

Bacillus licheniformis 에 의한 두유응고 효소의 생산

이철우 · 하덕모 *

동국대학교 공과대학 식품공학과

Production of Soymilk Clotting Enzyme by *Bacillus licheniformis*

Lee, Chul-Woo and Duk-Mo Ha*

Department of Food Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

The production of extracellular soymilk clotting enzyme by *Bacillus licheniformis* strain 192, one of the soymilk clotting enzyme producers isolated formerly, was studied under various conditions. The medium composed of 1.5% potato starch, 2.0% soybean milk, 10% defatted soybean meal extract and 0.6% KH_2PO_4 (pH 6.1) was chosen as the most suitable medium and the culture at 35-40°C for 3 days was most appropriate for the production of soymilk clotting enzyme.

근년에 두유가 ficin, bromelain 등의 단백질 분해효소에 의해서 응고된다는 것이 알려지게 되었고(1-3) 福家 등(4)은 두유를 발효시켜 curd를 형성하게 될 때에 이들 효소를 첨가함으로써 응고시간이 단축되고 curd의 질도 향상된다고 보고한 바 있다. Park 등(5)은 이와 같은 두유응고 효소가 미생물에 의해서도 생산된다는 것을 최초로 보고하였으며 저자들은 전보(6)에서 토양으로부터 두유응고 효소생산 균주로서 17 균주를 분리하여 *Bacillus cereus*(8 균주) *Bacillus pumilus*(8 균주) 및 *Bacillus licheniformis*(1 균주)로 동정하고 이들 중 생산능이 우수한 *Bacillus licheniformis* 192 균주와 *Bacillus pumilus* 118 균주가 생성하는 두유응고 효소활성에 미치는 pH 및 온도의 영향 등에 대해서 보고하였다. 본 연구에서는 이들 분리균주 중 두유응고 효소의 생산능이 우수한 *Bacillus licheniformis* 192 균주를 이용한 두유응고 효소생산 조건에 대해서 검토하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

Key word: *B. licheniformis*, soymilk clotting enzyme

*Corresponding author

전보(6)에서 토양으로부터 두유응고효소 생산균주로서 분리, 보고한 균주 중 그 생산능이 가장 우수한 *Bacillus licheniformis* 192 균주를 사용하였다.

두유

전보(6)에서와 같이 미국산 대두(Yellow No.1)를 침지, 마쇄한 다음 약 90°C에 가열, 여과하여 최종가수량 8~10 배의 두유를 조제하여 배지 및 효소활성 측정에 사용하였다.

배지 및 배양

두유응고 효소생산에 미치는 배지조성 및 pH의 영향을 검토하기 위하여 두유 5.0%, glucose 0.2%, peptone 0.2%, yeast extract 0.2% 및 KH_2PO_4 0.5% (pH 6.1) 조성의 배지를 기본배지로 하여 탄소원 및 질소원을 달리한 배지, 최적 탄소원 및 질소원에 각종 무기염을 단독으로 첨가한 배지 및 최적배지의 pH를 5.1~10.1로 달리한 배지를 시험배지로 사용하였다. 각 시험배지는 25 ml 씩 100 ml 용 삼각플라스크에 분주, 가압살균하고 *Bacillus licheniformis* 192 균주의 1백균이를 식균하여 35°C에서 3일간 진탕배양(120 rpm)한 다음 각 배양액의 효소활성을 비교하였다. 또 배양온도의 영향을 검토하기 위하여 최적배지를 이용하여 30~45°C로 배양온도를 달리한 각 배양액의 효소활성을

비교하였다.

Jar fermentor 에 의한 배양

두유응고 효소생성을 위한 최적배양조건에서의 배양 시간의 경과에 따른 효소활성의 변화를 검토하기 위하여 2.5 l 용량의 jar fermentor(MD-250, B.E. Marubishi Co.)에 최적배지 1.8 l를 넣어 가압살균한 다음 35°C에서 2일간 진탕배양으로 전배양한 배양액 50 ml를 접종하여 35°C에서 통기량 1.0 l/min, 교반속도 600 rpm으로 배양하면서 정기적으로 배양액의 효소활성을 비교하였다.

두유응고 효소활성의 측정

배양액의 효소활성 측정에 있어서는 배양액을 11,000×g로 20분간 원심분리하여 얻은 상침액을 시험효소액으로 하였다.

