

# 난분해성 케라틴 단백질을 함유하는 닭 우모 분해세균의 분리 및 특성

김세종<sup>1</sup> · 조천희<sup>2</sup> · 황경숙<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>목원대학교 미생물나노소재학과, <sup>2</sup>(주)카프코 생물화학연구소, <sup>3</sup>목원대학교 미생물생태자원연구소

## Isolation and Characterization of Keratinolytic Protein Chicken Feather-Degrading Bacteria

Se-Jong Kim<sup>1</sup>, Chun-Hwi Cho<sup>2</sup>, and Kyung-Sook Whang<sup>1,3\*</sup>

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

<sup>2</sup>KAFCO Biochemistry Research Institute, Chungbuk 373-831, Republic of Korea

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

(Received February 25, 2010/Accepted March 15, 2010)

Thirty-one chicken feather-degrading bacteria were isolated from wasted feather, compost and wastewater in a chicken farm. These isolates were categorized as Firmicutes (21 strains),  $\gamma$ -proteobacteria (4 strains), Actinobacteria (4 strains), and Bacteroidetes (2 strains) by 16S rRNA gene sequence analysis. We examined the feather-degrading isolates for degradation in the 2% of chicken feather meal. The strain *Chryseobacterium* sp. FBF-7, *Stenotrophomonas maltophilia* FBS-4, and *Lysinibacillus* sp. FBW-3 were selected as a keratinolytic protein degrading bacteria which showed the highest feather degradation of 75-90%. The characteristics of amino acids extracted from chicken feather meal by using keratinolytic protein degrading isolates and chemical method with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  were analyzed. Total amino acid content of strain *Chryseobacterium* sp. FBF-7 was 1,661.6  $\mu\text{mol/ml}$ , which was the highest and it was similar with chemical method. And essential amino acid content of total amino acid was thirty-seven percent (619.3  $\mu\text{mol/ml}$ ) and 596.9  $\mu\text{mol/ml}$  for keratinolytic protein degrading isolates and chemical method, respectively. The major amino acids were valine, glutamic acid, aspartic acid, glycine, and proline by the strain *Chryseobacterium* sp. FBF-7 and especially, higher contents of aspartic acid, threonine, serine, cysteine, and tyrosine were detected compared with chemical method.

**Keywords:** amino acids, chicken feather, keratinolytic protein degrading bacteria

국내에서 사육되고 있는 대표적 가금류인 닭은 연평균 약 58,000만 마리 정도가 도계되어 가공 처리되고 있으며, 도계 처리과정에서 발생하는 닭 우모(chicken feather)는 닭 생체중의 5-7%를 차지하여 연간 5만 톤 이상이 부산물로서 생산되고 있다(11, 26). 우모를 비롯하여 생물체의 보호기능을 하는 피부 각질이나, 손톱, 머리카락, 양모, 말발굽, 뿔, 깃털 등과 같은 케라틴(keratin)은 섬유상 구조 단백질(5, 9)로  $\beta$ -helix를 형성하는 펩타이드 결합과 사슬 내 수많은 수소결합 및 이황화결합 등 다양한 결합으로 이루어져 있기에 pepsin, trypsin, papain 등과 같은 일반적인 protease로는 거의 분해되지 않고 물리화학적으로도 매우 안정한 난분해성 단백질로 알려져 있다(6, 30). 이러한 난분해성 케라틴 단백질이 주성분인 우모는 극히

일부만이 보온재 및 쿠션 등 충전재로 사용되고 대부분 소각이나 매립 처리되어 왔으나, 소각 시 많은 매연이 발생하고 매립으로 인한 토양 환경오염의 주요 요인 중 하나로 알려져 왔다(18).

최근 동물 영양학자들에 의해 케라틴 단백질의 영양적 우수성이 알려지면서 폐기물로 배출되던 우모를 우모분(feather meal) 형태로 가공하여 가축 및 양어 사료 등으로 이용하고 있다(10). 또한, 조단백질 함량이 약 85%인 우모를 가압, 가열 등 물리적 처리법과 산·알칼리 처리에 의한 화학적 분해법을 이용하여 아미노산을 추출하여 활용하고 있다(12). 물리·화학적 처리에 의한 아미노산 추출은 공정과정 중 폐수 및 악취가 대량 발생하여 환경오염을 유발하는 원인이 되어 왔으며, 처리비용이 높아 경제성이 낮을 뿐 아니라 단위동물에 대한 소화율도 50% 이하로 매우 저조한 것으로 알려져 있다(2, 21). 이와 같은 물리·화학적 처리공정의 비효율성을 고려하여 생물학적

\* For correspondence. E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr; Tel: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7599

분해기술을 이용한 친환경적 가공 처리법에 관한 연구가 절실히 요구되고 있다.

