

최 종
연구보고서

토양미생물제제의 생산을 위한 배지 · 충전재 및
미세캡슐화에 관한 연구

Preparation of Culture Media from Agricultural
Byproducts for Soil Microbial Inoculants and
Encapsulation of the Inoculant Organisms

연구 기관

충남대학교 농업생명과학대학

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “토양미생물체제의 생산을 위한 배지·충전재 및 미세캡슐화에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 충남대학교

총괄연구책임자 : 최 우 영

세부연구책임자 : 장 기 운

연구원 : 윤 민 호 · 권 순 경

윤 종 영 · 이 근 혜

박 종 상 · 이 종 진

연구조원 : 전 수 현 · 서 영 식

박 해 성 · 김 수 정

홍 승 표 · 김 영 은

박 진 한 · 김 주 혜

임 성 재 · 김 명 준

차 정 아 · 이 하 나

이 미 화 · 이 종 은

홍 주 화 · 홍 성 길

나 승 주 · 전 한 기

배 희 수 · 김 미 희

요 약 문

I. 제 목

“토양미생물제제의 생산을 위한 배지·충진재 및 미세캡슐화에 관한 연구”

II. 연구개발의 목적 및 필요성

토양미생물제제는 부숙촉진, 인산가용화 등 영양성분의 전환 (transformation), 작물생육촉진성 근권세균 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)을 포함한 길항작용 등의 목적으로 다양한 제품이 유통되고 있으며, 환경친화적 농법에 부응하여 그 사용량이 점차 증가하고 있다.

그러나 미생물의 배양에는 고가의 배지성분을 사용하므로 생산업체간에 경쟁이 치열함에도 불구하고 결코 저렴하지 않은 가격에 판매되고 있으며, 또한 토양미생물제제의 시용효과를 보장하기 위하여는 제품의 단위중량당 생균수 (number of viable cells)가 중요함에도 불구하고 유통과정이나 보관기간 중에 변화의 진폭이 커서 대부분 기준에 미달하거나 경우에 따라서는 오염균이 우점하고 있는 즉 변질된 제품도 쉽게 발견된다.

본 연구에서는 ① 염가의 배양기질을 얻기 위한 “몇가지 농축산부산물의 배지 자원화”, ② 생균수를 유지시켜 제품의 유통기간을 보장할수 있도록 “생균체의 미세캡슐화 (microencapsulation)”와 “충진재-미생물 혼합제의 과립화 (granulation)”를 연구하여 현장에 적용할 수 있는 기술을 개발하는데 목표를 두고 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 농산가공 부산물의 배지자원화 기술개발

- 가. 두부·두유부산물
- 나. 맥주양조부산물
- 다. 폐당밀의 활용 및 맥아로부터 추출물의 제조
- 라. 농산부산물첨가 배지에서의 토양미생물의 생장을 비교

2. 축산가공 부산물의 배지자원화 기술개발

- 가. 도축부산물<Ⅰ> 혈액
- 나. 도축부산물<Ⅱ> 저급육
- 다. 유가공부산물<Ⅰ> 유단백
- 라. 유가공부산물<Ⅱ> 유청
- 마. 변태기 등 기타 부산물의 활용
- 바. 축산부산물첨가 배지의 조제 및 토양미생물의 생장을 비교

3. 생균체의 고정화·미세캡슐화 기술개발

- 가. 시험균주의 액체배양
- 나. 고정화·미세캡슐화 재료의 특성비교 및 선택
- 다. 미세캡슐화의 조건 및 방법의 개발
- 라. 미세캡슐화가 균체의 생존율에 미치는 영향 구명
- 마. 미세캡슐화 균체의 장기보존 효과

4. 충전재-미생물 혼합제의 과립화 기술개발

- 가. 무기재료 및 과립화를 위한 혼합비율
- 나. 다공질 무기재료에서의 미생물 정착성
- 다. 과립화 방법 및 조건의 구명

라. 충전재-미생물 과립화제제의 보존성 구명 및 유통기간 설정

5. 충전재-미생물 과립화제제의 비해·비효시험

비료공정규격<농촌진흥청고시 '02. 12. 31.>에 의한 비해·비효시험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 농산가공 부산물의 배지자원화 기술개발

농산가공 부산물 중에서 두부·두유부산물, 맥주양조부산물, 맥아 및 당밀을 가수분해하거나 추출하여 토양미생물의 배양을 위한 배지성분으로 사용하기 위한 기술을 개발하였다. 가수분해 및 추출 공정의 최적화, 가수분해물의 영양성분 평가, 분해물을 첨가한 배지에서의 미생물의 생육을 비교하였다.

2. 축산가공 부산물의 배지자원화 기술개발

축산가공 부산물 중에서 도축부산물로서 혈액 및 저급육, 유가공부산물로서 카제인 및 유청, 또는 기타 잡엽부산물로서 번데기 등을 가수분해하여 배지성분으로 사용하기 위한 기술을 개발하였다. 가수분해 및 추출 공정의 최적화, 가수분해물의 영양성분 평가, 분해물을 첨가한 배지에서의 미생물의 생육을 비교하였다.

3. 생균체의 고정화·미세캡슐화 기술개발

미생물을 배양하여 얻은 균체를 다당류 등의 바이오폴리머로 피복 및 고정하기 위한 폴리머재료의 선별, 조건 및 방법의 최적화, 캡슐화 공정이 미생물의 생존

율에 미치는 영향, 제품의 장기보존 효과 등을 구명하였다.

4. 충전재-미생물 혼합제의 과립화 기술개발

충전재로서 무기재료와 미생물을 혼합시켜서 과립화하는 기술을 개발하고저 각 재료의 적정 혼합비율을 선정하고 과립화 장치를 설계 제작하였으며, 공정을 최적화하고 과립제품의 건조 및 보관조건을 구명하였다.

5. 충전재-미생물 과립화제제의 비해·비효시험

주요 과립화제제에 대하여는 비료공정규격<농촌진흥청고시 '02. 12. 31.>에 따라 비해·비효시험으로서 미생물제제의 품목허가를 위한 채소(상추), 수목(재스민) 등에 대하여 작물재배시험을 수행하였다.

6. 농축산부산물의 배지자원화 기술에 대한 경제성 분석

주요 단백질 분해물 및 맥아추출물에 대하여는 단식공정 (batch process)의 경우 그 생산원가를 추산하고 시판품과의 가격을 비교하였다. 생산공정을 공장 규모로 scale-up 시켰을 경우의 생산원가를 예측하고 경제성을 분석하는 데는 다양한 인자를 고려해야 하겠으나, 여기서는 원료 1톤으로부터 단식공정으로 처리하였을 경우의 생산비만을 추산하였다.

7. 활용에 대한 건의

농업용미생물제제 및 보조사료로서의 생균제를 생산공급하는 업체가 난립하고 있고, 미생물을 취급할 수 있는 전문인력과 시설을 구비하지 못한 생산업체도

영업을 계속하고 있다. 이러한 업체들이 하루 속히 영세성을 탈피하여 정상적인
체도에 도달하기를 고대하고 있다

그러나 제품의 허가 및 등록뿐만 아니라 시장에서 유통 중인 미생물 제품의
품질 규격을 검증할 수 있는 제도를 마련하여, 사용농가가 품질이 보증되지 않은
제품을 고가에 매입하는 불이익을 당하는 모순을 제거해야 할 것이다.

SUMMARY

I. Title of the Project

Preparation of Culture Media from Agricultural Byproducts for Soil Microbial Inoculants and Encapsulation of the Inoculant Organisms

II. Objectives of the Research and Development

These studies were carried out primarily to develop the relatively simple processes for hydrolysis of natural protein substances, which could be obtained as byproducts of food and dairy industries, and to utilize the hydrolysates and extracts as microbiological medium ingredients to produce the soil inoculant preparations. Secondly, the studies were aiming to develop the inoculant preparations with longer shelf life that is, microencapsulation of the microbial cells with sodium alginate and/or granulation of the microbial cells with inorganic materials.

III. Contents and Scope of the Research and Development

1. Processes for hydrolysis of agricultural byproducts were investigated and optimized.

A. Soybean meals and isolated soy proteins

- B. Malts and molasses
- C. Others such as silk pupae
- D. Analysis for the physicochemical properties of the hydrolysates and extracts
- E. Application as cultivation media ingredients

2. Processes for hydrolysis of byproducts from dairy and meat industries were investigated and optimized.

- A. Casein and whey
- B. Low-grade meats
- C. Blood meals
- D. Analysis for the physicochemical properties of the hydrolysates and extracts
- E. Application as cultivation media ingredients

3. Materials and processes for microencapsulation of the microbial cells were selected and optimized.

- A. Cultivation of production of the microbial cell mass
- B. Selection of materials for immobilization and encapsulation
- C. Conitons and processes for microencapsulation
- D. Cell viability during the process for microencapsulation
- E. Shelf life of the immobilized capsules

4. Processes for granulation of the microbial cells with inorganic materials were developed.

- A. Inorganic materials and mixing ratio
- B. Compatibility of the microbial cells to the materials
- C. Conditions and methods for granulation
- D. Shelf life of the inorganics-microbe granules

5. Field tests for the inorganics-microbe granules according to the regulations for the specifications of fertilizers by ORD (Dec. 31, 2002) were carried out.

- A. Zeolite-microbe granules on lettuce
- B. Inorganics-microbe granules <L> on jasmin trees
- C. Inorganics-microbe granules <S> on lettuce

6. Economic analysis for production of the media ingredients from agricultural byproducts were done.

- A. Soybean peptone or Soytone
- B. Tryptone or Casitone
- C. Whey hydrolysates
- D. Blood peptone
- E. Malt extracts

IV. Results and Suggestions for Application of the Results

1. Processes for hydrolysis of agricultural byproducts

A. Acid-enzymatic processes for hydrolysis of soybean meals, ISP, and pupae were established to produce SM-, ISP-hydrolysates, and Pupae hydrolysates.

The processes consisted of the acid hydrolysis by 0.2 N hydrochloric acid and the enzymatic hydrolysis by commercial proteolytic enzymes such as Protamex and Flavourzyme.

B. Process for malt extracts preparation was developed. The yields were 52.0 and 53.9% of the malt powders.

C. The hydrolysates extracts were analyzed for their physicochemical properties such as pH, contents for moisture, nitrogens (T-N, A-N), carbohydrates, ashes and inorganics, and compositions of amino acids. It was found that their properties were similar to those of Difco medium ingredients such as Bacto soytone, peptone and malt extracts.

D. Standard test organisms were cultivated in a variety of media, broths and agar plates, which prepared with the hydrolysates and extracts as substitutions for Difco medium ingredients. The levels of growth and colony morphologies of the test strains were similar or superior to those prepared with Difco medium ingredients.

2. Processes for hydrolysis of byproducts from dairy and meat industries

A. Enzymatic processes for hydrolysis of milk proteins such as casein and whey were established to produce casein I, II- and whey I, II- hydrolysates. The hydrolysates I were those which digested by Protamex and Flavourzyme in combination, and II by Pancreatin alone.

B. Enzymatic processes for hydrolysis of meats, sirloin and shank, were established to produce Sirloin- and Shank-hydrolysates, employing Protamex and Flavourzyme in combination. Alkali-enzymatic process for hydrolysis of blood meals were established to produce Serum-hydrolysates: the process

consisted of alkali hydrolysis by 1.8 N potassium hydroxide and enzymatic hydrolysis by trypsin.

3. Microencapsulation of the microbial cells

A. Three types of microcapsules were prepared by:

- ▶ Sodium alginate-microbe beads were formed in calcium chloride solution,
- ▶ Then the sodium alginate-microbe beads were entrapped in a chitosan layer,
- ▶ Polysaccharide and microbe mixtures were spray-dried.

B. Cell viability during the process for microencapsulation of the sodium alginate-microbe beads was not dropped markedly, however the spray dried capsules lost viability 80.1%.

C. Shelf life of the sodium alginate-microbe beads entrapped in a chitosan layer was 30 months at 25°C in case of limit viability, 1×10^8 c.f.u./g.

4. Granulation of the microbial cells with inorganic materials

A. Inorganic materials such as serpentine, sericite, pyrophyllite, rock phosphate and zeolite were tested for the granulation.

B. A pilot-scale granulation apparatus with the mixer capacity of 500 kg was designed and constructed. The powdered inorganic materials were mixed thoroughly in the mixer. and then the microbial culture broth, 20% (v/w), was mixed to form a dough. The dough was sent to the primary and secondary granulator to produce the granules. These were dried on wired vats in a convection oven at 45°C.

C. Shelf life of the granules calculated from the data of vial counts: Those of inorganics-microbe granules were 12 months at 25°C in case of limit viability, 1×10^8 c.f.u./g.

5. Field tests for the inorganics-microbe granules

A. Field tests were carried out for the zeolite-microbe granules on lettuce, inorganics-microbe granules <L> on jasmin trees, and inorganics-microbe granules <S> on lettuce, according to the regulations for the specifications of fertilizers by ORD (Dec. 31, 2002) were carried out.

B. Positive effects on the growth of the lettuce and jasmin trees were recognised, however harmful effects were not found.

6. Economic analysis for production of the media ingredients from agricultural byproducts

A. Production costs of Soybean peptone or Soytone, Tryptone or Casitone, Whey hydrolysates, Blood peptone, and Malt extracts were calculated in case of those produced by a batch process.

B. The production costs were markedly low as compared to the commercial products.

7. Suggestions for application

Many manufacturers of the microbial preparations for agricultural purpose

or feed additives are operated without the microbiologist and the proper equipments. It is considered that a regulation to inspect the commercial products on the shelves of the supplier is necessary, and that the consumer and/or farmer should not purchase the microbial inoculants of unreliable qualities, paying high prices.

CONTENTS

| | |
|---|----|
| Chapter 1. Introduction | 21 |
| Section 1. Necessities of the Research and Development | 21 |
| 1. Scientific and Technological Aspects | 22 |
| 2. Economic and Industrial Aspects | 22 |
| 3. Social and Cultural Aspects | 22 |
| Section 2. Objectives and Scope of the Research and Development | 23 |
| Section 3. Periods of the Research and Development | 29 |
| Chapter 2. Current Status of the Research and Development | 30 |
| Section 1. Domestic Status | 30 |
| Section 1. Foreign Status | 31 |
| Chapter 3. Contents and Results of the Research and Development | 32 |
| Section 1. Contents and Methods | 32 |
| 1. Protein and Sugar Substances | 32 |
| 2. Hydrolysis of Protein Substances | 32 |
| A. Enzymes for Protein Hydrolysis | 32 |
| B. Process for Hydrolysis | 34 |
| 1) Soybean Proteins | 35 |
| 2) Whey | 36 |
| 3) Casein | 37 |
| 4) Low-grade Meat | 38 |
| 5) Blood Meal | 39 |
| 6) Silkworm pupae | 40 |
| 3. Preparation of Malt Extracts | 41 |
| 4. Analytical Methods | 41 |
| A. pH | 41 |
| B. Moisture | 41 |
| C. Nitrogen | 41 |
| D. Degree of Hydrolysis | 42 |
| E. Nitrogen Solubility Index | 42 |

| | |
|---|----|
| F. Carbohydrate | 43 |
| G. Ash | 43 |
| H. Inorganics | 44 |
| I. Amino Acid Composition | 44 |
| 5. Microbiological Methods | 45 |
| A. Standard Organism | 45 |
| B. Growth Rate | 45 |
| 6. Microencapsulation of Microbial Cells | 48 |
| A. Materials for Encapsulation | 48 |
| B. Conditions and Processes | 48 |
| C. Calculation of Shelf Life | 48 |
| 7. Granulation of Inorganics and Microbes | 52 |
| A. Inorganic Materials | 52 |
| B. Lab-scale Granulator | 52 |
| C. Pilot-scale Granulator | 52 |
| D. Processes | 52 |
| 8. Field Tests | 56 |
| A. Experimental Groups | 56 |
| B. Investigation and Analysis | 56 |
| Section 2. Results and Discussion | 59 |
| 1. Hydrolysis of Soybean Proteins | 59 |
| A. HCl | 59 |
| B. Enzymes | 59 |
| C. HCl-Enzyme | 60 |
| 2. Hydrolysis of Milk Proteins | 67 |
| A. Whey | 67 |
| B. Casein | 67 |
| 3. Hydrolysis of Meats and Blood | 68 |
| 4. Hydrolysis of Silkworm Pupae | 68 |
| 5. Yields and DH of the Hydrolysates | 69 |
| 6. Physicochemical Properties of the Hydrolysates | 69 |
| A. General Composition | 69 |
| B. Inorganics | 70 |
| C. Amino Acid Composition | 71 |
| 7. Microbial Growth on the Substitution Media | 83 |

| | |
|---|-----|
| A. Soybean Protein Hydrolysates | 83 |
| B. Milk Protein Hydrolysates | 83 |
| C. Meat and Blood Hydrolysates | 91 |
| D. Pupae Hydrolysates | 91 |
| E. Malt Extracts | 91 |
| 8. Microencapsulation of Microbial Cells | 102 |
| A. Processes for Encapsulation | 102 |
| B. Properties of the Capsules | 102 |
| C. Changes in Viability during Encapsulation | 102 |
| D. Shelf Life of the Capsules | 102 |
| 9. Granulation of Inorganics and Microbes | 109 |
| A. Inorganics-Microbe Mixed Granules | 109 |
| B. Properties of the Mixed Granules | 109 |
| C. Shelf Life of the Mixed Granules | 110 |
| 10. Field Experiments | 115 |
| A. Zeolite-Microbe Granules | 115 |
| B. Inorganics-Microbe Granules < I > | 119 |
| C. Inorganics-Microbe Granules < II > | 123 |
| 11. Economic Analysis | 127 |
| Chapter 4. Achievements and Contributions | 130 |
| Section 1. Achievements of the Objectives | 130 |
| Section 2. Contributions to the Related Field of Research and Development | 131 |
| Chapter 5. Application of the Results | 134 |
| Chapter 6. Nobel Informations from Foreign Researches | 135 |
| Chapter 7. References | 136 |
| Acknowledgements | 142 |

목 차

| | |
|--------------------------------------|----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요 | 21 |
| 제 1 절 연구개발의 필요성 | 21 |
| 1. 기술적 측면 | 22 |
| 2. 경제·산업적 측면 | 22 |
| 3. 사회·문화적 측면 | 22 |
| 제 2 절 연구개발의 목표 및 범위 | 23 |
| 제 3 절 연구기간 | 29 |
| | |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 | 30 |
| 제 1 절 국내 기술개발 현황 | 30 |
| 제 2 절 국외 기술개발 현황 ¹⁴ | 31 |
| | |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 | 32 |
| 제 1 절 연구수행 방법 및 내용 | 32 |
| 1. 천연단백질 및 당질 원료 | 32 |
| 2. 천연단백질의 가수분해 방법 | 32 |
| 가. 단백질 분해효소 | 32 |
| 나. 가수분해 공정 | 34 |
| 1) 대두단백의 염산 및 효소 가수분해 | 35 |
| 2) 유청단백의 효소가수분해 | 36 |
| 3) 카제인의 효소가수분해 | 37 |
| 4) 저급우유류의 효소가수분해 | 38 |
| 5) 건조혈분의 효소가수분해 | 39 |
| 6) 번데기의 효소가수분해 | 40 |
| 3. 맥아추출물의 조제 | 41 |
| 4. 이화학적 분석방법 | 41 |
| 가. pH | 41 |
| 나. 수분 함량 | 41 |
| 다. 질소 함량 | 41 |
| 라. 단백질의 가수분해도 | 42 |
| 마. 질소용해도 | 42 |

| | |
|---------------------------------|----|
| 바. 탄수화물 함량 | 43 |
| 사. 조회분 | 43 |
| 아. 무기이온 함량 | 40 |
| 자. 아미노산 조성 | 44 |
| 5. 미생물학적 방법 | 45 |
| 가. 공시균주 | 45 |
| 나. 생육속도의 비교 | 45 |
| 6. 미생물 균체의 미세캡슐화 방법 | 48 |
| 가. 캡슐화 재료 | 48 |
| 나. 캡슐화의 조건 및 방법의 개발 | 48 |
| 다. 캡슐화 균체의 보존기간 설정 | 48 |
| 7. 충전제-미생물 혼합제의 과립화 방법 | 52 |
| 가. 무기 재료 | 52 |
| 나. Lab-scale 과립기 | 52 |
| 다. Pilot-scale 과립기 | 52 |
| 라. 과립화 방법 | 52 |
| 8. 포장시험 방법 | 56 |
| 가. 시험구의 배치 및 처리 | 56 |
| 나. 생육조사, 토양성분 및 미생물 분석 | 56 |
| 제 2 절 연구결과 및 고찰 | 59 |
| 1. 대두단백질의 가수분해 | 59 |
| 가. 염산에 의한 대두단백질의 분해 | 59 |
| 나. 효소에 의한 대두단백질의 분해 | 59 |
| 다. 염산-효소 처리에 의한 대두단백질의 분해 | 60 |
| 2. 우유단백질의 가수분해 | 67 |
| 가. 유청단백질 | 67 |
| 나. 카제인 | 67 |
| 3. 수육 및 혈분의 가수분해 | 68 |
| 4. 번데기의 가수분해 | 68 |
| 5. 가수분해물의 수율 및 단백질분해도 비교 | 69 |
| 6. 가수분해물의 이화학적 특성 | 69 |
| 가. 일반성분 조성 | 69 |
| 나. 무기성분 | 70 |

| | |
|---|-----|
| 다. 아미노산 조성 | 71 |
| 7. 가수분해물을 이용한 배지의 조제 및 미생물 균주의 생육 | 83 |
| 가. 대두단백 가수분해물 | 83 |
| 나. 우유단백 가수분해물 | 83 |
| 1) 유청단백질 | 83 |
| 2) 카제인 | 84 |
| 다. 수육 및 혈분 가수분해물 | 91 |
| 라. 번데기 가수분해물 | 91 |
| 마. 맥아추출물 | 91 |
| 8. 토양미생물 균체의 고정화 · 캡슐화 | 102 |
| 가. 미세캡슐화 공정 | 102 |
| 나. 미세캡슐의 특성 | 102 |
| 다. 캡슐화 공정중 생균수의 변화 | 102 |
| 라. 미세캡슐화 균체의 보존기간 | 103 |
| 9. 충전재-미생물 혼합과립화 | 109 |
| 가. 무기충전재-미생물 혼합과립 | 109 |
| 나. 혼합과립의 특성 | 109 |
| 다. 혼합과립의 보존기간 | 110 |
| 10. 충전재-미생물 혼합과립의 비례 · 비효 | 115 |
| 가. 제올라이트-미생물 혼합과립 | 115 |
| 나. 무기재료-미생물 혼합과립<Ⅰ> | 119 |
| 다. 무기재료-미생물 혼합과립<Ⅱ> | 123 |
| 11. 경제성 분석 | 127 |
| | |
| 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 130 |
| 제 1 절 연구개발 목표의 달성도 | 130 |
| 제 2 절 관련분야에의 기여도 | 131 |
| | |
| 제 5 장 연구개발결과의 활용계획 | 134 |
| | |
| 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학 기술정보 | 135 |

| | | |
|-------|------------|-----|
| 제 7 장 | 참고문헌 | 136 |
| 감사의 글 | | 142 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

토양미생물제제는 부숙촉진, 인산가용화 등 영양성분의 전환 (transformation), 작물생육촉진성 근권세균 (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)을 포함한 길항작용 등의 목적으로 다양한 제품이 생산·유통되고 있으며, 점차 제품의 종류와 형태가 발전되고 환경친화적 농법에 부응하여 그 사용량이 날로 증가하고 있다.

그러나 미생물의 배양에는 고가의 배지성분을 사용하므로 생산업체간에 경쟁이 치열함에도 불구하고 결코 저렴하지 않은 가격에 판매되고 있으며, 또한 토양미생물제제의 시용효과를 보장하기 위해서는 제품의 단위중량당 생균수 (number of viable cells)가 매우 중요함에도 불구하고 유통과정이나 보관기간 중에 변화의 진폭이 커서 대부분 기준에 미달하거나 경우에 따라서는 오염 균주가 우점하고 있는 즉 변질된 제품도 쉽게 발견된다.

사용농가의 입장에서 보면 품질이 보증되지 않은 제품을 고가에 매입하는 불이익을 당하는 모순과, 생산업체의 입장에서 고가 제품으로써 더 이상 매출신장이 어려울 뿐 아니라 출고이후 자사제품의 품질을 자신할 수 없는 이중적인 모순에 처해있다고 볼 수 있다.

본 연구팀은 "부산물의 천연 배지자원화"와 "생균체의 미세캡슐화"에 관하여 관심을 가지고 연구하여 왔으며, 또한 토양미생물제제의 생산업체인 『뉴그린웰(주)』에서는 충전재로서 "인공제올라이트 제조 (특허제02610426호)"기술을 보유하고 있다.

본 연구에서는 ① 염가의 배양기질을 얻기 위한 "몇가지 농축산부산물의 배지자원화", ② 생균수를 유지시켜 제품의 유통기간을 보장할수 있도록 "생균체의 미세캡슐화 (microencapsulation)"와 "충전재-미생물 혼합제의 과립화 (granulation)"를 연구하여 현장에 적용할 수 있는 기술을 개발하는데 목표를 두고 있다.

1. 기술적 측면

두부·두유가공시 얻어지는 부산물 (비지 등), 도축부산물 (혈액 등), 맥주공장 부산물 (효모침전물 등), 유가공부산물 (casein 등)을 효과적으로 가수분해하는 기술을 개발한다면 미생물배양에 필요한 배지조성중 고가의 성분, 즉 유기질소원과 생육인자 (growth factor)를 보다 저렴하게 얻을 수 있으며, 생균체의 미세캡슐화와 충전제-미생물 혼합제의 과립화 기술을 확립한다면 제품의 유통·보관기간 중 생균수의 저하를 방지하고 품질을 보장할 수 있으므로, 이러한 기술의 개발은 매우 중요하고 시급한 과제이다.

2. 경제·산업적 측면

토양미생물제제의 생산원가를 절감함으로써 사용농가의 경제적 부담을 줄이고, 제품의 규격화를 도모함으로써 생산업계의 활성화와 환경친화적인 영농의 확대를 기할 수 있으므로 본 기술이 실용화 단계에 이르도록 꾸준한 지원이 필요하다.

3. 사회·문화적 측면

소비자에게 보다 안전한 친환경농산물을 공급하기 위하여 필요한 과제이다. 현재 토양미생물제제는 비료공정규격<농촌진흥청고시 99. 7. 19. → 02. 12. 31.>상 부산물비료로 규정되어 있으나 생균수를 보장하기 위해서는 보다 개선된 기준이 조속히 마련되어야 하겠다.

제 2 절 연구개발의 목표 및 범위

1. 농산가공 부산물의 배지자원화 기술개발

농산가공 부산물을 가수분해하여 토양미생물계 생산을 위한 배지성분으로 사용하기 위해서 그 가수분해 공정의 최적화, 가수분해물의 영양성분 평가, 분해물을 첨가한 배지에서의 미생물의 생육 비교 등을 주요항목으로 실험하였다.

가. 두부·두유부산물

- 1) 비지의 수분함량 조정 및 가수분해 조건 확립
 - ▶ 산가수분해 방법의 경우
 - ▶ 효소가수분해 방법의 경우 : Papain 및 pancreatin
- 2) 비지분해물 (peptone 또는 soytone)의 아미노산 조성 및 미량성분 분석
 - ▶ 배지성분으로써의 비지분해물의 함량비율 검토
 - ▶ *Bacillus*속 균주의 배양 및 포자형성을

나. 맥주양조부산물

- 1) 효모의 회수 및 가수분해 조건확립
 - ▶ Protamex 및 neutral protease
- 2) 효모분해물 (yeast lysate 또는 yeast extract)의 아미노산 조성 및 미량성분 분석

다. 폐당밀의 활용 및 맥아로부터 추출물의 제조

라. 농산부산물첨가 배지에서의 토양미생물의 생장을 비교

- 1) 부산물 첨가배지의 조제

2) 시험균주의 배양 및 성장률 구명

- ▶ *Bacillus* sp. (고온균)[Bae et al. 1977]
- ▶ *Mycobacterium flavum* (질소고정능)[Bae et al. 1977]
- ▶ *Cellulomonas flavigena* (섬유소분해능)[Bae et al. 1977]
- ▶ *Pseudomonas* sp. (PGPR)
- ▶ *Streptomyces albosporeus* (방선균)[Bae et al. 1977]
- ▶ *Aspergillus fumigatus* (사상균)[Bae et al. 1977]
- ▶ *Saccharomyces cerevisiae* (효모)
- ▶ *Lactobacillus casei* (유산균)

2. 축산가공 부산물의 배지자원화 기술개발

축산가공 부산물을 가수분해하여 토양미생물제제 생산을 위한 배지성분으로 사용하기 위해서 그 가수분해 공정, 가수분해물의 영양성분 평가, 분해물을 첨가한 배지에서의 미생물의 생육 등을 비교하였다.

가. 도축부산물< I >

- 1) 혈액으로부터 혈장성분의 분리
- 2) 혈장성분의 가수분해
- 3) 혈장분해물 (serum hydrolysate)의 아미노산 조성 및 미량성분 분석

나. 도축부산물< II >

- 1) 저급육의 가수분해
 - ▶ 효소 (papain, pepsin 등)
- 2) 저급육분해물 (meat extract 또는 protease peptone)의 화학조성 분석

다. 유가공부산물< I >

- 1) 유단백의 가수분해
 - ▶ HCl
 - ▶ 효소 (trypsin, pancreatin 등)
- 2) 유단백분해물 (casein hydrolysate, casein, caseamino acids)의 화학조성 분석

라. 유가공부산물<II>

- 1) 유청 (whey)을 이용한 유산균 (lactic acid bacteria)의 배양
- 2) 유청혼합배지의 조제

마. 번데기 (silk worm pupae) 등 기타 부산물의 활용

바. 축산부산물첨가 배지의 조제 및 토양미생물의 생장을 비교

3. 생균체의 고정화 · 미세캡슐화 기술개발

미생물을 배양하여 얻은 균체를 다당류 등의 바이오폴리머로 피복 및 고정하는 기술을 개발하고자 캡슐화 재료의 선별, 조건 및 방법의 최적화, 캡슐화 공정이 미생물의 생존율에 미치는 영향, 제품의 장기보존 효과 등을 실험하였다.

가. 시험균주의 액체배양

나. 고정화 · 미세캡슐화 재료의 특성비교 및 선택

- 1) Calcium alginate
- 2) Chitosan
- 3) κ-또는 ι-Carrageenan/ Locust bean gum

- 4) Cellulose 유도체 : methyl · ethyl · carboxymethyl cellulose
- 5) Methacrylic copolymer : acrylic & methacrylic acid esters

다. 미세캡슐화의 조건 및 방법의 개발

- 1) 가소제의 사용여부 : diethylphthalate 등
- 2) Air atomizer 또는 ultrasonic nozzle의 적용
- 3) 단일재료를 사용한 미세캡슐화 공정의 개발
- 4) 복합재료를 사용한 미세캡슐화 공정의 개발

라. 미세캡슐화가 균체의 생존율에 미치는 영향 구명

마. 미세캡슐화 균체의 장기보존 효과

4. 충전제-미생물 혼합제의 과립화 기술개발

충전제로서 무기재료와 미생물을 혼합시켜서 과립화하는 기술을 개발하고자 그 최적 혼합비율을 구명하고 과립화 장치를 설계 제작하였으며, 공정을 최적화하고 과립화 후 제제의 건조 및 보관조건에 관하여 실험하였다.

