

## Whole Chicken Feather-Degrading Keratinolytic Protease 생산균주의 분리 및 특성

박성민 · 정혁준 · 유대식\*  
계명대학교 미생물학과

**Selection and Cultural Characteristics of Whole Chicken Feather-Degrading Bacterium, *Bacillus* sp. SMMJ-2.** Park, Sung Min, Hyuck Jun Jung, and Tae Shick Yu\*. Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 701-704, Korea – Feather, generated in large quantities as a byproduct of commercial poultry processing, is almost pure keratin, which is not easily degradable by common proteases. Four strains, SMMJ-2, FL-3, NO-4 and RM-12 were isolated from soil for production of extracellular keratinolytic protease. They were identified as *Bacillus* sp. based on their morphological and physiological characteristics. They shown high protease activity on 5.0% skim milk agar medium and produced a substrate like mucoid on keratin agar medium. *Bacillus* sp. SMMJ-2 had a faster production time for producing keratinolytic protease than other strains. This strain did not completely degrade whole chicken feather for five days in basal medium but completely degraded whole chicken feather when supplied with nitrogen source for 40hours in keratinolytic producing medium (0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% fructose, 1.2% whole chicken feather, 0.01% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 7.0). When supplied with chicken feather as nitrogen source, keratinolytic protease activity was 89 units/ml/min. When soybean meal was used as nitrogen source, the keratinolytic protease production reached a maximum of 106 units/ml/min after 48 hours under 30°C, 180 agitation. To isolate the keratinolytic protease, the culture filtrate was precipitated with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and acetone. The recovery rate of keratinolytic protease was about 96% after treatment with 50% acetone. The enzyme was stable in the range of 30~50°C and pH 6.0~12.0.

**Key words:** Keratinolytic protease, whole chicken feather-degrading, *Bacillus* sp. SMMJ-2

### 서 론

Keratin은 불용성의 단백질로 사람의 머리카락과 손톱 및 조류의 feather를 구성하는 대표적인 물질이다. Keratin은 그 구조 내에 cysteine disulfide 결합, 이온결합 및 hydrophobic interaction으로 강한 사슬결합을 하고 있기 때문에 물리, 화학적으로 매우 강한 안정성을 가진다. 닭을 비롯한 조류의 feather는 soft type의  $\beta$ -keratin에 속하며, 사람의 머리카락과 손톱 및 동물의 뿔 등은 hard type의  $\alpha$ -keratin으로 분류되어진다[1].

Keratinase(EC 3.4.24.10)는 keratin을 분해하는 효소로 extracellular 효소인 keratinase type I과 cell bound 효소인 keratinase type II와 III로 구분되어진다[2]. Keratinase는 산업적 폐기물로 생성되어지는 feather keratin을 분해하는데 부분적으로 사용되어지고 있으며 또한 가금류의 feather를 이용하여 동물성 단백질 사료인 keratin meal을 제조할 때도

사용되어진다[3]. Keratinase의 특징은 일반적인 protease로 분해되지 않는 가금류 폐기물을 가수분해 할 수 있다는 것인데, 부산물로 발생되어지는 가금류 폐기물은 국내의 경우 연간 2만여 톤에 달하며, 고압, 가열처리하여 건조, 분쇄한 후 우모분 사료로 사용되어지고 있다. 하지만, 이와 같은 처리공정은 에너지의 소모가 많은 뿐만 아니라 처리 과정에서 필수 아미노산의 소실을 야기하여 사료로 처리하는 경우에 동물의 소화관 내에서 낮은 소화율을 나타내는 단점이 있다[4-6]. 이러한 단점을 극복하기 위하여 미생물이 생산하는 keratinase를 산업적으로 이용하고자 하는 많은 노력들이 현재까지 시도되고 있다. 현재까지 알려진 대표적인 keratinase 생산 균주로는 *Bacillus* sp.[7, 8], *Vibrio* sp.[9], *Actinomyces* sp.[10], Fungi[11], *Streptomyces* sp.[12] 등이 알려져 있다. 하지만, 미생물이 생산하는 keratinase를 이용하여 keratin substrate를 분해하는 경우에는 많은 시간을 필요로 하며 이것이 또 다른 단점으로 작용되어 산업적 이용에 있어서 한계를 나타내고 있다. 또한 keratinase에 의한 keratin의 분해 과정은 최근에서야 조금씩 밝혀지고 있다[1].

지금까지 보고된 keratinase는 구조적으로 serine protease의 특성을 나타내는 고온성 keratinolytic protease가 대부분

\*Corresponding author

Tel: 82-53-580-5252, Fax: 82-53-580-5164

E-mail: tsyu@kmu.ac.kr

을 차지하며 이러한 효소는 *B. licheniformis*, *B. subtilis* [8, 13], *Streptomyces pactum* [10], *Trychophyton rubrum* [14] 등에서 생산되며, 이밖에 trypsin-like keratinase와 subtilisin-like keratinase 등이 보고되었고 [15] 상온에서 *Pseudomonas* sp.에 의하여 생성되는 keratinase의 생산에 관한 연구도 보고되었다 [16].

본 연구에서는 가금류 폐기물로 발생되어지는 keratin 부산물인 whole chicken feather를 분해할 수 있는 높은 keratinolytic protease를 생산하는 균주를 개발할 목적으로 여러 토양시료로부터 균주를 분리하고 그 특성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

Keratinolytic protease를 생산하는 균주의 분리를 위하여 유럽 및 러시아 지역 등 13개소의 토양시료와 경북 성주군 일대의 가금류 사육농장의 토양을 사용하였다.

