시흥지역 녹조 예방 및 녹조 제거용 미생물제제 개발

김 정 근

시흥녹색환경지원센터

[별지 제2호서식]

연구결과보고서

2018년도 연구개발사업에 따라 연구중인 “시흥지역 녹조 예방 및 녹조 제거용 미생물제제 개발”에 관한 연구의 최종보고서를 붙임과 같이 제출 합니다.

붙임 : (최종) 보고서 ( )부. 끝.

연 구 기 관: 한국산업기술대학교

연구책임자 : 김 정 근 (인)

연구기관장 : 직인

시흥녹색환경지원센터장 귀하

제 출 문

시흥녹색환경지원센터장 귀하

본 보고서를 “시흥지역 녹조 예방 및 녹조 제거용 미생물제제 개발”에 관한 최종보고서로 제출합니다.

연구기관명 : 한국산업기술대학교

연구책임자 : 김 정 근 교수

(한국산업기술대 생명화학공학과)

연 구 원 : 전혜주, 이상현, 이호범

공동연구기관명 : 없음

시흥지역 녹조 예방 및 녹조 제거용 미생물제제 개발

김 정 근

시흥녹색환경지원센터

요 약 문

Ⅰ. 연구개요

1) 녹조(Algal bloom)는 호소에 남세균(cyanobacteria)의 과다 성장으로 인해 짙은 녹색으로 변하는 현상으로 시각적으로 나쁠 뿐만 아니라 심한 악취가 발생함. 또한 신경독성 물질인 microcystin과 간독성 물질인 cyanopeptolin을 생산하여 사람과 동물에게 건강상의 심각한 피해를 줌. 따라서 녹조는 국가적으로 해결해야 할 환경문제임.

2) 녹조 발생의 주된 원인은 부영양화로 특히 수질내 높은 인산 농도가 문제가 됨. 녹조 발생을 예방 및 억제하기 위해서는 호소내 침전되어 있는 유기•무기 인산염을 제거해야 함.

3) 본 연구에서는 발효 식품으로부터 분리된 안전한 저온성미생물(Psychrotroph)을 사용하여 사계절내내 호소내 유기•무기 인산염을 분해하여 녹조를 예방할 뿐만 아니라 발생된 녹조를 가수분해하여 방제할 수 있는 미생물제제를 개발하고자 함.

Ⅱ. 연구의 필요성 및 목적

1. 연구의 필요성

1) 매년 국내 4대강 및 저수지의 녹조 발생은 심각한 환경문제임. 또한 시흥시의 과림, 쌍용, 물왕, 뒷방울 저수지등도 부영양화로 매년 녹조가 발생하여 이에 대한 근본적인 해결 방법이 필요함.

2) 저수지 부영양화를 일으키는 주된 원인 물질은 계분 혹은 돈분 내 다량 존재하는 유기인산(phytate)염 및 무기인산염으로 밝혀짐. 녹조 발생을 근본적으로 억제하기 위해서는 저수지 퇴적층의 유기•무기인산염의 제거가 필요함.

3) 유기•무기인산염을 제거하는 방법으로 물리적, 화학적, 생물학적 방법이 있으나 미생물을 이용한 생물학적 방법이 가장 친환경적이고 경제적임.

4) 저수지내 유기•무기인산염 제거를 위해 고효율 분해 능력의 미생물 제제의 개발이 필요함. 특히, 여름 뿐만 아니라 봄, 가을, 겨울 등의 낮은 온도에서 유기•무기인산염을 가수분해할 수 있는 사계절용 미생물제제를 개발하면 그 효과는 매우 클 것임.

5) 따라서 본 연구에서는 안전한 발효 식품에서 선별한 저온성 미생물을 사용하여 유기•무기인산염 분해 효과 및 녹조 살균 효과가 우수한 미생물 제제를 검토하고자 한다.

2. 연구의 목적

본 과제의 연구 목표는 호소내 유기•무기인산염 분해 효과 및 녹조 살균 효과가 우수한 미생물을 선발하여 녹조 예방 및 녹조 제거용 미생물 제제를 개발하는데 있다.

1) 김치, 맥주로부터 분리된 균주의 무기인산염 분해능, 유기인산염 분해능, 녹조 살균 효과, 계분 분해능을 검토하여 우수균주 선별.

2) 선별된 3종 균주를 혼합한 미생물제제를 제조한 후 실험실적으로 녹조에 대한 살균 효과를 확인하고 이를 토대로 30L pilot 실험을 통하여 녹조 제거 효과 입증.

3) 2차년도(2019년도)에 녹조가 매년 발생하는 시흥시 과림저수지, 경기도내 골프장 연못 등에 현장적용 실험.

Ⅲ. 연구의 내용 및 범위

1. 추진전략 및 방법

1) 지역 환경 문제 해결

- 시흥시의 과림, 물왕, 쌍용저수지, 경기도의 신갈저수지, 원천저수지, 이동저수지 등은 부영양화로 매년 녹조가 발생하여 이에 대한 근본적인 해결 방법이 필요함.

2) 새로운 접근에 의한 문제 해결

▶ 지금까지 국내외적으로 녹조 예방 및 녹조 제거에 대한 많은 연구가 있었으나 근본적인 해결책이 제시되지 않고 있음. 따라서 현재의 연구 접근법과는 다른 새로운 접근이 필요함. 많은 문헌 검토를 통하여 호소내 유기•무기인산염 제거에 초점을 맞춤.

▶ 본 연구에서는 녹조 발생의 원인물질인 유기•무기인산염을 사계절 제거하기 위해 저온성 미생물을 자연으로부터 분리함. 호소내 가을, 겨울, 봄의 수온은 15℃ 이하임. 여름도 8미터 이상의 호소 수온은 4-8℃의 저온임. 따라서 사계절 유기•무기인산염을 분해하기 위해서는 분해능이 우수한 저온성 미생물이 필요함.

▶ 문헌 조사 결과, 김치 유산균과 맥주효모에 우수한 유기•무기인산염 분해능이 있음을 확인하고 김치로부터 김치유산균, 맥주 효모로부터 우수균주 선별함.

3) 안전하고 친환경적 방법으로 녹조 문제 해결

▶ 화학적인 방법과 달리 안전한 미생물을 이용한 친환경적인 방법으로 녹조문제 해결. 따라서 인체 안전성 확인된 김치유산균과 맥주효모균을 사용함.

4) 녹조 문제 해결로 지역 경제 활성화 및 큰 부가가치

▶ 저수지, 골프장의 작은 연못, 낚시터 등의 녹조문제가 해결하게 되면 지역 경제 활성화가 기여할 것이며 미생물 제제 판매에 의한 경제적인 부가가치도 클 것 임.

2. 연구 내용

1) 불용성 유기• 무기 인산염 분해 균주 분리

(1) 저온 발효식품인 김치로부터 저온성 유산균 분리 및 균주은행 (KCTC)으로부터 맥주 효모 균주 구입.

(2) 김치로 분리된 20여종의 유산균과 균주 은행으로부터 구입한 맥주효모 균주의 불용성 유기• 무기 인산염 분해능 확인

- 유산균인 경우는 MRS 배지 혹은 BCP 배지에 불용성 유기인산염인 inositol phosphate calcium salt, 무기인산염인 $Ca_3(PO_4)_2$ 혹은 유기인산염을 다량 함유한 계분을 첨가한 후 7℃, 15℃ 저온 배양기에서 잘 성장하며 투명환을 나타내는 균 확인 및 동정
- 효모인 경우는 potato dextrose 배지 inositol phosphate calcium salt, $Ca_3(PO_4)_2$ 혹은 계분을 첨가한 후 7℃, 15℃ 저온 배양기에서 잘 성장하며 투명환을 나타내는 균주 확인.
- 플라스크에서 유기인산염 및 무기인산염 분해능 측정 (Spectrometer 혹은 HPLC)

(3) 김치로부터 분리후 선발된 균주 동정 및 안전균주 여부 확인
- 생화학 키트에 의한 균주 동정
- 동정으로 GRAS Microorgansim 확인

(4) 선발된 유산균주와 효모의 생리적 배양학적 특성 분석
- 선발 균주의 생리적 특성 확인
- 배지 조성 실험

2) 녹조 분해 능력 우수 균주 선별

(1) 선별된 균주에 의한 시흥시 과림저수지 발생 녹조 분해 실험.
- 선별된 김치유산균 L-9, 김치유산균 CJLP, 효모 Y-44, 및 혼합 미생물 제제 MIX 1을 녹조에 접종한 후 28℃에서 녹조 분해 확인
- 20, 60, 100 rpm 진탕 조건에 따른 배양 일수에 따른 녹조 분해능 비교. (녹조의 침전, 균수의 변화, 클로르필 a 농도 변화 등 검토)
- 미생물 접종량(0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1.0%)에 따른 녹조 분해능 비교

3) 60 L Pilot에서의 유기인산 제거능과 녹조 살균 효과 확인

(1) 실험실에 60L pilot 배양조를 설치한 후 과림저수지 녹조를 사용하여 분리된 김치유산균 L-9, 김치유산균 CJLP, 효모 Y-44, 및 혼합미생물제제 MIX1의 녹조 살균 효과를 확인.

Ⅳ. 연구결과

(1) 김치로 분리된 20여종의 유산균주중에서 불용성 유기인산염염 및 무기인산염 분해능이 우수한 김치유산균 2종(L-9, CJLP) 선별. 4종 맥주 효모로부터 불용성 유기인산염염 및 무기인산염 분해능이 우수한 효모인 Y-44 선별

(2) 김치로부터 분리후 선발된 균주 동정 및 안전균주 여부 확인
- 생화학 API 키트에 의한 균주 동정
- 동정으로 안전한 균주임을 확인

(3) 분리된 균주(L-9, CJLP, Y-44) 및 혼합 미생물제제 제조후 500 mL 플라스크 및 60 L pilot 배양기를 사용한 녹조 제거 효과 확인
- 우수한 녹조균 살조 효과 확인

Ⅴ. 연구결과의 활용계획

1) 녹조 발생원인 물질의 근본적인 제거로 경기도 및 시흥시 저수지의 녹조 발생 억제
2) 양계, 오리, 돼지 농장에 사용했을 시 악취 발생 억제 효과
3) 골프장 작은 연못에 발생한 녹조 발생 억제 및 제거
4) 4대강 녹조 예방 및 녹조 확대 억제에 활용.

목 차

제 1 장 서론

1. 기술개발의 필요성 ---------- 2
2. 연구개발 목표 및 내용 ---------- 5

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

1. 국내의 관련기술의 현황 ---------- 10
2. 국외의 기술현황 ---------- 12

제 3 장 연구수행내용

1. 재료 및 방법 ---------- 16
2. 분석방법 ---------- 20

제 4 장 결론

1. 연구결과

1.1 김치유산균의 녹조 저해 및 녹조 제거 효과 ---------- 22
1.2. 맥주효모균의 녹조 저해 및 녹조 제거 효과 ---------- 31
1.3. 플라스크에서의 분리된 미생물의 녹조 분해 효과 ------ 36
1.4. Pilot에서의 분리된 미생물의 녹조 분해 효과 실험 ------ 46

제 5 장 연구결과의 활용계획

1. 기대효과 ---------- 50
2. 향후연구계획 및 사업성과 활용방안---------- 50

제 6 장 참고 문헌 ---------- 52

제 1 장 서 론

1. 연구의 필요성 ····· 2
2. 연구개발의 목적 ····· 5

제 1 장 서 론

녹조(Water bloom 혹은 algal bloom)는 호소에 남세균(cyanobacteria)의 과다 성장으로 인해 짙은 녹색으로 변하는 현상으로 전 세계적인 심각한 환경 문제이다. 녹조가 발생하면 시각적으로 나쁠 뿐만 아니라 심한 악취가 발생하고 신경독성 물질인 microcystin과 간독성 물질인 cyanopeptolin을 생산하여 사람과 동물에게 건강상의 심각한 피해를 준다. 남세균(cyanobacteria)은 엽록소를 가진 광합성 세균으로 *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Aphanizomenon* 속이 알려져 있다. 이 들중 우리나라 호소에서 주로 녹조를 일으키는 균은 *Microcystis aeruginosa*이다.

국내에서 녹조는 초여름(6월)-초가을(10월)에 걸쳐 발생하는데 이는 *Microcystis aeruginosas* 성장을 위한 최저온도는 15℃이고 최적온도가 32℃이기 때문이다.

녹조 발생 환경조건은 온도이외에 부영양화, 일사량, 물의 깊이, Lake turn-over 및 정체 등 다양한 원인이 복합적으로 작용해 발생된다. 특히, 수질내 질소와 인산 등의 농도가 높은 부영양화가 가장 큰 발생 원인이다. 그러나 *Microcystis aeruginosas* 등의 녹조균은 공기 중의 질소를 고정하는 능력이 있어 성장을 위한 가장 결정적인 영양성분은 인산이다. 특히, *Microcystis aeruginosas* 등의 남세균은 유기인산염을 가수분해후 생성된 인산을 이용하여 급속한 성장을 한다. 따라서 호소내 유기•무기인산염 농도는 녹조 발생과 깊은 연관이 있다.

지금까지 알려진 녹조 제거방법은 물리적, 화학적, 생물학적 방법으로 크게 나눈다. 첫째, 물리적 방법으로는 햇빛 차단, 유속 증가, 산소 유입, 오염토양 제거, 녹조 덩어리 걷어내기, 초음파, 고도 하수 종말 처리장 처리에 의한 영양물질 유입을 차단하는 방법이 있다. 현재 4대강 중심으로 발생된 녹조는 수문 개방을 통한 유속을 증가시켜 제거를 시도하고 있지만 그 효과가 확실하지 않다. 한편, 고도 하수 종말 처리장에 의한 유입 물질의 차단은 가장 효과적 방법이지만 시설 비용이 천문학적으로 소요되어 현실성이 없다.

둘째, 화학적 방법으로 녹조가 발생한 호소에 진흙 뿌리기, 과산화수소, 요오드, 산소계 살균제에 의해 살균, Mg, Al 등에 의한 공침법이 있다. 하지만 이들 방법은 공침에 의한 녹조 제거 효과는 확실하지만 원인 물질이 근본적으로 제거된 것이 아니기 때문에 녹조의 발생은 매년 되풀이된다. 더우기 호소내 화학물질으로 식수 오염 및 생태계 혼란을 일으켜 이들 물질의 사용은 극히 제한적이다.

셋째, 생물학적 방법은 녹조 분해 및 유기인산염 분해 능력이 있는 세균(Bacteria), 바이러스(Virus), 원생동물(Protozoa), 수초 등을 이용하는 것이다. 일부 세균은 녹조균을 가수 분해하여 이용하고 원생 동물은 녹조균을 직접 먹이로 섭취한다. 또한 일부 세균과 효모 등은 고분자 침전성 물질을 생성하여 녹조와 함께 응집 침전되어 녹조 제거에 효과적이다. 또한 일부의 세균과 효모는 호소내 부영양화 물질인 유기인산염을 분해하고 아질산과 암모니아등의 무기 질소원을 질소로 전환하는 탈질화 능력을 가지고 있어 수질 개선 및 부영양화를 막을 수 있다. 따라서 생물학적 방법은 가장 친환경적인 녹조제거 방법이다. 그러나 녹조분해 및 유기인산 분해능이 있는 세균, 효모, 원생동물 중에는 병원성 미생물이 있어 인체 및 환경에 위해를 주지 않는 안전한 미생물의 선택은 매우 중요하다.

앞서 언급한 바와 같이 녹조의 발생의 주된 원인은 부영양화중 특히 계분, 돈분에는 다량 존재하는 유기인산염의 유입에 의한 것이다. 따라서 호소내 녹조 발생을 억제하기 위해서는 계분, 돈분내의 유기인산염 농도를 낮추기 위해 사료내에 유기인산 분해 효소인 phytase가 첨가되도록 법 제정의 조치가 필요하다. 또한 과수원 혹은 밭에 뿌려진 계분 및 돈분 퇴비가 호소내로 직접 유입되지 못하도록 차단막을 설치하여 처리후 유입될 수 시설 보강도 시급히 이루어져야 할 것이다.

1. 기술개발의 필요성

1) 지역 환경 문제 해결

- 매년 초여름에서 가을까지 반복적으로 시흥시의 과림, 물왕, 쌍용저수지, 경기도의 신갈저수지, 원천저수지, 이동저수지등이 부영양화로 매년 녹조가 발생하여 이에 대한 근본적인 해결 방법이 필요함.

