

중온성 우모 분해균 *Bacillus* sp. SE-103의 분리 및 배양 조건 최적화

장형수 · 최 일^{1,†}

상지대학교 식품영양학과, ¹상지대학교 동물생명자원학부

Optimization of Conditions for Isolating and Cultivating *Bacillus* sp. Se-103 with a Mesophilic Feather-Degrading Activity

Hyung Soo Chang and Il Choi^{1,†}

Dept. of Food and Nutrition, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

¹College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

ABSTRACT This study was carried out to investigate the possibility to utilize feather meal by bacterial strains. A bacterial strain SE-103 producing keratinolytic enzyme was isolated from the soil of the poultry slaughterhouses. It was identified as *Bacillus* sp. by judging from its morphological and physiological characteristics. Subsequently the optimal culture conditions for the production of keratinolytic protease by *Bacillus* sp. SE-103 were investigated. The composition of optimal medium was 3.0% glucose, 0.4% urea, 0.2% NaNO₃, and 0.15% KCl. In addition, optimal initial pH and temperature were 6.0 and 35 °C, respectively.

(Key words : feather, keratinolytic protease, keratin)

서 론

국내 우모분의 생산량은 매년 증대되고 있다. 우모는 불용성 단백질인 keratin이 주 성분으로 이용도가 매우 낮아 사료적 가치가 떨어진다(Moris and Balloun, 1973). 이러한 우모의 이용 효율을 증대시키기 위해 가금의 깃털을 고압 수증기 처리(Papadopoulos et al., 1985) 후 건조·분쇄한 우모분 상태로 이용하기도 한다. 우모분은 사료 관리법상 조단백질 함량 80% 이상, 조회분 3% 이하, pepsin 소화율 75% 이상으로 규정하고 있다. 우모분의 주성분인 keratin은 glycine, cysteine, arginine, leucine 등이 풍부하며(Gregory et al., 1956), cobalamin과 미지성장인자(UGF)가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Harms and Goff, 1957; Sibbald et al., 1962).

최근 우모의 주성분인 keratin의 소화율 증대를 위해서 다양하게 연구되고 있으며, 특히 keratinolytic protease를 분비하는 미생물을 이용하는 방법(Shih, 1993)이 보고된 후 keratinase의 활성이 강한 미생물의 개발이 활발하게 진행되고 있다.

Keratin은 척추동물의 표피와 그 부속기관의 주된 구조단백질로 고도의 섬유질화 된 표피, 즉, 피부, 모발, 깃털(우모),

손·발톱, 뿔 등의 주된 성분이다. 특히 keratin filament는 상피세포의 골격을 형성하며 피부단백질이 외부환경의 stress에 대하여 특수한 안정성을 부여하는 disulfide 결합으로 구성되어 있다는 것이 특징이다(Elaine, 1995). Keratin은 그 구조 내에 cysteine disulfide 결합과 수소 결합 그리고 hydrophobic interaction으로 강하게 결합하고 있기 때문에 불용성이며 pepsin, trypsin, papain 등과 같은 일반적인 단백질 분해 효소로는 분해되지 않는다(Xiang et al., 1992).

Keratinase의 특징적인 성질로는 일반적인 protease에 의해서 분해되지 않는 우모분을 가수분해하여 아미노산 단위로 분해하므로 우모분의 사료 효율을 증대시킬 수 있다는 것이다. 지금까지 보고된 미생물기원의 keratinase는 대부분이 50~70 °C의 고온성 최적 온도를 갖는 효소들이었다(Williams et al., 1990; Smith, 1975).

또한 지금까지 보고된 미생물 유래의 keratinase들은 구조적으로 serine protease의 특성을 나타내는 호 알칼리성이면서 고온성의 keratinolytic protease가 대부분을 차지하며, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* 등(Tideto et al., 1992; Xiang et al., 1995)과 *Streptomyces pactum*(Brigitte et al., 1995), *Pseudomo-*

[†] To whom correspondence should be addressed : ichoi@sangji.ac.kr

nas sp.(Chon and Kwon, 2001)이 보고되어 있다. 그러나 최근에는 pH 5~9(Kim et al., 2001), pH 7(Rozs et al., 2001; Ramnani and Gupta, 2004)의 중성 균과 25~37 °C(Amanda and Adriano, 2008), 30~40 °C(Kim et al., 2001)의 중온 균에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구에서는 산업적으로 유리할 것으로 생각되는 우모분의 사료 효율 증대를 목적으로 중온 상태에서 활성이 강한 keratinolytic protease를 생산하는 균주를 분리 선별하여 동정하고 그 배양학적 특성을 조사하였기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 사용 균주의 분리

