

케라틴 단백질 폐기물의 생물공학적 적용을 위한 우모 분해세균의 분리 및 동정

손홍주* · 김용균 · 박연규¹

밀양대학교 생명공학과, ¹밀양대학교 환경공학과

Received October 13, 2003 / Accepted January 25, 2004

Isolation and Identification of Feather-Degrading Bacteria for Biotechnological Applications of Keratinaceous Protein Waste. Hong-Joo Son*, Yong-Gyun Kim and Yeon-Kyu Park¹. Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea, ¹Department of Environmental Engineering, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea - Feathers, which are almost pure keratin protein, are produced in large amounts as a waste by-product at poultry-processing plants. Keratinolytic enzymes may have important uses in biotechnological processes involving keratin-containing wastes from poultry and leather processes. In this study, screening and identification of keratin-degrading bacteria were investigated. Five keratin-degrading bacterial strains (F3-1, F3-4, F7-1, C1-1, C1-2) were isolated from compost and decayed chicken feather. On the basis of morphological, physiological studies, and Biolog system, all isolates were identified as the genus *Bacillus*. Among them, the strain F7-1 had the highest feather-degrading activity and was selected for further taxonomical study. Phylogenetic analysis of strain F7-1 based on comparison of 16S rDNA sequences revealed that this strain is closely related to *Bacillus megaterium*.

Key words - Feather, keratin, keratinolytic protease, *Bacillus megaterium*

가축의 도축부산물인 뼈, 내장, 모발, 혈액 및 우모 등을 가축사료와 같은 유용자원으로 이용하기 위한 많은 연구가 전세계적으로 오래 전부터 시도되어 왔다. 이중 가금류의 우모는 생산량이 방대하고, 단백질 함량이 높기 때문에 많은 동물 영양학자들의 관심의 대상이 되고 있다[11]. 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[10].

우모는 물리화학적으로 안정성이 강하며, 자연상태에서 불용성이고, trypsin, pepsin, papain 등과 같은 일반적인 단백질 가수분해효소로는 분해되지 않는 단백질인 케라틴으로 구성되어 있다[2]. 현재, 이러한 우모의 난분해성을 해결하면서 가축의 사료로 이용하기 위하여 적용되고 있는 방법은 우모를 가압 및 가열 처리하여 분해성을 높인 후, NaOH 등에 의하여 화학적으로 분해시켜 소화흡수력을 증가시킨 우모분(feather meal)을 생산하는 것이다[9,13]. 그러나 이러한 물리화학적 처리는 그 공정 중 폐수 및 악취가 대량 발생함으로써 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[19,20]. 이러한 우모 처리공정의 비효율성을 고려해 볼 때, 효소 및 미생물과 같은 생물촉매를 이용한 좀더 효율적이고 환경친화적인 우모 처리기술에 대한 연

구가 필요함을 알 수 있다.

상기와 같은 케라틴의 독특한 물리화학적 안정성에도 불구하고 우모가 자연계에 대량 축적되지 않는 것은 우모를 분해하고 이용하는 미생물이 자연환경 중에 존재함을 나타낸다. 우모를 분해하는 미생물이 생산하는 특이적인 protease를 keratinase 또는 keratinolytic protease라고 하는데, 이 효소들은 매우 compact한 기질을 분해한다는 측면에서 다른 protease 또는 peptidase와 구별되어 진다[21]. 지금까지 보고된 미생물기원의 keratinolytic protease는 serine protease의 특성을 나타내는 고온성 효소가 대부분을 차지하며, 일반적인 protease가 분해하기 어려운 섬유상 기질 등을 효율적으로 분해할 수 있음이 밝혀졌다[1]. 자연환경에 keratinolytic protease를 생산하는 미생물이 존재한다는 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[14,15].

