

우모분해세균 *Bacillus megaterium* F7-1에 의한 단백질 분해효소 생산에 영향을 미치는 배양조건

손흥주*

밀양대학교 생명공학과

Cultural Conditions for Protease Production by a Feather-Degrading Bacterium, *Bacillus megaterium* F7-1. Son, Hong-Joo*. Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-906, Korea – The effects of inorganic salts and feather concentrations on protease production by *Bacillus megaterium* F7-1 were investigated. Protease production was dependent on the presence of phosphates in the medium. Supplementation of medium with calcium ion slightly increased protease production. The highest protease production was obtained at 1.4% feather. The optimal medium contained 0.2% glucose, 0.8% skim milk, 0.06% K_2HPO_4 , 0.04% KH_2PO_4 , 0.06% NaCl, 0.03% $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.002% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ and 1.4% whole feather. By using this optimized medium, increased production of the protease was achieved compared with the cases of using basal medium.

Key words: *Bacillus megaterium*, feather, protease

많은 도축 부산물중 가금류의 우모(feather)는 생산량이 방대하고, 단백질 함량이 높기 때문에 여러 동물 영양학자들의 관심의 대상이 되고 있다[6]. 국내에서 사육되고 있는 대표적인 가금류인 닭의 2001년 도계수는 약 45,000만수로, 우리의 도축수를 감안한다면 연간 평균 4만 톤 이상의 엄청난 우모가 부산물로서 생산되고 있다[5]. 이처럼 가금류의 우모는 생산량이 방대하고, 조단백질 함량이 85%로 매우 높기 때문에 우모분(feather meal)의 형태로 가공하여 가축 및 양어 사료 등으로 이용하고 있다[4]. 우모는 생물학적으로 난분해성 단백질인 케라틴(keratin)으로 구성되어 있다[8]. 현재, 우모의 난분해성을 해결하면서 가축의 사료로 이용하기 위하여 적용되고 있는 방법은 가압, 가열 처리 후 NaOH에 의하여 화학적으로 분해시키는 것이지만 이러한 물리화학적 처리는 그 공정 중 폐수 및 악취가 대량 발생함으로써 환경오염을 유발하는 원인이 되며, 처리비용이 높아 경제성이 낮고, arginine, cystine 등 특정 아미노산이 파괴되는 동시에 단위동물에 대한 소화율도 50% 이하로 매우 저조한 것으로 알려져 있다[10, 11]. 이러한 우모 처리공정의 비효율성을 고려해 볼 때, 효소 및 미생물과 같은 생물 촉매를 이용한 좀더 효율적이고 환경친화적인 우모 처리기술에 대한 연구가 필요함을 알 수 있다.

상기와 같은 케라틴의 독특한 물리화학적 안정성에도 불구하고 우모가 자연계에 대량 축적되지 않는 것은 우모를 분

해하고 이용하는 미생물이 자연환경 중에 존재함을 의미한다. 우모를 분해하는 미생물이 생산하는 특이적인 protease를 keratinase 또는 keratinolytic protease라고 하는데, 이 효소들은 매우 compact한 기질을 분해한다는 측면에서 다른 protease 또는 peptidase와 구별되어 진다[13]. 저자는 환경친화적 처리에 의한 우모의 유용자원화를 달성하기 위하여 자연계에 다양하게 존재하는 미생물 중 protease를 생산하여 우모를 효율적으로 분해할 수 있는 *Bacillus megaterium* F7-1을 분리한 후, 효소생산에 영향을 미치는 탄소원, 질소원, 배양온도 및 배지 pH에 대하여 보고[15, 16]한 바 있다. 그러나 아직까지 우모의 농도, 각종 무기염 등이 protease의 생산에 미치는 영향에 대한 보고는 극소수에 불과하다. 따라서 본 연구에서는 이들 조건이 protease 생산성에 미치는 효과를 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