미생물이 생성하는 효소를 이용하여 난분해성 케라틴 단백질을 분해시키는 생물학적 분해기술에 관한 연구가 전통적으로 이용되고 있는 화학촉매를 대체하기 위하여 수행되고 있다. 케라틴 단백질 분해미생물이 생산하는 특이적인 효소를 keratinase 또는 keratinolytic protease라고 하는데, 이 효소들은 케라틴 외에도 매우 안정된 구조의 다양한 난분해성 기질을 분해한다는 측면에서 일반적인 단백질 분해효소와 구별되어진다(8). 지금까지 분리 보고된 keratinase 및 keratinolytic protease를 생성하는 미생물군은 세균이 대부분을 차지하고 일부 방선균과 곰팡이도 보고되어 왔다(3, 8, 13, 16, 16, 20, 25, 27). 이들 우모 분해균에 관한 연구는 keratinolytic protease 생성균의 분리와 동정 그리고 케라틴 단백질 분해효소의 특성에 관한 연구(21)가 주로 이루어진 반면, 이들 효소를 이용하여 우모로부터 추출된 아미노산의 특성과 산업적 가치 평가에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 국내 다양한 지역의 양계장으로부터 폐기물로 버려지는 폐깃털을 효율적으로 분해할 수 있는 케라틴 단백질 분해세균을 다수 확보하고, 우수 미생물을 선발하여 이들 균주를 이용하여 아미노산을 추출한 다음 화학적 분해법에 의해 추출된 아미노산과 특성을 비교함으로써 생물학적 분해법에 의해 추출된 아미노산의 친환경 비료로서의 사용 가능성을 평가하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시료채취

케라틴 단백질 분해세균을 분리하기 위하여 충남 보령과 홍성에 소재한 양계장으로부터 폐깃털 9시료와 양계장 부산물을 이용하여 퇴비발효가 진행되고 있는 계분퇴비 9시료를 채취하였으며, 전복 익산의 육체 가공공장에서 발생하는 폐수 시료를 포함해 총 19개의 시료를 채취하였다. 폐깃털은 양계장 내에 1년 이상 야적한 부산물을 채취하였고, 계분퇴비는 양계장 바닥 내 9개 지점으로부터 100 g씩 채취한 후 polyethylene vinyl bag에 넣어 실험실로 운반하여 4°C에 보존한 후 24시간 이내에 실험하였다.

### 배양배지

채취한 시료로부터 세균을 분리하기 위하여 NA 평판배지(1.0% bacto beef extract, 1.0% bacto peptone, 0.5% NaCl, 1.2% agar, pH 7.5±0.2)를 사용하였다. 단백질 분해세균의 선별을 위하여 기초배지(0.03% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.03% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.5% agar, pH 7.5±0.2)에 1.0% skim milk를 첨가한 평판배지를 이용하여 단백질 분해능을 판별하였다. 우모 분해능 시험을 위하여 무기염배지(0.05% NH<sub>4</sub>Cl, 0.05% NaCl, 0.03% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.03% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01% MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.01% yeast extract, pH 7.5±0.2)에 케라틴 단백질 우모분(chicken feather meal)을 2.0% 첨가한 배지를 사용하였다(27).

### 케라틴 단백질 분해능

채취한 각 시료로부터 순수 분리된 균주를 1.0% skim milk agar plate에 접종하여 28°C, 2일간 배양한 후 10 mm 이상의 큰 투명환을 생성하는 균주를 단백질 분해능이 우수한 균주로 판정하고 1차 분리하였다. Protease 활성 측정을 위해 배지에서 3일간 배양된 배양액을 4°C, 8,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 회수한 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 효소의 활성 측정은 casein을 기질로 이용하는 방법을 사용하였다. 조효소액 0.5 ml를 2.5 ml의 0.6% casein 현탁액(50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0)에 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 2.5 ml의 50% trichloroacetic acid (TCA) 저해제를 첨가하여 반응을 정지시키고 여과지(Whatman filter paper No.2 90 mm Ø)에 여과하여 불용성의 기질을 제거하였다. 여과된 여과액 1 ml에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 ml를 첨가하고 6배로 희석한 folin reagent를 0.5 ml 첨가하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 660 nm에서 흡광도(UVICON Spectrophotometer 930, Kontron Instruments, USA)를 측정하였다. 효소 단위는 tyrosine 표준도표를 이용하여 기본 조건하에서 1분간 기질로부터 1 µg의 tyrosine을 유리하는 효소의 총량을 1 unit로 하여 protease activity를 나타내었다. 이들 단백질 분해세균을 2.0% 우모분이 첨가된 무기염 배지에 각각 접종하여 25°C, 150 rpm으로 3일간 회전진탕 배양하면서 배양 24시간 마다 배양액을 여과지(whatman filter paper No.2, 90 mm Ø)로 거른 후 증류수로 4회 세척하였다. 여과지에 걸러진 깃털을 60°C 건조기(drying oven Mov-212, SANYO, Japan)에서 8시간 건조시킨 후 깃털의 건조량을 백분율로 나타내어(17) 우모분 분해능을 산출하였다.

