

## Bacillus firmus NA-1 균주와 Bacillus subtilis GT-D 균주를 이용한 발효비지의 기능성

오수명<sup>1</sup> · 김찬식<sup>2</sup> · 이삼빈<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>계명대학교 식품가공학과

<sup>2</sup>제주대학교 생명과학부

### Functional Properties of Soybean Curd Residue Fermented by *Bacillus* sp.

Soo-Myung Oh<sup>1</sup>, Chan-Shick Kim<sup>2</sup> and Sam-Pin Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

<sup>2</sup>Faculty of Biotechnology, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

#### Abstract

To convert the soybean curd residue (SCR) to functional food ingredient, alkaline fermentation of SCR was performed by *Bacillus firmus* NA-1 and *Bacillus subtilis* GT-D for 22 hr at 42°C. The micronized full-fat soy flour (MFS) was fortified to reduce the moisture content as well as to supply protein source. The mucilage and flavor productions in the fermented SCR were enhanced by the fortification of 20% MFS. The peptide production from the SCR fermented with *B. subtilis* GT-D substantially increased when judged by the detectable amount of tyrosine (480 mg%). The production of fibrinolytic enzyme was increased by the fermentation for 22 hr, indicating the relative activity of 62% (*B. firmus* NA-1) and 47% (*B. subtilis* GT-D), respectively. The SCR fermented by *B. firmus* NA-1 and *B. subtilis* GT-D indicated the consistency of 1.95 Pa · s<sup>n</sup> and 0.21 Pa · s<sup>n</sup>, respectively. After freeze-drying, the protease activity (615 unit/g) and  $\alpha$ -amylase activity (180 unit/g) were obtained from SCR fermented by *Bacillus firmus* NA-1 and *Bacillus subtilis* GT-D, respectively.

**Key words:** soybean curd residue, *Bacillus*, peptide, fibrinolytic enzyme, protease,  $\alpha$ -amylase

#### 서 론

대두는 양질의 식물성 단백질원으로 두부, 장류, 콩나물 등 다양한 전통식품에 이용되고 있으며, 특히 식품가공에서도 다양한 용도로 사용되고 있다(1). 콩의 국내 소비를 용도별로 보면 30%가량만이 직접 이용되고 나머지 70%는 식용유, 간장, 두유 및 두부 등의 2차 가공품 생산에 활용되고 있다(2). 특히, 두부는 전통적으로 동양인의 중요한 단백질 공급원으로 오랫동안 소비되어 왔으며, 콩 단백질의 농축 및 압착과정에서 콩유청(순물)과 비지(soybean curd residue)가 부산물로 생산된다. 부산물인 비지에는 영양성분이 남아 있고 및 식이섬유가 풍부함에도 불구하고 높은 수분함량과 비지 자체에 존재하는 다양한 미생물에 의해서 쉽게 변질되기 때문에 대부분이 가축의 사료, 토양의 비료로 이용되거나 부패된 상태로 폐기 처리되고 있다(3,4). 따라서 비지의 활용은 부산물의 이용이라는 측면에서 뿐만 아니라 환경 오염원의 처리비용 절감이라는 면에서도 중요한 연구과제이다. 특히 두부 생산공정에서 생산되는 부산물인 비지의 식품소재

로 활용은 기업의 경쟁력 향상과 콩 원료의 이용 극대화 측면에서 파급효과가 클 것으로 기대한다.

비지에 관련된 연구로는 비지의 저장성을 높이기 위해서 건조비지에 관한 연구(5,6), 건조방법에 따른 비지의 품질 변화(6), 건조비지 첨가에 의한 두부의 제조에 관한 연구(7), 효소제를 첨가한 비지의 발효과정 중 탄수화물 성분변화에 관한 연구(8) 및 빵 제조 시 비지 첨가 효과(9) 등이 있다. 일본에서는 비지로부터 다당류의 추출 및 정제에 관한 연구(10)가 있다. 특히, 비지발효에 관한 연구로는 비지에서 분리된 젖산균의 동정 및 비지 발효특성(11), 비지의 고초균 발효에 의한 성분변화에 관한 연구(12)를 비롯하여 비지와 밀기울의 혼합물을 이용한 장 제조(13) 등이 보고되었다. 최근에는 비지의 고초균 발효에 의한 생리활성물질의 생산에 관한 연구(14)가 보고되었지만, 국내외적으로 비지의 고초균 발효에 의한 기능성향상에 관한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 일본 나토(Natto)에서 분리된 *Bacillus firmus* NA-1과 재래식 청국장에서 분리 동정된