가. 무기재료 및 과립화를 위한 혼합비율

- 1) 다공질 무기재료의 특성구명 및 선발
 - ▶ 분상 및 입상 인공제올라이트 (artificial zeolite)
 - ▶ 사문석 (serpentine)/ 견운모 (sericite)/ 장석 (feldspar)
- 2) 각 재료 및 배양액의 적정 배합비율 검토
 - ▶ 사문석 · 장석의 비율 = 2 : 1
 - ▶ 견운모 · 사문석 · 장석의 비율 = 1 : 1 : 1
 - ▶ 기타 미량원소 : 붕소 0.05%, 망간 0.1%

▶ 액상비료 및 미생물배양액 : 30%

나. 다공질 무기재료에서의 미생물 정착성

다. 과립화 방법 및 조건의 구명

- 1) 과립화 장치의 설계 및 제작
- 2) 과립화 공정의 개발
- 3) 과립의 저온건조 조건확립 및 최적 수분함량 구명

라. 충전재-미생물 과립화제제의 보존성 구명 및 유통기간 설정

- 1) 과립화공정이 미생물 균체의 생존율에 미치는 영향 평가
- 2) 과립화제제의 보존성 및 미생물체의 장기보존 효과

5. 충전재-미생물 과립화제제의 비해·비효시험

주요 과립화제제에 대하여는 미생물제제의 품목허가를 위한 작물재배시험으로서 비료공정규격<농촌진흥청고시 '02. 12. 31.>에 따라 비해·비효시험을 하였다.

가. 시험처리

- 1) 시험구 및 면적 : 5처리구, 3반복구(15m²/구), 총 225m²
- 2) 공시작물 : 벼, 채소 (상치, 배추, 오이 등), 관상수 등을 대상으로 함.
- 3) 처리내용 : 관행구+미생물제제 무처리구/ 관행구+미생물제제 멸균구
미생물제제 반량구/ 미생물제제 추천구/ 미생물제제 배량구

나. 생육조사

엽수, 초장, 엽폭, 엽색도, 수확량 등

다. 토양 및 미생물상 분석

시험전·중·후에 pH, EC, T-N, Avail-P, 유기물, CEC, 토성, 치환성 양이온, 비중 등을 조사 분석함.

제 3 절 연구기간

| 구 분 | 연 구 개 발 목 표 | 연구개발 내용 및 범위 |
|----------------------------------|---|--|
| 1차년도 (2003.7. ~ 2004.7) | 농산가공부산물의 배지 자원화 ① 두부·두유부산물 ② 맥주양조부산물 | ▶ 가수분해 조건의 최적화 ▶ 분해물(peptone/soytone/yeast lysate/ yeast extract)의 영양평가 ▶ 첨가배지의 조제 ▶ 시험균주의 배양 및 성장률 구명 |
| | 축산가공부산물의 배지 자원화 ① 도축부산물<1>혈액 ② 도축부산물<2>저급육 | ▶ 성분의 분리 및 가수분해 ▶ 분해물(serum hydrolysate/ meat ex./ protease peptone)의 영양평가 |
| | 충전재-미생물 과립화 제제의 비해·비효시험 | ▶ 입상제오라이트-미생물 혼합제제 |
| 2차년도 (2004.7. ~ 2005.7) | ③ 폐당밀 및 맥아 | ▶ 폐당밀/ 맥아추출물 첨가배지의 조제 ▶ 시험균주의 배양 및 성장률 구명 |
| | ③ 유가공부산물< I > ④ 유가공부산물<2> | ▶ 유단백(casein hydrolysate/ casitone/ casamino acids) 및 유청(whey) |
| | 생균체의 고정화 및 미세캡슐화 | ① 캡슐화 재료의 특성비교 및 선발 ② 조건 및 방법의 개발 ③ 캡슐화 공정이 균체에 미치는 영향 ④ 균체의 보존 효과 |
| | 충전재-미생물 과립화 제제의 비해·비효시험 | ▶ 무기충전재< I >-미생물 혼합제제 |
| 3차년도 (2005.7. ~ 2006.7) | ⑤ 기타 잠엽부산물 | ▶ 축산/잠엽 부산물첨가 배지의 조제 및 토양미생물의 생장을 비교 |
| | 충전재-미생물 혼합제의 과립화 기술개발 | ▶ 무기재료 및 과립화를 위한 혼합비율 ▶ 다공질 무기재료에서의 정착성 ▶ 과립화 방법 및 조건의 구명 ▶ 과립화제제의 보존성 및 유통기간 |
| | 충전재-미생물 과립화 제제의 비해·비효시험 | ▶ 무기충전재< II >-미생물 혼합제제 |

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발 현황

1. 농축산부산물의 배지자원화

국내에서도 맥주효모로부터 효모추출물 (yeast extract)을 얻는 연구는 다수 이루어져 있으나, 그외의 부산물을 배지자원화하는 연구는 미진하다. 예를 들어 두부·두유부산물은 연 55,000톤에 달하지만 일부 건조하여 사료제조에 사용되는 것을 제외하고는 제대로 활용하지 못하고 있으며, 과즙업계의 착즙박, 도축폐기물 및 낙농부산물 등도 그러하다.

2. 토양미생물의 미세캡슐화

유산균에 관한 연구는 다수 보고되어 있으나 국내에서의 토양미생물의 미세캡슐화 연구는 전무하다. Chang 등(1996)에 의한 invertase 활성을 지닌 효모의 미세캡슐화 연구, Koo 등(2001), 김희수 (1991/ 서울대학교 박사학위논문), 이경옥 (1999/ 서울우유 기술연구소) 등에 의한 유산균의 캡슐화 연구 등이 보고되어 있다.

3. 충전제-미생물 혼합과립화

비료성분의 고정화개념에서 수목용의 “덩어리비료”를 예로 들 수 있겠으나, 미생물 균체와의 혼합제제는 개발된 바 없다.

제 2 절 국외 기술개발 현황

1. 농축산부산물의 배지자원화

맥주효모로부터 효모추출물 (yeast extract)을 얻는 방법은 오래전부터 연구되어 물리적인 방법과 효소 (β -1,3-glucanase)분해법이 정착되어 있으며, 그외에도 대두류, 저급육, 유단백 가수분해물로부터 시약급 또는 산업용 배지수준의 제품을 생산하고 있다.

2. 토양미생물의 미세캡슐화

미세캡슐화 연구는 주로 유산균음료 (발효유)에 사용되는 유산균 균체를 대상으로 주로 연구가 이루어져 왔으며, 토양미생물에 대한 연구는 미진하다. 유일하게 1980년 이래 프랑스의 국립농업연구소 (INRA)에서 근권미생물 (PGPR)의 캡슐화연구를 꾸준히 진행해온 점은 다행한 일이 아닐 수 없다. 근권미생물의 매크로캡슐화 (macroencapsulation)에 의한 작물의 생육촉진 (Jung, 1980), 약 10^8 의 세균을 함유한 직경 6mm의 alginate구의 분사기술 (Digat, 1988), 근권미생물을 calcium alginate 지지체로 캡슐화한 비료의 제조 (Fages *et al.*, 1988)로 시작하여 최근에는 길항성세균 *Pseudomonas fluorescens-putida*의 미세캡슐화 연구로 발전시키고 있다. (Amiet-Charpentier, 1998).

3. 충전재-미생물 혼합과립화

서방성 비료성분의 고정화 (immobilization) 개념 또는 근류균의 종자접종을 위한 방안으로써 연구되어 실용화 수준에 이르고 있다. (Fages *et al.*, 1988)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법 및 내용

1. 천연단백질 및 당질 원료

단백질원료로서 대두박 (soybean meal, 중국 및 브라질산)은 우성사료(주), 비지(vegemil residue)는 정식품(주)에서 제공한 것을, 분리대두단백 (isolated soy protein, ISP651; Dupon), 유청 (whey protein, Calpro80) 및 유단백 (sodium caseinate, Miprodan30; Denmark)은 남양유업(주)에서 제공한 것을 사용하였다. 수입우유은 호주산 (등심 및 사태)으로 시판품을 구입·사용하였으며, 잠업부산물로써 번데기 (silkworm pupae)는 중국산을 사용하였다. <Table 1.1 참조>

맥아분말 (malt)은 시판품 (칠갑농산, 한울농산 제품)을 구입하여 사용하였으며, 당밀은 우성사료(주)에서 제공한 것 (Laem Chabang, Thiland)을 사용하였다.

2. 천연단백질의 가수분해 방법

가. 단백질 분해효소

Novozymes A/S의 Protamex 1.5MG (endo-type protease) 및 Flavourzyme 1000MG (exo- & endo-type) 와 Sigma의 Pancreatin (P-1750; from porcine pancrea)을 사용하였다. 각 효소의 기원과 반응최적조건은 Table 1.2와 같다. <Table 1.2 참조>

단백질 분해효소의 활성도는 Kunitz법에 따라 측정하였다. 기질인 0.6% milk casein 용액 2.5 ml를 시험관에 넣고 30℃로 예열한 다음 조효소액 0.5 ml를 가하여 10분간 반응시켰다. TCA 용액 2.5 ml를 가하고 30℃에서 30분 간 방치 후 여

Table 1.1. Proximate compositions of the natural protein substances
(단위 : %)

| 원 료 | 수 분 | 조단백질 | 조지방 | 탄수화물 | 회 분 |
|-------------------------|------|------|------|---------------|-----|
| 대두박 (중국산) | 11.7 | 47.0 | 0.9 | 5.7* + 28.7** | 5.9 |
| (브라질산) | 12.6 | 46.4 | 1.5 | 5.4 + 29.8 | 5.8 |
| 비지(베지밀) | 1.8 | 35.8 | 16.9 | 41.3 | 4.2 |
| 분리대두단백(ISP651) | 4.6 | 82.0 | 3.8 | - | 9.8 |
| 효모(yeast, wet) | 67.2 | 13.8 | 0.6 | 14.8 + 0.8 | 2.9 |
| 유청(Calpro80) | 4.1 | 80.3 | 6.0 | 7*** | 2.6 |
| 유단백(Miprodan30) | 6.4 | 87.6 | 3.8 | - | 2.2 |
| 혈분 (swine) | 22.0 | 71.3 | ND | ND | ND |
| 번테기 (silkworm pupae) | 62.1 | 19.8 | 13.1 | ND | ND |
| 수입우육 (shank) | 64.5 | 27.2 | 7.4 | 0.0 | 0.9 |
| (sirloin) | 65.9 | 22.8 | 13.6 | 0.0 | 1.0 |
| 당밀 (molasses) | 19.8 | 2.5 | 0 | 68.4 | ND |
| 엿기름분말 | 16.9 | 0.4 | ND | 82.5 | ND |

*, 조섬유; **, 가용성무질소물; ***, Lactose로서의 값.

Table 1.2. Origin and reaction conditions of the proteolytic enzymes
employed for hydrolysis of the natural protein substances

| Proteolytic Enzymes | Origin | Optimum Temp | Optimum pH | Remarks |
|---------------------|---------------------------|--------------|------------|--------------------|
| Protamex 1.5MG | <i>Bacillus</i> species | 35~60℃ | 5.5~7.5 | endo-type |
| Flavourzyme 1000MG | <i>Aspergillus oryzae</i> | 50℃ | 5~7 | endo + exo type |
| Pancreatin | porcine pancrea | 40℃ | 6.5 | trypsin-like |

과하였으며 그 여액 1 ml에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 ml와 3배 희석한 Folin 시약 0.5 ml를 가하고 30°C에서 30분간 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 곡선은 L-tyrosine (100 µg/ml)을 각각 희석하고 위와 같이 Folin 시약으로 발색시켜 550 nm에서의 흡광도를 측정하여 작성하였다. 효소의 활성도는 효소액 1 ml에 의하여 1분간 1 µg의 tyrosine에 상당하는 Folin 발색성의 단백질 분해물이 생성되는 것을 1단위로 정의하였다.

나. 가수분해 공정

원료에 따라 효소 분해공정, 염산-효소 분해공정, 알칼리-효소 분해공정, 균체의 자기소화법 (autolysis) 등을 적용하기 위한 반응조건 및 세부공정을 비교 연구하였다. 최적화한 공정의 개요는 다음과 같다.

1) 대두단백의 염산 및 효소 가수분해

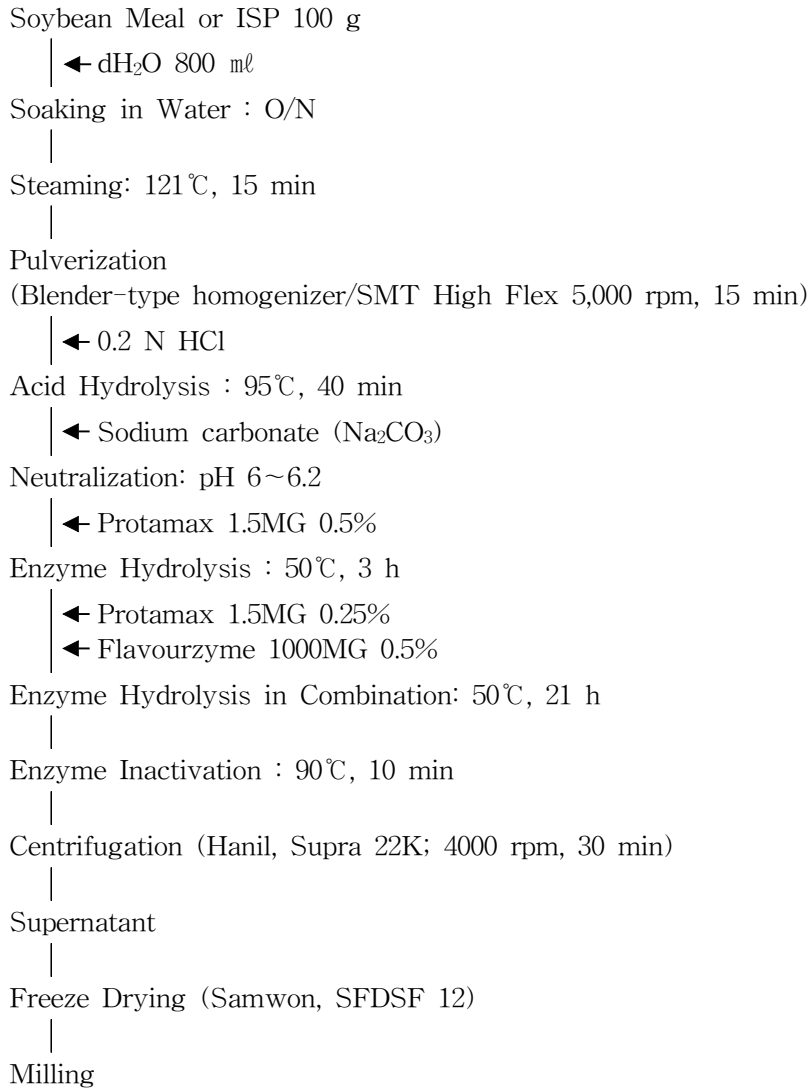


Fig. 1.1. Process for the preparation of soy protein hydrolysates.

2) 유청단백의 효소가수분해

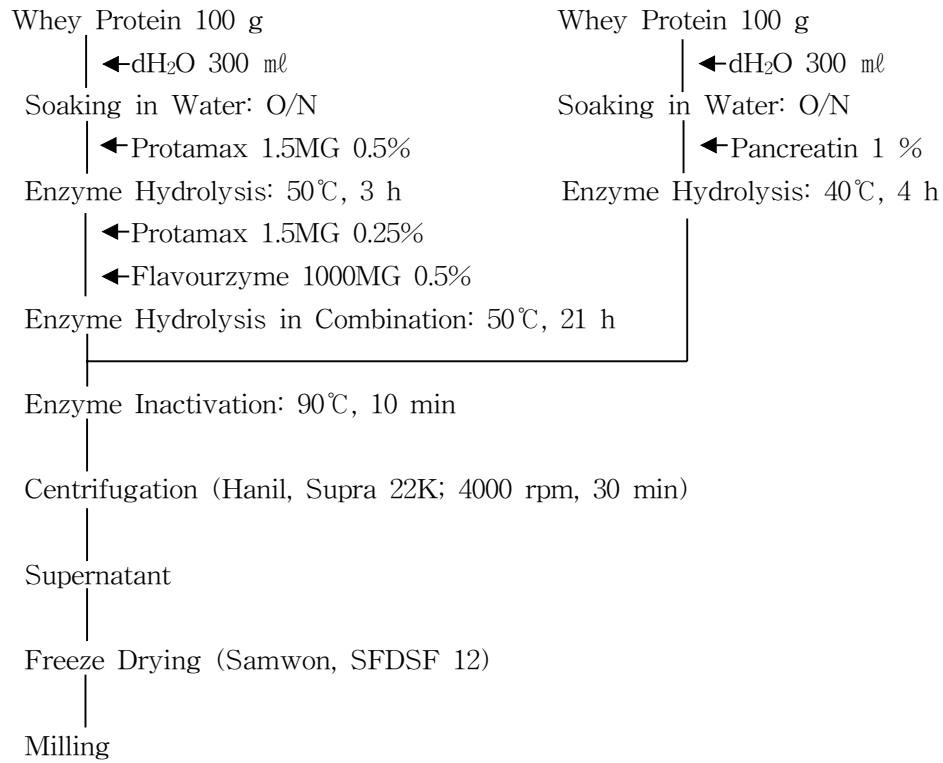


Fig. 1.2. Process for the preparation of whey protein hydrolysates.

3) 카제인의 효소가수분해

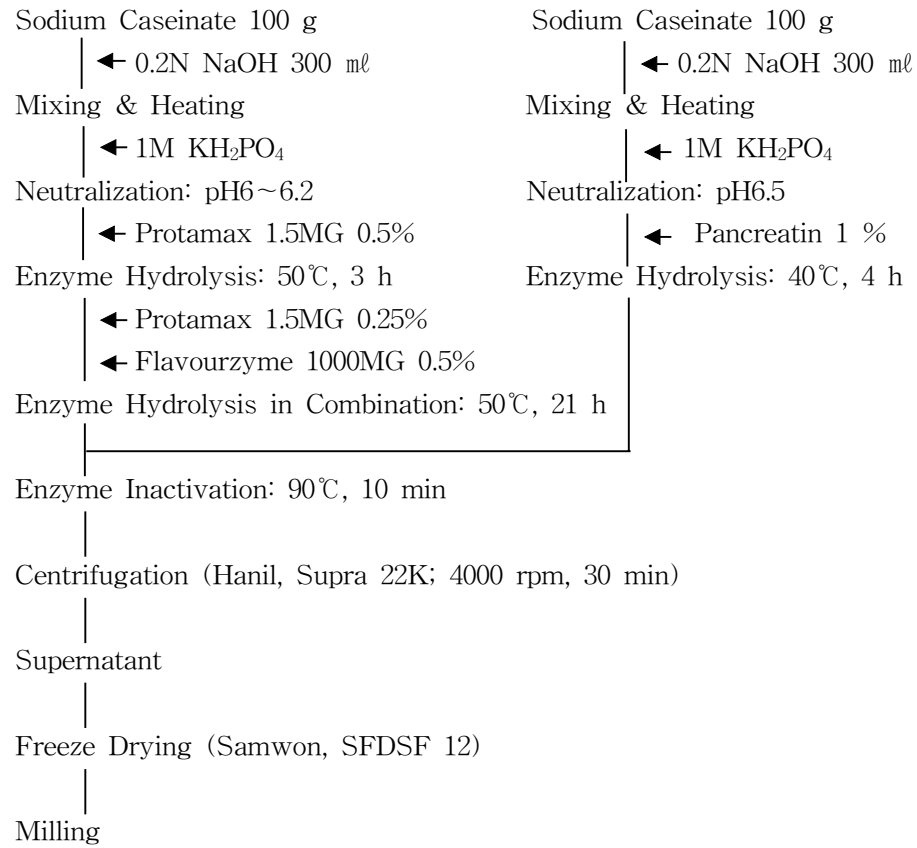


Fig. 1.3. Process for the preparation of casein hydrolysates.

4) 저급우육의 효소가수분해

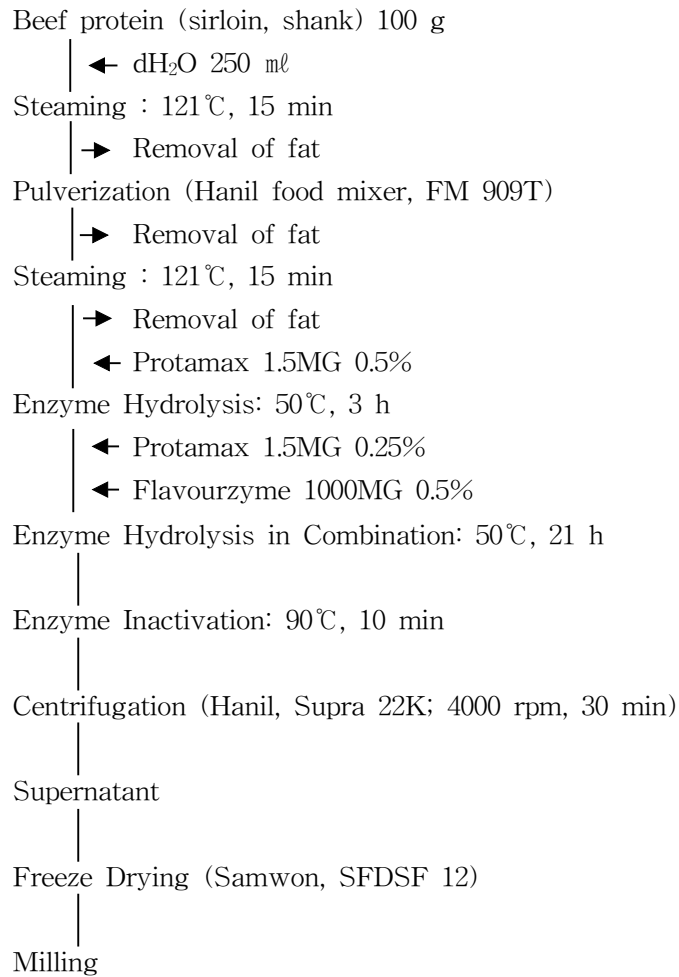


Fig. 1.4. Process for the preparation of beef hydrolysates.

5) 건조혈분의 효소가수분해

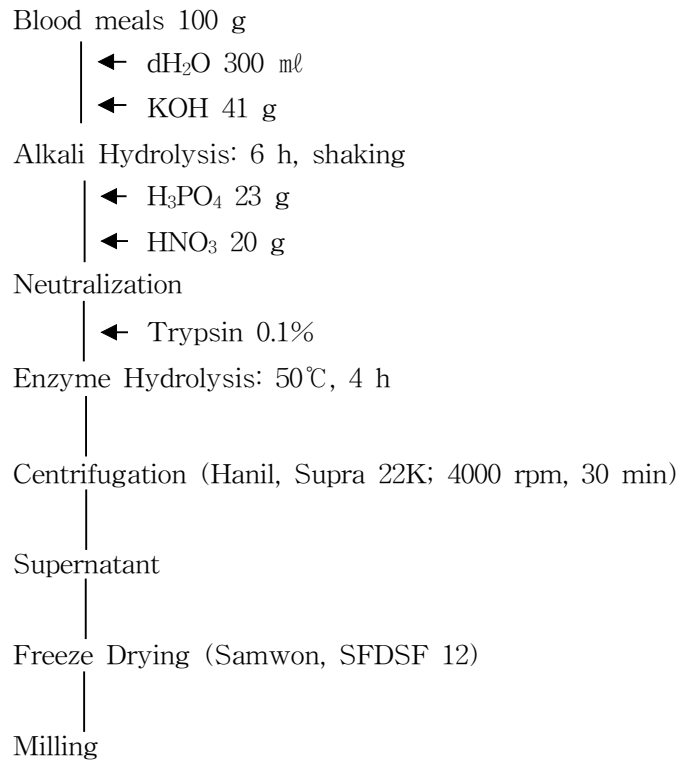


Fig. 1.5. Process for the preparation of blood meal hydrolysates.

6) 번데기의 효소가수분해

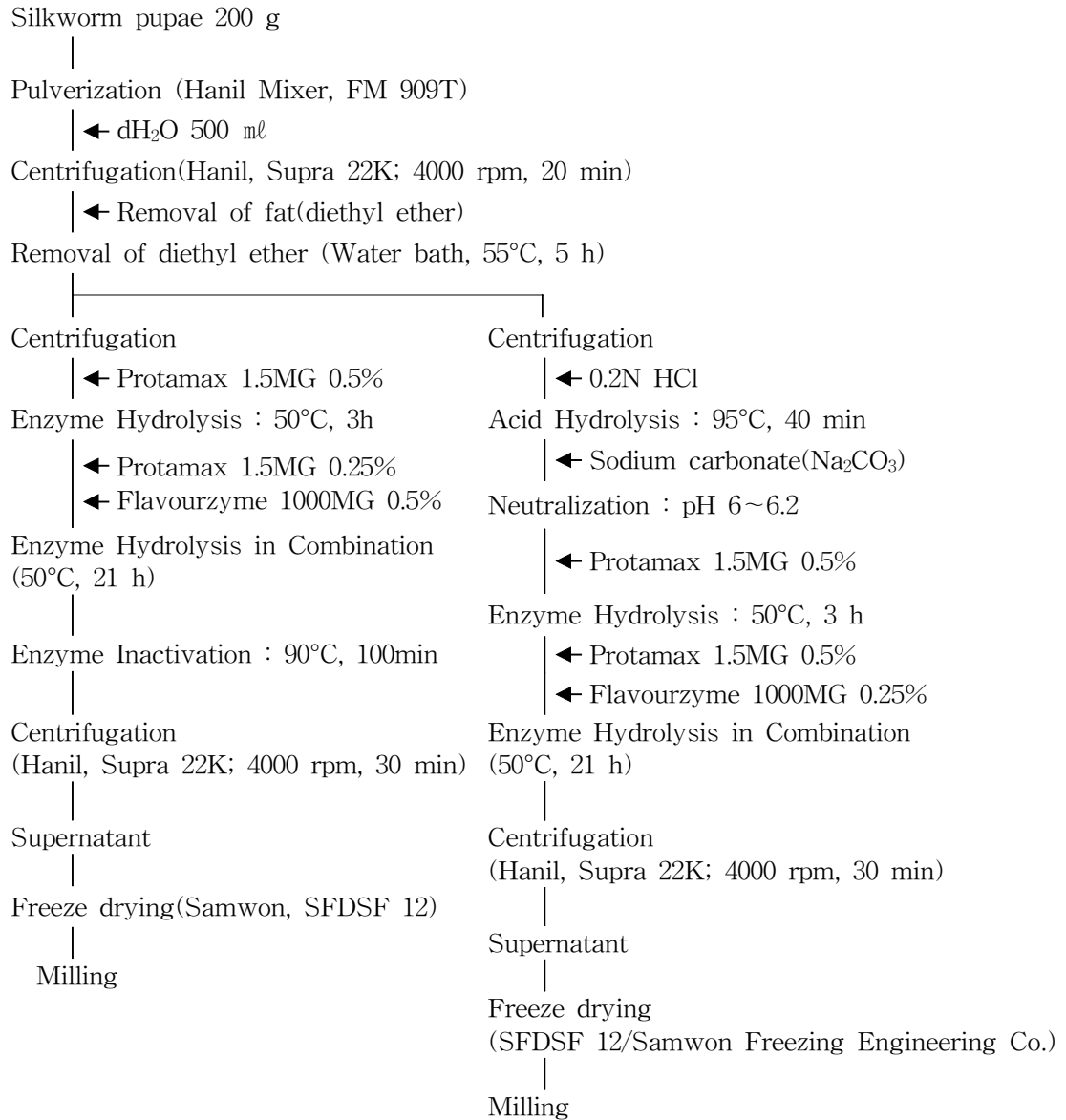


Fig. 1.6. Process for the preparation of silkworm pupae hydrolysates.

3. 맥아추출물의 조제

맥아분말 150 g을 물 1 ℓ와 혼합하여 60℃에서 5 h 반응시키고 cheese cloth로 거른 다음 다시 물 500 ml를 추가하였다. 여기에 계란 흰자를 풀어 혼합하고 끓인 후 냉각시켜 여과함으로서 불순물을 제거하였다. 굴절계로 Brix도를 측정하여 당의 농도를 조정하여 사용하였으며, 동결건조하여 보관하였다.

4. 이화학적 분석방법

가. pH

가수분해물을 1% 용액으로 만들어 pH meter (Corning 440)로 pH를 측정하였다.

나. 수분 함량

칭량병을 건조시켜 무게를 측정하고 여기에 가수분해물 2~3 g을 넣어 다시 정확히 무게를 측정하였으며, 105℃에서 항량에 이를 때까지 건조시킨 다음 데시케이터에서 냉각시켜 최종무게를 측정하였다.

$$\text{수분 함량(\%)} = \frac{(B - C) \times 100}{A}$$

A : 시료무게
B : 칭량병무게
C : 칭량병무게 + 건조후 시료양

다. 질소 함량

가수분해물의 총 질소 (T-N, total nitrogen)은 Kjeldahl법으로, 그리고 아미노태 질소 (A-N, amino nitrogen)은 Formol 적정법으로 각각 측정하였다.

