

산분해 대두 단백질로부터 분리된 Esterase 생성균의 생육 및 효소생성 특성

오 남 순*

공주대학교 산업과학대학 식품공학과

초 록: 산분해 대두 단백질로부터 식품 보존료인 *p*-hydroxybenzoic acid butyl ester를 분해하고, esterase 활성을 갖는 균주들을 분리, 동정하여 그들의 생육 및 효소 생성 특성을 조사하였다. 분리된 균주들은 전부 *Bacillus* sp. 로 동정되었으며, specific growth rate는 균주에 따라 0.844~1.213 h⁻¹였으며, esterase activity는 *Bacillus* sp. KB8 균주가 222 mU/ml로 대비균주인 *B. subtilis* ATCC6633의 21 mU/ml보다 10배 높은 활성을 보였으나 *p*-hydroxybenzoic acid butyl ester 분해 활성도는 5.4~8.1 mU/ml로 균주에 따른 큰 차이는 볼 수 없었다. *Bacillus* sp. KB8 균주의 배양시 NaCl의 첨가는 생육을 저해시키며, esterase의 세포의 축적과 세포내 합성을 억제시키는 것으로 나타났으며, 특히 NaCl 첨가 농도의 증가는 세포의 축적을 더 억제시키는 것으로 나타났다. 플라스크 배양실험 결과 *Bacillus* sp. KB8 균주의 효소 생성은 생육이 stationary phase 이후 점차 증가하여 배양 64시간에 420 mU/ml를 생성하였다. 온도에 대한 esterase의 활성은 50°C에서 30분간 실활없이 유지되었으나 70°C에서는 전부 실활되었다. 60°C와 65°C에서의 효소 활성은 노출 시간에 따라 지수적인 실활 경향을 보여 3시간 후 60°C에서 76%, 65°C에서는 3%의 잔존 효소활성을 보였다.(1997년 9월 23일 접수, 1997년 10월 22일 수리)

서 론

식품 소재로 이용되는 천연물 중에는 유지 또는 정유 성분 등¹⁾에 ester 화합물들이 다양한 형태로 분포되며, 화학적으로는 ester 화합물의 합성을 통하여 인공향료²⁾를 만들기도 한다. ester 화합물인 *p*-hydroxybenzoic acid butyl ester(butyl paraben)은 ethyl paraben, propyl paraben 등과 함께 광범위하게 미생물에 작용하여 효모, 곰팡이, 세균의 생육을 저지하는 능력을 갖고^{3,4)} 있어서 보존료로 식품에 널리 이용되며, 국내에서는 간장, 식초, 소스류, 약주, 탁주 등의 식품에 사용이 허용⁵⁾되고 있다. 식품 소재로 사용되는 원료 물질중에 함유되거나, 특정 기능을 위하여 인위적으로 첨가되는 ester 화합물들은 이를 분해하는 효소계의 작용을 받을 것이며, 특히 보존료로 사용될 경우 esterase에 의한 미생물의 생육억제라는 본래의 기능을 상실⁶⁾하게 된다. esterase는 동물 조직⁷⁾ 뿐 아니라 미생물계에도 널리 분포되고 있는 것으로 알려지고 있으며, *Aspergillus niger*,⁸⁾ *Aureobasidium pullulans*,⁹⁾ *Bakers Yeast*,¹⁰⁾ *Bacillus subtilis*,¹¹⁾ *Bacillus stearothermophilus*,¹²⁾ *Pseudomonas fluorescens*,¹³⁾ *Brevibacterium* sp.¹⁴⁾ 기원의 esterase에 관한 분리, 정제 및 효소 특성을 규명하는 차원에서 많은 연구가 수행되어 왔다. 한편 esterase는 의약¹⁵⁾ 용도와 치즈 가공 등에 향미 개선등의 품질강화^{16,17)}를 목적으로 사용되기도 하며, 식품의 품질손상⁶⁾을 유도시키는 부정적 측면도 있다.