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 분리 및 동정함으로써 새로운 생물자원을 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

우모 분해미생물의 분리 및 배지

경남 일원의 닭 가공공장과 대규모 양계장 주변의 토양,

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5544, FAX : +82-55-350-5544

E-mail : shjoo@mnu.ac.kr

양계분뇨 및 분뇨 속에 떨어진 우모 그리고 퇴비화 중인 벚짚 등으로부터 일정량의 시료를 채취하였다. 시료 각 1 g씩을 native whole chicken feather (약 0.1 g)가 첨가된 무기염 배지에 각각 접종한 후, 30°C, 200 rpm에서 회전진탕배양하였다. 정기적으로 whole feather의 분해유무를 육안으로 관찰한 후, 분해정도가 큰 실험구로부터 일정량의 배양액을 채취하여 skim milk agar plate에 접종 및 배양하면서 균체 생육속도가 빠르고, 직경이 큰 투명환을 생성하는 콜로니들을 일차적으로 우모 분해미생물로 선정하였다. 선정균주들을 각각 native whole chicken feather가 첨가된 무기염 배지에 접종하여 30°C, 200 rpm, 5일간 회전진탕배양하였다. 원심분리에 의하여 균체를 제거한 배양 상등액의 protease 활성을 측정 후, 활성이 가장 높은 균주를 실험균주로 최종 선정하였다. 이때 사용한 무기염 배지의 조성은 NH₄Cl 0.05%, NaCl 0.05%, K₂HPO₄ 0.01%, KH₂PO₄ 0.02%, MgCl₂ 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 일차 동정

분리균주의 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성을 *Manual of methods for general bacteriology*[6] 및 *Biochemical tests for identification of medical bacteria*[16]에 준하여 검토하였으며, 도출된 결과를 *Bergey's manual of determinative bacteriology*[7] 및 *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria*[2]를 참조하여 동정하였다. 또한 *Biolog*사의 MicroLog™ system (USA)을 이용하여 분리균주를 4시간 및 24시간 동안 배양한 후, 발색반응을 측정하였다. 측정 결과를 MicroLog™ release 4.0 software를 이용하여 95개 탄소원 이용 패턴에 따라 균주를 동정하였다.

DNA 추출 및 16S rDNA의 PCR 증폭

Genomic DNA의 분리는 Ausubel 등[1]의 방법에 준하여 추출하였다. 즉, 분리균주를 Luria-Bertani broth에서 20시간 동안 배양한 후, cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) 방법을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 주형으로 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR을 위해서 Bioneer사의 AccuPower® PCR PreMix tube에 DNA 주형 1 µL (약 40 ng), 각각 1 µL의 primers, 17 µL의 멸균된 3차 증류수를 첨가하여 잘 섞었다. PCR은 initial denaturation 94°C, 3분; denaturation 94°C, 1분; annealing 55°C, 1분; extension 72°C, 3분의 조건으로 30 cycle을 실시한 후, final extension을 72°C에서 5분간 유지하여 증폭을 종결하였다. 16S rDNA를 증폭하기 위하여 사용된 primers는 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 합성된 27F (5'-AGAGTTTGATCMITGGCTCAG-3') primer와

1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primer이었다[12].

16S rDNA의 PCR 증폭산물의 정제는 1% agarose gel에 PCR 증폭산물을 100 V의 전압으로 25분 동안 전기영동한 후, EtBr로 염색하여 원하는 band를 잘라 Qiagen PCR purification kit (Qiagen)를 이용하여 정제하였다.

16S rDNA 염기서열 분석 및 계통분류

정제된 PCR 증폭산물의 염기서열 결정은 ABI 377기종의 auto-sequencer를 사용하여 dye terminator sequencing method로 protocol에 따라 실시하였다. 염기서열 분석을 통하여 얻어진 분리균주의 부분 염기서열은 Blast network service를 이용하여 GenBank, EMBL, DDBJ에 등록된 다른 세균의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 각 염기서열의 alignment는 Clustal X (version 1.81) program package[24]를 이용하여 정렬하였고, Neighbor-joining method[22]에 의거하여 각 세균들의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