\*Corresponding author. E-mail: spllee@kmu.ac.kr  
Phone: 82-53-580-5554. Fax: 82-53-580-5554

*Bacillus subtilis* GT-D 균주를 종균으로 이용하여, 전지활성 생 대두미세분말이 강화된 비지의 고체발효를 통한 균주별 발효비지의 특성과 혈전용해효소, 펩타이드 및 protease,  $\alpha$ -amylase와 같은 생리활성물질이 포함된 기능성소재로 전환시키는 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

실험에 사용된 비지는 경상북도 김천산을 1 kg씩 비닐팩에 담아  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다. 전지활성 생 대두미세분말(micronized full-fat soy flour, MFS)은 Perican Co.(Toyko, Japan)으로부터 구입하였다. Fibrin, fibrinogen, thrombin 등은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하였으며, Folin phenol reagent는 Junsei(Japan)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 사용 균주

비지의 고초균 발효에 이용된 균주는 Seo와 Lee(15)가 일본청국장(natto)으로부터 분리한 *Bacillus firmus* NA-1을 사용하였으며, 재래식 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* GT-D는 16S rDNA sequencing을 통해서 동정되었다. 고초균 균주들은 MRS agar 배지를 이용하여  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 동안 배양하여 활성화시켰다.

### Starter 배양액 제조

전지활성 생 대두미세분말(micronized full-fat soy flour, MFS) 5% 용액을 균질화한 후  $121^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 살균한 액체 배지 50 mL에 MRS agar plate에서  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 1일 배양시킨 *B. firmus* NA-1 균주와 *B. subtilis* GT-D 균주를 1회 접종한 뒤 진탕배양기(SI-900R, JEIO TECH Co., Ltd., Korea)에서  $42^{\circ}\text{C}$ , 24시간 동안 180 rpm으로 배양하여 스타터로 사용하였다. 스타터 배양액의 생균수는 MRS agar plate에서 측정하였다.

### 일반성분 및 pH 측정

비지와 동결건조된 비지청국장분말의 일반성분은 AOAC 방법(16)에 의해서 측정되었다. pH는 pH meter(model 420A<sup>+</sup>, Thermo Orion, USA)를 이용하여 측정하였으며, 발효 비지 20 g을 채취하여 80 mL의 멸균수에 혼합한 후 혼합기(Jeil Scientific Ind. Co., LTD., Korea)로 2분 동안 5000 rpm에서 혼합한 후 시료의 pH를 측정하였다.

### 혈전용해효소의 활성 측정

혈전용해효소 활성은 fibrin plate method의 일종인 Astrup과 Müllertz method(17)을 사용하여 측정하였다. Fibrin plate는 0.5% fibrinogen을 0.067 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)에 용해시켜서 직경 9 cm인 petri dish에 10 mL를 가하였다. 여기에 0.067 M sodium phosphate

buffer(pH 7.4)에 용해된 thrombin(100 NIH/ mL) 0.1 mL을 가하고 신속하게 혼합한 후 실온에서 30분 방치하여 고형화시켰다. 혈전용해능 측정 시료는 비지발효물 2 g에 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0) 8.0 mL을 혼합한 후  $22,250 \times g$ 에서 15분 동안 원심 분리하여 얻은 상등액을 이용하였다.

Fibrin plate에 발효비지 추출액을 20  $\mu\text{L}$ 씩 각 표시한 위치에 점적하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 반응시킨 후 용해 면적으로 효소 활성을 구하였다. 표준 plasmin 효소활성의 표준곡선을 작성한 후 발효비지 중의 혈전용해효소는 표준곡선과 비교하여 plasmin unit로 환산하여 혈전용해활성(%)을 나타내었다. 대조구로서는 정제된 혈전용해효소인 plasmin(5 Unit/mL)을 사용하였으며, 다음과 같은 방법으로 혈전용해활성을 산출하였다.

$$\text{혈전용해활성(\%)} = \left( \frac{\text{시료의 용해면적}}{\text{Plasmin의 용해면적}} \right) \times 100$$

### 혈전용해효소의 열 안정성 측정

온도 변화에 따른 활성 변화는 열처리하지 않은 시료를 대조구로 하고,  $50 \sim 80^{\circ}\text{C}$ 까지 항온수조의 온도를 변화시키며 10분간 시료를 열처리한 후 각 시료를 혈전용해효소의 측정 방법과 동일하게 측정하여 혈전용해효소의 활성을 측정하였다.

