공학석사 학위논문

복합미생물을 이용한 수산폐기물의 분해특성

지도교수 김 중 균

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2002년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

식품생명공학부 생물공학과

정 해 윤

정해윤의 공학석사 학위논문을 인준함

2001년 12월 26일

주 심 공학박사 김 성 구 (인)

위 원 이학박사 이 형 호 (인)

위 원 공학박사 이 민 규 (인)

목차

도표목차

그림목차

Characterization of degradation of fish wastes using mixed microorganisms

Hae-Yoon Jeong

Major of Biotechnology, Division of Food Science and Biotechnology,
Graduate School
Pukyong National University

Abstract

Fifteen species of microorganisms were isolated from the intestines of fishes, fish feed, and ferment. Eleven microorganisms except HY4, HY8, HY12, and HY13 were Gram-positive, and HY1, HY2, HY3, HY5, HY6, and HY7 produced lactic acid. The species of HY1, HY2, HY3, HY4, HY5, HY6, HY13, and HY14 showed some growth in the medium containing 1 % of NaCl. Except HY6, HY7, HY8, HY12 and HY5, ten isolates had proteolytic activity, whereas only HY13 and HY14 had lipase activity. From all the results, four isolates (HY3, HY4, HY13 and HY14) were chosen for the degradation of fish wastes. There was no mutual inhibition among the microorganisms, and the optimum temperature and pH for the growth of the mixed culture were found to be 32℃ and 7, respectively. Under the optimum growth conditions, the maximum optical density and the maximum specific growth rate were estimated to be 2.35 and 0.46 h^{-1}, respectively. Major microorganisms in the mixed culture at the log-phase were HY3 and HY4 with 70 % occupancy. The degrading efficiency of fish waste by the mixed microorganisms was 2.3 times higher, compared to control. The total amount of free amino acids in the degraded products from fish wastes was 39 g/100 g-protein and little odor was produced by the mixed microorganisms after 48 hours.

서 론

오늘날 양식산업과 수산가공업의 발전에 따라 발생하는 환경 오염은 그 정도가 나날이 심각해져 가고 있다. 특히 수산가공공장, 횟집, 및 어판장 등지에서 나오는 수산 폐기물은 수질 및 해양오염의 중요한 원인의 하나가 되고 있다. 이렇게 어류를 가공할 때 대량으로 발생하고 있는 잔사의 처리는 주로 어분이나 어박의 제조 또는 퇴비나 비료등으로 사용되어 지고 있다. 그러나, 이들 어육가공 부산물 중 내장 부위는 산화나 부패가 빨리 진행되기 때문에 잔사 가공업자들도 수거하는 것을 기피하고 있는 실정으로 효율적으로 이용되지 않고 거의 폐기되고 있는 상태이다. 따라서 현재 조미공장에서 가공처리 후 발생되는 오징어·명태·쥐치 등의 내장과 같은 폐기물이 썩어서 생기는 유기성 오니는 환경부가 화학약품을 처리해 침전시킨 후 지정한 공해상에 투기해 오고 있는 실정이며, 이와 같은 해양투기는 수질오염을 가중시켜 수산자원을 고갈시키고, 그로 인해 어획량의 감소를 초래하고 있다. 또한 97년까지 1등급이던 동해남부 해상지역의 수질이 99년부터 2등급으로 떨어진 것으로 보도되어 충격을 더해 주고 있다. 그러나 내장의 폐기처리에 수반되는 경비문제 및 공해문제 이외에도 내장의 영향학적 가치 및 생산량을 고려할 때 폐기물이 아닌 재활용 자원으로서의 효율적 이용에 관한 연구가 요구되고 있는 실정이다[1].

이러한 폐단백질의 재활용방법의 연구진행을 살펴보면 동남아시아에서 널리 사용되고 있는 어장유의 제조법을 응용하여 가다랑어 두부 paste에 장유국을 첨가하여 숙성시킴으로써 어취가 비교

적 억제된 조미료를 얻었다고 보고가 있었고[2], 가다랑어 잔사를 원료로 하여 어간장을 제조하기 위한 기초실험에서 Koji의 첨가에 의한 풍미개선과 소르비톨, 젖산, 알코올 등을 첨가함으로써 어간장의 저염화를 시도하였으며, 가다랑어 자숙 추출물의 항산화성 인자로서 anserine, carnosine, histidine 및 alaninine 등과 같은 아미노산의 역할과 핵산관련 물질인 AMP, hypoxanthine 등의 항산화성에 대한 보조적 역할에 관하여서도 조사한 바 있다[3].

그리고 potease 처리에 의한 폐단백자원의 단백질 용출 및 기능성 변화에 대한 연구보고[4]와 산화된 번데기를 국균으로 처리하여 사료화 한 보고[5]와 어육잔사를 발효시킴으로써 과산화지질 함량이 낮은 어분을 제조한 방법[6]등의 연구는 미생물의 발효작용 및 산화억제작용을 이용한 부산물의 유효이용이라는 점에서 주목을 받았다. 또한 수산폐기물을 환경친화적인 발효공법을 이용하여 효과적으로 처리하면 인류 및 동물에게 유용한 지질 및 단백질로 이용될 수 있다는 연구보고가 있었고[7], 실제로 수산폐기물을 효율적으로 재활용하려는 방안으로 이들을 수거하여 단백질 함량이 높은 동물 사료 및 퇴비로서 재활용하려는 시도가 국내외적으로 이루어지고 있으나[8,9,10,11], 아직 초기 단계의 수준에 머물러 있어 아직까지는 단순히 물리적 농축가공처리법이나 재래식 발효에 의하여 사료와 퇴비를 생산하고 있는 실정이다[12].

수산폐기물의 주요 원료인 어류는 부패 또는 변질이 신속히 이루어져 그 처리에 어려움을 겪고 있다. 어류의 부패와 변질은

그 어류의 화학적 조성, 조직이 상태, pH, 수분활성(Aw)등 어류 본래의 성질과 미생물상 및 환경의 조건에 의하여 결정된다. 이 중에서도 어류 부패에 가장 큰 영향을 미치는 것은 미생물이다 [13]. 따라서, 본 연구에서는 버려지는 수산폐기물을 미생물을 이용하여 분해하여 사료 및 퇴비를 제조하기 위한 기초자료를 마련하고자 먼저 수산폐기물로부터 발생되는 유기성 폐기물을 빨리 효과적으로 발효시킬 수 있는 미생물들을 순수 분리하고, 이 균들의 혼합배양특성 및 복합미생물에 의한 수산폐기물의 분해특성을 아울러 조사하였다.