분석방법

분리균주에 의한 chicken feather의 분해정도는 우모의 건조무게 감소량을 측정함으로써 정량하였다[18]. Protease 활성 측정을 위하여 배양액을 12,000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 후, 그 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소 활성 측정을 위하여 0.5% Hammersten casein 기질용액(0.1 M 인산완충용액, pH 7.5) 450 µL에 적당하게 희석된 조효소액 50 µL를 첨가하여 30°C에서 1시간 동안 반응시켰다[3]. 반응액에 10% trichloroacetic acid 용액 250 µL를 첨가하여 반응을 종료시키고, 30분 동안 정치한 후, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 회수하였으며, 상등액의 흡광도를 280 nm에서 측정하였다[3]. 효소의 1 unit는 상기 조건에서 1분당 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 하였다.

결과 및 고찰

우모 분해세균의 분리

경남 일원에 위치하는 닭 가공공장과 양계장 주변의 토양, 양계분뇨 및 퇴비 등 각 시료로부터 chicken feather를 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(Fig. 1). 선정된 균주를 chicken feather가 첨가된 무기염 배지에 접종하여 5일 동안 배양한 결과, 퇴비로부터 분리된 C1-1 및 C1-2, 닭 가공공장 주변 토양으로부터 분리된 F3-1 및 F3-4, 붕괴된 우모로부터 분리된 F7-1 균주의 protease 활성이 우수하였다(Table 1). 이 중 protease 활성과 우모 분해능이 가장 우수한 F7-1 균주를

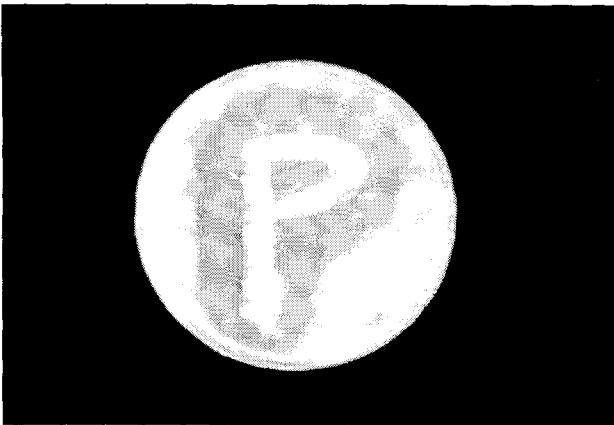


Fig. 1. Formation of clear zone on protease production medium containing 5% skim milk powder. Strain F7-1 was incubated at 30°C for 3 days.

Table 1. Screening of feather-degrading bacteria

Strain	Sampling site	Protease activity (unit/ml)	Feather degradation (%)
C1-1	Compost	10.3	57
C1-2	Compost	9.8	60
F3-1	Soil near poultry processing plant	10.8	60
F3-4	Soil near poultry processing plant	11.9	62
F7-1	Feather disintegrated	12.5	65

실험균주로 선정하였다.

분리균주의 일차 동정

실험균주의 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성을 밝힌 결과는 Table 2와 같다. 본 균주는 Gram staining시 양성을 나타내었으며, 포자를 형성하는 막대형 또는 타원형의 호기성 세균이었고, 3% KOH string test에서 음성을 나타내어 Gram

Table 2. Taxonomical characteristics of the isolated strain F7-1

Content	Characteristic	Content	Characteristic
Cell shape	Rod or ellipsoidal	Growth in 10% NaCl	-
Cell size	3.8-1.3 µm	Arginine dihydrolase	-
Gram staining	+	Lysine decarboxylase	-
Spore formation	+	ONPG	+
KOH string test	-	Catalase	+
Motility	+	Indole production	-
Chain of cells	+	VP	-
Colony shape	Circular, convex	Utilization of citrate	+
Colony color	Pale yellow	Casein hydrolysis	+
Glucose (acid)	+	Starch hydrolysis	+
Growth at 50°C	-	Gelatin hydrolysis	+

