

## Degradation of Poultry Feathers by *Bacillus amyloliquefaciens* Y10 With Plant Growth-promoting Activity and Biological Activity of Feather Hydrolyzates

Yedam Kim<sup>1</sup>, Young Seok Lee<sup>1</sup>, Youngsuk Kim<sup>1</sup>, Jinmyeong Song<sup>1</sup>, Yeongbeen Bak<sup>1</sup>, Gyulim Park<sup>1</sup>, O-Mi Lee<sup>2</sup> and Hong-Joo Son<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Life Science and Environmental Biochemistry, Life and Industry Convergence Institute, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

<sup>2</sup>Avian Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

Received April 4, 2024 / Revised May 13, 2024 / Accepted May 14, 2024

This study was conducted to characterize strain Y10, isolated from discarded chicken feathers. Strain Y10 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* through phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *B. amyloliquefaciens* Y10 exhibited plant growth-promoting activities, including the production of fungal cell-degrading enzymes (cellulase, lipase, protease, and pectinase), siderophores, ammonia, and indoleacetic acid. Furthermore, strain Y10 was able to inhibit the mycelial growth of several phytopathogenic fungi. When 0.1% sucrose as a carbon source and 0.05% casein as a nitrogen source were added to the basal medium, adjusted to pH 10, and cultured at 35°C, the degradation rate of chicken feathers by strain Y10 was about two times higher than that of the basal medium, with the feathers almost completely degraded in four days. Strain Y10 also degraded various keratin substrates, including duck feathers, wool, and human nails. It was confirmed that the feather hydrolyzates prepared using strain Y10 exhibited antioxidant activities, such as 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity (EC<sub>50</sub> = 0.38 mg/ml) and superoxide dismutase-like activity (EC<sub>50</sub> = 183.7 mg/ml). These results suggest that *B. amyloliquefaciens* Y10 is a potential candidate for the development of bio-inoculants and feed additives applicable to the agricultural and livestock industries, as well as the microbiological treatment of keratin waste.

**Key words :** Antioxidant, biodegradation, keratin, PGPR, poultry feather

### 서 론

가금육은 경제적이고 건강한 단백질 공급원으로서, 전 세계적으로 그 소비량이 꾸준히 증가하고 있다. 결과적으로 가금류를 도축하는 과정에서 발생하는 부산물인 우모(깃털)의 양도 비례적으로 증가하고 있는데 전 세계적으로 연간 8×10<sup>9</sup> 톤이 재활용되지 못하고 환경에 폐기되고 있다[13]. 국내의 경우, 농촌진흥청이 발표한 ‘2023년도 가금류 소비조사’에 따르면 국민 1인당 닭고기 소비량은 16.51 kg, 오리고기 소비량은 3.65 kg으로, 2020년 보다 닭과 오리의 소비가 급격히 증가했다.

우모는 수많은 이황화 결합의 존재로 인해 기존의 단백질 분해효소에 의해 분해되지 않는 물리화학적으로 안정

한 케라틴 단백질로 구성되어 있다[7]. 이러한 이유로, 극소량의 깃털만 쿠션, 비료 등으로 재활용되고 있으며, 대부분의 깃털은 매립되거나 소각되고 있다. 그러나, 이들 처리법은 온실 가스 및 H<sub>2</sub>S, 토양 침출수를 배출하여 대기 또는 수자원을 오염시킬 뿐만 아니라 병원성 세균의 전파와 같은 공중보건학적 문제를 초래한다[5, 26]. 따라서, 우모 폐기물을 환경친화적으로 처리하기 위한 효율적이고, 지속 가능한 방법의 개발이 절실히 필요한 상황이다. 우모 분해 미생물을 이용한 처리법이 우모 폐기물 관리를 위한 유망한 방법[27]으로 제안된 이후, 많은 우모 분해 미생물이 다양한 환경으로부터 분리 및 동정되었다. 예를 들면, 세균(*Bacillus* spp., *Geobacillus* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces* spp. 및 *Vibrio* sp.)과 곰팡이(*Chrysosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. 및 *Trichophyton* sp.)와 같은 우모 분해 미생물이 분리되고, 이들에 의한 우모 분해 특성이 확인되었다[3, 17, 21, 22]. 또한 이들 미생물을 이용하여 조제된 우모 분해산물의 비료[33] 및 사료 첨가제[29, 34]로서의 응용에 대한 연구도 진행되었는데, 미생물을 이용하여 조제된 우모 분해산물은 각종 아미노산과 펩티드를 함유하고 있어 아미노산

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5544, Fax : +82-55-350-5549

E-mail : [shjoo@pusan.ac.kr](mailto:shjoo@pusan.ac.kr)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

비료와 아미노산 보충용 사료첨가제로서 활용 가능성이 높은 것으로 확인되었다.

이처럼 새로운 우모 분해 미생물에 대한 요구가 증가함에 따라 생명공학적인 잠재력과 산업적 활용도가 확대된 새로운 미생물을 분리하는 것이 중요한 연구주제로 대두되었다. 농업생명공학적인 관점에서 볼 때, 우모 분해 활성과 함께 식물 성장 촉진 활성 및 항진균 활성을 동시에 보유한 우모 분해 미생물을 분리하고, 특성화한다면 우모 폐기물의 분해뿐만 아니라 작물 생산성을 향상시키기 위한 생물 접종제로서, 합성비료나 합성농약에 비해 경제적, 환경적으로 많은 이점을 제공할 수 있을 것이다. 예를 들면, 이들 우모 분해 미생물의 배양액 즉, 우모 분해산물에는 아미노산과 함께 식물 성장 촉진 활성 및 항진균 활성을 나타내는 세포가 함유되어 있으므로 생물비료 및 생물농약의 잠재적 동시 공급원이 될 수 있다. 또한 이들 미생물에 의해 조제된 우모 분해산물이 항산화능과 같은 생리활성을 나타낸다면 사료 첨가제로서의 그 가치는 더욱 향상될 것이다. 그러나 우모 분해 미생물에 대한 대부분의 연구는 동물 사료첨가제로서 우모의 소화율을 증가시키기 위한 목적으로 수행되었으며[4, 34, 36], 우모 폐기물의 농업적 활용을 위한 우모 분해 및 식물 성장 촉진 미생물의 분리와 특성화에 대한 연구는 Jeong 등[17]과 Woo 등[35]의 연구를 제외하고는 거의 보고되어 있지 않은 상황이다.

