

***Bacillus pumilus* RS7에 의한 난분해성 케라틴 분해효소의 생산 및 아미노산 공급원으로서 우모 분해산물**

우 은 옥 · 김 민 주 · 손 형 식 · 유 은 연 · 정 성 윤 · 손 홍 주 · 이 상 준 · 박 근 태^{***}
부산대학교 미생물학과, ^{*}부산대학교 한국 Bio-IT 파운드리 센터,
^{**}부산대학교 생명응용과학부, ^{***}부산대학교 산학협력단
(2007년 8월 20일 접수; 2007년 9월 11일 채택)

Production of Keratinolytic Protease by *Bacillus pumilus* RS7 and Feather Hydrolysate As a Source of Amino Acids

Eun-Ok Woo, Min-Ju Kim, Hyeng-Sik Son, Eun-Youn Ryu, Seong-Yun Jeong^{*},
Hong-Joo Son^{**}, Sang-Joon Lee and Geun-Tae Park^{***}

Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

^{*}Korea bio-IT Foundry Center, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

^{**}School of Applied Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

^{***}Research & University-Industry Cooperation, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

(Manuscript received 20 August, 2007; accepted 11 September, 2007)

Feathers are produced in huge quantities as a waste product at commercial poultry processing plants. Since feathers are almost pure keratin protein, feather wastes represent an alternative to more expensive dietary ingredients for animal feedstuffs. Generally they become feather meal used as animal feed after undergoing physical and chemical treatments. These processes require significant energy and also cause environmental pollutions. Therefore, biodegradation of feather by microorganisms represents an alternative method to prevent environment contamination. The aim of this study was to investigate cultural conditions affecting keratinolytic protease production by *Bacillus pumilus* RS7. We also assessed the nutritive value of microbial and alkaline feather hydrolysates. The composition of optimal medium for the keratinolytic protease was fructose 0.05%, yeast extract 0.3%, NaCl 0.05%, K₂HPO₄ 0.03%, KH₂PO₄ 0.04% and MgCl₂ · 6H₂O 0.01%, respectively. The optimal temperature and initial pH was 30°C and 9.0, respectively. The keratinolytic protease production under optimal condition reached a maximum after 18 h of cultivation. Total amino acid content of feather hydrolysates treated by NaOH and *B. pumilus* RS7 was 113.8 µg/ml and 504.9 µg/ml, respectively. Essential amino acid content of feather hydrolysates treated by NaOH and *B. pumilus* RS7 was 47.2 µg/ml and 334.0 µg/ml, respectively. Thus, feather hydrolysates have the potential for utilization as an ingredient in animal feed.

Key Words : Amino acid, Chicken feather, Feather hydrolysate, Keratin, Keratinolysis

1. 서 론

케라틴은 사람의 피부 각질이나 머리카락, 동물의 뼈 및 우모를 이루고 있는 구조 단백질이다^{1,2)}. 이들

중 β-sheets 구조의 케라틴으로 구성된 우모는 이황화 결합, 수소 결합, 소수성 상호작용 등의 다양한 결합으로 이루어져 있기 때문에 pepsin, trypsin 등의 일반적인 protease로는 거의 분해가 되지 않는 난분해성 단백질이다^{3,4)}.

국내의 경우, 우모는 닭이나 오리 등의 도축 부산물 또는 가축산업 폐기물로서 연간 4만 톤에 달하는 방대한 양이 배출되고 있는데, 우모의 조단백질 함

Corresponding Author : Geun-Tae Park, Research & University-Industry Cooperation, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Phone: +82-51-510-3741
E-mail: gtpark@pusan.ac.kr

량은 85% 정도로서, 그 영양적 가치가 매우 높기 때문에 우모분의 형태로 전환시킨 후, 사료 첨가물 등으로 사용하기도 한다⁵⁾. 이때, 사용되는 방법은 우모를 가압 및 가열 처리한 후, NaOH 등에 의하여 화학적으로 분해하여 소화흡수력을 증가시키는 것이다⁶⁾. 그러나 이러한 물리화학적 우모 처리법은 공정 중에 폐수 및 악취가 대량 발생하기 때문에 2차 환경오염을 유발하며, 동시에 고온 및 고압에 드는 에너지 비용 또한 매우 높으므로 경제성이 낮은 단점을 가지고 있다. 또한 처리 중에 arginine, cystine 등의 특정 아미노산이 파괴되기도 하고, 최종 생산된 우모분의 동물소화율도 50% 이하로 매우 저조한 것으로 알려져 있다^{7,8)}. 이러한 우모 처리공정의 비효율성을 고려해 볼 때, 좀 더 환경친화적이고 효율적인 우모 처리기술에 대한 연구가 필요함을 알 수 있다.