### 사용배지

토양시료로부터 균주를 분리하기 위하여 LB agar (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% sodium chloride, 1.5% agar, pH 7.0 ± 0.2) 배지를 사용하였다. 분리한 균주들 중에서 keratinolytic protease를 생산하는 균주의 선별을 위하여 5.0% skim milk 배지 (5.0% skim milk, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.0% agar)와 whole chicken feather keratin 배지 (2.0% whole chicken feather keratin, 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, agar 1.5%)를 사용하여 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내는 균주를 선별하였다. 선별된 균주를 대상으로 α-keratinase와 β-keratinase의 생산에 사용되어지는 5종류의 keratinolytic protease 생성배지 (No.1: 0.05% NaCl, 0.03% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% whole chicken feather, pH 7.0, No.2: 0.5% whole chicken feather, 0.2% glucose, 0.5% peptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% CaCl<sub>2</sub>, 0.1% MgSO<sub>4</sub>, pH 7.0, No.3: 0.5% whole chicken feather, 0.05% NH<sub>4</sub>Cl, 0.05% NaCl<sub>2</sub>, 0.01% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgCl, 0.01% yeast extract, pH 7.0, No.4: 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% fructose, 1.2% soybean meal, 0.01% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 7.0, No.5: 2.0% soluble starch, 2.0% skim milk, 1.0% NaCl, pH 7.0) [17-21]에서 배양한 후, keratinolytic protease 활성을 측정하였다.

### Whole chicken feather keratin의 제조

Keratin의 조제를 위하여 Krystyna 등 [20]의 방법을 변형하여 조제하였다. 즉, 10.0 g의 whole chicken feather에 500 ml의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가한 후, 끓는 물

에서 4시간 증탕하여 keratin 성분을 용해시킨 후, 2배 volume의 acetone (-76°C)으로 keratin 단백질을 침전시키고 8,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 침전물을 멸균수로 4회 세척하고 50°C에서 24시간 건조하여 사용하였다.

### 균주의 선별 및 동정

Keratinolytic protease를 생산하는 균주를 선별하기 위하여 계명대학교 미생물 생리학 연구실에서 보관중인 균주들과 토양에서 채취한 시료를 단계희석한 후, LB agar plate에 접종하여 30°C에서 3일간 배양하여 분리한 단일 균주를 사용하였다. 균주의 선별은 5.0% skim milk agar plate에 접종하여 clear zone의 크기를 확인하여 일차로 선별하였으며 선별된 균주를 2.0% keratin agar plate에 희석 접종하여 다량의 분비물질을 분비하며 배지 중 포함되어 있는 chicken 유래의 keratin 고형물 위에서 생육이 왕성한 균주를 최종적으로 keratinolytic protease 생산 균주로 선별하였다.

분리된 균주의 분류학적 동정을 위하여 현미경을 통한 형태 관찰, 그람염색, catalase 활성 측정 및 배양학적 특성을 조사하였으며 API 50 CHB kit (BioMerieux, France) 및 20E kit (BioMerieux, France)을 이용하여 동정하였다.

### Keratinolytic protease assay

Keratinolytic protease의 활성측정은 azo-casein을 기질로 이용하는 Sangali 등 [9]의 방법을 이용하였다. 즉, 효소의 활성측정을 위하여 배양액을 10,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 한 후, 상층액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액 150 μl를 500 μl의 2.0% azo-casein 현탁액 (50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0)에 첨가하여 50°C에서 15분간 반응시킨 후, 효소반응을 정지시키기 위하여 1.2 ml의 10.0% trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하여 실온에서 15분간 방치하였다. 10,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 하여 불용성의 기질을 제거한 후 기질에서 유리된 sulphanilic acid 발색단의 정도를 spectrophotometer (shimadzu, Japan)를 이용하여 440 nm에서 측정하였다. 대조구는 기질만 반응시킨 후, TCA를 첨가하고 조효소액을 첨가하여 조사하였으며 효소활성은 동일한 실험을 3회 반복한 값의 평균수치로 나타내었다. Keratinolytic protease에 대한 정의는 50°C에서 1분간 기질과 반응하여 흡광도 0.01을 증가시키는 효소량을 1 unit로 하였다 [9].

Protease 활성은 Lowry 등 [22]의 방법을 이용하였다. 즉, 조효소액 250 μl를 0.5% hammarsten casein milk (200 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0) 용액 1.2 ml에 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 5.0% TCA 용액 3.0 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 실온에서 30분간 방치하였다. 반응액을 10,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 한 후, 상층액 1.0 ml에 550 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 ml를 첨가하고 3배 희석한 0.5

ml folin reagent를 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 660 nm에서 OD 값을 측정하고 tyrosine standard curve를 이용하여 유리된 tyrosine량을 측정하였다. Protease 활성은 37°C에서 1분간 기질로부터 1 µg의 tyrosine을 유리하는 효소의 총량을 1 unit로 정의하였다.

#### 효소의 조정제 및 안정성

효소의 조정제를 위하여 keratinolytic protease 생산 배지에 전배양균을 1.0% 접종하여 30°C, 180 rpm에서 3일간 배양한 후, 배양액을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 균체를 제거한 배양액을 조효소액으로 하였다.