### 닭 우모 분해세균의 계통해석

케라틴 단백질 분해미생물로 선발된 균주의 계통학적 위치를 검토하기 위하여 평판배지에 형성된 콜로니를 주형 DNA로 하여 16S rRNA PCR 증폭하였다. 16S rRNA PCR 증폭에 사용된 primer는 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 합성된 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCG-3') primer를 사용하였다. PCR은 initial denaturation 94°C, 5 min; denaturation 94°C, 30 sec; annealing 53- 56°C, 30 sec; extension 72°C, 1 min의 조건으로 35 cycle을 실시한 후, final extension을 72°C에서 7분간 유지하여 증폭을 종결하였다.

16S rRNA의 PCR 증폭산물은 1% agarose gel, 0.5× TAE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 30분 동안 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad, USA)한 후, ethidium bromide (EtBr)로 15분간 염색하여 UV하에서 증폭 여부를 확인하고, QIAquick® PCR Purification kit (QIAGEN Inc.)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 증폭산물의 16S rRNA 염기서열 결정에는 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems)를 이용하여 cycle sequencing을 수행한 후, ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Bio-

systems)로 염기서열을 결정하였다.

16S rRNA 유전자 분석을 통하여 염기서열을 결정한 후 DDBJ/NCBI/RDP/GenBank database의 BLAST program을 이용하여 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 각 염기서열의 alignment는 CLUSTAL X algorithm를 이용하여 병렬로 정렬하였고, 계통도의 작성은 근린 결합법(24)에 의거하여 계통분류학적 위치를 결정하였다(29).

### 아미노산 추출 및 분석

수산화칼슘 처리에 의한 화학적 분해로 우모로부터 아미노산을 추출하기 위하여  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 를 처리한 후, 95°C에서 6시간 동안 가열시켜 우모를 가수분해한 후 phosphoric acid로 pH가 6-7인 약산성이 되도록 중화하고 감압 여과하여 가수분해물인 액상의 아미노산을 추출한 후, 4°C, 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다. 생물학적 분해를 이용한 아미노산 추출은 본 연구에서 최종 선발된 우수 균주를 2.0% 우모분이 첨가된 무기염배지에 각각 접종하여 25°C에서 150 rpm으로 3일간 회전진탕배양한 후, 배양액을 4°C, 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 회수하였다(31). 각각의 분해법으로 추출된 아미노산의 함량과 조성은 아미노산 분석기(L-8900 Amino Acid Analyzer, Hitachi, Ltd., Japan)를 이용하여 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 케라틴 단백질 분해세균의 수집

양계장으로부터 채취한 폐깃털 및 계분퇴비와 닭 가공공장의 폐수시료로부터 순수 분리된 총 183 균주를 대상으로 skim milk 평판배지 상에서 직경이 10-17 mm 이상의 큰 투명환을 나타내는 단백질 분해세균을 1차 선별한 결과, 폐깃털로부터 37균주, 계분퇴비로부터 43균주 그리고 폐수로부터 8균주 총 88균주가 단백질 분해 우수균주로 선별되어 분리균주의 약 50%가 단백질 분해능을 나타내는 특성을 나타내었다. 선별된 단백질 분해 우수균주의 protease 활성을 측정된 결과 약 99-2,585 unit/ml/min의 높은 활성을 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 양계장 부산물 시료는 단백질 분해미생물 유전자원 수집을 위한 우수한 시료임을 확인해 주었다.

단백질 분해능이 우수한 88균주 중 난분해성 케라틴 단백질 분해세균을 선별하기 위하여 2% 우모분이 첨가된 무기염배지에 상기의 단백질 분해세균을 각각 접종하고, 37°C에서 3일간 진탕배양하면서 각 균주의 우모 분해능을 조사하였다. 배양 3일 후 65% 이상의 높은 우모 분해능을 나타내는 균주를 선별한 결과, 폐깃털로부터 분리한 단백질 분해세균 중 10균주, 계분퇴비로부터 20균주, 폐수로부터 1균주가 높은 우모 분해능을 나타내어 총 31균주를 케라틴 단백질 분해 우수균주로 확보하였다(Table 1).

### 닭 우모 분해세균의 계통학적 다양성

양계장 부산물로부터 확보한 우모 분해세균 31균주에 대해

**Table 1.** Collection of chicken feather-degrading bacteria from chicken feather, compost and wastewater

Samples	Total isolates	No. of skim milk degrading bacteria	No. of feather degrading bacteria
Chicken feather	92	37	10
Chicken compost	70	43	20
Wastewater	21	8	1
Total	183	88	31

