19904583

664
L293ㅊ

GA0037-0973

200

최 종
보 고 서

# 수출형 고품질 우모분 제조 및 캐라틴태 단백질 개발

# Studies on the processing of high quality feather meal and development of keratinaceous protein

연구기관
한국식품개발연구원

농 림 부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 " 수출형 고품질 우모분 제조 및 캐라틴태 단백질 개발 " 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998 . 11 . .

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원
총괄연구책임자 : 이 남 형
연 구 원 : 김 영 붕
연 구 원 : 노 정 해
연 구 원 : 한 찬 규
연 구 원 : 최 신 양
연 구 원 : 김 희 주
협동연구기관명 : 강원대학교
협동연구책임자 : 안 철
연 구 원 : 고 석 현

# 여 백

# 요 약 문

Ⅰ. 제 목

수출형 고품질 우모분 제조 및 캐라틴태 단백질 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

가. 연구개발의 목적

° 발효처리 또는 효소처리에 의한 고품질 우모분 제조기술 확립 - 단백질 사료로 활용

° 케라틴태 단백질 분리 정제 - 인체용 식이성 단백질 소재로 활용

나. 연구의 필요성

1) 기술적 측면

◇ 우모 단백질의 85~95%는 케라틴(Keratin)으로 구성돼 있고 그 구조를 보면 $\beta$-helix를 형성하는 펩타이드군을 수소 결합에 의해 원통형 단위를 형성하고 이들은 다시 disulfide bond에 의하여 서로 결합돼 케이블과 같이 꼬여 있기 때문에 물리, 화학적으로 안정성이 강해서 소화관에서 효소에 의해 쉽게 분해가 안된다.

◇ 우모를 142~153℃, 압력 40~60 psi에서 30분~60분간 가압 가열처리하면 hydrogen bond나 disulfide bond가 쉽게 분해돼 비교적 간단한 펩타이드로 되며, 가공처리한 우모분은 가축사료로 쓰이고 있다. 그러나 생체내에서 아미노산 이용율이 극히 낮아서 오토그래프처리에 의한 물리적 처리는 기술적으로 적절치 않다는 것을 입증해 준다.

◇ 사료가치 향상을 위해서 미생물이 생산하는 효소(Keratinase)에 의해 케

라틴태 단백질을 분해하는 기술을 개발할 필요성이 있으며

◇ 또한 케라틴 태 단백질을 다이어트 식품원료로 사용하기 위한 연구가 병행돼 물리·화학적으로, 오토크래브된 우모분을 디메칠훠름아마이드(dimethyl formamide) 처리에 의해 단백질을 추출하는 공정을 통해서, 고부부가가치 가공 기술을 개발할 필요성이 있다.

2) 경제적 측면

◇ 미생물이 생산하는 효소 처리에 의해 사료가치를 증진시에는 현재 대두박 수준의 사료가치에서 중질어분 수준에 상당하는 고품질 단백질사료를 생산, 자원이용을 극대화할 필요성이 있다.

◇ 우모분의 대일 수출단가는 펩신소화율 68~78%인 경우에 kg당 34Yen이지만, 펩신소화율을 85~90%로 향상시에는 kg당 45Yen으로 수출단가를 높일 수 있다. 또한 품질향상에 의해서 국내 판매가격도 kg당 250원에서 320원 이상으로 높게 형성될 수 있다.

3) 사회적 측면

◇ 물리, 화학적처리 공정에 의하여 순수 케라틴태 단백질을 추출분리할 경우에, 이 단백질의 소화율이 낮으므로, 새로운 식이성 단백질 시장을 창출할 수 있으며 식품첨가물 원료로 개발할 필요성도 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

| 구 분 | 연구개발 내용 | 연구개발 범위 |
|---|---|---|
| 1차년도 (1995) | ° 실험실적 조건하에서 케라틴태 단백질 추출 및 정제 | ° 우모생산 현황 및 사용실태 조사<br>° 케라틴태 단백질 추출 정제<br>- 1차 분쇄 공정 검토<br>- 2차 화학적 처리 공정 검토<br>- 3차 분리 공정 검토<br>ㅇ 화학적 성분분석 및 펩신 소화율 측정 |
| | ° 케라틴태 단백질 분해 균주 스크리닝 | ° 케라틴 분해 미생물 탐색<br>° 케라틴 단백질 분해 세균의 선발 및 동정 |
| 2차년도 (1996) | ° 케라틴태 단백질 추출 및 정제 효율 증진 | ° 1차년도 결과 토대로 수율증진 방법 개선<br>° 식이성 단백질 가능성 검토<br>° 우모분 1kg 이상 처리할 수 있는 시작 장치 제작 및 케라틴 단백질 추출, 정제 시험 |
| | ° 동물사육시험으로 아미노산 이용율 평가 | ° 쥐에대한 동물사육 시험을 통하여 케라틴단백질의 아미노산 이용한 평가<br>° 배지조성, 배양온도, 배양시간 및 최적 생육조건 확립 |
| | ° 케라틴태 분해 미생물의 생육특성 및 분해 효소 국재성조사 | ° 선발균주의 케라틴 분해 효소가 세포 내 또는 세포외 존재확인 및 세포분획을 통한 국재성 조사함<br>° 실험실적 발효우모분 생산시험 in vitro 및 in vivo 평가 |

| 구 분 | 연구개발 내용 | 연구개발 범위 |
|---|---|---|
| 3차년도 (1997) | ° 식이성 단백질 소재의 가능성 검토 | - 식이성 단백질 소재의 가능성<br>° 소시지 제조시 단백질원으로의 가능성을 검토함.<br>° 다이어트 식품으로 이용하기 위하여 제품화를 검토함. |
| | ° 동물 사육시험을 통한 아미노산 이용율 평가 | - In vivo를 통한 아미노산 이용율 평가<br>° Pepsin 소화율이 높은 처리구를 사료화하여 동물사육 시험을 수행함.<br>° 아미노산 이용율 평가를 통하여 사료에 케라틴 단백질의 적정 첨가 수준을 결정함. |
| | ° 케라틴 분해균주 활용시험 | - 발효에 의한 우모분 제조시험 및 활용 시험<br>° 우모분해효소의 산업화 분자특성 연구<br>· 우모분해효소의 부분정제<br>· 정제효소의 pH, 열, 용매안정성 규명 |
| | ° 케라틴 분해효소의 분리정제 특성시험<br>° 우모분해 효소의 유전 특성 시험 | - 우모분해효소의 유전특성 연구<br>· 異種유전자표지(heterologous gene probe)에 의한 우모분해효소의 유전자 탐색<br>· 우모분해효소의 유전적 특성 규명<br>· 유전적 개량균주의 탐색 |
| | ° 분해균주를 활용한 scale up 시험 | - 산업화 공정 개발<br>· 균체에 의한 우모분해 공정 개발<br>· 정제효소에 의한 우모분해 공정 개발 |

## Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

### 1. 연구개발 결과

가. 캐라틴태 단백질 추출 및 정제

- 물리적인 방법에 의한 추출시 단백질함량 및 소화율과 추출정도 확인하였으며, ball mill로 분쇄 후 130℃에서 240분 열처리하는 것이 최적조건이라고 할 수 있다.
- 화학적 방법인 DMF처리에 의한 공정을 통하여 4가지의 형태로 캐라틴 단백질이 분해된 분해물로 추출 정제하였다.
- 분리된 단백질의 종류별로 전기영동 pattern을 통하여 캐라틴태 단백질이 분자량을 측정하였는데 원료우모는 약 44,500-66,200Da, 분쇄 후 화학적 방법으로 처리한 우모는 10,700-25,000Da 정도로 확인되었다.
- 물리적 처리 방법(Colloid mill, Ball mill)에 의해서 360분 autoclaving시 pepsin 소화율이 90% 이상으로 증진됐다. 물리적으로 분쇄후 다시 화학적 방법(Dimethylformamide)으로 케라틴 단백질 fraction을 분리하여 pepsin 소화율 측정 시 protein I fraction의 경우에 99% 이상으로 가장 높게 증진됐다.
- 우모분 1 Kg 이상 처리할 수 있는 시작장치는 온도를 조절할 수 있는 이중 자켓솥과 대형 교반기를 이용하였다.

나. 발효우모분에 대한 아미노산 이용률 평가 시험

- 동물사육 시험에 의한 아미노산 이용률 평가 결과 카제인 단백질은 94.58%, 케라틴 단백질(Protein fraction Ⅰ)은 93.61%, 원료 우모분은 15.49%로 케라틴 단백질의 경우에 카제인과 거의 유사한 아미노산 이용률을 나타냈다.
- 발효우모분의 생체내 아미노산 이용률은 83.67%, ball mill로 분쇄한 아미노산 이용률은 71.70%, autoclave한 우모분의 경우 75.72%로 측정되었다. 모두 대조구 casein의 아미노산 소화율 96.78% 보다는 낮은

성적이었다, 그러나 발효처리에 의해서 아미노산 이용률이 증진됐다는 것이 확인되었다.

다. 식이 단백질 소재로 이용 가능성 검토

- 다이어트 식품으로 이용하기 위하여 쌀, 감자 및 메밀가루를 주원료로 하여 죽을 제조하여 관능검사를 실시하였다. 그 결과 우모분의 적정 첨가량은 5% 이내에 첨가하는 것이 바람직하였다.
- 소시지 제조시 단백질원으로 가능성을 검토하기 위하여 대량의 우모단백질을 물리적 방법으로 분쇄하여 돼지고기의 대체시험시 관능검사 결과 5% 첨가군에서 가능성이 제시됐으나 향후 보완시험이 필요하다.

라. 우모 분해미생물 활용 시험

- 총 360균주를 양계장의 폐기분뇨 토양으로부터 순수분리하여 이 중 우모분해능을 보인 50균주(FDB: Feather-Degrading Bacteria로 명명)를 별도 분리하였으며, 이들 FDB 균주를 다시 정밀 배양과정을 거쳐 매우 우수한 우모분해능을 보유하고 있는 20균주 및 양호한 분해능을 보유하고 있는 9균주 등 총 29종의 산업화가능 균주를 분리하였다.
- 산업화가 가능하다고 판단되는 FDB균주 29개 균주를 임의 선정하여 지속적인 enrichment culturing에 의하여 그 분해능의 상승을 도모하였으며 이중 가장 안정된 growth pattern을 보인 FDB11-11에 대해 최적 조건을 산정하였다(pH7.0 at 45℃).
- 산업화 가능 29종의 균주를 포함한 50종의 FDB균주에 대해 생리·생화학적 실험 및 전자현미경 등에 의한 morphological test를 시행한 결과 *Alkaligenes* spp.로 동정되었다.
- 케라틴 분해균주의 생육특성시험은 keratinase 생산을 위한 생육 최

적 조건을 선정하기 위해서 온도별, pH별로 조사결과 온도는 45℃, pH 8.5 였다.

- 탄소원과 질소원의 공급 영향을 조사한 결과 질소원으로는 peptone, 탄소원으로는 glucose, sorbitol, maltose, fructose, cellobiose가 2배정도의 activity 증가를 보였다.
- 케라틴 분해효소의 국재성 시험은 분해효소의 소재확인, 분획시험 (activity by ammonium sulfate fractionation), 여러가지 solvent, detergent, reducing agents가 keratinase activity에 미치는 영향, 다른 protease의 우모분해능을 조사했다. 15개 균주중 FDB11-11 균주가 다양한 extracellular protein을 생산한다는 것을 확인하였다. 분자량은 21,000에서 31,000dalton사이 protein임. 배지내 적정 우모의 함량은 1% 였다..
- 기 선발한 우수균주 FDB11-11이 생산하는 우모분해효소를 얻기 위해 feather-containing broth(2ℓ)에 FDB11-11을 접종한 후 45℃에서 14일간 배양하여 그 배양액을 원심분리한 상등액을 얻었음.
- keratinase의 one step purification strategy 개발을 위해 large scale induction 실험을 시행하고 이를 전기영동에 의해 확인하였음. FDB11-11 균주는 small scale에서 분자량 21,000dalton - 31,000 dalton 범주에 2 종류의 protein이 induction됨이 확인되었음.
- 우모분해효소의 부분정제는 Sephadex G-50 gel filtration column chromatography 와 각 fraction을 SDS-PAGE 실험 결과 분자량 20,000 이하의 작은 protein들이 제거되었음을 확인하였다.
- 정제효소의 pH, 열, 용매안정성 규명은 부분정제액을 이용하여 pH(2 - 10), 온도(30℃ - 100℃), 용매(ethanol, chloroform, ether 등)에서의 안정성 실험을 진행하였다.

- 이종유전자표지(heterogeneous gene probe)에 의한 우모분해효소의 유전자 탐색: FDB11-11 chromosome에의 PCR amplication fragment탐색하였다.

마. 산업화 공정 개발

- 산업화 가능한 최적 발효 starter를 개발하기 위하여 FDB11-11균주와 FDB21-6, FDB24-1, FDB26-1 균주를 단독 혹은 혼합 배양하여 우모분해능을 조사한 결과 FDB11-11균주와 FDB26-1 균주를 동시 접종한 starter가 가장 우수하였으며, 산업화 공정 중 starter 도입 최적점을 판단하기 위한 feather meal 발효 시험 결과 별 아이가 없어 혼합 starter는 milling 공정 전후에 공히 투입 가능한 것으로 판단되었다.

2. 활용에 대한 건의

가. 우모의 단백질인 캐라틴 단백은 원래 저소화성 단백질로 동물의 생체내에서 이용률이 상당히 낮다. 이런 특성을 살려서 우모를 ball mill로 분쇄하여서 인체의 다이어트 식품 단백질급원으로 사용시 식이성 섬유와 같은 개념으로 식이성 단백질로 활용이 기대된다. 인체이용에 대한 연구보고는 전 세계에서 단 한건도 없기 때문에 앞으로 이 분야 연구를 더 보강하여서 식이성 단백질 개념을 정립할 필요성이 있으며 본 연구 자료를 토대로 하여서 특허 준비중에 있다.

나. 양계 축산 농가의 우모 혼합분뇨의 효율적 처리를 위한 생물학적 처리제로 활용될수 있으며,

대한민국국립도서관장서

다. 처리된 우모분의 자원화 미생물제제로 활용할 수 있을뿐만 아니라

라. 분리수거된 우모를 분해하여 소화흡수율 높은 사료첨가용 아미노산 자원화하는 생물학적 변환제로 활용할수 있다고 판단된다.

# 여 백

# SUMMARY

The object of the research is that keratinaceous material such as poultry feathers are ground by physical methods and extracted by DMF( dimethyl formamide ) as well as by enzyme processing methods to yield high levels of digestible protein which is suitable for using as a feed or food supplements for animals and humans, respectively.

1. Isolation and purification of keratinaceous protein

- Protein content and protein digestibility of feather meal by physical processing method were determined. Optimal condition to improve digestibility was at 130 ° C for 240 minutes by steam treatment after grinding by ball mill.
- After the chemical treatment of DMF to grind poultry feathers, 4 protein fractions were isolated and purified.
- Degradation of keratinaceous protein was confirmed by SDS-high density gel chromatography. Molecular weights of protein in raw feather meal was measured as approximately 44,500 - 66,200 daltons. However, molecular weights of keratinaceous protein by DMF treatment was approximately 10,700-25,000 daltons.
- Pepsin digestibilities of feather meal was increased over 90 % by physical treatment ( colloid mill, ball mill or autoclave for 360 minutes ). Pepsin digestibility of keratinaceous protein fraction 1 was improved to 99 % by physical and chemical treatments, simultaneously.
- Double jacket cooker to control temperature and big stirrer in laboratory scale ( 1 Kg of feather ) were used for isolation of keratinaceous

protein.

2. Amino acid digestibility of the fermented feather meal

- In vivo digestibility of amino aids were 94.58 % for casein protein, 93.61 % for keratinaceous protein fraction 1, and 15.49 % for raw feather meal.
- In vivo availability of amino acid of keratinaceous protein fraction was similar value to amino acid digestibility of casein.
- In vivo digestibility of amino acid of the fermented feather meal was evaluated as 83.67 %. Digestibility of amino acid were 71.70 % for ground feather meal by ball meal 75.72 % for autoclaved feather meal, and 96.78 % for casein. It was confirmed that amino acid digestibility of feather meal was significantly improved by fermentation.

3. Possibility for using as dietary protein

- Diet food was formulated with rice, potatoes, and buckwheat powder as main ingredients. Sensory evaluation was carried out in order to optimize supplemental level of ground and fine feather meal to pastes. Optimal level of ground feather meal was below 5 %.
- In order to use ground feather meal instead of pork for making sausages, 5% level of ground feather meal was acceptable in sensory evaluation. However, it is necessary further research to improve the quality of sausages.

4. Isolation of bacteria which had feather-degrading ability

- 360 strains of bacteria were isolated from feather waste and soils, and tested for their feather-degrading ability. Among 50 strains which showed good feather-degrading ability, 29 strains were finally selected

for their excellent feather-degrading ability.

- Enhancing microbial digestibility of feathers upto the industrially effective level:

  Enrichment culturing was carried out for the selected 29 strains of FDB, and strain FDB11-11 which exhibited the most stable growth pattern in the feather-enriched media was assessed for its optimal growth conditions(pH7.0 at 45C)

- Identification of the bacteria:

  Selected 29 strains of FDB were identified as *Alkaligenes* spp. by b iochemical and physiological tests as well as morphological observation with electron microscope.

- Assessing the optimal condition of growth and activity production of feather-degrading bacteria(FDB):

  The optimal condition of growth and production of keratinolytic activity of FDB strain 11-11 was 45C in temperature, 1% in feather meal content, and pH8.5.

- Location of keratinolytic enzyme in the bacterial cell:

  Upon SDS-PAGE of culture supernatants and its ammonium sulfate precipitates confirmed that the enzyme was extracellularly secreted protein, and that it was inducible by presence of feathers in the media. The apparent molecular weight of the enzyme was calibrated between 21,000 and 31,000 dal. The enzymatic activity of the keratinase was optimal at pH8.0, 37C. There was active serine at the active site of the enzyme.

- Assessing the conditions for the activity production and feather meal:

  Feather meal was produced by fermentation of feather waste with the strain FDB11-11 at 45C for 9 days, digestibility of the feather meal was assessed. The effects of concentration of the fermented feather meal and sources of the feather meal including commercially available

ones on the production of enzyme activity of the strain FDB11-11 were monitored.

- Defining molecular characteristics of keratinolytic enzymes at the industrial level:

  Thermostability of partially purified keratinase from the strain FDB11-11 was remarkable; 30% of total activity survived 100C. It was stable between pH 5.0 and 7.0, while 60% of activity remained at pH 8.0 to 9.0. The enzyme activity was stable in ethanol, while it was very unstable in ethyl acetate.

- Characterization of the genetic properties of the keratinolytic enzymes:

  The genetic determinant of keratinase was located on the chromosomal DNA. However, 5'-CAACCGTTCCTTACGGCATTCCTC-3' which was prepared from DNA sequence of keratinase from *Bacillus licheniformis* did not produce any detectable DNA on PCR.

5. Development of industrial procedures to digest feather wastes:

   In order to develope the optimal starter cultures for the industrial uses, combinatorially mixed cultures of the strain FDB11-11 with the strain FDB21-6, FDB24-1, and FDB26-1 were prepared and tested for their feather digestibility. The best result in fermentability was obtained by the mixed starter culture of FDB11-11 with FDB26-1.

6. These research results will be immediately applied in the industrial fields as follws:

- Keratinaceous protein of feather is very low in vivo digestibility. The concept of dietary protein is very similar to dietary fiber and feather meal ground by ball mill is possibility to use for dietary protein. It is very seldom to find out the references for using of dietary protein

through the processing of feather around the world. It is necessary to study the dietary protein in the future as well as to establish the concept of the dietary protein.

- development of biological reagents to ferment mixed waste of feather and other products,
- develpment of microbial fertilizer,
- development of biological converter of feather into easily digestible feed.

# 여 백

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction ---------- 23
1. Objectives and importance of the research ---------- 23
2. Reviewof references ---------- 28
3. Production and marketing situation of feather meal in Korea ---------- 28
Chapter 2. Isolation and purification of keratinaceous protein --------- 45
1. Introduction ---------- 45
2. Materials and methods ---------- 47
3. Results and discussion ---------- 52
Chapter 3. Evaluation of feeding value of feather meal and amino acid digestibility ---------- 75
1. Introduction ---------- 75
2. Materials and methods ---------- 79
3.Results and discussion ---------- 80
Chapter 4. Possibility for using as dietary protein ---------- 115
1. Introduction ---------- 115
2. Materials and methods ---------- 115
3. Results and discussion ---------- 123
Chapter 5. References ---------- 133

# 여 백

# 목 차

제 1 장 서 론 ---------- 23
제1절 연구개발의 목적과 범위 ---------- 23
제2절 기존 연구사례 ---------- 28
1. 우모분의 영양적 특성 ---------- 28
2. 우모분의 영양소 함량 ---------- 30
3. 우모분의 사료적 가치 ---------- 32
4. 우모 분해 균주 ---------- 37
제3절 국내 우모분의 생산현황 및 사용실태 ---------- 38
제 2 장 캐라틴태 단백질 추출 정제분야 ---------- 45
제1절 서 론 ---------- 45
제2절 재료 및 방법 ---------- 47
제3절 결과 및 고찰 ---------- 52
1. 우모 및 우모분의 성분 및 소화율 ---------- 52
2. 물리적 방법에 의한 캐라틴태 단백질 추출 ---------- 56
가. 분쇄조건별 소화율 조사 ---------- 56
나. 열처리 조건별 소화율 조사 ---------- 58
3. 화학적 방법에 의한 캐라틴태 단백질 추출 ---------- 63
가. 분쇄조건별 소화율 조사 ---------- 63
나. 분획단백질의 아미노산 조성 ---------- 66
다. 전기영동 방법에 의한 단백질 분해 ---------- 69
라. 시작장치의 검토 ---------- 73
제 3 장 우모분의 사료가치 평가 및 아미노산 이용률 평가 ---------- 75

제1절 서 설 ---------- 75
제2절 재료 및 방법 ---------- 79
제3절 결과 및 고찰 ---------- 80
1. 발효우모분의 사료가치 평가 ---------- 80
2. 동물사육 시험을 통한 아미노산 이용률 평가 ---------- 94
제 4 장 식이단백질 가능성 검토 ---------- 115
제1절 서 설 ---------- 115
제2절 재료 및 방법 ---------- 115
제3절 결과 및 고찰 ---------- 123
1. Dietary food 제조 ---------- 123
2. 소시지 제조 시험 ---------- 129
제 5 장 참고문헌 ---------- 133

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 목적과 범위

가. 연구배경

◇ 1996년도 전국의 도계수수는 338,037천수, 오리 도축수수는 8,624천수로서 년간 3만톤 이상의 우모가 부산물로 생산되며 닭의 깃털은 조단백질함량이 85% 내외로 아주 높으며 국내에서는 고온 고압처리를 한 후 닭, 개, 양어사료 원료로 사용되고 있다.

◇ 국내 6개업체에서 월 1,500톤 정도 우모분을 생산, 유통되고 있으며 대일수출도 1994년 500톤 정도로 추정되며, 수출단가는 kg 당 34Yen으로 낮다.

◇ 현 공정하에서 생산된 우모분은 높은 단백질(75~87%) 함량에도 불구하고 생체내에서 아미노산 이용율이 낮아서, 아미노산(lysine methionine, histidine, tryptophan)을 보충해 줘야만 대두박(44% 단백질)과 유사한 영양가치가 있다. 그러나 닭에서 우모분의 단백질 이용율은 27~63%로 아주낮다.

◇ 물리적 처리만으로는 사료가치를 높이는데 한계성이 있고, 또한 폐수 및 악취가 강해 일종의 공해산업으로 취급되고 있다.

나. 연구의 필요성

1) 기술적 측면

◇ 우모 단백질의 85~95%는 케라틴(Keratin)으로 구성돼 있고 그 구조를 보면 $\beta$-helix를 형성하는 펩타이드군을 수소 결합에 의해 원통형 단위를 형성하고 이들은 다시 disulfide bond에 의하여 서로 결합돼 케이블과 같이 꼬여 있기 때문에 물리, 화학적으로 안정성이 강해서 소화관에서 효소에 의해 쉽게 분해가 안된다.

◇ 우모를 142~153℃, 압력 40~60 psi에서 30분~60분간 가압 가열처리하

면 hydrogen bond나 disulfide bond가 쉽게 분해돼 비교적 간단한 펩타이드로 되며, 가공처리한 우모분은 가축사료로 쓰이고 있다. 그러나 생체내에서 아미노산 이용율이 극히 낮아서 오토그래프처리에 의한 물리적 처리는 기술적으로 적절치 않다는 것을 입증해 준다.

◇ 사료가치 향상을 위해서 미생물이 생산하는 효소(Keratinase)에 의해 케라틴태 단백질을 분해하는 기술을 개발할 필요성이 있으며

◇ 또한 케라틴 태 단백질을 다이어트 식품원료로 사용하기 위한 연구가 병행돼 물리·화학적으로, 오토크래브된 우모분을 디메칠훠름아마이드(dimethyl formamide) 처리에 의해 단백질을 추출하는 공정을 통해서, 고부부가가치 가공 기술을 개발할 필요성이 있다.

2) 경제적 측면

◇ 미생물이 생산하는 효소 처리에 의해 사료가치를 증진시에는 현재 대두박 수준의 사료가치에서 중질어분 수준에 상당하는 고품질 단백질사료를 생산, 자원이용을 극대화할 필요성이 있다.

◇ 우모분의 대일 수출단가는 펩신소화율 68~78%인 경우에 kg당 34Yen이지만, 펩신소화율을 85~90%로 향상시에는 kg당 45Yen으로 수출단가를 높일 수 있다. 또한 품질향상에 의해서 국내 판매가격도 kg당 250원에서 320원 이상으로 높게 형성될 수 있다.

3) 사회적 측면

◇ 물리, 화학적처리 공정에 의하여 순수 케라틴태 단백질을 추출분리할 경우에, 이 단백질의 소화율이 낮으므로, 새로운 식이성 단백질 시장을 창출할 수 있으며 식품첨가물 원료로 개발할 필요성도 있다.

◇ 우모분 사료의 펩신소화율을 현재 70% 내외에서 90% 이상으로 향상 가능함하며 식용등급의 케라틴태 단백질 추출정제로 인체 다이어트용 단백질 식품소재로 활용가능성 높다.

다. 연구개발의 목적

우모는 단백질 함량이 매우 높지만 그 단백질의 이용율은 매우 낮다. 또한 공해산업으로까지 여겨지기도 한다. 우모 단백질의 사료로 이용성을 높이고자 하는 것과 새로운 타입의 인체용 식이성 단백질 소재로서 활용도를 제고시켜 폐자원의 부가가치를 향상시키며 더 나아가 양계농가의 소득증대에 이바지 하는데 그 목적이 있다.

2. 연구의 범위

가. 1차년도(1995)

1) 케라틴 단백질 추출정제

- 1차 분쇄 공정 검토 : 우모수집, 세척, 건조(60℃ 이하, 3~4일), 함머밀로 분쇄하고

- 2차 화학처리 공정 검토(Cherry 등 1975) : DMF(N, N'-dimethyl formamide)와 분쇄 우모와의 적정 반응 비율 및 분해 시간을 조사하였다.

- 3차 분리 공정 검토 : 가수조건과 교반조건, 수용성 단백질과 비수용성 단백질 분리, $MgCl_2$에 의한 침전, EDTA와 물로수세, 건조조건을 조사하였다.

- 화학적 성분조사 및 in vitro 평가 : 분리된 단백질에 대한 아미노산, 무기물, 일반 조성분 함량분석 및 pepsin 효소에 의한 단백질 소화율을 평가하였다.

- 동물사육시험을 통한 아미노산 이용율 평가 : 분리된 케라틴 단백질은 사람이 식용 가능한 단백질이므로 공시동물은 쥐로 대두단백질과 우유단백질(카제인)과 아미노산 이용성을 평가하였다.

2) 케라틴 단백질 분해균주

- 케라틴태 단백질 분해 세균의 탐색 : Nutrient agar 배지를 이용하여

양계장 및 우모분 등으로 부터 균주를 분리하고 Ball-milled agar 배지에 생육시켜 clear zone을 형성하는 균주 탐색하였다.

- 케라틴태 단백질 분해세균의 선발 및 동정 : Ball-milled feather agar 배지에서 비교적 큰 clear zone을 형성하는 균주를 선발하여 형태학적 관찰과 Bergey's munual of systematic bacteriology의 생화학적 시험등을 통하여 균주동정을 행하였다..

나. 2차년도(1996)

1) 케라틴 단백질

- 케라틴태 단백질 추출 정제 : 1차년도 결과를 토대로 분쇄공정, 화학적 처리공정, 단백질 분리공정을 개선할수 있는 조건을 확립하였다.

- In vitro 및 In vivo 시험에 의한 평가 : 수율증진된 단백질에 대한 pepsin 소화율 및 동물시험을 통해서 아미노산 이용율을 평가하였다.

- 식이 단백질 가능성 검토 : 다이어트 식품 소재로 제빵 제과원료로 활용방안 탐색하였다.

- 시작 장치 제작 : 우모분을 50kg 이상 처리할 수 있는 시작장치를 제작하여서 케라틴 단백질 추출, 정제시험을 수행하였다.

2) 케라틴 단백질 분해균주

- 우모분 케라틴 분해균주의 최적 생육 특성시험 : 선발한 우수 균주에 대한 탄소원류, 질소원류, 무기염류 등의 영양소 시험과 pH, 배양온도, 배양시간 등의시험을 통하여 최적 생육조건을 확립하였다.

- 선발균주의 케라틴 분해효소의 국재성 시험 : 선발균주의 케라틴 분해효소의 세포내 또는 세포의 존재를 확인하고 세포내 존재시 세포분획을 통한 국재성을 조사하였다.

- 발효우모분 생산시험 및 in vitro 와 in vivo시험을 통한 사료가치 평가

를 수행하였다.

다) 3차년도 (1997)

1) 케라틴 단백질

- Scale up 시험을 통한 경제적 타당성 검토 : 2차년도 연구결과와 반복 operation 시험결과 자료를 토대로 feasibility test 수행을 통하여 경제적 타당성 검토를 행하였다.

2) 케라틴 분해균주

- 케라틴 분해균주 활용한 scale up 시험을 통한 경제적 타당성 검토 : 현재 오트크래빙에 대한 처리공정 후에, 케라틴 분해 균주를 활용한 발효 우모분 제조시험을 수행하며 생산된 시제품에 대한 이화학적, 생물학적 평가를 행하였다.

- 케라틴 분해효소의 분리정제 : 물리적 또는 화학적방법에 의해 효소를 추출한 다음 유안 또는 유기용매로 분획하여 효소 활성 부분을 모으고 이온크로마토그라피, gel filtration 등으로 정제를 한다. 효소의 정제도는 비활성, 전기영동에 의한 단일물질임을 확인하였다.

- 케라틴 분해효소의 일반적 특성시험 : 정제한 케라틴태 단백질 분해효소의 최적반응 pH, 온도, 시간과 pH 안정성, 열안전성 및 무기 염류의 효소활성에 미치는 영향을 시험하였다.

- 케라틴 분해효소의 작용모드 : 정제한 케라틴태 단백질 분해효소의 최적반응 조건에서 케라틴을 분해하는 양상과 분해산물의 아미노산, 단백질분석 등을 통하여 효소의 작용 모드를 확인하였다.

- 케라틴 분해균주와 효소이용의 효율성 비교검토 : 산업적으로 활용하기 위하여 균주와 효소를 이용한 발효 및 반응시험 성적을 토대로 하여서 효율성 비교 분석하며, 경제적인 공정 타당성 검토를 수행하였다..

## 제 2 절 우모분의 기존연구 사례

1. 우모분의 영양적 특성

우모분이란 가금의 깃털을 고압하에서 가열처리하여 건조, 분쇄한 것으로 그냥 말려서 만든 것에 비하여 소화이용율이 높고 사료가치가 우수하다. 우리나라의 우모분 사용량은 1970년대에는 3000톤 이상이었으나 1980년대에는 사용량이 계속 감소하여 1985년에는 455톤 정도에 지나지 않아 양적으로 풍부하다고는 볼 수 없었지만, 1990년대에는 15,000톤 정도로 그 사용량이 증가됐다. 우모분은 조단백질 함량이 85%이상 되므로 부족한 동물성 단백질을 보충할 수 있다는 것과 폐기물을 활용한다는 면에서 볼 때 사료화의 의의는 크다고 생각된다. 그러나 우모 단백질의 85-90%는 케라틴으로 구성되어 있고 특히 아미노산의 균형이 이루어져 있지 않아 methionine, lysine, histidine, tryptophan 등이 부족하다는 사실과, 우모 단백질은 소화 이용율이 극히 낮아 이것이 사료적 가치를 떨어뜨리는 요인이 되고 있다. 우모 케라틴의 구조를 보면 $\beta$- helix를 형성하는 펩타이드군은 수소 결합에 의하여 원통형 단위를 형성하고 이들은 다시 di-sulfide bond에 의하여 서로 결합되어 케이블과 같이 꼬여져 있기 때문에 물리, 화학적으로 안정성이 강하며 소화기관내에서 효소에 의해 쉽게 분해되지 않는다. 그러나 우모를 142 °C- 153 °C (40-69 psi)에서 30-60 분간 가압. 가열하게되면 hydrogen bond는 물론 disulfide bond 도 쉽게 분해되어 비교적 간단한 펩타이드로 되며 이 경우 우모의 대사에너지가 증가하게 되며 단백질의 이용성도 증가하게 되는 것이다. 우모분의 제조 방법이 우모 단백질의 이용성에 미치는 영향을 보면 다음과 같다. Burgos등 (1974)은 가금부산물, 육분, 우모분의 아미노산 함량과 그 이용성에 대한 연구를 통하여 우모분을 제조함에 있어서 batch 법이거나 continuous 법이거나 간에 우모와 폐기물을 분리하여 가공한 것이 함께 가공한 것보다

우수하였다고 보고하였다. 김춘수등(1972)은 우모분과 모발분의 사료가치를 비교하는 시험에서 우모분의 제조 방법은 알카리 처리 가공이 가압. 가열 처리보다 더욱 효과적인 방법이라고 했고, 닭사료에 우모분을 대두박이나 어분 대신에 4%까지 대치해도 역효과는 나타나지 않았다고 보고했다. 쥐에게 생우모를 유일한 단백질 급원으로 공급하면 쥐는 체중 감소가 오며 거의 대부분의 쥐는 끝내 폐사하였으나, 가수분해된 우모분을 급여하면 체중의 감소는 약간 있었지만 6주간의 시험 기간중에 폐사는 거의 없었다. 가수분해된 우모분에 lysine, methionine, tryptophan, histidine 을 첨가해 주면 쥐의 성장율이 대두 단백질구보다는 약간 떨어 졌으나 상당히 개선되었다고 한다. 생우모 단백질의 소화율은 7.7% 였으나 우모분 단백질의 소화율은 80% 정도 였다고 보고했다(McCasland 와 Richardson, 1966). Moran등 (1966)은 대두박과 우모분을 병아리 사료의 주된 단백질 급원으로 하여 급여할 경우 30분간 121 °C 에서 가열처리한 것이나 sodium sulfide 로 처리된 우모분은 병아리를 성장시키지 못했으나 우모를 18시간 121 °C 에서 autoclaving한 것은 병아리의 정상적인 발육을 가져왔다. 우모분은 양계사료의 경우에 대두박 대신에 5% 정도 사용해도 좋으나, 우모분의 제한 아미노산은 methionine, lysine, tryptophan 등이라고 보고했다. Morris와 Balloun(1971)은 40 psi 에서 30분간 처리한 우모분과 60분간 처리한 우모분의 사료적 가치는 비슷했고, 50 psi에서 60분간 처리한 우모분은 같은 압력에서 30분간 처리한 우모분보다 사료가치가 더 우수했다. Naber등 (1961) 은 병아리의 사료에 있어서 총 단백질의 25% 까지는 우모분으로 대치해도 아무런 장애가 나타나지 않았으며 , 총사료 단백질의 30%를 대치할 경우에는 lysine과 methionine을 첨가해 주어야 하고 총단백질의 50%이상을 대치할 경우에는 tryptophan, histidine 까지도 첨가해 주어야한다고 보고했다. 이영철(1970)은 우모를 25psi 에서 각각 30분, 60분, 90분, 120분간 처리했을 때 pepsin소화율과 사료밀도는

처리시간이 길수록 향상되었고 어분과 대두박 대신에 10%의 우모분을 급여했을 때 병아리의 성장율은 대조구에 비해서 떨어졌으나 5% 대치구는 대두박을 우모분으로 대치하여도 아무런 차이가 없었다. 즉, 25 psi에서 2시간 이상 가열하면 정상적인 우모분이 생산될 수 있다고 보고했다. Wessels(1972)는 세가지 우모분 단백질의 품질비교에 관한 연구에서 아프리카 우모분에 methionine, lysine, histidine 을 보충해 주면 질소 축적율이 좋아졌고 tryptophan은 첨가해도 아무런 추가 효과가 없었다. 아르헨티나 우모분은 아프리카나 카나다 우모분 보다 lysine, methionine, histidine을 첨가해 주어도 이용성이 떨어졌다고 보고했다.

2. 우모분의 영양소 함량

우모분은 단백질 함량이 76-87%로 단백질 함량은 높으나 다른 동물성 단백질 사료와 마찬가지로 조섬유와 가용무질소물의 함량은 거의 없다. Ca 과 P의 함량은 각각 평균 0.59%, 0.38%로 공급 능력이 매우 낮으며, 다른 케라틴 단백질과 같이 아미노산중 cystin함량이 특히 높고 threonine, arginine 함량도 높은 편이나 methionine, lysine, histidine 및 tryptophan 함량이 낮다.

Woodgate와 Vreeburg (1996)는 효소처리한 우모분의 영양소 이용율 평가를 실시했다. 효소처리는 50 °C에서 60분간 효소반응시킨 후 20분간 125 °C (25 psi)에서 autoclave한 다음에 100 °C에서 건조시켰다. 다음 표 1에서 보는바와 같이 pepsin 소화율은 일반우모분이 73.2%로 효소처리한 우모분 66.8%보다 높게 측정됐지만, 아미노산 소화율은 반대로 효소처리한 우모분이 85%, 일반 우모분이 67%로 효소처리 시 높게 측정돼 우모분의 경우에 펩신 소화율 측정법에 문제가 있음을 지적했다.

Table 1. Comparison of nutrients availability between general with enzyme treated feather mael

| Items | General feather meal | Enzyme treated feather meal |
|---|---|---|
| C. protein(%) | 85.0 | 84.4 |
| Pepsin digestibility(%) | 73.2 | 66.8 |
| Total amino acid digestibility(%) | 67.0 | 85.0 |

미국 ICI회사의 Cherry등 (1976)은 우모로 부터 식용등급의 단백질을 분리해냈다. Dimethyl formamide로 단백질을 추출해 냈는데 단백질 함량이 96%로 높고 아미노산 조성도 우수했다 (표2).

Table 2. Amino acid composition of feather protein on extracted by chemical treatment

| Amino acid | Composition (per wt.%) | Amino acid | Composition (per wt.%) |
|---|---|---|---|
| Asp. | 5.21 | Met. | 0.59 |
| Thr. | 4.16 | Iso. | 4.41 |
| Ser. | 14.82 | Leu. | 7.03 |
| Glu. | 8.03 | Tyr. | 3.43 |
| Pro. | 8.70 | Phe. | 7.52 |
| Gly. | 5.42 | His. | 1.86 |
| Ala. | 3.70 | Lys. | 1.34 |
| Cys. | 7.13 | $NH_4$ | 1.39 |
| Val. | 7.78 | Arg. | 7.21 |

3. 우모분의 사료적 가치

지규만등(1971)은 부로일러 병아리에 대한 우모분의 사료적 가치를 알기 위해 우모분으로 임자박과 대두박을 2%와 4% 대치하여 사양시험을 실시한 결과, 성장율은 우모분으로서 임자박을 2%와 4% 대치해도 대조구와 비슷한 증체를 하였고, 대두박 2% 대치시는 6%의 체중감소를 가져왔으나 유의성은 없었다고 하였다. 그러나 사료효율은 우무분 사용구에서 현저히 개선되어 종합적으로 보아 임자박 4% 나 대두박 2% 정도를 우모분으로 대치할 수 있다는 것이다. 한편 Gerry와 Smith(1954)는 가금사료에 우모분으로 ① 2.5%, 5%, 10% 의 대두박을 대치하던지 ② 22.5%, 5%의 어분을 대치하던지 ③ 2.5%의 대두박과 2.5%의 어분을 대치하던지 ④ 대두박 5% 와 어분 5%를 같이 대치하던지 간에 병아리의 성장율이나 사료효율에 아무런 영향이 없었고, 그리고 산란계 사료에 우모분을 사용해도 산란율이나 사료요구율에 아무런 영향이 없었다고 보고했다. Harms와 Goff(1957)는 종계영양에 우모분이 미치는 영향을 연구한 결과 우모분은 UGF를 함유 하고 있어서 옥수수, 대두박, 알팔파 분말로 배합된 종계사료에 우모분을 첨가하면 일정한 부화율을 유지할 수 있다고 했고 우모분을 5% 정도 첨가하는 것이 정상적인 산란을 뒷받침하는데 필요하다고 보고했다. Lillie등(1956) 도 병아리 사료에 우모분으로 어분을 대치할 수 있고 UGF원으로 필요할 것이라 하였다. McKerns와 Rittersporn (1958)에 의하면 브로일러 사료의 총단백질의 25% 까지는 우모분으로 대치할수 있다고 보고했다. Moran(1966b)등은 우모분에 4가지 아미노산 즉, methionine, lysine, histidine, tryptophan 을 보충하여 준다면 우모분 품질이 대두 단백질과 같아진다는 것을 알아냈다. 또한 생우모는 이러한 아미노산을 보충해 주어도 그 사료적 가치가 향상되지 않고 121℃에서 30분간 autoclave된 것이나 sodium sulfide 처리된 것도 우모 단백질의 이용에 도움을 주지 않았으나 121℃에서 18시간 가압 처리된 우모분의 사료적 가치는 크

게 향상된다는 것이다. Moran과 Summers(1969)는 우모분과 돈모분이 부로이러에 대하여 사료적 가치가 낮은 것은 lysine과 methionine의 함량이 부족하기 때문이라고 하였다. Naber와 Morgan(1955)은 기초사료에 우모분 5%를 첨가 급여했더니 병아리의 증체와 사료이용성이 좋아졌고 이것은 우모분이 우수한 cyanocobalamine의 공급제이기 때문이라 하였다. 박홍석등(1970)은 병아리 사료에 사용한 12%의 수입 어분을 국산 어분, 우모분, 혈분 (사료 단백질의 30% 대치)으로 대치한 결과 사료효율에서 우모분 대치구가 다른구에 비하여 우수하였고 국산어분 50% 대치구와 같은 결과를 냈다고 보고했다. 이영철(1972)은 부로일러 사료중 우모분의 대량 배합 가능성과 아미노산 불균형, 사료의 이용효율을 검토하기 위하여 어분, 옥수수전분의 일부 대용으로 8%의 우모분을 급여했으나 성장에 별다른 차이는 보지 못했고 우모분 16% 첨가시는 성장율이 크게 떨어졌다고 했다. 아미노산 불균형 사료(우모분 16%)를 급여 했을 때 사료 섭취량 및 단백질 소화율이 저하되었으나, 제한 아미노산인 lysine과 methionine을 보충 급여하면 이런 현상은 없어지고 대조구의 성적과 유사한 결과를 얻었다. 부로일러 사료내에 적당량의 필수 아미노산이 함유되어 있을 경우에 부로일러 사료에 적어도 2.5%의 우모분을 단백질 급원으로 사용할 수 있다(Romoser, 1955) 그런 저단백질 사료인 경우에 우모분의 사용효과는 대두박이나 육분에 비하여 다소 떨어지지만 필수아미노산을 충분히 함유하고 있는 고단백질 사료의 경우에는 상당량의 대두박이나 육분을 우모분으로 대치해도 아무런 영향이 없었다(Sibbald, 1962). Smith(1968)가 어분, 대두박, 우모분에 들어 있는 아미노산의 이용효율을 측정한 결과 우모분에 들어있는 아미노산의 이용성은 어분이나 대두박의 그것보다 상당히 떨어졌고 특히 histidine(0.0%), lysine(5.3%)의 이용성은 매우 낮아서 우모분의 영양가를 낮게 하는 원인일 것이라고 하였다. Stephens등(1959)은 부로일러 사료의 필수아미노산, 미네랄, 비타민, 단백질, 에너지 수준

을 다 같게 하여 시험한 결과 어분 6.2%를 넣은 시험사료에 태운 우모분을 첨가한구가 성장율이 제일 좋았는데 이는 우모분 속에 성장촉진 인자가 들어 있기 때문이라 하였고, ether로 추출한 우모분을 급여받은 구의 성장율이 대조구 보다 우수했다고 보고했다. Sullivan과 Stephenson(1957)에 의하면 병아리 사료에서 5%의 대두박을 우모분으로 대치해도 성장능력에서 아무런 영향이 없었다고 했다. 어분이 2.0%만 함유된 사료에서 1kg의 우모분과 1kg의 옥수수로서 2kg의 대두박을 대치하는 방식으로 사료내 우모분 첨가량을 1.0%부터 7.5% 까지 증가시켰는데 14주간의 시험결과에 따르면 우모분으로 대두박을 대치할 때 5%수준까지는 아무런 영향을 주지 않았으나 7.5%에서는 현저한 성장저해 현상이 일어났다. 이들은 우모분의 처리압력과 시간에 있어서는 15psi의 증기압으로 20분간 처리하는 것이 효과적이었고 35psi의 증기압으로 1시간 처리하여 분쇄한 것이 가장 좋았다고 보고했다. Tsang등( 1963)이 동 열량, 동 단백질 수준으로 만든 부로일러 사료에서 35 kg의 옥수수와 41kg의 우모분으로 70kg의 대두박과 5kg의 동물성 유지를 1:1 로 대치하여 사양시험을 한 결과, 부로일러 사료의 단백질 함량이 20% 일 때는 우모분을 4% 까지, 부로일러 사료의 단백질 함량이 22-26% 일 때는 8% 까지 대치가 가능하다고 보고했다. Baker등(1981) 스팀 처리한 우모분을 뉴햄프샤와 콜롬비안 교잡종 어린 병아리에게 급여한 결과, 우모분만으로 단백질원을 급여했을 경우에 제한 아미노산은 methionine, lysine, histidine 및 tryptophan을 첨가할 경우 옥수수- 대두박 위주사료의 단백질 요구량을 10% 대치할 수 있으며, methionine과 lysine을 첨가시에는 증체율이 큰 감소없이 40%를 대치할 수 있다고 했다. Thomas 와 Beeson(1977)이 기초사료에 고농후사료를 급여하면서 숫송아지에 대두박을 32% 대치한 우모분과 돼지 모발분의 건물, 에너지, 질소 이용율을 측정하였다. 건물과 에너지 소화율은 유사한 경향을 나타냈으며 분중의 질소 배설량은 대두박구가 적고 질소소화율도 대두박구가

높게 나타났으나 분중의 질소 배설량과 반추위내 암모니아 농도, 혈액의 요소함량은 대두박구가 높게 측정됐다. 이러한 이유는 우모분이나 모발분의 분해율이 대두박에 비하여 적음에 기인한다고 하였다. 어분과 마찬가지로 우모분이나 모발분도 bypass 단백질 공급원이 될 수 있으나 아미노산 조성이 양호한 편이 되지 않아서 methionine, lysine 등의 아미노산의 첨가가 요구된다. Wray등(1979)은 옥수수사일레지를 숫송아지에 기초사료로 급여하면서 단백질사료로 우모분과 모발분을 대두박의 50% 및 100%로 대치했을 때 일당증체량, 사료효율, 사료섭취량 및 육질에 있어서 대두박 첨가구와 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고했다. 또한 헤어포드 암송아지에게 우모분과 모발분을 대두박의 25% 및 50%로 대치했을 때는 증체량, 사료섭취량, 육질에 있어서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 사료요구율은 대두박 첨가구에 비해 나빴다고 했다.

Williams등(1991)은 발효우모분(Bacillus licheniformis로 발효)의 사료적 가치를 부로일러 육계에서 조사했는데 사료 단백질의 25%를 우모분으로 대치했다. 혐기적발효 우모분구의 경우에는 호기적 발효우모분구 및 autoclave한 우모분구에 보다 각각 6.9 %와 19.3%의 증체 효과를 나타냈으나 표준구인 대두박 급여구에 비해서는 6.4%의 낮은 증체효과를 보였다. 또한 3%와 6% 발효우모분 급여시 사양시험에서는 methionine, lysine, histidine을 보완시 대두박구와 동일한 증체 효과를 나타냈고, autoclave한 우모분 급여구는 원료 우모분구에 비해서는 성장이 개선됐지만 발효 우모분구에 비해서는 유의적으로 낮은 증체효과를 보였다. 이시험을 통하여 혐기적 발효 우모분의 경우에 양질 단백질 사료로서의 가능성을 나타냈다.

Papadopoulos등(1985)은 가공방법을 달리하여 생산된 우모분의 생체내 아미노산 소화율을 병아리 닭에서 측정 보고했다(표 3). 즉, autoclave 시간을 30, 50, 70분 처리한 것과 autoclave하기 전에 0.4% NaOH 처리한 것, 0.4%

단백질 분해효소(Maxatase, 330,000 Delft units/g)처리한 것을 비교했다.

