

Bacillus sp. SH-517에 의한 keratinase의 생성 최적 배양 조건

방병호 · 이문수¹ · 임기환² · 이동희^{2*}

을지대학교 식품과학부, ¹한국생명공학연구원, ²건국대학교 미생물공학과

Received April 7, 2008 / Accepted June 4, 2008

Optimal Culture Conditions on the Keratinase Production by *Bacillus* sp. SH-517. Byung-Ho Bang, Moon-Soo Rhee¹, Ki-Hwan Lim² and Dong-Heui Yi^{2*}. Division of Food Science, Eulji University, 212, Yangji-dong, Sujeong-gu, Sungnam-si, Gyeonggi-do, 461-713, Korea, ¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology 52 Eoeun-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-333, Korea, ²Department of Microbial Engineering, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-Gu, Seoul 143-701, Korea - A strain SH-517 which produce extracellular keratinase, was isolated from the soil of a poultry waste and a poultry factory. An isolate SH-517 was identified as *Bacillus* sp. based on its morphological and biochemical characteristics. The optimal culture conditions for the production of keratinase by *Bacillus* sp. SH-517 were investigated. The optimal medium composition for keratinase production was determined to be 2.0% chicken feather as carbon source, 0.5% beef extract as organic nitrogen source, 0.5% KNO₃ as inorganic nitrogen source and 0.06% KCl, 0.05% NaCl, 0.04% KH₂PO₄, 0.03% K₂HPO₄ as mineral source and 0.01% yeast extract as growth factor. The optimal temperature and pH of medium were shown 40°C and 8.5 with shaking culture (180 rpm/min), respectively. The maximum keratinase production reached maximum of 125 units/ml/min after 42 hr of cultivation under the optimal culturing conditions.

Key words : Keratinase, chicken feather, production, *Bacillus* sp. SH-517

서 론

깃털은 보통 조류가 가지는 총 중량의 5-7%를 차지하며 keratin 형태의 조단백질이 약 90% 이상 차지하고 있다[10]. 현재 전 세계적으로 많은 수의 가금류를 사육하고 있으며 동시에 도축도 하고 있다. 이 도축 과정에서 나오는 막대한 양의 깃털은 쓰레기로 축적된다. 이와 같이 버려지는 폐깃털은 단백질을 다량 함유하고 있어 폐깃털을 이용할 경우 환경오염은 물론 동물사료 등으로 유용하게 사용될 것이다. 그런데, 폐깃털의 주된 구조를 이루는 keratin의 물리적, 화학적 안정성으로 인하여 폐깃털의 처리가 큰 환경 문제를 야기하고 있으며 또한 소화가 불가능하여 동물사료로서의 이용도 제한을 받고 있다. 그리고 최근 환경오염에 대한 관심이 높아져서 폐기물의 환경 친화적이고 생물학적인 처리기술이 각광을 받고 있다. 그러한 이유로 가금류의 폐깃털 처리에 대한 연구가 진행되고 있으나 아직까지 완전한 폐깃털 처리 공정 개발이 미비한 실정이다[11].

Keratin 단백질은 polypeptide chain이 supercoiling된 상태에서 단백질 사슬이 매우 단단하게 쌓여 있으며, cysteine 함량이 높아 polypeptide chain 사이에 disulfide결합이 특히 많아 구조적으로 매우 단단하고 안정하다[7,20]. 그러나 깃털이 자연계에서 무한히 축적되지 않는 것은 이들을 분해하는 효소

인 keratinase를 분비하는 미생물이 존재하기 때문이다.

Keratinase를 생산하는 미생물로는 세균, 곰팡이, 방선균 등이 많이 연구되었으며, *Bacillus licheniformis* [2,12], *Bacillus* sp. [18,19], *Pseudomonas* sp. [17] *Trichophyton mentagrophytes* [23,24], *Aspergillus* sp. [4], *Streptomyces* sp. [1,22] 등의 미생물 균주가 발견되어 효소의 생산조건, 특성규명, 폐깃털의 사료제조 등에 관해서 연구되고 있지만 분해력이 떨어져 실용화에 큰 장애가 되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 가금류의 깃털을 강력하게 분해하는 keratinase를 생산하는 미생물 *Bacillus* sp. SH-517를 분리하였으며 이 균이 생성하는 최적 생성 조건을 검토한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

시험 균주 분리과 배양

Keratinase를 분리하기 위하여 경기도와 충청도 일대의 가금류 처리공장과 폐기물 처리장 부근의 토양에서 시료를 채취하여 그 균원 시료로 사용하였다. Keratinase를 생산하는 균주를 분리하기 위하여 균원 시료를 5.0% skim milk, agar 1.7% (pH 6.5)로 하는 1차 선별배지에 접종하여 37°C에서 36시간 배양하여 clear zone이 크고 생육이 우수한 균주를 1차 분리하고 분리된 각 균주를 0.5% chicken feather, 0.05% NH₄Cl, 0.05% NaCl, 0.04% KH₂PO₄, 0.03% K₂HPO₄, 0.01% MgCl₂ · 6H₂O, 0.01% yeast extract (pH 6.5)로 하는 2차 선별배지[16]에 접종하여 37°C에서 180 rpm으로 48시간

*Corresponding author

Tel : +82-2-450-3522, Fax : +82-2-3437-8360

E-mail : dhyi@konkuk.ac.kr

동안 액체 배양하여 원심분리한 상등액을 37°C에서 keratin azure를 이용하여 keratinase activity를 측정하였다. 이 중 활성이 가장 높은 균주를 최종 선별하여 SH-517이라 명명하고 이후의 실험에 사용하였다. 최종 선별된 균주는 Nutrient Broth (NB) 100 ml을 300 ml Erlenmeyer flask에 넣어 배양한 후 30% glycerol 현탁액과 1:1로 혼합하여 -70°C deep freezer에서 보관하였다. 그리고 효소 생산 조건을 검토하기 위한 배양은 2차 선별배지를 300 ml Erlenmeyer flask에 100 ml을 분주하여 121°C에서 20 min 동안 가압살균 한 후 전배양한 배양액(2차 선별배지에서 활성화시킨) 1 ml을 접종하여 37°C에서 48시간 진탕배양하였다.

우모 분해균의 동정

분리된 균주를 동정하기 위하여 Bergey's manual of systematic bacteriology [15]에 기술된 방법에 따라 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사하였다.