재료 및 방법

1. 배지 및 수산폐기물

수산폐기물 발효미생물의 분리 및 배양을 위하여 0.5 % beef extract, 1 % peptone 및 0.5 % NaCl이 포함된 배지를 사용하였으며, 복합미생물을 이용한 수산폐기물의 분해실험에 사용된 수산폐기물은 남천 해변 시장과 공동어시장 등의 수산시장으로부터 버려진 물고기의 내장을 수거하여 사용하였다.

2. 미생물의 순수 분리 및 보관

수산폐기물을 효과적으로 분해할 수 있는 균주를 순수분리하기 위하여 먼저 단백질과 지방분해 능력이 뛰어나고 높은 염분 농도에도 잘 자라 수 있는 균주를 선별하기 위하여 수산시장으로부터 폐기된 어류의 내장과 시판되고 있는 양어 사료 및 발효제로부터 균을 분리하였다. 폐기된 어류의 내장의 경우 우선 잘게 파쇄한 뒤, 5 %의 이 시료를 100 ml의 배지를 포함하는 250 ml flask에 접종하여 30℃에서 1일간 배양한 후 nutrient agar plate에 평판도말하고 배양 1일 후 형성된 colony들을 순수분리 하였다. 양어사료 및 발효제는 멸균된 증류수 100 ml에 각각 2 g의 양어사료와 발효제를 현탁한 뒤 10^6배 희석하여 nutrient agar plate에 평판도말하고 30℃에서 1일간 배양한 후 형성된 colony로부터 순수 분리하였다. 분리된 균주는 agar slant에서 3개월 단위로 계대배양하여 냉동·보관하였다.

3. 분리 균주의 특성 조사

3.1 단백질 분해 능력

각각의 분리된 미생물의 단백질 분해능은 1 %의 skim milk를 포함하는 nutrient agar배지에 균주를 접종하여 30℃에서 2일간 배양한 후, 생성된 colony 주위에 형성된 투명 환의 크기를 측정하여 단백질 분해효소의 활성을 조사하였다. 대조군으로서는 *Bacillus subtlis*의 효소 활성도를 측정하여 비교하였다[14].

3.2 지질 분해 능력

지질의 분해능력 측정을 위하여 tween 80(sigma) 1 ml을 400 ml의 뜨거운 물에 부어 녹인 다음에 100 ml의 올리브유를 넣어 고온 멸균 한 후 지질 기질로 사용하였고 spirit blue agar (sigma) 100 ml당 1 ml의 비율로 첨가하여 사용하였다. 이때 첨가된 Lipaidal emulsion이 미생물에 의해 분해가 되면서 pH의 저하를 가져와 spirit blue agar의 색깔이 청색으로 변하게 되는데, 지질의 분해능은 colony가 생성된 주변의 색깔의 청색을 띄는 정도를 비교하여 조사하였다.

3.3 젖산의 생성 능력

젖산의 생성 여부는 bromocresol purple을 nutrient배지에 첨가하여 접종 후 32℃에서 2일간 배양 후 colony 주위의 색이 보라색에서 노란색으로 변하는 것을 관찰하여 조사하였다.

3.4 NaCl의 내성도 측정

NaCl 1 %에서의 균주의 성장여부는 미생물 배양 배지에 0.5 % NaCl 대신에 1 %의 NaCl을 첨가하여 2일 배양 후 752 UV Grating spectrophotometer를 이용하여 600 nm 파장에서 optical density(OD) 측정하여 조사하였다. 그 외 미생물의 특성을 알아 보기 위하여 Gram-staining test와 catalase test를 행하였다.

3.5 SPI TEST를 이용한 미생물의 동정

API 50CHB test kit을 이용하여 이들 균주의 생화학적 특징들을 조사하여 동정하였다.

먼저 각각의 균주를 배양한 후 원심분리기를 사용하여 균주를 분리한후 10 ml의 증류수에 분리된 균주를 600 nm에서 OD값이 0.3이 되게 접종한다. 접종된 용액을 API test kit에 각각 접종한 후 30℃에서 24시간 배양한후 각 kit의 변화 상태를 관찰하였다.

4. 균주 배양

Agar plate 상의 순수 colony 하나를 접종용 tip을 이용하여 취한 후 미리 멸균된 5 ml의 배지를 포함하는 20 ml tube에 무균적으로 접종하여 30℃에서 late-log phase까지 배양하였다. Flask 배양은 tube에서 배양된 미생물을 5 % 접종량으로 하여 실시하였다. 복합 미생물의 최적 성장조건 규명실험은 250 ml flask에서 실시하였는데, tube에서 배양한 각각의 균주를 미리 멸균된 빈 flask에 동일 비율로 부어 잘 혼합한 후, 준비한 배양액을 5 % 접종한 후 여러 가지 다른 온도 및 pH에서 균주를 배양

하면서 2시간 단위로 OD를 측정하여, 최대 OD 및 최대 비 성장 속도(μ_{max})를 구하여 최적 배양조건을 결정하였다.

5. 미생물 상호간의 길항작용

혼합 배양시, 여러 미생물을 동시에 배양하게 되면 서로에게 inhibition을 일으키는 물질은 생산하는 경우가 있다. 따라서 각 균주간에 길항작용을 조사하여 혼합배양시의 저해 작용생성 여부를 알아보았다. 균주들 사이의 길항작용은 streak method[15]와 disk method[16]을 이용하여 조사하였다. Streak method를 사용하여 petri dish상에 한 균주를 미리 접종하여 2일 동안 30℃에서 생륙시킨 후 다른 한 균주를 cross로 접종시키고 배양하여 양 균주의 인접된 부위의 상태를 관찰하여 억제 현상을 관찰하였다. 또한 disk method를 사용하여 액체 배지에 한 균주를 2일간 생육시키고 원심분리 하여 그 상등액을 paper disk에 적신 후 미리 다른 균이 접종된 한천 배지 상에 놓고 24시간 더 배양하여 disk 주위의 균의 생육을 관찰하였다[17].