1M KH₂PO₄ 완충용액(pH 4.5)으로 pH 6.1이 되게 조절한 두유 5 ml에 시험효소액을 첨가하고 Arima 등(7)의 방법에 준하여 65°C에서 효소활성을 측정하였다. 효소활성은 Park 등(5)과 같이 5 ml의 두유를 1 분간에 응고시키는 효소활성을 1 단위로 나타내었다.

전분의 정량

감자전분을 탄소원으로 한 발효액 중의 전분의 정량은 발효액을 산 가수분해법(8)으로 분해하여 Somogi 변법(9)으로 glucose를 정량하고 전분량으로 환산하였다.

결과 및 고찰

두유응고 효소의 생산에 미치는 배지조성의 영향

탄소원 : 기본배지의 탄소원으로 각종 탄소원을 각각 0.2%씩 첨가하여 탄소원을 달리한 각 배양액의 최종 pH 및 두유응고 효소활성은 Table 1과 같으며 시험한 탄소원 중 감자전분을 사용한 배지에서 0.29 unit/ml의 가장 높은 효소활성을 나타내었다.

감자전분 농도가 효소생성에 미치는 영향을 비교한 결과는 Fig.1과 같으며 감자전분의 첨가량이 많을수록 효소활성은 증가하고 1.5%의 농도에서 0.91 unit/ml의 높은 활성을 나타내었으나 그 이상의 농도에서는 차이를 볼 수 없었다.

질소원 : 기본배지의 질소원으로 각종 무기 및 유기질소원을 각각 0.5%씩 첨가하여 질소원을 달리한 각 배양액의 효소활성을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

시험한 무기질소원 중 (NH₄)₂CO₃ 첨가배지에 있어서 약간의 효소활성을 나타내었으나 전반적으로 효소활성을 볼 수 없었으며, 유기질소원 중 yeast extract,

Table 1. Effects of carbon sources on soymilk clotting enzyme production by *Bacillus licheniformis* strain 192.

Carbon source	Final pH	Clotting activity* (unit/ml)
Glucose	7.1	0.14
Fructose	7.2	0.12
Galactose	7.1	0.20
Maltose	7.2	0.20
Saccharose	7.2	0.16
Lactose	7.1	0.19
Dextrin	7.2	0.17
Soluble starch	7.1	0.20
Potato starch	7.1	0.29
Glycerin	7.2	0.13
Sodium acetate	8.3	0.05
Sodium citrate	8.8	0.05

*One unit of soymilk clotting activity was defined as the amount of enzyme that clotted 5 ml of soymilk in 1 min. at 65°C

Table 2. Effects of nitrogen sources on soymilk clotting enzyme production by *Bacillus licheniformis* strain 192.

Nitrogen source	Final pH	Clotting activity* (unit/ml)
NH ₄ Cl	5.2	ND**
NH ₄ NO ₃	5.3	ND
(NH ₄) ₂ CO ₃	6.1	0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0	ND
NaNO ₃	6.1	ND
KNO ₃	6.1	ND
Urea	6.9	0.02
Yeast ex.	7.0	0.03
Peptone	7.2	0.03
Soybean milk	7.0	0.04
Defatted soybean meal ex.***	6.2	0.05