따라서 본 연구에서는 우모의 효율적인 분해가 가능함과 동시에 식물 성장 촉진활성이 있는 미생물을 분리 및 동정한 후, 우모 분해능을 개선시킬 수 있는 환경조건을 확립하고자 하였다. 나아가 실험균주가 보유하고 있는 식물 성장 촉진 활성 및 실험균주를 이용하여 조제된 우모 분해산물의 항산화능을 검토함으로써 농업, 축산업 등 다양한 분야에서의 활용을 위한 기초자료를 확보하는 것을 목적으로 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험균주의 선정 및 동정

지역 양계장 주변에서 채집된 닭의 우모로부터 분리된 Y10 균주가 우모를 분해할 수 있음을 예비실험을 통하여 확인한 후, 실험균주로 사용하였다. 실험균주 Y10을 동정하기 위하여 세포 및 집락(colony)의 형태적, 배양적 특성을 Gerhardt 등[12]의 방법에 준하여 조사하였다. 또한 실험균주의 계통학적 분류를 위하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위하여 *E. coli* 16S rRNA 유전자의 보존 서열에 기초하여 합성된 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') primer와 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하였다[20]. 실험균주의 16S rRNA 유전자의 염기

서열을 결정된 후, GenBank 데이터베이스에 축적되어 있는 유사균주들의 염기서열과 비교하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성하였다. 본 연구에서 결정된 염기서열은 GenBank에 기탁하였다(accession number PP784582).

### 식물 성장 촉진 및 항진균 활성 평가

실험균주의 식물병원성 곰팡이의 세포성분 분해효소(cellulase, lipase, protease, pectinase) 생성능은 Gerhardt 등[12]이 제시한 표준방법에 준하여 측정하였다. 실험균주의 siderophore 생성능과 암모니아 생성능은 각각 Chrome azurol S assay [30] 및 peptone water-Nessler assay [8]에 의하여 측정하였다. 식물성장 호르몬인 indoleacetic acid (IAA)의 생성능은 Tang과 Bonner의 방법[32]에 의하여 측정하였으며, 항진균 활성은 식물병원성 곰팡이(*Botrytis cinerea*, *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum*)와 실험균주와의 대치배양을 통하여 확인하였다.

### 우모 분해에 대한 환경인자의 영향

실험균주를 영양배지(nutrient broth)에 접종하여 30°C, 200 rpm에서 24시간 동안 전배양한 후, 우모배지(닭 우모 0.1%, glucose 0.1%, polypeptone 0.14%, NaCl 0.15%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.14%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.005%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03%, pH 7)에 2%(v/v) 접종하여 동일 배양조건에서 3일 동안 배양하였다.

실험균주 Y10의 우모 분해를 위한 배지는 상술한 우모 배지를 기본배지로 이용하여 개선하였다. 탄소원 및 질소원과 같은 배지 성분의 영향은 Table 1에 서술된 대로 조사하였다. 우모 분해에 대한 배양온도 및 배지 pH의 영향은 이들 환경요인(25-40°C 및 pH 4-11)을 개별적으로 변화시킴으로써 조사하였다. 최종적으로 개선된 배지 및 기본배지에 실험균주를 각각 접종하여 배양하면서 우모 분해율 및 우모분해효소인 keratinase의 활성을 측정하였다. Keratinase 활성은 Wawrzkiwicz 등[35]의 방법에 따라 조제된 keratin 분말을 기질로 사용하여 측정하였다. 세포가 제거된 배양 상등액 2 ml를 0.06% keratin 분말이 함유된 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) 3 ml에 첨가하여 30°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 5% trichloroacetic acid 1 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 반응액의 흡광도를 280 nm에서 측정하였다. Keratinase 활성의 1 unit (U)은 상기 조건에서 시간당 0.01의 흡광도 증가를 나타내는 효소의 양으로 정의하였다.

또한 Y10 균주에 의해 분해 가능한 기질을 확인하기 위하여 개선된 배지에 닭 우모 대신 다양한 케라틴 기질(오리 우모, 양모, 사람 손발톱)을 0.1% 첨가하여 배양하였다. 각 실험마다 상기에 서술된 절차에 따라 배양을 수행한 후, 각 케라틴 기질의 분해율을 측정하였다. 즉, 배양액을 Whatman No. 1 여과지를 이용하여 여과하여 잔존

**Table 1.** Influence of carbon and nitrogen sources on feather degradation by *Bacillus amyloliquefaciens* Y10

Carbon source (0.1%)	Relative feather degradation (%)	Nitrogen source (0.1%)	Relative feather degradation (%)
Glucose	19.8±2.3	Beef extract	54.6±1.1
Fructose	11.9±3.5	Casamino acid	58.3±2.4
Galactose	48.7±1.7	Casein	100.0±1.8
Sucrose	100.0±1.0	Gelatin	48.6±0.8
Lactose	72.6±3.6	Malt extract	42.5±2.2
Maltose	67.3±1.4	Polypeptone	54.7±1.9
Glycerol	26.8±1.2	Tryptone	60.5±2.4
Mannitol	33.2±2.9	Yeast extract	63.6±3.3
Sorbitol	46.3±3.0	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	23.9±1.5
None	65.1±1.3	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	38.4±0.6
		None	50.5±2.9

케라틴을 회수한 후, 90°C에서 향량이 될 때까지 건조하였다. 분해 전후의 케라틴 건조무게를 측정한 후, 건조무게 감소량을 % 백분율로 환산하여 상대 분해율을 나타내었다[17]. 분해된 우모의 미세구조는 시료를 백금으로 코팅한 후, 주사전자 현미경(JEOLTECHNIC LTD., Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 모든 실험은 세 번 반복한 후, 평균값±표준편차로 결과를 나타내었다.

**우모 분해산물의 항산화능 평가**

상기에서 확립된 개선배지에 실험균주를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 5일 동안 배양한 배양액을 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 15분) 및 여과(0.45 µm membrane filter)하여 세포를 완전히 제거하였다. 세포가 제거된 배양 상등액을 동결건조하여 항산화능 분석을 위한 시료로 사용하였다.

