

## Bacillus sp. SMMJ-2의 Keratinolytic protease 생산최적조건

박성민 · 유대식\*  
계명대학교 미생물학과

**Optimization of Keratinolytic Protease Productions from *Bacillus* sp. SMMJ-2.** Park, Sung Min and Tae Shick Yu\*. Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 701-704, Korea – *Bacillus* sp. SMMJ-2 producing extracellular keratinolytic protease was isolated from the Swedish soils. The optimal culture conditions for production of keratinolytic protease by *Bacillus* sp. SMMJ-2 were investigated. The optimal medium compositions for the keratinolytic protease production were 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0% fructose, 1.2% soybean meal (roasted), and 0.01% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Optimal initial pH and temperature for the production of keratinolytic protease were 7.0 and 30°C, respectively. The keratinolytic protease production showed a maximum of 105 units/ml/min after 72 hours cultivation under the optimal culture conditions.

**Key words:** *Bacillus* sp. SMMJ-2, keratinolytic protease, feather-degrading

### 서 론

Keratin 단백질의 가장 특징적인 성질은 물에 녹지 않는 불용성이며 또한 일반적인 proteolytic enzymes인 papain, pepsin, 및 trypsin 등에 의하여 쉽게 분해되지 않는다는 것이다. 주로 깃털과 양모, 뿔 비늘, 머리카락, 손톱, 그리고 난막 등을 구성하는 것으로 알려진 keratin은 물리, 화학적, 그리고 생물학적으로 매우 안정한 구조를 가지는 것으로 알려져 있다[1]. 이러한 특징은 단백질의 구조 내에 존재하는 cysteine disulfide bond, hydrogen bond, 그리고 hydrophobic interaction에 의한 것으로 알려져 있다[2]. 가금류 중 닭의 깃털에 존재하는 keratin 단백질은 분자량이 대략 10,500 dalton 정도이며, 아미노산 염기의 7% 정도가 sulfur-sulfur bond 또는 cross-linking에 의하여 cysteine 결합을 하는 것으로 알려져 있다[3]. 또한 아미노산 염기서열의 분석을 통하여 keratin 단백질은 40%의 hydrophobic chemical groups와 60%의 hydrophilic chemical group들로 구성되어 있다고 알려져 있다[4].

이와 같이 난분해성인 keratin을 수용화 시키는 방법으로는 산화, 환원방법을 사용하여 disulfide bond를 절단하고 불용성을 감소시킨 후, disulfide bond가 절단된 단백질에 pepsin을 처리하여 수용화 할 수 있다고 알려져 있으며[5, 6] 미생물이 생산하는 효소를 이용하여 분해할 수 있다고 알려져 있다. 미생물을 이용하여 keratin을 분해할 수 있는 연구들이 수행되어져 왔으며 현재에는 keratinase를 생산하는 균주에 대한 많은 보고가 되어져 있다. 그 중에서도 alkaline

keratinase를 생산하는 *Bacillus* sp. AH-101[7]과 *Kocuria rosea* 등[8]과 neutral keratinase를 생산하는 *Aspergillus oryzae*[9]와 *Bacillus licheniformis* 등[10]이 대표적으로 알려져 있으며 이러한 연구들의 결과로 keratinase encoding gene에 대한 보고도 되어지고 있다[11-13].

Keratinase는 산업적으로 그 이용성이 매우 넓으며 특히 전 세계적으로 발생량이 많고 폐기물로 분류되지만 다양한 아미노산을 함유하여 그 이용 가능성이 대두되고 있는 가금류의 깃털을 분해하여 단백질 사료로 전환하기 위한 연구 등[14]은 현재까지도 지속적으로 진행되어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 다양한 keratinolytic protease 중에서 가금류의 깃털을 분해할 수 있는 keratinolytic protease를 생산하는 것으로 밝혀진 *Bacillus* sp. SMMJ-2를 이용하여 효소의 생산성을 증가시키기 위한 다양한 배양학적 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 효소생산 기본배지

본 연구에서는 스웨덴 스톡홀름의 항구부근 토양시료에서 분리한 *Bacillus* sp. SMMJ-2를 사용하였으며 whole-chicken feather를 분해할 수 있는 keratinolytic protease를 생산한다고 앞서 보고되었다[15]. 효소생산을 위한 기본배지의 구성은 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(roasted), 그리고 0.01% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>이며 배양초기 pH는 7.0, 배양온도는 30°C이다.

#### Keratinolytic protease assay

Keratinolytic protease 활성은 azo-casein을 기질로 이용하는 Sangali 등[16]의 방법을 이용하였다. 배양액을 12,000

\*Corresponding author  
Tel: 82-53-580-5252, Fax: 82-53-580-5164  
E-mail: tsyu@kmu.ac.kr

rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 한 후, 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액 150 µl에 0.25 ml의 2.0% azocasein(50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0) 용액을 혼합하고 50°C에서 15분간 교반(94 rpm)하면서 반응 시킨 후, 1.2 ml의 10.0% trichloroacetic acid(TCA)를 첨가하여 실온에서 15분간 방치하였다. 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 하여 불용성의 기질을 제거하고 기질에서 유리된 sulphanic acid 발색단을 흡광도 440 nm에서 측정하였다. 대조구는 기질에 조효소액을 첨가하지 않고 실험구와 함께 동일한 조건에서 반응시킨 후 TCA를 첨가하고 조효소액을 혼합하여 조사하였으며, 동일한 실험을 3회 반복한 후 그 평균수치로 keratinolytic protease 활성을 나타내었다. Keratinolytic protease에 대한 정의는 50°C에서 1분간 기질과 반응하여 440 nm에서 흡광도 0.01을 증가시키는 효소량을 1 unit로 하였다.