6. 수산폐기물 분해 실험

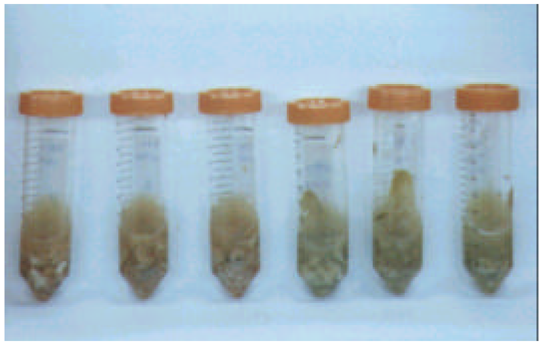
복합미생물을 이용한 수산폐기물 분해실험은 최적 접종량과 적정 수분량을 알아보기 위하여 Fig. 1. a에서 보는 바와 같이 50 ml의 튜브 각각에 생선 내장 및 수산폐기물 1 g을 투입하고 30℃에서 각각의 미생물 접종량에 배양액의 양을 달리 혼합을 하여 만든 배지를 넣어 실험을 하였다. 48시간 배양후 분해된 수산폐기물 (Fig. 1.b)은 각각 거름종이에 여과한 후 dry weight을 측정하였다.

복합미생물을 이용한 수산폐기물 분해실험은 여러 개의 250 ml flask에 각각 10 g(wet weight) 생선 내장, 5 ml의 복합미생물 배양액 및 5 ml의 배지를 함께 넣어 32℃에서 배양하였으며, 분해되는 정도는 일정시간 간격으로 배양기에서 flask를 하나씩 꺼내어 pH 및 dry weight를 측정하여 조사하였다. 복합미생물을 접종하지 않은 flask는 control로서 동일한 방법으로 배양 분석하였다. 수산폐기물의 건조중량은 배양된 시료를 100 ㎛ filter에 여과한 후 100℃에서 12시간 건조 후 그 중량을 측정하여 구하였다. 복합미생물에 의해 분해된 수산폐기물의 최종산물로부터의 아미노산 분석은 아미노산 자동분석기(Biochrome 202)를 이용하여 실시하였다.

7. 수산 폐기물의 분해시 악취 측정

수산폐기물의 퇴비화나 발효사료의 제조에 있어서의 악취 발생의 정도를 알아보기 위하여 관능법을 이용한 악취강도법[18]을 사용하여 측정하였다.

a.



b.

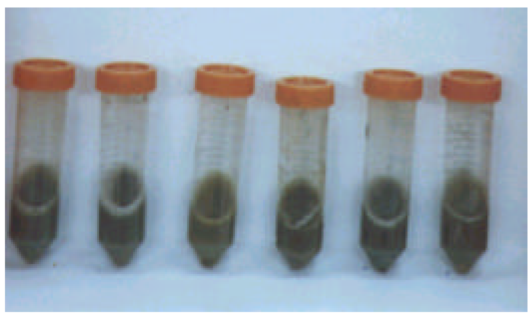


Fig. 1. Lysis of fishery byproduct : a) Initial stage b) stage after 48 h at 30℃.

결과 및 고찰

1. 분리 미생물의 특성

수산시장에서 버려진 어류의 내장과 시판되는 양어사료 및 발효제로부터 각각 6종, 5종, 그리고 4종의 총 15종의 미생물을 순수분리할 수 있었으며, 분리된 균들은 HY1에서부터 HY15까지로 명명하였다. 분리된 각각의 균들에 대한 특징은 Table 1에 나타내었다. 분리된 15종의 균주들 가운데 HY4, HY8, HY12, 그리고 HY13 을 제외한 나머지 11종의 균주들은 그람양성반응을 보였으며, 그 중 HY1, HY2, HY3, HY5, HY6, 그리고 HY7은 젖산생성능력을 가진 것으로 판명되었는다. 젖산을 생성하는 젖산균을 이용하여 수산폐기물을 처리할 경우 이들이 생산하는 젖산에 의해서 주변의 pH가 떨어지며 또한 이들이 생산하는 bacteriocin은 부패성균의 증식을 억제함으로써 위생적으로 높은 영양가를 가진 발효산물을 얻을 수 있다는 장점이 있다[19, 20]. 분리된 균주들 가운데 1 %의 NaCl에서 성장할 수 있는 균주는 수산폐기물로부터 분리된 HY1부터 HY6까지의 균주와 발효제로부터 분리된 HY13 및 HY14 이었다. 수산폐기물은 그 자체에 어느 정도의 염을 포함하고 있으므로 이를 효율적으로 분해하기 위해서는 1 % 염 농도에서도 자랄 수 있는 균주를 사용하는 것이 효율적이다. 따라서 분리된 균주 가운데 1 %의 NaCl에서 자랄 수 있는 8종의 균주 만이 수산폐기물의 처리에 적합하다고 보여진다.

분리된 균주들의 단백질 및 지방의 분해능력은 각각 skim milk agar와 spirit blue agar에 각각의 균주를 접종하여 30℃에서 24시간 배양을 하여 그 변화를 관찰하여 조사하였다. Fig. 2를 살펴

보면 HY 13 균주의 colony 주변에 이 균주가 분비한 단백질 분해효소에 의해 skim milk가 분해되어 투명한 환이 형성되어 있음을 알 수 있고, Fig. 3에서는 agar plate 위에 성장한 colony들이 지방을 분해하여 청색을 띄고 있음을 알 수 있다. 이와 같은 방법으로 단백질분해 및 지방의 분해능력을 조사한 결과 전체 15종의 균주 가운데 10종의 균주가 단백질 분해능력을 보였고 그 중에서도 HY3, HY4의 두 균주의 단백질 분해 활성이 뛰어났다 (Table 1). 지방의 분해능력은 단지 HY13 및 HY14 두 균주에서만 나타났으며, 단백질 분해능력을 가진 균주 가운데는 HY3 및 HY4가 대조군이였던 *Bacillus subtlis*의 효소 활성도보다 뛰어난 단백질 분해능력을 보였다(Table 2). 어류의 체성분을 살펴보면 단백질이 건물량 기준으로 65-75 %를 차지하고 있고, 이러한 수산물로부터 나오는 수산폐기물 또한 대부분이 단백질로 이루어져 있다[21]. 따라서, 이러한 폐기물들을 효과적으로 분해하기 위해서는 단백질 분해능력이 뛰어난 균주를 이용하는 것이 효율적이며, 또한 어체는 상당량의 지방을 포함하고 있으므로 지방을 분해할 수 있는 균주를 단백질 분해능이 뛰어난 균주와 혼합 배양함으로써 수산폐기물의 처리효율에 있어 향상을 꾀할 수 있으리라 사료된다. 따라서 1 % NaCl에서 성장할 수 있는 균주 가운데 단백질 분해능력이 뛰어난 HY3 와 HY4 균주 및 단백질 분해능력 외에 지방 분해능력을 가진 HY13 및 HY14균을 혼합 배양하여 수산폐기물을 처리하는 것이 효과적일 것으로 생각되어 이후의 실험은 이들 복합균을 이용하여 그 균주의 동정을 실시하고 실험을 하였다. 먼저 API 50 CH 와 API 20E package를 통한 종분석해 본 결과 HY3 균주는 *Bacillus cereus*와 94.8 % 일치를