* Clotting activity unit was defined as in Table 1

** Not detected

***Defatted soybean meal was extracted with a 5-fold amount of 0.1 N NaOH at 95°C for 4 hours.

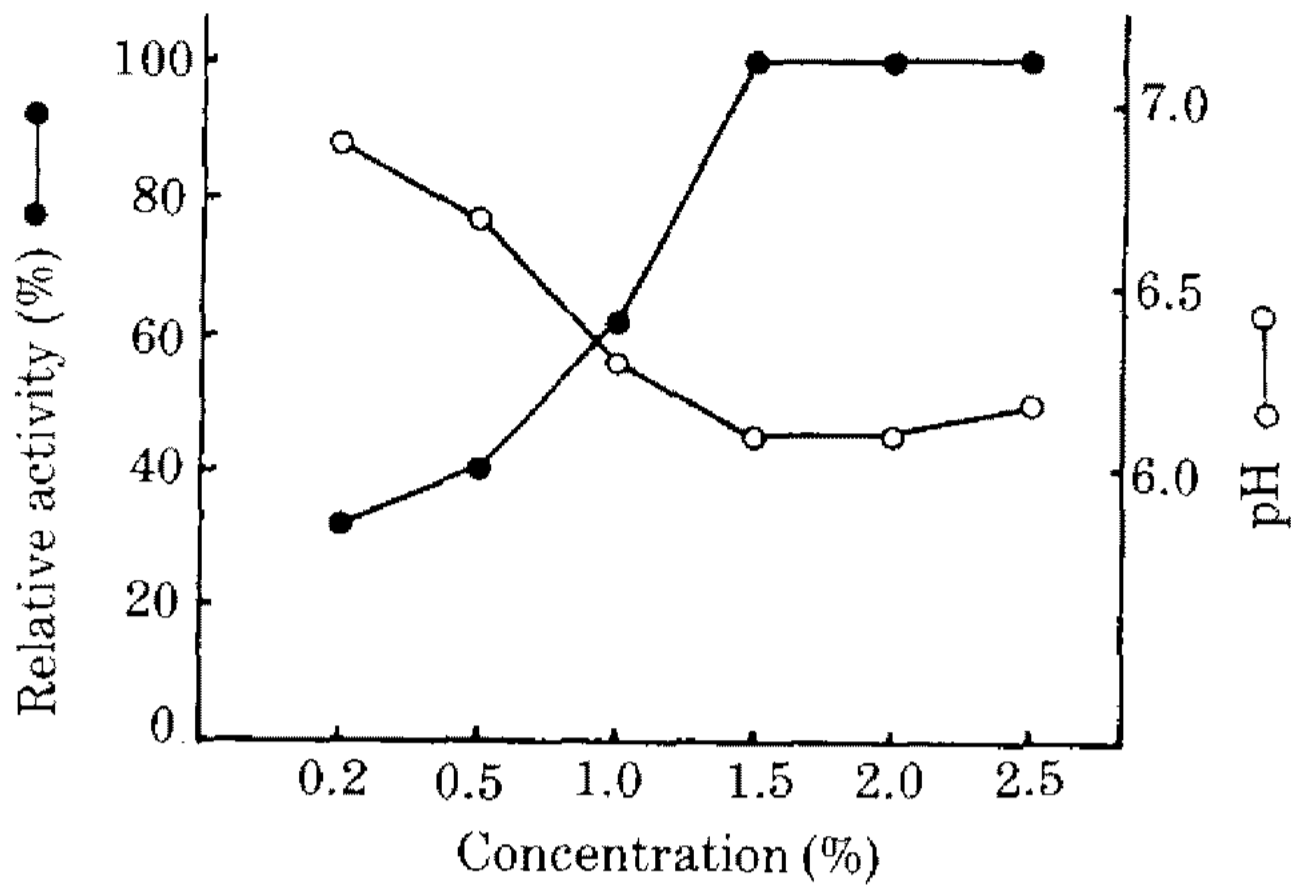


Fig. 1. Effects of potato starch concentration on soymilk clotting enzyme production by *Bacillus licheniformis* strain 192.

