하여 식품 전반에 대한 체계적인 연구가 필요하며, 특히 예방의학적 기능을 갖는 한국적인 신기능성 식품의 개발을 위한 연구가 반드시 요구된다. 그러므로, 여러 가지 기능성 펩타이드 및 미생물을 함유하는 어간장(액젓) 및 FPC(어육농축펩타이드) 생산에 필요한 미생물 및 효소 개발은 기능성 식품 산업뿐만 아니라 관련산업의 발전에도 크

게 이바지할 것이다.

Ⅲ. 연구개발사업의 내용 및 범위

제 1 장 기능성 효소 생산 기술 개발

제 1 절 멸치액젓 유래 저분자 peptide의 생리활성

천연 숙성 멸치액젓의 숙성 기간별 생성되는 다양한 형태의 기능성 peptide을 분리·정제하여 항암, 항산화 및 ACE 저해효과를 분석하였다.

제 2 절 멸치액젓 유래 저분자 물질의 항산화활성

천연 숙성 멸치액젓의 숙성 기간별 생성되는 다양한 형태의 항산화물질을 분리·정제하여 항산화활성 및 구조분석을 하였다.

제 3 절 멸치액젓 유래 *Bacillus subtilis* JM3 단백질분해효소의 정제 및 특성

멸치액젓 유래 내염성 미생물 (*Bacillus subtilis*)이 생산하는 단백질분해효소를 정제하여, 여러 가지 특성 (내염성, 내산성, 최적 pH 및 온도, 안정성, 기질 및 저해제 특이성, 동력학적 연구)을 분석하였다.

제 4 절 오징어 젓갈 유래 *Bacillus megaterium* KLP-98 단백질분해 효소의 정제 및 특성

오징어 젓갈 유래 내염성 미생물 (*Bacillus megaterium*)이 생산하는 단백질분해효소를 정제하여, 여러 가지 특성 (내염성, 내산성, 최적 pH 및 온도, 안정성, 기질 및 저해제 특이성, 동력학적 연구)을 분석하였다.

제 5 절 된장으로부터 분리한 *Asp. sp.* 101 단백질분해효소의 정제 및 특성

된장으로부터 분리한 곰팡이인 *Asp. sp.*가 생산하는 단백질분해효소를 정제하여, 여러 가지 특성 (내염성, 내산성, 최적 pH 및 온도, 안정성, 기질 및 저해제 특이성, 동력학적 연구)을 분석하였다.

제 6 절 된장으로부터 분리한 효모(Yeast) 단백질분해효소의 정제 및 특성

효모로부터 단백질분해효소를 정제하였으며, 여러 가지 특성 (내염성, 내산성, 최적 pH 및 온도, 안정성, 기질 및 저해제 특이성, 동력학적 연구)을 분석하였다.

제 7 절 기능성 효소 (*B. subtilis* JM3 protease)를 첨가한 멸치액젓의 품질특성

발효 및 숙성기간을 단축하기 위하여 멸치액젓에서 단백질분해 활성이 가장 큰 단백질분해세균 (*B. subtilis* JM3)이 생산해내는 단백질분해효소를 숙성 중의 멸치액젓에 첨가하여 여러 가지 품질 특성을 분석하였다.

제 8 절 멸치액젓에서 기능성 peptide의 정제 및 생리활성

단백분해세균 (*B. subtilis* JM3)이 생산해내는 단백질분해효소를 숙성 중의 멸치액젓에 첨가하여 생성되는 peptide을 분리·정제하였으며, 정제된 peptide의 생리활성을 분석하였다.

제 9 절 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소에 의한 멸치 근원섬유단백질 분해 특성

다양한 시판 단백질분해효소 및 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소의 멸치 actomyosin에 대한 가수분해 특성을 분석하였으며, 액젓 및 자건품으로 널리 이용하고 있는 멸치육 단백질을 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소로 가수분해시, 반응표면 분석법 (Response Surface Methodology, RSM)에 의한 최적의 가수분해 조건을 검토하였다.

제 2 장 기능성 미생물 (Starter) 개발

제 1 절 멸치액젓 유래 단백질분해세균의 분리 및 동정

액젓의 속성발효 및 항혈전, 항고혈압, 항산화 그리고 나아가서는 항암과 같은 생리활성 기능을 부여한 신개념의 액젓을 제조할 목적으로 상업적으로 이용 가능한 기능성 액젓 제조용 starter를 분리하고자 국내 시판 액젓 중 기호도가 매우 높은 멸치액젓으로부터 단백질분해활성이 강하고, 동시에 혈전용해활성이 우수한 균주를 분리하여, 최적 성장 조건 및 최적 효소 생산조건 등을 조사하였으며, 분리균주들의 동정은 형태학적, 배양학적 특징 및 PCR을 이용한 16S rRNA의 염기서열을 분석하여 동정하였다. 또한 분리한 균주를 대상으로

각종 생리활성기능의 유무를 알아보기 위하여 항산화 활성, 항균 활성, ACE 활성 저해 효과, 암세포 증식 억제 효과 등을 조사하였다.

제 2 절 멸치액젓 유래 *Bacillus subtilis* JM-3의 생리활성기능

앞으로 본 균주 (*B. subtilis* JM-3)의 멸치액젓 starter로서의 이용을 극대화하기 위하여서는 돌연변이에 의한 호염성 변이주의 유전적 육종이나 형질 전환 방법 등을 응용한 호염성 미생물과의 접목을 통한 내염성 균주의 개발도 필요할 것으로 여겨지며, 멸치액젓에 분리된 미생물의 돌연변이원성 실험 (Mutagenicity test), 항돌연변이원성 실험 (Antimutagenicity test), 변이원물질 및 항변이원활성을 측정하였다.

제 3 절 분리균주를 Starter로 이용한 가자미 식해 제조

발효 및 숙성기간을 단축하기 위하여 가자미 식해 제조시 단백질분해 활성이 가장 큰 단백분해세균 (*B. subtilis* JM3)을 starter로 첨가하여 숙성기간에 따른 품질특성을 분석하였다.

제 4 절 분리균주를 Starter로 이용한 멸치액젓 제조

발효 및 숙성기간을 단축하기 위하여 멸치액젓 제조시 단백질분해 활성이 가장 큰 단백분해세균 (*B. subtilis* JM3)을 starter로 첨가하여 숙성기간에 따른 품질특성을 분석하였다.

IV. 연구개발결과

제 1 장 기능성 효소 생산 기술 개발

제 1 절 멸치액젓 유래 저분자 peptide의 생리활성

숙성기간 (1, 3 및 5년)이 다른 멸치액젓으로부터 추출한 peptide는 정제과정에서 숙성 1년의 멸치액젓은 3개, 숙성 3년의 멸치액젓은 4개, 숙성 5년의 멸치액젓은 5개의 peak를 각각 나타내었다. 숙성기간이 길수록 멸치액젓의 peptide는 저분자화 되었으며, gel chromatography상의 후반부에 나타났다. 숙성기간이 다른 멸치액젓으로부터 추출한 peptide들의 생리활성 (항산화, 항암, ACE 저해활성)은 숙성기간이 길수록 증가하였다. 특히 항산화 및 항암활성은 IC₅₀이 각각 34 및 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 3년

숙성 peak 3이 제일 높았으나, ACE 저해활성은 IC₅₀이 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 1년 숙성 peak 3이 제일 높았다. 천연숙성 멸치액젓의 저분자 peptide는 뛰어난 생리활성을 갖고 있음이 밝혀졌으나 구조분석 등의 추가 연구가 필요하다고 본다.

제 2 절 멸치액젓 유래 저분자 물질의 항산화활성

5년 숙성 멸치액젓으로부터 한외여과 및 gel permeation chromatography를 통하여 정제한 생리활성물질은 5개의 peak를 나타내었다. 멸치액젓의 저분자 생리활성물질의 항산화활성은 peak 2 (84.7%) 및 peak 1 (42.6%) 순으로 높은 활성을 나타내었다. Peak 1의 주 항산화물질은 glutamic acid 및 lysine이었으며 peak 2의 항산화물질은 확인되지 못하였으나 갈변물질 또는 다른 물질일 것으로 추정된다.

제 3 절 멸치액젓 유래 *Bacillus subtilis* JM3 단백분해효소의 정제 및 특성

천연 숙성 발효된 멸치액젓에서 내산성 및 내염성 단백분해세균을 분리•동정하여 *Bacillus subtilis* JM-3로 명명하였다. 이 균주는 10% NaCl을 포함된 MRS 배지를 이용하여 37°C에서 배양하고 ammonium sulfate 분획 결과 40~60% 분획에서 가장 높은 protease 활성이 측정되었다. 이 분획은 ion exchange chromatography와 gel permeation chromatography로 정제하고 SDS-PAGE로 분석한 결과 20,000 daltons의 단일 밴드(band)가 얻어졌다. *Bacillus subtilis* JM-3 proteases의 정제효율은 5.3%이었으며 정제율은 35.56 fold로 정제되었다. 효소의 K_m 값과 V_{max} 값은 1.75 mg/mL과 318 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ 이었으며, 최적 온도는 60°C이었고 10~30°C사이에서 효소는 온도에 대한 안정성을 나타내었다. *Bacillus subtilis* JM-3 proteases의 최적 pH는 5.5이었고, pH 5.0~ 5.5 부근에서 안정한 것으로 나타나 산성 단백질 분해효소로 판명되었다. *Bacillus subtilis* JM-3 proteases는 각각 염농도 10, 20 및 30%에서 69, 21 및 1.3%의 잔존 단백질 분해 활성을 나타내었고 azocasein에서 가장 높은 기질 특이성을 나타내었으며, casein에서도 높은 활성을 나타내었다. *Bacillus subtilis* JM-3 proteases는 TLCK에 의해 완벽한 저해를 받았으며, DTT에도 저해를 받았다. 그러므로 *Bacillus subtilis* JM-3 proteases는 trypsin계 serine protease로 추정되어진다.

제 4 절 오징어 젓갈 유래 *Bacillus megaterium* KLP-98 단백질 분해 효소의 정제 및 특성

천연 숙성 발효된 오징어 젓갈에서 내산성 및 내염성 단백분해균을 분리•동정

하였다. 균주는 *Bacillus megaterium*으로 동정되었으며, *B. megaterium* KLP-98로 명명하였다. *B. megaterium* KLP-98 단백질분해효소는 40~60%의 ammonium sulfate 분획에서 효소활성이 가장 높았으며, ion exchange chromatography에서 2개의 peak를 나타내었다. *Bacillus megaterium* KLP-98 단백질분해효소의 정제율 및 정제효율은 18.8 fold 및 15.3%이었으며, SDS-PAGE 분석결과 64,000 Da의 단일 밴드 (band)가 얻어졌다. 효소의 Km 값과 Vmax 값은 각각 2 mg/mL와 283 unit/min 이었으며, 최적온도와 안정성 온도는 각각 60 및 40°C이었다. *B. megaterium* KLP-98 단백질분해효소의 적정 pH는 5.5이었고, pH 5.0~5.5 부근에서 안정한 산성 단백질분해효소이었다. *Bacillus megaterium* KLP-98 단백질분해효소는 염 농도 10, 20과 30%에서 73, 33과 4%의 잔존활성을 나타내었다. 단백질분해효소는 azocasein에서 가장 높은 기질 특이성을 나타내었으며, Z-Phe-Arg-Nmec에서도 높은 활성을 나타내었다. 저해제 실험에서는 NEM에 의해 완전 저해를 받았으며, TPCK에도 약간의 저해를 받았다. 그러므로 *Bacillus megaterium* KLP-98 단백질분해효소는 cysteine계 protease로 추정되어진다.

제 5 절 된장으로부터 분리한 *Asp. sp. 101* 단백질분해효소의 정제 및 특성

단백질 식품의 가공에 이용할 수 있는 내염성 산성 protease에 의해 분해되는 어육단백질 가수분해물의 특성과 이용성의 일환으로, 최적 배지조성을 확립하였다. *Asp. sp. 101*을 이용하여 단백질 분해효소의 생산을 높일 수 있는 조성으로 질소원으로서 대두단백원인 탈지대두분(DSF)과 분리대두단백(SPI)을 각각 2% 첨가 시에 효소활성이 가장 높게 나타났고, 무기질소원으로 CaCO₃와 K₂HPO₄이 각각 0.1% 씩 첨가 시에 가장 좋은 결과를 나타내었다. 또한 효소 활성도를 높이기 위하여 Arabic gum을 배양액에 0.1% 첨가 시 가장 활성이 높았다. 그리고 최고 15% NaCl 농도의 agar plate에서 생육이 가능하였으며, 조효소 또한 7%까지 염에 대한 안정성을 보였다. 이상에서와 같이 조정된 배지에 *Asp. sp. 101*에 의해 생산된 내염성 산성 단백질분해 효소는 일반적인 곰팡이류의 단백질 분해효소 생산용 배지에 비해 높은 생산성을 나타내었으며, 이러한 배지 조정을 함으로써 *Asp. sp. 101*에 의한 어육단백질의 가수분해물의 기능특성의 개선과 식품으로서의 이용성을 증가시키고, 산업적인 단백질 분해효소 생산 가능성을 시사하고 있다.

제 6 절 된장으로부터 분리한 효모(Yeast) 단백질분해효소의 정제 및 특성

Saccharomyces sp. B101이 생산하는 salt-tolerant protease를 ammonium sulfate fractionation, ultrafiltration, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100 column chromatography 법으로 정제하여 단일성을 보였으며, specific activity가 4688.9 units/mg, 최종 회수율은 3.1%으로 18배의 정제 효소를 얻었으며, Km값은 1.02 mg/ml이고 Vmax값은 278.38 unit/min이었다. SDS-PAGE 분석결과 분자량은 33 kDa의 단일밴드 (band)를 얻었다. *Saccharomyces* sp. B101 단백질분해효소의 최적 pH는 8.5이었고 pH 7.5에서도 95%의 높은 효소 활성을 나타냈으며 6.5에서 8.5까지의 pH영역에서 매우 안정하였다. 최적 온도 및 온도 안정성은 30 및 40°C 이었다. *Saccharomyces* sp. B101 단백질분해효소는 염농도 10 및 15%에서 50% 이상의 잔여활성을 나타내었다. Ag^{2+} 와 Fe^{2+} 에 의해서 저해를 받았고, Mn^{2+} 에 의해서는 효소활성이 증가되었으며, EDTA에 의해 저해를 보였으며, serine계에 특이적으로 저해를 일으키는 PMSF에 의해서도 저해를 보였으므로 이 효소는 효소 활성 부위에 serine잔기를 가지는 serine protease로 추정되며 금속이온도 활성부위에서 효소 활성에 관여하는 것으로 판단된다. 본 효소는 기질로서 분리대두단백(SPI)에 대한 높은 가수분해력을 보였다.

제 7 절 기능성 효소 (*B. subtilis* JM3 protease)를 첨가한 멸치액젓의 품질특성

멸치액젓에서 분리한 내염성 단백질분해균 (*B. subtilis* JM3)이 생산하는 효소를 숙성 6개월째의 액젓에 첨가하여 여러 가지 품질특성을 분석하였다. pH는 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소 첨가량 및 가수분해시간에 따른 변화는 없었고, 젓산량은 4% 단백질분해효소 첨가구가 제일 높았다. 아미노태 질소, 휘발성염기질소 및 가수분해도는 단백질분해효소 첨가구가 대조구에 비해 높았으며, 갈변도는 4% 효소 첨가구에서 높게 측정되었다. 2시간 동안 가수분해한 멸치액젓의 관능검사를 실시한 결과 단백질분해효소 첨가구가 대조구에 비해 향 및 맛에서 좋은 평가를 얻었다.

제 8 절 멸치액젓에서 기능성 peptide의 정제 및 생리활성

대조구, *B. subtilis* JM3 단백질분해효소 2 및 4% 첨가구의 멸치액젓은 gel chromatography 상에서, 각각 5, 6 및 7개의 peak를 나타내었다. 2% *B. subtilis* JM3 단백질분해효소 첨가구는 대조구 및 4% 첨가구에 비해 총 ACE 저해활성이 높았다. 총 DPPH 라디칼 소거능은 대조구, 2 및 4% *B. subtilis* JM3 단백질분해효소 첨가구에서 모두 50% 이상의 활성을 나타내었다. 총 cytotoxicity는 4% 단백질분해효

소 첨가구가 대조구 2% 효소 첨가구에 비하여 높았다.

제 9 절 *B. subtilis* JM3 단백분해효소의 멸치 근원섬유단백질 분해 특성

Alcalase는 pH 7.5-8.5, Protamex는 pH 7-8, Flavourzyme은 pH 5-6, *B. subtilis* JM3 단백분해효소는 5.5-6 사이에서 tyrosine 생성량이 가장 높았다. Alcalase, Protamex, Flavourzyme 및 *B. subtilis* JM3 단백분해효소는 45-55, 50-60, 45-55 및 50-60 °C에서 tyrosine 생성량이 가장 높았다. 반응표면분석방법에 의하여 얻어진 *B. subtilis* JM3 단백분해효소에 의한 최적 가수분해 조건은, 온도는 55 °C, pH는 5.92, 효소농도는 1.82, 가수분해 시간은 4.72 hr이었다.

제 2 장 기능성 미생물 (Starter) 개발

제 1 절 멸치액젓 유래 단백분해세균의 분리 및 동정

1, 3 그리고 5년 숙성한 멸치액젓으로부터 단백질 분해활성을 가진 미생물을 분리하여 기능성 starter로 이용하고자 단백질 분해활성이 강한 균주 JM-1, JM-2 그리고 JM-3를 분리하였으며, 생화학적 특성과 16S rRNA의 염기서열을 조사한 결과 세 균주 모두 *Bacillus subtilis*로 동정되었다. 분리균주들 중 *Bacillus subtilis* JM-3가 가장 강력한 단백질 분해 활성을 나타내었다.

제 2 절 멸치액젓 유래 *Bacillus subtilis* JM-3의 생리활성기능

B. subtilis JM-3의 최적 성장조건은 40°C, pH 5.0 그리고 NaCl를 첨가하지 않았을 때 성장이 가장 좋은 것으로 나타났다. *B. subtilis* JM-3의 최적 효소 생산 조건은 최적 성장 조건과 일치하였다. *B. subtilis* JM-3 배양 상청액은 강한 혈전용해 활성을 나타내었으며, N-nitroso compound인 NDMA 및 NMO에 대하여서는 약 60%의 변이억제 활성을 나타내었으며 변이억제 활성은 농도에 비례하는 것으로 나타났다. 또한 그람양성균으로 *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes* 그리고 *Micrococcus lutes* 등에 항균활성을 나타냈으며, 그람음성균은 *Enterobacter aerogenes*에서만 항균활성 보였고, *Listeria monocytogenes* 에 대하여 가장 강한 항균활성을 보였다. *B. subtilis* JM-3 배양 상청액은 ACE 활성 저해 효과는 없었으나, 83%의 높은 항산화 활성을 나타내었으며, SNU-1 cell에 대하여 88.9%의 암세포 증식 억제 효과를 나타내었다.

제 3 절 분리균주를 Starter로 이용한 가자미 식해 제조

전통적인 가자미 식해제조방법 중 엿기름을 첨가하는 대신 *B. cereus*를 starter로 1, 10, 20%를 첨가하여 가자미식해를 제조하였으며, 그 특징을 조사하였다. 총균수는 숙성 5~6일 만에 최대로 나타났으며, 균체 10% 첨가구에서는 3일 만에 최대로 나타났다가 증가폭이 줄어드는 경향으로 나타났다. 가자미식해 숙성 중의 pH의 변화는 전반적으로 숙성기간이 길어질수록 낮아지는 결과를 나타내었으나, 급격한 pH의 감소는 보이지 않았다. 특히, 엿기름은 숙성 9일째는 4.6까지 낮아지는 결과를 보였다. 숙성 기간에 따른 젖산의 생성량은 모든 시료구에서 6일째 최대치를 나타내었으나 균체 20% 첨가구에서는 3일째 급격한 상승을 나타내었고, 6일째에 최대를 그리고 9일째는 값이 급격히 떨어짐을 나타내었다. 식해 숙성 중의 아미노태 질소량의 변화는 각 실험구에서 꾸준히 증가하는 것으로 나타났으며 9일째에 최대값을 나타내었다. TBA 값의 변화는 지질산화정도를 나타내는데 균체 0%,1% 첨가구에서 숙성 6일만에 최대치를 나타내었고 10%,20% 그리고 엿기름을 첨가한 실험구에서는 9일째 최대를 나타내었다. VBN의 값의 변화는 위와 같이 숙성 3일째에 최대를 나타내었다. 균체 20% 첨가구에서는 6일째에 최대를 나타내었다.

제 4 절 분리균주를 Starter로 이용한 멸치액젓 제조

멸치액젓의 숙성중의 Amino-N량은 식염에 의한 영향을 덜 받는 TNBS법을 통해 살펴보면 숙성초기부터 높은 값을 나타내었고, 특히 15일째에는 모든 실험구에서 급격한 증가를 나타내어 숙성 20 일째까지 계속 급격한 상승을 하고 있다. 이는 신 등(2002)의 숙성어간장 제조 및 품질평가에 관한 연구에서 Koji 균을 첨가한 시료구와 흡사한 결과를 나타내며 특히, 숙성 20일째에는 신 등(2002)의 Koji 균의 첨가 시료구보다 더 높은 결과를 나타내었고 변 등의 (1994) 다시마 마쇄물을 이용한 멸치 젓갈의 숙성촉진에 관한 연구의 결과보다도 더 높은 Amino-N값을 나타내었다. TBA값은 지방의 산패를 측정하는 것으로 100g당 800 μ g~1000 μ g 로 매우 낮은 값을 나타내었으나, 계속 증가하는 추세였다. 식품중의 TBA의 변화는 Sihuber (1958), Bildack(1972), 김 등(1973) 에 의하면 일정기간까지는 증가하다가 그 이후 감소한다고 보고 하였다. VBN은 NH₃의 양을 재는 것으로 0%,1%,5%에 비해 10%의 Starter 첨가구에 높은 값을 나타내었다. 모든 실험구에서 변 등의(1994) 다시마 마쇄물을 이용한 멸치젓갈의 숙성촉진 연구에서의 20일째의 VBN값(60mg/100g)보다 높은 결과를 나타내어 멸치육의 단백질 분해속도가 상당히 빠른 것으로 추정된다. pH는 서서히 떨어지는 것을 알수 있었다.

특히, 5%의 Starter 첨가구에서 가장 낮은 pH를 나타내었다. 신 등(2002)의 숙성어간장의 제조 및 품질평가의 연구에서는 숙성기간 7일후 pH 4.7이하 보다 조금 높은 결과를 나타내었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

가. 기술적 측면

어간장 및 젓갈은 우수한 우리전통 수산발효식품이지만 이의 기능성 및 효능에 대하여는 아직까지 많이 알려지지 않고 있다. 같은 젓산 발효식품인 김치인 경우 1988년 서울 올림픽을 계기로 세계화되었지만, 상대적으로 젓갈류는 국내용으로만 머물고 있는 실정이다. 젓갈류 생산시 문제점 중의 하나는 이의 숙성 기간이 너무 길다는 것이다. 그러므로, 젓갈의 숙성기간을 단축하면서 기능성을 높여 수산발효식품의 경쟁력을 높이는 것이 본 연구의 목표이다.

본 연구가 효과적으로 이루어진다면

- 첫째, 수산발효식품에 존재하는 기능성 펩타이드의 탐색 방법이 확립되며
- 둘째, 여러 가지 기능성 펩타이드 생성을 유도하는 효소의 동정 및 생산기술이 확립되며
- 셋째, 수산발효식품에 존재하는 항암 등 기능성 미생물의 동정 및 생산 기술이 밝혀지며
- 넷째, 기능성 효소 및 미생물을 수산발효식품에 첨가함으로써 기능성 수산식품 제조의 기술 축적이 되며
- 다섯째, 생리활성 연구 및 물질의 정제 기술의 발전에도 보탬이 된다.

나. 경제 · 산업적 측면

- 첫째, 기능성 미생물 및 효소의 신제품화가 이루어지며 최소 50억 이상의 신규 시장의 개척이 가능하며
- 둘째, 수산발효식품의 기능성이 밝혀짐과 동시에 기능성 강화 식품을 생산함으로써 판매가 50% 이상 신장될 것으로 예상되며
- 셋째, 수산발효식품의 제조(숙성) 기간을 단축함으로써 원가절감을 가져오므로 약 15% 정도의 소비자가의 하락을 유도할 수 있으며
- 넷째, 기능성 효소를 이용한 새로운 상품인 어육 기능성 펩타이드(Fish Peptide Hydrolysate or Concentrate)의 상품화를 가져와 수산가공산업의 활성화에도 기여가 되며
- 다섯째, 김치와 더불어 젓갈류를 우리 전통의 발효식품으로 세계화할 수 있는

기반이 조성된다.

다. 활용방안

첫째, 기능성 미생물 및 효소의 상품화는 우선 참여기업에서 시행하도록 유도하며, 그 다음 새로운 벤처기업의 설립도 검토 한다

둘째, 젓갈 및 어간장 제조시 기능성 효소 및 기능성(항암) 미생물을 첨가하여 기능성 젓갈류 생산을 시도 한다

셋째, 기능성 수산발효식품을 선진하여 세계화할 수 있는 제품으로 육성 한다

넷째, 고기능성 어육 펩타이드(Fish Peptide) 생산에 활용하고자한다

다섯째, 저식염 젓산발효식품인 김치류 제조에 Starter로 기능성(항암) 미생물을 활용한다.

SUMMARY

The nutrition of food is traditionally emphasized to human beings so far. In accordance with the development of improvement of living levels, the functionality of food is recently highlighted and studied in the field of food science. A peptide hydrolyzed from protein has biofunctional activities such as antitumor, antioxidant, opioid, antithrombic, antihypertention, anticholesterol activities, etc. Fermented seafood has been used as a very important role in Korean dietary life and may contain various biofunctional substances. Fish sauce, one of the fermented seafood, contains a lot of amino acid and peptide hydrolyzed from fish protein during fermentation. There are many disadvantages in the production of fish sauce; long fermentation period, use of high salt content, food safety, and marketing.

The objectives of this study are to develop the enzyme and microbial starter to shorten the fermentation period of fish sauce and to enforce the functionality of fish sauce. In addition, the functionalities of peptide and microorganism in fish sauce are also investigated.

Chapter I . Development of Functional Enzyme

1. Biofunctional activities of low molecular weight peptides from anchovy sauce

Biofunctional activities of peptides purified from anchovy sauce fermented at 15 ± 3 °C for 1, 3, and 5 years, respectively, were investigated. 1 year-fermented anchovy sauce showed 3 peaks on gel permeation chromatography pattern, while 3 and 5 year fermented anchovy sauce showed 4 and 5 peaks, respectively. Longer fermentation period, lower molecular weight of peptides on gel permeation chromatography pattern. Antioxidant, antitumor, and ACE inhibitory activities of low molecular weight peptides were increased with increasing fermentation periods. Antioxidant and antitumor activities of peptide peak 3 from

3 year fermented anchovy sauce were the highest with 34 and 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of IC_{50} values, respectively, while ACE inhibitory activity (IC_{50} , 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of peak 3 from 1 year fermented was the highest.

2. Antioxidant activity of low molecular weight substances from anchovy sauce

Antioxidant activities of low molecular weight biocompounds purified from anchovy sauce fermented at 15 ± 3 °C for 5 years were investigated. 5 year fermented anchovy sauce showed 5 peaks on gel chromatography pattern. Antioxidant activities of peak 2 was 82.7% followed by peak 1 (42.6%). Main antioxidant compounds of peak 1 were glutamic acid and lysine, but peak 2 were not confirmed by amino acid sequencer.

3. Purification and Characterization of *Bacillus Subtilis JM-3* Protease from Anchovy sauce

Salt and acid tolerant bacteria, *Bacillus subtilis* JM3 was isolated from naturally fermented anchovy sauce at 15 ± 3 °C for 3 years. *B. subtilis* JM3 was cultured in MRS media with 10% NaCl concentration at 37°C for 8 days in a shaking incubator at 150 rpm. Protease activity was the highest in 40~60% ammonium sulfate fraction. Protease showed three peaks on ion exchange chromatography patterns and purified further through gel filtration chromatography. Yield of purified protease was 5.33% and its purification ratio was 35.56 folds. Peak I protease showed a single band on SDS-PAGE and its molecular weight was 20,000 Da. *Km* and *Vmax* values were of *B. subtilis* JM3 were 1.75 mg/mL and 318 unit/min, respectively. Optimal temperature for protease activity was 60°C but optimal stability temperature was 30°C. Optimal pH for protease activity was 5.5. *B. subtilis* JM3 protease was stable at pH 5.0~5.5. Therefore, *B. subtilis* JM3 protease was a acid protease. Relative activity of *B. subtilis* JM3 protease was 69, 21, and 1.3% at 10, 20, and 30% NaCl concentrations, respectively. The best substrate for *B. subtilis* JM3 protease was azocasein followed by casein. TLCK was the strongest inhibitor followed by DTT, but NEM did not inhibit this enzyme. *B. subtilis* JM3 protease was, therefore, presumed serine protease like trypsin type.

4. Purification and Characteristic of *Bacillus megaterium* KLP-98 Salt-tolerant Protease Derived from Squid *Jeot-gal*

Salt and acid tolerant bacteria, *Bacillus megaterium* KLP-98, was isolated from naturally fermented squid *Jeot-gal* purchased in a local market. *B. megaterium* KLP-98 was cultured in MRS media with 10% NaCl concentration at 37°C for 5 days in a shaking incubator of 150 rpm. Protease activity was the highest in 40~60% ammonium sulfate fraction. Protease showed two peaks on ion exchange chromatography patterns. Yield of purified protease was 15.3% and its purification ratio was 18.83 folds. Peak I protease showed a single band on SDS-PAGE and its molecular weight was 64,000 Da. *K_m* and *V_{max}* values *B. megaterium* KLP-98 protease were 2 mg/mL and 283 unit/min, respectively. Optimal temperature for *B. megaterium* KLP-98 protease was 60°C but optimal stability temperature was 30°C. Optimal pH of *B. megaterium* KLP-98 protease was 5.5 and this enzyme was very stable at pH 5.0~6.0. Therefore, *B. megaterium* KLP-98 protease was a acid protease. Relative activity of *B. megaterium* KLP-98 protease was 73, 33, and 4% at 10, 20, and 30% NaCl concentrations, respectively. The best substrate for *B. megaterium* KLP-98 protease was azocasein followed by casein. NEM was the strongest inhibitor followed by TPCK, but 2-Mercaptoethanol and DTT did not inhibit this enzyme. *B. megaterium* KLP-98, therefore, protease was presumed cysteine like protease.

5. Purification and Characterization of Salt-tolerant Acid Protease from Fungus, *Asp.* sp.

The microorganism producing salt-tolerant acid protease, isolated from the Korean traditional soybean paste, was identified as *Asp.* sp. 101. The enzyme was purified to homogeneity from the culture supernatant of *Asp.* sp. 101 by ammonium sulfate fractionation, ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50, gel chromatography on Sephadex G-100, and SDS-polyacrylamide electrophoresis. The specific activity and the purification fold of the purified enzyme were 2,301 unit/mg and 11.6, respectively. The molecular weight of the purified enzyme was 25,000 Da on SDS-PAGE. The optimal pH and temperature for the enzyme activity were pH 6.5 and 50°C, respectively. The enzyme activity was relatively stable at pH 4.5-7.5 and

temperature below 40°C. The protease was relatively stable at 5 and 10% salt concentrations. This protease was inhibited by Ag^{2+} and Zn^{2+} , but, activated by Cu^{2+} and Mn^{2+} . In addition, enzyme was potently inhibited by EDTA and PMSF. It was conclusively considered that the purified enzyme was a serine protease influenced by metal ions. K_m and V_{max} values for hammastein milk casein were 1.04 mg/mL and 124.84 unit/min, respectively.

6. Purification and Characterization of a Novel Protease from Yeast, *Saccharomyces* sp.

The microorganism producing salt-tolerant protease, isolated from the bakers' yeast dough, was identified as *Saccharomyces* sp. B101. The enzyme was purified to homogeneity from the culture supernatant of *Saccharomyces* sp. B101. by ammonium sulfate fractionation, ultrafiltration, ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50, and gel chromatography on Sephadex G-100. The specific activity and the purification fold of the purified enzyme were 4688.9 unit/mg and 18, respectively. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 33,000 Da on SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were pH 8.5 and 30°C, respectively. The enzyme activity was relatively stable at pH 6.5-8.5 and temperature below 35°C. This protease was relatively stable at 10 and 15% salt concentrations. This protease was inhibited by Ag^{2+} and Fe^{2+} , and on the contrary, activated by Mn^{2+} . In addition, the enzyme activity was potently inhibited by EDTA and PMSF. It was conclusively considered that the purified enzyme was a serine protease influenced by metal ions. K_m and V_{max} values for hammastein milk casein were 1.02 mg/mL and 278.38 unit/min, respectively.

7. Quality Characteristics of Anchovy Sauce Manufactured with *B. subtilis* JM3 Protease

Crude *B. subtilis* JM3 protease from naturally fermented anchovy sauce was purified in 40-60% ammonium sulfate fraction. In order to accelerate the fermentation of anchovy sauce, each 2 and 4% Crude *B. subtilis* JM3 protease was added to 6 month-ripened anchovy sauce, and it's quality was analyzed. pH was at constant during hydrolysis in all samples, while lactic acid contents of 2

and 4% protease added anchovy sauces were higher than control. The amino-nitrogen and volatile basic nitrogen contents of anchovy sauce with 2 and 4% proteases were twice higher than those of control. Anchovy sauces with 2 and 4% protease increased the hydrolysis rate by 27 and 32%, respectively. Browning degree of anchovy sauce with 4% was the higher than 2% and control. Anchovy sauce with 2 and 4% proteases was good in sensory evaluation of color, aroma, and taste.

8. Functionality of Anchovy Sauce Peptide hydrolyzed with *B. subtilis* JM3 Protease

Peptide was purified by ultrafiltration and gel permeation chromatography from anchovy sauce hydrolyzed with *B. subtilis* JM3 protease. Control, 2 and 4% proteases added anchovy sauces showed 5, 6, and 7 peaks, respectively on gel permeation chromatography patterns. Total ACE inhibitory activity was the highest on peak 6 (43.75%) of anchovy sauce with 2% protease, followed by peak 5 (34.82%) of control. Total DPPH radical scavenging effects was more than 50% in all samples. Total cytotoxicity was the highest on peak 3 (44.12%) of control, followed by peak 5 (42.04%) of anchovy sauce with 4% protease.

9. Hydrolysis Characteristics of Anchovy Muscle Actomyosin with *B. subtilis* JM3 protease

The optimal pHs for Alcalase, Protamex, Flavourzyme, and *B. subtilis* JM3 protease for the hydrolysis of anchovy actomyosin were 7.5–8.5, 7.0–8.0, 5.0–6.0, and 5.5–6.0, respectively, while the optimal temperatures were 45–55, 50–60, 45–55, and 50–60°C, respectively. Relative activities of Alcalase, Protamex, Flavourzyme, and *B. subtilis* JM3 proteases were 30.3, 65.1, 35.2 and 55.2% at 20% NaCl concentration, respectively. Protamex showed the highest proteolytic activities, followed by in order of Flavourzyme, Alcalase, and *B. subtilis* JM3 protease.

Chapter II. Development of Functional Microbial Starter

We isolated three bacterial strains, JM-1, JM-2 and JM-3 with proteolytic and fibrinolytic activity from anchovy sauce. Among the 3 bacterial strains, JM-3 showed the strongest proteolytic and fibrinolytic activity. Bacterial strain JM-3 was gram-positive rod, motile and formed endospore. The 16S rRNA of bacterial strain JM-3 was amplified by PCR and then its sequence was determined by ABI 310 genetic analyzer. The 16S rRNA sequence of bacterial strain JM-3 was compared to BLAST DNA database and identified to *Bacillus subtilis* with 99% of homology. The optimum temperature, pH and NaCl concentration for growth of *B. subtilis* JM-3 were 40°C, 5.0 and 0%, respectively. The optimum temperature, pH and NaCl concentration for proteolytic and fibrinolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3 were same as optimum conditions for growth. At 20% of NaCl concentration which is common NaCl concentration of fish sauce, *B. subtilis* JM-3 showed about 60% of proteolytic and fibrinolytic activity of 0% NaCl concentration. From above results, we found that *B. subtilis* JM-3 will be able to used for starter of functional fish sauce. The cell free culture of *B. subtilis* JM-3 showed antioxidative activity with 87%, strong antibacterial activity against *L. monocytogenes* and 88.9% of growth inhibition rate on the stomach cancer cell of human.

The amount of Amino-N was continuously increased during fermentation period of Gajami-Sikhae added *B. subtilis* JM-3 . When the 20% of *B. subtilis* JM-3 was added to Gajami-sikhae, the amount of Amino-N was dramatically increased on third day of fermentation.

The amount of Amino-N was continuously increased during fermentation period of Anchovy sauce added *B. subtilis* JM-3. Especially, When the 10% of *B. subtilis* JM-3 was added to Anchovy sauce, the amount of Amino-N of it was higher (above 100mg/100g) than that of control.

CONTENTS

Chapter I. Introduction	28
Section 1. Purpose	28
Section 2. Necessity of this study.....	29
Section 3. Bounds of this study	30
Chapter II. Information of domestic and foreign technology related this study	
Section 1. Domestic technology	32
Section 2. Foreign technology	33
Section 3. References	36
Chapter III. Development of functional enzyme.....	41
Section 1. Biofunctional activities of low molecular weight peptides from anchovy sauce	
1. Introduction.....	41
2. Materials and Methods.....	42
3. Results and Discussion.....	45
4. Conclusions.....	51
5. References.....	51
Section 2. Antioxidant activity of low molecular weight biocompounds from anchovy sauce	
1. Introduction.....	56
2. Materials and Methods.....	57
3. Results and Discussion.....	57
4. Conclusions.....	64
5. References.....	64
Section 3. Purification and Characterization of <i>Bacillus Subtilis</i> <i>JM-3</i> Protease from Anchovy Sauce.....	67
1. Introduction.....	67
2. Materials and Methods.....	69
3. Results and Discussion.....	73
4. Conclusions.....	85
5. References.....	86
Section 4. Purification and Characteristic of <i>Bacillus megaterium</i> KLP-98 Salt-tolerant Protease Derived from Squid <i>Jeot-gal</i> .	

1. Introduction.....	90
2. Materials and Methods.....	92
3. Results and Discussion	95
4. Conclusions.....	107
5. References	107
Section 5. Purification and Characterization of Salt-tolerant Acid Protease	
from Fungus, <i>Asp.</i> sp. 1.....	112
1. Introduction.....	112
2. Materials and Methods.....	113
3. Results and Discussion	116
4. Conclusions.....	125
5. References	125
Section 6. Purification and characterization of novel protease from Yeast,	
<i>Saccharomyces</i> sp. B101.....	127
1. Introduction.....	127
2. Materials and Methods.....	128
3. Results and Discussion.....	131
4. Conclusions.....	141
5. References	143
Section 7. Quality Characteristics of Anchovy Sauce Manufactured	
with <i>B. subtilis</i> JM3 Protease.....	147
1. Introduction.....	147
2. Materials and Methods.....	149
3. Results and Discussion.....	151
4. Conclusions.....	158
5. References	159
Section 8. Functionality of Anchovy Sauce Peptide hydrolyzed with <i>B.</i>	
<i>subtilis</i> JM3 Protease.....	162
1. Introduction.....	162
2. Materials and Methods	165
3. Results and Discussion.....	167
4. Conclusions.....	172
5. References	172

Section 9. Hydrolysis Characteristics of Anchovy Muscle Actomyosin with <i>B. subtilis</i> JM3 protease.....	176
1. Introduction.....	176
2. Materials and Methods.....	177
3. Results and Discussion.....	179
4. Conclusions.....	187
5. References	193
Chapter IV. Development of Functional Microbial Starter.....	195
Section 1. Identification of Functional Microorganism from Anchovy Sauce.....	195
1. Introduction.....	195
2. Materials and Methods.....	196
3. Results and Discussion.....	200
4. Conclusions.....	207
5. References	211
Section 2. Bioactivity of <i>Bacillus subtilis</i> JM-3.....	214
1. Introduction.....	214
2. Materials and Methods.....	214
3. Results and Discussion.....	219
4. Conclusions.....	227
5. References	227
Section 3. Manufacture of Gajami Sikhae with Starter.....	228
1. Introduction.....	228
2. Materials and Methods.....	228
3. Results and Discussion.....	229
4. Conclusions.....	235
5. References	235
Section 4. Manufacture of anchovy sauce with Starter.....	236
1. Introduction.....	236
2. Materials and Methods.....	237
3. Results and Discussion.....	241
4. Conclusions.....	241
5. References	243

Chapter V. Purpose achievement and contribution to the related fields.....	245
Section 1. Purpose and content.....	245
Section 2. Evaluation point.....	247
Section 3. Purpose achievement and contribution to the related fields.....	247
Chapter VI. Application plan of the study results.....	249
Chapter VII. Information of world science and technology.....	250

제 1 장 서론.....	28
제 1 절 연구목적.....	28
제 2 절 연구개발 필요성.....	29
제 3 절 연구개발 범위.....	30
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	32
제 1 절 국내 기술현황.....	32
제 2 절 국외 기술현황.....	33
제 3 절 참고문헌.....	36
제 3 장 기능성 효소 생산 기술 개발.....	41
제 1 절 멸치액젓 유래 저분자 peptide의 생리활성.....	41
1. 서론.....	41
2. 재료 및 방법.....	42
3. 결과 및 고찰.....	45
4. 결 론.....	51
5. 참고문헌.....	51
제 2 절 멸치액젓 유래 저분자 물질의 항산화활성.....	56
1. 서론.....	56
2. 재료 및 방법.....	57
3. 결과 및 고찰.....	57
4. 결 론.....	64
5. 참고문헌.....	64
제 3 절 멸치액젓 유래 <i>Bacillus subtilis</i> JM3 단백분해효소의 정제 및 특성	67
1. 서론.....	67
2. 재료 및 방법.....	69
3. 결과 및 고찰.....	73
4. 결 론.....	85
5. 참고문헌.....	86
제 4 절 오징어 젓갈 유래 <i>Bacillus megaterium</i> KLP-98 단백분해 효소의 정제 및 특성.....	90

1. 서 론.....	90
2. 재료 및 방법.....	92
3. 결과 및 고찰.....	95
4. 결 론.....	107
5. 참고문헌.....	107
제 5 절 된장으로부터 분리한 <i>Asp. sp. 101</i> 단백질분해효소의 정제 및 특성.....	112
1. 서 론.....	112
2. 재료 및 방법.....	113
3. 결과 및 고찰.....	116
4. 결 론.....	125
5. 참고문헌.....	125
제 6 절 된장으로부터 분리한 효모(Yeast) 단백질분해효소의 정제 및 특성	
1. 서 론.....	127
2. 재료 및 방법.....	128
3. 결과 및 고찰.....	131
4. 결 론.....	141
5. 참고문헌.....	143
제 7 절 기능성 효소(<i>B. subtilis</i> JM3 단백질분해효소)를 이용한 어간장의 속성 제조 및 특성	147
1. 서 론.....	147
2. 재료 및 방법.....	149
3. 결과 및 고찰.....	151
4. 결 론.....	158
5. 참고문헌.....	159
제 8 절 멸치액젓에서 기능성 peptide의 정제 및 생리활성	162
1. 서 론.....	162
2. 재료 및 방법.....	165
3. 결과 및 고찰.....	167
4. 결 론	172
5. 참고문헌.....	172
제 9 절 <i>B. subtilis</i> JM3 단백질분해효소의 멸치 근원섬유단백질 분해 특성	
1. 서 론.....	176

2. 재료 및 방법.....	177
3. 결과 및 고찰.....	179
4. 결 론.....	187
5. 참고문헌.....	193
제 4 장 기능성 미생물 (Starter) 개발.....	195
제 1 절 멸치액젓 유래 단백질분해세균의 분리 및 동정.....	195
1. 서 론.....	195
2. 재료 및 방법.....	196
3. 결과 및 고찰.....	200
4. 결 론.....	207
5. 참고문헌.....	211
제 2 절 멸치액젓 유래 <i>Bacillus subtilis</i> JM-3의 생리활성기능.....	214
1. 서 론.....	214
2. 재료 및 방법.....	214
3. 결과 및 고찰.....	219
4. 결 론.....	227
5. 참고문헌.....	227
제 3 절 분리균주를 Starter로 이용한 가자미 식해 제조.....	228
1. 서 론.....	228
2. 재료 및 방법.....	228
3. 결과 및 고찰.....	229
4. 결 론.....	235
5. 참고문헌.....	235
제 4 절 분리균주를 Starter로 이용한 멸치액젓 제조.....	236
1. 서 론.....	236
2. 재료 및 방법.....	236
3. 결과 및 고찰.....	237
4. 결 론.....	241
5. 참고문헌.....	243
제 5 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도.....	245
제 1 절 연구목표 및 내용.....	245

제 2 절 평가 착안점.....	247
제 3 절 목표 달성도 및 관련분야 기여도.....	247
제 6 장 연구개발결과의 활용계획.....	249
제 7 장 해외 과학 기술 정보.....	250

제 1 장 서 론

제 1절 연구목적

최근 식품 관련 연구의 발전에 따라 식품에 존재하는 기능성 성분들이 속속 밝혀지고 있다. 미국에서는 이른바 식품성분과 건강과의 관계를 나타내는 Health Claim을 인정하고 있으며, 일본에서도 식품의 기능성에 대한 연구가 활발히 이루어져 특정보건용식품제도가 도입되었다. 식품의 여러 성분 중에서 식품단백질 유래 peptide가 영양가치 이외에 여러 가지 기능성 (항암활성, 항산화활성, Opioid성, 면역증강활성, 항혈전활성, 혈압강화활성, 칼슘흡수촉진활성, 항콜레스테롤활성 등)을 나타내는 것이 밝혀짐에 따라 선진국에서는 암예방식품 (미국)이나 특정보건용식품 (일본)의 새로운 식품으로 등장하고 있다. 이에 따라 국내에서도 된장 및 대두단백질의 기능성 식품화 및 기능성 물질을 확인하는 연구가 최근에 이루어지고 있다. 또한, 최근에 수산물에 존재하는 기능성 물질의 동정에도 연구가 이루어지고 있는 실정이지만 아직 초보단계에 불과하다. 한편, 우리 전통 발효식품인 김치에는 항암작용을 비롯한 여러 가지 기능성 물질의 확인 및 작용기작이 밝혀지고 있으나 비슷한 젖산발효식품인 젓갈 및 어간장 (액젓) 유래 항암펩타이드 등의 기능성에 관한 연구보고는 없는 실정이다. 젖산발효식품의 주속성균인 유산균은 다양한 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 현재 유가공품 및 김치류 유래 유산균의 항암작용에 대한 연구는 많이 이루어지고 있으나 같은 젖산발효식품인 젓갈 및 어간장의 생리활성 연구는 찾아보기 힘들다.

생활수준의 향상으로 건강지향적인 삶의 추구를 모색하는 현대인의 욕구를 충족하기 위해서는 보건 의학적인 (기능성) 식품의 개발은 피할 수가 없다. 수산발효식품인 젓갈 및 어간장 (액젓)에도 여러 가지 고기능성 펩타이드가 많이 존재하는 것으로 추정되어지나 일부 수산물 또는 효소가수분해물에서 항산화 및 항혈전 작용 등만 보고되고 있을 뿐 천연발효 어간장 및 젓갈에 있어서의 항암작용을 비롯한 여러 가지 기능성 (항암활성, 항산화활성, Opioid성, 면역증강활성, 항혈전활성, 혈압강화활성, 칼슘흡수촉진활성, 항콜레스테롤활성 등)에 대한 연구보고는 아직까지 없다. 따라서, 수산발효식품의 경쟁력을 강화하기 위해서는 수산발효식품의 조미료 개념을 탈피하고 고기능성 식품으로 방향전환과 함께 여러 가지 기능성 물질을 생산하는 고기능성 효소 및 미생물을 starter로 첨가하여 기능성 물질의 생산을 유도하는 기술의 확보가 절실히 요구되는 시점이다. 그리고, 현재 상업용으로 개발되어 있는 효소 및 미생물은 젓갈과 같은 고식염식품에서는 활성이 약하여 starter로서의 기능은 충분하지 못하다. 그러므로 내염성 및 내산성인 고기능성 효소 및 미생물은 반드시 개발되어야 하는 분야이다.

제 2 절 연구 연구개발 필요성

1. 기술적 측면

식품단백질 유래 peptide가 영양 가치 이외에 여러 가지 기능성(항암활성, 항산화활성, Opioid성, 면역증강활성, 항혈전활성, 혈압강화활성, 칼슘흡수촉진활성, 항콜레스테롤활성 등)을 나타내는 것이 밝혀짐에 따라 선진국에서는 암예방식품(미국)이나 특정 보건용식품(일본)의 새로운 식품으로 등장하고 있다. 이에 따라 국내에서도 된장 및 대두단백질의 기능성 식품화 및 기능성 물질을 확인하는 연구가 최근에 이루어지고 있다. 또한, 최근에 수산물에 존재하는 기능성 물질의 동정에도 연구가 이루어지고 있는 실정이지만 아직 초보단계에 불가하다. 한편, 우리 전통 발효식품인 김치에는 항암작용을 비롯한 여러 가지 기능성 물질의 확인 및 작용기작이 밝혀지고 있으나 비슷한 젖산발효식품인 젓갈 및 어간장(액젓) 유래 항암펩타이드 등의 기능성에 관한 연구보고는 없는 실정이다.

수산발효식품 중 어간장(액젓)은 고식염을 사용하므로 오랜 숙성기간이 요구되어 생산자의 판매원가에 부담을 주고 있다. 그러므로 내염성이면서 기능성물질을 생산하는 효소 및 미생물이 산업계에서는 요구되고 있으나 아직 적당한 제품들을 생산하지 못하고 있다. 그리고, 현재 상업용으로 개발되어 있는 효소 및 미생물은 젓갈과 같은 고식염 식품에서는 활성이 약하여 starter로서의 기능은 충분하지 못하다. 따라서 내염성 및 내산성인 고기능성 효소 및 미생물은 반드시 개발되어야 하는 분야이다.

고부가가치·고기능성 펩타이드를 생산하는 미생물 및 효소 개발에 요구되는 핵심 기술로는 효소공학, 분리 및 정제기술, 발효공학, 미생물학, 배양공학 등을 들 수 있으며 이러한 분야의 통합적이고 체계적인 연구체제로 기술의 진보를 가져올 수 있다.

2. 경제·산업적 측면

WTO 체제 출범 후 각종 농수축산물의 수입이 날로 증가하고 있으며, 식품관련 분야의 기술의 발달로 고가의 식품소재나 건강보조식품의 수입도 늘어나고 있다. 이러한 다양한 식품의 수입개방에 대응하기 위한 방안의 하나로 우리전통식품의 우수함을 밝혀냄과 동시에 기존 식품의 기능성을 강화하여 새로운 고기능성 식품의 창출에 활용함으로써 외국식품의 수입억제 효과 및 국내 식품산업의 해외 진출에 기여할 수 있다. 그 중에서도 우리전통수산발효식품 유래 기능성 펩타이드 등의 물질을 생산하는 효소 및 미생물 개발은 신규시장 형성과 함께 관련산업의 발전을 가져올 뿐만 아니라 우리 문화의 우수성도 함께 밝혀내는 매개체 역할을 할 것이다.

3. 사회·문화적 측면

국민소득의 증대에 따라 육류의 소비가 증가하는 등 생활패턴이 달라지면서 고혈압, 동맥경화 등 순환기 계통의 질병 및 암의 발생률이 증가하고 있다. 1998년도 보건

복지부의 보고에 의하면 우리나라 국민의 사망원인별 1위는 순환계 질병이고 2위는 암이었다고 한다. 따라서, 국민보건의 차원에서 이에 대한 대책이 시급히 요망되며, 의료분야의 대응책 이외에 식생활의 개선을 통한 접근이 필요하다고 본다. 현재 국내에서는 고소득사회에 따른 건강요구형 식품의 수요가 날로 급증할 것으로 예상되며, 이에 대한 식품산업의 대비가 필요한 실정이다. 또한, 갈수록 사라져 가는 우리전통 식문화를 보존하고 전통식품의 우수함을 밝혀내는 것은 국민 건강 증진뿐만 아니라 문화적인 자부심에도 보탬이 될 것으로 본다.

제 3 절 연구개발 범위

1. 기능성 효소 생산 기술 개발

(1) 멸치액젓 유래 저분자 펩타이드의 항암 활성 및 항산화활성

멸치액젓(1, 3, 5년 숙성)을 10-20% TCA, PCA 용액 또는 Ammonium sulfate로 농도별로 단백질을 침전시켜 침전물의 여러 가지 기능성 (항암, 항혈전, 혈압강하)을 검색하였다. 펩타이드는 기능성을 가진 침전물을 column chromatography로 분석하여 펩타이드를 분리 • 정제하여 실험에 사용하였다.

(2) 기능성 효소의 개발

멸치액젓, 오징어 젓갈, 된장 및 효모에서 내염성 미생물이 생산하는 단백분해효소를 정제하여, 여러 가지 특성 (내염성, 내산성, 최적 pH 및 온도, 안정성, 기질 및 저해제 특이성, 동력학적 연구)을 분석하였다.

(3) 기능성 효소를 이용한 어간장의 숙성 제조 및 특성

발효 및 숙성기간을 단축하기 위하여 멸치액젓에서 단백질분해 활성이 가장 큰 단백분해세균 (*B. subtilis* JM3)이 생산해내는 단백분해효소를 숙성 중의 멸치액젓에 첨가하여 여러 가지 품질 특성을 분석하였으며, 멸치액젓에서 peptide을 분리 • 정제하여 생리활성을 분석하였다. 또한 다양한 시판 단백분해효소 및 *B. subtilis* JM3 단백분해효소의 멸치 actomyosin에 대한 가수분해 특성을 분석하였으며, 액젓 및 자건품으로 널리 이용하고 있는 멸치육 단백질을 *B. subtilis* JM3 단백분해효소로 가수분해시, 반응표면분석법 (Response Surface Methodology, RSM)에 의한 최적의 가수분해 조건을 검토하였다.

2. 기능성 미생물 (Starter) 개발

(1) 멸치액젓 유래 단백질분해세균의 분리 및 동정

액젓의 숙성발효 및 항혈전, 항고혈압, 항산화 그리고 나아가서는 항암과 같은 생리활성기능을 부여한 신개념의 액젓을 제조할 목적으로 상업적으로 이용 가능한 기능성 액젓 제조용 starter를 분리하고자 국내 시판 액젓 중 기호도가 매우 높은 멸치액젓으로부터 단백질분해활성이 강하고, 동시에 혈전용해활성이 우수한 균주를 분리하여, 최적 성장 조건 및 최적 효소 생산조건 등을 조사하였으며, 분리균주들의 동정은 형태학적, 배양학적 특징 및 PCR을 이용한 16S rRNA의 염기서열을 분석하여 동정하였다. 또한 분리한 균주를 대상으로 각종 생리활성기능의 유무를 알아보기 위하여 항산화 활성, 항균 활성, ACE 활성 저해 효과, 암세포 증식 억제 효과 등을 조사하였다.

(2) 멸치액젓 유래 *Bacillus subtilis* JM-3의 생리활성기능

앞으로 본 균주 (*B. subtilis* JM-3)의 멸치액젓 starter로서의 이용을 극대화하기 위하여서는 돌연변이에 의한 호염성 변이주의 유전적 육종이나 형질 전환 방법 등을 응용한 호염성 미생물과의 접목을 통한 내염성 균주의 개발도 필요할 것으로 여겨지며, 멸치액젓에 분리된 미생물의 돌연변이원성 실험 (Mutagenicity test), 항돌연변이원성 실험 (Antimutagenicity test), 변이원물질 및 항변이원활성을 측정하였다.

(3) 분리균주를 Starter로 이용한 가자미 식해 제조

발효 및 숙성기간을 단축하기 위하여 가자미 식해 제조시 단백질분해 활성이 가장 큰 단백질분해세균 (*B. subtilis* JM3)을 starter로 첨가하여 숙성기간에 따른 품질특성을 분석하였다.

(4) 분리균주를 Starter로 이용한 멸치액젓 제조

발효 및 숙성기간을 단축하기 위하여 멸치액젓 제조시 단백질분해 활성이 가장 큰 단백질분해세균 (*B. subtilis* JM3)을 starter로 첨가하여 숙성기간에 따른 품질특성을 분석하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술현황

1. 기능성 펩타이드

국내에서의 기능성 펩타이드에 관한 연구는 최근 활발히 연구되고 있다. 현재 국내에서 주로 연구되고 있는 분야는 1)된장, 쌀, 오징어 유래의 ACE 저해활성 펩타이드의 검색, 2) 치즈곤죽, 된장, 간장으로부터 항암활성 펩타이드검색, 3) 식물 가수분해물의 조제에 의한 특수 질병치유 펩타이드식의 연구, 4) 대두단백질의 가수분해에 의한 기능성 펩타이드의 제조, 5) 유청 단백질의 가수분해물에 의한 저알러지성 펩타이드의 연구 등에 국한되어 있다.

그러나 수산물에 존재하는 기능성 펩타이드 연구는 이제 초기단계이며 주로 혈압강하 (ACE) 펩타이드에 국한되어 있으며, 수산발효식품 유래 기능성 펩타이드 연구는 찾아보기 힘들다.

가. 혈압강하(Angiotensin converting enzyme (ACE) 저해) 펩타이드

최근 이루어지고 있는 ACE 저해 펩타이드 연구는 된장 (1, 2), 유청 (3), 멸치육 효소가수분해물 (4), 오징어 (5) 등에 국한되어 있다.

나. 항혈전 펩타이드

항혈전펩타이드에 관한 국내에서의 연구는 된장 (6), 자연물질 (7)에서의 탐색 연구에 국한되고 있다.

다. 항암 펩타이드

항암 펩타이드에 보고는 우리 전통 간장 유래 펩타이드 (8)의 종양세포에 대한 cytotoxin효과에 대한 연구가 있으며, 항암 펩타이드에 대한 연구는 이제 시작단계에 불과하다.

라. 기타 기능성 펩타이드

멸치육 가수분해물 (9)에서 항산화작용을 지닌 물질의 존재와 가자미피 젤라틴 (10) 항산화 펩타이드의 특성 보고는 있으나 수산발효식품에서의 항산화 펩타이드 연구는 찾아보기 힘들다.

2. 항암 미생물 및 내염성 단백질분해효소

국내에서도 항암 미생물에 관한 연구는 김치 유산균의 항암효과에 집중적으로

이루어지고 있다. 김치 *L. plantarum*은 복수암 및 고품암에 대한 효과 (11) 연구가 있으며, 김치 유산균은 유제품 유산균과 비슷한 항암효과 (12, 13)를 가진다고 하였다. 그러나 수산발효식품 유래 미생물에 대한 항암효과를 연구한 논문은 아직까지 없다. 내염성 단백분해효소에 관한 연구는 아직 국내에서는 없는 실정이다.

3. 젓갈 및 어간장 제조시 효소 및 미생물을 Starter로 첨가하는 연구

젓갈 및 어간장 제조시 효소 및 미생물을 starter로 첨가하는 보고는 많지 않다. 효소를 젓갈 및 어간장 제조에 응용한 것은 대부분 어간장 제조의 전단계로서 어육 가수분해물 제조에 이용 (14-18)한 것이며, 이용된 효소는 식물성 및 세균성 효소로 고식염에 대하여는 활성이 떨어져 starter로는 응용을 하지 못하였다고 보여진다. 따라서, 대두간장 제조시 첨가되는 *Aspergillus oryzae* koji를 어간장 제조시 속성 발효의 목적으로 starter로 첨가하는 방법 (19-23)이 보고 되고 있으나 아직 상업화 되지는 못하고 있다. Koji는 다양한 유기산 및 알콜 생성을 유도하므로 향과 맛에도 영향을 줄것으로 보여지나 고식염에 대한 안정성이 떨어지는 약점이 있어 이를 보완할 필요가 있다.

제 2 절 국외 기술현황

1. 기능성 펩타이드

식품은 인간의 생존에 가장 중요한 요소의 하나로서, 인체의 항상성 유지, 그 균형의 변화로부터 유발되는 질병, 또는 질병으로부터의 회복에 이르기까지 크고 작게 식품이 관여하고 있다. 식품은 의약품과는 달리 반복해서 섭취하기 때문에 유효기능을 발휘하는 화합물이 체내에 미량 도입되거나(기능성 물질은 일반적으로 극미량의 극소 농도로 생리활성을 발휘함), 그 활성이 매우 작은 경우에도 꾸준히 공급되기 때문에 생체로서는 중요한 영향을 받을 수밖에 없다 (24). 식품 기원의 생체 조절성 인자 중에서 식품단백질 유래의 펩타이드는 특히 다양한 활성을 나타내는데, 그 기원에 따라 현재적 펩타이드 및 잠재적 펩타이드로 나눌 수 있다 (25). 전자에는 호르몬 및 효소저해제가 해당되며, 후자에는 식품단백질이나 혈액단백질 등으로부터 파생되는 기능성 펩타이드로 최근 연구가 활발히 진행되고 있는 분야이다 (26).

가. 혈압강하 [Angiotensin converting enzyme (ACE) 저해] 펩타이드

ACE는 혈압상승 물질인 angiotensin II의 생성 및 혈압강하물질인 bradykinin

의 분해를 촉매하는 효소이다. 그러므로 이 효소의 저해물질은 혈압강화작용을 나타낸다. 식품단백질 유래 ACE 저해 펩타이드는 gelatin, casein 등에서 유래한 것이 상당 수 보고되어 있으며 (27-29), 수산물 유래도 많이 연구되고 있다(30-32). ACE 저해 펩타이드는 정맥주사 및 In vitro 분석시에는 혈압강화효과가 나타나나, 경구 투여시에는 전혀 효과가 없다. 그러나, 미생물 유래의 단백분해효소에 의하여 생성된 펩타이드 중에는 섭취 후 체내에서 소화관 protease나 ACE에 의하여 ACE저해 활성을 나타내는 펩타이드(IVGRPRHQQ 등)가 최근 발견되었다 (33). 그렇지만, 수산발효식품 유래 ACE 저해펩타이드에 관한 연구는 찾아보기 힘들다.

나. 항혈전 펩타이드

혈관내에서 혈소판이 응고하게 되면 혈전이 형성되어 혈액순환 상태가 방해받게 된다. 이러한 혈전은 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화 등 성인병의 원인이 된다. 혈전성질환의 예방과 치료에 혈전용해제, 항응고제 등이 많이 있으나 여러 가지 부작용으로 장기간 치료에는 적합치 않다. 식품유래 항혈전 펩타이드 연구는 주로 농산물 (34), 인유의 lactoferrin (35), 우유단백질 κ -casein 유래의 MAIPPKKNQD 및 쌀단백질의 TRYPSIN 분해물(36-38) 등이 혈소판 응집저해활성을 나타낸다. 그러나, 수산발효식품 유래 항혈전 펩타이드 연구는 찾아보기 힘들다.

다. 항암 펩타이드

항암펩타이드에 관해서는 선진국에서도 아직까지 그렇게 많이 연구되고 있지 않다. 단지 Kawamura 및 Ishikawa (39, 40)는 식품에 존재하는 항종양, 면역 단백질 및 펩타이드에 관하여 설명하였다.

라. 기타 기능성 펩타이드

기타 기능성 펩타이드에 관한 연구는 Opioid 작용 (41), 탐식 작용 (42, 43), 칼슘흡수촉진작용 (44), 담즙산 결합작용 (45, 46) 등이 보고되고 있다.

이 이외에도 인공합성한 펩타이드가 여러활성을 나타낸다고 보고되고 있으나 식품유래가 아니므로 설명을 생략하였다. 식품단백질 유래 펩타이드에 대한 최대의 관심은, 펩타이드 또는 이를 함유하는 전구체를 섭취하였을 때 어떤 생리활성을 나타내는지 하는 점이다. 최근에 이에 대한 연구가 동물실험을 통하여 활성적으로 이루어지고 있다.

2. 항암 미생물 및 내염성 단백분해효소

요구르트 등 유제품에서 유래되는 유산균 중 *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* 등의 추출물은 sarcoma 180 과 Ehrlich carcinoma 57 세포를 쥐에 경구 또는 복강 투여하였을 때 종양세포의 증식을 억제하였고 항암효과 및 항발암 그리고 면역계 활성화 효과 등을 나타내었다 (47). 지금까지 유산균이 갖는 항발암효과에 관한 연구는 유발효식품 (47-53)을 대상으로 한 것이고, 수산발효식품에 관한 연구는 없다. Gram 양성 유산균의 세포벽의 주성분인 peptidoglycan은 N-acetylglucosamine과 N-acetylmuramic acid로 구성되어 있는데 이들이 항돌연변이 또는 항암활성을 가질 것으로 추정된다. Hoseno 등 (49)은 발효유에서 분리한 유산균들이 NDEA 등 여러 가지 돌연변이물질에 대해 항돌연변이활성이 있음을 보고하였다. 유산균 자체가 항암성을 나타내기도 하는데 Reddy 등 (50)은 우유자체 및 생성된 젖산은 항암활성이 없었으나 요구르트 투석물은 암세포의 DNA 합성 저해와 암세포 증식억제 효과가 있다고 하였다. Bogdanov 등 (48)은 *L. delbrueckii* subcep. *bulgaricus*의 세포벽 peptidoglycan이 종양생성을 억제하는 것을 발견하였고, 이 peptidoglycan은 다른 *Lactobacilli* 의 세포벽을 구성하는 인자이며 이는 muramyl peptide로 구성되어 있다. Muramyl dipeptide와 그 유도체는 superoxide anion과 H₂O₂를 생성하여 암세포를 사멸한다고 알려져 있다 (53). 장내세균의 효소 중 β -glucuronidase, nitroreductase, azoreductase 등은 발암전구물질을 발암물질로 전환되는 것을 촉진한다고 알려져 있는데 유산균 중 *L. acidophilus*를 경구적으로 섭취하면 이들 효소의 활성이 저하된다고 한다 (54, 55).

수산발효식품의 숙성기간 단축을 위한 내염성 및 내산성 단백분해효소 개발에 대한 연구는 아직 없는 실정이다.

3. 어간장 제조시 효소 및 미생물을 starter로 첨가하는 연구

어간장 제조시 효소 및 미생물을 첨가하는 방안은 어간장의 숙성발효 및 어간장 제조를 위한 어육가수분해물제조가 주 목적이었으며, 일본을 비롯한 동남아시아에서 주로 연구되고 있다. 어육가수분해물 제조에 이용되어온 효소는 세균성 (56, 57) 및 식물성 효소 (58)가 주로 이용되고 있는데, 효소에 의한 어육가수분해물은 쓴맛을 나타내는 peptide 때문에 상품화하지는 못하고 있다. 재래식 방법에 의한 어간장 제조시 첨가하는 효소 (59)은 어느정도 숙성을 단축하였다고 보고되어지나, 고식염에 의한 효소의 활성이 떨어지는 단점이 있다. 그러므로, 어간장 제조시 starter로 미생물을 첨가하는 방법이 모색될 수도 있으나 첨가되는 세균 및 세균성 효소는 고식염에 의하여 저해를 받아 단백질의 가수분해에는 그다지 효과가 없다

(60). 그래서 내염성 효소 및 미생물의 개발이 우선적으로 필요하다고 본다. 또한, starter로 첨가되는 효소 및 미생물에 의한 항암 펩타이드 등의 기능성 물질의 생산을 유도하여 특색 있는 기능성 어간장의 연구는 아직까지 보고되고 있지 않다.

제 3 절 참 고 문 헌

1. 신재익, 안창원, 남희성, 이형재, 이형주, 문태화. 1995. 된장으로부터 A. C. E 재래 Peptide의 분획. 한국식품과학회지 27(2): 230-234
2. 황종현. 1997. 메주유래 *B. Subtilis* SCB-3으로 제조된 된장의 Angiotensin I Converting Enzyme 저해효과. 한국식품영양과학회지. 26(5): 775-783
3. 박윤주 · 윤여표 · 이형주 · 장해동. 1996. 유청으로부터 고정화 트립신을 이용한 기능성 펩타이드의 생산. 한국식품과학회지, 28(1): 99-104
4. 이태기, 박경범, 박덕천, 염동민, 김인수, 구연숙, 박영호, 김선봉. 1998. 멸치액 효소 가수분해중의 Angiotensin 전환 효소 저해작용. 한국수산학회지 31(6): 875-881
5. Suh, H. J., Cho, S. J., Whang, J. H., Lee, H. and Yang, H. C. 1997. Characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from squid hydrolysate Food Sci. Biotechnol 6(2): 122-124
6. 손영화, 이경애, 김승효, 안창원, 남희섭, 이형재, 산재익. 1996. Micro plate법에 의한 된장유래의 항혈전 펩타이드 탐색. 한국식품과학회지, 28(4): 684-688
7. 류근호, 이주성, 조선숙, 김미정, 정진호. 1994. 자연 식품에 의한 혈소판 응집, 억제능의 효율적 검색. 한국식품학회지, 9: 23-28
8. Kim. S.E., Pai, T. and Lee, H. J. 1998. Cytotoxic effects of the peptides derived from traditional korean soy sauce on Tumor cell lines. Food Sci. Biotechnol. 7(2): 75-79
9. 염동민, 이태민, 박영호, 김선봉. 1997. 멸치육 단백질 효소 가수분해물의 항산화 작용. 한국수산학회지, 30(5): 842-849
10. 김세권, 이현철, 변희국, 전유진. 1996. 가자미의 젤라틴 가수분해물로부터 항산화성 펩타이드의 분리. 정제 및 특성. 한국 수산학회지, 29(2): 246-255
11. 정호권. 1993. 김치유산균의 생리적 특성과 면역학적 특성. 김치과학과 산업. 2:23
12. 박건영. 1995. 김치의 영양학적 평가와 항돌연변이 및 항암효과. 한국 영양식량학회지, 24(1): 169-182
13. Son. T. T., Kim. S. H., and Park. K. Y. 1998. Antimutagenic activities of lactic acid bacteria isolated from kimchi. J. Korean Assoc. Cancer Preventio, 3: 65-70
14. Kim, S., Ahn, C., and Kang, O. 1993. Manufacture of fish sauce from the enzymatic hydrolysate of cod gelatin. J. Korean Soc. Food Nutr., 22(4): 470-477

15. Chae, S.K., Itoh, H., and Nikkuni, S. 1989. Effects of soy sauce koji and commercial proteolytic enzyme of the acceleration of fish sauce production). Korean J. Food Sci. Technol., 21(5): 639-648
16. 김상무. 1999. 효소를 이용한 어육단백질 제조. 한국식품과학회지, 31(3): 727-733
17. 강훈삼 · 강태중 · 배태진 · 김현주. 1994. 효소분해법에 의한 키조개 부산물 젓갈의 제조. 한국수산학회지, 27(5): 509-514
18. Cha, Y.J. and Kim, E.J. 1995. Response surface methodology in development of oyster hydrolysate. J. Korean Soc. Food Nutr. 24(3): 427-433
19. 차용준 · 이강희 · 이응호 · 김진수 · 주동식. 1990. 단백질분해균을 이용한 저식염멸치젓의 제조 및 저장중의 품질안정성. 한국농화학회지, 33:330-335
20. 차용준 · 김은정 · 주동식. 1994. Koji를 이용한 저식염 멸치젓의 속성제조에 관한 연구. 한국영양식량학회지, 23(2): 348-352
21. 김영명 · 구재근 · 이영철 · 김동수. 1990. 자가소화 및 정어리기질 코오지를 이용한 속성 정어리 액젓 제조에 관한 연구. 한국수산학회지, 23:167-171
22. Cha, Y.J. 1994. Changes of volatile compounds in low salt-fermented anchovy paste by adding koji. J. Korean Soc. Food Nutr. 23(3): 481-489
23. Kim, S.M. The effects of koji and sucrose on the manufacture of *Alaska pollack* scrap sauce. Food Sci. Biotechnol. 7(4): 242-247
24. Brantl, V., Teschmacher, H., Henschen, A. and Lottspeich. 1979. Hoppe-seyler's Z. Physiol. Chem. 360: 1211
25. 千葉英雄, 吉川正明. 1987. 化學と生物, 25:396
26. Yoshikawa, M. and Chiba, H. 1992. Frontiers and new horizons in amino acid research. p403
27. 芦田勝郎. 1993. 食品工業 7. 30:37
28. 長谷川昌康. 1992. 食品と開發, 27(12):43
29. 丸山進. 1993. 바이오메데이카, 8:40
30. Yano, S., Suzuki, K. and Funatsu, G. 1996. Isolation from α -zein of thermolysin peptides with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity. Biosci. Biotech. Biochem. 60(4):661-663
31. Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A. and Imayasu, S. 1994. Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. Biosci. Biotech. Biochem. 58(10):1767-1771
32. Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y. and Shimizu, T. 1993. Isolation and

- characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bonito bowels. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57(10): 1743-1744
33. 吉川正明. 1994. *バイオサイエンスとインダストリ*, 52:289
34. D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H. and Plow, E.F. 1991. *Trends Biochem. Sci.* 16:246
35. 編集部. 1993. *食品と開発* 28(3):23
36. Fiat, A.M., Lavy-Toledano, S., Caen, J.P. and Jolles, P. 1989. *J. Dairy Sci.* 56:355
37. Fiat, A.M., Migliore-Samour, D., Jolles, P., Drouet, L., Sollier, C.B.D. and Cean, J. 1993. *J. Dairy Sci.* 76:301
38. Mazoyer, E., Levy-Toledano, S., Rendu, F., Hermant, L., Lu, H., Fiat A.M., Jolles, P. and Cean, J. 1990. *Eur. J. Biochem.* 194:43
39. Kawamura, Y. and Ishikawa, M. 1993. Anti-tumorigenic and immunoactive protein and peptide factors in food stuffs (I) Antitumorigenic protein from *Tricholoma matsutake*. p327. In *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspect*. Waldron, K.W., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R.(ed.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
40. Kawamura, Y. and Muramoto, M. 1993. Anti-tumorigenic and immunoactive protein and peptide factors in food stuffs (II) Antitumorigenic protein from *Tricholoma matsutake*. p331. In *Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspect*. Waldron, K.W., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R.(ed.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
41. Fukudome, S. and Yoshikawa, M. 1992. *FEBS Lett.* 296:107
42. Fujita, H. and Yoshikawa, M. 1993. 'Peptide Chemistry 1992'. ESCOM Sci. Pub. B.V, p609
43. Parker, F., Migliore-Samour, D., Flo'h, F., Zerial, A., Warner, G.H., Jolles, J., Casaretto, M., Zahn, H. and Jolles P. 1984. *Eur. J. Biochem.* 176:677
44. Kitts, D.D. and Yuan, Y.V. 1992. *Trends Food Sci. Technol.* 3(2):31
45. Minami, K., Moriyama, R., Kitagawa, Y. and Makino, S. 1990. *Agric. Biol. Chem.* 54:511
46. 金谷昌廣, 角岡正月, 衫山薫, 伊吹文男, 岩見公和. 1994. *일본농예화학회강연요지집*. p7
47. Fernandes, C.F. and Shahani, K.M. 1990. Anticarcinogenic and immunological

- properties of dietary *Lactobacilli*. J. Food Prot., 53:704
48. Bogdanov, I.G., Dalev, P.G., Gurevich, A.I., Kolosov, M.N., Mal'kova, V.P., Plemynnikova, L.A. and Sorokina, I.B. 1975. Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. FEBS Lett. 57:259
 49. Hosono, A., Wardojo, R. and Otani, H. 1990. Inhibitory effects of lactic acid bacteris from fermented milk on the mutagenicities of volatile nitrosamines. Agric. Biol. Chem. 54:1639
 50. Reddy, G.V., Friend, B.A., Shahani, K.M. and Farmer, R.E. 1983. Antitumor activity of yogurt components. J. Food Prot. 46:8
 51. Kato, I., Kobayashi, S., Yokokura, T. and Mutai, M. 1981. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. Gann, 72:517
 52. Lee, H. 1989. Effects of *Lactobacillus acidophilus* on colon carcinogenesis. Ph.D Thesis. University of Nebraska-Lincoln, USA
 53. Penn, R.L., Maca, R.D. and Berg, R.D. 1985. Increased translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of tumor bearing mice. Infect. Immunology, 47:793
 54. Goldin, B.R. and Gorbach, S.L. 1984. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding in human intestinal bacterial enzyme activity. Am. J. Clin. Nutr. 39:756
 55. Perosa, M. .C., Golner, B., Goldin, B., Baraket, S., Dallal, G., and Russell, R. M. 1990. Effect of *Lactobacillus acidophilus* or yogurt feeding on bacterial fecal enzymes in the elderly. Gastroenterology, 98: A425
 56. Rebeca, B. D., Pena-vera, M. T. and Diza-castaned. 1991. production of fish protein hydrolysates with Bacterial protease; yield and nutritional value. J. Food Sci. 56(2): 309-314
 57. Rakakulthai, N., Lee, Y. Z. and Harrd, N. F., 1986.: Effect of enzyme supplement on the production of fish sauce from Male Capelin(*Mallotus villosus*). Can. Inst. Food Sci. Technol., 21(5): 639-648
 58. Beddows, C. G. and Ardeshir, A. G., 1979.: The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture. J. Food Technol., 14: 603-602
 59. Chaveesul, R., Smith, J. P. and Simpson, B. K. 1993.: Production of fish sauce and acceleration of sauce fermentation using proteolytic enzymes. J. Aqua. Food Prod. Technol., 2(3): 59-77
 60. Orejan, F. M. and Liston, J. 1981: Agents of proteolysis and its inhibition in *Patis*(fish sauce) fermentation. J. Food Sci. 47: 198

제 3 장 기능성 효소 생산 기술 개발

제 1 절 멸치액젓 유래 저분자 peptide의 생리활성

1. 서론

최근 식품성분이 가지는 각종 생체조절기능을 해명함으로써 식품의 기능을 새롭게 인식하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 식품에서 peptide는 영양, 맛 그리고 건강에 영향을 줌으로써 매우 중요한 역할을 한다. 일반적으로 생체에는 강한 생리활성 (peptide상 hormone, enkephalin, interleukin, 세포 성장 인자, 독성물질, bacteriosin 및 enzyme inhibitor 등)을 갖는 유리 peptide들이 많이 존재하고 있다⁽¹⁾. 또한 이와는 다른 종류의 peptide들이 식품의 발효 및 숙성 등의 가공처리 동안에 생성될 수 있으며, 이들 중에는 종래에 생리활성 peptide의 전구체로 생각되지 않았던 식품단백질이나 혈액단백질 등으로부터 생리활성 peptide가 만들어 진다⁽²⁾. 특히 생리활성 peptide는 구조 및 활성이 다양하고, 유전공학기술에 의한 생산 및 개조가 가능하며, 높은 안전성을 기대할 수 있다는 특성으로 인하여 주목받고 있는 물질이다⁽³⁾.

