

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001356-01

고상발효를 이용한 에너지 이용효율 개선용 미생물 제제
개발

(Development of microbial feed additive for improving the
efficiency of energy utilization using solid state
fermentation)

서울대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고상발효를 이용한 에너지 이용효율 개선용 미생물 제제 개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 9 일

주관연구기관명 : 서울대학교
주관연구책임자 : 교수 하종규
세부연구책임자 : 교수 하종규
연 구 원 : 서자겸
연 구 원 : 박민우
연 구 원 : 박은혜
연 구 원 : 박탄술
연 구 원 : 윤지수
협동연구기관명 : (주)진바이오텍
협동연구책임자 : 강정선
연 구 원 : 조원탁
연 구 원 : 조경진
연 구 원 : 권기현
연 구 원 : 김재영

요 약 문

I. 제 목

고상발효를 이용한 에너지 이용효율 개선용 미생물 제제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

사료 성분 중 동물의 배설량에 가장 크게 영향을 주는 성분은 섬유소인데, 이 성분은 소, 면양 등 반추동물의 경우 반추위내에 서식하고 있는 미생물이 분비하는 효소에 의해 가수분해되어 영양소로 이용될 수 있다. 그러나 돼지, 닭과 같은 단위동물은 섬유소를 소화하지 못하기 때문에 사료에 cellulase, xylanase, amylase 등의 복합 효소를 첨가할 필요가 있다.

사료효율 개선 및 면역증진 등의 목적으로 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Aspergillus* 균주들을 주로 사용하고 있으나, 이들 미생물은 섬유소 분해효소(cellulase family) 활성이 극히 미미하거나 없는 경우가 대부분이다.

cellulolytic biomass 분해활성이 높은 미생물 균주를 찾는 연구는 현재 전 세계적으로 진행되고 있다. 특히 반추위는 섬유소 분해균주가 다양하게 존재하는 곳으로서 섬유소 분해활성이 높은 미생물도 다량 존재하는 것으로 보고되고 있지만, 이러한 미생물을 실용화한 실적은 미흡한 수준이다.

섬유소 분해효소(Endoglucanase, Exoglucanase, B-glucanase)는 식품 및 사료산업에서 널리 이용되고 있다. 이들 효소를 생산하는 미생물로는 *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas* 등이 있는데, 이들 미생물 중 생균제로 활용 가능한 균주는 극히 제한적이어서 *Aspergillus*, *Bacillus* 등을 들 수 있다. 현재 판매되고 있는 미생물 제제의 경우 미생물 균주 자체에만 초점이 맞춰져 있고 균주가 가진 효소활성에 대한 기준은 없다. 따라서 생균제와 효소제를 별도로 사용함으로써 경제적 손실을 초래할 수 있다. 그렇지만, 고역가의 효소를 생산하는 미생물 제제를 개발할 수 있다면 더욱 경제적으로 동물을 사육할 수 있을 것이다.

미생물제제는 장내 유익균총의 성장 증진을 통한 체내 면역증진의 효과가 확인되고 있으며, 최근 소비자의식 변화로 인해 안전한 축산물에 대한 요구가 높아지면서 축산물 내 잔류하는 항생제를 최소화하기 위한 노력들이 진행되고 있다. 이러한 일련의 노력 중 항생제 대체제로서의 생균제의 기능이 부각되고 있다.

일반적으로 생균제는 액상발효 방법을 통해 제조하고 있는데, 액상발효의 경우 미생물 균체량을 늘리기에는 좋은 방법이 될 수 있으나, 미생물이 가진 다양한 효소를 발현하는 미생물제제의 생산에는 적합한 방법이 아니다. 반면, 고상발효를 통한 미생물 제제 생산기술은 사료로 사용되는 고체원료를 미생물이 필요로 하는 영양소로 이용하기 때문에 미생물 균체의 직접적인 공급 뿐만 아니라, 다양한 미생물 대사산물도 동시에 공급하는 장점을 지니고 있다. 특히 섬유소 분해 효소와 같은 중요한 기능을 갖는 기능성 물질의 생산을 극대화 할 수 있는 이상적인 방법이 될 수 있다.

따라서 본 과제는 섬유질 분해 효소의 활성이 우수한 미생물 균주를 선발하고, 효소활성이 극대화될 수 있도록 미생물 제제를 개선한 후 이들을 고상발효 방법으로 대량 생산하고자 한다. 개발 될 미생물 제제는 효소 분비와 기존의 생균제의 기능을 동시에 갖고 있기 때문에 미생물 제제의 급이 만으로도 동물 체내의 에너지 이용성을 증진시키고 생산성을 개선하는 효과를 기대할 수 있을 것으로 예상된다. 특히 미생물 효소에 대한 주관기관의 다년간의 연구 경험과 협동기관인 (주)진바이오텍이 수년간 다져온 고상발효기술을 접목한다면 미생물 제제가 가진 대사산물의 발현이 극대화될, 새로운 개념의 미생물제제 생산 공정의 개발 가능성은 높다고 하겠다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 가축의 에너지 이용효율을 개선할 목적으로, 반추위 미생물과 자연계에 존재하는 미생물 중 섬유소 분해활성이 우수한 균주를 선발하고, 이들을 이용한 고상발효 공정을 통해 미생물 제제를 개발하여 생산비용 절감 및 농가소득증대를 달성하기 위하여 실시되었다.

1. 섬유소 분해효소 활성 우수 균주 개발

가. 미생물 선발방법 확립

- 섬유소 분해 균주 screening 기법에 관한 문헌조사 및 기법 도입

나. 섬유소 분해능 우수 미생물 선발 및 동정

- 확립된 screening 기법을 도입하여 반추동물의 반추위 및 발효 식품군에서 target 미생물을 선발

다. 섬유소 분해활성 증대 및 효율화 방안 연구

- 효소의 활성 증가 방안에 대한 문헌조사 및 도입

라. 섬유소 분해활성 유전자 선발

- 반추위 내 섬유소 분해 미생물의 endoglucanase gene 선발.

마. 섬유소 분해활성 개선 미생물 개발

- 고전적 mutation과 genome shuffling을 이용하여 섬유소 분해 활성이 증가된 미생물을 개발함.

바. 고상발효를 위한 특성분석

- 고상발효된 제품의 반추위 내 소화율을 *in vitro* 실험으로 평가.

사. 동물 실험을 통한 최종 개발 미생물제제 효능평가 (*in vitro*, *in situ*, *in vivo*)

- 소화율, 반추위 발효 성장 및 생균제 특성 평가
- 위액과 분변의 장내 미생물 균총 변화 조사

- 육계사양실험을 통한 생산성 평가

2. 고상발효 공정을 통한 고효성 섬유소 분해효소 함유 미생물 제제 생산기술 개발

가. 미생물 발효공정 확립

- 고상발효 및 액상발효공정에 대한 자료조사
- 액상 및 고상발효 공정을 이용한 cellulase 활성 검증

나. 원료 별 dietary fiber 함량 조사

- 대표적인 사료자원에 대한 dietary fiber 분석 조사
- 효소활성능 증대를 위한 발효용 최적 사료자원 선정

다. 효소활성 분석법 확립

- 사료공정서 및 추가 방법 조사를 통한 분석방법 확립

라. 고상발효공정 개발

- 선발균주의 발효공정 개발을 위한 기초자료조사 (최적배지, 수분량, 발효시간 등)

마. 선발 균주 특성분석

- 선발 미생물 및 효소의 열안정성 검증

바. 대량 생산 공정 확립

- 대량생산을 위한 생산 공정/조건 확립
- 시제품 생산

사. 개발제품의 안정성 테스트

- 보관기간 및 저장조건에 따른 미생물 균수, 효소활성변화 조사

아. 경쟁제품과 비교 평가

- 시장 주요미생물 제제에 대한 효소활성 비교 평가

IV. 연구개발결과

1. 섬유소 분해효소 활성 우수 균주 개발

가. 미생물 선별방법 확립

- filter paper degradation 관찰법, Congo red staining 방법, chromogenic cellulose의 lysis 측정법 중 가장 효율적이라고 판단되는 방법으로 dyed-cellulose를 이용한 agar plate법을 확정하고 이를 통해 미생물을 screening 하였다.

나. 섬유소 분해능 우수 미생물 선발 및 동정

- 제조된 screening plate를 사용하여 반추동물의 반추위에서 38종, 발효 식품군에서 10종의 미생물을 분리하여 동결보관하였다. 반추위에서 분리한 미생물은 *Bacillus licheniformis*, 젓갈과 같은 발효 식품군에서 분리한 미생물은 *Bacillus subtilis* 로 동정되었다.

다. 섬유소 분해활성 증대 및 효율화 방안 연구

- 1년차 연구에서 선발된 균주 (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*)를 섬유소 분해 역가 향상을 위하여 traditional mutation method (U.V. irradiation, EMS treatment)와 genome shuffling을 도입하여, EMS 돌연변이주인 P11 은 25%, genome shuffling 돌연변이주인 GS2 은 100% 정도의 역가향상을 보였다.

라. 섬유소 분해활성 유전자 선발

- 1년차 연구에서 선발된 반추위 내 섬유소 분해 미생물 (*Eubacterium cellulosolvens*)에서 endoglucanase gene (cel5A)을 선발함. cel5A gene이 전이된 *E. coli*를 선발하고 endoglucanase activity를 확인하였다.

마. 섬유소 분해활성 개선 미생물 개발

- 선발된 *Bacillus sp.* #6 의 CMCase 효소 역가는 0.04U/ml 이었으며, avicelase 와 xylanase를 측정한 결과 이들 효소의 역가는 무시할 정도였다. 최적 pH와 반응온도는 pH 5와 50°C이었고 이 때의 CMCase 효소 활성은 0.072U/ml 이었다.
- EMS 처리를 한 P11을 trypan blue screening plate를 이용하여 가장 우수한 돌연변이주로 선발하였다. 돌연변이주 P11의 CMCase 효소활성은 pH 6.6, 37°C에서 0.05U/ml 이었고, 최적 pH와 온도는 pH 5와 50°C 이었다.

바. 고상발효를 위한 특성분석

- 선발된 *Bacillus sp.* #6 균주의 최적의 발효시간은 72시간이었고, 최적의 기질 대 수분 비율은 1:1이었다.
- 조사료에 20% *Bacillus sp.* #6 제제를 첨가하였을 때, 건물 소화율이 25.8% 향상되었다.

사. 동물 실험을 통한 최종 개발 미생물제제 효능평가 (in vitro, in situ, in vivo)

- In vitro 소화율 실험 결과에 의하면 *Bacillus sp.* #6 균주 처리구의 소화율이 상대적으로 대조구보다 월등히 유의적으로 높았다($P<0.05$). 미생물제제 처리구에서 휘발성 지방산 (VFA) 생산이 많았는데 이는 사료 내 섬유소가 많이 분해될 수 있도록 탄수화물과 단백질의 A fraction이 미생물제제 첨가에 의해 높아졌기 때문으로 보인다.
- In situ 건물 소실율은 *Bacillus sp.* 6번 균주 처리구가 대조구에 비해 9h에서 48h 동안 유의적인 차이를 나타내었다. 단백질 소실율에서도 마찬가지로 In situ 건물소실율의 결과와 비슷한 패턴을 보였고, 대조구와 처리구간의 소실율 차이가 6h에서 48h 동안에 20% 이상이었다 ($P<0.05$).
- in vitro 발효 후 DNA 기술을 이용한 미생물 군집의 변화 조사결과 처리구에서 섬유소 분

해 박테리아와 methanogen 의 감소 등이 관찰되었다.

- 0.05% oxgall을 첨가한 배지상에서 일정수준의 성장을 보인 점으로 보아 고상발효 미생물 제제가 내담즙성이 있는 것으로 판정되었다.
- pH 2.5, 3 과 같은 산성 조건에서도 미생물 제제의 효소역가가 가장 높게 측정되었던 pH 5 와 비슷한 정도의 CFU를 보였다.
- 외관상 소화율과 질소 평형 실험 결과에 의하면 Bacillus 6번 균주 고상발효제제의 급여 효과는 전반적으로 뚜렷하지 않았다. 반추위 대사특성 및 분과 위액에서의 미생물 군집 변화 결과에서도 처리구간에 유의적인 차이를 확인할 수 없었다.
- 단위동물에의 고상발효 미생물 제제의 효능을 알아보기 위하여 육계를 이용한 사양시험을 진행한 결과 0.1%의 fermentation enzyme 처리구에서 증체량, 사료효율, 진정대사에너지와 그 이용효율에서 가장 유의적인 효과를 나타내었다.

2. 고상발효 공정을 통한 고효성 섬유소 분해효소 함유 미생물 제제 생산기술 개발

가. 미생물 발효공정 확립

- *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* 및 *Trichoderma reesei* 균주를 이용한 액상 및 고상발효 테스트를 하여 그 효소활성을 비교한 결과 모든 균주별에서 액상발효 보다는 고상발효공정에서 높은 효소활성을 나타내었고, 탄소원을 많이 함유한 소맥피 (C/N ratio : 20) 에서 높은 효소 발현을 나타냈다.

나. 원료 별 dietary fiber 함량 조사

- 세포막의 총 NSP 함량은 조섬유소 함량이 비교적 높은 소맥피에서 높게 나타났으며, pentosan과 hemicellulose 함량 역시 높은 수준으로 조사되었다. 대두박의 경우 total NSP 함량이 가장 낮게 조사되었으며, 상대적으로 peptosan 함량이 높게 조사되었다. 또한, 옥수수 수의 경우 hemicellulose 함량이 높게 조사되었다.
- cellulose 및 hemicellulose 함량이 높은 원료인 소맥피가 cellulase 생산을 위한 최적의 발효원료인 것으로 판단되었다.

다. 효소활성 분석법 확립

- DNS를 이용한 환원당 측정방법 중 buffer 조성 및 추출시간, 효소활성의 정의 등에서 차이를 보이는 3가지 분석방법을 비교하였다.
- 제조샘플의 효소활성을 잘 표현할 수 있는 disodium hydrogen phosphate-citric acid buffer 와 DNS solution을 활용하여 환원당을 정량하는 분석방법을 본 과제 진행을 위한 표준 분석방법으로 선정하였다.

라. 고상발효공정 개발

- *Bacillus sp.* #6 와 mutation 균주인 P11, 반추위에서 분리한 *B. licheniformis* G7 균주를 원료조성 별로 발효 실험한 결과 C/N ratio 10정도인 SW배지(대두박+소맥피, 6: 4)가 최적으로 판단되었다.