우모를 친환경적으로 처리하는 대표적인 방법은 미생물이 생산하는 specific protease를 이용하는 것이다. 미생물이 생산하는 우모 분해효소를 keratinase 또는 keratinolytic protease라고 하며, 케라틴 외에도 다양한 난분해성 단백질을 분해한다는 측면에서 일반적인 protease와 구별되어 진다³⁾. 현재 keratinolytic protease 생산 미생물의 분리, keratinolytic protease의 효소적 특성 검토 및 효소 정제를 통한 다양한 난분해성 기질의 분해에 관한 연구가 많이 진행되고 있다³⁾. 일부 보고에 의하면 keratinolytic protease는 광우병을 일으키는 prion 단백질을 분해하는 기능도 가지고 있는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 그러나 이들 연구는 대부분 고온성 미생물에 초점을 맞추어 연구가 진행되고 있으며, keratinolytic protease를 이용하여 생산된 우모분의 동물사료로서의 영양적 가치에 대한 연구도 많이 행되어 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 환경친화적인 우모분 생산공정을 개발하기 위하여 증온 환경에서 높은 우모분해 활성을 가지고 있는 것으로 확인된 *Bacillus pumilus* RS7의 keratinolytic protease 생산 최적 조건을 확립하고, 우모 분해산물의 아미노산 종류와 그 함량을 조사함으로써 가축 사료로서의 활용을 위한 영양적 가치를 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 사용 균주 및 배지

본 실험에 사용된 우모분해 세균은 퇴비화 중인 뽕짚으로부터 분리된 *B. pumilus* RS7이었다. Keratinolytic protease 생산 최적조건을 검토하기 위하여 사용된 기본배지의 조성은 NH₄Cl 0.05%,

NaCl 0.05%, K₂HPO₄ 0.03%, KH₂PO₄ 0.04%, MgCl₂ · 6H₂O 0.01% 및 yeast extract 0.01% (pH 7.5)이었으며, 케라틴 공급원으로 닭의 우모 0.1%를 첨가하였다⁸⁾. 실험균주는 skim milk agar 배지 (tryptone 1%, yeast extract 0.5%, skim milk 5%, NaCl 0.5%, agar 2%, pH 7.5)에서 정기적으로 계대배양하면서 보존하였다.

2.2. 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 Wawrzkievicz 등¹⁰⁾의 방법을 이용하여 조제하였다. Soluble keratin을 이용한 효소 활성 측정 방법은 다음과 같다. 2% soluble keratin 용액 (0.1 M 인산 완충용액, pH 8.0) 4 ml에 조효소액 1 ml를 첨가하여 37°C에서 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, 상등액의 흡광도를 280 nm에서 측정하였다. 상기 조건에서 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit라 정의하고, keratinolytic activity를 나타내었다.

2.3. 우모 분해산물의 아미노산 분석

화학적으로 분해된 우모 분해산물과 본 실험균주에 의해 분해된 우모 분해산물의 영양적 가치를 비교하기 위해 다음과 같이 각각 우모를 처리하였다. 즉, 0.1 N NaOH 용액에 우모 0.1%를 첨가하여 60°C에서 1시간 동안 분해시켰다. 0.1 N HCl를 이용하여 중화한 후, 원심분리 (18,000 rpm, 30분, 4°C)하여 상등액을 회수하였다. 또한 확립된 실험균주의 최적배지에 0.1%의 우모를 첨가하여 18시간 동안 배양한 후, 배양액을 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 각 우모 분해산물의 아미노산 함량과 조성은 High Speed Amino acid Analyzer (L-8800, Hitachi사)를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Keratinolytic protease 생산 최적 조건

