

두유 응고효소 생산균의 분리 및 동정

하덕모*·이철우

동국대학교 공과대학 식품공학과

Isolation and Identification of Bacteria Producing a Soybean Milk Clotting Enzyme

Ha, Duk-Mo* and Chul-Woo Lee

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

Seventeen bacterial strains producing an extracellular soybean milk clotting enzyme were isolated from 150 soil samples, and identified as *Bacillus cereus*(8 strains), *Bacillus pumilus*(8 strains) and *Bacillus licheniformis* (1 strain).

Among them, *Bacillus pumilus* strain 118 and *Bacillus licheniformis* strain 192 showed relatively high soybean milk clotting activity. The coagulability of enzymes from these strains decreased as the pH of soybean milk was increased from 6.0 to 7.0. The optimum temperature for soybean milk clotting activity was 65°C.

대두는 옛부터 두부, 된장, 간장 등으로 가공되어 식용으로 하여 왔으며 근년에는 대두의 높은 영양가와 유화, 기포 및 수화작용 등의 여러가지 특성이 인식되어 대두의 가공, 이용의 방법이 다양하게 발전되고 있다. 특히 각종 두유제품은 널리 보급되고 있으며 육제품 및 수산제품의 첨가물로도 이용되기도 하고(1-8) 두유를 이용하여 치즈와 유사한 새로운 식품을 만들기 위한 시도도 이루어지고 있다(9-12).

두유를 이용한 치즈 유사제품의 제조에 있어서 curd 형성을 위해서는 응고제로서 두부 제조시와 같이 무기염류(Ca 염, Mg 염) 또는 δ -D-gluconic lactone을 사용하는 방법 이외에 유기산(초산, 젖산)을 사용하거나 젖산발효에 의해서 응고시키는 방법 등이 알려져 있으나, 이들 방법중 형성되는 curd의 조직으로 보아서 *Streptococcus thermophilus*, *Str. lactis* 등에 의한 젖산발효의 방법이 적합하다고 하며(11, 13) 이들 젖산균 이외에 *Saccharomyces fragilis*를 혼합배양 하거나(14, 15) 청주효모, 포도주효모, 빵효모 등으로 이용되는 *S. cerevisiae* 균주를 단독으로 사용하여 발효 응고시키는 방법(16)도 보고되고 있다.

근년에 이르러 두유가 ficin, bromelain 등의 단백질 분해효소에 의해서 응고된다는 것이 알려지게 되고(17-19) 福家 등(20)은 최초로 두유 응고를 위해서 단백질 분해효소를 이용하였으며 발효에 의해서 curd를 형성할 때에 ficin 또는 bromelain을 첨가함으로써 응고시간이 단축되고 질도 좋은 curd를 형성하게 된다고 보고하고 있다. 또 이와 같은 두유 응고효소가 미생물에 의해서 생산된다는 것이 근년에 Park 등(21)에 의해서 최초로 보고되었으며 이어서 Murata 등(22)은 현재 공업적으로 생산되고 있는 각종 protease 제재중에도 두유를 응고하는 종류가 있다는 것을 보고하고 있다.

두유로부터의 치즈 유사식품 등의 제조에 있어서 두유를 응고시키기 위해서는 치즈 제조시와 같이 응고효소를 이용하는 것이 curd의 조직이 좋을 뿐 아니라 제품에 신맛이 없다는 점에서 적합할 것으로 생각되나 두유 응고효소에 관한 연구는 미생물 효소에 의한 응고현상을 확인하는 단계에 있고 아직 두유 응고효소 생산균주를 동정하였다는 보고도 찾아볼 수 없다. 저자들은 국내 토양으로부터 두유 응고효소 생산균주를 분리할 수 있었으며 이들 분리균주를 동정하였기에 이에 대해서 보고하고자 한다.

Key words: Soymilk clotting enzyme, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*

*Corresponding author

재료 및 방법

두유

미국산 대두를 침지, 마쇄한 다음 약 90°C에 가열, 여과하여 최종 가수량 8~10 배의 두유를 조제하여 다음 실험에 사용하였다.

두유 응고효소 생산균주의 분리

전국 각 지역의 토양시료로부터 두유 응고효소 생산균주를 분리하였다. 분리방법은 Park 등(21)의 방법에 준하였다.

