

## 우모분해세균 *Bacillus megaterium* F7-1에 의한 Keratinolytic Protease의 생산

손홍주\* · 박근태<sup>1</sup> · 김용균

밀양대학교 생물공학과, <sup>1</sup>제주대학교 해양과학부

본 연구에서는 우모의 생물학적 처리를 위하여 keratinolytic protease를 생성함으로써 우모를 분해할 수 있는 *Bacillus megaterium*을 분리된 우모로부터 분리하였다. 본 균주에 의한 keratinolytic protease 생산 최적배지 조성 및 배양조건은 0.2% glucose, 0.8% skim milk, 0.05% NaCl, 0.01%  $K_2HPO_4$ , 0.02%  $KH_2PO_4$ , 0.01%  $MgCl_2$ , 초기 pH 6.5 및 25°C이었다. 특히, skim milk의 첨가는 효소 생산에 가장 효과적이었다. 최적조건에서 배양 5일만에 269 U/ml의 효소가 생산되었으며, 배양 6일경 98%의 우모가 분해되었다.

**Key words** □ *Bacillus megaterium*, feather, keratin, keratinolytic protease

최근 국내 가금육의 소비량이 꾸준히 증가하고 있는데, 국내에서 사육되고 있는 대표적인 가금류인 닭의 2001년 도계수는 약 45,000만수로, 오리의 도축수를 감안한다면 연간 평균 4만 톤 이상의 엄청난 우모가 부산물로서 생산되고 있다(1). 이처럼 가금류의 우모는 생산량이 방대하고, 조단백질 함량이 85%로 매우 높기 때문에 양계, 개 및 양어 사료로 이용되고 있으며, 많은 동물 영양학자들의 관심의 대상이 되고 있다(12). 그러나 생우모를 사료로 사용하였을 때, 주성분인 케라틴의 난분해성으로 인하여 그 이용도가 27~63%로 매우 낮아 사료적 가치가 떨어지는 단점이 있다(6). 따라서, 우모 부산물의 재활용 및 이용 효율을 향상시키기 위하여 우모를 우모분의 형태로 가공하여 가축의 사료 등으로 사용하고 있다(11). 1997년 현재 국내 우모분의 생산량은 14,000톤으로 국내 동물성 단백질 생산량의 약 11%를 차지하고 있다(6).

우모로부터 우모분을 생산하기 위하여 널리 적용되고 있는 방법은 우모를 가압 및 가열 처리하여 분해성을 높인 후, NaOH 등에 의하여 화학적으로 분해시켜 소화흡수력을 증가시키는 것이다(11, 14). 그러나 이러한 물리화학적 처리는 폐수 및 악취를 대량 발생시킴으로써 환경오염을 유발하는 원인이 되며, 처리비용이 높아 경제성이 낮고, arginine, cystine 등 특정 아미노산이 파괴되는 동시에 단위동물에 대한 소화율도 50% 이하로 매우 저조한 것으로 알려져 있다(19). 이러한 물리화학적 우모 처리공정의 비효율성을 고려해 볼 때, 효소 및 미생물과 같은 생물촉매를 이용한 좀더 효율적이고 환경친화적인 우모 처리기술에 대한 연구가 필요함을 알 수 있다.

우모의 주성분인 케라틴은 물리화학적으로 안정성이 강하며,

자연상태에서 불용성이고, trypsin, pepsin, papain 등과 같은 일반적인 단백질 가수분해효소로는 분해되지 않는다(4). 그러나 이러한 케라틴의 독특한 물리화학적 안정성에도 불구하고 우모가 자연계에 대량 축적되지 않는 것은 우모를 분해하고 이용하는 미생물이 자연환경 중에 존재함을 의미한다. 우모를 분해하는 미생물이 생산하는 특이적인 protease를 keratinase 또는 keratinolytic protease라고 하는데, 이 효소들은 매우 응축된 기질을 분해한다는 측면에서 다른 protease 또는 peptidase와 구별되어 진다(20). 따라서, 이러한 사실은 생물학적 우모 처리법의 개발을 가능케 하는 중요한 이유가 되는 것으로 판단된다. 일례로, 미국의 경우 1990년대 이후부터 우모를 효율적으로 분해하여 소멸시키거나 그 분해산물을 유용 아미노태의 영양원으로 자원화할 수 있는 생물학적 처리법의 개발에 연구가 집중되고 있다(15, 16).