2) 새로운 접근에 의한 문제 해결

- 지금까지 국내외적으로 녹조 예방 및 녹조 제거에 대한 많은 연구가 있었으나 근본적인 해결책이 제시되지 않고 있음. 따라서 현재의 연구 접근법과는 다른 새로운 접근이 필요함. 많은 문헌 검토를 통하여 호소내 유기인산염 제거에 포커스를 맞춤.

- 본 연구에서는 녹조 발생의 원인물질인 유기인산염을 사계절 제거하기 위해 저온성 미생물을 자연으로부터 분리함. 가을, 겨울, 봄의 수온은 15℃ 이하임. 여름도 수심이 8미터 이상 되는 곳의 수온은 4-8℃의 저온임. 따라서 유기 무기 인산염 분해능이 우수한 저온성 미생물의 선별이 필요함.

- 문헌 조사결과, 김치 유산균과 맥주효모가 우수한 유기인산분해능이 있음을 확인하고 김치로부터 김치 유산균, 균주은행으로부터 맥주 효모 4종으로부터 우수균주 선별함.

3) 안전하고 친환경적 방법으로 녹조 문제 해결

- 화학적인 방법과 달리 안전한 미생물을 이용한 친환경적인 방법으로 녹조문제 해결.

4) 녹조 문제 해결로 지역 경제 활성화 및 큰 부가가치

- 골프장의 작은 연못, 낚시터 등의 녹조문제가 해결하게 되면 지역 경제 활성화가 될 것이며 판매에 의한 경제적인 부가가치도 클 것 임.

2. 연구개발 목표 및 내용

2.1 연구 개발 목표

본 과제의 연구개발 목표는 유기인산염 분해 효과 및 녹조에 대한 살균 효과가 우수한 미생물을 자연으로부터 선별 분리하여 녹조 예방 및 녹조 제거용 미생물 제제를 개발하는데 있다.

(1) 유기인산염 분해 효과 및 녹조 살균 효과가 우수한 미생물은 저온성 발효식품(김치, 맥주)로부터 선별.

(2) 김치, 맥주로부터 분리된 균주의 무기인산염 분해능, 유기인산염 분해능, 녹조 살균 효과, 계분 분해능을 검토하여 우수균주 선별.

(3) 선별된 3종 균주를 혼합한 미생물제제를 제조한 후 실험실적으로 녹조에 대한 살균 효과를 확인하고 이를 토대로 30L pilot 실험을 통하여 녹조 제거 효과 입증.

(4) 2차년도(2019년도)에 녹조가 매년 발생하는 시흥시 과림저수지, 경기도내 골프장 연못등에 현장적용 실험.

2.2 연구개발 내용

(1) 호소내 유기인산염 물질을 가수분해하는 미생물의 개발

녹조 발생의 가장 중요한 원인은 부영양화(eutrophication)이다. 부영양화는 "영양물질이 풍부하게 공급되었다"는 뜻의 용어로 강이나 호수 등에 생활하수나 가축분뇨 등의 유입으로 질소와 인산과 같은 영양성분이 높은 것을 의미한다. 질소(N)와 인산(PO_4)은 미생물의 성장에 필수적인 영양 성분으로 이들 물질이 풍부하면 남세균이 대량으로 증식하는데 가정에서 배출되는 세제류, 생활하수, 산업폐수, 농경지의 비료와 퇴비 등이 호소로 흘러 들어 부영양화를 유발한다.

광합성 세균인 남세균은 공기중의 질소를 고정할 수 있는 능력을 가지고 있어 질소 성분이 낮은 조건하에서도 온도와 빛 등의 배양환경이 맞으면 인산 성분만 충분히 존재하면 폭발적으로 증식할 수 있다. 특히, 남세균은 일반적인 미생물과 다르게 호소내 유기인산염을 가수분해하여 인산을 만들어내는 능력이 탁월하여 호소내

유기인산염의 존재는 남세균 번창의 주된 원인이다. 따라서 녹조 발생을 억제하기 위해서는 호소내 유기인산염 농도를 낮추기 위한 방법이 요구된다. 호소내로 유입되는 유기인산염 농도를 낮추기 위한 방법으로는 첫째, 하천 곳곳에 하수 종말 처리장을 설치하는 것이지만 광범위한 지역에 설치가 어렵고 막대한 투자를 요구한다. 둘째는 호소내로 가금류 및 돼지 변의 유입을 최대로 억제해야 한다. 가금류와 돼지 변의 유기인산량은 소보다 압도적으로 높다. 따라서 가금류와 돼지 사료에 가수분해 효소를 첨가하여 그 배출량을 감소시키는 방법이다. 유럽의 경우, 가금류와 돼지 사료에 phytase를 첨해하여 유기인산의 배출을 감소시키기 위해 노력하고 있지만 우리나라는 phytase첨가를 법적으로 규제하지 않고 있다. 또한 과수원에 뿌리는 가금류와 돼지 변의 경우, 완전한 퇴비화된 것만을 사용해야 할 것이다. 셋째는 호소내 퇴적되어 있는 유기인산염 퇴적층을 제거하는 것이지만 이 또한 막대한 예산이 소요되는 작업이다. 넷째는 호소내에 수상식물을 재배하여 토양 미생물에 의해 유기인산염을 분해하는 방법이다. 그러나 수상 식물은 호소내 수심이 낮은 제한적인 지역에서 성장하기 때문에 재배가 쉽지 않다 다섯째 방법은 호소내에 유기인산염 분해능 우수한 미생물을 공급하여 자연적으로 분해시키는 방법이다. 특히, 봄, 가을, 겨울등 수온이 낮은 계절에도 분해하기 위해서는 저온성 미생물이 필요하다. 본 연구자는 불용성 유기•무기인산염 분해능이 우수한 저온성 미생물을 이용하여 호소내 유기•무기인산염을 분해하는 것으로 목표로 하였다.

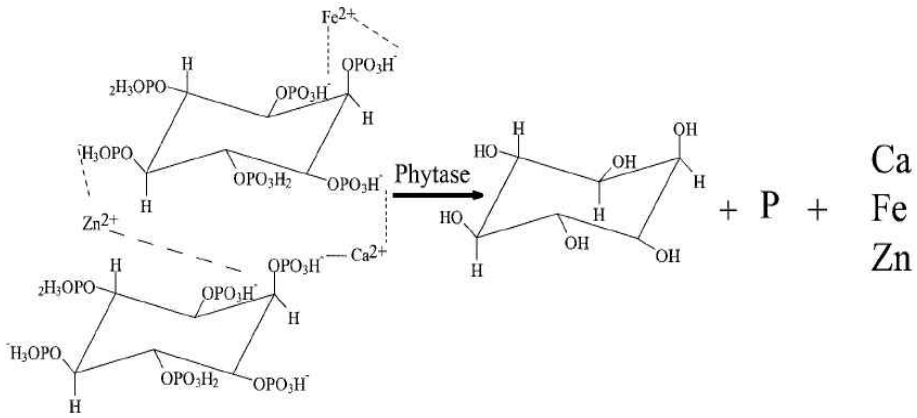


Fig. 1. 불용성 유기인산염 (Inositol phosphate염)구조와 효소 분해시 생성되는 물질

(2) 유기인산염을 분해하는 저온성 미생물의 개발

우리나라의 호소에서 녹조를 일으키는 주된 미생물은 Microcystis로 이의 최저 생육온도는 18℃이다. 따라서 녹조 발생은 따뜻한 수온(25℃-30℃)의 초여름-초가을에 발생한다. 그러나 물의 온도는 여름과 겨울에 수심에 따라 다양성을 나타내는데 이를 성층화 현상이라 한다. 성층화 현상이란 따뜻하고 밀도가 높은 물이 위에 놓이고 차갑고 밀도가 낮은 물이 아래에 놓여 밀도차에 의해 수 층이 분리되며 물이 수직운동이 없는 상태를 말한다. 이러한 현상은 특히 여름에 뚜렷하게 나타난다. 여름에 수심 10미터 이하의 수온은 약 4℃-8℃의 저온을 나타낸다. 또한, 추운 겨울 수표면의 온도는 0℃이지만 수심 10미터 바닥의 수온은 약 4℃ 이상을 나타낸다. 그러나 봄과 가을에는 호소에 대류가 발생하여 호소내 수온은 외부 평균 기온(10-15℃)과 비슷하다. 그러나 지금까지 알려진 유기인산 분해능이 있는 미생물들은 중온성 혹은 고온성 미생물이기 때문에 호소내 유기인산염 분해 미생물로는 적절치 않다. 따라서 본 연구자는 호소8℃내 바닥에 존재하는 유기인산염을 가수분해하기 위해서는 저온(4-15℃)에서 생육하며 유기인산 분해능이 있는 미생물 제제가 필요하다고 생각했다.

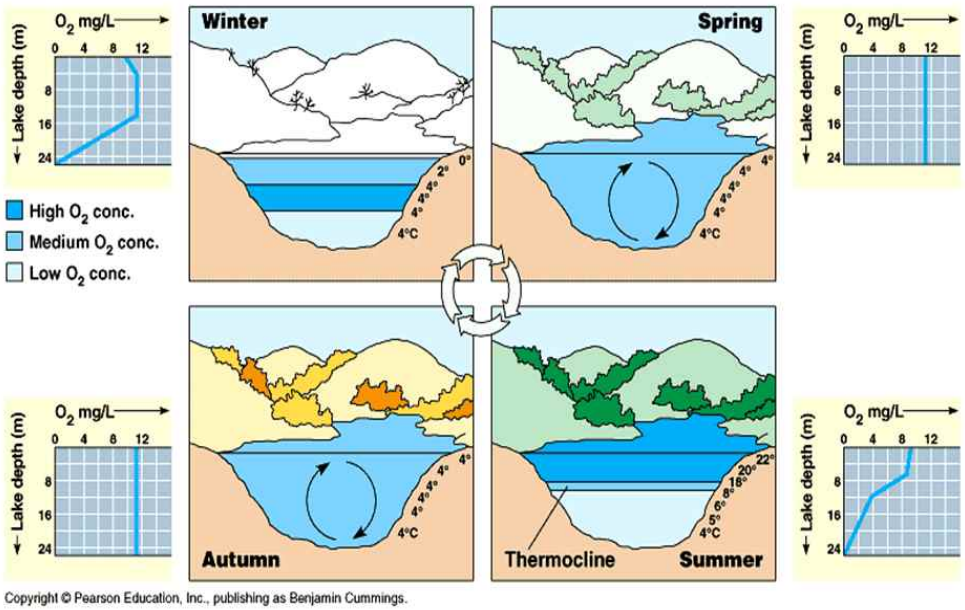


Fig. 2. 계절에 따른 물의 순환과 물의 깊이에 따른 수온과 용존산소량

(3) 녹조에 대하여 살균 효과를 갖는 안전한 미생물의 개발

지금까지 녹조를 살균할 수 있는 미생물로는 세균류, 곰팡이, 효모, 원생동물등 다양한 미생물이 알려져 있다. 그러나 이들 미생물이 녹조에 대한 살균 효과가 아무리 우수할지라도 인체, 동물, 식물에 해로운 미생물은 사용할 수 없다. 따라서 소위 인체에 안전한 미생물로 인정되는 미생물(GRAS Micro-organism)을 연구 대상으로 해야만 한다. 지금까지 안전한 미생물로 인정되는 미생물은 유산균, 일부 식용 효모, 일부의 Bacillus로 알려져 있다. 따라서 저온성 미생물로 유기인산염을 분해 및 녹조에 대하여 살균효과를 나타나는 균주는 매우 제한적이다. 본 연구자는 이러한 조건을 갖춘 미생물로 김치유산균과 맥주 효모에 주목하였다. 김치유산균은 30℃에서도 매우 잘 성장하지만 2-8℃에서도 생육하는 내냉성 미생물(psychrotroph)로 안전한 미생물이다. 또한 독일식 맥주 발효에 사용되는 효모도 역시 25℃에서도 잘 생육하지만 5-8℃에서도 생육하는 내냉성 미생물로 안전한 미생물이다. 따라서 본 연구자는 내냉성 미생물인 김치유산균과 맥주효모를 이용하여 세계 최초로 유기 인산염 분해 및 녹조 살균 효과를 갖는 미생물제제를 개발하고자 하였다.

Table 1. 미생물 종류에 따른 녹조 제거 미생물

미생물 종류	녹조제거 미생물
세균	*Lactobacillus amylovorus, Escherichia coil, Staphylococcus Lactobacillus fructivorans, Bacillus subtilis, Serratia sp. Pseudomonas sp., Streptomyces sp. Strptococcus sp.*
효모	*Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces pastorianus Schwanniomyces castellii, Candia utilis,*
곰팡이	*Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Aspergillus awamori, Aspergillus ficuum, Aspergillus fumigatus*

제 2 장 국내외 기술개발 현황

2.1 국내의 관련기술의 현황 ····· 10
2.2 국외의 기술 현황 ····· 12

제 2 장 국내외 기술 개발 현황

녹조 원인균인 남세균(cyanobacteria)는 광합성 세균이며 질소고정 능력을 가지고 있다. 따라서 이들은 빛을 에너지원으로 공기 중의 질소를 질소원으로 한다. 따라서 남세균 성장에 가장 많은 량 요구되는 영양성분은 인산(PO_4)으로 호소내 고농도 인산에 의한 부영양화는 녹조 번창의 주된 원인이다.

인산은 미생물 뿐만 아니라 식물의 성장에도 필수적인 역할을 하는 물질이지만 토양중에 존재하는 인산의 95~99%는 식물이 이용할 수 없는 불용성 인산이다 (Vassileva *et al.*, 1998). 따라서 과수원, 밭농사, 벼농사 등에 계분 및 돈분 등의 퇴비 혹은 무기 인산염의 형태로 많은 양이 시비되고 있다. 그러나 농사를 위해 시비된 많은 양의 인산염은 강우시 호소내로 유입되고 화학적, 생물학적 반응을 거쳐 식물이 이용할 수 없는 불용화된 형태로 침전된다.

그러나 수온이 따뜻한 하절기 호소내 불용성 인산염이 lake turn over에 의해 부상하면 남세균은 불용성 인산의 가수분해시 생성된 인산을 사용하여 폭발적인 성장을 한다. 따라서 녹조의 가장 큰 원인 물질은 호소내 존재하는 불용성 인산염이다. 녹조 발생을 억제하려면 호소내 침전된 불용화 인산 물질을 제거하는 것이 필요하다. 그러나 호소내 불용성 물질을 제거하는 방법은 첫째 물리적으로 불용성 인산염으로 오염된 토양을 준설하는 것이지만 이는 많은 시간과 비용이 소요되고 다시 호소내로 재유입되어 그 효과가 미미하다. 따라서 호소내 불용성 물질을 제거하는 방법은 미생물을 이용하여 꾸준히 이들 물질을 분해하는 방법이 최선이라 사료된다.

불용성 인산염을 가수분해하는 미생물의 작용기작은 주로 미생물이 분비하는 gluconic acid, 2-ketobluconic acid, lactic, isovaleric, isobutyric, acetic, glycolic, oxalic, malonic, succinic acid와 같은 유기산에 의하여 일어난다(Suh and Kwon, 2008). 인산 가용화 미생물로는 *Bacillus, Pseudomonas, Erwinia, Agrobacterium, Serratia, Flavobacterium, Enterobacter, Micrococcus, Azotobacter, Bradyrhizobium, Salmonella, Alcaligenes, Chromobacterium, Arthrobacter* 등의 다양한 세균과 *Streptomyces* 등의 방선균, *Penicillium, Aspergillus, Rhizopus, Fusarium, Sclerotium* 등의 사상균이 보고되었다 (Zhao and Lin, 2001). 효모 중에서는 토양에서 분리한 *Candida, Geotrichum, Rhodotorula, Williopsis* 등 소수의 종에서만 인산 가용화 활성이 확인되었다 (Alfred, 2011). 그러나 불용성 인산가용화 미생물중에는 병원성을 가지고 있는 것이 많아 이들의 선택시 인체 안전성, 환경에 미치는 영향등을 고려하여 신중하게 선별되어야 할 것이다. 한편 호소내 수온은 겨울은 4-6℃, 봄-가을은 6-20℃이고 여름일지라도 수심이 10미터 이상의 깊은 곳은 4-8℃를 나타낸다. 그러나 아쉽게도 지금까지 대부분의 연구자들은 중온성 혹은 고온성 미생물로부터 불용성 인산염

분해균을 분리하였다. 그러나 중온성 혹은 고온성 미생물은 수온이 높은 여름에만 작용하며 여름일지라도 수심이 깊어 수온이 낮은 곳에서는 전혀 가수분해 작용을 하지 못한다. 따라서 본 연구자는 지금까지 연구자와 다르게 호소의 실제적인 환경을 고려하여 년중 불용성 인산염을 가수분해하기 위해 저온성미생물(Psychrophile) 혹은 내냉성미생물(Psychrotroph)로부터 불용성 인산염 가수분해 이어야만 한다. 본 연구자는 인체 안전성 및 환경에 미치는 영향을 고려하여 수천년간 식용하여 온 김치유산균과 맥주 효모를 사용하여 불용성 인산염을 가수분해하는 균주를 선별하였다.

