

## 닭우모 단백질 가수분해물을 처리한 토마토 근권토양 내 세균군집의 계통 해석

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

<sup>1</sup>목원대학교 미생물나노소재학과, <sup>2</sup>목원대학교 미생물생태자원연구소

### Phylogenetic Analysis of Bacterial Populations in a Tomato Rhizosphere Soil Treated with Chicken Feather Protein Hydrolysate

Se-Jong Kim<sup>1</sup>, Song-Ih Han<sup>1</sup>, and Kyung-Sook Whang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbial & Nano Materials,

<sup>2</sup>Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

(Received September 23, 2013 / Accepted October 15, 2013)

As a result of conducting a cultural experiment of tomato using chicken feather protein hydrolysate (CPH) which was mass produced by keratin protein degrading bacterium *Chryseobacterium* sp. FBF-7 (KACC 91463P), we found that the stem and the root of tomato showed significant improvement in growth. For the purpose of phylogenetic interpretation, a comparison was drawn between the effect of CPH, a treated CPH and untreated, on the changes of bacterial populations by 454 pyrosequencing based on 16S rRNA gene sequences. Tomato rhizosphere soil untreated with CPH (NCPH) showed 6.54 Shannon index from 3,281 sequence reads, and the rhizosphere soil treated with CPH (TCPH) showed 6.33 Shannon index from 2,167 sequence reads, displaying that it does not affect the diversity. Bacterial populations were composed of 19 phyla in the rhizosphere soil, and the phylum *Proteobacteria* occupied 40% of total bacterial populations. *Bradyrhizobium*, *Agromonas*, *Nitrobacter*, and *Afipia* (BANA group) which belong to *Bradyrhizobiaceae* were abundant and commonly detected in both the treated and untreated soils, suggesting the dominance of bacterial group in rhizosphere soil. The results obtained showed that CPH treatment does not affect the indigenous bacterial populations present in the rhizosphere soil.

**Keywords:** *Bradyrhizobiaceae*, chicken feather protein hydrolysate, pyrosequencing, tomato rhizosphere soil

가금류의 폐기물로 발생되는 닭우모는 연간 평균 5만 여톤 이상이 발생한다. 닭우모는 물에 녹지 않는 불용성 케라틴(keratin) 단백질로 구조 내 시스테인 잔기 사이의 이황화결합, 수소결합, 소수성 상호작용으로 인해 trypsin, pepsin, papain과 같은 단백질분해효소로 분해되지 않는 물리·화학적으로 매우 안정한 구조체로 알려져 있다(Onifade *et al.*, 1998; Vignardet *et al.*, 1999; Gupta and Ramnani, 2006). 난분해성 케라틴 단백질인 닭우모의 영양적 우수성이 알려지면서 고압 및 가열 처리하여 건조 분쇄한 후 우모분 사료로 사용되어 왔다(Hong *et al.*, 2002). 이와 같은 처리공정은 많은 에너지가 필요할 뿐만 아니라 처리과정 중에 필수 아미노산의 손실이 있기 때문에(Hood and Healy, 1994), 산·알칼리 처리에 의한 화학적 분해법으로 아미노산을 추출하여 활용하고 있으나, 공정과정 중 폐수와 악취가 대량 발생하여 환경오염을 유발하고 처리 비용이 높아 경제성이 낮은

것으로 알려져 있다(Onifade *et al.*, 1998).

발효공정에 필요한 에너지와 비용 및 경제성 향상을 위한 방안으로 미생물이 생산하는 케라틴 단백질분해효소를 이용해 닭우모를 효율적으로 가수분해할 수 있는 연구가 활발히 진행되어 왔다(Yamamura *et al.*, 2002; Bertsch and Coello, 2005; Woo *et al.*, 2007b). 저자들은 선행연구에서 국내 양계장으로부터 닭우모분을 효율적으로 분해할 수 있는 다양한 계통군에 속하는 케라틴 단백질 분해세균을 분리하였고, 케라틴 분해 우수세균 *Chryseobacterium* sp. FBF-7 균주에 의해 생산되는 닭우모 단백질 가수분해산물인 아미노산의 특성을 보고한 바 있다(Kim *et al.*, 2010, 2011).

최근 닭우모에 다양한 종류의 아미노산이 함유되어 있는 것으로 밝혀지면서 닭우모 단백질 가수분해물을 토양개량제 및 작물 생육을 위한 친환경유기질비료로 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있다(Kim and Ko, 2005; Woo *et al.*, 2007a). 토양개량 및 작물생육용 자재는 혼합유박, 해초추출물, 님추출물, 식물추출물, 부식산, 목초액, 어류추출물, 키토산, 동물부산물 등 천연

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

아미노산이 주로 사용되고 있다. 친환경유기농자재는 2013년 기준 1,105개의 제품이 등록되어 있다. 친환경유기농자재로 사용하기 위해서는 농촌진흥청이 주관하는 「친환경유기농자재의 공시 및 품질인증」을 받아야만 하는데 토양개량 및 작물생육용 자재의 경우, 항생물질 검사, 작물 재배시험, 유해성분 검사를 받도록 되어 있다. 또한, 지속적 농업을 위해 친환경유기농자재를 사용할 경우 토양 내 서식하는 미생물군집에 미치는 영향에 관한 조사가 이루어져야 할 필요성이 제기되고 있다.

본 연구에서는 케라틴 단백질 분해세균 *Chryseobacterium* sp. FBF-7 균주에 의해 생산된 닭우모 단백질 가수분해물을 작물생육용 친환경유기농자재로의 활용 가능성을 검토하기 위해 토마토 재배시험을 통해 생육효과를 조사하고 닭우모 단백질 가수분해물을 처리한 토마토 근권토양 내 세균군집 변동을 pyrosequencing 기법을 이용하여 해석하였다.