분해시료 약 1 g을 Kjeldahl 플라스크에 취하고 황산염 혼합분말 (K_2SO_4 :

CuSO₄ = 9 : 1) 을 가하고 진한 황산을 넣어 분해시킨 다음 냉각, 여과 후 이 혼합물의 일정량에 과량의 NaOH를 넣고 증류하여 이때 발생하는 암모니아를 H₃BO₃용액에 흡수시킨 후 표준 산 용액으로 적정하였다.

$$\text{총 질소 (T-N, \%)} = (T - B) \times f \times \text{Normality} \times 14 \times (100/W) \times 10$$

T : 시료 적정량 (ml), B : 공시험에서 얻은 적정량 (ml),

f : 보정치 (표준 황산용액의 factor), W : 시료 무게 (mg)

Normality : 황산의 농도

Formalin 50 ml에 0.5% phenolphthalein용액을 가하고 0.02 N NaOH용액으로 엷은 붉은 색을 떨 때까지 중화하여 중성 formalin용액을 조제한 다음, 250-ml 삼각플라스크를 2개 준비하여 한쪽에는 가수분해물의 회석액 25 ml와 증류수 40 ml를 가하고 <공시험>, 다른 쪽에는 가수분해물 회석액 25 ml와 중성formalin용액 20 ml, 증류수 20 ml를 가하였다 <본시험>. 여기에 phe- nolphthalein용액을 6방울 가한 뒤 0.02 N NaOH용액으로 각각 엷은 붉은 색을 떨 때까지 적정하였다. 가수분해물 용액 중의 아미노태 질소함량은 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{아미노태 질소 (A-N, \%)} = (V_1 - V_0) \times F \times 0.00028 \times D \times \frac{100}{S}$$

V₁ : 본시험 적정소비량 (ml)

V₀ : 공시험 적정소비량 (ml)

F : 0.02N NaOH용액의 농도계수

D : 회석배수

S : 시료의 채취량 (g)

0.00028 : 0.02N NaOH용액 1 ml에 상당하는 질소량 (g)

라. 단백질의 가수분해도

분해물의 가수분해도 (degree of hydrolysis, DH)는 trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) 방법으로 측정하였다. 가수분해 시료용액을 1% sodium dodecyl sulfate에 현탁시켜 농도가 0.25~2.5×10⁻³ amino equivalents litre⁻¹가 되도록 준비

하였으며, 이 시료용액 0.25 ml에 0.2125 M phosphate buffer (pH 8.2) 2 ml와 0.1% TNBS 2 ml를 혼합한 다음 50°C의 암소 (暗所)에서 60분간 반응시켰다. 여기에 0.1 N HCl 4 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 30분간 정치한 다음 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 가수분해도는 펩티드결합이 끊어지는 비율, 즉 펩티드 사슬의 분열정도로 정의하며, 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$DH = \frac{\text{Number of peptide bond cleaved*}}{\text{Total number of peptide bond**}} \times 100 (\%)$$

* 가수분해물중 유리아미노산의 함량

** 시료중 유리아미노산의 총 함량

마. 질소용해도

질소용해도 (nitrogen solubility index, NSI)는 Kjeldahl법으로 측정된 질소의 값에 6.25를 곱하여 단백질의 함량을 구한 뒤 아래의 식으로 계산하였다.

$$NSI = \frac{\text{가수분해물의 단백질 함량}}{\text{원료의 단백질의 총 함량}} \times 100 (\%)$$

바. 탄수화물 함량

분해시료 중의 총당 (total carbohydrate, %) 함량은 phenol-sulfuric acid법¹²으로 비색 정량하였다. 시험관에 가수분해 시료용액 200 μ l와 5% phenol 용액 200 μ l를 넣은 다음 진한 황산 1 ml를 가하여 10분 간 반응시킨 후 잘 교반하였으며, 이 반응액을 30분간 정치한 후에 490 nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선으로부터 당 함량을 계산하였다. 이때 표준곡선은 glucose 용액을 사용하여 작성하였다.

사. 조회분

도가니를 건조시켜 무게를 측정하고 여기에 분해시료 약 1.5 g을 넣고 다시

무게를 정확히 측정하였으며, 이를 회화로에 넣고 550℃에서 약 24시간 태운 다음 데시케이터에 옮겨 냉각, 건조시킨 후 최종무게를 측정하였다.

$$\text{조회분 함량 (ash, \%)} = \frac{(B - C) \times 100}{A}$$

A : 시료무게

B : 도가니무게

C : 도가니무게 + 회화후의 시료무게

아. 무기이온 함량

Iron (Fe^{3+}), magnesium (Mg^{2+}), potassium (K^+), sodium (Na^+) 등은 가수분해 시료 1 g에 HClO_4 25 ml를 가하여 hot plate (100~300℃)에서 용액이 투명해질 때까지 분해시키고, 이를 냉각, 여과한 다음 원자흡광광도계 (atomic absorption spectrophotometer, Shimadzu AA-6800)를 사용하여 정량하였다.

Chloride (Cl^-), sulfate (SO_4^{2-}), phosphate (PO_4^{3-}) 등은 가수분해물을 1% 용액으로 만들어 이온크로마토그래피 (IC, Dionex System)로 정량하였다. Dionex IC에는 컬럼, AS4-SC; 펌프, GP40 gradient pump; 검출기, ED 40 electrochemical detector 및 suppressed conductivity ASRS-Ultra를 장착하였으며, 이동상으로는 1.8 mM sodium carbonate와 1.7 mM sodium bicarbonate를, 유속은 2.0 ml min⁻¹으로 하였다.

자. 아미노산 조성

Mason 등의 방법에 따라 시료를 먼저 산화시켜 산분해하고 Amino acid analyzer (S7110, Sykam)의 양이온교환컬럼으로 분리하고 ninhydrin으로 발색시켜 S3205 UV/Vis 검출기로 570 및 440 nm의 양파장에서 검출하였으며, 표준 아미노산으로부터 얻은 각 peak와의 면적비를 구하여 농도를 환산 (Pyamid 프로그램)하였다. 산화를 위하여 미리 예냉시킨 0.1~1.0 g의 분말시료와 산화시약 (30% hydrogen peroxide 0.5 ml, 88% formic acid 4.5 ml, phenol 25mg)을 혼합하여 0℃

에서 16시간 반응시켰으며, 여기에 50 ml의 6 N HCl을 가하여 110°C에서 23시간 분해시킨 다음 pH 2.2로 중화하였다.

5. 미생물학적 방법

가. 공시균주

생육시험을 위한 표준균주로서는 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양받아 시험에 사용하였다. <Table 1.3 참조>

나. 생육속도의 비교

본 실험에서 얻은 각종 가수분해물로 배지를 조제하고 <Table 1.4 참조>, 시판품 <Difco Laboratories, Division of Becton Dickinson and Company>의 것과 생육속도를 비교하였다. 액체배지 25 ml를 125-ml 삼각플라스크에 넣고 각각의 배지에 적절한 시험 균주 <Table 1.3>의 균체를 1백금이씩 접종하여 35±2°C에서 48시간 동안 진탕배양 (JeioTech SK-760A rotary shaker, 120 rpm)하였다. 그러나 시험 균주 중 유산균은 같은 조건에서 정치배양 (Vision Scientific VS-1203P3 Incubator)하였다. 한편 한천평판에서의 생육상태와 콜로니 특성을 비교하기 위하여, <Table 1.4>의 배지성분에 1.6%의 agar를 첨가해 고체배지를 조제하였으며, 여기에 시험 균주를 streaking하고 35±2°C에서 48시간 동안 정치배양하면서 관찰하였다.

Table 1.3. Test organisms grown on the substitution media

| Substitution Media | Test organisms/ ATCC |
|----------------------------|---|
| Soytone and Peptone media | <i>Escherichia coli</i> 25922 <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 <i>Proteus vulgaris</i> 13315 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 |
| NB or NA | <i>Salmonella typhimurium</i> 14028 <i>Staphylococcus aureus</i> 25923 <i>Escherichia coli</i> 25922 <i>Proteus vulgaris</i> 13315 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 |
| MRS Broth | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> 7830 <i>Lactobacillus fermentum</i> 9338 |
| NZM Broth | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 9763 <i>Streptomyces avermitilis</i> 31267 |
| Malt Extract Broth or Agar | <i>Candida albicans</i> 10231 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 9763 <i>Aspergillus niger</i> 16404 |

Table 1.4. Substitution of Difco medium ingredients with the hydrolysates prepared from natural proteins

| Difco medium ingredients | | Substitution |
|--------------------------------------|--------|---------------------------------------|
| Soytone medium | | |
| Bacto <u>soytone</u> | 2 % | |
| NaCl | 0.5 % | |
| Peptone medium | | |
| Bacto <u>peptone</u> | 2 % | ←SM- and/or ISP- hydrolysates |
| NaCl | 0.5 % | |
| pH 7.0±0.5 | | |
| MRS Broth <grams per litre> | | |
| Bacto <u>proteose peptone#3</u> | 10 g | ←Whey hydrolysates |
| Bacto <u>beef extract</u> | 10 g | ←Beef hydrolysates |
| Bacto <u>yeast extract</u> | 5 g | ←Autolysed yeast extract |
| Dextrose | 20 g | |
| Sorbitan monooleate complex | 1 g | |
| Ammonium citrate | 2 g | |
| Sodium acetate | 5 g | |
| Magnesium sulfate | 0.1 g | |
| Manganese sulfate | 0.05 g | |
| Potassium phosphate, dibasic | 2 g | |
| pH 6.5±0.2 | | |
| NZYM Broth <grams per litre> | | |
| Bacto <u>casein digest</u> | 10 g | ←Casein hydrolysates |
| Bacto yeast extract | 5 g | |
| Sodium chloride | 5 g | |
| Magnesium sulfate, anhydrous | 0.94 g | |
| pH 7.0±0.2 | | |
| NB or NA <grams per litre> | | |
| <u>Beef extract</u> | 3 g | ←Beef- and/or Serum- |
| Bacto <u>peptone</u> | 5 g | ←SM-, ISP-, and/or Pupae hydrolysates |
| pH 6.9~7.1 | | |
| Malt Extract Broth <grams per litre> | | |
| Bacto malt extract | 6 g | ←Malt extracts |
| Maltose | 1.8g | |
| Dextrose | 6 g | |
| Yeast extract | 1.2g | |
| pH 4.7±0.2 | | |

6. 미생물 균체의 미세캡슐화 방법

가. 캡슐화 재료

Alginate (sodium/calcium), Locust bean gum, Carrageenan/κ-Carrageenan, CM-cellulose 등을 사용하였으며, Fungilab (Barcelona, Spain) 점도계 모델 Visco Elite-R로 측정된 1% 용액의 점성도는 Table 1.5와 같은 것이었다. <Table 1.5 참조>

나. 캡슐화의 조건 및 방법의 개발

미생물의 균체 생산을 위하여 NB + 0.5% sucrose (비정제품)에 *Bacillus subtilis* 6633를 접종하고 60~72 h 배양하였으며, 배양액을 원심분리하여 균체를 회수하고 10^9 cfu/ml 수준으로 조정하여 사용하였다. 캡슐화의 방법은 2% 다당류 용액과 1:1 혼합하여 직접 분무건조하거나, 또는 노즐/미량펌프를 이용하여 0.05 M CaCl₂ 용액 중으로 분출시킴으로서 수축 응고되도록 하였으며 이를 그대로 동결건조하거나 또는 1% chitosan으로 코팅한 다음 동결건조하는 등의 방법을 적용하였다. <Fig. 1.7 참조>

다. 캡슐화 균체의 보존기간 설정

캡슐화 균체는 갈색병에 담아 밀전하고 각각 25℃ 및 35℃에 보관하면서 최저생균수 1×10^8 cfu/g으로 저하되는 기간을 측정하고 아래 식에 따라 값을 계산하여 유효 보존기간을 설정하였다.

$$Q_{10I} = \frac{T^{\circ}\text{C에서의 보존기간}}{(T+10^{\circ}\text{C})에서의 보존기간} = \frac{D_T}{D_{(T+10)}} = \frac{k_{(T+10)}}{k_T}$$

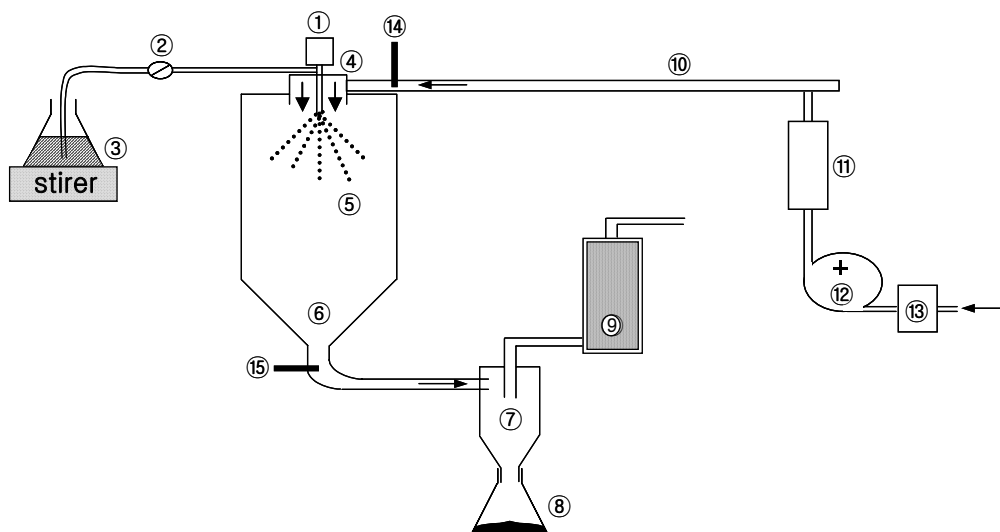


Fig. 1.9. Diagram of the atomizer for the microcapsule-3.

- 1) Spray nozzle, 2) Peristaltic pump, 3) Spray suspension, 4) Air distribution, 5) Drying chamber, 6) Cone of the drying chamber, 7) Cyclone, 8) Collecting flask, 9) Outlet filter, 10) Heating system, 11) Flow-gauge, 12) Turbine, 13) Filter, 14) Inlet temperature gauge, 15) Outlet temperature gauge.

Table 1.5. Comparison of viscosities of the gummy polysaccharides

| Samples <1% soln.> | Spindle | rpm | cp | % |
|-----------------------|---------|-----|--------|------|
| Sodium alginate | L2 | 60 | 276.9 | 44.2 |
| | | 100 | 261.8 | 69.6 |
| CMC | L2 | 60 | 374.0 | 59.7 |
| | | 100 | 320.6 | 85.2 |
| Alginic acid | L3 | 60 | 693.7 | 27.4 |
| | | 100 | 541.6 | 35.6 |
| Locust bean gum | L2 | 60 | 330.0 | 52.6 |
| | | 100 | 294.6 | 78.3 |
| Carrageenan | L1 | 60 | 43.6 | 34.2 |
| | | 100 | 39.7 | 51.7 |
| κ-Carrageenan | L4 | 60 | 6510.6 | 53.6 |
| | | 100 | 4100.6 | 56.2 |
| Calcium alginate | L1 | 60 | - | - |
| | | 100 | - | - |

A Fungilab (Barcelona, Spain) viscometer, Visco Elite-R, was employed.

7. 충전재-미생물 혼합제의 과립화 방법

가. 무기 재료

사문석, 견운모, 납석, 인광석 및 질석 (zeolite) 등을 사용하였으며, 화학성분은 <Table 1.6>에 나타낸 바와 같다.

나. Lab-scale 과립기

청진기술(독일 Gratt사 기술제휴)에서 제작한 모델 GPC-1의 유동층 과립기(fluid bed granulator)를 사용하였다. 그 구조를 <Fig. 1.10 및 1.11>에 도시하였으며, fluid bed chamber, bag filter, spray nozzle, heater, control panel로 구성되어 있다. 이는 결착제의 분무방식이 하향식으로써 과립화 공간(fluid bed chamber)의 부피가 탈지분유를 사용할 경우 1 kg이 적정량이었다. 물을 기준으로 할 경우 mass ratio (분무수량과 분무에 소요되는 공기량의 비/ air-to-liquid mass ratio)를 1,000으로 조정함으로써 분무수적의 크기를 100 μm 수준으로 맞추어 운용하였으며, 이때 노즐의 분무압은 약 2.0 bar가 소요되었다.

다. Pilot-scale 과립기

참여기업에서 출연한 Pilot-scale 과립성형기 <Fig. 1.12>를 사용하여 각종 무기재료에 미생물 배양액을 혼합하여 과립화하는 공정을 최적화하고자 실험하였다. 원료혼합기, 이송장치, 1차 과립기 및 2차 과립성형장치로 구성되어 있으며, 혼합기의 용량은 500 kg, 운용 용량은 150 kg/h 이었다.

라. 과립화 방법

각종 무기재료를 원료혼합기에 넣어 충분히 혼합하고, 미생물 배양액을 무기재료에 대하여 약 20% 첨가하여 고르게 반죽하였다. 이를 1차 과립기로 이송시켜 처리한 다음 다시 2차 과립장치에서 구형의 과립을 성형시켰으며, 이렇게 완성된

것은 vat에 담아서 45℃의 열풍건조기에 넣어 건조하였다. 체를 통과시켜 입자의 크기에 따라 대중소의 과립으로 분류하였다.

Table 1.6. Chemical compositions of the inorganic materials

| 성분 | 사문석 ¹⁾ | 견운모 ²⁾ | 납석 ³⁾ | 인광석 ⁴⁾ | 질석 ⁵⁾ |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| SiO ₂ | 36.9 | 70.9 | 57.3 | 5.0 | 71.0 |
| Al ₂ O ₃ | 1.48 | 16.3 | 19.0 | ND | 10. |
| CaO | 3.65 | 0.86 | ND | 64.0 | 2.2 |
| MgO | 34.5 | 1.66 | ND | 2.8 | 1.5 |
| Fe ₂ O ₃ | 10.7 | 0.94 | ND | ND | 2.5 |
| TiO ₂ | ND | 0.19 | ND | ND | ND |
| K ₂ O | ND | 5.30 | 1.7 | 0.3 | ND |
| Na ₂ O | ND | 0.29 | ND | ND | ND |
| ZnO | ND | 0.02 | ND | ND | ND |
| BaO | ND | 0.01 | ND | ND | ND |
| Ig loss | 13.3 | 3.27 | ND | ND | ND |

- 1) Serpentine, Mg₃SiO₅(OH)₄; 2) Sericite, KAl₂(AlSiO₃)O₁₀(OH)₂;
 3) Pyrophyllite, Al₂(OH)₂Si₄O₁₀; 4) Rock phosphate, Ca₅(PO₄)F
 5) Zeolite, (Na/Ca)₂(Al₂Si₃O₁₀) · 8H₂O.

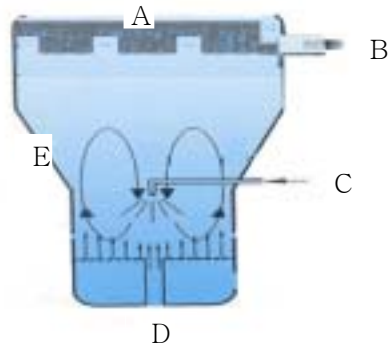


Fig. 1.10. Diagram of the granulator. (GPC-1, Chungin Tech. Co. Ltd.).

- <A> Bag filter
- Exhaust air to the dedusting system
- <C> Binder spray nozzle (top spray)
- <D> Inlet air chamber
- <E> Fluid bed chamber



Fig. 1.11. Granulation apparatus including the main body, spray pump, and chamber.

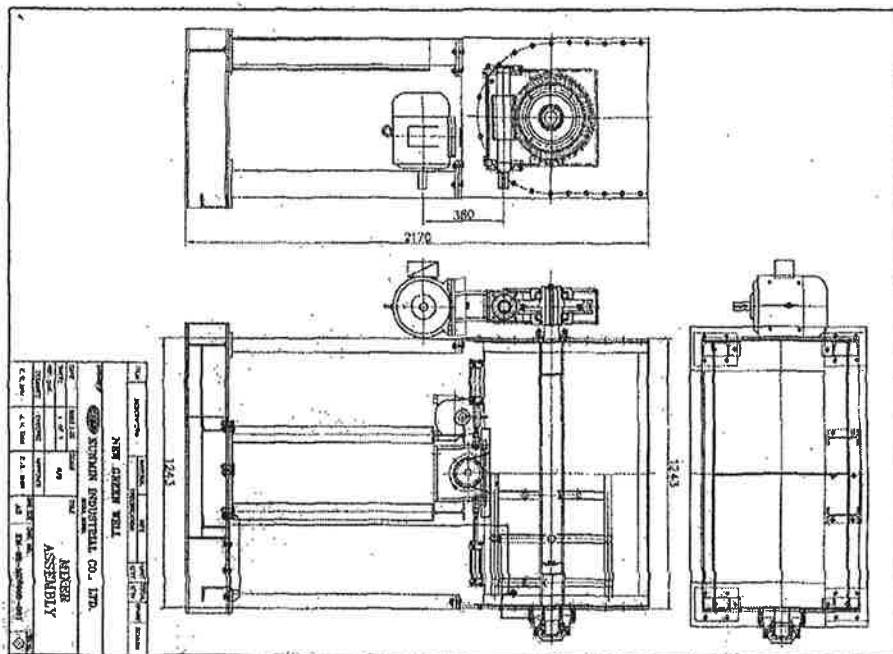
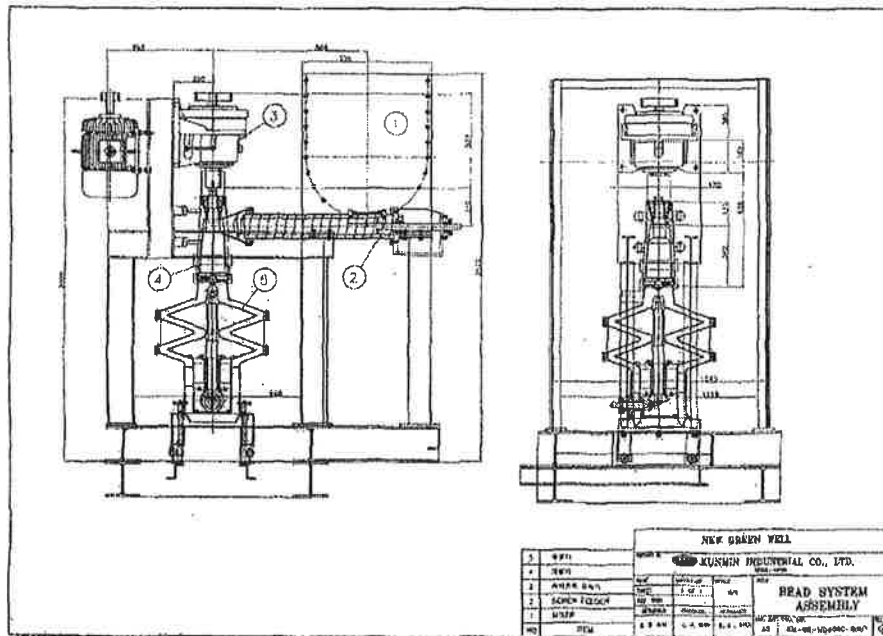


Fig. 1.12. Design drawing for the pilot-scale granulator.

<1> Mixer with worm-gearbox and screw jack gate, <2> Screw feeder with geared motor, <3> Cyclodrive and Motor with pulley and couplings, <4> Primary granulator, and <5> Secondary granulator.

8. 포장시험 방법

가. 시험구의 배치 및 처리

시설하우스내에 처리구 별(시험면적 15 m², 1.5 × 10 m)로 임의배치법에 따라 3반복 배치하여 상추(품종: 적치마, 농우종묘)를 재배하였다. 한편 수목에 대한 시험으로서는 재스민 묘목을 대상으로 유리온실에서 인공배양토를 사용하여 (포트당 1/ 5000a) 재배하였다.

처리내용은 <Table 1.7 및 1.8>과 같았다. 시비방법은 상추를 아주심기 2주전 퇴비, 공시 충전재-미생물 과립화제제를 각 처리구에 설정된 양의 1/2 만큼 시비한 후 균질하게 경운하여 토양과 혼합하였고, 로터리경운 후 공시미량요소복합비료의 나머지 1/2양 만큼을 골고루 살포하였으며, 정식 후 2주부터 과립비료를 일주일 간격으로 10a당 25말에 5kg기준으로 희석하여 엽면시비 하였다.

한편 포트시험의 경우에는 1/5,000a의 크기의 것으로 총 부피는 깊이 20 cm를 기준으로 하여 약 0.004 m³이었다. 이에 대한 토양(사양토), 원예용상토, 마석(난석)을 무게비 즉 토양: 원예용상토: 마석 = 2.4 kg : 0.45 kg : 0.15 kg으로 하여 배합하였다. 추가적으로 정식 후 뿌리활착을 위해 300배액(추천적량구 대비)으로 1회 관주처리하였고, 동시에 일주일 간격으로 2회 500배액으로 엽면살포한 후 15일 간격으로 엽면살포하였다.

나. 생육조사, 토양성분 및 미생물 분석

재스민 묘목의 생육을 조사하기 위하여 정식 후 15, 30, 50일에 초장, 경경, 근장, 엽록소함량, 생중량(지상부, 지하부) 등을 조사하여 평균값으로 계산하였다. 이렇게 상추및 수목 (재스민)의 생육현황과 수량을 조사하여 비교하고, 농촌진흥청의 “토양 및 식물체 분석법”(1998)에 준하여 재배토양의 이화학성을 분석하였다. 즉 토성 (soil texture)은 분산제인 sodium hexameta phosphate를 첨가하여 충분히 진탕한 다음 Hydrometer로 측정하였으며, pH와 EC는 물과 토양을 1 : 5로 혼합하여 pH meter와 EC meter로, 유효인산은 Bray-No.1법, 양이온치환용량 (cation exchange capacity: CEC)은 ammonium acetate법, T-C함량은 Tyurin법,

총질소는 Kjeldahl법, 치환성양이온은 ammonium acetate법으로 추출하여 ICP-Atomic emission spectrometry와 atomic absorption spectrophotometer (AA)로 측정하였다. 재배토양중 미생물의 변화양상은 상법에 따라 세균(방선균은 별도로) 및 사상균별로 조사하였다.

Table 1.7. 상추 재배시험에서의 처리구별 시용량

| 처 리 구 | NPK 시비량 (kg/10a) | | 퇴비시용량 (kg/10a) | 과립비료* 량(kg/300평) |
|--------|------------------|-------|-------------------|---------------------|
| | 기 비 | 추 비 | | |
| 관행구<1> | 5-5-4 | 5-0-4 | 1,000 | - |
| 관행구<2> | 5-5-4 | 5-0-4 | 1,000 | (10)** |
| 추천 반량구 | 5-5-4 | 5-0-4 | 1,000 | 5 |
| 추천 적량구 | 5-5-4 | 5-0-4 | 1,000 | 10 |
| 추천 배량구 | 5-5-4 | 5-0-4 | 1,000 | 20 |

*, 입상제오라이트-미생물혼합제제; **, 멸균처리한 입상비료를 사용.

Table 1.8. 재스민 묘목 재배시험에서의 처리구별 시용량

| 처 리 구 | NPK 시비량 (kg/10a) | | 입상복합비료* 처리량(kg/m ²) |
|--------|------------------|---------|------------------------------------|
| | 기 비 | 추 비 | |
| 관행구<1> | 8.5-14-9 | 8.5-0-5 | - |
| 관행구<2> | 8.5-14-9 | 8.5-0-5 | 5** |
| 추천 반량구 | 8.5-14-9 | 8.5-0-5 | 2.5 |
| 추천 적량구 | 8.5-14-9 | 8.5-0-5 | 5 |
| 추천 배량구 | 8.5-14-9 | 8.5-0-5 | 10 |

*, 무기충전제-미생물혼합제제; **, 멸균처리한 과립비료를 사용(관행구/멸균구).

※ 화학비료시비량은 차나무 시비기준(경남농업기술센터자료) 참조.

제 2 절 연구결과 및 고찰

1. 대두단백질의 가수분해

가. 염산에 의한 대두단백질의 분해

염산에 의한 대두단백질의 분해 조건을 알아보기 위하여, 0.15~3.4 N의 범위에서 염산의 농도를 달리하고 <Fig. 1.1>의 방법에 따라 대두박, 비지, 분리대두단백 등을 가수분해하였으며, 그 가수분해도(DH)의 측정결과를 <Fig. 2.1~2.3>에 그림으로 나타내었다.

단백질 원료를 비교하면 0.15 N HCl 농도에서 대두박의 DH 값은 5%, 비지 4%, 분리대두단백 2%로 큰 차이를 보이지는 않았으나, 대두박 중의 단백질이 다른 원료보다 분해가 잘 되었으며, 세 원료 모두 염산의 농도에 비례적으로 DH가 증가하여 3.4 N에서는 28~36%의 값을 나타내었다. 그러나 염산의 농도가 높아질수록 분해과정에서 불순물이 생성되거나 중화과정에서 다량의 염이 형성되는 단점이 있다. 실제로 0.2 N HCl의 농도로 분해하고 NaOH (또는 Na_2CO_3)로 중화할 경우 대두박 분해산물의 12%, 분리대두단백 분해산물의 22%에 이르기까지 NaCl이 생성되었으며, 이와 같은 높은 염농도는 곧 후속되는 효소분해를 저해할 수 있고, 또한 배지성분으로 사용할 경우에는 미생물의 생육에도 영향을 미칠 수 있으므로, 산분해 공정에서는 염산의 첨가량을 최소화해야만 할 것이다.

나. 효소에 의한 대두단백질의 분해

중국산 및 남미산의 대두박을 Protamex 1.5MG로 50°C에서 3시간 동안 가수분해하였으며, 이때 효소의 농도를 반응액량의 0.2~1.6%로 달리하여 실험한 결과 <Fig. 2.4>에서와 같은 DH 값을 얻었다.

적용한 효소의 농도 범위에서는 농도에 따른 DH의 증가 폭이 크지 않았고,

중국산이 남미산보다 DH가 약간 높으나 원산지별 차이를 인정할 수준은 아니었다.

김 등(1969, 1970)은 효소반응을 오래 지속할수록 단백질의 분해도를 향상시킬 수는 있으나, 8시간이상 경과되면 부패될 우려가 있으므로 8시간 정도가 실용적이며, 50°C가 최적 반응온도이지만 55~60°C에서도 분해율이 그다지 떨어지지 않았다고 하였다. 또한 pH 3.5이하에서는 효소는 상당히 저해를 받았으나 방부의 효과가 있었고, pH 4.5에서는 5~6시간 반응시 부패세균의 번식을 억제할 수 있었다. 그러나 효소에 따라 펩티드결합의 절단부위 및 양식이 다르고 또 그 작용 최적온도와 pH가 다르므로, 단백질의 가수분해정도는 효소의 종류나 처리조건 등에 따라 차이가 있을 뿐아니라 결과적으로 분해산물의 기능적 특성도 다양하게 변화된다. (문, 1990)

다. 염산-효소 처리에 의한 대두단백질의 분해

대두박과 분리대두단백을 0.2 N HCl로 가수분해한 후 Protamex로 1차 효소 분해, 이어서 Flavourzyme와 Protamex를 적용하여 2차 효소분해과정을 거쳐 분해산물을 얻었다. 비지는 지방함량이 16.95%로서 취급하기가 어려워서 이 실험에서는 제외하였으며, 대두박과 분리대두단백을 침지, 증자, 분쇄의 전처리를 한 다음 <Fig. 1.1>의 방법에 따라 0.2 N HCl을 첨가하여 95°C에서 40분간 처리한 후 pH 6.0~6.2로 중화시키고 Protamex 0.5%를 첨가하여 50°C에서 3시간 동안 1차 분해, 그리고 Protamex 0.25%와 Flavourzyme 0.5%를 첨가하여 같은 조건에서 2차 분해를 하였다. 효소를 실효시키기 위하여 90°C에서 10분간 열처리한 다음 분해액을 원심분리하였으며, 그 상정액을 동결건조하여 보관하면서 다음실험에 사용하였다.

동결건조하여 얻은 시제품의 수량을 계산하여 보면 원료 100 g으로부터 대두박의 경우 85.7 g의 분해산물 <SM-hydrolysates>를, 분리대두단백의 경우에는 97.3 g의 분해물 <ISP-hydrolysates>를 얻었고, 이때 중화과정에서 생성된 NaCl이 각각 12%, 22%로 계산되었으므로 고품분의 실수량 (net yield)은 각각 75.3%, 75.8%이었다.