1. 국내의 관련기술 현황

국내에서의 미생물에 이용한 불용화 무기 인산염 및 유기인산염 분해, 미생물에 의한 녹조 살조 기술 연구 현황은 많지 않고 단지 몇 편이 있다..

(1) 한국 전통 발효식품인 메주, 된장으로부터 무기인산 가용화 활성이 우수한 효모 5균주를 선발하였다. 선발한 균주는 *Pichia anomala* 2종, 3균주는 각각 *Pichia farinosa, Candida versatilis, Pichia subpelliculosa*로 동정되었다. 이들 효모는 20~35℃의 온도에서 잘 자라는 중온성으로 tricalcium phosphate를 가용화하였으며 안전하여 환경친화형 토양개량 미생물제로 개발할 예정이다(14).

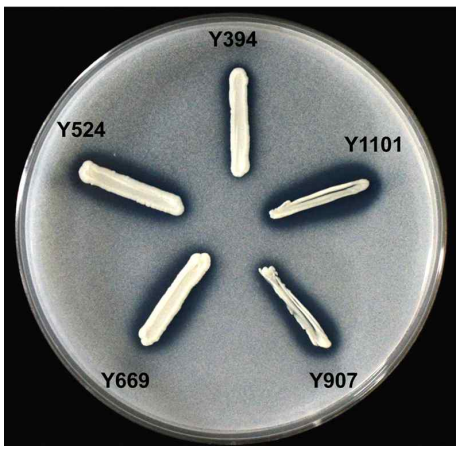


Fig. 3. 발효식품부터 분리된 효모들의 tricalcium phosphate 가용화

(2) 콩의 뿌리로부터 분리된 세균 *Rahnella aqualitis*는 인산기와 칼슘으로 구성된 불용성 인산염인 hydroxyapatite를 가용화하였다(13).

(3) 강등은 토양으로 분리된 곰팡이 Aspergillus가 난용성 인산염을 분해한다고 보고하였다. 본 연구는 난용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물을 개발하여 고효율의 biofertilizer를 개발함을 목적으로 하고 있다(17)

(4) 빵 효모인 *S. cerevisiae* 균주를 사용하여 phytase 생성 연구를 한 결과, 본 효모는 세포 내외로 phytase를 생산하였다. 이 효소의 최적 반응 pH는 3.5, 최적 반응온도는 40℃로 나타났다. 이 균주는 4.3 mM phytate를 36시간만에 95% 이상 분해하였고 0.4 mg-DCW/ml하에서 12시간만에 phytate를 90% 이상 효율적으로 분해하였다(15).

(5) 녹조의 증식을 억제하기 위하여 팔당호 주변에 자생하는 수생식물과 육상식물을 사용하여 녹조 제어 효과를 조사하였다. 식물에 의한 조류 증식 억제 효과는 식물 투여 후 7일 후 가장 좋은 효과를 나타내었다. 특히 애기마름은 1.25g/L 투여시 99%의 살조 효과를 보였다(16). .

2. 국외의 관련기술 현황

국외에서는 녹조를 생물학적으로 억제하기 위한 다양한 연구가 진행되었다. 원인물질인 무기인산염 분해, 유기인산염 분해하기 위한 연구와 녹조의 원인균을 다양한 미생물에 의해 살조하는 연구가 진행되었다.

1) 12개의 유산균을 사용하여 유기인산염인 phytate 분해 능력에 대하여 조사한 결과, 이들 모두 phytate를 분해하였다. 유산균 접종된 배양액에서 phytate가 사라지는 이유는 첫째는 유산균이 분비하는 phytase 효소에 의한 것이고 둘째는 lactic acid 생성에 따른 pH저하에 의해 무기인산염이 분해된다고 평가하였다(2).

2) 다양한 효모를 사용하여 phytase 분비능을 조사한 결과, 효모 Pichia 는 높은 phytase 활성이 가지고 있는 것으로 밝혀졌다. 이 효모로부터 얻어진 phytase의 활성

을 조사한 결과, 최적 pH는 4-5, 최적 반응온도는 60-80℃의 고온으로 나타났다(3).

3) Phytase 활성이 높은 효모를 선별하기 위하여 122개의 효모를 사용하여 활성 조사를 한 결과, 10개 효모균에서 phytase 활성이 확인되었다. 가장 높은 phytase 활성을 나타낸 균종은 *Arxula adeninivorans* 와 *Pichia anomala*이었다. 특히, *Arxula adeninivorans*는 세포내 효소와 세포외 효소를 함께 생산하였다. 반면에 *Pichia anomala*는 단지 세포외 효소를 분비하였다(5).

4) 폐수처리 시설에서 분리된 *Pseudomonas sp.*를 *Microcystis aeruginosa*과 함께 30℃, 5일 배양한 결과, *Microcystis aeruginosa*의 제거율은 100%이었다. 또한 chlorophyll a, 탁도, COD등도 각각 70%, 84%, 그리고 41%의 제거 효과를 나타내었다(1).

5) Phytase를 생성하는 미생물에 대하여 조사한 결과, 대부분의 상업적인 phytase는 곰팡이인 Aspergillus로부터 생산되었다. 그밖에 phytase를 생산하는 세균들은 토양이나 수상환경으로부터 분리된 Bacillus, Enterobacteria, Pseudomonas, Lactobacillus, Klebsiella, Yersinia 이다.

6) 인도 전통 액상 사료인 “Kudithi”와 폐기물 발효액 “Kooradu”를 사용하여 phytase 생산균을 분리한 결과, 효모, *Bacillus, Pseudomonas, Lactobacillus, Serratia, Staphylococcus*등의 균주가 분리되었다. 이들중 세균인 *Staphylococcus*가 가장 강한 phytase 활성을 나타내었고 효모, *Bacillus, Pseudomonas* 는 이들의 1/2 수준의 활성을 보였다(4) .
그러나 *Staphylococcus*는 포도상 구균으로 강한 병원성 미생물이기 때문에 살조제로 사용 가능성은 없다.

7) 곡물에 근거를 둔 발효 식품과 맥주에서 phytase 활성 높은 효모가 분리되었다. 이들 분리된 효모는 *S. cerevisiae, S. pastorianus, S. bayanus, Kazachstania exigua, Candida krusei* 등 이었다. 이들 중에서 맥주로 분리된 *S. pastorianus*가 phytase를 세포외 효소로 강하게 분비하였다(7).

8) 쿼럼센싱은 미생물이 일정 농도 이상이 되면 미생물간에 신호전달을 하여 새로운 특성을 나타내는 것으로 말한다. “*Microcystis aeruginosa*는 쿼럼센싱을 하는가”

에서 *Microcystis aeruginosa* 균수가 일정 농도이상이면 쿼럼센싱을 하여 biofilm을 형성하게 되어 원생동물에 대하여 저항하게 된다고 보고하였다. 따라서 *Microcystis aeruginosa*에 대한 억제 미생물을 넣어주면 *Microcystis aeruginosa*는 biofilm을 형성하지 않아 원생동물이 보다 쉽게 섭취할 것이다(8). 따라서 살조 미생물은 *Microcystis aeruginosa*의 쿼럼센싱을 억제하는 역할을 한다.

9) Algal bloom이 발생된 호소내 녹조로부터 Microcytis를 가수분해하는 균주를 분리하였다. 이들로부터 분리된 녹조 가수분해 세균은 *Bacillus mycoides, Pseudomonas stutzeri*로 밝혀졌다(11).

10) 녹조로부터 분리된 *Pseudomonas putida* CH-22의 *Microcystis aeruginosa* 분해 능력이 확인되었다. 이 균주와 녹조를 함께 배양할 시 7일 후 녹조 사멸율은 98.8%에 도달하였다. 또한 이 균주로 처리한 결과, 클로로필 a의 농도는 90% 이상 감소하였다. 따라서 *Pseudomonas putida* CH-22를 녹조 발생 호소에 적용은 호소내 녹조를 감소시킬 것이다(9).

11) 효모인 *Candida utilis*는 질소와 인산을 세포내로 흡수하여 호소내 *Microcystis aeruginosa* 균수 조정이 가능하였다. 탄소원이 없는 상태에서 *Candida utilis*를 접종한 결과, 4일 후 NH_4는 87.4%, 인산은 83.7% 각각 감소하였다. 또한 *Candida utilis*는 *Microcystis aeruginosa*를 현저히 감소시켰다. 녹조균의 감소는 *Candida utilis*에 의한 부영양화 물질인 질소와 인산의 감소에 의한 것이다(10).

12) 녹조를 발생시키는 cyanobacteria와 규조류에 대하여 살조 효과를 나타내는 미생물에 대하여 조사하였다. *Microcystis aeruginosa*의 성장은 방선균인 *Streptomyces neyagawensis*와 섬모충류인 *Stentor roeselii*에 의해 효과적으로 저해되었다. 그러나 이 두 균주을 함께 처리할시는 녹조가 오히려 증가하였다. 또한 저온에서 효소내 녹조를 일으키는 *Stephanodiscus hantzschii* 는 *Pseudomonas putida*를 처리하였을 시 현저히 감소하였다. 세균 *Pseudomonas putida*와 섬모충 *Stentor roeselii*를 함께 처리하였을 시 *Stephanodiscus hantzschii*는 더 현저하게 감소하였다. 이들 결과는 두 개 이상의 다른 미생물을 처리함에 의해 살조효과가 증가하는 결과를 나타낸다. 따라서 이러한 살조능력이 있는 두 개 이상의 미생물을 함께 처리하는 방법은 녹조를 제거하는데 유용하게 이용될 것이다(14)

제 3 장 연구수행내용

1. 연구목적 ····· 16
1.1 재료 및 방법 ····· 16
1.2 분석방법 ····· 20

제 3 장 연구수행내용

1. 연구목적

본 과제의 연구개발 목표는 김치 및 맥주효모로부터 저온에서 유기인산염 분해 효과 및 녹조의 살균 효과가 우수한 미생물을 분리 선별하여 녹조 예방 및 녹조 제거용 미생물 제제를 개발하는데 있다.

1.1 재료 및 방법

1.1.1 실험에 사용한 재료

본 연구에서는 인간과 자연에서 안전성이 있으며 저온에서 성장하는 균주를 분리하기 위하여 김치와 맥주 효모를 대상으로 하였다. 김치는 가정에서 담군 후 4℃에서 숙성중인 깍두기와 배추김치 국물을 사용하였다. 맥주 효모균은 균주 은행인 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)로부터 S. carsbergensis 4종(KCTC 7233, KCTC 7244, KCTC 17225, KCTC 17659), 시중으로부터 구입된 김치유산균 L. plantarum을 구입하여 사용하였다. 녹조의 살균 효과 실험에 사용한 녹조는 시흥시 과림저수지에 발생한 녹조를 -70℃ 냉동고에 보관하면서 해동하여 사용하였다.

1.1.2 녹조 억제 및 녹조 제거 실험

(1) 실험장치

녹조 억제 및 녹조 제거 실험에는 500 ml 플라스크에 녹조 200 ml를 넣고 실온, 120 rpm의 조건으로 진탕배양기를 사용하여 배양하였다. 이때 빛은 LED 램프(10 W)를 하루 14시간 공급하였다. 녹조 억제 및 제거 Pilot 실험은 실온에서 10 L 플라스틱 통에 3리터의 녹조를 가한 후 공기 주입기를 통하여 공기를 24시간 공급하면서 배양하였다. 주입된 공기에 의한 녹조의 DO는 약 5-7 ppm 수준을 유지하였다.

(2) 재료 및 방법

1) 유산균의 분리

유산균은 안전성이 입증된 김치로부터 BCP 배지에서 노란색을 나타내는 균을 선별한 후 순수 분리하여 사용하였다. 또한 맥주효모는 균주 은행으로부터 4종(KCTC 7233, KCTC 7244, KCTC 17225, KCTC 17659)을 구입에서 사용하였다.

2) 무기 인산 가용화 균주 선발

무기인산 가용화 유산균 선발에는 0.2%의 tricalcium phosphate가 포함된 BCP 고체배지를 사용하였다. BCP agar 배지로 조제하였으며 pH는 7.0으로 조정하였다. 배양은 선별된 유산균주를 접종하고 15℃에서 7일간 배양하여 균체 주위에 불용성 인산이 용해되어 투명환을 형성하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 BCP 고체배지에서 투명환 형성 여부를 수회 반복하여 활성을 확인하여 선발하였다. 무기인산 가용화 효모균 선발에는 0.2%의 tricalcium phosphate가 포함된 Yeast Malt 고체배지를 사용하였으며 pH는 5.0으로 조정하였다. 구입된 맥주 효모 균주를 접종하고 15℃에서 7일간 배양하여 균체 주위에 불용성 인산이 용해되어 투명환을 형성하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 YM 고체배지에서 투명환 형성 여부를 수회 반복하여 활성을 확인하여 선발하였다.

2) Inositol phosphate염으로부터 인산가용화 균주 선발

Inositol phosphate염 인산 가용화 유산균 선발에는 0.4% Inositol phosphate Ca염이 포함된 BCP 고체배지를 사용하였다. 배양은 선별된 유산균주를 접종하고 15℃에서 7일간 배양하면서 Inositol phosphate Ca염이 용해되어 투명환을 형성하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 BCP 고체배지에서 투명환 형성 여부를 수회 반복하여 활성을 확인하여 선발하였다. Inositol phosphate염 인산 가용화 효모균 선발에는 0.4% Inositol phosphate Ca염이 포함된 Yeast Malt 고체배지를 사용하였으며 pH는 5.0으로 조정하였다. 구입된 맥주 효모 균주를 접종하고 15℃에서 7일간 배양하여 균체 주위에 불용성의 Inositol phosphate염 용해되어 투명환을 형성하는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 YM 고체배지에서 투명환 형성 여부를 수회 반복하여 활성을 확인하여 선발하였다.

3) 계분 가용화 균주 선발

계분에는 inositol phosphate염과 단백질을 다량 포함하고 있다. 계분 포함배지에서 투명환이 생성된다면 이는 유기인산염 분해효소를 생산한다고 가정할 수 있다. 특히, 강과 호소에 계분으로부터 유기인산염이 녹조 발생의 주원인이기 때문에 계

분을 가수분해한다면 녹조 발생 원인물질의 제거라고 추론할 수 있다. 따라서 유산균 성장배지와 효모 성장 배지에 5% 계분을 첨가한 후 투명환 생성여부를 확인하였다. 계분 분해 유산균 선발시에는 5% 계분이 포함된 BCP 고체배지를 사용하였다. 계분 첨가배지에 선별된 유산균주를 접종하고 15℃에서 7일간 배양하면서 투명환을 형성을 확인하였다. 선별된 균주는 5% 계분 첨가 BCP 고체배지에서 투명환 형성 여부를 수회 반복하여 활성을 확인하여 선발하였다. 계분 가용화 효모균 선발에는 5% 계분이 포함된 Yeast Malt 고체배지를 사용하였으며 pH는 5.0으로 조정하였다. 구입된 4종 맥주 효모 균주를 접종하고 15℃에서 7일간 배양하면서 투명환 생성 여부를 확인하였다.

4) 플라스크에 의한 녹조 분해 확인

시흥시 과림저수지에서 샘플링된 녹조에 대한 살조 효과를 확인하고자 Shaker에서 플라스크 실험을 실시하였다. 이때 녹조의 성장을 위한 부영양화 조건을 만들어 주기 위하여 녹조액에 100 ppm의 인산을 첨가하였다.

배양조건은 500 mL 삼각 플라스크에 300 mL 과림저수지 녹조를 넣고 28℃, 100 rpm, LED 램프(10 W) 하에서 진탕하면서 5일간 배양하였다. 램프는 아침 7시부터-저녁 10시까지 하루 15시간 조사하였다. 녹조의 분해와 균의 응집을 확인하기 위하여 샘플링한 배양액은 100 mL 매스실린더에 넣고 30분간 방치후 균주간의 차이를 비교 분석하였다. 녹조 분해 효과 확인에는 김치유산균 L-9, 맥주 효모 Y-44, 김치 유산균 CJ- 와 이들 3종 균주가 혼합된 배양액을 사용하였다.

