

된장에서 분리한 효모(*Pichia farinosa* NASS-2)의 돈분 악취감소효과

유재홍* · 박인철 · 김완규

농촌진흥청 농업미생물과

Decrease efficiency of Offensive Odor from Pig Excreta by Yeast Strain, *Pichia farinosa* NASS-2 Isolated from Soy Bean Paste

Jae Hong Yoo*, In Cheol Park and Wan Gyu Kim

Agricultural Microbiology Division, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

(Received 12, November 2012., Revised 4, December 2012., Accepted 10, December 2012)

ABSTRACT : The different microbial species were isolated from soy bean paste samples. A yeast strain NASS-2 was effective to decrease odor activity on pig excreta was identified as *Pichia farinosa* based on nucleotide sequences of 18S ribosomal DNA and Internal transcribed space (ITS). The extracellular fraction of *P. farinosa* NASS-2 was effective to decrease odor activity of pig excrements. Optimal medium component for decreasing order activity on odor material composed of soluble starch 2.0% (w/v) and yeast extract 0.8% (v/v). The decrease of odor material was maximum at 28°C for 72 hours with pH 5.5. When the *P. farinosa* NASS-2 culture broth was treated to pig excrements, the removal efficiency was an average concentration with 1.38 ppm of ammonia gas.

KEYWORDS : Odor material, *Pichia farinosa*, Pig excrements, Soy bean paste

서 론

최근 국민소득 향상과 식생활 변화로 육류 소비량이 증가되고 대규모의 축산업으로 전환됨에 따라 사육두수의 확대에 따른 분뇨의 효율적인 처리문제 대두되고 있다. 다양한 가축분뇨 처리기술 보급과 아울러 자원화 이용방법 역시 축종에 따라 다양한 형태로 활용되어 지고 있어 어떠한 시설과 처리방법이 최적이라고 권장할 만한 것이 없는 것이 현실이다. 악취공해의 대책으로서 물리적 방법이나 화학적 방법이 여러 가지 있으나(Joo and Shoda, 2006) 악취 성분이 다양하고, 악취원의 농도가 매우 낮아도 후각에는 감지되므로 이를 제거하기 위한 장치가 매우 커지거나 유지비가 막대하여 장치형 시설의 적용은 비현실적이라 할 수 있다. 악취문제는 악취 성분 그 자체를 분해·제거하지 않으면 근본적인 해결을 할 수 없다. 따라서 악취 성분을 분해하는 미생물을 분리하여 가축 분뇨의 냄새를 제거하기 위한 조건과 우수한 미생물의 선발이 중요하다(Joo and Shoda, 2006). 악취의 원인은 주로 가축의 분과 뇨이고, 돈사에서 발생하는 악취의 성분으로는 암모니아와 휘발성 지방산이 주체가 되며(Schenk and Wehrmann, 1979) 이밖에 황화수소, 이황화메틸, 트리메틸아민,

스틸렌, 아세트알데하이드 등의 복합취로 구성되어 있다. 미생물을 이용한 악취가스 분해는 호기성 분해와 혐기성 분해로 나뉘는데(Park *et al.*, 2003), 일반적으로 NH₃을 비롯한 악취가스 이용 균주는 산소를 전자 수용체로 사용하는 호기성 분해가 대부분이며 이 경우 분해효율도 높다는 장점을 가지고 있다. 현재 악취제거 미생물은 30개 속 100여 종의 균주가 보고되고 있으며, 이들 균주는 주로 *Pseudomonas putida*와 같은 *Pseudomonas* 속이 많으며, 간혹 *Yeast*와 같은 다른 속의 미생물이 보고된 적도 있다(Park *et al.*, 2003).

본 연구에서는 우리나라 전통 발효 식품인 된장으로부터 악취감소효과를 나타내는 미생물을 분리하고 이들 중에서 효모균주를 분리하여 동정 하였으며 균학특성과 악취감소효과를 분석하여 그 결과를 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

된장으로부터 미생물분리

본 실험에 사용한 미생물 분리는 경기도 지방에서 채취한 된장시료로부터 미생물을 분리하였다. 된장 1g을 YM medium(Difco.) 10 mL에 넣고, 28°C에서 진탕배양 후 YM agar plate에 평판도말 하여 단일 균주를 분리하였다.