혈압상승에는 angiotensin I converting enzyme [EC 3.4.15.1.]가 관여하며⁽⁴⁾, 이 효소는 생체 중의 불활성형의 angiotensin I (decapeptide)의 C 말단의 His-Leu를 분리하여 혈관벽 수축작용을 하는 angiotensin II (octapeptide)로 전환하며, 또한 혈압강하인자인 bradykinin을 불활성하여 혈압을 상승시킨다⁽⁵⁾. 현재, 식품유래 ACE 저해 peptide는 주로 효소에 의한 식품의 가수분해물의 연구에 중점적으로 이루어지고 있다. 수산물에는 명태껍질⁽⁶⁾, 어육⁽⁷⁻⁹⁾, 대구가공부산물⁽¹⁰⁾, 담수어⁽¹¹⁾, 고등어⁽¹²⁾, 멸치⁽¹³⁾ 등에 또는 이들의 효소가수분해물에 ACE 저해 peptide가 존재한다고 보고 되고 있으며, 수산발효식품에는 정어리어간장⁽¹⁴⁾ 및 수산발효식품⁽¹⁵⁾에 ACE 저해제가 존재한다고 하였으나, ACE 저해 peptide에 대한 명확한 연구는 없는 실정이다.

항산화제란 산화를 방지하거나 지연시키는 물질을 통칭하는 것으로 그 작용기작에 따라 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유 라디칼 소거작용, 과산화물을 비라디칼로 분해하여 불활성 시키는 과산화물 분해제, 자동산화에 있어서 라디칼 저해제와 공존시 항산화 작용을 증가시키는 상승제 및 각종 활성산소계를 소거하는 singlet oxygen quencher 등으로 분류된

다⁽¹⁶⁾. 이러한 항산화제는 각종 식물의 추출물, 향료, 발효생산물 등에 대부분 flavonoids 또는 phenol계 화합물로 대부분 존재한다. 또한 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소로 분해하여 얻어진 peptide에서도 항산화활성이 보고 되고 있다^(9,17). 일반적으로 항산화제는 천연 항산화제와 합성항산화제로 대별되는데, 합성항산화제는 동물실험에서 발생과 각종 효소군 등에 영향을 주며, 특히 butylated hydroxytoluence (BHT)은 기형발생 또는 암 발생에 관여하는 것으로 보고되어⁽¹⁸⁾ 뛰어난 항산화제효과에 비해 부작용으로 인해 문제시 되고 있는 반면, 천연항산화제는 부작용이 거의 없어 식품첨가물 또는 약품으로 현재 널리 이용되고 있다. 그러나 천연항산화제 중 가장 널리 이용되는 α -tocopherol의 경우 비싼 가격과 지용성이라는 이용에 있어서의 제약으로 대체 천연항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다⁽¹⁹⁾. 수산식품의 항산화연구는 어육단백질⁽²⁰⁾, 대구고니⁽²¹⁾, 대구가공부산물⁽¹⁰⁾, 가자미⁽²²⁾, capelin⁽²³⁾, 고등어⁽²⁴⁾ 등의 효소가수분해물에 국한되어 있고 멸치액젓의 수용성 획분⁽²⁵⁾에도 항산화 효과가 있다는 연구가 있으나 천연숙성 멸치액젓의 항산화 peptide에 관한 연구는 없는 실정이다.

암은 오늘날 급속한 의학의 발달에도 불구하고 아직도 우리의 생명을 위협하는 무서운 불치병으로 알려져 있다. 암의 발생은 약 75%가 공해 식품 및 그릇된 식생활이 그 주된 원인으로 식원병이라고 할 만큼 식생활과 큰 관련이 있다⁽²⁶⁾. 항암 활성을 가지는 물질로는 대두유래 단백질분해효소 inhibitor^(27,28), phytic acid^(29,30), isoflavones⁽³¹⁾, 주목⁽³²⁾, 대두발효식품⁽³³⁾ 등 주로 농산물에 국한되어 있으며, 수산물에는 해조류⁽³⁴⁾의 항암효과 이외에는 찾아보기가 힘들다.

따라서 본 연구에서는 천연 숙성 멸치액젓의 숙성 기간별 생성되는 다양한 형태의 기능성 peptide을 분리·정제하여 항암, 항산화 및 ACE 저해효과를 분석하였다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

멸치 20 ton에 중량당 30%의 식염을 가하여 $15\pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 숙성한 멸치액젓 (풍미식품, 속초)을 시료로 사용하였다. Peptide 정제에 사용된 Bio-Rad P-2 gel은 Bio-Rad (California, USA)에서 구입하였고 항산화 작용 측정용 linoleic acid는 Sigma사 (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo)에서 구입하였으며 실험에 사용된 나머지 시약은 모두 특

급을 사용하였다.

나. 저분자 peptide의 정제

액젓을 sulfosalicylic acid로 제단백한 다음, 4°C에서 PM10 (MWCO 3,000) membrane filter (Amicon, Bedford, MA)를 사용하여 한외여과 하였다. 한외여과액을 40°C에서 감압농축한 후, Bio-gel P-2 (Bio-Rad, CA)를 충전한 column (2.6 × 70 cm)에서 0.5 mL/min의 유속으로 정제하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 최대 흡광도의 50%이상의 fraction을 pooling하여 실험에 사용하였다.

다. Peptide-nitrogen 함량

Peptide-nitrogen의 측정은 Umemoto의 개량 biuret법⁽³⁵⁾에 의하여 측정하였다. 즉, 시료를 두 개의 시험관에 각각 0.5 mL씩 취하고 증류수 4.5 mL씩을 가한 다음, 한 시험관에는 biuret 시약 I (0.4% CuSO₄, 8% NaOH, 0.2% glycerin)을 5 mL 첨가하여 A 반응구로, 다른 시험관에는 biuret II (8% NaOH, 0.2% glycerin) 5 mL를 첨가하여 B 반응구로 하였다. Blank는 시료용액 대신 증류수 5 mL를 사용하였다. 실온에서 2시간 반응시킨 후 545 nm에서 흡광도를 측정하여 peptide-nitrogen 함량을 구하였다.

라. NaCl 함량

시료의 NaCl 함량 측정은 Mohr 법⁽³⁶⁾으로 측정하였다.

마. 항산화 활성

Linoleic acid를 사용하여 Hayase and Kato 방법⁽⁵⁾을 사용하여 측정하였다. 즉 linoleic acid 1 g를 ethanol 20 mL에 용해하고 일정 농도로 조정된 시료 1 mL를 첨가하고 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 25 mL를 첨가한 다음 37°C에서 24시간 방치하였다. 이 용액을 25 mL chloroform (2~3회)으로 추출한 후 acetic acid 25 mL로 용해하였다. 포화 KI 용액 1 mL를 첨가하고 1 분간 진탕 후 5 분간 암소에서 방치한 다음 증류수 50 mL 및 1% 전분 지시약을 2~3방울 첨가하고 0.01 N Na₂S₂O₃으로 적정하여 항산화활성을 구하였다.

바. 항암활성

In vitro 항암실험을 위해 사용된 세포주는 한국세포주은행 (서울, 한국)에서 구입하였다. 암세포주는 인체에서 유래한 SNU-1 (서울대학교, 한국)을 실험에 이용하였다. 암세포 SNU-1은 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 fetal bovine serum (FBS)가 함유된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 배지를 교환해주며 75 mL cell culture flask에 5 mL씩 일정량으로 분할하여 주입하고 계속 6~7일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) Assay에 의한 저해효과 및 동물세포에 대한 시료의 암세포 성장저해효과를 측정하기 위하여 Carmichael et al.⁽⁴⁾의 방법에 따라 항암활성 (MTT Assay)을 측정하였다. 동물세포를 96 well plate에 1 x 10⁴ cell/well이 되게 180 분주하고 시료를 일정농도로 제조하여 20 µl를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 96시간 배양하였다. 여기에 5 mg/mL MTT용액 20 µl를 첨가하고 다시 위와 같은 조건에서 4시간 더 배양하였다. 이것을 원심분리 (8,000 x g, 10 min)하여 상등액을 제거하고 각 well당 dimethylsulfoxide (DMSO) 150 µl를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 항암활성을 구하였다.

사. Angiotensin converting enzyme (ACE) 저해활성 측정

ACE 저해활성 측정은 Cushman and Cheung의 방법⁽³⁷⁾에 의하여 측정하였다. 즉, 토끼의 허파에서 아세톤 분말로 정제한 시료 1 g에 400 mM sodium borate buffer (pH 8.3) 10 mL를 가한 다음 5°C에서 24시간 교반한 후 원심분리 (8,000 × g, 30 min)하여 얻은 상등액을 ACE angiotensin I 전환효소로 사용하였다. 시료 100 µL에 ACE 효소액 20 µL 및 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 200 µL를 가한 다음 37°C에서 5분간 preincubation하였다. 여기에 기질로써 0.5 mM His-His-Leu (2.14 mg/mL) 200 µL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1 N HCl 250 µL를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 2 mL를 가하여 15초간 교반한 다음 원심분리 (8,000 × g, 5 min)하여, 상등액 1 mL를 취하였다. 이 상등액을 완전히 건조시킨 뒤 1 M NaCl 3 mL를 가하여 용해한 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Peptide의 정제 및 특성

20 ton의 대형 숙성조 ($15\pm 3^{\circ}\text{C}$)에서 1, 3 및 5년 숙성시킨 멸치액젓의 저분자 물질의 gel chromatography 결과를 Fig. 1-3에 나타내었다. 1년 숙성 멸치액젓은 3개의 peak, 3년 및 5년 숙성시킨 멸치액젓은 각각 4 및 5개의 peak를 나타내었다. 숙성 1년 멸치액젓 (Fig. 1)의 peak 1 및 2 부분 (고분자 peptide)은 숙성 5년 (Fig. 3)에서 크기가 감소하여 후반부 (peak 3-5)의 저분자 peptide의 생성으로 진행되었음을 알 수 있다. 그러므로 gel chromatography 상에서 숙성기간이 길수록 저분자 peptide가 많이 생성되었기 때문에 숙성동안에 멸치의 단백질 및 고분자 peptide가 자가소화효소 및 미생물이 분비하는 단백분해효소에 의해 분해 되어 저분자의 peptide를 생성하였다고 보인다. 1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 유래 peptide의 정제 효율은 각각 2.98, 4.35, 및 5.10%로 숙성 기간이 길수록 peptide의 생성량이 높았다 (Table 1). 전통적으로 멸치액젓은 고농도 (25-30%)의 식염을 사용하기 때문에 생리활성측정에 소금의 영향을 최대한 제거하여야 한다. 본 실험에 사용한 Bio-Rad P2 gel은 시료의 식염함량을 약 26%에서 0.22% 이하로 효과적으로 낮추어 생리활성에 대한 소금의 영향은 무시하여도 문제가 없었다고 본다 (Table 1).

나. 항산화활성

1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 저분자 peptide의 총항산화활성은 각각 56.4, 90.3 및 185.3%로 숙성기간이 길수록 증가하였으며, 특히 5년 숙성 멸치액젓 peptide의 총항산화활성은 1 및 3년 숙성보다 각각 3.3 및 2.1배 정도 높았다 (Table 1). 숙성기간의 증가에 따른 peptide 함량의 증가는 크지 않은데 비해 항산화활성이 크게 증가한 이유는 저분자 peptide일수록 높은 항산화활성을 가지는 것을 알 수 있다. Peak 별 항산화활성은 5년 숙성 peak 2 (84.7%), 3년 숙성의 peak 3 (62.9%), 5년 숙성의 peak 1 (42.6%), 1년 숙성의 peak 2 (38.7%) 순으로 높은 수치를 나타내었다. 그러나 비활성(specific activity)은 3년 숙성 peak 3 (1,462.8 % · mL/mg), 5년 숙성 peak 2 (1,283.3), 1년 숙성 peak 2 (624.2) 순으로 3년 숙성의 peak 3이 가장 높은 값을 나타내었다. Yamaguchi et al.⁽³⁸⁾은 대두단백질을 효소로 가수분해시킨 분해물 중에서 분자량 2.5-3 kDa 사이의 peptide가 항산화활성이 가장 뛰어났다고 보고 하

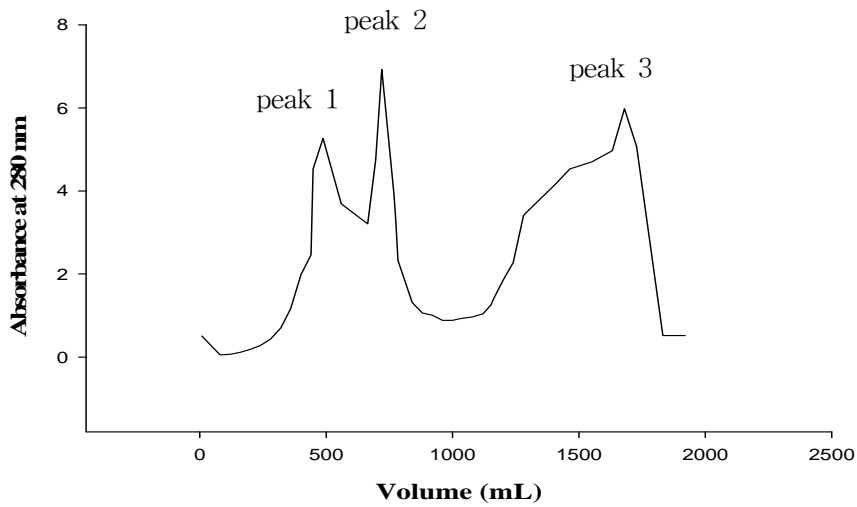


Fig. 1. Gel permeation chromatography pattern of peptides purified from anchovy sauce fermented at $15\pm 3^{\circ}\text{C}$ for 1 year.

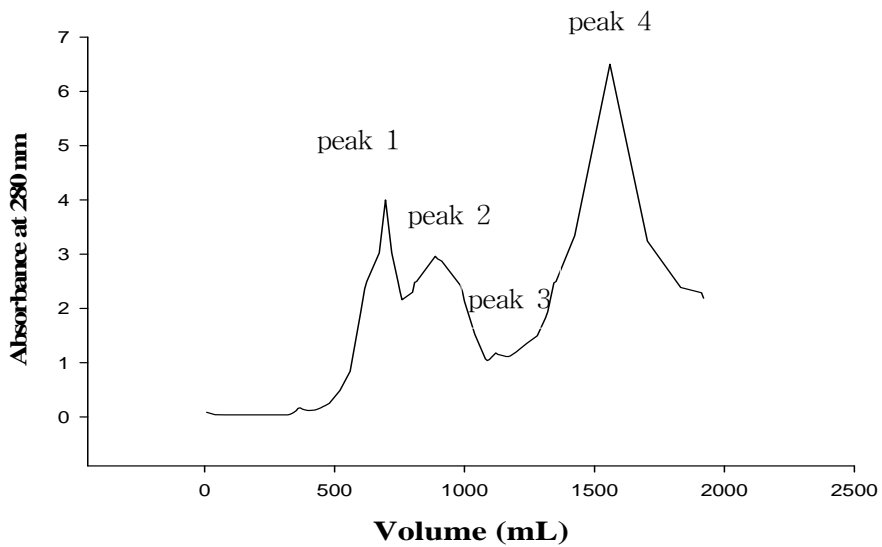


Fig. 2. Gel permeation chromatography pattern of peptides purified from anchovy sauce fermented at $15\pm 3^{\circ}\text{C}$ for 3 years.

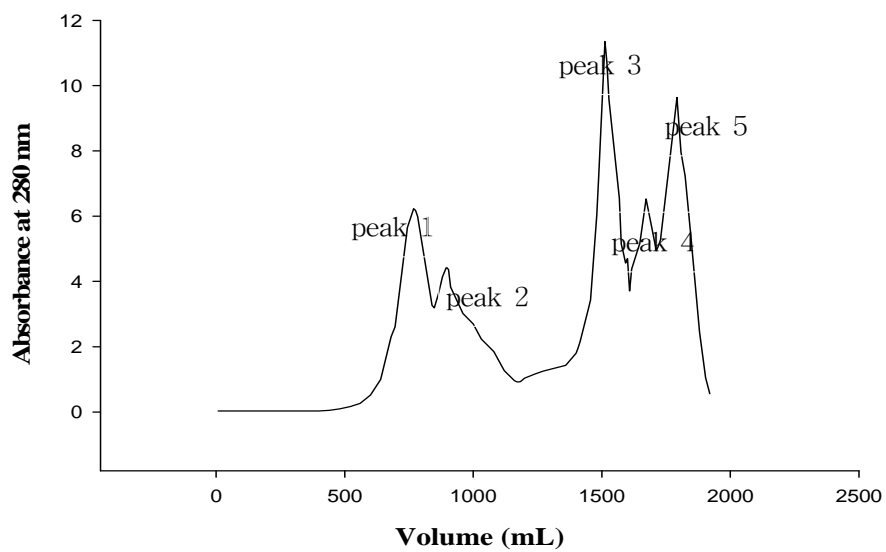


Fig. 3. Gel permeation chromatography pattern of peptides purified from anchovy sauce fermented at $15\pm 3^{\circ}\text{C}$ for 5 years.

였으며, Kim et al.⁽²²⁾은 가자미 gelatin을 한외여과막을 이용하여 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa인 막을 차례로 통과시켜 얻은 가수분해물 중에서 분자량 500-1,000 Da의 가수분해물이 α -tocopherol보다 항산화력이 10% 정도 더 높았다고 보고하였다. 또한 대두단백질, 우유 casein 및 난백 albumin 효소가수분해물의 항산화활성은 vitamin B12 (MW 1,350 Da) 보다 약간 큰 분자량을 가진 획분에서 가장 높았으며⁽³⁸⁾,

gelatin 가수분해물의 경우는 그보다 더 큰 분자량 획분에서 항산화활성이 높았다고 보고되고 있다⁽²²⁾. Park et al.⁽³⁹⁾은 *Symphycladia latiuscula*의 추출물에 대한 항산화활성에 대한 연구에서 추출물의 IC₅₀은 3.14-15.44 µg/mL로 나타났다고 하였으며, 특히 천연항산화제 (L-ascorbic acid 및 α-tocopherol) 및 합성항산화제 (BHA 및 BHT)의 IC₅₀은 각각 1.22 및 1.28, 1.06 및 3.21 µg/mL로 측정되었다고 보고하였다. 본 연구의 멸치액젓 유래 peptide의 IC₅₀은 34 µg/mL (3년 숙성 peak 3), 66 µg/mL (5년 숙성 peak 2), 80 µg/mL (1년 숙성 peak 2)로 천연 항산화제 및 합성항산화제에 비해서는 낮은 활성을 나타내었지만, 시료 자체가 100% 정제 peptide가 아니기 때문에 완전 정제된 peptide는 보다 낮은 IC₅₀값을 나타낼 것으로 추측된다. 약 10,000 daltons 분자량의 대구 frame 효소가수분해물은 α-tocopherol과 비슷한 항산화활성을 가지고 있으나⁽⁴⁰⁾, 대구고니 효소가수분해물인 경우 1,000 daltons 이하의 분자량에서 항산화활성이 높았다⁽²¹⁾. 멸치액젓의 BuOH층 및 수용액층 모두 항산화활성이 우수하고 항산화물질은 분자량 1,000 daltons 이하의 peptide일 것으로 추정하였지만⁽²⁵⁾, 이 논문에서는 식염의 영향을 고려하지 않은 약점이 있다. 어육단백질은 높은 금속이온봉쇄능으로 항산화활성을 나타내나, 금속이온봉쇄능은 금속이온의 종류에 따라 차이가 난다⁽²⁰⁾. Capelin의 효소가수분해물에서 정제한 4개의 peptide 획분 중에서 한개의 획분에서 높은 항산화활성을 나타내었고, 2개의 획분에서는 아주 약한 항산화활성을 나타내었으며, 나머지 1개의 획분에서는 prooxidant 활성을 나타내었다고 하였는데⁽²³⁾, 본 실험에서도 이와 유사하게 peptide 종류에 따라 항산화활성은 차이를 나타내고 있다.

다. 항암활성

멸치액젓 유래 항암활성도 항산화활성과 같이 숙성기간이 길수록 증가하였다. 즉 1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 저분자 peptide의 항암활성은 각각 15.66, 54.09 및 88.70%로 숙성기간이 길수록 증가하였으며, 특히 숙성 5년의 총항암활성은 숙성 1 및 3년보다 각각 약 5.7 및 1.6배 정도 높았다. Peak 별 항산화활성은 5년 숙성의 peak 2 (54.80%), 3년 숙성의 peak 3 (49.16%), 5년 숙성의 peak 1 (15.27%), 1년 숙성의 peak 2 (10.76%) 순으로 높았으며, 비항암활성 (specific antitumor activity)은 3년 숙성의 peak 3 (1,143.3 % · mL/mg), 5년 숙성의 peak 2 (830.3 % · mL/mg), 1년 숙성의 peak 2 (173.6 % · mL/mg)의 순으로 높았다 (Table 1). 대두

발효식품의 암세포주에 대한 세포 독성 조사 실험에서 된장 및 청국장 메탄올 추출물은 사람의 암세포 SNU-1에 대해서 성장억제효과를 나타내며, 이때의 IC₅₀은 각각 1,338 및 756.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었으며⁽³³⁾, 전통 약용식물은 추출물 농도 10-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이에서 항암활성을 나타내었다고 하였다⁽⁴⁰⁾. 본 실험의 항암 peptide의 IC₅₀은 3년 숙성 peak 3이 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 된장 및 청국장 추출물보다 낮아 훨씬 우수한 항암활성을 나타내어 천연숙성 멸치액젓에도 우수한 항암활성을 가진 물질 (peptide)이 존재하는 것으로 판명되었다. Lee et al.⁽⁴¹⁾은 까나리 및 멸치어간장에도 항종양 peptide가 존재한다고 하였으며, 세 개의 아미노산 (Asp, Asn, Phe)으로 이루어진 dipeptide가 주 항암 peptide라고 하였으나 어간장 원료 및 자세한 실험방법은 아직 제시되지 않고 있다. 또한 참치의 ether 추출물에도 인체 장암세포 및 백혈병성 임파모세포의 증식억제 및 생체내에서의 면역증강 효과를 나타내는 성분이 존재한다는 사실이 밝혀져 있으나 정확한 물질 규명은 이루어지지 않고 있다⁽⁴²⁾.

라. Angiotensin converting enzyme (ACE) 저해활성

최근 여러 식품으로부터 ACE 저해 peptide가 분리 및 정제되고 있으나 이들 ACE 저해 peptide는 소수성 및 방향족 아미노산을 함유하고 있어 용해도가 낮고 또한 강한 쓴맛을 나타내기 때문에 식품첨가제로의 이용에는 한계가 있다⁽⁴³⁾. 그러나 수산물의 효소가수분해물은 높은 용해도를 가지나 쓴맛을 나타내지 않기 때문에 ACE 저해활성을 가진 기능성 첨가물로 이용 가능성이 높다⁽⁴⁴⁾. 효소가수분해물의 ACE 저해활성은 분자량이 적을수록 증가하였으며⁽⁴⁰⁾, 단백질분해가 많을수록 증가하였다고 한다⁽⁴³⁾. 본 실험에서는 1, 3 및 5년 숙성 멸치액젓 저분자 peptide의 ACE 저해활성은 각각 212.5, 250.0 및 309.3%로 숙성기간이 길수록 증가하였으며, 특히 숙성 5년의 총ACE 저해활성은 숙성 1 및 3년보다 각각 약 1.5 및 1.2배 정도 높았으며, 항산화 및 항암활성에 비해 숙성기간이 증가할수록 활성의 증가폭은 낮았다 (Table 1). Peak 별 항산화활성은 1년 숙성의 peak 3 (97.8%), 5년 숙성의 peak 1 (93.2%), 3년 숙성의 peak 1 (91.8%), 5년 숙성의 peak 2 (84.9%) 순으로 아주 높았으며, 나머지 peak들도 상대적으로 높은 ACE 저해활성을 나타내었다. 비ACE 저해활성 (specific ACE inhibitory activity)은 1년 숙성의 peak 3 (2,126.3 % · mL/mg), 3년 숙성의 peak 1 (1,732.5 % · mL/mg), 1년 숙성의 peak 1 (1,378.3 % · mL/mg), 5년 숙성의 peak 2 (1,287.0 % · mL/mg)의 순으로 높았다 (Table 1). 고등어 근육

효소가수분해물의 ACE 저해 작용에서는 단백질의 함량보다는 peptide의 종류⁽¹²⁾ 및 적용 효소⁽¹⁴⁾에 따른 영향이 더 크다고 한다. 해조류의 ACE 억제효과 연구⁽⁴⁵⁾에서 미역의 경우 가수분해시간이 길어지면서 peptide-nitrogen 함량은 증가하였으나 ACE 효과는 감소하였다. 또한 Fujita and Yoshikawa⁽⁷⁾는 어육단백질에서 8개의 ACE 저해 peptide를 분리하였으나 활성은 peptide에 따라 차이가 있으며 이중 LKPNM peptide는 ACE에 의해 LKP로 분해되었을 경우 ACE 저해활성은 8배나 높았으며 상업용 항고혈압 치료제인 captopril의 91% 정도의 ACE 저해활성을 나타내었다고 하였다. ACE 저해활성은 peptide-nitrogen 생성량과도 관련이 있지만 peptide의 종류에 더 큰 영향을 받았으며^(12,15), 본 실험에서도 같은 원리가 적용되어진다고 본다.

4. 결론

숙성기간 (1, 3 및 5년)이 다른 멸치액젓으로부터 추출한 peptide는 정제과정에서 숙성 1년의 멸치액젓은 3개, 숙성 3년의 멸치액젓은 4개, 숙성 5년의 멸치액젓은 5개의 peak를 각각 나타내었다. 숙성기간이 길수록 멸치액젓의 peptide는 저분자화되었으며, gel chromatography상의 후반부에 나타났다. 숙성기간이 다른 멸치액젓으로부터 추출한 peptide들의 생리활성 (항산화, 항암, ACE 저해활성)은 숙성기간이 길수록 증가하였다. 특히 항산화 및 항암활성은 IC₅₀이 각각 34 및 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 3년 숙성 peak 3이 제일 높았으나, ACE 저해활성은 IC₅₀이 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인 1년 숙성 peak 3이 제일 높았다. 천연숙성 멸치액젓의 저분자 peptide는 뛰어난 생리활성을 갖고 있음이 밝혀졌으나 구조분석 등의 추가 연구가 필요하다고 본다.

5. 참고 문헌

1. 손동화: 건강기능성 식품 펩타이드 및 그 응용. 식품과학과 산업, 30: 22-29 (1997)
2. Mohr, V.M: Fish protein concentrate production by enzyme hydrolysis. In: Biochemical Aspects of New Protein Food. J. Alder-Nissen (ed), BO. Eggum. (1982)
3. Shin, Z.I., Ahn, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J., Lee, H.J. and Moon, T.H.: Fractionation of Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 230-234 (1995)

4. Charmichael, J., Degraff, E.G., Gazdaar, A.F., Minna, J. D., and Michell, J.B.: Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47: 936-942 (1987)
5. Hayase, F. and Kato, H.: Antioxidative components of sweet potatoes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 30: 37-40 (1984)
6. Byun, H.G. and Kim, S.K.: Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochem.* 36: 1155-1162 (2001)
7. Fugita, H. and Yoshikawa, M.: LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacol.* 44: 123-127 (1999)
8. Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M. and Mimura, T.: Isolation of angiotensin-converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155: 332-337 (1988)
9. Suetuna, K. and Osajima, K.: Blood pressure reduction and vasodilatory effects in vivo of peptides originating from sardine muscle. *Nippon Eiyou Shokuryou Gakkaishi* 52: 47-51 (1989)
10. Kim, S.K., Choi, Y.R., Park, P.J., Choi, J.H. and Moon, S.H.: Screening of biofunctional peptides from cod processing wastes. *J. Korean Soc. Aric. Chem. Biotechnol.* 43: 225-227 (2000)
11. Kim, T.J., Yoon, H.D., Lee, D.S., Jang, Y.S., Suh, S.B. and Yeum, D.M.: Angiotensin I converting enzyme inhibitory activity of hot-water extract and enzymatic hydrolysate of fresh water fish. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 871-877 (1996)
12. Yeum, D.M., Lee, T.G., Byum, H.S., Kim, S.B. and Park, T.H.: Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Bull, Korean Fish. Soc.* 25: 229-235 (1992)
13. Kim, S.B., Lee, T.G., Park, Y.B., Yeum, D.M., Kim, O.K., Do, J.R. and Park, Y.H.: Isolation and characteristics of angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of peptic hydrolysates of anchovy muscle protein. *Bull. Korean Fish. Soc.* 27: 1-6 (1994)

14. Lee, T.G., Park, Y.B., Park, D.C., Yeum, D.M., Kim, I.S., Gu, Y.S., Park, Y.H. and Kim, S.B.: Angiotensin converting enzyme inhibitory activity in enzymatic hydrolysates of anchovy muscle protein. *J. Korean Fish. Soc.* 31: 875-881 (1998)
15. Yeum, D.M., Lee, T.G., Do, J.R., Kim, O.K., Park, Y.B., Kim, S.B. and Park, Y.H.: Characteristics of angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from fermented fish product. *Bull. Korean Fish. Soc.* 26: 416-423 (1993)
16. Ahmael, S.: *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology.* p. 25-42. Chapman and Hall. New York. (1995)
17. Branen, A.L.: Toxicology and biochemistry of butylate hydroxyanisole and butylated hydroxytoluence. *J. Food. Sci.* 37: 873-875 (1975)
18. Doll, K. and Pet, R.: The causes of cancer, quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 1192-1308 (1981)
19. Yamaguch, N., Yokoo, Y. and Fujimabi, M.: Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 26: 65-70 (1979)
20. Kim, S.B., Yeum, D.M., Yeum, S.G., Ji, C.I., Lee, Y.W. and Park, Y.H.: Antioxidative effects of food protein hydrolysates by protease. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 492-497 (1989)
21. Kim, S.K., Choi, Y.R., Park, P.J., Choi, J.H. and Moon, S.H.: Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of cod teiset protein. *J. Korean Fish. Soc.* 33: 198-204 (2000)
22. Kim, S.K., Lee, H.C. Byun, H.G., and Jeon, Y.J.: Isolation and Characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. *J. Korean Fish. Soc.* 29: 246-255 (1996)
23. Amarowicz, R. and Shahidi, F.: Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. *Food Chem.* 58: 355-359 (1997)
24. Iwamoto, T., Watanabe, S., Nishimura, M., Onda, R., Iwamoto, M., Kurata, H., Matsumoto, A., Itakura, H. and Kondo, K.: Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by fish protein (mackerel peptide). p. 223 presented at

- 11th International Symposium on Atherosclerosis. October 8, Paris. (1997)
25. Park, J.O., Yoon, M.S., Cho, E.J., Kim, H.S. and Rye, B.H.: Antioxidant effects of fermented anchovy. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 1378-1385 (1999)
 26. Kennedy, A.R. and Little, J.B.: Effects of protease inhibitors on radiation transformation in vitro. *Cancer Res.* 41: 2103-2108 (1981)
 27. Yavelow, J., Finlay, T.H., Kennedy, A.R. and Troll, W.: Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res.* 43: 2454-2459 (1983)
 28. Elair, W.H., Billings, P.C., Carew, J.A., McGandy, C.K., Newberne, P. and Kennedy, A.R.: Suppression of dimethylhydrazine induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res.* 50: 580-586 (1990)
 29. Shamsuddin, A.M., Ullah, A. and Chakravarthy, A.K.: Inositol and inositol hexaphosphate suppress cell proliferation and tumor formation in CD-1 mice. *Carcinogenesis* 10: 1461-1463 (1989)
 30. Shamsuddin, A.M., Elsafeel, A.M. and Ullah, A.: Suppression of large intestinal cancer in F344 rats by inositol hexaphosphate. *Carcinogenesis* 9: 577-580 (1988)
 31. Coward, L., Barnes, N. C., Stechell, K.D.R. and Barnes, S.: Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates, antitumor isoflavones in soybean feeds from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1961-1967 (1995)
 32. Hwang, B.H., Zhao, J.L., Choi, K.P., Jung, S.W., Kim, E.J. and Ham, S.S.: The antimutagenic and anticancer effect of *Taxus cuspidata* extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 25: 1062-1068 (1996)
 33. Chung, K.S., Yoon, K.D., Kwon, D.J., Hong, S.S. and Choi, S.Y.: Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumour cells using MTT assay. *Korean J. Appl. Microbial. Biotechnol.* 25: 477-482 (1997)
 34. Cho, K.J., Lee, Y.S. and Ryu, B.H.: Antitumor effect and immunology

- activity of seaweeds toward Sarcoma-180. Bull, Korean Fish. Sci. 23: 345-352 (1990)
35. Umemoto, S.: A modification method for estimation of muscle protein by biuret method, Bull. Japanese Soc. Fish. 32: 427-435 (1966)
36. AOAC International: Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD (1995)
37. Cushman, D.W. and Cheung, H.S.: Spectrophotometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol. 20: 1637-1648 (1971)
38. Yamaguchi, N.S., Naito, S., Yokoo, Y. and Fujimaki, M.: Application of protein hydrolyzate to biscuit as antioxidant. J. Japanese Soc. Food Sci. Technol. 27: 56-59 (1980)
39. Park, H.J., Choi, J.S. and Chung, H.Y.: The antioxidant activity in extracts of *Symphyclocladia latiuscula*. Korean Fish. Soc. 31: 927-932 (1998)
40. Jeon, Y.J., Byun, H.G. and Kim, S.K.: Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. Proc. Biochem. 35: 471-478 (1999)
41. Lee, K.W., Kim, J.Y. and Lee, H.J.: Characterization of antitumor peptides fractionated from launce and anchovy sauce. Abstract No Tu09-7 presented at 11th World Congress Food Sci. Technol. April 22-27, COEX center, Seoul. (2001)
42. Hwang, E.I., Baik, N.G., Hwang, Y.K. and Lee, S.D.: Antitumor and immunological effects of tuna extract. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 353-366 (1992)
43. Matsui, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M. and Osajima, Y.: Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 922-925 (1993)
44. Kim, S.K., Jeon, Y.J. Byun, H.G., Kim, Y.T. and Lee, C.K.: Enzymatic recovery of cod frame peotein by crude proteinase derived from tuna pyloric

caeca. Fish Sci. 63: 421-427 (1997)

45. Lee, H.O., Yoon, H.D., Jang, Y.S., Suh, S.B. and Ko, Y.S.: Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. J. Korean Fish. Soc. 32: 738-746 (1999)

제 2 절 멸치액젓 유래 저분자 물질의 항산화활성

1. 서 론

최근 식품성분이 가지는 각종 생체조절기능을 해명함으로써 식품의 기능을 새롭게 인식하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 식품에서 peptide는 영양, 맛 그리고 건강에 영향을 줌으로써 매우 중요한 역할을 한다. 일반적으로 생체에는 강한 생리활성 (peptide상 hormone, enkephalin, interleukin, 세포 성장 인자, 독성물질, bacteriosin 및 enzyme inhibitor 등)을 갖는 유리 peptide들이 많이 존재하고 있다⁽¹⁾. 또한 이와는 다른 종류의 peptide들이 식품의 발효 및 숙성 등의 가공처리 동안에 생성될 수 있으며, 이들 중에는 종래에 생리활성 peptide의 전구체로 생각되지 않았던 식품단백질이나 혈액단백질 등으로부터 생리활성 peptide가 만들어 진다⁽²⁾. 특히 생리활성 peptide는 구조 및 활성이 다양하고, 유전공학기술에 의한 생산 및 개조가 가능하며, 높은 안전성을 기대할 수 있다는 특성으로 인하여 주목받고 있는 물질이다⁽³⁾.

항산화제란 산화를 방지하거나 지연시키는 물질을 통칭하는 것으로 그 작용기작에 따라 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유 라디칼 소거작용, 과산화물을 비라디칼로 분해하여 불활성 시키는 과산화물 분해제, 자동산화에 있어서 라디칼 저해제와 공존시 항산화 작용을 증가시키는 상승제 및 각종 활성산소계를 소거하는 singlet oxygen quencher 등으로 분류된다⁽⁴⁾. 이러한 항산화제는 각종 식물의 추출물, 향료, 발효생산물 등에 대부분 flavonoids 또는 phenol계 화합물로 대부분 존재한다. 또한 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소로 분해하여 얻어진 peptide에서도 항산화활성이 보고 되고 있다^(5,6). 일반적으로 항산화제는 천연 항산화제와 합성 항산화제로 대별되는데, 합성항산화제는 동물실험에서 발생과 각종 효소군 등에 영향을 주며, 특히 butylated hydroxytoluence (BHT)은 기형발생 또는 암 발생에 관여하는 것으로 보고되어⁽⁷⁾ 뛰어난 항산화제효과에 비해 부작용으로 인해 문제시 되고 있는 반면, 천연항산화제는 부작용이 거의 없어 식품첨가물 또는 약품으로 현재

널리 이용되고 있다. 그러나 천연항산화제 중 가장 널리 이용되는 α -tocopherol의 경우 비싼 가격과 지용성이라는 이용에 있어서의 제약으로 대체 천연항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다⁽⁸⁾. 아미노산 및 peptide는 대표적인 금속이온봉쇄능 (metal chelating agents)⁽⁹⁻¹¹⁾ 및 hydroperoxides를 imine⁽¹²⁾으로 전환능을 가진 항산화물질이다. 수산식품의 항산화연구는 어육단백질⁽¹³⁾, 대구고니⁽¹⁴⁾, 대구가공부산물⁽¹⁵⁾, 가자미⁽¹⁶⁾, capelin⁽¹⁷⁾, 고등어⁽¹⁸⁾ 등의 효소가수분해물에 국한되어 있고 멸치액젓의 수용성 획분⁽¹⁹⁾에도 항산화 효과가 있다는 연구가 있으나 천연숙성 멸치액젓의 항산화 물질 및 이의 구조분석에 관한 연구는 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 천연 숙성 멸치액젓의 숙성 기간별 생성되는 다양한 형태의 항산화물질을 분리·정제하여 항산화활성 및 구조분석을 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 재료

멸치 20 ton에 중량당 30%의 식염을 가하여 $15\pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 숙성한 멸치액젓 (풍미식품, 속초)을 시료로 사용하였다. Peptide 정제에 사용된 Bio-Rad P-2 gel은 Bio-Rad (California, USA)에서 구입하였고 실험에 사용된 나머지 시약은 모두 특급을 사용하였다.

나. 저분자 생리활성물질의 정제

멸치액젓으로부터 저분자 생리활성물질의 정제방법은 Fig. 1에 나타내었다. 즉, 액젓을 sulfosalicylic acid로 제단백하여, 4°C 에서 PM10 (cut off, 3,000 daltons) membrane filter (Amicon, Bedford, MA)를 사용하여 한외여과 하였다. 한외여과 한여과액을 40°C 에서 감압농축한 후, Bio-gel P-2 (Bio-Rad, CA)를 충전한 column (2.6×70 cm)을 사용하여 0.5 mL/min의 유속으로 용출 시켰다. 용출액을 5 mL씩 받아 280 nm에서 흡광도를 측정하여 최대흡광도의 50% 이상의 fraction을 pooling

Anchovy sauce



Precipitation of protein by adding the sulfosalicylic acid

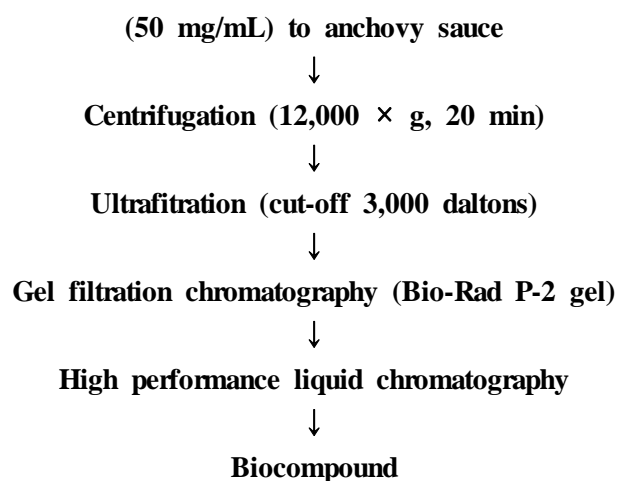


Fig. 1. Flow sheet for the purification of biocompound from anchovy sauce

하였다. 항산화활성이 높은 peak는 첫 단계로 Vydac C₁₈ (7.5 x 250 mm, Japan)을 이용하여 부분 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다. A 용매; 0.1% TFA/H₂O (pH 2.2), B 용매, 0.1% TFA를 포함하는 100% CH₃CN, B 용액의 농도구배; 0 → 20% (40 min), 유속; 2.0 mL/min, 파장; 220 nm, 온도; 40°C. 분리한 분획에 대해 활성을 나타낸 peak는 다시 Capcell Pak C₁₈ (7.5 x 250 mm, Shiseido, Japan)에 각

각 적용하여 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다. 용매, 유속, 파장은 1차 정제와 동일, B 용액의 농도구배; 0 → 15% (45 min). 2차 정제에서 활성이 나타난 peak를 다시 Capcell Pak C₁₈ (4.6 x 250 mm, Shiseido, Japan)에 각각 적용하여 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다. 용매 및 파장은 1차 정제와 동일, B 용액의 농도구배; 0 → 10% (30 min), 유속; 1.0 mL/min. 3차 정제에서 활성이 뛰어난 peak를 다시 Capcell Pak C₁₈ (4.6 x 250 mm, Shiseido, Japan)에 각각 적용하여 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다. 용매 및 파장은 1차 정제와 동일, B 용액의 농도구배; 0 → 10% (30 min), 유속; 0.5 mL/min. 정제에 사용한 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)는 Waters Model 486 (Waters Associates, Miliford, MA, USA)을 사용하였으며 HPLC-grade용 water와 acetonitrile은 TEDIA (Ohio, USA)사에서 구입하여 사용하였다.

다. Peptide-nitrogen 함량

Peptide-nitrogen의 측정은 Umemoto의 개량 biuret법⁽²⁰⁾에 의하여 측정하였다. 즉, 시료를 두 개의 시험관에 각각 0.5 mL씩 취하고 증류수 4.5 mL씩을 가한 다음, 한 시험관에는 biuret 시약 I (0.4% CuSO₄, 8% NaOH, 0.2% glycerin)을 5 mL 첨가하여 A 반응구로, 다른 시험관에는 biuret II (8% NaOH, 0.2% glycerin) 5 mL를 첨가하여 B 반응구로 하였다. Blank는 시료용액 대신 증류수 5 mL를 사용하였다. 실온에서 2시간 반응시킨 후 545 nm에서 흡광도를 측정하여 peptide-nitrogen 함량을 구하였다.

라. NaCl 함량

시료의 NaCl 함량 측정은 Mohr 법⁽²¹⁾으로 측정하였다.

마. 항산화활성

각 시료의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical에 대한 소거효과 측정은 Blois 방법⁽²²⁾을 사용하였다. Methanol로 농도를 조정된 시료 4 mL를 취하고, 0.15 mM DPPH 1 mL와 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여, DPPH radical 소거활성 [Reduction of DPPH (%) = (시료 처리구의 흡광도 / 대조구의 흡광도) × 100]을 구하였다.

바. Peptide의 서열 결정

HPLC에서 최종 정제한 시료의 peptide 서열 결정은 Protein sequencer (Shimadzu PSQ-1 protein sequencer, Japan)를 사용하여 아미노산 서열을 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 생리활성물질의 정제 및 특성

20 ton의 대형 숙성조 ($15\pm 3^{\circ}\text{C}$)에서 5년 동안 숙성시킨 멸치액젓의 저분자 생리활성물질의 gel chromatography 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 5년 숙성 멸치액젓은 chromatography상에서 5개의 peak를 나타내었다. 실험에 사용한 Bio-Rad P2 gel은 분자량이 100-1,800 daltons 사이의 분자량을 정제할 수 있는 능력을 지니고 있어 Fig. 2에서 peak 들이 후반부에 나타난 것은 분자량이 상대적으로 낮은 물질일 것으로 추정되어 진다. 5년 숙성 멸치액젓의 peptide-nitrogen 함량이 너무 낮아 ($270\ \mu\text{g}/\text{ml}$)아 동결건조로 농축 ($10,825\ \mu\text{g}/\text{ml}$)하여 실험에 사용하였을 때 정제 효율은 5.10%로 다소 낮았다 (Table 1). 전통적으로 멸치액젓은 고농도 (25-30%)의 식염을 사용하기 때문에 생리활성측정에 소금의 영향을 최대한 제거하여야 한다. 본 실험에 사용한 Bio-Rad P2 gel은 시료의 식염함량을 약 26%에서 0.003%로 효과적으로 낮추어 생리활성에 대한 소금의 영향은 무시하였다 (Table 1).

나. 항산화활성

총항산화활성은 185.3%이었으며 peak 2 (84.7%), peak 1 (42.6%), peak 3 (26.2%), peak 4 (13.8%), peak 5 (12.1%) 순으로 높은 값을 나타내었다. 단위질량당 비활성 (specific activity)은 peak 2가 ($1,283\ \% \cdot \text{ml}/\text{mg}$)로 peak 1 ($380.4\ \% \cdot \text{ml}/\text{mg}$) 및 peak 4 ($328.6\ \% \cdot \text{ml}/\text{mg}$) 보다 아주 높은 값을 나타내어 peak 2가 가장 우수한 항산화활성을 나타내었다. Yamaguchi et al.⁽²³⁾은 대두단백질을 효소로 가수분해시킨 분해물 중에서 분자량 2.5-3 kDa 사이의 peptide가 항산화활성이 가장 뛰어났다고 보고 하였으며, Kim et al.⁽¹⁶⁾은 가자미 gelatin을 한외여과막을 이용하여 10, 5 및

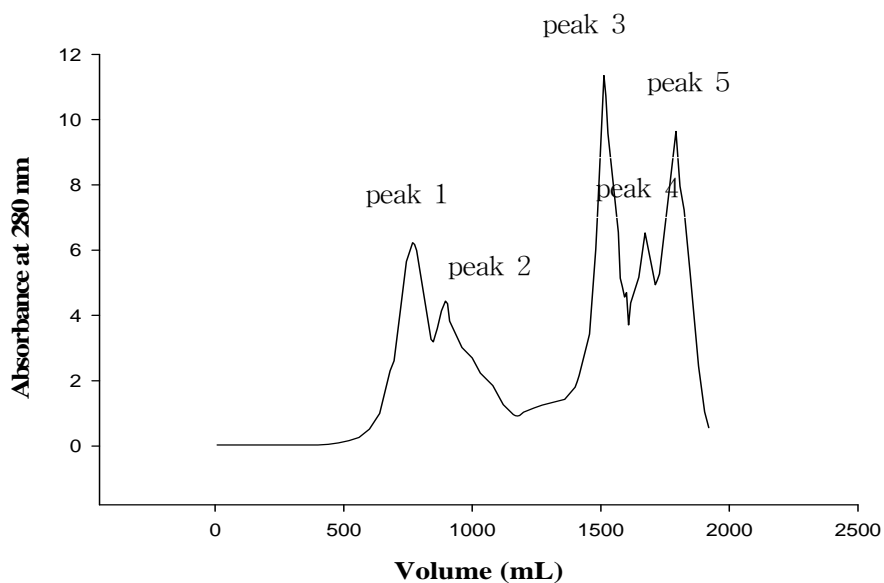


Fig. 2. Gel permeation chromatography pattern of biocompounds purified from anchovy sauce fermented at $15\pm 3^{\circ}\text{C}$ for 5 years.

Table 1. Antioxidant activity of low molecular weight biocompounds from anchovy sauce fermented at $15\pm 3^{\circ}\text{C}$ for 5 years

Biocompound	Peptide concentration (mg/mL)	Yield (%)	NaCl concentration (%)	Antioxidant activity (%)	Specific antioxidant activity (% · mL/mg)
Raw	10.825 (0.270) ¹⁾	100.00	26.200		
Peak 1	0.112	1.03	0.003	42.6	380.4
Peak 2	0.066	0.61	0.003	84.7	1283.3
Peak 3	0.172	1.59	0.003	26.2	152.3
Peak 4	0.042	0.39	0.003	13.8	328.6
Peak 5	0.160	1.48	0.003	12.1	75.6
Total		5.10		185.3	

Table 2. Antioxidant activity of low molecular weigh biocompounds from anchovy sauces fermented at 15°C for 5 years

Peptide	1st HPLC	2nd HPLC	3rd HPLC	4th HPLC	Antioxidant activity (%)	Sequence analysis	
Peak 1	1 C 1	2 C 2	3 C 4		48	Glutamic acid	
		2 C 3			52	Lysine	
Peak 2	1 C 2		3 C 2		30	No ¹⁾	
		2 C 6					
			3 C 5			30	N0
		2 C 8	3 C 4	4 C 5		30	No
1) Not analyzed		2 C 9				No	

1 kDa인 막을 차례로 통과시켜 얻은 가수분해물 중에서 분자량 500-1,000 Da의 가

수분해물이 α -tocopherol보다 항산화력이 10% 정도 더 높았다고 보고하였다. 또한 대두단백질, 우유 casein 및 난백 albumin 효소가수분해물의 항산화활성은 vitamin B12 (MW 1,350 Da) 보다 약간 큰 분자량을 가진 획분에서 가장 높았으며⁽²³⁾, gelatin 가수분해물의 경우는 그보다 더 큰 분자량 획분에서 항산화활성이 높았다고 보고되고 있다⁽¹⁶⁾. Park et al.⁽²⁴⁾은 *Symphycladia latiuscula*의 추출물에 대한 항산화활성에 대한 연구에서 추출물의 IC₅₀은 3.14-15.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다고 하였으며, 특히 천연항산화제 (L-ascorbic acid 및 α -tocopherol) 및 합성항산화제 (BHA 및 BHT)의 IC₅₀은 각각 1.22 및 1.28, 1.06 및 3.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 측정되었다고 보고하였다. 본 연구의 멸치액젓 유래 peptide에서 가장 높은 항산화활성을 나타낸 peak 2의 IC₅₀은 66 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (5년 숙성 peak 2)으로 천연 항산화제 및 합성항산화제에 비해서는 낮은 활성을 나타내었지만, 시료 자체가 100% 정제 peptide가 아니기 때문에 완전 정제된 peptide는 보다 낮은 IC₅₀값을 나타낼 것으로 추측된다. 약 10,000 daltons 분자량의 대구 frame 효소가수분해물은 α -tocopherol과 비슷한 항산화활성을 가지고 있으나⁽²⁵⁾, 대구고니 효소가수분해물인 경우 1,000 daltons 이하의 분자량에서 항산화활성이 높았다⁽¹⁴⁾. 멸치액젓의 BuOH층 및 수용액층 모두 항산화활성이 우수하고 항산화물질은 분자량 1,000 daltons 이하의 peptide일 것으로 추정하였지만⁽¹⁸⁾, 이 논문에서는 식염의 영향을 고려하지 않은 약점이 있다. 어육단백질은 높은 금속이온 봉쇄능으로 항산화활성을 나타내나, 금속이온봉쇄능은 금속이온의 종류에 따라 차이가 난다⁽²³⁾. Capelin의 효소가수분해물에서 정제한 4개의 peptide 획분 중에서 한 개의 획분에서 높은 항산화활성을 나타내었고, 2개의 획분에서는 아주 약한 항산화활성을 나타내었으며, 나머지 1개의 획분에서는 prooxidant 활성을 나타내었다고 하였는데⁽¹⁶⁾, 본 실험에서도 이와 유사하게 peptide 종류에 따라 항산화활성은 차이를 나타내고 있다.

멸치액젓의 항산화물질의 구조를 분석하기 위하여 항산화활성이 가장 높은 peak 1 및 2를 HPLC로 정제한 결과를 Table 2에 나타내었다. 본 논문에서는 정제 단계 별 data (peak)가 중요하지 않다고 판단하여 data를 제시하지는 않았지만, 1차 HPLC 정제에서 peak 1은 6개, peak 2는 9의 세부 peak를 나타내었으며 그 중 항산화활성을 나타낸 peak (1 C 1 in peak 1 and 1 C 2 in peak 2)는 HPLC로 2차 정제하였다. 2차 정제에서 peak1의 1 C 1은 총 11개, peak 2의 1 C 2는 총 9개의 세부 peak를 나타내었다. 이중 활성을 나타낸 peak (2 C 2, 3 in peak 1 and 2 C 6,8,9 in peak 2)는 순도가 높은 것은 바로 sequence를 분석하였으며, 순도가 낮은 것은 다시 3 및 4차 정제하여 sequence 분석을 하였다. Table 2에서 나타낸 것과 같이 peak 1에서 항산화활성을 나타낸 것은 아미노산인 glutamic acid 및 lysine이

었다. 그리고 peak2는 sequence분석이 되지 않았는데 이는 peptide나 아미노산와 다른 항산화물질로 추정되어 진다. 왜냐하면 어류는 지방(고도불포화지방)을 많이 함유하고 있기 때문에 어유의 산화를 방지하는 물질이 많이 존재하며, 또한 액젓의 숙성 중에 생겨나는 갈변물질 또한 항산화활성을 가지고 있기 때문인 것으로 보여 진다. 일반적으로 아미노산은 amine 반응 및 sulphur group들이 hydroperoxide와 반응하여 imines, sulphides, thiosulphinates, sulphoxides를 형성하여 항산화활성을 가지고 있다(12). 그러므로 본 실험에서 정제된 glutamic acid 및 lysine은 imine을 형성하여 항산화활성을 가지고 있다고 본다. 청어 기름을 시료로 하여 11개 아미노산의 항산화활성을 측정하였을 때, 10개의 아미노산이 항산화활성을 나타내었으며, 그 중 histidine, tryptophan, lysine이 강한 활성을 가지고 있는데 반해 glutamic acid 및 alanine 등은 다소 약한 항산화활성을 나타내었다(26). 이들 아미노산은 산화촉진물질과 결합하든지 아니면 산화된 1차 항산화물질을 재생함으로서 항산화활성을 나타낸다고 한다(26). 특히 histidine을 함유하고 있는 peptide는 금속뿐만 아니라 histidine의 imidazole ring이 지방 radical의 붕쇄(27) 또는 hydroxyl radical 및 singlet oxygen을 붕쇄(28)하여 항산화활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 어육단백질 가수분해물은 항산화물질 및 산화촉진제를 동시에 함유하고 있으나(29), 대두 및 우유단백질 가수분해물보다 뛰어난 항산화활성을 가지고 있다고 한다(13). 본 실험에서 구조분석이 되지 않은 물질은 멸치숙성 중 생성되는 갈변물질인 것으로 추정된다. 왜냐하면 비효소적갈변반응 (Maillard reaction) 물질들은 항산화활성을 가지고 있으나 아직 상업용으로는 개발되지 못하고 있기 때문이다(30,31). 그 이유는 갈변으로 인하여 식품첨가시 변색이 되기 때문이다(32).

4. 결론

5년 숙성 멸치액젓으로부터 한외여과 및 gel permeation chromatography를 통하여 정제한 생리활성물질은 5개의 peak를 나타내었다. 멸치액젓의 저분자 생리활성물질의 항산화활성은 peak 2 (84.7%) 및 peak 1 (42.6%) 순으로 높은 활성을 나타내었다. Peak 1의 주 항산화물질은 glutamic acid 및 lysine이었으며 peak 2의 항산화물질은 확인되지 못하였으나 갈변물질 또는 다른 물질일 것으로 추정된다.

5. 참고 문헌

1. 손동화: 건강기능성 식품 펩타이드 및 그 응용. 식품과학과 산업, 30: 22-29 (1997)
2. Mohr, V.M: Fish protein concentrate production by enzyme hydrolysis. In:

- Biochemical Aspects of New Protein Food. J. Alder-Nissen (ed), BO. Eggum. (1982)
3. Shin, Z.I., Ahn, C.W., Nam, H.S., Lee, H.J., Lee, H.J. and Moon, T.H.: Fractionation of Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 230-234 (1995)
 4. Ahmael, S.: *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology.* p. 25-42. Chapman and Hall. New York. (1995)
 5. Suetuna, K. and Osajima, K.: Blood pressure reduction and vasodilatory effects in vivo of peptides originating from sardine muscle. *Nippon Eiyou Shokuryou Gakkaishi* 52: 47-51 (1989)
 6. Branen, A.L.: Toxicology and biochemistry of butylate hydroxyanisole and butylated hydroxytoluence. *J. Food. Sci.* 37: 873-875 (1975)
 7. Doll, K. and Pet, R.: The causes of cancer, quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 1192-1308 (1981)
 8. Yamaguch, N., Yokoo, Y. and Fujimabi, M.: Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 26: 65-70 (1979)
 9. Pokorny, J. 1987. Major factors affecting the autooxidation of lipids. In *Autooxidation of Unsaturated Lipids.* Chan, H.W.S. ed., Academic Press, London. p. 141-206.
 10. Fujimoto, K., Neff, W.E. and Frankel, E.N. 1984. The reaction of DNA with lipid oxidation products, metals and reducing agents. *Biochim. Biophys. Acta.* 795: 100-107.
 11. Chen, H.M., Muramoto, K. and Yamauchi, F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean beta-conglycinin. *J. Agric. Food Chem.* 43: 574-578.
 12. Zaleska-Fiolka, J. 2000. Antioxidant properties of α -tocopherol, methionine, and selenomethionine in olive oils. *Riv. Ital. Sostanze Grasse.* 77: 543-547.
 13. Kim, S.B., Yeum, D.M., Yeum, S.G., Ji, C.I., Lee, Y.W. and Park, Y.H.: Antioxidative effects of food protein hydrolysates by protease. *Korean J. Food Sci. Technol.* 21: 492-497 (1989)

14. Kim, S.K., Choi, Y.R., Park, P.J., Choi, J.H. and Moon, S.H.: Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of cod teiset protein. J. Korean Fish. Soc. 33: 198-204 (2000)
15. Kim, S.K., Choi, Y.R., Park, P.J., Choi, J.H. and Moon, S.H.: Screening of biofunctional peptides from cod processing wastes. J. Korean Soc. Aric. Chem. Biotechnol. 43: 225-227 (2000)
16. Kim, S.K., Lee, H.C. Byun, H.G., and Jeon, Y.J.: Isolation and Characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. J. Korean Fish. Soc. 29: 246-255 (1996)
17. Amarowicz, R. and Shahidi, F.: Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. Food Chem. 58: 355-359 (1997)
18. Iwamoto, T., Watanabe, S., Nishimura, M., Onda, R., Iwamoto, M., Kurata, H., Matsumoto, A., Itakura, H. and Kondo, K.: Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by fish protein (mackerel peptide). p. 223 presented at 11th International Symposium on Atherosclerosis. October 8, Paris. (1997)
19. Park, J.O., Yoon, M.S., Cho, E.J., Kim, H.S. and Rye, B.H.: Antioxidant effects of fermented anchovy. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1378-1385 (1999)
20. Umemoto, S.: A modification method for estimation of muscle protein by biuret method, Bull. Japanese Soc. Fish. 32: 427-435 (1966)
21. AOAC International: Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Gaithersburg, MD (1995)
22. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 26, 1119-1200.
23. Yamaguchi, N.S., Naito, S., Yokoo, Y. and Fujimaki, M.: Application of protein hydrolyzate to biscuit as antioxidant. J. Japanese Soc. Food Sci. Technol. 27: 56-59 (1980)
24. Park, H.J., Choi, J.S. and Chung, H.Y.: The antioxidant activity in extracts of *Symphycladia latiuscula*. Korean Fish. Soc. 31: 927-932 (1998)
25. Jeon, Y.J., Byun, H.G. and Kim, S.K.: Improvement of functional properties

- of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. Proc. Biochem. 35: 471-478 (1999)
26. Marcusk, R. 1960. Antioxidative effect of amino acids. Nature 185: 886-887.
27. Murase, H., Nagao, A. and Terao, J. 1993. Antioxidant and emulsifying action of *N*-(long-chain-acyl)histidine and *N*-(long-chain-acyl)carnosine. J. Agric. Food Chem. 41: 1601-1604.
28. Wade, A.M. and Tucker, H.N. 1998. Antioxidant characteristics of L-histidine. J. Nutr. Biochem. 9: 308-315.
29. Shahidi F. and Amarowicz, R. 1996. Antioxidant activity of protein hydrolyzates from aquatic species. JAOCS. 73: 1197-1199.
30. Dworschak, E. and Szabo, L. 1986. Formation of antioxidative materials in the preparation of meals. Dev. Food Sci. 13: 311-319.
31. Dworschak, E., Tarjan, V. and Turos, S. 1986. Characteristics of some new flavoring materials produced by the Maillard reaction. AOCS Symp. Ser. 215: 159-168.
32. Yamauchi, N. 1991. Antioxidant properties of decolorized melanoidin. new Food Ind. 33: 76-80.

제 3 절 멸치액젓 유래 *Bacillus subtilis* JM3 단백질 분해 효소의 정제 및 특성

1. Introduction

Since the long coastal line of the Korean peninsula provides a variety of marine products for human consumption, fermented fisheries foods have played an important role in Korean dietary life. The typical fermented fisheries foods in Korea are divided into three group ; *Jeotkal* (fermented fisheries), *Sikhae* (fermented fisheries with cooked cereals), and fish sauce. Fish sauce is actually the liquid part of *Jeotkal* and has been used as a condiment for rice dishes. The manufacturing procedure of fish sauce consists of mixing small uneviscerated fish with high salt concentration and storing the mixture in sealed vessels at ambient temperatures or underground for a period of 6~18 months. Long fermentation period for manufacturing fish sauce results in waste and high labor

costs. Because most of microorganisms except for some halophiles can not grow up very well in high salt conditions, it usually takes a long fermentation period to manufacture fish sauce. Therefore, there has been much interest in accelerating the fish sauce processings to reduce production cost by shortening the digestion or fermentation periods. The studies of shortening fermentation periods were carried out by increasing temperature and adding accelerating agents such as enzymes, starter, and fish intestines, etc.

Various fermentation enhancers such as koji, fish intestines, and enzyme have been used for accelerating the fermentation of fish sauce. Among them, koji is most popular accelerating agent and has been used for manufacturing anchovy paste (Cha et al., 1994), horse mackerel sauce (Chae et al., 1989), Alaska pollack scrap sauce (Kim, 1998), sardine sauce (Lee et al., 1988), and anchovy sauce (Lee et al., 1989). Even though koji is usually used as fermentation enhancer for soy and fish sauce, it has some problems ; low activity in high salt and low acid conditions, need to culture microorganism, contaminations, etc. Furthermore, bacteria or their enzymes are only of minor importance during the digestion because of the inhibitory effect of the high salt concentration (Orejana and Liston, 1981). It appears, however, that bacteria play a role in forming the distinct flavor and aroma that, in turn, determine the quality of the fish sauce (Beddows, 1980).

Recently, some researchers have been looking for natural fermentation enhancers such as *squid viscera* (Kim, 1999) and *squid liver* (Yamazaki et al., 1992). But, fish sauce with accelerating agents showed lower quality such as flavors and tastes than naturally fermented fish sauce. Fish sauce manufactured with accelerating agents resulted in more strong fish odor and bitter tastes than naturally fermented fish sauce (Choi et al., 1999). This difference between fish sauce with/without acceleration agents might be come from the different kinds of peptides produced by different hydrolysis of fish proteins (Choi et al., 1999). Therefore, in order to solve these problems and shorten the fermentation periods of fish sauce, an alternative processing should be necessary.

Enzymes have been used as processing aids in the manufacture of food products to improve their quality, solubility, and stability for centuries (Whitaker, 1994). About 50% of the enzymes used as industrial processing aids are protein hydrolases which have been used in a number of industrial applications including laundry detergents, feed, leather treatment, silk degumming, cheese making, chill proofing, meat tenderizing,

fermented sauces, and the production of pharmaceuticals (Maugh, 1984). Therefore, Many types of proteases (acid, neutral, alkaline) have been studied in the food industry. Acid protease are a well known group of proteolytic enzymes that play an important role in the food processing industry (Ward 1983). There are many reports to use enzymes for shortening the fermentation period of fish sauce and improve its quality. Choi et al. (1999) manufactured fish sauce accelerated by various proteases. Kim (1999) used enzyme to make fish hydrolysate by enzymes for manufacturing fish sauce. Orejana and Liston (1981) manufactured *patis* (a fish sauce, Thailand) accelerated by trypsin. But these reports were not studied the salt-tolerant acid protease.

High activity proteases were purified from soy sauce halophiles, such as *Bacillus subtilis* CCKS-118 (Choi et al., 1996a), *Bacillus subtilis* CCKS-111 (Choi et al. 1996b), *Bacillus sp.* (Choi et al., 1997), *Halobacterium sp.* (An et al., 1990), *Halomonas sp.* ES 10 (Kim et al., 1991), and *Aspergillus sp. FC-10* (Su et al., 2001). Kamekura and Onishi (1974) reported that optimal NaCl concentration of *Bacillus sp.* protease was 0.5M NaCl. But there is no report to get a strong salt-tolerant acid protease from fish sauce microorganisms survived in high salt concentration ($\geq 25\%$). The objective of this study was to get a salt-tolerant acid protease from naturally fermented fish sauce. Therefore, strong proteolytic bacteria from anchovy sauce with 26% NaCl fermented at $15\pm 3^\circ\text{C}$ for 3 years was isolated and its protease was studied in this paper.

2. Materials and Methods

Enzyme preparation Anchovy sauces fermented at $15\pm 3^\circ\text{C}$ for 1, 3, and 5 years, respectively, were obtained from Poong-mi Food Company (Sokcho, Kangwondo, Korea). The strongest proteolytic bacterium was isolated from anchovy sauce fermented at $15\pm 3^\circ\text{C}$ for 3 years. Medium for the isolation of proteolytic bacteria from anchovy sauce was MRS agar with 2% skim milk. After inoculating 0.1 mL of anchovy sauce, this medium was incubated at 27.5°C for 48 hrs. The highest transparent colony was isolated, identified by genetic mapping method (Moyer et al., 1994; Wise et al., 1997), and inoculated in MRS liquid media with 10% NaCl. Five hundred mL of medium in a 1 liter wide-mouth culture flask was inoculated with 10mL (3.3×10^6 CFU/mL) aqueous *Bacillus subtilis* JM-3 suspension prepared from an 3 day old (37°C) MRS liquid

media. Culture was incubated at 37°C for 8 days in a shaking incubator at 150 rpm.

Protease purification. Culture media from individual shake flasks were filtered (Whatman No. 42 paper), combined to a volume of 2,000 mL, and then centrifuged at 12,000×g for 15 min. The supernatant was precipitated by increasing ammonium sulfate concentration by 20%. The precipitate in 40~60% ammonium sulfate fraction was dialyzed (10-kDa cutoff membrane) against 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.5) at 4°C overnight. The fraction was applied to a DEAE-sephadex column (2.6 × 30.0 cm) equilibrated with the same buffer. Proteases were eluted from the column by application of a 20 mM sodium acetate-buffered (pH 5.5) linear (0 to 1 M) NaCl gradient at 1 mL/min. Fractions containing greater than 50% of maximal peak activity were pooled and dialyzed against 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5. Pooled fraction was concentrated by ultrafiltration (10-kDa cutoff membrane, Amicon Co., Beverly, Maine) to 35 mL and then chromatographed on a Sephadex G 75 (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo) gel filtration column (2.6 × 90.0 cm) equilibrated with 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 at 0.1 mL/min. Fractions containing greater than 50% of maximal measured activity were pooled and concentrated to 50 mL. Enzyme was purified to homogeneity based on SDS-PAGE.

Enzyme assay. Protease activity was assayed with azocasein (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) at 25°C in 20 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, as described by Ninojor et al. (1985). The absorbance at 345 nm was determined and the equilibrated amount of tyrosine was calculated from the tyrosine standard curve. One unit of the enzyme activity is defined as the amount of tyrosine hydrolyzed per min (Fig. 1). Casein activity was determined by the modified method of Iwata et al (1986), and its activity was expressed as the absorbance at 280 nm. N-CBZ-Phe-ARG-7 amino-4-methylcoumarin (Z-Phe-Arg-NMec) and N_α-CBZ-Phe-ARG-7 amino-4-methylcoumarin (Z-Arg-Arg-NMec) activities were determined by the method of Barrett and Kirschke (1981). The assay mixture was composed of 1.25 mL of assay buffer, 0.25 mL of 1 mM Z-Phe-Arg-NMec solution, and 50 μl of enzyme solution.

Fluorescence intensity was measured by excitation at 375 nm and emission at 460 nm on a fluorometer (RF-5301, Shimadzu, Tokyo, Japan). The amount of free aminomethyl-coumarin (AMC) was determined from a standard curve. Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) and *p*-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) activities were determined by the method of Erlanger et al. (1961) and their activities were expressed as the absorbance at 256 and 247 nm, respectively. Relative activity is defined as the amount of hydrolyzed substrate per the amount of substrate hydrolyzed by 1 unit of trypsin.

Protein determination. Protein concentrations were determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as the calibration standard. The relative protein contents of chromatography fractions were estimated by absorbance at 280 nm.

Gel electrophoresis. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) was conducted for the determination of protein purity and molecular weight. A running gel (T 12%) was prepared with distilled water, 1.5 M Tris-HCl (Bio-Rad, California, USA) (pH 8.8) (25% v/v), SDS (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) (0.1% w/v), acrylamide (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) (12% w/v), N,N'-methylenebis acrylamide (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) (0.32% w/v), ammonium persulfate (Sigma Chemical Co. St. Louis. Mo.) (0.05% v/v) and N,N,N',N'-tetramethylene-ethylene diamine (TEMED) (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) (0.05% v/v). A stacking gel (T 4%) was prepared from distilled water, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) (25% v/v), SDS (0.1% w/v), acrylamide (4% w/v), N,N'-methylene bisacrylamide (0.1% w/v), ammonium persulfate (0.05% v/v) and N,N,N',N'-tetramethylene-ethylene diamine (TEMED) (0.1% v/v). Proteins were diluted (1:4) with sample buffer (0.065 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 10% glycerol, 1% SDS, 0.005% bromophenol blue, and 1% 2-mercaptoethanol) and denatured by heating at 100°C for 4 min. Proteins were then loaded onto 1 mm thick gel and run in a buffer of 0.6% Tris, 2.9% glycine, and 0.1% SDS, pH 8.3 at the current of 120 V. Following electrophoresis, gels were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue G-250 (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) in 40% ethanol and 10% acetic acid, and then

destained in 40% ethanol and 10% acetic acid. Molecular marker (MW-SDS-70) (Sigma Chemical Co., St. Louis. MO) for SDS-PAGE consisted of bovine serum albumin (66 kDa), chicken egg albumin (45 kDa), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen treated with PMSF (24 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), and α -lactalbumin (14.2 kDa).

Kinetic parameters. K_m and V_{max} values for *Bacillus subtilis* JM-3 protease acting on azocasein were calculated by linear regression analysis of Lineweaver-Burk, double-reciprocal, plots of initial velocity data obtained under the conditions described above.

Effect of temperature on enzyme activity. The effect of temperature on protease activity was determined by the method of Ninojor et al. (1985). After adding 250 μl of protease to 500 μl of 1% azocasein solution which was equilibrated to each temperatures (10~80°C) for 30 min, protease activity was determined at 345 nm.

Temperature stability. Temperature stability of protease was determined by incubating protease at each temperatures (10~80°C) for 30 min in advance and then protease activity was determined according to azocasein method (Ninojor et al., 1985).

Effect of pH on enzyme activity. The effect of pH on protease activity was determined by the method of Ninojor et al. (1985). After adding 250 μl of protease to 500 μl of 1% azocasein solution which was equilibrated to each pH (5.0~8.0) for 30 min, protease activity was determined at 345 nm.

pH stability. pH stability of protease was determined by incubating protease at each pH 5.0~8.0 for 30 min in advance and then protease activity was determined according to azocasein method (Ninojor et al., 1985).