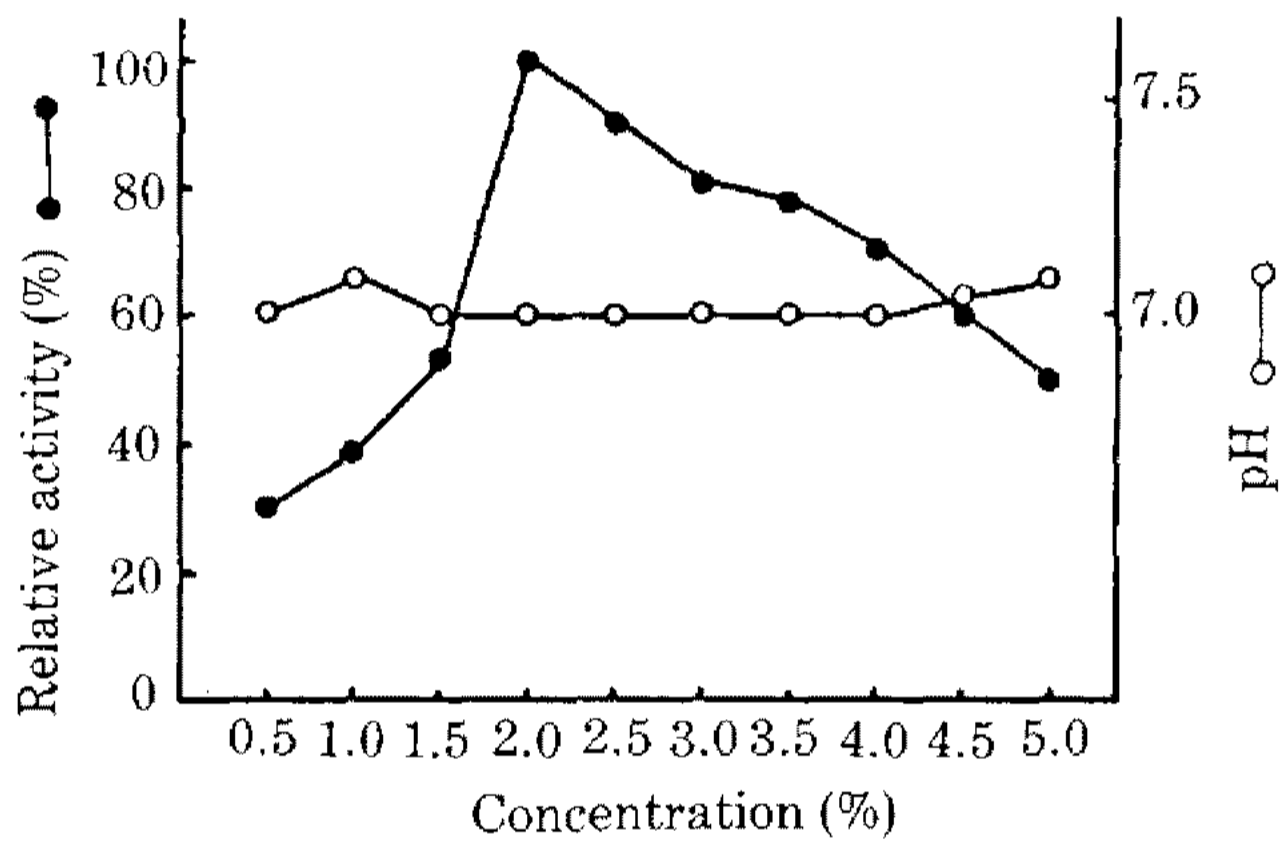


Fig. 2. Effects of soymilk concentration on soymilk clotting enzyme production by *Bacillus licheniformis* strain 192.

