

ORIGINAL ARTICLE

가금폐기물 처리를 위한 세균유래 케라틴 분해효소의 특성

고태훈 · 이상미 · 조광식 · 이예람 · 박수연 · 장은영 · 정성윤¹⁾ · 손흥주*

부산대학교 생명자원과학대학 및 생명산업융합연구원

¹⁾대구가톨릭대 의생명과학과

Characteristics of Bacteria-Originated Keratinase for Feather Waste Treatment

Tae-Hun Go, Sang-Mee Lee, Kwang-Sik Cho, Ye-Ram Lee, Soo-Yun Park,

Eun-Young Jang, Seong-Yun Jeong¹⁾, Hong-Joo Son*

College of Natural Resources & Life Science, Life and Industry Convergence Institute, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

¹⁾Department of Medical Life Science, Catholic University of Daegu, Daegu 712-784, Korea

Abstract

Keratin wastes are generated in excess of million tons per year worldwide and biodegradation of keratin by microorganisms possessing keratinase activity can be used as an alternative tool to prevent environmental pollution. For practical use of keratinase, its physicochemical properties should be investigated in detail. In this study, we investigated characteristics of keratinase produced by *Xanthomonas* sp. P5 which is isolated from rhizospheric soil of soybean. The level of keratinase produced by the strain P5 increased with time and reached its maximum (10.6 U/ml) at 3 days. The production of soluble protein had the same tendency as the production of keratinase. Optimal temperature and pH of keratinase were 40°C-45°C and pH 9, respectively. The enzyme showed broad temperature and pH stabilities. Thermostability profile showed that the enzyme retained 94.6%-100% of the original activity after 1 h treatment at 10°C-40°C. After treatment for 1 h at pH 6-10, 89.2%-100% of the activity was remained. At pH 11, 71.6% of the original activity was retained after 1 h treatment. Although the strain P5 did not degrade human hair, it degraded duck feather and chicken feather. These results indicate that keratinase from *Xanthomonas* sp. P5 could be not only used to upgrade the nutritional value of feather hydrolysate but also useful in situ biodegradation of feather.

Key words : Feather, Keratin, Keratinase, *Xanthomonas* sp.

1. 서론

케라틴(keratin)은 영양적으로 가치가 있지만 널리

이용되지 않는 동물성 단백질로서, 피부, 뿔 및 헤어의 섬유상 구성성분이며, 도축 및 도계산업에서 대량으로 폐기되고 있다(Kornilowicz-Kowalska와 Bohacz, 2011).

Received 28 February, 2014; Revised 9 May, 2014;

Accepted 21 May, 2014

*Corresponding author: Hong-Joo Son, College of Natural Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

Phone: +82-55-350-5544

E-mail: shjoo@pusan.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

케라틴은 그 구조 속에 이황화결합을 많이 포함하고 있으므로 물에 녹지 않는 특성을 가지고 있으며, 일반적인 단백질 분해효소에 의해 분해되지 않는다(Onifade 등, 1998).

현재, 케라틴 폐기물은 소각처리하거나 화학적 방법에 의하여 케라틴을 분해한 후, 그 분해산물을 가축의 사료첨가물로 재활용하고 있다. 화학적 처리를 통하여 생성된 케라틴 분해산물은 질소, 지방 등의 함량은 높으나 가축이 많이 요구하는 lysine, methionine과 같은 아미노산의 함량은 낮으며, 동시에 소화율이 낮은 단점을 가지고 있다(Papadoulos와 Ketelaars, 1986). 또한 에너지 비용이 많이 소요되고, 악취 등의 환경문제를 초래하기도 한다(da Rosa Gioppo 등 2009). 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 새로운 처리방법이 필요하게 되었으며, 최근 들어 미생물에 의한 케라틴 분해법이 상기의 문제점들을 해결할 수 있는 환경친화적인 대안으로서 활발히 연구되고 있다. 미생물학적 케라틴 처리법은 케라틴 분해효소(keratinase)를 생성하는 미생물을 분리하는 것부터 시작되는데, *Bacillus* spp., 방선균, 균류 등 다양한 미생물이 자연환경에서 분리되어 효소생산 특성과 이들 미생물에 의하여 처리된 케라틴 분해산물의 영양적 가치에 대하여 보고된 바 있다(Bertsch와 Coello, 2005; Brandelli 등, 2010). 이 외에도 케라틴 분해효소는 폐수 처리장의 단백질성 유기물 제거, 직물의 품질 개선, 가죽의 제모, 각질 제거용 화장품, 프리온 분해 등에 활용 가능성이 보고(Gupta와 Ramnani, 2006; Langeveld 등, 2003; Onifade 등, 1998)되었으며, 새로운 응용분야를 개척하기 위하여 케라틴 분해효소의 활성과 함께 식물성장촉진 활성이나 항진균 활성과 같은 독특한 성질을 동시에 보유한 균주를 분리하기 위한 연구도 시작되고 있다(Jeong 등, 2010).