Effect of NaCl concentration on enzyme activity. The effect of NaCl concentration on enzyme activity was determined by adding 250 μl of protease to 500 μl of 1 % azocasein with 5~30 % NaCl.

Effects of inhibitors on enzyme activity. The effect of inhibitor on enzyme activity was determined by mixing 250 μl of enzyme solution to 250 μl of each 1 mM inhibitors; *p*-toluene-sulfonyl-L-lysine chloromethylketone (TLCK), tosyl phenyl alanine chloromethyl ketone (TPCK), NEM, DTT, and 2-mercaptoethanol. This enzyme-inhibitor mixtures were incubated at 37 °C for 20 min. Relative activity was determined at 345 nm by adding 500 μl of this mixture to 1,000 μl of 1% azocasein solution and then by incubating at 25 °C for 30 min.

3. Results and Discussion

Purification of *Bacillus subtilis* JM-3 protease

The focus-enzyme for this study was the predominant cell-free salt-tolerant acid protease in NaCl-supplemented cultures. Halophile isolated from anchovy sauce was identified as *Bacillus subtilis* species by genetic mapping method (Fig. 2) and named as *Bacillus subtilis* JM-3. Protease activity was the highest in 40~60% ammonium sulfate fraction. There were three peaks on ion exchange chromatography pattern in which peak I had the stronger activity than others and eluted between 0.65~0.7 M NaCl gradient (Fig. 3). *Bacillus subtilis* CCKS-111 protease from traditional soysauce in Korea showed three peaks on DEAE chromatography pattern in which peak I was the higher activity than the others (Choi et al., 1997), which was the same to above result. But *Bacillus subtilis* LY-353 protease from fermented seafoods (anchovy paste and shrimp paste, etc.) showed two peaks on DEAE chromatography pattern in which the strongest protease (peak I) eluted between 0.16~0.19 M NaCl gradient (Lee et al., 1991), which was different from in this study. Enzyme is usually eluted as one peak on gel filtration chromatography in this study (Fig. 4), but *Bacillus subtilis* CCKS-111 protease from soysauce showed 2 peaks on gel filtration chromatography, which was unusual case (Choi et al., 1997). Purification fold and yield of *Bacillus subtilis* JM-3 protease were shown in Table 1. Purification fold and yield after ion exchange chromatography step were 16.8 and 6.17%, respectively, whereas those after gel filtration chromatography, 35.56 and 5.33%. Purification folds and yields were diverse depend on a kinds of Bacteria; 50.6 and 0.8% in *Bacillus subtilis* CCKS-111 protease of soysauce (Choi et al., 1997),

7.33 and 6.5% *Bacillus subtilis* LY-353 protease of fermented seafoods (Lee et al., 1991), 14.0 and 14% in *Halobacterium* sp. of salted seaweed (An et al., 1990), and 37.7 and 11.0% in *Neosatorya fischeri* var. *spinosa* IBT 4872 (Wu et al., 1998). *Bacillus subtilis* CCKS-111 protease from soysauce (Choi et al., 1997) showed lower specific activity than our study. Therefore, purification fold and yield of protease might be different depend on a kinds of microorganism, culture medium, and culture conditions, etc. Purification and yield of *Bacillus subtilis* JM-3 is considered to be a little low because MRS medium with 10% salt concentration contained glucose for microbial nutrient. Therefore, in order to get the maximal yield and activity of protease, selective medium for proteolytic bacteria need to be used.

Molecular weight of *Bacillus subtilis* JM-3 protease

Enzyme was purified to the homogeneity based on SDS-PAGE (Fig. 5). Therefore, there was no necessity to carry out further purification step. The molecular weight for *Bacillus subtilis* JM-3 protease was 14,600 daltons on SDS-PAGE (Fig. 5). The molecular weight for *Bacillus subtilis* CCKS-111 protease was 28 kDa (Choi et al., 1997).

Effect of temperature on *Bacillus subtilis* JM-3 protease activity

Protease activity increased from 40°C up to 60°C, but after then decreased significantly. The optimal temperature of *Bacillus subtilis* JM-3 for the hydrolysis of azocasein was 60°C (Fig. 6). Based on the results of *Bacillus subtilis* LY-353 protease from fermented seafoods (anchovy paste and shrimp paste, etc) in Korea (Lee et al., 1999), and *Bacillus subtilis* CCKS-111 protease traditional soy sauce in Korea (Choi et al., 1996), the optimal temperatures for all these proteases were 55°C which was almost same temperature to this study.

Optimal temperature of *Neosatorya fischeri* var. *spinosa* IBT 4872 acid protease (Wu et al., 1998) and *Halophilic Halobacterium* sp. proteases from salted seaweed (An et al., 1990) were 35 and 50°C, respectively, which were a little lower than that of *Bacillus subtilis* JM-3 protease in this study.

Temperature stability of *Bacillus subtilis* JM-3 protease

Temperature stability of *Bacillus subtilis* protease was shown in Fig. 7. *Bacillus subtilis* JM-3 protease was stable at 10~30°C.

The temperature for optimal stability of *Bacillus subtilis* JM-3 protease was 30°C. This enzyme was unstable above 40°C. Its relative activity compare with at 30°C was approximately 50% at 40°C. Temperature for optimal stability *Bacillus subtilis* JM-3 protease was much lower than optimal activity temperature. This discrepancy might be attributed to protective effects of the substrate at high activity temperature (Jiang et al., 1991). The temperature for optimal stability of *Bacillus subtilis* JM-3 protease was similar to that of *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118 protease from traditional soy sauce in Korea (Choi et al., 1996).

But, optimal stability temperature in this study was lower than those of *Halobacterium* sp. protease from salted-seaweed (An et al., 1990) and *Bacillus subtilis* LY-353 protease from fermented seafoods (anchovy paste and shrimp paste, etc.).

Effect of pH on *Bacillus subtilis* JM-3 protease activity

Relative activity increased up to pH 5.5 and then decreased significantly. The optimal pH for the hydrolysis of azocasein was 5.5 (Fig. 8). *Bacillus subtilis* JM-3 protease had high proteolytic activity at weak acidic conditions (pH 5.0~5.5). Therefore, *Bacillus subtilis* JM-3 protease was a acid protease. The optimal pH of *Bacillus subtilis protease* JM-3 was similar to that of Pacific whiting protease (Thomas et al., 1994).

But, optimum pH of this enzyme was lower than those of trypsin-like proteases derived from shrimp, pH 8.0 (Jiang et al., 1991), hepatopancreas protease from crawfish, pH 8.0 (Jeoug et al., 2000), *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118 protease, pH 9.0 (Choi et al., 1996), and Atlantic menhaden muscle, pH 7.0 (Choi et al., 1999).

The ideal substrate for *Bacillus subtilis* JM-3protease. Therefore, which was a specific substrate commonly used to assay trypsin-like enzymes (Doke et al., 1987). Relative activity of azocasein and casein were 100 and 98%, respectively. Protease of *Bacillus subtilis* JM-3 showed low activity on

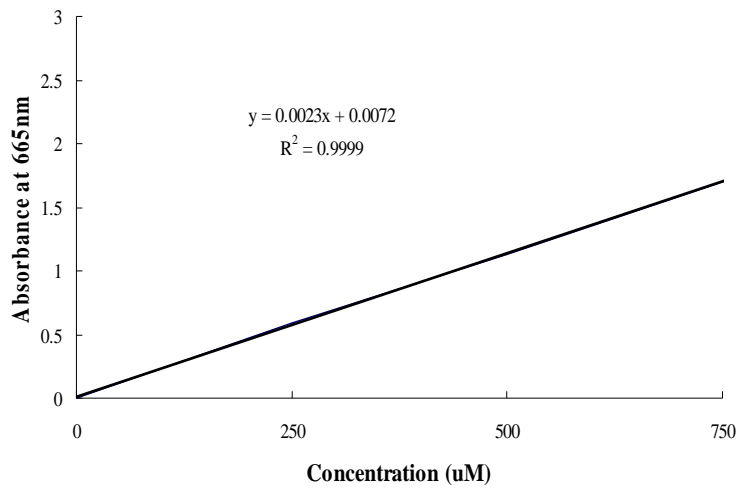


Fig. 1. Calibration on curve for tyrosine standard solution.

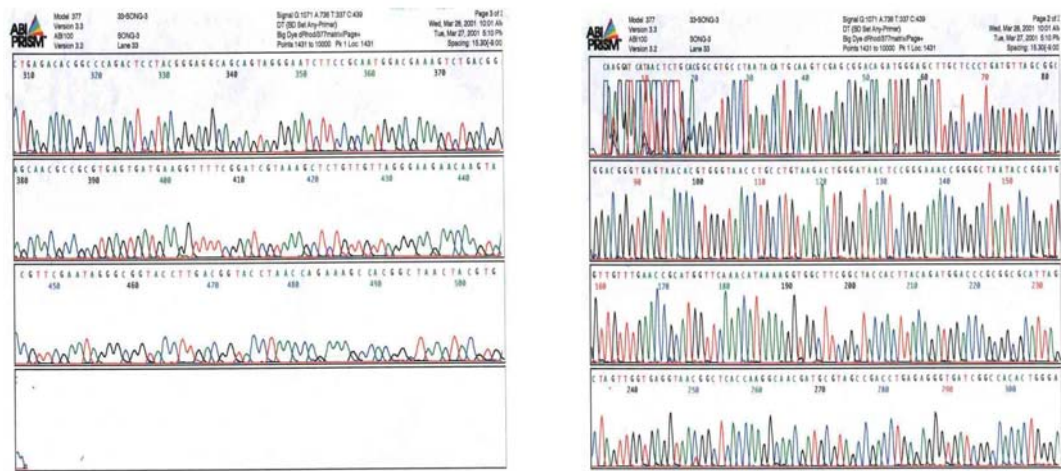


Fig. 2. 16S rRNA sequence of *Bacillus* sp. JM3.

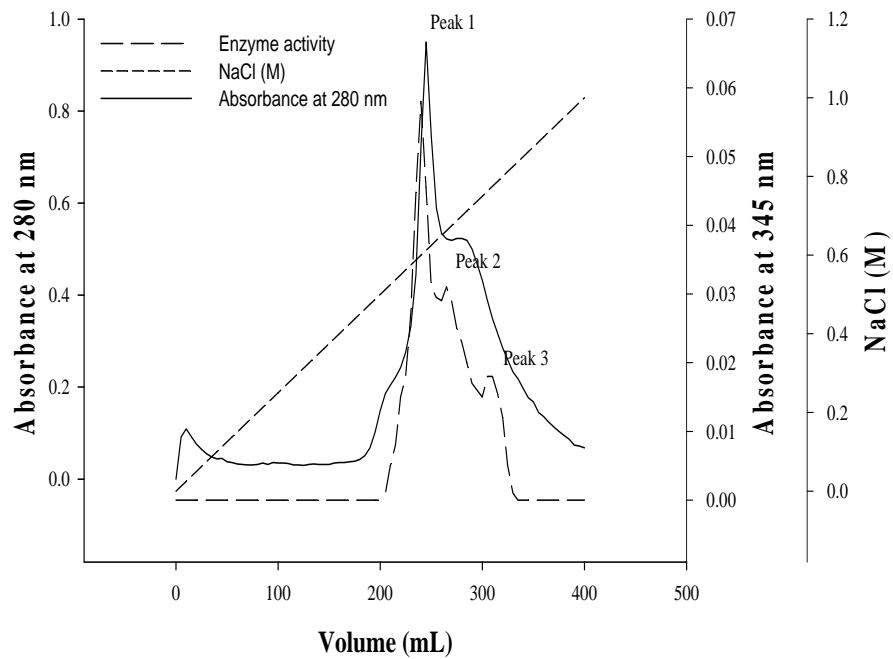


Fig. 3. Ion exchange chromatography pattern of *Bacillus subtilis* JM-3 proteases.

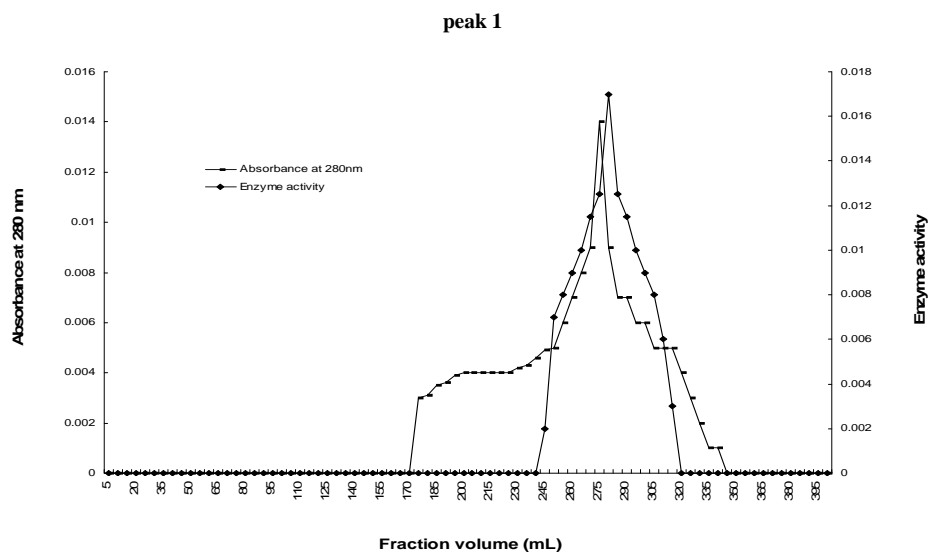


Fig. 4. Gel filtration chromatography pattern of *Bacillus subtilis* JM-3 protease.

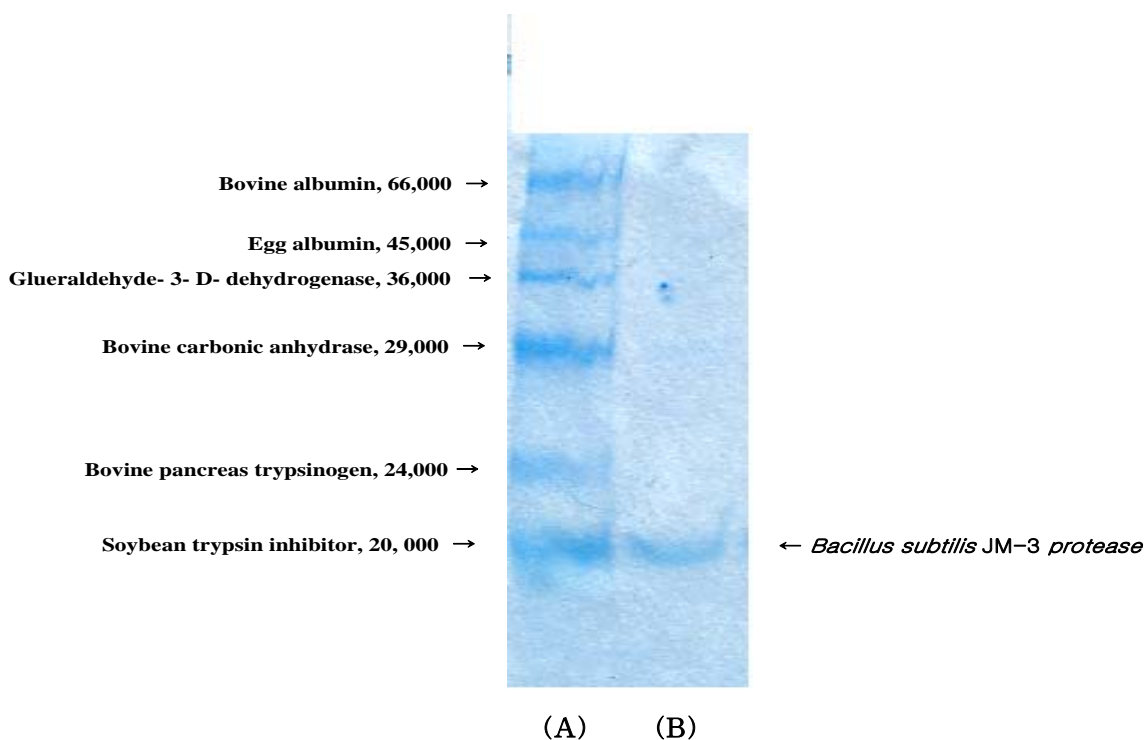


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of *Bacillus subtilis* JM-3 protease.

(A): Molecular marker; (B): *Bacillus subtilis* JM-3 protease.

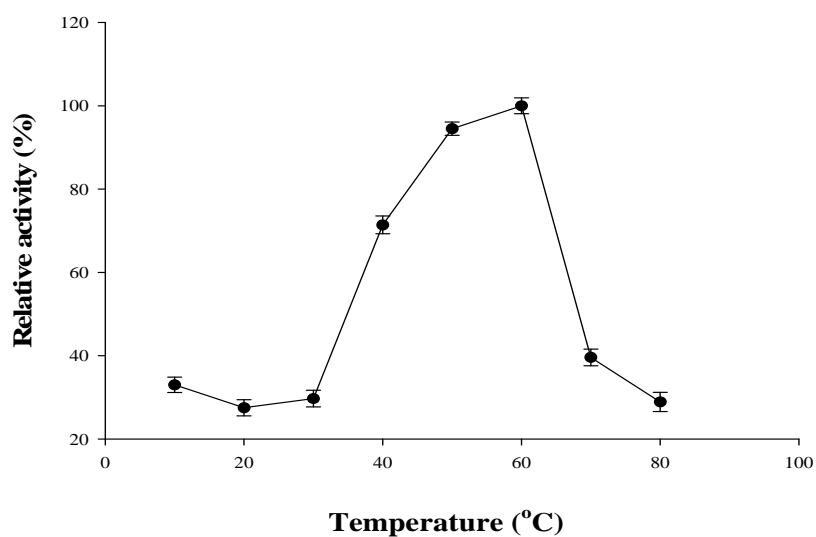


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of *Bacillus subtilis* JM-3 protease.

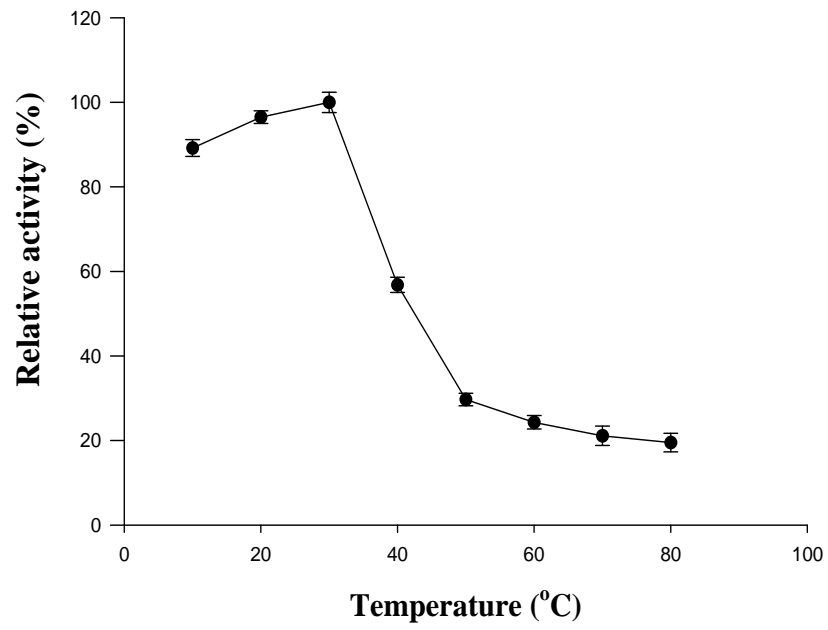


Fig. 7. Temperature stability of *Bacillus subtilis* JM-3 protease.

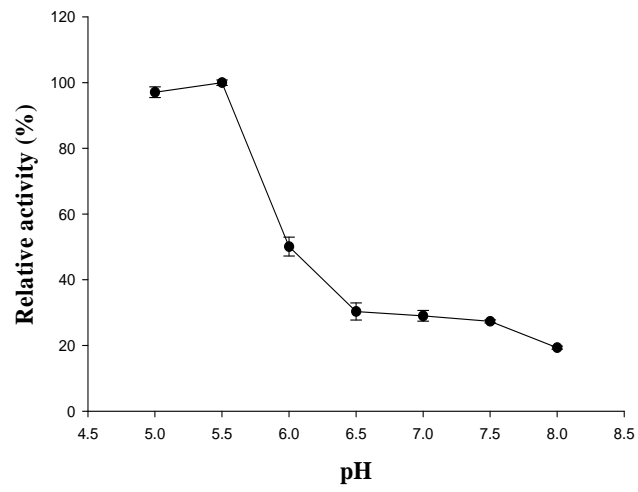


Fig. 8. Effect of pH on the activity of *Bacillus subtilis* JM-3 protease.

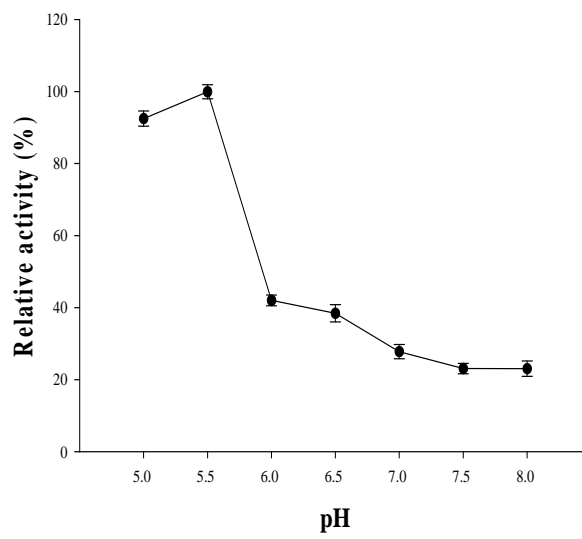


Fig. 9. pH stability of *Bacillus subtilis* JM-3 protease

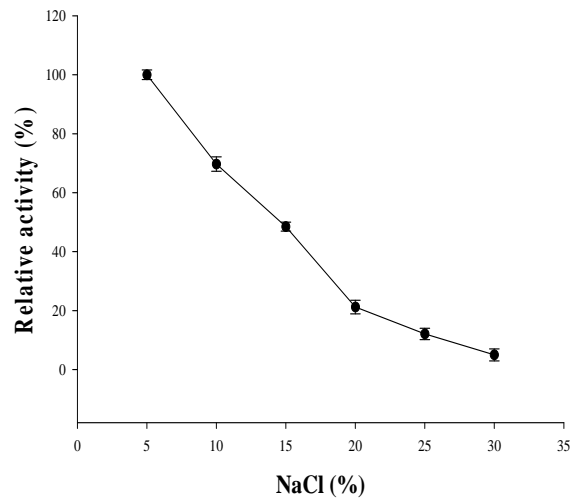


Fig. 10. Effect of NaCl concentration on the activity of *Bacillus subtilis* JM-3 protease

Z-Phe-Arg-NMec. Z-Phe-Arg-NMec and azocasein are a good substrate for cathepsin B and L, cysteine proteases (Barrett and Kirschke, 1981), but some trypsin-like serine proteinases also can hydrolyze them (Barrett and Kirschke, 1981; Kinoshita et al., 1990; Doke et al., 1987; Thomas et al., 1994).

Protease did not hydrolyze TAME and BTEE, which were model substrates for trypsin and chymotrypsin-like proteases, respectively (Choi et al., 1999). These results suggest that *Bacillus subtilis* JM-3 protease are serine protease like trypsin type.

Effect of inhibitor on *Bacillus subtilis* JM-3 protease

The effect of several known proteinase inhibitors on *Bacillus subtilis* JM-3 protease was shown in Table 3. *Bacillus subtilis* JM-3 protease was completely inhibited by 1 mM TLCK, specific inhibitor for serine type protease (Salvesen and Nagase., 1989). Also, *Bacillus subtilis* JM-3 protease was inhibited slightly by 1 mM DTT, specific inhibitor for trypsin-like protease, followed by in order of 2-Mercaptoethanol, specific for trypsin-like protease and TPCK, chymotrypsin-like protease, respectively. *Bacillus subtilis* JM-3 was not inhibited by 1 mM NEM, specific inhibitor for cystein protease (Doke et al., 1987). Atlantic menhaden protease, serine type protease, was inhibited by 1 mM TLCK (Choi et al., 1999). The activity of four anionic trypsins from crayfish hepatopancreas were inhibited about 50 % by 1 mM DTT (Kim et al., 1992). Wolz et al. (1990) reported that sulfhydryl reagents had strong inhibitory effects on *Astacus* protease in order of DTT, 2-mercaptoethanol, and glutathione. Protease of The protease from Atlantic menhaden was inhibited by 5 mM 2-Mercaptoethanol (Choi et al., 1999). From the substrate specificity and inhibitor studies, *Bacillus subtilis* JM-3 protease are serine protease like trypsin type. Trypsin has been reported to have a molecular weight between 20 and 25 kDa (Keil. 1971). The molecular weights for *Bacillus subtilis* JM-3 protease was lower than those reported for trypsin-like proteases; 24 kDa of white shrimp (*Penaeus setiferus*) (Gates and Travis. 1969), 20.5 kDa of rock crab (Brun and Wojtowicz., 1976), 24 kDa of Japanese spiny lobster (Galgani and Nagayama., 1987a), and 24 kDa of crayfish (DeVillez and Johnson., 1968). There are other reports that trypsin had higher molecular weight: 33.5 kDa of the midget gland

Table 3. Effect of substrate on the activity of *Bacillus subtilis* JM-3 protease

Substrate	Concentration	Relative activity (%)[*]
TAME	1mM	0.00
BTEE	1mM	0.00
Azocasein	1%	100.00
Casein	1%	98.07
Z-Phe-Arg-NMec	1mM	52.01
Z-Phe-Arg-NMec	1mM	0.00

* Relative activity is defined as the amount of hydrolyzed substrate per the amount of substrate hydrolyzed by 1 unit of trypsin.

Table 4. Effect of inhibitor on the activity of *Bacillus subtilis* JM-3 protease.

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)[*]
TLCK	1	0.00
TPCK	1	69.95
NEM	1	100.00
DTT	1	38.56
2-Mercaptoethanol	1	52.32

* Relative activity is defined as the amount of hydrolyzed substrate per the amount of substrate hydrolyzed by 1 unit of trypsin.

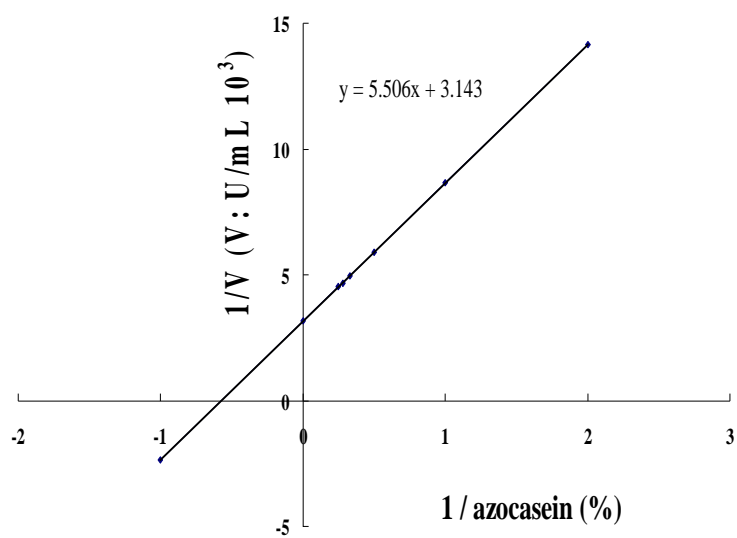


Fig. 11. Lineweaver-Burk plot of *Bacillus subtilis* JM-3 protease from anchovy sauce.

of crab, *Callinectes sapidus* (Dendinger and O'Connor., 1990), 30–31 kDa of Antarctic krill (Osnes and Mohr., 1985), and 28~30 kDa of krill (Kimoto et al., 1983).

Kinetic parameters.

The K_m and V_{max} values of *Bacillus subtilis* JM-3 protease were calculated from Lineweaver-Burk plot (Fig. 11). The K_m and V_{max} values were 1.75 mg/mL and 318 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$, respectively. The K_m and V_{max} values of *Bacillus subtilis globigii* CCKS-118 protease were $1.242 \times 10^{-4}\text{M}$ and 25.99 $\mu\text{g}/\text{min}$, respectively (Choi et al., 1996). The K_m and V_{max} values of *Neosatorya fischeri var. spinosa* IBT 4872 acid protease were 0.44% and 0.02 mmol^{-1} (Wu et al., 1998). K_m and V_{max} values of trypsin purified from dark flesh fish were 49.28~98.30 μM and 1.85~3.57 unit/min, respectively (Cho et al., 1996). V_{max}/K_m value, the physiological efficiency value, of *Bacillus subtilis* JM-3 protease was 181.6 $\mu\text{M} \cdot \text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. The V_{max}/K_m value of the four crawfish proteases were 243.5, 432.6, 309.6, and 387.9 $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ (Jeoung et al., 2000).

4. Conclusions

Salt and acid tolerant bacteria, *Bacillus subtilis* JM3 was isolated from naturally fermented anchovy sauce at $15 \pm 3^\circ\text{C}$ for 3 years. *B. subtilis* JM3 was cultured in MRS media with 10% NaCl concentration at 37°C for 8 days in a shaking incubator at 150 rpm. Protease activity was the highest in 40~60% ammonium sulfate fraction. Protease showed three peaks on ion exchange chromatography patterns and purified further through gel filtration chromatography. Yield of purified protease was 5.33% and its purification ratio was 35.56 folds. Peak I protease showed a single band on SDS-PAGE and its molecular weight was 20,000 Da. K_m and V_{max} values were of *B. subtilis* JM3 were 1.75 mg/mL and 318 unit/min, respectively. Optimal temperature for protease activity was 60°C but optimal stability temperature was 30°C . Optimal pH for protease activity was 5.5. *B. subtilis* JM3 protease was stable at pH 5.0~5.5. Therefore, *B. subtilis* JM3 protease was a acid protease. Relative activity of *B. subtilis* JM3 protease was 69, 21, and 1.3% at 10, 20, and 30% NaCl concentrations, respectively. The best substrate for *B. subtilis* JM3 protease was

azocasein followed by casein. TLCK was the strongest inhibitor followed by DTT, but NEM did not inhibit this enzyme. *B. subtilis* JM3 protease was, therefore, presumed serine protease like trypsin type.

5. References

- An, Y.S., Kim, C.J. and Choi, S.Y. 1990. Characteristic of protease from *Halobacterium* sp. J. Korean Agri Chem. Soc. 33(4), 337~342.
- Barrett, A.J. and Kirschke, H. 1981. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. In *Methods in Enzymology*, 80., 535~561
- Beddows, C.G. and Ardeshir, A.G. 1979. The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture. J. Food Technol., 14, 603~612
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248~254
- Cha, Y., Kim, E., and Joo, D. 1994. Studies on the processing of accelerated low salt-fermented anchovy paste by adding koji. J. Korean Soc. Food Nutr. 23, 348.
- Chae, S.K., Itoh, H. and Nikkuni, S. 1989. Effects of soy sauce koji and commercial proteolytic enzyme on the acceleration of fish sauce production (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*,21(5), 639~648
- Choi, C., Kim, S., Im, S.I., Lee, H.D., Lee, S.H., Son, J.H., Choi, H.J. and Kim Y. H. 1997. Purification and isolation of *Bacillus subtilis* CCKS-111 protease from traditional soy sauce in Korean. *Argiculture and Biotechnology.* 40(3), 178~183.
- Choi, C., Kim, S., Im, S.I., Lee, H.D., Lee, S.H., Son, J.H., Choi, H.J. and Kim Y. H. 1996. Purification and isolation of *Bacillus subtilis* CCKS-118 protease from traditional soysauce in Korean. *Argiculture and Biotechnology.* 39(3), 460~465.
- Choi, Y.J., Cho, Y.J. and Lanier, T.C. 1999a. Purification and characterization of alkaline proteinase from Atlantic Mahaden muscle. *J. Food Science.* 64(5), 768~771
- Choi, Y.J., Cho, Y.J. and Lanier, T.C. 1999b. Purification and characterization of alkaline proteinase from Atlantic Mahaden muscle. *J. Food Science.* 64(5), 772~775
- Choi, Y.J., Lanier, T.C. and Cho, Y.J. 1999. Purification and characterization of proteinase from Atlantic menhaden muscle. *J. Food Sci.* 64(5), 772~775.

- Choi, Y.J., Lanier, T.C., Lee, H.G. and Cho. Y.J. 1999. Purification and characterization of alkaline proteinase from Atlantic menhaden muscle. *J. Food Sci.* 64(5), 768~771
- Brun, G.L. and Woojtowicz, M.B. 1976. A comparative study of the digestive enzymes in the hepatopancreas of Jonah crab (*Cancer borealis*) and rock crab (*Cancer irroratus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 53B, 387-391.
- Deviliez, E.J. and Johnson, D.R. 1968. Determination of the molecular weight of crustacean trypsin by gel filtration. *Comp. Biochem. Physiol.* 24, 661~664.
- Dendinger, J.E. and O'Connor, K.L. 1990. Purification and characterization of a trypsin-like enzyme from the midgut gland of the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B, 525~530. Keil, B. 1971. Trypsin. In the enzymes, (P.D. Boyer, ed) vol. iii, 249~275.
- Doke, S.N., Ninjoo, V. 1987. Characteristics of an alkaline proteinase and exopeptidase from shrimp muscle. *J. Food Sci.* 52(5), 1203~1208
- Jeong, Y.H., Wei, C.I., Preston, J.F. and Marshall, M.R. 2000. Purification and characterization of proteases from hepatopancreas of crawfish. *J. Food Biochem.* 24, 311~332.
- Gates, B.J. and Travis, J. 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. *Biochem.* 8, 4483~4489.
- Galgani, F. and Nagayama, G. 1987a. Digestive proteinases in the Japanese lobster *Panulirus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 889~893.
- Heu, M.S. 1993. Purification and characterization of the proteolytic enzymes participating in autolysis of anchovy, *Engraulis japonica*. Ph. D. thesis, National Fisheries Univ. of Pusan, Pusan, Korea.
- Jeong, Y.H., Wei, C.I., Preston, J.F., and Marshall, M.R. 2000. Purification and characteristic of proteases from hepatopancreas of crawfish. *J. Food Biochemistry.* 24. 311~322.
- Jiang, S.T., Moody, M.W. and Chen, H.S. 1991. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). *J. Food Sci.* 56(2), 322~326.
- Kimoto, K., Kusama, S. and Murakami, K. 1983. Purification and characterization of serine protease from *Euphausia superba*. *Agric. Biol. Chem.* 47, 529~534.
- Kinoshita, M., Toyohara, H. and Shimizu, Y. 1990. Purification and properties of

- a novel latent proteinase showing myosin heavy chain-degrading activity from threadfin bream muscle. *J. Biochem.* 107, 587~591.
- Kim, S.M. 1999. Accelerating effect of squid viscera on the fermentation of Alaska pollack scrap sauce. *J. Food sci. Nutr.* 4(2), 103.
- Kim, S.M. 1996. The effect of sulfite salts on the shelf-life of low-salted Myungranjeot (soused roe of Alaska pollack). *Korean J. Food Sci. Technol.* 28, 940
- Kim, S.M. 1999. Manufacture of fish hydrolyzate by enzyme. *Korean. J. Food Sci. Technol.* 31(3), 727~733
- Kim, S.M. 1998. The effect of koji and sucrose on the manufacture of Alaska pollack scrap sauce. *Food sci. Biotechnol.* 7(4) 242~247.
- Kim, H.R., Kim, D.S., Ahn, C.B. and Pyeun, J.H. 1996. Purification and characterization of trypsins affecting of the autolysis of shrimp, *Penaeus japonicus*. *J. Korean Fish. Soc.* 29(6), 797~804
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680~682.
- Lee, B.W. Yoo, Y.S. and Choi, C.U. 1991. Purification and properties of protease from *Bacillus subtilis* LY-353. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20(1), 21~26
- Lee, E., Jee, S., Ahn, C. and Kim, J. 1988. Studies on the processing conditions and the taste compounds of the sardine sauce extracts (in Korean). *Bull. Korean Fish Soc.*, 21(1), 57~66
- Lee, E., Kim, J, Ahn, C., Lee, K., Kim, M., Chung, B. and Park, H. 1989a. Processing conditions of accrelated anchovy sauce extracts (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 18(2), 167~173
- Lee, B.W., You, Y.S., Im, G.H. and Choi, C.U. 1991. Purification and Properties of protease from *Bacillus subtilis* LY-353. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20(1), 21~26.
- Lee, D.S., Heu, M.S., Kim, D.S. and Pyeun, J.H. 1996. Some properties of the crude proteases from fish for application in seafood fermentation industry. *J. Korean Fish. Soc.* 29, 309~319
- Makinodan, Y. and Ikeda, S. 1969. Studies on fish muscle protease II. Purification and properties of a protease active in slightly alkaline pH range. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 35. 749~757.
- Maugh, T.H. 1984. A renewed interest in immobilized enzymes. *Science* 223, 474~476.

- Muramatsu, T. and Morita, T. 1981. Anionic trypsin-like enzymes from the crab *Eriocheir japonicus* de Haan active in more acidic media. *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, 527~533.
- Ninojor, V. and Srivastava, P.N. 1985. Partial purification and characterization of alkaline proteinases from the rabbit testis. *Gamete Res.* 11, 69.
- Osnes, K.K. and Mohr, V. 1985. On the purification and characterization of three anionic, serine-type peptide hydrolases from antarctic krill, *Euphausia superba*. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B, 607~619.
- Pyeun, J.H., Heu, M.S., Cho, D.M. and Kim, H.R. 1995. Proteolytic properties of cathepsin L, chymotrypsin, and trypsin from the muscle and viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. *J. Korean Fish. Soc.* 28(5), 557~568.
- Pollock, M.R. 1965. Purification and properties of penicillases from two strains of *Bacillus* ickenforms. A chemical, physico-chemical and physiological comparison. *Biochem. J.* 94, 666~675.
- Salvesen, G. and Nagase, H. 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. In proteolytic enzymes. In proteolytic enzymes. A Practical Approach. R. J. Beyond and J. S. Bond(Ed.), 83~103.
- Su, N.W. and Lee, M.H. 2001. Purification and characterization of a novel salt-tolerant protease from *Aspergillus* sp. FC-10, a soy sauce koji mold. *J. Industrial Microbiology and Biotechnology.* 26(4), 253~258.
- Thomas, A.S., Morrissey, M., Peters, M. and An, H.J. 1994. Purification and characterization of Pacific whiting protease. *J. Agricultural and Food chemistry.* 42, 2421~2427.
- Ward, O.P. 1983. Proteinases. In microbial enzymes and biotechnology ed. Fogarty, W.M. pp. 251~305. New York. Applied Science Publishers.
- Wasson, D. 1992. Fish muscle proteases and heat-induced myofibrillar degradation. *J. aquat. Food prod. Technol.* 1(2), 23~41
- Webber, K. and Osborn, M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406~4412.
- Wolz, R.L, C. Zeggaf, W. Stocker and R. Zwillig. 1990. Thiol containing compounds and amino acid hydroxamates as reversible synthetic inhibitors of *Astacus* protease. *Arch. Biochem. Biophys.*, 281, 275~282.

- Wu, L.C and Hang, Y.D. 1998. Purification and characterization of acid proteinase from *Neosartorya fischeri* var. *spinosa* IBT 4872. *Letters in Applied Microbiology*. 27, 71~75.
- Yamazaki, K., Kawai, Y., Inoue, N. and Shinano, H. 1992. Effect of squid liver on microflora of "Ika-Shiokara". *Nippon suisan Gakkaishi*. 58, 2373
- Zwilling R., Pfleiderer, G., Sonneborn, N.H., Kraft, V. and Tucky, I. 1969. The evolution of endopeptidases-V. Common and different traits of bovine and crayfish trypsin. *Comp. Biochem. Physiol.* 28, 1275~1287.

제 4 절 오징어 젓갈 유래 *Bacillus megaterium* KLP-98 단백질분해효소의 정제 및 특성

1. 서론

젓갈류는 어패류의 근육, 내장 또는 생식기 등에 일정량의 식염을 첨가하여 부패균의 번식을 억제하고 자가 소화효소 또는 미생물의 효소작용에 의해 육질을 분해시킨 우리나라 전통의 수산 발효식품으로서 제조 공정이 단순하고 특별한 제조 장치도 필요하지 않으며, 숙성 후의 독특한 감칠맛을 가지고 있어 옛부터 오늘에 이르기까지 밑반찬이나 김치의 조미소재로 많이 이용되고 있다. 명태의 알을 이용한 명란젓과 내장을 이용한 창란젓, 오징어를 이용한 오징어 젓갈 등 많은 종류의 젓갈이 생산되어지고 있다. 미생물 및 효소에 의하여 숙성되는 액젓 (어간장)은 25% 염농도에서 호염성 세균을 제외한 일반적인 미생물들은 성장할 수 없게 되어 12~18개월 이상의 오랜 숙성기간을 가진다. 이러한 장기간의 숙성기간은 액젓을 대량 생산하고자하는 산업화에 치명적인 약점이어서 액젓의 숙성기간 단축과 숙성 발효 제제에 관한 연구가 필요하다. 젓갈 및 어간장의 숙성제조에 관한 연구는 많이 이루어졌으며, 미생물, koji 및 효소를 첨가하여 숙성 제조한 연구로는 숙성 정어리 간장 제조 (이 등, 1988), 숙성멸치 어간장 제조 (이 등, 1989a), 숙성 명태 어간장(김 등, 1999), 미생물을 이용한 멸치젓의 숙성발효(차 등, 1994) 및 채 등 (1989)등의 koji와 효소를 첨가한 어간장의 제조, 효소를 첨가한 capelin 어간장 (Raksakulthai et al., 1986), horse mackerel 어간장 (채 등, 1989), Spell check 어간장 (Beddows et al., 1979), herring 어간장 (Chavesul et al., 1993), 효소적 가수분해를 이용한 정어리 어간장 제조 (배 등, 1990a,b,c,d) 등이 있다. 그러나 숙성 발효된 어간장 및 젓갈은 천연 발효된 것에 비하여 품질 (맛 또는 풍미 등)이 낮다고 보고되었다 (최

등, 1999). 즉, 천연 발효와 속성 발효과정 중 어육 단백질이 서로 다른 부위가 가수 분해되어 다른 종류의 펩타이드 및 아미노산이 생성되어 속성 제조 어간장이 천연 발효 어간장보다 비린내가 심하고 쓴맛이 느껴진다고 보고하였다. 이러한 문제점을 보완하기 위하여 속성 발효를 할 수 있는 제조 공정 또는 속성 발효제제의 개발이 필요한 실정이다.

효소는 생명체내 화학반응의 촉매 물질로써, 생명유지를 위해 생명체가 섭취하는 모든 음식물의 소화, 흡수, 영양의 운반 및 신체조직의 형성 모두가 효소의 작용으로 이루어지며 생명현상을 영위하는 에너지의 근원이 된다. 발효제제로 사용되는 효소는 예로부터 양조, 치즈제조, 피혁공업 등 발효 및 각종 기호식품 제조에만 사용되어져 왔으나 근래에 와서 식품, 의약품, 사료, 섬유, 세제, 화장품 공업은 물론 효소를 이용한 공정개선, 품질 향상 등 그 사용범위가 넓어지고 있다 (Maugh, 1984). 이렇게 효소의 수요가 급격한 증가를 나타내면서 미생물에 의한 효소의 생산이 공급의 안정성과 유리한 경제성 때문에 산업적으로 매우 중요한 위치를 차지하게 되었다. 효소는 단백질이기 때문에 무기 촉매와는 달리 온도나 pH(수소이온농도)등 환경 요인에 의하여 기능이 크게 영향을 받는다. 효소는 아무 반응이나 비선택적으로 촉매 하는 것이 아니고, 한가지 효소는 한가지 반응만을, 또는 극히 유사한 몇 가지 반응만을 선택적으로 촉매 하는 기질특이성을 가지고 있으므로 그 기질만큼 종류가 매우 많아서 지금까지 알려진 효소로는 약 2500여종이 넘지만 산업용으로 약 50여종이 이용되어지고 있다. 오늘날 효소로 인하여 식품분야에서 식품공정에 여러 가지 유리한 점이 있으며 최근 이를 이용하려는 연구가 활발히 전개되고 있다. 특히 일반 미생물이 생산하는 효소는 염에 의하여 비교적 쉽게 실활 되는 반면 내염성 또는 호염성 미생물이 생산하는 효소는 일반적으로 내염성으로서, 김 등 (1994)은 효소는 장류 등의 생산 공정에서 잡균의 오염을 줄일 수 있고 장류와 같은 염장 단백질식품의 속성을 촉진시키는 이점이 있다고 보고하였다. 정 등 (2001)은 내염성 효모를 장류의 제조나 공정에 사용함으로써 장류의 고혈압 예방 효과를 더욱 향상시킬 수 있을 것이고 나아가 고부가가치의 기능성 장류 생산에 유용하게 이용될 수 있을 것이라고 보고하였다.

Tsura 등 (1966)은 *Bacillus subtilis*가 생산하는 alkaline protease의 효소 특성에 대하여 보고하였고, 대두 어간장의 호염성 세균이 생산하는 단백질분해효소에 관한 연구로는, *Bacillus subtilis* CCKS-118 protease (최 등, 1996), *Aspergillus sp.* FC-10의 단백질분해 효소에 관한 연구 등이 있다 (Su 등, 2001). 그러나 단백질 분해효소의 정제 및 특성에 관한 연구는 많이 이루어졌으나 효소의 내산성 및 내염성에 관한 연구로는 Ward (1983)의 식품산업에서 acid protease의 특성, 최 등 (1988)의 *Penicillium citrinum* C-29가 생

산하는 acid protease의 생성조건 및 효소학적 성질에 관한 연구, 최 등 (1987)의 *Aspergillus fumigatus* A-12가 생산하는 acid protease의 특성에 관한 연구, 안 등 (1990)의 고도 호염성 *Halobacterium sp.*가 생산하는 protease의 특성, 배 및 송 (1987)의 한국염장 발효식품으로부터 분리한 호염성 세균의 분리·동정 및 염 요구성에 관한 연구, 김 등 (1991)의 *Halomonas sp. ES 10*가 생산하는 alkaline protease의 생산에 관한 연구가 보고되고 있다. *Bacillus megaterium*이 생산하는 단백분해효소에 관한 연구로는 Yoshimoto (1983)등의 *Bacillus megaterium* 유래 Proline iminopeptidase의 정제 및 특성에 관한 연구가 보고되었을뿐, 그 외에는 오 등(1995)의 *Bacillus megaterium*이 생산하는 γ -cyclodextrinase의 정제와 특성에 관한 연구, Ray (2000)의 *Bacillus megaterium*의 betaamylase의 정제와 특성에 관한 연구 등 주로 당분해 효소에 관한 연구가 대부분이다. 따라서, 본 연구에서는 오징어 젓갈에서 내염성 세균을 분리 해내고 내염성 세균이 생산하는 단백분해효소의 정제 및 특성을 연구하였다.

2. 재료 및 방법

가. 균주의 분리 및 동정

오징어 젓갈 (완도 식품, 강릉)을 균주의 분리원으로 사용하였다. 오징어 젓갈에서 분리해낸 단백질분해능이 강한 균은 선택배지 (skim milk 15g, bacto peptone 5g, yeast extract 1g, sodium chloride 100g, bacto agar 15g, distilled water 1L)를 사용하여, 37 °C에서 48 시간 배양하여 균을 동정하였다.

나. 균주 배양 및 효소 정제

선택배지를 사용하여 분리한 균을 20mL skim milk broth 배지에 접종하여 37 °C에서 72 시간동안 시험관에서 배양한 후 배양액 10 mL (1.2×10^7 CFU/mL)을 선택배지에 첨가하여, 37 °C에서 5일간 진탕배양 (150 rpm)하였다. 5일간 배양한 후 배양액은 4°C에서 원심분리 (4,500 rpm, 15 min)하여 bacteria cell을 제거하였다. Ammonium sulfate를 농도별 (0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% 및 80-100%)로 분획하였고 단백분해 활성이 가장 높은 분획을 20 mM sodium acetate 완충용액 (pH 5.5) 10 mL에 용해시켜 조효소액으로 사용하였다. 조효소액은 4°C의 저온실에서 24시간동안 투석 (10 kDa cutoff membrane)을 한 후 한외여과 (10 kDa cutoff membrane, Amicon Co., Beverly, Maine)를 하였다. 한외여과 후 조효소액은 DEAE Sephadex A-50 (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo) column (2.6×30.0 cm)

에서 0~1M의 NaCl 구배를 통해 용출하였다. Ion exchange chromatography에서 가장 높은 단백질활성 갖는 peak의 50% 이상인 분획 구간을 모은 후 Gel (Sephadex G-75, Sigma Chemical Co. St Louis, Mo) chromatography column (2.6×90.0cm)에서 유속 0.1 mL/min으로 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.5)로 정제하였다.

다. 전기영동 (Electrophoresis)

Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli (1970)의 방법을 사용하였다. 즉, running gel (T 12%)은 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) (25% v/v), SDS 0.1% (w/v), acrylamide (12% w/v), N,N'-methylene bisacrylamide (0.32% w/v), ammonium persulfate (0.05%v/v)a 및 N,N,N',N'-tetramethylene - ethylene diamine (TEMED) (0.05% v/v)을 혼합하였고, stacking gel (T 4%)은 0.5M Tris-HCl (pH 6.8)(25% v/v), SDS (0.1% w/v), acrylamide (4% w/v), N,N'-methylene bisacrylamide (0.1% w/v), ammonium persulfate (0.05% v/v) 와 N,N,N',N'-tetramethylene-ethylene diamine (TEMED) (0.1% v/v)를 혼합하여 사용하였다. 정제된 효소용액을 sample buffer (0.065 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 10% glycerol, 1% SDS, 0.005% bromophenol blue 및 1% 2-mercaptoethanol)와 1:4로 혼합하고 100℃에서 4분간 중탕 가열하여 gel에 loading 한 후 0.1% coomassie brilliant blue R-250 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) 과 40% ethanol 및 10% acetic acid로 염색한 다음 40% ethanol 및 10% acetic acid로 탈색하였다. Molecular marker로는 MW-SDS-70 (Sigma Chemical Co., St. Louis. MO) 을 표준품으로 사용하여 분자량을 계산하였다.

라. 단백질 정량 (determination Protein)

단백질 정량은 Bradford (1976) 방법을 사용하였고, bovine serum albumin으로 표준 곡선을 그려 단백질 양을 계산하였다.

마. 효소활성 측정 (Enzyme Activity)

정제과정 중의 효소 활성도는 azocasein 방법으로 측정하였다 (Ninjoor et al., 1985). 즉, 0.02M Sodium acetate buffer (pH 5.5)에 1% (w/v) azocasein을 녹인 2ml에 효소액 1ml을 가하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 5% TCA 3ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 여과 (Whatman No.41)하여 345 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 단위인 unit는 기질인 azocasein을 1분 동안 가수분해하여 1μM의 tyrosine

을 생성하는 것을 1 unit로 정의하였다 (Fig. 1.).

바. 적정 온도 (Optimal temperature)

10~80°C 범위에서 30분간 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 효소의 잔존활성은 Ninjoor (1985)등의 azocasein 방법으로 측정하였다. 즉, 기질용액과 효소용액을 각각의 반응온도에서 반응시킨 후 효소의 잔존활성을 측정하였다.

사. 온도의 안정성 (Stability temperature)

효소의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위하여 효소용액을 각각의 온도 10~80°C에서 30분동안 정치한 다음배양한 후 상온에서 기질과 반응시켰다. 효소의 잔존활성은 azocasein 방법 (Ninjoor et al., 1985)으로 측정하였다.

아. 최적 pH (Optimal pH)

효소의 최적 pH를 알아보기 위해 기질을 각각의 buffer (pH 5~6는 sodium acetate buffer, pH 6~7은 sodium phosphate buffer, pH 7~8은 Tris-HCl)에 용해시켰다. pH가 서로 다른 기질용액에 효소를 첨가하여 37°C에서 30분동안 반응시킨 후 azocasein 방법 (Ninjoor et al., 1985)으로 효소의 잔존활성을 측정하였다.

자. pH 안정성 (Stability pH)

효소의 pH에 대한 안정성을 측정하기 위하여 각기 pH가 다른 buffer (pH 5~6는 20m M sodium acetate buffer, pH 6~7은 20mM sodium phosphate buffer, pH 7~8은 20m M Tris-HCl)와 함께 같은 용량의 효소용액을 37°C에서 30분동안 평형화시킨 후 azocasein 방법 (Ninjoor et al., 1985)으로 효소 잔존활성을 측정하였다.

차. 염농도의 영향 (Effect of NaCl)

효소는 염농도 (0~30%)를 달리한 1%의 azocasein을 사용하여 37°C에서 30분동안 반응시킨 후 azocasein 방법 (Ninjoor et al., 1985)으로 효소의 잔존활성을 측정하였다.

카. 기질특이성 (Specific substrate)

효소의 기질특이성은 N-CBZ-Phe-ARG-7amino-4-methylcolumarin (Z-Phe-Arg-Nmec)과 N_α-CBZ-Phe-ARG-Phe-ARG-7 amino-4-methylcolumarin (Z-Arg-Arg-Nmec)은 Barrett and Kirschke (1981)의 방법으로 측정하였다. 즉,

1.25 mL의 buffer에 0.25 mL 1 mM Z-Phe-Arg-NMec과 50 μ l의 효소액을 첨가하여 Fluorometer (RF-5301, Shimadzu, Tokyo, Japan)을 사용하여 375 nm (excitation)과 460 nm (emission)에서 측정하였다. Benzoyl-L-tyrosine (BTEE, 1mM)와 p-tosyl-L-arginine ester (TAME, 1mM)는 Erlanger (1961) 등의 방법으로 측정하였다. 각각의 활성도는 256과 247 nm에서 측정하였고 잔존 활성은 1 unit의 trypsin이 기질을 가수분해하는 양을 기준으로 하여 환산하였다. Azocasein (1%)은 azocasein 방법 (Ninjoor et al., 1985) 으로 효소의 잔존활성을 측정하였고, casein (1%)은 Iwata (1986)등의 방법을 수정하여 사용하였다. 각각의 기질은 37°C에서 효소용액과 30동안 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다. 효소의 단위인 unit는 기질인 azocasein을 1분 동안 가수분해하여 1 μ M의 tyrosine을 생성하는 것을 1 unit로 정의하였다 (Fig. 1.).

파. 저해제의 영향 (Effect of Inhibitor)

효소활성에 대한 저해제의 영향을 알아보기 위하여 저해제 1mM Tosyl - L-lysine-chloromethylketone (TLCK), tosyl phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), 2-mercaptoethanol (1mM), N-ethylmaleimide (NEM, 1mM), Dithiothrditol (DTT)를 사용하여 37°C에서 20분 동안 배양한 후 효소 잔존활성을 측정하였다. 즉, 1%의 azocasein에 저해제와 함께 정제한 효소용액을 첨가하여 37°C에서 30분동안 반응시킨후 효소 잔존활성 측정하였다.

하. 동력학적 연구 (Kinetic parameters)

단백질 기질에 대한 반응 속도정수 (Km)와 최대 반응속도 (Vmax)는 azocasein을 기질로 하여 농도별 활성을 측정한 후 Lineweaver-Burk의 식 (Dixon and Webb, 1979)에 따라 계산하였다. 0.5~4%의 azocasein을 기질로 하여 37°C에서 30분동안 효소용액과 반응시켜 효소의 잔존활성을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 균주의 동정.

오징어 젓갈에서 분리한 단백분해능이 강한 균을 동정한 결과 *Bcillus megaterium*로 밝혀졌으며 (Table 1). *Bcillus megaterium* KLP-98로 명명하였다. *Bcillus megaterium* KLP-98이 생산하는 조효소의 적정 온도와 pH는 각각 37°C와 pH 5.5이었다.

나. 효소의 정제.

Ammonium sulfate 40-60%의 분획이 가장 높은 효소활성을 나타내었으며 Ion exchange chromatography에서는 효소활성이 있는 2개의 peak가 나타났다 (Fig. 2.). 효소활성이 큰 2개의 peak는 0.67~0.79M NaCl농도 구배 사이에서 나타났다. Ion exchange chromatography 정제 후의 정제율 (fold) 및 yield는 각각 6.37과 16.5%이었다 (Table 2). 전통 해산 발효식품 (멸치젓과 새우젓)으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* LY-353의 단백분해효소는 ion chromatography 0.16~0.19M NaCl의 사이에서 2개의 peak를 나타내었으며 (이 등, 1991), 한국 전통 대두간장으로부터 분리한 *Bacillus subtilis* CCKS-111 단백분해효소는 ion exchange chromatography상에서 3개의 peak를 나타내었다 (최 등, 1997). 효소활성이 큰 두 개의 peak 중 활성이 가장 높은 peak (Fraction No.25~36)를 pooling 하여 Shephadex G-75 (Sigma Chemical Co., St. Louis. MO) colum (2.6cm×90.0cm)에 적용하였고 gel chromatography상에서 효소활성이 큰 하나의 peak (Fraction No. 37-45)를 얻었다 (Fig. 3.). 효소의 gel chromatography 정제율 및 yield는 각각 18.8, 15.3%로 정제되었다 (Table 2.). Bacteria의 종류에 따른 정제율과 yield는 균마다 다소 차이가 있는데 대두간장에서 분리한 *Bacillus subtilis* CCKS-111 단백분해효소는 50.6과 0.8% (최 등, 1997), 해산 전통 발효식품에서 분리한 *Bacillus subtilis* LY-353 단백분해효소는 7.33 과 6.5% (이 등, 1991), 해산물에서 분리한 *Halobacterium* sp.의 단백분해효소는 14.0 과 14%으로 나타났으며 (안 등, 1990), *Neosatorya fischeri* var. *spinosa* IBT 4872의 산성 단백분해효소는 37.7과 11.0%로 정제되었다고 보고하였다. (Wu 등., 1998).

다. 전기영동.

Gel chromatography로 정제한 *Bcillus megaterium* KLP-98 단백분해효소는 SDS-PAGE를 사용하여 분자량 및 정제도를 측정하였다 (Fig. 4.). *Bcillus megaterium* KLP-98 단백분해효소는 SDS-PAGE에서 단일한 band로 나타났으며 효소의 분자량은 64 kDa이었다. Yoshimoto 등 (1983)은 *Bacillus megaterium*의 단백분해효소의 분자량은 60 kDa으로 보고되었다. Wonnop 등 (2001)의 가자미 근육에서 추출한 cathepsin L의 분자량은 39.8 kDa로 나타났으며, Thomas 등 (1994)은 대서양 대구 (whiting)에서 추출한 cysteine계 cathepsin의 분자량은 28.8 kDa으로 보고되었으며 본 실험의 결과보다 낮은 분자량으로 나타났다.

Table 1. Purification yield of *Bacillus megaterium* KLP-98 protease from squid *Jeot-gal*

Step	Volume (mL)	Total Protein (mg)	Total activity (U)*	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	2,000	1,234	1040	0.84	100.0	1.00
Amonium sulfate (40~60 %)	14	814	1000	1.23	96.2	1.46
DEAE (Peak I)	40	32	172	5.36	16.5	6.37
Sephadex G-75	120	10	159	15.86	15.3	18.83

* One unit of the enzyme activity is defined as the amount of tyrosine hydrolyzed per min.

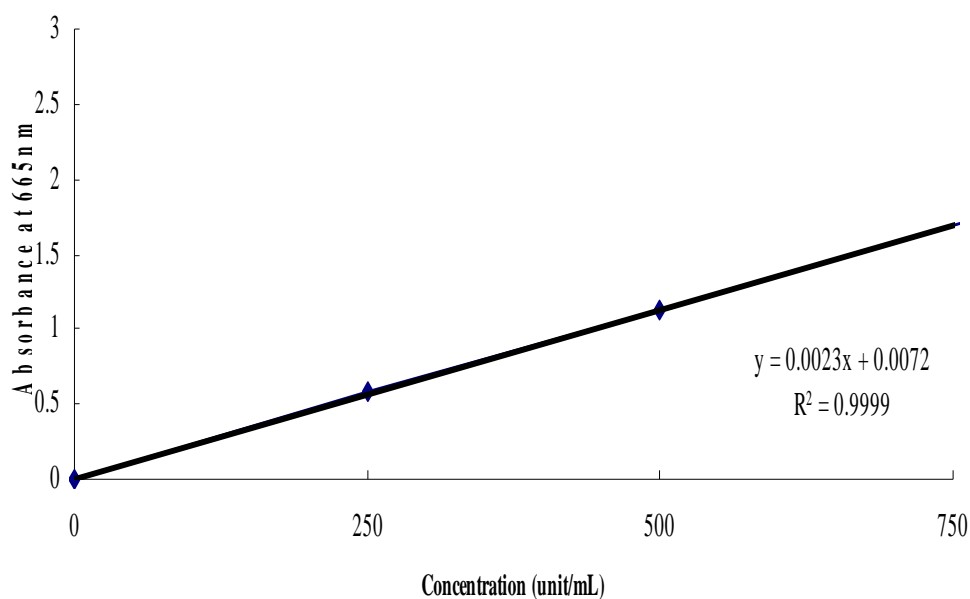


Fig. 1. Calibration curve of standard tyrosine solution.

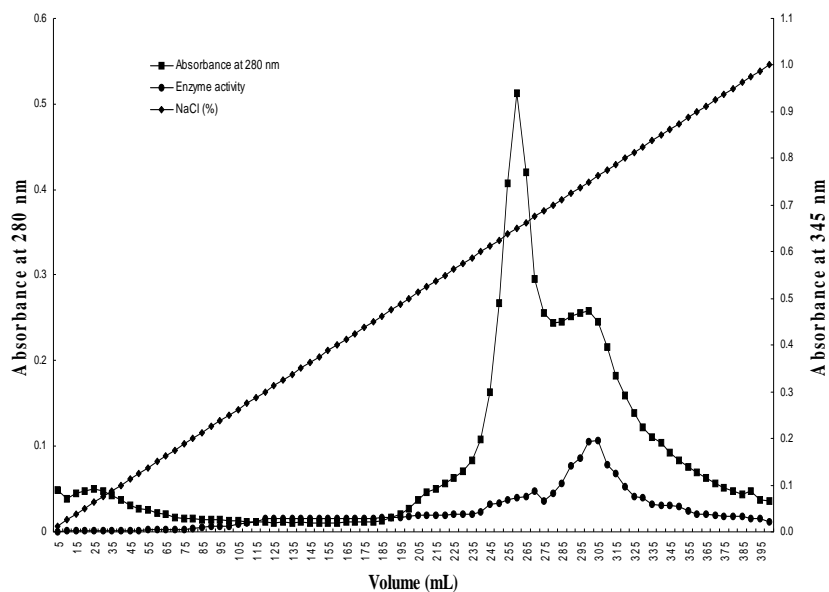


Fig. 2. Ion exchange chromatography pattern of *Bacillus megateriu* KLP-98 protease derived from squid *Jeot-gal*.

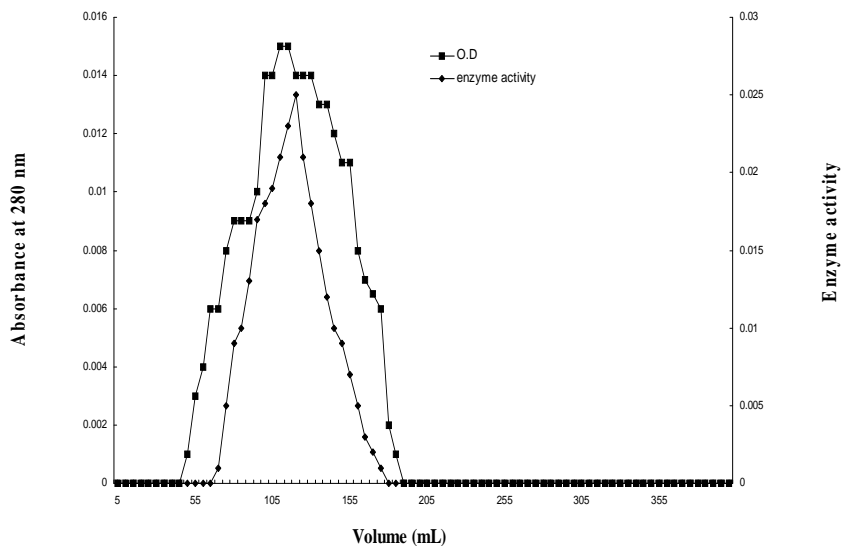


Fig. 3. Gel permeation chromatography pattern of *Bacillus megaterium* KLP-98 protease derived from squid *Jeot-gal*.

라. 최적온도 (Optimal temperature).

Bcillus megaterium KLP-98 단백질분해효소의 최적온도는 **Fig. 5**에 나타내었다. *Bcillus megaterium* KLP-98 단백질분해효소는 60°C에서 가장 높은 잔존활성을 보여 주었으며 60°C 이상에서는 잔존활성도가 낮아졌다. 또한 10~30°C의 범위에서 매우 낮은 잔존활성을 보였으며 40~60°C 사이에서 활성도가 상승하였으며 60°C에서는 최적 잔존활성을 나타내었다. 안 등 (1990)의 고도 호염성 *Halobacterium* sp. 단백질분해효소는 35°C에서 최적온도를 나타내었으며, 임 및 유 (1999)의 메주 유래의 *Syncephalastrum recemosum* PDA 132-2가 생산하는 protease의 정제 및 특성 연구에서는 50~60°C, Fukumoto (1967)등의 *Rhiz. chinensis*의 산성 단백질분해효소는 60°C, 최 등 (1988)의 *Penicillium citrinum* C-39에 의해 생산된 산성 단백질분해효소는 65°C에서 각각 최적온도를 나타내 본 실험과 유사함을 나타내었다. 또 Bergkvist (1963)의 *Asp. oryzae*의 단백질분해효소의 최적온도가 50°C, 정 및 박 (1979)의 *Aspergillus awamori* U-3가 생산한 산성 단백질분해효소 최적온도가 45°C로 나타나 본 실험보다는 낮은 온도를 나타내었다.

마. 온도 안정성 (Stability temperature).

Bcillus megaterium KLP-98 단백질분해 효소의 온도 안정성은 **Fig. 6**에 나타내었다. 온도에 대한 *Bcillus megaterium* KLP-98 단백질분해 효소의 안정성은 40°C까지 꾸준히 높은 활성도를 나타내었으나 40°C 이상의 온도에서는 활성이 급격히 낮아지는 것을 확인할 수가 있었다. *Bcillus megaterium* KLP-98 단백질분해효소의 최적 온도보다 온도 안정성이 낮은 이유는 효소액을 먼저 incubation 하는 온도 안정성 실험보다는 기질과 같이 반응온도에 적용하게 되는 최적온도 실험에서 기질이 효소를 보호하여 효소가 실활 되는 것을 예방한다고 보고하였다 (Jiang 등, 1991). 이 (1984)의 *Rhodotorula glutinis* 세포내 산성 단백질분해효소와 정 등 (1979)의 산성 단백질분해효소가 동일하게 50°C까지 꾸준한 활성을 나타냈다고 보고하였으며 최 등 (1988)의 연구에서는 acid protease가 70°C를 기점으로 하여 효소활성이 급격히 떨어졌다고 보고하였다. 최 등 (1987)의 *Aspergillus fumigatus* A-12의 acid protease 연구에서는 60°C를 기점으로 하여 효소활성이 급격히 떨어졌다고 보고하여 본 연구에서의 *Bcillus megaterium* KLP-98 단백질분해효소가 온도에 더 민감한 반응을 나타냄을 확인할 수 있었다.

바. 최적 pH (Optimal pH).

Bcillus megaterium KLP-98 단백질분해효소의 최적 pH를 **Fig. 7**에 나타내었다.

Table 2. Purification yield of *Bacillus megaterium* KLP-98 protease from squid *Jeot-gal*

Step	Volume (mL)	Total Protein (mg)	Total activity (U)*	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification fold
Crude extract	2,000	1,234	1040	0.84	100.0	1.00
Amonium sulfate (40~60 %)	14	814	1000	1.23	96.2	1.46
DEAE (Peak I)	40	32	172	5.36	16.5	6.37
Sephadex G-75	120	10	159	15.86	15.3	18.83

* One unit of the enzyme activity is defined as the amount of tyrosine hydrolyzed per min.

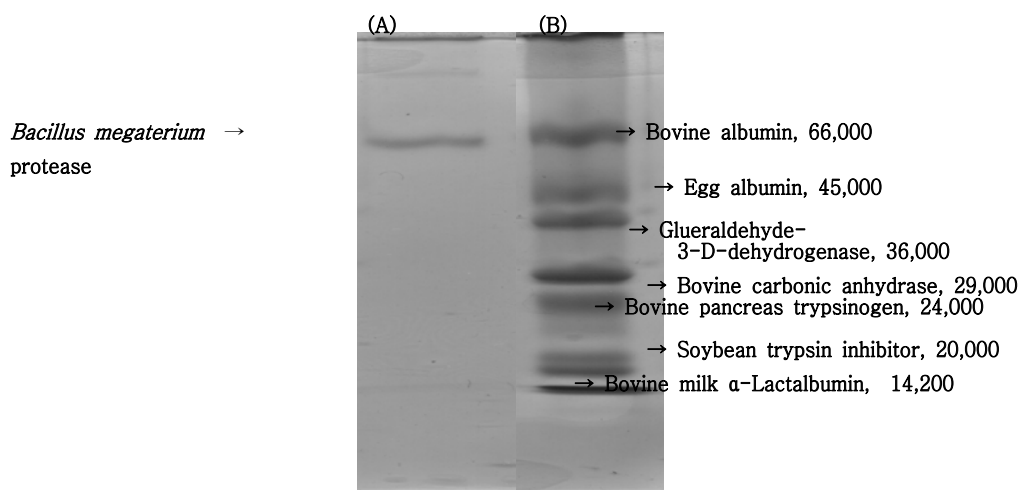


Fig. 4. SDS-Gel electrophoresis of *Bacillus megaterium* KLP-98 protease from squid *Jeot-gal*.

(A) *Bacillus megaterium* KLP-98 protease (B) Standard

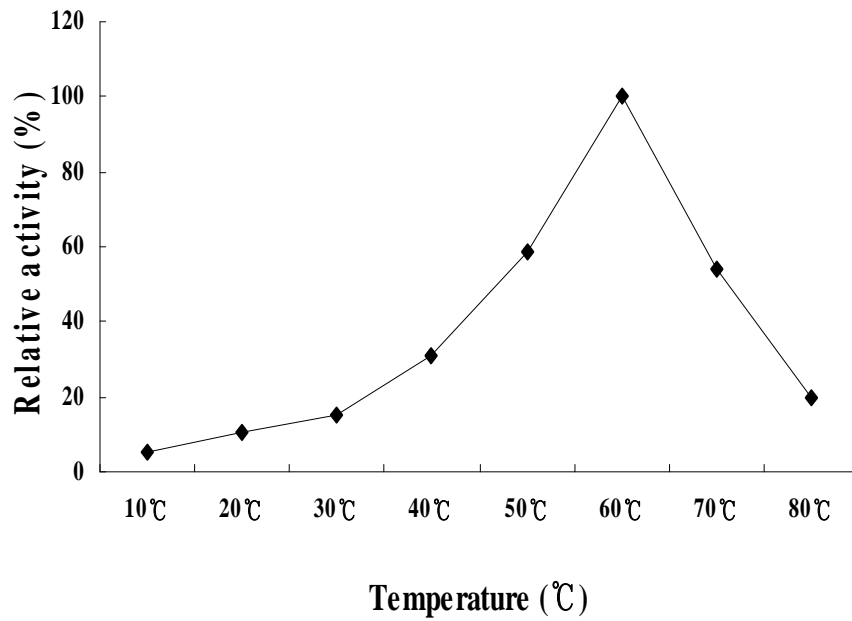


Fig. 5. Effect of temperature on the activity of *Bacillus megaterium* KLP-98 protease derived from squid *Jeot-gal*

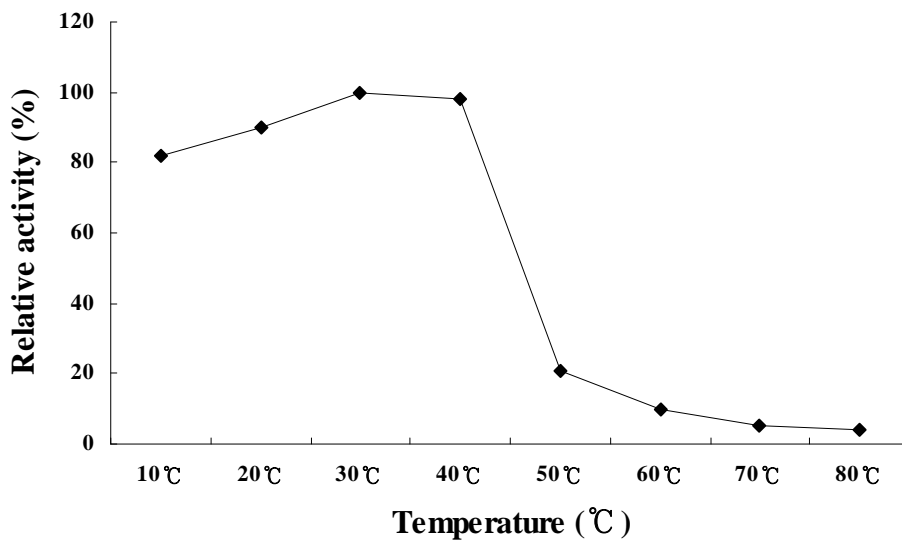


Fig. 6. Temperature stability of *Bacillus megaterium* KLP-98 protease derived from squid *Jeot-gal*.

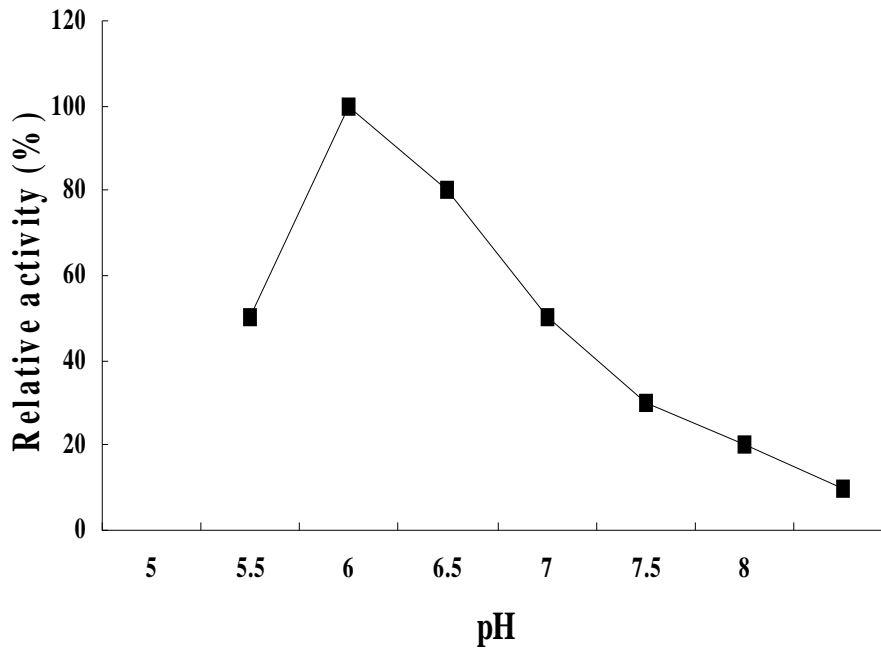


Fig. 7. Effect of pH on the activity of *Bacillus megaterium* KLP-98 protease derived from squid *Jeot-gal*.

