

## 대두유 응고효소 생산에 관한 연구

이기성 · 한면수 · 심상국\* · 정동효

중앙대학교 산업대학 식품가공학과, \*동남보건전문대학 식품가공과

**초록:** 토양 시료로부터 선별과정을 거쳐 대두유를 응고시킬 수 있는 extracellular 대두유 응고효소를 생산하는 균주를 분리하고 분리세균 K-324-7 균주에 의한 효소생성의 확인과 형태적 생리적 성질을 조사한 결과 *Bacillus cereus*로 동정되었다. *Bacillus* K-324-7 분리균이 생산하는 대두유 응고효소는 황산암모늄 0.8포화 용액에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 최적활성 pH는 6.1이며, 최적활성온도는 70°C이었다. 또한 pH 안정성은 pH 6.0~7.0 사이에서 안정하였고 열안정성은 50°C 이하의 온도에서 안정하였다. 한편 대두유 응고효소의 생산 배양조건을 검토한 결과 탄소원은 glucose 0.2%, 질소원은 peptone 0.2%, 무기염은  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5%, pH는 6.5, 배양온도는 35°C로 배양기간은 3일 정도가 적당하였으며 그 이상 배양하면 생성된 효소의 활성이 감소됨을 알 수 있었다(1990년 2월 1일 접수, 1990년 5월 25일 수리).

대두는 양질의 단백질과 필수지방산의 함량이 높은 식품재료로 각광을 받는 경제작물이며, 지금까지 두부, 간장, 된장, 대두유 등의 원료로 사용되어 왔고 최근에는 대두의 고단위 영양가와 구성 단백질의 여러가지 특성이 인식되어 대두가공 및 이용 방법이 많이 개발<sup>1-4)</sup>되어 있다. 그러나 이러한 대두 이용을 극대화하는데는 대두단백질이 지니는 제한된 기능성으로 인한 가공상의 많은 문제점들이 뒤따르고 있다. 즉 날롱비린내, 유사치즈제품에서 물을 흡수 보유하는 것과 장기간 가열처리로도 쉽게 무르지 않는 단점 등이<sup>5-7)</sup>.

이러한 문제점을 극복하기 위해서 많은 연구자들이 효소적, 화학적, 물리적 변형에 의한 대두단백질의 기능 특성을 개량하고자 노력하여 왔다. 특히 두부나 유사치즈에서 대두단백질의 응고는 대두의 수용성 단백질을 이용하는 것으로 대두유에 각종 응고제인 Ca, Mg, Al 등의 금속염과 glucono- $\delta$ -lactone이 사용되고 있다. 그러나 이들 화합물들은 무기염 형태로 존재할 경우 쓴맛을 매우게 되므로<sup>8)</sup> 품질면을 고려해서 꼭 제거해야만 하고, 인체내에 금속염이 다량 존재, 축적되어 중금속 오염 등을 일으킬 수 있을 것이라 생각된다<sup>9)</sup>.

한편 최근 20년 동안 동물, 식물 및 미생물학자들은 치즈 응고시 rennet대신에 대용응고효소의 개발을

활발히 진행시켜왔다. 그 결과 동물성의 hogpepsin<sup>10)</sup>, trypsin<sup>11)</sup> 등과 식물성 ficin<sup>12)</sup>, papain<sup>13)</sup> 등을 그리고 *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, *Mucor pusillus*, *Dothiorella ribis* 등의 수 많은 미생물들이 생산하는 대용응고효소가 제시되었다. 또한 bromelain<sup>17)</sup>을 처리함으로써 대두단백질을 응고시킬 수 있다고 보고되었다. Matsuoka와 Kawaguchi<sup>18)</sup>는 대두단백질의 분해를 증진시키기 위하여 깃산발효와 bromelain등의 첨가로 대두단백질을 응고시켜 양질의 curd를 형성시킬 수 있다고 보고하였다. 한편 Murakami와 Park<sup>19)</sup>, 하와이<sup>20)</sup> 등은 미생물효소를 사용하여 대두단백질을 응고할 수 있었다고 보고하였다. 그러나 아직 미생물이 생산하는 대두유 응고효소에 관한 반응기작과 특성에 관한 연구<sup>21)</sup>는 미약한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 대두유 응고효소를 생산하는 균주를 토양으로부터 분리, 선별하여 균주의 동정과 효소의 특성 및 생산조건을 검토하여 그 결과를 보고한다.