우모 분해산물의 항산화능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능과 superoxide dismutase (SOD) 유사활성을 통하여 평가하였다. DPPH 라디칼 소거능은 Blois의 방법[2]에 준하여 조사하였다. 200 µM DPPH 용액 1 ml를 각 농도별(0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.6 mg/ml) 시료 1 ml와 혼합하여 37°C, 암소에서 30분간 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 Marklund와 Marklund의 방법[23]에 의하여 조사하였다. 각 농도별 (10, 100, 150, 200 mg/ml) 시료 200 µl에 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) 3 ml, 7.2 mM pyrogallol 200 µl를 첨가하여 25°C에서 10분간 반응시켰다. 1 N HCl을 1 ml를 첨가하여 반응을 중지시킨 후, 420 nm에서 흡광도를 조사하였다. 각 실험에서 시료 대신 증류수를 음성 대조구로 사용하였으며, 실험구와 음성 대조구간의 흡광도 차이를 % 백분율로 환산하여 각 활성을 나타내었다. 양성 대조구로는 ascorbic acid를 사용하였다. 도출된 결과는 Sigmaplot 프로그램 사용하여 4 parametric logistic model에 적합시켜서 effective concentration (EC<sub>50</sub>)을 산출하였다.

**결과 및 고찰**

**실험균주의 동정**

실험균주 Y10의 세포는 막대형(rod)의 비운동성 그림 양성 세균으로서, 내생포자를 형성하였다. 영양한천 평판 배지(nutrient agar plate)에서 형성된 집락은 반투명(translucent), 불규칙(irregular), 볼록(convex)하였고, 점성과 노란색을 나타내었다. 이들 표현형적 특성은 실험균주가 *Bacillus* 속으로 분류될 수 있음을 시사한다. 실험균주를 보다 정확하게 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 NCBI Blast의 bl2seq program을 이용하여 정렬한 결과, Y10 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 99%의 상동성이 있음을 확인하였다. 계통수를 분석한 결과 또한 Y10 균주가 *Bacillus amyloliquefaciens*와 동일 클러스트(cluster)를 형성함을 보여주었다(Fig. 1). 따라서 실험균주를 *Bacillus amyloliquefaciens* Y10이라 명명하였다.

**실험균주의 식물 성장 촉진 및 항진균 활성**

실험균주가 보유하고 있는 식물 성장 촉진 및 항진균 활성을 조사한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. Y10 균주의

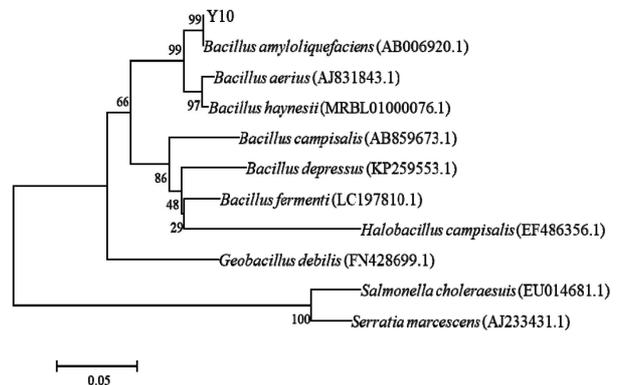


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of *Bacillus amyloliquefaciens* Y10 and *Bacillus* strains.

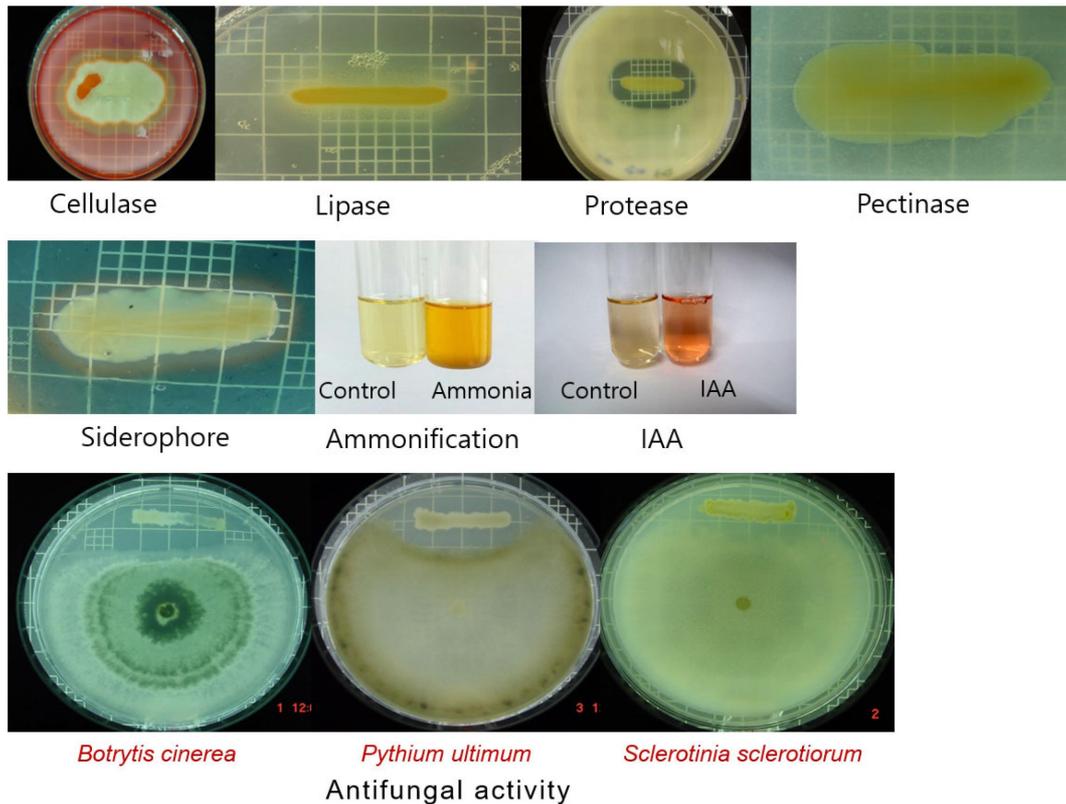


Fig. 2. Photographs showing plant growth-promoting and antifungal activities of *Bacillus amyloliquefaciens* Y10.