효소의 분리는 조효소액에 acetone을 농도별로 첨가하여 15분간 약하게 교반한 후, 10,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 침전물을 소량의 완충액으로 용해하여 회수하였다. 회수한 효소의 열 안정성을 검토하기 위해서 효소액을 30~80°C의 온도에서 20분간 열처리 한 후, 급냉각시켜 50°C에서 잔존효소활성을 검토하였으며, pH 안정성은 효소를 pH 3.0~12.0까지의 완충액을 이용하여 4°C에서 30시간 투석한 후, 잔존효소활성을 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균주의 선별

Keratinolytic protease를 생산하는 균주를 선별하기 위하여 연구실에서 보관하고 있는 균주 15종과 유럽 및 러시아 지역의 토양시료에서 분리한 균주 793종, 가금류 사육 농장의 토양시료에서 분리한 60종을 이용하였다. 각각의 단일 균주를 5.0% skim milk agar plate에 접종하여 30°C에서 3일간 배양한 후, Ø 20 mm 이상의 크고 선명한 clear zone을 형성하는 20 균주를 일차적으로 선별하였다(Fig. 1). 선별된 균주를 2.0% whole chicken feather를 함유하는 keratin agar배지에 접종하여 30°C에서 7일간 배양하면서 균의 생육

이 왕성하며 다량의 점질성의 물질을 생산하는 4개의 균주를 최종적으로 선별하였다. 2.0% whole chicken feather keratin을 함유하는 배지에서 chicken feather keratin에 대하여 직접적인 분해능을 관찰하기 어려웠으나 분비되어지는 점질성 물질에 의하여 chicken feather keratin 고형물의 탈색 정도를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

최종적으로 선별한 균주는 다음과 같다. SMMJ-2는 스웨덴 스톡홀름의 항구부근 시료에서, FL-3은 필란드 Lapenrananta 시료에서, NO-4는 노르웨이 Oslo 지역 시료에서 분리를 하였으며, RM-12는 러시아 Moscow 지역 시료에서 각각 분리하였다.

#### 균주의 동정

분리된 4개의 균주 SMMJ-2, FL-3, NO-4 및 RM-12의 형태학적 및 생리학적 특징을 조사한 결과는 Table 1과 같았다. 각각의 균주를 LB broth 20 ml에서 30°C, 24시간 전배양한 후, 동일한 배지의 pH를 3.0에서 11.0으로 조정한 후 전배양액을 100 µl씩 접종하여 72시간 배양하였다. pH 3.0을 제외한 4.0에서 11.0의 범위에서 양호한 증식을 나타내었다. 선별된 4균주는 동일하게 그람양성의 rod form으로 포자를 형성하고 형성된 집락은 원형으로 점질성의 물질을 생산하는 mucoid type이었으며 표면은 smooth하였고 광택을 나타내었다. 호기성 세균으로 catalase, gelatin liquefaction, citrate utilization 및 nitrate reduction 등을 하는 것으로 조사되었으며 Bergey's manual of systematic bacteriology와 비교한 결과 *Bacillus* sp로 분류되었다. API 50 CHB kit과 20E kit을 사용하여 24~48시간 동안 관찰한 후, API LABplus(V. 3. 3. 3, bioMerieux) 프로그램을 이용하여 동정한 결과 이들은 *Bacillus subtilis*로 판명되었으나, 각각 86.4, 84.2, 88.4 및 80.6%의 낮은 상동성을 나타내었다. 따라서 *Bacillus* sp로 명명하고 차후에 16s rRNA를 이용하여 보다 정확한 동정을 실시하고자 한다. *Bacillus* sp. SMMJ-2, FL-

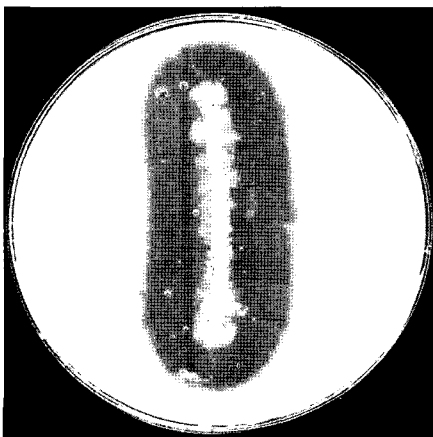


Fig. 1. Growth of *Bacillus* sp. SMMJ-2 on 5.0% skim milk agar.

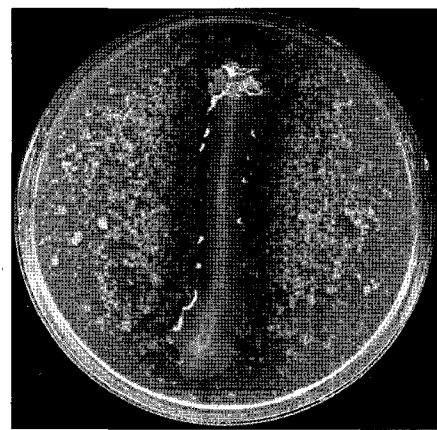


Fig. 2. Growth of *Bacillus* sp. SMMJ-2 on 2.0% whole chicken feather keratin agar.

**Table 1. Morphological, cultural and physiological characteristics of selected strains.**

| Characteristics      | SMMJ-2                  | FL-3                    | NO-4                    | RM-12              |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|
| Morphological:       |                         |                         |                         |                    |
| Gram staining        | +                       | +                       | +                       | +                  |
| Shape                | rod                     | rod                     | rod                     | rod                |
| Endospores produced  | +                       | +                       | +                       | +                  |
| Colonies form        | white-yellowish, smooth | white-yellowish, smooth | white-yellowish, smooth | white-gray, smooth |
| Mobility             | +                       | +                       | ±*                      | +                  |
| Physiological:       |                         |                         |                         |                    |
| Catalase             | +                       | +                       | +                       | +                  |
| Citrate utilization  | -                       | -                       | -                       | -                  |
| Gelatin liquefaction | +                       | +                       | +                       | +                  |
| Indole test          | -                       | -                       | -                       | -                  |
| Milk hydrolysis      | +                       | +                       | +                       | +                  |
| Oxidase              | +                       | +                       | +                       | +                  |
| Voges-Prokauer test  | -                       | -                       | -                       | -                  |
| 20°C                 | +                       | +                       | +                       | +                  |
| 37°C                 | +                       | +                       | +                       | +                  |
| 52°C                 | +                       | +                       | +                       | +                  |

\*Mobility was very slow.

