

전통메주로부터 대두단백질 가수분해효소 생산성 미생물의 분리 및 동정

강민정 · 김성호 · 주현규¹ · 이갑상² · 임무현*

대구대학교 식품·생명·화학공학부, ¹선문대학교 식량자원학부, ²원광대학교 식량자원학과

초 록 : 대두 단백질의 효소적 가수분해에 의한 분해물의 맛과 향을 개선시킬 수 있는 효소적 가수분해 system을 확립하기 위하여, 전통메주로부터 대두단백질 분해능이 우수한 균주를 분리하여, 분해 양상이 상이한 효소를 생산하는 곰팡이와 세균 3균주를 선별하여 동정을 실시하였다. 단백질 분해능이 우수한 균주 중 곰팡이 M4는 leucine 활성이, 곰팡이 M5는 azodye 활성이 높았으며, 세균은 leucine 활성이 가장 낮은 B16을 선별하여 효소의 작용에 의한 대두 단백질의 분해 양상이 상이한 균주로 분리하였다. 분리한 곰팡이 M4는 배양배지에서 균사는 백색이었으며 균핵은 흰색에서 검은 색으로 변화하였다. Slide배양 결과, 분생자두는 방사형이었고, 정낭은 곤봉형이었다. 분생자는 반구형으로 기경자와 단경자가 존재하였다. 분생자병은 무색으로 매끈한 표면이었다. 분류학상 *Aspergillus oryzae*(ahlburg)종의 특징과 유사하여 이 종으로 분류·동정하고 *Aspergillus oryzae* M4로 명명하였다. 곰팡이 M5는 MEA배지에서 흰색과 검은색의 균사가 혼재되어 있었다. Slide배양 결과, 회녹색의 균총과 긴(7 mm) 포자낭병이 존재하였다. 포자낭은 회갈색이었고, 큰 포자낭의 기저막에서 작은 포자낭들이 떨어져 나오는 형태를 보였다. 중축은 구형으로 절단된 유리질의 형태이었고, 포자낭 포자는 직경이 작은(80 µm) 타원형이었다. 따라서 분류학상 접합균의 *Mucor circinelloides*의 종과 유사하여, 이 종으로 분류·동정하고 *Mucor circinelloides* M5 라 명명하였다. 세균 B16은 백색의 불투명한 colony로서 circular, lobate한 형태였고, 간상형으로 내생포자를 함유하였다. 또한, gram염색, catalase, oxidase, β-glucosidase, V-P test 등에서 양성하였고, D-fructose, α-D-glucose, maltose, D-mannose, D-raffinose, stachyose, sucrose 등의 이용성이 있었다. B16의 형태학적, 생리학적 특징의 결과, *Bacillus megaterium*의 특징과 일치하였다. 그러나, 균체 지방산은 *Paenibacillus marcerans*의 균종과 유사하여 B16은 더 자세한 동정방법과 분류체계를 통해 명확한 동정이 필요하리라 사료되었다. 따라서 B16은 잠정적으로 *Bacillus megaterium* B16이라 명명하였다. (2000년 4월 17일 접수, 2000년 5월 26일 수리)

서 론

단백질 분해 효소는 효소의 작용 pH에 따라 acid, neutral, alkaline protease로 분류되고, 기질 특이성과 활성부위를 구성하는 amino acid의 조성에 따라 serine, cysteine, aspartic, metal protease 등과, 분해되는 위치에 따라 exopeptidase와 endopeptidase로 구분되어진다.^{1,2)} 따라서 매우 복잡한 작용기작과 특성을 나타내는 다수의 효소가 있으며 효소에 따라 protein 또는 polypeptide의 내부 임의의 장소의 특정 아미노산 서열들을 인식하고 절단하여 다양한 종류의 peptide를 생성시킨다.³⁾

우리나라의 식품에서 단백질 분해 효소의 이용으로는 전통 메주를 예로 들 수 있으며 특히 각 지방의 기후와 메주의 제조 방법의 차이에 따라 특징있는 미생물 균주가 다양하게 서식되고 있다.^{4,7)} 메주에서 일어나는 발효의 과정은 메주에 서식하는 미생물들에 의해 생산되는 효소의 작용으로 콩의 생화학적 변화가 일어나는 것으로 알려져 있다.^{7,8)} 전통 메주에 서식하는 미생물은 *Mucor*속,^{4,9,10)} *Rhizopus*속,^{4,6,9)} *Aspergillus*속,^{5,9,10)} *Penicillium*속^{5,10)} 등의 곰팡이류와 호기성 세균으로 일부 *Micrococcus*속 외에는 *Bacillus*속^{7,10,11)}이 있고, 혐기성 세균으로 *Streptococcus*속, *Lactobacillus*속, *Pediococcus*속 등이 내재하는

것으로 보고¹¹⁾ 되었다. 메주에서 이들 균주들은 자연 발효되는 과정에서 복잡하고 다양하게 작용하여 콩의 생화학적 변화를 일으키고, 특히 장류의 숙성과정에서 단백질 분해 효소의 작용으로 콩단백질에서 유래된 peptide와 유리 아미노산이 우리나라 전통 장류의 맛과 풍미의 근원이 되는 것으로 알려져 있다.¹²⁾

단백질의 가수분해 산물로 얻어지는 유리 amino acid, oligopeptide 및 저분자 단백질들은 혈압강하, Ca 흡수촉진 등 여러 가지 기능성을 가지므로 새로운 생물 소재로 각광 받고 있다. Qi 등¹³⁾은 분자량·표면소수성의 증가와 분리대두단백(soy protein isolate, SPI)의 용해성·유화능과의 상관성을 보고하였고, 대두단백질의 효소적 처리를 통하여 기능적 특성으로 효소적 가수분해물로 부터 angiotension converting enzyme (ACE) 저해성 peptide의 함유율을 높인 건강 기능성 식품의 개발과, 일부 peptide류가 amino acid보다 소장에서 흡수속도가 빠른 성질을 이용하여 드링크류의 sports식품으로의 이용에 대한 연구가 있다.^{14,15)} Han 등¹⁶⁾은 동물실험에서 대두 peptide의 표면소수도가 높을수록 더 많은 분변 cholesterol이 배설되고, 혈중 cholesterol의 농도가 낮아짐을 보고하였다. 이러한 여러가지 단백질 유래의 가수분해물을 혼합하여 영양의 균형을 맞추고, 특수질병의 예방효과를 갖는 건강 기능성 식품의 개발과 생산량이 많은 단백질 자원을 처리하여 고부가 가치의 신소재를 만들어내는 가공기술 또한 식품산업계의 주요 관심분야가 될 것으로 전망된다.

