

PB6) Keratinase 생산 균주의 분리 및 동정

우은옥*, 김정철, 손흥주¹, 이상준

부산대학교 미생물학과, ¹부산대학교 생명응용과학부

1. 서 론

Keratin은 사람의 피부 각질이나 머리카락, 동물의 뼈, 깃털을 이루고 있는 주된 구조 단백질로서, cystein disulfide 결합과 수소 결합, 소수성 결합 등의 강한 사슬결합으로 인해 일반적인 protease로는 거의 분해가 되지 않는 난분해성 단백질이다. 이러한 keratin 성 단백질 중 가금류 닭이나 오리 등의 도축 부산물인 우모는 그 배출량이 방대함과 동시에 조단백질의 함량이 85%로 매우 높아 영양적 가치가 뛰어나지만, 현재 국내에서는 도축 부산물들이 단순 폐기물로 처리 되거나 일부 물리화학적인 방법으로 처리되어 사료로 이용되고 있다. 물리 화학적 가공법은 고온, 고압의 상태에서 NaOH 등을 이용하여 분해하는 방법으로 이는 폐수, 악취 등 2차적 환경오염을 발생시키며 고온·고압에 요구되는 처리 비용 또한 매우 높아 경제성이 낮고 비효율적이므로 친환경적인 생물학적 처리 기술이 시급하다. 친환경 처리기술의 대표적 방법은 미생물이 생산하는 특이적 protease를 이용하는 것인데 keratinase 혹은 keratinolytic protease라 불리며 단순히 우모 분해에 이용하는 것 외에도 피부 각질제거를 위한 화장품 산업이나 가죽 산업 등에도 이용될 수 있다. 따라서 본 연구는 현재까지 알려진 고온성 keratinase와는 달리 산업적 이용가능성이 높은 중온성 keratinase를 연구하고, 그 분해산물의 영양적 가치를 조사함을 목적으로 한다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. native feather 분해 미생물의 분리 및 배지

경남 일대의 닭 가공 공장과 대규모 양계장 주변의 토양, 양계분뇨 및 분뇨 속에 떨어진 우모 그리고 퇴비화 중인 볏짚 등으로부터 일정량이 시료를 채취하여 native whole chicken feather (약 0.1g)가 첨가된 무기염 배지에 각각 접종한 후, 37°C, 200rpm에서 회전 진탕 배양하였다. 이들로부터 일정량의 배양액을 skim milk agar plate에 접종 및 배양하면서 균체 생육속도가 빠르고, 직경이 큰 투명한을 생성하는 콜로니들을 일차적으로 우모 분해미생물로 선정하였고 이들 배양 상등액의 protease 활성 측정을 통하여 실험균주를 최종 선정하였다.

2.2. 분리균주의 동정

생화학적 특성의 조사를 위해서 API 20E 와 50CHB kit를 사용하여 동정하였다. 또한 분자 생물학적 동정 방법으로 16S rDNA 유전자 염기서열 분석을 수행하였다.

2.3. 효소 활성 측정

Keratinolytic protease의 효소 활성 측정은 Hammersten casein 기질용액을 이용한 방법과 soluble keratin을 이용한 방법을 약간 변형하여 조사하였다. Casein을 이용한 효소 활성의 측정은 0.5% Hammersten casein 기질용액(0.1M 인산 완충용액 pH 7.5) 450 μ l에 적당하게 희석된 조효소액 50 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 20% trichloroacetic acid 용액 250 μ l를 첨가하여 반응을 종료시키고 60분 동안 정치한 후, 14000rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 상등액을 회수하였으며, 상등액의 흡광도를 280nm에서 측정하였다. Soluble keratin을 이용한 효소 활성의 측정은 실험실에서 추출한 0.2% soluble keratin 기질용액(0.1M 인산 완충용액 pH 8.0) 4ml에 조효소액 1ml를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 120분간 반응시켰다. 반응액의 1000 μ l에 20% trichloroacetic acid 용액 1000 μ l을 첨가시켜 반응을 종료시키고 상기와 같은 방법으로 활성을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분리된 우모 분해세균의 동정

분리 균주의 16S rDNA 부분 염기서열 결과와 생화학적 특성결과를 종합한 결과 본 실험 균주는 *Bacillus pumilus*로 동정되었다.

3.2. 효소 활성

Casein 기질과 soluble keratin 기질 활성 최적배지 조성, 온도, pH 조건은 유사한 양상을 보였다. 두 기질 모두 최적 배지 조성은 NaCl 0.05%, K₂HPO₄ 0.03%, KH₂PO₄ 0.04%, MgCl₂ 0.01%, Keratin 0.1%, Urea 0.05% 이었다. 생육 최적 pH는 7~9 이며, 최적온도는 casein 기질과 soluble keratin 기질 용액 모두 30 $^{\circ}$ C이었다. 세포 생육도와 깃털 분해도 에서도 상기와 같은 양상을 보아 깃털 분해능과 생육도의 연관성이 깊은 것으로 판단된다.

4. 요약

도축 부산물인 우모는 높은 영양적 가치를 가짐에도 불구하고 현재 사용하는 물리화학적 처리법의 여러 단점으로 효율적으로 이용되지 못하고 있어서 경제적 방법인 생물 공학적 처리에 대한 연구의 필요성이 커지고 있다. 본 연구에서는 그러한 방법 중 대표적인 방법으로 미생물이 생산하는 keratinase 를 이용한 생분해에 대해 연구를 하기 위해 퇴비화 벚짚에서 keratinolytic protease 생성능이 우수한 균주를 분리하였고 생화학적 동정법과 16S rDNA를 이용한 동정결과 *B. pumilus*로 동정되었다. 본 실험에서 분리된 *B. pumilus*는 기존에 활발히 연구되어 있지 않는 균주로서 native feather 분해도가 기존에 알려진 *Bacillus* 속들이 3일 정도에서 분해가 완료되는 것과는 달리 36시간~48시간 내에 깃대까지 완전히 분해하였다.

참 고 문 헌

- 손홍주, 2004, 케라틴 단백질 폐기물의 생물공학적 적용을 위한 우모 분해세균의 분리 및 동정, *Journal of Life Science*, 14(2), 229-234
- Krystyna wawrzkiwicz, 1987, Intracellular keratinase of *Trichlophyton gallinae*, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 25, 261-268