단계별 분해산물의 DH와 NSI 값을 나타낸 <Fig. 2.5 및 2.6>에서 보면 산분

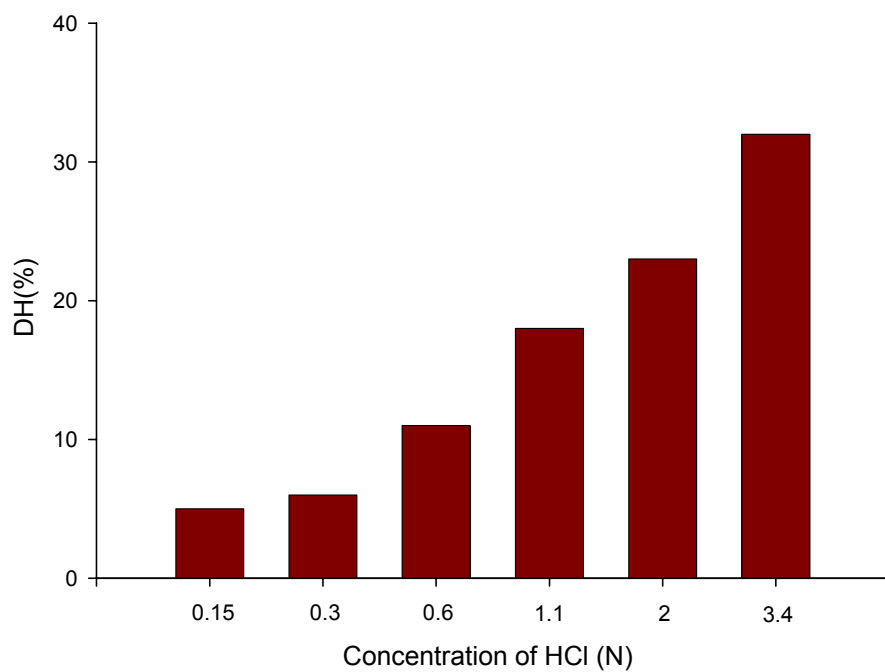


Fig. 2.1. Degree of hydrolysis of the soybean meal hydrolysates according to hydrochloric acid concentration. The soybean meals were hydrolysed by hydrochloric acid at 95°C for 40 minutes.

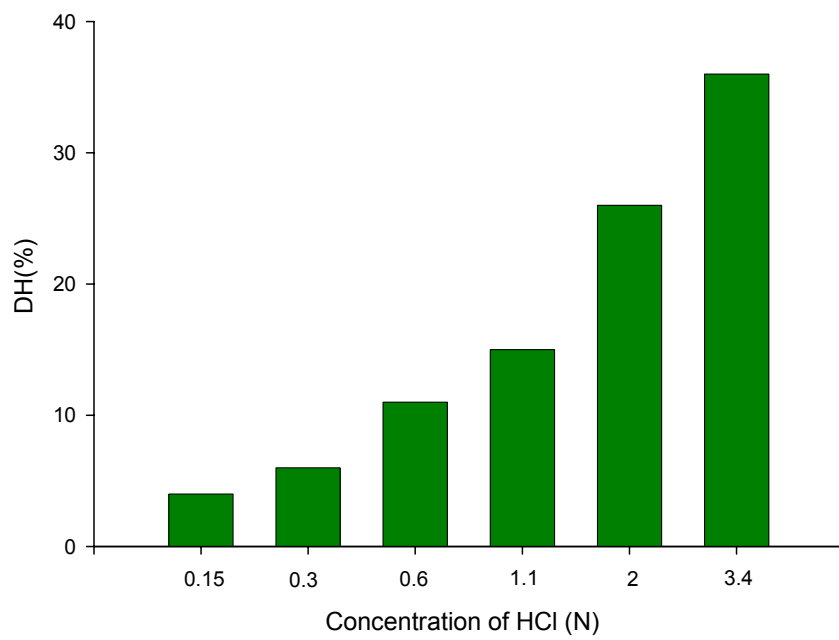


Fig. 2.2. Degree of hydrolysis of the vegemil residue hydrolysates according to hydrochloric acid concentration. The vegemil residues were hydrolysed by hydrochloric acid at 95°C for 40 minutes.

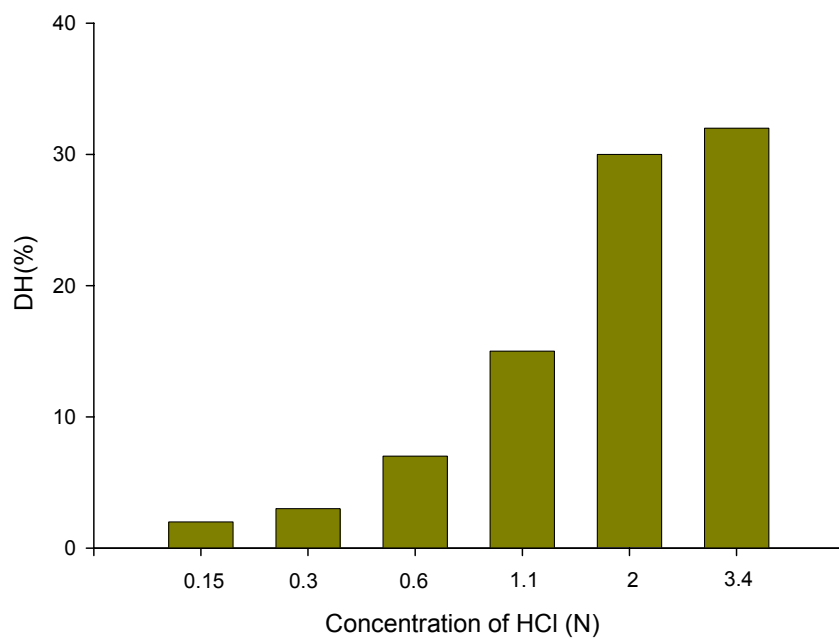


Fig. 2.3. Degree of hydrolysis of the isolated soy protein hydrolysates according to hydrochloric acid concentration. The isolated soy proteins were hydrolysed by hydrochloric acid at 95°C for 40 minutes.

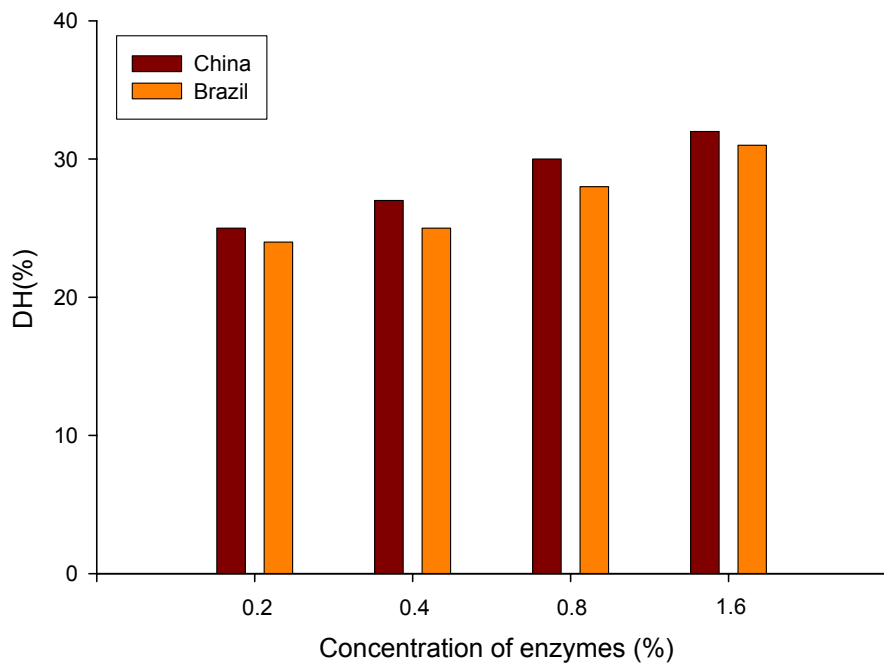


Fig. 2.4. Degree of hydrolysis of the soybean meal hydrolysates according to enzyme concentration. The soybean meals were hydrolysed by Protamex 1.5 MG (0.5%) at 50°C for 3 hours.

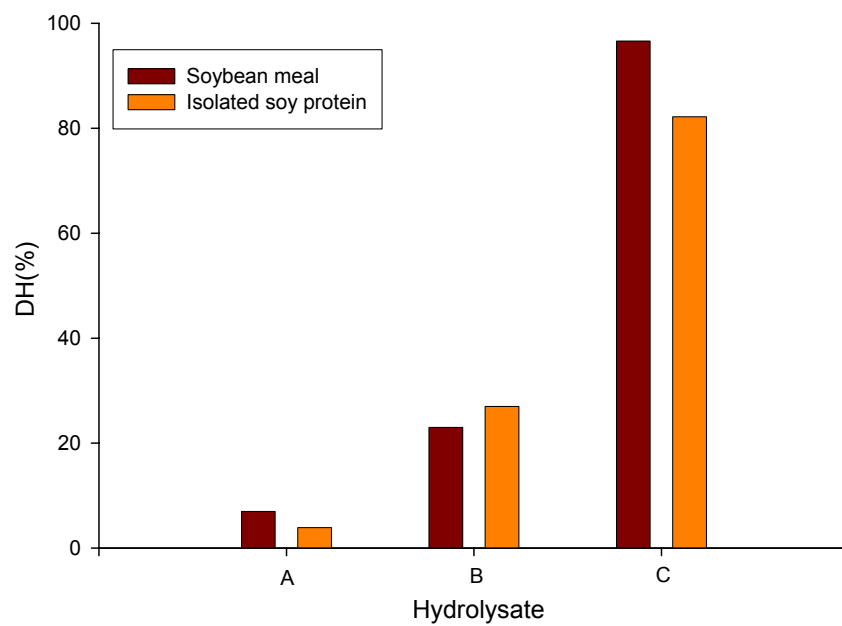


Fig. 2.5. Degree of hydrolysis of the hydrolysates from soybean meals and isolated soy proteins.

A: acidic hydrolysate by 0.2 N HCl

B: 1st enzymatic hydrolysate by Protamex 1.5MG (0.5%)

C: 2nd enzymatic hydrolysate by Flavourzyme 1000MG (0.5%) and Protamex 1.5MG (0.25%)

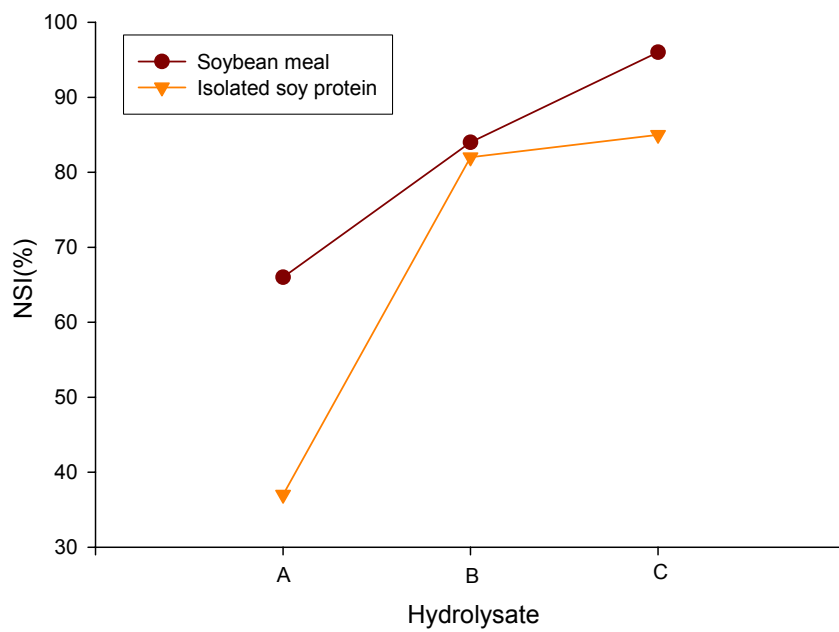


Fig. 2.6. Nitrogen soluble index of the hydrolysates from soybean meals and isolated soy proteins. Notes refer to Figure 2.5.

해 후의 DH 값보다 1차 효소분해과정을 거친 다음의 DH가 훨씬 더 높았으며, 이로써 산분해 과정에서 낮은 농도의 염산을 사용하더라도 1, 2차의 효소분해 과정을 통하여 가수분해도를 충분히 높일수 있음을 알 수 있었다. 각 단계의 측정 값을 보면 대두박 분해물의 DH와 NSI가 분리대두단백의 것보다 높은 편이었다.

Chiang (1972)은 대두단백을 H_2SO_4 로 105℃에서 15분간의 전처리를 거쳐 효소가수분해를 하였던 바, 전처리를 하지 않고 조제한 가수분해물에 비하여 전처리를 거친 것이 수량도 높고 품질도 좋았다고 하였다. 이 등(2002)은 산 분해시 0.1 N의 HCl을 사용하고서도 효소분해에 의하여 NSI 90%, DH 30%에 달하는 결과를 얻었다. 채 등(1997)은 산분해를 거치지 않고도 단백질 분해효소의 endo-형과 exo-의 것을 혼합 사용함으로써 50% 이상의 높은 DH를 얻었다고 하였다.

2. 우유단백질의 가수분해

가. 유청단백질

<Fig. 1.2>의 방법에 따라 유청을 증류수에 현탁시킨 후 효소 분해하였다. Protamex와 Flavourzyme의 복합효소로 가수분해 <Protamex-Flavourzyme 복합 효소 가수분해>하거나, Pancreatin 1%를 첨가하여 40℃에서 4시간 분해한 후 <Pancreatin 가수분해>, 효소를 실효시키기 위해 90℃에서 10분 간 처리한 다음 <Fig. 1.1>과 동일한 과정을 거쳤다. 이 과정을 통하여 원료 100 g으로부터 Protamex-Flavourzyme 복합효소가수분해물로서 90.3 g (Whey I-hydrolysates로 명명함)을, Pancreatin 효소가수분해물로서는 85.6 g (Whey II-hydrolysates)을 회수하였다. 즉 고형분 수량은 각각 90.3, 85.6% 이었다

나. 카제인

카제인은 증류수에 녹지 않기 때문에 <Fig. 1.3>의 방법에 따라 0.2 N NaOH를 첨가하고 가열하여 용해한 후 1 M KH_2PO_4 로 pH를 조정하고 <Protamex-Flavourzyme 복합효소가수분해> 또는 <Pancreatin 효소가수분해>를 하였다. 카제인 100 g으로부터 Protamex-Flavourzyme 복합효소가수분해물로서 65.6 g (Casein I -hydrolysates로 명명함)을, Pancreatin 효소가수분해물로서는 60.6 g (Casein II -hydrolysates)을 회수하였다. 각각의 고형분 수량은 곧 65.6, 60.6% 이었다.

3. 수육 및 혈분의 가수분해

쇠고기의 등심 및 사태에 증류수를 넣고 증자와 분쇄를 반복하면서 응고되는 지방을 제거한 다음 <Protamex-Flavourzyme 복합효소가수분해>를 하였다. 등심 100 g으로부터 21.6 g (Sirloin-hydrolysates라고 명명함)을, 사태 100 g으로부터는 30.4 g (Shank-hydrolysates)을 얻었다. 각각의 고형분 수량은 곧 21.6, 30.4%이었으며, 한편 제조과정에서 제거한 지방은 등심에서 약 20.9 g, 사태로부터는 약 12 g이었다.

건조 혈분은 증류수에 현탁하고 KOH로 알칼리분해 한 다음 H_3PO_4 와 HNO_3 로 중화하였고, 이어서 trypsin 등의 단백질 분해효소로 가수분해하였다. 분해액을 원심분리하여 상정액을 회수하고 이를 동결건조하여 고형분을 얻었으며, 그 수량은 건조 혈분 100 g으로부터 45.9 g (Serum-hydrolysates로 명명함)을 얻었으므로 곧 45.9%이었다.

4. 번데기의 가수분해

번데기를 파쇄하고 용매추출법 (diethylether사용)으로 지방을 제거한 다음 <Protamex-Flavourzyme 복합효소가수분해>를 하였다. 원료 100 g으로부터 각각 68.1 및 54.8 g의 분해물을 얻어 Pupae I, II -hydrolysates라고 명명하였다.

5. 가수분해물의 수율 및 단백질분해도 비교

각종 천연단백질로부터 얻은 최종분해산물에 대하여는 고품분 수율 (yield as dry matter)을 계산하고, DH와 NSI 값을 구하여 단백질 분해정도를 비교하였으며, <Table 2.1>에 종합하여 결과를 제시하였다.

SM-hydrolysates의 DH와 NSI가 96.6%, 98.5%로서 다른 가수분해물에 비하여 가장 높았으며, Serum-hydrolysates는 42.6%, 56.7%로서 최저의 값을 나타내었다. 대부분 가수분해물들의 단백질 분해정도가 50% 이상인 것으로 보아 미생물의 배양이나 발효에 효과적일 것으로 예상된다.

가수분해물의 특성 중에서 단백질의 가수분해정도가 미생물 배지성분으로 사용하는 데에 매우 중요한 인자가 되며, 가수분해 정도에 따라 다양한 용도의 배지로 이용될 수 있다. 즉 항생제 생산을 위한 발효에는 DH가 낮은 분해물을 사용하는 것이 보통이며 일반적인 발효에는 DH 10~60% 정도의 것이 적당하다. 또한 생육속도가 빠른 세균이나 아미노산, 핵산 및 효소의 생산을 위한 발효용으로는 DH가 비교적 높은 30~60% 정도의 분해물이 효과적이라고 알려져 있다. (인 등, 1996)

6. 가수분해물의 이화학적 특성

가. 일반성분 조성

SM- 및 ISP-hydrolysates은 Bacto Soytone 과 Peptone에 비하여 회분함량이 높았고, SM-hydrolysates는 총당함량이 14.4%로 적절한 수준이며 아미노태 질소 함량이 57.7%로 상당히 높았으나, ISP-hydrolysates는 4.0%의 낮은 총당함량을 보였다. <Table 2.2 참조>

Casein I, II-hydrolysates의 회분함량은 Bacto Casitone보다 높으며 Whey I, II-hydrolysates의 회분함량이 가장 낮았다. 그리고, Casein- 및 Whey-hydrolysates의 총당함량은 모두 5% 이상이였다. Casein I-hydrolysates의 총당함량과

아미노태 질소의 함량비 (AN/TN)는 9.5, 41.3%로 Bacto Casitone을 포함한 모든 가수분해물보다 높았으며, Whey II-hydrolysates의 아미노태 질소의 함량비는 1.3%로 낮은 수준이었다. <Table 2.3 참조>

Sirloin-, Shank- 및 Serum-hydrolysates의 회분함량은 Bacto Beef Extract와 비슷하였고, 총당함량은 Bacto Beef Extract가 0.1% 이하인데 비하여 높은 수준이었다. 아미노태 질소의 함량비는 Sirloin- 및 Shank-hydrolysates가 49.5%, 44.9%로서 Bacto Beef Extract와 Serum-hydrolysates의 15.7%, 12.9% 보다 상당히 높은 수치를 보였다. <Table 2.4 참조>

나. 무기성분

Bacto Peptone 과 Soytone을 기준으로 대두단백 분해물의 무기성분을 비교하면, SM-, ISP-hydrolysates의 Cl^- 와 Na^+ 함량이 현저히 높았고, SO_4^{2-} 는 낮고 나머지 성분의 함량에는 큰 차이가 없었다. 여기에서 Cl^- 와 Na^+ 의 함량은 중화과정에서 생성된 다량의 염에 기인하는 것으로 볼수 있다. <Table 2.7 참조>

Bacto Casitone을 기준으로 우유단백 가수분해물의 무기성분을 살펴보면, Casein I-hydrolysates, Whey I-hydrolysates의 Cl^- 함량이 2~3배 가량 높았다. Casein I, II-hydrolysates의 Mg^{2+} 함량은 낮으나, Whey I, II-hydrolysates 는 높았다. PO_4^{3-} 는 네 종류의 우유단백 가수분해물 모두 낮은 수준이었으며 K^+ 는 모두 높았고, 대두단백가수분해물과 마찬가지로 SO_4^{2-} 의 함량이 낮았다. <Table 2.8 참조>

Bacto Beef Extract를 기준으로 우육과 혈분 가수분해물을 비교하면, Sirloin-과 Shank-hydrolysates의 Cl^- 와 Na^+ 함량은 4~6배 정도로 높으며 Mg^{2+} 함량은 약간 낮았다. 이에 비하면 Serum-hydrolysates의 Cl^- , Na^+ , Mg^{2+} 함량은 아주 낮은 편이다. PO_4^{3-} 함량은 세 가수분해물 모두 낮은 경향을 보이는데 Sirloin- 및 Shank-hydrolysates보다 Serum-hydrolysates의 것이 높았다. K^+ 함량은 다른 가수분해물에서는 적절한 수준이었으나 Serum-hydrolysates는 3배 정도 높은 경향을 보였다. <Table 2.9 참조>

다. 아미노산 조성

SM- 및 ISP-hydrolysates는 동일하게 glutamic acid 함량이 가장 많고, aspartic acid, leucine, lysine 등의 순서이었으며, Bacto Soytone의 경우도 glutamic acid 함량이 가장 많고, aspartic acid, leucine, arginine, lysine 등의 비슷한 순서를 나타내었다. 그러나, Bacto Peptone은 glycine 함량이 가장 많고 glutamic acid, proline, alanine, arginine 등의 순서이었다. 아미노산 조성중 높은 함량을 보이는 glutamic acid, aspartic acid, lysine의 종류별 함량을 살펴보면 ISP-hydrolysates에서 가장 높으며, Bacto Soytone, Bacto Peptone, SM-hydrolysates의 순서를 나타내었다. <Table 2.11 참조>

Cystein, methionine, threonine을 제외한 나머지 아미노산의 함량을 살펴보면 Casein I, II-과 Whey I, II-hydrolysates가 Bacto Casitone에서보다 낮았다.

Bacto Casitone의 cystein 함량에 비하여, 우유단백 가수분해물들은 모두 높은 함량을 보였고, methionine의 경우 Casein II-hydrolysates를 제외한 나머지 가수분해물은 모두 Bacto Casitone에 비하여 낮은 수준이었다. 그리고, threonine의 함량은 Casein I, II-hydrolysates 보다 Whey I, II-hydrolysates에서 높았다. Glutamic acid는 Bacto Casitone을 비롯한 우유단백 가수분해물에 있어서 동일하게 가장 높은 함량을 보였으며, Bacto Casitone에서 가장 높고, Casein II-hydrolysates, Casein I-hydrolysate, Whey I-hydrolysates, Whey II-hydrolysates의 순이었다. <Table 2.12 참조>

Bacto Beef Extract는 glycine 함량이 가장 높고, glutamic acid, proline, alanine, arginine, aspartic acid 등의 순서이었으며, 이들 각 아미노산의 함량을 Sirloin-, Shank- 그리고 Serum-hydrolysates와 비교해보면 aspartic acid를 제외한 다른 아미노산이 Bacto Beef Extract에 비하여 크게 부족하다고 볼수 있다. Tyrosine의 경우 Sirloin- 및 Shank-hydrolysates에서는 함량이 낮으나, Serum-hydrolysates는 Bacto Beef Extract와 비슷한 수준이었다. 이외의 다른 아미노산의 함량은 Sirloin-, Shank-, Serum hydrolysates가 높거나 Bacto Beef Extract와 유사하였고, 조제한 세 가수분해물 중 Serum-hydrolysates의 아미노산 함량이 전체적으로 크게 낮은 경향을 보였다. <Table 2.13 참조>

Table 2.1. Yield, degree of hydrolysis and nitrogen solubility index of the hydrolysates

(units : %)

| Hydrolysates | Yield* | DH** | NSI*** |
|-------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| SM-hydrolysate | 75.3 | 96.6 | 98.5 |
| ISP-hydrolysate | 75.8 | 82.2 | 85.1 |
| Casein I, II-hydrolysate | 65.5/60.6 | 58.3/52.2 | 72.0/79.0 |
| Whey I, II-hydrolysate | 90.3/85.6 | 76.3/35.6 | 85.3/83.5 |
| Beef-hydrolysate (sirloin/shank) | 21.6/30.4 | 72.7/84.4 | 84.8/91.2 |
| Serum-hydrolysate | 45.9 | 42.6 | 56.7 |
| Pupae I, II-hydrolysate | 68.1/54.8 | 33.9/46.7 | 78.2/62.6 |

*Yield : yield as dry matter. **DH : degree of hydrolysis.

***NSI : nitrogen solubility index.

Table 2.2. Physicochemical properties of the soy protein hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

| Properties | Bacto Soytone | Bacto Peptone | SM-hydrolysate | ISP-hydrolysate |
|-----------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|
| Ash | 12.0 | 4.4 | 16.0 | 17.0 |
| Clarity* | 1.0 | 0.5 | ND | ND |
| Filterability** | 1.2 | 0.5 | ND | ND |
| Moisture | 4.6 | 3.0 | 10.3 | 6.9 |
| pH*** | 7.2 | 7.0 | 6.8 | 7.1 |
| T-C | 24.0 | 6.9 | 14.4 | 4.0 |
| T-N | 9.4 | 15.5 | 7.1 | 10.1 |
| A-N | 3.1 | 3.1 | 4.1 | 4.7 |
| AN/TN | 33.0 | 20.0 | 57.7 | 46.5 |

*, for 1% solution (NTU); **, g/cm³; ***, 1% solution.

Bacto soytone and peptone were purchased from Difco Lab., Div. of BD Co.

Table 2.3. Physicochemical properties of the milk protein hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

| Properties | Bacto Casitone | Casein-hydrolysate | | Whey-hydrolysate | |
|-----------------|----------------|--------------------|------|------------------|-----|
| | | I | II | I | II |
| Ash | 7.0 | 20.7 | 16.8 | 6.2 | 3.9 |
| Clarity* | 0.6 | ND | ND | ND | ND |
| Filterability** | 1.7 | ND | ND | ND | ND |
| Moisture | 3.7 | 5.9 | 4.2 | 6.0 | 5.4 |
| pH*** | 7.2 | 7.3 | 7.0 | 6.2 | 5.7 |
| T-C | 0.2 | 9.5 | 5.3 | 5.1 | 8.1 |
| T-N | 13.3 | 9.2 | 10.1 | 7.8 | 7.6 |
| A-N | 4.7 | 3.8 | 3.1 | 2.9 | 0.1 |
| AN/TN | 35.3 | 41.3 | 30.7 | 37.2 | 1.3 |

Notes refer to Table 2.2.

Table 2.4. Physicochemical properties of the beef and blood meal hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

| Properties | Bacto Beef extract | Sirloin-hydrolysate | Shank-hydrolysate | Serum-hydrolysate |
|-----------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Ash | 10.2 | 11.6 | 10.3 | 10.0 |
| Clarity* | 1.7 | ND | ND | ND |
| Filterability** | 0.6 | ND | ND | ND |
| Moisture | 2.5 | 5.9 | 7.1 | 3.9 |
| pH*** | 6.9 | 7.0 | 7.1 | 6.9 |
| T-C | <0.1 | 1.1 | 16 | 1.4 |
| T-N | 14.0 | 10.1 | 10.9 | 6.2 |
| A-N | 2.2 | 5.0 | 4.9 | 0.8 |
| AN/TN | 15.7 | 49.5 | 44.9 | 12.9 |

Notes refer to Table 2.2.

Table 2.5. Physicochemical properties of the silkworm pupae hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

| Properties | Bacto Peptone | Pupae I Hydrolysates | Pupae II Hydrolysates |
|-----------------|---------------|----------------------|-----------------------|
| Ash | 4.4 | 27.2 | 27.2 |
| Clarity* | 0.5 | ND | ND |
| Filterability** | 0.5 | ND | ND |
| Moisture | 3.0 | 60.3 | 60.4 |
| pH*** | 7.0 | 6.25 | 6.05 |
| T-N | 15.5 | 8.5 | 11.3 |
| A-N | 3.1 | 1.4 | 1.82 |
| AN/TN | 20.0 | 16.5 | 16.1 |

Notes refer to Table 2.2.

Table 2.6. Physicochemical properties of the blackstrap molasses and malt extract in comparison to the commercial Difco products

(unit %)

| Properties | Bacto Malt extract | Blackstrap Molasses | Chilkab Malt extract | Hanwool Malt extract |
|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Ash | 1.1 | 7.5 | 2.0 | 2.2 |
| Moisture | 4.5 | 26.3 | 7.3 | 7.1 |
| pH | 4.6 | 5.2 | 5.5 | 5.5 |
| Total Carbohydrate | 93.4 | 57.2 | 85.6 | 86.2 |
| Glu | ND | 10.3 | 14.0 | 14.2 |
| Fru | ND | 11.8 | 4.1 | 4.3 |
| Mal | ND | - | 52.7 | 53.8 |
| Suc | ND | 22.2 | - | - |
| Others | ND | 13.0 | 14.8 | 14.1 |
| Protein | 0.6 | 8.2 | 4.5 | 4.4 |

HPLC for sugar determination: Column, μ -Bondapak (300 × 4 mm); RI detector; Mobile phase, H₂O and acetonitrile (17:83); Flow rate, 1.0ml/min.