3 및 NO-4의 경우 점질성의 물질을 많이 생성하는 mucoid type이였으며 RM-12는 mucoid type 이였지만 배양 3일째부터 서서히 콜로니의 색이 진한 갈색으로 변하는 특징을 나타내었다. *Bacillus* sp. SMMJ-2, FL-3, NO-4 및 RM-12는 45°C에서는 증식을 하였지만 55°C에서는 증식하지 못하였다(Table 1).

#### 배지에 따른 keratinolytic protease의 생산조건

Keratinolytic protease의 생산을 위하여 재료 및 방법에서 언급한 5 종류의 keratinolytic protease배지를 각각 50 ml 제조한 후 pH를 7.0으로 조정하여 121°C 15분간 멸균한 후 사용하였다. LB broth를 이용하여 *Bacillus* sp. SMMJ-2, FL-3, NO-4 및 RM-12를 30°C, 180 rpm에서 24시간 동안 전배양한 후, 전배양액 0.5 ml(1.0%)를 각각의 keratinolytic protease 생성 배지에 접종하여 24시간 배양하고 10,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리한 후, 그 상층액을 조효소액으로 이용하여 keratinolytic protease 활성을 측정하였다. Table 2에서와 같이, 배지 1, 2, 3 및 4에서는 *Bacillus* sp. SMMJ-2, FL-3, NO-4 및 RM-12는 양호한 keratinolytic

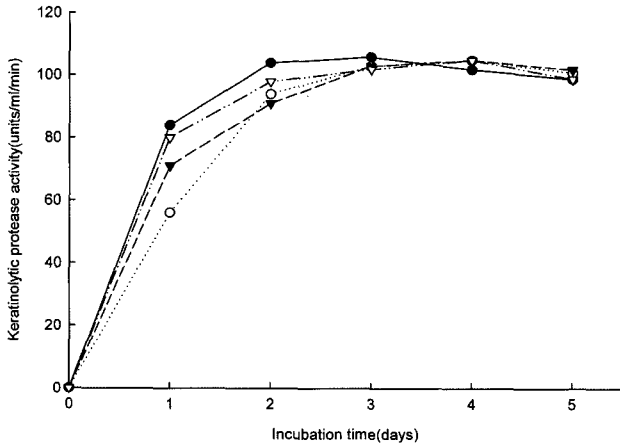
**Table 2. Keratinolytic protease activity with different culture medium.**

| Strain | Keratinolytic protease activity (units/ml/min) |             |             |             |             |
|--------|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
|        | Medium No.1                                    | Medium No.2 | Medium No.3 | Medium No.4 | Medium No.5 |
| SMMJ-2 | 32   | 39          | 36          | 84          | 6           |
| FL-3   | 35   | 43          | 41          | 56          | 3           |
| NO-4   | 30   | 34          | 36          | 71          | 12          |
| RM-12  | 45   | 49          | 45          | 80          | 4           |

protease 활성을 나타내었으며 그 중에서 질소원으로 soybean meal을 사용한 배지 4에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 그러나 배지 5의 경우에는 매우 낮은 keratinolytic protease 활성을 나타내었는데 이것은 배지의 성분에 의하여 균의 생육이 양호하지 못한 결과에 따른 것으로 판단되었다. 무기염류와 whole chicken feather만을 사용한 배지 1의 조건에서 일주일 이상 배양하여 본 결과, *Bacillus* sp. SMMJ-2, NO-4 및 RM-12는 feather을 모두 분해하였으나 *Bacillus* sp. FL-3은 분해하지 못하였으며 또한 모든 균주들이 깃대는 완전하게 분해하지 못하였다. 이 결과는 동일한 배지를 사용하여 배양 후 5~6일 경과하였을 때 깃대를 포함한 whole chicken feather를 모두 분해한다고 보고한 김등[22]의 결과와는 상이하였다.

#### 배양시간에 따른 keratinolytic protease 및 protease activity

가장 양호한 keratinolytic protease 활성을 나타낸 배지 4를 keratinolytic protease 생산 배지로 선택한 후, *Bacillus* sp. SMMJ-2, FL-3, NO-4 및 RM-12를 동일한 실험방법으로 배양하여 5일간 배양하면서 배양일수에 따른 keratinolytic protease 활성과 protease 활성을 측정하였다. 배양일수에 따른 keratinolytic protease는 배양 1일째 *Bacillus* sp. SMMJ-2, NO-4 및 RM-12에서 Fig. 3과 같이 80 units/ml/min의 활성을 나타내었으나, *Bacillus* sp. FL-3은 다른 균주들에 비하여 67% 정도의 활성을 나타내었다. 그러나 배양 2일째부터는 keratinolytic protease 생성의 차이가 크게 나타나지 않았으며, *Bacillus* sp. SMMJ-2의 경우 배양 3일째 106 units/ml/min으로 가장 높은 keratinolytic protease 활성을 나



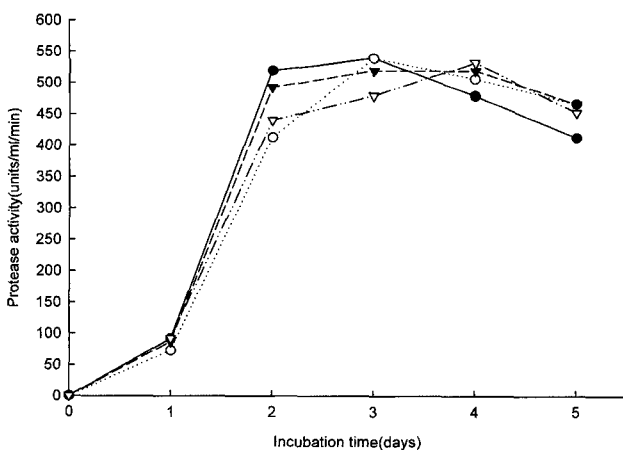
**Fig. 3.** Keratinolytic protease activity of selected *Bacillus* sp. strains. Symbols: ●, *Bacillus* sp. SMMJ-2; ○, *Bacillus* sp. FL-3; ▼, *Bacillus* sp. NO-4; ▽, *Bacillus* sp. RM-12.

