

## 가축분뇨 발효제의 개발을 위한 미생물 분리 및 특성조사

<sup>1,2</sup>김 소 영 · <sup>1,2</sup>김 흥 · † <sup>1,3</sup>채 희 정

<sup>1</sup>호서대학교 벤처전문대학원, <sup>2</sup>주영우환경, <sup>3</sup>호서대학교 식품생물공학과  
(접수 : 2003. 8. 20. 게재승인 : 2003. 12. 24.)

### Isolation and Characterization of Microorganisms for the Development of Fermentation Accelerator of Animal Manure

Soyoung Kim<sup>1,2</sup>, Hong Kim<sup>1,2</sup>, and Hee Jeong Chae<sup>1,3†</sup>

<sup>1</sup>Department of Innovative Industrial Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Asan 336-795, Korea  
<sup>2</sup>Young-Woo Environment Co. Ltd.

<sup>3</sup>Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea  
(Received : 2003. 8. 20. Accepted : 2003. 12. 24.)

Several microorganisms were isolated and characterized for the development of fermentation accelerator of animal manure. Firstly, 61 species were isolated from rice bran extract. Secondly, five strains of microorganisms were screened by the analysis of hydrolysis activities for organic compounds including protease, cellulase, amylase, and lipase. From a deodorization test for ammonia gas using the isolated strains, finally three bacterial strains were selected (NA 2, 12, 15). The selected strains, NA 2 and 15 were identified as *Bacillus acidocaldarius* and *Planococcus* sp. respectively. The media composition of key nutrients and pH for the mixed culture of the three selected strains were optimized using an experimental design method (response surface method) as follows : beef extract (4.59 g/L), peptone (8.72 g/L) and pH 6.3. Consequently, the isolated microorganisms seem to have potential applicability in the animal manure treatment.

**Key Words** : Microorganisms, fermentation accelerator, animal manure

#### 서 론

유기물을 대량으로 함유하고 있는 가축분뇨 (animal manure)는 최근 가축사육의 대규모화와 함께 그 발생량이 증가하고 있다. 국내에서 연간 부산되는 가축 분뇨량은 약 4천만 톤에 이르며 그 처리방법은 혐기성, 호기성 소화법 등의 정화처리 방법과 액비화를 통한 자원으로 재이용하는 방법이 있다(1). 정화처리를 위해 지난 수년 동안 시, 군에서 가축 분뇨처리장을 건설하여 운영 중에 있으나 그 처리 능력이 부족하고 운영비 등 추가 재정이 소요될 뿐만 아니라 방류수의 BOD 값이 기준치를 넘는 경우가 있어 환경오염에 심각한 문제를 야기시키고 있는 실정이다. 한편, 액비로 이용할 경우 가축분뇨를 6개월 정도 발효시킬 저장조가 필요하고, 외국에서 수입한 일부 발효촉진제를 사용하여 발효 저장시기를 줄

이고 있으나, 많은 양의 가축분뇨를 액비화하기 위해서는 저장조 시설이나 관리운영에 있어서 막대한 예산이 필요한 것으로 판단된다(2).

가축을 사육하는 농가수는 감소하는 추세임에도 불구하고 가축의 사육 두수는 지속적으로 증가되고 있으며, 발생하는 가축분뇨에 의한 수질오염과 악취가 축산 농가와 인근 주민의 민원을 유발하고 있다. 한편 대부분의 농경지는 영양소의 재공급을 화학비료에 의존하면서 토양이 점점 산성화되며 척박해지고 있다. 따라서 환경 친화적인 농업의 일환으로 유기질 비료의 사용이 필요한 실정이다. 가축분뇨에는 비료의 3대 요소 (질소, 인산, 칼리) 이외에도 농작물에 유익한 마그네슘, 칼슘 등의 영양소와 구리, 나트륨, 망간, 아연, 붕소, 몰리브덴 등의 미량요소를 다양하게 함유하고 있어 비료 가치가 높은 반면, 악취 발생과 질소 과다 등의 문제점을 가지고 있어 활용이 어려운 실정이다. 현재 가축분뇨에 대한 기술은 국가적 정책의 일환으로 진행되고 있다. 국내에서의 가축분뇨 처리기술은 크게 퇴비 및 액비 (liquefied fertilizer) 제조 기술, 대체 에너지 개발기술, 사료화 기술로 요약된다(3, 4). 이중 액비, 퇴비 및 에너지 개발기술은 부속 기술을 기반으

† Corresponding Author : Department of Food and Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea  
Tel : +82-41-540-5642, Fax : +82-2-6280-6346  
E-mail : hjchae@office.hoseo.ac.kr