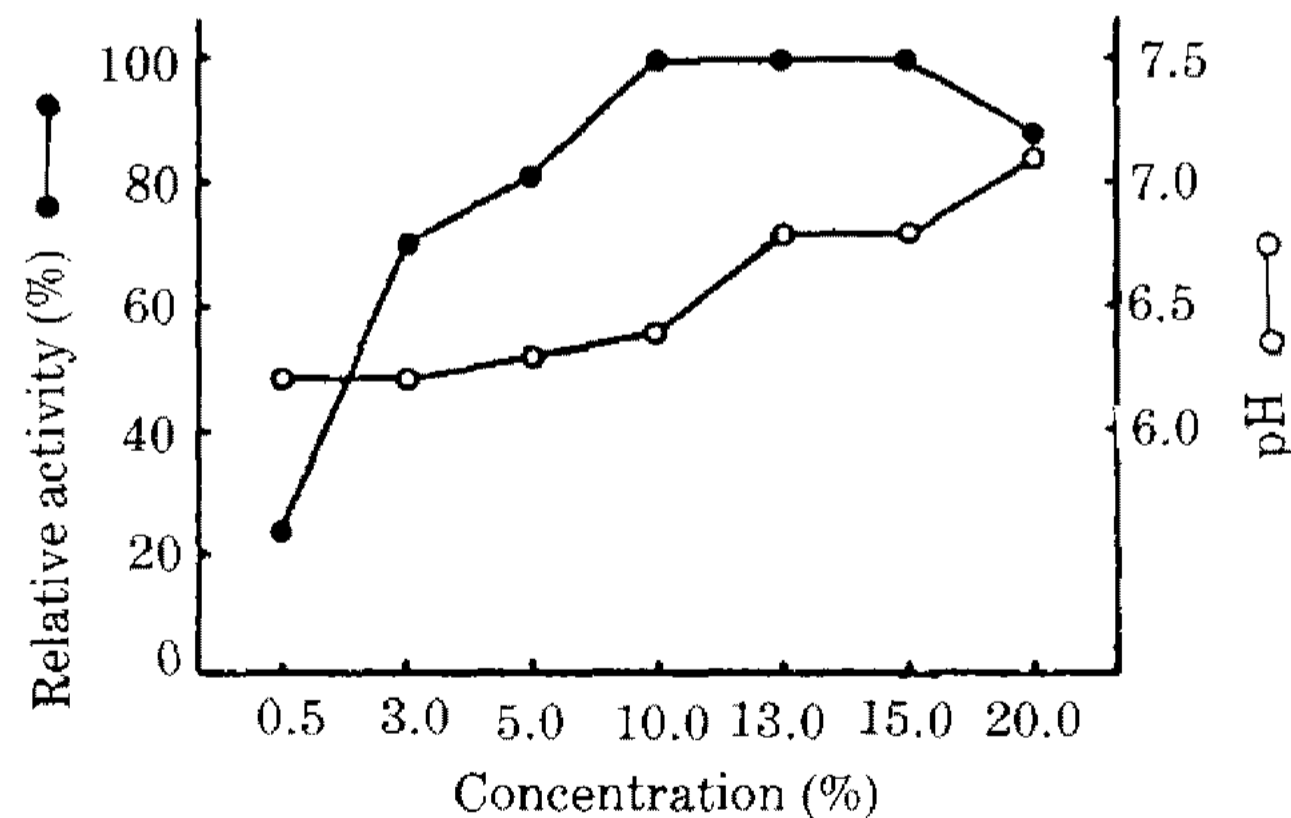


Fig. 3. Effects of defatted soybean meal extract concentration on soymilk clotting enzyme production by *Bacillus licheniformis* strain 192.

peptone, 두유 및 대두박 추출액이 각각 0.03, 0.03, 0.04 및 0.05 unit/ml의 효소활성으로 다른 질소원에 비하여 높은 효소활성을 나타내었다.

비교적 높은 효소활성을 나타내는 두유 및 대두박 추출액의 농도가 효소생산에 미치는 영향을 비교한 결과는 Fig.2 및 3과 같으며 두유 2.0% 및 대두박 추출액 10%의 각 농도에서 각각 0.10 및 0.17 unit/ml의 가장 높은 활성을 나타내었다. 이들 결과로부터 두유 2.0% 및 대두박 추출액 10%를 함께 첨가한 결과 그 효소활성이 크게 증가하여 0.43 unit/ml의 높은 활성을 나타내었다.

무기염 : 탄소원 및 질소원에 대한 결과를 이용하여 감자전분 1.5%, 두유 2.0%, 대두박 추출액 10% 조성

Table 3. Effects of inorganic salts on soymilk clotting enzyme production by *Bacillus licheniformis* strain 192.

Inorganic salt	Concn. (%)	Final pH	Clotting activity* (unit/ml)
None		7.0	3.00
KH ₂ PO ₄	0.1	6.6	3.16
	0.3	6.4	3.53
	0.5	6.3	5.00
	0.6	6.3	5.46
	0.8	6.3	5.46
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.025	7.4	3.04
	0.05	7.5	3.43
	0.1	7.5	3.43
	0.2	7.6	4.12
	0.002	7.2	3.04
NaCl	0.02	7.1	3.04
	0.05	7.3	3.16
	0.1	7.3	3.24
	0.002	7.2	3.07
	0.02	7.5	3.07
CaCl ₂	0.05	7.6	3.24
	0.1	7.6	4.44
	0.002	7.0	3.04
	0.02	7.1	3.24
	0.05	7.0	3.42
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1	5.2	ND**
	0.002	7.3	3.00
	0.02	7.3	3.07
	0.05	7.2	3.16
	0.1	7.2	5.00
MnSO ₄ ·nH ₂ O	0.002	7.3	3.00
	0.02	7.3	3.07
	0.05	7.2	3.16
	0.1	7.2	5.00

* Clotting activity unit was defined as in Table 1.

**Not detected.

의 배지에 각종 무기염을 첨가하고 두유응고 효소생성에 미치는 영향을 비교한 결과는 Table 3과 같다.

KH_2PO_4 의 첨가로 배양액의 효소활성은 현저하게 증가하고 0.6% 이상의 농도에서 5.46 unit/m/의 가장 높은 활성을 나타내었다.

MgSO_4 , NaCl , CaCl_2 , FeSO_4 및 MnSO_4 의 첨가량의 증가에 따라 응고 효소활성의 값이 높아지는 경향을 나타내었으나 효소액에 이들 염류를 첨가하였을 때에도 같은 정도로 응고작용이 촉진되는 것으로 보아 이와 같은 결과는 배양액에 함유되어 있는 이들 염류의 영향으로 추측된다.

이상의 결과로부터 *B. licheniformis* 192 균주의 두유응고 효소생산을 위한 최적배지조성을 감자전분 1.5%, 두유 2.0%, 대두박 추출액 10%, KH_2PO_4 0.6%로 추정하였다.

