

Research Article



CrossMark

Open Access

## 음식물 쓰레기로부터 Protease를 생산하는 *B. amyloliquefaciens* JH-35의 분리 및 특성

유재홍<sup>1</sup>, 주진호<sup>2</sup>, 김성국<sup>3</sup>, 장인환<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부 농업미생물과, <sup>2</sup>강원대학교 농업생명과학대학 바이오자원환경학과, <sup>3</sup>(주)대호중앙연구소

### Isolation and Characterization of Protease Producing *B. amyloliquefaciens* JH-35 from Food Waste

Jae Hong Yoo<sup>1</sup>, Jin Ho Joo<sup>2</sup>, Sung Gug Kim<sup>3</sup> and In-Hwan Jang<sup>3\*</sup> (<sup>1</sup>Agricultural Microbiology Division, Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea, <sup>2</sup>Department of Biological Environment, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea, <sup>3</sup>Central Research Institute of Daeho CO., Ltd., Hwasung 18628, Korea)

Received: 7 November 2016 / Revised: 14 November 2016 / Accepted: 17 November 2016

Copyright © 2016 The Korean Society of Environmental Agriculture

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.

ORCID

In-Hwan Jang

<http://orcid.org/0000-0002-4697-5095>

#### Abstract

**BACKGROUND:** Recent studies have described the importance of microbes and enzymes that can compost food waste. This study was carried out to improve production of protease of isolated microbes from food waste.

**METHODS AND RESULTS:** Seven bacteria isolated from various sources were screened for protease production by adding skim milk into the agar medium. About 7 microbes producing protease were tested, and strain JH-35 showed the highest protease activity among them. The strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* JH-35 based on morphological, cultural, physiological characteristics and 16S rRNA. In the fermentation experiment, the assay *B. amyloliquefaciens* JH-35 showed the highest protease activity in the condition of 1% glucose, 1.5% yeast extract and 0.2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. The optimal condition of culture with temperature 35°C, initial pH of 7 and shaking speed of 200 rpm and 24 hr.

**CONCLUSION:** The protease of the *B. amyloliquefaciens*

JH-35 had its activity at pH 7 and the optimal culture time was 24 hr. Also, *B. amyloliquefaciens* JH-35 was high salt tolerance. Our results suggest that *B. amyloliquefaciens* JH-35 from food waste may have the potential to degrade protein and carbohydrate in food waste.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*, Biofertilizer, Composting, Food waste, Protease

#### 서론

음식물 쓰레기는 인구증가와 삶의 질 향상으로 인하여 매년 생활폐기물의 증가(Ishii *et al.*, 2000)와 폐기물 해양투기 금지로 인하여 음식물 쓰레기, 가축분뇨와 동물성 폐기물의 재활용에 큰 사회적 문제이다(Kim and Cha, 2001). 음식물 쓰레기는 종량제 쓰레기 봉투를 사용 후 잠시 감소하였다가 다시 증가하게 되어 사회적 문제가 되고 있으며(Cho and Kim, 2004), 음식물 쓰레기의 자원화 방법에는 퇴비화, 사료화, 혹은 혐기성 소화를 통한 유효가스 이용 기술 등이 일반적으로 사용되고 있다. 음식물 쓰레기 비료화 연구는 매립지 확보가 어렵고 매립 시에도 침출수 등 환경문제가 1990년대 초반부터 대두되었으며, 최근 음식물 쓰레기 처리에 있어서 편리성 저해, 자원화에 있어서 최종자원화 생성물의 수요확대 어려움, 처리 및 자원화 공정에 있어서 음폐수, 악취(Kim *et*

\*Corresponding author: In-Hwan Jang  
Phone: +82-31-352-4083; Fax: +82-31-352-4051;  
E-mail: [ilonilon@hanmail.net](mailto:ilonilon@hanmail.net)

*al.*, 2003) 등의 2차 오염이 문제화 되면서 다양한 처리방법이 개발되고 있다(Jung *et al.*, 2000). 그 처리 방법 중에 하나가 미생물 처리에 의한 호기성 퇴비화이며, 유기성 폐기물을 안정한 물질로 전환하여 비료처럼 사용하는 생물학적 전환 시스템이다. 음식물 쓰레기 퇴비화 공정의 유기물 분해는 미생물에 의해서 주도적으로 진행되며(Suh *et al.*, 2001), 분해효율은 미생물의 종류에 따라 다르게 나타난다(Haruta *et al.*, 2005). 따라서 유기물 분해효율, 즉 퇴비화를 촉진시키기 위해서는 protease, amylase 및 cellulase 등의 효소분비를 하는 미생물을 사용하는 방법이 효율적이다(Hong *et al.*, 2003). 미생물은 세포외부에 존재하는 고분자성의 단백질을 세포 내로 흡수하기 위하여 protease를 분비하여 저분자 아미노산으로 분해한다. 이러한 단백질의 분해작용은 protease 분비효과가 없는 미생물이 열량원 이외에 질소원까지 이용할 수 있게 되어, amylase나 lipase 등과는 다른 측면에서 큰 의미를 가지게 된다(Kim *et al.*, 2002). 이와 같이 protease 생산성이 우수한 균주를 분리하기 위해서 구 등이(2005) 음식물 쓰레기 중의 단백질을 효과적으로 분해하기 위해 protease를 분비하는 *Bacillus* 속 미생물을 분리하였고, 토양으로부터 분리한 *Bacillus* sp. DK1122 (Lee *et al.*, 2016), *B. subtilis* FBL-1 (Kim *et al.*, 2016) 및 *Bacillus* sp. WRD-2 (Ok *et al.*, 2001), 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp. JK-1 (Kim, 2007)와 *B. amyloliquefaciens* (Lee *et al.*, 2015), 재래식 된장에서 분리한 *B. licheniformis* (Bae and Yoon, 2012), 해수에서 분리한 *Pseudoaltermonas donghaensis* HJ51 (Oh *et al.*, 2015)와 *Micrococcus* sp. PS-1 (Jin *et al.*, 2013) 등의 많은 연구가 이루어지고 있다. 음식물 쓰레기의 퇴비화는 초기 pH가 급격히 감소하다가 후반기에는 질소 화합물의 분해가 주를 이루어 진행되기 때문에 pH가 8-11까지 지속적으로 상승(Suler and Finstein, 1977)하게 되는 과정에서 *Bacillus* 속 미생물은 모두 관여하는 것으로 보고 되었다(Shin *et al.*, 2009).