로 하고 있다. 액비화에는 호기적 처리와 혐기적 처리가 있다. 폭기조에 의한 호기적 처리는 탱크에 유입된 분뇨를 교반하면서 산소를 공급하여 호기성 미생물을 활성화시켜 유기물이 분해되고 부숙되어서 유기질 액상 비료가 된다. 이러한 부숙과정에서 악취가 소멸되고, 분뇨는 흑갈색으로 변하며, pH도 9 이상으로 증가한다. 폭기처리의 장점은 저장 및 사용 기간 중에 악취와 메탄 가스 발생이 감소된다. 혐기성 처리 방법은 주로 에너지를 얻는 것을 목적으로 이용되고 있다. 액상분뇨를 저장탱크에 유입 정치하면 가벼운 부유물은 위로 상승하면서 거품(scum)을 형성하여 공기를 차단하고, 저층의 액은 점차 산소가 부족하게 되어 미생물 상이 변화한다. 이러한 상태에서 미생물은 먼저 산 생성 박테리아가 활동하여 유기산, H<sub>2</sub>O 및 CO<sub>2</sub>를 생성한다. 다음 단계에서는 메탄균이 작용하여 메탄가스를 생성하며, 유기물을 분해하게 된다. 일반적으로 액상분뇨를 장기간 저장탱크에 저장하여 부숙함으로써 농작물에 사용할 수 있는 비료나 퇴비로 전환시킨다. 또한 부숙 기간 중에 발생하는 열이나 메탄 등의 가스를 에너지자원으로 전환 사용하게 된다(5-7). 그러나 이러한 기술은 설비비용 및 부숙 기간에 따른 시간적 공간적 제약이 발생한다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 이동식 탱크로리를 이용한 교반 부숙기의 개발과 부숙 시간을 단축시키기 위한 미생물 첨가제 개발이 부각되고 있다. 이동식 탱크로리는 기존의 부숙시설이 갖는 공간적 시간적 문제를 해결하여, 수 시간 내에 속성 발효시켜 농작물에 살포하여, 약 한달 뒤 작물 파종이 가능하게 하는 기술이다. 그러나 가축분뇨 살포 후 파종 가능 시점까지의 오랜 기간이 걸린다는 점과 농작물 내 살포 후 비 등에 의한 하천 유입과 악취가 문제시되고 있다. 따라서 이러한 문제점들을 해결시킬 방안으로 부숙 기간의 단축 및 악취 제거를 위한 미생물 첨가제 개발이 필요로 하고 있다.

본 연구에서는 분뇨의 악취와 암모니아성 질소를 제거시킬 수 있고 발효촉진 기능을 가진 미생물을 선별하였으며, 선별된 균주를 동정하고, 실험계획법을 이용하여 선별된 미생물의 최적발효조건을 확립하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 스크리닝 및 순수분리

자연상태에서 발효된 쌀겨 추출물(㈜영우환경 제공)을 분리원으로 하여 균주를 순수 분리하였다. 분리배지로는 nutrient agar (NA, beef extract 3 g/L, peptone 5 g/L, agar 15 g/L, pH 6.8), yeast-maltose agar (YM, yeast extract 3 g/L, malt extract 3 g/L, peptone 5 g/L, glucose 10 g/L, ampicillin 0.05 g/L, agar 15 g/L, pH 6.2), Bennet's agar (BA, yeast extract 1 g/L, beef extract 1 g/L, glucose 10 g/L, agar 15 g/L, pH 7.2) 배지를 사용하였고, 각각의 배지에서 35℃와 55℃에서 2-3일 정도 배양 후 형성된 단일 콜로니를 분리하였다.

### 유기물 분해력 측정

순수분리된 균주의 유기물에 대한 정성적 분해능을 확인하고자, 다양한 유기물 (전분, 젤라틴, 카제인, 셀룰로오스, 지방)이 탄소원으로 첨가된 평판배지에 35℃와 55℃에서 각각 2-3

일 정도 배양하여 균체 주위의 투명환을 관찰하였다. 단백질 분해능을 분석하기 위해 skim milk agar (beef extract 3 g/L, peptone 5 g/L, agar 15 g/L, skim milk 10 g/L, pH 6.8)와 gelatin agar (gelatin 15 g/L, peptone 5 g/L, KNO<sub>3</sub> 1 g/L, pH 6.8)를 사용하였고, 탄수화물 분해능의 측정은 starch hydrolysis agar (beef extract, infusion from 5 g/L, soluble starch 20 g/L, tryptose 10 g/L, NaCl 5 g/L, agar 15 g/L, pH 7.4)와 cellulose agar (cellulose powder 10 g/L, yeast extract 1 g/L, NaCl 0.1 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.25 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.125 g/L, FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.0025 g/L, MnSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.025 g/L, agar 15 g/L, pH 7.2)에서 수행하였다. 또한, 지방 분해능 측정을 위해 tributyrin agar (tryptone 10 g/L, yeast extract 3 g/L, tributyrin 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar 15 g/L, pH 7.4)을 사용하였다.

