

## *Bacillus* sp. IJ-3가 생산하는 대두단백응고효소의 최적생산 조건 및 7S Globulin에 대한 효소적 작용에 관한 연구

박양원<sup>†</sup> · 김영전<sup>\*</sup>

동신대학교 식품생물공학과  
<sup>\*</sup>동국대학교 식품공학과

### Studies on the Optimum Conditions of Soy Protein Coagulating Enzyme Production from *Bacillus* sp. IJ-3 Strain and the Action of IJ-3 Strain Enzyme on 7S Globulin

Yang-Won Park<sup>†</sup> and Young-Jeon Kim<sup>\*</sup>

Dept. of Food and Biotechnology, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

<sup>\*</sup>Dept. of Food Science and Technology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

#### Abstract

A bacterial strain, designated as *Bacillus* sp. IJ-3 strain, was shown to produce the extracellular soy protein coagulating enzyme and culture conditions for the production of enzyme by this microbial strain was investigated. The culture medium giving a maximum soy protein coagulating activity was consist of 20%(w/v) soymilk, 2.0%(w/v) glucose, 4.0%(w/v) yeast extract, 5.0%(w/v) polypeptone and 1.0%(w/v) potassium phosphate, monobasic. Initial pH was optimal at 6.0 and the enzyme activity in the culture usually reached a maximal level of fermentation at 35°C. After the culture medium adjustment where required, enzyme activity was reached maximum at 72 hour of cultivation but this enzyme activity was reduced quickly. It can be assumed that *Bacillus* sp. IJ-3 strain enzyme has a specificity toward the 7S globulin.

**Key words:** soy protein coagulating enzyme, *Bacillus* sp., 7S globulin

#### 서 론

대두는 양질의 단백질을 포함하는 영양가 높은 식량으로, 우리나라에서는 두부 및 그의 응용제품이 전통적으로 이용되어 왔고, 과거 수년간 두유의 형태로 서도 대두단백을 이용하여 왔다. 두유는 우유와 마찬가지로 2가 금속염(1,2)이나 산(3,4), 열(5,6) 및 염(7), 또한 단백질 가수분해 및 응고작용을 가진 효소(4,8-10)로 처리하면 유청(whey)과 커드(curd)가 분리되는데 이 커드는 치즈가 될 수 있는 고형물로서, 고단백질인 만큼 식품소재로서의 응용이 기대되고 있다. 저자(11,12)는 토양으로부터 미생물을 탐색하여 대두단백 응고효소를 생산하는 균주인 *Bacillus* sp. IJ-3 균주를 얻어 이 효소의 효소학적 특성을 연구하였고, 미생물 효소를 이용한 soy cheese-like food를 제조하여 이에

대한 종합평가도 하였다. 이 연구에서 미생물 효소로 제조된 커드는 종래의 bromelain으로 제조된 것과는 달리 쓴 맛이 없고, 칼슘염이나 산 침전에 의해 만들어진 것과 전혀 다른 물성을 가진 식품소재로서의 가능성이 충분히 시사되었다. 그러나 대두단백 응고효소가 균체의 효소로서 생산되어지기는 하나 그 양이 실험실적으로만 사용될 수 있는 소량이며, 그 배양기간이 일반적인 배양기간의 두배정도(120시간)를 요하는 등, 효소생산에 있어 연구개선되어야 할 부분이 많이 남아 있는 실정이다.

본 연구에서는 토양으로부터 분리한 강력한 대두단백 응고효소 생산균인 *Bacillus* sp. IJ-3 균주에 대한 효소생산의 최적 배양조건 및 SEM과 gel electrophoresis를 통해 IJ-3 균주가 생산하는 효소의 7S globulin에 대한 작용을 검토하였다.

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

## 재료 및 방법

### 균주

Park(12)에 의해 토양으로부터 분리한 *Bacillus* sp. IJ-3 균주는 glucose peptone-agar 사면배지에 1 백금이를 접종하여 4°C에서 보관한 것을 사용 전에 35°C에서 72시간 배양하여 완전히 숙성시켜 실험에 사용하였다.

