J. Fd Hyg. Safety 15(3), 271–276 (2000)

박테리오신의 생산을 위한 두부비지의 이용
Ⅰ. 두부비지에서 분리한 *Bacillus* sp.에 의한 Amylase의 생산조건

이선희 · 이명숙†
부경대학교 미생물학과

Utilization the Tofu-Residue for Production of the Bacteriocin
Ⅰ. Cultural Conditions of *Bacillus* sp. for Amylase

Sun Hee Lee and Myung Suk Lee†
Dept. of Microbiology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

ABSTRACT – A amylase producing bacteria were isolated from tofu residue and identified as *Bacillus* sp. according to the morphological and biochemical properties, which were named *Bacillus* sp. GM7330 and *Bacillus* sp. GM7312. The cultural condition for the production of amylase was showed on 5% tofu residue added 3% glucose and 0.15% yeast extract. And incubated during 72 hrs at 30°C, *Bacillus* sp. GM7330 and *Bacillus* sp. GM7312 were producing amylase of 488 units and 341 units.

Key words □ *Bacillus* sp., Amylase, Tofu residue

두부비지는 대두를 침지, 마쇄, 여과하여 두부 또는 두유를 제조하는 과정에서 대량 얻어지는 부산물로서 대두로부터 수용성 물질이 빠져나간 상태이긴 하지만 인체의 생리적 기능에 관여하는 중요한 영양성분이 많이 남아 있다. 비지의 일반성분은 건물량을 기준으로 할 때 단백질이 약 24~30%, 지방이 약 13~15%, 탄수화물이 약 50~60% 그리고 회분이 4~5%[1]로 대두의 품종 및 비지 회수방법에 따라 많은 차이가 있으나 상당량의 단백질 및 탄수화물을 함유하고 있다. 그러나 현재 우리나라에서는 비지의 일부분만이 동물용 사료로 이용되고 있다. 이는 대부분 산패나 미생물의 번식으로 쉽게 부패되어 거의 산업 폐기물로 처리되고 있어 식품산업 현장에서 생산 원가 상승의 주된 요인이 되고 있을 뿐만 아니라, 환경문제 차원에서나 폐자원의 재이용 차원이란 관점에서도 주목되고 있다.

이러한 비지를 유용한 자원으로 이용하기 위한 연구는 꾸준히 늘어나는 추세이며, 국내에서의 비지에 대한 연구동향을 살펴보면 비지의 고온 건조를 통한 가공식품에의 이용,[2,3] 장류 재료로서의 이용[4] 등을 들 수 있다. 정 등[2]은 압착과 열풍건조에 의해 건조비지 분말을 만들었으며 이유식이나 복합분의 원료로의 이용 가능성을 제시[5]하였다. 또한 손 등[3]은 건조비지를 두유에 혼합하여 두부를 제조한 결과 견고성이 증가하고 부서짐과 과립성이 향상됨을 보여 건조비지 혼합에 의한 두부제조가 가능함을 보였다. 김 등[6,7]은 비지를 발효기질로 사용하기 위한 연구와 효소를 이용해 비지 및 대두 박으로부터 대두단백질의 추출 효율을 높이기 위한 연구를 행하였다. 이상에서 보듯이 비지의 이용에 대한 연구는 많이 있어 왔지만 실용화된 것은 거의 없는 실정이다.

한편, amylase와 protease 같은 효소처리를 통한 비지의 가용화는 70년대부터 진행되어 왔는데, *Aspergillus* 속이나 *Fusarium* 속 등의 곰팡이를 이용한 효소 분해[8,9] 등이 그 대표적인 예이다. α-Amylase(1,4-α-D-glucan glucanohydrolase EC 3.2.1.1)는 전분내의 α-1,4-glucosidic 결합을 가수분해하는 효소로서 다양한 미생물과 식물, 동물에 널리 분포되어 있으며[10] 그 중 내열성 균주에서 발견되는 내열성 α-amylase는 호화온도 이상에서도 역가를 유지하여 전분의 액화나 전분식품의 노화방지[11]에 이용되고 있고, 의약품, 동물사료, 오수처리, 세제 등에도 이용되는 오래 전부터 잘 알려진 효소이다.