Table 3. Pepsin digestibility of feather meal with various treatments

(%)

| A. A. | 30min | 50min | 70min | 30min+ NaOH | 70min+ NaOH | 30min+ enzyme | 70min+ enzyme |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Thr. | 63.5 | 61.3 | 59.0 | 60.7 | 52.8 | 65.9 | 56.2 |
| Cys. | 52.3 | 44.7 | 51.8 | 48.2 | 38.1 | 52.4 | 35.5 |
| Val. | 74.4 | 73.6 | 73.3 | 74.7 | 67.3 | 77.2 | 68.1 |
| Met. | 55.4 | 47.0 | 51.3 | 56.8 | 45.5 | 59.1 | 45.7 |
| Iso. | 79.8 | 79.1 | 78.5 | 79.9 | 73.2 | 82.4 | 76.2 |
| Leu. | 70.5 | 70.8 | 72.8 | 71.0 | 67.2 | 74.0 | 69.6 |
| Tyr. | 67.6 | 64.7 | 64.5 | 63.5 | 57.3 | 68.1 | 61.4 |
| Phe. | 76.2 | 76.5 | 75.1 | 74.6 | 67.8 | 79.3 | 71.4 |
| Lys. | 42.7 | 32.6 | 30.3 | 39.7 | 22.5 | 44.2 | 26.6 |
| His. | 41.1 | 38.6 | 35.6 | 41.9 | 26.7 | 47.3 | 32.9 |
| Arg. | 75.9 | 75.3 | 72.7 | 73.7 | 67.6 | 79.6 | 70.9 |
| Asp. | 40.8 | 36.4 | 33.0 | 42.0 | 29.7 | 44.6 | 30.0 |
| Ser. | 70.0 | 68.3 | 68.5 | 65.7 | 61.4 | 73.6 | 66.5 |
| Glu. | 63.2 | 58.2 | 60.2 | 61.7 | 53.9 | 64.8 | 56.7 |
| Pro. | 63.6 | 58.4 | 58.5 | 62.1 | 50.6 | 67.3 | 50.1 |
| Ala. | 62.9 | 68.6 | 68.6 | 68.5 | 60.5 | 73.9 | 65.3 |
| Mean | $62.9^{cd}$ | $59.6^{bcd}$ | $59.6^{bcd}$ | $61.5^{bcd}$ | $52.6^{a}$ | $65.9^{d}$ | $55.2^{ab}$ |

표 3에서 보는바와 같이 오토크래브시간에 따른 우모분의 소화율은 50분과 70분간에 통계적 차이가 없었으나 30분처리시 높은 소화율을 보였다. 70분 처리시에는 가성소다 처리나 효소처리 모두 제일 낮은 소화율을 나타냈다. 우모분은 효소나 가성소다보다도 열처리 시간에 소화율이 좌우된다고 보고하였다.

Luong과 Payne(1977)은 가수분해 시킨 우모분을 산란계사료에 7% 첨가하여서 시험시 methionine, lysine, 및 tryptophan 부족으로 산란율이 저하됐으나, 이들 아미노산을 적절히 보충한 산란시험에서는 대조구와 유사한 성적을 얻었다고 보고했다.

4. 우모분해 균주

Williams등 (1990)은 우모 분해 균주를 우모 쓰레기장에서 분리, 동정 및 그 특성을 보고했다. 자연상태의 케라틴은 일반 단백질 분해효소인 trypsin, pepsin, papain과 같은 단백질 분해효소에 의해 분해가 안된다. 그러나 특수균에 의한 분해가 일어난다는 보고가 있는데 Aspergillu species(Koh 등 1958), Cytonomyces(Sen Gupta 등, 1950), Streptomyces (Noval, 1959), Bacillus species(Molyneaux, 1959)균에 의한 분해가 보고돼 있다. Williams 등(1990)이 분리한 균주는 *Bacillus licheniformis PWD-1*으로 명명됐는데 이 균주는 endo-spore forming, motile, rod-shaped bacterium이며 gram stain variable, catalase positive하며 , 최적 성장 조건은 45-50 °C, pH 7.5 조건에서 잘 자란다. 전자현미경 사진에서는 internal crystal을 보였으며, 최대성장은 1% 우모기질에서 50 °C, 5일 배양시 ml당 $10^9$ cells 를 나타냈고 발효조건은 우모와 배지 비율을 1:2(배지는 $10^6$)로 했을 때 50 °C에서 6일 배양시간이 소요됐다. Lin 등(1992)은 우모분해 균주 *Bacillus lichniformis PWD-1*의 배지로 부터 keratinase 효소를 분리했다. 정제된 케라티네이스는 monomeric이고 분자량은 33k Dalton이며 최적 pH는 7.5, 최적 pI는 7.25였다. 효소는 -20℃에서 안정했으며, 가장 좋은 단백질 분해효소보다도 역가가 높았다. 실제적으로 우모 분해효소로 산업화가 가능할 것으로 보고했다.

Shih(1993)는 우모분의 발효에 관한 요약 보고서에서 *Bacillus licheniformis PWD-1* 이 우모 분해에 효과적이고 이 균과 여기서 추출한 효

소가 모두 사료중 우모의 소화율 증진에 유의적으로 기여한다고 보고했다.

## 제 3 절 국내 우모분(Feather meal)의 생산현황 및 사용실태

Table 4. Manufactures state of feather meal in Korea

unit : co.

| | '82 | '85 | '88 | '91 | '94 |
|---|---|---|---|---|---|
| Feather meal | 8 | 10 | 13 | 9 | 13 |
| Bone meal | 6 | 1 | 3 | 3 | 4 |

국내 우모분 제조업체 현황(표 4)을 보면 '82년도에 8개업체에서 '94년에는 13개업체로 늘어나고 있는 추세이다. 이런것은 우모분을 이용한 가축의 사료화를 많이하고 있고 폐기물이었던 것을 자원화를 시켜 폐기물 처리 비용을 시설투자를 통해 소득으로 전환되기 때문인 것으로 사료된다.

국내 우모분의 대표적인 4개 제조업체의 특징을 살펴보면 다음과 같다.

※ 대 화 산 업 ※

. 주소 : 경기도 김포군 검단면 불노리(T. 0341-84-6534)

. 품목 : 우모분 주생산업

. 생산량 : 400톤/월

(1) 제조공정

Raw material collection

↓

Autoclave : 150min/130 - 140℃

↓

Drying : Steam = 40 - 60min

↓

Grinding

(2) 특징

. 이용 : 닭 및 개 사료

. 화학제 처리 : 없 음

. 단계별 수분함량

autoclave 후 : 수분함량 약 50%

steam 후 : 수분함량 8 - 9%

※ 풀 그 린 식 품 ※

. 주소 : 천안군 동면 화덕리(T. 0417-555-9977)

. 품목 : 닭고기 생산을 위한 도계업 및 우모 생산

. 생산량 : 100톤/월(300톤/월 예정)

(1) 제조공정

Raw material collection

↓

Separation

↓

Autoclave : 180min/130 - 140℃

↓

Drying : Steam = 40 - 60min

↓

Grinding

↓

Screening

(2) 특징

. 이용 : 닭 및 개 사료

. 화학제 처리 : 없 음

. 단계별 수분함량

autoclave 후 : 수분함량 약 20%

steam 후 : 수분함량 10% 미만

※ 화 인 코 리 아 ※

. 주소 : 전남 나주군 금천면(T. 0613-31-8383)

. 품목 : 삼계탕 생산을 위한 전문도계업 및 우모 생산

. 생산량 : 삼계 10만수 , 15톤/일

(1) 제조공정

Raw material collection

↓

Separation

↓

Autoclave : 60min/130 - 140℃

↓

Drying : Steam = 40 - 60min

↓ (steam식 Disc건조기)

Grinding : Hammer mill 이용

↓

Screening

(2) 특징

. 이용 : 닭 및 개 사료

. 화학제 처리 : 없 음

. 국내업체 : 가압 cooking 함

문제점 : 냄새성 gas처리가 어렵다.

. 수출 : . 일본에 수출한 적 있음.

※ (주) 하 림 ※

. 주소 : 전북 익산시 망성면(T. 0653-862-2542)

. 품목 : 닭고기 생산을 위한 양계 계열화 사업, 전문도계 및 우모 생산

. 생산량 : 30만수/일 , 140톤/일 , 우모분생산량 6,258톤/95년

(1) 제조공정

Raw material collection
↓
Separation
↓
Autoclave : 60min/130 - 140℃
↓
Drying : Steam
↓ (steam식 Disc건조기)
Grinding : Hammer mill 이용
↓
Screening

(2) 특징

. 이용 : 닭 및 개 사료
. 화학제 처리 : 없 음
. 국내업체 : 가압 cooking 함
문제점 : 냄새성 gas처리가 어렵다.
. 성분조성
우모분 : 58% 이상 단백질
육분 : 55% 이상 단백질,

Table 5. Yearly production amounts of feather and bone meal

unit : ton

| | '82 | '85 | '88 | '91 | '94 |
|---|---|---|---|---|---|
| Feather meal | 1,359 | 749 | 2,667 | 2,921 | 11,870 |
| Bone meal | 255 | 42 | 1,495 | 10,780 | 10,095 |

Table 6. Production and marketing situaton of feather and bone meal

unit : ton

| | Production amounts | | | Sales amounts | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | '93 | '94 | In/De(%) | '93 | '94 | In/De(%) |
| Feather meal | 8,977 | 11,870 | 32.23 ↑ | 7,179 | 11,950 | 66.46 ↑ |
| Bone meal | 10,807 | 10,095 | 6.59 ↓ | 10,913 | 9,058 | 17.00 ↓ |

년도별 우모분 및 육골분의 생산 현황을 보면(표 5, 표 6) '82년도 1,359톤에서 '94년도에는 11,870 톤으로 약 10배 이상 증가를 하였다. 93년도와 비교를 하면 우모분 생산량은 약 32%가 증가를 하였고 그 판매량은 93년도에 비해 약 66%가 증가를 하였다. 따라서 우모분의 이용률은 매년 증가하는 추세이지만 육골분은 감소하는 추세이다. 그러나 일본에 비료로 극히 일부 수출한적 있으나 현재로는 우모분을 수출하는 업체는 없는 실정이다.

# 여 백

# 제 2 장 캐라틴태 단백질 추출정제

## 제 1 절 서 론

국내 우모의 생산량은 년간 3만여톤에 달하고 있다. 우모는 조단백질 함량이 약 85%로 아주 높아 고온 고압 처리한 후 닭, 개, 양어 사료의 원료로 사용되고 있다. 그러나 전처리 과정에서 폐수 및 악취가 강해 일종의 공해 산업으로 취급되고 있으며 단백질 이용률은 27 - 63%로 아주 낮다(Moran 등, 1966 ; Morris and Balloun, 1973). 우모는 섬유상 단백질인 keratin으로 구 성되었으며(Harrap and Woods, 1964), 그 구조는 β-helix를 형성하는 펩타이드 결합과 사슬내의 수많은 수소결합을 형성하고 이들은 다시 disulfide bond에 의하여 케이블과 같이 꼬여 있기 때문에 물리, 화학적으로 안정된 형태를 취하고 있어 소화효소에 의해 쉽게 분해가 어렵다(Schor and Krimm, 1961; Moran 등, 1966). 현 공정 하에서 생산된 우모분은 높은 단백질 함량 중 cysteine은 풍부하지만(Paradopoulos, 1984) 생체 내에서 아미노산 이용률이 낮아 일부 아미노산(lysine, methionine, tryptophan, histidine)을 보충해 줘야만 대두박과 유사한 영양 가치가 있다(Naber 등, 1961). 가수분해된 우모분에 lysine, methionine, tryptophan, histidine을 첨가해 주면 쥐의 성장율이 대두 단백질구보다는 약간 떨어 졌으나 상당히 개선되었다고 한다. 생우모 단백질의 소화율은 7.7% 였으나 우모분 단백질의 소화율은 80% 정도 였다고 보고했다(McCasland 와 Richardson, 1966). Moran등(1966)은 대두박과 우모분을 병아리 사료의 주된 단백질 급원으로 하여 급여할 경우 30분간 121℃에서 가열처리한 것이나 sodium sulfide 로 처리된 우모분은 병아리를 성장시키지 못했으나 우모를 18시간 121℃ 에서 autoclav한 것은 병아리의 정상적인 발육을 가져왔다. 우모분은 양계사료의 경우에 대두박 대신에 5% 정도 사

용해도 좋으나, 우모분의 제한 아미노산은 methionine, lysine, tryptophan 등이라고 보고했다. Morris와 Balloun(1971)은 40 psi 에서 30분간 처리한 우모분과 60분간 처리한 우모분의 사료적 가치는 비슷했고, 50 psi에서 60분간 처리한 우모분은 같은 압력에서 30분간 처리한 우모분보다 사료가치가 더 우수했다.

우모 가공방법은 autoclave hydrolysis, 화학제 처리(sodium sulfide, thioglycol ate) 및 효소처리(trypsin, pepsin, papain)등이 있다(Geiger 등, 1941). 우모를 고온고압으로 처리하면 hydrogen bond나 disulfide bond가 쉽게 분해되어 비교적 간단한 펩타이드로 된다(Papadopoulos 등, 1985). 최근에는 미생물로 부터 분비되는 keratinase라는 효소가 collagen, elastin 그리고 우모 keratin을 분해할 수 있어 이 효소를 사료에 첨가물로 사용할 때 우모분의 소화율이 크게 증가되었다고 한다(Shih, 1993). 우모의 가치향상을 위해 Dimethylformamide(DMF)를 사용하는 화학적인 방법도 대두되고 있다(Cherry, 1975). Woodgate와 Vreeburg (1996)는 효소처리한 우모분의 영양소 이용율 평가를 실시했다. 효소처리는 50℃에서 60분간 효소반응시킨 후 20분간 125℃(25 psi)에서 오토크래브한 다음에 100℃에서 건조시켰다. 다음 표 1에서 보는바와 같이 pepsin 소화율은 일반우모분이 73.2%로 효소처리한 우모분 66.8% 보다 높게 측정됐지만, 아미노산 소화율은 반대로 효소처리한 우모분이 85%, 일반 우모분이 67%로 효소처리 시 높게 측정돼 우모분의 경우에 펩신소화율 측정법에 문제가 있음을 지적했다.

우모를 205℃의 고온에서 가공하면 keratin을 구성하는 교차결합을 완전히 분해시키기 때문에 sulfur 함량이 낮아져 가용성이 높아지게 된다(Menefee and Yee, 1965 ; Menefee, 1965). 그러나 205℃라는 고온을 위한 에너지 소비량을 따져볼 때 효율적이지 못하기 때문에 적정 조건의 필요성이 대두된다.

따라서 본 연구는 물리적 및 화학적 처리에 의한 우모분의 소화율을 증진

시킬 수 있는 조건을 모색하여 이용율이 낮은 우모의 가치 향상에 그 목적이 있다.

## 제 2 절 재료 및 방법

### 1. 실험방법

#### 가 시료 준비

시중 우모분의 분석은 국내 4개회사의 시판 중인 우모분을 수거하여 일반성분 및 소화율을 비교 분석하였다. 또한 본 실험에 사용된 시료는 충남 천안 소재 (주)풀그린에서 수거 깨끗한 물로 세척하여 chopping --> colloid mill(grind size 30, 60, 80) --> ball mill의 단계별로 분쇄하였다. 각 공정별 시료를 준비하여 retort에서 110℃, 120℃, 130℃의 온도조건으로 6시간까지 1시간 간격으로 추출하여 시료를 준비하였다.

### 2. 분석 시험

#### 가. 일반성분 분석

시료의 일반성분 분석은 AOAC(1980)에 의해 분석하였다. 이때 단백질함량은 Kjeldahl(tecator, Sweden)를 사용하였고, 지방함량은 Soxhlet(DoSung Co., Korea)장치를 사용하여 분석하였다. 회분은 회화로(Fisher Scientific)를 이용하였고 수분은 105℃ oven를 사용하였다.

#### 나. 아미노산과 미량광물질 분석

우모분 및 화학적 방법에 의해 추출된 캐라틴태 단백질의 아미노산 분석은 Heinrikson과 Meredith(1984)의 Pico-Tag Amino acid 분석방법을 사용하였다. 이때 기기분석의 조건은 표 1과 같다.

Table 1. Conditions of HPLC for amino acid analysis

| Item | Condition |
|---|---|
| Instrument | Waters : injector, pump,<br>gradient controller, integrator<br>absorbance detector |
| Column | Waters PICO-Tag column(3.9mm x 150mm, 4 $\mu$ m) |
| Wavelengths | 254nm |
| Temp. | 40℃ |
| Chart speed | 1.0cm/min |
| Mobile phase | A : 0.14M sodium acetate trihydrate<br>0.05% triethylamine<br>pH 6.4 with phosphoric acid<br>1l HPLC grade water<br>B : 60% acetonitrile |

미량광물질 분석은 유도결합 플라즈마 방출분광법(ICP: Inductively Coupled Plasma Spectrophotometer, model J Y 38 plus., Jobin Yvon Co., France)을 이용하여 분석하였으며 시료의 전 처리 공정을 간단히 소개하면 다음과 같다. 시료 2g을 정확히 달아서 100ml의 Kjeldahl flask에 넣고 진한 황산 100ml 가하여 가수분해시키고 여기에 진한 질산 5ml를 첨가한 후 가열하여 유기물을 완전히 가수분해시킨다. 가수분해가 종료된 시료는 증류수로 적절히 희석한 다음 ICP에 주입, 분석하였다.

다. 단백질 소화율

수분과 지방을 제거한 시료를 취하여 단백질 함량을 kjeldahl을 사용하여 측정하였고, 동일시료를 0.4-0.5g를 취하여 AOAC(1995)의 pepsin digestibility 측정방법을 이용하여 0.2%의 pepsin 용액을 150ml 가하여 45℃ shaking water bath에서 16시간 교반하였다. 교반후 침전물이 생길 때까지

방치하였다가 여과(whatman No.4)한 후 여과지와 시료를 함께 60℃ oven에 건조한 후 kjedahl를 사용하여 남아 있는 단백질을 분석하여 아래의 계산방법에 의거 pepsin 소화율을 계산하였다. Pepsin 처리전 시료는 지방과 수분을 제거하여 같은 조건하에서 실시하였다.

$$\text{Pepsin 소화율(\%)} = \frac{\text{pepsin 처리전 protein함량(\%)} - \text{pepsin 처리후 protein함량(\%)}}{\text{pepsin 처리전 protein 함량(\%)}} \times 100$$

라. Keratin 단백질의 분해 정제

캐라틴 단백질의 추출 및 분해를 위하여 원모를 수집 세척하고 55℃에서 3일 건조하여 chopper(Chopper, Seydelman ; Germany), colloid mill(Super mass colloider, KASUGA E.W. Ltd. Japan) 과 ball mill(made in Korea)로 분쇄 단계를 거쳐 시료를 준비하였다. 화학적 처리 공정은 그림 1과 같이 Cherry 등(1975)이 방법인 DMF(N,N-dimethylforamide)를 사용하였고 공정별 분쇄 우모와의 반응 비율 및 분해 시간을 조사하였으며 분해 공정을 검토하여 수용성 단백질(protein I), 비수용성 단백질(protein II), $MeCl_2$에 의한 침전(protein III) 및 EDTA와 물로 투석(protein IV)하여 각 공정별 분쇄에 따른 우모분 단백질의 수율, 단백질 함량과 pepsin소화율을 측정하였다. 분해 과정을 좀더 상세히 살펴보면 각 공정별 분쇄 우모분 2.5g씩 취한 후 75% DMF를 시료량의 20배를 첨가한 후 온도가 98℃가 되게 hot plat를 고정하여 8시간 교반하여 우모분을 용해시켰다(Cherry등, 1977 : William등, 1976). 교반이 끝난 후 뜨거운 용액상태로 whatman No. 4로 여과후 상온에 방치하여 gel을 형성시켰다. 형성된 gel의 부피에 3배 이상의 증류수를 첨가후 5분간

교반후 원심분리하여 DMF를 세척하였다. 이와 같은 과정을 3번 이상 반복후 whatman No. 541로 여과한 후 동결 건조시켜 protein I, 동결건조전 acetone으로 세척과정을 더하여 evaporation하면 protein II, protein I을 $MeCl_2$로 세척후 acetone으로 다시 세척후 evaporation하여 protein III를 얻었다. 그리고 protein III 추출과정에서 0.1mM EDTA로 투석, aceton으로 세척후 evaporation하여 protein IV를 얻었다.

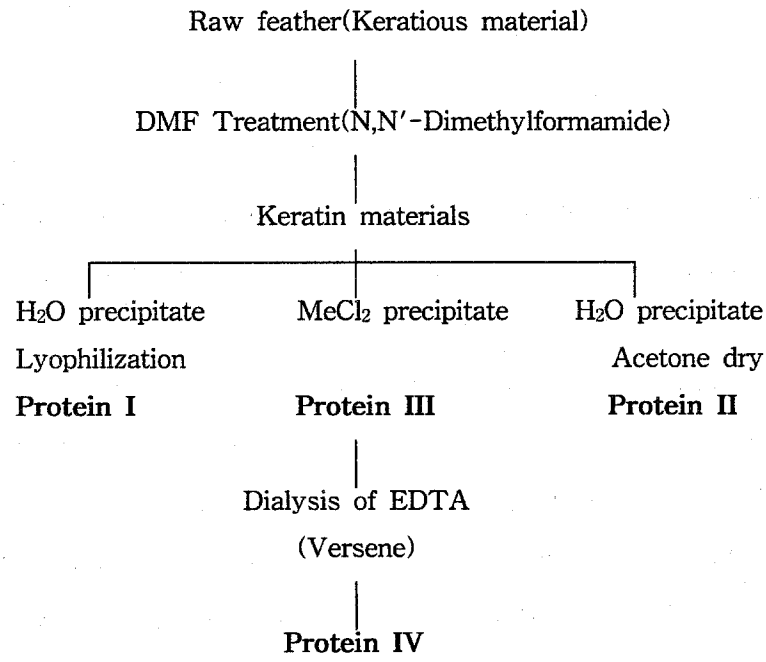



Fig 1. Procedure of extraction on keratinous protein by chemical method

마. 전기영동에 의한 분해 단백질 동정

원모, 물리적 처리에 의한 우모분 및 DMF에 의해 분해된 단백질을 자동전

기영동장치인 Phastsystem(Pharmacia, Biotech, Sweden)을 이용하여 분석하였다. 이때 marker(Pharmacia, Sweden)와 standard keratin(Sigma)를 구입하여 사용하였다. 본 실험에 이용된 전기영동 조건은 표 2와 같다.

Table 2. Conditions of electrophoresis for protein analysis

| items | Condition | Staining sol'n | Destaining sol'n |
|---|---|---|---|
| Seperation method | Phast Gel(R) high density<br>Phast Gel(R) gradient 8 - 25<br>1. 500V 10mA 3W 15C 1Vh<br>2. 500V 1mA 3W 15C 1Vh<br>3. 500V 10mA 3W 15C 158Vh | | |
| Staining method | 1. Fix 4min<br>2. Stain 8min<br>3. Destain 23min<br>4. Preservation 5min | 0.2% Phast Gel Blue R Sol'n(phast Gel Blue R 1 tablet + D.W. 80ml + methaol 120ml) 조건에 따라 10-2배로 destain sol'n로 희석해 사용 | (30% Methanol + 10% Acetic acid + D.W.) = (3 : 1 : 6) 비율로 제조해 사용 |
| Molecular weight marker | 1. MMW(94,000-14,000)<br>2. LMW(16,000-2,512) | | |

3. 통계처리

본 시험의 유의성 검정은 SAS(1988)를 이용 Duncan's 다중검정을 실시하였다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

### 1. 우모 및 우모분의 화학적 성분 및 소화율

국내에서 생산하는 원모 및 우모분을 수집, 화학성분과 소화율을 분석한 결과 표 3과 같다.

Table 3. Chemical composition of raw feather and feather meal with companies unit : %

| | Protein | Moisture | Fat | Ash |
|---|---|---|---|---|
| Raw feather | 83.32±1.36 | 9.01±0.42 | 6.68±0.46 | 0.59±0.16 |
| Taehwa (after dry) | 75.37±1.21$^{bc)}$ | 10.06±0.52$^{b)}$ | 9.14±0.74$^{d)}$ | 3.05±0.24$^{c)}$ |
| Taehwa (after mill) | 78.54±0.57$^{ab)}$ | 4..04±0.61$^{d)}$ | 11.16±0.29$^{c)}$ | 3.56±0.60$^{bc)}$ |
| Fine Korea | 80.68±0.47$^{a)}$ | 11.69±0.25$^{a)}$ | 5.08±0.31$^{e)}$ | 2.46±0.16$^{c)}$ |
| Harim | 68.12±6.15$^{cd)}$ | 7.49±0.44$^{c)}$ | 22.29±0.31$^{a)}$ | 4.26±0.68$^{a)}$ |
| Fulgreen | 72.85±0.64$^{cd)}$ | 6.69±0.98$^{c)}$ | 16.23±0.22$^{b)}$ | 4.81±0.79$^{a)}$ |

Means with the same letters in the column are not significantly different at 5% level.

원모의 일반성분을 분석한 결과 단백질함량이 약 83%, 수분이 9.0%, 지방이 6.6% 및 회분이 0.59%로 나타났다. 회사별 우모분의 단백질함량은 72.25 - 80.68%의 범위를 나타내고 있다. 수분함량에 있어서는 약 4.0 - 11.69%의

범위를 나타내었다. 이때 지방함량은 5.08 - 22.29%의 범위로 회사별에 따라 제조된 우모분의 지방함량은 차이가 크게 나타났다. 화인코리아의 우모분이 단백질함량이 가장 높게 나타났으며 지방함량에 있어서는 가장 낮게 나타났다. 또한 회사별 우모분의 성분은 5% 수준에서 유의차가 나타났다. 또한 각 회사별 소화율 측정을 위하여 수분 및 지방을 제거한 시료의 단백질함량 및 이때 측정한 소화율은 표 4에서 보는바와 같이 태화제품 중 건조만 한 제품이 실질적 소화율은 51.92%로 가장 낮았으며 화인코리아의 우모분이 74.93%

Table 4. Protein content and pepsin digestibility of feather meal with companies unit : %

| | Taehwa(Dry) | Taehwa(Mill) | FineKorea | Harim | Fulgreen |
|---|---|---|---|---|---|
| Protein content | 85.93±4.44 | 89.10±1.39 | 93.94±0.50 | 87.73±0.70 | 90.45±5.23 |
| Pepsin digest. | 60.41±1.72 | 64.50±4.21 | 79.76±0.60 | 80.76±0.92 | 71.57±2.45 |
| True digest[1]. | 51.92± 2.68[e)] | 57.47± 0.89[d)] | 74.93± 0.40[a)] | 70.85± 0.56[b)] | 64.75± 3.74[c)] |

* [1] True digest. : Protein content X Protein digest.
Means with the same letters in the row are not significantly different at 5% level.

로 가장 높게 나타났다. 이들간에 있어서는 유의차($p<0.05$)가 인정되었다. 회사별 단백질함량 및 소화율의 차이는 공정상 온도 및 시간에 따른 차이라고 할 수 있다.

현행 우모분 제조공정별로 단백질 함량 및 소화율의 변화를 보면 표 5와 같다.

Table 5. Changes on protein content and pepsin digestibility of feather meal with processing conditions unit : %

| | Raw feather | After steam | Drying after steam | Final product |
|---|---|---|---|---|
| Protein content | 97.84±0.96 | 94.83±0.24 | 96.67±0.24 | 97.25±0.50 |
| Pepsin digest. | 24.84±0.21 | 82.30±0.58 | 83.32±0.18 | 83.83±0.18 |
| True digest[1]. | 24.12±0.19[b)] | 75.29±0.07[a)] | 75.92±0.42[a)] | 76.58±1.80[a)] |

* [1] True digest. : Protein content X Protein digest.
Means with the same letters in the row are not significantly different at 5% level.

우모분 제조공정상 단백질함량은 raw feather의 경우 97.84%였지만 공정의 마지막인 제품에 있어서 단백질함량은 97.25%로 차이없었다. Pepsin 소화율에서는 raw feather은 24..83% 밖에 되지 않았지만 steam처리 후 pepsin 소화율은 82.30%로 급격히 증가를 하여 열처리에 의한 pepsin 소화율이 크게 증가되었다. 실질적인 소화율에 있어서도 pepsin 소화율의 결과와 유사한 결과를 보였다. 그러나 열처리후 건조나 분쇄정도에 있어서는 소화율에 차이가 없었다. 따라서 소화율을 증진시키는데 있어서 열처리가 가장 중요한 요인이라고 판단되었다.

원모 및 회사별 우모분의 아미노산 조성은 표 6과 같다. 원모의 총 아미

노산 함량은 77,175mg%였으며 각 회사의 우모분에서는 태화의 우모분이 원모의 아미노산 조성과 유사하였지만 타 회사의 제품에서는 원모보다 아미노산 조성이 저하되었다.

Table 6. Amino acid composition of raw feather and feather meal with companies

Unit : mg %/DM base

| Amino acid | Raw feather | Taehwa | FineKorea | Harim | Fulgreen |
|---|---|---|---|---|---|
| Asp. | 2,571 | 5,441 | 1,374 | 1,311 | 1,399 |
| Glu. | 6,263 | 8,872 | 3,159 | 3,362 | 3,449 |
| Ser. | 8,953 | 7,922 | 4,101 | 6,292 | 7,032 |
| Gly | 5,877 | 5,454 | 3,635 | 5,741 | 5,281 |
| His. | 1,387 | 1,470 | 1,706 | 409 | 1,345 |
| Arg. | 6,541 | 5,132 | 4,559 | 5,012 | 6,303 |
| Thr. | 4,388 | 4,056 | 2,994 | 3,463 | 3,964 |
| Ala. | 4,681 | 4,809 | 4,162 | 3,854 | 4,792 |
| Pro. | 7,361 | 5,393 | 4,102 | 5,401 | 6,799 |
| Tyr. | 325 | 578 | 174 | 400 | 508 |
| Val. | 10,415 | 6,657 | 4,952 | 8,059 | 10,701 |
| Met. | 690 | 1,220 | 201 | 674 | 778 |
| Cys. | 2,013 | 1,683 | 259 | 632 | 704 |
| Ileu. | 4,367 | 3,203 | 2,533 | 3,305 | 4,232 |
| Leu. | 7,300 | 6,163 | 4,672 | 5,870 | 7,162 |
| Phe. | 2,693 | 2,820 | 658 | 2,085 | 3,187 |
| Lys. | 1,450 | 2,750 | 2,218 | 1,748 | 1,855 |
| Total | 77,175 | 73,623 | 45,458 | 57,618 | 69,491 |

Table 7. Mineal composition of raw feather and feather meal with companies

Unit : mg %/DM base

| Mineral | Raw feather | Taehwa | FineKorea | Harim | Fulgreen |
|---|---|---|---|---|---|
| Na | 12.62 | 339.89 | 344.35 | 244.32 | 267.42 |
| P | 4.94 | 477.80 | 618.26 | 300.00 | 155.29 |
| Ca | 165.51 | 544.87 | 655.42 | 933.88 | 401.54 |
| Mg | 22.15 | 48.35 | 46.80 | 38.09 | 45.76 |
| Mn | 0.39 | 1.83 | 0.98 | 0.86 | 1.15 |
| Fe | 22.58 | 80.09 | 70.37 | 15.19 | 37.91 |
| Cu | 0.63 | 0.99 | 1.73 | 1.18 | 0.51 |
| K | 7.59 | 316.86 | 489.99 | 258.95 | 241.05 |
| Zn | 10.16 | 10.68 | 15.28 | 8.05 | 8.88 |
| Ba | 0.28 | 0.31 | 0.17 | 0.12 | 0.68 |

회사별 우모분의 미네랄 함량을 분석한 것에서는 각 성분 모두 raw feather 보다 제품에서 높은 함량을 나타내었다(표 7). Na는 raw feather에서 12.62mg% 인 것이 feather meal에서는 회사별에 관계없이 244.32-339.89mg%의 범위를 보였고, p에 있어서도 raw feather이 4.94mg% 인 반면 feather meal에서는 155.29-618.26mg%의 범위를 나타내 가공중에 상대적으로 매우 높게 나타나고 있음을 알 수 있었다. 이런 현상은 ca 및 k에 있어서도 유사한 결과를 보여주었다.

2. 물리적 방법에 의한 캐라틴태 단백질 추출

가. 분쇄조건별 소화율 조사

Raw feather를 분쇄조건(Chopping, Colloid 30, Colloid 60 및 Colloid 80)

으로 분쇄한 후 시료를 건조하여 단백질 및 단백질 소화율을 조사하였다. 그 결과 표 8과 같다.

Chopping한 우모분의 pepsin 소화율은 30%였으며 colloid 80mesh로 분쇄한 우모분의 pepsin 소화율은 24.8%였다. 이때 실질적인 소화율은 분쇄조건에 따라 5%의 유의차가 있었으나 29.46% - 11.58%의 범위였다. 따라서 열처리 하지않고 분쇄만 한 우모분의 소화율은 극히 낮았다.

표 8에서 분쇄정도에 의한 소화율은 가열처리하지 않은 시료의 결과이며 분쇄정도와 가열처리를 복합처리시 소화율을 검토한 결과는 표 9와 같다. 이때 사용된 온도조건은 130℃에서 3시간을 기준으로 열처리를 하였다. 그 결과 가열에 의하여 소화율은 증가하지만 분쇄정도에 따라서는 소화율에 차이가 없었다. 오히려 가열 후 건조를 하면 소화율이 감소하는 경향이 나타났다.

Table 8. Protein content and pepsin digestibility of raw feather with grinding conditions unit : %

| item | Chopping | Colloid 30 | Colloid 60 | Colloid 80 |
|---|---|---|---|---|
| Protein content | 97.84±0.96 | 94.83±0.23 | 96.67±0.24 | 97.25±0.50 |
| Pepsin digest. | 30.11±0.05 | 12.21±2.78 | 20.47±1.39 | 24.84±0.21 |
| True digest[1]. | 29.46±0.29[a)] | 11.58±0.03[d)] | 19.79±0.05[c)] | 24.16±0.13[b)] |

* [1] True digest. : Protein content X Protein digest.

Means with the same letters in the row are not significantly different at 5% level.

Table 9. Changes on pepsin digestibility of feather with manufacturing process and grinding conditions unit : %

| item | | Chopping | Colloid 30 | Colloid 60 | Colloid 80 |
|---|---|---|---|---|---|
| Dry after steam. | Prot. content | 93.67±1.10 | 94.51±0.22 | 93.22±1.41 | 96.16±0.24 |
| | Prot. digest. | 86.03±0.29 | 82.55±0.55 | 79.75±1.41 | 80.57±1.12 |
| | True digest. | 80.61±0.95[a)] | 78.01±0.18[b)] | 74.35±1.12[c)] | 77.48±0.19[b)] |
| Only steam | Prot. content | 91.94±1.83 | 92.92±0.01 | 92.54±0.30 | 92.55±0.87 |
| | Prot. digest. | 89.92±0.35 | 85.67±0.25 | 87.53±0.62 | 89.51±0.57 |
| | True digest. | 82.67±1.65 | 79.60±0.09 | 81.00±0.26 | 82.86±0.76 |

* [1] True digest. : Protein content X Protein digest.

* P. content : Protein content, P. digest : Pepsin digestibility

Means with the same letters in the row are not significantly different at 5% level.

나. 열처리 조건별 소화율 조사

상기의 분쇄조건에 따른 소화율에 있어서는 가열처리에 의한 것보다 소화율이 높지 않았으므로 열처리의 조건별로 적정 열처리 조건을 검토하기 위하여 온도와 시간에 따른 소화율 시험을 행한 결과 표 10과 같다

Colloid 80으로 분쇄한 110℃ steam 처리구에서의 실질적인 소화율이 60.77% - 75.93%의 범위를 나타내었으며, 120℃처리구에서는 72.89% - 73.91%의 범위였고 130℃처리구는 75.96% - 77.05%로 steam 처리온도가 증가할 수록 소화율도 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 열처리 시간에 있어

서는 동일온도 조건에서 시간에 따른 소화율은 증가하는 경향은 있지만 차이는 없었다. 이런 결과는 Ball mill로 분쇄한 것이나 Colloid 80분쇄한 것 모두 유사한 결과였다. 130℃, 120min 처리한 것이 실질적 소화율에서 가장 높게 나타났다. 따라서 표 12는 온도를 130℃로 고정하고 적정처리 시간을 다시 검토하기 위하여 소화율을 조사한 결과로 온도를 고정하고 처리시간을 늘이는 것이 소화율을 높이는 경향을 보이기는 하지만 CO 80처리구에서는 180분 처리한 것이 75.96% 가장 낮게 나타났으며 240분 처리한 것이 가장 높은 79.00%가 소화되었다. 또한 B.M. 처리구에서는 60분 열처리한 것이 73.49%로 가장 낮게 소화되었지만 CO 80처리구와 같이 240분 열처리한 것이 80.22%의 소화된 것을 보여주고 있다. 각 처리구 간에 있어서는 5%의 유의차가 인

인정되었다. 물리적 처리 방법인 것에 의한 소화율 조사에 있어서는 B.M.로 분쇄를 하고 130℃에서 240분 열처리하는 것이 최적조건이라고 할 수 있다.

2차년도에는 분쇄조건을 colloid 80과 ball mill로 분쇄한 것으로 하고 추출온도는 130℃로 고정하였다. 추출시간은 180분에서 360분까지 추출하였다. 그 결과 표 11에서 보는 바와같이 colloid 80으로 분쇄하고 130℃ steam 처리구에서의 실질적인 소화율이 75.96% - 79.00%의 범위를 나타내었으며, ball mill로 분쇄한 처리구들의 실질적인 소화율은 74.83% - 80.22%의 범위를 나타내었다.

Table 10. Protein content and pepsin digestibility of feather meal by heating conditions unit : %

| | | 110℃ | | 120℃ | | 130℃ | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 120min | 180min | 120min | 180min | 120min | 180min |
| Co 80 | P. content | 99.12± 0.32 | 98.46± 0.81 | 93.06± 0.51 | 93.65± 0.26 | 91.24± 0.26 | 91.63± 3.66 |
| | P. digest. | 76.61± 0.15 | 61.71± 0.26 | 78.33± 0.28 | 78.92± 0.39 | 84.45± 0.78 | 82.89± 0.45 |
| | True digest. | 75.93± 0.25$^{ab)}$ | 60.77± 0.51$^{d)}$ | 72.89± 0.40$^{c)}$ | 73.91± 0.75$^{bc)}$ | 77.05± 0.22$^{a)}$ | 75.96± 3.03$^{ab)}$ |
| BM | P. content | 99.94± 0.16 | 97.33± 1.00 | 92.34± 0.36 | 93.31± 0.95 | 90.53± 0.49 | 89.74± 0.24 |
| | P. digest. | 72.63± 1.21 | 57.62± 1.24 | 77.62± 0.07 | 77.49± 0.98 | 84.84± 0.16 | 83.38± 0.12 |
| | True digest. | 72.59± 0.11$^{c)}$ | 56.08± 0.58$^{e)}$ | 71.67± 0.28$^{d)}$ | 72.31± 0.74$^{cd)}$ | 76.80± 0.42$^{a)}$ | 74.83± 0.20$^{b)}$ |

* Co 80 : Ground feather with colloid 80mesh,
* BM : Ground feather with ball mill
* [1] True digest. : Protein content X Protein digest.
* P. content : Protein content, P. digest : Pepsin digestibility

Means with the same letters in the row are not significantly different at 5% level.

Table 11-1. Protein content and pepsin digestibility of feather meal with temperaturer at 130℃ unit : %

| item | | 60min. | 120min. | 180min. | 240min. |
|---|---|---|---|---|---|
| Co 80 | P. content | 92.14±0.26 | 91.24±0.26 | 91.63±3.66 | 90.67±0.60 |
| | P. digest. | 83.42±0.77$^{c}$ | 84.45±0.78 | 82.89±0.45 | 87.12±1.07 |
| | True digest. | 76.86±0.22$^{ab)}$ | 77.05±0.22$^{ab)}$ | 75.96±3.03$^{b)}$ | 79.00±0.52$^{a)}$ |
| BM | P. content | 92.26±0.25 | 90.53±0.49 | 89.74±0.24 | 90.48±0.05 |
| | P. digest. | 83.73±0.48 | 84.84±0.16 | 83.38±0.12 | 88.66±0.54 |
| | True digest. | 73.49±0.20$^{e)}$ | 76.80±0.42$^{c)}$ | 74.83±0.20$^{d)}$ | 80.22±0.04$^{a)}$ |

* Co 80 : Ground feather with colloid 80mesh
* BM : Ground feather with ball mill
* [1] True digest. : Protein content X Protein digest.
* P. content : Protein content, P. digest : Pepsin digestibility

Means with the same letters in the row are not significantly different at 5% level.

Table 11-2. Protein content and digestibility with the various autoclaving time at 130℃ unit : %

| Items | | 180min. | 240min. | 300min. | 360min. |
|---|---|---|---|---|---|
| Co 80 | P. content | 91.63±3.66 | 90.67±0.60 | 90.03±0.37 | 86.85±0.20 |
| | P. digest. | 82.89±0.45 | 87.12±1.07 | 87.29±0.86 | 90.28±0.48 |
| | True digest. | 75.96±3.03$^{b)}$ | 79.00±0.52$^{a)}$ | 78.59±0.33$^{ab}$ | 78.50±0.14$^{ab}$ |
| BM | P. content | 89.74±0.24 | 90.48±0.05 | 90.07±0.20 | 86.35±0.27 |
| | P. digest. | 83.38±0.12 | 88.66±0.54 | 88.21±0.24 | 91.10±0.74 |
| | True digest. | 74.83±0.20$^{c)}$ | 80.22±0.04$^{a)}$ | 79.45±0.17$^{b)}$ | 79.27±0.81$^{b)}$ |

*Co 80 : feather meal by colloid 80mesh,
*BM : feather meal by ball mill
*True digest. : Protein content X Protein digest. ($P<0.05$)
*P. content : Protein content, P. digest : Pepsin digestibility

CO 80처리구에서는 180분 처리한 것이 75.96% 가장 낮게 나타났으며 240분 처리한 것이 가장 높은 79.00%가 소화되었다. 또한 B.M. 처리구에서는 60분 열처리한 것이 73.49%로 가장 낮게 소화되었지만 CO 80처리구와 같이 240분 열처리한 것이 80.22%의 소화된 것을 보여주고 있다. 각 처리구 간에 있어서는 5%의 유의차가 인정되었다. 따라서 물리적 처리 방법에 의한 소화율 조사에 있어서는 B.M.로 분쇄를 하고 130℃에서 240분 열처리하는 것이 최적조건이라고 할 수 있었다.

### 3. 화학적 방법에 의한 캐라틴태 단백질 추출 및 정제

화학적 방법에 의한 캐라틴태 단백질 추출 및 정제는 Cherry 등(1975)이 방법으로 그림 1에 도해한 것과 같이 실시하였다. 그 결과는 표 12에 추출 수율은 나타내었다. DMF(Dimethylformamide)를 사용하여 검토한 수율의 결과는 chopping만 한 것은 protein I, protein II, protein III 및 protein IV 모두 20 - 28%의 범위였지만 분쇄정도가 미세할 수록 점점 증가하는 경향을 나타내었다. Ball mill로 분쇄한 것의 수율은 protein IV가 60.6%로 최소였으며 protein I이 74.12%로 최대의 수율을 나타내었다. 따라서 화학적 방법에 의해 keratin단백질을 분해할 때에는 분쇄를 보다 더 미세하게 하는 것이 중요하다고 할 수 있겠다. 또한 화학적 방법에 의해 분해한 keratin 단백질의 소화율을 조사한 결과는 표 13에 나타낸 것과 같다. 분해된 단백질의 fraction별 수분과 지방을 제거한 시료의 단백질함량은 chopping한 시료에서 는 83.19 - 95.37%의 범위를 나타내었지만 co. 30의 시료에서는 89.37 - 99.96%의 범위를 나타내어 단백질함량에서 분쇄를 미세하게 할 수록 추출되는 단백질함량이 높아지는 경향을 나타내었다. 단백질 fraction별에 있어서는 protein I이 가장 높게 나타났다. 이때 pepsin 소화율은 분해된 단백질이 거의가 소화되는 경향을 보였다. 실질적 소화율에 있어서는 chopping한 처리구는 82.29 - 95.33%였고 co.30처리구는 73.92 - 93.63%의 범위로 분쇄 정도에 따른 실질적 소화율은 미세하게 분쇄할 수록 증가하였다. 또한 각 처리구 모두 5%에서의 유의차가 있었다.

#### 가. 분쇄조건별 소화율 조사

표 14는 화학적 방법에 의한 분쇄조건별로 소화율을 검토하기 위하여 colloid 80과 ball mill 처리구를 fraction 별로 소화율을 조사하였다.

Table 12. Yield of keratineous protein by chemically treatments

unit : %

| items | Protein I | Protein II | Protein III | Protein IV |
|---|---|---|---|---|
| Chopping | 28.88 | 27.34 | 24.92 | 20.08 |
| Colloid 30 | 48.20 | 44.64 | 30.60 | 38.20 |
| Colloid 80 | 49.12 | 44.96 | 64.92 | 49.72 |
| Ball mill | 74.12 | 63.72 | 62.6 | 60.6 |

Table 13. Protein content and pepsin digestibility of extracted keratineous protein by chemically treatments unit : %

| items | | Protein I | Protein II | Protein III | Protein IV |
|---|---|---|---|---|---|
| Chopping | P. content | 95.37±0.44 | 88.96±0.35 | 87.48±0.02 | 83.19±0.37 |
| | P. digest. | 99.96±0.02 | 98.30±0.30 | 99.06±0.27 | 98.94±0.12 |
| | True digest. | 95.33±0.44$^{a)}$ | 87.44±0.36$^{b)}$ | 86.66±0.02$^{c)}$ | 82.29±0.35$^{d)}$ |
| Co 30 | P. content | 93.96±0.00 | 89.62±2.10 | 89.37±1.99 | 90.60±2.27 |
| | P. digest. | 99.65±0.04 | 99.44±0.27 | 82.72±0.95 | 99.53±0.15 |
| | True digest. | 93.63±0.04$^{a)}$ | 89.10±2.08$^{b)}$ | 73.92±1.65$^{c)}$ | 90.17±2.26$^{ab)}$ |

* Co 80 : Ground feather with colloid 80mesh,
* BM : Ground feather with ball mill
* P. content : Protein content, P. digest : Pepsin digestibility
* [1] True digest. : Protein content X Protein digest.

Means with the same letters in the row are not significantly different at 5% level.

분해된 단백질의 fraction별 수분과 지방을 제거한 시료의 단백질함량은 Co 80으로 처리한 시료에서는 85.60 - 97.40%의 범위를 나타내었지만 ball mill 처리구의 시료에서는 91.17 - 99.66%의 범위를 나타내어 단백질함량에서 분쇄를 미세하게 할 수록 추출되는 단백질함량이 높아지는 경향을 나타내었다. Fraction별 단백질함량에 있어서는 protein I이 가장 높게 나타났다.

Table 14. Protein content and digestility of keratinaceous protein fraction isolated by chemical treatment unit : %

| items | | Protein I | Protein II | Protein III | Protein IV |
|---|---|---|---|---|---|
| Co 80 | P. content | 97.40±0.39 | 91.60±0.18 | 87.71±0.32 | 85.60±0.33 |
| | P. digest. | 99.90±0.03 | 80.86±1.63 | 98.37±0.20 | 98.47±0.95 |
| | True digest. | 97.30±0.39$^{a}$ | 74.07±0.14$^{d}$ | 86.27±0.32$^{b}$ | 84.30±0.33$^{c}$ |
| BM | P. content | 99.66±0.70 | 94.12±0.07 | 95.05±0.42 | 91.17±1.58 |
| | P. digest. | 99.55±0.57 | 99.26±0.40 | 98.67±0.37 | 99.60±0.18 |
| | True digest. | 99.19±0.67$^{a}$ | 93.43±0.07$^{b}$ | 93.78±0.42$^{b}$ | 90.80±1.57$^{c}$ |

*Co 80 : Feather meal by colloid 80mesh,
*BM : Feather meal by ball mill
*P. content : Protein content, P. digest : Pepsin digestibility
*True digest. : Protein content X Protein digest.
Means with the same letters in the row are not significantly different at 5% level.

이때 pepsin 소화율은 분해된 단백질이 거의가 소화되는 경향을 보였다. 실질적 소화율에 있어서는 Co 80 처리구는 74.07 - 97.30%였고 ball mill처리구는 90.80 - 99.19%의 범위로 분쇄 정도에 따른 실질적 소화율은 미세하게 분

쇄할 수록 증가하였다. 또한 각 처리구 모두 5%에서의 유의차가 있었다.

따라서 화학적 방법에 의한 keratin단백질을 분해할 때에는 분쇄를 보다 더 미세하게 하는 것이 중요하다고 할 수 있겠다.

나. 단백질의 아미노산 조성

화학적 방법에 의한 각 fraction별 추출물(Co 30과 ball mill처리구)의 아미노산 조성을 보면 표 15 및 표 16과 같다.