Protease 활성은 Lowry 등[17]의 방법을 이용하였다. 즉, 조효소액 250 µl를 0.5% hammarsten-casein milk(200 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0)용액 1.2 ml와 혼합하고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 5.0% TCA 용액 3.0 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 실온에서 30분간 방치하였다. 반응액을 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리한 후, 상등액 1.0 ml에 2.5 ml 550 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 첨가하고 3배 희석한 0.5 ml의 folin reagent를 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 660 nm에서 흡광도를 측정하고 tyrosine standard curve에 대입하여 기질로부터 유리된 tyrosine량을 측정하였다. Protease 활성은 37°C에서 1분간 기질로부터 1 µg의 tyrosine을 유리하는 효소의 총량을 1 unit로 정의하였다.

#### Keratinolytic protease 생산에 미치는 온도, pH, 및 교반의 영향

*Bacillus* sp. SMMJ-2의 keratinolytic protease의 생산에 미치는 배양학적 특징을 조사하기 위하여 LB broth(1.0% tryptone, 1.0% sodium chloride, 0.5% yeast extract, pH 7.0)에 접종한 후, 30°C에서 12시간동안 배양하여 전배양액으로 사용하였다. 효소의 생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 전배양액 1.0%를 효소생산 기본배지 50 ml에 접종한 후 24, 30, 37, 45, 그리고 55°C에서 180 rpm, 4일간 배양하면서 효소의 활성을 조사하였다.

pH의 영향을 조사하기 위하여 효소생산 기본배지의 pH를 0.5N HCl과 0.5N NaOH를 이용하여 4.0에서 11.0으로 조정하여 앞에서 조사된 효소생산 최적배양온도에서 180 rpm, 4일간 배양하면서 조사하였다.

배양속도에 따른 keratinolytic protease 생산을 조사하기 위하여 앞에서 조사된 효소생산을 위한 최적 pH로 배지를 제조한 후, 최적배양온도에서 각각 정치배양, 50, 100, 150, 180, 그리고 200 rpm으로 4일간 배양하면서 효소의 활성을 조사하였다.

#### Keratinolytic protease의 생산에 미치는 다양한 탄소원 및 유, 무기 질소원의 영향

*Bacillus* sp. SMMJ-2에 의한 keratinolytic protease의 생산에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 효소생산 기본배지의 탄소원인 fructose를 대조구로 하고 arabinose, whole chicken feather, galactose, glucose, lactose, maltose, mannitol, raffinose, sorbitol, soluble starch, 그리고 sucrose를 fructose 대신 0.1% 첨가하여 배지를 제조한 후, 앞에서 조사된 효소생산 최적 배양조건에서 4일간 배양하면서 효소 활성의 변화를 조사하였다. Whole chicken feather은 지역 양계장에서 닭을 구입하여 수세, 건조하여 사용하였다.

질소원의 영향을 조사하기 위하여 앞에서 조사된 최적 탄소원을 첨가한 후, 1.2% soybean meal(roasted) 대신 유기질소원인 beef extract, malt extract, peptone, polypeptone, soybean meal(raw), tryptone, urea, chicken feather, 그리고 yeast extract를 각각 1.2% 첨가하여 배지를 제조하고 4일간 배양하면서 효소의 활성을 조사하였다.

*Bacillus* sp. SMMJ-2에 의한 keratinolytic protease의 생산에 미치는 무기질소원의 영향을 조사하기 위하여 앞에서 조사된 최적배지에 ammonium chloride, ammonium citrate, ammonium molybdate, ammonium nitrate, ammonium phosphate, ammonium sulfate, cadmium nitrate, potassium nitrate, 그리고 sodium nitrate를 0.1% 첨가하여 배지를 제조하고 4일간 배양하면서 keratinolytic protease 활성을 조사하였다.

#### Keratinolytic protease의 생산에 미치는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 농도 및 금속이온의 영향

효소생산 기본배지의 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 농도를 0, 0.3, 0.7, 1.0, 3.0, 그리고 5.0%로 각각 조정한 후 효소생산 최적농도를 조사하였으며 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>는 0, 0.2, 0.5, 1.0, 3.0, 그리고 5.0%로 각각 조정하여 keratinolytic protease의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

금속이온의 영향을 조사하기 위하여 앞에서 조사된 효소의 생산을 위한 배지에 calcium chloride, ferric chloride, ferrous sulfate, lead chloride, magnesium chloride, magnesium sulfate, manganese chloride, manganese sulfate, mercuric chloride, potassium chloride, 그리고 zinc chloride를 각각 0.1% 첨가하여 배지를 제조한 후 4일간 배양하면서 keratinolytic protease의 생산에 미치는 영향을 조사하였다.

#### Keratinolytic protease의 생성에 미치는 초기 접종량의 영향

앞에서 조사된 최적배지를 제조하여 LB broth에서 전배양한 *Bacillus* sp. SMMJ-2를 각각 0.1, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 그리고 10.0% 접종하여 keratinolytic protease를 조사하였다.