## 재료 및 방법

### 닭우모 단백질 가수분해물의 추출 및 아미노산 분석

닭우모 단백질 가수분해물(chicken feather protein hydrolysate, CPH)을 생산하기 위하여 양계 축산물 가공 판매 및 사료 제조업체인 (주)하림에서 배출되는 닭 우모분을 사용하였다. 가수분해물의 생산을 위해서는 2톤 규모의 발효기에 우모분배지(2% rice bran, 2% glucose, 2% 닭 우모분, pH 7.5±0.2)를 제조한 후 *Chryseobacterium* sp. FBF-7 (KACC 91463P) 균주 배양액을 5% 농도로 접종하고 30°C, 60 rpm에서 4일 동안 배양하여 가수분해하였다. 가수분해물을 멸균된 여과지(Whatman filter paper No. 2, 90 mm Ø)에 걸러 잔존 우모분을 제거한 후 4°C, 7,920×g (Supra 22K, Hanil, Korea)로 20분간 원심 분리하여 상층액을 추출하고 4°C에 냉장 보관하였다. 닭우모 단백질 가수분해물에 함유된 아미노산의 함량과 조성을 분석하기 위하여 추출한 가수분해물에 6 N HCl을 1:1로 넣고 N<sub>2</sub> gas로 2분간 치환시킨 후 110°C에서 12시간 동안 처리하고 감압하여 HCl을 제거하였다. 상기의 시료에 0.2 N HCl (pH 2.0-3.0) 2 ml을 첨가하여 용해시킨 후 여과지(Whatman filter paper No. 2, 90 mm Ø)로 여과하여 분석시료로 사용하였다. 아미노산의 함량과 조성 분석은 아미노산 분석기(Hitachi L-8900, Hitachi, Ltd., Japan)를 이용하였다.

### 토마토 재배시험

토마토 재배시험은 충남 부여 토마토시험장의 온실에서 수행하였다. 토마토 포트 재배시험에 사용한 토양은 토양미생물에 의한 영향을 최소화하기 위해 121°C에서 1시간 동안 멸균하여 실험에 사용하였다. 멸균한 토양을 포트(15 cm×15 cm Ø)에 1.5 kg씩 넣고 시험작물로 토마토(*Lycopersicon esculentum* Mill.) 유묘를 정식하였다. 닭우모 단백질 가수분해물 처리 시험구에는 가수분해물을 1/50로 희석하여 300 ml씩 15일 간격으로 4회 처리하고, 가수분해물을 처리하지 않은 대조구에는 동량의 물을 처리하였다. 가수분해물 처리 시험구와 대조구는 9반복으로 수행하였고, 60일 동안 토마토를 재배한 후 각 시험구별로 줄기 길

이, 직경, 두께, 마디수, 뿌리의 건조중량을 측정하였다. 시험결과는 Duncan 다중검정(SAS Institute, 1988)으로 5% 수준에서 처리간 유의성을 검정하였다.

### 토마토 근권토양 시료채취

토마토 유묘 이식에 사용한 토양을 대조구 토양으로 채취하였다. 토마토 재배 60일 후에 닭우모 단백질 가수분해물을 처리하지 않은 무처리구와 닭우모 단백질 가수분해물을 처리한 시험구의 토마토뿌리로부터 약 5 cm 주변의 토양을 근권 토양시료로 채취하였다. 각 근권 토양시료는 약 50 g씩 총 9개 포트에서 채취하여 혼합한 후 4°C에 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

### DNA 추출, PCR 증폭, pyrosequencing

토양시료로부터 DNA 추출은 Takada와 Matsumoto (2004)의 bead beating 방법을 개량한 ISOIL kit를 이용하였다. 매뉴얼에 따라 ISOIL kit (Nippon Kit Co., Japan)를 이용하여 대조구 토양, 닭우모 단백질 가수분해물을 처리한 토마토 근권토양, 가수분해물을 처리하지 않은 무처리구 토마토 근권토양 시료로부터 genomic DNA를 추출하였다. 세균의 16S rRNA 유전자의 PCR 증폭을 위해 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATC MTGGCTCAG-3')와 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')를 이용하였다. PCR 반응은 1× EF-*Taq* buffer (Solgent, Korea), 2.5 unit의 EF-*Taq* polymerase (Solgent), 0.2 mM dNTP mix, 0.1 µM의 primer, 100 ng의 template DNA를 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 40초, 55°C에서 annealing 40초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 7분간 final extension의 조건으로 PCR (GeneAMPR PCR System 9700, Applied Biosystems) 반응을 하였다. PCR 증폭산물은 0.8%의 agarose gel, 0.5× TAE buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001 M EDTA)에서 100 V, 25 mA로 30분간 전기영동한 후 ethidium bromide (EtBr)에 15분간 염색하여 UV (Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)하에서 추출 여부를 확인하고 PCR purification kit (Qiagen Inc.)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 이용하여 단일 가닥 DNA library 제작과 emulsion PCR을 진행한 후 pyrosequencing 반응을 진행하였다. 상기에 열거한 pyrosequencing에 요구되는 모든 반응은 염기서열 분석기 제조사(Roche)의 방법에 따라 MacroGen (Korea)에서 실시하였으며, GS FLX Titanium system (Roche, Germany)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

### 세균군집의 계통해석

Pyrosequencing을 통해 토마토 근권토양으로부터 얻어진 염기서열 데이터는 우선 GS FLX 소프트웨어(Roche)를 이용하여 염기서열의 adaptor와 PCR primer 부위를 제거하였다. 부정확하게 결정된 염기서열과 PCR 과정에서 발생할 수 있는 염기서열 오류를 최소화하기 위해 길이가 짧은 염기서열(<300 bp)을 제거하였다. 또한, Mothur version 1.30.1 (Schloss *et al.*, 2009)를 이용하여 chimera로 의심되는 염기서열도 제거하였다. 이렇게 전처리를 마친 염기서열에 대해 RDP Classifier (Cole *et al.*,

**Table 1.** Effect of growth on stem and root by CPH treatment

Soil sample	Germination (%)	Stem length (cm)	Stem weight (g)	Stem thickness (mm)	Root weight (g)
NCPH	93.3 b*	114±6.2 b	109±6.4 b	9.5±0.7 b	4.4±0.5 b
TCPH	100 a	127±6.1 a	127±3.4 a	10.1±0.3 a	7.6±0.3 a

\* Means followed by different letters within the column are significantly different at the 5% level (Duncan's Multiple Range Test)

2005)를 이용해 계통분류를 하였다(bootstrap cutoff=80%). 한편, 군집의 다양성을 분석하기 위해 RDP Aligner와 RDP Mothur: column distance matrix를 이용하여 distance matrix를 만들었으며, 이를 Mothur average clustering를 사용하여 observed operational taxonomic unit (OTU), Chao1 richness estimate, Shannon index 등의 다양성 지수들과 rarefaction curve 및 rank abundance curve 분석을 하였다.