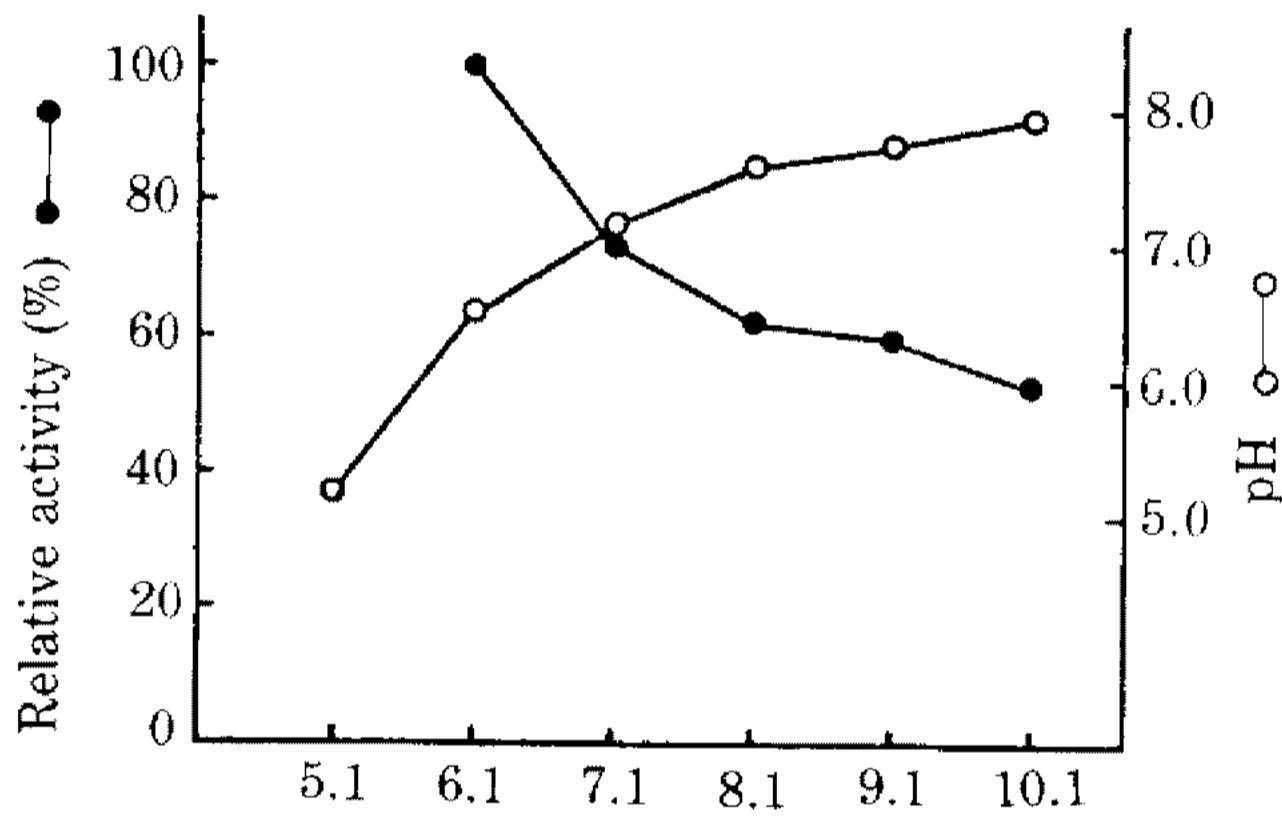


Fig. 4. Effects of initial pH on soymilk clotting enzyme production by *Bacillus licheniformis* strain 192.