- cellulose, cellobiose, lactose 과 같은 탄소원의 최적 첨가 수준은 5% 인 것으로 확인되었다.
- nitrogen source 로 urea를 4% 첨가하였을 때 cellulase 활성이 50% 이상 증가되었다.
- 발효형태에 있어서는 Mutant strain p11균주는 호기발효에서 높은 효소활성이 확인되었고, *Bacillus sp.* #6균주는 혐기발효공정에 더 적합한 균주로 p11균주에 비해 30%이상 높은 효소활성을 나타내었다.
- 최적의 수분함량은 65%인 것으로 확인되었으나, 대량생산에서의 문제점 때문에 최적 수분함량을 50%수준으로 결정하였다.
- 온도, 접종량, pH, 발효시간에 따른 효소활성 평가결과 p11 균주는 40℃, #6 균주는 35℃로, 나머지 조건은 10⁶CFU/g, 최적 pH는 5이상, 최적 발효시간은 60시간으로 설정하고 pilot scale 시험생산조건으로 확정하였다.

마. 선발 균주 특성분석

- Mutant strain p11 균주는 100℃에서 10분간 처리하여도 균수의 저하는 거의 없었다. 반면, 효소역가는 60℃ 10분 처리까지는 안정적이었으나, 70℃이상의 온도에서는 효소활성의 저하가 확인되었으며, 100℃, 10분 처리 시 50% 수준의 효소활성을 나타내었다.

바. 대량 생산 공정 확립

- 대량생산을 위해 선발균주별 예비 고체발효실험을 진행한 결과 *B. subtilis* #6 균주의 경우 1,500 U/g 수준으로 꾸준한 cellulase 활성을 나타내어 대량생산을 위한 후보 균주로 선정하였다.
- *B. subtilis* #6 균주의 단독발효가 G7 균주와의 복합발효보다 높은 효소활성을 나타내었다.
- 최적 효소활성 및 미생물 균수를 나타내는 시간이 42시간으로 확인되어 대량생산 공정에서는 발효시간을 기존 60시간에서 42~45시간으로 단축시킬 수 있을 것으로 확인하였다.
- cellulase 생산에 있어서 충분한 aeration은 *B. subtilis* #6의 배양에 필수적인 조건으로 판명되었다.

사. 개발제품의 안정성 테스트

- 최종 6개월 후 cellulase 활성은 초기 대비 약 87% 수준까지 감소하는 것으로 확인되었으나, 미생물 균수는 10⁹ cfu/g 수준을 유지하는 것을 확인하였다.

아. 경쟁제품과 비교 평가

- 생균제는 *Bacillus* 제품 2종, 유산균 제품 2종 및 효모 제품 2종으로 크게 나눠 비교한 결과, Pilot scale 공정을 통해 생산된 제품(mutant p11)은 타 생균제 샘플에 비해 최대 80% 이상 효소활성이 높았으며, 균수 측면에서도 4.0X10⁹CFU/g으로 타 생균제에 비해 월등히 뛰어난 제품으로 평가되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 섬유소 분해 활성을 가진 반추위 미생물 및 유전자원의 확보
- 새로운 개념의 친환경 기능성 미생물제제를 위한 고상발효 기술 개발
- 섬유소 분해효소를 분비하는 미생물 제제의 사용을 통해 환경 부하 저감기술 확보
- 효소함유 미생물제 개발을 통한 항생제 대체제 시장 확대
- 섬유소 분해 촉진을 통한 소화계 질병예방 및 환경개선을 통한 생산비용 절감 및 농가소득 증대
- 친환경 저비용 고상발효기술의 개발 및 제품생산능력 확대를 통한 제품의 경쟁력 강화
- 사료용 미생물제제 시장 선점을 통한 수출증대효과
- Biomass를 이용한 바이오에너지 생산을 위한 효소제 개발 분야의 연구역량 축적

Summary

(영문 요약문)

I . Title

Development of microbial feed additive for improving the efficiency of energy utilization using solid state fermentation.

II . Objectives and importance of the Study

Among the feed ingredient, fiber is the most significant component which affect the excretion level of the animal. In the case of ruminants, such as cattle and sheep, can utilize fiber as nutrient, thanks to hydrolase activity secreted by rumen microorganisms. In contrast pigs, chickens and other monogastric animals cannot digest fiber in the feed, and therefore the necessity of adding the enzyme complex consisted of cellulase, xylanase and amylase is increasing.

Although *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Aspergillus spp.* have been utilized for the purpose of improving feed efficiency and enhancement of immune response, the cellulase activity of those microorganisms is usually very low or no activity.

Extensive research activities to find microorganisms which have high cellulolytic biomass-degrading activity is now underway around the world. The rumen harbors a variety of microorganisms which have high cellulase activity, however, industrial application of these microbes is still limited.

Cellulase (Endoglucanase, Exoglucanase, B-glucanase) has been widely used in food and feed industry. These enzymes are primarily produced by *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas*. But among these microbes, possibility of being a candidate as probiotics is extremely restricted (only *Aspergillus* and *Bacillus* are used as probiotics). In the case of currently used probiotics on market, only their microbial population is of concern without consideration of microbial enzyme activity. Thus, both probiotics and enzymes separately have to be supplemented. Therefore, probiotics with the potency of high enzyme activity may become excellent choice for our animal industry.

The probiotics can enhance the immune response through the promotion of beneficial intestinal microbes' population. The need for safe livestock product has been increased due to the recent changes in consumer awareness, so the efforts to reduce antibiotic residues in livestock product are underway. As part of these efforts, the function of probiotics as alternative to antibiotics has emerged.

In general, probiotics are manufactured through a liquid fermentation which is a good way to increase the microbial population, but this is not suitable method for production of adequate probiotics to produce various kinds of enzymes. However, the technique of solid

state fermentation for probiotics production can utilize the solid substrate as nutrient for microbial growth, in addition to direct supply of microbial biomass, supplying a variety of microbial metabolites at the same time is also the benefits of using SSF technique. Especially, the SSF technique can be an ideal option for production of functional materials such as cellulolytic enzymes.

In this project, we planned to select the microorganism which has high cellulase activity and the SSF technique will be used for enhancing the microbial enzyme activity to promote the probiotics and for the mass production of it. Because the probiotics which will be developed, has the enzyme secretion ability and the functionality of existing probiotics, we can expect the effect of our probiotics will enhance the availability of energy in the animal body and promote the productivity. Especially, if the SNU's many years research experience about microbial enzymes and cooperative institutions, Genebiotech's solid-state fermentation technique will be combined, development of probiotics which maximized its expression of metabolites and new concept of probiotics production process will be highly possible.

III. Scope of Studies

In this research, for the purpose of improving the efficiency of energy utilization of livestock animals, we tried to select microorganisms with high cellulolytic activity from the rumen or other environmental niches and to develop microbial feed additives by solid-state fermentation.

1. Development of excellent cellulolytic microorganisms

- a. Establishment of microbial selection methods
 - Searching screening methods to find cellulolytic microorganisms.
- b. Selection of excellent cellulolytic microorganism and its identification
 - Selection of target microorganism from the rumen or fermented foods using established screening method.
- c. Improvement of cellulolytic activity and its efficiency
 - Searching methods for enhancing enzyme activity and its application.
- d. Selection of cellulolytic gene
 - Selection of endoglucanase genes from rumen cellulolytic microorganism.
- e. Development of microorganism having improved cellulolytic activity
 - Development of microorganism having improved cellulolytic activity by classical

mutation and genome shuffling.

f. Characterization for solid-state fermentation

- Evaluation of ruminal digestibility of SSF product in in vitro experiments.

g. Confirmation on efficacy of final microbial feed additives through animal experiments (in vitro, in situ, in vivo)

- Effect on digestibility and rumen fermentation.

- Change of intestinal microbial population in the rumen and feces.

- Estimation of productivity through feeding trial with broilers

2. Development of production technique of microbial feed additives containing high cellulase activity through the solid-state fermentation

a. Establishment of microbial fermentation process

- Comparative study on solid-state fermentation and liquid fermentation process.

- Verification of cellulase activity using liquid and solid state fermentation process.

b. Research on dietary fiber content of feeds

- Dietary fiber fraction of typical feeds.

- Selection of feeds for SSF.

c. Establishment of enzyme activity assay

- Search for proper assay methods for enzymes.

d. Development of solid-state fermentation process

- Search for optimum condition for fermentation process with selected microorganism (optimal media, water content, fermentation time, etc).

e. Characterization of selected microorganism.

- Verification of thermal stability of selected microorganism and its enzyme.

f. Establishment of mass production process

- Establishment of mass production process and condition

- Production of prototype product

g. Test of developed product's stability

- Changes in number of microbes and enzyme activity

h. Comparison with competitive products.

- Comparison with microbial feed additives on the market.

IV. Research and development results

1. Development of excellent cellulolytic microorganisms

a. Establishment of microbial selection methods

- Among the several methods such as filter paper degradation, congo red staining, lysis of chromogenic cellulose and agar plates with dyed-cellulose, the last one was chosen as most efficient and reliable method to screen out cellulolytic microorganisms.

b. Selection of excellent cellulolytic microorganism and its identification

- Using the prepared screening plates, we isolated 38 microorganisms from rumen and 10 microorganisms from fermented foods and stored frozen. The microorganism which was isolated from rumen was identified as *Bacillus licheniformis*, and the microorganism which was isolated from fermented food was *Bacillus subtilis*.

c. Research on Increasing cellulolytic activity and its efficiency

- In the 1st year studies, we selected two microorganisms (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*) and to enhance enzyme activity of those two microbes, we used the traditional mutation method (U.V. irradiation, EMS treatment) and genome shuffling. The enzyme activity was increased by 25% for P11 which was treated with EMS, 100% for GS2 which was mutated by genome shuffling method.

d. Selection of cellulolytic gene

- We selected endoglucanase gene (Cel5) from cellulolytic bacteria, *Eubacterium cellulosolvens* which was ruminal microorganism isolated during the 1st year research. And the selected endoglucanase gene was transformed into the *E. coli* and confirmed its enzyme activity.

e. Development of microorganism with improved cellulolytic activity

- The enzyme activity of selected *Bacillus sp.* #6 was 0.04U/ml and activity of avicelase and xylanase was negligible. Optimal pH and temperature was pH 5 and 50°C, respectively and CMCase enzyme activity was 0.072U/ml at optimum condition.
- EMS-treated P11 was selected as the best mutant by screening with trypan blue plate. The mutants P11's CMCase enzyme activity was 0.05U/ml at the condition of pH 6.6 and 37°C. And the optimal pH and temperature was pH 5 and 50°C, respectively.

f. Characterization for solid-state fermentation

- Optimal fermentation time for *Bacillus sp.* #6 was 72 hour and optimal substrate-to-water ratio was 1:1.
- When added 20% *Bacillus sp.* #6 to the forage, the dry matter digestibility was improved by 25.8%.

g. Test of efficacy of final developed microbial feed additives through animal experiment (in vitro, in situ, in vivo)

- The results of in vitro digestibility experiment showed significant difference between control and treatment with *Bacillus #6* ($P < 0.05$). There was also large difference in VFA production, which is believed due to increased A fraction of CHO and CP in the substrate during fermentation with the microbial additive treatment.
- There was significant difference in the in situ dry matter disappearance rate between the control group and *Bacillus sp.* #6 treatment group during the 9 hour to 48 hour incubation. Similar pattern was also observed in the protein disappearance rate with more than 20% differences ($P < 0.05$).
- Judging from the amount of DNA isolated from in vitro rumen samples, the cellulolytic bacteria and methanogen population was decreased.
- It seemed that the microbial product had bile acid tolerance at lower than 0.05% oxgall. *Bacillus sp.* #6 has some degree of resistance compared with other probiotics such as *L. bulgaricus* and *L. lactis* which are sensitive at the low level of bile acid.
- When we checked the acid tolerance at the pH 2.5, and pH 3, the CFU at the acidic condition show similar compared with pH 5 which was optimal condition for enzyme activity of microbial feed additive.
- Supplementation of *Bacillus sp.* #6 did not give any significant influences on apparent digestibility and nitrogen balance. Rumen fermentation and microbial population in the ruminal fluid and feces were not affected by the treatment with microbial feed additive.
- To evaluate the effect of microbial feed additive on the monogastric animal, we conducted feeding trial with broilers. And the results showed that the group which was treated with 0.1% fermentation enzyme had significant effect on body weight gain (BWG), feed conversion rate, true metabolize energy (TME) and its efficiency.

2. Development of production technique of microbial feed additives containing high cellulase activity through the solid-state fermentation.

a. Establishment the microbial fermentation process

- Through the comparison of enzyme activity of *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei* after liquid and solid state fermentation, the enzyme activity of solid state fermentation was higher than liquid one. And wheat bran with high carbon

source (C/N ratio : 20) had high degree of enzyme secretion.

b. Research of dietary fiber content of each feed

- The total NSP content of the cell membrane was high in the wheat bran which had high crude fiber content, and the content of pentosan and hemicelluloses was also high. In the soybean meal, total content of NSP was lowest and pentosan content was relatively high. And in the case of corn, the hemicellulose content was high.
- For the efficient cellulase production, wheat bran was selected as optimal substrate for solid-state fermentation because of its high content of cellulose and hemicellulose.

c. Establishment of enzyme activity assay

- Three assay methods having different procedures for detecting reducing sugars were compared to find best method.
- The assay which use disodium hydrogen phosphate-citric acid buffer and DNS solution was chosen for the standard method in our project, because of its ability to express the prepared samples' enzyme activity.

d. Development of solid-state fermentation process

- From the results of fermentation according to the type of substrate with *Bacillus sp.* #6 and mutant P11 and *B. licheniformis* G7 isolated from the rumen, SW media (soybean meal + wheat bran, 6:4 and C/N ratio = 10) was chosen for the optimal media composition.
- The optimum level of carbon sources such as cellulose, cellobiose and lactose was about 5%.
- The cellulase activity was increased by 50% when urea was added as nitrogen source.
- In the form of fermentation type, at the aerobic fermentation condition, mutant P11 had higher activity, and *Bacillus sp.* #6 was proper candidate for anaerobic fermentation condition and had more than 30% higher activity than mutant P11.
- Although the optimal water content was determined as 65%, we chose 50% because of the problems in mass production.
- For the determination of optimal fermentation condition, 40°C for mutant P11, 35°C for *Bacillus sp.* #6, and other factors (amount of inoculums = 10^6 CFU/g, more than pH 5, fermentation for 60 hour) was applied for the test conditions of pilot scale production.

f. Characterization of selected microorganism

- There was little effect on the number of mutant P11 even at 100°C for 10 min. On the other hand, the enzyme activity was stable after treatment with 60°C for 10 min. However after treatment at higher than 70°C, loss of enzyme activity was detected. And after treatment with 100°C for 10 min, 50% level of enzyme activity was observed.