두유 응고효소 생산균주 분리를 위한 1차 선발에 있어서는 살균수로 적당히 희석한 토양시료로부터 Table 1의 A 배지를 이용하여 순수분리하였다. 30°C에서 3일간 배양하여 나타난 colony를 B 배지에 이식하여 5°C에 보존하면서 다음 실험에 사용하였다. 1차 선발에 의해서 150 개의 토양시료로부터 508 균주가 분리되었다.

2차 선발에 있어서는 1M KH₂PO₄ 완충용액(pH 4.5)으로 pH 6.0에 조절한 두유 10ml를 시험관에 분주하여 120°C에서 15분간 살균한 다음 분리균주를 1백금이 접종하여 35°C에서 2일간 배양하고 배양의 결과 두유를 응고시키게 되는 균주를 선발하였다. 2차 선발에 의해서 162 균주가 선발되었다.

3차 선발에 있어서는 배양액의 두유 응고효소 활성으로 효소생산 균주를 최종적으로 확인하였다. Table 1의 C 배지 25ml를 100ml용 플라스크에 분주하여 120°C에서 15분간 살균한 다음 앞에서 선발된 균주 1백금을 접종하여 35°C에서 3일간 진탕배양(120 rpm) 하였다. 배양액은 11,000×g로 20분간 원심분리하고 얻은 상정액을 효소액으로 사용

하여 두유 응고활성을 측정하였다. 두유를 응고시키게 되는 배양액은 응고현상이 효소작용에 의한 것임을 확인하기 위하여 효소액을 100°C에서 10분간 가열하여 활성의 실활여부를 관찰하였다. 3차 선발의 결과 17 균주의 두유 응고효소 생산균이 선발되었다.

두유 응고효소 활성의 측정

두유를 1M KH₂PO₄ 완충용액(pH 4.5)으로 pH 6.1에 조절하고 그 5ml에 시험효소액을 첨가하여 Arima 등(23)의 방법에 준하여 65°C에서 효소활성을 측정하였다. 5ml의 두유를 1분간에 응고시키는 효소활성을 1단위로 나타내었다.

두유 응고효소 활성에 대한 pH 및 온도의 영향을 시험하기 위한 효소액으로서는 배양액의 상정액에 황산암모늄을 가하여 80%로 포화시켜 얻은 침전을 소량의 물에 용해하여 20배량의 0.04M KH₂PO₄ 완충용액(pH 6.1)으로 투석한 것을 사용하였다.

두유 응고효소 생산균주의 동정

두유 응고효소 생산균으로 확인한 균주는 Bergy's manual of systematic bacteriology (24), Bergy's manual of determinative bacteriology 제 8판 (25) 및 기타 동정서(26-29)에 따라서 형태학적 및 생리학적 여러 특징을 조사하여 동정하였다.

결과 및 고찰

두유 응고효소 생산균주의 분리

150 개의 토양시료로부터 두유 응고효소 생산균주로서 027, 032, 088, 101, 102, 114, 118, 119, 138, 151, 188, 192, 196, 283, 286, 335 및 404 균주의 17 균주를 분리하였다. 이들 균주 배양액의 두유 응고효소 활

Table 1. Medium composition

Components (g/liter)	A	B	C
Soybean milk	50.0		50.0
Dextrose	2.0	10.0	2.0
Peptone	2.0	2.0	2.0
Yeast extract	2.0	1.0	2.0
Beef extract		1.0	
KH ₂ PO ₄	2.0	10.0	5.0
Agar	13.0	15.0	
pH	6.1	5.6	6.1

A: Composition of medium for 1st screening.

B: Composition of medium for preservation.

C: Composition of medium for enzyme production.

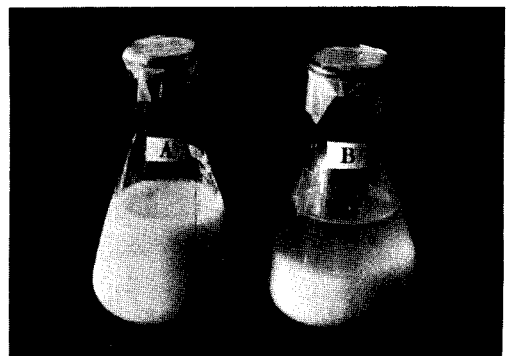


Fig. 1. Coagulation of soybean milk by bacterial enzyme. A, untreated soybean milk; B, soybean milk treated with the culture filtrate of isolate.

