

최 종
연구보고서

섬유소 분해효소 생산균주를 이용한
왕겨와 쌀겨의 재활용 기술 개발

Development of technology for utilization of rice hull
and rice bran by microorganism produced cellulase

연구기관
동아대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “섬유소 분해효소 생산균주를 이용한 왕겨와 쌀겨의 재활용 기술개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 I. “균주의 대량 생산기술 개발”, 세부과제 II. “미생물 제제의 생산기술 개발“ 및 세부과제 III. “효과 검정 및 용도 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 21일

주관연구기관명: 동아대학교

총괄연구책임자: 이진우

세부연구책임자: 배계선

연구원: 조강익

연구원: 김보경

연구원: 이보화

연구원: 김혜진

연구원: 김이준

협동연구기관명: 시설원예시험장

협동연구책임자: 이한철

협동연구원: 이성찬

협동연구원: 강남준

협동연구원: 김지민

요 약 문

I. 제 목

섬유소 분해효소 생산균주를 이용한 왕겨와 쌀겨의 재활용 기술 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

벼를 도정하는 과정에서 발생하는 부산물로 벼 껍질인 왕겨와 현미 겨층인 쌀겨 및 씨눈·싸라기 등이 있다. 최근 우리나라 벼 생산량은 연평균 약 730만톤이며 부산물인 왕겨는 약 146만톤, 쌀겨는 약 58만톤 정도 발생하는 것으로 추정된다. 섬유소 분해효소 생산균주를 이용하여 중요한 농업부산물을 왕겨와 쌀겨를 재활용하는 기술을 개발하는 것이 본 연구의 목적이다. 이와 같은 기술의 개발의 필요성은 환경 오염성 농업부산물이 대량 생산되고 있으며, 농업 경제성을 높이기 위하여 농업 부산물을 이용한 미생물 제제의 개발에 수요가 증가되고 있으며, 또한 왕겨와 쌀겨를 탄소원으로 이용하는 섬유소 분해효소 생산 균주를 확보하였기 때문이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 섬유소 분해효소 생산균주의 대량 생산 기술 개발
 - 가. 배지 조건 최적화
 - 나. 배양 조건 최적화
 - 다. 생물배양기 규모에서의 배양 조건 최적화
 - 라. pilot 규모에서의 배양 조건 최적화
2. 미생물 제제의 생산 기술 개발
 - 가. 왕겨를 이용한 미생물 제제의 생산
 - 나. 미강을 이용한 미생물 제제의 생산

다. 미생물 제제의 생산공정 개발

3. 미생물 제제의 효과 검정 및 용도 개발

가. 포트 규모의 효과 검정

나. 포장 규모의 효과 검정

다. 미생물 제제의 처리가 토양 미생물에 미치는 영향

라. 미생물 제제의 처리에 의한 물리·화학적 변화 측정

마. 생산된 미생물 제제의 용도 개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 섬유소 분해효소 생산 균주 동정

토양에서 분리한 섬유소 분해효소 생산균주의 16s rDNA의 부분적 염기서열 분석 및 *gyrase A* 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 99.95%의 확률로 *Bacillus amyloliquefaciens*로 판명되어서 *B. amyloliquefaciens* DL-3으로 명명하였다.

나. 섬유소 분해효소 생산균주의 대량 생산 기술 개발

섬유소 분해효소를 생산하는 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 대량 생산기술을 개발하기 위하여 플라스크 규모 및 7L와 100L 생물배양기를 사용하여 배지 및 배양 조건을 최적화하였다. *B. amyloliquefaciens* DL-3 배양을 위한 최적 탄소원 및 질소원은 5%(w/v) 왕겨 및 질소원으로 0.2%(w/v) 펄톤이었으며 최적 배양온도 및 배지의 초기 pH는 각각 37°C 및 6.8이었다. 생물배양기를 사용하여 *B. amyloliquefaciens* DL-3를 배양하기 위한 최적 교반속도 및 통기량은 300 rpm 및 1.0 vvm이었으며 최적 접종량은 1~5%이었다.

다. 섬유소 분해효소의 특성 연구 및 생산공정 개발

B. amyloliquefaciens DL-3 균주를 100L 생물배양기를 사용하여 배양하고 균체를 제거한 상등액을 UF system을 사용하여 분자량 30,000이하의 물질을 제거하면서 약 4배 농축하였다. 농축한 상등액에 (NH₄)₂SO₄를 첨가하여 상등액에 존재하는 단백질을 수거한 후, HiTrap™ QXL 이온교환컬럼을 장착한 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 정제한 섬유소 분해효소를 SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 결과, *B. amyloliquefaciens* DL-3 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 분자량은 약 54 kDa 이었다.

B. amyloliqueifaciens DL-3 섬유소 분해효소의 최적 반응온도 및 pH는 각각 50℃ 및 6.0이었으며 온도 안정성은 50℃에서 가장 높았으며 비교적 넓은 pH 범위에서 pH 안정성을 나타냈다. *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소는 CMC 외에도 cellobiose에 높은 기질 특이성을 나타냈으며 $MnCl_2$ 와 같은 금속이온에 저해를 받았으나 $CoCl_2$ 와 같은 금속에 의한 저해정도는 무시할 정도 이었다. 진공냉동건조한 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소는 보관온도에 관계없이 장시간 보관하여도 활성의 변화가 없었다. *B. amyloliqueifaciens* DL-3가 생산하는 섬유소 분해효소의 유전자를 cloning한 결과, 섬유소 분해효소의 유전자는 1,527개의 염기로 구성되어 있으며 섬유소 분해효소는 508개의 아미노산으로 구성되어 있었다.

라. 미생물 제제의 생산 기술 개발

B. amyloliqueifaciens DL-3 배양액과 왕겨를 사용하여 미생물 제제를 대량 생산하기 위한 최적 접종량은 20% 이상이었으며, 최적 수분함량은 40% 이상이었다. 폐당밀 (corn steep liquor)의 첨가는 왕겨를 이용하여 생산한 미생물 제제의 생균수를 증가시켰다. *B. amyloliqueifaciens* DL-3 배양액과 미강을 사용하여 미생물 제제를 대량 생산하기 위한 최적 접종량은 20% 이상이었으며, 최적 수분함량은 50% 이상이었다. 왕겨와 마찬가지로 폐당밀의 첨가는 미강을 이용하여 생산한 미생물 제제의 생균수를 증가시켰다. 미강을 사용하여 미생물 제제를 생산하기 위한 최적 배양온도는 32~37℃이며, 최적 배양시간은 24~48시간 이었다. 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제는 37℃까지 온도에 관계없이 60일 후에도 일정한 수의 생균수를 유지하였다.

마. 미생물 제제의 효과 검정 및 용도 개발

포트 규모의 실험에서 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제는 상추의 생육을 촉진시켰으나 왕겨를 사용하여 제조한 미생물 제제는 상추의 생육을 감소시켰다. 포장 규모의 실험에서 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제는 상추, 배추, 오이 및 토마토의 생육을 촉진시켰다. 미생물 제제를 처리한 토양의 미생물 수는 처리한 미생물 제제의 농도에 비례하여 증가하였다. 미생물 제제를 처리하지 않은 토양에 비하여 미생물 제제를 처리한 토양의 전기전도도는 높았으나 암모니아태 질소 및 질산태 질소의 함량은 감소하였는데, 이는 미생물 제제를 처리한 토양에서 자란 작물의 생육이 처리하지 않은 토양에서 자란 작물의 생육보다 높기 때문이라고 판단된다.

미생물 제제의 처리는 토마토, 고추, 오이, 수박 및 멜론 등과 같은 과채류의 발아율을 향상시켰으며, 각 작물의 생육을 촉진시켰다. 토마토, 고추, 수박, 고추 및 멜론의 육묘중 생육에 적합한 미생물제제의 처리농도는 0.01~0.001배액이었고 오이는 0.1배액이었다. 또한, 미생물 제제의 처리는 과채류의 근활력을 상승시켰으며 미생물 제제의 처리 농도가 높을수록 토양의 질소 및 인의 함량이 높았다. 미생물 제제

의 처리는 토마토, 고추, 오이, 수박 및 메론 등과 같은 과채류의 초장, 생체중, 및 건물중 등과 같은 초기의 생육을 촉진하였다.

2. 활용에 대한 건의

가. 특허 등록 및 기술거래소를 통한 기술 이전

본 연구 사업의 결과로 얻어진 기술은 특허를 출원하여 지적 재산권으로 보호를 받을 것이며 지적 재산권은 동아대학교 기술이전센터, 서울기술거래소 및 부산기술거래소와 같은 공인된 기술거래소에 등록하여 본 연구과제에서 얻어진 기술을 상품화하여 일반 기업에서 기술료를 지불하고 사용할 수 있도록 할 것이다.

나. 미생물 제제의 대량 생산 및 산업화

본 연구 결과에서 얻은 기술로 미생물 제제를 대량 생산하는 것이 가능하며, 기술적인 면과 경제성을 고려하여 부산과 경남 및 경북의 가능한 시장 규모 약 42 억 원이며 물량으로 약 10 톤 정도이다. 이와 같은 자료를 바탕으로 개발된 기술을 미생물 제제와 관련있는 기업체에 기술을 이전하여 산업화 할 계획이다.

다. 신기술 개발을 위한 연구과제 개발

본 연구에서 개발한 섬유소 분해효소 및 이를 사용하여 농업 부산물에서 바이오 에탄올을 생산하는 기술의 개발에 대한 가능성을 확인하였으며, 이에 대한 구체적인 연구 계획을 생물산업에 관련된 기업체들과 준비 중이다. 즉, 왕겨를 탄소원으로 사용하여 섬유소 분해효소를 대량으로 생산하는 공정을 개발하고 생산된 섬유소 분해효소를 왕겨에 처리하여 왕겨를 포도당과 같은 단당류로 분해한 다음, 이 단당류를 사용하여 에탄올 발효 및 고분자 중합체 생산에 이용할 것이다.

라. 국제공동 연구의 가능성

말레이시아의 경우에 팜오일을 생산하는 과정에서 많은 양의 팜오일박이 생산되고 있으나, 현재는 태워서 처분하고 있으나 이산화탄소의 배출양이 많으므로 생물학적인 처리를 할 계획이다. 본 연구를 통하여 *B. amyloliquefaciens* DL-3 균주는 팜오일박을 유일한 탄소원으로 사용하여 생육함을 확인하였다. 이는 *B. amyloliquefaciens* DL-3 균주가 농업 부산물인 왕겨와 미강은 물론, 팜오일박을 재활용할 수 있는 능력이 입증되었다고 판단된다. 또한, 본 연구 결과를 바탕으로 말레이시아의 팜오일 업체와 팜오일박의 재활용에 대한 연구를 토의하고 있는 중이다.

SUMMARY

I . Title

Development of technology for utilization of rice hull and rice bran by microorganism produced cellulase

II. Purpose and importance of research and development

In the process of hulling rice, the resulting products include rice hull, the outer layer of the rice, and unpolished rice, which consists of rice bran and the eye of the grain. In Korea the amount of rice produced annually is about 7.3 million tons, and this is predicted to include approximately 1.46 million tons of rice hull and 580,000 tons of rice bran. The purpose of this study was to develop a technology to reuse rice hull and rice bran leftover from rice production, using microorganism producing cellulase. This kind of technology development is needed because there is a mass production of pollutive materials created in the rice hulling process, and also to increase the economic power of farming. There is an increase in organism reproduction development using leftover resources from farming, and the fiber degrading enzyme productive bacteria, which uses rice hull and rice bran as carbon sources, has been confirmed.

III. Contents and extents of research and development

1. Development of technology for mass production of microorganisms producing cellulase

가. Optimization of media

나. Optimization of culture conditions

다. Optimization of culture condition with a bioreactor

라. Optimization of culture condition with a pilot scale pilot

2. Development of technology for production of microbial product
 - 가. Production of microbial product with rice hull
 - 나. Production of microbial product with rice bran
 - 다. Development for production of microbial product

3. Evaluation of microbial product and development of its applications
 - 가. Evaluation of microbial product with a pilot scale
 - 나. Evaluation of microbial product with a field scale
 - 다. Effect of microbial product on soil microorganisms
 - 라. Effect of microbial product on physio-chemical properties of soil
 - 마. Development of microbial product's applications

IV. Results and proposal for practical use of this research

1. Results of study and development

가. Isolation and identification of microorganism producing cellulase

As a result of analyzing the partial base order of the cellulase producing bacteria's 16s rDNA and the base order of the gyrase A gene, a 99.95% probability of *Bacillus amyloliquefaciens* has been confirmed and has been named *B. amyloliquefaciens* DL-3.

나. Development of technology for mass production of microorganism producing cellulase

To develop a mass production technique for *B. amyloliquefaciens* DL-3, which produces fiber degrading enzyme productive bacteria, optimal culture and cultivation conditions were achieved using flasks and 7 and 100 liter cultures. The optimal carbon and nitrogen sources for the culture of *B. amyloliquefaciens* DL-3 were 5%(w/v) husks and 0.2%(w/v) peptone, and the optimal temperature and initial pH were 37°C and 6.8, respectively. The optimal agitation speed and amount of ventilation for the culture of *B. amyloliquefaciens* DL-3 were 300 rpm and 1.0 vvm, and the optimal inoculation amount was 1-5%.

다. Characterization and development of technology for production of cellulase

Using a 100L culture device, *B. amyloliquefaciens* DL-3 were cultivated, and the upper liquid, which had been removed of the bacterial bodies, was

concentrated to approximately 4 times while removing materials under a molecular weight of 30,000 using the UF system. Ammonium sulfate was added to the concentrated upper liquid, removing existing proteins, and the liquid was refined using HiTrap™ QXLion exchange column fixed chromatography. The refined fiber degrading enzyme was electrically analyzed using SDS-polyacrylamide gel, and as a result the molecular weight of fiber degrading enzyme produced by *B. amyloliquifaciens* DL-3 bacteria was approximately 54 kDa.

The optimal reaction temperature and pH for *B. amyloliqueifaciens* DL-3 cellulase were 50°C and 6.0, respectively. Temperature stability was highest at 50°C, and pH stability was observed at a fairly broad spectrum. *B. amyloliqueifaciens* DL-3 cellulase showed a high temperament characteristic to cellobiose and CMC, and was hindered by metal ions such as MnCl₂. However, the hindrance produced by metals such as CoCl₂ was low enough to ignore. Freeze-dried *B. amyloliqueifaciens* DL-3 cellulase showed no change in activity after long periods of storage, regardless of storage temperature. After cloning the gene for cellulase produced by *B. amyloliqueifaciens* DL-3, the cellulase was constructed of 1,527 bases, and the fiber degrading enzyme was made up of 508 amino acids.

라. Development of technology for production of microbial products

Using *B. amyloliqueifaciens* DL-3 culture liquid and rice hull, the optimal amount of inoculation for the mass production of organism materials was 20%, and the optimal amount of hydration was over 40%. The addition of corn steep liquor increased the live bacteria in the microbial product produced using rice hull. The same as rice hull, the addition of corn steep liquor increased the live bacteria in the microbial product produced using rice bran. The optimal culture temperature for the production of microbial product using rice bran was 32-37°C, and the optimal culture time was 24-48 hr. The microbial product using rice bran retained the same number of live bacteria after 60 days, regardless of temperature, up to 37°C.

마. Evaluation of microbial product and development of its applications

The microbial product using rice bran in a pot-scale study promoted the growth of lettuce, but the microbial product using rice hull decreased it. In the

field-scale study the microbial product using rice bran promoted the growth of lettuce, Chinese abbage, cucumber, and tomatoes. The organisms in soil treated with mirobial product increased in ratio to the concentration of microbial product. In comparison to soil not treated with omicrobial product, the soil that was treated had a higher electrical conduction rate but decreased in amount of ammonia-nitrogen and nitrate-nitrogen. This was thought to be because the products grown in treated soil were higher than those grown in untreated soil.

Treatment using microbial product increased the rate of budding in fruits and vegetables such as tomatoes, pepper, cucumber, watermelon, and melon, and also promoted growth of each product. In seedling cultures of tomatoes, pepper, watermelon, and pepper and melon, the appropriate treatment concentration of organism for their growth was 0.01-0.001 of the liquid, and that for cucumber was 0.1 of the liquid. Also, treatment using microbial increased the root strength of the products, and the amount of nitrogen and phosphate in the soil increase in proportion to the treatment concentration. Treatment using organism promoted initial growth of products such as tomatoes, pepper, cucumber, watermelon, and melon, including leaf length, wet weight, and dry weight.

2. Proposals regarding utilization

가. Patent registration and technique transfer through technology exchange

The technologies achieved from this study will be patented and protected as knowledgeable assets, and these knowledgeable assets will be registered at licensed technology exchange facilities such as Donga University Technology Licensing Center, Seoul Technology Licensing Center, and Busan Technology Licensing Center. The technologies achieved from this study process will be commercialized and made to be utilized in general businesses in exchange for usage fees.

나. Mass production and industrialization of microbial product

Mass production of organism 製製 has been made possible through the technologies achieved as a result of this study, and, considering the technological and economical aspects, the possible marketscale in the Busan, Gyungnam, and Gyungbook regions is about 4.2 billion KRW, and approximately 10 tons in products.

다. Development of study processes for the development of new technologies

In this study, fiber degrading enzymes and the possibility of developing technologies to produce bio-ethanol from farm waste using these enzymes has been confirmed, and specific research plans are underway with bio-industry related companies. In other words, mass production methods of fiber degrading enzymes using rice chaff as carbon sources will be developed, the rice chaff will be broken down into monosaccharide such as glucose by being treated with fiber degrading enzymes, and this monosaccharide will be used for ethanol fermentation and the production of high-molecule polymers.

라. Possibility of international cooperation research

In Malaysia, a great amount of palm oil-waste is produced in the process of palm oil production. This is currently being disposed through burning, but due to a large carbon dioxide discharge there are plans to use biological methods instead. Through this study *B. amyloliquefaciens* DL-3 bacteria has been confirmed to be able to be produced using palm oil-waste as the only carbon source. This proves that *B. amyloliquefaciens* DL-3 bacteria have the ability to reuse palm oil-waste, as well as rice chaff and 미강. Also, a research regarding the reuse of palm oil-waste based on the results of this study is being discussed with a palm oil company in Malaysia.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	19
Section 1. Purpose and significance of the research	19
1. Purpose of the research	19
2. Requisite of the research	19
Section 2. Contents and scope of the research	22
1. Final goal of the research	22
2. Annual contents and scope of the research	24
Chapter 2. Current situation in domestic and foreign technology	27
Section 1. Current situation of domestic and foreign technology	27
1. Current situation of domestic technology	27
2. Current situation of foreign technology	27
Section 2. Current situation of our research center	29
1. Preceding research	29
2. Equipments and facility	31
Chapter 3. Research contents and results	33
Section 1. Isolation and identification of useful microorganisms	33
1. Materials and methods	33
2. Results	34
Section 2. Development for production of microorganism producing cellulase	38
1. Materials and methods	38
2. Results	41
가. Optimization of media	41
나. Optimization of culture conditions	50
다. Optimization of culture condition with a bioreactor	54
라. Optimization of culture condition with a pilot scale	67

Section 3. Characterization and development for production of cellulase-----	70
1. Materials and methods-----	70
2. Results-----	72
가. Isolation and purification of cellulase-----	72
나. Biochemical characterization of cellulase-----	75
다. Gene cloning of cellulase-----	85
라. Development for mass production of cellulase-----	85
Section 4. Development for production of microbial product-----	88
1. Materials and methods-----	88
2. Results-----	89
가. Production of microbial product with rice hull-----	89
나. Production of microbial product with rice bran-----	92
다. Development for production of microbial product-----	98
Section 5. Evaluation of microbial product and development of it applications-	100
1. Materials and methods-----	100
2. Results-----	103
가. Evaluation of microbial product with a port scale-----	103
나. Evaluation of microbial product with a field scale-----	104
1) Effect of microbial product on growth of lettuce-----	104
2) Effect of microbial product on growth of Chinese cabbage-----	106
3) Effect of microbial product on growth of cucumber-----	106
4) Effect of microbial product on growth of tomato-----	109
다. Effect of microbial product on soil microorganisms-----	113
라. Effect of microbial product on physio-chemical properties of soil--	115
마. Development of microbial product's applications-----	116
Chapter 4. Accomplishment and contribution-----	136
Section 1. Attainment of goal of this research-----	136
Section 2. Contribution to related fields and expected impacts-----	137
1. View point of technology-----	137
2. view point of economics and industry-----	138
3. Published articles and patents-----	138

Chapter 5. Application scheme of the research-----	139
Chapter 6. Information of foreign technology obtained from this research-----	142
Chapter 7. References-----	143

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	19
제1절	연구개발의 목적과 필요성	19
1.	연구개발의 목적	19
2.	연구개발의 필요성	19
제2절	연구개발 내용 및 범위	22
1.	최종연구목표	22
2.	연차별 연구개발의 내용 및 범위	24
제 2 장	국내외 기술개발 현황	27
제1절	국내 외국 타 연구기관의 기술 현황	27
1.	국외의 기술 현황	27
2.	국내의 기술 현황	27
제2절	본 연구기관의 관련 기술 현황	29
1.	선행연구	29
2.	보유 시설 및 장비	31
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	33
제1절	섬유소 분해효소 생산 균주의 동정	33
1.	연구수행방법	33
2.	연구결과	34
제2절	섬유소 분해효소 생산균주의 대량 생산 기술 개발	38
1.	연구수행방법	38
2.	연구결과	41
가.	배지 조건 최적화	41
나.	배양 조건 최적화	50
다.	생물배양기 규모에서의 배양 조건 최적화	54
라.	pilot 규모에서의 배양 조건 최적화	67

제3절	섬유소 분해효소의 특성 연구 및 대량생산 공정 개발-----	70
1.	연구수행방법-----	70
2.	연구결과-----	72
가.	섬유소 분해효소 분리 및 정제-----	72
나.	섬유소 분해효소의 생화학적 특성-----	75
다.	섬유소 분해효소의 유전자 cloning-----	85
라.	섬유소 분해효소의 대량생산 공정 개발-----	85
제4절	미생물 제제의 생산 기술 개발-----	88
1.	연구수행방법-----	88
2.	연구결과-----	89
가.	왕겨를 이용한 미생물 제제 생산-----	89
나.	미강을 이용한 미생물 제제 생산-----	92
다.	미생물 제제 생산 공정 개발-----	98
제5절	미생물 제제의 효과검정 및 용도 개발-----	100
1.	연구수행방법-----	100
2.	연구결과-----	103
가.	포트 규모의 효과검정-----	103
나.	포장 규모의 효과검정-----	104
1)	상추의 생육에 미치는 영향-----	104
2)	배추의 생육에 미치는 영향-----	106
3)	오이의 생육에 미치는 영향-----	106
4)	토마토의 생육에 미치는 영향-----	109
다.	미생물 제제의 처리가 토양 미생물에 미치는 영향-----	113
라.	미생물 제제의 처리에 의한 토양의 물리·화학적 변화 측정-----	115
마.	미생물 제제의 용도 개발-----	116
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도-----	136
제1절	연구개발 목표의 달성도-----	136
제2절	관련분야의 기여도-----	137
1.	기술적 측면-----	137
2.	경제·산업적 측면-----	138
3.	연구논문 발표 및 특허 등록-----	138

제 5 장	연구개발결과의 활용계획-----	139
제1절	연구개발결과의 활용계획-----	139
1.	특허 등록 및 기술거래소를 통한 기술 이전-----	139
2.	미생물 제제의 대량 생산 및 산업화-----	139
제2절	타 연구에의 응용-----	140
1.	연구과제 개발-----	140
2.	국제공동 연구-----	141
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	142
제 7 장	참고문헌-----	143

여 백

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적과 필요성

1. 연구개발의 목적

벼를 도정하는 과정에서 발생하는 부산물로 벼 껍질인 왕겨와 현미 겨층인 쌀겨 및 씨눈·싸라기 등이 있다. 최근 우리나라 벼 생산량은 연평균 약 730만톤이며 부산물인 왕겨는 약 146만톤, 쌀겨는 약 58만톤 정도 발생하는 것으로 추정된다. 벼의 도정 공정에서 대량 발생하는 왕겨는 과거에 과일의 포장 및 운반을 위한 충전재료 및 농어촌의 난방과 취사를 위한 연료로 대량 사용되었으나 현재는 거의 사용되지 않고 있는 실정이다. 매년 대량으로 생산되는 왕겨는 자연 상태에서 쉽게 분해가 되지 않기 때문에 이미 환경을 오염시키는 주요한 원인 물질이 되고 있는 실정이며 도정 비용을 상승시키는 원인이 되고 있다. 따라서 섬유소 분해효소 생산균주를 이용하여 환경 오염원인 왕겨와 쌀겨를 재활용하는 기술을 개발하여 농업 생산성을 향상시키는 것이 본 연구의 목적이다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

1) 벼 도정 부산물의 대량 생산

벼를 도정하는 과정에서 발생하는 부산물로 벼 껍질인 왕겨와 현미 겨층인 쌀겨 및 씨눈·싸라기 등이 있다. 최근 우리나라 벼 생산량은 연평균 약 730만톤이며 부산물인 왕겨는 약 146만톤, 쌀겨는 약 58만톤 정도 발생하는 것으로 추정된다. 왕겨의 주성분은 조섬유, 가용성 당질, 회분 및 조단백질이며 쌀겨의 주성분은 가용성 당질, 조지방, 조단백질 및 조섬유이다. 각각의 부산물을 구성하는 구성 성분의 함량은 표 1에서 보는 바와 같다. 이와 같이 벼를 도정하는 공정에서 발생하는 부산물은 주요 구성 성분으로 보아 부가 가치가 높은 상품 생산을 위한 원료로 이용 가치가 있음에도 불구하고 쌀겨만 일부 미강유 생산에 이용되고 대부분 사료로 이용되거나 폐기되고 있는 실정이다.

2) 왕겨 및 쌀겨의 친환경적 이용 기술 개발

벼의 도정 공정에서 대량 발생하는 왕겨는 과거에 과일의 포장 및 운반을 위한 충전재료 및 농어촌의 난방과 취사를 위한 연료로 대량 사용되었으나 현재는 거의 사용되지 않고 있는 실정이다. 매년 대량으로 생산되는 왕겨는 자연 상태에서 쉽게 분해가 되지 않기 때문에 이미 환경을 오염시키는 주요한 원인 물질이 되고 있는 실

정이며 도정 비용을 상승시키는 원인이 되고 있다. 따라서 환경오염의 방지와 도정 산업의 경쟁력을 강화시키기 위하여 왕겨와 쌀겨의 처리 방법 및 재활용 기술의 개발이 절대적으로 필요하다.

표 1. 벼의 도정 과정에서의 발생하는 왕겨와 쌀겨(미강)의 양 (2002년도)

구분		왕겨	미강
생산량		약 146만 톤/연	약 58만 톤/연
성분	조섬유	35 ~ 46	7 ~ 11
	가용성당질	22 ~ 35	34 ~ 52
	조단백질	2 ~ 3	11 ~ 15
	조지방	-	15 ~ 20
	회분	13 ~ 21	7 ~ 10
용도		실리카 생산	미강유 생산, 사료

3) 왕겨와 쌀겨의 재활용 기술 개발에 필요한 유용 미생물의 확보

본 연구 과제의 주관기관인 동아대학교의 생물화학공학 실험실에서는 선행 연구를 통하여 왕겨와 쌀겨의 주성분이 섬유소를 분해하는 효소를 생산하는 균주를 토양에서 분리하였다. 분리한 균주를 동정한 결과 *Bacillus stearothermophilus*로 확인되었으며 쌀겨는 물론 왕겨를 유일한 영양분으로 사용하여 생육하는 결과를 확인하였다. 또한 이 균주는 섬유소 분해효소(cellulase)외에 키틴 분해효소(chitinase), 키토산 분해효소(chitosanase) 및 단백질 분해효소(protease)를 생산함을 확인하였다. 따라서 왕겨와 쌀겨를 재활용할 수 있는 기술의 개발에 필요한 중요한 균주를 이미 확보하였으므로 본 연구과제의 성공적인 수행에 큰 어려움은 없을 것으로 예상된다.

나. 경제·산업적 측면

1) 환경 오염성 쌀 도정 부산물의 재활용 필요성

자연 상태에서 쉽게 분해되는 양은 왕겨를 포함하는 벼의 도정 공정 부산물은 과거와 달리 거의 소비가 되지 않는 실정으로 이를 자연 상태에 방치할 경우에 환경을 오염시키는 주된 원인 물질이 될 것이다. 따라서 벼의 도정 공정에서 발생하는 대량의 부산물을 재활용할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

2) 현재의 유기질 비료 제조의 문제점

현재 개발된 유기질 비료의 생산 방법은 주로 농축산 부산물에 톱밥을 일정량 섞어 수분 함량을 조절한 후, 자연 발효를 유도하거나 미생물 제재를 일정량 첨가하여 만드는 방법이다. 수분 함량을 조절하기 위하여 톱밥 또는 미강 등을 사용하고 있으나 제한된 생산량의 톱밥을 쓰기 때문에 이미 톱밥의 수요가 생산량을 초과하고 있으며 가격도 약 150원/kg으로 유기질 비료의 생산단가를 증가시키는 주요한 원인이 되고 있다. 계속되는 톱밥의 수요가 증가하고 있기 때문에 중국 등지에서 수입하고 있는 실정이다.

3) 유기질 비료 생산 비용의 절감

벼의 도정 공정에서 발생하는 부산물을 이용하여 유기질 비료를 생산할 수 있다면 화학비료의 사용에 따른 환경 오염을 방지할 수 있으며 부산물의 재활용에 의한 생산비용도 절감할 수 있을 것이다.

다. 사회·문화적 측면

1) 유기질 비료의 수요 증대

전국의 시설작물 재배면적은 1998년 현재 약 75,812ha이며 이 시설작물의 재배에 사용된 상토재의 양은 약 815,504톤으로 매출량을 기준으로 3,662억원이다. 화학비료의 남용에 의한 환경 오염의 방지책으로 유기질 비료를 선호하므로 유기질 비료의 수요는 계속 증가할 것이다. 현재 유기질 비료를 만든 일반적인 재료중의 하나가 톱밥이나, 수요의 증가와 제한된 생산 때문에 가격이 계속 상승되고 있다.

2) 환경 오염원 제거에 의한 쾌적한 환경 조성

농촌 사회의 환경 오염원이 될 수 있는 왕겨와 쌀겨를 이용하여 농업에 필요한 유기질 비료를 생산한다는 본 연구는 환경오염물의 제거, 환경오염의 정화비용 절감과 부산물의 재활용이라는 여러 가지의 예상 효과를 기대할 수 있다. 사회 문화적인 측면에서의 기대효과는 이론과 실체를 바탕으로 하는 학문적인 연구가 우리의 실생활에서 부딪치는 필수 불가결한 문제를 풀 수 있다는 좋은 예를 보여주는 것이라 하겠다. 농촌 사회에 소속된 사람들에게 과학이 우리 생활과 동떨어져 존재하는 것이 아니라는 인식을 심어주기에 충분한 과제라고 할 수 있겠다. 특히, 과학의 혜택에서 소외된 계급이라고 생각하였던 농업에 종사하는 사람들에게 돌아갈 수 있는 직접적인 혜택은 과학 및 연구의 개념에 대한 그들의 의식구조를 바꾸기에 충분할 것이다.

제 2절 연구개발 내용 및 범위

1. 최종연구목표

가. 균주의 대량생산 기술 개발

- 1) 왕겨와 미강과 같은 농업 부산물을 이용하여 섬유소 분해효소 생산 균주를 대량 생산하기 위한 배지 조건을 최적화한다.
- 2) 왕겨와 미강과 같은 농업 부산물을 이용하여 섬유소 분해효소 생산 균주를 대량 생산하기 위한 배양 조건 최적화한다.
- 3) 플라스크 규모의 실험에서 최적화한 조건을 참고로 7L 생물배양기 규모에서 왕겨와 미강과 같은 농업 부산물을 이용하여 섬유소 분해효소 생산 균주의 대량배양 조건을 최적화한다.
- 4) 7L 생물배양기 규모의 실험에서 최적화한 조건을 참고로 100L 생물배양기 규모에서 왕겨와 미강과 같은 농업 부산물을 이용하여 섬유소 분해효소 생산 균주의 대량배양 조건 최적화한다.

다. 미생물제제의 생산 기술 개발

1) 왕겨를 이용한 미생물 제제 생산

섬유소 분해효소 생산 균주를 사용하여 왕겨를 이용한 미생물 제제의 생산 조건을 최적화한다. 생산 조건에는 최적 접종량 결정, 최적 배양 온도 결정, 최적 배양 시간 결정, 최적 수분 함량 결정 및 제조한 미생물 제제의 최적 보관 조건 결정 등을 포함한다.

2) 미강을 이용한 미생물 제제 생산

섬유소 분해효소 생산 균주를 사용하여 미강을 이용한 미생물 제제의 생산 조건을 최적화한다. 생산 조건에는 최적 접종량 결정, 최적 배양 온도 결정, 최적 배양 시간 결정, 최적 수분 함량 결정 및 제조한 미생물 제제의 최적 보관 조건 결정 등을 포함한다.

3) 미생물 제제의 생산 공정 개발

섬유소 분해효소 생산 균주를 사용하여 농업 부산물인 왕겨와 미강을 이용하여 미생물 제제를 대량 생산하는 공정을 개발한다.

다. 효과검정 및 용도 개발

1) 포트 및 포장 규모의 효과 검정

포트 및 포장에서 상추, 배추, 오이, 토마토 및 딸기 등의 작물에 대한 미생물 제제의 효과를 검정한다.

2) 미생물 제제의 처리가 토양의 미생물 및 물리·화학적 성분의 변화에 미치는 영향

미생물 제제의 처리가 처리한 토양의 미생물 상의 변화 및 물리·화학적 성분의 변화에 미치는 영향을 조사한다.

4) 미생물 제제의 용도 개발

미생물 제제가 딸기와 같은 작물에 미치는 영향을 검토하여 미생물 제제를 상토제로 개발할 수 있는 가능성에 대하여 검토한다.

2. 연차별 연구개발의 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	연구 개발 결과
1차 년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ● 균주의 대량생산 기술개발 (플라스크 규모) 	<ul style="list-style-type: none"> • 배지조건의 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 탄소원 결정 - 최적 탄소원의 농도 결정 - 최적 질소원 결정 - 최적 질소원의 농도 결정 - 최적 무기염의 종류 및 농도 결정 • 배양조건의 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 생육 온도 결정 - 최적 교반 속도 결정 - 최적 초기 pH 결정 	플라스크 규모의 배양 조건 최적화
	<ul style="list-style-type: none"> ● 미생물 제제의 생산기술 개발 (실험실 규모) 	<ul style="list-style-type: none"> • 왕겨를 이용한 미생물 제제 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 접종량 결정 - 최적 배양온도 결정 - 최적 배양 시간 결정 - 최적 수분 함량 결정 - 최적 보관 조건 결정 • 미강을 이용한 미생물 제제 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 접종량 결정 - 최적 배양온도 결정 - 최적 배양 시간 결정 - 최적 수분 함량 결정 - 최적 보관 조건 결정 	실험실 규모의 미생물 제제 생산 기술 최적화
	<ul style="list-style-type: none"> ● 효과 검정 및 용도 개발 (포트 규모) 	<ul style="list-style-type: none"> • 효과검정 <ul style="list-style-type: none"> - 포트규모의 효과검정 (배추 및 상추) - 토양의 물리·화학적 변화검토 	포트 규모의 효과 검정 및 토양에 미치는 영향 검토

<p>2차 년도 (2004)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 균주의 대량생산 기술개발 (생물배양기 규모) ● 미생물 제제의 생산기술 개발 (pilot 규모) ● 효과 검정 및 용도 개발 (포장 규모) 	<ul style="list-style-type: none"> • 배지조건의 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 탄소원 결정 - 최적 탄소원의 농도 결정 - 최적 질소원 결정 - 최적 질소원의 농도 결정 • 배양조건의 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 생육 온도 결정 - 최적 교반 속도 결정 - 최적 통기량 결정 - 최적 초기 pH 결정 • 왕겨를 이용한 미생물 제제 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 접종량 결정 - 최적 배양온도 결정 - 최적 배양 시간 결정 - 최적 수분 함량 결정 - 최적 보관 조건 결정 • 미강을 이용한 미생물 제제 생산 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 접종량 결정 - 최적 배양온도 결정 - 최적 배양 시간 결정 - 최적 수분 함량 결정 - 최적 보관 조건 결정 • 효과검정 <ul style="list-style-type: none"> - 포장규모의 효과검정 (배추 및 상추) - 토양의 물리·화학적 변화 검토 	<p>생물배양기 규모의 배양 조건 최적화</p> <p>pilot 규모의 미생물 제제 생산 기술 최적화</p> <p>포장 규모의 효과 검정 및 토양에 미치는 영향 검토</p>
-------------------------	---	--	--

<p>3차 년도 (2005)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 균주의 대량생산 기술개발 (Pilot 규모) ● 미생물 제제의 생산기술 개발 (시제품 생산 규모) ● 효과 검정 및 용도 개발 (용도 개발) 	<ul style="list-style-type: none"> • 배지조건의 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 탄소원 결정 - 최적 탄소원의 농도 결정 - 최적 질소원 결정 - 최적 질소원의 농도 결정 • 배양조건의 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 최적 생육 온도 결정 - 최적 교반 속도 결정 - 최적 통기량 결정 - 최적 초기 pH 결정 - 최적 내압 결정 • 왕겨를 이용한 미생물 제제의 시제품 생산 • 미강을 이용한 미생물 제제의 시제품 생산 • 왕겨와 미강을 이용하여 생산한 미생물 제제의 최적 혼합비 결정 • 용도 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 배추와 상추 외의 과수작물을 이용한 효과 검정 - 혼합 미생물 제제의 효과 검정 - 토양의 물리·화학적 변화 검토 	<p>pilot 규모의 배양 조건 최적화</p> <p>미생물 제제의 시제품 생산 및 혼합제제의 개발</p> <p>미생물 제제의 용도 개발 및 혼합제의 사용이 토양에 미치는 영향 검토</p>
-------------------------	--	--	---

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 외국 타 연구기관의 기술 현황

1. 국외의 기술 현황

벼의 도정 공정에서 대량 발생하는 부산물을 재활용하는 예로서, 미국의 한 기업체에서는 왕겨를 이용하여 규소 결정체인 휘커스를 생산하여 고가로 수출하고 있다. 이탈리아 캐나다에서는 왕겨를 태운 후에 재를 이용하여 특수한 벽돌을 만드는데 상업적인 성공을 하였다고 한다. 선진국을 중심으로 왕겨를 재활용할 수 있는 기술의 개발이 부분적으로 이루어지고 있으나 벼 도정 공정의 부산물인 왕겨 또는 쌀겨를 대량으로 재활용하는 기술의 개발은 전무한 상태이다. 벼 도정 공정의 또 다른 부산물인 쌀겨를 재활용하는 한 방법으로 쌀겨에서 기름을 짜서 이용하고 찌꺼기는 가축의 사료로 이용하고 있으나 이를 이용하여 산업적인 규모로 새로운 물질을 생산하거나 재활용하는 기술에 대한 연구는 아직 보고되지 않는 실정이다.

섬유소 분해효소에 대한 연구는 미국, 중국, 영국, 일본 및 유럽과 남미 등 전 세계적으로 진행되고 있으며 생물자원이 풍부한 인도, 남아프리카공화국 및 짐바브웨 등에서도 농업 부산물을 재활용하려는 노력으로 섬유소 분해효소에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 중국의 경우에는 농업부산물을 이용하여 에탄올을 생산하려는 연구의 선행연구로서 섬유소 분해효소의 대량생산에 대한 기술을 개발하고 있는 중이다. 섬유소 분해효소를 산업적으로 생산하는 업체는 Novo Nordisk, Genencor, Alko, Daiwa 등이 있으며 Novo Nordisk은 인슐린을 비롯한 의약품 및 여러 종류의 산업용 효소를 생산하여 전 세계에 공급하고 있다. 다국적 기업인 Genentech과 Corining의 합작으로 탄생한 Genencor는 전분을 효소분해하여 포도당으로 만드는 공정과 관련된 모든 효소 및 연료용 에탄올을 생산하고 있으며 이에 대한 많은 기술을 축적하고 있다.

2. 국내의 기술 현황

벼의 도정 공정에서 대량 발생하는 왕겨 및 쌀겨의 재활용 및 재활용 기술개발은 매우 미미한 실정이다. 특히 벼의 껍질인 왕겨는 그 조직이 매우 단단하여 쉽게 부서지거나 분해되지 않기 때문에 왕겨를 재활용하는 방법은 거의 없는 실정이다. 왕겨에 톱밥 및 퇴비를 혼합하여 버섯재배용 배지를 생산하거나 왕겨 숯 등을 생산하고 있으나 그 소비량은 왕겨의 생산에 비하여 극히 미비한 실정이다. 왕겨와 송진 및 전분을 혼합하여 일회용 그릇을 생산하는 기술이 개발되어 화학재료를 주성분으로 하는 일회용 그릇을 대신할 수 있다.

왕겨에 대한 부분적인 재활용 기술이 개발되어 왕겨를 재활용하고 있으나 대

량으로 이용할 수 있는 근본적인 기술의 개발은 전무한 실정이다. 왕겨의 주성분인 섬유소를 분해하는 효소를 생산하는 균주를 사용하여 유기물인 왕겨를 분해하고 분해 산물을 이용할 수 있는 원천적인 기술의 개발이 필요하다. 이는 자연에서 생산된 유기물을 부분적으로 분해하여 자연으로 되돌려 환경 친화적인 재활용 기술의 개발을 의미한다. 따라서 섬유소 분해 미생물을 대량으로 배양하고 이 배양액과 왕겨 또는 쌀겨를 일정한 비율로 혼합한 후, 일정시간 고상 배양하여 유기질 비료를 개발한다면 이는 왕겨를 대량으로 재활용하는 기술의 개발인 동시에 환경 오염원을 근원적으로 제거하는 방법의 개발일 것이다. 쌀 도정 공정의 부산물을 사용하여 미생물 제제를 개발하는 것은 친환경적인 유기질 비료의 대량 생산과 농업에서의 경제성을 향상을 의미하는 것이다. 왕겨의 주성분인 섬유소를 분해하는 효소를 생산하는 균주를 사용하여 유기물인 왕겨를 분해하고 분해 산물을 이용할 수 있는 원천적인 기술의 개발이 필요하다.

제2절 본 연구기관의 관련 기술 현황

1. 선행연구

가. 섬유소 분해 효소를 생산하는 균주 분리

본 연구 과제의 주관기관인 동아대학교의 생물화학공학 실험실에서는 식품 가공 부산물인 사과박과 간장박의 재활용을 위한 기술 개발에 대한 연구를 수행하는 과정에서 섬유소를 분해하는 효소를 생산하는 균주를 토양에서 분리하였다. 분리한 이 균주는 섬유소 분해효소(cellulase)외에 키틴 분해효소(chitinase), 키토산 분해효소(chitosanase) 및 단백질 분해효소(protease)를 생산함을 확인하였다. 따라서 왕겨와 쌀겨를 재활용할 수 있는 기술의 개발에 필요한 중요한 균주를 이미 확보하였으므로 본 연구과제의 성공적인 수행에 큰 어려움은 없을 것으로 예상된다.

나. 섬유소 분해효소 생산 균주의 왕겨 이용성 확인

토양에서 분리한 균주는 그림 1에서 보는 바와 같이 왕겨를 유일한 영양원으로 사용하여 제조한 고체 배지에서 생육할 수 있다는 결과를 얻었다. 이는 분리한 균주가 섬유소 분해효소를 생산하고 이 효소를 사용하여 왕겨의 주성분이 섬유소를 분해하고 생산된 분해산물을 영양분으로 사용할 수 있음을 보여 주는 간접적인 증거이다. 또한 왕겨를 유일한 영양원으로 사용하여 제조한 액체 배지에서도 균체의 증식을 확인할 수 있었다. 따라서 분리한 균주는 왕겨 또는 쌀겨와 같이 섬유소가 주성분인 농업 부산물을 사용하여 유기질 비료를 생산하는 기술의 개발에 필요한 균주임이 확인 되었다고 할 수 있다.



그림 1. 섬유소 분해효소 생산 균주의 왕겨 이용성

다. 왕겨를 이용하여 섬유소 분해효소를 생산하는 해양 미생물의 분리 및 동정

본 연구팀은 섬유소 분해효소의 생산성이 우수한 균주를 선별하기 위하여 경상도 인근 바다에서 약 1,000 종의 미생물을 분리하였으며 이 중에서 섬유소 분해효소의 생산성이 높은 12종의 미생물을 확보하였다. 이 중에는 왕겨를 유일한 영양원으로 사용하여 섬유소 분해효소를 생산하는 미생물을 확인하였으며 16s rDNA의 염기서열 및 gyrase A 유전자를 분석한 결과, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*임을 확인하였다. 이 균주에 대한 배지조건의 최적화를 확립하였으며 7L 생물배양기를 사용하여 배양 조건의 최적화에 대한 연구를 진행 중이다.

라. 토양에서 분리한 균주의 섬유소 분해효소 생산 확인

탄소원으로 섬유소(cellulose)의 농도를 다르게 제조한 배지를 사용하여 배양한 배양액에 수거하여 전기 영동한 결과는 그림 3과 같으며 탄소원의 농도에 따라 생산되는 특정 단백질의 농도가 다름을 확인하였다. 이는 분자량이 약 50,000인 단백질이 inducible한 섬유소 분해효소임을 증명하는 간접적인 증거이다.

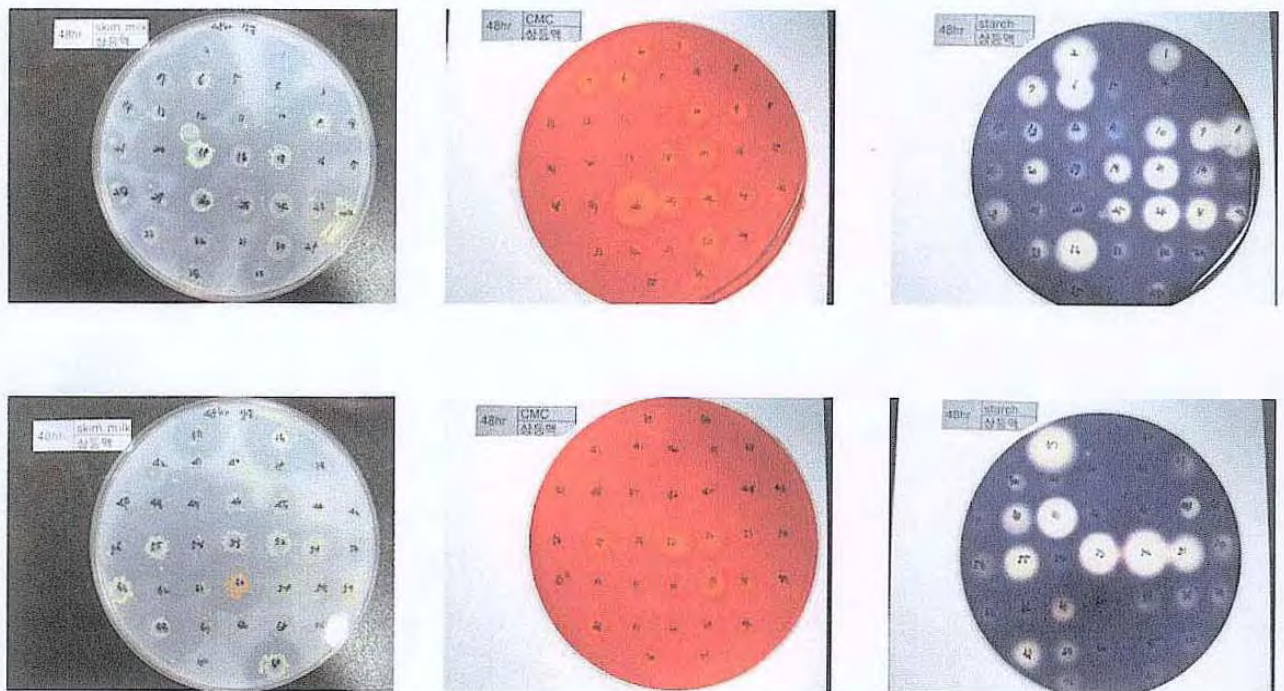


그림 2. 섬유소 분해효소를 생산하는 해양미생물의 선별

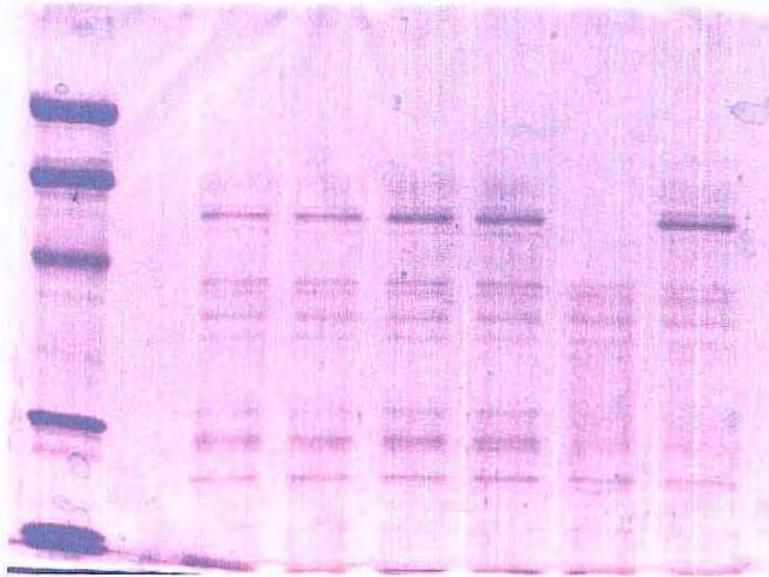


그림 3. 탄소원의 농도별 배양액에 생산된 단백질양의 변화 (좌로부터; molecular weight marker, 0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% 및 3.0% 함유소)

2. 보유 시설 및 장비

효소를 대량생산하기 위하여 먼저 실험실규모에서 플라스크와 7L 발효조에서 최적배양조건을 확립한 다음, 100L 발효조로의 scale-up을 시도한다. 균체의 분리에 사용되는 연속원심분리기는 tubular-bowl 타입으로서 분당 10L의 처리속도로 배양액에서 균체를 분리해낼 수 있다. 한외여과(ultra filtration)는 고분자의 물질이 저분자의 용질과 함께 용매에 녹아있는 경우에, 초미세한 구멍을 가진 막을 높은 수압으로 통과시킴으로 저분자의 용질과 고분자의 물질을 분리하는 원리이다. 미생물에서 생산되어지는 효소의 분자량에 근거해서 그 이하의 저분자물질을 분리하여 정제함과 동시에 효소액을 농축시킴으로 다음 조작을 용이하게 하는 역할을 한다. 동결건조(freeze drying)는 항생제, 효소액과 박테리아 현탁액을 건조시킬 때 사용되는 방식으로 얼어있는 효소농축액으로부터 승화에 의해 수분을 제거하는 방법이다. 대부분의 효소가 열에 민감하기 때문에 열변성에 의한 실활을 막기 위해 동결건조방식으로 효소를 결정화한다.

본 연구의 총괄책임자인 이진우 교수의 생물화학공학실험실은 미생물의 기초 연구에 필요한 모든 시설을 갖추고 있고 미생물의 대량생산이 가능한 100L의 생물배양기와 pilot 수준의 분리, 정제 장비도 갖추고 있다. 5대의 7L 생물배양기와 1대의 100L 생물배양기, 연속원심분리기, 한외여과장치, 진공동결 건조기, 진공건조기 등을 갖추고 있으며, 이를 사용할 수 있는 숙련된 연구 인력을 보유하고 있다.



Clean Bench



Shaking Incubator



100 L fermenter



7 L Jar fermenter

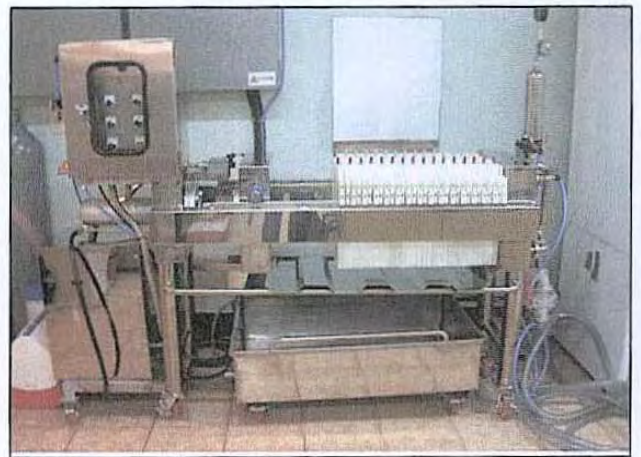
그림 4. 생물화학공학연구실의 미생물 배양관련 연구 장비



Continuous Centrifuse



UF System



Filter press

그림 5. 생물화학공학연구실의 분리 및 정제 관련 연구 장비

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 섬유소 분해효소 생산 균주의 동정

1. 연구수행 방법

가. 16s rDNA 염기서열 분석

토양에서 분리한 섬유소 생산균주의 동정은 (주)마이크로아이드에 의뢰하였으며 균주의 동정은 16s rDNA의 부분적인 염기서열 확인과 *gyrA* 유전자의 전체 염기서열을 분석하여 동정하였다. 섬유소 분해효소 생성능이 뛰어난 것으로 판별된 균주를 배양한 후, 배양액을 균질기(homogenizer)로 파쇄하여 100 μ l의 TE buffer(pH 8.0)에 녹이고, 리조자임(lysozyme)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 반응시킴으로써 세포벽을 분해하였다. 세포벽이 분해된 균체에 500 μ l의 구아니딘-사코실 용액(guanidine-sarcosyl solution: Guanidine thiocyanate(Sigma) 60g, 0.5mM EDTA 20ml, 및 Deionized water 20ml)을 첨가하여 원심분리하고 상등액을 수득하였다.

수거한 상등액에 0.54배 부피의 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여 염색체 DNA를 침전시켰다. 상등액을 제거하여 침전된 염색체 DNA를 수득하고, 90 μ l의 TE buffer(pH 8.0)에 녹인 후, 10 μ l의 RNase A(10 mg/ml, Sigma)를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시킨 다음, 3배 부피의 에탄올을 첨가하여 염색체 DNA를 침전시켰다. 상기 침전된 염색체 DNA를 30 μ l의 증류수에 녹여 16S rDNA의 증폭을 위한 주형으로 사용하였다.

서열번호 1로 표시된 27F(5' -AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') 및 서열번호 2로 표시된 1522R(5' -AAG GAG GTG WTC CAR CC-3')를 프라이머로 사용하고, 다음과 같은 조건하에서 PCR을 수행하여 16S rDNA 유전자를 증폭하였다. 사용기기는 GenAmp TM PCR System 9700(Applied Biosystem)이었으며 PCR을 위한 반응 혼합물(reaction mixture, 총 부피: 50 μ l)의 구성은 주형 DNA 10ng, 200 μ M dNTP, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 40mM KCl, 0.15mM MgCl₂, 3mM MgSO₄, 20 μ g BSA, 0.005U Vent 중합효소, 1U Taq 중합효소 및 프라이머(27F 및 1522R 각각 0.5 μ M) 이었다. 16S rDNA 증폭용 PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C, 3분 → [94 $^{\circ}$ C, 30초 → 50 $^{\circ}$ C, 30초 → 72 $^{\circ}$ C, 5분] 30회 → post-elongation: 72 $^{\circ}$ C, 10분이었다.

증폭된 PCR 산물은 Wizard PCR Preps DNA Purification System(Promega)을 이용하여 정제하고, 1% agarose gel에 전기영동하여 16S rDNA의 크기를 확인하였다. 염기서열은 ddNTP에 형광물질을 표지한 BigDye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystem)를 사용하여, 다음과 같은 PCR 반응을 수행한 후, ABI PRISM TM 310 Genetic Analyzer(Applied

Biosystem)를 이용하여 분석하였다. 염기서열 분석용 PCR 반응 조건은 [96°C 10초 → 50°C 5초 → 60°C 4분]이었으며 총 25회 반복하였다.

나. Gyrase A 염기서열 분석

위의 실험에서 16s rDNA의 염기서열을 분석하기 위하여 분리한 DNA를 주형으로 사용하고, 서열번호 4로 기재된 p-gyrA-f(5' -CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3') 및 서열번호 5로 기재된 p-gyrA-r(5' -CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3')을 프라이머로 사용하고, 다음과 같은 조건하에서 PCR을 수행하여 자이레이즈 A 유전자를 증폭하였다. Gyrase A의 유전자 증폭을 위하여 사용기기는 GenAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystem)이었으며, PCR을 위한 반응 혼합물(reaction mixture, 총 부피: 50ul)의 구성은 주형 DNA 10ng, 200uM dNTP, 10mM Tris-HCl(pH 9.0), 40mM KCl, 0.15mM MgCl₂, 3mM MgSO₄, 20ug BSA, 0.005U Vent 중합효소, 1U Taq 중합효소 및 프라이머(p-gyrA-f 및 p-gyrA-r 각각 0.5uM)이었다. PCR 반응조건은 94°C, 3분 → [94°C, 30초 → 50°C, 30초 → 72°C, 5분] 30회 → post-elongation: 72°C, 10분이었다.

증폭된 PCR 산물은 Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega)을 이용하여 정제하고, 1% agarose gel에 전기영동하여 gyrase A DNA의 크기를 확인하였다. 염기서열은 ddNTP에 형광물질을 표지한 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Applied Biosystem)를 사용하여, 다음과 같은 PCR 반응을 수행한 후, ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystem)를 이용하여 분석하였다. 염기서열 분석용 PCR 반응 조건은 [96°C 10초 → 50°C 5초 → 60°C 4분]이었으며 25회 반복하였다.

2. 연구결과

가. 16s rDNA 염기서열

섭유소 분해 능력이 있는 균주를 토양에서 분리하고 16s rDNA의 염기서열을 부분적으로 결정하고 *gyrA* 유전자의 염기서열을 결정하여 동정하였다. 16s rDNA의 결정된 염기서열의 개수는 814bp이며 결정된 염기서열은 아래와 같으며 염기서열을 분석한 결과, 섭유소 분해효소를 생산하는 균주는 *Bacillus* 속으로 판명되었다.

```
5'-GCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGC
TCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTA
AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTCTGAAC
CGCATGGTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCC
GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGT
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
```

CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGG
AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
GGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCA
GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAAC
TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACG
CTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGT-3'

나. Gyrase A 유전자 염기서열

Bacillus 속으로 일차 판명된 균주의 gyrase A 유전자의 959개의 염기서열을 분석한 결과는 아래와 같다.

5'-TATGCAATGAGCGTTATCGTATCCCGGGCGCTTCCGGATGTGCGTGACGGT
CTGAAGCCGGTTCACAGACGGATTTTGTACGCAATGAATGATTTAGGCATGA
CCAGTGACAAACCATATAAAAAATCTGCCCGTATCGTCCGGTGAAGTTATCGG
TAAGTACCACCCGCACGGTGAATCAGCGGTTTACGAATCAATGGTCAGAATG
GCGCAGGATTTTAACTACCGCTACATGCTTGTGACGGACACGGCAACTTCG
GTTCGGTTGACGGCGACTCAGCGGCCGCGATGCGTTACACAGAAGCGAGAATG
TCAAAAATCGCAATGGAAATTCTGCGTGACATTACGAAAGACACGATTGACT
ATCAAGATAACTATGACGGTTCAGAAAGAGAGCCTGCCGTCATGCCTTCGAG
ATTTCCGAATCTGCTCGTAAACGGGGCTGCCGGTATTGCGGTCGGAATGGCG
ACAAACATTCCCCCGCATCAGCTTGGGGAAAGTCATTGAAGGCGTGCTTGCCGT
AAGTGAGAATCCTGAGATTACAAACCAGGAGCTGATGGAATACATCCCGGGC
CCGGATTTTCCGACTGCAGGTCAGATTTTGGGCGGAGCGGCATCCGCAAGGC
ATATGAATCCGGACGGGGATCAATCACGATCCGGGGCTAAGGCTGAAATCGAA
GAGACTTCATCGGGAAAAGAAAGAATTATTGTCACGGAACTTCCTTATCAGG
TGAACAAAGCGAGATTAATTGAAAAAATCGCGGATCTTGTCCGAGACAAAA
AAATCGAAGGAATTACCGATCTGCGAGACGAATCCGACCGTAACGGAAATGAG
AATCGTCATTGAGATCCGCCGTGACGCCAATGCTCACGTCATTTTGAATAAC
CTGTACAAACAAACGGCCCTGCAGACGTCTTTCGGAAATCAATCTGCTGGCGCT
CGTTGACGGACAGCCGAAGGT-3'

표 2. 섬유소 분해효소 생산균주의 16s rDNA 염기서열 분석에 의한 유사성

Strain	Accession No	Similarity	nt differences /compared
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23350T	X60605	99.63	3/806
<i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070T	AB021181	99.51	4/814
<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031T	AB021198	99.39	5/814
<i>Bacillus</i> subsp. <i>subtilis</i> DSM 10T	AJ276351	99.26	6/814
<i>Bacillus mojavensis</i> IFO 15718T	AB021191	99.02	8/814
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> NRRL	B-23049T/AF074970	99.02	8/814
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13T	X68416	97.66	19/813
<i>Bacillus pumilus</i> NCDO 1766T	X60637	96.21	30/792
<i>Bacillus sporothermodurans</i> DSM 10599T	U49079	95.08	40/813
<i>Bacillus carboniphilus</i> JCM 9731T	AB021182	95.06	40/810
<i>Bacillus oleronius</i> DSM 9356T	X82492	94.55	44/808
<i>Bacillus indicus</i> Sd/3T	AJ583158	94.26	46/801

표 3. 섬유소 분해효소 생산균주의 gyrase A 유전자 염기서열 분석에 의한 유사성

Strain	Accession No	Similarity	nt differences /compared
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KCTC 1660T	AF272015	95.95	38/939
<i>Bacillus mojavensis</i> NRRL B-14698T	AF272019	84.10	124/780
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> NRRL	B-23049T AF272020	82.84	139/810
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> KCTC 3135T	AF272021	82.48	133/759
<i>Bacillus atrophaeus</i> KCTC 3701T	AF272016	82.07	156/870
<i>Bacillus vallismortis</i> NRRL B-14890T	AF272025	81.49	167/902
<i>Bacillus licheniformis</i> KCTC 1918T	AF272017	78.25	186/855

다. 균주 동정

토양에서 분리한 섬유소 분해효소 생산균주의 16s rDNA의 부분적 염기서열 분석 및 gyrase A 유전자의 염기서열을 분석한 결과, 표 2 및 3과 같이 99.95%의 확률로 *Bacillus amyloliquefaciens*로 판명되어서 *B. amyloliquefaciens* DL-3으로 명명하였다. *B. amyloliquefaciens* DL-3 균주의 gyrase A 유전자 염기서열을 바탕으로 구성된 Neighbor-joining tree는 아래 그림과 같다.