### Tyrosine 함량 측정

비지 발효물의 peptide 생성정도를 측정하기 위하여 Folin phenol 시약을 이용하여 발효비지의 추출액 중에 존재하는 tyrosine 함량을 측정하였다(18). 각 발효비지를 증류수로 5배 희석하여 추출한 시료를 증류수로 5배 희석시킨 시료액 0.7 mL에 0.44 M TCA(trichloroacetic acid) 0.7 mL을 첨가하고  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시키고,  $22,250 \times g$ 에서 10분 동안 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2.5 mL와 phenol reagent 0.5 mL를 차례로 넣고 혼합한 후  $37^{\circ}\text{C}$  항온수조에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 반응액의 흡광도를 spectrophotometer (UNION, Kontron instruments, France)로 660 nm에서 측정하였다.

### 가수분해 효소활성도 측정

효소활성은  $\alpha$ -amylase와 protease로 나누어 역가를 측정하였으며, 비지발효물 5 g에 증류수 95 mL을 첨가한 뒤 실온에서 진탕 후 원심분리( $22,250 \times g$ , 15 min)하여 효소액을 조제한 다음 효소활성을 측정하였다.  $\alpha$ -Amylase의 활성도는 1% 전분용액 1 mL에 맥바인 완충액 2.6 mL과 0.1% 염화칼슘 0.2 mL을 첨가한 용액을 기질로 사용하였고 미리 조제한 시험액 0.2 mL을 첨가하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후, 반응액 0.1 mL을 5 mL의 요오드 시액에 넣어 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 공시험액은  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 가열하여 활성을 잃은 검액 0.2 mL 첨가한 것을 말하

며, 시험액과 동일한 방법으로 측정하였다. 효소활성단위는 공시험액의 값이 시험액 값의 10%가 감소할 때 1 unit로 표시하였다(19,20).

Protease의 활성도는 Anson의 방법을 변형하여 측정하였다(21). 기질로 0.6%의 casein용액 0.35 mL과 효소액 0.35 mL를 시험관에 넣고 항온수조에서 37°C에서 10분간 반응시킨 후 0.44 M TCA 용액을 0.7 mL을 넣어 반응을 정지시킨 후 37°C에서 30분간 정치시킨다. 이 반응액을 원심분리(22,250×g, 15 min)한 후 여액 1 mL에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 mL과 3배 희석된 Folin reagent 0.5 mL을 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 반응조건 하에서 1분간에 tyrosine 1 µg을 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

점도 측정

비지 발효물 20 g에 증류수 80 mL 첨가하여 균질화 후에 여과 체(sieve)를 이용하여 여과시킨 시료를 제조하였다. 여과액 13 mL을 취하여 원통형점도계(HAAKE RheoStress 1, Germany)에 spindle(Rotor DG43 DIN 53544 Titan)을 장착하여 measuring cup DG43을 사용하여 측정하였다. 측정 온도는 20°C에서 전단속도( $\dot{\gamma}$ )는 1~100 s<sup>-1</sup>의 범위에서 점도 측정을 통해서 유동특성을 알아보았고, 점조도지수는 Power law model로 측정하였다(22).

$$\text{Power law model} : \sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

여기서  $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(s<sup>-1</sup>),  $\sigma$ 는 전단응력(Pa), K는 점조도 지수(consistency index, Pa·s<sup>n</sup>), n은 유동성 지수(flow behavior index)이다.

발효비지의 제조

비지(수분함량 84%) 50 g에 전지활성 생 대두미세분말을 0, 10, 15, 20 %로 농도별로 첨가한 후 autoclave(MLS-3020, Sanyo Electric Co., Ltd., Japan)를 이용하여 121°C에서 15분간 살균한 뒤 고초균 *B. firmus* NA-1과 *B. subtilis* GT-D starter 1%를 각각 접종하여 14, 18, 22, 26시간동안 42°C 항온 발효조에서 발효하였다.

동결건조 발효비지의 특성

20%의 MFS를 첨가한 비지에 *B. firmus* NA-1과 *B. subtilis* GT-D starter 1%를 각각 접종하여 42°C에서 22시간 동안 발효한 비지 발효물 20 g 정도를 동결 수기에 담아 동결건조기(Super Modulyo-220, Thermo Savant, USA)에서 3일 동안 동결건조한 다음 Cutting Mill(Type3, Korea)로 파쇄하여 분말로 만든 후 수분함량, pH, 열전용해능, 가수분해효소활성, tyrosine 함량 및 조단백질함량을 측정하였다. 동일 조건으로 살균한 비지에 균만 접종한 것을 control로 하여 22시간 발효시킨 시료와 비교하였다.