Amylase에 대한 연구는 1833년 보리맥아의 추출액에서 분말로 분리된 이후로 꾸준히 이루어지고 있으며, 특히 전분 분자를 급속하게 저분자화하는 α-amylase의 연구가 가장 잘 이루어지고 있다. α-amylase는 현재까지 많은 기원의 효소가 순수하게 분리되어 작용 기작, 단백화학적 성질에 관하여 많은 보고가 나오고 있으나, 효소기원에 따라 최적 pH, pH 안정성의 범위, 내열성, 분해생성물에 있어서 차이점을 보이며, 이는 전분 분해 작용이 각각의 효소에 따

†Author to whom correspondence should be addressed.

라 다른 기작에 의해 반응한다고 할 수 있다. 최근에는 식품의 물성 개량에 유용한 성질을 가지고 있는 올리고당에 대한 관심이 증대되고 특정한 올리고당만을 선택적으로 많이 생산하는 amylase가 발견[12-15]되면서 효소를 이용한 올리고당의 생산에 대한 관심이 높아지고 있다.

한편, 박테리오신은 미생물이 생산하는 항균성 물질로서 젖산균에 의한 박테리오신의 생산은 1947년, *Lactococcus lactis*에서 처음 발견된 이래 현재까지 *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., 그리고 *Streptococcus* sp.등에서 생산 분리된 박테리오신에 관한 연구가 꾸준히 발표되고 있다.[16,17] 또한 박테리오신은 천연적인 peptide성 저분자 물질로서 체내 흡수시 쉽게 분해되기 때문에 일반 항생물질이나 화학합성 보존제보다 안전성이 높은 것으로 평가받고 있어 최근 증가 추세에 있는 천연성 방부제에 대한 소비자의 욕구에 잘 부합된다 할 수 있다. 또한, 폐기물인 두부비지를 이용하여 박테리오신을 생산한다면 박테리오신의 생산원가를 낮출 수 있다.

따라서 본 실험에서는 두부 제조의 부산물인 두부비지의 효율적 이용의 한 방법으로 천연 항균성 물질인 박테리오신을 생산하기 위한 전단계 실험으로 두부비지로부터 amylase 생산 균주를 분리하고 이 균주가 두부비지를 발효기질로 하여 amylase 생산을 위한 배지조성, 배양조건 등을 연구하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 두부비지는 (주)동화식품(부산시 소재)에서 두부 생산시 부산물로 얻어지는 것을 수집하여 -80°C의 동결고(REVCO, ULT 2586-7-D12)에 보관하면서 실험에 사용하였다.

두부비지로부터 amylase 생산 균주의 분리

부산소재 자갈치 시장에서 구입한 발효비지를 30°C에 6일간 방치하면서 2일 간격으로 시료를 각각 15g씩 채취하여 멸균 생리식염수(0.85%)를 135 ml 첨가하여 혼합하고 260 rpm으로 60초 동안 stomacher(Lab blender stomacher 400, Seward Co.,)로 균질화 하였다. 이 균질화된 시료를 멸균 생리식염수(0.85%)를 사용하여 순차적으로 10^{-1}~10^{-6}까지 희석한 후, 희석액 0.1 ml씩을 분리 배지에 도말 하였다. 분리배지는 일반 세균의 경우 nutrient agar, 곰팡이와 효모의 경우는 YM agar를 사용하였다. 분리배지를 통해 순수분리한 미생물들은 한 달 간격으로 계대 배양하여 냉장 보관하였다.

분리 미생물의 효소 활성 측정

분리 균주의 amylase 활성은 nutrient agar와 YM agar에 1% starch를 첨가하여 plate를 만든 후 백금이로 분리한 균주를 접종하여 3일간 배양한 후 iodine 용액을 분무하여 방치시켜서 형성된 투명환(clear zone)의 크기를 측정하였다.

이때 투명환이 나타난 균주는 Kim과 Sohn[7]의 방법을 변형하여 정량적으로 활성을 측정하였다. 즉, 0.1N sodium phosphate buffer(pH 6.0)에 starch를 기질로 하여 1%가 되도록 조제한 후, 이 용액 0.8 ml에 조효소액(배양액을 원심분리한 후 상등액) 0.2 ml을 가하여 55°C에서 50분간 반응시킨 후 10분간 100°C로 가열하여 반응을 정지시키고 Somogyi Nelson's method에 의해 환원당을 측정하였다. 즉, glucose를 표준물질로 이용하였으며, amylase의 활성은 1분 동안 1 μmol의 환원당을 생산할 수 있는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

분리된 균주의 동정

분리된 균주를 colony 색과 형상, Gram 염색법으로 1차 분류한 후 배양 특성과 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's manual of systematic bacteriology[18]와 The Prokaryotes[19]에 준하여 동정하였다.