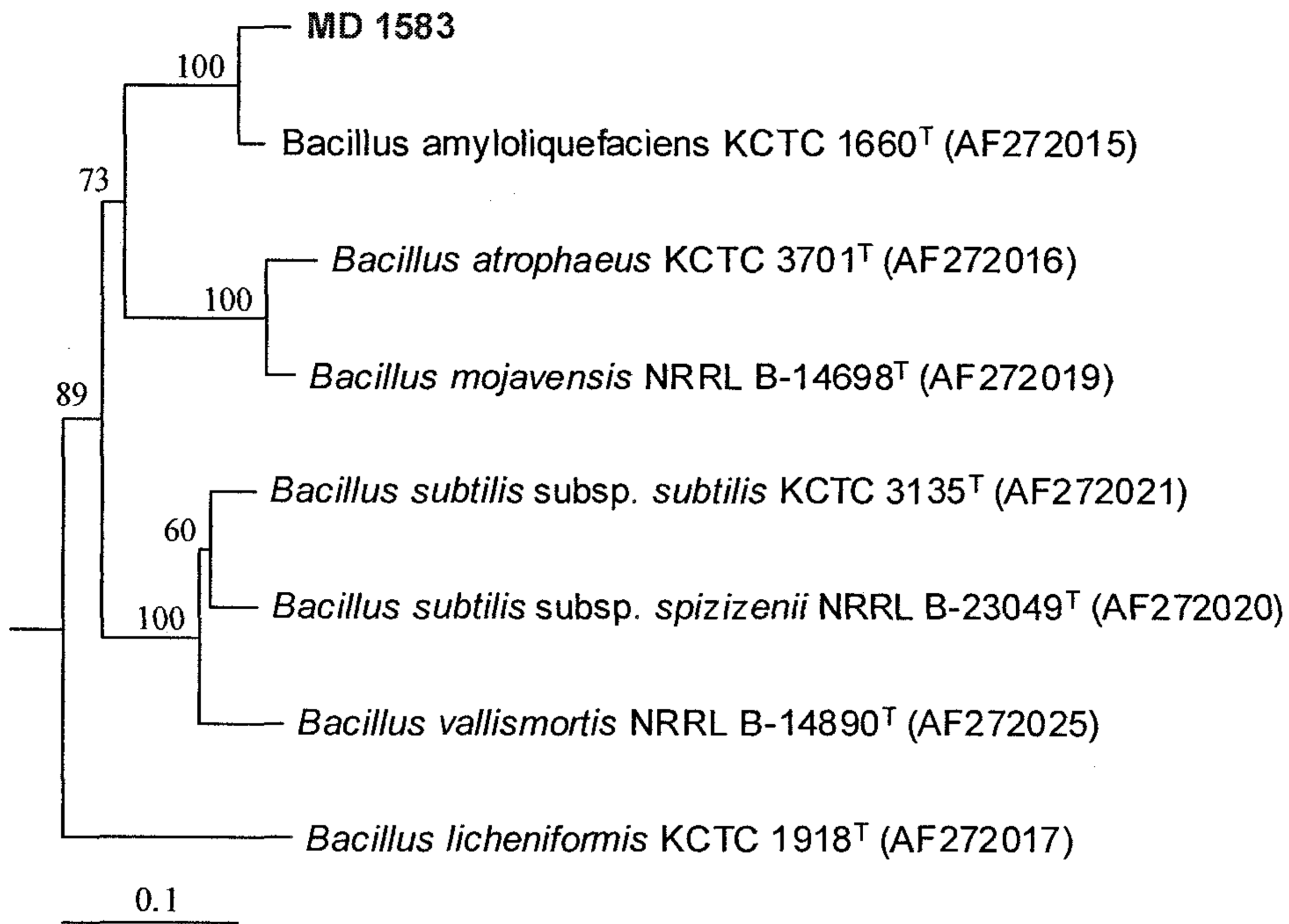


그림 6. 섬유소 분해효소 생산 *B. amyloliquefaciens* DL-3 균주의 gyrase A 유전자 염기서열을 바탕으로 구성된 Neighbor-joining tree

제2절 섬유소 분해효소 생산균주의 대량 생산 기술 개발

1. 연구수행 방법

가. 배지 조건 최적화

섬유소 분해효소를 생산하는 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 배지 및 생산 조건의 최적화는 선행 연구에서 확인한 배지를 참고로 수행하였다. 배지의 구성은 0.25% yeast extract, 0.5% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 0.06% $(NH_4)_2SO_4$ 이었으며 탄소원의 농도는 2%이었다. 사전 실험을 통하여 토양에서 분리한 섬유소 분해효소를 생산하는 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 배지를 최적화하기 위하여 탄소원으로 포도당, cellulose, carboxymethylcellulose (CMC), 아비셀, 미강 및 왕겨와 같은 각종 탄소원을 사용하여 배양한 후, 균주의 생균수, 섬유소 분해효소의 생산 및 총 단백질의 생산량을 측정하여 최적 탄소원을 확립하였다. 무기질소원과 유기질소원을 사용하여 배지를 제조하여 배양한 후, 균주의 생균수, 섬유소 분해효소의 생산 및 단백질의 생산량을 측정하고 경제성을 고려하여 최적 탄소원을 확립하였다. 균체의 증식은 흡광도 및 건조중량을 측정하여 비교하였으며 단백질 정량은 Bradford 법을 사용하여 균체를 제거한 상등액에 존재하는 총 단백질의 양을 측정하였다. 섬유소 분해효소의 생산성은 기질로서 carboxymethyl cellulose (CMC)를 사용하여 측정하였으며, 1%의 CMC와 20분간 반응시킨 상등액에 DNS를 첨가하여 550nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

질소원의 최적화는 탄소원의 실험과 같은 방법으로 수행하였다. 질소원으로 Yeast extract, Malt extract, Beef extract, Peptone, Tryptone, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 , NH_4Cl , CSL(corn steep liquor)을 사용하였으며 각각의 농도는 0.25%이었다. 교반 진탕배양기를 사용하여 최적 탄소원과 질소원 및 각각의 최적 농도를 구하기 위한 플라스크 실험의 기본 배양 조건은 배양온도와 교반속도가 각각 37°C에서 200 rpm에서 진행되었다.

나. 배양 조건 최적화

섬유소 분해효소를 생산하는 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 배양 조건을 최적화하기 위하여 플라스크 실험에서 가능한 최적 온도, 최적 배지의 pH 및 최적 교반속도 등을 결정하기 위한 실험을 탄소원 및 질소원의 최적화를 위한 실험과 동일한 방법 및 조건으로 수행하였다. 최적 생육 온도 및 최적 생육 pH를 확인하기 위하여 각기 다른 생육 온도 및 각기 다른 pH의 배지를 사용하여 배양한 후, 균주의 성장(생균수 및 건조 중량), 섬유소 분해효소의 생산성과 총 단백질량 등을 비교하여 섬유소 분해효소를 생산하는 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 최적 배양 조건을 확립하였다.

다. 생물배양기 규모에서의 배양 조건 최적화

플라스크 실험을 통하여 최적화된 탄소원 및 질소원과 각각의 최적 농도를 참고로 그림 7과 같이 7L 생물배양기(코바이오텍사, 한국)를 사용하여 탄소원, 질소원, 온도, 교반속도 및 통기량을 최적화하였다. 플라스크 실험을 통하여 얻은 최적 탄소원 및 질소원을 확인 실험하였으며 배양온도를 최적화하기 위하여 25℃, 30℃ 및 35℃에서 배양하면서 균주의 성장(생균수 및 건조 중량), 섬유소 분해효소의 생산성과 총 단백질량 등을 비교하여 섬유소 분해효소를 생산하는 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 최적 배양 조건을 확립하였다. 최적 초기 pH를 결정하기 위하여 배지의 pH를 각각 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0으로 조정하여 실험하였다.

라. pilot 규모에서의 배양 조건 최적화

플라스크 실험 및 7L 생물배양기를 사용하여 얻은 결과를 참고로 그림 8과 같이 100L 생물배양기를 사용하여 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 섬유소 분해효소 최적 생산조건을 확인하였다. 전배양 배지는 2% 포도당, 0.25% 효모추출물, 0.5% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 0.06% $(NH_4)_2SO_4$ 이었으며, 배지의 pH는 6.8로 조정하여 사용하였다. 본 배양의 배지는 탄소원으로 5.0% 왕겨를 사용하였으며 질소원으로 0.2%의 펄튼을 사용하였다. 배지에 첨가한 무기염의 종류와 농도는 전배양배지와 동일하였다. 본 배양의 배양온도, 교반속도 및 통기량은 37℃, 200 rpm 및 1.0 vvm이었다.



그림 7. 균주의 대량생산 기술 개발에 사용된 7L 생물배양기



그림 8. 균주의 대량생산 기술 개발에 사용된 100L 생물배양기

2. 연구결과

가. 배지 조건 최적화

1) 탄소원이 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

B. amyloliquefaciens DL-3의 배양 배지로서 풀루란 생산배지를 사용하였으며 탄소원으로 포도당, 왕겨, 미강, 팽연왕겨, 사과박, CMC, 아비셀 및 섬유소를 2%(w/v) 첨가한 배지에 균주를 접종하고 37°C에서 일정시간 배양하면서 생균수, 섬유소 분해효소의 활성 및 총 단백질 생산량을 측정된 결과, 그림 9에서와 같이 미강, 사과박 및 CMC가 균체의 생육에 우수한 탄소원으로 밝혀졌으며 왕겨의 이용도도 높으나 다른 탄소원에 비하여 소모되는 속도가 늦었다. 섬유소 분해효소에 대한 생산성은 그림 10에서와 같이 포도당을 탄소원으로 사용하였을 때에 가장 우수한 결과를 얻었으나 미강 및 왕겨를 사용한 경우에도 일정량 이상의 섬유소 분해효소가 생산됨을 확인하였다. 균체의 성장 및 섬유소 분해효소의 생산성 등을 비교한 결과, 미강 및 왕겨 등은 섬유소 분해효소 생산 균주인 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 유용한 탄소원임을 알 수 있었다.

2) 탄소원의 농도가 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

탄소원으로 포도당을 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 및 5.0%(w/v)의 농도로 첨가한 배지를 사용하여 일정한 온도에 배양하면서 균체의 성장 및 섬유소 분해효소의 생산성을 비교한 결과, 시간에 따라 생균수가 증가함을 알 수 있었으며 포도당의 농도가 2%일때 가장 높은 생균수를 나타냈다.

탄소원으로 미강을 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 및 5.0%(w/v)의 농도로 첨가한 배지를 사용하여 일정한 온도에 배양하면서 균체의 성장 및 섬유소 분해효소의 생산성을 비교한 결과, 미강의 농도가 1%이고 48시간 배양하였을 때에 가장 높은 생균수를 나타냈다. 섬유소 분해효소의 활성(unit)는 미강의 농도가 증가할수록 상승하여 미강의 농도가 5%일때 가장 높게 나타났다. 따라서 균체의 증식과 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 미강의 농도는 다름을 알 수 있었다.

탄소원으로 왕겨를 각각 0, 1.0, 2.0 및 5.0%(w/v)의 농도로 첨가한 배지를 사용하여 일정한 온도에 배양하면서 균체의 성장 및 섬유소 분해효소의 생산성을 비교한 결과, 그림 11과 같이 왕겨의 농도가 높을수록 생균수는 증가하였으나 시간의 경과에 따라 생균수의 차이는 없었다. 미강의 농도가 증가할수록 섬유소 분해효소의 활성도 증가하였으며 농도에 관계없이 배양 후, 25시간에 최고의 활성을 나타냈다.

탄소원으로 팽연왕겨를 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 및 5.0%(w/v)의 농도로 첨가한 배지를 사용하여 일정한 온도에 배양하면서 균체의 성장 및 섬유소 분해효소의 생산성을 비교한 결과, 그림 12와 같이 왕겨를 탄소원으로 사용하여 얻은 결과와 유사하였다. 즉, 팽연왕겨의 농도가 높을수록 생균수는 증가하였으나 시간의 경과에 따

라 팽연왕겨의 농도에 따른 생균수의 차이는 없었다. 팽연왕겨의 농도가 증가할수록 섬유소 분해효소의 활성도 증가하였으며 농도에 관계없이 배양 후, 25시간에 최고의 활성을 나타냈다.

탄소원으로 섬유소를 각각 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 및 5.0%(w/v)의 농도로 첨가한 배지를 사용하여 일정한 온도에 배양하면서 균체의 성장 및 섬유소 분해효소의 생산성을 비교한 결과, 그림 13과 같이 섬유소의 농도가 증가할수록 생균수가 증가하여 섬유소의 농도가 1%일때 24시간 배양 후에 최고의 생균수를 나타냈으며 이 후, 섬유소의 농도가 증가할수록 생균수는 감소하였다. 섬유소 분해효소의 활성은 그림 14와 같이 배양시간에 따라 증가하였으며 48시간 배양시에 섬유소의 농도에 따라 증가하였으며 섬유소의 농도가 2%일때 최고의 활성을 나타냈다.

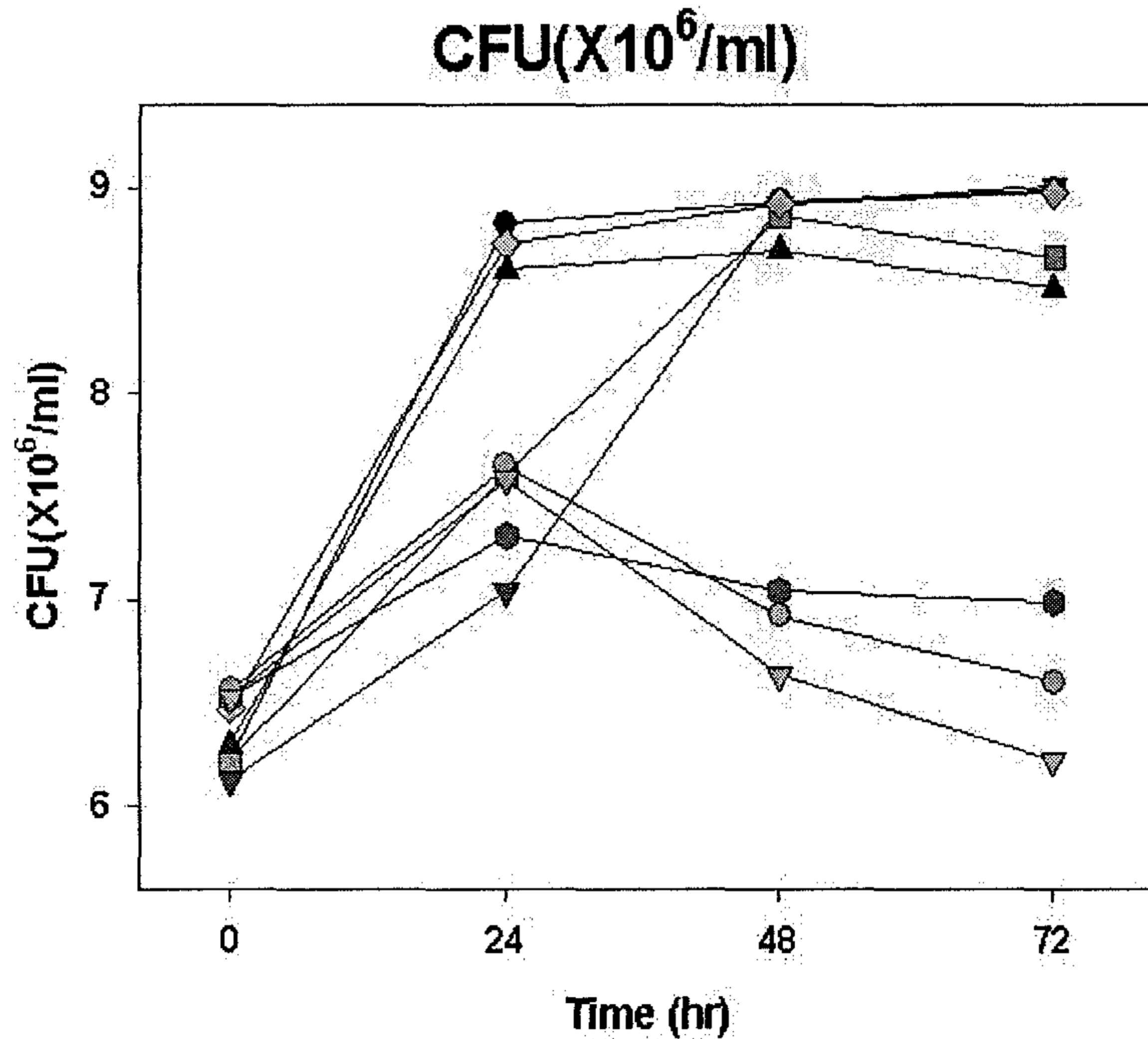


그림 9. 탄소원이 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

- Rice Hulls
- Expanded Rice Bran
- ▲ CMC
- Avi-cell
- ▼ Rice Bran
- ◆ Apple Pomace
- Glucose
- ▽ Cellulose

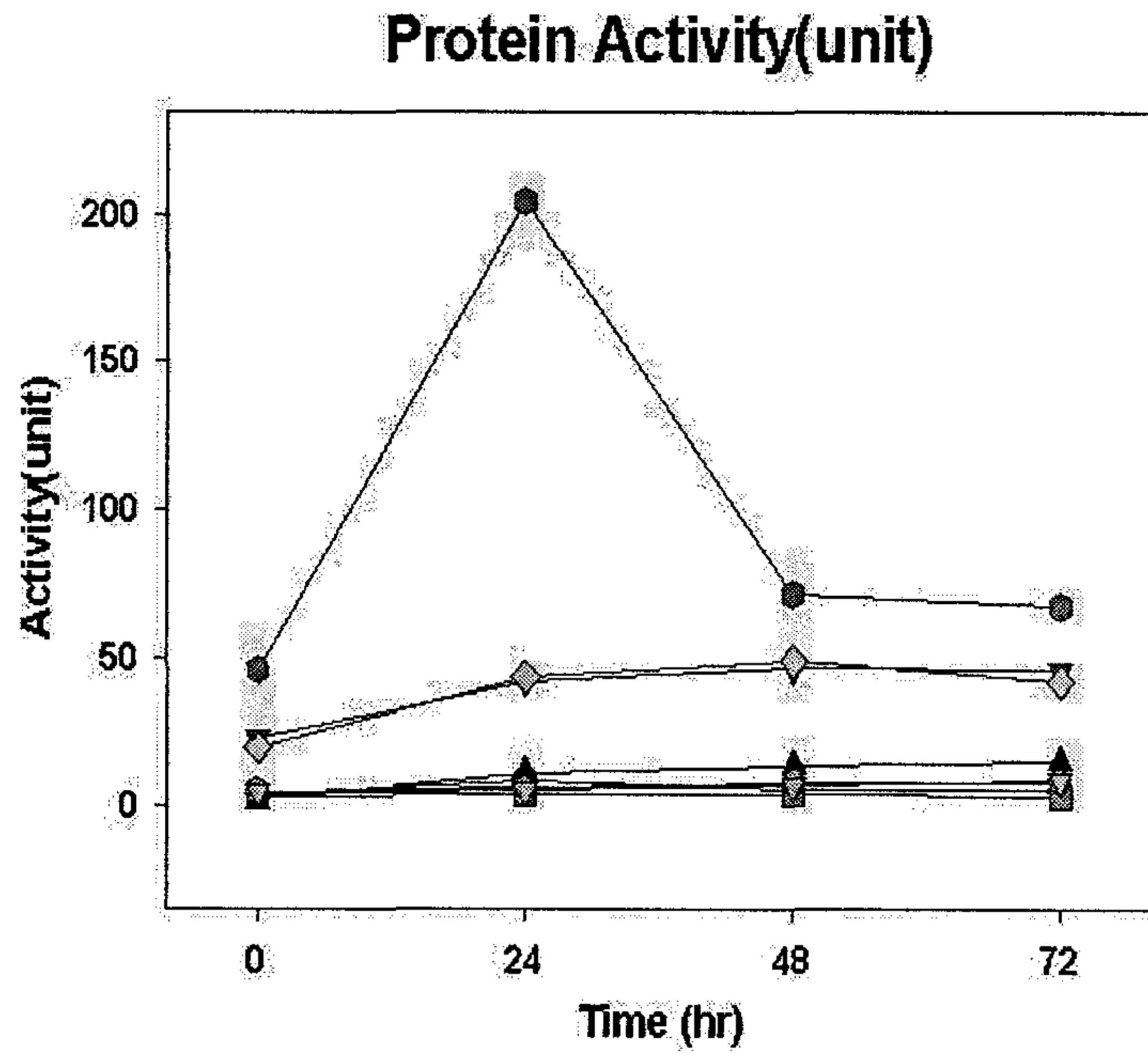


그림 10. 탄소원이 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

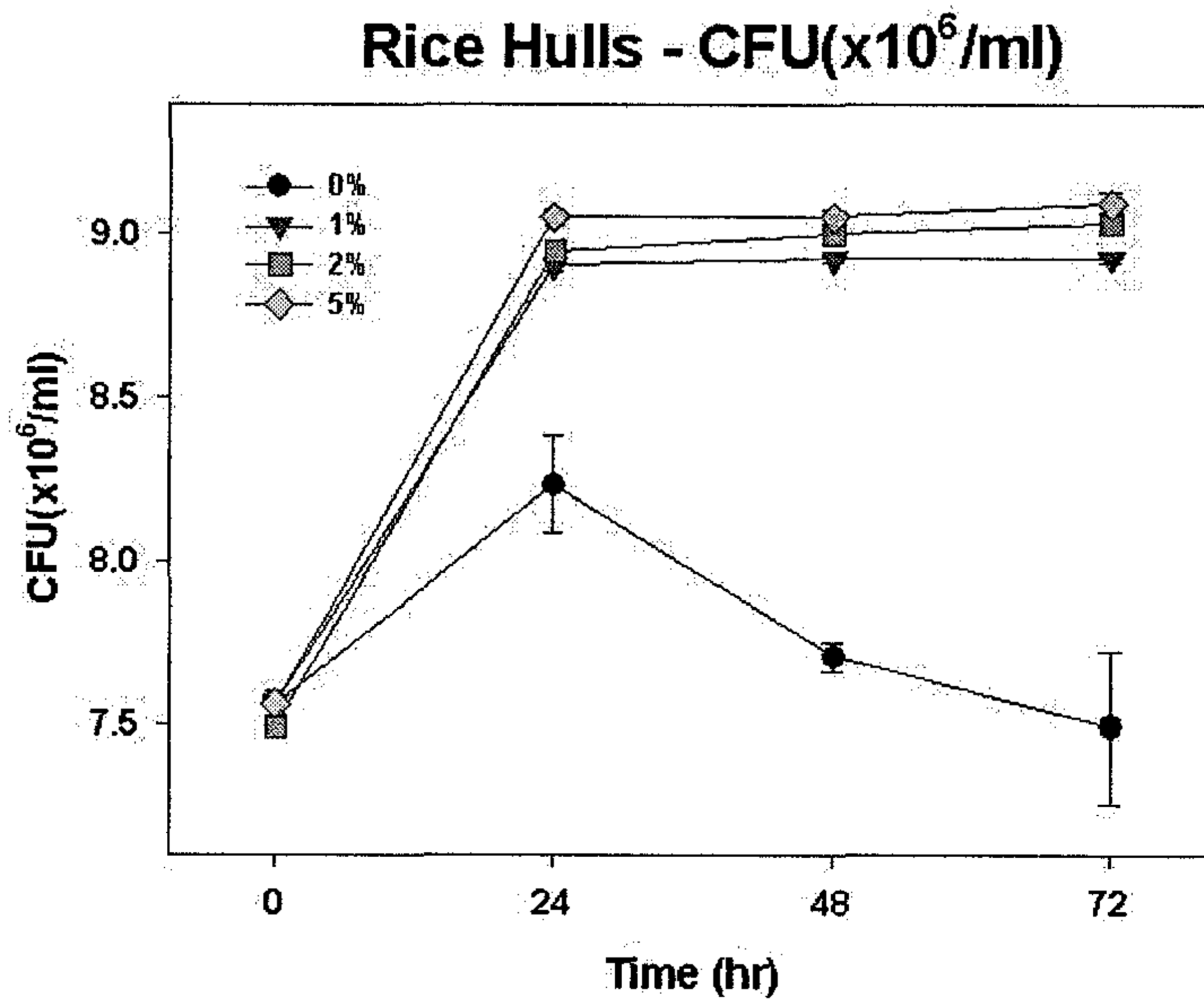


그림 11. 왕겨의 농도가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

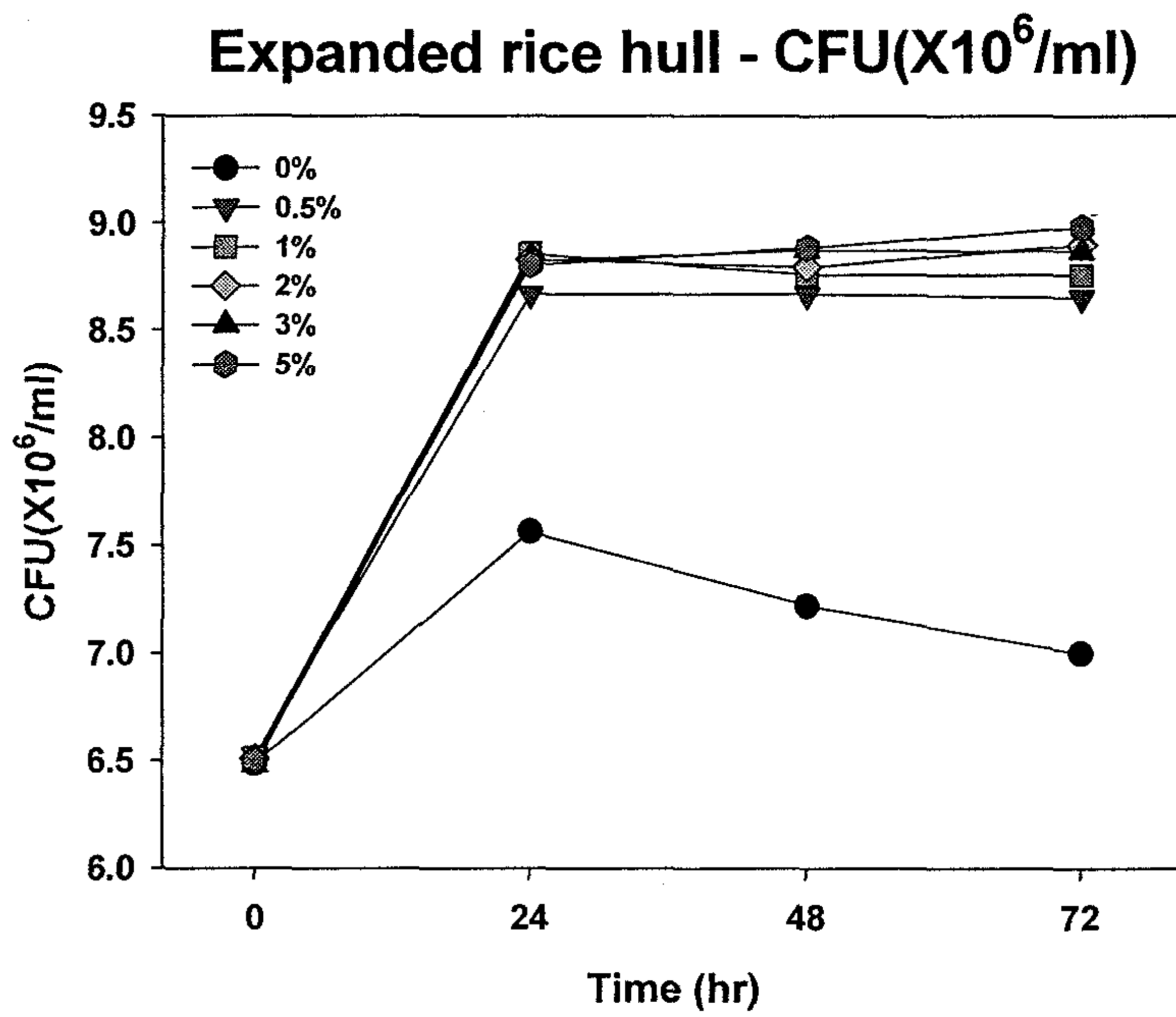


그림 12. 팽연왕겨의 농도가 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

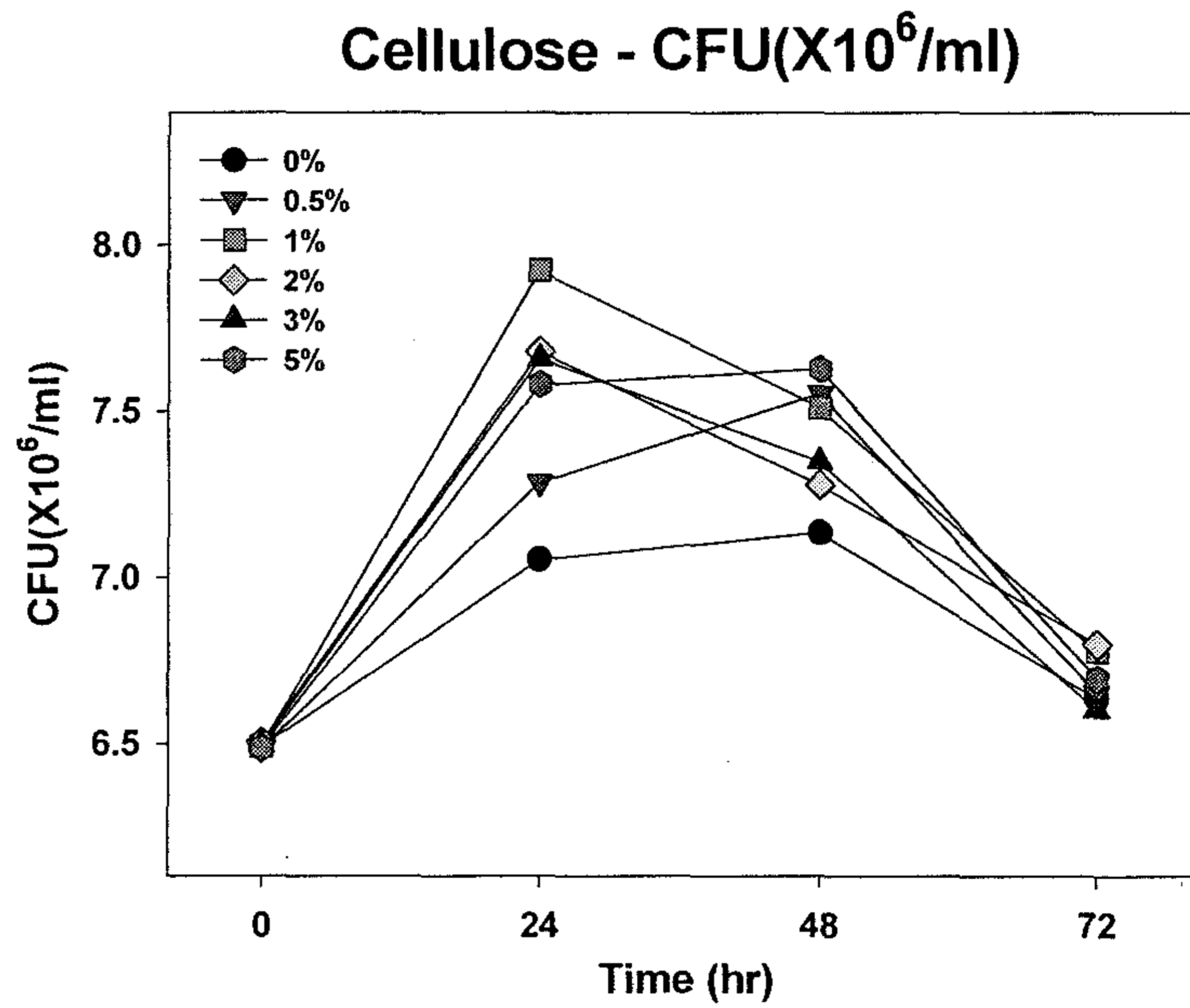


그림 13. 섬유소의 농도가 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

Cellulose - Activity(units)

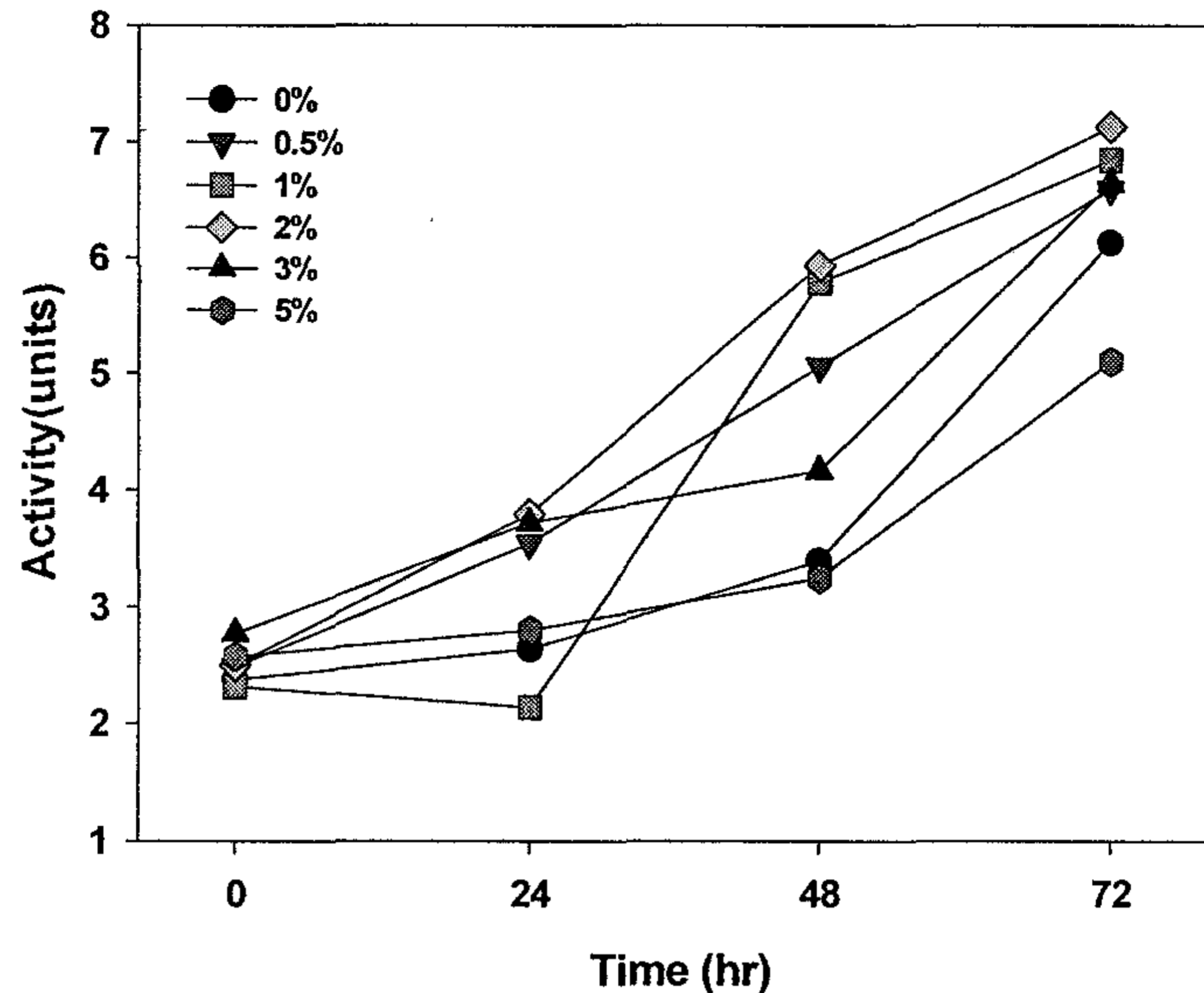


그림 14. 섬유의 농도가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

3) 질소원이 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 의 영향

B. amyloliqueifaciens DL-3의 배양 배지로서 폴루란 생산배지를 기본 배지로 사용하고 탄소원으로 2% (w/v) 포도당을 사용하였으며, 질소원으로 0.25%(w/v) yeast extract, malt extract, pwptone, beef extract, tryptone, ammonium sulfate, ammonium nitrate, ammonium chloride 및 corn steep liquor (CSL)을 사용하여 질소원의 영향을 검토하였다. 일정한 시간 간격으로 배양액의 생균수를 측정하여 질소원의 영향을 검토한 결과, 그림 15와 같이 CSL이 *B. amyloliqueifaciens*의 생육에 가장 우수한 질소원임을 확인하였다. 이와 같은 결과는 탄소원으로 2%(w/v)의 포도당을 사용하여 얻은 결과이므로 탄소원의 변화에 따른 질소원의 최적화 실험을 계속하여 수행하였다.

4) 왕겨의 종류가 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

최적 탄소원으로 확인된 왕겨가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 미치는 세부적인 영향을 검토하기 위하여 본 연구실에서 사용하고 있는 왕겨, 협동기관인 원예시험장에서 사용하고 있는 왕겨, 부산광역시 강서구에 위치하는 (주)풍년농산의 왕겨 및 팽연왕겨 등을 탄소원으로 사용하여 실험을 수행하

였으며, 각각 왕겨의 성분은 부경대학교 사료연구실에 의뢰하여 분석하였다. 각 왕겨의 수분함량, 조지방, 조단백질, 조회분, 조섬유, 탄수화물 및 염분의 성분을 분석한 결과는 표 4와 같이 각 왕겨의 성분이 다소 다름을 알 수 있었다.

탄소원으로 사용한 각기 다른 종류의 왕겨를 탄소원으로 120시간 배양한 결과, 그림 16 및 17와 같이 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 생육에 각기 다른 결과를 나타냈다. 기존에 사용한 왕겨를 사용하였을 때, *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 생육이 가장 우수하였다. 또한, 질소원으로 사용한 펩톤의 농도에 따라 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 각기 다른 생육 결과를 나타냈다. 건조중량으로 비교한 생육의 결과와 같이 기존의 왕겨를 탄소원으로 사용하였을 때, 가장 많은 총 단백질을 생산하였으며, 섬유소 분해효소의 생산도 기존의 왕겨를 탄소원으로 사용하였을 때, 가장 우수한 결과를 얻었다. 따라서 각종 왕겨는 생산지 및 생산공정에 따라 성분이 각기 다르며, 각기 다른 성분 때문에 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 생육 및 *B. amyloliqueifaciens* DL-3가 생산하는 섬유소 분해효소의 생산성이 다름을 알 수 있었다.

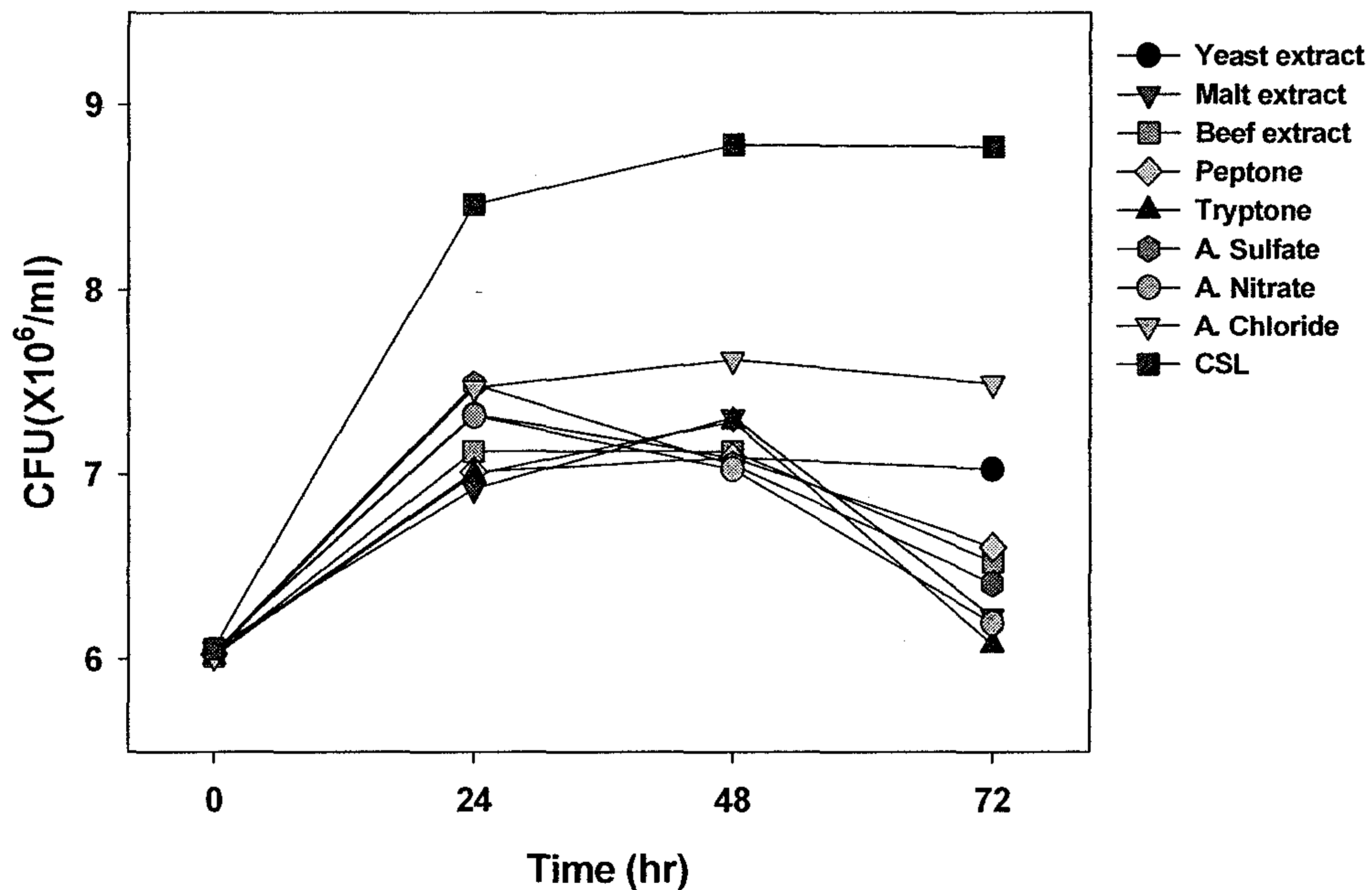


그림 15. 질소원이 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 균주의 생육에 미치는 영향

표 4. 왕겨의 종류별 구성 성분 분석

시료명 분석항목	기존 왕겨	원예시험장	풍년농산 왕겨	풍년농산 팬연왕겨
수분 (%)	25.11±0.38	7.11±0.23	18.23±0.11	17.41±0.30
조지방 (%)	2.27±0.13	0.20±0.01	0.51±0.12	0.31±0.10
조단백질 (%)	20.43±0.33	2.41±0.12	1.92±0.04	1.79±0.09
조회분 (%)	13.49±0.15	14.11±0.09	12.95±0.39	14.36±0.15
조섬유 (%)	12.75±0.03	46.99±0.09	42.97±0.28	39.78±0.51
탄수화물 (%)	38.69	76.18	66.68	66.14
염분 (%)	0.38±0.02	0.14±0.00	0.08±0.00	0.08±0.01

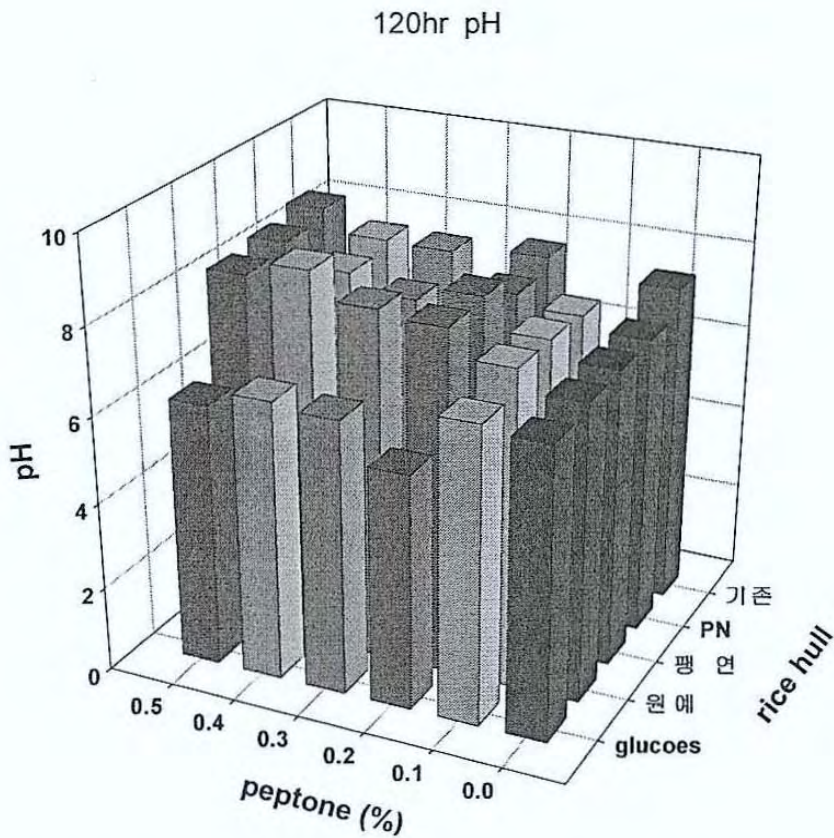


그림 16. 왕겨 종류별 *B. amyloliquefaciens* DL-3 배양액의 pH에 미치는 영향

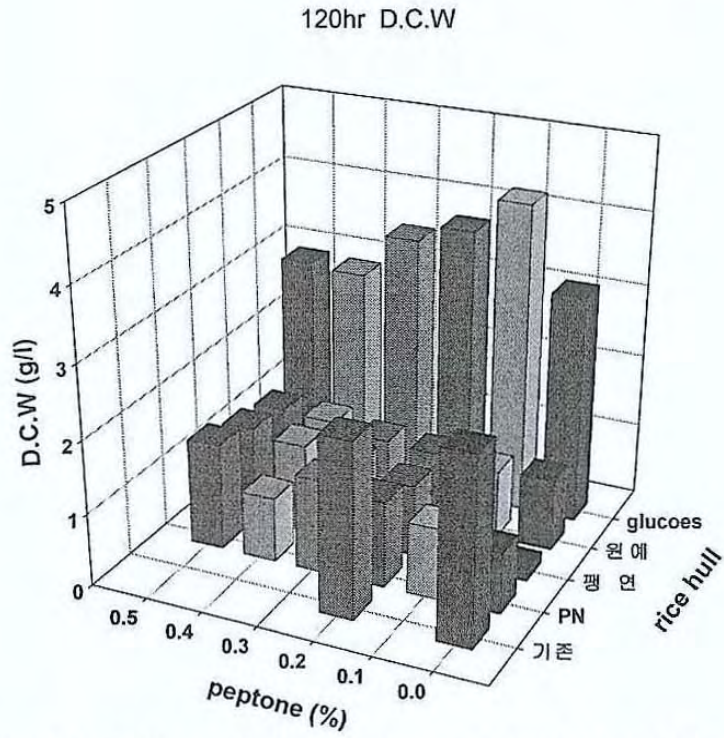


그림 17. 왕겨 종류별 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 균체 증식에 미치는 영향

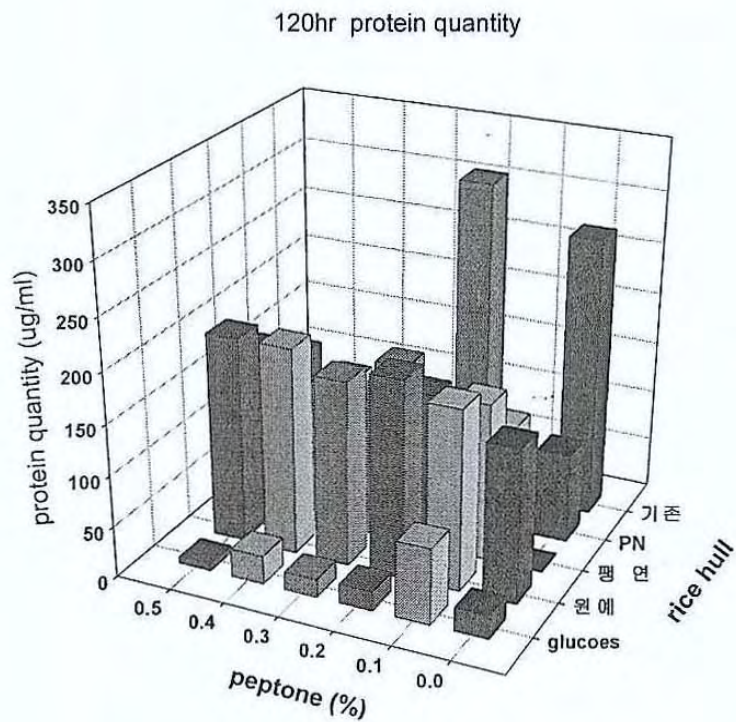


그림 18. 왕겨 종류별 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 총 단백질 생산에 미치는 영향

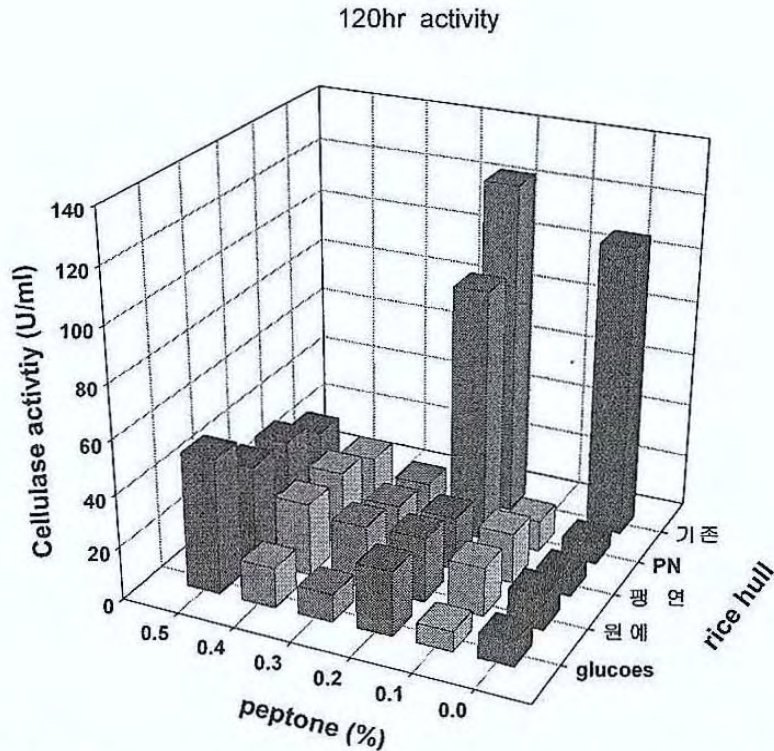


그림 19. 왕겨 종류별 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

5) 폐당밀의 첨가가 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

B. amyloliqueifaciens DL-3의 탄소원으로 왕겨를 사용하고 질소원으로 폐당밀 (corn steep liquor, CSL)을 사용하여 각각의 최적 농도를 확인하였다. *B. amyloliqueifaciens* DL-3 배양배지의 탄소원으로 왕겨의 농도를 각각 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0%(w/v)로 하고 질소원으로 폐당밀의 농도를 각각 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0%(w/v)로 하여 배지를 조제한 후, 동일한 조건으로 120시간 배양하여 생균수를 측정 한 결과는 그림 20과 같다. 탄소원인 왕겨의 농도가 증가할수록 생균수는 증가하였으며 동일한 왕겨의 농도에서도 질소원으로 사용된 폐당밀의 농도가 증가할수록 생균수는 증가하였다. 최고의 생균수는 왕겨와 폐당밀의 농도가 각각 2%인 경우에 나타났으나, 왕겨의 농도 및 폐당밀의 농도가 증가할수록 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 생균수가 증가하는 경향을 얻었으므로 왕겨의 농도를 2%이상 사용하여 왕겨 및 폐당밀의 농도 증가가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향을 검토할 필요가 있다고 판단하였다.

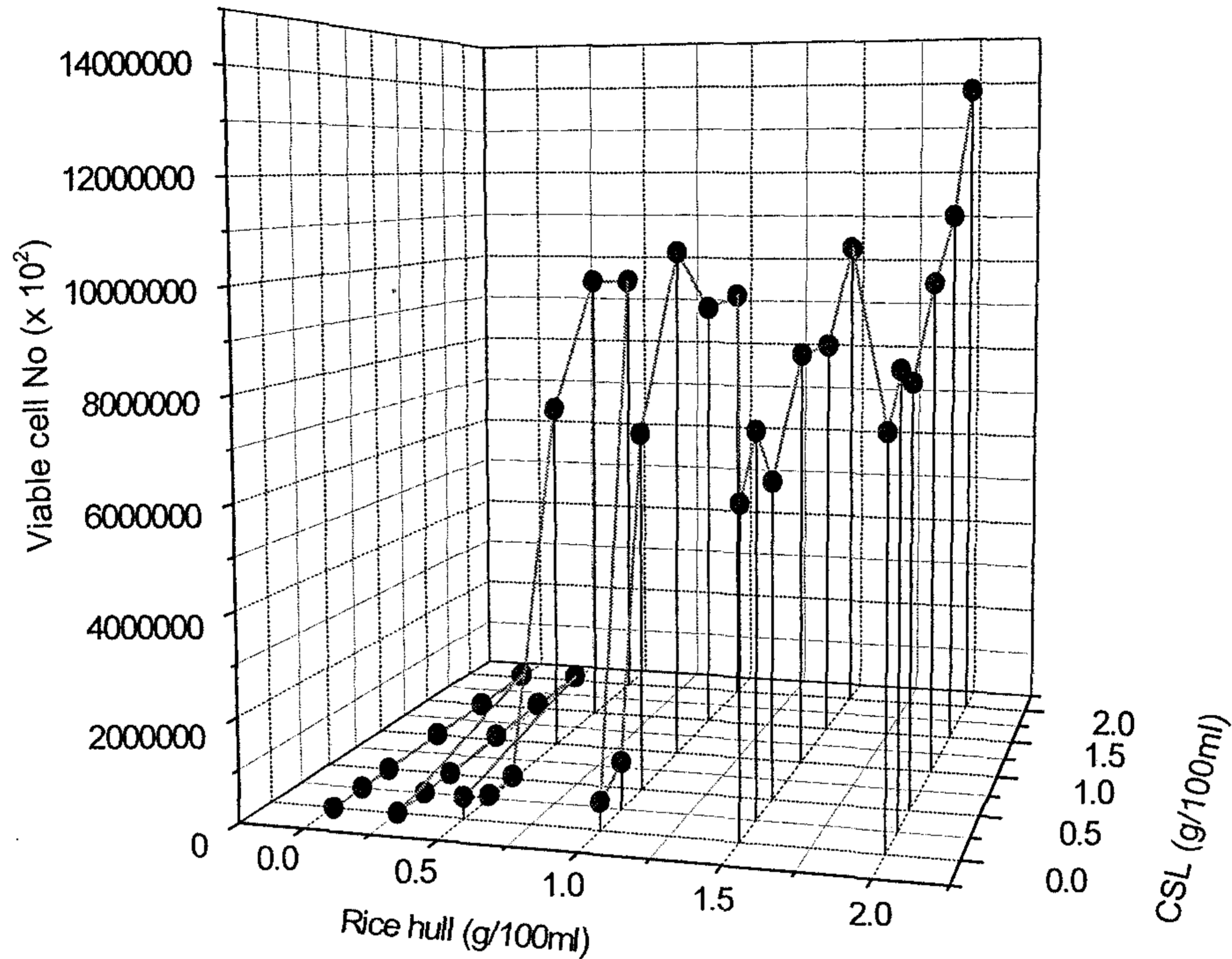


그림 20. 폐당밀의 첨가가 *B. amyloliquefaciense* DL-3의 생육에 미치는 영향.

나. 배양 조건 최적화

1) 섬유소 분해효소 생산균주의 배양 온도 최적화

생물 배양기를 사용한 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 배양 조건을 최적화하기 위하여 플라스크 규모에서 진탕배양기를 사용하여 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 최적 생육온도를 확인하였다. *B. amyloliquefaciens* DL-3를 배양배지의 탄소원으로 2%(w/v) 포도당을 첨가한 배지를 제조하고 전배양액을 접종한 후, 각각 28, 32, 37, 42 및 47°C에서 24시간 배양한 후, 생균수를 측정된 결과는 표5와 같다. 온도의 증가에 따라 생균수는 증가하였으며 37°C에서 최고의 생균수인 5.3×10^8 을 나타냈으며, 이후 온도의 증가에 따라 생균수의 감소를 나타냈다.

표 5. 온도가 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

Strain	생균수 (x 10 ⁸)				
	28℃	32℃	37℃	42℃	47℃
<i>B. amyloliquefaciens</i> DL-3	3.6	4.3	5.3	4.3	4.2

2) 섬유소 분해효소 생산균주의 배양 pH 최적화

섬유소 분해효소 생산균주인 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 최적 배양 pH를 확인하기 위하여 탄소원으로 2%(w/v) 포도당을 첨가한 배지를 제조하고 배지의 pH를 각각 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 및 8.0으로 조절한 후 전배양액을 접종한 후에 24시간 배양하였다. 배양액의 생균수를 측정된 결과는 표 6와 같다. 배지의 pH가 증가에 함에 따라 생균수는 증가하였으며 배지의 pH가 7.0일때 최고의 생균수를 보였으나 배지의 pH가 5.0부터 8.0까지 생균수의 커다란 차이는 없었다. 이와 같이 플라스크 규모의 실험에서 얻은 최적 배양온도 및 배지의 최적 pH 등의 결과를 참고로 생물배양기를 사용한 배양 조건의 최적화 실험을 수행하였다.

표 6. 배지의 pH가 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

Strain	생균수 (x 10 ⁸)				
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
<i>B. amyloliquefaciens</i> DL-3	60.7	69.0	72.3	74.3	72.0

3) 섬유소 분해효소 생산균주의 배양 온도 및 배지 pH 최적화

배양온도와 배지의 초기 pH가 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 생육 및 섬유소 분해효소 생산에 미치는 상호 작용을 검토하기 위하여 배지의 초기 pH를 각각 5.8, 6.8, 7.2, 7.8, 8.2 및 9.2로 조절하고 배양온도를 각각 32, 37 및 42℃로 72시간 배양한 결과는 그림 21, 22, 23 및 24와 같다. 배양액의 초기 pH를 7.2로 조절한 배지를 사용하여 32℃에서 배양하였을 때, 가장 우수한 생육을 나타내었으나, 배양액의 초기 pH를 6.8로 조절한 배지를 사용하여 37℃에서 배양하였을 때 가장 많은 섬유소 분해효소를 생산하였다. 섬유소 분해효소 생산균의 생육에 최적인 조건과 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 조건이 다르다는 결과를 확인하였다.