결과 및 고찰

청국장 균주 동정

재래 청국장에서 분리된 고초균은 16S rDNA sequence 분석결과 *Bacillus subtilis*로 동정되었으며 *Bacillus subtilis* GT-D로 명명하였다. Gene bank data 분석결과 *Bacillus subtilis* AY583216과 99% homology를 보였다.

MFS 첨가에 따른 발효비지의 변화

비지의 성분분석은 Oh 등(14)에 의해서 보고되었으며, 비지에 10<sup>6</sup> CFU(colony forming unit)/g 이상의 미생물이 존재하여 발효에 영향을 미칠 수 있으므로 살균한 후 고초균에 의한 고체발효를 수행하였다. 비지의 청국장발효에 영향을 미치는 인자로서 원료 비지의 수분함량의 조절 및 영양강화를 위해서 MFS를 혼합하였다. 84%의 수분함량을 포함하는 비지에 전지활성 생 대두미세분말(MFS)을 10, 15, 20% 농도별로 첨가함으로써 비지의 초기 수분함량을 78, 74, 70%로 감소시킬 수 있었으며, 특히 MFS첨가에 의해서 발효된 비지청국장은 콩 단백질의 보강, tyrosine 함량증가, 점질물 생성 및 풍미 향상에 효과가 있었다. 발효온도 42°C에서 26시간 발효 이후에는 발효비지로부터 암모니아취가 심해지는 것을 고려하여 비지를 22시간 이내 발효를 실시하였다.

비지 청국장 발효물로부터 생산되는 단백질의 가수분해물인 peptide 함량은 콩단백질로부터 유리된 peptide에 포함된 방향족 아미노산인 tyrosine의 페놀잔기와 반응하는 Folin-Ciocalteu 시약을 사용하여 측정하였다. Fig. 1과 같이 tyrosine 측정 결과 전체적으로 *B. firmus* NA-1 균주보다는

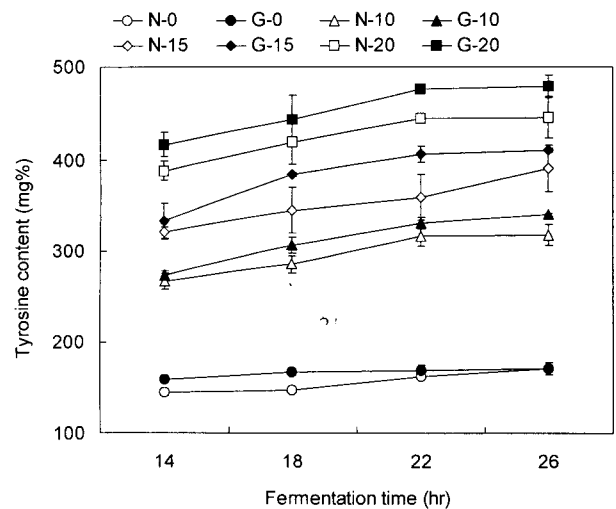


Fig. 1. Effect of MFS (micronized full-fat soy flour) on the tyrosine content in SCR (soybean curd residue) fermented by *B. subtilis* GT-D and *B. firmus* NA-1. n=2. N-0: *B. firmus* NA-1 with 0% MFS, G-0: *B. subtilis* GT-D with 0% MFS, N-10: *B. firmus* NA-1 with 10% MFS, G-10: *B. subtilis* GT-D with 10% MFS, N-15: *B. firmus* NA-1 with 15% MFS, G-15: *B. subtilis* GT-D with 15% MFS, N-20: *B. firmus* NA-1 with 20% MFS, G-20: *B. subtilis* GT-D with 20% MFS.

*B. subtilis* GT-D 균주를 사용하는 경우에 tyrosine 함량이 높게 나왔으며, 특히 20% MFS를 첨가하여 *B. subtilis* GT-D 균주를 이용한 발효물에서 발효시간이 경과할수록 tyrosine 함량이 416, 443, 476, 480 mg%로 증가하는 것을 알 수 있었다. *B. firmus* NA-1 균주의 경우에는 발효시간이 14시간에서 26시간으로 증가되면서 388, 420, 445, 445 mg%로 증가되었으며 발효시간이 22시간 이후에는 거의 변화가 없었다(Fig. 1). 발효전의 비지 자체의 tyrosine 함량이 42 mg%인 점을 고려할 때 MFS 첨가에 따라서 발효된 비지청국장의 tyrosine 함량이 크게 증가함을 알 수 있었다.

