

## 김치에서 단백질분해효소활성 균주분리 및 동정

민승기 · 김정희\* · 김태운<sup>1</sup> · 김경남

풀무원 기술연구소, <sup>1</sup>경희대학교 생명과학대학 식품공학전공

### Isolation and Identification of Protease Producing Bacteria in Kimchi

Sung-Gi Min, Jung-Hee Kim\*, Tae-Woon Kim<sup>1</sup> and Kyung-Nam Kim

R & D Center, Pulmuone Corp., <sup>1</sup>College of Life Sciences, Kyung Hee University

Strains producing the protease, which is essential for growth of lactic acid bacteria and fermented kimchi, were screened and identified. Among five types of selected pulmuone kimchis (Jeonlado kimchi, ripened kimchi, yeolmu kimchi, kakkugi, and baechu kimchi), nine strains of bacteria were screened and identified by whole cell protein pattern and API test. The nine strains consisted of one of *Lactobacillus* sp., one of *Leuconostoc* sp., six of *Bacillus* sp., and one of *Brevibacillus* sp. The protease activities of these strains were compared with known strains (*Bac. subtilis* KCCM 12248 and *Bac. licheniformis* KCCM 11851) producing protease. Among tested strains, K-2 (*Brevibacillus* sp.) showed the highest value (0.11 unit/mg) in protease activity.

**Key words:** kimchi, starter, protease, activity, lactic acid bacteria

### 서론

김치는 원, 부재료에서 유래된 탄수화물과 단백질 등이 분해되어 당류 및 아미노산 등 여러 저분자 물질을 생성함으로써 독특한 맛과 풍미를 형성하게 된다. 김치에서 유래되는 효소류 중 protease는 단백질을 가수분해시켜 아미노산을 생성함으로써 정상형 젖산균의 번식환경을 조성하게 된다. 김치숙성 초기에는 일반적으로 아미노산의 요구성이 낮은 이상형의 젖산균이 번식하나 protease의 작용으로 각종 유리아미노산이 생성되면 젖산 생성량이 높은 정상형의 젖산균이 번식하게 되므로 김치 숙성도에 관여하는 미생물 종류 및 효소활성도 달라지게 된다<sup>(1-6)</sup>. 그러나 지금까지의 김치와 관련된 효소에 대한 연구는 배추, 무 등의 조직감에 관여하는 연구가 있을 뿐 김치맛에 직접적으로 영향을 주는 가수분해 효소에 대한 연구는 극히 일부이다<sup>(7,8)</sup>.

젖산균은 영양요구성이 매우 까다로운 미생물로 복잡한 단백질 분해체계를 가지는 것으로 알려져 있다. 유제품 유래의 젖산균의 경우, 우유단백질의 대부분을 차지하는 카제인은 세포벽에 부착된 cell-envelope proteinase에 의해서 분해되어 여러가지 크기의 peptide로 만들어지고 이들의 transport 시스

템에 의해서 세포내로 이동된 다음, 세포내 peptidase들에 의해서 분해되어 이용된다고 보고되었다<sup>(9-13)</sup>. 유제품 유래 젖산균의 생육이 단백질분해시스템에 영향을 받는 것과 마찬가지로 김치유래 젖산균도 김치제조과정 중 첨가되는 것같이 함유하고 있는 단백질의 분해가 젖산균의 성장속도와 김치의 풍미에 큰 영향을 미칠 것으로 추정된다. 이에 본 연구에서는 김치에서 유래되는 protease 활성균주를 분리, 동정하였으며 그 기작과 기능이 밝혀져 있는 표준균주와의 활성정도를 비교 분석하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 분리

높은 단백질 분해효소를 생산하는 균종을 분리할 목적으로 풀무원에서 시판되는 5종의 김치(전라도김치, 숙성김치, 열무김치, 깍두기, 배추김치)를 샘플링하여 시료로 사용하였다. 채취된 시료는 생리식염수 0.85%(w/v)로 희석하여 순차적으로 skim milk agar 배지(skim milk 5 g/L, bacto tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 5 g/L, bacto agar 15 g/L)에 도말하고, 30°C로 48시간 배양하여, extracellular protease에 의해 분해되어 형성된 투명환(Clear zone or halo)의 크기가 직경 0.5 cm 이상인 균주를 분리하여 동정하였다. 본 균주의 보관을 위하여 멸균된 glycerol stock solution을 사용하여 냉동 보관하고, 실험은 extracellular protease의 활성유지를 위해 skim milk 배지에서 계대 배양하면서 사용하였다.