기질의 조제

깃털의 전처리

도계장에서 수집한 깃털에서 다른 이물질들을 분리해낸 후, 증류수를 이용하여 10회 세척하였다. 세척한 chicken feather를 60°C dry oven에서 완전 건조가 되도록 3일 동안 건조하고, 약 5 mm의 길이로 절단하여 배지 성분 및 activity test를 위한 기질로서 사용하였다.

Keratin azure의 전처리

Keratin azure를 기질로 사용하기 위하여 다음과 같이 전처리하였다. Keratin azure를 1~2 mm로 절단한 후 막자사발에 넣고 액체질소를 가하여 급랭시킨 후 미세하게 분쇄하여 분말화하였다.

사용 기기 및 시약

본 실험에 사용한 spectrophotometer는 Hitachi model 2000을 사용하였으며, 시약은 Sigma 사의 keratin azure를 사용하였으며, 그 외의 시약은 특급 내지 1급 시약을 사용하였다.

균체량의 측정

균체량의 측정은 먼저 여과지(Filter papers No. 1)로 여과하여 깃털을 제거한 후 8,000 rpm으로 15 min 동안 원심분리하여 D.C.W. (dry cell weight)를 측정하였다. 원심분리하여 얻은 균체를 105°C에서 항량이 되도록 건조한 후 중량을 측정하였다.

효소 활성 측정

Keratin azure를 이용한 Assay

배양조건 검토를 위하여 효소의 활성은 Suntornsuk 등

[18]의 방법을 변형하여 조사하였다. 즉, 조효소액(원심분리액) 1 ml을 Keratin azure 현탁액(0.01M Tris-HCl buffer pH 7.5, 4 mg/ml) 1 ml에 첨가하여 water bath에서 37°C, 150 rpm으로 1시간 반응 시킨 후 반응액을 10분간 끓여서 반응을 정지시키고 8,000 rpm에서 원심분리하여 기질에서 유리된 발색단을 595 nm에서 측정하였다. 대조군은 조효소액과 Keratin azure 현탁액의 혼합액을 반응 전에 10분간 끓인 것으로 하였다. 그리고 효소의 units는 37°C에서 1분동안 기질과 반응한 반응액의 흡광도를 0.01 증가시키는 효소량을 1 unit라 하였다.

깃털을 이용한 assay

깃털을 이용한 효소활성의 측정은 Farag 등[4]의 keratin을 이용한 효소활성 측정 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 조효소액 5 ml을 0.1 g의 절단된 깃털에 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응 시킨 후 8,000 rpm으로 원심 분리하여 잔여 깃털을 제거한 후 Lowry method [13]를 이용하여 770 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정

본 실험에 사용한 분리된 균주 SH-517의 형태학적 특성 및 각종 배지를 이용한 배양상의 특성을 조사한 결과(not shown data), Gram 양성의 호기성 간균이며 내생포자를 형성하고 운동성이 있었으며 catalase는 양성, oxidase는 음성이었다. Glucose를 이용하여 산을 형성하였으며 가스 발생은 음성이었다. Gelatin, casein, starch의 가수분해능이 있었으며 indol 생성능에서는 음성이었다. Citrate utilization 및 nitrate reduction 등을 하는 것으로 조사되었으며 Bergey's manual of systematic bacteriology [15]와 비교한 결과를 종합하여 볼 때 SH-517 strain은 *Bacillus licheniformis*와 가장 가까운 특성을 보였으나 정확한 균종을 밝힐 수는 없었다. 따라서 여기서는 *Bacillus* sp. SH-517로 명명하고, 차후에 16S rRNA를 이용하여 보다 정확한 동정을 실시하고자 한다.

탄소원의 영향

분리된 균주의 균체 증식과 효소활성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 chicken feather 0.5%를 첨가한 탄소원을 배제한 2차 선별배지에 각종 탄소원을 0.5% 되도록 첨가하여 37°C에서 48시간 진탕배양(180 rpm)한 후 균체량과 효소 활성을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 결과에서 D-raffinose, D-sorbose, fructose, α-cellulose 등이 깃털만을 유일 탄소원으로 하였을 때보다 높은 효소활성을 나타내었다. Kim [9]은 1%의 포도당 첨가 시 효소활성 및 균체생성을 촉진하였다는 보고와는 상반된 결과로, 이는 균주의 차이에 의한 것으로 사료된다. Chon과 Kwon [3] 그리고 Page와

Table 1. Effect of C-source on the production of keratinase produced by *Bacillus* sp. SH-517

C-source ¹⁾	D.C.W. (g/l) ²⁾	Final pH	Relative activity (%)
None	0.78	7.1	100.0
D-Raffinose	1.34	6.5	135.3
Xylose	0.37	4.8	45.7
Glucose	0.25	4.7	68.2
Galactose	1.38	6.2	95.7
Fructose	0.29	4.7	110.4
D-Sorbose	0.32	6.5	108.1
Lactose	0.54	4.6	50.3
Sucrose	0.37	4.8	81.2
Maltose	0.30	5.1	93.4
Dextrin	0.39	4.8	52.3
Cellobiose	0.43	4.7	65.3
Mannitol	0.26	4.7	43.9
Sorbitol	0.32	4.5	73.4
α -Cellulose	1.34	7.1	107.2
Soluble starch	0.50	4.7	60.1

¹⁾All carbon sources were added to 0.5%.

²⁾Cultivation was carried out for 48 hr at 37°C in the 2nd isolation medium containing 0.5% feather, 0.05% NH₄Cl, 0.05% NaCl, 0.04% KH₂PO₄, 0.03% K₂HPO₄, 0.01% MgCl₂ · 6H₂O, 0.01% yeast extract (pH 6.5).

Stock [14]은 raffinose가 효소생성을 촉진시켰다는 보고와 일치하였다. 그리고 본 연구에서는 D-raffinose 등이 효소생성을 촉진시켰으나 산업적으로 사용되기에 비용이 많이 들어가는 탄소원이므로 깃털만을 유일한 탄소원으로 다음 실험을 계속하였다.

