

닭 우모 분해세균 *Elizabethkingia meningoseptica* CS2-1이 생산하는 단백질분해효소의 특성 및 아미노산 생산을 위한 배양조건

김세종¹ · 조천희² · 황경숙^{1,3*}

¹목원대학교 미생물나노소재학과, ²(주)카프코 생물화학연구소, ³목원대학교 미생물생태자원연구소

Characterization of Protease Produced by *Elizabethkingia meningoseptica* CS2-1 and Optimization of Cultural Conditions for Amino Acid Production

Se-Jong Kim¹, Chun-Hwi Cho², and Kyung-Sook Whang^{1,3*}

¹Department of Microbial & Nano Materials, Mokwon University, Daejeon, 302-729, Republic of Korea

²KAFCO Biochemistry Research Institute, ChungBuk 373-831, Republic of Korea

³Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, Daejeon, 302-729, Republic of Korea

Received January 26, 2011; Accepted March 22, 2011

A feather-degrading bacterium *Elizabethkingia meningoseptica* CS2-1 was isolated from compost in a chicken farm. Cultured on a basal medium containing 2% chicken feather, the bacterium showed 729.7 $\mu\text{mol/mL}$ of amino acid. Optimal culture conditions for feather degradation by *E. meningoseptica* CS2-1 were 25°C, pH 7.5, and 180 rpm. The optimal pH and temperature for protease activity were 8.0 and 40°C, respectively. The composition of an optimal medium for amino acid production was 0.05% NH₄Cl, 0.05% NaCl, 0.03% K₂HPO₄, 0.03% KH₂PO₄, 0.01% MgCl₂ · 6H₂O, 0.1% urea, and 2% chicken feather. Characteristics of amino acids extracted from the optimal medium under the optimal culture conditions of *E. meningoseptica* CS2-1 were analyzed. The total amino acid content of strain CS2-1 was 1063 $\mu\text{mol/mL}$, which was 46% higher compared to the basal condition (729.7 $\mu\text{mol/mL}$). The essential amino acid content in the total amino acid was 315.9 $\mu\text{mol/mL}$, which was 44% higher than that of the basal condition. Major amino acids were proline (14%), aspartic acid (12%), glutamic acid (11%), serine (10%), alanine (10%), glycine (9%), and tyrosine (7%) by strain CS2-1. These results suggest that strain CS2-1 can be used as a potential microbial resource for the production of amino acid using chicken feathers.

Key words: amino acid, chicken feather, *Elizabethkingia meningoseptica* CS2-1, keratin, protease

서 론

케라틴은 척추동물의 표피와 그 부속기관의 주된 구조 단백질로 주로 사람의 머리카락, 손발톱, 피부 및 조류의 깃털과 양모, 뿔 비늘 등을 구성하는 대표적인 물질이다[Onifade 등, 1998]. 케라틴의 가장 특징적인 성질은 물에 녹지 않는 불용성의 단백질이며 구조 내에 시스테인 잔기 사이의 이황화결합, 수소결합 및 소수성 상호작용으로 강한 사슬결합을 하고 있어 trypsin, pepsin, papain과 같은 단백질분해효소로는 거의 분해가 되지 않는 난분해성 단백질로[Lin 등, 1992; Gupta와 Ramnani,

2006] 물리·화학적으로 매우 안정한 구조체인 것으로 알려져 있다[Vignardet 등, 1999].

가금류의 폐기물로 발생되는 닭 우모(chicken feather)는 국내의 경우 연간 평균 5만여 톤 이상 탈하며 고압 및 가열 처리하여 건조 분쇄한 후 우모분 사료로 사용되어 왔다[Hong 등, 2002]. 이와 같은 처리공정은 에너지의 소모가 많을 뿐만 아니라 처리 과정 중 필수 아미노산의 소실을 야기하며 사료로 이용될 경우 동물의 소화관 내에서 낮은 소화율을 나타낸다[Hood와 Healy, 1994]. 이러한 단점을 극복하기 위하여 미생물이 생산하는 케라틴 단백질분해효소를 다양한 효소산업 분야에 이용하고자 하는 많은 노력들이 시도되었다. 단백질분해효소에 의한 케라틴 단백질의 분해과정이 밝혀지면서[Yamamura 등, 2002] 전 세계적으로 발생량이 많고 산업 폐기물로 분류되는 닭 우모를 효율적으로 가수분해할 수 있는 효소를 탐색하고 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다[Bertsch와 Coello

*Corresponding author
Phone: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7599
E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr

2005; Woo 등, 2007b]. 또한, 닭 우모는 다양한 아미노산을 함유하고 있어 분해미생물을 이용해 우모를 가수분해하여 얻어진 아미노산을 사료 및 비료 등의 산업분야에 이용하는 연구가 진행되고 있다[Kim과 Ko, 2005; Woo 등, 2007a]. 케라틴 단백질 분해효소를 생산하는 미생물로는 *Bacillus* sp. [Lin 등, 1992; Takami 등, 1992; Zaghoul 등, 1998; Wang과 Shih, 1999; Woo 등, 2007b), *Pseudomonas* sp. [Chon 등, 2003], *Chryseobacterium* sp. [Riffel 등, 2007; Kim 등, 2010], *Vibrio* sp. [Sangali와 Brandelli, 2000], *Actinomycetes* sp. [Bockle 등, 1995; Chitte 등, 1999; Mitsuki 등, 2004]와 *Aspergillus* sp. [Parag와 Hassan, 2004], *Microsporium* sp. [Lee 등, 1987], *Trichophyton* sp. [Tsuboi 등, 1989; Lobarzewski 등, 1990; Asahi 등, 1992], *Doratomyces* sp. [Vignardet 등, 1999]와 같은 균류가 알려져 있다. 미생물이 생산하는 효소를 이용하여 산업공정에서 케라틴 기질을 분해하는 경우에는 전통적으로 사용되는 화학촉매에 비해 발효공정에 필요한 비용과 에너지를 절감시키는 장점이 있으므로 효율적인 공정법 개발을 위해서는 효소를 대량생산할 수 있는 배양조건과 효소의 특성에 관한 연구가 이루어져야 한다.