MFS 첨가 시에 비지청국장 발효에 따른 alkaline protease로서 알려진 혈전용해효소의 활성은 Fig. 2에서 나타나고 있다. 상대혈전용해효소활성은 *B. subtilis* GT-D 균주보다는 *B. firmus* NA-1 균주를 사용하는 경우에 10% 이상 높았으며, 발효 22시간까지 증가하다가 26시간부터는 변화가 없는 것으로 보였다(Fig. 2). 특히 비지 청국장 발효시에 MFS의 첨가는 무 첨가에 비해서 혈전분해효소의 상대활성이 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 비지 청국장 발효시에 영양성분의 강화가 혈전분해효소생성을 저해하는 것으로 판단되었다. Seo와 Lee(23)는 *B. firmus* NA-1 균주 이용한 콩 grit의 청국장 발효에서 발효시간 24시간에서 상대활성 50~70%로 혈전용해효소 활성을 보였다는 결과와 비교할 때 동일 균주를 이용한 비지청국장 발효물의 혈전용해효소 활성은 60~70%로 거의 비슷한 값을 보였다. 발효비지의 혈전용해효소는 MFS의 첨가에 따른 효과가 없었지만, 수분의 감소, tyrosine의 증가를 보였다. 특히, 20%의 MFS를 첨가한 비지를 22시간 발효하였을 때 무 첨가군에 비해서 tyrosine 함량이 증가되었으며, 비지청국장의 풍미가 가장 양호함을 알 수 있었다. 따라서 MFS 20%를 첨가한 비지를 42°C에서 22시간 동안 발효하는 것이 최적 조건이라 사료되었다. 점도측정 결과 *B. firmus* NA-1 균주를 이용한 비지청국

장 발효물의 추출액이 높은 점도도 값을 나타내었으며, *B. firmus* NA-1과 *B. subtilis* GT-D 균주 모두 20% MFS 첨가하여 26시간 발효시키는 경우에 발효물의 점도가 증가하면서 각각 2.18, 0.35 Pa·s<sup>n</sup>로 가장 높은 점도도 값을 나타내었다(Table 1). 특히 *B. firmus* NA-1 균주를 사용한 비지청국장 발효물이 *B. subtilis* GT-D 균주보다 높은 점도도 값을 나타내었다. *B. firmus* NA-1 균주를 사용하는 경우에 MFS 첨가 농도가 증가할수록 점도도 값이 증가하는 경향을 보였다. 또한 비지청국장의 점질물은 비뉴우톤유체의 흐름특성을 나타내었고, 이는 MFS의 첨가가 청국장의 유용성분인 점질물의 생산에 기여하는 것으로 판단되었다. Oh 등(14)은 비지에 10%의 MFS를 첨가한 후 1%의 고초균 스타터를 접종하여 비지청국장을 제조하였을 때 점도도 1.32 Pa·s<sup>n</sup> 값을 나타낸 것과 비교할 때 실험에 사용된 수분함량이 비교적 높은 비지에 MFS를 20% 첨가하여 22시간 동안 발효시킨 비지청국장의 점도도 값이 1.95 Pa·s<sup>n</sup>로 높은 점도도 값을 보였다. 특히 발효시간이 26시간 증가되면서 점도도 값이 2.18 Pa·s<sup>n</sup>로 증가되었다. 이는 발효에 사용된 MFS 농도,

Table 1. Comparison of consistency index from the SCR fermented by *Bacillus* sp. (Unit: Pa·s<sup>n</sup>)

	MFS (%)	Time (hr)			
		14	18	22	26
NA-1 <sup>1)</sup>	0	0.18	0.14	0.08	0.06
	10	0.17	0.56	1.18	1.12
	15	0.77	1.0	1.21	1.65
	20	0.78	1.29	1.95	2.18
GT-D <sup>2)</sup>	0	0.004	0.01	0.01	0.01
	10	0.02	0.01	0.01	0.01
	15	0.06	0.03	0.04	0.06
	20	0.04	0.07	0.21	0.35

<sup>1)</sup>NA-1: *B. firmus* NA-1. <sup>2)</sup>GT-D: *B. subtilis* GT-D.

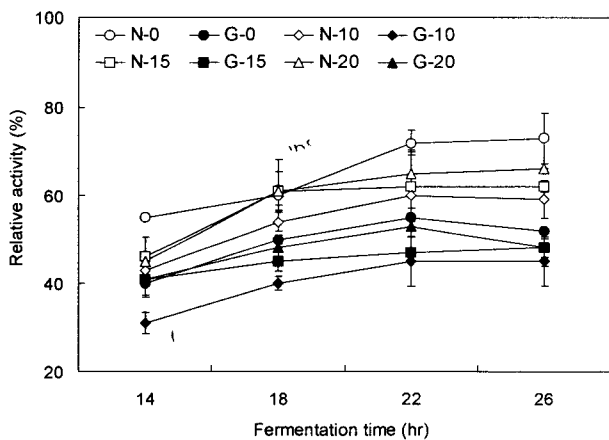


Fig. 2. Effect of MFS (micronized full-fat soy flour) on the fibrinolytic enzyme activity of fermented SCR (soybean curd residue) by *B. subtilis* GT-D and *B. firmus* NA-1. n=2. Samples are the same as in Fig. 1.