1차년도의 결과 원모의 총아미노산 함량은 77.15% 였지만 colloid 30의 총아미노산 함량은 fraction 별로 41.33 - 94.54%의 범위였다. Fraction 별에 있어서는 protein I이 94.54%로 가장 높게 나타났으며 Protein IV는 41.33%로 가장 낮게 나타났다. 또한 ball mill로 분쇄한 것의 총아미노산 함량은 54.59 - 83.99%의 범위를 보였다. Ball mill에서도 colloid 30처리구와 마찬가지로 protein I이 가장 높게 나타나 정제가 되면 될수록 총아미노산 함량은 감소하는 경향을 보여주었다. 일본에서 유통되고 있는 우모분을 구입하여 분석한 결과 총 아미노산 함량은 62.97%로 1차년도에서 분석한 국내 원모의 아미노산 함량인 77.17% 보다 낮은 경향을 보였다. 아미노산 종류별로는 정제가 되면 될수록 lysine은 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 15. Amino acid composition of the keratinaceous protein fraction isolated chemically after grinding by colloid 30 mesh

unit: %

| Amino acid | Protein I | Protein II | Protein III | Protein IV |
|---|---|---|---|---|
| Asp. | 5.83 | 5.31 | 5.47 | 2.61 |
| Glu. | 9.58 | 8.71 | 8.84 | 4.28 |
| Ser. | 10.36 | 9.58 | 9.03 | 4.48 |
| Gly. | 7.55 | 7.07 | 6.41 | 3.16 |
| His. | 3.87 | 3.72 | 3.46 | 2.06 |
| Arg. | 6.59 | 6.16 | 5.88 | 3.14 |
| Thr. | 4.35 | 4.04 | 3.65 | 2.05 |
| Ala. | 2.33 | 2.05 | 2.02 | 0.91 |
| Pro. | 9.66 | 9.10 | 8.24 | 4.02 |
| Tyr. | 2.65 | 2.45 | 2.41 | 1.48 |
| Val. | 8.90 | 8.28 | 7.48 | 3.70 |
| Met. | 1.85 | 1.71 | 1.78 | 1.01 |
| Cys. | 2.26 | 1.97 | 2.41 | 0.73 |
| Ileu. | 5.32 | 4.91 | 4.47 | 2.19 |
| Leu. | 8.25 | 7.71 | 7.10 | 3.60 |
| Phe. | 4.83 | 4.46 | 4.07 | 1.82 |
| Lys. | 0.31 | 0.23 | 0.24 | 0.02 |
| Total | 94.54 | 87.54 | 83.04 | 41.33 |

Table 16 Amino acid composition of the keratinaceous protein fraction isolated chemically after grinding by ball mill

unit: %

| Amino acid | Protein I | Protein II | Protein III | Protein IV | Japan feather |
|---|---|---|---|---|---|
| Asp. | 5.63 | 5.20 | 3.45 | 3.71 | 4.49 |
| Glu. | 8.79 | 8.53 | 5.68 | 6.05 | 7.36 |
| Ser. | 8.96 | 8.89 | 5.93 | 6.12 | 6.30 |
| Gly. | 6.39 | 6.44 | 4.13 | 4.22 | 4.81 |
| His. | 3.51 | 3.59 | 2.59 | 2.67 | 1.21 |
| Arg. | 6.51 | 5.98 | 4.25 | 4.37 | 4.71 |
| Thr. | 3.89 | 3.77 | 2.62 | 2.70 | 3.03 |
| Ala. | 1.99 | 1.95 | 1.09 | 1.28 | 1.63 |
| Pro. | 8.66 | 8.65 | 5.58 | 5.87 | 5.55 |
| Tyr. | 2.41 | 2.37 | 1.73 | 1.78. | 2.10 |
| Val. | 7.39 | 7.52 | 4.90 | 5.13 | 5.24 |
| Met. | 0.94 | 1.23 | 0.92 | 0.79 | 2.34 |
| Cys. | 3.19 | 3.06 | 1.49 | 1.64 | 1.09 |
| Ileu. | 4.26 | 4.40 | 2.89 | 2.99 | 3.28 |
| Leu. | 7.31 | 7.17 | 4.77 | 4.99 | 5.64 |
| Phe. | 4.16 | 4.03 | 2.51 | 2.69 | 2.82 |
| Lys. | 0.17 | 0.13 | 0.06 | 0.00 | 1.28 |
| Total | 83.92 | 82.99 | 54.59 | 57.05 | 62.97 |

다. 전기영동 방법에 의한 keratin 단백질의 분해 확인

Keratin 단백질이 화학적 분해에 의하여 분해되는 정도를 전기영동으로 그 정도를 확인하고자 실시하였다. 이때 사용된 기종으로는 Phastsystem을 사용하여 각 조건은 실험방법에 기술한 것과 같이 행하였다. 그 결과 그림 2는 Phastgel gradient 8-25(SDS 사용시 6- 300kDa)를 사용하여 band 들을 나타낸 것으로 시약급 표준 keratin(분자량 약 44,500 - 66,200)과 분자량을 나타내는 marker(MMW)는 잘 나타났지만 그 외의 시료는 gel의 최하단에 나타나 정확한 분해정도를 확인할 수 없었다. 따라서 사용한 gel을 gradient 8-25를 사용하지 않고 SDS 사용 시 1-100kDa의 범위를 나타낼 수 있는 high density gel을 사용하였다. 이 때 사용한 marker도 LMW를 사용하였다. 그 결과 그림 3은 분쇄정도에 의하여 분해되는 정도를 나타낸 것으로 choping처리구, Co 30처리구 및 Co 80처리구 모두 유사한 형태의 전기영동 pattern을 나타내었다. Band의 상단에 keratin의 형태로 일부가 남아있는 것이 확인이 되며 그 2개의 band는 분자량이 약 44,500 - 66,200Da정도라고 확인되었다. 또한 중단에 1개 하단에 2개의 band가 형성되어 있는 것이 확인이 되었다. 이 band들은 분쇄시 일부 keratin이 분쇄되어 나타난 것인지 전기영동을 위하여 사용된 시약에 의하여 분해된 것인지는 아직 확인이 되지 않고 있다. 그림 4, 그림 5 및 그림 6은 원모를 1차적으로 Co. 30, Co 80과 ball mill로 분쇄를 한 시료를 화학적인 방법으로 분해(protein I, Protein II, Protein III 및 protein IV)를 하여 keratin단백질이 분해정도를 나타낸 사진이다. 이때 사용한 gel은 high density gel 이었으며 marker는 LMW를 사용하여 확인하였다. Band의 pattern은 모두 유사한 형태를 나타내었지만 ball mill로 분쇄한 그림 6에서는 중단에 나타난 band가 매우 희미해 colloid로 분쇄한 것에 비하여 keratin이 더 분해되는 것으로 추측할 수 있었다. 여기에 나타난 band들이 분자량은 약 25,000Da에서 2개, 약 10,700Da에서 1개의

band임이 확인되었다. 따라서 전기영동에 의한 분석결과 원모를 DMF처리시 분쇄정도에 의한 차이는 없는 것으로 사료되어 최적 분해조건을 검토하기 위해서는 수율 및 소화율에 의한 분해의 최적조건을 확립해야 할 것으로 사료되었다.

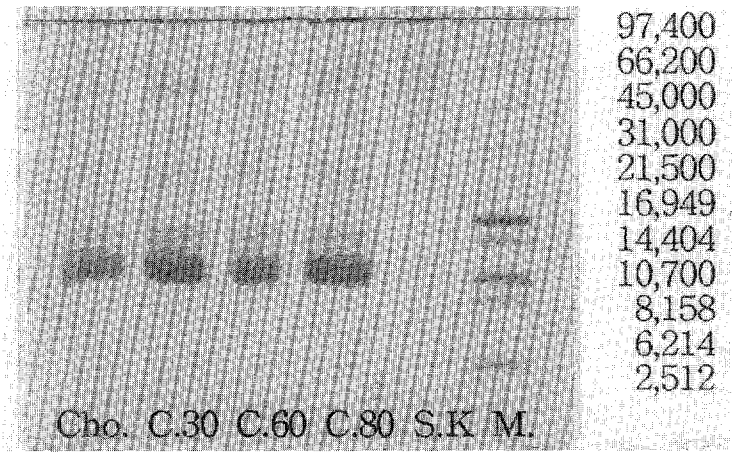



Photo 2. High density gel을 사용한 분쇄조건별 raw feather의 band
Cho : Chopping, C.30 : Colloid 30, C.60 : Colloid 60,
C.80 : Colloid 80, S.K : Standard keratin, M : Marker

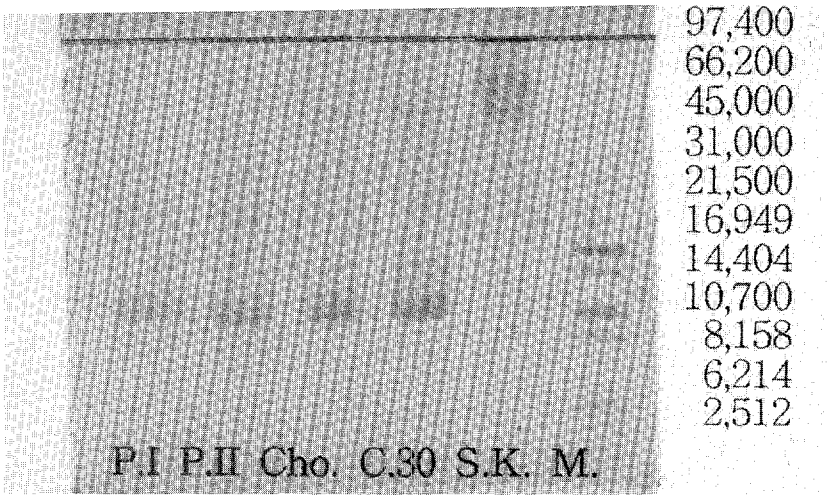



Photo 3. DMF처리에 따른 시료를 High density gel을 사용한 band의 비교
P. I : Protein I, P.II : Protein II, Cho : Chopping,
C.30 : Colloid 30, S.K : Standard keratin, M : Marker

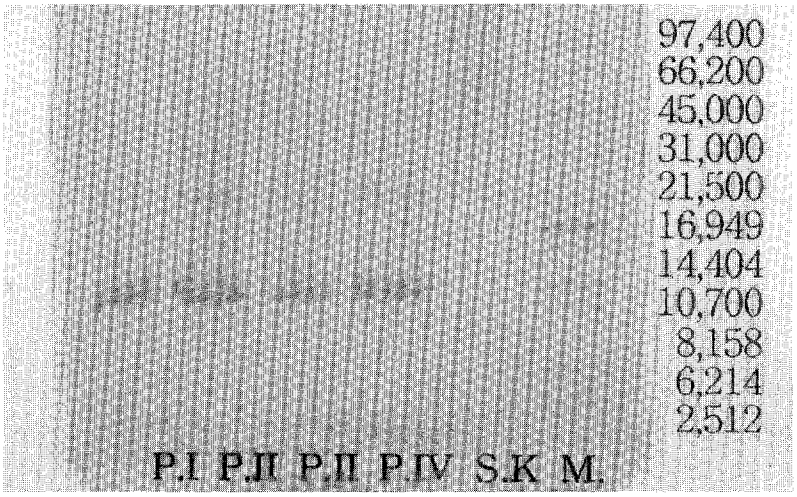



Photo 4. DMF 처리한 Co. 30시료를 High density gel을 사용한 band
P. I : Protein I, P.II : Protein II, P.III : Protein III,
P.IV : Protein IV, S.K : Standard keratin, M : Marker

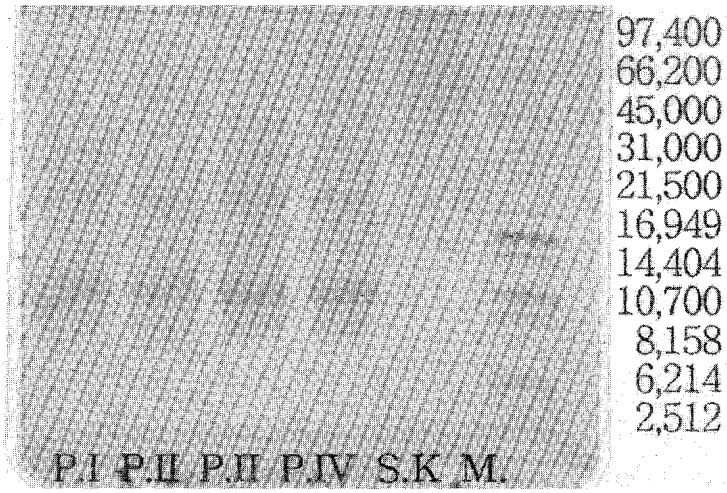



Photo 5. DMF 처리한 Co. 80시료를 High density gel을 사용한 band
P. I : Protein I, P.II : Protein II, P.III : Protein III,
P.IV : Protein IV, S.K : Standard keratin, M : Marker

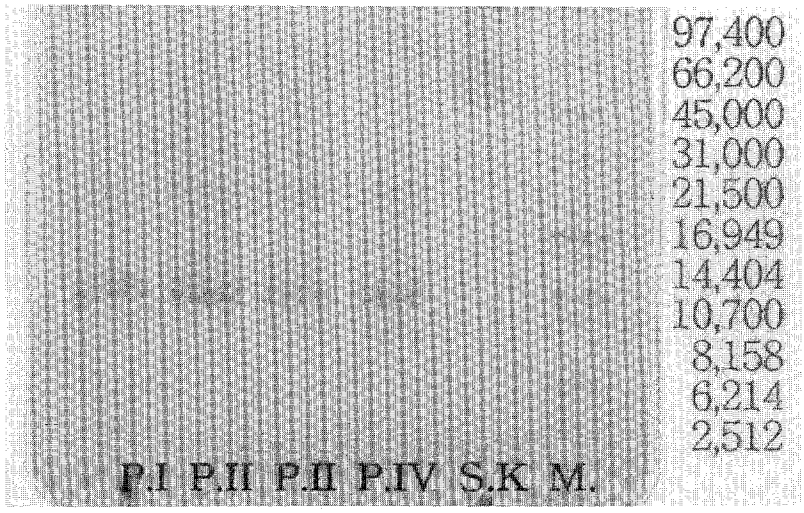



Photo 6. DMF처리한 BM시료를 High density gel을 사용한 band
P. I : Protein I, P.II : Protein II, P.III : Protein III,
P.IV : Protein IV, S.K : Standard keratin, M : Marker

3) 시작장치의 검토

본 내용에 있어서는 실험실적인 규모보다 큰 최소 1kg이상의 시료를 한꺼번에 처리할 수 있는 장치를 모색함으로서 실용화를 할 경우 보다 편이를 위하여 검토하였다. 따라서 본 시험에서 검토된 시작장치는 다음의 사진에서 나타낸 것과 같이 온도를 조절할 수 있는 이중자켓 솥과 대형 교반기를 이용하여 검토하였다. 그 결과 실험실적인 방법에서 소규모로 검토한 것보다 분해되는 정도의 차이는 있었지만 좀 더 밀폐시킬 수 있는 방법과 교반의 속도를 빠르게 할 경우 그 효과는 실험실적으로 행한 것과 유사하리라고 사료되었다(그림 7 및 그림 8).

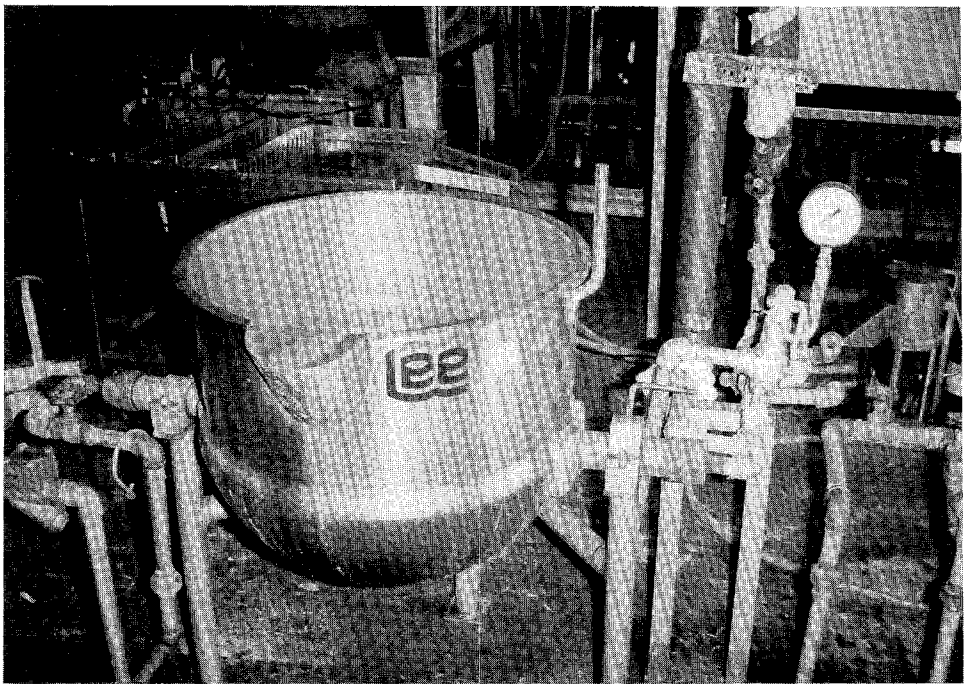


Photo 1-1. Apparatus of keratinaceous protein production by chemical tratment

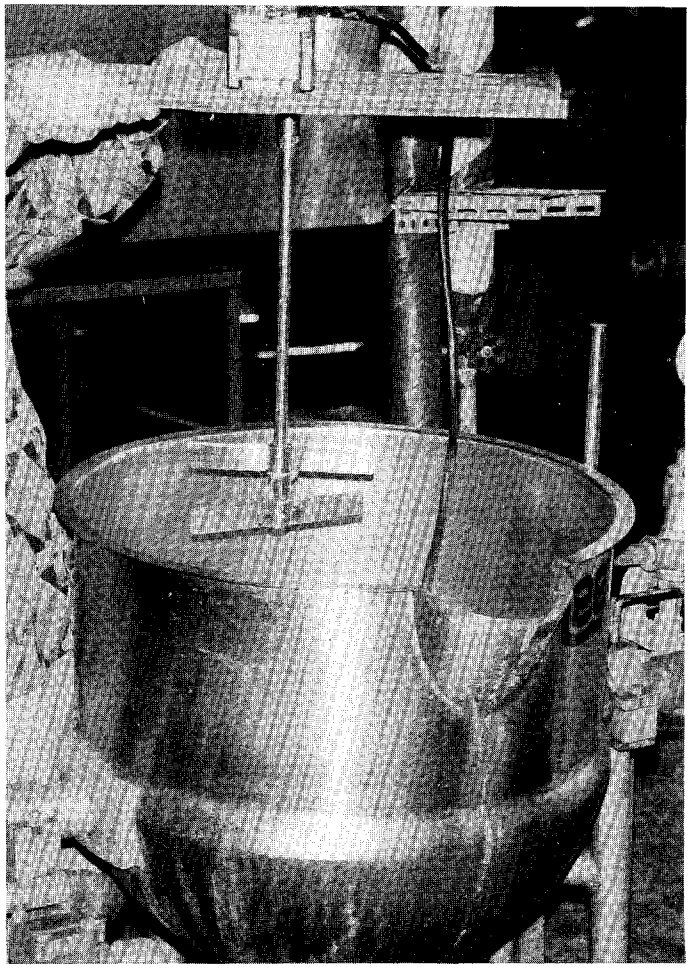


Photo 1-2. Apparatus of keratinaceous protein production by chemical treatment

# 제 3 장 우모분의 사료가치 평가 및 아미노산 이용률

## 제 1 절 서 설

지규만등(1971)은 부로일러 병아리에 대한 우모분의 사료적 가치를 알기 위해 우모분으로 임자박과 대두박을 2%와 4% 대치하여 사양시험을 실시한 결과, 성장율은 우모분으로서 임자박을 2%와 4% 대치해도 대조구와 비슷한 증체를 하였고, 대두박 2% 대치시는 6%의 체중감소를 가져왔으나 유의성은 없었다고 하였다. 그러나 사료효율은 우무분 사용구에서 현저히 개선되어 종합적으로 보아 임자박 4% 나 대두박 2% 정도를 우모분으로 대치할 수 있다는 것이다. 한편 Gerry와 Smith(1954)는 가금사료에 우모분으로 ① 2.5%, 5%, 10% 의 대두박을 대치하던지 ② 22.5%, 5%의 어분을 대치하던지 ③ 2.5%의 대두박과 2.5%의 어분을 대치하던지 ④ 대두박 5% 와 어분 5%를 같이 대치하던지 간에 병아리의 성장율이나 사료효율에 아무런 영향이 없었고, 그리고 산란계 사료에 우모분을 사용해도 산란율이나 사료요구율에 아무런 영향이 없었다고 보고했다. Harms와 Goff(1957)는 종계영양에 우모분이 미치는 영향을 연구한 결과 우모분은 UGF를 함유 하고 있어서 옥수수, 대두박, 알팔파 분말로 배합된 종계사료에 우모분을 첨가하면 일정한 부화율을 유지할 수 있다고 했고 우모분을 5% 정도 첨가하는 것이 정상적인 산란을 뒷받침하는데 필요하다고 보고했다. Lillie등(1956)도 병아리 사료에 우모분으로 어분을 대치할 수 있고 UGF원으로 필요할 것이라 하였다. McKerns와 Rittersporn (1958)에 의하면 브로일러 사료의 총단백질의 25% 까지는 우모분으로 대치할수 있다고 보고했다. Moran(1966)등은 우모분에 4가지 아미노산 즉, methionine, lysine, histidine, tryptophan 을 보충하여 준다면 우모분

품질이 대두 단백질과 같아진다는 것을 알아냈다. 또한 생우모는 이러한 아미노산을 보충해 주어도 그 사료적 가치가 향상되지 않고 121℃에서 30분간 autoclave된 것이나 sodium sulfide 처리된 것도 우모 단백질의 이용에 도움을 주지 않았으나 121℃에서 18시간 가압 처리된 우모분의 사료적 가치는 크게 향상된다는 것이다. Moran과 Summers(1968)는 우모분과 돈모분이 부로이러에 대하여 사료적 가치가 낮은 것은 lysine과 methionine의 함량이 부족하기 때문이라고 하였다. Naber와 Morgan(1955)은 기초사료에 우모분 5%를 첨가 급여했더니 병아리의 증체와 사료이용성이 좋아졌고 이것은 우모분이 우수한 cyanocobalamine의 공급제이기 때문이라 하였다. 박홍석등(1970)은 병아리 사료에 사용한 12%의 수입 어분을 국상 어분, 우모분, 혈분(사료 단백질의 30% 대치)으로 대치한 결과 사료효율에서 우모분 대치구가 다른구에 비하여 우수하였고 국산어분 50% 대치구와 같은 결과를 냈다고 보고했다. 이영철(1972)은 부로일러 사료중 우모분의 대량 배합 가능성과 아미노산 불균형, 사료의 이용효율을 검토하기 위하여 어분, 옥수수전분의 일부 대용으로 8%의 우모분을 급여했으나 성장에 별다른 차이는 보지 못했고 우모분 16% 첨가시는 성장율이 크게 떨어졌다고 했다. 아미노산 불균형 사료(우모분 16%)를 급여 했을 때 사료 섭취량 및 단백질 소화율이 저하되었으나, 제한 아미노산인 lysine과 methionine을 보충 급여하면 이런 현상은 없어지고 대조구의 성적과 유사한 결과를 얻었다. 부로일러 사료내에 적당량의 필수 아미노산이 함유되어 있을 경우에 부로일러 사료에 적어도 2.5%의 우모분을 단백질 급원으로 사용할 수 있다(Romoser, 1955) 그런 저단백질 사료인 경우에 우모분의 사용효과는 대두박이나 육분에 비하여 다소 떨어지지만 필수아미노산을 충분히 함유하고 있는 고단백질 사료의 경우에는 상당량의 대두박이나 육분을 우모분으로 대치해도 아무런 영향이 없었다(Shbbald,1962). Smith (1968)가 어분, 대두박, 우모분에 들어 있는 아미노산의 이용효율을 측정한

결과 우모분에 들어있는 아미노산의 이용성은 어분이나 대두박의 그것보다 상당히 떨어졌고 특히 histidine(0.0%), lysine(5.3%)의 이용성은 매우 낮아서 우모분의 영양가를 낮게 하는 원인일 것이라고 하였다. Stephens등 (1959)은 부로일러 사료의 필수아미노산, 미네랄, 비타민, 단백질, 에너지 수준을 다 같게 하여 시험한 결과 어분 6.2%를 넣은 시험사료에 태운 우모분을 첨가한구가 성장율이 제일 좋았는데 이는 우모분 속에 성장촉진 인자가 들어 있기 때문이라 하였고, ether로 추출한 우모분을 급여받은 구의 성장율이 대조구 보다 우수했다고 보고했다. Sullivan과 Stephenson(1957)에 의하면 병아리 사료에서 5%의 대두박을 우모분으로 대치해도 성장능력에서 아무런 영향이 없었다고 했다. 어분이 2.0%만 함유된 사료에서 1kg의 우모분과 1kg의 옥수수로서 2kg의 대두박을 대치하는 방식으로 사료내 우모분 첨가량을 1.0% 부터 7.5% 까지 증가시켰는데 14주간의 시험결과에 따르면 우모분으로 대두박을 대치할 때 5%수준까지는 아무런 영향을 주지 않았으나 7.5%에서는 현저한 성장저해 현상이 일어났다. 이들은 우모분의 처리압력과 시간에 있어서는 15psi의 증기압으로 20분간 처리하는 것이 효과적이었고 35psi의 증기압으로 1시간 처리하여 분쇄한 것이 가장 좋았다고 보고했다. Tsang등(1963)이 동열량,동 단백질 수준으로 만든 부로일러 사료에서 35 kg의 옥수수와 41kg의 우모분으로 70kg의 대두박과 5kg의 동물성 유지를 1:1로 대치하여 사양시험을 한 결과, 부로일러 사료의 단백질 함량이 20%일 때는 우모분을 4% 까지, 부로일러 사료의 단백질 함량이 22- 26 % 일 때는 8% 까지 대치가 가능하다고 보고했다. Baker등(1981) 스팀 처리한 우모분을 뉴햄프샤와 콜롬비안 교잡종 어린 병아리에게 급여한 결과, 우모분만으로 단백질원을 급여했을 경우에 제한 아미노산은 methionine, lysine, histidine, tryptophan 이고, methionine을 첨가할 경우 옥수수- 대두박 위주사료의 단백질 요구량을 10% 대치할 수 있으며, methionine과 lysine을 첨가시에는 증체율이 큰 감소없이 40%를 대치

할 수 있다고 했다. Thomas 와 Beeson(1977)이 기초사료에 고농후사료를 급여하면서 숫송아지에 대두박을 32% 대치한 우모분과 돼지 모발분의 건물, 에너지, 질소 이용율을 측정하였다. 건물과 에너지 소화율은 유사한 경향을 나타냈으며 분중의 질소 배설량은 대두박구가 적고 질소소화율도 대두박구가 높게 나타났으나 분중의 질소 배설량과 반추위내 암모니아 농도, 혈액의 요소함량은 대두박구가 높게 측정됐다. 이러한 이유는 우모분이나 모발분의 분해율이 대두박에 비하여 적음에 기인한다고 하였다. 어분과 마찬가지로 우모분이나 모발분도 bypass 단백질 공급원이 될 수 있으나 아미노산 조성이 양호한 편이 되지 않아서 메치오닌, 라이신 등의 아미노산의 첨가가 요구된다. Wray등(1979)은 옥수수사일레지를 숫송아지에 기초사료로 급여하면서 단백질사료로 우모분과 모발분을 대두박의 50% 및 100%로 대치했을 때 일당증체량, 사료효율, 사료섭취량 및 육질에 있어서 대두박 첨가구와 유의적인 차이를 보이지 않았다고 보고했다. 또한 헤어포드 암송아지에게 우모분과 모발분을 대두박의 25% 및 50%로 대치했을 때는 증체량, 사료섭취량, 육질에 있어서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 사료요구율은 대두박 첨가구에 비해 나빴다고 했다.

Williams등(1991)은 발효우모분(Bacillus licheniformis로 발효)의 사료적 가치를 부로일러 육계에서 조사했는데 사료 단백질의 25%를 우모분으로 대치했다. 혐기적발효 우모분구의 경우에는 호기적 발효우모분구 및 오토크래브한 우모분구에 보다 각각 6.9%와 19.3%의 증체 효과를 나타냈으나 표준구인 대두박 급여구에 비해서는 6.4%의 낮은 증체효과를 보였다. 또한 3%와 6% 발효우모분 급여시 사양시험에서는 lysine, histidine, tryptophan을 보완 시 대두박구와 동일한 증체효과를 나타냈고, autoclave한 우모분 급여구는 원료 우모분구에 비해서는 성장이 개선됐지만 발효 우모분구에 비해서는 유의적으로 낮은 증체효과를 보였다. 이시험을 통하여 혐기적 발효 우모분의

경우에 양질 단백질 사료로서의 가능성을 나타냈다.

## 제 2 절 재료 및 방법

1차 시험 결과 pepsin 소화율이 가장 낮은 원료 우모분과 물리화학적 처리에 의해서 pepsin소화율이 가장 높은 (Ball mill 처리후 protein fraction I) 캐라틴 단백질 추출물을 선정하여서 아미노산 이용율 시험을 수행하였다. 시험처리구 내역 및 사료배합은 표 1과 같으며 4처리구 3반복으로 반복당 2수씩 공시하였으며 공시동물은 S.D.계통의 체중 150g 내외인 쥐를 24수 공시하였다. 분 채취는 전분채취법(Total collection method)에 의하였다.

Table 1. Formula of experimental diets(1st phase)

| Feeds | Control | Non-nitrogen | Low-protein | High-protein |
|---|---|---|---|---|
| Glucose | 10 | 30 | 10 | 10 |
| Corn starch | 55 | 55 | 55 | 55 |
| feather meal | - | - | 20 | 20 |
| Casein | 20 | - | - | - |
| Fiber | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Corn oil | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| DL-Methione | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Choline bitartrate | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Vit. mix. | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Min. mix. | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Protein | 20 | - | 19.0 | 19.8 |
| Calories Kcal/g | 3.85 | 3.85 | 3.85 | 3.85 |

# 제 3 절 결과 및 고찰

## 1. 발효우모분의 사료가치 평가

### 가. 제 1차 시험

표 2는 카제인과 colloid 30으로 분쇄한 우모분, 물리화학적으로 추출한 keratinaceous protein I분획물을 시험사료에 20% 첨가하였을 때의 아미노산 함량을 분석한 결과이다. 함유황 아미노산인 methionine과 cysteine이 낮게 나타났으며, 특이한 것은 캐라틴 단백질 I을 함유한 사료에서 histidine과 lysine이 검출되지 않았는데 반면 원료 우모에는 histidine 0.35%, lysine 0.94%로 분석되었다. 이 결과는 추출과정에서 이들 아미노산이 파괴가 된 것으로 사료된다.

표 3은 카제인 처리구에서 아미노산 소화율은 glycine이 83.3%로 가장 낮았고 methione과 serine이 100%로 완전히 이용되었다. Alanine의 경우 88.9%로 낮은 편이었으나 alanine과 glycine을 제외하고는 모두 90%이상의 소화율을 나타냈으며 총 아미노산 평균 소화율은 93.9%로 평가 되었다. Colloid 30으로 분쇄한 원료 우모 자체의 아미노산 소화율은 아주 저조했으며 leucine, phenylalanine, aspartate, glutamate, cysteine, proline 등은 10% 이하의 낮은 소화율을 보였으며 colloid 30 분쇄 우모분의 총아미노산 평균 소화율은 21.7%로 극히 저조하였다.

단백질 분획물중 fraction I의 경우 threonine, aspartate, alanine, glycine, tyrosine의 소화율이 80 - 89% 사이였으나 그외 아미노산 이용율은 90% 이상으로 높은 소화율을 나타내었다. Keratinaceous protein I의 총아미노산 평균 소화율은 92.7%로 상당히 우수하게 평가되었다.

표 4에서 가소화 아미노산은 내생질소에서 오는 아미노산과 뇨중에서 오는 아미노산을 고려하지 않았기 때문에 true개념은 아니며 apparent digestible 아미노산으로 표기하였다. 이 표에서는 카제인이나 우모분과 캐라틴 단백질 I을 시험사료 중에 20%혼합된 상태에서 측정된 결과이며, 카제인은 94.58%, 캐라틴 단백질 아미노산 소화율은 93.61%, 원료우모분은 15.49%의 아미노산 소화율을 보였다.

이 결과로 볼 때 캐라틴태 단백질 분획물I의 경우 아미노산 이용률이 카제인과 거의 유사함을 나타냈는데 이는 캐라틴 단백질 I이 훌륭한 아미노산 자원임을 입증한 결과로 평가된다. 이때의 사료의 섭취량과 일당증체량 및 배설된 단백질 및 아미노산 함량을 보면 표 5, 표 6 및 표 7과 같다.

일당증체량은 대조구가 4.54g 이었으나 N-free, Low-keratin 및 High-keratin 급여구는 1.76-2.0g으로 대조구에 비해 현저하게 감소하였다. 또한 사료섭취량에 있었도 대조구가 18.0g/day 인 반면 N-free, Low-keratin 및 High-keratin 급여구는 11.3-15.4g/day로 사료섭취량에 있어서도 현저하게 적은량을 섭취하였다, 따라서 사료섭취량이 작기 때문에 일당증체량도 대조구에 비해 감소되었음을 알 수 있었다.

표 7에서 배설된 분의 량은 대조구가 1.41g 이었으며 low-keratin 처리구는 5.29g으로 가장 많은 배설을 하였으며 high-keratin구가 1.13으로 가장 적은량을 배설하였다. 분내 단백질함량도 low-keratin 섭취구가 49.02%로 가장 높았으며 high-keratin구가 20.64%로 그 다음으로 분내 단백질 함량이 높게 나타나 keratin 단백질이 체내 섭취가 잘 안되고 있음이 확인되었다.

따라서 이때 소화율을 보면 대조구가 92.4%인 반면 high-keratin섭취구가 88.0%였다. 가장 낮게 단백질 소화율을 보인 것은 low-keratin으로 1.9%밖에 소화되지 않았다.

Table 2. Amino acid contents of the experimental diet (D.M basis)

| Amino acid intake | Casein | Raw feather by colloid 30 | Keratinaceous protein 1 |
|---|---|---|---|
| Indispensable | | | |
| Arginine | 1.34 | 1.8 | 4.66 |
| Histidine | 0.86 | 0.35 | N.D |
| Isoleucine | 0.91 | 0.78 | 0.8 |
| Leucine | 1.62 | 1.24 | 1.34 |
| Lysine | 2.05 | 0.94 | N.D |
| Methionine | 0.73 | 0.25 | 0.27 |
| Phenylalanine | 0.99 | 0.84 | 0.95 |
| Threonine | 0.76 | 0.78 | 0.74 |
| Tryptophane | N.D | N.D | N.D |
| Valine | 1.16 | 1.26 | 1.35 |
| Dispensable | | | |
| Alanine | 0.51 | 0.64 | 0.69 |
| Aspatate | 2.13 | 1.66 | 1.62 |
| Cysteine | N.D | 0.61 | 0.48 |
| Glutamate | 3.91 | 1.63 | 1.53 |
| Glycine | 0.31 | 1.00 | 1.13 |
| Proline | 1.92 | 1.76 | 1.9 |
| Serine | 0.89 | 1.72 | 2.01 |
| Tyrosine | 0.96 | 1.49 | 0.4 |
| Total amino acid | 21.05 | 17.75 | 19.89 |

Table 3. Apparent digestiblility of Amino acid of the experimental diets

| Amino acid intake | Casein | Raw feather by colloid 30 | Keratinaceous protein I |
|---|---|---|---|
| Indispensable | | | |
| Arginine | 91.7 | 35.7 | 98.1 |
| Histidine | 93.3 | 60 | ND |
| Isoleucine | 93.8 | 25 | 100 |
| Leucine | 96.7 | 5.3 | 93.3 |
| Lysine | 91.9 | 57.1 | ND |
| Methionine | 100 | 75 | 100 |
| Phenylalanine | 92.3 | 7.7 | 90.9 |
| Threonine | 92.9 | ND | 87.5 |
| Tryptophane | ND | ND | N.D |
| Valine | 95.2 | 10.5 | 93.3 |
| Dispensable | | | |
| Alanine | 88.9 | 10 | 87.5 |
| Aspatate | 94.7 | 7.7 | 88.8 |
| Cysteine | ND | ND | 100 |
| Glutamate | 95.7 | 4 | 88.2 |
| Glycine | 83.3 | 13.3 | 92.3 |
| Proline | 97.1 | ND | 95.2 |
| Serine | 100 | 11.5 | 95.7 |
| Tyrosine | 94.7 | 25 | 80 |
| Total amino acid | 93.9 | 21.7 | 92.7 |

Table 4. Apparent digestible amino acid of the experimental diets

| Amino acid intake | Casein | Raw feather by colloid 30 | Keratinaceous protein I |
|---|---|---|---|
| Indispensable | | | |
| Arginine | 1.23 | 0.64 | 4.57 |
| Histidine | 0.8 | 0.21 | ND |
| Isoleucine | 0.85 | 0.2 | 0.8 |
| Leucine | 1.57 | 0.07 | 1.25 |
| Lysine | 1.88 | 0.54 | ND |
| Methionine | 0.73 | 0.19 | 0.27 |
| Phenylalanine | 0.91 | 0.06 | 0.86 |
| Threonine | 0.71 | ND | 0.65 |
| Tryptophane | ND | ND | ND |
| Valine | 1.1 | 0.13 | 1.26 |
| Dispensable | | | |
| Alanine | 0.45 | 0.06 | 0.6 |
| Aspatate | 2.02 | 0.13 | 1.44 |
| Cysteine | ND | ND | 0.48 |
| Glutamate | 3.74 | 0.07 | 1.35 |
| Glycine | 0.27 | 0.13 | 1.04 |
| Proline | 1.86 | ND | 1.81 |
| Serine | 0.89 | 0.2 | 1.92 |
| Tyrosine | 0.9 | 0.12 | 0.32 |
| Total amino acid | 19.91 | 2.75 | 18.62 |

Table 5. Daily feed intake(D.M. basis)

| | Treatment | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Control | N-free | Low-keratin[1)] | High-keratin[2)] |
| No, of rat | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Daily gain(g/day) | 4.54±2.33 | 1.76±0.66 | 1.98±0.33 | 2.0±1.12 |
| water intake (ml/day) | 29.9±3.14 | 17.6±4.07 | 21.5±2.65 | 22.5±0.78 |
| Moisture(%) | 11.93±0.01 | 12.42±0.07 | 13.42±0.12 | 10.99±0.01 |
| Feed intake(g/day)[1] | 18.0±1.72 | 13.0±2.25 | 15.4±4.54 | 11.3±1.04 |

1) Feather meal after grinding with colloid 30

2) Keratinaceous protein I fraction

Table 6. Daily fecal excreta(D.M. basis)

| | Treatment | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Control | N-free | Low-keratin | High-keratin |
| No of rat | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Feces amount (fresh, g/head /day) | 1.69±0.35 | 1.48±0.31 | 6.2±1.47 | 1.32±0.3 |
| Moisture(%) | 16.85 | 13.61 | 14.78 | 14.3 |
| Daily fecal[2] excreta(g) | 1.41±0.29 | 1.28±0.27 | 5.29±1.25 | 1.13±0.26 |

Table 7. Digestibility tests of feather meal in vivo

| | Treatment | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Control | N-free | Low-keratin | High-keratin |
| Feed intake[1](g/day) | 18.0±1.72 | 13.0±2.25 | 15.4±4.54 | 11.3±1.04 |
| Protein(%) | 17.45±0.16 | 1.53±0.13 | 17.08±0.53 | 17.52±0.22 |
| Protein intake(g) | 3.14±0.30 | 0.20±0.03 | 2.64±0.77 | 1.99±0.18 |
| Daily fecal excreta[1](g) | 1.41±0.29 | 1.28±0.27 | 5.29±1.25 | 1.13±0.26 |
| Protein(%) | 16.5±2.31 | 11.08±1.70 | 49.02±1.9 | 20.64±1.43 |
| Protein excreta(g) | 0.23±0.05 | 0.14±0.03 | 2.59±0.61 | 0.23±0.05 |
| Digestibility(%) | 92.4 | 30.0 | 1.9 | 88.0 |

나. 제 2차 시험

소화율 증진을 위하여 우모분을 분해할 수 있는 균을 찾아 원모를 실험실적으로 발효에 의해 분해시켰다. 분해된 우모분의 사료가치 평가를 위하여 in vitro로 소화율을 측정하였고 그 후 동물 사육시험을 통하여 발효된 우모분의 사료가치를 평가하기 위하여 실시하였다. 시험처리구 내역 및 사료배합은 표 8과 같으며 4처리구 3반복으로 반복으로 공시하였으며 공시동물은 S.D.계통의 체중 150g 내외인 쥐를 공시하였다. 분 채취는 전분채취법(Total collection method)에 의하였다. 분쇄구는 원모를 세척하고 건조하여 ball mill로만 분쇄를 하였으며 열처리구는 원모를 세척후 열처리하고 건조 및 분쇄를 하였다. 또한 발효 및 열처리구는 원모를 세척후 효소처리를 하여 발효를 시키고 열처리를 하여 건조 및 분쇄를 하여 사료 배합을 하였다. 각 처리구의 첨가량은 20%로 하였다.

Table 8. Formula of experimental diets(2nd phase)

| Ingredients | Control(C) | Ground(G) | Heat(H) | Fermented + Heat(F+H) |
|---|---|---|---|---|
| Glucose | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Corn starch | 55 | 55 | 55 | 55 |
| Feather meal | - | 20 | 20 | 20 |
| Casein | 20 | - | - | - |
| Fiber | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Corn oil | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| DL-Methione | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Choline bitartrate | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Vit. mix. | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Min. mix. | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Protein | 20 | 19.5 | 19.0 | 19.8 |
| Calories Kcal/g | 3.85 | 3.85 | 3.85 | 3.85 |

Table 10. Daily feed intake and fecal excreta

| | Treatment | | | |
|---|---|---|---|---|
| | C | G | H | F+H |
| Daily gain (g/day) | 2.37±3.36 | 3.84±0.72 | 0.86±0.25 | -0.93±0.32 |
| Feed intake[1] (g/day) | 16.5±1.87 | 19.96±2.96 | 9.13±0.38 | 6.86±1.31 |
| Water intake (ml/day) | 31.2±7.3 | 25.0±4.5 | 17.9±3.2 | 14.0±1.7 |
| Daily feacal[1] excreta(g) | 5.03±1.33 | 13.43±1.95 | 3.57±0.65 | 2.37±0.77 |

1. D.M. basis

동물사육 시험의 결과 일당증체량은 G처리구가 3.84g으로 다른 처리구에 비해 가장 높았으며 F+H처리구는 체중감소가 일어났다. 이 결과는 사료섭취량이 대조구에서는 16.5g/day 이었으나 H구 와 F+H구에서는 9.13g/day 및 6.86g/day로 대조구에 비해서도 2배 이상 섭취량이 감소하였다.

이렇게 사료섭취량이 적게 나타난 이유는 아직 확실히 규명할 수는 없지만 시기적인 문제이거나 발효된 우모분이 기호성이 좋지 않아서 인지는 확실히 알 수는 없다. 또한 사료에 발효우모분의 첨가량이 20%가 너무 많이 첨가되었다고도 생각해 볼 수 있겠다. 표 9에서 사료섭취량은 각 처리구 마다 달라 대조구가 16.5±1.87g/day, G처리구가 19.96±2.96g/day, H처리구가 9.13±0.38g/day 및 F+H처리구가 6.86±1.31g/day 였으며 이때의 분의 량은 대조구가 5.03±1.33g/day, G 처리구가 13.43±1.95g/day, H처리구가 3.57±0.65g/day 및 F+H처리구가 2.37±0.77g/day 였으므로 이때의 소화율을 계산하기 위하여 조사된 단백질 함량 및 각 처리구간 소화율을 표 10과 같다.

Table 10. Protein digestibility of experimental diets

| | | Treatment | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | C | G | H | F+H |
| Feed Intake | Protein(%) | 25.05±0.7 | 20.1±0.48 | 19.97±0.88 | 19.65±0.55 |
| | Protein intake(g) | 3.9±0.44 | 3.78±0.56 | 1.72±0.56 | 1.26±0.24 |
| Fecal excreta | Protein(%) | 16.75±5.59 | 52.74±1.54 | 27.6±3.13 | 31.6±3.43 |
| | Protein excreta(g) | 0.84±0.22 | 7.09±1.03 | 0.99±0.18 | 0.75±0.24 |
| Protein digestibility(%) | | 78.5 | 0 | 42.4 | 40.5 |

1. D.M. basis

각 처리구 모두 단백질 함량은 유사하였지만 소화율에 있어서는 대조구 보다 훨씬 저하되었다. 이 결과는 발효에 의한 것이 소화율을 증진 시키는 것이 아니라 오히려 소화를 저하시키고 기호성을 떨어뜨려 효과가 없는 것으로 사료되었다. 이런 결과는 F+H처리구의 pepsin 소화율을 사전 조사해 본 결과 16.86±0.00%로 매우 낮게 나타난데 기인한 것으로 판단되었다.

표 11은 발효우모분을 이용하여 제조된 사료의 아미노산 함량을 나탄낸 것으로 총 아미노산의 함량은 대조구가 17.91%, 열처리구는 16.49% 및 발효처리구는 14.41%로 대조구에 비해 처리구들의 아미노산 함량이 낮게 나타났다. 표 12는 소화시험 기간중에 배설된 분에 있는 아미노산을 분석한 결과로 대조구인 카제인 단백질구가 총아미노산 함량이 20.76%에 비해서 원료 우모분 60.01%, 열처리 우모분 44.42%, 발효우모분 44.32%로 대조구에 비해서 소화안된 아미노산 함량이 너무 높게 측정되었는데 그 이유는 확실치 않다.

Table 11. Amino acid contents of the experimental diet (D.M. basis)

| Amino acid intake | C | G | H | F+H |
|---|---|---|---|---|
| Indispensible | | | | |
| Arg | 1.20 | 1.48 | 2.06 | 2.14 |
| His | 1.20 | 0.90 | 0.32 | 0.29 |
| Ile | 0.70 | 0.74 | 0.87 | 1.07 |
| Leu | 1.27 | 1.34 | 1.46 | 1.81 |
| Lys | 1.76 | 1.70 | 0.53 | 0.52 |
| Met | 0.49 | 0.35 | 0.34 | 0.53 |
| Phe | 0.55 | 0.58 | 0.57 | 0.87 |
| Thr | 0.62 | 0.40 | 0.77 | 0.16 |
| Val | 1.11 | 1.32 | 1.53 | 1.73 |
| Dispensible | | | | |
| Ala | 0.42 | 0.56 | 0.72 | 0.76 |
| Asp | 1.44 | 0.91 | 1.50 | 0.23 |
| Cys | N.D | 1.78 | 0.66 | 0.91 |
| Glu | 3.56 | 1.02 | 0.16 | 0.51 |
| Gly | 0.21 | 0.83 | 1.18 | 0.92 |
| Pro | 1.69 | 1.92 | 1.38 | 0.39 |
| Ser | 0.87 | 1.73 | 2.03 | 0.72 |
| Tyr | 0.82 | 0.42 | 0.41 | 0.87 |
| Total amino acid | 17.91 | 18.00 | 16.49 | 14.41 |

Table 12. Amino acid contents of the feaces (D.M. basis)

| Amino acid intake | C | G | H | F+H |
|---|---|---|---|---|
| Indispensible | | | | |
| Arg | 2.38 | 4.84 | 3.72 | 3.24 |
| His | 1.21 | 0.88 | 1.42 | 1.26 |
| Ile | 0.88 | 2.95 | 1.60 | 1.69 |
| Leu | 1.12 | 4.63 | 2.56 | 2.62 |
| Lys | 2.88 | 2.30 | 4.43 | 3.66 |
| Met | 0.30 | 0.17 | 0.55 | 0.55 |
| Phe | 0.89 | 3.11 | 1.77 | 1.79 |
| Thr | 0.71 | 2.29 | 1.62 | 1.83 |
| Val | 1.06 | 4.56 | 2.84 | 2.78 |
| Dispensible | | | | |
| Ala | 0.91 | 2.41 | 2.19 | 1.78 |
| Asp | 2.07 | 5.06 | 5.16 | 6.04 |
| Cys | 0.30 | 2.32 | 1.24 | 1.07 |
| Glu | 2.48 | 6.52 | 4.71 | 5.28 |
| Gly | 0.74 | 3.68 | 1.95 | 1.79 |
| Pro | 0.98 | 6.85 | 3.92 | 4.37 |
| Ser | 1.16 | 5.91 | 3.09 | 3.04 |
| Tyr | 0.71 | 1.53 | 1.65 | 1.54 |
| Total amino acid | 20.76 | 60.01 | 44.42 | 44.32 |

Table 13. Apparent digestibility of amino acid of the experimental diets

| Amino acid intake | C | G | H | F+H |
|---|---|---|---|---|
| Indispensible | | | | |
| Arg | 36.16 | 0 | 24.92 | 43.41 |
| His | 67.64 | 30.30 | 0 | 0 |
| Ile | 59.77 | 0 | 23.87 | 41.0 |
| Leu | 71.61 | 0 | 27.40 | 46.08 |
| Lys | 47.49 | 3.25 | 0 | 0 |
| Met | 80.4 | 65.25 | 32.56 | 61.08 |
| Phe | 47.97 | 0 | 0 | 23.48 |
| Thr | 63.49 | 0 | 13.43 | 0 |
| Val | 69.46 | 0 | 22.93 | 40.03 |
| Dispensible | | | | |
| Ala | 31.11 | 0 | 0 | 12.3 |
| Asp | 53.95 | 0 | 0 | 0 |
| Cys | N.D. | 7.29 | 21.69 | 56.01 |
| Glu | 77.63 | 0 | 0 | 0 |
| Gly | 0 | 0 | 31.26 | 27.08 |
| Pro | 81.53 | 0 | 0 | 0 |
| Ser | 57.23 | 0 | 36.65 | 0 |
| Tyr | 72.02 | 0 | 0 | 34.51 |
| Total amino acid | 62.79 | 6.24 | 13.81 | 22.82 |

Table 14. Apparent digestible amino acid of the experimental diets

| Amino acid intake | C | G | H | F+H |
|---|---|---|---|---|
| Indispensible | | | | |
| Arg | 0.43 | 0 | 0.51 | 0.93 |
| His | 0.81 | 0.27 | 0 | 0 |
| Ile | 0.42 | 0 | 0.21 | 0.44 |
| Leu | 0.91 | 0 | 0.40 | 0.84 |
| Lys | 0.83 | 0.06 | 0 | 0 |
| Met | 0.39 | 0.23 | 0.11 | 0.32 |
| Phe | 0.26 | 0 | 0 | 0.21 |
| Thr | 0.40 | 0 | 0.10 | 0 |
| Val | 0.77 | 0 | 0.35 | 0.69 |
| Dispensible | | | | |
| Ala | 0.13 | 0 | 0 | 0.09 |
| Asp | 0.78 | 0 | 0 | 0 |
| Cys | 0 | 0.13 | 0.14 | 0.51 |
| Glu | 2.76 | 0 | 0 | 0 |
| Gly | 0 | 0 | 0.37 | 0.25 |
| Pro | 1.38 | 0 | 0 | 0 |
| Ser | 0.50 | 0 | 0.74 | 0 |
| Tyr | 0.59 | 0 | 0 | 0.30 |
| Total amino acid | 11.37 | 0.69 | 2.94 | 4.57 |

표 13에서는 시험사료의 외견상(apparent) 소화율인데 대조구인 카제인 단백질구도 62.79%로 문헌상이나 1차시험에서의 성적보다도 훨씬 낮았으며 우모분구는 원료 6.24%, 열처리구 13.81%, 발효우모분(열처리)은 22. 82%로써 특히 열처리나 발효우모분의 경우에 이론적으로 설명할 수 없는 낮은 소화율을 보였는데 추후 재시험이나 품질개선 시험이 더욱 필요하다고 본다. 표 14에서는 가소화성 아미노산을 나타내고 있는데 시험사료 중에 단백질 급원이 20% 함유된 사료로서 측정결과 카제인구의 아미노산 소화율은 63.48%, 원료우모분 3.87%, 열처리 우모분 17.82%, 발효우모분 31.71%로 아주 낮아서 열처리나 발효처리시 문제점이 있는 것 같다.