Fig. 1의 결과와 같이 깃털이 2% 첨가되었을 때에 가장 높은 효소 활성을 나타내었다. 이는 깃털의 농도가 1~3%에 걸

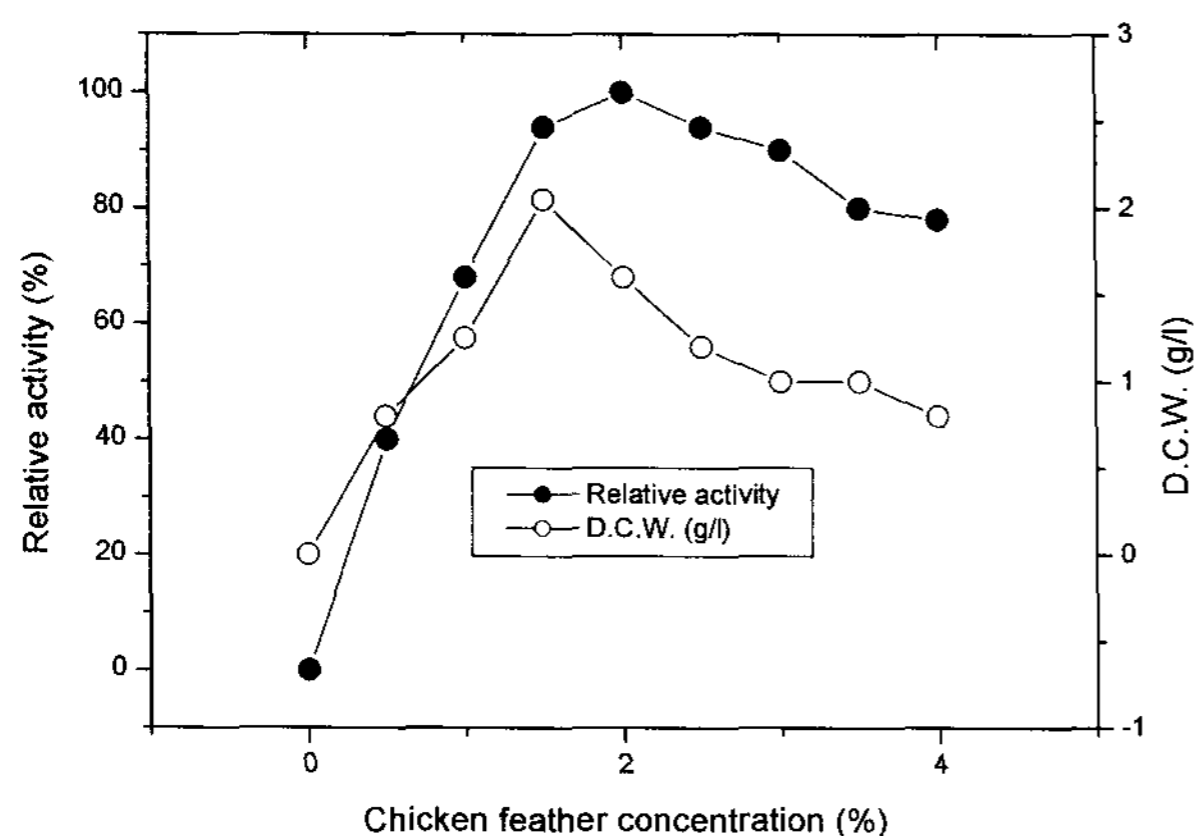


Fig. 1. Effect of feather concentration on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. SH-517. Each concentration of chicken feather was added to 2nd isolation medium and cultivation was carried out for 48 hr at 37°C with shaking culture (180 rpm/min).

쳐 효소 활성에는 큰 차이가 없다는 Suntornsuk 등[18]의 결과와는 약간의 차이가 있었고 1% 깃털에서 가장 활성이 좋았다는 Cheng 등[2]의 결과와도 차이가 있었다.

배양액의 pH의 변화는 초기의 pH 6.5에서 최고의 활성을 나타낸 2.0% 깃털의 농도에서 7.1로 약간 증가하다가 활성과 더불어 다시 떨어지기 시작하여 4.0%에서 초기 pH인 6.5로 낮아졌다.

질소원의 영향

본 균주의 균체 증식과 효소 활성에 영향을 미치는 질소원의 영향을 조사하기 위하여 유일 탄소원으로 깃털을 2% 첨가한 배지에 각 질소원을 0.1%가 되도록 첨가하여 37°C에서 48시간 진탕배양하여 균체량과 효소활성을 조사한 결과는 Table 2와 같았다.

유기질소원으로는 beef extract를 첨가하였을 때 가장 효소활성 및 균체 증식이 우수하였으며 yeast extract와 peptone을 첨가하였을 때에도 좋은 결과가 나타났다. 무기질소원으로는 KNO₃를 첨가하였을 때 가장 효소활성과 균체 증식이 뛰어났으며 NH₄Cl을 사용하였을 때에는 깃털을 유일 질소원으로 사용하였을 때보다 활성과 균체증식이 낮게 측정되었다. 이는 NH₄Cl이 질소원으로서 양호하였다는 Williams 등[21]의 결과와 상반되었다. 깃털과 함께 다른 질소원을 첨가하였을 때 대부분의 질소원에서 깃털을 유일 질소원으로 사용하였을 때에 비하여 효소활성과 균체증식이 우수하였음을 알 수 있었다. 또한 Rosa 등[17]의 keratin을 유일한 질소원으로 사용하였다는 보고와는 상이하였다.

Table 2. Effect of N-source on the production of keratinase by *Bacillus* sp. SH-517

N-source ¹⁾	D.C.W. (g/l) ²⁾	Final pH	Relative activity (%)
None	0.45	7.0	100
Beef extract	1.72	7.3	159.3
Malt extract	0.52	5.7	97.8
Yeast extract	1.68	7.1	122.2
Tryptone	1.65	7.2	92.6
Peptone	1.62	7.3	120.7
Soybean meal	1.57	6.9	105.2
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.45	5.8	100.7
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.02	6.9	111.1
NaNO ₃	0.64	6.9	124.6
NH ₄ NO ₃	0.41	6.8	120.7
KNO ₃	0.75	7.0	126.7
NH ₄ Cl	0.23	6.6	94.1

¹⁾All nitrogen sources were added to 0.1%.

²⁾Cultivation was carried out for 48 hr at 37°C in the 2nd isolation medium containing 2.0% feather, 0.05% NaCl, 0.04% KH₂PO₄, 0.03% K₂HPO₄, 0.01% MgCl₂ · 6H₂O and 0.01% yeast extract (pH 6.5).