우모분의 분해능이 강한 미생물을 분리하기 위하여 원주 지역을 중심(원주 사제리, 궁촌리)으로 한 강원도(횡성 청룡리, 반곡리) 및 경기도 일원(여주 삼교리, 다대리)의 도계장과 양계장 주변 토양 및 하천수에서 150여점의 시료를 채취하여 균원 시료로 사용하였다.

2. 사용 배지

우모의 주성분인 keratin의 분해력이 우수하고 중온과 중성 pH에서 생육이 빠르고 안정적인 균주를 분리하기 위해서 Table 1의 배지를 사용하였으며, 종균용 배지와 효소 생산 배지로는 Table 2와 Table 3의 배지를 사용하였다.

3. 우모 keratin의 제조

Keratinolytic protease의 활성 측정에 사용할 우모 keratin의

Table 1. The composition of isolation medium

Component	Concentration (g/L)
Glucose	10.0
Yeast extract	1.0
K ₂ HPO ₄	3.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
NH ₄ Cl	1.5
NaCl	1.0
Keratin*	1.0
pH	7.0

*Keratin was isolated from chicken feather.

Table 2. The composition of seed medium

Component	Concentration (g/L)
Glucose	10.0
Yeast extract	1.0
K ₂ HPO ₄	3.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
NaCl	1.0
Keratin*	1.0
pH	7.0

*Keratin was isolated from chicken feather.

Table 3. The composition of enzyme production medium

Component	Concentration (g/L)
Glucose	30.0
Urea	2.0
NaNO ₃	2.0
KCl	0.2
K ₂ HPO ₄	3.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2
Keratin*	1.0
pH	7.0

*Keratin was isolated from chicken feather.

제조는 10.0 g의 우모에 500 mL dimethyl sulfonide를 첨가하여 100 °C에서 2시간 가열 처리하여 용해시킨 후 두 배의 cold acetone으로 keratin 단백질을 침전시키고 6,000 × g로 원심 분리하였다. 이때 침전물을 증류수로 4회 세척하고 다시 원심분리한 후 건조하여 사용하였다(Krystyna et al., 1987).

4. 균주의 선별 및 동정

Keratinolytic protease를 생산하는 균주를 선별하기 위하여 균원 시료를 살균수에 현탁하여 분리용 배지에 도말하고 35 °C에서 72시간 배양하여 투명환이 크고 생육이 우수한 균주를 1차 선별하였다(Fig. 1). 1차 선별된 균주를 종균용 배지에서 배양하여 원심 분리한 상등액을 35 °C에서 우모 keratin 분해 활성을 측정하여 활성이 가장 우수한 균주 SE-103을 실험에 이용하였다.

최종 선별된 균주를 동정하기 위하여 Bergey's manual of systematic bacteriology(John et al., 1994)와 Biochemical test for

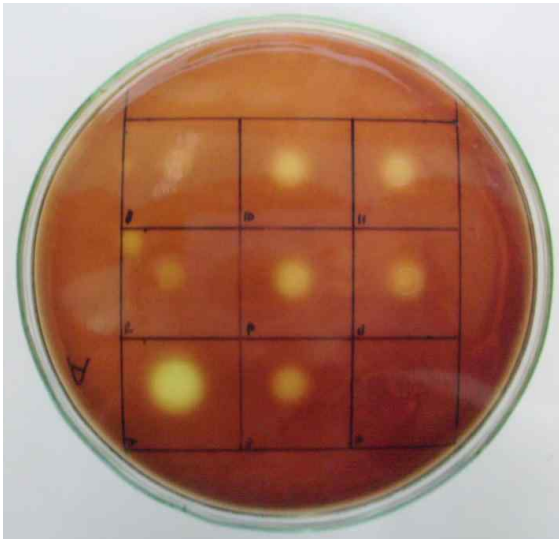


Fig. 1. Formation of clear zone in the isolation medium.

identification of medical bacteria(Macffadin, 1984)의 방법에 따라 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사·비교하여 분류·동정하였다.