배양온도가 효소 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 20-50°C로 각각 조절된 기본배지에서 5일 동안 회전 진탕 배양한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 본 균주는 20-37°C에서 효소 생산량이 우수하였으며, 30°C에서 최대의 생산량을 나타내었다. 그러나 45°C 이상에서는 급격하게 효소 생산량이

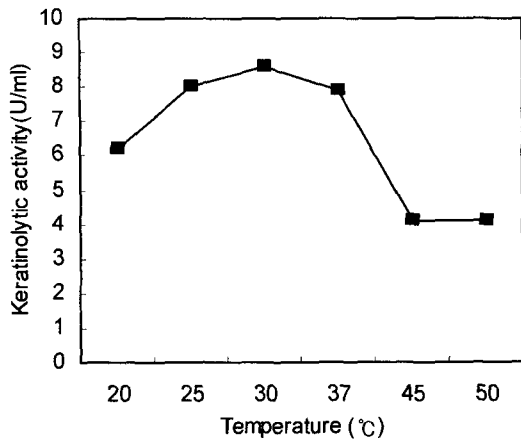


Fig. 1. Effect of temperature on keratinolytic activity of *Bacillus pumilus* RS7.

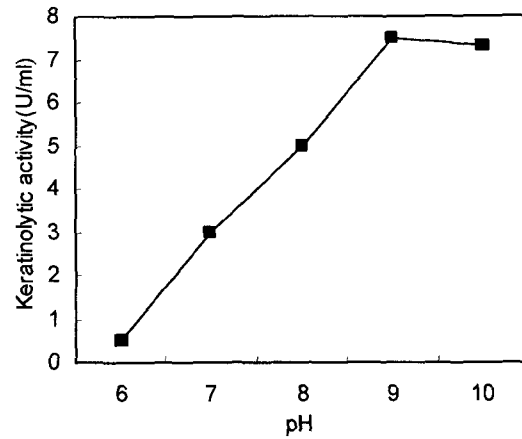


Fig. 2. Effect of initial medium pH on keratinolytic activity of *Bacillus pumilus* RS7.

감소되었다. 이 결과는 본 균주가 생산하는 keratinolytic protease는 45°C 이상의 온도에서 매우 불안정하다는 것을 의미한다.

배지의 초기 pH가 효소 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 6-10으로 각각 조절된 기본배지에서 배양한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 효소 생산량은 pH 증가에 따라 비례적으로 증가하다가 pH 9-10에서 최대의 생산량을 나타내었다. 따라서 본 균주가 생산하는 keratinolytic protease는 알칼리에 내성을 가지고 있는 것으로 판단되며, 이러한 결과는 본 효소를 산업적으로 응용하고자 할 때 매우 유용한 특성이 될 것으로 추정된다. *Bacillus* sp. P-001A는 pH 4.5-11.5에서 효소 생산이 최적인 것¹¹⁾으로 알려져 있어 본 균주와 비슷한 경향을 보였으나, *Bacillus subtilis*와 *B. pumilis*의 경우, 각각 pH 5-9, pH 5-6에서 keratinolytic protease 생산이 최적인 것으로 보고¹²⁾되어 있다.

탄소원이 효소 생산량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 우모 0.1%가 함유된 기본배지에 각종 탄소원을 0.05%씩 첨가하여 30°C, 200 rpm에서 5일 동안 배양한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. Soluble starch, sorbitol을 제외한 모든 탄소원이 탄소원 무첨가 대조구보다 효소 생산량이 높았으며, 그중 fructose를 첨가한 경우에 효소 생산량이 가장 높았다. 그리고 탄소원의 첨가가 효소 생산에 반드시 필수적인 것은 아니었는데, 이것은 우모가 탄소원의 역할을 일부 수행한 것에 기인하는 것으로 판단된다. *B. subtilis* FDB-29 및 *Bacillus licheniformis* PWD-1의 경우, 탄소원의 첨가가 keratinolytic protease의 생산을 완전히 저해하는 것으로 보고⁴⁾되어 있어 본 결과와 상이하였다. Keratinolytic protease

의 생산을 위한 최적 fructose 농도는 0.05%이었다 (미제시).