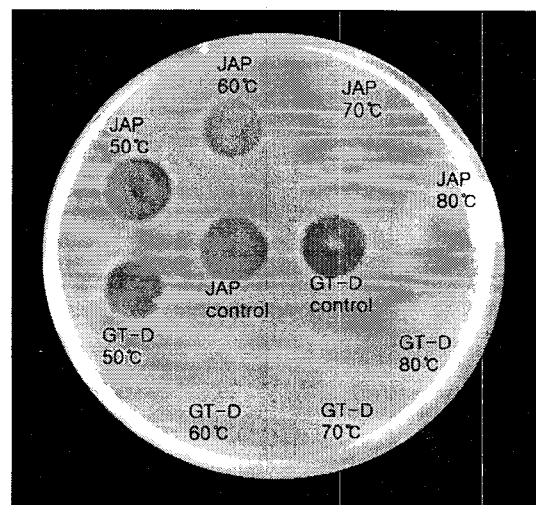


Fig. 3. Thermal stability of fibrinolytic enzymes from SCR fermented by *B. subtilis* GT-D and *B. firmus* NA-1. JAP: *B. firmus* NA-1, GT-D: *B. subtilis* GT-D.

Table 2. Functional properties of fermented SCR after freeze drying

	<i>B. firmus</i> NA-1		<i>B. subtilis</i> GT-D	
	N <sup>1)</sup>	F <sup>2)</sup>	N	F
Moisture content (%)	3.9	6.5	3.9	3.6
pH	6.4	6.5	7.5	7.1
$\alpha$ -Amylase activity (unit/g)	-	-	-	180±1
Protease activity (unit/g)	-	615±80	-	381±70
Tyrosine content (mg%)	321±29	1706±50	320±2	1903±28
Relative activity (%)	-	70	-	60
Crude protein (%)	ND	28	ND	28

<sup>1)</sup>N: non-fermented SCR. <sup>2)</sup>F: fermented SCR.

비지종류 및 발효시간에 따라 비지청국장의 점도에 차이가 나는 것으로 사료되었다.

고초균 *B. firmus* NA-1과 *B. subtilis* GT-D로 최적조건에서 발효된 비지청국장의 추출물을 열처리하지 않은 시료와 열처리한 각각의 시료의 혈전용해효소의 열안정성에 대한 결과는 Fig. 3에서 나타내고 있다. *B. firmus* NA-1 균주를 이용한 비지청국장의 효소활성은 60°C까지 확인할 수 있었으며, 열처리전과 비교하여 상대혈전분해효소 활성이 15% 감소를 보였다. 반면에 70°C에서 10분 동안 열처리하는 경우에 혈전용해효소활성이 완전히 소실되는 것으로 나타났다. *B. subtilis* GT-D 균주를 이용한 비지청국장에서는 50°C까지 혈전용해효소 활성이 12%의 감소를 보였으며, 60°C에서는 혈전용해효소의 활성이 완전히 소실되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 Seo 등(23)이 보고한 *B. firmus* NA-1 균주를 이용한 콩 grit 발효추출물에서의 혈전용해효소의 열안정성이 60°C까지 나타나는 것과 동일하였으며, Yoo 등(24)의 *B. subtilis*로부터 생산된 혈전용해효소는 65°C, Jang 등(25)이 보고한 혈전분해효소는 45°C까지는 매우 안정하였으나 50°C이상에서는 급격하게 활성이 감소하다가 60°C이상에서는 거의 활성을 상실하는 열안정성을 보였다. 이는 고초균의 종류에 따라 생산된 혈전용해효소의 열안정성과 최적 온도에 차이가 있음을 알 수 있었다.

