

Candida rugosa CY-10의 접종에 따른 돈분배양액내 악취저감 효과에 관한 연구

김태일 · 정광화 · 전병수 ·곽정훈 · 최희철 · 박주희 · 양창범 · 한정대 · 유용희 · 김민균*
농촌진흥청 축산기술연구소

Effects of the Inoculation of *Candida rugosa* CY-10 on the Reducing Odours in Pig Slurry Medium

Kim T. I., Jeong K. H., Jeon B. S., Kwag J. H., Choi H. C., Park J. H., Yang C. B.,
Han J. D., Yoo Y. H. and Kim M. K.*

National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-350, Korea

Summary

This study was carried out to isolate and identify the yeasts from the the composts, which were effective to reduce odor of the pig feces, and to investigate their physiological properties. In yeasts, one of 30 isolates was obtained on 10% pig feces extract medium. Judging from the morphological and biochemical characteristics, the CY-10 isolated from the compost were identified as *Candida rugosa*. This isolated strain showed the deodorizing activity by reducing the concentration of NH₃ and R-NH₂ than that of the control. The CY-10 had completely utilizing butyric acid and iso-butyric acid including 10% pig slurry of the volatile fatty acids, which are the specific malodorous agents of pig feces. Compared to control, this yeast was found effective for decrease in NH₄-N, Soluble-N and BOD, 20%, 12.6%, and 9.82% respectively.

(Key words : Pig slurry, Deodorization, Yeast, *Candida* spp.)

서 론

가축분뇨의 자원으로의 활용을 위해서 주로 퇴비가 이루어지고 있다. 축분의 퇴비화를 통해 토양의 지력 및 작물의 영양원으로 공급하게 된다. 퇴비로 이용시 토양의 물리화학적, 미생물상이 개선되며 화학비료의

대체에 따른 농가생산비를 절감시킬 수 있으며 환경조화형 농업을 유도할 수 있다. 그러나 이러한 일련의 퇴비화 공정중에 발생하는 난분해 물질의 분해 지연 및 악취발생은 커다란 난제로 대두되고 있기 때문에 이를 해결하고자 많은 노력을 기울이고 있으나 최선의 대안을 마련하지 못하고 있는 실정이다. 농

* 서울대학교 농생대 응용생물화학부(Division of Applied and Chemistry, School of Agricultural Biotechnology Center for Plant Molecular Genetics and Breeding Research, College of Agriculture and Life science, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea)

경지에서 발생하는 악취의 주원인은 가축분뇨의 생산, 처리 및 시용 등에 의하며, 이는 농후사료의 사용과 경지면적 당 사양두수의 증가로 더욱 심각해지고 있다^[23]. 악취의 생성은 가축 분의 저장기간 중 가축분에 함유되어 있는 난분해 물질인 섬유소와 영양소 및 함유황 유기물질 등이 분해될 때 생성된다. 이로 인하여 신선한 농경지 주위의 민가에까지 영향을 미쳐 악취로 인한 분쟁이 생기게 되며 때로는 곤충류가 번식하여 위생상 좋지 않은 영향을 미치기도 한다. 특히 돼지 분뇨는 악취가 심하게 발생되며 주된 악취성분은 합질소 유기물로부터 이산화질소, 아민 및 암모니아가 발생되며 함유황 유기물로부터 황화수소, 메틸메르 카탄, 에틸설파이드 등이 발생되고 탄소화합물로부터 휘발성 지방산류 등이 발생된다^[2,6,17]고 보고되고 있다. 이러한 악취를 제거하기 위한 방법으로는 물리적 방법, 화학적 방법, 생물학적 방법 등 여러 방법이 활용되고 있다.

축분뇨로 배출되는 질소화합물의 양을 줄임으로써 돈분슬러리에서 발생하는 악취를 제어하고자 하는 연구를 수행하였으며^[9], 미생물을 이용하여 악취를 제어하고자 노력하였다^[10,15,19]. 악취성분을 분해하는 미생물을 이용하는 경우 그 미생물의 무취화 조건이나 미생물의 성질에 따라 돈분의 악취감소능이 다르다. 이들을 처리할 수 있는 미생물로 세균으로는 *Corynebacterium* spp^[14], *Micrococcus* spp, *Flavobacterium* spp^[20], *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp, *Pseudomonas* spp.^[17] 등이 있으며, 방선균으로는 *Streptomyces* spp^[12], *Actinomycetes* spp^[22] 등, 곰팡이로는 *Mucor* spp, *Copinus* spp, *Helminthosporium* spp^[21]. 등이 악취효과가 있다고 하였다. 또한 효모를 이용하여 계분의 악취를 감소시켰다고 하였다^[10,16].