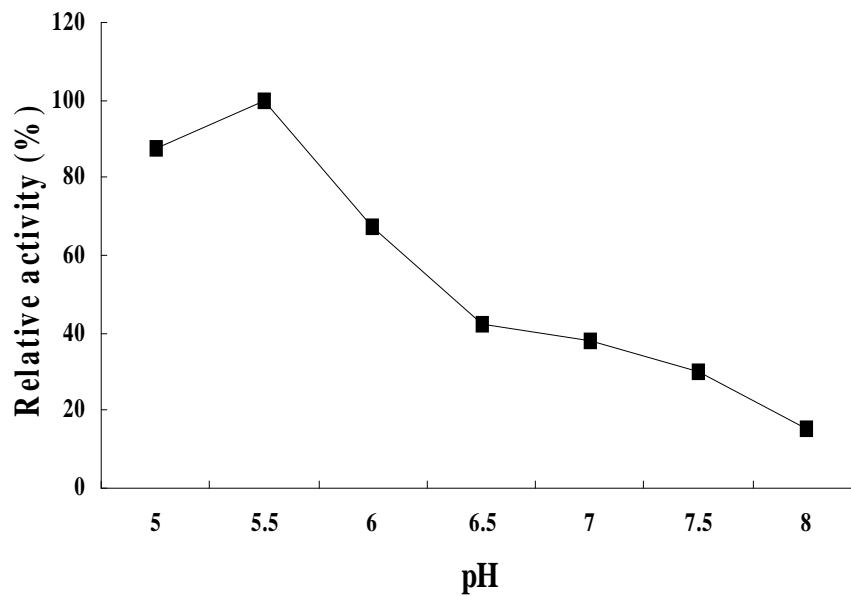


Fig. 8. pH stability of *Bacillus megaterium* KLP-98 protease derived from squid *Jeot-gal*.

pH 5에서는 효소 활성이 50%으로 나타내었고, pH 5.5에서 100%을 나타내었다. 그 이상의 pH에서는 효소활성이 저하되는 경향을 나타내었으며, 이 결과로부터

Bcillus megaterium KLP-98의 단백분해효소는 산성 pH에서 최고 활성을 나타내는 산성 단백분해효소임을 알 수 있다. 이 (1986)의 연구에서 acid protease가 pH 6.0에서 최대활성을 나타냈다고 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 보였다. 최 등 (1988)의 acid protease는 pH 3.5에서 최 등 (1987)의 *Aspergillus fumigatus* A-12에 의해 생산된 acid protease는 pH 2.5~3.0 사이에서 최대활성을 나타내었다고 보고해 본 실험보다 내산성이 강한 protease임을 알 수 있었다.

사. pH 안정성 (pH Stability).

Bcillus megaterium KLP-98 단백분해효소의 pH 안정성은 Fig. 8에 나타내었다. *Bcillus megaterium* KLP-98 단백분해효소는 산성영역인 pH 5.0~6.0까지 비교적 높은 활성도를 나타내었으나 그 이상의 알칼리영역의 pH에서는 활성도가 크게 저하되었다. 최 등(1987)의 *Aspergillus fumigatus* A-12의 산성 단백분해효소는 pH 2.0~4.0에서 효소 활성이 안정하였다고 보고하여

Bcillus megaterium KLP-98 단백분해효소 보다 더 넓은 산성영역에서 안정함을 보여주었다. 임 및 유 (1999)의 메주 유래의 *Syncephalastrum recemosum* PDA 132-2의 단백분해효소는 pH 2.0~6.0범위의 산성영역에서 안정하였고 알칼리영역에서는 비교적 활성이 낮았다고 보고하여 본 실험보다 넓은 범위의 산성영역에서 안정성을 보였다. 또 최 등 (1988)의 *Penicillium citrinum* C-39의 단백분해효소는 pH 3.0~4.5범위에서 안정하였다고 보고하였다.

아. 염농도의 영향 (Effect of NaCl).

Bcillus megaterium KLP-98 단백분해효소의 염 농도에 대한 영향은 Fig. 9에 나타내었다. 염농도가 증가할수록 효소활성이 낮아지는 경향을 나타내었으나, 염농도 20%, 25%에서도 *Bcillus megaterium* KLP-98 단백분해효소는 각각 33%, 5.2%의 효소 활성을 나타내었다. 안 등 (1990)은 고도 호염성 *Halovacterium sp.*가 생산하는 protease의 특성 연구에서 염농도가 증가할수록 효소활성이 저하되었다고 보고하여, 본 실험과 유사한 경향을 나타냈다. Heu 등 (1993)은 멸치로부터 추출한 cathepsin L이 5%의 염농도에서도 67%의 잔존활성을 갖는다고 보고하였으며 이 등 (1991)의 *Bacillus subtilis* LY-353 단백분해효소는 1%의 염농도가 최적 염농도라고 보고하였다. *Bcillus megaterium* KLP-98 단백분해효소는 높은 농도의 염에서도 효소의 잔존활성이 남아 있어 고염을 첨가하여 제조하는 젓갈 및 어간장 등에서 충분히 육을 가수분해 할 수 있다고 보여진다.

자. 기질특이성 (Substrate specificity).

Bacillus megaterium KLP-98 단백질분해효소의 기질특이성은 **Table 3**에 나타내었다. *Bacillus megaterium* KLP-98 단백질분해효소는 azocasein에서 100.07%로 가장 높은 잔존활성을 나타내었고 Z-Phe-Arg-Nmec이 95.56%로 두번째로 높은 활성을 보였다. Z-Phe-Arg-Nmec와 azocasein은 cysteine계의 대표적인 기질이라고 보고되었으며 일부 trypsin계의 효소들도 이들을 가수분해한다고 보고되었다 (Barrett and Kirschke, 1981). Wonnop 등 (2001)은 Z-Phe-Arg-Nmec이 가자미 근육에서 추출한 cathepsin L의 대표적인 기질이라고 보고하였다. trypsin계의 대표적인 기질들인 TAME에서는 약한 잔존활성을, casein에서는 거의 잔존활성이 나타나지 않았다. Chymotrypsin의 대표적 기질인 BTEE에서도 잔존활성은 거의 나타나지 않았다. 위의 결과로 미루어 보아 *Bacillus megaterium* KLP-98 단백질분해효소는 Z-Phe-Arg-Nmec과 azocasein에서 높은 단백질분해 활성을 나타내므로 cysteine계 효소로 추정되어진다.

차. 저해제의 영향 (effect of Inhibitor).

Bacillus megaterium KLP-98 단백질분해 효소에 대한 저해제의 영향은 **Table 4**에 나타내었다. 저해제로는 TLCK, TPCK, NEM (N-ethylmaleimide), DTT 및 2-Mercaptoethanol을 사용하였으며, cysteine계의 대표적 저해제인 NEM에 의해 7.1%로 가장 많은 저해를 받았다. trypsin계의 대표적 저해제인 TPCK 및 TLCK에서 약간의 저해를 받았으나, 2-Mercaptoethanol에서는 상승효과를 나타내었고, cysteine계의 상승물질인 DTT에서도 상승효과를 나타내었다. 박 등 (1995)의 cytotoxicity of a cysteine proteinase of adult clonorchis sinensis 연구에서도 추출된 cysteine계 효소가 NEM에 의해 저해를 받았다고 보고하였으며, Doke 등 (1987)은 NEM이 cysteine계의 대표적 저해제라고 보고하였다. Tomas 등 (1994)의 Pacific Whiting protease 연구에서도 cysteine계 효소의 활성 상승제인 DTT와 EDTA에서는 상승효과를 보였다고 보고하였다. 위의 기질특이성 실험과 저해제 실험의 결과로 보아 *Bacillus megaterium* KLP-98은 cysteine계의 내염성 효소로 추정되어진다. 박 등 (1995)의 연구에서는 cysteine계 효소의 분자량이 24 kDa으로 나타났으며 강 등 (1995)의 A cysteine protease of *Paragonimus westermani* eggs 단백질분해효소 연구에서는 cysteine계 효소의 분자량이 35 kDa으로 나타났다. 또 송 등 (1992)의 cysteine proteinasespanganum 연구에서도 cysteine계 효소의 분자량이

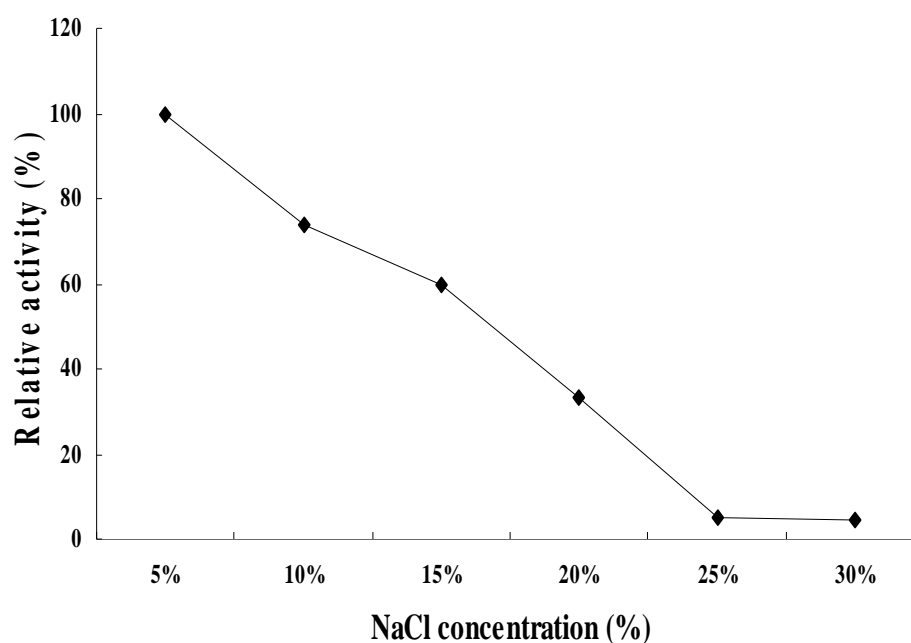


Fig. 9. Effect of NaCl of *Bacillus megaterium* KLP-98 protease derived from squid *Jeot-gal*.

Table 3. Specific substrate of *Bacillus megaterium* KLP-98 protease derived from squid *Jeot-gal*

Substrate	Concentration	Relative activity (%)*
TAME	1 mM	40.04
BTEE	1 mM	1.24
Azocasein	1%	100.07
Casein	1%	0.22
Z-Phe-Arg-Nmec	1 mM	95.56
Z-Arg-Arg-Nmec	1 mM	14.45

* Relative activity is defined as the amount of hydrolyzed substrate per the amount of substrate hydrolyzed by 1 unit of trypsin.

Table 4. Effect of various inhibitor on *Bacillus megaterium* KLP-98 protease derived from squid *Jeot-gal*

Inhibitor	Concentration (mM)	Relative activity (%)*
TLCK	1	28.6
TPCK	1	18.4
NEM	1	7.1
DTT	1	127.1
2-Mercaptoethanol	1	142.9

* Relative activity is defined as the amount of hydrolyzed substrate per the amount of substrate hydrolyzed by 1 unit of trypsin.

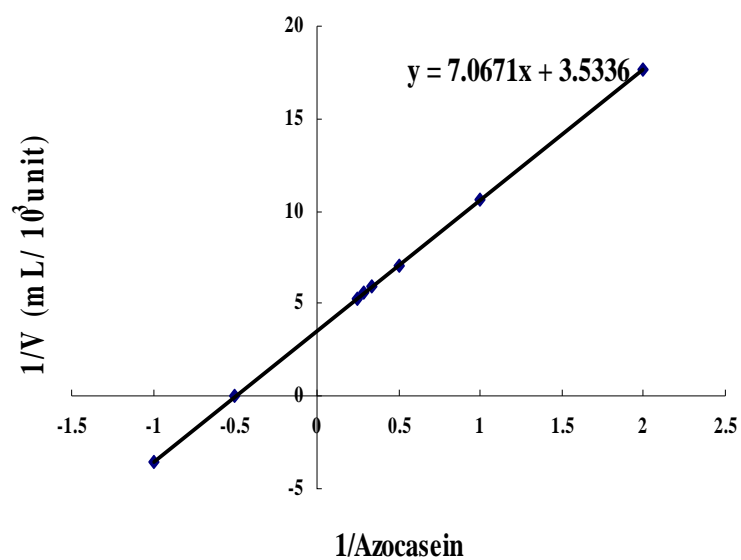


Fig. 10. Lineweaver-Burk plots for the hydrolysis of azocasein by salt-tolerant protease of *Bacillus megaterium* KLP-98.

28 kDa으로 나타났다. 그리고 Ramasamy-R 등 (1993)의 열대열원충 cysteine 단백질 효소에 대한 논문에서도 단백질 효소의 분자량이 26 kDa로 나타나 모두가 본 연구의 *Bcillus megaterium* KLP-98 단백질 효소 분자량보다는 낮게 나타났다.

카. 동력학적 연구 (Kinetic parameter).

오징어 젓갈에서 정제한 *Bcillus megaterium* KLP-98 단백질 효소의 K_m 값과 V_{max} 값을 산출하기 위한 Lineweaver-Burk에 관한 식을 Fig. 10.에 나타내었다. *Bcillus megaterium* KLP-98 단백질 효소의 K_m 과 V_{max} 값은 2 mg/ml와 283 unit/mL이었다. *Bcillus megaterium* KLP-98 단백질 효소의 V_{max}/K_m 값은 141.5 unit/mg이었다. 안 등 (1990)의 고도 호염성 *Halobacterium sp.*의 단백질 효소의 K_m 값은 $4.2 \times 10^{-4} M$ 이었다. *Neosatorya fischeri var. spinosa* IBT 4872의 산성 단백질 효소의 K_m 과 V_{max} 값은 0.44 mg/mL와 0.02 mmol^{-1} 이었다 (Wu 등, 1998).

4. 결론

천연 숙성 발효된 멸치액젓에서 내산성 및 내염성 단백질 분해세균을 분리 • 동정하여 *Bacillus subtilis* JM-3로 명명하였다. 이 균주는 10% NaCl을 포함한 MRS 배지를 이용하여 37°C에서 배양하고 ammonium sulfate 분획 결과 40~60% 분획에서 가장 높은 protease 활성이 측정되었다. 이 분획은 ion exchange chromatography와 gel permeation chromatography로 정제하고 SDS-PAGE로 분석한 결과 20,000 daltons의 단일 밴드(band)가 얻어졌다. *Bacillus subtilis* JM-3 proteases의 정제 효율은 5.3%이었으며 정제율은 35.56 fold로 정제되었다. 효소의 K_m 값과 V_{max} 값은 1.75 mg/mL과 $318 \mu M \cdot \text{min}^{-1}$ 이었으며, 최적 온도는 60°C이었고 10~30°C사이에서 효소는 온도에 대한 안정성을 나타내었다. *Bacillus subtilis* JM-3 proteases의 최적 pH는 5.5이었고, pH 5.0~ 5.5 부근에서 안정한 것으로 나타나 산성 단백질 분해 효소로 판명되었다. *Bacillus subtilis* JM-3 proteases는 각각 염농도 10, 20 및 30%에서 69, 21 및 1.3%의 잔존 단백질 분해 활성을 나타내었고 azocasein에서 가장 높은 기질 특이성을 나타내었으며, casein에서도 높은 활성을 나타내었다. *Bacillus subtilis* JM-3 proteases는 TLCK에 의해 완벽한 저해를 받았으며, DTT에도 저해를 받았다. 그러므로 *Bacillus subtilis* JM-3 proteases는 trypsin계 serine protease로 추정되어진다.

5. 참고문헌

- An, Y.S., Kim, C.J. and Choi, S.Y. 1990. Characteristic of protease from *Halobacterium* sp. J. Korean Agri Chem. Soc. 33(4), 337~342.
- Barrett, A.J. and Kirschke, H. 1981. Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. In *Methods in Enzymology*, 80., 535~561.
- Bae, T.J., Han, B.H., Cho, H.D., Kim, B.S., and Lee, H.S. 1990a. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality. *Bull.Korean Fish.* 23(2), 109~124.
- Bae, T.J., Han, B.H., Cho, H.D., Kim, B.S., and Lee, H.S. 1990b. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality. *Bull.Korean Fish.* 23(2), 125~136.
- Bae, T.J., Han, B.H., Cho, H.D., Kim, B.S., and Lee, H.S. 1990c. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality. *Bull. Korean Fish.* 23(5), 361~372.
- Bae, T.J., Han, B.H., Cho, H.D., Kim, B.S., and Lee, H.S. 1990d. Conditions for rapid processing of modified fish sauce using enzymatic hydrolysis and improvement of product quality. *Bull. Korean Fish.* 23(5), 373~377.
- Beddows, C.G. and Ardeshir, A.G. 1979. The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture. *J. Food Technol.*, 14, 603~612.
- 배무 · 송경숙. 1987. 한국 염장 발효식품으로부터 분리한 호염성 세균의 분리 · 동정 및 염 요구성. *한국산업미생물학회지.* 15(5), 301~305.
- Bergkvist, R. 1963. The proteolytic enzymes of *Aspergillus niger*. II. Properties of the proteolytic enzymes. *Acta Chemica Scandinivica*, 17, 1541~1551.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248~254.
- Cha, Y., Kim, E., and Joo, D. 1994. Studies on the processing of accelerated low salt-fermented anchovy paste by adding koji. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23, 348.
- Chae, S.K., Itoh, H. and Nikkuni, S. 1989. Effects of soy sauce koji and

- commercial proteolytic enzyme on the acceleration of fish sauce production (in Korean). Korean J. Food Sci. Technol. 21(5), 639~648.
- Chaveesul, R., Smith, J.P. and Simpson, B.K. 1993. Production of fish sauce and acceleration of sauce fermentation using proteolytic enzyme. J. Aqua. Food Prod. Technol., 2(3), 59~77.
- Choi, C., Kim, S., Im, S.I., Lee, H.D., Lee, S.H., Son, J.H., Choi, H.J. and Kim Y. H. 1997. Purification and isolation of *Bacillus subtilis* CCKS-111 protease from traditional soy sauce in Korean. Argiculture and Biotechnology. 40(3), 178~183.
- Choi, C., Kim, S., Im, S.I., Lee, H.D., Lee, S.H., Son, J.H., Choi, H.J. and Kim Y. H. 1996. Purification and isolation of *Bacillus subtilis* CCKS-118 protease from traditional soysauce in Korean. Argiculture and Biotechnology. 39(3), 460~465.
- Choi, Y.J., Kim, I.S., Cho, Y.J., Seo, D.H., Lee, T.G., Park, Y.B, and Park, J.W. 1999. Peptide Properties of Rapid Salted and Fermented Anchovy Sauce Using Various Proteases. J. Korean Fish. 32(4), 48~494.
- Choi, C., Son, G.M. and Cho, Y.J. 1988. Production of Acid Protease by *Penicillium citrinum* C-39 and Characteristics of the Enzyme. 자원문제연구. 7, 13~17.
- Choi, C., An, B.J. and Son, G.M. 1987. Production of Acid Protease by *Aspergillus fumigatus* A-12 and Characteristics of the Enzyme. 6, 35~40.
- Chung, M.J. and Park, N.K. 1979. Studies on the Proteolytic Enzyme of Mold. Part I. Production of Acid Protease by *Aspergillus awamori* U-3 and characteristics of Enzyme. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 7(3), 157~164.
- Dixon, M. and Webb, E.C. 1979. Enzymes, 3rd ed., Longman, London, pp. 47~62, 138~140, 164~169.
- Doke, S.N., Ninjoor, V. 1987. Characteristics of an alkaline proteinase and exopeptidase from shrimp muscle. J. Food Sci. 52(5), 1203~1208.
- Heu, M.S. 1993. Purification and characterization of the proteolytic enzymes participating in autolysis of anchovy, *Engraulis japonica*. Ph. D. thesis, National Fisheries Univ. of Pusan, Korea.
- 정승찬 · 현광욱 · 김재호 · 이종수. 2001. 내염성 효모의 분리 및 세포외 protease의 생산. 한국생물공학회지. 16(2), 158~162.
- Jiang, S.T., Moody, M.W. and Chen, H.S. 1991. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus*

- monodon). J. Food Sci. 56(2), 322~326.
- Kang, S.Y., Cho, M.S., Chung, Y.B., Kong, Y. and Cho, S.Y. 1995. A cysteine protease of *Paragonimus westermani* eggs. Korea. J. Parasitol. 33(4), 323~330.
- Kim, C.J., Kim, G.C., Oh, M.J., and Choi, S.H. 1991. Production of alkaline protease from *Halomonas sp.* ES 10. J. Korean Agric. Chem. Soc. 34(4), 307~311.
- Kim, S.M. 1999. Accelerating effect of squid viscera on the fermentation of Alaska pollack scrap sauce. J. Food sci. Nutr. 4(2), 103.
- Kim, J.B. 1994. Enzyme and its application from extremophile. Biotechnology News. 1, 38~46.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680~682.
- Lee, H.T. 1984. Properties and Function of Intracellular Acid protease II in *Rhodotorula glutinis*. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
- Lee, B.W., You, Y.S., Im, G.H. and Choi, C.U. 1991. Purification and Properties of protease from *Bacillus subtilis* LY-353. J. Korean Soc. Food Nutr. 20(1), 21~26.
- Lee, E., Kim, J., Ahn, C., Lee, K., Kim, M., Chung, B. and Park, H. 1989a. Processing conditions of accreted anchovy sauce extracts (in Korean). J. Korean Soc. Food Nutr., 18(2), 167~173.
- Lee, E., Jee, S., Ahn, C. and Kim, J. 1988. Studies on the processing conditions and the taste compounds of the sardinesauce extracts (in Korean). Bull. Korean Fish Soc., 21(1), 57~66.
- 임성일 · 유진영. 1999. 메주 유래 *Syncephalastrum-racemoum* PDA 132-2가 생산하는 Protease의 정제 및 특성. 한국식품영양과학회지. 28(5). 1010~1016.
- Maugh, T.H. 1984. A renewed interest in immobilized enzymes. Science 223, 474~476.
- Ninojor, V. and Srivastava, P.N. 1985. Partial purification and characterization of alkaline proteinases from the rabbit testis. Gamete Res. 11, 69.
- 오용택 · 김용휘 · 차연수. 1995. *Bacillus megaterium*이 생산하는 r-cyclodextrinase의 정제와 특성에 관한 연구. 한국농화학회지. 38(1), 42~48.
- Park, H., Ko, M.Y., Paik, M.K., Soh, C.T., Seo, J.H. and Im, K.I. 1995.

- Cytotoxicity of a cysteine proteinase of adult *Clonorchis sinensis*. Korea. J. Parasitol. 33(3). 211~218.
- Raksakulthai, N., Lee, Y.Z., and Haard, N.F. 1986. Effect of enzyme supplements on the production of fish sauce from MaleCapelin (*Mallotus villosus*). Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 19(1), 28~33.
- Ramasamy-R. and Ramasamy-MS. 1993. Preliminary studies on the use of synthetic oligonucleotide probes based on conserved protein sequences for identifying genes in mosquitoes and malaria parasites. J. National science. 16 5~172.
- Ray, R.R. 2000. Purification and characterization of extracellular beta-amylase of *Bacillus megaterium* B(6). Acta microbiologica et Immunologica hungarica. 47(1), 29~40.
- Song, C.Y., Choi, D.H., Kim, T.S. and Lee, S.H. 1992. Isolation and partial characterization of cysteine proteinase from sparganu Kisaengchunghak-Chapchi. 30(3), 191~199.
- Su, N.W. and Lee, M.H. 2001. Purification and characterization of a novel salt-tolerant protease from *Aspergillus* sp. FC-10, a soy sauce koji mold. J. Industrial Microbiology and Biotechnology. 26(4), 253~258.
- Thomas, A.Seymour., Michael, T.Morrissey., Maego, Y. Peters., and An, Haejung. 1994. Purification and Characterization of Pacific Whiting Proteases. Oregon State University Seafood. Laboratory. 250-36th street. Astoria. Oregon 97103-2499.
- Tsura, D., Heizokira, K. and Yamamoto, T. 1966. Studies on bacterial proteinase part 16. purification. Crystalization and some enzymatic properties of alkaline protease of *Bacillus subtilis* var. amylosacchariticus. Agr. Biol. Chem. 30, 1261.
- Wonnop, V., Alfred, R. M., Kim, S.M., and An, H.J. 2001. Cathepsin L:A Predominant Heat-Activate Heat-Activated Proteinase in Arrowtooth Flounder Muscle. J. Agric Food Chem. 49, 2633-2640.
- Wu, L.C and Hang, Y.D. 1998. Purification and characterization of acid proteinase from *Neosartorya fischeri* var. spinosa IBT 4872. Letters in Applied Microbiology. 27, 71~75.
- Yoshimoto, T., Saeki, T., Tsuru, D. 1983. Proline iminopeptidase from *Bacillus megaterium* purification and characterization. Journal of Biochemistry. 93(2),

제 5 절 된장으로부터 분리한 *Asp. sp. 101* 단백질효소의 정제 및 특성

1. Introduction

For many years the fermentation industry has used microorganisms to produce antibiotics, amino acids, enzymes and other useful biocompounds. These microorganisms, which have been isolated from the environment and then mutated to increase yields of the desired product, have proved safe to handle[16]. Almost 60% of industrial enzymes are proteolytic enzymes produced in plants (papain, ficin, and bromelain), animals (pepsin, chymotrypsin, and trypsin), and microorganisms (fungal acid, fungal neutral, fungal alkaline, fungal milk coagulant, bacterial neutral, and bacterial alkaline protease). 70% of them are produced in microorganisms. According to their characteristics, the proteases produced in various strains are used in baking industry, photographic industry, brewing and fermentation industry, protein hydrolysates, gelatine industry for cheese and casein, meat industry, leather industry, and enzyme detergents, etc[9]. Bacteria and fungi are mainly used for the industrial production of enzymes. Among the fungi, the genus *Aspergillus* is the most important one, especially the species *A. niger* and *A. oryzae*. The majority of industrial enzymes are proteolytic enzymes[13, 21]. *Aspergillus oryzae* belongs to the *A. flavus* group and has played a pivotal role as a starter to develop the traditional fermentation foods. *A. oryzae* can produce the large amounts of various hydrolytic enzymes such as amylases and proteases in solid cultures or submerged cultures. The acid protease (E.C.3.4.23) of *A. oryzae* is considered to be most important in producing the delicious taste of soy sauce by hydrolyzing raw materials. *A. oryzae*, therefore, offers promise as a host for extracellular protein production. [14] With increasing demand of protease in processing of protein foods, high activity of proteases is required to reduce processing expenditure and to improve product quality. *A. oryzae* was identified as the most important microorganism in producing high activity of protease among wheat bran koji, soybean koji, mackerel, sardine, anchovy, squid, fermented anchovy, fermented squid, and soil. Fish sauce uses traditionally a high amount

of salt ($\geq 25\%$) which inhibits the growth of microorganism and enzyme activity, thus prolongs its fermentation period. Therefore, in order to shorten the ripening periods of fish sauce, a salt-tolerant and acid protease is needed.

In this study, the purification and characteristics of the salt-tolerant acid protease from *Aspergillus* sp. 101 was isolated from traditional korean soybean paste.

2. Materials and Methods

Microorganism and Cultivation

Asp. sp. 101 producing a salt-tolerant acid protease was isolated according to the method of Tsujita and Endo[23] from traditional soybean pastes that were purchased from local markets and households in Korea. *Asp.* sp. 101 was cultivated in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 200 ml of culture broth consisted of 2 % defatted soybean flour at 27 °C for 4 days in a shaking incubator at 150 rpm.

Assay of protease

Enzyme activity was determined according to the modified method of Anson[7]. 1 ml of enzyme solution was added 5 ml of 0.6 % casein solution in 1/15 M phosphate buffer, pH 5.5 at 37 °C for 10 min. The reaction was stopped by adding 5 ml of 0.44 M trichloroacetic acid (TCA), and the solution was allowed to stand for 30 min. The resulting solution was then filtered with Whatman No. 2. 2 ml of filtrate was mixed with 5 ml of 0.55 M Na₂CO₃ solution and 1 ml of 1 N Folin reagent, and then the mixture was stood for 30 min at room temperature. The absorbance was measured at 660 nm with spectrophotometer (HP 8452A series, HEWLETTPACKRD Co. USA), which was converted to the amount of tyrosine equivalent by applying a standard curve. One unit (U) of protease activity was defined as the amount of enzyme releasing 1mol of tyrosine equivalent per 10 min.

Estimation of protein

Protein concentrations were determined according to Lowry[10] with egg ovalbumin as the standard. During column chromatography, concentration of protein in the fractions were monitored by measuring their absorbance at 280nm.

Enzyme purification

Unless otherwise specified, all operations for the purification of the extracellular protease were performed at 4 °C.[11]

Fungal cells were harvested from the 500 ml culture broth by centrifuging at 5,000 rpm for 15 min. The remaining culture supernatant was collected as a crude enzyme solution, and ammonium sulfate was added to precipitate an enzyme. The resultant precipitate of crude enzyme was dissolved in 20 mM NaOAc buffer, pH 5.5. The crude enzyme solution was dialyzed against the same buffer for 48 h at 4 °C, and then concentrated by ultrafiltration (M.W. cut off 10,000 dalton). The concentrated enzyme solution was applied to DEAE-sephadex ion exchange column (3.5 X 50.0 cm), preequilibrated with the same buffer, and eluted with NaCl gradient of 0 - 0.5 M in a flow rate of 0.4 ml/min at 4 °C. Active fractions containing greater than 50% of maximal peak activity were pooled and concentrated by ultrafiltration. For further purification, gel filtration with Sephadex G-100 column (1.6 X 70.0 cm) was successfully performed in the same buffer at 4 °C. The concentration of protein was determined according to the Lowry method[10] with bovine serum albumin as standard protein.

Molecular Weight Determination

The molecular weight of the enzyme was determined by SDS-PAGE with standard proteins (Sigma Chemical Co., St. Louis. MO) consisted of phosphorylase B (M.W. 110,000), bovine serum albumin (M.W. 90,000), ovalbumin (M.W. 52,200), carbonic anhydrase (M.W. 36,200), soybean trypsin inhibitor (M.W. 29,000) and lysozyme (M.W. 21,400). SDS-PAGE was carried out according to the method of Laemmli[9].

A running gel (T12%) was prepared with distilled water, 1.5M Tris-HCl (Bio-Rad, California, USA) (pH 8.8) (25% v/v), SDS (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) (0.1% w/v), acrylamide (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) (12% w/v), N,N'-methylene-bis-acrylamide (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) (0.32% w/v), ammonium persulfate (Sigma Chemical Co. St. Louis. Mo.) (0.05% v/v) and N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine (TEMED) (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) (0.05% v/v).

A stacking gel (T 4%) was prepared from distilled water, 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) (25% v/v), SDS (0.1% v/v) acrylamide (4% w/v), N,N'-methylene-bis-acrylamide (0.1% w/v), ammonium persulfate (0.05% v/v) and N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine (TEMED) (0.1% v/v). Proteins were diluted (1:4) with sample buffer (0.065 M Tris-HCl buffer, pH 6.8,

containing 10% glycerol, 1% SDS, 0.005% bromophenol blue, and 1% 2-mercaptoethanol) and denatured by heating at 100°C for 4 min. Proteins were then loaded onto 1 mm thick gel and run in a buffer of 0.6% Tris, 2.9% glycine, and 0.1% SDS, pH 8.3 at the current of 120 V. Following electrophoresis, gels were stained with Coomassie brilliant blue R 250, and then destained in 40% ethanol and 10% acetic acid

Effect of pH and Temperature on the Enzyme Activity

The protease activity of the enzyme was assayed at various temperatures of 20 °C and pH 5.5. The enzyme activity was also determined at an optimum temperature and a pH range of 3.5-10.5, respectively in citrate buffer for pH 3.5-4.5, phosphate buffer for pH 5.5-7.5, and in glycine-NaOH buffer for pH 8.5-10.5.

Effect of pH and Temperature on the Enzyme Stability

The enzyme solution was stood for 30 min at the pH range of 3.5-10.5 and room temperature, and concurrently incubated for 30 min at a temperature range of 20-70 °C in water bath and pH 5.5. The protease activity was assayed at pH 5.5 at 37 °C.

Effect of NaCl concentration on enzyme activity.

The salt-tolerant protease activity of the enzyme was assayed at 5%-20% NaCl concentrations and pH 5.5.

The effect of NaCl concentration on enzyme activity was determined by adding 500 μ l of enzyme to 500 μ l of 0.6% casein at 5~20% NaCl concentrations.

Effect of Metal Ions and Inhibitors

The effects of metal ions were investigated by using AgNO₃, BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, FeSO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, MnSO₄, and ZnSO₄. The effects of protease inhibitors were also studied by using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), iodoacetic acid, phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), 2,4-dinitrophenol, 2-mercaptoethanol, and *O*-phenanthroline. The purified protease was preincubated in the absence and the presence of bivalent cations such as Mg²⁺, Ca²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ba²⁺, and Fe²⁺ and other inhibitors with a final concentration of 1 mM in 1/15 M phosphate buffer, pH 5.5 for 30 min at 40 °C. The protease activity was measured at pH 6.5 and 50 °C. The remaining activity was expressed as a percentage of the activity compared with control.

Measurement of Kinetic Constants

The kinetic constants, K_m and V_{max} for the hydrolysis by the purified enzyme were determined by Lineweaver–Burk plot[12]. Casein dissolved in 1/15 M phosphate buffer, pH 5.5 was used as a substrate at various concentrations of 1–10 mg/m

3. Results and Discussion

Purification of *Asp. sp. 101* protease

Asp. sp. 101 was inoculated in 2% defatted soybean flour and cultivated for 5 days at 27 °C in shaking incubator. The crude enzyme prepared by c.f.g. 5,000 rpm, 15min. The protease was purified from the culture supernatant of *Asp. sp. 101*. An ammonium sulfate (40%–80% saturation) precipitation was done on the crude enzyme. The precipitate was dissolved in 10ml of 20mM NaOAc buffer, pH 5.5, dialyzed against the same buffer and then put onto a pre-equilibrated DEAE–sephadex column (3.5 X 50.0 cm). The fractionation of protease by ion exchange chromatography on DEAE–sephadex A–50 was first performed, as shown in Figure 1. Active protein peaks could be obtained which were eluted from the column with a salt linear gradient in the concentration of 0–0.5 M NaCl. Most protease activity was mainly detected on the relatively large protein peak that was first eluted with 0.2 M NaCl gradient, and minor active protein peaks were eluted with 0.4 M NaCl gradient. Gel filtration chromatography profile is shown in Figure 2. Only one large protein peak with protease activity was separated. After the final purification step, the purified enzyme had a specific activity of 2301units/mg protein, which indicated that the enzyme was purified 12–fold with approximately 7 % yield (table 1). The electrophoretic patterns of the protein eluents from the active protein peaks for each chromatography purification were investigated on the SDS–PAGE gel (Fig. 3). The active crude enzyme from *Asp. sp. 101* exhibited a few protein bands on the SDS–PAGE gel. However, the electrophoretic pattern of the active protein peak from the gel filtration chromatography showed only one protein band (lane A) in Figure 3. This result indicated that the proteins of different molecular weight without any protease activity in the active crude enzyme were removed through the final gel filtration procedure. In addition, it was assumed that there existed two types of active enzymes having a different charge and the same molecular weight, since two active enzyme peaks were separated from ion exchange chromatography and identified as one active enzyme band on the SDS–PAGE

and gel filtration step. For the following experiment in the present report, the active enzyme that was purified by gel filtration from the main large peak of ion exchange chromatography was employed.

Molecular Weight

The molecular weight of the protease finally purified through gel filtration was estimated to about 25kDa by 12% SDS-PAGE, as shown in Figure 3. This value based its Rfvalue by semilogarithmic graph of molecular weight versus relative mobility, Fig. 4. It was lower than that of the alkaline protease, 29kDa [6] and internal acid protease I and II, 60kDa and 42kDa, respectively [23]. However, it was similar to the molecular weight, 23kDa of proteinase from *Aspergillus flavus*. [8] **pH effect on the activity and stability of *Asp. sp. 101***

The optimal pH for protease activity was determined at pH 3.5-10.5. The enzyme had the optimum pH 6.5 (Fig. 5). The enzyme activity was relatively higher in the acidic region than in the alkaline region.[13, 19]

The pH stability of the protease was also investigated at pH 3.5-10.5 by measuring the residual enzyme activity. The enzyme was more stable in the acidic region, pH 4.5-6.5 than in the alkaline region, pH 7.5-10.5. Thus, the protease from *Asp. sp. 101* was considered to be acidic protease. According to Lim *et al.* [18], the stability of protease from *Aspergillus saitoi* was very stable at pH 3-6.3 at 30 °C.

Effect of temperature on the *Asp. sp. 101* protease activity and stability

The effect of temperature on the activity and stability of the protease also determined at 20-70 °C and pH 6.0. The optimal temperature for the enzyme activity was approximately 50 °C. (Fig. 6) This is the same result of Lim *et al.* [18] in which optimal temperature for most acid protease was at 45-55 °C. *Asp. sp. 101* protease was reasonably stable up to 40 °C and its stability sharply decreased at higher temperatures(Fig. 6), which was the same results of Cha[20] and Lim[17]. The residual activity at 50, 60, and 70 °C 40, 25, and 20%, respectively.

Effect of Salt concentration on *Asp. sp. 101* protease on activity and stability

Effect of NaCl concentration on *Asp. sp. 101* protease activity and stability was shown in Fig. 7. The protease was decreased greatly as NaCl

Purification Steps	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude S.N.T	97270	490.7	198.22	100	1
Ammonium sulfate	21229	19.4	1094.27	21.82	5.52
Ultrafiltration After Dialized	13351	10.8	1236.2	13.72	6.23
Sephadex A-50	8913	5.24	1700.9	9.15	8.57
Sephadex G-100	6581	2.86	2301	6.75	11.59

The enzyme assay for the proteolysis was carried out with 0.6% of casein in 1/15 M phosphate buffer, pH 7.0 at 37°C for 10 min. The reaction was stopped by 0.4 M trichloroacetic acid and stood for 30 min. Then, it was filtrated and mixed with 1 N folin reagent. The absorbance of the reaction mixture was measured at 660 nm. The enzyme unit (U) was defined as the amount of enzyme producing 1 mol of tyrosine per 10 min. The protein concentration was determined according to the Lowry method.

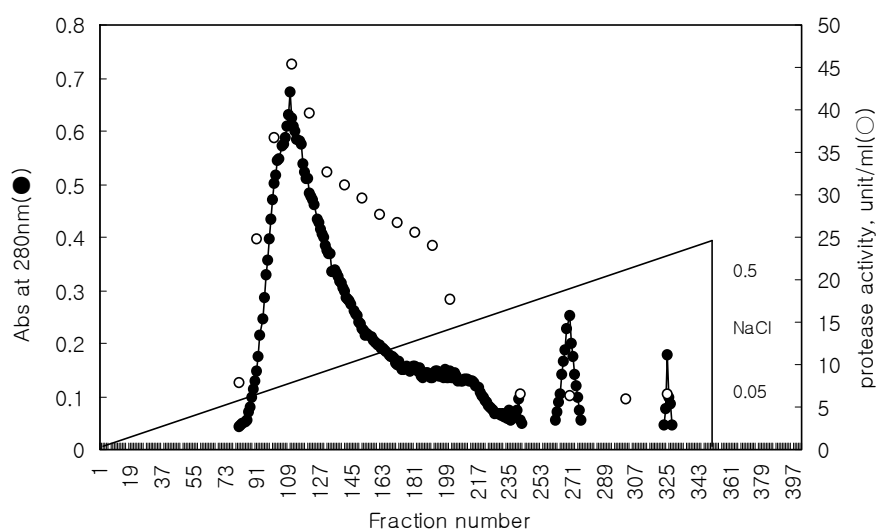


Fig. 1. Ion exchange chromatogram of protease from *Asp.sp.101* on DEAE-sephadex.

The protein sample was applied to the column (3 x 50 cm) equilibrated with 20 mM of NaOAc buffer, pH 5.5. The protein was eluted with 0-0.5 M of the NaCl linear gradient at the flow rate of 0.4 ml/min at 4°C. The fraction volume was 2 ml.

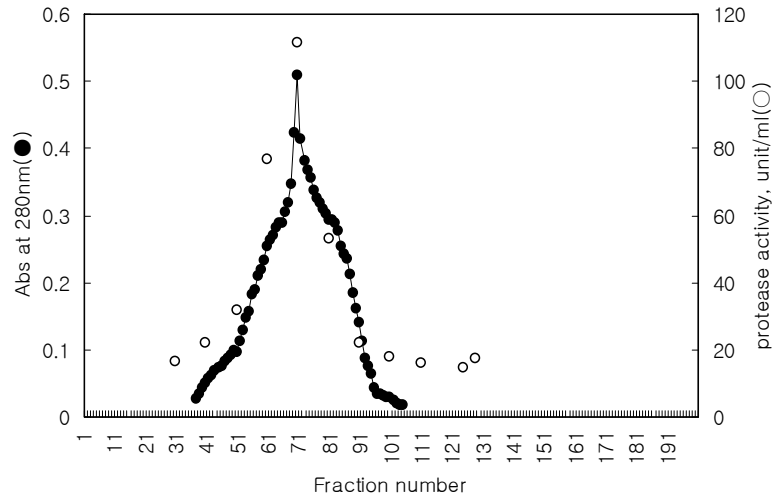


Fig. 2. Gel chromatogram of protease from *Asp.sp.101* on Sephadex G-100.

The protein was eluted through the column (1.6 x 70 cm) equilibrated with 20 mM of NaOAc buffer, pH 5.5 at the flow rate of 0.3 ml/min at 4°C. The fraction volume was 3ml.

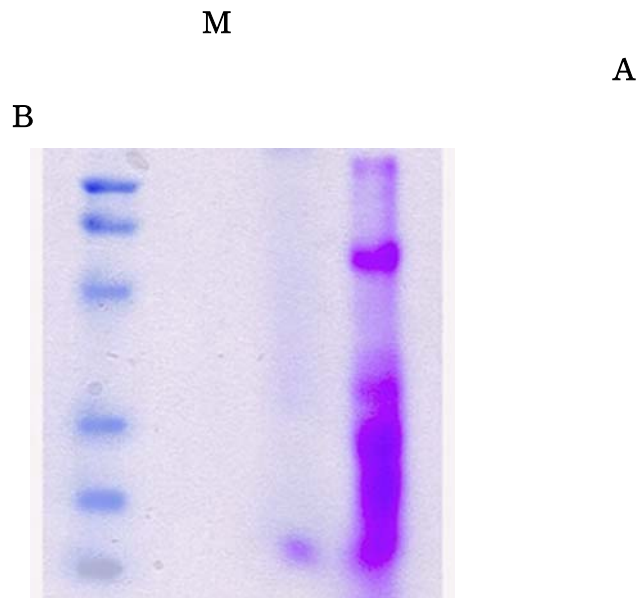


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of protease from *Asp.sp.101*.

M : Molecular marker, A : *Asp. sp. 101* protease, B : Crude S.N.T

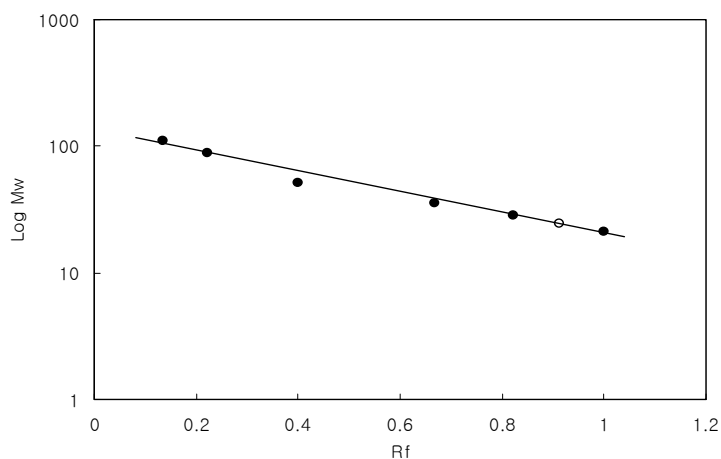


Fig. 4. Molecular weight determinant of the *Asp. sp. 101* protease by 12% SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

Purified enzyme (○) ; Size marker (●) : phosphorylase B (110kD), Bovine serum albumin (90kD), Ovalbumin (52.2kD), Carbonic anhydrase (36.2kD), Soybean trypsin inhibitor (29kD), Lysozyme (21.4kD)

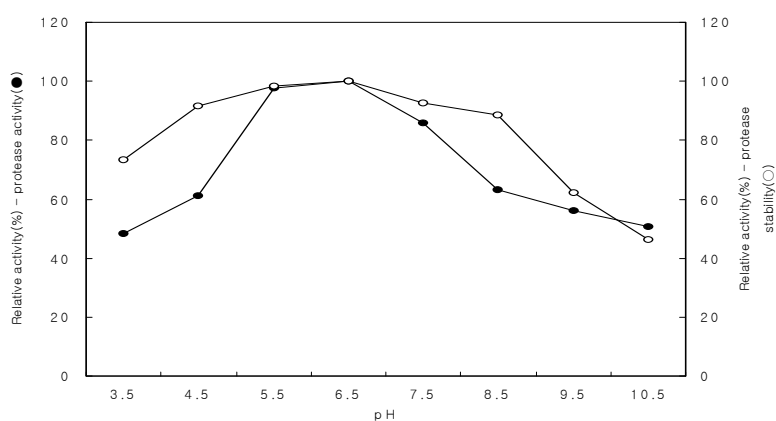


Fig. 5. Effect of pH on the activity and stability of the *Asp. sp. 101* protease.

The enzyme activity (●) was assayed in citrate buffer for pH 3.5–4.5, phosphate buffer for pH 5.5–7.5 and in glycine–NaOH buffer for pH 8.5–10.5, respectively. The enzyme stability (○) was measured by incubating it for 30min at the various pH values and 30°C. After the incubation, the enzyme assay was performed in 1/15 M phosphate buffer, pH 5.5 at 37°C.

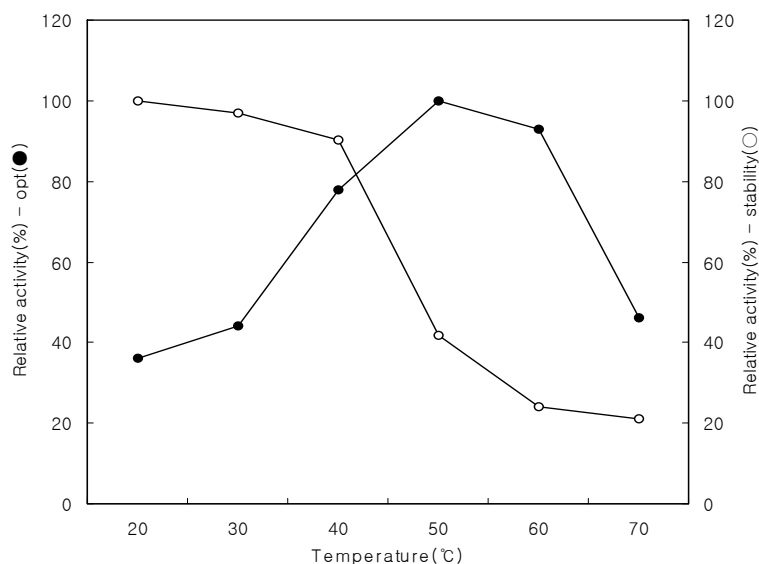


Fig. 6. Effect of temperature on the activity and stability of the protease from *Asp.sp.101*.

The protease activity (●) was assayed at various temperatures of 10–60°C and pH 7 in 1/15 M phosphate buffer. The enzyme stability (○) was measured by keeping it for 30min at the various temperatures and pH 7, and the enzyme assay was performed in 1/15 M phosphate buffer, pH 7.0 at 37°C.

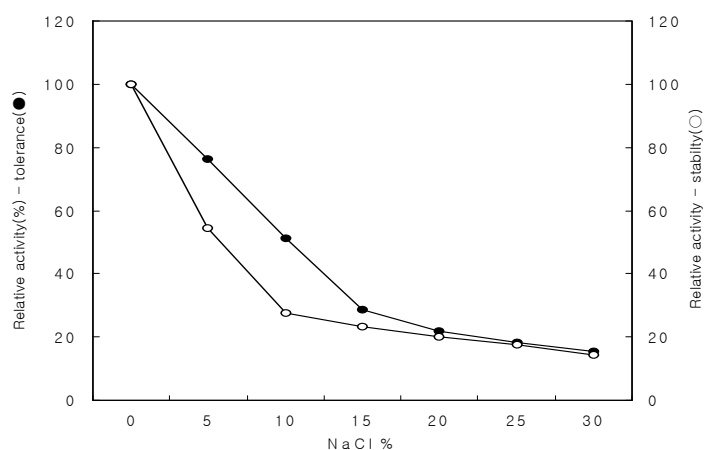


Fig. 7. Effect of salt on the activity and stability of the protease from *Asp.sp.101*.

The salt-tolerant protease activity (●) was assayed at various NaCl concentration of 5–30% and pH 7 in 1/15 M phosphate buffer. The enzyme

stability (○) was determined by adding 500 μl of protease to 500 μl of 0.6% casein with 5–30% NaCl.

concentration increased. Salt-tolerant protease activity was determined at 0–30% NaCl concentrations and pH 6.0. and it remained at 5 and 10% NaCl concentration, enzyme activities were survived by 80 and 50%, respectively. This was similar to the result of Fukushima[24]. This suggests that the *Asp.* sp. 101 protease can hydrolyze anchovy protein in anchovy sauce with more than 25% NaCl concentration. The salt stability of the protease was also investigated at 5–30% NaCl concentration by measuring the residual enzyme activity.

Effect of Metal Ions on the Enzyme Activity

The effects of metal ions on the protease activity are shown in Table 2. 1 mM Cu^{2+} and Mn^{2+} increased the enzyme activity by 84–97% compared with control. On the contrary, Ag^{2+} , K^{+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} inhibited protease activity by 12%, 7%, 14% and 15%. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} and Ba^{+} showed inhibitory effect on the protease activity. This result was similar to the result by Choi[19]. Thus, the acid protease from *Asp.* sp. 101 was not under the influence of relative activity by metal ions. [2]

Effect of Inhibitors on the Enzyme Activity

The effects of protease inhibitors were also determined at 50°C and pH 6.0. (Table 3) *Asp.* sp. 101 protease was inhibited by 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), which was specific for serine protease. EDTA and *o*-phenanthroline also inhibited protease by 52% and 16%, respectively. Especially, EDTA was the strongest inhibitor, followed by in order of phenylmethylsulfonyl fluoride, *o*-phenanthroline, and Iodoacetic acid. In general, EDTA and *o*-phenanthroline has known to remove the essential metal ions from the enzyme molecule to inactivate the enzyme. This indicates that the acid protease from *Asp.* sp. 101 is a serine protease which requires metal ion group for the enzyme activity. [3, 4]

Enzyme kinetics

In order to evaluate the kinetic constant of *Asp.* sp. 101 protease, the initial velocities of the enzyme reactions were determined depending on various concentrations of the casein substrate. As shown in Figure 8, the kinetic constant, K_m and V_{max} was determined by using a Lineweaver–Burk plot. The

reaction properly followed the Michaelis–Menten kinetics[12]. K_m was 1.04 mg/ml and the V_{max} was 124.84 unit/ml. K_m value was similar to 1.3 mg/ml

Ion	Metal	Relative activity(%)
	Control	100
Ag ²⁺	AgNO ₃	88
Ba ²⁺	BaCl ₂	101
Ca ²⁺	CaCl ₂	97
Co ²⁺	CoCl ₂	109
Cu ²⁺	CuSO ₄	184
Fe ²⁺	FeSO ₄	85
K ⁺	KH ₂ PO ₄	93
Mg ²⁺	MgSO ₄	98
Mn ²⁺	MnSO ₄	197
Zn ²⁺	ZnSO ₄	86

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml metal ion solution (1 mM), was incubated at 25° for 30 min and the residual activities were assayed. The results were expressed as percent (%) relative activity to that of none.

Inhibitor	Relative activity (%)
Control	100
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	48
Iodoacetic acid	92
Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)	53
2,4-Dinitrophenol	100
2-Mercaptoethanol	100
o-Phenanthroline	84

Enzyme was incubated in 1/15 M phosphate buffer containing various reagent for 30 min at 25°. The residual activities were assayed by the spectrophotometric method as described in the text. The results were expressed as percent (%) relative activity to that of none.

aEDTA : ethylenediaminetetraacetic acid, PMSF: phenylmethyl sulfonylfluoride.

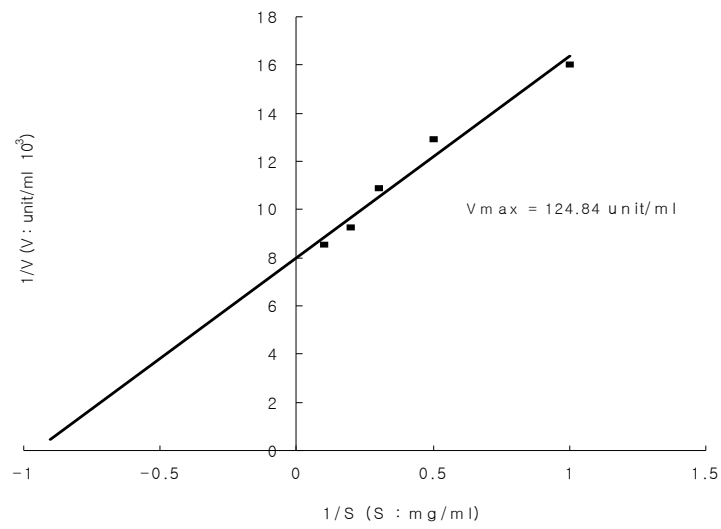


Fig. 8. Lineweaver-Burk plot for hydrolysis of casein by protease from *Asp. sp.101*.

The enzyme activity was assayed with various concentrations (1-10 mg/ml) of casein in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0).

of the alkaline protease [15], and similar to 1.11 mg/ml of *Rhizopus oryzae* protease [1].

4. Conclusions

The microorganism producing salt-tolerant acid protease, isolated from the Korean traditional soybean paste, was identified as *Asp.* sp. 101. The enzyme was purified to homogeneity from the culture supernatant of *Asp.* sp. 101 by ammonium sulfate fractionation, ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50, gel chromatography on Sephadex G-100, and SDS-polyacrylamide electrophoresis. The specific activity and the purification fold of the purified enzyme were 2,301 unit/mg and 11.6, respectively. The molecular weight of the purified enzyme was 25,000 Da on SDS-PAGE. The optimal pH and temperature for the enzyme activity were pH 6.5 and 50°C, respectively. The enzyme activity was relatively stable at pH 4.5–7.5 and temperature below 40°C. The protease was relatively stable at 5 and 10% salt concentrations. This protease was inhibited by Ag^{2+} and Zn^{2+} , but, activated by Cu^{2+} and Mn^{2+} . In addition, enzyme was potently inhibited by EDTA and PMSF. It was conclusively considered that the purified enzyme was a serine protease influenced by metal ions. *K_m* and *V_{max}* values for hamastein milk casein were 1.04 mg/mL and 124.84 unit/min, respectively.

5. Reference

1. Banerjee, R., and B. C. Bhattacharya. 1993. Kinetic properties of extracellular alkaline protease of *Rhizopus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 380–382.
2. Cheong Choi et al. 1987. Production of acid protease by *Aspergillus fumigatus* A-12 and Characteristics of the Enzyme. *Resource research.* 6.
3. Cheong Choi et al. 1996. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111 in Korean Traditional soy sauce. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**: 915–921.
4. Cheong Choi et al. 1996. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-118 in Korean Traditional soy sauce. *Agricultural chem. and Biotech.* **39**: 460–465.
5. Heejeong Chae et al. 1997. Production and characteristics of enzymatically hydrolyzed soy sauce by the treatment using proteases. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 784–787.

6. H. Tatsumi., et al. 1988. Cloning and sequencing of the Alkaline Protease cDNA from *Aspergillus oryzae*. Agric. Biol. Chem. **52**: 1887-1888.
7. Jonghyup Kim. 1975. Microbiology . Samilgak. 63-70.
8. J. E. Mellon., P. J. Cotty. 1996. Purification and partial characterization of an elastolytic proteinase from *Aspergillus flavus* culture filtrates. Appl. Microbiol. Biotechnol. **46**: 138-142.
9. K. Murakami., Ishida. Y., and M. Atsushi. 1991. Isolation and characterization of alkaline protease gene of *Aspergillus oryzae*. Agric. Biol. Chem. **55**: 2807-2811.
10. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
11. Laemmle, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**: 680-685.
12. Lineweaver, H., and D. Burke. 1934. Determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. **56**: 658-666.
13. Manjae Chung. 1984. Studies on the production of acid protease by *Rhizopus japonicus* and purification of the enzyme. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. **12**: 45-50.
14. Myeongrak Choi , Jinman Kim. 1998. Optimization of *Aspergillus oryzae* immobilizing technology for acid protease production. Bull. Yosu Nat'l. Univ. **13**: 759-765.
15. Moo Bae, Pilyon Park. 1989. Purification and Characterization of thermotolerable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp. No. 8-16. Kor. J. Microbiol. Bioeng. **17**: 545-551.
16. Peder Barbesgaard, Hans Peter Heldt-Hansen, Borge Diderichsen. 1992. On the safety of *Aspergillus oryzae* : a review. Appl Microbiol Biotechnol. **36**: 569-572.
17. Seongil Lim. 2000. Purification and characterization of protease produced by *Aspergillus wentii* isolated from Korean traditional *Meju*. Korean J. Food sci. technol. **32**: 161-167.
18. Seongil Lim, Jinyoung Yoo. 1999. Purification of fungal protease produced by *Mucor racemosus f. racemosus* PDA 103 from Korean traditional *Meju*. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **27**: 446-451.

19. Sangyul Kim. 1973. Isolation of *Penicillium sp.* and the properties of the acid protease. Korean J. appl. Microbiol. Bioeng. **1**: 93-98.
20. Woensuep Cha, cheong Choi. 1995. Characteristics and action pattern of alkaline protease produced from *Aspergillus fumigatus*. J. korean soc. food nutr. **18**: 348-355.
21. Youngki Yang et al. 1998. The hybrid formation between *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* and *Penicillium chrysogenum* by nuclear transfer and the production of alkaline protease. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **26**: 290-296.
22. Yonggun An. 1994. Enzyme purification method. Yangseogak. 20-35.
23. Y. Tsujita, and A. Endo. 1978. Presence and partial characterization of internal acid protease of *Aspergillus oryzae*. Appl. environ. microbiol. **36**: 237-242.
24. Yaichi Fukushima., et al. 1989. Continuous protease production in a carbon-limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*. Appl Microbiol Biotechnol. **30**:604-608.

제 6 절 된장으로부터 분리한 효모(Yeast) 단백질분해효소의 정제 및 특성

1. Introduction

In soy-sauce processes salt-tolerant yeasts and enzymes are very important for the flavor formation. Most grow actively at higher salty condition than those optimal for bacteria; hence it usually easy to keep large-scale cultures of yeast free from fast growing, contaminating microorganisms. In addition, a new process using immobilized salt-tolerant yeasts has been developed and shown to be very effective for accelerating the flavor formation. However, many strains have been developed to suit a specific need.[17][18] Among halotolerant microorganisms, it have been known for the bacteria producing protease, including *Halobacterium salinarium*, *Bacillus sp.*, *Halobacterium halobium*, *Halomonassp.*, etc[19] and their characteristics for the protease were

investigated. In case of yeast, there was only reported on producing of extracellular protease from *Saccharomyces lipolytica*[20][21] and several strains isolated from traditional meju[22]. But excepting *Zygosaccharomyces rouxii*[23] as salt-tolerant yeast, very little was known about studies on production of extracellular enzyme.[24] With increasing demand of protease in processing of protein foods, high activity of proteases is required to reduce processing expenditure and to improve product quality. Therefore, In this study we isolated a microorganism enduring on high salty condition and investigated its biochemical properties and electrophoretic patterns of both the membrane and soluble proteins to identify the strain. Also, In order to understand better the potential roles and uses of protease in food bio-processing, the purification and characteristics of the salt-tolerant protease from *Saccharomyces* sp. B101 was executed.

2. Materials and Methods

Microorganism and Cultivation

Asp. sp. 101 producing a salt-tolerant acid protease was isolated according to the method of Tsujita and Endo[23] from traditional soybean pastes that were purchased from local markets and households in Korea. *Asp.* sp. 101 was cultivated in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 200 ml of culture broth consisted of 2 % defatted soybean flour at 27 °C for 4 days in a shaking incubator at 150 rpm.

Assay of protease

Enzyme activity was determined according to the modified method of Anson[7]. 1 ml of enzyme solution was added 5 ml of 0.6 % casein solution in 1/15 M phosphate buffer, pH 5.5 at 37 °C for 10 min. The reaction was stopped by adding 5 ml of 0.44 M trichloroacetic acid (TCA), and the solution was allowed to stand for 30 min. The resulting solution was then filtered with Whatman No. 2. 2 ml of filtrate was mixed with 5 ml of 0.55 M Na₂CO₃ solution and 1 ml of 1 N Folin reagent, and then the mixture was stood for 30 min at room temperature. The absorbance was measured at 660 nm with spectrophotometer (HP 8452A series, HEWLETTPACKRD Co. USA), which was converted to the

amount of tyrosine equivalent by applying a standard curve. One unit (U) of protease activity was defined as the amount of enzyme releasing 1mol of tyrosine equivalent per 10 min.

Estimation of protein

Protein concentrations were determined according to Lowry[10] with egg ovalbumin as the standard. During column chromatography, concentration of protein in the fractions were monitored by measuring their absorbance at 280nm.

Enzyme purification

Unless otherwise specified, all operations for the purification of the extracellular protease were performed at 4 °C.[11]

Fungal cells were harvested from the 500 ml culture broth by centrifuging at 5,000 rpm for 15 min. The remaining culture supernatant was collected as a crude enzyme solution, and ammonium sulfate was added to precipitate an enzyme. The resultant precipitate of crude enzyme was dissolved in 20 mM NaOAc buffer, pH 5.5. The crude enzyme solution was dialyzed against the same buffer for 48 h at 4 °C, and then concentrated by ultrafiltration (M.W. cut off 10,000 dalton). The concentrated enzyme solution was applied to DEAE-sephadex ion exchange column (3.5 X 50.0 cm),preequilibrated with the same buffer, and eluted with NaCl gradient of 0 - 0.5 M in a flow rate of 0.4 ml/min at 4 °C. Active fractions containing greater than 50% of maximal peak activity were pooled and concentrated by ultrafiltration. For further purification, gel filtration with Sephadex G-100 column (1.6 X 70.0 cm) was succeedingly performed in the same buffer at 4 °C. The concentration of protein was determined according to the Lowry method[10]with bovine serum albumin as standard protein.

Molecular Weight Determination

The molecular weight of the enzyme was determined by SDS-PAGE with standard proteins (Sigma Chemical Co., St. Louis. MO) consisted of phosphorylase B (M.W. 110,000), bovine serum albumin (M.W. 90,000), ovalbumin (M.W. 52,200), carbonic anhydrase (M.W. 36,200), soybean trypsin inhibitor (M.W. 29,000) and lysozyme (M.W. 21,400). SDS-PAGE was carried

out according to the method of Laemmli[9].

A running gel (T 12%) was prepared with distilled water, 1.5M Tris-HCl (Bio-Rad, California, USA) (pH 8.8) (25% v/v), SDS (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) (0.1% w/v), acrylamide (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) (12% w/v), N,N'-methylene-bis-acrylamide (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) (0.32% w/v), ammonium persulfate (Sigma Chemical Co. St. Louis. Mo.) (0.05% v/v) and N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine (TEMED) (Bio Basic Inc., Toronto, Canada) (0.05% v/v).

A stacking gel (T 4%) was prepared from distilled water, 0.5M Tris-HCl (pH 6.8) (25% v/v), SDS (0.1% v/v) acrylamide (4% w/v), N,N'-methylene-bis-acrylamide (0.1% w/v), ammonium persulfate (0.05% v/v) and N,N,N',N'-tetramethylene-ethylenediamine (TEMED) (0.1% v/v). Proteins were diluted (1:4) with sample buffer (0.065 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, containing 10% glycerol, 1% SDS, 0.005% bromophenol blue, and 1% 2-mercaptoethanol) and denatured by heating at 100°C for 4 min. Proteins were then loaded onto 1 mm thick gel and run in a buffer of 0.6% Tris, 2.9% glycine, and 0.1% SDS, pH 8.3 at the current of 120 V. Following electrophoresis, gels were stained with Coomassie brilliant blue R 250, and then destained in 40% ethanol and 10% acetic acid.

Effect of pH and Temperature on the Enzyme Activity

The protease activity of the enzyme was assayed at various temperatures of 20 °C and pH 5.5. The enzyme activity was also determined at an optimum temperature and a pH range of 3.5-10.5, respectively in citrate buffer for pH 3.5-4.5, phosphate buffer for pH 5.5-7.5, and in glycine-NaOH buffer for pH 8.5-10.5.

Effect of pH and Temperature on the Enzyme Stability

The enzyme solution was stood for 30min at the pH range of 3.5-10.5 and room temperature, and concurrently incubated for 30min at a temperature range of 20-70 °C in water bath and pH 5.5. The protease activity was assayed at pH 5.5 at 37 °C.

Effect of NaCl concentration on enzyme activity

The salt-tolerant protease activity of the enzyme was assayed at 5%–20% NaCl concentrations and pH 5.5.

The effect of NaCl concentration on enzyme activity was determined by adding 500 μl of enzyme to 500 μl of 0.6 % casein at 5~20 % NaCl concentrations.

Effect of Metal Ions and Inhibitors

The effects of metal ions were investigated by using AgNO_3 , BaCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , and ZnSO_4 . The effects of protease inhibitors were also studied by using ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), iodoacetic acid, phenylmethyl sulfonylfluoride (PMSF), 2,4-dinitrophenol, 2-mercaptoethanol, and *O*-phenanthroline. The purified protease was preincubated in the absence and the presence of bivalent cations such as Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , and Fe^{2+} and other inhibitors with a final concentration of 1 mM in 1/15 M phosphate buffer, pH 5.5 for 30 min at 40 °C. The protease activity was measured at pH 6.5 and 50°C. The remaining activity was expressed as a percentage of the activity compared with control.

Measurement of Kinetic Constants

The kinetic constants, K_m and V_{max} for the hydrolysis by the purified enzyme were determined by Lineweaver–Burk plot[12]. Casein dissolved in 1/15 M phosphate buffer, pH 5.5 was used as a substrate at various concentrations of 1–10 mg/m

4. Results and Discussion

Saccharomyces sp. B101 was inoculated in 2% defatted soybean flour and cultivated for 2 days at 30°C in shaking incubator. The crude enzyme prepared by c.f.g. 5,000 rpm, 15min. The protease was purified from the culture supernatant of *Saccharomyces* sp. B101. The supernatant was precipitated by increasing ammonium sulfate concentration by 20%. An ammonium sulfate precipitation was done on the crude enzyme, as shown in Figure 5. Protease activity was the highest in 60–80% ammonium sulfate fraction. The precipitate was dissolved in 10 ml of 20 mM NaOAc buffer (pH 5.5), dialyzed (10-kDa cutoff membrane) against the same buffer and then put onto a pre-equilibrated DEAE–sephadex column (3.5 X 50 cm). The fractionation of protease by ion

exchange chromatography on DEAE-sephadex A-50 was first performed, as shown in Figure 6. Active protein peaks could be obtained which were eluted from the column with a salt linear gradient in the concentration of 0-0.5 M NaCl. Most protease activity was mainly detected on the relatively large protein peak that was first eluted with 0.2 M of NaCl gradient, and minor active protein peaks were eluted with 0.4 M of NaCl gradient. But *Saccharomycopsis lipolytica* extracellular protease[32] showed one peak on DEAE chromatography pattern in which the strongest protease eluted between 0.1-0.15 M NaCl gradient, which was different from in this study. Active fractions of active peak from the ion chromatography were collected, and continuously applied into the Sephadex G-100 gel column which was equilibrated with 20 mM of NaOAc buffer (pH 5.5). Filtration profile of the protein eluents through Sephadex G-100 column (1.6 X 70 cm) are shown in Figure 7. Only one large protein peak with protease activity could be separated. It was agreement with result by *Saccharomycopsis lipolytica* neutral protease[35]. Enzyme is usually eluted as one peak on gel filtration chromatography in this study, but *Saccharomycopsis lipolytica* protease showed 2 peaks on gel filtration chromatography, which was unusual case[32]. These purification procedures shown above are summarized in 2. After the final purification step, the purified enzyme had a specific activity of 4688.9 units/mg protein, which indicated that the enzyme was purified 18-fold with approximately 3% of its yield. Purification folds and yields were diverse depend on a kinds of Yeast; 5.7 and 51% in *Serratia marcescens* metalloprotease from soil[47], 12.2 and 4.4% in pathogenic luminous *Vibrio harveyi* cysteine protease from diseased tiger prawn. *Bacillus* sp. KSM-K protease[49] from soil sample showed lower specific activity and yield than our study. Therefore, purification fold and yield of protease might be different depend on a kinds of microorganism, culture medium, and culture conditions, etc. In order to get the maximal yield and activity of protease, selective medium for proteolytic strain need to be used. The electrophoretic patterns of the protein eluents from the active protein peaks for each chromatography purification were investigated on the SDS-PAGE gel, as shown in Figure 9. The active crude enzyme from *Saccharomyces* sp. B101 exhibited a few protein bands on the SDS-PAGE gel. However, the electrophoretic pattern of the active protein peak from the gel

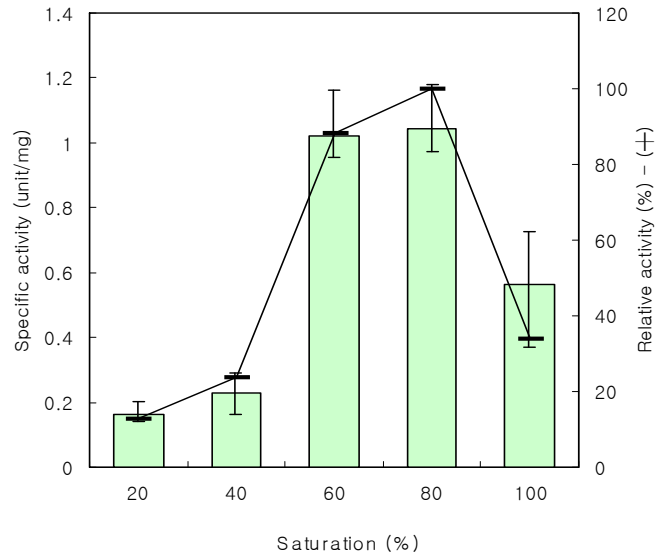


Fig. 5. Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation on the specific activity of the protease from *Saccharomyces* sp. B101.

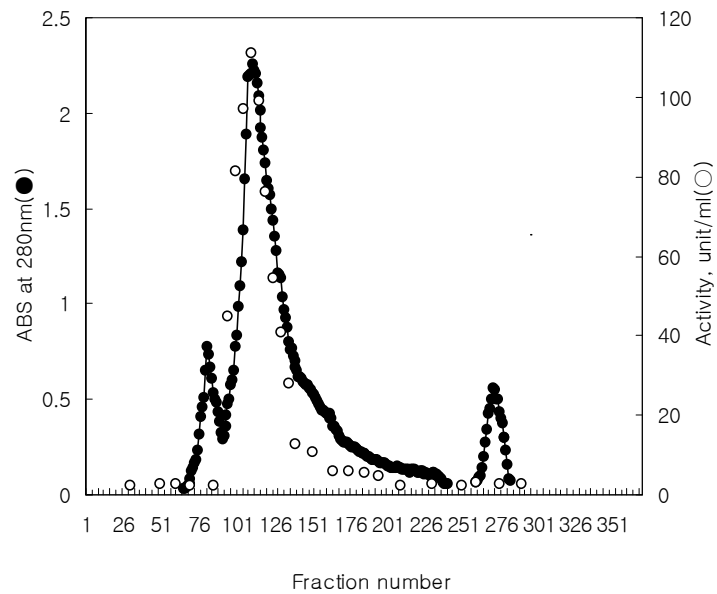


Fig. 6. Ion exchange chromatogram of protease from *Saccharomyces* sp. B101 on DEAE-Sephadex.

The protein sample was applied to the column (3 x 50 cm) equilibrated with 20 mM of NaOAc buffer (pH 5.5). The protein was eluted with 0-0.5 M of the NaCl linear gradient at the flow rate of 0.4 ml/min at 4°C. The fraction volume was 2 ml.

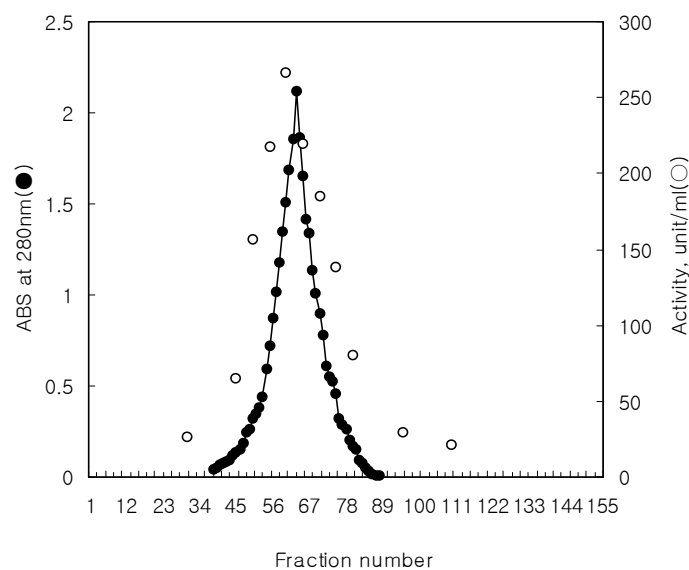


Fig. 7. Gel chromatogram of protease from *Saccharomyces* sp. B101 on Sephadex G-100.

The protein was eluted through the column (1.6 x 70 cm) equilibrated with 20 mM of NaOAc buffer (pH 5.5) at the flow rate of 0.3 ml/min at 4°C. The fraction volume was 3ml.

Purification Steps	Total activity (Units)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude S.N.T	248411.77	956.55	259.70	100	1
Ammonium sulfate	83311.76	49.01	1699.80	33.54	6.55
Ultrafiltration After Dialized	28989.41	14.01	2069.48	11.67	7.97
Sephadex A-50	14968.76	5.34	2800.60	6.03	10.78
Sephadex G-100	7698.82	1.64	4688.87	3.10	18.06

The enzyme assay for the proteolysis was carried out with 0.6% of casein in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) at 37°C for 10min. The reaction was stopped by 0.4 M trichloroacetic acid and stood for 30 min. Then, it was filtrated and mixed with 1 N folin reagent. The absorbance of the reaction mixture was measured at 660nm. The enzyme unit (U) was defined as the amount if enzyme producing 1 mol of tyrosine per 10 min. The protein concentration was determined Table filtration chromatography showed only one protein band (lane B) in Figure 8.