### 효소활성 측정

유기물 분해력이 높은 균주를 선별하여 amylase, protease, lipase와 cellulase의 활성을 측정하였다. 선별된 균주를 nutrient broth 배지에서 55℃에서 24, 48, 72시간 동안 배양한 배양액을 효소액으로 사용하여 분석을 수행하였다. 균체 농도는 균 배양액을 증류수로 세척 후, 칭량접시에 담아 50℃에서 건조시켜 건조무게로 측정하였다.

**Amylase activity** : 기질로 1% 가용성 전분용액 5 mL를 사용하고, 고체배지로부터 agar를 제외하고 제조한 액체배지에서 미리 배양된 균주 배양액을 1 mL씩 사용하여 실험하였다. 공시험구 (blank test)로는 균주 배양액 대신 증류수 1 mL를 가한 것을 사용하였다. 반응용 시료와 공시험구를 0.1 M-초산완충용액으로 최적 pH (pH 6.8)를 맞추고, 항온수조에서 30분간 효소-기질액을 반응시킨 후 (40℃에서 진탕교반), 얼음물을 사용하여 효소 반응액을 냉각시켜 효소의 활성을 정지시키고 0.1 N I<sub>2</sub>용액 20 mL를 가하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 1분당 포도당 1 μg이 생성되게 하는 효소량으로 정의하였다(8).

**Protease activity** : 시험관에 2% 기질용액 (casein) 1 mL를 취하여 넣고 40℃의 항온수조 중에서 가온한 후, 미리 40℃로 유지시킨 균체 배양액 1 mL를 가하여 잘 혼합하고 40℃에서 반응시켰다. 배양액을 가한 다음 10분 후에 0.4 M TCA 2 mL를 가하여 잘 혼합하고 30분 동안 방치시켰다. 반응액을 자연 여과하고 침전을 제거하고, 여액 0.5 mL를 시험관에 넣고 0.4 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 2.5 mL를 가해 잘 혼합하였다. Folin시약 0.5 mL를 가하여 잘 혼합하고 40℃에서 10분간 가온한 후, 660 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 흡광도를 tyrosine 농도로 환산하기 위해 tyrosine 농도를 변화시켜서 위의 조작을 반복하여 표준곡선을 미리 작성해 두었다. 1 unit은 1분간에 tyrosine 1 μg 상당량의 생성물을 나오게 하는 효소량으로 하였다(9).

**Lipase activity** : 기질은 olive oil 35 g과 얼음 50 g, gum arabic (10% 용액) 200 mL를 함께 blender에 넣고 마쇄함으로써 유화시켰다(이 때 얼음은 blender에서 나는 열을 방지하기 위하여 증류수 대신 사용하였고 기질의 변성을 방지하기 위하여 15초 간격으로 유화시켜 전체 시간은 2분이 되게 하였다). 기질은 4℃에서 보관하면서 사용하였고 농도는 0.348

M이었다. 효소 반응액은 0.01 M-Tris 용액 (pH 9.0) 0.2 mL, CaCl<sub>2</sub> 용액 (1 mM) 0.2 mL, 기질용액 0.2 mL 및 일정량의 효소액 1 mL으로 구성되었으며 최종 부피는 증류수로 총 1 mL이 되도록 보정하였고, 효소 반응액을 35°C에서 30분간 반응시킨 후 ethanol을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 생성된 유리 지방산은 phenolphthalein의 존재 하에서 0.01 N KOH용액으로 중화 적정하였고, 동일 조건 하에서 배양액 대신 증류수를 사용하여 대조구 실험을 행하였다. 1 unit은 효소액 1 mL당 1분간에 10 μmol의 유리 지방산을 생성하게 하는 효소의 양으로 정의하였다(10).

**Cellulase activity** : 기질은 0.05 M citrate-NaOH buffer (pH 5.0)에 녹인 1% cellulase 용액 0.5 mL에 효소액 0.5 mL를 가하여 50°C에서 30분간 반응시킨 후, DNS 용액 3 mL을 가하여 생성된 환원당을 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 포도당을 사용하였다. 분당 효소액 1 μmol의 환원당을 생성하는 속도를 1 unit로 정의하였다(11).

### 암모니아 탈취 측정

1차 종묘 배양한 발효액 (5 mL)을 적정 액체배지 100 mL에 1 mL 접종하여 200 rpm으로 진탕되는 각각 55°C의 진탕 배양기에서 48시간 배양하여 균 배양액을 준비하였다. 고액 분리시킨 액상타입의 돼지분뇨를 밀폐시킨 500 mL 삼각플라스크에 100 mL씩 넣어 각각 55°C의 진탕배양기에서 1시간 정도 가온시킨 후, 가스택 (KORINS Co., Korea)을 사용하여 암모니아 가스 생성량을 측정하였다. 돼지 분뇨의 암모니아 가스 생성량 측정 후, 미리 준비해 놓은 균주 배양액 1 mL를 첨가하여 시간별로 암모니아 가스생성 변화량을 측정하였다.