**결과 및 고찰**

**닭우모 단백질 가수분해물의 대량생산**

선행연구에서 케라틴 단백질 분해 우수세균 *Chryseobacterium* sp. FBF-7 균주는 실험실 규모의 조건(6 L 용량의 발효조)에서 75.0%의 닭우모분해율을 나타냈으며 1,661 µmol/ml 함량의 닭우모 단백질 가수분해물(chicken feather protein hydrolysate, CPH)을 생산하였다(Kim et al., 2010). 본 연구에서는 닭우모 단백질 가수분해물의 대량생산을 위해 *Chryseobacterium* sp. FBF-7 균주의 최적배지를 검토한 결과, 2% 닭 우모분분에 2% 쌀겨와 2% glucose를 첨가한 배지에서 8.81×10<sup>8</sup> CFU/ml의 균체 밀도에 도달하였다. 상기의 최적배지를 이용해 2톤 규모의 발효조에서 30℃, 60 rpm으로 4일간 배양한 결과, 91.2%의 우모 분해능(자료 미제시)을 나타내었으며, 대량 생산한 CPH에 함유된 아미노산 총 함량을 측정된 결과, 2,495 µmol/ml로 실험실 규모에 비해 50% 이상 증가되었다. 추출된 아미노산 중 필수 아미노산(histidine, threonine, lysine, methionine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine) 함량은 774.8 µmol/ml로 총 아미노산 함량의 31%를 차지하였고, 실험실 규모에서의 함량(619.3 µmol/ml)

보다 25% 증가하였다(Fig. 1). 닭우모 단백질로부터 높은 함량의 아미노산을 추출하기 위해서는 균주의 우모 분해율에 비례하고, 균체밀도가 증가하면 분해율이 향상된다고 보고된 바 있다(Kim et al., 2011). 본 균주의 닭우모 단백질 가수분해물 대량생산을 위한 최적배지와 배양조건을 최적화한 결과 균체밀도를 향상시킬 수 있었으며, 닭 우모분이 90% 이상 분해됨으로써 가수분해물로 생성되는 아미노산의 함량이 증수된 것으로 판단된다.

**CPH 처리에 의한 토마토 생육효과**

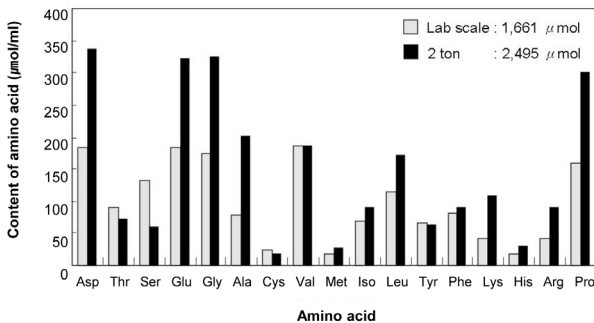
닭우모 단백질 가수분해물(CPH) 처리가 토마토 생장에 미치는 효과를 Table 1에 나타내었다. 토마토 종자를 CPH 1/50 희석액에 2시간 침지 처리하여 128공 포트에 파종하고 28℃에서 15일 동안 배양한 후 발아율을 비교한 결과, CPH 무처리구(NCPH)는 93% 발아율을 나타낸 반면 CPH 처리구(TCPH)는 100%가 발아하였다. 한편, CPH를 1/50 이상의 농도로 처리할 경우, 토마토 종자의 발아가 되는 기간이 길어지고 유묘 생장도 양호하지 못한 것으로 나타나 CPH 1/50 희석농도가 토마토 작물의 생장을 위한 최적농도로 판단되었다(자료 미제시).

토마토 유묘 정식 후 15일, 30일, 45일째에 1/50로 희석한 CPH를 토양에 관주 처리하여 60일간 재배하였다. 온실에서 60일간 포트 재배 후 각 시험구별로 토마토 식물체의 초장, 지상부 생체중, 줄기 직경, 뿌리 건중량을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. CPH 무처리구(NCPH)는 초장 114 cm, 지상부 생체중 109 g, 줄기 직경 9.5 mm, 뿌리 건중량 4.4 g이었으며, CPH 처리구(TCPH)는 초장 127 cm, 지상부 생체중 129 g, 줄기 직경 10.7 mm, 뿌리 건중량 7.6 g으로 Duncan의 다중 검정 결과, 5% 수준에서 유의성이 인정되었고, CPH 처리구는 무처리구에 비해 토마토 지상부의 생장은 6-16%, 뿌리의 생장은 70% 향상되는 효과가 있었다. 토마토 뿌리를 채취하여 뿌리의 발달 양상을 관찰한 결과, CPH 처리구의 토마토 뿌리는 무처리구에 비해 뿌리의 발육과 생장이 매우 우수하였다(Fig. 2).

**CHP 처리 근권토양 내 세균군집의 다양성비교**

토마토 유묘를 정식한 직후의 토양을 대조구(control)로 설정하고, CPH를 처리하지 않은 토양에서 60일간 재배한 근권토양(NCPH)과 CPH를 처리하고 60일간 재배한 근권토양(TCPH) 시료로부터 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 대상으로 16S rRNA 유전자를 증폭하여 pyrosequencing을 수행하였다. 대조구토양 시료로부터 2,440 reads, NPCH 처리시료로부터 3,281 reads, TCPH에서 2,167 reads의 염기서열을 얻었다(Table 2).