본 연구에서는 음식물 쓰레기 퇴비화에 미생물을 사용하기 위하여 음식물 쓰레기 및 여러 자원으로부터 protease 생산성이 높은 미생물을 분리하였고, 이들 중에서 바실러스 균주를 분리하여 동정하였으며, 염내성 농도, protease 생산성을 증대시키기 위한 배양배지와 배양조건을 조사하여 미생물 첨가제를 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주의 분리원

음식물 쓰레기의 비료화에 적합한 미생물을 분리하기 위하여 경기도 화성을 중심으로 한 음식물 쓰레기(한식), 우분, 계분, 돈분, 산토양, 논토양, 주유소 주변토양, 태안반도 갯벌 토양 및 바닷물에서 100점의 시료를 채취하여 균주의 분리 시험에 사용하였다.

### 균주의 분리 및 선별

음식물 쓰레기의 비료화에 적합한 단백질 분해력이 우수

한 바실러스 속 세균을 분리하기 위하여, 각 시료를 드라이 오븐에서 80°C에서 30분간 열처리를 하였으며, 생리식염수에 희석한 후 상정액을 분리용 배지(1% glucose, 0.5% yeast extract, 0.1% peptone, 2% skim milk, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.02%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.5% agar)에 도말 하여 35°C에서 3일간 배양한 후, colony 주변에 생성된 투명환의 크기가 1 cm 이상인 것을 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주를 NB (nutrient broth)를 이용하여 35°C에서 150 rpm, 24시간 배양한 후, 배양액의 protease 활성을 측정하여 가장 우수한 균주를 최종 선별하였다(Kim *et al.*, 2002).

### 분리 미생물의 동정 및 특성

분리 미생물을 동정하기 위하여 세균으로부터 genomic DNA는 genomic DNA prep kit (Sol Gent Co.)을 사용하여 구입회사에서 제시한 방법에 준하여 수행하였으며, PCR을 통한 16S rDNA 결과 분석은 NCBI의 BLAST와 database의 염기서열의 상동성을 조사하였다. 또한 분리 균주의 특성을 파악하기 위하여 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성을 조사하였다.

### Protease 활성 분석

Protease의 활성 측정은 Hull 방법(Hull, 1974)에 따라 수행하였다. 시험에 사용할 효소액은 배양액을 10,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 상등액을 효소분석에 사용하였다. 기질 용액은 50 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7)에 기질인 casein을 0.6% (w/v) 첨가하여 사용하였다. 반응방법으로는 5 mL의 기질용액에 상등액 0.5 mL를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 0.4 M trichloroacetic acid를 5 mL 첨가하여 30°C에서 20분간 방치시켜 반응 종결 후, 여과하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성 단위는 1분 동안에 1 μg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

### 최적 배양조건 검정

분리 균주의 최적 배양조건을 검정하기 위하여 M9 minimal 배지를 기초 배지로 이용 하였으며, 각 배양조건은 종균 1% 접종, 35°C, 150 rpm 및 24시간 배양 후에 protease를 측정하였다. 배양배지는 탄소원(glucose, arabinose, mannose, lactose, galactose, fructose, sucrose, soluble starch, trehalose), 질소원(NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, soypeptone, peptone, yeast extract, malt extract, soybean meal, beef extract) 및 무기화합물에 따른 영향과 첨가 농도에 대하여 조사하였다. 배양조건으로는 온도(20, 25, 30, 35, 40, 45, 50°C), pH (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), 교반속도(0, 50, 100, 150, 200, 250 rpm) 및 배양시간(0, 6, 12, 24, 36, 48, 72)에 따른 영향에 대하여 조사하였다. 미생물 성장에 미치는 영향은 분광광도계를 사용하여 660 nm에서 배양액의 흡광도를 측정하여 나타내었다.