본 연구는 우모의 환경친화적 처리에 의한 유용자원화를 최종 목적으로 설계되었으며, 이에 따라 먼저 자연계에 다양하게 존재하는 미생물 중 keratinolytic protease를 생산하여 우모를 효율적으로 분해할 수 있는 토착 미생물을 분리한 후, 효소 생산에 영향을 미치는 배지조성 및 환경인자를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 우모 분해미생물의 분리 및 동정

경남 일원의 닭 가공공장 대규모 양계장 주변의 토양, 양계 분뇨 및 분뇨 속에 떨어진 우모 그리고 퇴비화 중인 뽕짚 등으로부터 일정량의 시료를 채취하였다. 시료 각 1g씩을 0.1% native whole chicken feather가 첨가된 무기염 배지에 각각 접종한 후, 30°C, 200 rpm에서 회전진탕배양하였다. 정기적으로 우모의 분해유무를 육안으로 관찰한 후, 분해정도가 큰 실험구로부터 일정량의 배양액을 채취하여 skim milk agar plate에 접종 및 배

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 055-350-5544, Fax: 055-350-5544  
E-mail: shjoo@mmu.ac.kr

양하면서 세포 생육속도가 빠르고, 직경이 큰 clear zone을 생성하는 콜로니들을 일차적으로 우모 분해미생물로 선정하였다. 선정 균주들을 각각 native whole chicken feather가 첨가된 무기염 배지에 접종하여 30°C, 200 rpm, 5일간 회전진탕배양하였다. 원심분리에 의하여 세포를 제거한 배양 상등액의 protease 활성을 측정된 후, 활성이 가장 높은 균주를 실험균주로 최종 선정하였다. 이때, 사용한 무기염 배지의 조성은 NH<sub>4</sub>Cl 0.05%, NaCl 0.05%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.01%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02%, MgCl<sub>2</sub> 0.01% 및 yeast extract 0.01%(pH 7.5)이었으며, 케라틴 공급원으로 native whole feather를 첨가하였다(25). Skim milk agar plate의 조성은 tryptone 1%, yeast extract 0.5%, skim milk 5%, NaCl 0.5% 및 agar 2%(pH 7.5)이었다.

분리균주의 동정은 Bergey's manual of determinative bacteriology (9), MicroLog<sup>TM</sup> system (Biolog, USA) 및 16S rDNA 유전자 염기서열 분석(3, 13)을 통하여 수행하였다.

### 효소 생산조건 검토

균주 분리에 사용한 무기염 배지를 기본배지로 하여 효소 생산조건을 검토하였다. 전배양은 50 ml의 nutrient broth가 함유된 250 ml 용량의 conical flask에 nutrient agar plate에서 보존중인 균주 한 백균이를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 24시간 동안 회전진탕배양하였다. 전배양액을 본배양액 50 ml가 함유된 250 ml 용량의 conical flask에 약 2×10<sup>6</sup>/ml의 농도로 접종하여 200 rpm에서 4일간 회전진탕배양하였다.

### 분석방법

분리균주에 의한 우모의 분해정도는 우모의 건조무게 감소량을 측정함으로써 정량한 후, % 백분율로 나타내었다(18). 세포 생육은 nutrient agar plate를 이용하여 생균수를 측정하여 나타내었다. Protease 활성 측정을 위하여 배양액을 17,418×g에서 15분 동안 원심분리한 후, 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성 측정을 위하여 0.5% Hammersten casein 기질용액(0.1M 인산완충용액, pH 7.5) 450 μl에 적당하게 희석된 조효소액 50 μl를 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다(5). 반응액에 10% trichloroacetic acid 용액 250 μl를 첨가하여 반응을 종료시키고, 30분 동안 정치한 후, 17,418×g에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였으며, 상등액의 흡광도를 280 nm에서 측정하였다(5). 효소의 1 unit는 상기 조건에서 1분당 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 우모 분해세균의 분리 및 실험균주의 선정