염기서열은 3% cutoff를 기준으로 Mothur를 이용해 rarefaction curve 분석을 실시하여 pyrosequencing으로부터 얻은 염기서열



**Fig. 1.** Comparison of relative amount of amino acid in CPH (chicken feather protein hydrolysate) produced by *Chryseobacterium* sp. FBF-7. The culture was grown on the different condition: gray box, lab scale by using 6 L fermentor; black box, mass culture by using 2 ton fermentor.

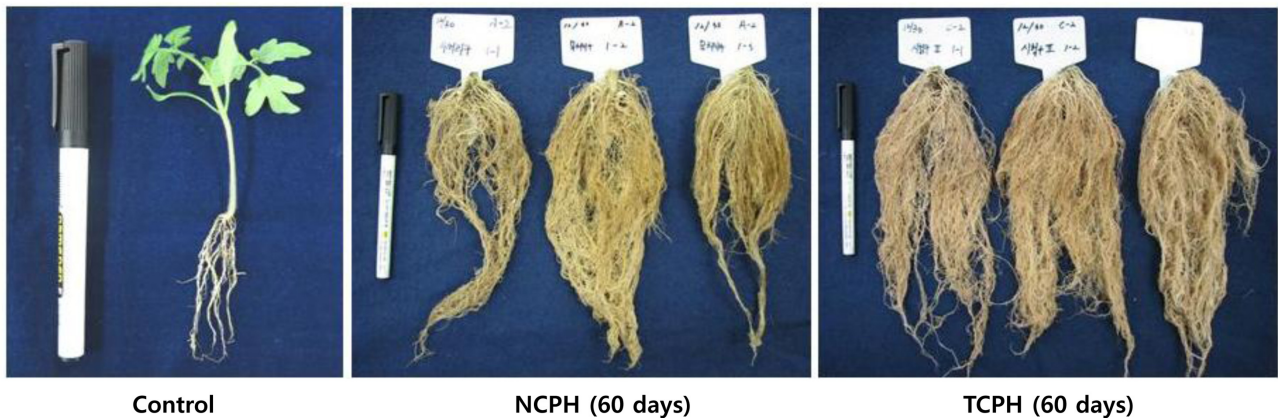


Fig. 2. Seedling of *L. esculentum* Mill. grown in the CPH-untreated and -treated during 60 days.

Table 2. Bacterial diversity indexes of the different rhizosphere soils cultivated with tomato plants

Soil sample	Total sequencing reads	No. of OTUs	Chao richness	Ace richness	Shannon index
Control	2,440	232	518	753	2.41
NCPH	3,281	1,242	2,806	4,015	6.54
TCPH	2,167	931	2,314	3,396	6.33

의 수가 세균군집의 다양성을 충분히 설명하고 있는지 비교하였다(Fig. 3). 대조구토양의 경우 곡선이 plateau에 도달하여 분석에 이용된 2,440개의 염기서열 수가 시료에 포함된 모든 종을 확인하기에 충분하였다. 반면, 가수분해물을 처리하지 않은 토양과 가수분해물을 처리한 근권 토양의 rarefaction curve는 plateau에 도달하지 못해 세균군집의 다양성을 충분히 예측하기 위해서는 더 많은 염기서열의 확보가 필요할 것으로 판단되었다. 또한, abundance-based coverage estimator (ACE) index, Chao1 richness index 및 Shannon diversity index를 계산한 결과, 대조구토양에서는 232 OTU, shannon diversity index 2.41로 나타났으며, NCPH에서는 1,242 OUT, shannon diversity index 6.54로 확인되었다(Table 3). TCPH의 경우, 931 OTU, shannon diversity index 6.33로 확인되었다. Rarefaction curve와 마찬가지로 토마토 재배 60일 후 발달된 근권토양 내 다양성 지표(index)는 크게

증가하였다. 단백질 가수분해물을 처리하지 않은 근권토양과 가수분해물을 처리한 근권토양의 다양성 지수 비교를 위하여 Mothur를 이용하여 1,776 reads로 표준화한 후 shannon diversity index를 확인한 결과, 각각 4.93과 4.84의 다양성 지수를 나타내었다. 또한, mothur의 Libshuff 프로그램을 이용하여 NCPH와 TCPH의 다양성에 대한 유의성을 확인한 결과, 두 시험구는 통계적으로 유사한 군집 구조를 나타내어( $P < 0.01$ ), 세균군집의 다양성에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

### 토마토 근권토양 내 세균군집의 계통해석

각 토양시료로부터 획득된 16S rRNA sequence library로부터 세균군집의 계통해석을 수행하였다. 유효정식 직후의 대조구 토양(control) 내 세균군집은 총 19개의 문(phylum)으로 분류되었다. 전체 염기서열의 80.3%가 Firmicutes 문으로 가장 우점하였으며, Proteobacteria (7.8%), Actinobacteria (7.6%), Bacteroidetes (0.9%), Planctomycetes (0.7%), Fusobacteria (0.5%), Chloroflexi (0.4%), Acidobacteria (0.3%), Cyanobacteria (0.2%), Verrucomicrobia (0.3%), Deinococcus-Thermus (0.1%), OD1 (0.1%), Elusimicrobia (0.1%), BRC1 (0.1%), Chlorobi (0.1%), Armatimonadetes (0.1%), OP3 (0.04%), Nitrospirae (0.04%), Gemmatimonadetes (0.04%) 문이 분포하였다. 대조구 토양 내 전체군집의 80% 이상이 Firmicutes 문으로 나타난 결과는 닭우모가수분해물 처리에 의한 식물생육촉진효과를 검정함에 있어 토양미생물에 의한 효과를 배제하기 위해 유효정식전에 토양을 멸균하고 식히는 과정에서 토양 및 공기 중에 열에 내성을 갖고 빠르게 성장하는 세균이 다수 존재한 것으로 판단되었다.