질소원이 효소 생산량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 yeast extract와 NH₄Cl을 제외한 기본배지에 각종 질소원을 0.1%씩 첨가하여 배양한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. Malt extract를 제외한 모든 유기 질소원이 무기 질소원보다 효소 생산에 효과적이었다. 이들 유기 질소원은 질소원 무첨가 대조구보다 효소 생산량을 크게 증가시켰으며, 그중 beef extract, casein, skim milk, yeast extract 등 (26-53 U/ml)은 대조구 (6 U/ml)보다 4배 이상 효소 생산량을 증가시켰다. 무기 질소원의 첨가는 효소 생산량을 크게 저해하였으므로, 이들이 catabolite repression 작용을 수행함을 알 수 있었다. 탄소원과 마찬가지로 질소원의 첨가 역시 효소 생산에 반드시 필수적인 것은 아니라는 것을 알 수 있었다. 따라서 우모가 탄소원으로서의 역할뿐만 아니라 질소원의 역할도 수행하는 것으로 추정되었다. Keratinolytic protease의 생산을 위한 최적 yeast extract 농도는 0.3%이었다 (미제시).

이상에서 확립된 최적 배지 및 배양조건은 fructose 0.05%, yeast extract 0.3%, NaCl 0.05%, K₂HPO₄ 0.03%, KH₂PO₄ 0.04%, MgCl₂·6H₂O 0.01%, (초기 pH 9, 30°C)이었다. 최적 조건에서 배양 시간별로 pH와 keratinolytic activity의 변화를 검토한 결과, 배양 18시간 경 가장 높은 keratinolytic activity를 나타내었으며, 배양 36 시간 만에 우모가 완전히 분해되었다 (미제시).

3.2. 우모 분해산물의 아미노산 함량

화학적 방법 및 *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분

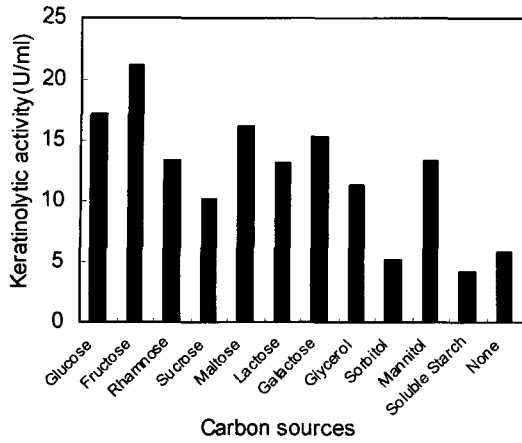


Fig. 3. Effect of carbon source on keratinolytic activity of *Bacillus pumilus* RS7.

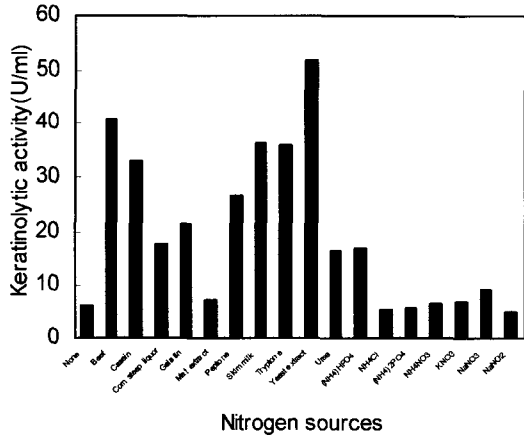


Fig. 4. Effect of nitrogen source on keratinolytic activity of *Bacillus pumilus* RS7.

해산물의 아미노산 함량과 조성을 분석한 결과는 다음과 같다. 화학적 방법 및 *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물의 총 아미노산 함유량은 각각 113.8 $\mu\text{g/ml}$ 및 504.9 $\mu\text{g/ml}$ 으로서, *B. pumilus* RS7에 의한 분해산물의 총 아미노산 함유량이 화학적 방법에 의한 분해산물보다 4.4배 많은 것으로 나타났다 (Fig. 5).