### 기본배지

Park(12)이 사용한 효소생산을 위한 기본배지를 대조군으로 하였다.

### 대두단백 응고효소의 최적생산을 위한 요인의 결정

#### 두유의 영향

대두단백 응고효소의 생산에 미치는 두유의 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 두유의 양이 각각 10, 20, 30%(w/v) 되도록 첨가하여 35°C incubator에서 72시간 배양한 후 원심분리하여 얻은 상정액(효소용액)으로 효소활성을 측정하였다.

#### 탄소원의 영향

대두단백 응고효소 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위해 기본배지에 glucose 대신 각종 탄소원을 1%(w/v)씩 첨가하여 각각의 경우에서 효소활성을 측정한 후, 그중 가장 높은 효소활성을 보인 탄소원의 농도가 1.0~5.0%(w/v) 되도록 첨가하여 35°C incubator에서 72시간 배양한 뒤, 원심분리하여 얻은 상정액으로 효소활성을 측정하였다.

#### 질소원의 영향

균의 증식 및 효소생산에 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 yeast extract 및 peptone 대신 각종 질소원을 1%(w/v)씩 첨가하여 효소활성을 측정한 후 가장 높은 효소활성을 보인 질소원의 농도를 1.0~5.0%(w/v) 되도록 가하여 35°C incubator에서 72시간 배양한 뒤 원심분리하여 얻은 상정액으로 효소활성을 측정하였다.

#### 무기염류의 영향

효소생산에 미치는 무기염류의 영향을 조사하기 위해 기본배지에 인산칼륨(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 대신에 각종 무기염류를 0.5%(w/v)씩 첨가하여 그중 가장 높은 효소활성을 보인 무기염류의 농도를 0.5~3.0%(w/v) 되도록 가하고 35°C incubator에서 72시간 배양하여 원심분리한

후 얻은 상정액으로 효소활성을 측정했다.

#### 초기 pH의 영향

효소 생산성에 미치는 초기 pH의 영향을 조사하기 위해 효소생산 배지의 초기 pH를 3~10까지 조절하여, 35°C incubator에서 72시간 배양한 후 상정액으로 효소활성을 측정하였다.

#### 배양온도의 영향

효소활성의 증가에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위해 각각의 온도(30, 35 및 40°C)에서 pH 6.0으로 조정된 배지로 72시간 배양하여 얻은 상정액으로 효소활성을 측정하였다.

#### 대두단백 응고활성의 측정

Park(12)의 방법을 수정하여 대두단백 응고활성을 측정하였다. 시험관에 1mM의 calcium chloride 용액을 포함하는 두유 5ml를 주입하고 이를 65°C에서 5분간 전처리한 다음, 효소용액(배양액) 0.5ml를 가하여 응유입자의 생성을 관찰하였다.

대두단백 응고활성의 정도는 5ml의 두유를 1분에 응고시키는 것을 1 soy protein coagulating unit로 나타내었다.

#### 금속이온의 영향

pH 6.0으로 조정된 1ml의 두유에 1mM의 금속이온 용액을 가하고, 65°C에서 5분간 전처리 한 다음 효소용액 0.1ml를 가하여 금속이온용액의 첨가에 따른 두유 응고활성을 측정하였다.

#### SPI 분해활성 측정

0.1M Tris-HCl 완충용액(pH 9.0) 1ml에 1.2% SPI (soy protein isolate), 헤모글로빈, 카제인 등을 기질로 하여 효소용액 200μl를 가하여 50°C에서 30분간 반응시키고 0.55M TCA용액을 1ml 첨가하여 여과한 후 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성도는 280nm에서 흡광도가 1.0일 때 1unit로 하였다.

#### 주사전자현미경의 관찰

조제된 7S globulin 용액에 IJ-3 균주의 효소액을 0.5 ml를 첨가하고 65°C에서 15분간 반응시켜 생성된 응고물(coagulum)의 형태를 주사전자현미경으로 관찰하였다.