본 연구에 사용된 균주는 붕괴된 우모로부터 분리된 *B. megaterium* F7-1이었으며[16], 사용된 기본배지의 조성 및 배양조건은 glucose 0.2%, skim milk 0.8%, K_2HPO_4 0.01%, KH_2PO_4 0.02%, NaCl 0.05%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01%, pH 6.5 및 30°C이었으며, 다른 언급이 없는 한 0.1%의 whole feather를 첨가하여 효소 생산성을 검토하였다. 이때, 배양온도, 배지의 초기 pH, glucose 및 skim milk의 농도는 이전에 최적화된 것이었다[15]. 다른 언급이 없는 한, 전배양은 50 ml의 nutrient broth가 함유된 250-ml 용량의 conical flask에 nutrient agar plate에서 보존중인 균주 한 백금이를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 24시간동안 회전진탕배양하였다. 전배양액을 본배양액 50 ml가 함유된 250-ml 용량의 conical flask에 2%(v/v) 접종한 후, 200 rpm에서 5일간 회

*Corresponding author

Tel: 82-55-350-5544, Fax: 82-55-350-5544

E-mail: shjoo@mnu.ac.kr

전진탕배양하였다. 우모의 분해정도는 우모의 건조무게 감소량을 측정함으로써 정량한 후, % 백분율로 나타내었다[9]. Protease 활성 측정을 위하여 배양액을 17,418 × g에서 15분 동안 원심분리한 후, 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성 측정을 위하여 0.5% Hammersten casein 기질용액(0.1M 인산완충용액, pH 7.5) 450 µl에 적당하게 희석된 조효소액 50 µl를 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다[1]. 반응액에 10% trichloroacetic acid 용액 250 µl를 첨가하여 반응을 중지시키고, 30분 동안 정지한 후, 17,418 × g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였으며, 상등액의 흡광도를 280 nm에서 측정하였다[1]. 효소의 1 unit는 상기 조건에서 1분당 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소양으로 하였다. 각 결과는 3번의 동일 실험으로부터 각 3번의 분석을 통하여 도출된 값의 평균으로 표현하였다.

전배양을 위한 배지의 종류는 protease 생산에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다[7]. 전배양용 배지가 protease

생산 및 우모 분해에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 Nutrient broth에서 가장 우수한 효소 생산을 나타내었으며, Luria-Bertani medium에서는 효소 생산이 다소 저조하였다. 이후 전배양은 Nutrient broth에서 실시하였다.

기본배지에 함유된 각 무기염의 농도가 protease 생산 및 우모 분해에 미치는 영향은 Table 2에서 보는 바와 같다. 기본배지에 함유된 모든 무기염들이 protease의 생산과 우모 분해에 필수적인 것은 아니었는데 특히, NaCl과 MgCl₂ · 6H₂O의 첨가는 효소 생산성 증가에 별다른 영향을 나타내지 않았다. 그러나 각 무기염들은 적정 농도에서 효소 생산성을 완만하게 증가시켰다. KH₂PO₄, NaCl 및 MgCl₂ · 6H₂O의 경우, 각각 0.04%, 0.06% 및 0.03% 이상의 농도에서는 효소 생산성이 더 이상 증가하지 않고 일정하였으며, K₂HPO₄는 0.07% 이상의 농도에서 효소 생산성이 감소하였다. *B. licheniformis* RGI의 경우, 1% 이상의 인산염은 효소 생산성을 감소시킨다고 보고[12]되어 있어 본 연구결과와 상이하였다. 한편, 효소 생산량과 우모 분해정도는 반드시 비례하지는 않았는데, 효소 생산량이 높음에도 불구하고 우모 분해도가 낮은 것은 protease와 함께 케라틴을 효율적으로 분해하는데 요구되는 일부 accessory protein이 제거되었거나 그 생산이 억제된 것에 기인하는 것으로 알려져 있다[14]. 그리고, 본 실험에서는 미세하게 마쇄된 우모를 사용한 것이 아니라 native whole feather를 사용하였고, 이에 따라 각 실험구마다 사용된 native whole feather의 형태에 따라 효소와 기질간의 접촉이 일정하게 일어나지 않음으로서 이런 현상이 나타나는 것으로 추정되어, 앞으로 이에 대한 보다

Table 1. Effect of preculture on protease production by *B. megaterium* F7-1.