Table 2.7. Inorganics of the soy protein hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

(units : % amount)

| Inorganics | Bacto Soytone | Bacto Peptone | SM- hydrolysates | ISP- hydrolysates |
|-------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| Calcium | 0.055 | 0.008 | ND | ND |
| Chloride | 0.165 | 1.086 | 3.200 | 6.100 |
| Cobalt | <0.001 | <0.001 | ND | ND |
| Copper | <0.001 | <0.001 | ND | ND |
| Iron | 0.008 | 0.004 | 0.040 | 0.004 |
| Lead | <0.001 | <0.001 | ND | ND |
| Magnesium | 0.161 | 0.007 | 0.263 | 0.020 |
| Manganese | <0.001 | <0.001 | ND | ND |
| Phosphate | 0.820 | 0.445 | 1.290 | 1.470 |
| Potassium | 2.220 | 0.203 | 2.273 | 0.559 |
| Sodium | 3.404 | 1.759 | 5.400 | 7.500 |
| Sulfate | 2.334 | 0.244 | 0.074 | 0.073 |
| Sulfur | 1.660 | 0.410 | ND | ND |
| Tin | <0.001 | <0.001 | ND | ND |
| Zinc | 0.001 | 0.001 | ND | ND |

Table 2.8. Inorganics of milk protein hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

(units : % amount)

| Inorganics | Bacto Casitone | Casein-hydrolysates | | Whey-hydrolysates | |
|------------|----------------|---------------------|--------|-------------------|-------|
| | | I | II | I | II |
| Calcium | 0.010 | ND | ND | ND | ND |
| Chloride | 0.110 | 3.256 | 0.168 | 2.124 | 0.322 |
| Cobalt | <0.001 | ND | ND | ND | ND |
| Copper | <0.001 | ND | ND | ND | ND |
| Iron | 0.003 | 0.004 | 0.005 | 0.006 | 0.005 |
| Lead | <0.001 | ND | ND | ND | ND |
| Magnesium | 0.019 | 0.005 | 0.006 | 0.067 | 0.075 |
| Manganese | <0.001 | ND | ND | ND | ND |
| Phosphate | 2.604 | 0.117 | 0.118 | 0.017 | 0.023 |
| Potassium | 0.162 | 3.476 | 2.409 | 1.138 | 1.168 |
| Sodium | 3.073 | 8.362 | 5.096 | 1.809 | 0.500 |
| Sulfate | 0.339 | <0.001 | <0.001 | 0.074 | 0.073 |
| Sulfur | 0.676 | ND | ND | ND | ND |
| Tin | <0.001 | ND | ND | ND | ND |
| Zinc | 0.004 | ND | ND | ND | ND |

Table 2.9. Inorganics of beef and blood meal hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

(units : % amount)

| Inorganics | Bacto Beef extract | Sirloin- hydrolysates | Shank- hydrolysates | Serum- hydrolysates |
|-------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Calcium | 0.018 | ND | ND | ND |
| Chloride | 1.576 | 5.116 | 4.811 | 0.930 |
| Cobalt | <0.001 | ND | ND | ND |
| Copper | 0.001 | ND | ND | ND |
| Iron | 0.001 | 0.014 | 0.008 | 0.056 |
| Lead | <0.001 | ND | ND | ND |
| Magnesium | 0.022 | 0.073 | 0.058 | 0.006 |
| Manganese | <0.001 | ND | ND | ND |
| Phosphate | 0.345 | 0.021 | 0.016 | 0.193 |
| Potassium | 1.994 | 1.367 | 1.275 | 3.946 |
| Sodium | 2.774 | 6.777 | 5.703 | 0.713 |
| Sulfate | 0.829 | 0.766 | <0.001 | 0.078 |
| Sulfur | 0.661 | ND | ND | ND |
| Tin | <0.001 | ND | ND | ND |
| Zinc | 0.002 | ND | ND | ND |

Table 2.10. Inorganics of silworm pupae hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

(unit : % amount)

| Inorganics | Bacto Peptone | Pupae I Hydrolysates | Pupae II Hydrolysates |
|------------|---------------|----------------------|-----------------------|
| Calcium | 0.055 | ND | ND |
| Chloride | 0.165 | 11.7 | 10.3 |
| Cobalt | < 0.001 | ND | ND |
| Copper | < 0.001 | ND | ND |
| Iron | 0.008 | 0.013 | 0.012 |
| Lead | < 0.001 | ND | ND |
| Magnesium | 0.161 | 0.33 | 0.44 |
| Manganese | < 0.001 | ND | ND |
| Phosphate | 0.820 | 2.450 | 2.75 |
| Potassium | 2.220 | 1.3 | 1.5 |
| Sodium | 1.759 | ND | ND |
| Sulfate | 3.404 | 9.0 | 4.8 |
| Sulfur | 2.334 | 0.4 | 0.1 |
| Tin | < 0.001 | ND | ND |
| Zinc | 0.001 | ND | ND |

Table 2.11. Amino acid compositions of the soy protein hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

(units : % amount)

| Amino acids | Bacto Soytone | Bacto Peptone | SM-Hydrolysate | ISP-Hydrolysate |
|-------------|---------------|---------------|----------------|-----------------|
| Ala | 2.46 | 8.67 | 1.70 | 2.46 |
| Arg | 3.82 | 6.76 | 2.02 | 1.61 |
| Asp | 7.27 | 5.60 | 5.20 | 7.75 |
| Cys | 1.45 | 0.20 | 1.41 | 1.21 |
| Glu | 12.76 | 10.21 | 9.18 | 13.85 |
| Gly | 2.51 | 15.59 | 1.32 | 1.96 |
| His | 1.24 | 0.58 | 1.10 | 1.66 |
| Ile | 2.37 | 1.45 | 2.19 | 3.25 |
| Leu | 4.03 | 3.01 | 3.32 | 5.00 |
| Lys | 3.45 | 3.42 | 2.61 | 4.10 |
| Met | 0.86 | 1.19 | 0.80 | 0.65 |
| Phe | 2.46 | 1.81 | 1.32 | 2.32 |
| Pro | 2.92 | 8.80 | 1.95 | 3.34 |
| Ser | 2.87 | 2.87 | 1.58 | 2.60 |
| Thr | 2.17 | 1.81 | 1.64 | 2.46 |
| Trp | 0.47 | 0.36 | ND | ND |
| Tyr | 1.93 | 0.64 | 0.14 | 0.41 |
| Val | 2.65 | 2.35 | 2.20 | 3.19 |
| Total | 57.59 | 75.32 | 39.68 | 57.79 |

Table 2.12. Amino acid compositions of the milk protein hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

(units : % amount)

| Amino acids | Bacto Casitone | Casein-hydrolysate | | Whey-hydrolysate | |
|-------------|----------------|--------------------|-------|------------------|-------|
| | | I | II | I | II |
| Ala | 3.01 | 1.69 | 1.80 | 2.35 | 2.29 |
| Arg | 3.76 | 0.51 | 2.46 | 0.74 | 1.96 |
| Asp | 6.61 | 4.41 | 4.71 | 5.34 | 5.27 |
| Cys | 0.02 | 0.23 | 0.37 | 1.41 | 0.91 |
| Glu | 20.03 | 14.24 | 15.07 | 8.90 | 8.70 |
| Gly | 1.97 | 1.10 | 1.20 | 1.24 | 1.17 |
| His | 2.17 | 1.74 | 1.76 | 1.25 | 1.29 |
| Ile | 4.16 | 3.34 | 3.18 | 2.98 | 2.68 |
| Leu | 8.74 | 5.94 | 6.15 | 5.42 | 4.98 |
| Lys | 13.62 | 5.18 | 5.39 | 4.45 | 3.97 |
| Met | 1.71 | 0.76 | 2.04 | 1.11 | 0.88 |
| Phe | 4.02 | 2.59 | 3.09 | 1.66 | 1.78 |
| Pro | 8.57 | 6.91 | 7.67 | 3.14 | 3.84 |
| Ser | 4.82 | 2.99 | 3.66 | 2.91 | 3.21 |
| Thr | 3.74 | 2.73 | 2.67 | 3.89 | 3.67 |
| Trp | 0.14 | ND | ND | ND | ND |
| Tyr | 2.09 | 0.93 | 3.22 | 0.54 | 1.50 |
| Val | 4.06 | 3.38 | 3.32 | 2.67 | 2.38 |
| Total | 93.24 | 58.64 | 67.74 | 50.00 | 50.48 |

Table 2.13. Amino acid compositions of the beef and blood meal hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

(units : % amount)

| Amino acids | Bacto Beef extract | Sirloin-hydrolysate | Shank-hydrolysate | Serum-hydrolysate |
|-------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| Ala | 8.96 | 3.81 | 4.56 | 3.14 |
| Arg | 5.66 | 0.52 | 1.20 | 2.27 |
| Asp | 4.30 | 6.40 | 6.55 | 5.09 |
| Cys | 0.17 | 0.49 | 0.58 | 0.21 |
| Glu | 12.55 | 11.34 | 12.06 | 4.49 |
| Gly | 16.25 | 4.06 | 6.73 | 1.92 |
| His | 2.50 | 2.39 | 2.03 | 2.44 |
| Ile | 1.45 | 3.46 | 3.27 | 0.41 |
| Leu | 3.63 | 5.58 | 5.44 | 4.67 |
| Lys | 3.27 | 6.44 | 6.30 | 5.81 |
| Met | 1.08 | 0.97 | 1.09 | 0.42 |
| Phe | 2.00 | 2.18 | 1.97 | 2.53 |
| Pro | 9.58 | 3.85 | 4.98 | 1.57 |
| Ser | 2.10 | 2.12 | 2.65 | 1.86 |
| Thr | 1.42 | 3.35 | 3.38 | 1.40 |
| Trp | 0.32 | ND | ND | ND |
| Tyr | 1.03 | 0.38 | 0.37 | 1.03 |
| Val | 2.62 | 2.55 | 2.61 | 3.47 |
| Total | 78.89 | 59.90 | 65.79 | 42.73 |

Table 2.14. Amino acid compositions of the silkworm pupae hydrolysates in comparison to the commercial Difco products

(units : % amount)

| Amino acids | Bacto Peptone | Pupae I Hydrolysates | Pupae II Hydrolysates |
|-------------|---------------|----------------------|-----------------------|
| Ala | 8.67 | 2.56 | 3.31 |
| Arg | 6.76 | 1.83 | 1.05 |
| Asp | 5.60 | 5.66 | 6.59 |
| Cys | 0.20 | 0.72 | 0.93 |
| Glu | 10.21 | 6.39 | 8.00 |
| Gly | 15.59 | 2.51 | 3.35 |
| His | 0.58 | 1.93 | 2.40 |
| Ile | 1.45 | 2.53 | 3.13 |
| Leu | 3.01 | 3.78 | 4.76 |
| Lys | 3.42 | 3.66 | 4.76 |
| Met | 1.19 | 1.50 | 2.28 |
| Phe | 1.81 | 2.45 | 3.17 |
| Pro | 8.80 | 1.84 | 2.82 |
| Ser | 2.87 | 2.37 | 3.37 |
| Thr | 1.81 | 2.48 | 3.09 |
| Trp | 0.36 | ND | ND |
| Tyr | 0.64 | 1.24 | 3.20 |
| Val | 2.35 | 3.08 | 3.79 |
| Total | 78.89 | 46.53 | 60.0 |

7. 가수분해물을 이용한 배지의 조제 및 미생물 균주의 생육

가. 대두단백 가수분해물

대두단백 가수분해물로서 SM- 및 ISP-hydrolysates를 대체성분으로 <Table 1.4>에서와 같이 Soytone 배지와 Peptone 배지를 조제하고 각 배지에 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*의 균체 1백금이씩 접종하여 <Table 1.3 참조>, 35±2℃에서 진탕배양하면서 일정시간 간격으로 생균수를 측정하여 배지 종류별로 각 균주의 생육속도를 확인하였다.

시험균주 모두 접종 후 6시간까지 급속히 생육하여 생장곡선상 대수기에 상당하였으며, 그 이후에는 정지기에 접어들어 변화의 폭이 적었다. *E. coli*와 *P. vulgaris*는 배지에 따라 24시간 이후 사멸하는 경향을 보이는데 이는 균주의 특성에 따른 것으로 보인다. 시험균주의 생육도는 Bacto Soytone 배지에서 가장 높았으나, SM- 및 ISP-hydrolysates 배지에서의 생육도와 큰 차이가 없었으며, Bacto Peptone 배지에서의 생육 수준이 현저히 낮았다. <Fig. 2.7 참조>

한편, <Table 1.4>의 배지조성에 agar 1.6%를 첨가하여 고체평판배지를 조제하고 시험균주를 streaking하여 35±2℃에서 24~48시간 정치배양하면서 콜로니 형태와 생육 상태를 관찰하였으며, 48시간 후의 결과를 <Fig. 2.8>에 사진으로 나타내었다. SM- 및 ISP-hydrolysates 고체배지에서의 시험균주의 생육 정도는 Bacto Soytone 및 Peptone 배지에서보다 더 양호하거나 비슷한 수준을 나타내었다.

나. 우유단백 가수분해물

1) 유청단백질

유청단백 가수분해물로서 Whey I - 및 Whey II -hydrolysates를 대체성분으로 사용하여 <Table 1.4>에서와 같이 MRS broth를 조제하고 여기에 *Lactobacillus delbrukii* subsp. *lactis*와 *Lactobacillus fermentum*을 접종하여 <Table 1.3 참조> 35±2℃에서 정치배양하면서 일정시간 간격으로 생균수를 측정하여 배지 종류별로

각 균주의 생육속도를 확인하였다.

시험균주의 생육은 접종 후부터 12시간까지 증가하다가 그 이후에는 감소하는데, *L. delbrukii* subsp. *lactis*보다 *L. fermentum*의 감소 현상이 훨씬 더 급격하였다 <Fig. 2.9 참조>. 이러한 유산균주의 사멸 현상은 Whey II-hydrolysates 로 조제한 MRS broth에서 더욱 뚜렷하게 관찰되었으며, 배양액의 pH를 측정된 결과 그 사멸의 원인이 단순히 pH의 저하에 기인하는 것으로는 볼수 없었다.

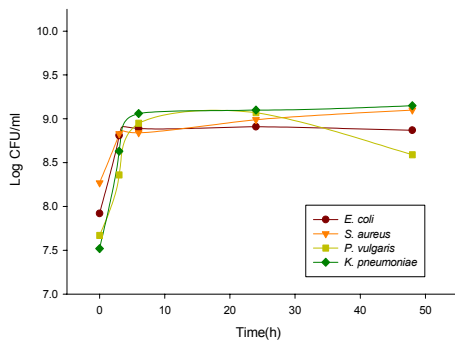
그러나 <Table 1.4>의 MRS broth에 agar 1.6%를 첨가하여 조제한 고체평판 배지에 시험균주를 streaking하여 35±2℃에서 24~48 h 정지배양하면서 콜로니 형태와 생육 상태를 관찰한 결과, Bacto Peptone, Whey I 및 II-hydrolysates로 조제한 MRS 평판에서의 생육도는 차이를 발견할 수 없었으며, 모두 비슷한 수준이었다. <Fig. 2.10 참조>

2) 카제인

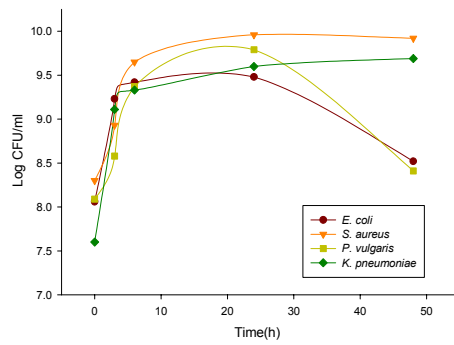
Casein I - 및 Casein II-hydrolysates를 대체성분으로 하여 <Table 1.4>에서와 같이 NZYM 배지를 조제하고 각 배지에 *E. coli*, *Bacillus subtilis*를 접종하여 <Table 1.3 참조>, 35±2℃에서 진탕배양하면서 일정시간 간격으로 생균수를 측정하여 배지 종류별 각 균주의 생육속도를 확인하였다.

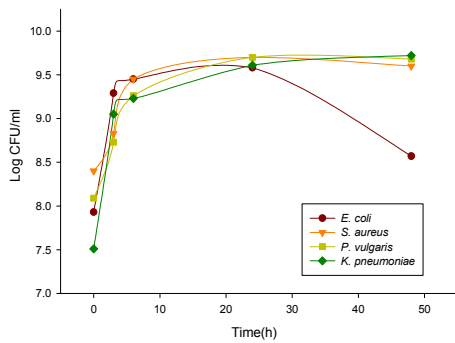
*E. coli*의 생육도는 Bacto Casitone, Casein I - 그리고 Casein II-hydrolysates 로 조제한 NZYM 배지에서 접종 후 12시간까지 증가하다가 24시간 이후에는 감소하는 경향을 보였다. *B. subtilis*는 Bacto Casitone으로 조제한 NZYM 배지에서 접종 후 12시간까지 급격히 증가하다 그 이후에는 큰 변화가 없었고, Casein I - 및 Casein II-hydrolysates로 조제한 NZYM 배지에서는 24시간까지 완만하게 증가하다가 그 이후에는 역시 큰 변화가 없었다. 이들 두 균주의 생육정도는 배지의 종류에 따라 차이가 거의 없었으며, Casein II-hydrolysates로 조제한 NZYM 배지에서의 생육도가 약간 우월하였다. <Fig. 2.11 참조>

그리고 <Table 1.4>의 NZYM broth의 조성에 agar 1.6%를 첨가하여 조제한 고체평판배지에서 시험균주의 콜로니 형태와 생육도를 관찰한 결과, <Fig. 2.12>에 사진으로 나타낸 바와같이 Casein I - 및 II-hydrolysates로 조제한 NZYM 배지에서의 생육 상태가 Bacto Casitone으로 조제한 것에 비하여 더 좋거나 비슷하였다.

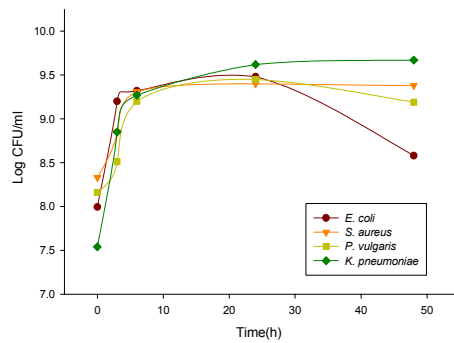


<A>





<C>



<D>

Fig. 2.7. Growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* and *Klebsiella pneumoniae* in the culture broths prepared with the soy protein hydrolysates and Difco products. The cultures were grown at $35\pm 2^\circ\text{C}$ with shaking.

<A> Bacto Peptone;

 Bacto Soytone

<C> SM-hydrolysates;

<D> ISP-hydrolysates



<A>





<C>



<D>

Fig. 2.8. Colony morphologies of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* and *Klebsiella pneumoniae* on the agar plates which made of Bacto Peptone <B.P>, Bacto Soytone <B.S>, SM-hydrolysates <SM>, and ISP-hydrolysates <ISP>. The cultures were grown at 35± 2°C for 48 h.

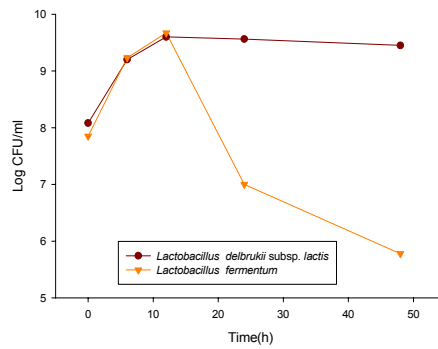
<A> *Escherichia coli*;

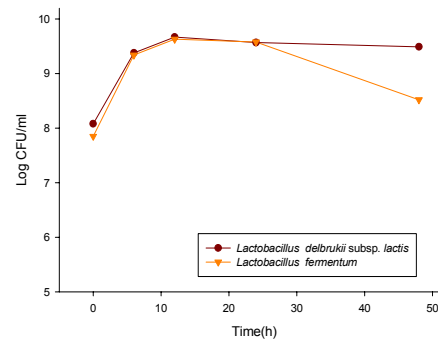
 Staphylococcus aureus

<C> *Proteus vulgaris*;

<D> *Klebsiella pneumoniae*

<A>





<C>

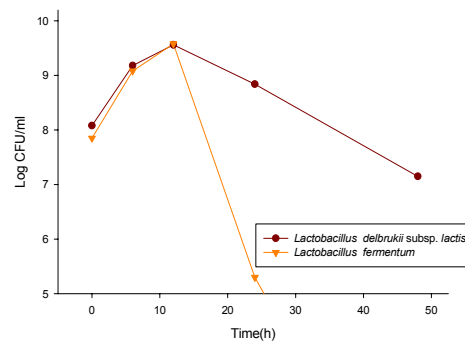
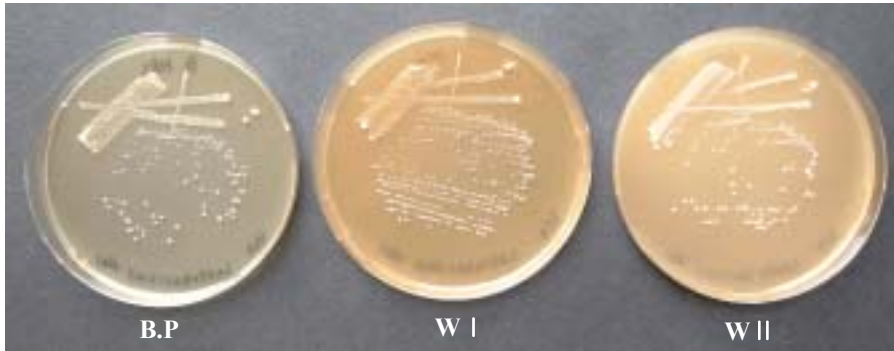


Fig. 2.9. Growth of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactobacillus fermentum* in the MRS broths prepared with the whey protein hydrolysates and Difco products. The cultures were grown at $35\pm 2^\circ\text{C}$ with shaking.

<A> Bacto Peptone; Whey I-hydrolysates; <C> Whey II-hydrolysates



<A>

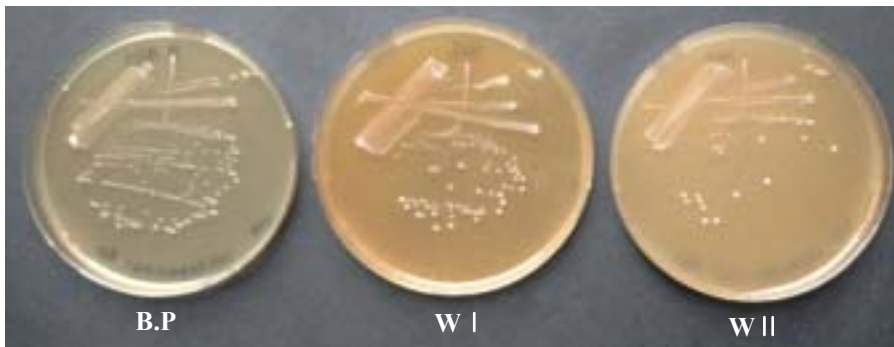
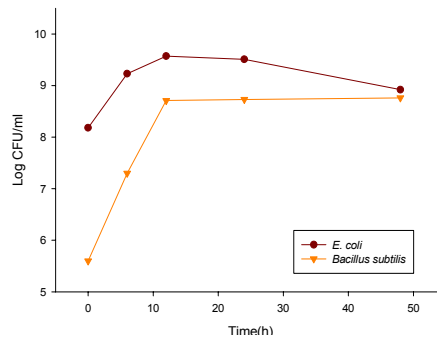


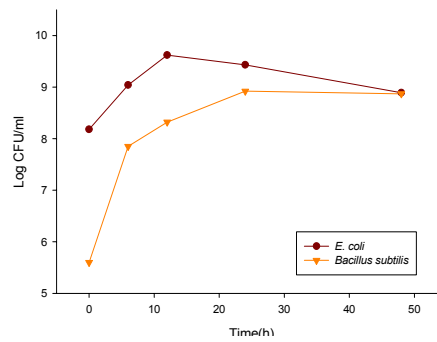
Fig. 2.10. Colony morphologies of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactobacillus fermentum* on the MRS agar plates which made of Bacto Peptone <B.P>, Whey I -hydrolysates <W I >, Whey II -hydrolysates <W II>. The cultures were grown at $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 h.

<A> *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*;

 Lactobacillus fermentum

<A>





<C>

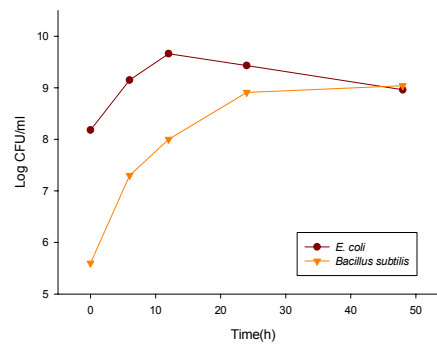


Fig. 2.11. Growth of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* in the culture broths prepared with the caseine hydrolysates and Difco products. The cultures were grown at $35\pm 2^\circ\text{C}$ with shaking.

<A> Bacto casitone; Casein I-hydrolysates; <C> Casein II-hydrolysates.



<A>



Fig. 2.12. Colony morphologies of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* on the NZYM agar plates which made of Bacto Casitone <B.C>, Casein I -hydrolysates <C I>, Casein II -hydrolysates <C II>. The cultures were grown at $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 h.

<A> *Escherichia coli*; *Bacillus subtilis*

다. 수육 및 혈분 가수분해물

Sirloin-, Shank- 그리고 Serum-hydrolysates를 대체성분으로 하여 <Table 1.4>에서와 같이 NB broth를 조제하고 여기에 *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*를 접종하여 <Table 1.3 참조>, 35±2℃에서 진탕배양하면서 일정시간 간격으로 생균수를 측정하여 배지 종류별로 균주의 생육속도를 확인하였다.

시험균주는 위에서 조제한 NB broth에서 모두 접종 후 6~12시간에 정지기에 도달하여 생균수를 유지하였고 24시간 이후에 사멸하는 경향을 보였으며, <Fig. 2.13>에서 보는 바와 같이 그 생육도는 Bacto Beef Extract 보다 Sirloin-, Shank- 및 Serum-hydrolysates로 조제한 NB broth에서 훨씬 좋았다.

그리고 <Table 1.4>의 NB의 조성에 agar 1.6%를 첨가하여 조제한 NA 평판 배지에 시험균주를 streaking하여 35℃에서 48시간 동안 정치배양하면서 콜로니 형태와 생육 상태를 관찰한 결과, <Fig. 2.14>에 나타낸 바와 같이 Sirloin-, Shank- 및 Serum-hydrolysates로 조제한 NA 배지에서의 생육 정도가 Bacto Beef Extract로 조제한 것에 비하여 더 좋거나 비슷하였다.

라. 번데기 가수분해물

Pupae-hydrolysate I 및 II를 대체성분으로 하여 조제한 NB broth 및 NA plate에서의 *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*의 생육상태를 확인하였다. <Fig. 2.15, 2.16, 2.17, 2.18 참조>

마. 맥아추출물

Malt extract를 대체성분으로 하여 조제한 Malt extract broth 또는 agar에서 *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*의 생육을 확인하였다. <Fig. 2.19, 2.20, 2.21, 2.22 참조>

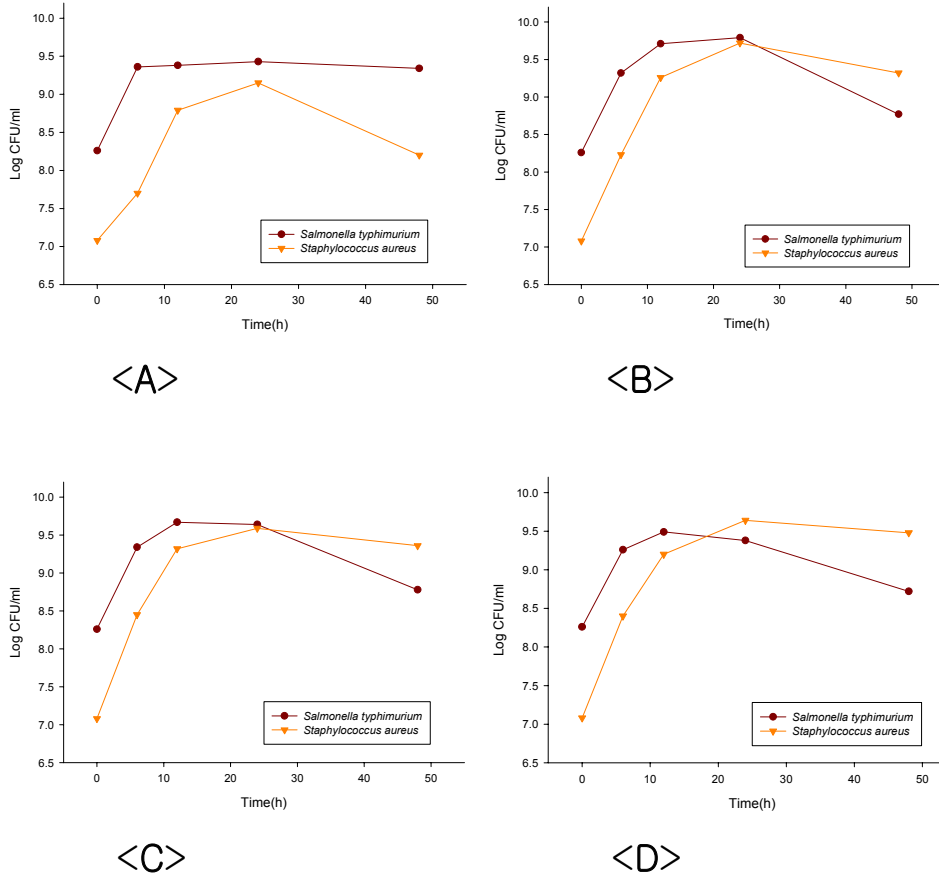


Fig. 2.13. Growth of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in the culture broths prepared with the beef and blood meal hydrolysates and Difco products. The cultures were grown at $35\pm 2^\circ\text{C}$ with shaking.

- | | |
|-------------------------|--------------------------|
| <A> Bacto Beef Extract; | Sirloin-hydrolysates |
| <C> Shank-hydrolysates; | <D> Serum-hydrolysates |



Fig. 2.14. Colony morphologies of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* on the agar plates which made of Bacto Beef Extract <B.B>, Sirloin-hydrolysates <Si>, Shank-hydrolysates <Sh> and Serum-hydrolysates <Se>. The cultures were grown at $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 h.

<A> *Salmonella typhimurium*; *Staphylococcus aureus*

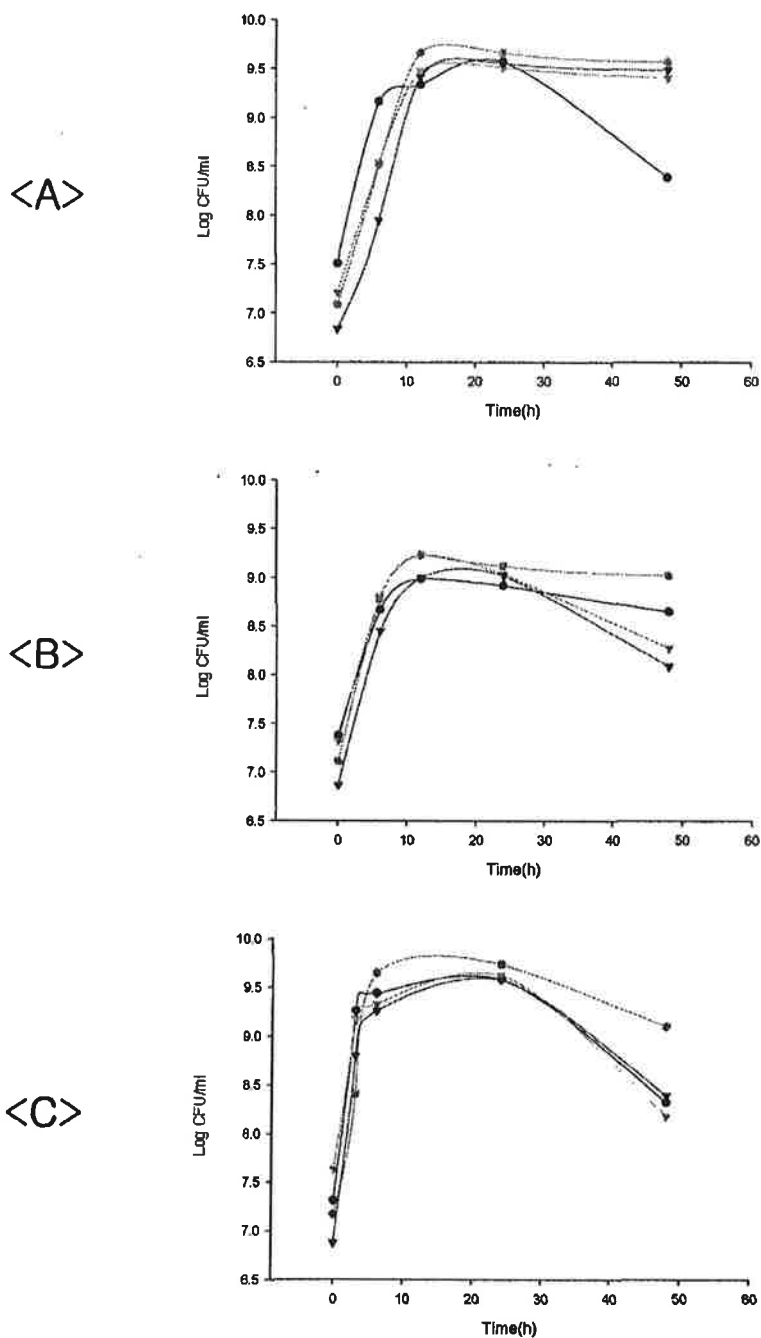


Fig. 2.15. Growth curves of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* and *Klebsiella pneumoniae* in medium prepared by Bacto Peptone<A>, silkworm pupae-hydrolysate I and silkworm pupae hydrolysates II <C> at 35°C with shaking.