결과 및 고찰

Keratinolytic protease의 생산에 미치는 배양온도, pH 및 진탕배양속도의 영향

*Bacillus* sp. SMMJ-2에 의한 keratinolytic protease의 생산에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 각각 24, 30, 37, 45, 그리고 55°C에서 배양하여 조사하였다. 배양 1일째 37°C에서 90 units/ml/min으로 가장 높은 keratinolytic protease활성을 나타내었으나, 배양 2일째부터는 30°C에서 104 units/ml/min, 배양3일째는 106 units/ml/min으로 가장 높은 keratinolytic protease활성을 나타내었다. 30°C와 37°C를 비교할 때 keratinolytic protease활성의 큰 차이는 나지 않았으며 30°C와 비교하여 24°C의 경우에는 90%정도의 keratinolytic protease활성을 나타내었으나, 45°C의 경우에는 42%, 55°C의 경우에는 28%로 매우 낮게 조사되었다(Fig. 1). 이 결과로 볼 때 *Bacillus* sp. SMMJ-2에 의해서 생산되어지는 keratinolytic protease는 고온의 배양조건 보다는 37°C 이하의 상온조건에서 보다 양호한 생산을 한다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 20°C에서 30°C보다 두 배 이상의 keratinolytic protease를 생산한다고 보고한 Shohei 등[18]의 결과보다는 조금 높은 배양온도였으며 37°C로 보고한 전 등[19]의 결과와는 유사하였고 45°C로 보고한 Cheng 등[20]의 결과와는 상이하였으며 70°C로 보고한 Letourneur 등[21]의 결과와는 많은 차이를 나타내었다. Protease 활성의 경우에 배양 1일째 37°C에서 가장 높게 조사되었으며 배양 3일째 30°C에서 가장 높게 조사되었다. Keratinolytic protease 활성과는 상이하게 45°C의 경우 30°C와 비교할 때 77% 이상의 protease활성을 나타내었으나, 55°C의 경우에는 11%로 매우 낮게 조사되었다.

Keratinolytic protease의 생산에 미치는 pH의 영향을 조사

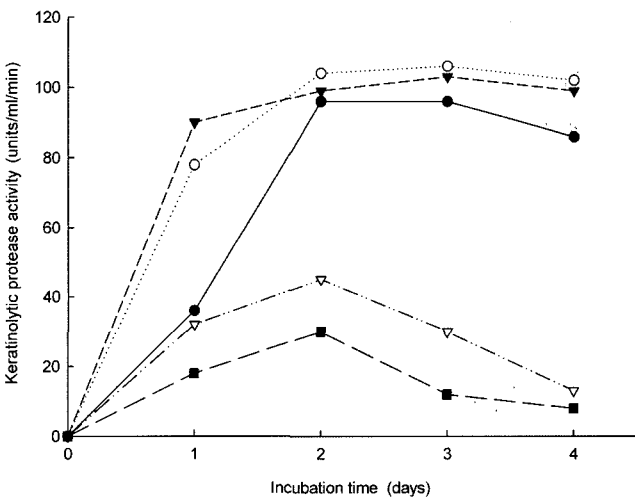


Fig. 1. Effect of different incubation temperatures for keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SMMJ-2. Symbols : ●, 24°C; ○, 30°C; ▼, 37°C; ▽, 45°C; ■, 55°C.

한 결과, 배양 1일째 pH 11.0의 경우에는 균은 증식하였으나 keratinolytic protease 활성은 확인되지 않았으나 배양 2일째 이후부터는 활성을 확인할 수 있었으며 pH 7.0에서 배양 3일째 103 units/ml/min으로 가장 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내었다. *Bacillus* sp. SMMJ-2는 pH 4.0에서는 생육을 하지 못하였으나, pH 4.0을 제외한 모든 조건에서 pH 7.0과 비교하였을 때 80% 이상의 keratinolytic protease 활성을 나타내는 것으로 조사되었다. 그리고 pH 5.0과 6.0의 약산성의 배양조건보다는 중성 및 알칼리성의 배양조건인 pH 7.0~11.0의 범위에서 보다 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내었으며(Fig. 2) 이 결과는 최적배양 pH를 7.5라고 보고한 Elrefai 등[22]과는 유사하였으나, 8.0과 9.0으로 보고한 Anbu 등[23]과 김 등[24]의 결과와는 약간의 차이를 나타내었다. Protease 활성의 경우에도 pH 7.0에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 약산성(pH 6.0)에서 약알칼리성(pH 10.0) 사이의 범위에서 전반적으로 높은 protease 활성을 나타내었다.

배양속도에 따른 keratinolytic protease 활성을 조사하기 위하여 정치배양 및 다양한 rpm으로 진탕 배양한 결과, 200 rpm으로 진탕배양 하였을 때 108 units/ml/min으로 가장 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내었다. 180 rpm으로 배양한 경우에도 200 rpm과 유사한 활성을 나타내었으며 100 rpm 이상의 진탕속도 에서는 200 rpm과 비교하였을 때 96% 이상의 활성을 나타내는 것으로 조사되었다. 그러나 정치배양의 경우에는 200 rpm과 비교할 때 41%의 keratinolytic protease 활성을 나타내었으나 배양일수에 따라 지속적으로 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3). Protease 활성은 배양 3일째 180 rpm의 조건에서 400 units/ml/min으로 가장 높게 조사되었다.

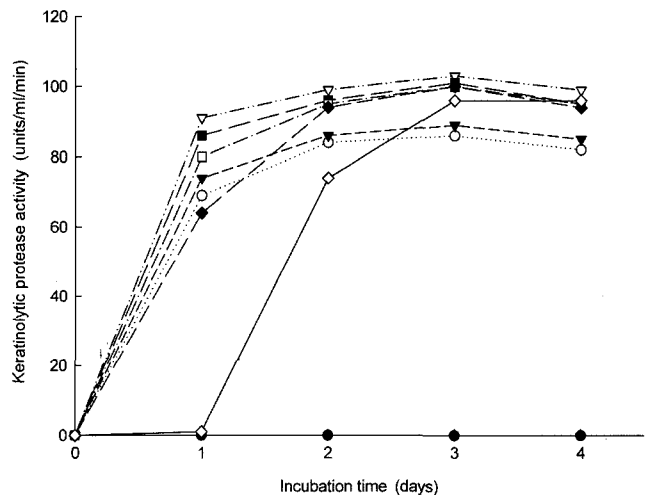


Fig. 2. Effect of different culture pHs for keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SMMJ-2. Symbols : ●, pH 4.0; ○, pH 5.0; ▼, pH 6.0; ▽, pH 7.0; ■, pH 8.0; □, pH 9.0; ◆, pH 10.0; ◇, pH 11.0.