NCPH 내에는 Proteobacteria에 속하는 계통군이 41.5%로 분포율이 가장 높았고, Acidobacteria (15%), Gemmatimonadetes

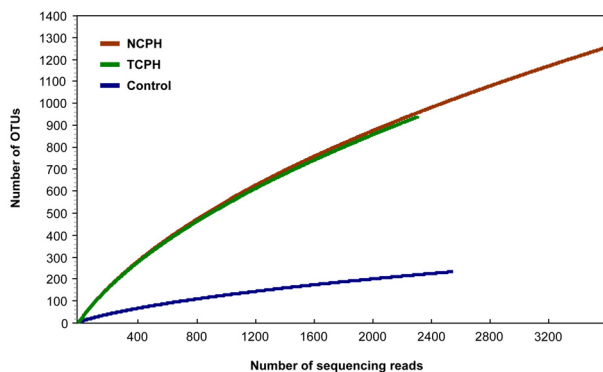
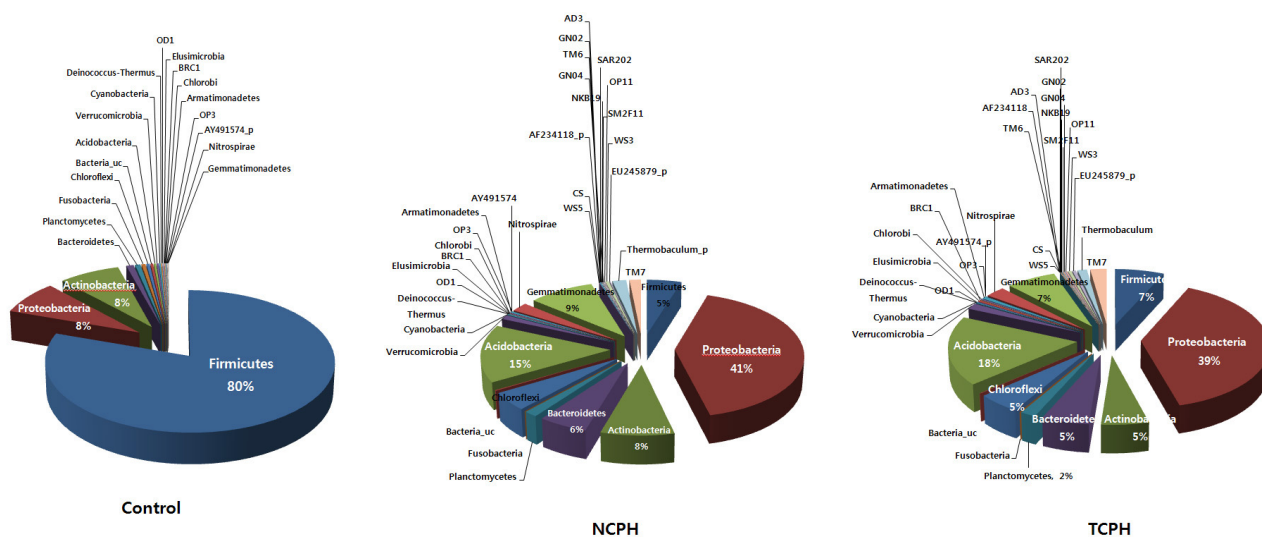


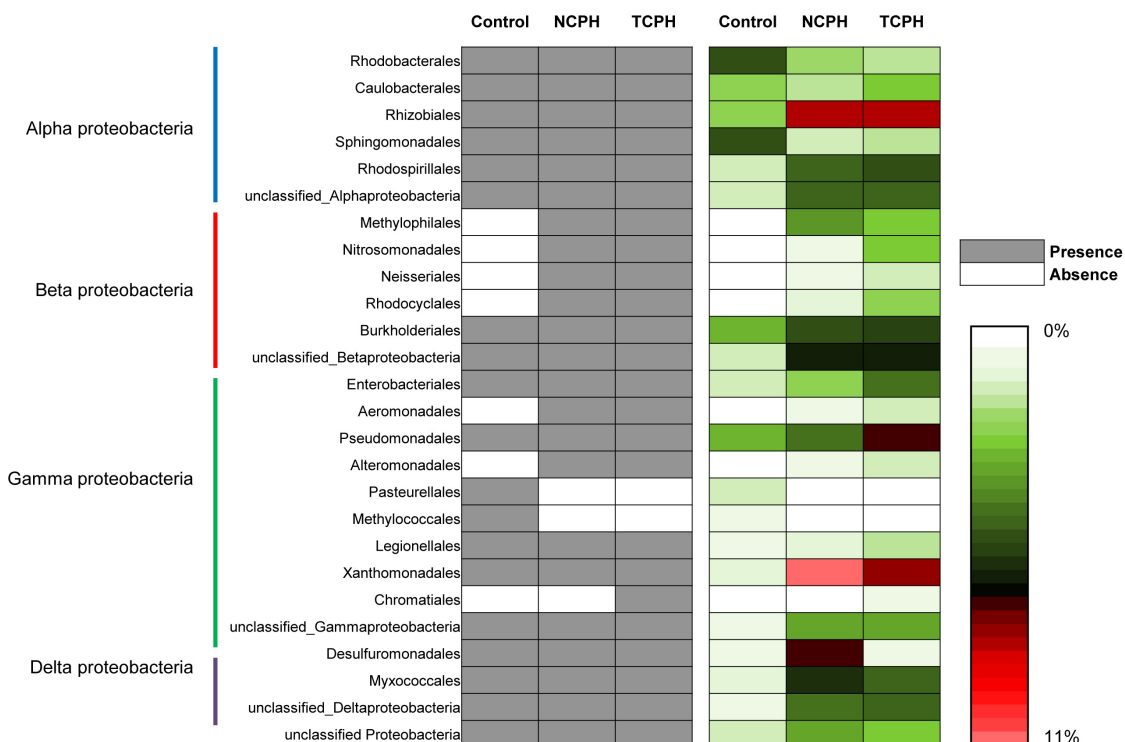
Fig. 3. Rarefaction curves of OTUs in the three different tomato rhizosphere soil samples evaluated by 3% cutoff.