- g. Establishment of mass production process
- Through the result of conducting preliminary research with each selected microorganisms for the mass production, *B. subtilis* #6 was finally chosen as candidate because of its maintenance of high cellulase activity at about 1,500 U/g.
 - The fermentation of *B. subtilis* #6 alone had higher enzyme activity than fermentation together with *B. licheniformis* G7.
 - Optimal fermentation time was 42 hours in subsequent studies so that in the mass production, fermentation time will be able to be shortened from 60 hours to 42~45 hours.
 - Sufficient aeration was an essential culture condition for *B. subtilis* #6 for the production of cellulase.
- h. Test of developed product's stability
- Though the cellulase activity was approximately 87% compared to the initial level, the number of microorganism was maintained about 10^9 cfu/g after 6 months of storage.
- i. Comparison with other commercial products
- *Bacillus sp.* #6 produced by pilot scale processing had more than 80% higher enzyme activity compared with other probiotic samples. And in terms of microbial population of *Bacillus sp.* #6, the degree 4.0×10^9 CFU/g was absolutely high. So, solid-state fermentation product of *Bacillus sp.* #6 is a far superior product than other products.

V. Utilization of research results and achievements

- Isolation of cellulolytic microorganism from the rumen.
- Development of solid-state fermentation technique to produce environmental friendly and functional microbial feed additives.
- Securement of the technique for reducing environmental load through utilization of microbial additives which express cellulolytic enzymes.
- Development of microbial feed additives having high cellulolytic enzymes activities as antibiotic alternatives.
- Increasing farm income through reducing production costs and digestive disease prevention and environmental improvement, promoted by enhancing cellulolytic activity.
- Enforcement of product's competitiveness through development of environmental friendly solid-state fermentation technique and production capacity.
- Increasing exports through the sales of microbial feed additive.
- Accumulation of research capacity of enzyme production for the production of bio-energy utilized biomass.

CONTENTS

(영 문 목 차)

1. Overview of Research and development project	22
2. Domestic and international technology developments	23
1) Comparison between domestic and international technology	23
2) Patent analysis	23
a. Range of patent analysis	23
b. The relationship with this research according to patent analysis	24
3) Literature analysis	25
a. Range of literature analysis	25
b. The relationship with this research according to literature analysis	25
4) Product and market analysis	26
a. Production and market status	26
3. Contents and results of research performed	27
1) Establishment of microbial selection methods	27
a. Observation	27
b. Congo-red staining	27
c. Chromogenic cellulose method	27
2) Selection of excellent cellulolytic microorganism	28
a. Selection of excellent cellulolytic microorganism from the rumen	28
b. Selection of excellent cellulolytic microorganism from food group	31
3) Characterization of enzyme expression according to fermentation method	34
a. Comparison of enzyme activity with liquid and solid-state fermentation	34
4) Selection of media for solid-state fermentation and investigation of dietary fiber fraction of each diet	37
a. Studies on general composition and dietary fiber fraction of each diet	37
b. Selection of grain media content for optimal fermentation of microbes	38
5) Establishment of enzyme activity assay	40
a. Cellulase assay-1	40
b. Cellulase assay-2	41
c. Cellulase assay-3	43
d. Enzyme activity analysis	45
6) Development of improved cellulolytic microbes	46
a. Target of experiment	46
b. Materials and methods	46

c. Results and discussion	49
7) Screening of cellulolytic enzyme gene	56
a. Screening of cellulolytic microbes from the rumen	56
b. Isolation and analysis of cellulase gene	59
8) Development of improved strains by transformation	61
a. Used microbes and plasmid	61
b. Cellulase gene cloning and confirmation of transformants	62
c. Measurement of CMCase activity	62
d. Isolation and manipulation of DNA	62
e. Confirmation of transformant and its enzyme activity	62
f. Utilization strategy for the strains	65
9) Final selection and characterization of microbes for solid-state fermentation	65
a. Selection and identification of strong cellulolytic microbes from nature	65
b. Development of excellent cellulolytic microbes using classical mutation	67
c. Characterization of selected strains' cellulolytic ability	68
d. Production of cellulase using solid-state fermentation	73
10) Development of pilot scale process of each selected strains	78
a. Characteristics of selected strains according to C/N ratio	78
b. Characteristics of solid fermentation according to type of carbon source	81
c. Mineral addition effect	85
d. Fermentation characteristics depending on the type of nitrogen source	85
e. Effect of simultaneous treatment of carbon and nitrogen source on enzyme activity	90
f. Changes in enzyme activity according to the type of fermentation	90
g. Fermentation characteristics according to the initial water content of solid media	92
h. Effect of fermentation temperature	93
i. Change of enzyme activity due to inoculation level	94
j. Effect of initial pH	95
k. Setting the optimal fermentation time	95
l. Setting the optimal condition for solid-state fermentation	96
11) Evaluation of fermentation characteristics at the optimal condition of pilot scale	97
a. Setting the fermentation condition of liquid inoculum	97
b. Evaluation of fermentation characteristics at the optimal fermentation condition	99
c. Comparison with competitive products	100
12) Evaluation of selected microbes	102
a. Thermal stability	102
b. Product shelf life testing	102

13) Establishment of pilot scale solid-state fermentation process	103
a. Target of experiment	103
b. Materials and methods	103
c. Results	105
d. Discussion	108
14) Product shelf life testing	108
a. Purposes	108
b. Materials and methods	109
c. Results	109
15) Evaluation of SSF microbial feed additive's efficacy	110
a. Target of experiment	110
b. Materials and methods	110
c. Results	113
d. Discussion	120
16) Feeding trial of ruminant with SSF microbial feed additive	122
a. Target of experiment	122
b. Materials and methods	122
c. Results	124
d. Discussion	130
17) Evaluation of SSF microbial feed additive through feeding trial of monogastric animal	131
a. Target of experiment	131
b. Experiment 1	132
c. Experiment 2	134
d. Discussion	137
 4. Achievement and contribution to livestock industry	 138
 5. The results of research and its application plan	 140
1) The direction of developed techniques and its expectation	140
2) Information of patent	140
3) Performance issues during the research	141
4) Analysis of product and market	143
 6. Collection of related foreign science technology related to present research	144
1) Technique to improve the microbes enzyme activity and its application	144
2) Comparison between liquid and solid-state fermentation	145
 7. Reference	 148

목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	22
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	23
제 1 절. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교	23
제 2 절. 특허분석	23
제 1 항. 특허분석 범위	23
제 2 항. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성	24
제 3 절. 논문분석	25
제 1 항. 논문분석 범위	25
제 2 항. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성	25
제 4 절. 제품 및 시장 분석	26
제 1 항. 생산 및 시장현황	26
제 3 장. 연구개발 수행 내용 및 결과	27
제 1 절. 미생물 선발방법 확립	27
제 1 항. Observation	27
제 2 항. Congo-red staining	27
제 3 항. Chromogenic cellulose method	27
제 2 절. 섬유소 분해 활성 우수 미생물 선발	28
제 1 항. 반추동물의 반추위에서 섬유소분해 활성이 우수한 박테리아 선발	28
제 2 항. 식품군에 존재하는 섬유소 분해 활성 우수균주 선발	31
제 3 절. 미생물 발효 방법에 따른 효소발현 특성	34
제 1 항. 액상발효 및 고상발효를 통한 효소활성 비교	34
제 4 절. 원료별 dietary fiber 분획조사 및 고상발효용 배지선정	37
제 1 항. 원료별 일반성분 및 dietary fiber 분획 조사	37
제 2 항. 미생물 발효 및 대사물질 생산에 최적의 곡물배지조성 선정	38
제 5 절. 효소활성 분석법 확립	40
제 1 항. Cellulase 분석법-1 : 사료공정서 분석법	40
제 2 항. Cellulase 분석법 2	41
제 3 항. Cellulase 분석법 3	43
제 4 항. 효소활성 분석결과	45
제 6 절. 섬유소 분해 활성 증가 미생물 개발	46
제 1 항. 실험 목표	46
제 2 항. 실험 재료 및 방법	46
제 3 항. 결과 및 고찰	49

제 7 절. 섬유소 분해효소 유전자 선발	56
제 1 항. 반추동물의 반추위로부터 섬유소 분해 균주선발	56
제 2 항. 섬유소 분해효소 유전자 분리 및 분석	59
제 8 절. 효소활성이 개선된 형질전환 균주 개발	61
제 1 항. 사용균주 및 plasmid	61
제 2 항. Cellulase gene cloning 및 형질전환 균주의 확인	62
제 3 항. CMCase 활성 측정	62
제 4 항. DNA 분리와 조작	62
제 5 항. 형질전환 균주 확인 및 효소역가 확인	62
제 6 항. 균주 활용방안	65
제 9 절. 고상발효를 위한 최종 미생물 선발 및 특성 평가	65
제 1 항. 섬유소 분해력이 높은 자연계 미생물 선발 및 동정	65
제 2 항. 고전적 mutation을 이용한 우수 섬유소 분해 균주 개발	67
제 3 항. 선발된 균주의 섬유소 분해 특성 조사	68
제 4 항. 고상발효를 통한 섬유소 분해 효소의 생산	73
제 10 절. 선발균주별 pilot scale 공정 개발을 위한 기초자료 조사	78
제 1 항. C/N ratio에 따른 선발균주의 고체발효 특성	78
제 2 항. 탄소원의 종류에 따른 고체발효 특성	81
제 3 항. Mineral 첨가에 따른 영향	85
제 4 항. 질소원의 종류에 따른 발효특성	85
제 5 항. 탄소원 및 질소원의 동시 처리가 효소활성에 미치는 영향	90
제 6 항. 발효형태에 따른 효소활성 변화	90
제 7 항. 고체배지의 초기 수분함량에 따른 발효특성	92
제 8 항. 발효 온도에 따른 영향	93
제 9 항. 종균 접종량에 따른 효소활성 변화	94
제 10 항. 초기 pH에 따른 영향 조사	95
제 11 항. 최적 발효시간 설정	95
제 12 항. 최적 고체발효조건 결정	96
제 11 절. 최적조건에서의 pilot scale 발효특성 평가	97
제 1 항. 액상종균의 발효조건 결정	97
제 2 항. 최적 발효조건에서의 발효특성 평가	99
제 3 항. 경쟁제품 비교평가	100
제 12 절. 선발 미생물의 특성평가	102
제 1 항. 내열성 평가	102
제 2 항. 제품 저장성 테스트	102
제 13 절. 대량 고체발효 공정 확립	103
제 1 항. 실험 목표	103
제 2 항. 재료 및 방법	103
제 3 항. 결과	105
제 4 항. 고찰	108

제 14 절. 저장안정성 평가	108
제 1 항. 목적	108
제 2 항. 재료 및 방법	109
제 3 항. 결과	109
제 15 절. 고상발효 미생물제제의 효능평가	110
제 1 항. 실험 목표	110
제 2 항. 실험 재료 및 방법	110
제 3 항. 결과	113
제 4 항. 고찰	120
제 16 절. 고상발효 미생물 제제의 반추동물 대사 실험	122
제 1 항. 실험 목표	122
제 2 항. 실험 재료 및 방법	122
제 3 항. 결과	124
제 4 항. 고찰	130
제 17 절. 단위동물 사양실험을 통한 고상발효제제의 효과 평가	131
제 1 항. 실험 목표	131
제 2 항. 실험 1 : 섬유소 분해활성이 우수한 미생물제제의 급여가 육계의 성장, 도체중 및 장내균총에 미치는 영향	132
제 3 항. 실험 2 : 섬유소 분해활성이 우수한 미생물제제의 강제급여가 소화율에 미치는 영향 측정	134
제 4 항. 고찰	137
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	138
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획	140
제 1 절. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과	140
제 2 절. 특허출원 내용	140
제 3 절. 과제기간 중 논문실적	141
제 4 절. 제품 및 시장분석 측면	143
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	144
제 1 절. 군주의 활성증가 방안 탐색 및 활용	144
제 2 절. 액상발효 및 고상발효 공정 비교	145
제 7 장 참고문헌	148

제 1 장. 연구개발과제의 개요

사료 성분 중 동물의 배설량에 가장 크게 영향을 주는 성분은 섬유소인데, 이 성분은 소, 면양 등 반추동물의 경우 반추위내에 서식하고 있는 미생물이 분비하는 효소에 의해 가수분해되어 영양소로 이용될 수 있다. 그러나 돼지, 닭과 같은 단위동물은 섬유소를 소화하지 못하기 때문에 사료에 cellulase, xylanase, amylase 등의 복합 효소를 첨가할 필요가 있다.

사료효율 개선 및 면역증진 등의 목적으로 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Aspergillus* 균주들을 주로 사용하고 있으나, 이들 미생물은 섬유소 분해효소(cellulase family) 활성이 극히 미미하거나 없는 경우가 대부분이다.

cellulolytic biomass 분해활성이 높은 미생물 균주를 찾는 연구는 현재 전 세계적으로 진행되고 있다. 특히 반추위는 섬유소 분해균주가 다양하게 존재하는 곳으로서 섬유소 분해활성이 높은 미생물도 다량 존재하는 것으로 보고되고 있지만, 이러한 미생물을 실용화한 실적은 미흡한 수준이다.

섬유소 분해효소(Endoglucanase, Exoglucanase, β -glucanase)는 식품 및 사료산업에서 널리 이용되고 있다. 이들 효소를 생산하는 미생물로는 *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Cellulomonas* 등이 있는데, 이들 미생물 중 생균제로 활용 가능한 균주는 극히 제한적이어서 *Aspergillus*, *Bacillus* 등을 들 수 있다. 현재 판매되고 있는 미생물 제제의 경우 미생물 균수 자체에만 초점이 맞춰져 있고 균주가 가진 효소활성에 대한 기준은 없다. 따라서 생균제와 효소제를 별도로 사용함으로써 경제적 손실을 초래할 수 있다. 그렇지만, 고역가의 효소를 생산하는 미생물 제제를 개발할 수 있다면 더욱 경제적으로 동물을 사육할 수 있을 것이다.

미생물제제는 장내 유익균총의 성장 증진을 통한 체내 면역증진의 효과가 확인되고 있으며, 최근 소비자의식 변화로 인해 안전한 축산물에 대한 요구가 높아지면서 축산물 내 잔류하는 항생제를 최소화하기 위한 노력들이 진행되고 있다. 이러한 일련의 노력 중 항생제 대체제로서의 생균제의 기능이 부각되고 있다.