2. 동물 사육시험을 통한 아미노산 이용률 평가(3차 시험)

2차년도에 아미노산 이용율 평가시험에서 대조구인 카제인 (총량의 20%)을 100%로 발효우모분 대체시 아미노산 이용률이 낮았으므로 본 시험에서는 카제인의 50%만 대체(총량의 10% 수준)하여 쥐를 이용하여 In vivo시험을 실시하였다. 시험처리구 내역은 4처리구 3반복으로 반복당 2수씩 공시하였으며 공시동물은 S.D.계통의 체중 150g 내외인 쥐를 24수 공시하였다. 분 채취는 전분채취법(Total collection method)에 의하였다. 이때 사료의 배합비는 표 15와 같다.

Table 15. Formula of experimental diets(3rd phase)

| Ingredients | Casein | Ground F.M. | Autoclaved F.M. | Fermented F.M. |
|---|---|---|---|---|
| Glucose | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Corn starch | 55 | 55 | 55 | 55 |
| Feather meal | - | 10 | 10 | 10 |
| Casein | 20 | 10 | 10 | 10 |
| Fiber | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Corn oil | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| DL-Methionine | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Choline | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Vit. mix. | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| Min. mix. | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| Protein | 20 | 19 | 19 | 19 |
| Calories Kcal/g | 3.85 | 3.85 | 3.85 | 3.85 |

Table 16. Amino acid content of the experimental diets

Unit : DM %

| A. A. | Control | Ground feather | Autoclaved feather | Fermented feather |
|---|---|---|---|---|
| Asp. | 1.41 | 1.50 | 1.33 | 1.29 |
| Thr. | 0.70 | 0.74 | 0.79 | 0.74 |
| Ser. | 0.85 | 0.91 | 1.06 | 0.95 |
| Glu. | 4.49 | 3.22 | 3.86 | 3.74 |
| Pro. | 2.51 | 1.93 | 2.17 | 2.06 |
| Gly. | 0.43 | 0.64 | 0.68 | 0.59 |
| Ala. | 0.66 | 0.66 | 0.72 | 0.95 |
| Cys. | - | - | - | - |
| Val. | 1.42 | 1.33 | 1.45 | 1.35 |
| Met. | 0.66 | 0.72 | 0.74 | 0.74 |
| Iso. | 1.15 | 1.01 | 1.09 | 1.02 |
| Leu. | 1.96 | 1.74 | 1.85 | 1.75 |
| Tyr. | 0.76 | 0.69 | 0.67 | 0.57 |
| Phe. | 1.16 | 0.98 | 1.05 | 0.98 |
| Lys. | 1.82 | 1.23 | 1.41 | 0.84 |
| His. | 0.75 | 0.53 | 0.58 | 0.42 |
| Arg. | 0.85 | 0.85 | 0.96 | 0.84 |
| Total A.A. | 21.58 | 18.68 | 19.67 | 18.83 |

※ DM % : 89.40, 88.89, 89.38, 89.48 % , respectively.

Table 17. Amino acid content of casein, ground feather meal, autoclaved feather meal, and fermented feather meal

Unit : DM %

| A. A. | Control | Ground feather | Autoclaved feather | Fermented feather |
|---|---|---|---|---|
| Asp. | 9.00 | 4.73 | 6.12 | 5,24 |
| Thr. | 2.68 | 3.70 | 3.62 | 2.38 |
| Ser. | 2.17 | 6.58 | 6.97 | 4.45 |
| Glu. | 18.17 | 9.89 | 10.40 | 9.79 |
| Pro. | 13.17 | 8.80 | 9.73 | 9.90 |
| Gly. | 1.63 | 6.65 | 6.67 | 5.04 |
| Ala. | 3.15 | 4.54 | 4.76 | 4.37 |
| Cys. | - | - | - | - |
| Val. | 6.34 | 6.89 | 7.99 | 5.98 |
| Met. | 2.81 | 0.70 | 0.69 | 2.08 |
| Iso. | 4.93 | 4.47 | 4.75 | 3.80 |
| Leu. | 9.14 | 7.16 | 7.77 | 6.82 |
| Tyr. | 4.27 | 2.85 | 2.42 | 1.82 |
| Phe. | 4.89 | 4.97 | 4.81 | 3.91 |
| Lys. | 8.80 | 7.17 | 3.19 | 2.99 |
| His. | 3.50 | 1.43 | 0.65 | 2.46 |
| Arg. | 4.76 | 6.78 | 7.08 | 3.60 |
| Total A.A. | 99.41 | 87.31 | 87.71 | 74.61 |

※ DM % : 90.59, 89.67, 90.25, 83.32 % , respectively.

Table 18. Amino acid content in the faeces of the experimental group

Unit : DM %

| A. A. | Control | Ground feather | Autoclaved feather | Fermented feather |
|---|---|---|---|---|
| Asp. | 0.95 | 2.40 | 2.77 | 1.92 |
| Thr. | 0.66 | 1.59 | 1.87 | 1.12 |
| Ser. | 0.53 | 3.00 | 3.31 | 1.74 |
| Glu. | 1.23 | 4.32 | 4.63 | 3.19 |
| Pro. | 0.60 | 3.39 | 3.67 | 2.33 |
| Gly. | 0.55 | 2.40 | 2.61 | 1.76 |
| Ala. | 0.57 | 1.78 | 2.00 | 1.52 |
| Cys. | - | - | - | - |
| Val. | 0.64 | 2.97 | 3.32 | 2.20 |
| Met. | 0.22 | 0.26 | 0.36 | 0.30 |
| Iso. | 0.51 | 1.94 | 2.10 | 1.43 |
| Leu. | 0.75 | 2.81 | 3.20 | 2.15 |
| Tyr. | 0.37 | 0.78 | 1.01 | 0.57 |
| Phe. | 0.47 | 1.76 | 1.99 | 1.35 |
| Lys. | 0.82 | 1.19 | 1.42 | 1.25 |
| His. | 0.28 | 0.39 | 0.50 | 0.41 |
| Arg. | 0.59 | 2.37 | 2.65 | 1.64 |
| Total A.A. | 9.74 | 33.35 | 37.41 | 24.88 |

※ DM % : 98.98, 98.55, 98.11, 98.76 % , respectively.

Table 19. Daily intake of amino acids in the experimental diets

Unit : g/d

| A. A. | Control | Ground feather | Autoclaved feather | Fermented feather |
|---|---|---|---|---|
| DM intake | 15.22 | 14.72 | 13.46 | 14.59 |
| Asp. | 0.215 | 0.220 | 0.179 | 0.188 |
| Thr. | 0.107 | 0.108 | 0.106 | 0.108 |
| Ser. | 0.125 | 0.134 | 0.143 | 0.139 |
| Glu. | 0.683 | 0.474 | 0.520 | 0.546 |
| Pro. | 0.382 | 0.284 | 0.292 | 0.301 |
| Gly. | 0.065 | 0.094 | 0.092 | 0.086 |
| Ala. | 0.100 | 0.097 | 0.097 | 0.139 |
| Cys. | - | - | - | - |
| Val. | 0.216 | 0.196 | 0.197 | 0.197 |
| Met. | 0.100 | 0.106 | 0.100 | 0.108 |
| Iso. | 0.175 | 0.149 | 0.147 | 0.149 |
| Leu. | 0.298 | 0.256 | 0.249 | 0.255 |
| Tyr. | 0.116 | 0.102 | 0.090 | 0.083 |
| Phe. | 0.177 | 0.144 | 0.141 | 0.143 |
| Lys. | 0.277 | 0.181 | 0.190 | 0.123 |
| His. | 0.114 | 0.078 | 0.078 | 0.061 |
| Arg. | 0.129 | 0.125 | 0.129 | 0.123 |
| Total intake | 3.283 | 2.748 | 2.750 | 2.749 |

Table 20. Daily excreta of amino acids in the faeces

Unit : g/d

| A. A. | Control | Ground feather | Autoclaved feather | Fermented feather |
|---|---|---|---|---|
| DM excreta | 0.88 | 1.23 | 0.94 | 1.02 |
| Asp. | 0.0084 | 0.0295 | 0.0260 | 0.0196 |
| Thr. | 0.0058 | 0.0196 | 0.0176 | 0.0114 |
| Ser. | 0.0047 | 0.0369 | 0.0311 | 0.0177 |
| Glu. | 0.0108 | 0.0531 | 0.0435 | 0.0325 |
| Pro. | 0.0053 | 0.0417 | 0.0345 | 0.0238 |
| Gly. | 0.0048 | 0.0295 | 0.0245 | 0.0180 |
| Ala. | 0.0050 | 0.0219 | 0.0188 | 0.0155 |
| Cys. | - | - | - | - |
| Val. | 0.0056 | 0.0365 | 0.0312 | 0.0224 |
| Met. | 0.0019 | 0.0032 | 0.0034 | 0.0031 |
| Iso. | 0.0045 | 0.0239 | 0.0197 | 0.0146 |
| Leu. | 0.0066 | 0.0346 | 0.0301 | 0.0219 |
| Tyr. | 0.0033 | 0.0096 | 0.0095 | 0.0058 |
| Phe. | 0.0041 | 0.0216 | 0.0187 | 0.0138 |
| Lys. | 0.0072 | 0.0146 | 0.0133 | 0.0128 |
| His. | 0.0025 | 0.0048 | 0.0047 | 0.0042 |
| Arg. | 0.0052 | 0.0292 | 0.0249 | 0.0167 |
| Total intake | 0.1831 | 0.4102 | 0.3586 | 0.2572 |

Table 21. Amino acid digestibility of the experimental diets

Unit : DM %

| A. A. | Control | Ground feather | Autoclaved feather | Fermented feather |
|---|---|---|---|---|
| Asp. | 96.09 | 86.59 | 85.47 | 89.57 |
| Thr. | 94.58 | 81.85 | 83.40 | 89.44 |
| Ser. | 96.36 | 72.46 | 78.25 | 87.27 |
| Glu. | 98.42 | 88.80 | 91.63 | 94.05 |
| Pro. | 98.61 | 85.32 | 88.18 | 92.09 |
| Gly. | 92.62 | 68.62 | 73.37 | 79.07 |
| Ala. | 95.00 | 77.42 | 80.62 | 88.85 |
| Cys. | - | - | - | - |
| Val. | 97.41 | 81.38 | 84.16 | 88.63 |
| Met. | 98.10 | 96.98 | 96.60 | 97.13 |
| Iso. | 97.43 | 83.96 | 86.60 | 90.20 |
| Leu. | 97.79 | 86.48 | 87.91 | 91.41 |
| Tyr. | 97.16 | 90.59 | 89.44 | 93.01 |
| Phe. | 97.68 | 85.00 | 86.74 | 90.35 |
| Lys. | 97.40 | 91.93 | 93.00 | 89.59 |
| His. | 97.81 | 93.85 | 93.97 | 93.11 |
| Arg. | 95.97 | 76.64 | 80.70 | 86.42 |
| Total A.A. | 96.78 | 84.24 | 86.26 | 90.02 |

Table 22. Amino acid digestibility of the ground feather meal

Unit : DM %

| A. A. | Dig. of A.A. of standard diet with ground feather(A) | Dig. of A.A. of standard diet with casein(B) | B×50% (C) | Dig. of ground feather meal | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | (A-C) | (A-C)/50% |
| Asp. | 86.59 | 96.09 | 48.05 | 38.54 | 77.08 |
| Thr. | 81.85 | 94.58 | 47.29 | 34.56 | 69.12 |
| Ser. | 72.46 | 96.36 | 48.18 | 24.28 | 48.56 |
| Glu. | 88.80 | 98.42 | 49.21 | 39.59 | 79.18 |
| Pro. | 85.32 | 98.61 | 49.31 | 36.01 | 72.02 |
| Gly. | 68.62 | 92.62 | 46.31 | 22.31 | 44.62 |
| Ala. | 77.42 | 95.00 | 47.50 | 29.92 | 59.84 |
| Cys. | - | - | - | - | - |
| Val. | 81.38 | 97.41 | 48.71 | 32.67 | 65.34 |
| Met. | 96.98 | 98.10 | 49.05 | 47.93 | 95.86 |
| Iso. | 83.96 | 97.43 | 48.72 | 35.24 | 70.48 |
| Leu. | 86.48 | 97.79 | 48.90 | 37.58 | 75.16 |
| Tyr. | 90.59 | 97.16 | 48.58 | 42.01 | 84.02 |
| Phe. | 85.00 | 97.68 | 48.84 | 36.16 | 72.32 |
| Lys. | 91.93 | 97.40 | 48.70 | 43.23 | 86.46 |
| His. | 93.85 | 97.81 | 48.91 | 44.94 | 89.88 |
| Arg. | 76.64 | 95.97 | 47.99 | 28.65 | 57.30 |
| Average of diges. | | | | | 71.70 |

표 22, 표 23 및 표 24는 우모분 자체의 소화율을 계산해내는 과정을 설명한 자료임.

Table 23. Amino acid digestibility of the autoclaved feather meal

Unit : DM %

| A. A. | Dig. of A.A. of standard diet with ground feather(A) | Dig. of A.A. of standard diet with casein(B) | B×50% (C) | Dig. of ground feather meal | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ( A-C ) | (A-C)/50% |
| Asp. | 85.47 | 96.09 | 48.05 | 37.42 | 74.84 |
| Thr. | 83.40 | 94.58 | 47.29 | 36.11 | 72.22 |
| Ser. | 78.25 | 96.36 | 48.18 | 30.07 | 60.14 |
| Glu. | 91.63 | 98.42 | 49.21 | 42.42 | 84.84 |
| Pro. | 88.18 | 98.61 | 49.31 | 38.87 | 77.74 |
| Gly. | 73.37 | 92.62 | 46.31 | 27.06 | 54.12 |
| Ala. | 80.62 | 95.00 | 47.50 | 33.12 | 66.24 |
| Cys. | - | - | - | - | - |
| Val. | 84.16 | 97.41 | 48.71 | 35.45 | 70.90 |
| Met. | 96.60 | 98.10 | 49.05 | 47.55 | 95.10 |
| Iso. | 86.60 | 97.43 | 48.72 | 37.88 | 75.76 |
| Leu. | 87.91 | 97.79 | 48.90 | 39.01 | 78.02 |
| Tyr. | 89.44 | 97.16 | 48.58 | 40.86 | 81.72 |
| Phe. | 86.74 | 97.68 | 48.84 | 37.90 | 75.80 |
| Lys. | 93.00 | 97.40 | 48.70 | 44.30 | 88.60 |
| His. | 93.97 | 97.81 | 48.91 | 45.06 | 90.12 |
| Arg. | 80.70 | 95.97 | 47.99 | 32.71 | 65.42 |
| Average of diges. | | | | | 75.72 |

Table 24. Amino acid digestibility of the fermented feather meal

Unit : DM %

| A. A. | Dig. of A.A. of standard diet with ground feather(A) | Dig. of A.A. of standard diet with casein(B) | B×50% (C) | Dig. of ground feather meal | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | (A-C) | (A-C)/50% |
| Asp. | 89.57 | 96.09 | 48.05 | 41.52 | 83.04 |
| Thr. | 89.44 | 94.58 | 47.29 | 42.15 | 84.30 |
| Ser. | 87.27 | 96.36 | 48.18 | 39.09 | 78.18 |
| Glu. | 94.05 | 98.42 | 49.21 | 44.84 | 89.68 |
| Pro. | 92.09 | 98.61 | 49.31 | 46.45 | 92.91 |
| Gly. | 79.07 | 92.62 | 46.31 | 32.76 | 65.52 |
| Ala. | 88.85 | 95.00 | 47.50 | 41.35 | 82.70 |
| Cys. | - | - | - | - | - |
| Val. | 88.63 | 97.41 | 48.71 | 39.92 | 79.84 |
| Met. | 97.13 | 98.10 | 49.05 | 48.08 | 96.16 |
| Iso. | 90.20 | 97.43 | 48.72 | 41.48 | 82.96 |
| Leu. | 91.41 | 97.79 | 48.90 | 42.51 | 85.02 |
| Tyr. | 93.01 | 97.16 | 48.58 | 44.43 | 88.86 |
| Phe. | 90.35 | 97.68 | 48.84 | 41.51 | 83.02 |
| Lys. | 89.59 | 97.40 | 48.70 | 40.89 | 81.78 |
| His. | 93.11 | 97.81 | 48.91 | 44.20 | 88.40 |
| Arg. | 86.42 | 95.97 | 47.99 | 38.43 | 76.86 |
| Average of diges. | | | | | 83.67 |

Table 25. Digestible amino acid of the ground feather meal(%)

| A. A. | A.A. of ground feather meal | Digestibility | Digestible amino acid of ground feather meal |
|---|---|---|---|
| Asp. | 4.73 | 77.08 | 3.65 |
| Thr. | 3.70 | 69.12 | 2.56 |
| Ser. | 6.58 | 48.56 | 3.20 |
| Glu. | 9.89 | 79.18 | 7.83 |
| Pro. | 8.80 | 72.02 | 6.34 |
| Gly. | 6.65 | 44.62 | 2.97 |
| Ala. | 4.54 | 59.84 | 2.72 |
| Cys. | - | - | - |
| Val. | 6.89 | 65.34 | 4.50 |
| Met. | 0.70 | 95.86 | 0.67 |
| Iso. | 4.47 | 70.48 | 3.15 |
| Leu. | 7.16 | 75.16 | 5.38 |
| Tyr. | 2.85 | 84.02 | 2.39 |
| Phe. | 4.97 | 72.32 | 3.59 |
| Lys. | 7.17 | 86.46 | 6.20 |
| His. | 1.43 | 89.88 | 1.29 |
| Arg. | 6.78 | 57.30 | 3.88 |
| Total | 87.31 | 71.70 | 60.32 |

표 25, 표 26 및 표 27은 가소화성 아미노산 함량(개개 아미노산 X 각 아미노산의 소화율)을 나타내는 것임.

Table 26. Digestible amino acid of the autoclaved feather meal(%)

| A. A. | A.A. of autoclaved feather meal | Digestibility | Digestible amino acid of autoclaved feather meal |
|---|---|---|---|
| Asp. | 6.12 | 74.84 | 4.58 |
| Thr. | 3.62 | 72.22 | 2.61 |
| Ser. | 6.97 | 60.14 | 4.19 |
| Glu. | 10.40 | 84.84 | 8.82 |
| Pro. | 9.73 | 77.74 | 7.56 |
| Gly. | 6.67 | 54.12 | 3.61 |
| Ala. | 4.76 | 66.24 | 3.15 |
| Cys. | - | - | - |
| Val. | 7.99 | 70.90 | 5.66 |
| Met. | 0.70 | 95.10 | 0.66 |
| Iso. | 4.75 | 75.76 | 3.60 |
| Leu. | 7.77 | 78.02 | 6.60 |
| Tyr. | 2.42 | 81.72 | 1.98 |
| Phe. | 4.81 | 75.80 | 3.65 |
| Lys. | 3.19 | 88.60 | 2.83 |
| His. | 0.65 | 90.12 | 0.59 |
| Arg. | 7.08 | 65.42 | 4.63 |
| Total | 87.71 | 75.72 | 64.18 |

Table 27. Digestible amino acid of the fermented feather meal(%)

| A. A. | A.A. of autoclaved feather meal | Digestibility | Digestible amino acid of autoclaved feather meal |
|---|---|---|---|
| Asp. | 5.24 | 83.04 | 4.35 |
| Thr. | 2.38 | 84.30 | 2.01 |
| Ser. | 4.45 | 78.18 | 3.48 |
| Glu. | 9.77 | 89.68 | 8.76 |
| Pro. | 9.90 | 92.91 | 9.20 |
| Gly. | 5.04 | 65.52 | 3.30 |
| Ala. | 4.37 | 82.70 | 3.61 |
| Cys. | - | - | - |
| Val. | 5.98 | 79.84 | 4.77 |
| Met. | 2.08 | 96.16 | 2.00 |
| Iso. | 3.80 | 82.96 | 3.15 |
| Leu. | 6.82 | 85.02 | 5.80 |
| Tyr. | 1.82 | 88.86 | 1.62 |
| Phe. | 3.91 | 83.02 | 3.25 |
| Lys. | 2.99 | 81.78 | 2.45 |
| His. | 2.46 | 88.40 | 2.17 |
| Arg. | 3.60 | 76.86 | 2.77 |
| Total | 74.61 | 83.67 | 62.69 |

Table 28. Amino acid digestibility of the ground feather meal, autoclaved feather meal, and fermented feather meal (%)

| A. A. | Control | Ground feather | Autoclaved feather | Fermented feather |
|---|---|---|---|---|
| Asp. | 96.09 | 77.08 | 74.84 | 83.04 |
| Thr. | 94.58 | 69.12 | 72.22 | 84.30 |
| Ser. | 96.36 | 48.56 | 60.14 | 78.18 |
| Glu. | 98.42 | 79.18 | 84.84 | 89.68 |
| Pro. | 98.61 | 72.02 | 77.74 | 92.91 |
| Gly. | 92.62 | 44.62 | 54.12 | 65.52 |
| Ala. | 95.00 | 59.84 | 66.24 | 82.70 |
| Cys. | - | - | - | - |
| Val. | 97.41 | 65.34 | 70.90 | 79.84 |
| Met. | 98.10 | 95.86 | 95.10 | 96.16 |
| Iso. | 97.43 | 70.48 | 75.76 | 82.96 |
| Leu. | 97.79 | 75.16 | 78.02 | 85.02 |
| Tyr. | 97.16 | 84.02 | 81.72 | 88.86 |
| Phe. | 97.68 | 72.32 | 75.80 | 83.02 |
| Lys. | 97.40 | 86.46 | 88.60 | 81.78 |
| His. | 97.81 | 89.88 | 90.12 | 88.40 |
| Arg. | 95.97 | 57.30 | 65.42 | 76.86 |
| Average | 96.78 | 71.70 | 75.72 | 83.67 |

Table 29. Digestible amino acid of the ground feather meal, autoclaved feather meal, and fermented feather meal (%)

| A. A. | Control | Ground feather | Autoclaved feather | Fermented feather |
|---|---|---|---|---|
| Asp. | 8.65 | 3.65 | 4.58 | 4.35 |
| Thr. | 2.53 | 2.56 | 2.61 | 2.01 |
| Ser. | 2.09 | 3.20 | 4.19 | 3.48 |
| Glu. | 17.88 | 7.83 | 8.82 | 8.76 |
| Pro. | 12.99 | 6.34 | 7.56 | 9.20 |
| Gly. | 1.51 | 2.97 | 3.61 | 3.30 |
| Ala. | 2.99 | 2.72 | 3.15 | 3.61 |
| Cys. | - | - | - | - |
| Val. | 6.18 | 4.50 | 5.66 | 4.77 |
| Met. | 2.76 | 0.67 | 0.66 | 2.00 |
| Iso. | 4.80 | 3.15 | 3.60 | 3.15 |
| Leu. | 8.94 | 5.38 | 6.06 | 5.80 |
| Tyr. | 4.15 | 2.39 | 1.98 | 1.62 |
| Phe. | 4.78 | 3.59 | 3.65 | 3.25 |
| Lys. | 8.57 | 6.20 | 2.83 | 2.45 |
| His. | 3.42 | 1.29 | 0.59 | 2.17 |
| Arg. | 4.57 | 3.88 | 4.63 | 2.77 |
| Average | 96.81 | 60.32 | 64.18 | 62.69 |

Table 16은 시험사료의 아미노산 함량(건물기준) 분석자료이다. 총아미노산에서 보는 바와 같이 대조구가 21.58%, 원료우모분(볼밀분쇄) 함유 시험사료구가 18.68%, autoclave한 우모분 함유 시험사료구가 19.67%, 발효처리한 우모분 함유 시험사료구가 18.83%로 분석됐다. 발효우모분 함유 시험사료의 아미노산 함량이 autoclave한 우모분 함유 시험사료의 개개의 아미노산 함량보다 전반적으로 낮은 경향을 나타냈다. 추측컨데 발효중에 미생물이 성장하면서 영양원으로 이용한 것으로 사료된다.

Table 17은 순수한 우모분 자체의 아미노산(건물기준) 함량 분석자료이다. 카제인은 glutamic acid 함량이 18.17%, proline이 13.17%로 높았으며, serine 2.17%, glycine 1.63%로 낮게 분석됐다. Aspartic acid는 9.00%, lysine은 8.80%, leucine 9.14%, methionine 2.18%로 분석됐다. Ball mill 로 분쇄한 우모분 역시 glutamic acid 함량이 9.89%, proline이 8.80%로 높았고, 대신에 histidine 1.43%, methionine 0.70%로 낮은 분석치를 보였다. Leucine 7.16%, lysine 7.17%, valine 6.89%, arginine 6.78%, glycine 6.65%, serine 6.58%로 분석돼 카제인과는 다른 아미노산 패턴을 보였다. 우모분 간에도 처리방법에 따라서 아미노산패턴이 다른데 오토크래브 처리한 우모분의 경우에 glutamic acid, proline, aspartic acid, valine, leucine, arginine은 증가된 반면에 histidine, lysine이 상대적으로 열처리 증자에 의해 감량을 보였다. 발효처리한 우모분은 그 전 단계에서 autoclave처리를 하기 때문에 오토크래브 처리한 아미노산과 비교해 보면, 대부분의 아미노산이 발효처리에 의해 함량이 감소된 것을 알수 있다. 특히 arginine, serine, threonine, valine, tyrosine, glycine 함량이 크게 감소 됐다. 총아미노산 함량을 비교해 보면 오토크래브한 우모분이 87.71%, 발효 우모분이 74.61%로 발효에 의해서 13.1%나 총아미노산이 감량됐음을 알 수 있다.

Table 18은 시험사료를 급여한 네 처리구에서 소화시험 기간중에 배설된

분(faeces)중의 아미노산 함량을 분석한 자료이다. 대조구인 카제인구는 총아미노산이 많이 생체내에서 이용돼서 9.74%만 분중으로 배설된데 비하여서, 분쇄우모분은 33.35%, 오토크래브한 우모분이 37.41%, 발효우모분중 아미노산이 24,88%나 분중으로 배설됐다. 우모분중에서 발효우모분급여구의 분중 아미노산이 상대적으로 낮다는 것은 생체내에서 이용율이 높다는 것을 의미한다.

Table 21은 시험사료의 아미노산 소화율을 측정한 자료이다. 대조구인 카제인 함유 시험사료의 각각의 아미노산 소화율은 모두 92% 이상인데 비하여서 분쇄우모분 함유 시험사료의 아미노산은 glycine 68.62%, serine 72.46%, arginine 76.64%, alanine 77.42%로 카제인구에 비해서 비교적 낮은 함량이며, methionine, tyrosine, lysine, histidine 만 90% 이상의 소화율을 나타냈다. 오토크래브 처리한 우모분 함유 시험사료의 아미노산 함량도 분쇄 우모분 함유 시험사료와 유사한 경향을 보였으나 serine과 glycine의 경우에 80% 이하의 소화율을 나타냈다. 발효우모분 함유 시험사료의 아미노산 소화율은 오토크래브 처리한 우모분함유 시험사료의 아미노산에 비해서 소화율이 개선됐음을 알 수 있다. 즉, 총아미노산 소화율을 비교해 보면 발효처리 우모분구가 90.02% 로 오토크래브 처리한 우모분 함유 시험사료의 아미노산소화율 86.26%에 비해 높다는 것을 알수 있다. lysine을 제외한 모든 아미노산 소화율이 높았다.

Table 22는 우모분 자체의 아미노산 소화율을 계산한 자료이다. 대조구인 표준사료에는 카제인이 20% 함유돼 있으나 우모분구는 카제인 10%와 우모분 10%로 총 단백질 급원의 50% 만을 우모분으로 물량기준 대치했기 때문에, 시험사료의 아미노산 소화율은 우모분과 카제인을 1:1로 급여해서 나온 자료이므로 우모분 자체의 아미노산만을 알기 위해서는 분리해서 계산해야 된다. 예를들면, aspartic acid의 경우를 들어보자. 카제인 함유 시험사료중

aspartic acid의 소화율은 96.09%로 측정됐지만 분쇄우모분 함유 시험사료중 aspartic acid의 소화율은 86.59%로 측정됐다. 표준 카제인구 aspartic acid소화율 96.09%는 분쇄우모분구에서는 50%만 카제인으로부터 온 것이므로 96.09 × 50% = 48.05 %가 카제인 아미노산 소화율에 해당된다. 따라서 분쇄우모분 자체의 아미노산소화율은 86.59 - 48.05 = 38.54 % 인데 이는 분쇄우모분 50%중의 aspartic acid 소화율이기 때문에 100%인 경우로 환산해 줘야 한다. 그값이 77.08%인 것이다. 즉 순수한 분쇄우모분 자체의 aspartic acid의 소화율이 77.08%란 말이다. 나머지 개개의 아미노산 소화율도 같은 방법으로 계산해 냈다.

Table 23에서는 autoclave 처리한 우모분 자체의 아미노산 소화율을 개개의 아미노산 별로 측정한 자료이며, Table 24에서는 발효처리한 우모분 자체의 아미노산 소화율을 개개의 아미노산 별로 측정한 자료이다. 계산법은 Table 22와 동일하다.

Table 28은 분쇄 우모분 자체, 오투크래브 처리한 우모분 자체, 발효처리한 우모분 자체의 개개 아미노산별 소화율을 측정한 결과를 한데 모은 자료이다. 분쇄한 우모분의 아미노산의 소화율의 경우에는 개개 아미노산 별로 소화율이 상당히 큰 차이를 보이고 있다. Methionine이 95.86%로 가장 좋고 histidine 89.88%, lysine 86.46%, tyrosine 84.02%로 80% 이상인데 비하여 serine은 48.56%, glycine 44.62%, alanine 59.84%, arginine 57.30%로서 60% 이하의 소화율을 나타낸 아미노산도 많았다. 오토크래브 처리한 우모분의 아미노산 소화율의 경우에는 분쇄우모분의 경우 보다 다소 개선됐으나, 역시 serine은 60.14%, glycine은 54.12%, alanine은 66.24%, arginine은 65.14%로 다른 아미노산들의 소화율에 비해서 상대적으로 낮은 수치였다. 그러나 이들 아미노산의 경우에는 분쇄우모분과 비교시에는 소화율이 크게 개선된 성적이다. 발효우모분의 아미노산 소화율의 경우에도 serine 78.18%, glycine

65.52%, valine 79.84%, arginine 76.86%로 상대적으로 낮은 소화율을 보였지만 이들 아미노산 소화율 역시 오토크래브 처리한 우모분의 소화율보다 크게 개선 됐음을 알 수 있다.

발효처리한 우모분의 아미노산 소화율은 lysine과 histidine만 제외하고는 전 아미노산에서 오토크래브 처리한 우모분의 아미노산 소화율 보다 크게 개선 됐다. 즉, 분쇄 우모분의 아미노산 평균 소화율은 71.71%, 오토크래브 처리한 우모분의 아미노산 평균 소화율은 75.72%, 원료 분쇄 우모분의 아미노산 평균 소화율은 83.67%로, 원료 분쇄 우모분의 아미노산 소화율을 100으로 봤을 때, 오토크래브 처리한 우모분의 아미노산 소화율은 106, 발효 처리한 우모분의 경우에는 117 단위의 소화율 증진 효과가 있었다.

우모 단백질에 관한 문헌을 보면 우모 단백질은 85-90%는 케라틴으로 구성되어 있고 특히 아미노산 균형이 이루어 지지않아 methionine, lysine, histidine, tryptophan 등이 부족하고,우모 단백질은 소화 이용율이 극히 낮아 이것이 사료가치를 떨어뜨리는 요인이 되고 있다 (한인규, 1989). 우모 케라틴의 구조를 보면 $\beta$-helix를 형성하는 펩타이드군은 수소 결합에 의해서 원통형 단위를 형성하고 이들은 다시 disulfide bond에 의하여 서로 결합되어 케이블과 같이 꼬여져 있기 때문에 물리, 화학적으로 안전성이 강하며 소화기관내에서 효소에 의해 쉽게 분해가 되지 않은다. 그러나 우모를 142-153℃ (40-60 psi)에서 30-60 분간 가압.가열하면

hydrogen bond는 물론 disulfidebond 도 쉽게 분해되어 비교적 간단한 펩타이드로 되며 이 경우에 단백질 이용성이 증가된다(한인규 1989). 본 시험에서 오토크래브처리나 발효 처리에 의해서 아미노산의 소화율이 증진된 것도 문헌에 보고된 기작에 의한 것으로 봐진다. 그러나 아미노산 소화율에 관한 문헌 보고는 거의 없어서 본시험에서 얻은 자료와 직접 비교 할 수는 없었다. 특히 관심이 되는 결과는 우모원료를 볼밀로 곱게 분쇄했을 때 아미노산

이용율이 71.7%로 높아졌다는 사실이다. 이점에 대해서는 앞으로도 계속 연구할 필요가 있다고 제안한다.

Table 29는 우모분의 가소화성 아미노산(digestible amino acid) 함량이다. 가소화성 아미노산은 우모분의 개개 아미노산 함량에다 개개 아미노산의 소화율을 곱해서 계산했다.

카제인의 평균 가소화 아미노산 함량은 96.81% 였으나 , 분쇄 우모분의 평균 가소화 아미노산 함량은 60.32%, 오토크래브 처리한 우모분의 평균 가소화 아미노산 함량은 64.18%, 발효 우모분의 평균 가소화 아미노산 함량은 62.69%로 측정됐다. 발효 우모분의 경우에 소화율이 높음에도 불구하고 평균 가소화 아미노산 함량이 낮은 이유는 발효 우모분 자체의 총 아미노산 함량이 74.61%로서, 분쇄우모분의 총 아미노산 함량이 87.41%나 오토크래브 처리한 우모분의 아미노산 함량 87.71%에 비해서 절대적으로 낮은데 기인된다고 볼 수 있다.

결론적으로 우모분은 볼밀(ball mill)로 분쇄하거나 오토크래브 처리하거나 발효처리를 통하여서 소화율을 개선 시킬 수 있다. 시중에 유통되고 있는 우모분은 거의 모두 오토크래브 처리한 우모분인데 본시험에서는 오토크래브 처리한 우모분의 아미노산 소화율은 75.72% 인데 비하여서 발효처리한 우모분의 아미노산의 소화율은 83.67%로 크게 개선된 성적을 얻었다.

# 제 4 장 식이단백질 가능성 검토

## 제 1 절 서 설

본 시험에 있어서는 단백질 함량은 매우 높지만 소화가 잘 안되는 우모의 특성을 살려 식이성 단백질의 제품에 적용하고자 실시하였다. 검토를 위하여 소화율이 가장 낮은 원모를 ball mill로 미세하게 분쇄하여 제조된 우모분을 여러 가지의 식품소재와 혼합하여 식이단백질의 가능성을 검토하였다. 또한 가공식품인 소시지 제조시에도 단백질원의 대체품으로 가능성을 검토하고자 실시하였다.

## 제 2 절 재료 및 방법

1. Dietary food 제조

본 시험에 있어서는 식이성 단백질의 검토를 위하여 소화율이 낮은 원모 중 ball mill로 미세하게 분쇄된 우모분을 여러 가지의 식품소재와 혼합을 하여 식이단백질의 가능성을 검토하였다. 여기에 사용된 원료들은 쌀가루를 95%로 하고 2.5%와 5% 수준에서 볶은 콩가루, 건조된 쇠고기 가루 및 건조 분쇄된 우모분을 첨가하여 제 1차 제조를 하였다(표 1).

Table 1. Formula of dietary food(1st phase)

| | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rice P. | 95 | 95 | 95 | 95 | 95 | 95 |
| Feather P. | 5 | 2.5 | 2.5 | - | - | - |
| Fried soybean P. | - | 2.5 | - | 5 | 2.5 | - |
| Dried beef P. | - | - | 2.5 | - | 2.5 | 5 |

2차년도까지의 결과를 토대로 단백질 함량은 높으며 소화율이 낮은 Ball mill 처리한 우모분을 다이어트 식품으로의 가능성을 관능검사를 통하여 검토하였다. 이때 3가지 형태로 행하였으며 그 배합비는 표 2, 표 3 및 표4 와 같다. 이때 관능검사 요원은 20명으로 실시하였고 관능검사는 표 6와 같이 실시하였다.

Table 2. Formula of dietary food using potato powder(2nd phase)

| Items \ Treatments | 145 | 334 | 226 | 910 | 505 | 767 | 190 | 280 | 730 | 668 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Potato P. | 950 | 900 | 950 | 900 | 950 | 900 | 950 | 900 | 950 | 900 |
| Feather P. | 50 | 100 | 25 | 50 | 25 | 50 | - | - | - | - |
| Fried soybean P. | - | - | 25 | 50 | - | - | 50 | 100 | - | - |
| Dried beef P. | - | - | - | - | 25 | 50 | - | - | 50 | 100 |

Table 3. Formula of dietary food using buckwheat powder(2nd phase)

| Items \ Treatments | 460 | 578 | 606 | 715 | 482 | 917 | 380 | 839 | 526 | 150 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Buckwheat P. | 950 | 900 | 950 | 900 | 950 | 900 | 950 | 900 | 950 | 900 |
| Feather P. | 50 | 100 | 25 | 50 | 25 | 50 | - | - | - | - |
| Fried soybean P. | - | - | 25 | 50 | - | - | 50 | 100 | - | - |
| Dried beef P. | - | - | - | - | 25 | 50 | - | - | 50 | 100 |

Table 4. Formula of dietary food using rice powder(2nd phase)

| Items \ Treatments | 301 | 569 | 638 | 109 | 247 | 253 | 316 | 966 | 459 | 647 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rice P. | 950 | 900 | 950 | 900 | 950 | 900 | 950 | 900 | 950 | 900 |
| Feather P. | 50 | 100 | 25 | 50 | 25 | 50 | - | - | - | - |
| Fried soybean P. | - | - | 25 | 50 | - | - | 50 | 100 | - | - |
| Dried beef P. | - | - | - | - | 25 | 50 | - | - | 50 | 100 |

2. Dietary 소시지 제조 시험

가. 소시지 제조

Ball mill로 분쇄된 원료 우모분 가지고 소시지를 제조하였다. 이때 배합비는 표 5와 같이하고 제조공정은 그림 1과 같이 하여 제조하였다. 소시지 제조 후 분석은 조직감, 색택, 관능검사, 가열수율 및 소화율을 측정하였다.

Table 3. Formula of dietary sausage with feather mill (unit : %)

| Materials | Tratment | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0% | 5% | 10% | 15% | 20% |
| Lean meat | 58.7 | 53.8 | 48.9 | 44.0 | 39.1 |
| Lard | 19.6 | 19.6 | 19.6 | 19.6 | 19.6 |
| Water | 19.6 | 23.2 | 26.9 | 30.6 | 34.3 |
| Feather meal | 0.0 | 1.2 | 2.4 | 3.6 | 4.8 |
| Mixed spice | 2.2 | 2.2 | 2.2 | 2.2 | 2.2 |
| Total | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Table 5.

관 능 검 사 표

일시 : 1998. . . 성명 :

ex) 채점방법

1 2 3 4 5 6 7 8 9

매우나쁘다 ← 보통이다 → 매우좋다

| | 569 | 109 | 253 | 966 | 647 |
|---|---|---|---|---|---|
| 색 깔 | | | | | |
| 향 | | | | | |
| 맛 | | | | | |
| 기호도 | | | | | |

대단히 감사합니다.

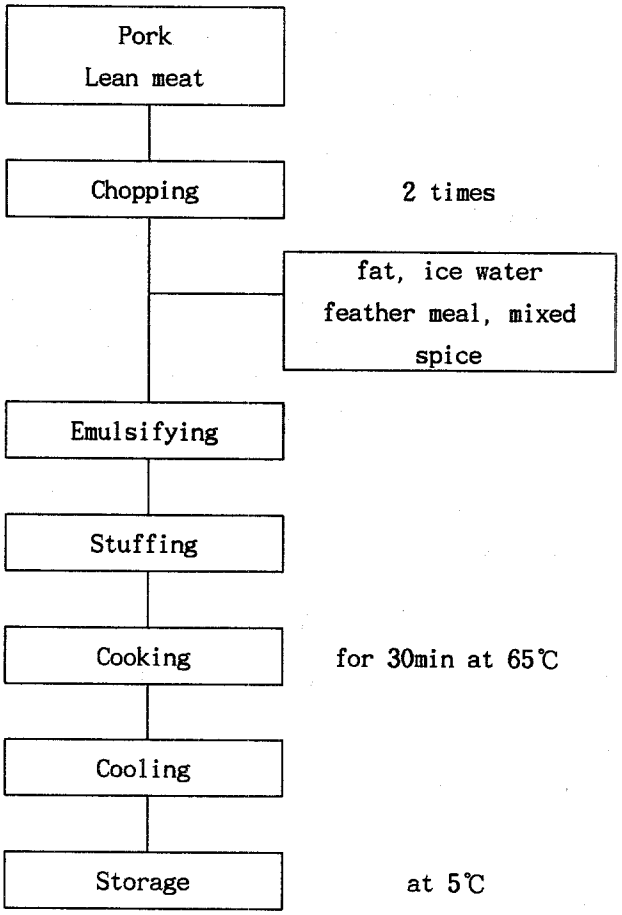



Fig 1. Procedure of sausage manufacturing

나. 분석항목

1) 소화율

수분과 지방을 제거한 시료를 취하여 단백질 함량을 kjeldahl을 사용하여 측정하였고, 동일시료를 0.4-0.5g를 취하여 AOAC(1980)의 pepsin digestibility 측정방법을 이용하여 0.2%의 pepsin 용액을 150ml 가하여 45℃

shaking water bath에서 16시간 교반하였다. 교반후 침전물이 생길 때까지 방치하였다가 여과(whatman No.4)한 후 여과지와 시료를 함께 60℃ oven에 건조한 후 kjedahl를 사용하여 남아 있는 단백질을 분석하여 아래의 계산방법에 의거 pepsin 소화율을 계산하였다. Pepsin 처리전 시료는 지방과 수분을 제거하여 같은 조건하에서 실시하였다.

$$\text{Pepsin 소화율(\%)} = \frac{\text{pepsin 처리전 protein함량(\%)} - \text{pepsin 처리후 protein함량(\%)}}{\text{pepsin 처리전 protein 함량(\%)}} \times 100$$

2) 가열수율

가열수율은 소시지 제조 후 무게를 측정하고 65℃에서 30분간 가열한 후 가열된 소시지의 casing을 벗겨낸다. Casing이 벗겨진 소시지의 무게와 casing의 무게를 측정하여 가열수율을 계산하였다.

3) 색택

소시지의 색택은 색차계(color difference meter, model No 600IV, Yasuda Seika Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 이때 표준색판은 L = 89.2, a = 0.921, b = 0.78로 하였다.

4) 조직감

소시지의 조직감 측정은 일정한 두께로 절단한 후 Texture analyzer (stable micro system Ltd., UK)를 사용하여 TPA(Texture profile analsis) test를 실시하였다. 이때의 조건은 표 6과 같으며 육의 전형적인 기계적 조직감 측정 시 texture profile은 그림 2와 같다.

Table 6. Texture measuring condition for TPA of sausage

| | |
|---|---|
| o Test speed | 1.0mm/s |
| . Pre test speed | 5.0mm/s |
| . Post test speed | 10mm/s |
| o Sample area | 506mm |
| o Probe diameter | 25.4mm |
| o Distance | 50% |
| o Time | 2.0s |

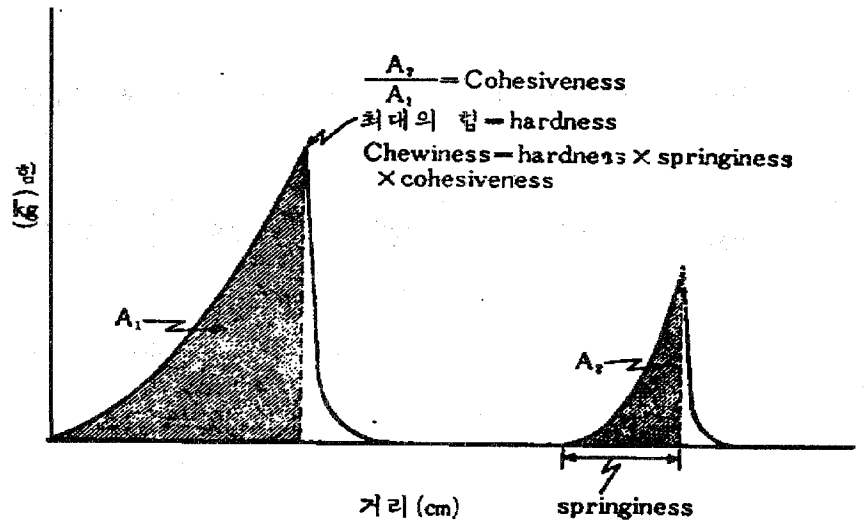



Fig 2. Typical texture profile curve of meat products

3) 관능검사

소시지의 관능검사는 사전 작성된 관능검사표에 따라 표 7과 같이 색택, 냄새, 맛, 조직감 및 기호도를 조사하였다. 평가는 9점법으로 하였다. 평가는

동일시료에 대해 날짜를 달리하여 평가시 처리구들의 배치는 실시때 마다 다르게 배치하여 3회에 걸쳐 실시하였으며 1회 평가시 15명씩의 평가요원들이 평가하였다.

Table 7

관 능 검 사 표

일시 : 1998. . . 성명 :

ex) 채점방법

1 2 3 4 5 6 7 8 9

매우나쁘다 ◀—— 보통이다 ——▶ 매우좋다

| | 362 | 109 | 235 | 875 | 432 |
|---|---|---|---|---|---|
| 색 깔 | | | | | |
| 향 | | | | | |
| 맛 | | | | | |
| 조직감 | | | | | |
| 기호도 | | | | | |

대단히 감사합니다.

## 제 3 절 결과 및 고찰

1. Dietary food 제조의 가능성

본 시험에 있어서는 식이성 단백질의 검토를 위하여 소화율이 낮은 원모중 ball mill로 미세하게 분쇄된 우모분을 여러 가지의 식품소재와 혼합을 하여 식이단백질의 가능성을 검토하였다. 여기에 사용된 원료들은 쌀가루를 95%로 하고 2.5%와 5% 수준에서 볶은 콩가루, 건조된 쇠고기 가루 및 건조 분쇄된 우모분을 첨가하여 제조를 하였다(표 1). 그 결과 제조물의 소화율과 관능검사의 결과는 표 8과 같다. 소화율에서는 케라틴 단백질이 첨가된 처리구들이 볶은 콩단백이나 건조된 쇠고기가 들어간 것보다 소화율이 낮게 나타나 단백질 함량은 높지만 소화가 덜 되어 체내 축적되지 않게 되는 것임을 알수 있었다. 또한 10명의 관능요원에 의해 평가된 결과 쌀가루와 쇠고기 혼합구가 거부감이 가장 적게 나타났지만 우모분이 혼합된 것도 거부감을 나타낸 비율에서 최고 30%까지 밖에 나타나지 않아 식이단백질로의 가능성을 충분히 제시하여 주고 있다.

Table 8. Comparison of pepsin digestibility of dietary food

| | A | B | C | D | E | F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pepsin digestibility | 65.28± 2.83 | 65.35± 7.03 | 70.57± 2.89 | 80.41± 2.30 | 79.38± 6.13 | 91.47± 6.29 |
| Sensory evaluation | Y : 20%<br>Y/N: 30%<br>N : 50% | Y : 10%<br>Y/N: 30%<br>N : 60% | Y : 30%<br>Y/N: 20%<br>N : 50% | Y : 0%<br>Y/N: 30%<br>N : 70% | Y : 30%<br>Y/N: 50%<br>N : 20% | Y : 10%<br>Y/N: 20%<br>N : 70% |

다이어트 식품으로의 가능성을 1차시험 결과 충분히 제시가 되었으므로 2차시험에서는 소화율이 낮은 원모중 ball mill로 미세하게 분쇄된 우모분을 여러 가지의 식품소재와 혼합을 하여 식이단백질의 가능성을 검토하였다. 여기에 사용된 원료들은 쌀가루, 메밀가루 및 찐 감자가루를 95%로 하고 2.5%와 5% 수준에서 볶은 콩가루, 건조된 쇠고기 가루 및 건조 분쇄된 우모분을 첨가하여 제조를 하였다(표 2, 표 3 및 표 4). 그 결과 제조물의 관능검사 결과는 표 9, 표 10 및 표 11과 같다.

감자가루를 주원료로 하여 제조한 죽의 관능검사 결과 각 처리구 모두 색깔에서 차이가 없었으며 메밀가루에서와 마찬가지로 쇠고기 가루가 첨가된 처리구들의 결과 냄새, 맛 및 기호도에서 모두 좋지 않은 결과를 나타내었다 ($p<0.05$). 감자를 주원료로 하여 제조된 죽의 관능검사 결과 감자 90%, 우모분 5% 및 콩가루 5%로 제조한 죽의 결과가 맛, 냄새 및 기호도면에 있어서 가장 우수한 결과를 나타내었다.

메밀가루를 주원료로하여 제조한 죽의 관능검사 결과 각 처리구 모두 색깔에서 차이가 없었다. 그러나 냄새, 맛 및 기호도에서 쇠고기가루가 첨가된 처리구 482, 917, 526 및 150 처리구가 좋지 않은 결과를 나타내었으며 ($p<0.05$) 콩단백이 첨가된 처리구들이 냄새, 맛 및 기호도면에서 우수하게 나타났지만 우모분이 첨가된 처리구와 유의차는 나타나지 않았다.

쌀가루를 주원료로 하여 제조한 죽의 관능검사 결과 감자가루 와 메밀가루로 제조한 것과 달리 색깔에 있어도 유의차를 보였으며($p<0.05$) 쌀가루 90%와 우모분 10% 처리구가 가장 우수하였다. 냄새면에 있어서도 우모분이 첨가된 처리구가 우수하다는 경향을 나타내었으며 쇠고기 가루가 첨가된 제조구에서는 색, 냄새, 맛 및 기호도면에서 나쁘다는 평을 받았다. 기호도 면에 있어서도 우모분 5% 및 콩가루 5%가 첨가된 것이 가장 우수하다는 결과를 나타내었다.