#### 전기영동

IJ-3 strain 효소용액과 반응시킨 7S globulin의 가수분해 상태를 전기영동으로 확인하였다.

## 결과 및 고찰

대두단백 응고효소의 최적생산을 위한 요인의 결정

대두단백 응고효소의 최적 생산을 위해 두유 첨가량, 탄소원, 질소원, 무기염류, 초기 pH 및 배양온도 등을 기본배지를 중심으로 차례로 검토하였다. 먼저 초기 pH를 6.0으로 고정된 후 실험을 진행하였는데 초기 pH를 6.0 이하로 하여 배양하는 경우, 배양초기 단계에 pH의 저하현상이 오래도록 지속되므로 효소활성의 저하 내지는 활성을 보이지 않는 경향이 두드러졌다. 이것은 균주가 두유에 포함이 되어있는 탄소원과 첨가되는 glucose에 의해 민감하게 영향을 받기 때문인 것으로 사료된다.

두유 첨가량의 영향

두유첨가량에 따른 효소 생산의 차이를 알아보기 위하여 두유 첨가량과 대두단백응고효소활성의 관계를 검토하였다. 기본배지에 두유 첨가량을 10, 15, 20, 25 및 30%로 달리하여 72시간 배양 후 각각의 효소용액에 따른 대두단백 응고효소 활성의 차이를 측정하였고 그 결과는 Fig. 1과 같았다.

대두단백 응고효소의 생산은 두유 첨가량이 20%일 때 가장 효과적이었으며, 특히 20%의 두유 첨가는 기본배지에 의한 효소활성(0.15 unit)의 약 3.8배의 효소 활성 증가를 보였다.

탄소원의 영향

대두단백 응고효소 생산에 있어 탄소원에 따른 상대활성도를 조사한 결과(Table 1), 효소활성은 glucose 첨가군에서 가장 높았고 다음으로 maltose, lactose,

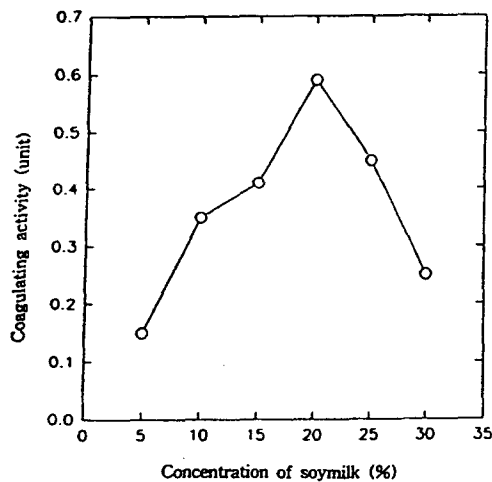


Fig. 1. The effect of soymilk concentration on the soy protein coagulating enzyme production.

sorbitol의 순이었다.

이 실험에서는 탄소원 중 가장 높은 활성을 보인 glucose를 사용했으며, 최적 glucose의 농도는 기본배지에 1.0~5.0%(w/v)가 되도록 첨가하여 72시간 배양한 효소액으로 그 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다.

효소생산을 위한 최적 glucose의 농도는 2.0%(w/v)로, 기본배지에 의하여 얻어진 효소활성(0.15unit)에 비해 약 4배의 증가를 보였으며, 그 이상의 농도에서는 상대 효소활성의 감소를 보여 glucose 농도의 증가에 따라 대두단백 응고효소 활성은 감소하는 것을 알 수 있었다.

질소원의 영향

Table 2에 질소원에 따른 상대 효소활성을 나타내었다. Table에서 보는 것과 마찬가지로 yeast extract와 beef extract에서 높은 상대 효소활성을 보였다.