Amylase 생산 최적 조건

탄소원과 질소원 – 먼저 5% 두부비지 용액에 glucose의 농도를 0, 1, 2, 3, 4%로 첨가하여 30°C에서 72 hr 배양하면서 각각의 균수와 amylase 활성정도를 측정하였다. 또한 질소원의 최적 농도를 알아보기 위해 yeast extract를 0, 0.15, 0.3% 농도로 첨가하여 각각의 균수와 amylase 활성을 측정하였다.

배양 최적온도와 pH – Glucose 3%, yeast extract 0.15%를 첨가한 5% 두부비지용액에 균주를 접종하여 25, 30, 37, 45°C에서 배양하면서 24 hr마다 생산된 amylase의 활성을 측정하여 amylase 생산을 위한 배양 최적온도와 배양시간을 결정하였다.

또한 pH를 4~9 사이로 조절하면서 amylase 생산을 위한 초기 pH를 알아보았다.

결과 및 고찰

두부비지로부터의 amylase 생산 균주의 분리 및 효소 활성 측정

초기균수 5×10^7 CFU/g인 두부비지를 30°C에서 2일 보관한 후 생균수를 측정한 결과 1.4×10^8 CFU/g로 균수가

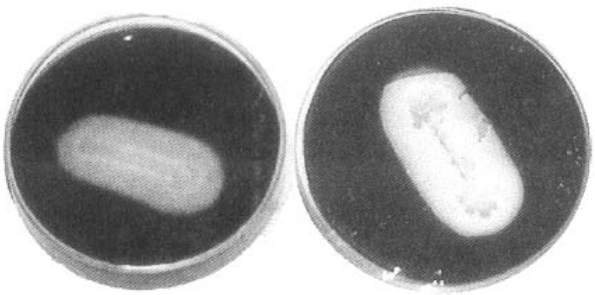

Fig. 1. Amylase production *Bacillus* sp. GM7330(A) and *Bacillus* sp. GM7312(B) on YM agar containing 1% starch.
After incubation during 72hrs at 30°C the plate was sprinkled with iodine solution.

증가하였으며, 4일과 6일 보관한 후 생균수를 측정한 결과도 1.0×10^8 CFU/g과 2.1×10^8 CFU/g의 균이 존재하여 계속해서 10^8 CFU/g 이상의 균수가 유지됨을 알 수 있었다.

이러한 두부비지로부터 총 58 종류의 균주를 분리할 수 있었으며, 분리한 58종의 균주를 대상으로 amylase 활성을 측정한 결과 10종의 균주가 starch 첨가 배지에서 투명환을 형성하였다(Fig. 1). 이 때 투명환의 크기는 직경 2 mm에서 9 mm정도를 나타내었는데 이는 amylase 활성이 높은 균주인 *Bacillus subtilis* KCTC1028의 투명환 크기 8 mm[20]와 비교하여도 높은 활성을 나타낸다고 할 수 있다. 10종의 균주를 정량적으로 amylase 활성을 측정한 결과 50 units이상의 활성을 나타내었으며, 특히 2종의 균주는 300 units 이상을 나타내었다. 따라서 amylase 활성이 가장 높은 두 균주를 공시 균주로 하여 이 후의 실험을 행하였다.

분리된 균주의 동정

분리된 균주를 colony 색과 형상, Gram 염색법, 배양특성과 생화학적 특성을 조사하여 Bergey's manual of systematic bacteriology[18]와 The Prokaryotes[19]에 준하여 동정한 결과(Table 1) starch 첨가 배지에서 투명환을 형성하고 정량적인 amylase 활성 측정에서 300 units이상을 나타낸 두 공시 균주 모두 *Bacillus* sp.로 동정되었으며 각각을 *Bacillus* sp. GM7330과 *Bacillus* sp. GM7312로 명명하였다. 이 두 균주는 30°C에서 2일 동안 방치한 두부비지내에 각각 4.0×10^7 CFU/g과 1.0×10^7 CFU/g씩 존재하였다. 또한 공시 균주 이외에 starch 첨가배지에서 투명환을 나타내었던 10종의 균주 중 4종이 *Bacillus* sp.로 동정되었으며(결과 미제시), 이들 균주의 균수는 두부비지에 존재하는 전체 생균수 중 53%인 7.5×10^7 CFU/g이었으며 6일 동안 방치한 두부비지내에서는 전체의 62%인 8.7×10^7 CFU/g의 균수를 나타내어 두부비지내에서 *Bacillus* sp.가 주도하여 발효가 이루어짐을 알 수 있었다.