Table 9. Comparison of sensory evaluation of dietary food using potato powder

| Items / Samples | Colour | Flavor | Taste | Acceptability |
|---|---|---|---|---|
| 145 | 4.7 | $4.3^{bc}$ | $4.1^{abc}$ | $3.8^{abcd}$ |
| 226 | 5.2 | $4.5^{abc}$ | $4.0^{abc}$ | $3.9^{abcd}$ |
| 505 | 5.2 | $4.0^{bc}$ | $4.4^{ab}$ | $3.8^{abcd}$ |
| 190 | 4.7 | $4.9^{ab}$ | $4.3^{abc}$ | $4.2^{abc}$ |
| 730 | 4.3 | $3.3^{c}$ | $2.8^{c}$ | $2.7^{d}$ |
| | | | | |
| 334 | 4.6 | $4.8^{ab}$ | $4.8^{a}$ | $4.1^{abcd}$ |
| 910 | 5.3 | $5.7^{a}$ | $5.5^{a}$ | $5.1^{a}$ |
| 767 | 5.2 | $4.3^{bc}$ | $4.1^{abc}$ | $3.6^{bcd}$ |
| 280 | 5.3 | $5.3^{ab}$ | $5.3^{a}$ | $4.7^{ab}$ |
| 668 | 3.7 | $3.2^{c}$ | $3.1^{bc}$ | $3.1^{cd}$ |

Means with the same letters in the column are not significantly different at 5% level.

Table 10. Comparison of sensory evaluation of dietary food using buckwheat powder

| Items / Samples | Colour | Flavor | Taste | Acceptability |
|---|---|---|---|---|
| 460 | 6.4 | $5.3^{ab}$ | $4.9^{b}$ | $5.3^{abc}$ |
| 606 | 6.3 | $5.3^{ab}$ | $5.7^{ab}$ | $5.8^{ab}$ |
| 482 | 6.1 | $4.0^{b}$ | $5.7^{ab}$ | $5.1^{bc}$ |
| 380 | 6.1 | $6.1^{a}$ | $6.2^{a}$ | $6.2^{a}$ |
| 526 | 5.6 | $4.1^{b}$ | $4.9^{b}$ | $4.7^{c}$ |
| | | | | |
| 578 | 5.4 | $4.7^{bc}$ | $4.5^{ab}$ | $4.5^{b}$ |
| 715 | 5.4 | $5.4^{ab}$ | $5.2^{ab}$ | $5.3^{ab}$ |
| 917 | 4.8 | $3.9^{c}$ | $5.2^{ab}$ | $4.8^{ab}$ |
| 839 | 5.7 | $6.2^{a}$ | $5.7^{ab}$ | $5.7^{a}$ |
| 150 | 4.5 | $3.7^{c}$ | $5.0^{ab}$ | $4.4^{b}$ |

Means with the same letters in the column are not significantly different at 5% level.

Table 11. Comparison of sensory evaluation of dietary food using rice powder

| Items / Samples | Colour | Flavor | Taste | Acceptability |
|---|---|---|---|---|
| 301 | $6.7^{ab}$ | $5.8^{a}$ | $5.3^{abc}$ | $5.0^{bc}$ |
| 638 | $6.9^{ab}$ | $5.9^{a}$ | $6.2^{ab}$ | $6.1^{ab}$ |
| 247 | $5.9^{abc}$ | $5.1^{abc}$ | $6.3^{a}$ | $6.0^{ab}$ |
| 316 | $6.8^{ab}$ | $5.6^{ab}$ | $5.6^{abc}$ | $5.5^{abc}$ |
| 459 | $5.0^{cd}$ | $4.5^{bc}$ | $4.9^{bc}$ | $4.7^{cd}$ |
| | | | | |
| 569 | $7.1^{a}$ | $5.8^{a}$ | $6.0^{abc}$ | $5.8^{abc}$ |
| 109 | $6.7^{ab}$ | $5.7^{ab}$ | $6.1^{ab}$ | $6.3^{a}$ |
| 253 | $5.8^{bc}$ | $3.9^{cd}$ | $5.1^{abc}$ | $4.7^{cd}$ |
| 966 | $6.8^{ab}$ | $5.2^{ab}$ | $5.3^{abc}$ | $5.4^{abc}$ |
| 647 | $4.3^{d}$ | $3.1^{d}$ | $4.7^{c}$ | $3.9^{d}$ |

Means with the same letters in the column are not significantly different at 5% level.

Table 12. Comparison of chemical composition and pepsin digestibility of dietary food using various powder unit : %

| | Samples | Moisture | Protein | Pepsin digestibility |
|---|---|---|---|---|
| Potato | 334 | 89.1±0.41 | 2.05±0.07 | 55.21±2.67 |
| | 910 | 88.5±0.64 | 1.70±0.08 | 65.99±3.81 |
| | 767 | 89.4±0.15 | 1.69±0.01 | 69.96±0.86 |
| | 280 | 89.4±0.79 | 1.14±0.06 | 75.58±4.37 |
| | 668 | 89.8±1.65 | 1.70±0.13 | 84.78±3.65 |
| Buckwheat | 578 | 90.9±0.28 | 1.96±0.07 | 52.29±2.44 |
| | 715 | 91.0±0.74 | 1.80±0.01 | 64.85±0.55 |
| | 917 | 91.7±0.08 | 1.64±0.01 | 64.21±1.56 |
| | 839 | 90.5±0.38 | 1.53±0.00 | 81.60±4.83 |
| | 150 | 91.3±0.34 | 1.68±0.05 | 80.30±4.06 |
| Rice | 569 | 91.3±0.02 | 1.33±0.05 | 41.30±1.37 |
| | 109 | 91.4±0.11 | 1.10±0.02 | 59.91±2.10 |
| | 253 | 90.9±0.07 | 1.34±0.01 | 61.65±4.76 |
| | 966 | 91.3±0.04 | 0.94±0.07 | 68.47±2.29 |
| | 647 | 91.6±0.17 | 1.21±0.06 | 56.87±1.28 |

또한 각 부재료를 혼합하여 제조된 죽의 성분함량 및 소화율을 표 12에 나타내었다. 그 결과 수분 및 단백질 함량에 있어서 첨가구에 따른 차이가 없었으나 수분함량에 있어서 감자 첨가구 낮은 경향을 보였다. 소화율에서는 감자와 메 및 첨가구에서는 우모분이 첨가되지 암ㅎ은 것이 가장 높게 나타났다. 가장 낮게 나타난 첨가구는 감자와 우모분 100% 첨가구가 낮게 나타나 단백질 함량은 낮지만 체내에서 흡수가 되지않아 dietary 제품으로 가능성을 더욱 높여주었다.

2. Dietary 소시지 제조시험

제조된 소시지의 일반성분을 살펴보면 표 13과 같다. 수분함량의 첨가량에 따라 조금씩 차이는 있지만 전체적으로 66.58-68.85%의 범위를 나타내었다. 또한 단백질 함량에서는 12.82-14.78%의 범위를 지방함량에서는 15.81-20.58%의 범위를 회분은 1.50-1.68의 범위를 나타내었다. 또한 소시지 제조시 가열수율(표 14)에 있어서는 대조구가 98.86%였으며 각 첨가 농도별에 있어서는 차이가 없게 나타났다. 20% 대체구에서만 97.86%로 통계적 차이가 있었다($p<0.05$). 표 15는 우모분이 농도별로 첨가하여 제조된 소시지의 소화율을 나타낸 것으로 대조구의 소화율은 98.88% 였으나 첨가량에 따라 그 소화율은 감소를 하여 5%첨가구가 95.83%, 10%첨가구가 85.72%, 15% 첨가구가 82.28% 및 20% 첨가구는 74.13%로 첨가량이 증가함에 따라 소화율은 감소하는 경향이 있어 dietary 소시지로서의 가능성을 한층더 높여주었다. 이때 우모분이 첨가된 소시지의 색택(표 16)에서 lightness에서 0% 와 20% 대체구는 차이가 없었다. 5% 대체구가 69.71로 가장 낮아 상대적으로 어두운 색을 띄고 있다고 할 수 있다. 반면 redness에서는 대조구가 5.49, 5% 대체구가 4.94로 통계적 차이는 없었으나 10% 이상 대체구에서는 5%의 유의차가 나타났다. 조직감(표 17)에 있어서는 springiness, gumminness, cohosiveness, hardness 및 chewiness 각 항목에서 feather meal 대체량이 많을수록 감소하는 경향을 보였다($p<0.05$). 관능검사(표 18)에서는 색택에 있어서는 대조구와 5%첨가구간 차이가 없었다. 그러나 10% 이상 대체구는 각각의 대체구에서 5%의 유의차를 보였다. 맛에 있어서는 5%의 4.55 와 10%구의 4.73으로 차이가 없었으나 대조구의 6.73 보다 낮게 나타났다. 조직감 및 기호도에서 각 처리구간 유사한 결과를 나타냈지만 10% 대체 소시지 단백질 함량에 대해 10%까지 대체 가능성을 제시할 수 있었다.

Table 13. Chemical composition of dietary sausage

%

| Treatment | Moisture | C. protein | C. fat | Ash |
|---|---|---|---|---|
| 0% | 67.14±0.09$^{ab}$ | 13.43±0.23$^{b}$ | 17.4±0.07$^{b}$ | 1.63±0.03$^{ab}$ |
| 5% | 66.59±0.31$^{b}$ | 12.99±0.30$^{c}$ | 20.58±2.84$^{a}$ | 1.58±0.01$^{b}$ |
| 10% | 66.95±0.12$^{b}$ | 12.82±0.03$^{c}$ | 18.33±0.70$^{ab}$ | 1.69±0.06$^{a}$ |
| 15% | 68.85±0.24$^{a}$ | 13.4±0.05$^{b}$ | 15.91±0.42$^{b}$ | 1.50±0.03$^{c}$ |
| 20% | 67.63±2.04$^{ab}$ | 14.78±0.07$^{a}$ | 16.60±0.31$^{b}$ | 1.51±0.03$^{c}$ |

Table 14. Cooking yield of processed sausage with feather meal

| | 0% | 5% | 10% | 15% | 20% |
|---|---|---|---|---|---|
| Cooking yield(%) | 98.86± 0.72$^{a}$ | 98.98± 0.68$^{a}$ | 98.64± 0.66$^{ab}$ | 98.56± 0.62$^{ab}$ | 97.86± 0.63$^{b}$ |

Table 15. Pepsin digestibility of dietary sausage

%

| | 0% | 5% | 10% | 15% | 20% |
|---|---|---|---|---|---|
| Pepsin digestibility(%) | 98.88± 1.12$^{a}$ | 95.93± 1.09$^{a}$ | 85.72± 2.56$^{b}$ | 82.29± 7.03$^{bc}$ | 74.13± 8.57$^{c}$ |

Table 16. Color of processed sausage with feather meal using color difference meter

| Treatment | Lightness(L value) | Redness(a value) | Yellowness(b value) |
|---|---|---|---|
| 0% | 72.48±0.77[a] | 5.49±0.89[a] | 12.36±0.99[c] |
| 5% | 69.71±0.75[c] | 4.94±0.71[a] | 11.99±0.92[c] |
| 10% | 71.12±0.31[b] | 3.45±0.78[b] | 12.24±0.93[b] |
| 15% | 71.49±0.60[b] | 3.17±0.56[b] | 13.43±0.67[b] |
| 20% | 72.43±1.17[a] | 0.19±0.54[c] | 15.51±0.87[a] |

Table 17. Texture analysis of processed sausage with feather meal

| Treatment | spinginess | gumminess | cohesiveness | hardness | chewiness |
|---|---|---|---|---|---|
| 0% | 0.912± 0.021[a] | 1022.1± 51.6[a] | 0.475± 0.007[a] | 2151.0± 130.1[a] | 931.7± 45.9[a] |
| 5% | 0.908± 0.012[a] | 767.3± 47.0[b] | 0.443± 0.010[b] | 1732.0± 109.1[b] | 696.4± 37.3[b] |
| 10% | 0.889± 0.023[a] | 512.3± 45.5[c] | 0.426± 0.014[c] | 1206.2± 135.4[c] | 456.5± 53.4[c] |
| 15% | 0.823± 0.038[b] | 504.8± 34.9[c] | 0.429± 0.015[c] | 1177.1± 74.3[c] | 415.9± 43.2[c] |
| 20% | 0.807± 0.050[b] | 334.6± 30.0[d] | 0.391± 0.010[d] | 856.8± 79.4[d] | 270.5± 33.6[d] |

Table 18. Sensory evaluation of processed sausage with feather meal

| Treatment | Color | Odor | Taste | Texture | Acceptability |
|---|---|---|---|---|---|
| 0% | 6.64± 1.43$^{a}$ | 6.73± 1.56$^{a}$ | 6.73± 1.42$^{a}$ | 7.55± 0.82$^{a}$ | 7.18± 1.25$^{a}$ |
| 5% | 6.18± 1.25$^{ab}$ | 4.82± 1.33$^{b}$ | 4.55± 1.13$^{b}$ | 4.82± 1.54$^{b}$ | 4.86± 1.25$^{b}$ |
| 10% | 5.18± 1.40$^{bc}$ | 4.18± 1.66$^{b}$ | 4.73± 1.42$^{b}$ | 3.91± 1.04$^{bc}$ | 4.18± 1.25$^{bc}$ |
| 15% | 4.55± 1.44$^{c}$ | 4.27± 1.49$^{b}$ | 4.27± 1.19$^{bc}$ | 3.64± 0.67$^{c}$ | 3.73± 0.79$^{c}$ |
| 20% | 2.73± 1.68$^{c}$ | 3.55± 1.13$^{b}$ | 3.27± 1.49$^{c}$ | 2.27± 1.35$^{d}$ | 2.36± 1.12$^{d}$ |

# 제 5 장 참고문헌


1. Baker, D.H., R.C. Blitenthal, K.P.Boebel,G.L. Czarnecki, L.L.Southern and G.M. Willis. 1981. Protein- amino acid evaluation of steam processed feather meal. Poultry Science 60 : 1865 - 1872

2. Burgos, A., J. I. Floyd and E.L. Stephenson. 1974. The amino acid content and availability of different samples of poultry by-product meal and feather meal. Poultry Sci. 53: 198- 203

3. Cherry, J.P., G.Y.Young, and A.L.Shewfelt. 1976. Patented procedure produces protein isolates from feathers. Food Product Development 10: 109

4. Harms, R.H. and O.E. Goff. 1957. Feather meal in hen nutriton. Poultry Sci. 35: 234-235

5. Lillie, R.J., J.R. Sizemore and C.A. Denton. 1956. Feather meal in chick nutrition. Poultry Sci. 35 : 316-318

6. Lin, X., C.C. Lee, E.S.Casle, and Jason C. H. Shih 1992. Purification and characterization of a keratinase from a feather- degrading bacillus licheniformis strain. Applied and Environmental Microbiology 58: 3271 - 3275

7. Loung , V.B.and C.G.Payne. 1977. Hydrolyzed feather protein as a source of amino acids for laying hens. Br. Poult.Sci. 18 : 523 - 526

8. McCasland, W.E. and L.R. Richardson. 1966. Methods for determining

the nutritive value of feather meals. Poultry Sci. 45 : 1231- 1236

9. McKerns,K.W. and E.Rittersporn. 1958. The nutritional significance of processed keratin in poultry feeding. Poultry Sci. 37 : 433- 436

10. Molyneaux, H.H.1959. The digestion of wool by a keratinolytic Bacillus. Aust.J. Biol. Sci. 12 : 274- 278

11. Moran, E.T.Jr., J.D.Summers and S.J.Slinger. 1966. Amino acid inbalance : The cause for inferior performance of chicks fed feather meal rations. Poultry Sci. 45: 1107

12. Moran,E.T., J.D.Summers and S.J.Slinger. 1966. Keratin as sources of protein for the growing chicks. 1. Amino acid inbalance as the cause for inferior perfotmance of feather meal and the implication of disulfide bonding in raw feather as the reason for digestibility. Poultry Sci. 45: 1257- 1266

13. Morris, W.C. and S.L.Balloun. 1971. Effect of processing methods on the utilization of hydrolyzed feather meal by broilers. Poultry Sci. 50 : 1609

14. Naber,E.C. and C.L. Morgan. 1955. Feather meal and poultry meal scrap in chick starting rations. poultry Sci. 35 : 888 _ 895

15. Naber,E.C.,S.P.Toucjburn, B.D. Barnett and C.L.Morgan. 1961. Effect of processing methods and amino acid supplementation of feather protein on dietary utilization by the chick. Poultry Sci. 1234-1245

16 Noval, J., and W.J. Nickerson. 1959. Decomposition of naive keratin by

Streptomyces fradiae. J.Bacteriol. 77 : 251-263

17. Romoser, G.L. 1955. Studies on feather meal, poulrty by-products meal and methionine in broiler rations. Proc. Univ. Maorryland Nutrition Conference. 41- 46

18. Shih, J.C. 1993. Recent develpopment in poultry waste digestion and feather utilization - A Review. Poultry Sci. 72: 1617 -1620

19. Papadopoulos, M.C. 1985. Processed chicken feathers as feedstuff for poultry and swine. A Review. Agricultural Wastes 14 : 275- 290

20 Sen Gupta, S.R., S.S.Nigam, and R.N.Tandan, 1950. A new wool degrading fungus- Ctenomyces.Text. Res. J. 20: 671 -675

21. Sibbald,I.R., S.J.Slinger and W.F.Peppers. 1962. The utilization of hydrolyzed feather mel by growing chicks. Poultry Sci. 41 : 844- 849

22. Stephens, J.F., J.K.Bletner and O.E.Goff. 1959. Fraction of hydrolyzed feather meal in broiler diets. Poultry Sci. 38: 1249

23. Sullivan,T.W., and E.L.Stephenson. 1957. Effect of processing methods on the utilization of hydro;yzed poultry feathers by growing chicks. Poultry Sci. 36 : 819-825

24. Thomas, V.M., and W.M. Beeson. 1977. Feather meal and hair meal as protein sources for steer calves. J. Anlmal Sci. 46: 819-825

25. Tsan,S.T.L.,E.L.Mckee,G.P.Andrews,C.W.Winslade, R.L.Steinhauser and H.A. Windor. 1963. The utilization of hydrolyzed poultry feathers in

isonitrogenous and isocaloric broiler rations. Poultry Sci. 42 : 1369-1372

26. Wessels, J.P.H. 1972. A study of the protein quality of different feather meals. Poultry Sci. 51: 537- 541

27. Williams,C.M., C.S.Richter, J.M.MacKenzie, JR.,and Jason C.H.Shih. 1990. Isolation, identification, and chracterization of a feather-degrading bacterium. Applied and Environmental Microbiology 56: 1509 - 1515

28. Williams, C.M., C.G. Lee, J.D.Garlich, and Jason C.H.Shih. 1991. Evaluation of a bacterial fermentation product, feather- lysate, as a fed protein. Poultry Sci. 70:85-94

29. Woodgate, S.L.and B.K.Vreeburg. 1996. Nutitional evaluation of enzyme processed feather protein. Proceedings of The 8th AAAP Animal Science Congress (Japan)pp.218-219

30. Wray, M.I., W.M.Beeson, T.W.Perry, M.T.Mohler and E. Baugh. 1979. Effect of soybean, feather and hair meals and fat on the performance of growing -finishing beef cattle. J. Animal Sci. 48: 748 - 757

31. 김 춘수, 강유성, 지규만. 1972. 우모분과 모발분의 사료적 가치 비교 시험. 한축지 14: 55-60

32. 박홍석, 이남형. 1970. 초생추 사료의 외산 어분에 대한 국산 어분, 우모분 및 혈분의 대치 효과. 한축지 12: 334- 338

33. 이영철, 1970. 간이처리에 의한 우모분이 병아리 성장에 미치는 영향 (1).

한축지. 12:202-206

34. 이영철. 1972. 우모분 사료가 부로일러 증체에 미치는 영향 (2). 한축지 : 36- 40

35. 지규만, 김춘수 1971. 우모분의 사료적 가치에 관한 연구. 한축지 13: 49-52

# 여 백

# 협동연구 보고서

연 구 과 제 : 수출형 고품질 우모분 제조 및
캐라틴테 단백질 개발

협동연구과제 : 발효우모분 생산 및 이용

협동연구기관 : 강원대학교

연구책임자 : 안 철

연 구 기 간 : 1995.12.16 ~ 1998.11.30 ( 3 년)

# 여 백

# 요 약 문

Ⅰ. 제 목

우모분해세균의 탐색 및 동정(1차년도)

우모분해세균의 산업화 기술 개발 연구(2차 및 3차년도)

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 한국 양계 축산업계의 현장애로사항 중의 하나는 양계 분뇨 중의 우모 및 우모분(feather waste)으로서 이들은 그 난분해성(poor digestibility)으로 인해 퇴비 혹은 자원화를 저해하는 원인이 될 뿐만 아니라 기타 농업 유용자원으로의 재활용을 방해하는 가장 장애요인이 되고 있다. 이러한 양계 우모는 특히 이들이 단시간에 대량으로 발생하는 계육 가공 공장의 경우 매우 심각하여 이의 처리비용이 결국 생산단가 및 부대비용을 높이는 원인이 되고 있다.

현재 이러한 우모의 난분해성을 해결하기 위해 가장 일반적으로 사용되는 방법은 우모 및 우모분의 열처리(autoclaving) 및 화학적 처리로써 121℃에서 우모분을 처리하여 분해성을 높인 후 NaOH 등에 의해 화학적으로 분해하는 방법인 바, 분리·수거된 우모의 feather-meal로의 이용은 가능하나 산업적 규모로의 응용에는 제한적일 수밖에 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 우모의 주성분인 keratin을 효율적으로 분해할 수 있는 우모분해세균을 분리하여 이를 동정하고 그 산업적 응용을 위한 기술을 개발함을 일차적 목적으로 하여 생물학적 처리에 의한 우모의 효율적 처리와 그 분해산물인 아미노산 등의 유용 사료화를 도모함으로써 궁극적으로는 농업 현장의 문제점 해결과 경제성 제고에 기여하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

上記의 연구 목적을 달성하기 위해 본 연구는 9단계의 세부 목표를 설정하여 진행되었는 바,

1. 우모 및 우모분을 분해할 수 있는 능력을 가진 세균을 자연상태로부터 분리하고,
2. 분리된 우모분해성 세균을 산업적으로 유효한 수준까지 그 분해성을 증진시키며,
3. 선별된 우모 분해균을 동정하여 균의 특성을 분자생리학적 수준에서 정의하고,

이를 바탕으로 이차적으로는 이들 균주를 산업 현장에서 유용한 미생물 자원화하기 위해

4. 우모분해균주의 생육특성을 검색하여 최대 생산을 위한 영양·생육조건을 검토하며
5. 세포 내에서의 우모분해 효소의 세포내 혹은 세포막내 所在를 분석하고
6. 궁극적으로는 발효우모분의 생산 가능성을 타진하며,

이러한 2단계의 성공적인 실험 결과를 기초로 하여 3차년도에는

7. 산업화 대상 우모분해균이 분비하는 효소의 산업화 분자 특성을 정확히 규명하고,
8. 이 유용 우모분해효소의 유전적 특성을 분석, 유용효소의 응용범위를 넓힘으로써
9. 궁극적으로는 균체 및 효소에 의한 우모분해 산업화 공정을 개발하고자 하였다.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

위의 9단계별 세부 연구목표별 연구개발 결과는 다음과 같다.

1. 우모분해세균의 탐색: 총 360균주를 양계장의 폐기분뇨 토양으로부터 순수 분리하여 이중 우모분해능을 보인 50균주(FDB: Feather-Degrading Bacteria로 명명)를 별도 분리하였으며, 이들 FDB균주를 다시 정밀 배양과정을 거쳐 매우 우수한 우모분해능을 보유하고 있는 20균주 및 양호한 분해능을 보유하고 있는 균주 9균주 등 총 29종의 산업화 가능 균주를 분리하였다.

2. 우모분해성능 증진을 위한 세균의 적응 실험: 이들 산업화가 가능하다고 판단되는 FDB균주 29주를 임의 선정하여 지속적인 enrichment culturing에 의하여 그 분해능의 상승을 도모하였으며 이중 가장 안정된 growth pattern을 보인 FDB11-11에 대해 최적 조건을 산정하였다(pH7.0 at 45℃).

3. 최종선별된 우모분해세균의 동정: 산업화 가능 29종의 FDB균주에 대해 생리·생화학적 실험 및 전자현미경 등에 의한 morphological test를 시행한 결과 *Alkaligenes* spp.로 동정되었다.

4. 우모분 케라틴 분해균주의 최적 생육특성 시험: 제1차년도에서 개발된 균주 중 산업적 유용성이 뛰어날 것으로 판단된 15균주에 대해 효소활성 및 탄소동화실험을 행하여 최우수균주로 FDB 11-11을 선정하였으며, 이 최우수균주의 생육최적조건 및 효소 생산 최적조건을 규명하였다(45℃, pH8.5, feather 1% as feather meal).

5. 우모 분해효소의 국재성: 배양액 및 ammonium sulfate 침전 분획물의 SDS-PAGE 결과 우모분해효소(keratinase)는 세포외로 분비되어 배지내에 축적되는 효소임을 확인하였으며 그 생산이 feather에 의해 induction되는 분자량 21,000-31,000 dalton 사이의 효소임을 규명하였고, 효소의 활성 최적조건이 pH8.0, 37℃임과 효소의 활성부위에 active serine이 있음을 규명하였다.

6. 발효우모분 생산실험: FDB11-11 균주를 대량 배양하여 feather에 처리한 후 이를 45℃에서 9일간 발효시켜 우모분을 제조하였으며 그 소화흡수율의 증대효과를 규명하였다. 한편 FDB11-11의 활성에 미치는 우모분의 양, 기존 상업적 제품에 대한 FDB11-11균주의 활성을 기타 균주와 비교측정한 결과 FDB11-11균주가 가장 우수하였다.

7. 우모분해효소의 산업화 분자특성 연구: FDB11-11 균주로부터 대량으로 부분정제한 효소의 열안정성은 70℃ 에서 60%, 100C에서 30%의 잔류활성을 보였으며, pH5 - pH 7 사이에서 가장 안정되었으나 pH 8 - pH 9에서도 60%의 잔류 활성을 나타내었고, 9종의 산업적 유기용매 중 ethanol에서 가장 안정한 반면 ethyl acetate에 가장 취약하였다.

8. 우모분해효소의 유전특성연구: FDB11-11의 우모분해효소 유전자는 chromosome에 소재하였으며, *Bacillus licheniformis*의 keratinase로부터 제조한 probe(5'-CAACCGTTCCTTACGGCATTCCTC-3')에 의해 PCR detection되지 않았다.

9. 산업화 공정 개발: 산업화 가능한 최적 발효 starter를 개발하기 위하여 FDB11-11균주와 FDB 21-6, FDB24-1, FDB26-1 균주를 단독 혹은 혼합 배양하여 우모분해능을 조사한 결과 FDB11-11균주와 FDB26-1 균주를 동시 접종한 starter가 가장 우수하였으며, 산업화 공정 중 starter 도입 최적점을 판단하기 위한 feather 및 feather meal 발효 시험 결과 별 차이가 없어 혼합 starter는 milling 공정 전후에 공히 투입 가능한 것으로 판단되었다.

본 연구에서 개발된 FDB11-11 균주를 포함한 29종의 우모분해균 및 연구자료는 즉각적으로

1) 양계 축산농가의 우모 혼합분뇨의 효율적 처리를 위한 생물학적 처리제로

활용될 수 있으며,

2) 처리된 우모분뇨의 퇴비 자원화 미생물제제로 활용될 수 있을 뿐만 아니라,

3) 분리 수거된 우모를 분해하여 소화 흡수율 높은 사료첨가용 아미노산 자원화하는 생물학적 변환제(biological converter)로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

# 여 백

# SUMMARY

1. Title: · Isolation and identification of feather-degrading bacteria(1st year of research)
· Studies for industrialization of feather-degrading bacteria isolated from soil(2nd and 3rd year of research)

2. Objectives and importance of the research:

One of the major problems of the broiler industry of Korea has been the feather wastes, poor digestibility of which worked as invincible barriers in the reutilzation of the waste material for the agricultural fertilizers or industrial resources. General approaches to solve the poor digestibility of feather waste were the autoclaving of the waste feathers and subsequent treatment by chemicals using NaOH. However, the scope of technical application of the methods was limited due to its difficulties in scaling-up.

Therefore, we tried to develope new biological methods to solve the practical problems of previous methods by isolating/identifying feather-degrading bacteria from soil and by using them as biological degraders of industrial feather waste. We also tried to develope practical methods to utilize the product of biological digestion, feather mill, as effective feed.

3. Scope of research

To accomodate research objectives stated above, the scope of this study comprised 9 research steps.

1) Isolation of bacteria which had feather-degrading ability
2) Enhancing microbial digestibility of feathers upto the industrially effective level
3) Identification of the bacteria

4) Assessing the optimal condition of growth and activity production of feather-degrading bacteria(FDB)
5) Location of keratinolytic enzyme in the bacterial cell
6) Assessing the conditions for the activity production
7) Defining molecular characteristics of keratinolytic enzymes at the industrial level
8) Characterization of the genetic properties of the keratinolytic enzymes
9) Development of industrial procedures to digest feather wastes

4. Results and recommendations

1) Isolation of bacteria which had feather-degrading ability:
360 strains of bacteria were isolated from feather waste and soils, and tested for their feather-degrading ability. Among 50 strains which showed good feather-degrading ability, 29 strains were finally selected for their excellent feather-degrading ability.

2) Enhancing microbial digestibility of feathers upto the industrially effective level :
Enrichment culturing was carried out for the selected 29 strains of FDB, and strain FDB11-11 which exhibited the most stable growth pattern in the feather-enriched media was assessed for its optimal growth conditions(pH7.0 at 45C)

3) Identification of the bacteria:
Selected 29 strains of FDB were identified as *Alkaligenes* spp. by biochemical and physiological tests as well as morphological observation with electron microscope.

4) Assessing the optimal condition of growth and activity production of

feather-degrading bacteria(FDB):
The optimal condition of growth and production of keratinolytic activity of FDB strain 11-11 was 45C in temperature, 1% in feather meal content, and pH8.5.

5) Location of keratinolytic enzyme in the bacterial cell:
Upon SDS-PAGE of culture supernatants and its ammonium sulfate precipitates confirmed that the enzyme was extracellularly secreted protein, and that it was inducible by presence of feathers in the media. The apparent molecular weight of the enzyme was calibrated between 21,000 and 31,000 dal. The enzymatic activity of the keratinase was optimal at pH8.0, 37C. There was active serine at the active site of the enzyme.

6) Assessing the conditions for the activity production and feather meal:
Feather meal was produced by fermentation of feather waste with the strain FDB11-11 at 45C for 9 days, digestibility of the feather meal was assessed. The effects of concentration of the fermented feather meal and sources of the feather meal including commercially available ones on the production of enzyme activity of the strain FDB11-11 were monitored.

7) Defining molecular characteristics of keratinolytic enzymes at the industrial level:
Thermostability of partially purified keratinase from the strain FDB11-11 was remarkable; 30% of total activity survived 100C. It was stable between pH 5.0 and 7.0, while 60% of activity remained at pH 8.0 to 9.0. The enzyme activity was stable in ethanol, while it was very unstable in ethyl acetate.

8) Characterization of the genetic properties of the keratinolytic enzymes:
The genetic determinant of keratinase was located on the chromosomal

DNA. However, 5'-CAACCGTTCCTTACGGCATTCCTC-3' which was prepared from DNA sequence of keratinase from *Bacillus licheniformis* did not produce any detectable DNA on PCR.

9) Development of industrial procedures to digest feather wastes:
In order to develope the optimal starter cultures for the industrial uses, combinatorially mixed cultures of the strain FDB11-11 with the strain FDB21-6, FDB24-1, and FDB26-1 were prepared and tested for their feather digestibility. The best result in fermentability was obtained by the mixed starter culture of FDB11-11 with FDB26-1.

These research results will be immediately applied in the industrial fields as follws:

1) development of biological reagents to ferment mixed waste of feather and other products,
2) develpment of microbial fertilizer
3) development of biological converter of feather into easily digestible feed.

# 목 차

제 1 장 서론 ..... 153

제 1 절 연구 목적 및 필요성 ..... 153
제 2 절 연차별 세부 연구 목표 및 내용 ..... 155

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ..... 157

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 ..... 159

제 1 절 연구 내용 ..... 159
제 2 절 연구 결과 ..... 163

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도 ..... 239

제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획 ..... 241

# 여 백

# 제 1 장 서론

## 제 1 절 연구 목적 및 필요성

축산분야의 국제적 경쟁력 획득이 곧 축산농가와 국가의 생존전략의 주요한 기반이 되는 현재의 시장경제 논리의 연장선상에서 축산자원의 효율적 이용은 현대 축산업의 당면과제이자 현안의 하나인 환경보전형 축산업의 所要와 불가분의 관계에 있으며, 따라서 폐자원으로서의 우모분의 재활용 및 효율적 자원화를 위한 실질적 방안으로 그 분해미생물의 분리 및 동정, 산업화 기술을 모색하고자 하는데 본 연구의 일차적 動因이 있다. 이러한 환경보전형 축산업이란 새로운 축산개념은, 축산농가의 소득증대를 위해 양축 頭數를 증가시킴에 따라 필연적으로 발생하는 다량의 축산 분뇨를 처리하기 위해 이를 액비 또는 퇴비화함으로서 오히려 자원화하자는 것으로써, 농림부의 축산업관계 정책의 주요목표(專業化, 團地化, 系列化를 통한 경쟁력 제고와 환경보전형 축산업 육성, 1995년도 주요농정시책, 1995. 1., 농림수산부, p9-10)로도 설정되어 있는 바, 그 구체적 실천방안으로 첫째 가축 분뇨 및 폐기물의 퇴비화 촉진을 위한 제도 개선을 추진하고, 둘째 발효 퇴비의 생산 및 유통 활성화를 통한 퇴비화 기술을 개발할 것을 권장하고 있다.

이러한 정부의 축산 시책을 수용하기 위해 각 축산업계와 축산농가들은 각기 축산분뇨 및 폐기물의 자원화를 위해 적극 노력하고 있다. 그러나 현재 한국 축산 및 특히 양계업계의 현장애로사항 중의 하나는 양계 분뇨 중의 우모 및 우모분(hair and feather waste)으로서 이들은 그 난분해성(poor digestibility)으로 인해 퇴비 혹은 자원화를 저해하는 원인이 될 뿐만 아니라 기타 농업 유통자원으로의 재활용을 방해하는 가장 큰 애로사항화하고 있다. 이러한 양계 우모는 특히 이들이 단시간에 대량으로 발생하는 계육 가공 공장의 경우 매우 심각하여 이의 처리비용이 결국 생산단가 및 부대비용을 높이는 원인이 되고 있다.

이러한 양계 분뇨 혹은 도계장에서의 우모의 난분해성으로 인한 문제점은 년간 100만톤 내지 120만톤의 양계 폐기물이 발생하는 미국의 축산업

계에서도 이미 동일한 애로사항으로 제기되어 환경오염 및 공중보건의 저해 요인으로 지적된 바 있으며, 문제의 핵심이 되고 있는 우모의 난분해성을 해결하기 위한 노력이 80년대부터 꾸준히 시도되어 왔다. 그러나 현재까지 가장 많이 이용되고 있는 방법은 우모 및 우모분의 열처리(autoclaving) 및 화학적 처리로써 121℃에서 우모분을 처리하여 분해성을 높인 후 NaOH 등에 의해 화학적으로 분해하는 방법인 바, 분리·수거된 우모의 feather-meal로의 이용은 가능하나 산업적 규모로의 응용에는 제한적일 수밖에 없는 실정이다.

특히 우모의 주성분은 단백질인 keratin으로서 우모분해의 주요인은 이 keratin의 분해효소(keratinolytic protease)이며 현재까지 이러한 keratinolytic protease를 분해하는 미생물로는 *Bacillus*, *Streptomyces* 등이 보고되었으며, 최근 *Bacillus licheniformis* PWD-1이 호기성발효에 의해 우모의 keratin을 분해하는 성능이 있는 것으로 보고된 바 있다. 따라서 본 연구는 이러한 난분해성 우모 및 우모분으로 인한 양계 폐자원의 유용자원화 애로사항을 이들 미생물에 의한 생물학적 방법으로 해결하기 위해

① 우모 및 우모분을 분해할 수 있는 능력을 가진 세균을 자연상태로부터 분리하고,

② 분리된 우모분해성 세균을 산업적으로 유효한 수준까지 그 분해성을 증진시키며,

③ 선별된 우모 분해균을 동정하여 균의 특성을 분자생리학적 수준에서 정의하고,

이를 바탕으로 이차적으로는 이들 균주를 산업 현장에서 유용한 미생물자원화하기 위해

④ 우모분해균주의 생육특성을 검색하여 최대 생산을 위한 영양·생육조건을 검토하며

⑤ 세포 내에서의 우모분해 효소의 세포내 혹은 세포막내 所在를 분석하고

⑥ 궁극적으로는 발효우모분의 생산 가능성을 타진하며,

이러한 2단계의 성공적인 실험 결과를 기초로 하여 3차년도에는

⑦ 산업화 대상 우모분해균이 분비하는 효소의 산업화 분자 특성을 정확히

규명하고,

⑧ 이 유용 우모분해효소의 유전적 특성을 분석, 유용효소의 응용범위를 넓힘으로써

⑨ 궁극적으로는 균체 및 효소에 의한 우모분해 산업화 공정을 개발함에 그 연구의 목표를 설정하였다

## 제 2 절 연차별 세부 연구목표 및 내용

본 연구의 최종 연구목표는 우모분해세균의 산업화 기술 개발인 바, 연도별 세부목표 및 내용은 다음과 같다.

| 구 분 | 연구개발목표 | 연구개발내용 및 범위 |
|---|---|---|
| 제1차년도 (1995. 12. 1-1996. 11. 30) | 우모분해세균의 탐색 및 동정 | ○ 우모분해세균의 탐색<br>○ 우모분해성능 증진을 위한 세균의 적응 실험<br>○ 최종 선별된 우모분해세균의 동정 |

| 구 분 | 연구개발목표 | 연구개발내용 및 범위 |
|---|---|---|
| 제2차년도<br>(1996. 12. 1-<br>1997. 11. 30) | 우모분해세균의<br>산업화 기술개발 | ㅇ우모분 케라틴 분해균주의 최적 생육특성 시험<br>· 우수균주의 생육 생리특성 연구<br>· 우수균주의 배양특성 연구<br>· 최적 생육조건 산정<br>ㅇ 선발균주의 케라틴분해효소의 국재성 시험:<br>· 케라틴 분해효소의 所在 확인<br>· 케라틴 분해효소의 분획실험<br>ㅇ 발효 우모분 생산시험:<br>· 발효우모분의 in vitro/in vivo 생산실험<br>· 발효우모분의 사료가치 평가 시험 |
| 제3차년도<br>(1997. 12. 1-<br>1998. 11. 30) | 우모분해세균의<br>산업화 기술개발 | ㅇ우모분해효소의 산업화 분자특성 연구<br>· 우모분해효소의 부분정제<br>· 부분정제효소의 pH, 열, 용매 안정성 규명<br>ㅇ우모분해효소의 유전특성 연구<br>· 異種유전자표지(heterologous gene probe)에 의한 우모분해효소의 유전자 탐색<br>· 우모분해효소의 유전적 특성 규명<br>· 유전적 개량균주의 탐색<br>ㅇ산업화 공정 개발<br>· 균체에 의한 우모분해 공정 개발<br>· 부분정제효소에 의한 우모분해 공정 개발 |

# 제 2 장 국내외 기술개발 현황

양계 분뇨 중의 우모 및 우모분(hair and feather waste)은 그 난분해성(poor digestibility)으로 인해 퇴비 혹은 자원화를 저해하는 원인이 될 뿐만 아니라 기타 농업 유통자원으로의 재활용을 방해하는 가장 큰 원인이 되고 있는 바, 前述한 바와 같이 이러한 양계 우모는 특히 이들이 단시간에 대량으로 발생하는 계육 가공 공장의 경우 매우 심각하여 이의 처리비용이 결국 생산단가 및 부대비용을 높이는 원인이 되고 있다. 이러한 우모의 난분해성으로 인한 문제점으로 인해 년간 100만톤 내지 120만톤의 양계 폐기물이 발생하는 미국 축산업계에서는 문제의 핵심이 되고 있는 우모의 난분해성을 해결하기 위한 노력이 80년대부터 꾸준히 시도되어 화학적인 처리 방법과 생물학적인 처리 방법 양면의 모색이 시도되어 왔다.

현재까지 가장 많이 이용되고 있는 방법은 우모 및 우모분의 열처리(autoclaving) 및 화학적 처리로써 121℃에서 우모분을 처리하여 분해성을 높인 후 NaOH 등에 의해 화학적으로 분해하는 방법인 바, 분리·수거된 우모의 feather-meal로의 이용은 가능하나 산업적 규모로의 응용에는 제한적일 수밖에 없는 실정이다. 따라서 90년대 이후 우모를 효율적으로 분해하여 소멸시키거나 그 분해산물을 유용 아미노태의 영양원으로 자원화 할 수 있는 생물학적인 처리법의 개발에 연구가 집중되었다.

이러한 생물학적 처리의 근본은 우모의 主단백질인 keratin의 분해효소(keratinolytic protease)를 탐색, 동정하고 이를 산업화하는 학문적 기반을 조성하는 것으로서, 현재까지 이러한 keratinolytic protease를 분해하는 미생물로는 *Bacillus, Streptomyces, Aspergillus, Ctenomyces* 등이 보고되었으며, 최근 *Bacillus licheniformis* PWD-1이 호기성발효에 의해 우모의 keratin을 분해하는 성능이 있는 것으로 보고된 바 있다(C. M. Williams *et al.*, Applied and Environmental Microbiology 56:1509-1515). 이 *Bacillus licheniformis* PWD-1이 생산하는 keratinase는 membrane ultrafiltration과 carboxymethyl cellulose ion exchange column chromatography 및 Sephadex G-75 chromatography에 의해 정제 되어 분자량 33kdal의 효소로 규명되었으며, 그 amino-terminal amino acid sequence로부터 얻어진 primer를 이용한

PCR walking 법에 의해 염기서열을 분석한 결과 *Bacillus licheniformis* NCIMB6816이 생산하는 subtilisin Carlsberg와 97%의 상동성이 있는 효소로 판명되었다(Xiang Lin *et al.*, Applied and Environmental Microbiology 61:1469-1474). 현재 이 효소를 이용하여 연속적으로 우모를 분해할 수 있는 고정화법(immobilization of keratinase)이 고안되어 사용되고 있다(Xiang Lin *et al.*, Applied and Environmental Microbiology 62:4273-4275).

현재 이러한 keratinase 생산균주에 대한 연구는 독일 등 유럽에서도 활발하게 진행 중이며, Technical University Hamburg의 연구팀 등이 *Streptomyces pactum* 및 고열 혐기성균 중 *Fervidobacterium pennavorans* 로부터 keratolytic protease의 분비를 확인한 바 있다(Applied and Environmental Microbiology 61:3705-3710, 62:2875-2882).

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 연구내용

1. 우모분해세균의 탐색:

가. Basal media(BM)의 준비: 우모분해세균 분리를 위해 $NH_4Cl$ 0.5 g/l, NaCl 0.5 g/l, $K_2HPO_4$ 0.4 g/l, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.1 g/l, yeast extract 0.1 g/l, agar 20 g/l의 BM을 제조하여 사용하였다.

나. Feather preparation: 증류수로 세척된 우모를 ball-milling 또는 hammer-milling 한 후 121C에서 15 psi로 20분간 autoclaving하여 사용하였다.

다. 우모를 유일 탄소원으로 하는 우모분해세균의 검색: Basal medium에 살균된 feather powder를 균일하게 혼합한 후 이 agar plate에 양계분뇨 혹은 우모분 희석액으로부터 얻은 균총을 도말하여 호기적 조건 하에서 25℃, 37℃, 50℃로 24시간에서 48시간 배양한 후 Clear zone을 형성하는 균을 유효균으로 분리하였다.

2. 우모분해성능 증진을 위한 세균의 적응 실험:

가. 1차 유효균으로 분리된 균주에 대해 그 우모분해능의 최적 조건을 파악하고 기존의 우모분해능을 증진시킬 수 있는 배양 조건을 탐색하기 위해 27℃, 37℃, 50℃ 및 기타 필요 온도에서의 growth pattern과 우모의 전처리 과정과 우모분해능의 관계, 액체 및 고체 배지에서의 움모분해능의 관계를 조사하였다.

나. 순수분리된 우모분해균을 10 ml의 basal medium에 살균된 우모분과 상기의 최적조건에서 장기 배양한 후 가장 분해능이 탁월한 균주를 분리하여 동일한 배양과정을 반복, 유전적 적응에 의한 효소 생상능력의 극대화를 시도하였다.

3. 최종 선별된 우모분해세균의 동정:

상기의 2개 단계에서 최종 선발된 우모분해균을 형태학적 관찰 및 생화학적/

생리학적 특성을 시험하여 그 결과를 Bergy's manual of systematic bacteriology에 의거하여 분석함으로써 균주를 동정하였다.

4. 우모분 케라틴 분해균주의 최적 생육특성 시험

가. 우수 균주의 생육 생리특성 연구

- 15종의 우수균주 중 가장 우모분해능이 뛰어난 FDB11-11 균주의 keratinase 생산을 위한 생육 최적 조건을 산정하기 위하여 서로 다른 온도(25℃, 37℃, 45℃)와 pH(6.5, 7.5, 8.5) 조건 하에서의 activity를 측정하였다.

나. 우수 균주의 배양 특성 연구

- FDB11-11의 배양특성을 조사하기 위하여 여러 가지 protein( feather, feather meal, commercial feather meal, casein)을 배지에 첨가해 준후 FDB11-11을 접종하여 8일 동안 배양시키면서 Cell density(CFU/ml)의 변화, pH의 변화, 그리고 keratinase activity의 변화를 조사하였다.
- 같은 방법으로 여러 가지 carbon과 nitrogen source의 activity에 대한 영향을 4일 간격으로 측정하였다.

5. 선발균주의 케라틴 분해효소의 국재성 시험

가. 케라틴 분해효소의 소재 확인

- 케라틴 분해효소의 소재를 확인하기 위하여 FDB11-11균주를 포함한 15개 균주 각각에 대해서 배양액을 얻은후 원심분리와 filtering을 통하여 culture supernatants를 얻고, 그 10ml씩을 test tube에 넣고 멸균된 single feather를 넣어준후 5일간 배양시켜 activity를 측정하였다.
- FDB11-11이 생산하는 keratinase의 소재를 확인하기 위하여 cell culture supernatants를 ammoniumsulfate(90%) 로 침전시켜서 SDS - PAGE를 하였다.
- keratinase 가 feather에 의해 induction 되는 지 알아보기위하여 feather 가 함유된 배지와 함유되지 않은 배지에서 FDB11-11을 각각 배양에서 위와 같은 방법으로 전기영동하여 protein의 차이를 확인하였다.

나. 케라틴 분해효소의 분획실험(activity by ammoniumsulfate fractionation)

- cell culture supernatant 100ml을 얻어서 ammonium sulfate (75% saturation cut)로 단백질을 침전시킨 후 원심분리하여 획득한 침전물을 10ml 멸균 증류수에 녹여 위와 같은 방법으로 실험하였다.

다. FDB11-11 균주가 생산한 keratinase 의 최적 activity condition test
- FDB11-11 균주가 생산한 keratinase 의 최적 activity condition을 측정하기 위하여 cell culture supernatant를 얻어서 각각 pH를 6에서10까지 그리고 온도는 15℃에서 60℃로 구분하여 incubation한 후 activity의 변화를 확인하였다.

라. 여러가지 solvents, detergents 및 reducing agents가 keratinase의 activity에 미치는 영향
- solvent는 각각 1%, 5%를 첨가해준 후 실험하였고, detergent 및 reducing agent는 0.1%, 0.5%, 1%를 첨가한 후 45℃에서 5일간 배양한 후 activity의 변화를 확인하였다.
마. PMSF의 영향 평가
- protease inhibitor인 PMSF를 각각 10㎛, 50㎛, 100㎛, 200㎛, 300㎛, 400㎛이 되게 첨가해준 후 keratinase activity의 변화를 확인하였다.

6. 발효우모분 생산실험
가. 공장에서 1차로 가공된 여러 feathermeal 의 발효 실험
- 공장에서 가공된 여러가지 feather meal(A, B, C, D, E)과 순수한 feather만을 갈아서 만든 sample(F)을 가지고(10% w/v) 45℃에서 6일간 배양하면서 각각의 cell population의 변화와 activity의 변화를 관찰하였다.
- 같은 방법으로 feather의 양을 10%에서 25%로 높여준 후 8일간 배양하며 최종 activity와 cell population을 확인하였다.

나. 공장에서 1차로 가공된 sample의 배양상등액에서의 activity
- 각각의 sample을 cell culture supernatants에 5%가 되게 첨가해준 후 5일간 45℃에서 incubation시킨 후 activity를 확인하였다.

다. FDB-strain에 의한 우모 전처리 효과

- FDB-strain이 실제적으로 산업현장에서 응용될 수 있는 가능성을 타진하기 위하여 feather 1g에 15종의 FDB의 cell culture 10ml 를 잘 섞어 준 후 8일간 배양하여 121℃에서 20분간 autoclave한 후 그 feather를 30ml의 증류수에 현탁하여 activity를 측정하였다.

라. FDB11-11을 이용한 feather의 대량 발효 실험

- 대량으로 feather를 발효시키기 위하여 우선 FDB11-11의 cell culture를 1 ℓ 배양하여 준비하였다. 1 ℓ의 배양액에 수분이 포함된 feather 2kg을 잘 섞어준 후 45℃에서 9일간 배양하여 발효시킨 후 autoclave한 후 건조하여 소화율 실험분석은 한국식품개발연구원의 공동연구팀에서 시행하였다.

7. 우모분해효소의 산업화 분자특성 연구:

2차년도에서 규명한 최적 생산조건에서 FDB11-11이 생산하는 우모분해효소을 이온교환수지 및 gel filtration column chromatography에 의해 부분정제하고 이들 부분정제효소의 pH, 열, 용매 안정성을 규명하여 산업화 공정에 도입되는 여러 조건에 적합한 분자특성을 파악하였다.

8. 우모분해효소의 유전특성 연구:

*Fervidobacterium* 기원의 열안정성 우모분해효소와 *Bacillus* 기원의 우모분해효소의 아미노산 서열 및 유전자 염기서열로부터 異種유전자표지(heterologous gene probe)를 합성하고 이를 이용하여 FDB11-11 균주의 염색체로부터 직접 우모분해효소의 유전자를 탐색하고 그 유전적 특성 규명함으로써 산업화 과정에 유용한 유전적 개량균주를 탐색하였다.