효소생산을 위한 질소원의 최적 농도를 조사하고자 상대적으로 높은 효소활성을 보인 yeast extract와 pep-

Table 1. Effect of carbon sources on the soy protein coagulating enzyme production

Carbon sources	Relative activity(%)
Glucose	100
Maltose	86
Lactose	83
Sorbitol	82
Galactose	70
Fructose	65
Sucrose	63

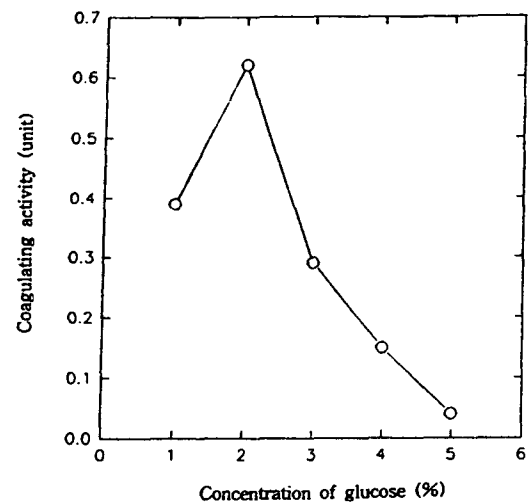


Fig. 2. The effect of the glucose concentration on the soy protein coagulating enzyme production.

Table 2. Effect of nitrogen sources on the soy protein coagulating enzyme production

Nitrogen sources	Relative activity(%)
Yeast extract	100
Beef extract	93
Peptone	89
Casein	76
Tryptone	71
Gelatin	52

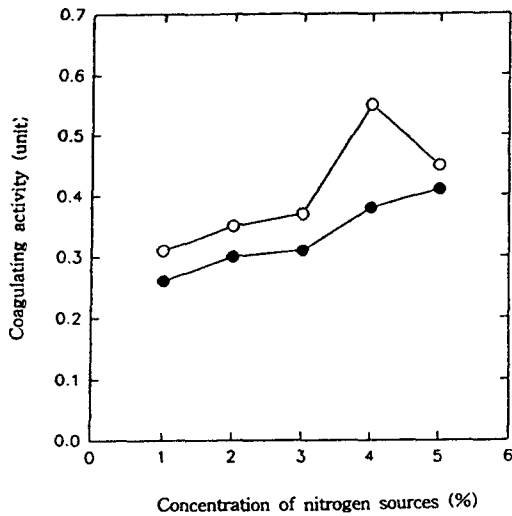


Fig. 3. The effect of concentration of nitrogen sources on the soy protein coagulating enzyme production.

tone을 1.0~5.0%(w/v) 농도가 되도록 각각 첨가하여 효소활성을 측정하였으며 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 3에서 보는 것과 마찬가지로 질소원으로서의 yeast extract와 peptone의 효소생산을 위한 최적 농도는 각각 4%와 5%였으며, 기본배지가 갖는 활성의 각각 3.6배와 2.7배의 효소활성의 증가를 보였다.

무기염류의 영향

대두단백 응고효소 생산에 미치는 염류의 영향을 조사한 결과를 Table 3에 나타내었다. Table에 보이는 것과 마찬가지로  $KH_2PO_4$  첨가군의 상대활성이 높았으며,  $Na_2CO_3$ 군도 높은 편이었다.

가장 높은 활성을 보인  $KH_2PO_4$  농도를 0.5~3.0% (w/v) 되도록 첨가하여 효소생산의 최적농도를 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

Fig.에서 보는 것과 마찬가지로 소량의 무기염류는 균 생육의 증가에 영향을 주는데 1%의 첨가가 가장 높은 활성을 나타내어 기본배지의 약 2.6배의 효소활성

Table 3. Effects of various salt on the soy protein coagulating enzyme production

Salt sources	Relative activity(%)
$KH_2PO_4$	100
$Na_2CO_3$	81
NaCl	43
$MgSO_4$	52
$CaCl_2$	51

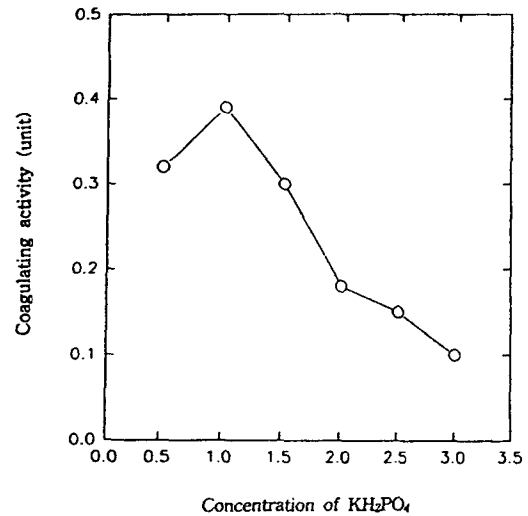


Fig. 4. The effect of salt concentration on the soy protein coagulating enzyme production.