일반적으로 생균제는 액상발효 방법을 통해 제조하고 있는데, 액상발효의 경우 미생물 균체량을 늘리기에는 좋은 방법이 될 수 있으나, 미생물이 가진 다양한 효소를 발현하는 미생물제제의 생산에는 적합한 방법이 아니다. 반면, 고상발효를 통한 미생물 제제 생산기술은 사료로 사용되는 고체원료를 미생물이 필요로 하는 영양소로 이용하기 때문에 미생물 균체의 직접적인 공급뿐만 아니라, 다양한 미생물 대사산물도 동시에 공급하는 장점을 지니고 있다. 특히 섬유소 분해 효소와 같은 중요한 기능을 갖는 기능성 물질의 생산을 극대화 할 수 있는 이상적인 방법이 될 수 있다.

따라서 본 과제는 섬유질 분해 효소의 활성이 우수한 미생물 균주를 선발하고, 효소활성이 극대화될 수 있도록 미생물 제제를 개선한 후 고상발효 방법으로 대량 생산하고자 한다. 개발될 미생물 제제는 효소 분비와 기존의 생균제의 기능을 동시에 갖고 있기 때문에 미생물 제제의 급이 만으로도 동물 체내의 에너지 이용성을 증진시키고 생산성을 개선하는 효과를 기대할 수 있을 것으로 예상된다. 특히 미생물 효소에 대한 주관기관의 다년간의 연구 경험과 협동기관인 (주)진바이오텍이 수년간 다져온 고상발효기술을 접목한다면 미생물 제제가 가진 대사산물의 발현이 극대화된, 새로운 개념의 미생물제제 생산 공정의 개발 가능성은 높다고 하겠다.

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
섬유소 분해활성 우수 균주 개발	미국 외 다수	90	70	90	
고상발효를 이용한 효소활성 함유 미생물 제제 대량생산 기술 개발	우리나라를 비롯한 아시아권(일본, 중국)	60	85	100	

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

제 2 절. 특허분석

제 1 항. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	국내 : 특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), 미국 : 미국 특허청(www.uspto.gov) 일본 : www.ipdl.inpit.go.jp/homepg_e.ipdl, 유럽 : ep.espacenet.com
검색기간	19880101 ~ 20071231 (최근 20년간)
검색범위	제목, 초록, 청구항

제 2 항. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		섬유소 분해활성 우수 균주개발	고상발효를 이용한 cellulase 강화 미생물 제제 생산기술
Keyword		((cellulase)*activity)*mutant	((cellulase)*solid*state*fermentation)* probiotics
검색건수		① 국내 : 17건, ② 미국 : 360건 ③ 일본 : 5건, ④ 유럽 : 300건	① 국내 : 2건, ② 미국 : 11건 ③ 일본 : 0건, ④ 유럽 : 0건
유효특허건수		① 국내 : 2건, ② 미국 : 11건 ③ 일본 : 2건, ④ 유럽 : 4건	① 국내 : 0건, ② 미국 : 0건 ③ 일본 : 0건, ④ 유럽 : 0건
핵심특허 및 관련성	특허명	야로이아 속 효모에서의 세포 표면 단백질을 이용한 목적단백질의 세포 표면 발현방법	된장에서 분리한 신규한 바실러스 렌티모부스 GB-102 및 이를 루핀종실배지에서 발효시킨 사료첨가물
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2007	2001
	관련성(%)	60	30
	유사점	효소 분해활성 증가를 위한 형질전환체 제조방법	amylase, protease, cellulase 등 소화효소 생산균주 이용 고상발효 미생물 제제
차이점	본 발명은 산업 효모인 야로이아 속 세포 표면에 목적단백질을 발현하기 위한 플라스미드 및 이를 이용한 목적단백질의 세포 표면 발현방법	효소활성은 균주자체가 가진 특성일 뿐 고활성 효소를 생산을 목표로 하지 않음	
핵심특허 및 관련성	특허명	Production of cellulase	셀룰라아제(Cellulase)와 자일란아제(xylanase)를 생산하는 아스퍼질러스 나이거(Aspergillus niger) KK2 균주와 이에 의해 제조된 효소 및 고체 배양물
	보유국	일본	대한민국
	등록년도	1988	2004
	관련성(%)	70	70
	유사점	Mutation을 통한 cellulase 분해효소 활성 강화	돌연변이를 통한 고활성 cellulase 및 xylanase를 생산하는 Aspergillus niger 배양조성물
차이점	UV mutation 을 통한 효소 활성 증가방안으로 사료첨가제 및 고체발효를 위한 균주는 아님	고체배양을 위해 벧집을 이용하여 효소제를 생산하여 효소제에 초점이 맞춰져 있어 생균제로서 활용가능성이 낮음	

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

제 3 절. 논문분석

제 1 항. 논문분석 범위

대상국가	미국, 유럽, 한국, 일본, 중국, 인도
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), Scopus DB(www.scopus.com)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

제 2 항. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		섬유소 분해활성 우수 균주 개발	고상발효를 이용한 cellulase 강화 미생물 제제 생산기술
Keyword		cellulase*production	solid state fermentation*cellulase
검색건수		300	131
유효논문건수		93	48
핵심논문 및 관련성	논문명	Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies	Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition
	학술지명	Biotechnology Advances	Animal Feed Science and Technology
	저자	Y.-H. Percival Zhang 등	E.B.N. Graminha 등
	게재년도	2006	2008
	관련성(%)	80	80
	유사점	섬유소 분해활성 우수 균주 개발을 위한 screening 방법 제시 및 다양한 cellulase activity assay 비교 그리고 섬유소 분해효소 활력 증가를 위한 rational design과 directed evolution 방법 제시하였음.	고상발효에 의한 섬유소 분해효소 생산을 위해 다양한 농산부산물이 이용될 수 있음을 제시하였으며, 또한 발효된 농산부산물의 영양적 가치 및 사료첨가제로서의 가능성도 제시하였음.
차이점	우수 섬유소 분해효소 분리 및 이를 다양한 균주에 형질전환시켜 섬유소 분해효소 분비능력이 우수한 미생물 제제를 개발하고자 함.	고상발효를 위한 균주로 주로 곰팡이를 제시하였는데, 본 연구에서는 다양한 미생물을 대상으로 할 것이며, cellulase 강화 미생물제제에 의한 동물의 생산성 향상에 대한 구체적인 연구가 필요함.	

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

제 4 절. 제품 및 시장 분석

제 1 항. 생산 및 시장현황

가) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 2009년 생균제 생산 현황 : 23,582톤 (월간 1,965톤 규모)
- 주요 생산 균주 : 효모 (54% 이상), 바실러스 균, 유산균
- 시장 규모

연 도	2009년	2012 (E)	증가율 (%)
항 목			
배합사료 총 생산량 (톤)*	16,481,215	12,375,000	-24.9
생균제 시장 규모 (톤)**	23,582	33,020	40.0
생균제 시장 규모 (억원)	353.7	495.3	40.0

* (사) 한국 사료협회 “배합사료 편람 (2010)” 참조

** (사) 한국단미사료협회 “단미·보조사료 편람 (2010)” 참조

- 시장 특징 : 생균의 공급을 위주로 하는 제품이 대부분이며 특정 기능을 추가한 제품에 대한 개념은 정립이 되어 있지 못함. 항생제 대체제로서, 소화효율 개선을 위한 기능성 생균제의 시장 요구가 증가되고 있는 실정임.

나) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 2007년 생균제 생산 현황 : 272,000톤
- 주요 생산 균주 : 효모, 바실러스 균, 유산균
- 시장 규모

연 도	2007년	2012 (E)	증가율 (%)
항 목			
배합사료 총 생산량 (톤)*	680,000,000	700,000,000	3.0
생균제 시장 규모 (톤)*	272,000	350,000	28.7
생균제 시장 규모 (억원)	612.8	778.6	27.0

*Feed Mix Vol 15(1) : 25 (2007)

- 시장 특징 : 국내 시장과 같이 생균의 공급을 위주로 하는 제품이 대부분이며 특정 기능을 추가한 제품에 대한 개념은 정립이 되어 있지 못함. 항생제 대체제로서, 소화효율 개선을 위한 기능성 생균제의 시장 요구가 증가되고 있는 실정이며 가공사료가 많은 비중을 차지하고 있어 내열성이 우수한 생균제 개발에 우선되고 있음.

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 미생물 선발방법 확립

반추동물의 반추위와 생활 식품군에서 적절한 미생물을 찾기 위해 우선적으로 미생물 선발 방법을 탐색하였다. 탐색된 방법은 1) filter paper degradation 관찰법, 2) Congo red staining 방법, 3) chromogenic cellulose의 lysis 측정법이였다.

제 1 항. Observation

상기 방법은 미생물의 liquid culture에 Whatman No. 1 paper를 첨가한 후, 5-7일간 배양시켜 filter paper가 분해되는 정도를 육안으로 관찰하여 target 미생물의 cellulase를 확인하는 방법이다(G. M. Maluszinska and L. Janota-bassalik, 1974). 이 방법은 insoluble cellulose의 분해정도를 직접 측정하므로, biomass를 분해하기 위한 산업적인 미생물 선발에 장점이 있으나, filter paper를 분해하는 데 상당한 시간을 요한다는 단점이 있다. 또한 하나의 isolation 된 미생물의 liquid media에서 측정할 수 있음에 따라 다수의 미생물이 존재하는 경우에서 섬유소 분해활성이 있는 개체를 선별하기에는 어려움이 뒤따랐다.

제 2 항. Congo-red staining

상기 방법은 congo-red solution이 media 내의 polysaccharide와 강하게 상호작용한 후, 미생물이 cellulose를 분해하면 염색된 부분의 색이 사라지는 효과를 이용하여 섬유소 분해 미생물을 선발하는 방법이다(R. M. Teather and P. J. Wood, 1982). congo-red를 이용한 섬유소 분해 미생물 선발 방법은 다음과 같다. 먼저 여러 미생물이 존재하는 agar plate에 congo-red solution으로 염색한 후, 1M의 NaCl로 destaining 하고 washing 한다. 이후, colony 주위에 white zone을 확인한다(A. S. S. Ibrahim and A. I. El-diwany, 2007)(그림 1). 위의 방법은 Observation 방법에서 해결하지 못했던 여러 미생물 후보군 중에서 섬유소 분해활성이 있는 미생물만 선별해야하는 문제점을 해결할 수 있었다. 하지만 agar plate에 염색하는 과정에서 congo-red solution의 toxic한 성질이 미생물에 악영향을 끼칠 수 있으며 washing 과정에서 선별된 미생물이 씻겨 내려가는 상황도 발생할 수 있다는 보고가 있었다.

제 3 항. Chromogenic cellulose method

상기 방법은 OBR(ostazin brillant red)나 RBB(Ramazoil brilliant blue)와 같은 염색물과 결합된 soluble한 cellulose를 이용하는 방법으로서 탐색 미생물이 상기 물질을 분해할 경우 white zone이 발생한다(Baird et al., 1990; Biely et al., 1996)(그림 2). 위의 방법을 사용할 경우 여러 미생물 군에서 섬유소를 분해할 수 있는 미생물들만 선별이 가능하다는 장점과 함께 congo-red staining 방법이 가지고 있는 유해성이 없다는 장점이 있으며 congo-red를 이용한 screening system보다 간편하게 실험할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 반추위액 1ml 내에 존재하는 박테리아는 $10^{10} \sim 10^{11}$ 정도 존재하며 이 중에서 섬유소 분해 활성이 우수한 균주를 찾기 위해서는 간편한 screening 방법이 필요할 것으로 사료된 바 상기방법을 채택하였다.



그림 1. Congo-red staining에 의한 미생물 선발법 (A. S. S. Ibrahim and A. I. El-diwany, 2007).

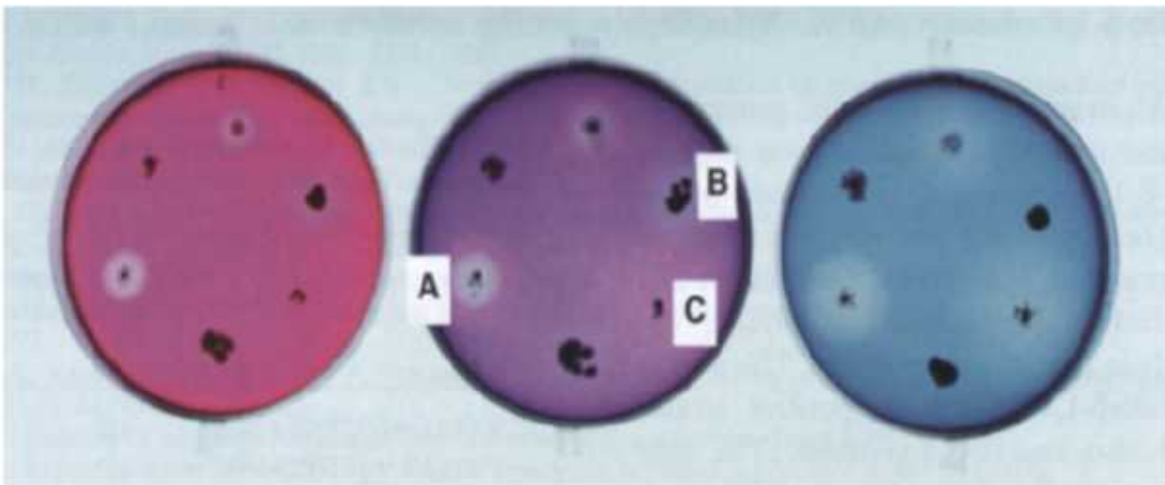


그림 2. OBR-gallactomannan(빨강색 media)과 RBB-xylan(파란색 media)을 이용한 섬유소 분해 활성 미생물 선발법.

제 2 절. 섬유소 분해 활성 우수 미생물 선발

제 1 항. 반추동물의 반추위에서 섬유소 분해 활성이 우수한 박테리아 선발

상기 연구의 목적은 반추위에 존재하는 미생물 중에서 섬유소 분해 활성이 우수한 박테리아를 1차적으로 선발함에 있다. 반추위에 존재하는 박테리아의 분리 및 동정을 위하여 수정된 Dehority(1965)의 액체 배지 및 고체배지가 사용되었다.

가. 위액의 채취

위액은 거세된 Holstein 소와 한국 재래 산양의 반추위 cannula를 통하여 채취되었다. 채취된 위액은 미리 보온되고 CO₂ gas가 충전된 용기에 보관하여 실험실로 운반되었고, 사료입자에 부착된 미생물을 분리하기 위하여 homogenizer에 넣고 CO₂ gas를 충전하며 강하게 1분간 교반한 다음, 2겹의 cheese cloth로 여과하여 시료로 이용하였다.