Table 1. Protease activity of isolated microbes from various sources

Strain	Protease activity (Unit/mL)	Isolated sources
<i>B. anthracis</i> JH-01	0.80±0.29	Paddy soil
<i>B. amyloliquefaciens</i> JH-30	2.37±0.35	Mountains soil
<i>B. amyloliquefaciens</i> JH-35	3.81±0.21	Food waste
<i>B. subtilis</i> JH-21	2.03±0.42	Feather meal
<i>B. subtilis</i> JH-29	3.40±0.33	Food waste
<i>B. megaterium</i> JH-08	2.45±0.12	Mountains soil
<i>B. pumilis</i> JH-07	1.20±0.26	Mountains soil

### 통계검정

결과에 대한 통계 분석은 Statistical Analysis System (SAS, 2012)를 이용하여 분산분석을 실시하였으며, 각 평균 간 유의성 검정은 Duncan의 다중 검정법(Multiple range test)에 의하여 실시하였다. 처리구간의 유의성 검정은 유의 수준  $p < 0.05$ 에서 검정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 균주의 선별 및 균주동정

Protease를 분비하는 미생물을 분리하기 위하여 skim milk가 분해되어 생성되는 투명한 크기가 10 mm 이상되는 미생물을 1차 분리하였다. 1차 분리한 균주를 nutrient broth에 35°C, 150 rpm 조건에서 1일간 배양하여 protease 활성이 가장 높게 나온 균주를 최종적으로 선별하였다. 그 결과 Table 1과 같이 7개의 균주 중에서 음식물 쓰레기에서 분리한 균주가 protease 활성이 3.80 unit/mL로 가장 높게 나타났으며, 16S rDNA 결과 *Bacillus amyloliquefaciens* 동정되어 *B. amyloliquefaciens* JH-35로 명명하였다. 따라서 protease 생성 최적화 시험에 *B. amyloliquefaciens* JH-35 균주를 최종 선별하여 사용하였다.

#### 균주의 특성

*B. amyloliquefaciens* JH-35의 균주 특성을 파악하기 위하여 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성을 조사하였다. 그 결과 *B. amyloliquefaciens* JH-35의 형태는 간균이며, 그람 염색 시 양성을 나타내었다. 선별된 균주는 운동성을 나타내지 않았으며, 내생포자를 형성하였다. 전분, 카제인 및 젤라틴 액화에 대한 가수분해 양성을 나타내었으나, 색소를 생성하지 않았다. pH 4-9까지 생장이 가능한 것으로 조사되었으며 glucose, arabinose 및 manitol을 이용하여 산을 생성하는 것으로 나타났다. 또한 염도에 따른 성장 가능성은 8%까지는 성장하였으나, 염도가 10% 이상 시 생장이 되지 않았다 (Table 2). 이는 음식물 쓰레기 분해 적용 시 초기 및 농축되는 염도가 5% 이하인 점과(Koo et al., 2005)과 구 등이(2005) 음식물 쓰레기 중의 단백질을 효과적으로 분해하기 위해 분리하여 사용한 *Bacillus* 속 균주의 염내성 농도가 8%로 나타난 결과와 비교하였을 때, *B. amyloliquefaciens*

Table 2. Morphological and physiological characteristics of *B. amyloliquefaciens* JH-35

Charateristics	Strain JH-35
Shape	Rod
Gram stain	+
Spore formation	+
Mortility	-
Starch hydrolysis	+
Casein hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	+
Pigment production	+
pH 4.0~9.0	+
Acid production (glucose, arabinose, mannitol)	+
NaCl 2%	+
NaCl 4%	+
NaCl 6%	+
NaCl 8%	+
NaCl 10%	-

JH-35 균주와 동일한 결과를 나타내어 음식물 쓰레기의 비료화에 적용 가능할 것으로 판단된다.

#### 배지조성에 따른 protease 생산에 미치는 영향

탄소원에 의한 효과: Glucose, arabinose 및 mannose와 같은 탄소원 9종류에 대한 protease 활성과 미생물 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 3과 같이 효소 활성은 glucose, soluble starch, arabinose, sucrose가 각각 1.86, 1.40, 1.35 및 1.26 unit/mL로 높게 나타났으며, glucose를 사용하였을 때 1.86 unit/mL로 가장 높게 나타났다. 균체 성장은 glucose, sucrose, soluble starch, arabinose가 각각 1.21, 1.02, 0.97 및 0.89로 높은 순으로 나타나, 미생물생장에 가장 효율적이고, 효소활성에 가장 큰 영향을 미치는 glucose를 탄소원으로 결정하였다. Glucose 첨가 농도에 따른 protease 생산에 미치는 영향을 검정하기 위하여 첨가농도를 달리하였으며, 그 결과 protease 활성은 glucose 1.0와 2.5% 첨가 시에 각각 1.98 및 1.99 unit/mL로 가장 높게 나타났다. 또한 미생물의 균체 성장은

**Table 3. Effects of carbon sources on the growth and protease activity of *B. amyloliquefaciens* JH-35**

Carbon sources (%)		Cell growth (660 nm)	Protease activity (Unit/mL)
Glucose,	1	1.21±0.16	1.86±0.19
Arabinose,	1	0.89±0.08	1.35±0.15
Mannose,	1	0.22±0.04	0.16±0.02
Lactose,	1	0.53±0.11	1.00±0.10
Galactose,	1	0.31±0.07	0.42±0.13
Fructose,	1	0.45±0.11	0.35±0.12
Sucrose,	1	1.02±0.03	1.26±0.08
Soluble starch,	1	0.97±0.08	1.40±0.25
Trehalose,	1	0.88±0.05	0.98±0.28
Control		0.18±0.03	0.12±0.02
Carbon concentrations (%)		Cell growth (660 nm)	Protease activity (Unit/mL)
Glucose,	0	0.16±0.02	0.13±0.01
Glucose,	0.5	0.88±0.12	1.06±0.25
Glucose,	1.0	1.28±0.06	1.98±0.20
Glucose,	1.5	1.23±0.12	1.80±0.17
Glucose,	2.0	1.29±0.15	1.78±0.33
Glucose,	2.5	1.25±0.21	1.99±0.28
Glucose,	3.0	1.27±0.18	1.87±0.35