This result indicated that the proteins of different molecular weight without any protease activity in the active crude enzyme could be removed through final the gel filtration procedure. In addition, it was assumed that there existed two types of active enzymes having a different charge and the same according to the Lowry method. molecular weight, since two active enzyme peaks were separated from ion exchange chromatography and identified as one active enzyme band on the SDS-PAGE and gel filtration step. For the following experiment in the present report, the active enzyme that was purified by gel filtration from the main large peak of ion exchange chromatography was employed.

Molecular Weight

The molecular weight of the protease finally purified through gel filtration was estimated to about 33 kDa by 12% SDS-PAGE, as shown in Figure 8. Therefore, there was no necessity to carry out further purification step. This value based its Rf value by semilogarithmic graph of molecular weight versus relative mobility (Fig. 9), indicating that the enzyme is a monomer. It was higher than that of the alkaline protease(27–30 kDa) from *Saccharomycopsis lipolytica* CX161-1B[31] and extracellular protease(30 kDa) from *Candida lipolytica*[32], respectively, but lower than that of antarctic yeast *candida humicola* extracellular protease(36 kDa)[33], *Saccharomyces cerevisiae* Protease B(43 kDa)[34] and *Saccharomycopsis lipolytica* neutral protease(42 kDa)[35]. However, it was similar to the molecular weight (32 kDa) of alkaline proteinase from *Yarrowia lipolytica* 504D.[36]

Effect of pH on the Activity and Stability

The optimum pH for protease activity was determined over the pH range from 3.5 to 10.5. As shown in Figure 10, the optimal pH for the hydrolysis of casein was 8.5. *Saccharomyces* sp. B101 protease had higher proteolytic activity at weak alkaline conditions (pH 7.5–8.5) than at the alkaline region(> 8.5). Therefore, *Saccharomyces* sp. B101 protease was a alkaline protease. Optimal pH of *Saccharomyces* sp. B101 protease was lower than those of alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica* CX161-1B, pH

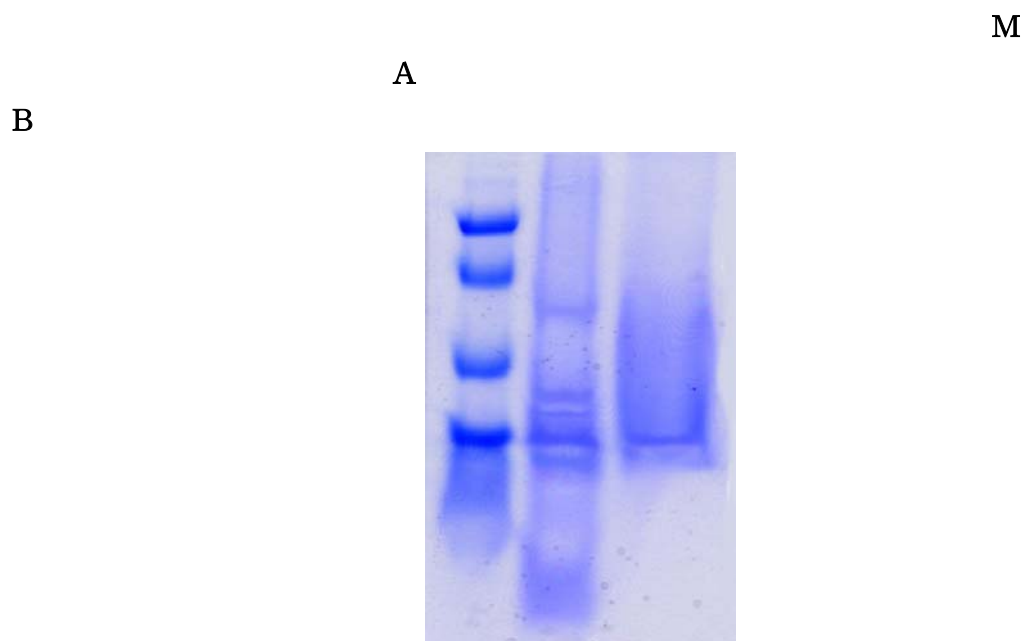


Fig. 8. SDS–polyacrylamide gel electrophoresis of the protease from *Saccharomyces* sp. B101.

- M : Reference protein : phosphorylase B (111 kD), Bovine serum albumin (73 kD), Ovalbumin (47.5 kD), Carbonic anhydrase (33.9 kD), Soybean trypsin inhibitor (28.8 kD), Lysozyme (20.5 kD)
- A : Crude S.N.T
- B : After Sephadex G-100 chromatography (purified enzyme)

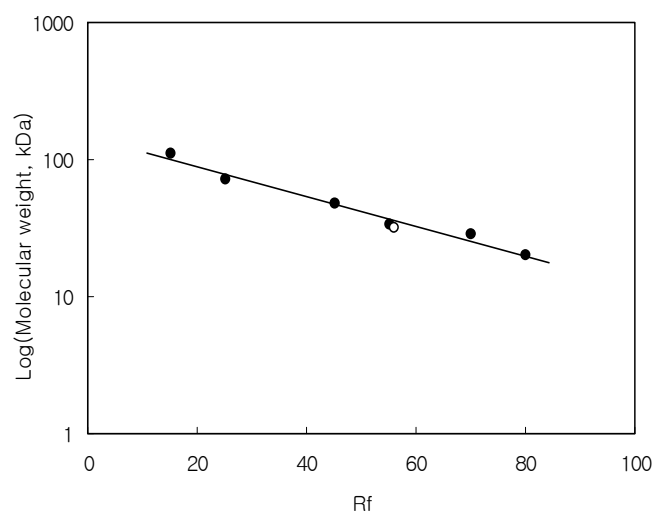


Fig. 9. Molecular weight estimation of the enzyme by 12% SDS–PAGE.

Purified enzyme (○) ; Size marker (●) : phosphorylase B (111 kD), Bovine serum albumin (73 kD), Ovalbumin (47.5 kD), Carbonic anhydrase (33.9 kD), Soybean trypsin inhibitor (28.8 kD), Lysozyme (20.5 kD)

9–10[31], alkaline proteinase from *Yarrowia lipolytica* 504D, pH 9.5 [36].

When investigating the enzyme stability at various pHs, *Saccharomyces* sp. B101 protease exhibited high stability within a range from neutral to weak alkaline pH (6.5– 8.5), but lost its activity above pH 8.5 (Fig. 10). Similar results have been reported for the alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* [45] and a novel protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674 [46], yet these enzymes were inactivated at pH 7.5, implying that the enzyme from *Saccharomyces* sp. B101 is more stable within a neutral pH range. Thus, the protease from *Saccharomyces* sp. B101 was also considered to show the properties of neutral protease.

Effect of Temperature on the Activity and Stability

The effect of temperature on the activity and stability of the protease also examined in the range of 10–60°C at pH 7.0. As shown in Figure 11, the optimum temperature for the enzyme activity was approximately 30°C. This optimum temperature belongs to a range for *Saccharomyces carlsbergensis* M15 protease as 30–35°C as reported by Cichosz *et al.*[37], and *Candida humicola* extracellular protease[33] and *Aspergillus terreus*(IJIRA 6.2) alkaline serine protease[45] were 37°C, which were a little higher than that of *Saccharomyces* sp. B101 protease in this study.

The purified enzyme was stable up to 40°C and its stability sharply decreased at higher temperatures (Figure 11), which showed its non-thermostability. Temperature for optimal stability *Saccharomyces* sp. B101 protease was higher than optimal activity temperature. The 60, and 25% of residual activity were shown at 50, and 60°C, respectively. Thermal inactivation was observed more rapidly at 40°C. The temperature for optimal stability of *Saccharomyces* sp. B101 was agree with that of *Saccharomyces cerevisiae* proteinases by Anna[38]. But, optimal stability temperature in this study was lower than those of *Bacillus* sp. YG95 proteolytic enzyme from traditional Me-jus[49].

Effect of Salt on the Activity and Stability

Effect of NaCl concentration on protease activity and stability were shown in Fig. 12. Relative activity of *Saccharomyces* sp. B101 protease decreases with

increasing NaCl concentration.

The result of salt-tolerant protease activity was examined in the concentration of 0%-25% at pH 7.0, and it was resulted that the 90 and 70% of residual activity were shown at 5% and 10%, respectively. This result was similar to the result by Fukushima[39]. These results suggest that the protease from *Saccharomyces* sp. B101 can hydrolyze anchovy protein in anchovy sauce with more than 15% NaCl concentration. The salt stability of the enzyme was also investigated in the concentration of 5-25% by measuring the residual enzyme activity. As shown in Figure 12, the purified enzyme was stable up to 15% and its stability sharply was decreased, that is, relative activity of purified protease was lessened with increasing NaCl concentration. But, optimal stability salt in this study was lower than those of haloalkaliphilic *Natrialba magadii* (formerly *Natronobacterium magadii*) extracellular serine protease in hypersaline environments (>15% NaCl)[50].

Effect of Metal Ions on the Enzyme Activity

The effects of metal ions on the protease activity are represented in Table 3. Under the conditions employed, Mn^{2+} with 1 mM increased the enzyme activity by 5% when compared to the control of absence for metal ion. On the contrary, Ag^{2+} , Cu^{+} , Mg^{2+} and Fe^{2+} showed somewhat an inhibitory effect. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} and Ba^{+} had no inhibitory effect on the enzyme activity. This result was similar to the result by Choi[40]. Thus, the protease from *Saccharomyces* sp. B101 was not under the influence of relative activity by metal ions. [32][36] The salt-tolerant protease activity (●) was assayed at various NaCl concentration of 5-25% and pH 7 in 1/15 M phosphate buffer. The enzyme stability (○) was determined by adding 500 μl of protease to 500 μl of 0.6% casein with 5-25% NaCl.

Effect of Inhibitors on the Enzyme Activity

The effects of other protease inhibitors were also examined in 1/15 M phosphate buffer at pH 6.0. The results are shown in Table 4. The enzyme activity was inhibited by protease inhibitors such as phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) with 1 mM, which were specific for the inhibition of serine protease. Therefore, the enzyme from *Saccharomyces* sp. B101 can be classified as a serine protease based on its sensitivity to PMSF. EDTA and

o-phenanthroline showed an inhibitory effect on the enzyme activity. Especially, the inhibition effect of EDTA was shown to be the strongest among the

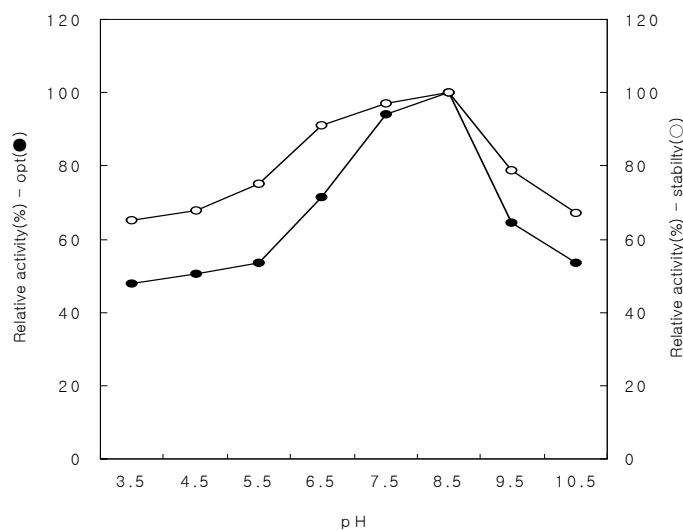


Fig. 10. Effect of pH on the activity and stability of he protease from *Saccharomyces* sp. B101.

The enzyme activity (●) was assayed in citrate buffer for pH 3.5 4.5, phosphate buffer for pH 5.5 7.5 and in glycine-NaOH buffer for pH 8.5 10.5, respectively. The enzyme stability (○) was measured by incubating it for 30min at the various pH values and 25°C. After the incubation, the enzyme assay was performed in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) at 37°C.

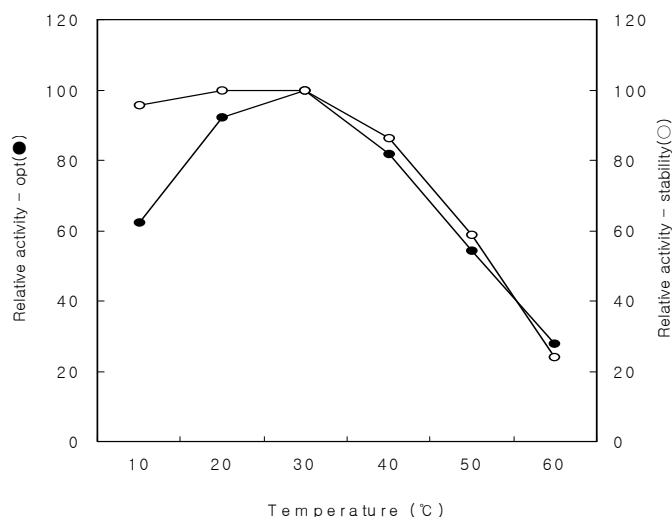


Fig. 11. Effect of pH on the activity and stability of he protease from *Saccharomyces* sp. B101.

The protease activity (●) was assayed at various temperatures of 10-60°C and pH 7 in 1/15 M phosphate buffer. The enzyme stability (○) was measured by keeping it for 30min at the various

temperatures and pH 7, and the enzyme assay was performed in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0) at 37°C.

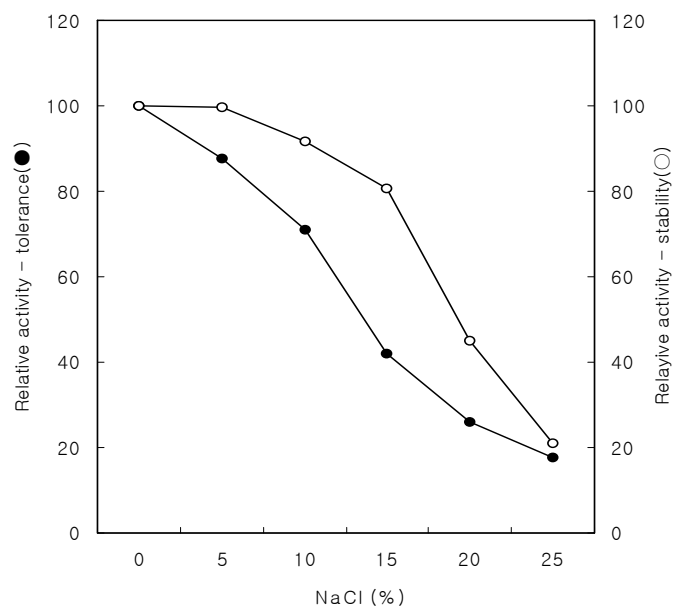


Fig. 12. Effect of salt on the activity and stability of the protease from *Saccharomyces* sp. B101.

Ion	Metal (1 mM)	Relative activity (%)
	None	100
Ag ²⁺	AgNO ₃	73
Ba ²⁺	BaCl ₂	101
Ca ²⁺	CaCl ₂	96
Co ²⁺	CoCl ₂	101
Cu ²⁺	CuSO ₄	83
Fe ²⁺	FeSO ₄	54
K ⁺	KH ₂ PO ₄	93
Mg ²⁺	MgSO ₄	92
Mn ²⁺	MnSO ₄	105
Zn ²⁺	ZnSO ₄	94

The reaction mixture, consisted of 0.5 ml enzyme solution and 0.5 ml metal ion solution (1 mM), was incubated at 25° for 30 min and the residual activities were assayed. The results were expressed as percent (%) relative activity to that of none.

inhibitors used. In general, EDTA and *o*-phenanthroline has been known to remove the essential metal ion from the enzyme molecule to bring about the inactivation of the enzyme. Thus, This indicates that the protease from *Saccharomyces* sp. B101 is a serine protease which requires metal ion group for the enzyme activity. The dual sensitivity to EDTA and PMSF, though uncommon, has been reported certain other bacterial and fungal proteases. It was in good agreement with earlier published values.[31][32][41][42]

Enzyme kinetics

In order to evaluate the kinetic constant for the proteasereaction by the purified enzyme, the initial velocities of the enzyme reactions were determined depending on various concentrations of the casein substrate. As shown in Figure 13, the kinetic constant, K_m for the proteolysis was determined by using a Lineweaver-Burk plot. The reaction properly followed the Michaelis-Menten kinetics. The K_m was evaluated to be 1.02 mg/ml and the V_{max} was 278.38 unit/ml. The K_m value obtained was similar to that (1.3 mg/ml) of the alkaline protease as reported by Bae [43], and it was in agreement with the K_m value for the protease from *Rhizopus oryzae* [44]. V_{max}/K_m value, the physiological

efficiency value, of *Saccharomyces* sp. B101 protease was 272.9 unit/mg.

4. Conclusions

The microorganism producing salt-tolerant protease, isolated from the bakers' yeast dough, was identified as *Saccharomyces* sp. B101. The enzyme was purified to homogeneity from the culture supernatant of *Saccharomyces* sp. B101. by ammonium sulfate fractionation, ultrafiltration, ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50, and gel chromatography on Sephadex G-100. The specific activity and the purification fold of the purified enzyme were 4688.9 unit/mg and 18, respectively. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be 33,000 Da on SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were pH 8.5 and 30°C, respectively. The enzyme activity was relatively stable at pH 6.5-8.5 and temperature below 35°C. This protease was relatively stable at 10 and 15% salt concentrations. This protease was inhibited by Ag²⁺ and Fe²⁺, and on the contrary, activated by Mn²⁺. In addition,

Reagent (1 mM)	Relative activity (%)
None	100
EDTAa	66
Iodoacetic acid	99
PMSFa	75
2,4-Dinitrophenol	99
2-Mercaptoethanol	98
<i>o</i> -phenanthroline	50

Enzyme was incubated in 1/15 M phosphate buffer containing various reagent for 30 min at 25°. The residual activities were assayed by the spectrophotometric method as described in the text. The results were expressed as percent (%) relative activity to that of none.
aEDTA : ethylenediaminetetraacetic acid, PMSF: phenylmethyl sulfonylfluoride.

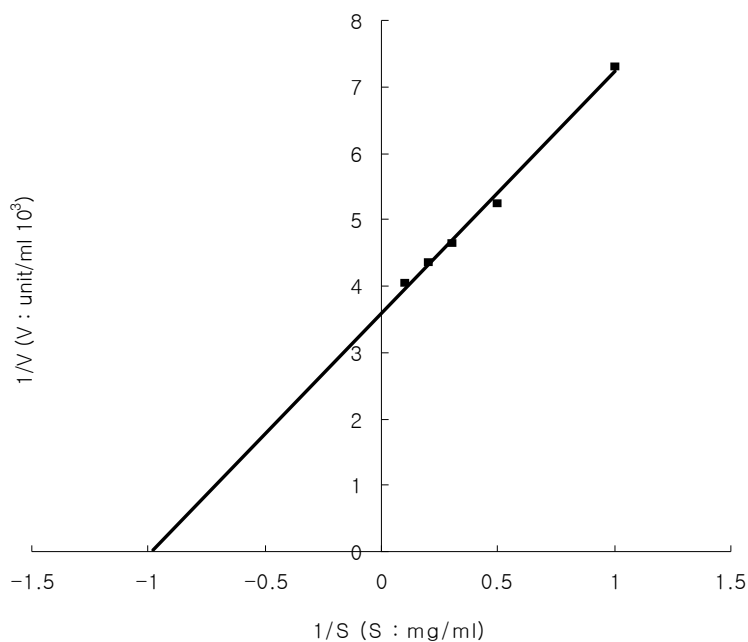


Fig. 13. Lineweaver–burk plot for casein by protease from *Saccharomyces* sp. B101.

The enzyme activity was assayed with various concentrations (1–10 mg/ml) of casein in 1/15 M phosphate buffer (pH 7.0).

the enzyme activity was potently inhibited by EDTA and PMSF. It was conclusively considered that the purified enzyme was a serine protease influenced by metal ions. K_m and V_{max} values for hammastein milk casein were 1.02 mg/mL and 278.38 unit/min, respectively.

5. Reference

1. An, Y. G. 1994. Enzyme purification method. Yangseogak. p. 20–35.
2. Ahmed, T. H. A., E. H. Kennedy and D. G. Ahearn. 1997. Purification and Characterization of a neutral protease from *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. of Bacteriology*. **130**: 1125–1129.
3. Anna, H., S. Dobozi, G. Yongyi and S. Pfeiffer. 1989. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* proteinases. *Hung. Elelmez. Ip.* **43**: 322–5.
4. Anson, M. L. 1939. The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* **22**: 79–91.
5. Anthony, H. R. and J. S. Harrison. 1987. The yeasts. Academic press INC.

- (London) Ltd., p. 1-8.
6. Bae, M. and P. Y. Park. 1989. Purification and Characterization of thermotolerable alkaline protease by alkalophilic *Bacillus* sp. No. 8-16. *Kor. J. Microbiol. Bioeng.* **17**: 545-551.
 7. Bae, I. H. and K. H. Kang. 1987. Purification and properties of extracellular protease from *Saccaromycopsis lipolytica*. *Korean J. Dairy Sci.* **15**: 286-293.
 8. Bae, I. H. and K. H. Kang. 1989. Caseinolytic action of extracellular protease of *Saccharomycopsis lipolytica*. *Korean J. Dairy Sci.* **11**: 194-203.
 9. Banerjee R. and B. C. Bhattacharya. 1993. Kinetic properties of extracellular alkaline protease of *Rhizopus oryzae*. *J. Ferment. Bioeng.* **75**: 380-382.
 10. Bibek, R. 1996. Fundamental food microbiology, CRC press, p. 109-113.
 11. Byun, Y. G., H. K. Joo, M. H. Lim, S. H. Kim and K. S. Lee. 1998. Purification and characterization of proteolytic enzyme from *Bacillus* sp. YG95 by traditional Me-jus. *Agri. Chem. and biotechnol.* **41**: 349-354.
 12. Catrinus van der S., T. Johnnes and H. W. Rene. 2001. Enhancing and accelerating flavor formation by salt-tolerant yeasts in Japanese soy-sauce processes. *Trends in Food Science & Technology.* **43**: 6-9.
 13. Cichosz, G., R. Jerzy and K. Marian. 1989. Proteolytic activity of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis* M15. *Pishch. Tekhnol.* **2**: 39-44.
 14. Choi, C., B. J. An and K. M. Son. 1987. Production of acid protease by *Aspergillus fumigatus* A-12 and Characteristics of the Enzyme. Resource research. **6**: 35-40.
 15. Choi, C., K. S. Choi, Y. J. Cho, S. I. Lim, S. Kim, J. H. Son, H. D. Lee and Y. H. Kim. 1996. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-111 in Korean Traditional soy sauce. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**: 915-921.
 16. Choi, C., K. S. Choi, Y. J. Cho, S. I. Lim, S. H. Lee, J. H. Son, H. J. Choi and H. D. Lee. 1996. Characteristics and action pattern of protease from *Bacillus subtilis* CCKS-118 in Korean Traditional soy sauce. *Agri. chem. and Biotech.* **39**: 460-465.
 17. David, R. B. 1982. The biology of yeasts. Edward Arnold (Publishers)

- Limited. **140**: 48-56.
18. Gomi, K. and Y. Ota. 1984. Physical and chemical characterization of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1061-1062.
 19. Graham G. S. and I. Russell. 1981. Current developments in yeast research. Pergamon press Canada Ltd. p. 3-25.
 20. Han, H. J., M. J. In and M. H. Kim. 1997. Production and characteristics of enzymatically hydrolyzed soy sauce by the treatment using proteases. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**:784-787.
 21. Ichiro, Y., D. Hirata, M. Machida and S. Fukui. 1986. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the secretable acid protease gene from *Sacchromycopsis fibuligera*. *Agri. Biol. Chem.* **50**: 109-113.
 22. James, A. B., R. W. Payne and D. Yarrow. 2000. Yeasts characteristics and identification 3rd edition. Cambridge university press. p. 1-6.
 23. Jeong, S. C., K. W. Hyun and J. S. Lee. 2001. Isolation of a halotolerant yeast and the production of extracellular protease. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **16**: 158-162.
 24. John, E. G. 1998. Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiology and molecular Biology Reviews.* **62**: 1492-1553.
 25. Jung, J. Y., H. S. Yun and E. K. Kim. 1997. Hydrolysis of olive oil by lipase, immobilized on hydrophobic support. *J. of Microbiology and Biotechnology.* **7**: 151-156.
 26. Kim, C. H. and C. B. Yoo. 1998. Charaterization of alkaline proteinase from *Yarrowia lipolytica* 504D. *Kor. J. Microbiology.* **34**: 82-86.
 27. Kim, S. S. and Y. J. Kim. 2001. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. *Arch. Microbiol.* **175**: 458-461.
 28. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
 29. Lance, S. D., M. M. O'donnel, F. S Kaczmarek, D. A. Pereira, J. R. Dezeew and A. E. Franke. 1987. Cloning and Sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *J. of Bacteriology.* **169**: 4621-4629.

30. Lee, J. S., S. H. Yi, S. J. Kwon, C. Ahn and J. Y. Yoo. 1997. Enzyme activities and physiological functionality of yeasts from traditional *Meju*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 448-453.
31. Lee, S. K. 1996. Industrial application and development of yeasts. *KIST applied microbiology.* **9**: 20-27.
32. Lineweaver, H. and D. Burke. 1934. Determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **56**: 658-666.
33. Looze, Y., L. Gillet, J. Leonis and E. Polastro. 1979. Protease B from *Saccharomyces cerevisiae*. *International journal of peptide and protein research.* **13**: 253-259.
34. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
35. Mala, B. R., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **62**: 597-635.
36. Maria I. G., C. A. Studdert, J. J. Sanchez and R. E. DeCastro. 2000. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization. *Extremophiles.* **4**: 181-188.
37. Minoda, Y. and T. Sugiura. 1982. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 2885-2893.
38. Neidleman, S. 1986. *Enzymology and food processing*. Noyes publishing, Park Ridge, N.J. U.S.A., p. 37-56.
39. Ogawa, Y., H. Tatsumi, S. Murakami, Y. Ishida, K. Murakami, A. Masaki, H. Kawabe, H. Arimura, E. Nakano, H. Motai and A. Toh-e. 1990. Secretion of *Aspergillus oryzae* alkaline protease in an osmophilic yeast, *Zygosaccharomyces rouxii*. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 2521-2529.
40. Ogrydziak, D. M. and S. J. Scharf. 1982. Alkaline extracellular protease produced by *Saccharomycopsis lipolytica* CX161-1B. *J. General microbiology.* **128**: 1225-1234.
41. Park, S. K. and D. H. Chung. 1988. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**: 17-24.

42. Pelomo, R. S. and R. J. Wodzinski. 1997. Production, purification and characterization of a 50kDa extracellular metalloprotease from *Serratia marcescens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**: 317-324.
43. Pin, C. L., K. K. Lee, C. C. Tu and S. N. Chen. 1999. Purification and Characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous *Vibrio harveyi*. *Current microbiology.* **35**: 32-39.
44. Peder, B., H. P. Heldt-Hansen and B. Diderichsen. 1992. On the safety of *Aspergillus oryzae* : a review. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **36**: 569-572.
45. Ray, M. K., K. U. Devi and G. S. Kumar. 1992. Extracellular protease from the Antarctic yeast *Candida humicola*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1918-1923.
46. Sun, C. K., S. G. Park and M.C. Choi. 1998. Characterization of alkaline serine proteases secreted from the *Coryneform bacterium* TU-19. *J. of Microbiol. Biotechnol.* **8**: 639-644.
47. Syamal, K. C., N. Matsumura and R. S. Ranu. 2000. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). *Current microbiology.* **40**: 239-244.
48. Tochi, K., Y. Hakamada, and S. Ito. 1996. Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. *App. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 63-71.
49. While, T. J., J. H. Meade, S. P. Shoemaker, K. E. Koths and M. Innis. 1984. Enzyme cloning for the food fermentation technology. *Food Technol.* **38**: 90-95.
50. Yon, S. P., Y. O. Kim, J. K. Lee, H. K. Kim and T. K. Oh. 1996. Purification and Characterization of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis* NS70. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**: 1-6.
51. Yaichi, F., H. Itoh, T. Fukase and H. Motai. 1989. Continuous protease production in a carbon-limited chemostat culture by salt tolerant *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **30**: 604-608.
52. Yoo, J. Y., H. G. Kim and D. J. Kwon. 1998. Improved process for preparation of traditional *Kanjang*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 268-274.

제 7 절 기능성 효소를 이용한 어간장의 숙성 제조 및 특성

1. 서론

어간장 (액젓)은 어패류에 고농도 (약 25-30%)의 식염을 첨가하여 부패를 억제하면서 자가소화 및 미생물에 의해 육을 분해 · 숙성시킨 액상의 전통 수산발효식품으로서, 주로 동남아시아 및 지중해 연안에서 널리 이용되고 있는 식품이며, 우리나라는 주로 고식염 농도의 액젓형태로 이용되고 있는 천연조미료이다 (1). 어간장은 어체 내의 단백질분해효소 및 미생물이 분비하는 효소의 작용으로 생성된 저분자의 peptide류 및 아미노산과 숙성 중에 일어나는 여러 가지 화학변화에 의하여 독특한 풍미를 가지며, 이용되는 원료와 제조 방법에 따라 명칭과 종류도 다양하다. 세계적으로 생산되고 있는 어간장은 한국의 액젓 (어간장, 어장유), 중국의 어로 (魚露), 일본의 Shottsuru 및 Ishiri, 태국의 Nampla, 캄보디아의 Tuktrey, 태국, 캄보디아, 베트남, 라오스 등지에서 만들어지는 Nucoman, 말레이시아의 Bellachan과 Budu, 미얀마의 Ngapi, 필리핀의 Patis 및 Bagoong, 인도네시아의 Trassikan 및 Ketjapikan, 인도 및 파키스탄의 Colombocure, 그리스의 Garos, 프랑스의 Pissala, 스칸디나비아의 Tidbit, 남미의 Anchovy sauce 등이 있으며 (2), 중요한 단백질 공급원의 하나로 이용되고 있는 식품이다. 그러나 어간장의 독특한 풍미나 잠재적 이용가치에도 불구하고, 고 식염 농도, 장기간의 숙성, 유통과정 중 색택의 변화, 침전물 생성 및 어취 때문에 일부 소비자들은 대두 간장을 선호하고 있다. 어간장에 대한 연구로는 Shottsuru의 미생물 (3), 정어리 어간장 제조공정 개선 (4), 정어리 잔사 (5), 크릴 (6), 말쥐치 잔사 (7), 대구피 젤라틴 (8), 가다랑어 잔사 (9), 고등어 가공잔사 (10)등의 연구가 보고 되어있다. 그리고 어간장의 제조 공정을 단축하기 위한 연구로는 koji를 첨가한 숙성멸치간장제조 (11, 12) 및 숙성정어리간장 제조 (4)가 있으며, 효소를 첨가한 연구로는 capelin 어간장 (13), horse mackerel 어간장 (14), ikanbilis 어간장 (15), herring 어간장 (16) 등이 있으나, 숙성 중 쓴맛 및 어취 성분이 남아있어 상품화하지는 못하고 있는 실정이다. 한편, Pyeun et al. (17), Cho et al. (18) 및 Lee et al. (19)은 멸치육의 사후변화 및 자가소화에는 trypsin 보다는 cathepsin L 및 chymotrypsin의 단백질분해 활성이 더 깊이 관여한다고 보고 하였다. 또한 액젓 제조 시 첨가하는 25-30%에 해당하는 다량의 염은 극히 일부의 미생물을 제외하고는 생육이 불가능하기 때문에 미생물에 의한 다양한 형태의 육단백질의 분해는 불가능할 것으로 추정하였다 (17). 이 같은 고염은 어류 자체에 포함되어 있는 단백질분해효소의 활성을 50%까지 저해하기 때문에 저염에서 시판용 단백질 분해 효소를 사용하여 제조한 것갈과는 육단백질의 절단 부위가 틀려 생성되는

peptide의 종류에 큰 차이가 있을 것이며, 이 같은 차이는 젓갈의 풍미에 큰 영향을 준다고 한다 (18). 따라서 어체가 어느 정도 분해한 다음 어체 자체에 있는 내인성 효소는 고농도의 식염 때문에 대부분 실활하고, 장기간의 숙성발효에 관여하는 내염성 미생물이 분비하는 효소는 극히 제한적일 수밖에 없으나 어간장의 풍미에 많은 영향을 미친다고 볼 수 있다. 그러므로 어간장을 숙성제조하기 위한 효소의 개발은 천연발효 어간장의 숙성에 관여하는 내염성 미생물이 분비하는 효소가 가장 이상적이라고 판단되어진다. 우리나라를 중심으로 대량 어획되는 멸치는 칼슘을 다량 함유하고 양질의 아미노산과 n-3계열의 고도 불포화지방산, 각종 유용 비타민, 정미성분 등을 함유하여 영양적으로 우수하며 젓갈 및 액젓을 만드는 원료로 사용되고 있다 (20). 특히, 멸치액젓은 종래에는 주로 가정에서 제조되어 왔으나, 근래에는 시판용인 대규모로 제품화되고 있으며, 그 수요도 늘어나는 추세에 있다. 가정에서 담아 먹던 멸치액젓은 6-7개월간 숙성하여 배포에 걸러 제조하는데 비해 시판용인 대규모로 제조하는 경우 숙성기간을 단축시키기 위해 starter를 첨가하는 경우도 있으며, 액젓이 숙성되면 가열살균 또는 여과 공정을 등을 거친 후 필요에 따라 caramel 등으로 색택을 조정하여 어느 정도 규격화하여 용기에 담아 포장하여 시중에 판매되고 있다 (21). 멸치액젓에 관한 연구로는 숙성 액젓 엑스분의 가공조건 및 저장안정성과 정미성분 (22, 23), 단백질 분해효소를 이용하여 제조한 숙성 멸치액젓의 펩티드 특성 (24), 미생물을 이용한 저 식염 멸치젓의 숙성 발효에 관한 연구 (25), 가온숙성 중의 지질함량 및 지방산조성의 변화 (26), 품질표준화 (27-29), 레토르트 식품화 (30), 가공공정 및 포장 개선 (31), 전기투석을 이용한 액젓의 탈염 중화학적 변화 (32), 고정화 미생물을 이용한 개량액젓 제조 (33), 그리고 재래식 방법으로 제조한 액젓의 숙성 중 정미 성분변화 (34) 등이 있다. Koo et al. (35)은 숙성 발효 제품은 장기간 숙성하여 저장한 제품에 비하여 풍미가 현저히 떨어지며, 숙성 발효에 의하여 leucine 및 isoleucine의 양이 증가하고, 절단된 peptide의 말단에 위치한 leucine 때문에 쓴맛이 증가한다고 보고 하였다. 따라서, 멸치액젓 제조시 액젓의 풍미에 영향을 주지 않으면서 발효 속도를 향상 시킬 수 있는 효소의 개발이 필요 할 것으로 보인다.

2. 재료 및 방법

가. 균주의 배양 및 *B. subtilis* JM3 단백분해효소 추출

멸치액젓에서 분리한 내염성 단백분해균인 *B. subtilis* JM3균을 (36) BHI broth에 접종시켜 37°C에서 5일간 진탕배양한 후 4°C에서 원심분리 (3,500 × g, 15

min)하여 bacteria cell을 제거하였다. Ammonium sulfate의 농도를 증가하면서 단백질 분해활성이 가장 높은 농도 (40-60%)에서 효소를 분리 · 정제한 다음, 20 mM sodium acetate 완충용액 (pH 5.5) 10 mL에 용해시켜 효소액으로 사용하였다.

나. 멸치액젓의 제조

6개월 숙성된 멸치액젓 (풍미식품, 속초시)에 효소액을 2 및 4%를 첨가하여 가수분해하여 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 품질특성을 분석하였다. 기능성 특성 분석을 위한 시료는 -40℃ 저장하면서 필요시마다 저온 (5℃)에서 해동하면서 사용하였다.

다. pH 측정

pH meter (동우메디칼, 서울)을 사용하여 측정하였다.

라. 가수분해도 측정

가수분해도는 Hoyle et al. (37)에 의한 trichloroacetic acid (TCA)법으로 측정하였다. 즉, 멸치액젓 5 g에 20% TCA 용액 15 mL를 가한 다음 원심분리 (3,000 × g, 15분)한 다음, 상등액 및 멸치액젓의 총질소함량을 semi-micro Kjeldahl법 (39)으로 측정하여 다음식으로부터 가수분해도를 계산하였다.

$$\text{가수분해도 (\%)} = \frac{\text{상등액 (20\% TCA 가용성) 질소함량}}{\text{paste상의 총질소함량}} \times 100$$

마. 젖산량 측정

멸치액젓 5 g에 80% ethanol 10 mL를 가하여 교반한 다음 3,500 × g에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하고, 잔사에 80% ethanol 5 mL를 넣고 마쇄한 후 원심 분리하여 취한 상등액과 합하여 0℃에서 24시간 방치한 후 5 mL를 취하여 0.1% phenolphthalein 지시약을 가한 다음 0.5 N NaOH 용액으로 적정하여 젖산량으로 환산하였다.

바. 휘발성 염기질소 (Volatile Basic Nitrogen, VBN)

휘발성 염기질소량은 Conway unit 법(39)을 다소 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 즉, 멸치액젓 10 g에 증류수 90 mL를 가하여 1 분 동안 교반한 후 여과지 (whatman NO 2, England)로 여과시켰다. Conway unit 외실에 여과액 1 mL 및 과량의 K₂CO₃ 1 mL, 내실에는 0.01 N H₂SO₄ 용액 1 mL를 각각 넣고 37℃에서 3 시

간 반응시켰다. Burnswisk (0.07% methyl red, 0.01% methylen blue) 지시약을 1-2 방울 첨가한 다음 0.01 N NaOH로 적정하였다. 휘발성염기 질소량은 다음 계산식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{VBN (mg\%)} = \frac{0.14 \times (b-a) \times f \times d}{w} \times 100$$

w; 시료의 무게, a; 시료의 적정량 (mL), b; 대조구의 적정량 (mL), f; 0.01 N NaOH의 factor, d; 희석배수

사. 아미노태 질소 (NH₂-N)

Fomol 법 (40)으로 측정하였다. 즉, 멸치액젓 5 g에 증류수 250 mL를 가하여 30분 동안 교반한 후, 교반용액 25 mL를 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.5로 조정하고, 여기에 미리 pH 8.5로 조제한 formaldehyde 용액 20 mL를 가하여 pH 가 낮아지면 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.5까지 다시 적정하였다. 같은 조작으로 0.1 N NaOH 용액의 공시험을 실시하여 아미노태 질소 (NH₂-N)함량을 다음 계산식을 사용하여 계산하였다.

아미노태질소 (mg/100g) =	$\frac{a \times 0.0014 \times f \times 250 \times 1000}{5 \times 25}$
--------------------	---

a; 0.1 N NaOH 적정 mL, f; 0.1 N NaOH 의 factor

아. 갈변도

숙성기간 동안 액화된 원액을 감압여과 (Micromembrane filtration: pore size 0.45 μm)한 다음 분광광도계 (Shimadzu model UV-2101 PC, Japan)를 사용하여 453 nm에서 측정하였다 (41).

자. 관능검사

멸치액젓의 맛, 향기, 짠맛 및 색조 등에 훈련된 8인의 panel member은 20-25 세 사이의 남자 5명 및 여자 3명으로 구성하여 관능적 특성을 측정하였고, 시료에 대한 종합적인 평가는 5단계 평점법으로 평가하였다. 검사결과에 대한 통계적인 유의성 검정은 SPSS (Statistical Packages for Social Science, Michigan Avenue, Chicago, IL., USA)를 이용하여 Duncan's multiple comparison test로 95% 신뢰도

에서 유의차를 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

가. pH 및 젖산량의 변화

가수분해시간에 따른 pH 및 젖산량의 변화는 Fig. 1에 나타내었다. 대조구, 2 및 4% 효소첨가구의 pH는 각각 5.90-5.89, 5.90-5.98 및 5.90-5.98로 나타났으며, 대조구는 가수분해시간에 따른 pH 변화는 없었으며, 단백분해효소첨가구는 가수분해 4시간째까지 pH는 다소 증가하였다가 감소한 다음, 그 후 일정수준을 유지하였다. Kim et al. (42)은 단백질 분해효소를 이용하여 제조한 속성 멸치액젓의 peptide 특성에 관한 연구에서 단백분해효소를 첨가하였을 때 pH는 숙성기간동안에 6.1-6.7로 변화가 없었다고 보고 하였으며, 본 실험의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 젖산량은 대조구의 경우 가수분해 0 시간째에 1.39 mg/100g으로 나타났으며, 그 후 가수분해시간 동안에는 젖산량의 변화는 없었다 (Fig. 1). 2 및 4% 효소첨가구는 가수분해 0 시간째 젖산량 1.39 mg/100g에서, 가수분해 10 시간째에 각각 1.50 및 1.59 mg/100g으로 증가하였다가, 그 후 가수분해시간 동안에 젖산량은 일정한 수준을 유지하였다 (Fig. 1). 단백분해효소첨가구는 젖산량의 증가에도 불구하고 pH는 일정한 수준을 유지하였는데, 이는 유리아미노산과 같은 기타 유기물질의 완충작용 때문이라고 보여진다 (42).

나. 아미노태 질소의 변화

가수분해 시간에 따른 아미노태 질소의 변화는 Fig. 2에 나타내었다. 대조구, 2 및 4% 효소첨가구의 아미노태 질소는 가수분해 0시간째에 661 mg/100g으로 측정

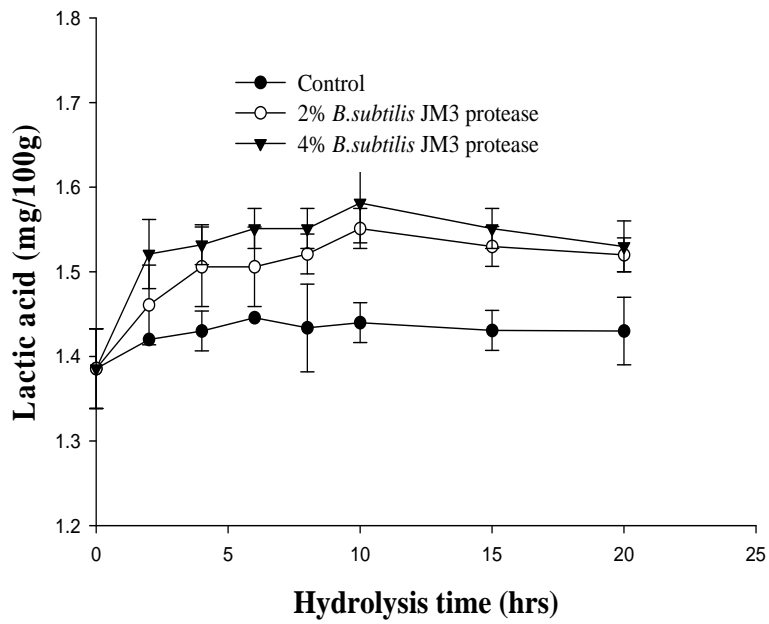
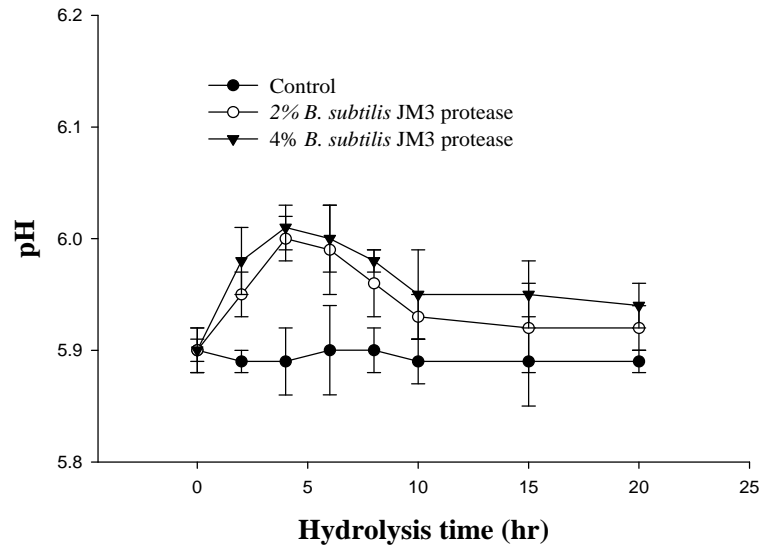


Fig. 1. pH and lactic acid content changes of anchovy sauce hydrolyzed by *B. subtilis* JM3 protease at room temperature at different hydrolysis time.

되었으며, 대조구는 가수분해시간에 따른 아미노태 질소량은 변화가 없었다. 2 및 4% 효소첨가구는 가수분해 2시간째에 각각 762 및 798 mg/100g으로 증가하였고, 그 후 가수분해시간에 동안에 일정수준을 유지하였다. 액젓은 천연조미가 주된 역할이고 그 맛의 결정 요인은 여러 가지가 있으나, 핵산 관련물질 및 아미노태 질소 화합물에 의한 것이라고 할 수 있다 (24). 핵산관련물질 중 맛의 주성분인 IMP는 숙성된 액젓에는 극히 미량뿐이므로, 숙성 중에 함량이 증가하는 저분자 질소화합물인 아미노태 질소량이 액젓의 조미에 결정적인 영향을 미치게 되며 (24), Kim et al. (21)은 시판 멸치액젓의 품질평가 방법에 관한 연구에서 시판 액젓의 경우 아미노태 질소의 함량은 437.50-1,288.00 mg%로 다양하게 측정 되었다고 보고하고 있으며, 식품공전 (2000)에서 아미노태 질소 함량은 600 mg/100g 이상으로 규정하고 있다. 본 실험에서 사용한 멸치액젓은 6개월간 숙성시킨 제품으로 높은 아미노태 질소량을 나타내었으며, 또한 *B. subtilis* JM3 단백분해효소의 첨가는 아미노태 질소량을 크게 증가시켰다. 이는 *B. subtilis* JM3 단백분해효소가 멸치 actomyosin에 대하여 20% NaCl 농도에서도 55.2%의 잔존활성을 나타내었으며 (Fig. 12), 본 실험에서 사용된 멸치액젓은 6 개월 숙성된 제품으로 수용액중에는 다량의 근원섬유 단백질이 존재할 것으로 생각되며, 따라서 *B. subtilis* JM3 단백분해효소가 염농도의 영향을 적게 받은 것으로 보여진다 (43).

다. 휘발성 염기질소의 변화

가수분해시간에 따른 휘발성염기질소의 변화를 Fig. 3에 나타내었다. 대조구, *B. subtilis* JM3 단백분해효소 2 및 4% 첨가구의 가수분해 0시간째 휘발성염기질소량은 154 mg/100g으로 측정되었으며, 대조구는 가수분해 10시간째에 189 mg/100g으로 증가하였다가 감소한 다음, 그 후 가수분해시간 증가에 따른 변화는 없었다. 2 및 4%의 효소첨가구는 가수분해 2시간째에 휘발성염기질소량은 220 및 250 mg/100g으로 증가하였다가 감소한 다음, 그 후 일정수준을 유지하였다. 가수분해시간에 따른 휘발성 염기질소의 증가는 아미노태 질소량의 변화와 거의 일치하였으며, Oh (44)는 1 년 숙성된 멸치액젓의 휘발성염기 질소량은 530.7 mg/100g 이었다고 보고하였으며, 본 실험에서 사용된 멸치액젓은 6개월간 숙성된 제품으로 휘발성 염기질소량은 그 보다 낮은 값을 나타내었다. 단백분해효소첨가구는 대조구에 비해 가수분해 2 시간째에 높은 휘발성염기 질소량을 나타내었는데, 이는 단백질이 분해 되어 생성된 다량의 유리 아미노산이 멸치액젓 내에 증식하는 세균에 의하여 분해 되어 저급 아민 물질 생성으로 휘발성염기질소량이 증가한 것으로 보인다 (45).

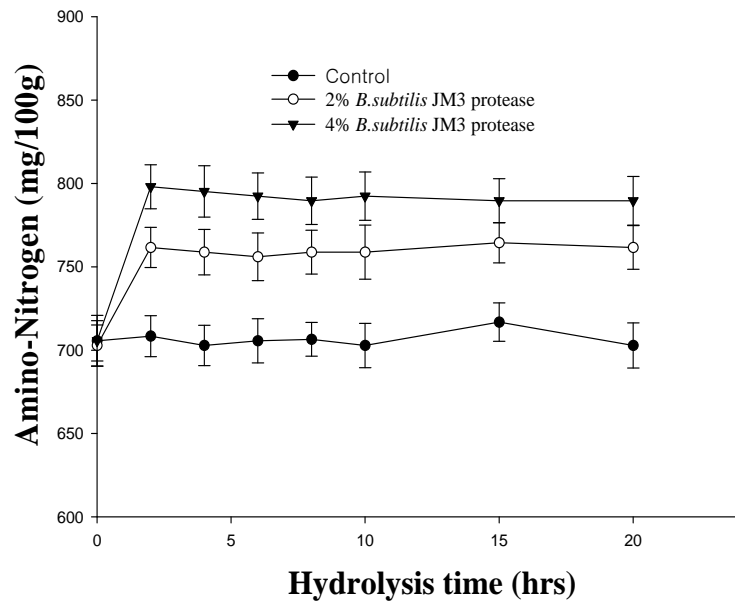


Fig. 2. Amino-nitrogen content changes of anchovy sauce hydrolyzed by *B. subtilis* JM3 protease at room temperature at different hydrolysis time.

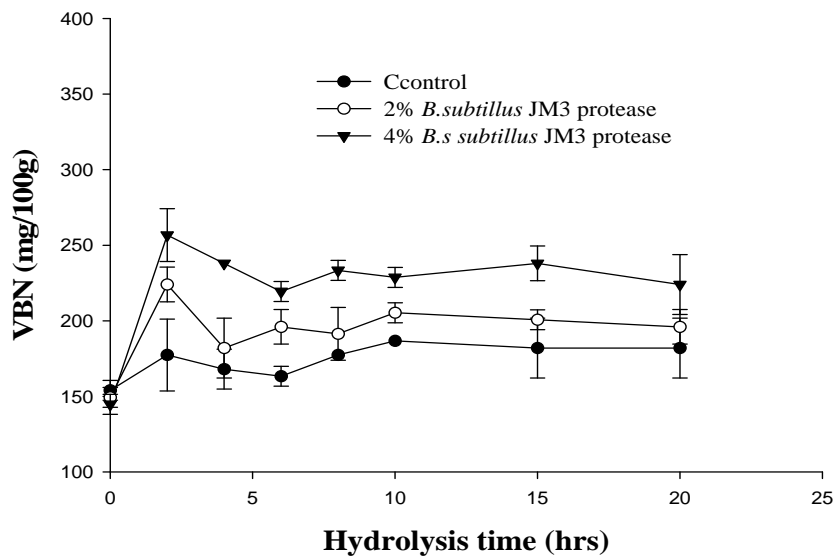


Fig. 3. VBN content changes of anchovy sauce hydrolyzed by *B. subtilis*

JM3 protease at room temperature at different hydrolysis time.

라. 가수분해도의 변화

가수분해 시간에 따른 가수분해도를 Fig. 4에 나타내었다. 대조구의 경우 가수분해시간에 따라 19.17-21.30% 범위로 측정되었으며, 2 및 4%의 효소첨가구는 가수분해 0 시간째에 19.17%에서 가수분해 2 시간째에 각각 27 및 32%으로 증가하였으며, 그 후 숙성기간동안에 약간 증가하였다. Kim et al. (46)은 자가 소화액 및 정어리 기질 코오지를 이용한 숙성 정어리액젓 제조에 관한 연구에서 숙성 15일째 *Asp. oryzae* 간장용 코오지를 첨가한 정어리액젓의 가수분해도는 40.6%이었으며, *Asp. sojae* 간장용 코오지를 첨가한 것은 36.8%를 나타내었으며, 본 실험에서 사용한 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소 4%을 첨가한 멸치액젓의 가수분해도는 32%으로 유사한 경향을 나타내었다. 최적 가수분해 시간인 2시간째에 총질소에 대한 아미노태 질소량이 차지하는 비율은 대조구, 2 및 4% 효소첨가구에서 각각 76.2, 82.9 및 85.8%으로 나타났다. 대조구, *B. subtilis* JM3 단백질분해효소 2 및 4% 첨가구의 가수분해도는 각각 $y = 0.2627x^3 - 4.1269x^2 + 20.142x + 3.8748$ ($R^2 = 0.9476$), $y = 0.1784x^3 - 2.7601x^2 + 13.357x + 8.9419$ ($R^2 = 0.9569$) 및 $y = 0.0417x^3 - 0.6482x^2 + 3.0781x + 16.98$ ($R^2 = 0.8144$)으로 나타났으며, 결정 계수 (R^2)는 각각 0.9476, 0.9569 및 0.8144로 높은 상관관계를 나타내었다. 수식 중의 y 값은 아미노태 질소량, x 값은 가수분해 시간이다. 2 및 4%의 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소 첨가에 의한 가수분해도 증가는 저분자 질소화합물인 아미노태 질소 (762 및 798 mg%) 및 휘발성 염기질소 (220 및 250 mg%)의 함량을 증가시켰으며, *B. subtilis* JM3 단백질분해효소의 농도가 증가할수록 높은 가수분해도를 나타내었다.

마. 갈변도의 변화

가수분해 시간에 따른 액젓의 갈변도 변화는 Table 1에 나타내었다. 453 nm에서의 흡광도 수치는 액젓의 갈변도를 나타내는 값으로 (41), 대조구의 경우 1.598-1.599 범위로 나타났으며, 가수분해시간 동안에 변화는 없었다 (Table 1). 2 및 4% 효소첨가구는 가수분해 초기 1.598에서, 가수분해 동안에 약간 증가하여 6 시간째 각각 1.603 및 1.632로 나타났으며 (Table 1), 효소첨가량 및 가수분해 시간이 증가할수록 갈변도는 증가하였다. 대조구, 2 및 4% 효소첨가구의 가수분해시간에 따른 갈변도는 각각 $Y = 0.0016 \ln(X) + 1.598$ ($R^2=0.9584$), $Y=0.0033 \ln(X) + 1.15981$ ($R^2=0.9205$) 및 $Y=0.0246 \ln(X) + 1.6005$ ($R^2=0.9272$)으로 나타났으며, 수식 중 y 값은 453 nm에서의 흡광도 수치, x 값은 가수분해시간이다. 그리고 4% 단백질분해효소를 첨가한 멸치액젓의 기울기는 0.0246으로 대조구 및 2% 단백질분해효소를

첨가한 멸치액젓의 0.0016 및 0.0033에 비해 15 및 7배로 높았으며, 이는 효소 첨가

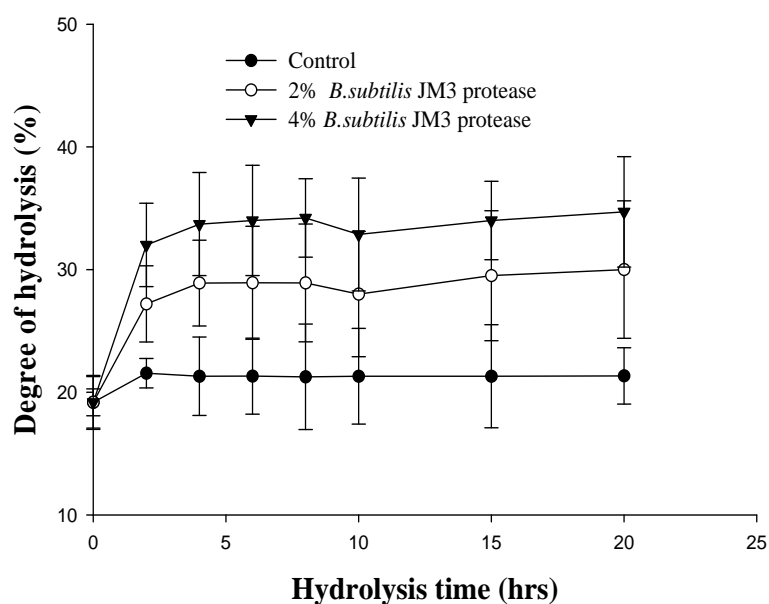


Fig. 4. Hydrolysis degree changes of anchovy sauce by *B. subtilis* JM3 protease at room temperature at different hydrolysis time.

Table 1. Browning degree changes of anchovy sauce hydrolyzed by *B. subtilis* JM3 protease at room temperature at different hydrolysis time

Sample	Hydrolysis time (hrs)			
	0	2	4	6
Control	1.598 ^a	1.599 ^a	1.598 ^a	1.599 ^a
2% protease	1.598 ^a	1.601 ^b	1.601 ^b	1.603 ^b
4% protease	1.598 ^a	1.629 ^c	1.622 ^c	1.632 ^c

^{a, b, c} Means in column with the same superscript are not significantly different ($p < 0.05$)

량이 많을 수록 갈변도가 증가하였다는 것을 의미한다. 액젓의 갈변이 일어나는 이유는 액젓 내에 함유되어 있는 성분 중 아미노기를 가지는 물질인 암모니아, 아민, 아미노산, peptide 및 지방산화에 의해서 생성된 carbonyl 화합물이 이 현상 (갈변)을 일으키는 것으로 알려져 있으며 (46), *B. subtilis* JM3 단백질분해효소 첨가에 의한 갈변도가 대조구에 비해 높은 것은 효소에 의한 단백질이 가수분해 되어 저분자 peptide 및 아미노산의 양이 증가되었기 때문이라고 생각되어진다. Im et al. (42)은 숙성 및 저장 중 액젓의 색도변화에 관한 연구에서 6 개월 숙성 멸치액젓의 흡광도 수치는 1.6 이었다고 보고하였으며, 본 실험의 흡광도 (대조구; 1.598-1.600, 2%;1.598-1.603, 4%; 1.598-1.630) 수치와 유사한 값을 나타내었다.

바. 관능검사

2 시간째 가수분해한 시료의 관능검사 결과를 Table 1에 나타내었다. 대조구는 생선의 비린내가 감지되어, *B. subtilis* JM3 단백질분해효소첨가구에 비해 맛 및 향에 대하여 낮은 평가를 받았다. 또한 2% 효소첨가구는 4% 효소첨가구에 비해 맛 및 향에 대하여 낮은 평가를 받았으며, 이는 4% 효소첨가구가 멸치액젓의 맛 성분으로 추정되는 저분자 peptide 및 아미노태 질소량이 많기 때문인 것으로 보여진다. Kim et al. (41)은 숙성기간동안에 멸치액젓의 염도의 변화는 0.9%내외의 변화를 보였다고 하였으며, 본 실험에서도 짠맛에 대한 유의적인 차이는 나타나지 않았다 ($p>0.05$).

4. 결론

멸치액젓에서 분리한 내염성 단백질분해균 (*B. subtilis* JM3)이 분리·정제한 효소를 숙성 6개월재의 액젓에 첨가하여 여러 가지 품질특성을 분석하였다. pH는 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소 첨가량 및 가수분해시간에 따른 변화는 없었고, 젖산량은 4% 단백질분해효소 첨가구가 제일 높았다. 아미노태 질소, 휘발성염기질소 및 가수분해도는 단백질분해효소 첨가구가 대조구에 비해 높았으며, 갈변도는 4% 효소 첨가구에서 높게 측정되었다. 가수분해가 가장 높게 나타난 2 시간째에 관능검사를 실시한 결과 단백질분해효소 첨가구가 향 및 맛에서 좋은 평가를 얻었다.

Table 2. Sensory evaluation of anchovy sauce hydrolyzed by *B. subtilis* JM3 protease at room temperature for 2 hrs

Sample	Color	Aroma	Saltiness	Taste
Control	1.5 ^{a*}	2.8 ^a	2.6 ^a	2.0 ^a
2% protease	2.2 ^b	3.3 ^b	2.7 ^a	3.2 ^b
4% protease	2.3 ^c	3.8 ^c	2.6 ^a	3.5 ^c

^{a, b, c} Means in column with the same superscript are not significantly different ($p < 0.05$)

* 5: very acceptable, 4: acceptable, 3: moderate, 2: unacceptable, 1: very unacceptable

5. 참고문헌

1. Kim, Y.M. and Kim, D.S. 1999. *Fermented Seafood in Korea-Its Raw Materials and Products*. Changjo, Seoul. pp. 9-10
2. Yeum, D.M., Lee, T.G., Do, J.R., Kim, O.K., Park, Y.B., Kim, S.B., and Park, Y.H. 1993. Characteristics of Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from fermented fish product. 2. characteristics of angiotensin-I converting enzyme inhibitors of fish sauce prepared from sardine, *Sardinops melanosticta*. Bull. Korean Fish. Soc. 26(5), 416-423.
3. Yoshinaka, R., Sato, M., Tsuchiya, N., and Ikeda, S. 1983. Production of fish sauce from sardine by utilization of its visceral enzymes. Bull. Japanese Soc. Sci. Fish. 49(3), 463-469.
4. Lee, E.H., Jee, S.K., Ahn, C.B., and Kim, J.S. 1988. Studies on the processing conditions and the taste compounds of the sardine sauce extracts. Bull. Korean Fish. Soc. 21(1), 56-66.
5. Lee, E.H., Cho, S.Y., Ha, J.H., Oh, K.S., and Kim, C.Y. 1984. Processing of sardine sauce from sardine scrap. Bull. Korean Fish. Soc. 17(2), 117-124.
6. Lee, E.H., Cho, S.Y., Cha, Y.J., Park, H.S., and Kwon, C.S. 1984. Studies on the processing of krill sauce. J. Korean Soc. Food Nutr. 13(1), 97-106.
7. Lee, E.H., Ahn, C.B., Kim, J.S., Lim, C.W., Lee, S.W., and Choi, Y.A. 1988. Processing and taste compounds of the fish sauce from filefish scrap. J. Korean Soc. Food Nutr. 17(4), 326-335.
8. Kim, S.K., Ahn, C.B., and Kang, O.J. 1983. Manufacture of fish sauce from the enzymatic hydrolysate of cod gelatin. J. Korean Soc. Food Nutr. 22(4), 470-477.
9. Lee, E.H., Lee, T.H., Kim, J.S., and Ahn, C.B. 1989. Processing and taste compounds of the fish sauce from skijack scrap. Bull. Korean Fish. Soc., 22(1), 25-35.
10. Lee, E.H., Park, H.S., Ahn, C.B., and Hwang, G.C. 1986. Preparation of fish sauce from mackerel scrap. Bull. Korean Fish. Soc. 15(3), 201-206.
11. Lee, C.H., Ahn, J.S., Kim, B.K., and Park, H.Y. 1989. Keeping quality and taste compounds in the extracts from rapid fermented anchovy sauce. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 18, 131-142
12. Lee, E.H., Kim, J.S., Ahn, C.B., Lee, K.H., Kim, M.C., Chung, B.K., and Park,

- H.Y. 1989. Processing conditions of accelerated anchovy sauce extracts. J. Korean Soc. Food Nutr. 18(2), 131-139.
13. Raksakulthai, N., Lee, Y.Z., and Harrod, N.F. 1986. Effect of enzyme supplements on the production of fish sauce from Male Capelin (*Mallotus villosus*). Can. Inst. Food Sci. Tec. J. 19(1), 28-33.
 14. Chae, S.K., Itoh, H. and Nikkuni, S. 1986. Effects of soy sauce koji and commercial proteolytic enzyme of the acceleration of fish sauce production. Korean J. Food Sci. Technol. 21(5), 639-648.
 15. Beddows, C.G. and Ardeshir, A.G. 1979. The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture. J. Food Technol. 14, 603-612.
 16. Chaveesul, R., Smith, J.P., and Simpson, B.K. 1993. Production of fish sauce and acceleration of sauce fermentation using proteolytic enzymes. J. Aqua. Food Prod. Technol. 2(3), 59-77.
 17. Pyeun, J.H., Lee, D.S., Kim, D.S., and Heu, M.S. 1996. Activity screening of the proteolytic enzymes responsible for post-mortem degradation of tissues. J. Korean Fish Soc. 29(3), 296-308.
 18. Cho, D.M., Heu, M.S., Kim, D.S., and Pyeun, J.H. 1996. Kinetic analysis for enzymatic properties of trypsines purified from dark-fleshed fish. J. Korean Fish Soc. 29(1), 64-70.
 19. Lee, D.S., Heu, M.S., Kim, D.S., and Pyeun, J.H. 1996. Some properties of the crude protease from fish for application in seafood fermentation industry. J. Korean Fish Soc. 29(3), 309-319.
 20. Kil, B.S., Tae, J.K., Jung, M.J., and Young, J.C. 2001. Establishment of processing condition of salted anchovy. 1. Change of chemical compositions during fermentation of salted anchovy by salting methods. J. Korean Fish. Soc. 34(2), 98-102.
 21. Kim, J.H., Ryu, G.H., Ahn H.J., Lee, K.H., Lee, H.J., and Byun, M.W. 2000. Quality evaluation of commercial salted and fermented anchovy sauce. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29(5), 837-842.
 22. Lee, C.H., Ahn, J.S., Kim, B.K., and Park, H.Y. 1989. Keeping quality and taste compounds in the extracts from rapid fermented anchovy sauce. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 18, 167-174.

23. Lee, C.H., Kim, J.S., Ahn, K.H., Lee, M.C., Kim, B.K., and Park, H.Y. 1989. The processing conditions of extracts from rapid fermented anchovy sauce. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 18, 167-174.
24. Choi, Y.J., Kim, I.S., Cho, Y.J., Seo, D.H., Lee, T.G., Park, Y.B., and Park, J.W. 1999. Peptide properties of rapid salted and fermented anchovy sauce using various protease. J. Korean Fish. Soc. 32(4), 488-494.
25. Cha, Y.J. and Lee, E.H. 1989. Studies on the processing of rapid fermented anchovy prepared with low salt contents by adapted microorganism. Bull. Korean Fish Soc. 221(5), 363-369.
26. Kim, D.S., Koizumi, C., Jeong, B.Y., and Jo, K.S. 1994. Studies on the lipid content and fatty acid composition of anchovy sauce prepared by heating fermentation. J. Korean Fish. Soc. 27, 469-475.
27. Choi, Y.J., Kim, S.H., Kim, D.S., and Cho, Y.J. 1998. Properties and utilization of undigested peptides in anchovy sauces. 1. Use of undigested peptides as a quality parameter of anchovy sauces. J. Korean Fish. Soc. 31, 386-392.
28. Oh, K.S. 1995. The comparison and index components in quality of salt-fermented anchovy sauce. Korean J. Food Soc. Technol. 27, 487-494.
29. Park, C.K. 1995. Extractive nitrogenous constituents of anchovy sauce and their quality standardization. Korean J. Food Soc. Technol. 27, 471-477.
30. Oh, K.S. 1996. Studies on the processing of sterilized salt-fermented anchovy sauce. Korean J. Food Sci. Technol. 28, 1038-1044.
31. Lee, D.S., Suh, E.S., and Lee, K.H. 1989. Processing and packing of anchovy sauce. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25, 1087-1093.
32. Oh, S.W., Nam, E.J., Jo, J.H., Kim, E.M., and Kim, Y.M. 1997. Chemical changes during desalting of fish sauces using electro-dialyzer. Korean J. Food Sci. Technol. 29, 992-998.
33. 김상호. 1998. 고정화 미생물을 이용한 수산발효 신제품 개발. 부경대학교 대학원 박사학위 청구논문.
34. Cho, Y.J., Park, H.Y., and Choi, Y.J. 2000. Change of components in salt-fermented anchovy, *Engraulis japonicus* sauce during fermentation. J. Korean Fish Soc. 31, 386-392.
35. Koo, J.G., Kim, Y.M., Lee, Y.C., and Kim, D.S. 1990. Taste compounds of

- rapid processed sardine sauce. J. Korean Fish Soc. 23(2), 87-92.
36. Lee, S.S., Kim, S.M., Park, U.Y., Kim, H.Y., and Shin, I.S. 2002. Studies on proteolytic and fibrinolytic activity of *Bacillus subtilis* JM3 isolated from anchovy sauce. Korean J. Food Sci. Technol. 34(2), 283-289.
37. Hoyle, N.T. and Meirritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). J. Food Sci. 59, 76-79.
38. AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, USA.
39. Conway, E.J. 1950. *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*. Croby Lookwood and Son ltd., London, England.
40. Sorensen, S.P.L. 1907. Biochem. 7, 45.
41. Im, Y.S., Choi, Y.J., and Cho, Y.J. 2000. Changes in color value of salt-fermented fish sauces during fermentation and storage. J. Korean Fish. Soc. 33(5), 358-387.
42. Kim, I.S., Choi, Y.J., Heu, M.S., Cho, Y.J., Im, Y.S., Gu, Y.S., Yang, S.G., and Park, J.W. 1999. Peptide properties of rapid salted and fermented anchovy sauce using various protease. 1. Hydrolysis of anchovy sauce and actomyosin by various protease. J. Korean Fish. Soc. 32(4), 481-487.
43. Lee, D.S., Heu, M.S., Kim, D.S., and Pyeon, J.H. 1996. Some properties of the crude protease from fish for application in seafood fermentation industry. J. Korean Fish. Soc. 29(3), 309-319.
44. Oh, K.S. 1999. Quality characteristics of salt-fermented anchovy sauce and sandlance sauce. J. Korean Fish. Soc. 32(3), 252-255.
45. 박영호 · 장동석 · 김선봉. 1995. 수산가공이용학. 형설출판사, pp. 372-373.
46. Chung, C.H. and Toyomizu, M. 1976. Studies on the browning of dehydrated food as a function of water activity: 1. Effect of A_w on browning in amino acid-lipid systems. Nippon Suisan Gakkaishi. 42, 697-702.

제 8 절 멸치액젓에서 기능성 peptide의 정제 및 생리활성

1. 서론

식품중의 중요한 구성 성분인 단백질은 소화 및 식품가공 과정 중 각종 효소에 의하여 가수분해 되면 소화, 흡수를 촉진하는 영양적 기능 뿐만아니라 혈압강하작

용과 진통마취작용 외에 칼슘흡수 촉진 작용, 항알러지 작용 및 혈청콜레스테롤 레벨저하작용 등의 여러 가지 생리활성을 가지는 peptide를 생산하는 것으로 알려져 있다 (1). 특히 전통발효식품인 멸치액젓은 펩타이드, 지질 및 소금을 과량 함유하고 있고 오랫동안 숙성 및 저장을 거쳐야 되는 식품으로 항암, 항산화 및 ACE 저해활성과 같은 생리활성을 가지는 있는 것으로 생각된다. 사람의 질병에 의한 사망자수 중에서 그 비율이 높은 3대 질병으로서 뇌혈관질환, 심장질환 및 암에 의한 질환 등이 있는데, 이 중 뇌혈관질환과 심장질환은 고혈압증과 밀접한 관계가 있다 (2). 그러나 아직까지 수많은 연구에도 불구하고 고혈압의 발병원인은 아직 정확히 밝혀지지 않고 있는 실정으로, Jeong (3)은 고혈압을 치료하지 않은채 오랫동안 방치하면 심근경색, 뇌출혈 그리고 심부전의 합병증을 초래할 수 있으며 심장과 혈관의 근육이 비대해지고 동맥경화도 유발할 수 있다고 보고하였다. 따라서 고혈압 자체가 뚜렷한 증상을 나타내지 않는다 하더라도 혈압을 정상으로 환원시키는 일은 관상동맥질환, 뇌졸중 및 신부전증 등의 발병에 중요한 일이라 할 수 있다. 고혈압증의 대부분을 차지하고 있는 본태성 고혈압의 원인은 Renin-Angiotensin계가 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 여겨지고 있으며, 여기에는 Angiotensin converting enzyme [EC 3.4.15.1.]이라는 효소가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 (4). 생체 중에 존재하고 있는 불활성형의 decapeptide인 Angiotensin I은 혈압이 떨어지면 신장에서 분비되는 renin이라는 물질에 의해 생성이 되며, 이것이 angiotensin converting enzyme (ACE)에 의해 C 말단의 His-Leu이 떨어져 나감으로서 혈관벽 수축 작용이 있는 angiotensin II로 전환되며 생체 혈압 강하인자인 bradykinin을 불활성시킴으로써 혈압이 상승하게 된다 (5). 따라서 이러한 ACE의 활성을 억제시킴으로써 혈압 상승 원인이 되는 aginotensin II의 생성을 저하시켜 혈압의 상승을 억제할 수 있게 된다. 이와 관련하여 1960년대 Ferreira (6)은 *Bothrops jararaca*라는 뱀의 독으로부터 bradykinin potentiating factors (BPFs)라는 bradykinin의 반응을 증강시키는 인자를 발견하였으며, Bokle (7)은 이것이 bradykinin의 분해 및 불활성화를 촉매 하는 효소를 저해한다는 것을 밝혀냈다. Schaeffer et al. (8)은 BPFs의 발견에 뒤이어 nonapeptide인 teprotide (BPF_{9a})를 합성하여, 이것이 본태성 고혈압 환자에 있어 혈압을 강하게 떨어뜨린다는 것을 밝혀냈다. 그러나 teprotide는 심부전 환자에 있어서도 양호한 효과를 나타내었지만, peptide이기 때문에 경구투여에 문제가 발생하였다. 그 후 기질에 대한 변환효소 작용의 추정과 변환효소와 carboxypeptidase A에 대한 기질의 저해약인 D-benzylsuccinic acid 와의 관계연구, 또한 C 말단의 proline 이 ACE 활성저해에 중요하다는 사실 등에 의해, Ondetti et al. (9)은 최초의 경구투여가 가능한 ACE 저해제인 captopril을 개발하였다. 그 후

변환효소의 활성 부위, 그중에서도 Zn^{+} 와 결합할 수 있는 새로운 화학기를 갖는 enalapril이 개발되었으며, 고혈압에 관한 미국 합동위원회 (1988)에서는 ACE 저해제를 고혈압 치료제의 first choice로 인정하게 되었다 (9). ACE 저해제는 아직까지도 수많은 화합물이 개발 중 (Imidapril, Trandorapril, CS-622, Temocapril, CV-3317)에 있지만 어떤 것은 captopril과 같은 활성체로, 어떤 것은 prodrug type로 화학구조는 극히 다양하다. 현재, 식품성분 중에서 ACE 저해효과를 나타내는 성분으로 여러 가지 식품단백질의 효소 가수분해물로부터 얻어진 peptide류를 중심으로 주로 연구되고 있으며 (10-12), ACE 저해 peptide를 분리하여 아미노산 배열을 해석하고, 이를 기초로 peptide를 화학적으로 합성하여 저해효과에 미치는 C 및 N 말단 아미노산의 영향에 대한 연구가 진행되고 있다. 항산화제란 산화를 방지하거나 지연시키는 물질을 통칭하는 것으로 그 작용기작에 따라 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 자유 라디칼 소거작용, 과산화물을 비라디칼로 분해하여 불활성 시키는 과산화물 분해제, 자동산화에 있어서 라디칼 저해제와 공존시 항산화 작용을 증가시키는 상승제 및 각종 활성산소계를 소거하는 singlet oxygen quencher 등으로 분류된다 (13). 항산화제는 다시 크게 두 그룹으로 분류되는데, 첫째 primary 또는 chain-breaking antioxidant로서 지질 라디칼과 반응하여 더욱 안정한 생산물로 바꾸는 그룹과 둘째 secondary 또는 preventive antioxidant로서 다른 mechanism에 의해 자동산화를 지연시키는 그룹으로 분류 된다 (13). Primary antioxidant는 상대적으로 안정한 라디칼을 만들기 위해 지질 유리라디칼에 수소원자를 제공함으로써 연쇄반응의 연장을 저지하여 자동산화를 막는다. 이러한 형태의 항산화제는 대부분 페놀화합물로서 α -tocopherol과 그 유도체 (14) 및 quercetin과 caffeic acid 등의 flavonoid계 (15)가 알려져 있다. Secondary antioxidant는 순수한 지질에서는 항산화 효과를 나타내지 않지만 primary antioxidant의 효과를 증가시키거나 prooxidant의 효과를 저해시킨다. 이러한 형태의 항산화제는 α -tocopherol과 같은 primary antioxidant와 상승작용을 가지는 인지질 (15) 및 ascorbic acid (16)등이 있다. 대표적 산화반응인 지질의 산패는 주로 높은 온도나 빛에 의해 생성된 지질 라디칼이나 O_2 에 의해 과산화물의 생성과 분해가 연쇄적으로 일어나는 반응으로 이들은 페놀성 항산화제가 존재할 때에는 페놀성 OH기가 유지의 유리기 수용체로서 작용하여 유지 산패의 초기 단계에 생성된 유리기들이 안정한 공명 혼성체를 형성하도록 하여 산화작용을 억제하게 된다 (16). 이러한 항산화제는 각종 식물의 추출물, 향료, 발효 생산물 등에 flavonoid 또는 phenol 화합물로 대부분 존재한다. 또한 동물성 단백질 및 식물성 단백질을 효소로 분해하여 얻어진 peptide에서도 항산화활성이 보고되고 있다 (17, 18). 일반적으로 항산화제는 천연 항산화제와 합성항산화제로 구별되

는데, 합성항산화제인 butylated hydroxytoluence (BHT)은 기형발생 또는 암 발생에 관여하는 것으로 보고 되어 (19) 뛰어난 항산화제효과에 비해 부작용으로 인해 문제시 되고 있는 반면, 천연항산화제는 부작용이 거의 없어 식품 첨가물 또는 약품으로 현재 널리 이용되고 있다. 그러나 천연항산화제 중 가장 널리 이용되는 α -tocopherol의 경우 비싼 가격과 지용성이라는 이용 상의 제약으로 대체 천연항산화제의 개발이 요구되고 있는 실정이다 (16). 암은 오늘날 급속한 의학의 발달에도 불구하고 아직도 우리의 생명을 위협하는 무서운 불치병으로 알려져 있다. 암의 발생은 약 75%가 공해 식품 및 그릇된 식생활이 그 주된 원인으로 식원병이라고 할 만큼 식생활과 큰 관련이 있다 (20). 암의 발생 요인에 대한 많은 연구 결과에도 불구하고 암 발생 기전에 대해서 확실히 알려져 있지 않고 치료에 있어서도 큰 효과를 발휘하지 못하고 있으며, 인체에 무해하고 효과적으로 암을 퇴치할 수 있는 새로운 항암제의 개발은 현대 의학에 있어 매우 중요한 당면과제라 하겠다 (21). 현재 항암 활성을 가지는 물질로는 대두에서 유래하는 단백질분해효소 inhibitor (22-24), phytic acid (25, 26), isoflavones (27-29) 등이 있으며, 특히 genistein을 비롯한 대두 isoflavone 성분의 항암 효과에 대한 연구가 보고 되고 있다 (30). MTT test는 Mosmann (31)에 의해 개발된 colorimetric tetrazolium assay로써, 짧은 배양기간 때문에 암세포 성장억제 효과보다는 암세포 살해능이 주로 측정되며 환자의 종양표본을 가지고 직접 검사하기 힘들다는 단점이 있으나 조작이 비교적 간편하고 짧은 기간 내에 실행할 수 있으며 반자동적으로 객관적인 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있어서 암의 기초 연구에 많이 사용되고 있다 (32).