staining의 결과를 재확인할 수 있었다. 세포는 운동성이 있었으나 배양시간 경과에 따라 운동성이 소실된 variant가 나타났다. 이러한 현상은 *Bacillus* 속에서 일반적으로 관찰되는 사실로 보고되어 있다[2]. Nutrient agar plate에서 원형의 불룩한 콜로니를 형성하였으며, 50°C 및 10% NaCl에서 생육하지 못하는 특성이 관찰되었다. Catalase를 가지고 있었으나 arginine dihydrolase 및 lysine decarboxylase는 가지고 있지 않았으며, casein, starch 및 gelatin을 가수분해할 수 있었다. 이상의 결과를 Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria 및 Bergey's manual of determinative bacteriology에 준하여 검토한 결과, 실험균주는 *Bacillus* 속에 포함됨을 알 수 있었으나 정확하게 일치하는 종(species)은 없었다.

따라서 보다 정확한 균주 동정을 위하여 Biolog사의 MicroLog™ system (USA)을 이용하여 실험균주를 24시간 동안 배양한 후, 발색반응을 측정하였다. 그 결과, 본 실험균주는 *Bacillus* 속에 포함됨이 확실하였고, 그중 *Bacillus megaterium*과 가장 유사한 것으로 나타났다. 그러나 *B. megaterium*과의 similarity index value (SIM)가 0.49로 나타남에 따라 정확한 종의 동정을 위하여 다른 방법이 필요함을 알 수 있었다. Biolog user guide에 의하면 MicroLog™ system을 이용하여 세균을 동정할 경우, 각각 4시간 및 24시간 배양시, 균주의 SIM이 0.75 및 0.5 이상이 되어야만 정확하게 동정되었음을 나타낸다.

16S rDNA 염기서열 분석 및 계통분류

실험균주의 보다 정확한 동정을 위하여 16S rDNA의 염기서열 분석을 실시하였다. 실험균주의 genomic DNA를 추출하여 16S rDNA 유전자 primers를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 600 bp 정도의 증폭된 DNA 단편을 확인할 수 있었으며, 이 DNA의 부분 염기서열을 분석한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 16S rDNA 부분 염기서열을 NCBI GenBank에 등록된 유사 균주와 비교분석하여 유전자간 상관성을 알아본 결과, 본 실험균주는 *B. megaterium*과 98%의 상동성을 가

GACAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGCTTGCTT
 CTATGACGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTCGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGA
 TAACCTCGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTCATGGGAGATGATTG
 AAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
 TAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGTGCGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACG
 AAAGTCGACGGAGCAACGCCGCGTGTGATGAAGGCTTTCGGTCTGTAAGTCTGTT
 GTTAGGAAGAACAAGTACGAGAGTAAGTCTGCTGACCTTGACGGTACCTAACCGAAG
 CCACGGCTAACTACNTGCCANCAGCCGCGTAACNTANGTGGCAAGCGTTATCCGGAA
 TTATTGGGCGTAAAGCGCGCANGCGGNTTCTTAANTCNGANGNAAACCACCGCTGCTC

Fig. 2. Partial nucleotide sequence of 16S rDNA from the isolated strain F7-1.

지고 있었으며, NCBI Blast의 bl2seq program을 이용하여 염기서열을 정렬한 데이터는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. Drancourt 등[4]에 의하면, 종 수준의 동정으로는 99% 이상의 상동성을 가져야 하며, 속 수준의 동정으로는 97% 이상의 상동성을 가져야 한다고 보고되어 있다. 그러나 아직 16S rDNA 염기서열을 기초로 하여 세균 동정에 관여하는 염기서열 상동성 비교의 기준은 정해진 것은 아니다[5]. 한편, 16S rDNA 구조에 기초하여 실험균주와 알려진 *Bacillus*

spp.와의 분자계통학적 유연관계를 파악하기 위하여 Neighbor-joining method[22]에 의하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성하였고, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 즉, 분자계통학적 분석에서도 본 실험균주는 *Bacillus* 속을 포함하는 계통학적 그룹에 속하며, 특히 *B. megaterium*과 높은 유연관계를 나타내었다. 이상과 같이 실험균주의 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성, Biolog system을 이용한 분석 및 16S rDNA 염기서열 분석 결과에 의거하여 본 실험균주는 *B. megaterium*으로 동정되었다. 결과를 제시하지는 않았지만 균주 C1-1, C1-2, F3-1 및 F3-4는 모두 *B. pumilus*로 동정되었다.