glucose 1, 2 및 3% 첨가가 각각 1.28, 1.29 및 1.27로 가장 높게 나타났다. 이와 같이 glucose의 첨가 농도가 1% 이상 되었을 때, protease 활성과 균체 농도가 높은 것으로 나타났다. 따라서 glucose의 첨가농도를 1%로 결정하였다. 이와 같은 결과는 *B. subtilis* PANH765의 protease 활성에 영향을 미치는 탄소원으로 2% glucose 사용 시 4.20 unit/mL로 가장 높게 나타난 결과와 유사하였으나(Kim *et al.*, 2002), 식층식물에서 분리한 *Bacillus* sp. SH-8이 2% 전분에서 514 unit/mL (Yoon *et al.*, 2006), 토양에서 분리한 *Bacillus* sp. WRD-2가 3% lactose에서 64.02 unit/mL (Ok *et al.*, 2001) 및 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp. JK-1가 2% xylose에서 상대적으로 가장 높은 활성을 나타내었다는 보고와 다르게 나타났다(Kim, 2007). 한편 soluble starch를 배양배지 내 첨가 시 분리 미생물의 protease 활성(1.40 unit/mL)과 미생물 균체 성장(0.97)은, *B. subtilis* PANH765에 의한 protease 활성(0.37 unit/mL)과 균체 성장(0.3)결과와 비교하였을 때 상반된 결과를 나타내었다. 이는 분리 미생물 균주의 amylase가 원활하게 분비되어 soluble starch를 직접 분해하여 영양성분으로 이용하기 때문인 것으로 판단되며, 분리 미생물의 amylase 및 protease 효소분비는 음식물 쓰레기 분해 적용 시 적합한 것으로 판단된다(Kim *et al.*, 2002).

질소원에 의한 효과: Yeast extract, peptone 및 tryptone와 같은 질소원 9종류에 대한 protease 활성과 미생물 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 4와 같이 효소 활성은 yeast extract, tryptone, peptone, soypeptone이 각각 3.25, 3.08, 3.03 및 2.88 unit/mL로 높게 나타났으며,

yeast extract를 사용하였을 때 3.25 unit/mL로 가장 높게 나타났다. 또한 미생물 균체의 성장은 tryptone, peptone, beef extract, yeast extract가 각각 2.29, 2.18, 2.16 및 2.11로 높은 순으로 나타났다. 따라서 효소활성에 효율적이고, 미생물 성장에 가장 큰 영향을 미치는 yeast extract를 질소원으로 결정하였다. Yeast extract 첨가 농도에 따른 protease 생산에 미치는 영향을 검정하기 위하여 첨가농도를 달리하였으며, 그 결과 protease 활성은 yeast extract 1.5, 2.0 및 2.5% 첨가 시, 각각 4.86, 4.80 및 4.67 unit/mL 순으로 높게 나타났다. 미생물 균체 성장은 yeast extract 1.5, 2.0, 2.5 및 1.0% 첨가 시, 각각 2.67, 2.66, 2.69 및 2.29로 순으로 높게 나타났으며, 1.5% 이상의 첨가 농도에서는 첨가량에 따른 미생물성장의 차이가 나타나지 않았다. 따라서 yeast extract의 첨가 농도를 1.5%로 결정하였다. 이와 같은 결과는 *B. subtilis* PANH765의 protease 활성에 영향을 미치는 질소원으로 yeast extract 4.70 unit/mL로 가장 높게 나타났으며, 1% yeast extract 첨가 시에 효소활성이 가장 높게 나타났다는 보고(Kim *et al.*, 2002)와 토양유래 *Bacillus* sp.에 1% yeast extract 사용 시 92 unit/mL로 가장 높은 활성을 나타낸 결과와 일치하였다(Ok *et al.*, 2001).

무기성분에 의한 효과:  $K_2HPO_4$ 와 같은 무기성분 6종류에 대한 protease 활성과 미생물 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 5와 같이 효소활성은  $K_2HPO_4$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 가 각각 5.37, 4.88 및 4.77 unit/mL로 높게 나타났으며,  $K_2HPO_4$ 를 사용하였을 때 5.37 unit/mL로 가장 높게 나타났다. 또한  $K_2HPO_4$ 가 미생물 성장에 미치는 효과가 2.78로 가장 높게 나타나, 효소활성

**Table 4. Effects of nitrogen sources on the growth and protease activity of *B. amyloliquefaciens* JH-35**

Nitrogen sources (%)	Cell growth (660 nm)	Protease activity (Unit/mL)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , 1	0.89±0.15	0.80±0.29
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1	0.74±0.23	1.20±0.35
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 1	0.55±0.18	0.80±0.21
NH <sub>4</sub> Cl, 1	1.09±0.12	1.22±0.42
Yeast extract, 1	2.11±0.27	3.25±0.33
Soypeptone, 1	2.09±0.21	2.88±0.12
Peptone, 1	2.18±0.15	3.03±0.52
Tryptone, 1	2.29±0.16	3.08±0.15
Beef extract, 1	2.16±0.11	2.75±0.14
Control	1.28±0.15	1.78±0.18
Nitrogen concentrations (%)	Cell growth (660 nm)	Protease activity (Unit/mL)
Yeast extract, 0	1.29±0.23	2.10±0.13
Yeast extract, 0.5	1.67±0.19	2.75±0.20
Yeast extract, 1.0	2.29±0.15	3.62±0.32
Yeast extract, 1.5	2.67±0.29	4.86±0.38
Yeast extract, 2.0	2.66±0.17	4.80±0.21
Yeast extract, 2.5	2.69±0.10	4.67±0.35