2. 재료 및 방법

가. Peptide의 정제

(1) Peptide 정제

액젓을 sulfosalic acid로 제단백하여, 4 °C에서 Amicon의 PM10(MWCO 3,000, USA) membrane filter을 사용하여 한외여과 하였다. 한외여과 한 여과액을 40°C에서 감압농축한 후, Bio-gel P-2 (CA, USA)를 충전한 column (2.6 × 70 cm)을 사용하여 0.5 mL/min의 유속으로 용출 시켰다. 이때 용출액을 5 mL씩 받아 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 방법(33)을 사용하였고, bovine serum albumin을 표준으

로 한 표준곡선으로부터 단백질량을 계산하였다.

나. 생리활성

(1) ACE 저해능 측정

ACE 활성은 Chsuman and Cheung (34)의 방법에 의하여 측정하였다. 즉, Angiotensin- I 전환효소는 토끼의 허파에서 아세톤 분말로 정제한 시료 1 g에 400 mM sodium borate buffer (pH 8.3) 10 mL를 가한 다음 5 °C에서 24시간 교반한 후 원심분리 (8,000 × g, 30 min)하여 얻은 상등액을 ACE 조효소액으로 사용하였다. 시료 100 µL에 ACE 조효소액 20 µL 및 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3) 200 µL를 가한 다음 37 °C에서 5분간 preincubation 시켰다. 여기에 기질로써 0.5 mM His-His-Leu (2.14 mg/mL) 200 µL를 첨가하여 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 250 µL를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 2 mL를 가하여 15초간 교반한 다음 원심분리 (200 × g, 5 min) 하여, 상등액 1 mL를 취하였다. 이 상등액을 완전히 건조시킨 뒤 1 M NaCl 3 mL를 가하여 용해한 다음 228 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 계산식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ACE inhibition (\%)} = (1 - S/C) \times 100$$

S; 시료의 흡광도, C; blank의 흡광도

(2) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거작용

각 시료의 DPPH radical에 대한 소거효과 측정은 Blois 방법 (35)을 사용하였다. Methanol로 농도를 조정된 시료 4 mL를 취하고, 0.15 mM DPPH 1 mL와 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하여, DPPH radical 소거활성 [Reduction of DPPH (%) = (시료 처리구의 흡광도 / 대조구의 흡광도) × 100]을 구하였다.

다. 함암활성

(1) 세포주

실험에 사용한 세포주는 성장 속도가 빠르고 비교적 항암제 감수성이 예민한 위암세포주 SNU-1 (서울대학교, 서울)을 사용하였다. SNU-1은 55 °C에서 30 분간 열처리한 Fetal bovine serum (FBS)을 10% 첨가한 RPMI-1640(Life Technologies Inc, USA)배지에 1% penicillin-streptomycin (Life technologies Inc,

USA)과 20 mM HEPES buffer를 첨가하여 37 °C의 5% CO₂ incubator에서 72 hr 동안 배양하였다.

(2) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay에 의한 암세포 독성 측정

SNU-1에 대한 시료의 세포 독성을 측정하기 위하여 Carmichael et al (36)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. SNU-1을 96 well plate에 1×10^4 cells/well이 되게 180 µL씩 주입한 다음, 일정농도 (10 µg/mL)로 조정된 시료를 well plate에 20 µL 첨가한 다음 37 °C의 5% CO₂ incubator에서 72 hr동안 배양하였다 (대조구는 증류수를 사용하였다). 72 hr 배양 후 인산생리식염수에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT (Aldrich Chem. Co., USA) 용액을 한 well 당 20 µL씩 넣은 후 각 well 당 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 150 µL를 가하여 ELISA reader (Molecular Device Co.)로 550 nm에서 흡광도를 측정하여 성장억제효과 [Cytotoxicity=(대조구의 흡광도-시료처리구의 흡광도)/대조구의 흡광도]를 구하여 세포 독성 활성의 지표로 하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Peptide의 gel chromatography

대조구, *B. subtilis* JM3 단백분해효소 2 및 4%을 첨가한 액젓의 gel-chromatography 결과를 Fig. 1-3에 나타내었으며, 대조구는 5개 (peak 1:195-280 mL, peak 2: 430-465 mL, peak 3: 560-600 mL, peak 4: 675-725 mL, peak 5: 810-870 mL), 2% *B. subtilis* JM3 단백분해효소첨가구는 6개 (peak 1: 215-250 mL, peak 2: 430-90 mL, peak 3: 545-570 mL, peak 4: 580-625 mL, peak 5: 675-745 mL, peak 6: 840-890 mL) , 4% *B. subtilis* JM3 단백분해효소 첨가구는 7개 (peak 1: 185-265 mL, peak 2: 410-450 mL, peak 3: 475-520 mL, peak 4: 530-560 mL, peak 5: 565-595 mL, peak 6: 620-676 mL, peak 7: 750-825 mL)의 peak가 나타났으며, 이러한 결과는 효소 첨가에 의해 고분자 peptide가 분해되어 저분자의 peptide를 많이 생성한 것으로 보인다. 특히 대조구의 peak 2 및 3의 peptide가 *B. subtilis* JM3 단백분해효소에 의해서 분해 되어 2% 효소 첨가구는 3개로, 4% 효소 첨가구는 4개로 분리되었던 것으로 추정되어진다. 따라서 *B. subtilis* JM3 단백분해효소는 효과적으로 액젓의 polypeptide를 가수분해 시켰으며, 가수분해시 생성된 저분자 peptide는 액젓의 관능적 특성 (맛 및 향)에 영향을 주었

던 것으로 생각되어진다.

나. ACE 저해활성

B. subtilis JM3 단백질분해효소 첨가에 의해 생성된 멸치액젓 유래 peptide의 ACE 저해활성을 Table 1에 나타내었다. Specific ACE 저해활성은 대조구의 경우 peak 5 (34.82%), 2% 효소 첨가구는 peak 6 (43.75%), 4% 효소 첨가구는 peak 7 (26.34%)에서 가장 높았다. 총 ACE 저해활성은 대조구 및 2% 첨가구의 경우 specific 활성과 같은 peak에서 제일 높았으며, 4%의 첨가구는 peak 5 (29.46%)에서 가장 높았다. Yeum et al. (37)은 ACE 저해 작용에는 단백질의 함량보다는 그 중의 peptide의 종류에 따른 영향이 크다고 보고 하였으며, Lee et al.(38)등도 해조류의 ACE 억제효과 연구에서 미역의 경우 가수분해시간이 길어지면서 peptide-nitrogen 량은 증가하였으나 ACE 효과는 감소하였다고 하였으며, 본 실험의 결과에 있어서도 ACE 저해활성은 단백질량에 비례하지 않았다. 또한 ACE 저해활성에 차이가 나는 것은 가수분해에 의하여 생성된 peptide의 사슬 길이나 구조 및 그 아미노산의 배열이 다르기 때문으로 보여진다. 분획물의 총 ACE 저해활성의 합은 2% 효소 첨가구 (197.32%)가 대조구 (107.51%) 및 4% 효소 첨가구 (161.60%)에 비해 ACE 저해활성이 높았으며, 이는 ACE 저해효과를 나타내는 생리활성 물질이 가수분해 되어 peptide 사슬 구조가 달라지기 때문이라고 보여진다 (37). Yeum et al. (37)은 효소에 의한 고등어 근육 단백질 가수분해물의 ACE 저해작용에 관한 연구에서 단백질 가수분해물의 IC₅₀은 95 µg/mL로 나타났다고 보고 하였으며, Kim et al.(39)은 멸치육 단백질 가수분해물의 IC₅₀은 45 µg/mL로 나타났다고 보고하였다. 본 실험에서 대조구의 peak 5 (Specific ACE inhibition activity : 34.82%), 2% 효소첨가구의 peak 6 (Specific ACE inhibition activity : 43.75%) 및 4% 효소첨가구의 peak 7 (Specific ACE inhibition activity : 26.34%)에 있어서 ACE 저해활성이 높았으며, 이 분획물의 구조 및 sequence 규명 등 보충연구가 필요하다고 생각된다.

다. DPPH radical 소거 작용

Specific DPPH 라디칼 소거활성은 대조구, 2 및 4% 효소 첨가구의 peak 5, 6 및 7에서 94.11, 90.91 및 97.00%으로 가장 높았고, 총 DPPH 라디칼 소거능은 대조구의 경우 specific 활성과 같은 peak에서 제일 높았으며, 2% 효소첨가구는 peak 2 (92.98%), 4% 효소첨가구는 peak 3 (103.72%)으로 가장 높았다 (Table 2). 분획물의 총 DPPH 라디칼 소거활성의 합은 4% 효소첨가구 (674.99%), 2% 효소첨가구 (513.90%) 및 대조구 (426.13%)순으로 높게 나타났으며, 이는 단백질분해효소 첨가량

이 많을수록 단백질이 가수분해 되면서 더욱 다양한 형태의 peptide가 생성되었기 때문이라고 생각된다. 또한 모든 분획물에서 DPPH 라디칼 소거 활성은 50% 이상으로 높았으며, 이는 액젓의 수용액층에는 peptide 또는 아미노산이 풍부하기 때문이라고 보여진다. 또한 Kim et al. (40)은 대구의 고니 단백질을 각 효소별로 가수분해시킨 가수분해물의 항산화활성은 가수분해도와 항산화 활성과는 상관관계가 없다고 하였으며, 이러한 결과는 기질의 차이 뿐만 아니라 각 효소가 기질에 작용하는 절단 부위가 다르기 때문에 N 말단 및 C말단에 위치하는 아미노산의 종류가 달라지므로 항산화활성이 다르게 나타난다고 보고하였다. Yee et al (41)은 대두단백질을 pepsin으로 가수분해시킨 가수분해물의 항산화 활성을 측정한 결과, 대조구에 비해 약 80% 정도 항산화활성이 높았다고 하였으며, Yamaguchi (42)는 대두단백질을 효소로 가수분해시킨 가수분해물 중에서 분자량 2.5-3 kDa 사이의 peptide가 항산화활성이 가장 뛰어났다고 보고 하였다. Krogull et al (43)은 질소 화합물인 단백질, peptide 및 아미노산은 자체적으로 산화가 일어나며, pH, 온도, 수분활성 및 산화촉매제나 저해제의 존재 여부에 따라 항산화활성의 차이가 있다고 보고하고 있다. Park et al. (44)은 *Symphycladia latiuscula*의 추출물에 대한 항산화 활성에 대한 연구에서 추출물의 IC₅₀은 3.14-15.44 µg/mL로 나타났다고 하였으며, 특히 천연 항산화제 (L-ascorbic acid 및 α-Tocopherol) 및 합성항산화제 (BHA 및 BHT)의 IC₅₀은 각각 1.22 및 1.28, 1.06 및 3.21 µg/mL로 측정되었다고 보고하였다. 본 연구에서도 대조구는 peak 5 (IC₅₀ : 5.31 µg/mL), 2% 단백분해효소 첨가구는 peak 6 (IC₅₀ : 5.29 µg/mL), 4% 효소첨가구는 peak 7 (IC₅₀ : 5.15 µg/mL)에서 높은 활성을 나타내었으며, 천연 항산화제 및 합성항산화제에 비해서는 약 5 배 정도 낮은 활성을 보였다. Kim et al.(45)은 가자미 젤라틴을 한외여과막을 이용하여 10 kDa, 5 kDa 및 1 kDa인 막을 차례로 통과시켜 얻은 가수분해물 중에서 분자량 500-1000 Da의 가수분해물이 α-Tocopherol보다 항산화력이 10% 정도 더 높았다고 보고하였으며, Yamaguchi et al.(111)은 대두단백질, 우유카제인 및 난백 알부민의 가수분해물에 대한 항산력은 vitamin B12 (MW 1350 Da) 보다 약간 큰 분자량을 가진 획분에서 가장 높았으며, 젤라틴 가수분해물의 경우는 그보다 약간 더 큰 분자량 획분에서 항산화활성이 높았다고 보고 하였다. 본 실험에 높은 항산화활성을 가지는 peptide의 분자량은 1,000 Da 내외로 생각되며, 정제과정을 통한 분자량 측정 및 아미노산 조성에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

라. 항암효과

Specific cytotoxicity는 대조구의 경우 peak 5 (38.29%), 2% 효소 첨가구는 peak

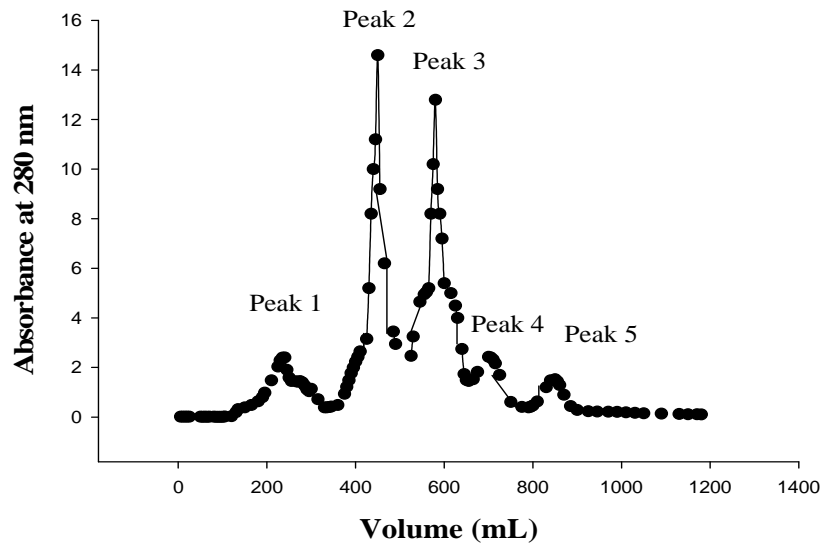


Fig. 1. Gel permeation chromatography pattern of peptides purified from anchovy sauce fermented for 6 months.

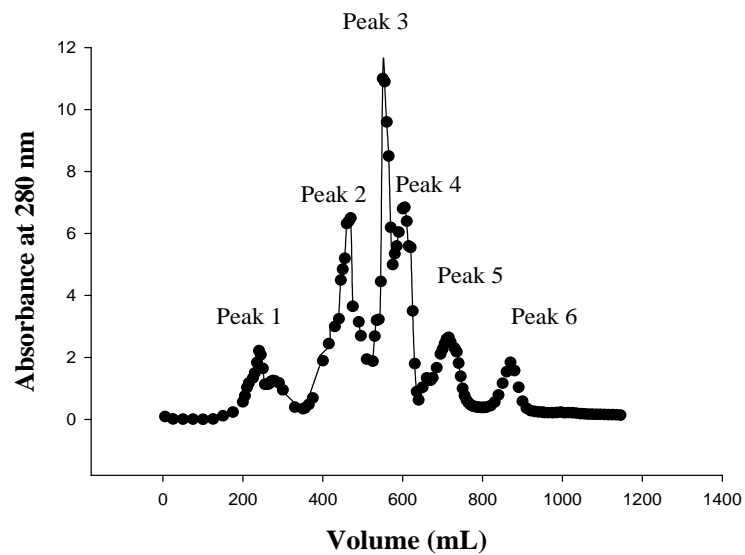


Fig. 2. Gel permeation chromatography pattern of peptides purified from anchovy sauce hydrolyzed by 2% *B.subtilis* JM3 protease at room temperature for 2 hrs.

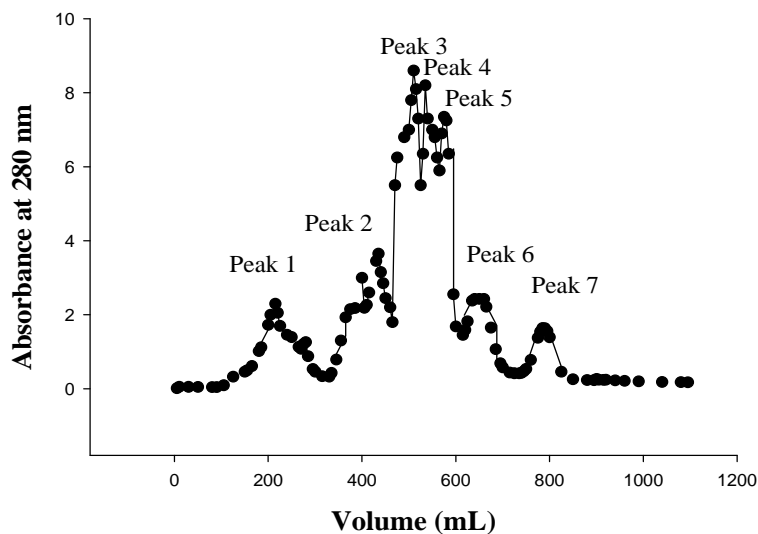


Fig. 3. Gel permeation chromatography pattern of peptides purified from anchovy sauce hydrolyzed by 4% *B. subtilis* JM3 protease at room temperature for 2 hrs.

Table 1. Antitumor, antioxidative and ACE inhibitory activities of peptides purified from anchovy sauce hydrolyzed by *B. subtilis* JM3 protease at room temperature for 2hrs

Sample	Peptide	Protein (mg/mL)	Specific ACE inhibition (%)	Total ACE inhibition (%)	Specific Reduction of DPPH (%)	Total Reduction of DPPH (%)	Specific Cytotoxicity (%)	Total Cytotoxicity (%)
Control	Peak 1	0.22	0.18	4.02	2.65	58.26	0.88	38.97
	Peak 2	0.10	2.46	24.55	8.94	89.36	1.71	34.13
	Peak 3	0.14	1.49	20.91	6.49	90.91	1.55	44.12
	Peak 4	0.02	11.61	23.21	46.75	93.49	7.62	35.07
	Peak 5	0.01	34.82	34.82	94.11	94.11	38.29	38.29
	Total				107.51		426.13	
2% <i>B. subtilis</i> JM3 protease	Peak 1	0.26	0.41	10.71	2.47	64.21	1.76	34.76
	Peak 2	0.10	4.11	41.07	9.30	92.98	4.92	37.88
	Peak 3	0.16	2.37	37.95	5.71	91.32	0.76	9.31
	Peak 4	0.17	1.50	25.45	5.06	86.05	2.61	34.76
	Peak 5	0.04	9.60	38.39	22.11	88.43	14.49	39.02
	Peak 6	0.01	43.75	43.75	90.91	90.91	15.61	15.61
Total				197.32		513.90		171.34
4% <i>B. subtilis</i> JM3 protease	Peak 1	0.33	0.58	19.20	2.51	82.95	0.83	21.02
	Peak 2	0.17	1.16	19.64	5.69	96.69	2.77	35.17
	Peak 3	0.19	1.32	25.00	5.46	103.72	1.98	28.51
	Peak 4	0.22	0.85	18.75	4.71	103.62	1.36	23.36
	Peak 5	0.15	1.96	29.46	6.38	95.66	3.60	42.04
	Peak 6	0.18	1.29	23.21	5.29	95.25	2.76	37.57
	Peak 7	0.01	26.34	26.34	97.00	97.00	34.76	34.76
Total				161.6		674.99		222.43

6 (15.61%), 4% 첨가구는 peak 7 (34.76%)에서 가장 높았다. 총 cytotoxicity는 peak 3 (44.12%), 2% 첨가구는 peak 5 (39.02%), 4% 첨가구는 peak 5 (42.04%)에서 가장 높았다 (Tabl 3). 분획물에 대한 총 cytotoxicity는 4% 효소첨가구 (222.43%), 대조구 (190.58%) 및 2% 효소첨가구 (171.34%) 순으로 높게 나타났다. 분획물의 총 cytotoxicity의 합은 4% 효소 첨가구 (222.43%)가 가장 높았으며, 다음으로 대조구 (190.58%) 및 2% 효소 첨가구 (171.34%)순으로 높았다. Chung et al. (46)은 대두발효식품의 암세포주에 대한 세포 독성 조사 실험에서 된장 메탄올 추출물 및 청국장 메탄올 추출물은 사람의 암세포 SNU-1에 대해서 성장 억제 효과를 나타내었다고 하였으며, 이때의 IC₅₀은 각각 13.38 및 0.756 mg/mL이었다. Yang et al (47)은 전통 약용식물 및 각종 식물의 항암 효과에 대한 연구에서 약용식물의 추출물은 10-100 µg/mL사이에서 SNU-1에 대한 항암활성을 나타내었다고 보고하였으며, 본 실험에서 대조구의 peak 5 (Specific cytotoxicity : 38.29%) 및 4% 효소 첨가구 peak 7 (Specific cytotoxicity : 34.76%)의 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

4. 결론

대조구, *B. subtilis* JM3 단백분해효소 2 및 4% 첨가구의 멸치액젓은 gel chromatography 상에서, 각각 5, 6 및 7개의 peak를 나타내었다. 2% *B. subtilis* JM3 단백분해효소 첨가구는 대조구 및 4% 첨가구에 비해 총 ACE 저해활성이 높았다. 총 DPPH 라디칼 소거능은 대조구, 2 및 4% *B. subtilis* JM3 단백분해효소 첨가구에서 모두 50% 이상의 활성을 나타내었다. 대조구 peak 3의 총 cytotoxicity는 단백분해효소 첨가구에 비하여 높았다.

5. 참고문헌

1. Yoshikawa, M.F., Tani, F., Ashikaga, T., Yoshimura, T., and Chiba, H. 1986. Purification and characterization of an opioid antagonist from a peptic digest of bovine k-casein. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2951-2984.
2. Seki, E., Osajima, K., Matsui, T., and Osajima, Y. 1993. Separation and purification of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from heated sardine meat by treatment with alkaline protease. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 40(11), 783-791.
3. Jeong, S.H. 1994. Angiotensin converting enzyme and its inhibitors. *Medicine Information.* 9. 152-158.

4. Saxena, P.R. 1992. Interaction between the renin - angiotensin - aldosterone, and sympathetic nervous systems. *J. Cardiovascular Pharmacology*. 19(6), 80-88.
5. Manjusri, D. and Richard, L.S. 1975. Pulmonary angiotensin - converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 250(17), 6762-6768.
6. Ferreira, S.H. 1965. A Bradykinin potentiating factor (BPF) present in venom of *Borhrops jararaca*. *Brit. J. Pharmacology*. 24. 163-168.
7. Bokhle, Y.S. 1968. Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung. *Nature*. 220, 919-925.
8. Schaeffer, T., Engel, S.L., Gold, B.I., and Rubin, B. 1971. Inhibition of pressor effect of angiotensin (A-Z) and augmentation of bradykinin (B) by synthetic peptides. *Pharmacologist*, 13, 215-220.
9. Ondetti, M.A., Rubin, B., and Cushman, D.W. 1977. Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. New class of orally active antihypertensive agents. *Sci.* 196, 441-444.
10. Maruyama, S., Suzuki, H., and Tomizuka, N. 1985. Effects of Zinc ion on inhibition by angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from and enzymatic hydrolysate of casein. II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on the uterus and the ileum of rats. *Agric. Biol. Chem.* 1915, 1405-1409.
11. Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H., and Maruyama, S. 1991. Structures and activity of angiotensin-converting enzyme inhibitors in an α -zein hydroly sate. *Agric. Biol. Chem.* 55(5), 1313-1318.
12. Satio, Y., Wanezaki, K., Kawato, A., and Imayasu, S. 1994. Antihypertensive effects of peptide in sake and its by products on spontaneously hypertensive rats. *Biosci, Biotech. Biochem.* 58(5), 812-816.
13. Ahmael, S. 1995. *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapman and Hall. New York. pp. 25-42.
14. Hodnick. W.F., Milosavljevic, E.B., Nelson, J.H., and Pardini, K.S., 1988. Electrochemistry of flavonoids. Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. *Biochem. Pharmacol.* 37, 2607-2611.
15. Hudson, B. J.F. and Lewis, J.K. 1983. Polyhydroxy flavonoid antioxidants for

- edible oils. Phospholipids as synergists. *Food Chem.*, 10, 111-120.
16. Bendich, A., Machlin, L.J., Scandurra, O., Burton, G.W., and Ingold, K.U. 1986. The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free Rad. Biol. Med.*, 2, 419-444.
 17. Yamaguchi, N., Yokoo, Y., and Fujimabi, M. 1979. Antioxidative activities of protein hydrolyzates. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 26, 65-70.
 18. Suetsuna, K. and Osajima, K. 1989 Blood pressure reduction and vasolilatory effects in vivo of peptides orginating from Sardine muscle, *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi*. 42(1), 47-54.
 19. Branen, A.L. 1975. Toxicology and biochemisty of butylate hydroxyanisole and butylated hydroxytoluence. *J. Food. Sci.* 37, 873-875.
 20. Doll, K. and Pet, R. 1981. The Causes of cancer, quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States. *J. Nat. Cancer Inst.* 66, 1192-1308.
 21. Cho, K.J, Lee, Y.S. and Ryu, B.H. 1990. Antitumor effect and immunology activity of seaweeds toward Sarcoma-180. *Bull, Korean Fish. Sci.* 23(5), 345-352.
 22. Kennedy, A.R. and Little, J.B. 1981. Effects of protease inhibitors on radiation trans for mation in vitro. *Cancer Res.*, 41, 2103-2109.
 23. Yavelow, J., Finlay, T.H., Kennedy, A.R., and Troll, W. 1983. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an antidiarcinogen. *Cancer Res.* 43, 2454-2459.
 24. Elair, W.H., Billings, P.C., Carew, J.A., McGandy, C.K., New berne, P., and Kennedy, A.R. 1990. Supression of dimethylhydrazine induced Carcino-genesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res.* 50, 580-587.
 25. Shamsuddin, A.M., Ullah, A., and Chakravarthy, A.K. 1989. Inositol and inositol hexaphosphate supress cell proliferation and tumor formation in CD-1 mice. *Carcinogenesis*, 10, 1461-1469.
 26. Shamsudolion, A.M., Elsafeel, A.M., and Ullah, A. 1988. Supression of large intestinal cancer in F344 rats by inositol hexaphosphate. *Carcinogenesis*, 9, 577-584.
 27. Coward, L., Barnes, N. C., Stechell, K.D.R., and Barnes, S. 1995. Genistein, daidzein, and their β -glycoside conjugates, antitumor isoflavones in soybean

- foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.* 41. 1961-1966.
28. Okura, A., Rakawa, H., Oka, H., Yoshinari, T., and Monden, T. 1988. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val12]Ha-ras-transformed NIH 3T3cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 157, 183-189.
29. Peterson, G. and Barnes, S. 1991. Genistein inhibition of the human breast cancer: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179, 661-669.
30. Tiisala, S., Majuri, M-L., Carpen, O., and Renkonen, R. 1994. Genistein enhances the ICAM-1 and its counter receptors. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 203, 443-448.
31. Mosmann, T. 1993. *J. Immunol. Method.* 65, 55
32. Park, J.G., Kwon, O.J., Kim, S.W., and Kim, J.P. Testing of LAK cell activity using a tetrazolium-based colorimetric (Mtt) assay. *Kor. J. Cancer Association.* 19 (2), 68-78.
33. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
34. Cheung, H. S. and D. W. Chshman. 1971. Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20, 1637-1647.
35. Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* 26, 1119-1200.
36. Charmichael, J., Degraff, E.G., Gazdaar, A.F., Minna, J. D., and Michell, J.B. 1987. Evaluation of a tetrazolium based semiautomated colorimetric assay, assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 936-943.
37. Yeum, D.M., Lee, T.G., Byum, H.S., Kim, S.B., and Park, T.H. 1992. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Bull, Korean Fish. Soc.* 25(3) 229-235.
38. Lee, H.O., Yoon, H.D., Jang, Y.S., Suh, S.B., and Ko, Y.S. 1999. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of algae. *J. Korean. Fish. Soc.* 32(4), 738-746.
39. Kim, S.B., Lee, T.G., Park, T.B., Yeun, D.M., Kim, O.K., Do, J.K., and Park, Y.H. 1994. Isolation and characteristics of angiotensin I converting enzyme

- inhibitory activity of peptic hydrolyzates of anchovy muscle protein. Bull. Korean Fish. Soc. 27(1), 1-6.
40. Kim, S.K., Choi, Y.R., and Park, P.J. 2000. Purification and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysate of cod teiset protein. J. Korean Fish. Soc. 33(3), 198-204.
41. Yee, J.J., Shipe, W.F., and Kinsella, J.E. 1980. Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper-catalyzed methyl linoleate oxidation. J. Food Sci. 45, 1082-1083.
42. Yamaguchi, N.S., Naito, S., Yokoo, Y., and Fujimaki, M. 1980. Application of protein hydrolyzate to biscuit as antioxidant. J. Japanese. Soc. Food Sci. Technol. 27, 56-59.
43. Krogull, M.K. and Fennema, O. 1981. Oxidation of tryptophan in the presence of oxidizing methyl linoleate. J. Agric. Food Chem. 35, 66-70.
44. Park, H.J., Choi, J.S. and Chung, H.Y. 1998. The antioxidant activity in extracts of *Symphyocladia latiuscula*. J. Korean Fish. Soc. 31(6), 927-932.
45. Kim, S.K., Lee, H.C., Byun, H.G., and Jeon, Y.J. 1996. Isolation and characterization of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of yellowfin sole skin gelatin. J. Korean Fish. Soc. 29, 246-255.
46. Chung, K.S., Yoon, K.D., Kwon, D.J., Hong, S.S., and Choi, S.Y. 1997. Cytotoxicity testing of fermented soybean products with various tumour cells using MTT assay. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25(5), 477-482.
47. Yang, Y.M., Hyun, J.W., Lim, K.H., Sung, M.S., Kang, S.S., Paik, W.H., Bae, K.W., Cho, H., Kim, H.J., Woo, E.R., Park, H.K., and Park, J.G. 1996. Antineoplastic effect of extracts from traditional medicinal plants and various plants (III). Kor. J. Pharmacogn. 27 (2). 105-110.

제 9 절 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소에 의한 멸치 근원섬유 단백질 분해 특성

1. 서론

수산발효식품 (액젓 및 젓갈)은 어류에 식염을 가하여 염장함으로써 부패균의 번식을 억제하고 자가소화효소 또는 미생물의 효소작용에 의해 어류 단백질을 분해시킨 제품이다. 어류 단백질의 조성을 보면 대체로 근장 단백질이 30-38%, 근원섬

유단백질이 60-75%, 그리고 근기질 단백질이 1-5%로 이루어져 있다 (1). 이 중 특히 근원섬유 단백질은 생체의 근수축기작과 단백질 식품의 구성에 중요한 역할을 담당하고 있는 염용성 단백질이다. 따라서 액젓 및 젓갈의 제조시 사용되는 염에 의하여 염용성 단백질인 근원섬유 단백질이 숙성 초기 단백질 분해효소에 의하여 먼저 분해 되어질 것으로 생각된다 (2). 현재, 수산발효식품 (젓갈 및 액젓)의 숙성 기간을 단축하기 위하여 다양한 효소를 첨가한 연구가 보고 되고 있지만, 어류 단백질의 주 성분인 근원섬유 단백질에 대한 효소의 특성 연구는 미비한 실정이다. 또한 효소 사용시 원료어의 종류나 상태, pH 및 온도에 따라 효소의 최적 조건이 다르기 때문에 과학적인 실험설계를 통한 최적 조건 설정이 필요하다. 통계학적으로 볼 때 실험의 설계라 함은 관심이 있는 변수를 의도적으로 변경시켜 측정된 결과에 대하여 어떻게 영향을 미치는가를 연구하기 위한 계획이다 (3). 따라서 체계적으로 실험을 설계하여 수행하게 되면 최소한의 실험으로도 유의성 여부를 확인할 수 있는 결과와 경비 절감 효과를 거둘 수 있다. 전통적으로 많이 이용해 오던 실험방법으로는 요인변수 (independent variables)들 중에서 한 변수를 제외한 모든 변수를 고정 시키고, 한 번에 한 변수만을 변화시켜 그 효과를 관찰하는 one-factor-at time-method가 적용되어 왔다. 그러나 변수들이 상호의존성을 지니고 있을 경우에는 one-factor-at time-method에 의한 최적조건은 실제 최적 조건이라 보기는 어렵다. 따라서 이러한 경우에는 잘 설계된 실험계획에 따라 실험을 수행함으로써 실험구 수를 감소시켜 실험 시간과 경비를 절감시키고 요인별 상호작용도 관찰할 수 있어 전통적 방법인 one-factor-at time-method에로 찾아내기 힘든 true optimal condition도 구할 수 있다 (3). 그러므로 실험설계에 의한 분석은 제품개발, 공정개발, 원가절감, 분석방법 개발, 품질관리 등의 측면에서 널리 이용되고 있으며 (4), 이와 함께 다양한 연구에 많이 이용되고 있는 방법에는 반응표면분석 (Response Surface Methodology, RSM)이 잘 알려져 있다 (5). 반응표면분석은 최근 우리나라의 식품개발 및 반응특성 연구에 많이 응용되고 있으며, 느타리버섯숙의 개발 (6), 산국의 추출특성 모니터링 (7), 기능성 melanoidin의 생성반응 최적화 (8), 마이크로웨이브 추출공정 최적화 (9) 및 추출특성 모니터링 (10), 멸치액젓 및 간장 가공부산물의 가수분해 최적화 조건 (11)등 여러 분야에서 응용되고 있는 실정이다. 따라서 반응표면분석을 사용함으로써 연구자가 여기서 얻은 결과로부터 중요한 변수를 변경 시켰을 때 나타날 수 있는 결과를 예측할 수 있도록 하여 실험설계를 사용하지 않은 연구자보다 경쟁적인 우위를 확보할 수 있을 것이다 (3).

2. 재료 및 방법

가. 멸치 actomyosin에 대한 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소의 영향

(1) Crude actomyosin의 추출

Crude actomyosin은 Kim et al. (2)의 방법을 다소 수정하여 추출하였다. 즉, 멸치육 100 g에 1%의 Triton X-100 (Sigma, USA)을 함유한 50 mM sodium phosphate (pH 7.5) 완충용액을 400 mL를 첨가하여 homogennizer (LJK Labotechniques, Malaysia)을 이용하여 30 초간 분쇄한 다음 원심분리 (3,000 × g, 10 min) 하였다. 상등액을 제거한 다음 sodium phosphate 완충용액으로 2회 반복 추출하였다. 원심분리 후 상등액을 제거한 잔사에 1 M NaCl을 함유한 50 mM sodium phosphate 완충용액으로 잔사를 다시 부유 시켜 원심분리 (8000 × g, 10 min) 하였다. Gauge를 이용하여 잔사를 제거하고 상등액은 0.5 M NaCl을 함유한 50 mM sodium phosphate 완충용액을 사용하여 24 hr 시간 동안 투석한 다음 원심분리 (15,000 × g, 10 min)하여 상등액을 crude actomyosin으로 하였다.

(2) 효소활성 측정

멸치 actomyosin에 대한 단백질분해 효소의 분해활성은 Kim (12)의 방법을 다소 수정하여 측정하였다. 즉, actomyosin 0.5 mL에 *B. subtilis* JM3 및 시판 단백질분해 효소액 0.5 mL 및 50 mM sodium phosphate 완충용액 1.5 mL을 첨가하여 water bath에서 1시간 동안 반응한 다음 10% TCA 용액 2.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 그런 다음 원심분리 (3,000 × g, 20 min)하여 취한 상등액을 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 (unit/mg)은 1 분 동안 효소 단백질 1 mg이 1 μ M의 tyrosine 생성량을 1 unit/mg으로 표시하였다.

(3) 효소반응 최적 조건

B. subtilis JM3 및 시판 단백질분해효소의 멸치 actomyosine에 대한 최적 가수분해 조건을 알아보기 위하여 pH, 온도 및 염농도에 대한 효소활성을 알아보았다.

(가) pH

B. subtilis JM3 및 시판 단백질분해효소의 최적 pH를 구하기 위하여 50 mM acetate buffer (pH 4.0-7.0), 50 mM phosphate buffer (pH 4.5-9.0) 및 50 mM tris-HCl buffer (pH 7.0-10.0)을 각각 사용하여 효소활성 측정법에 따라 측정하였다.

(나) 온도

B. subtilis JM3 및 시판 단백분해효소의 최적 온도를 구하기 위하여 효소 용액을 각각의 온도 20-60℃에서 30 분 동안 정치한 다음 각각의 온도에서 기질과 반응시킨 후 효소활성 측정법에 따라 잔존활성을 측정하였다.

(다) 염농도의 영향

B. subtilis JM3 및 시판 단백분해효소의 염농도 (0-30%)에 대한 영향을 알아보기 위하여 염농도를 달리한 기질을 사용하여 최적 온도에서 1 시간동안 반응시킨 후 효소활성 측정법에 따라 효소의 잔존활성을 측정하였다.

나. 반응표면분석법 (Response Surface Methodology, RSM)에 의한 멸치육 단백질의 최적의 가수분해 조건

(1) 멸치육 단백질 제조

멸치육 단백질은 선도가 양호한 체중 8-16 g, 체장 8-10cm의 멸치 (*Engraulis japonica*)의 육만을 취하여 세절 마쇄하고 여기에 5배량의 chloroform/methanol (3:2, v/v)혼합액을 가하여 어두운 곳에서 24시간 방치한 다음 흡인 여과하여 잔사를 진공동결 건조 및 마쇄하고 200 mesh 체로 거른 분말을 멸치육 단백질로 하였고, 여기에 10배량의 증류수를 가하여 가수분해물 제조의 시료로 사용하였다.

(2) 실험 디자인 및 통계적 모델링

모든 실험의 design, data 분석 및 최적화는 Design Expert (State-Easy Co., Minneapolis, USA)의 software을 사용하였다. pH, 온도, 가수분해 시간 및 효소 농도에 대하여 반응표면 분석 (Response Surface Methodology, RSM) (13)에 의해 결정하였다. Quadratic model 및 stepwise regression은 F-test를 위해 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 멸치 actomyosin에 대한 *B. subtilis* JM3 단백분해효소의 영향

(1) 효소 농도 및 반응시간의 영향

B. subtilis JM3 단백분해효소, Protamex, Alcalase 및 Flavourzyme을 멸치 actomyosin에 대하여 각각 1-5 mg/mL의 범위로 첨가하였을 때 생성되는 tyrosine

생성량에 대한 효소 농도의 영향을 Fig. 1에 나타내었다. Protamex, Alcalase, Flavourzyme 및 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소는 효소 농도 3.0 mg/mL까지는 tyrosine 생성량이 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 거의 일정한 값을 나타내었다. 효소농도를 3 mg/mL로 첨가하여 반응시간을 변화시켜 반응시간에 따른 tyrosine 생성량의 흡광도를 Fig. 2에 나타내었으며, 반응시간 60분까지 거의 직선형으로 증가하였다. Cho et al. (14)은 멸치 내장의 trypsin 활성은 기질 BAPNA (N α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide)에 대하여 효소농도에 비례하며, 반응 30분까지는 직선형으로 증가한다고 하였으며, 본 실험에서의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 가수분해 반응을 위한 효소농도 및 반응 시간은 1차 반응 농도에 해당하는 범위와 시간으로 한정하였다.

(2) pH 및 온도의 영향

pH 변화에 따른 tyrosine 생성량을 Fig. 10에 나타내었다. Alcalase는 pH 7.5-8.5, Protamex는 pH 7.0-8.0, Flavourzyme은 pH 5.0-6.0 사이에서 tyrosine 생성량이 가장 높았으며 (Fig. 3), NOVO사에서 보고한 Alcalase, Protamex 및 Flavourzyme의 최적 pH 조건 (pH 8, 7-8 및 5.5-6.5) 과 유사한 경향을 나타내었다. *B. subtilis* JM3 단백질분해효소는 5.5-6.0 사이에서 tyrosine 생성량이 가장 높았다 (Fig. 4). Kim (15)의 완전 정제된 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소의 특성에 관한 연구에서 최적 pH는 5.5 부근이라고 보고 하였으며, 본 실험의 부분 정제 효소 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 온도 변화에 따른 tyrosine 생성량의 변화를 Fig. 11에 나타내었다. Alcalase, Protamex 및 Flavourzyme은 각각 45-55, 50-60 및 45-55 °C에서 tyrosine 생성량이 가장 높았으며 (Fig. 5), NOVO사에서 보고한 Alcalase, Protamex 및 Flavourzyme의 최적 온도 조건 (50-60, 50 및 50-55 °C)과 유사한 경향을 나타내었다. *B. subtilis* JM3 단백질분해효소는 50-60 °C에서 tyrosine 생성량이 가장 높았다 (Fig. 5). Kim (15)의 결과에서도 완전 정제된 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소의 최적 온도는 50-60 °C이었다고 보고하였으며, 본실험의 부분 정제 효소 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

(3) NaCl에 의한 영향

멸치 actomyosin의 가수분해에 미치는 NaCl 농도의 영향을 Fig. 6에 나타내었다. NaCl 농도 증가에 따른 효소의 활성은 모든 효소에서 감소하는 경향을 나타내었으며, 20% NaCl 농도에서 Alcalase, Protamex 및 Flavourzyme 는 각각 30.3, 65.1 및 35.2%의 잔존활성을 나타내었다. *B. subtilis* JM3 단백질분해효소는 20%의

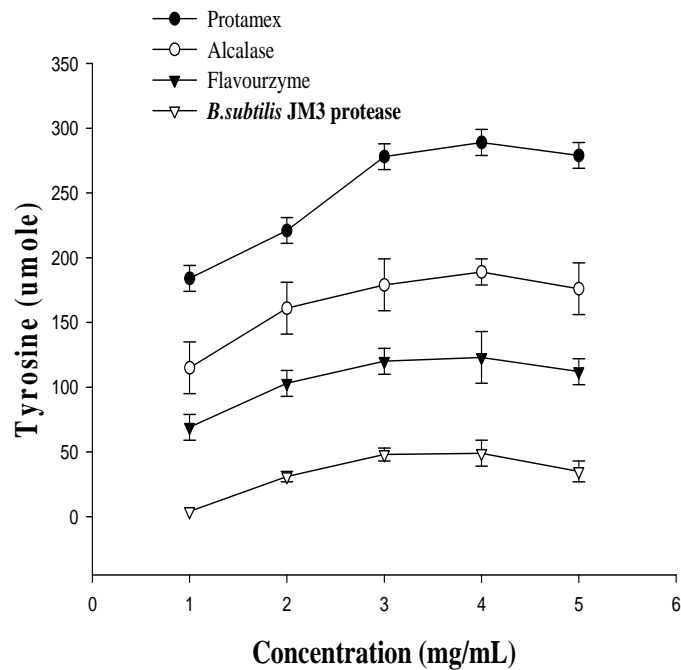


Fig. 1. Effects of enzyme concentration tyrosine production from anchovy actomyosin.

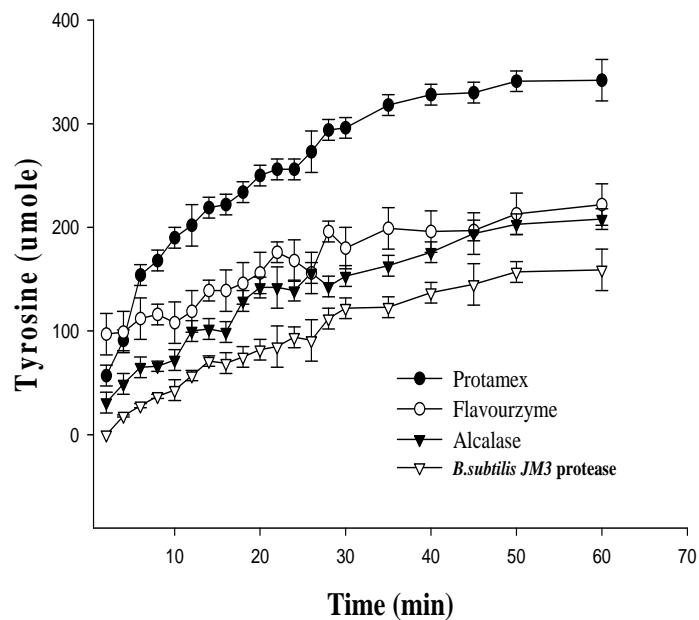


Fig. 2. Effects of hydrolysis time on tyrosine from anchovy actomyosin with *B. subtilis* JM3 and commercial protease.

NaCl 농도에서 55.2%의 잔존 활성을 보였으며, Kim (15)은 20%의 NaCl 농도에서 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소는 20%의 잔존활성을 나타내었다고 보고와는 다소 차이를 보였다. 이는 사용한 기질의 차이에 기인하는 것으로 보여지며, Brown and Smith (16)는 casein 기질의 조제 과정이 열 변성 과정을 거쳐 조제하게 됨으로서 느슨해진 단백질 구조 내의 SH기 및 OH기 등의 음하전을 띠는 이온과 Na⁺이온이 결합하여 효소 작용을 방해하기 때문에 식염 농도가 증가할수록 효소활성이 떨어진다고 보고 하였으며, Lee et al. (17)은 단백질분해효소에 대하여 효소활성에 미치는 영향을 casein 및 근원섬유단백질 기질에 대하여 연구한 결과에서 casein 기질에 대하여 염농도가 25%일때 효소활성은 60%이상 감소하였고, 근원섬유단백질 기질에 대하여 염농도가 25% 일때 효소활성은 80% 가량 잔존하다고 하였으며, 근원섬유단백질 기질에 대하여 염농도의 영향을 적게 받은 것은 근원섬유 단백질이 염에 의하여 안정한 상태로 존재함으로써 효소 작용을 보다 받기 쉬워진 것이 원인으로 생각된다 (17).

(4) 최적효소의 선정

3종류의 시판용 단백질 분해효소 중에서 멸치육 가수분해물 제조를 위한 최적 가수분해효소를 선정하기 위하여 각 효소별 최적 pH, 온도 및 효소 농도를 조정하여 한 시간 동안 반응 시킨 후 효소활성을 측정하였다. 그리고 효소 활성을 다시 판매가격으로 나눈 값이 가장 높은 것을 최적 효소로 선정하였다. 왜냐하면 이것은 산업적으로 응용될 적에 기업의 측면에서 가장 경제성이 있으며 생산량을 극대화할 수 있기 때문이다. Table 1에 나타난 바와 같이 Protamex, Alcalase, Flavourzyme 및 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소 순으로 효소활성이 높았으며, 이는 Protamex 및 Alcalase는 세균에서 분리된 정제 효소로 endo type의 단백질분해효소이며, Flavourzyme은 곰팡이에서 분리된 정제 효소로서 단백질 가수분해시 생성는 쓴맛을 제거하기 위하여 사용되는 exo type의 단백질분해효소로, 본실험에서는 효소의 특성은 무시하였다. 또한 *B. subtilis* JM3 단백질분해효소의 활성이 시판 단백질분해효소에 비해 낮은 활성을 나타낸 것은 상업적 이용시 경제성의 문제로 완전 정제 효소가 아닌 부분 정제 효소를 사용하였기 때문으로 생각된다. 판매가격에 대한 효소활성 (A/C)면에서도 Protamex는 0.19로, Alcalase는 0.14, Flavourzyme은 0.12로 나타났으며, A/C면에서 Protamex가 가장 효과가 좋았다. 본 실험에서는 산업적 응용을 전제로 할 적에 무엇보다도 경제성이 가장 우선적으로 고려되어야 할 것으로 생각되며, A/C 값이 높은 Protamex를 우선적으로 선택하였다.

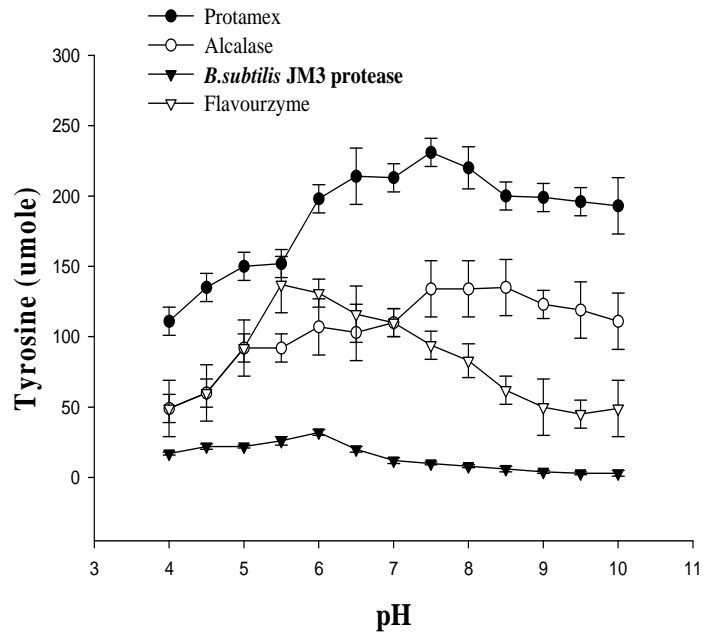


Fig. 3. Effects of pH on tyrosine from anchovy actomyosin with *B. subtilis* JM3 and commercial protease.

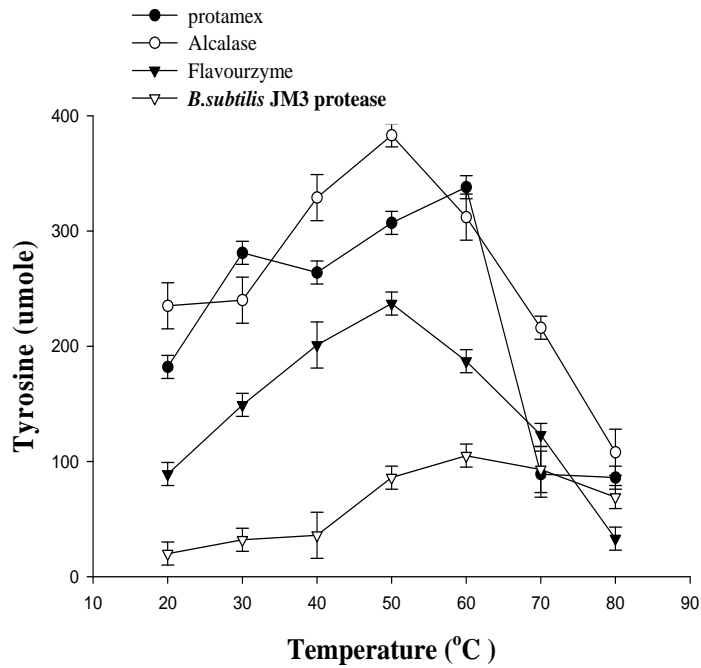


Fig. 4. Effects of temperature on tyrosine from anchovy actomyosin with *B. subtilis* JM3 and commercial protease.

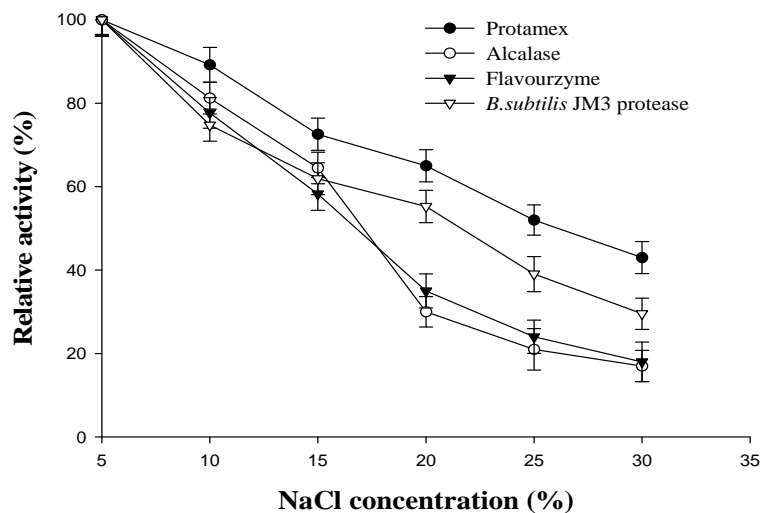


Fig. 5. Effects of NaCl concentration on tyrosine from anchovy actomyosin with *B. subtilis* JM3 and commercial protease.

Table 1. Evaluation of commercial proteases for anchovy actomyosin

Protease	Opt. pH ¹⁾	Opt. Tem (°C)	Concentration of protease (mg/mL)	Activity ²⁾	Cost	A/C ³⁾
Protamex	7.5	50	3	3.16	16.5	0.19
Alcalase	8	55	3	1.98	13.86	0.14
Flavourzyme	6	55	3	1.42	12.21	0.12
<i>B. subtilis</i> JM3 protease	5.5	55	3	0.79		

¹⁾ Optimal temperature and pH of each protease were suggest from proteolytic activities for anchovy crude actomyosin from anchovy

²⁾ One unit of the enzyme activity is defined as the amount of tyrosin hydrolyzed per min

³⁾ Enzyme activity per cost

나. 반응표면분석법 (Response Surface Methodology, RSM)에 의한 최적 가수분해 조건

통계적 모델링 및 분석

멸치 actomyosin 효과적으로 가수분해시킨 Protamex와 *B. subtilis* JM3 단백분해효소의 효소활성을 0.8 Unit/mg으로 조정된 후 멸치육 단백질에 대한 가수분해도를 알아보기 위하여 Design Expert (State-Easy Co., Minneapolis, USA)의 software를 사용하여 25개의 실험구를 만들어 비교 분석하였다. Protamex 첨가구에 있어서 효소 농도, 온도, pH 및 가수분해 시간에 따른 가수분해도는 각각 25.46-31.58% 사이의 범위를 가지고 있었으며, 효소 농도, 온도, pH 및 가수분해 시간을 각각 2%, 60 °C, 8 및 6 hr으로 조절된 시료의 가수분해도가 31.58%으로 가장 높게 나타났다 (Table 2). *B. subtilis* JM3 단백분해효소 첨가구에 있어서 효소 농도, 온도, pH 및 가수분해 시간에 따른 가수분해도는 24.37-29.08% 사이의 범위를 가지고 있었으며, 효소 농도, 온도, pH 및 가수분해 시간을 각각 2%, 60 °C, 4 및 6 hr으로 조절된 시료의 가수분해도 (DH%)가 29.08%으로 가장 높았다 (Table 2). Protamex 첨가구는 *B. subtilis* JM3 단백분해효소 첨가구에 비해 약 2.5% 정도로 가수분해도가 높았다. Protamex 및 *B. subtilis* JM3 단백분해효소에 의한 가수분해도에 대한 ANOVA 표를 Table 3에 나타내었다. 낮은 probability 와 높은 Lack of Fit 값으로 quadratic model은 적당한 model이라고 보여진다 (Table 3). Protamex 및 *B. subtilis* JM3 단백분해효소 농도, 온도, pH 및 가수분해 시간에 따른 constraint coefficient 값을 Table 4에 나타내었다. 가수분해도에 대한 Protamex 및 *B. subtilis* JM3 단백분해효소 농도의 constraint coefficient (2.02588 및 1.92977)는 온도(0.05162 및 0.035232), pH (1.06963 및 -0.49773) 및 가수분해시간 (0.24088 및 -0.62398)의 constraint coefficient값 보다 높게 나타났으며, 이것은 Protamex 및 *B. subtilis* JM3 단백분해효소의 농도가 멸치육 단백질을 가수분해하는데 있어 pH, 온도 및 가수분해 시간에 비해 크게 영향을 미치는 것으로 생각되어진다. Protamex 첨가구에 있어서 가수분해에 영향을 미치는 두 독립변수 상호간의 상관관계를 알아보기 위해 두 변수간의 3 차원식을 도식화하였다. 온도 (Tem) 와 Protamex 농도와 의 관계를 Fig. 6에 나타내었다. 50-60°C 부근에서 효소 농도 (Protamex)가 증가할수록 29-31%의 가수분해도를 나타내었으며, 효소 농도 (Protamex) 와 pH의 관계 (Fig. 6)에서는 pH 7-8 부근에서 효소농도 (Protamex)가 증가할수록 가수분해도가 증가하였다. 이러한 결과는 Protamex의 최적 pH 및 온도는 7 및 50 °C 부근이기 때문인 것으로 보여진다 (Fig. 3 및 4). 가수분해시간 (time) 및 효소 농도

(Protamex)와의 관계 (Fig. 6)에서는 가수분해시간에 따른 가수분해도는 증가하지 않았으며, 효소농도가 증가할수록 가수분해도는 28%으로 증가하였다가 감소하였다. 가수분해 시간 (Time) 및 온도 (Tem)와의 관계 (Fig. 6)에서는 온도 및 시간에 따른 상관관계는 나타나지 않았다. Protamex 효소에 의한 가수분해의 방정식에 있어서 독립변수 및 각 변수들간의 상호작용은 현저한 차이를 나타내었으며 ($p < 0.0107$), 이러한 RSM 결과로부터 얻어진 이차방정식모델 (Quadratic Model)은 다음과 같다.

$$DH (\%) = 21.9861 + 5.93855 \times A + 0.556615 \times B - 1.96777 \times A^2$$

($R^2 = 0.882805$, $p < 0.0107$), Where, DH (%) = Degree of hydrolysis, A (%) = Protamex, B = pH

반응표면분석방법에 의하여 얻어진 Protamex에 의한 최적 가수분해 조건은, 온도는 52°C, pH는 7.52, 효소농도는 1.24%, 가수분해 시간은 3.82 hr이었다.

B. subtilis JM3 단백분해효소 첨가구에서 가수분해에 영향을 미치는 두 독립변수 상호간의 상관관계를 알아보기 위해 두 변수간의 3 차원식을 도식화하였다. 온도 (Tem) 와 *B. subtilis* JM3 단백분해효소 농도와와의 관계를 Fig. 7에 나타내었다. 50-60°C 부근에서 효소 농도 (*B. subtilis* JM3 protease)가 증가할수록 28-29%의 가수분해도를 나타내었으며, 효소 농도 (*B. subtilis* JM3 protease) 와 pH의 관계 (Fig. 7)에서는 pH 4-5 부근에서 효소농도 (*B. subtilis* JM3 protease)가 증가할수록 가수분해도가 증가하였다. 이러한 결과는 *B. subtilis* JM3 단백분해효소의 최적 pH 및 온도는 5.5 및 50 °C 부근이기 때문인 것으로 보여진다 (Fig. 3 및 4). 가수분해시간 (time) 및 효소 농도 (*B. subtilis* JM3 protease)와의 관계 (Fig. 7)에서는 가수분해시간에 따른 가수분해도는 증가하지 않았으며, 효소농도가 증가할수록 가수분해도는 29% 까지 증가하였다가 감소하였다. 가수분해 시간 (Time) 및 온도 (Tem)와의 관계 (Fig. 7)에서도 온도 및 시간에 따른 상관관계는 나타나지 않았다. *B. subtilis* JM3 단백분해효소에 의한 가수분해의 방정식에 있어서 독립변수 및 각 변수들간의 상호작용은 현저한 차이를 나타내었으며 ($p < 0.0107$), 이러한 반응표면분석 결과로부터 얻어진 이차방정식모델 (Quadratic Model)은 다음과 같다.

$$DH (\%) = 29.98 + 1.84 \times A - 0.71 \times B - 3.077 \times A^2 - 1.15 \times AB$$

($R^2 = 0.834065$, $p < 0.0241$), Where, DH (%) = Degree of hydrolysis, A (%) = *B. subtilis* JM3 protease, B = pH

반응표면분석방법에 의하여 얻어진 *B. subtilis* JM3 단백분해효소에 의한 최적 가수분해 조건은, 온도는 55 °C, pH는 5.92, 효소농도는 1.82, 가수분해 시간은 4.72 hr 이었다. Protamex 및 *B. subtilis* JM3 단백분해효소로 멸치육을 가수분해시킬 때의 최적 조건으로 멸치육 가수분해물을 제조한다면 기존의 가수분해 조건에서 보다 높은 효율을 얻을 수 있으며, 산업적 경쟁력도 높을 것으로 생각되어진다.

4. 결론

Alcalase는 pH 7.5-8.5, Protamex는 pH 7-8, Flavourzyme은 pH 5-6, *B. subtilis* JM3 단백분해효소는 5.5-6 사이에서 tyrosine 생성량이 가장 높았다. Alcalase, Protamex, Flavourzyme 및 *B. subtilis* JM3 단백분해효소는 45-55, 50-60, 45-55 및 50-60 °C에서 tyrosine 생성량이 가장 높았다. 반응표면분석방법에 의하여 얻어진 *B. subtilis* JM3 단백분해효소에 의한 최적 가수분해 조건은, 온도는 55 °C, pH는 5.92, 효소농도는 1.82, 가수분해 시간은 4.72 hr이었다.

Table 2. Responses of dependent variable to the hydrolysis conditions for Protamex and *B. subtilis* JM3 protease

Enzyme concentration (%)	Temp (°C)	pH	Time (hr)	DH (%)	
				Protamex	<i>B. subtilis</i> JM3 protease
0	45	6	1.0	25.41	25.40
0	60	4	1.0	26.41	23.21
1	45	4	6.0	28.21	29.25
2	30	8	6.0	25.16	27.07
0	45	6	1.0	25.41	25.40
0	60	8	6.0	22.98	26.25
0	60	4	6.0	24.87	24.37
2	60	8	1.0	25.48	25.16
0	30	4	6.0	25.41	24.21
0	60	8	6.0	25.48	25.40
2	60	8	6.0	31.58	28.46
2	30	8	1.0	25.16	28.66
0	30	8	.0	25.16	24.49
1	45	4	6.0	26.75	29.04
2	60	4	1.0	31.53	29.44
1	60	6	6.0	29.92	26.75
2	30	4	1.0	31.85	28.85
2	60	4	6.0	29.86	29.08
2	30	4	6.0	28.66	27.71
0	30	4	1.0	25.48	25.40
2	30	8	1.0	22.29	25.80
0	30	6	3.5	25.31	25.42
0	30	8	1.0	26.75	26.10
1	60	6	6.0	27.81	28.25
0	30	6	3.5	25.21	25.20

Table 3. ANOVA table for nonlinear model of anchovy protein hydrolysis by Protamex and *B. subtilis* JM3 protease

Enzyme	Model	Selection	Source	SS	DF	MS	F-value	Prob>F
Protamex	Q ²⁾	S	Model	131	14	9	4.52	0.0107
			Residual	20	10	2		
			Lack of Fit	5	5	1	0.33	0.8737
BSP ¹⁾	Q	S	Model	167	14	11	3.59	0.0241
			Residual	33	10	3		
			Lack of Fit	18	5	3	1.31	0.3864

¹⁾ BSP = *B.subtilis* JM3 protease, ²⁾ Q= quadratic, S= stepwise

Table 4. Constraint coefficients expressed as pseudo values of degree of anchovy protein hydrolysis by Protamex and *B. subtilis* JM3 protease

Degree of Hydrolysis			
Factor	Constraint coefficient	Factor	Constraint coefficient
A = Protamex	2.026	A = BSP ¹⁾	1.930
B = Temp	0.051	B = Temp	0.035
C = pH	1.069	C = pH	0.498
D = Time	0.241	D = Time	0.624
A ²	1.337	A ²	3.073
B ²	0.376	B ²	1.955
C ²	0.558	C ²	1.582
D ²	0.997	D ²	1.843
AB	0.430	AB	0.156
AC	0.490	AC	1.153
AD	0.149	AD	0.525
BC	0.259	BC	0.028
BD	0.275	BD	0.159
CD	0.192	CD	0.494
R ²	0.8634	R ²	0.8346

¹⁾ BSP = *B.subtilis* JM3 protease

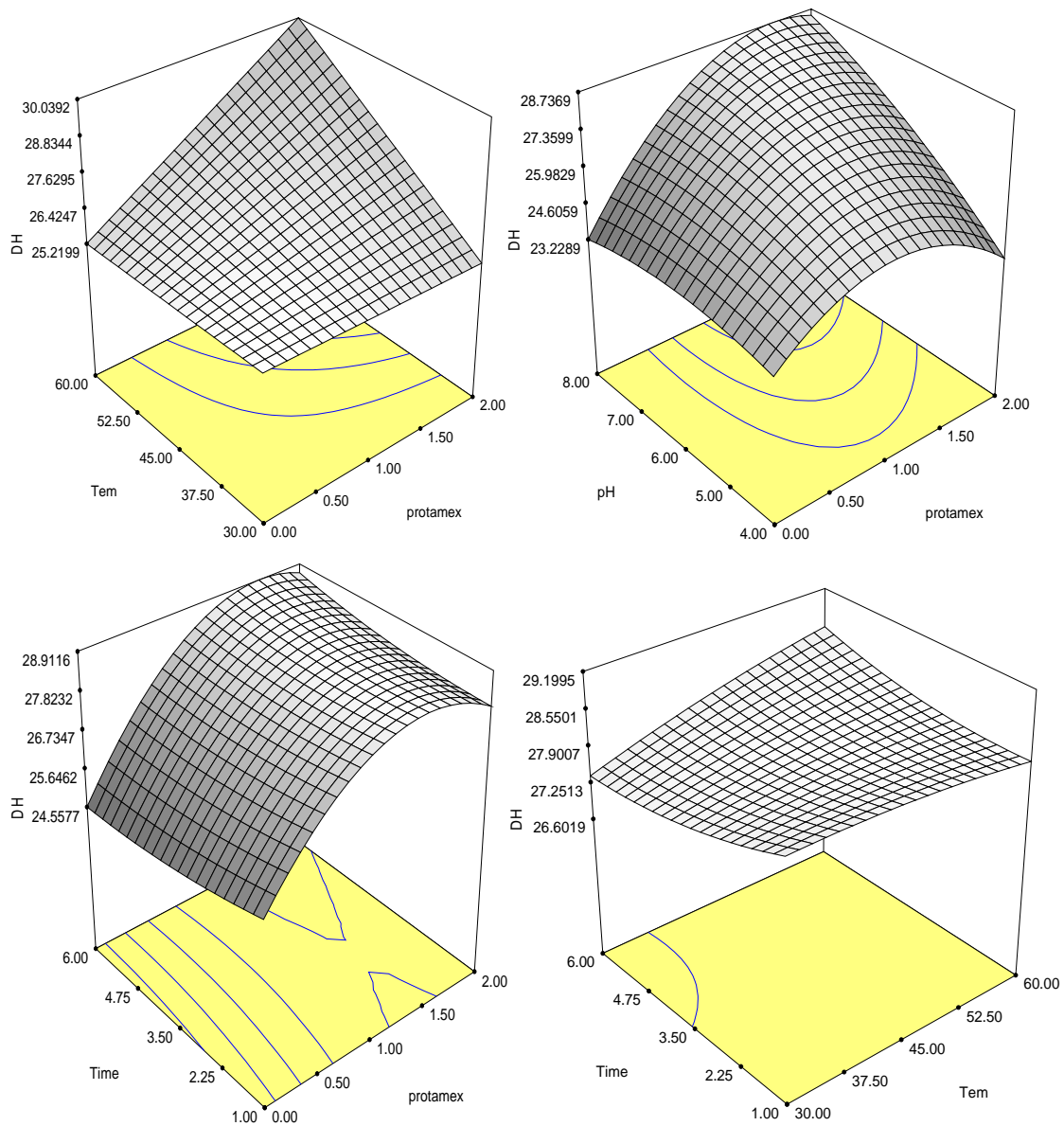


Fig. 6. Degree of anchovy protein hydrolysis by Protamex as a function of pH, temperature, time and concentration.

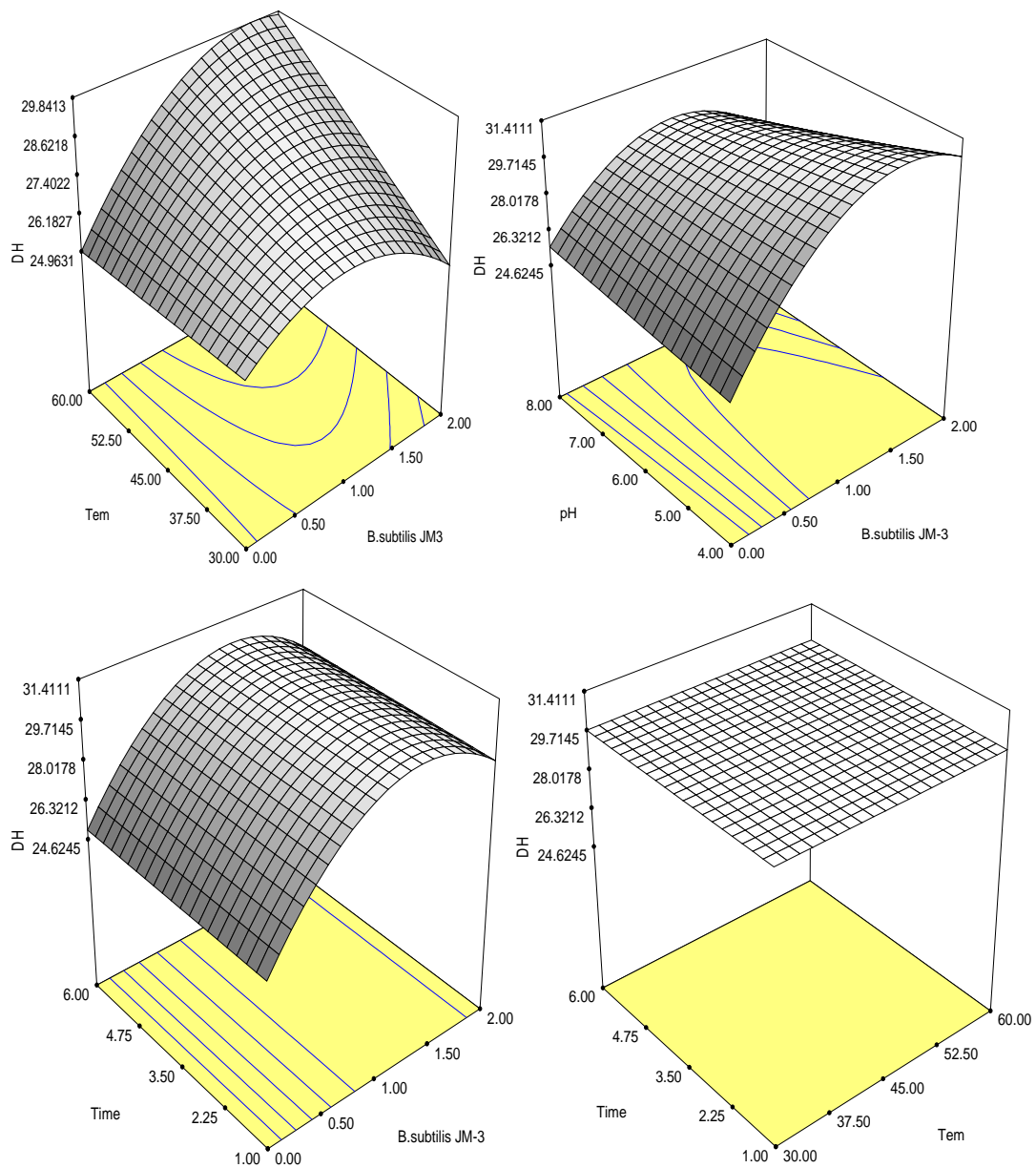


Fig. 7. Degree of anchovy protein hydrolysis by *B. subtilis* JM3 protease as a function of pH, temperature, time and concentration.