찾는말 : *Aspergillus oryzae*, *Mucor circinelloides*, *Bacillus megaterium*, 메주, 분리, 동정

*연락처 : Tel : 82-53-850-6531; Fax : 82-53-850-6539

따라서 본 연구는 대두 단백질분해 효소의 작용과 성질을 이용하여, 특정기능을 가진 단백질분해물의 조제에 필요한 제반적인 연구를 위하여 단백질분해 효소활성이 우수하고 단백질 분해 형태와 분해 peptide의 특징이 다르게 나타나는 효소를 탐색하기 위하여 우리나라의 전통메주에서 곰팡이와 세균을 분리, 동정하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선별

전보¹⁷⁾에서 수집한 전국 각지의 메주 시료를 표면의 외부층과 표면으로부터 두께 2-3 cm까지의 내부층으로 나누어서 100 mesh로 마쇄한 후, 멸균 생리식염수에 희석, 현탁하여 그 상등액을 곰팡이 분리배지로서 potato dextrose agar(PDA, Difco Co.)(Table 1)와 세균 분리배지로서 trypticase soy agar(TSA, Difco Co.)(Table 1)배지에 도말한 후 각각 28°C에서 7일, 35°C에서 3일간 배양하였다. 생육이 양호하고 colony 모양이 상이한 균주를 1차 선별하여 1% soy protein isolate(SPI)가 함유된 Czapek-Dox broth(CDB, 곰팡이용)배지와 trypticase soy broth(TSB)배지(세균용)에 배양한 후 단백질분해 효소 활성이 우수한 곰팡이 2균주와 세균 1균주를 최종 선별하여 동정하였다.

분리 균주의 동정

순수 분리한 균주 중 곰팡이는 Table 1의 배지 중 Czapek yeast extract(autolysate) agar(CYE), Czapek yeast extract agar with 20% sucrose(CY20S), malt extract agar(MEA), *Aspergillus flavus/parasiticus* agar(AFPA), creatine sucrose agar(CREA)에 접종하여 28°C에서 7일간 배양한 후, Domsch 등¹⁸⁾과 Raper 등¹⁹⁾의 방법에 준하여, 육안 및 실체현미경으로 균총의 형태, 색깔, 외형적 특징 등을 관찰하였고, 광학현미경의 관찰은 slide culture법²⁰⁾으로 포자(spore), 포자낭병(sporangiophore), 포자낭(sporangium)의 모양, 색깔, 크기, 분생자(conidia), 분생자병(conidiophore)의 모양, 색깔, 크기 등의 특징을 관찰하여 동정하였다.

세균은 TSA배지에 계대 배양하면서 Bergey's manual of systematic bacteriology²¹⁾와 Microbiological applications²²⁾에 준

하여 균주의 형태적, 생리적 특성과 Biolog system을 사용하여 물질의 이용능을 조사하였다. Gas chromatography(GC)를 이용한 Microbial identification system(MIS) whole cell fatty acid analysis²³⁾를 이용하여 균체 지방산을 분석하여 identification library와 비교하여, 세균 B16의 확인, 동정하였다.

분리균주의 보존 및 배양

분리된 균주중 세균은 TSA배지에, 곰팡이는 PDA배지에 계대 배양하여 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

세균의 배양은 종배양액을 2%(v/v)되게 TSB배지에 접종하여 45°C, 150 rpm에서 60시간 동안 진탕 배양하였고, 곰팡이는 각각, 밀기울배지에 분무 접종하여 28°C, 3일간 배양하여 koji로 만든 후 추출하여 사용하였다.

단백질의 정량과 protease activity 측정

효소단백질의 양은 Lowry법²⁴⁾에 따라 측정하였고, bovine serum albumine(BSA)을 표준물질로 사용하여 단백질 함량을 계산하였다.

균 분리를 위한 효소활성은 Anson 방법²⁵⁾으로 측정하였다. 즉, 분리용 액체배지에 배양후 균주를 원심분리하여 그 상등액을 조효소 용액으로 사용하였다. 조효소용액 1 ml에 50 mM Tris-HCl buffer(pH 6.0)에 녹인 3% SPI 기질용액 3 ml를 가한 후 30°C에서 30분간 반응 후, 0.4 M trichloroacetic acid(TCA) 3 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고, 실온에서 30분간 정치하였다가 원심분리(5000 rpm, 10 min, 5°C) 하여 그 상등액을 취하여 0.4 M Na₂CO₃ 5 ml와 1 N Folin reagent 0.5 ml를 넣고 30분간 발색시킨 후 spectrophotometer(UV-1201, Shimadzu Co, Japan) 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 단위는 30°C에서 1분 동안에 1 µg/ml의 tyrosine을 유리시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

Endopeptidase 과 exopeptidase 활성 측정

분리된 세균과 곰팡이가 생산하는 효소의 일정기질에 대한 작용부위가 서로 다른 균주의 선택을 위하여 azocoll dye-release법과 leucine aminopeptidase법을 이용하여 효소활성을 측정하였다.²⁶⁾ Endopeptidase의 활성측정은 0.1 g azocoll을 0.05

Table 1. Media ingredients used in the experiments

Trypticase soy broth(TSB, Difco, Co): 1.7% tryptone(pancreatic digest of casein), 0.3% soytone(papaic digest of soy bean meal), 0.25% dextrose, 0.5% NaCl, 0.25% K ₂ HPO ₄ , pH 7.3
Trypticase soy agar(TSA, Difco Co): TSB + 1.5% agar
Potato dextrose broth(PDB, Difco Co): 20% potato(infusion from), 2% dextrose, pH 5.1
Potato dextrose agar(PDA, Difco Co): PDB + 1.5% agar
Czapek-Dox Broth(CDB): 3.0% sucrose, 0.3% NaNO ₃ , 0.1% K ₂ HPO ₄ , 0.05% KCl, 0.05% MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0.001% FeSO ₄ · 7H ₂ O, pH 7.3
Czapek yeast extract(autolysate) agar(CYA): CDB + 0.5% yeast extract + 1.5% agar, pH 7.3
Czapek yeast extract agar with 2.0% sucrose(CY20S): 2.0% sucrose instead of 3.0% sucrose into CDB + 0.5% yeast extract + 1.5% agar, pH 7.3
Malt extract agar(MEA): 2.0% malt extract, 2.0% glucose, 0.1% peptone, pH 5.5
Aspergillus flavus/parasiticus agar(AFPA): 2.0% yeast extract, 1.0% peptone, 0.05% ferric ammonium citrate, dichloran(botran®), 1.5% agar, pH 6.3
Creatine sucrose agar(CREA): 0.3% creatine(1H ₂ O), 3% sucrose, 0.05% KCl, 0.1% KH ₂ PO ₄ , 0.05% MgSO ₄ · 7H ₂ O, 0.001% FeSO ₄ · 7H ₂ O, 0.001% ZnSO ₄ · 7H ₂ O, 0.0005% CuSO ₄ · 5H ₂ O, 0.005% chloramphenicol, 0.0002% dichloran(botran®), 0.005% bromocresol purple, 1.5% agar pH 6.0