또한 접종량에 따른 녹조 살조효과 차이를 확인하기 위해 0.1%, 0.5%, 1% 등을 각각 접종하여 배양하였다. 주입된 공기에 의한 녹조의 DO는 약 5-7 ppm 수준을 유지하였다.

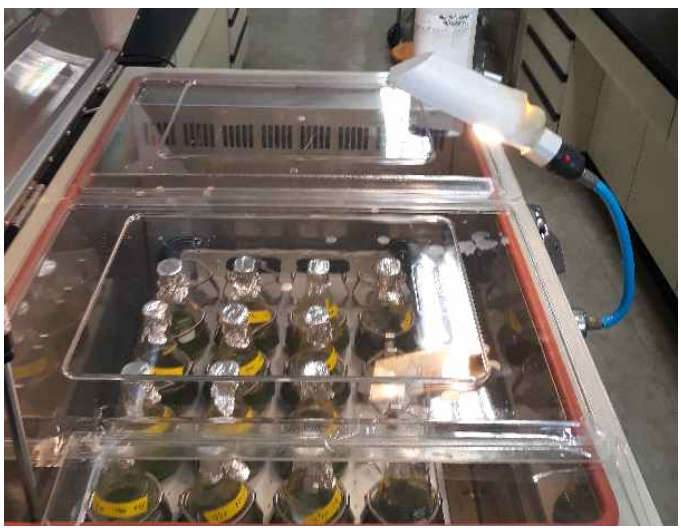


Fig. 4. 플라스크에 의한 녹조 분해실험을 위한 장치

5) Pilot에 의한 녹조 분해 확인

Pilot 실험은 산소주입장치가 설치된 60 L 반응기에 시흥시 과림저수지에 샘플링된 녹조 25 L를 주입하고 실온 (20-25℃)에서 형광등(하루 24시간 조사)을 빛으로 사용하여 7일간 배양하며 녹조 살균 효과를 검토하였다. 이때 녹조의 성장을 위한 부영양화 조건을 만들어주기 위하여 배양액에 100 ppm의 인산을 첨가하였다. 녹조 분해 효과 확인에는 김치유산균 L-9, 맥주 효모 Y-44, 김치 유산균 CJ- 와 이들 3종 균주가 혼합된 배양액을 사용하였으며 접종은 0.5%하였다.

1.2 분석방법

1) Inositol phosphate로부터 유리인산 농도 측정

유기인산염 가용화 능력 측정은 유산균인 경n는 0.2%의 inositol phosphate가 포함된 MRS 액체배지를, 효모는 0.2%의 inositol phosphate가 포함된 YM 배지를 사용하였으며 28, 150 rpm의 조건으로 진탕배양하면서 1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13일 간격으로 배양액을 10 mL씩 취하여 유리인산의 양을 측정하였다. 유리 인산의 양을 측정하기 위하여 각 배양액 2 mL을 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하고 상청액을 0.45 um의 일회용 멸균 필터로 여과하여 균체와 불용성 잔류물을 제거하였다. 배양액 중의 유리인산 농도는 Phosphate Colorimetric Assay Kit (BioVision Incorporated)를 이용하여 반응시키고 650 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 얻어진 각 시료의 흡광도를 인산 표준용액으로 작성한 standard curve와 비교하여 유리인산의 농도를 계산하였다.

2) 김치로부터 분리된 유산균주의 동정

유산균주의 동정은 API 50 동정 키트를 사용하여 동정하였다. 동정키트의 배양은 37℃, 혐기적인 조건으로 배양하였다.

3) 클로르필 제거 효과

녹조 살조 미생물의 녹조 색소제거를 확인하기 위하여 배양액 100mL를 매스실린더를 붓고 30분간 방치후 응집되어 침전된 녹조의 양(SV 30)을 측정하였으며 색소의 변화를 확인하였다.

제 4 장 연구결과

1. 연구결과 ---------- 21
1.1 김치유산균의 녹조 저해 및 녹조 제거 효과 결과 --------- 21
1.2. 맥주효모균의 무기, 유기인산분해 ---------- 30
1.3. 플라스크에서의 분리된 미생물의 녹조 분해 효과 ---------- 35
1.4. Pilot에서의 분리된 미생물의 녹조 분해 효과 실험 ---------- 45

제 4 장 결론

1. 연구결과

1.1 김치유산균의 녹조 저해 및 녹조 제거 효과

1.1.1 김치로부터 저온성 유산균 분리

배추김치, 깍두기, 물김치 등의 김치로부터 저온성 유산균을 분리하고자 15℃와 7℃ incubator에서 배양하였다. 김치로부터 분리된 균주가 유산균임을 확인하기 위하여 유산균 분별 배지(Differential media)인 BCP 배지를 사용하였다. 균의 성장시 노란색을 나타내는 균주는 산을 생성하는 균주이기 때문에 1차적으로 유산균으로 선별하였다. 김치와 깍두기국물의 유산균수는 $2\sim7.1X10^{8}$ CFU/ml 수준으로 나타났다(Fig. 3). BCP배지에서 노란색을 나타낸 유산균중 30균주를 선별한 후 7℃와 15℃등의 저온에서 성장을 확인하였다. 분리된 30균주는 7℃와 15℃등의 저온에서 잘 성장하였다. 저온에서 순수 분리 배양된 균주를 사용하여 무기인 분해능, 유기인 분해능, 계분 분해 등을 확인하고 분리된 균주중 가장 우수한 균주를 선별하였다.

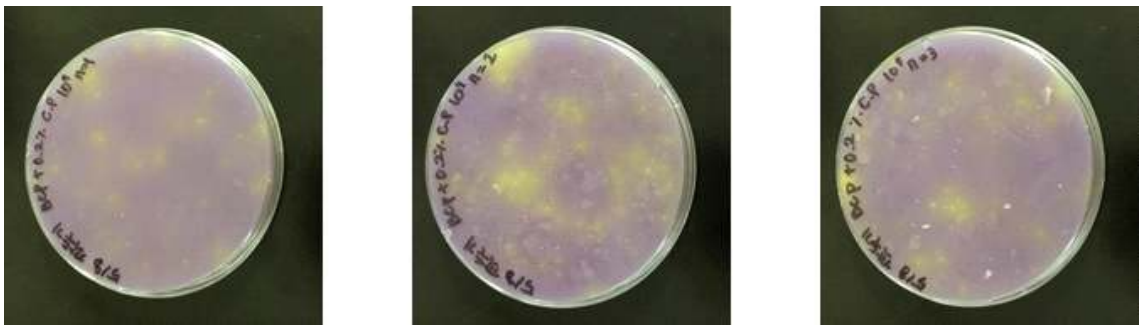


Fig. 5. 깍두기 및 배추 김치에서 분리된 김치유산균(15도씨 배양, BCP배지)

1.1.2 김치로부터 분리된 유산균의 Calcium Phosphate 분해능 실험

김치로부터 분리된 30개 유산균의 무기인산으로부터 인산 분해능을 확인하고자 BCP배지에 calcium phosphate (0.2%)를 첨가한 후 15℃, 7일간 배양하면서 투명환 크기(clear zone size)를 비교하였다(Fig. 4). 분리된 30개 유산균은 모두 calcium phosphate 첨가배지에서 투명환을 나타내어 calcium phosphate를 가수분해하는 것으로 확인되었다. 특히 30개의 유산균중 L-8, L-9, L-15, L-30, L-32 균주의 분해능이 우수하게 나타났다.



Fig. 6. 김치로부터 분리된 김치 유산균의 calcium phosphate 분해능 비교

1.1.3. 김치유산균의 inositol phosphate염 분해능 비교 실험

BCP배지에 유기 인산염인 inositol phosphate Ca염 (0.4%)를 첨가한 후 15℃, 7일간 배양하면서 분리된 30개 김치유산균의 유기인산염 분해능을 비교하였다. 분리된 30개 유산균 모두 inositol phosphate Ca염를 가수분해하는 것으로 확인되었다 (Fig. 5). 특히 이들 김치유산균중 L-8, L-9, L-15, L-30, L-32번 균주의 분해능이 우수하게 나타났다.



Fig. 7. 김치유산균의 inositol phosphate염 분해능 비교

1.1.4. 김치유산균의 계분 분해능 비교 실험

계분은 다른 분뇨에 비하여 inositol phosphate 염과 단백질을 다량 함유하고 있다. 그러나 유산균은 단백질 분해 능력이 약한 균주이기 때문에 유산균이 계분을 분해하여 투명환(clear zone)을 형성한다면 이는 유산균에 의한 inositol phosphate 염 분해 능력으로 판단되었다. 따라서 BCP배지에 5% 계분을 첨가한 후 김치유산균을 접종한 후 15℃, 7일간 배양하면서 계분 분해능을 비교 확인하였다. 김치로부터 분리된 30개 유산균은 모두 계분을 가수분해하는 것으로 확인되었다. 특히 이들 김치 유산균중 L-2, L-4, L-8, L-12, L-19, L-22 , L-3 균주의 투명환이 크게 나타나타났다. 따라서 김치 유산균은 계분내 inositol phosphate 염 분해할 수 있음에 따라 호소 혹은 강 바닥에 존재하는 inositol phosphate 염을 분해할 수 있을 것으로 사료되었다.

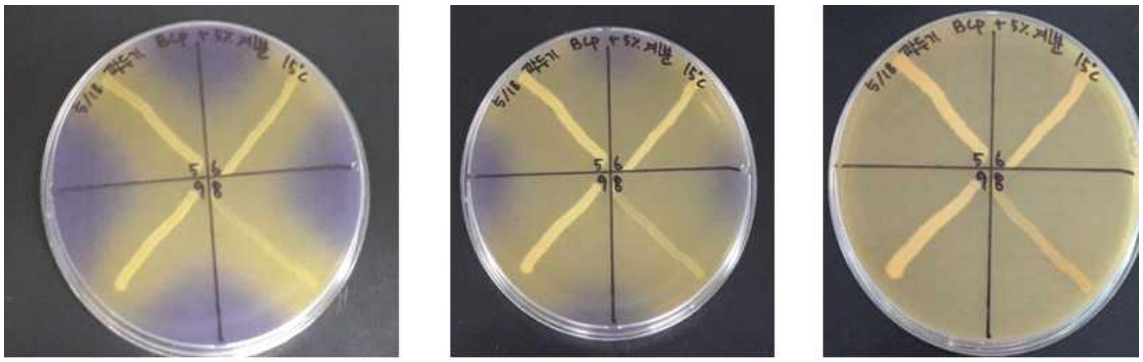


Fig. 8. 5% 계분포함 BCP배지에서 김치유산균의 투명환 생성 확인

1.1.5. 저온(7℃)에서의 김치유산균의 무기인산염, 유기인산염, 계분 분해능 비교 실험

앞서의 실험에서 분리된 김치유산균은 15℃에서 잘 성장하고 무기인산염, 유기인산염, 계분등을 잘 분해하는 것으로 나타났다. 따라서 7℃의 낮은 온도조건에서 분리된 김치 유산균의 성장성 및 무기인산염, 유기인산염, 계분 등의 분해 능력을 확인하였다. BCP배지에 calcium phosphate (0.2%), inositol phosphate salt(0.4%), 7%의 계분을 첨가한 후 7℃, 7일간 배양하면서 분리된 김치유산균의 분해능을 비교하였다. 김치로부터 분리된 30개 유산균은 모두 잘 성장하였으며 calcium phosphate, inositol phosphate salt, 계분 등을 가수분해하여 투명환 형성을 확인하였다. 특히 이들 김치 유산균중 L-9, L-30번 균주의 분해능이 우수하여 균주 동정 및 녹조 예방 효과를 확인할 김치유산균으로 선별하였다.

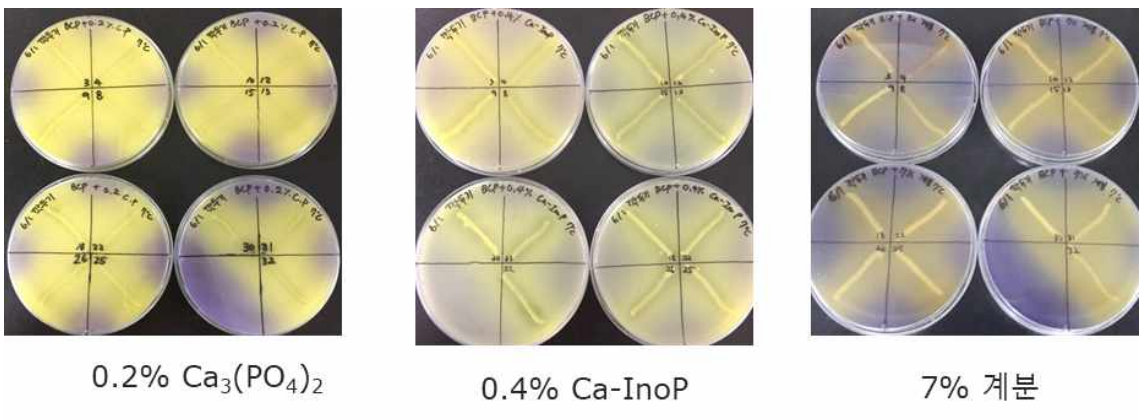


Fig. 9. 저온(7℃)에서의 김치유산균의 무기인산염, 유기인산염, 계분 분해능 비교

1.1.6 김치로부터 분리된 저온성 유산균의 동정

김치로부터 분리된 저온성(7℃, 15℃ 성장) 유산균을 사용하여 무기인 분해능, 유기인 분해능, 계분 분해 등을 확인한 결과, L-9과 L-30이 가장 우수하다고 판단되었다. 따라서 L-9 과 L-30 균주의 종명 확인을 위하여 API 50 kit를 사용하여 동정한 결과, 분리된 L-9과 L-30 균주는 김치유산균의 대표적인 균주인 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 로 확인되었다.

* 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 의 균주 특성은 아래와 같다. 류코노스톡 메센테로이데스는 pH 4.8 이하에서는 생장이 잘 안 되는 균이다. 세포의 크기는 0.9~1.2μ로서 생육 적정 온도는 21~25℃이다. 특히 설탕 용액에서는 덱스트란으로 된 점층으로 싸여 있는 것이 특징이다. 류코노스톡 메센테로이데스는 글루코스, 과당, 갈락토스, 마노스, 자일로스, 아라비노스 및 수크로스 등을 발효하여 젖산을 생성한다. 류코노스톡 메센테로이데스는 제당 공장의 점액에서 처음 분리되었는데, 여러 종류의 채소나 기타 식물의 발효 제품에도 존재하고 있으며, 김치의 발효 초기에 주로 발육하여 김치를 혐기적 상태로 만든다. 그러나 제당 공장에서는 유해균으로 이 균으로 인해 파이프가 막히는 경우가 종종 있다.

김치 내에는 약 30여 종의 아주 다양한 유산균이 보고되어 있는데, 김치의 발효, 숙성, 온도에 따라 생육하는 균의 종류는 다르다. 김치의 발효 초기에는 류코노스톡 메센테로이데스가 자라고 발효 후기에는 내산성이 강한 유산 간균인 락토바실러스 플란타룸과 락토바실러스 브레비스가 자란다. 류코노스톡 메센테로이데스는 김치가 맛있다고 느껴지는 적숙기까지의 발효를 주도하는 유산균으로 알려져 있다.



