

## *Bacillus subtilis* IB101을 이용한 암모니아 가스 제거 및 생산배지 최적화

<sup>1</sup>김 소 영 · <sup>1</sup>노 용 호 · <sup>1</sup>강 성 각 · <sup>2</sup>김 영 범 · <sup>2</sup>장 우 진 · <sup>2</sup>김 동 준 · † <sup>1</sup>윤 현 식  
<sup>1</sup>인하대학교 생물공학과, <sup>2</sup>(주) 엠지인투바이오 생물공학 연구소  
(접수 : 2006. 11. 28., 게재승인 : 2007. 4. 30.)

## Ammonia Gas Removal by *Bacillus subtilis* IB101 and Optimization of Culture Media

So-Young Kim<sup>1</sup>, Yong-Ho Noh<sup>1</sup>, Sung Gak Kang<sup>1</sup>, Young-Bum Kim<sup>2</sup>, Woo-Jin Jang<sup>2</sup>,  
Dong-Joon Kim<sup>2</sup>, and Hyun Shik Yun<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, MG Intobio Co., Incheon 402-751, Korea

(Received : 2006. 11. 28., Accepted : 2007. 4. 30.)

Ammonia gas is one of the major pollutants which cause environmental pollution and damage to the human and the livestock. The objective of this study was to investigate the important parameters for the development of efficient removal of ammonia gas by *Bacillus subtilis* IB101 and to optimize the medium composition for the mass production of *B. subtilis* IB101. The ammonia gas removal efficiency was evaluated at different growth phases and by changing culture conditions (temperature, pH). The effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration in preculture medium was examined. Medium optimization for the mass production of *B. subtilis* IB101 was performed by using Plackett-Burman design and one factor at a time method. The removal of ammonia gas was more efficient at exponential phase by 20% than at stationary phase. The ammonia gas removal was the highest at pH 4 and 30 °C. There was not any significant influence of concentration of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on the removal of ammonia gas. The components of optimized medium for the production of viable *Bacillus subtilis* IB101 was yeast extract 10 g/l, soluble starch 2.5 g/l, MgSO<sub>4</sub> 6 g/l, CaCl<sub>2</sub> 1.55 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75 g/l, soy bean meal 8 g/l.

**Key Words** : Ammonia gas, *Bacillus subtilis* IB101

### 서 론

축산농가에서의 가축의 분뇨는 토양오염, 수질오염 그리고 대기오염을 유발한다. 특히 악취문제는 대표적인 생활 환경오염의 하나이며 환경민원에서 큰 비중을 차지하고 있다(1). 그 중 가장 피해가 큰 것이 암모니아 가스이다. 이러한 암모니아는 가축의 체내에서 미생물의 분해에 의해 질소화합물이 형성된 것으로서 소화가 불충분하게 이루어진 사료 및 체내 질소 생성물, 오줌으로 배설된 질소 등이 그 구성 물질이다(2).

암모니아는 사람에게는 눈 따가움, 호흡기 질병, 두통, 콧물, 식욕 감퇴 등의 피해를 주며 축산농가의 가축에는 암모니아 농도 약 10 ppm부터 성장에 영향을 미치며 암모니아 가스에 지속적으로 노출됨으로서 결막염, 성숙도 및 육질저하, 질병 감염률의 상승의 피해를 유발하고 있다(2).

2005년 2월 10일부터 본격적으로 시행되고 있는 「악취 방지법」에서는 암모니아, 메틸머캅탄, 황화수소 등 22가지 물질을 지정악취물질로 정하고 이 중 암모니아와 황화수소의 허용배출농도는 엄격한 배출허용기준의 범위로 각각 1~2 ppm, 0.02~0.06 ppm으로 제시하고 있다. 배출허용기준이 초과할 경우 악취배출시설의 전부 또는 일부의 사용중지 처분을 받게 되며 폐쇄까지 이를 수 있다. 또한 5천만원 이하의 과징금이 부과될 수 있다(3). 이는 영세한 축산농가에서 큰 부담이 될 수밖에 없으며, 그만큼 악취물 질제거는 필수적이고 중요한 문제가 되었다. 축산농가에서

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering,  
Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel & Fax : +82-32-860-7517

E-mail : hyunshik@inha.ac.kr

손쉽게 사용할 수 있으면서 저렴한 악취물질제거에 대한 연구가 시급하다.

심각한 악취를 유발하는 암모니아를 억제하기 위한 연구가 다양하게 진행되고 있다. 쉽게 억제하는 방법으로 환기를 통한 방법이 있으나 암모니아는 공기보다 무거워 환기를 시켜도 축사 주위 100 m 이내에 가라앉아 토양을 오염시키며 겨울철에는 환기율이 떨어지고 연료비 상승으로 어려움이 많다(2). Biofilter를 이용한 악취처리기술은 여러 가지 악취를 동시에 제거할 수 있으며 운전비용이 적게 소요되고 유지관리가 유리하지만 충전재의 제작단가가 고가이기 때문에 경제성이 떨어진다(4). 그래서 경제성이 높고 제거율이 우수한 충전재의 선발과 국내 축산환경에 적합한 저렴한 농가보급형 biofilter의 개발이 수행되었다(4, 5). 사료의 단백질 수준에 따라 가축 배설물의 암모니아 가스 발생량에 영향을 미침에 따라 합성아미노산, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces cerevisiae* 등을 첨가함으로써 육계사내 암모니아 가스발생에 미치는 영향에 대해 연구되었으며(6) 이러한 가축 사료의 연구는 계속되고 있다. 그러나 가축의 분에서의 악취제거에는 효과가 있으나 분뇨의 수분과 섞이게 되면서 그 효과는 떨어지고 있다.

