

## 미생물을 이용한 다용도 고효형 탈취제의 개발

김유진\*, 이은정, 전미옥, 김초희, 박성훈\*, 이은열  
 경성대학교 식품공학과, 부산대학교 화학공학과\*  
 전화 (051) 620-4716, FAX (051) 622-4986

### ABSTRACT

This study was to develop of efficient microbial agent for malodor removal. Total ten strains of beneficial bacteria *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., and photosynthetic bacteria were isolated and identified on the basis of their morphological and biochemical characteristics. The enzyme activities such as amylase, protease, lipase and cellulase of bacteria cells were measured. Furthermore, effective formulation procedure was developed with nutrient additive, stabilizing agent and mineral materix. For preparation of microbial agent, developing of formulation technique was very helpful for increasing the cell survival rate.

### 서 론

경제발전에 따른 산업활동의 급변화에 따라 최근 생활하수 및 산업폐수등이 수질오염의 주범으로 사회적으로 큰 관심의 대상이 되고 있을 뿐만 아니라 이로 인해 발생하는 악취는 매년 많은 민원을 야기시키고 있는 실정이다. 이러한 악취를 제거하기 위한 방법중 하나로 자연에서 분리한 환경친화적 미생물을 이용한 환경정화용 미생물제제가 최근 많이 이용되고 있다. 이러한 미생물제제는 악취발생원으로 오염된 장소에 배양된 악취제거 미생물을 투여해 자연 생분해 속도를 증가시켜 신속히 원상 회복시키며 악취원의 근원적 차단을 목적으로 한다<sup>(1)</sup>. 현재 이들 미생물제제들은 유용 미생물을 담체에 부착시킨 후 건조 분쇄하여 분말상으로 제품화하거나, 또는 액상 형태로 제조되어 사용되고 있는데<sup>(2)(3)(4)(5)</sup>, 대부분이 제제의 활성도 및 장기간 안정성 등에 있어 매우 미흡한 실정이다. 특히 분말상 제제의 경우 제형화의 불안정성에 의해 미생물의 보존성 및 재활성화 효율이 떨어지므로 미생물제제로서의 기능을 충분히 발휘하지 못하고 있는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 각종 유기성 폐수, 생활하수, 분뇨 등의 악취제거를 생물학적 방법으로 처리하기 위한 효율적 고효형 미생물 탈취제의 개발을 위해 악취분해 및 유기물 분해 활성이 우수한 유용 미생물들을 선발하고, 경제성 있는 제조방법을 개발하고자 하였다. 특히 제제의 재활성화 측면에서 미생물들의 장기 안정성을 도모할 수 있는 제형화제의 선별과 제형

화 기법을 개발하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 우수균주의 분리·동정 및 탐색

각종 약취의 효율적 처리를 위한 미생물제제의 개발 및 생산을 위하여 다양한 환경 내에 존재하는 우수균주를 스크리닝하였으며, 16S rRNA 유전자 염기서열 결정 및 미생물의 생리·생화학적 특성과 API kit isolation system을 이용하여 기질 이용성과 효소활성을 조사하여 동정하였다. 또한 선별된 균주들을 효소활성 검정용 배지에 배양하여 amylase, protease, lipase, cellulase 등의 활성을 확인하였다.

### 제제화 방법

유용 미생물과 미생물 안정제 및 보호제 혼합액을 무기성분의 전달매체와 잘 섞어 흡착시킨후 freeze drier기로 진공동결 건조하였다. 이때 제제 1ml당 균 밀도는  $10^9$  이상의 집락수(colony forming unit) 정도로 조절하였다.

### 제제화 효율

미생물 제제화에 따른 영향을 제제화 전·후에 평판 희석법에 의해 미생물의 생존수를 측정하여 제제화 효율성을 조사하였다. 미생물 생존율은 제제화전의 미생물수와 제제화후의 미생물수를 고체 평판배지를 이용하여 35℃에서 24시간 배양하여 생성되는 colony수로서 계산하였다.

$$\text{미생물 생존율 (\%)} = \frac{\text{제제화후 미생물 수 (CFU/ml)}}{\text{제제화전 미생물 수 (CFU/ml)}} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 유용 미생물의 분리·동정

광합성 미생물은 질소화합물의 아미노산, 생리활성물질, 당류 등의 유용물질의 생산, 지구 환경내 탄소, 질소, 유황의 순환, 또는 각종 환경 악화와 공해문제의 해결, 특히 미생물의 대사작용에 의한 각종 약취제거, 독성물질의 무독화등 그 기능이 매우 다양하게 사용된다. 따라서 본 연구에서는 총 2종의 유용 광합성세균을 분리, 확보하였으며 16S rRNA 유전자 염기서열 결정을 통해 동정하였다. 이 결과 분리·선별된 균주는 홍색 비황 세균의 일종인 *Rhodospirillum rubrum*과 *Rhodopseudomonas acidophila*와 가장 근친종으로 나타났다. 또한 형태·생리학적 특성이 *Bacillus* sp. 와 *Pseudomonas* sp. 와 유사한 나머지 8종의 균주를 API isolation system을 통해 동정하였다. Gram 염색 결과 6종의 Gram(+) 균과 3종의 Gram(-) 균이 관찰되었으며 모두 간균의 형태를 취하고 있었다. Gram(+) 균은 기존의 알려져 있는 *Bacillus* sp.들로서 동히 90%이상의 homology를 보였으며, Gram(-)균의 경우 *Pseudomonas* sp.로 역시 90%이상의 homology를 보였다. 일반적

으로 *Bacillus* sp.는 단백질, 지방, 전분질 등의 비교적 큰 고분자 물질을 저분자의 수용성 유기화합물로 분해하고, 악취유발물질을 제거하는 기능을 가지고 있다. 또한 *Pseudomonas* sp.는 지방산, 글리세롤, 글루코스, 초산 등의 저분자 유기화합물을 자화시키는 것으로 알려져 있다.

