

大豆醱酵을 위한 *Bacillus subtilis* 菌株의 純粹分離에 關한 研究

許 允 行

서울保健專門大學 食品加工科

Studies on the Selection and the Identification of *Bacillus subtilis* for Fermentation of Soybean

Yun Haeng Hur

Department of Food Technology,
Seoul Health Junior College

Abstract

The study was carried out to investigate for the property of *Bacillus* strains, on the native growthed microflora in Korean native soybean paste, and *Bacillus* strains of the high enzyme producing, were selected and identified, from the microflora, that is, identified *Bacillus* strains beared resemblance to *B. subtilis*, on the colony, appearance was pellicle, surface's spreading, color creamy-thin browned, colony elevation flated, and edge lobated, the identified *B. subtilis* strain named for the *B. subtilis* SCF.

For the protease activity of *B. subtilis* SCF, according to the variation with pH, the pH stability was pH 7~8, and on the its protease activity, optimum temperature was 40°C, on the other hand, temperature of the highest stability of the protease was 50°C.

I. 緒 論

大豆는 蛋白質과 必須 amino acid가 高루 含有되어 있어 營養價値가 높아 蛋白質의 給源으로서 우리나라 뿐만 아니라 東洋各國의 重要한 食糧資源이다.

大豆 醱酵食品에 대한 研究로서 金等¹⁾은 變質을 이용한 Koji 醱酵에서 protease 力價

는 醱酵 48 時間까지가 最高였고, 李等²⁾은 醱酵大豆에서 分離된 細菌을 利用하였을 때 TCA, 可溶性 窒素, amino 態 窒素 등이 크게 增加한 것으로 報告하였다. 著者は 大豆醱酵에 對해서 報告한바 있는데^{3~5)} 大豆는 그 組織의 稠密성과 加熱處理에서도 完全하게 해결하지 못하는 非分解性 物質等 때문에 使用하는 微生物에 따라서 그의 分解度가 다르게 된다.^{5,6)}

그러므로 著者는 大豆醱酵의 效率을 높이고 醱酵大豆食品의 營養的 向上을 위하여 수집된 醬類에서 *Bacillus* sp. 의 菌株를 分離 同定の 實驗을 行하였기에 이에 報告한다.

II. 材料 및 方法

1. 實驗材料

서울市內에서 수집한 醬類(된장) 20 種을 각각 3%씩으로 한 것을 水浸(14°C/24 時間), 加壓蒸熱殺菌(121°C/30 分)하여, 40°C 로 冷却한 大豆에 添加한 다음 恒溫器에서 醱酵(37°C/48 時間)시킨 것을 菌株分離用 材料로 하였다.

2. 菌株의 分離

菌株分離用 試料에서 주로 粘質物 部位를 채취하여 dillution method 로 희석한 다음 $10^{-2} \sim 10^{-6}$ (viable cell count)의 희석액 1ml를 Table 1 과 같이 組成된 培地에서 常法(dillution pour plate method)으로 培養하였다. 培地에서 투명하게 나타난 Colony 를 微生物 크기 測定法으로 值終크기를 比較하여 巨大性인 것들을 分離하였다. 分離된 菌株를 Table 2 와 같이 組成된 培地에서 진탕배양(37°C/48 時間)하고, 이 培養液을 원심분리시켜 그 上澄液을 組酵素液으로 하였다.^{2,7)}

3. 蛋白質 分解酵素 活性的 測定

Protease 活性的 測定은 Folin 法⁸⁾에 따라 組酵素液 1ml를 sodium phosphate buffer 試液(pH 7.2)과 混化시킨 다음 0.6%牛乳 Casein 液 5ml를 加하고, 이 混合液을 water bath에서 反應(37°C, 20 分) 시켰다. 그리고 沈澱劑인 0.4 M trichloro acetic acid (TCA) 試液 5ml를 加하여 反應을 정지

Table 1. The composition of nutrient broth agar medium for isolation of *Bacillus* sp.

Beef extract	10g
Peptone	10g
Agar	20g
Solution of extracted powder in boiled Soybean (4.3% W/V extraction)	11
Final pH	7.2

Table 2. The composition of liquid broth medium for aerobic culture of *Bacillus* sp.