*Corresponding author <E-mail : yj7915@Korea.kr>

돼지분변에서 생육가능한 돈분악취가스 감소 미생물의 효과

돼지분변으로부터 돼지분변에 생육이 가능한 미생물을 분리하여 분리, 동정한 후 돼지분변 1 L에 효모 배양액 1%를 접종하여, 10일 경과 후 황화수소가스의 변화량을 GC(Varion 3800)를 이용하여 악취 감소효과를 분석하였다.

rDNA분석

분리효모의 동정을 위하여 액체배지(YM)에서 28°C에서 72시간 동안 진탕배양하여 5×10^9 얻어진 효모세포를 준비 하였다. 효모로부터 genomic DNA는 genomic DNA prep kit for yeast(Sol Gent Co.)을 사용하여 구입회사에서 제시한 방법에 준하여 추출 하였다. PCR을 위한 반응 조건은 전체 PCR 반응액을 50 μ L로 하였고 반응조성은 10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 100 ng primer, 50 ng Template DNA, 2.5 mM dNTP, 및 2.5 unit Taq polymerase(Promega)를 넣어 실시하였다. PCR반응은 94°C에서 4분간 predenaturation 시킨 후 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분 extension 하여 총 35 Cycle 실시하였으며 최종 DNA 합성은 72°C에서 10분으로 하였다. PCR 증폭산물은 1.5% agarose gel로 전기영동하여 Ethidium bromide 염색으로 확인 한 후 gel extraction kit (QIAGEN)로 PCR산물을 정제하고 염기서열 분석 후 NCBI의 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)의 database와 염기서열의 상동성을 조사 하였다.

악취감소 효과 검증

악취감소효과 미생물의 활성 검증은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 단일균락의 균주를 돈분액(분과 뇨 혼합) 50 mL와 수돗물 50 mL가 혼합된 삼각플라스크에 접종하여 28°C에서 7일동안 진탕배양 후 관능검사(후각 이용)와 악취 가스 검지 가스관(GASTEC, 3 L, 3 M, 4 L, 4 LT, Japan)을 이용하여 행하였다.

악취감소 미생물의 대량배양조건 확립

분리한 악취 감소 효모는 YM 액체배지가 들어 있는 배양기(5 L, CNS Co.)를 이용하여 물리적 조건인 pH는 4.5, 6, 7, 8로 조절하였고, 공기공급량은 0.5 mL/mim으로 간격으로 1.0 mL/mim에서 3.0 mL/mim 주입하였다. 교반속도는 100 rpm, 150 rpm 및 200 rpm으로 고정하여 악취 가스 감소효과를 검토 하였다. 화학적 조건으로 탄소원으로는 glucose(Junsei co.), starch soluble(대정화금, 한국), 질소원으로는 yeast extract(오뚜기, 한국), 대두박(화성전분, 한국), 무기염류로는 NaCl(대상, 한국) 등을 사용하여 효모의 생육과 악취감소효과를 조사 하였다.

악취발생화합물 NH₃-N의 분석

NH₃-N함량 분석을 위하여 컬럼은 IonPac AS12A를 사용하였고, 이동상은 12.5 mM Na₂CO₃ + 17.5 mM이었고, NaHCO₃ 유속은 1.2 mL/min, 검출기는 Suppressed Conductivity, Detector SRS Current 100 mA, 시료주입량 25 μ L의 조건을 이용하여 먹는물 수질 공정 시험 방법(환경부 고시 2002-91)에 준하여 NH₃-N의 분석을 행하였다.

결과 및 고찰

악취감소효과 효모 분리 및 동정

경기도 지방에서 채취한 된장으로부터 돈분에서 발생하는 악취감소효과를 나타내는 미생물을 분리하였다. 분리한 미생물들을 동정한 결과 *Pseudomonas* 10종, *Corynebacterium* 8종 외 39종의 세균과 효모를 분리 할 수 있었다(Table 1). 주로 대부분 그람 음성 세균이 존재하였는데, 이중 3종류의 효모가 분리 되었다. 그중에서 rDNA염기서열 분석에 의하여 효모균을 동정한 결과

Table 1. Microbial species isolated from various soy bean paste samples

Microbial species	No. of isolates
<i>Pseudomonas</i>	10
<i>Corynebacterium</i>	8
<i>Halomonas</i>	6
<i>Planococcus</i>	4
<i>Arthrobacter</i>	4
<i>Bacillus</i>	2
<i>Brachybacterium</i>	1
<i>Paracoccus</i>	1
<i>Pichia farinosa</i>	3