5. 참고문헌

1. Suzuki, T. 1981. *Fish and Krill Protein*. Applied Science Publishing, London, pp. 1
2. Kim, I.S., Choi, Y.J., Heu, M.S., Cho, Y.J., Im, Y.S., Gu, Y.S., Yang, S.G., and Park, J.W. 1999. Peptide properties of rapid salted and fermented anchovy sauce using various protease. 1. Hydrolysis of anchovy sauce and actomyosin by various protease. *J. Korean Fish. Soc.* 32(4), 481-487.
3. 이기동 · 이정은 · 권종호. 2000. 식품공업에서 반응표면분석의 응용. *식품과학과 산업*, 33(1), 33-44.
4. Gontard, N., Guilbert, S., and Cuq, J.L. 1992. Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J. Food Sci.* 57. 190-196.
5. Myers, R.H. 1971. *Response Surface Methodology*. Allyn and Bacon Inc., Boston, USA. pp. 127-137
6. Lee, G.D., Kim, H.G., Kim, J.G., and Kwon, J.H. 1997. Optimization for the preparation condition of instant rice gruel using oyster mushroom and brown rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29, 737-744
7. Lee, G.D., Kim, J.S., and Kwon, J.H. 1996. Monitoring of dynamic changes in maillard reaction substrates by response surface methodology. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28. 375-383
8. Lee, G.D. and Kwon, J.H. 1998. The use of response surface methodology to optimize the maillard reaction to produce melanoidines with high antioxidative and antimutagenic activities. *International Journal of Food Sci. Technol.* 33, 375-383.
9. Lee, S.B., Lee, G.D., and Kwon, J.H. 1999. Optimization of extraction conditions for soluble ginseng components using microwave extraction system under pressure. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28, 409-416.
10. Lee, S.B., Lee, G.D., and Kwon, J.H. 1999. Monitoring of extraction characteristics and comparison of extraction efficiencies for ginsenosides in the microwave-assisted process under pressure. *J. Ginseng Res.* 23, 164-171.
11. Kim, H., Lee, J.S., and Cha, Y.J. 2002. Processing of functional enzyme-hydrolyzed sauce from anchovy sauce and soy sauce processing by-products. 1. Optimization of hydrolysis conditions by response surface

- methodology. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31(4), 653-657.
12. Kim, H.R. and Pyeun, J.H. 1986. The proteinase distributed in the intestinal organs of fish 2. Characterization of the three alkaline proteinase from the pyloric caeca of mackerel, *Scomber Japonicus*. Bull. Korean Fish. Soc. 19(6), 547-557.
 13. Box, G.E.P. and Benhnken, D.W. 1960. Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics. 2, 455-461.
 14. Cho, D.M., Heu, M.S., Kim, H.R., kim, D.S., and Pyeun, J.H. 1996. Kinetic analyses for enzymatic properties of trypsins purified from dark fleshed fish. J. Korean Fish. Soc. 29(1), 64-70.
 15. Kim, W.J. 2002. Purification and charterization of *Bacillus Subtilis* JM3 protease from anchovy sauce. Ms thesis, Kangnung National University.
 16. Brown, D.H. and Smith, W.E. 1990. *The Impact of Metal Ion Chemistry on Our Understanding of Enzymes*. In "Enzyme Chemistry", 2nd ed., Chapman and Hall, London. pp. 227-243.
 17. Lee, D.S., Heu, M.S., Kim, D.S., and Pyeun, J.H. 1996. Some properties of the crude protease from fish for application in seafood fermentation industry. J. Korean Fish. Soc. 29(3), 309-319.

제 4 장 기능성 미생물 (Starter)의 개발

제 1 절 멸치액젓 유래 단백분해세균의 분리 및 동정

1. 서 론

최근 조사되어진 현대인의 사망원인 별 분석자료(Korea National Statistical Office, 2000)에 의하면 혈관 내 장애에 의한 사망원인이 1위를 차지하고 있으며, 우리나라의 경우 또한 국민소득의 향상과 식생활 문화의 서구화에 따라 혈관 장애에 의한 사망률이 1위를 차지하고 있다. 혈관 장애에 의한 질환으로는 뇌졸중(中風)과 심부전증 등이 대표적으로 알려져 있으며, 그 원인으로는 고혈압과 동맥경화가 직접적인 원인으로 보고(Kil et al., 1998)되어지고 있다. 특히 뇌졸중(中風)은 현재 우리나라의 중·장년층에서 많이 발생하고 있으며 이로 인하여 많은 사람들이 사망에 이르거나 불구가 되고 있는 실정이다. 우리 인체는 생체 내에서 일어나는 크고 작은 상처들에 의한 혈액의 손실을 방지하기 위한 방어 수단으로 혈전(Fibrin)을 생성하게 되는데 이렇게 생성된 혈전은 상처복구 후에도 분해되지 않고 혈관을 순환하게 된다. 혈관내의 잉여(剩餘) 혈전들이 뇌혈관과 같은 아주 작은 모세혈관 벽에 침착하게 되어 혈액의 흐름을 방해함으로써 뇌 조직으로의 원활한 영양분 및 산소의 공급을 차단하게 되고, 이로 인하여 동맥벽이 변성을 일으켜 동맥압을 이겨내지 못하고 파열되면, 뇌졸중에 의한 반신 불수 또는 직접적인 사망의 원인으로 작용하게 된다. 이러한 잉여 혈전의 생성을 사전에 억제하거나, 혈관 벽에 침착 되어진 혈전을 제거하기 위한 수단으로 지렁이의 건조분말(Mihara et al., 1991; Nakajima et al., 1993), 뱀의 독(Kim et al., 1991) 그리고 거머리(Lee et al., 1993)와 같은 벌레 등이 가지고 있는 혈전 용해물질의 분리에 관한 연구들이 수행되어져 왔으며, 최근에는 전통발효식품과 같은 새로운 분리원으로부터 혈전의 억제·용해물질들의 분리에 대한 연구(Sumi et al., 1987, 1995)가 활발하게 진행되고 있다. 특히 전통발효식품의 하나인 멸치액젓으로부터 새로운 종류의 혈전 용해 활성 효소와 이러한 효소를 생산하는 미생물들이 분리되었다는 보고(Nobuyoshi et al., 1992; Choi et al., 1998)는 주목할 만 하다. 이는 멸치액젓이 고래로부터 오늘날까지 우리의 식생활문화의 한 부분을 차지하면서 경험적으로 인체에 안전하다는 임상의 결과를 시사하는 것으로 인체 투여 부작용에 대한 안전성을 이미 충족했을 뿐만 아니라 복용에 있어서도 번거롭지 않다는 장점을 가지고 있기 때문이다.

멸치액젓은 신선한 선어(鮮魚)를 염장하여 자가소화 효소 및 미생물의 작용에 의하여 원료가 분해·숙성된 액상의 전통 발효식품으로, 독특한 맛과 영양이 풍부하여 예로부터 간장 대용, 김치의 부재료나 조미료로 널리 사용되어져 왔다. 숙성기간 중 미생물 기원의 효소작용에 의하여 어육단백질이 여러 형태의 peptide로 분해되어 멸치액젓의 풍미를 향상시킬 뿐만 아니라 항암, 혈압강하, 혈청콜레스테롤 강하, 면역증강 그리고 칼슘 흡수의 촉진 등과 같은 광범위한 생리활성기능을 가지는 것으

로 보고되어지고 있다. 이에 멸치액젓 숙성 중에 생성되는 peptide의 생리활성기능에 관한 많은 연구 결과들이 보고되고 있으며, Lee et al.(1991)은 멸치액젓의 숙성에 관여하는 미생물의 특성에 대하여서도 보고한 바 있다. 이러한 일련의 연구들은 멸치액젓을 비롯한 전통발효식품 중에는 미지의 생리활성 기능을 가지는 물질들이 다량 존재한다는 것을 보여주고 있으나, 멸치액젓 산업은 인스턴트 문화의 보급과 지속적인 화학 조미료의 개발 등으로 인하여 그 규모가 작아지고 있는 추세(Korea National Statistical Office, 2000)이며, 숙성기간의 장기화와 지속적인 저장·관리 또한 멸치액젓 제조산업의 경제성을 저하시키는 원인으로 작용하고 있어, 멸치액젓 제조산업의 획기적인 전환을 요구하고 있다. 이에 장기간을 요하는 멸치액젓의 숙성기간을 단축하기 위한 많은 연구가 진행되어져 왔다(Kim et al., 1990; Kim et al., 1999). 단백질 분해 효소를 멸치액젓에 첨가하여 숙성기간을 단축하려는 노력들과 단백질 분해활성이 우수한 미생물을 직접 첨가하는 방법들이 여러 실험을 통하여 수행되었다(Kim et al., 1975; 1990). 그러나 이러한 연구들은 재래식 방법에 의하여 숙성되어진 멸치액젓에 비하여 쓴맛을 가지며, 멸치액젓의 염농도가 20% 이상에 달함으로서 인위적으로 첨가되어진 미생물의 성장이 저해 받는 결과를 보여 왔다.

따라서 본 연구에서는 멸치액젓의 숙성발효 및 항혈전, 항고혈압 그리고 나아가서는 항암과 같은 생리활성기능을 부여한 신개념의 멸치액젓을 제조할 목적으로 상업적으로 이용 가능한 기능성 멸치액젓 제조용 starter를 분리하고자 전통발효식품의 하나인 멸치액젓으로부터 단백질 분해활성이 뛰어난 균주의 선별과 아울러 혈전 용해활성이 우수한 균주를 분리하여, 최적 성장 조건 및 최적 효소 생산 조건 등을 조사하였으며, 분리균주들의 동정은 형태학적, 배양학적 특징 및 PCR을 이용한 16S rRNA의 염기서열을 분석(Fox et al., 1980; Franco et al., 1998; Yang et al., 1999)하여 동정하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시료

단백질 분해활성과 혈전 용해활성을 가지는 균주의 분리원으로는 강원도 속초시에 위치한 풍미(株)에서 생산·시판되어지고 있는 1년, 3년 그리고 5년 숙성한 멸치액젓을 사용하였다. 시료의 채취는 풍미(株)의 저장 탱크로부터 무균적으로 직접 채취하였으며, 5℃ 이하의 빙장함에 넣어 실험실로 가져와 바로 실험에 사용하였다.

나. 생균수의 측정

(1) 일반세균수의 측정

숙성 멸치액젓의 일반세균의 생균수 측정용 배지로 Plate count agar(Difco. Co.)를

사용하였고, 호염성 일반세균의 생균수 측정용 배지로는 동일 배지에 10%의 NaCl을 첨가하여 사용하였다. 생균수의 측정은 AOAC(1995)의 방법에 준하여 표준평판법으로 행하였고 27.5℃와 37℃에서 48시간 배양한 후에 측정하였다.

(2) 유산균수의 측정

유산균수의 생균수 측정용 배지로는 DeMan, Rogosa, Sharpe agar(이하 MRS agar, Difco. Co.)를 사용하였고, 호염성 유산균의 생균수 측정용 배지로는 동일 배지에 10%의 NaCl을 첨가하여 사용하였다. 유산균수의 측정은 일반세균의 생균수 측정과 동일한 방법으로 행하였으며, 15℃와 27.5℃에서 72시간 배양한 후에 측정하였다.

(3) 효모, 곰팡이수의 측정

효모와 곰팡이의 생균수 측정용 배지로는 호정(好井, Kono) 배지(Table 4-1)를 사용하였고, 호염성 효모와 곰팡이의 생균수 측정용 배지로는 동일 배지에 10%의 NaCl을 첨가하여 사용하였다. 효모와 곰팡이수의 측정은 일반세균의 생균수 측정과 동일한 방법으로 행하였으며, 15℃와 27.5℃에서 72시간 배양한 후에 측정하였다.

Table 4-1. Composition of the Kono medium

Ingredients	Concentration
Glucose	10 g
Bacto peptone	10 g
Yeast extract	5 g
Potassium phosphate monobasic	5 g
Sodium chloride	100 g
Thioglycolic acid	10 g
Bacto agar	18~20 g
5~10% fish sauce	1000 mL

※ pH not adjusted and autoclaved at 121℃ for 15 min.

다. 균주의 분리 및 배양

1, 3 그리고 5년간 숙성한 멸치액젓으로부터 다음과 같은 방법으로 균주를 분리하였다. 2% skim milk(Difco Co.)를 첨가한 MRS agar 평판에 멸치액젓 100 μ l를 도말평판법에 의하여 접종하고 27.5℃에서 48 시간 배양한 후, 단백질 분해활성이 있는 3 균주를 분리하였으며 각각 JM-1, JM-2 그리고 JM-3라고 명명하였다. 이렇게 분리되어진 균주들을 MRS 액체배지에서 24시간 이상 배양한 후에 배양액과 glycerol을 4:1이 되게 혼합하여 멸균된 2 mL vial tube에 분주하여 -85℃에서 보관

하면서 실험균으로 사용하였다.

라. 분리균주의 배양학적 성상

(1) 형태학적 특성

분리균주 JM-1, JM-2 그리고 JM-3를 Brain heart infusion broth(이하 BHI broth, Difco Co.)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후에 Hanging drop method에 의해 현미경을 통하여 운동성을 직접 관찰하였고, Gram 염색을 통하여 균의 형태 및 염색여부를 관찰하였으며, malachite green 용액을 가하여 60초간 증탕한 후에 포자형성의 유·무를 관찰하였다.

(2) 생리, 생화학적 특성

(가) Catalase 시험

분리균주를 BHI agar 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후에 3%의 H₂O₂에 한 백금이의 균을 접종하여 가스 생성여부를 관찰하였다.

(나) Glucose로부터 가스 발생

분리균주를 Durham관이 든 시험관의 GYP(1% glucose, 0.5 yeast extract, 0.5 peptone) 액체배지에 접종하여 37°C에서 1~3일간 배양하면서 매일 가스 발생여부를 관찰하였다.

(다) Indole 생성

분리균주를 1% tryptone nutrient broth 배지에 접종하여 32°C에서 2일간 배양한 후 Kovac's 시약 5 mL를 시험관 기벽을 따라 흘러내리게 하여 가볍게 흔들어 준 후 정치하여 색깔을 관찰하고 적색으로 변하면 양성으로 판정하였다.

(라) 기타 생화학적 시험

ONPG, gelatin 액화성, Citrate의 이용여부, urea의 이용여부, esculin 분해여부, VP reaction, Nitrate reduction 그리고 당의 이용에 관한 사항은 API kit (API 50 CHB, Bio Merieux Co., France)를 사용하여 관찰하였다.

마. 분리균주의 동정

숙성 멸치액젓으로부터 분리한 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성을 가지는 분리균주 JM-1, JM-2 그리고 JM-3를 다음과 같은 방법으로 동정하였다.

(1) 분리균주의 DNA 추출

BHI 액체배지에서 배양한 각 균들을 4,000×g, 10분간 원심 분리하여 균체를 모으고, 그 pellet을 TE buffer에 현탁한 후 40 μL의 lysozyme을 첨가하여 30℃에서 30분간 반응시키고, 이후 절차는 Bioneer의 AccuPrep™ Genomic DNA extraction Kit를 이용하여 DNA를 추출하였다.

(2) 추출된 DNA의 PCR

PCR 반응은 DNA thermal cycler (Perkin Elemer Co., USA)를 사용하여 수행하였으며, 6F (5'GRAGTTTGATCMTGGC: corresponding to positions 6 to 23 of *Escherichia coli* 16s rRNA)와 1492R (3'GGTTACCTTGTTACGACTT: corresponding to positions 1474 to 1492 of *E. coli*)를 primer로 사용하였다 (Franco et al., 1998).

반응 조건은 94℃에서 1분간 denaturation, 53℃에서 2분간 annealing, 72℃에서 2분간 extension, 이러한 반응을 1회로 하여 30회 실시하였다. PCR products는 전기영동(agarose gel)을 통하여 분리, 정제하였다.

(3) 16S rRNA 유전자의 염기 서열 분석

분리, 정제한 PCR product의 염기서열을 분석하기 위하여 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elemer Co., USA)로서 sequencing reaction을 실시하였다. 미리 준비하여 둔 PCR mixture를 thermal cycler (GeneAmp PCR System 2400)에 넣고 96℃ (10 sec), 50℃ (5 sec), 60℃ (4 min)를 1회로 하여 25회 실시하였다. Sequencing 과정은 ABI 310 genetic analyzer의 protocol에 따라서 실시하였다.

(4) 16S rRNA sequence의 비교 및 동정

각 균주의 16S rRNA sequence를 National Center for Biotechnology Information (이하 NCBI)에서 제공하는 BLASTIN 2.0 (BLAST DNA database search service, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)의 유전자 database와 비교 분석하여 균을 동정하

였다.

바. 단백질 분해활성 측정

단백질 분해활성을 지닌 균주들을 MRS broth에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후에 3,000×g, 20분간 원심분리하여 cell을 제거한 후 그 상청액만을 시료로 사용하였다. 2% skim milk를 첨가한 MRS agar 평판 중앙에 멸균 disk paper를 올려놓은 후 준비한 시료 40 μ l를 분주하고 37°C에서 48시간 배양한 후에 형성된 투명환의 크기로 그 활성의 정도를 확인하였다.

대조구로는 한국생명공학연구원 유전자은행으로부터 분양 받은 단백질 분해활성을 지닌 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 생균수

(1) 일반세균수

1, 3 그리고 5년간 숙성한 멸치액젓 시료의 일반세균의 생균수 변화를 Fig. 4-1에 나타내었다. 비호염성 세균수는 숙성 기간에 관계없이 일정한 수준으로 검출되었으나, 호염성 세균수는 숙성기간이 경과함에 따라서 감소하는 경향을 보였다.

(2) 유산균수

숙성기간별 유산균의 생균수 변화를 Fig. 4-2에 나타내었다. 비호염성 유산균수는 숙성기간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 보인 반면, 호염성 유산균수는 숙성기간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 보였다.

(3) 효모, 곰팡이수

숙성기간에 따른 효모 및 곰팡이의 생균수 변화를 Fig. 4-3에 나타내었다. 비호염성 효모, 곰팡이수는 3년 그리고 5년 숙성 멸치액젓 시료에서만 검출되었으며, 호염성 효모, 곰팡이수는 모든 실험구에서 검출되지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 멸치액젓의 숙성기간에 따른 미생물상의 변화는 숙성초기에는 일반세균이 대부분을 차지하나 숙성이 진행됨에 따라 호염성 유산균 및 진균류 쪽으로 미생물상이 천이되는 것으로 추측된다. 이는 멸치 젓갈의 숙성기간에 따른 미생물상의 변화에 대한 연구(Lee and Choi, 1974)에서 숙성초기에는 *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Falvobacterium*, *Brevibacterium* 속과 같은 그람음성 간균이 많이 검출되었으나 숙성기간이 경과하면서 호염성 세균인

Halobacterium 속들과 *Pediococcus*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Saccharomyces* 속과 같은 구균류와 효모류 등이 증가하였다는 보고와 유사한 결과로 여겨지며, 또한 멸치액젓은 숙성 초기에 자가 분해효소 및 단백질 분해활성이 우수한 균들에 의하여 어육단백질이 빠르게 분해되고, 숙성이 진행되면서 효모류에 의한 알코올발효와 유산균에 의한 발효가 진행되면서 특유의 감칠맛을 만든다는 보고(Cha et al., 1983)와도 매우 유사한 결과로 생각되어진다.

나. 균주의 분리 및 배양학적 성상

(1) 형태학적 특성

1, 3 그리고 5년간 숙성한 멸치액젓으로부터 2% skim milk(Difco Co.)를 첨가한 MRS agar 평판을 이용하여 단백질 분해활성을 가지는 3 종의 균주(JM-1, JM-2, JM-3)를 분리하였으며, 분리균주들의 형태학적 특성을 Table 4-2에 나타내었다. 3 균주 모두 Gram-positive의 단간균으로서 내생포자를 형성하며, 운동성이 있었다. colony는 우유빛의 불규칙한 cream 형태로 평판에 넓게 퍼져 자라는 것을 관찰할 수 있었다.

(2) 생리, 생화학적 특성

분리균주 JM-1, JM-2 그리고 JM-3의 생리, 생화학적 특성을 Table 4-3에 나타내었다. 3 균주 모두 ONPG 양성 그리고 Indole 음성으로 나타났으며, Citrate를 이용하고, Decarboxylase와 Urease 그리고 Oxidase는 생산하지 않는 반면에 Catalase와 Gelatinase는 생산하는 것으로 나타났다. 당의 이용은 D-Glucose, L-Arabinose, D-Xylose, D-Mannitol를 이용하여 산을 생산하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 분리균주 JM-1, JM-2 그리고 JM-3는 모두 *Bacillus* 속으로 추정할 수 있었으며, 정확한 동정을 위해서 PCR을 이용하여 분리균주의 16S rRNA의 염기서열을 분석, NCBI에서 제공하는 BLASTN 2.0 프로그램을 이용하여 동정을 시도하였다.

다. 분리균주의 동정

Bacillus sp. JM-1, JM-2 그리고 JM-3를 동정하기 위하여 16S rRNA의 염기서열을 분석한 결과 3 균주 모두 동일한 염기서열을 가지는 것으로 나타났으며, 그 중 *Bacillus* sp. JM-3의 염기서열을 Fig. 4-4에 나타내었다.

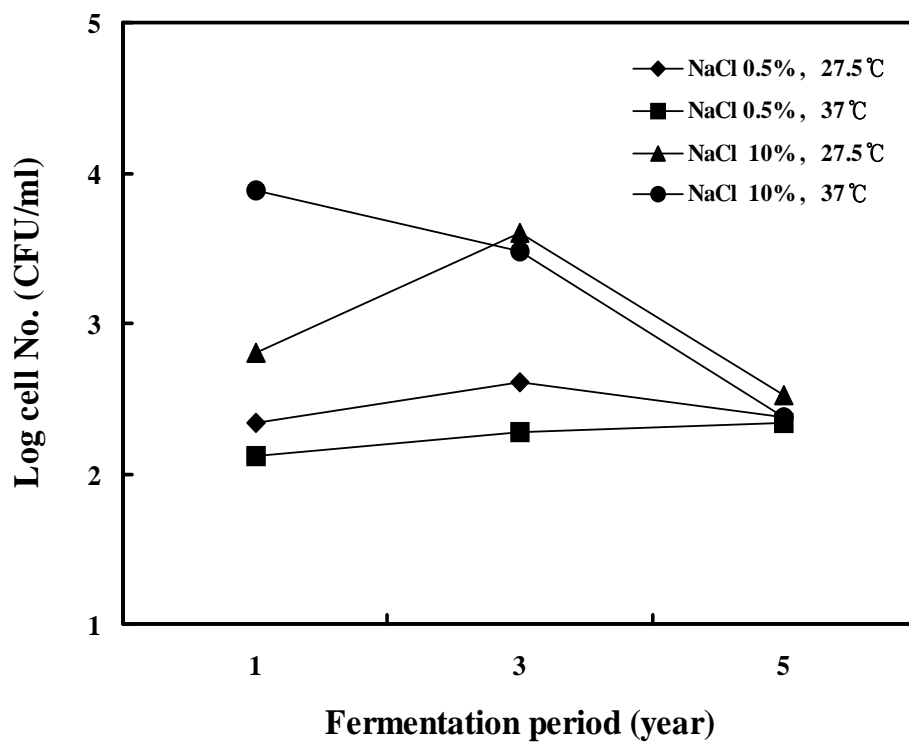


Fig. 4-1. Viable cell numbers of bacteria from anchovy sauce fermented for 1, 3 and 5 years.

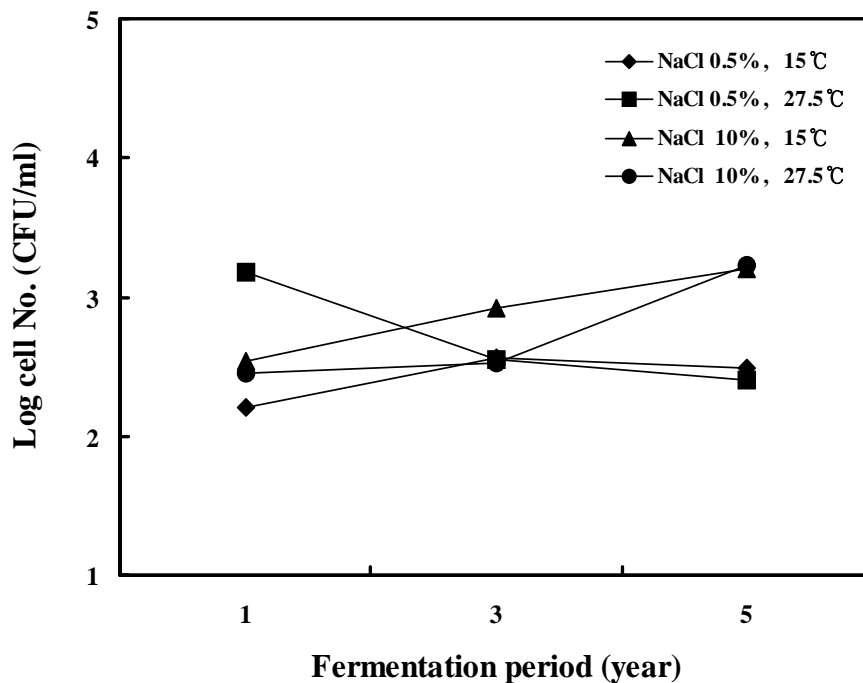


Fig. 4-2. Viable cell numbers of lactic acid bacteria from anchovy sauce fermented for 1, 3 and 5 years.

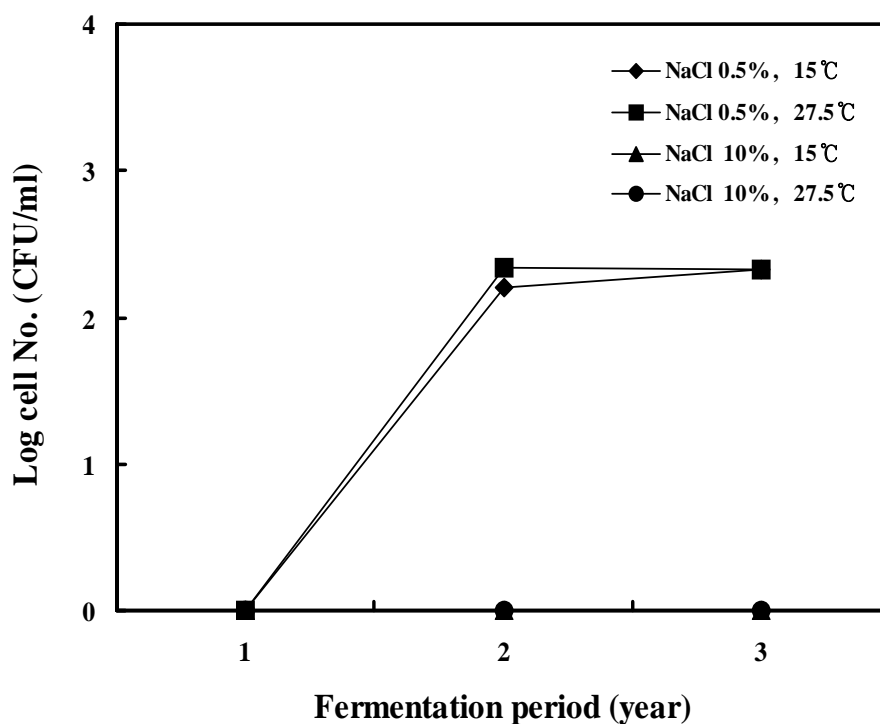


Fig. 4-3. Viable cell numbers of fungi from anchovy sauce fermented for 1, 3 and 5 years.

Table 4-2. Morphological characteristics of bacterial strain JM-1, JM-2 and JM-3 isolated from Anchovy sauce

	JM-1	JM-2	JM-3
Gram stain	+ ¹⁾	+	+
Form	rod	rod	rod
Spore	+	+	+
Motility	+	+	+

1), positive

Table 4-3. Comparison of physiological and biochemical characteristics of bacterial strain JM-1, JM-2 and JM-3 with those of *B. subtilis* and *B. pumilis*

Characteristics	JM-1	JM-2	JM-3	<i>B. subtilis</i>	<i>B. pumilis</i>
Oxidase	- ¹⁾	-	-	-	-
Catalase	+ ²⁾	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	-
Gas production on glucose	-	-	-	-	-
Citrate utilization	+	+	+	+	+
Gelatinase production	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	-
Acid from	L-arabinose	+	+	+	+
	D-xylose	+	+	+	+
	D-mannitol	+	+	+	+
	D-glucose	+	+	+	+

B. subtilis JM-3: 1 ggcggtcctaatacatgcaagtcgagcggacagatgggagcttgctcctgatgtagcg 60
B. subtilis KL-077: 31 ggcggtcctaatacatgcaagtcgagcggacagatgggagcttgctcctgatgtagcg 90
B. subtilis JM-3: 61 ggggacgggtgagtaacacgtgggtaacctgctgtaagactgggataactccgggaaac 120
B. subtilis KL-077: 91 ggggacgggtgagtaacacgtgggtaacctgctgtaagactgggataactccgggaaac 150
B. subtilis JM-3: 121 cggggctaataccggatggtgtttgaaccgcatggttcaaacataaaagggtgcttcgg 180
B. subtilis KL-077: 151 cggggctaataccggatggtgtttgaaccgcatggttcaaacataaaagggtgcttcgg 210
B. subtilis JM-3: 181 ctaccacttacagatggaccgcggcattagctagttggtgaggtaacggctaccaa 240
B. subtilis KL-077: 211 ctaccacttacagatggaccgcggcattagctagttggtgaggtaacggctaccaa 270
B. subtilis JM-3: 241 ggcaacgatgcgtagccgacctgagagggtgatcgccacactgggactgagacacggcc 300
B. subtilis KL-077: 271 ggcaacgatgcgtagccgacctgagagggtgatcgccacactgggactgagacacggcc 330
B. subtilis JM-3: 301 cagactctacgggagcagcagtagggaatctccgcaatggacgaaagtctgacggag 360
B. subtilis KL-077: 331 cagactctacgggagcagcagtagggaatctccgcaatggacgaaagtctgacggag 390
B. subtilis JM-3: 361 caacgccgctgagtgatgaagggtttcgatcgtaaagctctgtttagggaagaaca 420
B. subtilis KL-077: 391 caacgccgctgagtgatgaagggtttcgatcgtaaagctctgtttagggaagaaca 450
B. subtilis JM-3: 421 agtaccgttcgaatagggcggtaccttgacggtacctaaccagaaagccacggctaacta 480
B. subtilis KL-077: 451 agtaccgttcgaatagggcggtaccttgacggtacctaaccagaaagccacggctaacta 510
B. subtilis JM-3: 481 cgtgc 485
B. subtilis KL-077: 511 cgtgc 515

Fig. 4-4. *Bacillus subtilis* strain KL-077 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Length = 1501, Score = 961 bits (485), Identities = 485/485 (100%),

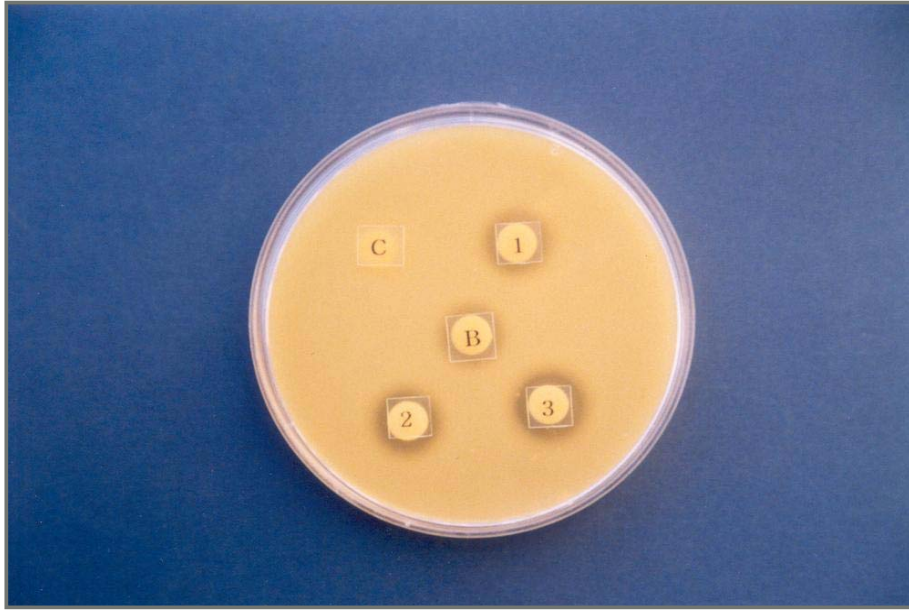


Fig. 4-5. Proteolytic activity of *Bacillus* sp. JM-1, JM-2 and JM-3 in skim milk plate at 37°C for 48 h.

C: BHI broth (negative control)

B: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (positive control)

1: *Bacillus* sp. JM-1

2: *Bacillus* sp. JM-2

3: *Bacillus* sp. JM-3

다. 분리균주의 동정

Bacillus sp. JM-1, JM-2 그리고 JM-3를 동정하기 위하여 16S rRNA의 염기서열을 분석한 결과 3 균주 모두 동일한 염기서열을 가지는 것으로 나타났으며, 그 중 *Bacillus* sp. JM-3의 염기서열을 Fig. 4-4에 나타내었다.

16S rRNA sequence를 NCBI에서 제공하는 BLAST DNA database search service (BLASTN 2.0)를 이용하여 비교, 분석한 결과 *Bacillus* sp. JM-1, JM-2 그리고 JM-3 모두 *Bacillus subtilis*와 100%의 상동성을 보이는 근연종으로 나타났다. 이 결과를 토대로 멸치액젓에서 분리한 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 가지는 *Bacillus* sp. JM-1, JM-2, JM-3 세 균주 모두 *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

라. 분리균주의 단백질 분해활성 측정

2% skim milk를 함유한 MRS 한천배지에서 분리균주들의 단백질 분해활성을 측정 한 결과를 Fig. 4-5에 나타내었다. *B. subtilis* JM-1과 JM-2에서는 직경 15 mm와 17 mm의 투명환을 관찰할 수 있었으며, *B. subtilis* JM-3는 직경 20 mm로 가장 넓게 나타나 가장 강한 단백질 분해활성을 나타내었다.

마. *B. subtilis* JM-3의 최적 성장조건

숙성 멸치액젓으로부터 분리한 균주 중 단백질 분해활성 및 혈전 용해 활성이 제일 강하였던, *B. subtilis* JM-3의 최적 성장 온도와 pH를 조사한 결과를 Fig. 4-6에 나타내었다.

20℃이하의 온도에서는 느린 성장을 보였으나, 25℃ 이상의 온도에서는 온도가 증가함에 따라 성장속도가 빨라지는 경향을 나타내었다. 최적성장 온도는 일반적인 *Bacillus* 속의 최적 성장온도인 30~37℃ 보다는 조금 높은 40℃로 나타났다. 이는 Choi et al. (1988)의 발효 대두로부터 분리된 단백질 분해활성을 가지는 *B. subtilis*의 최적 성장온도가 37~40℃ 사이였다는 보고와 Kil et al. (1988)에 의하여 청국장 에서 분리된 혈전 용해효소 생산 *Bacillus* sp. KP-6408의 최적 성장온도가 40℃ 이었다는 보고와 유사하게 나타났다.

B. subtilis JM-3는 pH 5부근에서 가장 빠른 성장을 보였으며, pH 4 이하에서는 성장이 불가능하였고, pH 9 이상의 알칼리 조건에서는 성장에 저해를 받는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 지금까지 보고된 protease를 생산하는 여러 *Bacillus* 속의 성장조건으로 알려진 중성 부근 혹은 약알칼리였다는 보고들 (Lee et al., 1991; Jang, 1992)과는 다소 상이한 pH 특성을 나타내었다. *B. subtilis* JM-3의 최적 성장 식염농도를 조사한 결과를 Fig. 4-7에 나타내었다. *B. subtilis* JM-3는 식염을 첨가하지 않은 실험구에서 가장 양호하게 성장하였으며, 식염 12% 첨가구까지는 성장의

저해는 없었으나, 12% 이상의 농도에서는 배양 10일까지 성장의 저해를 보였다. 그러나 배양시간이 경과함에 따라서 잘 적응하여, 배양 종료시점인 30일 경과 후에는 20%의 식염 첨가구에서도 식염을 첨가하지 않은 실험구의 약 60%까지 성장하였다.

바. *B. subtilis* JM-3의 단백질 분해효소 최적 생산조건

(1) 온도

B. subtilis JM-3의 단백질 분해효소 생산에 미치는 온도의 영향을 Fig. 4-8에 나타내었다. 15~50℃에서 배양한 모든 실험구에서 단백질 분해활성을 보였으며, 40℃에서 가장 강력한 활성을 나타내었다.

(2) pH

B. subtilis JM-3의 단백질 분해효소 생산에 미치는 pH의 영향을 Fig. 4-9에 나타내었다. pH 4를 제외한 pH 5~9에서 배양한 실험구에서 단백질 분해활성을 보였으며, pH 5에서 가장 강력한 활성을 나타내었다.

(3) 식염농도

B. subtilis JM-3의 단백질 분해효소 생산에 미치는 식염농도의 영향을 Fig. 4-10에 나타내었다. 식염농도 0~20%에서 배양한 모든 실험구에서 단백질 분해활성을 보였으며, 식염을 첨가하지 않은 실험구에서 가장 강력한 활성을 나타내었으나 멸치액젓의 일반적인 염농도인 NaCl 20%에서도 식염을 첨가하지 않은 실험구의 약 60%의 활성을 나타내었다.

4. 결론

이상의 결과로 볼 때, *B. subtilis* JM-3의 단백질 분해효소 생산의 최적온도는 40℃, 최적 pH는 5 그리고 식염농도 0% 이었다. 이러한 결과는 *B. subtilis* JM-3의 최적 성장조건과 일치하는 것으로, 대부분의 미생물이 생산하는 효소활성에 관한 연구 (Kwak et al., 2001)의 최적 성장조건과 최대 효소 생산 범위는 크게 차이가 나지 않는다는 보고 (Mah et al., 2001)와 같은 경향을 보이는 것으로 나타났다. 그러나 Kamal et al (1995)의 *B. subtilis*가 생산하는 subtilisin의 특성을 파악한 연구에서는 최대 효소 생산 범위가 40℃, pH는 7부근 이었다는 보고와 Ahn et al (1990)의 *B. subtilis*가 생산하는 protease의 최적 생산 조건은 40℃와 pH 12.5 이었다는 보고 등과 비교하였을 때, 최적 효소 생산 온도는 일치하였으나, *B. subtilis* JM-3의 최적 효소생산 pH는 5 부근으로 상대적으로 낮은 값을 보였다. 대부분의 *Bacillus* sp.이 생산하는 단백질 분해효소는 중성이나 염기성 조건에서 단백질 분해효소의 최적 생산이나 최대 효소활성을 가지는 alkaline protease로 알려져 있다 (Horikoshi, 1971; Chang et al., 1988; Tsuchiya et al., 1991). 이에 반하여

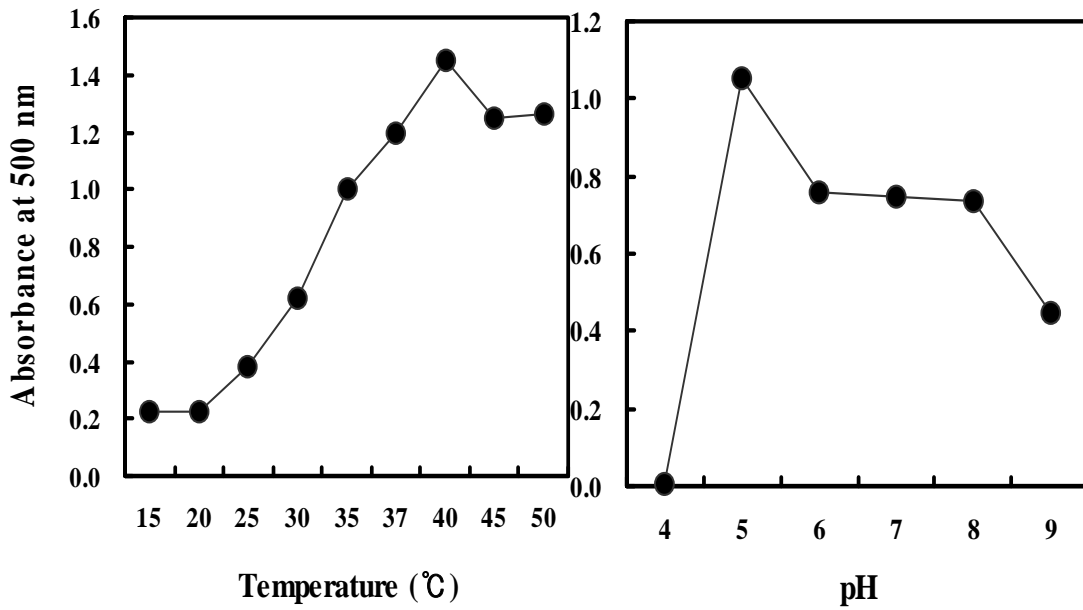


Fig. 4-6. Optimum growth temperature and pH of *B. subtilis* JM-3 isolated from anchovy sauce.

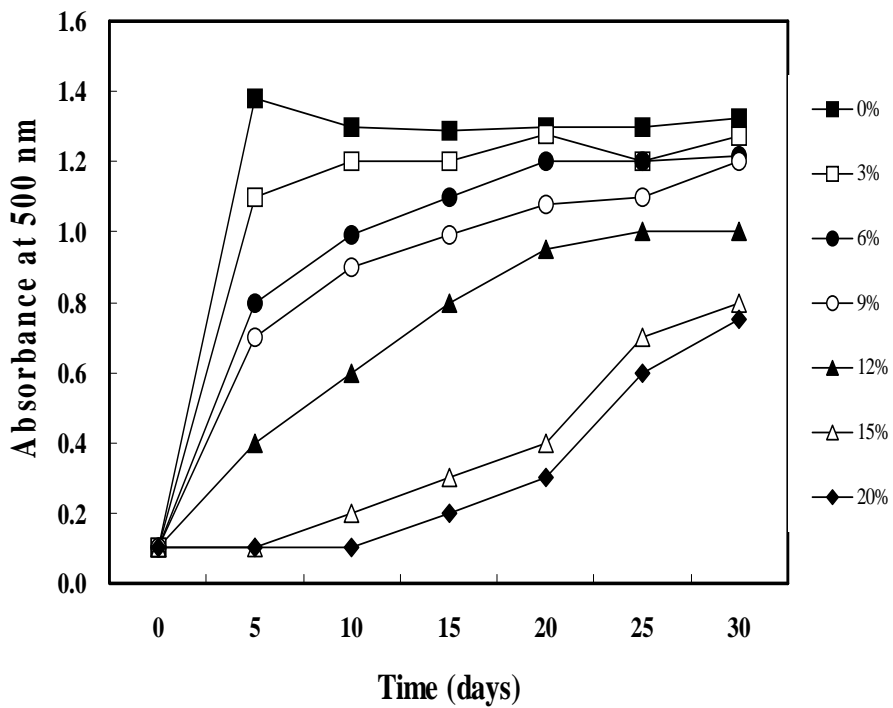


Fig. 4-7. Optimum growth NaCl concentration of *B. subtilis* JM-3 isolated from anchovy sauce.

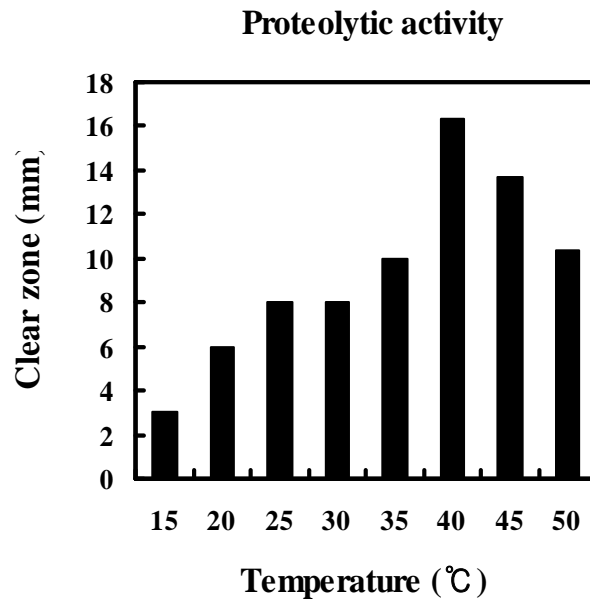


Fig. 4-8. Optimum temperature for the proteolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3.

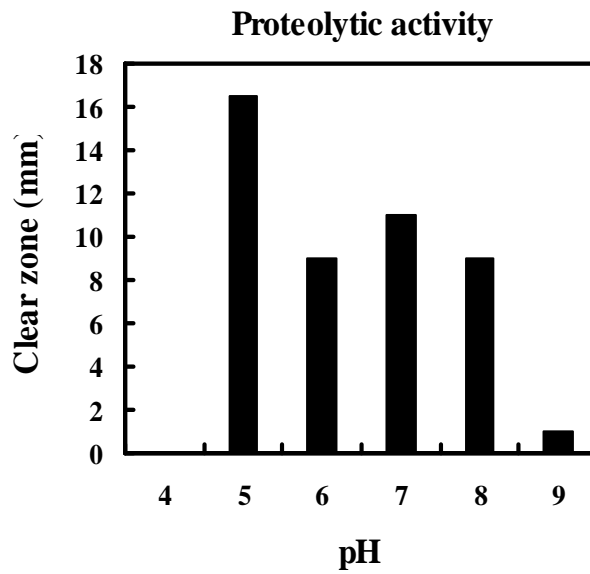


Fig. 4-9. Optimum pH for the proteolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3.

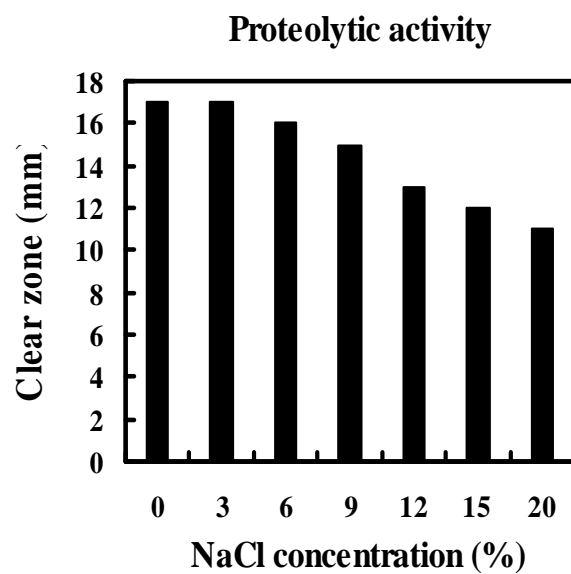


Fig. 4-10. Optimum NaCl concentration for the proteolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3.

B. subtilis JM-3의 최적 성장과 최대 단백질 분해효소 생산 조건은 약산성인 pH 5로서 대단히 특이적인 것으로 사료된다. 멸치액젓은 숙성 초기에는 단백질 분해활성이 강력한 균들이 대량 증식하면서 어육단백질의 분해가 빠르게 진행되지만 숙성이 진행되면서 유산균과 효모류의 성장에 의하여 멸치액젓의 pH가 낮아져 그 성장이 저해 받게 되는데 이는 멸치액젓의 숙성 기간을 장기화시키는 여러 요인 중의 하나로 작용하고 있다. 그러나 *B. subtilis* JM-3는 단백질 분해효소의 최적 생산조건이 pH 5로서 숙성 멸치액젓의 starter로서의 매우 유리한 조건이라 할 수 있을 것이다.

식염 첨가량에 따른 *B. subtilis* JM-3의 성장 및 단백질 분해효소 생산은 배양 초기에는 식염농도 12% 이상의 첨가구에서 성장 저해를 보였지만, 30일간의 장기간 배양 결과 멸치액젓의 일반적인 식염농도인 20%의 식염첨가구에서도 식염 무첨가구의 약 60%의 성장 및 단백질 분해활성을 나타내었다. 최근 5~10% 수준의 저식염농도의 멸치액젓 제조 방법이 계속적으로 개발되고 있으며 (Kim and Choi, 1975; Ha et al., 1986; Cha et al., 1983), 숙성 멸치액젓 또한 3~6개월의 숙성기간을 요함으로, 숙성 초기에 성장이나 효소 생산의 지연은 멸치액젓 starter로서 문제가 되지는 않을 것으로 사료된다.

5. 참고문헌

- Ahan, J. W., T. K. Oh, Y. H. Park and K. H. Park. 1990. Partial Purification and Characterization of the Alkaline Protease from *Bacillus* sp (in korean). Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech. 18, 344-350.
- Cha, Y. J., S. Y. Chung, J. H. Ha, I. C. Jeong and E. H. Lee. 1983. Studies on the processing of low salt fermented sea foods (in korean). Bull. Korean Fish. Soc. 16(3), 211-215.
- Chang, S. J., Y. S. Kim, H. C. Sung, Y. J. Choi and H. C. Yang. 1988. A study on the alkaline protease produced from *Bacillus subtilis* (in korean). J. Korean. Agric. Chem. Soc. 31(4), 356-360.
- Choi, W. A, J. W. Lee, K. H. Lee and S. H. Park. 1998. Effects of Environmental and Nutritional Conditions on Fibrinolytic enzyme Production from *Bacillus subtilis* BK-17 in Flask Culture. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13, 491-496.
- Choi, Y. J., S. H. Kim, Y. S. Im, I. S. Kim, K. S. Kim and Y. J. Cho. 1988. Properties and utilization of undigested peptides in anchovy sauces (in korean). J. Korean Fish. Soc. 31, 386-392.
- Fox, G. E., E. Stackebrandt, R. B. Hespell, J. Gibson, J. Maniloff, T. A. Dyer, R. S. Wolfe, W. E. Balch, R. Tanner, L. Magrum, I. B. Zablen, R. Blakemore, R.

- Gupta, L. Bonen, B. J. Lewis, D. A. Stahl, K. R. Luehrsen, K. N. Chen and C. R. Woesw. 1980. *The phylogeny of prodaryotes*. *Science*, 209, 457-463.
- Franco, W., J. S. Ramon, M. G. Patrick, S. W. Lidia and D. G. George. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in enviromental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2545-2553.
- Ha, J. H., S. W. Han and E. H. Lee. 1986. Studies on the processing of low salt fermented seafoods (in korean). *Bull. Korean Fish. Soc.* 19(4), 312-320.
- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I .Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 211. *Agric. Biol. Chem.* 35, 1407-1414.
- Jang, Y. C. 1992. Proteinases produced from bacillus lichenformis SSA3-2M1 (in korean). *Kor. J. Microbiol.* 30, 239-244.
- Kamal, M., J. Hoog, O. Kaiser, R. Shafqat, J. Razzadi, T. Zaidi Z. H. and H. Jormvall. 1995. Isolation, characterization and structure of subtilisin from a thermostable *Bacillus subtilis* isolate. *Federation of European Biochemical Societies.* 374, 363-366.
- Kil, O. K., G. N. Kim and I. S. Park. 1988. Production and Characterization of Fibrinolytic Enzyme: Optimal Condition for Production of the Enzyme from *Bacillus* sp. KP-6408 Isolated from Chungkook-jang (in korean). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27, 51-56.
- Kim, D. S., H. L. Choi and Y. N. Youm. 1991. Purification and properties of snake venom phosphodiesterase from *Agkistrodon halys* (in korean). *J. Korean. Biochem.* 24(1), 71-77.
- Kim, J. K. and S. D. Kim. 1999. Genetic breeding of Korean soybean paste-fermenting *Bacillus* sp. by UV mutation. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 32(2), 148-153.
- Kim, Y. M., J. G. Koo, Y. C. Lee and D. S. Kim. 1990. Study on the use of sardine meal Koji and autolysates from sardine meat in rapid processing of sardine sauce. *J. Korean Fish. soc.* 23(2), 167-177.
- Kim, Z. U. and S. H. Choi. 1975. A study on the manufacturin of soysauce by the combined use of *Aspergillus sojae* and *Bacillus subtilis*. *J. Korean Agric. Chem.* 18(1), 1~9.
- Korea National Statistical Office. 2000. A study on causes of death for 1999.
- Lee, J. G. and W. K. Choi. 1974. Studies on the variation of microtlora during the fermentation of anchovy, *Engraulis Japonica*. *Bull. Korean Fish. Soc.* 7(3): 105-114.

- Kwak, G. S., S. K. Kim and H. K. Jun. 2001. Purification and characterization of bacteriocin J105 produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* J105 isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11(2), 275-280.
- Lee, S. K., S. G. Lee, J. H. Son, and Y. S. Choi. 1993. Screening and purification of anticoagulant proteins from Korea Leeches (in Korean). *J. Korean. Agric. Chem. Soc.* 26(3), 228-233.
- Lee, Y. J., Y. J. Cho, K. M. Son and C. Choi. 1991. Characterization of alkaline protease produced by *Bacillus* sp. CW-1121. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 24; 537-542.
- Mah, J. H., K. S. Kim, J. H. Park, M. W. Byun, Y. B. Kim and H. J. Hwang. 2001. Bacteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11(4), 577-584.
- Mihara, H., H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda, M. Seiki, and M. Maruyama. 1991. A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Japanese J. Physiol.* 41, 461-464.
- Nakajima, N., H. Mihara, and H. Sumi. 1993. Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1730-1734.
- Nobuyoshi N., T. Naotoshi, and S. Hiroyuki. 1992. Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive tract (shiodara): purification and characterization. *Biotech. Biochem.* 57, 1604-1612.
- Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara and H. Muraki. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experimentia.* 43, 1110-1111.
- Sumi, H., N. Nakajima and C. Yatagai. 1995. A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwoxinase) in skipjack "Shiokara," a Japanese traditional fermented food. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 112B 3, 543-547.
- Tsuchiya, K., T. Sakashita, Y. Nakamura and T. Kimura. 1991. Production of thermostable alkaline protease by alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. *Agric. Biol. Chem.* 55, 3125-3131.
- Yang, Y., L. Jiang, L. Zhu, Y. W. and S. Y. 1999. Thermal stable and oxidation-resistant variant of subtilisin E. *Journal of Biotechnology.* 81, 113-118.

제 2 절 멸치액젓 유래 *Bacillus subtilis* JM-3의 생리활성기능

1. 서 론

멸치액젓의 속성발효 및 항혈전, 항고혈압 그리고 나아가서는 항암과 같은 생리활성기능을 부여한 신개념의 멸치액젓을 제조할 목적으로 상업적으로 이용 가능한 기능성 멸치액젓 제조용 starter를 분리하고자 전통발효식품의 하나인 멸치액젓으로부터 단백질 분해활성이 우수한 균주를 분리하여, 혈전용해활성, 항균활성, 항산화활성, 항변이원활성, ACE 저해활성, 암세포 증식억제 효과 등을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 혈전 용해 활성 측정

Fibrin (혈전) 용해 활성은 Astrup and Mullertz (1952)의 방법을 일부 수정한 방법에 의해 측정하였다. Fibrinogen을 0.3%가 되도록 10 mM 인산완충용액(pH 8.0)에 완전히 용해시키고, 이 fibrinogen 인산완충용액 10 mL를 평판에 붓고, 45°C로 유지된 1% 멸균천천용액을 동량 첨가하여 충분히 혼합 후, thrombin 100 units (Sigma Co., USA)를 첨가하였다. 이를 상온에서 1시간 정도 방치하여 고화된 fibrin 평판에 적정수의 구멍(지름 2 mm)을 뚫은 후 단백질 분해활성 실험에 사용한 것과 동일한 시료 50 μ L를 분주하여 37°C에서 10시간 배양한 후 형성되는 투명환의 크기로 활성의 정도를 비교하였다.

양성 대조구는 대표적인 혈전 용해제인 plasmin (1.0 U/mL, Sigma. Co., USA)을 사용하였고, 음성 대조구는 멸균 BHI 액체배지를 시료와 동량 사용하였다.

$$\text{혈전 용해 활성(\%)} = \left(\frac{\text{시료의 용해영역}}{\text{plasmin의 용해영역}} \right) \times 100$$

나. 항균활성 측정

(1) 항균활성 측정용 균주 및 배양 배지

항균활성 실험에 사용되어진 Indicator organism들은 KCTC와 ATCC로부터 분양받아 사용하였으며, *Vibrio* sp.는 3%의 NaCl이 첨가되어진 nutrient broth medium, 이를 제외한 세균은 nutrient broth를 사용하여 37°C에서 24시간 전배양 하였다. 효모류의 경우는 30°C의 MRS broth에서 48시간 전배양하여 실험에 사용하였다.

(2) 실험 방법

① 항균활성의 실험은 Agar diffusion method로 Mueller hinton agar(MH)를 사용하여 투명환의 크기를 측정하는 방법으로 실시하였다.

② 건조되어진 MH agar plate에 전배양 되어진 Indicator organism 100 μ l를 도말 평판법에 의하여 접종한 후 지름 5 mm의 구멍을 뚫어 여기에 시료 50 μ l를 조심스럽게 접종하여 전배양 조건과 동일한 조건으로 배양하였다.

③ 양성 대조구로는 5 units의 Penicillin-Streptomycin을 사용하였고, 음성대조구로는 멸균 BHI broth를 시료와 동량 사용하였다.

다. 항산화활성 측정

(1) 시료의 준비

분리균주 중 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성이 가장 강력한 *B. subtilis* JM3을 BHI broth medium에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 원심분리하여(3,000 rpm, 20 min.) 상청액만 분자량 3,000 Da.의 filter로 한외여과하여 분자량 3,000 Da. 이상의 용액만을 여과멸균(0.45 μ l)하여 시료로 사용하였다.

(2) 실험 방법

① 항산화능의 측정은 Hayase and Kato(1984)의 방법에 의하여 과산화물가를 측정하여 시료의 산화 억제율(%)로 나타내었다.

② 삼각플라스크에 linoleic acid 1.00g을 정칭한 후 ethyl alcohol 20 mL를 가하여 완전히 녹이고 0.2 M 인산완충용액(pH 7.0) 25mL을 가하여 혼합하였다.

③ 시료 1 mL를 첨가하여 50°C에서 40 rpm/min의 조건으로 24시간 자동 산화시킨 다음 통상의 방법에 따라 과산화물가를 분석하였다. 음성 대조구는 BHI broth를 시료와 동량 첨가하여 실험하였다.

라. 항변이원 활성 측정

(1) 최소 glucose 한천평판배지

Vogel-Bonner 최소배지를 만든 후, agar 15g을 700ml의 증류수에 녹인 것, glucose 20g을 200ml의 증류수에 녹인 것, Vogel-Bonner 최소배지 100ml를 121°C, 25분간 각각 멸균한다. 멸균한 배지를 60°C까지 방냉한 후 세 용액을 무균적으로 혼합하여 평판배지를 만들고, 2일간 건조한 후 시험에 사용하였다.

(2) Soft agar

0.5 mM L-histidine과 0.5mM D-biotin을 함유한 수용액을 만들어 10ml씩 시험관에 분주하고 121°C, 15분간 멸균한 후, 방냉하여 냉장고에 보존하였다. Soft agar는 200 ml 용량의 삼각플라스크에 NaCl 0.6g, agar 0.7g, 증류수 100ml를 넣고 121°C, 15분

간 멸균하였다. 사용 직전에 멸균한 histidine-biotin 용액 10ml를 37℃로 가온하여 soft agar 100ml에 첨가하여 사용하였다.

(3) 변이원물질

실험에 사용한 변이원 물질로는 식육이나 어육을 가열 조리할 때 발생하는 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1)과 2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f] quinoxaline(MeIQx) (일본 岡山大學 藥學部 早津彦哉 教授로부터 분양)를 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 1.0 ppm과 0.5 ppm 용액을 각각 만든 후 사용직전 각 시험관에 0.1ml씩 분주하였다. 그리고 N-nitrosoamine 중 변이원 성이 높은 것으로 알려진 N-nitrosodimethyl-amine(NDMA)과 N-nitrosomorpholine(NMO)은 증류수로 10ppm과 20ppm 용액을 각각 만들어 동일한 방법으로 시험하였다.

(4) 항변이원활성 측정

B. subtilis JM3 배양액의 항변이원활성은 preincubation method(早津彦哉, 1990)로 측정하였다. 먼저 0.5ml의 S9 mix와 0.1ml의 *S. typhimurium* TA 98 배양액을 시료와 변이원물질이 이미 들어 있는 시험관에 넣고 잘 섞은 후 37℃에서 20분간 진탕 배양한다. 이 조작을 Table 2, 3, 4에 나타낸 것처럼 각 실험구의 순서대로 실시하고 배양 후 2ml의 soft agar를 첨가하여 최소 glucose 한천평판배지에 붓고 37℃에서 2일간 배양하여 형성된 복귀 colony 수를 측정하였다.

(5) 대조구

음성대조구로서는 변이원물질 대신 DMSO 0.1ml와 시료 대신 증류수 0.1ml를 첨가하였으며, 양성대조구로서는 변이원물질 0.1ml와 시료 대신 증류수 0.1ml를 첨가하여 3항 3)의 (4)와 같은 방법으로 측정하였다.

(6) 변이억제율의 계산

변이억제율은 다음의 식에 의하여 구하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{a-b}{a-c} \times 100$$

a : 변이원물질에 의한 복귀 colony 수

b : 변이원물질에 시료를 작용시킨 경우의 복귀 colony 수

c : 자연복귀 colony 수

마. ACE 저해효과 측정

(1) Angiotensin-converting enzyme(ACE)의 억제

ACE(Sigma Co.)는 다음과 같은 전처리 과정을 거친 것을 조효소로 사용하였다. 토끼의 허파로부터 얻은 아세톤 침전분말 1g에 붓산 완충용액(pH 8.3, 400mM NaCl) 10 mL를 가하여 5°C에서 24시간 교반한 후 원심분리 (10,000 rpm, 30 min.)하여 얻은 상청액을 냉동 보관하여 사용하였다.

(2) 실험 방법

① *B. subtilis* JM3 배양 농축액의 혈압강화 활성은 Cheung and Chehman(1971)의 방법으로 ACE 활성 저해효과를 측정하여 나타내었다.

② 항균활성 실험에 사용되어진 동일 시료 100 μ l에 0.1 M 인산완충용액 200 μ l를 가한 후 20 μ l의 ACE 조효소액을 첨가하여 37°C에서 5분간 방치하였다.

③ 이 용액에 기질(Hip-His-Leu, 2.14 mg/mL) 200 μ l를 가한 후 다시 37°C에서 30분간 반응 시킨 후 1 N HCl 250 μ l를 가하여 반응을 정지시킨다.

④ Ethyl acetate 2 mL를 가하여 15초간 균질화 시킨 후 200×g의 조건으로 10분간 원심분리 시켜 상청액을 1 mL을 취하고, 이 상청액을 120°C에서 30 분간 건조하였다.

⑤ 완전히 건조되어진 상청액을 1 M NaCl 용액 1 mL을 가해 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정한다.

바. 항암활성

(1) 암세포 및 배양 조건

본 실험에 사용되어진 암세포는 한국세포주은행으로부터 동결보존된 SNU-1(사람의 위암세포)을 분양 받아 10%의 FBS가 첨가되어진 RPMI 1640 배지를 이용하여 37°C의 CO₂배양기(5% CO₂)에서 원하는 세포농도가 될 때까지 배양하여 사용하였다.

(2) 실험 방법

① *B. subtilis* JM3 배양 농축액이 나타내는 암세포에 대한 세포독성을 항암 작용의 지표로 삼았으며, 세포독성의 측정은 MTT assay로 실시하였다.

② 96 well plate의 각 well 당 암세포 배양액 180 μ l(1.0×10^4 cell/mL)씩을 분주하고 항균활성에 사용되어진 동일한 시료를 일정 농도로 희석하여 20 μ l씩 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 96시간 배양하였다.

③ 인산생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 20 μ l를 참가하고 동 배양 조건에서 3시간 더 배양한 후에 이를 2,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상청액을 제거하였다.

④ Formazan이 형성되어진 각 well에 DMSO 300 μ l를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader(Moleculat Device Co.)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Table 4-4. Design of antimutagenic test of *B. subtilis* JM3 culture against Trp-P-1 with *S. typhimurium* TA 98

Sample code	Concentration of sample and adding volume (S9 mix+)			
	<i>B. subtilis</i> JM3 culture (mℓ)	D.W. (mℓ)	1.0 ppm Trp-P-1	DMSO (mℓ)
Negative control	0.0	0.1	0.0	0.1
Positive control	0.0	0.0	0.1	0.1
A	0.0125	0.0	0.1	0.0
B	0.025	0.0	0.1	0.0
C	0.05	0.0	0.1	0.0
D	0.1	0.0	0.1	0.0
Trp-P-1 only	0.0	0.1	0.1	0.0

Table 4-5. Design of antimutagenic test of *B. subtilis* JM3 culture against MeIQx with *S. typhimurium* TA 98

Sample code	Concentration of sample and adding volume (S9 mix+)			
	<i>B. subtilis</i> JM3 culture (mℓ)	D.W. (mℓ)	0.1 ppm MeIQx	DMSO (mℓ)
Negative control	0.0	0.1	0.0	0.1
Positive control	0.0	0.0	0.1	0.1
A	0.0125	0.0	0.1	0.0
B	0.025	0.0	0.1	0.0
C	0.05	0.0	0.1	0.0
D	0.1	0.0	0.1	0.0
MeIQx only	0.0	0.1	0.1	0.0

Table 4-6. Design of antimutagenic test of *B. subtilis* JM3 against NDMA and NMO with *S. typhimurium* TA 100 (S9 +)

Sample code	Concentration of sample and adding volume (S9 mix+)			
	<i>B. subtilis</i> JM3 culture (mℓ)	D.W. (mℓ)	Mutagen	Medium (mℓ)
Negative control	0.0	0.1	0.0	0.1
Positive control	0.0	0.1	0.1	0.0
A	0.0125	0.0	0.1	0.0
B	0.025	0.0	0.1	0.0
C	0.05	0.0	0.1	0.0
D	0.1	0.0	0.1	0.0
MeIQx only	0.0	0.1	0.1	0.0

⑤ 적정 희석 농도의 Adriamycin(Sigma Co.)을 양성의 대조구로 사용하였으며, 음

성대조구로 멸균 BHI broth 넣어 사용하였다. 대조 균주로는 *B. subtilis* ATCC 6633 균주를 사용하였으며 시료와 동일한 방법에 의하여 제조되어진 배양 농축액을 사용하였다.

⑥ 성장억제 효과(%)를 아래의 계산식에 의하여 구하였다.

$$\text{성장억제효과(}\%) = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

가. 혈전용해활성

단백질 분해활성을 지닌 분리균주들의 혈전 용해 활성 조사한 결과를 Table 4-7과 Fig. 4-11에 나타내었다. *B. subtilis* JM-1, JM-2 그리고 JM-3 모두에서 투명환을 관찰할 수 있었으며, 그중 *B. subtilis* JM-3에서 가장 넓은 투명환이 관찰되어 혈전 용해 활성 가장 강력함을 알 수 있었다. *B. subtilis* JM-1의 혈전 용해 활성(%)은 plasmin 1.0 U/mL의 60%에 해당하는 fibrin 분해활성을 나타낸 반면, *B. subtilis* JM-2와 JM-3는 90%와 110%로 plasmin과 거의 같은 활성을 보였다. 더욱이 본 실험에서 확인된 분리균주들의 혈전 용해 활성 정제되지 않은 배양액을 그대로 사용하여 얻어진 결과로서 앞으로 분리·정제된 효소를 사용한다면 보다 높은 혈전 용해 활성 나타낼 것으로 사료된다.

나. 혈전용해활성 효소 최적생산 조건

(1) 온도

B. subtilis JM-3의 혈전용해효소 생산에 미치는 온도의 영향을 Fig. 4-12에 나타내었다. 15~50℃에서 배양한 모든 실험구에서 혈전용해활성을 보였으며, 40℃에서 가장 강력한 활성을 나타내었다.

2) pH

B. subtilis JM-3의 혈전용해효소 생산에 미치는 pH의 영향을 Fig. 4-13에 나타내었다. pH 4를 제외한 pH 5~9에서 배양한 실험구에서 혈전용해활성을 보였으며, pH 5에서 가장 강력한 활성을 나타내었다.

3) 식염농도

B. subtilis JM-3의 혈전용해효소 생산에 미치는 식염농도의 영향을 Fig. 4-14에 나타내었다. 식염농도 0~20%에서 배양한 모든 실험구에서 혈전용해활성을 보였으며, 식염

Table 4-7. The fibrinolytic activity of *B. subtilis* JM-1, JM-2 and JM-3 isolated from anchovy sauce

Sample	Relative activity (%)
<i>B. subtilis</i> JM-1	60
<i>B. subtilis</i> JM-2	90
<i>B. subtilis</i> JM-3	110
Plasmin (positive control)	100
BHI broth (negative control)	0

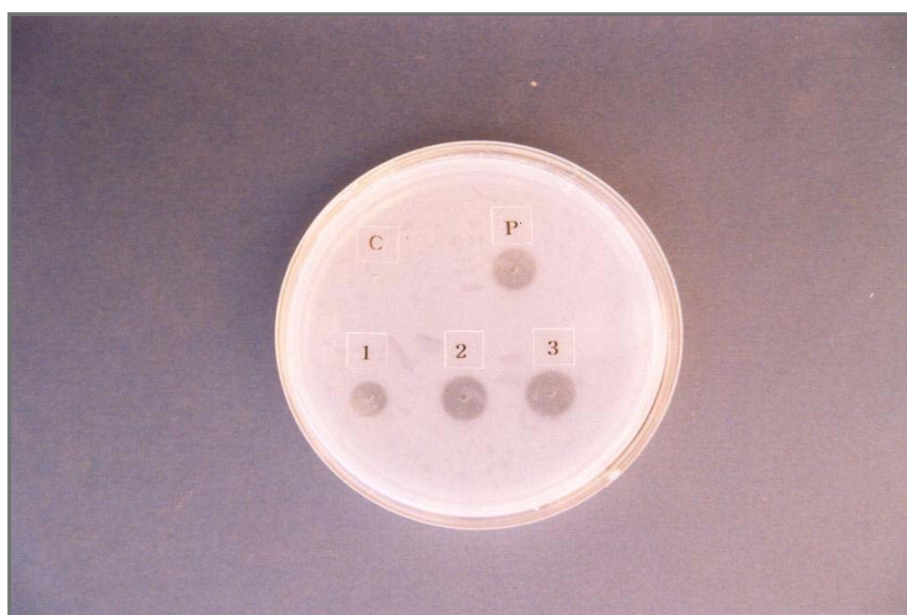


Fig. 4-11. Fibrinolytic activity of *B. subtilis* JM-1, JM-2 and JM-3 in fibrin plate at 37°C for 10 h.

C, BHI broth (negative control); P, Plasmin 1.0 U/mL (positive control); 1, *B. subtilis* JM-1; 2, *B. subtilis* JM-2; 3, *B. subtilis* JM-3

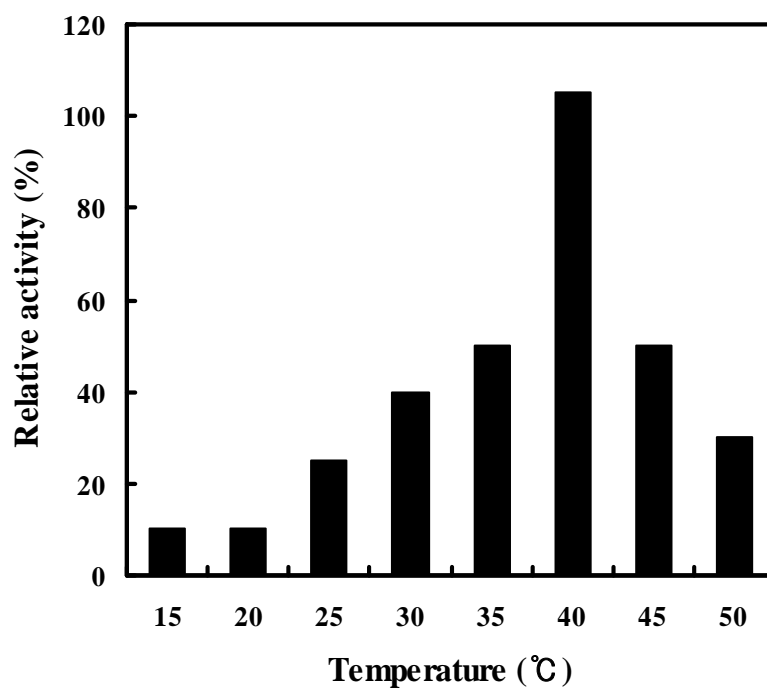


Fig. 4-12. Optimum temperature for the fibrinolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3.

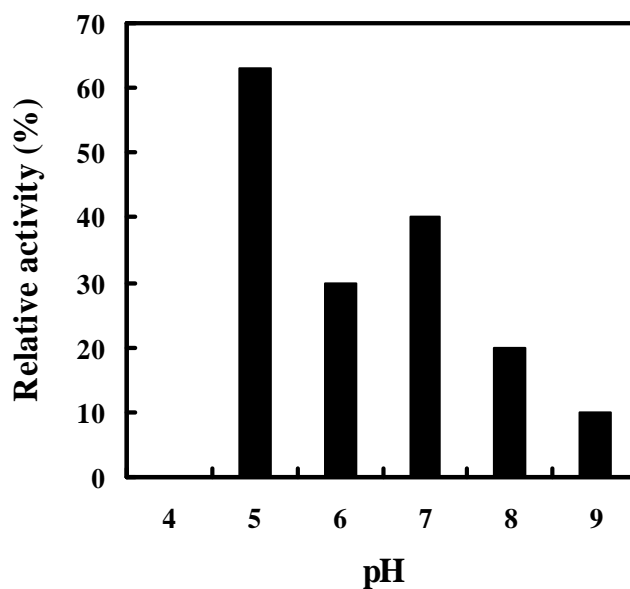


Fig. 4-13. Optimum pH for the fibrinolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3.

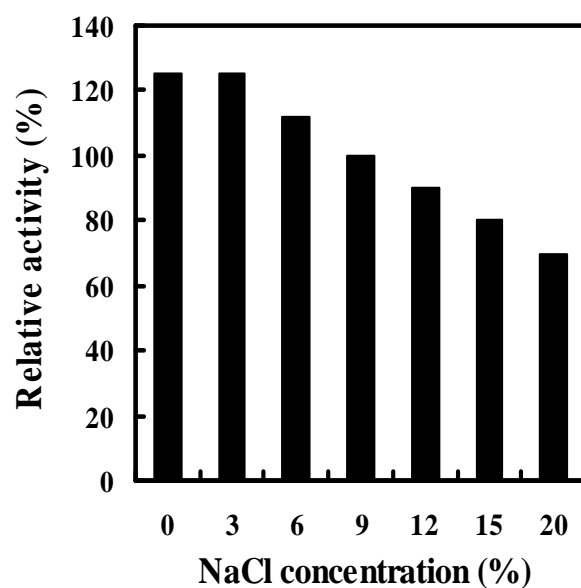


Fig. 4-14. Optimum NaCl concentration for the fibrinolytic enzyme production of *B. subtilis* JM-3.