9. 산업화 공정 개발

2차년도에 걸친 영구 결과와 上記 2단계 연구 자료를 기초로 균체에 의한 우모분해 공정 및 부분정제효소에 의한 우모분해 공정을 실제 공장 현장과 연계시켜 개발하였다.

# 제 2 절 연구 결과

## 1. 우모분해세균의 탐색

가. sampling 장소의 선정 및 sampling

- 춘천근교의 양계장을 탐색하여 양계폐기물 퇴적 상태 및 우모 분해상태를 기준으로 우모분해세균의 존재 가능성이 가장 높은 것으로 판단되는 두 장소로부터 양계 폐기물 퇴치장의 토양 및 액체사상의 두가지 상태로 시료를 채취하였다.

- sampling 장소: 춘천시 장학리 이춘연씨 양계장에서 토양, liquid sample채취
춘천시 창촌 노인근씨 양계장에서 토양 채취

나. 우모분해 세균 분리를 위한 최적배지의 탐색 및 표준화

- 우모분해 세균의 분리를 위한 최적배지(우모분을 거의 유일한 탄소원 및 에너지원으로 사용케 하는 최소배지)의 조성을 탐색한 결과 다음과 같은 배지가 최적배지로 판단되었다.

In 1 liter of water, $NH_4Cl$: 0.5g, NaCL: 0.5g, $KH_2PO_4$: 0.3g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$: 0.1g, yeast extract: 0.1g, feather: 5g, agar: 20g, pH adjusted in to 7.5 before 20 min's autoclave

- 우모의 수집·가공은 도계장(현진도계장, 춘천시 후평동 소재)으로부터 65C 10 min간 前처리된 우모를 공급받아 이를 물에 세척한 후 3일 동안 일광 건조시킨 다음 cutter로 잘게 잘라준 후 마쇄하여 사용하였다.

- 우모분해 세균 분리용 배지는 autoclave시 우모의 표면 浮上 및 불균형 분포로 인하여 clear zone의 형성 및 확인에 일차적 장애 요인이 되었으며, 이를 극복하기 위하여 우모를 별도 살균한 후 이를 旣 살균한 broth media에 장치한 후 액체 상태에서 배양하는 방법을 고안·사용하였다.

다. 우모 분해 세균의 분리

1) single colony로부터의 분리: 양계폐기물 퇴치장의 토양 및 폐수로부터 우

모분해세균을 분리하기 위해, 토양의 경우 3g을 멸균증류수에 현탁한 후 그 원심분리 상등액을, 그리고 폐수(액체) 시료의 경우 그 자체를 실험 원액으로 간주하여 각각 적절 희석액을 上記의 배지에 도말하여 각각 25와 37C에서 열흘간 배양하여 single colny를 만들고 이로부터 clear zone 형성 colony를 분리하려 하였으나 적절수의 colony가 형성되었음에도(Table 1), clear zone의 파악이 거의 불가능하였다.

2) enriched culture로부터의 우모분해세균의 분리: 上記의 시료를 그대로 액체배지(별도 살균한 우모가 포함된)에 접종하여 우모분해세균총의 우점화 배양(dominative incubation)을 유도한 후 가장 잘 우모를 분해하는 시료로부터 single colony isolation을 행하여 각 colony를 동일한 액체배지에서 순수 재배양함으로써 우수 우모분해능력 소유주를 분리하였다(Fig. 1참조). 그 결과는 다음과 같다.

- 37C, 45C에서의 1st enrichment (5 days' incubation) 결과 45C에서의 하일/토양 시료가 가장 분해대사가 활발하였다.
- 따라서 하일/토양 시료의 1st enrichment culture를 분리용 배지에 spreading하여 형성된 colony 중 360개를 각각 10ml broth culture에 배양하여 그 분해능을 분석하였다 (Table 2).
- 이중 50개가 우수한 우모분해능력을 보여 이를 FDB(feather-degrading bacteria) strain으로 명명하고 stock culture를 준비한 후 각 균주별로 분해능 비교실험을 시행한 결과 Table 3 및 Table 4에 요약된 바와 같이 매우 우수한 균주 3균주, 우수 17균주, 양호 9균주를 구분할 수 있었으며 이들 29개 균주를 산업화 가능성이 있는 실험대상균주로 선정하였다.

## 2. 우모 분해성능 증진을 위한 세균의 적응실험

· 우모분해능의 최적 조건 탐색(온도, pH): 50개 FDB 균주에 대해 최적 온도 및 최적 pH 분석을 위한 연구 결과, 25C, 37C, 45C 중 45C가 가장 우모

분해능이 큰 것으로, pH는 7.0부근이 최적 배양 및 생산 조건인 것으로 판단되었다. (Table 5 및 Table 6, FDB11-11의 분석 결과 참조).

### 3. 우모의 전처리 상태에 따른 우모분해실험

. 우모를 각각 121℃ 20분, 100℃ 30분 그리고 60℃에서 30분간 열처리를 해준후 FDB11-11균주를 접종해준후 7일간 배양하면서 activity, pH 그리고 cell population의 변화를 관찰하였다. 실험결과 60℃보다는 100℃, 100℃ 보다는 121℃에서 autoclave 한 우모가 activty가 높게 나타났다(Table 7). 이같은 결과는 높은 온도로 열처리를 해준 것이 우모의 결합력을 약화시킨것에 기인한 것으로 판단된다.

### 4. 최종 선별된 우모분해 세균의 동정

· 현재 50개 旣분리된 FDB 균주에 대해 기초적인 cell morphology, 생리·생화학적 특성 및 발효 특성 실험을 시행한 결과 중 동정에 긴요한 결과는 Table 8에 요약된 바와 같았다.

· 또한 이들 균주의 배양 특성은 Table 9(FDB5-6/8-4의 경우) 및 Fig. 2-1, 2-2에 도시된 바와 같이 경시적 pH 증가 특성을 보였다.

· API50 system에 의한 동정은 그림 2.1과 2.2에서와 같이 배양 media pH의 염기화로 인해 발효여부의 판단이 매우 곤란하여 reliability의 유효성이 없는 것으로 판단되었다.

· 이들 기초 자료와 전자현미경 관측(Fig. 3 참조)에 의해 현재 이들 균주는 모두 *Alkaligenes* spp.인 것으로 판단되었다.

Table 1. Screening result of feather-degrading bacteria from poultry wastes

| | Soil sample of poultry waste spot | | Aqueous extract sample of poultry waste | |
|---|---|---|---|---|
| | 25℃ | 37℃ | 25℃ | 37℃ |
| $10^{-2}$ | 407 | 276 | TNTC | TNTC |
| $10^{-4}$ | 11 | 7 | TNTC | 388 |
| $10^{-6}$ | 0 | 0 | 45 | 25 |
| $10^{-8}$ | 0 | 0 | 1 | 2 |

Fig. 1: Flow diagram of feather-degrading bacteria

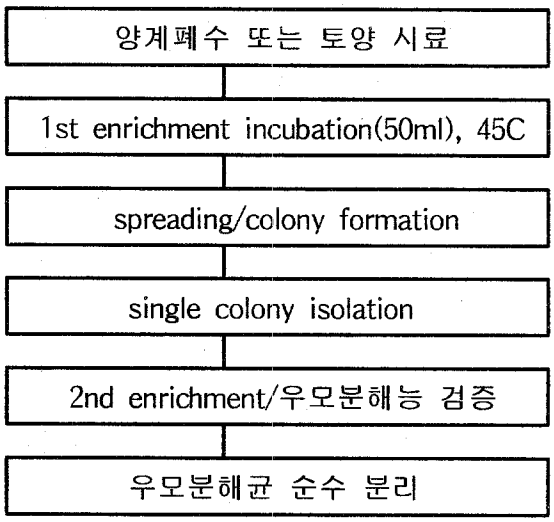


Table 2. Feather-proteolytic activity of bacteria isolated from soils of Ha-il region.

| strain | activity | strain | activity | strain | activity | strain | activity |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-1 | ++ | 3-7 | + | 6-1 | ++ | 8-7 | - |
| 1-2 | - | 3-8 | - | 6-2 | - | 8-8 | + |
| 1-3 | + | 3-9 | - | 6-3 | - | 8-9 | ++ |
| 1-4 | - | 3-10 | - | 6-4 | - | 8-10 | ++ |
| 1-5 | - | 3-11 | - | 6-5 | ++ | 8-11 | - |
| 1-6 | ++ | 3-12 | - | 6-6 | - | 8-12 | - |
| 1-7 | ++ | 4-1 | ++ | 6-7 | - | 9-1 | - |
| 1-8 | ++ | 4-2 | ++ | 6-8 | - | 9-2 | + |
| 1-9 | ++ | 4-3 | - | 6-9 | ++ | 9-3 | - |
| 1-10 | - | 4-4 | - | 6-10 | - | 9-4 | - |
| 1-11 | + | 4-5 | - | 6-11 | ++ | 9-5 | + |
| 1-12 | - | 4-6 | ++ | 6-12 | ++ | 9-6 | - |
| 2-1 | - | 4-7 | - | 7-1 | - | 9-7 | + |
| 2-2 | - | 4-8 | - | 7-2 | - | 9-8 | - |
| 2-3 | ++ | 4-9 | ++ | 7-3 | - | 9-9 | - |
| 2-4 | ++ | 4-10 | - | 7-4 | ++ | 9-10 | - |
| 2-5 | ++ | 4-11 | - | 7-5 | - | 9-11 | ++ |
| 2-6 | ++ | 4-12 | ++ | 7-6 | + | 9-12 | - |
| 2-7 | ++ | 5-1 | - | 7-7 | - | 10-1 | - |
| 2-8 | - | 5-2 | ++ | 7-8 | - | 10-2 | - |
| 2-9 | - | 5-3 | - | 7-9 | - | 10-3 | + |
| 2-10 | ++ | 5-4 | ++ | 7-10 | - | 10-4 | ++ |
| 2-11 | ++ | 5-5 | - | 7-11 | ++ | 10-5 | + |
| 2-12 | - | 5-6 | ++ | 7-12 | - | 10-6 | + |
| 3-1 | + | 5-7 | - | 8-1 | + | 10-7 | + |
| 3-2 | - | 5-8 | - | 8-2 | - | 10-8 | - |
| 3-3 | ++ | 5-9 | - | 8-3 | + | 10-9 | - |
| 3-4 | - | 5-10 | - | 8-4 | ++ | 10-10 | - |
| 3-5 | ++ | 5-11 | - | 8-5 | - | 10-11 | - |
| 3-6 | ++ | 5-12 | - | 8-6 | - | 10-12 | - |

| strain | activity | strain | activity | strain | activity | strain | activity |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 11-1 | + | 13-7 | + | 16-1 | ++ | 18-7 | - |
| 11-2 | - | 13-8 | - | 16-2 | - | 18-8 | - |
| 11-3 | ++ | 13-9 | + | 16-3 | - | 18-9 | - |
| 11-4 | ++ | 13-10 | - | 16-4 | - | 18-10 | - |
| 11-5 | + | 13-11 | - | 16-5 | - | 18-11 | - |
| 11-6 | ++ | 13-12 | ++ | 16-6 | - | 18-12 | - |
| 11-7 | + | 14-1 | - | 16-7 | - | 19-1 | - |
| 11-8 | - | 14-2 | - | 16-8 | - | 19-2 | - |
| 11-9 | + | 14-3 | - | 16-9 | ++ | 19-3 | - |
| 11-10 | ++ | 14-4 | - | 16-10 | + | 19-4 | ++ |
| 11-11 | ++ | 14-5 | ++ | 16-11 | - | 19-5 | - |
| 11-12 | - | 14-6 | - | 16-12 | - | 19-6 | - |
| 12-1 | - | 14-7 | - | 17-1 | - | 19-7 | - |
| 12-2 | + | 14-8 | - | 17-2 | - | 19-8 | - |
| 12-3 | + | 14-9 | - | 17-3 | - | 19-9 | + |
| 12-4 | - | 14-10 | - | 17-4 | - | 19-10 | + |
| 12-5 | - | 14-11 | - | 17-5 | - | 19-11 | ++ |
| 12-6 | ++ | 14-12 | ++ | 17-6 | ++ | 19-12 | - |
| 12-7 | - | 15-1 | - | 17-7 | - | 20-1 | - |
| 12-8 | ++ | 15-2 | - | 17-8 | + | 20-2 | - |
| 12-9 | - | 15-3 | - | 17-9 | - | 20-3 | - |
| 12-10 | - | 15-4 | - | 17-10 | + | 20-4 | - |
| 12-11 | - | 15-5 | ++ | 17-11 | - | 20-5 | - |
| 12-12 | - | 15-6 | - | 17-12 | - | 20-6 | - |
| 13-1 | - | 15-7 | - | 18-1 | - | 20-7 | - |
| 13-2 | ++ | 15-8 | - | 18-2 | - | 20-8 | - |
| 13-3 | + | 15-9 | ++ | 18-3 | - | 20-9 | - |
| 13-4 | + | 15-10 | + | 18-4 | ++ | 20-10 | - |
| 13-5 | + | 15-11 | - | 18-5 | - | 20-11 | - |
| 13-6 | - | 15-12 | - | 18-6 | - | 20-12 | - |

| strain | activity | strain | activity | strain | activity | strain | activity |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 21-1 | - | 23-7 | ++ | 26-1 | ++ | 28-7 | - |
| 21-2 | - | 23-8 | - | 26-2 | - | 28-8 | ++ |
| 21-3 | - | 23-9 | - | 26-3 | - | 28-9 | ++ |
| 21-4 | + | 23-10 | - | 26-4 | - | 28-10 | - |
| 21-5 | - | 23-11 | - | 26-5 | - | 28-11 | - |
| 21-6 | ++ | 23-12 | - | 26-6 | - | 28-12 | - |
| 21-7 | - | 24-1 | ++ | 26-7 | + | 29-1 | - |
| 21-8 | + | 24-2 | - | 26-8 | - | 29-2 | - |
| 21-9 | - | 24-3 | ++ | 26-9 | - | 29-3 | ++ |
| 21-10 | - | 24-4 | - | 26-10 | - | 29-4 | - |
| 21-11 | - | 24-5 | - | 26-11 | - | 29-5 | - |
| 21-12 | - | 24-6 | - | 26-12 | - | 29-6 | - |
| 22-1 | ++ | 24-7 | - | 27-1 | - | 29-7 | - |
| 22-2 | ++ | 24-8 | - | 27-2 | - | 29-8 | - |
| 22-3 | - | 24-9 | - | 27-3 | ++ | 29-9 | - |
| 22-4 | - | 24-10 | - | 27-4 | - | 29-10 | - |
| 22-5 | - | 24-11 | - | 27-5 | - | 29-11 | - |
| 22-6 | - | 24-12 | - | 27-6 | ++ | 29-12 | - |
| 22-7 | - | 25-1 | - | 27-7 | - | 30-1 | - |
| 22-8 | - | 25-2 | - | 27-8 | - | 30-2 | - |
| 22-9 | - | 25-3 | - | 27-9 | - | 30-3 | - |
| 22-10 | - | 25-4 | - | 27-10 | - | 30-4 | - |
| 22-11 | ++ | 25-5 | ++ | 27-11 | - | 30-5 | - |
| 22-12 | - | 25-6 | - | 27-12 | - | 30-6 | - |
| 23-1 | - | 25-7 | - | 28-1 | ++ | 30-7 | - |
| 23-2 | - | 25-8 | - | 28-2 | - | 30-8 | - |
| 23-3 | + | 25-9 | - | 28-3 | - | 30-9 | - |
| 23-4 | - | 25-10 | - | 28-4 | - | 30-10 | - |
| 23-5 | ++ | 25-11 | - | 28-5 | - | 30-11 | ++ |
| 23-6 | - | 25-12 | - | 28-6 | - | 30-12 | - |

* ++; excellent digestion after 4 day's incubation at 45C, +; good digest ion, −; no change

Table 3. Feather-degrading ability of selected strains

| strain | incubation day | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1-1 | | | | | | | | | |
| 1-6 | | | | | | | | | |
| 2-3 | | | | | | | | | |
| 2-7 | | | | | | | | | |
| 2-11 | | | | | | | | | |
| 3-5 | | | | | | | | | |
| 4-6 | | | | | | | | | |
| 5-6 | | | | | | | | | |
| 6-1 | | | | | | | | | |
| 6-9 | | | | | | | | | |
| 6-11 | | | | | | | | | |
| 8.-4 | | | | | | | | | |
| 10-4 | | | | | | | | | |
| 11-3 | | | | | | | | | |
| 11-4 | | | | | | | | | |
| 11-6 | | | | | | | | | |
| 11-10 | | | | | | | | | |
| 11-11 | | | | | | | | | |
| 12-6 | | | | | | | | | |
| 12-8 | | | | | | | | | |
| 13-2 | | | | | | | | | |
| 13-12 | | | | | | | | | |
| 14-5 | | | | | | | | | |
| 14-12 | | | | | | | | | |
| 15-5 | | | | | | | | | |

| strain | incubation day | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 15-9 | | | | | | | | | |
| 16-1 | | | | | | | | | |
| 16-9 | | | | | | | | | |
| 17-6 | | | | | | | | | |
| 18-4 | | | | | | | | | |
| 19-4 | | | | | | | | | |
| 19-11 | | | | | | | | | |
| 21-6 | | | | | | | | | |
| 22-1 | | | | | | | | | |
| 22-2 | | | | | | | | | |
| 22-11 | | | | | | | | | |
| 23-5 | | | | | | | | | |
| 23-7 | | | | | | | | | |
| 24-1 | | | | | | | | | |
| 24-3 | | | | | | | | | |
| 25-5 | | | | | | | | | |
| 26-1 | | | | | | | | | |
| 26-7 | | | | | | | | | |
| 27-3 | | | | | | | | | |
| 27-6 | | | | | | | | | |
| 28-1 | | | | | | | | | |
| 28-8 | | | | | | | | | |
| 28-9 | | | | | | | | | |
| 29-3 | | | | | | | | | |
| 30-11 | | | | | | | | | |

Table 4. Classification of selected strains based on their proteolytic activity

| 구 분 | 내 역 | 균수 |
|---|---|---|
| 최우수 | 배양후 2일에서 4일 사이에 완전히 분해됨 | 3 |
| 우수 | 배양후 5일에서 7일 사이에 완전히 분해된 | 17 |
| 양호 | 배양후 8일에서 9일 사이에 완전히 분해됨 | 9 |
| 미흡 | 배양후 9일이 경과하여도 부분적인 분해만 일어남 | 21 |
| 합 계 | | 50 |

Table 5. Effect of incubation temperatures on the external pH and cell density of strain FDB11-11

| temp' / hours | 25℃ | | | 37℃ | | | 45℃ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | pH | CFU/ml | acti-vity | pH | CFU/ml | acti-vity | pH | CFU/ml | acti-vity |
| 0 | 6.76 | 3.0e4 | - | 6.81 | 3.1e4 | - | 6.82 | 3.0e4 | - |
| 12 | 6.78 | nc | - | 6.82 | 1.5e5 | - | 6.84 | 1.0e5 | - |
| 24 | 6.68 | 1.0e5 | - | 6.72 | 2.0e6 | - | 6.77 | 2.0e6 | - |
| 36 | 6.68 | 6.1e6 | - | 6.77 | 7.5e6 | - | 6.83 | 7.6e6 | - |
| 48 | 6.73 | 9.1e6 | - | 6.82 | 7.9e6 | - | 6.91 | 9.1e6 | - |
| 60 | 6.81 | 1.7e7 | - | 6.90 | 8.6e6 | - | 6.96 | 1.2e7 | - |
| 72 | 6.81 | 8.0e6 | - | 6.94 | 1.6e6 | - | 6.91 | 4.0e6 | - |
| 84 | 6.85 | 8.6e6 | - | 6.98 | 3.3e6 | - | 7.00 | 8.0e4 | + |
| 96 | 6.89 | 2.2e6 | - | 7.00 | 2.4e6 | - | 7.05 | 1.1e6 | + |
| 108 | 6.91 | 1.7e7 | - | 7.05 | 1.3e6 | + | 7.12 | 5.0e6 | + |
| 120 | 6.97 | 3.9e7 | - | 7.12 | 5.0e6 | + | 7.24 | 1.4e7 | + |
| 132 | 7.00 | 3.8e7 | - | 7.25 | 6.7e6 | + | 7.45 | 5.3e6 | + |
| 144 | 7.05 | 3.0e7 | - | 7.27 | 6.7e6 | + | 7.49 | 2.3e6 | + |
| 156 | 7.11 | 4.5e7 | + | 7.32 | 7.3e6 | + | 7.53 | 6.0e6 | + |
| 168 | 7.20 | 2.8e7 | + | 7.44 | 5.0e6 | + | 7.78 | 2.3e6 | + |
| 180 | 7.17 | | + | 7.39 | | + | 7.80 | | + |

Table 6. Effect of initial pH of media on the cell density and pH of the cultured media

| pH / hours | pH5 | | | pH6 | | | pH7 | | | pH8 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | pH | CFU /ml | activity | pH | CFU /ml | activity | pH | CFU /ml | activity | pH | CFU /ml | activity |
| 0 | 4.83 | 3.0e4 | - | 5.94 | 3.1e4 | - | 6.97 | 2.8e4 | - | 7.98 | 2.9e4 | - |
| 12 | 5.29 | nc | - | 6.10 | 5.7e4 | - | 6.98 | 8.3e4 | - | 7.59 | 4.2e5 | - |
| 24 | 5.20 | nc | - | 6.11 | 1.6e5 | - | 6.85 | 1.0e6 | - | 7.31 | 5.7e6 | - |
| 36 | 5.25 | nc | - | 6.21 | 4.3e6 | - | 6.88 | 8.9e6 | - | 7.29 | 3.3e7 | - |
| 48 | 5.36 | 9.8e4 | - | 6.33 | 7.3e6 | - | 6.95 | 9.8e6 | - | 7.36 | 1.9e7 | - |
| 60 | 5.45 | 2.4e5 | - | 6.40 | 6.0e6 | - | 7.04 | 1.1e7 | - | 7.44 | 1.1e7 | - |
| 72 | 5.76 | 2.1e5 | - | 6.45 | 1.6e6 | - | 7.05 | 1.6e7 | - | 7.51 | 8.3e6 | - |
| 84 | 5.83 | 2.2e4 | - | 6.52 | 4.0e6 | - | 7.16 | 1.4e5 | + | 7.52 | 3.3e6 | - |
| 96 | 5.91 | 1.0e4 | - | 6.62 | 1.7e6 | - | 7.30 | 2.2e6 | + | 7.66 | 1.7e6 | + |
| 108 | 5.94 | 3.0e6 | - | 6.69 | 3.0e6 | - | 7.34 | 2.1e5 | + | 7.71 | 1.8e5 | + |
| 120 | 6.06 | 2.1e6 | - | 6.77 | 1.3e7 | - | 7.45 | 9.6e6 | + | 7.77 | 6.0e6 | + |
| 132 | 6.16 | 2.3e6 | - | 6.89 | 5.0e6 | - | 7.61 | 1.0e6 | + | 7.91 | 4.0e6 | + |
| 144 | 6.24 | 2.0e6 | - | 6.96 | 6.3e6 | - | 7.72 | 2.3e6 | + | 8.02 | 4.3e6 | + |
| 156 | 6.32 | 4.7e6 | - | 7.04 | 2.0e6 | - | 7.85 | 2.1e5 | + | 8.19 | 5.7e6 | + |
| 168 | 6.37 | 8.3e6 | - | 7.14 | 7.0e6 | + | 7.99 | 5.3e6 | + | 8.35 | 3.3e6 | + |
| 180 | 6.39 | | - | 7.16 | | + | 8.11 | | + | 8.37 | | + |

Table 7. Effect of preincubation of feather on the cell density, pH and keratinolytic activity

| Heat / day | 121℃ 20min | | | 100℃ 30min | | | 60℃ 30min | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Activity | pH | CFU/ml | Activity | pH | CFU/ml | Activity | pH | CFU/ml |
| **0** | 0 | 6.81 | 3.2e5 | 0 | 7.07 | 3.1e5 | 0 | 7.07 | 3.2e5 |
| **1** | 1.6517 | 7.02 | 6.3e7 | 0.6512 | 6.91 | 1.1e7 | 0.8197 | 6.87 | 6.3e7 |
| **2** | 2.0630 | 7.21 | 1.3e6 | 1.0359 | 7.05 | 1.0e6 | 0.9611 | 7.04 | 1.3e6 |
| **3** | 2.5760 | 7.42 | 6.3e6 | 1.4870 | 7.25 | 8.0e5 | 1.1209 | 7.18 | 6.3e6 |
| **4** | 2.9379 | 7.62 | 5.7e6 | 1.5739 | 7.49 | 2.7e6 | 1.1981 | 7.41 | 5.7e6 |
| **5** | 3.1750 | 7.90 | 1.0e6 | 1.7862 | 7.66 | 3.3e5 | 1.5967 | 7.59 | 1.0e6 |
| **6** | 3.3523 | 8.16 | 1.7e7 | 2.1672 | 7.95 | 3.0e6 | 1.4407 | 7.88 | 1.7e7 |
| **7** | 3.4843 | 8.45 | 5.0e6 | 2.3816 | 8.23 | 1.8e6 | 1.3908 | 8.11 | 5.0e6 |

Table 8. Basic characteristics of selected feather-degrading bacteria

| strain | cell morphology | gram -staining | catalase test | ferments glucose | growth in nonfeather media | final pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1-1 | 구균 | - | + | - | + | 7.92 |
| 1-6 | 구균 | - | + | - | + | 7.64 |
| 2-3 | 구균 | - | + | - | + | 7.70 |
| 2-7 | 구균 | - | + | - | + | 7.78 |
| 2-11 | 구균 | - | + | - | + | 7.62 |
| 3-5 | 구균 | - | + | - | + | 7.87 |
| 4-6 | 구균 | - | + | - | + | 8.22 |
| 5-6 | 간균 | - | + | - | + | 8.02 |
| 6-1 | 구균 | - | + | - | + | 7.17 |
| 6-9 | 간균 | ± | + | - | + | 7.93 |
| 6-11 | 구균 | - | + | - | + | 7.68 |
| 8-4 | 구균 | - | + | - | + | 7.82 |
| 10-4 | 구균 | - | + | - | + | 7.63 |
| 11-3 | 구균 | - | + | - | + | 7.97 |
| 11-4 | 구균 | ± | + | - | + | 8.10 |
| 11-6 | 구균 | - | + | - | + | 7.85 |
| 11-10 | 간균 | - | + | - | + | 7.87 |
| 11-11 | 구균 | - | + | - | + | 7.80 |
| 12-6 | 간균 | ± | + | - | + | 7.80 |
| 12-8 | 구균 | - | + | - | + | 8.01 |
| 13-2 | 구균 | + | + | - | + | 7.36 |
| 13-12 | 구균 | - | + | - | + | 7.99 |
| 14-5 | 구균 | - | + | - | + | 7.87 |
| 14-12 | 구균 | - | + | - | + | 7.91 |
| 15-5 | 구균 | - | + | - | + | 7.84 |

| strain | cell morphology | gram -staining | catalase test | ferments glucose | growth in nonfeather media | final pH |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 15-9 | 구균 | - | + | - | + | 7.91 |
| 16-1 | 구균 | - | + | - | + | 7.23 |
| 16-9 | 구균 | - | + | - | + | 7.80 |
| 17-6 | 구균 | - | + | - | + | 7.72 |
| 18-4 | 구균 | - | + | - | + | 7.59 |
| 19-4 | 구균 | + | + | - | + | 7.74 |
| 19-11 | 구균 | - | + | - | + | 7.80 |
| 21-6 | 구균 | - | + | - | + | 7.89 |
| 22-1 | 구균 | - | + | - | + | 7.91 |
| 22-2 | 구균 | - | + | - | + | 7.95 |
| 22-11 | 구균 | - | + | - | + | 7.99 |
| 23-5 | 구균 | - | + | - | + | 7.65 |
| 23-7 | 구균 | - | + | - | + | 7.81 |
| 24-1 | 구균 | - | + | - | + | 7.24 |
| 24-3 | 구균 | - | + | - | + | 8.00 |
| 25-5 | 간균 | - | + | - | + | 7.84 |
| 26-1 | 간균 | - | + | - | + | 7.89 |
| 26-7 | 구균 | - | + | - | + | 7.87 |
| 27-3 | 구균 | - | + | - | + | 8.17 |
| 27-6 | 구균 | - | + | - | + | 7.67 |
| 28-1 | 구균 | - | + | - | + | 7.87 |
| 28-8 | 간균 | ± | + | - | + | 7.76 |
| 28-9 | 구균 | - | + | - | + | 7.32 |
| 29-3 | 간균 | - | + | - | + | 7.69 |
| 30-11 | 구균 | - | + | - | + | 7.85 |

Table 9. Time-dependent change of external pH and cell density of strain FDB5-6 and FDB8-4

| strain \ hours | | 0 | 8 | 16 | 24 | 32 | 40 | 48 | 56 | 64 | 72 | 88 | 102 | 126 | 150 | 174 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FDB 5-6 | pH | 7.04 | 6.84 | 6.90 | 7.00 | 7.09 | 7.09 | 7.13 | 7.17 | 7.33 | 7.34 | 7.52 | 7.64 | 7.72 | 7.91 | 8.02 |
| | CFU/ml | 9.7e4 | 5.6e6 | 9.0e6 | 2.4e7 | nc | 3.2e7 | 6.0e7 | 3.0e7 | 5.0e7 | 3.5e7 | 5.0e7 | 4.2e7 | 2.3e7 | 5e6 | 8e6 |
| FDB 8-4 | pH | 7.09 | 6.94 | 6.97 | 7.05 | 7.08 | 7.08 | 7.19 | 7.24 | 7.26 | 7.25 | 7.38 | 7.51 | 7.61 | 7.75 | 7.82 |
| | 8CFU/ml | 5.0e4 | 3.3e6 | 9.8e6 | 2.2e7 | nc | 4.4e7 | 2.8e7 | 2.4e7 | 3.6e7 | 3.4e7 | 4.2e7 | 4.4e7 | 1.1e7 | 1.2e7 | 4.4e7 |

*CFU/ml expressed as 9.7e4 which means 9.7 x $10^4$ ** nc; not checked

Fig. 2.1. Changes in population and media pH of strain FDB5-6

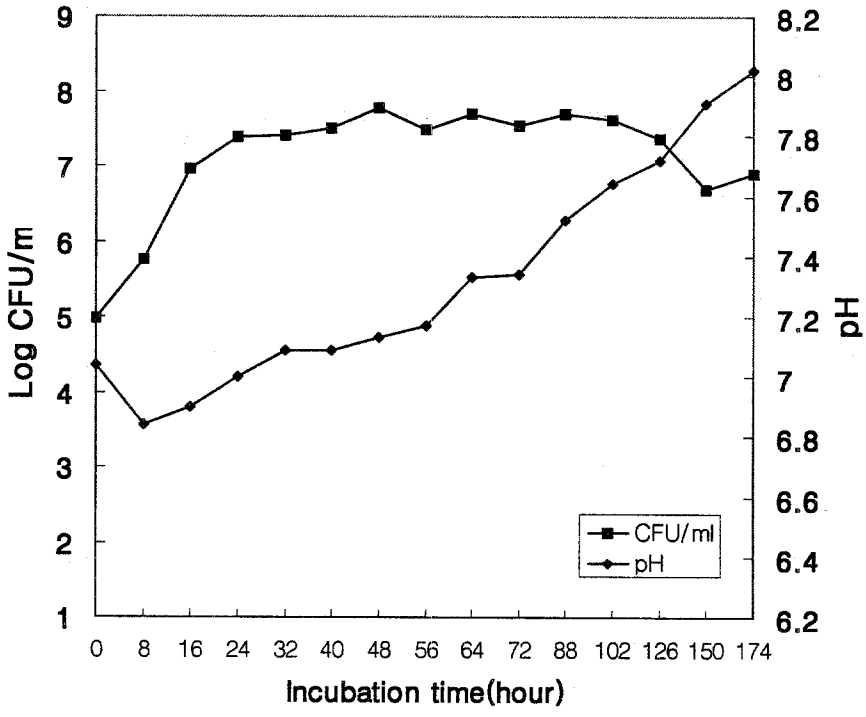


Fig. 2.2. Changes in population and media pH of FDB8-4

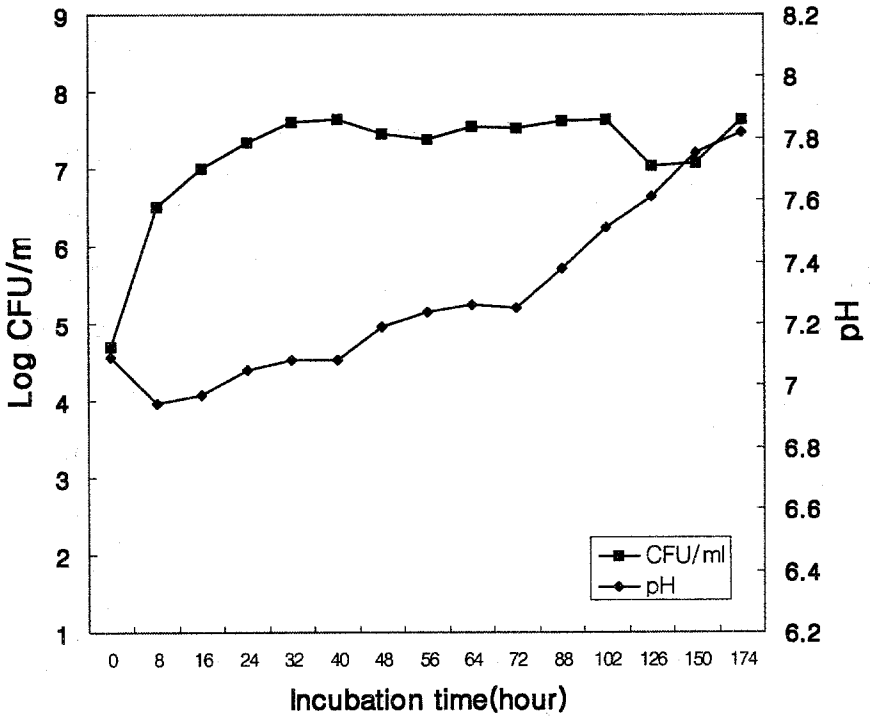
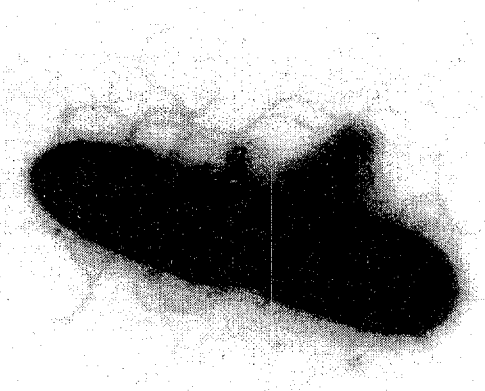


Fig. 3. Electronmicroscopic picture of the strain FDB 11-11



## 4. 우모분 케라틴 분해균주의 최적 생육특성 시험

### 가. 우수 균주의 생육 생리특성 연구

1) 우수균주의 효소활성 및 탄소원 동화 실험: 제1차년도 연구 결과 선발한 우수균주 15종에 대한 효소활성 및 탄소원 동화 실험을 시행한 결과는 각각 Table 10과 Table 11과 같다.

2) FDB11-11 균주(Fig. 4)의 keratinase 생산을 위한 생육 최적 조건 실험:

- 15종의 우수균주 중 가장 우모분해능이 뛰어난 FDB11-11 균주(Fig. 4, Fig. 5)의 keratinase 생산을 위한 생육 최적 조건을 산정하기 위하여 서로 다른 온도(25℃, 37℃, 45℃)와 pH(6.5, 7.5, 8.5) 조건하에서의 activity를 측정하였다. activity는 OD280nm에서 측정하였으며 이때 실험에 사용한 배지는 기초배지(basal medium)에 0.5%의 Feather를 넣어준 후 Autoclave 하여 사용하였는 바 배지의 조성은 다음과 같다.

  In 1 liter of water, $NH_4Cl$: 0.4g, NaCl 0.5g, $KH_2PO_4$: 0.3g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$: 0.1g, Yeast extract: 0.1g, Feather: 5g, Agar: 20g (pH adjusted to 7.5 before 20 min's autoclave)

- 실험결과는 Table 12-1(Activity에 대한 생육온도 및 pH의 영향), Table 12-2(Growth rate에 대한 생육온도 및 pH의 영향), Table 12-3(배지 pH에 대한 생육온도 및 pH의 영향)과 같다.
- 이러한 실험 결과는
  - FDB11-11의 Activity는 각각의 온도에대해서 pH가 올라갈수록 증가하고, 온도는 45℃에서, 그리고 pH는 8.5에서 가장 높은 Activity를 나타냈으며,
  - FDB11-11의 cell growth는 pH 에 의해 영향을 많이 받아 pH 7.5 와 8.5에서 보다는 특히 pH 6.5에서는 낮은 cell growth를 보였고,
  - 배양 중의 pH 의 변화는 계속적으로 알칼리화 되었으나 pH 7.5와 pH 8.5로 배양한 것은 초기에 일시적으로 pH가 낮아지는 현상을 보였다.

나. 우수 균주의 배양 특성 연구

1) 여러 가지 단백질원이 FDB11-11의 우모분해능에 미치는 영향:

- FDB11-11의 배양특성을 조사하기 위하여 여러 가지 protein( feather, feathermeal, commercial feather meal, casein)을 배지에 첨가해 준후 FDB11-11을 접종하여 8일 동안 배양시키면서 Cell density(CFU/ml)의 변화, pH의 변화, 그리고 Keratinase activity의 변화를 조사한 결과는 각각 Table 13-1, 13-2, 13-3 및 Fig. 6에 요약한 것과 같다.

- 이러한 실험결과는 다음과 같은 사항으로 설명 가능할 것으로 판단된다.

  · 기초배지에 여러 가지형태의 feather와 casein을 공급해주었을 때 DB11-11은 casein 같은 단백질 보다는 feather를 단백질원으로 선호하며,

  · 같은 feather라 하더라도 배지에서 적정한 양을 넘으면(2%) 오히려 cell growth와 activity를 저해하는 요인이 됨

  · 적당한 feather 의 양은 배지의 1% 정도였음

  · 공장에서 가공된 feather meal을 단백질원으로 사용하였을 때 cell growth가 가장 높았고, pH도 가장많이 올라갔음

2) 같은 방법으로 여러 가지 carbon과 nitrogen source의 activity에 대한 영향을 4일 간격으로 측정한 결과(Table 14),

  · 여러가지 탄소원과 질소원의 공급영향을 조사한결과 질소원으로는 peptone, 탄소원으로는 glucose , sorbitol, dulicitol, maltose, fructose, cellobiose 가 2배 정도의 activity 증가를 보였음

  · 그러나 mannitol 과 inositol을 첨가해 주었을때에는 오히려 activity가 절반정도로 감소하였음

다. 최적 생육 조건 산정

1) 최적 생육 조건 산정: 상기의 가 및 나항의 실험 결과를 바탕으로 산정한 FDB11-11 균주의 최적 생육조건은 Fig. 7에 요약된 바와 같이 45℃, pH8.5

였다.

2) 최적생육조건에서의 생육속도 및 우모분해능: 상기의 최적조건에서의 Cell growth rate과 keratinase production rate는 Fig. 8과 같았다.

## 5. 선발균주의 케라틴 분해효소의 국재성 시험

가. 케라틴 분해효소의 소재 확인

1) 케라틴 분해효소의 소재를 확인하기 위하여 FDB11-11균주를 포함한 15개 균주 각각에 대해서 배양액을 얻은후 원심분리와 filtering을 통하여 culture supernatants를 얻고, 그 10ml씩을 test tube에 넣고 멸균된 single feather를 넣어준 후 5일간 배양시켜 activity를 측정한 결과는 Table 15와 같다.

2) 15 FDB strain 공히 약하지만 culture supernatant에서 activity를 보였다.

3) FDB11-11이 생산하는 keratinase의 소재를 확인하기 위하여 cell culture supernatant를 ammoniumsulfate(90%)로 침전시켜서 SDS - PAGE를 하였다 (Fig. 9). 그리고 keratinase가 feather에 의해 induction 되는지 알아보기위하여 feather가 함유된 배지와 함유되지 않은 배지에서 FDB11-11을 각각 배양해서 위와 같은 방법으로 전기영동하여 protein의 차이를 확인하였다(Fig. 10).

4) 실험결과, FDB11-11 균주는 다양한 extracellular proteins들을 생산한다는 것을 확인하였다.

5) feather에 의한 induction test 결과, 분자량이 21,000에서 31,000dalton 사이의 protein이 feather를 넣어주지않은 배지에서는 생산되지 않았으며 따라서 이 protein이 keratinase일 것으로 판단되었다.

나. 케라틴 분해효소의 분획실험(Activity by Ammoniumsulfate fractionation)

1) cell culture supernatant 100ml을 얻어서 ammonium sulfate(75% saturation cut)로 단백질을 침전 시킨 후 원심분리하여 획득한 침전물을 10ml 멸균 증류수에 녹여 위와 같은 방법으로 실험한 결과는 Fig. 11과 같다.

2) 15 FDB strain 모두 좋은 activity를 보였으나 특히 FDB 2-3, 10-4, 11-11, 28-9가 높은 activity를 보였다.

다. FDB11-11 균주가 생산하는 keratinase의 최적 activity condition

1) FDB11-11 균주가 생산한 keratinase의 최적 activity condition을 측정하기 위하여 cell culture supernatants를 얻어서 각각 pH를 6에서10까지, 그리고 온도는 15℃에서 60℃로 구분하여 incubation 한 후 activity의 변화를 확인하였다(Table16-1, 16-2)

2) 실험결과, 각 온도별로 pH8일 때 activity가 가장 좋았으며(keratinase production 결과와 같음) 최적 조건은 37℃ pH8이었다.

라. 여러가지 solvent와 detergent, reducing agents가 keratinase의 activity에 미치는 영향

1) 이것을 확인하기 위하여 solvent는 각각 1%, 5%를 첨가해준 후 실험하였고, detergent 및 reducing agent는 0.1%, 0.5%, 1%를 첨가한 후 45℃에서 5일간 배양하여 activity의 변화를 확인하였다.

2) 실험결과는 Table 17(Activity에 대한 solvents의 영향), Table 18(Activity에 대한 detergents와 reducing agents의 영향)과 같다.

3) 이러한 실험 결과는 FDB11-11이 생산하는 Keratinase가 여러가지 solvent와

detergent 및 reducing agent 에 의해 약5%에서 20%정도의 activity 가 감소하였음을 보여 주는 것으로 판단되었다.

마. PMSF의 keratinase에 대한 영향

protease inhibitor인 PMSF를 각각 10㎛, 50㎛, 100㎛, 200㎛, 300㎛, 400㎛이 되게 첨가해준 후 activity의 변화를 확인한 결과는 Fig. 12와 같은 바, PMSF 의 농도가 높아질수록 activity는 저해가 많이되었다.

사. 다른 protease의 feather degrading activity에 대한 영향

여러가지 protease 인 pronase, pepsin, trypsin, papain을 각각 최종농도가 10㎍, 50㎍, 100㎍되게 처리해 준 결과, 이런 protease는 feather를 분해하지 못한다는 것을 확인하였으며 그 자체의 activity가 매우 미약했을 뿐만 아니라 농도를 높여주어도 activity의 변화가 거의 없었다.

## 6. 발효우모분 생산실험

가. 공장에서 1차로 가공된 여러 feathermeal의 발효 실험

공장에서 가공된 여러 가지 feathermeal(A, B, C, D, E)과 순수한 feather만을 갈아서 만든 sample(F)을 가지고(10% w/v) 45℃에서 6일간 배양하면서 각각의 cell population의 변화(Fig. 13)와 activity의 변화(Fig. 14)를 관찰한 결과, FDB11-11이 여러 sample에 대해 공히 activity를 보였으며, cell population의 변화도 비슷하였다.

나. Feathermeal 25% 일 때의 발효 실험

가 항과 같은 방법으로 feather의 양을 10%에서 25%로 높여준 후 8일간 배양하여 최종 activity와 cell population을 확인한 결과(Fig. 15), 역시 가 항과 유사한 결과를 보였다. 그러나 sample(F)가 최대의 cell population을 보였는 바 이것은 다른 sample에 포함된 불순물질이 오히려 세포가 성장하는데 저해하는 것으로 사료된다.

다. 공장에서 1차로 가공된 sample의 배양상등액에서의 activity

각각의 sample을 cell culture supernatant에 5%가되게 첨가해 준 후 5일간 45℃에서 incubation 시킨 후 activity를 확인한 결과(Fig. 16), 6개의 sample 모두 activity를 나타냈으며, activity의 차이가 sample에 따라현격하였다. 순수한 feather인 sample (F)가 가장 낮은 activity를 보였는데 이것은 다른 sample들에는 feather이외의 물질이 섞여있기 때문인 것으로 판단되었다.

라. FDB-strain에 의한 우모 전처리 효과

FDB-strain이 실제적으로 산업현장에서 응용될 수 있는 가능성을 타진하기 위하여 feather 1g에 15종의 FDB의 cell culture 10ml 를 잘 섞어 준 후 8일간 배양하여 121℃에서 20분간 autoclave하고 그 feather를 30ml의 증류수에 현탁하여 activity를 측정한 결과는 Table 19과 같은 바, 결과적으로 이 실험에서도 상기 실험에서 activity 가 높았던 균주들의 activity 가 높게 나왔으나 배양액에 비해 feather의 양이 많은 소이로 feather의 외형상의 분해는 잘 이루어지지 않았다.

마. FDB11-11을 이용한 feather의 대량 발효 실험

1) 대량으로 feather를 발효시키기 위하여 우선 FDB11-11의 cell culture를 1 ℓ 배양하여 준비하였다.1 ℓ 의 배양액에 수분이 포함된 feather 2kg을 잘 섞어 준 후 45℃에서 9일간 배양하여 발효시킨 후 autoclave하고 건조하였다. 초기 우모분해균 FDB11-11 접종량은 $1.2\times10^6$ 이었고 pH는 8.5였다. 소화율 분석은 한국식품개발연구원의 공동연구팀이 시행하였다(결과는 한국식품개발연구원의 해당 부분 연구보고서 참조 요망).

