한국환경과학회 봄 학술발표회지 제16권(제1호), 453~456, 2007
Proceedings of the Korean Environmental Sciences Society Conference, May, 18~19, 2007

PB3)

환경친화적 미생물 비료 개발을 위한 우모분해 세균의 분리 및 응용

우은옥*, 김민주, 유은연, 박근태[1], 손홍주[2], 이상준
부산대학교 미생물학과, [1]부산대학교 산학협력단, [2]부산대학교 생명응용과학부

1. 서 론

국내의 닭, 오리 도축산업으로부터 부산물로 배출되는 우모는 연평균 4만 톤에 이르고 있는데, 최근 가금육 소비량 증가에 따라 우모의 배출량은 더욱 증가할 것으로 예측된다. 가금류의 우모는 단백질 함량이 높기 때문에 가축의 사료로 이용되고 있으며, 많은 동물 영양학자들의 관심의 대상이 되고 있다.

그러나 생우모를 사료로 사용하였을 때, 주성분인 케라틴의 난분해성으로 인하여 그 이용도가 27-63%로 매우 낮아 사료적 가치가 떨어지는 단점이 있다. 따라서, 우모 부산물의 재활용 및 이용 효율을 향상시키기 위하여 우모를 고온, 고압 조건에서 강알칼리 화합물을 이용하여 분해하는 물리화학적 처리법이 적용되고 있다. 그러나 물리화학적 처리 공정 중 폐수 및 악취가 대량 발생함으로써 환경오염이 유발되며, 처리비용이 높아 경제성이 낮은 것으로 알려져 있다. 이러한 우모 처리공정의 비효율성을 고려해 볼 때, 효소 및 미생물과 같은 생물 촉매를 이용한 보다 효율적이고 환경친화적인 우모 처리기술에 대한 연구가 필요함을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서는 환경친화적인 미생물 기원의 비료 제제 개발을 위하여 중온 환경에서 높은 우모분해 활성을 가지는 미생물을 국내 자연환경으로부터 분리 및 동정함으로서 새로운 토착 생물자원을 확보하고자 하였으며, 물리화학적 방법에 의한 우모 분해산물과 미생물에 의한 우모 분해산물의 식물 성장효과를 비교함으로서 미생물 비료로서의 적용 가능성을 타진하였다.

2. 실험방법

2.1. Keratinolytic protease 생산 세균의 분리 및 배지

경남 일대의 닭 가공 공장과 양계장 주변의 토양, 양계분뇨 및 분뇨 속에 떨어진 우모 그리고 퇴비화 중인 볏짚 등으로부터 일정량의 시료를 채취하여 keratinolytic protease 활성이 가장 높은 균주를 실험균주로 최종 선정하였다.

2.2. Keratinolytic protease 생산 세균의 동정

최종 선정된 실험균주의 분류학적인 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적인 특성을 조사하였다. 또한, 16S rDNA 분석을 통하여 염기 서열을 결정한 후, National

Center for Biotechnology Information (NCBI)의 GenBank 데이터베이스와 비교하였다.

2.3. Keratinolytic protease 활성 분석 방법

실험균주가 생산하는 keratinolytic protease의 활성을 측정하기 위하여 배양액을 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 후 얻어진 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소반응을 위한 기질인 soluble keratin은 Wawrzkiewicz 등의 방법을 이용하여 조제하였다. Soluble keratin을 이용한 효소 활성 측정 방법은 다음과 같다. 2% soluble keratin 용액(0.1 M 인산완충용액, pH 8.0) 4 ml에 조효소액 1 ml를 첨가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응액 1 ml에 20% trichloroacetic acid 용액 1 ml를 첨가하여 반응을 종료시키고 60분 동안 정치한 후, 14,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였으며, 흡광도를 280 nm에서 측정하였다. 상기 조건에서 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit라 정의하고, keratinolytic activity를 나타내었다.

