

보 문

우분 적용을 위한 *Bacillus subtilis* SRCM 101269의 분리 및 특성 연구

전새봄¹ · 오현화¹ · 엄태봉¹ · 조재영² · 양희종³ · 정도연^{3*}

¹전북대학교 자연과학대학 생물학과, ²전북대학교 농과대학 생물환경화학과, ³(재)발효미생물산업진흥원

Characteristic study and isolation of *Bacillus subtilis* SRCM 101269 for application of cow manure

SaeBom Jeon¹, HyeonHwa Oh¹, Tai-Boong Uhm¹, Jae-Young Cho², Hee-Jong Yang³, and Do-Youn Jeong^{3*}

¹Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Republic of Korea

²Department of Bioenvironmental Chemistry, Chonbuk National University, Jeonju 54896, Republic of Korea

³Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Republic of Korea

(Received January 14, 2016; Revised February 22, 2016; Accepted February 22, 2016)

ABSTRACT: *Bacillus subtilis* SRCM 101269 having safety and *amo* gene isolated from Korean traditional fermented food and their investigated characterization to apply the cow manure such as cellulase and xylanase activities, 16S rRNA sequencing, and ability of removal of livestock manure odor. Cow manure application results for the removal of livestock manure odor, the ammonia gas was reduced more than two-fold compared to the control group after 6 days, and reduced to less than 10 ppm after 9 days. In the case of cow manure added fowl droppings and other wood-based mixture components, ammonia gas maintained constant after 3 days of fermentation. However, in the case of sample inoculated *B. subtilis* SRCM 101269, ammonia gas reduced in course of fermentation time, and concentration of hydrogen sulfide also reduced for 65 ppm. Changes of nitrite concentration according to fermentation time no showed different for cow manure, however nitrite concentration in mixed livestock manure increased when compared to control. And then sulfate concentration in cow manure decreased, and no showed different when compared to the initial fermentation. No apparent change of sulfate concentration in mixed livestock manure detected. Through the previously studies, *B. subtilis* SRCM 101269 has high potential in industrial application manufacturing the cow manure as removal of livestock manure odor.

Key words: *Bacillus subtilis*, ammonia monoxygenase (*amo*), composting, cow manure, removal of livestock manure odor

유기 폐기물 총 발생량의 13.9%를 차지하고 있는 축산 폐기물은 최근 여러 가지 환경 문제를 발생시키는 주요 오염 물질로 대두되고 있어 축산 폐기물의 퇴비화는 축산 폐기물로 인한 환경오염 문제를 저감화 할 수 있을 뿐 아니라 화학비료를 대체할 수 있는 유기질 비료의 생산과 이에 따른 농업 생산성 향상, 폐자원의 재활용을 도모할 수 있다는 측면에서도 그 효용가치가 매우 크다(Kim *et al.*, 1997). 가축 분뇨 처리를 이용한 퇴비화 방법으로는 미생물을 이용하여 유기물을 분해시키는 방법으로 우분과 같은 고형상의 분뇨처리방법이 주로 사용되고 있다(Shin, 2002). 하지만 공장 시설의 최적화가 되어있

다 하더라도 가축분뇨의 상태가 매번 다르며, 처리기간 동안 우분 퇴적물에서 발생하는 악취는 주변 지역의 심각한 민원을 발생하게 되어 사회적 문제를 일으키며, 각 농가에 퇴적되는 가축분뇨를 수거하여 퇴비화 공장에서 대량 처리하는데 소요되는 시간이나 경제적 비용 역시 간과할 수 없는 문제이므로 퇴비화에 이용되는 미생물의 선택이 무엇보다도 중요한 요인으로 작용할 수 있다. 퇴비화에 이용되는 미생물의 특성으로는 퇴비화 과정에서 발생하는 고열에 견딜 수 있는 고온성 미생물이 가장 적합하며, 가축 분뇨에 다량 함유된 섬유질을 분해하는 효소인 cellulase 활성이 높은 균주일 필요성이 있다(Stutzenberger, 1971).

하지만 기본적으로 우분에서 발생하는 악취는 우분에 함유된 미생물이 퇴적물에서 증식하면서 암모니아와 황화수소 등

*For correspondence. E-mail: jdy2534@korea.kr
Tel.: +82-63-653-9597; Fax: +82-63-653-9590

의 악취 원인 화합물을 생성함으로 발생하게 되는데, 미생물에 의한 악취의 생물학적 처리는 주로 암모니아 산화균이나 황화세균을 이용하여 문제점을 해결하고 있다(Kim *et al.*, 2013). 대표적으로 암모니아성 질소를 분해하는 질화 세균 *Nitrosomonas*는 ammonia monooxygenase (*amo*)의 작용으로 암모니아성 질소를 아질산성 질소로 전환한다고 알려져 있으나(Koops *et al.*, 1991), 독립영양세균(autotrophic bacteria)에 속하는 *Nitrosomonas*는 성장속도가 종속영양세균에 비해 느리고, 암모니아를 분해하는데 열량소모량이 높아서 암모니아 분해를 목적으로 하는 가축분뇨에 사용하기에는 적절하지 못한 세균으로 알려져 있다(Matulewich and Finstein, 1978). 또한 황화합물을 분해하는 세균인 *Starkeya novella* (Kappler *et al.*, 2001), *Thiobacillus* (Nakamura *et al.*, 1990)나, sulfide quinone reductase를 분비하는 것으로 알려진 *Rhodobacter capsulatus* (Schütz *et al.*, 1999)의 경우 분리나 배양조건이 단순하지 않아 가축분뇨의 황화수소 저감화에 어려움을 겪고 있다.

기존에 알려진 암모니아 분해 및 황화합물 분해 능력을 갖는 미생물의 산업화 측면에서 많은 어려움이 있기 때문에 최근에는 중온에서 고온에 이르기까지 퇴비화의 전 과정에 관여하며, 고온의 퇴비화 과정에서는 발견되지 않는 곰팡이나 효모에 비해 세포 증식 속도가 빠르고, 고온성 세균이 아니라라도 포자를 형성할 수 있어 중온 단계에서 다시 성장하여 발효에 관여할 수 있는 *Bacillus sp.*를 이용한 특성 및 산업화 연구가 활발히 이루어지고 있다(Ryckeboer *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004). 특히 *Bacillus sp.*는 내열성 포자를 생성하는 그람 양성 균이며, 종속영양세균으로 가축분뇨에 함유된 당류를 분해하는데 유용한 효소 분비력을 가지고 있으며, 증식이나 배양 조건이 비교적 빠르고 단순하다. 또한 퇴적된 가축 분뇨의 통성 혐기성 조건에서 증식이 가능하고 수분조절제로 첨가되는 톱밥이나 벧짚, 낙엽 등의 목질성분을 분해하는 효소를 가지고 있어 우분의 퇴비화에 적합한 미생물로 자리잡고 있다(Ushida *et al.*, 2003).