Table 1. Biochemical characteristics of the isolates

Characteristics	*Bacillus* sp. GM7330	*Bacillus* sp. GM7312
Gram stain	+	+
catalase test	+	+
oxidase test	+	-
TSI	K/A	K/A
spore	+	+
AFB stain	-	-
Rhamnose	-	+
N-acetylglucosamine	+	+
D-ribose	-	+
Inositol	-	+
Sucrose	+	+
Maltose	+	+
Itacobate	-	-
Suberate	-	-
Malonate	-	-
Acetate	+	-
DL-lactate	+	+
L-alanine	-	+
α-ketogluconate	-	-
Glycogen	-	+
3-hydroxy benzonate	-	-
L-serine	+	-
Mannitol	-	+
D-glucose	+	+
Salicine	-	+
D-meliose	-	+
L-fucose	+	-
D-sorbitol	-	+
L-arabinose	-	+
Propionate	+	-
Caprate	-	-
Valerate	+	-
Citrate	+	+
Histidine	+	-
2-ketogluconate	-	+
3-hydroxybutyrate	-	+
ρ-4-hydroxy benzonate	-	-
L-proline	+	+

Amylase 생산 최적 조건

탄소원과 질소원 – 분리한 두 균주의 amylase 생산을 위한 탄소원의 최적필요량을 알아보기 위해 5% 두부비지 용

Table 2. Effect of glucose concentration on amylase production by *Bacillus* sp. GM7330 and GM7312

Conc. (g/l)	Amylase I[a]			Amylase II[b]		
	Reduced sugar (mg/l)	Activity unit/ml	Activity Relative activity(%)	Reduced sugar (mg/l)	Activity unit/ml	Activity Relative activity(%)
0	184.0	20.4	4.2	707.4	78.6	23.0
10	727.2	80.8	16.6	1125.0	125.0	36.7
20	4095.0	455.0	93.2	1764.9	196.1	57.5
30	4392.0	488.0	100.0	3069.0	341.0	100.0
40	753.3	81.7	16.7	2375.1	263.9	77.4

Bacillus sp. GM7330 and *Bacillus* sp. GM7312 were incubated in 5% tofu residue (pH 6.0) added 0.15% yeast extract during 72 hrs at 30°C.
Enzyme reaction was performed under the condition of pH 6.0 and reaction time, 1hr.
[a]separated *Baellus* sp. GM7330
[b]separated *Bacillus* sp. GM7312

Table 3. Effect of yeast extract concentration on amylase production by *Bacillus* sp. GM7330 and GM7312

Conc. (g/l)	Amylase I[a]			Amylase II[b]		
	Reduced sugar (mg/l)	Activity unit/ml	Activity Relative activity(%)	Reduced sugar (mg/l)	Activity unit/ml	Activity Relative activity(%)
0	3051.2	339.0	70.6	2252.7	250.3	73.4
1.5	4392.0	488.0	100.0	3069.0	341.0	100.0
3.0	3224.7	358.3	74.6	2230.2	247.8	72.7

Bacillus sp. GM7330 and *Bacillus* sp. GM7312 were incubated in 5% tofu residue(pH 6.0) added 3% glucose during 72 hrs at 30°C.
Enzyme reaction was performed under the condition of pH 6.0 and reaction time, 1hr.
[a]separated *Bacillus* sp. GM7330
[b]separated *Bacillus* sp. GM7312

액에 glucose의 농도를 0, 1, 2, 3, 4%로 첨가하여 각각을 균수와 amylase 활성정도를 측정한 결과(Table 2), glucose 농도 3%에서 두 균주 모두 가장 큰 활성을 나타내었으며 *Bacillus* sp. GM7330과 *Bacillus* sp. GM7312가 각각 488 units과 341 units을 나타내었다. *Bacillus* sp. GM7330의 경우 glucose를 2%의 농도로 첨가한 경우에도 455 units의 활성을 나타내었으며 *Bacillus* sp. GM7312의 경우에는 4% 첨가하였을 때도 200 units이상의 활성을 나타내었다. 또한 두 균주 모두 0, 1%에서는 거의 활성을 나타내지 않았다. 이는 균주의 생육에 탄소원인 glucose가 필요해서 이기도 하지만 amylase가 최종산물이 존재할 때 더 큰 활성을 나타내는 유도효소임을 알 수 있다.