미생물 유래 케라틴 단백질분해효소는 exocellular keratinase [Bernal 등, 2005], neutral keratinase [Lin 등, 1999; Parag와 Hassan, 2004], trypsin-like keratinase, subtilisin-like keratinase [Brysk와 Rajaraman, 1992], alkaline protease [Takami 등, 1992], serine protease [Bockle 등, 1995] 등이 보고되었다. 지금까지 보고된 대부분의 케라틴 단백질분해효소는 구조적으로 serine protease의 특성을 나타내며, 50-70°C의 최적온도를 나타내는 고온성 효소가 대부분을 차지한다. 이들 고온성 효소는 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* [Lin 등, 1992; Takami 등, 1992], *Streptomyces pactum* [Bockle 등, 1995], *Trichophyton rubrum* [Asahi 등, 1992]에 의해 생성되고 분해하기 어려운 섬유상의 기질 등을 고온에서 효율적으로 분해할 수 있음이 보고되었다.

저자들은 선행연구에서 국내 양계장 퇴비로부터 수집한 다양한 종류의 우모 분해세균 31균주를 확보하고 계통분류를 수행하였다[Kim 등, 2010]. 본 연구에서는 계통학적으로 다양한 이들 균주를 대상으로 닭 우모분으로부터 생성되는 아미노산의 특성을 평가하여 우수 균주를 최종 선발하고 바이오산업에 활용하기 위한 배양조건과 효소학적 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시험배지 및 배양. 실험균주는 NB broth [1.0% (w/v) peptone, 0.5% (w/v) NaCl, 1.0% (w/v) beef extract, pH 7.5]에 접종한 후, 28°C에서 24시간 배양하여 전배양액으로 사용하였다. 단백질분해효소 활성과 우모 분해능 시험을 위하여 무기염기초배지[0.05% (w/v) NH₄Cl, 0.05% (w/v) NaCl, 0.03% (w/v) K₂HPO₄, 0.03% (w/v) KH₂PO₄, 0.01% (w/v) MgCl₂·6H₂O, 0.01% (w/v) yeast extract, pH 7.5]에 케라틴 기질로 닭 우모분(chicken feather meal)을 2.0% (w/v) 첨가하여 사용하였다.

Protease의 활성 및 우모 분해율 측정. Protease의 활성 측정은 2.0% (w/v) 우모분이 첨가된 무기염기초배지에서 배양된 균주 배양액을 4°C, 7,920×g (Supra 22K, Hanil, Incheon, Korea)로 20분간 원심 분리하여 균체와 잔존 우모를 제거한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액의 활성 측정은 Anson [1938]의 방법을 개량하여 수행하였다. 기질용액은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 기질인 casein을 0.6% (w/v)가 되도록 용해하여 사용하였다. 기질용액 2.5 mL과 조효소액 0.5 mL를 혼합하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 50% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) 2.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응 정지액을 4°C, 22,250×g (Micro 17R, Hanil)에서 5분간 원심 분리하여 취한 상등액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 용액 2.5 mL과 6배로 희석한 Folin reagent 용액 0.5 mL을 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 660 nm에서 흡광도(UVICON Spectrophotometer 930, Kontron Instruments, Denver, CO)를 측정하였다. 효소 활성도(Unit)는 tyrosine 표준도표를 이용하여 상기 조건하에서 1분간 기질로부터 1 μg의 tyrosine을 유리하는 효소의 양으로 하였다. 우모 분해율을 조사하기 위하여 2.0% (w/v) 우모분이 첨가된 무기염기초배지에 전배양액을 1.0% (v/v) 접종하고 3일 동안 배양한 후 여과지(Whatman filter paper No. 2, 185 mm φ)에 걸러진 잔존 우모의 건조량을 측정하여 분해율을 백분율로 산출하였다. Protease의 활성과 우모 분해율 측정은 3회 반복 수행하였다.

닭 우모 분해세균의 최적 배양조건. 우모 분해 우수세균의 최적 배양조건을 조사하기 위하여 2.0% (w/v) 우모분이 첨가된 무기염기초배지에 전배양액을 1.0% (v/v) 접종하여 각 시험에 사용하였다. 우모 분해를 위한 최적 배양온도를 조사하기 위하여 20, 25, 30, 35, 40°C에서 120 rpm으로 3일 동안 배양한 후 우모 분해율을 측정하였다. 무기염기초배지의 최적 pH를 조사하기 위하여 배지의 pH를 6.0-8.0까지 조절하여 제조한 후 최적 배양온도에서 120 rpm으로 3일 동안 배양한 후 우모 분해율을 측정하였다. 최적 배양속도를 조사하기 위하여 무기염기초배지를 최적 pH로 조절하고 최적 배양온도에서 100, 120, 150, 180, 200, 220, 250 rpm으로 3일 동안 배양한 후 우모 분해율을 측정하여 최적 배양조건을 확인하였다.

효소활성 특성. Protease의 최적 활성 pH를 조사하기 위하여 pH 3.0부터 pH 12.0까지 효소 활성을 측정하였다. pH는 50 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 3.0-7.0), 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.0-9.0)과 50 mM glycine-NaOH 완충용액(pH 9.0-11.0)을 사용하였다. 효소의 활성은 완충용액에 조효소액을 넣어 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후 측정하였다. 효소의 최적 활성 온도를 검토하기 위하여 조효소액을 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.0)의 기질용액과 혼합하여 37°C에서 20분 동안 반응시킨 후 효소 활성을 측정하였다.