\*Corresponding author : Jung-Hee Kim, R&D Center, Pulmuone Corp., Seoul 120-600, Korea  
Tel: 82-2-3277-8478  
Fax: 82-2-3277-8503  
E-mail: unify@pulmuone.co.kr

**균주의 분류 및 동정**

분리된 균주의 동정은 SDS-PAGE를 이용한 whole cell protein pattern과 API 50CH kit(Biomereius, USA)를 사용하였으며 biomereius의 database system의 결과를 토대로 상호 비교 분석하였다.

**SDS-PAGE**

분리된 균주를 5 mL의 NB broth에서 30°C, 24시간 배양한 뒤 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액을 제거하고, pellet은 증류수와 Tris-buffer(pH 8.0)에서 각각 2번씩 세척한 뒤, 50 mg의 glass bead(425-600 µm; Sigma, St. Louis, USA)를 tube에 담고 5분간 vortexing 하였다. 시료의 pellet은 다시 동량의 sample buffer(2×sample buffer; 4×Tris-HCl/SDS (pH 6.8) 25 mL, glycerol 20 mL, sodium dodecyl sulfate 4 g, mercaptoethanol 2 mL, bromophenol blue 1 mg, H<sub>2</sub>O 41 mL)를 첨가한 뒤 95°C에서 5분간 가열하였다. 원심분리 후 상등액은 gradient (8-16%) SDS-PAGE로 분석하였다. 염색은 0.05% coomassie brilliant blue R-250 용액에서 수행하였으며, 10% acetic acid, 30% methanol 용액에서 2시간 탈색시키고 분석하였다.

**단백질 정량**

Bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Lowry법<sup>(14)</sup>에 따라 측정하였다.

**Protease 활성**

선별된 균주는 NB broth(Difco, USA)에 배양하고 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 분리된 젓산균의 protease 활성은 Anson 방법을 변형하여 측정하였다<sup>(15)</sup>. 즉, 조효소액에 기질로 Azocasein을 30°C에서 30분간 반응시키고, 10% TCA를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리한 상등액에 10% NaOH를 첨가하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성은 조효소액 1 mL이 1분 동안 30°C에서 1 µg의 tyrosine을 생성할 때를 1 unit으로 하였다.

**김치의 일반성분 분석**

시료김치를 waring blender로 마쇄한 후 거즈로 걸러 그 여액을 일정량 취하여 pH는 pH meter(IQ Scientific, USA)로 측정하였으며, 산도는 AOAC의 방법<sup>(16)</sup>에 의하여 10 mL 김치여액을 중화시키는데 소비된 0.1 N NaOH의 양을 lactic acid의 양으로 환산하였다. NaCl 농도 측정은 염도계(Atago, Japan)를 사용하였다.