Fig. 10. API 50 동정 키트에 의한 L-9, L-30의 생화학반응 결과

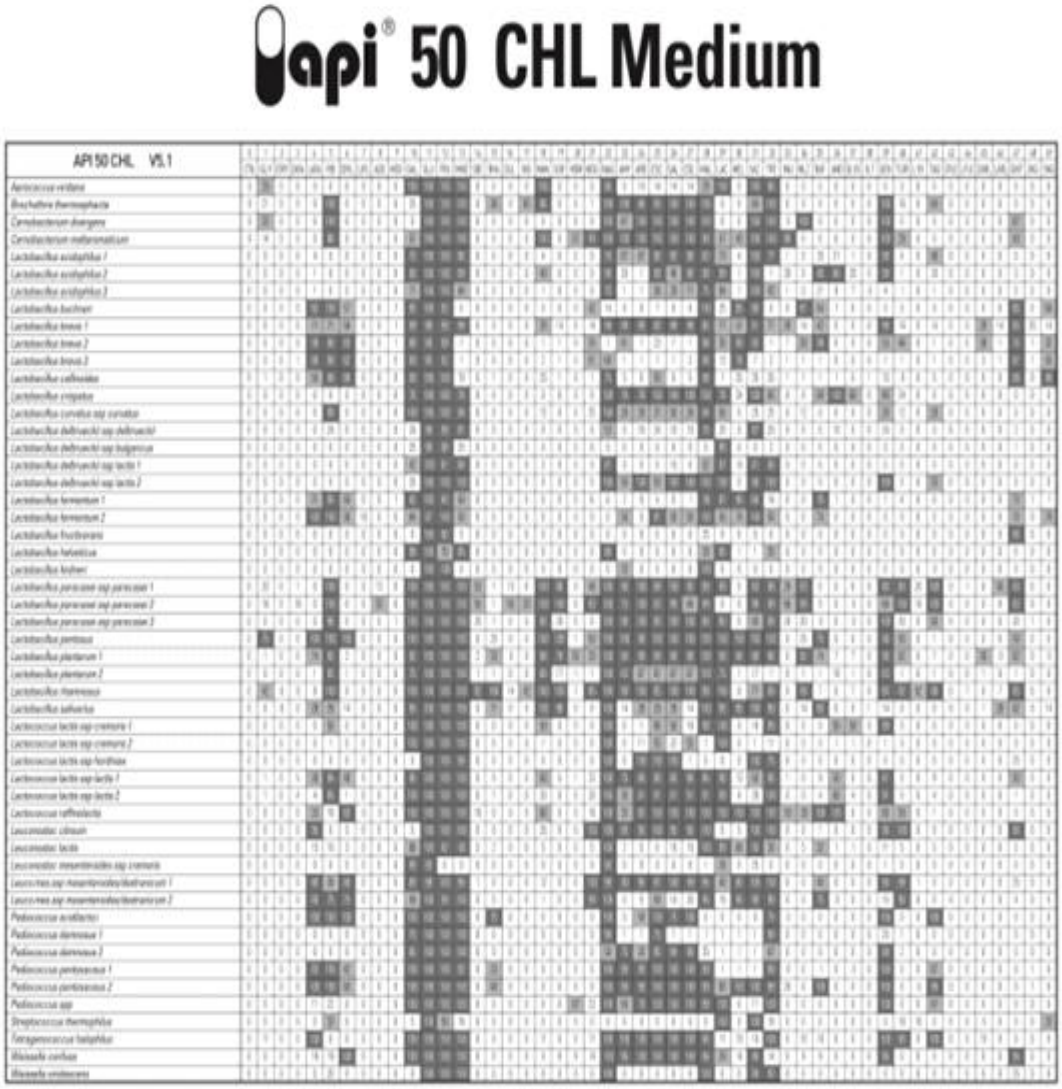


Fig. 11. API 분석에 따른 유산균 균종 확인

1.1.7. 선별 균주의 inositol phosphate로부터 유리 인산량 비교

앞서의 실험을 통하여 선정된 L-9과 L-30 김치 유산균의 inositol phosphate 인산 가용화 능력을 측정하기 위하여 유리된 가용화 인산량을 spectrophotometer를 사용하여 정량적로 분석하였다. 유산균의 증식에 많이 사용되는 MRS배지에 0.2% inositol phosphate를 첨가한 후 L-9과 L-30 김치유산균을 접종한 후 8일간 생성되는 유리 인산량을 정량하였다. 실험결과, L-9는 L-30보다 빠르게 배지내 인산을 소모하였으며 2일차에 inositol phosphate로부터 가용화 인산을 가장 높게 생성하여 L-9이 L-30 보다 유기인산염 분해능이 우수하다고 사료되어 김치유산균 최종 후보 균주로 L-9을 선정하였다.

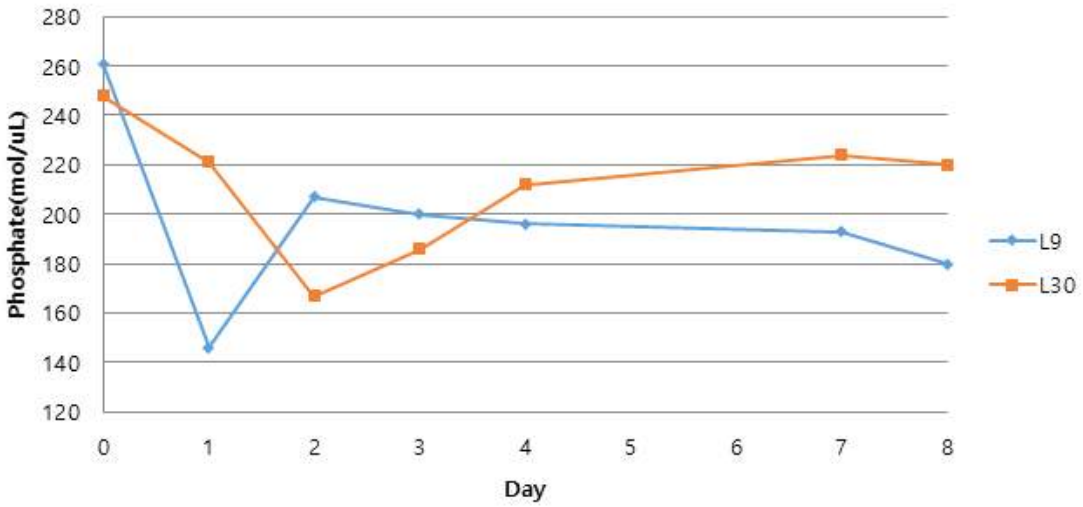


Fig. 12. 김치유산균 L-9, L-30으로부터 생성된 유리 인산량.

1.1.8. 선정된 유산균을 사용한 녹조 침전 및 분해

금강에서 채집된 녹조에 선정된 김치유산균 L-9, L-30을 접종한 후 L-9, L-30에 의한 녹조 침전 및 분해 효과를 플라스크를 사용하여 확인하였다. 실험결과, L-9과 L-30는 배양 1일차에 녹조를 침전시키고 분해하여 녹조의 량이 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 현상은 유산균이 녹조를 가수분해할 뿐만 아니라 녹조들 간의 결합을 분해하여 부력을 낮게 해줌으로써 녹조를 가라앉히는 효과가 있는 것으로 사료되었다. 배양 3일차에는 김치유산균 접종구 뿐만 아니라 유산균 비접종구(control)도 녹조가 많이 분해되는 것으로 나타났다. 이는 이미 알려진 바와 같이 녹조는 산소가 공급되면 녹조내에 존재하는 유산균량이 증가하면서 녹조를 파괴하는 것으로 사료된다.



0일차 1일차

Fig. 13. 선정 김치유산균을 사용한 0일차, 1일차 녹조 침전 및 분해



3일차

Fig. 14. 선정 김치유산균을 사용한 3일차 녹조 침전 및 분해

1.2. 맥주효모균의 무기, 유기인산분해

1.2.1. 맥주 효모의 calcium phosphate 분해능 확인

맥주 효모(Saccharomyces carlsbegensis 혹은 Saccharomyces pastorianus)는 하면 발효에 사용되는 균주로 Saccharomyces cerevisia)보다 낮은 온도에서 발효하는 저온성 발효 균주이다. 균주은행(KCTC)으로부터 맥주 효모 4종(KCTC 7233, KCTC 7244, KCTC 17225, KCTC 17659)을 구입하여 calcium phosphate[$Ca_3(PO_4)_2$] 분해능을 확인하였다. 효모균주 배양 배지인 Yeast Malt배지에 calcium phosphate (0.2%)를 첨가한 후 15℃, 7일간 배양하면서 투명환의 크기를 확인되었다. 4종의 맥주 효모중 KCTC 7244, KCTC 17659의 분해력이 우수하였다.



Fig. 15. 맥주 효모의 Calcium phosphate 분해능 확인

1.2.2. 맥주효모의 inositol phosphate 분해능 확인

Yeast Malt 배지에 유기인산염인 inositol phosphate calcium염 (0.4%)를 첨가한 후 15℃, 7일간 배양하면서 맥주 효모 4종의 투명환 크기를 비교하였다. 맥주 효모 4종중 KCTC 7244, KCTC 17659은 균주가 성장한 주변에 투명환을 나타내었다. 따라서 KCTC 7244, KCTC 17659은 inositol phosphate 분해하는 능력이 있다고 판단되었다.

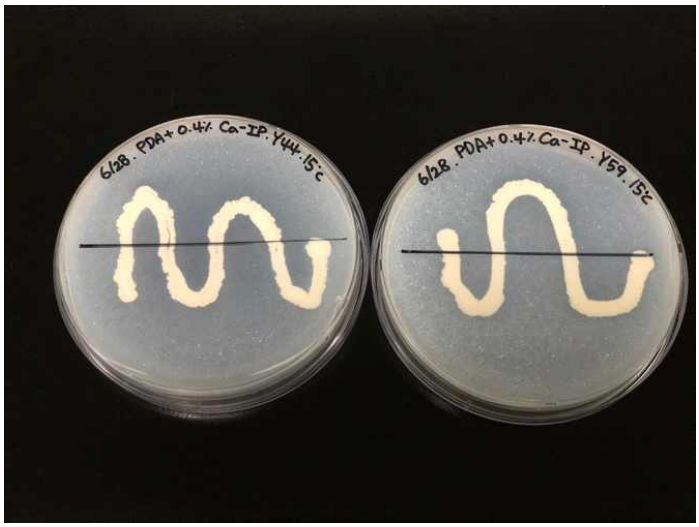


Fig. 16. 맥주 효모의 inositol phosphate 분해능 확인

1.2.3. 맥주 효모의 계분 분해능 확인

닭은 장의 길이가 짧아 장내 미생물(유산균 혹은 효모)에 의해서 inositol phosphate 분해하지 못하여 계분내 inositol phosphate염 농도는 소의 변보다 10배 이상 높다. 따라서 계분을 첨가한 배지에 맥주효모를 접종하였을 시 투명환이 형성된다면 이는 inositol phosphate 염 분해하는 효모능력에 의해 생성된 것 판단된다. Yeast Malt 배지에 5% 계분을 첨가한 후 15℃, 7일간 배양하면서 맥주효모 4종을 접종한 후 계분 분해능을 비교하였다. 맥주 효모 4종 모두 계분을 가수분해하는 것으로 확인되었으며 이중 KCTC 7244, KCTC 17659의 분해력이 다른 균종보다 우수하였다,



Fig. 17. 맥주효모의 계분(4% 첨가) 분해능 확인

1.2.4. 맥주 효모에 의한 inositol phosphate로부터 인산 생성 정량 분석

앞서의 실험을 통하여 선정된 KCTC 7244와 KCTC 17659 맥주 효모균주의 inositol phosphate로부터 인산 생성 능력을 spectrophotometer를 사용하여 정량적으로 분석하였다. 효모 증식에 많이 사용되는 Yeast Malt 배지에 0.2% inositol phosphate를 첨가한 후 KCTC 7244와 KCTC 17659 균을 접종한 후 8일간 배양하면서 생성되는 유리 인산량을 정량하였다. 실험결과, KCTC 17659보다 KCTC 7244의 인산 생성량이 높게 나타나 유기인산염을 분해하기 위한 효모균으로 KCTC 7244를 선정하였다.

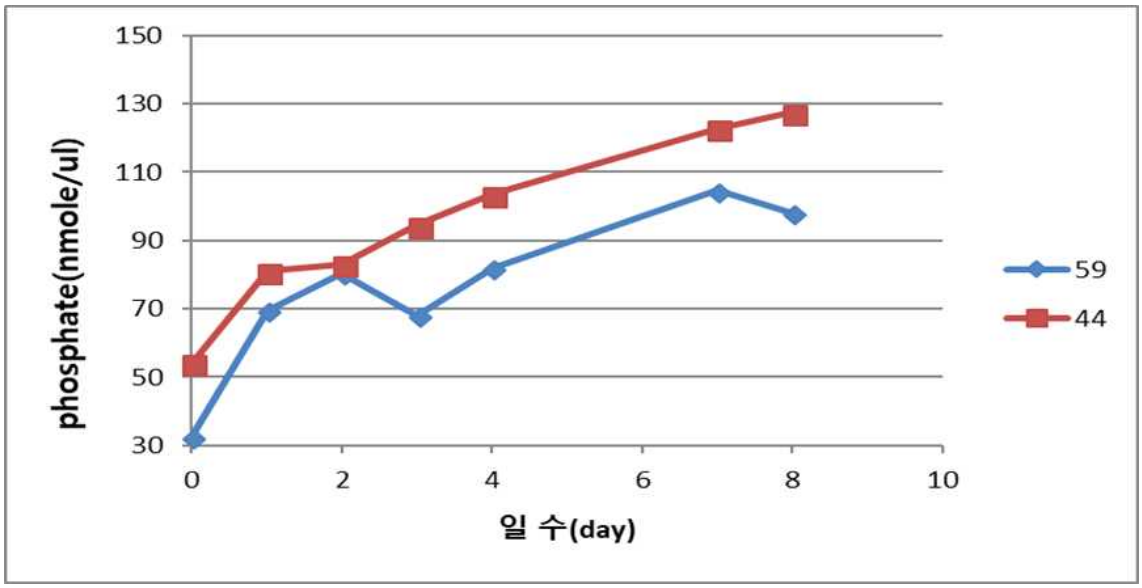


Fig. 18. 맥주효모의 inositol phosphate 로 인산 생성 능력 비교

1.2.5. 맥주효모의 녹조 침전 및 분해능 비교

금강에서 채집된 녹조에 선정된 맥주효모 KCTC 7244와 KCTC 17659 을 각각 접종한 후 이들 균주에 의한 녹조 침전 및 분해 효과를 확인하였다. 실험결과, 맥주효모(KCTC 7244, KCTC 17659)는 녹조 침전 및 분해효과는 없는 것으로 나타났다. 한편, 김치유산균은 1일차에도 녹조를 가수분해하여 침전시키는 효과를 나타내었다.



Fig. 19 맥주효모(KCTC 7244, KCTC 17659)와 김치유산균(L-9, L-30)의 녹조 침전 및 분해능 비교

1.3. 플라스크에서 분리된 미생물의 녹조 분해 효과 실험

선별된 3종 미생물(김치유산균 L-9, 맥주효모 Y-44, 김치유산균 CJLP) 및 3종 균주를 혼합한 미생물제제 Mix를 사용하여 **시흥시 과림저수지에서 샘플링된 녹조에 대한** 분해효과를 진탕(100 rpm, 60 rpm, 20 rpm)하면서 조사하였다(그림 참고). 실험결과, 선별 미생물(김치유산균 L-9, 맥주효모 Y-44, 김치유산균 CJLP)과 혼합한 미생물제제 Mix을 접종한 것은 대조구에 비하여 녹조가 현저히 감소하였다.
특히, 혼합 미생물제제 MIX를 접종한 실험구는 1종 미생물 접종 실험구보다 녹조 분해 효과가 우수하였다. 따라서 녹조 미생물제제 제조시 1종 미생물을 사용하는 것보다는 3종 미생물을 혼합하는 것이 바람직하다. 또한 교반속도(100, 60, 20 rpm)에 따른 녹조 분해 효과를 비교한 결과, 100 rpm에서의 녹조 분해 효과는 20 rpm 보다 우수하였다. 이는 녹조 분해시 높은 용존 산소농도와 높은 마찰력이 녹조 분해에 좋은 환경임을 확인하였다. 또한 대조구(미생물 비처리구)도 미생물 처리구보다 녹조 분해속도는 늦지만 산소를 충분히 공급하면 녹조를 분해할 수 있음을 확인하였다.

균주 처리 농도(0.1%, 0.5%, 1.0%)에 따른 녹조 분해 효과를 검토한 결과, 균주 농도에 의존적이었다. 그러나 3종 미생물이 혼합된 미생물제제 MIx은 균주 처리농도 0.1% 농도에서도 다른 실험구보다 우수한 살균 및 클로르필 제거 효과를 확인하였다. 한편 선별된 미생물 접종후 균주와 접종량에 따른 pH 변화를 조사한 결과, 김치유산균인 L-9과 CJLP를 접종한 실험구의 pH는 6.8 수준이었고 MIX 실험구의 pH는 7.2수준으로 배양액 pH에 차이가 있었다(Table 2).

