

Vermicomposting 조건에서 분리한 Phytase의 활성화와 인 함량에 미치는 영향

이주삼 · 배희동* · 박보라

연세대학교 생물자원공학과

Influences of Phosphorus Content and Phytase Activity from the Vermicomposting Environment

Lee Ju-Sam, Bae Hee-Dong* and Park Bo-Rha

Department of Biological Resources & Technology, Yonsei University

Summary

The effect of earthworm on the recycling or control of organic P in environment has been investigated. The activity of phytase(myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.8) produced by isolated microorganisms from vermicomposted cow manure was usually higher than that of phytase produced by isolated microorganisms from composted cow manure. However, the activity of phytase excreted by seperated earthworm(*Eisenia foetida*) was not detected. The concentration of total P and available P was revealed 2.88%, 0.22% in composted cow manure and 1.70%, 0.14% in vermicomposted cow manure.

(Key words : Organic P, Vermicomposting, Composting, Phytase)

서 론

최근, 축산업의 기업화 경향이 두드러짐에 따라 환경오염원으로서의 가축분뇨의 대량 발생을 유발하고 있다. 특히 분을 통한 환경 내로의 인의 배설은 토양이나 수중 부영양화의 원인 가운데 하나로 세계적인 공해문제로 대두되고 있다. 우리 나라의 연간 가축분뇨 발생량은 약 43,375천 톤 정도로 추정되고

있기 때문에 막대한 량의 가축분뇨의 처리를 위한 환경 친화적인 처리방법의 모색이 시급하다(축산기술연구소, 1997).

사료 내의 인은 주로 phytate (myo-inositol hexaphosphate)에 Ca, Mg, Fe, Zn 등이 결합된 유기인 형태로 존재한다. 그러나 대부분의 가축은 불용성 유기태 인을 가용성 인으로 전환하는 가수분해효소인 phytase(myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase, EC

* 경기도청 경제투자관리실(Economy & Investment Management Office, Kyonggi Provincial Government)

3.1.3.8)의 활성도가 낮아 다량의 인을 대부분 불용성의 형태로 배설하고 있다. 특히, 돼지 및 가금류와 같은 단위동물의 경우 섭취 인의 60% 이상이 분으로 배설되고 있다. 또한 하수처리 시 사용되는 석회질 역시 슬러지 중 불용화 인의 증가원인이 되므로, 가축분 및 슬러지를 그대로 퇴비화 할 경우 인을 비롯한 불활성 무기원소의 축적이 증가되어 토양개량 및 식물에 의한 이용효율의 저하를 유발할 우려가 있다.

최근에는 phytase를 생산하는 미생물을 가축에게 직접 급여(DFM, direct fed microbes) 함으로써 사료효율의 증대와 인의 배설량을 감소시키려는 노력이 이루어지고 있다 (Sebastian 등, 1996). Phytase는 대부분의 식물 종자와 밀기울, 동물의 간과 혈액, 효모, *Aspergilli*, *Escherchia coli*, *Bacilli* 등 토양을 비롯한 자연계에 널리 분포하고 있다 (Carvalier-Smith, 1989; Rossman, 1994).

Vermicomposting은 지렁이에 의한 분해와 생산기능을 이용하여 퇴비화의 효율을 극대화시킨 유기성 폐기물의 처리 방안이다(李 등, 1992; 이, 1995). 따라서 vermicomposting에 의하여 가축분뇨 및 하수 슬러지 등을 처리하고자 할 경우, 유기물의 효과적인 감량과 유해원소의 부분적 제거 외에도 환경으로 배출되는 인의 이용 및 제어에 미치는 지렁이의 역할을 평가하는 것은 유기성 폐기물의 처리와 관련하여 중요한 의미를 지닌다.