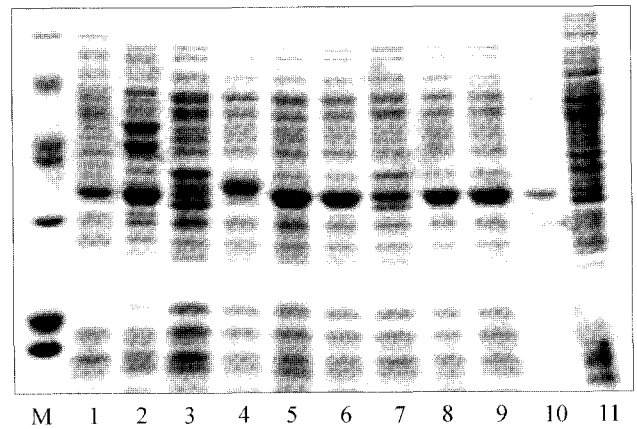
**결과 및 고찰**

**균주의 분리**

5종의 김치에서 채취한 시료를 생리식염수로 희석하여 순



**Fig. 1.** The protease activity of isolates (K1,K2) by the size of clear zone in various kimchi.



**Fig. 2.** Whole cell protein pattern of isolates by SDS-PAGE analysis.

(M: marker, 1: *Bac. subtilis* KCCM 12248, 2: *Bac. licheniformis* KCCM 11851, 3: K-1, 4: K-2, 5: K-3, 6: K-4, 7: K-5, 8: K-6, 9: K-7, 10: K-8, 11: K-9).

차적으로 skim milk가 함유된 배지에 도달한 뒤 투명환이 생성된 균주들 중에서 0.5 cm 이상 되는 것을 1차 분리하고(Fig. 1), 이들 균주 중에서 cell morphology에 의해 곰팡이와 효모를 제외시킨 9종을 최종 선별하고, K-1, K-2, ~K-9으로 명명하였다(Table1). 분리된 9종은 젓갈이 많이 함유된 전라도 김치에서 2주, 4°C에서 6개월간 숙성시킨 숙성김치에서 1주, 열무김치 1주, 깍두기 4주, 배추김치에서 2주였다. 예로부터 무에는 여러가지의 소화효소가 많이 함유되어 있다고 보고되어 있다<sup>(5,17-19)</sup>. 본 연구에서도 무김치의 일종인 깍두기에서 전체의 40%로 가장 많은 protease 활성균주를 분리할 수 있어 동일한 결과로 유추할 수 있었으며, 분리균주 9주 중에서는 *Bacillus* sp.가 5주로 가장 우세하게 분리되었다.

**Table 1.** Isolation of protease producing bacteria from various kimchi

Kimchi sorts	Jeonlado kimchi	Ripened kimchi	Yeolmu kimchi	Kkakdugi	Baechu kimchi
Isolated bacteria No.	K-1, K-2	K-3	K-4	K-5, K-6, K-7, K-8	K-9

Table 2. Taxonomical characteristics of isolated strains<sup>1)</sup>

Source	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7	K-8	K-9
Gram staining	positive	positive	positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
shape	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	coccus
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Adnitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Methyl-xyloside	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	<sup>2)</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	+ <sup>2)</sup>	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\alpha$ -Methyl-D-mannoside	-	-	+	+	+	+	+	+	-
$\alpha$ -Methyl-D-glucoside	-	+	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl glucosamine	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Amygdaline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arbutine	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Trehalose	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -Gentibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Turanose	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	+	+	+	+	+	+	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Keto gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Keto gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1)</sup>API 50CH kit was used.<sup>2)</sup>+: Produced acid from carbohydrates, -: Not produced acid from carbohydrates.

**Table 3. Comparison of classification of isolated bacteria by SDS-PAGE and API test**

Isolated bacteria	SDS-PAGE	API test
K-1	I	<i>Lactobacillus delb. delb.</i>
K-2	II	<i>Brevibacillus brevis</i>
K-3	III	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
K-4	III	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
K-5	III	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
K-6	III	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
K-7	III	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
K-8	III	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
K-9	IV	<i>Leuconostoc citreum</i>

**Table 4. Protease activity of isolated bacteria and reference bacteria**

Isolated bacteria	Total protein (mg/mL)	Specific activity (unit/mg)
K1	10.56	0.058
K2	9.78	0.110
K3	10.63	0.035
K9	9.45	0.005
<i>Bac. subtilis</i> KCCM 12248	8.39	0.030
<i>Bac. licheniformis</i> KCCM 11851	9.70	0.018