2.4. 화학적 및 미생물학적 방법에 의한 우모의 분해

우모의 화학적인 분해는 0.1 N NaOH 용액에 우모를 0.1% 첨가하여 60℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 0.1 N HCl를 이용하여 중화함으로서 분해하였다. 이후, 원심분리 (18,000 rpm, 30분, 4℃)하여 상등액을 회수하였다. 실험균주에 의한 우모 분해산물은 무기염 배지에 0.1%의 우모를 첨가하여 배양하면서 실험균주에 의하여 분해가 완료된 배양액을 원심분리한 후, 상등액을 회수함으로서 조제하였다.

2.5. 우모 분해산물이 식물 성장에 미치는 영향

공시 식물로는 생장기간이 비교적 짧고, 개화여부 확인이 가능한 해바라기 (*Helianthus sannuus* L.)를 선정하였다. 실험에 사용된 토양은 펄라이트, 버미큘라이트와 피트모스를 건조 상태에서 1: 1: 1 (w/w/w)로 혼합한 것이었다. *Helianthus sannuus* L. 종자는 6시간 동안 shocking시킨 후, pot에 파종하여 배양기 (Eyelaton, FLI-301N, Japan)에서 35일 동안 배양하였다. 명 처리 14시간, 암 처리 10시간의 광주기를 주었으며, 빛의 세기는 160 $\mu mol/m^2 \cdot s^2$ PAR로 유지하였다. 온도는 22±1℃ (명 조건)과 18±1℃ (암 조건)로, 습도는 70±7%로 각각 조절하였다. 매일 충분히 관수한 후, 각 우모 분해산물을 25%로 희석하여 1일 1회, 각 pot 당 5 ml씩 뿌리를 향해 분주하였다. 식물 성장에 미치는 영향은 생장률(성장 길이), 잎 수의 증가량, 개화율 및 잎의 건조 생체량을 측정하여 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Keratinolytic protease 생산 균주의 분리 및 동정

퇴비화 중인 볏짚으로부터 우모 분해능이 뛰어나고, 높은 keratinolytic activity를 가진 RS7 균주를 분리하였다. RS7 균주는 우모가 첨가된 무기염 배지를 이용하여 30℃에서 배양 시, 5일 만에 우모를 완전히 분해하였다. *Bacillus licheniformis* PWD-1은 50℃에서 10일 만에 우모를 완전히 분해하며, *Streptomyces pactum* DSM40530은 50℃에서 부분적으로 우모를 분해하는 것으로 보고 되어있다. 따라서, RS7 균주의 우모 분해능이 보다 우수하며, 또한 30℃에서 우모를 완전히 분해할 수 있었으므로 우모 가공시 고온성 우모 분해균주들보다

에너지를 절약할 수 있을 것으로 판단되었다.

우모 0.1%가 첨가된 분리용 무기염 배지에서 회분배양을 실시하면서 keratinolytic activity를 검토한 결과, 배양 시간 경과에 효소 활성은 완만하게 증가하다가 배양 6일경 최대 활성 (41 U/ml)을 나타내었으며, 그 후 급격하게 효소 활성이 감소하였다. 예비실험을 통하여 확립된 최적 무기염 배지에서 배양 18시간 경 가장 높은 keratinolytic activity를 보였고, 36시간 만에 우모가 완전히 분해되었다.

RS7 균주는 그람양성 세균으로서 실험균주의 16S rDNA 염기서열을 분석한 후, NCBI GenBank에 등록된 유사 균주들과 유전자간의 상관성을 알아본 결과, *Bacillus pumilus*와 100%의 상동성을 가지고 있었다. 따라서 실험균주를 *B. pumilus* RS7이라고 명명하였다.

3.2. 우모 분해산물이 식물 성장에 미치는 영향

우모 분해산물의 비료적 가치를 평가하기 위하여 화학적 방법 및 *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물을 *Helianthus sannuus* L.에 분주했을 때 생장률, 잎 수 증가량, 개화율 및 건조 생체율의 차이는 다음과 같다.