Table 2의 결과를 바탕으로 유기질소원으로는 beef extract를 사용하여 실험 하였고 무기질소원으로는 KNO₃를 사용하여 각각의 최적 농도를 측정 한 결과, Fig. 2과 Fig. 3과 같이 각각 0.5%에서 최적의 효소활성과 균체 증식을 보였다. 그리고 Fig. 2와 Fig. 3의 배양액의 초기 pH는 7.0으로 조정하여 사용했는데, 효소의 생성 최대 농도에서 pH가 7.1로 증가하다가 다시 효소활성과 더불어 6.9로 약간 낮아졌다.

금속염의 영향

본 균주의 균체 증식과 효소활성에 미치는 금속염의 영향을 조사하기 위하여 금속염을 제외한 기본배지에 각 금속염을 각각 0.05%되게 첨가하여 37°C에서 48시간 진탕배양한

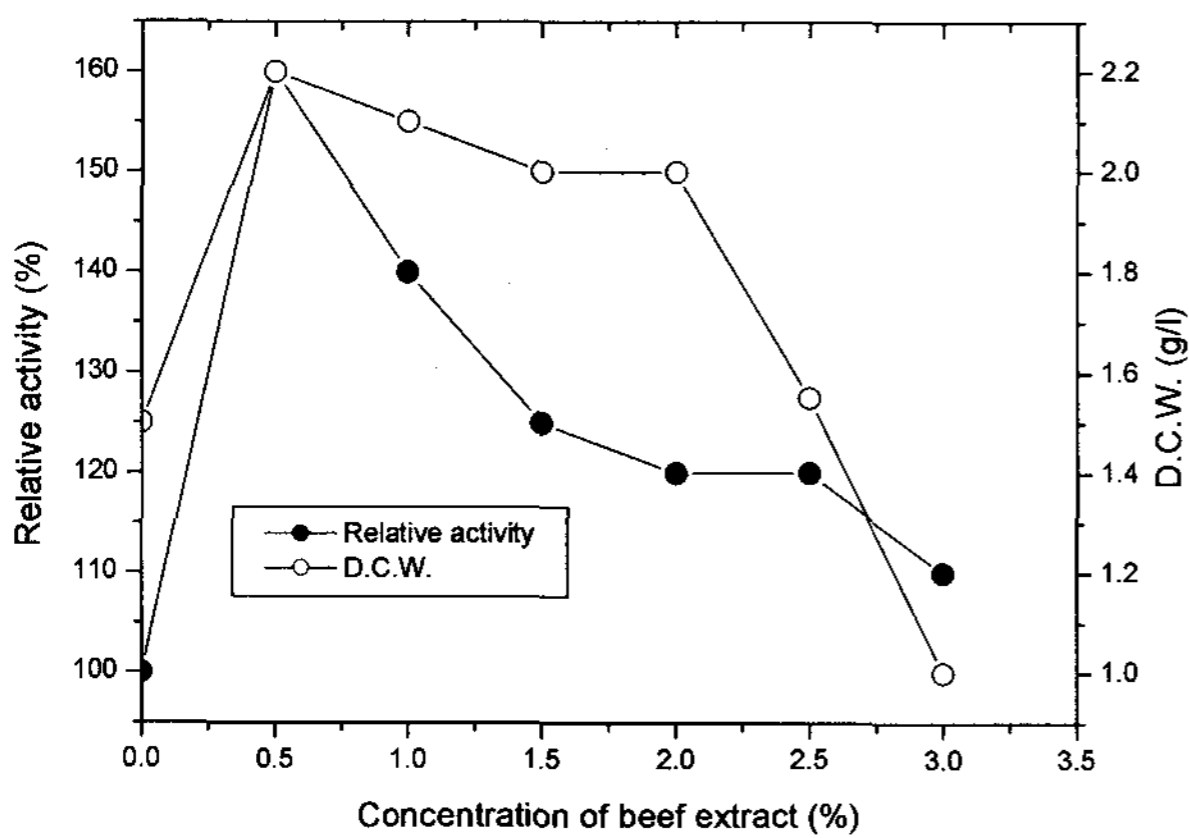


Fig. 2. Effect of beef extract concentration on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. SH-517. Each concentration of beef extract was added to 2nd isolation medium(pH 7.0) containing 2.0% chicken feather and cultivation was carried out for 48 hr at 37°C with shaking culture (180 rpm/min).