### 선별 균주의 혼합배양

최종 선별된 균주를 혼합하여 배양하였다. 배지는 nutrient broth (NB, beef extract 3 g/L, peptone 5 g/L, pH 6.8)를 사용하였고, 150 rpm으로 회전하는 55°C의 진탕배양기에서 48시간 배양하였다(12).

### 실험계획법을 이용한 배지조건 최적화

실험설계는 반응표면계획법 (response surface method)인 중심합성계획법 (central composite design)을 사용하여 조작 변수들의 영향과 상호작용 등을 포함한 데이터를 분석하였다 (13). 실험은 반복 없이 2가지의 범위 (-1, +1) 내에서 16번 시행하였다. 독립변수 (beef extract, peptone의 양 및 배지의 pH)를 이용하여 종속변수 (균체성장률)에 대한 회귀방정식을 얻음으로써 각각의 반응조건에 대한 상호작용 및 최적의 반응조건을 구하였다. 실험설계 프로그램은 Design-Expert 6.0 Software (Stat-ease Inc., USA)를 사용하였다.

### 균주 동정

균주의 동정은 Bergey's manual(14)에 따라 최종 선별된 균주에 대해 14가지 (Gram test, extracellular protease, extracellular amylase, catalase, 형태, NaCl (1%, 2%, 3%) 존재 하에서의 성장상태, 성장온도, 포도당으로부터 산 생성능, citrate 이용, phenylalanine deamination, indol 형성, Voges-

proskauer test, KOH test, spore-staining)의 동정실험을 행하였다(15, 16).

## 결과 및 고찰

### 균주 스크리닝 및 순수분리

다양한 균을 분리하기 위해 일반세균, 효모균, 방선균의 분리를 위해 각각 NA, YM, BA 배지를 분리용 배지로 사용하였다. 시료를 다양한 희석배율로 희석하여 세 종류의 배지에 도말하여 각각 35°C와 55°C의 온도에서 48시간 동안 배양한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 32종의 일반 세균류, 20종의 효모류, 9종의 방선균으로 보이는 총 61개의 단일콜로니를 얻을 수 있었다. 균주의 명명은 배지 이름의 약자에 숫자를 표기하여 나타내었다.

Table 1. Isolation of microorganisms from the rice bran extract

Incubation temperature	Nutrient agar (NA)	Yeast-maltose agar (YM)	Bennet's agar (BA)	No. of Isolated colony
35°C	NA 29 - NA 32 (4 colony)	YM 1 - YM 2 (20 colony)	BA 2-3, BA 5, BA 9 (7 colony)	31
55°C	NA 1 - NA 28 (28 colony)	-	BA 1, BA 4 (2 colony)	30
Total				61

### 유기물 분해력 측정

가축분뇨에는 다양한 유기물이 많아 그것이 비료로서의 성능을 갖추기 위해선, 유기물이 작물에 흡수될 수 있도록 분해되어야 한다. 분리된 미생물들의 단백질, 탄수화물, 지방 등의 유기물에 대한 분해성능을 각각의 성분이 포함된 고체 배지에서 정성적으로 분석하였다(Table 2). 61개의 순수 분리된 균주의 유기물 분해력을 정성적으로 측정된 결과, 약 20종의 균주가 3가지 이상의 유기물 분해효소를 지닌 것으로 나타났고, 그 중 NA 2, 5, 12, 15, 18이 다양한 유기물에 대해 높은 분해력을 나타냈다. 유기물 분해력이 높은 이들 균주들은 NA 배지에서 분리된 것으로 보아 대부분 일반세균의 일종일 것으로 추정되었다. 이와 같이 분리된 5종의 미생물은 55°C에서 배양된 고체배지에서 선별되었고, 35°C의 중온에서도 높은 성장률을 보여 (테이터 제시) 가축분뇨 처리용 미생물로 적합한 것으로 판단되었다. 실제 이동식 탱크로리에 발효추진 미생물이 투입되고 이동 중 부숙되는 과정은 계절변화에 따라 다양한 온도 (대략 35-55°C)에서 진행되기 때문이다.