한편, 적은 비용으로 단백질을 분해하기 위해서는 정제효소를 사용하는 것보다 조효소를 사용하는 것이 훨씬 유리하며, 조효소가 정제효소보다 안정성이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 실제 조효소 상태의 제품이 대량의 단백질을 처리하기 위한 효소 제제로 시판되고 있다. 또한 케라틴 분해효소의 특성은 균주 특이적이므로 각 균주가 생성한 효소의 물리화학적 특성을 조사하는 것은 효율적인 효소 적용을 위해서 반드시 선행되어야 할 연구이다.

본 저자들은 이전에 식물성장촉진 활성(항진균 활성, siderophore 생성능, indoleacetic acid 생성능)과 케라틴 분해효소 활성을 동시에 가지는 새로운 균주 *Xanthomonas* sp. P5를 분리하여 그 특성에 대하여 조사한 후, 이 균주의 케라틴 처리제제 및 생물비료 제제로서의 가능성을 보고하였다(Jeong 등, 2010). 따라서 본 연구에서는 이 균주가 생성한 케라틴 분해효소의 물리화학적 특성과 기질 특이성을 검토함으로써 실제 효소 적용에 필요한 기초자료를 획득하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 균주는 콩의 근권토양에서 분리된 *Xanthomonas* sp. P5이었다(Jeong 등, 2010). 케라틴 분해효소 생산에 이용된 배지의 조성은 K_2HPO_4 0.03%, KH_2PO_4 0.04%, yeast extract 0.01% (pH 7)이었으며, 탄소원 및 질소원으로 우모 케라틴(feather keratin)을 0.1% 첨가하였다 (Jeong 등, 2010). 영양배지(nutrient broth)를 이용하여 30°C, 200 rpm에서 24 시간동안 배양된 전배양액 2% (v/v)를 50 ml의 생산배지가 함유된 250-ml 용량의 삼각플라스크에 접종한 후, 전배양과 동일한 조건에서 배양하였다.

2.2. 케라틴 분해효소의 물리화학적 특성 조사

배양액을 4°C, 10000×g에서 원심분리하여 세포를 제거한 후, 여액을 물리화학적 특성 조사를 위한 조효소액으로 사용하였다. 케라틴 분해효소의 최적 활성 pH는 pH 3-11의 0.1M 완충액을 이용하여 조사하였다. 이 때 사용된 완충액은 pH 3-6 (sodium acetate 및 sodium citrate), pH 6-8 (potassium phosphate), pH 7-9 (Tris-HCl), pH 9-11 (glycine-NaOH, sodium bicarbonate-NaOH)이었다. 케라틴 분해효소의 최적 활성 온도는 20°C-70°C에서 조사하였다. pH 안정성을 조사하기 위해 pH 3-11의 완충액에 효소를 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 또한 온도 안정성을 조사하기 위해 10°C-100°C 범위에서 1시간동안 반응시켰다. 케라틴 분해효소 활성은 아래의 분석방법에 준하여 측정하였다.

실험균주가 생성한 케라틴 분해효소의 기질특이성을 조사하기 위하여 케라틴으로 구성되어있는 닭우모, 오리

우모, 사람의 손발톱과 모발을 분해기질로 선정하였다. 사람의 손발톱은 분쇄기로 파쇄하여 사용하였다. 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 9)에 각 기질 0.1% 및 10 U/ml의 효소액 1 ml를 첨가하여 30°C, 200 rpm에서 6시간동안 반응시킨 후, 각 케라틴의 분해율을 측정하였다.

2.3. 분석방법

케라틴 분해효소의 활성은 다음과 같이 측정하였다. 조효소액 400 µl를 0.01 g 우모 케라틴이 함유된 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) 600 µl에 첨가하여 30°C, 1300 rpm에서 3시간동안 반응시켰다. 5% trichloroacetic acid를 첨가하여 효소 활성을 정지시킨 후, 10000×g, 20°C에서 30분간 원심분리하였다. 280 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하여 효소 활성을 측정하였다. 케라틴 분해효소의 활성 1 unit는 시간당 0.01의 흡광도 증가를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다(Wawrikiewicz 등, 1987).