지렁이가 토양 내 유기태 인에 미치는 영향에 관한 연구는 지렁이의 배설물인 분립(cast) 중의 유효인 함량이 표토에 비하여 5~10배 이상 증가한다고 알려진 이후, 유효인 증가의 원인을 규명해 왔다. 지렁이에 의한 인산가수분해효소의 활성 촉진은 크게 두 부분으로 나눌 수 있다. 하나는 육탄당 등의 필수영양인자를 저장하기 위한 수단외 일종으로 인산화 육탄당(phosphorylated hexose)의 탈인산화 작용에 이용하기 위하여 지렁이 체

내에서 직접 효소를 분비하는 경우로 지렁이의 장관 미부(*Pheretima hawayana*), 전립선(*Eutyphoeus waltoni*), 정낭(*Barogaster* 속), 맹장상피(*Barogaster* 속, *Pheretima posthuma*, *Lumbricus castaneus*) 등에서 분비되는 것이 관찰되었다(Haase, 1969; Van Gasen, 1960). 다른 하나는 지렁이에 의해 미생물 수가 증가됨에 따라 인산가수분해효소의 분비율이 높아지는 경우이다. 실제로 Parle(1963)은 지렁이의 장관과 분립의 미생물 상은 토양으로부터 유래하나, 총균수는 토양에 비해 유의하게 증가한다고 보고하여 이를 뒷받침하였다. 그러나 근래에는 지렁이에 의해 증가된 유효인산 함량이 식물생장을 촉진한다는 지금까지의 연구결과에 대한 반론도 제기되고 있다. Casalicchio와 Graziano(1987)는 고품체기물의 퇴비화 실험결과, 지렁이를 도입한 처리구의 유효인산 함량은 대조구와 유의한 차이가 없었으며 오히려 감소하는 경향을 나타내었다고 하였다.

이상의 견지에서 본 연구에서는 환경으로 배출되는 유기태 인을 제어함으로써 안전한 퇴비를 생산하고자 하는 생물학적 처리방법의 일환으로서 vermicomposting의 이용가능성을 제시하기 위하여 지렁이가 우분내 phytase-생성균의 활성과 인의 함량에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시 지렁이 및 배양

공시 지렁이는 우리나라에서 자생하는 줄무늬 지렁이(*Eisenia foetida*)를 사용하였다. 2개의 비이커에 우분 1kg을 각각 충전한 후, 25마리의 지렁이(개체당 평균 생체중 약 0.8g)를 도입한 처리구와 지렁이를 도입하지 않은 무처리구로 나누어 25℃ incubator에서 30일간 사육하였다.

2. 미생물의 분리

채취한 시료는 생리식염수에 현탁, 희석하여 nutrient agar plate에 분주하고 37°C, 16시간 배양하였다. 서로 다른 단일 colony를 형성하는 균주를 분리하여 L.B. 조성bruth(10g Bacto-trypton, 5g Bacto-yeast extract, 5g NaCl, and 2.5g glucose per liter)에서 계대배양(3 times, 16 hr.)한 후, phytase 분석 시까지 glycerine에 첨가 후 냉동 보관하였다.

3. 분리한 미생물의 phytase 역가 분석

보관된 균주를 다시 배양한 후, 원심분리(13,500 rpm, 5 min, 4°C)하여 상등액과 cell로 구분하였으며, 상등액은 exo-cellular enzyme 용액으로 이용하였고 침전된 cell은 endo-cellular enzyme 용액으로 사용하기 위하여 0.05M sodium acetate buffer(pH 5.5)를 첨가, 현탁한 후, 재 원심분리(13,500 g, 5 min, 4°C)하였다. 채취한 cell은 sonication(5 min)하여 enzyme를 추출하였으며 원심분리 후 상등액을 phytase 분석용 시료로 사용하였다.

또한 지렁이에 의한 phytase 활성을 검토하기 위하여 처리구에서 채취한 지렁이를 whole worm, skin, intestine의 3분획으로 나누었다. 각각의 분획을 homogenization한 후, 0.05M sodium acetate buffer(pH 5.5)를 1:1 (v/v) 비율로 혼합하여 원심분리(13,500 g, 5min, 4°C)한 상등액을 지렁이의 crude enzyme 용액으로 사용하였다.