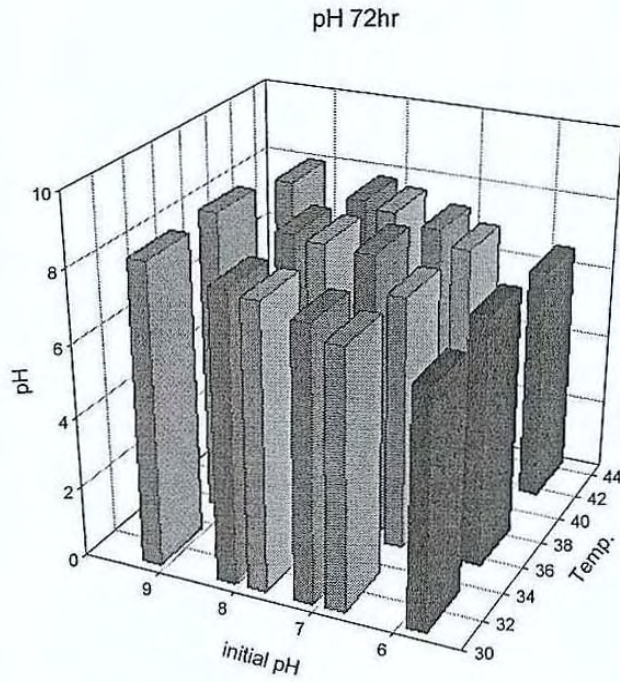


그림 21. 배양온도 및 배지의 초기 pH가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 배양액의 pH에 미치는 영향

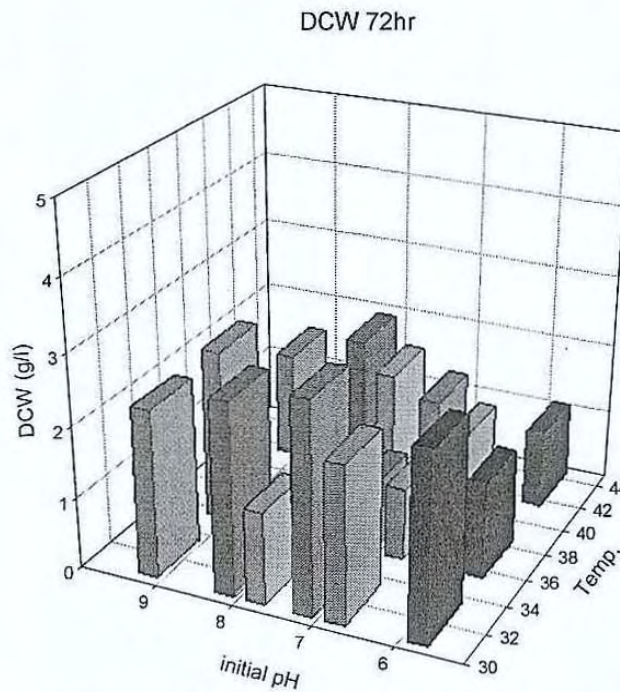


그림 22. 배양온도 및 배지의 초기 pH가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 배양액의 pH에 미치는 영향

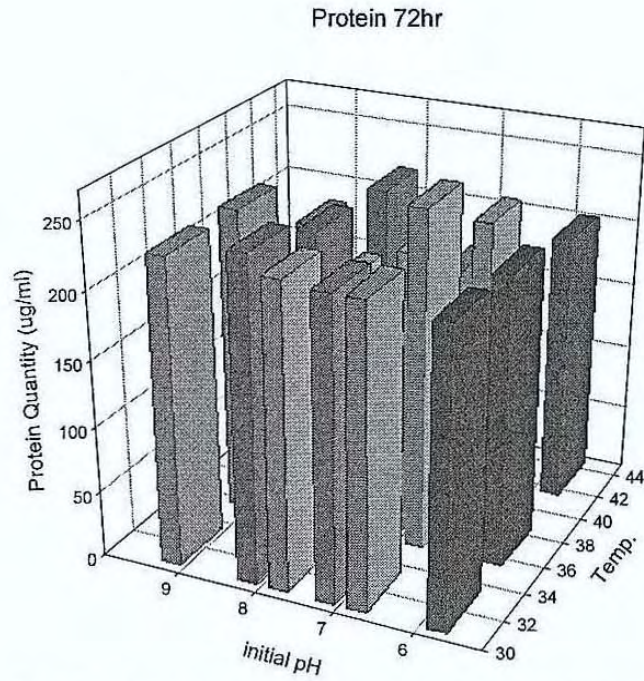


그림 23. 배양온도 및 배지의 초기 pH가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 총 단백질 생산에 미치는 영향

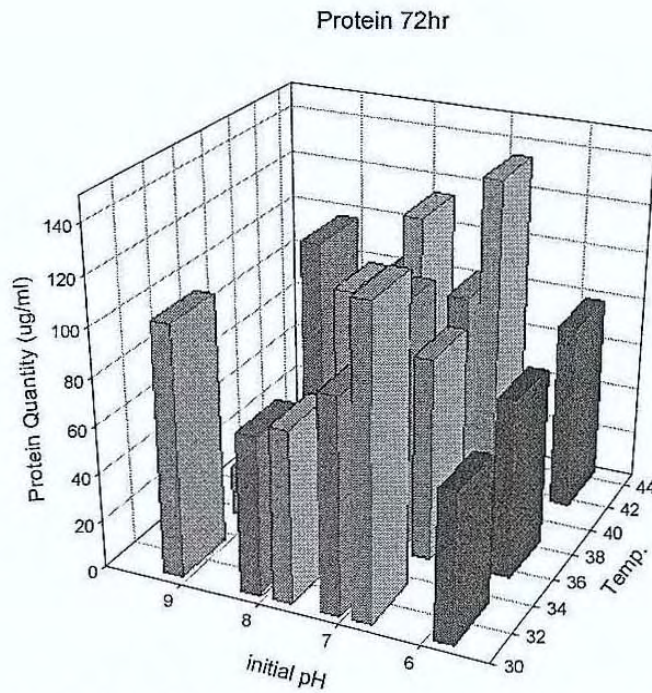


그림 24. 배양온도 및 배지의 초기 pH가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

다. 생물배양기 규모에서의 배양 조건 최적화

1) 탄소원이 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 영향

균주의 대량생산 기술을 개발하기 위하여 코바이오텍사의 KF-7L 생물배양기를 사용하여 배지 및 배양 조건의 최적화 실험을 수행하였다. *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주를 사용하여 섬유소 분해효소를 생산하기 위한 최적 탄소원을 구하기 위하여 탄소원으로 포도당, 설탕, 전분, 미강 및 왕겨를 사용하여 섬유소 분해효소의 생산성을 비교하였다. 각 탄소원의 농도는 2%(w/v)이었으며 질소원으로 0.25%(w/v) 호모추출액을 사용하였다. 배양온도는 37°C이었으며 통기량은 1.0 vvm을 유지하였다. 포도당과 설탕을 각각 탄소원으로 사용한 배양액의 pH는 72시간 배양한 후, 약 4.5이었으나 전분, 미강 및 왕겨를 각각 탄소원으로 사용한 배양액의 pH는 약 6.0이었다. 건조중량 및 O.D.를 측정하여 비교한 균체의 생육은 표 7과 같이 모든 탄소원에서 양호한 것으로 나타났다. 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 탄소원은 표 8과 같이 전분, 포도당, 설탕, 왕겨 및 미강의 순서이었으며 전분을 탄소원으로 사용한 경우, 3일 배양한 배양액의 섬유소 분해효소의 활성은 약 250 unit/ml 이었다. 왕겨와 미강을 탄소원으로 사용배지에서도 일정한 양 이상의 섬유소 분해효소가 생산됨을 확인하였다.

2) 포도당의 농도가 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 영향

섬유소 분해효소를 생산하기 위한 포도당의 최적 농도를 구하기 위하여 섬유소 분해효소 생산균주인 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 탄소원으로 포도당을 사용하였으며 포도당의 농도는 각각 0, 1, 2 및 5%(w/v)이었다. 질소원은 0.25%(w/v) 호모추출액을 사용하였으며 섬유소 분해효소의 생산성을 비교하기 위하여 사용한 생물배양기는 코바이오텍사의 KF-7L 제품으로 working volume은 4L이었다. 배양온도는 37°C이었으며 통기량은 1.0 vvm을 유지하였다.

표 7. 탄소원의 종류가 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 생육에 미치는 영향

탄소원	건조중량 (g/l)							
	0 시간	3 시간	6 시간	12 시간	24 시간	36 시간	48 시간	72 시간
포도당	0.46	2.68	2.78	2.86	2.94	3.12	3.44	3.82
설탕	1.90	2.00	2.18	2.18	2.34	3.22	3.31	3.42
전분	0.20	1.04	1.16	1.26	1.46	1.66	1.34	1.16
미강	1.28	1.92	2.20	2.22	2.78	2.94	3.05	3.52
왕겨	1.74	2.00	2.72	3.58	3.94	3.04	3.54	3.62

그림 25 및 26과 같이 탄소원으로 사용한 포도당의 농도에 따라 48시간 배양한 후, 배양액의 pH, 생균수 및 건조중량의 차이가 있었다. 배양액에 존재하는 총 단백질의 양과 섬유소분해효소의 활성도 그림 27 및 28과 같이 포도당의 농도에 따라 차이가 있었다. 탄소원으로 사용한 포도당의 농도가 5%인 경우에 가장 높은 섬유소 분해효소의 활성을 나타냈다.

표 8. 탄소원의 종류가 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

탄소원	섬유소 분해효소 활성 (unit/ml)							
	0 시간	3 시간	6 시간	12 시간	24 시간	36 시간	48 시간	72 시간
포도당	12.2	26.6	63.2	100.1	168.3	147.8	105.8	97.3
설탕	16.2	26.2	92.3	99.7	71.9	55.9	44.7	25.2
전분	14.8	52.6	165.6	219.2	249.1	238.9	123.1	73.9
미강	22.3	28.4	55.6	79.5	82.9	86.3	46.2	33.0
왕겨	12.5	18.5	33.0	32.0	50.8	60.1	75.3	31.2

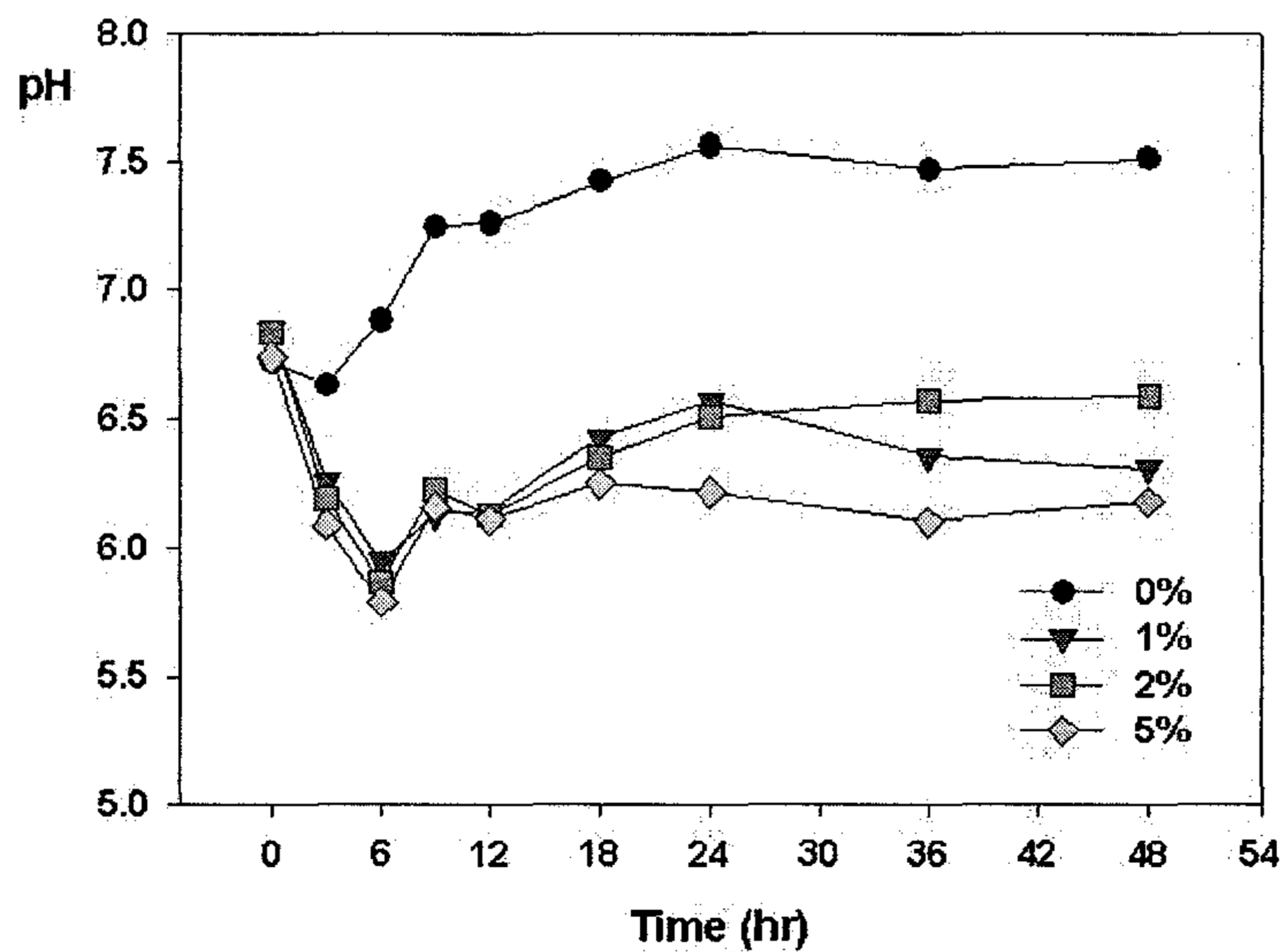


그림 25. 포도당의 농도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 배양액배지 pH 에 미치는 영향

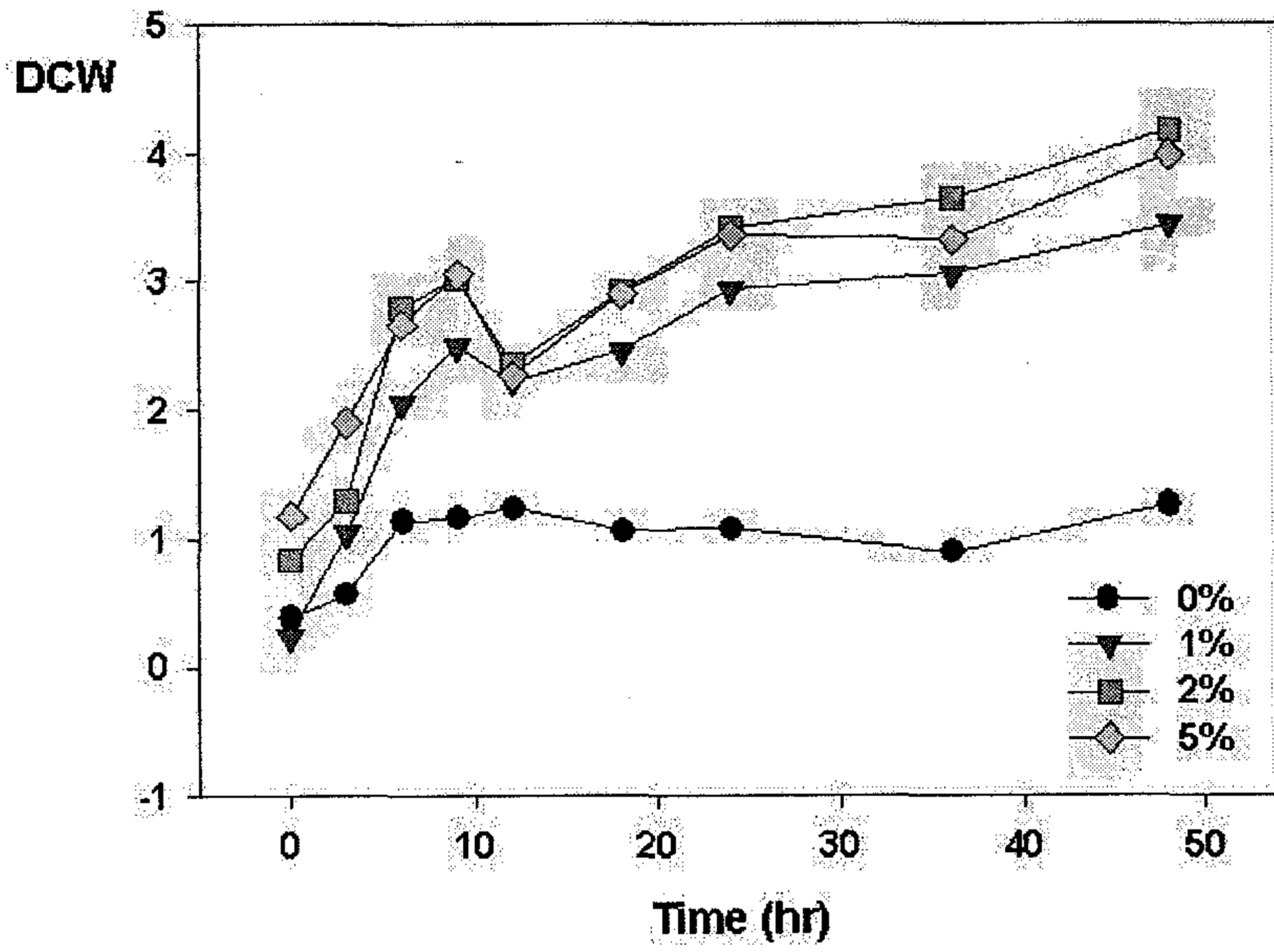


그림 26. 포도당의 농도가 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

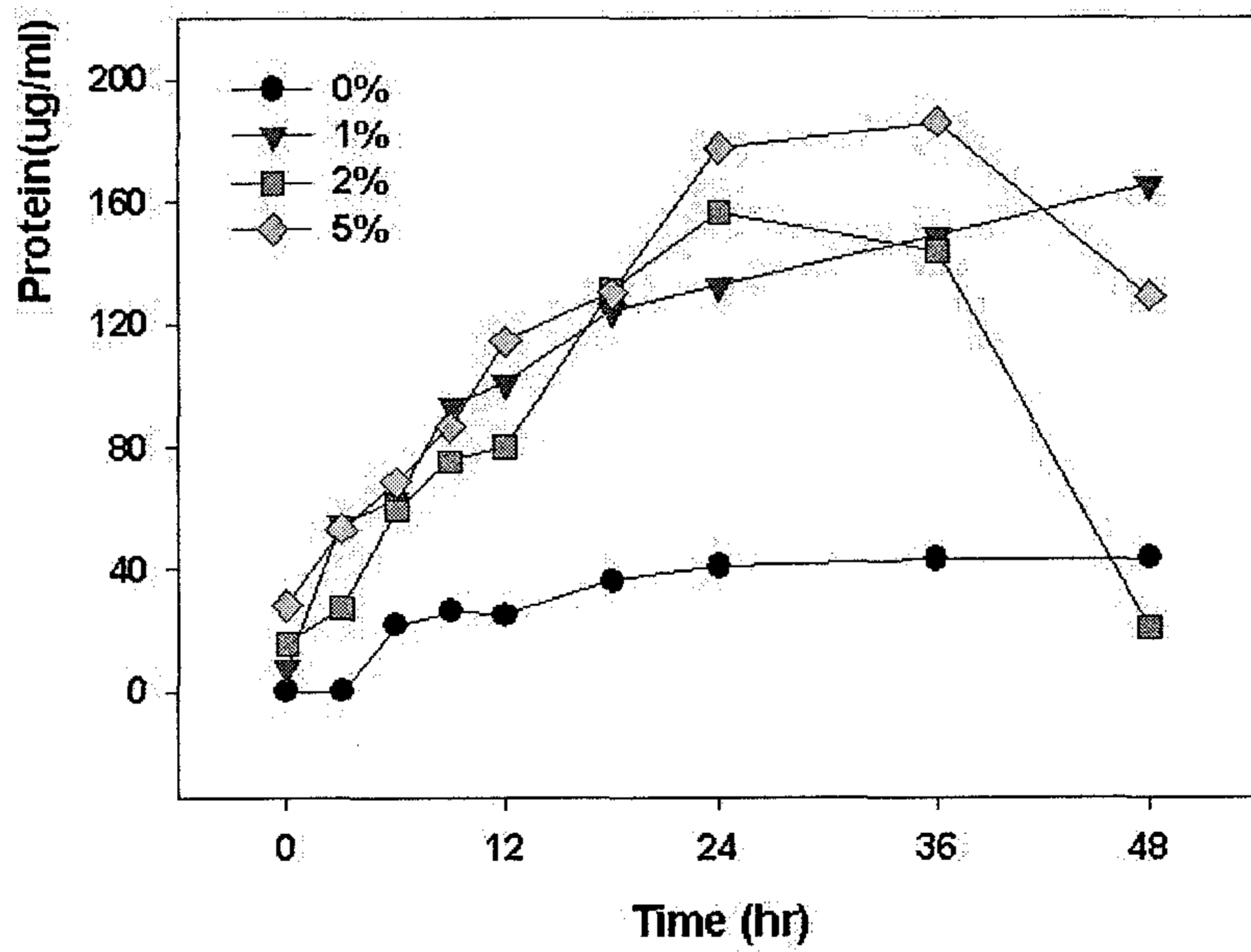


그림 27. 포도당의 농도가 *B. amyloliquefaciens* DL-3가 생산하는 총 단백질양에 미치는 영향

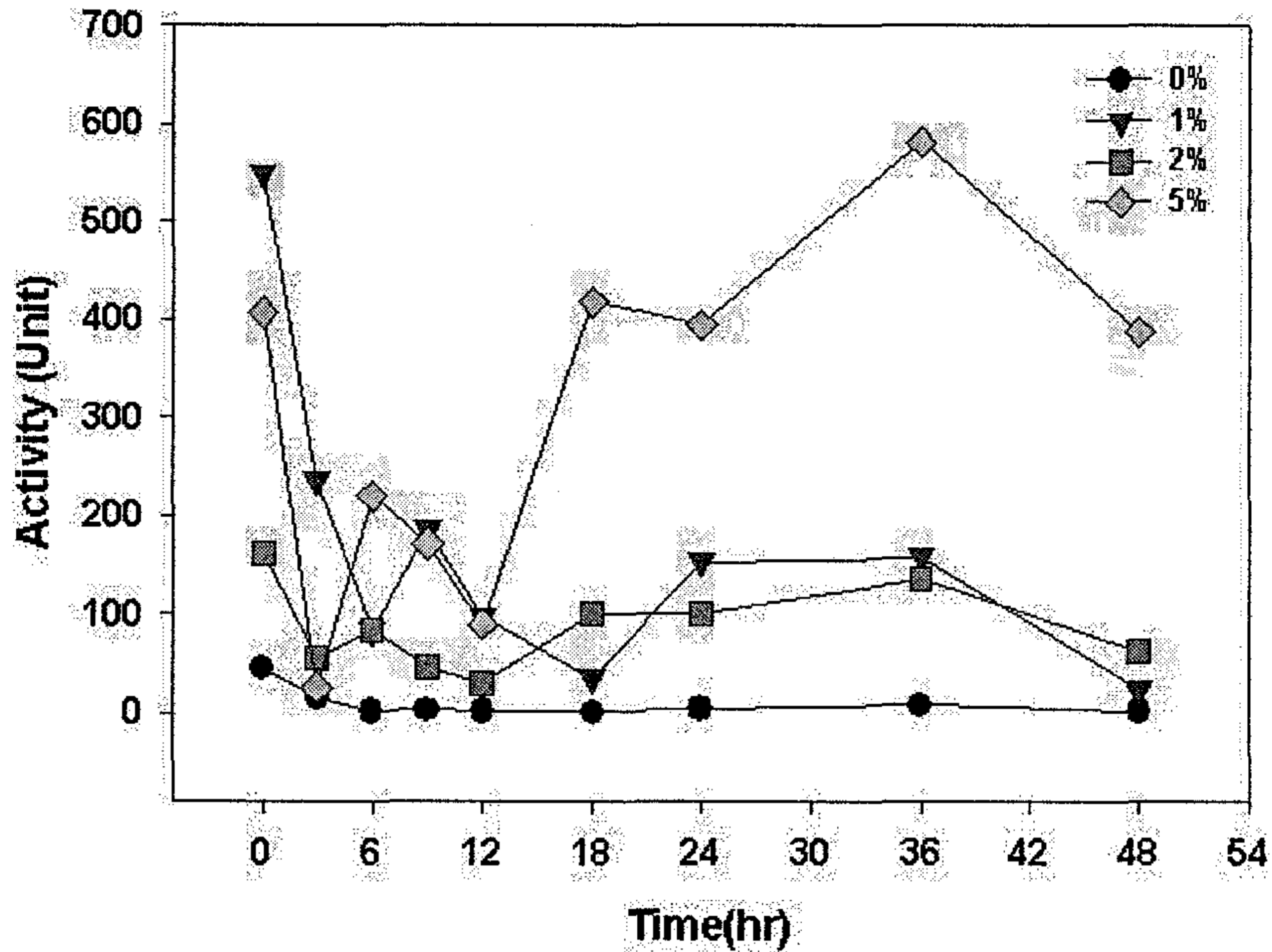


그림 28. 포도당의 농도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

3) 미강의 농도가 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 영향

섬유소 분해효소를 생산하기 위한 미강의 최적 농도를 구하기 위하여 섬유소 분해효소 생산균주인 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 탄소원으로 미강을 사용하였으며 미강의 농도는 각각 0, 1, 2 및 5%(w/v)이었다. 질소원은 0.25%(w/v) 효모추출액을 사용하였으며 섬유소 분해효소의 생산성을 비교하기 위하여 사용한 생물배양기는 코바이오텍사의 KF-7L 제품으로 working volume은 4L이었다. 배양온도는 37°C이었으며 통기량은 1.0 vvm을 유지하였다. 탄소원으로 사용한 미강의 농도에 따라 72시간 배양한 후, 배양액의 pH, 생균수 및 건조중량의 차이가 있었다. 그림 30과 같이 미강의 농도가 증가함에 따라 생균수도 증가하였으나 72시간 배양한 후에 미강의 농도가 1% 및 2%에서의 생균수는 거의 비슷하였다. 배양액에 존재하는 총 단백질의 양과 섬유소분해효소의 활성도 미강의 농도에 따라 차가 있었다. 표 9와 같이 탄소원으로 사용한 미강의 농도가 5%인 경우에 가장 높은 섬유소 분해효소의 활성을 나타냈다.

Rice Bran - CFU(x10⁶/ml)

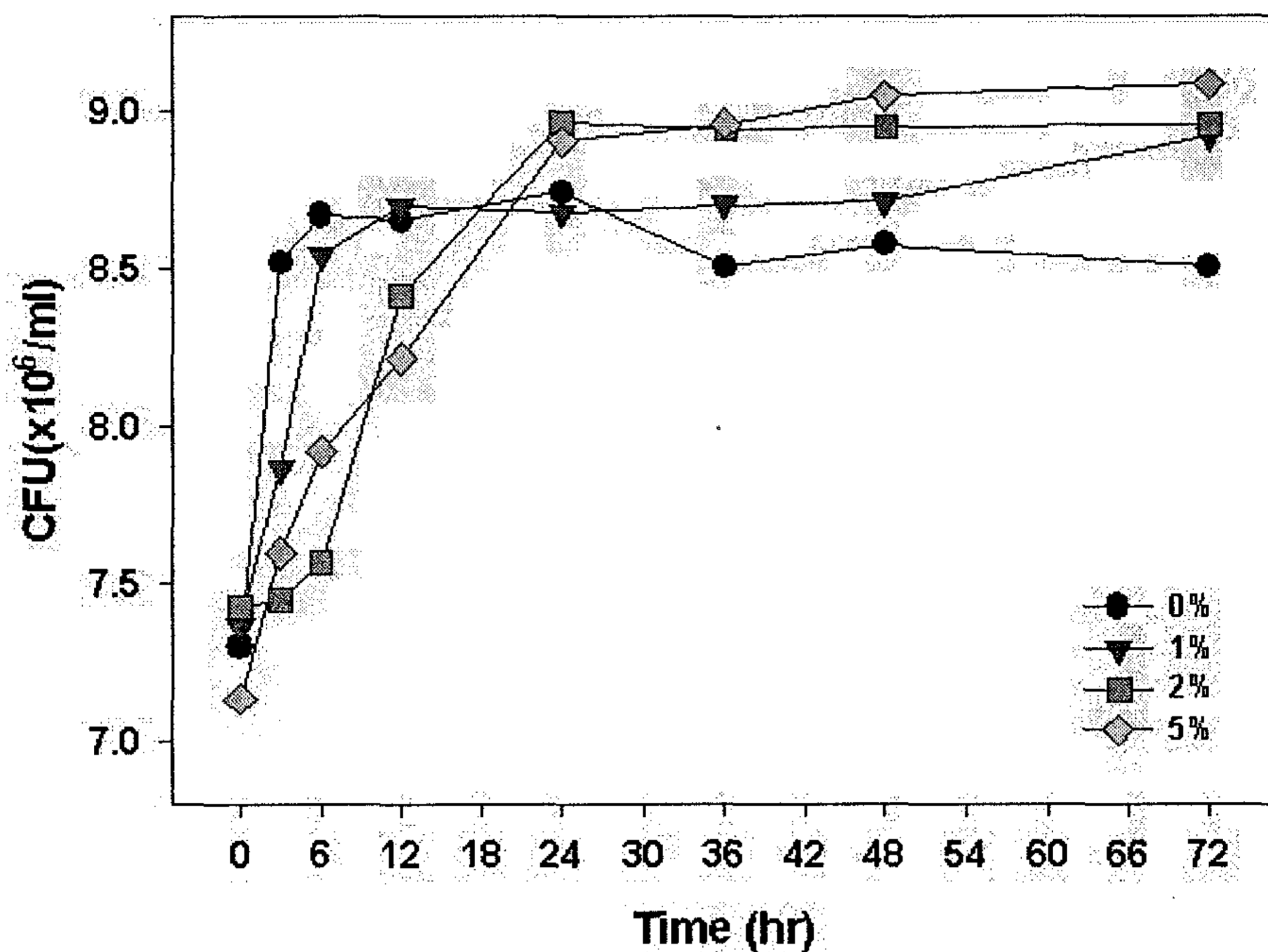


그림 30. 미강의 농도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

표 9. 미강의 농도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

미강 (%)	섬유소 분해효소 활성 (unit/ml)							
	0 시간	3 시간	6 시간	12 시간	24 시간	36 시간	48 시간	72 시간
0	29.0	22.4	21.7	20.2	17.4	8.3	5.9	5.3
1	28.2	65.3	100.7	134.1	65.3	43.8	32.2	38.4
2	29.4	71.5	92.0	153.8	173.7	80.3	43.4	36.0
5	27.1	69.6	97.1	153.3	185.9	127.4	103.1	123.7

4) 질소원이 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 영향

생물배양기 규모에서 섬유소 분해효소를 생산하기 위한 질소원의 최적화를 위하여 섬유소 분해효소 생산균주인 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 질소원으로 효모추출액, 펩톤, malt extract, tryptone 및 ammonium chloride를 사용하여 섬유소 분해효소의 생산성을 비교하였다. 각 질소원의 농도는 0.25%(w/v) 이었으며 탄소원으로 2.0%(w/v)의 왕겨를 사용하였다. 섬유소 분해효소의 생산성을 비교하기 위하여 사용한 생물배양기는 코바이오텍사의 KF-7L 제품으로 working volume은 4L이었다. 배양 온도는 37°C이었으며 통기량은 1.0 vvm을 유지하였다. 펩톤과 트립톤을 각각 질소원으로 사용한 배양액의 pH는 배양 72시간 후, 6.5내지 7.0이었으나 malt extract 및 ammonium chloride를 각각 질소원으로 사용한 배양액의 pH는 6.0 이하를 나타냈다. 건조중량 및 O.D.를 측정하여 비교한 균체의 생육은 표 10과 같이 모든 질소원에서 양호한 것으로 나타났다. 표 11과 같이 탄소원으로 2.0%(w/v)의 왕겨를 사용한 경우, 섬유소 분해효소의 생산에 최적인 질소원은 malt extract 및 효모추출액이었으며 72시간 배양한 배양액의 섬유소 분해효소의 활성은 약 120 unit/ml 이었다.

5) 섬유소 분해효소 생산을 위한 접종량의 최적화

섬유소 분해효소를 생산하기 위한 접종량을 최적화하기 위하여 탄소원으로 2% 포도당을 첨가한 배지를 사용하고 7L 생물배양기에 각각 2%(v/v) 및 5%(v/v)의 전배양액을 접종하여 37°C에서 60시간까지 배양하면서 건조중량을 측정하여 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 생육을 비교한 결과는 그림 31과 같다. 섬유소 분해효소의 생산은 5%(v/v) 접종한 경우가 2% 접종한 경우에 비하여 높았으나 배양시간이 경과함에 따라 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 생산은 거의 비슷한 경향을 나타냈다.

표 10. 질소원이 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

질소원	OD at 600nm							
	0 시간	3 시간	6 시간	12 시간	24 시간	36 시간	48 시간	72 시간
효모추출액	1.66	1.91	2.15	2.83	2.57	3.88	4.23	4.37
펩톤	2.07	2.83	2.97	2.86	2.84	4.09	4.13	4.41
트립톤	1.96	2.02	2.08	2.16	2.33	3.71	4.44	4.37
malt extract	1.39	2.23	2.63	2.21	2.13	3.09	3.16	3.26
ammonium chloride	1.45	1.68	1.64	2.05	2.96	3.57	3.58	3.63

표 11. 질소원이 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

질소원	섬유소 분해효소 활성 (unit/ml)							
	0 시간	3 시간	6 시간	12 시간	24 시간	36 시간	48 시간	72 시간
효모추출액	14.4	15.2	22.3	54.2	62.6	101.6	93.1	71.9
펄톤	10.9	16.8	23.5	35.2	48.8	33.0	38.9	27.1
트립톤	11.4	24.2	30.2	35.5	43.2	24.5	16.1	15.2
malt extract	22.8	32.4	40.3	47.4	88.7	111.7	120.2	196.5
ammonium chloride	19.2	27.1	37.2	61.8	44.0	32.8	13.5	11.0

exp. 5

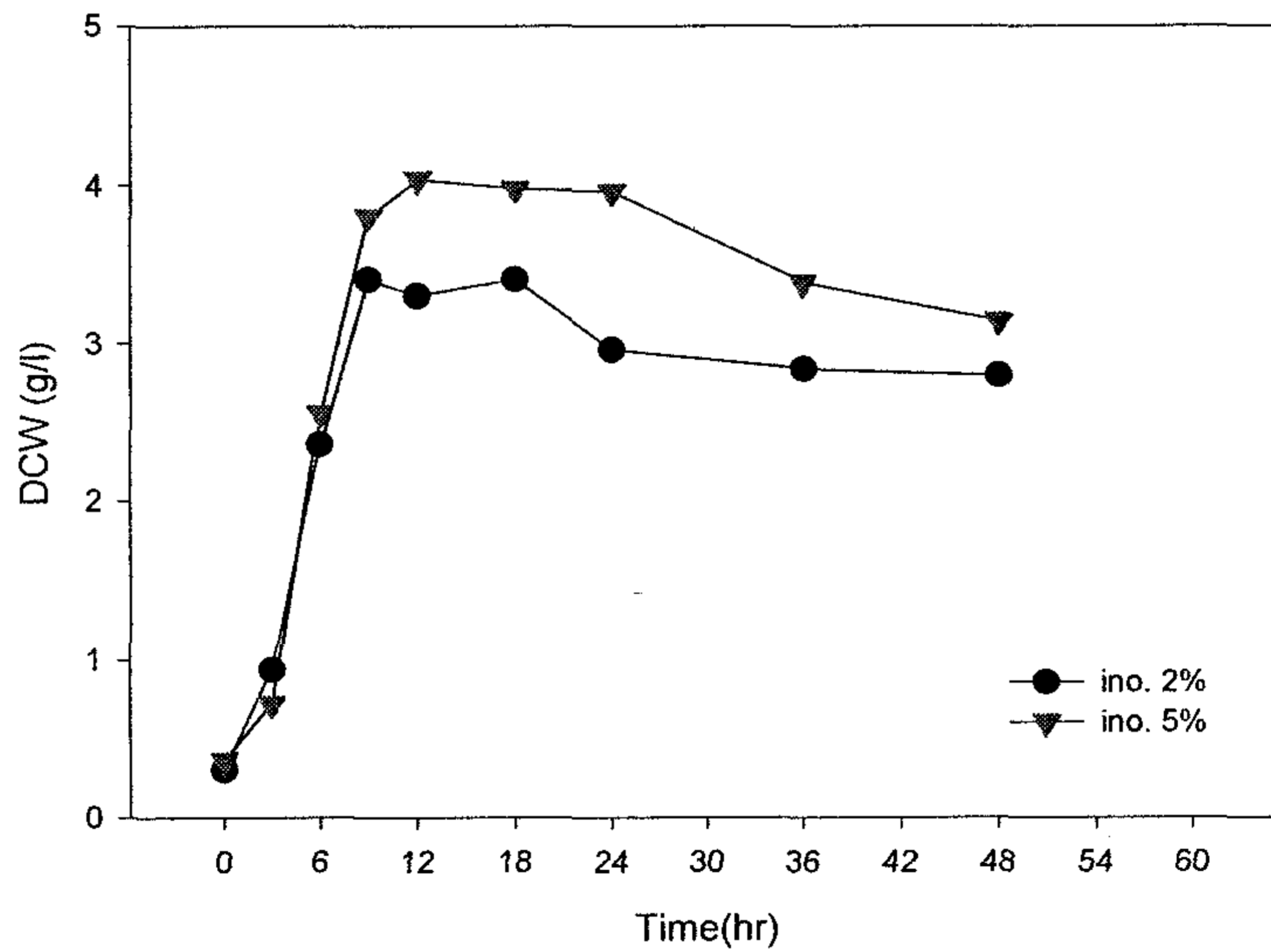


그림 31. 접종량이 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

6) 배양 온도가 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 영향

섬유소 분해효소를 생산하기 위한 온도의 최적화를 위하여 섬유소 분해효소 생산균주인 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 탄소원으로 2%(w/v) 포도당 및 질소원으로 0.25%(w/v) 효모추출액을 사용하였으며 무기염 성분으로 0.5% K_2HPO_4 , 0.1% $NaCl$, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 0.06% $(NH_4)_2SO_4$ 를 사용하여 배양한 후에 배양액의

섬유소 분해효소의 생산성을 비교하였다. 배양온도는 각각 25, 30, 32, 35, 37 및 42°C 이었다. 섬유소 분해효소의 생산성을 비교하기 위하여 사용한 생물배양기는 코바이오 텍사의 KF-7L 제품으로 working volume은 4L이었으며 통기량은 1.0 vvm을 유지하였다. 건조중량으로 비교한 균체의 생육은 배양온도가 30, 32, 35 및 37°C일 경우에 큰 차이는 없었다. 그림 32 및 표 12와 같이 배양액에 존재하는 총 단백질의 양 및 섬유소 분해효소의 활성은 배양온도가 35°C일 때 가장 높았다.

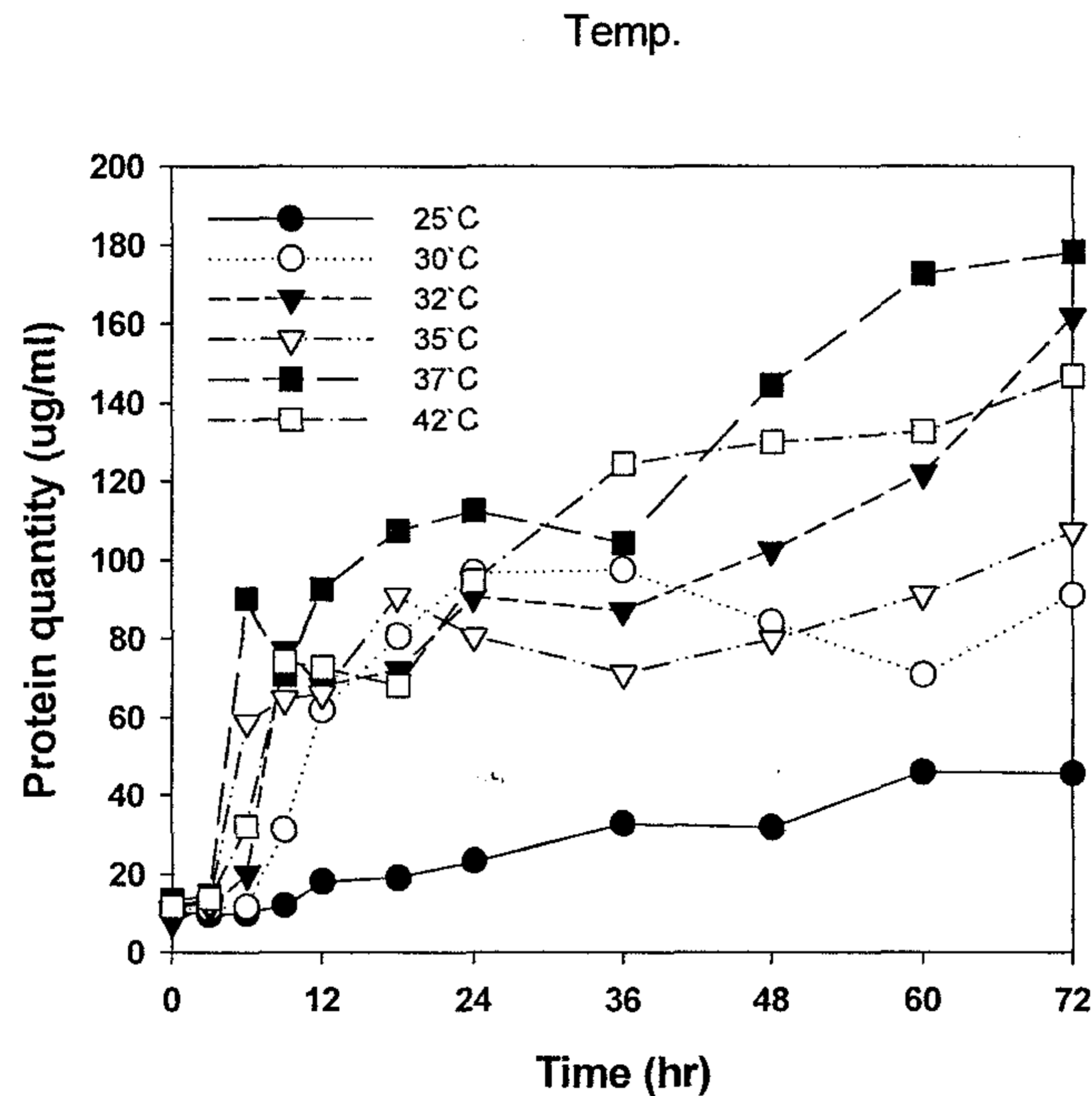


그림 32. 배양 온도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 총 단백질 생산에 미치는 영향

표 12. 배양온도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

온도 (°C)	섬유소 분해효소 활성 (unit/ml)							
	0 시간	3 시간	6 시간	12 시간	24 시간	36 시간	48 시간	72 시간
25	10.7	9.7	12.1	18.2	23.4	32.9	45.9	31.9
30	11.1	11.9	23.1	33.2	96.8	97.6	84.2	70.8
32	11.2	13.2	38.8	64.6	90.6	107.3	91.2	79.9
35	7.9	11.7	20.2	68.0	90.9	122.0	162.3	102.6
37	13.6	14.6	45.6	92.6	112.7	144.5	172.7	104.4
42	11.8	13.9	32.2	72.7	94.6	124.4	130.0	132.7

7) 교반속도가 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 영향

생물배양기를 사용하여 섬유소 분해효소를 생산하기 위한 교반속도의 최적화를 위하여 섬유소 분해효소 생산균주인 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 탄소원으로 2%(w/v) 포도당 및 질소원으로 0.25%(w/v) 효모추출액을 사용하였으며 무기염 성분으로 0.5% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 0.06% $(NH_4)_2SO_4$ 를 사용하여 배양한 후에 배양액의 섬유소 분해효소의 생산성을 비교하였다. 교반속도는 각각 200, 300, 400 및 500rpm이었으며 통기량은 1.0 vvm을 유지하였다. 그림 33 및 34와 같이 배양액의 pH는 시간이 경과함에 따라 교반속도에 관계없이 상승하였으며 건조균체량(DCW)으로 비교한 균체의 생장은 400과 500rpm에서 빠름을 알 수 있었다. 섬유소 분해효소의 생산량은 교반속도가 300과 400rpm에서 높게 나타났다. 이 결과에서 균체의 최적 성장조건과 섬유소 분해효소의 최적 생산조건이 다르다는 사실을 알 수 있었다.

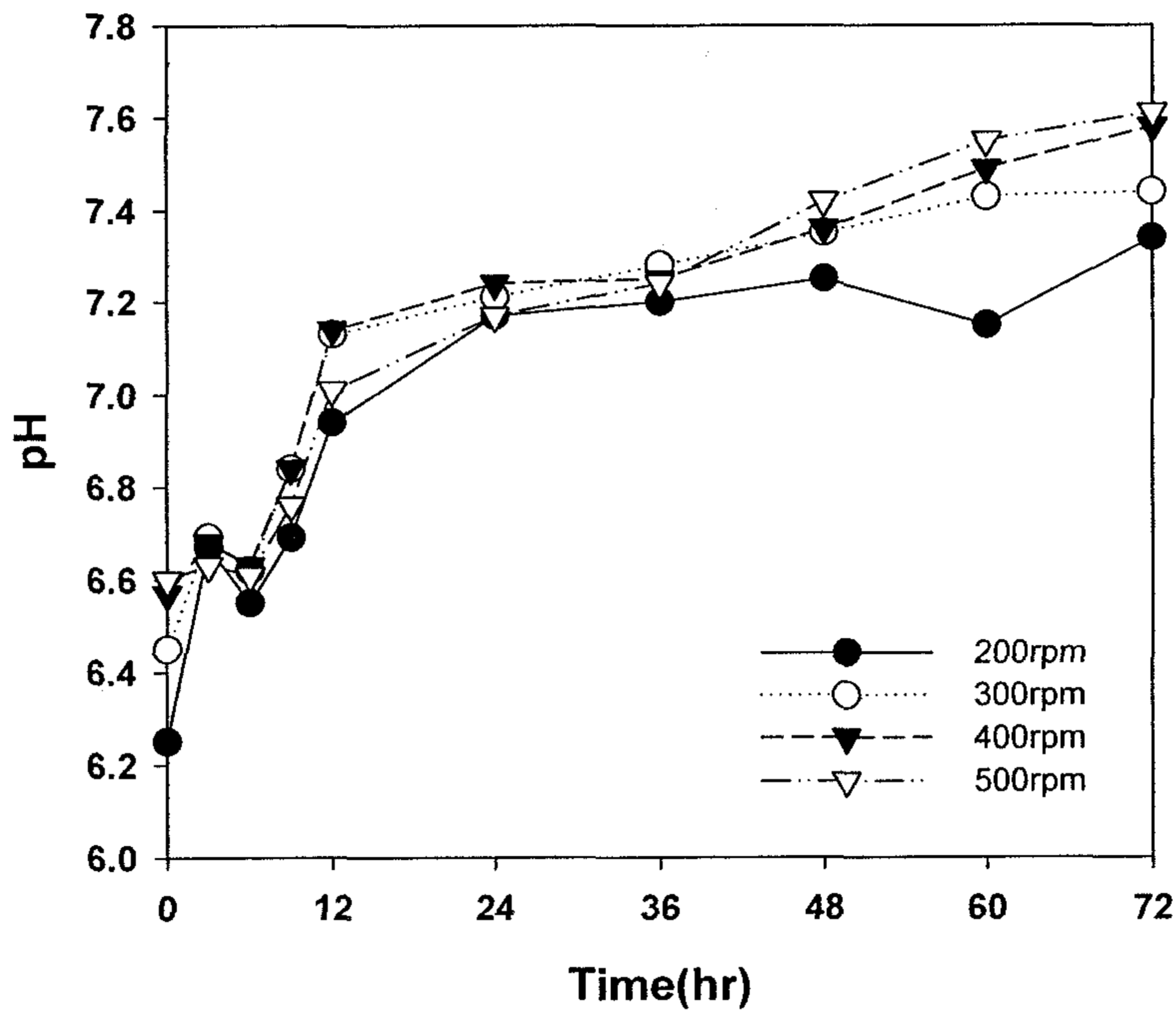


그림 33. 배양기의 교반속도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3 배양액의 pH에 미치는 영향

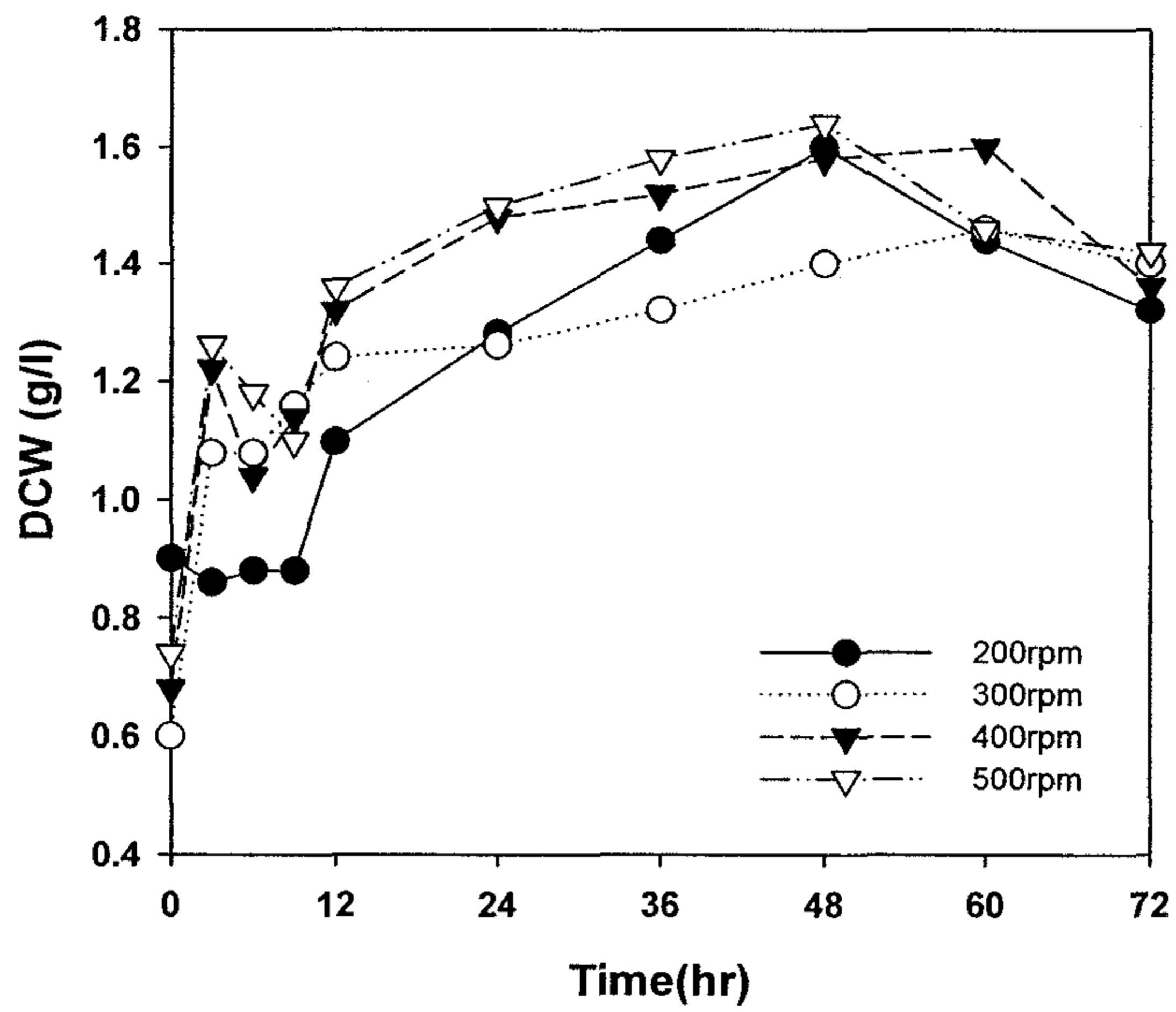


그림 34. 배양기의 교반속도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

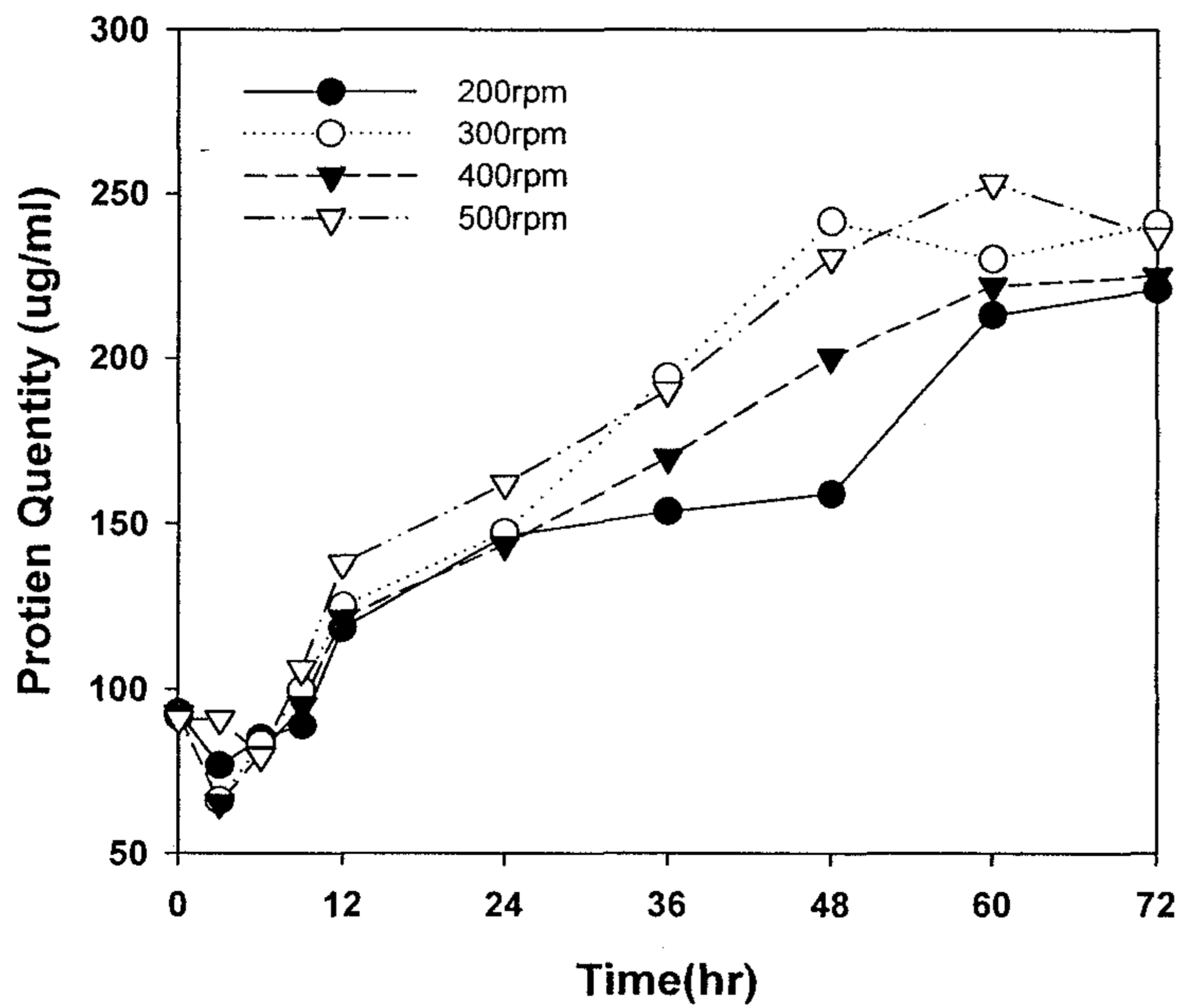


그림 35. 배양기의 교반속도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 총 단백질 생산에 미치는 영향

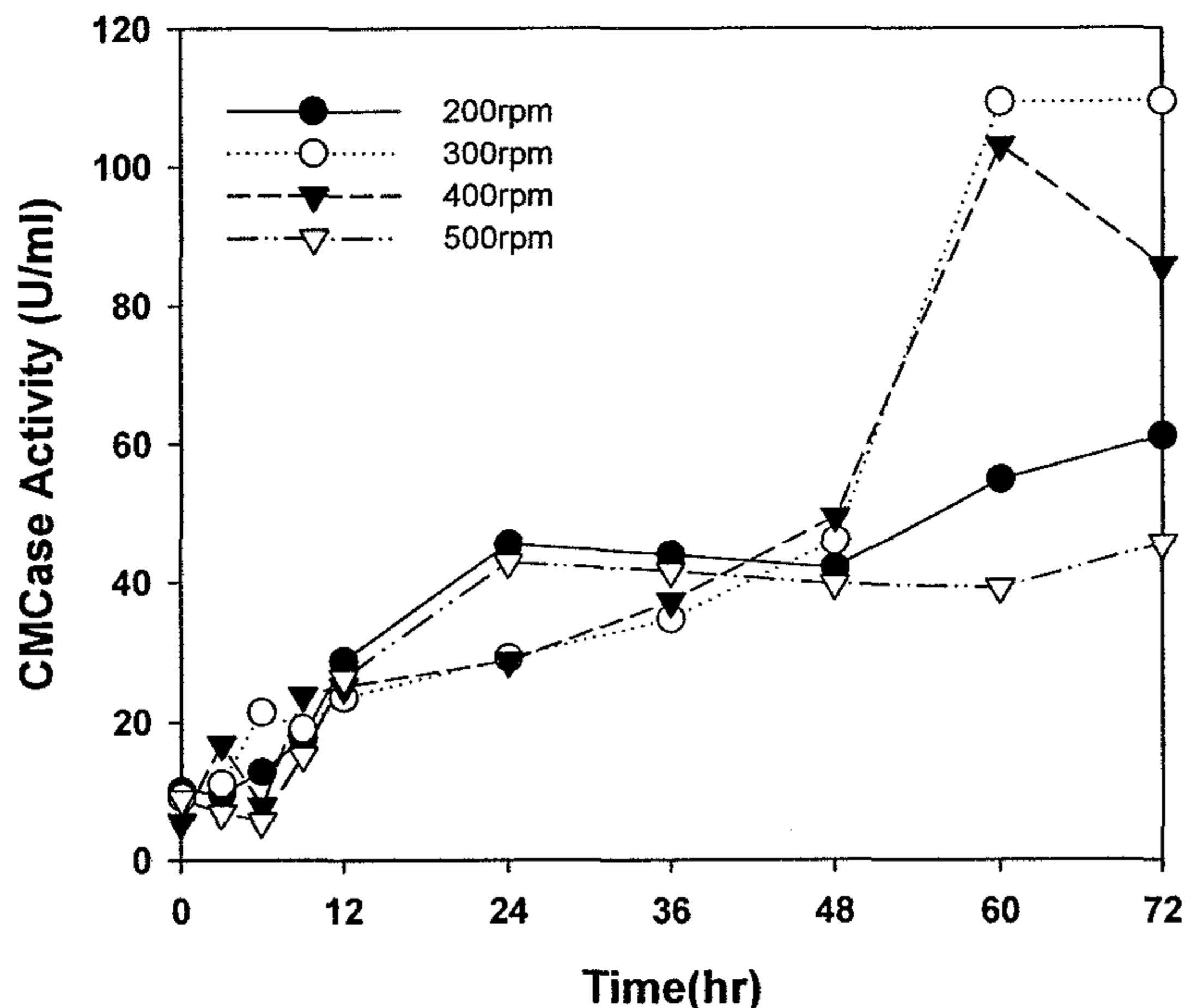


그림 36. 교반속도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 영향

7) 배양액의 pH 조절이 섬유소 분해효소의 생산에 미치는 영향

섬유소 분해효소의 생산조건을 최적화를 위하여 섬유소 분해효소 생산균주인 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 탄소원으로 2%(w/v) 포도당 및 질소원으로 0.25%(w/v) 효모추출액을 사용하였으며 무기염 성분으로 0.5% K_2HPO_4 , 0.1% NaCl, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 및 0.06% $(NH_4)_2SO_4$ 를 첨가한 배지에 배양하였다. 배양액의 pH 각각 5.0 및 7.0로 조절하면서 pH의 변화, 건조중량, 섬유소 분해효소의 생산 및 총 단백질 양을 측정하였다. 그림 37과 같이 배양액의 pH를 각각 5.0 및 7.0로 조절하면서 배양한 경우에 배양액의 pH는 72시간 동안 각각 5.0과 7.0을 유지하였으며 배양액의 pH를 조절하지 않은 경우에는 초기 pH 6.5에서 서서히 pH가 감소하여 72시간 배양한 후의 pH는 약 5.8이었다. 그림 38 및 39와 같이 배양액의 pH를 조절하지 않은 경우에 균체의 생장이 가장 빨랐으며 섬유소 분해효소의 생산도 가장 높았다. 배양액의 pH를 7.0으로 조절한 경우의 결과가 5.0으로 조절한 경우보다 균체의 성장 및 섬유소 분해효소의 생산량이 많았다. 이와 같은 결과를 통하여 초기 pH를 최적화한 배지를 사용하여 pH의 조절없이 *B. amyloliquifaciens* DL-3를 배양하는 것이 균체의 증식 및 섬유소 분해효소의 생산에 가장 좋은 조건임을 알 수 있었다.