2) 9일간 발효 중의 cell population의 변화와 activity의 변화는 각각 Fig. 17과 Fig. 18에 도시된 바와 같다,

Table 10. Enzymatic activity profiles of selected FDB-strains

| Strain | nitrates→ nitrites | nitrites→ nitrogen | indole production | glucose | araginine | urease | esculin | gelatin | PNPG |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2-3 | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 10-4 | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 11-11 | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 12-8 | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 15-5 | + | - | + | - | - | - | + | + | - |
| 16-1 | - | - | + | - | - | - | + | + | - |
| 16-9 | - | - | + | - | - | - | + | - | - |
| 19-4 | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 21-6 | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| 24-1 | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 24-3 | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 25-5 | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 26-1 | + | - | - | - | + | + | + | - | - |
| 27-6 | + | - | - | - | - | ± | + | - | - |
| 28-9 | - | - | - | - | - | ± | + | - | - |

※ glucose → acidification, arginine → dihydrolase, esculin → β-glucosidase gelatin → hydrolysis, PNPG → β-galactosidase

Table 11. Carbon assimilation profiles of selected FDB strains

| Strain | GLU | ALA | MNE | MAN | NAG | MAL | GNT | CAP | ADI | MLT | CIT | PAC |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2-3 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | + |
| 10-4 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |
| 11-11 | + | - | - | + | + | - | + | - | - | + | - | + |
| 12-8 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |
| 15-5 | + | - | - | - | + | - | + | - | - | + | - | - |
| 16-1 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |
| 16-9 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |
| 19-4 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |
| 21-6 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |
| 24-1 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |
| 24-3 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |
| 25-5 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |
| 26-1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 27-6 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |
| 28-9 | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | + |

Fig. 4. Time-dependent degradation of feathers by strain FDB11-11

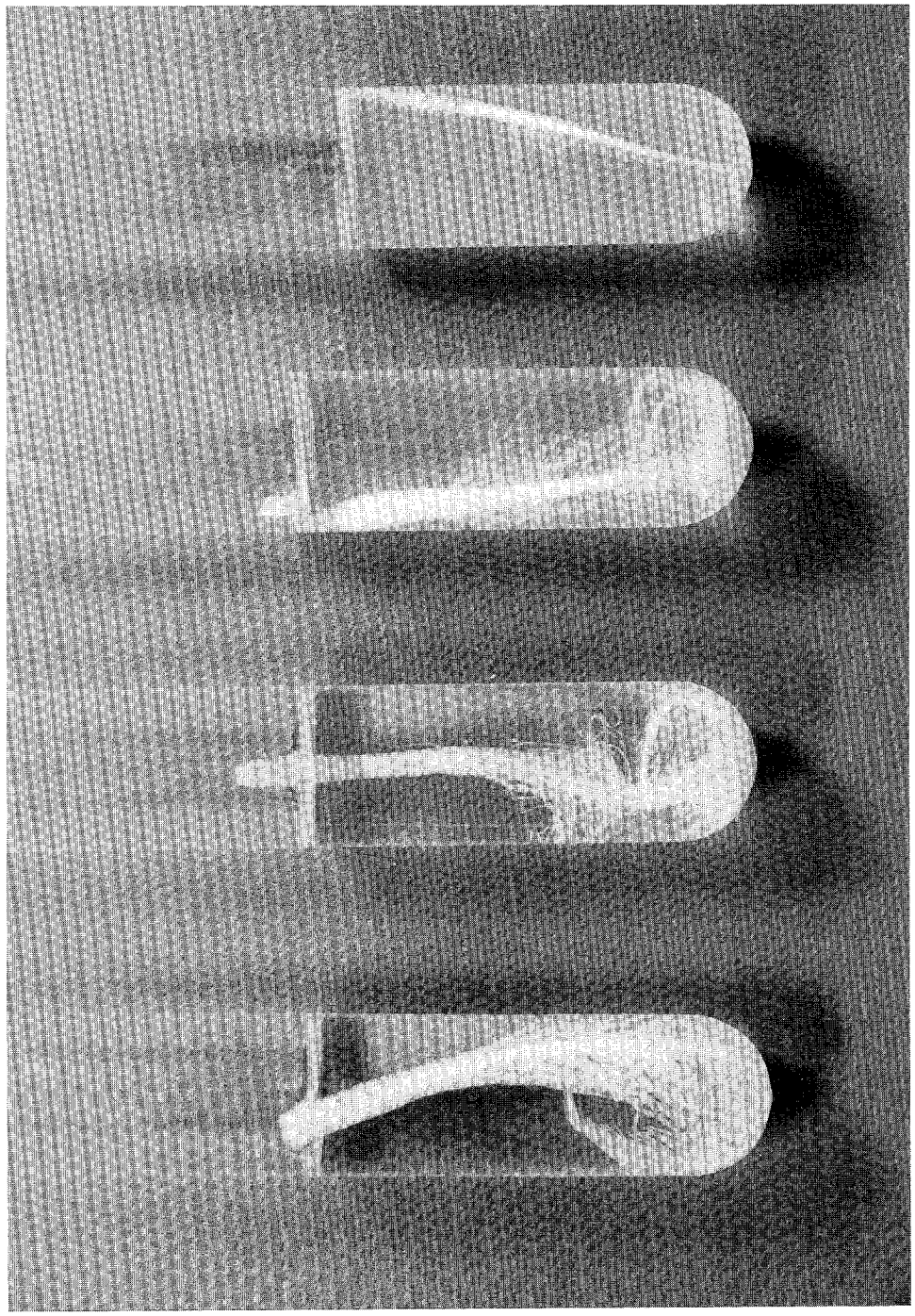
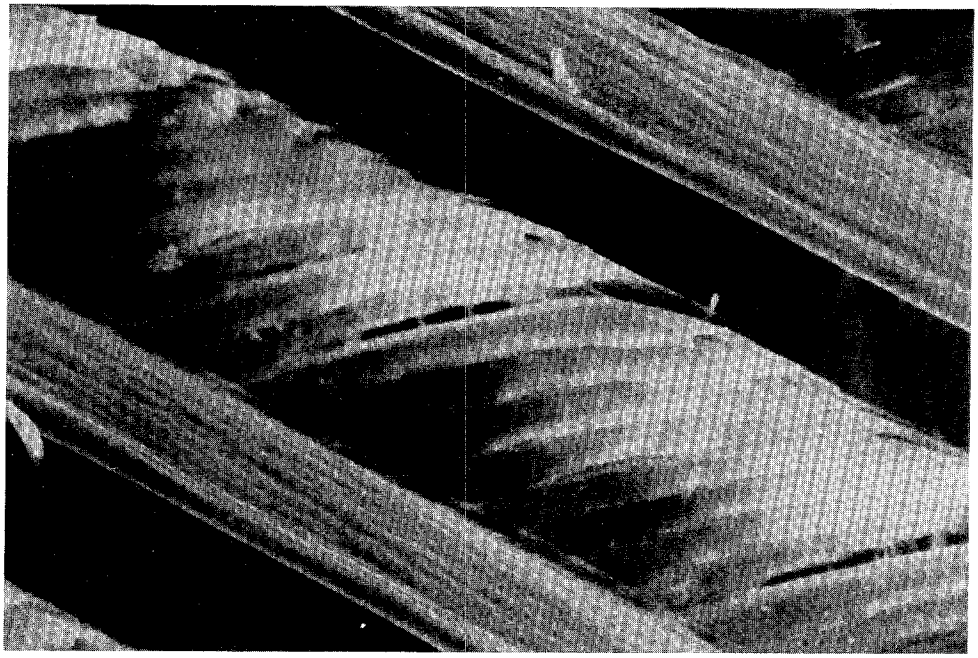


Fig. 5. Scanning electron microscopy of natural feather and degraded feather



Natural feather

Degraded feather

Table 12-1. Effect of different growth temperatures and pHs on production of keratinase

| | Activity | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 25℃ | | | 37℃ | | | 45℃ | | |
| | pH6.5 | pH7.5 | pH8.5 | pH6.5 | pH7.5 | pH8.5 | pH6.5 | pH7.5 | pH8.5 |
| 0 day | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 day | 0.0108 | 0.0201 | 0.0195 | 0.0205 | 0.0495 | 0.0392 | 0.0325 | 0.0520 | 0.0495 |
| 2 day | 0.0526 | 0.0584 | 0.0623 | 0.0546 | 0.0701 | 0.0757 | 0.0669 | 0.0923 | 0.1084 |
| 3 day | 0.0162 | 0.0373 | 0.0305 | 0.0354 | 0.0619 | 0.0738 | 0.0547 | 0.0819 | 0.0945 |
| 4 day | 0.0105 | 0.0103 | 0.0392 | 0.0292 | 0.2066 | 0.2326 | 0.0310 | 0.1313 | 0.1922 |
| 5 day | -0.0993 | -0.0170 | 0.0524 | 0.0142 | 0.1807 | 0.2806 | 0.0163 | 0.2796 | 0.3645 |
| 6 day | -0.1129 | -0.0152 | 0.1687 | 0.0035 | 0.3652 | 0.2930 | 0.0993 | 0.2855 | 0.4346 |
| 7 day | -0.1362 | 0.0113 | 0.0443 | 0.0633 | 0.2879 | 0.3153 | 0.1324 | 0.3074 | 0.4471 |
| 8 day | 0.0021 | 0.0395 | 0.0872 | 0.0789 | 0.2952 | 0.3589 | 0.1535 | 0.2987 | 0.4372 |

Table 12-2. Effect of different growth temperatures and pHs on the growth rate of FDB11-11

| | CFU/ml | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 25℃ | | | 37℃ | | | 45℃ | | |
| | pH6.5 | pH7.5 | pH8.5 | pH6.5 | pH7.5 | pH8.5 | pH6.5 | pH7.5 | pH8.5 |
| 0 day | 5.5e3 | 5.4e3 | 5.5e3 | 5.3e3 | 5.6e3 | 5.5e3 | 5.5e3 | 5.6e3 | 5.4e3 |
| 1 day | 4.0e4 | 3.0e5 | 2.0e4 | 2.7e6 | 6.0e6 | 5.7e7 | 1.0e4 | 1.4e7 | 6.7e7 |
| 2 day | 5.3e6 | 5.8e6 | 5.0e6 | 6.0e6 | 7.0e6 | 1.7e7 | 3.3e4 | 3.3e6 | 3.0e6 |
| 3 day | 7.0e6 | 9.0e6 | 1.0e7 | 3.3e6 | 9.0e6 | 1.7e7 | 3.0e6 | 2.0e7 | 2.5e7 |
| 4 day | 1.0e7 | 1.2e7 | 1.8e7 | 6.0e6 | 3.6e7 | 4.5e7 | 2.3e6 | 6.0e6 | 1.3e7 |
| 5 day | 2.1e5 | 3.0e6 | 1.7e6 | 6.7e5 | 1.3e6 | 2.3e7 | 2.7e5 | 2.3e5 | 1.9e7 |
| 6 day | 5.0e6 | 1.4e7 | 1.8e7 | 9.0e6 | 2.8e7 | 3.4e7 | 1.0e6 | 2.7e7 | 3.5e7 |
| 7 day | 5.7e6 | 3.5e7 | 8.0e6 | 5.7e6 | 3.3e6 | 8.0e6 | 2.3e6 | 7.0e6 | 1.0e7 |
| 8 day | 3.3e5 | 1.5e7 | 9.0e6 | 8.0e6 | 7.0e6 | 1.4e7 | 2.0e6 | 9.0e6 | 2.0e6 |

Table 12-3. Effect of different growth temperatures and pHs on media pH of strain FDB11-11

| | pH | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 25℃ | | | 37℃ | | | 45℃ | | |
| | pH6.5 | pH7.5 | pH8.5 | pH6.5 | pH7.5 | pH8.5 | pH6.5 | pH7.5 | pH8.5 |
| 0day | 6.20 | 7.40 | 8.33 | 6.20 | 7.40 | 8.33 | 6.20 | 7.40 | 8.33 |
| 1day | 6.37 | 7.35 | 8.21 | 6.43 | 7.25 | 7.85 | 6.54 | 7.28 | 7.66 |
| 2day | 6.47 | 7.25 | 7.75 | 6.54 | 7.26 | 7.65 | 6.63 | 7.32 | 7.47 |
| 3day | 6.56 | 7.31 | 7.69 | 6.71 | 7.36 | 7.76 | 6.79 | 7.51 | 7.80 |
| 4day | 6.65 | 7.46 | 7.92 | 6.87 | 7.74 | 7.92 | 6.95 | 7.88 | 8.00 |
| 5day | 6.66 | 7.42 | 7.70 | 6.88 | 7.65 | 7.88 | 7.04 | 7.83 | 8.10 |
| 6day | 6.66 | 7.46 | 7.90 | 6.93 | 7.96 | 8.18 | 7.28 | 8.10 | 8.31 |
| 7day | 6.64 | 7.36 | 7.69 | 6.96 | 7.72 | 8.14 | 7.33 | 8.08 | 8.32 |
| 8day | 6.67 | 7.38 | 7.75 | 7.07 | 7.86 | 8.33 | 7.49 | 8.34 | 8.56 |

Fig. 6. Effect of amount of feathers on the keratinase activity produced by FDB11-11

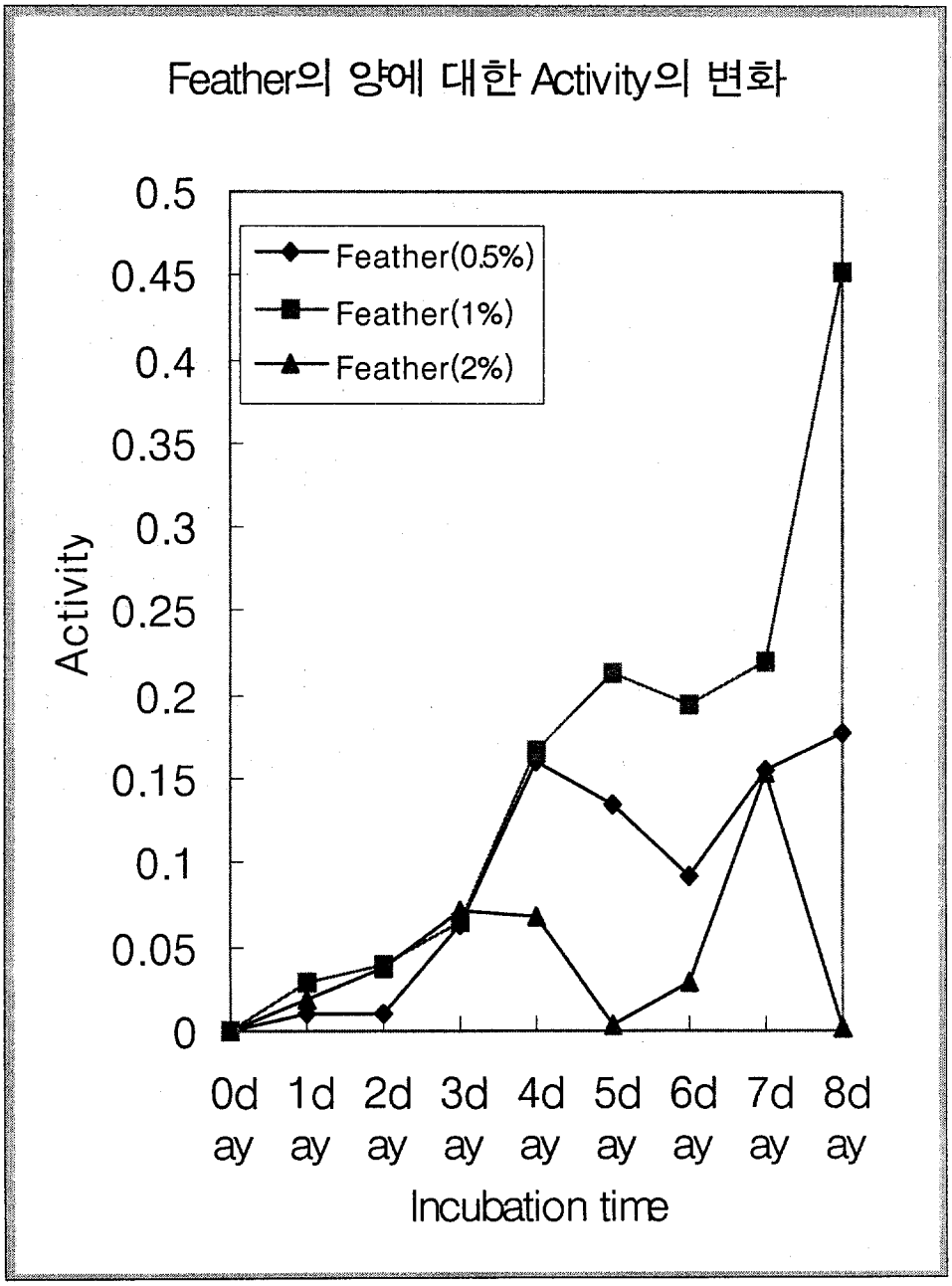


Table 13-1. Effect of protein sources on the keratinase activity of FDB11-11 during 8 days' incubation

| | Activity | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | Feather (0.5%) | Feather (1%) | Feather (2%) | Feather meal | Commercial Feather meal | Casein |
| 0day | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1day | 0.0152 | 0.0107 | 0.0282 | 0.0195 | 0.0102 | 0.1542 | 0.0172 |
| 2day | 0.0244 | 0.0099 | 0.0400 | 0.0379 | -0.0071 | 0.2942 | 0.0289 |
| 3day | 0.0695 | 0.0632 | 0.0654 | 0.0716 | 0.0388 | 0.1939 | 0.0675 |
| 4day | 0.0405 | 0.1598 | 0.1674 | 0.0676 | 0.1145 | 0.0702 | 0.0072 |
| 5day | 0.0238 | 0.1349 | 0.2139 | 0.0031 | 0.0250 | 0.1690 | 0.0301 |
| 6day | 0.0064 | 0.0914 | 0.1942 | 0.0295 | -0.0043 | 0.2789 | 0.1011 |
| 7day | 0.0016 | 0.1549 | 0.2198 | 0.1541 | -0.0033 | 0.3581 | 0.0195 |
| 8day | -0.0105 | 0.1781 | 0.4515 | 0.0011 | -0.0220 | 0.4118 | 0.0987 |

Table 13-2. Effect of protein sources on the growth rate of FDB11-11

| | CFU/ml | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | Feather (0.5%) | Feather (1%) | Feather (2%) | Feather meal | Commercial Feather meal | Casein |
| 0day | 4.0e4 | 4.2e4 | 4.1e4 | 4.1e4 | 4.0e4 | 4.2e4 | 4.0e4 |
| 1day | 1.4e5 | 1.1e5 | 5.1e6 | 2.0e6 | 2.7e6 | 1.9e7 | 2.7e4 |
| 2day | 2.2e5 | 1.5e5 | 4.0e6 | 9.2e4 | 1.5e5 | 6.0e7 | 5.0e4 |
| 3day | 2.2e5 | 5.0e5 | 7.5e6 | 2.2e5 | 2.0e5 | 6.0e6 | 1.3e4 |
| 4day | 2.4e5 | 2.3e5 | 5.0e6 | 7.0e4 | 1.5e5 | 4.0e6 | 1.3e4 |
| 5day | 1.7e5 | 2.7e5 | 8.0e6 | 2.0e6 | 3.0e6 | 9.0e6 | 2.0e4 |
| 6day | 2.2e5 | 2.5e5 | 2.4e6 | 5.0e5 | 1.5e5 | 3.3e5 | 2.3e4 |
| 7day | 7.0e5 | 4.0e6 | 3.0e6 | 5.0e6 | 6.0e6 | 2.7e6 | 3.0e4 |
| 8day | 1.6e6 | 3.0e6 | 3.3e6 | 5.7e6 | 1.5e7 | 4.0e6 | 2.0e5 |

Table 13-3. Effect of protein sources on the pH of medium of FDB11-11

| | pH | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Control | Feather (0.5%) | Feather (1%) | Feather (2%) | Feather meal | Commercial Feather meal | Casein |
| 0day | 6.55 | 6.48 | 6.46 | 6.40 | 6.34 | 6.37 | 5.76 |
| 1day | 6.65 | 6.72 | 6.76 | 6.72 | 6.64 | 6.72 | 5.94 |
| 2day | 6.72 | 6.84 | 6.85 | 6.91 | 6.79 | 6.67 | 5.93 |
| 3day | 6.85 | 6.99 | 7.10 | 7.13 | 7.01 | 7.12 | 6.05 |
| 4day | 6.92 | 7.17 | 7.33 | 7.39 | 7.24 | 7.37 | 6.16 |
| 5day | 6.89 | 7.44 | 7.77 | 7.89 | 7.76 | 7.82 | 6.21 |
| 6day | 6.88 | 7.51 | 7.85 | 7.84 | 7.70 | 8.03 | 6.33 |
| 7day | 6.77 | 7.76 | 8.17 | 8.20 | 8.01 | 8.33 | 6.37 |
| 8day | 6.67 | 7.65 | 8.27 | 8.15 | 7.84 | 8.50 | 6.64 |

Fig. 7. Effect of different growth temperatures and pHs on the keratinase production by strain FDB11-11

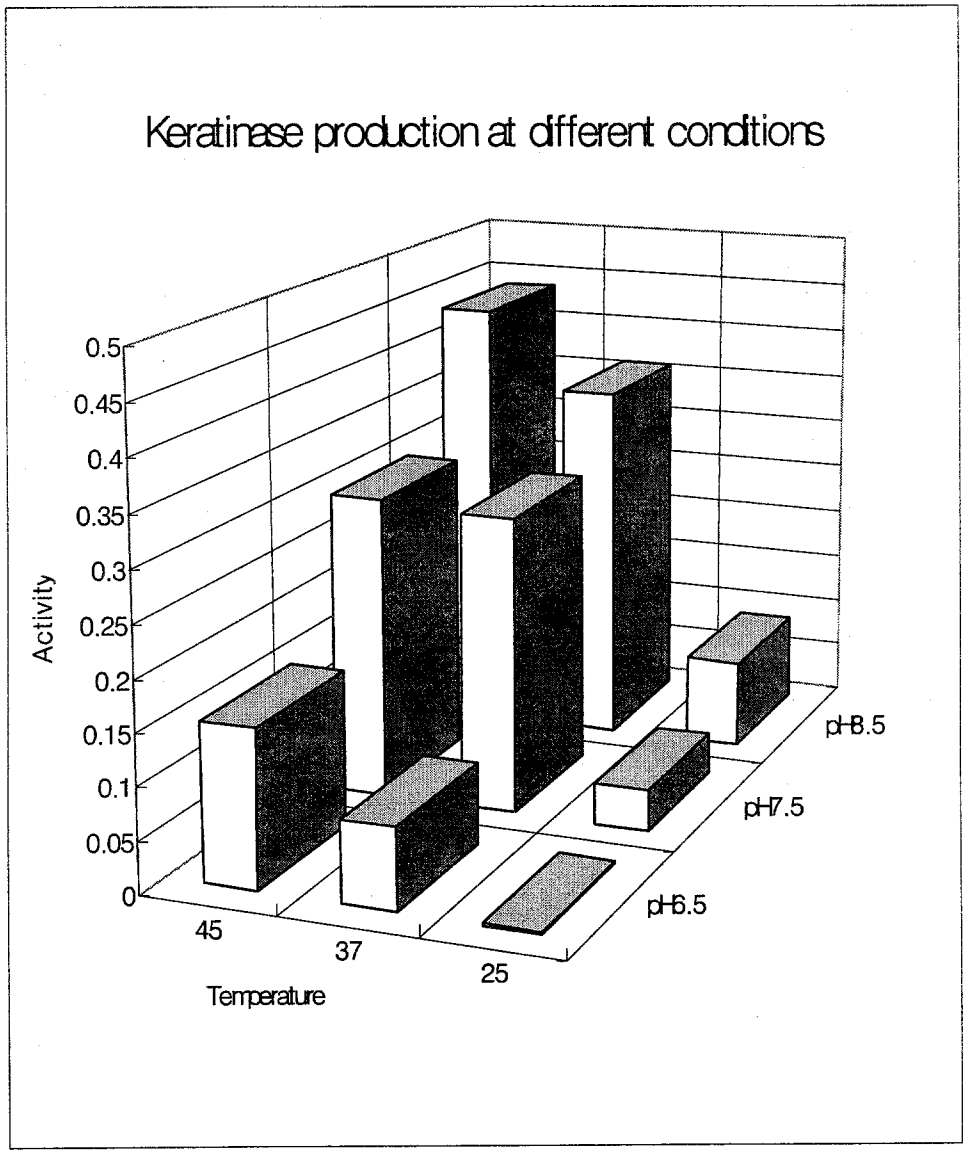


Fig. 8. Cell growth and keratinase activity of the strain FDB11-11 at the optimal conditions

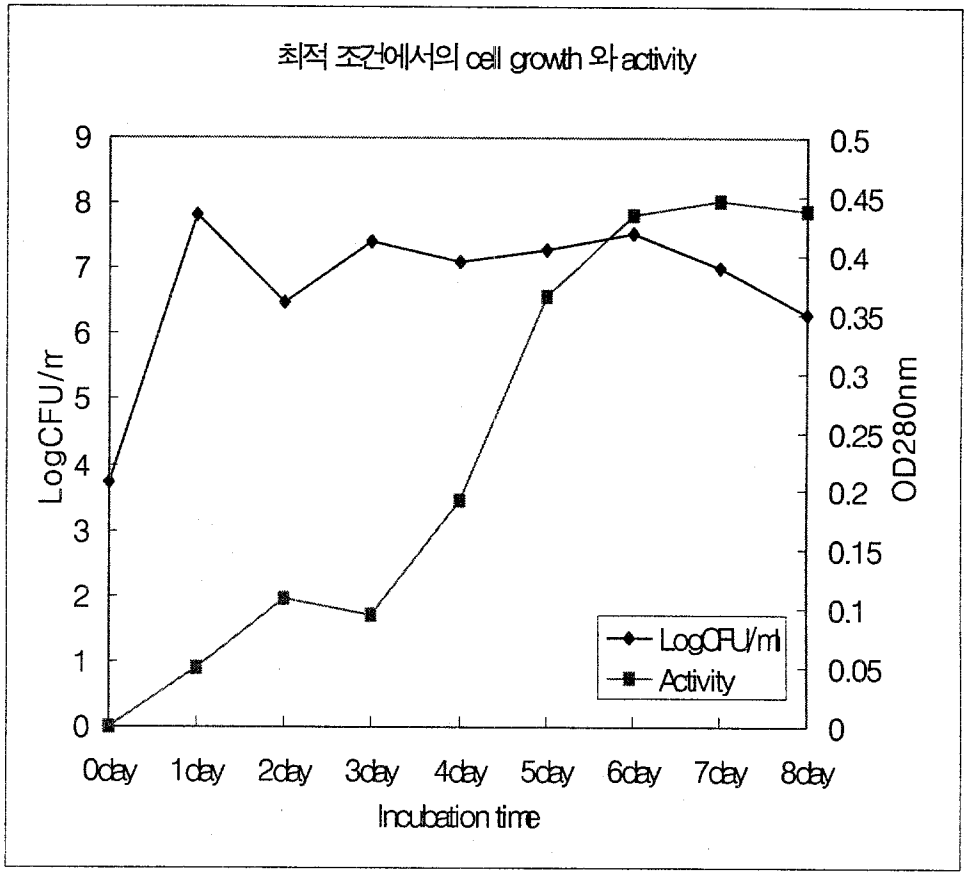


Table 14. Effect of various carbon and nitrogen sources on the keratinase activity, growth rate, and pH of growth medium of strain FDB11-11

| | Activity | | CFU/ml | | pH | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 4day | 8day | 4day | 8day | 4day | 8day |
| None | 0.1671 | 0.2658 | 5.0e6 | 1.7e6 | 8.18 | 8.15 |
| Peptone | 0.3011 | 0.6888 | 1.0e6 | 7.0e5 | 8.89 | 8.94 |
| Tryptone | 0.166. | 0.2715 | 1.2e7 | 4.0e5 | 8.86 | 9.07 |
| Glucose | 0.2897 | 0.6778 | 1.3e6 | 3.3e5 | 6.40 | 6.02 |
| Sucrose | 0.2068 | 0.2694 | 1.0e7 | 5.0e6 | 6.69 | 7.25 |
| Mannitol | 0.0465 | 0.1693 | 1.1e5 | 7.0e4 | 5.82 | 5.60 |
| Lactose | 0.1780 | 0.2623 | 2.0e6 | 1.0e6 | 7.54 | 8.23 |
| Sorbitol | 0.3213 | 0.6341 | 2.0e6 | 1.0e6 | 7.25 | 7.99 |
| Inositol | 0.0512 | 0.1701 | 2.0e4 | 3.0e4 | 5.88 | 5.77 |
| Dulicitol | 0.2954 | 0.6479 | 1.1e7 | 3.3e5 | 7.62 | 7.87 |
| Xylose | 0.1652 | 0.2593 | 1.0e6 | 1.0e6 | 6.45 | 6.74 |
| Maltose | 0.3015 | 0.6844 | 2.7e6 | 1.0e7 | 6.43 | 6.29 |
| Arabinose | 0.1689 | 0.2638 | 2.7e6 | 3.0e6 | 6.90 | 7.65 |
| Fructose | 0.3305 | 0.6532 | 2.0e6 | 3.3e5 | 5.95 | 5.68 |
| Galactose | 0.1589 | 0.2659 | 6.0e6 | 3.3e5 | 7.55 | 8.10 |
| Cellobiose | 0.3205 | 0.6816 | 1.3e6 | 1.5e7 | 6.86 | 7.77 |
| Raffinose | 0.1789 | 0.2522 | 2.3e6 | 3.3e5 | 7.60 | 8.15 |

Table 15. Activity of culture supernatants

| | Activity | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1st | 2nd | 3rd | Average |
| 2-3 | 0.0283 | 0.0281 | 0.0134 | 0.0232 |
| 10-4 | 0.0279 | 0.0041 | 0.0786 | 0.0368 |
| 11-11 | 0.0802 | 0.0338 | 0.0559 | 0.0556 |
| 12-8 | 0.0005 | 0.0059 | 0.0299 | 0.0295 |
| 15-5 | 0.0663 | 0.0231 | -0.0123 | 0.0257 |
| 16-1 | -0.0188 | 0.0866 | -0.0123 | 0.0187 |
| 16-9 | 0.0075 | 0.0185 | 0.0058 | 0.0106 |
| 19-4 | -0.0345 | 0.0559 | 0.0338 | 0.0184 |
| 21-6 | 0.0615 | 0.0721 | 0.0075 | 0.0470 |
| 24-1 | 0.0276 | 0.0283 | 0.0419 | 0.0326 |
| 24-3 | 0.0387 | 0.0203 | 0.0278 | 0.0292 |
| 25-5 | 0.0206 | 0.0381 | 0.0422 | 0.0336 |
| 26-1 | 0.0261 | 0.0182 | 0.0352 | 0.0265 |
| 27-6 | 0.0181 | 0.0241 | 0.0382 | 0.0268 |
| 28-9 | 0.0244 | 0.0177 | 0.0332 | 0.0251 |

Fig. 9. Profiles of extreacellular proteins of FDB11-11 by SDS-PAGE

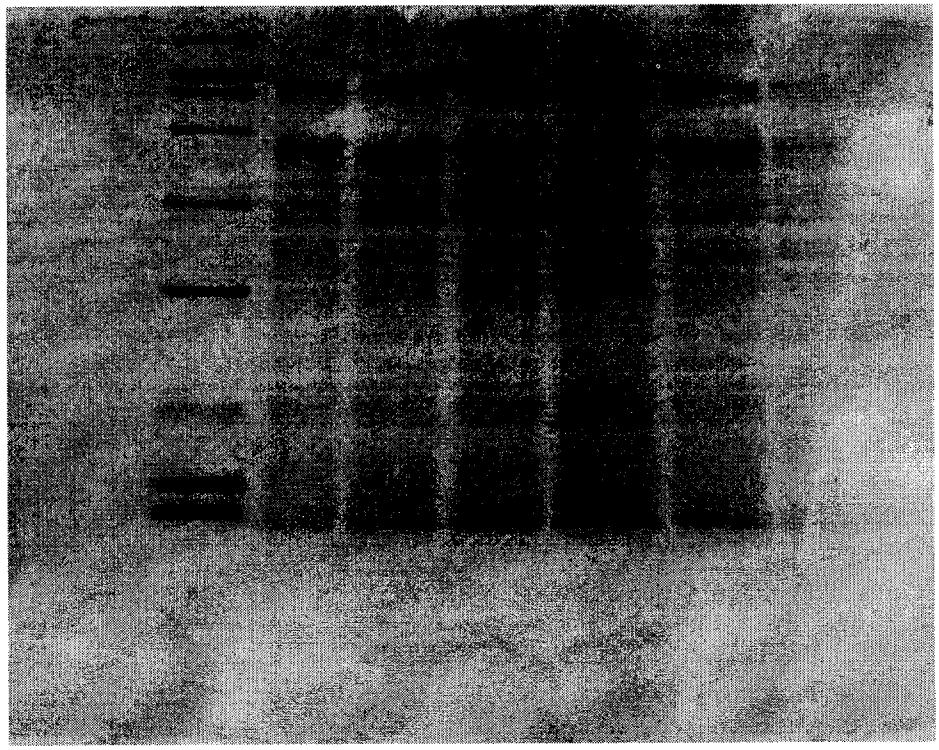
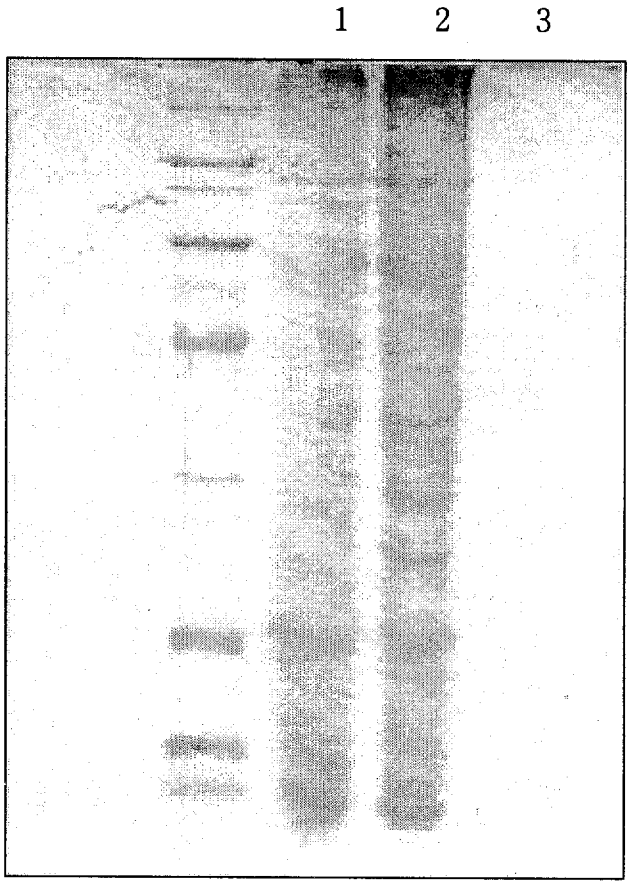


Fig. 10. Induced and non-induced Keratinase




Lane 1 : molecular-weight standards
Lane 2 : protein patterns of non-feather broth
Lane 3 : protein patterns of feather-containing broth

Fig. 11. Profiles of keratinase activity from 15 FDB strains

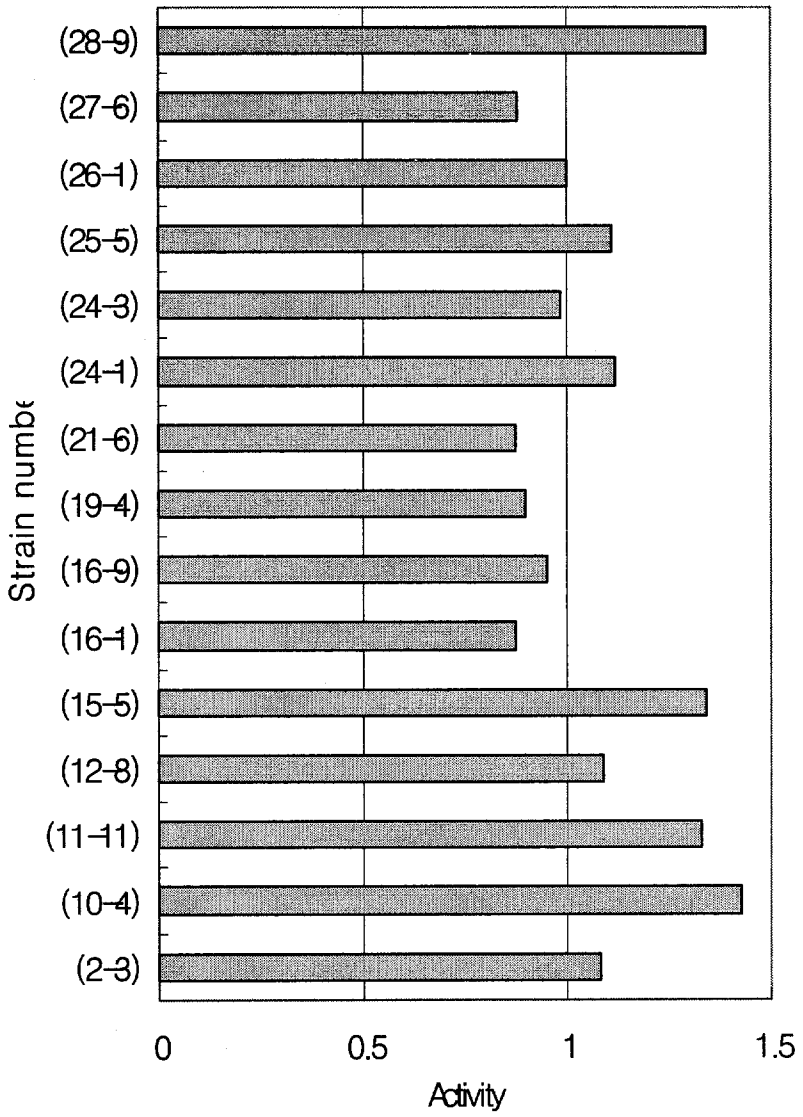


Table 16-1. Optimal conditions for keratinase activity on 15℃, 25℃, 30℃ with pH 6, 7 , 8, 9, 10

| 15℃ | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1st | 2nd | 3rd | average |
| pH6 | 1.8395 | 1.8802 | 1.8041 | 1.8413 |
| pH7 | 2.0395 | 1.9354 | 1.8790 | 1.9513 |
| pH8 | 1.9596 | 1.9229 | 1.9693 | 1.9506 |
| pH9 | 1.9229 | 1.9259 | 2.0070 | 1.9519 |
| pH10 | 1.8751 | 1.8187 | 1.9367 | 1.8768 |

| 25℃ | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1st | 2nd | 3rd | average |
| pH6 | 1.8567 | 1.9027 | 1.9161 | 1.8918 |
| pH7 | 1.8416 | 1.8861 | 1.8717 | 1.8664 |
| pH8 | 2.0781 | 2.0970 | 2.1705 | 2.1152 |
| pH9 | 1.9966 | 2.0750 | 2.0481 | 2.0399 |
| pH10 | 1.8872 | 1.9002 | 1.8838 | 1.8904 |

| 30℃ | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1st | 2nd | 3rd | average |
| pH6 | 2.0762 | 2.0064 | 1.9705 | 2.0177 |
| pH7 | 2.2712 | 2.0388 | 2.3276 | 2.2125 |
| pH8 | 2.1412 | 2.1366 | 2.0422 | 2.1070 |
| pH9 | 2.0342 | 2.0614 | 1.9897 | 2.0284 |
| pH10 | 1.9350 | 1.9102 | 1.7857 | 1.8769 |

Table 16-2. Optimal conditions for keratinase activity on 37℃, 45℃, 60℃ with pH 6, 7 , 8, 9, 10

| 37℃ | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1st | 2nd | 3rd | average |
| pH6 | 2.0049 | 1.9518 | 1.9071 | 1.9546 |
| pH7 | 1.9152 | 1.8484 | 1.8207 | 1.8614 |
| pH8 | 2.3987 | 2.4741 | 2.1111 | 2.3279 |
| pH9 | 2.0409 | 1.9287 | 2.0960 | 2.0218 |
| pH10 | 2.0884 | 2.2527 | 2.0603 | 2.1338 |

| 45℃ | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1st | 2nd | 3rd | average |
| pH6 | 1.9227 | 1.8921 | 2.0616 | 1.9588 |
| pH7 | 2.0118 | 2.1211 | 1.8792 | 2.0040 |
| pH8 | 2.1515 | 2.1884 | 2.2595 | 2.1998 |
| pH9 | 2.1261 | 2.0861 | 2.2275 | 2.1465 |
| pH10 | 1.9590 | 1.9355 | 1.9406 | 1.9450 |

| 60℃ | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1st | 2nd | 3rd | average |
| pH6 | 1.7517 | 1.7909 | 1.7395 | 1.7607 |
| pH7 | 1.8030 | 1.7641 | 1.8228 | 1.7966 |
| pH8 | 1.9666 | 2.0697 | 2.1540 | 2.0634 |
| pH9 | 1.8784 | 1.9265 | 1.8844 | 1.8964 |
| pH10 | 2.0071 | 2.1324 | 1.9842 | 2.0412 |

Table 17. Effect of various solvents on keratinase activity by FDB11-11 culture supernatants at 45℃

| | | 1st | 2nd | 3rd | average | residual activity(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| acetone | 1% | 2.0143 | 2.0922 | 2.1982 | 2.1016 | 89 |
| | 5% | 2.2917 | 2.1517 | 2.1620 | 2.2018 | 93 |
| acetonitrile | 1% | 2.0611 | 1.9741 | 2.0258 | 2.0203 | 86 |
| | 5% | 1.8752 | 2.0001 | 1.9847 | 1.9533 | 82 |
| chloroform | 1% | 1.9558 | 2.0263 | 2.0841 | 2.0220 | 86 |
| | 5% | 1.9818 | 1.8416 | 1.8914 | 1.9049 | 81 |
| diethylether | 1% | 2.1307 | 1.9236 | 1.9706 | 2.0083 | 85 |
| | 5% | 2.5446 | 2.3382 | 2.2385 | 2.3737 | 100 |
| DMSO | 1% | 2.0563 | 2.0613 | 2.0825 | 2.0667 | 88 |
| | 5% | 2.0615 | 2.0563 | 2.0085 | 2.0421 | 87 |
| ethanol | 1% | 2.4239 | 2.4228 | 2.3137 | 2.3868 | 101 |
| | 5% | 1.9971 | 2.1178 | 1.9750 | 2.0299 | 81 |
| ethylacetate | 1% | 2.2908 | 2.2620 | 2.6123 | 2.3883 | 101 |
| | 5% | 1.9604 | 1.8416 | 1.9537 | 1.9189 | 81 |
| isoamylalcohol | 1% | 2.1214 | 2.0420 | 2.1662 | 2.1098 | 89 |
| | 5% | 1.9346 | 2.0927 | 1.9192 | 1.9821 | 84 |
| isopropanol | 1% | 2.5308 | 2.1628 | 2.0173 | 2.2369 | 95 |
| | 5% | 1.8942 | 2.0121 | 2.0982 | 2.0015 | 85 |
| methanol | 1% | 2.3240 | 2.2236 | 2.2013 | 2.2496 | 95 |
| | 5% | 2.0195 | 2.0502 | 2.0808 | 2.0510 | 87 |
| toluene | 1% | 2.1714 | 2.3543 | 2.0100 | 2.1785 | 92 |
| | 5% | 2.0350 | 2.0156 | 2.0326 | 2.0277 | 96 |
| control | | 2.4743 | 2.3490 | 2.2567 | 2.3600 | 100 |

Table 18. Effect of detergents and reducing agents on keratinase activity by FDB11-11 in culture supernatants at 45℃

| | | 1st | 2nd | 3rd | average | residual activity(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **DTT** | 0.1% | 2.1801 | 2.3686 | 2.1005 | 2.2164 | 94 |
| | 0.5% | 2.2392 | 2.0082 | 2.2081 | 2.1518 | 91 |
| | 1% | 2.1472 | 2.0502 | 2.1275 | 2.1083 | 89 |
| **SDS** | 0.1% | 2.2632 | 1.9904 | 2.0480 | 2.1005 | 89 |
| | 0.5% | 2.0450 | 1.9603 | 2.2279 | 2.0777 | 88 |
| | 1% | 1.8758 | 1.8750 | 1.7624 | 1.8377 | 78 |
| **TritonX-100** | 0.1% | 2.2415 | 2.3724 | 2.1948 | 2.2695 | 96 |
| | 0.5% | 2.1315 | 1.9403 | 2.1009 | 2.0575 | 87 |
| | 1% | 2.0010 | 1.9546 | 1.9878 | 1.9811 | 84 |
| **Tween80** | 0.1% | 2.4838 | 2.1669 | 2.3046 | 2.3184 | 98 |
| | 0.5% | 2.1886 | 2.1341 | 2.0963 | 2.1396 | 91 |
| | 1% | 1.8612 | 2.0680 | 1.9571 | 1.9621 | 83 |
| **$\beta$-mercapto ethanol** | 0.1% | 2.0719 | 2.1867 | 2.0623 | 2.1069 | 89 |
| | 0.5% | 2.0197 | 1.9916 | 2.2632 | 2.0915 | 89 |
| | 1% | 2.1182 | 2.1037 | 2.0940 | 2.1053 | 89 |
| **control** | | **2.4743** | **2.3490** | **2.2567** | **2.3600** | **100** |

Fig. 12. Inhibition mode of keratinase activity by protease inhibitor(PMSF)

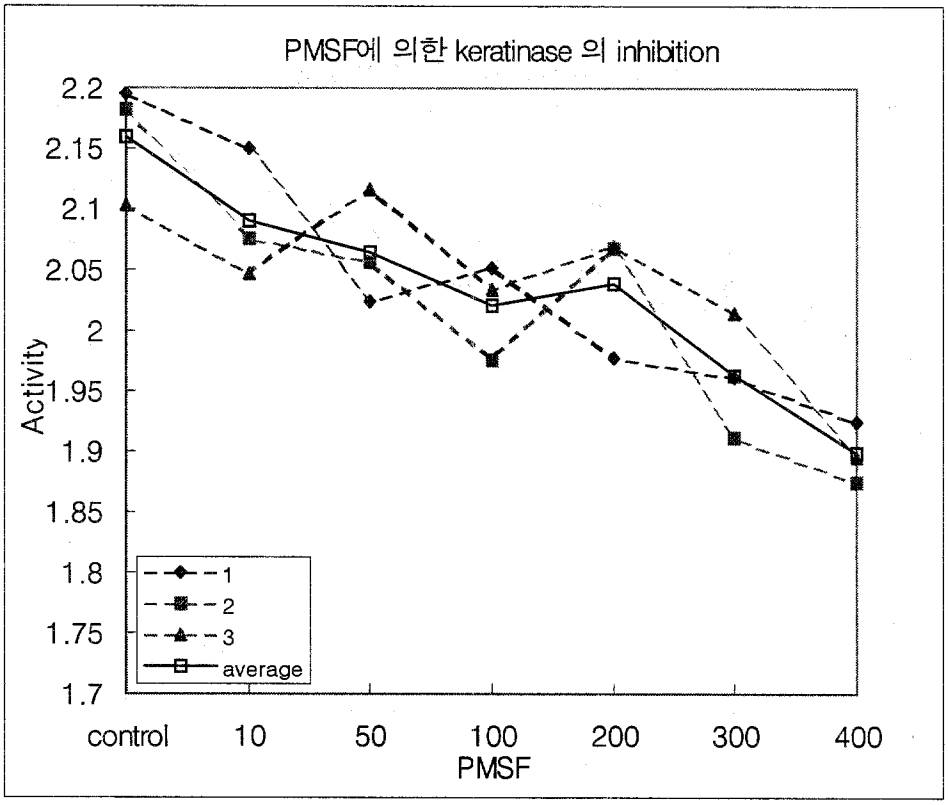


Fig. 13. Change of cell population of FDB11-11 in different feather meal content during 6 days' fermentation at 45℃

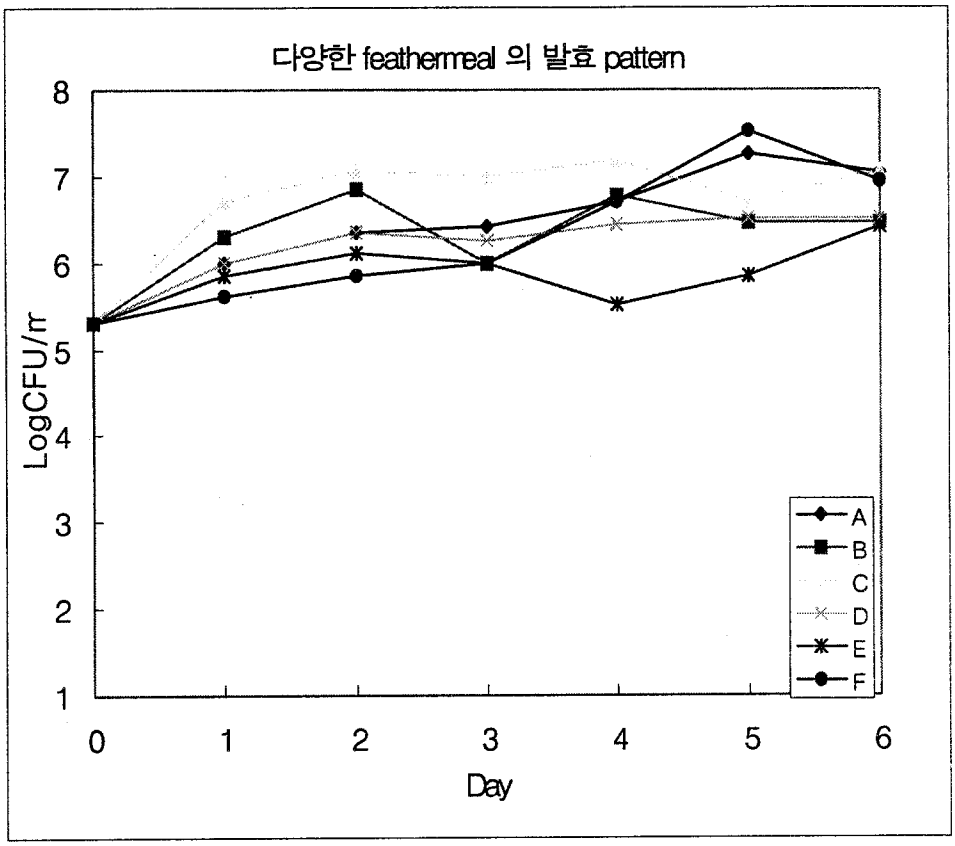


Fig. 14. Change of keratinase activity of FDB11-11 in different feather meal during 6 days' fermentation at 45℃

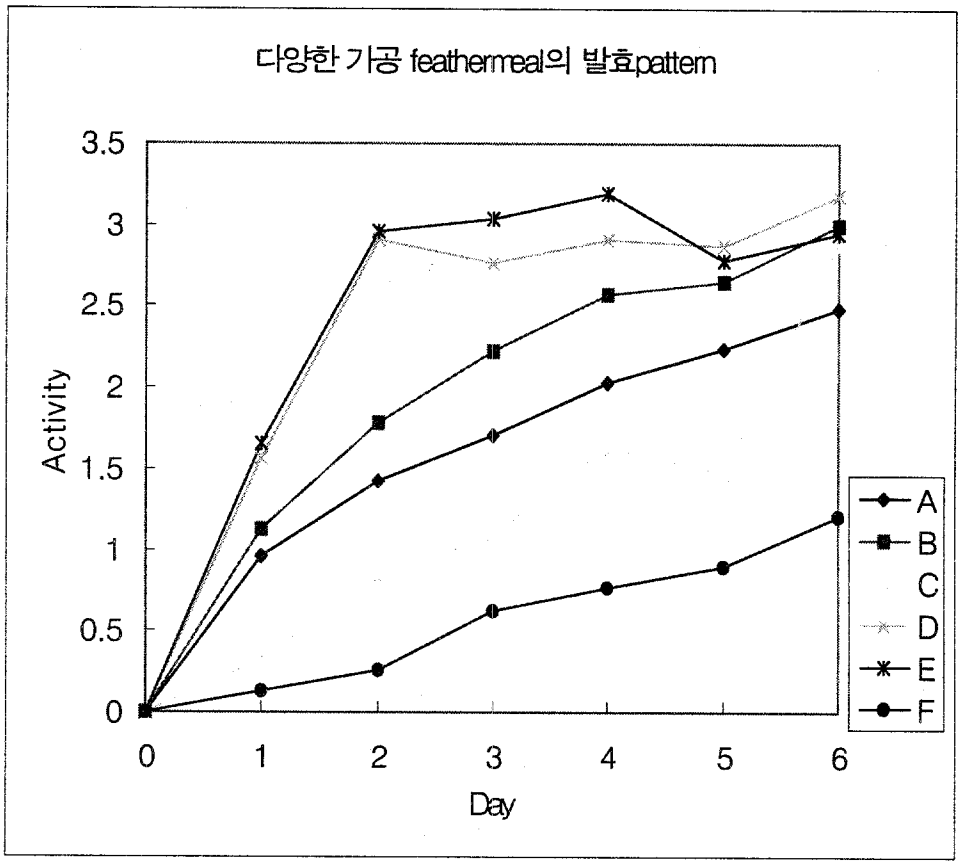


Fig. 15. The difference of cell population and keratinase activity against various feather meal after 6 days' fermentation at 45℃ in 25% feather-containing media