따라서, 본 연구에서는 전통 장류로부터 *B. subtilis*를 분리하고 기능을 평가하기 위해 암모니아 분해 효소인 *amo* 유전자의 유무를 확인하여 우분 퇴비화에 적용 가능한 균주를 선별하였다. 또한 가축분뇨인 우분과 우분에 계분과 목질성분이 첨가된 혼합분에서의 악취저감화 및 유효성분의 함량분석을 실시하였으며, 가축 분뇨의 퇴비화 적용 가능성을 확인하기 위해 우분과 계분 및 수분 조절제인 톱밥을 일정량 혼합한 퇴비단을 제작하고 복합 악취의 저감화와 cellulose 함량 감소를 통한 최종 선별 균주 *B. subtilis* SRCM 101269의 퇴비 적용 특성을 확인하였다.

재료 및 방법

미생물의 분리 및 선별

Bacillus sp. 균주의 선별을 위해 순창지역에서 시판되는 전통 장류를 수집하였으며, 수집한 시료 1 g을 채취하여 단계희석법을 통하여 Nutrient agar (NA, Difco™) 배지에 도말하여 배양한 후 미생물의 형태학적 차이를 이용하여 1차 선별하고, 다시 순수 배양하여 균주를 분리하였다. 선별한 미생물은 다음 연구에 사용하기 위해 -80°C에서 보관하여 사용하였다.

세포의 효소활성 측정

분리균주를 대상으로 발효특성 중 amylase, protease, cellulase, xylanase와 같은 세포의 효소 활성이 높은 *Bacillus* 균주를 선별하기 위해 paper disc 방법을 이용하였고, 각 효소와 특이적으로 반응할 기질의 성분이 포함된 고체 선별배지를 사용하였다. 선별한 균주에 대한 세포의 효소 활성을 조사하기 위해 선별 균주를 Nutrient broth (NB, Difco™)에 접종하여 37°C, 200 rpm으로 18시간 진탕 배양한 후 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 배양 상등액을 취하여 조효소액으로 사용하였다. Protease 활성은 skim milk를 기질로 하여 2%의 skim milk (Difco™)에 1.5%의 agar를 첨가한 skim milk agar 배지를 제조(Vermelho *et al.*, 1996)하여 각 선별한 균주의 배양 상등액을 0.45 µm membrane filter (Sartorius)로 제균한 뒤 20 µl씩을 준비한 6 mm paper disc (ADVANTEC Co.)에 분주하고 37°C에서 24시간 반응시킨 후 분해능을 억제환(Clear zone)의 직경으로 조사하였다. Amylase 활성은 1% soluble starch (Sigma-Aldrich)를 함유한 starch agar 배지에 각 선별한 균주의 배양 상등액을 제균하고 20 µl씩을 준비한 disc에 분주하였다. 20 µl씩을 준비한 disc에 분주한 후 37°C에서 24시간 반응하여 분해능을 억제환의 직경으로 조사하였다. Cellulase 생성능은 1%의 carboxymethyl-cellulose (CMC, Sigma-Aldrich)를 함유한 CMC 고체 배지에 paper disc를 올리고 조효소액 20 µl를 분주하여 37°C에서 18시간 배양한 후 0.1% congo red 용액으로 15분간 염색한 후 증류수로 세척하여 건조한 후 염색이 되지 않은 억제환을 측정하였고(Baek *et al.*, 2009), xylanase 활성은 기 보고된 방법(Yoon *et al.*, 2014)에 따라 1% xylan (Sigma-Aldrich)을 기질로 하는 고체 배지에 paper disc를 올리고 cellulase 생성능 측정 방법과 동일하게 억제환의 크기를 측정하여 활성이 우수한 균주를 선별하였다.

선별 균주의 동정

최종 선별한 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 동정을 위해 universal primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')을 사용하여 유전자를 증폭한 후 동정에 중요한 가변 염기영역을 포함하는 1,443 bp를 BigDye terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems Inc.)를 사용하여 해독하였다(Chakravorty *et al.*, 2007). 해독 염기서열을 이용하여 BLASTN search와 Ribosomal Database Project version 10 (RDP, <http://rdp.cme.msu.edu>)의 SeqMatch program에서 상동성이 높은 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열을 조사하여 CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994)를 이용하여 염기 서열간의 상호 비교를 실시하였다. 계통도 분석을 위하여 확보한 균주의 16S rRNA 염기서열을 정렬하고 chromatogram의 시각적 관찰과 수작업을 통해 격차가 최소화 되도록 보정한 후 Tamura-Nei model에 기초한 Maximum Likelihood 방법(Tamura and Nei, 1993)을 사용하여 phylogenetic tree를 작성하였다(Fig. 1). 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계학적 신뢰도를 높이기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 반복 실행하였으며, 계통분석과 bootstrap 분석은 MEGA program (Tamura *et al.*, 2011)을 사용하였다.

선별 균주의 *amo* 유전자의 보유 여부 조사

최종 선별한 균주의 암모니아 분해 유전자(Hooper *et al.*, 1997) 보유를 확인하기 위해 지시 균주인 *Bacillus subtilis* 168 (accession No. NC_000964)의 *amo* 유전자 정보를 이용하여 primer를 제작(Forward: 5'-TGGATGGATGATCGGAACAC-3'; Reverse: 5'-GGTGCCGACAAAGCTAGTCA-3'; product size 295 bp)하여 colony PCR을 수행하였다. *amo* 유전자의 증폭을 위한 PCR 조건은 95°C에서 5분간 초기 변성 후 95°C에서 1분간 변성, 54°C 30초간 결합, 72°C 1분간 증폭을 35회 반복하고 72°C에서 5분간 마지막 증폭을 실시하였다. PCR을 통해 얻은 산물은 1.0% agarose gel (Lonza)을 이용하여 전기영동을 통해 *amo* 유전자의 존재 유무를 확인하였다.