이처럼 돈분에서 발생하는 악취를 제어하는 미생물의 이용은 증가하고 있으나 이들

미생물에 대한 연구가 미비한 상태이며 국내에서는 악취저감능을 가진 효모에 대한 보고가 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 돈분 완숙 퇴비시료에서 분리한 효모를 이용하여 돈분의 악취저감능과 그의 특성을 조사하여 악취유용 미생물에 관한 기초자료를 얻고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주의 분리

퇴비시료를 Malt extract Agar 평판배지에 도말한 후 28℃에서 배양하면서 3일후 콜로니가 구형이고, 점질성이 없으며, 백색 또는 황색의 은은한 광택을 가진 것을 검경하여 효모임을 확인한 후 분리하였다. 발견된 효모는 MEA(Malt extract Agar) 또는 PDA(Potato Dextrose Agar) 평판배지에 옮겨 순수 분리 하였다^[5,24].

2. 유용균주의 선발

분리된 균주는 10% 돈분배지에 접종하여 돈슬러리 평판배지(돈분을 거즈로 이용하여 여과한 후 한천분말(Agar power) 1.5%가 되게하여 굳게 한 후 도말하여 28℃에서 3일간 배양하여 생육이 빠른 균주를 악취유용 균주로 선발하였다^[14].

3. 분리균주의 동정

균주의 동정은 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 Kreger-Van Rji^[10]의 방법에 준하여 조사하였고 악취저감능이 있는 효모는 형태학적 조사 및 SDA 성장, Corn meal-tween 80 agar에서 성장, dextrose, lactose, sucrose, galactose, threhalose, melobiose의 이용 등 생화학적 특성을 조사하여 동정하였다^[3, 4].

4. 생균수 및 배양액의 pH 조사

10% 돈분액체 배지 500ml에 효모를 최종 농도 1%(V/V)되게 접종하여 정치배양하면서 정치 배양 후 1일령부터 9일령까지 매일 시료를 채취하여 Malt extract agar(Difco, co)배지에 도말한 후 28℃에서 3일간 배양 후 효모집락을 계수하여 효모균수로 하였다. pH를 측정하기 위해서 균이 접종된 10% 돈분액체배지 10ml를 채취하여 pH 측정기(Model 125, Corning Co.)를 이용하여 pH를 측정하였다.

5. 약취 분석

가. 약취제어능 측정

10% 돈분 유출액 배지를 이용하여 가스검지관(Gastek Co., Japan)을 이용하여 암모니아, 아민류, 황화수소, 이산화탄소, 메틸메르캡탄 등의 농도를 측정하였다. 대조구는 분리균주를 접종하지 않고 처리구와 동일한 조건으로 배양하여 조사하였다.

나. 휘발성 지방산의 측정

배양액시료 10g을 채취하여 10,000rpm에서

20분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 2N-HCl 5ml를 첨가하여 다시 10,000rpm 20분간 원심 분리시킨다. Separator funnel에서 상층액 3ml를 채취하고 3ml ethyl ether (chilled)를 첨가하여 충분히 분리시킨 다음 -20℃에서 4시간 저장한 후 diazomethane을 이용하여 methylation시킨 후 휘발성 지방산 분석에 이용하였다^[11]. Table 1은 GC조건을 나타낸 것이다.

6. 배양액의 BOD, 질소화합물 분석방법

BOD는 배양시료 10g를 채취하여 standard methods for the examination of water and wastewater^[12]에 따라 분석하였으며, 상기시료의 soluble-N, NH₄-N 등은 AOAC 방법^[13]에 따라 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 효모의 선발 및 동정

약취관련물질을 제어할 수 있는 효모를 선발하기 위하여 퇴비시료를 1% peptone soln.에 넣어 10분간 진탕한 후 Malt extract agar 배지에 평판도말한 다음 28℃에서 3일간 배양한 후 자란 30균주를 분리하였다. 분리된

Table 1. Instrumental conditions of gas chromatography for determination of volatile fatty acids

Items	Condition
Column	Polyethylene glycol 1500
Detector	FID
Column Temp.	35℃ - 120℃(Raised at 4℃ /min)
Inject temp.	140℃
Detector temp.	140℃
Flow rate(Carrier)	H ₂ 40 ml/min. Air 1,000 ml/min. N ₂ 25 ml/min.