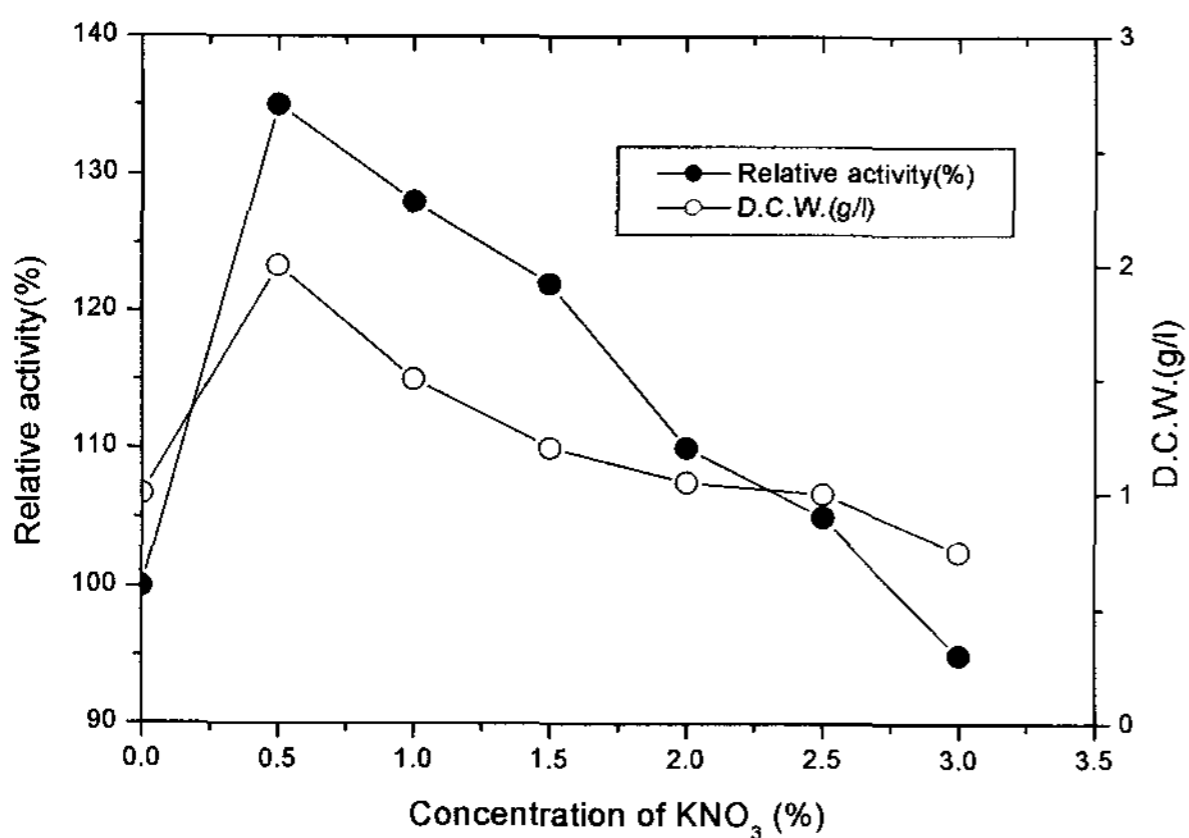


Fig. 3. Effect of KNO₃ concentration on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. SH-517. Each concentration of KNO₃ was added to 2nd isolation medium(pH 7.0) containing 2.0% chicken feather and 0.5% beef extract and cultivation was carried out for 48 hr at 37°C with shaking culture (180 rpm/min).

Table 3. Effect of metal ions on the production of keratinase produced by *Bacillus* sp. SH-517

Metal ions ¹⁾	D.C.W. (g/l) ²⁾	Final pH	Relative activity (%)
None	1.12	7.0	100.0
AgNO ₃	0.22	7.1	10.6
NaCl	1.88	6.5	116.0
KCl	2.01	7.3	139.4
Li ₂ SO ₄ · H ₂ O	0.41	6.8	52.1
BaCl ₂ · 2H ₂ O	0.32	6.6	54.3
CaCl ₂	0.88	6.3	84.0
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.23	6.0	78.7
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.91	6.4	64.9
HgCl ₂	0.11	6.2	19.2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.24	7.1	89.4
MnSO ₄ · 7H ₂ O	1.34	6.9	58.5
ZnSO ₄	1.05	7.0	77.7

¹⁾All metal ion were added to 0.05%.

²⁾Cultivation was carried out for 48 hr at 37°C in the 2nd isolation medium containing 2.0% feather, 0.5% beef extract, 0.04% KH₂PO₄, 0.03% K₂HPO₄, 0.01% Yeast extract (pH 6.5).

후 균체량과 효소활성을 조사한 결과는 Table 3과 같았다.

KCl을 첨가하였을 때 효소생산이 가장 우수하였다. 이는 MgSO₄와 FeSO₄를 첨가하였을 때 활성이 우수했다는 Page 등[14]의 보고와는 상이하였는데, 아마 이것은 균주의 차이로 나타난 결과로 생각된다. 그리고 KCl의 농도에 대한 영향은 Fig. 4와 같이 KCl을 0.06% 첨가하였을 때 효소활성이 가장 우수하였다. 배양액의 pH변화는 초기 pH 7.0에서부터 시작하여 KCl 모든 농도에 이르기까지 7.0을 유지하였다.

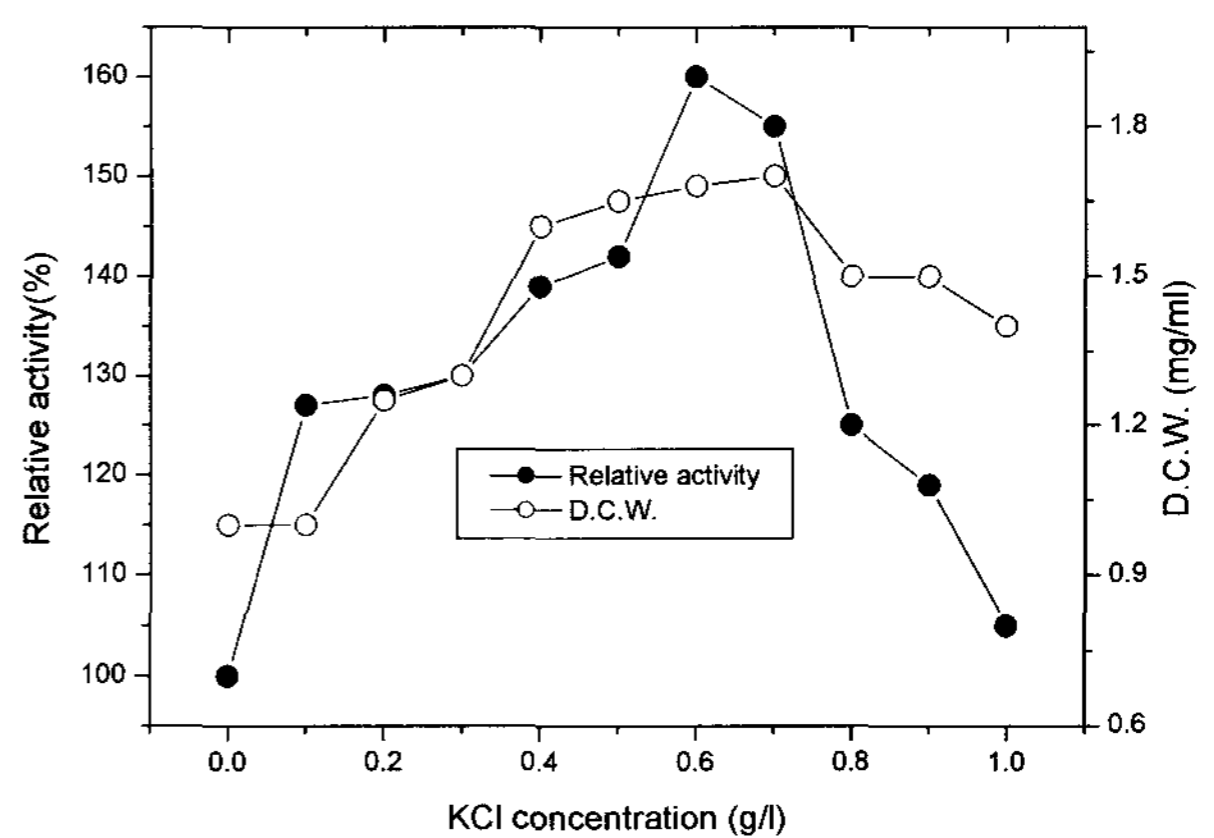


Fig. 4. Effect of KCl concentration on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. SH-517. Cultivation was carried out for 48 hr at 37°C in each given KCl concentration with shaking culture (180 rpm/min) in the 2nd isolation medium containing 2.0% feather, 0.5% beef extract, 0.5% KNO₃, 0.05% NaCl, 0.04% KH₂PO₄, 0.03% K₂HPO₄ and 0.01% yeast extract (pH 7.0).