질소원의 최적 농도를 알아보기 위해 yeast extract의 농도를 0, 0.15, 0.3%를 첨가하여 각각의 균수와 amylase 활성을 측정한 결과(Table 3), 두 균주 모두 0.15% 첨가하

Table 4. Optimum temperature on amylase production by *Bacillus* sp. GM7330 and GM7312

Temp (°C)	Amylase I[a]			Amylase II[b]		
	Reduced sugar (mg/l)	Activity unit/ml	Activity Relative activity(%)	Reduced sugar (mg/l)	Activity unit/ml	Activity Relative activity(%)
10	888.3	98.7	20.2	1125.0	125.0	36.7
20	2156.4	239.6	49.1	1764.9	196.1	57.5
30	4392.0	488.0	100.0	3069.0	341.0	100.0
37	4073.5	452.1	92.6	2370.1	263.4	77.2
45	735.3	81.7	16.7	707.4	78.6	23.0

Bacillus sp. GM7330 and *Bacillus* sp. GM7312 were incubated in 5% tofu residue(pH 6.0) added 3% glucose and 0.15% yeast extract during 72 hrs.
Enzyme reaction was performed under the condition of pH 6.0 and reaction time, 1hr.
[a]separated *Bacillus* sp. GM7330
[b]separated *Bacillus* sp. GM7312

Table 5. Effect of initial pH on amylase production by *Bacillus* sp. GM7330 and GM7312

pH	Amylase I[a]			Amylase II[b]		
	Reduced sugar (mg/l)	Activity unit/ml	Activity Relative activity(%)	Reduced sugar (mg/l)	Activity unit/ml	Activity Relative activity(%)
4.0	3526.8	391.8	80.3	2111.4	234.6	68.8
5.0	4014.3	446.0	91.4	2888.1	320.9	94.1
6.0	4392.0	488.0	100.0	3069.0	341.0	100.0
7.0	3939.6	437.7	89.7	2185.2	242.8	71.2
8.0	3228.1	358.7	73.5	2176.2	241.8	70.9
9.0	1796.3	199.6	40.9	855.9	95.1	27.9

Bacillus sp. GM7330 and *Bacillus* sp. GM7312 were incubated in 5% tofu residue added 3% glucose and 0.15% yeast extract during 72 hrs at 30℃.
Enzyme reaction was performed under the condition of pH 6.0 and reaction time, 1hr.
[a]separated *Bacillus* sp. GM7330
[b]separated *Bacillus* sp. GM7312

였을 때 가장 높은 활성을 나타내었으며 0% 또는 0.3%를 첨가한 경우에는 각각 300 units과 200 units정도의 활성만을 나타내었다.

배양 최적온도와 pH – Glucose 3%, yeast extract 0.15%를 첨가한 5% 두부비지용액에 균주를 접종하여 10, 20, 30, 37, 45°C에서 배양하면서 24 hr마다 생산된 amylase의 활성을 측정하여 amylase 생산을 위한 배양 최적온도와 배양시간을 알아본 결과(Table 4), 두 균주 모두 30°C에서 72 hr 배양했을 때 가장 활성이 높게 나타났다. 또한 37°C에서도 두 균주 모두 높은 활성을 나타내었으나

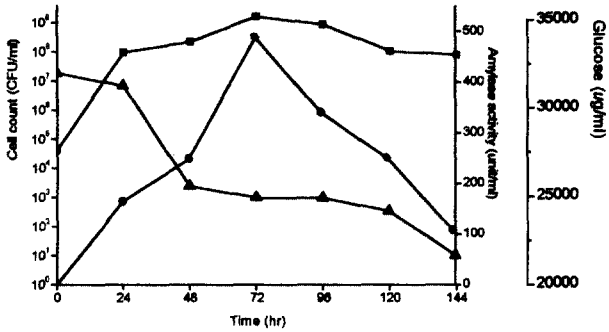

Fig. 2. Change of cell count and amylase activity produced from *Bacillus* sp. GM7330.
- ● - : Amylase activity - ■ - : Cell count
- ▲ - : Glucose