**Whole cell protein pattern을 이용한 균주의 분류 및 동정**

SDS-PAGE는 많은 균주의 속을 비교하고, 분류하는데 많이 사용되고 있으며, 특히 김치에서 분리되는 젖산균의 동정 및 분류에 효과적이라고 보고되고 있다<sup>(20,21)</sup>. 이에 분리된 9개의 균주들은 SDS-PAGE에 의해 whole cell protein pattern을 확인하고 비교하였다. 본 연구에서 분리된 균주의 whole cell protein pattern이 동일하게 보이는 균주를 같은 group으로 간주하여, Fig. 2에서 보는 바와 같이 3번 lane을 Group I, 4번 lane을 Group II, 5,6,7,8,9,10번 lane을 Group III, 11번 lane을 Group IV로 총 4group으로 나누었다. 또한 그 단백질분해효소의 기작과 기능이 잘 알려져 있는 표준균주인 *Bacillus subtilis* KCCM 12248와 *Bacillus licheniformis* KCCM 11851과의 유사성도 whole cell protein pattern을 통하여 확인해 보았으나, 김치에서 분리된 균주는 두 종의 표준균주와는 다른 whole cell protein pattern을 보여 동일한 균주가 아님을 유추할 수 있었다.

**API test를 이용한 균주의 분류 및 동정**

API 50CH kit 로 동정한 결과 Table 2와 같이 각각의 분리균주들은 gram 양성이며 원형의 colony형태를 가지고 있었다. 그리고 SDS-PAGE로 분별한 Group I은 *Lactobacillus* sp.로 Group2는 *Brevibacillus* sp.로 Group3는 *Bacillus* sp.로 Group4는 *Leuconostoc* sp.으로 모두 동일하게 동정되어 whole cell protein pattern과 API kit 분석방법은 동일한 결과를 얻을 수 있었다(Table 3).

**단백질 함량 및 protease 활성**

Peptide hydrolase의 종류는 30여종이 보고되고 있으나 본

실험에서는 Azocasein을 기질로 하여 생성된 amino acid를 정량함으로써 비특이적 단백질분해효소의 활성을 측정하였다. 효소의 촉매력은 일정한 효소단백질이 나타내는 활성에서 계산하므로 단백질함량과 활성의 측정결과는 Table 4와 같다. 효소의 존재량은 촉매하는 반응속도를 측정하고 활성은 효소량에 비례하지만 같은 양이더라도 조건에 따라 다른 활성을 나타내며 효소의 반응속도는 여러가지 조건에 영향을 받기 때문에 기질에 대한 효소활성이 다르게 나타난다. 비효소 활성도는 Table 4와 같이 분리된 4 group의 균주 중에서 K-2가 0.11 unit/mg로 가장 높았고, 이는 단백질 분해효소 활성이 높은 표준균주인 *Bacillus subtilis* KCCM 12248 (0.03 unit/mg)보다 약 4배가량 높은 값이다. 김치의 부재료로 사용되는 새우젓과 멸치액젓은 이러한 균주에 의해서 단백질 성분을 아미노산으로 분해함으로써 조미료로서의 역할 뿐만 아니라 발효에 필수적인 젖산균의 균체증식을 촉진하는 역할을 할 것으로 사료된다. 따라서 향후 protease 생성균주 K-2는 김치제조시 starter로 사용되었을 경우 아미노산의 생성을 유도하여 김치의 풍미를 향상시켜 줄 것으로 기대되어 진다.

**요 약**

김치의 가수분해효소로서 발효원으로 사용되고 균체증식에 필수적인 아미노산 생산에 관여하는 단백질분해효소를 생성하는 균주를 분리하여 동정하였다. 시판되는 풀무원 김치의 5종(전라도김치, 숙성김치, 열무김치, 포기김치, 맛김치)에서 단백질분해효소 활성을 지닌 균주 중 곰팡이와 효모를 제외하고 총 9주를 분리하여 whole cell protein pattern 및 API kit 으로 동정하여 각각의 균주들을 *Lactobacillus* sp. 1종, *Leuconostoc* sp. 1종, *Bacillus* sp. 6종, *Brevibacillus* sp. 1종으로 판정되었다. 분리된 9종과 단백질 분해효소 활성이 높은 표준균주인 *Bacillus subtilis* KCCM 12248와 *Bacillus licheniformis* KCCM 11851에 대해 단백질분해활성을 비교한 결과 김치에서 분리되는 K-2(*Brevibacillus*속)가 0.11 unit/mg으로 가장 높은 값을 보였다.