**Fig. 4.** Taxonomic composition at the phylum level based on 16S rRNA gene sequences retrieved from the three different tomato rhizosphere soil samples.

(9.1%), *Actinobacteria* (8.3%), *Bacteroidetes* (5.6%), *Firmicutes* (4.8%), *Chloroflexi* (4.7%), *Nitrospira* (2.4%), *Planctomycetes* (1.5%), *Verrucomicrobia* (1.1%), *Cyanobacteria* (0.2%), WS3 (0.1%), OD1 (0.1%), CS (0.1%), TM6 (0.1%), *Deinococcus-Thermus* (0.03%) 문이 분포하였다. TCPH 내 계통군은 *Proteobacteria* (39%) 문이 우점 분류군이었으며, *Acidobacteria* (18%), *Firmicutes*

(6.8%), *Gemmatimonadetes* (6.9%), *Actinobacteria* (5.5%), *Bacteroidetes* (5.5%), *Chloroflexi* (5%), *Nitrospira* (2.7%), TM7 (2.3%), *Verrucomicrobia* (1.6%), *Planctomycetes* (1.8%), WS3 (0.5%), OD1 (0.2%), OP11 (0.13%), *Cyanobacteria* (0.1%) 문으로 확인되었다(Fig. 4). 이상, 토마토 재배 60일 후 NCPH와 TCPH에서 *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*,



**Fig. 5.** Heat map analysis of the 26 orders based on absence and the ratio of detected *Proteobacteria* sequences.

*Actinobacteria* 문이 전체 세균군집의 5.5–41.5%를 나타내는 주요 계통군으로 확인되었다. 특히, 가수분해물을 대조구 토양 내 *Proteobacteria* 문은 전체 세균군집의 7.7%에 불과했으나 토마토를 60일간 재배한 토마토 근권토양 내에는 세균군집의 약 40% 이상이 *Proteobacteria* 문으로 나타났다.

**CPH 처리 토양 내 *Proteobacteria* 계통군의 특성**

토마토 생육과 더불어 발달된 근권토양 내 우점균인 *Proteobacteria* 문(4 class, 26 order) 중 *Rhodobacteriales*, *Caulobacterales*, *Rhizobiales*, *Sphingomonadales*, *Rhodospirillales*, *Methylophilales*, *Nitrosomonadales*, *Neisseriales*, *Rhodocyclales*, *Burkholderiales*, *Enterobacteriales*, *Aeromonadales*, *Pseudomonadales*, *Ateromonadales*, *Legionellales*, *Xathomonadales*, *Desulfuromonadales*, *Myxococcales*는 모든 시험구 토양에 분포하는 세균군집으로 확인되었다. TCPH에서는 *Chromatiales* 목의 계통군이 특징적으로 나타났으며, *Sphingomonadales*, *Rhodospirillales*, *Pseudomonadales* 목의 계통군은 증가되는 세균군집으로 확인되었고, *Lysobacter*, *Pseudofulvimonas*, *Arenimonas*, *Xanthomonas*을 포함하는 *Xathomonadales* 목과 *Desulfuromonads*, *Geobacter*을 포함하는 *Desulfuromonadales* 목 그리고 *Myxococcus*를 포함하는 *Myxococcales* 목에 속하는 계통군은 감소되는 세균군집으로 확인되었다(Fig. 5).

가수분해물을 처리한 TCPH 내 *Proteobacteria* 계통군에 속하는 주요 목은 *Rhizobiales* (6.0%), *Xathomonadales* (5.6%)이었다. 특히, *Rhizobiales* 목에 속하는 계통군은 TCPH와 NCPH 토양 모두에서 우점을 이루는 세균군집으로 확인되었다. 모든 근권토양 내 *Rhizobiales* 목에 속하는 세균군집은 10개의 family로 분류되었고, 이 중 *Bradyrhizobiaceae*가 약 45%로 가장 높은 분포를 나타내었다(Fig. 6). 우점군집으로 확인된 *Bradyrhizobiaceae*에 대하여 계통분석한 결과, *Bradyrhizobium* (n=25), *Agromonas* (n=2), *Nitrobacter* (n=96), *Afipia* (n=15) 속으로 분류되었다. 이를 *Bradyrhizobium*, *Agromonas*, *Nitrobacter*, *Afipia* 속에 속하는 각 세균그룹은 NCPH와 TCPH 근권토양 모두에 분포하여 가수분해물(CPH) 처리에 의해 우점군집인 *Bradyrhizobiaceae* 세

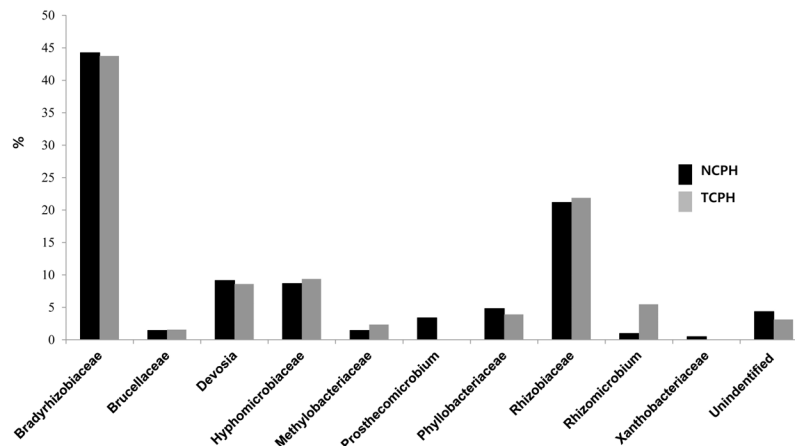
균군집에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 7).

일본의 토양미생물 연구그룹은 *Bradyrhizobium*, *Agromonas*, *Nitrobacter* 그리고 *Afipia*를 “BANA group”으로 명명하였으며 이들 그룹은 토양생태계를 구성하는 토착세균군집으로 보고된 바 있다(Hattori and Hattori, 1980; Ohta and Hattori, 1980, 1983; Whang and Hattori, 1988; Kasahara and Hattori, 1991). 특히, BANA group 중 *Bradyrhizobium* 속은 토착 근류균으로 토양내 콩과식물과 공생하며 질소고정하는 균으로 토양 내 널리 분포하고 있다(Brockwell *et al.*, 1988; Bottomley, 1992; Minamisawa *et al.*, 1992, 1999; Minamisawa and Mitsui, 2000; Brockwell, 2004).