### 실험재료 및 방법

#### 대두유

대두유의 제조는 Hang과 Jackson<sup>7)</sup>의 방법에 따라 대두에 물을 가하여 냉장고에서 하룻동안 침지시켜 물을 제거한 것에 9배의 물을 가하여 mixer로 마쇄하

여 cheese cloth로 여과한 여액을 가압증기실에서 121°C, 15분간 살균하여 제조하였다.

### 대두유 응고효소 생산균의 분리 및 동정

서울 및 경기도 지역 일원의 토양을 수거하여 대두유 응고효소를 생산하는 균주를 분리하였다.

분리방법은 대두유에 0.2% glucose, 0.2% yeast extract, 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 가하여 pH 6.1로 조절한 배지에 수집한 토양 1g을 가한 후 분주, 평판배양법에 따라 30°C에서 72시간 배양한 후에 나타나는 집락을 순수분리하였다. 1M phosphate buffer(pH 4.5)로 대두유를 pH 6.1로 조절한 후 10ml를 시험관에 취하고 면전하여 살균하였다. 이것에 토양에서 분리한 집락을 1백금이 접종하여 35°C에서 48시간 배양시켜 Murakami와 Park<sup>19)</sup> 등의 방법에 준하여 대두유가 응고되어 whey와 curd로 분리되었는가를 관찰하였다. 일단 선별된 집락은 12시간 액체배양한 후 2ml를 25ml의 기본배지에 접종하여 35°C에서 72시간 진탕배양(100rpm) 하였다. 이 배양액을 원심분리(8,000×g, 10min)하여 상정액을 조효소액으로 사용하여 대두유 응고활성을 측정하여 활성도가 가장 높은 집락을 최종 선별하여 공식균주로 사용하였다.

선별한 균주의 동정은 Manual of Methods for General Bacteriology<sup>22)</sup>, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>23)</sup>, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology<sup>24)</sup> 및 Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria<sup>25)</sup> 등에 따라하였다.

### 조(粗)효소의 정제

조효소의 조정제는 최종선별된 균주의 배양액에 황산암모늄을 0.2포화되게 가하여 4°C에서 7시간 방치, 침전시킨 후 원심분리(5,000×g, 30min)하여 침전물을 얻고 그 상정액은 다시 같은 방법으로 0.4, 0.6, 0.8, 1.0포화가 되게 하여 생성된 침전물을 각각 구분하여 회수하였다. 포화도에 따라 얻은 침전물을 증류수로 완전 용해시킨 후 4°C에서 3일간 투석시킨 액을 조효소액으로 사용하였다.

### 대두유 응고효소의 활성측정

대두유 응고효소의 활성은 유등<sup>16)</sup>이 사용한 방법에 따라 행하였다. 즉 pH 6.1로 조절된 대두유 5ml에 조효소액 0.5ml를 가하여 혼합한 후 65°C에서 방치하여 점성이 강해지며 미립자가 나타날 때 까지의 시간을 측정하여 효소활성으로 나타내었다.

대두유 5ml를 1분동안에 응고시키는 효소의 양을 대두유 응고단위 lunit로 하였다.

### 결과 및 고찰

#### 대두유 응고효소 생산균의 분리

경기도 일원과 서울지역에서 채취한 400여종의 토양시료로부터 35°C에서 대두유를 이용하는 154집락을 순수분리하였다. 이들 집락은 재선별 과정을 거쳐, 응고효소단위가 최고값(soymilk-clotting activity : 0.24unit)을 나타낸 K-324-7집락을 최종 선별하여 본 실험의 공식균주로 하였다.