나. 위액의 희석 및 배양

채취된 위액은 수정된 Dehority media를 사용하여 10⁻¹~10⁻⁹까지 희석하였고 희석된 접종액을 섬유소 분해 활성 탐색용 screening media(표 1)에 접종하여 2-3일간 배양 후 선발하였다. Dehority media의 carbon source는 반추위 내의 미생물 중 cellulose를 주로 이용하는 미생물들만 선발하기 위하여 soluble cellulose인 CMC와 cellobiose를 이용하여 구성되었고, 선발을 위해서 CMC중의 일부가 RBB-CMC로 대체되었다.

표 1. Composition of Dehority agar media

Component	100ml
Mineral I sol.	20ml
Mineral II sol.	20ml
Resazurine	0.1ml
Rumen fluid	20ml
Vitamin mixture	1.0ml
VFA sol.	6.7ml
Casein(acid hydrolyzed casein)	2g
Hemin sol.	0.1ml
Carbon source	0.5g
8% Na ₂ CO ₃	5ml
2.5% Cysteine-HCl	0.1ml
Agar	2g

*mineral sol. I : KH₂PO₄ 4.5g in 1L of distilled water

mineral sol. II : CaCl₂(anhydrous) 0.25g, MgSO₄(anhydrous) 0.25g, NaCl 4.5g, (NH₄)₂SO₄ 4.5g, MnSO₄*H₂O 0.1g, FeSO₄*7H₂O 0.1g, CoCl₂*6H₂O 0.01g, ZnSO₄*7H₂O 0.1g in 1L of distilled water

VFA sol. : Acetic acid 17ml, Butyric acid 4ml, Propionic acid 6ml, iso-butyric acid 1ml, n-valeric acid 1ml, iso-valeric acid 1ml, DL-a-methylbutyric acid 1ml in 1L in distilled water

다. 섬유소 분해 활성 미생물의 선발

반추위 내에서 섬유소 분해 활성 우수 균주를 찾기 이전 제조된 agar plate media가 cellulase에 효과적으로 반응을 하는지 확인하기 위하여 시약으로 판매되는 cellulase(*Trichoderma reesei*, sigma)를 사용하여 역가확인을 수행하였다(그림 3). 제조된 plate media에 cellulase를 함유한 filter paper를 놓아둔 후 24시간 뒤 발생하는 zone을 확인하였고 그림 3과 같이 색이 사라지는 것을 확인할 수 있었다. 반추위액의 희석정도는 발견되는 섬유소 분해 미생물의 수에 영향을 미쳤으며(그림 4), 미생물을 선발할 수 있는 최적의 농도는 10⁻⁴~10⁻⁵인 것으로 사료된다. 희석된 반추위액을 100µl 접종하여 2-3일 배양 후 발생하는 colony를 1차적으로 선발한 후(그림 4), 3회의 subculture 과정을 거쳐 균주를 동정하였고, Holstein 거세

우에서 30종, 재래 산양에서 8종의 미생물의 선발하여 30% glycerol를 첨가한 후 -80℃ deep freezer에 동결 보관하였다.



그림 5 cellulase에 의해 나타난 colorless zone.



그림 6. 반추위 내 섬유소 분해 미생물 screening 과정.

이 중, 재래산양의 반추위에서 분리된 1종의 균주는 일반 호기 상태에서도 자라는 것을 확인하였으며, 호기 상태에서 선발하여 3차 분리과정을 거친 후 분자생물학적 방법에 의한 identification을 실시하였다. 선발균주의 염기서열을 분자 생물학적으로 분석한 결과 NCBI에 등록된 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580과 100% 일치하였다(그림 5). 추후 선발된 미생물에 대한 identification을 모두 완료할 계획이며, *Bacillus licheniformis*로 확인된 G10번과 비슷한 형태를 띠며 자란 G5, G6, G7에 대한 호기상태 배양 및 관찰도 필요할 것으로 사료된다. 또한 선발된 미생물군에 대한 정확한 cellulase activity 측정을 위하여 DNS reducing sugar assay를 완료할 계획이다.

>|gb|CP000002.3| D Bacillus licheniformis ATCC 14580, complete genome
Length=4222597

Sort alignments for this subject sequence by:
E value Score Percent identity
Query start position Subject start position

Features in this part of subject sequence:
rRNA-ribosomal protein

Score = 490 bits (265), Expect = 2e-135
Identities = 267/268 (99%), Gaps = 0/268 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      CGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGC 60
          |||
Sbjct 3123268 CGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCGGAGCTTGCTCCCTTAGGTCAGC 3123209

Query 61     GGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA 120
          |||
Sbjct 3123208 GGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA 3123149

Query 121    CCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCCAATCATAAAAAGGTGGCTTT 180
          |||
Sbjct 3123148 CCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCCAATCATAAAAAGGTGGCTTT 3123089

Query 181    CAGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCAC 240
          |||
Sbjct 3123088 CAGCTACCCTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGGGTAACGGCTCAC 3123029

Query 241    CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG 268
          |||
Sbjct 3123028 CAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG 3123001

```

그림 7. Sequence result of selected bacteria G10 from Korea native goat's rumen.

제 2 항. 식품군에 존재하는 섬유소 분해 활성 우수균주 선발

가. 선발과정

제지공장 및 하천 퇴적토 등의 샘플과 미소된장 및 짓갈류를 대상으로 사료용 생균제로 사용 가능한 균주를 목표로 미생물 분리 동정을 실시하였다. 균주 선발 방법에 따라 무작위로 *Bacillus* spp.인 진핵 세포류 균주들에 대해 colony의 gram staining 및 morphological 특성을 분석하여 *Bacillus* spp. 로 판단되는 균주를 cellulase 활성 테스트를 위해 선발하였다. 선발 균주를 대상으로 각각 cellulase 테스트용 agar 배지에 접종하여 24시간 후 그 환의 지름의 크기를 확인하여 환의 지름이 10mm 이상인 균주 10종을 1차 선발하였다. 선발된 균주는 #1(13mm), #4(14mm), #5(15mm), #6(13mm), #7(13mm), #8(10mm), #9(13mm), #12(13mm), #13(14mm), #14(10mm)로 10~15mm의 범위를 나타냈다. Cellulase 분해활성이 확인된 균주를 액상배양을 통해 cellulase 분해활성 테스트를 실시하여 2차 균주 10종을 최종 선발하였다. API kit를 이용한 동정결과 *B. subtilis*와 동일한 패턴을 확인하였으며, *B. subtilis*와 98%이상의 homology를 확인하였으며, 선발된 균주의 동정을 위해 API kit를 이용하여 1차 동정을 실시하였다.

나. 선발된 후보균주의 역가 확인

선발된 후보 균주의 역가를 간접적으로 확인하기 위하여 반추위에서 사용되었던 RBB-CMC를 carbon source로 사용하여 screening agar media를 제조하였다. 선발된 미생물 균주에서 cellulase의 역가를 갖고 있는 미생물은 반추위 미생물과 마찬가지로 colony 주위에 탈색되는 부위가 발생하는 것을 확인할 수 있었고(그림 6), 형태학적인 측면에서 *Bacillus*로 추정되었다. 상기 방법을 통하여 선발된 미생물군 중에서

1, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14번 총 10종의 미생물이 섬유소 분해 활성이 있는 것으로 우선 선별되었다.

표 2. Composition of screening agar

component	100ml
Yeast extract	2g
CMC	0.8g
RBB-CMC	0.2g
glucose	0.2g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.25g

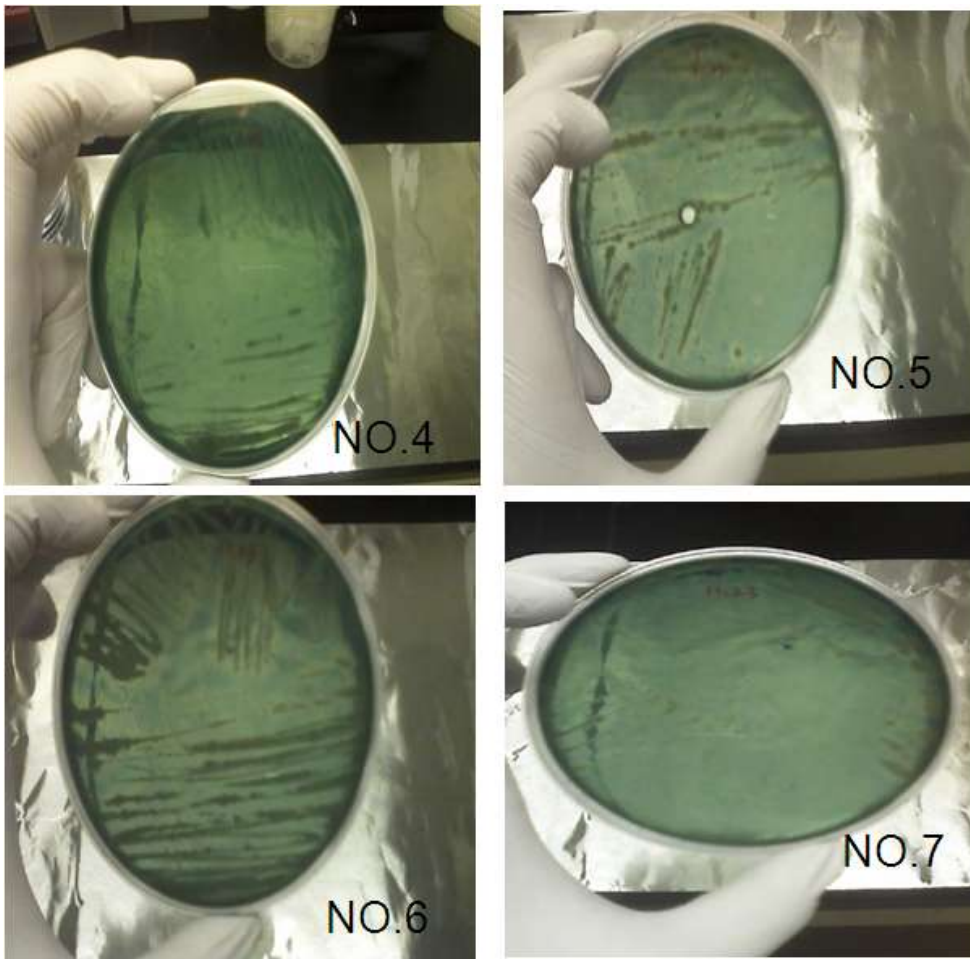


그림 8. 선별된 후보 미생물의 역가 확인.

이후 좀 더 정확한 cellulase activity의 측정을 위하여 선별 미생물의 배양실험이 수행되었다. 젓갈에서 분리된 4, 5, 6, 7번 균주는 cellulase activity를 확인하기 위하여 nutrient broth에서 48hr동안 배양되었고, 배양액을 13,000rpm에서 15min동안 원심분리하여 상층액을 enzyme assay에 사용하였다. 상층액에 존재하는 섬유소 분해효소(CMCase)의 역가는 carboxymethyl cellulose로부터 분해되어 나오는 환원당의 함량을 3, 5- Dinitrosalicylic acid(DNS)로 인해 발색되는 정도로 측정함으로써 분석하였다. 원심분리한 상등액 0.1ml을 1% CMC solution 50µl과 혼합하여 50°C water bath에서 1시간동안 배양한 후 300µl DNS

solution을 첨가하여 반응을 정지시키고 boiling water에 5분간 반응시켜 발색시킨 후, U.V spectrometer를 이용하여 흡광도를 분석하였다. 효소에 의해 환원되는 glucose의 양을 측정하기 위하여 glucose를 표준물질로 하여 검량선을 작성한 후 배양액에 존재하는 환원당의 농도를 측정하였다. 단위는 Unit/ml로 1 unit은 enzyme 1ml이 1min동안 환원시키는 glucose의 μmol 의 양을 의미한다.

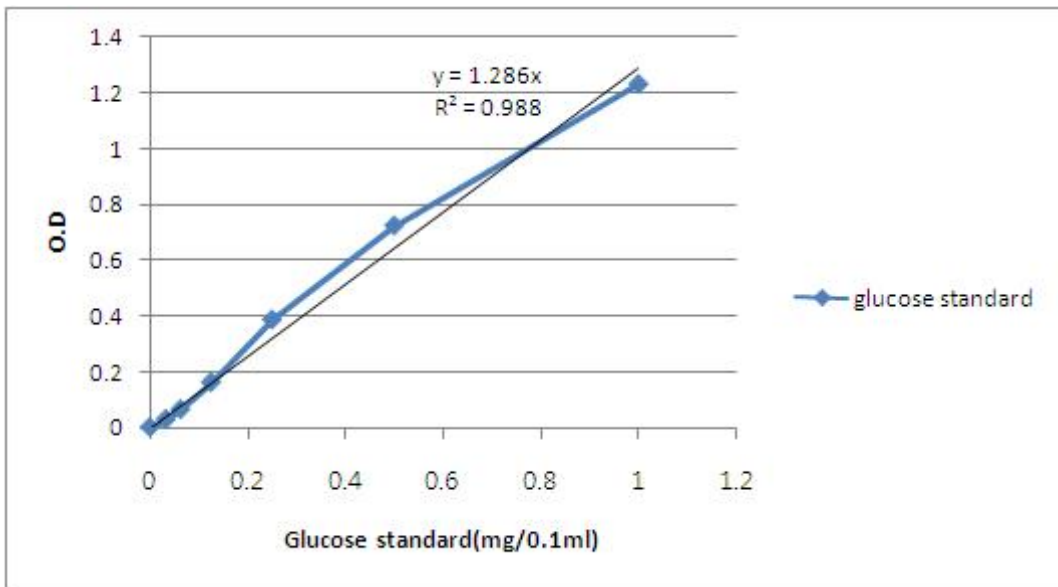


그림 9. 그림 7. 효소에 의해 발생하는 환원당 측정 위한 glucose standard(mg/0.1ml)

젓갈에서 분리된 총 4종의 선발 미생물의 역가는 그림 8과 같다. Nutrient broth에서 48hr 배양하였을 경우 5번과 6번 미생물에서 역가가 높게 측정되었고(각각, 0.011U/ml, 0.010U/ml) 4번과 7번의 경우 흡광도는 측정되었으나, 매우 낮은 역가를 나타내었다. 이후의 실험에서 Nutrient broth에 CMC를 0.5%첨가하여 media를 구성하였고, 전 실험과 동일하게 48hr 배양 후, DNS reducing sugar assay를 수행한 결과, 5번, 6번 및 7번 미생물에서 cellulase의 강한 활성을 확인할 수 있었다(각각, 0.0818U/ml, 0.0783U/ml, 0.0323U/ml). 이는 media에 첨가된 CMC가 미생물이 가지고 있는 cellulase gene의 inducer로 작용한 결과로 사료된다. 또한 4번 미생물은 CMC의 첨가에도 불구하고 역가의 활성을 나타내지 않음에 따라 균주가 cellulase를 형성하지 않는 것으로 파악되며, 이는 사전 screening 실험에서 보여준 결과와 일치하였다.

이번 실험결과에서 추정되는 media에 CMC의 첨가가 선발 미생물의 cellulase 활성에 영향을 미친다는 결과에 따라 다른 후보 균주의 역가 실험을 위해 제조된 배지에는 Nutrient broth와 함께 0.5%의 CMC가 첨가되었다. 전 실험에서 사용된 4, 5, 6, 7번을 제외한 총 6종의 선발 균주와 재래 산양에서 분리된 호기성 균주 1종이 CMC 첨가된 media에서 48hr동안 배양되었으며 배양 이후 상층액을 채취하여 원심분리한 후 DNS reducing sugar assay로 activity 측정 실험에 사용하였다.

젓갈에서 선발된 균주를 제외한 6종의 균주 역시 CMC activity를 보였다(그림 9). 그 중 1번, 8번, 14번 균주가 특히 높은 역가를 보였으며(0.066U/ml, 0.061U/ml, 0.068U/ml), 반추위에서 분리된 G10번 균주 역시 높은 역가를 보였다(0.047U/ml). 9번 균주는 screening plate에서 넓은 colorless zone을 나타내어 역가가 높을 것으로 사료되었으나 실제 DNS assay에서는 다른 균주보다 낮은 역가를 보였고(0.018U/ml), 이는 9번 균주가 생산하는 enzyme의 type이 intra cellular type에 의한 것으로 추정된다.

결과적으로, 식품균에서 선발된 총 10종의 균주 중 섬유소 분해 활성이 높은 균주로 1, 5, 6, 8, 14번 균주가 최종적으로 선발되었다.

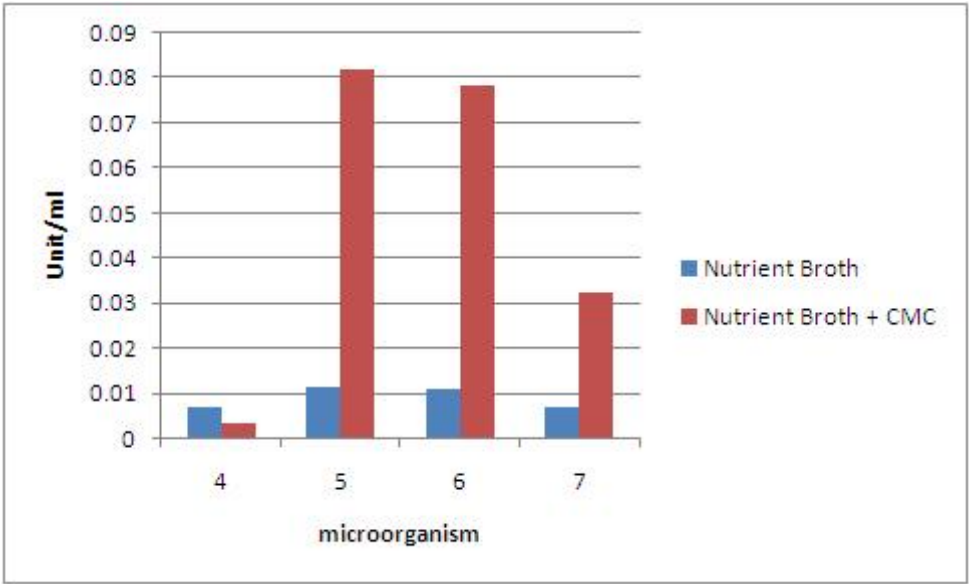


그림 10. media의 성분에 따른 cellulase activity(U/ml).

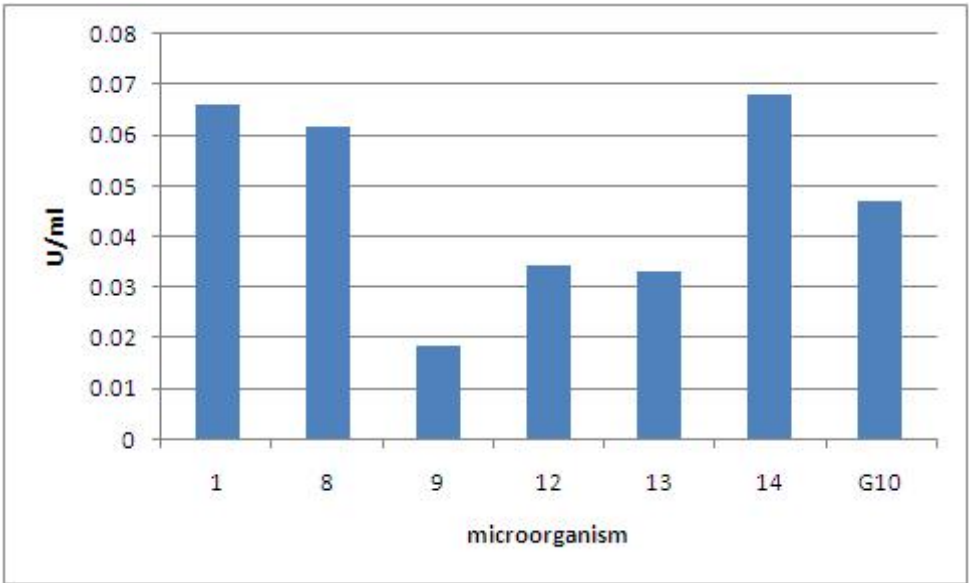


그림 11. 식품군에서 선발된 균주의 enzyme activity(U/ml).

제 3 절. 미생물 발효 방법에 따른 효소발현 특성

제 1 항. 액상발효 및 고상발효를 통한 효소활성 비교

가. Cellulase 발현을 위한 액상발효 테스트

Cellulase 생산을 위한 액상발효 배지조성을 표 3에 나타내었다. 액상발효의 경우 최적의 C/N ratio는 7~10으로 주로 사용되는 탄소원으로는 lactose 및 cellulose를 주로 사용하였으며, 질소원으로는 $(NH_4)_2SO_4$ 및 CSL(corn steep liquor)을 주 질소원으로 사용하는 것으로 조사되

었다. 따라서 본 실험에서는 10L 액상발효기를 이용하여 lactose를 탄소원으로 사용하고 질소원으로 yeast extract, peptone, CSL을 사용하였다. 또한, 최적 발효온도는 28~32℃로 곰팡이 성장에 적합한 온도를 설정하였으며, air pressure는 5psi로 설정하였으며, 발효시간을 72시간으로 설정하고 발효테스트를 실시하였다. 테스트 균주로는 대표적인 cellulase 생산에 사용되는 균주인 *Trichoderma reesei* 및 *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* 균주를 이용하여 각각 효소활성을 고상발효와 비교 평가하였다.

표 3. Cellulase 발현을 위한 액상발효 배지조성

Medium composition	g/L
1. C source	
Lactose	5
2. N source	
Yeast extract	0.3
Peptone	0.75
CSL	5
3. Minerals	
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.3
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.0036
ZnSO ₄ H ₂ O	0.0014
MnSO ₄ H ₂ O	0.0016
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.00271
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.3
KH ₂ PO ₄	2.0

나. Cellulase 발현을 위한 고상발효 테스트

Cellulase 발현을 위한 고상발효용 배지로 옥수수, 소맥피, 대두박을 각각 테스트하고, 각 곡류별 dietary fiber 함량 조사를 실시하여 최종 cellulase 활성이 높은 미생물 생산을 위한 배지 조성 설정에 활용하고자 하였다.

본 연구를 위한 고상발효 조건을 표 4에 나타내었다. Cellulase 발현을 위한 발효시간을 72시간으로 액상발효와 동일한 시간을 설정하였으며, 발효온도 역시 액상발효와 동일한 28~32℃의 조건에서 발효를 실시하여 액상발효 및 고상발효 조건에서의 효소활성을 비교 평가하였다.

표 4. Cellulase 발현을 위한 고상발효 조건

Factor	Condition
Fermentation Temp.	28-32℃
Moisture content	50%
pH	6.5~7.0
Aeration/ Humidity	Agitation at 34℃/ 90%
Fermentation time	72hrs

다. Cellulase 활성 분석방법

Cellulase 활성은 carboxymethyl cellulase(CMC)를 기질로 하여 효소를 작용시켜 기질이 분해되어 생성되는 환원당(reducing sugar)을 정량하여 cellulase의 활성도를 측정, 효소활성 측정 방법은 다음과 같다.

(1) 기질용액

Carboxymethylcellulose(CMC) 1g을 20mM sodium acetate buffer(pH 5.5) 용액 100ml 에 녹여 1% 베타글루카나제 기질 용액으로 하였다.

(2) 조효소액

시료 1g을 증류수 9ml에 용해시켜 10ml로 부피를 맞춘 뒤 적당한 농도로 희석하여 조효소액을 제조하였다.

(3) 효소반응 조건

- 기질용액 0.5ml과 조효소액 0.5ml을 혼합
- 40℃에서 30분간 보온
- DNS(dinitrosalicylic acid) 용액 3ml을 첨가하여 반응중지
- 10분간 물속에서 중탕
- 분광광도계로 흡수치 A_{540} 측정

(4) 효소활성 단위

분당 glucose 1 μ mol에 해당하는 당을 유리하는 효소량을 1unit로 정의한다.

(5) 검량곡선

5mM glucose 용액으로 검량곡선을 작성하여 효소량을 계산하였다.

라. 액상 및 고상발효를 통한 Cellulase 활성 비교

Aspergillus oryzae, *Aspergillus niger* 및 *Trichoderma reesei* 균주를 이용한 액상 및 고상발효 테스트를 통한 효소활성을 비교한 결과를 표 5에 나타내었다. 각 균주별로 액상발효 보다는 고상발효공정에서 높은 효소활성을 나타내었다. 또한, 고상발효에서도 원료에 따른 효소활성의 차이를 확인하였으며, C/N ratio가 낮은 질소원을 많이 함유한 대두박 보다는 탄소원을

많이 함유한 소맥피(C/N ratio: 20)에서 높은 효소발현을 나타내어 문헌상에 나타난 최적 액상 발효 조건 (C/N ratio: 7~10)과는 차이를 보였다.

표 5. 액상 및 고상발효 테스트를 통한 cellulase 활성 비교

Microorganisms	Raw materials	SSF (U/g)	SmF (U/mL)
<i>A. oryzae</i>	Corn	13.30	0.33
	SBM	3.18	
	Wheat bran	32.18	
<i>A. niger</i>	Corn	36.36	1.12
	SBM	15.77	
	Wheat bran	50.44	
<i>T. reesei</i>	Corn	58.43	3.42
	SBM	39.20	
	Wheat bran	78.32	

제 4 절. 원료별 dietary fiber 분획조사 및 고상발효용 배지선정

제 1 항. 원료별 일반성분 및 dietary fiber 분획 조사

총 3종의 사료자원에 대해 AOAC 분석법을 기준으로 일반성분 분석을 실시하였으며, 그 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6. 사료자원별 일반성분 함량 분석 결과(%)

	Corn	Soybean meal	Wheat bran
Moisture	12.25	10.43	11.68
Crude protein	7.57	46.43	14.43
Crude fibre	3.1	3.94	8.2
Crude fat	6.93	0.35	2.7
Ash (DM basis)	2.11	6.22	5.21

옥수수, 대두박, 소맥피의 사료자원에 대한 세포막 구성물질에 대한 분석은 Van Soest 방법과 Updegroff 방법을 이용하였으며, total pentosan, pentose 분석은 Frazer 등 (1956)의 분석방법을 이용하여 분석을 실시하였다. Pectin의 분석에는 Sadasivan 과 Annison (1996)의 분석방법(중량측정법)을 사용하였으며, total NSP함량은 Englyst와 Cummings 방법을 기초로 비색법