증가를 보였으나, 무기염류 2% 이상의 첨가는 오히려 효소생산을 감소시켜 거의 효소활성을 보이지 않았다.

초기 pH의 영향

효소생산성에 미치는 초기 pH의 영향에 대한 실험 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 결과에 따르면 초기 pH가 중성범위(pH 6.0)에서 가장 높은 상대효소 활성을 보였고, 산(pH 3.0), 염기(pH 10.0)하에서 진행한 배양액의 효소활성 능력은 보이지 않았다.

Fig.에서 보는 것과 마찬가지로 중성범위의 pH에서 효소활성이 가장 큰 것은 대두단백 응고작용의 pH 범위가 중성부근이며, pH 안정성과도 관련된 것으로 사료된다.

온도의 영향

배양온도에 따른 효소활성의 측정은 30~40°C의 범위에서 행하였고, 그 결과는 Fig. 6에 나타내었다.

온도상승에 따른 대두단백 응고효소활성은 30°C에서 72시간 배양할 때 0.2unit의 효소활성을 나타내고, 35°C에서 72시간 배양할 때 최대 효소활성(0.5unit)을 보여 30°C에 비해 약 2.5배의 효소활성이 증가하였다. 한편 40°C의 배양에서는 효소활성을 보이지 않았다.

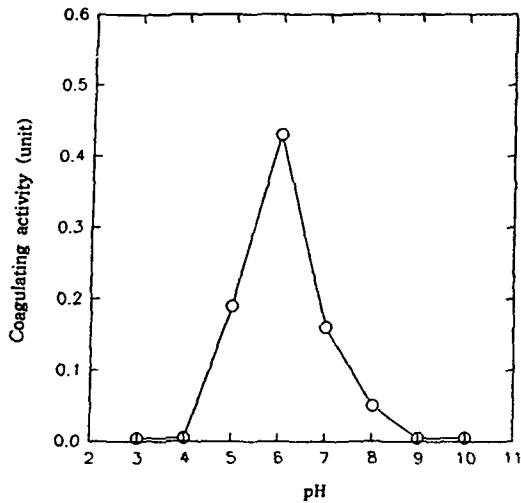


Fig. 5. The effect of initial pH on the soy protein coagulating enzyme production.

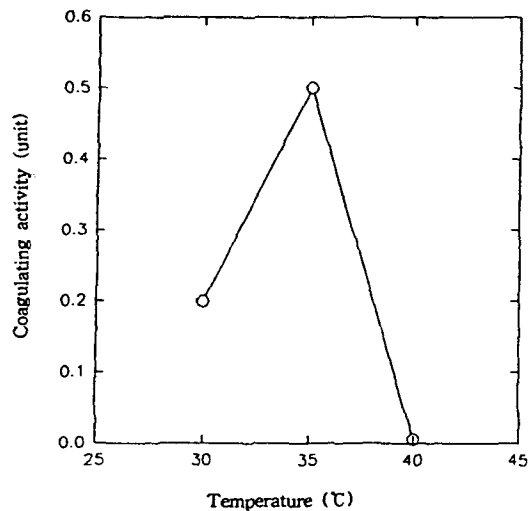


Fig. 6. The effect of temperature on the soy protein coagulating enzyme production.

#### 금속이온의 영향

Table 4에 대두단백 응고활성에 대한 금속이온의 영향을 조사하였다.

Table에서 보는 것과 마찬가지로 1가 이온인 KCl 첨가군에서 상대 효소활성도는 약간 감소했으나,  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  등의 2가 금속이온 첨가군에서는 효소활성의 증가가 관찰되었다.