단독 균주를 10% 돈분배지에 streaking하여 28℃ 72시간 배양하여 돈분배지에서 성장이 빠른 균주는 일단 약취유용 미생물로 간주하여 퇴비에 적응성이 있으며 약취에 유용성이 매우 큰 균주로서 CY-10를 선발하였으며 이의 형태학적 특성을 조사한 결과 Malt extract agar배지에서 난형 또는 장원형이며 검경결과 구형의 영양세포만 관찰되어 전형적인 효모형태였으며 생리, 생화학적 특성들을 조사하였다^{3, 4}. 그 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 CY-10은 galactose와 glucose, adonitol 등을 대사하는 능을 가졌으며 *Candida rugosa* (Fig. 1)로 동정되어 본 실험에서는 *Candida rugosa* CY-10으로 명명하였다.

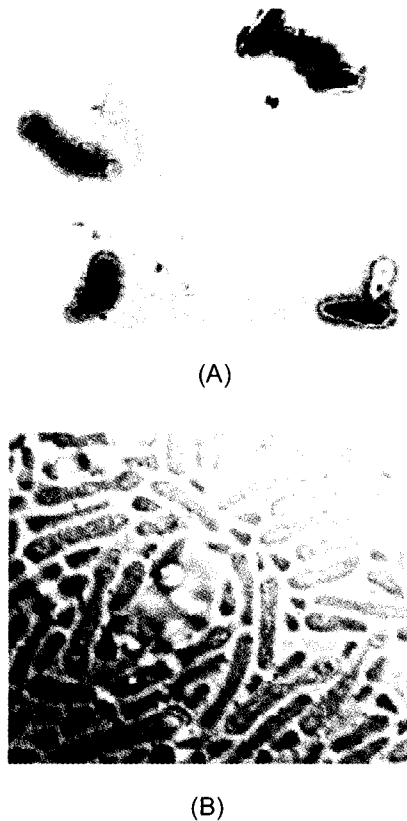


Fig. 1. Vegetative cells(A) and Phase contrast (B) on Tween 80 -Corn meal agar (at X 1,000 magnification).

Table 2. Biological and physiological characteristics of the isolated yeast

Characteristics	Strain	CY-10
Color		White
Shape		Yeast-like
Glucose		+
Galactose		+
Lactose		+
Sucrose		+
Maltose		+
Cellobiose		-
a-Methyl-D-Glucose		+
Xylose		+
Arabinose		-
Trehalose		+
Melezitose		-
Raffinose		-
N-Acetyl-D-Glucosamins		-
Xylitol		+
Ducitol		-
Adonitol		+
Palatinose		-
Glycerol		+
Sorbitol		+
Erythritol		+
Melibiose		-
Inositol		-
At 37℃		+
0.1% Cycloheximide		-
Potassium nitrate		-
2-Keto-D-Gluconate		-
Urea		-
Genus		<i>Candida rugosa</i>

2. 효모의 성장곡선 및 pH 변화

선발된 효모 CY-10를 10% 돈분배지에 10^2 cfu/ml 되게 초기 접종하여 28℃에서 배양하면서 성장을 조사하였다. CY-10은 배양기간 동안 서서히 증가하여 배양기간 9일째에 ml 당 10^6 cfu가 되었다(그림 2 참조). 효모의 성장기간 중 pH의 변화는 초기 pH 8.15~8.18에서 배양 후 무침가구와는 크게 차이가 없이 낮아졌으나 CY-10의 경우 배양 후 9일 후 급속히 낮아져 pH가 6.9가 되었다. 이는 통상적으로 효모가 약산성에 양호한 생육을 나타내지만 선발된 균주는 약 알카리에서도 양호한 생육을 나타내는 특징을 가지고 있었다.

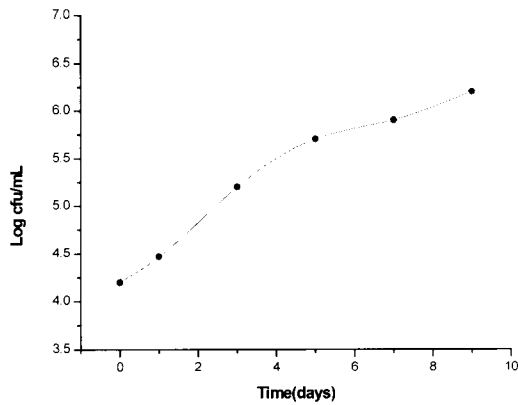


Fig. 2. Changes in microbial number during the incubation of the CY-10 treatment of 10% pig feces.