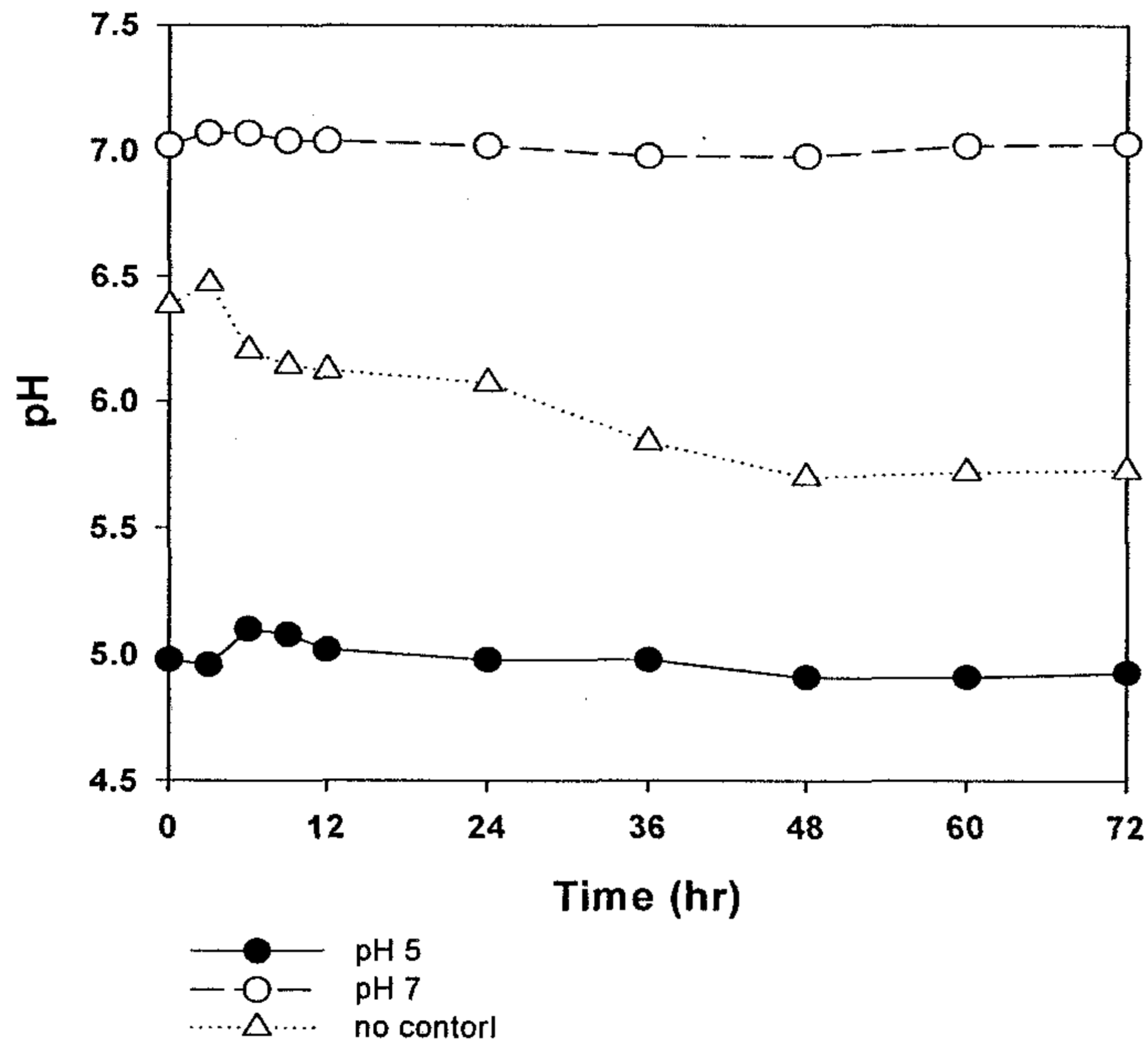


그림 37. 배양액의 pH 조절이 *B. amyloliquifaciens* DL-3 배양액의 pH에 미치는 영향

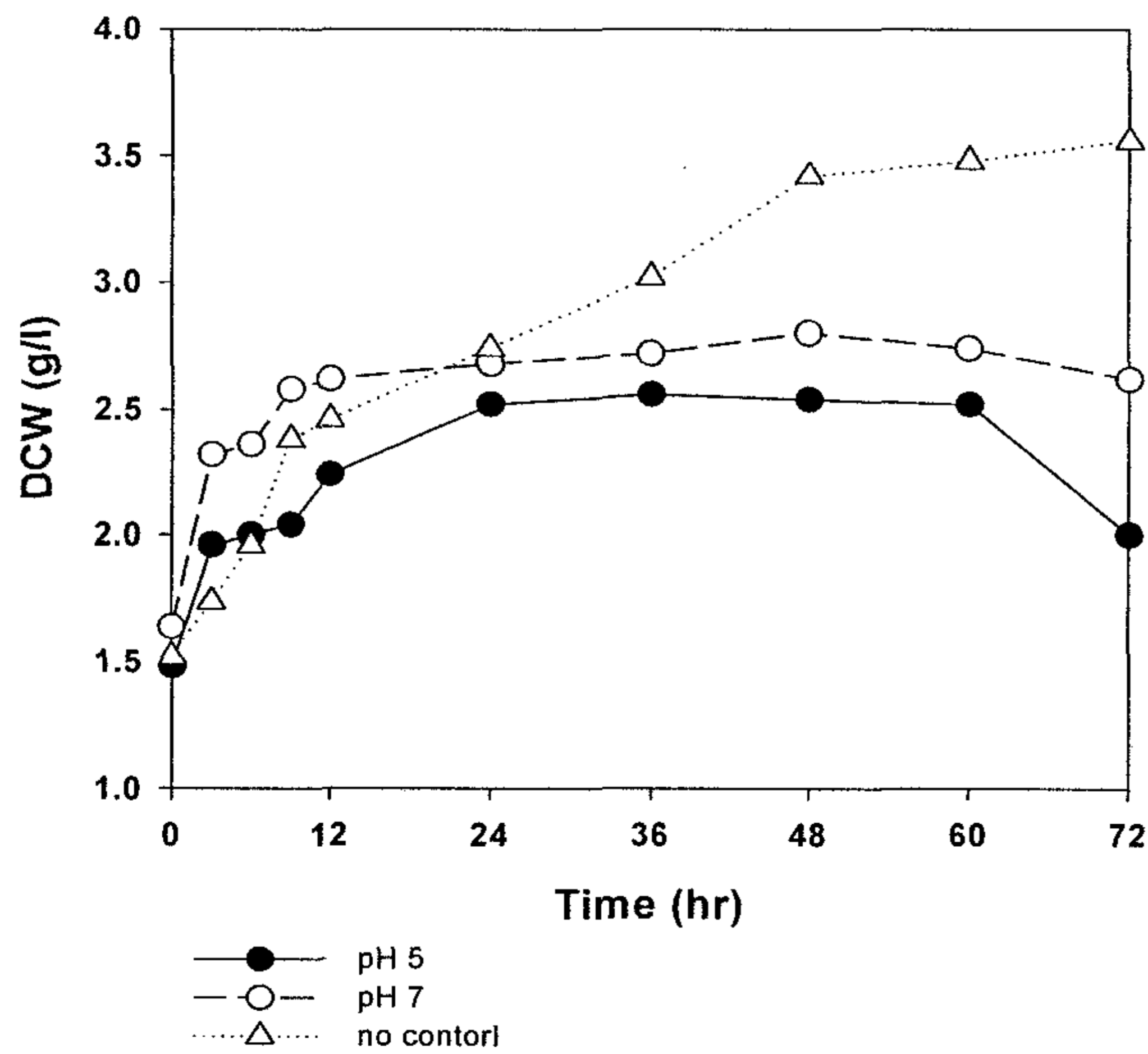


그림 38. 배양액의 pH 조절이 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 생육에 미치는 영향

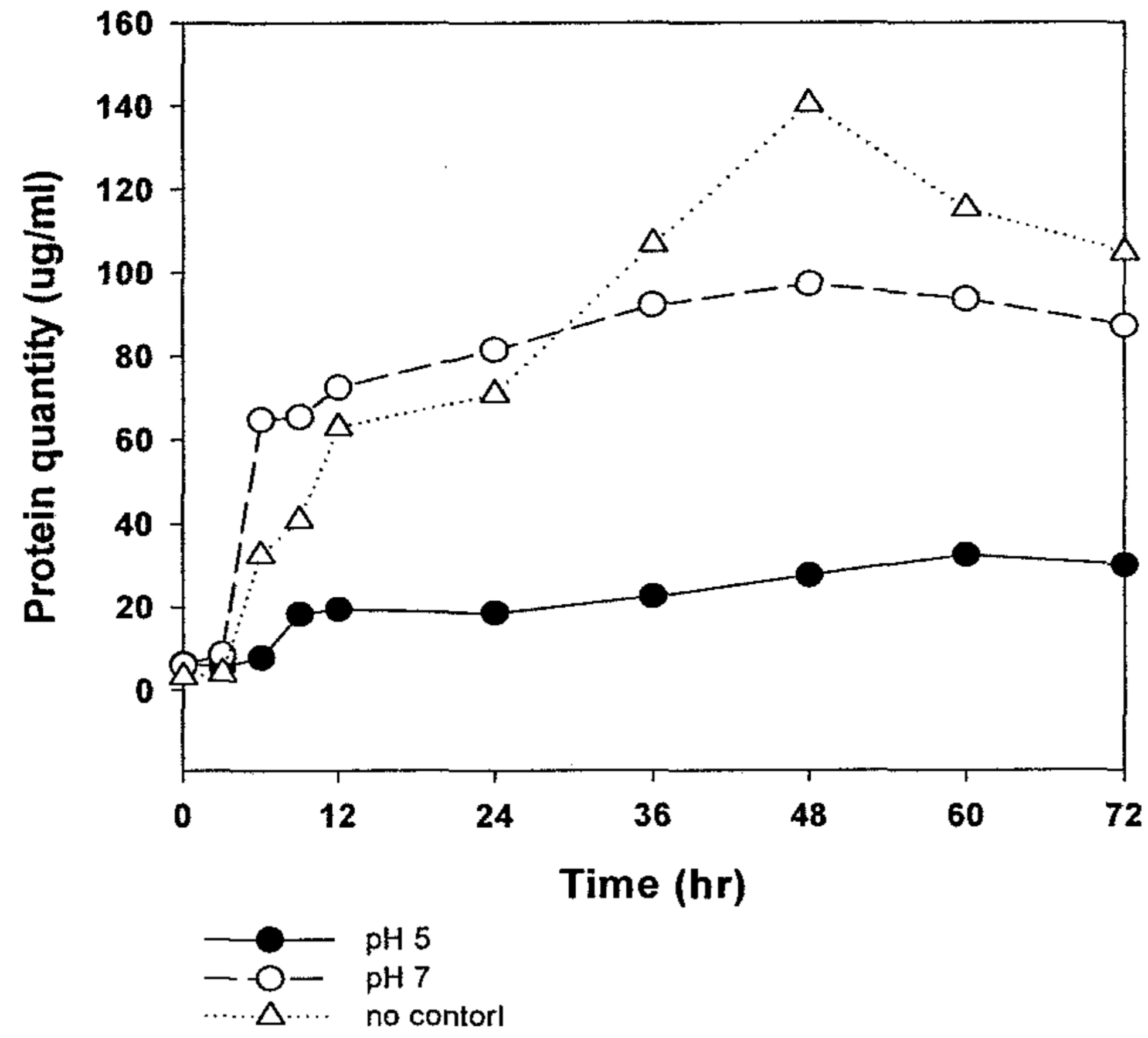


그림 39. 배양액의 pH 조절이 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 총 단백질 생산에 미치는 영향

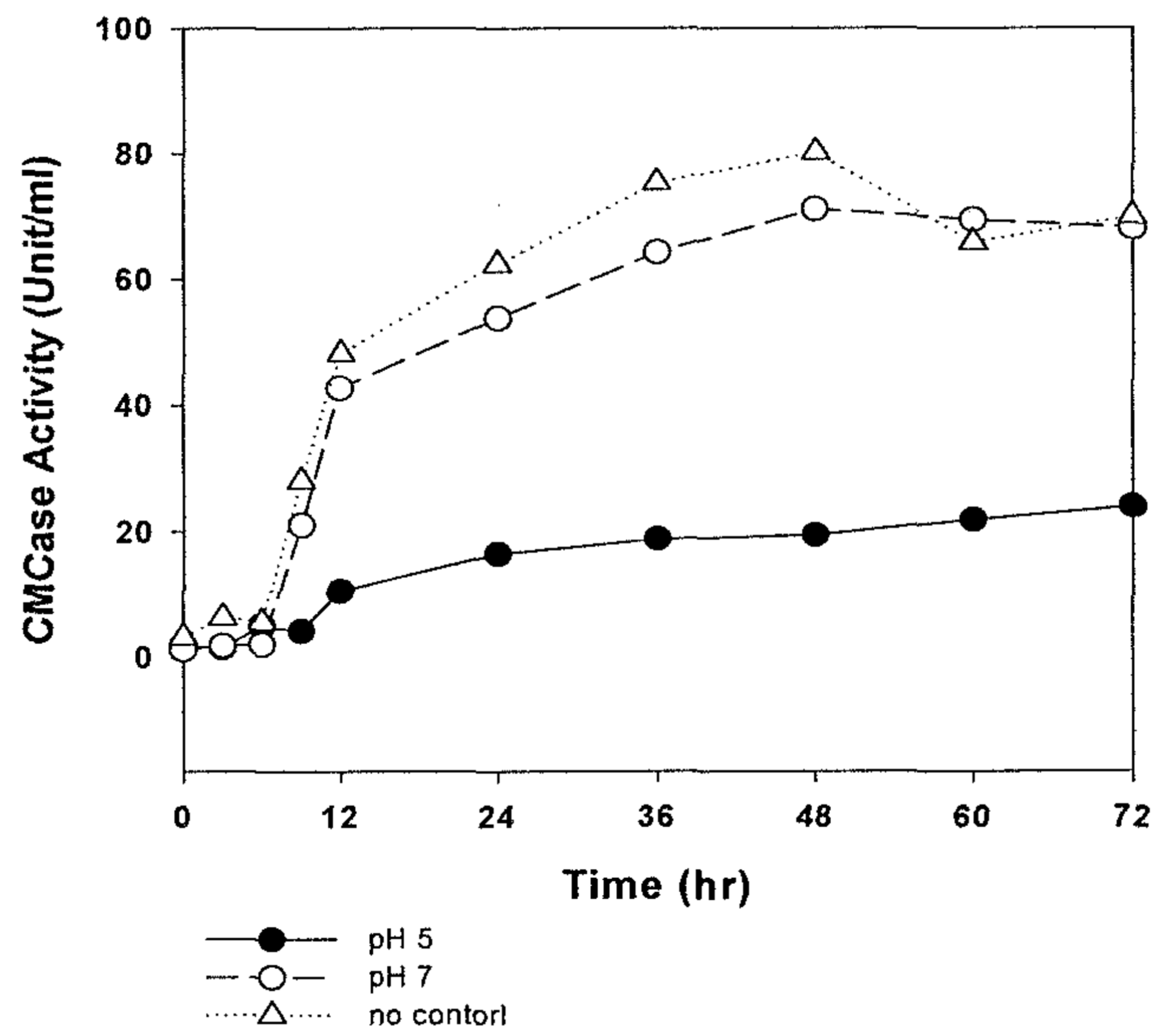


그림 40. 배양액의 pH 조절이 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산에 미치는 영향

라. pilot 규모에서의 배양 조건 최적화

탄소원으로 2%(w/v) 포도당을 첨가한 배지를 사용하고 100L 생물배양기를 사용하여 섬유소 분해효소 생산균을 배양한 결과는 그림 41과 같다. 배양 조건은 전 배양액을 5%(v/v) 접종한 후, 1vvm의 통기량과 200rpm의 교반속도를 유지하면서 37°C에서 48시간 배양하였다. 생균수는 그림 42와 같이 시간이 경과함에 따라 증가하여 배양 후, 9시간에 최고의 생균수를 나타냈으며 이 후에 서서히 감소하였으나 균체의 건조중량은 12시간까지 급격히 증가한 이후 일정한 수치를 유지하였다. 섬유소 분해효소의 생산은 그림 8에서와 같이 배양 후, 6시간에 최고의 활성을 나타냈으며 9시간이 지난 후에 총 단백질의 양은 최고의 수치를 나타냈다.

플라스크 및 7L 생물배양기를 사용한 실험에서 얻은 최적화 조건으로 5%(w/v) 왕겨를 탄소원으로 사용하고 0.2% 펙톤을 질소원으로 사용한 배지에 전배양액을 1%(v/v) 접종하고 100L 생물배양기를 사용하여 섬유소 분해효소 생산균을 배양한 결과는 그림 43 및 44와 같다. 배양 조건은 1 vvm의 통기량과 500rpm의 교반속도를 유지하면서 37°C에서 72시간 배양하였다. 균체는 시간이 경과함에 따라 증가하였으며, 용존산소는 시간의 경과에 따라 감소하였다. 섬유소 분해효소와 총 단백질의 생산은 배양 후, 9시간부터 급격히 증가하였으며 36시간 이후, 급격한 변화는 없었다.

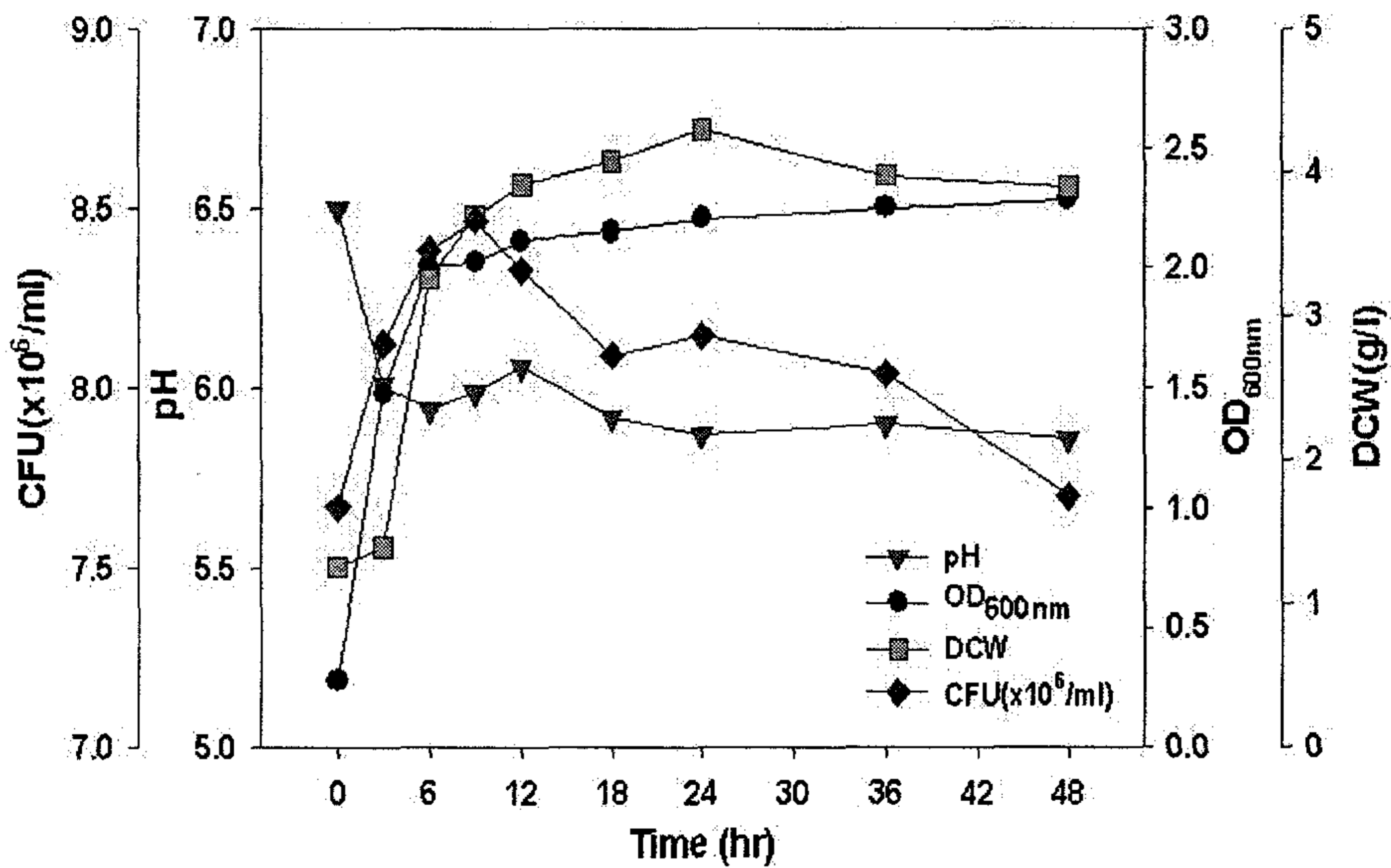


그림 41. 100L 생물배양기에서 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 성장

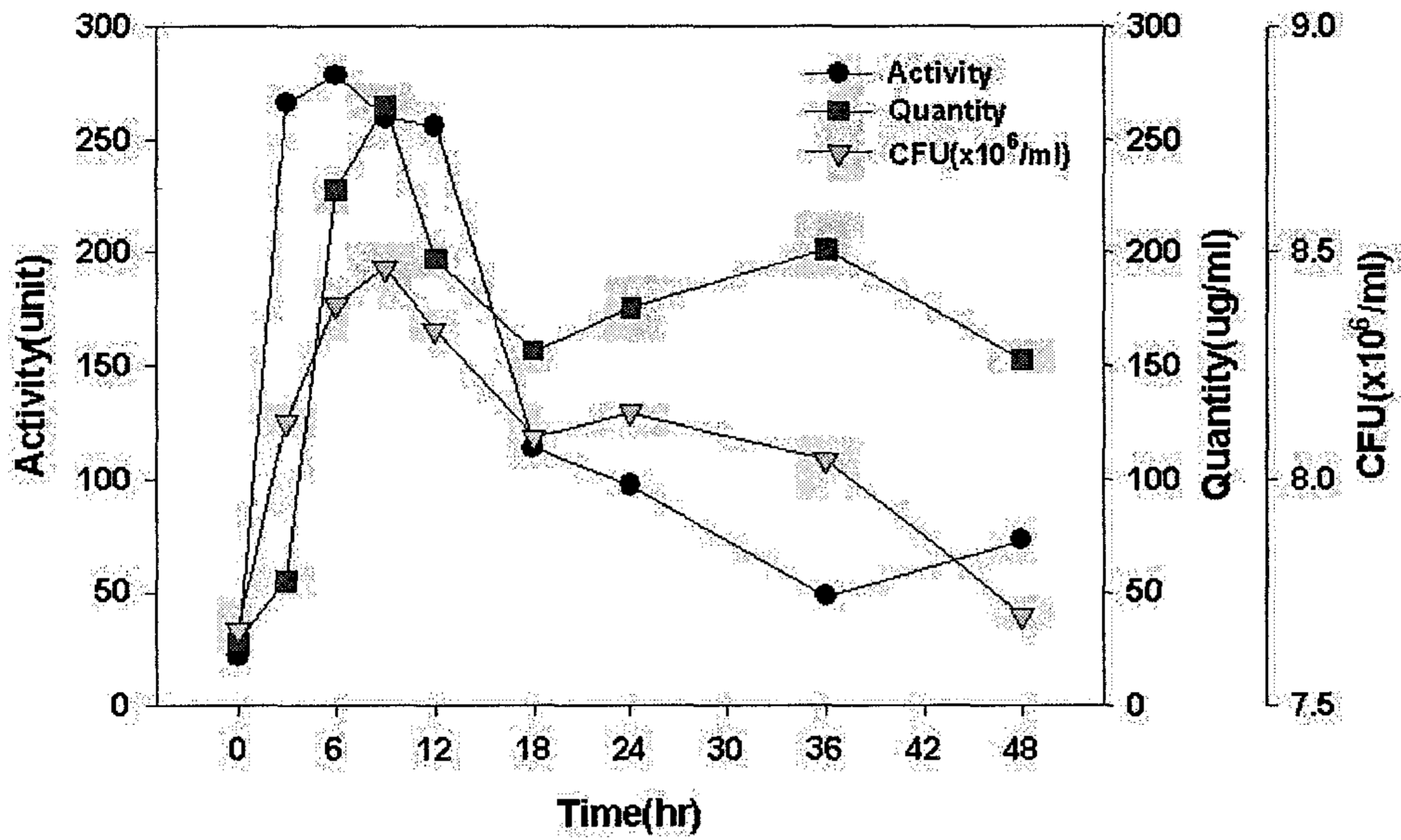


그림 42. *B. amyloliquefaciens* DL-3의 총 단백질 생산 및 섬유소 분해효소 생산

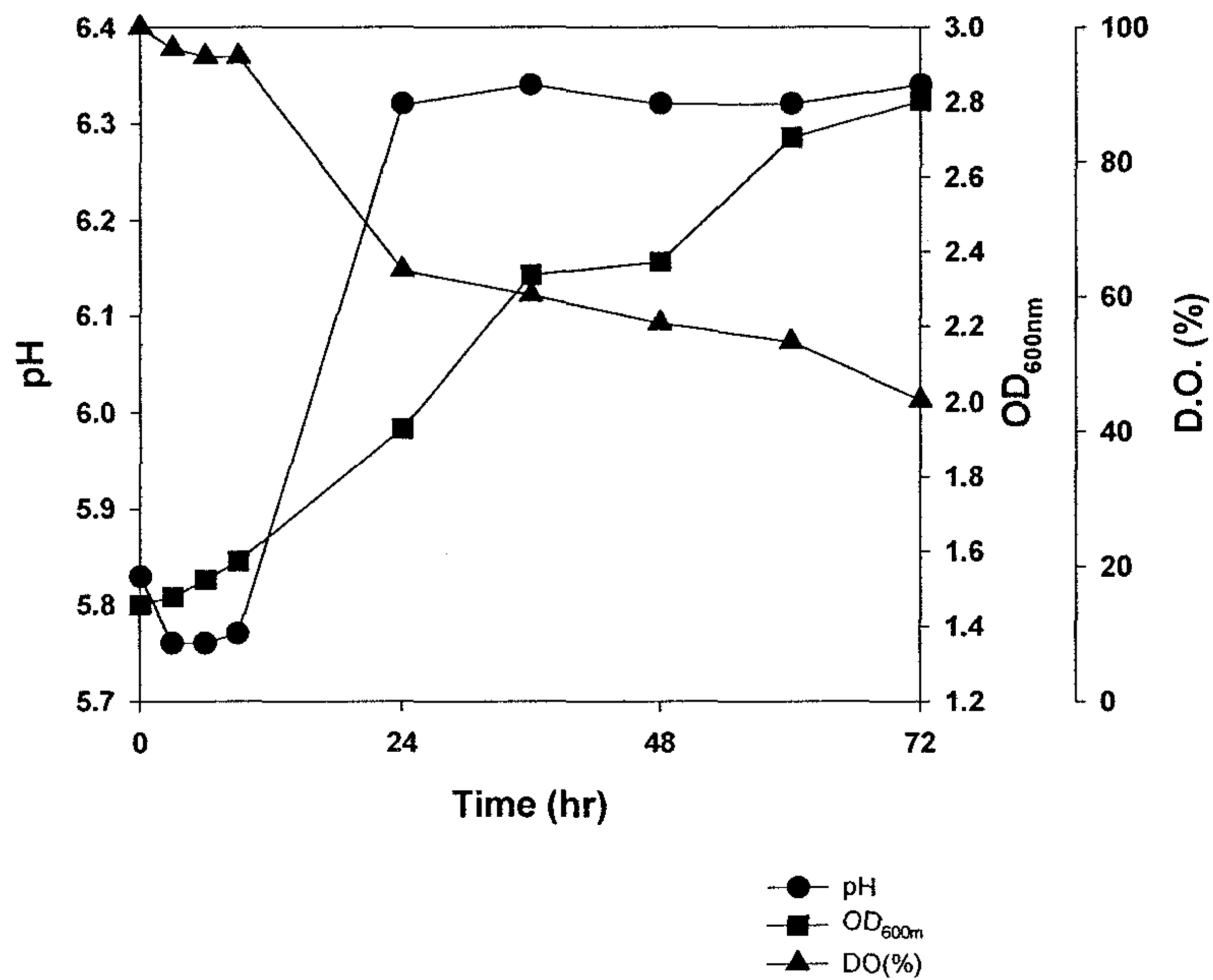


그림 43. 왕겨를 탄소원으로 사용한 배지에서 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 생육곡선

플라스크와 7L 생물배양기를 사용한 실험에서 최적화한 조건을 참고로 파이로트 규모인 100L 생물배양기에서 배양한 결과, 그림 44와 같이 섬유소 분해효소 생산균주인 *B. amyloliquifaciens* DL-3는 왕겨를 탄소원으로 이용하여 균체의 증식은 물론, 약 300 unit/ml의 섬유소 분해효소를 생산함을 확인하였다.

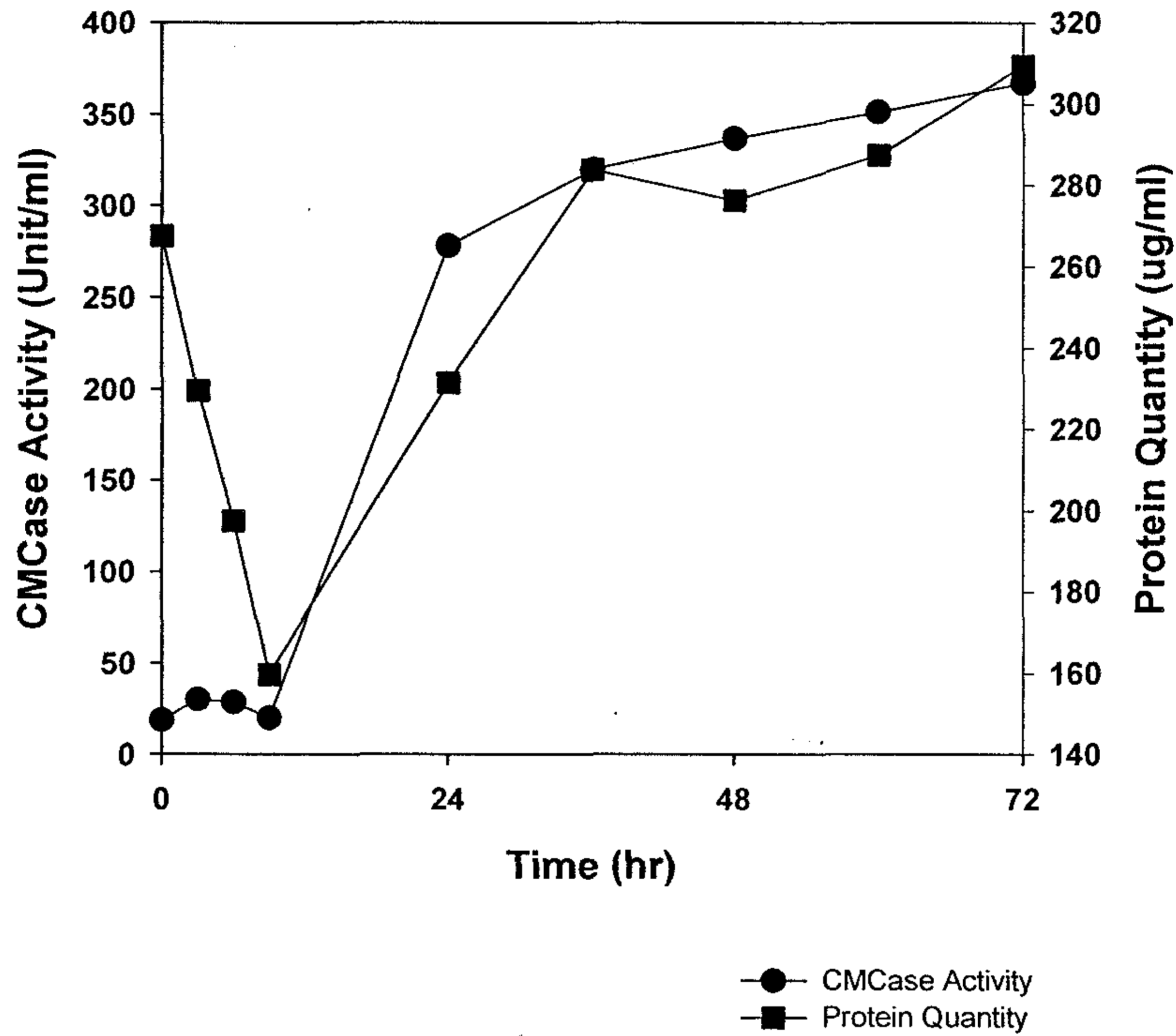


그림 44. 왕겨를 탄소원으로 사용한 배지에서 *B. amyloliquefaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 생산

제3절 섬유소 분해효소의 특성 연구 및 대량생산 공정 개발

1. 연구수행 방법

가. 섬유소 분해효소 분리 및 정제

B. amyloliqueifaciens DL-3 균주를 100L 생물배양기를 사용하여 배양하고 연속원심분리기를 사용하여 균체를 제거하였다. 균체를 제거한 상등액을 UF system 을 사용하여 분자량 30,000이하의 물질을 제거하면서 약 4배 농축하였다. 농축한 상등액에 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 첨가하여 상등액에 존재하는 단백질을 침전시켰다. 약 1일간 저온에 보관한 후에 원심분리하여 침전된 단백질을 얻었다. 침전물에 적당한 부피의 Tris-HCl buffer(pH 8.0)를 첨가하여 완전히 녹인 후, dialysis하여 분자량 10,000 ~ 12,000 이하의 저분자 물질을 제거하였다.

저분자 물질을 제거한 상등액을 HiTrap™ QXL 이온교환컬럼을 장착한 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 크로마토그래피를 통과한 분획들의 섬유소 분해효소 활성을 CMC를 탄소원으로 제조한 고체배지를 사용하여 확인하였다.

나. 섬유소 분해효소의 생화학적 특성

1) 반응의 최적 온도 및 온도 안정성

분리·정제하여 동결건조된 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소와 buffer (Tris-HCl pH8.0) 및 1% CMC 용액을 섞은 후에 20, 30, 37, 50, 70, 90℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 후에 혼합물에 존재하는 환원당의 농도를 DNS 법으로 측정하여 최적 온도를 구하였다.

B. amyloliqueifaciens DL-3 섬유소 분해효소의 온도 안정성은 분리·정제하여 동결건조된 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소를 각각 20, 30, 37, 50, 70, 90℃에 각각 1, 3, 5, 7, 9 및 24시간 보관한 후에 1% CMC 용액과 혼합하여 1시간 반응시킨 후에 혼합물에 존재하는 환원당의 농도를 DNS 법으로 측정하여 비교하였다.

2) 반응의 최적 pH 및 pH 안정성

분리·정제하여 동결건조된 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소와 1% CMC 용액을 각각 다른 pH의 완충용액을 사용하여 1시간 반응시킨 후에 반응액에 존재하는 환원당의 농도를 DNS 법으로 측정하여 최적 반응 pH를 구하였다. Citrate buffer를 사용하여 pH 3.0, 4.0, 5.0 및 6.0의 완충용액을 제조하였으며, sodium phosphate buffer를 사용하여 pH6.0, 6.4, 6.8 및 7.2의 완충용액을 제조하였다. 또한, Tris-HCl buffer를 사용하여 pH 7.5, 8.0, 8.5 및 9.0의 완충용액을 제조하였으며, glycine-NaOH buffer를 사용하여 pH9.0, 10.0 및 11.0의 완충용액을 제조하여 실험을

수행하였다.

B. amyloliqueifaciens DL-3 섬유소 분해효소의 pH 안정성은 분리·정제하여 동결건조된 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소를 pH가 각각 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 6.8, 7.2, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0 및 11.0인 완충용액에 각각 1, 3, 5, 7, 9 및 24 시간 보관한 후에 1% CMC 용액과 혼합하여 1시간 반응시킨 후에 혼합물에 존재하는 환원당의 농도를 DNS 법으로 측정하여 비교하였다.

3) 기질 특이성

B. amyloliqueifaciens DL-3 섬유소 분해효소의 기질에 대한 특이성을 확인하기 위하여 avicel, carboxymethylcellulose (CMC), cellobioase, β -glucan, p-nitrophenyl- β -glucospyranoside 및 xylan 등을 기질로 사용하였다. 각각의 기질의 농도는 2% (w/v)이었으며 효소와 섞어서 50°C에서 1시간 반응시킨후에 반응액의 환원당을 DNS 방법으로 측정하여 비교하였다.

4) 금속이온의 영향

각종 금속이온들이 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소의 반응에 미치는 영향을 검토하기 위하여 5mM 농도의 CoCl_2 , HgCl_2 , EDTA, KCl_2 , PbCl_2 , NiCl_2 , SrCl_2 및 MnCl_2 를 각각 처리한 효소 반응액을 2% (w/v) 농도의 CMC 용액과 혼합한 후에 50°C에서 1시간 반응시켰다. 반응액에 존재하는 환원당의 농도를 DNS 방법으로 측정하여 금속이온들이 섬유소 분해효소의 반응에 미치는 영향을 검토하였다.

5) 보관온도의 영향

B. amyloliqueifaciens DL-3 섬유소 분해효소의 최적 보관온도 및 방법을 구하기 위하여 배양액에서 균체를 제거한 상등액을 각각 4°C, 실온 (약 20°C), 30°C 및 37°C에 보관하면서 상등액에 존재하는 총 단백질의 양과 섬유소 분해효소의 활성을 측정하였다. 또한, 분리·정제하여 동결건조한 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소를 각각 4°C, 실온 (약 20°C), 30°C 및 37°C에 보관하면서 일정시간이 지난 후에 일정량을 취하여 완충용액에 녹인 후에 존재하는 총 단백질의 양과 섬유소 분해효소의 활성을 측정하였다.

다. 섬유소 분해효소의 유전자 cloning

B. amyloliqueifaciens DL-3 균주의 섬유소 분해효소 유전자를 cloning하기 위하여 균주를 LB에 37°C에서 15시간 배양하였다. 배양액에서 균체를 수거한 후, 알려진 방법으로 genome gene을 분리하였다. Genome DNA를 주형으로 하는 섬유소 분해효소의

유전자를 분리하기 위하여 PCR을 수행하였다. 등록된 섬유소 분해효소의 유전자를 참고로 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 균주의 섬유소 분해효소 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 promoter를 제조하였다. Primer는 각각 YJ-1과 YJ-2로 명명하였으며 각각의 염기배열은 다음과 같았다.

YJ-1의 염기서열; 5' ATGAAACGGTCAATTTCTATTTT 3'

YJ-2의 염기서열: 5' TGACAAACCCCTTGTCTTGGG 3'

PCR에 의하여 증폭된 산물을 *E. coli* T vector와 혼합하여 ligation시켰다. Ligation된 plasmid를 *E. coli* JM109에 transformation을 시킨 후에 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 균주의 섬유소 분해효소 유전자가 도입된 transformant를 선별하였다. 선별된 균주에서 알려진 방법으로 plasmid를 분리하였다. Plasmid의 분리는 선별된 균주를 TEM buffer에 현탁시킨 후에 lysozyme, protease K 및 SDS를 현탁액에 첨가하여 균체의 세포벽과 세포막을 제거하였다. 세포벽과 세포막이 제거된 현탁액에 1M NaCl를 첨가하고 Phenol : chloroform : isoamylalcohol의 비율이 25 : 24 : 1 용액을 첨가한 후, 30초 동안 흔들어주었다. 이 현탁액을 원심분리하여 얻은 상등액에 에탄올을 처리하여 얻은 침전물을 수거하여 plasmid를 분리하였다. 분리한 plasmid의 염기서열을 분석하여 섬유소 분해효소의 염기서열을 결정하였으며, 염기서열을 바탕으로 아미노산 배열을 결정하였다.

라. 섬유소 분해효소의 대량생산 공정 개발

B. amyloliqueifaciens DL-3 균주가 생산하는 섬유소 분해효소를 플라스크 규모 및 pilot 규모로 분리 및 정제하는 실험을 통하여 섬유소 분해효소의 대량생산 공정을 개발할 것이다. 즉, 섬유소 분해효소 생산 균주의 배양과 배양액에서의 균체 분리, 균체를 제거한 상등액의 농축 및 섬유소 분해효소 분획의 분리와 건조 등의 조건을 최적화하여 섬유소 분해효소의 대량 생산 공정을 개발할 것이다.

2. 연구 결과

가. 섬유소 분해효소 분리 및 정제

1) 섬유소 분해효소의 분자량 비교

B. amyloliquifaciens DL-3 균주가 생산하는 섬유소 분해효소를 분리·정제하기 위한 공정을 확립하기 위하여 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 배양액에 존재하는 단백질을 농축하고 기존에 시판되는 섬유소 분해효소와 동일한 조건으로 SDS-Polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동하고 각각의 분자량을 비교하였다. 일정 시간 배양한 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 상등액에 황산암모늄을 첨가하여 단백질을 농축하였으며 침전된 단백질을 Tri-HCl buffer에 녹여서 시료를 준비하였다.

그림 45와 같이 기존에 섬유소 분해효소로 시판되는 제품들은 완전히 정제된 섬유소 분해효소가 아니라 부분적으로 정제된 섬유소 분해효소이며 섬유소 분해효소가 아닌 단백질도 다량 포함되어 있음을 알 수 있었다. 섬유소 분해효소의 활성을 나타내는 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주 배양액을 분자량의 cut-off 범위가 10,000인 ultrafiltration membrane을 사용하여 농축하여 얻은 단백질도 기존에 시판되는 제품과 유사하게 다양한 분자량의 단백질이 혼합되어 있음을 알 수 있었다.

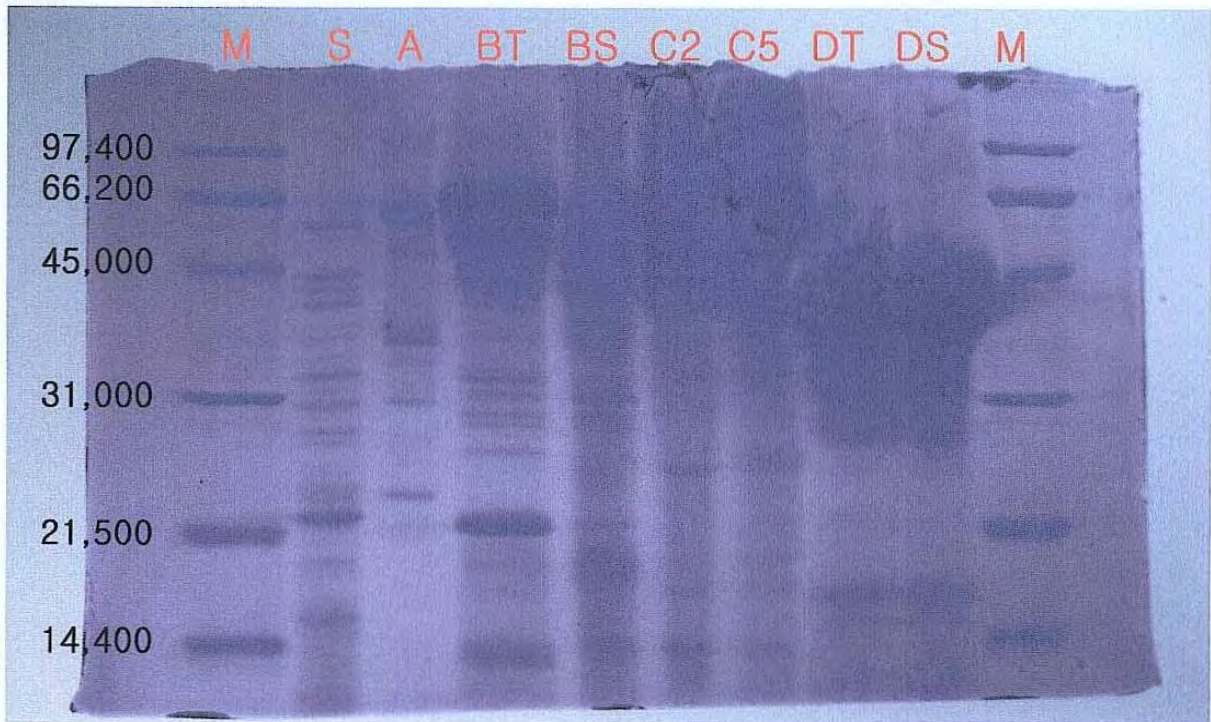


그림 45. *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주 균주가 생산하는 섬유소 분해효소와 시판되는 섬유소 분해효소와의 비교 (M; Marker, S: supernatant of *B. subtilis* subsp. *subtilis* A-53, A; *Aspergillus niger* in Tris-HCl pH 8.0 buffer, B-T; *Trichoderma viride* in Tris-HCl pH 8.0 buffer, B-S; *Trichoderma viride* in sodium acetate pH 5.0 buffer, C-2; *Trichoderma reesei* in Tris-HCl pH 8.0 buffer (2 x dilution), C-5; *Trichoderma reesei* in Tris-HCl pH 8.0 buffer (5 x dilution), D-T: *Aspergillus* sp. in Tris-HCl pH 8.0 buffer and D-S: *Aspergillus* sp. in sodium acetate pH 5.0 buffer)

2) 섬유소 분해효소의 분리·정제

B. amyloliquifaciens DL-3 균주가 생산하는 섬유소 분해효소를 분리·정제하기 위하여 균체를 제거한 배양액에 황산암모늄을 처리하여 단백질을 농축한 후에 dialysis하여 염 성분을 제거하였다. 염 성분을 제거한 시료를 HiTrap™ QXL ion exchange column(음이온 컬럼)를 장착한 이온교환크로마토그래피를 사용하여 단백질의 분획을 분리하였다. 분리한 분획을 carboxyl methy cellulose (CMC)가 첨가된 agar 배지에 20 µl 점적하여 CMC의 분해능을 비교하였다. 그림 46과 같이 분획 55에서 69, 분획 73부터 81, 분획 86부터 89, 분획 90부터 99 및 분획 112부터 113 등에서 CMC 분해능을 확인하였다. CMC 분해능이 확인된 분획을 SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 결과는 그림 48과 같다. CMC 분해능을 나타내는 단백질의 분자량은 약 66,000 및 31,000의 두 종류의 단백질로 구성되어 있음을 알 수 있었다. 정제된 섬유소 분해효소를 SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 결과, *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주가 생산하는 섬유소 분해효소의 분자량은 약 54 kDa 이었다.

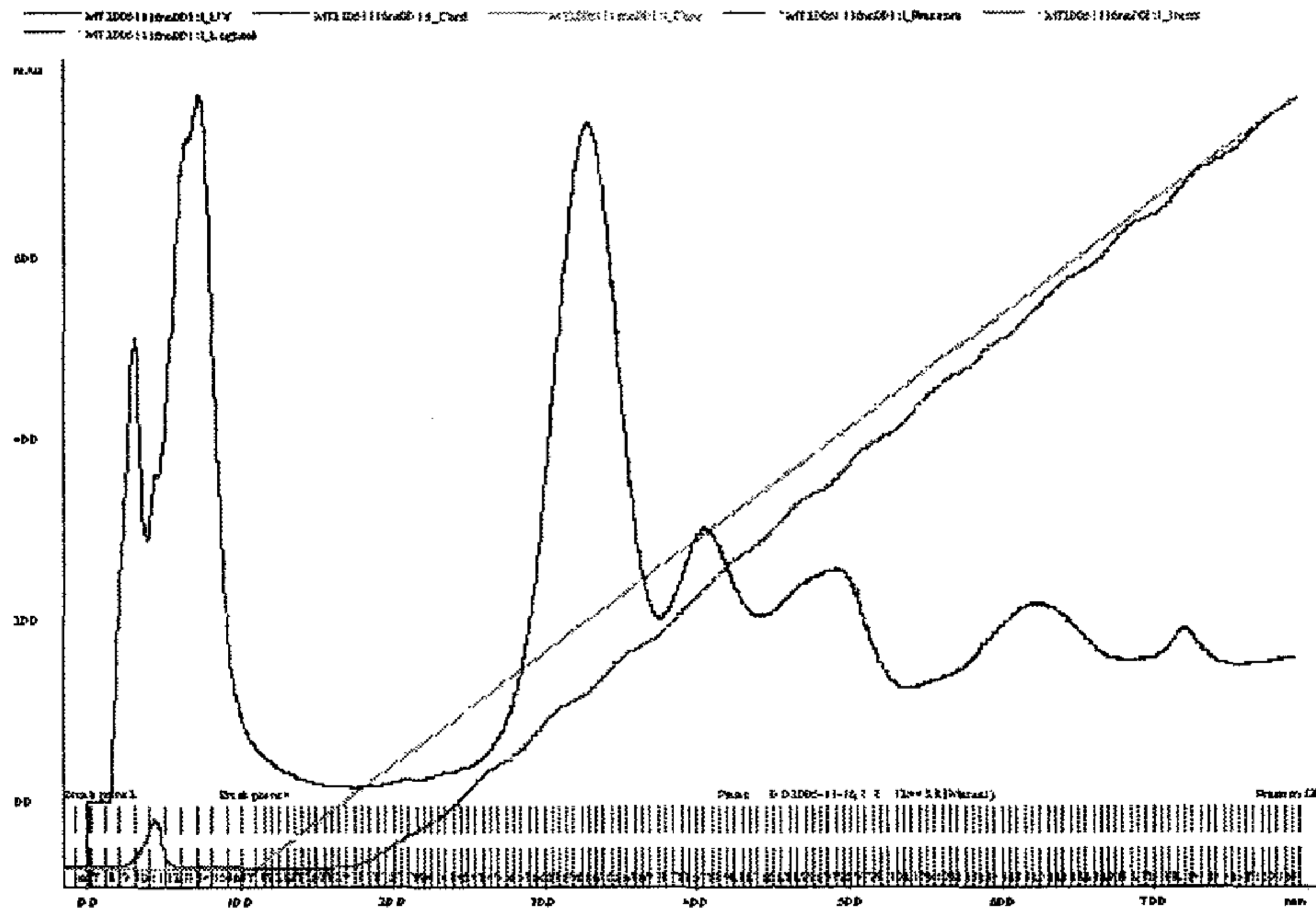


그림 46. 이온교환크로마토그래피를 사용하여 분리한 단백질 분획들



그림 47. 이온교환크로마토그래피를 사용하여 분리한 단백질 분획들의 CMC 분해능 비교

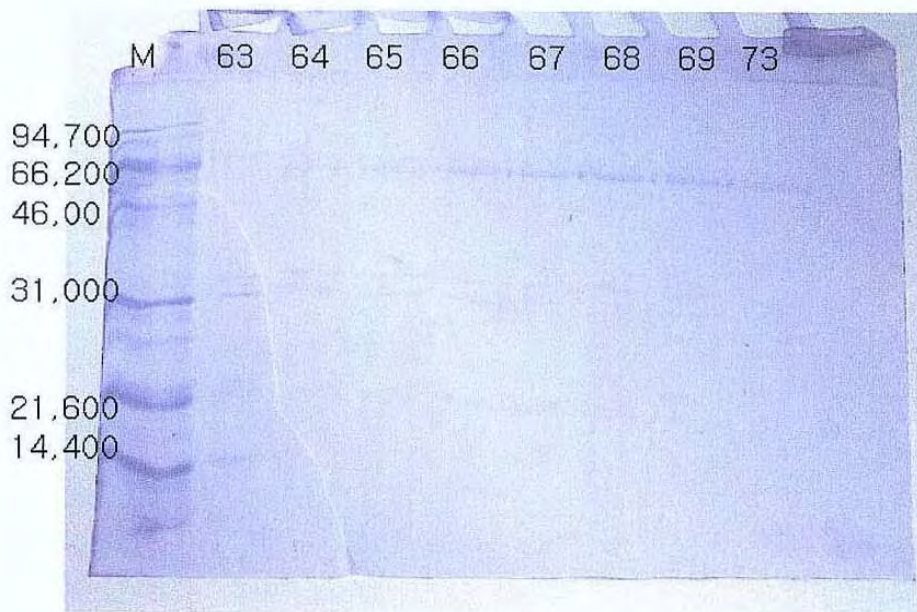


그림 48. CMC 분해능이 있는 단백질 분획의 전기영동

나. 섬유소 분해효소의 생화학적 특성

1) 반응의 최적 온도 및 온도 안정성

분리·정제하여 동결건조된 *B. amyloliquefaciens* DL-3 섬유소 분해효소와 buffer (Tris-HCl pH 8.0) 및 1% CMC 용액을 섞은 후에 20, 30, 37, 50, 70, 90℃에서 1시간 반응시킨 후, 혼합물에 존재하는 환원당의 농도를 DNS 법으로 측정하여 최적 온도를 구한 결과는 그림 49와 같다. 온도의 증가에 따라 반응속도가 증가하여 50℃에서 최적 반응속도를 나타냈으며 이후에 온도의 증가에 따라 반응속도는 감소하였다.

B. amyloliqueifaciens DL-3 섬유소 분해효소의 온도 안정성을 확인하기 위하여 섬유소 분해효소를 각각 20, 30, 37, 50, 70, 90°C에 각각 1, 3, 5, 7, 9 및 24시간 보관한 후에 1% CMC 용액과 혼합하여 1시간 반응시킨 후에 혼합물에 존재하는 환원당의 농도를 DNS 법으로 측정하여 비교하였다. 그림 50과 같이 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소를 반응 최적온도인 50°C에 보관한 경우에 24시간이 경과한 후에도 약 90%의 활성을 나타냈다. *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소는 보관 온도가 70 및 90°C인 경우에도 24시간이 경과한 후에도 약 75%의 활성을 나타냈다.

2) 반응의 최적 pH 및 pH 안정성

B. amyloliqueifaciens DL-3 섬유소 분해효소와 1% CMC 용액을 각각 다른 pH의 완충용액을 사용하여 1시간 반응시킨 후에 반응액에 존재하는 환원당의 농도를 DNS 법으로 측정한 결과는 그림 51과 같다. 각기 다른 buffer를 사용하여 적정한 pH에서 반응한 결과, *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소 반응의 최적 pH는 citrate buffer를 사용하여 제조한 pH 6.0임을 알 수 있었다.

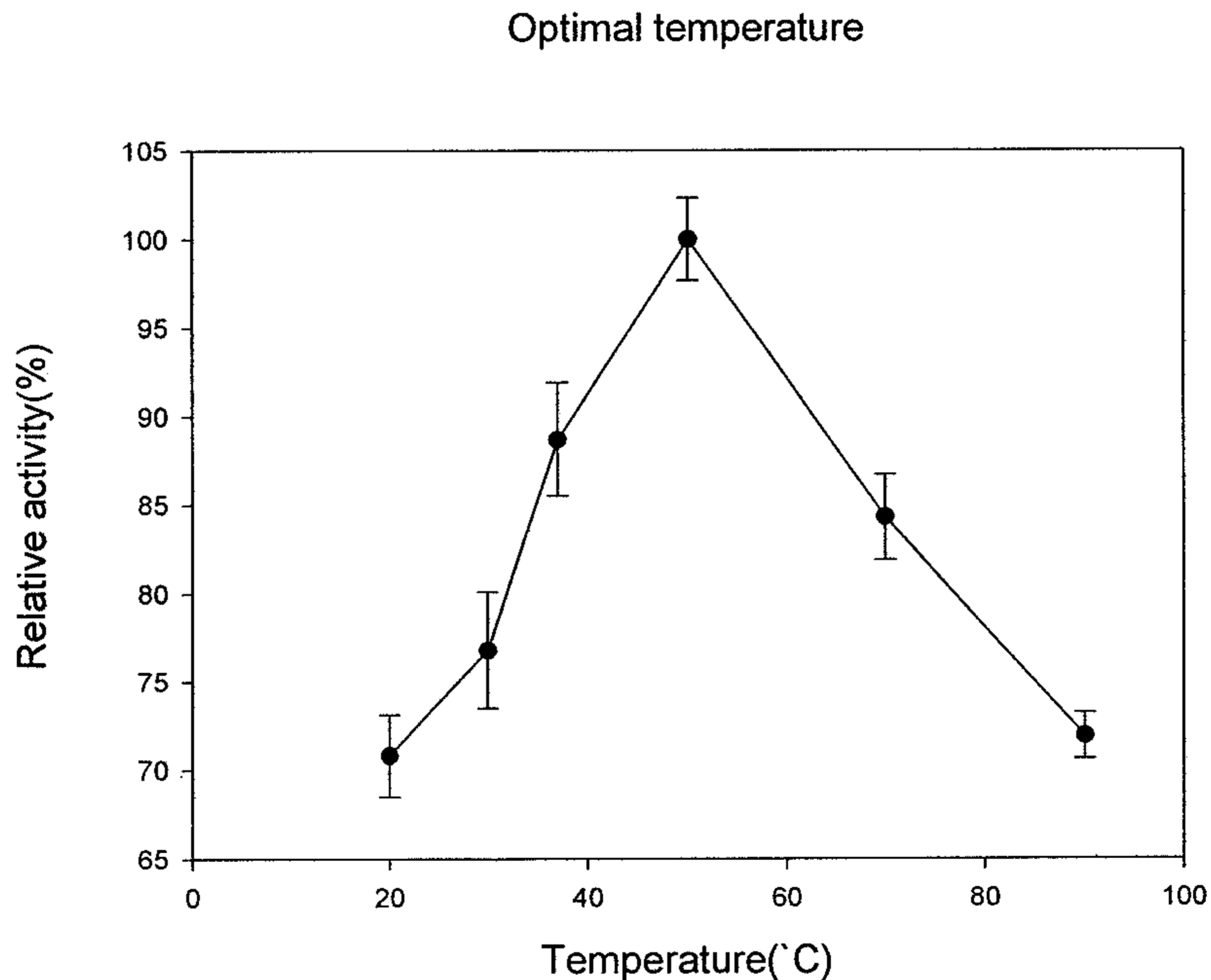


그림 49. 온도가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3가 생산한 섬유소 분해효소의 반응에 미치는 영향

B. amyloliquefaciens DL-3 섬유소 분해효소를 pH가 각각 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 6.8, 7.2, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 10.0 및 11.0인 완충용액에 각각 1, 3, 5, 7, 9 및 24시간 보관한 후에 1% CMC 용액과 혼합하여 50°C에서 1시간 반응시킨 후에 혼합물에 존재하는 환원당의 농도를 DNS 법으로 측정하여 비교한 pH 안정성은 그림 52와 같다. *B. amyloliquefaciens* DL-3 섬유소 분해효소를 pH가 6.8 및 7.2인 sodium-phosphate 완충용액에 보관하였을 때, 24시간 후의 활성은 초기 활성의 약 40%이었다. 또한 pH 8.0, 8.5 및 9.0인 Tris-HCl 완충용액에 보관하였을 때도 24시간 후의 활성은 약 40%이었으나 pH 10 및 11의 glycine-NaCl 완충용액에 보관하였을 경우의 활성은 20% 미만이었다. 이와 같은 결과로 *B. amyloliquefaciens* DL-3 섬유소 분해효소의 최적 반응 pH와 최적 안정성을 유지하는 pH가 다소 다름을 알 수 있었다.