M Tris-HCl buffer(pH 7.2) 20 ml에 녹여 상온에서 60분간 교반 용해 후 원심분리하여 침전물을 동량의 buffer에 재용해 후 기질로 사용하였다. 효소액 0.3 ml에 기질 1.7 ml를 첨가한 후 30°C에 60분 동안 반응시킨 다음 원심분리(5,000 rpm, 5 min)하여 상정액을 spectrophotometer 520 nm에서 흡광도값으로 측정하였다. Exopeptidase의 활성측정은 leucine-*p*-nitroanilide 25 mg을 DMSO(dimethylsulfoxide) 1 ml와 0.2 M phosphate buffer (pH 7.0) 50 ml에 녹여 기질로 사용하였다. 효소액 0.3 ml에 기질용액 3.7 ml를 혼합하여 30°C에서 60분간 반응시킨 후, 1 M acetic acid 1 ml를 첨가하여 반응을 중지시킨 다음 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로서 azocoll과 *p*-nitroaniline을 사용하였으며 이들의 흡광도값을 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 선별

전국 각 지방에서 수집한 전통메주에서 총 54개의 균주를 분

Table 2. The comparison of enzyme activity for exo-peptidase (azodye method) and endo-peptidase(leucine method) (unit : mg/ml)

Bacteria No.	Azodye	Leucine	Mold No.	Aazodye	Leucine
16	0.010	0.068	1	0.010	0.042
95	0.034	0.169	2	0.035	0.000
97	0.019	0.160	3	0.006	0.004
101	0.019	0.137	4	0.007	0.141
108	0.043	0.147	5	3.008	0.043
			6	0.057	0.157
			7	0.958	0.199

리하였고, 그 중 육안으로 보았을 때 형태가 상이하고 단백질 분해능이 우수한 세균 5균주와 곰팡이 7균주를 선별하였다 (Table 2). 이들 중 기질에 대한 효소 작용부위가 상이한 균주를 선별하기 위해 azodye법과 leucine법²⁰으로 실험하였다. 세균의 경우 azodye활성이 낮고 leucine활성은 대체로 높았다. 그 중 전보¹⁷에서 분리, 동정된 B95의 leucine 활성이 가장 높았고, B16이 leucine활성이 가장 낮았다. 곰팡이의 경우는 leucine

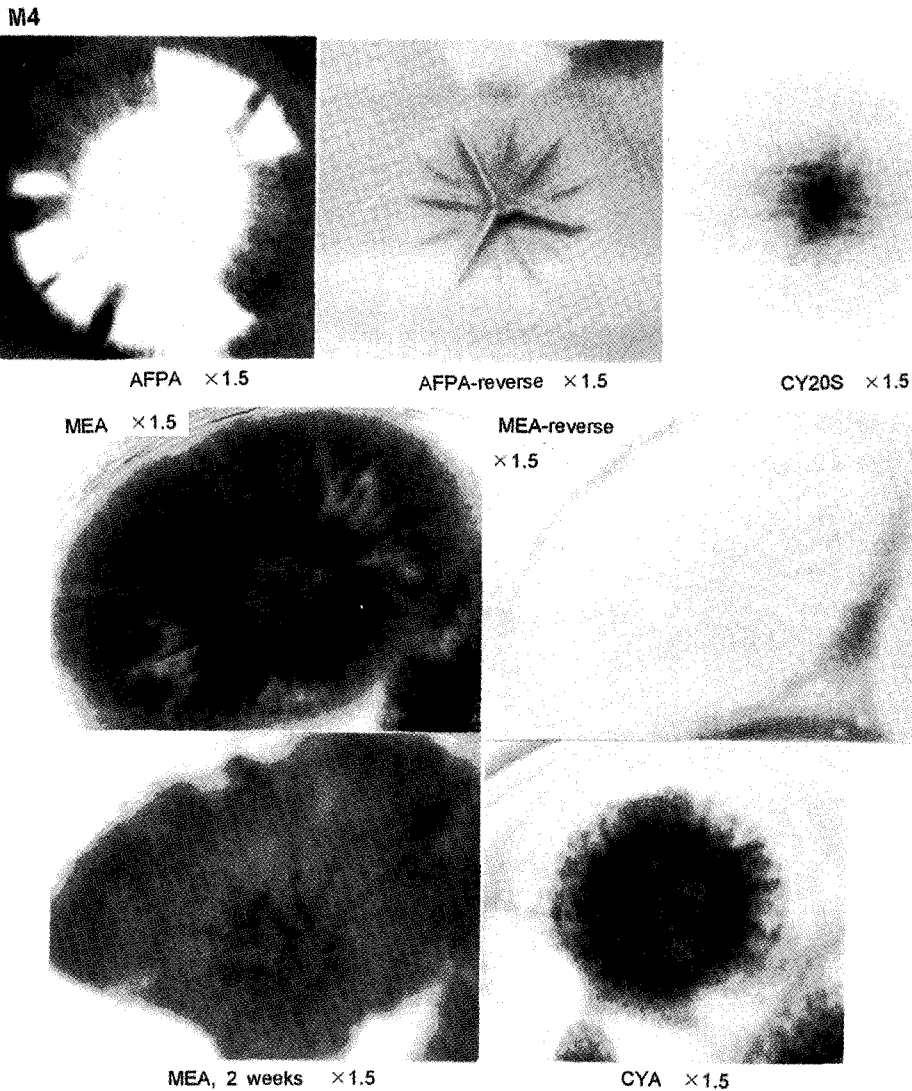


Fig. 1. Microscopic photograph of the strain M4 isolated from Meju.

활성이 높은 M4와 azodye 활성이 높은 M5를 세균은 B16을 각각 최종 선별하여 동정에 사용하였다.