을 이용하여 사료자원별 total NSP함량을 분석하여 표 7에 나타내었다.

표 7. 사료자원별 dietary fiber (Total pentosan, cellulose, hemicellulose, Pectin, Lignin, Total NSP) 조성(%)

Ingredient	Soybean meal	Wheat bran	Corn
Pentosan	4.64±0.88	15.02±1.37	3.95±0.37
Pectin	2.20±0.46	8.15±4.31	2.56±0.75
Cellulose	2.12±0.22	5.1±0.03	1.45±0.16
Hemicellulose	3.30±0.26	20.29±5.01	7.38±2.35
Lignin	0.51±0.08	2.34±0.11	0.60±0.05
Total NSP	12.59±0.14	36.65±0.61	16.60±0.73

(Mean ± S.D., n=3)

(성균관대학교/ 단미사료협회, 2009)

세포막의 총 NSP 함량은 조섬유소 함량이 비교적 높은 소맥피에서 높게 나타났으며, pentosan과 hemicellulose 함량 역시 높은 수준으로 조사되었다. 대두박의 경우 total NSP 함량이 가장 낮게 조사되었으며, 상대적으로 peptosan 함량이 높게 조사되었다. 또한, 옥수수의 경우 hemicellulose 함량이 높게 조사되었다. 이 결과는 발효테스트에서 미생물 종류가 상이하지만, 소맥피를 원료로 한 배지에서 cellulase 활성이 가장 높은 것과 일치하는 것으로 결론적으로 cellulose 및 hemicellulose 함량이 높은 원료인 소맥피가 cellulase 생산을 위한 최적의 발효 원료인 것으로 판단되었다.

제 2 항. 미생물 발효 및 대사물질 생산에 최적인 곡물배지조성 선정

고상발효를 통한 미생물 발효 및 효소발현에 최적인 배지조성은 상기 실험에서 확인된 바와 같이 소맥피를 주요 곡물배지로 선정하였으며, 소맥피를 주원료로 한 배지에 섬유소 함량이 높은 wheat straw, soybean hull, rice chaff를 5% 수준으로 첨가하여 cellulase 활성을 높이기 위한 추가 테스트를 진행 하였다.

고상발효 조건 확립을 위해 초기 접종균수에 따른 효소발현정도를 조사하였다. 초기 접종균수를 $10^4 \sim 10^7$ cfu/g까지 접종량을 달리하여 32°C에서 48시간 동안 배양을 통해 효소 발현량을 조사하였다. 예비실험으로 *A. niger* 균주를 사용하였으며 접종균수를 10^4 cfu/g 수준접종 시 70U/g으로 가장 우수한 결과를 얻어(그림 10) 초기 접종균수가 효소활성에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다.

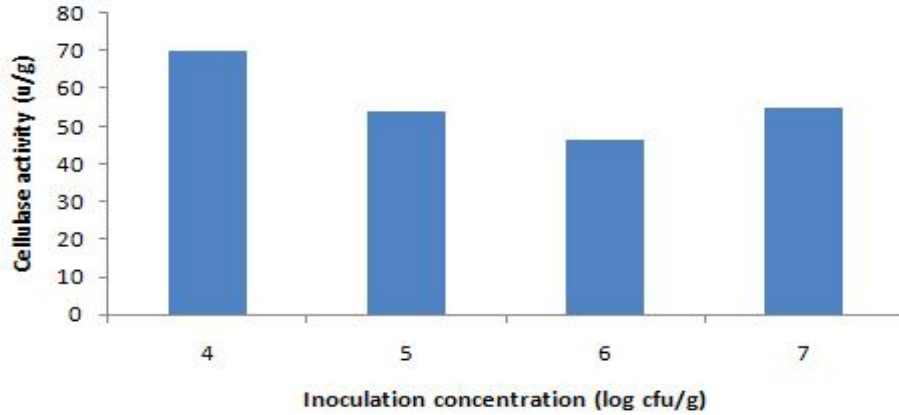


그림 12. *A. niger* 의 접종 농도에 따른 cellulase의 발현.

추가적으로 고상발효를 통한 최적 발효시간을 확인하기 위해 *A. niger* 균주를 이용한 고상발효 테스트를 통해 미생물 균수 및 효소활성 발현조건을 조사하였다. 초기 접종균수는 cellulase 발현율이 가장 우수한 10^4 CFU/g 수준을 접종하였으며, 원료배지는 소맥피를 사용하고 초기 수분함량을 45%, 발효온도를 32°C 로 설정하여 균성장 및 효소발현에 대한 테스트를 진행하였다. 발효 시간별 효소발현 정도 및 균수변화를 측정하여 그림4에 나타내었다. Cellulase 발현율은 발효 24시간에 최대를 나타내었으며, 그때의 균수는 6.1×10^6 CFU/g의 균수를 나타내었다. 발효 48시간일 때 효소활성은 약 40% 감소하였으며, 균수는 7.6×10^7 CFU/g으로 약 10배 증가하였다. 최종 균수는 1.5×10^8 CFU/g까지 증가하였지만, 효소역가는 55U/g 수준으로 계속 유지되었다. 이는 초기 균사성장단계에서 효소활성이 계속적으로 증가하지만, 그 이후 본격 포자형성단계에서부터는 효소활성이 급격히 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서 균수 및 효소발현 정도를 고려하여 최적 발효시간을 32~36시간 정도인 것을 확인하였으며, 초기 수분함량 및 원료배지의 조성 및 종류에 따라 차별성을 보일 것으로 판단되어 추가 실험을 진행하였다.

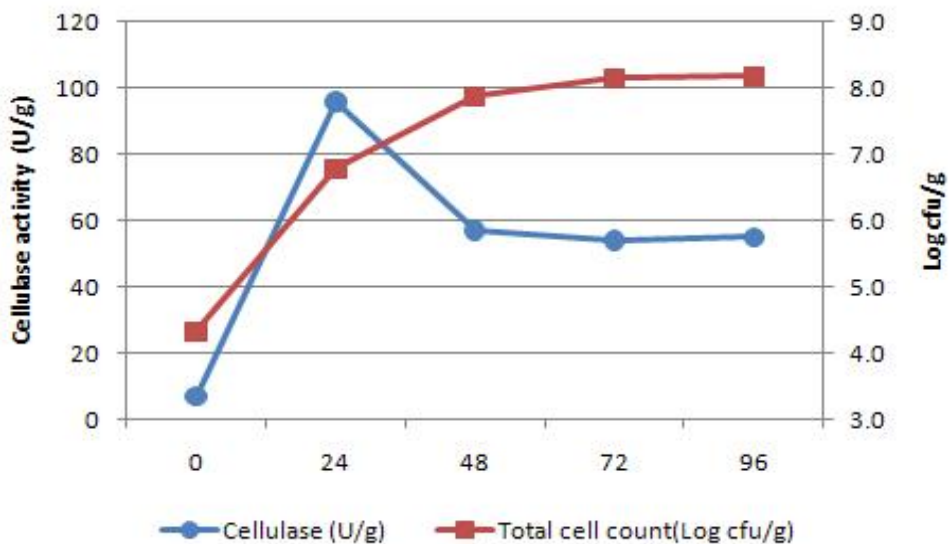


그림 13. *A. niger* 의 발효시간에 따른 균수 및 cellulase 발현량 변화.

제 5 절. 효소활성 분석법 확립

효소활성 분석을 위해 다음과 같이 3가지 방법을 대상으로 분석방법을 확립하였으며, 분석을 통해 효소활성을 가장 잘 표현할 수 있는 방법을 표준분석방법으로 선정하여 본 연구에 활용하고자 하였다.

제 1 항. Cellulase 분석법-1 : 사료공정서 분석법

가. 원리

셀룰라아제(cellulase, 섬유소분해효소)는 glucose의 β -1,4 결합에 의하여 축합된 셀룰로오스(cellulose, 섬유소)의 가수분해에 관여하는 효소이다. 변성 섬유소인 carboxymethyl cellulose(CMC)를 기질로 하여 효소를 작용시켜 기질이 분해되어 생성되는 환원당(reducing sugar)을 정량하여 cellulase의 활성도를 측정한다.

나. 시약

모든 시약 용액들은 깨끗한 D.W로 제조하며 미생물의 오염을 방지하기 위해 멸균된 시약병에 보관한다.

(1) 반응 용액

- Sodium acetate Buffer, 0.1M, pH 5.5 (4℃, 2주 보관)
- Solution A : 11.55 ml glacial acetic acid(Merck Cat No. 1.00063.1011)/liter (0.2M)
- Solution B : 27.2g sodium acetate trihydrate(sigma Cat No. 236500)/liter (0.2M)
- Solution B에 Solution A를 적절히 혼합하여 pH 5.5의 용액을 만든다. 상기 용액을 최종 200ml로 희석하면 sodium acetate buffer, 0.1M, pH 5.5 용액이 된다.

(2) 기질 용액

- 2% CMC solution
- Sodium acetate Buffer, 0.1M, pH 5.5를 이용하여 CMC (sigma Cat No. C-5678) 2g을 최종 2g/100ml이 되도록 녹인다.

(3) 정지·발색 용액

- 1N-NaOH 용액
- DNS reagent : 2% NaOH 1L 에 다음의 시약들을 정확하게 넣어 녹인다. 반드시 개별적으로 시약을 넣고 완전히 녹이면서 만든다.

400 g of potassium sodium tartrate tetrahydrate

1 g of Na₂SO₃

4 g of Phenol

20g of Dinitrosalicylic acid

상기 용액은 최종 2ℓ가 되게 한다(with distilled water). 4℃ 냉장보관을 하며 2~3개월간 사용이 가능하다.

3,5-dinitrosalicylic acid (Sigma, Cat No. D0550-500G)

다. 방법

(1) 효소액의 조제

- 시료를 증류수에 용해시켜 적당한 농도로 사용한다. 최종의 희석액에는 0.1M sodium acetate Buffer를 사용한다.

(2) 활성도의 측정

- 2% CMC 용액 1ml을 시험관에 취하고,
- 여기에 0.1M sodium acetate Buffer 1ml을 가하여 혼든다.
- 45℃의 항온수조에서 3분간 예열한 후
- 효소액(적당하게 희석된 것, 희석배율 F) 0.2ml를 넣어서 혼든다.
- 45℃의 항온수조에서 60분간 진탕 반응시킨다.
- 반응 직후에 1N-NaOH 용액 1ml를 가하여 반응을 정지시킨다(혹은 100℃의 끓는 물에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켜도 됨).
- 반응 상층액 0.2ml를 취해서 DNS 용액 0.6ml씩 넣고
- 100℃ 끓는 물에서 5분간 반응시킨다.
- 그리고 증류수로 5ml이 되게 희석시킨다.
- 550nm에서 OD값을 측정하여 CMC로부터 유리된 환원당(glucose)의 양을 환산한다(환원당의 정량은 Somogyi법이나 Bertrand법을 이용해도 무방함).
- 측정된 환원당의 양을 G μ g이라 한다.
- 대조로서 2% CMC 용액 1ml, 0.1M sodium acetate Buffer 1ml, 1N-NaOH용액 1ml를 가하여 흔들고, 다시 효소액 1ml를 가한 혼합액 1ml의 환원당을 정량하여 glucose로서 표시한다. 이것을 B mg으로 한다.

라. 계산

효소 활성도 단위는 45℃에서 60분간에 생성되는 환원당(glucose)의 mg수로서 표시한다.

효소활성도 = (G - B) X 10 X F (F는 효소액의 희석배수)

제 2 항. Cellulase 분석법 2

가. 원리

셀룰라아제(cellulase, 섬유소분해효소)는 glucose의 β -1,4 결합에 의하여 축합된 셀룰로오스

(cellulose, 섬유소)의 가수분해에 관여하는 효소이다. 변성 섬유소인 carboxymethyl cellulose(CMC)를 기질로 하여 효소를 작용시켜 기질이 분해되어 생성되는 환원당(reducing sugar)을 정량하여 cellulase의 활성도를 측정한다.

나. 시약

모든 시약 용액들은 깨끗한 D.W로 제조하며 미생물의 오염을 방지하기 위해 멸균된 시약병에 보관한다.

(1) 반응 용액

- Sodium acetate Buffer, 0.1M, pH 5.5 (4°C, 2주 보관)
- Solution A : 11.55 ml glacial acetic acid(Merck Cat No. 1.00063.1011)/liter (0.2M)
- Solution B : 27.2g sodium acetate trihydrate(sigma Cat No. 236500)/liter (0.2M)
- Solution B에 Solution A를 적절히 혼합하여 pH 5.5의 용액을 만든다. 상기 용액을 최종 200ml로 희석하면 sodium acetate buffer, 0.1M, pH 5.5 용액이 된다.

(2) 기질 용액

- 1% CMC solution
- Sodium acetate Buffer, 0.1M, pH 5.5를 이용하여 CMC (sigma Cat No. C-5678) 1g을 최종 1g/100ml이 되도록 녹인다.

(3) 정지·발색 용액

- DNS reagent : 2% NaOH 1L 에 다음의 시약들을 정확하게 넣어 녹인다. 반드시 개별적으로 시약을 넣고 완전히 녹이면서 만든다..

400 g of potassium sodium tartrate tetrahydrate

1 g of Na₂SO₃

4 g of Phenol

20g of Dinitrosalicylic acid

상기 용액은 최종 2ℓ 가 되게 한다(with distilled water). 4°C 냉장보관을 하며 2~3개월간 사용이 가능하다.

3,5-dinitrosalicylic acid (Sigma, Cat No. : D0550-10G, D0550-25G, D0550-100G, D0550-500G)

다. 방법

(1) 효소액의 조제

- 시료 3g에 0.1M sodium acetate Buffer 30ml을 넣어 1시간 추출한다(in 50ml tube).
- 상기 추출물을 3000rpm, 10분간 원심분리하여 상등액을 0.45 um syringe filter로 여과한다.
- 적절히 희석한 용액을 효소액으로 사용한다.

(2) 활성도의 측정

- 1% CMC 용액 150 μl 를 micro tube에 취하고, 여기에 0.1M sodium acetate Buffer 140 μl 를 가하여 혼합한다.
- 45°C의 항온수조에서 5분간 예열한다.
- 효소액(적당히 희석된 것, 희석배율 F) 10 μl 를 넣어 혼합한다.
- 정확하게 45°C에서 30분간 반응한다.
- 반응정지 시에는 DNS 용액 900 μl 를 넣어 혼합한다.
- 100°C 끓는 물에서 5분간 반응시킨다.
- 냉수로 냉각한 후 540nm에서 흡광도를 측정한다.
- 흡광도계에서 zero는 증류수 300 μl 에 DNS 900 μl 를 넣고 반응한 용액을 사용한다.
- 대조로서 1% CMC 용액 150 μl , 0.1M sodium acetate Buffer 140 μl , DNS 용액 900 μl 를 가하여 혼합하고, 다시 효소액 10 μl 를 가하여 이용한다.

라. 계산

효소 활성도 단위는 45°C에서 1분 동안에 1mmol의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의한다.

$$\text{효소활성도(U/g)} = (\text{효소 반응구의 OD값} - \text{효소 대조구의 OD값}) * 13.1 * F(\text{희석배수})$$

제 3 항. Cellulase 분석법 3

가. 일반 원리

Cellulase는 cellulose를 분해하여 환원당을 생산하는데, 환원당은 DNS 용액과 반응하여 발색 반응을 일으키게 된다. 발색결과를 colorimeter 로 측정하는 것이다.

나. 정의

효소 역가 1 Unit는 특정조건에서 기질을 분해하여 시간당 포도당 1 μmol 을 생산할 수 있는 효소양으로 측정한다.

다. 주요 기기

- Ultraviolet-visible spectrophotometer (UV 1601)
- 항온수조 (40 \pm 2°C)
- Electron Balance
- Vortex agitator

라. 시약

(1) Disodium Hydrogen Phosphate-Citric acid Buffer

- Solution A : 0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 35.6g의 0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 이나 71.62g의 0.2M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 를 증류수에 용해시켜 1000ml로 만든다.
- Solution B : 0.1M Citric acid : 21.01g의 $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 를 증류수에 용해 후 1000ml로 만든다.
- Solution C : Solution A 493ml과 Solution B 507ml를 잘 혼합하여 Disodium Hydrogen Phosphate-Citric acid Buffer를 만든다 (pH 4.8).

(2) DNS 시약

- 182g의 Potassium sodium tartrate tetrahydrate를 500ml의 증류수에 용해시킨다.