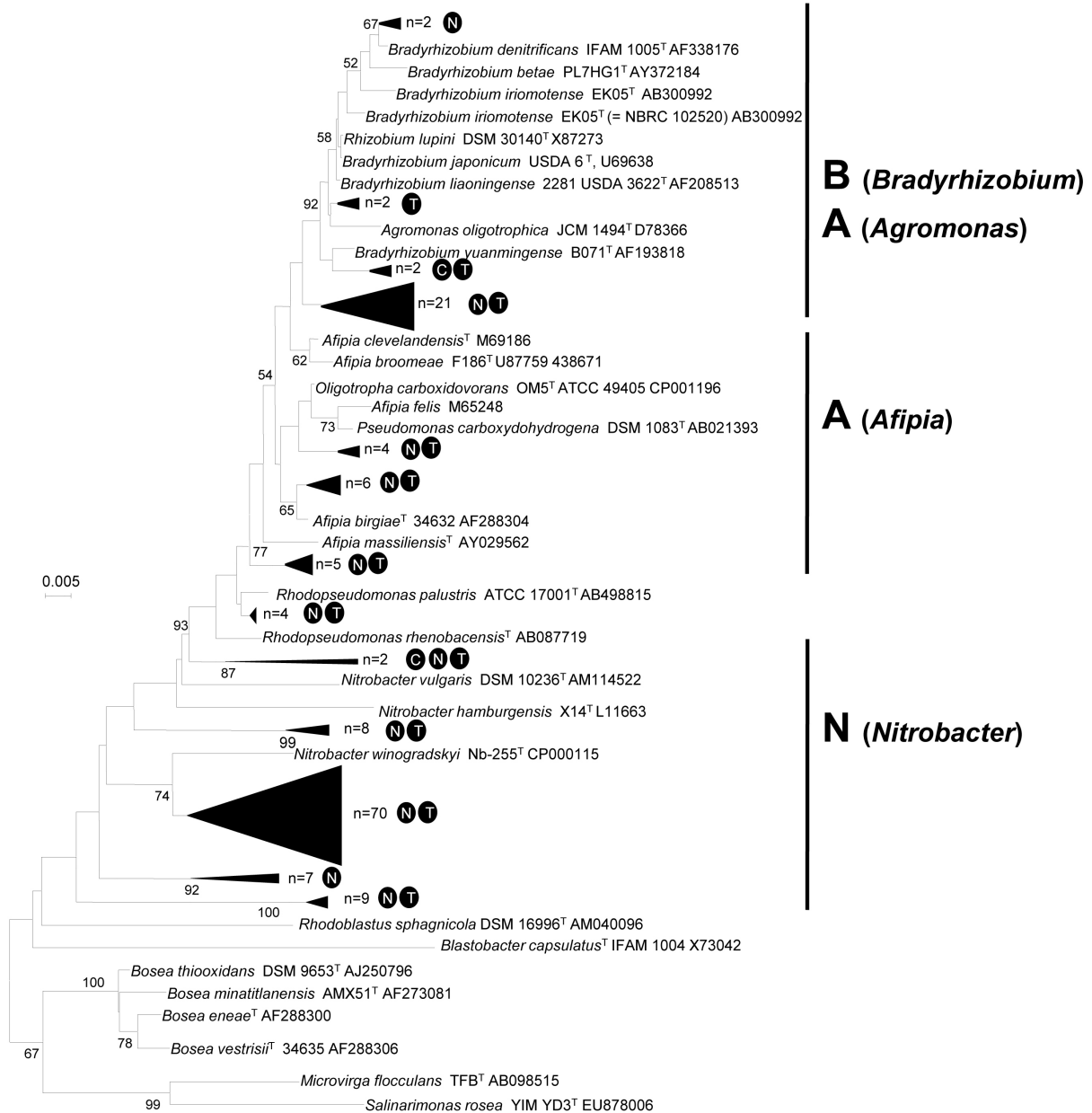
이상, 본 연구에서는 닭우모분으로부터 생산한 닭우모 단백질 가수분해물(CHP)을 토마토 작물에 처리한 결과, 토마토 작물의 지상부와 지하부의 생장을 크게 향상시켜 성장효과가 매우 우수한 것으로 확인되었다. 또한, CHP는 토양내 세균군집 다양성 및 주요 토착미생물 군집인 *Bradyrhizobiaceae*에 영향을 미치지 않는 것으로 판단되어 향후 CHP를 작물생육용 친환경 자재로 활용 가능할 것으로 평가되었다.

**적요**

케라틴 단백질 분해 세균 *Chryseobacterium* sp. FBF-7 (KACC 91463P)을 이용하여 대량생산한 닭우모 단백질 가수분해물(CPH)을 토마토에 처리한 결과, 토마토 줄기와 뿌리의 생장이 현저하게 증가되었다. 닭우모 가수분해물을 처리한 토마토 근권토양 내 세균군집 변동에 대한 계통학적 해석을 위하여 16S rRNA 유전자 서열을 기반으로 454 pyrosequencing을 수행하였다. 가수분해물을 처리하지 않은 토마토 근권토양(NCPH)의 16S rRNA 유전자 염기서열(3,281 reads)과 가수분해물을 처리한 토마토 근권토양(TCPH)의 16S rRNA 유전자 염기서열(2,167 reads)은 각각 6.33과 6.54의 다양성 지수를 나타내어 세균군집의 다양성에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다. 각 토마토 근권토양에는 총 19개의 문(phyla)의 세균이 존재하



**Fig. 6.** Taxonomic composition at the family level within the order *Rhizobiales* for the 16S rRNA gene sequences retrieved from the two different tomato rhizosphere soil samples.