#### K-324-7균주 효소에 의한 대두유의 응고

1M phosphate buffer(pH 4.5)를 사용하여 pH 6.1로 조절된 대두유 5ml에 효소액 0.5ml를 가하여 65°C에서 5분간 반응시킨 후 그 반응혼합물을 원심분리(1,500×g, 5min)하였다.

Fig. 1에서 같이 K-324-7균주에 의하여 생산된 효소액에 의하여 대두유가 응고되었음을 나타내었다(Fig. 1의 C, D). 그러나 효소액을 100°C에서 5분간 처리한 것(Fig. 1의 B)이나 물을 가한 것(Fig. 1의 A)은 응고 현상을 볼 수 없었다. 또한 *Streptococcus lactis* IFO 12007이 생산하는 효소액과 이 효소액을 100°C에서 처리한 것(Fig. 1의 E, F)에서도 응고현상을 볼 수 있었는데 이는 *Strep. lactis* IFO 12007이 생산하는 젖산에 의해서 응고된 것이다. 이러한 사실은 대두유

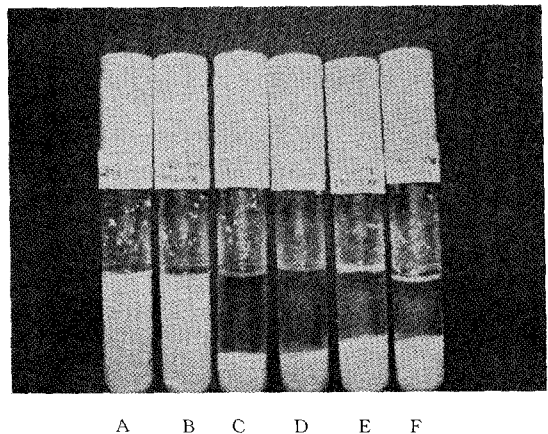


Fig. 1. Coagulation of soymilk by the enzyme reaction.

A : Water, B : Inactivated enzyme, C : K-324-7, D : K-145-3, E : *Strep. lactis* IFO 12007, F : Inactivated *Strep. lactis* IFO 12007.

응고가 K-324-7균주가 생산하는 효소액에 의하여 응고되었음을 나타내었고 효소액을 처리한 반응 혼합물은 원심분리에 의하여 whey와 curd로 분리되었다.

**공시균주의 동정**

K-324-7 분리균주는 1.0×3.0μm 크기의 호기성, Gram 양성 및 간균으로 Table 1과 같은 형태적 생리적 특성을 지니고 있었다. 포자형성균으로 oval spore 형이며 주편모를 가져 운동성이 있으며 카제인과 전분을 가수분해하고 catalase반응은 양성이며, indole을 생성하지 않는 점으로 보아 전형적인 *Bacillus*속의 특

징적인 형태와 생리적인 성질<sup>22-25)</sup>을 나타내었다.

*Bacillus*속의 K-324-7균주는 혐기적 한천에서 생육하고, glucose로부터 산을 생성하나, xylose, arabinose, mannitol, lactose에서는 산을 생성하지 않았다. 또한 citrate를 이용하며 nitrate를 환원하는 등 *Bacillus cereus*의 특성과 일치하여 *Bacillus cereus*로 동정하였다.