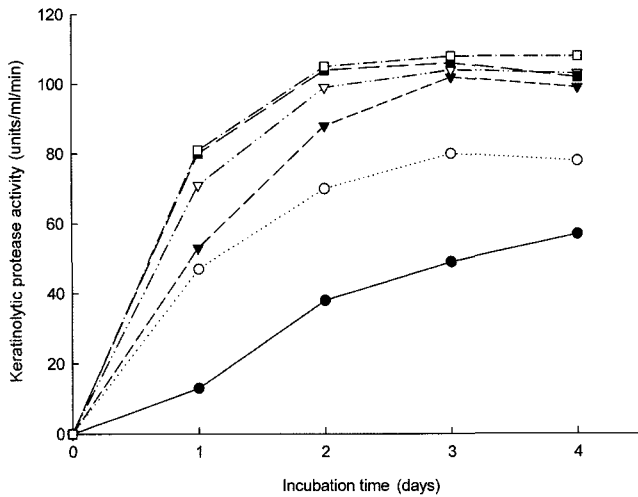


Fig. 3. Effect of various agitations for keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SMMJ-2. Symbols : ●, none; ○, 50 rpm; ▼, 100 rpm; ▽, 150 rpm; ■, 180 rpm; □, 200 rpm.

#### Keratinolytic protease의 생산에 미치는 탄소원의 영향

다양한 탄소원을 이용하여 keratinolytic protease의 생산에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 배양 1일째 첨가한 탄소원에 의한 keratinolytic protease활성은 전반적으로 대조구인 fructose와 큰 차이를 나타내지 않았으나, arabinose, maltose 그리고 soluble starch를 첨가한 경우는 대조구와 비교할 때 67% 정도의 keratinolytic protease 활성을 나타내었고 chicken feather를 첨가한 경우에는 12%를 나타내었다. 배양 2일째 chicken feather를 제외한 다른 탄소원의 경우에 대조구와 유사한 keratinolytic protease 활성을 나타내었으나, 배양 3일과 4일째는 fructose를 첨가한 대조구가 102 units/ml/min, 101 units/ml/min으로 가장 높은

Table 1. Effect of various carbon sources for keratinolytic protease production.

| Carbon sources    | Incubation time (days) |     |     |     | Final pH |
|-------------------|------------------------|-----|-----|-----|----------|
|                   | 1                      | 2   | 3   | 4   |          |
| Control(fructose) | 74                     | 100 | 102 | 101 | 7.62     |
| Arabinose         | 50                     | 89  | 96  | 100 | 7.46     |
| Galactose         | 73                     | 98  | 99  | 100 | 7.70     |
| Glucose           | 71                     | 96  | 100 | 99  | 7.69     |
| Lactose           | 68                     | 95  | 99  | 97  | 7.68     |
| Maltose           | 53                     | 96  | 94  | 101 | 7.65     |
| Mannitol          | 65                     | 89  | 99  | 99  | 7.67     |
| Chicken feather   | 9                      | 15  | 19  | 21  | 7.68     |
| Sucrose           | 71                     | 95  | 96  | 94  | 7.54     |
| Raffinose         | 65                     | 92  | 96  | 96  | 7.65     |
| Soluble starch    | 46                     | 89  | 96  | 96  | 7.62     |
| Sorbitol          | 62                     | 91  | 98  | 94  | 7.61     |

keratinolytic protease 활성을 나타내었다. 첨가한 다른 탄소원의 경우에 대조구와 큰 차이를 나타내지 않았으나 chicken feather를 첨가한 경우에는 매우 낮은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 탄소원으로 feather를 처리하였을 때 fructose보다 50% 이상의 활성을 나타내었다고 보고한 Mohamedin [25]의 보고와는 상이하였으나 chicken feather가 *Bacillus* sp. SMMJ-2의 keratinolytic protease의 생산을 위한 탄소원으로 적합하지 않았던 앞선 보고[15]와 동일한 결과를 나타내었다. Protease 활성은 배양 2일째까지 galactose를 첨가한 경우 각각 84, 400 units/ml/min으로 가장 높게 조사되었으며, 3일째는 maltose를 첨가한 경우에(420 units/ml/min), 그리고 4일째는 sorbitol을 첨가한 경우에 640 units/ml/min으로 가장 높게 조사되었다.

대조구와 유사한 정도의 keratinolytic protease 활성을 나타내는 것으로 조사된 glucose와 fructose를 대상으로 농도에 따른 keratinolytic protease 활성을 조사하였다. Fructose와 glucose를 각각 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 그리고 3.0%의 농도로 첨가하여 배지를 제조한 후 배양하면서 keratinolytic protease활성을 조사한 결과, 0.1%의 glucose를 첨가하였을 때 1.0% fructose를 첨가한 경우와 비교하여 배양 3일째 93%의 활성을 나타내는 것으로 나타났으나, glucose의 경우 농도가 증가할수록 활성이 약간씩 감소하는 것으로 조사되었다. Fructose의 경우에는 1.0% 첨가하였을 때 111 units/ml/min으로 가장 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내었으나, 0.1~2.0% 범위의 농도에서는 큰 차이를 나타내지는 않았다(Table 2).