16S rRNA 염기서열을 결정하여 계통학적 특성을 검토한 결과, Firmicutes 계통군에 속하는 균주는 21균주로 수집된 총 우모 분해세균의 68%를 차지하였으며,  $\gamma$ -proteobacteria 계통군에 속하는 균주는 4균주, Actinobacteria 계통군에 속하는 균주는 4균주 그리고 Bacteroidetes 계통군에는 2균주가 확인되었다. 특히, Firmicutes 계통군에 속하는 균주 중 *Bacillus amyloliquefaciens* 균주가 18균주로 우점을 이루었으며, 그 외에 *Bacillus subtilis*, *Lysinibacillus* sp.가 속하였다.  $\gamma$ -Proteobacteria 계통군에는 *Enterobacter aerogenes*, *Stenotrophomonas maltophilia*가 속하였으며, Actinobacteria 계통군에는 *Phycobacter jejuensis*, *Brevibacterium luteolum*, *Micrococcus lylae*가 속하였고 그리고 Bacteroidetes 계통군에는 *Chryseobacterium* 속에 속하는 균주가 확인되어 계통학적으로 다양한 우모 분해세균이 양계장 부산물 내에 서식하는 것으로 판단되었다(Fig. 1).

지금까지 보고된 keratinolytic protease 또는 keratinase를 생산하며 우모를 분해하는 세균으로는 *Bacillus* 속에 속하는 *B. pumilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis* 그리고 *B. megaterium* 등이 가장 많이 보고되었으며, 이 외에도 *Pseudomonas* sp, *Vibrio* sp., *Chryseobacterium* sp. 그리고 *Flavobacterium* 등이 분리 보고되었다(8, 14, 23, 25, 28, 30, 31, 32).

### 닭 우모 분해 우수균주 선발

케라틴 단백질 우모 분해세균 31 균주 중 우모 분해능을 검토한 결과, FBS-4 균주의 분해율은 90%, FBW-3 균주는 85% 그리고 FBF-7 균주는 75%의 높은 분해율을 나타내어 우수균주로 최종 선발하였다. 우모분이 첨가된 무기염배지 내에서 이들 우수 균주의 생육능을 조사한 결과,  $2.1 \times 10^8$ - $1.5 \times 10^9$  CFU/ml의 높은 생육능을 나타내었다. Protease 활성을 측정된 결과, FBS-4 균주는 1,402 unit/ml/min를, FBW-3 균주는 1,276 unit/ml/min를 그리고 FBF-7 균주가 2,585 unit/ml/min의 매우 높은 활성을 나타내었다.

최종 선발된 이들 우모 분해 우수균주의 계통학적 위치를 검토한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 폐깃털 시료로부터 분리한 FBF-7 균주는 Bacteroidetes 계통군의 *Chryseobacterium* 속에 속하였으며 *Chryseobacterium* 속의 근연종들과 상동성을 검토한 결과, *Chryseobacterium gambrini*<sup>T</sup> (AM232810)와 99.15%, *Chryseobacterium stagni*<sup>T</sup> (DQ314742)와 99.08%의 상동성을 나타내었다(7). 계분퇴비 시료로부터 분리한 FBS-4 균주는  $\gamma$ -proteobacteria 계통군의 *Stenotrophomonas* 속에 속

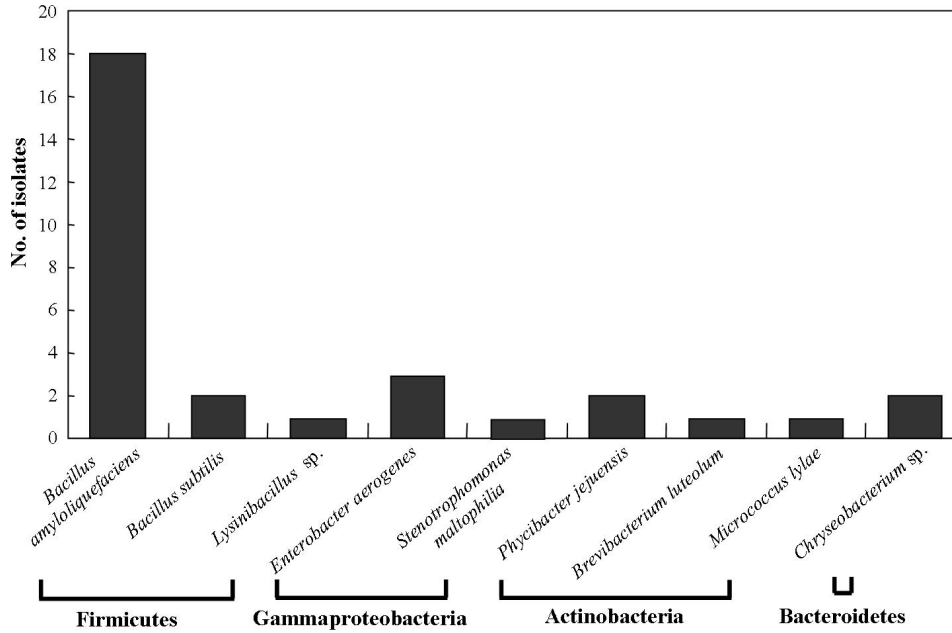


Fig. 1. Phylogenetic characteristics of feather-degrading bacteria collected from chicken farm.