선별 균주의 약취 저감화능 측정

약취 저감화능을 분석하기 위해 암모니아 산화 세균인 *Nitrosomonas europaea* (KCTC 12270)와 황화수소 제거균으로 알려진 *Starkeya novella* (KCTC 2845)를 표준 균주로 사용하여 최종 선별 균주와 비교 연구에 사용하였다. *N. europaea*의 경우 황산암모늄이 첨가된 무기영양배지 #464 (<http://kctc.kribb.re.kr>)에 선별균주와 *S. novella*는 NB (Difco)에 접종하여 37°C, 200 rpm에서 18시간 동안 진탕 배양한 후 배양액 1 ml을 취해 실험구에 접종하였고, 대조구로는 실험구에 배양액

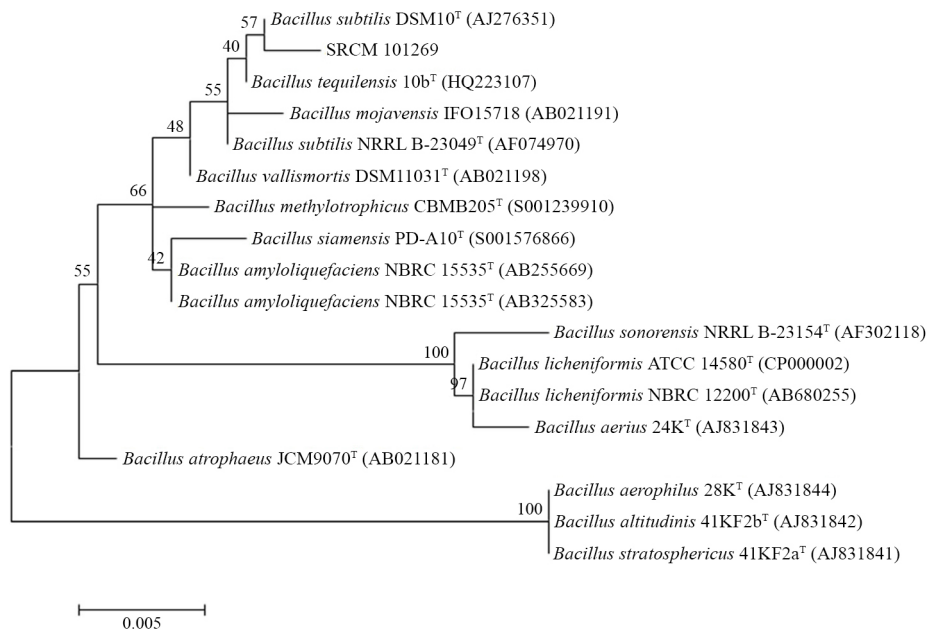


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain SRCM 101269. All the sequences used here were from *Bacillus* type strains. GenBank accession numbers are given in parentheses. The branching pattern was generated by maximum likelihood method. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values are expressed as percentages of 1,000 replicates.

대신 멸균 증류수 1 ml을 접종하였다. 실험구로는 검출한계치를 초과하는 순창지역에서 수거한 악취가 심한 우분 시료와 혼합분(우분, 계분, 기타 목질성분의 혼합분)을 사용하였고, 각 시료는 50 ml tube에 5 g씩 취해 균주를 접종한 후 광배양기 (WooilBio F&M)에서 37°C로 정치 배양하면서 암모니아와 황화수소 가스량의 변화 및 잔류하는 nitrate와 sulfate의 변화를 측정하기 위한 분석 시료로 사용하였다.

암모니아(NH₃)와 황화수소(H₂S) 가스량 측정

암모니아와 황화수소 가스량의 변화는 실시간 데이터 기록이 가능하며 분해능의 검출한계가 100 ppm까지 측정되는 복합가스 검출기(Multi-RAE Lite, RAE System)를 사용하여 측정하였으며, 측정을 위한 시료는 배양 전 0일부터 3일 간격으로 9일 동안 시료를 대상으로 측정하였고, 측정 전 순수 공기를 이용한 영점 보정을 실시한 후 제조사에서 제공하는 50 ppm의 암모니아와 25 ppm의 황화수소 표준가스(CALCAZ Inc., USA)를 이용하여 보정한 후 측정 방법은 50 ml syringe에 가스를 포집하고 검출기 측정부위에 분사하여 계측된 수치를 기록하였으며 3회 반복하여 평균값을 결과값으로 사용하였다.

Nitrite (NO₂⁻)와 Sulfate (SO₄²⁻)의 생성 측정

NO₂⁻ 생성량은 Griess 시약을 이용한 Nitrite/Nitrate Assay Kit (Sigma Aldrich)을 통해 앞서 선별 균주의 악취 저감화능 측정을 위해 준비한 시료를 대상으로 하여 처리구 내 존재하는 안정된 산화물인 NO₂⁻를 측정하여 분석하였다. 그 방법을 간단히 기술하면 다음과 같다. 대조구를 포함한 실험구에 증류수를 첨가하여 현탁액을 만들고 이를 1.5 ml tube에 옮겨 12,000 rpm, 15분, 4°C에서 원심분리한 후 상층액을 취해 12,000 rpm, 3분, 4°C에서 원심분리 후 상층액 80 µl를 96 well plate 각각의 정해진 용기에 넣고, buffer 용액을 20 µl 첨가하여 반응액을 100 µl가 되도록 조정한 후 Griess reagent A 용액 50 µl를 첨가해 잘 혼합한 후 실온에서 5분간 정치시키고, Griess reagent B 용액을 50 µl 첨가해 잘 혼합한 후 실온에서 10분간 정치시켜 발색을 유도하고, plate reader (TECAN, Männedorf)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 nitrite 표준 곡선을 기준으로 NO₂⁻ 생성량을 측정하였다. 모든 시료는 반복 실험하였으며, 표준곡선은 NaNO₂를 표준용액으로 하여 단계별 희석을 통해 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하고 결과값을 바탕으로 정량표준곡선을 작성하여 얻어진 선형회귀방정식을 이용하여 우분 또는 혼합분 시료 1 mg에 함유된 NO₂⁻의 µM 농도로 정의하였다.

또한 시료구에 잔류하는 SO₄²⁻의 농도는 Kolmert 등(2000)의 방법을 변형하여 측정하였다. Na₂SO₄를 표준용액으로 하여 단계별 희석을 통해 정량표준곡선을 작성하여 결과값을 산출하였으며, 앞선 우분 또는 혼합분의 시료는 희석하여 25 µl씩 각각 microplate well에 첨가하고 125 µl의 증류수를 첨가해 혼합하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 각각의 값을 대조구로 사용하였다. 이후 precipitating 용액(1% barium chloride, 1% sodium chloride, 0.025% gelatin, 5 ml conc. hydrochloride in 1 L D.W.)을 40 µl 첨가하고 혼합하여 5분간 실온에서 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 얻어진 선형회귀방정식을 이용하여 우분 또는 혼합분 시료 1 mg에 함유된 SO₄²⁻의 mM 농도로 정의하였으며, SO₄²⁻의 측정을 위해 사용한 시약은 모두 Sigma Aldrich 사 제품을 구입하여 사용하였다.