**Table 5. Effects of inorganic compounds on the growth and protease activity of *B. amyloliquefaciens* JH-35**

Inorganic compounds (%)	Cell growth (660 nm)	Protease activity (Unit/mL)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O, 0.5	2.55±0.15	4.88±0.30
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0.5	2.49±0.15	4.73±0.24
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.5	2.78±0.18	5.37±0.19
CuSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0.5	0.80±0.25	0.82±0.17
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0.5	1.31±0.11	2.40±0.33
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 0.5	1.58±0.43	1.43±0.12
Control	2.36±0.18	4.67±0.27
Inorganic salts concentrations (%)	Cell growth (660 nm)	Protease activity (Unit/mL)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0	2.23±0.14	4.32±0.32
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.2	2.58±0.24	5.12±0.22
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.5	2.63±0.33	4.81±0.10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.0	2.66±0.28	3.78±0.43
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2.0	2.60±0.17	3.82±0.26

과 미생물 성장에 가장 큰 영향을 미치는 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>를 무기성 분으로 결정하였다. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 첨가 농도에 따른 protease 생산에 미치는 영향을 검정하기 위하여 첨가농도를 달리하였다. 그 결과 protease 활성은 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2, 0.5 및 0% 첨가 시, 각각 5.12와 4.81 unit/mL 순으로 높게 나타났으나, 1% 이상 첨가 시 효소활성은 감소하는 것으로 나타났다. 미생물의 균체 성장은 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, 0.5, 2.0과 0.2%의 첨가 시, 각각 2.66, 2.63, 2.60과 2.58 순으로 높게 나타났으나, 0.2% 이상의 첨가 농도에서는 첨가량에 따른 균체 농도의 차이가 나타나지 않았다. 이와 같이 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 첨가 농도를 0.2% 첨가 하였을 때 protease 활성과 균체 농도가 높은 것으로 나타났

다. 따라서 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 첨가 농도를 0.2%로 결정하였다. 이는 식용식물에서 분리한 *Bacillus* sp. SH-8이 0.3% CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O에서 575 unit/mL (Yoon *et al.*, 2006), 재래식 된장에서 분리한 *B. licheniformis*가 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O에서 213 unit/mL (Bae and Yoon, 2012) 및 청국장에서 분리한 *Bacillus* sp. JK-1가 0.3% CuSO<sub>4</sub>에서 상대적으로 가장 높은 활성을 나타내었다는(Kim, 2007) 보고와 다르게 나타났다. 또한 효소활성의 수치가 각 논문 데이터마다 차이가 나는 이유는, 단백질분해효소 분석방법 및 균주의 특성에 의한 차이 때문인 것으로 판단된다.

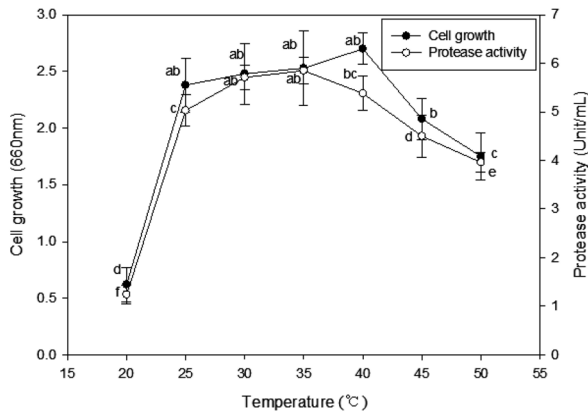


Fig. 1. Effect of temperature on the growth and protease activity of *B. amyloliquefaciens* JH-35.

배양온도에 의한 영향

최적배지 조건에서 배양온도 차이에 대한 protease 활성과 미생물 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 1 과 같이 효소활성은 35°C와 30°C에서 각각 5.88 및 5.70 unit/mL로 가장 높게 나타났으나, 30°C와 35°C 처리구의 유의적인 차이는 나타나지 않았다( $p < 0.05$ ). 한편 20°C와 50°C 일때 효소활성이 1.24 및 1.86 unit/mL로 낮게 나타났다 ( $p < 0.05$ ). 미생물생장은 40°C, 35°C와 30°C에서 각각 2.70, 2.53 및 2.48으로 가장 높게 나타났으나, 30-40°C 처리구의 유의적인 차이는 나타나지 않았다( $p < 0.05$ ). 이와 같이 효소활성에 가장 큰 영향을 미치는 온도는 30°C와 35°C로 나타났으며, 두 처리구간의 유의적인 차이는 없었으나 분석결과 효소함량과 미생물 성장이 높은 35°C를 최적온도로 결정하였다. 이는 토양에서 분리한 *Bacillus* sp. WRD-2가 생산하는 protease (Ok et al., 2001)와 젓갈에서 분리한 *Bacillus* sp. SJ-10에서 분비되는 protease의 최적온도가 40°C로 나타나 본 실험의 결과와 유사하였으나(Kim et al., 2009), 재래식 된장에서 분리한 *B. licheniformis*에서 분비되는 protease는 65°C (Bae and Yoon, 2012)와 *B. licheniformis* LBBL-11에서 분비되는 protease는 60°C로 본 시험의 사용 균주 보다 높은 온도에서 활성을 나타내었다(Juyigbe and Ajele, 2008). 이와 같이 *Bacillus* 속 미생물이 생산하는 단백질 분해효소는 산성, 중성, 알칼리성에서 활성을 나타내나, Kim 등(2009)의 보고와 같이 대부분이 중성과 알칼리성에서 최적활성을 나타내게 되며 중성은 30-37°C에서, 알칼리성은 60°C에서 최적활성과 안정성을 나타냈다는 보고와 일치하였다. 또한 구 등이(2005) 음식물 쓰레기 중의 단백질을 효과적으로 분해하기 위해 분리한 *Bacillus* 속 31번 균주가 40 및 50°C에서 75%의 효소활성을 나타내었다는 결과와 비교하였을 때, *B. amyloliquefaciens* JH-35 균주와 유사한 결과를 나타내어 음식물 쓰레기의 비료화에 적용 가능할 것으로 판단된다.