5. 조효소액의 조제와 효소 활성 측정

효소 생산용 배지에 전배양액을 5%(v/v) 접종하여 35 °C에서 24시간 진탕 배양(120 rpm/min)한 후 배양액을 원심 분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 우모 keratin을 이용한 keratinolytic protease의 활성 측정은 Ryoji et al. (1987)과 Esteban and Berta(1984)의 방법을 온도 등 본 실험 목적에 부합되도록 하기 위해 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 0.6%의 우모 keratin 현탁액 0.8 mL에 조효소액 0.2 mL를 첨가하여 35 °C에서 1시간 반응시킨 후 10% TCA 용액 0.2 mL를 첨가하여 4 °C에서 15분간 반응을 중지시켰다. 반응액을 10,000 × g에서 원심분리하고 그 상등액 1.0 mL에 0.1 M NaOH 1.0 mL, Folin 시약 0.5 mL를 첨가하여 20분간 상온에서 발색 시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성은 상대 활성으로 나타냈으며, Unit는 35 °C에서 1시간동안 기질로부터 1 μg의 tyrosin을 생성하는 효소량을 1 unit로 하였다.

6. 균주의 배양

효소의 생산 조건을 검토하기 위하여 250 mL 삼각 flask에 종균 배지 50 mL를 넣고 121 °C에서 20분간 멸균한 후 시험 균주를 1백금이 접종하여 35 °C에서 24시간 전 배양하였다. 동일 배지에 전 배양액 0.1 mL를 접종하여 35 °C에서

24시간 진탕 배양하였으며, 효소 생산용 배지는 250 mL 삼각 flask에 각각의 탄소원, 질소원 및 금속염 등을 달리한 배지 50 mL를 넣고 24시간 진탕배양하면서 배양 시간별 효소 활성을 측정하여 최적 영양소를 조사한 후 다시 영양소별 최적 농도를 확인하였다.

7. 통계 처리

본 실험에서 얻은 자료에 대한 통계 분석은 SAS(2002) 패키지 프로그램을 이용하여 유의성($P < 0.05$)을 검토하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 선별

우모 keratin 분해 효소를 생산하는 균주를 선별하기 위하여 원주권을 중심으로 한 강원 및 경기도 일원 도계장의 토양과 하천수로부터 채취한 균원 시료를 멸균수에 현탁한 후 분리용 고체 배지에 도말하여 35 °C에서 72시간 배양하여 투명환이 큰 균주를 선별하였다(Fig. 1). 1차로 선별된 균주를 Table 2의 배지에 각각 배양하여 원심 분리한 상등액을 35 °C에서 우모 keratin 분해 활성을 측정하여 활성이 가장 높은 SE-103 균주를 선별하여 본 실험에 이용하였다.

2. 균주의 동정

최종 선별된 SE-103 균주의 형태학적 및 배양학적 특성은 Table 4와 같이 고체 배지에서 유백색 colony를 형성하고, gram 양성 간균으로 운동성이 있고 포자를 형성하며 크기는 1.3~1.6×0.4~0.5 μm였다.

배양학적 특성은 중성에서 생육이 좋았고, catalase와 oxidase를 생성하며, Voges-Proskauer test는 음성으로 나타났다. Gelatin과 casein을 분해하며 40 °C 이상에서도 생육이 가능하였다. 이상의 결과로 본 균주는 *Bacillus pumilus*와 유사한 성질을 나타내어 *Bacillus* sp. SE-103으로 명명하였다.

3. 우모 Keratin 분해를 위한 배지의 최적화

1) 탄소원

우모 keratin 분해 효소의 활성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 종균 배지를 기본 배지로 하여 각종 탄소원을 각각 1.0%씩 첨가하여 35 °C에서 24시간 진탕 배양한 후 효소 활성을 측정한 결과는 Table 5와 같이 glucose, xylose, ribose에서 효소 활성이 우수하였다. 반면, soluble starch, dex-