그밖에도 목초액을 이용한 암모니아 제거 효율 특성(1), terpene으로 암모니아 가스의 분해(7), 광합성세균, 호기성 및 혐기성 등의 복합미생물 그리고 탈취제를 이용한 양돈 분뇨의 혐기성 부숙 과정에서의 악취감소효과(8), 해양미생물인 *Vibrio alginolyticus*를 이용한 암모니아 가스 제거(9)와 고온성 암모니아 내성균의 첨가하여 돈분 퇴비화 과정 중 암모니아, 황화합물 등의 발생저감효과(10)에 대한 연구가 수행되었다. 그러나 복잡한 처리과정으로 인한 비경제적, 사용된 미생물체에 의한 2차오염 등으로 활성화되고 있지 못한 실정이다.

생산배지의 최적화를 위한 방법으로 Plackett-Burman design과 one factor at a time 방법을 이용하였다. Plackett-Burman design은 fractional factorial design 방법 중 하나로 많은 factor가 존재할 때 적은 횟수의 실험으로 중요 factor를 선별할 수 있으며 주요 영향을 판단할 수 있는 방법이다(11, 12). One factor at a time 방법은 다른 배지 성분은 고정시키고 한 가지 배지 성분만 여러 농도로 첨가하는 방법이다(12, 13).

본 연구에서는 처리방법이 간단하고 경제적이며 가축이나 인체에 무해한 미생물체를 위한 선행연구로 퇴비, 축사, 분뇨에서 선발한 고효능 암모니아 제거균주인 *Bacillus subtilis* IB101을 이용하여 좋은 암모니아 가스 제거 효과를 보이는 환경적 조건과 대량 배양할 수 있는 생산배지의 최적화에 대해 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 실험에서 사용된 균주는 퇴비, 축사, 분뇨에서 분리한 *Bacillus subtilis* IB101 (MG Intobio Co., Korea)이며 기본

배지의 조성은 yeast extract (Becton Dickinson, USA) 20 g/l, 대두분 (Seorim Foods Co., Korea) 8 g/l, corn starch (Samchun Chemical Co., Korea) 5 g/l, MgSO<sub>4</sub> (Duksan Chemical Co., Korea) 6 g/l, CaCl<sub>2</sub> (Kanto Chemical Co., Japan) 1.55 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Samchun Chemical Co., Korea) 10 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Junsei Chemical Co., Japan) 3 g/l이며, 이 배지를 이용하여 30°C, 250 rpm에서 배양하였다. 배지의 최적화 실험에서는 전배양 배지로 LB배지를 이용하여 30°C, 250 rpm의 shaking incubator (Vision Scientific Co., Korea)에서 배양하였다.

### 반응기

일정한 환경에서 암모니아 가스의 제거를 측정하기 위해 lab scale로 축사 내 환경을 simulation할 수 있는 500 ml 반응기를 제작하였다(Fig. 1). 반응기 내의 배지는 20 ml로 그 조성은 yeast extract 5 g/l, 대두분 8 g/l, soluble starch 10 g/l, MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/l, CaCl<sub>2</sub> 1.55 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/l이다. 축사의 암모니아 농도 200 ppm(14)의 조건을 맞추기 위해 3% 암모니아수 (Samchun chemical Co., Korea) 0.5 ml이 첨가하였고, 첨가된 암모니아수가 배지에 직접 닿는 것을 방지하기 위해 glass bead (5 mm, Galstechnoq, Germany) 200 g을 넣었다. Cell을 1% 접종한 뒤 12시간 반응 후 암모니아 가스를 채취하여 농도를 확인하였다.

### 분석방법

암모니아 가스 농도 측정은 신속한 측정이 가능한 검지기 (Gastec Co. Ltd, Japan)를 이용하여 검지관을 sampling port에 끼운 후 100 ml 을 채취하여 암모니아 가스 농도를 측정하였으며 암모니아 가스를 측정할 수 있는 측정농도 범위 2.5~200 ppm, 10~1,000 ppm의 3 La, 3 M 검지관 (Gastec Co., Japan)을 이용하였다.

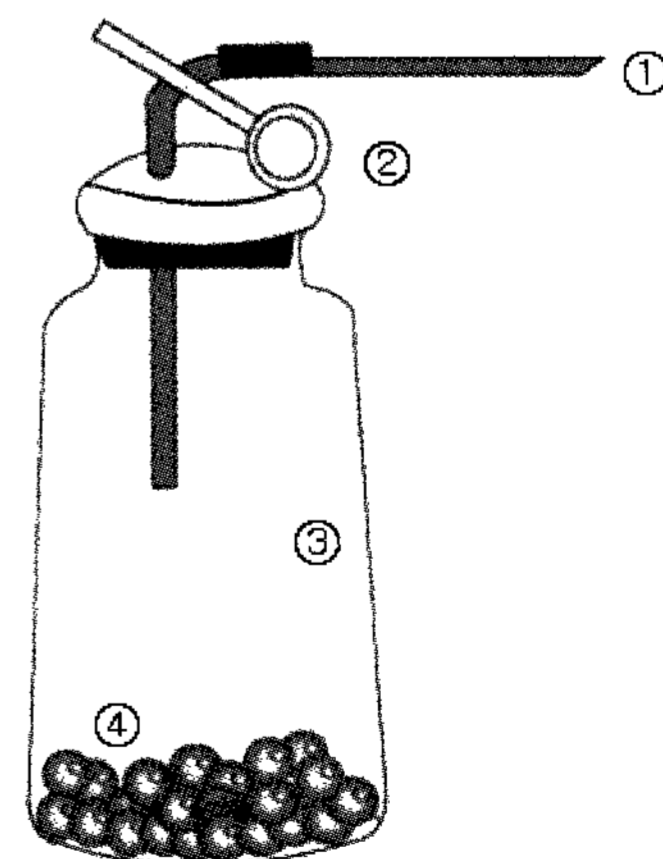


Figure 1. Diagram of the laboratory-scale reactor (① Sampling port; ② Clamp; ③ 500 ml volume reactor; ④ 5 mm glass beads).