보였고 HY4 균주의 경우는 *Bacillus subtilis*와 97.7 % 일치하였으며 HY13의 경우에도 *Bacillus pumilus*와 99.9 % 일치하였다. 그러나 HY14 균주는 *Bacillus pumilus*와 69.5 % 일치를 보여 보다 정확한 균주의 동명이 요구된다. Fig. 4는 담체에 부착된 순수한 HY4 균주를 SEM으로 촬영한 것을 나타낸 것으로 화살표가 표시하는 원형형태가 *Bacillus subtilis*이다.

Fig. 2. Photo of clear zone formed on the skim milk agar plate by proteolytic activity of HY3.

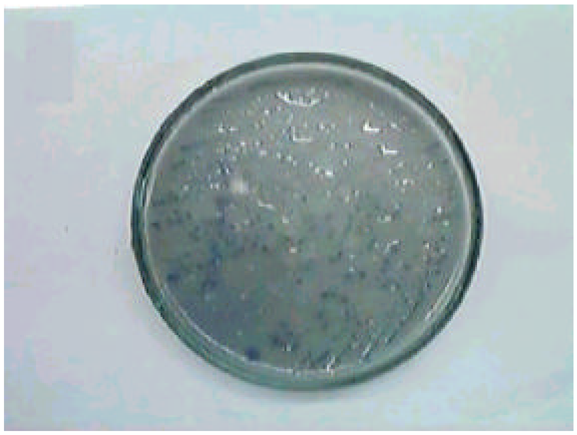


Fig. 3. Blue colonies formed on the spirit blue agar plate by lipolytic activity of HY13.

Table 1. Enzyme activities of isolates on agar plates

Strains	Proteolytic activity[a] (cm)	Colony size (cm)
Bacillus subtlis	1.7	1.0
HY1	1.2	0.8
HY2	1.2	0.7
HY3	2.5	1.2
HY4	2.2	1.0
HY5	1.2	0.9
HY6	0	0.2
HY7	0	0.3
HY8	0	0.2
HY9	0.4	0.2
HY10	0.8	0.4
HY11	0.8	0.6
HY12	0	0.8
HY13	0.6	0.2
HY14	0.4	0.3
HY15	0	0.2

[a]Diameter of clear zone was determined on a nutrient medium containing 1 % skim.

Table 2. Characteristics of isolated microorganisms

Characteristics / Isolates	Catalase	Gram reaction	Lactate production	Growth at 1 % NaCl	Proteolytic	Lipolytic activity
HY1	+	+	+	+	+	−
HY2	+	+	+	+	+	−
HY3	+	+	+	+	+	−
HY4	+	−	−	+	+	−
HY5	+	+	+	+	+	−
HY6	-	+	+	+	−	−
HY7	-	+	+	-	−	−
HY8	-	−	-	-	−	−
HY9	+	+	−	-	+	−
HY10	+	+	−	-	+	−
HY11	+	+	−	-	+	−
HY12	+	−	−	-	−	−
HY13	+	−	−	+	+	+
HY14	+	+	−	+	+	+
HY15	+	+	−	-	−	−

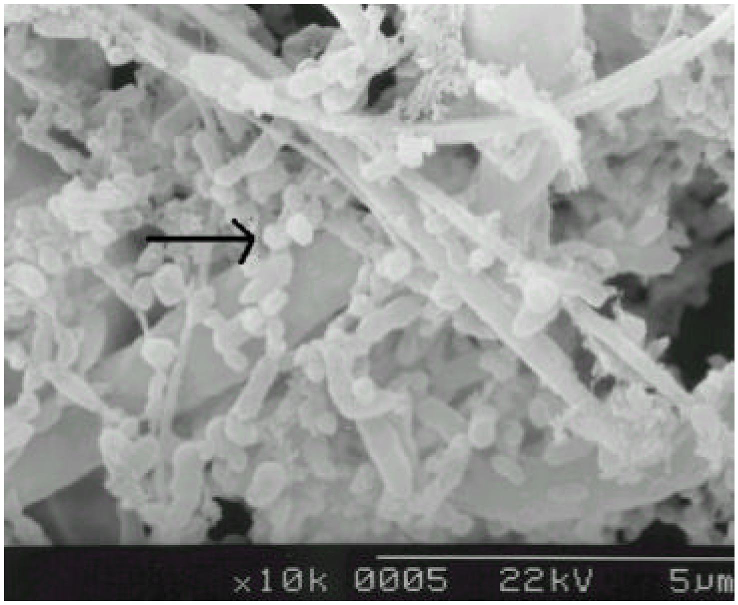


Fig. 4. SEM micrograph of HY4.

2. 복합균의 최적성장 조건 및 성장 특성

복합균을 이용한 수산폐기물의 처리에 앞서 HY3, HY4, HY13, 그리고 HY14 균주들 사이의 상호 길항 작용을 조사한 결과 이들 네 균주 사이에는 어떠한 저해작용도 보이지 않았다(Table 3). 따라서 이 네 균주는 각 균주가 가지고 있는 특성을 최대한 유지하면서 수산폐기물처리를 위한 혼합 배양을 할 수 있다는 장점을 가진다. 혼합된 복합균의 최적 성장을 위한 조건을 조사 한 결과 온도는 32℃에서 최대 성장을 보였다(Fig. 5). pH는 7에서 최대 성장을 함을 관찰할 수 있었다. 이때 pH 4.5까지는 균의 성장이 계속되었으나, 4.0 이하에는 성장속도는 저하되나 최대 OD값은 다른값과 비슷한 현상을 볼 수 있었다(Fig. 6). Fig. 7 및 Fig. 8은 각각 pH 및 온도에 따른 최대 OD 및 최대 비성장속도를 보여 주는데 그림에서 보이듯이 복합균은 pH 7 및 32℃에서 가장 높은 OD 및 비성장속도를 가짐을 알 수 있었다.