복합 악취 제어능과 cellulose 분해능

복합 악취 제어능을 조사하기 위해 우분(70%), 계분(10%), 그리고 수분조절제로 톱밥(20%)을 혼합하여 소형퇴비화장치 발효단을 제작하였다. 제조한 발효단에 SRCM 101269 배양액 0.25%를 접종하여 분석을 위한 시료로 사용하였고, 대조구로 접종하지 않은 발효단을 제작하여 비교하였다. 매일 소형퇴비화장치 발효단 상층부 일정 지점에서 산소, 유독, 가연성 가스 및 휘발성 유기화합물의 복합 또는 개별 측정이 가능한 휴대용복합가스측정기 iBrid MX6 (Industrial Scientific)를 이용하여 복합악취 변화량을 측정하였다. 또한, 소형퇴비화장치에서 발효중인 퇴비시료의 cellulose 분해능을 조사하기 위해 1주 간격으로 42일 동안 시료를 채취하여 60°C에서 24시간 처리하여 완전 건조 후 미세분말로 균질화하여 Updegraff (1969)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 0.5 g을 취해 진한 황산(98%) 10 ml를 첨가하여 25°C 항온수조에서 1시간 동안 전처리한 다음 표준검량선법에 의해 분석하였다. 시료 내 cellulose의 정량 분석을 위해 표준 검량선은 20 µm 이하의 결정질 미세 cellulose (Sigma Aldrich)를 표준용액으로 하여 620 nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선을 작성하였으며, 분석결과를 이용해 시료의 cellulose 분해능을 조사하였다.

결과 및 고찰

전통발효식품으로부터 *Bacillus* 균주의 분리

우분 퇴비화를 위해서는 고온성 세균이 아니더라도 포자를 형성함으로써 증온 단계에서 다시 발아 및 성장하여 발효에 관

여(Ryckeboer et al., 2003) 할 수 있는 기능성 *Bacillus* 균주의 선별을 위해 전라북도 순창군에서 제조한 장류 약 112종을 수집하였고, 수집한 시료를 배양하여 육안으로 집락의 형태, 색 등 형태학적 차이에 의해 총 146종의 세균을 분리하였다. 분리한 균주를 대상으로 우분 비료화에 필요한 효소활성을 측정하기 위해 NB 액체 배지에 배양하여 다음 연구에 사용하였다.

분리 균주의 세포외 효소활성 분석

일반적인 퇴비화 과정은 유기물이 분해되면서 발생하는 고온을 기준으로 하여 주발효(active composting)와 부숙(후발효, maturation) 단계로 나뉘며, 주발효 과정에서는 유기물 분해가 활발히 일어나는 시기로 고온이 유지되어 동식물 및 병원균의 사멸과 악취 제거 효과가 발생하게 된다. 이러한 유용 반응이 주로 일어나는 주발효 과정은 퇴비화 공정에서 가장 주요한 단계로 다양한 분해산물로부터 안정화된 유기물뿐만 아니라 전체 퇴비화 공정기간의 단축 또는 지연에도 큰 영향을 주는 시기로 알려져 있다(Papadimitriou and Balis, 1996). 주발효 기간에 일어나는 각종의 유기물 성분의 분해도 미생물이 분비하는 세포외 효소에 의해서 대부분 분해가 이루어지기 때문에 미생물에 의한 효소의 활성은 퇴비화가 진행되면서 나타나는 물리화학적 환경변화에 큰 영향을 미치게 된다(Kim et al., 1997). 따라서 분리한 미생물을 대상으로 세포외 효소 중 우분의 퇴비화와 관련이 높은 amylase, protease, cellulase, xylanase의 활성을 정성 분석을 통해 조사하였다(Table 1). 분리균주 가운데 총 7개의 균주가 4가지 효소에 대한 활성을 갖는 것으로 나타났으며, 주발효 단계에서 초기에 영향을 주는 protease와 amylase에 대한 활성이 가장 우수하였으며, 발효 후기에 주로 활성을 나타내며 lignocelluloses 분해에 관여한다고 알려진(Kim et al., 1997) cellulase와 xylanase 활성을 동시에 나타내는 SRCM 101269 균주가 고른 효소활성을 지니고 있는

것으로 나타났고 특히 투명환의 크기와 투명도에서 가장 우수하여 최종 균주로 선별하였다. 일반적으로 주발효에 소요되는 시간은 퇴비화 원료를 구성하는 유기물의 분해 효율에 크게 좌우되며, 한가지 효소에 대한 활성을 나타내기 보다는 단백질, 지질, 탄수화물 등 고분자물질에 대한 각종 가수분해 효소의 활성이 두루 뛰어날수록 퇴비화 시간 및 비용상 이상적인 결과를 얻을 수 있다고 보고(Atkinson et al., 1996)되고 있어 SRCM 101269의 우분 적용 가능성을 확인할 수 있었다.

분자생물학적 동정 및 Phylogenetic tree 작성

최종 선별한 SRCM 101269의 동정을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 분석 결과를 GenBank에서 BLAST search 결과 *B. subtilis*로 판명되었으며, 염기서열을 이용하여 SeqMatch program에서 상동성이 높은 표준 균주와 상호비교를 실시하였으며, *B. subtilis* DSM 10과 99%의 유사성을 나타내었다. 16S rRNA 염기서열을 토대로 하여 phylogenetic tree를 작성하여 계통수를 분석하였고(Fig. 1). 최종적으로 *B. subtilis* SRCM 101269로 명명하였다.

암모니아 분해 유전자(amo) 보유여부 조사

우분, 돈분, 계분과 같이 가축 분뇨를 비료화 하는데 있어서 가장 큰 어려움 중 하나는 암모니아와 같은 혐오성 가스의 발생이며, 이러한 문제점은 가축분뇨 사용 능가뿐만 아니라 주변에 민원 유발의 소지가 되고 주변 작물의 생육에도 악영향을 주어 암모니아 가스의 효율적인 제거는 분뇨의 비료화에 있어 매우 중요하다. 분뇨에서 발생하는 악취는 황화수소와 암모니아가 주원인이며, 특히 암모니아가스 농도는 50 mg/L 보다 높을 경우 혐기성 부숙 및 한냉지에서 동결이 발생하게 된다(Ryckeboer et al., 2003). 현재까지 알려진 암모니아 관련 연구로는 요소 분해 효소(Urase)의 효소 작용 억제제를 이용한 암모니아 발생 연구(Varel, 2002), 분뇨의 악취와 암모니아 성 질소를 제거할 수 있으며 발효촉진 기능을 갖는 미생물의 선별(Kim et al., 2003), 돈분 퇴비화를 위한 *Bacillus* sp.의 분리 동정과 액체 비료의 악취 제거에 관한 연구(Kim et al., 2004) 등과 같이 다양한 연구가 진행되고 있지만 대부분 미생물 선별과 효과에 관한 연구 위주로 진행되고 있는 실정이다. 따라서, 좀더 쉽고 간편하게 암모니아 분해 여부를 확인하기 위해 NCBI data base를 이용하여 *B. subtilis* 168의 complete genome data를 기반으로 ammonia monooxygenase와 관련된 유전자를 탐색하고, 이를 이용하여 specific primer를 제작하였다. 제작한 primer를 이용하여 PCR 후 전기영동으로 최종

Table 1. Extracellular enzyme activities of the isolated strains

Isolated strains	Extracellular enzyme activity ^a			
	Amylase	Protease	Cellulase	Xylanase
SCKB 1443	2.34	1.89	1.90	2.15
SRCM 101269	4.79	3.22	1.62	1.91
SCKB 1455	2.83	2.90	1.68	1.89
SCKB 1456	4.37	2.31	1.62	1.88
SCKB 1458	2.57	2.92	1.75	1.96
SCKB 1461	1.92	1.36	1.63	1.92
SCKB 1469	1.78	2.16	1.76	1.92

^a Enzyme activity = size of halo (clear zone diameter) / size of paper disc (6 mm).