### 생산배지의 최적화

생산배지의 최적화를 위한 방법으로 Plackett-Burman design과 one factor at a time method를 사용하였다.

Plackett-Burman design과 결과분석은 minitab program을 사용하였다. 입력변수를 2 수준, 즉 (+)와 (-)로 변화시키게 되는데 (+)에서는 +50%, (-)에서는 -50%로 변화를 주었다. OD 결과값을 얻기 위해 Bioscreen C (Labsystems, Finland)를 이용하였다. Bioscreen C는 한번에 sample수 200까지 가능하며 하나의 sample의 replication을 5번으로 하여 이때 얻어진 OD 값을 평균하여 결과 값을 산출하였다. One factor at a time method로 불용성 물질인 대두분의 영향을 살펴보았다. 다른 배지의 조성은 일정하게 하였고, 대두분의 농도만 변화를 주어 250 ml flask에서 30°C, 250 rpm에서 24시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**B. subtilis IB101의 접종 시간에 다른 암모니아 제거 효율**

B. subtilis IB101의 접종 시간에 따른 암모니아 제거 효과를 알아보기 위하여 기본배지에서 3, 6, 9, 12, 14, 16시간 동안 배양한 cell을 반응기에 1% 접종하였고 12시간 반응시킨 후 검지기를 이용하여 반응기내의 암모니아 가스를 측정하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 exponential phase 단계의 cell을 접종한 반응기에서는 70% 이상의 암모니아 가스 제거율을 보였다. 그리고 stationary phase 단계의 cell을 접종한 반응기에서는 약 50%의 암모니아 가스 제거율을 보였다. Exponential phase에서 접종하는 것이 암모니아 가스 제거효율이 약 20% 더 우수함을 알 수 있었다. 이것은 exponential phase에서 자란 cell을 접종하였을 때 세포 생장이 활발하게 이루어지면서 암모니아가 질소원으로 이용되기 때문인 것으로 보인다.

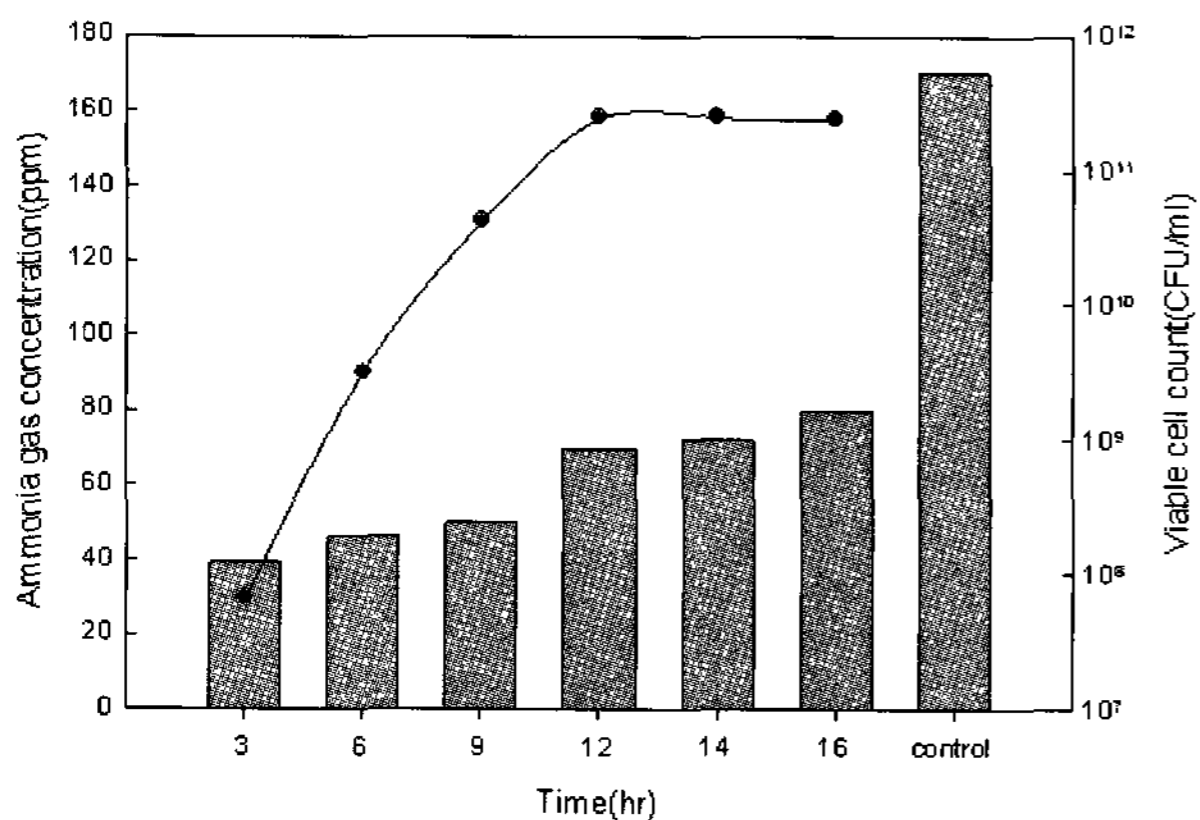


Figure 2. Removal of ammonia by inoculation time of *B. subtilis* IB101 and cell numbers (▨ : Ammonia gas concentration, ● : Cell numbers).

**pH 및 온도에 따른 B. subtilis IB101의 암모니아 제거 효율**

질산화 반응 최적화를 위한 pH와 온도의 최적조건을 알아보는 실험을 진행하였다. 반응기 내의 배지의 초기 pH

를 2, 4, 6, 8, 9, 10으로 조절한 후 exponential phase에서 배양한 *B. subtilis* IB101을 1% 접종하였다. 그리고 20, 25, 30°C에서 12시간 반응 후 검지기를 이용하여 암모니아 가스 농도를 측정하였다. 각 반응기의 pH 보정은 1 M의 HCl과 1 M NaOH로 하였다.