성은 Table 2와 같으며 192 및 118 균주는 각각 0.14 및 0.13 unit/ml의 가장 높은 효소활성을 나타내었다.

균주의 동정

두유 응고효소 생산균주의 형태학적, 배양학적 및

Table 2. Soybean milk clotting enzyme production by the isolates.

Strain No.	Clotting activity* (U/ml)	Strain No.	Clotting activity (U/ml)
027	0.04	151	0.04
032	0.03	188	0.04
088	0.05	192	0.14
101	0.05	196	0.04
102	0.03	283	0.05
114	0.07	286	0.04
118	0.13	335	0.07
119	0.07	404	0.04
138	0.04		

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

생리학적 성질은 Table 3 및 4와 같다. 이들 모든 균주는 Gram 양성, catalase 양성의 직상 간균으로 운동성이며 세포중앙에 내생포자를 형성하여 *Bacillus* 속의 특징을 나타내었다.

Bacillus 속의 이들 균주중 027 균주는 anaerobic agar에서 생육하며 전분 및 casein을 분해하고 arabinose, xylose 및 mannitol로부터 산을 생성하지 않았다. 또, 질산염을 환원하고 tyrosine을 분해하며 phenylalanine의 아미노기 이탈반응을 볼 수 없는 등 *B. cereus*의 기체와 모두 일치하였다. 032, 102, 038, 151, 196 및 283의 6균주는 그 성질이 서로 같고 이들 균주는 phenylalanine의 아미노기 이탈반응이 양성이며 404 균주는 질산염을 환원하지 않는 점이 027 균주와 다르나 그 이외의 성질은 기체와 모두 동일하여 이들 8균주를 *B. cereus*로 동정하였다.

088, 101, 114 및 335 균주의 4균주는 그 성질이 같았다. 이들 균주는 anaerobic agar에서 생육하지 않으며 전분을 분해하지 않고 또한 질산염을 환원하지 않으며 colony는 얼은 황색을 띠게 되는 등 *B. pumilus*에 대한 기체와 잘 일치하였다. 118, 119, 188 및 286의 4균주도 그 성질이 서로 같았고 이들 균주는 propionate를 이용하는 점이 앞의 균주들과 다르나 그 이외의 성질이 동일하여 이들 8균주를

Table 3. Morphological and cultural characteristics of bacterial strains producing a soybean milk clotting enzyme.

Characteristics	Species and strain No.					
	<i>Bacillus cereus</i> 027	<i>Bacillus cereus</i> 032, 102, 138, 151, 196, 283	<i>Bacillus cereus</i> 404	<i>Bacillus pumilus</i> 088, 101, 114, 335	<i>Bacillus pumilus</i> 118, 119, 188, 286	<i>Bacillus licheniformis</i> 192
Cell form	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Size (μm)	3-5×1.0-1.2	3-5×1.0-1.2	3-5×1.0-1.2	2-3×0.6-0.8	2-3×0.6-0.8	1.5-3×0.6-0.8
Gram reaction	+	+	+	+	+	+
Spore shape	ellipsoidal	ellipsoidal	ellipsoidal	ellipsoidal	ellipsoidal	ellipsoidal
Spore position	central	central	central	central	central	central
Motility	+	+	+	+	+	+
Growth in anaerobic agar	+	+	+	-	-	+
Growth on 1% glucose nutrient agar	rough, opaque	rough, opaque	rough, opaque	smooth transparent slightly yellowish	smooth transparent slightly yellowish	rough, opaque
Growth in 7% NaCl	+	+	+	+	+	+
Temperature for growth	up to 40°C	up to 40°C	up to 40°C	up to 50°C	up to 50°C	up to 55°C

Table 4. Physiological characteristics of bacterial strains producing a soybean milk clotting enzyme.