Protease 생산과 우모 분해능에 미치는 탄소원 및 질소원. Protease 생산과 우모 분해능에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향을 조사하기 위하여 NH₄Cl과 yeast extract가 첨가되지 않은 무기염기초배지를 대조구로 하고 12종류의 탄소원(glucose, fructose, rhamnose, saccharose, maltose, lactose, glycerol,

galactose, sorbitol, mannitol, starch, mannose)과 13종류의 질소원(beef extract, casein, gelatin, peptone, skim milk, tryptone, yeast extract, urea, $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 , KNO_3 , NH_4NO_3)을 각각 0.1% (w/v) 첨가하고 2.0% (w/v) 우모분을 첨가하여 배지를 제조한 뒤 앞에서 조사된 균주의 최적 배양조건에서 3일 동안 배양한 후 조효소액의 효소 활성과 우모 분해를 변화를 조사하였다.

아미노산 추출 및 분석. 우모 분해산물 아미노산의 정량·정성을 검토하기 위하여 2.0% (w/v) 우모분이 첨가된 최적 배지에 균주 전배양액을 1.0% (w/v) 접종하고 최적 배양조건에서 3일 동안 배양한 후, 배양액을 4°C, 7,920×g에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 회수하였다. 상층액 1 mL에 1 mL의 6 N HCl을 가하고 N_2 gas로 2분간 치환시킨 후 110°C에서 12시간 처리한 뒤 감압하여 HCl을 제거하였다. 0.2 N HCl (pH 2.0-3.0) 2 mL를 첨가하여 용해시킨 후 여과지(Whatman filter paper No. 2, 90 mm ϕ)로 여과하여 분석시료로 사용하였다. 아미노산의 정량·정성 분석은 아미노산 분석기(Hitachi L-8900, Hitachi, Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하였다.

결과 및 고찰

닭 우모 분해 우수균주 선발. 저자들은 선행연구에서 양계장 내 퇴비로부터 수집한 단백질분해세균 중 2% 닭 우모분이 첨가된 무기염기초배지에서 배양 3일 내에 70% 이상의 높은 분해율을 나타내는 우모 분해세균 31 균주를 확보하고 계통분류를 수행하였다[Kim 등, 2010]. 본 연구에서는 계통학적으로 다양한 우모 분해세균을 이용하여 닭 우모분으로부터 생성되는 아미노산의 정량·정성을 분석하여 바이오산업에 활용 가능한 우수균주를 선발하고자 하였다.

본 실험에는 Firmicutes 계통군에 속하는 *Bacillus amyloliquefaciens* CF3-4, CS2-8과 *B. subtilis* BS1-4, γ -proteobacteria 계통군의 *Enterobacter* sp. BS2-1, Actinobacteria 계통군의 *Agrococcus jejuensis* AF3-2와 *Brevibacterium luteolum* BS1-6 그리고 Bacteroidetes 계통군의 *Elizabethkingia meningoseptica* CS2-1를 사용하여 닭 우모로부터 가수분해된 아미노산의 정량·정성 분석 결과를 Table 1에 나타내었다. 아미

노산의 총 함량을 비교한 결과, *B. luteolum* BS1-6은 791.7 $\mu\text{mol/mL}$, *E. meningoseptica* CS2-1은 729.7 $\mu\text{mol/mL}$ 로 다른 균주보다 높게 추출되었다. *Bacillus amyloliquefaciens* CF3-4와 CS2-8, *B. subtilis* BS1-4, *Enterobacter* sp. BS2-1, *A. jejuensis* AF3-2는 600-667 $\mu\text{mol/mL}$ 정도의 아미노산을 추출하였다. 각 시험 균주에 의해 우모분으로부터 추출되는 17종류의 아미노산 조성을 비교한 결과, 5종류의 아미노산(aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, proline)을 주요 아미노산으로 생성하는 공통적인 특성을 나타내었다. 특히 *B. luteolum* BS1-6 균주는 주요 아미노산 외에도 valine과 leucine이 높게 추출되며, *E. meningoseptica* CS2-1 균주는 alanine과 tyrosine이 높게 추출되는 특징을 나타내었다.

현재까지 보고된 닭 우모 분해세균을 보면 *Bacillus*속 종이 대부분으로 많은 연구가 이루어진 반면, 상기의 균주들에 대한 보고는 미흡하다. 특히 우모 분해능을 나타내는 *B. luteolum*에 관한 연구는 보고된 바 없어 자세한 효소학적 특성에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다. 현재 *Elizabethkingia*속에는 *E. miricola*와 *E. meningoseptica* 두 균주가 알려져 있으며, *E. meningoseptica* KB042가 alkaline protease를 생산하며 우모 분해능이 있음이 최근에 보고되었다[Nagal과 Jain, 2010a; 2010b]. 이상의 결과로부터 시험균주 중에서 높은 아미노산 생성량을 나타내는 *E. meningoseptica* CS2-1 균주를 우수균주로 최종 선발하여 바이오산업에 활용하기 위한 기초연구로서 본 균주의 효소 생산 및 우모 분해능을 위한 최적 배지와 배양조건을 확립하고 효소에 의해 추출되는 우모 분해산물 아미노산의 특성을 조사하였다.

닭 우모 분해 최적 배양조건. *E. meningoseptica* CS2-1 균주의 우모 분해 최적 배양조건을 확립하기 위하여 배양온도, 배지 초기 pH, 진탕배양 속도에 따른 우모 분해율을 조사한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. 최적 배양온도를 조사하기 위해 20-40°C로 3일 동안 배양한 결과, 25°C에서 첨가된 2% 우모분의 75%를 분해하여 최적 배양온도로 확인되었다.

무기염기초배지 초기 최적 pH를 조사하기 위해 pH 6.0-8.0으로 제조된 배지에 시험균주를 접종하고 25°C에서 3일 동안 배양한 결과, pH 7.5에서 79%를 분해하여 무기염기초배지의 최적 pH로 확인되었다.