Beef extract	10g
Peptone	10g
Sodium chloride	5g
Tap water	11
Final pH	7.2

시킨 다음 35°C에서 30 時間 沈澱을 完結시켜 濾過(Wat. NO. 2)하였다.

이 濾液中 2ml를 取하여 0.5 M Na_2CO_3 試液 5ml와 Folin phenol 試液 1ml를 加하고 發色(35°C, 20 分)시켜 室溫에서 冷却後 Spectrophotometer (Hitachi spectrometer, M-100-16), 660 nm에서 optical density (O.D)를 測定하였다. 이 測定값을 tyrosine standavd curve를 利用하여 換算(Tyrosine, μg 數)한 것과 다시 relative activity (%)로 한 것으로 나타내었다.

4. 菌株의 選別 및 同定

1) 第1次 選別

分離된 모든 菌株는 Table 2로 組成된 培地에서 培養하였고, Bergey's manual⁹⁾에 따라 培養特性을 갖는 優秀菌株만을 選別하였다.

2) 第2次 選別

1次 選拔된 菌株들을 Table 3 및 Table 4 와 같은 Glucose 培地를 사용하여 water

Table 3. The composition of glucose medium-a for morphological characteristics

Glucose	5.0 g
(Added after sterilization)	
Ammonium phosphate	1.0 g
Potassium chloride	0.2 g
Magnesium sulfate	0.2 g
Yeast extract	0.2 g
Bornecresol purple	0.008 g
Tap awater	1.000 ml
Final pH	7.2

Table 4. The composition of glucose medium-b for morphological characteristics

Glucose	10.0 g
Peptone	5.0 g
Yeast extract	3.0 g
Sodium Chloride	5.0 g
Bornecresol purple	0.008 g
Top Water	1.000 ml
Final pH	7.0

bath에서 培養(37°C, 90時間)하고, 酸, Gas 生成 등의 生化學的 實驗과 Folin 法에 따라 protease 活性을 測定한 後 活性이 가장 強力한 菌株만을 選擇하였다.

3) 最終 選別 및 同定

第 2 次에서 選別된 菌株을 增殖培養하여 이들 菌株들을 單一菌으로 하여 常法에 따라 大豆에 移植한 後 이들을 醱酵(40°C, 48 hrs)시키면서 芳香性, 增殖狀態, 粘質物의 生成能力 등이 優秀한 것을 最終 選別하였다. 選別된 菌株의 Protease 活性, 培養的, 形態的, 生化學的 特性과 顯微鏡 觀察에 의하여 *Bacillus subtilis* 近緣인 *B. subtilis* strain 으로 同定되었다.

(1) *Subtilis* Strain 의 pH 變化에 따른 Protease 活性度

分離 同定한 菌株의 酵素의 最適 pH를 結

定하기 위하여 pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9로 調節한 각각의 緩衝溶液에 基質溶液을 녹이고 여기에 抽出酵素를 加하였다. 이것을 恒溫器에서 反應시켜(40°C, 30分), protease 活性을 測定하였고, pH 安定性을 보기 위해서 pH 2.0~10.0으로 調節한 基質溶液의 酵素反應液을 30°C에서 24時間 維持시킨 後 남아 있는 protease 活性을 測定하였다.

(2) *Subtilis* Strain 의 溫度 變化에 따른 protease 活性度

分離 同定된 菌株의 酵素의 最適溫度를 結定하기 위하여 基質의 酵素反應液을 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90°C로 하여 30分 동안 처리하고, protease 活性을 測定하였다. 溫度의 安定性은 酵素反應液을 最適 pH와 溫度 20~90°C에서 30分 동안 反應시켰을 때 protease 活性을 測定하여 殘存하는 活性값으로 나타냈다.

III. 結果 및 考察

1. 菌株의 選定 및 同定

dillution pour plate 法에 따라 分離한 菌株의 培養的, 形態的, 生化學的, 芳香의 特性을 比較 實驗한 結果는 Table 5, 6, 7, 8 과 Fig. 1 과 같다.