Table 4. Taxonomical characteristic of isolated strain SE-103

Characteristics	Strain SE-103	<i>Bacillus pumilus</i>
Gram stain	+	+
Shape	Rod	Rod
Motility	+	+
Spore formaion	+	+
Spore position	Central	Central
Anaerobic growth	-	-
Growth in NaCl (2~7%)	+	+
Growth at 10 °C	-	-
Growth at 30 °C	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Urease	-	-
Utilization of citrate	+	+
Voges/Proskauer test	+	+
Methyl red test	-	-
Starch hydrolysis	-	+
Casein hydrolysis	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+
Utilization of :		
Glucose	+	+
Xylose	+	+
Arabinose	+	+
Mannitol	+	+

trin 등 다당류를 첨가하였을 때 효소 활성이 현저히 떨어졌다. 이는 본 균주가 배양 중 amylase의 분비능이 없거나 활성이 낮아 다당류만을 이용하는 것으로 추정된다. 이런 결과는 Shimogaki et al.(1991)의 soluble starch가 우수하였다는 보고와 우모분을 첨가 시 우수하였다는 Rosa et al.(1996)의 보고와는 상이하였으나, Page and Stock(1974)의 glucose 사용 시 균체 증식 및 효소 활성이 우수하였다는 보고와는 일치하였다. Glucose의 농도가 효소 생산에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 2와 같이 3% 첨가하였을 때 효소 활성이 가장 높았다.

2) 질소원

우모 keratin 분해 효소의 생산에 미치는 유기질소원의 영

Table 5. Effect of carbon source on the production of keratinolytic protease by *Bacillus* sp. SE-103

Carbon source	Final pH	Relative activity (%)
None	6.8	31.8
Arabinose	7.0	67.2
Raffinose	6.9	18.8
Ribose	6.9	79.7
Rhamnose	6.9	34.4
Xylose	7.1	82.8
Glucose	6.9	100.0
Fructose	6.9	75.0
Galactose	6.9	73.4
Mannose	7.0	71.8
Lactose	6.9	37.5
Sucrose	7.0	84.8
Trehalose	6.8	25.0
Maltose	7.0	68.8
Dextrin	6.9	21.9
Cellobiose	6.5	56.3
Mellezitose	7.0	15.6
Sorbose	6.7	76.6
Sorbitol	6.8	20.3
Mannitol	6.8	20.3
Myo-Inositol	6.9	25.0
Soluble starch	6.9	18.8

향을 조사하기 위하여 glucose를 3.0% 첨가한 종균배지에 각종 유기, 무기질소원을 각각 0.2%씩 첨가하여 35 °C에서 24 시간 진탕 배양한 후 우모 keratin에 대한 분해 활성을 조사한 결과는 Table 6 및 Table 7과 같다.

유기질소원은 urea에서 활성이 가장 우수하였고 기타 soybean meal, casamino acid, yeast extract에서도 비교적 우수했다. 또한 무기질소원의 경우 NaNO₃에서 가장 우수하였으며, KNO₃ 첨가에서도 비교적 우수하게 나타났다. 이런 결과는 유기질소원으로 우모 keratin을 유일한 질소원으로 이용한다는 Rosa et al.(1996)의 보고와는 상이하였고, soybean meal을 사용 시 가장 우수하였다는 Chon and Kwon(2001)의 보고와도 상이하였으나 무기질소원의 경우는 유사한 결과를 나타

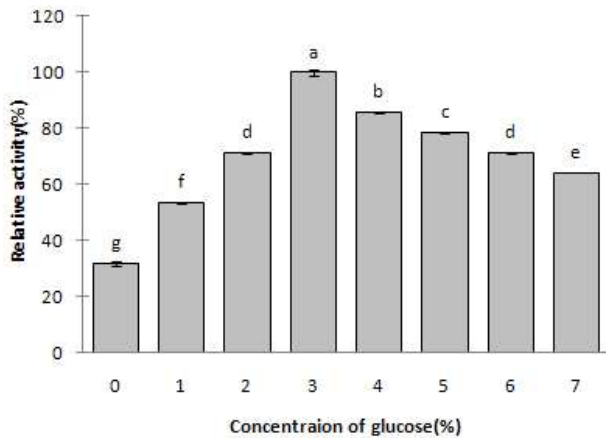


Fig. 2. Effect of glucose concentration on the production of the keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SE-103. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Table 6. Effect of organic nitrogen source on the production of keratinolytic protease by *Bacillus* sp. SE-103

N-source	Final pH	Relative activity (%)
None	7.0	15.4
Yeast extract	6.7	80.24
Peptone	7.0	79.43
Beef extract	6.6	69.35
Malt extract	6.5	70.16
Soytone	6.5	75.00
Soybean meal	6.6	83.87
Tryptone	6.5	55.24
Milk casein	6.4	68.54
Skim milk	6.6	70.16
Casamino acid	6.6	80.64
Urea	6.8	100.00

냈다.