곰팡이 M4의 동정

분리된 균주 중 곰팡이 M4의 경우는 평판배지 상에서 생육 상태를 관찰한 결과(Fig. 1) CYA배지에서 직경 45~52 mm, MEA배지에서 50~56 mm, CY20S배지에서 36~40 mm로 대체로 성장이 원활하였고, CYA배지에서 37°C에서 배양했을 때는 60~65 mm로 성장하여 배양온도의 범위는 넓은 것으로 나타났다. 균총(colony)으로서 세 배지에서의 분생자의 색깔은 연노랑과 연두색에 가까운 olive색을 띄었다. 균핵(sclerotia)은 최초에 흰색에서 중심부부터 검은 색으로 변화하는 양상을 보였다. 외

부의 형태적 변화로서, CYA배지에서는 방사형으로 갈라지고 MEA와 CY20S에서는 양털모양(floccuse)을 나타내었고, 균사(mycelium)는 세배지상에서 모두 백색에 가까운 색을 나타내었다. 배양배지 후면부의 색깔은 CYA배지에서는 연갈색에 가까운 색을 띄었으나, MEA와 CY20S에서는 둘 다 노란 색을 나타내어 유사한 색의 변화를 보였다. 그러나 CYA배지에 접종 후 37°C에서 배양했을 때 배지 뒷면부는 담황색에 가까운 회노란색을 띄었으며, AFPA배지를 이용하여 28°C에서 배양 시, 균총은 길이가 35 mm의 방사형이었고, 뒷면부는 황토색의 색깔변화를 보였으나, CREA배지에서는 생육하지 못하는 것으로 나타났다.

M4의 slide배양물의 검경 결과 분생자두(conidial head)는 성

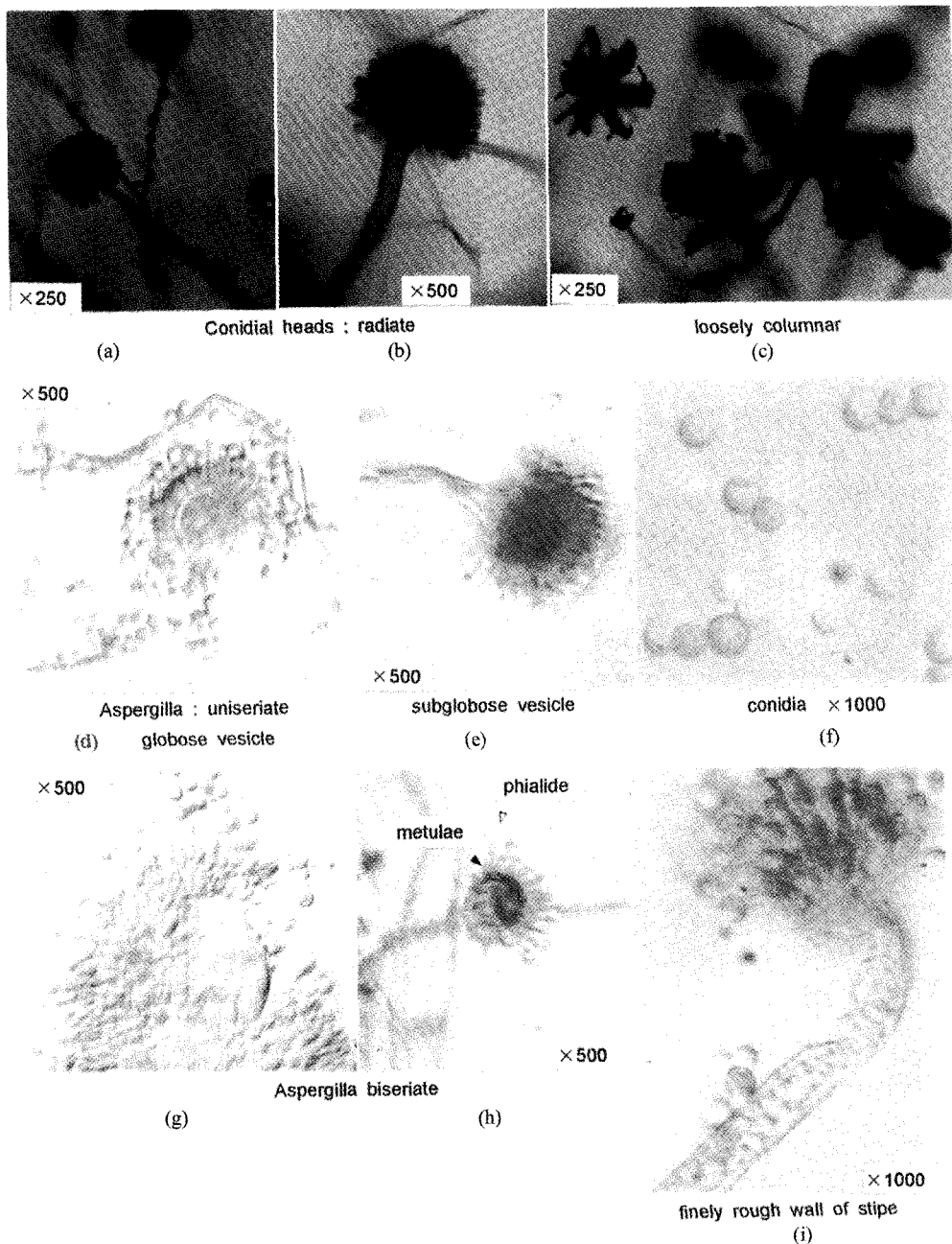


Fig. 2. Microscopic photograph of the strain M4 isolated from Meju.

숙되었을 때 연녹색으로 변화하였고, 거의 원형에 가까운 전형적인 방사형의 모습이었고(Fig. 2-A, 2-B), 정낭(vesicle)은 구형이었으나, 곤봉형(20~40 μm)에 가까운 형태를 이루고 있었다(Fig. 2-C, 2-E). *Aspergilla*는 대부분 2연쇄상(biseriate)이었고 부분적으로 단쇄상(uniseriate)을 보였다(Fig. 2-D, 2-G). 분생자(conidia)는 반구형으로 구형형태를 가지고 있었고, 직경은 3.5~10 μm으로 매끄러운(smooth) 표면(wall)을 가지고 있었다(Fig. 2-F). 기경자(metulae)는 8~12×4~5 μm의 크기로 정낭의 윗쪽 절반부분을 덮고 있었고, 단경자(phialide)는 길이가 8~15×3~5 μm정도이었다(Fig. 2-H). 분생자병(stipes)은 무색으로서 벽면에 미세하면서 거친 돌기가 있었으나, 전반적으로 매끈

한 표면(smooth wall)을 가지고 있었고, 길이는 0.5~2.5 mm×10~35 mm에 이르는 긴 편이었다(Fig. 2-I).