Temperature stability

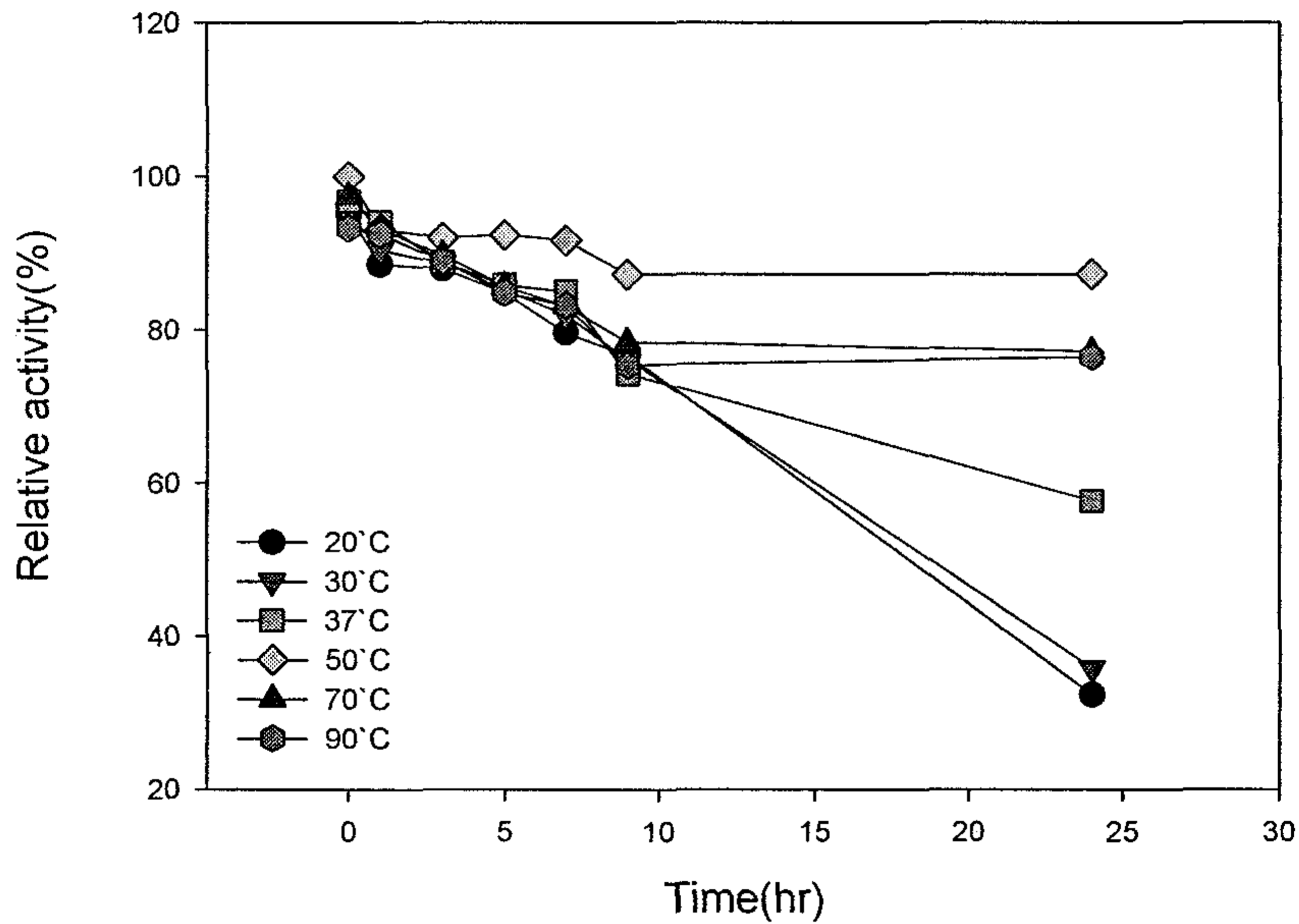


그림 50. *B. amyloliquefaciens* DL-3가 생산한 섬유소 분해효소의 온도 안정성

Optimal pH

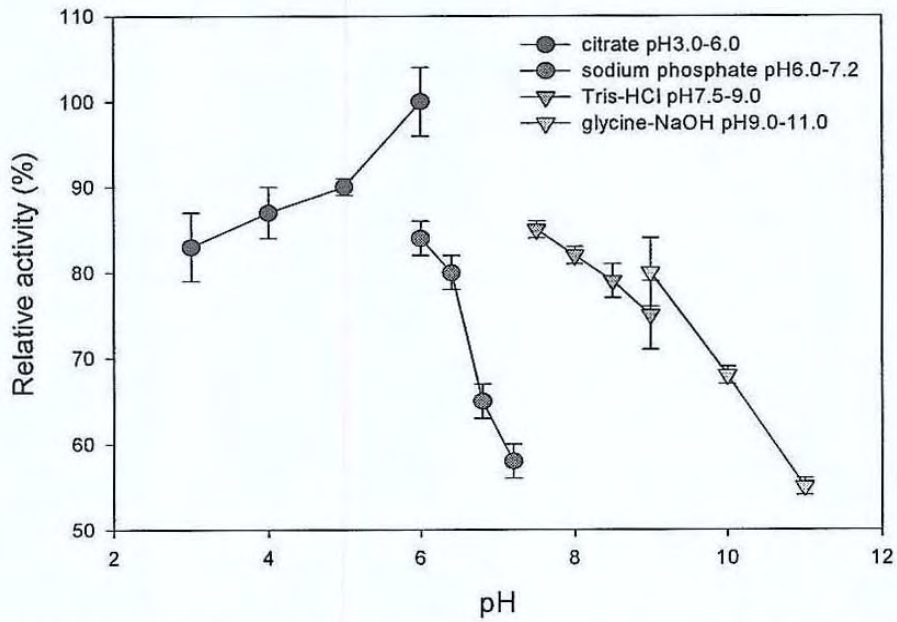


그림 51. pH가 *B. amyloliquefaciens* DL-3가 생산한 섬유소 분해효소 반응에 미치는 영향

pH stability

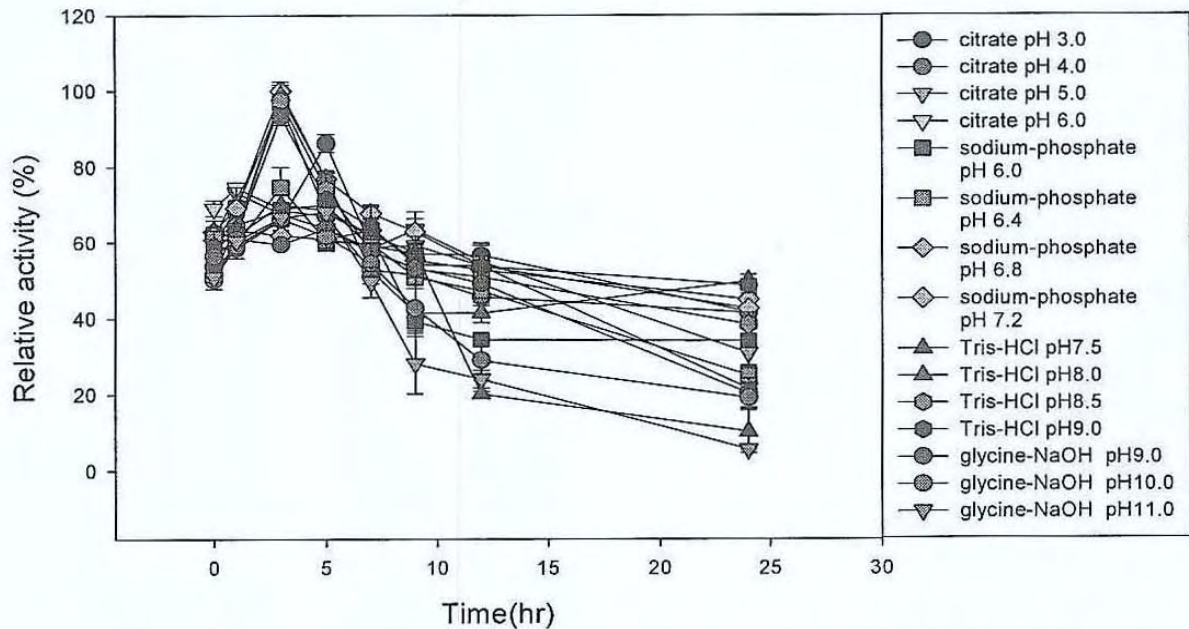


그림 52. *B. amyloliquefaciens* DL-3가 생산한 섬유소 분해효소의 pH 안정성

3) 기질 특이성

B. amyloliquefaciens DL-3 섬유소 분해효소의 기질로 avicel, carboxymethylcellulose (CMC), cellobiose, β -glucan, p-nitrophenyl- β -glucospyranoside 및 xylan 등을 사용하여 기질에 대한 특이성을 비교한 결과는 그림 53과 같다. 기질로 사용한 이당류인 cellobiose에 대한 특이성이 가장 높았으며 CMC, B-glucan, xylan 및 avicell과 같은 다당류를 분해할 수 있음을 확인하였다. 이는 *B. amyloliquefaciens* DL-3 섬유소 분해효소가 다당류의 베타-결합은 물론, 알파 결합도 일부 분해할 수 있음을 알 수 있었다.

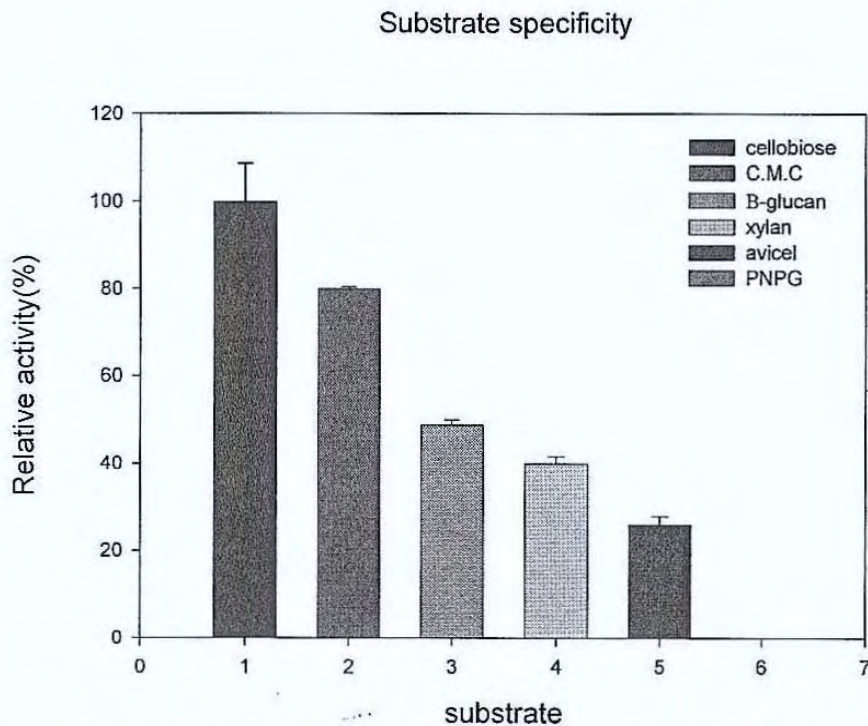


그림 53. *B. amyloliquefaciens* DL-3가 생산한 섬유소 분해효소의 기질에 대한 특이성

4) CMC와 pNPG에 대한 V_{max} 및 K_m

B. amyloliquefaciens DL-3 섬유소 분해효소의 기질로서 CMC와 para-nitrophenyl- β -D-glucoside (pNPG)의 V_{max} 와 K_m 값을 결정하기 위하여 각각의 농도가 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20 mM 인 CMC 및 pNPG 용액을 섬유소 분해효소와 50°C에서 1시간 반응 시키면서 410nm에서 시간에 따른 흡광도값(Abs/min)을 측정하고 이를 참고로 결정한 V_{max} 와 K_m 값은 각각 그림 54, 55, 56 및 57과 같다. *B.*

amyloliquefaciens DL-3 섬유소 분해효소의 기질로서 CMC에 대한 V_{max} 와 K_m 값은 각각 169.7 U/ml이며 0.92 mg/ml이었으며 ρ NPG에 대한 V_{max} 와 K_m 값은 각각 26.6 U/ml이며 1.18 mg/ml이었다.

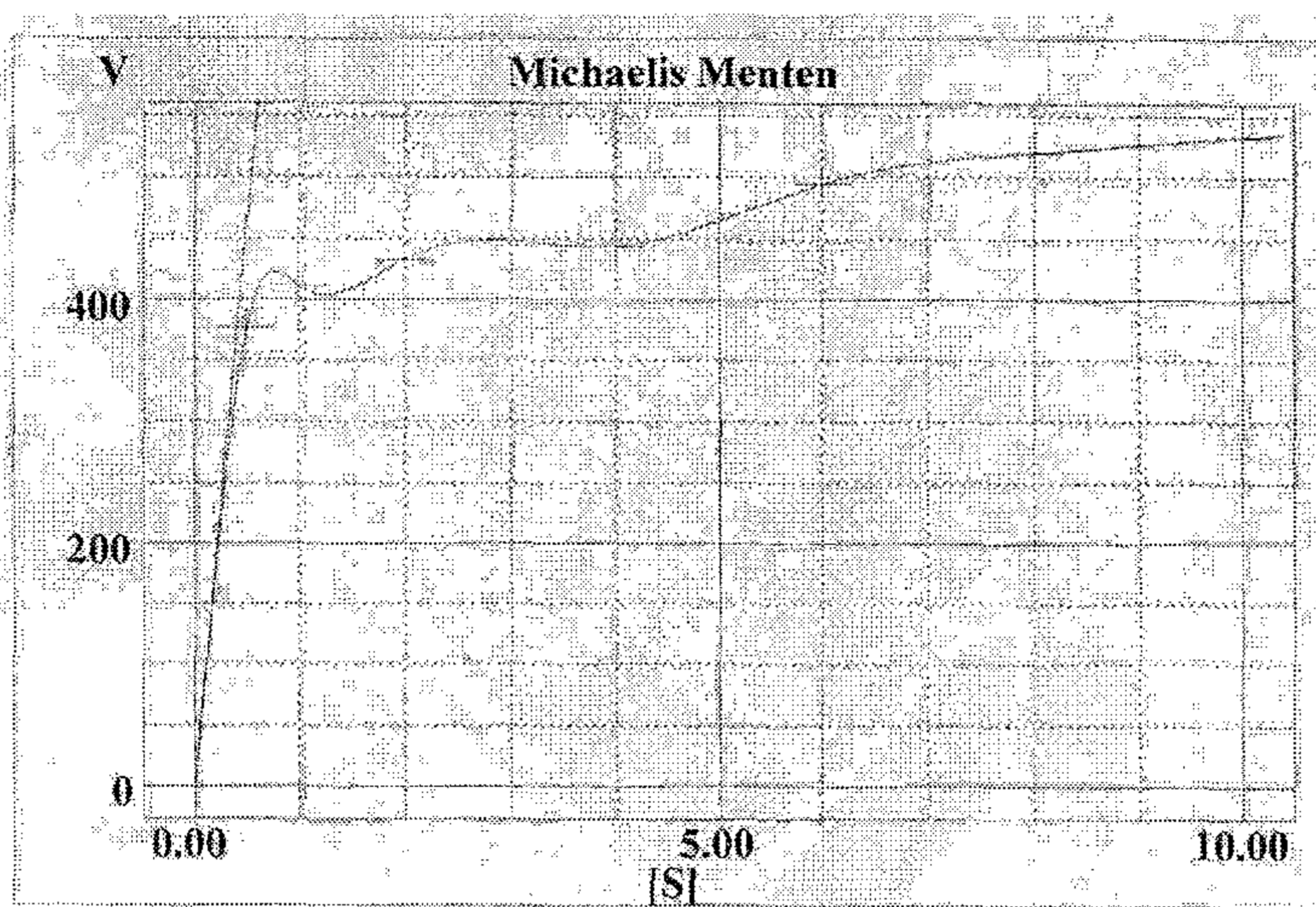


그림 54. *B. amyloliquefaciens* DL-3가 생산한 섬유소 분해효소의 CMC에 대한 Michaelis Mentens 반응곡선

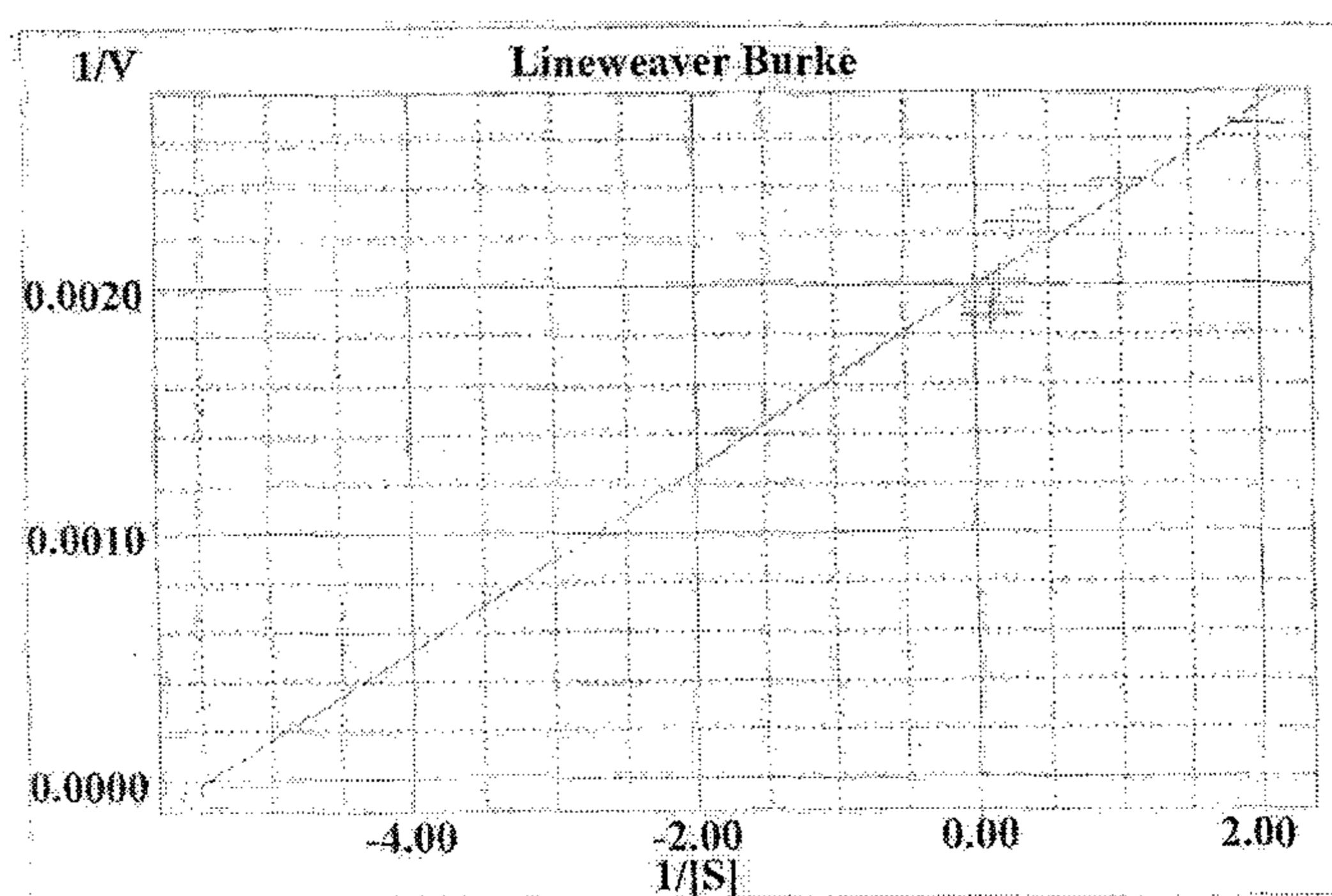


그림 55. *B. amyloliquefaciens* DL-3가 생산한 섬유소 분해효소의 CMC에 대한 Lineweaver Burke 곡선

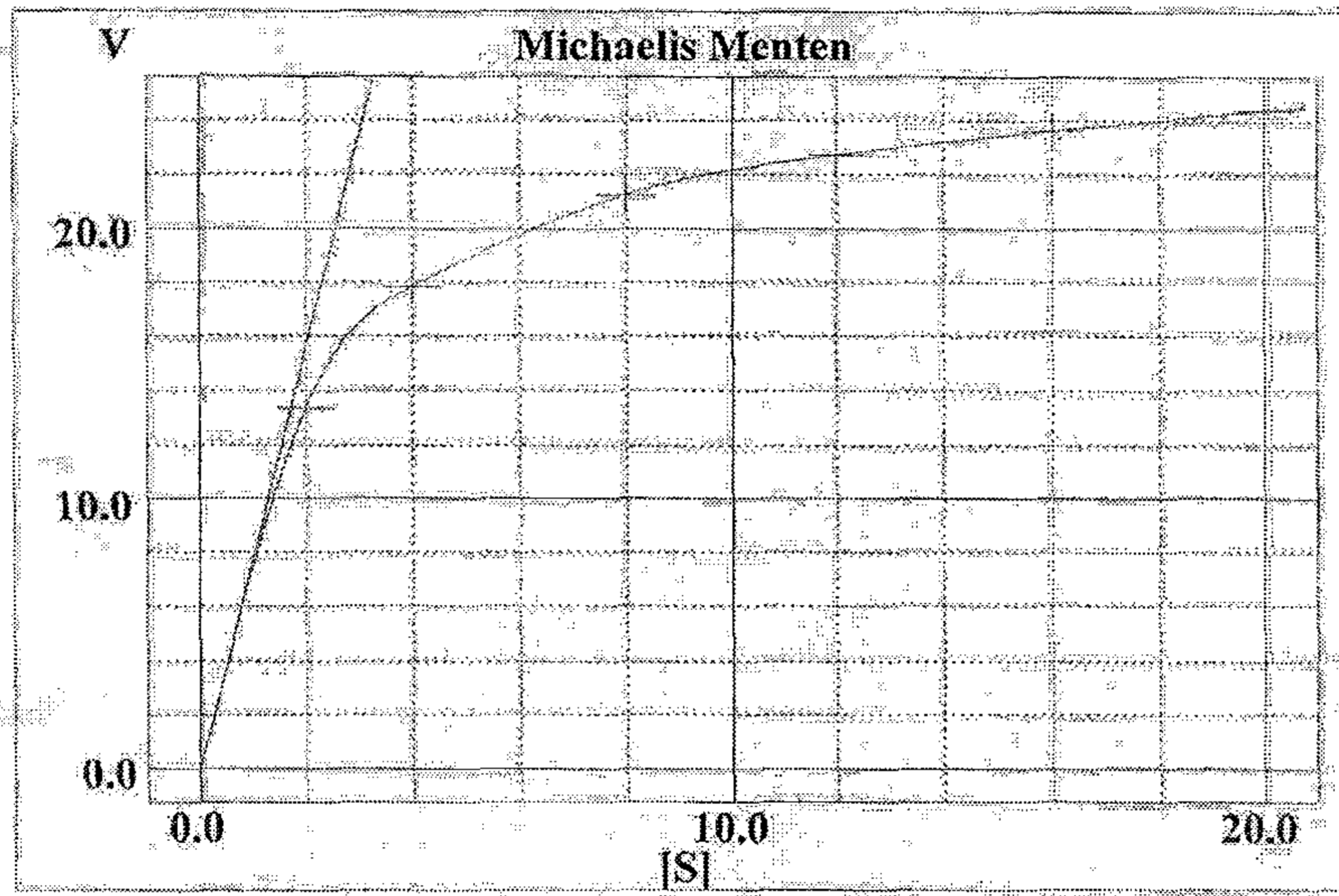


그림 56. *B. amyloliquefaciens* DL-3가 생산한 섬유소 분해효소의 pNPG에 대한 Michaelis Mentens 반응곡선

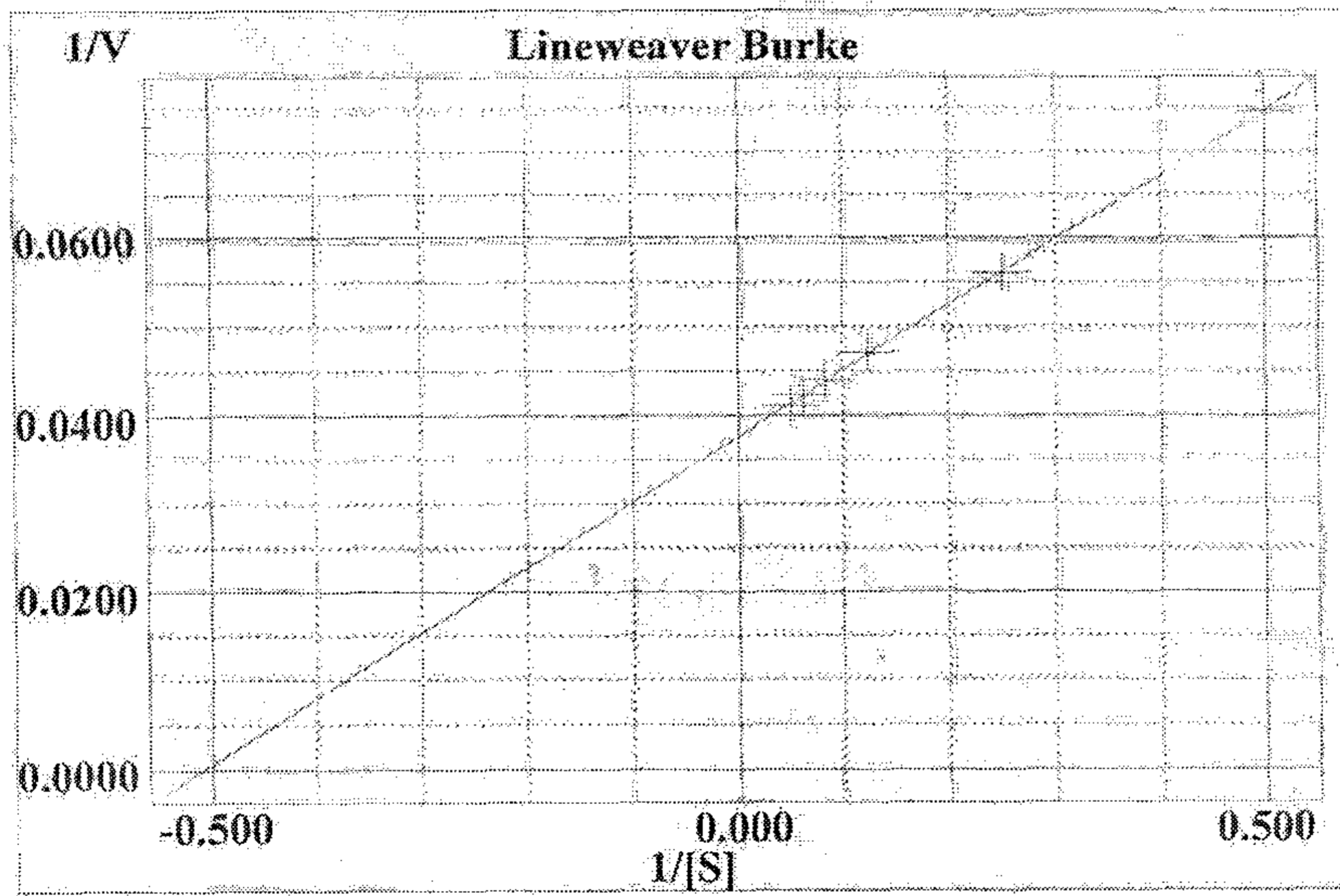


그림 57. *B. amyloliquefaciens* DL-3가 생산한 섬유소 분해효소의 pNPG에 대한 Lineweaver Burke 곡선

5) 금속이온의 영향

각종 금속이온들이 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소의 반응에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각각 5mM 농도의 CoCl₂, HgCl₂, EDTA, KCl₂, PbCl₂, NiCl₂, SrCl₂ 및 MnCl₂를 첨가한 효소 반응액을 2% (w/v) 농도의 CMC 용액과 혼합한 후에 50°C에서 1시간 반응시킨 후, 반응액에 존재하는 환원당의 농도를 DNS 방법으로 측정하였다. 금속이온이 섬유소 분해효소에 미치는 영향은 표 13과 같이 대부분의 금속이온이 섬유소 분해효소의 반응을 저해시켰다. 특히, MnCl₂의 저해 정도가 가장 높았으며 CoCl₂의 저해 정도는 금속이온을 첨가하지 않은 경우와 비슷한 활성을 나타내었다.

표 13. 금속이온이 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 활성에 미치는 영향

금속이온 (5mM)	상대적 활성(%)
control	100 ± 7.2
CoCl ₂	97.3 ± 4.8
HgCl ₂	46.7 ± 0.7
EDTA	65.5 ± 4.8
KCl ₂	57.4 ± 15.2
PbCl ₂	63.2 ± 12.2
NiCl ₂	59.9 ± 2.1
SrCl ₂	63.4 ± 7.6
MnCl ₂	23.1 ± 4.7

6) 보관온도의 영향

B. amyloliqueifaciens DL-3 섬유소 분해효소의 최적 보관온도 및 방법을 구하기 위하여 배양액에서 균체를 제거한 상등액을 각각 4°C, 실온 (약 20°C), 30°C 및 37°C에 보관하면서 상등액에 존재하는 총 단백질의 양과 섬유소 분해효소의 활성을 측정한 결과는 그림 58 및 59와 같다. 액상 상태로 보관한 *B. amyloliqueifaciens*

DL-3 섬유소 분해효소의 활성은 시간에 따라 급속히 감소하여 30℃ 및 37℃에 보관한 경우에 8일 후의 섬유소 분해효소의 활성은 거의 없었으며 4℃에 보관한 경우의 활성은 약 30%이었다.

B. amyloliqueifaciens DL-3이 생산한 섬유소 분해효소를 분리·정제하여 동결건조한 섬유소 분해효소를 각각 4℃, 실온 (약 20℃), 30℃ 및 37℃에 보관하면서 완충용액에 녹인 후에 총 단백질의 양과 섬유소 분해효소의 활성을 측정된 결과는 그림 61 및 62와 같다. 진공냉동건조한 *B. amyloliqueifaciens* DL-3 섬유소 분해효소는 약 8일이 지난 후에도 보관온도에 관계없이 100%이상의 활성을 유지하는 것을 확인하였다.

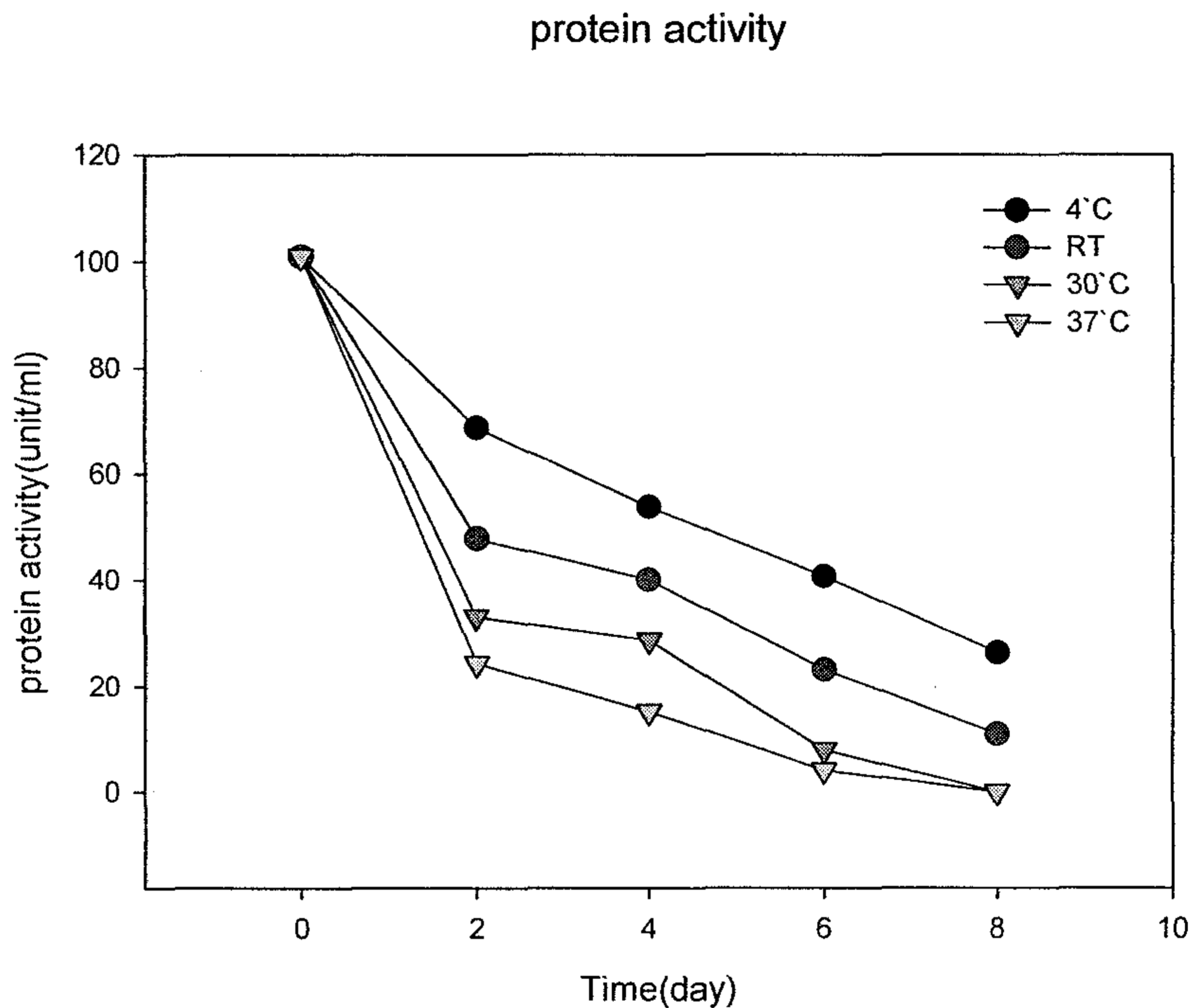


그림 58. 보관온도가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 활성에 미치는 영향

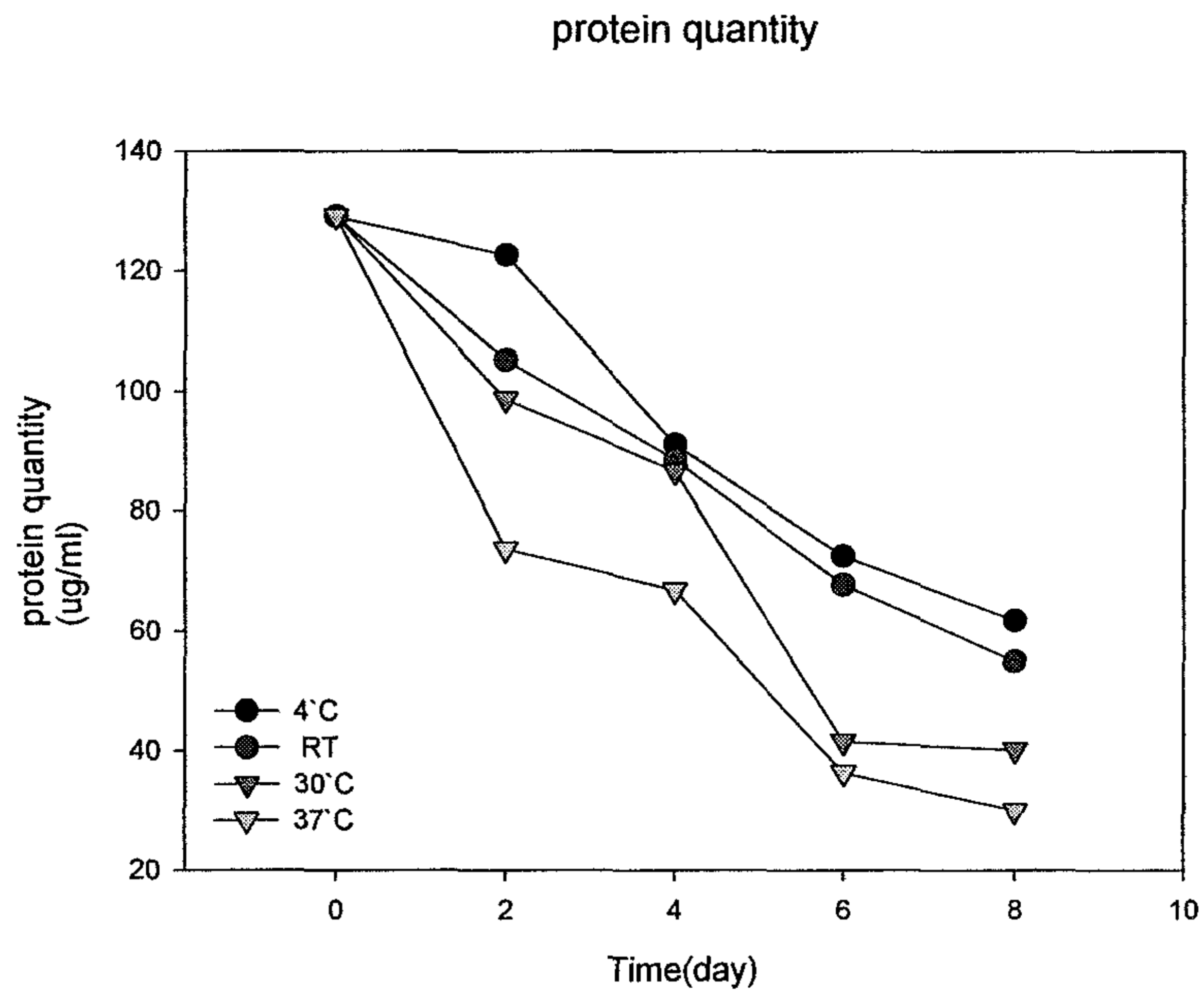


그림 59. 보관온도가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 양에 미치는 영향

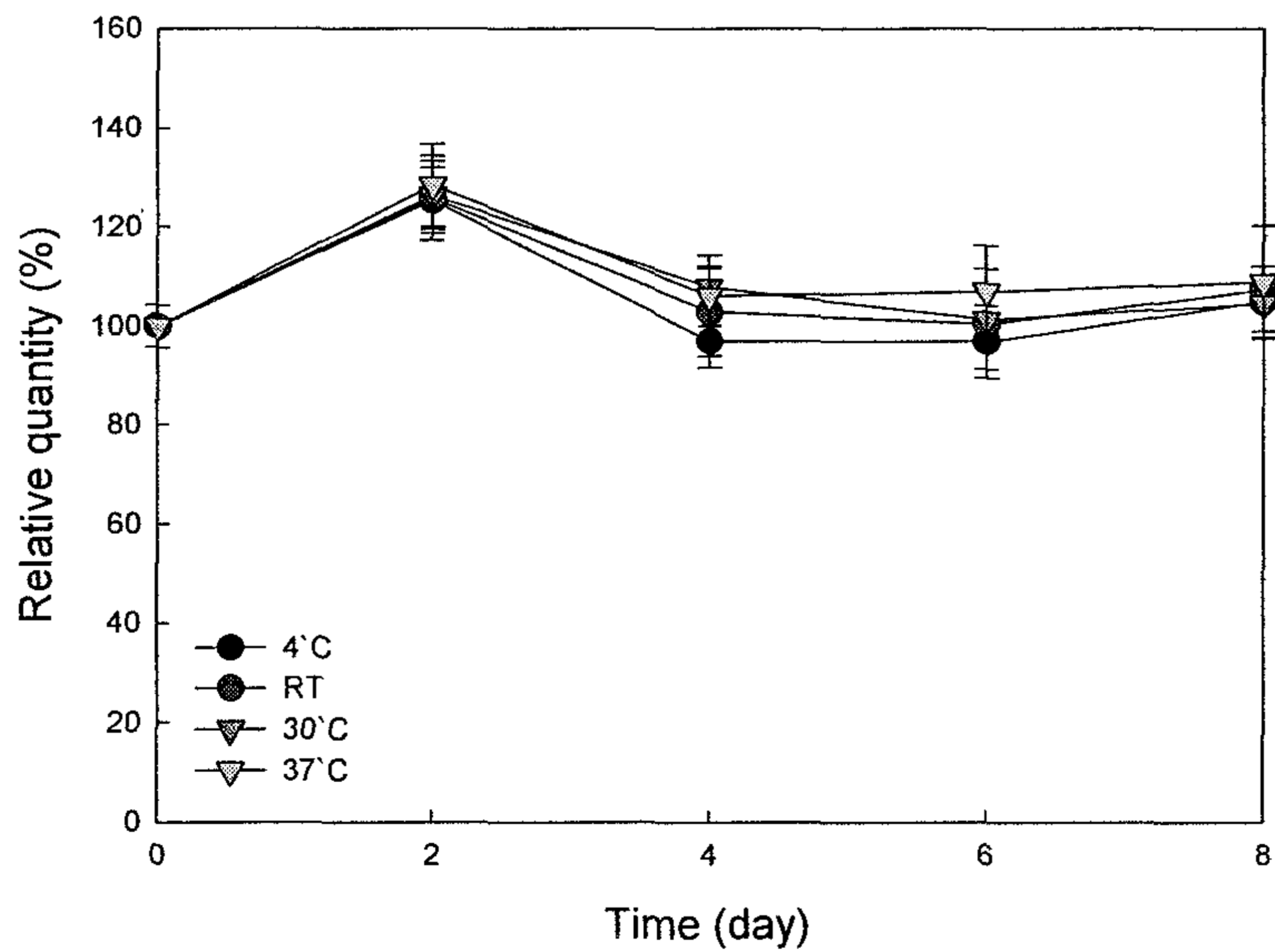


그림 60. 보관온도가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 활성화에 미치는 영향

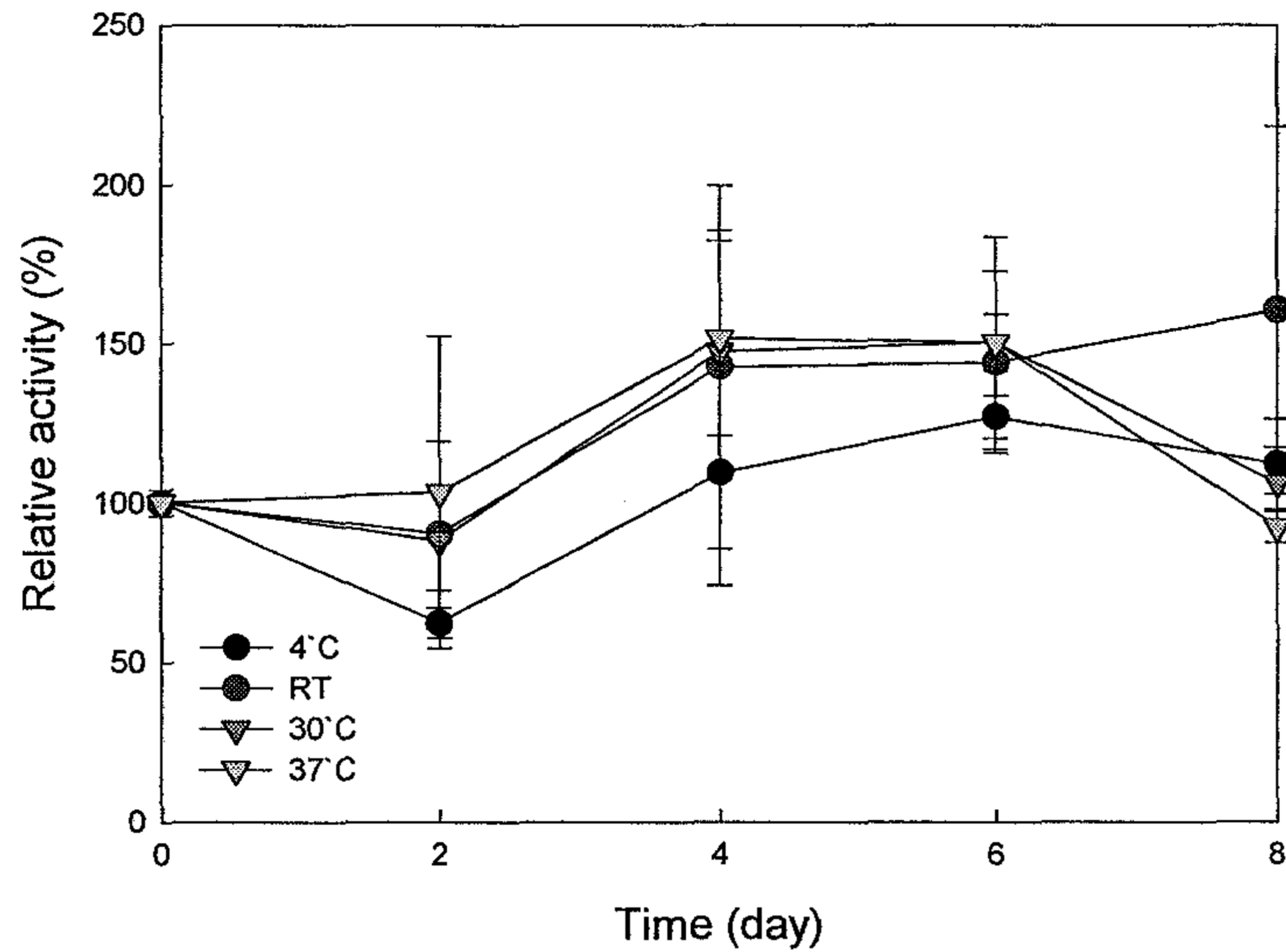


그림 61. 보관온도가 *B. amyloliqueifaciens* DL-3의 섬유소 분해효소 양에 미치는 영향

다. 섬유소 분해효소의 유전자 cloning

B. amyloliqueifaciens DL-3이 생산하는 섬유소 분해효소 유전자를 cloning 하여 염기서열을 분석한 결과는 그림 62와 같이, 섬유소 분해효소 유전자는 1,527개의 염기로 구성되어 있으며 이를 바탕으로 계산한 구성 아미노산은 508개로 알려졌다.

라. 섬유소 분해효소의 대량생산 공정 개발

플라스크 규모 및 7L와 100L 생물배양기를 사용하여 배양조건의 최적화 및 분리·정제 조건의 최적화를 통하여 구성한 *B. amyloliqueifaciens* DL-3을 이용한 섬유소 분해효소의 대량 생산공정은 그림 63과 같다. 농업 부산물과 같은 자원의 재활용을 위하여 많은 양의 섬유소 분해효소가 필요한 현실 및 경제성 등을 고려하여 구성된 대량 생산 공정은 크게, 발효 공정과 filter press 및 한외여과기를 사용한 분리 공정으로 구성되어있다.

발효공정은 섬유소 분해효소 생산성이 500 unit/ml인 *B. amyloliqueifaciens* DL-3를 50ton 규모의 생물배양기에서 배양하는 조건으로 구성되었으며 분리공정은 filter press를 사용하여 균체를 제거하고 섬유소 분해효소를 포함하는 상등액을 한외여과기를 사용하여 농축하는 공정으로 구성되어 있다.

ATGATGCGAAGGAGGAAAAGATCAGATATGAAACGGTCAATTTCTATTTTTATTACGTGTTTATTGATTGCGGTATTGACAATGGGCGGC 90
 M M R R R K R S D M K R S I S I F I T C L L I A V L T M G G
 TTGCTGCCTTCGCCGGGATCAGCAGCAGGGACAAAACGCCAGCAGCCAAGAATGGGCAGCTTAGCATAAAAGGAACACAGCTCGTAAAC 180
 L L P S P G S A A G T K T P A A K N G Q L S I K G T Q L V N
 CGGGACGGCAAAGCGGTACAATTGAAAGGGATCAGTTCACATGGATTGCAGTGGTATGGCGATTTTGTCAATAAAGACAGCTTAAATGG 270
 R D G K A V Q L K G I S S H G L Q W Y G D F V N K D S L K W
 CTGAGAGACGATTGGGGCATAACCGTTTTCCGCGCGGGGATGTATACGGCAGATGGCGGTTATATTGATAATCCGTCCGTGAAAAATAAA 360
 L R D D W G I T V F R A A M Y T A D G G Y I D N P S V K N K
 GTAAAAGAAGCGGTTGAAGCGGCAAAGAAGCTCGGGATATATGTCATCATTGACTGGCATATCTTAAATGACGGCAACCCAAACCAACAT 450
 V K E A V E A A K E L G I Y V I I D W H I L N D G N P N Q H
 AAAGAGAAGGCAAAGAATTTTTAAGGAAATGTCAAGTCTTACGGAACACGCCAAACGTCATTTATGAAATTGCAAACGAACCAAAC 540
 K E K A K E F F K E M S S L Y G N T P N V I Y E I A N E P N
 GGTGATGTGAAGTGAAGCGTGATATTAACCGTATGCGGAAGAAGTGATTTCCGTTATCCGCAAAAATGATCCAGACAACATCATCATT 630
 G D V N W K R D I K P Y A E E V I S V I R K N D P D N I I I
 GTCGGAACCGGTACATGGAGCCAAGATGTGAATGATGCAGCCGATGATCAGCTAAAAGATGCAAACGTCATGTACGCGCTTCATTTTTAT 720
 V G T G T W S Q D V N D A A D D Q L K D A N V M Y A L H F Y
 GCCGGCACACACGGCCAATCTTACGGGATAAAGCAAACCTATGCCTCAGTAAAGGAGCGCCTATTTTCGTGACGGAATGGGGAACAAGC 810
 A G T H G Q S L R D K A N Y A L S K G A P I F V T E W G T S
 GACGCGTCTGGAAATGGCGGTGTATTCCTTGACCAGTCGCGGGAATGGCTGAATTATCTCGACAGCAAGAACATCAGCTGGGAGAAGTGG 900
 D A S G N G G V F L D Q S R E W L N Y L D S K N I S W E N W
 AATCTTTCTGATAAGCAGGAATCATCCTCAGCGTTAAAGCCGGGAGCATCTAAAACAGGCGGCTGGCCGCTTACAGATTTAACTGCTTCA 990
 N L S D K Q E S S S A L K P G A S K T G G W P L T D L T A S
 GGAACATTGTAAGAGAAAACATTCTCGGCAACAAAGATTCAACGAAAGAAGCCCTGAAACGCCAGCACAAGATAACCCCGCACAGGAA 1080
 G T F V R E N I L G N K D S T K E R P E T P A Q D N P A Q E
 AACGGCATTCTGTACAATACAAAGCAGGGGATGGGGGTGTTAACAGCAACCAAATCCGCCCGCAGCTTACATAAAAAATAACGGCAAT 1170
 N G I S V Q Y K A G D G G V N S N Q I R P Q L H I K N N G N
 GCGACGGTTGATTTAAAAGATGTCACTGCCGTTACTGGTATAACGCGAAAAACAAGGGCCAAAACCTTTGACTGTGACTACGCGCAGATT 1260
 A T V D L K D V T A R Y W Y N A K N K G Q N F D C D Y A Q I
 GGATGCGGCAATCTGACCCACAAATTTGTGACGCTGCATAAACCCAAGCAAGGTGCAGATACCTATCTGGAAGTGGGTTTTAAAACAGGA 1350
 G C G N L T H K F V T L H K P K Q G A D T Y L E L G F K T G
 ACGCTGTCACCGGGAGCAAGCACAGGGAATATTCAGCTTCGTCTTACAATGATGACTGGAGTAGTTATGCACAAAGCGGCGATTATTCC 1440
 T L S P G A S T G N I Q L R L H N D D W S S Y A Q S G D Y S
 TTTTTCAATCAAATACGTTTTAAACAACGAAAAAATTACATTATATCATCAAGGAAAACCTGATTTGGGGAACAGAACCCCATAG 1527
 F F Q S N T F K T T K K I T L Y H Q G K L I W G T E P H *
 GGATCCTT 1535

그림 62. *B. amyloliqueifaciens* DL-3가 생산하는 섬유소 분해효소의 유전자 염기서열
 및 섬유소 분해효소의 아미노산 서열

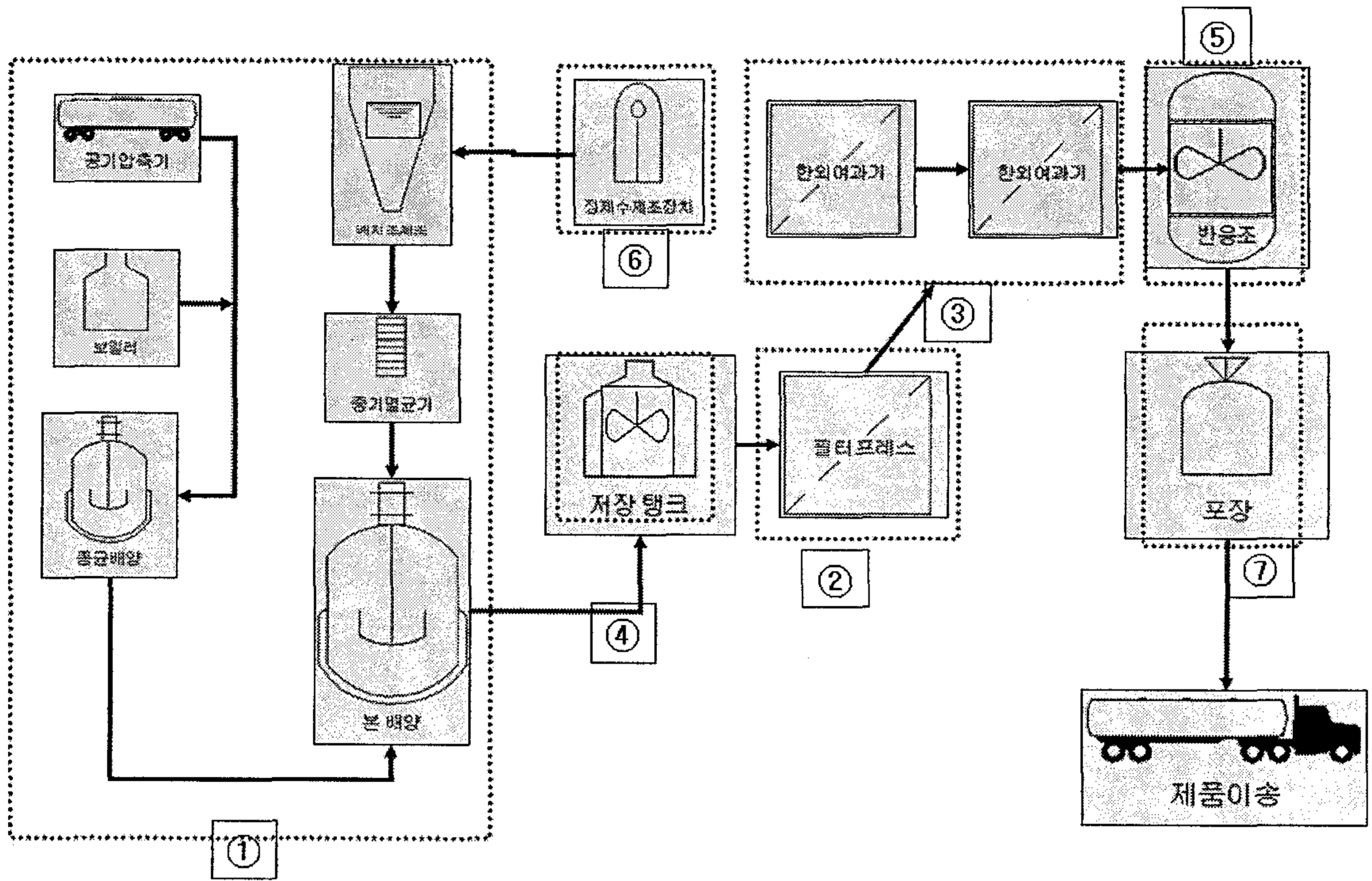


그림 63. 섬유소 분해효소 대량생산 공정도 (①; 미생물 배양, ②; 필터 프레스, ③; 한외 여과기, ④; 저장탱크, ⑤; 반응탱크, ⑥; 정제수 제조 및 ⑦; 포장)

제4절 미생물 제제의 생산 기술 개발

1. 연구수행 방법

가. 왕겨를 이용한 미생물 제제 생산

왕겨를 이용한 미생물 제제의 생산기술을 개발하기 위하여 섬유소 분해효소를 생산하는 *B. amloliquifaciens* DL-3 균주 배양액과 왕겨의 최적 혼합비율, 최적 배양온도, 최적 배양시간, 최적 수분함량 및 최적 보관조건 등을 결정하였다. 미생물 배양액과 왕겨와의 최적 혼합비율을 구하기 위하여 미생물 배양액의 접종량을 각각 0, 10, 20, 30, 40 및 50%로 하고 일정한 온도에서 일정한 시간 배양하면서 생균수를 측정하여 최적 접종량을 하였다. 최적 수분함량의 결정은 동일한 양의 균주 배양액을 왕겨와 혼합한 후, 수분함량을 각각 0, 17, 29, 38, 44 및 50%로 조절하여 배양하면서 생균수를 측정하여 결정하였으며, 최적 배양온도는 27, 32, 37, 42 및 47°C에서 배양하면서 일정한 시간별로 각각의 배양액에 존재하는 생균수를 측정하여 결정하였다.

왕겨를 이용한 미생물 제제의 최적 보관 조건을 결정하기 위하여 *B. amloliquifaciens* DL-3 균주 배양액과 왕겨를 사용하여 제조한 미생물 제제를 각각 4°C, 18°C, 실온 (약 24°C), 30°C 및 37°C에 보관하면서 10일 간격으로 각각의 보관된 미생물 제제의 생균수를 측정하여 결정하였다.

나. 미강을 이용한 미생물 제제 생산

미강을 이용한 미생물 제제의 생산기술을 개발하기 위하여, 왕겨의 실험 경우와 동일한 실험방법으로 섬유소 분해효소를 생산하는 *B. amloliquifaciens* DL-3 균주 배양액과 미강의 최적 혼합비율, 최적 배양온도, 최적 배양시간, 최적 수분함량 및 최적 보관 조건 등을 결정하였다. 미생물 배양액과 왕겨와의 최적 혼합비율을 구하기 위하여 미생물 배양액의 접종량을 각각 0, 10, 20, 30, 40 및 50%로 하고 일정한 온도에서 일정한 시간 배양하면서 생균수를 측정하여 최적 접종량을 하였다. 최적 수분함량의 결정은 동일한 양의 균주 배양액을 왕겨와 혼합한 후, 수분함량을 각각 0, 17, 29, 38, 44 및 50%로 조절하여 배양하면서 생균수를 측정하여 결정하였으며, 최적 배양온도는 27, 32, 37, 42 및 47°C에서 배양하면서 일정한 시간별로 각각의 배양액에 존재하는 생균수를 측정하여 결정하였다.

미강을 이용한 미생물 제제의 최적 보관 조건을 결정하기 위하여 *B. amloliquifaciens* DL-3 균주 배양액과 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 각각 4°C, 18°C, 실온 (약 24°C), 30°C 및 37°C에 보관하면서 10일 간격으로 각각의 보관된 미생물 제제의 생균수를 측정하여 결정하였다.

다. 미생물 제제의 생산 공정 개발

왕겨와 미강을 이용하여 제조한 미생물 제제의 생산 효율 및 포트와 포장에서 배추 및 상추에 미치는 영향 등을 고려하여 미생물 제제의 생산 공정을 결정하였다. *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 왕겨 및 미강의 이용성은 유사하였으나, 포트 및 포장의 실험 결과, 왕겨를 이용하여 제조한 미생물 제제보다 미강을 이용하여 제조한 미생물 제제의 실험 결과가 우수하므로 왕겨는 미생물 대량배양의 탄소원으로 사용하고 미강은 미생물 배양액과 혼합하여 미생물 제제를 제조하는 혼합제로 사용하여 미생물 제제를 대량 생산하는 공정을 개발하였다. 즉, 왕겨는 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 액체 배양을 위한 탄소원으로 사용하여 균체의 대량 증식을 유도하였으며, 생산된 배양액과 미강을 혼합하여 고상배양하여 미생물 제제를 제조하였다.

2. 연구 결과

가. 왕겨를 이용한 미생물 제제의 생산

1) 최적 접종량 결정

왕겨를 이용하여 미생물 제제를 생산하기 위한 최적 접종량을 구하기 위하여 왕겨에 *B. amyloliquifaciens* DL-3 배양액을 0, 10, 20, 30, 40 및 50%(v/w) 첨가한 후, 37°C에서 고상배양하면서 미생물 제제에 존재하는 생균수를 측정하였다. 일정한 양의 미생물 배양액과 미강을 혼합한 후에 증류수를 첨가하는 방법으로 전체의 수분함량을 보정하였으며 미생물 제제의 수분함량은 약 50%이었다. 표 14와 같이 접종량이 20%이하인 경우에는 미생물의 증가가 거의 없었으며 접종량이 30, 40 및 50%일 경우에 균체의 증가를 나타냈다. 접종량 많을수록 미생물 제제에 존재하는 생균수의 수는 많았으나 24시간 이후에는 배양시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타냈다.