**Fig. 7.** Phylogenetic tree showing relatedness of family *Bradyrhizobiaceae* by neighbor-joining grouping of aligned sequences of the 16S rRNA gene pyrosequencing C, control; N, NCPH; T, TCPH.

였고, 이종의 약 40%가 *Proteobacteria*이었다. *Proteobacteria*의 *Bradyrhizobiaceae*에 속하는 *Bradyrhizobium*, *Agromonas*, *Nitrobacter* 그리고 *Afipia* (BANA group)는 NCPH와 TCPH의 모든 근권토양에서 우점을 이루어 닭우모 가수분해물 처리에 의해 토양 토착세균 군집에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

### 감사의 말

이 논문은 2013년도 목원대학교 연구년 지원에 의하여 연구되었습니다.

### 참고문헌

**Bertsch, A. and Coello, N.** 2005. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. *Bioresour. Technol.* **96**, 1703–1708.

**Bottomley, P.J.** 1992. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. In Stacey, G., Burris, R.H., and Evans, H.J. (eds.), *Biological nitrogen fixation*, pp. 293–348. Chapman & Hall, New York, USA.

**Brockwell, J.** 2004. Abundant, cheap nitrogen for Australian farmers: a history of Australian nodulation and nitrogen fixation conferences. *Soil Biol. Biochem.* **36**, 1195–1204.

- Brockwell, J., Holliday, R.A., and Pilka, A.** 1988. Evaluation of the symbiotic nitrogen-fixing potential of soils by direct microbiological means. *Plant Soil* **108**, 163–170.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M., Garrity, G.M., and Tiedje, J.M.** 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **33**, D294–D296.
- Gupta, R. and Ramnani, P.** 2006. Microbial keratinase and their prospective application: An overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**, 21–33.
- Hattori, R. and Hattori, T.** 1980. Sensitivity to salts and organic compounds of soil bacteria isolated on diluted media. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **26**, 1–14.
- Hong, S.J., Namkung, H., Kim, W.Y., and Paik, I.K.** 2002. Effects of supplemental feather digests on the growth of broiler chicks and taurine content in the broiler meat. *Kor. J. Poult. Sci.* **29**, 141–147.
- Hood, C.M. and Healy, M.G.** 1994. Bioconversion of waste keratins: wool and feathers. *Resour. Conserv. Recycl.* **11**, 179–188.
- Kasahara, Y. and Hattori, T.** 1991. Analysis of bacterial populations in a grassland soil according to rates of development on solid media. *FEMS Microbiol. Ecol.* **86**, 95–102.
- Kim, S.J., Cho, C.H., and Whang, K.S.** 2010. Isolation and characterization of keratinolytic protein chicken feather-degrading bacteria. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 86–92.
- Kim, S.J., Cho, C.H., and Whang, K.S.** 2011. Characterization of protease produced by *Elizabethkingia meningoseptica* CS2-1 and optimization of cultural conditions for amino acid production. *J. Appl. Biol. Chem.* **46**, 86–92.
- Kim, J.H. and Ko, Y.D.** 2005. Effect of dietary protease (bromelain) treated feather meal on the performance and nutrient utilization in broilers. *J. Anim. Sci. Technol.* **47**, 221–232.
- Minamisawa, K., Seki, T., Onodera, S., Kubota, M., and Asami, T.** 1992. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2832–2839.
- Minamisawa, K. and Mitsui, H.** 2000. Genetic ecology of soybean bradyrhizobia. In *Soil Biology* (Bollag J. and Stotzky G., eds.), Vol 10, pp. 349–377. Marcel Dekker, New York, USA.
- Minamisawa, K., Nakatsuka, Y., and Isawa, T.** 1999. Diversity and field site variation of indigenous populations of soybean bradyrhizobia in Japan by fingerprints with repeated sequences RSa and RSβ. *FEMS Microbiol. Ecol.* **29**, 171–178.
- Ohta, H. and Hattori, T.** 1980. Bacteria sensitive to nutrient broth medium in terrestrial environments. *Soil Sci. Plant Nutr.* **26**, 99–107.
- Ohta, H. and Hattori, T.** 1983. *Agromonas oligotrophica* gen. nov. sp. nov. a nitrogen-fixing oligotrophic bacterium. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 429–446.
- Onifade, A.A., Al-Sane, N.A., Al-Musallam, A.A., and Al-Zarban, S.** 1998. A review: Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresour. Technol.* **66**, 1–11.
- SAS Institute.** 1988. SAS/STAT user's guide, release 6.03. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., and *et al.*** 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 7537–7541.
- Takada-Hoshino, Y. and Matsumoto, N.** 2004. An improved DNA extraction method using skim milk from soils that strongly adsorb DNA. *Microbes Environ.* **19**, 13–19.
- Vignardet, C., Guillaume, Y.C., Friedrich, J., and Millet, J.** 1999. A first order experimental design to assess soluble proteins released by a new keratinase from *Doratomyce smicrosporus* on human substrate. *Int. J. Pharm.* **191**, 95–102.
- Whang, K.S. and Hattori, T.** 1988. Oligotrophic bacteria from rendzina forest soil. *Antonie van Leeuwenhoek* **54**, 19–36.
- Woo, E.O., Kim, M.J., Ryu, E.Y., Park, G.T., Lee, C.Y., Son, H.J., and Lee, S.J.** 2007a. Isolation and application of feather-degrading bacteria for development of environment-friendly biofertilizer. *J. Environ. Sci.* **16**, 1103–1109.
- Woo, E.O., Kim, M.J., Son, H.S., Ryu, E.Y., Jeong, S.Y., Son, H.J., Lee, S.J., and Park, G.T.** 2007b. Production of protease by *Bacillus pumilus* RS7 and feather hydrolysate as a source of amino acids. *J. Environ. Sci.* **16**, 1203–1208.
- Yamamura, S., Morita, Y., Hasan, Q., Rao, S.R., Murakami, Y., Yokoyama, K., and Tamiya, E.** 2002. Characterization of a new keratin-degrading bacterium isolated from deer fur. *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 595–600.