하였으며 *Stenotrophomonas* 속의 근연종들과 상동성을 조사한 결과, *Stenotrophomonas maltophilia*<sup>T</sup> (X95923)와 99.78%의 높은 상동성을 나타내었다(15). 또한, 닭 가공공장에서 채취한 폐수 시료로부터 분리한 FBW-3 균주는 Firmicutes 계통군의 *Lysinibacillus* 속에 속하였으며 *Lysinibacillus* 속에 속하는 근연종들과 상동성을 조사한 결과, *Lysinibacillus boronitolerans*<sup>T</sup>

(AB199591)와 97.70%, *Lysinibacillus fusiformis*<sup>T</sup> (L14013)와 97.11%, *Lysinibacillus sphaericus*<sup>T</sup> (L14010)와 96.96%의 상동성을 나타내어 FBW-3 균주는 *Lysinibacillus* 속의 신종으로 제안되었다(1).

상기의 *Chryseobacterium sp.* FBF-7, *Stenotrophomonas maltophilia* FBS-4 및 *Lysinibacillus sp.* FBW-3의 염기서열은

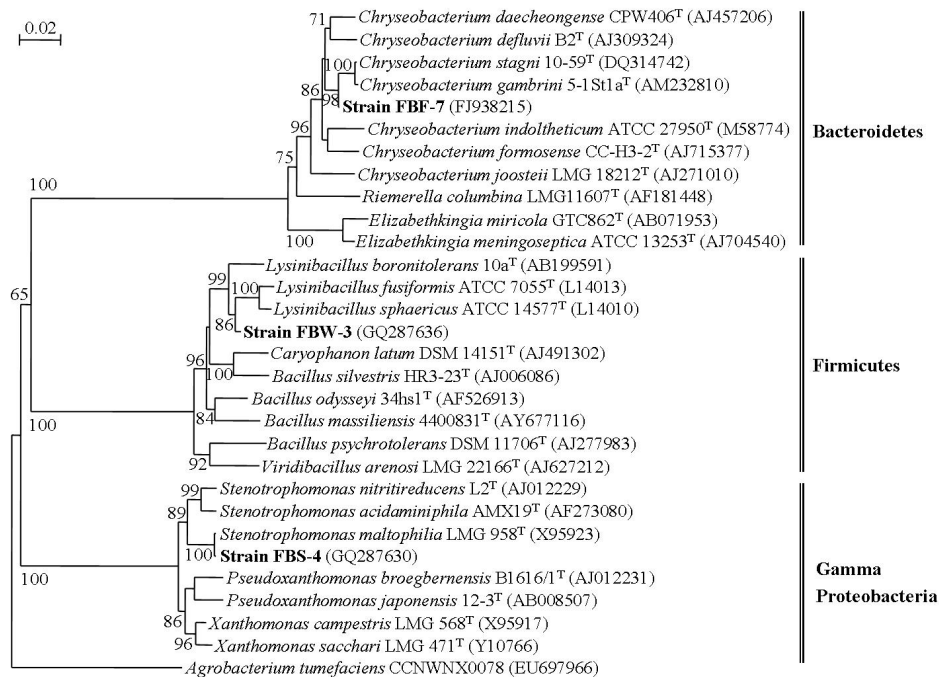
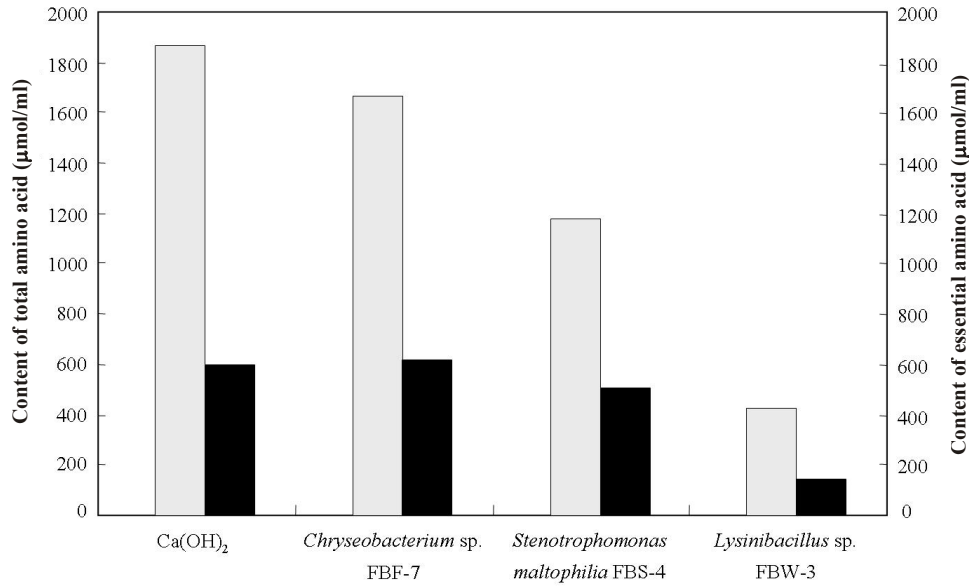


Fig. 2. Phylogenetic relationships of feather-degrading bacteria based on similarities of 16S rRNA. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values and shown at nodes. Scale bar, 1 nucleotide substitution in 100 bases. Superscript T means the type strain.