#### Keratinolytic protease 생산에 미치는 질소원의 영향

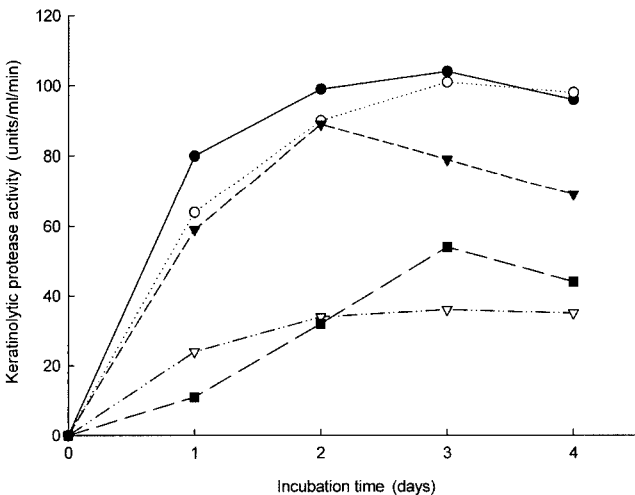
질소원에 따른 *Bacillus* sp. SMMJ-2에 의한 keratinolytic protease의 생산은 유기질소원과 무기질소원으로 나누어서 조사하였다. 효소생산 배지에 탄소원으로 1.0% fructose를 첨가하고 대조구인 1.2% soybean meal(roasted) 대신에 다양한 유기 질소원을 첨가하여 30°C, 200 rpm으로 배양하면서 조사한 결과, soybean meal(roasted, and raw), chicken feather, polypeptone, 그리고 yeast extract에서만 keratinolytic protease 활성을 확인할 수 있었다. Beef extract, skim milk, peptone, 그리고 tryptone을 첨가한 경우에는 *Bacillus* sp. SMMJ-2가 증식은 하였으나, keratinolytic protease 활성은 확인할 수 없었고 urea의 경우에는 증식하지 못하였다. 이 결과는 yeast extract와 peptone을 처리하였을 때 높은 수준의 활성을 나타낸다고 보고한 Amare 등[26]의 보고와는 상이하였다. Chicken feather의 경우 배양 2일째까지는 soybean meal(raw)과 유사한 활성을 나타내었으나 배양 3일째 활성이 감소하는 것으로 조사되었다. 이것은 질소원으로 공급한 chicken feather이 모두 분해되어 질소원의 부족에 의한 것으로 판단되었으며 기본배지에 사용한 유기질소원인 soybean meal(roasted)이 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 4).

**Table 2. Effect of different concentrations of fructose and glucose for keratinolytic protease production.**

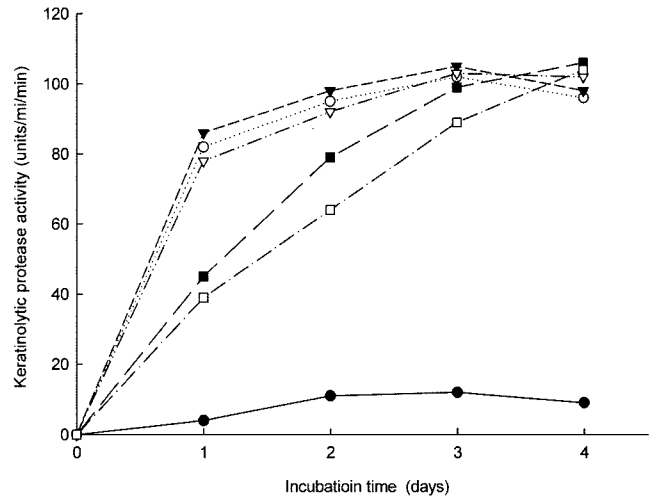
| Carbon sources | Incubation time (days) |     |     |     |
|----------------|------------------------|-----|-----|-----|
|                | 1                      | 2   | 3   | 4   |
| None           | 69                     | 91  | 101 | 99  |
| Fructose 0.1%  | 88                     | 107 | 108 | 103 |
| 0.5%           | 71                     | 104 | 110 | 101 |
| 1.0%           | 76                     | 105 | 111 | 109 |
| 2.0%           | 61                     | 96  | 109 | 90  |
| 3.0%           | 51                     | 89  | 105 | 103 |
| Glucose 0.1%   | 71                     | 99  | 103 | 103 |
| 0.5%           | 64                     | 98  | 102 | 101 |
| 1.0%           | 54                     | 94  | 101 | 99  |
| 2.0%           | 51                     | 81  | 95  | 94  |
| 3.0%           | 45                     | 79  | 92  | 90  |

Keratinolytic protease 생산에 있어서 soybean meal (roasted)의 최적 농도를 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 유기 질소원으로 soybean meal(roasted)을 첨가하지 않은 경우에 keratinolytic protease활성은 매우 낮게 조사되었으며 이 결과를 바탕으로 질소원으로 soybean meal(roasted)의 공급이 keratinolytic protease의 생산에 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다. 1.2%의 soybean meal(roasted)을 공급하였을 때 가장 높은 활성을 나타내었으며 0.6%와 1.8%의 경우에도 비슷한 수준의 높은 활성을 나타내었고 2.4%와 3.0%의 경우에는 배양 4일째에 가장 높은 활성을 나타내었다.

앞서 조사한 결과를 바탕으로 탄소원으로 1.0% fructose와 유기질소원으로 1.2% soybean meal(roasted)를 첨가하여 효소생산배지를 제조한 후, 다양한 무기 질소원을 각각 0.1%



**Fig. 4. Effect of various organic nitrogen sources for keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SMMJ-2.** Symbols : ●, soybean meal (roasted); ○, soybean meal (row); ▼, chicken feather; ▽, yeast extract; ■, polypeptone.