Table 1. Comparison of amino acids extracted from feather meal medium by using chicken feather-degrading bacteria

Strains	Total amino acid (mol/mL)	Composition of amino acid ($\mu\text{mol/mL}$)																
		Asp	Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	Lys	His	Arg	Pro
Firmicutes																		
<i>B. amyloliquefaciens</i> CF3-4 (HQ896933)	643.1	78.7	30.3	62.0	75.2	61.8	31.9	22.3	31.2	5.4	14.1	35.7	13.8	46.5	21.7	7.0	26.8	78.6
<i>B. amyloliquefaciens</i> CS2-8 (HQ896936)	619.9	73.7	28.5	56.3	73.2	52.3	30.9	20.7	27.5	5.9	11.6	31.7	31.2	53.8	23.4	7.7	22.9	68.4
<i>B. subtilis</i> BS1-4 (HQ896935)	664.1	72.7	32.0	61.2	71.6	90.0	31.7	15.8	31.1	7.3	11.4	29.4	30.4	53.3	25.0	13.2	25.9	62.1
γ-proteobacteria																		
<i>Enterobacter</i> sp. BS2-1 (HQ896932)	667.1	78.6	32.8	65.4	75.7	62.2	30.7	21.9	28.9	4.2	14.4	37.4	30.0	52.9	20.5	8.1	25.7	77.8
Actinobacteria																		
<i>A. jejuensis</i> AF3-2 (HQ896931)	599.6	58.7	30.1	63.4	67.0	61.0	28.7	15.2	32.9	6.2	17.6	37.0	24.6	41.6	22.0	5.8	24.6	63.4
<i>B. luteolum</i> BS1-6 (HM748600)	791.7	56.5	43.1	94.9	76.1	121	54.2	11.5	59.3	2.5	34.7	62.9	14.4	33.8	16.6	7.0	26.6	76.5
Bacteroidetes																		
<i>E. meningoseptica</i> CS2-1 (HM748601)	729.7	98.8	25.4	76.9	85.4	64.6	68.7	12.0	26.5	9.4	10.0	28.4	57.4	26.1	24.1	12.0	16.3	87.7

Table 2. Analysis of optimal culture conditions for chicken feather degradation by using *E. meningoseptica* CS2-1

Culture condition	Chicken feather degradation (%)	
Incubation temperature (°C)	20	45±1.7
	25	75±1.8
	30	67±1.7
	35	49±1.3
	40	23±1.6
Chicken feather meal medium (pH)	6.0	55±1.6
	6.5	62±2.0
	7.0	71±2.5
	7.5	79±1.9
	8.0	75±1.7
Incubation speed (rpm)	120	70±1.5
	150	79±1.5
	180	85±1.6
	200	83±0.9
	220	78±1.4
250	71±1.3	

최적 배양속도를 조사하기 위해 무기염기초배지의 pH를 7.5로 조절하고 25°C에서 120-250 rpm으로 3일 동안 배양한 결과, 180 rpm에서 85%를 분해하여 최적 배양속도로 확인되었다. 이상의 결과로부터 *E. meningoseptica* CS2-1의 최적 배양조건은 25°C, pH 7.5, 180 rpm으로 확인되었고, 선행연구[Kim 등, 2010]에서 닭 우모 분해세균 분리에서 사용된 배양조건(25°C, pH 7.5, 150 rpm)에서의 분해율보다 11% 향상되는 결과를 나타내었다. 특히 *E. meningoseptica* CS2-1은 Nagal과 Jain [2010a]이 보고한 *E. meningoseptica* KB042의 최적 배양조건(37°C, pH 7.0, 150 rpm)과는 상이하였고, 최적 배양조건에서 배양 6일 후에 첨가된 1% 우모분의 82.5%를 분해하는 *E. meningoseptica* KB042 균주보다 우모 분해능이 우수하였다.

Protease의 최적 활성 pH 및 온도. *E. meningoseptica* CS2-1 균주를 우모분이 첨가된 무기염기초배지에 접종하고 최적 배양조건에서 3일 동안 배양하여 획득한 조효소액을 대상으로 최적 활성 pH와 온도를 조사하였다. Protease의 최적 활성 pH를 조사한 결과, pH 8.0에서 22.8 U/mL로 가장 높은 활성을 나타내었으며, pH 8.0 이상에서는 효소 활성이 급격히 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1A).

최적 활성 온도를 조사한 결과, 40°C에서 20.3 U/mL로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 60°C 이상에서는 효소 활성이 급격히 감소하였다(Fig. 1B). 이러한 반응 pH와 온도에 따른 활성 결과는 Nagal 등[2010b]의 *E. meningoseptica* KB042 유래 alkaline protease의 최적 활성(pH 10.0, 60°C)과는 상이하였다.

Protease 생산과 우모 분해능에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향. 본 균주의 효소 활성과 우모 분해능에 미치는 탄소원 및 질소원의 영향을 조사하기 위하여 NH₄Cl과 yeast extract를 제외한 무기염기초배지에 우모분을 2% 농도로 첨가하고 각종 탄소원과 질소원을 각각 0.1%씩 첨가하여 최적 배양조건에서 3일 동안 배양한 결과는 Table 3에 보는 바와 같다. Saccharose, maltose, lactose, glycerol, mannitol, mannose를 첨가한 경우,