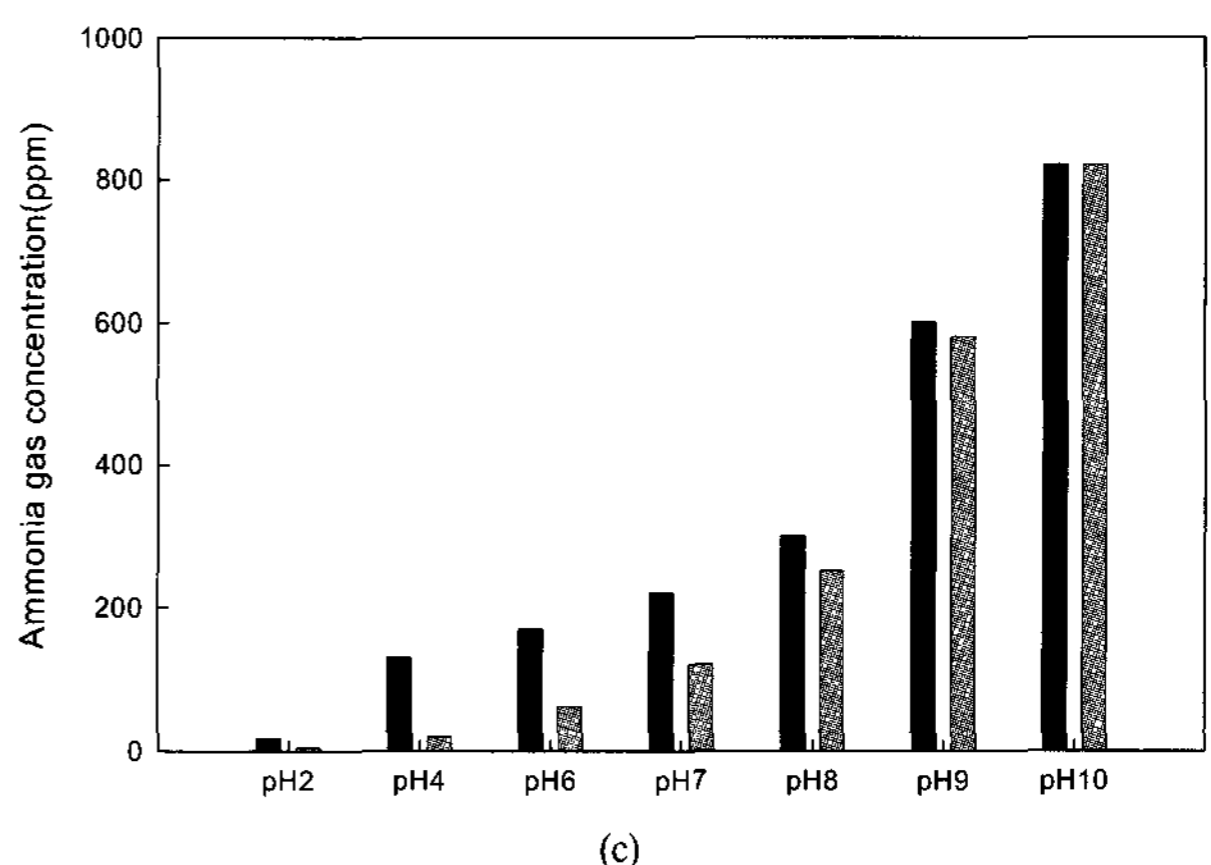
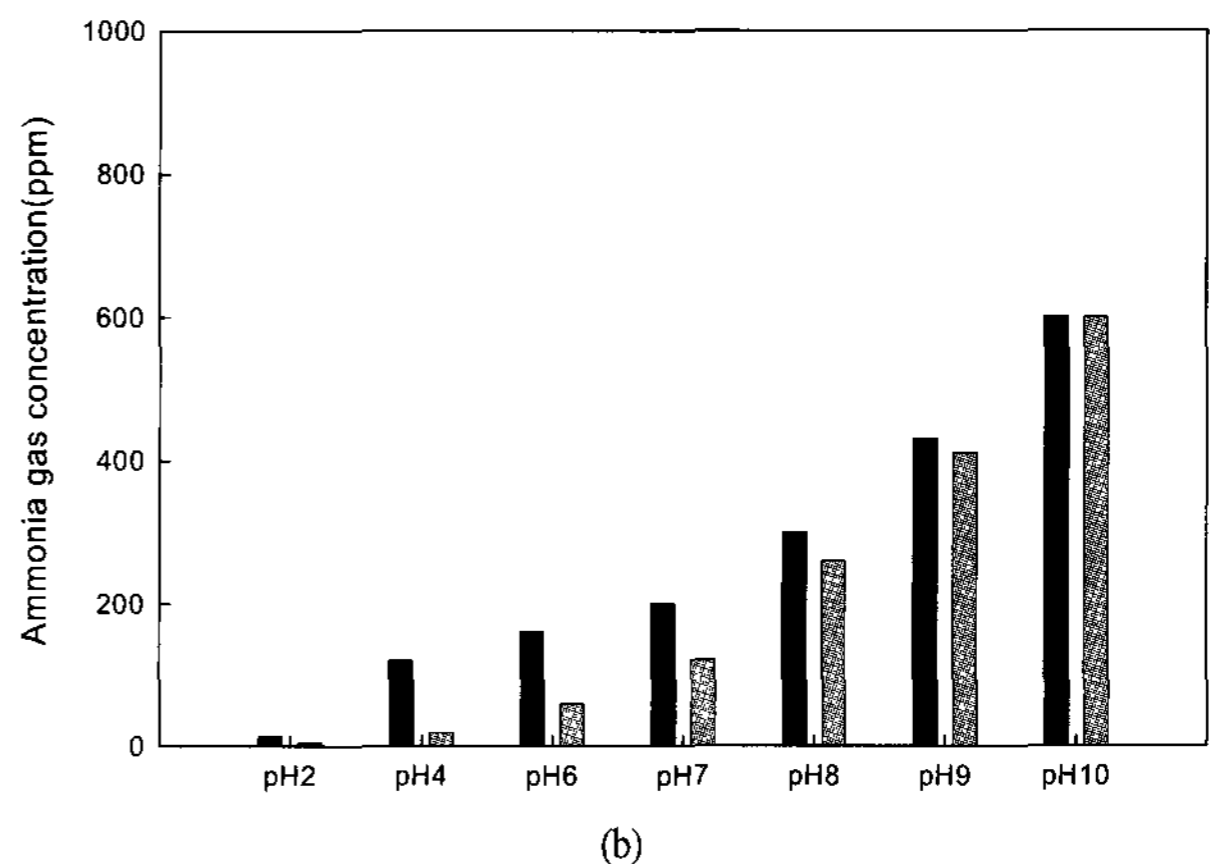
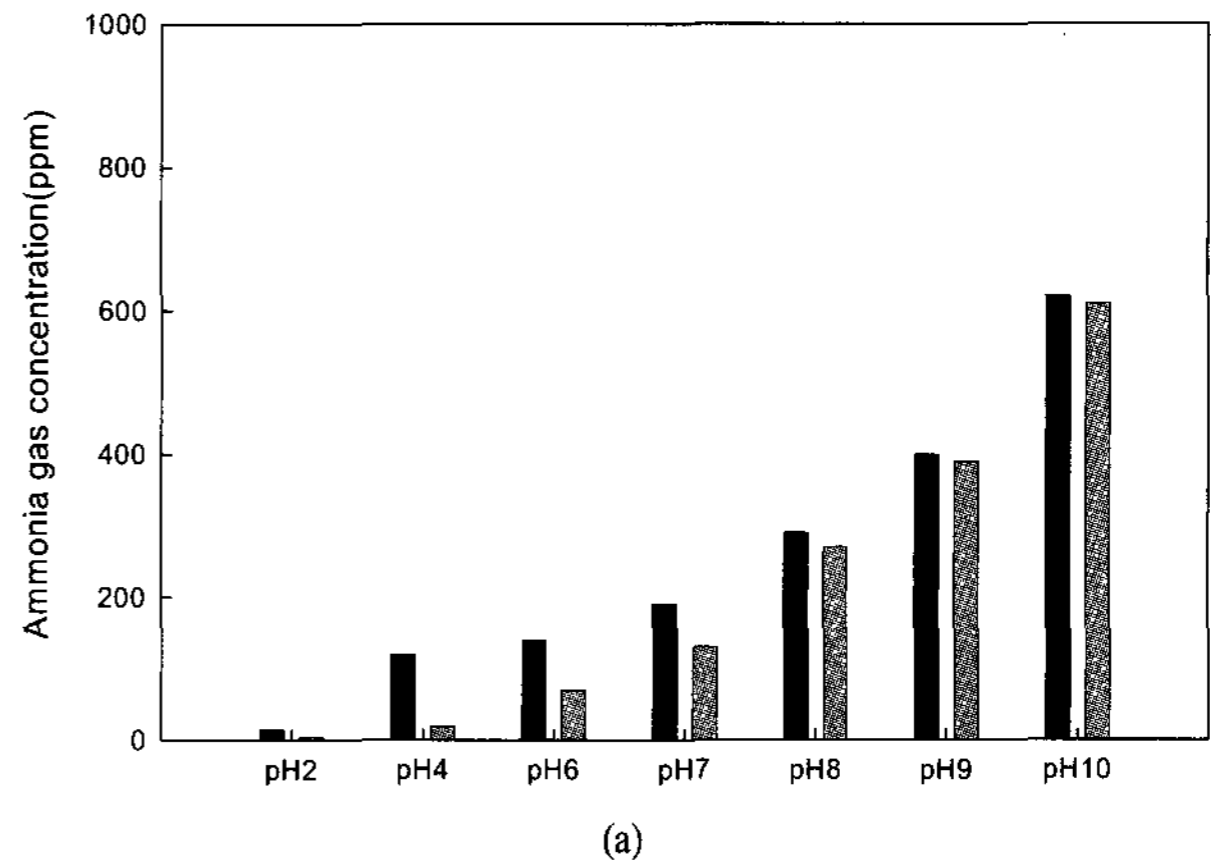