Table 2. 접종 미생물의 종류 및 접종량에 따른 배양시 pH 변화

		대조구	L-9		CJLP		Y-44		MIX	
접종량(%)		0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0	0.1	1.0
100 rpm	0일차	7.04	6.98	6.98	7.03	7.03	7.00	7.00	7.06	7.06
	4일차	7.23	6.76	6.66	6.88	6.81	7.10	6.90	7.32	7.24
60 rpm	0일차	6.98	6.92	6.92	6.89	6.89	7.00	7.00	6.99	6.99
	4일차	7.11	6.76	6.79	6.95	6.81	7.10	7.00	7.23	7.17

1.3.1. 교반속도와 배양 시간에 따른 녹조 분해 효과

1.3.1.1. 100 rpm에서 배양일자별 녹조 분해

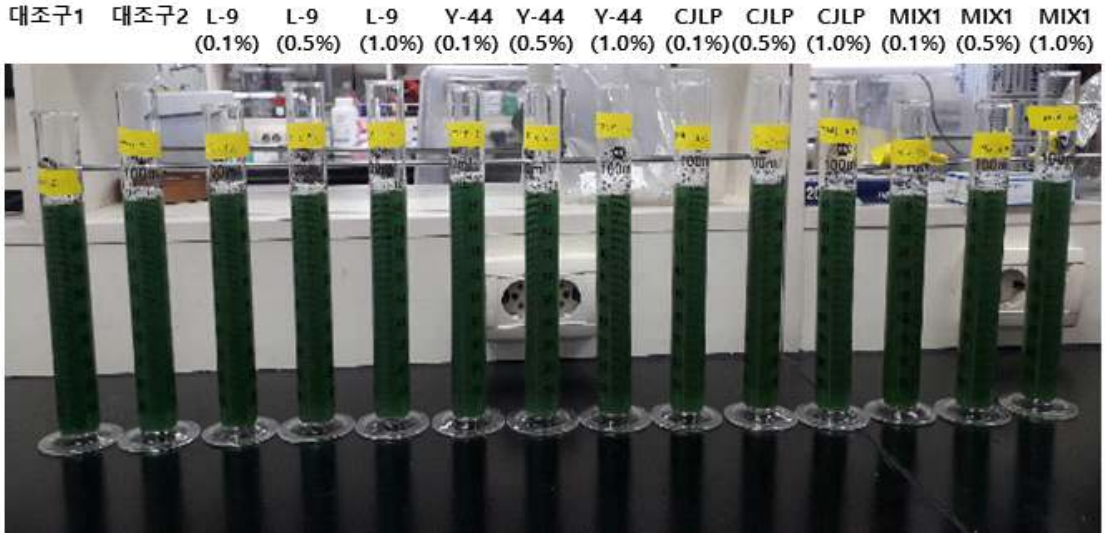


Fig. 20. 플라스크 실험(0일차)

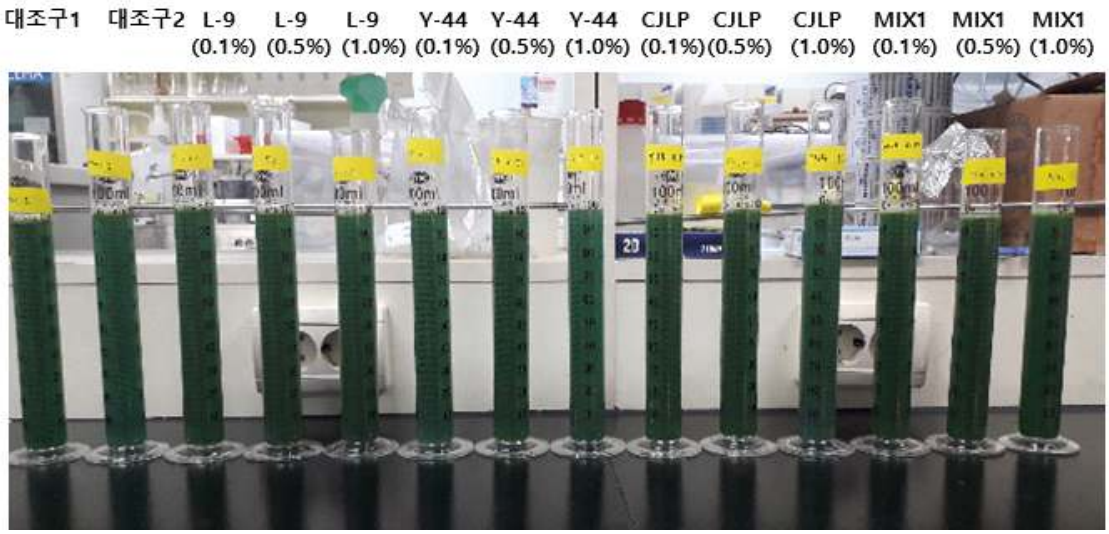


Fig. 21. 플라스크 실험(1일차)

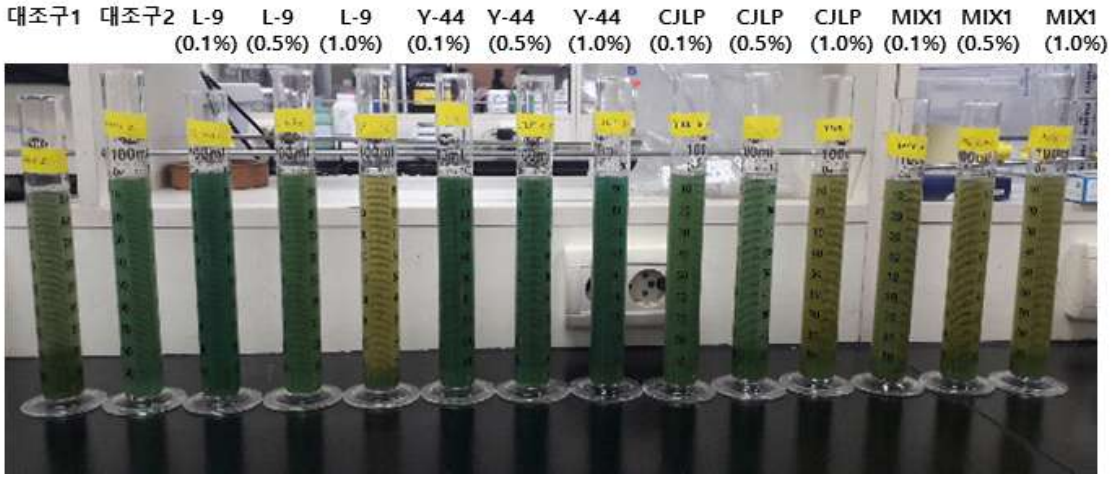


Fig. 22. 플라스크 실험 (2일차)

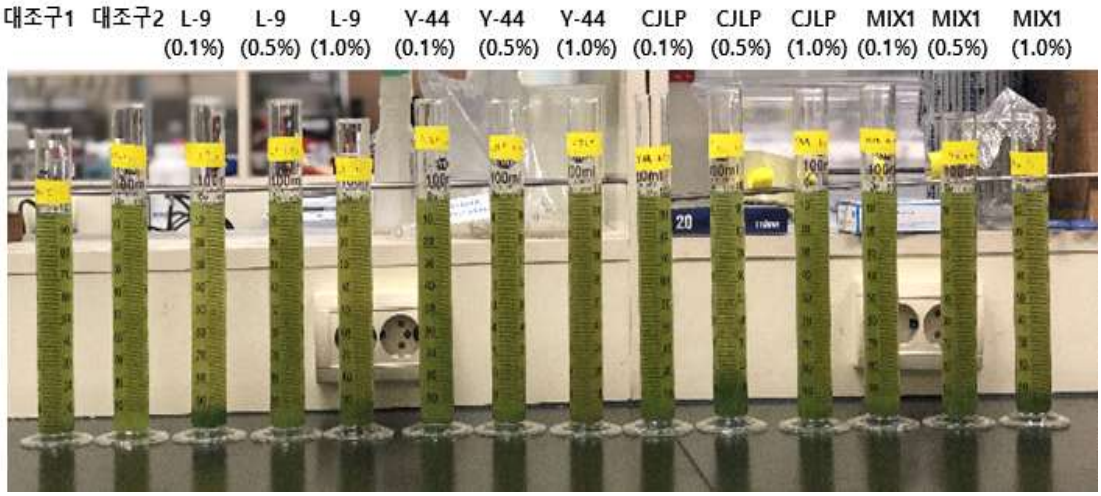


Fig. 23. 플라스크 실험 (4일차)

1.3.1.2. 교반속도 60 rpm조건에서 배양일자별 녹조 분해



Fig. 24. 플라스크 실험(0일차)

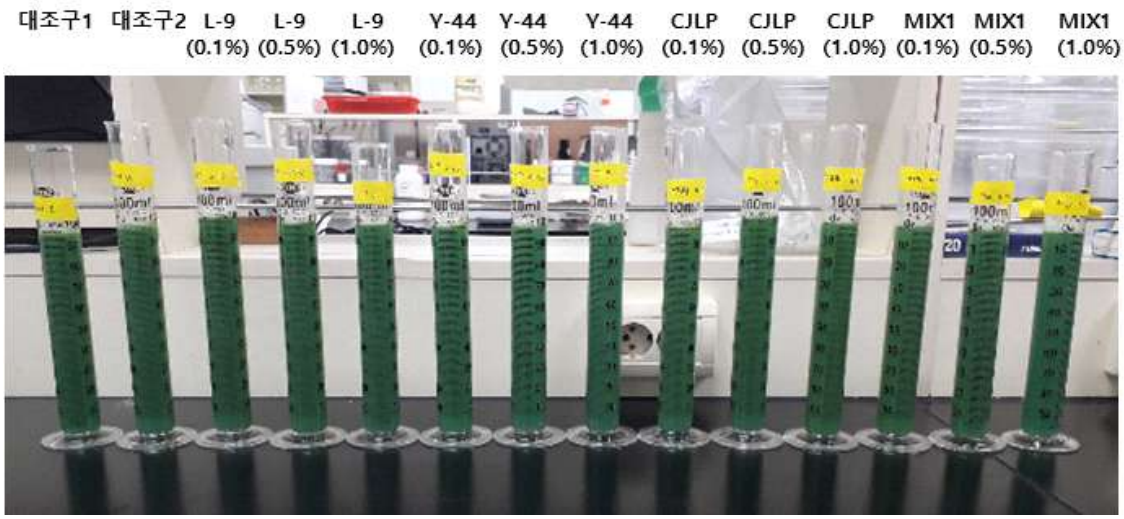


Fig. 25. 플라스크 실험(1일차)

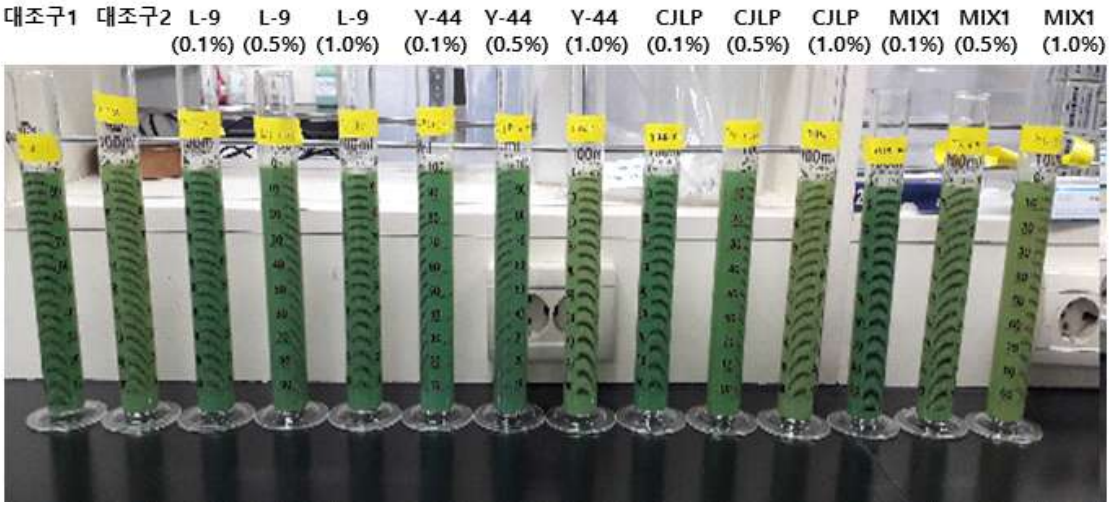


Fig. 26. 플라스크 실험 (2일차)

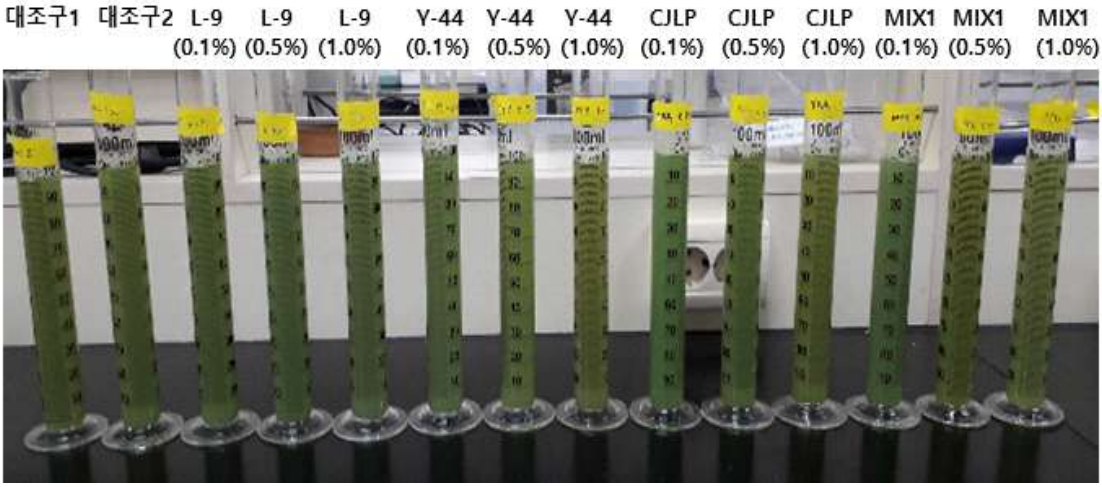


Fig. 27. 플라스크 실험(3일차)

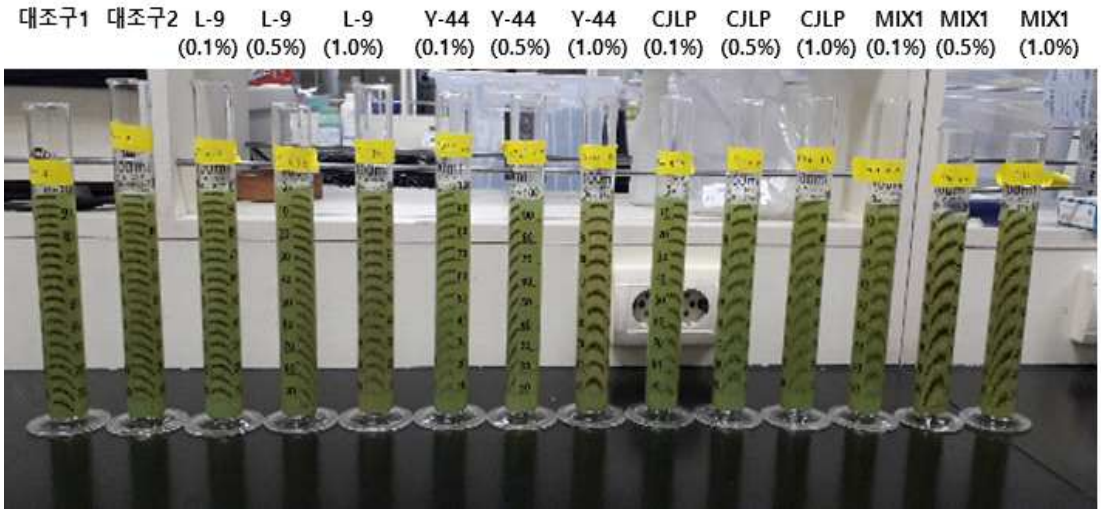


Fig. 28. 플라스크 실험(4일차)

1.3.1.3. 교반속도 20 rpm 조건에서 녹조 분해

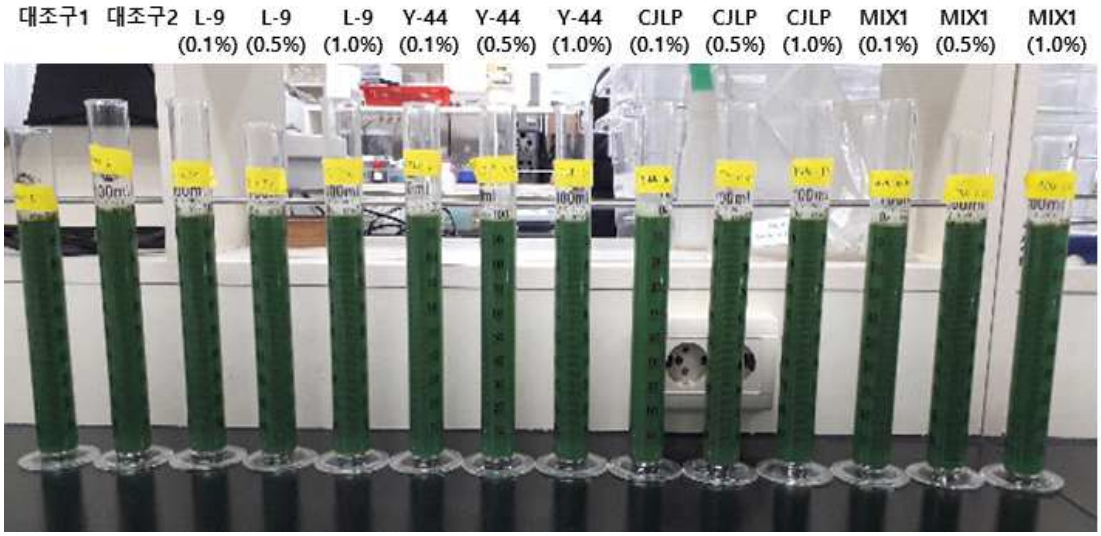


Fig. 29. 플라스크 실험(0일차)