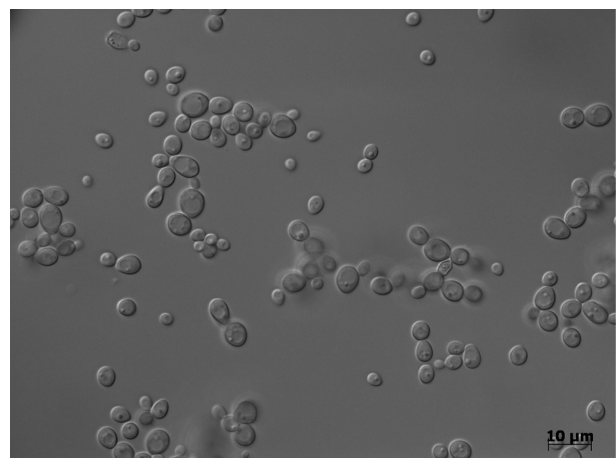


Fig. 1. Microscopic features of *Pichia farinosa* NAAS-2 ($\times 1000$).

Pichia farinosa 로 동정되었으며 *P. farinosa* NASS-2 균주를 본 연구에 이용하였다. 일반적으로 배양액면에 피막을 형성하는 산막효모가 존재하는 것을 알 수 있었다. 하지만 동정 결과 *Pichia membranefaciens* 같은 맥주와 포도주등에 균막을 형성하는 유해균은 발견되지 않았다.

Fig. 1은 분리효모를 광학현미경($\times 1000$ 배)으로 관찰한 것을 나타낸 결과로서 전형적인 산막효모인 *Pichia farinosa*의 형태적인 특성을 나타내었다.

악취감소 미생물의 대량배양조건 확립

실험실에서 사용하고 있는 Soluble starch와 Yeast extract는 고가의 시약으로 산업화 할 경우, 경제성 부분을 고려해야 한다. 따라서 대량배양용배지로 사용할 수 있는 저렴한 탄소원으로 무수 포도당을, 질소원으로 Yeast extract를 선발하여 효모의 대량배양조건을 검토 하였다(Table. 2). Table. 2 나타난 바와 같이 효모를 대량배양하는데 소요되는 생산비가 실험실용 배지 대비, 탄소원은 1/8, 질소원은 1/7의 수준으로 나타났다. 이는 악취감소효과를 가지고 있는 효모를 산업화 하고자 최적배지를 대량 생산에 사용할 경우, 생산비를 줄일 수 있는 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 특히 실험에 사용한 무수포도당과 효모엑기스의 경우 식품산업에서 사용하고 있는 재료로, 환경오염, 인축에 미치는 해로운 영향이 없고, 악취감소효과 효모의 생육이 양호하여 대량생산하는 생산용 배지로서 사용이 가능 할 수 있을 것이다.

악취발생화합물 $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 분석

Table 3에 나타낸 바와 같이, 악취감소효과를 갖는 다른

Table 2. Media components for optimal culture of *Pichia farinosa* NAAS-2

Conditions	Laboratory culture	Mass culture
Soluble starch	2.0%	1.2%
Yeast extract	1.2%	0.6%
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	30	28
Agitation (rpm)	200	180
Aeration (L/Min)	0.5	0.1

Table 3. Analysis of $\text{NH}_3\text{-N}$ Concentration

Treatments	Concentration (ppt)
Control 1 ¹⁾	596.13
Control 2 ²⁾	102.12
Treatment 1 ³⁾	14.48
Treatment 2 ⁴⁾	63.2

¹⁾No treatment.

²⁾*Bacillus* sp.

³⁾*P. farinosa* NAAS-2.

⁴⁾*Bacillus subtilis*.

Table 4. Effect of diminution of offensive odor on pig dung excreta treated with *P. farinosa* NAAS-2

Treatment	NH_3 content	H_2S content
Control	19.49 ppm	5.89 ppb
<i>P. farinosa</i> -NAAS-2	1.38 ppm	0.32 ppb

미생물인 *Bacillus subtilis*와 *Pichia farinosa* NAAS-2를 돈분에 처리한 결과, 처리전 596 ppt의 암모니아 가스 농도에서 *Bacillus subtilis* 처리구는 63.2 ppt, *Pichia farinosa* NAAS-2는 14.48ppt로 감소하는 효과를 얻을 수 있었다. 이같은 사실은 *Bacillus subtilis* IB 101을 이용하여 악취 가스 제거하고자 할 때, 악취가스중 암모니아 가스를 20~30% 제거효과가 있다는 보고가 있지만(Kim *et al.*, 2007) 본 실험에 사용한 *Pichia farinosa* NAAS-2는 돈분에 발생 되어지는 암모니아가스를 95%이상 가스를 제거하는 효과가 있어 일반세균보다는 월등한 악취효과 감소 효과를 나타내었다. 이는 가축분뇨 발효제의 개발을 위한 미생물 분리 연구에서 분리된 미생물이 암모니아가스를 95% 제거 하였다는 보고와 유사한 결과가 나타 나타났었다(Kim *et al.*, 2002).

