

고온에서 발효 가능한 균주 분리 및 효소활성

이나영, 김용석, 신동화

전북대학교 식품공학과 (전북 전주시 덕진구 덕진동 561-756)

tel: +82-63-270-2570 fax: +82-63-270-2572 e-mail: dhshin@moak.chonbuk.ac.kr

서론

강알칼리, 고온 및 저온 등의 극한 환경조건에서 잘 증식하는 미생물은 상온, 약산성 또는 중성에서 잘 증식하는 미생물보다는 그 내성기작과 구조가 상이함으로 여러 가지 배양학적 특성 및 대사산물의 이용면이 상이하다. 극한 환경인 고온에서 증식가능하며, 단백질 분해력이 강력한 균주를 대두 발효시 이용하면 발효과정에서 미생물오염을 막고 발효속도를 높이는등의 이점과 이에 따른 산업적 이용가능성이 넓을 것이다.

본 실험에서는 고온에서 발효능있는 균을 분리 및 동정하고, 분리한 균주에 대해 온도에 따른 효소활성을 측정하여 산업적 이용 가능성을 타진하였다.

재료 및 방법

균주분리

토양시료에 0.1% peptone water와 24시간 수침한 대두콩을 첨가하여 80℃에서 10분간 열 쇼크한 후 100℃에서 40분간 처리하여 80℃에서 배양하였다. 이 배양액 0.1ml를 Tryptic soy agar(TSA)에 도말하여 50℃에서 배양하여 생성된 colony를 순수 분리하였다. 균주의 보존은 분리용 고체배지에 계대배양하여 4℃에서 보존하였다.

조효소액

12시간 수침한 대두를 121℃에서 30분간 멸균한 대두배지에 50℃에서 18시간 배양한 균배양액 5%(w/v)를 접종하여 60℃, 70℃, 80℃에서 24시간 배양하였다. 이 배양액을 마쇄하여 실온에서 2시간 추출후 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 하였다.

Protease activity

pH 3, pH 7과 pH 9로 조정된 0.6% casein 5ml에 조효소액 1mL를 첨가하여 50℃에서 30분간 반응시키고, 0.4M TCA 5mL를 첨가하여 반응을 정지시켜 여과하였다. 이 여액 1mL에 0.4M Na₂CO₃ 5mL와 Folin 시약 1mL를 혼합한 후 660nm에서 흡광도를 측정해 효소액 1ml에서 1분간 1 μ g의 tyrosine을 유리한 때를 1 unit로 하였다.

Amylase activity

Amylase activity는 α -amylase와 β -amylase로 나누어 측정하였다.

α -amylase 1%전분용액에 조효소액을 1mL첨가하여 50℃에서 30분간 반응시킨 다음 0.5N acetic acid 10ml를 첨가한 후 3.33×10^{-4} 요오드액 10mL로 반응시켜 700nm에서 측정하였다. 효소액 1mL가 blue value(700 nm)을 10% 저하시킨 amylose의 mg을 1 unit로 하였다.

β -Amylase는 0.5% 전분용액 1mL에 pH 5.0 acetate 완충용액 1 mL를 첨가후 50℃에서 60분간 반응시키고, DNS 3mL를 가하여 끓는 물에서 5분간 방치 후 증류수 10mL를 가하여 535nm에서 비색정량 하였다. 효소액 1mL에서 1분간 생성하는 환원당을 glucose로 환산하여 mg로 표시한 것을 1 unit로 하였다.

결과 및 고찰

고온에서 발효가능한 균주를 탐색하기 위하여 시료를 열쇼크(80℃)후 100℃에서 40분간 처리한 모액에서 분리된 5균주는 gram positive, 간균으로 catalase 양성이며, casein과 starch이용시 발효하였고, Bergey's manual of determinative bacteriology 및 API Kit test에 의해 *B. licheiformis*와 *B. subtilis*로 동정되었다(Table 1).