Figure 3. Removal of ammonia gas by pH and temperature ((a) 20°C; (b) 25°C; (c) 30°C (■ ; Control, ▨ ; *B. subtilis* IB101)

배지 성분 중의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 NaOH가 가해지면 암모니아 (NH<sub>3</sub>)가 발생하게 되는데 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 NaOH가 첨가된 pH 8, 9, 10의 반응기에서 암모니아 가스

농도는 높게 측정되는 것을 볼 수 있다. 반면에 HCl이 첨가된 경우 중화 반응으로 인해 암모니아 가스가 제거되었다. *B. subtilis* IB101의 효과를 보기 위해 각 pH, 온도에서의 control을 측정하였다. pH 4에서는 control과 비교했을 때 80% 이상의 암모니아 가스 제거 효율을 보였다. 각 온도 별로는 암모니아 제거 효과의 큰 차이는 없으나 30°C에서 3~20 ppm 정도의 암모니아 가스가 제거되며 조금 더 높은 제거 효율을 보였다. 반응이 끝난 후 30°C에서 각 pH의 생균수를 측정 한 결과 pH 4에서의 생균수가 제일 높게 측정되었고(Table 1), pH 4에서 각 온도의 생균수를 측정 한 결과 30°C의 반응기에서 높은 생균수가 측정되었다(Table 2). pH 4, 30°C에서 *B. subtilis* IB101의 생장이 우수하며 따라서 암모니아 가스 제거 효율도 높은 것으로 보인다. 축산 농가 적용 시 보조제로 pH를 낮출 수 있는 성분을 함께 사용할 경우 암모니아 가스 제거 효율을 더 높일 수 있을 것이다.