**Fig. 5. Effect of various concentrations of soybean meal (roasted) as organic nitrogen source for keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SMMJ-2.** Symbols : ●, 0%; ○, 0.6%; ▼, 1.2%; ▽, 1.8%; ■, 2.4%; □, 3.0%.

첨가하여 30°C에서 200 rpm으로 배양하면서 keratinolytic protease 활성을 조사한 결과 배양 3일째 ammonium sulfate를 첨가한 경우에 대조구와 동일한 106 units/ml/min의 활성을 나타내었으나, keratinolytic protease 생산성에 있어서 무기질소원의 첨가에 따른 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 이후의 실험에서는 무기 질소원을 첨가하지 않았다. 무기질소원을 첨가한 대부분의 배지조건에서 keratinolytic protease활성은 대조구에 비하여 10% 정도 저해되는 것으로 조사되었다. 그리고, cadmium nitrate에 의해서는 *Bacillus* sp. SMMJ-2의 생육이 저해되었다(Table 3).

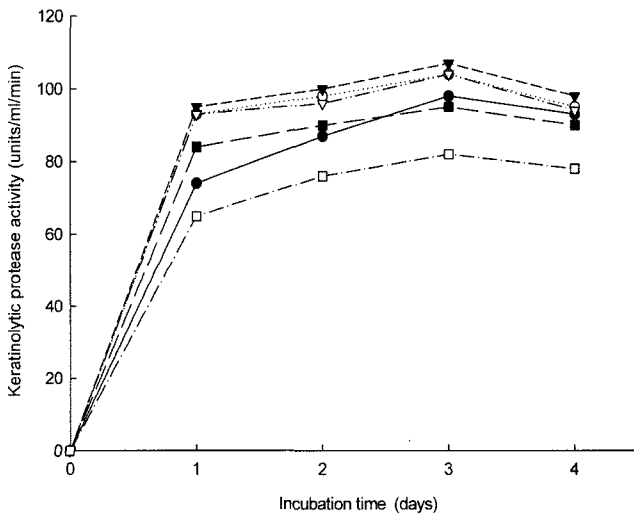
**Keratinolytic protease 생산에 미치는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 그리고 금속이온의 영향**

무기염으로 첨가한 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 농도에 따른 keratinolytic protease 활성을 조사한 결과, 0% 경우에는 배양 3일째 대조구인 0.7%와 비교하였을 때 약 92%의 활성을 나타내었으며 0.3%와 1.0%의 경우에도 97%로 조사되었다. 그러나 3.0%와 5.0%의 경우 각각 89%와 77%로 상대적으로 keratinolytic protease 활성이 감소하는 것으로 조사되었다. 대조구인 0.7%를 첨가한 경우에 107 units/ml/min으로 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 6).

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 농도에 따른 영향은 배양 3일째 대조구인 0.2%에서 105 units/ml/min로 가장 높게 조사되었다. 1.0%를 첨가한 경우에는 98%의 활성을 나타내었으며 0%, 0.5%, 그리고 1.0%에서는 95% 이상의 활성을 나타내었다. 그러나 5.0%를 첨가한 경우에 75%의 활성을 나타내었으며 이러한 결과는 농도의 증가에 따른 keratinolytic protease 활성의 감소를 나타낸 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>와 유사하게 조사되었다(Fig. 7).

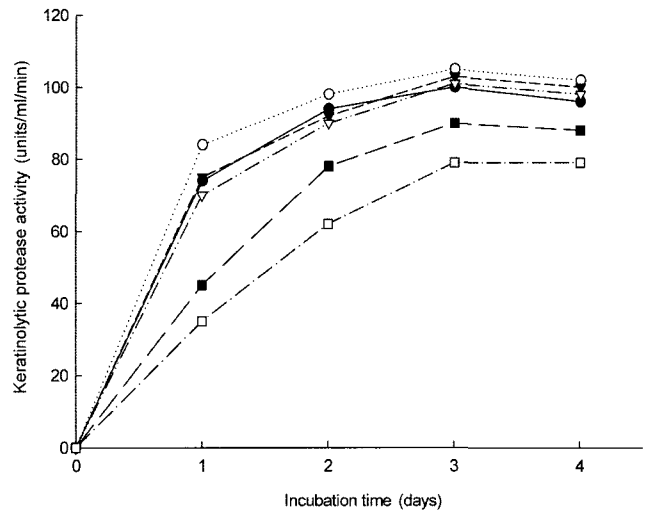
**Table 3. Effect of inorganic nitrogen sources for keratinolytic protease production.**

| Inorganic nitrogen sources | Incubation time (days)                         |     |     |    | pH   |
|----------------------------|--|-----|-----|----|------|
|                            | 1  | 2   | 3   | 4  |      |
|                            | Keratinolytic protease activity (units/ml/min) |     |     |    |      |
| Control                    | 89   | 100 | 106 | 92 | 7.50 |
| Ammonium chloride          | 76   | 91  | 96  | 86 | 7.48 |
| Ammonium citrate           | 91   | 97  | 100 | 78 | 7.05 |
| Ammonium molybdate         | 75   | 88  | 95  | 80 | 7.32 |
| Ammonium nitrate           | 81   | 92  | 97  | 80 | 8.06 |
| Ammonium phosphate         | 76   | 87  | 94  | 76 | 7.28 |
| Ammonium sulfate           | 86   | 94  | 106 | 86 | 7.54 |
| Cadmium nitrate            | -  | -   | -   | -  | 7.05 |
| Potassium nitrate          | 86   | 93  | 97  | 79 | 8.06 |
| Sodium nitrate             | 91   | 96  | 103 | 85 | 8.05 |



**Fig. 6. Effect of different concentrations of K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> for keratinolytic protease production.** Symbols : ●, 0%; ○, 0.3%; ▼, 0.7%; ▽, 1.0%; ■, 3.0%; □, 5.0%.