본 연구는 간장 제품에서 보존료로 사용되는 ester 화합물의 분해로 말미암은 제품변질의 원인을 규명하기 위하

여 시행되었다. 따라서 식품의 원료로 많이 사용되고, 특히 간장 제조시 주재료로 사용되는 산분해 대두 단백질(HVP)로부터 보존료로 사용되는 ester 화합물인 butyl paraben을 분해하는 esterase 생성 세균들을 분리, 동정하고 이들 균주에 대한 몇 가지 생육 및 효소의 생성특성과 열 안정성 등을 조사하였다. 이는 또한 자연계에 널리 분포되는 세균 기원의 효소에 대한 ester 화합물들의 불안정성 개선에 관한 기초 자료로서 산업적 의미를 두고 시행되었다.

재료 및 방법

시약 및 기기

미생물 분리원인 산분해 대두 단백질(HVP)은 국내 식품사의 제품을 구입하여 사용하였으며, 미생물 분리 및 보존 배지에 사용된 시약은 Difco사의 plate count agar(PCA), nutrient broth media(NB) 및 bacto-soytone 등이며, 효소 활성 측정용 시약으로는 Sigma사의 *p*-nitrophenylacetate(*p*NPA), *p*-nitrophenol(*p*NP)과 *p*-hydroxybenzoic acid butyl ester(*p*HBB, Kanto Chemical, Japan)를 사용하였다. 분리 균주의 동정을 위하여 Automatic Vitek Microbial Identification System(bioMerieux Vitek, Ins., USA)를 사용하고, 생육 및 효소활성의 측정에는 spectrophotometer(Jasco-570, Japan), HPLC(Samsung SLC, 한국)와 Vibracell(Sonics & materials Inc., USA)등을 이용하였다.

찾는말: *Bacillus* sp., esterase, 산분해 대두 단백질, *p*-hydroxybenzoic acid butyl ester

*연락처

균주의 분리 및 동정

산분해 대두 단백질을 멸균된 생리 식염수로 10배씩 단계적으로 희석하여 무작위로 분리된 50 colony를 PCA배지에서 사면배양 후 NB배지 5 ml에 1 loop 접종하여 48시간 진탕배양한 후, pHBB를 200 ppm이 되도록 첨가하고 다시 4일간 반응시킨 후 pHBB에 대한 분해능과 pNPA를 기질로 한 esterase 효소활성을 가진 균주들을 선발하였다. 선발된 균주들은 Gram 염색법 및 형태적 분류를 거친후 VITEK 동정기기를 이용하여 동정을 하였다.

균주의 배양

분리 균주들은 PCA배지에서 30°C, 18시간 배양 후 냉장 고에 보관하여 필요시 마다 새로운 PCA 배지에서 활성화시켜 사용하였으며, 활성화된 균주를 NB 액체배지에 1 loop 접종하고 30°C에서 12 시간 배양한 것을 종균으로 사용하였다.

배양 배지는 glucose 10 g/l, bacto-soytone 10 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l로 하고, 살균후 pH가 7.0이 되도록 조절한 후 100 ml 씩 500 ml baffle 달린 삼각 플라스크에 분주하여 121°C에서 10분간 살균후 종균을 0.1 ml 접종하여 배양하였다. 배양조건은 30°C, 120 rpm의 진탕배양으로 소정의 시간 동안 배양하면서 생육 및 효소활성 등을 측정하였다. 대비균주로는 esterase 생성균주인 *B. subtilis* ATCC6633을 사용하였다.

균주 생육 및 esterase 활성의 측정

균주의 생육은 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서의 흡광도로 측정하였다. 효소활성을 위한 조효소액은 배양액을 Mini-centrifuge (6,000 rpm)에서 10분간 원심분리한 후의 상정액을 사용하였으며, 효소의 열안정성과 NaCl 농도에 따른 효소활성은 셀로판 투석막을 이용한 투석후의 시료를, 세포내 효소활성은 sonicator(Vibracell)로 세포를 파쇄한 후 원심분리한 시료를 조효소액으로 사용하여 측정하였다.