집락 주변에 cellulase, protease, pectinase와 같은 식물병원성 곰팡이의 세포성분과 세포벽을 분해할 수 있는 효소의 존재를 나타내는 투명대가 관찰되었으며, lipase의 존재를 나타내는 불투명 침전대도 형성되었다. 그러나 amylase, chitinase와 같은 다른 분해효소의 생성은 관찰되지 않았다. 곰팡이의 세포성분과 세포벽을 가수분해할 수 있는 효소들은 토양 유래 식물병원성 곰팡이의 생육을 억제함으로써 간접적으로 작물의 성장을 촉진시키는 것으로 보고되었다[6]. Chrome azurol S 평판배지에 형성된 집락 주변에 주황색 영역이 관찰되었고, peptone water를 진한 노란색으로 변화시켰으므로 Y10 균주는 siderophore와 암모니아를 생성할 수 있음을 확인하였다. 철-킬레이팅 화합물인 siderophore는 농작물이 흡수할 수 없는 불용성 Fe<sup>3+</sup>을 가용화시킴으로써 농작물의 성장에 도움을 주며, 암모니아는 식물병원성 곰팡이의 생육을 억제하는 것으로 보고되었다[8, 28]. 그리고 Y10 균주가 접종된 배양액은 IAA 검출 시약인 Salkowski 시약을 첨가했을 때, 분홍색으로 변화되었기에 식물성장 호르몬인 IAA 생성능이 있음을 알 수 있었다. 한편, 몇몇 식물병원성 곰팡이(*B. cinerea*, *P. ultimum*, *S. sclerotiorum*)에 대한 실험균주의 항진균 활성을 조사한 결과, 실험균주의 존재 하에 이들 식물병원성 곰팡이의 균사체 생육은 크게 억제됨을 확인하였다.

### 우모 분해를 위한 환경요인의 개선

미생물에 의한 우모 분해는 환경요인, 특히 탄소원과 질소원, 배양온도와 배지의 초기 pH에 결정적인 영향을 받는 것[27, 29]으로 보고되었기에 우모 폐기물의 효율적인 처리나 산업적 응용을 위하여 이들 환경요인을 개선하는 것은 중요하다.

탄소원이 *B. amyloliquefaciens* Y10의 우모 분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 기본배지에 각종 탄소원을 0.1%씩 첨가하여 배양한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 탄소원을 첨가하지 않은 대조구보다 우모 분해능이 높은 탄소원은 sucrose, lactose와 같은 이당류였으며, 단당류와 당알콜은 우모 분해를 저해하였다. 이것은 단당류와 당알콜이 우모 분해에 관련된 효소의 활성이나 합성을 저해한다는 의미인데, 탄수화물은 미생물의 우모 분해효소 생산을 저해하는 catabolite repressor로 작용한다는 일반적인 사실[10]과 다른 결과이므로 향후, 우모 분해효소 조절 시스템에 대한 구체적인 효소학적, 분자생물학적 연구가 필요함을 알 수 있었다. 선정된 탄소원인 sucrose의 우모 분해 최적농도는 0.1%이었으며, 그 이상의 농도에서는 우모 분해가 억제되어 전형적인 bell-type의 sucrose 이용 패턴을 보여주었다(Fig. 3A). 질소원이 우모 분해에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1% sucrose가 첨가된 배지에 각종 질소원을 0.1%씩 첨가하여 배양한 결과, 무기질

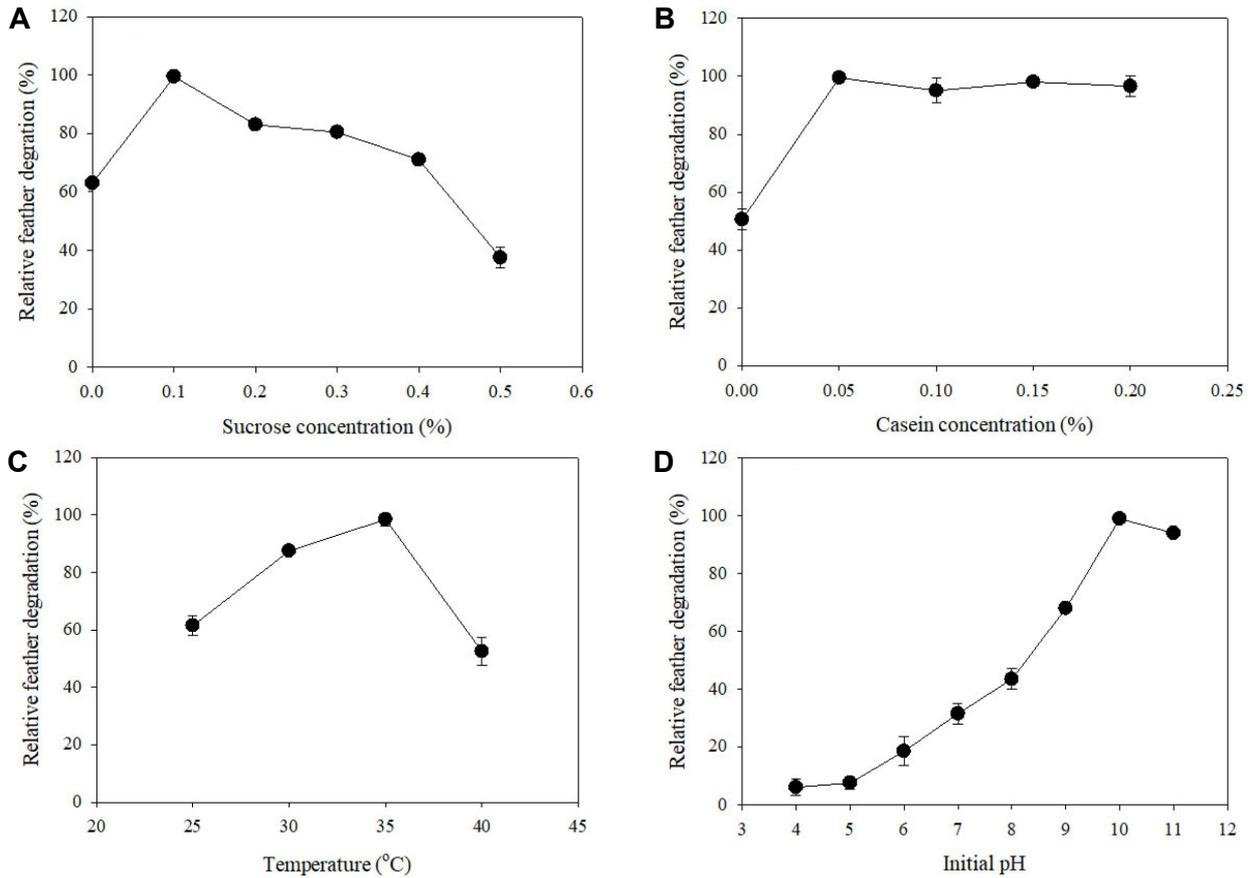


Fig. 3. Influence of sucrose (A) and casein (B) concentrations, temperature (C) and initial pH (D) on feather degradation by *Bacillus amyloliquefaciens* Y10.