최적 성장조건에서의 복합균주의 성장 특성이 Fig. 9에 보여지는데 복합균은 2시간의 정체기를 가지며 약 12시간만에 정지기에 도달했다. 이때 최대 OD 및 최대 비성장속도는 각각 2.35 및 0.46 h^{-1}이었다. 4종으로 이루어진 복합균 가운데 순수배양시 가장 성장속도가 빠른 HY3 균의 최대 배양속도인 0.43 h^{-1}에 비하여 복합균이 빠른 성장 속도를 보였다. 이러한 결과는 복합균의 배양시 균주 상호간의 synergy 효과에 의한 것으로 사료된다. 복합균의 배양에 있어 각 균주의 population 비를 살펴보면 대수증식기 및 정지기에 걸쳐 HY3 및 HY4 균이 약 전체 population의 70 %로 H13 및 HY14에 비하여 빠른 성장을 보였다. 이러한 결

과는 yeast extract 및 peptone과 같은 단백질 성분으로 이루어진 배지에서 단백질 분해능력이 뛰어난 HY3 및 HY4가 다른 균에 비하여 빠른 속도로 성장 한 결과에 기인한 것으로 사료된다.

Table 3. Growth inhibition of four isolates for each other

Stain	HY3	HY4	HY13	HY14
HY3	ND	-	-	-
HY4	-	ND	-	-
HY13	-	-	ND	-
HY14	-	-	-	ND

Symbols: ND; not detected -; No antagonism.

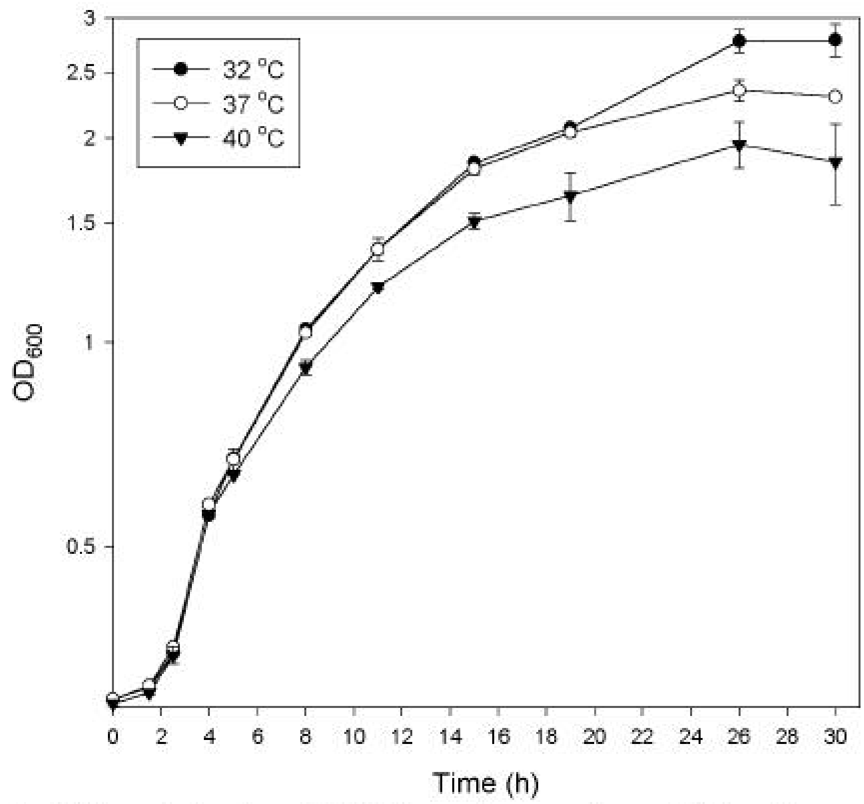


Fig. 5. The mixed culture of offal-fermenting organisms at different temperature
The temperature were controlled at 32°C, 37°C and 40°C, and cultured at a normal medium with 0.5% NaCl and initial pH, 7.0.

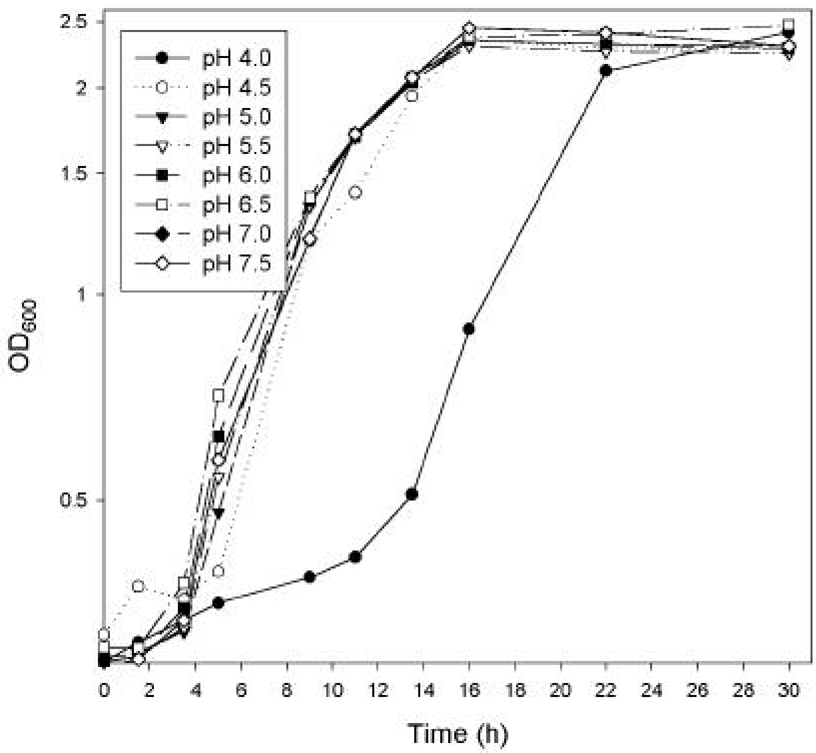


Fig. 6. The mixed culture of offal-fermenting organisms at different initial pH conditions. The temperatures were controlled at 32°C, and cultured at a normal medium with 0.5% NaCl.