Table 4-8. Inhibitory spectrum of the antimicrobial substance produced by *Bacillus subtilis* JM3

Indicator bacteria	Clear zone (mm)
Gram-positive	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-25923	0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633	14
<i>Bacillus cereus</i> KCTC-1012	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCTC-3140	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	20
<i>Micrococcus lutes</i> ATCC-9341	16
Gram-negative	
<i>Escherichia coli</i> ATCC-25922	0
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC-43889	0
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC-13048	16
<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC-2058	0
<i>Salmonella enteritidis</i>	0
<i>Vibrio cholerae</i> KCTC-0139	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC-2210001	0
<i>Vibrio vulnificus</i> KCTC-2987	0
Yeasts	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS-1200	0
<i>Candida albican</i> 17PL76	0

Table 4-9. Antioxidative effect of produced enzyme solution by *Bacillus subtilis* JM3 on oxidation of linoleic acid by oxygen method (50°C, 24 hrs)

Additive	Na ₂ S ₂ O ₃	POV(mL/g)	Index(%)
Control (D.W.)	38.5	770	100.0
Negative control (BHI broth)	36.0	720	93.5
<i>B. subtilis</i> JM3 culture	5.0	100	13.0

Table 4-10. Antimutagenic specificity of *B. subtilis* culture against Trp-P-1 and MeIQx with *S. typhimurium* TA 100 (S9 mix +)

Amount of <i>B. subtilis</i> culture (mL/plate)	His ⁺ revertant CFU/plate					
	Trp-P-1			MeIQx		
	Trp-P-1 only	Sample + Trp-P-1	Negative control	MeIQx only	Sample + MeIQx	Negative control
0.0125	501	454	40	242	235	28
0.025	501	497	40	242	251	28
0.05	501	489	40	242	227	28
0.1	501	504	40	242	239	28

Table 4-11. Antimutagenic specificity of *B. subtilis* culture against NDMA and NMO with *S. typhimurium* TA 100 (S9 mix +)

Amount of <i>B. subtilis</i> culture (mL/plate)	His ⁺ revertant CFU/plate					
	NDMA			NMO		
	NDMA only	Sample + NDMA	Negative control	NMO only	Sample + NMO	Negative control
0.0125	476	401	23	563	552	32
0.025	476	327	23	563	403	32
0.05	476	287	23	563	324	32
0.1	476	232	23	563	253	32

을 첨가하지 않은 실험구에서 가장 강력한 활성을 나타내었으나 멸치액젓의 일반적인 염농도인 NaCl 20%에서도 식염을 첨가하지 않은 실험구의 약 60%의 활성을 나타내었다.

다. 항균활성

분리균주 *B. subtilis* JM3의 항균활성 결과는 Table 4-8에 나타내었다. 그람양성균으로 *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes* 그리고 *Micrococcus lutes* 등에 항균활성을 나타냈으며, 그람음성균은 *Enterobacter aerogenes*에서만 항균활성 보였다. 그리고 본 실험에 사용되어진 2종의 효모에서는 항균활성은 나타내지 않았다. 성장억제를 보인 균주 중에서 *Listeria monocytogenes*의 투명환이 가장 넓게 나타나 이 균주에 대한 성장억제 효과가 가장 큰 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 대부분의 bacteriocin의 항균활성은 그람음성균의 독특한 세포구조 때문에 그람양성균에 국한되어져 왔으며, 최근 Lactic acid bacteria가 생산하는 일부 bacteriocin이 제한적으로 그람음성균인 *Listeria monocytogenes*에 성장을 억제한다는 보고(Daeschel, 1993; Mah et al., 2001)들과 비교하여 매우 유사한 결과로 볼 수 있을 것이다. *B. subtilis*가 생산하는 subtiicin의 항균활성에 관한 연구는 그동안 활발히 진행되어져 왔으며, 최근 Han et al.(2001)에 의한 김치로부터 분리한 *B. subtilis*-430의 항균활성에 관한 연구에서는 그람양성균을 비롯한 그람음성, 효모에도 광범위한 항균활성을 보였다는 것은 매우 특이적인 경우라 할 수 있을 것이다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, *B. subtilis* JM-3가 생산하는 항균물질은 항균활성 영역이 광범위하지는 않았지만 어간장의 숙성 중 미생물 상의 조절 능력을 가질 것으로 여겨지며, *Listeria monocytogenes*와 같은 저온성 병원미생물의 성장을 효과적으로 억제할 것으로 여겨진다.

라. 항산화활성

Linoleic acid mixture에 *B. subtilis* JM3의 배양 농축액(이하 시료) 1 mL을 첨가하여 50°C에서 산화반응 시켰을 때의 결과는 Table 4-9와 같다.

증류수 1mL를 첨가한 대조구의 경우는 24시간 자동산화 시켰을 때의 POV값이 770 mL/g로 현저하게 증가하였는데, 이는 유사한 조건인 50°C에 정치하여 48시간 동안 ethyl linoleic acid를 자동산화 시켰을 때의 값과 유사한 과산화물가 생성량이다. 반면, 시료 1mL 넣어준 실험구에서는 POV값이 100 mL/g로 linoleic acid의 자동산화를 80%이상 억제한 효과를 가지는 것으로 나타났다. 이는 매우 높은 산화억제 효과로 최 등(1993)의 실험에서 대표적 항산화물질인 BHA 0.05%의 농도와 유사한 결과를 보여주는 것이다. *B. subtilis*가 항산화 물질을 생산한다는 것은 Choi et al. (1997)의하여 전통 대두발효식품으로부터 갈색색소를 생산하는 *B. subtilis* DC-2를

분리하였는데 이들이 생산하는 갈색색소가 항산화능을 가진다고 보고하였다. 또한 전통 간장이나 된장 중의 갈색색소(멜라노이딘 관련물질)들이 항산화능을 가진다는 여러 보고들을 종합하여 볼 때, 아마도 *B. subtilis* JM3 또한 배양 중 생성되는 어떤 대사산물이 대단히 높은 항산화능을 가지는 것으로 추측 할 수 있으며, 앞으로 더 많은 연구가 진행된다면 천연 항산화제로서의 산업적 이용 또한 가능할 것으로 기대된다.

마. 항변이활성

분리균주 *B. subtilis* JM3의 항변이활성을 조사한 결과는 Table 4-10 및 4-11과 같다. 항돌연변이원성 실험 전에 돌연변이원성 실험을 먼저 행하여 본 결과 모든 시료에서 자연복귀 영역에서 벗어나지 않는 것으로 나타나 돌연변이원성은 없는 것으로 판단하였다.

이를 기초로 하여 식육이나 어육을 가열 조리할 때 발생하는 Trp-P-1과 MeIQx, 그리고 N-nitrosoamine 중 변이원성이 높은 것으로 알려진 NDMA 및 NMO를 돌연변이원으로 사용한 항돌연변이원성 시험에서, *B. subtilis* JM3의 배양액은 Trp-P-1과 MeIQx에 대하여서는 항변이활성이 없었으나(Table 4-8), N-nitroso compound인 NDMA 및 NMO에 대하여서는 약 50%의 변이억제 활성을 나타내었으며, 변이억제 활성은 농도에 비례하는 것으로 나타났다 (Table 4-9, Fig. 10).

바. ACE 저해활성

분리균주 *B. subtilis* JM3의 혈압강화 활성 결과를 Table 4-12에 나타내었다. 분리균주 *B. subtilis* JM3의 배양농축액 100 μ l를 첨가하여 ACE 조효소의 활성 저해 효과를 알아본 결과 90%의 저해율을 보였으나, 음성 대조구로 사용한 멸균 BHI broth를 첨가한 실험구에서도 90%의 저해율을 가지는 것으로 나타나 시료의 ACE 활성 억제 효과는 없는 것으로 나타났다. 즉, 분리균주 *B. subtilis* JM3가 배양 중 생산하는 대사산물에 의한 ACE 억제 효과를 갖는 것이 아니라 BHI 배지에 존재하는 여러 물질들의 작용인 것으로 생각할 수 있을 것이다. 또한 ACE는 불활성형인 angiotensin-I의 C말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin-II로 전환시켜 혈압을 상승시킴과 동시에 생체내에서 혈압강화작용을 갖는 bradykinin을 분해하여 불활성화 시킴으로서 고혈압의 원인으로 여겨지고 있으며, 이러한 ACE 활성 저해제로는 casein 가수분해물, 인공 합성 peptide, 어육단백질로부터 분획되어진 peptide 또는 근육단백질의 가수분해물들이 알려져 있다. 이와 같이 대부분의 ACE 억제작용을 가지는 물질들이 단백질의 가수분해물로서 본 실험의 결과 또한 BHI medium 속에 상당 부분 존재하는 가수분해 단백질이나 peptide들의 작용에 의하여 ACE 활성이 강력히 저해된 것으로 추측되어진다.

Table 4-12. ACE Inhibition effect of produced enzyme solution by *B. subtilis* JM3

Sample	ACE inhibition rate(%)
<i>B. subtilis</i> JM3 culture	90
Negative control (BHI broth)	90

Table 4-13. Inhibitory effect of produced enzyme solution by *Bacillus subtilis* JM3 on the growth of SNU-1 cell using MTT assay

Samples	Growth inhibition rate(%)
<i>Bacillus subtilis</i> JM3	
1/16 dilution	42.6
1/8 dilution	41.9
1/4 dilution	43.4
1/2 dilution	57.3
Not dilution	88.9
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	52.8
Adriamycin	
0.005 mg/mL	93.0
0.001 mg/mL	79.9
0.5 μ g/mL	73.11
0.1 μ g/m	34.3
0.05 μ g/m	26.9
0.01 μ g/m	18.15

사. 암세포 증식억제 효과

분리균주 *B. subtilis* JM3의 항균활성 결과는 Table 16에 나타내었다. *B. subtilis* JM3의 배양농축액을 2배 희석법에 의하여 암세포 성장억제 효과를 측정된 결과 원액 20 μ l를 첨가한 경우 88.9%의 높은 성장억제를 나타내었으며, 1/2희석 농도에서는 성장억제율이 농도의 희석비율에 비하여 매우 크게 저하되었으나 성장억제율 57.3%로 IC₅₀이상의 농도를 유지하는 것으로 나타났다. 1/4 이상의 희석단계에서는 성장억제율이 40%의 수준을 유지하며 크게 저하되지 않는 것을 알 수 있었다. 시료 원액의 암세포 성장억제효과(88.9%)는 양성 대조구로 사용되어진 대표적 항암물질인 adriamycin의 1 mg/mL의 농도의 성장억제효과(80%) 보다도 높은 것으로 나타났다. 본 균주는 지속적인 실험을 통하여 어간장 starter로 개발뿐만 아니라 저비용의 항암물질 생산 균주로 산업에 직접 적용할 수 있기를 기대한다.

4. 결론

본 연구를 통하여 단백질 분해활성이 가장 우수했던 *B. subtilis* JM-3는 혈전용해 활성, 항균활성, 항산화활성, 항변이활성, 암세포 증식억제활성이 있는 것으로 나타나, 기능성 멸치액젓 제조용 starter로서 가능성이 확인되었으며, 앞으로 본 균주의 대량배양기술과 경제적인 효소의 분리 및 정제기술이 확립된다면 기존의 단백질 분해효소와 혈전 용해제들이 갖고 있는 단점인 고가의 제품 대신 저가의 새로운 효소 개발이나 혈전 용해제의 개발이 가능할 것으로 기대된다. 그리고 앞으로 본 균주의 멸치액젓 starter로서의 이용을 극대화하기 위하여서는 돌연변이에 의한 호염성 변이주의 유전적 육종 (Kim and Kim, 1999)이나 형질 전환 방법 등을 응용한 호염성 미생물과의 접목을 통한 내염성 균주의 개발도 필요할 것으로 여겨진다.

5. 참고문헌

- Astrup, T. and S. Mullertz. 1952. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Archs. Biochem. Biophys.* 40, 346-350.
- Cheung, H. S. and D. W. Chehman. 1971. Spectrometric assay and properties of angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20, 1637-1647
- Choi, U. K., W. D. Ji, H. C. Chung, D. H. Choi and Y. G. Chung. 1997. Optimum condition for pigment production and antioxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2 with response surface methodology. *J. Korean Soc. Food sci. Nutr* 26(4), 620~624.
- Choi, Y. J., S. H. Kim, Y. S. Im, I. S. Kim, K. S. Kim and Y. J. Cho. 1993. Properties and utilization of undigested peptides in anchovy sauces (in korean). *J. Korean Fish. Soc.* 31, 386-392.

Daeschel, M. A. 1993. Applications and interactions of bacteriocin from lactic acid bacteria in foods and beverages. p. 63-91.

Kim, J. K. and S. D. Kim. 1999. Genetic breeding of Korean soybean paste-fermenting *Bacillus* sp. by UV mutation (in korean). J. Korean. Agric. Chem. Soc. 32(2), 148-153.

제 3 절 *Bacillus subtilis* JM-3를 Starter로 이용한 가자미식해의 제조

1. 서 론

가자미식해는 영동지방의 특산물로서 독특한 풍미를 지니고 있는 발효수산식품으로 생선과 식염 외에 곡물의 첨가로 발효를 일으켜 숙성기간이 짧은 것이 특징이다. 또한 젓갈에 김치 맛이 가미되어 독특한 맛과 풍미로 비린내 억제 효과를 가지고 있으며 젓갈보다 염도가 비교적 낮은 식품이다.

본 연구에서는 가자미식해의 풍미 개선과 맛의 향상을 목적으로 멸치액젓에서 분리한 *B. subtilis* JM-3를 가자미식해 제조 시에 첨가하여 pH의 변화, 산도, 아미노태 질소(Amino-N), VBN, TBA 등의 변화에 대하여 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가) 균주의 배양

20℃에서 48시간 배양한 후 5,000rpm에서 30분간 원심분리하여 모은 균체를 가자미식해에 1%, 10%, 20% 첨가한다.

나) 식해의 제조

재료는 주문진 수산시장에서 선도 좋은 참가자미를 구입하여 아래와 같은 방법으로 제조 하였다. 준비된 재료를 잘 섞어 발효조에 잘 다져 넣은 다음, 멸치액젓에서 분리한 *Bacillus subtilis* JM-3균체를 어육 중량당 1%, 10%, 20% 첨가하고 밀봉하여 20±3 ℃ 정도로 숙성시키면서 3일 간격으로 생균수 및 성분분석을 실시하였다.

다) 생균수 측정 및 젓산균의 측정

생균수 측정은 표준한천평판법에 의하여 측정하였고 젓산균은 선택배지인 MRSA 을 이용하여 측정하였다.

라) 일반 성분 측정

단백질은 semi-microkjeldahl법으로 측정하였다.

마) 아미노태질소(NH₂-N)의 측정

아미노태 질소는 TNBS법(Alder-Nissen, 1979)은 시료를 500배 희석하여 2mL의 0.2125M sodium phosphate buffer와 TNBS시약을 넣고 50℃에서 30분간 반응시킨 후 0.1M sodium sulfitedyddor을 2mL 첨가하여 1분간 교반 후 420nm에서 O.D. 값을 측정하여 L-leucine을 이용한 표준곡선을 통해 농도를 구하였다.

바) 휘발성 염기 질소(VBN), TBA의 측정

휘발성 염기질소는 Conway unit를 사용하여 미량화산법으로 측정하였고 TBA는 Turner 법으로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 가자미식해 숙성에 따른 균수의 변화

식해 숙성중의 미생물의 변화를 Table 4-14와 4-15에 나타내었다. 총균수는 숙성 5~6일 만에 최대로 나타났으며, 균체 10% 첨가구에서는 3일 만에 최대로 나타났다가 증가폭이 줄어드는 경향으로 나타났다. 이 등(1983)은 가자미식해 연구에서 숙성기간이 16일째까지는 총균수가 급격히 증가하였다가 그 다음부터 감소하였다고 하였는데 본 실험에서는 9일째까지 실험한 결과 이 등(1983)보다 총균수가 빨리 증가하는 것을 알수 있었다. Lactic acid bacteria는 각 실험구에서 숙성 3일째까지 급격히 증가하다가 그 이후부터는 서서히 증가하였다. 이 등(1983)은 가자미식해 실험에서 Lactic acid bacteria는 숙성온도 20℃에서 숙성 16일째에 8.0×10^6 정도였으며 그 후로 감소하였다고 보고 하였고, 수안네 등(1987)은 가자미식해에서 20℃에서 숙성 4일째에 2.6×10^8 까지 도달한다고 보고 하였다. 본 실험은 수안네 등(1987)과 유사한 결과를 나타내었다.

나. 가자미식해 숙성에 따른 어육 단백질량의 변화

가자미식해 어육단백질의 변화를 Table 4-16에 나타내었다. 숙성기간에 따른 단백질 성분의 변화는 거의 없는 것으로 나타내었다. 차 등 (1990) 단백질 분해세균을 이용한 멸치액젓의 제조에서 멸치액젓의 일반성분은 제조과정 중 성분변화가 거의 없다고 나타내었고, 김 등(1984)의 오징어 식해 개발에 관한 연구에서도 숙성온도와 저장기간을 달리 하였을 경우에도 뚜렷한 성분변화를 가져오지 못했다고 보고 하였는데, 본 실험에서도 이와 유사한 결과를 얻을 수 있었다.

다. 가자미식해의 숙성 중 pH값의 변화

가자미식해 숙성 중의 pH의 변화를 Fig. 4-15에 나타내었다. 가자미식해 숙성 중의 pH의 변화는 전반적으로 숙성기간이 길어질수록 낮아지는 결과를 나타내었으나, 급격한

Table 4-14. Change in the number of Total aerobic flora during the fermentation of Gajami sik-hae

Starter(%)	Fermentation period (day)			
	0	3	6	9
0	1.3×10^8	4.1×10^8	1.1×10^9	1.1×10^9
1	1.6×10^8	1.1×10^9	1.2×10^9	7.7×10^8
10	5.6×10^8	1.2×10^9	7.0×10^8	8.6×10^8
20	2.9×10^8	8.3×10^8	1.1×10^9	1.2×10^8
엿기름	2.7×10^8	1.1×10^9	3.4×10^8	1.0×10^8

Table 4-15. Change in the number of latic acid bacteria during the fermentation of Gajami sik-hae

Starter(%)	Fermentation period (day)			
	0	3	6	9
0	5.7×10^4	6.0×10^7	5.3×10^7	7.7×10^8
1	1.1×10^5	2.4×10^7	8.3×10^7	8.4×10^8
10	9.3×10^5	8.8×10^7	5.6×10^7	8.5×10^8
20	1.1×10^6	1.4×10^7	4.8×10^7	1.3×10^8
엿기름	6.9×10^4	3.2×10^8	4.3×10^8	4.4×10^8

Table 4-16. Change of crude protein during the fermentation of Gajami sik-hae

Starter(%)	Fermentation period (day)			
	0	3	6	9
0	17.16	17.06	17.54	17.45
1	18.16	17.51	16.63	17.68
10	16.56	16.29	17.24	17.45
20	15.78	15.82	15.64	16.36
엿기름	18.80	17.74	18.04	18.34

pH의 감소는 보이지 않았다. 특히, 옛기름은 숙성 9일째는 4.6까지 낮아지는 결과를 보였다. 김 등 (1994)의 오징어 식해에 관한 연구에서는 pH가 10일 만에 4.5이하로 나타났다고 보고 하였는데, 본 실험에서는 이보다는 조금 높게 나타났다. 그러나 이는 멸치젓이 숙성적기에 pH 5.5~5.6(이 및 최,1974)인데 비해 낮은 수치이며, 이러한 현상은 식해 제조 시 첨가되는 곡류 및 저농도의 식염첨가(7%)에 따른 미생물의 활성 증가에 따라 유기산이 많이 생산되는 것이 원인이라고 생각된다.

라. 가자미식해의 숙성 중의 산도(Acidity)의 변화

가자미식해의 숙성 중의 산도(Acidity)의 변화를 Fig. 4-16에 나타내었다. 숙성 기간에 따른 젓산의 생성량은 균체 0%에서는 숙성 6일째에 최대값을 나타내었고, 나머지 실험구에서도 숙성 6일째 최대를 나타내었으나 대조구에 비하여 낮았다. 특히, 균체 20% 첨가구에서는 3일째 급격한 상승을 나타내었고, 6일째에 최대를 그리고 9일째는 값이 급격히 떨어짐을 나타내었다. 김 등(1994)에서와 같이 숙성 중의 pH변화는 주로 젓산 생성량과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

마. 가자미식해의 숙성 중 아미노태질소(Amino-N)의 변화

가자미식해 숙성 중의 아미노태질소(Amino-N)의 변화를 Fig. 4-17에 나타내었다. 식해 숙성 중의 아미노태 질소량의 변화는 각 실험구에서 꾸준히 증가하는 것으로 나타났으며 9일째에 최대값을 나타내었다. 특히 B. subtilis JM-3를 20% 첨가한 가자미식해의 경우 숙성 3일째에 아미노태질소의 함량이 급격히 증가하여 이 균이 단백질의 분해에 관여하는 것으로 사료된다. 이 등(1983)은 가자미식해 연구에서 숙성 15일까지 아미노태 질소량이 최대를 나타내었다고 보고하였다. 본 실험도 숙성기간을 길게 하여 재차 실험이 요구되어진다.

바. 가자미식해 숙성 중의 TBA값의 변화

가자미식해 숙성 중의 TBA값의 변화를 Fig. 4-18에 나타내었다. TBA 값의 변화는 지질산화정도를 나타내는데 균체 0%,1% 첨가구에서 숙성 6일만에 최대치를 나타내었고 10%, 20% 그리고 옛기름을 첨가한 실험구에서는 9일째 최대를 나타내었다. 이는 김 등 (1994)의 오징어 식해 개발에 관한 연구에서 숙성 5일 만에 최고치를 나타낸 것과 유사한 결과를 나타내었다.

사. 가자미식해 숙성 중의 VBN 값의 변화

가자미식해 숙성 중의 VBN 값의 변화를 Fig. 4-19에 나타내었다. VBN의 값의 변화는

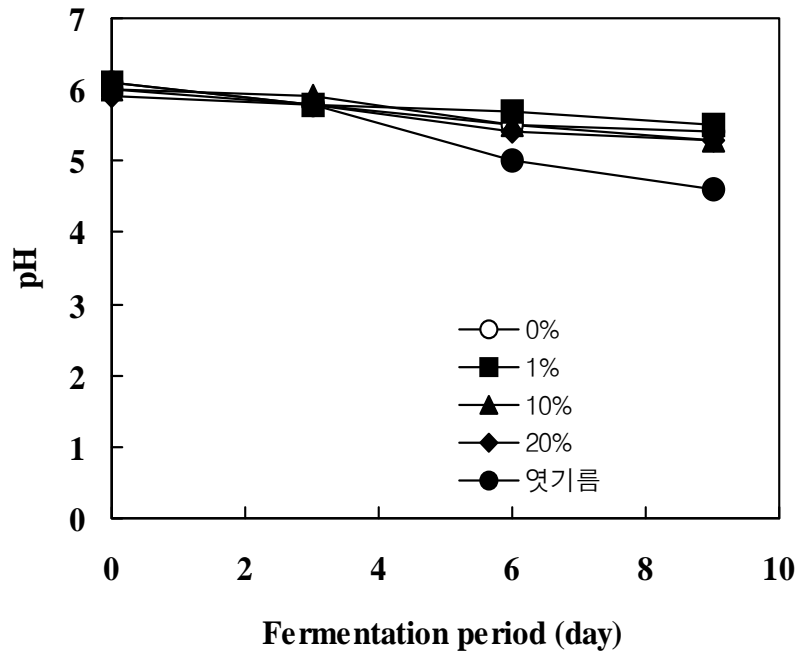


Fig. 4-15. Change of pH during the fermentation of Gajami sik-hae

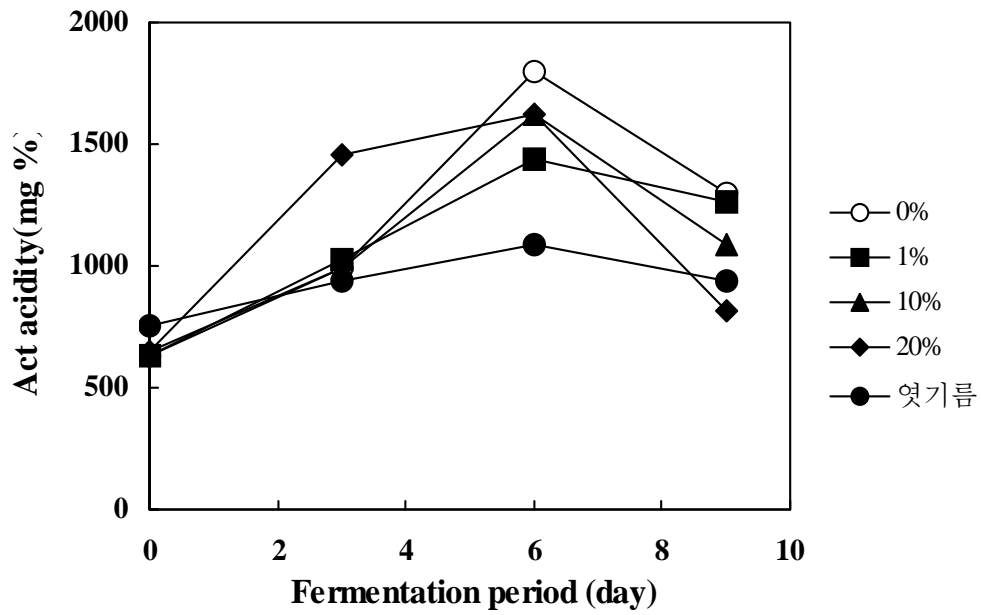


Fig. 4-16. Change of lactic acid during the fermentation of Gajami sik-hae (mg %)

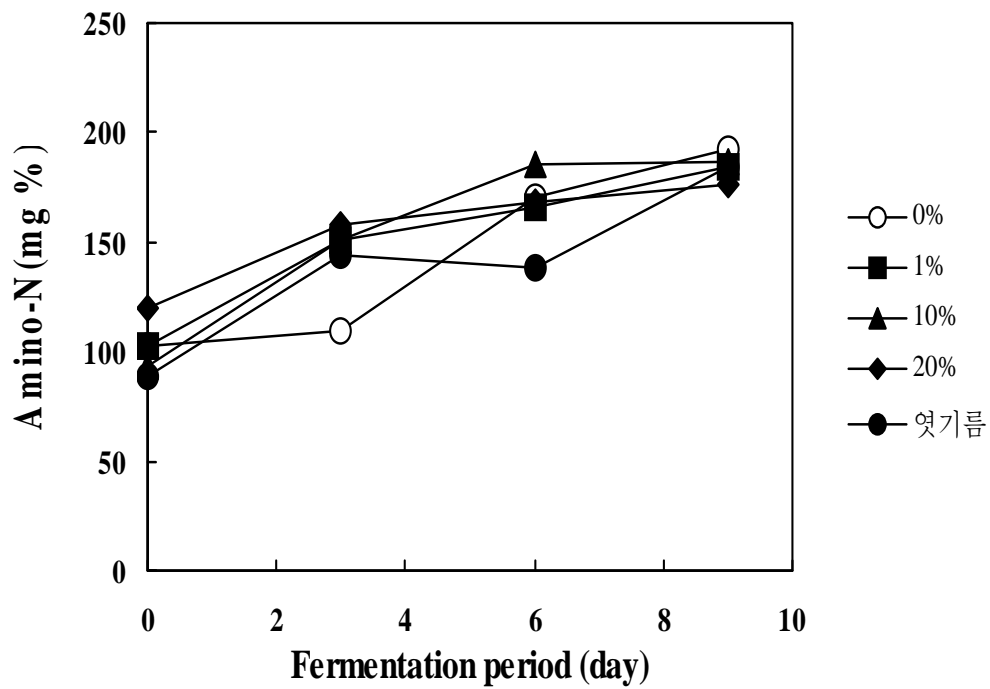


Fig. 4-17. Change of Amino-N during the fermentation of Gajami sik-hae (mg %)

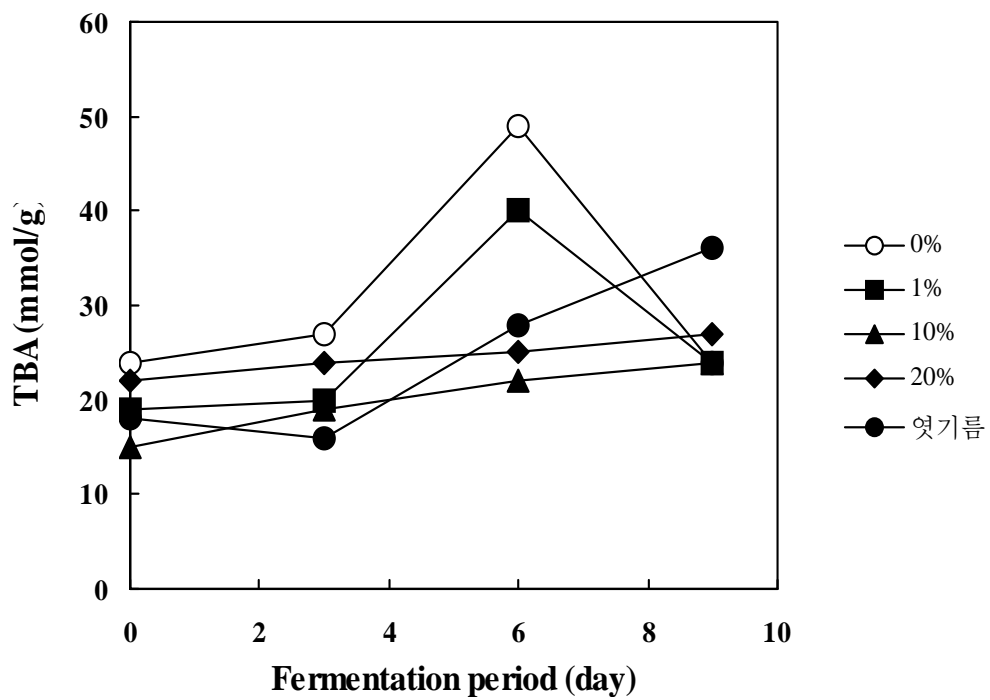


Fig. 4-18. Change of TBA during the fermentation of Gajami sik-hae (mmol/g)

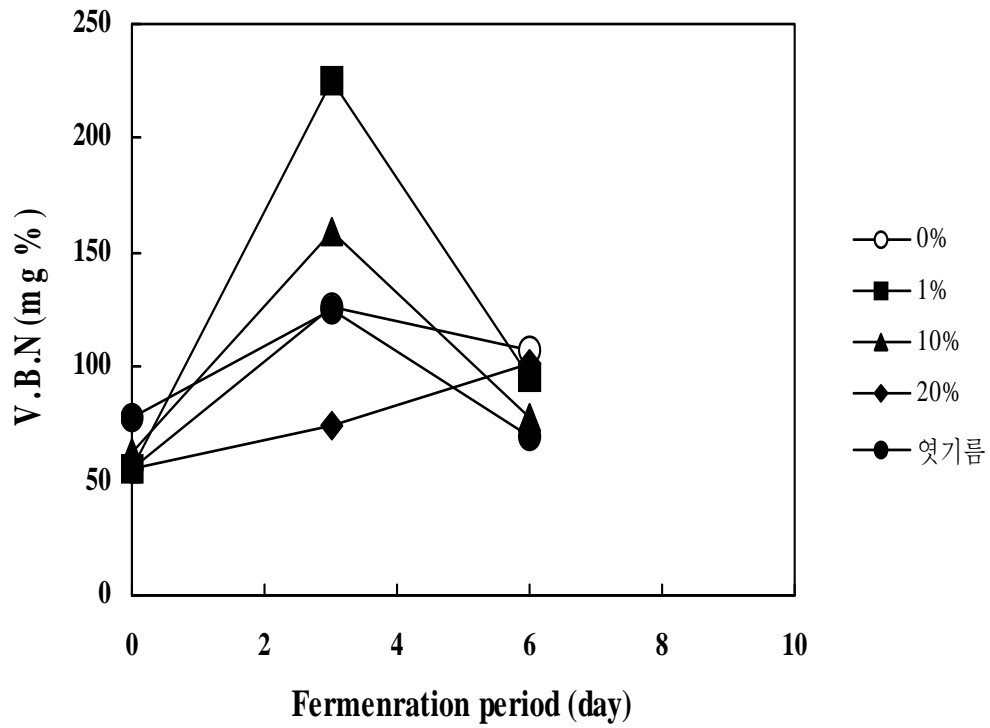


Fig. 4-19. Change of VBN during the fermentation of Gajami sik-hae (mg %)

위와 같이 숙성 3일째에 최대를 나타내었다. 균체 20% 첨가구에서는 6일째에 최대를 나

타내었다. 이 등(1983)의 가자미식해에 관한 연구에서 14일째에 최대를 나타낸다고 보고하였고, 그 이후로는 서서히 증가한다고 보고하였으나, 본 실험에서는 군체 20% 첨가구를 제외한 모든 실험구에서 3일째 이후로는 급격히 떨어지는 결과를 나타내었다.

4. 결론

이상의 결과를 요약하면, 총균수는 숙성 5~6일 만에 최대로 나타났으며, 군체 10% 첨가구에서는 3일 만에 최대로 나타났다가 증가폭이 줄어드는 경향으로 나타났다. 그리고 숙성기간에 따른 단백질 성분의 변화는 거의 없는 것으로 나타났으며 가자미식해 숙성 중의 pH의 변화는 전반적으로 숙성기간이 길어질수록 낮아지는 결과를 나타내었으나, 급격한 pH의 감소는 보이지 않았다.

숙성 기간에 따른 젖산의 생성량은 군체 0%에서는 숙성 6일째에 최대값을 나타내었고, 나머지 실험구에서도 숙성 6일째 최대를 나타내었으나 대조구에 비하여 낮았다. 특히, 군체 20% 첨가구에서는 3일째 급격한 상승을 나타내었고, 6일째에 최대를 그리고 9일째는 값이 급격히 떨어짐을 나타내었다.

식해 숙성 중의 아미노태 질소량의 변화는 각 실험구에서 꾸준히 증가하는 것으로 나타났으며 9일째에 최대값을 나타내었다. 특히 *B. subtilis* JM-3를 20% 첨가한 가자미식해의 경우 숙성 3일째에 아미노태질소의 함량이 급격히 증가하였다.

TBA 값의 변화는 지질산화정도를 나타내는데 군체 0%, 1% 첨가구에서 숙성 6일만에 최대치를 나타내었고 10%, 20% 그리고 옛기름을 첨가한 실험구에서는 9일째 최대를 나타내었다.

VBN의 값의 변화는 위와 같이 숙성 3일째에 최대를 나타내었다. 군체 20% 첨가구에서는 6일째에 최대를 나타내었다.

5. 참고문헌

- 김상무, 백운두, 이근태. 1994. 강릉지방의 오징어 식해 개발에 관한 연구 Bull. Korean Fish. Soc 27(4), 366~372.
- 무사수안네, 김영배, 이철호. 1987. 가자미식해 발효에 관여하는 미생물에 관한연구. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 15(3), 150~157
- 이철호, 조태숙, 임무현, 강주희, 양한철. 1983. 가자미 식해에 관한 研究 Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 11(1), 53-58.
- 정해숙, 이수학, 우강용. 1992. 함경도 지방의 전통가자미 식해의 소금 첨가수준에 따른 숙성 중 맛 성분의 변화에 관한 연구. Korean J. Food S차. Technol. 24(1), 59-64

제 4 절 *Bacillus subtilis* JM-3를 Starter로 이용한 멸치

액젓의 제조

1. 서 론

멸치는 양질의 아미노산, 핵산관련물질, 무기질 및 고도불포화 지방산이 많이 함유되어 있는 우수한 식품자원으로 대부분 마른 멸치나 젓갈의 원료로 이용되고 있지만 일시 다핵성 어종으로 보다 효율적인 원료의 처리 미 그 이용을 위해서는 여러 가지 가공기술의 개발이 요망되고 있다.

멸치가공기술에 관한 연구로는 각종 조리재료 및 식품가공용 중간소재로서 이용할 수 있는 냉동멸치 조미육의 제조에 관한 연구(오 등, 1989; 박 등, 1989), 젓갈 제조 시 첨가되는 식염의 양을 줄이기 위하여 저식염 멸치젓의 제조에 관한 연구(차 등, 1983; 차와 이, 1985), 멸치젓갈 숙성 중 미생물상의 변화에 대한 연구 등(차 등, 1990)이 있으나 멸치를 이용한 액젓에 대한 연구는 거의 없으며, 특히 내염성 미생물을 이용한 숙성발효 및 기능성 멸치액젓에 대한 연구는 찾아볼 수 없다.

본 연구에서는 멸치액젓에서 분리한 *B. subtilis* JM-3를 멸치액젓 제조시에 첨가하여 숙성발효 및 기능성 멸치액젓을 제조하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시 료

본 실험에 사용된 멸치는(*Engraulis japonicus*) 기장에서 구입하였으며, 수분은 71.3% 단백질은 17.3%, 지방은 9.29 %, 회분의 함량이 2.2%, 염분 1.6%, pH 6.9 VBN값은 27 mg/100g였다.

나. Starter의 제조

Bacillus subtilis JM-3를 20℃에서 48시간 배양한 후 5,000rpm에서 30분간 원심분리하여 모은 균체를 멸치에 1, 5, 10%를 첨가한다.

다. 멸치 액젓의 제조

멸치를 가볍게 수세하고, 탈수를 한 후, 원료 중량당 20%의 식염을 첨가하고 잘 혼합하여 플라스틱숙성용기에 1kg 씩 분취한 후 원료 중량당 Starter의 첨가 비율을 1%, 5%, 10%로 달리하여 20℃에서 저장하여 두고 실험에 사용하였다.

라. 생균수 측정 및 젓산균의 측정

생균수 측정은 표준한천평판법에 의하여 측정하였고 젓산균은 선택배지인 MRSA를 이용하여 측정하였다.

마. 일반 성분 측정

수분은 상압가열건조법(AOAC, 1990), 단백질은 semi-microkjeldahl법, 지방은

soxhlet법, 염도는 Mohr법, pH는 pH meter(Istek 730P)로 측정하였다.

바. 아미노태질소(NH₂-N)의 측정

아미노태 질소는 TNBS법(Alder-Nissen, 1979)은 시료를 500배 희석하여 2mL의 0.2125M sodium phosphate buffer와 TNBS시약을 넣고 50°C에서 30분간 반응시킨 후 0.1M sodium sulfitedyddor을 2mL 첨가하여 1분간 교반 후 420nm에서 O.D. 값을 측정하여 L-leucine을 이용한 표준곡선을 통해 농도를 구하였다.

사. 휘발성 염기 질소(VBN), TBA의 측정

휘발성 염기질소는 Conway unit를 사용하여 미량확산법으로 측정하였고 TBA는 Turner 법으로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 숙성과정 중의 생균수와 젖산균수의 변화

숙성과정중의 생균수와 젖산균수의 변화는 Table 4-17과 4-18에 나타내었다. 숙성 초기 생균수는 멸치액젓의 제조에서 Starter의 첨가로 인하여 대조구를 제외한 Starter 첨가구에서 10⁷CFU/mL 이상의 높게 나타났다. 이는 숙성초기 아미노태질소와 VBN 값이 높게 나타난 것으로 미루어 Starter에 의한 영향으로 생각된다.

전 실험구에서 15일째까지 서서히 감소하여 20일째에는 거의 변화가 없었다. 이는 생멸치 자체의 세균과 운반과 제조과정중 오염된 세균이 발효 진행과정에 새로운 환경에 의해 도태된 것으로 보여진다. 일부 Starter도 영향을 받은 것으로 생각된다. 변 등(1994)는 다시마를 이용한 멸치젓갈 숙성발효의 연구에서 생균수는 10⁵ 으로 숙성 40일째까지 거의 변화가 없었고, 40일 이후에 증가한다고 보고하였다.

또한, 이 등(1988)의 말쥐치잔사를 이용한 어간장 제조 및 제품의 정미성분에 관한 연구에서도 생균수는 담금 직후 2.5×10⁷ CFU/mL 였으나 서서히 감소한다고 보고하였다. 젖산균수는 숙성초기 는 1.8×10² CFU/mL ~ 3.0×10² CFU/mL로 나타났으나, 숙성기간이 길어짐에 따라 서서히 증가하여 20일째에는 대조구는 2.5×10⁴ CFU/mL을 나타내었고, 10% 첨가구에서는 5.9×10⁶ CFU/mL 으로 나타났다. 이 등(1988)의 연구에서 젖산균은 숙성 30일째까지 10⁵ CFU/mL 정도까지 증가한다고 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 젖산균의 증가로 인한 lactic acid와 유기산들 증가로 인해 pH가 서서히 낮아지는 것을 알 수 있었다. 숙성의 촉진에 영향을 미치는 생균수의 증가는 확인할 수 없었지만, 초기의 Starter의 첨가로 인한 성분의 변화와 유산균의 증가로 인한 분해의 촉진 등을 확인할 수가 있었다.

나. 일반 성분

멸치 액젓의 재료인 생멸치의 성분 조성은 Table 4-19와 같다. 수분함량은 71.3%,

단백질 함량은 17.3%, 지방은 9.29%, 회분함량은 2.2%, 염분 1.6%, pH 6.9, VBN값은 27mg/100g로 나타났다.

다. 숙성 과정중의 pH 의 변화

멸치액젓의 발효과정중의 pH 의 변화는 Fig. 4-20에 나타내었다. pH는 숙성초기에는 모든 Starter 첨가구에서 pH 5.8~6.0 범위를 유지하였으나, 숙성기간이 길어짐에 따라서 서서히 감소하여 20일째에는 대조구를 제외한 전 실험구에서 pH 5.7이하로 나타났다. 특히 5%의 실험구에서 pH 5.65로 가장 낮게 나타났다. 생멸치에 비해 pH가 감소하는 이유는 젖산균의 증식에 의한 lactic acid의 증가 등 유기산들이 증가하기 때문이라고 생각된다.

라. 숙성 과정중의 아미노태질소의 변화

멸치액젓의 발효과정중의 아미노태질소의 변화는 조 (2000)등의 까나리액젓의 아미노태질소 측정 실험에서 포르몰법, 銅鹽法이 염에 농도가 높을수록 아미노태질소의 함량이 낮아졌고, TNBS 법은 거의 일정하였다는 보고를 근거하여 TNBS법에 의해 아미노태질소의 함량을 측정하였다.

멸치액젓의 숙성기간에 따른 아미노태질소의 함량의 변화는 Fig. 4-21에 나타내었다. 아미노태 질소는 대조구를 제외한 전 Starter 첨가구에서 높게 나타났다. 단백질 분해세균인 Starter의 첨가로 숙성초기에는 이 균의 직접적 작용이나 또는 이 균이 생산하는 protease의 작용에 의해 생성된 유리아미노산이 육에 다량 남아 있게 되고 또 이것들이 액즙으로 이행되면서 높게 나타난 것으로 추정된다. 15일째에는 모든 실험구에서 급격한 증가를 나타내어 숙성 20 일째까지 급격하게 상승하였다. 특히, 20%의 첨가구에서는 대조구에 비하여 100mg/100g 이상의 큰 차이를 보였다. 또한 신 등(2002)의 숙성어간장 제조 및 품질평가에 관한 연구에서 Koji 균을 첨가한 시료구와 흡사한 결과를 나타내며 특히, 숙성 20일째에는 신 등(2002)의 Koji 균의 첨가 시료구에서의 432.1mg/100g 보다 더 높은 결과인 771.8mg/100g 을 나타내었고, 변 등의 (1994) 다시마 마쇄물을 이용한 멸치 젓갈의 숙성축진에 관한 연구의 결과보다도 더 높은 아미노태질소의 함량을 나타내었다. 시판 멸치액젓의 아미노태질소 함량은 600mg/100mL 등으로 규정하고 있으며(수산물검사소, 1994) 본 연구에서는 이보다 높게 나타났다. 숙성 축진에 관여하는 성분이라고 추정되는 아미노태 질소의 함량은 5%, 10%의 Starter 첨가구에서 숙성기간에 따라 증가하는 것으로 보아 숙성을 촉진시키는 것으로 생각된다.

Table 4-17. Change in the number of Total aerobic flora in salt-fermented anchovy sauce during fermentation

Starter(%)	Fermentation period (day)				
	0	5	10	15	20
0	3.3×10^4	5.2×10^3	2.1×10^3	4.3×10^3	2.5×10^4
1	6.8×10^7	4.2×10^6	1.3×10^6	7.6×10^5	5.3×10^5
5	2.5×10^7	9.7×10^6	7.4×10^5	6.3×10^5	8.2×10^5
10	2.1×10^8	8.3×10^7	6.2×10^6	3.8×10^6	5.9×10^6

Table 4-18. Change in the number of Latic acid bacteria in salt-fermented anchovy sauce during fermentation

Starter(%)	Fermentation period (day)				
	0	5	10	15	20
0	1.8×10^2	4.2×10^4	5.8×10^4	5.1×10^4	7.2×10^4
1	2.5×10^3	4.0×10^4	4.6×10^4	5.8×10^4	5.3×10^4
5	2.5×10^2	3.7×10^4	4.8×10^4	6.3×10^5	8.2×10^5
10	3.0×10^2	4.5×10^4	6.0×10^4	3.8×10^5	6.9×10^5

Table 4-19. The contents of proximate composition, VBN and pH in the anchovy sauce

Moisture (%)	Ash (%)	Crude protein (%)	Crudelipid (%)	VBN (mg/100g)	pH
71.3	2.2	17.34	9.29	27	6.9

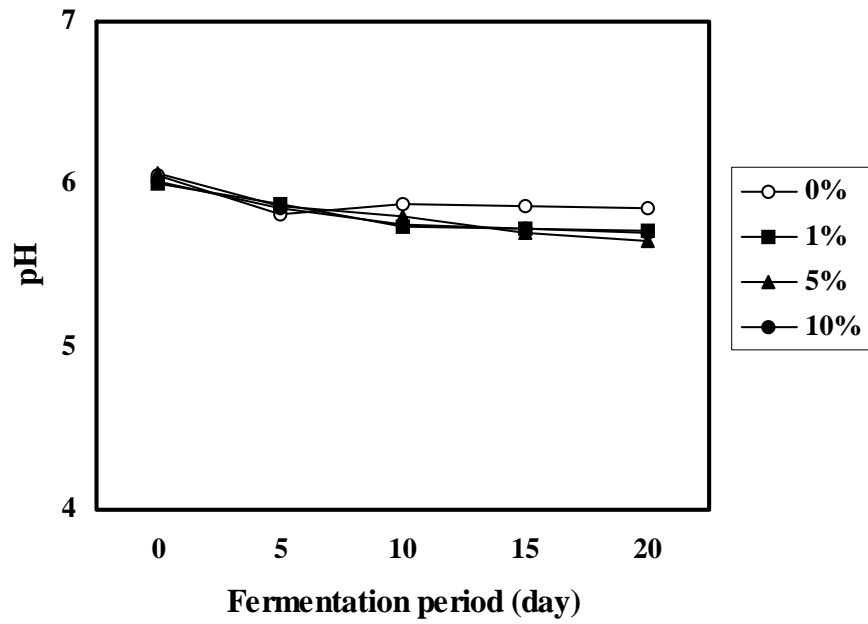


Fig 4-20. Change of pH in salt-fermented Anchovy sauce fermented by *B. subtilis* JM-3.

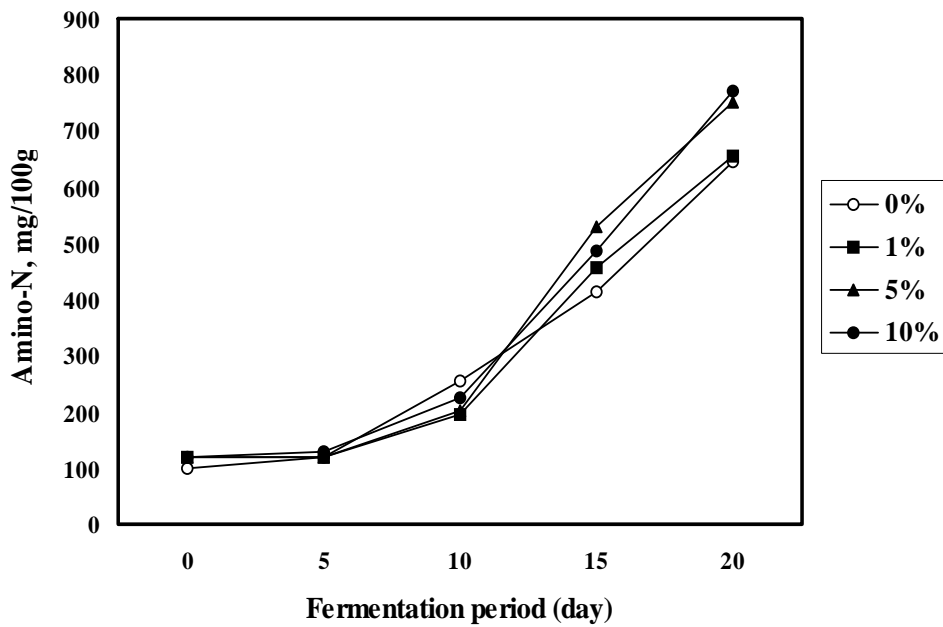


Fig 4-21. Changes of Amino-N content of Anchovy sauce fermented by *B. subtilis* JM-3.

마. 숙성과정 중의 VBN 값의 변화

숙성과정중의 VBN의 함량은 Fig 4-22와 같다. 숙성초기에는 대조구(43.68mg/100g)에 비하여 Starter의 첨가구에서 더 높게 나타났으며 숙성기간에 길어짐에 따라 대조구에서는 완만한 증가를 보였으며 Starter 첨가 실험구에서는 숙성 10일째 급격한 증가를 보였다. 특히, 10%의 Starter의 첨가구에서 가장 높게 났다. 이는 변 등의 (1994) 다시마 마쇄물을 이용한 멸치젓갈의 숙성촉진 연구에서의 20일째의 VBN값(60mg/100g)보다 높은 결과를 나타내었다. 전반적으로 Starter 첨가구의 VBN 값이 대조구에 비해 훨씬 높게 나타나는 것으로 보아 숙성이 촉진되고 있다고 생각한다.

바. 숙성과정 중의 TBA 값의 변화

숙성과정 중의 TBA 값의 변화는 Fig 4-23에 나타내었다. TBA값은 지방의 산패를 측정하는 것으로 지방의 분해산물인 malonaldehyde의 양을 $Y=0.120X+0.004(r^2=99.74)$ 표준곡선을 통해 측정하였다. 숙성초기에는 100g당 $700\mu\text{g}\sim 1600\mu\text{g}$ 로 비교적 낮은 값을 나타내었다. 숙성기간이 길어질수록 식품중의 TBA의 변화는 대조구를 제외한 전 실험구에서 높은 증가폭을 나타내었으나, 그 양은 극히 적었다. 이와 같은 결과는 지방의 분해산물이 aldehyde가 단백질의 분해생성물 등과의 반응에 의하여 일어난 영향인 것으로 추측된다. 식품의 숙성중의 TBA 값의 변화에 관하여 Sihuber (1958), Bildack(1972), 김 등(1973)에 의하면 일정기간까지는 증가하다가 그 이후 감소한다고 보고 하였다. 전반적으로 꾸준히 상승하고 있는 경향을 나타내었고 대조구 보다 Starter 첨가구에서 특히 10%의 첨가구에서 가장 높게 나타나는 것으로 보아 숙성촉진에 관여한다고 생각된다.

4. 결론

이상의 결과를 요약하면 숙성초기 생균수는 멸치액젓의 제조에서 Starter의 첨가로 인하여 대조구를 제외한 Starter 첨가구에서 10^7CFU/mL 이상의 높게 나타났다.

젓산균수는 숙성초기 는 $1.8\times 10^2\text{ CFU/mL} \sim 3.0\times 10^2\text{ CFU/mL}$ 로 나타났으나, 숙성기간이 길어짐에 따라 서서히 증가하여 20일째에는 대조구는 $2.5\times 10^4\text{ CFU/mL}$ 을 나타내었고, 10% 첨가구에서는 $5.9\times 10^6\text{ CFU/mL}$ 으로 나타났다.

pH는 숙성초기에는 모든 Starter 첨가구에서 pH 5.8~6.0 범위를 유지하였으나, 숙성기간이 길어짐에 따라서 서서히 감소하여 20일째에는 대조구를 제외한 전 실험구에서 pH 5.7이하로 나타났다. 아미노태 질소는 대조구를 제외한 전 Starter 첨가구에서 높게 나타났다. 15일째에는 모든 실험구에서 급격한 증가를 나타내어 숙성 20일째까지 계속 급격하게 상승하였다. 특히, 20%의 첨가구에서는 대조구에 비하여

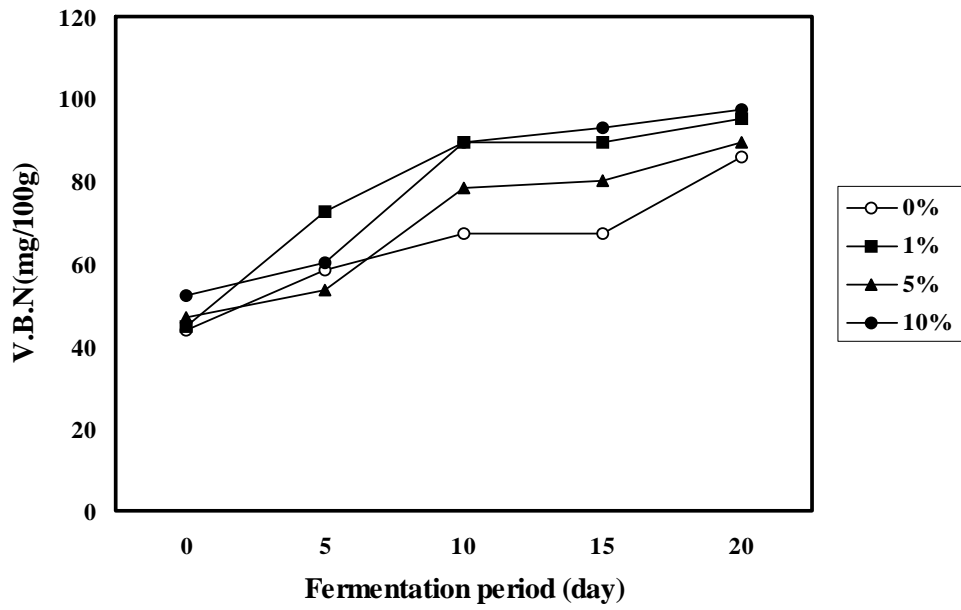


Fig 4-22. Change of VBN in salt-fermented Anchovy sauce fermented by *B. subtilis* JM-3.

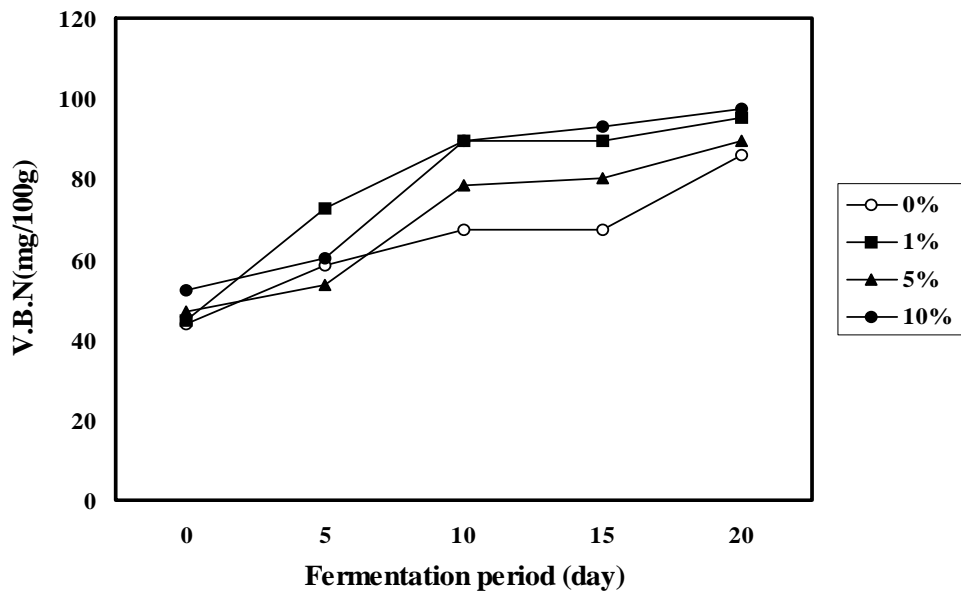


Fig 4-23. Change of TBA in salt-fermented fermented Anchovy sauce fermented by *B. subtilis* JM-3.

100mg/100g 이상의 큰 차이를 보였다. VBN의 경우, 숙성초기에는 대조구

(43.68mg/100g)에 비하여 Starter의 첨가구에서 더 높게 나타났으며 숙성기간에 길어짐에 따라 대조구에서는 완만한 증가를 보였으며 Starter 첨가 실험구에서는 숙성 10일째 급격한 증가를 보였다. 특히, 10%의 Starter의 첨가구에서 가장 높게 나타났다. TBA값은 숙성초기에는 100g당 700 μ g~1600 μ g 로 비교적 낮은 값을 나타내었다. 숙성기간이 길어질수록 식품중의 TBA의 변화는 대조구를 제외한 전 실험구에서 높은 증가폭을 나타내었으나, 그 양은 극히 적었다.

5. 참고문헌

- 박희열, 오광수, 이응호. 1989. 멸치를 이용한 식품가공용 중간소재의 동결저장 안정성. 한국식품과학회지. 21(4), 536-541.
- 변한석, 이태기, 여생규, 박영범, 김선봉, 박영호. 1994. 감자마쇄물을 이용한 멸치젓갈의 숙성조절. Bull. Korean Fish. Soc, 27(2), 121-126.
- 변한석, 이태기, 이용우, 박영범, 김선봉, 박영호. 1994. 다시마 마쇄물을 이용한 멸치젓갈의 숙성 촉진. Bull. Korean Fish. Soc. 27(2), 127-132.
- 송영옥, 하대석, 하재형. 1982. 멸치젓갈 熟成中 脂質의 酸化와 蛋白質의 分解. Korea J. Nutrition & Food, 11(1)
- 신석우, 권미애, 장미순, 강태중. 2002. 숙성어간장 제조 및 품질 평가. Korean J. Food Sci. Technol. 34(4), 666-672.
- 오광수, 노낙현, 이응호, 박희열. 1989. 멸치를 이용한 식품가공용 중간소재의 가공. 한국식품과학회지. 21(4), 498-504.
- 이응호, 박향숙, 안창범, 황규철. 1986. 고등어 가공잔사를 이용한 어간장의 제조. J. Korean Fish. Soc. Food Nutr. 15(3), 201-206.
- 이응호, 안창범, 김진수, 임치원, 이승원, 최영애. 1988. 말취치잔사를 이용한 어간장 제조 및 제품의 정미성분. J. Korean Soc. Food Nutr. 17(4), 326-335.
- 이응호, 이태훈, 김진수, 안창범. 1989. 가다랑어 殘渣를 利用한 어간장 製造 및 風味成分. Bull. Korean Fish. Soc. 22(1), 25-35.
- 이종갑, 최위경. 1974. 멸치젓갈 熟成에 따른 微生物相의 變化에 對하여. Bull. Korean Fish. Soc. (7)3
- 임영선, 이근우, 김건배, 최영준, 이인수, 조영제. 밴댕이 액젓의 숙성 중 성분변화. 2001. J. Korean Fish. Soc. 34(5), 488-492.
- 조영제, 임영선, 박희열, 최영준. 2000. 숙성기간에 따른 멸치액젓의 성분변화. J. Korean Fish. Soc. 33(1), 9-15.
- 조영제, 송민우, 임영선, 최영준. 2000. 까나리액젓 중의 아미노태질소 측정. J. Korean Fish. Soc. 33(1), 9-15.
- 차용준, 박향숙, 조순영, 이응호. 1983. 저염 수산발효식품의 가공에 관한 연구. 4. 저염멸치젓의 가공. 한수지. 16(4), 363-367.

차용준, 이강희, 이용호, 김진수, 주동식. 1990. 미생물을 이용한 저식염 멸치젓의 숙성발효에 관한 연구 3. 단백질 분해세균을 이용한 저식염 멸치젓의 제조 및 저장중의 품질안정성. J. Korean Agric. Chem. Soc. 33(4), 330-336.

차용준, 이용호. 1985. 저염 수산발효식품의 가공에 관한 연구. 5. 저식염 멸치젓 및 조기젓의 가공조건. 한수지. 18(3), 206-213.

제 5 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표 및 내용

1. 연구목표

구 분	목 표	내용 및 범위
1차 년도 (2000 년)	<ul style="list-style-type: none"> ♣ 수산발효식품에 존재하는 기능성 펩타이드의 검색 ♣ 수산발효식품 유래 항암 등 기능성이 우수한 균주 선발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수산발효식품의 숙성기간별에 따른 기능성 펩타이드의 검색 <ul style="list-style-type: none"> - 항암, 항혈전 및 혈압강하 펩타이드 등의 기능성 ○ 수산발효식품 유래 항암활성 등 기능성이 우수한 균주 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 단백분해균, 유산균, Fungi 등
2차 년도 (2001 년)	<ul style="list-style-type: none"> ♣ 내염성 미생물 유래 기능성 펩타이드 생성 효소의 정제 ♣ 내염성 및 내산성 기능성(항암) 미생물(starter) 제품 생산기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 단백분해균이 생산하는 기능성 펩타이드 생성 효소 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 효소의 특이성(최적 온도, pH 등) 연구 - 동력학적 연구(Vmax, Km) ○ 내염성 및 내산성 기능성(항암) Starter 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 해양미생물 유래 기능성 미생물 개발 - 기타 호염 미생물 유래 기능성 미생물 개발
3차 년도 (2002 년)	<ul style="list-style-type: none"> ♣ 기능성 효소를 이용한 기능성 수산발효식품 생산 ♣ 기능성 미생물(Starter)을 이용한 기능성 수산발효식품 제품 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기능성 펩타이드 생산 효소 식품에의 적용 <ul style="list-style-type: none"> - 어간장 제조시 첨가 ○ 기능성 미생물의 식품에의 첨가 <ul style="list-style-type: none"> - 어간장 starter로 첨가 - 식해 starter로 첨가

2. 연구내용

가. 기능성 효소 생산 기술 개발

(1) 어간장의 기능성 검색

(가) 숙성기간별 기능성 검색 - 멸치액젓(1, 3, 5년 숙성)을 10-20% TCA, PCA 용액 또는 Ammonium sulfate로 농도별로 단백질 및 펩타이드를 침전시켜 침전물의 여러 가지 기능성 (항암, 항혈전, 혈압강하)을 검색한다

(나) 펩타이드의 정제 - 기능성을 가진 침전물을 column chromatography로 분석하여 펩타이드를 분리한다

(다) 펩타이드의 동정 - 각 펩타이드의 기능성을 측정하여 기능성 펩타이드를 확인한다.

(2) 기능성 효소 생산

(가) 액젓(어간장) 유래 단백질분해균의 검색 - 단백질분해균의 동정 및 검색을 위하여 선택 배지를 사용하여 단백질분해능이 우수한 균주를 검색한다

(나) 균주의 대량생산 조건 설정 - 선택된 균주들의 최적 성장조건을 설정한다

(다) 선택균주의 최적 효소 생산 조건을 설정 - 온도, pH, 배지조성에 따른 최적 효소 생성 조건을 설정한다

(라) 효소의 내염성 및 내산성 측정 - 기질의 염 및 pH농도(산성 4-6)의 변화에 따른 효소의 역가를 측정한다

(3) 기능성 효소 첨가에 의한 기능성 어간장 생산

기능성 효소 첨가에 따른 어간장의 기능성 펩타이드 검사 - 숙성기간별에 따른 어간장의 기능성 펩타이드 생성 변화를 측정한다

나. 기능성 미생물(starter) 개발

(1) 수산발효식품 유래 향암 등 기능성 미생물 검색 - 멸치 어간장(1, 3, 5년 숙성)에 존재하는 향암 등 기능성 미생물을 검색한다.

(2) 내염성 및 내산성 미생물의 starter로의 개발 - 해양 및 호염 미생물 중에서 향암 등 기능성이 우수한 미생물을 starter로 개발한다.

(3) 기능성 미생물(starter)을 첨가한 기능성 수산발효식품 개발

(가) 어간장 제조시 첨가 - 어간장 제조시 starter를 첨가하여 여러 가지 성분 변화 및 기능성 측정

(나) 식해 제조시 첨가하 - 식해 제조시 starter를 첨가하여 여러 가지 성분 변화 및 기능성 측정

제 2 절 평가 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도(2000 년)	○수산발효식품 유래 기능성 펩타이드 검색	50
	○수산발효식품 유래 기능성 미생물 검색	50
2차년도(2001 년)	○기능성 펩타이드 생성 효소 검색 및 생산	50
	○호염성(해양)미생물 유래 기능성미생물 검색 및 starter로의 개발	50
3차년도(2002 년)	○기능성 효소첨가에 의한 기능성 수산식품	50
	○기능성 starter를 이용한 기능성 수산식품	50
최종평가	○ 기능성 펩타이드의 생성을 유도하는 효소 개발	50
	○ 기능성 미생물 개발	50

제 3 절 목표 달성도 및 관련분야 기여도

1. 기능성 효소 개발

본 과제의 목표인 수산발효식품의 기능성 향상을 위한 효소개발의 목표는 초과 달성되었다고 본다. 그 이유는 다음과 같다.

가. 액젓의 발효 및 숙성 중 생성되는 펩타이드의 기능성을 명확하게 밝혀내어 정리하였다. 이에 대한 연구 결과는 다음과 같이 메스컴에서 조명을 받았다.

(1) 2001. 10. 20. 중앙일보 15면



멸치액젓 항암효과 있다

강릉대학교 해양생명공학부 김상무 교수

결핵을 유발 해 조는 멸치액젓의 대장암세포의 증식을 막는 연구 결과가 잇따라 발표됐다. 김상무 강릉대학교 해양생명공학부 교수 연구팀은 멸치 액젓에서 추출한 펩티드(단백질 구성물질)가 대장암세포의 증식속도를 평균 50%까지 늦추는 것을 확인했다.

그리고 지난10월 10일 강릉대에서 열린 수산학회 학술대회에서 발표했다. 이어 현재실현이 100% 인드레올은 아니나 펩티드는 종양세포에서 발효한 내용은 계속 5가지 있다. (본지전주)

멸치액젓으로 부터 추출한 펩타이드의 항암 작용



김상무 교수

발효식품에 함유되어 있는 성분인 Peptide는 발효되는 동안이나 가수분해되는 과정에서 생산된다. 이렇게 생산된 저분자 Peptide는 생리학적 반응이 크다고 보고되고 있다.

최근 논문들에 대한 Peptide의 실험에 대한 연구는 활발히 진행되어왔으나 수산발효식품의 Peptide 의 기능성에 대한 연구는 미비한 실정이다.

김사, 알은 오늘날 분자생물학으로 알려져 있다.

인간 발효를 야 70%가 공해사 후 및 30%가 식생활이 그 주된 원인으로 식생활 이라고 할 수 있다. 따라서 인체에 유익하고 노화억제효과를 올릴 수 있는 새로운 항암제의 개발은 한계 되었다 있어 매우 중요한 학제적 연구이다.

우리가 매일 섭취하는 식품

에는 인체에 유익한 많은 기능성 성분들이 있으며 근계에 들어 식품은 단지 식생활을 해 열하기 위한 수단으로서 뿐만 아니라 인간의 건강보조 약품의 기능을 갖게 일로부터 식품성분 에 기능성 물질들 첨가하거나 기존의 식품자체내의 기능성분 들을 갖는 시도를 필요로 하게 되었다.

식품에 들어있는 항암 등 기능성 물질은 비활성으로 합성되어 있으나 대의 섭취를 통해 활성 인의 등 반인간에 유익한 물질 을 얻어고 알려져 있다. 이러한 기능성 식품 성분 중에서 항암 물질에 대한 연구는 미비한 실 정이며 이러한 기능을 갖는 식 품이나 물질을 갖게 된다면 식 생활에서 우리는 고품질을 제공할 수 있을 것이다.

우리나라는 3개의 바다를 품 려서 다양한 어류자원이 산재되어 있고 해마다 많은 수산물들이 생산되고 있다. 그러나 많은 수산물에도 불구하고 활용되는 분야 는 적고 많은 어종에 불구 러나 폐기물로 처리되는 양 도 만 늘었다.

그러나 우리나라 및 남반구에 어서는 이러한 많은 어종자원을 발효식품(발효 및 저장)을

로 가공하여 섭취하였다. 수산 발효식품은 어류자원을 열처리하여 다량량이 산성분해는 효소에 의해 가수분해 시키는 작용을 도한다.

숙성과정 중 어류자원의 단백질 또는 원미고 펩타이드는 저 분자 펩타이드의 기능성에 대해 서 많은 연구가 진행되고 있 으며, 그 기능성이 속속 밝혀지고 있는 실정이다.

본 연구에서는 원미해의 수 산 발효 식품에서 얻어지는 저 분자 펩타이드의 발효 (antitumor) 실험을 하였다.

재료 및 방법 저분자 Peptide의 정제 - 멸치 액젓은 200ml 속성조(200ml)로 이 용해 15-30°C에서 4시간(3, 5, 6 시간) 실험 실험원료로 사용하 였다.

멸치 액젓에 포함되어 있는 고분자 단백질을 제거하기 위해 0.1% acetic acid (50g/L)로 침전시키고 원미액(100ml)을 3,000 dalton 이하의 저분자 Peptide를 정제하였다. (Koh, Eui-Ran 2-2, Inc(California, USA) (culture size, 8x100cm), chromatography)로 Peptide를 정제 하였다.

Peptide-N 점막 (Lamarco(1998))의 방법을 사용하 였다.

멸암형성 측정 - 쥐발효식품 추출액에 의해 사용된 종양 배양 유닛 사용에 의해 실험에서 멸암 받은 암세포를 사용 하였다. 마 세포배양용 DMEM (6400)이 10% FBS를 첨가하여 배양된 것을 실험에 사용하였다. 멸암 형성 측정은 MTT assay방법을 사용한다 측정하였다.

결과 및 결론

숙성기간(3, 5, 6)은 4시간 동안 멸치 액젓으로부터 추출한 Peptide는 3가지 멸암에서 1 년의 멸치액젓은 3개의 peak, 5 년의 멸치액젓은 4개의 peak 에 속성 (멸)의 만치도정은 3개 의 peak를 가지 나타났다.

숙성기간이 길어질수록 멸치 액젓의 Peptide는 저분자량 500 200, gel column analysis 결과 4가지에 나타났다.

숙성기간이 다른 멸치액젓으로 부터 추출한 Peptide의 멸암효 과는 저 분자 peak에서 각각 21.46%와 12.27%의 높은 멸암 효과를 나타내었다.

나. 기능성 효소 개발

고식염 발효식품인 액젓에 적합한 단백분해효소를 다양한 고식염식품 (액젓, 젓갈, 된장)에서 가장 단백분해활성이 높은 균을 분리하여 동정하였으며 이들 미생물이 생산하는 단백분해효소의 최적 생산조건 및 특성을 명확하게 밝혀내었다.

다. 기능성 효소 첨가에 의한 기능성 어간장 생산

본 과제에서 개발된 효소 중에서 가장 기능성 및 활성이 높은 멸치액젓유래 *Bacillus subtilis* JM3 균이 생산하는 단백분해효소를 숙성 6개월째의 멸치액젓에 첨가하여 여러 가지 특성 및 기능성을 분석한 결과 아주 양호한 결과를 얻었으며, 또한 멸치 근원섬유단백질에 대한 가수분해 특성도 밝혀내었다.

2. 기능성 미생물 (starter) 개발

본 연구를 통하여 단백질 분해활성과 혈전 용해 활성 가장 우수했던 *B. subtilis* JM-3의 기능성 멸치액젓 제조용 starter로서 가능성이 확인되었으며, 앞으로 본 균주의 대량배양기술과 경제적인 효소의 분리 및 정제기술이 확립된다면 기존의 단백질 분해효소와 혈전 용해제들이 갖고 있는 단점인 고가의 제품 대신 저가의 새로운 효소개발이나 혈전 용해제의 개발이 가능할 것으로 기대된다. 그리고 앞으로 본 균

주의 멸치액젓 starter로서의 이용을 극대화하기 위하여서는 돌연변이에 의한 호염성 변이주의 유전적 육종⁽³¹⁾이나 형질 전환 방법 등을 응용한 호염성 미생물과의 접목을 통한 내염성 균주의 개발도 필요할 것으로 여겨진다.

제 6 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 얻어진 결과의 활용계획은 다음과 같다.

1. 기능성 미생물 및 효소의 상품화는 우선 참여기업에서 시행하도록 유도하며, 그 다음 새로운 벤처기업의 설립도 검토 한다.
2. 특히, 멸치액젓에 항암 펩타이드가 있다는 연구결과(메스컴에 조명된 내용)는 참여기업에서 적극 광고 등을 통하여 활용하도록 한다.
3. 젓갈 및 어간장 제조시 기능성 효소 및 기능성(항암) 미생물을 첨가하여 기능성 젓갈류 생산에 대한 기술 이전은 먼저 참여기업과 상의하여 이전한다.
4. 기능성 수산발효식품을 선진하여 세계화할 수 있는 제품으로 육성하며, 수출을 적극 권장하도록 한다.
5. 본 연구에서 개발된 단백분해효소를 고기능성 어육 펩타이드(Fish Peptide) 생산에의 활용은 참여기업 뿐만 아니라 관련기업을 파악하여 기술이전을 상의한다.
6. 저식염 젓산발효식품인 김치류 제조에 Starter로 기능성(항암) 미생물을 활용하는 방안을 김치회사와 상의한다.
7. 기능성 미생물을 이용한 수산발효식품의 Starter 개발은 참여기업이 기술이전을 받을 수 있도록 한다.
8. 전통 방법에 의해 숙성되어진 수산발효식품의 풍미를 그대로 유지한 숙성 발효식품의 개발은 참여기업에게 기술이전을 한다.
9. 본 연구에서 얻어진 효소 및 미생물을 이용하여 항암, 항변이원성과 같은 생리활성기능을 가지는 새로운 기능성 수산발효식품 개발은 참여기업과 상의 후 개발하도록 한다.

제 7 장 해외 과학 기술 정보

1. 미국

미국은 동남아산 어간장(액젓)을 수입하여 주로 Oriental store를 중심으로 판매하고 있으나 판매량이 계속 증가하고 있다. 미국 현지에서 현재까지는 어간장 생산 공장이 없으나 Oregon State University의 Seafood Laboratory에서 태평양 서해안에서 많이 어획되고 있는 Pacific whiting의 가공(surimi) 잔사를 이용한 어간장 개발에 성공하여 현지 생산을 준비 중이다.

그러나, 본 과제에서 수행한 기능성 강화를 위한 효소 및 starter 개발은 아직 시도되지 못하고 있으며, 관심을 가지고 있다는 정보는 있다.

2. 일본

일본은 전통적으로 어간장(shottuburo, Ihirishi 등)을 생산하여 왔으나 현재에는 값싼 동남아산이 시장을 석권하고 있다. 전통적으로 간장(대두간장) 문화가 발달하여 대두간장용 starter는 개발되어 현재에 시판중이다.

그러나 어간장의 기능성 강화를 위한 효소 및 starter 개발은 현재까지 보고된 적은 없다.

3. 동남아

동남아는 어간장이 단백질원의 하나로 국민식생활에 아주 중요한 부분을 차지하고 있다. 동남아에서는 어간장의 유통기간을 연장하기 위하여 전통적으로 살균공정을 가지고 있으며, 기능성 강화를 위한 효소 및 starter 개발은 아직 까지 기술이 없어 시도를 못하고 있다.

4. 유럽

유럽에서는 지중해 연안을 중심으로 어간장 문화가 형성되어 있으나 기술 개발은 오히려 세계적인 효소 생산업체인 Denmark의 Novo Nordisk가 주도하고 있는 실정이다. Novo는 대두간장 및 단백질 가수분해물제조를 위해 개발한 단백질분해효소(Alcalase, Protamex, Fluorozyme 등)을 어간장 생산에 적용하려고 하였으나 내염성 및 내산성이 약하여 아직까지 적용을 못하고 있으며, 이런 종류의 효소가 개발되면 동남아 및 중국시장을 겨냥하여 판매를 할려고 본 과제의 참여업체로 참여하였던 것이다.

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.