소원보다 유기질소원을 첨가했을 때 대체로 높은 우모 분해능을 보여주었으며, 그중 casein 첨가구에서 우모 분해능이 가장 높았다(Fig 3B). 일반적으로 단백질 분해효소 생산 미생물을 배양할 때, 무기 질소원을 사용하면 단백질 분해효소의 생성이 저해된다고 보고되었다[11]. 선정된 질소원 casein의 우모 분해 최적농도는 0.05%이었으며, 그 이상의 농도에서는 우모 분해가 일정하게 유지되었으므로 casein 이용 패턴은 inhibition-type임을 알 수 있었다.

배양온도가 실험균주의 우모 분해에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3C에서 보는 바와 같이 35°C에서 우모 분해가 가장 높았고, 그 이상 및 이하의 온도에서는 분해율이 현저하게 감소되었다. 배지의 초기 pH가 Y10 균주의 우모 분해에 미치는 영향을 조사한 결과, 배지의 초기 pH가 알칼리성일수록 우모 분해능이 증가하여 pH 10에서 가장 높은 분해율을 나타내었다(Fig. 3D). 일반적으로 우모 분해 활성을 띠는 균주들은 알칼리 조건에서 우모 분해효소 생산이 최적인 것으로 보고[25]되어 있는데 본 연구도 동일한 결과를 보여주었다.

이상과 같이 확립된 개선배지 및 기본배지에서 Y10 균주를 각각 배양한 결과, 기본배지에서는 1일의 지연기를

거친 후, 우모가 분해되기 시작하여 배양 3일에 가장 높은 우모 분해율(56%)을 나타내었으나 개선배지에서는 지연기 없이 배양 시간 경과에 비례하여 우모가 분해되어 배양 4일에 최종적으로 98%의 분해율을 나타내었다(Fig. 4A). Keratinase의 활성은 배지의 종류에 관계없이 시간 경과에 따라 증가하였는데, 증가 패턴은 우모 분해 패턴과 동일하였다. 이것은 실험균주가 생산한 keratinase에 의해 우모가 분해되었음을 시사한다. 배양 전후의 우모를 비교한 결과, 배양 후의 시료는 육안으로 우모의 원형이 전혀 관찰되지 않았으며, 주사전자현미경으로 미세구조를 관찰했을 때, 우모가 전체적으로 미세하게 단편화되어 분해되었음을 알 수 있었다(Fig. 4B). 한편, *Xanthomonas* sp. P5 [18]와 *Pseudomonas geniculata* H10 [29]은 우모를 완전 분해하는데 각각 7일 및 4일이 소요된 반면, *Stenotrophomonas maltophilia* R13 [17]은 5일에 84%, *Bacillus subtilis* S8 [16]은 4일에 91%를 분해하였다고 보고되었다.

#### 실험균주의 케라틴 기질 이용능

상기에서 확립된 개선배지에 닭 우모 대신 오리 우모, 양모, 사람 손발톱과 같은 다양한 케라틴 기질을 각각 첨

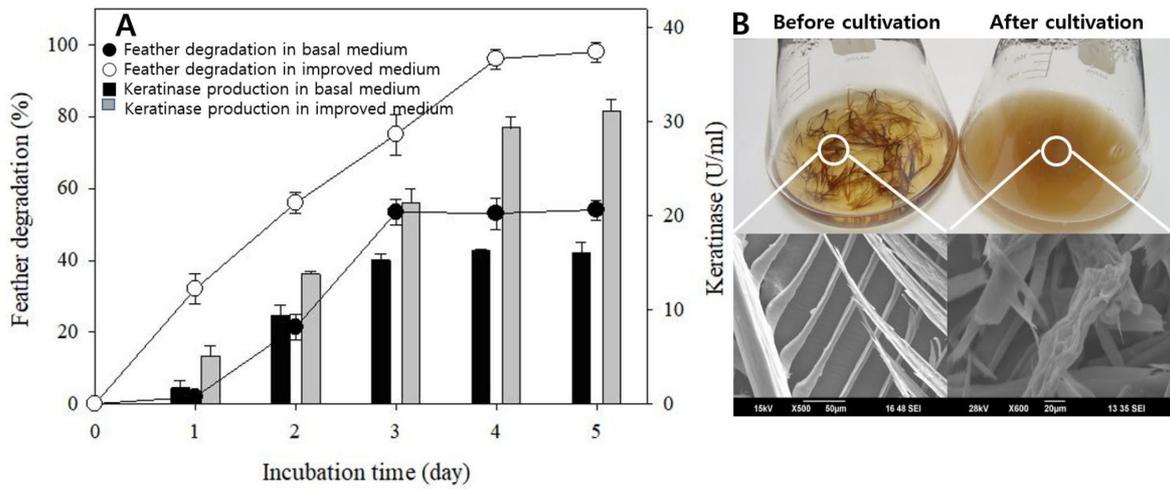


Fig. 4. Time course (A) of feather degradation and keratinase production by *Bacillus amyloliquefaciens* Y10 in improved and basal media. (B) indicates photographs of visual and scanning electron microscopy of chicken feathers observed before and after cultivation in an improved medium.