pH에 의한 영향

최적배지 조건과 최적배양 조건에서 pH 차이에 대한 protease 활성과 미생물 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

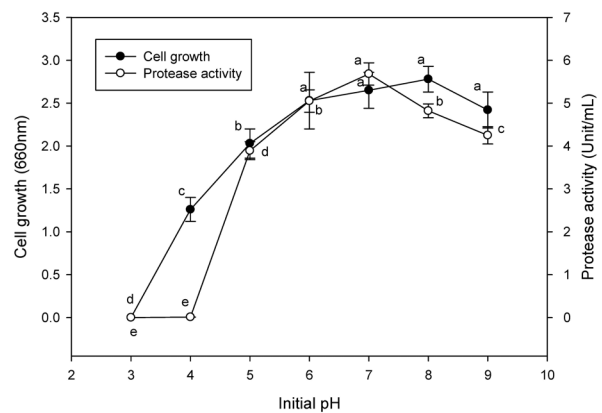


Fig. 2. Effect of initial pH on the growth and protease activity of *B. amyloliquefaciens* JH-35.

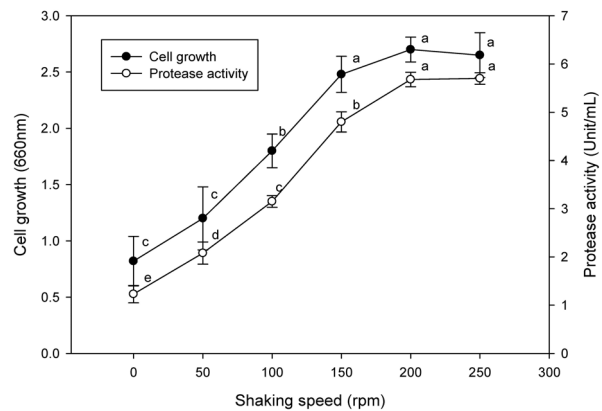


Fig. 3. Effect of shaking speed on the growth and protease activity of *B. amyloliquefaciens* JH-35.

그 결과 Fig. 2와 같이 효소활성은 pH 7에서 5.68 unit/mL로 가장 높게 나타났으며, pH 3과 4에서 효소활성이 각각 0과 0.01 unit/mL로 거의 생성이 되지 않았다( $p < 0.05$ ). 또한 미생물생장은 pH 6에서 9까지의 처리구가 pH 3에서 5까지의 처리구에 비해 매우 성장이 활발하게 나타났다. 그러나 pH 6에서 9까지 처리구의 미생물 생육이 각각 2.53, 2.65, 2.78 및 2.42로 나타나, pH 6에서 9의 구간은 유의적인 차이는 나타나지 않았다( $p < 0.05$ ). 이와 같이 효소활성에 가장 큰 영향을 미치는 온도가 pH 7으로 나타나 최적 pH를 7로 결정하였다. 이는 토양에서 분리한 *B. subtilis* PANH765에서 분비되는 protease가 pH 7 (Kim et al., 2002)에서 최대 활성을 나타낸 결과와 고등어에서 분리한 *B. megaterium*의 protease가 pH 8 (Bae and Yoon, 2012)에서 최적활성을 나타낸 결과와 일치하였다. 또한 최 등(1996)이 보고한 한식의 음식물 쓰레기의 발효 초기 pH가 5에서 5일 이후에는 pH가 9로 상승하여 비료화(composting) 반응이 진행된다는 보고와 구 등이(2005) 음식물 쓰레기 중의 단백질을 효과적으로 분해하기 위해 분리한 *Bacillus* 속 균주의 pH가 5-9의 넓은 범위에서 생장이 원활하였다는 결과와 비교하였을 때, *B. amyloliquefaciens* JH-35 균주 또한 넓은 범위에서 원활

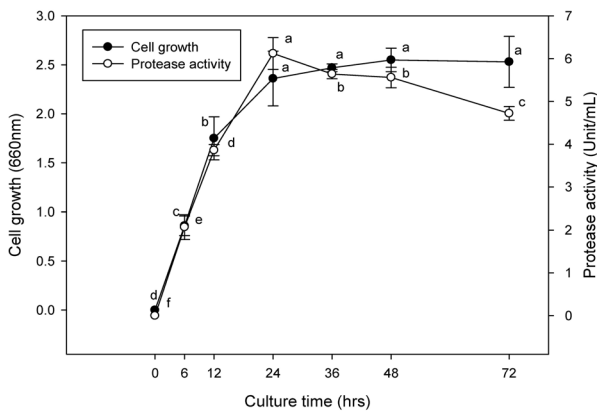


Fig. 4. Effect of culture time on the growth and protease activity of *B. amyloliquefaciens* JH-35.