Table 1. Cell numbers by pH at 30°C (CFU/ml)

	pH 2	pH 4	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
30°C	2.76×10 <sup>8</sup>	2.36×10 <sup>10</sup>	8.7×10 <sup>9</sup>	3.16×10 <sup>8</sup>	7.6×10 <sup>7</sup>	1.3×10 <sup>5</sup>	1×10 <sup>5</sup>

Table 2. Cell numbers by temperature at pH 4 (CFU/ml)

	20°C	25°C	30°C
pH 4	1.4×10 <sup>8</sup>	2.73×10 <sup>8</sup>	2.36×10 <sup>10</sup>

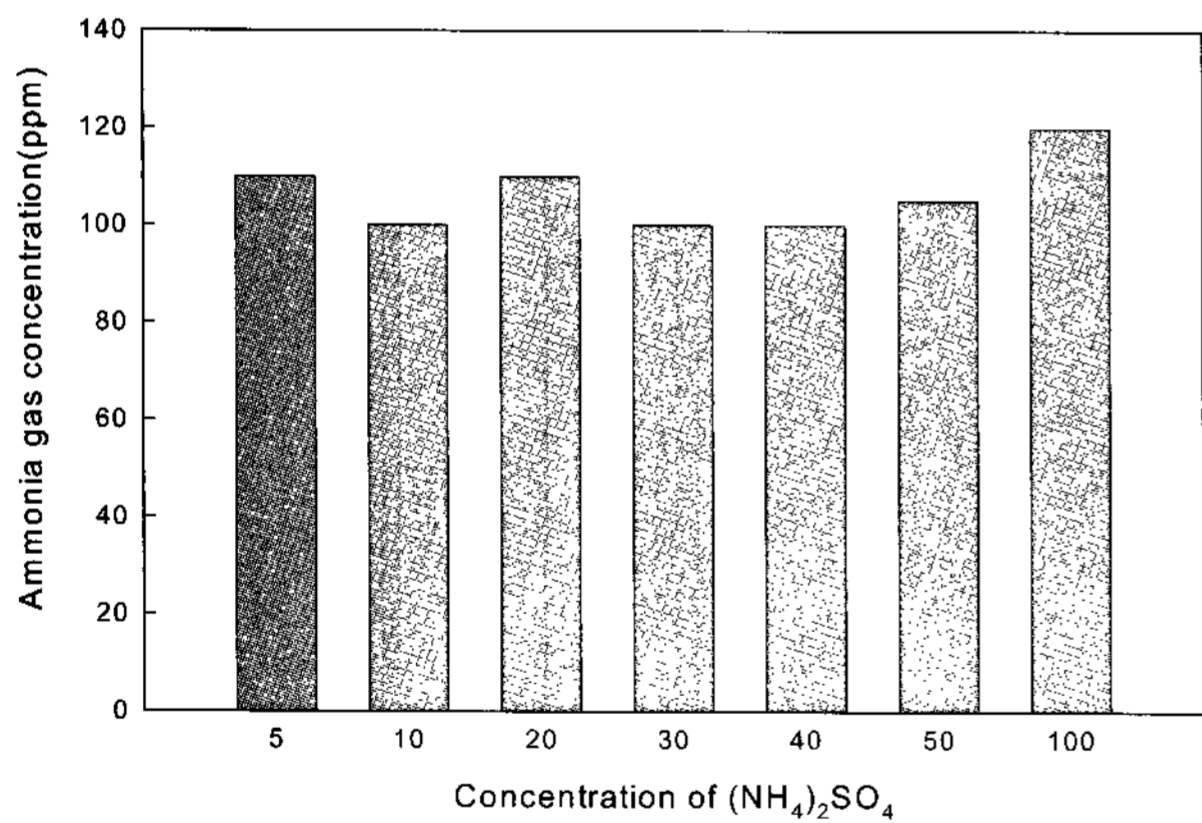


Figure 4. Effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> on ammonia gas removal.

**배지 구성성분 중 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 농도에 따른 암모니아 제거효율**

암모니아 가스 제거 효율을 높이기 위해 *B. subtilis* 배양 시 배지 구성성분 중 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도에 변화를 주어 각 농도에서 배양된 *B. subtilis* IB101이 암모니아 가스 제거에 미치는 영향에 대해 알아보았다. 배지의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도를 각각 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 g/l로 하여 배양하였고 반응기에 일정한 양의 cell을 반응기에 접종하였다. 여러 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 농도에서 측정된 암모니아 가스 농도는 100~110 ppm으로 거의 일정하게 측정되었다(Fig. 4). 따라서 배지 중의 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도는 *B. subtilis* IB101의 암모니아 가스 제거 효율에는 영향이 없는 것으로 보인다. 단지 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도가 높을수록 *B. subtilis* IB101의 생장에

저해를 받는 것으로 보이며, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 농도가 100 g/l인 경우에는 세포생장이 거의 보이지 않았다.

**생산배지의 최적화**

암모니아 분해 능력이 우수한 *B. subtilis* IB101의 대량 배양을 위한 배지 조성을 얻기 위하여 배지의 최적화를 수행하였다. 첫 번째로 중요한 실험변수를 선별하는 방법으로 실험횟수를 감소시킬 수 있고 factor들의 영향을 조사할 수 있는 Plackett-Burman design을 이용하여 yeast extract, soluble starch, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>의 영향을 고찰하였다. Bioscreen C를 이용한 OD (optical density) 값으로 결과값을 산출하였으며 통계분석 프로그램인 minitab program을 이용하였다. 두 번째로 one factor at a time method를 이용하여 첫 번째 방법으로 선정된 배지에 대두분을 여러 농도로 첨가하여 높은 생균수를 얻을 수 있는 최적의 농도를 알아보았다.