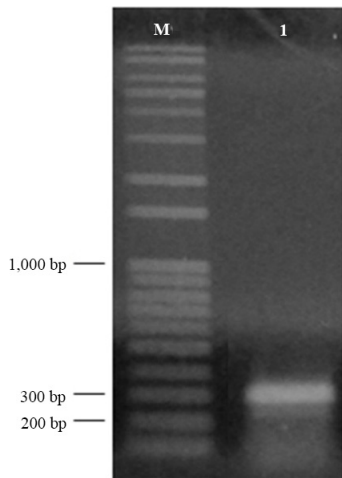


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR product to detect the ammonia monoxygenase gene (*amo*) of *Bacillus subtilis* SRCM 101269 using specific primer. PCR product size was 295 bp. Lanes: M, DNA size marker; 1, PCR product of SRCM 101269.

선별 균주 *B. subtilis* SRCM 101269의 밴드를 확인한 결과 *amo* gene을 보유하고 있는 것으로 분석되었다(Fig. 2). 따라서 SRCM 101269 균주는 암모니아 분해능을 지닌 균주로서 암모니아성 악취 제거에 효과를 갖는 균주임을 확인하였다.

암모니아와 황화수소 측정을 통한 악취 저감화능 분석

우분의 퇴적시 발생하는 악취의 주원인으로는 암모니아와 황화합물의 복합가스 생성으로 인해 발생한다고 알려져 있으며(Oh *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2009), 이러한 악취를 제거하기 위해서 최근에는 biofiltration을 이용한 생물학적 처리시스템에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으나(Kim *et al.*, 2000), 우분의 발효시 직접 미생물을 첨가하여 황화수소 및 암모니아 가스를 제어하는 연구는 미흡한 실정이다(Kuroda *et al.*, 2004). 특히 타 분뇨를 이용한 경우보다 우분을 이용한 퇴비화의 경우 계분이 혼합된 경우보다 악취도 평가에서 암모니아 농도보다 황화합물의 농도가 더 높게 측정된다고 보고(Jang *et al.*, 2009)되고 있어, 우분 시료의 경우 선별 균주와 비교를 위한 표준 균주로 황화합물 분해세균인 *S. novella*를 사용하였고, 계분이 첨가된 혼합분의 경우 대표적인 암모니아 분해 세균인 *N. europaea*를 표준 균주로 사용하여 비교 연구를 통해 최종 선별 균주의 악취 저감화능을 상대 평가하였다. 먼저 우분의 경우 우분 시료에 함유된 다른 미생물 균총에 의해 암모니아 가스가 분해 됨을 균주를 접종하지 않은 대조구를 통해 확인할 수 있었고, 대조구와 *S. novella*를 접종한 실험구에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 선별 균주인 SRCM 101269를 접종한

실험구에서는 발효 6일 경과 후 대조구와 비교해 2배 이상 암모니아 가스가 감소됨을 확인하였고, 9일 후에는 10 ppm 미만으로 암모니아 가스의 농도가 감소함을 확인하였다. 또한 혼합분의 경우 발효 3일차에 대조구를 포함한 모든 실험구에서 암모니아 가스의 농도가 평균 30 ppm 수준으로 감소하는 경향을 보였고, 3일 이후에는 대조구와 *N. europaea*를 접종한 실험구에서는 발효기간이 늘어남에 따라 큰 변화를 보이지 않았으나, SRCM 101269를 접종한 혼합분에서는 3일 이후에도 지속적으로 감소하여 발효 9일 경과 후 11 ppm까지 암모니아 가스가 감소하는 것을 확인하였다(Table 2). 반면 황화수소의 경우 우분과 혼합분 모두에서 대조구 및 비교 실험구에서는 농도의 변화를 보이지 않았으나, SRCM 101269를 접종한 실험구에서는 발효 9일 경과 후 우분과 혼합분 모두 평균 65 ppm 수준으로 감소하여(Table 2), 본 연구를 통해 선별한 SRCM 101269의 암모니아와 황화수소 모두 표준 균주와 비교하여도 우수한 악취 저감화능을 지녀 우분 및 혼합분의 비료화에 적용 가능한 균주임을 확인하였다.

Table 2. Changes of NH₃ gas during composting periods by inoculated strains in cow and mixed manures

Manure sample	Odor ^b (ppm)	Composting Period (days)		<i>S. novella</i> (KCTC 2845)	<i>B. subtilis</i> SRCM 101269
		Control			
Cow manure	NH ₃	0	≥ 99.0	≥ 99.0	≥ 99.0
		3	≥ 99.0	≥ 99.0	≥ 99.0
		6	≤ 51.0	≤ 62.0	≤ 20.0
	H ₂ S	9	≤ 46.0	≤ 31.0	≤ 8.0
		0	≥ 99.9	≥ 99.9	≥ 99.9
		3	≥ 99.9	≥ 99.9	≥ 99.9
Mixed manure ^a	NH ₃	6	≥ 99.9	≥ 99.9	≥ 99.9
		9	≥ 99.9	≥ 99.9	≤ 67.8
		0	≥ 99.9	≥ 99.9	≥ 99.9
	H ₂ S	3	≥ 99.9	≥ 99.9	≥ 99.9
		6	≥ 99.9	≥ 99.9	≥ 99.9
		9	≥ 99.9	≥ 99.9	≤ 65.7

^a Mixed manure is composed of 70% cow manure, 10% fowl droppings and 20% sawdust.

^b MultiRAE lite, RAE systems has detection range about analysis of degradation ability. (NH₃, 0-100 ppm; H₂S, 0-100 ppm).

The experiments were carried out in triplicate (*P* < 0.05).

Nitrite (NO_2^-)와 Sulfate (SO_4^{2-}) 측정을 통한 악취 저감화능 분석

발효 기간 중 발생하는 가스에 포함된 암모니아와 황화수소가 우분과 혼합분 시료에서 미생물에 의한 대사과정을 통해 아질산과 황산염으로 축적되는 양을 분석하기 위해 아질산염과 황산염의 농도 변화를 측정하였다.