한 성장과 protease 분비효과로 인하여 음식물 쓰레기의 비료화에 적용 가능할 것으로 판단된다.

#### 교반속도에 의한 영향

최적배지 조건에서 교반속도 차이에 대한 protease 활성과 미생물 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 효소활성은 200 rpm과 250 rpm에서 각각 5.68과 5.70 unit/mL로 가장 높게 나타났으며( $p < 0.05$ ), 미생물생장은 150, 200과 250 rpm에서 각각 2.48, 2.70과 2.65로 가장 높게 나타났( $p < 0.05$ ). 이와 같이 효소활성과 미생물의 생육에 가장 큰 영향을 미치는 교반속도는 충분한 호기조건인 200 rpm 이상으로 나타났다. 따라서 최적 교반속도를 200 rpm으로 결정하였다. 이는 토양에서 분리한 *B. subtilis* PANH765에서 분비되는 protease가 150rpm에서 최대 5.72 unit/mL로 나타난 결과와 비교하였을 때, *B. amyloliquefaciens* JH-35 균주가 *B. subtilis* PANH765보다 호기적 조건에서 배양시켜야 protease 활성이 높게 나타나는 것으로 판단된다 (Kim et al., 2002).

#### 배양시간에 의한 영향

최적배지 조건에서 배양시간 차이에 대한 protease 활성과 미생물 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Fig. 4와 같이 효소활성은 24시간에서 6.12 unit/mL로 가장 높게 나타났으며, 48시간 이후부터 시간이 경과 할수록 효소활성이 감소하는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 미생물생장은 24시간부터 72시간까지 2.36에서 2.55으로 나타나, 24시간부터 최고의 증식효과를 나타내었으며 72시간 까지 미생물의 생균수가 유지되는 것으로 나타났다( $p < 0.05$ ). 이와 같이 효소활성과 미생물 생육에 가장 큰 영향을 미치는 배양시간은 24시간으로 나타나, 최적 배양시간을 24시간으로 결정하였다. 이 결과는 *B. amyloliquefaciens* CGD3균주(Lee et al., 2015)가 48시간에 8.02 unit/mL로 높은 활성을 나타낸 결과보다 빠른 활성을 나타내었고, 청국장에서 분리한 *B. subtilis*균주가 24시간에 8.00 unit/mL로 최적활성을 나타내어 본 시험의

결과와 동일하였다(Kim, 2007). 또한 24시간 이후부터 protease 활성이 감소하였는데 이는 식층식물로 분리한 *Bacillus* sp. SH-8의 protease 활성이 26시간 이후부터 50% 이상 감소하였다는 보고(Yoon et al., 2006)와 발효시간이 길어질수록 배양액내의 *B. amyloliquefaciens* CGD3균주의 protease 활성이 감소하였다는 보고와 일치하였다(Lee et al., 2015).

## 결론

본 연구는 음식물 쓰레기의 퇴비화에 활용하기 위한 미생물을 선별하고자, protease 생산능이 우수한 미생물을 7종 분리하였으며, protease 생산능이 가장 우수한 JH-35를 최종 분리하였다. 음식물 쓰레기로부터 분리한 JH-35 균주의 형태학적, 배양학적 및 생화학적 특성과 16S rDNA로 동정한 결과 *B. amyloliquefaciens*로 동정되어, *B. amyloliquefaciens* JH-35로 명명하였다. 음식물 쓰레기 퇴비화에 미생물제로 이용하기 위하여, *B. amyloliquefaciens* JH-35 대한 염농도에 대한 내성, protease의 최적배지 조성과 최적배양조건을 알아보았다. 그 결과 염농도 내성은 8%로 나타났으며, 최적배지 조성은 1.0% glucose, 1.5% yeast extract, 0.2%  $K_2HPO_4$  이었으며, 최적배양조건은 35°C, pH 7, 교반속도는 200 rpm이었다. 이와 같은 최적 배양 조건으로 배양하였을 때, protease 생산에 대한 최적 배양시간은 24시간일때 6.12 unit/mL로 나타났다. 이와 같이 배양배지와 배양조건을 조사하여 protease 활성이 증가된 음식물 쓰레기 미생물 첨가제를 개발하고자 하였으며, *B. amyloliquefaciens* JH-35의 넓은 pH 범위에서 원활한 성장과 protease 분비 효과, 8%의 내염성과 같은 본 시험의 결과를 토대로 점검할 때 음식물 쓰레기 분해 미생물로 적용 가능성이 충분할 것으로 판단되며, 향후 음식물 쓰레기 퇴비화 실증시험을 거쳐서, 분해 미생물 첨가제로 적용되기를 기대한다.

## Acknowledgement

This study was supported by a grant (Project No. PJ0108482016) National Institute of Agricultural Science, Rural Development Administration, Republic of Korea.