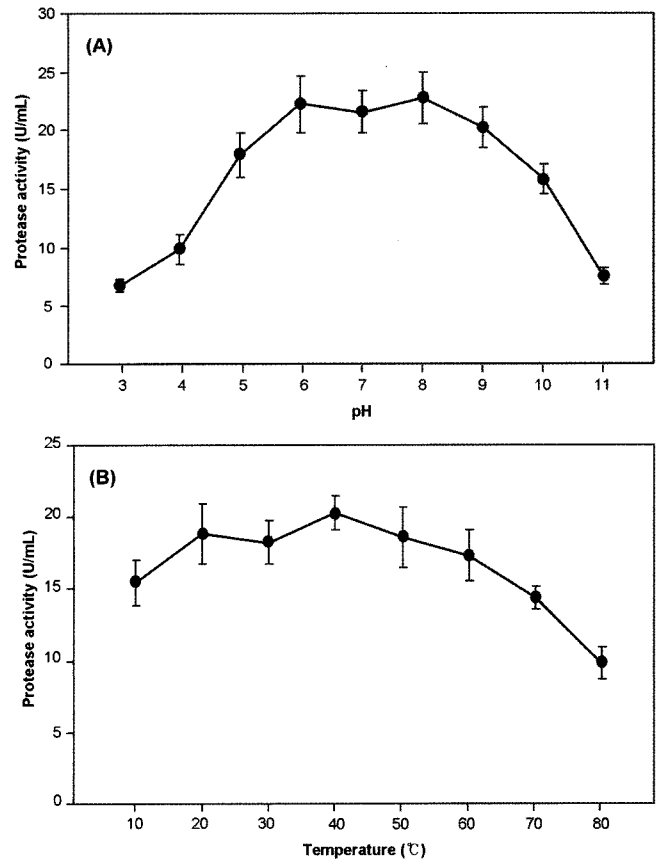


Fig. 1. Effect of reaction pH (A) and temperature (B) on activity of protease produced by *E. meningoseptica* CS2-1. The protease activity was determined after the incubation for 3 days at optimal culture conditions (initial pH 7.5, 180 rpm, and 25°C). The values are means of three replications±standard deviation.

탄소원을 첨가하지 않은 대조구(13.6 U/mL, 51%)보다 효소 활성과 분해율이 높았으며, 그 중 saccharose를 첨가한 경우 효소 활성(21.2 U/mL)과 우모 분해율(80%)이 가장 높았다. Glucose, fructose, rhamnose, galactose, sorbitol, starch 첨가 시 효소 활성이 저하되었으나, rhamnose, sorbitol, starch는 대조구보다 우모 분해율이 높았다. 대조구보다 우모 분해율이 높음에도 불구하고 효소 활성이 낮은 것은 탄소원이 효소 생산 관련대사에 있어 catabolite repression을 나타내기 때문인 것으로 추정된다 [Chu 등, 1992]. 또한, 효소 활성과 우모 분해율은 반드시 비례하지 않았는데, 이는 효소 활성이 높음에도 불구하고 우모 분해율이 낮은 것은 효소와 함께 케라틴 단백질을 효율적으로 분해하는데 요구되는 일부 accessory protein이 제거되었거나 그 생산이 억제된 것에 기인하는 것으로 추정된다는 보고가 있다 [Singh, 2002]. 이미 보고된 케라틴분해효소(keratinase) 생성 균주 중에서 *B. licheniformis* PWD-1과 *B. subtilis* FDB-29의 경우, 탄소원의 첨가가 효소의 생산을 완전히 저해하는 것으로 보고되어 있다[Wang과 Shih, 1999].

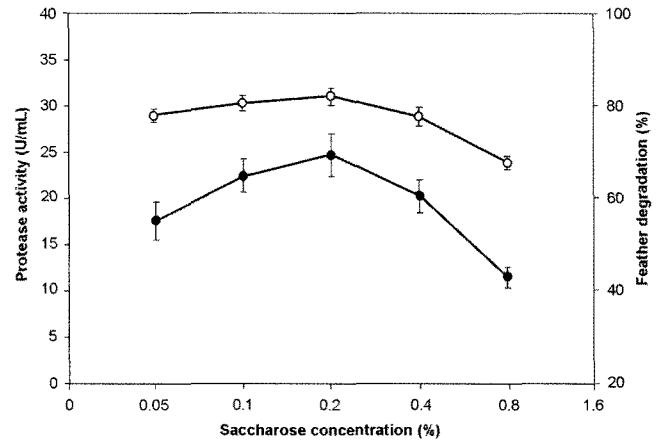
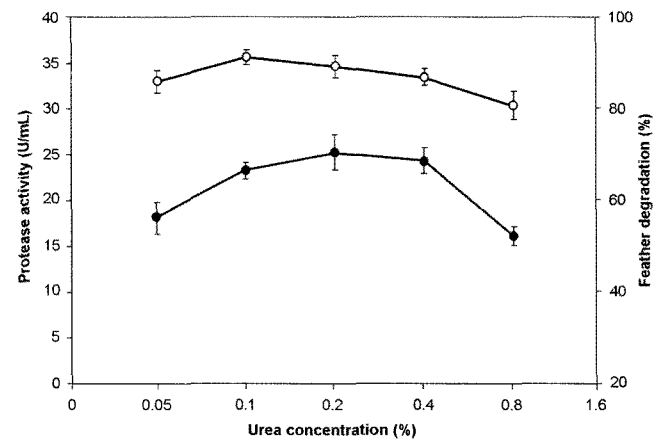
닭 우모 분해에 최적 탄소원인 saccharose를 각각 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8% 농도로 첨가하여 배지를 제조한 후 동일한 조건에서 3일 동안 배양한 후 적정 농도를 조사한 결과, 0.2% 첨가 시 24.8 U/mL로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 0.2% 이

Table 3. Effect of carbon and nitrogen sources on the production of protease and the ratio of chicken feather degradation by *E. meningoseptica* CS2-1

Source	<i>E. meningoseptica</i> CS2-1	
	Relative activity (%)	Feather degradation (%)
None	100	51±1.6
Carbon source		
Glucose	87	51±1.4
Fructose	72	45±1.9
Rhamnose	96	55±1.5
Saccharose	156	80±2.1
Maltose	114	62±0.8
Lactose	115	55±1.2
Glycerol	120	70±1.4
Galactose	56	41±0.8
Sorbitol	75	57±1.3
Mannitol	115	69±1.5
Starch	95	55±1.5
Mannose	108	65±1.2
Nitrogen source		
Beef extract	155	86±2.2
Casein	132	71±1.8
Gelatin	114	71±1.4
Peptone	180	89±1.3
Skim milk	164	86±1.9
Tryptone	136	83±0.9
Yeast extract	79	80±1.2
Urea	166	92±2.3
(NH ₄) ₂ PO ₄	93	76±0.8
NH ₄ Cl	105	74±1.3
NaNO ₃	100	77±1.8
KNO ₃	130	87±2.0
NH ₄ NO ₃	97	74±1.4