분리균의 특징으로 균총이 세 배지상에서 연두색에 가까운 olive색의 변화를 보인점과 MEA에서 성장이 빠르고, 양털모양의 균총의 형태와 방사형의 분생자두와 균핵이 흰색에서 검은색으로 변화하는 양상으로 Lee 등⁵⁾과 Raper 등¹⁹⁾의 분류상 *Aspergillus oryzae*(ahlburg) cohn종에 유사한 특징을 보였으며, Czapeck agar 류의 배지에서 성장이 원활하고(45~52 mm), 배지상에서 균총이 연두색의 색을 띄운다는 점과 구형의 정낭으로 크기가 20~40 μm을 형성한다는 점, biseriate와 uniseriate가 혼재되어 있다는 점, 분생자병이 부분적으로 거친 돌기이나 대부

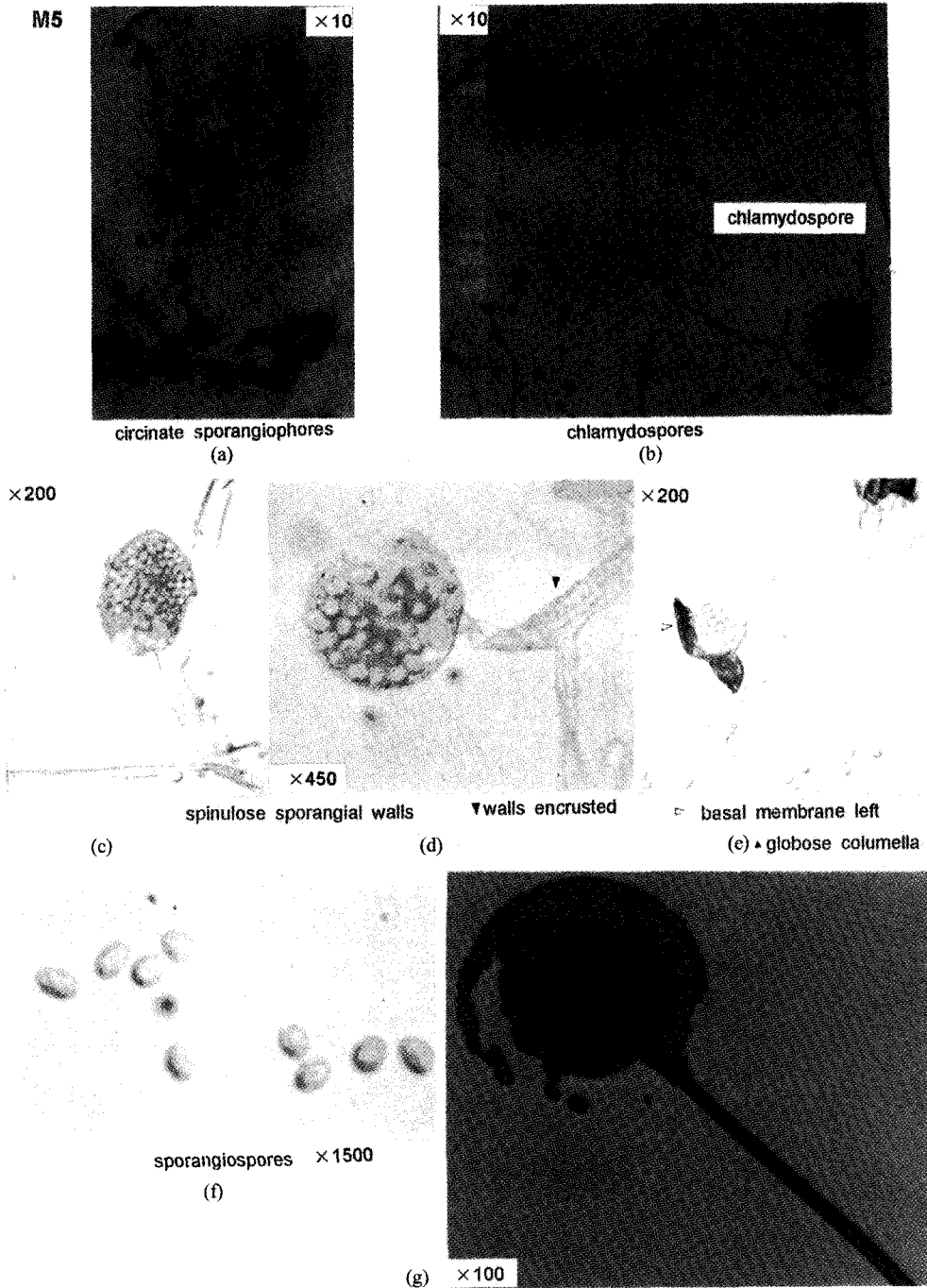


Fig. 3. Microscopic photograph of the strain M5 isolated from *Meju*.

Table 3. Morphological and biochemical characteristics of the bacteria No. 16 isolated from *Mejus*

Characteristics	Results
Gram stain	+
Spore stain	+
Cell shape	rod
Catalase reaction	+
Oxidase reaction	+
Urease reaction	-
β-Glucosidase reaction	+
Voges-Proskauer test	+
Colony form	circular
Colony elevation	raised
Colony margin	lobate
Hydrolysis of casein	+
gelatin	+
starch	+

Symbols : (+) Positive, (-) Negative.

분 매끄러운 표면을 가진다는 점등에서 Lee 등⁵⁾과 Raper 등¹⁹⁾의 분류상의 *Aspergillus oryzae*(ahlburg) cohn var. *effusus*종의 특징과도 유사하였다. 따라서 곰팡이 M4의 특징이 *Aspergillus oryzae*의 전반적인 특징과 일치하여 *Aspergillus oryzae*로 잠정적으로 분류, 동정하고 *Aspergillus oryzae* M4로 명명하였다. 이종에 속한 균종은 각종 발효식품에서 널리 이용되고 있고, 특히 우리나라의 전통메주에서 *Aspergillus oryzae*를 이용한 메주제조와 화학적 작용성에 대한 연구와 산업적 제조공정에 이용 가능성을 제시²⁷⁾하고 있다.