Urea의 농도가 효소 활성에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 3과 같이 0.4% 첨가 시 효소 생산이 가장 높게 나타났고, NaNO₃의 경우 Fig. 4와 같이 0.2% 첨가 시 효소 생산이 가장 우수하였다.

3) 금속염

우모 keratin 분해 효소의 생산에 미치는 금속염의 영향을

Table 7. Effect of inorganic nitrogen source on the production of keratinolytic protease by *Bacillus* sp. SE-103

Inorganic nitrogen source	Final pH	Relative activity (%)
None	7.0	74.2
NH ₄ Cl	8.7	73.88
NH ₄ NO ₃	8.7	71.94
(NH ₄) ₂ PO ₄	8.7	78.61
(NH ₄) ₂ SO ₄	8.7	78.33
NaNO ₃	8.8	100.00
KNO ₃	8.8	86.11
NaNO ₂	8.9	44.16

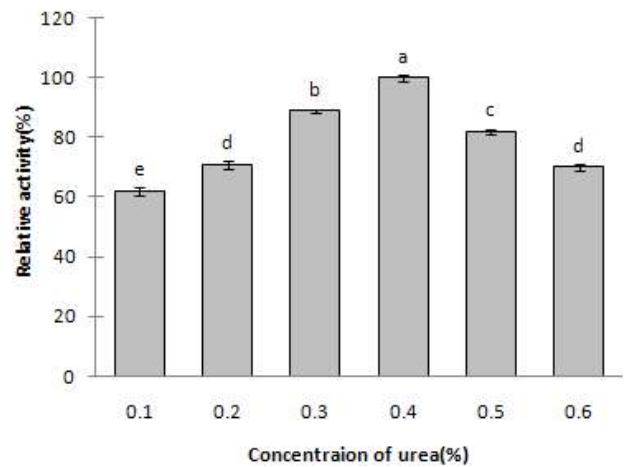


Fig. 3. Effect of urea concentration on the production of the keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SE-103. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

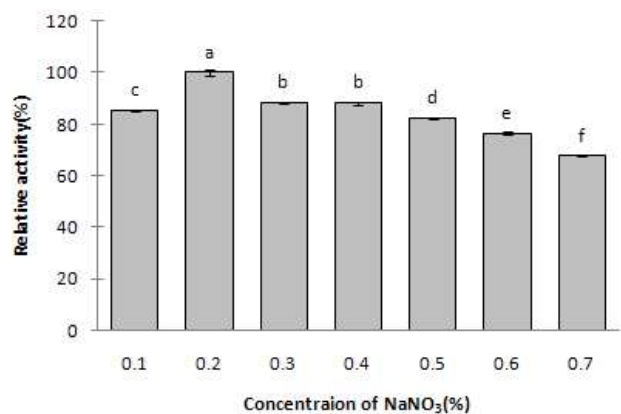


Fig. 4. Effect of NaNO₃ concentration on the production of the keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SE-103. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

조사하기 위하여 glucose 3%, urea 0.4%, NaNO_3 0.2% 첨가한 기본 배지에 각종 금속염을 1.0 mM 첨가하여 35 °C에서 24 시간 진탕 배양한 후 우모 keratin의 분해능을 조사한 결과는 Table 8과 같이 KCl 첨가 시에 효소 생산이 가장 우수하였다. 이는 KCl 첨가 시 효소 생산이 가장 우수하였다는 Chon and Kwon(2001)의 보고와 일치하였고, FeSO_4 첨가 시 우수하였다는 Page and Stock(1974)의 보고와 MgSO_4 에서 우수하였다는 Tideto et al.(1992)의 보고와는 상이하였다.

KCl의 농도에 대한 영향은 Fig. 5와 같이 KCl 0.15% 첨가 시 효소 활성이 가장 높게 나타났다.