Table에 나타난 바와 같이 菌은 대부분이 rod 型에서 Cylindrical 모양이었고, E 4, E 5, E 6, E 7, E 9, E 10, E 11, E 13의 菌株에서 巨大性을 보였으며 胞子는 모두 生成되었고, E 5, E 6, E 7, E 15, E 18, E 20 등에서 그 크기가 優秀하게 나타났다. 이들 菌株 중에서 典型的인 *Bacillus subtilis* 近緣에 屬하는 indol, H₂S의 陰性反應, biotin 要求性, Gram 染色 陽性反應에 모두 適合한 菌株들은 E 2, E 4, E 6, E 7, E 11, E 13, E 18 이었다. 이들 菌株들은 Table 3, 4 로 組成된 培地로부터 培養에 있어서 酸 生成과 Gas非生成의

Table 5. Differential characteristics of the isolated bacteria

	vegetative cell		Spore		Production		Relation to Biotin	Gram staining
	shape	size (μ)	presence	size (μ)	Indol	H ₂ S		
E1	R.C	0.7~1.0× 1.5~3.0	+	0.8~0.9× 1.0~1.2	-	+	+	+
E2	R	0.9~1.1× 2.0~3.0	+	1.0×1.0	-	-	+	+
E3	R	0.9~1.2× 2.5~3.0	+	0.9× 1.0~1.3	-	+	+	+
E4	C	0.9~1.0× 2.0~4.0	+	0.9× 1.0~1.2	-	-	+	+
E5	R	1.0~1.2× 3.0~6.0	+	0.9× 1.0~1.4	+	+	-	+
E5	R.C	1.0~1.2× 2.5~3.5	+	1.2× 1.0~1.5	-	-	+	+
E7	R.C	1.0~1.2× 2.0~4.0	+	1.0× 1.3~1.5	-	-	+	+
E8	C	1.4~1.6× 2.5~3.5	+	0.9× 1.0~1.1	+	-	-	+
E9	C	0.8~1.3× 2.0~4.0	+	0.8× 1.1	+	+	-	+
E10	C	1.0~1.4× 2.0~4.5	+	0.9× 1.0~1.2	-	-	-	+
E11	R.C	1.0~1.3× 2.0~4.0	+	0.9× 1.0~1.3	-	-	+	+
E12	R	0.8~0.9× 1.5~2.5	+	0.9× 1.0~1.1	-	+	+	+
E13	R.C	0.8~1.0× 2.0~4.0	+	1.1× 1.2~1.3	-	-	+	+
E14	C	0.9~1.1× 2.0~3.0	+	1.2× 1.0~1.3	+	-	-	+
E15	R	0.7~0.9× 2.0~3.0	+	1.1× 1.4~1.5	-	-	-	+
E16	R	0.9~1.0× 2.0~3.5	+	1.2×1.0	+	-	+	+
E17	CR	0.9~1.2× 2.5~3.5	+	0.9×1.0	-	+	-	+
E18	CR	0.9~1.0× 2.0~3.0	+	0.8× 1.2~1.5	-	-	+	+
E19	C	0.9~1.0× 2.0~3.5	+	0.7× 1.1~1.3	+	-	-	+
E20	R	0.8~1.0× 2.0~3.5	+	0.8× 1.2~1.4	+	+	-	+

R : Rod C Cylindrical or elliptical

Table 6. The characteristics of the selected *Bacillus* strain

strains	Vegetative cell shape	products of action on Glucose		protease activity
		Acid ^a	Gas ^b	
E2	R	+	-	125.0
E4	C	-	+	81.5
E6	R.C	+	-	192.5
E7	R.C	+	-	131.0
E11	R.C	-	-	107.5
E13	R.C	+	+	64.0
E18	C.R	+	-	45.0

R : Rod C : Cylindrical

Table 7. Culture characteristics of selected *Bacillus* strain on steamed soybean

	Growth	Thread	Flavor
E ₂	+++	+++	Weak fermenting soybean flavor.
E ₄	++	++	Off flavor.
E ₆	+++	+++	Fermenting soybean-like.
E ₇	++	+++	Ammonia-like
E ₁₁	+++	++	Off flavor
E ₁₃	++	++	Strong ammonia.
E ₁₈	++	++	Fermenting soybean-like.