타내었고, *Bacillus* sp. FL-3, NO-4 및 RM-12는 배양 4일째 105 units/ml/min으로 가장 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내었다.

Protease 활성의 경우에 *Bacillus* sp. SMMJ-2와 RM-12는 keratinolytic protease 활성과 유사한 양상 즉, 배양 3일과 4일째 가장 높은 protease 활성을 나타내었으나, *Bacillus* sp. FL-3과 NO-4는 3일째 가장 높은 protease 활성을 나타내었고, 이것은 keratinolytic protease 활성과는 다른 양상을 나타내었다(Fig. 4).

***Bacillus* sp. SMMJ-2의 배양초기 keratinolytic protease activity**

*Bacillus* sp. FL-3, NO-4 및 RM-12는 30°C에서 4일간 배양할 경우 가장 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내었으며, 이것은 *Bacillus* sp. SMMJ-2를 3일간 배양하였을

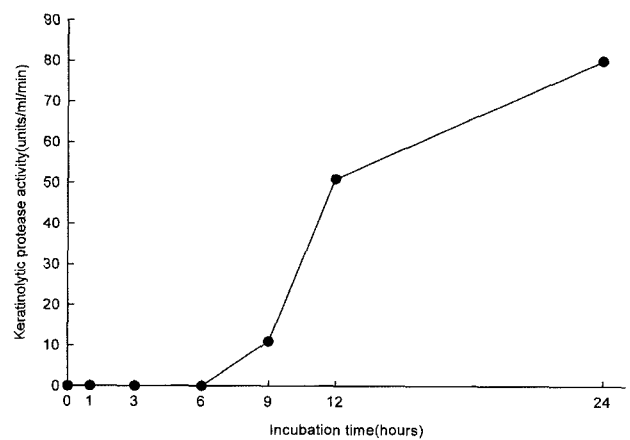


**Fig. 4.** Protease activity of selected *Bacillus* sp. strains. Symbols: ●, *Bacillus* sp. SMMJ-2; ○, *Bacillus* sp. FL-3; ▼, *Bacillus* sp. NO-4; ▽, *Bacillus* sp. RM-12.

때와 비슷한 keratinolytic protease 활성을 나타내었다. *Bacillus* sp. SMMJ-2와 NO-4 및 RM-12의 경우 가장 높은 keratinolytic protease 활성의 81% 가량이 배양 1일째 생산된다는 결과를 바탕으로 *Bacillus* sp. SMMJ-2를 공시균으로 선발하여 배양 초기의 keratinolytic protease 활성을 조사하였다. 배양 후 1, 3, 6, 9, 12 및 24시간 동안 효소의 생산을 알아본 결과 배양 후 6시간 이내에는 keratinolytic protease 활성을 나타내지 않았으나 9시간이 경과하면서 keratinolytic protease 활성을 나타내었는데 이것으로부터 keratinolytic protease의 생산이 균의 증식과 관계가 있음을 알 수 있었다(Fig. 5).

***Bacillus* sp. SMMJ-2의 whole chicken feather 이용성**

*Bacillus* sp. SMMJ-2를 공시균으로 하여 whole chicken feather의 분해를 조사하기 위하여 keratinolytic protease 생산 배지인 배지 4를 기본배지로 선택하였다. 기본배지를 대조구로 하고 탄소원과 질소원으로 whole chicken feather를 첨가하였을 때의 영향을 조사하기 위하여 탄소원으로는 0.1% whole chicken feather를 첨가하였으며 질소원으로는 1.2% whole chicken feather를 첨가하여 각각의 배지를 제조하고 전배양액 500 μl를 첨가한 후 4일간 배양하면서 이들의 keratinolytic protease 활성 및 protease 활성을 조사하였다. Fig. 6과 7에서와 같이 대조구로 사용한 기본배지에서 가장 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내었으며, 질소원으로 1.2% whole chicken feather를 첨가한 경우에도 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내었다. 탄소원으로 0.1%의 whole chicken feather를 첨가한 경우에는 keratinolytic protease 활성이 매우 낮게 조사되었는데 이러한 결과를 바탕으로 whole chicken feather를 질소원으로 사용할 수 있다는 것을 알 수 있었으나, 탄소원으로 사용하기에는 부적합하다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 유일한 탄소원 및 질소원으로 whole chicken feather를 사용하였을



**Fig. 5.** Keratinolytic protease activity of *Bacillus* sp. SMMJ-2 for 1 day.

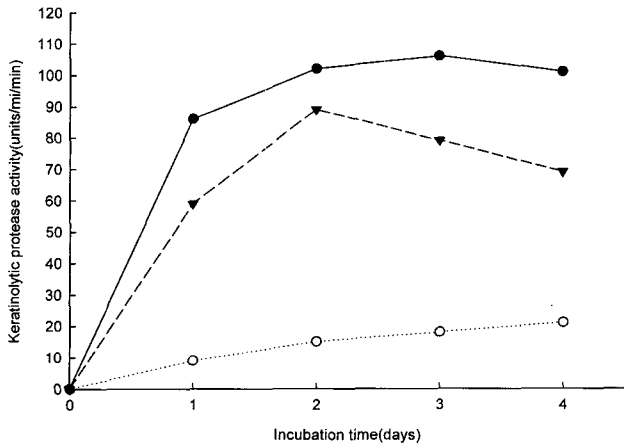


Fig. 6. Effect of whole chicken feather as carbon and nitrogen source on *Bacillus* sp. SMMJ-2 for producing keratinolytic protease. Symbols: ●, control; ○, carbon source; ▼, nitrogen source.