상의 농도에서는 효소 활성이 급격히 감소하였다. 우모 분해율은 0.05-0.4% 범위에서 78-82%로 큰 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 2). 균주 생육도를 조사한 결과, 0.2% 첨가 시 4.13×10^7 CFU/mL로 가장 우수한 생육도를 나타내었으며, 0.8% 첨가 시 1.83×10^5 CFU/mL로 생육도가 가장 낮았다(자료 미제시).

Protease의 생산에 결정적인 영향을 미치는 성분은 질소원으로 알려져 있다[Chu 등, 1992]. 질소원이 효소 활성과 우모 분해율에 미치는 영향을 조사한 결과, 질소원 모두 대조구의 우모 분해율(51%)보다 20-40%로 증가되어 우모 분해에 효과적이었다. 특히 beef extract, peptone, skim milk, urea (21.1-24.5 U/mL)는 대조구(13.6 U/mL)보다 1.5배 이상 효소 활성을 증가시켰다. Yeast extract의 첨가는 분해율을 크게 증가시키지만, 효소 활성이 저하된 결과로 보아 catabolite repression을 나타낸 것으로 판단된다. 탄소원과 마찬가지로 질소원 역시 동일한 상대활성 임에도 불구하고 우모 분해율이 크게 달라 효소 활성과 우모 분해가 비례관계를 나타내지 않음을 확인할 수 있었다. 반면, 닭 우모로부터 추출되는 아미노산의 함량은 효소 활성보다 우모 분해율에 비례하며, 동일한 분해율을 나타낸다 하더라도 아미노산의 함량과 조성은 균주마다 서로 상이함을 확인할 수 있었다. 상기의 결과로부터 닭 우모분으로부터 높은 함량의 아

**Fig. 2.** Effect of saccharose concentration on the protease production and feather degradation of *E. meningoseptica* CS2-1. The protease activity and feather degradation were determined after the incubation for 3 days at optimal culture conditions (initial pH 7.5, 180 rpm, and 25°C). The values are means of three replications±standard deviation. Symbols: ●, Protease activity; ○, Feather degradation.**Fig. 3.** Effect of urea concentration on the protease production and feather degradation of *E. meningoseptica* CS2-1. The protease activity and feather degradation were determined after the incubation for 3 days at optimal culture conditions (initial pH 7.5, 180 rpm, and 25°C). The values are means of three replications±standard deviation. Symbols: ●, Protease activity; ○, Feather degradation.

미노산을 추출하기에는 효소 활성이 peptone보다 약하긴 하나 우모 분해율이 높은 urea를 최적 질소원으로 선정하였다.

닭 우모 분해에 최적인 urea의 적정 농도를 조사한 결과, 0.2% 첨가 시 25.4 U/mL로 가장 높은 활성을 나타내었으며, 0.4% 이상의 농도에서는 효소 활성이 급격히 감소하였다. 우모 분해율은 0.1%에서 92%로 가장 높았고, 그 이상의 농도에서는 분해율이 점차 감소하였으며 효소 활성과 우모 분해율이 비례하지는 않았다(Fig. 3). 균주 생육도를 조사한 결과, 0.1% 첨가 시 6.77×10^8 CFU/mL로 가장 우수한 생육도를 나타내었으며, 0.8% 첨가 시 4.07×10^7 CFU/mL로 생육도가 가장 낮았다(자료 미제시).

닭 우모분의 적정 농도를 조사하기 위하여 우모분을 1~10%까지 첨가하여 배양한 후 분해율을 측정한 결과, 2% 첨가 시 최대 분해율(90~92%)을 나타내었으며 3% 이상에서는 농도가

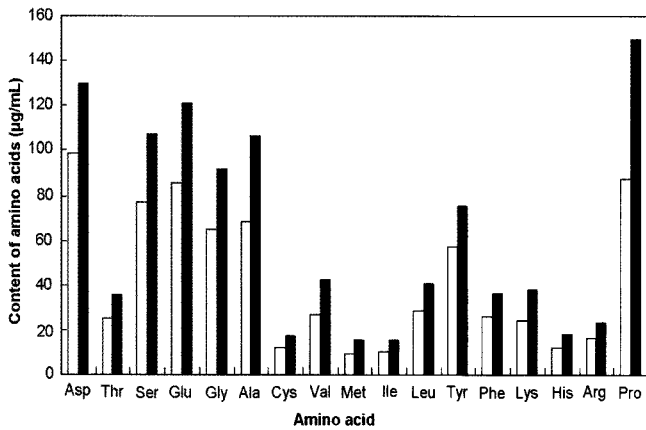


Fig. 4. Characteristics of amino acid extracted from basal and optimal conditions by using *E. meningoseptica* CS2-1. □: Content of amino acids extracted from basal conditions, ■: Content of amino acids extracted from optimal conditions.

증가할수록 분해율이 감소하였다(자료 미제시).