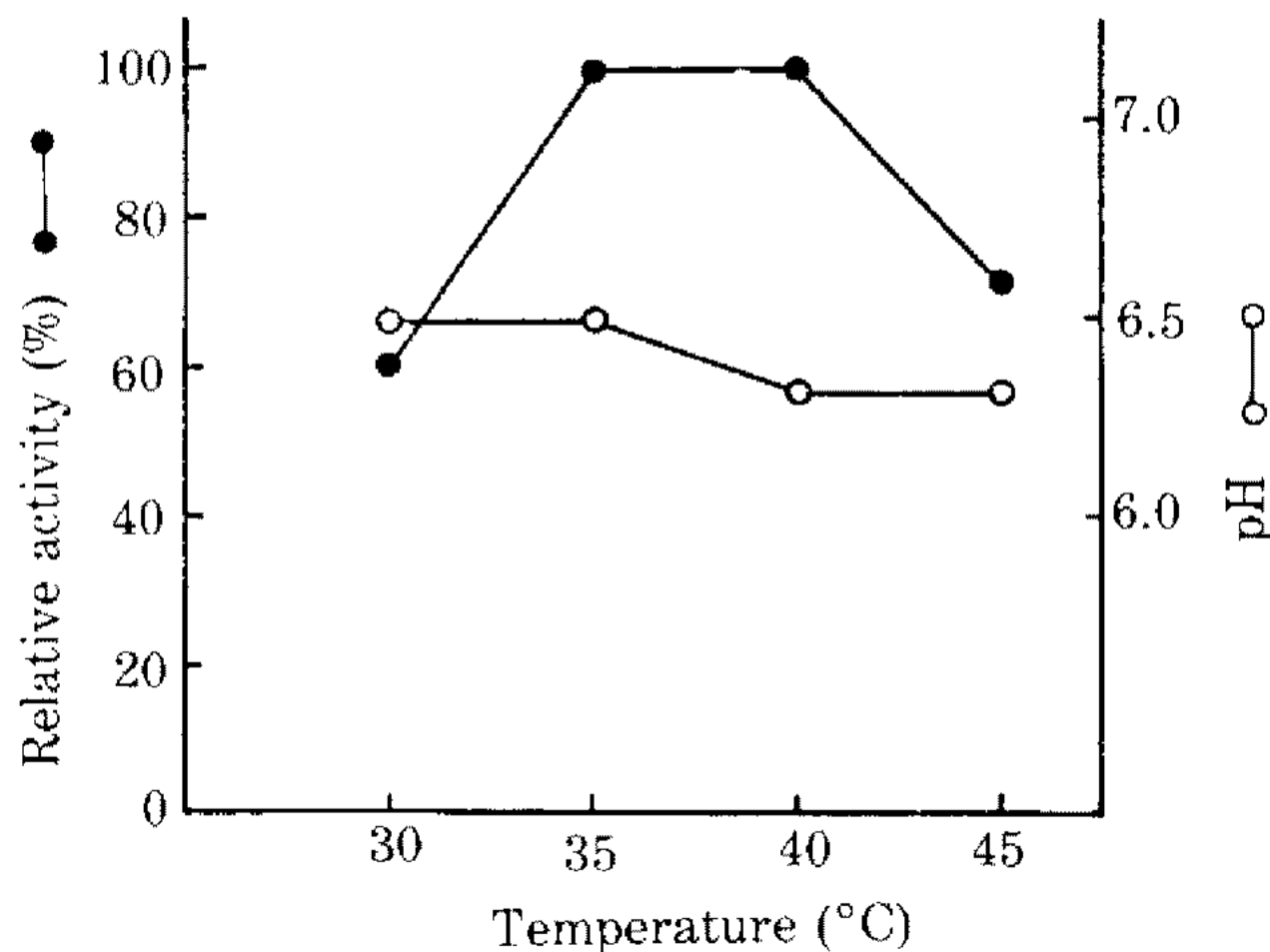


Fig. 5. Effects of temperature on soymilk clotting enzyme production by *Bacillus licheniformis* strain 192.