배양 시작 시점에서 종료 시점까지의 총 생장률 (total increasing hight)의 경우, *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물을 분주한 실험군이 화학적 방법에 의한 분해산물을 분주한 실험군보다 1.7 cm 정도 길었으며, 대조군에 비해 3.5 cm 정도 길었다. *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물을 분주한 실험군의 잎 수 총 증가량은 6.7개로서, 화학적 방법에 의한 분해산물을 분주한 경우 (5.6개)보다 약 1.2배 높게 나타났으며, 물을 분주한 대조군 (2.3개)보다 3배 정도 높았다. 개화율은 대조군 및 화학적 방법에 의한 우모 분해산물을 분주한 실험군에서는 배양 35일 후에도 개화되지 않았으며, 무기염 배지에서는 10%의 낮은 개화율을 보였다. 그러나 *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물을 분주한 경우, 30%의 개화율을 보였다. 잎의 건조 생체량은 잎의 넓이와 두께를 포함하는 값이다. *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물을 분주한 실험군의 총 건조 생체량은 2.6 g으로서, 화학적 방법에 의한 분해산물을 분주한 실험군 (2.2 g)보다 1.2배 정도 높았다. 또한 물을 분주한 대조군 (0.7 g) 보다 4배 정도 높았으며, 잎 수의 차이인 3배보다 더 큰 차이를 보였다.

4. 요 약

가금류의 도축 부산물로 대량 배출되고 있는 우모는 주로 생물학적으로 난분해성 단백질인 케라틴으로 구성되어 있다. 따라서 물리화학적 처리에 의하여 우모를 처리하고 있으나 이 방법은 환경오염을 유발한다. 따라서 본 연구에서는 환경친화적 우모 분해 공정을 개발하고, 우모 분해산물의 식물 성장을 위한 비료로서의 가치를 평가하기 위하여 퇴비화 볏짚에서 케라틴 분해효소 생성능이 우수한 균주인 RS7을 분리하였다. RS7의 생화학적 특성과 16S rDNA의 염기 서열을 분석하여 동정한 결과, *Bacillus pumilus* RS7로 동정되었다. *B. pumilus* RS7은 30℃에서 배양 5일 만에 우모를 완전히 분해할 수 있었다. 본 균주에 의한 우모 분해산물은 *Helianthus sannuus* L.의 생장율, 잎 수 증가량, 개화율, 건조 생체량에 있어 대조군과 화학적 우모 분해산물보다 우수하였다. *Bacillus pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물은 식물 성장 촉진을 위한 미생물기원 비료로써의 역할을 수행할 수 있었으며, 이에

따라 양계산업에서 배출되는 우모 폐기물이 환경에 주는 악영향을 감소시킬 수 있을 것으로 예측된다.

참 고 문 헌

Hong S.J., Namkung H., Kim W.Y., Paik I.K., 2002, Effects of supplemental feather digests on the growth of boiler chicks and taurine content in the boiler meat, Kor. J. Poult. Sci., 29, 141-147.

Moritz J.S., Latshaw J.D., 2001, Indicator of nutritional value of hydrolyzed feather meal, Poult. Sci., 80, 79-86.

Choi I., Chang H.S., 1999, Isolation and cultural characteristics of microorganism for the utilization of feather meal, Kor. J. Anim. Nutr. Feed, 23, 59-66.

Lee N.H., Kim Y.B., Kim H.J., Seong K.S., Rho J.H., Han C.K., 1999, Effects of physiochemical treatment on the isolation of keratinaceous protein and amino acids of feather meal, Kor. J. Anim. Nutr. Feed, 23, 15-20.

Colette M.H., Michael G.H., 1994, Bioconversion of waste keratins: wool and feathers, Conserv. Recyc., 11, 179-188.

Son H.J., Kim Y.G., Park Y.K., 2004, Isolation and identification of feather-degrading bacteria for biotechnological applications of keratinaceous protein waste, Kor. J. Life Sci., 14, 229-234.

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., 1994, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

Wawrzkiewicz K., Lobarzewski J., Wolski T., 1987, Intracellular keratinase of *Trichlophyton gallinae*, J. Med. Veterinary Mycology, 25, 261-268.

Choi J.M., 1995, Changes of physical properties of feather-amended media, J. Kor. Soc. Hort. Sci., 36, 707-714.

Böckle B., Galunsky B., Müller R., 1995, Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM40530, Appl. Environ. Microbiol., 61, 3705-3710.