동결건조 후 발효비지의 특성

최적 조건에서 고초균에 의해서 발효된 비지 청국장은 전형적인 청국장 냄새가 나며 또한 70%이상의 수분을 함유하고 있어 저장기간이 짧고 변질되기 쉬운 단점을 가지고 있다. 발효된 비지청국장의 저장성 향상 및 활용도를 높이기 위하여 비지청국장을 동결건조 후 분말화 하였다. 비지의 동결건조에 대한 연구는 보고된 바 없으며, 열풍에 의한 비지의 건조(5), Kim 등(6)은 건조방법에 따른 비지의 품질변화에서 천일건조, 송풍건조, 열풍건조에 대하여 보고한 바 있다. 비지 청국장의 열풍건조는 점질물로 인하여 열풍건조에 어려움이 있었으며, 또한 갈변화에 따른 품질저하가 있었다. 동결건조는 비지발효물의 전형적인 청국장 냄새를 줄일 수 있었으며, 70% 이상의 수분을 포함하던 발효물을 6%이하의 수분을 포함하는 비지청국장 분말로 만들 수 있었다. 동결건조 후 비지청국장의 활성은 Table 2에 나타내었다.

동결건조된 비지분말은 4~6%의 수분함량, pH 6.4~7.5 및 조단백질함량은 28%로 나타났다. 혈전용해효소 측정 결과 균주 접종 후 발효하지 않은 대조구의 경우에는 효소활성이 없었으나 고초균 발효한 시료의 경우 NA-1 균주는 70%로 GT-D 균주의 60%보다 10%이상 높은 활성을 나타냈다. Seo 등(23)은 *B. firmus* 균주에 의한 콩 grit 발효추출물을 이용하여 혈전용해효소의 동결건조 전과 후를 비교해 보았을 때 동결건조 후에도 동결건조 전과 후 비슷한 활성을 나타낸 것으로 보고하고 있다. 대조구로서 두 균주를 첨가한 후 비 발효된 시료는 tyrosine 함량이 320 mg%였으나 발효비지로부터는 NA-1 균주는 1706 mg%, GT-D 균주는 1902 mg%로 GT-D 균주가 200 mg% 정도 높게 나타났다. 또한 효소 활성의 경우 대조구에서는 모두 활성이 없었으며, 비지청국장의 protease 효소활성도는 615 unit/g으로 NA-1 균주가 GT-D 균주보다 약 200 unit/g 정도 높은 활성을 보였고,  $\alpha$ -amylase은 GT-D 균주에서만 180 unit/g의 활성을 확인할 수 있었다. 따라서 GT-D 균주에 의해서 발효된 비지청국장 분말은 건강기능식품중에서 효소식품군에 적합한 것으로 사료되었다. 고초균에 의해서 발효된 비지청국장은 동결건조 분말은 수분함량의 감소로 인하여 저장성 향상뿐만 아니라 풍미개선에 효과가 있었으며, 혈전용해효소나 protease 또는  $\alpha$ -amylase와 같은 가수분해효소의 활성이 유지됨을 확인할 수 있었다.

요 약

일본 청국장에서 분리된 *Bacillus firmus* NA-1과 재래 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* GT-D를 이용하여 전지활성 생 대두미세분말(MFS) 첨가 및 발효시간에 따른 비지 발효물의 혈전용해효소, 가수분해효소, 점질물, 펩타이드 생산 및 풍미개선 효과를 알아보았다. 84%의 수분함량을 포함하는 비지에 대두미세분말을 10, 15, 20% 첨가함으로써 78, 74, 70%로 수분함량을 감소시킬 수 있으며, 발효시간이 경과할수록 tyrosine 함량이 증가하였으며, *B. firmus* NA-1 균주보다는 *B. subtilis* GT-D 균주를 사용하는 경우에 높은 값을 보였다. 발효비지의 점조도는 *B. firmus* NA-1 균주를 이용한 발효물이 높은 값을 보였으며, 두 균주 모두 MFS 20%를 첨가한 후 26시간 발효한 발효물에서 2.18, 0.35 Pa·s<sup>1)</sup>

로 가장 높은 점조도 값을 나타내었다. 혈전용해효소 역시 *B. firmus* NA-1 균주를 이용한 비지청국장에서 10%이상의 높은 활성을 보였으며, 발효 22시간까지 증가하다가 26시간 부터는 큰 변화가 없거나 감소하는 경향을 보였다. 따라서 20%의 MFS를 첨가한 후 42°C에서 22시간 동안 발효하는 것이 발효취 생성을 최소화하는 조건이라 사료되었다. 비지청국장의 동결건조는 청국장 냄새 및 수분함량을 6%수준으로 줄일 수 있었으며, 혈전용해효소의 활성을 포함하였다. *B. firmus* NA-1 균주를 이용한 시료에서는 615 unit/g의 가장 높은 protease의 활성을 보였으며, *B. subtilis* GT-D 균주를 이용한 시료에서는 1903 mg%의 tyrosine 함량 및 180 unit/g의  $\alpha$ -amylase의 활성을 나타내었다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 지원 및 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전통 미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원과 산업자원부의 지역혁신 인력 양성 사업의 연구결과로 수행되었음.