### 효소활성 측정

정상적인 유기물 분해력 측정을 통해 선별된 NA 2, 5, 12, 15, 18 균주에 대해 amylase, protease, lipase와 cellulase의 활성을 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이, NA 2 균주의 경우 48시간 배양시 amylase와 protease의 활성이 각각 2.89 unit/g cell와 4.22 unit/g cell로 높게 나타났고, cellulase와 lipase 활성은 72시간 경과 후 각각 38.20 unit/g cell와 1.35 unit/g cell의 값을 보였다. NA 15의 경우 amylase는 48시간 배양 후 3.25 unit/g cell, protease, cellulase와 lipase의 활성은

Table 2. Hydrolysis activities of isolated microbes

Organic compound	NA 1	NA 2	NA 3	NA 4	NA 5	NA 6	NA 7	NA 8	NA 9	NA 10	NA 11	NA 12	NA 13	NA 14	NA 15	NA 16
Casein	L	H	H	L	M	M	L	L	L	L	L	M	L	L	H	L
Gelatin	L	H	H	L	M	M	L	L	L	L	L	M	L	L	H	L
Starch	M	M		M	L		L	M	M	L	L	M	M	M	L	L
Cellulose	M	M		M	M		L	M	L	L	L	L	M	M	M	M
Fat	L	M	L	L	H		M	M	H	H	M	H	L	L	M	M
	NA 17	NA 18	NA 19	NA 20	NA 21	NA 22	NA 23	NA 24	NA 25	NA 26	NA 27	NA 28	NA 29	NA 30	NA 31	NA 32
Casein	L	M	L	L	L		L		L	L		L		L		
Gelatin	L	M		L	H				L					L		
Starch	H	L		M	L		M		L	H	H	L	L	L	H	H
Cellulose	L	H		M	L			M			L	L	L	L	L	L
Fat	L	H		M	M		M	M	H		L	L	H			L
	YM 1	YM 2	YM 3	YM 4	YM 5	YM 6	YM 7	YM 8	YM 9	YM 10	YM 11	YM 12	YM 13	YM 14	YM 15	YM 16
Casein	L			L					L			L				L
Gelatin	L	L		L									L	L	L	L
Starch	M	L	H	L	M	H	M	M				L	L	L	L	L
Cellulose	M	L	L	L	L	L	L	L					L	L	L	L
Fat	M	H	H	M	M		H	H				H	L	L	L	L
	YM 17	YM 18	YM 19	YM 20	BA 1	BA 2	BA 3	BA 4	BA 5	BA 6	BA 7	BA 8	BA 9			
Casein					H	M		M	M			M	M			
Gelatin					M	M		M	L			M	M			
Starch	L		L	L	M	M		H	M	H	L	M	M			
Cellulose	L	L	L	L	L							M	M			
Fat	M	M	M	M	M	M	M		L	M	M	L	L			

H : clear zone over 1 cm, M : clear zone of (0.5-1 cm), L : clear zone below 0.5 cm

Table 3. Optimization of culture media for the mixed microorganisms by an experimental design method

No	block	Factor 1 A: beef extract (g/L)	Factor 2 B: peptone (g/L)	Factor 3 C: pH	Response growth rate hr <sup>-1</sup>
1	block1	0	10	7.3	0.115
2	block1	6	10	6.3	0.379
3	block1	0	0	6.3	0.046
4	block1	6	0	7.3	0.122
5	block2	3	12.07	6.8	0.17
6	block2	7.24	5	6.8	0.141
7	block2	3	5	7.51	0.111
8	block2	3	5	6.09	0.211
9	block1	3	5	6.8	0.29
10	block1	3	5	6.8	0.372
11	block1	3	5	6.8	0.184
12	block2	3	5	6.8	0.383
13	block2	3	5	6.8	0.387
14	block2	3	5	6.8	0.236
15	block2	3	0	6.8	0.098
16	block2	0	5	6.8	0.101

72시간 배양 시 각각 6.08 unit/g cell, 39.45 unit/g과 1.48 unit/g cell으로 나타났다. 나머지 3가지의 균주 (NA 5, 12, 18)도 비슷한 활성을 나타냈다. 효소활성 결과를 분석한 결과, protease와 lipase 활성의 경우 48-72시간 배양 시, 높은 활성을 나타냈고, amylase activity는 24-48시간 배양 시, cellulase 활성은 72시간 배양 시에 높은 활성을 나타냈다. 즉 배양 초기에는 amylase의 활성이 높았고, 중기에는 protease와

lipase, 후기에는 cellulase의 활성이 높게 나타났다. 따라서 이들 4개 주요 효소들은 균주를 48시간 이상 배양했을 때, 높게 나타남을 알 수 있었다.

**암모니아 탈취 측정**

가축분뇨를 비료화 하는데 있어서 어려움 중 하나는 암모니아 등의 혐오성 가스의 발생이며, 이러한 문제점은 가축분

노사용 농가의 주변에 민원유발의 소지가 되고 작물의 생육에도 영향을 미치므로 암모니아 가스의 효율적인 제거가 매우 중요하다. 따라서 본 연구에서는 유기물 분해능이 우수하면서도 암모니아 탈취능이 우수한 균주의 선별을 시도하였다. 유기물 분해력을 지닌 효소활성이 높은 NA 2, 5, 12, 15, 18 균주의 암모니아 가스 탈취 성능을 측정하였다. 가스검지관을 사용하여 초기 분뇨의 농도, 균주와 혼합배양 후 48시간과 70시간 후에 암모니아 가스의 변화량을 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 NA 2 균주는 70시간 후에는 암모니아 가스를 약 95%까지 감소시켰고, NA 12와 15 균주도 각각 65%와 57%씩 감소시켜 높은 암모니아 가스 탈취성능을 보이는 것으로 나타났다.