Precultures	Protease activity (U/ml)	Feather degradation (%)
Nutrient broth (NB)	227	85
NB + 0.04% skim milk	204	81
Luria-Bertani medium (LB)	184	72
LB + 0.04% skim milk	180	76

Cells in each seed medium were incubated for 24 h at 30°C and 200 rpm. Batch cultures were initiated by inoculating medium with a 2% (v/v) inoculum of preculture.

Table 2. Effect of inorganic salt on protease production by *B. megaterium* F7-1.

Salts	Protease activity (U/ml)	Feather degradation (%)	Salts	Protease activity (U/ml)	Feather degradation (%)		
KH ₂ PO ₄	None	189	83	NaCl			
	0.01%	208	83	None	246	82	
	0.02%	235	85	0.01%	249	85	
	0.03%	238	85	0.02%	256	83	
	0.04%	254	85	0.03%	253	84	
	0.05%	253	83	0.04%	255	87	
	0.06%	254	87	0.05%	259	85	
				0.06%	266	84	
K ₂ HPO ₄	None	182	84	0.07%	265	86	
	0.01%	206	81	MgCl ₂ · 6H ₂ O			
	0.02%	237	84		None	260	85
	0.03%	235	85		0.01%	264	86
	0.04%	246	90		0.02%	270	82
	0.05%	260	84		0.03%	273	86
	0.06%	268	86		0.04%	272	85
	0.07%	251	84				

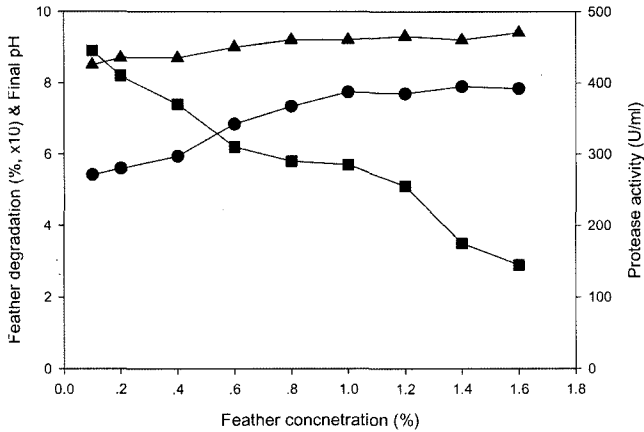


Fig. 1. Effect of feather concentration on protease production by *B. megaterium* F7-1. ●, protease activity; ■, feather degradation; ▲, final pH.

자세한 연구가 필요함을 알 수 있었다. 따라서 배양조건 결정인자로 효소 생산량을 기준으로 하는 것이 보다 타당할 것으로 판단되었다. 기본배지에 함유되어 있지 않았던 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 및 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 추가적으로 첨가하여 배양한 결과, 0.002% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 제외하고는 효소 생산에 아무런 영향을 미치지 않았다 (미제시). 그러나 *B. licheniformis* RG1의 경우, Ca^{2+} 의 첨가는 protease의 생산을 저해한다고 보고되어 있다[12]. 이상에서 결정된 protease 생산을 위한 최적배지의 조성은 glucose 0.2%, skim milk 0.8%, K_2HPO_4 0.06%, KH_2PO_4 0.04%, NaCl 0.06%, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.03% 및 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.002% (pH 6.5, 30°C)이었다.

상기에서 결정된 최적배지에 whole feather를 농도별로 첨가하여 protease 생산을 검토한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 우모의 첨가량이 많을수록 효소 생산량은 증가하여 1.4%에서 395 U/ml의 최대 효소 생산량을 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 일정하였다. 이 결과는 본 실험군주에 의한 protease의 생산에는 다른 배지성분보다 효소의 기질이 되는 케라틴 단백질이 더 중요한 인자로 작용함을 의미한다. *B. licheniformis* PWD-1의 경우, 1% 이상의 우모 농도에서 효소 생산이 크게 감소하는 것으로 알려져 있으며 [2], *B. pumilis* FH9는 1.5% 우모 농도에서 protease 생산이 가장 높은 것으로 보고[3]되어 있다. 한편, protease의 생산과 달리 우모의 분해율은 우모 농도에 반비례하였다. 이것은 고농도의 우모는 substrate inhibition 또는 protease 생산의 repression을 초래하는 것으로 설명될 수 있으며, 이러한 현상은 Cheng *et al.*[1]에 의하여 보고된 바 있다. 배양액의 pH는 배양 시간 경과에 따라 증가하기 시작하여 배양 5일 후, pH 8.5~9.4를 나타내었다. 케라틴 분해균주를 배양할 경우, 배양시간 경과에 따라 배양액의 pH가 알칼리성으로 변화되는 것은 케라틴 기질에 존재하는 강력한 disulfide bond