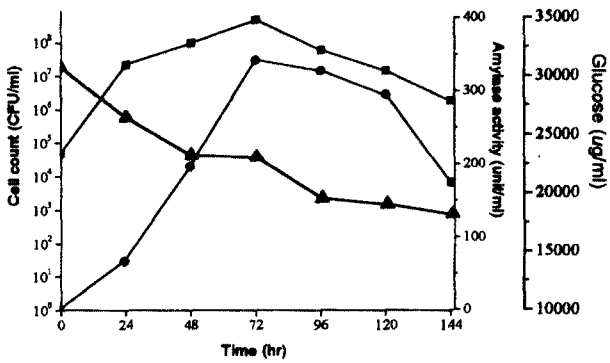

Fig. 3. Change of cell count and amylase activity produced from *Bacillus* sp. GM7312.
- ● - : Amylase activity - ■ - : Cell count
- ▲ - : Glucose

이는 대부분의 *Bacillus* sp.의 증식 적온인 37℃보다는 조금 낮다고 할 수 있다.

분리 균주의 배양 최적 pH를 알아보기 위한 실험에서는 (Table 5) 모두 pH 6.0에서 최고 활성을 나타내었다. 균수는 pH 9.0을 제외하고는 2×10^8~8×10^8 CFU/g 정도로 비슷한 결과가 나왔다. *Bacillus* sp. GM7330의 경우에는 pH 5.0에서 446 units의 활성을 나타내었고 pH 4.0에서도 392 units의 활성을 나타내어 산성에서도 생육 가능하며 amylase 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 또한 pH 7.0과 pH 8.0에서도 350 units이상의 활성을 나타내는 것을 보아 pH에 대한 생육 범위가 넓음을 알 수 있었다.

이상의 실험 결과에서 얻어진 두 균주의 pH와 온도 및 적정 탄소원, 질소원량을 기준으로 균수의 변화와 amylase의 활성변화를 알아보았다(Fig. 2와 Fig. 3). 두 균주 모두 72시간 배양하였을 때, 접종 시부터 급격히 감소되었던 glucose가 감소되지 않음을 알 수 있었고 이는 amylase의 활성이 높게 나타났기 때문이라고 사료된다. 그리고 144시간동안 배양하였을 때는 amylase의 활성이 100 units정도로 떨어졌으며 glucose의 양도 다시 감소함을 알 수 있었다.

Amylase 생산 균주에 의한 두부비지의 가용화

이 등[21]은 시판 amylase를 이용하여 비지 내 다당류 성분을 분해한 후 젖산균을 배양하여 박테리오신 생산을 시도하였는데, 적정농도의 질소원을 첨가시켰을 경우 박테리오신의 생산이 증가하여 박테리오신의 생산을 위한 두부 비지의 이용가능성을 제시하였다. 본 실험에서 나타난 amylase의 활성치가 이 등이 사용한 시판 효소보다는 낮지만, *Bacillus* sp. 균주를 사용하기 때문에 amylase 이외에 protease 등도 미량이나마 생산되어(결과 미제시) 시판효소를 이용하는 것보다 젖산균의 생육에는 더 유리하다고 할 수 있다. 따라서 젖산균이 박테리오신을 생산하기 위한 pH나 온도 조건을 잘 조절한다면 두부비지를 박테리오신의 생산에 이용할 수 있다고 사료된다.

국문 요약

시중에서 시판되고 있는 발효비지로부터 총 58종의 균주를 분리하였으며, 그 중 starch 첨가 배지에서 투명환을 형성한 10종을 분리하였다. 이 10종의 균주를 정량적으로 amylase 활성 측정을 하여 가장 큰 활성을 가진 2종의 균주를 재분리하여 공시 균주로 선정하였다. 공시 균주를 동정한 결과 두 균주 모두 *Bacillus* sp.로 동정되었으며, 각각을 *Bacillus* sp. GM7330과 *Bacillus* sp. GM7312라고 명명하였다. 분리된 2종의 균주는 모두 5% 두부비지 용액에 glucose 3%와 yeast extract 0.15%를 첨가하여 초기 pH를 6.0으로 조정하여 30℃에서 72 hr 배양하였을 때 각각 488 units과 341 units으로 가장 큰 활성의 amylase를 생산하였다.