효소활성은 10 mmole/liter pNPA 0.1 ml에 조효소액 0.3 ml과 100 mmole/liter sodium phosphate 완충액(pH 6.8) 3.1 ml을 첨가하여 30°C에서 반응시키면서 유리되는 pNP량을 400 nm에서의 흡광도로 측정하였고(본 실험조건에서 pNP의 molar absorptivity는 7136 L mol⁻¹cm⁻¹), 대조구는 상기 조효소액을 100°C 에서 30분간 중탕한 후 동일한 방법으로 측정하였다. 효소활성 1 Unit는 1분당 1 μmole의 pNP를 유리하는 효소량으로 정의하였다.

pHBB의 분해 활성 측정

pHBB 분해활성은 10 mmole/liter pHBB 0.1 ml에 조효소액 1.0 ml과 100 mmole/liter sodium phosphate 완충액(pH 6.8) 3.1 ml을 첨가하여 37°C 항온기에서 30분간 반응시킨 후 200 mmole/liter sodium acetate 완충액(pH 4.0) 3.1 ml을 첨가하여 반응을 종료시킨 후 여과하여 pHBB의 잔존량을 254 nm(UV-VIS detector; SLC 200)에서 HPLC

(solvent; methanol 70 : H₂O 30, column; Shiseido Capcell-PAK C-18, flow rate; 1 ml/min)로 분석하고 분해량으로 환산하여 분해활성을 측정하였다. 1분당 pHBB 1 μmole을 분해시키는데 소요되는 효소량을 pHBB 분해활성 1 Unit로 정의하였다.

단백질의 정량

시료의 단백질은 Bovine serum albumin을 표준단백질로 한 Lowry method¹⁸⁾에 따라 정량하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 동정 및 esterase 생성능

실험 균주들은 분리원의 생육환경이 고염도, 약산성, 낮은 수분활성도 등으로 세균의 생육에 불리한 환경조건(Table 1)에서 분리되었다. pHBB를 분해시키며 esterase 생성능을 보인 균주는 6종이 분리되었고, 전부가 Gram (+)이며 포자형성능을 갖고 rod type 으로 생화학 반응과 형태 분석에서 *Bacillus*속 균주들로 동정(Table 2)되었다. 본 실험에 사용된 비교 균주는 esterase 생성능을 가진 것으로 알려진 *Bacillus subtilis* ATCC6633 균주였다. 분리균주들의 생육 및 효소활성에 관한 결과는 Table 3과 같다. 비성장속도는 *Bacillus* sp. KB50 균주가 0.844 h⁻¹ 로 제일 느렸으며, *Bacillus* sp. KB27 균주가 1.213 h⁻¹ 로 제일 빠른 생육속도를 보였다. 48시간 배양 동안의 생육은 분리 균주 간 약간의 차이는 있었으나 대략 2.88~3.35의 흡광도를 보였다. pHBB 분해활성은 5.4~8.1 mU/ml로 균주 간 큰 차이를 보이지 않았으나, esterase 활성은 21~222 mU/ml로 나타나 균주에 따라 큰 차이를 보였다. 분리균주들 중 *Bacillus* sp. KB8 균주가 222 mU/ml 로 제일 높은 esterase 활성을 보여 비교균주인 *B. subtilis* ATCC6633 균주의 21 mU/ml 에 비해 10배의 높은 활성을 보였고, 분리균주들 중 제일 낮은 활성을 보인 *Bacillus* sp. KB50 균주의 34 mU/ml 보다는 6.5배 높은 활성이었다. pHBB 분해활성과 esterase 효소활성의 차이는 기질로 사용된 pHBB 와 pNPA의 ester 결합 구조와 ester 결합을 하는 alkyl기의 상이에서 기인된 효소의 기질 특이성^{8,11)} 때문이라 사료된다. *Bacillus* sp. KB8 균주의 효소활성 수준은 Meghji 등¹¹⁾의 *B. subtilis* NRRL365 균주를 이용한 실험에서 조건에 따라 50~4,500 mU/ml의 esterase 활성을 나타낸다고 한 것과는 최고 활성 수준에서 차이를 보였으나, 이는 본 실험과는 배양온도, 배지조성 등이 상이한 조건에서 실시되었기 때문으로 생각되며, Meghji 등¹¹⁾은 또한 탄소원의 종류에 따라 그 생성능이 큰 차이를 보인다 하여 포도당 등의 단당류나 이