**Fig. 3.** Comparison of total amino acid and essential amino acid extracted from chicken feather meal by chemical and biological methods. (□) content of total amino acid, (■) content of essential amino acid.

GenBank에 각각 accession no. FJ938215, GQ287630 그리고 GQ287636로 등록하였다.

### 생물학적 및 화학적 분해법에 의해 추출된 아미노산의 특성

본 연구에서 우모 분해 우수균주로 선발된 *Chryseobacterium* sp. FBF-7, *Stenotrophomonas maltophilia* FBS-4 그리고 *Lysinibacillus* sp. FBW-3 균주를 2% 우모분이 함유된 무기염 배지에 각각 접종한 후 미생물 효소분해에 의해 추출된 총 아미노산 함량과 수산화칼슘(Ca(OH)<sub>2</sub>) 처리에 의한 화학적 분해법에 의해 추출된 총 아미노산 함량을 각각 비교·검토하였다. *Chryseobacterium* sp. FBF-7 균주에 의해 추출된 총 아미노산 함량은 1661.6 μmol/ml로 가장 높은 함량을 나타내었으며, *S. maltophilia* FBS-4 균주는 1175.8 μmol/ml 그리고 *Lysinibacillus* sp. FBW-3 균주는 427.4 μmol/ml로 추출되었다. 화학적 분해법에 의해 추출된 총 아미노산 함량은 1866.8 μmol/ml로 *Chryseobacterium* sp. FBF-7 균주에 의해 추출된 총 아미노산 함량과 유사하였다.

생물학적 분해법과 화학적 분해법에 의해 추출된 아미노산 중 필수 아미노산(histidine, threonine, lysine, methionine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, tryptophan) 함유량을 비교 검토한 결과, *Chryseobacterium* sp. FBF-7 균주에 의해 추출된 총 아미노산 함량 중 필수 아미노산 함량은 619.3 μmol/ml로 총 아미노산 함량의 37%를 차지하였고, *S. maltophilia* FBS-4 균주는 503.5 μmol/ml로 43% 그리고 *Lysinibacillus* sp. FBW-3 균주는 139.5 μmol/ml로 33%를 차지하였다. 한편, 화학적 분해법에 의해 추출된 필수 아미노산 함량은 596.9 μmol/ml로 총 아미노산 함유량의 32%를 차지하는 것으로 나타났다(Fig. 3).

이상의 결과로부터 *Chryseobacterium* sp. FBF-7 균주는 화학적 분해법에 의해 추출된 아미노산 함량과 유사한 함유량을

나타내었으며, 특히 필수 아미노산 함량이 화학적 분해법보다 더 높게 추출되는 특성을 나타내었다.

아미노산 생성량이 가장 높게 나타난 *Chryseobacterium* sp. FBF-7 균주를 이용한 생물학적 분해법과 Ca(OH)<sub>2</sub> 처리에 의한 화학적 분해법에 의해 추출된 아미노산의 조성을 비교 검토하였다. *Chryseobacterium* sp. FBF-7에 의해 총 17종의 아미노산이 추출되었으며, aspartic acid (11%), glutamic acid (11%), glycine (10%), valine (11%) 그리고 proline (10%)이 주요 아미노산으로 추출되는 특성을 나타내었다. 화학적 처리에 의해 추출된 아미노산의 경우, glutamic acid (10%), glycine (22%), alanine (10%) 그리고 valine (10%), proline (13%)이 주요 아미노산으로 추출되는 것으로 나타났다.

*Chryseobacterium* sp. FBF-7에 의해 추출된 아미노산의 경우 aspartic acid, threonine, serine, cysteine, valine, tyrosine, phenylalanine, lysine, histidine 그리고 arginine은 화학적 분해법보다 높게 추출되는 특성을 나타내었다. 특히, aspartic acid (38%), threonine (287%), serine (303%), cysteine (262%) 그리고 tyrosine (88%)은 화학적 분해법보다 더 높게 추출되는 특징을 나타내었다(Fig. 4).