표 14. 접종량이 왕겨를 사용하여 제조한 미생물 제제의 생균수에 미치는 영향

접종량 (%)	생균수 (x 10 ⁶)			
	0 시간	24 시간	48 시간	72 시간
0	0.1 ± 0.2	11.3 ± 2.7	14.5 ± 3.5	18.3 ± 2.8
10	0.7 ± 0.4	42.4 ± 11.2	11.4 ± 2.6	3.5 ± 0.2
20	16.2 ± 2.1	204.6 ± 146.3	243.6 ± 10.2	183.4 ± 15.4
30	29.0 ± 1.5	342.6 ± 27.6	311.5 ± 22.4	284.5 ± 15.6
40	42.3 ± 1.2	354.3 ± 24.3	312.4 ± 15.9	206.8 ± 14.6
50	56.4 ± 0.3	386.4 ± 24.6	329.7 ± 23.4	261.6 ± 24.6

2) 최적 수분함량 결정

왕겨를 이용하여 미생물 제제를 생산하기 위한 최적 수분함량을 구하기 위하여 왕겨에 *B. amyloliquifaciens* DL-3 배양액을 20%(v/v) 접종한 후에 증류수를 첨가하여 혼합물의 수분함량을 20, 40, 60 및 80%(v/v)로 조정하였다. 배양액 및 증류수를 첨가하지 않은 왕겨를 수분함량이 0%인 시료로 하여 실험하였다. 각기 다른 수분함량의 혼합물 37°C에서 고상배양하면서 미생물 제제에 존재하는 생균수를 측정하였다. 표 15와 같이 수분함량이 증가할수록 미생물 제제에 존재하는 생균수는 증가하였으나 수분함량이 40% 이하인 경우에 미생물의 증식은 확인되지 않았다. 따라서 왕겨를 사용하여 미생물 제제를 제조할 경우에 왕겨에 접종하는 미생물 배양액의 양 및 왕겨와 미생물 배양액이 혼합된 혼합물의 수분함량이 중요함을 알 수 있었다.

이후, 왕겨와 미강을 사용하여 각각 제조한 미생물 제제를 사용하여 효과 검정을 수행한 결과, 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제는 상추와 배추 등과 같은 작물의 생육을 촉진시키는 효과가 있다고 확인되었으나 왕겨를 사용하여 제조한 미생물 제제는 상추와 배추 등과 작물의 생육을 촉진시키지 못한다는 결과를 얻었다. 즉, 왕겨의 구성성분 중에 상추와 배추의 생육을 억제시키는 물질이 존재한다는 결과를 얻었으며, 이 후의 실험은 미강을 사용한 미생물 제제의 최적화에 중점을 두고 진행하였다. 플라스크 규모의 실험에서 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 탄소원으로 왕겨를 사용한 결과, 왕겨는 우수한 탄소원 중의 하나로 밝혀졌으며 표 16과 같이 왕겨의 농도가 증가할수록 균체의 성장이 빠르며 섬유소 분해효소의 생산도 증가한다는 결과를 얻었다. 이 결과를 참고로 왕겨는 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주를 액상 배양하는 탄소원으로 사용하고 미강은 액상 배양된 균주를 사용하여 미생물 제제를 제조하기 위한 고상배양의 탄소원으로 사용하여 미생물 제제의 대량 생산 공정을 개발할 계획이다.

표 15. 수분함량이 왕겨를 사용하여 제조한 미생물 제제의 생균수에 미치는 영향

수분함량 (%)	생균수 (x 10 ⁶)			
	0 시간	24 시간	48 시간	72 시간
0	3.4 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
20	2.7 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
40	3.0 ± 0.5	7.0 ± 2.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
60	2.6 ± 0.2	7.2 ± 2.7	85.3 ± 5.9	45.4 ± 7.8
80	2.4 ± 0.3	49.7 ± 5.2	63.4 ± 7.2	26.5 ± 2.5

표 16. 왕겨의 농도가 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 생육에 미치는 영향

왕겨 (%)	생균수 (x 10 ⁶)			
	0 시간	24 시간	48 시간	72 시간
0.0	12.3	96.7	50.3	37.3
0.25	18.0	403.3	406.6	446.7
0.5	14.3	333.3	516.7	736.7
1.0	18.7	413.4	590.0	553.2
1.5	16.7	389.2	573.3	473.3
2.0	14.3	402.4	500.0	620.2

3) 폐당밀의 첨가 영향

왕겨와 배양액의 혼합액에 0.25%의 폐당밀을 첨가하여 배양한 결과는 그림 65와 같다. 그림에서 보는 바와 같이 폐당밀을 첨가하지 않은 경우에는 왕겨와 균주 배양액의 혼합비율이 6:4 및 5:5와 같이 균주 배양액의 비율이 높은 경우에만 생균수의 증식이 확인되었으나 0.25%의 폐당밀을 첨가한 경우에는 왕겨와 균주 배양액의 혼합비율이 7:3인 경우에도 생균수의 증식이 확인되었다. 따라서 왕겨를 이용하여 미생물 세제를 제조하는 경우에 소량 첨가하는 폐당밀은 생균수의 증가에 많은 도움을 줄 수 있다는 결론을 얻을 수 있었다

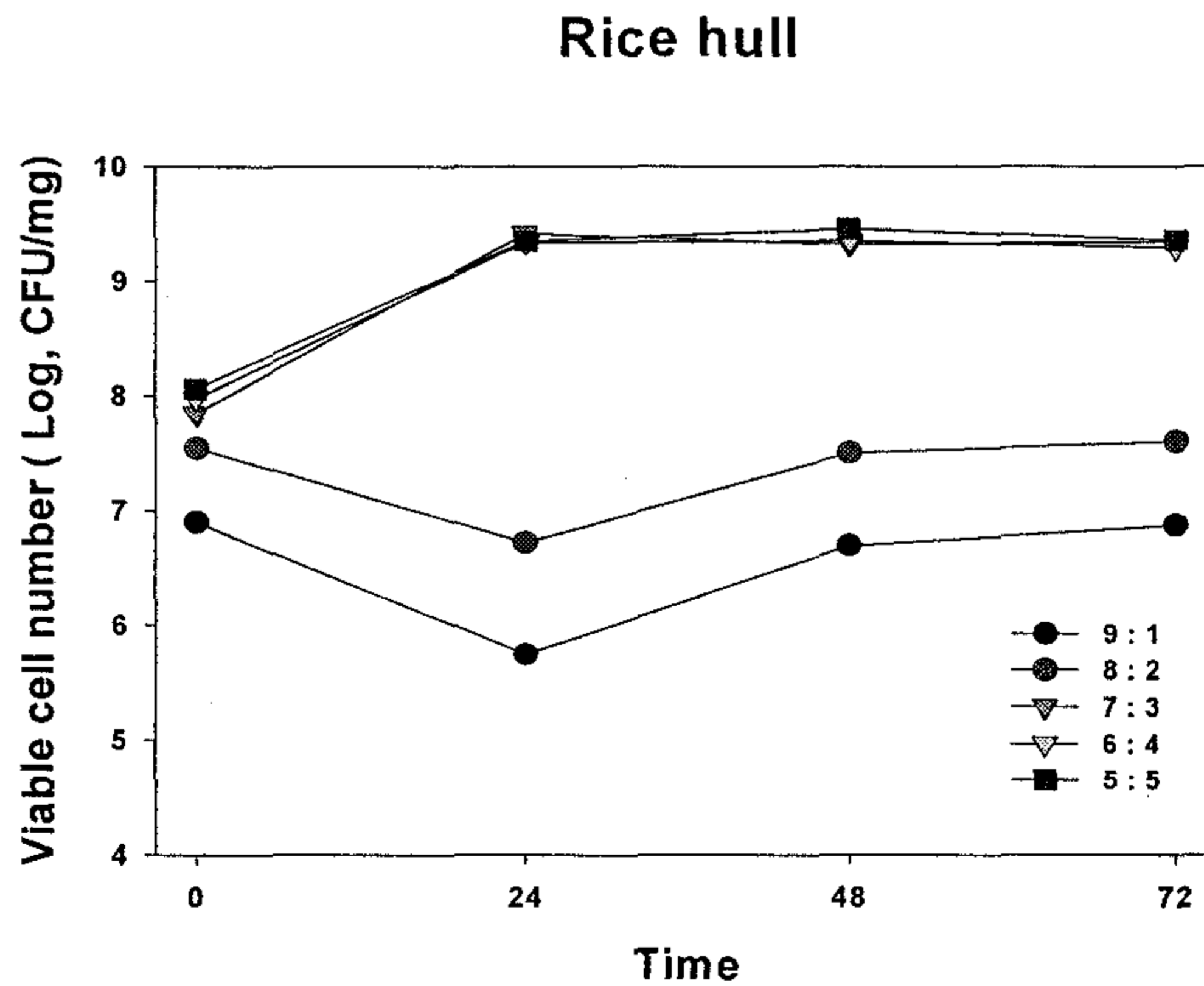


그림 64. 배양액의 혼합 비율에 따른 생균수의 변화

Rice hull + CSL(0.25%)

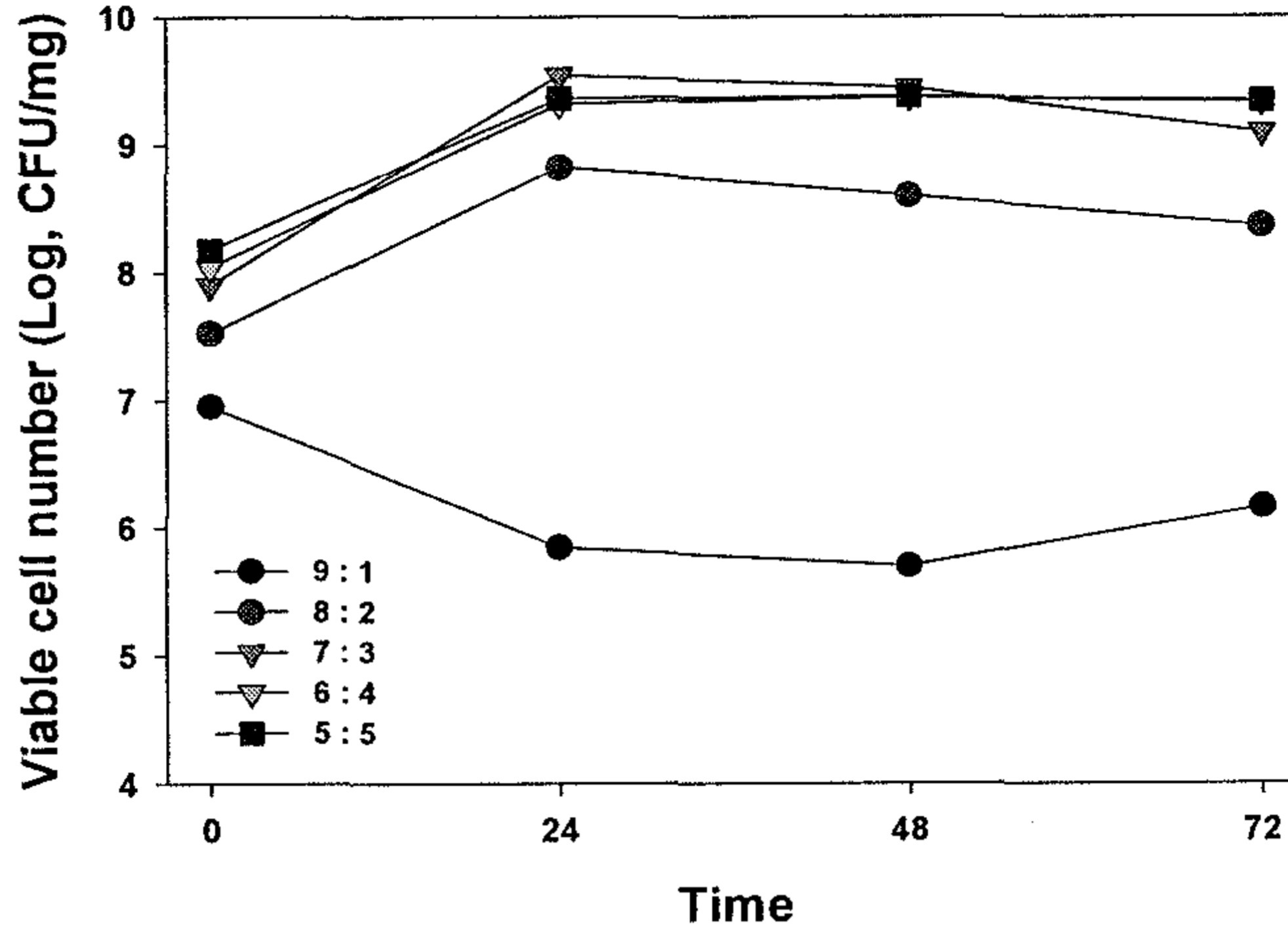


그림 65. 폐당밀을 첨가가 미생물 제제의 생균수에 미치는 영향

나. 미강을 이용한 미생물 제제의 생산 조건 최적화

1) 최적 접종량 결정

미강을 이용하여 미생물 제제를 생산하기 위한 최적 접종량을 구하기 위하여 *B. amyloliquifaciens* DL-3 배양액의 접종량을 0, 10, 20, 30, 40 및 50%로 하여 37°C에서 고상배양하면서 미생물 제제에 존재하는 생균수를 측정하였다. 일정한 양의 미생물 배양액과 미강을 혼합한 후에 증류수를 첨가하는 방법으로 전체의 수분함량을 보정하였으며 미생물 제제의 수분함량은 약 50%이었다. 표 17과 같이 접종량이 많을수록 미생물 제제에 존재하는 생균수의 수는 많았으나 배양시간이 경과함에 따라 감소하는 경향을 나타냈다. 즉, 초기의 접종량이 많을수록 미생물 제제에 존재하는 최대 생균수는 배양 초기에 나타났으며 접종량이 적을수록 일정한 시간이 경과한 후에 나타났다. 미생물 제제에 존재하는 생균수 및 경제성을 고려하여 미강을 사용하여 미생물 제제를 제조할 경우에 최적 접종량은 20%로 결정하였다. *B. amyloliquifaciens* DL-3 배양액을 미강에 일정량 접종한 후, 37°C에서 고상배양하면서 미생물 제제의 수분함량을 측정하였다. 표 18과 같이 접종량에 관계없이 초기의 수분함량이 50%에서 72시간까지 배양하였지만 미생물 제제의 수분함량은 크게 변화가 없었다. 배양시간의 경과에 따라 다소 증가하는 현상을 보였는데, 이는 미강을 분해하여 증식하는 미생물들의 생리대사의 결과라 할 수 있을 것이다.

표 17. 접종량이 미강을 이용한 제조한 미생물 제제의 생균수에 미치는 영향

접종량 (%)	생균수 (x 10 ⁶)			
	0 시간	24 시간	48 시간	72 시간
0	0.1 ± 0.6	11.3 ± 2.7	13.5 ± 12.5	16.3 ± 2.8
10	0.5 ± 1.0	242.4 ± 11.2	325.4 ± 15.6	83.5 ± 13.2
20	11.0 ± 1.1	303.5 ± 16.3	723.5 ± 20.6	1,103.4 ± 35.3
30	29.0 ± 1.5	454.8 ± 17.6	608.5 ± 18.4	583.6 ± 35.3
40	42.3 ± 1.2	558.4 ± 22.3	312.4 ± 15.9	501.4 ± 21.3
50	56.4 ± 0.3	1,001.4 ± 64.2	79.8 ± 6.5	76.6 ± 5.6

표 18. 접종량이 미강을 이용하여 제조한 미생물 제제의 수분함량에 미치는 영향

접종량 (%)	수분함량 (%)			
	0 시간	24 시간	48 시간	72 시간
0	46.1	47.0	44.4	47.3
10	43.7	45.0	44.1	45.1
20	45.1	46.3	46.3	46.4
30	43.4	47.8	48.9	50.7
40	46.8	48.2	50.1	48.7
50	44.3	48.7	45.2	48.8

2) 최적 수분함량 결정

미강을 이용하여 미생물 제제를 생산하기 위한 최적 수분함량을 구하기 위하여 미강에 *B. amyloliquifaciens* DL-3 배양액을 10%(v/v) 접종한 후에 증류수를 첨가하여 혼합물의 수분함량을 17, 29, 38, 44 및 50%로 조정하였다. 배양액 및 증류수를 첨가하지 않은 미강을 수분함량이 0%인 시료로 하여 실험하였다. 각기 다른 수분함량의 미강과 균주 배양액의 혼합물을 37°C에서 고상배양하면서 미생물 제제에 존재하는 생균수를 측정하였다. 표 19와 같이 미강과 미생물 배양액을 혼합한 혼합물의 수분함량이 증기할수록 미생물 제제에 존재하는 생균수는 증가하였다. 미강을 사용하여 미생물 제제를 제조할 경우에 미강의 수분함량이 약 40% 이하일 경우에 미생물의 증식이 미미함을 알 수 있었으며 초기 수분함량이 50% 이상 되어야 미생물이 원활히 증식함을 알 수 있었다. 미강에 존재하는 미생물의 최대 생균수를 나타내는 시간은

수분함량이 높아서 생육환경이 비교적 우수한 환경일수록 배양 초기에 나타났다. 미생물 제제의 수분함량의 변화는 표 20과 같이 배양 후, 72시간까지 배양 초기 수분함량이 유지되었으며 수분함량의 차이가 미생물의 생육에 영향을 미친 것으로 판단되었다.

표 19. 수분함량이 미강을 이용한 제조한 미생물 제제의 생균수에 미치는 영향

수분함량 (%)	생균수 (x 10 ⁶)			
	0 시간	24 시간	48 시간	72 시간
0	0.8 ± 0.6	0.8 ± 0.5	0.8 ± 0.5	0.8 ± 0.6
17	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.6	4.3 ± 0.6	4.0 ± 1.0
29	0.8 ± 0.5	7.0 ± 2.3	7.7 ± 1.3	1.0 ± 0.3
38	0.3 ± 0.2	7.2 ± 2.7	8.0 ± 1.9	2.3 ± 0.6
44	0.3 ± 0.6	49.7 ± 5.2	65.2 ± 2.5	25.3 ± 2.1
50	0.2 ± 0.6	479.3 ± 18.3	83.3 ± 5.8	55.7 ± 3.4

표 20. 수분함량이 미강을 이용하여 제조한 미생물 제제의 수분함량에 미치는 영향

수분함량 (%)	수분함량 (%)			
	0 시간	24 시간	48 시간	72 시간
0	4.2	4.5	5.4	4.6
17	15.8	15.3	10.1	12.9
29	22.6	26.6	23.1	21.2
38	33.3	31.4	31.4	33.3
44	41.3	40.5	40.4	45.3
50	45.1	47.8	48.4	46.7

3) 폐당밀의 첨가 영향

미강을 사용하여 미생물 제제를 생산하기 위한 최적 접종량을 구하고 첨가한 폐당밀의 최적 농도를 구하기 위하여 미강과 48시간 배양한 *B. amyloliquefaciens* DL-3 균주 배양액의 비율을 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 및 5:5의 비율로 혼합한 후, 각기 다른 농도의 폐당밀을 첨가하고 37°C에서 24시간 배양하고 혼합액의 존재하는 생균수를 측정한 결과는 표 21과 같다. 표에서와 같이 균주 배양액의 혼합비율이 높을수록 미생물 제제에 존재하는 생균수의 증가를 확인하였으며 첨가한 폐당밀의 농도가 0.5%까지는 폐당밀의 첨가에 따라 생균수의 증가가 확인되었으나 1.0%와 2.0% 첨가할 경우에는 생균수가 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 첨가하는 폐당밀의 농도가 일정 수준 이상일 경우에 균체의 증식을 방해하는 현상이 있음을 확인한 결과이다. 따라서 미강을 사용하여 미생물 제제를 제조할 경우에 첨가하는 폐당밀의 농도는 0.5%가 최적임을 알 수 있었다.

표 21. 미강을 사용한 미생물 제제 제조시 접종량과 폐당밀의 영향

폐당밀 (%)	생균수 ($\times 10^6/g$) (미강 : 균주 배양액)				
	9 : 1	8 : 2	7 : 3	6 : 4	5 : 5
0.0	190.0	450.0	683.3	1,133.3	3,233.3
0.25	1,533.3	2,666.7	3,233.3	4,600.0	5,733.3
0.5	1,733.3	2,233.3	2,543.3	3,300.0	12,066.7
1.0	1,333.3	1,766.7	2,766.7	2,766.7	3,133.3
2.0	173.3	1,600.0	2,566.7	2,633.3	2,666.7

3) 최적 배양온도 결정

미강을 이용하여 미생물 제제를 생산하기 위한 최적 배양온도를 구하기 위하여 미강에 *B. amyloliquifaciens* DL-3 배양액을 20%(v/v) 접종한 후에 증류수를 첨가하여 혼합물의 수분함량을 50%로 조정하고 각 혼합물을 27, 32, 37, 42 및 47°C에서 고상배양하면서 미생물 제제에 존재하는 생균수를 측정하였다. 표 22와 같이 배양온도의 상승에 따라 미생물 제제에 존재하는 미생물의 생육이 증가하나 배양온도가 42°C 이상인 경우에는 급격하게 생육이 저해됨을 알 수 있었다. *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 최적 배양온도로 판단되는 37°C에서 배양한 경우에는 24시간 배양한 후에 최대 생균수를 나타냈으나 32°C로 배양한 경우에는 48시간 배양한 후에 최대 생균

수를 나타냈다. 또한, 37°C에서 24시간 배양한 경우의 생균수는 32°C로 24시간 배양한 경우의 생균수 보다 높았으나 32°C로 48시간 배양한 경우의 생균수는 37°C로 48시간 배양한 경우의 생균수 보다 높았다. 따라서 최적 배양온도는 배양시간에 따라 32~37°C이며 온도에 따른 섬유소 분해효소의 생산성 등을 고려하여 결정하여야 할 것이다. 각기 다른 온도에서 배양할 경우, 각 미생물 제제의 수분함량의 변화는 표 23과 같았으며 이전의 실험 결과와 같이 배양온도에 관계없이 72시간까지 초기 수분함량이 유지되었었다. 수분의 증발 등을 고려할 때, 고상 배양중의 미생물 제제의 수분함량이 다수 감소될 것으로 예상하였으나 미생물의 생육과 이 결과 발생하는 이산화탄소와 물에 의하여 미생물 제제의 수분함량이 유지되는 것으로 판단된다.

4) 최적 배양 시간 결정

최적 배양시간은 앞의 실험 결과와 같이 접종량, 미강의 수분함량 및 배양 온도에 따라 영향을 받음을 알 수 있다. 즉, 접종량이 많고 수분함량이 높으며 최적 온도에서 배양할 경우에 배양시간은 단축되며 역으로 접종량이 적고 수분함량이 적은 경우에 미생물의 생육속도가 늦어짐을 알 수 있었다. 또한, 접종량, 미강의 수분함량 및 배양온도가 미생물 제제에 존재하는 최대 생균수에도 영향을 줌을 알 수 있었다. 따라서 최적 배양시간은 배양액의 상태, 접종량, 미강의 수분함량 및 배양온도에 따라 미생물의 증식속도가 다르며 이 결과, 미생물 제제에 존재하는 미생물의 최대 생균수가 변하기 때문에 배양조건을 참고로 결정하여야 할 것이다. 미강을 이용하여 미생물 제제를 제조할 경우, *B. amyloliquifaciens* DL-3의 최적 배양시간은 24시간에서 48시간까지임을 알 수 있었다.

표 22. 배양온도가 미강을 이용한 제조한 미생물 제제의 생균수에 미치는 영향

배양온도 (°C)	생균수 (x 10 ⁶)			
	0 시간	24 시간	48 시간	72 시간
27	0.1 ± 0.0	11.3 ± 0.3	19.7 ± 2.3	11.7 ± 0.6
32	0.1 ± 0.1	114.3 ± 1.5	134.3 ± 2.6	41.7 ± 5.2
37	0.1 ± 0.0	251.2 ± 17.3	90.3 ± 10.6	32.6 ± 2.6
42	0.1 ± 0.1	23.5 ± 1.5	2.1 ± 0.6	0.0 ± 0.0
47	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

표 23. 배양온도가 미강을 이용하여 제조한 미생물 제제의 수분함량에 미치는 영향

배양온도 (°C)	수분함량 (%)			
	0 시간	24 시간	48 시간	72 시간
32	42.0	47.8	48.4	46.7
37	44.7	45.9	47.7	46.5
42	46.2	48.8	48.4	45.3
47	47.4	47.5	44.6	48.1
44	42.4	45.8	44.8	46.7

표 24. 보관온도가 미생물 제제의 생균수에 미치는 영향

보관온도 (°C)	생균수 (10 ^x /g)						
	0일	10일	20일	30일	40일	50일	60일
4	8.3	9.7	10.2	9.1	8.7	8.4	8.1
18	8.3	9.7	10.1	8.8	8.6	8.2	7.5
실온	8.3	9.5	9.6	8.9	8.7	7.8	7.4
30	8.3	10.0	9.8	8.6	7.7	7.4	7.2
37	8.2	10.0	9.7	8.2	7.6	7.2	6.8

5) 최적 보관 온도 결정

미강과 *B. amyloliquifaciens* DL-3 배양액을 혼합하여 제조한 미생물 제제의 최적 보관온도를 결정하기 위하여 제조한 미생물 제제를 4, 18, 30 및 37°C와 실온에 보관하면서 미생물 제제에 존재하는 미생물의 생균수를 측정하였다. 실온은 약 20~24°C의 온도를 유지하는 실험실 내에 보관한 경우를 의미한다. 표 24와 같이 보관온도에 따라 미생물 제제에 존재하는 미생물의 생균수는 변화함을 알 수 있었다. 보관온도가 4 및 18°C인 경우에는 40일이 지난 후에도 일정한 생균수를 유지하였으나 보관온도가 30 및 37°C인 경우에는 40일이 지난 후부터 급격한 생균수의 감소를 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 표 25와 같이 보관온도에 따라 미생물 제제의 수분함량에 차이가 나는 것이 기인한다고 할 수 있을 것이다. 즉, 보관온도가 30 및 37°C인 경우에는 40일이 지난 후부터 미생물 제제의 수분함량이 급격히 감소하였으며 수분함량의 급격한 감소가 생균수 감소의 원인이라고 할 수 있을 것이다. 따라서 제조한 미생

물 제제를 실온 및 그 이상에서 보관할 경우에 미생물제제의 수분함량을 유지시킨다면 미생물 제제에 존재하는 미생물의 수를 보다 더 오래 유지시킬 수 있을 것이다.

표 25. 보관온도가 미생물 제제의 수분함량에 미치는 영향

보관온도 (°C)	수분함량 (%)						
	0일	10일	20일	30일	40일	50일	60일
4	44.5	48.8	52.6	53.7	52.3	55.8	56.7
18	42.3	44.6	49.6	48.3	45.6	41.3	35.6
실온	44.6	43.7	49.1	42.6	44.0	36.3	31.3
30	43.8	42.5	49.9	43.3	30.3	27.4	25.3
37	48.8	44.7	44.2	30.6	24.7	18.2	11.0

다. 미생물 제제의 생산 공정 개발

왕겨와 미강 및 왕겨와 미강을 사용하여 각각 제조한 미생물 제제의 효과를 검정한 결과, 미강 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제는 배추와 상추 등의 생육을 촉진시키는 결과를 얻었으나, 왕겨 및 왕겨를 사용하여 제조한 미생물 제제는 배추와 상추의 생육을 촉진시키지 못하는 결과를 얻었다 (효과검정 및 용도 개발 결과 참조). 이와 같은 결과는 미강과 다르게 왕겨의 구성 성분 중에 배추와 상추의 생육을 억제시키는 물질이 존재하는 것이 원인이 있다고 생각한다. 본 연구를 통하여 왕겨를 사용하여 제조한 미생물 제제는 작물의 생육을 촉진시키는 역할이 없다고 판단되었으나 왕겨가 섬유소 분해효소를 생산하는 균주인 *B. amyloliquifaciens* DL-3의 유용한 탄소원 중의 하나이므로 왕겨와 미강을 사용하여 미생물 제제를 대량생산하는 제조공정의 개발이 가능하다고 판단하였다. 즉, 왕겨는 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주의 액체 배양을 위한 탄소원으로 사용하고 미강은 액체 배양된 *B. amyloliquifaciens* DL-3 균주를 사용하여 미생물 제제를 제조하기 위한 고상 배양의 탄소원으로 사용하는 방안을 검토하는 것이 농업 부산물인 왕겨와 미강을 동시에 재활용할 수 있을 것이다. 왕겨와 미강을 사용하여 미생물 제제를 대량으로 생산할 수 있는 공정을 간단히 도식화하면 아래 그림 66과 같다.

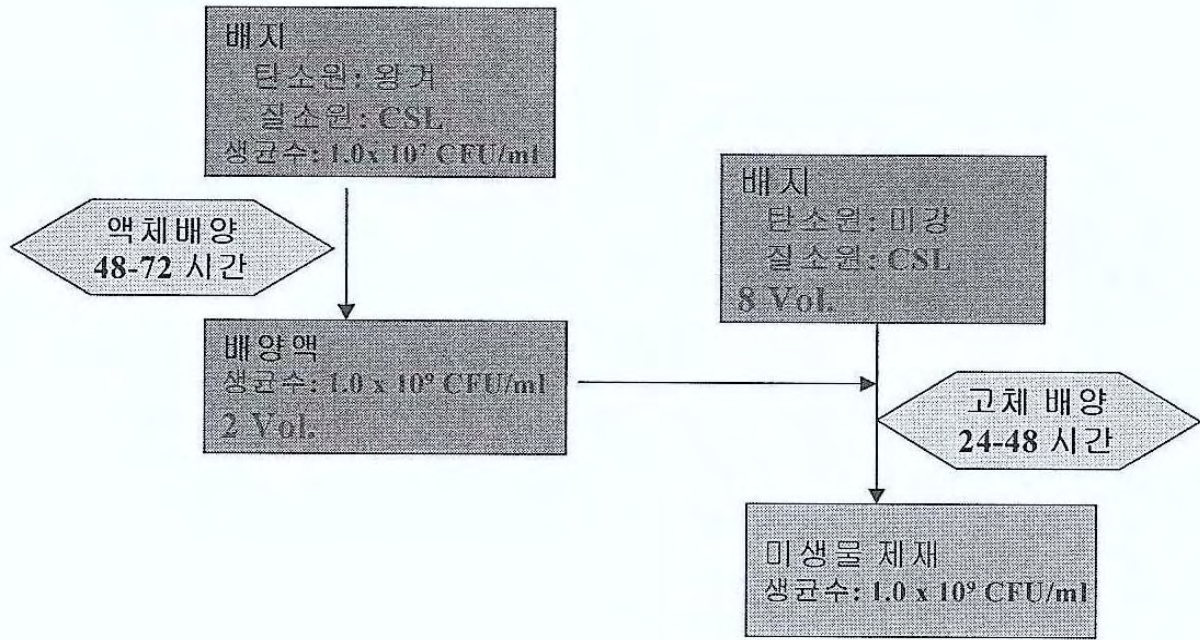


그림 66. 왕겨와 미강을 사용한 미생물 제제의 대량생산 공정

제5절 미생물 제제의 효과 검정 및 용도 개발

1. 연구수행 방법

가. 포트 규모의 효과 검정

미생물 제제의 효과를 검정하기 위한 공시작물로는 상추를 사용하였으며 효과검정은 부산의 원예연구소 시설원예시험장의 온실에서 포트를 사용하여 실시하였다. 포트시험에 사용한 토양은 가로 1m, 세로 1m 및 높이 10 cm의 사각 나무통에 넣고 일정량의 물에 녹인 미생물 제제와 혼합하여 각각 기준량 처리와 배량 처리 시험에 사용하였으며 무처리구는 동일한 양의 토양에 미생물 제제의 시험구에 사용한 양의 물만을 넣은 토양을 사용하였다. 포트 시험에서 미생물 제제의 기준량 처리는 400g의 미생물 제제를 10L의 물에 녹여 0.1m³의 토양에 첨가하고 골고루 섞은 토양을 사용한 경우를 의미하며 배량 처리는 800g의 미생물 제제를 10L의 물에 녹여 0.1m³의 토양에 첨가하고 골고루 섞은 토양을 사용한 경우를 의미한다.

나. 포장 규모의 효과 검정

원예시험소 시설원예시험장의 시설을 사용하여 배추, 상추, 오이 및 토마토와 같은 작물을 대상으로 제조한 미생물 제제의 효과검정을 수행하였다. 효과검정은 포트와 포장에서 수행하였으며 완전임의 배치법 (completely randomized design)을 이용하여 3회 반복하여 검정하였으며 생체중량, 최장길이, 잎면적, 잎수 및 건조 중량 등을 측정하여 미생물제제가 배추와 상추의 생육에 미치는 영향을 확인하였다.

오이는 장춘청장오이를 8월 14일 파종하여 설파대목에 접목하여 9월 21일에 정식하였으며 토마토는 '슈퍼도태랑' 품종을 7월 9일 파종하여 74일 육묘하여 오이와 같이 9월 21일 정식하였다. 생육은 오이의 경우는 수확이 끝난 후 초장과 엽수를 측정하였으며 토마토는 정식 후 50일이 되었을 때 초장과 엽수를 조사한 후 적심하였다. 시험구는 구당 6주씩 난괴법 3반복으로 처리하였으며, 작물의 재배 관리는 농촌진흥청 표준관리기준에 따랐다.

포장시험은 가로 x 세로가 1m x 2m의 포장에서 수행하였다. 포트 시험에서 미생물 제제의 기준량 처리는 400g의 미생물 제제를 10L의 물에 녹여 1m²의 토양에 첨가하고 골고루 섞은 토양을 사용한 경우를 의미하며 배량 처리는 800g의 미생물 제제를 10L의 물에 녹여 1m²의 토양에 첨가하고 골고루 섞은 토양을 사용한 경우를 의미한다. 공시작물에 대한 미생물 제제의 특성과 효과를 조사하기 위해서 엽폭, 잎수 및 지상부의 생체중량을 측정하였다.

다. 미생물 제제의 처리가 토양 미생물에 미치는 영향

미생물 제제를 처리한 구와 무처리구의 토양 시료를 주기적으로 채취하여

토양 미생물상의 변화를 확인하였다. 미생물 제제를 처리한 토양과 처리하지 않은 토양을 채취하여 멸균수에 현탁시키고 희석하여 선별배지를 도말한 후 일정 시간 배양하였다. 각 선별배지를 사용하여 전체 미생물수, 방선균, 곰팡이, 트리코테르마 등의 미생물 상의 변화를 확인하였다.

미생물 제제를 처리하기 직전과 처리한 후 공시작물을 정식 한 후, 2주 단위로 하여 총 3회, 공시작물의 재배토양 표면으로부터 깊이 10 cm까지의 흙을 채취한 후, 가는 체로 거른 다음 0.85% NaCl 멸균수에 현탁시킨 다음 선택배지를 사용하여 미생물제제의 처리량, 채취 시기별 및 균 종류별로 희석법과 한천배지 평판 도말법으로 토양내의 미생물의 종류별 계수를 실시하였다. 실험에 사용한 선택배지의 종류로는 일반 세균을 선별하는 Tryptic Soy Agar (TSA), 방선균을 선별하는 Actinomycetes Isolation Agar (AIA), 곰팡이의 선별에 사용하는 Potato Dextrose Agar (PDA)에 항생제로 chloramphenicol와 함께 사용하였으며, 트리코테르마를 선별하는데는 Malt Extract Agar (MEA)에 항생제로 chlorotetracyclin을 50µg/ml의 농도로 첨가한 배지를 사용하였다. 선별 배지에 도말한 미생물은 30°C에 48시간 배양하여 형성된 콜로니수를 측정하였다. 토양 상의 총 균수는 이들 선택배지를 사용하여 계수된 개별 미생물들의 생균수의 총 합계로 계산하였다.

라. 미생물 제제의 처리에 의한 물리·화학적 변화 측정

미생물 제제를 처리한 포장의 토양 미생물 변화를 측정된 시료를 건조하여 토양 중에 존재하는 무기물의 농도를 원자흡광 분도계를 사용하여 측정하였다. 토양의 pH와 토양 전기전도도(EC) 및 Av (P₂O₅) 등을 측정하여 토양의 물리적인 변화를 검토하였으며 Ca, Mg 및 K 이온의 농도와 NH₄ 형태의 질소와 NO₃ 형태의 질소 농도를 측정하여 토양의 화학적인 변화를 검토하였다.

마. 미생물 제제의 용도 개발

1) 미생물 제제가 과채류 육묘에 미치는 영향

토마토(서광), 오이(낙동청장오이), 수박(참맛꿀수박), 고추(녹광) 및 멜론(에메랄드 하계1호) 5작물의 과채류를 공시하여 미생물 제제가 육묘에 미치는 영향을 검토하였다. 동아대학교 응용생명공학부 생물화학공학연구실에서 개발한 미생물 제제를 이용하여 농도처리별(0(무처리), 1배액, 0.1배액, 0.01배액, 0.001배액, 0.0001배액)로 상토에 골고루 혼합하였다. 혼합된 상토를 50공의 연결 포트에 채운다음 각 작물의 종자를 셀 당 1립씩을 파종한 다음 저면관수를 하였다. 배지에 적절하게 수분을 흡수시킨 후 수분증발을 억제하기 위하여 신문지로 덮었다. 각 작물의 미생물 제제의 처리 농도별 3개의 연결 포트를 한 처리로 하여 난괴법 3반복을 하였다. 주요 조사내용은 각 작물의 미생물 제제의 처리 농도별 발아율과 초장, 생체중, 건물중 등 경시적 생육

이였으며, 육묘 후 식물체의 무기양분과 상토의 화학성을 조사하였다. 처리 당 10주씩 3반복으로 식물체를 채취하여 잎과 줄기의 지상부와 뿌리의 지하부(이하 지상부와 지하부로 표기)를 나누어 각각의 생체중을 측정한다. 다음, 시료를 80°C 건조기에서 32시간 건조한 후 건물중을 측정하였다. 무기성분 분석을 위해서 건조된 식물체의 시료 10g을 계량하여 침출액으로 침출한 후 질소는 간이 증류법으로 분석하였으며, 그리고 인산은 Vanadate 법으로 분해하여 비색계(UV/VIS spectrophotometer, Lambda 18, Perkin Elmer)를 이용하여 측정하였다. 그리고 K, Ca 및 Mg는 tenery solution으로 분해한 후 원자흡광분광광도계(atomic absorption spectrophotometer 3300, Perkin Elmer)로 분석하였다.

뿌리의 활력은 효소활성 측정법인 α -나프트라민법에 준하였다. 정식 후 20, 50 및 100일에 각 처리당 3반복으로 10주씩 뿌리를 채취하였다. 뿌리를 세척한 다음 1cm 길이로 잘라 혼합한 후 2g을 계량하여 100mL 삼각플라스크에 넣었다. 그리고 40 mg · g⁻¹의 α -나프탈렌(C₁₀H₉N)과 1/10M의 인산 완충액을 등량 혼합하여 50 mL로 정량한 다음, 시료가 담긴 플라스크에 넣고 5~10분 진동하여 흡착시켰다. 이 때 2 mL를 시험관에 채취하여 반응 전의 시료로 이용하였고, 남은 것은 진동기에 걸어 20~30°C에서 6시간 동안 반응시켜 반응 후의 시료로 이용하였다. 채취된 각각의 시료(2mL)에 10 mL의 증류수, 1 mL의 1% Sulfanilic acid 및 1 mL의 1% NaNO₂을 첨가하여 5분간 실온에 방치하여 발색시킨 후 분광광도계(510nm)로 측정하였다.

계산법은 $N(\mu\text{g}) = (\text{최초 채취한 시험액} \times 25) - (\text{반응후 액} \times 25) / (\text{blank test의 최초액} \times 25) - (\text{blank test의 반응후 액} \times 25)$ 와 같다.

2) 미생물 제제가 과채류 생육에 미치는 영향

본 실험은 시설원예시험장의 플라스틱 하우스(폭 6m × 길이 40m)에서 수행되었다. 토마토(서광), 오이(낙동청장오이), 수박(참맛꿀수박), 고추(녹광) 및 멜론(에메랄드 하계1호) 5작물의 과채류를 공시하였다. 실험1에서 각 작물의 미생물 제제 농도별 (무처리, 1배액, 0.1배액, 0.01배액, 0.001배액 및 0.0001배액)로 육묘된 묘를 재배포장에 정식하여 초기생육을 조사하였다. 실험포장은 각 작물의 표준시비량을 기비로 사용하고 퇴비를 시비한 후 경운하여 골고루 섞은 다음 평탄작업을 하였다. 관수를 위하여 점적호스를 깔 다음 흑색 필름으로 멀칭한 후 각 작물의 재식거리에 맞게 피복재에 쇠파이프를 구멍을 내어 정식을 할 수 있게 하였다. 각 작물의 묘를 농도처리별 10주씩 정식하여 난괴법 3반복으로 배치하였다. 각 작물의 재식거리는 토마토(120×30cm), 오이(120×30cm), 수박(120×45cm), 고추(120×40cm), 및 멜론(120×40cm)이었다. 주요조사 내용은 식물체의 초장, 생체중 등 초기생육이었다. 각 작물의 재배 및 조사는 농촌진흥청 표준재배법 및 조사법에 준하였다.

2. 연구 결과

가. 포트 규모의 효과 검정

왕겨와 미강을 사용하여 각각 제조한 미생물 제제의 효과를 검정하고 그 효과를 비교하기 위하여 공시작물로 상추를 사용하여 28일간 포트에 재배하면서 엽장, 엽폭, 엽수, 엽면적, 생체중 및 엽록소의 함량을 비교하였다. 그림 67과 같이 왕겨는 미강과 다르게 상추의 성장을 억제시키는 결과를 얻었으며 왕겨를 사용하여 제조한 미생물 제제 역시, 상추의 생육을 촉진시키지 않는다는 결과를 얻었다. 이에 비하여 미강과 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제는 상추의 생육을 촉진시킨다는 결과를 얻었다.



그림 67. 왕겨와 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제의 효과 검정

표 26 및 27과 같이 효과 검정에서 얻은 엽장, 엽폭, 엽수, 엽면적, 생체중 및 엽록소의 함량을 측정하여 얻은 결과를 LSD 및 던칸 다중검정법을 이용하여 검증한 결과, 미강 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제는 상추의 생육을 촉진시킨다는 사실과 미강만을 처리한 경우보다 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제의 처리가 상추의 생육을 더욱 촉진시킨다는 사실을 확인하였다. 이에 비하여 왕겨는 상추의 촉진을 억제시키는 사실을 확인하였으며 왕겨를 사용하여 제조한 미생물 제제는 왕겨만을 사용한 경우에 비하여 상추의 생육을 촉진시켰으나 무처리구에 비하여 엽장, 엽폭 및 엽수가 작은 결과를 나타냈으므로 미생물 제제로서의 효과가 없다는 결론을 얻었다. 따라서 왕겨의 경우에는 미생물 제제를 제조하는 재료보다는 다른 활용 방안을 검토하여야 할 것이다.

나. 포장 규모의 효과 검정

1) 미생물 제제의 처리가 상추의 생육에 미치는 영향

미강을 사용하여 미생물 제제를 제조하고 공시작물로 상추를 사용하였으며 처리구를 10 가지로 구분하여 포트에서의 효과 검정을 수행하였다. 처리구는 1) 무처리구-1, 2) 미생물제제 5% 처리구, 3) 미생물 제제 10% 처리구, 4) 미생물 제제 15% 처리구, 5) 미생물 제제 20% 처리구, 6) 무처리구-2, 7) 미강 5% 처리구, 8) 미강 10% 처리구, 9) 미강 15% 처리구 및 10) 미강 20% 처리구이었다.

표 26. 왕겨 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제의 처리가 상추의 생육에 미치는 영향

처리구	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (매)	엽면적 (cm ²)	생체중 (g)	엽록소 함량
Control	17.33	9.37	13.33	331.37	24.43	14.23
왕겨	8.83	4.93	11.33	324.93	11.43	15.40
미강	15.93	8.60	15.53	330.70	22.23	17.20
왕겨제제 x 1배	10.80	5.93	13.67	327.40	12.10	16.40
미강제제 x 1배	16.67	9.10	16.90	333.30	27.93	18.43
왕겨제제 x 2배	11.37	6.50	14.33	328.20	13.17	16.90
미강제제 x 2배	18.67	10.63	19.23	339.70	57.80	19.93
LSD 5%	0.59	0.83	0.87	1.61	5.08	1.83
1%	0.83	1.16	1.21	2.26	7.12	2.56

표 27. 왕겨 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제의 처리가 상추의 생육에 미치는 영향에 대한 던칸검정법에 의한 검증

처리	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (매)	엽면적 (cm ²)	생체중 (g)	엽록소 함량
Control	17.33b	9.37ab	13.33d	331.37bc	24.43b	14.23d
왕겨	8.83e	4.93d	11.33e	324.93f	11.43c	15.40cd
미강	15.93c	8.60b	15.53bc	330.70cd	22.23b	17.20abc
왕겨제재 x 1배	10.80d	5.93cd	13.67d	327.40ef	12.10c	16.40bcd
미강제재 x 1배	16.67bc	9.10b	16.90b	333.30b	27.93b	18.43ab
왕겨제재 x 2배	11.37d	6.50c	14.33cd	328.20de	13.17c	16.90bcd
미강제재 x 2배	18.67a	10.63a	19.23a	339.70a	57.80a	19.93a

표 28. 미생물 제제의 처리가 상추의 생육에 미치는 영향

처리	생체중 (g)	둘레	길이	엽장	엽폭	엽수	간조중
Microbial product 0%	358	18	31	26.3±1.53	30.0±1.00	17	11.7
Microbial product 5%	418	22	35	25.6±2.25	27.7±1.04	23	15.8
Microbial product 10%	162	16	26	21.5±1.50	23.3±1.76	14	7.0
Microbial product 15%	128	12	20	23.3±4.61	22.0±2.65	15	5.8
Microbial product 20%	102	12	19	17.2±2.47	21.0±2.00	17	5.8
Control	344	18	31.5	28.5±1.80	33.3±1.53	28	13.0
Rice bran 5%	412	21	30	25.5±1.32	29.3±3.51	27	11.7
Rice bran 10%	500	21	36	23.5±2.25	31.8±3.18	25	18.6
Rice bran 15%	182	15	24	19.0±1.00	22.9±3.12	20	4.8
Rice bran 20%	84	12	14.5	15.5±1.32	18.8±3.33	16	4.4

미강을 사용하여 제조한 미생물 제제가 상추의 생육에 미치는 영향은 표 28과 같이 미생물 제제의 처리 농도가 5%까지는 상추의 생육을 촉진하는 효과를 얻었으나 처리 농도가 10%, 15% 및 20%에서는 상추의 생육이 급격히 감소하는 결과를 얻었다. 또한 미강의 처리 농도가 10%까지는 상추의 생육을 촉진하는 효과를 얻었으나 미강의 처리농도가 일정 수준 이상 일때 역시 상추의 생육을 억제하는 결과를 얻었다. 이는 미강 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제가 상추의 생육을 촉진하는 효과가 있으나 일정한 농도 이상에서는 오히려 상추의 생육을 억제할 수 있으므로 최적 처리 농도를 결정하여 처리하는 것이 중요하다는 결론을 얻었다. 표 6에서와 같이 배추에 대한 미생물 제제의 포트 효과검정도 상추에서와 같은 결과를 얻었다.

2) 미생물 제제의 처리가 배추의 생육에 미치는 영향

미강을 사용하여 미생물 제제를 제조하고 공시작물로 배추를 사용하였으며 상추의 효과검정과 같은 방법으로 실시하였다. 처리구를 10가지로 구분하여 포트에서의 효과 검정을 수행하였다. 처리구는 1) 무처리구-1, 2) 미생물제제 5% 처리구, 3) 미생물 제제 10% 처리구, 4) 미생물 제제 15% 처리구, 5) 미생물 제제 20% 처리구, 6) 무처리구-2, 7) 미강 5% 처리구, 8) 미강 10% 처리구, 9) 미강 15% 처리구 및 10) 미강 20% 처리구이었다. 표 29와 같이 배추에 대한 미생물 제제의 포트 효과검정도 상추에서와 같은 결과를 얻었다.

3) 미생물 제제의 처리가 오이의 생육에 미치는 영향

미강 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 토양에 기준구(500kg/10a) 및 2배 처리구(1,000kg/10a)로 처리하여 오이를 재배하면서 미강 또는 미생물 제제를 처리하지 않은 무처리구에서 자란 오이와 초장 및 엽수 등과 같은 생육 및 수량을 그림 10과 11과 같이 온실내의 포장에서 비교하였다. 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제의 효과를 관찰하기 위하여 미생물 제제 및 미강만을 처리한 구에 오이를 심고 그 결과를 비교하였다. 토양에 처리한 미생물 제제가 토양 내에서 적응하는 시간을 고려하여 배양된 미생물을 미강에 9월 14일 접종하여 30℃에서 2일간 배양 한 후 9월 16일에 토양에 처리하였다.

오이는 장춘청장오이를 8월 14일 파종하여 설파대목에 접목하여 9월 21일에 정식하였다. 생육은 오이의 경우는 수확이 끝난 후 초장과 엽수를 측정하였으며 시험구는 구당 6주씩 난피법을 3반복으로 처리하였으며, 작물의 재배 관리는 농촌진흥청 표준관리기준에 따랐다. 미생물 제제의 처리에 따른 생육은 표 30과 같이 초장은 무처리가 405.2cm인데 비해 미강이나 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 처리구가 다소 긴 경향이였다. 미생물 제제를 500kg/10a로 처리한 구에서 421.7cm로 가장 길었

으며 그 다음은 미강(1,000kg/10a) 처리구가 420.0cm이었다. 엽수는 모든 처리에서 44.4~45.4매 정도로 처리구 간의 차이가 없었다. 즉, 미강이나 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 처리구가 무처리에 비해 다소 긴 경향이였으며 엽수는 모든 처리에서 처리구간에 차이가 없었다.

표 29. 미생물 제제의 처리가 배추의 생육에 미치는 영향

처리	생체중(g)	들레	길이	엽장	엽폭	엽수	건조중
Microbial product 0%	630	16	32	30.0±0.00	18.5±2.59	37	24.1
Microbial product 5%	1006	18	36	36.2±2.02	21.8±3.17	50	33.5
Microbial product 10%	714	16.5	38	34.3±1.53	21.3±2.08	44	28.4
Microbial product 15%	584	17	34	33.8±0.57	18.5±0.87	44	28.3
Microbial product 20%	422	14	31	29.3±2.08	16.8±1.44	40	22.5
Control	678	16	33	36.8±2.02	36.8±2.02	46	23.8
Rice bran 5%	934	18	36	34.0±2.59	20.5±2.50	44	59.8
Rice bran 10%	1058	19	39	39.3±2.30	24.5±3.04	48	52.6
Rice bran 15%	558	15	40	35.3±1.75	22.0±1.00	45	30.0
Rice bran 20%	362	15	24	22.3±1.04	12.8±1.04	34	15.7



그림 68. 오이에 대한 미생물 제제의 효과검정



그림 69. 미생물 제제를 처리한 토양에서 자라는 오이

표 30. 미생물 제제 처리에 따른 오이의 생육(조사시기: 수확후)

처 리	초장(cm)	엽수(매)
무처리	405.2 ± 40.0	44.6 ± 3.2
미강 (500kg/10a)	414.4 ± 24.4	45.4 ± 1.8
미강 (1,000kg/10a)	420.0 ± 10.1	44.7 ± 3.5
미생물제제 (500kg/10a)	421.7 ± 23.8	44.9 ± 2.4
미생물제제 (1,000kg/10a)	411.8 ± 23.0	44.4 ± 1.8

왕겨 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 처리한 결과는 표 31과 같다. 총수량에서 미생물제제(500kg/10a) 처리구가 과중이 9,967kg/10a, 그리고 과수가 49,700개로 다른 처리에 비해 유의차 있게 무겁고 많았으며 다음은 미강(500kg/10a)과 미생물 제제(1,000kg/10a) 처리구 등과 같은 순으로 무겁고 많은 경향이였다. 상품수량은 무처리구에 비해 미강이나 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 처리한 구가 많은 경향이였으며, 미생물 제제를 10a당 500kg수준으로 처리한 구가 10a당 6,623kg으로 가장 많았으나 처리구 간에 유의차가 없었다. 즉, 상품수량은 무처리구에 비하여 미강이나 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 처리한 구가 많은 경향이였다. 이러한 결과는 토양 내 영양분의 과다로 영양생장이 과잉되어 곡과 등 기형과의 발생이 많아 상품수량이 적은 것으로 추측되는데 미생물 제제(500kg/10a) 처리구의 비상품 수량이 많은 결과가 이러한 추측을 뒷받침한다. 따라서 미생물 제제를 토양 중에 넣었을 때 초기 미생물분해에 의해 양분이 과다함으로 기비량과 관수량을 적절히 조절해야 할 것으로 생각된다.

4) 미생물 제제의 처리가 토마토의 생육에 미치는 영향

미강 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 토양에 기준구(500kg/10a) 및 2배 처리구(1,000kg/10a)로 처리하여 오이를 재배하면서 미강 또는 미생물 제제를 처리하지 않은 무처리구에서 자란 오이와 초장 및 엽수 등과 같은 생육 및 수량을 그림 70과 같이 온실내의 포장에서 비교하였다. 처리하는 미생물의 효과를 보기위하여 미생물을 배양하여 접종한 미강과 미생물처리를 하지 않은 미강만을 처리한 구를 두었으며 미생물 제제의 토양 내에서의 적응시간을 고려하여 배양된 미생물을 미강에 9월 14일 접종하여 30℃에서 2일간 배양 한 후 9월 16일에 토양에 처리하였다. 토마토는 '슈퍼도태랑' 품종을 이용하였으며, 7월 9일 파종하여 74일 육묘하여 9월 21일 정식하였으며 생육은 토마토는 정식 후 50일이 되었을 때 초장과 엽수를 조사한 후 적

심하였다. 시험구는 구당 6주씩 난피법을 3반복으로 처리하였으며, 작물의 재배 관리는 농촌진흥청 표준관리기준에 따랐다.

미생물 제제의 처리에 따른 토마토의 적심전 초기생육을 표 32과 같이 초장은 비해 미강이나 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 처리한구가 무처리에 비해 다소 긴 경향이었으나 처리 간에 차이가 없었다. 미생물 제제를 500kg/10a로 처리한구에서 초장이 $164.9 \pm 10.9\text{cm}$ 로 무처리 구보다 길어 미생물 제제 처리효과가 있었다. 그러나 엽수는 모든 처리에서 26.0~27.5매 정도로 처리 간에 차이가 없었다. 즉, 토마토의 초장은 무처리구에 비하여 미강이나 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제의 처리구가 무처리구에 비해 다소 긴 경향이었으며, 엽수는 처리간에 차이가 없었다.

표 31. 미생물 제제 처리에 따른 오이의 수량(조사기간: 10. 17~12. 30)

처리내용	총수량		상품수량		비상품수량	
	무게 (kg/10a)	개수 (개/10a)	무게 (kg/10a)	개수 (개/10a)	무게 (kg/10a)	개수 (개/10a)
무 처리	8,442 ^{ab}	41,000 ^b	6,135 ^a	28,500 ^b	2,307 ^a	12,500 ^{ab}
미강 (500kg/10a)	8,596 ^{ab}	42,800 ^b	6,560 ^a	30,740 ^{ab}	2,036 ^a	12,060 ^{ab}
미강 (1,000kg/10a)	8,287 ^b	40,700 ^b	6,370 ^a	29,700 ^{ab}	1,917 ^a	11,000 ^{ab}
미생물 제제 (500kg/10a)	9,967 ^a	49,080 ^a	6,623 ^a	34,320 ^a	2,503 ^a	14,760 ^a
미생물 제제 (1,000kg/10a)	8,337 ^{ab}	38,400 ^b	6,531 ^a	27,900 ^b	1,806 ^a	10,500 ^b

^aMean separation within columns by DMRT at 5% level.

표 33은 미생물 제제의 처리에 따른 토마토의 수량을 나타낸 것이다. 총수량에서 미생물 제제(500kg/10a) 처리구에서 수확한 토마토의 과중이 8,539kg/10a로 다른 처리에 비해 무거웠으나 유의차는 없었다. 그러나 10a당 착과수는 미생물 제제를 처리한구가 다른 구보다 유의차 있게 많았으며 미생물 제제(500kg/10a) 처리구가 38,160개로 많았으며 다음은 미생물 제제(1,000kg/10a) 처리구 및 미강(1,000kg/10a) 처리구 등의 순으로 많은 경향이였다. 상품 수량은 무처리에 비해 미강이나 미생물 제제를 처리한구가 많은 경향이였으며, 미생물 제제를 10a당 500kg 처리가 10a당 6,865kg으로 가장 많았으나 처리구 간에 유의차가 없었다. 과실의 상품율은 미생물 제

재(500kg/10a) 처리구가 80.4%로 다른 처리구에 비해 낮았다. 이러한 결과는 오이와 같이 토양 내 영양분의 과다로 곡과 등 기형과의 발생이 많아 상품수량이 적은 것으로 추측된다. 따라서 토마토도 오이와 같이 기비량과 관수량의 관리가 매우 중요한 것으로 생각된다.

표 32. 미생물 제제 처리에 따른 토마토의 생육(조사시기: 적심시)

처 리	초장(cm)	엽수(매)
무처리	154.3 ± 9.1	26.0 ± 1.2
미강 (500kg/10a)	158.0 ± 8.2	27.3 ± 1.9
미강 (1,000kg/10a)	159.3 ± 8.7	27.5 ± 2.6
미생물제제 (500kg/10a)	164.9 ± 10.9	27.3 ± 2.3
미생물제제 (1,000kg/10a)	161.5 ± 8.8	26.3 ± 2.6

표 33. 미생물 제제 처리에 따른 토마토의 수량

처리내용	총수량		상품수량		비상품수량	
	무게 (kg/10a)	개수 (개/10a)	무게 (kg/10a)	개수 (개/10a)	무게 (kg/10a)	개수 (개/10a)
무 처 리	7,058 ^a	29,840 ^b	6,048 ^a	24,760 ^b	1,101 ^a	5,080 ^a
미강 (500kg/10a)	7,282 ^a	30,700 ^b	6,360 ^a	25,420 ^{ab}	922 ^a	5,280 ^a
미강 (1,000kg/10a)	7,318 ^a	31,200 ^b	6,376 ^a	26,680 ^{ab}	943 ^a	4,520 ^a
미생물제제 (500kg/10a)	8,539 ^a	38,160 ^a	6,865 ^a	30,600 ^a	1,243 ^a	7,560 ^a
미생물제제 (1,000kg/10a)	7,708 ^a	34,480 ^{ab}	6,525 ^a	28,040 ^{ab}	1,183 ^a	7,708 ^a

²Mean separation within columns by DMRT at 5% level.



그림 70. 토마토에 대한 미생물 제제의 효과검정

다. 미생물 제제의 처리가 토양 미생물에 미치는 영향

미생물 제제의 처리가 토양 미생물상에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각 처리구의 토양시료를 채취하여 일반세균, Actinomycetes 속, 곰팡이 및 Trichoderma 등과 같은 미생물의 생균수를 선택배지를 사용하여 측정하였다. 미생물 제제의 처리가 상추 재배토양의 미생물에 미치는 영향은 그림 71과 같다. 그림에서와 같이 미생물 제제를 처리하지 않은 토양에 비하여 미생물 제제 또는 미강을 처리한 토양에서의 총 생균수는 무 처리구에 비하여 농도에 비례하여 증가함을 알 수 있었다. 미생물 제제의 효과 검정 및 토양 미생물의 수적인 증가 등과 같은 결과는 처리한 미생물 제제가 토양 미생물의 수적 증가 및 각 토양 미생물의 상대적 비율을 변화시킴을 알 수 있었으며 상추의 생육을 촉진시키기 위하여 최적 농도로 처리해야 된다는 사실을 알 수 있었다.