4. 우모 Keratin 분해를 위한 배양 환경의 최적화

1) pH

초기 pH가 효소 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 3에서부터 pH 10까지 조절한 후 35 °C에서 24시간 진탕 배양 하여 효소 활성을 조사한 결과 Fig. 6과 같이 pH 6에서 가장 우수하였으며, pH 4부터 pH 8 범위에서 비교적 좋은 활성을 나타냈다. 이는 *Bacillus* sp.를 이용한 실험에서 pH 9(Suntornsuk and Suntornsuk, 2003)에 비해 낮게 나타났으며, pH 5~9(Kim et al., 2001), pH 7(Rozs et al., 2001; Ramnani and Gupta, 2004)과 유사하였다.

Table 8. Effect of metal ions on the production of keratinolytic protease by *Bacillus* sp. SE-103.

Metal ions	Final pH	Relative activity (%)
None	7.000	52.50
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.066	70.10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.055	76.13
KCl	7.047	100.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7.068	44.72
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	7.063	75.87
CuCl_2	7.023	25.87
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	7.053	80.90
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7.067	35.42
Li_2SO_4	7.073	81.65
ZnCl_2	7.061	65.07
HgCl_2	7.056	70.35
Ag_2SO_4	7.064	60.80
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.066	87.43

2) 배양 온도와 배양 시간

배양 온도에 따른 효소 활성을 조사한 결과는 Fig. 7에서와 같이 35 °C에서 가장 우수하게 나타났으며, 이는 *Bacillus* sp.에서 65 °C(Pillai and Archana, 2008), 50 °C(Williams et al., 1990)에 비해 낮았고, 25~37 °C(Amanda and Adriano, 2008), 30~40 °C(Kim et al., 2001)와 유사한 결과를 보였다. 배양 시간의 영향을 조사하기 위하여 최적 배지 조건에서 각 시간대별 우모 keratin 분해 효소의 활성을 조사한 결과 Fig. 8과 같이 24시간 배양했을 때 가장 우수한 활성을 나타냈다. 이는 지금까지의 보고에서 나타낸 10일(Williams et al., 1990), 4일(Rozs et al., 2001), 72시간(Kim et al., 2001) 및 48~60시간

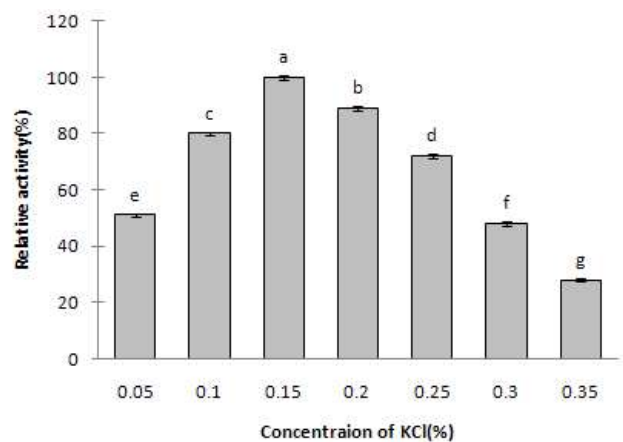


Fig. 5. Effect of KCl concentration on the production of the keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SE-103. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

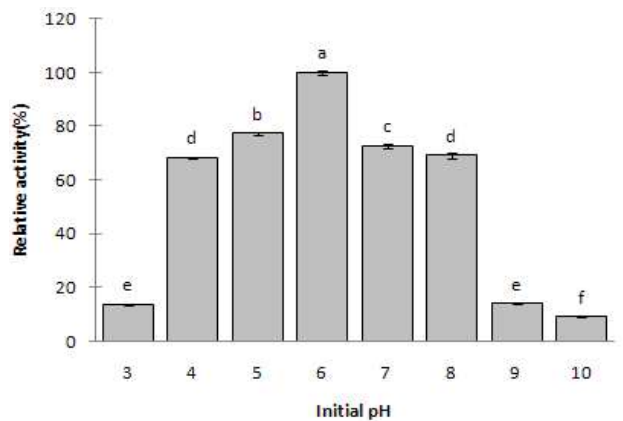


Fig. 6. Effect of pH on the production of the keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SE-103. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