Characteristics	Species and strain No.					
	<i>Bacillus cereus</i> 027	<i>Bacillus cereus</i> 032, 102, 138, 151, 196, 283	<i>Bacillus cereus</i> 404	<i>Bacillus pumilus</i> 088, 101, 114, 335	<i>Bacillus pumilus</i> 118, 119, 188, 286	<i>Bacillus licheniformis</i> 192
Catalase	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer test	+	+	+	+	+	+
pH in V-P broth						
<6	+	+	+	+	+	+
>7	-	-	-	-	-	-
Acid from						
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	-	+	+	+
D-Xylose	-	-	-	+	+	+
D-Mannitol	-	-	-	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of						
Casein	+	+	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+	+	+
Starch	+	+	+	-	-	+
Utilization of						
Citrate	+	+	+	+	+	+
Propionate	+	+	+	-	+	+
Degradation of tyrosine	+	+	+	-	-	-
Deamination of phenylalanine	-	+	+	-	-	-
Egg-yolk lecithinase	+	+	+	-	-	-
Nitrate reduced to nitrite	+	+	-	-	-	+
Formation of indol	-	-	-	-	-	-
Reaction in litmus milk:						
Reduction	-	-	-	-	-	-
Peptonization	+	+	+	+	+	+
Acid curd	-	-	-	-	-	-
Alkaline reaction	-	-	-	-	-	-
Arginine dehydrolase	+	+	+	-	-	-

B. pumilus 로 동정하였다.

192 균주는 anaerobic agar 에서 생육하며 casein 및 전분을 분해하고 질산염을 환원하였다. 또 55°C 까지 생육하며 arginine dehydrolase 양성으로 여러

성질이 *B. licheniformis* 에 대한 기재와 모두 일치하여 이 균종으로 동정하였다.

이상과 같이 두유 응고효소 생산균으로 분리된 17 균주는 *B. cereus* (8 균주), *B. pumilus* (8 균주) 및

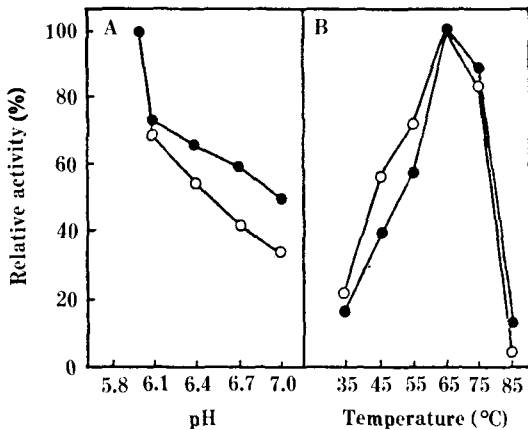


Fig. 2. Effects of pH(A) and temperature(B) on activity of the soybean milk clotting enzyme from isolates. ○-○, *Bacillus pumilus* strain 118; ●-●, *Bacillus licheniformis* strain 192.

B. licheniformis (1 균주)로 동정하였다.

두유 응고효소 활성에 대한 pH 및 온도의 영향

분리된 두유 응고효소 생산균주중 활성이 비교적 높은 *B. pumilus* 118 및 *B. licheniformis* 192의 두 균주가 생산하는 효소활성에 대한 pH 및 온도의 영향은 Fig. 2, A 및 B와 같다.

두유는 pH 5.9 이하에서는 효소의 첨가없이도 두유가 응고하게 되므로 효소작용에 대한 pH의 영향을 알 수 없으나 두유를 pH 6.0, 6.1, 6.4, 6.7 및 7.0의 각 단계로 pH를 조절하여 65°C에서 30분간 반응시켰을 때 두 균주가 생산하는 효소활성은 모두 pH가 높아질수록 저하되는 경향을 나타내었고 이와 같은 경향은 Park 등(21)이 두유 응고효소 생산균주로 분리, 보고한 K-295G-7 균주가 생산하는 효소에 대한 결과와 같다.

두유(pH 6.1)에 두 균주의 효소액을 각각 가하여 45, 55, 65 및 75°C의 각 온도에서 30분간 반응시켜 효소활성을 비교한 결과 두 균주의 것이 모두 65°C에 있어서 그 활성이 가장 높았으며 Park 등(21)은 K-295G-7 균주가 생산하는 효소의 최적온도를 75°C로 보고하고 있으나 이와 같은 차이는 Murata 등(22)이 보고한 바와 같이 생장미생물의 종류에 따라 두유 응고효소의 최적온도가 다르기 때문인 것으로 추측된다.