배양 온도의 영향

본 균주의 배양 온도에 따른 균체증식과 효소활성을 조사하기 위하여 각 온도에서 48시간 배양하여 각각의 균체량과 효소활성을 측정된 결과는 Fig. 5와 같이 40°C에서 균체증식 및 enzyme activity가 가장 우수하였고 35~45°C 범위에서 90% 이상의 효소활성을 보였다. 이는 30°C에서 효소활성이 가장 우수했다는 *Streptomyces* 속 균을 사용한 Brigitle 등[1]과 50°C의 Young과 Smith [22]의 보고와는 상이하였으며 같은 *Streptomyces* 속을 이용한 Kim [9]과의 보고와는 잘 일치하였다. 그리고 같은 *Bacillus* 속을 이용한 Kang 등[8]의 결과와도 잘 일치하였다.

초기 pH의 영향

본 균주의 초기 pH에 따른 균체증식과 효소활성을 조사하기 위하여 기본배지에 pH 3.5에서 pH 10까지 조절 한 후 48시간 배양하여 pH에 따른 균체량과 효소활성을 측정하였다. 결과는 Fig. 6과 같이 pH 8.5에서 가장 효소활성이 우수하였으며, pH 8.0에서 균체생산이 가장 많았다. 또한 pH 6.5에서부터 pH 9.0까지의 넓은 범위에 걸쳐 균체생산과 효소활성이 우수하였다. 이는 pH 9.0에서 가장 높은 효소 활성을 보였다는 Suntornsuk 등[18], Kim [9] 및 Giongo 등[5]과 유사하였으나 pH 7.5에서 최고 활성을 나타냈다는 Lee 등[11]과는 약간 상이하였다.

배양 시간의 영향

본 균주의 배양 시간에 따른 keratinase 생산에 대한 영향을 조사하기 위하여 지금까지 조사된 효소 생산 최적 조건인 탄소원으로 chicken feather 2%, 질소원으로 beef extract

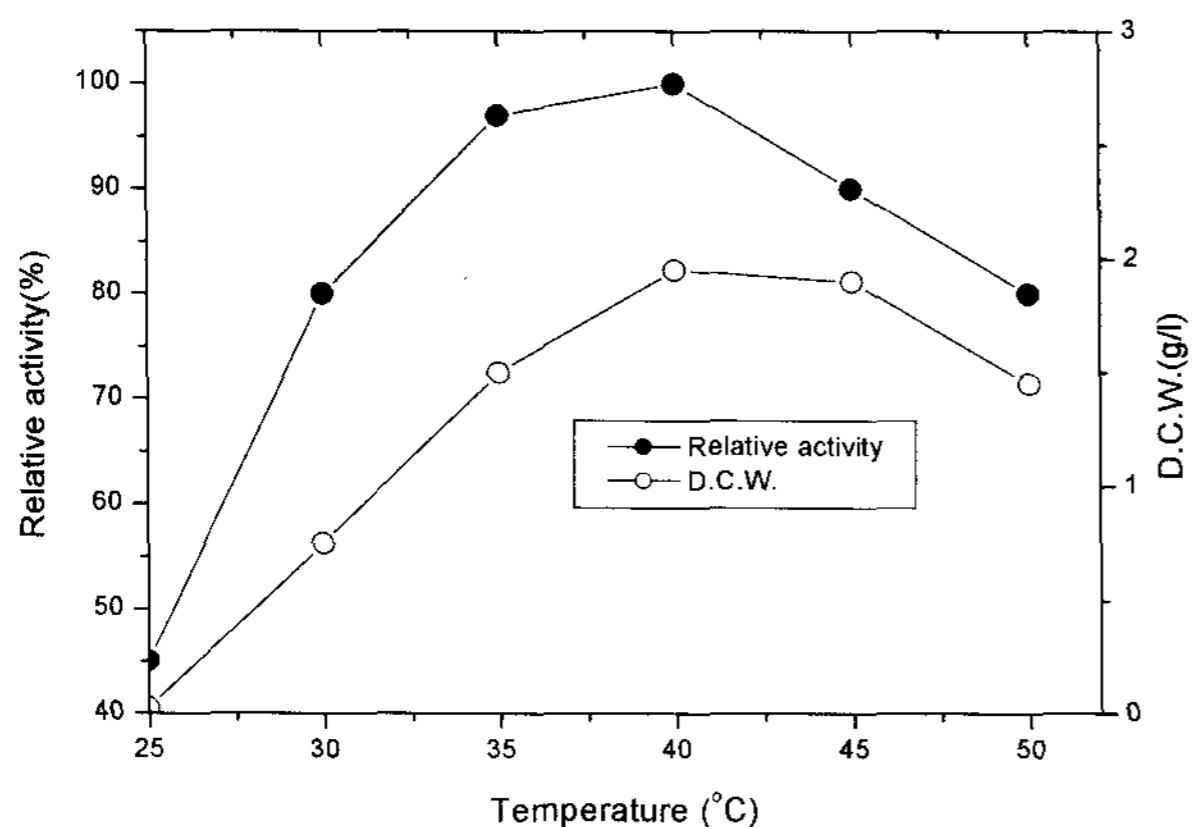


Fig. 5. Effect of temperature on the production of the keratinase produced by *Bacillus* sp. SH-517. Cultivation was carried out for 48 hr at each temperature with shaking culture (180 rpm/min) in the 2nd isolation medium containing 2.0% feather, 0.5% beef extract, 0.5% KNO₃, 0.06% KCl, 0.05% NaCl, 0.04% KH₂PO₄, 0.03% K₂HPO₄ and 0.01% yeast extract (pH 7.0).