현재, keratinolytic protease를 생산하는 *Bacillus* 속으로 *B. pumilis*[8], *B. cereus*[8], *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 feather가 함유된 무기염 배지에 균주를 접종하여 30 °C, 200 rpm으로 배양하면서 관찰한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 본 실험균주는 배양시간 경과에 따라 우모를 효율적으로 분해할 수 있었는데, 배양 4일 후, feather shaft를

```

Strain F7-1 : 4 aacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgagcgaactgattagaagcttgcttcta 63
B. megaterium : 6 aacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgagcgaactgattagaagcttgcttcta 65
Strain F7-1 : 64 tgacgttagcggcggacgggtgagtaacacgctgggcaacctgcctgtaagactgggataa 123
B. megaterium : 66 tgacgttagcggcggacgggtgagtaacacgctgggcaacctgcctgtaagactgggataa 125
Strain F7-1 : 124 cttcgggaaaccgaagctaataccggataggatcttctccttcattgggagatgattgaaa 183
B. megaterium : 126 cttcgggaaaccgaagctaataccggataggatcttctccttcattgggagatgattgaaa 185
Strain F7-1 : 184 gatggtttcggctatcacttacagatgggcccgcggtgcattagctagttggtaggtaa 243
B. megaterium : 186 gatggtttcggctatcacttacagatgggcccgcggtgcattagctagttggtaggtaa 245
Strain F7-1 : 244 cggctcaccaaggcaacgatgcatagccgacctgagaggggtgatcggccacactgggact 303
B. megaterium : 246 cggctcaccaaggcaacgatgcatagccgacctgagaggggtgatcggccacactgggact 305
Strain F7-1 : 304 gagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaatcttcgcaatggacgaaa 363
B. megaterium : 306 gagacacggcccagactcctacgggagcagcagtagggaatcttcgcaatggacgaaa 365
Strain F7-1 : 364 gtctgacggagcaacgcccgtgagtgatgaaggcttccgggctgtaaaactctgttgtt 423
B. megaterium : 366 gtctgacggagcaacgcccgtgagtgatgaaggcttccgggctgtaaaactctgttgtt 425
Strain F7-1 : 424 agggaagaacaagtacgagagtaactgctcgtaccttgacggtacctaaccagaaagcca 483
B. megaterium : 426 agggaagaacaagtacgagagtaactgctcgtaccttgacggtacctaaccagaaagcca 485
Strain F7-1 : 484 cggctaactacntgccancagccgcgtaatacctangtggcaagcggttatccggaatta 543
B. megaterium : 486 cggctaactacntgccancagccgcgtaatacctangtggcaagcggttatccggaatta 545
Strain F7-1 : 544 ttgggcgtaaaagcgcgcgagcggnttcttaantcngangnaa 588
B. megaterium : 546 ttgggcgtaaaagcgcgcgagcggnttcttaantcngangnaa 590
    
```

Fig. 3. Alignment data of 16S rDNA nucleotide sequences of the isolated strain F7-1 and *Bacillus megaterium* (AJ 550462). The alignment was generated by the bl2seq program in NCBI Blast. Differences between these sequences are indicated by asterisks (*).