곰팡이 M5의 동정

평판배지상의 생육상태를 관찰한 결과 PDA배지에서 회색의 균사가 성장하여 검은색의 균층을 형성하였고 MEA에서는 흰색과 검은색의 균사가 혼재하여 자라는 것으로 나타났다. M5의 slide 배양물의 검경 결과로서 균층(colony)은 회색으로 높이가 7mm에 이르는 긴 포자낭병(sporangiophore)으로 이루어져 있었고, 긴 형태와 여러 개의 짧은 가지(branches)를 가진 비대칭적(symptodial) 상태였고 짧은 가지는 고리모양(circinate)도 일부 관찰되었다. 직경은 약 17μm 정도였고 약간 딱딱한(encrusted) 표면(wall)을 가지고 있었다(Fig. 3-A, 3-B). 후막포자(clamydospores)는 기질의 윗 부분과 안쪽 부분에 극소수가 발견되었다(Fig. 3-B). 포자낭(sporangia)은 처음은 얇은 노란색에 가까운 흰색이었으나 성숙해가면서 회갈색을 띄었고, 직경이 80μm에 이르렀다. 표면은 작은 가시모양(spinulose)이 있는 약간 거친면을 가지고 있었고, 큰 포자낭 표면이 깨어져 작은 깃(collars)형태로 떨어져 나오며, 큰 기저막(basal membrane)에서도 연속적으로 작은 포자낭들이 떨어져 나오는 형태를 보였다(Fig. 3-C, 3-D, 3-E). 중축(columella)은 기저(base)부분에서 절단된 형태로서 직경이 30-40μm에 이르는 구형(globose)의 유리질(hyaline)의 형태를 가지고 있었다(Fig. 3-E). 포자낭 포자(sporangiospore)는 타원형(ellipsoidal) 형태이었고, 4-7×3.5-5μm의 크기로 매끄러운 표면(smooth wall)을 가졌다(Fig. 3-F, 3-G).

Table 4. Test of assimilation and oxidation of various sources by the bacteria No. 16 isolated from *Mejus* using Biolog system

Sources	Results
α-cyclodextrin	-
α-cyclodextrin	V
Dextrin	+
Glycogen	+
Inulin	-
Mannan	-
Tween 40	+
Tween 80	+
N-acetyl-D-glucosamine	V
N-acetyl-D-mannosamine	-
Amygdalin	-
L-arabinose	-
D-arabitol	-
Arbutin	-
Cellobiose	V
D-fructose	+
L-fucose	-
D-galactose	-
D-galacturonic acid	-
Gentabiose	V
D-gluconic acid	V
α-D-glucose	+
m-inositol	-
α-D-lactose	-
Lactulose	-
Maltose	+
Maltotriose	-
D-mannitol	-
D-mannose	+
D-melezitose	-
D-melibiose	-
α-metyl-D-galactoside	-
β-metyl-D-galactoside	-
3-metyl glucose	+
α-metyl-D-glucoside	-
β-metyl-D-glucoside	-
α-metyl-D-mannoside	-
Palatinose	-
D-psicose	+
D-raffinose	+
L-rhamnose	-
D-ribose	-
Salicin	-
Sedoheptulosan	-
D-sorbitol	-
Stachyose	+
Sucrose	+
D-tagatose	-
D-trehalose	V
Turanose	+
Xylitol	-
D-xylose	-
Acetic acid	-
α-hydroxybutylic acid	-
β-hydroxybutylic acid	-
γ-hydroxybutylic acid	-

Table 4. Continued

Sources	Results
p-hydroxyphenyl acetic acid	-
α -ketoglutaric acid	-
α -ketovaleric acid	-
Lactamide	-
D-lactic acid methyl ester	-
L-lactic acid	-
D-malic acid	-
L-malic acid	-
Methyl pyruvate	+
Mono-methyl succinate	-
Propionic acid	-
Pyruvic acid	V
Succinamic acid	-
Succinic acid	-
N-acetyl-L-glutamic acid	-
Alaniamide	-
Water	-
D-alanine	-
L-alanine	-
L-alanyl-glycine	-
L-asparagine	-
L-glutamic acid	-
Glycyl-L-glutamic acid	-
L-pyroglytamic acid	-
L-serine	-
Putrescine	-
2, 3-butanediol	-
Glycerol	-
Adenosine	-
2'-Deoxyadenosine	-
Inosine	-
Thymidine	-
Uridine	-
Adenosine-5'-monophosphate	-
Thymidine-5'-monophosphate	-
Uridine-5'-monophosphate	-
Fructose-6-phosphate	-
Glucose-1-phosphate	-
Glucose-6-phosphate	-
D-L- α -glycerol phosphate	-

Symbols: (+) Positive, (-) Negative, (V) Variable.

본 균주의 비대칭적 포자낭벽의 특징으로 일부 고리모양의 짧은 가지를 보이는 점과 쉽게 부서져 columella가 뚜렷이 관찰된다 점에서 Lee 등⁴⁾과 Domsch 등¹⁸⁾이 분류한 *Mucor racemosus* f. *racemosus*와 일부 유사한 특징이 있었으나, 본 M5는 포자의 형태가 구형이 아닌 타원형이며, 구형의 포자낭으로서 직경이 작았으며, 후막포자가 드물었다는 점에서 다소 차이를 보였다. Lee 등⁴⁾이 메주에서 분리한 *Mucor circinelloides* f. *circinelloides*의 포자낭은 회갈색이었고, 대부분 포자낭벽이 쉽게 부서져 구형의 columella가 뚜렷히 관찰되었다는 보고와 본 M5 균주의 형태상 유사하였으며 Domsch 등¹⁸⁾의 분류에서 집합균(Zygomycetes)의 *Mucor circinelloides*의 형태와도 유사한 결과를 보여 동속, 동종으로 분류, 동정하였고

Mucor circinelloides M5 라 명명하였다. 이 균종은 우리나라의 전통메주에서 쉽게 분리되고¹⁰⁾ 특징적으로 단백분해 효소의 역가가 높고 전통 장류의 맛에 영향을 주는 균주라 보고⁴⁾되었고, 이들 균종을 이용한 콩알메주의 대량생산을 위한 발효의 특성을 검토한 보고²⁸⁾가 있다.