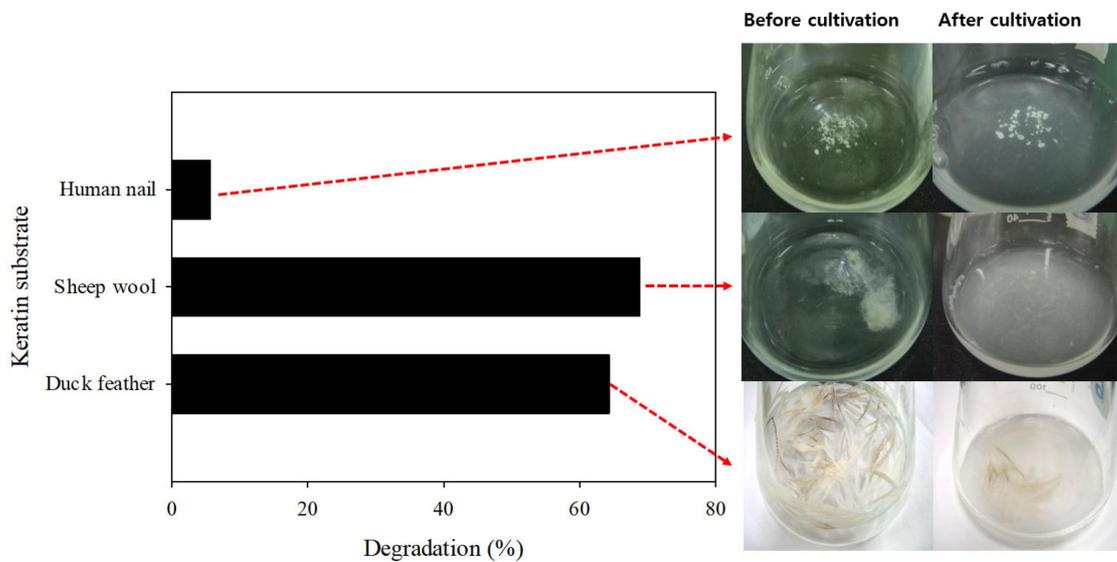


Fig. 5. Degradation of different keratin substrates by *Bacillus amyloliquefaciens* Y10.

가하여 5일 동안 배양한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 실험균주는 오리 우모와 양모에 대해 각각 64.3%, 68.8%의 비교적 높은 분해율을 나타내었으나 사람의 손발톱은 5.7%의 현저히 낮은 분해율을 보여주었다. 이러한 차이는 각 케라틴 기질의 구조적 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 한편, *B. pumilis* F3-4는 오리의 우모, 양모 및 사람의 손발톱을 각각 81%, 10% 및 15% 분해[31]하였으며, *Thermoactinomyces candidus*는 양모의 11%를 분해[15]하였다고 보고되었다. 이것은 우모 분해 미생물의 기질 이용능은 균주 특이성이 있음을 의미한다. 요약하면, *B. amyloliquefaciens* Y10의 우모 분해효소는 다양한 케라틴 기질에 대해 활성이 있음을 알 수 있었는데, 이러한 효소

학적 특성은 실험균주를 다양한 동물의 뿔, 발굽과 같은 케라틴 폐기물의 처리공정이나 양모의 품질을 개선시키는 공정[19]에 사용 가능성이 있음을 시사한다.

#### 우모 분해산물의 항산화능

생물체의 호흡과정에서 산소가 산화되면서 생성된 활성산소는 생체 조직을 공격하고, 세포를 손상시킨다. 결과적으로 암과 같은 다양한 질병, 돌연변이를 유발하기도 하며, 노화의 원인이 되기도 한다. 활성산소를 제거하기 위하여 butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole 등의 합성 항산화제가 사용되고 있으나 이들은 많은 부작용을 초래할 수 있어 천연 항산화 물질의 개발은 매우

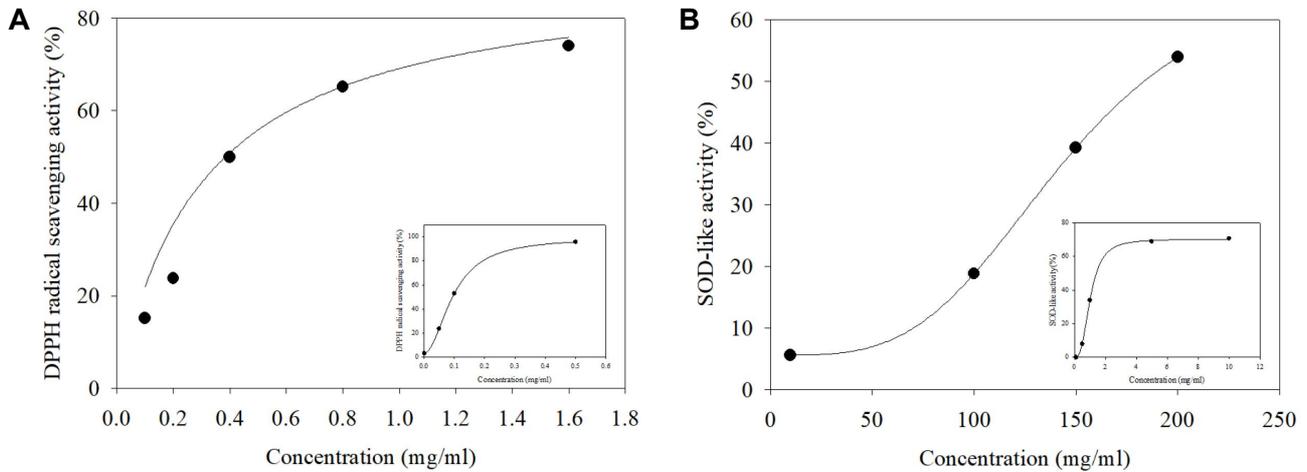


Fig. 6. DPPH radical scavenging (A) and SOD-like (B) activities of feather hydrolyzates prepared by *Bacillus amyloliquefaciens* Y10. The inset figures indicate DPPH radical scavenging and SOD-like activities of ascorbic acid, respectively.