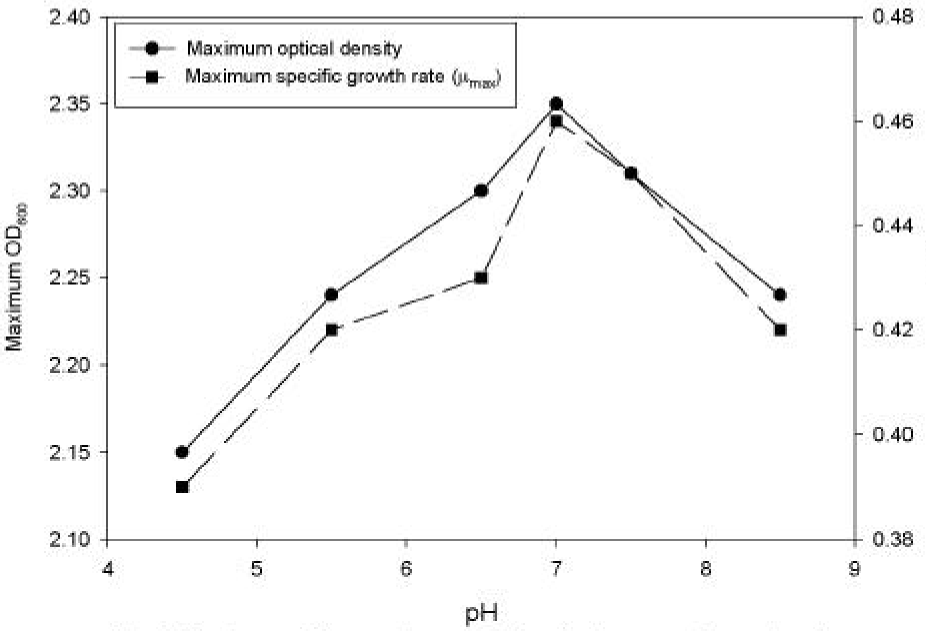


Fig. 7. Maximum OD_{600} and μ_{max} of mixed microorganisms at various pHs in shaken flasks.

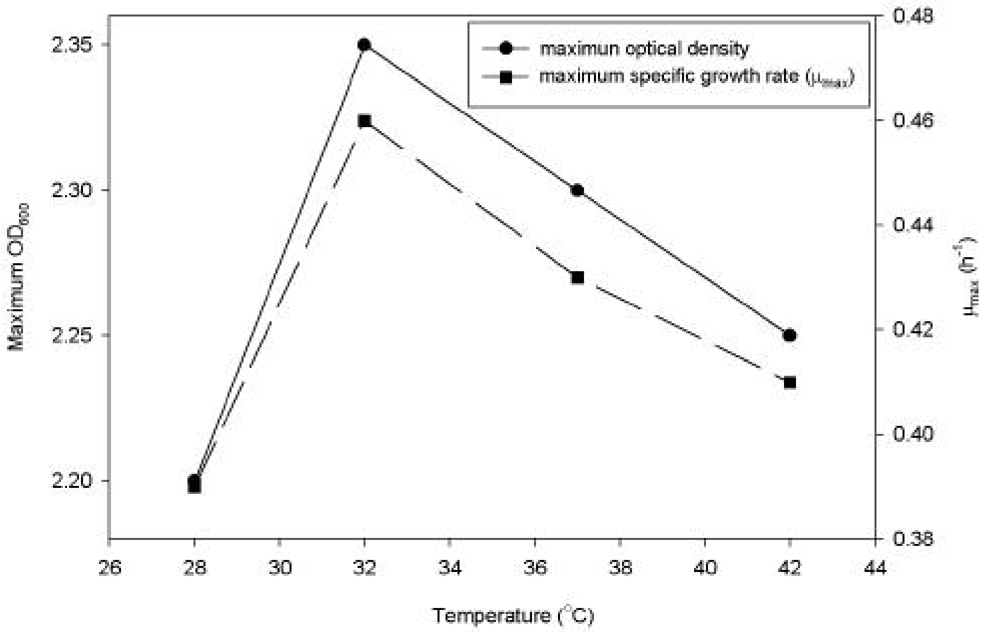


Fig. 8. Maximum OD_{600} and μ_{max} of mixed microorganisms at various temperatures in shaken flasks.

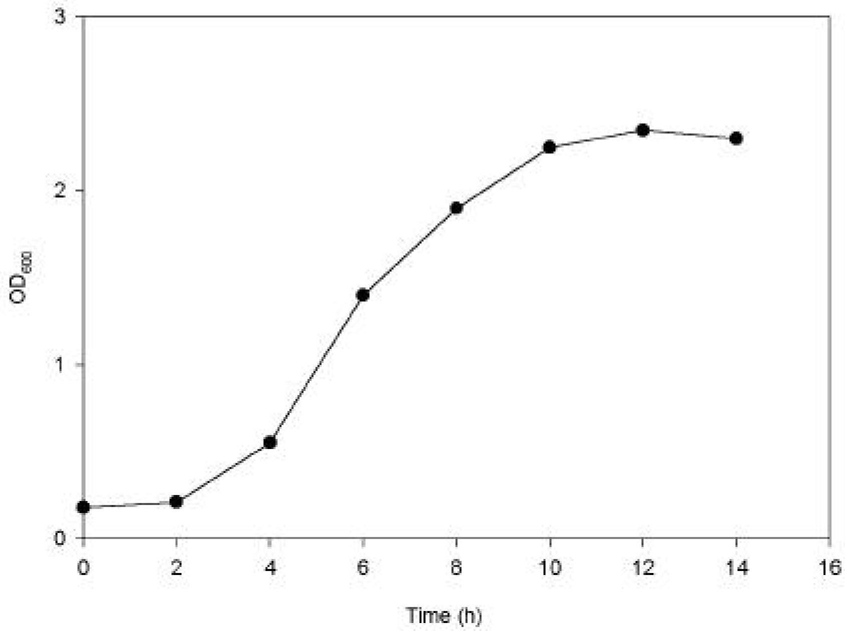


Fig. 9. Growth curve of mixed microorganisms cultivated in a shaken flask at optimum conditions.