실험균주의 생육도는 배양액 내에 잔존하는 미분해 우모 케라틴을 Whatman no.1 여과지를 이용하여 제거한 후, 여액의 흡광도를 660 nm에서 측정함으로써 확인하였다. 배양액의 단백질 농도는 Bradford법(Bradford, 1976)을 이용하여 측정하였으며, 표준물질로는 bovine serum albumin을 사용하였다. 케라틴의 분해율은 케라틴의 건조무게 감소량을 측정 후, 백분율(%)로 나타내었다. 다른 언급이 없는 한, 모든 실험은 세 번 반복하였으며, 결과는 평균값으로 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 케라틴 분해효소의 생산

효소생산 배지에 실험균주를 접종하여 배양시간 경과에 따른 케라틴 분해효소의 활성, 균체 생육도 및 단백질 농도를 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 균체 생육도는 배양 4일까지 시간에 비례하여 증가하다가 정지기에 도달하였으며, 케라틴 분해효소의 활성과 가용성 단백질의 농도는 배양 3일까지 서로 비례하여 지속적으로 증가하였다. 배양 3일 경, 케라틴 분해효소의 활성은 10.6 U/ml이었다. Onifade 등(1998)의 보고에 따르면 우모 케라틴이 분해됨에 따라 그 분해산물인 가용성 단백질의 농도는 증가하고, 결과적으로 케라틴 분해효소의

활성과 가용성 단백질의 농도는 비례관계에 있다고 하였다. 이후 실험은 3일 동안 배양한 배양액을 이용하여 수행하였다.

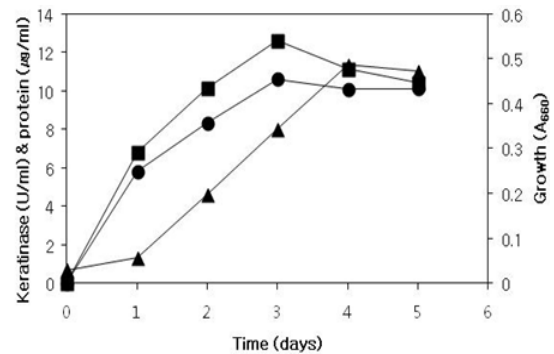


Fig. 1. Time courses of keratinase, protein and cell growth in a production medium. ● keratinase, ■ protein, ▲ growth.

3.2. 케라틴 분해효소 활성에 대한 온도 및 pH의 영향

실험균주가 생성한 케라틴 분해효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 전형적인 종 모양의 온도곡선을 나타내었다. 본 효소는 35°C-50°C 범위에서 77.1%-100%의 활성을 나타내었으며, 그중 40°C-45°C에서 최대 활성을 나타내었다. 또한 50°C 및 60°C에서도 여전히 62% 및 31.4%의 활성을 나타내었다. 본 연구결과는 대부분의 세균유래 케라틴 분해효소는 50°C 이상에서 최적 활성을 나타낸다는 다음의 보고와 다소 상이하였다. 즉 *Bacillus licheniformis*

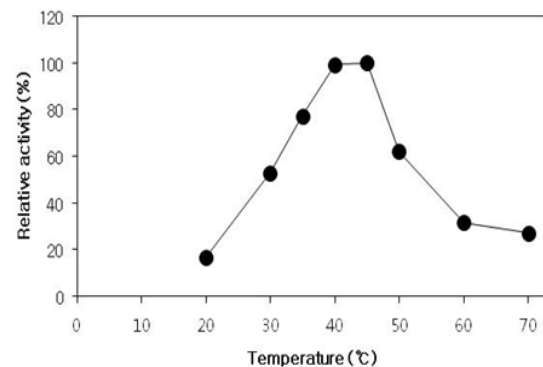


Fig. 2. Effect of temperature on keratinase produced by *Xanthomonas* sp. P5.

PWD-1은 50°C에서, *B. pumilius*는 60°C에서, *Streptomyces pactum* DSM40530은 65°C에서 최적 활성을 나타낸다고 하였다(Bockle 등, 1995; Han과 Damodaran, 1998; Lin 등, 1992). 낮은 온도에서 최적 활성을 가지는 케라틴 분해효소는 반응 중에 소비되는 에너지를 절약할 수 있다는 장점을 가지는데(Sangali와 Brandelli, 2000), 이러한 측면에서 본 실험균주는 상기 균주들보다 비교 우위에 있을 것으로 판단된다.