Table 4에는 분리한 효모로 제조한 악취저감효과 처리제를 돈분에 처리하고 15일 경과 후 악취 가스 감소율을 조사한 결과를 나타 내었다. Table 4에 나타난 바와 같이 암모니아가스(NH_3 gas)는 처리 전 19.49 ppm에서 처리 후는 1.38 ppm으로, 황화수소 가스(H_2S gas)는 처리 전 5.89 ppb에서 처리 후는 0.32 ppb으로 감소하는 효과를 나타내었다. 미생물을 이용한 암모니아 제거 효과에 관련된 보고로는 *Alcaligenes faecalis* No.4를 이용한 고농도 암모늄제거(Joo *et al.*, 2005), 해양미생물 *Vibrio alginolyticus*를 이용한 암모니아 가스제거(Kim *et al.*, 2000), *Candida rugosa* CY-10을 접종, 돈분배양액내 악취가 저감하는 효과에 대한 연구등이 있다(Kim *et al.*, 2002). 하지만 보고된 미생물 대부분 세균이고 효모가 악취가스 효과를 나타낸다고 보고는 거의 없는 실정이다. 따라서 *P. farinosa* NAAS-2로 제조한 악취감소 처리제를 축산물폐기물(돈분뇨)에 Bioremediation agents로 사용한다면 환경 친화적인 처리제로 활용 할 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

경기도 지방의 된장 시료로부터 악취감소 효과 미생물 중에서 효모가 분리되었으며 rDNA염기서열분석에 의하여 *Pichia farinosa*로 동정 되었다. 공시균주 *P. farinosa* NASS-2로 대량배양조건 확립 및 미생물처리제를 제조하였다. 분리한 효모로 제조한 악취저감효과 처리제의 실내 시험결과 돈분에 미생물제를 처리하고 15일 경과 후 악취 가스 감소율을 조사한 결과, 암모니아가스(NH_3 gas)는 처리 전 19.49 ppm에서 처리 후는 1.38 ppm으로, 황화수소

가스(H_2S gas)는 처리 전 5.89 ppb에서 처리 후는 0.32 ppb으로 감소하는 효과를 나타내었다. 일반적으로 박테리아가 악취저감효과 미생물로 사용되고 있으나 본 연구에서 사용한 된장에서 분리한 효모 특히 산막효모인 *P. farinosa* NASS-2의 악취효과(암모니아가스, 황화수소 가스)는 처음 보고이다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 국립농업과학원 농업기술 연구개발사업(과제번호: PJ008580)에서 연구비 지원으로 수행된 결과이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Joo, H. S. and Shoda, M. 2006. A study on the pathway of high-strength ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium *Alcaligenes faecalis* No. 4. *Environ. Eng. Res.* 230-235.
- Joo, H. S., M. Hirai and Shoda, M. 2005. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification aerobic denitrification by *Alcaligenes faecalis* No. 4. *J. Biosci. Bioeng.* 100:184-191.
- Kim, N. J., Hirai M. and Shoda, M. 2000. Removal of a high load of ammonia gas by a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*. *J. biosci. bioeng.* 90:410-415.
- Kim, S. Y., Noh, Y. H., Kang, S. G., Kim Y. B., Jang W. J., Kim D. J. and Yun H. S. 2007. Ammonia gas removal by *Bacillus subtilis* IB101 and optimization of culture media. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 22:162-167.
- Kim, T. I., Jeong, K. H., Jeon, B. S., Kwag, J. H., Choi, H. C., Park, J. H. 2002. Effects of the inoculation of *Candida rugosa* CY-10 on the reducing odours in pig slurry medium. *J. L. H. E.* 8:17-24.
- Park, J. H., Jun, G. I. and Jeong, C. H. 2003. Ammonia removal characteristics by pyroligneous liquid at livestock farmhouse. *J. Environment. Sci.* 12:1309-1313.
- Schenk, M. K. and Wehrmann, J. 1979. The influence of ammonia in nutrient solution in growth and metabolism of cucumber plants. *Plant Soil.* 52:403-414.