수집한 각 시료로부터 우모를 분해할 수 있는 38 균주를 분리하였다. 육안 관찰로 우모의 분해정도가 큰 18 균주를 선정하여 skim milk agar plate에 접종 및 배양하였다. 3일 동안 배양 후, 직경 1 cm 이상의 투명환을 생성하는 12 균주를 선별하였다. 선정된 균주를 우모가 첨가된 무기염 배지에 접종하여 5일 동안

배양한 결과, 붕괴된 우모로부터 분리된 F7-1 균주의 protease 활성과 우모 분해능이 가장 우수하였다. F7-1 균주는 Gram 양성균의 포자를 형성하는 막대형 또는 타원형의 호기성세균으로서, 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성을 검토한 결과, *Bacillus* 속으로 추정되었고, Biolog사의 MicroLog<sup>TM</sup> system(USA) 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 *Bacillus megaterium*으로 판명되었다(22). 현재, keratinolytic protease를 생산하는 *Bacillus* 속으로 *B. pumilis*(10), *B. cereus*(10), *B. licheniformis*(25), *B. subtilis*(23) 등이 알려져 있으며, keratinolytic protease를 생산함으로써 우모를 가수분해할 수 있는 *B. megaterium*에 대한 보고는 본 논문이 최초이다.

본 실험균주에 의한 우모 분해양상을 조사하기 위하여 whole native feather가 함유된 무기염 배지에 균주를 접종하여 30°C, 200 rpm으로 배양하면서 관찰한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 본 실험균주는 배양시간 경과에 따라 우모를 효율적으로 분해할 수 있었는데, 배양 4일 후 feather shaft를 제외한 모든 성분을 분해할 수 있었으며, 배양 6일 후 feather shaft까지 분해할 수 있었다.

### 효소생산 최적 배지조건

탄소원이 효소 생산량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 native whole feather 0.1%가 함유된 무기염 기본배지에 각종 탄소원을 0.1% 농도로 첨가하여 30°C, 200 rpm에서 4일동안 회전진탕배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. Glucose, fructose, rhamnose, galactose를 첨가한 경우, 탄소원을 첨가하지 않은 대조구보다 효소 생산량이 높았으며, 그중 glucose를 첨가한 경우에 효소 생산량이 15.3 U/ml로 가장 우수하였다. Sucrose, maltose 등은 효소 생산을 저해시켰다. 그러나 탄소원을 첨가한 모든 실험구에서 무첨가 대조구보다 세포 생육도가 높았다(자료 미제시). 대조구보다 세포 생육도가 높음에도 불구하고 효소 생산량이 저해된 탄소원의 경우, 탄소원이 효소 생산 관련대사에 있어 catabolite repression을 나타내기 때문인 것으로 추정되나

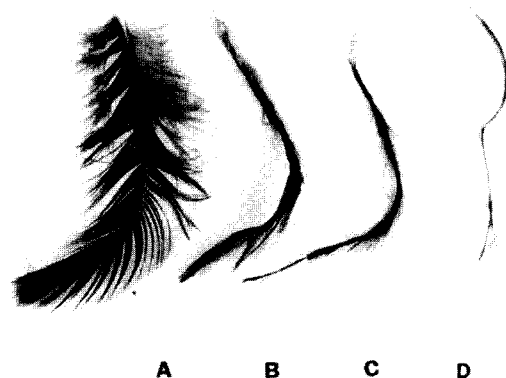


Fig. 1. Feather degradation by *B. megaterium* F7-1 after (A) 0, (B) 2, (C) 3, and (D) 4 days.

**Table 1.** Effect of carbon source on the keratinolytic protease production and feather degradation of *B. megaterium* F7-1

Carbon source (0.1%)	Protease activity (U/ml)	Feather degradation (%)
Glucose	15.3	74
Fructose	14.5	63
Rhamnose	14.1	72
Sucrose	13.2	57
Maltose	10.4	47
Lactose	10.3	62
Galactose	13.7	70
Glycerol	9.3	35
Sorbitol	12.5	73
Mannitol	9.5	51
Soluble starch	9.5	50
None	13.5	68