대표적으로 *Nitrosomonas* sp. 계열의 미생물들이 질산화 과정을 통해 암모니아를 아질산과 질산으로 산화하여 에너지를 얻는다고 알려져 있으며, 암모니아를 아질산으로 전환하는 세균을 암모니아 산화세균, 아질산을 질산으로 전환하는 세균을 아질산 산화세균이라고 한다. 이러한 미생물들은 NH_4 , NO_2 , NO_3 의 다양한 형태의 질소를 이용하며, 질소화합물의 전환이 질소화합물의 산화형태를 변화시켜 질소의 순환이 이루어지게 된다(Lim et al., 2006). 이러한 대사과정을 이용하여 암모니아 및 아질산성 질소 산화세균주의 분리(Nam et al., 1999), 축산환경 개선을 위한 암모니아 제거 미생물의 탐색 및 분리(Lee and Lee, 2009) 등과 같이 미생물의 분리부터 적용까지 다양한 연구를 통해 암모니아성 악취 제거에 미생물을 이용하고 있다. 따라서, 최종선별 균주 SRCM 101269의 아질산염 농도의 변화를 *N. europaea*와 비교를 통해 암모니아 저감 기능을 조사한 결과(Fig. 3), 우분의 경우 대조구가 3일 경과 후 아질산염이 급증하였으나 6일 이후에는 다른 시료와 동일한 농도를 유지하며 큰 차이를 보이지 않았지만, 혼합분에서는 대조구에서는 큰 변화를 보이지 않았으나 *N. europaea*와 SRCM 101269를 접종한 실험구에서는 6일 이후에는 약 2배 가량 증가하였다. 특히 *N. europaea*를 접종한 실험구에 비해 SRCM 101269에서 더 활발한 암모니아 산화 작용이 일어나 가장 높은 수치를 보였다. 앞선 암모니아 가스 검출 결과와 비교하여 보면 혼합분의 경우 암모니아 가스가 산화되어 아질산으로 축적됨으로서 농도가 증가하는 상관관계를 보이고 있었으며, 혼합분에서는 Lee와 Lee (2009)의 결과와 같이 암모니아 산화 기작을 통해 암모니아를 저감한다는 것을 확인할 수 있었다.

황화계 악취 분해능의 경우 황은 다양한 산화상태를 갖고 유기물과 무기물의 형태로 존재하고 있으며, 미생물에 의한 산화 및 환원 반응을 통해 다양한 황 화합물의 산화상태를 유지하게 해준다. 특히 호기적 조건에서는 유기물의 탈황(desulfurization)으로 황산염이 형성되며 황산염 환원 세균은 이를 이용하여 황산염 환원작용으로 몇몇 아미노산의 필수 구성 원소로 전환하여 단백질 합성에 이용한다. 혐기성 미생물은 유기화합물을 황화 수소와 일부 유기성 황화합물로 환원하고, *Thiobacillus*

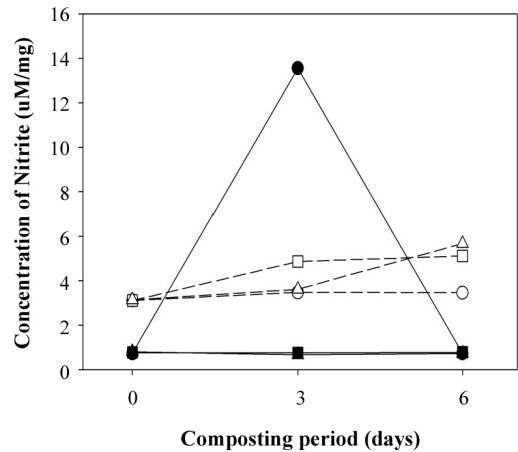


Fig. 3. Changes of nitrite concentration by composting periods in cow and mixed manure. Mixed manure is composed of 70% cow manure, 10% fowl droppings, and 20% sawdust. Straight line is nitrite concentration in cow manure, and broken line is nitrite concentration in mixed manure. Circle symbol is control (closed, cow manure; opened, mixed manure), square symbol inoculated *N. europaea* (closed, cow manure; opened, mixed manure), and triangle symbol inoculated SRCM 101269 (closed, cow manure; opened, mixed manure).

와 같은 황 세균은 대사작용을 통해 황화수소를 전자 공여체로 이용하게 된다. 따라서 황화계 악취 저감화를 위해서는 황산화 미생물과 황산염 환원 세균과 같은 특수한 미생물들의 산화 혹은 환원 작용에 의해 황 화합물을 순환 및 재순환시키는 역할을 수행하고 있다(Atlas and Bartha, 1993). 따라서 황화수소의 저감화능을 조사하기 위해 황화합물 산화 미생물로 알려진 *S. novella*를 이용하여 SRCM 101269와 비교를 통해 황산염의 농도를 측정하였다(Fig. 4). 측정 결과 우분에서는 황산화염이 6일 경과 후 모두 감소하여 비슷한 수치를 보였고, 특히 *S. novella*와 SRCM 101269를 접종한 실험구에서는 3일 경과 후 대부분의 황산화염이 분해되어 4 mg/ml 이하의 수치를 보이고 SRCM 101269가 좀더 빠른 분해능을 지니고 있는 것으로 나타났으나, 혼합분에서는 실험구 모두 황산화염의 농도가 큰 변화를 나타내고 있지 않았다. 이는 혼합분의 초기 황산화염 농도 자체가 낮아 황산화염의 함량 변화가 나타내지 않은 것으로 조사되었다. 따라서 SRCM 101269는 표준 균주와 비교하여도 악취 저감화능에서 암모니아와 황산화염의 분해능이 모두 우수한 균주로서 우분과 혼합분 모두에 적용 가능한 균주로 산업적 적용이 가능함을 확인하였다.

발효단 제조를 통한 복합 악취 제어능 및 cellulose 분해능

최종적으로 SRCM 101269를 이용하여 가축분뇨의 복합악취 제거와 퇴비화로서의 적합성 평가를 위해 소형퇴비발효단

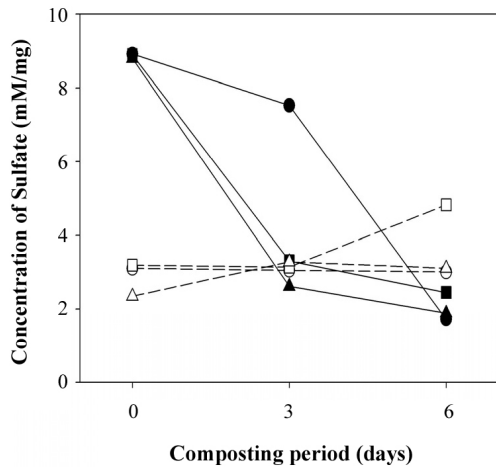


Fig. 4. Changes of sulfate concentration by composting periods in cow and mixed manure. Mixed manure is composed of 70% cow manure, 10% fowl droppings and 20% sawdust. Straight line is sulfate concentration in cow manure, and broken line is sulfate concentration in mixed manure. Circle symbol is control (closed, cow manure; opened, mixed manure), square symbol inoculated *N. europaea* (closed, cow manure; opened, mixed manure), and triangle symbol inoculated SRCM 101269 (closed, cow manure; opened, mixed manure).