실험균주가 생성한 케라틴 분해효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 본 효소는 pH 7-11에서 58.8%-100%의 활성을 나타내었으며, 그중 pH 9에서 최대 활성을 나타내었다. pH 3에서는 활성을 나타내지 않았으며, pH 4-6.5의 산성 영역에서는 7.4%-34.3%의 낮은 활성을 나타낸 반면 pH 10-11의 강알칼리성 영역에서는 최소 55.2%-68.8%의 높은 활성을 나타내었다. 지금까지 보고된 대부분의 미생물유래 케라틴 분해효소는 pH 7.5-9에서 최적 활성을 나타내는 neutral 또는 alkaline protease인 것으로 알려져 있다. 예를 들면, *B. licheniformis* PWD-1은 pH 7.5에서, *S. pactum* DSM40530은 pH 8에서, *Streptomyces* sp. BA7은 pH 8.5에서, *B. licheniformis* RPK는 pH 9에서 최적 활성을 가진다(Bockle 등, 1995; Fakhfakh 등, 2009; Korkmaz 등, 2003; Lin 등, 1992). 그러나 *B. subtilis* 및 *B. pumilus*가 생성한 keratinase는 각각 pH 6 및 pH 10의 약산성 및 강알칼리성에서 최적 활성을 나타내었다(Balaji 등, 2008; Han과 Damodaran, 1998). 한편, 케라틴 분해효소는 피혁공장의 제모공정에서 그 응용 가능성이 보고된 바 있는데, 이 공정은 pH 8-9에서

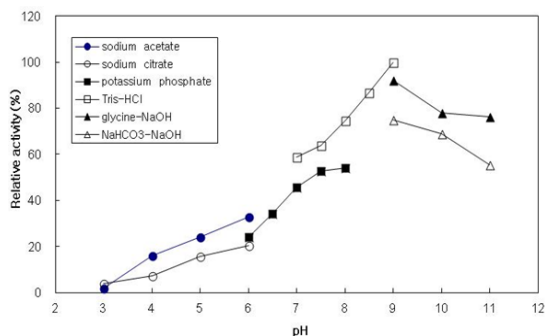


Fig. 3. Effect of pH on keratinase produced by *Xanthomonas* sp. P5.

진행되므로 이 범위의 pH에서 최적 활성을 가지는 효소는 사용 가능성이 매우 크다고 하였다(Mocedo 등, 2008).

3.3. 케라틴 분해효소의 온도 및 pH 안정성

실험균주가 생성한 케라틴 분해효소의 온도 안정성을 조사한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 10°C-40°C에서 1시간 동안 처리시, 94.6%-100%의 활성이 유지되었으며, 50°C에서 처리시에도 46.9%의 잔존 활성을 나타내었다. 그러나 70°C 이상에서는 거의 실패하였다. 미생물 케라틴 분해효소는 비교적 넓은 온도 범위에서 효소 활성을 유지하는 것으로 보고되었다(Gupta와 Ramnani, 2006). 예를 들면, *Streptomyces* sp.가 생성한 케라틴 분해효소는 50°C에서 1시간 처리시에 80%의 잔존 활성을 나타내어 본 실험균주보다 온도 안정성이 뛰어났다(Tatineni 등, 2008).

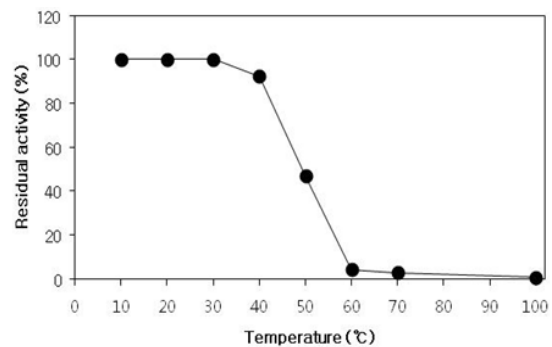


Fig. 4. Thermal stability of keratinase produced by *Xanthomonas* sp. P5.