(7), 이에 대한 자세한 실험이 뒤따라야 할 것으로 판단된다. 그리고 탄소원의 첨가가 효소 생산에 반드시 필수적인 것은 아니었는데, 이것은 우모가 탄소원의 역할을 일부 수행한 것에 기인하는 것으로 판단된다. *B. licheniformis* PWD-1과 *B. subtilis* FDB-29의 경우, 탄수화물의 첨가가 keratinolytic protease의 생산을 완전히 저해하는 것으로 보고되어 있다(24). 한편, 효소 생산량과 우모 분해정도는 반드시 비례하지는 않았는데, 효소 생산량이 높음에도 불구하고 우모 분해도가 낮은 것은 keratinolytic protease와 함께 케라틴을 효율적으로 분해하는데 요구되는 일부 accessory protein이 제거되었거나 그 생산이 억제된 것에 기인하는 것으로 추정된다는 보고가 있다(21). 그리고, 본 실험에서는 미세하게 마쇄된 우모를 사용한 것이 아니라 native whole feather를 사용하였고, 이에 따라 각 실험구마다 사용된 native whole feather의 형태에 따라 효소와 기질간의 접촉이 일정하게 일어나지 않음으로서 이런 현상이 나타나는 것으로 추정되어, 앞으로 이에 대한 보다 자세한 연구가 필요함을 알 수 있었다. 따라서, 이후 실험부터는 우모 분해정도보다는 효소 생산량을 배양조건 결정인자로 사용하였다.

효소 생산에 최적인 glucose의 농도를 조사한 결과, 0.2%에서 효소 생산량이 19.2 U/ml로 최대였으며, 그 이상의 농도에서는 효소 생산량이 급격히 감소하였다. 우모 분해정도는 0.3%에서 가장 높았으며, 역시 우모 분해와 효소 생산량이 비례하는 것은 아니었다(Fig. 2).

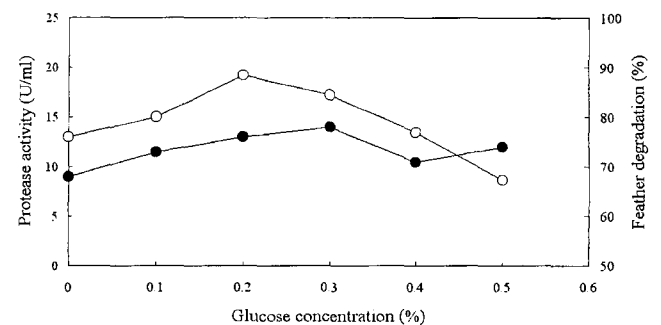
Protease의 생산에 결정적인 영향을 미치는 성분은 질소원으로 알려져 있다(7). 따라서 질소원이 효소 생산량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 yeast extract와 NH<sub>4</sub>Cl을 제외한 기본배지에 각종 질소원을 0.02%씩 첨가하여 30°C, 200 rpm에서 4일간 배양한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. Casamino acid, malt extract를 제외한 유기 질소원이 무기 질소원보다 효소 생산 및 우모 분해에 효과적이었다. 이들 유기 질소원은 질소원 무첨가 대조구보다 효소 생산량을 증가시켰으며, 그중 beef extract, gelatin, skim milk, tryptone 등(24.9-28.3 U/ml)은 대조구(14.9 U/ml)

**Table 2.** Effect of nitrogen source on the keratinolytic protease production and feather degradation of *B. megaterium* F7-1

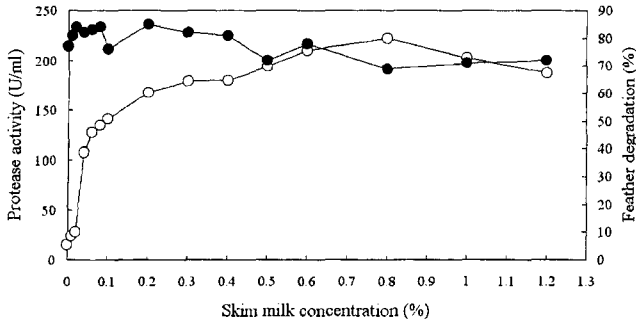
Nitrogen source (0.02%)	Protease activity (U/ml)	Feather degradation (%)
Beef extract	24.9	83
Casamino acid	5.2	61
Casein	18.5	74
Corn steep liquor	17.9	82
Gelatin	26.6	78
Malt extract	4.8	48
Polypeptone	18.5	65
Skim milk	28.3	87
Tryptone	28.1	84
Yeast extract	18.9	71
Urea	5.6	61
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.2	28
NH <sub>4</sub> Cl	4.3	28
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.0	29
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5.3	35
KNO <sub>3</sub>	5.9	47
NaNO <sub>3</sub>	3.2	32
NaNO <sub>2</sub>	0.8	13
None	14.9	69