**대두유 응고효소 생산조건**

1) 영양원의 영향

효소생산 조건을 검토하기 위하여 탄소원, 질소원을 각각 0.2%, 무기염을 각 0.5% 가하여 대두유 응

Table 1. Morphological characteristics of strain K-324-7

Properties	K-324-7	<i>Bacillus cereus</i> KFCC 11714
<b>A. Morphological properties</b>		
1. Type & size	Rods, 1.0×3.0μm	Rods, 1.1×3.5μm
2. Gram staining	Positive	Positive
3. Colonies on agar plate	Thicken velvet	Thicken velvet
4. Flagella	Several(Peritrichous)	Several(Peritrichous)
5. Spore	Elliptical & oval	Elliptical
6. Motility	Active	Active
7. Growth in anaerobic agar	Positive	Positive
8. Temp. for growth up to 40°C	Positive	Positive
<b>B. Biochemical properties</b>		
1. Acid formation from		
Glucose	+	+
Xylose	-	-
Arabinose	-	-
Mannitol	-	-
Lactos	-	-
2. Gas from glucose	+	+
3. Citrate utilization	+	+
4. Catalase	+	+
5. Oxidase	+	+
6. Growth at pH 5.7	+	+
7. Growth at 7.0% NaCl	+	+
8. Growth at 45°C	+	+
9. Indole	-	-
10. Voges-Proskauer	+	+
11. Nitrate reduction	+	+
12. Casein hydrolysis	+	+
13. Starch hydrolysis	+	+
14. Urea	-	-
15. Digestion of tyrosine	+	+

고효소 생산에 미치는 영향을 조사하였다(Table 2). 탄소원은 glucose, galactose, sucrose 순으로 질소원은 peptone, yeast extract, NH<sub>4</sub>Cl 순으로 대두유 응고효소 생산을 증가시킬 수 있었으나 요소는 효소생산을 나타내지 못하였다. 무기염에서는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>가 가장 높은 효소생산을 나타내고 있는데 이는 Murakami와 Park<sup>29)</sup> 등의 보고와 일치하고 있다.

Table 2. Effects of nutritional sources on production of soymilk clotting enzyme

Nutritional sources		Soy milk-clotting activity (units)	Relative activity (%)
Carbon (0.2%)	Control	0.17	100
	Sucrose	0.23	134
	Dextrin	1.19	109
	Glucose	0.25	147
	Maltose	0.18	106
	Galactose	0.23	139
	Fructose	0.22	130
	Soluble starch	0.20	117
	Rhamnose	0.18	107
	Soy milk	0.12	73
Nitrogen (0.2%)	Control	0.16	100
	NH <sub>4</sub> Cl	0.22	135
	KNO <sub>3</sub>	0.17	105
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.22	137
	Meat extract	0.20	122
	Peptone	0.24	153
	Yeast extract	0.23	143
	Tryptone	0.17	105
Urea	—	—	
Inorganic salts (0.5%)	Control	0.16	100
	KCl	0.18	111
	NaCl	0.22	133
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25	151
	CaCl <sub>2</sub>	0.18	113
	MgSO <sub>4</sub>	0.20	124
	FeSO <sub>4</sub>	0.17	107

\* Incubated at 35°C for 72 hrs.

2) 온도, pH의 영향

효소생산에 미치는 온도와 pH와 영향을 알아 본 결과 Fig. 2와 같이 35°C에서 효소생산 최고활성을 나타내었으나, 30°C 이하와 40°C 이상에서는 활성이 감소하였다. 배양초기 pH의 경우 pH 6.5 부근에서 가장 높은 효소 생산량을 나타내고 있다. 이 결과로 보아 온도와 pH는 대두유 응고효소 생산에 매우 큰 영

향을 줄 수 있는 요인<sup>19, 20)</sup>임을 알 수 있었다.

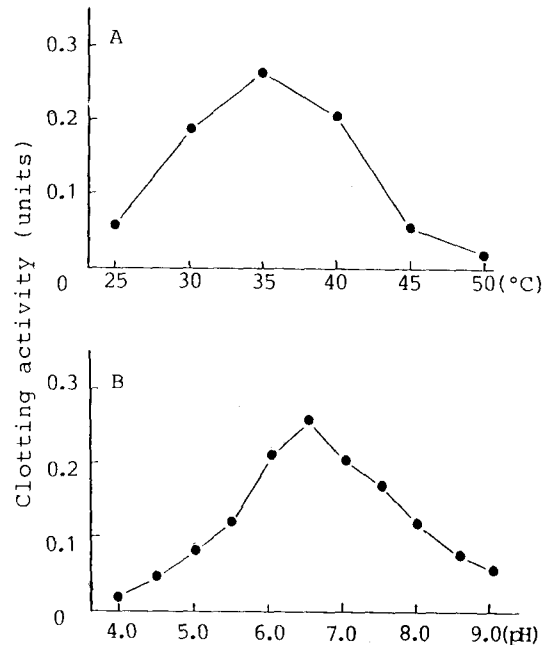


Fig. 2. Effects of incubation temperature(A) and pH(B) on production of soymilk-clotting enzyme.