Keratinolytic protease의 생산에 미치는 금속이온의 영향을 조사한 결과 배양 1일째 금속이온을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 금속이온을 첨가한 모든 조건에서 25~68%의 저해가 되어졌으며 특히 mercuric chloride를 첨가한 경우에는 *Bacillus* sp. SMMJ-2가 증식을 하지 못하였다. 배양 3일째 대조구의 경우에 105 units/ml/min의 활성을 나타내었고 potassium chloride를 첨가한 경우에만 대조구와 비교할 때 98%의 활성을 나타내었으며 배양 4일째에는 대조구에 비하여 높은 활성을 나타내었다. 이 결과는 0.2% potassium chloride를 첨가하였을 때 가장 높은 활성을 나타내었다고 보고한 전 등[19]의 결과와 유사하였다. 그러나 금속이온으로 lead chloride를 첨가하였을 때 keratinolytic protease의 생성이 저해된다고 보고한 Aida 등[9]과는 상이한 결과를 나타



**Fig. 7. Effect of different concentrations of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> for keratinolytic protease production.** Symbols : ●, 0%; ○, 0.3%; ▼, 0.7%; ▽, 1.0%; ■, 3.0%; □, 5.0%..

내었다. 또한 *Bacillus* sp. 유래 효소의 경우에 calcium이 존재하는 경우에 효소의 안정성과 생산이 증가된다고 알려져 있으나 이 경우에는 특이적인 생산의 향상은 나타나지 않았다. 다른 금속이온의 경우에 keratinolytic protease의 생산에 대한 뚜렷한 저해양상을 나타내었는데, 특히 ferric chloride와 ferrous sulfate의 경우 40% 이상의 저해를 받는 것으로 조사되었다(Table 4).

**Keratinolytic protease의 생성에 미치는 초기 접종량의 영향**

초기 접종량에 따른 keratinolytic protease 생산의 정도를 조사하기 위하여 앞에서 조사되어진 최적배지 즉, 1.0%

**Table 4. Effect of various metal ion sources for keratinolytic protease production.**

| Sources           | Incubation time (days)                         |    |     |     | pH   |
|-------------------|--|----|-----|-----|------|
|                   | 1  | 2  | 3   | 4   |      |
|                   | Keratinolytic protease activity (units/ml/min) |    |     |     |      |
| Control           | 87   | 98 | 105 | 103 | 7.83 |
| CaCl <sub>2</sub> | 50   | 76 | 91  | 93  | 7.47 |
| FeCl <sub>3</sub> | 35   | 53 | 59  | 61  | 7.48 |
| FeSO <sub>4</sub> | 65   | 60 | 63  | 62  | 7.73 |
| HgCl <sub>2</sub> | -  | -  | -   | -   | 6.74 |
| KCl               | 57   | 88 | 103 | 105 | 7.50 |
| MgCl <sub>2</sub> | 57   | 77 | 89  | 90  | 7.58 |
| MgSO <sub>4</sub> | 57   | 79 | 92  | 93  | 7.57 |
| MnCl <sub>2</sub> | 30   | 64 | 68  | 57  | 7.61 |
| MnSO <sub>4</sub> | 33   | 66 | 70  | 58  | 7.59 |
| PbCl <sub>2</sub> | 54   | 82 | 93  | 97  | 7.49 |
| ZnCl <sub>2</sub> | 28   | 63 | 66  | 56  | 7.58 |

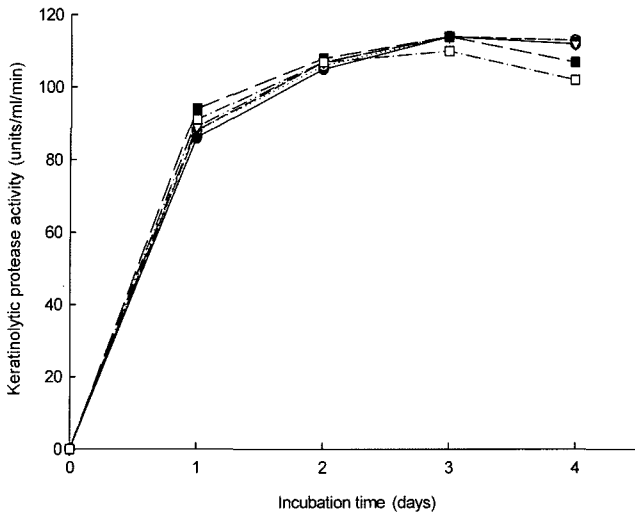


Fig. 8. Effect of various inoculum size for keratinolytic protease production of *Bacillus* sp. SMMJ-2. Symbols : ●, 0.1%; ○, 0.5%; ▼, 1.0%; ▽, 3.0%; ■, 5.0%; □, 10.0%.

fructose, 1.2% soybean meal(roasted), 0.7%  $K_2HPO_4$ , 0.2%  $KH_2PO_4$ , 0.01%  $Na_2CO_3$ 로 배지를 제조한 후, 최적배양조건인  $30^\circ C$ , 200 rpm으로 4일간 배양하면서 조사하였다. 5.0% 접종한 경우 배양 1일째와 2일째 가장 높은 keratinolytic protease 활성을 나타내었으나 다른 경우와 큰 차이는 나타내지 않았다. 배양 3일째에는 10.0%를 제외한 모든 경우에서 유사한 keratinolytic protease 활성을 나타내었으며 4일째에는 모든 조건에서 활성이 감소하는 것으로 조사되었으며 5.0%와 10.0%의 경우에는 다른 조건보다 보다 많이 감소하는 것으로 조사되었다(Fig. 8).