보다 2배 정도 효소 생산량을 증가시켰다. 무기 질소원의 첨가는 효소 생산량을 크게 저해하였으므로, 이들이 catabolite repression 작용을 수행함을 알 수 있었다. 일반적으로 protease 생산균주를 배양할 때, 질소원으로 무기 질소원을 사용하면 protease 생산이 저해되는 것으로 알려져 있다(8). 탄소원과 마찬가지로 질소원의 첨가 역시 효소 생산에 반드시 필수적인 것은 아니라는 것을 알 수 있었다. 따라서 우모가 탄소원으로서의 역할뿐만 아니라 질소원의 역할도 수행하는 것으로 추정되었다.

Skim milk를 최적 질소원으로 선정하여 효소 생산에 최적인 농도를 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. Skim milk의 첨가량이 많을수록 효소 생산량은 증가하여 0.8%에서 222 U/ml



**Fig. 2.** Effect of glucose concentration on the keratinolytic protease production and feather degradation of *B. megaterium* F7-1. Growth was carried out in 250-ml conical flasks with 50 ml production medium. The protease activity and feather degradation were determined after 4 days incubation at 30°C. ○, protease activity; ●, feather degradation.

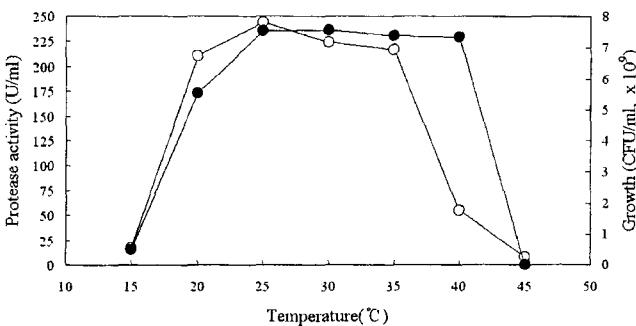


**Fig. 3.** Effect of skim milk concentration on the keratinolytic protease production and feather degradation of *B. megaterium* F7-1. Growth was carried out in 250-ml conical flasks with 50 ml production medium. The protease activity and feather degradation were determined after 4 days incubation at 30°C. ○, protease activity; ●, feather degradation.

의 최대 효소 생산량을 나타내었으며, 그 이상의 농도에서는 효소 생산량이 감소되었다. 이 결과는 본 실험균주에 의한 keratinolytic protease의 생산에는 탄소원보다 질소원이 더 중요한 인자로 작용함을 의미한다. 우모 분해정도는 탄소원 및 질소원의 경우와 마찬가지로 효소 생산량과 정확한 비례관계를 나타내지는 않았으나 skim milk의 농도가 높을수록 전체적으로 우모 분해도가 완만하게 감소하는 것으로 나타났다.

**효소생산 최적 배양조건**

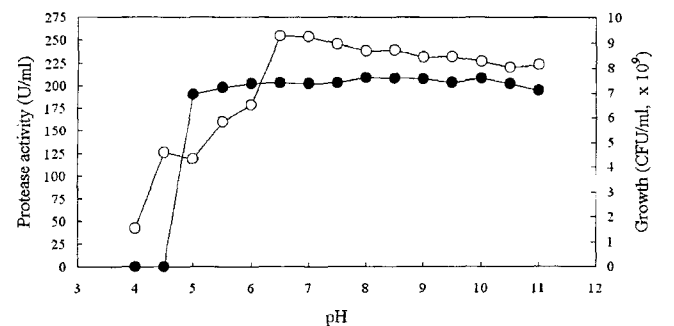
배양온도가 세포 생육 및 효소 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 상기에서 결정된 최적 배지에 전배양액을 약  $2 \times 10^6$  ml의 농도로 접종하여, 4일동안 회전진탕배양한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 본 균주는 20~40°C에서 활발하게 생육할 수 있었으며, 그중 25~40°C에서 가장 우수한 생육도를 나타내었다. 또한 15°C에서 배양한 경우, 4일 후의 세포 생육도는  $4.86 \times 10^8$ /ml로서, 20~40°C에 비해 생육도가 낮았지만 배양 6일 후  $6.98 \times 10^9$ /ml까지 생육도가 증가하였다(자료미제시). 그러나 45°C