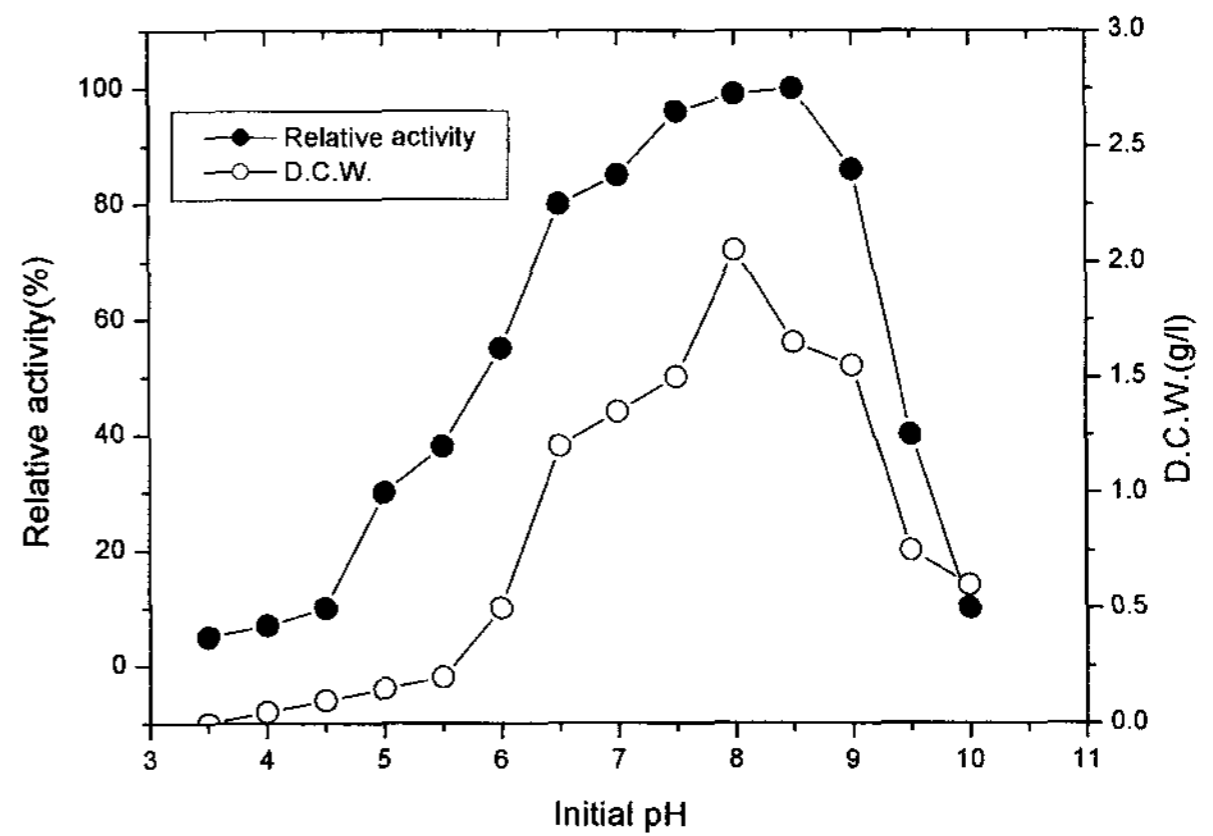


Fig. 6. Effect of initial pH on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. SH-517. Cultivation was carried out for 48 hr at 37°C in each pH with shaking culture (180 rpm/min) in the 2nd isolation medium containing 2.0% feather, 0.5% beef extract, 0.5% KNO₃, 0.06% KCl, 0.05% NaCl, 0.04% KH₂PO₄, 0.03% K₂HPO₄ and 0.01% yeast extract.

0.5%, KNO₃ 0.5%, 금속염으로 KCl 0.06%, NaCl 0.05%, KH₂PO₄ 0.04%, K₂HPO₄ 0.03% 및 생육인자인 yeast extract 0.01%를 첨가한 효소생산 배지에 전배양한 종균을 1% (v/v) 되게 접종한 후 pH 8.5, 40°C에서 배양하여 6시간 간격으로 균주의 성장과 효소활성을 조사하였다. 결과는 Fig. 7과 같이 접종 후 18시간 후부터 효소활성이 급격하게 증가하여 42시간에서 가장 높은 효소활성을 보였으며 균체증식은 24시간부터 일정하게 나타났다. 이는 Williams 등[21], Yu 등[23] 및 Kang 등[8]의 5일보다 효소생산 시간이 매우 빠름을 알 수 있었다. 현재 산업적으로 미생물이 생산하는 keratinase의 실