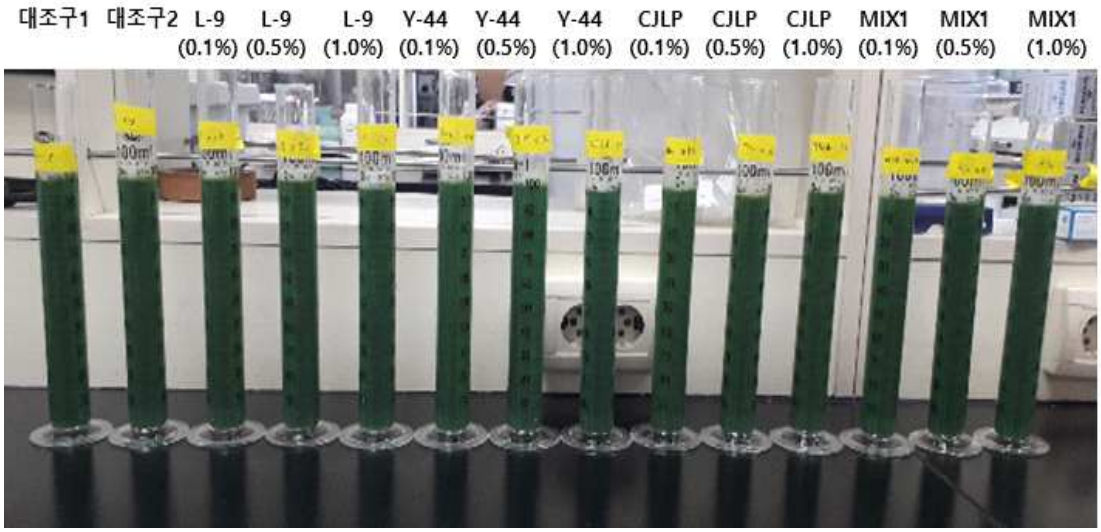


Fig. 30. 플라스크 실험(1일차)

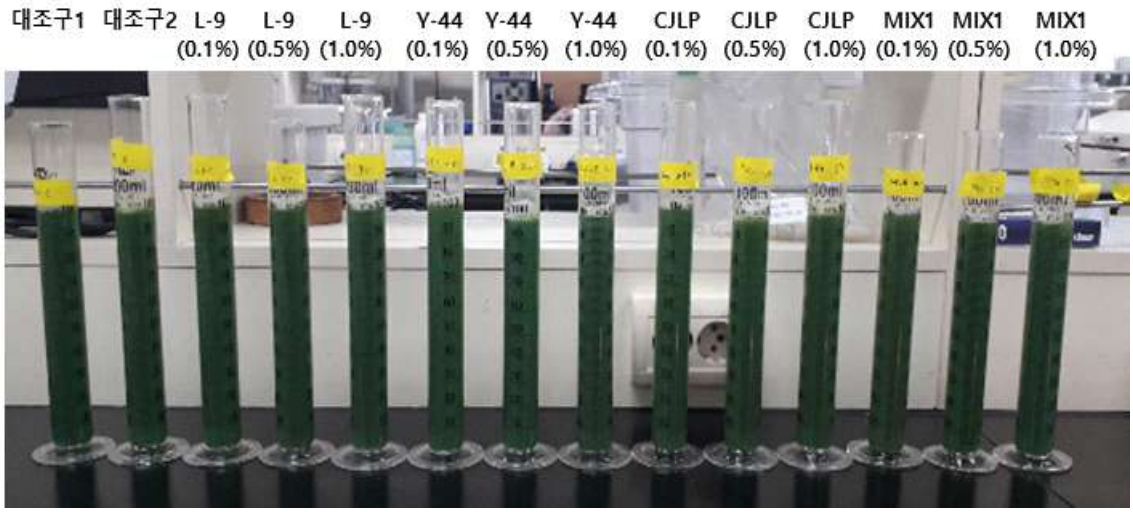


Fig. 31. 플라스크 실험(2일차)

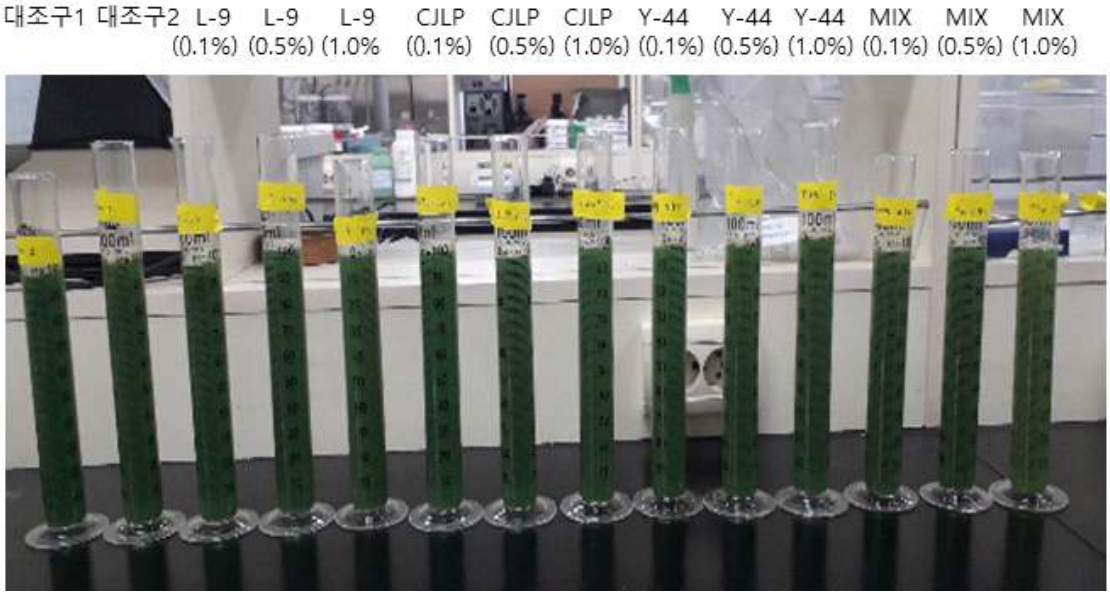


Fig. 32. 플라스크 실험(3일차)

1.3.1.4. 접종농도에 따른 미생물의 녹조 분해 효과(2일 배양)

1) 김치유산균 L-9의 접종 농도별 녹조분해 효과

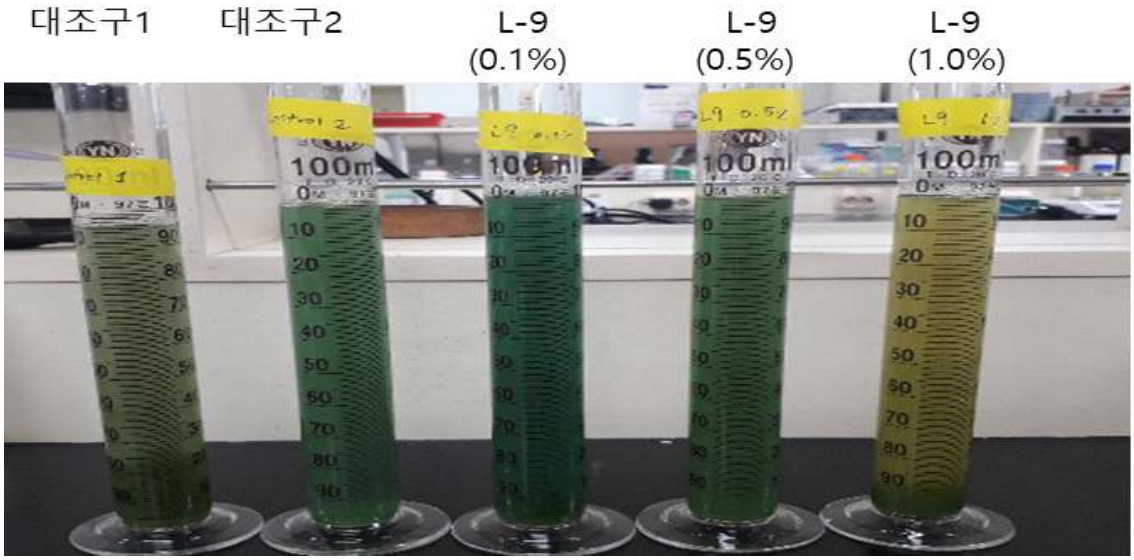


Fig. 33. 김치유산균 L-9의 접종 농도별 녹조분해 효과

2) 김치유산균 CJLP의 접종 농도별 녹조분해 효과

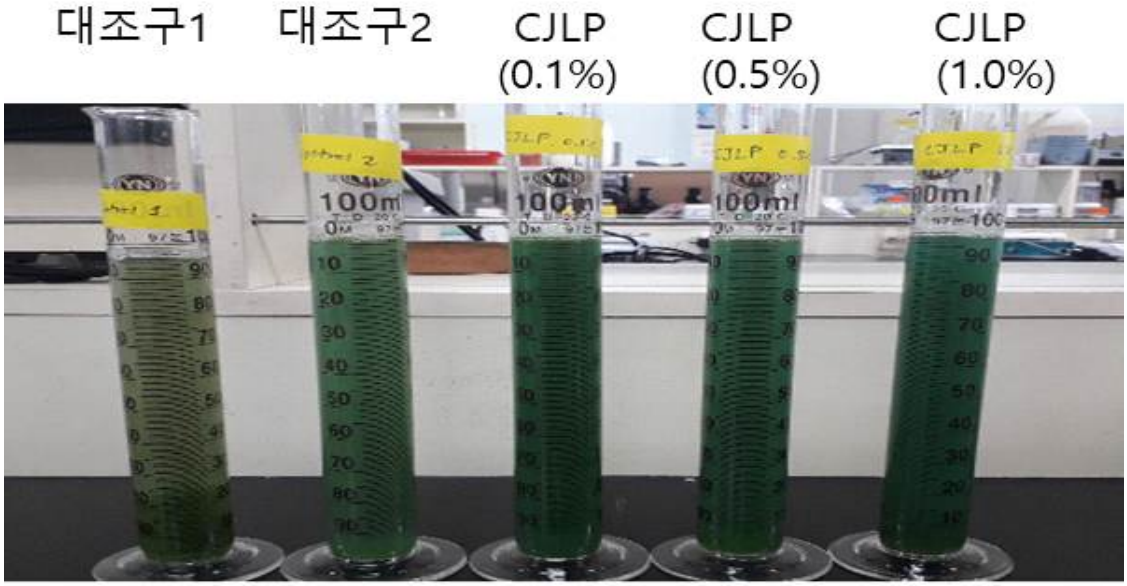


Fig. 34. 김치유산균 CJLP의 접종 농도별 녹조분해 효과

3) 맥주효모 Y-44의 접종 농도별 녹조 분해 효과

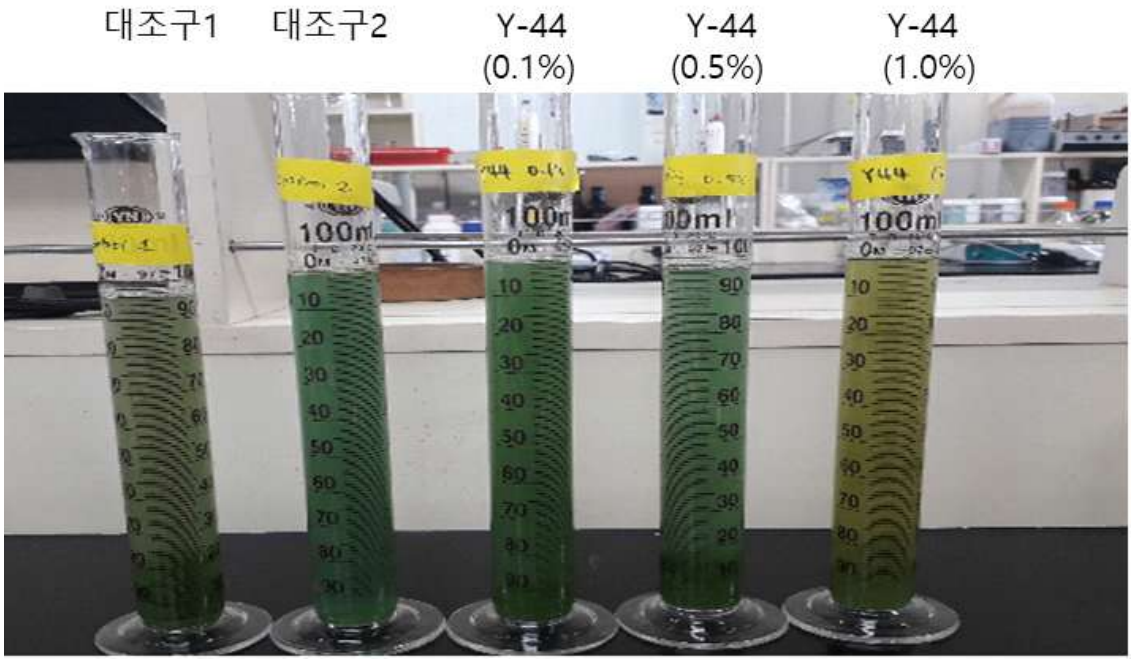


Fig. 35. 맥주 효모 Y-44의 접종 농도별 녹조 분해 효과

4) 개발된 혼합 미생물제제 MIX1의 접종 농도별 녹조 분해 효과

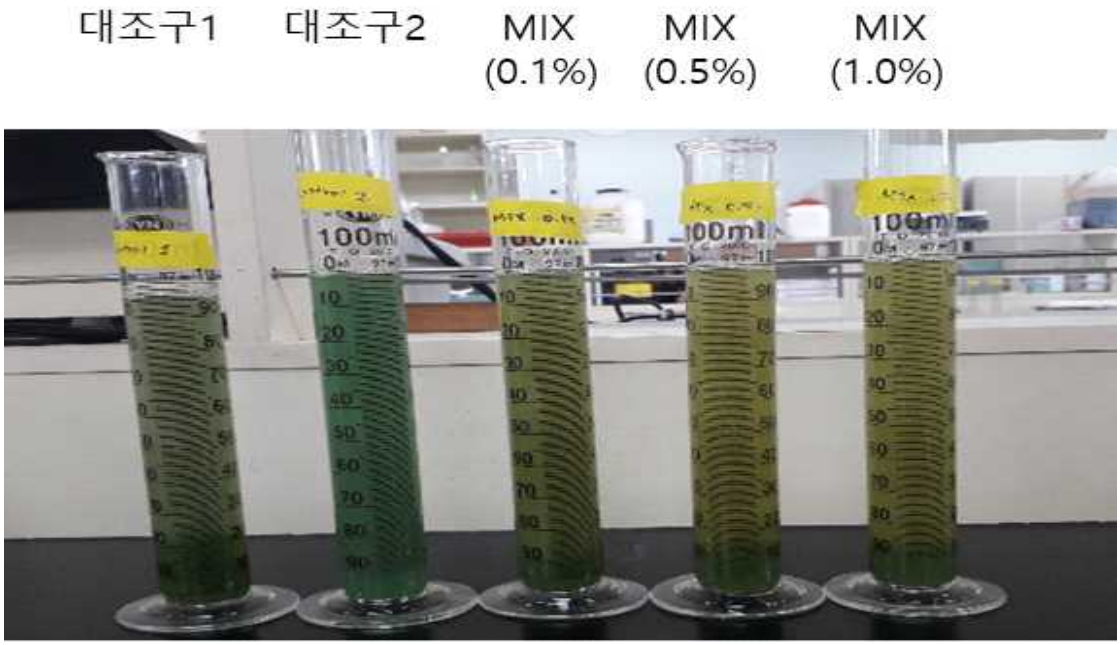


Fig. 36. 혼합 미생물제제 MIX1의 접종 농도별 녹조 분해 효과

1.4. Pilot 배양조에서의 분리된 미생물의 녹조 분해 효과

60 L pilot 배양조에서 선정된 2종 미생물(김치유산균 L-9, 김치유산균 CJLP) 및 3종 균주가 혼합(김치유산균 L-9, 김치유산균 CJLP, Y-44)된 미생물제제 Mix 사용하여 녹조에 대한 분해효과를 조사하였다(Fig. 36). 실험결과, 분리된 미생물(김치유산균 L-9, 김치유산균 CJLP)과 혼합 미생물제제 Mix 첨가 실험구는 대조구에 비하여 녹조 분해가 빠르게 나타났다. 3일 배양 후 김치유산균 L-9과 미생물 혼합액 MIX의 녹조 제거율은 각각 96%와 97.5%로 대조구 75%보다 높게 나타났다. 또한 6일 배양 후 녹조 제거율은 99.5%와 99.7%의 녹조 제거 효과를 나타내었다. 그러나 6일 배양시 김치유산균 CJLP의 녹조제거율은 L-9과 MIX보다 낮은 96%를 나타내었다.