가 환원에 의하여 절단되었다는 것을 의미한다[8]. 따라서 본 균주는 sulfitolysis 기능을 수행하는 protease를 생산하는 것으로 추정되나 이에 대한 것은 앞으로 좀더 자세한 연구가 필요함을 알 수 있었다.

결론적으로 각종 무기염 및 우모의 농도를 최적화시킨 결과, 기본배지(235 U/ml)의 약 1.7배(395 U/ml)에 해당하는 protease를 생산할 수 있었으며, 이것은 탄소원 및 질소원 외에 무기염도 효소 생산에 긍정적인 역할을 하며, 특히 기질은 효소 생산을 크게 증가시킨다는 것을 시사한다.

REFERENCES

1. Charney, J. and R. M. Tomarelli. 1947. A colourimetric method for the determination of proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* **171**: 501-505.
2. Cheng, S. W., H. M. Hu, S. H. Shen, H. Takai, M. Asano, and Y. C. Tsai. 1995. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biochem. Biotechnol.* **59**: 2239-2243.
3. El-Refai, H. A., M. A. AbdelNaby, A. Gaballa, M. H. El-Araby, and A. F. Fattah. 2005. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilis* FH9 keratinolytic activity. *Process Biochem.* **40**: 2325-2332.
4. Kim, Y. B., J. B. Lee, K. S. Sung, and N. H. Lee. 1998. Effects of physical processing on protein content and pepsin-digestibility of feather meals. *Kor. J. Anim. Sci.* **40**: 103-110.
5. Korea Chicken Council. 2002. www.chicken.or.kr/3data/do.htm.
6. Lahl, W. J. and S. D. Braun. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* October 68-71.
7. Lin, X., C. C. Lee, E. S. Casale, and J. C. H. Shih. 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3271-3275.
8. Onifade, A. A., N. A. Al-Sane, A. A. Al-Musallam, and S. Al-Zarban. 1998. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresource Technol.* **66**: 1-11.
9. Oyeka, C. A. and H. C. Gugnani. 1997. Keratin degradation by *Scytalidium* species and *Fusarium solani*. *Mycoses* **41**: 73-76.
10. Papadopoulos, M. C. 1985. Processed chicken feathers as feedstuff for poultry and swine. A review. *Agric. Wastes* **14**: 275-290.
11. Papadopoulos, M. C., A. R. El Boushy, and A. E. Roodbeen. 1985. The effect of varying autoclaving conditions and added sodium hydroxide on amino acid content and nitrogen characteristics of feather meal. *J. Sci. Food Agric. Abstr.* **36**: 1219-1226.
12. Ramnani, P. and R. Gupta. 2004. Optimization of medium

- composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RGI using statistical methods involving response surface methodology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **40**: 191-196.
13. Rao, M. B., A. M. Tanksale, M. S. Ghatge, and V. V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597-635.
14. Singh, C. J. 2002. Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes. *Mycopathologia* **156**: 151-156.
15. Son, H. J., G. T. Park, and Y. G. Kim. 2004. Production of a keratinolytic protease by a feather-degrading bacterium, *Bacillus megaterium* F7-1. *Kor. J. Microbiol.* **40**: 43-48.
16. Son, H. J., Y. G. Kim, and Y. K. Park. 2004. Isolation and identification of feather-degrading bacteria for biotechnological applications of keratinaceous protein waste. *J. Life Sci.* **14**: 229-234.

(Received June 25, 2005/Accepted Dec. 12, 2005)