중요한 주제이다[24]. 따라서 실험군주에 의하여 우모가 완전히 분해된 배양액을 이용하여 조제된 우모 분해산물의 항산화능을 조사하였다. 우모 분해산물의 DPPH 라디칼 소거능을 분석한 결과는 Fig. 6A에서 보는 바와 같다. 우모 분해산물의 농도 0-0.8 mg/ml의 범위에서 DPPH 라디칼 소거능은 농도 의존적으로 급격하게 증가하였으며, 이후에는 완만하게 증가하였다(hyperbolic type). 우모 분해산물의 SOD 유사활성은 농도 의존적으로 완만하게 증가하는 sigmoidal type을 나타내었다(Fig. 6B). 이 결과를 바탕으로 산출된 우모 분해산물의 DPPH 라디칼 소거능과 SOD 유사활성의 EC<sub>50</sub>은 각각 0.38 mg/ml 및 183.7 mg/ml로서, 양성 대조구인 ascorbic acid의 DPPH 라디칼 소거 유효농도(EC<sub>50</sub> = 0.09 mg/ml) 및 SOD 유사활성 유효농도(EC<sub>50</sub> = 1.52 mg/ml)보다 높았다. 본 연구에서 사용된 우모 분해산물의 DPPH 라디칼 소거 유효농도는 *Bacillus pumilus* A1 [9]을 이용하여 조제된 것(EC<sub>50</sub> = 0.3 mg/ml)보다 다소 높았으나 *Bacillus* sp. MPTK6 [26]를 이용하여 조제된 것(EC<sub>50</sub> = 0.6 mg/ml)보다는 낮았다. 비록 ascorbic acid 보다 낮은 항산화능을 보였음에도 불구하고 우모 분해산물의 이런 항산화 잠재력은 매우 흥미로운 결과이다. 실제로 우모 분해산물은 가축이나 어류를 위한 천연 단백질 공급원과 항산화제로 사용될 수 있다[1]. 또한 항산화능이 있는 우모 분해산물을 사료첨가제로 사용하면 사료의 산화 방지는 물론 가축의 질병 예방 효과도 기대할 수 있을 것이다[9]. 이러한 효과는 사료첨가제로서 로즈마리 추출물, 비타민 C와 같은 다양한 천연 항산화제에서 입증된 바 있다[14]. 서론에서 언급했다시피 미생물을 이용하여 조제된 우모 분해산물은 다양한 아미노산을 함유하고 있어 아미노산 비료와 사료첨가제로서 활용 가능성이 높다. 요약하면, 본 실험 결과는 우모 분해산물의 사료첨가제로서의 영양적 가치에 덧붙여 산화 스트레스에 의

해 초래되는 동식물 질병을 위한 의약용으로서의 잠재적 가능성이 있음을 시사한다.

### 감사의 글

This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University.

### The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

### References

- Alahyaribeik, S., Seyed, D. S., Tabandeh, F., Honarbakhsh, S. and Ghazanfari, S. 2021. Stability and cytotoxicity of DPPH inhibitory peptides derived from biodegradation of chicken feather. *Protein Expr. Purif.* **177**, 105748.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Bohacz, J. 2017. Biodegradation of feather waste keratin by a keratinolytic soil fungus of the genus *Chrysosporium* and statistical optimization of feather mass loss. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 12.
- Brandelli, A. 2008., Bacterial keratinases: useful enzymes for bioprocessing agroindustrial wastes and beyond. *Food Bioprocess. Technol.* **1**, 105-116.
- Cheong, C. W., Lee, Y. S., Ahmad, S. A., Ooi, P. T. and Phang, L. Y. 2018. Chicken feather valorization by thermal alkaline pretreatment followed by enzymatic hydrolysis for protein-rich hydrolysate production. *Waste Manag.* **79**, 658-666.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. and Barka

- E. A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4591-4959.
7. da Gioppo, N. M. R., Moreira-Gasparin, F. G., Costa, A. M., Alexandrino, A. M., de Souza, C. G. M. and Peralta, R. M. 2009. Influence of the carbon and nitrogen sources on keratinase production by *Myrothecium verrucaria* in submerged and solid state cultures. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 705-711.
  8. Dye, R., Pal, K. K., Bhatt, D. M. and Chauhan, S. M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* **159**, 371-394.
  9. Fakhfakh, N., Ktari, N., Haddar, A., Mnif, I. H., Dahmen, I. and Nasri, M. 2011. Total solubilisation of the chicken feathers by fermentation with a keratinolytic bacterium, *Bacillus pumilus* A1 and the production of protein hydrolysate with high antioxidative activity. *Process Biochem.* **46**, 1731-1737.
  10. Fisher, S. H. and Sonenshein, A. L. 1991. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**, 107-135.
  11. Fujiwara, N. and Yamamoto, K. 1987. Production of alkaline protease in a low-cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. *J. Ferment. Technol.* **65**, 345-348.
  12. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N. and Wester, E. W. 1981. *Manual of methods for general bacteriology*, pp. 5-61, American Society for Microbiology: New York, USA.
  13. Ghaffar, I., Imtiaz, A., Hussain, A., Javid, A., Jabeen, F., Akmal, M. and Qazi, J.,I. 2018. Microbial production and industrial applications of keratinases: an overview. *Int. Microbiol.* **21**, 163-174.
  14. Hamre, K., Kolas, K. and Sandnes, K. 2010. Protection of fish feed, made directly from marine raw materials, with natural antioxidants. *Food Chem.* **119**, 270-278.
  15. Ignatova, Z., Gousterova, A., Spassov, G. and Nedkov, P. 1999. Isolation and partial characterization of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic actinomycete strain *Thermoactinomyces candidus*. *Can. J. Microbiol.* **45**, 217-222.
  16. Jeong, J. H., Jeon, Y. D., Lee, O. M., Kim, J. D., Lee, N. R., Park, G. T. and Son, H. J. 2010. Characterization of a multifunctional feather-degrading *Bacillus subtilis* isolated from forest soil. *Biodegradation* **21**, 1029-1040.
  17. Jeong, J. H., Lee, O. M., Jeon, Y. D., Kim, J. D., Lee, N. R., Lee, C. Y. and Son, H. J. 2010. Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that produces plant growth-promoting activity. *Process Biochem.* **45**, 1738-1745.
  18. Jeong, J. H., Park, K. H., Oh, D. J., Hwang, D. Y., Kim, H. S., Lee, C. Y. and Son, H. J. 2010. Keratinolytic enzyme-mediated biodegradation of recalcitrant feather by a newly isolated *Xanthomonas* sp. P5. *Polym. Degrad. Stab.* **95**, 1969-1977.
  19. Kang, S. M., Cha, M. K., Kim, S. J. and Kwon, Y. J. 2006. The effect of quality improvement for wool and silk treated with protease produced by *B. subtilis* K-54. *J. Kor. Soc. Cloth. Ind.* **8**, 239-244.
  20. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley and Sons: New York, USA.
  21. Li, Q. 2019. Progress in microbial degradation of feather waste. *Front. Microbiol.* **10**, 2717.
  22. Lucas, F. S., Broennimann, O., Febbraro, I. and Heeb, P. 2003. High diversity among feather-degrading bacteria from a dry meadow soil. *Microb. Ecol.* **45**, 282-290.
  23. Marklund, S. and Marklund, G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* **47**, 469-474.
  24. Masaki, H. 2010. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects. *J. Dermatol. Sci.* **58**, 85-90.
  25. Mazzoto, A. M., Cedrola, S. M. L., Lins, U., Rosado, A. S., Silva, K. T., Chaves, J. Q., Rabinovitch, L., Zingali, R. B. and Vermelho, A. B. 2010. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**, 89-96.
  26. Mukesh Kumar, D., Priya, P., Nithya Balasundari, S., Nandhini Devi, G. S. D., Immaculate Nancy Rebecca, A. and Kalaichelvan, P. T. 2012. Production and optimization of feather protein hydrolysate from *Bacillus* sp. MPTK6 and its antioxidant potential. *Middle-East J. Sci. Res.* **11**, 900-907.
  27. Onifade, A. A., Al-Sane, N. A., Al-Musallam, A. A. and Al-Zarban, S. 1998. 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.
  28. Pandey, P., Kang, S. C., Gupta, C. P. and Maheshwari, D. K. 2005. Rhizosphere competent *Pseudomonas areuginosa* GRC1 produces characteristic siderophore and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). *Curr. Microbiol.* **51**, 303-309.
  29. Park, G., Lee, G. M., Lee, Y. S., Kim, Y., Jeon, C. M., Lee, O. M., Kim, Y. J. and Son, H. J. 2023. Biodegradation and valorization of feather waste using the keratinase-producing bacteria and their application in environmentally hazardous industrial processes. *J. Environ. Manage.* **346**, 118986.
  30. Schwyn, B. and Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56.
  31. Son, H. J., Park, H. C., Kim, H. S. and Lee, C. Y. 2008. Nutritional regulation of keratinolytic activity in *Bacillus pumilis*. *Biotechnol. Lett.* **30**, 461-465.
  32. Tang, Y. W. and Bonner, J. 1947. The enzymatic inactivation of indoleacetic acid I. Some characteristics of