케라틴계열 단백질 부산물 중 가금류의 우모는 다양한 아미노산을 함유하고 있는 것으로 알려져 영양학적 관점에서 우모로부터 추출된 아미노산은 고가의 젤라틴이나 콜라겐보다 저렴하기 때문에 비료로써의 가치가 매우 우수하다. 우모로부터 아미노산을 추출하기 위해 가압, 가열 등 물리적 처리법과 산·알칼리 처리에 의한 화학적 분해법을 이용하여 추출하고 있으나 물리·화학적 처리에 의한 아미노산 추출은 공정과정 중 폐수 및 악취가 대량 발생하여 환경오염을 유발하는 원인이 되어 왔다. 국내의 경우 이와 같은 아미노산 함유 물질로부터 미생물이 생산하는 효소를 이용한 생물학적 분해에 의한 아미노산

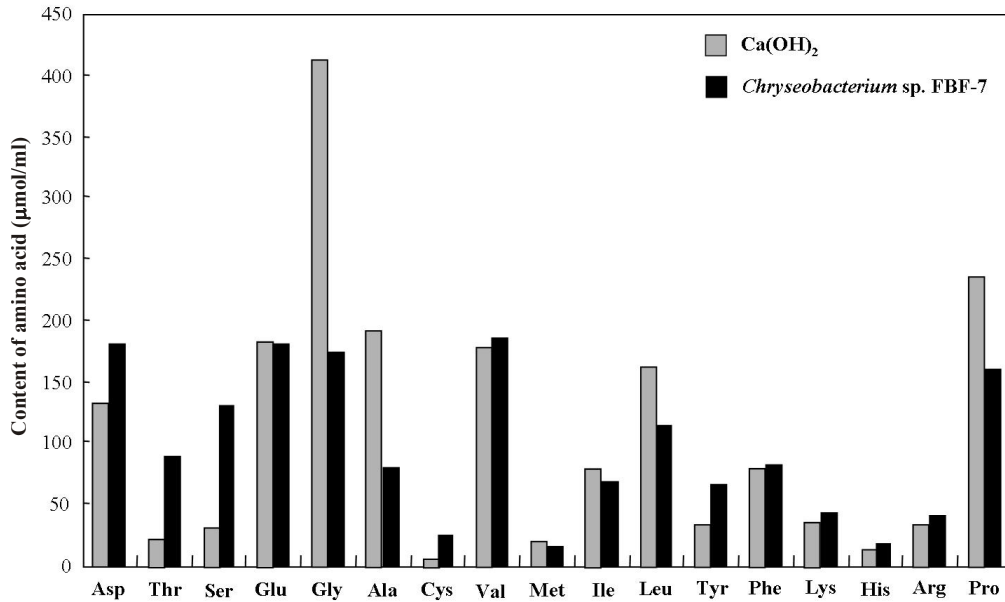


Fig. 4. Comparison of amino acids extracted from 2% chicken feather meal medium by chemical and biological methods.

추출과 분해산물의 이용에 관한 연구가 매우 미흡한 실정이다.

본 연구를 통하여 확보된 케라틴 단백질 분해세균은 계통학적으로 다양한 미생물로 구성되어 있어 다양한 분야의 효소산업에 이용될 수 있는 유전자원으로 잠재적 가치가 클 것으로 기대한다. 특히 최종 선발된 우모 분해 우수세균 *Chryseobacterium* sp. FBF-7에 의해 추출된 추출 아미노산 함량은 기존 화학적 분해법에 의해 추출되는 함량과 유사하고 필수 아미노산 생성량도 높게 나타나 산업공정에서 전통적으로 이용되고 있는 화학축매를 대체할 수 있는 상업용 효소로 개발 가능하다고 판단된다. *Chryseobacterium* sp. FBF-7 균주를 이용하여 케라틴 단백질 우모로부터 생산된 아미노산은 친환경 토양 개량제 및 작물생육촉진을 위한 아미노산 비료로써의 활용 가치가 매우 높을 것으로 기대된다.

## 적요

양계장 부산물 시료로부터 우모 분해세균 31균주를 분리하였다. 수집된 우모 분해세균에 대해 16S rRNA 염기서열을 해석하여 계통학적 특성을 검토한 결과, Firmicutes (21균주),  $\gamma$ -proteobacteria (4균주), Actinobacteria (4균주) 그리고 Bacteroidetes (2균주) 계통군에 속하는 다양한 세균이 확보되었다. 우모 분해세균 중 우모 분해율이 75-90% 이상인 우수균주 *Chryseobacterium* sp. FBF-7, *Stenotrophomonas maltophilia* FBS-4 그리고 *Lysinibacillus* sp. FBW-3를 최종 선발하였다. 이들 균주를 이용한 생물학적 분해법과 Ca(OH)<sub>2</sub>를 이용한 화학적 분해법에 의해 추출된 아미노산의 특성을 비교한 결과, *Chryseobacterium* sp. FBF-7에 의해 추출된 총 아미노산 함량이 1661.6  $\mu\text{mol/ml}$ 로 선발 균주 중 가장 높게 나타났으며, 화학적 분해법에 의해 추출된 총 아미노산 함량과 유사하였다.

*Chryseobacterium* sp. FBF-7에 의해 생성된 필수 아미노산 함유량은 619.3  $\mu\text{mol/ml}$ 로 총 아미노산의 37%를 함유하였으며, 화학적 분해법에 의한 경우, 596.9  $\mu\text{mol/ml}$ 의 필수 아미노산을 생산하여 총 아미노산 함유량의 32%를 차지하는 것으로 나타났다. *Chryseobacterium* sp. FBF-7에 의해 추출된 아미노산의 조성을 검토한 결과, valine, glutamic acid, aspartic acid, glycine 그리고 proline이 주요 아미노산이었으며, 특히 aspartic acid, threonine, serine, cysteine 그리고 tyrosine이 화학적 추출법보다 더 높게 추출되는 특징을 나타내었다.