3. 복합균을 이용한 수산폐기물의 분해

복합균을 이용한 수산폐기물의 분해 정도를 알아보기 위하여 flask 실험을 실시하였는데 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 초기 6.1 g의 건조중량을 가지는 수산폐기물에 복합균을 처리한 경우 처리 6시간 이후부터 급격히 분해되기 시작하였으며, 처리 48시간 이후에는 대부분이 분해되어 약 0.3 g 정도의 고형분만이 남았다. 이에 비하여 대조구의 경우를 살펴보면 초기 6.3 g의 건조중량이 처리 6시간 이후부터 분해되어 처리 48시간 이후에도 약 40 % 정도만이 분해되었다. 48시간의 처리시간을 기준으로 처리구가 대조구에 비하여 약 2.3배 높은 분해활성을 나타내었으며, 이때 수산폐기물의 최대 분해속도는 0.24 g/h였다. 대조구에서 보여진 수산폐기물의 분해 활성은 어류의 사후에도 장기에 분포하는 단백질 분해효소들에 의한 것과[22, 23], 수산폐기물 내에 존재하는 일부의 미생물이 배지 첨가로 인하여 성장하여 수산폐기물의 분해에 관여한 것으로 사료된다.

48시간 후의 복합미생물에 의한 수산폐기물의 분해정도를 알아보기 위하여, 분해된 수산폐기물의 최종산물에 대한 대조구 및 처리구의 유리 아미노산 양을 분석하여 Table 5에 나타내었다. 처리구의 경우 총 유리된 아미노산의 양이 39 g/100 g-protein으로 대조구에 비하여 약 2배 가량 많은 양이 유리되었으며, 이는 처리구의 수산폐기물이 대조구에 비하여 보다 더 잘 분해되었음을 보여 주었다. 이 결과를 Food Agricultural Organization (FAO) guidelines[24]과 비교하여 보면, threonine, leucine 및 phenylalanine의 양은 FAO guidelines 보다 높거나 비슷하지만

다른 아미노산은 훨씬 적은 양이나 검출되지 않았고, 따라서 이 수산폐기물의 발효산물은 사료로서는 사용되기에는 부적절함을 알 수 있었는데, 이는 실험에 사용된 수산폐기물의 선도가 좋지 않았음을 말해준다. 어류는 사후에 장기에 분포하고 있는 미생물에 의해 부패되기 시작하는데 부패의 정도가 심할수록 이 폐기 단백질을 이용한 분해산물은 사료로서는 사용될 수 없고 유기퇴비로서 사용하여야 함을 알 수 있었다[13]. 이러한 어류의 장기의 신속한 분패를 막기 위해서는 열처리등의 전처리를 거치고 압축 등의 방법으로서 영양가의 효율을 올릴 수 있을것으로 사료 되며 앞으로 보다 많은 연구가 필요하겠다. 수산폐기물의 분해시 발생되는 악취정도는 처리구의 경우 미생물 처리후 24시간 이후부터 악취가 감소하여 처리 48시간 뒤에는 대부분의 악취가 제거된 반면, 대조구의 경우는 48시간 후에도 여전히 악취를 풍겼다(Table 6). 이러한 결과는 처리구의 경우 처리 24시간 이후부터 pH가 5 이하로 떨어져서 다른 부패성 세균의 성장이 억제되어 나타난 결과로 사료된다.

Table 4. Changes in mass and pH of fish wastes during the period of treatment by mixed microorganisms

Condition / Time (h)	Control		Treatment by mixed microorganisms	
	Dry weight (g)	pH	Dry weight (g)	pH
0	6.3±0.8	7	6.1±1.2	7
6	6.0±1.0	6.9	5.5±1.0	6.8
12	5.6±1.2	6.7	4.2±0.5	6.2
24	5.0±0.8	6.4	1.3±0.1	5.2
36	4.2±0.5	6.3	0.5±0.1	4.8
48	3.8±0.5	6.2	0.3±0.1	4.5

Table 5. The comparison of amounts of free amino acids between the treated fish waste and control

Free amino acid	Control (g/100g protein)	Treatment (g/100g protein)
Arginine	0.008	0.005
Aspartic acid	0.028	0.045
Glutamic acid	0.019	0.037
Isoleucine	0.015	0.028
Leucine	0.024	0.044
NH_3	0.005	0.010
Phenylalanine	0.013	0.023
Methionine	0.007	0.012
Serine	0.024	0.051
Threonine	0.026	0.048
Tyrosine	0.008	0.026
Taurine	0.027	0.061
Total	0.204	0.390

Table 6. Changes in odor of fish wastes during the period of treatment by mixed microorganisms

Condition / Time (h)	Control		Treatment by mixed microorganisms	
	The strength of odor	pH	The strength of odor	pH
0	1	7	1	7
6	2	6.9	2	6.8
12	3.4	6.7	3.2	6.2
24	3.7	6.4	2.1	5.2
36	3.5	6.3	1.3	4.8
48	3.1	6.2	0.5	4.5

*The strength of odor : 1 = Indistinguishable smell, 2 = Scent, 3 = Odor, 4 = Stench, 5 = Vomiting, unbearable odor.

요 약

버려지는 수산폐기물의 생물학적 처리를 위하여 수산시장에서 버려진 어류의 내장, 시판되는 양어사료 및 발효제로부터 총 15종의 미생물을 분리하였다. 분리된 15종의 균주들 가운데 HY4, HY8, HY12, 그리고 HY13 을 제외한 나머지 11종의 균주들은 그람양성반응을 보였으며, 그 중 HY1, HY2, HY3, HY5, HY6, 그리고 HY7은 젖산생성 능력을 가진 것으로 판명되었다. 분리된 균주 가운데 1 %의 NaCl에서 성장할 수 있는 균주는 HY1부터 HY6까지의 균주와 HY13 및 HY14 이었다. 단백질 분해 및 지방의 분해능력을 조사한 결과 전체 15종의 균주 가운데 10종의 균주가 단백질 분해능력을 보인 반면 HY13 및 HY14 두 균주만이 지방 분해 능력을 나타내었다. 이상의 결과로부터 HY3, HY4, HY13, 그리고 HY14 네 균주를 선택하여 수산폐기물의 분해특성을 알아보았다.

실험에 사용된 복합균주들 사이에는 어떠한 저해작용도 보이지 않았고, 복합균의 최적 성장 pH 및 온도는 각각 7 및 32℃이었다. 최적 성장 조건에서 복합균주의 성장 특성은 2시간의 정체기를 가지며 약 12시간만에 정지기에 도달하였고, 최대 OD 및 최대 비성장 속도는 각각 2.34 및 0.46 h^{-1} 이었다. 혼합 배양에 있어 각 균주의 population 비를 살펴보면 대수증식기 및 정지기에 걸쳐 HY3 및 HY4 균이 전체의 70 %를 차지해 HY13 및 HY14에 비하여 빠른 성장을 보였다. 복합균을 이용한 수산폐기물 분해 실험에서 처리구가 대조구에 비하여 약 2.3배 높은 분해활성을 보였으며, 이때 수산폐기물의 최대 분해속도는 0.24 g/h이였다. 복합균을 이용하여 수산폐기물을 처리한 결과, 처리 48시간

후 유리된 총아미노산의 양은 39 g/100 g-protein 이었으며, 대조구에 비해 악취 제거능력도 뛰어났다.