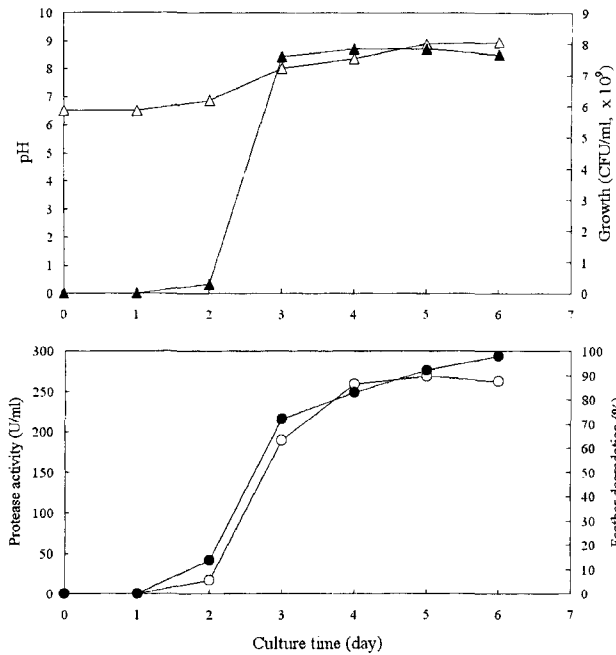
**Fig. 4.** Effect of temperature on the keratinolytic protease production and growth of *B. megaterium* F7-1. Growth was carried out in 250-ml conical flasks with 50 ml production medium. The protease activity and feather degradation were determined after 4 days incubation at 30°C. ○, protease activity; ●, growth.

에서는 배양시간을 연장하여도 더 이상 세포수가 증가하지 않고  $3.36 \times 10^6$ /ml 정도로 일정하였다. 따라서, 본 균주는 45°C에서는 거의 생육하지 못하는 것으로 판단된다. 효소 생산량은 온도 증가에 따라 비례적으로 증가하다가 25°C에서 최대의 생산량을 나타내었으며, 20~35°C에서 비교적 효소 생산량이 우수하였다. 그러나 세포 생육도가 높았던 40°C에서는 급격하게 효소 생산량이 감소되었으며, 45°C에서는 효소 활성이 나타나지 않았다. 이 결과는 본 균주가 생산하는 keratinolytic protease는 40°C 이상의 온도에서 매우 불안정하다는 것을 의미하며, 이것을 검증하기 위하여 현재 효소 특성에 대한 환경조건을 검토 중에 있다. 배지의 초기 pH가 세포 생육 및 효소 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30°C에서 4일동안 배양한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 본 균주는 pH 5.0~11.0에서 활발하게 생육할 수 있었으며, pH 4.0~4.5에서는 거의 생육할 수 없었다. 따라서 본 균주의 생육 pH 범위는 약산성~알칼리성으로 매우 넓은을 알 수 있었다. 효소 생산량은 pH 증가에 따라 비례적으로 증가하다가 pH 6.5에서 최대의 생산량을 나타내었다. pH 6.5 이상에서 효소 생산량이 완만하게 감소하였으나 pH 11.0에서도 여전히 우수한 효소 생산량을 나타내어, 본 균주가 생산하는 keratinolytic protease는 알칼리에 내성을 가지고 있는 것으로 판단되며, 효소 특성에 대한 검토를 해 보아야 되겠지만 이러한 결과는 본 효소를 산업적으로 응용하고자 할 때 매우 유용한 특성이 될 것으로 일단 추정된다. *B. subtilis*와 *B. pumilis*의 경우, keratinolytic protease의 생산이 각각 pH 5~9, pH 5~6에서 최적인 것으로 보고되어 있으며(10), *Bacillus* sp. P-001A는 pH 4.5~11.5에서 효소 생산이 최적인 것으로 알려져 있어(2), 본 균주와 비슷한 경향을 나타내었다.