Table 8. Culturing characteristics of the selected *Bacillus subtilis* SCF

<i>Bacillus</i> sp. colony	
Appearance	Pellicle
Surface	Spreading
Color	Creamy-thin brown
Colong elevation	Flat
Edge	Lobate

適合性 實驗, protease 活性實驗의 結果는 Table 6, Fig. 1과 같이 나타났다. 즉, protease 活性이 가장 큰 菌株는 E 6 였고, E 7, E 2, E 11의 順으로 낮게 나타났다. 한편, E 6 菌株의 protease 活性이 培養 60時間에서

活性의 最大를 보인 반면, 對照區인 *Bacillus natto* 는 72 時間에서 最大 活性을 나타낸 점으로 보아 分離菌株인 E 6 가 醱酵時間을 短縮시키는 長點을 갖는 것으로 나타났다.

또 酸과 Gas 發生實驗에 適合한 菌은 E 2, E 6, E 7, E 18로 나타났다. 또한 이들 7개의 選拔된 菌株들에 對하여 大豆醱酵에 의한 芳香實驗을 한 結果는 Table 6에 나타낸 바와 같다.

E 4, E 11은 芳香性이 좋지 않았고, E 7 과 E 13은 암모니아성인데 반하여 E 2는 약한 醱酵大豆의 芳香性을 보였으며, E 6와 E 18은 典型的인 醱酵大豆의 芳香을 나타냈다.

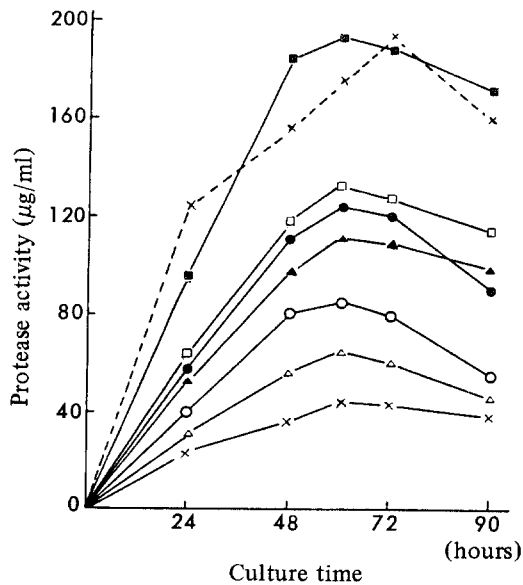


Fig. 1. Changes in protease activity of *Bacillus* sp.

- : protease activity, *Bacillus* sp. E2.
- : protease activity *Bacillus* E4.
- : protease activity *Bacillus* E6.
- : protease activity *Bacillus* E7.
- △-△ : protease activity *Bacillus* E11.
- △-△ : protease activity *Bacillus* E13.
- X-X : protease activity *Bacillus* E18.
- X...X : *Bacillus natto* (control).

이 E6菌株는 Table 7에서와 같이 顯微鏡의 觀察에서 Colong가 淡褐色에서 옅은 褐色이며 편평하고 粉狀組織과 같은 培養性이어서 典型的인 *Bacillus subtilis* strain 近緣으로 同定되었고, *Bacillus subtilis* SCF의 記號를 붙였다.

2. PH 變化에 따른 *B. Subtilis* SCF Protease의 活性度

Protease의 pH 變化에 따른 活性度는 Fig. 2, 3에 나타난 바와 같다. Fig. 2에서와 같이 pH의 增加와 더불어 活性度도 增加하다가 pH의 7~8에서 活性度가 가장 높게 나타났다가 다시 緩慢하게 減少를 보였다. 따