Table 1. Physicochemical parameters of acid hydrolysed soybean protein

pH	Aw	NaCl conc. (%)	Bacteria (CFU/ml)	Total amino acid content (mg/100g)
4.89	0.833	16.4	15×10 ²	3,241

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of isolated strains from acid hydrolysed soybean protein

Morphology & biochemical data	Isolated strain						ATCC 6633
	KB5	KB8	KB16	KB27	KB50	KB141	
Gram staining	+	+	+	+	+	+	+
Spore formation	+	+	+	+	+	+	+
Cell morphology	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
Tetrazolium red	-	-	-	-	-	-	-
Tagatose	-	-	-	-	+	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	+	+	+	+	+	+
Galactose	-	-	-	-	-	-	+
Arabinose	+	+	-	-	+	-	+
Xylose	+	+	+	-	-	-	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	-	+	-	+	+	+
Amygdalin	-	-	-	-	+	-	-
Inulin	+	+	+	+	-	+	+
Ribose	-	+	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
Palatinose	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	-	+	+
N-acetyl-D-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+
amylopectin	+	+	-	+	-	+	+
Potassium thiocyanate	+	+	+	+	+	+	+
7% NaCl	+	+	+	+	-	-	+
Mandelic acid	+	+	+	+	+	+	+
Oleandomycin	-	-	-	-	-	-	-
Sodium acetate	-	-	-	-	-	+	+
Arabitol	-	-	-	-	-	-	-
Polyamidohydrogostrepin	+	+	+	+	+	+	+
Nalidixic acid	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+

Table 3. Growth and enzyme activity of isolated strains and type strain on soytone media

strain	μ_{max}	Growth ¹⁾ (A600)	Esterase activity (mU/ml)	β HBB dec. act. ²⁾ (mU/ml)
KB5	0.946	2.887	123	5.8
KB8	1.038	2.903	222	6.6
KB16	0.975	2.912	106	5.9
KB27	1.213	2.984	88	7.5
KB50	0.844	3.354	34	6.5
KB141	1.196	3.268	47	8.1
ATCC6633	1.043	3.250	21	5.4

¹⁾ Growth was measured by absorbance at 600 nm after 48 hours cultivation.

²⁾ β HBB decomposition activity.

당류를 기질로 사용할 때 최고 260 mU/ml의 효소활성을 보인 점이나, Donaghy와 McKay¹⁹⁾는 *Fusarium graminearum*을 5일간 액체 배양할 경우 최고 201 mU/ml의 효소활성을 보인 결과들은 본 실험의 분리균주인 *Bacillus* sp. KB8 균주의 효소활성 수준과 유사하였다. 효소의 산업적 이용측면을 고려할 때 상기 Meghji 등과 Donaghy 등의 esterase 생산성에 관한 최적화 연구가 본 연구에서 분리된 *Bacillus* sp. KB8 균주에서도 시행할 가치가 있는 것으로

Table 4. Growth and esterase activity of *Bacillus* sp. KB8 strain at various NaCl concentrations

NaCl conc. (g/l)	μ_{max}	Growth ¹⁾			Extra. spe. act. ²⁾ (mU/mg protein)	Intra. spe. act. ³⁾ (mU/mg protein)	Ratio ⁴⁾
		24 h	48 h	64 h			
0	1.038	3.015	2.787	2.595	290	879	0.33
30	0.908	2.733	3.073	2.878	55	124	0.44
50	0.734	2.868	3.034	3.025	32	111	0.29
70	0.579	2.778	2.843	2.971	17	105	0.16
90	0.394	2.384	2.820	2.823	4	87	0.05
110	0.224	0.338	2.318	2.413	4	64	0.06

¹⁾ Growth was measured by absorbance at 600 nm.

²⁾ Extracellular specific activity.

³⁾ Intracellular specific activity.

⁴⁾ Ratio of extracellular specific activity to intracellular specific activity.

사료된다.