4. Phytase 활성 측정

Phytase의 활성은 ortho-phosphate의 함량을 측정하였다. 일정비율로 희석한 0.15ml의 enzyme용액에 0.6ml의 substrate용액(0.2% sodium phytate in 0.05M sodium acetate buffer, pH 5.0 containing 0.01% NaN₃)을 넣고

37°C water bath에서 30분간 반응시킨 후, 0.75ml의 5% TCA 용액을 가하여 반응을 정지시켰다. Blank는 enzyme 용액에 TCA 용액을 넣어 효소를 불활성화시킨 다음, 기질용액을 첨가하였다. 5분간 방치 후, 1.5ml의 colouring reagent(4:1 ratio of 1.5% ammonium molybdate solution in 5.5% sulfuric acid/2.7% ferrous sulfate solution)를 가하여 발색시킨 후, 700nm에서 흡광도를 측정하였다.

Phytase 1 unit는 30분당 기질(Na-phytate)로부터 유리된 ortho-phosphate 1μ mole ml⁻¹로 하였으며 반응조건은 pH 5.0 및 반응온도 37°C였다. Specific activity는 단백질 1mg을 기준으로 phytase activity를 계산하였으며, relative activity는 가장 높은 total activity를 나타낸 처리구를 100으로 하여 산출하였다.

5. 단백질 정량

미생물의 미량 단백질 함량을 정량하기 위하여 Bradford(1976)의 방법을 이용하였다. Human albumin(Sigma Chem Co.)을 표준시료로 하였으며 Sigma Diagnostics Micro-Protein Determination kit를 사용하여 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 균주의 동정

분리, 선별한 균의 동정은 형태학적, 생화학적인 성질을 검토하여 Bergey's Manual of Determination Bacteriology(Holt 등, 1994)에 제시되어 있는 방법에 준하여 수행하였다.

7. 인의 정량

지렁이를 도입한 처리구와 도입하지 않은 무처리구 각각의 총인(Total P₂O₅)과 유효인(Available P₂O₅)의 함량을 측정하였다. 총인의 함량은 바나드몰리브덴산암모늄비색법을,

유효인의 함량은 Lancaster 법(농촌진흥청, 1997)을 이용하였다. 모든 실험은 처리 당 3 반복하였다.

결 과

1. Phytase의 활성 측정

지렁이(EW1-9), vermicomposted cow manure (CT1-8)와 composted cow manure (SO1-8)에서 순수 분리한 미생물의 exo- 및 endo-cellular phytase의 활성 측정결과를 Table 1과 2에 각각 나타내었다.

Exo-cellular phytase의 활성은 EW-3,9, CT-2,4,5, SO-2,3,5 균주를 제외하고는 확인되지 않았다. Composted cow manure(무처리구)에서 분리한 균주의 exo-cellular phytase는 vermicomposted cow manure(처리구)와 지렁이로부터 분리한 균주에 비해 약간 높거나 비슷한 활성을 보였다. 가장 높은 활성을 나타낸 균주는 지렁이에서 분리한 EW-3(44.28 μ mole \cdot ml⁻¹)이었다.

Endo-cellular phytase의 활성은 분리한 모든 균주에서 확인되었으며, 무처리구에 비해 지렁이와 처리구에서 분리한 균주의 효소활성이 비교적 높은 경향을 보였다. 가장 높은 활성을 나타낸 균주는 CT-3(139.0 μ mole \cdot ml⁻¹)이었고, 가장 높은 specific activity를 나타낸 것은 CT-2(1138.77 μ mole \cdot ml⁻¹)이었으며, 두 균주 모두 vermicomposted cow manure에서 분리한 것이었다. 또한 지렁이 체내에서 직접 분비되는 phytase 활성을 측정하기 위하여 지렁이를 whole- worm, skin, intestine의 3분획으로 나누어 실험하였으나, 유의할 만한 효소활성은 확인되지 않았다.