#### SPI 분해활성 측정

조제된 효소를 이용하여 가수분해 활성도를 측정한 결과를 Table 5에 나타내었다.

Table 4. Effects of metal ions on soy protein coagulating activity of *Bacillus* sp. IJ-3 strain enzyme

Metal ion	Relative activity(%)
None	100
KCl	90
$CaCl_2$	250
$MgCl_2$	215
$ZnCl_2$	204
$CuCl_2$	230
$BaCl_2$	210
$MnCl_2$	225

Reaction mixture contained 1ml of soymilk containing 1mM of metal ions, adjusted to pH 6.0 and 0.1ml of enzyme solution, and the enzyme reaction was done at 65°C

Table 5. Relative proteolytic activity on various proteins

Substrate	Relative activity(%)
SPI	100
Casein	85
Hemoglobin	43
Ovalbumin	17
BSA	46

Enzyme reaction was carried out at pH 9.0 and 50°C for 30 minutes

BSA: Bovine serum albumin

Table에서 보여주는 것과 마찬가지로, *Bacillus* sp. IJ-3 균주효소는 SPI에 대한 분해도가 높았으며, 이것은 효소가 다른 단백질 보다 SPI를 쉽게 가수분해하는 기질특성을 가진 때문으로 사료된다.

#### 배지조성의 영향

대두단백 응고효소 활성은 기존의 배지조성에서 120시간 배양으로 그 최대의 활성(0.15unit)을 보였다.

*Bacillus* sp. IJ-3 균주효소의 효소활성을 높이기 위하여 기존의 배지조성을 중심으로 효소활성에 영향을 주는 배지조성(두유 첨가량, 탄소원, 질소원 및 무기염류) 및 환경인자(pH, 온도 및 배양시간)의 변화에 따른 효소활성을 측정하였다.

기존의 배지조성에서 보인 효소활성(0.15unit)은 Fig. 7에서 보는 것과 마찬가지로 배지조성을 달리한 결과, 배양시간은 크게 단축되었으며, 최대 활성도는 크게 향상되었음을 알 수 있었다.

기존의 배지조성에서는 120시간의 배양에서 효소 활성(0.15 unit)을 최대로 하였으나, 조정된 배지를 통한 *Bacillus* sp. IJ-3 균주의 배양은 72시간 배양으로 최대의 효소활성(0.8 unit)을 보여 약 5.3배의 효소활성의 증가를 보였다.

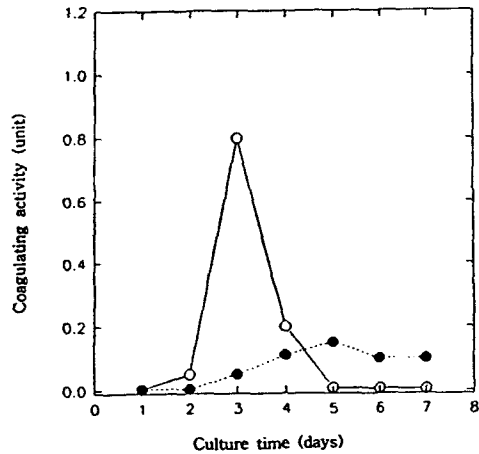


Fig. 7. Time course of the enzyme production by *Bacillus* sp. IJ-3 strain.

- : The feature of enzyme production after adjustment of modified medium
- : The feature of enzyme production of basal medium

주사 전자 현미경에 의한 7S globulin의 응고물의 측정

효소에 의한 7S globulin의 응고현상을 확인하기 위하여 SEM을 이용하여 7S globulin의 Ca, HCl 및 효소에 의한 응고물 생성을 관찰하였다. Fig. 8에서 보는 것과 마찬가지로 IJ-3 strain 효소에 의한 7S globulin의 응고입자는 다른 것들(Ca, HCl)에 비해 큰 것을 알 수 있다.