- the enzyme contained in pea seedlings. *Arch. Biochem.* **13**, 17-25.
33. Vesela, M. and Friedrich, J. 2009. Amino acid and soluble protein cocktail from waste keratin hydrolysed by a fungal keratinase of *Paecilomyces marquandii*. *Biotechnol. Bio-process Eng.* **14**, 84-90.
34. Wang, H., Guo, Y. and Shih, J. C. H. 2008. Effects of dietary supplementation of keratinase on growth performance, nitrogen retention and intestinal morphology of broiler chickens fed diets with soybean and cottonseed meals. *Anim. Feed Sci. Technol.* **140**, 376-384.
35. Wawrzkiwicz, K., Lobarzewski, J. and Wolski, T. 1987. Intracellular keratinase of *Trichopton gallinae*. *J. Med. Vet. Mycol.* **25**, 261-268.
36. Williams, C. M., Richter, C. S., Mackenzie, J. M. and Shih, J. C. H. 1990. Isolation, identification and characterization of a feather-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1509-1515.
37. 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. 2007. Production of keratinolytic protease by *Bacillus pumilus* R37 and feather hydrolysate as a source of amino acids. *J. Environ. Sci.* **16**, 1203-1208.

### 초록 : 식물 성장 촉진 활성을 가진 *Bacillus amyloliquefaciens* Y10에 의한 가금 우모의 분해 및 생산된 우모 분해산물의 생리활성

김예담<sup>1</sup> · 이영석<sup>1</sup> · 김영석<sup>1</sup> · 송진명<sup>1</sup> · 박영빈<sup>1</sup> · 박규림<sup>1</sup> · 이오미<sup>2</sup> · 손홍주<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 생명환경화학과 및 생명산업융합연구원, <sup>2</sup>농림축산검역본부 조류세균과)

가금류 우모는 환경오염 물질이자 병원성 세균의 저장소로 간주되는 축산폐기물이다. 따라서 우모 폐기물을 관리하기 위한 지속 가능하고, 환경친화적인 방법을 개발하는 것은 매우 중요하다. 본 연구는 폐기된 닭의 우모로부터 분리된 Y10 균주를 동정하고, 특성화하기 위하여 수행되었다. Y10 균주는 표현형 및 16S rRNA 유전자 분석을 통해 *Bacillus amyloliquefaciens*에 속하는 것으로 확인되었다. *B. amyloliquefaciens* Y10은 곰팡이 세포성분을 분해하는 효소(cellulase, lipase, protease and pectinase), siderophore, 암모니아 및 IAA 생성과 같은 식물 성장 촉진 활성을 나타내었다. 나아가 Y10 균주는 일부 식물병원성 곰팡이의 균사체 생육을 억제할 수 있었다. 기본배지에 탄소원으로 sucrose 0.1%, 질소원으로 casein 0.05%를 첨가한 후, 배지의 pH를 10으로 조정하여 35°C에서 배양했을 때, 실험균주에 의한 우모 분해율은 기본배지 대비 약 2배 증가되었으며, 배양 4일에 우모는 완전히 분해되었다. 또한 실험균주는 개선된 조건에서 오리 우모, 양모, 사람의 손발톱과 같은 다양한 케라틴 기질을 분해할 수 있었다. Y3 균주를 이용하여 조제된 우모 분해산물은 DPPH 라디칼 소거능(EC<sub>50</sub> = 0.38 mg/ml)과 SOD 유사활성(EC<sub>50</sub> = 183.7 mg/ml)과 같은 항산화 능력이 있음을 확인하였다. 이 결과는 실험균주는 케라틴 폐기물의 미생물학적 처리뿐만 아니라 농축산 산업에 적용할 수 있는 생물 비료, 생물 농약 및 사료첨가제 개발의 잠재적인 후보가 될 수 있을 시사한다.