## 감사의 말

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다 (M-02-20080704171810).

## 참고문헌

- Ahmed, I., A. Yokota, A. Yamazoe, and T. Fujiwara. 2007. Proposal of *Lysinibacillus boronitolers* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 57, 1117-1125.
- Baker, D.H., R.C. Blitenthal, K.P. Boebel, G.L. Czarnicki, L.L. Southern, and G.M. Willis. 1981. Protein-amino acid evaluation of steam-processed feather meal. *Poult. Sci.* 60, 1865-1872.
- Bockle, B., B. Galunski, and R. Muller. 1995. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM40530. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3705-3710.
- Chon, D.H., S.M. Kang, and T.J. Kwon. 2003. Purification and some properties of keratinolytic protease produced by *Pseudomonas* sp. KP-364. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31, 224-229.
- Colette, M.H. and G.H. Michael. 1994. Bioconversion of waste

- keratins: wool and feathers. *Conserv. Recyc.* 11, 179-188.
6. Gupta, R. and P. Rammani. 2006. Microbial keratinase and their prospective application: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 21-33.
  7. Herzog, P., I. Winkler, D. Wolking, P. Kampf, and A. Lipski. 2008. *Chryseobacterium ureilyticum* sp. nov., *Chryseobacterium gambrini* sp. nov., *Chryseobacterium pallidum* sp. nov. and *Chryseobacterium molle* sp. nov., isolated from beer-bottling plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58, 26-33.
  8. Kim, J.M., W.J. Lim, and H.J. Suh. 2001. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochem.* 37, 287-291.
  9. Kim, W.K. and P.H. Patterson. 2000. Nutritional value of enzyme- or sodium hydroxide treated feathers from dead hens. *Poult. Sci.* 79, 528-534.
  10. 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.
  11. Korea Chicken Council. 2002. [www.chicken.or.kr/chicken/data/state.htm](http://www.chicken.or.kr/chicken/data/state.htm).
  12. 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.
  13. 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.
  14. Marchisio, V.F., A. Fusconi, and S. Rigo. 1994. Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi. *Mycopathologia* 127, 103-115.
  15. Moore, E.R.B., A.S. Kruger, L. Hauben, S.E. Seal, R. De Baere, R. De Wachter, K.N. Timmis, and J. Swings. 1997. 16S rRNA gene sequence analysis and inter- and intragenic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151, 145-153.
  16. Mukhopadhyay, R.P. and A.L. Chandra. 1990. Keratinase of Streptomycete. *Indian J. Exp. Bio.* 28, 575-577.
  17. Oyeka, C.A. and H.C. Gugnani. 1997. Keratin degradation by *Scytalidium* species and *Fusarium solani*. *Mycoses* 41, 73-76.
  18. Papadopoulou, M.C. 1985. Processed chicken feathers as feedstuff for poultry and swine. *A review. Agric. Wastes* 14, 275-290.
  19. Papadopoulou, 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.
  20. Qin, L.M., S. Dekio, and J. Jidoi. 1992. Some biochemical characteristics of a partially purified extracellular keratinase from *Trichophyton schoenleinii*. *Zentralbl. Bakteriol.* 277, 236-244.
  21. Onifade, A.A., N.A. Al-Sane, A.A. Al-Musallam, and A. 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. *Biores. Technol.* 66, 1-11.
  22. Riffel, A. and A. Brandelli. 2000. Isolation and characterization of a feather-degrading bacterium from the poultry processing industry. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29, 255-258.
  23. Riffel, A., A. Brandelli, C.M. Bellato, G.H.M.F. Souza, M.N. Eberlin, and F.C.A. Tavares. 2007. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. *J. Biotechnol.* 128, 693-703.
  24. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-426.
  25. Sangali, S. and A. Brandelli. 2000. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *J. Appl. Microbiol.* 89, 735-743.
  26. Santos, R.M.D.B., A.A.P. Firmino, C.M. de Sá, and C.R. Felix. 1996. Keratinolytic activity of *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Microbiol.* 33, 364-370.
  27. Son, H.J., G.T. Park, and Y.G. Kim. 2004. Production of a keratinolytic protease by a feather-degrading bacterium, *Bacillus megaterium* F7-1. *Kor. J. Microbiol.* 40, 43-48.
  28. 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.
  29. Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
  30. 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.
  31. Woo, E.O., M.J. Kim, H.S. Son, E.Y. Ryu, S.Y. Jeong, H.J. Son, S.J. Lee, and G.T. Park. 2007. Production of keratinolytic protease by *Bacillus pumilus* RS7 and feather hydrolysate as a source of amino acids. *J. Environ. Sci.* 16, 1203-1208.