3. 악취성분 분석

가. 가스검지관을 이용한 분석

선발된 균주를 10% 돈분슬러리 액체배지에 접종하여 30℃에서 72시간 배양한 후 가스검지관을 이용하여 암모니아, 아민류, 이산화탄소, 황화수소, 메틸메르캡탄 등의 농도를 측정하였다. 이들 효모의 특징은 무침가구에 비해 이산화탄소는 많이 발생되며, 반면 암

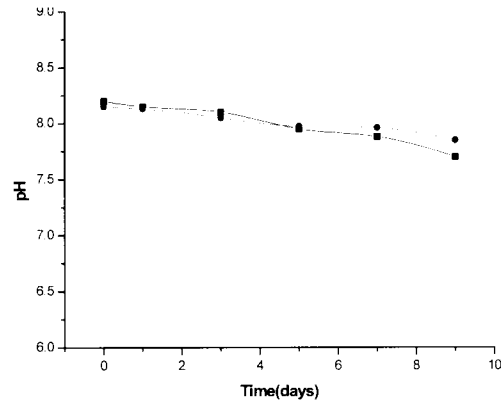


Fig. 3. Changes in pH during the incubation of the CY-10 treatment of 10% pig feces. Symbols ■; Control ●; CY-10.

모니아와 아민류의 발생은 감소시키는 경향을 나타냈다. 또한 황화수소나 메틸메르캡탄 가스는 검출되지 않았다(Table 3).

나. Gas chromatography 분석

CY-10이 접종된 돈분 슬러리내 휘발성지방산을 조사한 결과가 Table 4에 제시되었다. CY-10은 무침리구에 비해 acetic acid를 3.073 mM로 54.03%, propionic acid 0.786mM로 74.15%, iso-butyric acid와 butyric acid는 100% 감소하였으며, iso-valeric acid는 0.275 mM로 78.26% 감소하는 결과를 나타내었다. 따라서 본 시험에서 분리 동정한 *Candida rugosa* CY-10는 뷰틸산류를 특이적으로 유용하는 효모인 것으로 나타났다.

축산농가에서 발생하는 악취오염의 주된 성분은 n-butyric acid, iso-butyric acid, n-valeric acid, iso-valeric acid 등의 휘발성 지방산이라고 하였다¹⁸⁾. 이는 축산분뇨내의 휘발성 지방산은 주로 유기물의 혐기적 분해과정에서 발생하며 주요한 악취성분으로 다루어지고 있는데 이들 지방산은 호기성미생물에 의한 산화과정에 의해 탄산가스의 무취성분으로 분해되어 악취의 감소가 일어난다고 하

Table 3. Concentration of malodorants by deodorant microorganism in the 10% pig slurry by addition of *Candida rugosa* CY-10

(unit : ppm)

Strain \ Malodorants	NH ₃ (<30)	R.NH ₂ (5-100)	CO ₂ (300-5,000)	H ₂ S	CH ₂ SH
Control	2.5	6	1,400	N.D	N.D
CY-10	<2	4	5,000	-	-

CY : Compost yeast, N.D *: Not detectable

Table 4. Utilization of volatile fatty acids by *Candida rugosa* CY-10 in the 10% pig slurry medium

(unit : mM)

Sample \ VFA	Acetic acid	Propionic acid	Iso-butyric acid	Butyric acid	Iso-valeric acid
Control	6.684	3.087	0.089	0.0315	1.267
CY-1	3.073 (54.03)	0.786 (74.15)	0 (100)	0 (100)	0.275 (78.26)

() * Reducing rate

였다^[9,12]는 유사한 보고를 얻을 수 있었다.

악취성분은 유기물의 분해에 의해서 주로 발생하는 암모니아, 황화합물, 인돌류, 휘발성지방산 등으로 불쾌감과 더불어 인축에 피해를 줄 수 있는데 이들 성분을 감소시키기 위해서는 호기성 미생물을 이용하여 신속히 유기물을 분해시킴으로써 가능하다는 보고^[18, 21]와 유사한 결과를 얻었다.