전기영동

IJ-3 strain 효소용액과 반응시킨 7S globulin의 가수분해 패턴을 Fig. 9에 나타내었다. Fig.에서 보는 것과 마찬가지로 IJ-3 strain 효소는 7S globulin을 특이적으로 분해하는 것을 알 수 있었다. Mohri와 Matsushita (4) 및 Fuke와 Matsuoka(9)의 보고에 의하면 효소에 의한 7S globulin의 가수분해는 일어나지 않으며, 11S globulin이 분해되면서 7S globulin도 함께 침강한다고 하였다. 이것은 7S globulin이 IJ-3 균주 효소에 의해 분해가 일어나 커드를 형성하는 것과는 근본적으로 다른 것임을 의미하고 있다. 다시 말하면 IJ-3 strain 효소는 7S globulin에 대해 어떤 기질 특이성을 갖고 있다는 한가지 증거를 보여주는 것이다.

이상에서 토양에서 선별한 대두단백 응고효소를 생산하는 *Bacillus* sp. IJ-3 균주의 효소생산능력을 높이기 위해 배양조건을 검토하였고, 생산된 효소의 7S globulin에 대한 특이작용도 함께 관찰하였다. 두유 첨가

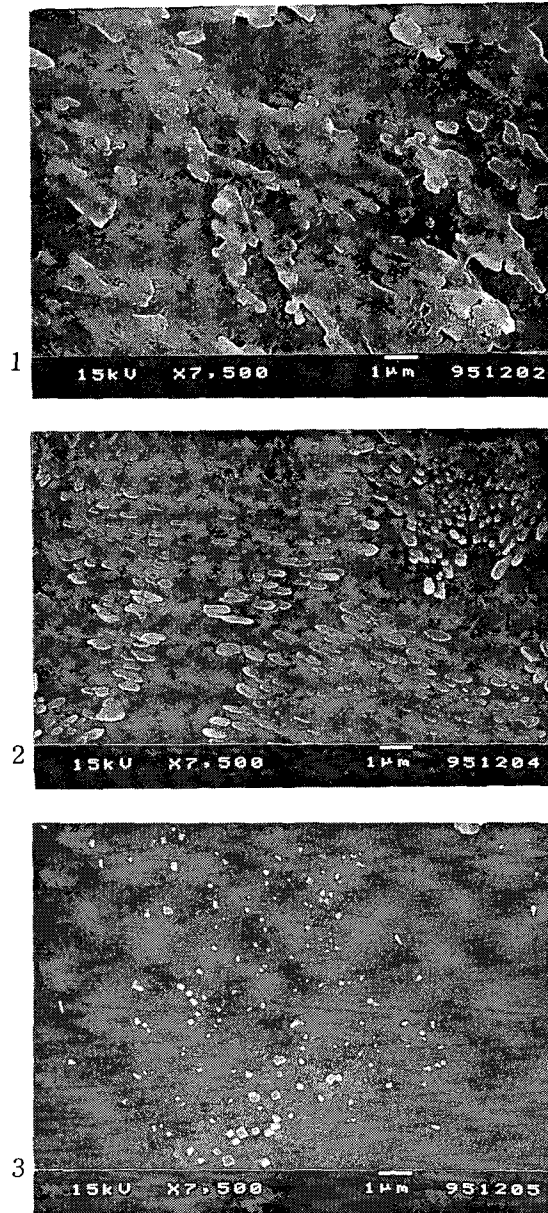


Fig. 8. The feature of scanning electron micrographs on the 7S globulin coagulum.

- 1: Coagulum by IJ-3 strain enzyme
- 2: Coagulum by calcium chloride solution
- 3: Coagulum by hydrochloric solution

량 등 배지조성을 달리한 배지에서 효소의 생산능력은 기존의 배지조성에 비해 약 5.3배 가량 증가하였으며, 배양시간도 48시간이 단축되었다. SEM을 통해 본 효소에 의한 7S globulin의 응고입자는 다른 것들에 비해 컸으며, 전기영동으로 나타난 단백질의 가수분해에 있

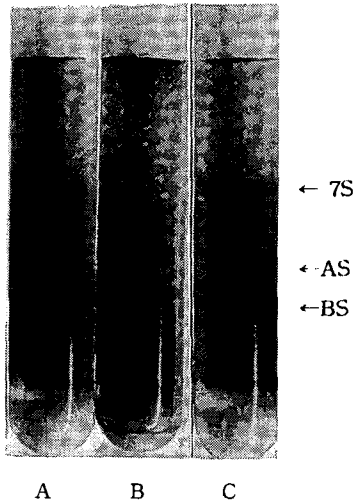


Fig. 9. The degradation patterns of 7S globulin by IJ-3 strain enzyme.