**문 헌**

- Ryu, J.Y., Lee, H.S. and Rhee, H.S. Changes in organic acids and volatile flavor compounds in kimchi fermented with different ingredient. Korean J. Food Sci. Technol. 16: 169-174 (1984)
- Oh, Y.A. and Kim, S.D. Changes in enzyme activities of salted Chinese cabbage and kimchi during salting and fermentation. J. East Asian Soc. Dietary Life 26: 404-410 (1997)
- Kim, H.J. and Jeon, J.K. The study of microflora changes during kimchi fermentation. Atomic Energy Thesis 6: 112-115 (1966)
- No, W.S., Hawer, Y.H. and Oh, H.K. The study of microflora on kimchi fermentation. Thesis, Seoul Health College 2: 15-18 (1981)
- Hahn, Y.S., Oh, J.Y. and Song, J.E. The Study on amyolytic enzyme and protease activity of kimchi. Korea J. Food Sci. Technol. 34: 269-273 (2002)
- Baek, H.H., Lee, C.H., Woo, D.H., Park, K.H., Pek, U.H., Lee, K.S and Nam, S.B. Prevention of pectinolytic softening of kimchi tissue. Korean J. Food Sci. Technol. 21: 149-153 (1989)
- Park, H.O., Kim, K.H. and Yoon, S. A study of characteristics of

- pectinesterase, polygalacturonase and peroxidase in kimchi materials. *Korean J. Dietary Culture* 5: 443-448 (1990)
8. Kim, H.J., Lee, J.J., Cheigh, M. J. and Choi, S.Y. Amylase, protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of kimchi ingredients. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30 : 1333-1338 (1998)
  9. Exterkate, F.A. Location of peptidase outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 177-183 (1984)
  10. Pritchard, G.G. and Coolbear, T. The physiology and biochemistry from proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 179-206 (1993)
  11. Smid, E. J., Poolman, B. and Konings, W.N. Casein utilization by *Lactococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2447-2452 (1995)
  12. Tan, P.S.T., Poolman, B. and Konings, W.N. Proteolytic enzyme of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Res.* 60: 269-286 (1993)
  13. Lee, Y.J., Jae, Y.C., Lee, H.J., Chang, H.C., Kim, J.H., Chung, D.K., Kim, Y.S., Cho, S.K. and Lee, D.H. Identification of cell-envelope proteinase of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 116-122 (2002)
  14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A and Randal, R.J. Protein measurement with folinphenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
  15. Novo Industry A/S. Anson hemoglobin method for determination of bacterial proteinase activity. AF 4.2/5, Novo Industry A/S, Bagsvaerd, Denmark (1990)
  16. AOAC. Official Methods of Analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1990)
  17. You, T.J. Source Book of Food, pp. 168-169. Seo-Woo, Seoul, Korea (1993)
  18. Woon, B.S. and Lee, K.S. Food Ingredients, pp. 83-84. Su-Hak Sa, Seoul, Korea (1985)
  19. Cho, J.S. Food Ingredients, pp. 150-151. Moon-Un Dang, Seoul, Korea (1987)
  20. Pot, B., Vandamme, P. and Kersters, K. Analysis of electrophoretic whole-organisms protein fingerprints, pp. 493-521. In: *Chemical Method in Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons, Chichester, USA (1994)
  21. Kim, T.W., Lee, J.L., Jung, S.H., Kim, Y.M., Jo, J.S., Chung, D. K., Lee, H.I. and Kim, H.Y. Identification and distribution of predominant lactic acid bacteria in kimchi, a Korea traditional fermented food. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 635-642 f(2002)

---

(2002년 12월 26일 접수; 2003년 7월 19일 채택)