화학적 방법 및 *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물의 필수 아미노산 함유량은 각각 47.2 $\mu\text{g/ml}$, 334.0 $\mu\text{g/ml}$ 으로서, *B. pumilus* RS7에 의한 분해산물의 필수 아미노산 함유량이 화학적 방법에 의한 분해산물보다 7배 많은 것으로 나타났다 (Fig. 6). 또한 화학적 방법에 의한 우모 분해산물이 함유하고 있는 필수 아미노산은 총 아미노산 함유량의 41.5%를 차지하였으나 *B. pumilus* RS7에 의한 분

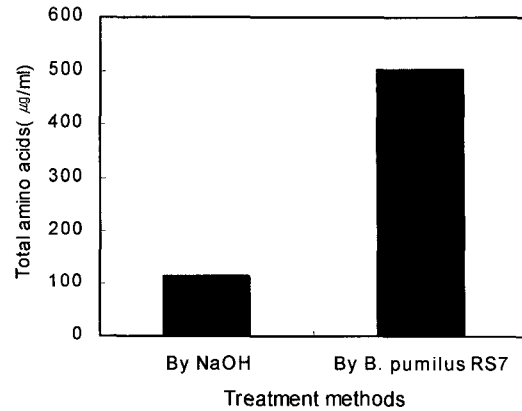


Fig. 5. Total amino acid content of feather hydrolysates treated by NaOH and *Bacillus pumilus* RS7.

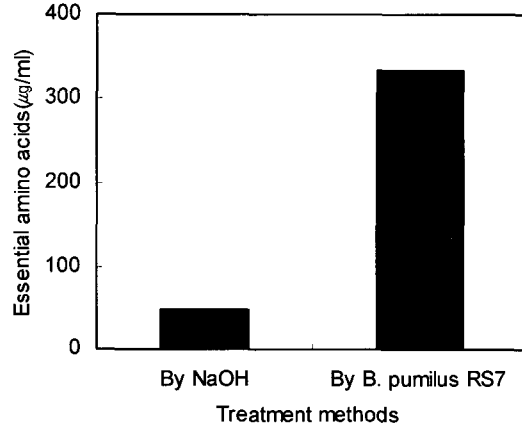


Fig. 6. Essential amino acid content of feather hydrolysates treated by NaOH and *Bacillus pumilus* RS7.

해 산물의 경우, 필수 아미노산이 총 아미노산 함유량의 66.2%를 차지하였다.

Table 1에서 보는 바와 같이 화학적 방법에 의한 우모 분해산물이 함유하고 있는 주요 아미노산은 13종으로 분석되었으며, 필수 아미노산은 threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine, lysine, arginine 등 8종으로 분석되었다. *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물이 함유하고 있는 주요 아미노산은 17종으로 분석되었으며, 필수 아미노산은 threonine, valine, methionine, phenylalanine, tryptophane, lysine, histidine, arginine 등 8종으로 분석되었다. *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물에서 leucine, isoleucine 등의 필수 아미노산은 검출되지 않았으며, valine을 제외한 다른 필수 아미노산의 함량은 화학적 방법에 의한 우모 분해

Table 1. Amino acid type and content of feather hydrolysates treated by NaOH and *Bacillus pumilus* RS7

	Treatment methods	
	NaOH ($\mu\text{g/ml}$)	<i>Bacillus pumilus</i> RS7 ($\mu\text{g/ml}$)
Aspartic acid	19.8	4.5
Threonine	1.0	4.0
Serine	9.5	1.3
Glutamic acid	9.1	2.0
Glycine	1.9	1.1
Alanine	9.2	0.9
Citrulline	-	2.8
Valine	7.0	2.4
Cysteine	-	8.9
Methionine	13.2	58.4
Isoleucine	6.4	-
Leucine	10.1	-
Tyrosine	-	73.7
Phenylalanine	6.1	167.9
Tryptophane	-	3.6
Ornithine	-	0.2
Lysine	0.5	91.5
Histidine	-	74.0
Arginine	2.9	6.1

산물보다 높았다. 특히, 가축 사료 성분 중 제한 아미노산인 lysine¹³⁾의 함량이 크게 증가한 것과 화학적으로 처리된 우모 분해산물에 존재하지 않았던 cystine, tyrosine, histidine 등의 필수 아미노산이 검출되었다는 것은 주목할 만한 결과이며, 반면 leucine, isoleucine 등은 가축 사료에 가장 많이 이용되고 있는 옥수수에 과잉으로 존재하기 때문에 큰 문제가 되지 않을 것으로 판단되었다¹⁴⁾. 따라서, 기존의 화학적 우모 분해산물보다 우모 분해세균에 의한 우모 분해산물이 동물 사료 첨가물로서 가치가 더 높을 것이라고 판단되었다.