을 제작하여 대조구와 동시에 노지에서 발효하면서 복합악취의 변화량과 축산업에서 퇴비화 초기단계에 cellulase에 의해 왕겨, 억새, 볏짚, 톱밥 등 수분 조절제를 분해함으로 인해 균주의 초기 성장에 필요한 탄소원을 제공하는 등 축산분뇨의 퇴비화 촉진에 관련된 cellulase 함량의 변화를 측정하여 분석하였다. 대조구와 실험구 모두 발효단 제작 후 7일까지는 악취 농도가 급격하게 증가하였으나, SRCM 101269를 접종한 발효단에서는 대조구에 비해 발효 9일부터 복합가스의 농도가 현저하게 감소하여 14일 이후에는 20 ppm 이하를 유지하여 서서히 감소하는 경향을 보였다(Fig. 5). 환경부 악취방지법(Ministry of Environment, 2014)에 의한 복합악취 허용기준이 배출구의 경우 500 ppm 이하, 부지경계선 15 ppm 이하인 것을 감안하면 최종 선별 균주인 SRCM 101269를 초기에 우분 퇴적물에 살포하고 혼합하여 발효한다면 상대적으로 빠른 시간에 악취를 저감할 수 있을 것으로 나타났다. 또한, 퇴비화 과정 중 부속도에 크게 영향을 주는 cellulase의 분해 정도를 비교한 결과 초기 cellulase 함량은 큰 변화가 없이 지속되다 7일 경과 후 퇴비화가 활발하게 진행되면서 cellulase의 함량이 18% 이하로 크게 감소하였다(Fig. 6). 앞서 분리 단계에서 SRCM 101269의 경우 cellulase 활성이 높게 나타나 퇴비단에서 퇴비화가 진행됨에 따라 이분해성 cellulase가 당과 같은 저분자 유기화합물로 전환되면서 함량이 감소한 것으로 분석되며, 이는 cellulase, hemicelluloses, pectin 등 난분해성 물질들이 분해되는 퇴비화

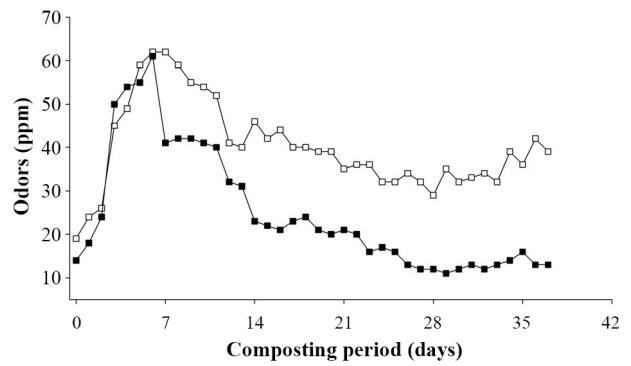


Fig. 5. The time course profile of multiple odors in compact compost inoculated SRCM 101269. Compact compost manufactured using mixed manure (70% cow manure, 10% fowl droppings and 20% sawdust). (□, control; ■, *B. subtilis* SRCM 101269).

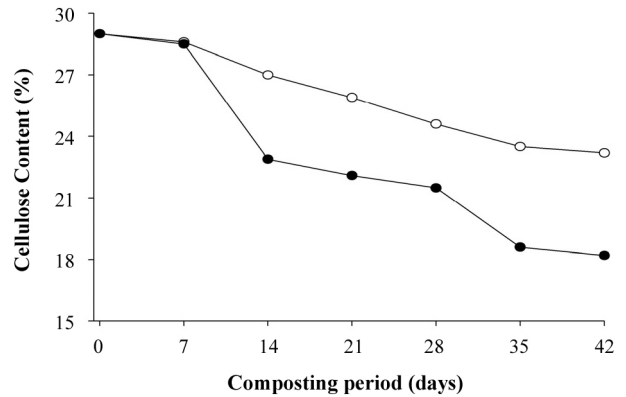


Fig. 6. The time course profile of cellulose content in compact compost inoculated SRCM 101269. Compact compost manufactured using mixed manure (70% cow manure, 10% fowl droppings and 20% sawdust). (○, control; ●, *B. subtilis* SRCM 101269).

지속단계(Ryckeboer *et al.*, 2003)의 소요 시간을 단축시켜 퇴비화를 위한 발효단 제작시 공정 및 시간적 감소의 장점을 갖는 것으로 나타났다. 추후 대량생산 공정 및 최적화 등 추후 공정이 필요하지만, 본 연구를 통해 표준 균주와 비교해도 뒤떨어지지 않는 악취 저감화 기능과 발효단 제조 시 시간 및 비용을 감소할 수 있는 퇴비화를 위한 산업적 응용이 가능한 균주로서의 가능성을 확인하였다.

적 요

안전성이 확보되고 *amo* 유전자가 있는 토종미생물 *Bacillus subtilis* SRCM 101269는 전통발효식품으로부터 분리하였으며, cellulase, xylanase 생성능, 동정, 악취저감화능 등을 조사하여 우분 적용을 위한 특성 연구를 진행하였다. 가축분뇨 악

취제어 관련 우분 적용 결과, 발효 6일 경과 후 대조구에 비해 2배 이상 암모니아 가스가 감소하였고 9일 경과 후 10 ppm 미만으로 농도가 감소하였다. 우분에 계분과 기타 목질성분이 첨가된 혼합분의 경우 발효 3일 후부터 일정 농도로 암모니아 가스가 유지되는데 반해, *B. subtilis* SRCM 101269를 접종한 시료에서만 발효시간의 경과에 따라 암모니아 가스가 감소하였으며, 황화수소의 농도 또한 9일이 경과한 시료에서 65 ppm으로 감소됨이 확인되었다. 발효 경과에 따른 아질산염과 황산염의 시료 내 변화량을 측정할 결과 우분에서의 아질산염은 변화가 없었으나, 혼합분에서는 대조구에 비교하여 증가하였다. 황산염의 경우 우분에서는 발효초기보다 감소하였으나 대조구와 비교하여 큰 차이를 보이지 않았고, 혼합분에서는 변화가 없는 것으로 분석되었다. 최종적으로 앞선 연구들을 토대로 *B. subtilis* SRCM 101269 균주의 우분퇴비 생산의 산업적 활용이 가능함을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 2015년 산업통상자원부 산업기술거점기관지원(한국형 유용균주, 과제번호: R0004073) 사업의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