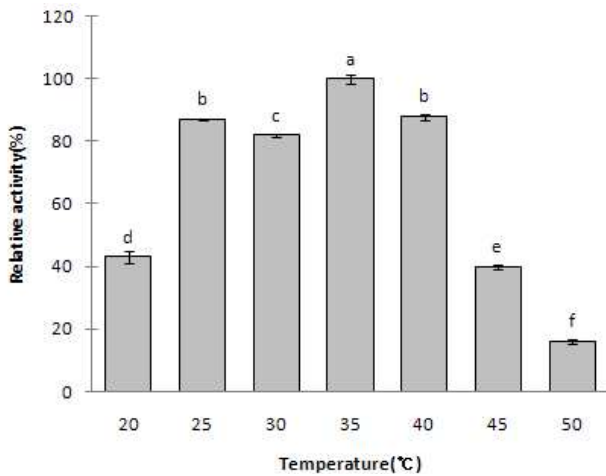


Fig. 7. Effect of culture temperature on the production of the keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SE-103. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

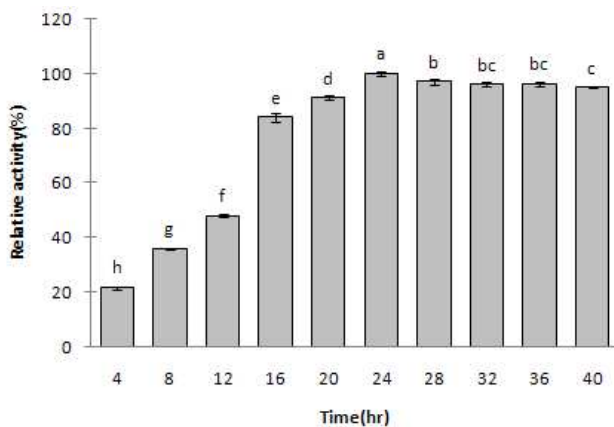


Fig. 8. Effect of culture time on the production of the keratinolytic protease produced by *Bacillus* sp. SE-103. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

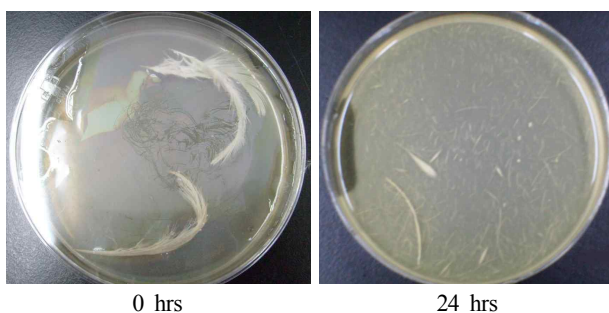


Fig. 9. Chicken feather disintegration using protease preparation from *Bacillus* sp. SE-103.

(Gassesse et al., 2003)에 비해 매우 우수한 균주로 생각되며, Ramnani and Gupta(2004)의 24시간과는 유사하였다. Fig. 9는 최적화 배지에 우모를 넣고 121 °C에서 20분간 살균한 후 *Bacillus* sp. SE-103을 접종하여 우모의 분해력을 나타낸 그림이다.

이상의 결과로 지금까지 보고된 keratin 분해 균주는 고온성 또는 긴 배양 시간이 필요한 것에 비해, 본 연구는 35 °C에서 24시간 배양 시 최대 활성을 나타내는 우수한 균주로 이용 효과가 높을 것으로 생각된다.

적 요

본 연구는 박테리아에 의한 우모분의 이용 가능성을 조사하기 위해 우모 keratin 분해 활성이 높은 균주를 분리한 후 keratinolytic protease 활성이 가장 우수한 효소 생산을 위한 최적 배양 조건을 조사하였다.

SE-103 균주로 형태학적·생화학적 특성을 조사한 결과 *Bacillus* sp.로 확인되어 *Bacillus* sp. SE-103으로 명명하였다. 최적 배지 조성은 glucose 3.0%, urea 0.4%, NaNO₃ 0.2%, KCl 0.15%였으며, 배양 조건은 초기 pH 6.0, 배양 온도 35 °C, 24시간 진탕 배양하였을 때, 효소 생산이 가장 우수하게 나타났다.

사 사

본 논문은 2008년도 상지대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

Amanda SM, Adriano B 2008 Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. strain P34. *World J Microbiol Biotechnol* 24(5): 641-646.

Brigitte B, Galunsky B, Muller R 1995 Characterization of a keratinolytic serine protease from *Streptomyces pactum* DSM 40530. *Appl Environ Microbiol* 61:3705-3710.