<A>Bacto Peptone; Pupae-Hydrolysates I ; <C>Pupae-Hydrolysates II

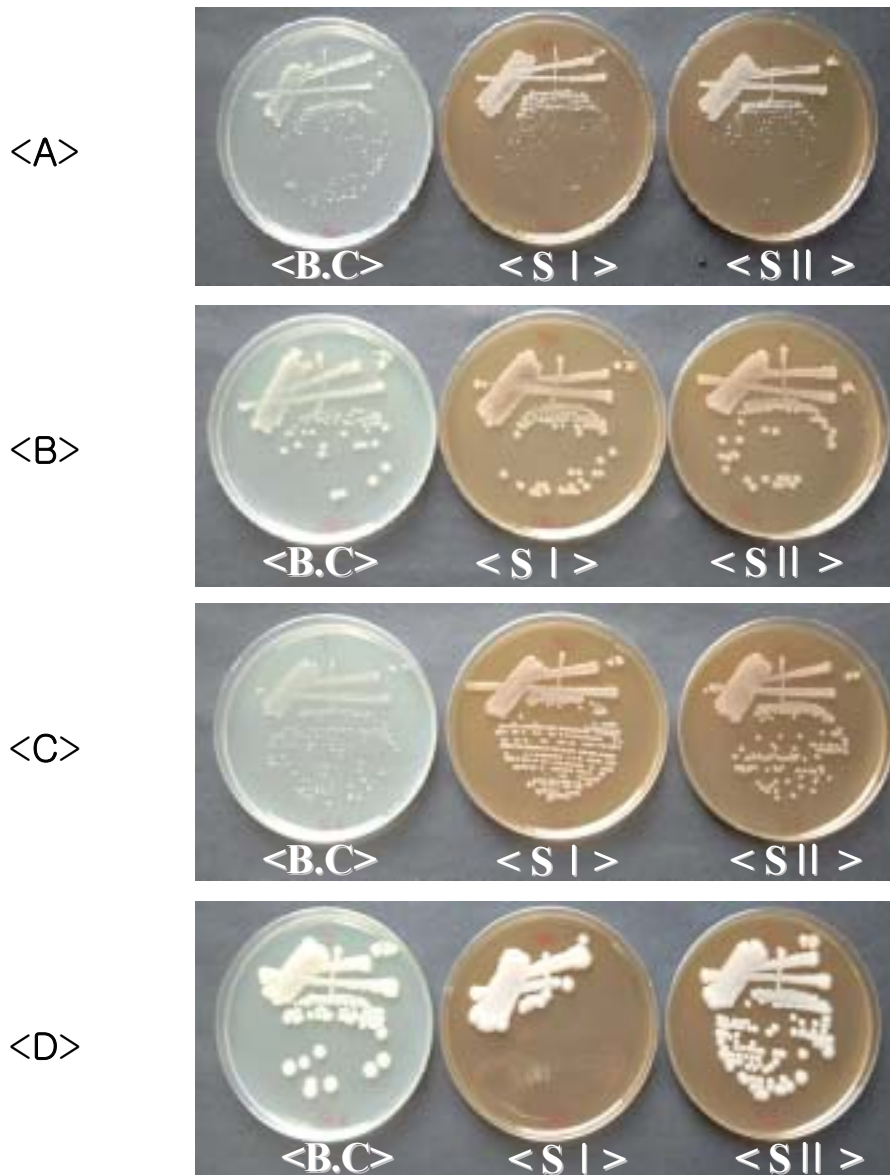
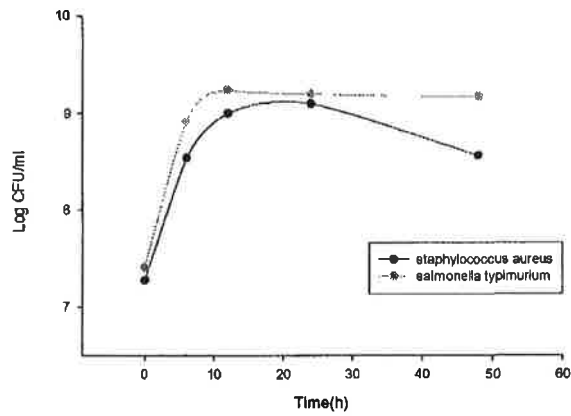
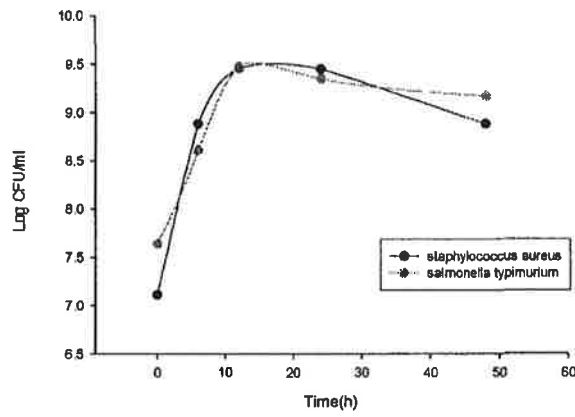


Fig. 2.16. Colonization characteristics of *Escherichia coli* <A>, *Staphylococcus aureus* , *Proteus vulgaris* <C> and *Klebsiella pneumoniae* <D> in Bacto Peptone, silkworm pupae-hydrolysates which contain agar. The cultures were grown at $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 h.

<A> *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus*
 <C> *Proteus vulgaris* <D> *Klebsiella pneumoniae*

<A>





<C>

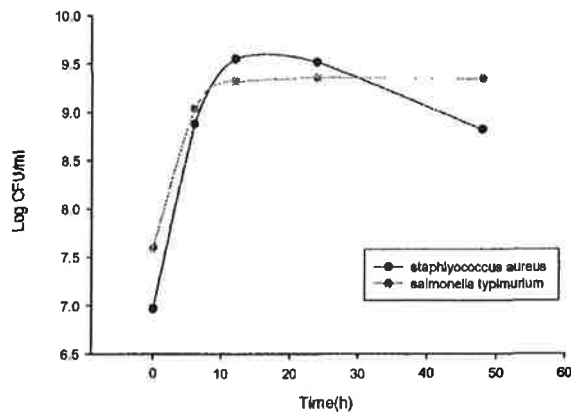


Fig. 2.17. Growth of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in the culture broths prepared with silkworm pupae hydrolysates and Difco products. The cultures were grown at $35\pm 2^\circ\text{C}$ with shaking.

<A> Bacto Peptone; Pupae-Hydrolysates I; <C> Pupae-Hydrolysates II

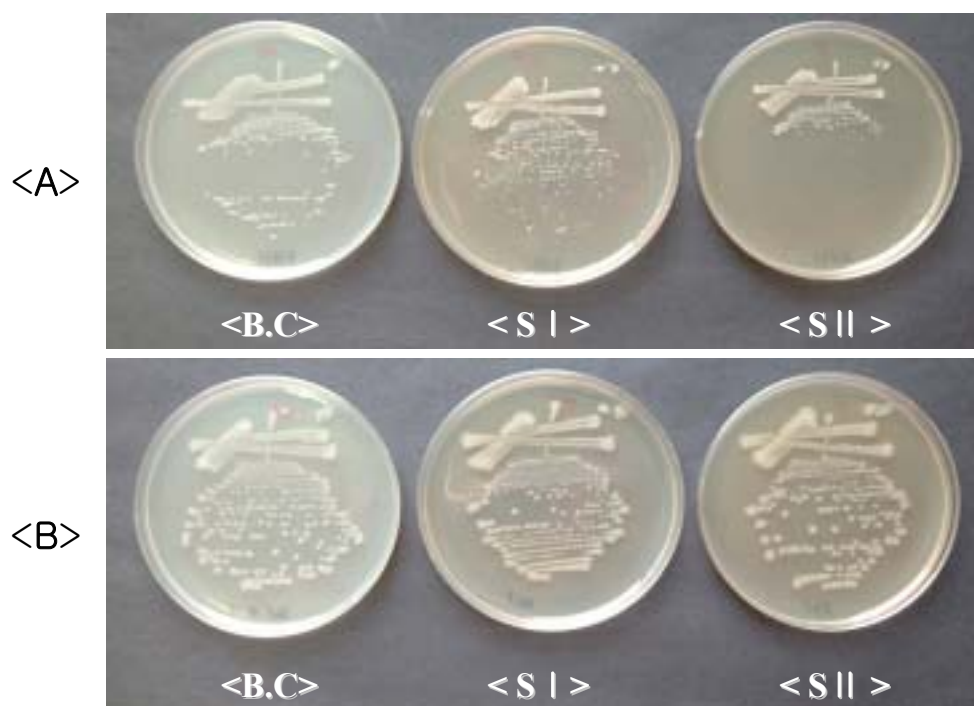


Fig. 2.18. Colony morphologies of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* on the agar plates which made of Bacto Peptone <B.C>, silkworm pupae hydrolysates I <S I>, silkworm pupae hydrolysates II <S II>. The cultures were grown at $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 h.

<A> *Salmonella typhimurium*; *Staphylococcus aureus*

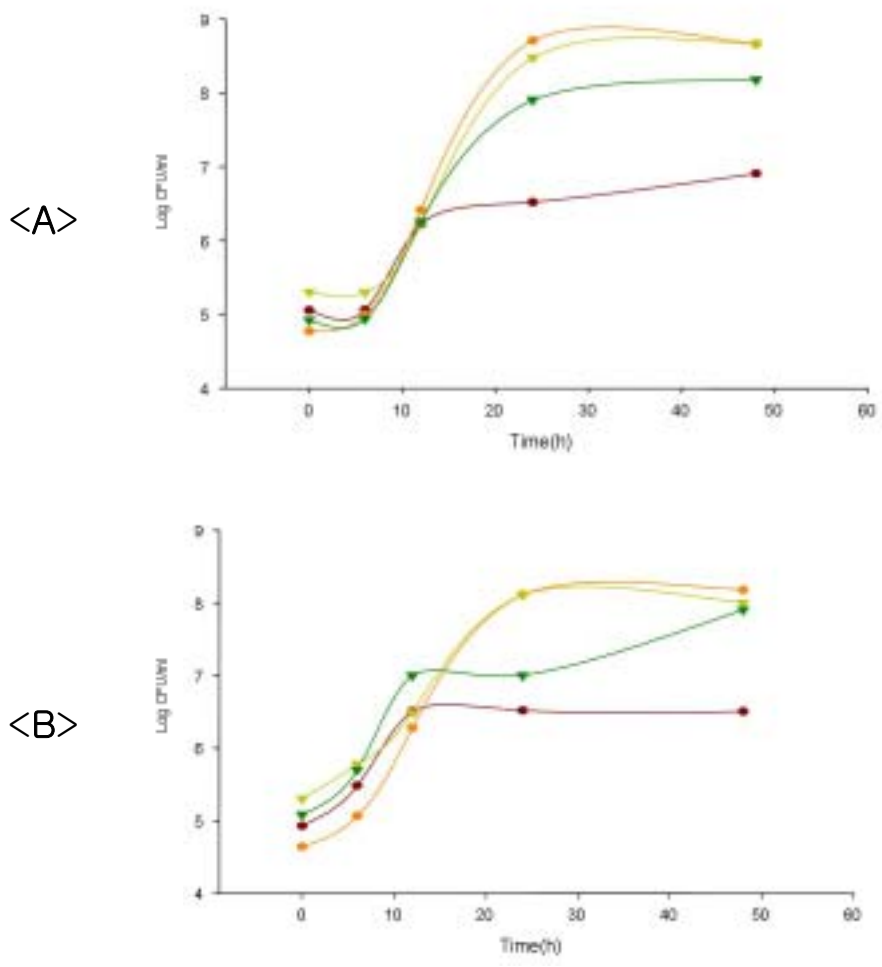


Fig. 2.19. Growth curves of standard organism, *Candida albicans* <A> and *Saccharomyces cerevisiae* in the broth prepared by Bacto malt extract, Chilkab malt extract, Hanwool malt extract, and black- strap molasses. The cultures were grown at 35±2°C with shaking.

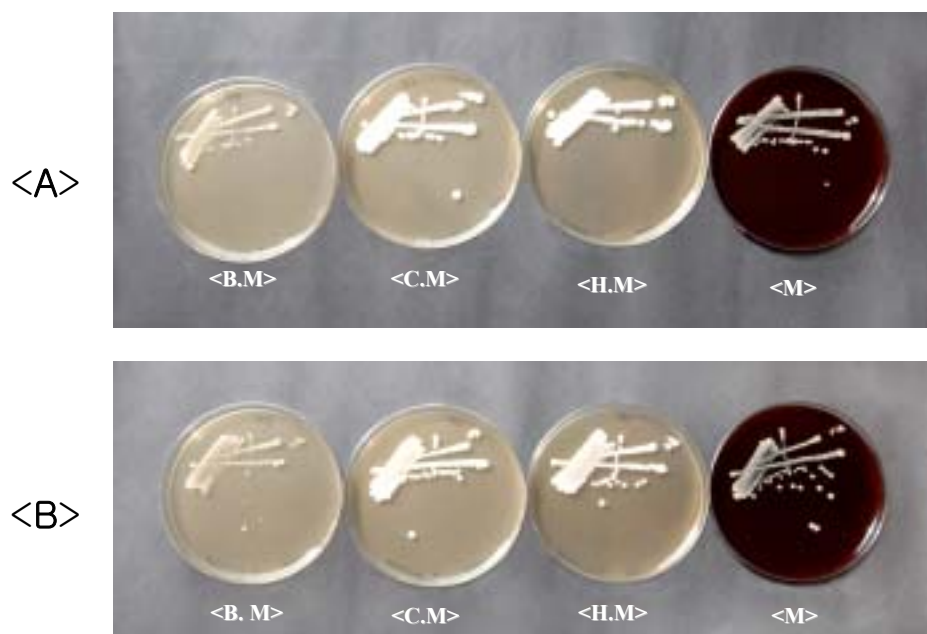


Fig. 2.20. Colony morphologies of *Candida albicans* <A> *Saccharomyces cerevisiae* on the Malt agar plates which made of Bacto malt extract <B.M>, Chilkab malt extract <C.M>, Hanwool malt extract <H.M> and blackstrap molasses <M>. The cultures were grown at $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 h.

<A> *Candida albicans*; *Saccharomyces cerevisiae*

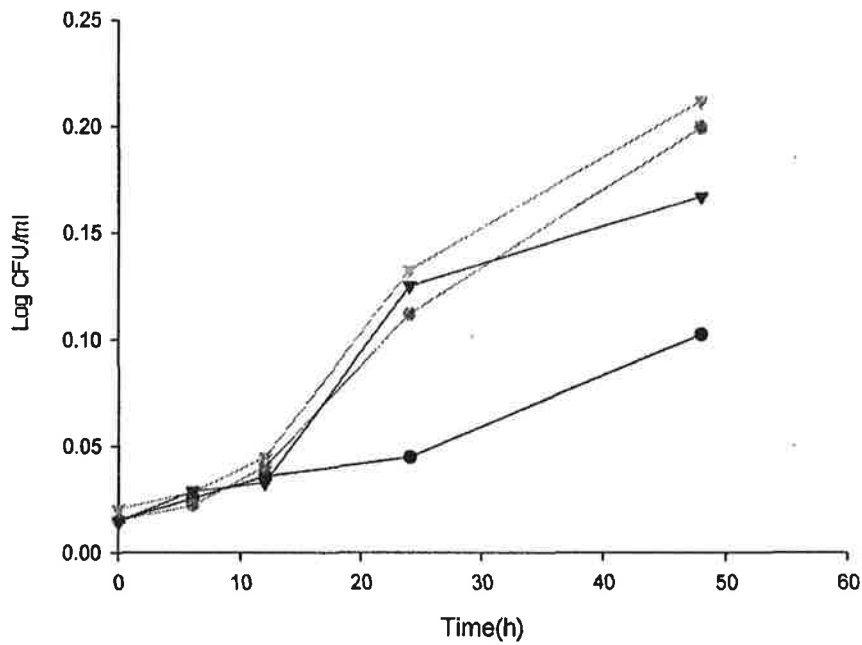


Fig. 2.21. Growth of *Aspergillus niger* in the culture broths prepared with Bacto malt extract <B.M>, Chilkab malt extract <C.M>, Hanwool malt extract <H.M> and blackstrap molasses<M>. The cultures were grown at $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48 h.

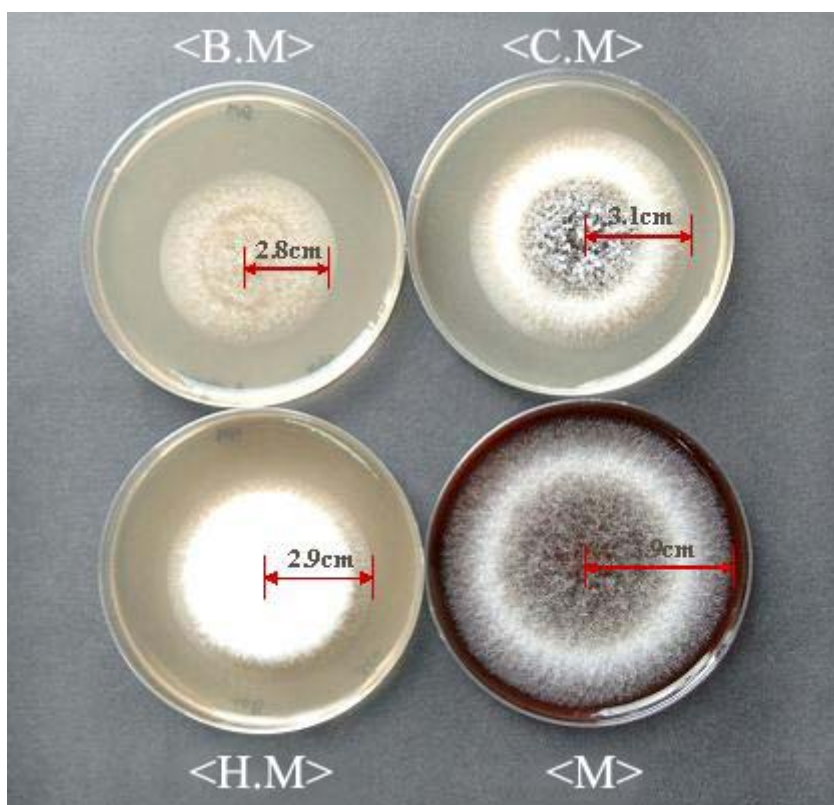


Fig. 2.22. Colony morphologies of *Aspergillus niger* on the agar plates which made of Bacto malt extract <B.M>, Chilkab malt extract <C.M>, Hanwool malt extract <H.M> and blackstrap molasses <M>. The cultures were grown at $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 72 h.

8. 토양미생물 균체의 고정화·캡슐화

가. 미세캡슐화 공정

캡슐화 재료로서 alginate(acid/sodium/calcium forms), locust bean gum, carrageenan/ λ -carrageenan, CMC 등의 물성을 비교하고, 미생물 균체를 2% 다당류 용액과 1:1 혼합하여

▶ 노즐/미량펌프를 이용하여 CaCl_2 용액 중으로 분출시킴으로서 수축 응고시키고 이를 그대로 동결건조하는 방법<Microcapsule-1>,

▶ 이를 더욱 1% chitosan으로 코팅한 다음 동결건조하는 등의 방법<Microcapsule-2>

▶ 직접 분무건조하는 방법<Microcapsule-3>

에 따라 Microcapsule-1, 2 및 3를 제조하였으며, 외관을 사진으로 나타내었다.

<Fig. 2.23 참조>.

나. 미세캡슐의 특성

실험재료 및 방법에 기술한바와 같이 3가지 방법에 따라 Camscope (Semtech Vision, USA)로 캡슐의 입자크기를 측정된 결과 <1> $1.56 \pm 0.14 \text{ mm}$; <2> $1.58 \pm 0.1 \text{ mm}$; <3> $8.56 \pm 0.82 \mu\text{m}$ 이었으며<Fig. 2.24 참조>, 그 표면의 조질은 <Fig. 2.25>에 나타낸 바와 같다.

다. 캡슐화 공정중 생균수의 변화

캡슐 제조공정중 미생물의 생균수의 변화는 크지 않았으며, <Microcapsule-3>의 분무건조에 의한 사멸율이 80.1%로 비교적 높은 편이었다. <Table 2.16 참조>

라. 미세캡슐화 균체의 보존기간

<Microcapsule-1, 2 및 3>에 대하여 각각 암소에서 25℃ 및 35℃에 보관하면서 생균수의 변화를 조사하였으며 그 결과를 <Table 2.16>에 나타내었다.

이를 기초로 유통기간 즉 보존 유효기간을 추산하면 <Microcapsule-2>가 가장 길어서 생균수의 최저한계점을 1×10^8 c.f.u./g으로 설정한 경우에도 25℃에서 30개월로 계산되었다.<Table 2.17 참조> 한편 <Microcapsule-3>의 경우에는 앞의 <나>항에서 기술한 바와 같이 분무건조 공정 중 사멸율이 높기 때문에 유통기간 설정실험의 출발점에서의 생균수가 <Microcapsule-1 및 2> 보다 낮았고 이로 인하여 유통기간이 짧게 산정되었다. 따라서 <Microcapsule-3>는 분무건조 공정 중 사멸율을 감안하여 캡슐화 균체의 농도를 그 만큼 높여서 분무건조 공정을 거치도록 해야 할 것이다.

Table 2.15. Properties of the granular fertilizers made of inorganic materials and microorganisms, in comparison with the microcapsules

| Mixed-type microcapsule | Size in diam. (mm/ μ m) | Hardness (g) | Remarks |
|-------------------------|-----------------------------|------------------|---------|
| Microcapsule-1 | 1.56 \pm 0.14 mm | 152.7 \pm 41.4 | |
| Microcapsule-2 | 1.58 \pm 0.10 mm | 170.4 \pm 39.8 | |
| Microcapsule-3 | 8.56 \pm 0.82 μ m | ND | |

Size of the capsules in diameter were determined by a Camscope (Semtech Vision, USA). Hardness of the granules and capsules were determined by a rheometer (TA-XT2i Texture Analyser), and presented as the force (g) in compression. Conditions were: pre test speed, 3.0 mm/s; test speed, 2.0 mm/s; post test speed, 2.0 mm/s; and distance, 75%.

Table 2.16. Changes in viabilities during encapsulation and preservation

| Sample | Before encapsulation | After encapsulation | After storage* for 6 months | After storage* for 12 months |
|----------------|----------------------|---------------------|--|--|
| Microcapsule-1 | 5.9×10^8 | 5.6×10^8 | 4.8×10^8 2.8×10^8 | 3.1×10^8 1.6×10^8 |
| Microcapsule-2 | 5.9×10^8 | 4.3×10^8 | 4.1×10^8 3.7×10^8 | 3.9×10^8 2.2×10^8 |
| Microcapsule-3 | 5.9×10^8 | 1.1×10^8 | 9.3×10^7 6.2×10^7 | 5.4×10^7 8.5×10^6 |

* The samples were stored at 25/35°C in the dark and dry conditions.

Table 2.17. Shelf life of the microcapsules calculated by Q_{10} value

| Sample | Limit viability | Shelf-life (mon) | | | Q_{10} |
|----------------|-----------------|------------------|-------|-------|----------|
| | | 25°C | 30°C | 35°C | |
| Microcapsule-1 | 1×10^7 | 27.12 | 20.65 | 15.70 | 1.73 |
| | 1×10^8 | 22.80 | 17.20 | 13.00 | 1.75 |
| Microcapsule-2 | 1×10^7 | 38.31 | 26.59 | 18.48 | 2.07 |
| | 1×10^8 | 30.00 | 20.61 | 14.16 | 2.12 |
| Microcapsule-3 | 1×10^7 | 22.21 | 16.27 | 11.93 | 1.86 |
| | 1×10^8 | 2.93 | 1.94 | 1.29 | 2.27 |

Limit numbers of viable cells per gram of the microcapsules were set at 1×10^7 <Upper> and at 1×10^8 c.f.u./g <Lower>.

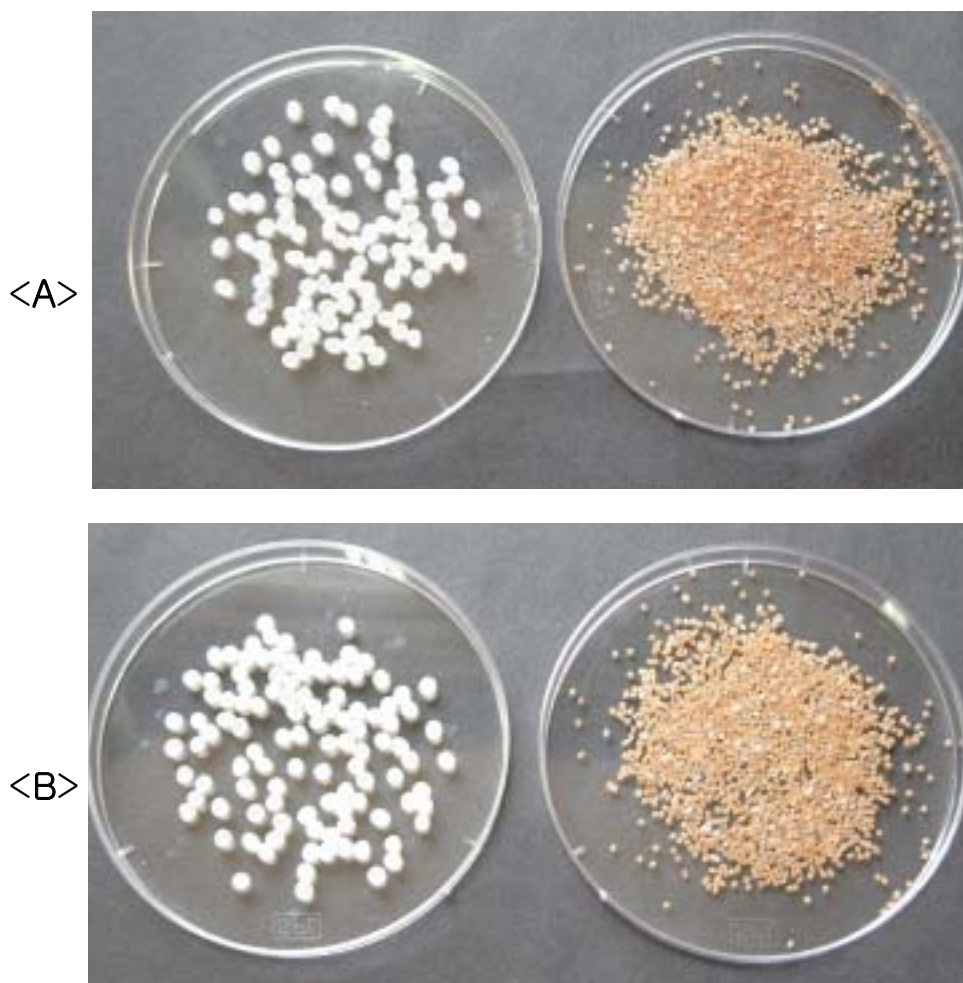


Fig. 2.23. Apparent morphology of Microcapsule-1 <A> and -2 . <Left> before drying, <Right> after drying



Fig. 2.24. Size measurements for the Microcapsule-1<A>, -2 and -3<C>.

Apparent diameters were determined by Camscope (Semtech Vision, USA) :
 1.56 ± 0.14 mm for <A>; 1.58 ± 0.1 mm for ; 8.56 ± 0.82 μm for <C>.

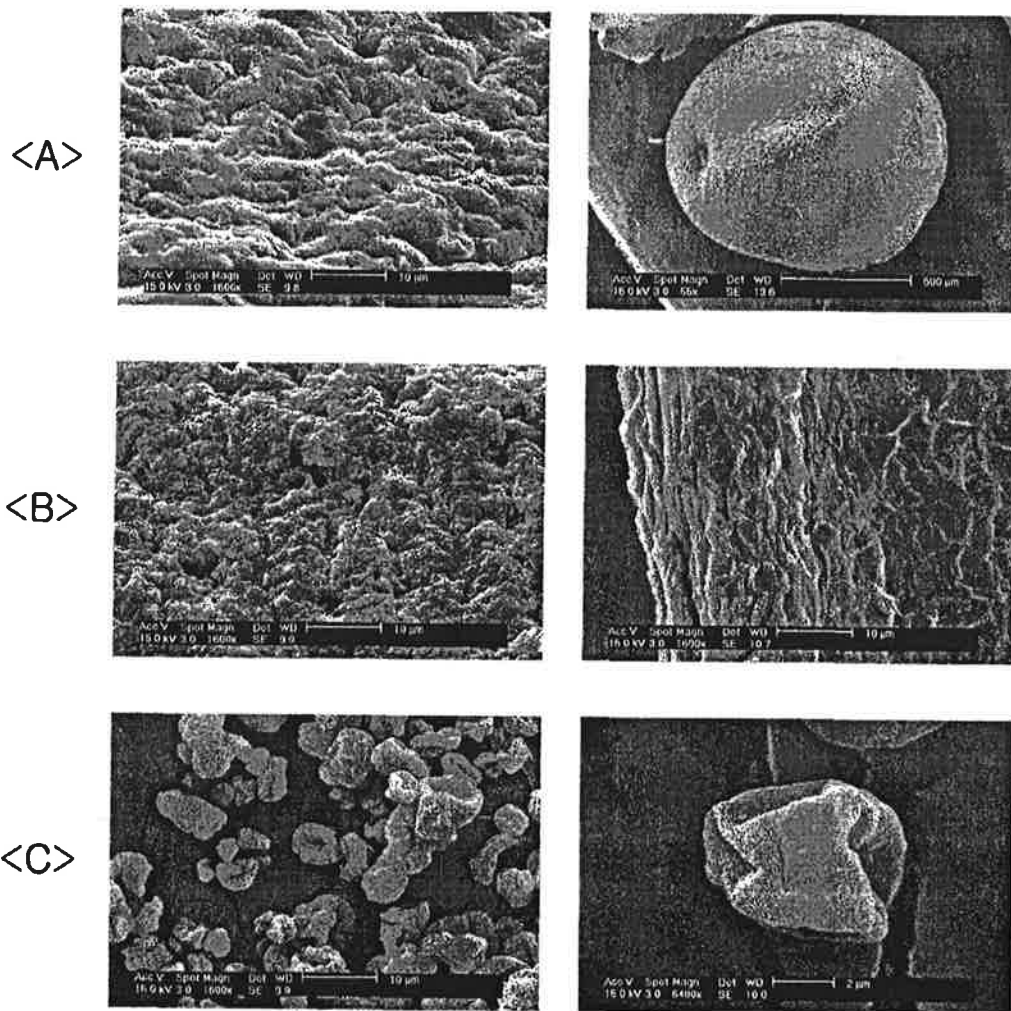


Fig. 2.25. Morphologies of the Microcapsule-1<A>, -2 and -3<C>.