**실험계획법을 이용한 배지 조건 최적화**

암모니아 가스의 높은 탈취성능을 보이는 3종의 균주 NA 2, 12, 15를 혼합 배양하여 실험계획법의 일종인 반응표면계획법에 의해 실험을 설계하고 결과를 분석하였다. Table 3과 같이 반응표면계획법 (response surface method)의 중심합성계획법 (central composite design)에 의한 총 16가지의 배지 조건에서 실험을 통해 균체의 성장속도를 조사하였다. 중심합

성계획법은 2차 이상의 근사 반응 함수를 만드는데 있어서 보편적으로 사용되는 방법이다. Beef extract의 양은 0-7.24 g/L, peptone은 0-12.07 g/L, pH는 6.09-7.51까지 다양한 조건 하에서 실험한 결과, 균체의 성장속도는 0.046-0.387 hr<sup>-1</sup> 범위의 값을 나타냈다. 위와 같이 실험에 의해 얻어진 결과는 중심합성계획법에 의해 이차함수의 형태로 산출되었고, 다중회귀분석 결과 Table 4와 같은 최종 모델식을 얻을 수 있었다. 최종 모델식을 분석해 보면, pH가 다른 변수에 비해 균체의 성장속도에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 본 모델식을 통해 높은 균체 성장속도를 갖는 최적의 배지 조건을 구하기 위해 컴퓨터 모사를 한 결과, pH가 6.3으로 고정되었을 때, beef extract와 peptone의 변화에 따른 성장속도의 변화는 Fig. 3과 같이 나타났다. 최적 배지 조건은 beef extract 4.59 g/L, peptone 8.73 g/L일 때, 성장속도가 0.34 hr<sup>-1</sup>로 최고값을 나타낸다는 것을 프로그램에 의해 통계적으로 산출할 수 있었다. 또한 결정된 최적 배지 조건으로 5회의 검정 실험결과 프로그램에 의해 예측된 값 (0.34)에 대해 약 94%에 해당하는 0.32 hr<sup>-1</sup> 값을 얻을 수 있었고, 이로부터 중심합성계획법에 의해 예측된 결과와 실제 실험결과사이에 높은 신뢰성이 있음을 알 수 있었다(Table 5).