참고문헌

1. Hackler, L. R., D. B. Hand, K. H. Steinkraus and J. P. Van Buren.: A comparison of the nutritional value of protein from several soybean fractions. *J. Nutri.*, **80**, 205 (1963)
2. Chung, S. S., H. N. Chang and M. Y. Park.: Dehydration of soybean residue by hot-air in conjunction with filter pressing. Korea *J. Food Sci. Technol.*, **10**, 1 (1978)
3. Sohn, J. W. and W. J. Kim.: Some quality changes in soybean curd by addition of dried soymilk residue. *Korea J. Food Sci. Technol.*, **17**, 522 (1985)
4. Sul, M. H.: Changes in quality of soybean curd residue during drying process and investigation of drying methods. Master Thesis of KyoungSung University (1996)
5. Ohno, A., T. Ano and M. Shoda.: Use of soybean curd residue, Okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, Iturin A, by Bacillus subtilis NB22, *Process Biochemistry*, **31**, 801 (1996)
6. Kim, K. S., E. H. Park, Y. B. Choi, K. C. Kim, S. H. Lee. and H. S. Sohn.: Solubilization of tofu-residue using multienzyme derived from *Aspergillus niger* CF-34. Korea *J. Food Sci. Technol.*, **26**, 484 (1994)
7. Kim, K. S. and H. S. Sohn.: Characterization of tofu-residue hydrolyzing carbohydrase isolated from *Aspergillus niger* CF-34. *Korea J. Food Sci. Technol.*, **26**, 490 (1994)
8. Chung, S. H. and K. H. Park.: Preparation of plant cell wall lytic enzymes from Fusarium moniliforme and protoplast isolation from plant leaf and cell suspension cultures. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.*, **18**, 148 (1990)
9. Sharma, A. and R. Joseph : Studies on the application of plant cell wall degrading enzymes from *Aspergillus torreus* and *Neurospora crassa. Biotechnol. Lett.*, **5**, 481 (1983)
10. Vihinen, M. and P. Mantsals.: Microbial amylolytic enzymes, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **24**, 329-418 (1989)
11. Komaki, T.: Application of amylases and related enzymes to industry. In the amylase Research Society of Japan.(ed), Handbook of amylases and related enzymes. Pergamon Press. England: 195-196 (1998)
12. Takasaki, Y.: Production of maltohexaose by α-amylase from *Bacillus criculans* G-6. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1537-1547 (1982)
13. Fogarty, W. M., F. Bealin-Kelly, C. T. Kelly and E. M. Doyle.: A novel maltohexaose forming α-amylase from *Bacillus caldovelox*: Patterns and mechanisms of action. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, **36**, 184-189 (1991)
14. Takasaki, Y., H. Shinohara, M. Tsuruhisa, S. Hayashi, and K. Imada : Maltotetraose-producing amylase from *Bacillus* sp. MG-4. *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1715-1720 (1991)
15. Cha, J., Y. B. Kim, B. C. Seo and K. W. Park : Characterization of *Streptomyces* sp. KSM-35 and purification of its maltotetraose forming amylase. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 633-637 (1994)
16. Berry, E. D., Liewen, M. B., Mandigo, R. W. and Hutkins, R. W.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin producing Pediococcus during the manufacture of fermented semidry sausage. *J. Food Prot.*, **53**, 194 (1990)
17. Okereke A. and Thomas, J. M.: Nisin dissipates the proton motive forces of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2463 (1992)
18. Kandler, O. and N. Weiss.: In Bergey's manual of systematic bacteriology, ed. by J. G. Holts, P. A. Sneath, N. S. Mair and M. E. Sharpe. vol. 2, Williams & Wilkins (1986)
19. Hammes, W. P., N. Weiss and W. Holzapfel.: In Prokayrote. ed. by A. Balowers, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer. 2nd Ed., Springer-Verlag. (1994)
20. Kim, K. H., J. Y. Kim and K. B. Lee.: Isolation of aerobic bacteria and its efficacy for the treatment of Korean food-wastes. *Korean J. Life Science*, **9**, 510 (1999)
21. Lee, M. S., W. J. Lee, D. S. Kim, J. H. Park, J. H. Kang.: Production of the bacteriocin from the tofu-residue. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 74-80 (1999)