이상에서 확립된 닭 우모로부터 아미노산 생산을 위한 *E. meningoseptica* CS2-1의 최적 배지 및 배양조건은 NaCl 0.05%, K_2HPO_4 0.03%, KH_2PO_4 0.03%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01%, saccharose 0.2%, urea 0.1%, chicken feather meal 2% (pH 7.5, 25°C, 180 rpm)이었다. 상기 조건에서 3일 동안 배양한 결과, 21.5 U/mL의 효소 활성과 83% 분해율, 2.97×10^7 CFU/mL의 생육도를 나타내었다(자료 미제시). 그러나, Saccharose와 urea를 최적농도로 혼합 첨가 시 효소 활성과 우모 분해율이 단독 첨가 시보다 감소하였는데, 이것은 영양원의 과다로 catabolite repression에 의해 효소 활성이 감소하는 것으로 추정되나 이에 대한 것은 앞으로 좀더 자세한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

E. meningoseptica CS2-1에 의해 추출되는 아미노산 특성.

닭 우모분으로부터 아미노산 생산을 위한 *E. meningoseptica* CS2-1의 최적 배지 및 배양조건에서 추출한 아미노산의 정량 및 정성을 분석한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 우수균주 선발에서의 기본조건과 확립한 최적조건에서 추출한 아미노산의 함량과 조성을 비교 분석한 결과, 우모 분해율이 기본조건(72%)보다 20% 증가함에 따라 아미노산의 총 함량은 1,063 µmol/mL로 기본조건(729.7 µmol/mL)보다 46%로 향상되었다. 총 아미노산 중 필수 아미노산(histidine, tyrosine, lysine, methionine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine) 함유량은 315.9 µmol/mL로 기본조건(219.3 µmol/mL)보다 44%로 향상되었다.

최적조건에서 추출한 아미노산의 조성을 검토한 결과, *E. meningoseptica* CS2-1은 닭 우모분으로부터 17종류의 아미노산을 추출하였으며, 그 중 proline (14.1%), aspartic acid (12.2%), glutamic acid (11.4%), serine (10.1%), alanine (10%), glycine (8.6%), tyrosine (7.1%)이 주요 아미노산으로 분석되었고 valine (4%), leucine (3.8%), lysine (3.5%), phenylalanine (3.4%), threonine (3.3%), arginine (2.2%), histidine (1.7%), cysteine (1.6%), methionine (1.5%), isoleucine

(1.5%)이 분석되었다. 특히 17종류의 아미노산 모두 기본조건보다 31-70% 향상되었으며, 향후 실용화를 위한 대량생산에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다. Nagal과 Jain[2010a]이 보고한 *E. meningoseptica* KB042가 2% 우모분부터 생산하는 아미노산의 총 함량은 최대 937.85 µg/mL이었고, valine, tryptophan, threonine, leucine, cysteine, methionine, arginine 등 7종류의 아미노산이 분석되었다는 보고와는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

본 연구를 통하여 탐색된 *E. meningoseptica* CS2-1은 닭 우모를 분해할 수 있는 케라틴 단백질분해효소를 생산하며 우모분으로부터 높은 함량의 아미노산을 생산함을 확인할 수 있었다. 특히 본 균주의 효소 생산과 우모 분해능을 위한 최적 배양조건을 최적화한 결과, 기본 배양조건에서의 분해율(74%)보다 11% 향상된 결과를 얻을 수 있었다. 효소의 최적 활성 pH와 온도를 조사한 결과, pH 8.0 (22.8 U/mL)과 40°C (20.3 U/mL)에서 최적 활성을 나타내었다. 상기의 결과는 Nagal 등 [2010a; 2010b]이 보고한 *E. meningoseptica* KB042 유래 alkaline protease의 최적 활성과 배양조건이 상이한 것으로 나타나 앞으로 본 균주의 효소학적 특성에 관한 연구가 필요함을 알 수 있었다. 또한, 배지조건을 최적화한 결과 닭 우모분을 90% 이상 분해할 수 있었으며, 분해산물로 생성되는 아미노산의 총 함량은 1,063 µmol/mL, 필수 아미노산의 함량은 315.9 µmol/mL로 기본조건보다 1.4배 향상시킬 수 있었다. 따라서, *E. meningoseptica* CS2-1 균주는 우모 분해산물로서 총 17종류의 다양한 아미노산을 생산하여 산업공정에서 전통적으로 사용되고 있는 화학축매를 대체할 수 있는 상업용 효소로서 이용 가능성이 매우 높을 것으로 판단된다. 특히 닭 우모분으로부터 추출되는 아미노산은 친환경농업을 위한 토양개량제 및 작물 생육촉진을 위한 아미노산 비료로서의 활용 가치가 매우 높을 것으로 기대된다.

초 록

양계장 퇴비로부터 분리한 다양한 계통군의 닭 우모 분해세균 중 2% 우모분으로부터 높은 함량의 아미노산을 생성하는 *Elizabethkingia meningoseptica* CS2-1 (729.7 µmol/mL)를 선발하였다. 선발 균주의 protease 활성과 우모 분해능을 위한 최적배지 및 배양조건을 확립하고 우모 분해산물 아미노산의 특성을 조사하였다. *E. meningoseptica* CS2-1의 최적 배양조건은 25°C, pH 7.5, 180 rpm이었으며, 효소는 pH 8.0, 40°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. *E. meningoseptica* CS2-1의 아미노산 생산을 위한 최적 배지조건은 NH_4Cl 0.05%, NaCl 0.05%, K_2HPO_4 0.03%, KH_2PO_4 0.03%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01%, urea 0.1%, 닭 우모분 2%이었다. *E. meningoseptica* CS2-1를 최적 배지 및 배양조건에서 배양한 결과, 아미노산의 총 함량은 1,063 µmol/mL로 기본조건(729.7 µmol/mL)보다 46%로 향상되었고 필수 아미노산 함유량은 315.9 µmol/mL로 기본조건(219.3 µmol/mL)보다 44%로 향상되었다. 닭 우모분으로부터 추출되는 17 종류의 아미노산 중 proline (14%), aspartic acid (12%), serine (10%), alanine (10%), glycine

(9%), tyrosine (7%)이 주요 아미노산으로 추출되는 특징을 나타내었다. 따라서, *E. meningoseptica* CS2-1은 닭 우모로부터 아미노산 생산을 위한 미생물유전자원 소재로서 잠재적 가치를 클 것으로 판단된다.