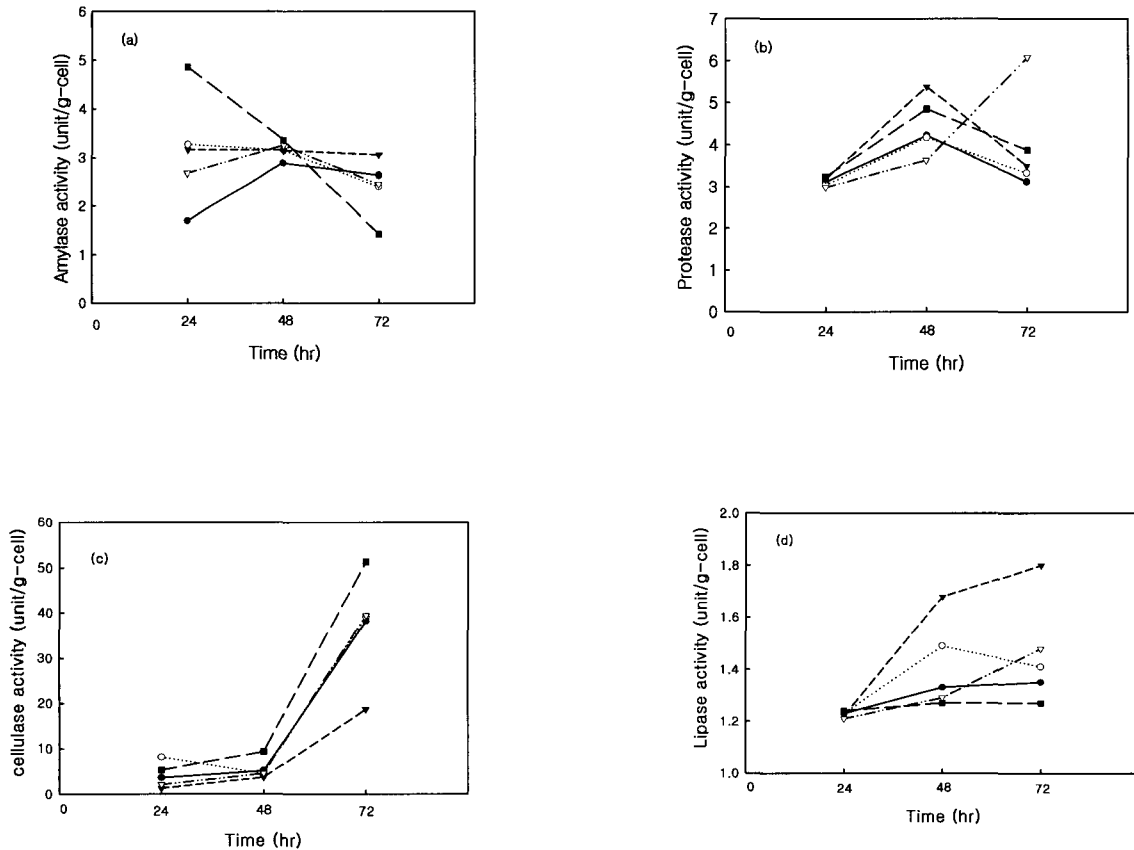


Figure 1. Enzyme activities of the selected microbial strains: (a) amylase activity, (b) protease activity, (c) cellulase activity, (d) lipase activity. (● : NA 2, ○ : NA 5, ▼ : NA 12, ▽ : NA 15, ■ : NA 18)

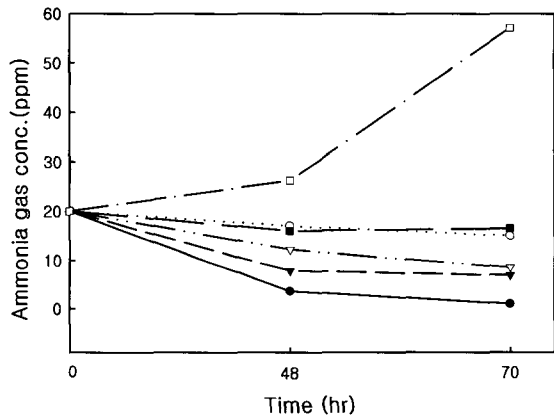
**Table 4.** Equation for the cell growth rate in terms of experimental factors in experimental design method

Cell growth rate =	
- 7.435	
+ 0.192	x [beef extract]
+ 0.152	x [peptone]
+ 2.133	x pH
- 8.369E-003	x [beef extract] <sup>2</sup>
- 2.722E-003	x [peptone] <sup>2</sup>
- 0.151	x pH <sup>2</sup>
+ 7.763E-004	x [beef extract] x [peptone]
- 0.019	x [beef extract] x pH
- 0.017	x [peptone] x pH

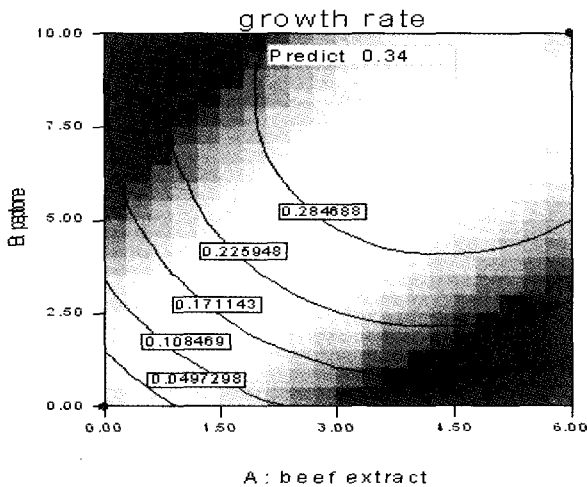
\*[ ] represents concentration of each component.

**Table 5.** Experimentally estimated growth rate for the selected microorganisms cultured by the optimized conditions

Trial No.	1	2	3	4	5
Growth rate	0.356	0.298	0.310	0.319	0.324
Average value	0.32				



**Figure 2.** Ammonia-deodorizing activity for pig manure by the selected strains (● : NA 2, ○ : NA 5, ▼ : NA 12, ▽ : NA 15, ■ : NA 18 □ : blank).



**Figure 3.** The effect of peptone and beef extract concentrations on the growth rate predicted by an experimental design method.

**Table 6.** Identification of the selected microorganisms

Strain	NA 2	NA 12	NA 15
Gram(+/-)	+	-	-
Extracellular protease	low	middle	middle
Extracellular amylase	low	low	not
Catalase	+	+	+
Morphology	rod	rod	cocci
Growth in NaCl			
1%	+	+	+
2%	-	-	-
3%	-	-	-
Growth temperature	50-60°C	50-60°C	50-60°C
Acid from glucose	ND	+	ND
Utilization of citrate	-	-	ND
Deamination of phenylalanine	ND	+	+
Formation of indol	ND	ND	-
Voges-proskauer test	ND	ND	ND
KOH test	+	+	+
Spore-staining	+	ND	ND
Identification result	<i>Bacillus acidocaldarius</i>	YWNA12 (unknown)	<i>Planococcus sp.</i>

**균주 동정**

효소활성과 탈취실험에서 우수한 성능을 나타낸 3종 (NA 2,12,15)의 균주에 대해서 14가지의 동정실험을 행하였다. Table 6에서 보는 바와 같이 NA 2는 *Bacillus acidocaldarius* 로 동정되었고, NA 15는 *Planococcus sp.*로 부분 동정되었으며, NA 12는 Bergey's manual 상에 존재하지 않았다.