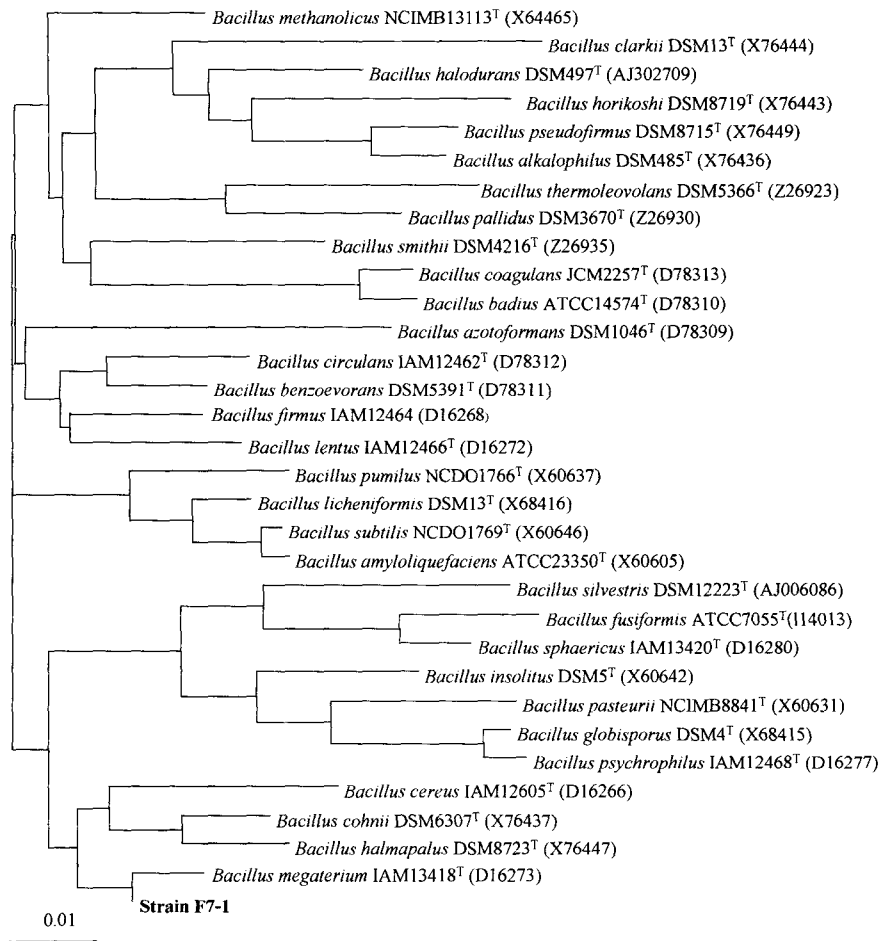


Fig. 4. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of strain F7-1 and the type strains of some *Bacillus* species. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position. Superscript T means the type strain.

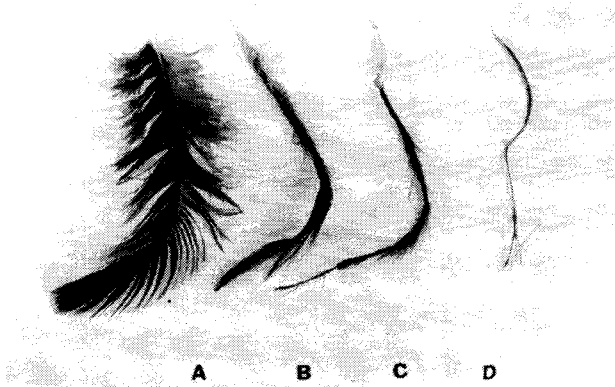


Fig. 5. Feather degradation by *B. megaterium* F7-1 after (A) 0, (B) 2, (C) 3, and (D) 4 days.

제외한 모든 성분을 분해할 수 있었으며, 배양 6일 후 feather shaft까지 분해할 수 있었다. 이러한 결과를 기초로 본 실험 균주는 기보고된 *Bacillus* spp.가 생산하는 keratinolytic protease의 특성 및 우모 분해조건 등이 상이할 것으로 판단

되어, 현재 생산조건 및 조효소의 특성에 대하여 연구를 계속하고 있다.