2. Phytase 생성균주 동정

Exo- 및 Endo-cellular phytase 활성에 있어

Table 1. Investigation for the exo-cellular phytase producing microorganisms isolated from three different sources(earthworm *Eisenia foetida*, vermicomposted and composted cow manures)

Isolate	Content	
	Unit(Ortho-phosphate, μ mole \cdot ml ⁻¹)	Relative activity (%)
EW ¹⁾ - 1	N.D ⁴⁾	-
- 2	N.D	-
- 3	44.28	100
- 4	N.D	-
- 5	N.D	-
- 6	N.D	-
- 7	N.D	-
- 8	N.D	-
- 9	33.15	75
CT ²⁾ - 1	N.D	-
- 2	18.17	41
- 3	N.D	-
- 4	29.93	68
- 5	0.39	0.8
- 6	N.D	-
- 7	N.D	-
- 8	N.D	-
SO ³⁾ - 1	N.D	-
- 2	12.93	29
- 3	35.29	80
- 4	N.D	-
- 5	28.67	65
- 6	N.D	-
- 7	N.D	-
- 8	N.D	-

^{1,2)} and ³⁾ were isolates obtained from earthworm *Eisenia foetida*(EW), vermicomposted(CT) and composted cow manure(SO), respectively.

⁴⁾ ND: not detected.

Table 2. Investigation for the endo-cellular phytase producing microorganisms isolated from three different sources(earthworm *Eisenia foetida*, vermicomposted and composted cow manures)

Isolate	Content			
	Unit(Ortho-phosphate $\mu\text{mole} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Protein $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Unit(Specific activity $\mu\text{mole} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Relative activity ¹ %
EW - 1	54.8	0.23	236.41	39
- 2	26.3	0.03	1029.30	19
- 3	51.9	0.22	239.19	37
- 4	45.6	0.24	191.17	33
- 5	37.9	0.06	583.97	27
- 6	43.9	0.07	610.00	32
- 7	29.4	0.07	395.86	21
- 8	48.4	0.13	367.67	35
- 9	52.1	0.14	348.83	37
CT - 1	112.3	0.28	399.91	81
- 2	70.4	0.06	1138.77	51
- 3	139.0	0.20	694.21	100
- 4	61.4	0.23	262.05	44
- 5	28.8	0.07	425.30	21
- 6	54.5	0.09	612.47	33
- 7	4.60	0.14	333.74	33
- 8	1.6	0.27	6.03	1
SO - 1	89.0	0.29	304.51	64
- 2	1.4	0.29	4.57	1.02
- 3	33.7	0.12	276.86	24
- 4	33.6	0.12	892.86	24
- 5	59.7	0.16	369.07	43
- 6	28.1	0.20	138.00	20
- 7	32.9	0.05	640.66	24
- 8	38.6	0.07	548.10	28

¹ Calculated by based on total activity.

서 가장 높은 활성을 나타낸 EW-3와 CT-3의 생화학적 특성은 Table 3과 같다.

EW-3과 CT-3 동정균주로 선발하여 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 에 준하여 실험한 결과, EW-3은 *Micro-*

bacterium sp.와 CT-3은 *Corynebacterium* sp.의 특성과 일치하였다. 그러나 가장 높은 specific activity를 나타낸 CT-2는 미생물의 성장속도가 상대적으로 느리고 단백질 양이 적어 동정균주로 선발하지 않았다.

Table 3. Characteristics of isolates EW-3 and CT-3

Characteristics	Isolates	
	EW - 3	CT - 3
Color of colonies	yellow-white	white
Cell shape	rod	rod
Gram staining	+	+
Spore forming	-	-
Motility	+	-
Growth in anaerobic condition	+	+
Survive heating at 65°C for 30min.	+	+
Enzyme activity of catalase	+	+
Acid from		
glucose	-	-
xylose	-	-
sucrose	-	+

3. Composted- 와 vermicomposted cow manure 간의 인의 함량 비교

Composted cow manure(무처리구)와 vermicomposted cow manure(처리구)간의 총 인 및 유효인의 함량을 측정하였다. 무처리구의 총 인과 유효인의 함량은 각각 2.88%와 0.22% 이었으며, 처리구에서는 1.70%와 0.14%의 함량을 나타내어 무처리구에 비해 총 인은 약 41.0%, 유효인은 약 36.4% 정도 감소하는 경향을 보였다.