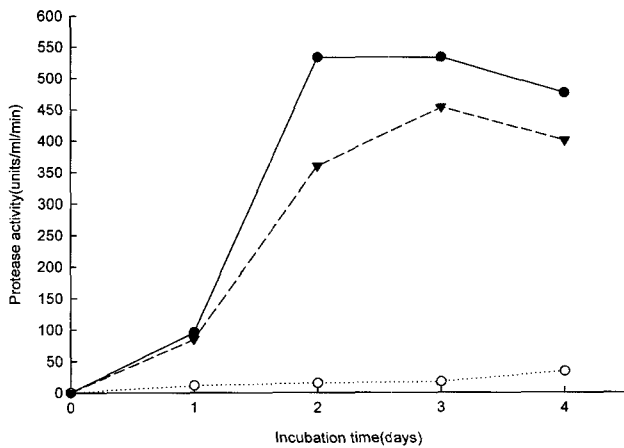


Fig. 7. Effect of whole chicken feather as carbon and nitrogen source on *Bacillus* sp. SMMJ-2 for producing protease. Symbols: ●, none; ○, carbon source; ▼, nitrogen source.

때 다른 유, 무기의 탄소원 및 질소원에 비하여 높은 keratinolytic protease 활성을 나타낸다고 보고한 Mohamedin [23]의 보고와는 상이한 결과를 나타내었다.

탄소원으로 whole chicken feather를 사용한 경우에 keratinolytic protease 활성과 protease 활성은 매우 낮지만 배양일수에 따라 효소의 활성도 증가되는 양상을 나타내었으며 이것은 균의 증식과 관련이 있는 것으로 판단하였다. Protease 활성도 keratinolytic protease 활성과 같이 대조구가 가장 높은 활성을 나타내었으며 탄소원으로 사용한 경우가 가장 낮은 활성을 나타내었다. 4일간 배양한 후 최종 pH는 각각 대조구가 7.62, 질소원으로 첨가한 경우가 7.54, 탄소원으로 0.1% 첨가한 경우가 7.68로 모두 중성의 pH를 나타내었다. *Bacillus* sp. SMMJ-2의 경우 배지 1의 조건에서 일주일 이상 배양할 경우에 깃대를 제외한 feather만을 완전하게 분해하였으나, whole chicken feather를 질소원으로

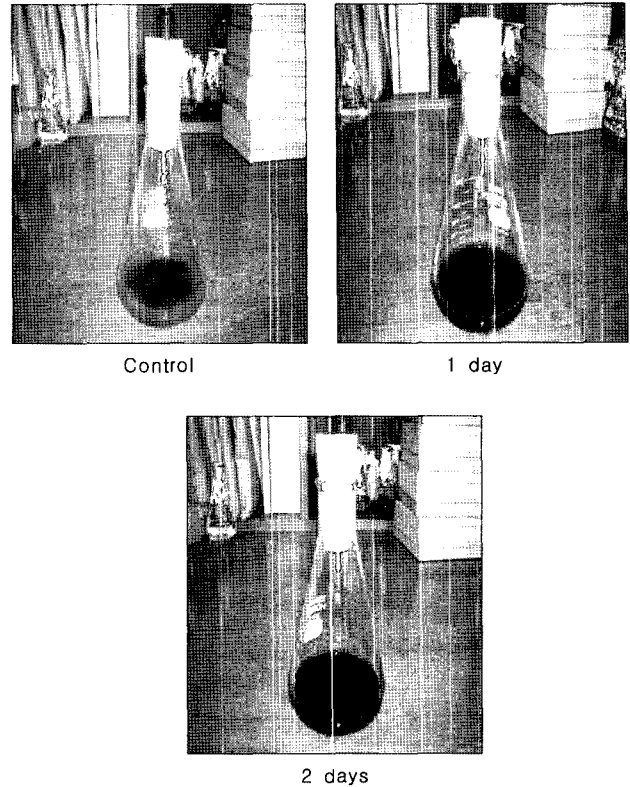


Fig. 8. Feather-degradation by *Bacillus* sp. SMMJ-2 for 2 days.

1.2%를 첨가한 경우에 40시간 이내에 깃대를 포함한 feather를 모두 분해하였다(Fig. 8).

이상의 결과로부터 *Bacillus* sp. SMMJ-2에 의한 whole chicken feather의 분해는 무기염의 종류와 탄소원의 첨가에 많은 영향을 받는다는 것을 알 수 있었으며, 또한 *Bacillus* sp. SMMJ-2의 경우에 keratinolytic protease의 생산을 위하여 질소원으로 whole chicken feather보다는 soy bean meal이 유리하다는 것을 알 수 있었다. 현재 산업적으로 미생물이 생산하는 keratinolytic protease의 실용화가 활발하지 않은 것 중에 가장 큰 이유는 whole chicken feather의 분해를 위하여 많은 시간을 요구하기 때문인데 *Bacillus* sp. SMMJ-2의 경우 산업적 이용의 가능성이 매우 높은 것으로 판단되었다.