## References

- Bae, Y. E., & Yoon, K. H. (2012). Production and characterization of thermostable protease from *Bacillus licheniformis* isolated from korean traditional soybean paste. *Korean Journal of Microbiology*, 48(4), 298-304.
- Cho, G. S., & Kim, N. C. (2004). A study on the feed stuff of food waste by bulking agents. *Journal of the Korean Society for Environment Analysis*, 7(1), 37-42.
- Choi, M. H., Chung, Y. J., & Park, Y. H. (1996). Effects of seeding on the microbial changes during thermophilic

- composting of food waste. Korea Organic Resources Recycling Association, 4(1), 1-11.
- Haruta, S., Nakayama, T., Nakamura, K., Hemmi, H., Ishii, M., Igarashi, Y., & Nishino, T. (2005). Microbial diversity in biodegradation and reutilization process of garbage. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 1-11.
- Hong, J. H., Ann, Y. G., & Jung, J. D. (2003). A study on the garbage decomposing characteristics of the garbage-decomposing accelerant(I). *Korean Journal of Sanitation*, 18(1), 58-67.
- Hull, M. E. (1974). Studies on milk proteins II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *Journal of Dairy Science*, 30, 881-884.
- Jin, Y. R., Yu, S. N., Kim, K. Y., Kim, S. H., Park, S. K., Kim, H. K., Lee, Y. S., Choi, Y. L., Ji, J. H., & Ahn, S. H. (2013). Production and characterization of alkaline protease of *Micrococcus* sp. PS-1 isolated from seawater. *Journal of Life Science*, 23(2), 273-281.
- Jung, W. J., Lee, J. C., Kim, T. H., & Lim, K. T. (2000). Processing method and feed value of food wastes as swine feed resources. *Korean Journal of Environmental agriculture*, 19(1), 44-50.
- Juyigbe, F. M., & Ajele, J. O. (2008). Some properties of extracellular protease from *Bacillus* licheniformis LBBL-11 isolated from iru, a traditionally fermented African locust bean condiment. *African Journal of Biochemistry Research*, 2, 206-210.
- Kim, E. Y., Kim, D. G., Kim, Y. R., Choi, S. Y., & Kong, I. S. (2009). Isolation and identification of halotolerant *Bacillus* sp. SJ-10 and characterization of its extracellular protease. *Korean Journal of Microbiology*, 45(2), 193-199.
- Kim, J. Y. (2007). Isolation and characterization of an alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* JK-1. *Korean Journal of Microbiology*, 43(4), 331-336.
- Kim, M. N., Si, J. B., & Wee, Y. J. (2016). Identification of a newly isolated protease-producing bacterium, *Bacillus subtilis* FBL-1, from soil. *Microbiology and Biotechnology letters*, 44(2), 185-193.
- Kim, K. C., Bae, B. Y. H., Kim, S. W., & Kim, S. J. (2003). Production of amylase by a filamentous fungus, strain FM04, and enzymatic hydrolysis of food waste. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 18, 363-370.
- Kim, K. P., Kim, N. Y., Rhee, C. H., Woo, C. J., & Bae, D. H. (2002). Isolation and characterization of protease producing bacteria from soil. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 31(5), 754-759.
- Kim, Y. J., & Cha, B. H. (2001). The study analysis of feed and compost of chicken broth of Korean restaurants food wastes. *Journal of Korean Society of Environmental Administration*, 3, 353-357.
- Koo, K. W., Chung, Y. H., Hong, S.H., Oh, S. H., Kim, D. S., & Jeon, H. J. (2005). Isolation of new microorganisms which degrades the protein of a food garbage efficiently and its application. *Korea Academia-industrial Cooperation Society*, 6(4), 342-348.
- Ishii, K. M., Fukui, M., & Takii, S. (2000). Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 768-777.
- Lee, H. J., Yoo, J. S., & Bae, D. H. (2016). Purification and characterization of an alkaline protease produced by alkalophilic *Bacillus* sp. DK1122. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology letter*, 44(3), 333-340.
- Lee, R. H., Yang, S. J., Hwang, T. Y., Chung, S. K., & Hong, J. H. (2015).  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory activity and protease characteristics produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Korean Journal of Food and Preservation*, 22(5), 727-734.
- Oh, J. S., Choi, Y. S., & Roh, D. H. (2015). Characterization and optimum production condition of extracellular protease from *Pseudoaltermonas donghaensis* HJ51. *Korean Journal of Microbiology*, 51(1), 75-80.
- Ok, M., Seo, W. S., Cha, J. Y., & Cho, Y. S. (2001). Enzyme production of a protease-producing strain, *Bacillus* sp SH-8 isolated from insect-eating plant. *Journal of Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 44(4), 246-250.
- Shin, J. H., Lee, J. W., Nam, J. H., Park, S. Y., & Lee, D. H. (2009). Bacterial community dynamics during composting of food wastes. *Korean Journal of Microbiology*, 45(2), 148-154.
- Stronach, S. M., Rudd, T., & Lester, J. N. (1989). Anaerobic fermentation process in industrial wastewater treatment. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York Tokyo.
- Suh, M. G., Lee, S. B., Lee, K. E., & Lee, S. H. (2001). A study on reduction of food waste. *Korean Society of Environmental Health*, 27, 14-19.
- Suler, D. J., & Finstein, M. S. (1997). Effect of temperature, aeration, and moisture on CO<sub>2</sub> formation in bench scale, continuously thermophilic composting of solid waste. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 345-350.
- Yoon, K. H., Lee, M. S., Park, B. W., Park, Y. H., Kim, H., Kim, J. H., & Kim, M. S. (2006). Enzyme production of a protease-producing strain, *Bacillus* sp SH-8 isolated from insect-eating plant. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(4), 323-328.