NaCl 농도에 따른 *Bacillus* sp. KB8 균주의 생육과 효소 활성

분리균주들 중 esterase 활성도가 제일 높았던 *Bacillus* sp. KB8 균주를 대상으로 생육과 효소 생성능에 미치는 NaCl 농도의 영향을 조사하였다(Table 4). NaCl 농도의 증가에 따라 균주의 비성장 속도는 NaCl 무첨가시 1.038 h⁻¹로 부터 NaCl 첨가농도에 따라 느려져 NaCl 11% 첨가시 0.224 h⁻¹로 거의 직선적으로 감소되었다. 고농도 NaCl 조건하의 부진했던 생육은 배양시간의 경과에 따라 점차 회복되는 양상을 보였으나, 세포외 효소의 비활성은 NaCl 무첨가시 290 mU/mg protein 이었고, NaCl 11% 첨가시는 4 mU/mg protein으로 무첨가에 비해 약 1%의 비활성을 보여 효소의 세포외 축적이 NaCl에 의해 상당히 저해되는 것으로 나타났다. 세포내 효소의 비활성은 NaCl 무첨가시 879 mU/mg protein 인데 비해 NaCl 를 11% 첨가한 경우의 비활성은 64 mU/mg protein으로 무첨가시의 비활성도 대비 7% 수준에 머물렀다. 이는 효소의 세포외 분비에서 보인 NaCl 첨가 영향과 유사한 결과로 NaCl 첨가에 의해 효소 생합성이 억제되는 것으로 사료되었다. 그러나 세포외 효소와 세포내 효소의 비활성도의 비는 NaCl 농도 5%까지는 0.29~0.44의 비를 보인 반면, 7% 이상을 첨가할 경우는 0.05~0.16의 비를 보여 NaCl 농도의 증가가 효소의 생성보다는 세포외 축적을 더 억제시키는 것으로 나타났다. Lambrechts 와 Galzy¹⁴⁾는 균주별로 esterase 생성에 대한 NaCl의 영향을 연구하였는데 *Brevibacterium* sp. R312에서는 NaCl 첨가로 esterase 합성이 촉진되며, *B. linens* 62의 경우는 억제시킨다는 두가지 다른 결과를 얻어 효소 생성에 대한 NaCl 첨가 효과가 균주에 따라 다르게 나타남을 보고한 바 있다.

Bacillus sp. KB8 균주와 ATCC6633 균주의 생육 및 esterase 생성 profile

Bacillus sp. KB8 균주와 *B. subtilis* ATCC6633 균주의

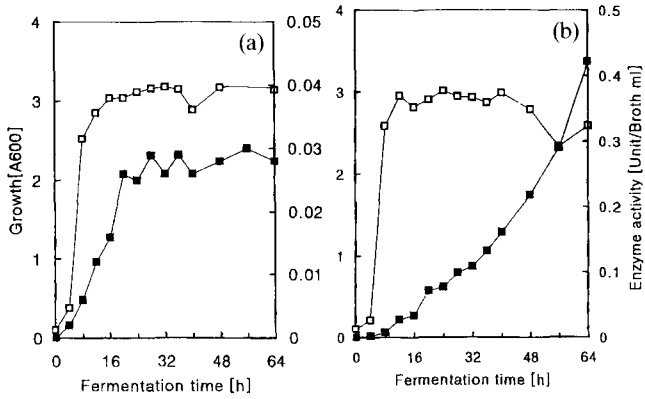


Fig. 1. Growth and esterase production of *B. subtilis* ATCC6633 (a) and *Bacillus* sp. KB8 (b) strains by flask fermentation. □-□ : growth measured by absorbance at 600 nm. ■-■ : esterase production (U/ml).