요 약

150 개의 토양시료로부터 두유 응고효소를 생산하

는 세균 17 균주를 분리하였으며 이들 균주는 *Bacillus cereus* (8 균주), *Bacillus pumilus* (8 균주) 및 *Bacillus licheniformis* (1 균주)로 동정하였다. 분리된 두유 응고효소 생산균주중 *Bacillus pumilus* 118 및 *Bacillus licheniformis* 192 균주가 비교적 높은 두유응고효소 활성을 나타내었고 이들 두 균주의 효소활성은 pH 6.0~7.0의 범위에 있어서 pH 7.0에 가까울수록 저하되며 그 최적온도는 65°C였다.

사 사

본 연구는 1988년도 한국과학재단의 연구비 지원에 의해서 수행되었으며 동 재단에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Koto, A. and S. Nakai: *Biochim. Biophys. Acta*, **624**, 13 (1980).
2. Nakai, S., L. Ho, N. Helbig, A. Kato and M.A. Tung: *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, **13**, 23 (1980).
3. Kato, A., N. Tsutsui, N. Matsudomi, K. Kobayashi and S. Nakai: *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2775 (1981).
4. 古川忠康, 太田惠教: *日本食品工業學會誌*, **28**, 451 (1981).
5. Voutsinas, L.P., E. Cheung and S. Nakai: *J. Food Sci.*, **48**, 26 (1978).
6. Hermansson, A.M.: *J. Food Technol.*, **12**, 177 (1977).
7. Yanagi, S., H. Miyaguchi, K. Saito and T. Watanabe: *Cereal Chem.*, **55**, 157 (1978).
8. Kinsella, J.E.: *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **56**, 242 (1979).
9. Hang, Y.D. and H. Jackson: *Food Technol.*, **21**, 1033 (1967).
10. 福島男兒: *日本特許公告*, 昭 40-21228 (1965).
11. 川口 豊: *日本食品工業學會誌*, **26**, 434 (1979).
12. 松岡博厚, 笹子謙治, 關口正勝: *日本食品工業學會誌*, **15**, 103 (1968).
13. 松岡博厚, 福家洋子: *日本食品工業學會誌*, **24**, 553 (1977).
14. 川口豊: *日本食品工業學會誌*, **27**, 1 (1980).
15. 川口豊, 松岡博厚: *日本食品工業學會誌*, **28**, 1 (1981).
16. 橋本俊郎, 木村宏忠, 高橋 清: *日本食品工業學會誌*, **32**, 255 (1985).
17. 伊藤 寛: *大豆開發*, **30**, 9 (1975): 蛋白質の高度利用技術および資源の開發に關する研究, *日本農林水産技術會議事務局*, p. 51 (1976).

18. Fuke, Y. and H. Matsuoka: *J. Food Sci.*, **43**, 312 (1984).
19. Mohri, M. and S. Matsushita: *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 486 (1984).
20. 福家洋子, 松岡博厚: 日本食品工業學會誌, **27**, 275 (1980).
21. Park Y. W., I. Kusakabe, H. Kobayashin and K. Murakami: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3215 (1987).
22. Murata, K., I. Kusakabe, H. Kobayashi, M. Akaike, Y.W. Park and K. Murakami: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 385 (1987).
23. Arima, K., S. Iwasaki and G. Tamura: *Agic. Biol. Chem.*, **31**, 540 (1967).
24. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md., Vol. 1, (1984).
25. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md., 8th ed., (1974).
26. Norris, J.R., R.C.W. Berkeley, N.A. Logan and A.G. O'Donnel: *The Prokaryotes*, (Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balow and H.G. Schegal, ed.) Springer-Verlaq Berlin, Vol. 2, pp. 1713-1734 (1981).
27. Gordon, R.E., W.C. Haynes and C. Hor-Noy Pang: *The genus Baccillus*, Agriculture Handbook No. 427, Agriculture Reserch Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C. pp. 410-443 (1973).
28. Smibert, R.M. and N.R. Krieg: *Manual of Methods for General Bacteriology*, (Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R. N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Phillips, ed.) American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 410-443 (1981).
29. 東京大學 醫科學研究所學友會編: 細菌學實習提要, 改訂 5 版, 丸善株式會社, 東京 (1976).

(Received January 25, 1989)