3) 배양기간

공시균주의 배양시간에 따른 효소 생산량과 pH변화를 조사하기 위하여 35°C에서 5일간 배양하면서 대두유 응고활성과 pH변화를 경시적으로 조사한 결과 Fig. 3과 같다.

이 결과로 보아 배양기간은 3일 정도가 가장 적합하였으며 배양시간이 증가함에 따라 pH는 증가하였다. 그러나 3일 이상 배양하면 효소의 활성이 감소하였다. 이는 생성된 대두유 응고효소가 배양온도(35°C)에서 오랫동안 보존되므로 활성이 감퇴된 것으로 사료된다<sup>30)</sup>. 또한 pH의 증가는 배양일수가 지남에 따라 배지의 질소원이 암모니아태로 변화함에 기인한 것으로 생각된다.

Bacillus cereus K-324-7 생산 대두유 응고효소의 특징

1) 조효소액의 분별침전

상법에 의하여 황산암모늄을 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 포화시킨 조(粗)효소액 0.5ml를 대두유 5ml에 가하여 65°C에서 5분간 반응시킨 후, 원심분리(1,500×g, 5min)한 결과는 Fig. 4와 같다. 이 결과 본 효소는 황산암모늄 0.8 포화용액에서 얻은 침전이 가장 강한 활성을 나타내고 있다.

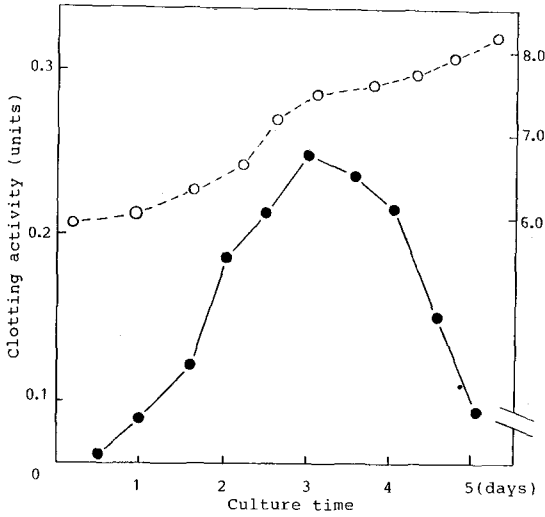
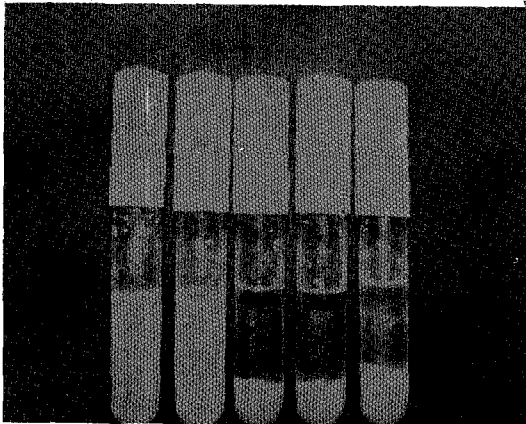


Fig. 3. Time course of soymilk-clotting enzyme cultivation.

○-○- : pH, and ●-●- : Clotting enzyme activity



A B C D E

Fig. 4. Activity of soymilk-clotting enzymes fractionated by ammonium sulfate.

A : Precipitated from 0.2 saturated  $(NH_4)_2SO_4$ , B : Precipitated from 0.4 saturated  $(NH_4)_2SO_4$ , C : Precipitated from 0.6 saturated  $(NH_4)_2SO_4$ , D : Precipitated from 0.8 saturated  $(NH_4)_2SO_4$  and E : Precipitated from 1.0 saturated  $(NH_4)_2SO_4$ .