세균 B16 균주의 동정

분리된 세균 B16의 형태학적, 생리학적 특성(Table 3)으로 백색의 불투명한 colony로서, circular하고 표면은 lobate한 외부형태였고, 간상형으로 포자 염색시 내생포자를 함유하고 있었으며, gram 염색은 양성이었다고, catalase, oxidase, β -glucosidase 및 Voges-Proskauer 시험(V-P test)에서도 양성으로 나타나, 일반적인 *Bacillus* sp.와 유사하였지만,²¹⁾ 좀더 자세한 생리학적 특성을 Biolog system을 이용하여 조사한 결과(Table 4), 주요 당류로서 D-fructose, α -D-glucose, maltose, D-mannose, D-raffinose, stachyose, sucrose 등의 이용성이 있었고, α -D-lactose, L-arabinose, D-galactose, glycerol 등의 이용성은 없는 것으로 나타났다. 또한 B16 세균의 균체지방산 분석의 결과(Fig. 4), C_{15:0} anteiso(37.87%), C_{15:0} iso(23.04%), C_{16:0}(12.12%), C_{17:0} anteiso(8.96%)과 iso(7.99%) 등의 성분이 혼재되어 있는 양상이었다. 이들 균체지방산의 특징은 기존의 *Bacillus* 균종과는 다소 다른 *Paenibacillus marcerans*의 균종과 유사한 특징을 보여 다소 상이한 결과를 나타내었다. 이에 대하여 다른 동정방법과 분류체계를 통해 명확한 동정이 필요하리라 사료된다. B16 균주의 대부분의 형태학적, 생리학적인 특징이 Bergey's manual of systematic bacteriology²¹⁾와 Microbiological applications²²⁾ 등의 분류의 결과, *Bacillus megaterium*의 특징과 일치하여, 잠정적으로 이 균으로 분류하고, *Bacillus megaterium* B16이라 명명하였다.

이⁷⁾는 메주의 발효과정에서 분리한 *Bacillus megaterium* 균종이 단백분해 효소 역가가 높고, 간장제조시 맛과 냄새에 영향을 주는 주요 균으로서 메주 전체에 분포되어 있다고 보고하여 본 실험 결과와 유사하였으며, 구 등²⁹⁾이 메주에서 분리한 *Bacillus licheniformis*는 L-arabinose, D-xylose, D-mannitol 등의 당 이용성이 있다고 보고하여 본 실험의 B16의 균주의 당 이용성의 결과와는 상이하였다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 한국과학재단 특정기초연구비(96-04-02-50-01-3)지원으로 수행 되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Nunokawa, Y., Namba, Y. and Watanabe, S. (1961) A study of the rice koji protease. *J. Soc. Brew.* 53, 930-933.
2. Neurath, H. (1989) In 'Proteolytic Enzymes, A Practical Approach: The Diversity of Proteolytic Enzymes,' Beynon R. J. and Bond J. S.(Ed), Chap. 1., pp. 1-13, IRL Press, Oxford, New York.
3. Appel, W. (1970) In 'Method of Enzymatic Analysis,'

Sherlock Version: 2.95

DATA:C99203387A

03-FEB-99 10:42:49

RT	Area	Ar/Ht	Respon	ECL	Name	Comment 1	Comment 2
1.594	472944594	0.026	. . .	7.008	SOLVENT PEAK	< min rt	
1.951	850	0.026	. . .	7.746		< min rt	
5.288	1641	0.033	1.026	12.612	13:0 ISO	0.44 ECL deviates	Reference 0.000
6.548	2413	0.038	0.992	13.617	14:0 ISO	0.62 ECL deviates	Reference 0.007
7.057	5854	0.035	0.981	13.998	14:0	1.49 ECL deviates	Reference 0.006
8.001	92119	0.038	0.966	14.623	15:0 ISO	23.04 ECL deviates	Reference 0.009
8.137	151733	0.038	0.964	14.713	15:0 ANTEISO	37.87 ECL deviates	Reference 0.010
8.570	4117	0.041	0.958	14.999	15:0	1.02 ECL deviates	Reference 0.007
9.596	4242	0.040	0.948	15.625	16:0 ISO	1.04 ECL deviates	Reference 0.006
9.810	12943	0.040	0.946	15.756	16:1 wilc	3.17 ECL deviates	Reference 0.004
10.208	49699	0.041	0.942	15.999	16:0	12.12 ECL deviates	Reference 0.005
10.872	4533	0.041	0.937	16.387	ISO 17:1 w10c	1.10 ECL deviates	Reference 0.000
11.024	2166	0.046	0.936	16.476	Sum In Feature 5	0.52 ECL deviates	17:1 ISO I/ANTEI B
11.286	33044	0.041	0.935	16.630	17:0 ISO	7.99 ECL deviates	Reference 0.006
11.444	37057	0.043	0.934	16.722	17:0 ANTEISO	8.96 ECL deviates	Reference 0.005
13.660	2646	0.043	0.925	18.000	18:0	0.63 ECL deviates	Reference 0.004
*****	2166	SUMMED FEATURE 5	0.52	17:1 ISO I/ANTEI B 17:1 ANTEISO B/i I

Solvent Ar	Total Area	Named Area	% Named	Total Amt	Nbr Ref	ECL Deviation	Ref ECL Shift
472944594	404207	404207	100.00	386402	11	0.001	0.007

TSBA [Rev 3.90]	Paenibacillus	0.596 (Bacillus)
	P. macerans	0.596 (Bacillus)
	P. m. GC subgroup A	0.596 (Bacillus)
CLIN [Rev 3.90]	Bacillus	0.246
	B. subtilis	0.246
	B. circulans	0.154

Fig. 4. Results on whole cell fatty acid analysis of bacteria B16 by microbial identification system (MIS) of gas chromatography.