**효소의 조정제 및 안정성**

조효소액 50 ml에 ammonium sulfate를 0~30% 및 30~60% 포화되게 첨가하여 4°C에서 12시간 방치한 후, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 침전물을 얻었다. 각각의 침전단백질을 소량의 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.0)에 용해시켜 투석하면서 염을 제거한 후, 효소활성을 측정한 결과 회수율이 25%로 매우 낮게 나타났다(Table 3). 그러나 10%, 20%, 30% 40% 및 50% 비율로 acetone을 첨가하여 원심분리한 후, 침전물을 소량의 50 mM tris-HCl buffer(pH 8.0)

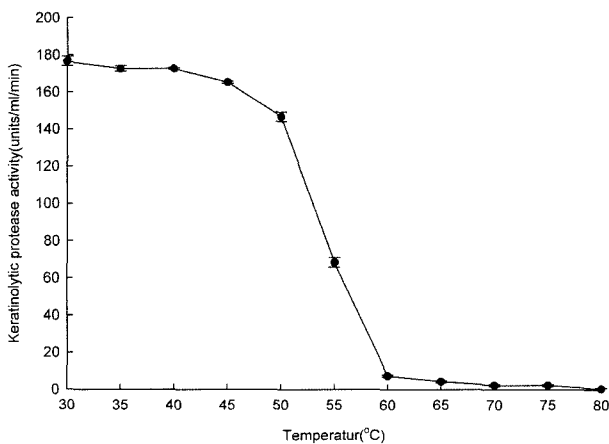
**Table 3. Recovery yield of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and acetone precipitation.**

| Precipitation                                   | Activity (units/ml/min) | Recovery (%) |
|---|-------------------------|--------------|
| Culture broth                                   | 104                     | 100          |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |                         |              |
| 0-30%   | 9                       | 9            |
| 30-60%  | 24                      | 25           |
| Extra broth                                     | 0                       | 0            |
| Acetone   |                         |              |
| 10%   | 5                       | 5            |
| 20%   | 10                      | 10           |
| 30%   | 11                      | 11           |
| 40%   | 50                      | 48           |
| 50%   | 100                     | 96           |

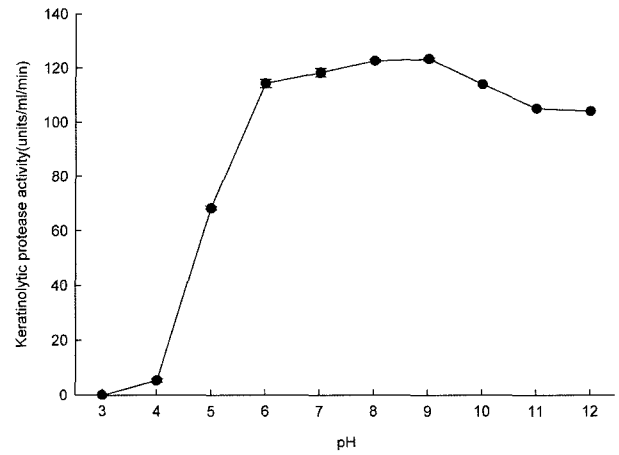
에 용해시켜 효소활성을 측정된 결과 50% acetone에서 96%의 높은 회수율을 나타내었다. 따라서 본 효소는 50% acetone에서 매우 안정한 것으로 판단되었고 효소 정제를 위한 농축조작으로 적합하다고 판단하였다.

회수한 조효소액을 이용하여 열안정성을 검토하기 위하여 30°C에서 80°C까지의 각 온도에서 20분간 열처리 후 급냉각시켜 50°C에서 잔존효소량을 측정하였다. 본 효소의 열안정성은 Fig. 9에서 나타난 바와 같이 30~50°C까지는 80% 이상의 잔존효소활성을 나타내었으나, 55°C에서는 38%로 잔존효소활성이 급격하게 감소하였고, 60°C 이상에는 효소활성이 거의 실패 되었다.

pH의 영향을 검토하기 위하여 glycine-HCl buffer(pH 3.0), Na-acetate buffer(pH 4.0, 5.0), citrate-phosphate buffer(pH 6.0), Tris-HCl buffer(7.0, 8.0), glycine-NaOH buffer(pH 9.0, 10.0, 11.0, 12.0)를 이용하여 효소액을 4°C에서 투석한 후 50°C에서 잔존효소활성을 측정하였다. 효소의 pH안정성은 Fig. 10에서 나타난 바와 같이, pH 6.0~12.0에서



**Fig. 9. Thermal stability of the keratinolytic protease activity produced by *Bacillus* sp. SMMJ-2.**



**Fig. 10. pH stability of the keratinolytic protease activity produced by *Bacillus* sp. SMMJ-2.**

는 비교적 안정한 것으로 나타났으며, pH 5.0에서는 50% 정도의 잔존활성을 나타내었다.

### 요 약

가금류의 feather은 전 세계적으로 발생되지 않는 지역이 없을 만큼 광범위하게 발생되어지는 폐기물로서, 현재까지 많은 연구지들에 의하여 그 이용성에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 그러나 disulfide 결합, 수소결합 및 이온결합에 의하여 매우 강한 결합력을 가지는 feather 구성 단백질의 화학적인 성질 때문에 분해하여 사용하기에 많은 어려움이 있다. 가금류 폐기물을 이용한 사료의 제조과정에서 가열 및 가압 등의 과정을 거치면서 아미노산의 손실이 발생하고 낮은 소화율 등이 문제로 야기되어지고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위한 노력으로 미생물이 생산하는 keratinolytic protease를 이용하고자 산업적으로 이용 가능성을 가지는 균주를 분리하였다. 토양 시료로부터 *Bacillus* sp. SMMJ-2, FL-3, NO-4 및 RM-12 4종의 keratinolytic protease 생성균을 분리하였다. 이 균주들은 5.0% skim milk agar plate에서 높은 protease 활성을 나타내었으며, 2.0% whole chicken feather agar plate에서도 많은 점질성의 물질을 생산하였다. Keratinolytic protease 생산을 위하여 배지 4(0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% fructose, 1.2% soybean meal, 0.01% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 7.0)에서 *Bacillus* sp. SMMJ-2에 의한 keratinolytic protease의 생산을 조사한 결과, 배양 3일에 가장 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내었다. 그러나, Basal medium(0.05% NaCl, 0.03% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.04% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5% whole chicken feather, pH 7.0)에 유일한 탄소 및 질소원으로 whole chicken feather를 첨가하고 배양한 결과, 30°C에서 일주일 이상 배양하였을 때 feather은 모두 분해되었으나 깃대는 분리하지 못하였고 배지 4에 질소원으로 1.2% whole chicken feather