Table 3. Plackett-Burman design

Run Order	Yeast extract	Soluble starch	MgSO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	OD
1	-1	1	-1	1	1	1	0.032
2	-1	-1	-1	1	-1	1	0.355
3	-1	1	1	1	1	1	0.126
4	-1	1	-1	1	-1	-1	0.284
5	1	-1	-1	1	1	-1	0.204
6	1	-1	-1	1	1	-1	0.108
7	-1	-1	1	-1	1	-1	0.348
8	1	1	-1	-1	1	1	0.030
9	-1	1	-1	-1	1	1	0.197
10	-1	-1	-1	-1	1	-1	0.158
11	-1	-1	1	1	-1	1	0.640
12	1	1	1	-1	-1	-1	-0.016
13	1	1	1	1	-1	-1	0.037
14	0	0	0	0	0	0	0.078
15	1	-1	1	1	1	1	-0.240
16	1	1	-1	1	-1	1	0.010
17	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0.531
18	1	-1	1	-1	-1	1	0.349
19	-1	1	1	-1	1	-1	0.155
20	1	-1	1	-1	1	1	0.099
21	-1	-1	1	1	-1	-1	0.662
22	1	-1	-1	-1	-1	1	0.222
23	1	1	1	1	1	-1	-0.110
24	-1	1	1	-1	-1	1	0.081
25	1	1	-1	-1	-1	-1	-0.034

기본배지의 조성으로 Plackett-Burman design을 이용하여 OD에 영향을 미치는 주요 factor를 살펴보았다. Yeast extract, soluble starch, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 각 변수로 (-)에는 -50%, (+)에는 +50%로 변화시키고 OD를 측정하였다(Table 3). 그 결과 yeast extract, soluble starch, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 OD에 미치는 주요 factor임을 알 수 있었다. 이 3가지 성분은 (-) effect로 작용하며 그에 따라 OD값이 증가하는 것을 보였다. (-) effect 성분인 yeast extract, soluble starch, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 조성을 기본조성에서 -50%로 하여 yeast extract 10 g/l, soluble starch 2.5 g/l, MgSO<sub>4</sub> 6 g/l, CaCl<sub>2</sub> 1.55 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g/l의 조성으

로 (+), (-)로 변화시켜 OD를 측정하였다. 그 결과  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 가 OD에 영향을 미치는 주요 factor였으며 이 성분은 (-) effect로 작용하였다.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 조성을 -50%로 하여 yeast extract 10 g/l, soluble starch 2.5 g/l,  $\text{MgSO}_4$  6 g/l,  $\text{CaCl}_2$  1.55 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/l의 조성으로, 다시 (+), (-)로 변화시켜 OD를 측정하였다. 그 결과 여전히  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 성분이 주요 factor로 (-) effect로 작용함을 알 수 있었다. 다시  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 의 조성을 -50%하여 yeast extract 10 g/l, soluble starch 2.5 g/l,  $\text{MgSO}_4$  6 g/l,  $\text{CaCl}_2$  1.55 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/l의 조성으로 진행하였다. 그 결과  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 성분이 OD에 영향을 미치는 주요 factor로 (-) effect로 작용하였으나 (-) effect로 작용할 때의 OD값은 큰 증가를 보이지 않았다. (-) effect로 작용한  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 조성을 -50%로 하여 yeast extract 10 g/l, soluble starch 2.5 g/l,  $\text{MgSO}_4$  6 g/l,  $\text{CaCl}_2$  1.55 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.5 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/l의 조성으로 진행한 결과 soluble starch와  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 가 (-) effect로,  $\text{MgSO}_4$ 가 (+) effect로 OD에 미치는 영향이 변화하였다. 따라서 OD값이 (-) effect 또는 (+) effect에 따라 증가하는 정도가 작다고 보여지는 yeast extract 10 g/l, soluble starch 2.5 g/l,  $\text{MgSO}_4$  6 g/l,  $\text{CaCl}_2$  1.55 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/l의 조성이 최적의 조성으로 생각되어진다. 기본배지의 조성 Plackett-Burman design을 이용하여 얻어진 조성으로 250 ml flask 로 30°C, 250 rpm에서 24시간 배양 후 *B. subtilis* IB101의 생균수를 측정하였다(Table 4). 기본배지의 조성보다 Plackett-Burman design을 이용하여 얻어진 조성에서 더 많은 생균수가 측정되었다. Plackett-Burman design을 통하여 얻어진 조성이 *B. subtilis* IB101의 생균수 증가에 좋은 효과를 보인 조성이라 볼 수 있다.

Table 4. Cell numbers by medium composition

	Components	Cell numbers (CFU/ml)
Sample 1	Basal medium	$2.4 \times 10^{11}$
Sample 2	P	$3.4 \times 10^{11}$
Sample 3	P + soy bean meal 2 g/l	$3.9 \times 10^{11}$
Sample 4	P + soy bean meal 4 g/l	$4.3 \times 10^{11}$
Sample 5	P + soy bean meal 6 g/l	$4.63 \times 10^{11}$
Sample 6	P + soy bean meal 8 g/l	$6.5 \times 10^{11}$
Sample 7	P + soy bean meal 12 g/l	$4.63 \times 10^{11}$
Sample 8	P + soy bean meal 18 g/l	$2.6 \times 10^{11}$