2) 최적활성 조건

황산암모늄 0.8 포화용액을 사용하여 효소의 최적 활성 pH, 활성온도, pH안정성과 열안정성을 검토한 결과는 Fig. 5와 같다.

응고효소의 최적활성 pH는 pH 5.8~7.0까지 pH 0.3

간격으로 조절된 대두유 5ml에 조효소액 0.5ml를 가하여 65°C에서 30분간 응고활성을 측정하였다. 그결과 pH 6.1에서 최적활성을 나타내었으며 pH가 증가함에 따라 활성은 감소하였다. 그러나 pH 5.8이하에서는 효소액의 첨가없이 자체적으로 응고가 일어나 대두유 응고활성을 측정할 수 없었다.

이에 따라 pH 강화에 따른 대두유 응고력의 증가는 animal rennet(Hansen's animal rennet)<sup>26, 27)</sup>는 물론 대부분의 미생물 응고효소<sup>14, 27~29)</sup>와 비슷한 결과를 나타내었다.

pH 6.1로 조절된 대두유 5ml에 조효소액 0.5ml를 가하여 35°C~85°C까지 5°C의 간격으로 응고활성의 최적온도를 측정 한 결과, 70°C까지 온도 상승과 더불어 응고력이 증가되는 것을 알 수 있었다. *Bacillus cereus*<sup>29)</sup>는 75°C, *Pseudomonas mycogenes*<sup>14)</sup>는 70°C 이상, *Streptomyces griseus*<sup>14)</sup>는 70°C 이상을 나타낸다고 보고한 바와 같이 본 균주가 생산하는 대두유 응고효소도 높은 온도에서 응고력을 나타냄을 알 수 있었다.

pH 안정성을 조사하기 위하여 조(粗)대두유 응고효소의 pH를 4.0~9.0까지 pH 0.5 간격으로 조절한 후 35°C에서 1시간 작용시켜 투석막을 사용하여 4°C에서 0.04M phosphate buffer(pH 6.1)에 3일간 투석시

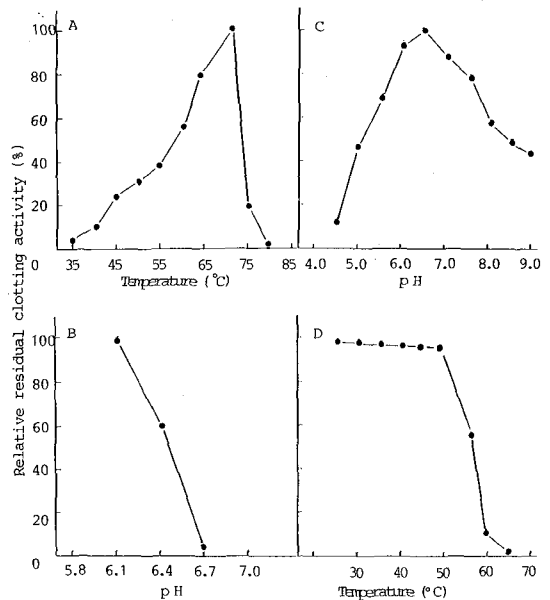


Fig. 5. Effects of various conditions on soymilk-clotting enzyme activity.

A : Optimum temperature, B : Optimum pH, C : Stable pH and D : Stable temperature.