- A: Native soy protein  
 B: Hydrolyzed soy protein by IJ-3 strain enzyme  
 C: Ca-precipitated soy protein

어서도 IJ-3 균주 효소는 7S globulin에 특이적으로 작용하고 있는 것으로 판단되었다. 앞으로 IJ-3 균주 효소의 7S globulin에 대한 기질 특이성 연구가 필요할 것으로 사료되며, 현재 본 연구실에서 이에 따른 연구가 진행중이다.

### 요 약

*Bacillus* sp. IJ-3 균주는 균체의 효소로 대두단백 응고효소를 생산하고, 이 박테리아의 최적 효소생산에 대한 배지조성 및 배양조건을 검토하였다. 최대의 대두단백 응고효소를 생산하는 배지조성은 soymilk 20%(w/v), glucose 2.0%, yeast extract 5.0%, peptone 4.0% 및 potassium phosphate, monobasic 1.0%였다. 초기 pH는 6.0이었고, 35°C 배양에서 최대 효소활성을 보였다. 조정된 배지 조성에서 72시간 배양에 최대 효소활성을 나타내었으며, 기존배지 활성의 약 5.3배의 효소활성의 증가를 보였다. *Bacillus* sp. IJ-3 균주효소는 7S globulin에 대해 특이성을 갖고 있는 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 1995-1996년도 한국과학재단 핵심전문 연구의 지원으로 수행되는 과제의 일부분이며, 지원에 감사드립니다.

### 문 헌

- Saio, K., Koyama, E. and Watanabe, T. : Effect of calcium and phosphorus on solubility characteristics of soybean meal protein. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 1195(1967)
- Lee, C. H. and Rha, C. K. : Microstructure of soybean protein aggregates and its relation to the physical and textural properties of the curd. *J. Food Sci.*, **43**, 79 (1978)
- Bau, H. M., Poullain, B. and Beaufrand, M. J. : Comparison of cold-, acid- and salt-precipitated soy protein. *J. Food Sci.*, **43**, 106(1978)
- Mohri, M. and Matsushita, S. : Improvement of water absorption of soybean protein by treatment with bromelain. *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 486(1984)
- Mori, T., Nakayama, T. and Utsumi, S. : Gelation mechanism of soybean 11S globulin. *J. Food Sci.*, **47**, 26 (1981)
- Utsumi, S. and Kinsella, J. E. : Structure-function relationships in food proteins : subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S and soy isolate proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 297(1985)
- Iwabuchi, S. and Yamauchi, F. : Effect of heat and ionic strength upon dissociation-association of soybean protein functions. *J. Food Sci.*, **49**, 1289(1984)
- Arai, S., Noguchi, M., Kurosawa, S., Kato, H. and Fujimaki, M. : Applying proteolytic enzymes on soybean. *J. Food Sci.*, **35**, 392(1970)
- Fuke, Y. and Matsuoka, H. : Preparation of fermented soybean curd using stem bromelain. *J. Food Sci.*, **49**, 312(1984)
- Park, Y. W., Kusakabe, I., Kobayashi, H. and Murakami, K. : Production and properties of a soymilk-clotting enzyme system from a microorganism. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3215(1985)
- Park, Y. W. : Characteristics of the soybean protein and its utilization. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **22**, 643 (1993)
- Park, Y. W. : Studies on the characteristics of the soybean protein coagulating enzyme from microorganism and the soy cheese-like food(curd). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **23**, 973(1994)

(1996년 6월 19일 접수)