혼합 미생물제제 MIX 접종 실험구는 1종 미생물만 사용한 실험구보다 녹조 분해 효과가 우수하게 나타나 여러 종의 미생물을 혼합하여 미생물제제를 제조하는 것이 바람직하다고 사료되었다.

Table 3. Pilot에서 배양 일수에 따른 녹조균수 변화

접종균주	배양일수 (days) (Microcystis 균수)		
	0 (cell/mL)	3 (cell/mL)	6 (cell/mL)
대조구	2.0×10^9	5.0×10^8 (제거율 : 75%)	1.0×10^8 (제거율 : 95%)
김치유산균 L-9	2.0×10^9	8.0×10^7 (제거율 : 96%)	1.0×10^7 (제거율 : 99.5%)
김치유산균 CJLP	2.0×10^9	3.0×10^8 (제거율 : 85%)	8.0×10^7 (제거율 : 96%)
혼합제제 (L-9, Y-44, CJLP)	2.0×10^9	5.0×10^7 (제거율 : 97.5%)	6.0×10^6 (제거율 : 99.7%)

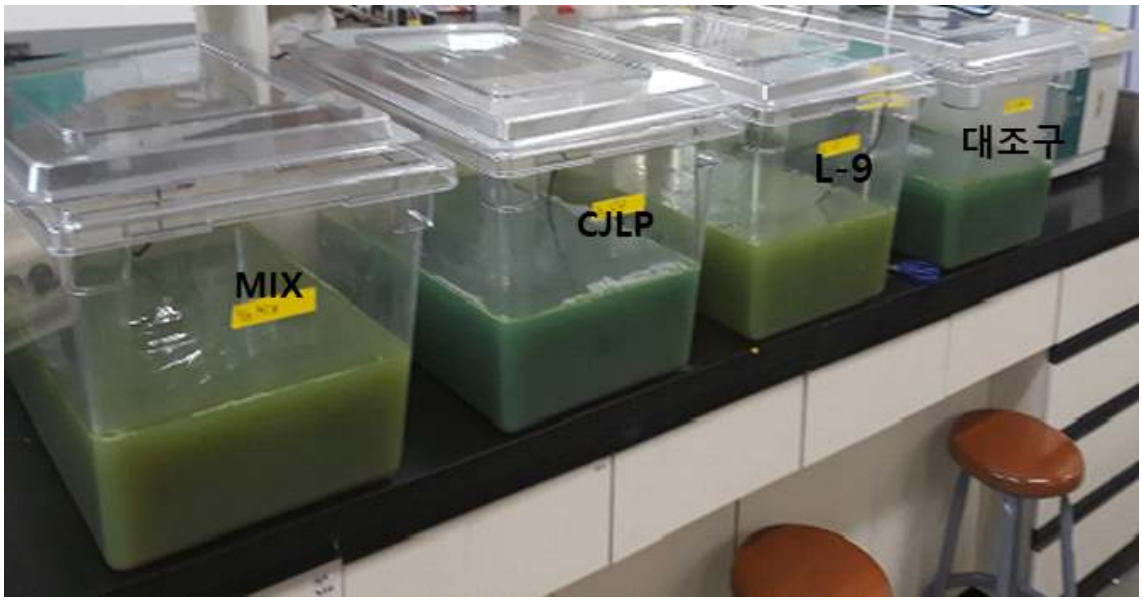


Fig. 37. 60 L Pilot 배양조에서 녹조 분해 (5일차)

1.4.1. Pilot에서 배양 일자별 녹조 분해 효과

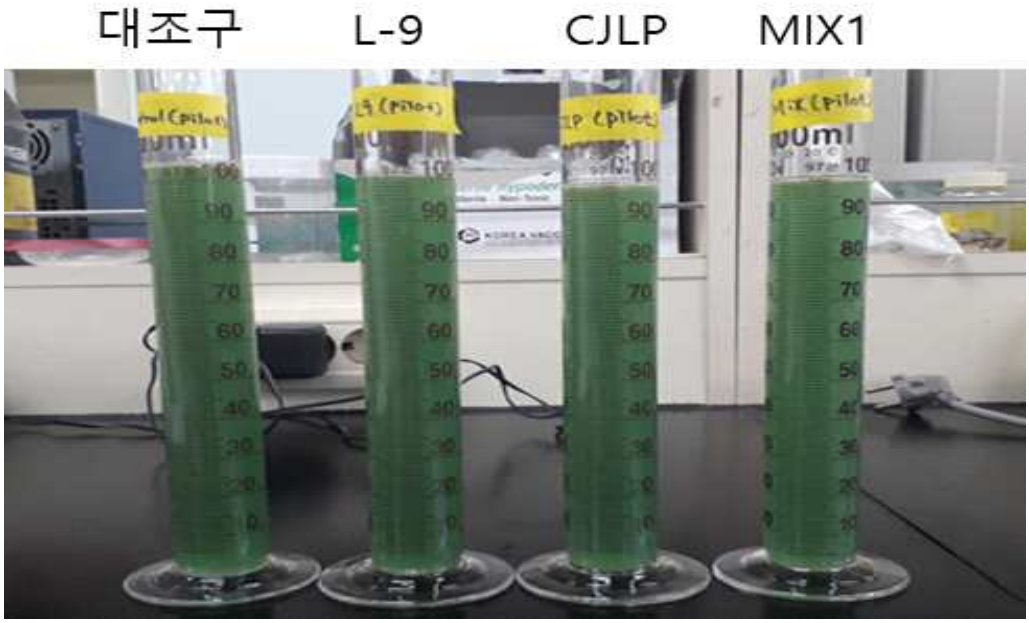


Fig. 38. Pilot 배양조에서 녹조 분해 효과 (1일차)

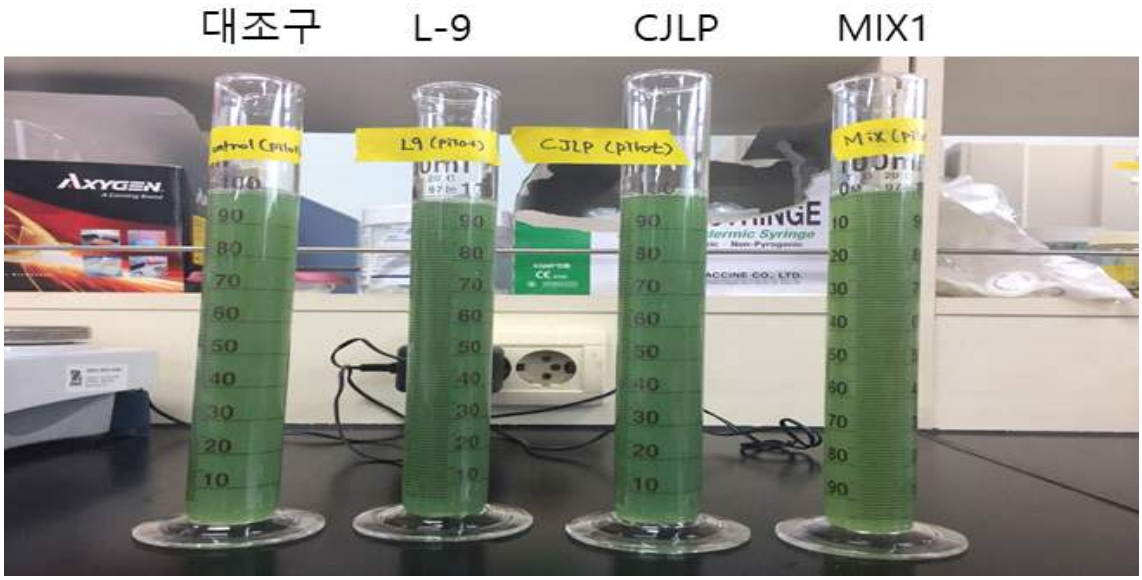


Fig. 39. Pilot 배양조에서 녹조 분해 효과 (3일차)

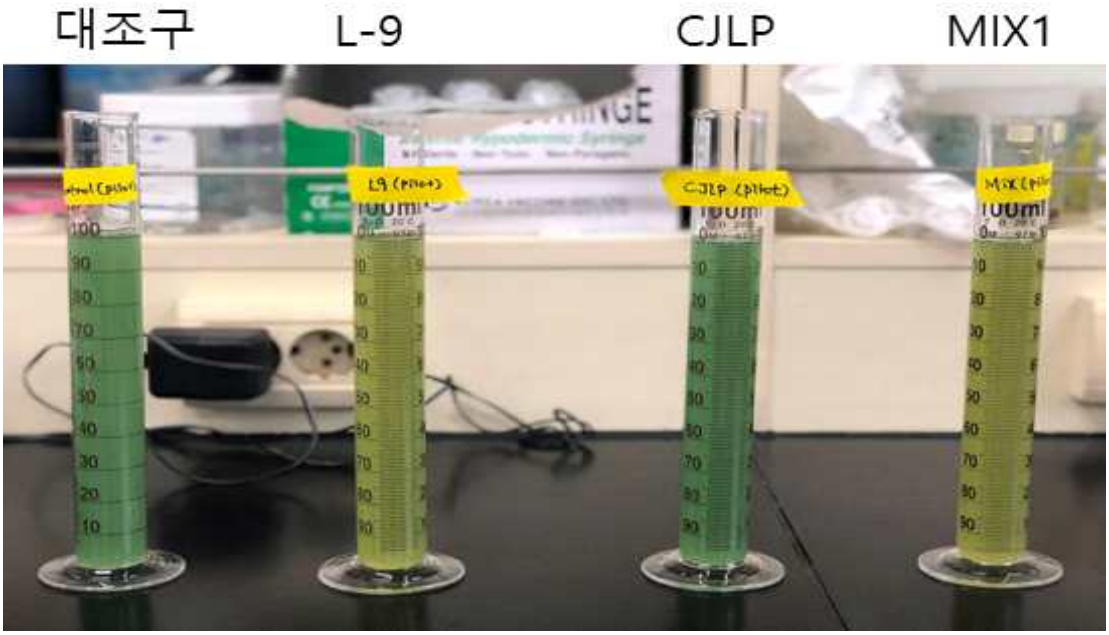


Fig. 40. Pilot 배양조에서 녹조 분해 효과 (6일차)

제 5 장 연구결과의 활용계획

1. 기대효과 ····· 49
2. 향후연구계획 및 사업성과 활용방안 ····· 49

제 5 장 연구결과의 활용계획

1. 기대효과

1) 사계절 저수지의 불용성 유기• 무기인산염을 제거하여 부영양화 문제 해결.
2) 부영양화 문제 해결에 의한 녹조 예방
3) 하절기 발생 녹조에 대한 미생물 살조제
4) 안전한 미생물(김치 유산균 및 효모)의 사용으로 식물, 어류에 좋은 건강한 생태 환경 조성.

2. 향후 연구계획

1) 양계장 및 돈사 악취제거 현장 시험.
2) 시흥시 과림저수지 및 골프장 연못에서의 현장 시험.

3. 사업성과 활용방안.

1) 뛰어난 불용성 유기• 무기인산염 분해 효과에 의한 녹조 예방 미생물제제.
   - 골프장의 녹조 발생 예방제

2) 뛰어난 녹조 살조 효과로 하절기 녹조 제거 미생물제제로 판매.
   - 저수지 및 골프장 녹조 제거 미생물제제로 판매.

3) 양계, 오리, 돼지 농장등 악취 발생 억제제 및 Biofertilizer로 판매.
   - 유산균 및 효모 사용으로 부패균 성장 억제하여 악취 발생 억제 및 악취 제거 효과.

제 6 장 참 고 문 헌

1. 참고문헌 51

제 6 장 참고문헌

(1) N. Sugiura, N. Oyamada, A. Kurosawa, T. Saito 1993. Lytic characteristics of blue-green alga, Microcystis aeruginosa by Pseudomonas sp. Jpn. J. Toxicol. Environ. Health 39(2): 94-99.

(2) K. Shirai, S. Revah-Moiseev, M. Garcia-Garlbay, V. M. Marshall 1994. Ability of some strains of lactic acid bacteria to degrade phytic acid. Lett. in Applied Microbiol. 19: 366-369.

(3) Y. Nakamura, H. Fukuhara, K. Sano 2000. Secreted phytase activities of yeasts. Bioscience, Biotechnol. 64(4): 841-844

(4) P. Mukesh, S. Suma, M.A. Singaracharya, V. Lakshmipathi 2004. Isolation of phytate-hydrolysing microbial strains from traditional waste water of rice fermentation and liquid cattle feeds. World J. Microbiol. Biotechnol. 20: 531-534.

(5) M. Olstorpe, J. Schnürer, V. Passoth 2009. Screening of yeast strains for phytase activity. FEMS Yeast Res. 9: 478-488.

(6) M. Jorquera, O. MARTíNEZ, F. Maruyama, P. Marschner, M. L. Mora 2008. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. Microbes Environ. 23(3) : 182-191.

(7) L. Nuobariene, A.S. Hansen, L. Jespersen, N. Arneborg 2011. Phytase-active yeasts from grain-based food and beer. J. Applied Microbiol. 110: 1370-1380.

(8) C. Zhai, P. Zhang, F. Shen, C. Zhou 2012. Does *Microcystis aeruginosa* have quorum sensing? FEMS Microiol. Lett. 336: 38-44.

(9) H. Zhang, Z. Yun, Q. Huang, X. Xiao, X. Wang, F. Zhang, X. Wang, Y. Liu, C. Hu. 2011. Isolation, identification and characterization of phytoplankton-lytic bacterium CH-22 against *Microcystis aeruginosa.* Limnologica, 41(1): 70-77.

(10) Y. Kong, X. Xu, L Zhu, L. Miao 2013. Control of the Harmful Alga Microcystis aeruginosa and Absorption of Nitrogen and Phosphorus by Candida utilis. Appl. Biochem. Biotechnol. 169: 88-99.

(11) J. R Gumbo, G. Ross, T. E. Cloete 2010. The isolation and identification of predatory bacteria from a *Microcystis* algal bloom. African J. Biotechnol. 9(5): 663-671.

(12) B. Kim, S. Hwang, Y. Kim, S. Hwang, N. Takamura, M. Han 2007. Effects of biological control agents on nuisance cyanobacterial and diatom blooms in freshwater systems. Microbes Environ. 22(1), 52-58.

(13) K. Y. Kim, D. Jordan and H. B. Krishnan 1997. *Rahnella aqualitis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiol. Lett.* 153:273-277.

(14) I. C. Park, J. S. Kim, J.A Jung, J. H. Yoo 2013. Characterization of phosphate solubilizing yeasts from korean traditional fermented Foods. Kor. J. Mycol. 41(4): 218-224.

(15) S.W. Seo, M. J. In, N. S. Oh 2005. Production and reaction properties of phytase by S. cerevisiae CY strain. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 48(3): 228-232.

(16) B. J. Lim, W. H. Jheong, M. S. Byeon, S. O Jun 2000. Inhibitory effect of *Microcystis aeruginosa* growth by plants in vitro. Korean J. Limnol. 33(2): 136-144.

주 의 문

최종연구보고서

시흥지역 녹조 예방 및 녹조 제거용 미생물제제 개발

발행인 : 센터장 한신호
발행일 : 2018년 12월 18일
발행처 : 시흥녹색환경지원센터
주 소 : 경기도 시흥시 산기대로 237 한국산업기술대학교
시흥비지니스센터 602호
전 화 : 031-8041-0931
팩 스 : 031-8041-0939

※ 주 의

1. 이 보고서는 시흥녹색환경지원센터에서 시행한 연구개발사업의 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 시흥녹색환경지원센터에서 시행한 연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.