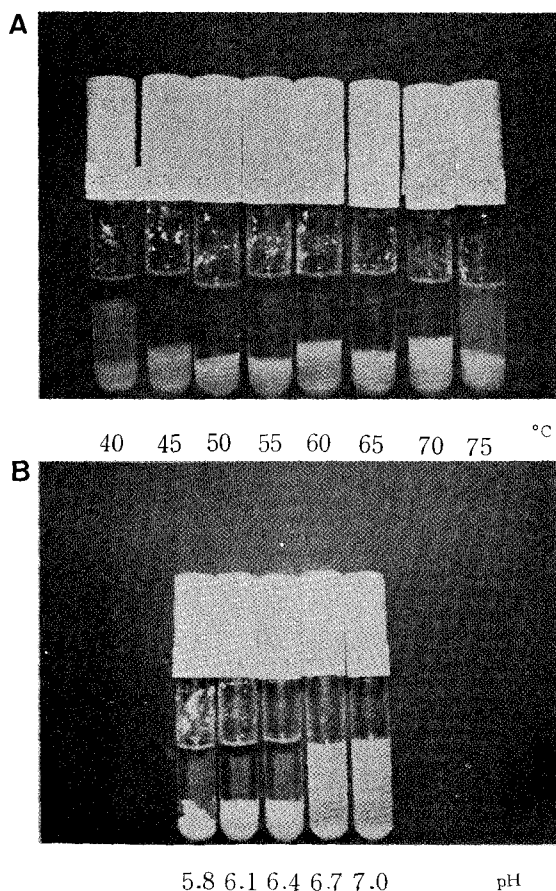


Fig. 6. Effects of temperature(A) and pH(B) on soymilk clotting.

A : Effect of temperature on soymilk clotting at pH 6.1. Reactions were carried out at various temperatures for 5 min.

B : Effect of pH on soymilk clotting at 65°C. Reactions were carried out at different pHs for 5min.

켜 pH 6.1로 재조절하여 65°C에서 조효소의 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 pH 6.0~7.0범위에서 안정성을 나타내고 있다. 이는 공시균주가 생산하는 대두유 응고효소의 pH 안정범위는 중성부근이며 유 등<sup>6)</sup>의 *Dothiorella ribis*에 의한 효소의 pH 안정성과도 일치하고 있다.

열안정성은 조효소를 30°C~70°C까지 온도 5°C의 간격으로 각 온도에서 30분간 처리한 후 pH 6.1로 조절된 대두유 5ml에 조효소 0.5ml씩 가하여 65°C에서 효소 잔존활성을 측정하였다. 조(粗)대두유 응고효소는 50°C 이하의 온도에서는 안정하였고, 그 이상의 온도에서는 급격히 활성이 저하되었다. 이 결과로 보아 본 효소도 50°C 이하에서 안정성을 가지고, *Dothiorella ribis*<sup>6)</sup> 생산효소(45°C) 와도 거의 일치하고 있다.

3) 조(粗)효소액에 의한 curd 형성에 미치는 온도와 pH의 영향

pH 6.1로 조절된 대두유 5ml에 조효소액 0.5ml를 가하여 40°C~75°C까지의 온도 범위에서 5분간 반응한 후 원심분리(1,500×g, 5min)하였다. 그 결과(Fig. 6) 45°C~75°C에서는 curd가 형성되었으나 40°C와 75°C에서는 curd가 형성되지 않았다.

pH 0.3 간격으로 pH 5.8~7.0까지 조절한 대두유에 효소액을 가하여 65°C에서 5분간 반응시킨 후 원심분리하였다. 반응 후 pH 5.8~6.4사이에서 대두유가 응고되어 whey와 curd로 분리되었다.