## 요 약

스웨덴 스톡홀름의 항구부근 토양시료로부터 분리한 *Bacillus* sp. SMMJ-2는 단백질 분해활성이 높은 균주로서 특히 keratinolytic protease 생산성이 우수한 균주이다. 효소생산을 위한 최적 배지조성은 0.7%  $K_2HPO_4$ , 0.2%  $KH_2PO_4$ , 1.0% fructose, 1.2% soybean meal(roasted), 그리고 0.01%  $Na_2CO_3$  이었으며 배양초기 pH는 7.0, 배양온도는  $30^\circ C$ 에서 200 rpm 조건일 때 효소생산이 가장 우수하였으며 이때의 활성은 105 units/ml/min로 조사되었다.

## 감사의 글

본 연구는 산업자원부의 지역혁신 인력양성사업의 연구결과로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Vignardet, C., Y. C. Guillaume, J. Friedrich, and J. Millet. 1999. A first order experimental design to assess soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyces microsporus* on human substrate. *Int. J. Pharm.* **191**: 95-102.
- Xiang, L., C. G. 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.
- Arai, K. M., R. Takahashi, Y. Yokote, and K. Akahane. 1983. Amino acid sequence of feather keratin from fowl. *Eur. J. Biochem.* **132**: 501-507.
- Schmidt, W. F. and M. J. Line. 1996. Physical and chemical structures of poultry feather fiber fractions in fiber process development. *TAPPI.* **79**: 135-140.
- Williams, C. M. and J. C. H. Shih. 1989. Enumeration of some microbial groups in thermophilic poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. *J. Appl. Bacteriol.* **67**: 25-35.
- Williams, C. M., C. S. Richter, J. M. Mackenzie, and J. C. H. Shih. 1990. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1509-1515.
- Hideto, T., T. Akiba, and K. Horikoshi. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 519-523.
- Bernal, C., J. Cairo, and N. Coello. 2005. Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enzyme Microb. Technol.* **36**: 211-216.
- Aida, M. F. and M. A. Hassan. 2004. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb. Technol.* **34**: 85-93.
- Lin, X., G. D. Inglis, L. J. Yanke, and K. J. Cheng. 1999. Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 149-153.
- Hideto, T., T. Kobayashi, R. Aono, and K. Horikoshi. 1992. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the structural gene for a thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 101-108.
- Xiang, L., D. W. Kelemen, E. S. Miller, and J. C. H. Shih. 1995. Nucleotide sequence and expression of *KerA*, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1469-1474.
- Shinigi, M., M. Ichikawa, T. Oka, M. Sakai, Y. Moriyama, Y. Sameshima, M. Goto, and K. Furukawa. 2004. Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiopsis* sp. TOA-1. *Enzyme Microb. Technol.* **34**: 482-489.
- Uchida, K., P. Mandebvu, S. J. Sniffen, and M. P. Carter. 2003. Effect of feeding methionine supplements with different rumen escape values on performance of high

- producing dairy cows in early lactation. *J. Anim. Feed. & Tech.* **107**: 1-14.
15. Park, S. M., H. J. Jung, and T. S. Yu. 2006. Selection and cultural characteristics of whole chicken feather-degrading bacterium, *Bacillus* sp. SMMJ-2. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 7-14.
  16. Sangali, S. and A. Brandelli. 2000. Isolation and characterization of a novel feather-degrading bacterial Strain. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **87**: 17-24.
  17. 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.
  18. Shohei, Y., Y. Morita, Q. Hasan, S. R. Rao, Y. Murakami, K. Yokoyama, and E. Tamiya. 2002. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer-fur. *J. Biosci. Bioeng.* **93**: 595-600.
  19. 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.
  20. Cheng, S. W., H. M. Hu, S. W. Shen, H. Takagi, M. Asano, and Y. C. Tsai. 1995. Production and characterization of keratinase of a feather-degrading *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**: 2239-2243.
  21. Letourneau, F., V. Soussotte, P. Bressollier, P. Branland, and B. Verneuil. 1998. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K1-02: a new isolated strain. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 77-80.
  22. Elrefai, H. A., M. A. Abdelnaby, A. Gaballa, M. H. Elaraby, and A. F. Abdel fattah. Improvement of the newly isolated *Bacillus pumilus* FH9 keratinolytic activity. 2005. *Process Biochem.* **40**: 2325-2332.
  23. Anbu, P., S. C. B. Gopinath, A. Hilda, T. L. Priya, and G. Annadurai. 2005. Purification of keratinase from poultry farm isolate-*Scopulariopsis brevicaulis* and statistical optimization of enzyme activity. *Enzyme Microb. Technol.* **36**: 639-647.
  24. Kim, J. D. 2003. Preliminary characterization of keratinolytic enzyme of *Aspergillus flavus* K-03 and its potential in biodegradation of keratin wastes. *Mycobiology* **31**: 209-213.
  25. Mohamedin, A. H. 1999. Isolation, identification and cultural conditions of a protease producing thermophilic *Streptomyces* strain grown on chicken feather as a substrate. *Int. Biodeg. Biodeg.* **43**: 13-21.
  26. Amare, G., H. K. Rajni, B. A. Gashe, and B. Mattiasson. 2003. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microb. Technol.* **32**: 519-524.

(Received Apr. 10, 2006/Accepted June 12, 2006)