4. 배양액의 BOD, 질소화합물의 양적 변화

Candida rugosa CY-10의 배양기간 동안 암모니아태 질소, 수용성 질소 및 BOD 농도의 변화를 조사한 결과 암모니아태 질소는 무첨가구에 비해 20% 정도를 감소시켰으며 수용성질소의 경우는 배양기간동안 서서히 감소하여 배양 9일째에 12.6%가 무첨가구에 비해 감소되었다.

BOD는 무첨가구에 비해 첨가구가 배양기

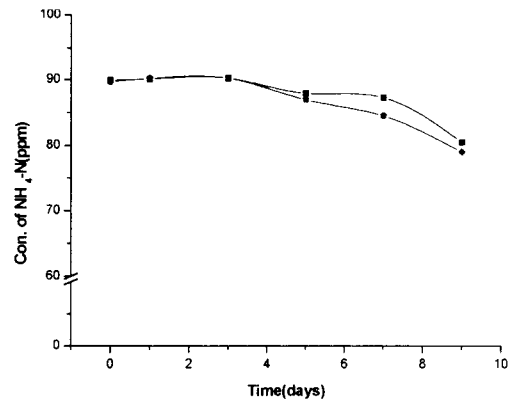


Fig. 4. Changes in NH4-N during the incubation of the CY-10 treatment of 10% pig feces. Symbols ■; Control ●; CY-10.

간동안 완만하게 감소하여 배양 9일째에 9.82%를 감소시켰다.

악취성분을 분해하는 미생물을 이용하는 경우 그 미생물의 무취화 조건이나 미생물의 성질에 따라 돈분의 악취감소능이 다르다.

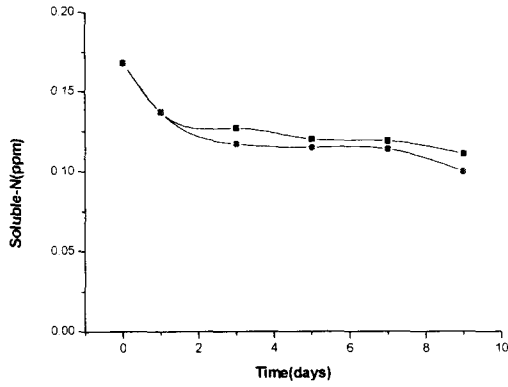


Fig. 5. Changes in Soluble-N during the incubation of the CY-10 treatment of 10% pig feces. Symbols ■; Control ●; CY-10.

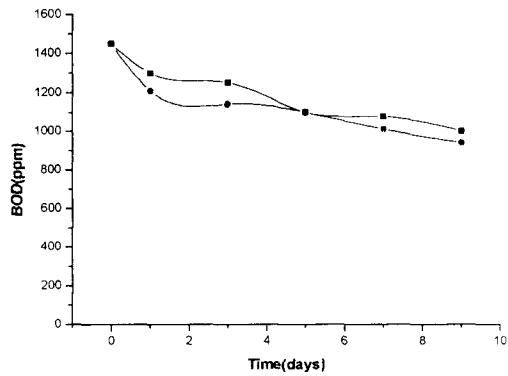


Fig. 6. Changes in BOD during the incubation of the CY-10 treatment. Symbols ■; Control ●; CY-10.

이들을 처리할 수 있는 미생물로 이처럼 효모를 이용한 돈분의 악취제어에 관한 연구는 첨가한 돈분 배지가 첨가하지 않는 배지에 비해 휘발성지방산의 농도가 현저하게 감소되는 경향을 보인 것은 미생물이 증식하면서 돈분내의 지방산을 분해하여 이용하였기 때문인 것으로 보인다. 이처럼 균주에 따라 지방산 감소 능력이 다른 것은 악취성분을 분해하는 미생물을 이용하는 경우 그 미생물의 무취화 조건이나 미생물의 특성에 따라 돈분의 악취감소능이 다르기^[13] 때문에 본 균주

와 상가작용을 하는 미생물군을 조합하여 악취저감능을 배가시킬 수 있는 여러 가지 조건에 대한 보다 다각적인 연구와 더불어 축분 퇴비화시 본 실험의 분리균주의 활용연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