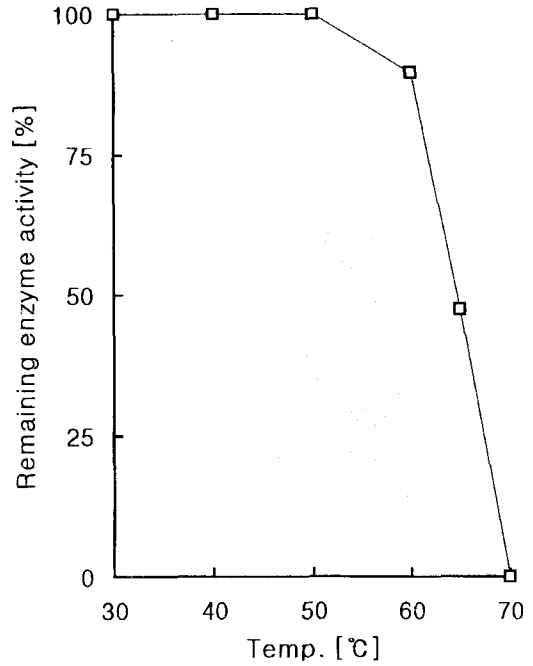


Fig. 2. Thermal stability at various temperatures. Enzymes was preincubated for 30 minutes at each temperature.

비성장 속도는 Table 3에서 보는 바와 같이 각각 1.038 h^{-1} 와 1.043 h^{-1} , 최대 성장도는 각각 3.015, 3.177의 흡광도를 보여 두 균주의 생육은 비성장 속도와 최대 성장도 면에서 매우 유사 하였으나, 효소의 생성 양상은 다르게 나타났다. *B. subtilis* ATCC6633 균주의 경우(Fig. 1(a)) 생육과 연관된 효소 생성능(growth-associated product formation)을 보여 성장속도의 증가와 더불어 효소 생성능이 증가하다가 stationary phase 초기(배양 20 시간 이후)에서 효소 생성능이 최대치에 도달한 이후 약 0.03 U/ml로 증가되지 않고 거의 일정하게 유지되었다. 이에 비해 *Bacillus* sp. KB8 균주(Fig. 1(b))의 효소 생성능은 Stalder와 Bachofen²⁰⁾의 보고와 같이 균주 생육이 late exponential phase 또는 stationary phase 이후(배양 16 시간 이후) 부터 증가하기 시작하여 배양이 종료될 때까지 점증하는 양상을 보여 배양 64 시간 후 *B. subtilis* ATCC6633 균주 보다 약 14배 높은 0.42 U/ml의 효소 활성을 보였다.

효소의 열안정성

온도에 따른 *Bacillus* sp. KB8 균주 기원 esterase의 열안정성을 30, 40, 50, 60, 65, 70°C의 항온수조에서 조효소액을 30분간 정치시킨 후 잔존 효소활성으로 조사하였다(Fig. 2). 그 결과 50°C 까지는 활성이 유지되었으나, 60°C에서 90%, 65°C에서는 약 50%의 잔존 효소활성을 보였으며, 70°C에서는 전부 실활되었다. *Bacillus* sp. KB8 균주 기원의 esterase는 *Bacillus* sp. Wai 28A5²¹⁾ 과 *B. stearothermophilus* G18A7²²⁾ 기원의 esterase 보다는 열안정성이 낮았으나, *B. stearothermophilus*²³⁾ 나 *Aureobacidium pullulans*^{9,24)} 기원의 esterase에 대한 열안정성과는 유사한 결과였다.

Bacillus sp. KB8 균주의 조효소액을 항온수조에서 30°C, 60°C, 65°C에서 3시간 동안 정치시키면서 경시적으로 잔존 효소활성을 조사한 결과(Fig. 3) 30°C에서는 3시간 후 100%의 잔존 활성을 보였고, 60°C에서는 76%의 잔존 활성을 보였으나, 65°C에서는 3%의 잔존 활성을 보여 거의 실활되는 것으로 나타나 60°C 이상에서 온도변화에 따른 효