이상에서 확립된 keratinolytic protease 생산을 위한 최적 배지 및 배양조건은 glucose 0.2%, skim milk 0.8%, NaCl 0.05%,  $K_2HPO_4$  0.01%,  $KH_2PO_4$  0.02%,  $MgCl_2$  0.01%, 초기 pH 6.5 및 배양온도 25°C이었다. Native whole feather를 사용함으로써 초래되는 우모 분해와 효소 생산량간의 불균형을 최소화하기 위하여 우모를 homogenizer (Super Matdol, Seoul, Korea)로 마쇄한 후,



**Fig. 5.** Effect of initial pH on the keratinolytic protease production and growth of *B. megaterium* F7-1. Growth was carried out in 250-ml conical flasks with 50 ml production medium. The protease activity and feather degradation were determined after 4 days incubation at 30°C. ○, protease activity; ●, growth.



**Fig. 6.** Time course of keratinolytic protease production, growth and feather degradation by *B. megaterium* F7-1. Experiments were carried out using the optimized medium, initial pH 6.5, and 25°C. ○, protease activity; ●, feather degradation; △, pH; ▲, growth.

최적배지에 0.1% 농도로 첨가하여 회분배양을 실시한 결과는 Fig. 6에서 보는 바와 같다. 1일의 유도기를 거쳐 배양 3일만에 대수기 말기에 도달하였으며, 배양 6일까지 정지기가 지속되었다. 그러나 효소 생산은 배양 5일경 269 U/ml로 최대였으며, 그 후 감소하였다. *B. cereus*와 *B. pumilis*는 대수기 말기에 최대 효소 활성을 나타내는 것으로 보고되어 있다(10). 우모는 세포 생육과 효소 생산이 더 이상 증가하지 않는 배양 6일까지 계속 분해되었는데, 이때 우모의 분해율은 98%이었으며 육안으로도 우모가 거의 관찰되지 않았다. 그리고 배지조건 검토시 초래된 우모 분해와 효소 생산간의 불균형도 나타나지 않았는데, 이것은 효소 생산과 우모 분해율간의 관계를 검토할 때, 사용되는 우모의 형태가 중요함을 의미한다. 배양액의 pH는 배양 시간 경과에 따라 증가하기 시작하여 배양 4일 후, pH 8.8~8.9를 나타내었다. 케라틴 분해균주를 배양할 경우, 배양시간 경과에 따라 배양액의 pH가 알칼리성으로 변화되는 것은 케라틴 기질에 존재하는 강력한 disulfide bond가 환원에 의하여 절단되었다는 것을 의미한다(17). 따라서, 본 균주는 sulfitolysis 기능을 수행하는 keratinolytic protease를 생산하는 것으로 추정되나 이에 대한 것은 앞으로 좀 더 자세한 연구가 필요함을 알 수 있었다.

본 연구에서 사용된 *Bacillus megaterium* F7-1은 케라틴을 거의 완전히 분해할 수 있는 능력을 가지고 있었으며, 약산성-알칼리성에서도 keratinolytic protease를 생산할 수 있었다. 따라서 본 균주는 사료산업 뿐만 아니라 케라틴 분해관련 산업 - 가죽, 화장품 산업 - 등에도 매우 유용하게 사용될 가능성이 있음을 알 수 있었다.