<A> Surface of the Microcapsule-1 which prepared by sodium alginate encapsulation and dropping into calcium chloride soln.

 Surface of the Microcapsule-2 which prepared by sodium alginate encapsulation-chitosan coating.

<C> Surface of the Microcapsule-3 which prepared by sodium alginate encapsulation and spray drying.

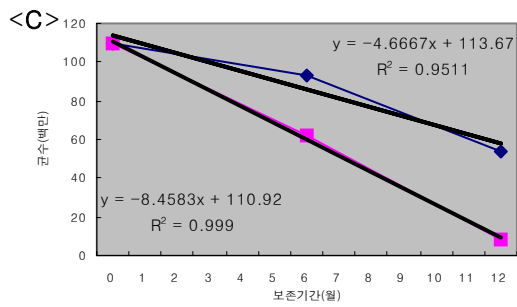
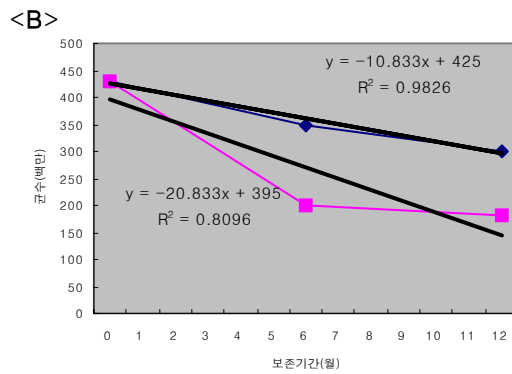
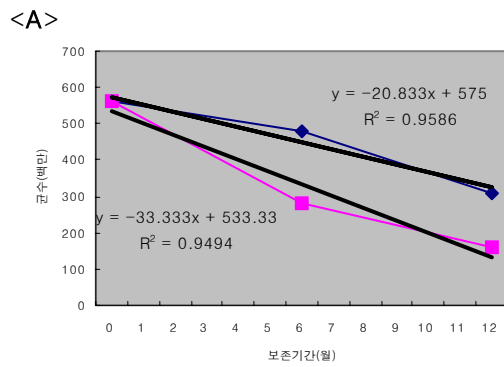


Fig. 2.26. Calculation of Q10 values by the rate of reduction in bacterial counts during storage at 25 and 35°C.

<A> Microcapsule-1, Microcapsule-2, <C> Microcapsule-3

9. 충전제-미생물 혼합과립

각종 무기재료를 원료혼합기에 넣어 충분히 혼합하고, 미생물 배양액을 무기 재료에 대하여 약 20% 첨가하여 고르게 반죽하였다. 이를 1차 과립기로 이송시켜 처리한 다음 다시 2차 과립장치에서 구형의 과립을 성형시켰으며, 이렇게 완성된 것은 vat에 담아서 45°C의 열풍건조기에 넣어 건조하였다. 체를 통과시켜 입자의 크기에 따라 대중소의 과립으로 분류하였다.

가. 무기충전제-미생물 혼합과립

Pilot-scale 과립성형기로 사문석, 견운모, 제올라이트를 원료로 하여 2가지 입자크기 <L: 3.60±0.35mm in diam/ S: 1.22±0.38mm in diam)로 입상의 제올라이트-미생물 혼합제제를 제조하였고, 또한 사문석, 납석, 제올라이트, 인광석을 원료로 하여 미생물 혼합과립비료를 제조하였다. 후자는 입자의 크기에 따라 <L: 3.60± 0.35 mm/ M : 3.60±0.35 mm/ S: 1.22±0.38mm in diam)로 구분하였다. <Fig. 2.27 및 2.28>

나. 혼합과립의 특성

이들 혼합과립의 형태를 그림으로 나타내었으며, <Fig. 2.27>에서 보는 바와 같이 그 단면의 조직에 있어서 종류별 간에 차이는 없었다. 여러 배합비율을 비교하여 적정비율을 찾아서 실험하였으므로 사문석, 견운모, 제올라이트를 원료로 한 입상의 제올라이트-미생물 혼합제제에 비하여 사문석, 납석, 제올라이트, 인광석을 원료로 하여 제조한 미생물 혼합과립비료가 평균적으로 경도가 높았다. <Table 2.18>에 나타낸 바와 같이 전자의 90.5±52.2~92.3±49.2 g에 비하여 후자의 경우에는 102.4±43.8~112.6±63.9 g이었으며, 이들은 모두 전향에서 제조한 미세캡슐의 152.7± 41.4~170.4 ± 39.8 보다는 경도가 낮았다.

그러나 이들 혼합과립은 미세캡슐과는 달리 쉽게 수분을 흡수하여 분산되는

성질을 나타내었다. 혼합과립은 물에 담그면 30 s 이내에 분산 현탁되므로 재배작물에 직접 분무하거나 관수파이프로 관주가 가능하다. 한편 미세캡슐화 제제는 경도가 높은 반면에 물에 침지하여도 쉽게 분산되지 않으므로 분무 또는 관주용으로는 적합하지 않다. 그리고 재배토양에 시용하여도 7 d 경과하여야 분산되기 시작하여 28~35 d까지 서서히 폴리프로 서방성 미생물제제라고 볼 수 있다.

다. 혼합과립의 보존기간

혼합과립에 대하여 각각 암소에서 25°C 및 35°C에 보관하면서 생균수의 변화를 조사하였으며 그 결과를 <Table 2.19>에 나타내었고, 이를 기초로 유통기간 즉 보존 유효기간을 추산하여 <Table 2.20>에 정리하였다.

혼합과립 간에 현저한 차이는 없으나 제올라이트-미생물 혼합제제보다도 무기충전제-미생물 혼합제제가 유통기간이 다소 길어서 생균수의 최저한계점을 1×10^7 c.f.u./g으로 설정한 경우 25°C에서 12개월로 계산되었다.

Table 2.18. Properties of the granular fertilizers made of inorganic materials and microorganisms, in comparison with the microcapsules

| Mixed-type granule/capsule | Size in diam. (mm) | Hardness (g) | Remarks |
|----------------------------------|--------------------|--------------|---------|
| Zeolite/ Microorganism <L> | 3.6 ± 0.35 | 92.3 ± 49.2 | |
| <S> | 1.2 ± 0.38 | 90.5 ± 52.2 | |
| Inorganics/ Microorganism <L> | 4.8 ± 0.61 | 112.6 ± 63.9 | |
| <M> | 3.6 ± 0.36 | 108.1 ± 23.7 | |
| <S> | 2.2 ± 0.45 | 102.4 ± 43.8 | |
| Microcapsule-1 | 1.56±0.14 | 152.7 ± 41.4 | |
| Microcapsule-2 | 1.58±0.10 | 170.4 ± 39.8 | |

Notes refer to Table 2.16.

Table 2.19. Changes in viabilities during granulation and preservation

| Sample | Before granulation | After granulation | After storage* for 6 months | After storage* for 12 months |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|--|--|
| Zeolite/ Microorganism<L> | 4.0×10^8 | 2.7×10^7 | 1.8×10^7 9.5×10^6 | 7.9×10^6 6.6×10^6 |
| Zeolite/ Microorganism<S> | 4.0×10^8 | 3.3×10^7 | 1.2×10^7 1.1×10^7 | 8.1×10^6 4.2×10^6 |
| Inorganics/ Microorganism<L> | 3.5×10^8 | 8.8×10^7 | 2.6×10^7 2.2×10^7 | 2.4×10^7 1.5×10^7 |
| Inorganics/ Microorganism<M> | 3.5×10^8 | 9.1×10^7 | 3.2×10^7 1.9×10^7 | 1.7×10^7 9.8×10^6 |
| Inorganics/ Microorganism<S> | 3.5×10^8 | 8.3×10^7 | 2.7×10^7 2.5×10^7 | 2.1×10^7 2.0×10^7 |

* The samples were stored at 25/35°C in the dark and dry conditions.

Table 2.20. Shelf life of the granules calculated by Q_{10} value

| Sample | Shelf-life (mon) | | | Q_{10} |
|---------------------------------|------------------|-------|-------|----------|
| | 25°C | 30°C | 35°C | |
| Zeolite/ Microorganism<L> | 10.80 | 9.62 | 8.57 | 1.26 |
| Zeolite/ Microorganism<S> | 9.71 | 9.11 | 8.53 | 1.14 |
| Inorganics/ Microorganism<L> | 12.75 | 11.97 | 11.21 | 1.14 |
| Inorganics/ Microorganism<M> | 11.95 | 11.17 | 10.42 | 1.15 |
| Inorganics/ Microorganism<S> | 12.52 | 12.34 | 12.22 | 1.02 |

Limit numbers of viable cells per gram of the granules were set at 1×10^7 c.f.u./g.

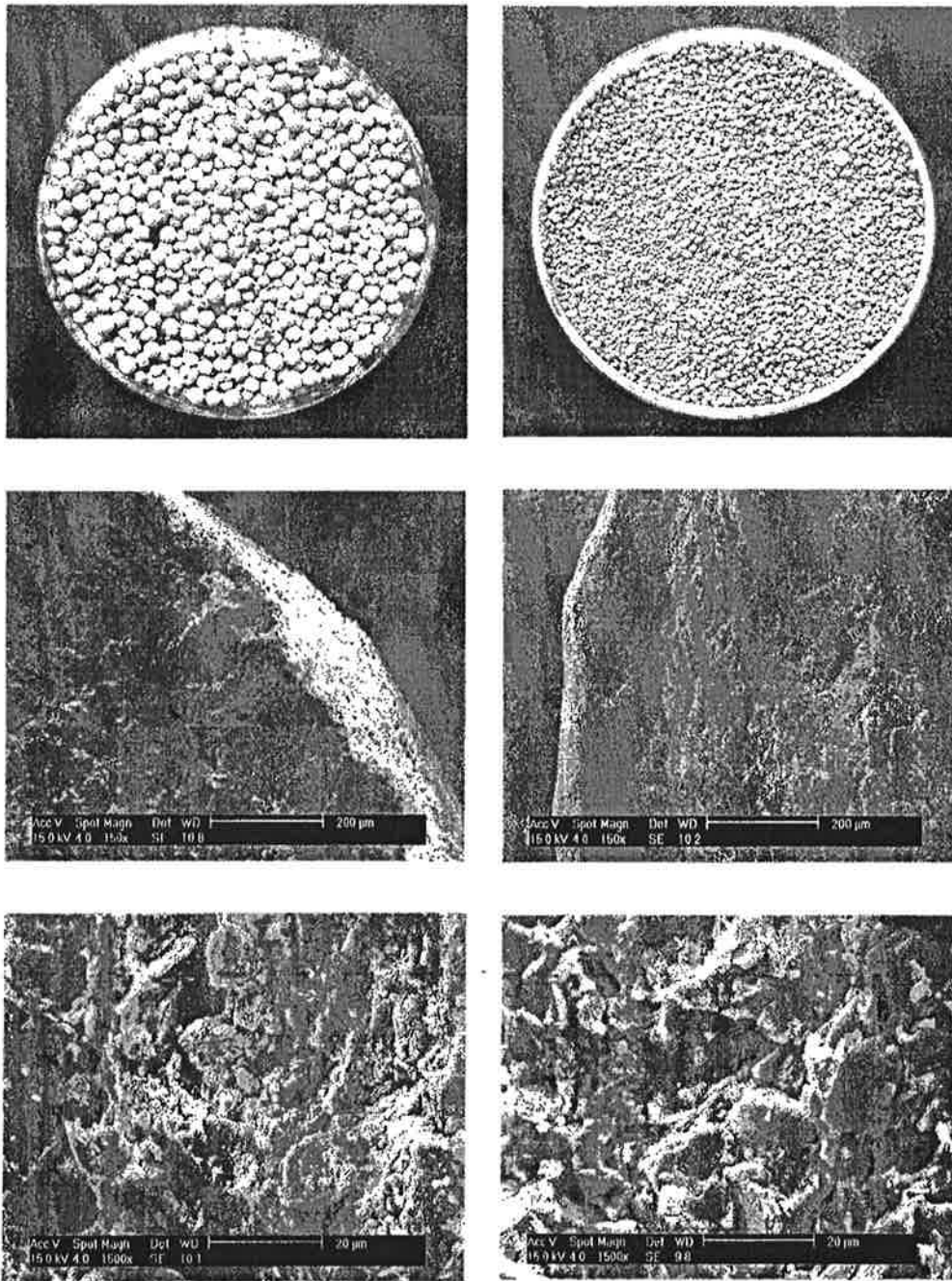


Fig. 2.27. Two types of the zeolite-microorganism granules.
 <Left> Average size of the granules with 3.6 ± 0.35 mm in diameter.
 <Right> Average size of the granules with 1.2 ± 0.38 mm in diameter.

<A>





<C>



Fig. 2.28. Mixed-type granular fertilizer made of inorganic materials and microorganisms.

<A> large size, medium size, and <C> small size granules

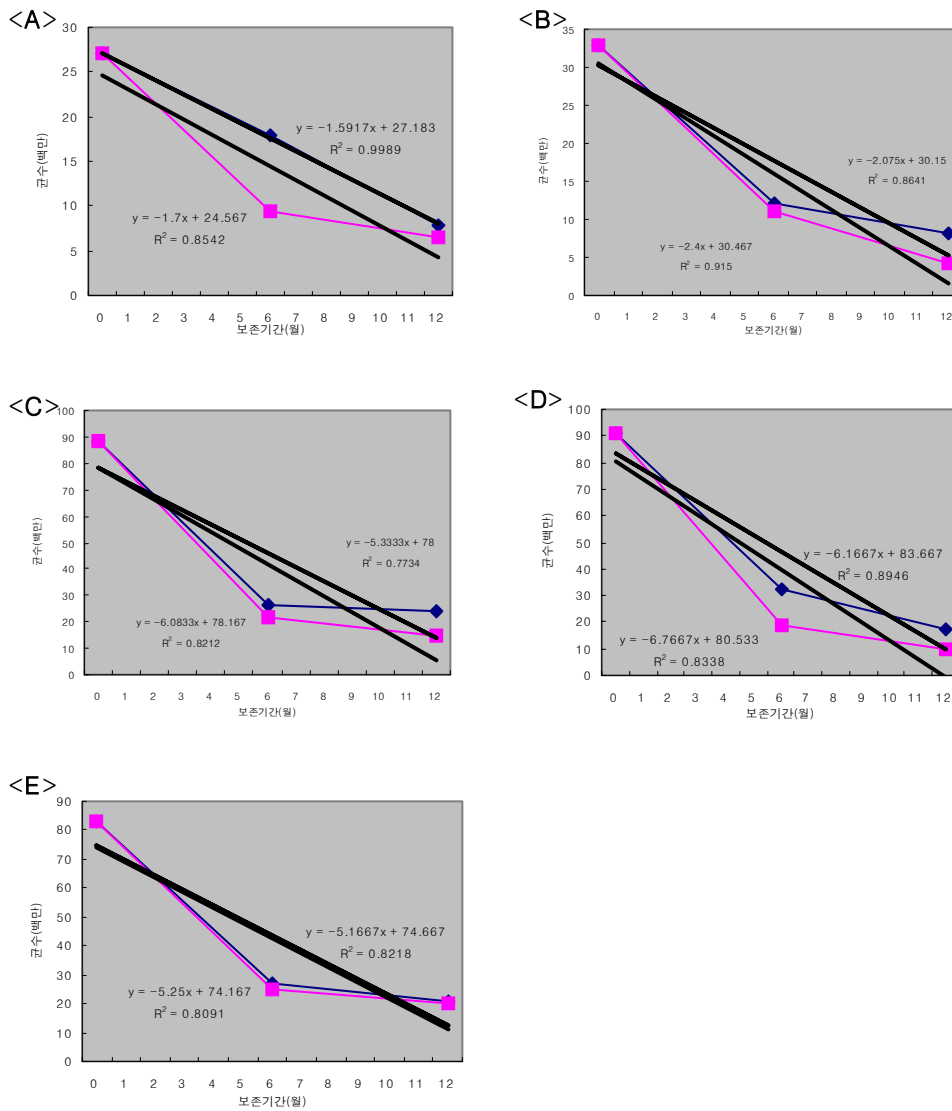


Fig. 2.29. Calculation of Q10 value of the granules by the rate of reduction in bacterial counts during storage at 25 and 35°C.

- <A> Zeolite/Microorganism-L, Zeolite/Microorganism-S,
- <C> Inorganics/Microorganism-L, <D> Inorganics/Microorganism-M,
- <E> Inorganics/Microorganism-S

10. 충전제-미생물 혼합과립의 비효·비효

가. 제올라이트-미생물 혼합과립

전항에서 제조한 제올라이트-미생물혼합제제로 작물재배시험을 통하여 비효 및 비효를 구명하였다. 시설하우스 (대전광역시 유성구중세동 317번지) 사양토에서 처리구당 면적 15 m² (1.5×10 m)로 임의배치하여 3반복으로 상추 (품종: 적치마)를 재배하였으며, 상추의 생육현황과 수량을 조사하여 비교하고, 재배토양의 이화학성 및 미생물의 변화양상을 조사하였다.

제올라이트-미생물혼합제제 중 보증성분 및 유해성분의 분석결과는 <Table 2.21 및 2.22>에 나타내었다. 보증성분인 붕소는 0.07%, 망간은 0.12%로 비료공정 규격에 부합되었으며, 유해성분은 검출되지 않았다.

재배토양의 토성은 사양토였으며 pH 6.3으로 약산성이었고 전기전도도(EC) 2.22 dS/m, 질소함량 0.24%, 유효인산 862 mg/kg으로 다소 높았다. 치환성양이온은 칼슘함량이 5.16 cmol_c/kg, 고토 2.34 cmol_c/kg, 가리 2.08 cmol_c/kg 등 이었다. 토양의 화학성 변화를 살펴보면, 전기전도도가 약간 증가하는 경향을 보였고, 총 질소와 유기물 등은 약간 감소하였으나 작물재배 시험 후 전체 처리구간에 토양의 화학적 특성에 큰 차이는 발견할 수 없었다. <Table 2.23 및 2.24 참조>

엽장의 경우 대조구(멸균구)에 비해 공시비료(충진제-미생물과립제)의 추천반량, 적량 및 배량처리구에서 3~9%의 증가효과를 보였고, 엽폭도 3~9%의 증가효과를 보였다. 그러나 생육결과에 따른 Duncan의 신다중 검정 결과 5% 유의 수준에서 각 처리구는 대조구(멸균구)와 유의성이 인정되지 않았다.

엽록소 함량을 분석함 결과 공시비료의 추천반량 및 적량, 배량처리구에서 대조구(멸균구)에 비해 2~5%정도 높게 나타났으나, 대조구(멸균구)와 각 처리구의 유의성은 나타나지 않았다.

상추의 수확량과 개체중량에서 공시비료의 추천반량 및 적량, 배량처리구가 대조구(멸균구)에 비해 4~12%, 6~18%의 증수효과를 보였으며, 수확량과 개체중량의 통계처리 결과 대조구(멸균구)와 5% 유의수준에서 추천적량 및 배량구에서 각각 유의성이 인정되었다. <Table 2.26 참조>

결론적으로, 전 시험기간을 통하여 공시비료의 시비에 따른 상추의 피해는 발

견되지 않았으며, 공시비료의 처리에 따른 상추의 생육 상태는 대조구(멸균구)보다 처리량에 따라 엽장과, 엽폭 등이 증가되었고, 수확량 및 개체 중량은 추천 적량 및 배양처리구에서 증수되었다.

Table 2.21. 공시원료의 보증성분 (수용성)

| 구 분 | 붕 소 | 망 간 | 비 고 |
|------|---------|--------|-----|
| | % | | |
| 공시원료 | 0.07 | 0.12 | 적 합 |
| 공정규격 | 0.05%이상 | 0.1%이상 | |

Table 2.22. 공시원료의 유해성분

| 구 분 | 비소 | 니켈 | 크롬 | 아질산 | 티탄 | 카드뮴 | 아황산 | 비 고 |
|------|-------|----|----|-----|----|-----|-----|-----|
| | mg/kg | | | | | | | |
| 공시원료 | ND* | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 적 합 |

*, Not detected (검출되지 않음)

Table 2.23. 재배토양의 이화학적 특성

| 처 리 구 | pH (1:5) | EC | T-N | T-C | Ava.- P ₂ O ₅ | Ex.-cations (cmol _c /kg) | | | | CEC |
|-------|-------------|------|------|------|--|--|------------------|----------------|-----------------|-----------------------|
| | | dS/m | % | | mg/kg | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | K ⁺ | Na ⁺ | cmol _c /kg |
| 시험전 | 6.3 | 2.22 | 0.24 | 3.52 | 862 | 5.16 | 2.34 | 2.08 | 1.01 | 14.1 |

Table 2.24. 시험전후 재배토양의 이화학적 특성

| 처 리 구 | pH (1:5) | EC dS/m | T-N % | T-C % | Ava.- P ₂ O ₅ mg/kg | Ex.-cations (cmol _c /kg) | | | | CEC cmol _c /kg |
|----------|-------------|------------|----------|----------|---|--|------------------|----------------|-----------------|------------------------------|
| | | | | | | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | K ⁺ | Na ⁺ | |
| 시험전 | 6.3 | 2.22 | 0.24 | 3.52 | 862 | 5.16 | 2.34 | 2.08 | 1.01 | 14.1 |
| 관행구 | 6.0 | 2.51 | 0.19 | 3.21 | 761 | 4.93 | 2.01 | 1.79 | 1.10 | 13.3 |
| 시 멸균구 | 6.0 | 2.46 | 0.20 | 3.22 | 768 | 4.94 | 2.02 | 1.77 | 1.11 | 13.3 |
| 협 반량구 | 6.1 | 2.48 | 0.21 | 3.24 | 764 | 4.96 | 2.00 | 1.77 | 1.07 | 13.5 |
| 후 적량구 | 6.1 | 2.45 | 0.20 | 3.25 | 768 | 5.00 | 2.01 | 1.80 | 1.08 | 13.6 |
| 배량구 | 6.0 | 2.46 | 0.21 | 3.24 | 765 | 5.00 | 2.03 | 1.81 | 1.10 | 13.5 |

Table 2.25. 제올라이트-미생물 혼합과립 비료가 상추의 생육에 미치는 효과

| 처 리 구 | 엽 장 | | 엽 폭 | | Chlorophyll 함량 | |
|----------|--------------------|-----|-------------------|-----|-----------------------|-----|
| | cm | 지수 | cm | 지수 | mg/100cm ² | 지수 |
| 관행구 | 16.5 ^{a*} | 98 | 11.8 ^a | 99 | 2.20 ^a | 99 |
| 대조구(멸균구) | 16.8 ^a | 100 | 11.9 ^a | 100 | 2.22 ^a | 100 |
| 추천 반량처리구 | 17.4 ^a | 103 | 12.2 ^a | 103 | 2.27 ^a | 102 |
| 추천 적량처리구 | 18.0 ^a | 107 | 12.5 ^a | 106 | 2.31 ^a | 104 |
| 추천 배량처리구 | 18.3 ^a | 109 | 12.9 ^a | 109 | 2.34 ^a | 105 |

Table 2.26. 제올라이트-미생물 혼합과립 비료가 상추의 수확량에 미치는 효과

| 처 리 구 | 수확량 | | 개체중량 | |
|----------|--------------------|-----|--------------------|-----|
| | (kg/100주) | 지수 | (g/10EA) | 지수 |
| 관행구 | 2.49 ^b | 99 | 53.7 ^b | 99 |
| 대조구(멸균구) | 2.52 ^b | 100 | 54.5 ^b | 100 |
| 추천 반량처리구 | 2.63 ^{ab} | 104 | 57.6 ^{ab} | 106 |
| 추천 적량처리구 | 2.78 ^a | 110 | 62.2 ^a | 114 |
| 추천 배량처리구 | 2.82 ^a | 112 | 64.2 ^a | 118 |

*DMRT at 5% level

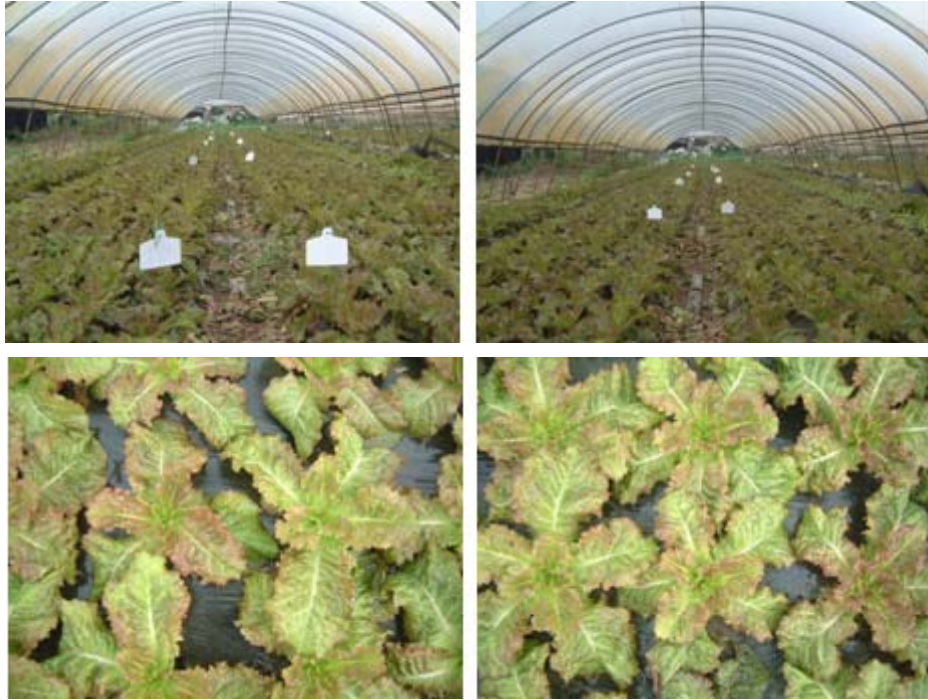


Fig. 2.30. 제올라이트-미생물 혼합과립 비료의 상추 재배시험
시설하우스 (대전광역시 유성구중세동 317번지) 사양토에서의 적치마 재배

나. 무기재료-미생물 혼합과립< I >

입상의 무기충전재-미생물혼합제제에 대하여 수목재배 시험으로서는 재스민 묘목을 대상으로 유리온실 <대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교 농업생명과학대학 부속농장>에서 인공배양토를 사용하여 포트시험 하였다.

과립의 평균크기 4.8 ± 0.61 mm in diam.의 대립을 사용하여 시험하였으며, 보증 성분 및 유해성분의 분석결과는 <Table 2.27 및 2.28>에 나타내었다. 보증성분인 붕소는 0.07%, 망간은 0.12%로 비료공정규격에 부합되었으며, 유해성분은 검출되지 않았다.

토양의 화학성 변화를 살펴보면, 시험 전 토양은 사양토로 인공배양토를 만들기 전 토양으로서 우리나라 일반 산림 토양 pH 5.48, 유효인산 25.6 mg/kg 보다 약간 높은 토양이었으나, 자스민 생육에 적당한 토양이었다. 시험 전·후 토양의 변화를 살펴보면 pH는 약간 감소하였고, 전기전도도(EC) 유기물과 유효인산 등은 약간 증가였다. 그러나 재배시험 후 전체 처리구간에 토양의 화학적 특성에 큰 차이는 발견할 수 없었다. <Table 2.29 참조>

자스민 정식 후 15, 30일째 생육을 살펴보면, 대조구(멸균구)에 비해 공시비료(충진제-미생물과립제)의 추천반량, 적량 및 배양처리구에서 초장과 근장 등이 증가하였고, 생중량도 3~10%정도의 증가효과를 보였다. 그러나 생육결과에 따른 Duncan의 신다중 검정 결과 5% 유의 수준에서 각 처리구는 대조구(멸균구)와 유의성이 인정되지 않았다.

자스민 정식 50일 후 최종생육 조사결과 공시비료(충진제-미생물과립제)의 추천반량 및 적량, 배양처리구에서 대조구(멸균구)에 비해 초장 4~11%, 근장 7~12%, 경경 4~11%정도 높게 나타났으며, 생중량 지상부, 지하부 모두대조구(멸균구) 보다 7~17%, 7~15% 증가하였다. 생중량 지상부, 지하부의 통계처리 결과 대조구(멸균구)와 5% 유의수준에서 추천적량 및 배양구에서 각각 유의성이 인정되었다. <Table 2.30 참조>

결론적으로, 전 시험기간을 통하여 공시비료(충진제-미생물과립제)의 시비에 따른 자스민 묘목의 피해는 발견되지 않았으며, 공시비료(충진제-미생물과립제)의 처리에 따른 자스민 묘목의 생육 상태는 대조구(멸균구)보다 처리량에 따라 초장과, 근장 등이 증가되었고, 생중량 지상부 및 지하부도 증수되었다.