고 찰

유기태 인은 가축분을 통해 환경 내로 다량 배설되어 토양 및 수중 부영양화의 주원인이 되고 있다. 이를 제어하는 환경친화적 처리법의 일환으로서 vermicomposting의 이용 가능성을 검토하기 위하여 지렁이, vermi-

composted cow manure(처리구) 및 composted cow manure(무처리구)에서 분리한 미생물과 지렁이 체내에서 분비되는 phytase의 활성을 각각 측정하였다. 미생물의 exo- 및 endocellular phytase의 활성을 측정한 결과, exocellular phytase는 지렁이, 처리구 및 무처리구 간에 비슷한 활성을 나타내었으며, endocellular phytase는 대체적으로 지렁이와 처리구에서 분리한 균주의 효소활성이 무처리구에 비해 높았다(Table 1, 2). 또한 지렁이를 whole worm, skin, intestine의 3 분획으로 나누어 각각에서 분비되는 phytase 활성을 측정한 결과, 유의할만한 효소활성은 확인되지 않았다.

Satchell과 Martin(1984), Satchell 등(1984)은 *Eisenia foetida*를 대상으로 인산효소의 활성을 측정한 결과, pH 3-5와 pH 9-10에서 가장 높은 활성을 나타낸 것은 미생물의 활동과 알칼리성 인산효소 때문이라고 하였으며, 알칼리성 인산효소 역시 장내미생물에 의하여 생산된다는 가능성을 배제할 수 없다고 하였다. 본 실험의 결과에서는 대체적으로 composted cow manure에 비해 vermicomposted cow manure의 phytase 활성이 높았으며, 지렁이에서 분리한 미생물에서는 효소의 활성이 확인되었던 반면에 지렁이 체내에서 분비하는 효소의 활성은 극히 미미하였다. 즉, vermicomposting으로 처리한 우분내 인산가수분해효소의 활성이 촉진되는 것은 지렁이에 의한 간접적인 영향의 결과로, 미생물의 활성이 증대하였기 때문으로 판단된다(Ross와 Cairns, 1982).

지렁이가 배설한 분립의 유기인의 함량은 하층토양에 비해 증가되나 특히, 분으로 배출되는 총 인의 함량은 지렁이가 섭취하기 이전의 유기체가 함유하고 있는 인의 함량보다는 적었다(Bahl, 1947). 이는 토양의 비옥도 증진 및 식물체 생육을 촉진하기 위한 목적으로 지렁이의 분립을 사용할 수 있다는 사

실을 제시할 뿐만 아니라, 환경으로 배출되는 인의 함량을 감소시키기 위한 생물학적 처리방법의 하나로서 **vermicomposting**이 고려될 수 있다는 가능성을 시사하는 것으로 판단된다. 지렁이가 환경내 인의 함량에 미치는 영향을 검토하기 위하여 지렁이를 도입하지 않은 무처리구와 도입한 처리구의 총인과 유효인의 함량을 측정본 실험의 결과, 지렁이를 도입하여 처리한 우분이 무처리구에 비해 총인은 약 41.0%, 유효인은 약 36.4% 정도 감소하였다. 이는 지렁이의 성장 및 대사유지에 필요한 가용성 인의 요구량이 증가함에 따라 체내 인산가수분해효소의 활성이 극히 낮은 지렁이가 우분 내 유기태 인을 이용하기 위해서는 미생물과의 공생관계를 형성할 필요가 있었기 때문인 것으로 생각된다. 따라서 지렁이의 활동에 의하여 미생물의 증식이 촉진되면서 우분 내 인의 이용을 가속화하였을 것으로 판단된다. 그러나 좀더 정확한 결론을 얻기 위해서는 이후에 지렁이의 무기질 대사 및 인 요구량에 대한 연구를 비롯하여 지렁이와 미생물간의 공생관계에 대한 명확한 규명이 이루어져야 할 필요가 있다고 생각된다.