실험균주가 생성한 케라틴 분해효소의 pH 안정성을 조사한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 본 효소는 pH 6-10에서 1시간 동안 처리시에도 최대 89.2%-100%의 활성이 유지되었으며, pH 11에서도 최대 71.6%의 활성이 유지되었다. 일반적으로 미생물 케라틴 분해효소는 pH 5-11에서 안정한 것으로 알려져 있어 본 연구결과와 비슷하였다(Gupta와 Ramnani, 2006). *B. pumilius*가 생성한 케라틴 분해효소는 pH 11에서 2시간 처리시에도 40%의 활성이 남아있다고 하였다(Han과 Damodaran, 1998). 그러나 예외적으로 *S. pactum* DSM40530이 생성한 케라틴 분해효소는 pH 4에서도 안정한데, 이것은

지금까지 알려진 가장 낮은 pH에서 안정한 케라틴 분해 효소이다(Bockle 등, 1995). 한편, 산성 영역에서는 사용 완충액의 종류에 따라 활성의 변화가 컸는데 완충액에 함유되어 있는 성분이 효소 활성에 영향을 미친 것으로 판단되었으며, 효소의 보존시 완충액의 선정도 중요한 인자임을 알 수 있었다.

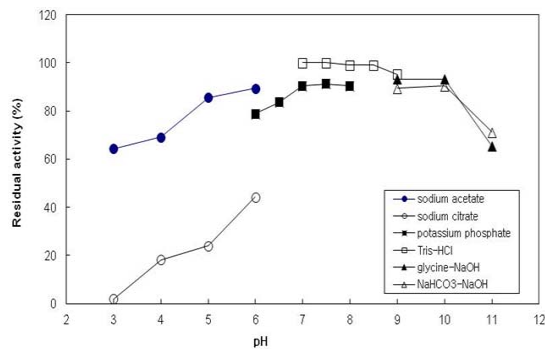


Fig. 5. pH stability of keratinase produced by *Xanthomonas* sp. P5.

3.4. 케라틴 분해효소의 기질특이성

실험균주가 생성한 케라틴 분해효소에 의하여 분해가 가능한 기질의 종류를 조사한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 본 효소는 닭우모, 오리우모 및 사람의 손발톱을 각각 43.6%, 55.4% 및 24.3% 분해하였으나 사람의 모발은 거의 분해할 수 없었다. 닭 우모를 케라틴 분해효소 생성세균으로 처리했을 경우, 우모 분해산물의 영양적 가치와 소화율은 화학적 처리를 거친 분해산물보다 우수

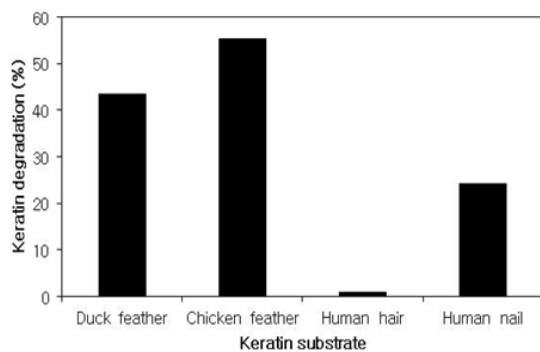


Fig. 6. Substrate specificity of keratinase produced by *Xanthomonas* sp. P5.

한 것으로 보고되어있다(Brandelli, 2008). 따라서 실험 균주가 생성한 케라틴 분해효소는 우모 분해산물의 영양적 가치 개선뿐만 아니라 다른 케라틴 폐기물의 처리에도 활용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

4. 결론

전세계적으로 대량 발생되고 있는 케라틴 폐기물을 환경친화적으로 처리하기 위하여 케라틴 분해효소를 생산하는 미생물이 대안으로 대두되고 있다. 다양한 목적으로 케라틴 분해효소를 이용하기 위해서는 효소의 물리 화학적 특성을 조사하는 것이 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 콩의 근권토양에서 분리된 *Xanthomonas* sp. P5가 생산한 케라틴 분해효소의 특성을 조사하였다. 본 균주에 의한 케라틴 분해효소의 생산은 시간 경과에 따라 증가하여 배양 3일 경, 최대 10.6 U/ml의 케라틴 분해효소가 생산되었다. 가용성 단백질의 생산 패턴은 케라틴 분해효소의 생산 패턴과 동일하였다. 케라틴 분해효소는 40°C-45°C 및 pH 9에서 최대 활성을 나타내었다. 케라틴 분해효소는 넓은 온도 및 pH 안정성을 나타내었다. 즉, 10°C-40°C에서 1시간 동안 처리했을 때, 94.6%-100%의 활성이 유지되었다. 또한 pH 6-10에서 1시간 동안 처리시, 최대 89.2%-100%의 활성이 유지되었고, pH 11에서도 최대 71.6%의 활성이 유지되었다. P5 균주는 사람의 모발은 분해하지 못하였지만 오리 및 닭의 우모는 충분히 분해할 수 있었다. 따라서 *Xanthomonas* sp. P5가 생성한 케라틴 분해효소는 우모의 현장 분해나 우모 분해산물의 영양성분을 개선하는데 활용 가능성이 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업입니다(No. 2010-0023046).