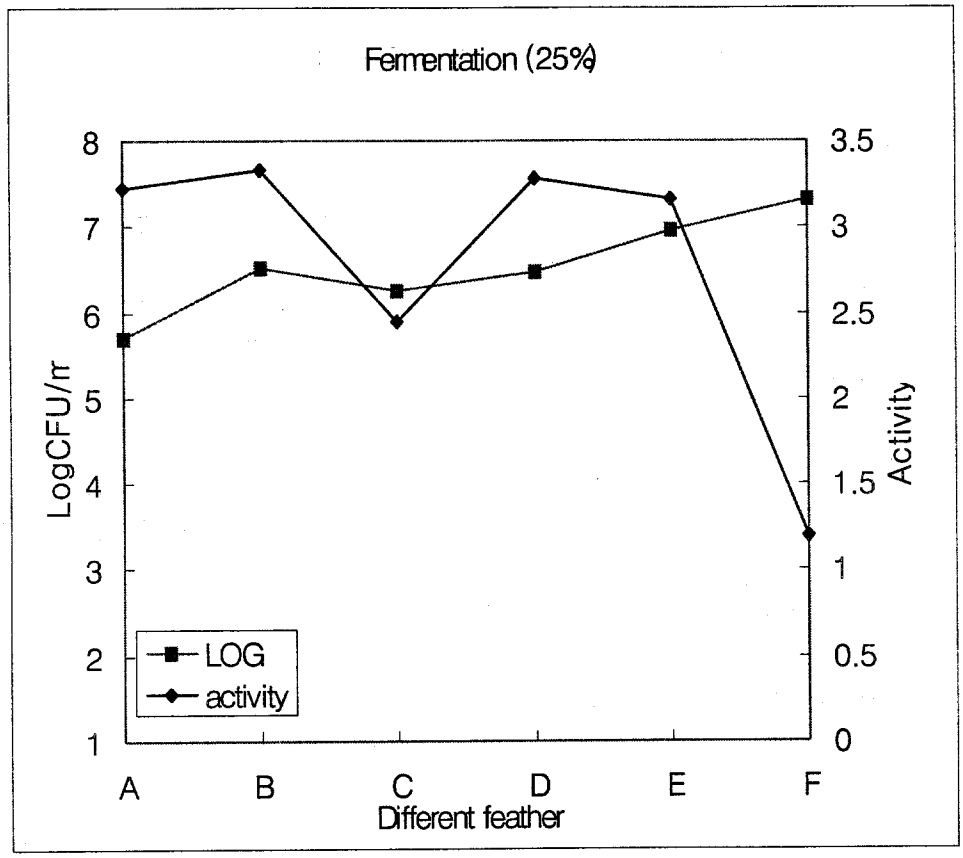


Fig. 16. Keratinase activity against different feather meal by FDB11-11 culture supernatants after 6 days' incubation at 45℃

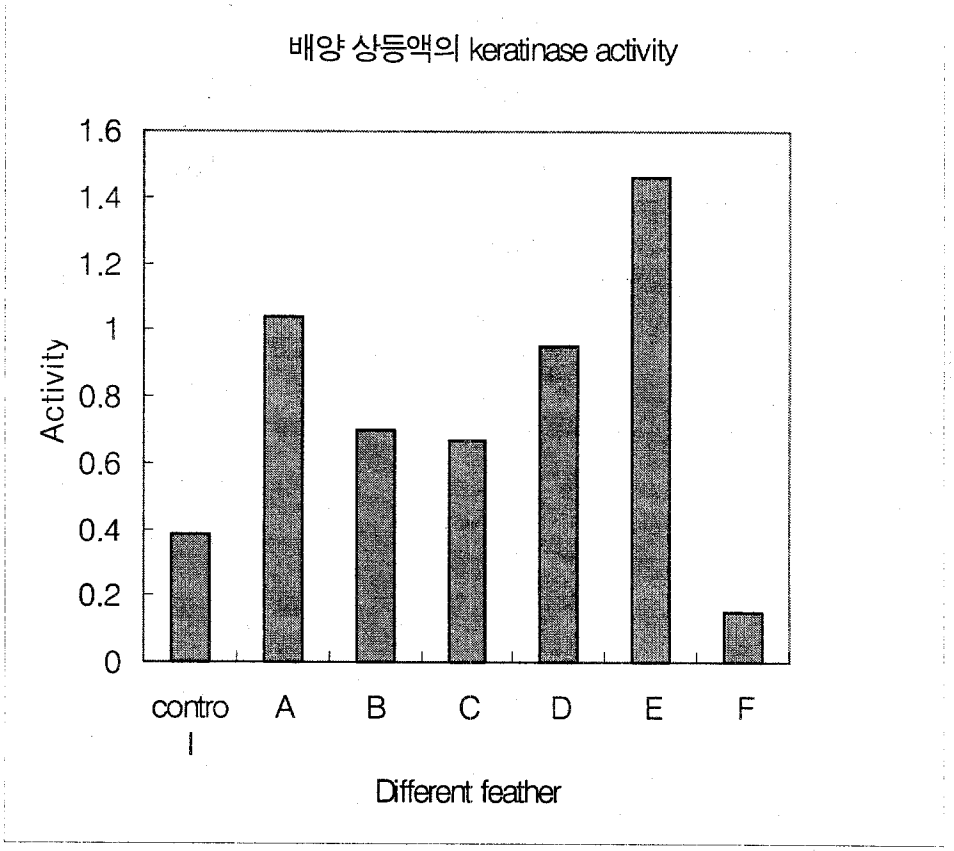


Table 19. Effect of FDB cultures on the degradation of keratin

| | Activity | |
|---|---|---|
| | 280nm | 540nm |
| 2-3 | 0.1235 | 0.1755 |
| 10-4 | 0.0659 | 0.1884 |
| 11-11 | 0.1297 | 0.1824 |
| 12-8 | 0.0668 | 0.0808 |
| 15-5 | 0.1230 | 0.0774 |
| 16-1 | 0.0659 | 0.1858 |
| 16-9 | 0.1276 | 0.1619 |
| 19-4 | 0.1037 | 0.0042 |
| 21-6 | 0.1312 | 0.1032 |
| 24-1 | 0.1175 | 0.1357 |
| 24-3 | 0.1272 | 0.0694 |
| 25-5 | 0.1678 | 0.0369 |
| 26-1 | 0.1255 | 0.1872 |
| 27-6 | 0.0987 | 0.0578 |
| 28-9 | 0.1268 | 0.1795 |

Fig. 17. Change of cell population during large scale fermentation of feathers

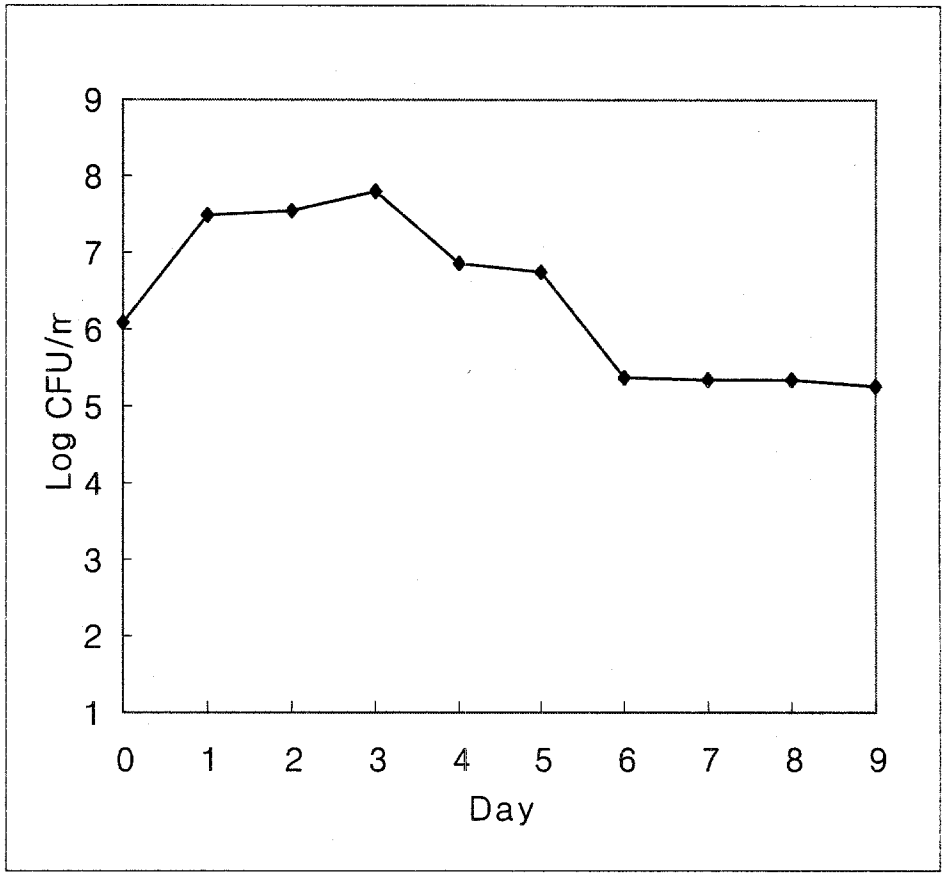
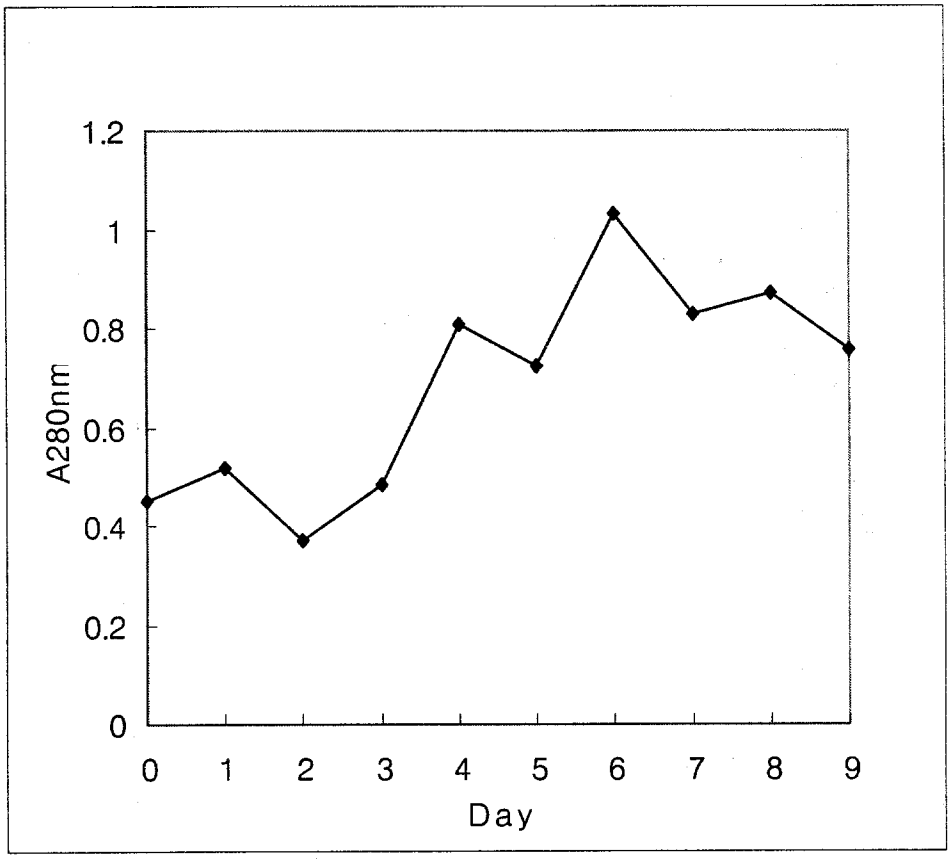


Fig. 18. Change of keratinase activity during large scale fermentation of feathers



## 7. 우모분해효소의 산업화 분자특성 연구

### 가. 우모분해효소의 부분정제

1) 우모분해효소 부분정제액(crude sample)의 제조

· 제2차년도 연구 결과 선발한 우수균주 FDB11-11이 생산하는 우모분해효소를 얻기위해 feather-containing broth(2 ℓ)에 FDB11-11을 접종한 후 45℃에서 14일간 배양하여 그 배양액을 원심분리한 상등액을 얻었다.

· 이 상등액을 다시 ammoniumsulfate로 30% - 90% precipitation 시킨 후 protein pattern을 확 인한 결과(Fig. 19), 90%로 분획한 samle에서 protein banding이 확실히 보였으므로 90% ammoniumsulfate로 precipitation한 후 원심분리하여 이를 부분정제 효소액(crude sample)으로 하였다. 부분정제효소액의 효소 농축도(concentration effect)는 Fig. 20에 도시된 바, cell-free supernatant(lane 2)와 ammoniumsulfate precipitates(lane 3)의 protein을 비교하였다.

· 부분정제효소액 제조에 사용된 배지는 기초배지(basal medium)에 0.5%의 feather를 넣어준 후 autoclave하여 사용하였으며 그 조성은 다음과 같다.

In 1 liter of water, $NH_4Cl$: 0.4g, NaCl 0.5g, $KH_2PO_4$: 0.3g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$: 0.1g, Yeast extract: 0.1g, Feather: 5g, Agar: 20g (pH adjusted to 7.5 before 20 min's autoclaving)

2) 우모분해효소의 mass induction test

· keratinase의 one step purification strategy 개발을 위해 large scale induction 실험을 시행하고 이를 전기영동에 의해 확인하였다(Fig. 21-A, 21-B).

· 실험결과 FDB11-11 균주는 small scale에서의 예비실험결과(Fig. 21-A)와 비교했을 때 분자량 21,000 dalton - 31,000 dalton 범주에 2 종류의 protein이 induction됨을 확인하였다(Fig. 21-B).

· mass induction시 그 상대적 생산량이 증가된 protein이 존재하는 것으로 미루어(Fig. 21-B), feather degrading activity가 keratinase 외에 또 다른

protein에 의해 보조될 가능성도 있는 것으로 예측되었다.

· 상기의 가능성을 판별하기 위한 실험의 하나로 각 protein들의 기원을 추적하였다(Fig. 22). 이를 위해 우모 sample을 증류수에 담가 autoclave한 후 얻은 상등액을 ammoniumsulfate 로 침전시킨 후 각각의 step에서의 protein pattern을 비교하였으며 그 결과 우모 자체에서 용출된 protein들은 없는 것으로 확인되었다.

3) 우모분해효소 부분정제액의 gel filtration

· 보다 정제된 우모분해효소액의 제조를 위해 Sephadex G-50 gel filtration column chromato-graphy를 시행한 결과는 각각 Fig. 23(elution profile) 및 Fig. 24(protein profile)과 같다.

· Major peak 부분(fraction #65, 67, 69, 71, 73, 75)의 sample을 SDS-PAGE 한 결과 분자량 20,000 이하의 작은 protein들이 제거되었음을 확인하였다 (Fig. 24).

나. 부분정제효소의 pH, 열, 용매 안정성 규명

1) 우모분해효소의 pH 안정성 test

· Keratinase 부분정제액을 이용하여 pH2에서 pH10까지 각각 10mM buffer: pH2-3(glycine-HCl), pH4-6(citrate), pH7(phosphate), pH8(Tris-Hcl), pH9-10(glycine-NaOH)로 24시간 동안 투석하면서 pH를 조절하였다.

· 실험결과 우모분해효소는 pH가 올라갈수록 안정한 것으로 확인되었다. pH5에서 pH7사이에서 가장 안정한 것으로 확인되었으며, pH8과 pH9에서 60%이상의 activity가 남아있었으며 pH2와 pH3에서는 약 80%의 activity가 소실되었음(Fig. 25).

2) 우모분해효소의 열안정성 실험

· 우모분해효소를 각각의 온도(30℃ - 100℃)에서 1시간 동안 처리해준 후 activity를 확인하였다.

· 실험결과 우모분해효소는 비교적 열에 안정한 것으로 확인되었으며, 처리 온도가 높아짐에 따라 activity가 감소하였으나, 100℃에서 처리해준 sample 도 30%가량의 activity가 남아있었다(Fig. 26).

3) 우모분해효소의 유기용매 안정성 실험

· 여러가지 유기용매에 대한 우모분해효소의 안정성을 확인하기위하여, 30% 의 유기용매(acetone, ethyl acetate, ethanol, methanol, 2-propanol, iso-amyl alcohol, chloroform, dimethyl ether, toluene)를 우모분해효소 sample에 1시간 동안 처리해준 후 activity를 확인하였다.

· 실험결과 우모분해효소는 여러 유기용매중 ethanol에서 제일 안정하였으며, Ethyl acetate에서 제일 불안정하여 약 50%의 activity가 소실 되었다. isoamyl alcohol, chloroform에서는 20%의 activity가 소실되었으며, dimethyl ether, toluene, acetone에서는 30%, methanol, 2-propanol에 서는 약 40%의 activity가 각각 감소하였다(Fig. 27).

## 8. 우모분해효소의 유전특성 연구

가. 우모분해균주의 항생제 저항성 실험

· 우모분해균주의 유전특성연구를 위한 기초실험으로 여러 가지 항생제 (ampicillin, chloramphe- nicol, erythromycin, vancomycin)를 배지에 2㎍/ml 에서 128㎍/ml까지 넣어준 후 FDB 4균주의 배양액을 1㎕ spot하여 4일동안 45℃에서 배양하면서 colony형성을 관찰하였다.

· 우모분해균인 FDB11-11, FDB21-6, FDB24-1, FDB26-1은 4가지의 항생제 에 대해 유사한 저항 성을 가진 것을 확인하였으며, ampicillin(Table 20-1) 을 처리해준 경우 4균주모두 소량의 항생제 즉 2㎍/ml을 넣어주었을 때 전혀 자라지 않았다. Chloramphenicol(Table 20-2)의 경우, FDB11- 11, FDB21-6, FDB24-1균주는 4㎍/ml을 처리해준 sample도 colony를 형성하였고, FDB26-1균주만이 그보다 항생제 저항성이 낮았다. 배지에 erythromycin(Table 20-3)을 첨가한 경우, FDB24-1이 16㎍/ml의

erythromycin을 첨가한 배지에서도 colony를 형성하였으며, FDB11-11은 8㎍/ml, FDB24-1과 FDB26-1은 4㎍/ml의 농도에서 저항성을 보였다. FDB 4균주모두 vancomycin에는 2㎍/ml 이상의 농도에서 성장이 저해됨을 보였다(Table 20-4).

나. 이종유전자표지(heterologous gene probe)에 의한 우모분해효소의 유전자 탐색:

North Carolina State University의 Shih 박사팀이 분석한 *Bacillus licheniformis* PWD-1 기원의 keratinase 유전자로부터 primer sequence를 다음과 같이 설계하고 이를 이용하여 FDB11- 11 chromosome에의 PCR amplication fragment 탐색을 시행하였다.

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Amino acid | Q | T | V | P | Y | G | I | P |
| DNA probe | 5'-CAA | CCG | TTC | CTT | ACG | GCA | TTC | CTC |

(antisense sequence는 random primer 이용)

## 9. 산업화 공정개발

가. 균체에 의한 우모분해 공정 개발

1) FDB11-11을 이용한 feather 의 대량 발효 실험

· FDB11-11균주를 이용, 대량으로 feather를 발효시키기 위하여 우선 FDB11-11의 cell culture를 1ℓ배양한 후 그 배양액에 수분이 포함된 feather 4 kg을 잘 섞어준 뒤 45℃에서 14일간 배양하여 발효시키고 이를 autoclave한 후 건조하였다(초기 접종량은 $1.2\times10^6$, pH 8.5).

· 14일간 발효중의 cell population의 변화와 activity의 변화는 각각 Fig. 28과 Fig. 29에 요약 도시된 바와 같음.(2차년도 대량 발효시보다 5일간 연장 배양하였음)

2) 최적 발효 starter의 제조: 토양에서 분리된 4종의 FDB 균주를 이용한 우모분해 최적화 실험

· FDB11-11, FDB21-6, FDB24-1, FDB26-1을 이용한 co-culture: 우수우모분해균주로 선발된 FDB 4균주를 이용한 최적 starter 제조를 위해 4종의 균주를 각각 preculture한 다음 200ml broth(feather contained)에 각각 1 균주만 접종한 것, 2 균주를 접종한 것, 3 균주를 접종한 것, 그리고 4 균주 모두를 접종한 것 등으로 구분하여 접종, 8 일간 배양한 후 각 시료의 cell population, pH, keratinase activity의 변화를 분석하였다(Table 21).

· 실험결과 1 균주만을 접종한 시료群에서는 FDB11-11균주와 FDB26-1균주의 activity가 가장 우수하였으며좋았으며, 2균주를 접종한 경우에서도 FDB11-11과 FDB26-1을 같이 접종해주었을 때의 activity가 가장 우수하였다(Table 22).

· 또한 3균주를 같이 접종한 경우와 4균주모두를 접종한 경우에는 FDB11-11과 21-6, 26-1을 접종하였을 경우의 activity가 가장 우수하였으나 FDB11-11과 FDB26-1 두 균주를 접종하였을 때의 activity와 별 차이가 없었다.

· 따라서 최적의 starter는 FDB11-11과 FDB26-1 두 균주를 혼합한 것으로 판단되었다.

· cell population과 pH의 변화는 시료에 따라 차이가 있었으나 activity와는 상관관계가 없었다.

· 이 실험에 사용된 4 균주의 기본적인 특징은 다음과 같다.

| Characteristics | FDB11-11 | FDB21-6 | FDB24-1 | FDB26-1 |
|---|---|---|---|---|
| Cell morphology | coccus | coccus | coccus | rod |
| Gram-staining | - | - | - | - |
| Catalase test | + | + | + | + |
| Oxidase test | + | + | + | + |
| Fermentation of glucose | - | - | - | - |
| Growth in non-feather broth | + | + | + | + |
| Final pH | 7.80 | 7.89 | 7.24 | 7.89 |
| Origin | 토양(하일) | 토양 | 토양 | (계분+나무) |
| Enrichment | ○ | ○ | ○ | ○ |

3) FDB11-11, FDB21-6, FDB24-1, FDB26-1 co-culture의 feathermeal 적성 분석:

· 상기 2)항과 같은 방법으로 영양분을 feather에서 feathermeal(commercial)로 바꿔준 후 그 이용을 확인한 결과, activity는 차이가 있었으나 feather를 이용하였을 때 보다는 크지 않았다(Table 21). 이는 feathermeal 자체가 이미 공장에서 제조될 당시 여러 공정을 거쳐 자연적인 상태의 feather과는 다른 성분으로 바뀐 때문으로 판단되었다.

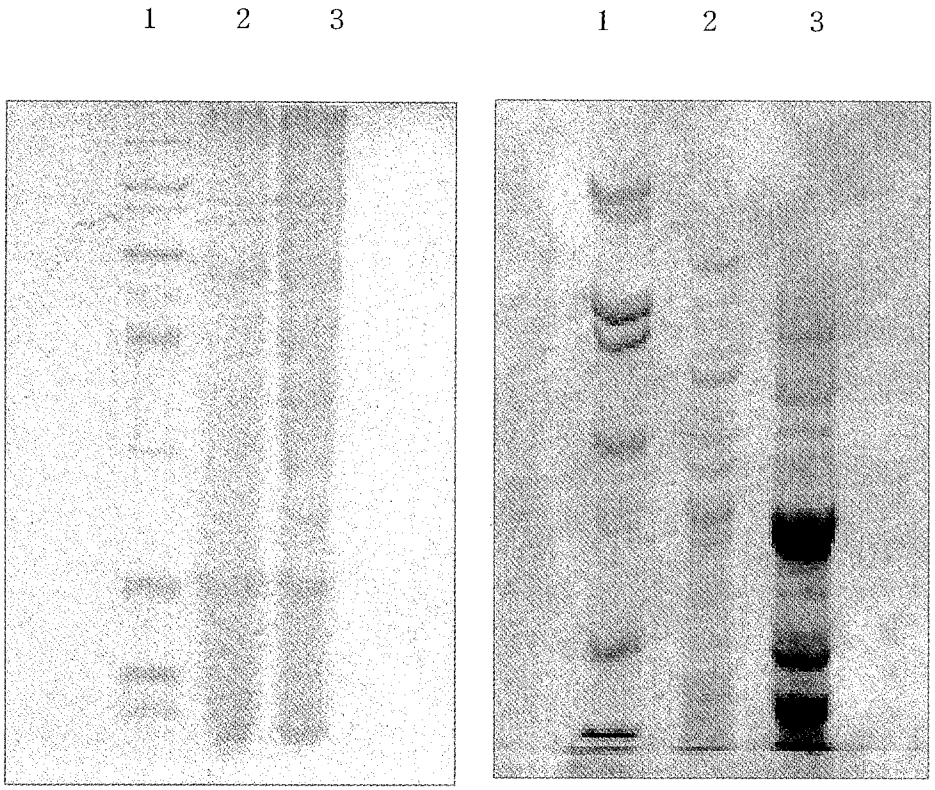
4) FDB11-11과 FDB26-1 2균주를 이용한 feathermeal의 이용도 분석:

· 위 실험에서 가장 activity가 좋았고, 또한 경제적인(2 균주만을 이용함) FDB11-11과 FDB26-1의 co-culture를 이용해 여러 공장에서 만들어진 feathermeal을 영양분으로 하여 배양한 후 cell population과 pH, 그리고 activity의 변화를 확인한 결과, 6 종류의 feathermeal의 이용도에 유의성 있는 차이는 발견되지 않았음(Table 23). 이는 상기 두 균주의 혼합배양이 일반적으로 모든 시료에 응용될 수 있음을 시사하는 매우 고무적인 결과로 판단된다.

Fig. 20. Protein profiles of starin FDB11-11

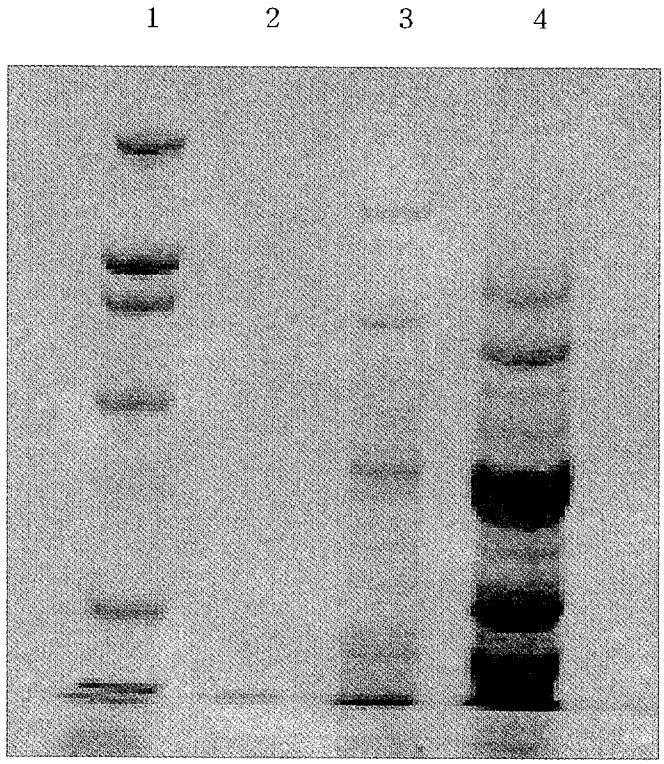
Lane 1 : molecular-weight standards
Lane 2 : protein patterns of cell-free supernatants
Lane 3 : protein patterns of ammoniumsulfate precipitates

Fig. 21. Keratinase induction in strain FDB11-11




Lane 1 : molecular-weight standards
Lane 2 : protein patterns of non-feather broth
Lane 3 : protein patterns of feather-containing broth

Fig. 22. Comparison of protein profile: water extracts of autoc laved feather, nutrient broth, and feather-containing broth




Lane 1 : molecular-weight standards
Lane 2 : protein pattern of water extracts of autoclaved feather
Lane 3 : protein pattern of non-induced sample
Lane 4 : protein pattern of Induced sample

Fig. 23. Elution profile of crude proteins from strain FDB11-11 on Sephadex G-50

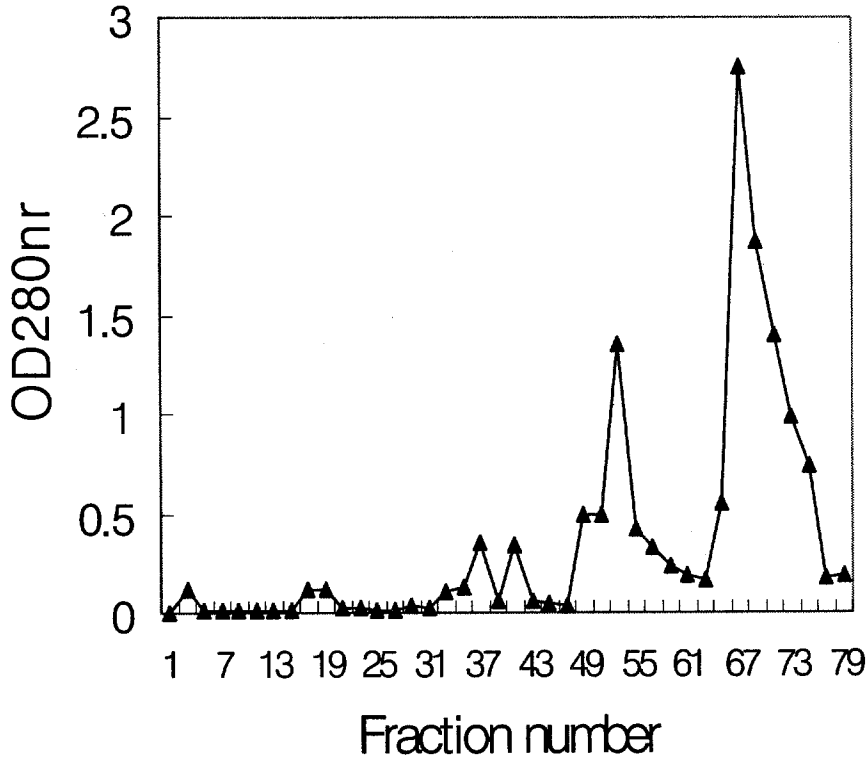
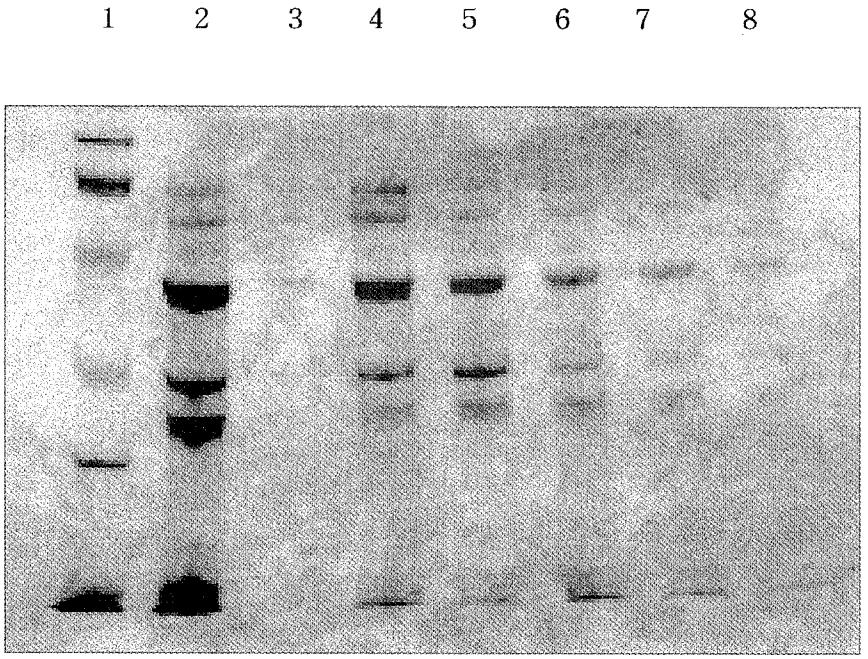


Fig. 24. SDS-PAGE of gel filtrates




Lane 1 : molecular-weight standards
Lane 2 : protein profiles of induced samples of FDB11-11
Lane 3 : SDS-PAGE of fraction number 65
Lane 4 : SDS-PAGE of fraction number 67
Lane 5 : SDS-PAGE of fraction number 69
Lane 6 : SDS-PAGE of fraction number 71
Lane 7 : SDS-PAGE of fraction number 73
Lane 8 : SDS-PAGE of fraction number 75

Fig. 25. pH stability of keratinase produced by FDB11-11

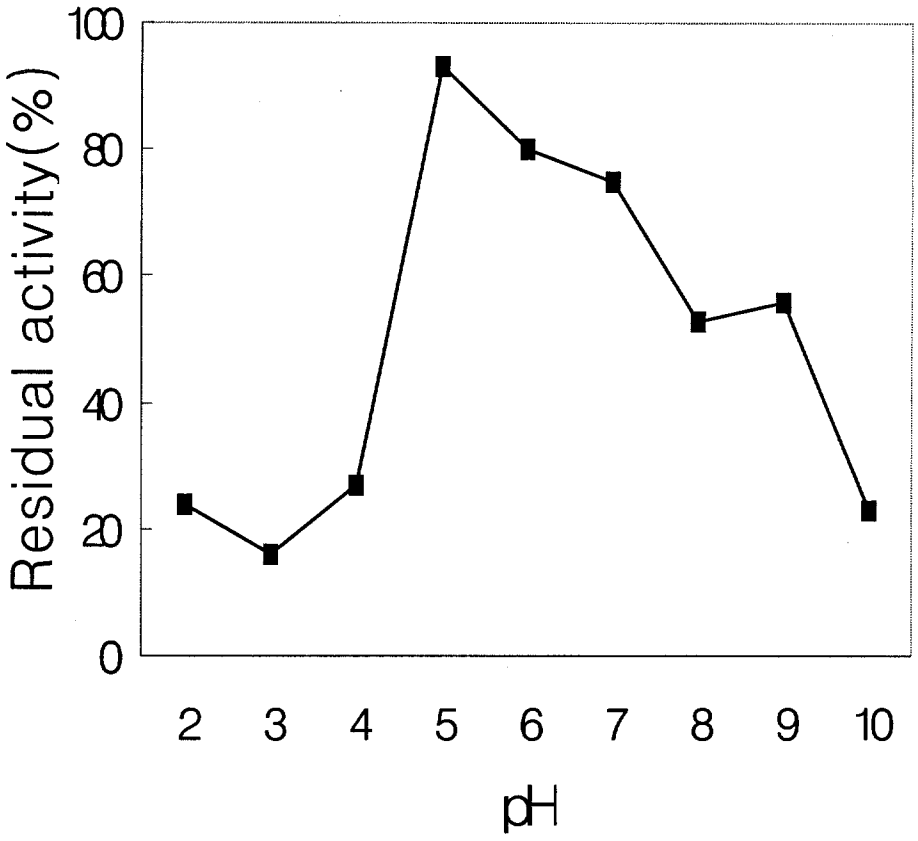


Fig. 26. Heat stability of keratinase produced by FDB11-11

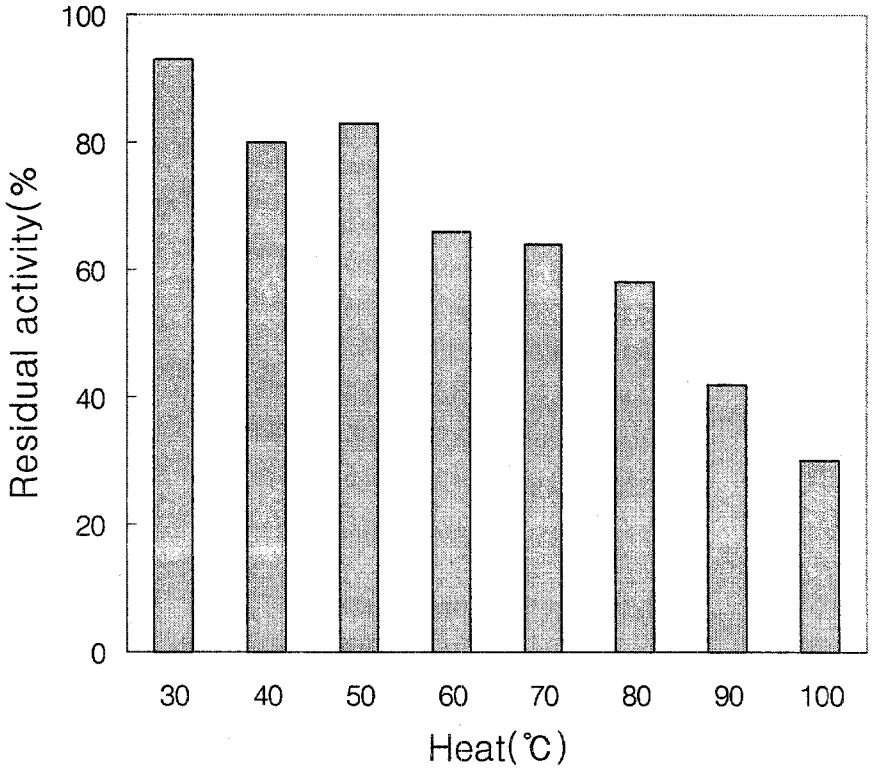


Fig. 27. Solvent stability of keratinase produced by FDB11-11

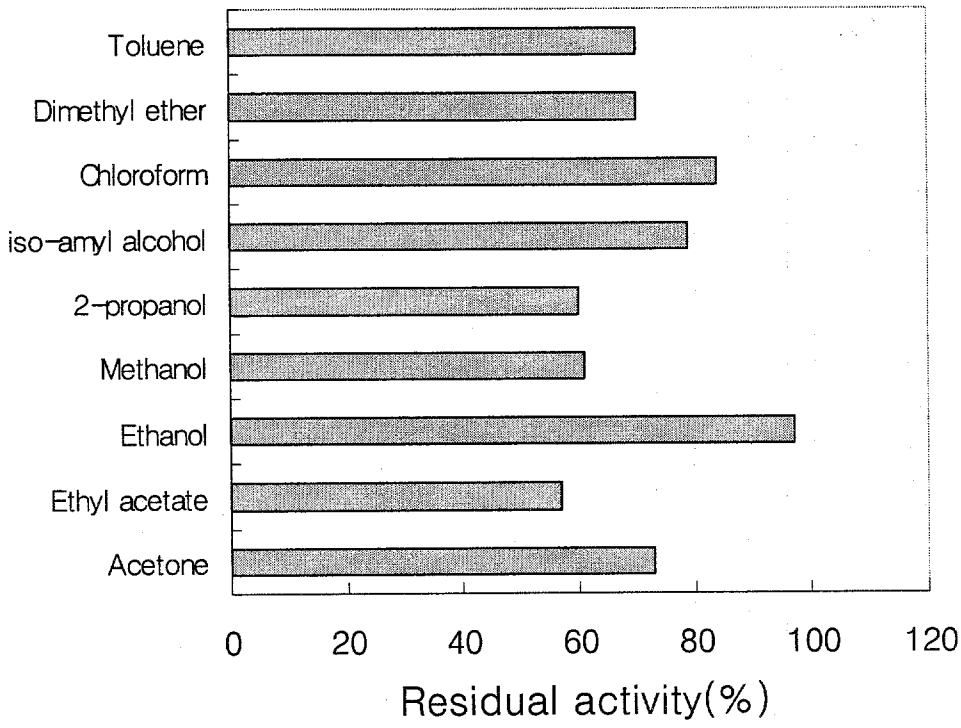


Table 20. Cell growth of 4 FDB strains on antibiotic treatment

20-1 Ampicillin

| Strain # | FDB11-11 | | | | FDB21-6 | | | | FDB24-1 | | | | FDB26-1 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Day | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

20-2. Chloramphenicol

| Strain # | FDB11-11 | | | | FDB21-6 | | | | FDB24-1 | | | | FDB26-1 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Day | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2μg/ml | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 4μg/ml | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 8μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

20-3. Erythromycin

| Strain # | FDB11-11 | | | | FDB21-6 | | | | FDB24-1 | | | | FDB26-1 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Day | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2μg/ml | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 4μg/ml | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 8μg/ml | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 16μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 32μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

20-4. Vancomycin

| Strain # | FDB11-11 | | | | FDB21-6 | | | | FDB24-1 | | | | FDB26-1 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Day | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 2μg/ml | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 4μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 64μg/ml | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Fig. 28. Change of cell population during large scale fermentation of feathers

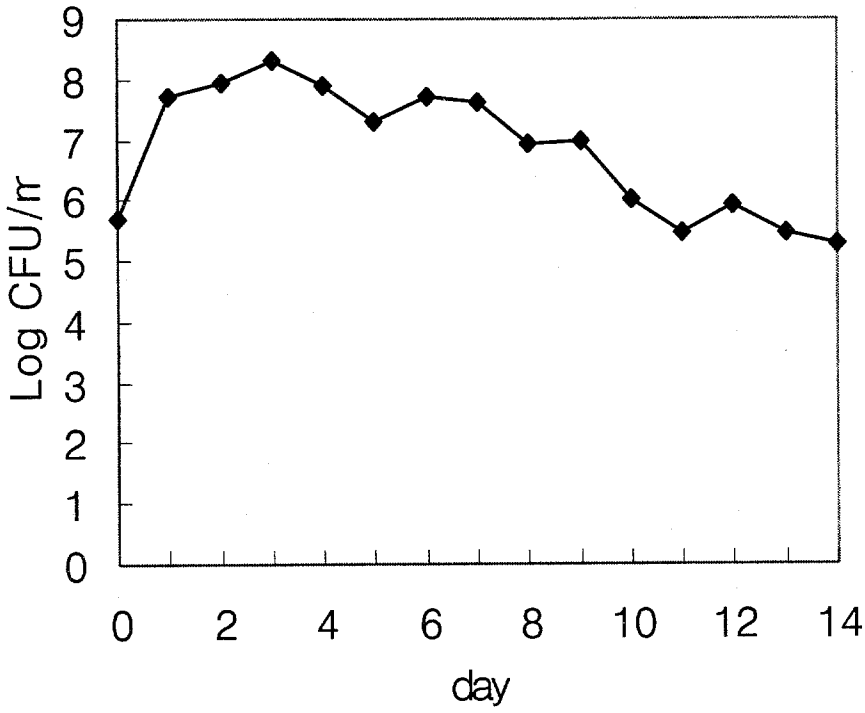


Fig. 29. Change of keratinase activity during large scale fermentation of feathers

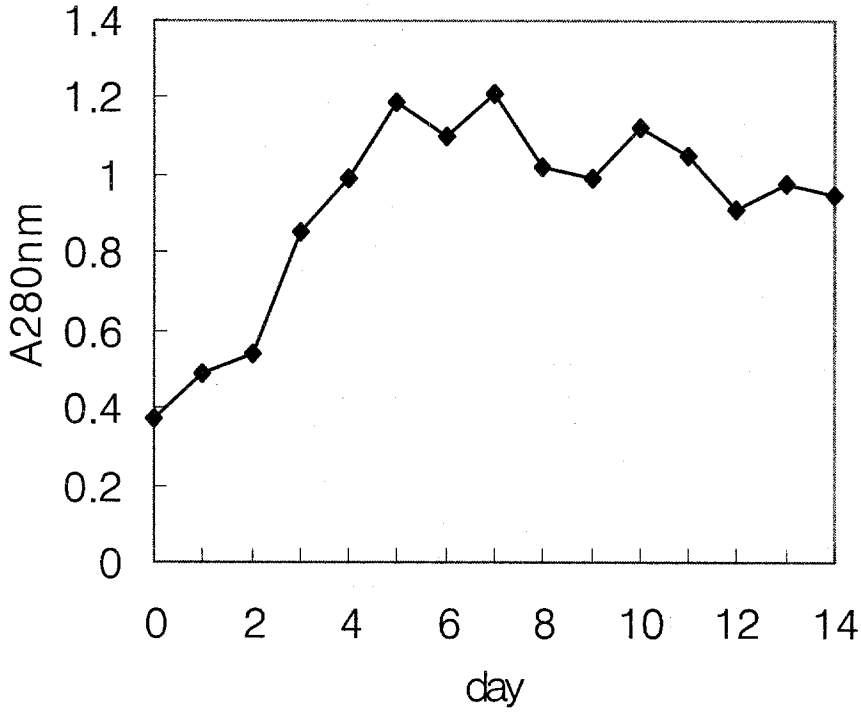


Table 21. Optimization of starter culture: cell growth, keratinase activity, and pH change of co-culture of 4 FDB strains.

| Strains | Cell population | Keratinase Activity | pH |
|---|---|---|---|
| 11-11(A) | $1.0\times10^{5}$ | 1.1020 | 8.07 |
| 21-6(B) | $9.0\times10^{5}$ | 0.5211 | 7.79 |
| 24-1(C) | $3.0\times10^{5}$ | 0.6493 | 7.71 |
| 26-1(D) | $2.0\times10^{5}$ | 1.1679 | 8.01 |
| A + B | $3.0\times10^{5}$ | 1.0138 | 8.06 |
| A + C | $1.1\times10^{7}$ | 0.9943 | 7.87 |
| A + D | $1.0\times10^{5}$ | 1.5132 | 7.83 |
| B + C | $3.0\times10^{5}$ | 0.4050 | 7.81 |
| B + D | $1.0\times10^{5}$ | 1.4588 | 7.88 |
| C + D | $1.5\times10^{7}$ | 1.3741 | 7.72 |
| A + B + C | $8.0\times10^{5}$ | 1.2242 | 7.69 |
| A + B + D | $8.0\times10^{4}$ | 1.6662 | 7.98 |
| A + C + D | $2.0\times10^{5}$ | 1.5562 | 7.88 |
| B + C + D | $4.0\times10^{5}$ | 1.5292 | 8.04 |
| A + B + C + D | $3.0\times10^{5}$ | 1.3449 | 7.88 |

Table 22. Optimization of substrate utility by starter cultures: cell growth, keratinase activity, and pH change of co-culture of 4 FDB strains in commercially available feather meals.

| | Cell population | Activity | pH |
|---|---|---|---|
| 11-11(A) | $3.0\times10^{6}$ | 0.1891 | 8.23 |
| 21-6(B) | $3.3\times10^{6}$ | 0.0885 | 8.43 |
| 24-1(C) | $2.0\times10^{7}$ | 0.0826 | 8.22 |
| 26-1(D) | $1.0\times10^{6}$ | 0.1690 | 7.65 |
| A + B | $7.0\times10^{5}$ | 0.0667 | 8.04 |
| A + C | $2.0\times10^{7}$ | 0.0605 | 8.37 |
| A + D | $8.0\times10^{5}$ | 0.3677 | 7.76 |
| B + C | $2.0\times10^{7}$ | 0.1497 | 8.08 |
| B + D | $1.0\times10^{6}$ | 0.0821 | 7.80 |
| C + D | $6.0\times10^{6}$ | 0.1399 | 7.69 |
| A + B + C | $1.0\times10^{4}$ | 0.0821 | 6.26 |
| A + B + D | $5.0\times10^{5}$ | 0.1791 | 7.70 |
| A + C + D | $1.2\times10^{7}$ | 0.1452 | 7.80 |
| B + C + D | $5.0\times10^{6}$ | 0.1258 | 7.49 |
| A + B + C + D | $5.0\times10^{6}$ | 0.1398 | 7.78 |

Table 23. Utilization of 6 different feather meals as substrate of optimal starter of strain FDB11-11 and FDB21-6.

| Feathermeal | cell population | Keratinase activity | pH |
|---|---|---|---|
| A | $5.3\times10^{6}$ | 0.7854 | 7.57 |
| B | $5.6\times10^{6}$ | 0.8673 | 7.82 |
| C | $2.0\times10^{6}$ | 0.9202 | 7.65 |
| D | $5.3\times10^{6}$ | 0.7870 | 7.74 |
| E | $3.0\times10^{6}$ | 0.9280 | 7.78 |
| F | $1.3\times10^{6}$ | 0.8240 | 7.88 |

# 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

본 연구의 연구개발목표는 우모분해균의 탐색 및 동정, 그리고 이의 산업화 기술 개발로서 前述한 제3장의 연구 결과를 근거로 하여 각 세부 목표별 달성도를 자체 평가한 결과는 다음과 같다.

| 구 분 | 연구개발목표 | 연구개발내용 및 범위 | 목표 달성도 |
|---|---|---|---|
| 제1차년도 (1995. 12. 1-1996. 11. 30) | 우모분해세균의 탐색 및 동정 | ○ 우모분해세균의 탐색<br>○ 우모분해성능 증진을 위한 세균의 적응 실험<br>○ 최종 선별된 우모분해세균의 동정 | 100 %<br>100 %<br>100 % |
| 제2차년도 (1996. 12. 1-1997. 11. 30) | 우모분해세균의 산업화 기술 개발 | ○ 우모분 케라틴 분해균주의 최적 생육특성 시험<br>· 우수균주의 생육 생리특성 연구<br>· 우수균주의 배양특성 연구<br>· 최적 생육조건 산정<br>○ 선발균주의 케라틴분해효소의 국재성 시험:<br>· 케라틴 분해효소의 所在 확인<br>· 케라틴 분해효소의 분획실험<br>○ 발효 우모분 생산시험:<br>· 발효우모분의 생산실험<br>· 발효우모분의 사료가치 평가 시험 | 100 %<br><br><br><br><br>100 %<br><br><br><br>100 % |
| 제3차년도 (1997. 12. 1-1998. 11. 30) | 우모분해세균의 산업화 기술 개발 | ○우모분해효소의 산업화 분자특성 연구<br>· 우모분해효소의 부분정제<br>· 부분정제효소의 pH, 열, 용매 안정성 규명<br>○우모분해효소의 유전특성 연구<br>· 異種유전자표지(heterologous gene probe)에 의한 우모분해효소의 유전자 탐색<br>· 우모분해효소의 유전적 특성 규명<br>· 유전적 개량균주의 탐색<br>○산업화 공정 개발<br>· 균체에 의한 우모분해 공정 개발<br>· 부분정제효소에 의한 우모분해 공정 개발 | 100 %<br><br><br>100%<br><br><br><br><br>100% |

# 여 백

# 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

우모의 주성분은 단백질인 keratin으로서 우모분해의 주요인은 이 keratin을 분해할 수 있는 분해효소(keratinolytic protease)로서 현재까지 이러한 keratinolytic protease를 분비하는 균으로는 *Streptomyces, Bacillus, Aspergillus, Ctenomyces, Fervidobacterium* 등이 보고된 바 있다(제2장, 국내외 연구동향 참조). 최근 *Bacillus licheniformis* PWD-1이 호기성 발효에 의해 우모 keratin을 분해하는 성능이 있는 것으로 보고되었으나, 이 균은 고온혐기발효균총(thermophilic anaerobic digester)의 일부로서 유효한 바, 직접적인 우모폐기물 처리에 그 유효성이 검토된 바 아직 없다.

따라서 본 연구는 새로운 우모분해성 세균을 탐색 및 동정하고 이의 산업화에 소요되는 기술적 기반을 연구함으로써 한국적 산업 현장에 적용 가능한 분해 세균을 개발하고, 또한 이를 통해 궁극적으로는 양계 농가의 애로사항을 해결하려고 한 바, 본 연구에서 개발된 *Alkaligenes* spp 및 이의 산업화 특성은,

1) 양계 축산농가의 우모 혼합분뇨의 효율적 처리를 위한 생물학적 처리제로 활용될 수 있으며,

2) 처리된 우모분뇨의 퇴비 자원화 미생물제제로 활용될 수 있을 뿐만 아니라,

3) 분리 수거된 우모를 분해하여 소화 흡수율 높은 사료첨가용 아미노산 자원화하는 생물학적 변환제(biological converter)로 활용할 수 있다.