본 연구에서 사용된 *Bacillus megaterium* F7-1은 케라틴을 거의 완전히 분해할 수 있는 능력을 가지고 있었다. 따라서 본 균주는 사료산업 뿐만 아니라 가죽산업의 탈모공정이나 사람 피부의 죽은 세포성분인 케라틴을 제거하기 위한 화장품 조성물 등 케라틴 분해관련 산업에도 매우 유용하게 사용될 가능성이 있음을 알 수 있었다.

요 약

케라틴으로 구성되어 있는 우모는 도계 공장에서 부산물로 대량 배출되는 단백질 폐기물이다. 현재, 물리화학적 처리를 통하여 우모를 가축의 사료로 재활용하기 위한 방법이 시행되고 있으나 이러한 방법은 많은 단점을 가지고 있으며, 결과적으로 keratinolytic protease의 이용은 우모의 생물공학적 처리를 위해 반드시 필요한 과정임을 알 수 있다. 본 연구에서는 우모의 생물학적 처리를 위하여 keratinolytic protease를 생성함으로써 우모를 분해할 수 있는 세균을 자연계

로부터 분리한 후, 그 분류학적 위치를 검토하였다. 퇴비화 중인 벚짚, 닭 가공공장 주변의 토양 및 붕괴중인 우모로부터 keratinolytic protease 생성능이 우수한 5 균주를 최종 선정하였다. 그중 효소 생성능과 우모 분해능이 가장 우수한 F7-1을 실험균주로 선정하여 형태학적, 배양적 및 생화학적 특성을 조사한 결과, *Bacillus* sp.로 동정되었으며, Biolog system을 이용한 동정에서도 *Bacillus* sp.로 조사되었다. 보다 정확한 균주 동정을 위하여 16S rDNA 염기서열 분석을 수행하였으며, 그 결과 F7-1 균주는 *B. megaterium*과 계통진화학적으로 가장 유연관계가 높았다.

감사의 글

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

참고 문헌

- 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.
- 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.
- 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.
- Drancourt, M., C. Bottel, A. Carlioz, R. Martelin, J. P. Gayral and D. Raoult. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3623-3630.
- Fox, G. E., J. D. Wisotzkey and P. Jurtschuk, Jr. 1992. How close is close: 16S rDNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 166-170.
- Gerhardt, P., R. G. E. Murray, R. N. Costilow, E. W. Nester, W. A. Wood, N. R. Krieg and G. B. Phillips. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 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.
- Kim, J. M., W. J. Lim and H. J. Suh. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochem.* **37**, 287-291.
- 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.
- Korea Chicken Council. 2002. www.chicken.or.kr/3data/do.htm.
- Lahl, W. J. and S. D. Braun. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* October, 68-71.
- 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.
- Lee, N. H., Y. B. Kim, H. J. Kim, K. S. Seong, J. H. Rho and C. K. Han. 1999. Effects of physiochemical treatment on the isolation of keratinaceous protein and amino acids of feather meal. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed* **23**, 15-20.
- 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.
- Lin, X., J. C. H. Shih and H. E. Swaisgood. 1996. Hydrolysis of feather keratin by immobilized keratinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4273-4275.
- Macfaddin, J. F. 1980. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- 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.
- Oyeka, C. A. and H. C. Gugnani. 1997. Keratin degradation by *Scytalidium* species and *Fusarium solani*. *Mycoses* **41**, 73-76.
- Papadopoulos, M. C. 1985. Processed chicken feathers as feedstuff for poultry and swine. A review. *Agric. Wastes* **14**, 275-290.
- Papadopoulos, M. C., A. R. El Boushy and A. E. Roodbeen. 1985. The effect of varying autoclaving conditions and added sodium hydroxide on amino acid content and nitrogen characteristics of feather meal. *J. Sci. Food Agric. Abstr.* **36**, 1219-1226.
- 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.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-426.
- 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.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The ClusAlX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4876-4882.
- 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.