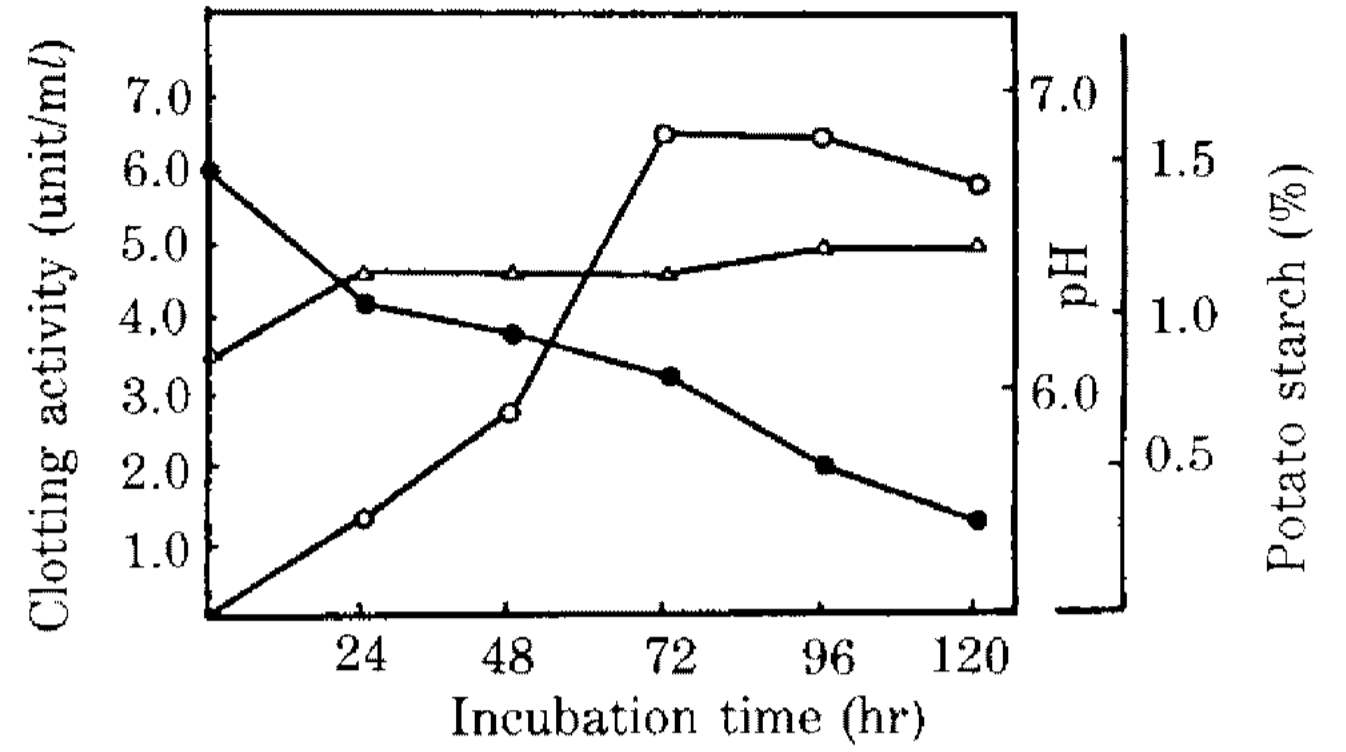


Fig. 6. Time course of soymilk clotting enzyme production by *Bacillus licheniformis* strain 192.

○-○, Clotting activity; △-△, pH; ●-●, Potato starch.

두유응고효소 생산에 미치는 pH, 온도 및 배양시간의 영향

pH 및 온도 : 최적배지의 초기 pH를 달리한 각 배양액의 두유응고 효소활성을 비교한 결과는 Fig.4와 같이 pH6.1에서 가장 높은 효소활성을 나타내었으며 pH5.1 이하에서는 효소활성을 볼 수 없었다. 또 pH 6.1로 조정된 최적배지를 이용하여 배양온도를 달리하였을 때 온도차이에 따른 배양액의 효소활성은 Fig.5와 같이 35~40°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

배양시간 : Jar fermentor로 최적배지를 이용하여 35°C에서 배양하였을 때의 배양시간의 경과에 따른 배양액의 pH, 전분농도 및 효소활성의 변화는 Fig.6과 같다. 두유응고 효소활성은 3일간의 배양에서 가장 높은 값을 나타내었고 그 최고치는 6.32 unit/m/였다.

요 약

두유응고 효소생산균으로 분리, 보고한 균주 중 생산능이 우수한 *Bacillus licheniformis* 192 균주의 두유응고 효소생산을 위한 최적조건을 검토하였다. 최적배지 조성은 potato starch 1.5%, 두유 2.0%, 대두박 추출액 10% 및 KH_2PO_4 0.6% (pH 6.1)였으며 35~40°C에서 3일간 배양하였을 때 가장 높은 효소활성을 나타내었다.

참고문헌

1. 伊藤寛: 大豆開發, 30, 9(1975); 蛋白質의 高度利用技術および 資源의 開發に關する研究, 日本農林水産技術會議事務局, 51(1976).
2. Fuke, Y. and H. Matsuoka: *J. Food Sci.*, 43, 312 (1984).

3. Mohri, M. and S. Matsushita : *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 486 (1984).
4. 福家洋子, 松岡博厚 : 日本食品工業學會誌, **27**, 275 (1980).
5. Park Y.W., I. Kusakabe, H. Kobayashi and K. Murakami : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3215(1987).
6. 하덕모, 이철우 : 産業微生物學會誌, **17**, 109(1989).
7. Arima, K., S. Iwasaki and G. Tamura : *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 540(1967).
8. 辛孝善 : 食品分析, 新光出版社, 107(1987).
9. Somogy, M. : *J. Biol. Chem.*, **195**, 19(1952).

(Received January 24, 1990)