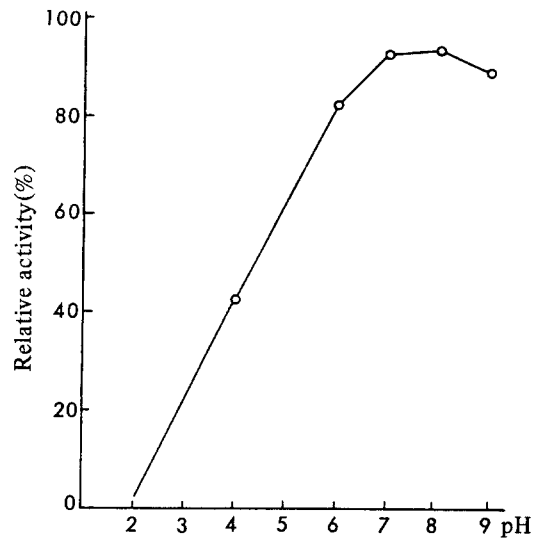


Fig. 2. Optimum pH. of crude protease from isolated *Bacillus Subtilis* SCF.

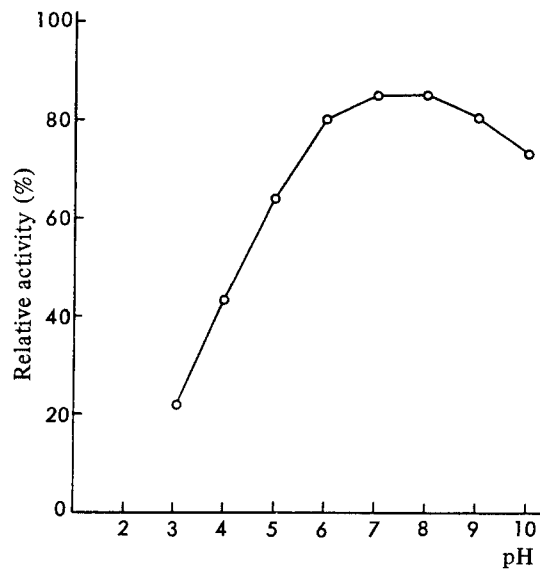


Fig. 3. pH stability of crude protease from isolated *Bacillus Subtilis* SCF.

라서 protease의 最適 pH는 7~8 범위에 해당하는 것으로 사료된다. 이 값은 바로 李等²⁾이 分離한 *B. natto*와 類似한 研究結果였다.

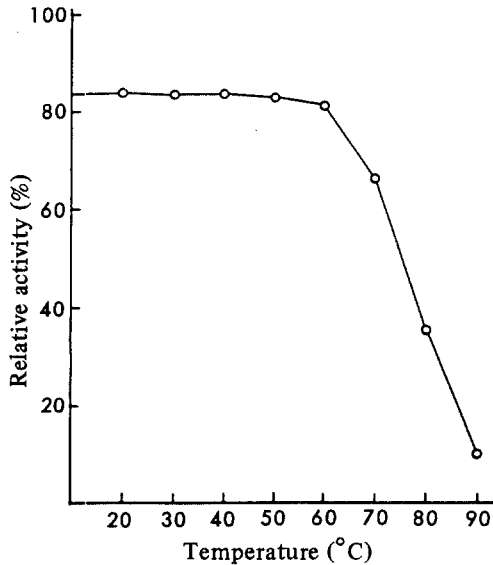


Fig. 5. Temperature stability of crude protease from isolated *Bacillus subtilis* SCF.

또한 pH의 안정성은 Fig. 3에 나타난 바와 같이 pH가 상승함에 따라 활성도도 증가하다가 pH 7~8 영역에서 최대의 활성도를 보였다가 pH 8 이상에서는緩慢한減少를 보였다. 이것은 pH 7~8에서菌의增殖이 가장活發하였고, pH 8 이상에서는酵素活性은低下하기 때문인 것으로 생각된다.^{10,11)} 따라서 protease 안정성은 alkali 性인 7~8 領域에 해당되는 것으로 사료된다.