## 감사의 글

이 논문은 2002년도 한국학술진흥재단의 지원(KRF-2002-041-F00011)에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 한국단미사료협회. 2002. 단미, 보조사료현황.
2. Atalo, K. and B.A. Gashe. 1993. Protease production by a thermophilic *Bacillus* species(P-001A) which degrades various kinds of fibrous protein. *Biotechnol. Lett.* 15, 1151-1156.
3. Ausubel, F.A., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.A. Smith, J.G. Seidman, and K. Struhl. 1988. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
4. Barrow, G.I. and R.K.A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge University Press, New York.
5. Charney, J. and R.M. Tomarelli. 1947. A colourimetric method for the determination of proteolytic activity of duodenal juice. *J. Biol. Chem.* 171, 501-505.
6. Choi, I. and H.S. Chang. 1999. Isolation and cultural characteristics of microorganism for the utilization of feather meal. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed* 23, 59-66.
7. Chu, I.M., C. Lee, and T.S. Li. 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC14416. *Enzyme Microb. Technol.* 14, 755-761.
8. Fujiwara, N. and K. Yamamoto. 1987. Production of alkaline protease in a low-cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. *J. Ferment. Technol.* 65, 345-348.
9. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
10. Kim, J.M., W.J. Lim, and H.J. Suh. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochem.* 37, 287-291.
11. Kim, Y.B., J.B. Lee, K.S. Sung, and N.H. Lee. 1998. Effects of physical processing on protein content and pepsin-digestibility of feather meals. *Kor. J. Anim. Sci.* 40, 103-110.
12. Lahl, W.J. and S.D. Braun. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* October, 68-71.
13. Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175, *In* E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York.
14. Lee, N.H., Y.B. Kim, H.J. Kim, K.S. Seong, J.H. Rho, and C.K. Han. 1999. Effects of physicochemical treatment on the isolation of keratinaceous protein and amino acids of feather meal. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed* 23, 15-20.
15. Lin, X., C.C. Lee, E.S. Casale, 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.
16. Lin, X., J.C.H. Shih, and H.E. Swaisgood. 1996. Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4273-4275.
17. Onifade, A.A., N.A.Al-Sane, A.A.Al-Musallam, and S. Al-Zarban. 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. *Bioresource Technol.* 66, 1-11.

18. Oyeka, C.A. and H.C. Gugnani. 1997. Keratin degradation by *Scytalidium* species and *Fusarium solani*. *Mycoses* 41, 73-76.
19. Papadopoulos, M.C. 1985. Processed chicken feathers as feedstuff for poultry and swine. A review. *Agric. Wastes* 14, 275-290.
20. Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 597-635.
21. Singh, C.J. 2002. Optimization of an extracellular protease of *Chrysosporium keratinophilum* and its potential in bioremediation of keratinic wastes. *Mycopathologia* 156, 151-156.
22. Son, H.J., Y.G. Kim, and Y.K. Park. 2003. Isolation and identification of feather-degrading bacteria for biotechnological applications of keratinaceous protein waste. *Kor. J. Life Sci.* in press.
23. Taha, I.Z. 1998. Cloned *Bacillus subtilis* alkaline protease(*apr A*) gene showing high level of keratinolytic activity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 70/72, 199-205.
24. Wang, J.J. and J.C.H. Shih. 1999. Fermentation production of keratinase from *Bacillus licheniformis* PWD-1 and a recombinant *B. subtilis* FDB-29. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22, 608-616.
25. Williams, C.M., C.S. Richter, J.M. MacKenzie, Jr., and J.C.H. Shih. 1990. Isolation, identification, and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1509-1515.

(Received January 5, 2004/ Accepted March 2, 2004)

---

**ABSTRACT : Production of a Keratinolytic Protease by a Feather-Degrading Bacterium, *Bacillus megaterium* F7-1**

**Hong-Joo Son\***, **Geun-Tae Park<sup>1</sup>**, and **Yong-Gyun Kim** (Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, <sup>1</sup>Faculty of Marine Science, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea)

*Bacillus megaterium* F7-1 producing keratinolytic protease was isolated from decayed chicken feather. The optimal culture conditions for the production of keratinolytic protease by *B. megaterium* F7-1 were investigated. The composition of optimal medium for the keratinolytic protease was 0.2% glucose, 0.8% skim milk, 0.05% NaCl, 0.01% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 0.01% MgCl<sub>2</sub>. Especially, skim milk was found to be the most effective compound in keratinolytic protease production. The optimal temperature and initial pH were 6.5 and 25°C, respectively. The keratinolytic protease production under optimal condition reached a maximum of 269 U/ml after 5 days of cultivation. *B. megaterium* F7-1 degraded 98% of the feather used in the optimized medium within 6 days.