Table 2.27. 공시원료의 보증성분 (수용성)

| 구 분 | 붕 소 | 망 간 | 비 고 |
|------|---------|--------|-----|
| | % | | |
| 공시원료 | 0.07 | 0.12 | 적 합 |
| 공정규격 | 0.05%이상 | 0.1%이상 | |

Table 2.28. 공시원료의 유해성분

| 구 분 | 비소 | 니켈 | 크롬 | 아질산 | 티탄 | 카드뮴 | 아황산 | 비 고 |
|------|-------|----|----|-----|----|-----|-----|-----|
| | mg/kg | | | | | | | |
| 공시원료 | ND* | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 적 합 |

*, Not detected (검출되지 않음)

Table 2.29. 재배토양의 이화학적 특성

| 처 리 구 | pH (1:5) | EC | T-N | T-C | Ava.- P ₂ O ₅ mg/k g | Ex.-cations (cmol _c /kg) | | | | CEC | |
|-------------|-------------|------|------|------|---|--|------------------|----------------|-----------------|-----------------------|------|
| | | dS/m | % | | | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | K ⁺ | Na ⁺ | cmol _c /kg | |
| 시험전 | 6.3 | 2.22 | 0.24 | 3.52 | 862 | 5.16 | 2.34 | 2.08 | 1.01 | 14.1 | |
| 관행구 | 6.3 | 2.05 | 0.08 | 2.21 | 267 | 5.80 | 2.13 | 1.79 | 1.32 | 12.2 | |
| 시 험 후 | 멸균구 | 6.3 | 1.96 | 0.09 | 2.32 | 270 | 6.04 | 2.15 | 1.77 | 1.30 | 12.3 |
| | 반량구 | 6.4 | 2.00 | 0.08 | 2.34 | 274 | 6.00 | 2.05 | 1.77 | 1.30 | 12.5 |
| | 적량구 | 6.5 | 1.85 | 0.10 | 2.45 | 280 | 6.10 | 2.15 | 1.80 | 1.29 | 12.6 |
| 배량구 | 6.5 | 1.91 | 0.11 | 2.50 | 290 | 6.13 | 2.08 | 1.81 | 1.27 | 12.5 | |

Table 2.30. 공시작물의 생육조사 결과

| 처리구 | 초장 | 근장 | 경경 | 엽록소함량 | 생증량 | |
|----------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| | | | | | 지상부 | 지하부 |
| | cm | | mm | mg/100cm ² | g/ea | |
| 관행구 | 35.0 ^a | 11.0 ^a | 5.15 ^a | 4.40 ^a | 24.4 ^a | 5.60 ^a |
| | 38.6 ^a | 16.1 ^a | 5.29 ^a | 4.78 ^a | 30.4 ^a | 7.50 ^a |
| | 40.7 ^a | 22.8 ^a | 5.53 ^a | 5.14 ^a | 37.9 ^b | 99 |
| 관행(별균구) | 35.3 ^a | 11.0 ^a | 4.99 ^a | 4.72 ^a | 24.3 ^a | 5.67 ^a |
| | 38.7 ^a | 16.4 ^a | 5.26 ^a | 4.86 ^a | 30.5 ^a | 7.67 ^a |
| | 40.8 ^a | 23.3 ^a | 5.52 ^a | 5.13 ^a | 38.4 ^b | 100 |
| 추천 반량처리구 | 37.0 ^a | 12.3 ^a | 5.01 ^a | 4.72 ^a | 25.9 ^a | 6.27 ^a |
| | 40.8 ^a | 17.4 ^a | 5.53 ^a | 4.94 ^a | 31.9 ^a | 7.97 ^a |
| | 42.6 ^a | 25.0 ^a | 5.75 ^a | 5.31 ^a | 40.9 ^{ab} | 107 |
| 추천 적량처리구 | 39.0 ^a | 12.3 ^a | 5.36 ^a | 5.00 ^a | 26.5 ^a | 6.37 ^a |
| | 42.3 ^a | 17.6 ^a | 5.66 ^a | 5.10 ^a | 33.7 ^a | 8.47 ^a |
| | 45.0 ^a | 25.5 ^a | 6.05 ^a | 5.43 ^a | 43.3 ^a | 113 |
| 추천 배량처리구 | 39.7 ^a | 12.6 ^a | 5.47 ^a | 5.09 ^a | 27.2 ^a | 6.40 ^a |
| | 42.3 ^a | 17.9 ^a | 5.73 ^a | 5.17 ^a | 34.0 ^a | 8.43 ^a |
| | 45.3 ^a | 26.2 ^a | 6.11 ^a | 5.54 ^a | 45.0 ^a | 117 |

*DMRT at 5% level

※ 생육조사결과 : <상>재식후 15일째, <중>재식후 30일째, <하>재식후 50일째.



Fig. 2.31. 무기충전제-미생물 혼합과립 비료<1>의 수목재배시험

유리온실 <대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교 농업생명과학대학 부속농장> 인공배양토에서의 재스민 포트재배시험하우스 (대전광역시 유성구중세동 317

다. 무기재료-미생물 혼합과립<II>

전항에서 제조한 무기충전재-미생물혼합제제 소립(과립의 평균직경 2.3 ± 0.45 mm)으로 작물재배시험을 통하여 비혜 및 비효를 구명하였다. 시설하우스 (대전광역시 유성구중세동 125-1번지) 사양토에서 처리구당 면적 15 m^2 ($1.5 \times 10 \text{ m}$)로 임의배치하여 3반복으로 상추 (품종: 적치마)를 재배하였으며, 상추의 생육현황과 수량을 조사하여 비교하고, 재배토양의 이화학성 및 미생물의 변화양상을 조사하였다.

충전재-미생물혼합제제(소립) 중 보증성분 및 유해성분의 분석결과는 대립의 것과 동일하였다. 보증성분인 붕소는 0.07%, 망간은 0.12%로 비료공정규격에 부합되었으며, 유해성분은 검출되지 않았다.

시험 전·후 토양의 화학성 변화를 살펴보면, pH와 총 질소, 유기물 유효인산 등 대부분이 약간 감소하는 경향을 보였고, 전기전도도(EC)는 약간 증가하였으나 작물재배 시험 후 전체 처리구간에 토양의 화학적 특성에 큰 차이는 발견할 수 없었다. <Table 2.31 참조>

공시비료 시비에 따른 생육조사결과 엽장의 경우 대조구(멸균구)에 비해 공시과립비료의 추천반량, 적량 및 배량처리구에서 5~9%의 증가효과를 보였고, 엽폭도 2~7%의 증가 효과를 보였다. 그러나 생육결과에 따른 Duncan의 신다중 검정결과 5% 유의 수준에서 각 처리구는 대조구(멸균구)와 유의성이 인정되지 않았다.

엽록소 함량의 분석결과 공시 과립비료의 추천반량 및 적량, 배량처리구에서 대조구(멸균구)에 비해 2~6%정도 높게 나타났으나, 대조구(멸균구)와 각 처리구의 유의성은 나타나지 않았다. <Table 2.32 참조>

상추의 수확량과 개체중량에서 공시 과립비료의 추천반량 및 적량, 배량처리구가 대조구(멸균구)에 비해 6~14%, 6~16%의 증수효과를 보였으며, 수확량과 개체중량의 통계처리 결과 대조구(멸균구)와 5% 유의수준에서 추천적량 및 배량구에서 각각 유의성이 인정되었다. <Table 2.33 참조>

결론적으로, 전 시험기간을 통하여 공시 과립비료의 시비에 따른 상추의 피해는 발견되지 않았다. 공시비료의 처리에 따른 상추의 생육 상태는 대조구(멸균구)보다 처리량에 따라 엽장과 엽폭 등이 증가되었고, 수확량 및 개체 중량은 추천적량 및 배량처리구에서 증수되었다.

Table 2.31. 시험 전·후 공시토양의 화학적 특성

| 처 리 구 | pH (1:5) | EC dS/m | T-N % | T-C | Ava.- P ₂ O ₅ mg/kg | Ex.-cations (cmol _c /kg) | | | | CEC cmol _c /kg | |
|-------|-------------|------------|----------|------|---|--|------------------|----------------|-----------------|------------------------------|------|
| | | | | | | Ca ²⁺ | Mg ²⁺ | K ⁺ | Na ⁺ | | |
| 시험전 | 6.70 | 0.85 | 0.27 | 3.33 | 750 | 5.11 | 2.28 | 1.70 | 0.76 | 13.8 | |
| 시 | 관행구 | 6.48 | 1.43 | 0.19 | 3.09 | 673 | 4.81 | 2.03 | 1.49 | 1.10 | 13.0 |
| | 멸균구 | 6.49 | 1.32 | 0.19 | 3.05 | 679 | 4.88 | 2.05 | 1.46 | 1.06 | 13.0 |
| 험 | 반량구 | 6.57 | 1.23 | 0.21 | 3.08 | 679 | 4.87 | 2.05 | 1.52 | 1.02 | 13.4 |
| 후 | 적량구 | 6.64 | 1.25 | 0.22 | 3.11 | 673 | 4.90 | 2.06 | 1.47 | 1.01 | 13.6 |
| | 배량구 | 6.61 | 1.23 | 0.23 | 3.14 | 682 | 4.95 | 2.09 | 1.49 | 1.01 | 13.6 |

Table 2.32. 상추의 생육에 미치는 효과

| 처 리 구 | 엽 장 | | 엽 폭 | | Chlorophyll 함량 | |
|----------|--------------------|-----|-------------------|-----|-----------------------|-----|
| | cm | 지수 | cm | 지수 | mg/100cm ² | 지수 |
| 관행구 | 16.0 ^{a*} | 100 | 10.9 ^a | 99 | 2.10 ^a | 99 |
| 대조구(멸균구) | 16.0 ^a | 100 | 11.0 ^a | 100 | 2.13 ^a | 100 |
| 추천 반량처리구 | 16.8 ^a | 105 | 11.2 ^a | 102 | 2.17 ^a | 102 |
| 추천 적량처리구 | 17.1 ^a | 107 | 11.5 ^a | 105 | 2.21 ^a | 104 |
| 추천 배량처리구 | 17.4 ^a | 109 | 11.7 ^a | 107 | 2.26 ^a | 105 |

*DMRT at 5% level

Table 2.33. 상추의 수확량에 미치는 효과

| 처 리 구 | 수 확 량 | | 개 체 중 량 | |
|----------|--------------------|-----|--------------------|-----|
| | (kg/100주) | 지수 | (g/10EA) | 지수 |
| 관 행 구 | 2.45 ^d | 98 | 53.4 ^d | 97 |
| 대조구(멸균구) | 2.51 ^{cd} | 100 | 55.0 ^{cd} | 100 |
| 추천 반량처리구 | 2.64 ^{bc} | 106 | 58.4 ^{bc} | 106 |
| 추천 적량처리구 | 2.78 ^{ab} | 111 | 62.4 ^{ab} | 113 |
| 추천 배량처리구 | 2.85 ^a | 114 | 63.8 ^a | 116 |

*DMRT at 5% level



Fig. 2.32. 무기충전제-미생물혼합제제 소립의 작물재배시험

대전광역시 유성구중세동 125-1번지 시설하우스에서의 상추재배 현황. (토양, 사양토; 품종, 적치마)

11. 경제성 분석

앞에서는 몇 가지 활용 가능한 농축산부산물을 선별하여 이를 배지자원화하기 위한 실험실 실험으로서, 그 주성분의 추출 또는 가수분해 공정을 최적화 하였다. 이러한 생산공정을 파이롯 규모 또는 공장 규모로 scale-up 시켰을 경우의 생산원가를 예측하고 경제성을 비교하는 것은 용이하지 않으며, 이는 경제성에 영향을 미치는 요인이 다양하기 때문이다.

여기서는 원료 1톤으로부터 단식공정(batch process)으로 처리하였을 경우의 생산비를 추산하였으며 그 결과를 <Table 2.34>에 정리하였다. 또한 시판가격과의 비교를 위하여 실험용 및 산업용 배지 가격을 <Table 2.35>에 나타내었다.

현재국내에서 시판되고 있는 산업용 배지 가격에 비하면 현저히 저렴하기 때문에, 미생물용 배지를 생산하는 전문업체의 설립이 가능하다고 생각되지만 중국산과의 경쟁을 예상해야 할 것이다. 유럽의 합작 투자에 의한 중국에서의 효모추출물의 생산이 궤도에 올라 있으며, 뉴질랜드 산 peptone도 세계적으로 가격 경쟁력을 가지고 있기 때문이다. 한편, 품목에 따라서는 미생물제제 생산업체에서 직접 생산해서 사용하는 것도 고려해 볼 수 있겠다. 국내시장의 규모는 농업용미생물제제 2~300억, 보조사료용 생균제 600억으로 추산되며, 다수의 영세업체가 경쟁하고 있는 상황에서 자체생산의 효율성을 우선 고려해야 할 것이다.

Table 2.34. Production costs for the protein hydrolysates and malt extracts

| 재 료 비 | | 공정/포장 비용 | 감 가 상각비 | 생 산 비 |
|-------------------------|---|-------------|------------|--|
| 원 료 | 효소/시약 | | | |
| 탈지대두박 : 250원×1,000kg | Pancreatin : 60,000원×40kg | 4,500,000원 | 45,000원 | Soytone수율 75% 7,195,000÷750kg =9,590원/kg |
| 카제인 : 1,100원×1,000kg | Pancreatin : 60,000원×50kg Protamex : 21,000원×25kg | 6,975,000원 | 69,000원 | Casitone/Tryptone 수율 66% 11,669,000÷660kg =17,680원/kg |
| 유청 : 450원×1,000kg | Pancreatin : 60,000원×50kg Protamex : 21,000원×25kg | 6,975,000원 | 69,000원 | Whey hydrolysate 수율 86~90% 11,019,000÷860kg =12,810원/kg |
| 혈분 : 500원×1,000kg | KOH : 2,000원×60kg H ₃ PO ₄ : 2,000원×40kg | 3,500,000원 | 35,000원 | Blood peptone수율 46% 4,235,000÷460kg =9,210원/kg |
| 맥아 : 2,800원×1,000kg | - | 2,800,000원 | 28,000원 | Malt ext. 수율 52~54% 3,108,000÷530kg =5,860원/kg |

※ Production costs were calculated when the hydrolysates and extracts were produced by batch process.

Table 2.35. Prices of the peptones, yeast extracts and malt extracts

| Items | Manufacturer | Package | Retail price | Grade |
|---------------|--------------|---------|--------------|--------------|
| Peptone | NZP | 5 kg | 250,000 | I |
| | BD211677 | 500 g | 82,500 | L |
| Soytone | Sigma 87972 | 1 kg | 83,000 | I and L both |
| | | 5 kg | 343,000 | I and L both |
| | BD243620 | 500 g | 85,000 | L |
| Tryptone | Sigma 95039 | 1 kg | 77,000 | I and L both |
| | | 5 kg | 370,000 | I and L both |
| | BD211705 | 500 g | 73,800 | L |
| Casitone | BD225930 | 500 g | 117,500 | L |
| Yeast extract | Hubei Angel | 25 kg | 240,000 | F |
| | Sigma 09182 | 1 kg | 89,000 | I and L both |
| | | 5 kg | 318,000 | I and L both |
| | BD212750 | 500 g | 74,500 | L |
| Malt extract | Sigma 70167 | 500 g | 77,000 | L |
| | BD218630 | 500 g | 53,800 | L |

I, industrial use; L, laboratory use; F, food additive.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표의 달성도

항목별 연구개발 목표와 수행내용을 아래에 기술하였으며, 그 목표달성도를 <Table 4.1.>에 요약하여 나타내었다.

1. 농산가공 부산물의 배지자원화 기술개발

농산가공 부산물 중에서 두부·두유부산물, 맥주양조부산물, 맥아 및 당밀을 가수분해하거나 추출하여 토양미생물의 배양을 위한 배지성분으로 사용하기 위한 기술을 개발하였다. 가수분해 및 추출 공정의 최적화, 가수분해물의 영양성분 평가, 분해물을 첨가한 배지에서의 미생물의 생육을 비교하였다.

2. 축산가공 부산물의 배지자원화 기술개발

축산가공 부산물 중에서 도축부산물로서 혈액 및 저급육, 유가공부산물로서 카제인 및 유청, 또는 기타 잡업부산물로서 번데기 등을 가수분해하여 배지성분으로 사용하기 위한 기술을 개발하였다. 가수분해 및 추출 공정의 최적화, 가수분해물의 영양성분 평가, 분해물을 첨가한 배지에서의 미생물의 생육을 비교하였다.

3. 생균체의 고정화·미세캡슐화 기술개발

미생물을 배양하여 얻은 균체를 다당류 등의 바이오폴리머로 피복 및 고정하기 위한 폴리머재료의 선발, 조건 및 방법의 최적화, 캡슐화 공정이 미생물의 생존율에 미치는 영향, 제품의 장기보존 효과 등을 구명하였다.

4. 충전제-미생물 혼합제의 과립화 기술개발

충전재로서 무기재료와 미생물을 혼합시켜서 과립화하는 기술을 개발하고저 각 재료의 적정 혼합비율을 선정하고 과립화 장치를 설계 제작하였으며, 공정을 최적화하고 과립제품의 건조 및 보관조건을 구명하였다.

5. 충전제-미생물 과립화제제의 비례·비효시험

주요 과립화제제에 대하여는 비료공정규격<농촌진흥청고시 '02. 12. 31.>에 따라 비례·비효시험으로서 미생물제제의 품목허가를 위한 채소(상추), 수목(재스민) 등에 대하여 작물재배시험을 수행하였다.

6. 농축산부산물의 배지자원화 기술에 대한 경제성 분석

주요 단백질 분해물 및 맥아추출물에 대하여는 단식공정 (batch process)의 경우 그 생산원가를 추산하고 시판품과의 가격을 비교하였다.

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 농축산가공 부산물의 배지자원화 기술

농축산가공 부산물 즉 두부·두유부산물, 맥주양조부산물, 맥아 및 당밀, 도축 부산물, 우유가공부산물, 잠엽부산물 등을 가수분해 또는 추출하여 토양미생물의 배양을 위한 배지성분으로 사용하기 위한 기술은 관련 생산업계에 활용될 수 있으며 보조사료로서 생균제 생균제 생산업계에도 확대적용 될 수 있다.

2. 생균체의 고정화·미세캡슐화 기술개발

미생물 균체를 다당류 등의 바이오폴리머로 피복 및 고정하여 미세캡슐화하는 기술은 미생물체제의 유통기간을 현저하게 연장하고 농가사용에는 편리성을 향상시킬 것이다.

3. 충전제-미생물 혼합제의 과립화 기술개발

각종 무기재료와 미생물을 혼합시켜서 과립화하는 기술 및 과립화 장치는 전 문학계의 주요 자료로서 활용될 수 있으며, 미생물체제의 유통업계 및 사용농가에 대하여 크게 편리성을 증진시킬 것이다.

Table 4.1. Objectives of the study and their achievements

| 연구개발목표 | 달성도 | 주요연구개발내용 |
|-------------------------------|------|---|
| ○ 농산가공 부산물의 배지 자원화 기술개발 | 100% | ▶ 두부·두유부산물 ▶ 맥주양조부산물 ▶ 폐당밀 및 맥아 |
| ○ 축산가공 부산물의 배지 자원화 기술개발 | 100% | ▶ 도축부산물: 혈액 및 저급육 ▶ 유가공부산물: 카제인 및 유청 ▶ 기타 잠엽부산물: 번데기 ▶ 농축산부산물로부터 얻은 배지 성분의 영양성분 평가 ▶ 대체배지에서의 표준미생물 균주의 생육비교 |
| ○ 생균체의 고정화 및 미세캡슐화 | 100% | ▶ 캡슐화 재료의 특성비교 및 선발 조건 및 방법의 개발 ▶ 캡슐화 공정이 균체에 미치는 영향 ▶ 균체의 장기보존 효과 |
| ○ 충전제-미생물 혼합제의 과립화 기술개발 | 100% | ▶ 무기재료의 성발 ▶ 과립화를 위한 재료의 혼합비율 ▶ 다공질 무기재료에서의 정착성 ▶ 과립화 방법 및 조건의 구명 ▶ 과립화제제의 보존성 및 유통기간 |
| ○ 충전제-미생물 과립화 제제의 비헤·비효시험 | 100% | ▶ 제올라이트-미생물 혼합제제 ▶ 무기충진제<Ⅰ>-미생물 혼합제제 ▶ 무기충진제<Ⅱ>-미생물 혼합제제 |
| ○ 농축산부산물의 배지자원화 기술에 대한 경제성 분석 | 100% | ▶ 단식공정에 의한 생산원가의 계산 ▶ 시판품과의 가격비교 |

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 지적재산권의 확보

- ▶ 농축산부산물로부터 미생물배지 성분의 생산공정에 관한 특허
- ▶ 토양미생물의 미세캡슐화 및 충전재 혼합과립 제조에 관한 특허

2. 참여기업 등에 기술이전을 통하여 산업화 또는 기업화에 기여

- ▶ 농축산부산물로부터 단백질 및 탄소원의 가수분해 및 추출기술
- ▶ 토양미생물의 대량배양 기술
- ▶ 토양미생물의 캡슐화기술
- ▶ 미생물-충전재 혼합과립 제조기술
- ▶ 토양미생물 제제의 장기보관 기술

3. 미생물제제 생산업체에 배지생산 기술의 보급·교육 및 홍보

미생물 전문인력을 보유하고 있지 않은 일반 생산업체에서 용이하게 수용할 수 있도록 위 2항의 기술을 보급하거나 교육하며, 농업 및 축산관련 잡지에 자주 투고하고 농수산 박람회출품하여 적극 홍보하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 배지 자원화 기술

실험용 배지성분은 고가의 것이므로 최근에는 산업용의 미생물 배지성분을 비교적 염가로 대량생산하여 공급하는 회사가 늘고 있다.

- ▶ Kosher Pareve, Netherland : 중국현지 공장에서 Yeast extract 생산공급
- ▶ NZP, New Zealand : Meat + Gelatin으로부터 염가의 Peptone 생산
- ▶ Hubei Angel Yeast, China : 식품첨가물 규격의 각종 Yeast extract 생산
- ▶ Unison(-Tianjin) Int'l Trading Co., Ltd, China : Soytone S20의 공급

2. 미생물의 캡슐화 기술

1980년 이래 프랑스의 국립농업연구소 (INRA)에서 근권미생물 (PGPR)의 캡슐화 연구를 진행해 오고 있다.

- ▶ 근권미생물의 매크로캡슐화 (macroencapsulation)에 의한 작물의 생육촉진 (Jung, 1980)
- ▶ 약 10^8 의 세균을 함유한 직경 6 mm의 alginate구의 분사기술 (Digat, 1988)
- ▶ 근권미생물을 calcium alginate 지지체로 캡슐화한 비료의 제조 (Fages *et al.*, 1988)
- ▶ 길항성세균 *Pseudomonas fluorecens-putida*의 미세캡슐화 연구 (Amiet-Charpentier, 1998).

제 7 장 참고문헌

- Amiet-Charpentier, C., P. Gadille, B. Digat, and J. P. Benoit. 1988. Micro-encapsulation of rhizobacteria by spray-drying: Formulation and survival studies. *J. Microencapsulation*. 15(5), 639-659.
- Alder-Nissen, J. 1976. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J. Agric. Food Chem.* 24(6), 1090~1093.
- Alder-Nissen, J. 1986. In *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publisher. New York.
- Alder-Nissen, J. 1977. Enzymatic hydrolysis of food of food proteins. *Process Biochem.* July/August. 18~23.
- Alder-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food Chem.* 27(6), 1256~1262.
- Alder-Nissen, J., Olsen, H. S. 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy proteins. In *Functionality and Protein Structure*. *Am. Chem. Soc.* Washington. D. C. 125~146.
- Alvarez, R. J., and M. Nichols. 1982. Formulating microbiological culture media careful balance between science and art. *Dairy Food Sanitation*. 2, 356~359.
- AOAC. 1980. In *Official Methods of Analysis*, 13th Ed, Association of Official Analytical Chemists. Washington. D. C.
- Bridson, E. Y. 1990. Media in microbiology. *Rev. Med. Microbiol.* 1, 1~9.
- Chiang, P. C., and M. Z. Sternberg. 1972. Verfahren zur herstellung loes-

- licher protein. German Offen Patent 2220299.
- De Feo, J. 1986. Properties and applications of hydrolyzed proteins. *ABL*. July/August. 44~47.
- Dewettinck, K. W., L. Mssens, L. Derro, and A. Huyghebaert. 1999. Agglomeration tendency during top-spray fluidized bed coating with gelatine and starch hydrolysate. *Lebensn Wiss u Techno.*, 32, 102~106.
- Dewettinck, K., A. Huyghebaert. 1998. Top-spray fluidized bed coating: Effect of process variable on coating efficiency. *Lebensm Wissu Techol.*, 31, 568~575.
- Dewettinck, K. L., W. Derro, W. Messens, and A. Huyghebaert. 1998. Agglomeration tendency during top-spray fluidized bed coating with gums. *Lebensm Wiss u Techol.*, 31, 576~584.
- Dubois, N., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350~356.
- Dziezak, J. D. 1988. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol.* 42, 136~151.
- Fedorova, N. B. and A. D. Neklyudov. 1985. The effect of the yeast biomass concentration and of exogenous proteolytic enzymes on the intensity of the baker's yeast autolysis. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 21, 714-718
- Hjalmarsson, S., R. Akesson. 1983. Modern Kjeldahl procedure, *Int. Laboratory.* 3, 70~76.
- Huguet. M. L., A. Groboillot, R. J. Neufeld, D. Poncelet, and E. Dellacherie. 1994. Hemoglobin encapsulation in chitosan/calcium alginate baeds. *J. Appl. Polymer Sci.* 51, 1427-1432

- Huntoon, F. M. 1918. □□Hormone□□medium. A simple medium employable as a substitute for serum medium. *J. Infect. Dis.* 23, 169~172.
- Jost, R., and J. C. Monti. 1977. Partial enzymatic hydrolysis of whey protein by trypsin. *J. Dairy Sci.* 60, 1387~1392.
- Kang, H. A., and M. G. Sin. 2004. Optimization of fluidized bed granulating conditions for powdered milk by response surface methodology. *Korean J. Food Sci Technol.*, 31(5), 1308~1314.
- Kim, C. H., Y. Kim, and J. O. Kim. 1996. Studies on the microcapsulation of ω-3 polyunsaturated fatty acid. *Korean. J. Food Sci. Technol.*, 28(4), 743~749.
- Kim, J. H., J. M. Oh. 2002. Alginate coating on the storage stability and dissolution rate of enteric coated Lansoprazole. *J. Kor. Pharm. Sci.*, 32(4), 277~284.
- Kim, S. Y., P. S. W. Park, and K. C. Rhee. 1990. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 38, 651.
- Kinsella, J. E. Functional properties of soy proteins. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 56, 542.
- Klinger, I. J. 1917. The effect of hydrogen ion concentration on the production of precipitates in a solution of peptone and its relation to the nutritive value of media. *J. Bacteriol.* 2, 351~353.
- Koo, S. M., Y. H. Cho, C. S. Huh, Y. J. Baek, and J. Y. Park. 2001. Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11(3): 376-383
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.* 30,

291~310.

- Lahl, W. J. and S. D. Braun. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food Technol.* 48(10), 68~71.
- Lee, K. Y., W. H. Park, and W. S. Ha. 1997. Polyelectrolyte complexes of sodium alginate with chitosan or its derivatives for microcapsules. *J. Appl. Polymer Sci.* 63: 425-432
- Liener, I. E. 1978. Soybean: Chemistry and Technology. (2nd ed.) Vol. 1. (A. K. Smith and S. J. Circle eds.). AVI Pub. Co., Westport. CT.
- Mason, V. C., S. Bech-Andersen and M. Rudemo. 1980. Hydrolysate preparation for amino acid determination in feed constituents in Proc. 3rd EAAP Symp. on Protein Metabolism and Nutrition, Vol. 1.
- Nash, P., M. M. Krenz. 1991. Culture media. In Manual of Clinical Microbiology (5th. ed.) (A. Balows, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy ed). 1226~1288.
- Nolan, R. A., and W. G. Nolan. 1972. Elemental analysis of vitamine-free casamino acids. *Appl. Microbiol.* 24, 290~291.
- Olsen, H. S. and J. Adler-Nissen. 1979. Industrial production and application of a soluble enzymatic hydrolyzate of soya protein. *Process Biochem.* 14(7), 6~11.
- Pommer, K. 1995. New proteolytic enzymes for the production of savory ingredients. *Cereal Food World.* 40(10), 745~748.
- Remunan-Lopez, C., and R. Bodmeier. 1997. Mechanical. water uptake and permeability properties of crosslinked chitosan glutamate and alginate films. *J. Controlled Release.* 44: 215-225
- Sheu, T. Y., and R. T. Marshall. 1993. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *J. Food Sci.*, 54: 557~561.

- Sorensen, S. P. L. 1908. Enzyme studies. *Biochem. z.* 7, 45~101.
- Torben, S., and W. Ole. 1977. Control of fluidized bed granulation. *Arch. Pharm. Chemi Sci.*, Ed. 5, 178~193.
- Torben, S. and W. Ole. 1978. Control of fluidized bed granulation. *Arch. Pharm. Chemi Sci.*, Ed. 6, 69~82.
- 김남대, 최순곤, 주현규, 1992. 대두의 처리방법에 따른 일반성분과 효소활성화. *한국농화학회지*. 35(4), 232~236.
- 김상필, 박희경, 김도환, 허태련. 1995. Alcohol fermentation을 위한 배지로서 cheese whey의 이용. *한국식품과학회지*. 27(6), 878~884.
- 김정환, 김현욱. 1995. Casein의 pepsin 가수분해가 담즙산 결합에 미치는 영향. *한국낙농학회지*. 17(4), 310~317.
- 김재욱, 변시명. 1966. 한국산 대두의 단백질에 대한 연구(제1장): 대두품종별 화학적 조성에 관하여. *한국농화학회지*. 7, 79~84.
- 김재욱, 조무제, 김상순, 이춘령. 1969. 미생물을 이용한 대두단백질분해 이용 연구. *한국농화학회지*. 12, 19~24.
- 김재욱, 조무제, 1970. 대두를 이용한 이유식 제조에 관한 연구(제1보); 효소를 이용한 대두단백질 분해 적정 조건결정 및 조제에 관하여. *한국농화학회지*. 13(1), 29~34.
- 김천제. 1990. 육제품 생산에 가축부산물의 효과적 이용연구. *한국식육연구회지*. 10(1), 29~45.
- 김철재. 1990. 대두단백 식품종류와 이의 영양학적, 식품학적 기능 특성. *한국콩연구회지*. 7(2), 39~57.
- 문지웅. 1990. 기능성 식품소재의 개발동향과 생리적 역할, 우유 Casein, oligo당, EPA 를 중심으로. *한국유가공기술과학회지*. 8(1), 29~36.

- 변진원, 황인경. 1993. 단백질분해효소처리된 대두단백질의 기능적 특성. *한국콩연구회지*. 10(1), 41~48.
- 윤석영, 김창식, 김상교, 백영진, 김효중. 2001. 비지를 이용한 효소분해 간장 및 그 간장의 제조방법. 한국공개특허 01-104790호.
- 이규승, 윤민호, 오승호. 2003. 건조혈분으로부터 아미노산 제조방법. 한국공개특허 02-40238호
- 이철호, 이진열. 2002. 염산과 효소를 이용한 고농도 단백질가수분해물의 제조방법. 한국공개특허 00-33747호.
- 이호봉, 남희섭, 김재훈. 2000. 쇠고기 농축물의 제조방법. 한국공개특허 00-20349호
- 인만진, 최경호, 임철, 유귀환, 김민홍. 1996. 대두박 효소분해물의 미생물 배양 배지로서의 용도. 한국공개특허 96-17840호.
- 주정현. 2003. 대두단백 효소 가수분해물의 항균활성 펩타이드 탐색. 충남대학교 대학원 석사논문
- 채희정, 인만진, 김민홍. 1997. 단백질소재 첨가물로서의 효소분해 대두 단백질의 특성. *한국농화학회지*. 40(5), 404~407.
- 하월규, 전석락, 김정완, 이수원, 이재영, 손동화. 1994. 효소가수분해에 의한 유청 단백질의 항원성 저하. *한국식품과학회지*. 26(1). 74~80.

감 사 의 글

본 연구의 수행에 도움을 주신 아래 분들에게 고마움을 표합니다.

청미바이오 기술연구소장 최성현 박사님

남양유업(주) 중앙연구소 정우영 과장님

우성사료(주) 천영주 팀장님

주 의

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