3. 溫度變化에 따른 *B. Subtillis* SCF Protease의 活性度

Protease의 溫度에 따른 活性度의 變化를 Fig. 4에 나타내었다. 그림에서 알 수 있는 바와 같이 溫度가 上昇함에 따라 酵素의 活性도 急히 上昇하다가 40°C에서 가장 높은 活性을 보였다. 다시 40°C에서부터緩慢한減少率을 보인後 60°C에서 부터는 急히 低下하였다. 따라서 protease의 最適溫度는 40°C 前後가 되는 것으로 생각된다. 또

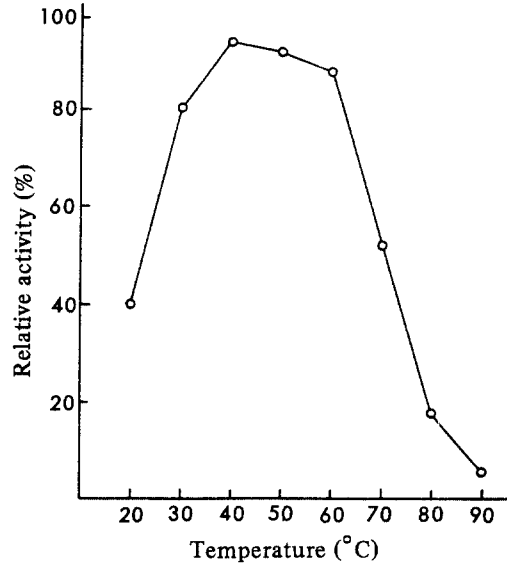


Fig. 4. Optimum temperature of crude protease from isolated *Bacillus subtilis* SCF.

한, Fig. 5에 있어서는 溫度가 50°C까지 上昇함에 따라서 酵素의 活性이 安定性을 보이다가, 50°C에서 60°C 사이에서는 極히 微量減少率을 보였다. 그리고 60°C 이상에서는 酵素活性이 크게 떨어졌다. 따라서 50°C까지가 protease 最高의 安定性 溫度에 該當하는 것으로 사료된다. 그러므로 이 酵素도 60°C 이상에서는 다른 일반 酵素와 유사하게 酵素 蛋白質의 熱變性에 의한 沮害가 發生하여 酵素活性이 떨어지는 것으로 보여진다.^{2,10)}

IV. 結 論

醬類 20種에서 自然棲息한 microflora에서 微生物(*Bacillus* strain)의 性質을 調査하고 이들에게서 蛋白質 分解酵素의 活性이 강한 優秀菌株을 選定, 同定하였다.

이 細菌은 *B. subtilis* 近緣이었으며 Colony는 pellicle로 나타났고, 色은 creamy-

hin brown, spreading(surface), flate(colony elevation), 그리고 가장자리는 lobate였고 이分離된 菌을 *B. subtilis* SCF로 記號를 붙였다. 分離菌株인 *B. subtilis* SCF의 pH變化에 따른 protease 活性度에서 pH 安定性은 pH 7~8이었다.

또 이 菌의 溫度變化에 따른 protease 活性度에서 最適溫度는 40℃ 前後였고 50℃가 protease의 最高安定性에 해당하는 온도였다.

參 考 文 獻

1. 金敬子, 柳明基, 金尙淳, 韓國食品科學會誌, 14(4), 301, 1982.
2. 李啓瑚, 李孝枝, 鄭文教, 韓國農化學會誌, 14(3), 191, 1971.
3. 許允行, 李尙建, 徐正淑, 서울保健專門大學論文集, 5, 19, 1985.
4. 李尙建, 許允行, 徐正淑, 서울保健專門大學論文集, 4, 33, 1984.
5. 徐正淑, 柳明基, 許允行, 韓國食品科學會誌, 15(4), 385, 1983.
6. Sang yeol Lee, young Kyoo Min, and Kwan Hwa Park, Kor. J. Food Sci. Tech., 15(2), 101, 1983.
7. 李啓瑚, 李妙淑, 朴性五, 韓國農化學會誌, 19(2), 82, 1976.
8. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., Methods in Enzymology, Vol. III. Academy press, p. 469, 1957.
9. R. E. Buchanan and N.E. Gibbons, Bergy's manual of Determinative Bacteriology 8th Edition, p. 531, Williams and Wilkins. Co. Blatimore Md. 1974.
10. 李甲湘, 鄭東孝, 韓國食品科學會誌, 5(3), 163, 1973.
11. 성낙주, 지영애, 정승용, 韓國食品科學會誌, 13(3), 275, 1984.