Key words: amino acid, chicken feather, *Elizabethkingia meningoseptica* CS2-1, keratin, protease

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력양성사업(M-02-20080704171810)으로 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Anson (1938) The estimation of pepsin, trypsin, papain, and cathepsin with hemoglobin. *J Gen Physiol* **22**, 79-89.
- Asahi M, Lindquist R, Fukuyama K, Apodaca G, Epstein WL, and Mckerrow JH (1992) Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. *Biochem J* **232**, 139-144.
- Bernal C, Cairo J, and Coello N (2005) Purification and characterization of a novel exocellular keratinase from *Kocuria rosea*. *Enz Microb Technol* **36**, 211-216.
- Bertsch A and Coello N (2005) A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Biores Technol* **96**, 1703-1708.
- Bockle B, Galunski B, and Muller R (1995) Characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM40530. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3705-3710.
- Brysk MM and Rajaraman S (1992) Cohesion and desquamation of epidermal stratum corneum. *Prog Histochem Cytochem* **25**, 1-53.
- Chitte RR, Nalawade VK, and Dey S (1999) Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* SDS. *Lett Appl Microbiol* **28**, 131-136.
- Chon DH, Kang SM, and Kwon TJ (2003) Purification and some properties of protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364. *Kor J Microbiol Biotechnol* **31**, 224-229.
- Chu IM, Lee C, and Li TS (1992) Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC14416. *Enz Microb Technol* **14**, 755-761.
- Gupta R and Ramnani P (2006) Microbial keratinase and their prospective application: An overview. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**, 21-33.
- Hong SJ, Namkung H, Kim WY, and Paik IK (2002) Effects of supplemental feather digests on the growth of broiler chicks and taurine content in the broiler meat. *Kor J Poult Sci* **29**, 141-147.
- Hood CM and Healy MG (1994) Bioconversion of waste keratins: Wool and feathers. *Conserv Recyc* **11**, 179-188.
- Kim JH and Ko YD (2005) Effect of dietary protease (bromelain) treated feather meal on the performance and nutrient utilization in broilers. *J Anim Sci Technol* **47**, 221-232.
- Kim SJ, Cho CH, and Whang KS (2010) Isolation and characterization of keratinolytic protein chicken feather-degrading bacteria. *Kor J Microbiol* **46**, 86-92.
- Lee KH, Park KK, Park SH, and Lee JB (1987) Isolation, purification and characterization of keratinolytic proteinase from *Microsporium canis*. *Yonsei Med J* **28**, 131-138.
- Lin X, Inglis GD, Yanke LJ, and Cheng KJ (1999) Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**, 149-153.
- Lin X, Lee CG, Casale ES, and Shih JCH (1992) Purification and characterization of a keratinase from a feather-degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3271-3275.
- Lobarzewski J, Grzywnowicz K, Wawrzekiewicz K, Staszczak M, and Wolski T (1990) Feather keratin as a ligand in an affinity chromatographic technique for isolation of protease from *Trichophyton verrucosum*. *J Chromat* **520**, 223-235.
- Mitsuiki S, Ichikawa M, Oka T, Sakai M, Moriyama Y, Sameshima Y, Goto M, and Furukawa K (2004) Molecular characterization of a keratinolytic enzyme from an alkaliphilic *Nocardiosis* sp. TOA-1. *Enz Microb Technol* **34**, 482-489.
- Nagal S and Jain PC (2010a) Production of feather hydrolysate by *Elizabethkingia meningoseptica* KB042 (MTCC 8360) in submerged fermentation. *Indian J Microbiol* **50**, 41-45.
- Nagal S, Kango N, and Jain PC (2010b) Production of alkaline protease from *Elizabethkingia meningoseptica* KB042 using chicken feathers. *Ann Microbiol* **60**, 629-635.
- Onifade AA, Al-Sane NA, Al-Musallam AA, and Al-Zarban S (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.
- Parag AM and Hassan MA (2004) Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enz Microb Technol* **34**, 85-93.
- Riffel A, Brandelli A, Bellato CM, Souza GHMF, Eberlin MN, and Tavares FCA (2007) Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *J Biotechnol* **128**, 693-703.
- Sangali S and Brandelli A (2000) Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain Kr2. *J Appl Microbiol* **89**, 735-743.
- Singh CJ (2002) Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes. *Mycopathologia* **156**, 151-156.
- Takami H, Nakamura S, Aono R, and Horikoshi K (1992) Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. No. AH 101. *Biosci Biotech Biochem* **56**, 1667-1669.
- Tsuboi R, Ko I, Takamori K, and Ogawa H (1989) Isolation of a keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. *Infect Immun* **57**, 3479-3483.
- Vignardet C, Guillaume YC, Friedrich J, and Millet J (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.
- Wang JJ and Shih JCH (1999) Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *J Ind Microbiol Biotechnol* **22**, 608-616.
- Woo EO, Kim MJ, Ryu EY, Park GT, Lee CY, Son HJ, and Lee SJ (2007a) Isolation and Application of Feather-Degrading Bacteria

- for Development of Environment-Friendly Biofertilizer. *J Environ Sci* **16**, 1103-1109.
- Woo EO, Kim MJ, Son HS, Ryu EY, Jeong SY, Son HJ, Lee SJ, and Park GT (2007b) Production of protease by *Bacillus pumilus* RS7 and feather hydrolysate as a source of amino acids. *J Environ Sci* **16**, 1203-1208.
- Yamamura S, Morita Y, Hasan Q, Rao SR, Murakami Y, Yokoyama K, and Tamiya E (2002) Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. *J Biosci Bioeng* **93**, 595-600.
- Zaghloul TI, Al-Bahra M, and Al-Azmeh H (1998) Isolation, identification, and keratinolytic activity of several feather-degrading bacterial isolates. *Appl Biochem Biotechnol* **70**, 207-213.