유기물 분해 활성 조사

4가지 효소 검증용 배지에 picking technique을 이용해 분별 균주들의 유기물 분해 활성을 조사하였다. 효소 검증용 선택배지에서 투명환을 통해 가시적으로 유기물 분해능을 확인하였다(표. 1). 대부분 모든 균주에서 높은 유기물 분해 활성능이 나타남을 확인할 수 있었다.

표. 4. 선별 균주의 기능성 효소 활성능

미생물 \ 기질	Amylase <sup>a)</sup>	Protease <sup>b)</sup>	Lipase <sup>c)</sup>	Cellulase <sup>d)</sup>
<i>Bacillus</i> sp.-1	++	++	++	++
<i>Bacillus</i> sp.-2	+	++	+	+++
<i>Bacillus</i> sp.-3	++	+++	+++	++
<i>Bacillus</i> sp.-4	++	++	++	+++
<i>Bacillus</i> sp.-5	+++	++	++	++
<i>Bacillus</i> sp.-6	+++	+++	++	+
<i>Pseudomonas</i> sp.-1	++	++	++	+++
<i>Pseudomonas</i> sp.-2	++	+	++	++
Photosynthetic bacteria-1	++	++	+++	+
Photosynthetic bacteria-2	+	++	++	++

※ -(없음), +(약), ++(보통), +++(강)

제제화에 따른 유용 미생물의 밀도변화

미생물제제가 다양한 자연 환경생태계에서 생존을 유지하면서 악취제거를 비롯한 자연정화 작용을 유지하기 위해서는 유용 미생물의 보호, 빠르고 지속적인 효능 유지, 미생물의 장단기적 성장 등이 필요하다. 이러한 요건을 만족시키기 위해 본 연구에서는 먼저 미생물 보호제 및 안정화제등과 미생물을 혼합하고 미생물 흡착 matrix로 장석(feldspar)류 광물(M I, M II)을 사용하여 제제화한 후 freeze drier기로 진공동결 건조하였다. 미생물의 활성을 장기간 유지하기 위한 방법에는 동결건조, 건조, 냉동등 여러 가지 방법이 있으나 그 중 미생물의 보존에 가장 유효한 것으로는 동결건조인 것으로 알려져 있다.<sup>(6)</sup> 본 연구에서는 제제화후 최종적으로 진공동결 건조하고 제제화 전·후에 따른 미생물의 생존력을 조사하였다. 표. 2.에서와 같이 matrix M I 단독으로 제제화한 경우에 제제화에 따른 영향이 거의 없었으며, matrix M II가 혼합될수록 미생물의 생존율이 저하됨을 알 수 있다. 특히 matrix M I 만으로 미생물을 흡착시킨 경우에는 제제화 후 생존율이 50% 이하로

감소하였다. 따라서 materix MII에 비해 materix MI이 제제화에 따른 미생물 안정화 효과가 매우 우수함을 알수 있었으며, 이후 안정한 미생물제제의 전달매체로 materix MI을 선택하였다.

표. 2. 제제화 효율

구분	동결건조 전 세포수 (cfu/g)	동결건조 후 세포수 (cfu/g)	제제화 후 생존율 (%)
MI:II (1:0)	$2.5 \times 10^9$	$1.1 \times 10^9$	44
MI:II (0.7:0.3)	$2.5 \times 10^9$	$1.6 \times 10^9$	64
MI:II (0.5:0.5)	$2.5 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$	76
MI:II (0.3:0.7)	$2.5 \times 10^9$	$2.3 \times 10^9$	92
MI:II (0:1)	$2.5 \times 10^9$	$2.8 \times 10^9$	112

### 요약

본 연구에서는 각종 유기성 폐수, 생활하수, 분뇨 등의 악취제거를 생물학적 방법으로 처리하기 위한 효율적 고품 미생물 탈취제의 개발을 위해 악취분해 및 유기물 분해 활성이 우수한 유용 미생물들을 선발하고, 안정적이며 경제성 있는 제조방법을 개발하고자 하였다. 먼저 다양한 환경으로부터 농화배양을 통해 유용 광합성 미생물 및 각종 악취환경의 물리·화학적 성상에 부합하는 활성 미생물들을 탐색, 확보하였다. 또한 미생물의 고농도 배양, 세포의 회수공정, 미량 영양원 및 미생물 안정화제의 첨가, 특히 제제의 재활성화 측면에서 미생물들의 장기 안정성을 도모하기 위한 미생물 전달매체 및 제형화제의 선별과 제형화 기법의 기초를 확립하였다.

### 참고문헌

1. 권기석, 윤병대, "Bioremediation 기술개발과 미생물의 역할" (1996), 생물산업, 9(3), 17-24
2. 박민규, "폐수처리용 미생물제재 제조방법" (1997), 대한민국 특허
3. 서형원, "미생물 전달매체 및 그 제조방법" (1997), 대한민국 특허
4. Fravel, D. R., Marois, J. J., Lumsden, R. D., and Connick, W. J. Jr., "Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix." *Phytopathology*, (1985), 75: 774-777
5. Renald R. P., "Internal gelation method for forming multilayer microspheres and product thereof." (1998), U.S patent
6. John G. Day, Mark R. McLellan, "Chyopreservation and Freeze-drying Protocols" *Methods in Molecular Biology*, (1995), 38