## 참 고 문 헌

1. Nakai, S., Ho, L., Helbig, N., Kato, A. and Tung, M. A. : Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 13 : 23 (1980)
2. Kato, A. and Nakai, S. : Biochem. Biophys. Acta, 624 : 13 (1980)
3. Kato, A., Tsutsui, N., Matsudomi, N., Kobayashi, K. and Nakai, S. : Agric. Biol. Chem., 45 : 2775 (1980)
4. Lee, K.Y., Park, E.S. and Yoon, S. : Kor. J. Food Sci. Technol., 21 : 338 (1989)
5. Arat, S., Koyanag, O. and Fujimaki, M. : Agric. Biol. Chem., 31 : 808 (1967)
6. Rackis, J.J., Sessa, D.J. and Hoing, D.H. : Agric. Biol. Chem., 56 : 262 (1979)
7. Hang, Y.D. and Jackson, H. : Food Technol., 21 : 1033 (1967)
8. 김재욱 : 농산가공학, 향문사, p. 140 (1980)
9. 이태경, 성하진, 최용진, 양한철 : 한국산업미생물학회지, 15 : 183 (1987)
10. Sherwood, I, R.I. : J. Dairy Res., 6 : 407 (1935)
11. Yu, J. and Arima, K. : J. Kor. Food Sci. Technol., 2 : 21 (1970)
12. Robbins, B.H. and Lamson, P.O. : J. Biol. Chem., 106 : 725 (1964)
13. Winden, H. and Kosikowsky, F.V. : J. Dairy Sci., 39 : 97 (1956)
14. Tsugo, T. and Yamachi, K. : XV Intern. Dairy Congre. Proc., 2P
15. Sardines, J.L. : Appl. Microbiol., 2 : 248 (1968)
16. 유주현, 김유삼, 홍운명, 아리마케이 : 한국식품과

- 학회지, 3 : 3 (1971)
17. Fuke, Y. and Matsuoka, H. : J. Jap. Soc. Food Sci. Technol., 27 : 275 (1980)
  18. Matsuoka, H. and Kawaguchi, Y. : J. Jap. Soc Food Sci. Technol., 28 : 1 (1980)
  19. Murakami, K. and Park, Y. W. : Agric. Biol. Chem., 49 : 3215 (1985)
  20. Ha, D.M. and Lee, C.H. : Kor J. Appl. Microb. Bi-  
oeng., 17 : 109 (1989)
  21. Park, Y.M., Kobayashi, H., Kusakabe, I. and Mu-  
rakami, K. : Agric., Biol. Chem., 51 : 2343 (1987)
  22. Gerhardt, P., Muray, G.E.G., Gostillow, R.N., Nester,  
E.W., Wood, W.A., Kreig, N.R. and Phillips, G.B. :  
Manual of Methods for General Bacteriology, Am,  
Soc, for Microbiology, Washington (1981)
  23. Buchaman, R.E. and Gibbons, N.E. : Bergey's Man-  
ual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams  
& Wilkins Co., Baltimore, Md. (1984)
  24. Krieg, N.R. and Holt, J.G. : Bergey's Manual of Sys-  
tematic Bacteriology, Williams & Wilkins Co., Bal-  
timore, Md., IV (1984)
  25. Jean, F. MacFaddin : Biochemical Test for  
Identification of Medical Bacteria, Williams &  
Wilkins Co., Baltimore, Md (1980)
  26. 津郷友吉, 吉野梅夫, 谷口雄吉, 三木杉郎, 有馬  
啓 : 日本畜産學會報, 35 : 222 (1964)
  27. 松岡博厚, 笹子謙治 : 日食工會誌, 15:103 (1968)
  28. Hanato, J. : Biochemical Z., 149 ; 228 (1924)
  29. Holter, H. : Biochemical Z., 225 ; 160 (1932)

#### Isolation and production of soymilk-clotting enzymes from *Bacillus* sp. K-324-7

Gi-Soung Lee, Myun-Soo Han, Sang-Kook Shim and Dong-Hyo Chung (Department of Food Science and Technology, College of Industrial Studies, Chung-Ang University, Seoul, \*Department of Food Technology, Dongnam Health Junior College, Kyunggido)

**Abstract** : A bacterial strain which was capable of producing extracellular soymilk-clotting enzyme was isolated from soil samples during the course of screening test. The characteristics of the isolated strain K-324-7, indicated that the strain belonged to species of *Bacillus cereus*. The crude purification of this enzyme was precipitated by salting out with ammonium sulfate of 0.8 saturation. The optimal pH for the enzyme activity was at 6.1~7.0 and below 50°C. The optimal culture medium for the production of soymilk-clotting enzyme were consisted of 0.2% glucose, 0.2% peptone, and 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  with initial pH value of 6.5. The activity of enzyme was maximum when the microbe was cultured for 3 days at 35°C.