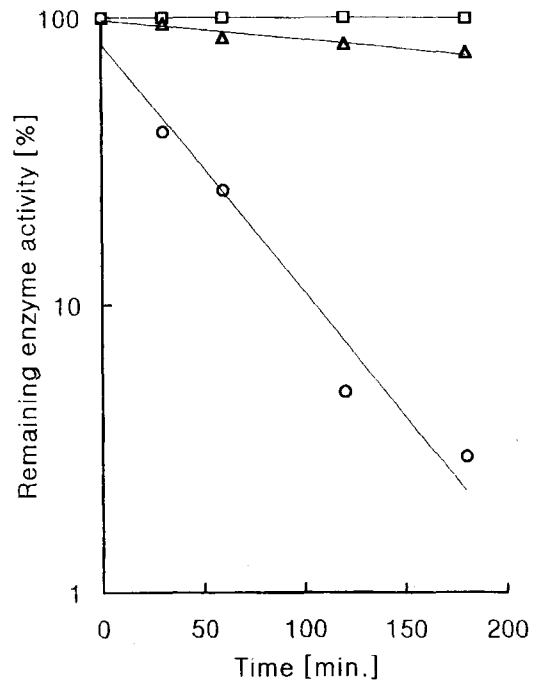


Fig. 3. Thermal inactivation of the esterase at 30(□), 60(Δ) and 70(○)°C.

소의 실활은 빠른 속도로 진행되었다. 60°C와 65°C에서의 효소 활성의 온도 의존성은 60~70°C 사이에는 semilog-graph에서 1차 반응으로 실활되는 지수적 관계를 따른다는 Amaki등²³⁾이나 Matsunaga등¹²⁾의 결과와 유사한 온도 의존 경향을 보였다.

또한 온도 변화에 따라 *Bacillus* sp. KB8 유래의 esterase 조효소액은 4°C 및 실온에서 약 4주간 효소 활성이 유지되었으나, -18°C에서는 1주일 후의 분석에서 100% 실

활되었다(Data 미제시). 이는 식품의 제조 공정상 가열처리에 의해 품질에 부정적 영향을 미칠 경우 esterase의 불활성화를 위한 하나의 대책으로 저온처리를 생각해 볼 수 있으나, 앞으로 몇가지 보완 실험을 실시해야 할 것으로 사료되었다.