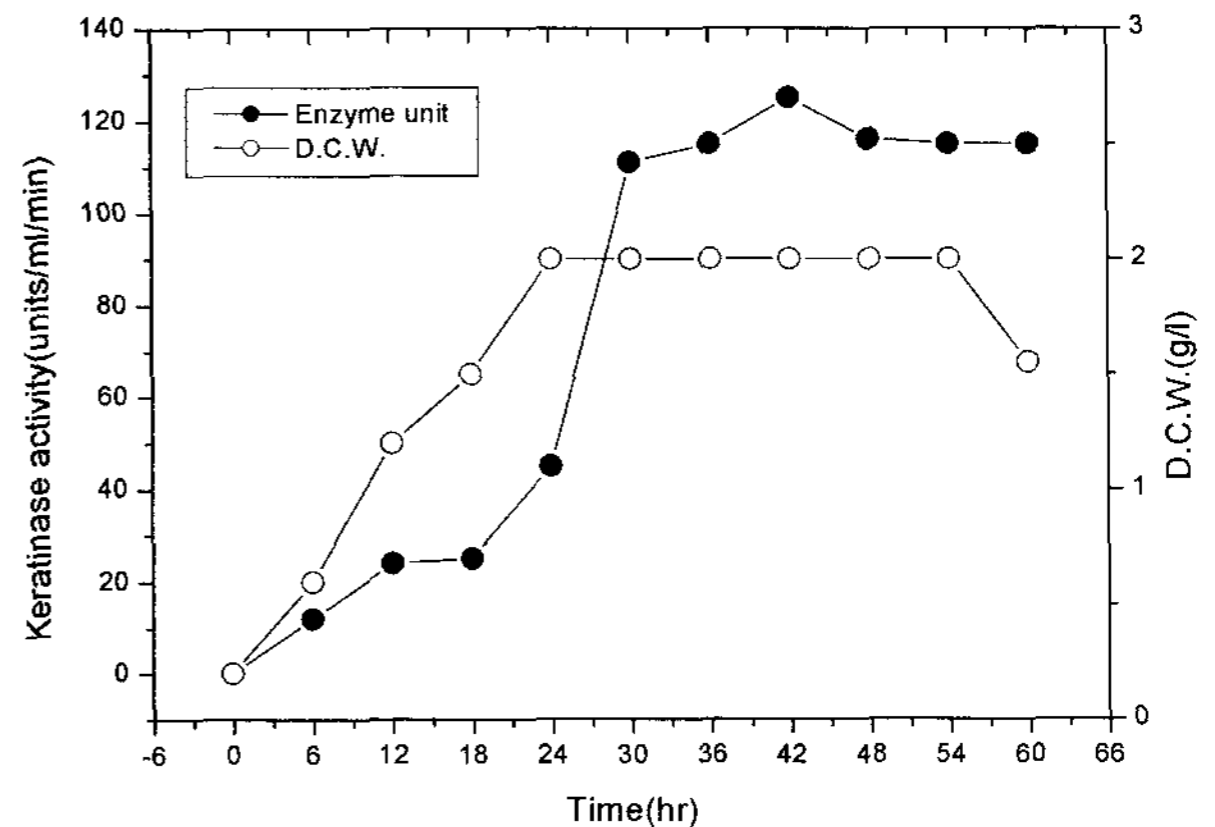


Fig. 7. Effect of culture time on the production of the keratinase by *Bacillus* sp. SH-517. Cultivation was carried out at 40°C for each given time with shaking culture (180 rpm/min) in the 2nd isolation medium containing 2.0% feather, 0.5% beef extract, 0.5% KNO₃, 0.06% KCl, 0.05% NaCl, 0.04% KH₂PO₄, 0.03% K₂HPO₄ and 0.01% yeast extract (pH 8.5).

용화가 활발하지 않은 것 중에 가장 큰 이유는 chicken feather의 분해를 위하여 많은 시간을 요구하기 때문인데 *Bacillus* sp. SH-517의 경우 산업적 이용의 가능성이 매우 높은 것으로 사료된다.

요 약

경기도와 충청도 일대의 가금류 처리공장과 폐기물 처리장 부근 토양으로부터 protease 활성이 높은 균주를 분리한 후 그 중 keratinase 활성이 높은 1균주를 최종 선별하여 동정하고 효소생산을 위한 최적 배양조건을 검토한 결과는 다음과 같다. 선별된 균주는 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과 *Bacillus* 속으로 판명되었으며, 편의상 *Bacillus* sp. SH-517로 명명하여 사용하였다. *Bacillus* sp. SH-517에 의한 keratinase 생성 최적 조건을 검토하였는데, 최적 배지 조성은 탄소원으로 chicken feather 2.0%, 유기질소원으로 beef extract 0.5%, 무기질소원으로 KNO₃ 0.5%, 무기염으로 KCl 0.06%, NaCl 0.05%, KH₂PO₄ 0.04%, K₂HPO₄ 0.03%이었고 그리고 생육인자로 yeast extract 0.01%이었다. 진탕배양 시 (180 rpm/min), 최적 온도와 배지의 pH는 각각 40°C, 8.5로 나타났으며, 위와 같은 최적 조건 하에서 keratinase의 최대 활성은 42시간 만에 125 units/ml/min이었다.

References

- Brigitte, B., G. Boris and M. Rudolf. 1995. Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3705-3710.
- 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. Biotechnol. Biochem.* **59**, 2239-2243.
- Chon, D. H. and T. J. Kwon. 2000. Isolation of keratinolytic protease producing microorganism and its cultivation condition. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 134-141.
- Farag, A. M. and M. A. Hassan. 2004. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technol.* **34**, 85-93.
- Giongo, J. L., F. S. Lucas, F. Casarin, P. Heeb and A. Brandelli. 2007. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 375-382.
- Gupta, R. and P. Ramnani. 2006. Microbial keratinases and their prospective applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 21-33.
- Kaluzewska, M., K. Wawrzkiwicz and J. Lobarzewski. 1991. Microscopic examination of keratin substrates subjected to the action of the enzyme of *Streptomyces fradiae*. *Int. Biodeterior.* **27**, 11-26.
- Kang, H. J., 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.
- 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.
- Latshaw, J. D., N. Musharaf and R. Retrum. 1994. Processing of feather to maximize its nutritional value for poultry. *Animal Feed Sci. Technol.* **47**, 179-188.
- Lee, Y. J., J. H. Kim and J. S. Lee. 2004. Production and characterization of keratinase from *Paracoccus* sp. WJ-98. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **9**, 17-22.
- Lin, X., C. G. Lee, S. C. Ellen 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.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Rabdall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193-265.
- Page, W. J. and J. J. Stock. 1974. Phosphate-mediated alteration of the *Miceosporum gypseum* germination protease specificity for substrate enhanced keratinase activity. *J. Bacteriol.* **117**, 422-431.
- Peter, H. A. S., S. M. Nicholas, E. M. Sharpe and J. G. Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. pp. 1122-1123, Williams & Wilkins.
- Kim, J. C., M. J. Kim, H. S. Son, E. Y. Ryu, S. Y. Jeong, M. A. Kim, G. T. Park, H. J. Son and S. J. Lee. 2007. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium for recycling of keratinous protein waste. *J. Environ. Sci.* **16**, 1337-1343.
- Rosa, S. P., F. Bicca, P. C. Santos, S. K. Ferrao, H. Dewes, C. C. Gaylarde, C. Temignoni and R. W. S. P. Thomas. 1996. Digestion of keratin by *Pseudomonas* sp. *Int. Biodeter. Biodeg.* **37**, 121-125.
- Suntornsuk, W. and L. Suntornsuk. 2003. Feather degradation by *Bacillus* sp. FK-46 in submerged cultivation. *Bioresource Technol.* **86**, 239-243.
- Takami, T., S. Nakamura, R. Aono and K. Horikoshi. 1992. Degradation of human hair by a thermostable alkaline *Bacillus* sp. No. AH-101. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1667-1669.
- Vignardet, C. G., J. Friedrich and J. A. Millet. 1999. First order experiment design to assess soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyces microsporus* on human substrate. *Int. J. Pharm.* **191**, 95-102.
- Williams, C. M., C. S. Richter, J. M. Mackenzie and C. H. S. Jason. 1990. Isolation, Identification and Characterization of a Feather Degrading Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1509-1515.
- Young, R. A. and R. E. Smith. 1975. Degradation of feather keratin by culture filtrates of *Streptomyces fradiae*. *Can. J. Microbiol.* **21**, 583-586.
- Yu, R. J., S. R. Harmon and F. Blank. 1968. Isolation of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Bacteriol.* **96**, 1435-1436.
- Yu, R. J., S. R. Harmon and F. Blank. 1969. Hair digestion by a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Invest. Dermatol.* **53**, 166-171.