적 요

지렁이, **vermicomposted cow manure**(처리구)와 **composted cow manure**(무처리구)에서 각각 순수 분리한 미생물의 **exo-** 및 **endo-cellular phytase**의 활성을 측정하고 처리구와 무처리구 간의 인의 함량을 비교함으로써 지렁이가 우분 내 인산가수분해효소의 활성과 인의 함량에 미치는 영향을 검토하였다.

1. 미생물의 **exo-cellular phytase**의 활성은 EW-3,9, CT-2,4,5, SO-2,3,5 등에서만 확인되었으며 지렁이, 처리구와 무처리구 간에는 비슷한 활성을 보였으나 가장 높은 활성을 나타낸 균주는 지렁이에서 분리한 EW-3이었

다.

2. 미생물의 **endo-cellular phytase**의 활성은 모든 균주에서 확인되었고 지렁이와 처리구에서 분리한 균주의 효소활성이 무처리구에 비해 비교적 높은 경향을 보였으며 가장 높은 활성을 나타낸 균주는 처리구에서 분리한 CT-3이었다.

3. 가장 높은 **phytase** 활성을 나타낸 EW-3과 CT-3균주는 각각 *Microbacterium* sp.와 *Corynebacterium* sp.인 것으로 확인되었다.

4. **Vermicomposted cow manure**의 총 인과 유효인의 함량은 **composted cow manure**에서 보다 약 41.0%, 36.4% 정도 각각 감소하였다.

인 용 문 헌

1. Bahl, K. N. 1947. Excretion on the Oligochaeta. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 22:109-127.
2. Bradford, M. 1976. A refine and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-253.
3. Casalicchio, G. and Graziano, P. L. 1987. A comparison of chemical properties of compost and wormcasting from solid municipal waste sewage sludge. On earthworm. A.M. Bonvicini Pagliai & P. Omodeo(eds.). Selected Symposia and Monograph U. Z. I., 2, Mucchi, Modena. p. 437-457.
4. Haase, E. 1969. On histophysiology of the intestine of the earthworm(English abstract). *Zoologischer Anzeiger.* 33:535-539.
5. Holt, J. G., Liston, J., Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., Cowan, S. T., Murray, R. G. E., Niven, A. W. and Stanier, R.

- Y.(Eds). 1994. Bergey's Manual of Determination Bacteriology. 9th ed. William and Wilkins Co., Baltimore, Maryland.
6. Parle, J. N. 1963. Micro-organisms in the intestines of earthworm. *J. Gen. Microbiol.* 31:1-11.
 7. Ross, D. J. and Cairns, A. 1982. Effects of earthworm and ryegrass on respiratory and enzyme activities of soils. *Soil Biol. Biochem.* 14:583-587
 8. Satchell, J. E. and Martin, K. 1984. Phosphatase activity in earthworm faeces. *Soil Biol. Biochem.* 16(2):191-194.
 9. Satchell, J. E., Martin, K. and Krishnamoorthy, M. 1984. Stimulation of microbial phosphatase production by earthworm activity. *Soil Biol. Biochem.* 16(2):195-200.
 10. Sebastian, S., Touchburn, S. P., Chavez, E. R. and Lague, P. C. 1996. The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poultry Sci.* 75:729-236.
 11. Van Gansen, P. S. 1962. Structures and function of the digestive tract of the lumbricid *Eisenia foetida* Savigny. *J. Microscopy.* 1:363-368.
 12. 농촌진흥청. 1997. 시료채취 및 비료검사법. 농촌진흥청
 13. 李柱三, 鄭在春, 曹益煥. 1992. 제지 슬러지와 우분의 혼합비율이 붉은 지렁이의 생육과 분립의 화학적 조성에 미치는 영향. 한국폐기물학회지 9(2):19-26.
 14. 이주삼. 1995. Vermicomposting에 의한 우분의 처리. - 먹이의 탄질율과 사육밀도가 지렁이의 생육과 분립생산에 미치는 영향. 한국축산시설환경학회지 1(1):65-75.
 15. 축산기술연구소. 1997. 새로운 가축분뇨처리기술. 농촌진흥청.