이상의 결과에서 식품 소재로 많이 사용되는 산분해 대두 단백질로부터 pHBB분해활성을 갖고 esterase를 다량 생성하는 균주들의 존재는 비록 고농도의 NaCl 조건하에서 생육과 esterase 활성은 상당히 억제를 받으나, 제품의 장기간 유통과 보존중에 자연 유래의 균주에서 기원한 esterase에 의해 점진적인 품질악화가 예상된다. 이는 보존료로 사용되는 ester 화합물의 분해 뿐만 아니라, 미각에 관련한 다른 ester 화합물에 대해서도 어느 정도 영향을 미칠 것으로 생각되므로 원료의 미생물 오염 및 esterase 불활성화에 대한 다양한 대책이 강구되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Whitfield, F. B. and J. H. Last (1986) In Progress in Essential Oil Research(Proceedings of the international symposium on essential oils) : The flavour of the passionfruit-A review. Brunke, E. J. Ed., Walter de Gruyter & Co., Berlin, Germany.
- Kuentzel, H. and D. Bahri (1995) In Food Flavorings : Synthetic ingredients of food flavorings. P. R. Ashurst, 2nd Ed., Chap. 5, Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.
- Hanaoka, Y. (1962) 장유 보존에 관한연구. 일본발효공학잡지 **40**, 610-614.
- Kyzlink, V. (1990) In Principles of Food Preservation, Chap. 4. Elsevier Inc., N.Y., USA.
- 식품첨가물공전(I) (1995) 한국식품공업협회, p 559-569.
- Hanaoka, Y. (1964) 장유 보존에 관한 연구. 일본발효공학잡지 **42**, 553-564.
- Somorin, O. and J. Skorepa (1978) Aliesterase activity in normal and postheparin human blood sera. *J. Biochem.* **83**, 617-623.
- Okumura, S., M. Iwai and Y. Tsujisaka (1983) Properties and substrate specificities of four esterases from *Aspergillus niger* NRRL 337. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1869-1872.
- Imanaka, H., T. Miyoshi, T. Kosomi, Y. Kubochi, S. Hattori and T. Kawakita (1985) Acetylsterases. U.S. Patent 4,517,299.
- Toshimitsu, N., H. Hamada and M. Kojima (1986) Purification and some properties of an esterase from yeast. *J. Ferment. Technol.* **64**, 459-462.
- Meghji, K., O. P. Ward and A. Araujo (1990) Production, purification and properties of extracellular carboxyl esterases from *Bacillus subtilis* NRRL 365. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3735-3740.
- Matsunaga, A., N. Koyama and Y. Nosoh (1974) Purification and properties of esterase from *Bacillus stearothermophilus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **160**, 504-513.
- Nakagawa, A., T. Tsujita and H. Okuda (1984) Purification and some properties of intracellular esterase from *Pseudomonas fluorescence*. *J. Biochem.* **95**, 1047-1054.
- Lambrechts, C. and P. Galzy (1995) Esterase activities of *Brevibacterium* sp. R312 and *Brevibacterium linens* 62. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1464-1471.
- Abbott, B. J. and D. J. Fukuda (1975) Cephalosporin acetylsterase(*Bacillus subtilis*). *Methods Enzymol.* **43**, 731-734.
- Peppler, H. J. and G. Reed (1987) In Biotechnology : Enzymes in food and feed processing, H. J. Rehm and G. Reed, Ed., vol. 7a, 576-578, VCH, Weinheim, Germany.
- Shahani, K. M. (1975) In Enzymes in food processing : Lipases and Esterases, G. Reed, Ed., 181-217, Academic Press, Inc., New York, USA.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. A. Farr and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Donaghy, J. and A. M. McKay (1992) Extracellular carboxylesterase activity of *Fusarium graminearum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 742-744.
- Stalder, V. and R. Bachofen (1994) Physiology of growth and carboxylesterase secretion of a newly isolated *Bacillus thermoglucosidasius* strain EAEC, enriched on ethyl acetate. *Microbiol. Research* **149**, 9-16.
- Janssen, P. H., C. R. Monk and H.W. Morgan (1994) A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp. and continuous assay of its p-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* **120**, 195-200.
- Owusu, R.K. and D. A. Cowan (1991) Isolation and partial characterization of a novel thermostable carboxylesterase from a thermophilic *Bacillus*. *Enzyme Microb. Technol.* **13**, 158-163.
- Amaki, Y., E. E. Tulin, S. Ueda, K. Ohmiya and T. Yamane (1992) Purification and properties of a *Bacillus stearothermophilus* produced by recombinant *Bacillus brevis*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 238-241.
- Myburgh, J., B. A. Prior and S. G. Kilian (1991) The temperature and pH properties of the extracellular hemicellulose-degrading enzymes of *Aureobacidium pullulans* NRRL Y 2311-1. *Process Biochem.* **26**, 343-348.

Esterase Production and Culture Characteristics of Bacteria Isolated from Acid Hydrolysed Soybean ProteinNam-Soon Oh*(*Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-800, Korea*)

Abstract: The characteristics of growth and esterase activity of bacterial strains isolated from acid hydrolysed soybean protein were examined. All the isolated strains having decomposition activity of *p*-hydroxybenzoic acid butyl ester and esterase producing activity were identified as *Bacillus* sp. by morphological and biochemical methods. The specific growth rates, esterase activities and *p*-hydroxybenzoic acid butyl ester decomposition activities of isolated strains were 0.844~1.213 h⁻¹, 21~222 mU/ml and 5.4~8.1 mU/ml, respectively. In the fermentation of *Bacillus* sp. KB8 strain which had the highest esterase producing activity, growth, extracellular excretion and intracellular synthesis of esterase were inhibited by adding NaCl in the culture broth. Esterase producing activity gradually increased after late exponential growth phase, until maximum value of 420 mU/ml reached after 64 hours culture period. Esterase of *Bacillus* sp. KB8 strain was stable up to 50°C for 30 minutes, but was inactivated by heating for 30 minutes at 70°C. The enzyme activity exponentially decreased during the incubation time at the temperatures of 60 and 65°C.

Key words: *Bacillus* sp., esterase, acid-hydrolysed soybean protein, *p*-hydroxybenzoic acid butyl ester

*Corresponding author