를 첨가하였을 때 40시간 이내에 깃대를 포함한 feather를 모두 분해하였다.

*Bacillus* sp. SMMJ-2에 의한 keratinolytic protease의 생산은 접종 후 9시간이 지나면서 생산되기 시작하여 24시간 동안 배양하였을 때 최대 활성의 86%를 나타내는 것으로 조사되었다. *Bacillus* sp. SMMJ-2에 의하여 생산되어지는 keratinolytic protease 활성은 30°C, 180 rpm으로 3일간 배양했을 때 106 units/ml/min 이었으며, protease 활성은 540 units/ml/min을 나타내었다. 온도와 pH에 대한 효소의 안정성은 50% acetone을 이용하여 분리한 효소로 조사한 결과, 30~50°C까지는 80% 이상의 잔존효소활성을 나타내었고, 60°C 이상에는 20분간 열처리로 효소가 거의 실패 되었다. 효소의 pH 안정성은 pH 6.0~12.0에서는 비교적 안정한 것으로 조사되었다.

### 감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Shohei, Y., Y. Morita, Q. Hasan, S. R. Rao, Y. Murakami, Y. Kenji, and T. Eiichi. 2002. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. *J. Biosci. Bioeng.* **93**: 595-600.
- Park, I. W. 1986. *Enzyme Nomenclature into Korean*. pp. 362. Chongro Pub. Co., Seoul, Korea.
- Kim, J. H. and Y. D. Ko. 2005. Effect of dietary protease (bromelain) treated feather meal on the performance and nutrient utilization in broilers. *J. Anim. Sci. Technol.* **47**: 221-232.
- Baker, D. H., R. C. Blitenthal, R. C. Boebel, G. L. Czarniecki, G. K. Southern, and G. M. Willis. 1981. Protein-amino acid evaluation of steam-processed feather meal. *Poult. Sci.* **60**: 1865-1872.
- Papadopoulose, M. C., A. R. Eiboushy, and E. H. Ketelaars. 1985. Effect of different processing conditions on amino acid digestibility of feather meal determined by chick assay. *Poult. Sci.* **64**: 1729-1741.
- Dalev, P., I. Ivanov, and A. Liubomirova. 1997. Enzymic modification of feather keratin hydrolysates with lysine aimed at increasing the biological value. *J. Sci. Food Agric.* **73**: 242-244.
- Molyneaux, G. S. 1959. The digestion of wool by a keratinolytic *Bacillus*. *Aust. J. Biol. Sci.* **12**: 274-278.
- Tideto, T., S. Nakamura, R. Aono, and K. Horikoshi. 1992. Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. No. AH 101. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1667-1669.
- Sangali, S. and A. Brandelli. 2000. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **87**: 17-24.
- Bockle, B., B. Galunski, and R. Muller. 1995. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM40530. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3705-3710.
- Filipello, M. V., A. Fusconi, and S. Rigo. 1994. Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi. *Mycopathologia* **127**: 103-115.
- Nickerson, W. J., J. J. Noval, and R. S. Robinson. 1963. Keratinase: I. Properties of the enzyme conjugate elaborated by *streptomyces fradiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **77**: 76-86.
- Xing, L., D. W. Kelemen, E. S. Miller, and C. H. S. Jason. 1995. Nucleotide sequence and expressing of *Ker A*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1469-1474.
- Yu, R. J., S. R. Harmon, and F. Blank. 1968. Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Bacteriol.* **96**: 1435-1436.
- Brysk, M. M. and S. Rajaraman. 1992. Cohesion and desquamation of epidermal stratum corneum. *Prog. Histochem. Cytochem.* **25**: 1-53.
- Chon, D. H., S. M. Kang, and T. J. Kwon. 2003. Purification and some properties of keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 224-229.
- Chon, D. H. and T. J. Kwon. 2001. Isolation of keratinolytic protease producing microorganism and its cultivation condition. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 134-141.
- Letourneau, F., V. Soussotte, P. Bressollier, P. Branland, and B. Verneuil. 1998. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02: a new isolated strain. *Appl. Microbiol.* **26**: 77-80.
- Jang, S. A., M. H. Kim, M. S. Lee, T. K. Oh, and C. B. Sohn. 2000. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus* sp. S19 from shrimp *Jeot-Gal*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 258-263.
- Krystyna, W., J. Lobarzewski, and T. Wolski. 1987. Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *J. Med. Veter. Mycol.* **25**: 261-268.
- Kang, H. J., H. J. Lee, T. S. Jung, T. G. Kim, Y. J. Eo, and J. H. Kim. 2003. Isolation and characterization of feather-degrading bacterial strains. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* **27**: 129-134.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mohamedin, A. H. 1999. Isolation, identification and some cultural conditions of a protease producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken as a substrate. *Int. Biodet. Biodeg.* **43**: 13-21.

(Received Nov. 4, 2005/Accepted Mar. 12, 2006)