Chon DH, Kwon TJ 2001 Isolation of keratinolytic protease producing microorganism and its cultivation condition. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 29:134-141.

- Elaine F 1995 Keratins and the skin. *Ann Rev Cell Develop Biol* 11:123-153.
- Esteban B, Berta M 1984 Purification and some properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol* 77:599-604.
- Gassesse A, Kaul RH, Gashe BA, Mattiasson B 2003 Novel alkaline proteases from alkalophilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microb Technol* 32:519-524.
- Gregory BR, Wilder OHM, Ostby PC 1956 Studies on the amino acid and vitamin composition of feather meal. *Poultry sci* 35:234-235.
- Harms RH, Goff OE 1957 Feather meal in hen nutrition. *Poultry sci* 36:358-361.
- John GH, Krieg NR, Sneath PHA 1994 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins Baltimore, Maryland.
- Kim JM, Lim WJ, Suh HJ 2001 Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochem* 37:287-291.
- Krystyna W, Lobarzewski J, Wolski T 1987 Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *J Med Veter Mycol* 25: 261-268.
- Macfadin JF 1984 *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. Williams and Wilkins 2nd ed. Baltimore, Maryland.
- Moris WC, Balloun WSL 1973 Effect of processing method on utilization of feather meal by broiler chicks. *Polultry Sci* 52: 858-866.
- Page WJ, Stock JJ 1974 Phosphoate-mediated alteration of the *Microsporium gypseum* germination protease specificity for substrate: Enhanced keratinase activity. *J Bacteriol* 117:422-431.
- Papadopoulos MC, Boushy AR, Ketelaars EH 1985 Effect of different processing conditions on amino acid digestibility of feather meal determined by chicken. *Poult Sci* 64:1729-1741.
- Pillai P, Archana G 2008 Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(4): 643-650.
- Ramnani P, Gupta R 2004 Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RGI using statistical methods involving response surface methodology. *Biotechnol Appl Biochem* 40:491-496.
- Rosa SP, Bicca F, Santos PC, Ferrao SK, Dewes H, Gaylarde CC, Termignoni C, Thomas RWSP 1996 Digestion of keratin *Pseudomonas* sp.. *Inter Biodeter Biodegr* 37:1-2.
- Rozs M, Manczinger L, Vagvolgyi C, Kevei F 2001 Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol Lett* 205:221-224.
- Ryoji T, Ko IJ, Matsuda K, Ogawa H 1987 A new keratinolytic proteinase from clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes*. *J Dermatol* 14:506-508.
- SAS 2002 SAS System Release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Shih JCH 1993 Resent development in poultry waste digestion and feather utilization - a review. *Poultry Sci* 72:1617-1620.
- Shimogaki H, Takeuchi K, Nishino T, Ohdera M, Kudo T, Ohba K, Iwama M, Irie M 1991 Purification and properties of a novel surface-activity agent-and alkaline resistant protease from *Bacillus* sp. *Y Agric Biol Chem* 55:2251-2258.
- Sibbald IR, Slinger SL, Pepper WF 1962 The utilization of hydrolyzed feather meal by growing chicks. *Poultry Sci* 41: 844-849.
- Smith RE 1975 Assessmsnt of the availability of amino acid in feather meal, soybean meal and feather meal by chick growth assay. *Poultry Sci* 47:1624-1630.
- Suntornsuk W, Suntornsuk L 2003 Feather degradation by *Bacillus* sp. FK 46 in submerged cultivation. *Bioresour Technol* 86:239-243.
- Tideto T, Nakamura S, Aono R, Horikoshi K 1992 Degradation of human hair by a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. No.AH-101. *Biosci Biotech Biochem Mycoses*. 56:1667-1669.
- Williams CM, Richter CS, Mackenzie JM, Shih JCH 1990 Isolation idification and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl Environ Microbiol* 56:1509-1515.
- Xiang L, Kelemen DW, Miller ES, Shih JCH 1995 Nucleotide sequence and expressing of keratin, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1. *Appl Environ Microbiol* 61:1469-1474.
- Xiang L, Lee CG, Casale ES, Shih JCH 1992 Purification and characterization of keratinase from a feather degrading *Bacillus licheniformis* strain. *Appl Environ Microbiol* 58: 3271-3275.

(접수: 2009. 12. 19, 수정: 2009. 12. 27, 채택: 2008. 12. 28)