### 문헌

- Ma CY, Liu WS, Kwok KC, Kwok F. 1997. Isolation and characterization of proteins from soymilk residue (okara). *Food Research International* 29: 799-805.
- Woo EY, Kim MJ, Shin WS, Lee KS. 2001. Production of protein hydrolyzate, that can be used as food additives, from Okara. *Korean J Food Sci Technol* 33: 769-773.
- Shurtliff W, Aoyagi A. 1995. *Tofu and Soymilk Production*. New Age Food Study Center, Lafayette, CA, USA.
- Kang KH, Lee DS. 1991. Studies on the Tofu-residue recycling. *Korean Sci Ind* 24: 31-35.
- Chung SS, Chang HN, Park MY. 1978. Dehydration of soybean residue by hot-air in conjunction with filter pressing. *Korean J Food Sci Technol* 10: 1-7.
- Kim DS, Seol NH, Kim HD. 1996. Change in quality of soybean curd residue as affected by different drying methods. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 453-459.
- Sohn JW, Kim WJ. 1985. Some quality changes in soybean curd by addition of dried soymilk residue. *Korean J Food Sci Technol* 24: 522-525.
- Lee GJ. 1984. Changes in carbohydrate composition during the fermentation of soybean curd residue with enzymes. *J Korean Biochem* 17: 44-50.
- Cho MK, Lee WJ. 1996. Preparation of high-fiber bread with soybean curd residue and Makkolli (rice wine) residue. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 632-636.
- Yamaguchi F, Ota Y, Hatanaka C. 1996. Extraction and purification of pectic polysaccharides from soybean okara and enzymatic analysis of their structures. *Carbohydrate Polymers* 30: 265-273.
- Beak J, Lee IS, Lee SP. 2002. Characterization and fermentation characteristics of lactic acid bacteria isolated from soybean curd residue (Biji). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 583-588.
- Lee MS, Kim KH, Lee GJ. 1987. Microbiological studies and biochemical changes in fermentation soybean curd residue during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 19: 520-527.
- Im SK, Yoo SM, Kim TY, Chun HK. 2004. Quality characteristics of bijijang in different fermentation conditions. *Korean J Food Sci Technol* 36: 448-455.
- Oh SM, Seo JH, Lee SP. 2005. Production of fibrinolytic enzyme and peptides from alkaline fermentation of soybean curd residue by *Bacillus firmus* NA-1. *J Food Sci Nutr* 34: 904-909.
- Seo JH, Lee SP. 2004. Optimization of the production of fibrinolytic enzyme from *Bacillus firmus* NA-1 in fermented soybeans. *J Food Sci Nutr* 9: 14-20.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of official agricultural chemists, Washington DC, USA.
- Astrup T, Müllertz S. 1952. The fibrin plate method for estimation fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys* 40: 346-351.
- Matsushita S, Iwami N, Nitta Y. 1966. Colorimetric estimation of amino acids and peptides with the Folin phenol reagent. *Anal Biochem* 16: 365-371.
- Sohn KH, Jo MN, Jeon HJ, Park J, Joo MS. 2001. Effect of bean water concentration and incubation time on amylase activity and physicochemical characteristics of Yukwa paste. *J Food Sci Technol* 33: 288-293.
- Park JM, Oh HI. 1995. Changes in microflora and enzyme activities of traditional Kochujang Meju during fermentation. *J Food Sci Technol* 27: 1158-1165.
- Kim HJ, Lee JJ, Cheigh MJ, Choi SY. 1998. Amylase, protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of Kimchi ingredients. *J Food Sci Technol* 30: 1333-1338.
- Genc M, Zorba M, Oza G. 2002. Determination of rheological properties of boza by using physical and sensory analysis. *J Food Engineering* 52: 95-98.
- Seo JH, Lee SP. 2004. Production of fibrinolytic enzyme from soybean grit fermented by *Bacillus firmus* NA-1. *J Medicinal Food* 7: 442-449.
- Yoo CK, Seo WS, Lee CS, Kang SM. 1998. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme excreted by *Bacillus subtilis* K-54 isolated from Chung Guk Jang. *J Appl Microbiol Biotech* 26: 507-514.
- Jang SA, Kim MH, Lee MS, Oh TK, Sohn CB. 2000. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus* sp. S19 from shrimp Jeot-Gal. *J Appl Microbiol Biotech* 28: 258-263.

(2005년 9월 30일 접수; 2005년 12월 27일 채택)