4. 결 론

전 세계적으로 방대하게 배출되는 도축 부산물인 우모는 높은 영양적 가치를 가지고 있기 때문에 동물 사료로 이용되고 있다. 우모는 물리화학적으로 분해한 후, 동물 사료로 이용되지만 이들 방법은 많은 에너지를 요구하며, 폐수와 악취 등 환경오염을 유발한다. 따라서, 환경오염을 유발하지 않는 경제적 방법인 생물학적 처리에 대한 연구 필요성이 커지고 있다. 본 연구에서는 우모 분해활성을 가지고 있는 *B. pumilus* RS7의 keratinolytic protease 생산 최적조건 및 우모 분해산물의 아미노산 함량을

분석하였다. *B. pumilus* RS7의 keratinolytic protease 생산 최적 조건은 fructose 0.05%, yeast extract 0.3%, NaCl 0.05%, K₂HPO₄ 0.03%, KH₂PO₄ 0.04%, MgCl₂ · 6H₂O 0.01% (30°C, 초기 pH 9)이었다. 최적 조건에서 배양 18시간에 가장 높은 keratinolytic activity를 나타내었다. 화학적 방법 및 *B. pumilus* RS7에 의한 우모 분해산물의 총 아미노산 및 필수 아미노산의 함량은 각각 113.8 $\mu\text{g/ml}$, 504.9 $\mu\text{g/ml}$ 및 47.2 $\mu\text{g/ml}$, 334.0 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 이에 따라, 동물 사료 성분으로서 미생물학적 우모 분해산물의 높은 잠재적 이용 가능성을 확인하였다.

감사의 글

“이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었음”

참 고 문 헌

- 1) Bertsch A., Coello N., 2005, A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient, *Biores. Technol.*, 96, 1703-1708.
- 2) Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Musallam A.A., Al-Zarban A., 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, *Biores. Technol.*, 66, 1-11.
- 3) Gupta R., Ramnani P., 2006, Microbial keratinase and their prospective application: an overview, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 21-33.
- 4) Wang J.J., Shih J.C.H., 1999, Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 608-616.
- 5) 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.
- 6) Kim W.K., Patterson P.H., 2000, Nutritional value of enzyme- or sodium hydroxide-treated feathers from dead hens, *Poult. Sci.*, 79, 528-534.
- 7) Colette M.H., Michael G.H., 1994, Bioconver-

- sion of waste keratins: wool and feathers, *Conserv. Recyc.*, 11, 179-188.
- 8) 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.
 - 9) Wang J.J., Borwornpinyo R., Odetallah N., Shih J.C.H., 2005, Enzymatic degradation of a prion-like protein, Sup35NM-His6, *Enz. Microb. Technol.*, 36, 758-765.
 - 10) Wawrzekiewicz K., Lobarzewski J., Wolski Y., 1987, Intracellular keratinase of *Trichlophyton gallinae*, *J. Med. Veterinary Mycol.*, 25, 261-268.
 - 11) Atalo K., Gashe B.A., 1993, Protease production by a thermophilic *Bacillus* species (P-001A) which degrades various kinds of fibrous protein, *Biotechnol. Lett.*, 15, 1151-1156.
 - 12) Kim J.M., Lim W.J., Suh H.J., 2001, Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste, *Process Biochem.*, 37, 287-291.
 - 13) Kim Y.B., Lee J.B., Sung K.S., Lee N.H., 1998, Effect of physical processing on protein content and pepsin-digestibility of feather meal, *Kor. Food Research Institute*, 40, 103-110.
 - 14) Lee N.H., Kim Y.B., Kim H.J., Seong K.S., Rho J.H., Han C.K., Ahn C., 1999, Studies on the amino acid bioavailability of fermented feather meal in the rats, *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.*, 23, 21-28.