분리된 5균주에 대해 온도별 효소활성을 측정하였다(Table 2). Protease activity는 acidic, neutral, alkaline으로 나누어 측정하였으며, 그 결과 acidic에서 효소활성이 강하게 나타났다. 60℃로 발효시 HT-2균주가 효소활성이 강하게 나타났으며, 최대 68.25 unit/mL의 효소활성을 나타냈다. HT-4균주가 70℃에서 발효시 최대 38.64 unit/mL로 60℃로 발효시보다 효소활성이 상당히 억제되었다.

α -Amylase는 HT-1의 효소활성이 활발하였으며, 최대 3.32 unit/mL을 나타냈고, 80℃발효시 HT-5균주가 최대 2.23 unit/mL을 나타내었다. β -Amylase는 HT-1이 효소활성이 가장 활발하였으며 온도가 올라갈수록 억제가 되었으나 80℃에서 발효시에도 최대 0.21 unit/mL의 효소활성을 나타내었다. 효소활성은 발효온도가 높을수록 억제가 되었으며, 70℃와 80℃에서 발효시 큰 차이를 보이지 않았고, 온도에 따라 균주들의 효소활성에도 약간의 차이를 보였다.

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strains

Characteristics	HT-1	HT-2	HT-3	HT-4	TH-5
Gram-stain	positive	positive	positive	positive	positive
Shape	rod	rod	rod	rod	rod
Catalase	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	(-)	(-)
Propionate	+	+	+	-	-
Casein	+	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+	+
Egg-yolk lecithinase	-	-	-	-	-
M-R test	+	+	+	-	-
V-P test	+	+	+	+	+
API Kit	<i>B. licheiformis</i>	<i>B. licheiformis</i>	<i>B. licheiformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. subtilis</i>

Table 2. Effect of incubation temperature on enzyme activities of isolated strains

Isolated strains	Amylase (unit/mL)		Protease (unit/mL)		
	α -	β -	acidic	neutral	alkaline
60°C incubation					
HT-1	3.32	0.62	66.86	64.32	64.78
HT-2	3.30	0.70	68.25	67.33	66.63
HT-3	2.66	0.56	63.62	59.00	56.68
HT-4	2.80	0.57	62.24	54.60	52.52
HT-5	2.98	0.26	63.16	62.93	62.93
70°C incubation					
HT-1	2.93	0.22	34.47	34.01	32.39
HT-2	2.11	0.21	33.55	27.49	26.84
HT-3	2.07	0.21	33.08	27.99	27.53
HT-4	1.96	0.21	38.64	32.39	26.84
HT-5	1.91	0.22	31.00	34.70	30.54
80°C incubation					
HT-1	1.69	0.21	32.16	31.93	22.63
HT-2	1.94	0.20	29.15	25.22	23.37
HT-3	1.81	0.21	32.85	27.76	22.90
HT-4	2.08	0.20	34.01	27.76	22.13
HT-5	2.23	0.19	34.47	29.38	23.37

참고문헌

1. Roh, J.S., Chung, Y.C., Park, S.K., Sung, N.K. Isolation of alkalopsychrotrophic protease - producing *Pseudomonas* sp. RP-222 and properties of its curde enzyme. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 383-389 (1991)
2. Kim, M.S., Ahn, E.Y., Ahn, E.S., Shin, D.H. Characteristic changes of Kochujang by heat treatment. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 867-874 (2000)
3. Park, J.S., Lee, M.Y., Kim, J.S., Lee, T.S. Compositions of nitrogen compound and amino acid in soybean paste(Doenjang) prepared with different microbial sources. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26: 609-615 (1994)
4. Lee, C.H., Kwon, T.J., Kanh, S.M., Suh, H.H., Kwon, G.S., Oh, H.M., Yoon, B.D. Production and characterization of an alkaline protease from an isolate, *Xanthomonas* sp. YL-37. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 515-521 (1994)
5. Johnvesly, B., Virupakshi, S., Patil, G.N., Ramalingam, Naik, G.R. Cellulase-free thermostable alkaline xylanase from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *J. Microbiol. Biothechnol.* 12: 153-156 (2002)