P : Components of medium by Plackett-Burman design

대두분은 불용성물질이기 때문에 Bioscreen C를 이용하여 OD를 측정할 수 없었기 때문에 one factor at a time 방법으로 대두분이 생균수에 미치는 영향을 살펴보았다. Plackett-Burman design을 통하여 최적의 조성으로 생각되는 배지의 조성과 함께, 대두분의 영향을 알아보기 위해 250 ml flask에 대두분의 2, 4, 6, 8, 12, 18 g/l 각각 첨가하여 30°C, 250 rpm에서 24시간 배양 후 생균수를 측정하였다(Table 4). 각 다른 농도의 대두분을 첨가한 결과 Plackett-Burman design을 통하여 얻어진 조성 (Sample 2)보다 더 많은 생균수가 측정되는 것으로 보아 대두분이 첨가되는 것이 *B. subtilis* IB101의 대량생산에 더 효과적임을

알 수 있다. 그리고 대두분 농도 8 g/l에서 다른 농도의 대두분을 첨가한 것에 비해 더 많은 생균수가 측정되었다. 결과적으로 *B. subtilis* IB101의 대량생산을 위한 최적의 배지 조성은 yeast extract 10 g/l, soluble starch 2.5 g/l,  $\text{MgSO}_4$  6 g/l,  $\text{CaCl}_2$  1.55 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/l, 대두분 8 g/l이었다.

## 요 약

암모니아 가스는 환경오염 중 가장 피해가 큰 물질로 가축 뿐만 아니라 사람에게도 많은 피해를 준다. 본 연구의 목적은 *Bacillus subtilis* IB101을 이용하여 암모니아 가스의 제거효율이 좋은 조건과 최적으로 배양할 수 있는 생산배지의 최적화에 대하여 알아보는 것이다. 암모니아 제거 효과가 우수한 균주인 *B. subtilis* IB101의 암모니아 가스 제거 효능이 좋은 성장단계를 알아보았으며, 기본배지의 구성성분 중  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도에 변화를 주어 각각 다른  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  농도의 배지에서 배양된 cell이 암모니아 가스 제거에 미치는 영향을 알아보았다. 그리고 온도 및 pH에 따른 암모니아 가스 제거 효능의 최적조건을 알아보았다. *B. subtilis* IB101의 대량 배양을 위한 배지 조성을 얻기 위하여 Plackett-Burman design과 one factor at a time method를 이용하여 기본배지의 구성성분의 영향에 대하여 살펴보고 최적의 배지조성을 알아보았다. Exponential phase 단계인 *B. subtilis* IB101을 접종한 것이 stationary phase 단계인 *B. subtilis* IB101을 접종한 것보다 암모니아 가스 제거 효율이 약 20% 정도 우수하였다. 30°C, pH 4의 배양조건에서 암모니아 가스 제거 효율이 가장 높았다. 기본 배지 구성성분 중  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도의 변화에 따른 암모니아 가스 제거 효율에는 영향이 없었다. 최적화된 배지의 구성 성분은 yeast extract 10 g/l, soluble starch 2.5 g/l,  $\text{MgSO}_4$  6 g/l,  $\text{CaCl}_2$  1.55 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/l, 대두분 8 g/l이었다.

## 감 사

본 연구는 중소기업청 중소기업기술혁신 개발사업 (S1007962)의 일부로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Park, J. H., G. I. Jun, and C. H. Jeong (2003), Ammonia removal characteristics by pyroigneous liquid at livestock farmhouse, *J. Environ. Sci.* **12**, 1309-1313.
2. <http://www.koreapork.or.kr/JOURNAL/9911-month/new/new3.html>.
3. Korean Environment Policy Bulletin (2005), Ministry of Environment.
4. Lee, S. J., D. I. Chang, and H. H. Chang (2006), Effect of biofilter made of composted pine tree bark and perite on reducing odor from pig house, *Kor. J. Environ. Agr.* **25**(2), 118-123.
5. Cho, S. I., M. L. Kim, Y. Y. Kim, and W. Y. Yeo (2003),

- Development of biofilter system for ammonia removal in livestock facility, *J. Kor. Soc. Agr. Mach.* **28**(5), 457-464.
6. Lee, S. J., S. W. Chio, H. Namkung, and I. K. Paik (2000), Effect of dietary protein and feed additive on ammonia gas emission in broiler house, *J. Anim. Sci. Technol.* **42**(3), 299-314.
  7. Park, Y. G. (2004), Study of ammonia-gas removal's characteristics using wood-material, *Kor. J. San.* **19**(2), 7-14.
  8. Kang, K. H., S. K. Kim, C. G. Hu, and M. G. Lee (2006), The effect of reduction of contaminants and odor according to the additives in the anaerobic maturation process of piggery slurry, *J. Environ. Sci.* **15**(2), 169-175.
  9. Kim, N. J., Y. Sugano, M. Hirai, and M. Shoda (2000), Removal of a high load of ammonia gas by a marine bacterium, *Vibrio alginolyticus*, *J. Biosci. Bioeng.* **90**(4), 410-415.
  10. Seo, M. C., K. Kuroda, D. Hanajima, and K. Haga (1998), Effect of thermophilic ammonium tolerant bacteria of mal-odors emission of composting of pig manure, *J. Kor. Soc. Soil Sci. Fert.* **31**(1), 77-84.
  11. Lee, S. H., S. B. Lee, H. G. Lee, and S. Y. Oh (2001), Experimental design methodology for quality improvement, Proceedings of Spring Symposium of Korean Operation Research and Management Science Society and Korean Institute of Industrial Engineers.
  12. <http://www.cheric.org/ippage/p/ippdata/2000/14/%BD%C7%C7%E8%B8%B9%B9%FD.html>
  13. Koo, J. H., I. J. Chio, H. S. Nam, H. J. Lee, Z. I. Shin, and T. K. Oh (1997), Medium optimization for production of thermostable alkaline proteases from *Bacillus licheniformis* NS70, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**(2), 207-211
  14. Kim, N. J. and Y. C. Jung (2002), Study on the treatment of ammonia gas at high loading by a new bacteria, *Vibrio alginolyticus*, Proceedings of Spring Joint Symposium of Korean Society on Water Quality and Korean Society of Water and Wastewater, 363-366.