- Academic Press, pp. 4-10, New York.
- Lee, S. S., Park, K. H., Choi, K. J. and Won, S. A. (1993) Identification and isolation of *Zygomyceteous* fungi found on Maejus, a raw material of Korean traditional soy sauces, *The Kor. J. of Mycol.* **21**, 172-187.
 - Lee, S. S., Park, K. H., Choi, K. J. and Won, S. A. (1993) A study on *Hyphomyceteous* fungi found on Maejus, a raw material of Korean traditional soy sauces, *The Kor. J. of Mycol.* **21**, 247-272.
 - Yhin, H. J. and Lee, B. H. (1968) Taxonomical studies of *Rhizopus* spp. in *Korea-Rhizopus* spp. isolated from meju. *The Kor. J. of Mycol.* **6**, 100-105.
 - Lee, S. S. (1995) Meju fermentation for a raw material of Korean traditional soy products, *The Kor. J. of Mycol.* **23**, 161-175.
 - Kim, D. H., Lim, D. W. Bai, S. and Chun S. B. (1997) Fermentation characteristic of whole soybean meju model system inoculated with *Bacillus* strains, *Kor. J. Food Sci. Technol.* 1006-1015.
 - Park, J. M. and Oh, H. I. (1995) Changes in microflora and enzyme activities of traditional *Kochujang* Meju during fermentation, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**(1), 56-62.
 - Cho, D. H. and Lee, W. J. (1970) A study on the fermentive microflora of Korean traditional soy sauce, *J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol. Soc.* **13**(1), 35-42.
 - Hu, S. H. and Ha, D. M. (1991) Occurrence of acid producing bacteria in Meju loaves, *J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol. Soc.* **34**(2), 130-133.
 - Lee, J. S., Kwon, S. J., Chung, S. W., Choi, Y. J., Yoo, Y. J. and Chung, D. H. (1996) Changes of microorganisms enzyme activities and major component during the fermentation of Korean traditional *Doenjang* and *Kochujang*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**(2), 247-253.
 - Qi, M., Hettiarachy, N. S. and Kalapathy, U. (1997) Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin, *J. Food Sci.* **62**(6), 1110-1115.
 - Shon, D. H. (1994) Physiological activities peptide from food protein, *Food Technol.* **7**(3), 25-27.
 - Kang, Y. J., Lee, K. C. and Park, Y. H. (1988) Hydrolysis of 7S and 11S soy proteins by commercial proteases, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **20**(3), 338-343.
 - Han, E. S., Lee, H. J. and Shon, D. H. (1993) Effect of surface hydrophobicity of soybean peptide on the concentration of serum cholesterol and fecal steroid excretion in rats, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **25**(5), 571-575.
 - Byun, Y. G., Kim, S. H., Jo, H. K., Lee, G. S. and Yim, M. H. (1998) Isolation and identification of protease producing bacteria, *Bacillus subtilis* YG-95 from the traditional *Me-Ju*, and its production conditions, *J. Kor. Agric. Chem. Biotechnol. Soc.* **41**(5), 342-348.
 - Domsch, K. H., Dams, W. and Anderson, T. (1980) In 'Compendium of Soil Fungi. Vol. 2.' p.105, p.405. Academic Press Ltd., London.
 - Raper, K. B. and Fennell, D. I. (1965) In 'The Genus *Aspergillus*,' Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. p.370, p.376.

20. Harris, J. L. (1986) Modified method for fungal slide culture, *J. Clin. Microbiol.* **24**, 460-461.
21. John, G. H., Krieg, N. R. and Sneath, P. H. A. (1994) In 'Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,' 9th Ed., Williams and Wilkins, Baltimore.
22. Harold, J. B. (1994) In 'Microbiological Applications,' WCB, 6th Ed., Washington D. C.,
23. Stoakes, L., Kelly, T., Schieven, B., Harley, D., Ramos, M., Lannigan, R., Groves, D. and Hussain, Z. (1991) Gas liquid chromatographic analysis of cellular fatty acids for identification of gram-negative anaerobic *Bacilli*, *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2636-2638.
24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-271.
25. Anson, M. L. (1938) The estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin, *J. Gen. Physiol.* **22**, 79-95.
26. Mousdale, D. M. (1997) In 'Applied Microbial Physiology, The Practical Approach Series, The Analytical Chemistry of Microbial Cultures,' Rhodes P. M. and Stanbury, P. F. (Ed), Chap. 7., pp. 182-183, IRL Press, Oxford. New York.
27. Park, K. J., Kim, Y. M., Lee, B. H. and Lee, B. K. (1977) Fungal microflora on Korean home-made *meju*, *The Kor. J. of Mycol.* **5**, 7-12.
28. Kim, D. H. and Kim, S. H. (1999) Biochemical characteristics of whole soybean cereals fermented with *Mucor* and *Rhizopus* strains, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**(1), 176-182.
29. Koo, M. S., Kim, Y. S., Oh, H. I. and Kim, J. K. (1996) Isolation and identification of flavor-producing microorganisms from traditional *Kochujang*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**(4), 439-444.

Isolation and Identification of Microorganisms Producing the Soy Protein-Hydrolyzing Enzyme from Traditional *Mejus*

Min-Jung Kang, Seong-Ho Kim, ¹Hyun-Kyu Joo, ²Gap-Sang Lee and Moo-Hyun Yim*(Division of Food, Biological and Chemical Engineering, Taegu University, Kyungsan 712-714, Korea; ¹Division of Food Resources, Sun-Moon University, Asan 336-840, Korea; ²Department of Agricultural Chemistry, Won-Kwang University, Iksan, 570-640, Korea)

Abstract : In order to develop the enzymatic hydrolysis system concerned with taste and flavor, strains having the high hydrolyzing activity on the soy protein were selected from some traditional *Mejus*. Two molds and one bacterium producing enzymes which were different in character of hydrolysis were isolated and identified. Leucine and azodye enzyme activities of both M4 and M5 were relatively high among in the isolated molds. And, leucine enzyme activity of B16 was the lowest in the isolated bacteria. These strains were isolated as microorganisms having a dissimilar hydrolysis pattern on the soy protein by enzymatic reactions. Mold M4 on the culture solid media was mycelium colors of white and its sclerotia colors were changed from white to black. According to the result of slide culture, radial conidial head, subclavate vesicle, conidia of subglobose, stipes of uncolored with smooth walls and metula and phialides were existed. Because M4 was taxonomically similar to the characteristics of *Aspergillus oryzae* (ahlburg) species, M4 was identified and named as *Aspergillus oryzae* M4. Mold M5 showed white and black mycelium on the MEA medium. Mold M5 colony exhibited grayish-green color and have long(7 mm) sporangiophores at slide culture. Sporangia became brownish-gray and the wall of larger sporangia was broken to form small collars, and smaller sporangia were formed continually from large basal membrane. Columella is globose and hyaline, and sporangiospores are ellipsoidal of small diameter(80 μm). Because M5 was taxonomically similar to the *Mucor circinelloides* of zygomycetes, M5 was identified and named as *Mucor circinelloides* M5. Bacteria B16 colony was opaque white, circular and lobate, and had rod shaped endospore. B16 was found positive in stain, catalase, β-glucosidase and V-P tests. B16 was found to utilize D-fructose, α-D-glucose, maltose, D-mannose, D-raffinose, stachyose and sucrose. By the morphological and physiological results, the characteristics of B16 was thought to correspond to that of *Bacillus megaterium*. However, fatty acid composition was similar to *Paenibacillus marcerans*, requiring further study for the definite identification. Accordingly, Bacteria B16 was provisionally classified and named as *Bacillus megaterium* B16.

Key words : *Aspergillus oryzae*, *Mucor circinelloides*, *Bacillus megaterium*, *Meju*, isolation, identification,

*Corresponding author