IV. 적 요

본 연구는 돈분 완숙퇴비에서 돼지분뇨 악취제어 효과가 뛰어난 효모를 분리하고, 그들의 특성을 조사하여 악취미생물에 관한 기초자료를 얻고자 수행하였다. 10% 돈분배지에서 성장이 우수한 균주를 선발하고 10% 돈분액체배지에 접종하여 28℃ 72시간 배양한 후 가스검지관을 이용하여 암모니아와 아민류를 측정하여 이들에 대한 기질 선호성을 가진 효모를 악취유용 미생물로 CY-10을 선발하였다. 이의 형태적, 생화학적 특성에 따라 퇴비에서 분리한 CY-10은 *Candida rugosa*로 동정되어 본 시험에 공시로 *Candida rugosa* CY-10으로 하였다. 이의 악취저감능을 조사하기 위해서 돈분 액체배지에 성장시키면서 이들 배양액의 휘발성 지방산을 분석한 결과 대조구에 비해 CY-10의 경우 iso-butyric acid와 butyric acid를 100% 감소시켜 부틸산류에 기질특이성이 있는 것으로 나타났다. 또한 이의 처리구는 대조구에 비해 NH₄-N, soluble-N, BOD를 각각 20%, 12.6%, 9.82%를 감소시키는 효과가 있었다.

V. 인 용 문 헌

1. AOAC. 1980. In official method of analysis, 13th ed., Association of official analytical chemists, Washington D. C.
2. Babyish, H. and Stickly, G. 1978. Influence of pH on inhibition of bacteria, fungi, coliphages by bisulfate and sulfite. *Environ. Research.* 15:405-417

3. Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D. 1983. Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge University Press, London.
4. Davise H. L. 1995. Medically important fungi: A guid to identification. 3 ed. ASM press Washington, D. C.
5. Dindal, D. L. 1990. Soil sampling and methods of analysis. *Soil Biology Guide*. Wiley Interscience.
6. Doring, T. A. 1977. Measurement of odor intensity in farming situations. *Agri. Environ.* 3:109-120.
7. Greenberg, A. E. 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th Ed., American Public Health Association Inc., New York.
8. Hannano, T., Oka, Y., Takada, O. and Asano, T. 1972. Test of malodor composition in the feces of domestic animals, *Bull. Hyogo Prefect, Stan, Anim. Husbandry*, 9:140-145.
9. Higaki, S. 1970. Treatment of excrements of domestic animals. *Anim. Husbandry* 30: 119-124.
10. Kreger-Van Rij, N. J. W. 1984. The yeasts(a toxonomic study). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
11. Metcalfe, L. D. and Schmidt, A. A. 1961. The rapid preparation of fatty acids esters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.*, 33:277-284
12. Ohta, Y. and Ikeda, M. 1978. Deodorization of cattle feces by microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:487-491
13. Ohta, Y. and Kuwada, Y. 1988. Rapid deodorization of cattle feces by microorganims *Biol. Wastes*, 24:227-240.
14. Ohta, Y. and Sato, H. 1985. An artificial medium or deodorant microorganism, *Agri. Biol. Chem.*, 49:1195-1196.
15. Olga, Fassatiova 1986. Moulds and filamentous fungi in technical microbiology. *Progress in industrial microbiology Vol(22)* Elsevier.
16. Tanaka, Y., Hayashida, S. and Hongo, M. 1977. Treatment of hen feces with fungi. *Hakko Kogaku Kaishi* 55:134-140.
17. Terada, A., Hara, H., Li, S. T., Yagi, S., Ichikawa, H., Nichi, J., Ko, S. H. and Itsuoka, T. 1993. Effect of microbial preparation and fecal flora and fecal metabolic products of pigs. *Anim. Sci. Technol.(Jpn.)*, 65(9):806-814.
18. Yun, I. L. and Ohta, Y. 1997. Some physiological properties of microorganism capable of deodorizing from animal feces. *Bio. technol.* 60:21-26.
19. 太田欽幸. 1991. 微生物 利用した 脱臭法, 平成 3年度 家畜 ふん 尿處理利用研究會 資料., 草地試驗場, 畜産試驗場, pp 45-52.
20. 太田欽幸. 1994. 微生物で 悪臭を防ぐ (悪臭性排泄物による 生育하는 無臭化 微生物. *化學の生物* 32(1):11-12.
21. 田中米實. 1976. ほか. 絲狀菌 による畜産排出物の 處理. *醱酵工學*, 54:333-339.
22. 田中米實. 1978. ほか. 放線菌 による畜産排出物の 處理. *醱酵工學*, 56:134-140.
23. 윤세영, 이상규. 1992. 가축분뇨 발효시 악취가스 생성억제제 시용효과에 관한 연구. *한국토양학회지* 5(1):62-69.
24. 농업기술연구소. 1988. 토양화학분석법 pp. 243-295.