Lettuce pot total

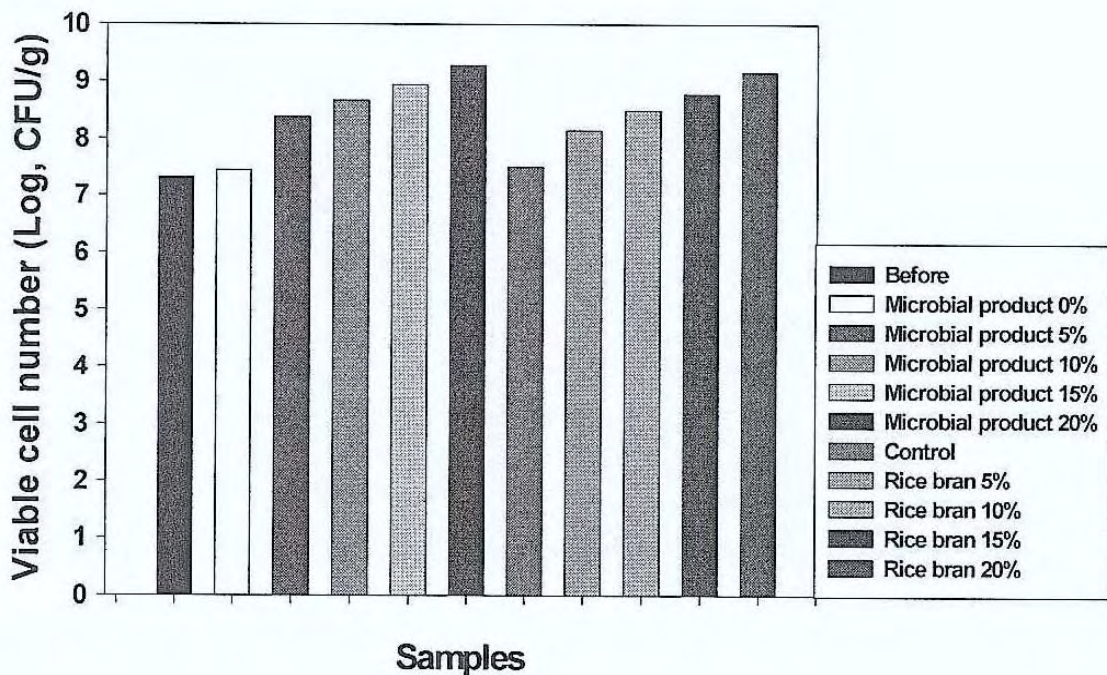


그림 71. 미생물 제제의 처리가 상추 재배토양의 미생물에 미치는 영향

2) 미생물 제제의 처리가 배추 재배 토양의 미생물에 미치는 영향

미생물 제제의 처리가 배추 재배 토양의 미생물에 미치는 영향을 검토하기 위하여 각 처리구의 토양시료를 채취하여 일반세균, Actinomycetes 속, 곰팡이 및 Trichoderma 등과 같은 미생물의 생균수를 선택배지를 사용하여 측정하였다. 미생물 제제의 처리가 상추 재배토양의 미생물에 미치는 영향은 그림 72와 같다. 그림에서와 같이 미생물 제제를 처리하지 않은 토양에 비하여 미생물 제제 또는 미강을 처리한 토양에서의 총 생균수는 무 처리구에 비하여 농도에 비례하여 증가함을 알 수 있었다. 미생물 제제의 효과 검정 및 토양 미생물의 수적인 증가 등과 같은 결과는 처리한 미생물 제제가 토양 미생물의 수적 증가 및 각 토양 미생물의 상대적 비율을 변화 시킴을 알 수 있었으며 상추의 생육을 촉진시키기 위하여 최적 농도로 처리해야 된다는 사실을 알 수 있었다. 미생물 제제의 처리가 배추 재배토양의 미생물에 미치는 영향은 그림 72와 같으며 상추에서 얻은 결과와 유사한 결과를 얻었다.

Chinese cabbage pot total

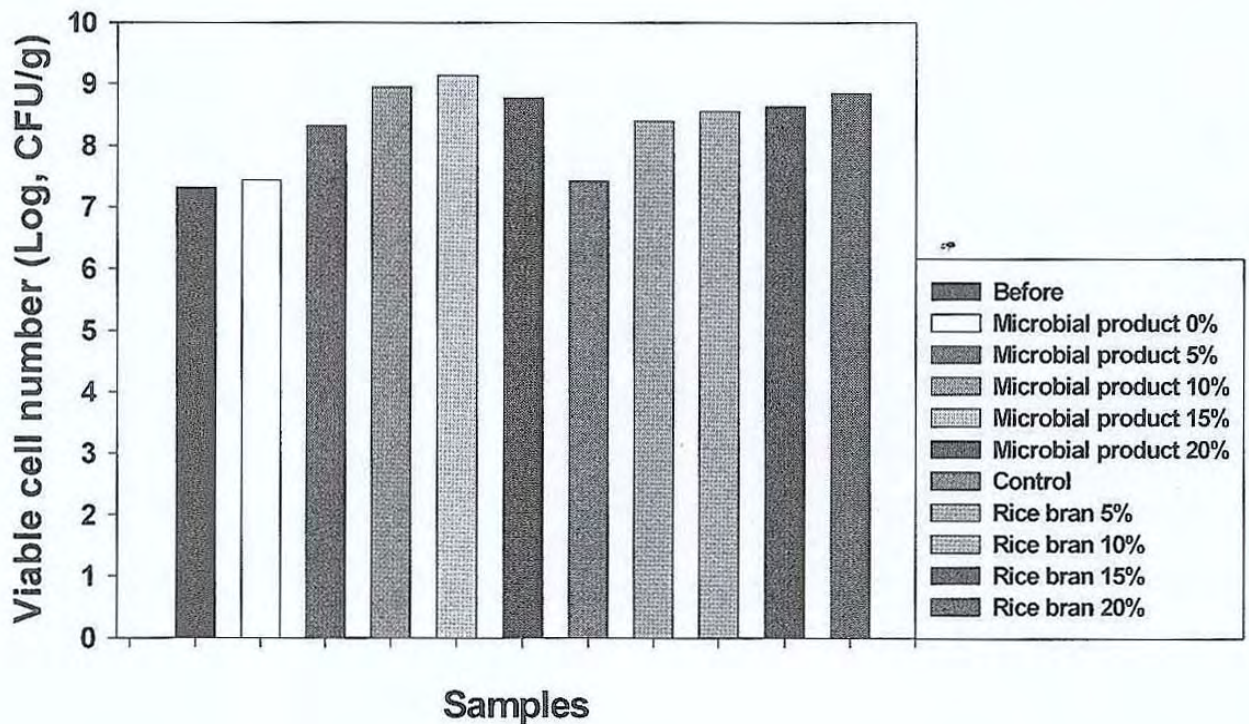


그림 72. 미생물 제제의 처리가 배추 재배토양의 미생물에 미치는 영향

라. 미생물 제제의 처리에 의한 물리·화학적 변화 측정

1) 미생물 제제의 처리에 의한 오이 재배 토양의 물리·화학적 변화

미강 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 토양에 처리하고 오이를 재배한 후, 토양의 물리·화학적 변화를 측정하였다. 이는 미강 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제의 처리가 처리하지 않은 무처리구에 비하여 토양의 산도 및 질소의 형태 등을 비교하기 위한 실험이었다. 표 34는 미생물 제제 처리에 따른 토양 중 무기성분 함량을 나타내 것이다. 토양중 산도는 pH 6.33~6.65로 처리구 간에 차이가 없었다. 토양 전기전도도(EC)는 미생물 제제(1,000kg/10a) 처리구가 5.68dS/m로 가장 높았으며, 이는 토양 중에 K 및 NO₃ 함량이 많은 것에 기인되는 것으로 추측된다. 그러나 다른 처리구는 3.30~3.73 dS/m로 처리구간에 차이가 없었다. 인산 함량은 미강(1,000kg/10a) 처리구에서 1,695mg/Kg으로 다른 처리구에 비해 많았으며 미강이 들어간 처리구에서 농도가 높은 것을 미루어 봐 미강이 분해되면서 토양 중에 증가한 것으로 생각된다. 칼슘 및 마그네슘 함량은 처리구간에 차이가 없었으며 칼륨은 인산과 달리 미생물 제제(1,000kg/10a) 처리구에서 2.63cmol/Kg으로 가장 많았다. NO₃ 함량은 미생물 제제(1,000kg/10a) 처리구에서 416mg/Kg으로 미생물 제제(500kg/10a) 처리구의 237mg/Kg보다 많았다. 이는 미생물 제제(500kg/10a) 처리구가 생육이 좋아 토양내 질소를 많이 흡수한 결과로 생각된다.

표 34. 미생물 제제 처리에 따른 오이 재배 토양 중 무기성분 함량

처리	pH (1:5)	EC (dS/m)	Av. P ₂ O ₅ (mg/Kg)	Ex. Cations(cmol/Kg)			NH ₄ -N (mg/Kg)	NO ₃ -N (mg/Kg)
				Ca	Mg	K		
무처리	6.59	3.30	894	5.42	2.24	1.70	11.2	222
미강 (500kg/10a)	6.61	3.38	1,297	5.85	2.99	1.83	9.4	285
미강 (1,000kg/10a)	6.65	3.25	1,695	5.52	3.37	1.94	9.7	232
미생물제제 (500kg/10a)	6.33	3.73	1,361	5.75	3.37	1.62	13.1	237
미생물제제 (1,000kg/10a)	6.33	5.68	1,248	6.02	3.23	2.63	9.2	416

2) 미생물 제제의 처리에 의한 토마토 재배 토양의 물리·화학적 변화

미강 및 미강을 사용하여 제조한 미생물 제제를 토양에 처리하고 토마토를 재배한 후, 토양의 물리·화학적 변화를 측정하였다. 이는 미강 및 미강을 사용하여

제조한 미생물 제제의 처리가 처리하지 않은 무처리구에 비하여 토양의 산도 및 질소의 형태 등을 비교하기 위한 실험이었다. 표 35는 토마토의 미생물 제제 처리에 따른 토양 중 무기성분 함량을 나타내 것이다. 토양 중 산도는 pH 6.67~7.13로 처리구 간에 차이가 없었으나 오이 토양보다는 다소 높았다. 토양 전기전도도(EC)는 미강(500kg/10a) 처리구가 3.12dS/m로 가장 높았다. 인산, 칼슘, 마그네슘 및 칼륨 함량은 미강(1,000kg/10a) 처리구에서 다른 처리구에 비해 많았으며 오이 토양과 같이 미강이 분해되면서 토양 중에 증가한 것으로 생각된다. 토마토의 생육이 좋았던 미생물 제제의 처리가 다른 처리에 비해 암모니아태와 질산태 질소가 적은 것으로 미루어 봐 오이와 같이 토양내 질소를 많이 흡수한 결과로 생각된다.

표 35. 미생물 제제 처리에 따른 토마토 재배 토양 중 무기성분 함량

처리	pH (1:5)	EC (dS/m)	Av. P ₂ O ₅ (mg/Kg)	Ex. Cations(cmol/Kg)			NH ₄ -N (mg/Kg)	NO ₃ -N (mg/Kg)
				Ca	Mg	K		
무처리	6.59	3.30	894	5.42	2.24	1.70	11.2	222
미강 (500kg/10a)	6.61	3.38	1,297	5.85	2.99	1.83	9.4	285
미강 (1,000kg/10a)	6.65	3.25	1,695	5.52	3.37	1.94	9.7	232
미생물제제 (500kg/10a)	6.33	3.73	1,361	5.75	3.37	1.62	13.1	237
미생물제제 (1,000kg/10a)	6.33	5.68	1,248	6.02	3.23	2.63	9.2	416

마. 미생물 제제의 용도 개발

1) 미생물 제제가 과채류 육묘에 미치는 영향

가) 미생물 제제가 발아율에 미치는 영향

그림 73, 74, 75, 76 및 77은 각 작물을 2007년 2월 15일에 파종하여 미생물 제제의 처리농도에 따른 2월 26일의 발아율을 조사한 것이다. 토마토는 미생물 제제의 농도가 높은 1배액에서 발아율이 64%로 가장 낮았고 0.01배액 및 0.001배액에서 94%로 높았으며 무처리도 94%의 높은 발아율을 보였으나 0.0001배액에서는 88%의 낮은 발아율을 나타냈다. 고추는 미생물 제제의 농도가 높은 1배액에서 발아율이 74%로 가장 낮았고 무처리, 0.1배액 및 0.01배액에서 98%로 높은 발아율을 보였으나 0.001배액에서는 92%의 다소 낮은 발아율을 나타냈다.

오이는 토마토, 고추와 같이 미생물 제제의 농도가 높은 1배액에서 80%로 낮은 발아율을 나타냈고 무처리, 0.1배액 및 0.01배액에서 96~98%로 높은 발아율을 보였다. 수박은 오이, 토마토, 고추와 달리 1배액, 0.1배액 및 0.01배액에서 72%의 낮은 발아율을 나타냈고 0.001 및 0.0001배액의 낮은 농도에서 98~100%로 높은 발아율을 보였다. 멜론은 미생물 제제의 높은 농도인 1배액에서 68%의 낮은 발아율을 나타냈으나 농도가 낮을수록 높은 발아율을 보였다. 이상의 결과를 보면 모든 작물에서 미생물 제제의 높은 농도인 1배액에서 발아율이 낮았으며 0.1배액 및 0.01배액에서 비교적 높은 발아율을 나타냈다.

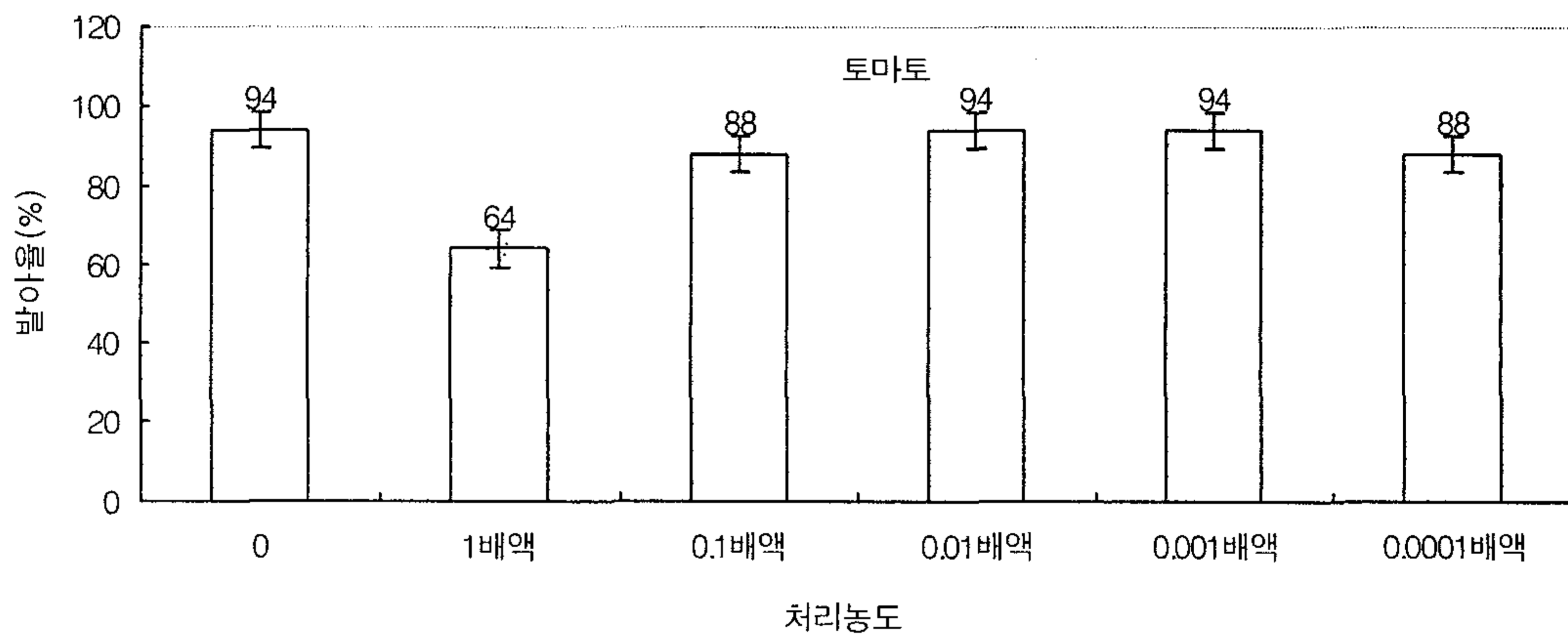


그림 73. 미생물 제제의 처리가 토마토의 발아에 미치는 영향

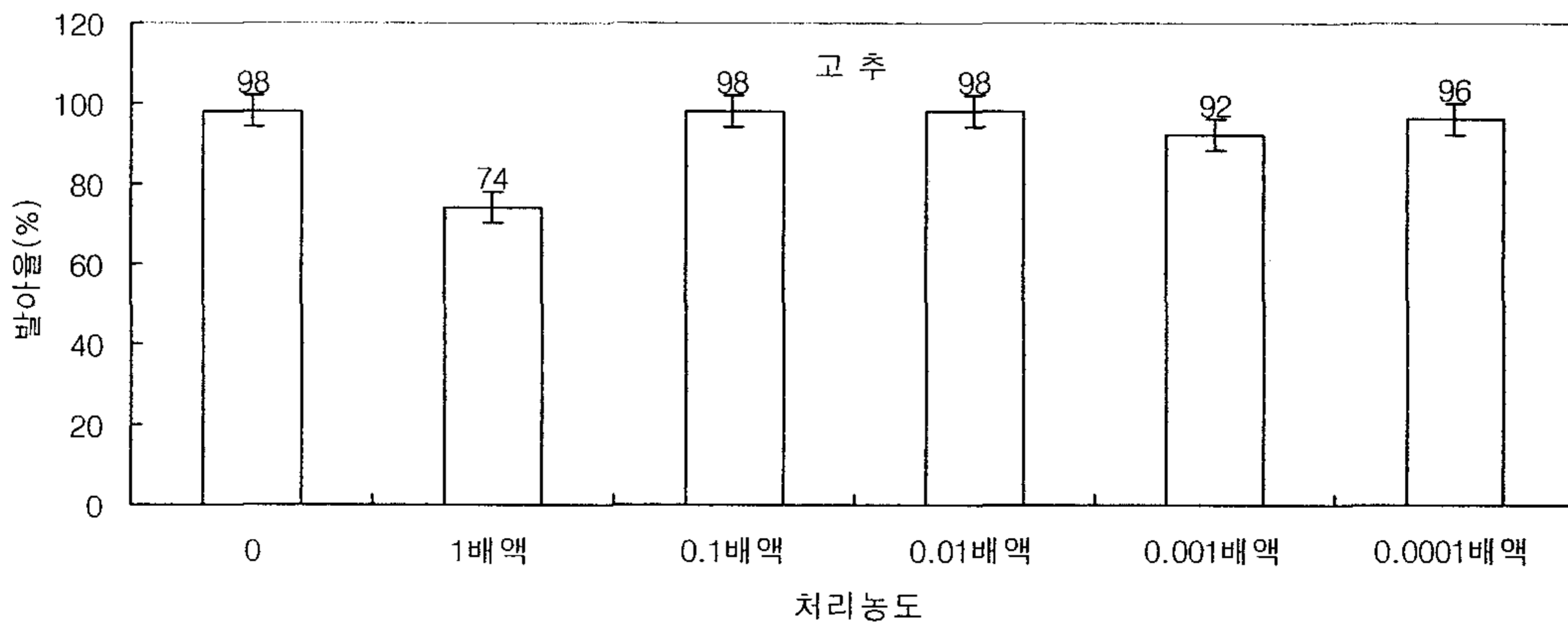


그림 74. 미생물 제제의 처리가 고추의 발아에 미치는 영향

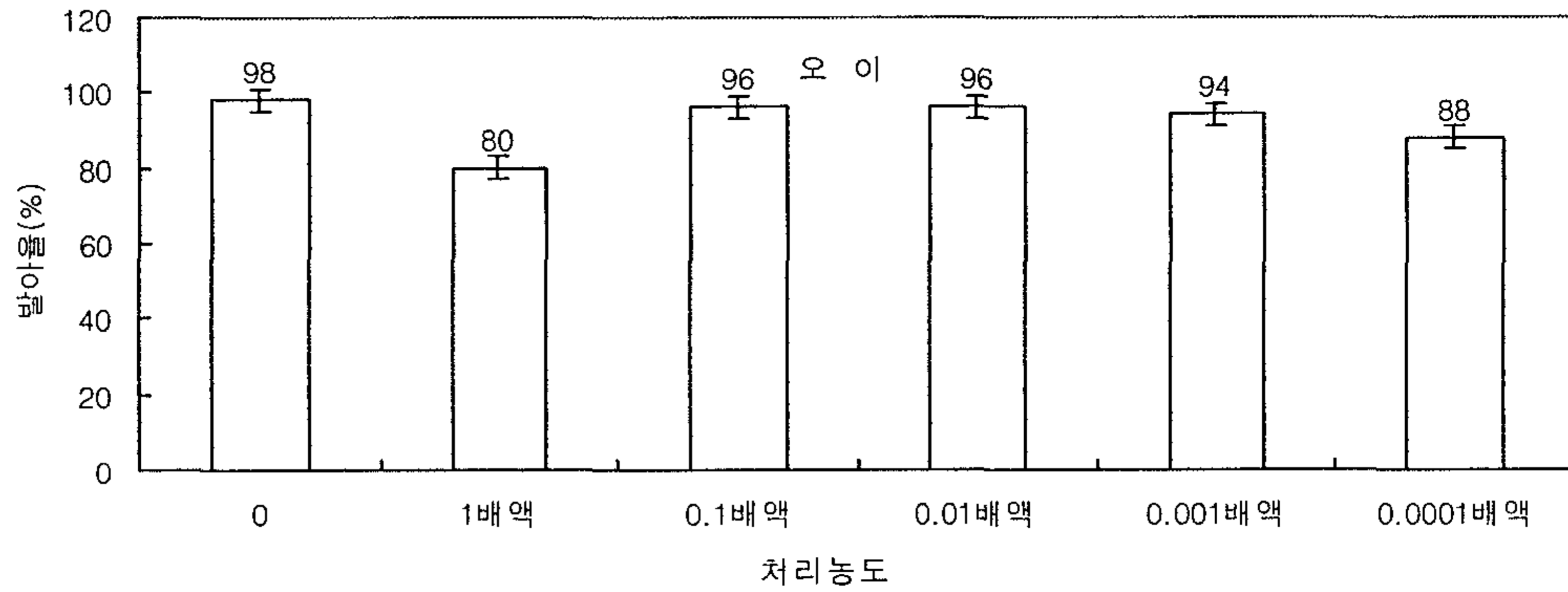


그림 75. 미생물 제제의 처리가 오이의 발아에 미치는 영향

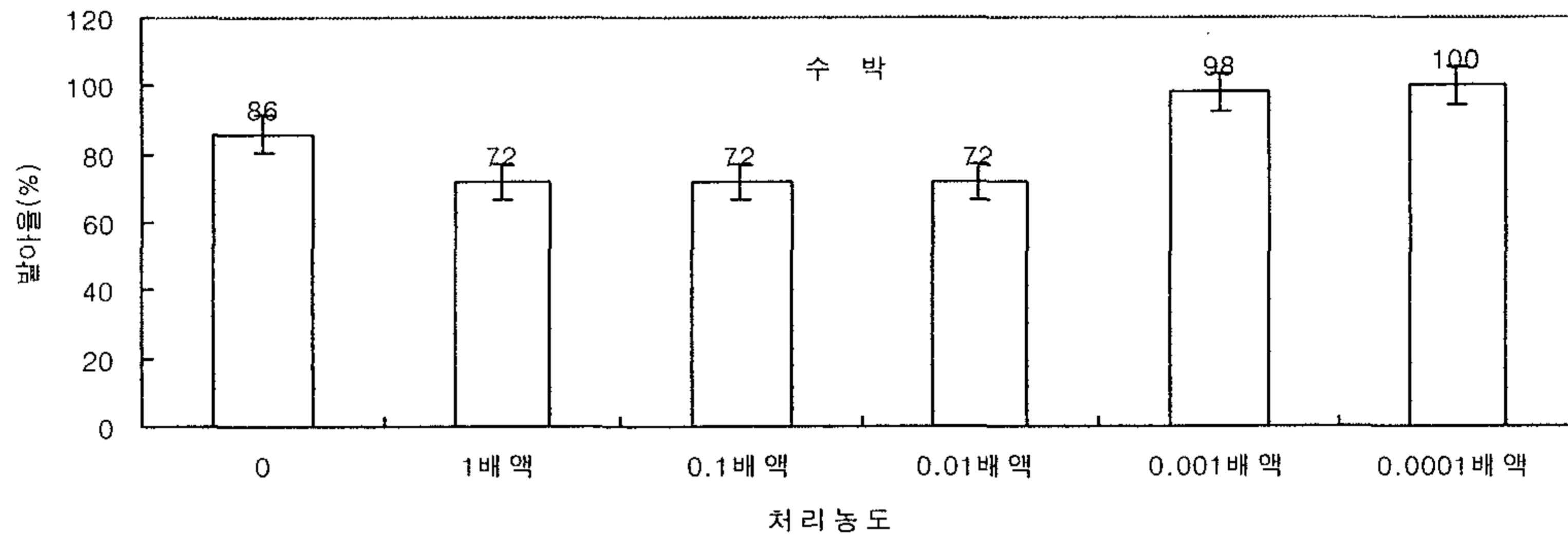


그림 76. 미생물 제제의 처리가 수박의 발아에 미치는 영향

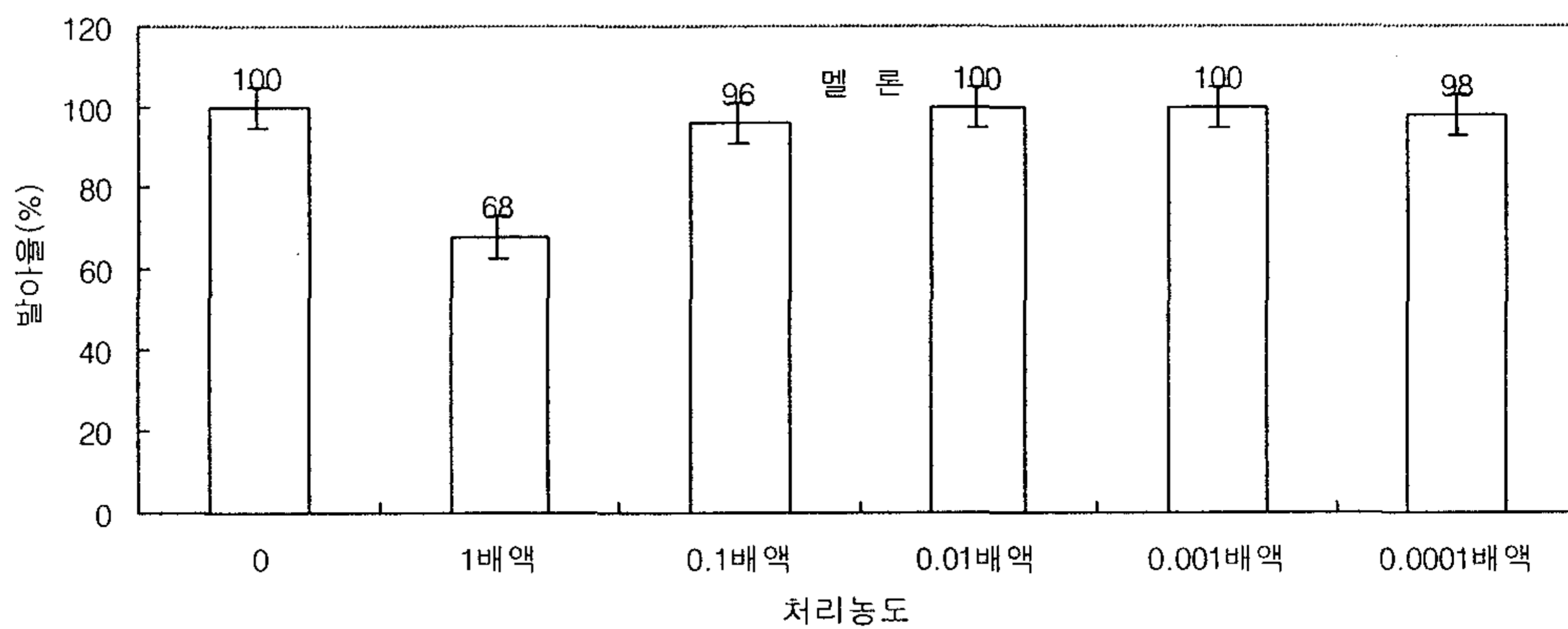


그림 77. 미생물 제제의 처리가 멜론의 발아에 미치는 영향

나) 미생물 제제의 처리가 작물의 육묘 생육에 미치는 영향

표 36은 미생물 제제의 처리농도별 토마토의 육묘중 생육을 나타낸 것으로 초장, 생체중, 및 건물중의 육묘중 생육은 미생물 제제의 처리효과가 인정되어 무처리보다 미생물제제를 처리함으로써 좋았고 농도가 높거나 낮으면 생육이 억제되었다. 초장은 미생물 제제의 농도가 낮을수록 길어지는 경향이었으며 0.001배액에서 30.2cm로 가장 길었으며 0.0001배액에서는 억제되었다. 엽장, 엽폭 및 엽수도 같은 경향을 보여 0.001배액에서 가장 길고 많았다. 근장은 미생물 제제의 처리 농도간에 유의차가 인정되지 않았다. 지상부 및 지하부의 생체중은 0.001배액에서 각각 19.6g, 4.63g으로 가장 무거웠으며 건물중도 같은 경향을 보여 각각 5.63g, 3.45g으로 가장 무거웠다. 이상의 결과에서 토마토의 묘소질은 미생물 제제를 0.001배액으로 처리하는 것이 가장 좋은 것으로 사료되었다.

표 36. 미생물 제제의 처리농도별 토마토의 육묘생육

처리농도	초장 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (매)	근장 (cm)	생체중(g)		건물중(g)	
						지상부	지하부	지상부	지하부
0 (무처리)	22.0c	9.4	9.2	4.5a	5.5a	17.9b	4.98a	4.98b	2.77b
1 배액	20.0c	8.2	6.5	4.1a	5.0a	17.3b	4.82a	4.82b	2.17b
0.1배액	25.2b	8.4	7.2	4.0a	5.5a	17.7b	5.69a	5.69a	3.17a
0.01배액	26.8b	8.7	7.8	4.3a	5.5a	17.7b	5.26a	5.26a	3.03a
0.001배액	30.2a	9.1	8.6	4.6a	5.3a	19.6a	4.63a	5.63a	3.45a
0.0001배액	24.7b	9.0	7.8	4.0a	5.8a	16.4b	5.51a	6.51a	3.51a

^b Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

표 37는 미생물 제제의 처리 농도별 고추의 육묘중 생육을 나타낸 것으로 육묘중 생육은 미생물 제제의 처리효과가 인정되었고, 무처리보다 미생물제제를 처리함으로써 좋았다. 초장은 미생물 제제의 농도가 낮을수록 길어지는 경향이었으며 0.01~0.001배액에서 각각 17.3cm, 17.0cm로 가장 길었으며 0.0001배액에서는 억제되었다. 육묘중 생육은 미생물 제제의 처리효과가 인정되었으며, 무처리보다 미생물 제제를 처리함으로써 좋았다. 초장은 미생물 제제의 농도가 낮을수록 길어지는 경향이었으며 0.01~0.001배액에서 각각 17.3cm, 17.0cm로 가장 길었으며 0.0001배액에서는 억제되었다. 엽장,

엽폭 엽수 및 근장도 같은 경향을 보여 0.01~0.001배액에서 가장 길고 많았다. 지상부 및 지하부의 생체중은 0.01~0.001배액에서 각각 지상부 17.1g, 17.9g, 지하부 9.94g, 10.07g으로 가장 무거웠으며 건물중도 같은 경향을 보였다. 이상의 결과에서 고추의 묘소질은 미생물 제제를 0.01~0.001배액으로 처리하는 것이 가장 좋은 것으로 사료되었다.

표 37. 미생물 제제의 처리농도별 고추의 육묘생육

처리농도	초장 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (매)	근장 (cm)	생체중(g)		건물중(g)	
						지상부	지하부	지상부	지하부
0 (무처리)	14.1b	5.5	2.9	1.6a	6.2a	15.5b	6.87b	2.37c	0.80b
1 배액	11.0b	4.4	2.5	1.5a	5.3a	14.8b	6.73b	3.40b	0.83b
0.1배액	14.5b	4.8	2.6	1.8a	6.1a	13.8b	7.34b	3.59b	0.98b
0.01배액	17.3a	5.5	2.9	2.1a	7.1a	17.1a	9.94a	3.59b	1.29a
0.001배액	17.0a	5.6	3.0	2.1a	6.9a	17.9a	10.07a	4.32a	1.36a
0.0001배액	13.8b	4.8	2.5	1.7a	6.0a	16.3ab	6.65b	3.15b	1.00b

^bMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

표 38. 미생물 제제의 처리농도별 오이의 육묘생육

처리농도	초장 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (매)	근장 (cm)	생체중(g)		건물중(g)	
						지상부	지하부	지상부	지하부
0 (무처리)	24.2b	7.0	8.8	6.4b	3.6a	30.7b	20.2c	3.48a	1.14a
1 배액	23.0b	10.0	10.6	5.3b	3.9a	35.6a	22.3b	3.47a	1.57a
0.1배액	32.2a	10.8	10.4	7.8a	3.9a	35.8a	24.2a	3.77a	1.62a
0.01배액	29.9a	7.0	8.7	7.8a	3.3a	33.3b	21.7c	3.41a	1.41a
0.001배액	30.9a	8.2	8.8	5.9b	3.7a	32.2b	21.9bc	3.50a	1.35a
0.0001배액	25.2b	7.7	9.0	5.7b	3.4a	32.5b	22.9b	3.42a	1.05a

^bMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

표 38은 미생물 제제의 처리농도별 오이의 육묘중 생육을 나타낸 것이다. 초장, 생체중, 및 건물중의 육묘중 생육은 미생물제제의 처리효과가 인정되었으며, 무처리보다 미생물 제제를 처리함으로써 좋았고 토마토와 고추에 비교하여 높은 농도에서 생육이 좋았다. 초장은 미생물 제제의 농도가 높을수록 길어지는 경향이었으며 0.1 배액에서 32.2cm로 가장 길었으며 농도가 낮은 0.01배액 이상에서, 그리고 농도가 높은 1 배액에서 억제되었다. 엽장, 엽폭 엽수 및 근장도 같은 경향을 보여 0.1배액에서 가장 길고 많았다. 지상부 및 지하부의 생체중은 0.1배액에서 각각 35.8g, 24.2g으로 가장 무거웠으며 건물중도 같은 경향을 보여 각각 3.77g, 1.62g으로 가장 무거웠다. 이상의 결과에서 오이의 묘소질은 미생물 제제를 0.1배액으로 처리하는 것이 가장 좋은 것으로 사료되었다.

표 39는 미생물제제의 처리농도별 수박의 육묘중 생육을 나타낸 것으로 육묘중 생육은 미생물 제제의 처리효과가 인정되어 무처리보다 미생물제제를 처리함으로써 좋았다. 초장은 미생물 제제의 농도가 낮을수록 길어지는 경향이었으며 0.01~0.001배액에서 각각 22.3cm, 25.8cm로 가장 길었으며 0.001배액에서는 억제되었다. 엽장, 엽폭 및 엽수도 같은 경향을 보여 0.01~0.001배액에서 가장 길고 많았다. 근장은 4.3cm 내외로 미생물 제제의 처리 농도간에 유의차가 인정되지 않았다. 지상부 및 지하부의 생체중은 0.01~0.001배액에서 각각 지상부 45.7g, 25.8g, 지하부 4.1g, 4.0g으로 가장 무거웠으며 건물중도 같은 경향을 보였다. 이상의 결과에서 수박의 묘소질은 미생물 제제를 0.01~0.001배액으로 처리하는 것이 가장 좋은 것으로 사료되었다.

표 39. 미생물 제제의 처리농도별 수박의 육묘생육

처리농도	초장 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (매)	근장 (cm)	생체중(g)		건물중(g)	
						지상부	지하부	지상부	지하부
0 (무처리)	17.5c	5.2	5.1	4.0b	4.3a	14.7c	2.5c	1.7c	0.26b
1 배액	17.6c	5.3	5.3	3.8b	3.7a	11.5c	2.6c	1.1c	0.24b
0.1배액	18.8c	6.0	5.6	4.7b	4.4a	19.1b	3.4b	2.6b	0.30a
0.01배액	22.3a	6.4	6.6	6.0a	4.3a	25.7a	4.1a	3.3a	0.37a
0.001배액	25.8a	7.0	6.6	7.6a	4.3a	25.8a	4.0a	3.5a	0.39a
0.0001배액	20.6b	6.1	5.8	5.7a	4.3a	19.9b	2.7c	2.8b	0.33a

^p Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

표 40은 미생물 제제의 처리 농도별 멜론의 육묘중 생육을 나타낸 것으로 육묘중 생육은 미생물 제제의 처리효과가 인정되었으며, 무처리보다 미생물 제제를 처리함으로써 좋았다. 초장은 미생물 제제의 농도가 낮을수록 길어지는 경향이였으며 0.01~0.001배액에서 각각 20.8cm, 20.0cm로 가장 길었으며 0.001배액에서는 억제되었다. 엽장, 엽폭 및 엽수도 같은 경향을 보여 0.01~0.001배액에서 가장 길고 많았다. 근장은 3.9cm 내외로 미생물제제의 처리 농도간에 유의차가 인정되지 않았다. 지상부 및 지하부의 생체중은 0.01~0.001배액에서 각각 지상부 34.6g, 32.6g, 지하부 15.5g, 15.3g으로 가장 무거웠으며 건물중도 같은 경향을 보였다. 이상의 결과에서 수박의 묘소질은 미생물제제를 0.01~0.001배액으로 처리하는 것이 가장 좋은 것으로 사료되었다.

표 40. 미생물 제제의 처리농도별 멜론의 육묘생육

처리농도	초장 (cm)	엽장 (cm)	엽폭 (cm)	엽수 (매)	근장 (cm)	생체중(g)		건물중(g)	
						지상부	지하부	지상부	지하부
0 (무처리)	15.1b	5.9	6.5	4.4c	3.3b	19.8b	10.9b	1.6b	0.6b
1 배액	13.6b	6.3	6.8	3.9c	3.7a	21.4b	12.9b	1.7b	0.9a
0.1배액	17.1b	6.2	7.2	5.9b	3.9a	30.4a	11.5b	2.1a	1.1a
0.01배액	20.8a	6.7	7.7	7.5a	3.9a	34.6a	15.5a	2.6a	1.2a
0.001배액	20.0a	6.4	7.6	7.5a	4.0a	32.6a	15.3a	2.7a	1.1a
0.0001배액	15.4b	5.8	6.9	5.0b	3.9a	25.4b	12.2b	2.4a	0.8ab

^b Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

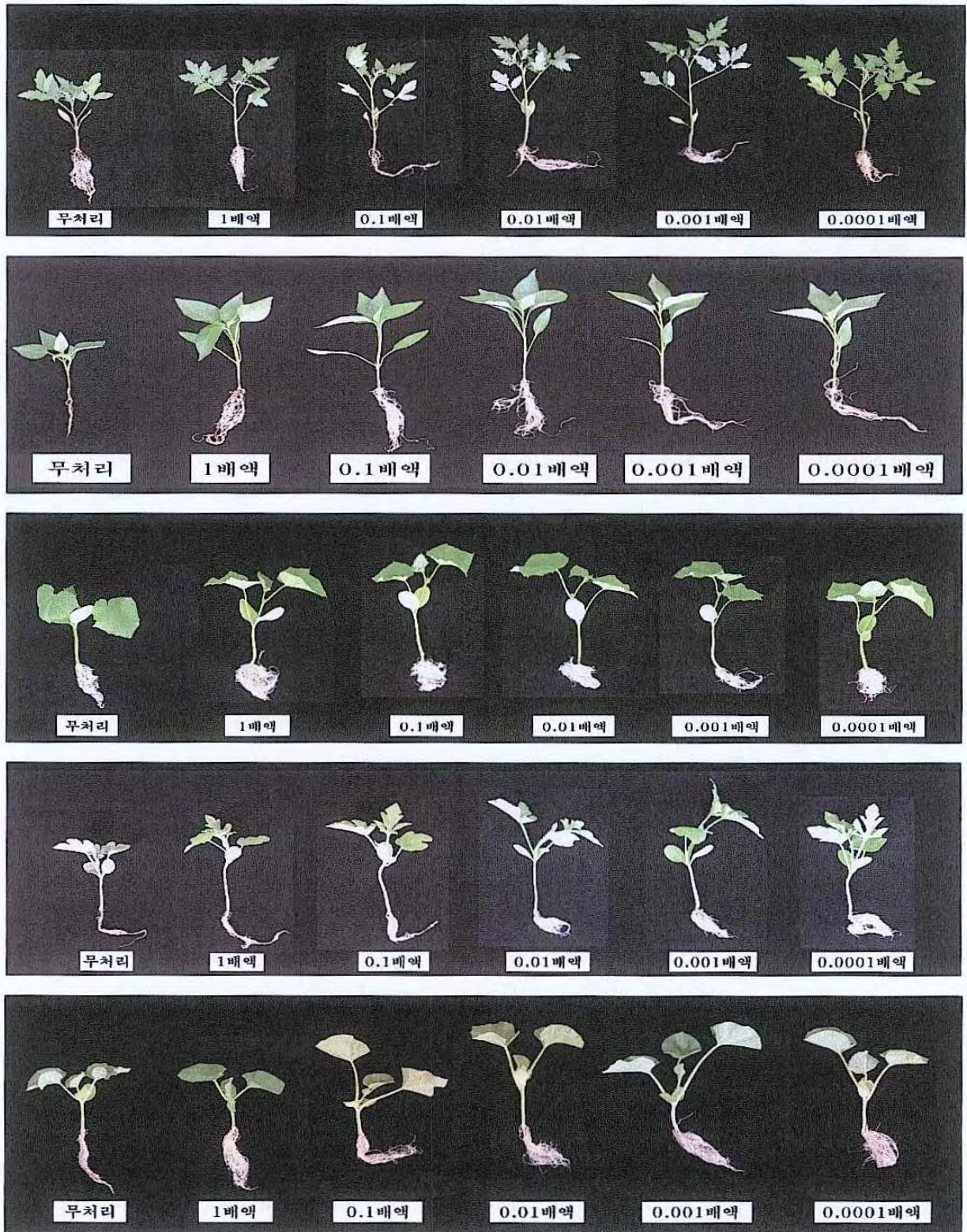


그림 78. 미생물 제제가 육묘의 생육에 미치는 영향 (위로부터; 토마토, 고추, 오이, 수박 및 멜론)

그림 79, 80, 81, 82, 및 83은 각 작물의 처리농도별 초장의 경시적 변화를 나타낸 것이다. 육묘중 토마토의 초장의 생육은 미생물 제제의 농도가 높은 1배액에서는 무처리보다 억제적이었으나 0.01~0.001배액에서 효과적이었다. 고추는 미생물제제의 처리의 효과가 인정되었으며 모든 처리가 무처리보다 생육이 좋았고 토마토와 같이 0.01~0.001배액에서 가장 효과적이었다. 오이는 토마토 및 고추와 달리 1배액에서 초장의 생육에 가장 효과적이었다. 수박은 초장의 생육에 미생물·제제의 처리효과가 인정되었으며 생육이 진전될수록 효과가 컸다. 무처리에 비해 모든 농도처리에서 초장이 길었으며 토마토와 같이 0.01~0.001배액에서 가장 효과적이었다. 멜론은 초기에는 미생물제제의 처리효과가 미미했으나 생육이 전진됨에 따라 처리효과가 컸으며 0.01~0.001배액에서 가장 효과적이었다.

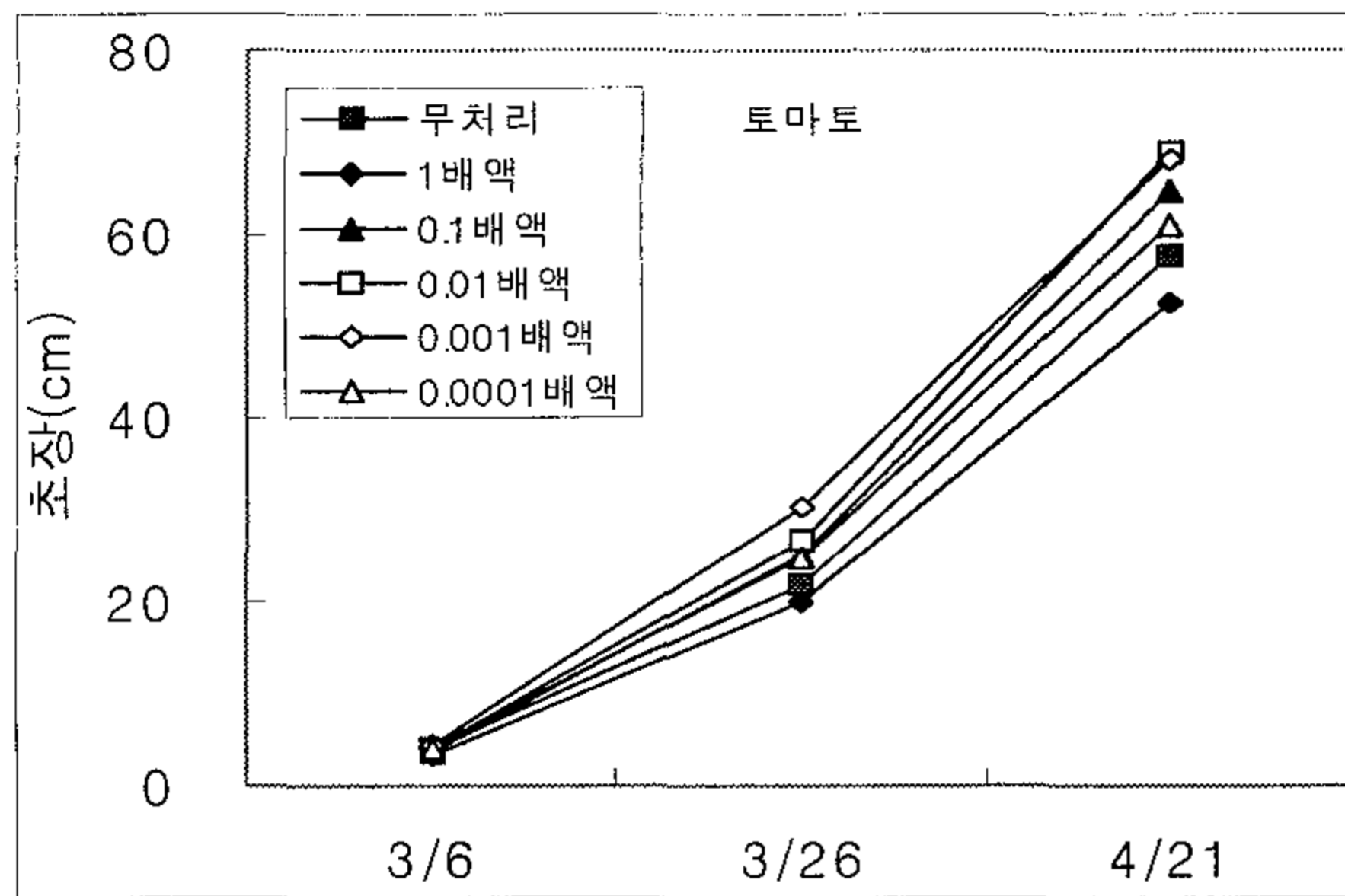


그림 79. 미생물 제제의 처리가 토마토 육묘의 초장에 미치는 영향

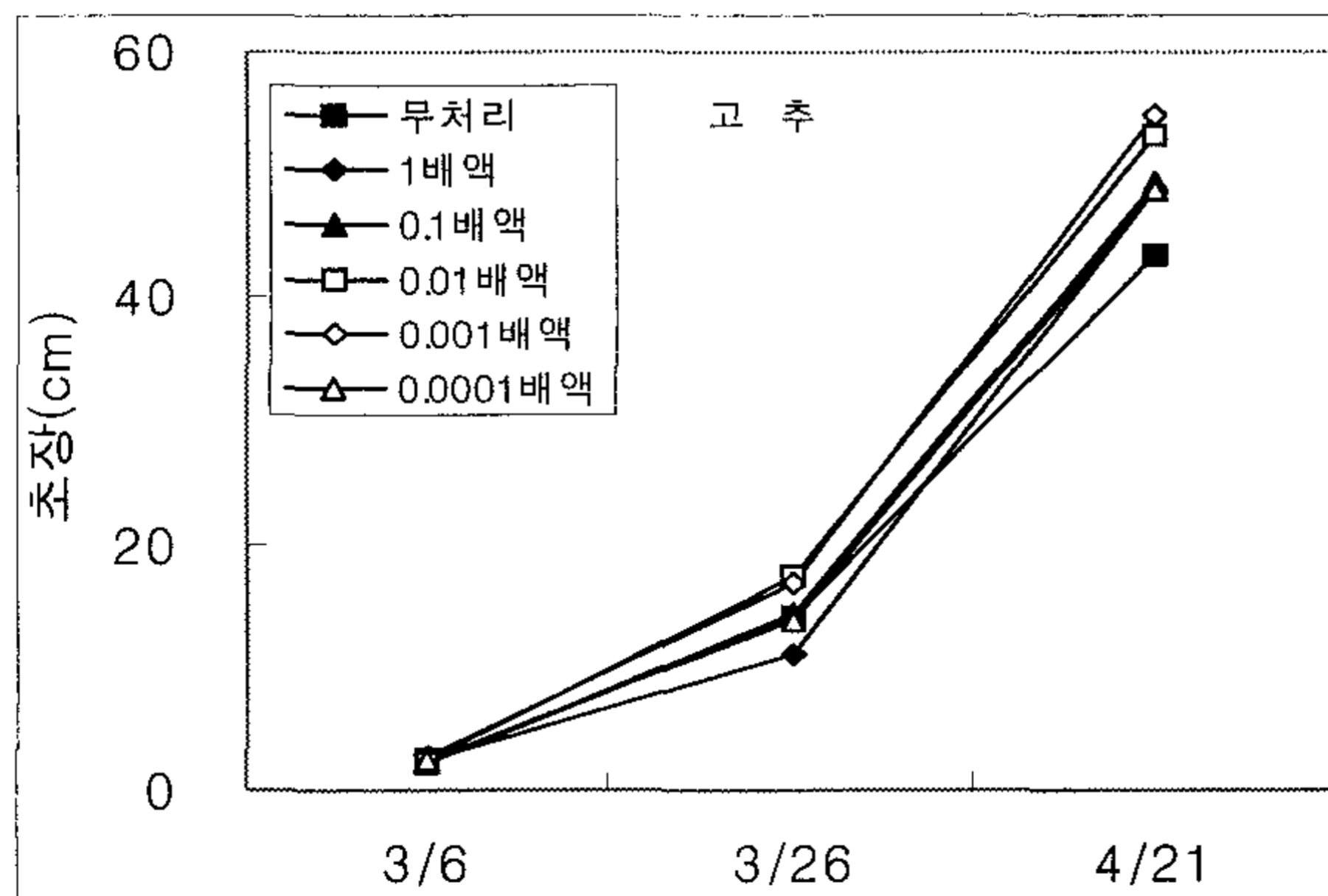


그림 80. 미생물 제제의 처리가 고추 육묘의 초장에 미치는 영향

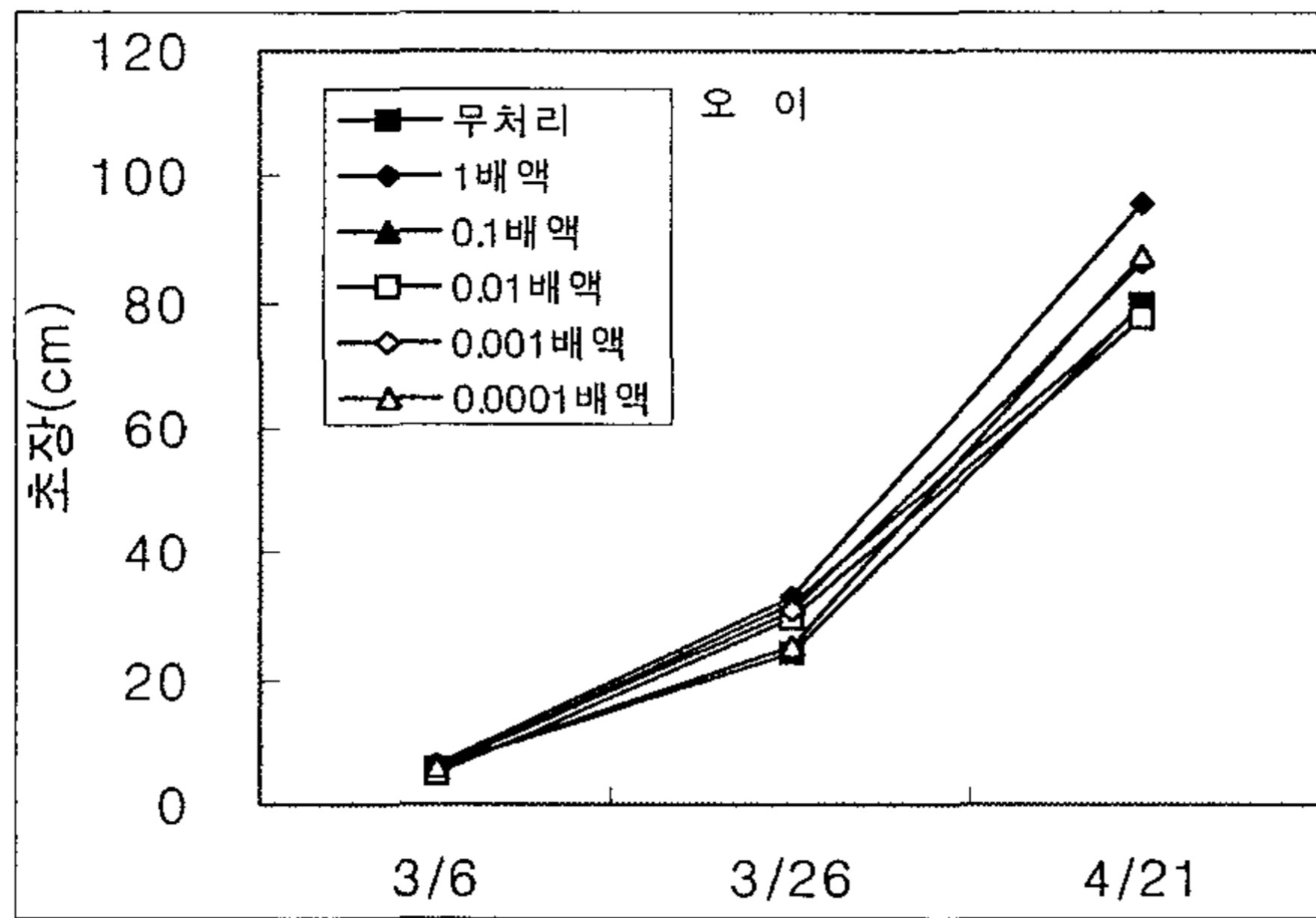


그림 81. 미생물 제제의 처리가 오이 육묘의 초장에 미치는 영향

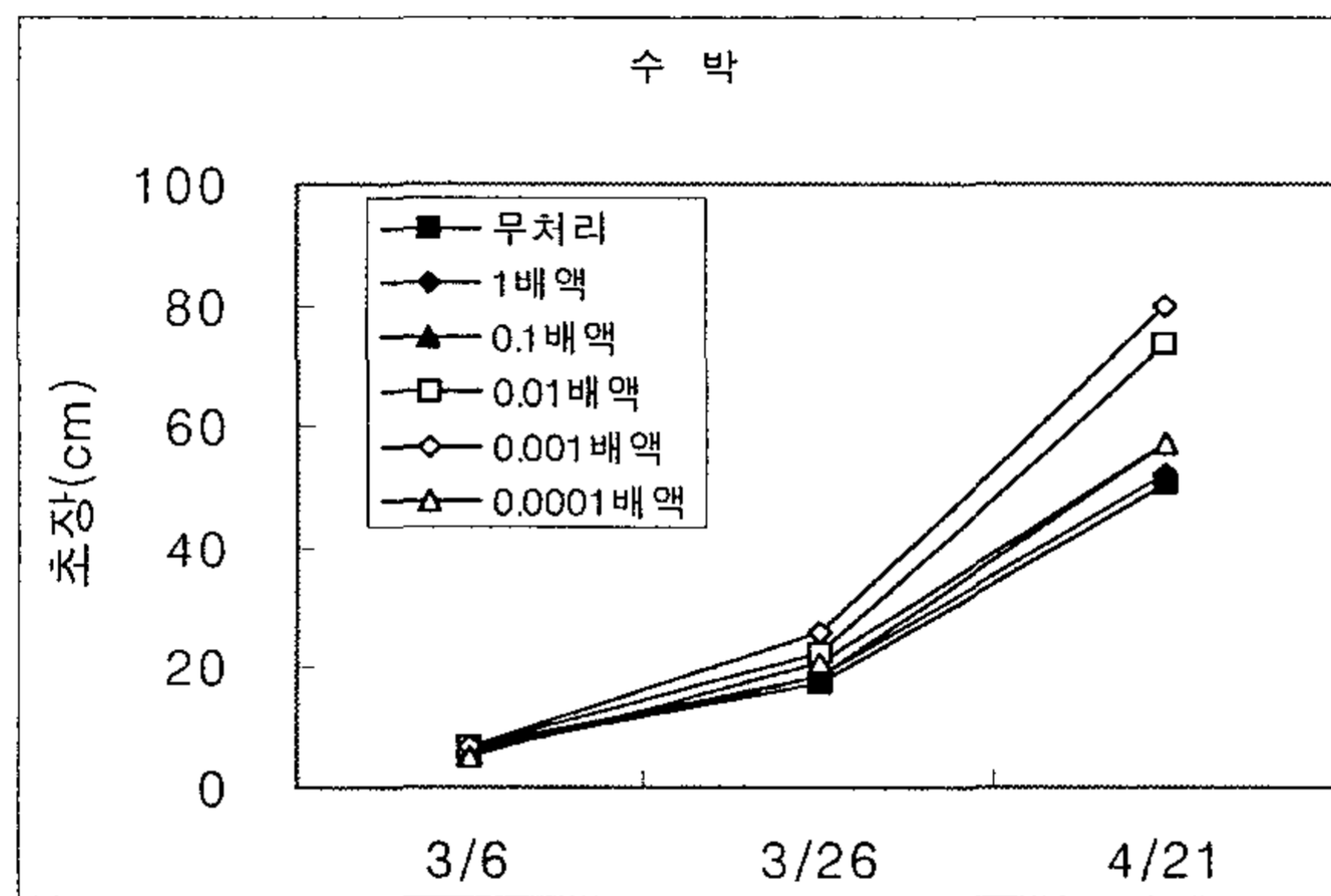


그림 82. 미생물 제제의 처리가 수박 육묘의 초장에 미치는 영향

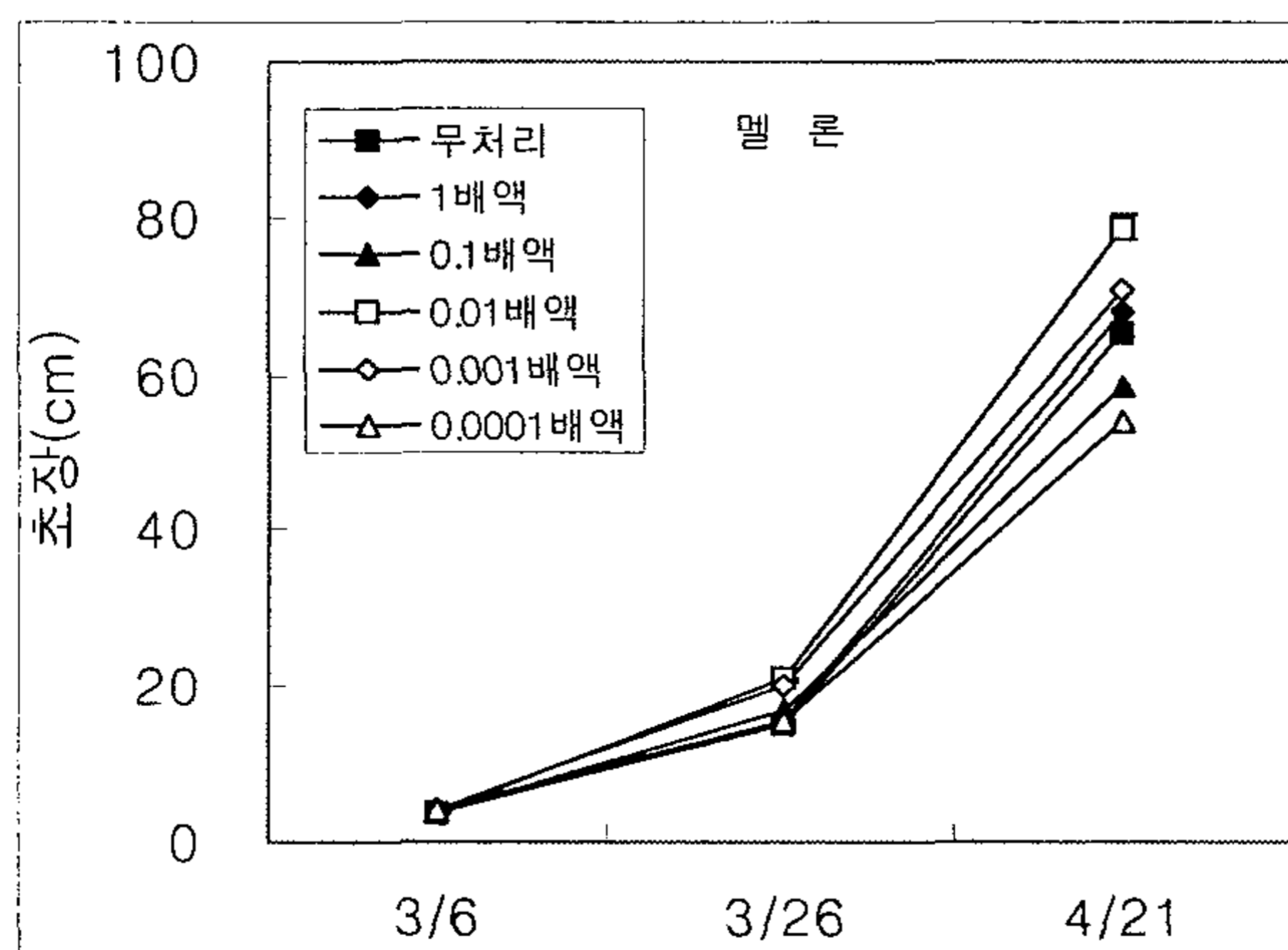


그림 83. 미생물 제제의 처리가 멜론 육묘의 초장에 미치는 영향

그림 84, 85, 86, 87 및 88은 각 작물의 처리 농도별 생체중의 경시적 변화를 나타낸 것이다. 육묘중 토마토의 생체중은 초기에는 미생물 제제의 처리 효과가 미미하였으나 생육이 전진됨에 따라 효과가 컸으며 모든 농도처리에서 무처리보다 무거웠으며 0.01~0.001배액에서 가장 무거웠다. 고추는 미생물 제제의 처리의 효과가 인정되었으며 토마토와 같이 0.01~0.001배액에서 가장 효과적이었다. 오이는 다른 작물에 비해 미생물 제제의 다소 높은 농도에서 효과적이었는데 0.1배액에서 가장 효과적이었다. 수박은 미생물 제제의 처리효과가 인정되었으며 생육이 진전될수록 효과가 컸다. 1배액을 제외한 모든 농도처리에서 무처리에 보다 생체중이 무거웠으며 토마토와 같이 0.01~0.001배액에서 가장 효과적이었다. 멜론은 다른 작물과 달리 초기에서 미생물제제의 처리효과가 컸으며 생육이 전진됨에 따라 처리효과가 컸고 0.01~0.001배액에서 가장 효과적이었다.