참고문헌

Balaji, S., Kumar, M. S., Karthikeyan, R., 2008, Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus*

- subtilis* MTCC (9102), World J. Microbiol. Biotechnol., 24, 2741-2745.
- Bertsch, A., Coello, N., 2005, A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient, Bioresour. Technol., 96, 1703-1708.
- Bockle, B., Galunsky, B., Muller, R., 1995, Characterization of keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM40530, Appl. Environ. Microbiol., 61, 3705 - 3710.
- Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., 72, 248-254.
- Brandelli, A., Daroit, D. J., Riffel, A., 2010, Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications, Appl. Microbiol. Biotechnol., 85, 1735-1750.
- Brandelli, A., 2008, Bacterial keratinase: useful enzyme for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond, Food Bioprocess Technol., 1, 105-106.
- da Rosa Gioppo, N. M., Moreira-Gasparin, F. G., Costa, A. M., Alexandrino, A. M., de Souza, C. G. M., Peralta, R. M., 2009, Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 36, 705-711.
- Fakhfakh, N., Kanoun, S., Manni, L., Nasri, M., 2009, Production and biochemical and molecular characterization of a keratinolytic serine protease from chicken feather-degrading *Bacillus licheniformis* RPK, Can. J. Microbiol., 55, 427-436.
- Gupta, R., Ramnani, P., 2006, Microbial keratinases and their prospective applications: an overview, Appl. Microbiol. Biotechnol., 70, 21-33.
- Han, X. Q., Damodaran, S., 1998, Purification and characterization of protease Q: a detergent- and urea-stable serine endopeptidase from *Bacillus pumilus*, J. Agric. Food Chem., 46, 3596 - 3603.
- Jeong, J. H., Park, K. H., Oh, D. J., Hwang, D. Y., Kim, H. S., Lee, C. Y., Son, H. H., 2010, Keratinolytic enzyme-mediated biodegradation of recalcitrant feather by a newly isolated *Xanthomonas* sp. P5, Polym. Degrad. Stab., 95, 1969-1977.
- Korkmaz, H., Unaldi, M. N., Aslan, B., Coral, G., Arıkan, B., Colak, O., 2003, Keratinolytic activity of *Streptomyces* strain BA7, a new isolate from Turkey, Annal. Microbiol., 53, 85-93.
- Kornilowicz-Kowalska, T., Bohacz, J., 2011, Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects, Waste Manage., 31, 1689-1701.
- Langeveld, J. P. M., Wang, J. J., Van de Wiel, D. F. M., Shih, G. C., Garssen, G. J., Bossers, A., Shih, J. C. H., 2003, Enzymatic degradation of prion protein in brain stem from infected cattle and sheep, J. Infect. Dis., 188, 1782-1789.
- Lin, X., Lee, C. G., Casale, E. S., Shih, J. C. H., 1992, Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain, Appl. Environ. Microbiol., 58, 3271 - 3275.
- Mocedo, A. J., Da Silva, B. W. O., Termignoni, C., 2008, Properties of a non collagen-degrading *Bacillus subtilis* keratinase, Can. J. Microbiol., 54, 180-188.
- Onifade, A. A., Al-Sane, N. A., Al-Musallam, A. A., Al-Zarban, S., 1998, Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources, Bioresour. Technol., 66, 1-11.
- Papadoulos, M. C., Ketelaars, E. H., 1986, Effects of processing time and moisture content on amino acid composition and nitrogen characteristics of feather meal, Anim. Feed Sci. Technol., 14, 279-290.
- Sangali, S., Brandelli, A., 2000, Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2, J. Appl. Microbiol., 89, 735-743.
- Tatineni, R., Doddapaneni, K. K., Potumarthi, R. C., Vellanki, R. N., Kandathil, M. T., Kolli, N., Mangamoori, L. N., 2008, Purification and characterization of an alkaline keratinase from *Streptomyces* sp., Bioresour. Technol., 99, 1596-1602.
- Wawrzekiewicz, K., Lobarzewski, J., Wolski, T., 1987, Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*, J. Med. Vet. Mycol., 25, 261-268.