- Atkinson, C.F., Jones, D.D., and Gauthire, J.J. 1996. Biodegradabilities and microbial activities during composting of municipal solid waste in bench-scale reactors. *Compost Sci. Util.* **4**, 14-23.
- Atlas, R.M. and Bartha, R. 1993. Microbial ecology-fundamentals and application, 3rded., pp. 323-332. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Redwood city, California, USA.
- Baek, H.J., Zo, Y.G., and Ahn, T.S. 2009. Hydrolytic and metabolic capacities of thermophilic *Geobacillus* isolated from litter deposit of a lakeshore. *Korean J. Microbiol.* **1**, 32-40.
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., and Alland, D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods* **69**, 330-339.
- Hooper, A.B., Vannelli, T., Bergmann, D.J., and Arciero, D.M. 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **71**, 59-67.
- Jang, Y.K., Jung, B.J., Kim, J., Song, K.B., Kim, H.J., and Yoo, Y.H. 2009. Assessment of odor characterization and odor unit from livestock facilities by animals. *J. Environ. Impact Assessment* **19**, 29-38.
- Kappler, U., Friedrich, C.G., Trüper, H.G., and Dahl, C. 2001. Evidence for two pathways of thiosulfate oxidation in *Starkeya novella* (formerly *Thiobacillus novellus*). *Arch. Microbiol.* **175**, 102-111.
- Kim, Y.S., Kang, M.K., Bae, K.S., Lee, K.S., and Rhee, Y.H. 1997. Changes in physic-chemical and microbiological parameters during active composting of cattle manure. *Korean J. Microbiol.* **33**, 267-273.
- Kim, S.Y., Kim, H., and Chae, H.J. 2003. Isolation and characterization of microorganisms for the development of fermentation accelerator of animal manure. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 466-472.
- Kim, K.D., Kim, K.Y., and Hahm, Y.T. 2004. Studies on the isolation and identification of *Bacillus* sp. for the composting of swine manure and the removal of malodorous gases from its liquid compost. *Korean J. Microbiol.* **40**, 154-159.
- Kim, N.J., Mitsuyo, M., and Shoda, M. 2000. Comparison of organic and inorganic packing materials in the removal of ammonia gas in biofilters. *J. Hazard. Mater.* **72**, 77-90.
- Kim, H.S., Park, S.J., Jheong, W.H., Srinivasan, S., and Lee, S.S. 2013. The study on the effect of efficient microorganism for early stabilization of the burial sites. *Korean J. Microbiol.* **49**, 343-352.
- Kolmert, A., Wikstrom, P., and Hallberg, K.B. 2000. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *J. Microbiol. Methods* **41**, 179-184.
- Koops, H.P., Böttcher, B., Möller, U.C., Pommerening-Röser, A., and Steh, G. 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas urea* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1689-1699.
- Kuroda, K., Hanajima, D., Fukumoto, Y., Suzuki, K., Kawamoto, S., Shima, J., and Haga, K. 2004. Isolation of thermophilic ammonium-tolerant bacterium and its application to reduce ammonia emission during composting of animal wastes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 286-292.
- Lee, S.J. and Lee, E.Y. 2009. Screening and isolation of ammonia removal microorganism for the improvement of livestock environment. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 408-412.
- Lim, J.S., Jo, W.S., and Lee, E.Y. 2006. Removal of mixed gases of H₂S and NH₃ by the biofilter packed with biomedica. *Clean Technol.* **12**, 165-170.
- Matulewich, V.A. and Finstein, M.S. 1978. Distribution of autotrophic nitrifying bacteria in a polluted river (the Passaic). *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 61-71.
- Ministry of Environment. 2014. Odor prevention act enforcement rules. Ministry of Knowledge Economy, Korea.
- Nakamura, K., Miki, H., and Amano, Y. 1990. Cell growth and accumulation of *Thiobacillus thiooxidans* S3 in a pH-controlled thiosulfate medium. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **36**, 369-376.

- Nam, B.S., Ryu, W.R., Lee, Y.H., Kim, J.M., and Cho, M.H. 1999. Isolation and characterization of ammonia and nitrite nitrogen oxidizing strains. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 76-81.
- Oh, Y.S., Kim, K.H., Koo, Y.S., Kim, M.S., Seol, M.H., Chon, S.S., Choi, Y.J., and Ahn, D.H. 2006. Odor emission characteristics in livestock waste treatment facilities. *Korean J. Odor Res. Eng.* **5**, 1-9.
- Papadimitriou, E.K. and Balis, C. 1996. Comparative study of parameters to evaluate and monitor the rate of a composting process. *Compost Sci. Util.* **4**, 52-61.
- Park, S., Jung, D.H., Yoo, E.S., and Kim, M.I. 2009. Evaluation of complex odor and odor compounds in a pilot-scale ultra thermophilic aerobic composting process. *J. Korean Geo-environmental Society* **10**, 33-39.
- Ryckeboer, J., Mergaert, J., Coosemans, J., Deprins, K., and Swings, J. 2003. Microbiological aspects of biowaste during composting in a monitored compost bin. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 127-137.
- Schütz, M., Maldener, I., Griesbeck, C., and Hauska, G. 1999. Sulfide-quinone reductase from *Rhodobacter capsulatus*: requirement for growth, periplasmic localization, and extension of gene sequence analysis. *J. Bacteriol.* **181**, 6516-6523.
- Shin, H.J. 2002. Effect on livestock manure composting by the enriched microbial population. *Kor. J. Life Science* **12**, 129-135.
- Stutzenberger, F.J. 1971. Cellulase production by *Thermomonospora curvata* isolated from municipal solid waste compost. *Appl. Microbiol.* **22**, 147-152.
- Tamura, K. and Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. Mega5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731-2739.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.
- Updegraff, D.M. 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.* **32**, 420-424.
- Ushida, K., Hashizume, K., Miyazaki, K., Kojima, Y., and Takakuwa, S. 2003. Isolation of *Bacillus* sp. as a volatile sulfur-degrading bacterium and its application to reduce the fecal odor of pig. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **16**, 1795-1798.
- Varel, V.H. 2002. Livestock manure odor abatement with plant-derived oils and nitrogen conservation with urease inhibitors: A review. *J. Anim. Sci.* **80**, E1-E7.
- Vermelho, A.B., Meirelles, M.N.L., Lopes, A., Petinate, S.D.G., Chaia, A.A., and Branquinha, M.H. 1996. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **91**, 755-760.
- Yoon, Y.M., An, G.H., Kim, J.K., Ahn, S.H., Cha, Y.L., Yang, J.W., Yu, K.D., Ahn, J.W., Moon, Y.H., Koo, B.C., et al. 2014. Xylanase activity of *Bacillus pumilus* H10-1 isolated from *Ceratotherium simum* feces. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* **5**, 316-322.