이상의 실험으로 가축분뇨의 액비화를 위한 3종의 발효촉진 및 암모니아 탈취성능이 우수한 중·고온성 미생물 균주를 자연으로부터 순수 분리하였고 실험계획법에 의해 최적의 발효조건을 선정하였다.

**요약**

본 연구에서는 가축분뇨의 비료화를 위한 분뇨의 악취와 암모니아성 질소를 제거시킬 수 있는 기능성 발효촉진 미생물의 선별을 목표로 쌀겨 자연발효 추출물로부터 총 61개의 균주를 순수 분리하였고, 순수 분리된 균주의 단백질, 지방, 탄수화물 등의 유기물 분해 효소활성 (amylase, protease, cellulase 및 lipase), 암모니아 가스의 탈취성능을 조사하여 최종적으로 NA 2, 12, 15의 3종의 균주를 선별하였다. 최종 선별된 균주에 대해서 동정실험을 수행한 결과, NA 2는 *Bacillus acidocaldarius*로 동정되었고, NA 15는 *Planococcus sp.*로 부분동정되었다. 이들 분리된 미생물을 가축분뇨처리제로 개발하기 위한 최적의 혼합 배양 조건을 구하기 위해 반응표면계획법으로 배지 조성과 pH와 같은 조작 변수들의 영향과 상호작용 등을 포함한 데이터를 분석한 결과, 최적 배양 조건은 beef extract 4.59 g/L, peptone 8.73 g/L, pH 6.3으로 결정되었다. 분리된 미생물들은 발효촉진 및 암모니아 탈취 성능이 우수하면서도 중·고온성 미생물로서 가축분뇨처리에 활용가능성이 높은 것으로 판단되었다.

**감사**

본 연구는 중소기업청의 기술혁신개발사업 (2002-2003)의 연구비와 충남환경기술개발센터의 일부 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Kim, C. H. (1994), Situation of livestock waste and strategies for waste treatment, *J. Kor. Organ. Waste Rec.* **2**, 31-40.
2. Jung, Y. J., J. B. Cho, and H. A. Choi (1994), A Study on the Nightsoil Treatment in Korea - The Trouble and it's Solution, Proc. Korean Society of Environmental Engineers Conference 1994, Jeju.
3. Inbar, Y., Y. Hadar, and Y. Chen (1993), Recycling of cattle manure: the composting process and characterization of maturity, *J. Environ. Qual.* **22**, 857-863.
4. Huh, D. and M. K. Jeong (2001), Cost and return to the scale of livestock manure management, *Kor. J. Agric. Manag. Policy* **28**, 364-382.
5. Jung, K. Y., N. J. Cho, and Y. G. Jeong (1998), Comparison of liquid composting efficiency using liquid pig manure in different condition, *Kor. J. Environ. Agric.* **17**, 301-305.
6. Min, K. S. (1989), Anaerobic digestion of swine manure in low temperature, *J. Kor. Wastes Eng. Soc.* **6**, 79-85.
7. Cheon, D. W. and M. S. Park (2003), Preference analysis on livestock liquid manure, *Kor. J. Agric. Manag. Policy* **30**, 75-87.
8. Panchoy, S. K. and E. L. Rice (1973), Soil enzymes in relation to old field succession: amylase, cellulase, invertase, dehydrogenase and urease, *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **37**, 47-50.
9. Chae, S. K. (1997), Food Analytics, pp206-208, II-GU Publishing Co., Korea.
10. Braun, P., G. Balzer, and K. Fehlhaber (2001), Activity of bacterial lipase at chilling temperatures, *Food Microbiol.* **18**, 211-215.
11. Park, W. H. (1988), Isolation and enzymatic probiotics of cellulase from wild *Cryptoderma citrinum*, *Kor. J. Pharmacogn.* **19**, 28-33.
12. Degeest, B., F. Mozzi, and L. DeVuyst (2001), Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations, *J. Food Microbiol.* **79**, 161-174.
13. Lee, S. J. and E. Y. Kim (2002), Optimization of biodiesel production from waste frying oil using response surface method, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 396-402.
14. John, G. H. (1973), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, The Williams & Wilkins Co., USA.
15. Lopes, J. D. R., V. R. Crispim, and C. Lage (2001), Identification of microorganisms for the analysis of images obtained by neutron radiography, *Rid. Phys. Chem.* **61**, 619-622.
16. Mariey, L. J., P. Signolle, C. Amiel, and J. Travert (2001), Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics, *Vibrational Spectroscopy* **26**, 151-159.