감 사 의 글

부족한 저에게 논문이 완성될 수 있도록 항상 많은 격려와 가르침을 주신 김중균 지도교수님께 감사드립니다. 그리고 한해 동안 저를 돌보아 주신 화학공학과의 이민규 교수님께 감사의 말씀과 교수님의 기대를 많이 저버린 듯 하여 죄송하다는 말을 이 자리를 빌어 올리고 싶습니다. 바쁘신 중에도 부족한 저의 논문을 수정해주시고 지도해주신 이형호 교수님, 김성구 교수님 그리고 임학섭 박사님께 진심으로 감사드립니다. 학문에 임하는 자세와 시야를 넓혀 주신 홍용기 교수님, 공인수 교수님, 박남규 교수님 그리고 공재열 교수님께도 감사드립니다.

항상 밝은 모습으로 실험실 생활에 많은 도움을 준 혜경이와 철원이에게 고맙다는 말을 전하고 싶고 언제나 따뜻한 눈길로 저를 지켜 보아주고 실험을 도와준 환경공학과의 이은숙 학우님 그리고 멀리서 저의 논문에 대하여 아낌없이 충고 해주신 탁건태 선배님과 저의 동기 범규에게도 감사의 뜻을 전합니다.

오늘이 있기까지 변치 않은 사랑으로 돌보아 주신 아버지 어머님께 머리 숙여 감사드립니다. 그리고 언제나 막내동생을 걱정해주는 누나들에게도 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Lee, S. C and Woo, K. L., A study on development of effective utilization method of skipjak tuna viscera. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24(1), 1992, 86-91.

2. Lee, E. H., Pack, H. S., Ahn, C. B and Hwang, G. C., Preparation of fish sauce from mackerel scrap. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 15, 1986, 201.

3. **이태현 : 가다랑어 잔사를 이용한 어간장 제조 및 향미 성분. 부산수산대학 대학원 석사학위 논문**(1987).

4. Chum, S. S., Cho, Y. J., Son, G. M., Choi, H. J and Choi, C., Change of functional properties and extraction of protein from abolished protein resource by protease. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 41(1), 1998, 13-17.

5. Zucconi. F and M. de Bertoldi, Compost specification for the production and characterization of compost from municipal solid waste. 1996, p. 30-50. *In* M. de Bertoldi. (ed.), Compost; Production, quality and use. *Elsevier Applied Sience*,

6. **富山**拆**夫** ：**酵素化學工業全集**. **厚生閣**, p17, 53.

7. Raa, J and A. Gildberg, Fish silage: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition* 16, 1982, 383-419.

8. Cisse, A., P. Luquet and A. Etchian., Use of chemical or biological fish silage as feed for *Chrysichthys nigrodigitatus* (Bagridae). Aquat. Living Resour. Ressour. *Vivantes Aquat*. 8(4), 1995, 373-377.

9. Fagbenro, O and K. Jauncey, Chemical and nutritional quality of fermented fish silage containing potato extracts, formalin or ginger extracts. *Food Chem*. 50(4), 1994, 383-388.

10. Faid, M., A. Zouiten, A. Elmarrakchi and A. Achkari-Begdouri, Biotransformation of fish waste into a stable feed ingredient. *Food Chem*. 60(1), 1996, 13-18.

11. Liao, P. H., L. Jones., A. K. Lau., S. Walkemeyer., B. Egan and N. Holbek., Composting of fish wastes in a full-scale in vessel system. *Bioresource Technology* 59, 1997, 163-168.

12. Martin, A. M., 1992. Use of extracts from fisheries by-products and peat compost in fermentation processes. Proceeding of the 1991 fisheries by-product composting conference. Madison, USA Univ. Wisconsin Sea Grant Inst. no. WISCU-W-91-001, 129-134.

13. Oh, E. G., Park, M. Y and Chang, D. S., Proteolytic yeasts isolated from mackerel(*Scomber japonicus*) *J. Korean Fish. Soc.* 31(4), 471-476.

14. Yang, J. K., Seu, Y. K., Choi, K. M., Park, E. R., Whang, K and Lee, S. T., Isolation and characteristics of mesophilic or thermophilic bacteria from the treating process of Chinese restaurant waste using thermophilic oxic process. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1997, 623-629.

15. Kim, K. H and Lee, K. B., Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strain AE6 producing an antifungal substance and a mosquitocidal delta-endotoxin simultaneously. *Korean J. Sanitation* 13(2), 1998, 40-46.

16. Cremer, A. Antibiotic sensitivity and assay tests. In. Colins, C. H. and P. M. Lyne (eds.), *Microbiological methods*. 1984, 167-181.

17. Kim, K. K., Kim, J. Y and Lee, K. B., Isolation of aerobic bacteria and its efficacy for the treatment of korean food-wastes. *Kor. J. Life Science, 9(5), 510-517.*

18. **가축분뇨의 자원화를 위한 기술 지침서 -농촌진흥청 축산기술연구소**. 1996

19. Agung, S., Elena, T and Louis H, E., Digestibity studies on fisheries by-product based diets for penaeus monodon. *Aquaculture*. 143, 1996, 331-340.

20. Dapkevicius, M. L. N. E., M. J. R. Nout., F. M. Rombouts, J. H. Houben and W. Wymenga, Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International J. Food. Microbiol*. 57, 2000, 107-114.

21. **배승철**, **김일규**, **김정대**, **이상민**, **이종윤**, **장혜경**. 1998. **어류영양과 사료**. pp. 33, 1st eds., **삼광출판사**.

22. Sherekar, S. V., M. S. Gore and V. Ninjoor, Purification and characterization of cathepsin B from the skeletal muscle of fresh water fish, *Tilapia mossambica*. *J. Food Sci*. 53(4), 1998, 1018-1023.

23. Ueno, R., Sakanaka, K. S., Ikeda and Horoguchi, Y., Purification of pepstatin insensitive protease from mackerel white muscle. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54, 1998, 691-697.

24. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Amino acid content of foods and biological data on proteins. FAO Nutritional Studies No. 24, 1980. Rome, Italy.