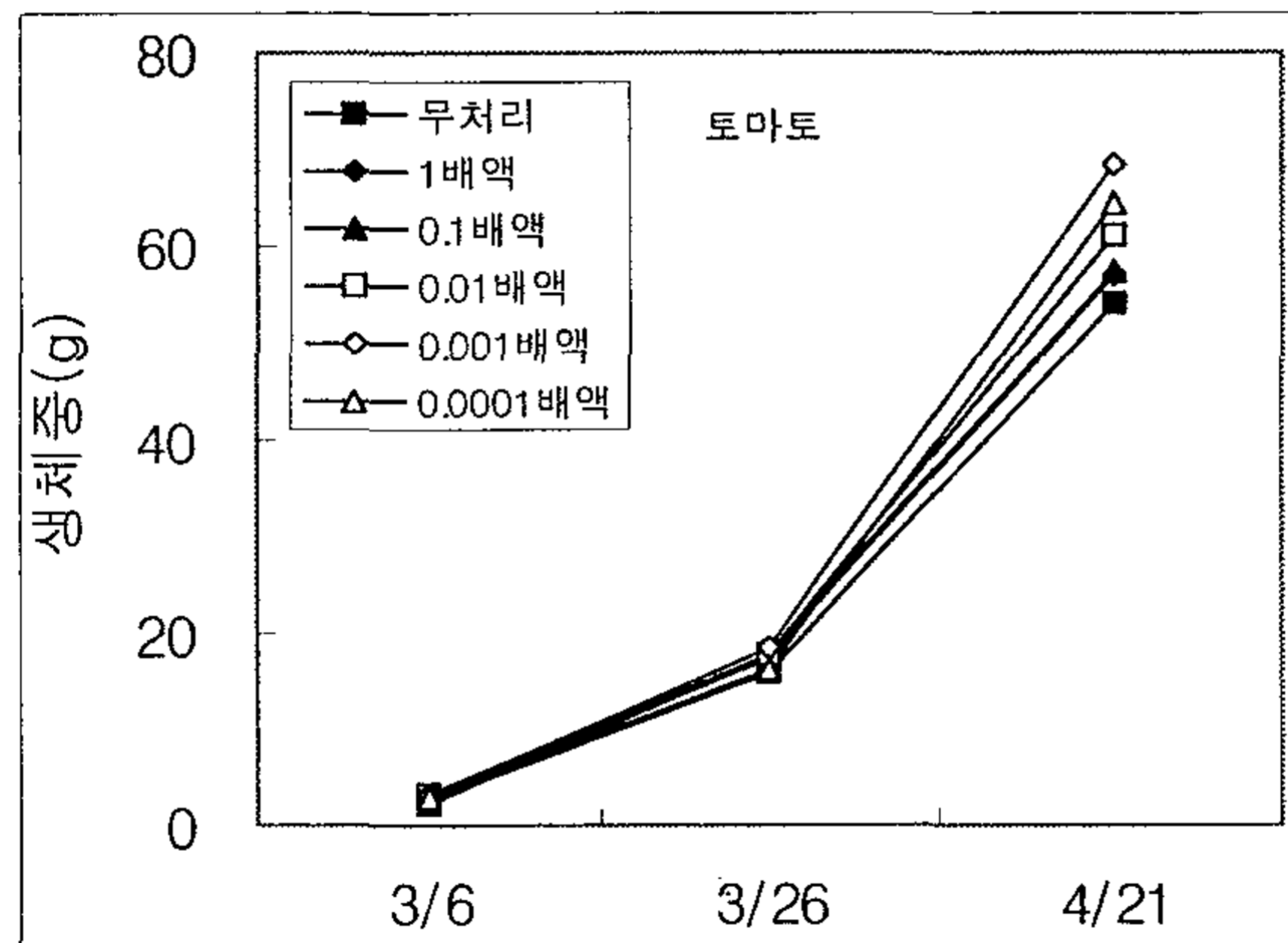


그림 84. 미생물 제제의 처리가 토마토 육묘의 생체중에 미치는 영향

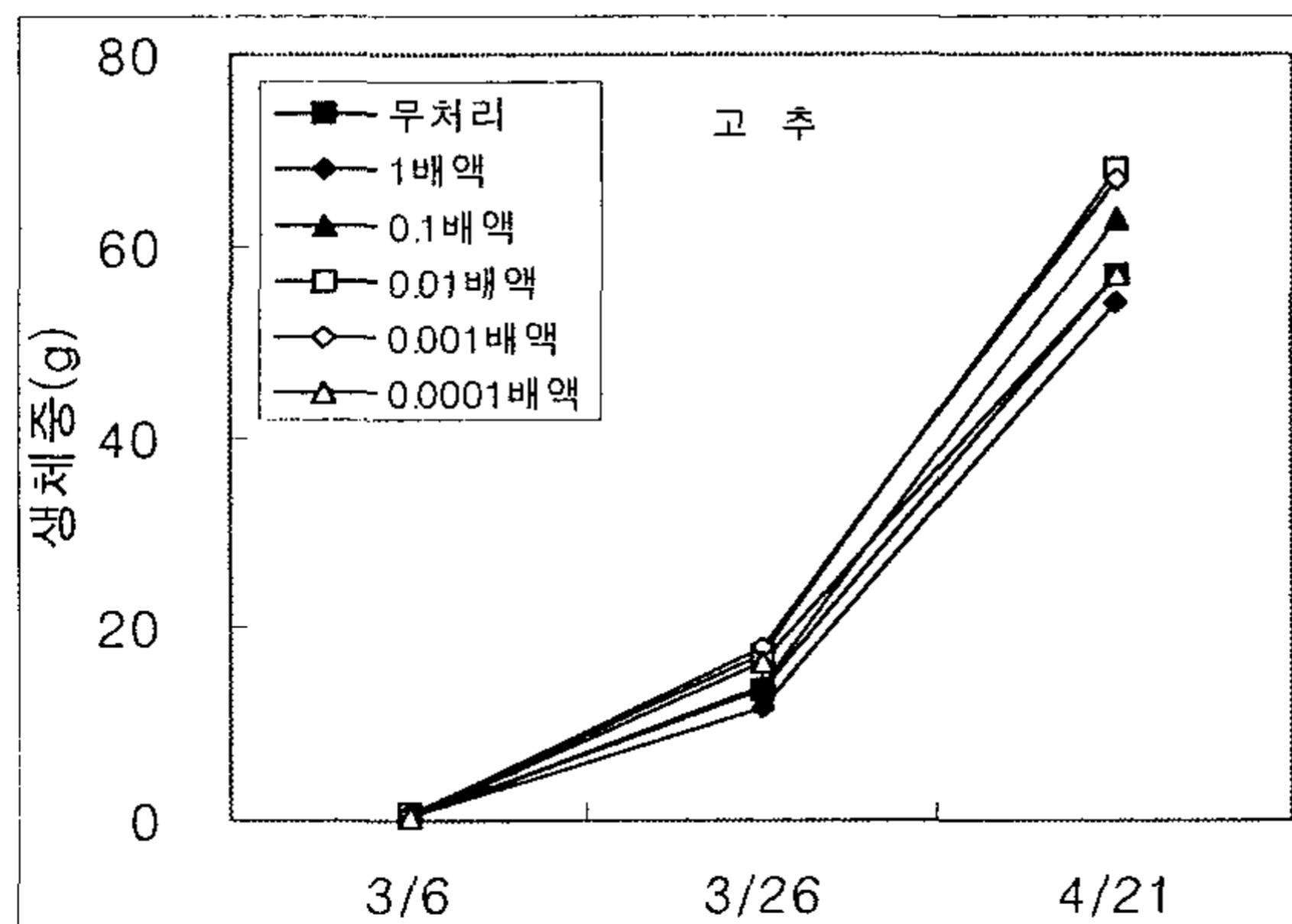


그림 85. 미생물 제제의 처리가 고추 육묘의 생체중에 미치는 영향

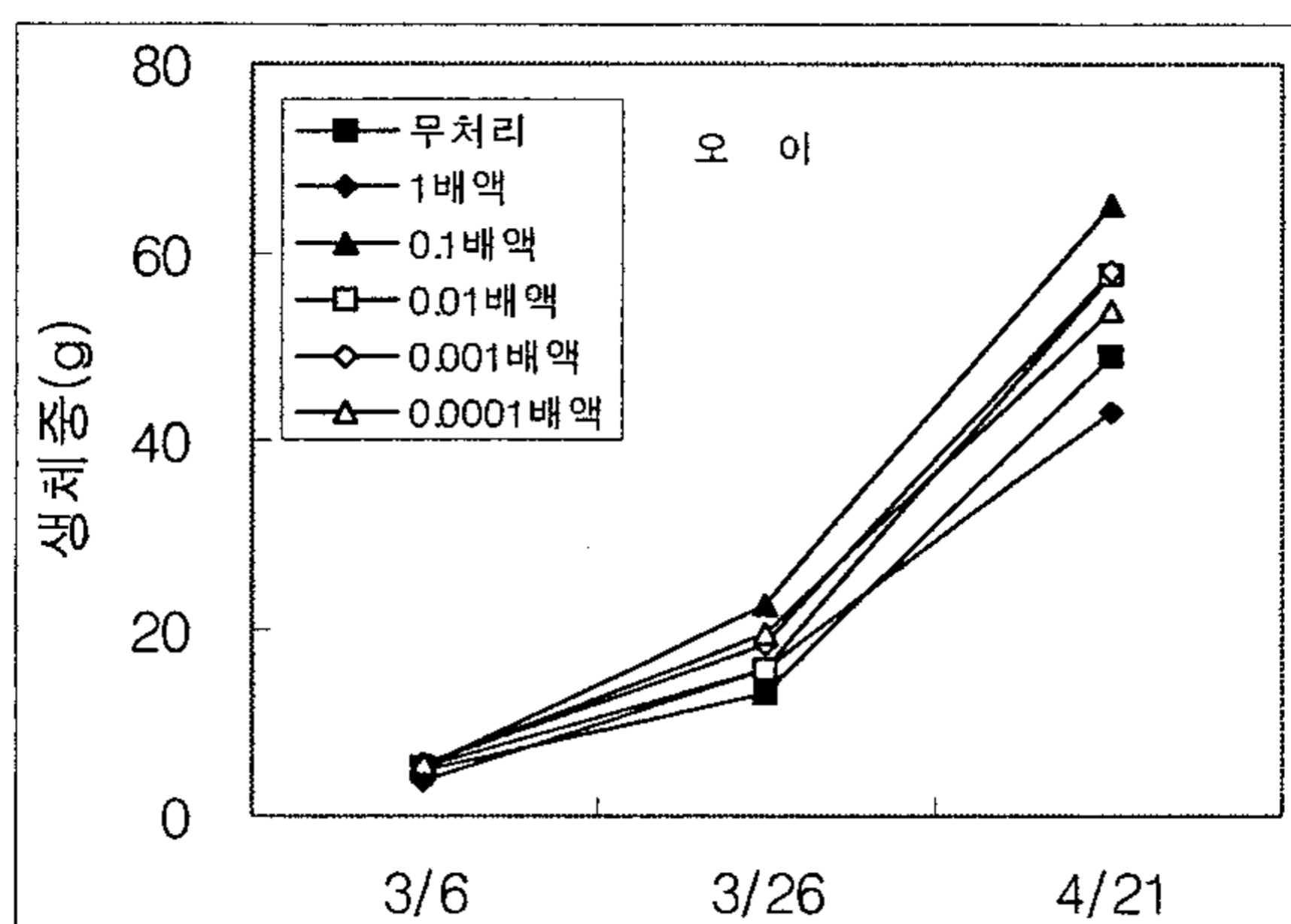


그림 86. 미생물 제제의 처리가 오이 육묘의 생체중에 미치는 영향

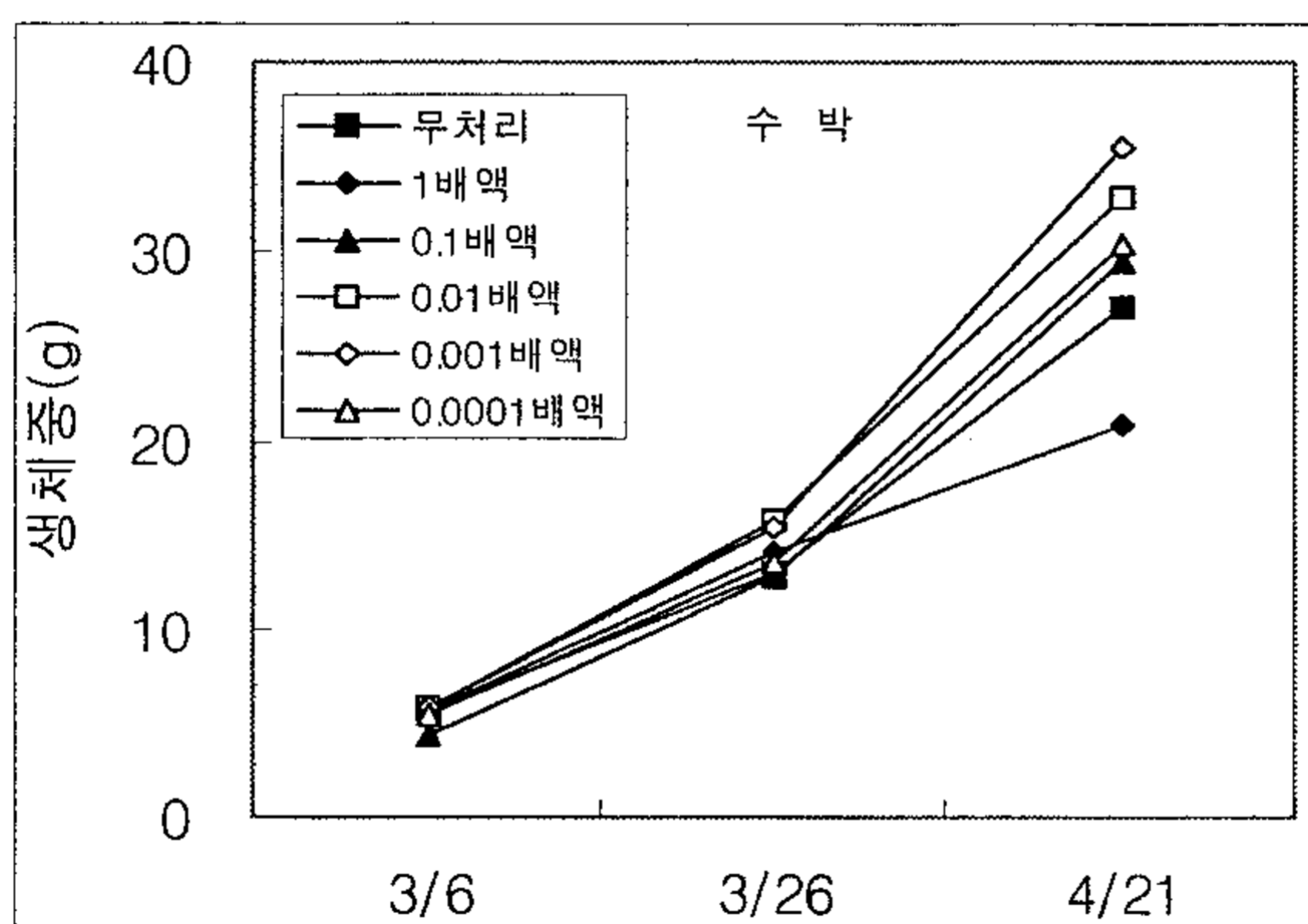


그림 87. 미생물 제제의 처리가 수박 육묘의 생체중에 미치는 영향

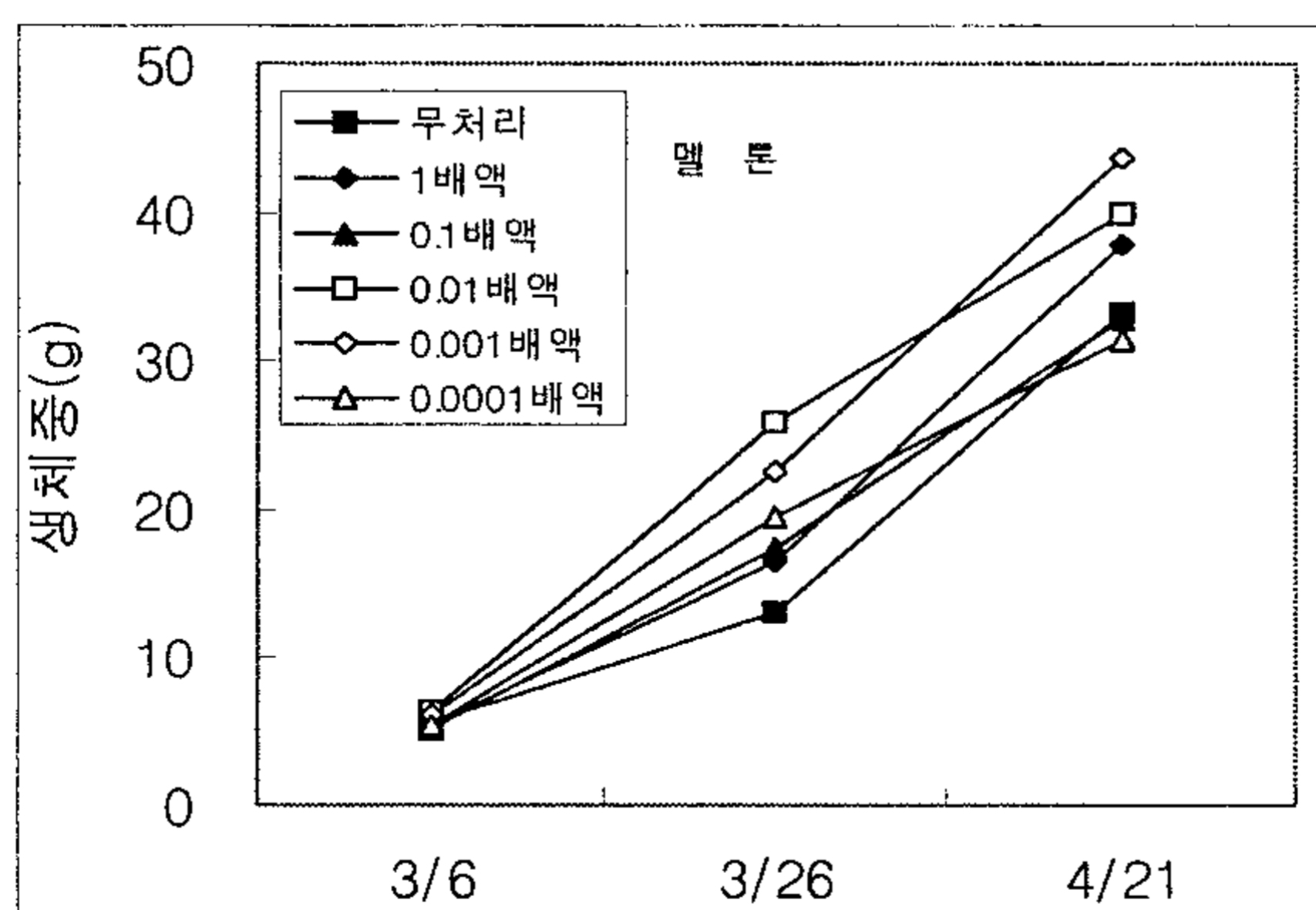


그림 88. 미생물 제제의 처리가 멜론 육묘의 생체중에 미치는 영향

미생물 제제의 처리 농도에 따른 각 작물의 근활력은 표 41과 같이 육묘중 근활력은 모든 작물에서 미생물 제제의 처리효과가 인정되어 무처리보다 미생물 제제를 처리함으로써 근활력이 좋았다. 토마토는 미생물 제제의 농도가 낮을수록 근활력이 좋았으며 0.01~0.001배액에서 각각 $56, 54\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 로 가장 좋았다. 고추, 수박 및 멜론도 토마토와 같은 경향으로 0.01~0.001배액에서 가장 근활력이 좋았다. 반면 오이는 다른 작물과 달리 1~0.01배액에서 근활력이 $51\sim 54\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 으로 가장 좋았다. 이상의 결과에서 오이를 제외한 모든 작물에서 미생물 제제를 0.01~0.001배액으로 처리하는 것이 근활력이 좋았다.

이러한 결과에서 미생물제제의 처리는 토양의 이화학적성을 개선하여 작물의 근활력을 좋게 하며 그 결과로 작물의 작물이 좋아짐을 미루어 짐작할 수 있다. 이때에 알맞은 미생물 제제의 처리농도는 토마토, 고추, 수박, 멜론은 0.01~0.001배액이고 오이는 1~0.1배액인 것으로 판단된다.

표 41. 미생물 제제의 처리농도에 따른 각 작물의 근활력

처리농도	토마토 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	고 추 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	오 이 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	수 박 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$)	멜 론 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$)
0 (무처리)	42b	40b	46b	41c	44c
1 배액	44b	46b	51a	46b	48b
0.1배액	48a	45b	54a	44b	46bc
0.01배액	56a	52a	47b	53a	55a
0.001배액	54a	53a	48b	52a	51b
0.0001배액	49a	50a	46b	48ab	49b

^b Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

표 42는 미생물 제제의 처리농도에 따른 토마토 묘의 무기양분 함량을 나타낸 것이다. 질소 및 인산함량은 미생물제제의 1배액에서 1.59%, 2.02%로 가장 많았으나 농도가 낮을수록 감소하는 경향이었으며 무처리보다 함량이 낮았다. 칼슘함량은 1% 내외로 처리간에 차이가 없었다. 마그네슘 및 나트륨 함량은 무처리보다 미생물

제제를 처리구에서 낮았다. 칼륨함량은 미생물 제제의 1배액에서 5.69%로 가장 많았고 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였다.

표 43은 미생물 제제의 처리 농도에 따른 고추 묘의 무기양분 함량을 나타낸 것이다. 질소 함량은 미생물 제제의 무처리에서 2.98%로 가장 많았으나 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였고, 칼슘 및 마그네슘 함량은 질소와 같은 경향으로 미생물 제제의 무처리에서 각각 0.94% 및 1.16%로 가장 많았으나 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였다. 인산함량은 미생물 제제의 1배액에서 1.4%로 가장 많았으나 농도가 낮을수록 감소하는 경향으로 무처리보다 함량이 낮았다. 칼륨함량은 미생물 제제의 1배액에서 6.45%로 가장 많았고 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였다. 나트륨함량은 처리 농도간에 차이가 없었다.

표 44는 미생물 제제의 처리농도에 따른 오이 묘의 무기양분 함량을 나타낸 것이다. 질소 함량은 미생물 제제의 1배액에서 1.87%로 가장 많았으며 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였고, 인산, 칼륨 및 나트륨 함량은 질소와 같은 경향으로 미생물 제제의 1배액에서 각각 1.77%, 4.34% 및 1.09%로 가장 많았으나 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였다. 칼슘함량은 무처리보다 미생물 제제의 처리구가 낮았으며 미생물 제제의 농도가 낮을수록 많은 경향이였다.

표 45는 미생물 제제의 처리농도에 따른 수박 묘의 무기양분 함량을 나타낸 것이다. 질소 함량은 미생물 제제의 1배액에서 2.82%로 가장 많았고 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였다. 인산 및 칼륨 함량도 질소와 같은 경향으로 미생물제제의 1 배액에서 각각 1.41%, 5.59%로 가장 많았으나 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였다. 칼슘함량은 미생물제제의 농도가 낮을수록 많은 경향이였고 마그네슘도 칼슘과 같은 경향으로 농도가 낮을수록 함량이 높았다.

표 46은 미생물 제제의 처리농도에 따른 멜론 묘의 무기양분 함량을 나타낸 것이다. 질소 함량은 미생물 제제의 처리가 무처리구 보다 2.27%가 낮았으며 미생물 처리 중에는 1 배액에서 2.13%로 가장 많았고 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였다. 인산 함량은 미생물 제제의 1배액에서 1.87%로 가장 높았으며 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였으며, 인산 및 칼륨 함량도 질소와 같은 경향으로 미생물 제제의 1배액에서 각각 1.87%, 4.41%로 가장 많았으나 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였다. 칼슘함량은 미생물 제제의 농도가 낮을수록 많은 경향이였고 마그네슘도 칼슘과 같은 경향으로 농도가 낮을수록 함량이 높았다.

표 42. 미생물제제의 처리농도에 따른 토마토 묘의 무기양분 함량

처리농도	T-N (%)	P ₂ O ₅ (%)	CaO (%)	MgO (%)	K ₂ O (%)	Na ₂ O (%)
0 (무처리)	1.39	1.20	0.98	0.95	4.12	0.60
1 배액	1.59	2.02	1.03	0.66	5.69	0.43
0.1배액	1.29	1.24	1.22	0.82	3.94	0.37
0.01배액	1.23	1.05	1.10	0.79	4.05	0.29
0.001배액	1.19	0.85	0.99	0.71	3.93	0.29
0.0001배액	1.11	0.79	1.01	0.70	3.37	0.31

표 43. 미생물제제의 처리농도에 따른 고추 묘의 무기양분 함량

처리농도	T-N (%)	P ₂ O ₅ (%)	CaO (%)	MgO (%)	K ₂ O (%)	Na ₂ O (%)
0 (무처리)	2.98	1.26	0.94	1.16	5.95	0.36
1 배액	2.80	1.40	0.61	0.63	6.45	0.33
0.1배액	1.52	1.06	0.64	0.63	5.11	0.29
0.01배액	1.95	1.03	0.61	0.65	4.99	0.39
0.001배액	1.94	1.08	0.66	0.67	4.79	0.33
0.0001배액	1.83	0.96	0.65	0.61	4.65	0.30

표 45. 미생물제제의 처리농도에 따른 수박 묘의 무기양분 함량

처리농도	T-N (%)	P ₂ O ₅ (%)	CaO (%)	MgO (%)	K ₂ O (%)	Na ₂ O (%)
0 (무처리)	2.30	1.03	1.33	1.18	3.86	0.52
1 배액	2.82	1.41	0.81	0.59	5.59	0.36
0.1배액	1.55	0.90	1.51	1.04	3.21	0.21
0.01배액	1.65	0.82	1.43	1.06	3.06	0.27
0.001배액	1.50	0.79	1.50	1.12	3.25	0.35
0.0001배액	1.46	0.83	1.52	1.04	2.96	0.22

표 46. 미생물제제의 처리농도에 따른 멜론 묘의 무기양분 함량

처리농도	T-N (%)	P ₂ O ₅ (%)	CaO (%)	MgO (%)	K ₂ O (%)	Na ₂ O (%)
0 (무처리)	2.27	1.25	1.09	0.91	2.92	2.84
1 배액	2.13	1.87	0.87	0.66	4.41	2.38
0.1배액	1.46	1.08	1.05	0.75	3.66	1.48
0.01배액	1.84	1.16	1.23	0.86	3.93	2.03
0.001배액	1.54	1.10	1.06	0.78	3.57	1.81
0.0001배액	1.38	0.99	1.22	0.85	3.53	1.39

미생물 제제의 처리가 과채류 육묘에 미치는 영향을 정리하면 1) 토마토, 고추, 오이, 수박 및 멜론의 각 작물 발아율은 미생물 제제 1배액에서 무처리보다 낮아 80%이하였으나 0.1배액 이하로 낮아질수록 발아율은 90% 이상 높게 나타났다. 2) 미생물 제제의 처리농도별 각 작물의 육묘중 생육을 나타낸 것으로 초장, 생체중, 및 건물중의 육묘중 생육은 미생물 제제의 처리효과가 인정되어 무처리보다 미생물 제제를 처리함으로써 좋았고 농도가 높거나 낮으면 생육이 억제되었다. 3) 토마토, 고추, 수박, 고추 및 멜론의 육묘중 생육에 적합한 미생물 제제의 처리농도는 0.01~0.001배액 이었고 오이는 0.1배액이었다. 4) 육묘중 근활력은 모든 작물에서 미생물 제제의 처리 효과가 인정되었으며, 무처리보다 미생물 제제를 처리함으로써 근활력이 좋았다. 토마토, 고추, 수박 및 멜론은 미생물 제제의 농도가 낮을수록 근활력이 좋았으며 0.01~0.001배액에서 가장 좋았다. 반면 오이는 다른 작물과 달리 1~0.01배액에서 근활력이 51~54 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 으로 가장 좋았다. 5) 식물체 무기양분함량에서 모든 작물의 질소 및 인산함량은 미생물 제제의 1배액에서 많고 농도가 낮을수록 감소하는 경향이였다. 칼륨, 칼슘, 마그네슘 및 나트륨 함량은 처리간에 경향이 달랐으며 무처리보다 미생물 제제의 처리구가 낮았다.

2) 미생물 제제가 과채류의 생육에 미치는 영향

표 47는 미생물 제제의 농도에 따른 토마토의 생육과 과실구성요소를 나타낸 것이다. 초장, 생체중, 및 건물중의 육묘중 생육은 미생물 제제의 처리효과가 인정되어 무처리보다 미생물 제제를 처리함으로써 좋은 결과를 얻었다. 지상부 및 지하부의 생체중은 0.001배액에서 각각 6,550g, 280g으로 가장 무거웠으며 건물중도 같은 경향을 보여 각각 500g, 48.9으로 가장 무거웠다. 평균 과중은 미생물 제제를 0.001배액

에서 167g으로 가장 무거웠으며 주당 착과수가 0.01~0.001배액에서 가장 많았으며 그 결과로 주당 수량도 각각 2.13kg, 2.20kg으로 무처리보다 많았다.

표 47. 미생물 제제의 처리농도에 따른 토마토의 생육

처리농도	초장 (cm)	생체중(g)		건물중(g)		평균과중 (g)	착과수 (개/주)	수량 (kg/주)
		지상부	지하부	지상부	지하부			
0 (무처리)	117.6a	5,400c	220.0c	450.0b	31.45c	150b	12.5a	1.88c
1 배액	112.6a	5,700b	210.0c	410.0b	38.38b	153b	11.6a	1.78c
0.1배액	114.7a	5,750b	220.0c	450.0b	38.28b	156b	12.2a	1.90b
0.01배액	118.8a	6,120a	250.0a	490.0a	45.70a	158b	13.5a	2.13a
0.001배액	118.0a	6,550a	280.0a	500.0a	48.91a	167a	13.2a	2.20a
0.0001배액	111.0a	6,440a	230.0b	490.0a	39.29b	157b	12.4a	1.95b

^bMean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

표 48은 미생물 제제의 농도에 따른 고추의 생육을 나타낸 것으로 초장은 미생물 제제의 처리효과가 인정되었으며, 무처리보다 미생물 제제를 처리함으로써 좋았다. 지상부의 생체중 및 건물중은 0.001배액에서 각각 640g, 75.1g으로 가장 무거웠다. 평균 과중은 처리간에 유의차가 인정되지 않았으며 주당 착과수가 0.01~0.001배액에서 가장 많았다. 표 49는 미생물 제제의 농도에 따른 오이의 생육을 나타낸 것으로 초장은 미생물 제제의 처리효과가 인정되지 않았으나 무처리보다 미생물 제제를 처리함으로써 좋았다. 지상부의 생체중 및 건물중은 0.01배액에서 가장 무거웠다. 평균과중은 미생물 제제의 0.1배액에서 169g으로 가장 무거웠고 착과수도 12.5개로 가장 많았다.

표 50는 미생물 제제의 농도에 따른 수박의 생육을 나타낸 것으로 초장, 생체중, 및 건물중의 육묘중 생육은 미생물 제제의 처리효과가 인정되었으며, 무처리보다 좋았다. 지상부의 생체중 및 건물중은 0.01배액에서 각각 3,890g, 280.9g으로 가장 무거웠다. 평균과중은 미생물 제제의 처리효과가 인정되어 0.01~0.001배액에서 가장 무거웠다. 착과수는 처리간에 유의차가 인정되지 않았으며 주당 착과수가 16개정도였

다. 표 51은 미생물 제제의 농도에 따른 멜론의 생육을 나타낸 것으로 초장, 생체중, 및 건물중의 육묘중 생육은 미생물 제제의 처리효과가 인정되었으며, 무처리보다 좋았다. 초장은 미생물제제의 0.01배액에서 78.6cm로 다른 농도에 비해 길었다. 지상부의 생체중 및 건물중은 0.01배액에서 가장 무거웠다. 평균 과중은 미생물 제제의 처리효과가 인정되어 0.01~0.001배액에서 가장 무거웠다. 착과수는 처리간에 유의차가 인정되지 않았다.

표 48. 미생물 제제의 처리농도에 따른 고추생육

처리농도	초장 (cm)	생체중(g)		건물중(g)		평균과중 (g)	착과수 (개/주)
		지상부	지하부	지상부	지하부		
0 (무처리)	53.3a	570b	53.0c	56.3b	10.7b	10.2a	142b
1 배액	48.6a	540b	56.2c	59.9b	10.6b	10.2a	145b
0.1배액	49.2a	630a	60.9b	62.0b	11.6ab	10.3a	156a
0.01배액	50.2a	630a	66.3b	71.7a	13.6a	10.3a	166a
0.001배액	50.8a	640a	71.9a	75.0a	12.8a	10.2a	163a
0.0001배액	48.6a	570b	63.7b	72.3a	12.1a	10.3a	158a

^b Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

표 49. 미생물 제제의 처리농도에 따른 오이의 생육

처리농도	초장 (cm)	생체중(g)		건물중(g)		평균과중 (g)	착과수 (개/주)
		지상부	지하부	지상부	지하부		
0 (무처리)	170.0a	4,880b	175.2b	520.0a	32.8b	156c	10.2b
1 배액	175.7a	4,310b	184.4b	510.0a	32.6b	168a	11.3b
0.1배액	179.2a	5,710a	239.0a	550.0a	37.9a	169a	12.5a
0.01배액	177.8a	5,770a	241.4a	550.0a	33.0b	162b	11.4b
0.001배액	176.4a	5,500a	221.4a	530.0a	33.4b	160b	11.2b
0.0001배액	176.5a	5,370a	197.4b	530.0a	33.4b	157c	11.3b

^b Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

표 50. 미생물 제제의 처리농도에 따른 수박의 생육

처리농도	초장 (cm)	생체중(g)		건물중(g)		과중 (kg)	착과수 (개/주)
		지상부	지하부	지상부	지하부		
0 (무처리)	170.4a	2,710c	51.6b	250.0b	8.3b	1,260b	1.5a
1 배액	152.5a	2,080c	58.2a	250.0b	8.4b	1,370b	1.6a
0.1배액	177.2a	3,340b	53.1b	227.4a	8.5b	1,380b	1.6a
0.01배액	173.5a	3,890a	59.1a	280.9a	9.2a	1,460a	1.6a
0.001배액	179.9a	3,540ab	59.5a	276.0a	10.3a	1,470a	1.6a
0.0001배액	187.1a	3,040b	58.3a	220.0b	9.7a	1,400a	1.6a

^b Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

표 51. 미생물 제제의 처리농도에 따른 멜론의 생육

처리농도	초장 (cm)	생체중(g)		건물중(g)		과중 (g)	착과수 (개/주)
		지상부	지하부	지상부	지하부		
0 (무처리)	55.3b	1,320b	36.2b	110.0b	5.1b	850b	0.8a
1 배액	57.9b	1,800b	34.5b	120.0b	5.9b	860b	0.9a
0.1배액	58.4b	1,290b	29.7b	120.0a	5.6b	890ab	0.9a
0.01배액	78.6a	2,000a	65.9a	126.0a	12.3a	950a	0.8a
0.001배액	61.0b	1,380b	40.6b	110.0b	6.5b	960a	0.9a
0.0001배액	53.8b	1,130b	32.9b	110.0b	5.0b	880ab	0.8a

^b Mean separation within columns by Duncan's multiple range test at $p \leq 0.05$.

미생물 제제의 처리가 과채류의 생육에 미치는 영향을 정리하면 아래와 같다. 1) 토마토, 고추, 수박, 고추 및 멜론의 초장, 생체중, 및 건물중 등 초기생육에 적합한 미생물 제제의 처리농도는 0.01~0.001배액이었고 오이는 0.1배액이었다. 2) 토마토는 지상부 및 지하부의 생체중은 0.001배액에서 각각 6,550g 및 280g으로 가장 무거웠으며 건물중도 같은 경향을 보여 각각 500g 및 48.9g으로 가장 무거웠다. 평균과중

은 미생물 제제를 0.001배액에서 167g으로 가장 무거웠으며 주당 착과수가 0.01~0.001배액에서 가장 많았으며 그 결과로 주당 수량도 각각 2.13kg, 2.20kg으로 무처리보다 많았다. 3) 고추는 지상부의 생체중 및 건물중은 0.001배액에서 각각 640g, 75.1g으로 가장 무거웠다. 평균 과중은 처리간에 유의차가 인정되지 않았으며 주당 착과수가 0.01~0.001배액에서 가장 많았다. 4) 오이는 지상부의 생체중 및 건물중은 0.01배액에서 가장 무거웠다. 평균 과중은 미생물 제제의 0.1배액에서 169g으로 가장 무거웠고 주당 착과수도 12.5개로 가장 많았다. 5) 수박은 지상부의 생체중 및 건물중은 0.01배액에서 각각 3,890g, 280.9g으로 가장 무거웠다. 평균과중은 미생물 제제의 처리효과가 인정되어 0.01~0.001배액에서 가장 무거웠다. 착과수는 처리간에 유의차가 인정되지 않았으며 주당 착과수가 16개정도였다. 6) 멜론은 지상부의 생체중 및 건물중은 0.01배액에서 가장 무거웠다. 평균과중은 미생물 제제의 처리효과가 인정되었으며, 0.01~0.001배액에서 가장 무거웠다. 착과수는 처리간에 유의차가 인정되지 않았다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표의 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도		달성도 (%)
	착안 사항	척도(점수)	
1차년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> ● 균주의 대량생산기술 개발 (플라스크 규모) <ul style="list-style-type: none"> • 배지조건의 최적화 • 배양조건의 최적화 ● 미생물 제제의 생산기술 개발 (실험실 규모) <ul style="list-style-type: none"> • 왕겨를 이용한 미생물 제제 생산 • 미강을 이용한 미생물 제제 생산 ● 효과 검정 및 용도 개발 (포트 규모) <ul style="list-style-type: none"> • 효과검정 • 토양의 물리·화학적 변화 검토 	15 15 20 20 20 10	100
2차년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> ● 균주의 대량생산기술 개발 (생물배양기 규모) <ul style="list-style-type: none"> • 배지조건의 최적화 • 배양조건의 최적화 ● 미생물 제제의 생산기술 개발 (pilot 규모) <ul style="list-style-type: none"> • 왕겨를 이용한 미생물 제제 생산 • 미강을 이용한 미생물 제제 생산 ● 효과 검정 및 용도 개발 (포장 규모) <ul style="list-style-type: none"> • 효과검정 • 토양의 물리·화학적 변화 검토 	15 15 20 20 20 10	100
3차년도 (2006)	<ul style="list-style-type: none"> ● 균주의 대량생산기술 개발 (pilot 규모) <ul style="list-style-type: none"> • 배지조건의 최적화 • 배양조건의 최적화 ● 미생물 제제의 생산기술 개발 (시제품 생산 규모) <ul style="list-style-type: none"> • 왕겨를 이용한 미생물 제제 생산 • 미강을 이용한 미생물 제제 생산 • 왕겨와 미강을 이용한 미생물 제제의 생산 ● 효과 검정 및 용도 개발 (용도 개발) <ul style="list-style-type: none"> • 용도개발 • 토양의 물리·화학적 변화 검토 	15 15 15 15 10 20 10	100
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ● 균주의 대량생산기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 배지조건의 최적화 • 배양조건의 최적화 ● 미생물 제제의 생산기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 왕겨를 이용한 미생물 제제 생산 • 미강을 이용한 미생물 제제 생산 • 왕겨와 미강을 이용한 미생물 제제의 생산 ● 효과 검정 및 용도 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 효과 검정 • 용도 개발 • 토양의 물리·화학적 변화 검토 	15 15 15 15 10 10 10	100

제2절 관련분야의 기여도

1. 기술적 측면

가. 섬유소 분해효소 생산균주 동정

토양에서 분리한 섬유소 분해효소 생산 균주를 16s rDNA의 염기서열 및 *gyrase* 유전자의 염기서열을 확인하여 균주를 동정하였으며, 이 균주가 생산하는 섬유소 분해효소에 대한 특성을 전문학술지에 발표하였다.

나. 섬유소 분해효소 생산균주의 대량 생산 기술 개발

왕겨와 쌀겨를 탄소원으로 섬유소 분해효소 생산균주를 대량 배양하는 조건을 최적화하였으며, 이를 바탕으로 농업 부산물을 이용한 섬유소 분해효소 생산 기술을 확립하였다. 본 연구에서 얻은 결과와 공정개발 전문가들의 자문으로 섬유소 분해효소의 대량 생산공정을 확립하였다. 또한, 본 연구 결과를 바탕으로 농업 부산물을 이용한 바이오 에탄올의 생산에 대한 가능성을 확립하였다.

다. 섬유소 분해효소의 특성 연구 및 섬유소 분해효소 생산 공정 개발

섬유소 분해효소를 생산하는 균주를 배양한 배양액에서 섬유소 분해효소를 분리·정제하였으며, 정제된 섬유소 분해효소를 사용하여 섬유소 분해효소의 기질 특이성, 최적 반응 pH 및 안정성, 최적 반응 온도 및 안정성과 특정한 기질에 대한 k_m 및 V_{max} 값을 측정하였다. 또한, 섬유소 분해효소 유전자를 cloning하여 섬유소 분해효소 유전자의 염기 서열 및 섬유소 분해효소를 구성하는 아미노산의 서열을 결정하였다.

라. 미생물 제제의 생산 기술 개발

본 연구를 통하여 섬유소 분해효소 생산균주의 배양액과 왕겨와 쌀겨를 사용하여 미생물 제제를 생산하기 위한 섬유소 분해효소 생산 균주의 접종량, 수분함량 및 배양온도 등을 최적화하여 미생물 제제를 생산하는 기술을 개발하였으며, 생산된 미생물 제제의 보관 방법을 최적화하였다.

마. 미생물 제제의 효과 검정 및 용도 개발

본 연구의 결과로 제조한 미생물 제제에 대한 효과 검정을 동아대학교 생명자원과학대학 및 원예연구소 시설원예시험장에서 포트 및 포장에서 실시하였으며 상추, 배추, 딸기 및 토마도와 같은 작물을 대상으로 하였다. 미생물 제제를 처리한 포장의 미생물 상의 변화 및 유기물과 무기물의 변화를 측정하여 미생물 제제의 처리가

토양에 미치는 영향을 검토하였다. 토양에 처리한 미생물 제제가 작물에 미치는 효과 외에 미생물 제제가 상토제로서의 기능을 검토하였다.

2. 경제·산업적 측면

가. 왕겨와 쌀겨를 이용한 미생물 제제의 생산에 의한 도정 공업의 경쟁력 증가

환경 오염성 부산물인 왕겨 및 쌀겨를 이용하여 미생물 제제를 생산한다면 각 도정 공장에서 발생하는 부산물을 처리하기 위해 소비되는 비용을 절감할 수 있으며 이는 농업에 기반을 두고 있는 벼 도정 공장의 생산성 향상에 도움이 되며 이들 기업의 시장 경쟁력이 상승되는 것이다. 현재 각 도정 공장에서 사용되지 않아 보관 중인 왕겨의 양은 점차적으로 증가하는 추세이며 보관상의 문제와 공간의 부족 등으로 도정 비용을 상승시키는 원인이 되고 있다. 왕겨 및 쌀겨와 같이 벼의 도정 공정에서 발생하는 부산물의 재활용 기술이 개발되지 않는다면 쌀의 개방에 의한 저가의 외국산 쌀이 도입될 경우, 국내 도정 공장의 채산성을 악화시키는 새로운 요인이 될 것이다.

나. 왕겨와 쌀겨를 이용한 유기질 비료의 생산과 이용 증대

배추, 시금치, 상추 등을 포함하는 시설작물의 재배 면적은 1998년 현재 약 75,812 ha이며 이 시설작물에 소요되는 상토제의 양은 약 820,00 톤 정도로 추산된다. 상토제의 가격을 kg당 400원으로 계산하면 시설 작물에 소요되는 상토제의 총 가격은 약 3,600 억원이 된다. 따라서 본 연구에서 개발한 기술을 사용하여 왕겨와 쌀겨를 이용하여 유기질 비료를 생산한다면 농업 부산물을 재활용하여 양질의 유기질 비료를 대량 생산할 수 있을 것이며 이는 우수한 유기질 비료의 이용 증대를 의미하는 것이다.

3. 연구논문 발표 및 특허 등록

본 연구에서 동정한 섬유소 분해효소 생산균주 및 이를 이용한 섬유소 분해효소 생산에 대한 연구 결과를 전문학술지에 1편 발표하고 국내외 학술대회에서 9편 발표하였다. 또한, 미생물 제제 및 미생물 제제를 생산하는 방법에 대한 특허를 대한민국 특허청에 등록하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 연구개발결과의 활용 계획

1. 특허 등록 및 기술거래소를 통한 기술 이전

본 연구 사업의 결과로 얻어진 기술은 특허를 출원하여 지적 재산권으로 보호를 받을 것이며 지적 재산권은 동아대학교 기술이전센터, 서울기술거래소 및 부산 기술거래소와 같은 공인된 기술거래소에 등록하여 본 연구과제에서 얻어진 기술을 상품화하여 일반 기업에서 기술료를 지불하고 사용할 수 있도록 할 것이다.

2. 미생물 제제의 대량 생산 및 산업화

기술거래소를 통한 기술의 이전은 본 연구 과제의 연구 결과뿐만 아니라 본 연구과제의 결과를 산업화시킬 수 있는 know-how까지를 포함한다. 즉, 본 연구 과제에 참여하였던 신진연구 인력을 중심으로 미생물 제제를 대량으로 생산한다는 가정하에 추정된 생산량은 표 4와 같다. 초기 생산양은 전국 시장과 지리적으로 가능한 부산과 경남·북의 시장 규모를 바탕으로 계획하였다. 부산과 경남·북의 가능한 시장 규모에서 기술적인 면과 경제성을 고려하여 계획한 점유율은 효모사료, 상토제 및 유기질 비료가 각각 5%, 0.1% 및 15%이며 이 수치를 바탕으로 한 초기 판매액을 약 42 억원이며 물량으로 약 10 톤 이었다.

표 52. 사업계획 대상 품목의 시장규모 (단위; 백만원, 1999년 현재)

품명	전국시장 규모	유효시장 규모	가능한 시장규모 (부산, 경남·북)	사업 계획량 (톤)
효모사료	231,800	231,800 (100%)	53,892	2,695
상토제	3,145,685	3,145,685 (100%)	1,075,201	1,075
유기질 비료	55,045	11,315 (20%)	3,076	460
합계	3,432,530	3,388,800	1,132,166	4,230

제2절 타 연구에의 응용

1. 연구과제 개발

본 연구에서 개발한 섬유소 분해효소 및 이를 사용하여 농업 부산물에서 바이오 에탄올을 생산하는 기술의 개발에 대한 가능성을 확인하였으며, 이에 대한 구체적인 연구 계획을 생물산업에 관련된 기업체들과 준비 중이다. 즉, 본 연구에서 개발한 공정을 이용하여 아래 그림과 같이, 왕겨를 탄소원으로 사용하여 섬유소 분해효소를 대량으로 생산하는 공정을 개발하고 생산된 섬유소 분해효소를 왕겨에 처리하여 왕겨를 포도당과 같은 단당류로 분해한 다음, 이 단당류를 사용하여 에탄올 발효 및 고분자 중합체 생산에 이용할 것이다.

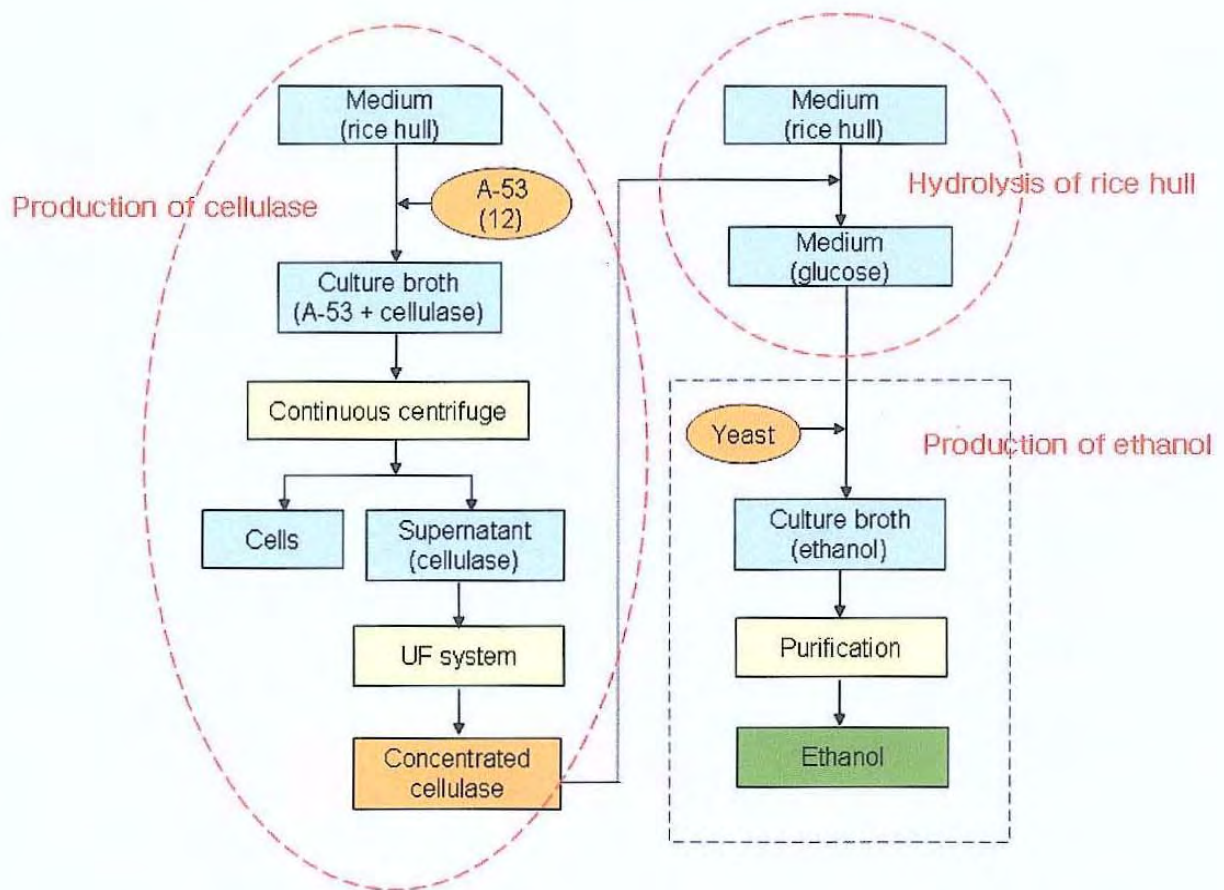


Fig. 89. 섬유소 분해효소 생산균주의 대량생산 및 섬유소 분해효소 생산을 이용한 바이오 에탄올의 생산

2. 국제공동 연구

말레이시아의 경우에 팜오일을 생산하는 과정에서 많은 양의 팜오일박이 생산되고 있으나, 현재는 태워서 처분하고 있으나 이산화탄소의 배출량이 많으므로 생물학적인 처리를 할 계획이다. 본 연구를 통하여 *B. amyloliquefaciens* DL-3 균주는 팜오일박을 유일한 탄소원으로 사용하여 생육함을 확인하였다. 이는 섬유소 분해효소를 생산하는 *B. amyloliquefaciens* DL-3 균주가 농업 부산물인 왕겨와 미강은 물론, 팜오일박을 재활용할 수 있는 능력이 입증되었다고 판단된다. 또한, 본 연구 결과를 바탕으로 말레이시아의 팜오일 업체와 팜오일박의 재활용에 대한 연구를 토의하고 있는 중이다.

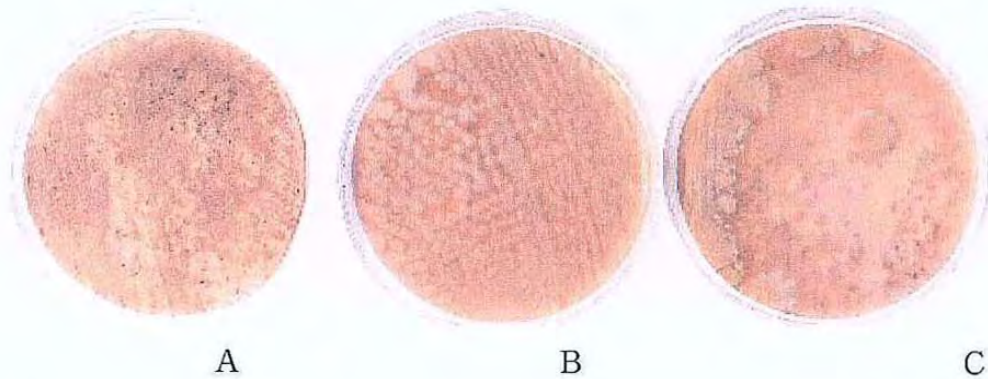


그림 90. *B. amyloliquefaciens* DL-3 균주의 팜오일박 이용성 (A; 팜오일박, B; 팜오일박과 효모 추출물 및 C; 팜오일박, 효모추출물 및 무기염)

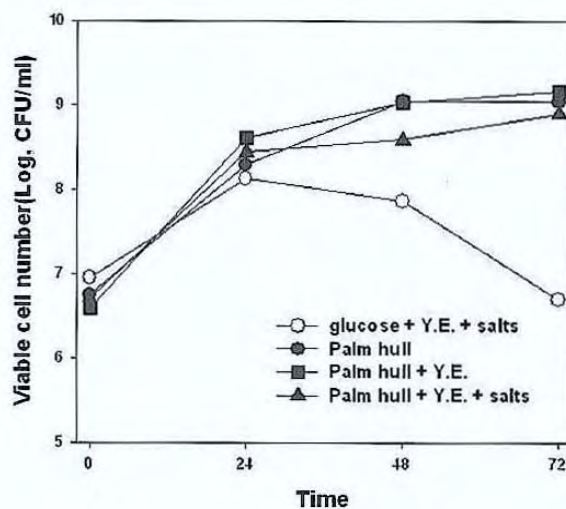


그림 91. 팜오일박을 이용한 *B. amyloliquefaciens* DL-3 균주의 생육

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

제 7 장 참고문헌

- Ashadi, R. W., K. Shimokawa, and K. Ogawa. 1996. The mechanism of enzymatic cellulose degradation (II). mode of action of cellulose hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger* UC. J. Gen. Appl. Microbiol. 42:103-108.
- Azizah, A. H. and Y. S. Luan. 2000. Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. Food Chem. 68:15-19.
- Bakare, M. K., I. O. Adewale, A. Ajayi and O. O. Shonukan. 2005. Purification and characterization of cellulase from wild-type and two improved mutants of *Pseudomonas fluorescens*. Afri. J. Biotechnol. 4:898-904.
- Bataillon, M. A., P. N. Cardinali, N. Castillon and F. Duchiron. 200. Purification and characterization of a moderately thermostable xylanase from *Bacillus* sp. strain SPS-0. Enzyme Microb. Technol. 26:187 - 192.
- Beguin, P., J. Millet, S. Chauvaux, K. Tokatlidid, K., Navas, J., Fujini, T., Lemaire, M., Raynaud, O., Daniel, and J. P. Aubert. 1992. Bacterial cellulase. Biochem. Soc. Trans., 20, 42-46.
- Betella, C., I. Ory, C. Webb, D. Cantero and A. Bkandino. 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. Biochem. Eng. J. 26:100-106.
- Bhat, M. K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application. Biotechnol. Adv.15:583-620.
- Haki, G. D. and S. K. Rakahit. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. Biores. Technol. 89:17-34.
- Haq, I., H. Ashraf, J. Iqbal and M. A. Qadeer. 2003. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. Biores. Technol. 87:57-61.
- Ikeda, Y., E. Y. Park and N. Okuda. 2006. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. Biores. Technol. 97:1030-1035.
- Johnvesly, B., S. Virupakshi, G. N. Patil, Ramalingam and G. R. Naik. 2002. Cellulase-free thermostable alkaline xylanase from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. J. Microbiol. Biotechnol. 12; 153-156.
- Juhász, T., Z. Szengyel, K. Reczey, M. Siika-Aho and L. Viikari. 2005. Characterization of cellulase and hemicellulases produced by *Trichoderma*

- reesei* on various carbon source. *Process Biochem.* 40:3519-3525.
- Kang, S. W., Y. S. Park, J. S. Lee, S. I. Hong, S. W. Kim. 2004. Production of cellulase and hemicellulases by *Aspergillus niger* KK2 from lignocellulosic biomass. *Biores. Technol.* 91:153-156.
- Lapdot, A., A. Mechaly, and Y. Shoham. 1996. Overexpression and single-step purification of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *J. Biotechnol.* 51:259-264.
- Lee, S. M. and Y. M. Koo. 2001. Pilot-scale production of cellulose using *Trichoderma reesei* Rut C-30 in fed-batch mode. *J. microbiol. Biotechnol.* 11: 229-233.
- Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E., and A. L. Burton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Anal. Biochem.*, 2, 127-132.
- Murashima, K., T. Nishimura, Y. Nkamura, J. Koga, T. Moriya, N. Sumida, T. Yaguchi, and T. Kono. 2002. Purification and characterization of new endo-1,4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enz. Microb. Technol.* 30:319-326.
- Pattana, P., R. Khanok and L. K. Khin. 2000. Isolation and properties of a cellulosome-type multienzyme complex of the thermophilic bacteroides sp. strain P-1. *Enzyme Microb. Tceh.* 26:459-465.
- Pelach, M. A., F. J. Pastor, J. Puig, F. Vilaseca, and P. Mutje. 2003. enzymatic deinking of old newspaer with cellulase. *Pro. Biochem.* 38:1063-1067.
- Sá-Pereira, P., J. Duarte and M. Costa-Ferreira. 2000. Electroelution as a simple and fast protein purification method: isolation of an extracellular xylanase from *Bacillus* sp. CCM1 966. *Enzyme Microb. Technol.* 27:95 - 99.
- Sharma, A. S. K. Khare, and M. N. Gupta. 2001. Hydrolysis of rice hull by crosslinked *Aspergillus niger* cellulase. *Biores. Technol.* 78:281-284.
- Tanaka, T., M. Hoshina, S. Tanabe, K. Sakai, S. Ohtsubo and M. Taniguchi. 2006. Production of D-lactic acid from deffated rice bran by simutaneous saccharification and fermentation. *Biores. Technol.* 97:211-217.
- Wen, Z., W. Liao and S. Chen. 2005. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manre. *Biores. Technol.* 96:491-499.
- Wyk, J. P. H. and M. Mohulatsi, M. 2003. Biodegradation of wastepaper by

- cellulase from *Trichoderma viridae*. *Biores. Technol.* 86:21-23.
- Xia, L. and S. Xueliang. 2004. High-yield cellulase production by *Trichoderma reesei* ZU-02 on corn cob residue. *Biores. Technol.* 91:259-262.
- Too, S. S, K. C. Kim, Y. A. Oh, S. Y. Chung and S. J. Kim. 2002. The high production of cellulotic enzyme using cellulosic waste by a fungus, strain FJ1. *Kor. J. Microbiol Biotechnol.* 30:172-176.