- 1)에 6.3g의 3,5-dinitrosalicylic acid와 21g의 sodium hydroxide, 5g의 phenyl hydroxide와 5g의 sodium sulfite를 첨가하여 용해가 잘 되도록 혼합한다.
- 2)에 증류수를 첨가하여 1000ml이 되도록 하여 냉각시킨다. 그리고 갈색병에 보관한다.
- 이 시약의 보관 기간은 1개월로 한다.

(3) CMC-Na 시약

- 200ml의 증류수에 2g의 CMC-Na를 넣어 가열을 하여 용해가 될 때까지 물을 끓인다.
- 용해가 완전히 된 후 거즈를 이용하여 여과시킨다.
- 여기에 20ml의 Disodium Hydrogen Phosphate-Citric acid Buffer (pH 4.8)와 40ml의 증류수로 100ml이 되도록 여과시킨다.
- 이 용액은 냉장보관하며 사용가능 기간은 1주일이다.

(4) 1% 표준 포도당 시약

- 1.000g의 포도당을 측정 후 (AR) 105℃에서 무게가 변하지 않을때까지 건조시킨 후 증류수에 용해시켜 100ml을 만들어 100ml 용량의 병에 넣어 보관한다.

마. Standard Curve 작성

- 1%의 표준 포도당 시약을 1.0ml, 2.0ml, 3.0ml, 4.0ml, 5.0ml과 6.0ml를 각각 50ml의 mass flask에 담아 증류수로 완전히 용해시킨다.
- 각 flask의 포도당 농도는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 된다.
- 각 농도별로 0.5ml를 취하여 분석용 시험관에 담는다.
- 3)의 시험관에 1.5ml의 Disodium Hydrogen Phosphate-Citric acid Buffer (pH 4.8)와 3ml DNS 시약을 넣어 Boiling water bath에서 7분간 끓인다 (시간은 시료를 넣고 나서 끓기 시작하는 시점에서부터 측정한다).
- 7분간 끓인 후 10ml의 증류수를 넣고 바로 시험관을 꺼낸다.
- 반응이 일어난 시료를 550nm에서 발색을 측정한다.
- 표준곡선을 구하기 위해 측정값은 Y축으로 비교하고 각 농도의 절반의 값을 X축으로 (100, 200, 300, 400, 500, 600) 비교한다.

- Blank 곡선 : 0.5ml의 포도당 용액 대신 0.5ml의 증류수를 취해 표준곡선과 같은 과정을 거쳐 곡선을 그린다.

바. 측정

- 측정을 위한 효소 용액 제조 : 정확히 1.000g의 시료를 측정하여 50ml의 시험관에 담는다.
- 상기 튜브에 19ml의 증류수를 첨가하여 vortex mixer로 덩어리가 완전히 풀릴 때까지 혼합한다.
- 덩어리가 풀린 tube를 40±2℃의 항온수조에 넣어 60분간 가운을 하는데 3 ~ 4회 shaking을 해준 후 여과지를 이용하여 여과한 후 이 여과액을 효소 분석을 위한 시료로 사용한다.
- 효소시료의 희석은 증류수를 이용하여 특정 배수로 (OD값은 0.2 ~ 0.4 사이로 유지) 진행한다.
- 희석 시료액 0.5ml를 취하여 40℃로 가온 후 여기에 1.5ml의 CMC-Na 용액을 첨가하여 다시 40℃로 가온한다 (희석 배수가 다른 시료들도 다른 시험관에 넣어 동일하게 진행한다). 40℃에서 20분간 보관 후 (시간은 정확히 지킬 것) 3ml의 DNS 시약을 넣고 7분 동안 끓는 water bath에서 끓이고, 반응을 종료시킨 후 표준 곡선과 같은 방법으로 OD를 측정한다.
- Blank 곡선 : 0.5ml의 희석 시료액을 취하여 3ml의 DNS 시약과 1.5ml의 CMC 시약을 첨가하여 표준곡선과 같은 과정을 거쳐 곡선을 그린다.

사. 계산

$$\text{CMC Enzyme Activity } (\mu\text{molG} / \text{hr}\cdot\text{g} \text{ 또는 } \mu/\text{g}) = \frac{r}{W \times 20} \times \frac{60}{180}$$

r = 표준 포도당 용액에 대한 표준 곡선으로 부터의 포도당 량, 60 = 1 시간 (60 분)

W = 반응을 일으키는 실제 효소의 양으로 $0.5 \times \frac{1}{\text{dilution factor}}$

제 4 항. 효소활성 분석결과

효소활성 비교평가를 위해 국내 시장에 주로 유통되는 사료용 효소제 3종 및 자체 고상발효를 통해 제조된 샘플에 대해 상기 3가지 방법에 대한 효소활성 분석을 실시하였다(표 8).

표 8. 경쟁제품 및 자체 발효제품의 분석방법 별 효소활성 분석결과

Samples	Cellulase (U/g)		
	Method-1	Method-2	Method-3
Comp. A	288.5±4.3	318.2±5.2	4,454.8±220.3
Comp. B	124.3±4.1	132.4±2.5	1,853.6±112.3
Comp. C	275.9±5.2	318.3±4.6	4,774.5±130.3
<i>T. reesei</i>	240.1±3.7	245.4±5.8	3,681.0±215.3
<i>A. niger</i>	45.7±2.3	55.3±3.3	940.1±41.3

효소활성 분석결과 분석방법별로 차이가 있었으며, 방법1과 2에서는 큰 분석결과의 차이를 확인할 수 없었으나, 분석방법 3의 경우 분석방법 1, 2와의 차이가 약 15~17배 정도로 상당히 높은 효소활성을 나타내는 것을 확인하였다.

효소활성 측정결과 분석방법 2와 분석방법 3의 결과를 비교하였을 때, 분석방법 2의 경우 Comp. A 와 Comp. C의 효소활성이 거의 동일하게 측정되었으나, 분석방법 3에서는 그 차이를 더 명확하게 볼 수 있었다. 각 분석방법은 DNS를 이용한 환원당 측정방법으로 원리는 동일하지만, 과정 중 buffer 조성 및 추출시간에서 비롯된 효소활성의 정의 등에서 차이를 보였다. 따라서 제조샘플의 효소활성을 잘 표현할 수 있는 분석방법 3을 본 과제 진행을 위한 표준 분석방법으로 선정하였다.

제 6 절. 섬유소 분해 활성 증가 미생물 개발

제 1 항. 실험 목표

- 가. Cellulolytic probiotics 개발을 위해 반추동물의 반추위 및 생활 식품군에서 섬유소 분해 미생물을 선발한다.
- 나. Cellulase production 및 activity가 향상된 균주를 고전적 mutation과 genome shuffling을 이용하여 개발한다.

제 2 항. 실험 재료 및 방법

가. Bacteria identification

1년차 연구에서 선발된 균주의 동정을 위하여 genomic DNA를 Kit(DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen)로 추출하였다. 분리된 DNA를 주형으로 16s rDNA를 PCR로 증폭하였고, 사용한 primer는 다음

과 같다.

(1) 27f : 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3'

(2) 1492r : 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3'

1515bp 크기의 반응 산물을 수거하여 automatic sequencer를 이용하여 염기서열을 분석한 후 NCBI의 GenBank 자료에 근거하여 분자생물학적 분류를 진행하였다.

나. U.V. mutation

선발된 균주의 섬유소 분해 효소 역가 향상을 위하여 U.V. mutation을 시도하였다. 선발 균주를 seed culture한 후, 1차 계대 배양하여 overnight시킨 다음, plating하여 mutation 시킬 균주 준비를 완료하였다. 250nm 파장대의 빛을 내는 U.V. lamp 2개(Sankei Co. Ltd., 20W)를 사용하였고, 30cm의 거리를 두고 10~12분간 U.V. 조사하였다. 이 후 빛이 들어가지 않도록 호일로 씌워 37°C incubator에서 24hr 배양시켰고, 살아남은 균주를 선발하여 Azo-CMC(Megazyme, Ireland) LB media에 계대 배양하여 발색 반응 정도로 activity를 측정하였다. overnight시킨 Azo-CMC LB media를 1ml 취하여 4°C에서 13,000g×10min으로 원심분리한 후 상등액 500ul과 precipitation solution (Sodium acetate trihydrate 4g; Zinc acetate 0.4g; 15ml의 증류수에 녹인 후, NaOH로 pH 6.5로 적정하고 100% ethanol 80ml 첨가)1ml 과 room temperature에서 10분간 반응시켰다. 반응 sample을 vortexing한 후, 13,000g×3min동안 원심분리하고, 상등액의 발색정도를 U.V. spectrometer(UV-1601PC, Shimadzu Co. Ltd)에서 590nm의 파장으로 측정하였다.



그림 14 U.V. mutation system. 전경

다. Genome shuffling

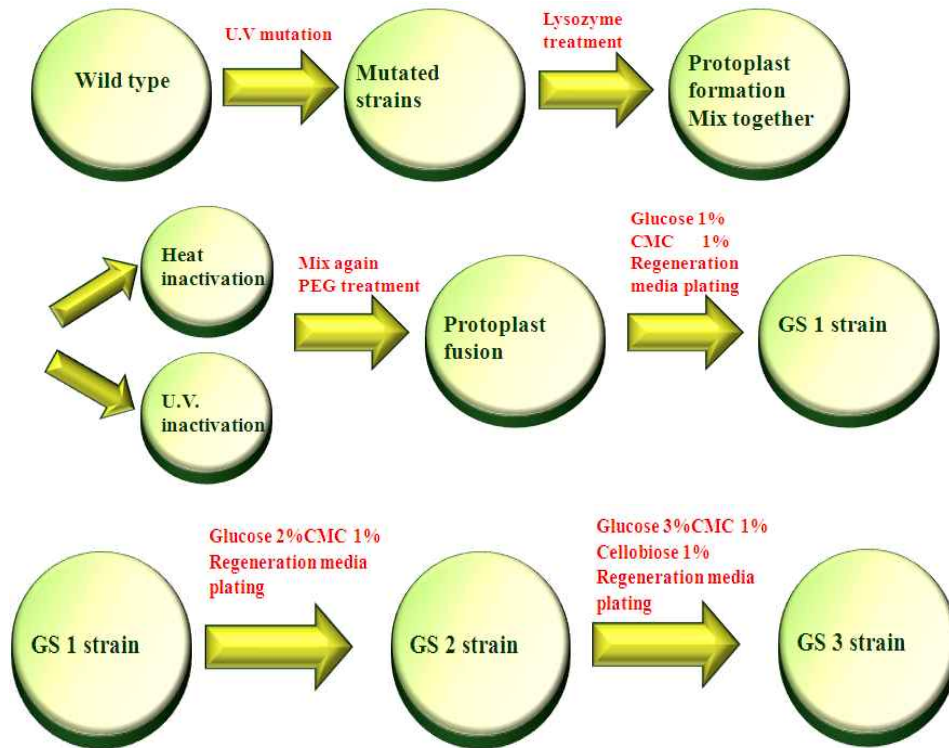


그림 13. Genome shuffling 의 개요.

선발된 균주의 섬유소 분해 효소 역가향상을 위해 사용된 genome shuffling 방법은 그림 13와 같다. U.V. mutation된 균주 중 wild type 균주보다 역가가 향상된 균주를 1차 선발하여 parental strain으로 규정하였다. parental strain 각각을 PAB broth 10ml에 seed culture한 후, 다시 40ml PAB broth에 계대 배양하여 OD value 0.4~0.5에서 배양액을 4°C, 4000g×10min 조건으로 원심분리하여 pellet을 추출하였다. 추출된 pellet에 lysozyme이 포함된 SMM solution(0.5M sucrose; 0.02M maleic acid; 0.02M MgCl₂)을 첨가시킨 후 shaking incubator에서 37°C, 100rpm×30min 조건으로 배양하여 protoplast type을 완료하였다. protoplast type의 parental strain을 다시 원심분리하고 세척한 다음, 0.4ml의 SMM solution을 첨가하여 resuspension 시켰고, 동량의 parental strain을 pipetting하여 섞어주었다. 각각의 parental strain이 섞인 시료를 2개로 분리한 후 protoplast inactivation 과정(U.V. inactivation; Heat inactivation)을 수행하였고, 이를 PEG solution에 동일한 양으로 첨가하여 protoplast fusion이 되도록 하였다. fusion된 sample을 취하여 십진 희석한 후 regeneration agar media에 plating하여 genome shuffling 된 1세대 균주를 확보하였고, U.V. mutation strain보다 역가가 증진된 균주를 다시 확보한 후, GS2 strain과 GS3 strain까지 실험을 수행하였다. shuffling 세대가 올라갈수록 역가 향상을 기대하기 위하여 regeneration agar media에 첨가되는 glucose의 양을 증가시켰고, GS3 균주를 확보할 시에는 cellobiose도 첨가하였다.

라. 선발균주의 섬유소 분해효소 역가 측정

선발 균주의 섬유소 분해 효소 역가 측정은 균주의 배양 상등액을 조효소로 사용하여 수행되었다. 상

등액에 존재하는 섬유소 분해효소(CMCase)의 역가는 carboxymethyl cellulose로부터 분해되어 나오는 환원당의 함량을 3, 5- Dinitrosalicylic acid(DNS)로 인해 발색되는 정도로 측정함으로써 분석하였다. 원심 분리한 상등액 0.1ml을 1% CMC solution 300 μ l과 혼합하여 50 $^{\circ}$ C water bath에서 1시간동안 배양한 후 300 μ l DNS solution을 첨가하여 반응을 정지시키고 boiling water에 5분간 반응시켜 발색시킨 후, U.V spectrometer(UV-1601PC, Shimadzu Co. Ltd)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 분석하였다. 효소에 의해 환원되는 glucose의 양을 측정하기 위하여 glucose를 표준물질로 하여 검량선을 작성한 후 배양액에 존재하는 환원당의 농도를 측정하였다. 단위는 Unit/ml로 1 unit은 enzyme 1ml이 1min동안 환원시키는 glucose의 μ mol의 양을 의미한다.

마. RAPD PCR

genome shuffling 균주의 fusion 여부를 확인하기 위하여 RAPD PCR을 수행하였다. 최종적으로 선발된 genome shuffling 균주와 wild type균주를 seed culture하고 1차 계대 배양한 후, 배양액을 13,000g \times 1min간 원심 분리하여 cell pellet을 확보하였다. 확보된 cell pellet에서 genomic DNA extraction kit(DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen)을 사용하여 gDNA를 추출하였으며, 상기 gDNA를 template으로 하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 pre-incubation, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 36 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 extension 시키는 반응을 45회 반복한 후 72 $^{\circ}$ C에서 8분간 반응시키고 cooling하는 과정으로 수행되었다. RAPD PCR에 사용된 random oligopriemer는 표 9와 같다.

표 9. RAPD PCR용 Primer

Name	Sequence	GC contents(%)	Tm($^{\circ}$ C)
B1	5' TACAACGAGG 3'	50.0	30.0
B2	5' TGGATTGGTC 3'	50.0	30.0
B3	5' TCGGTCATAG 3'	50.0	30.0
B4	5' TACCTAAGCG 3'	50.0	30.0
B5	5' GATCATAGCG 3'	50.0	30.0
B6	5' AACGCGTAGA 3'	50.0	30.0
B7	5' TACGATGACG 3'	50.0	30.0
B8	5' TAGAGACTCC 3'	50.0	30.0
B9	5' CACATGCTTC 3'	50.0	30.0

제 3 항. 결과 및 고찰

가. Bacteria identification

genome shuffling에 적용하기 위한 균주는 반추위에서 선발된 균주로서 혐기 및 호기 상태에서도 자라는 것으로 1년차 연구에서 확인되었다. 위 균주에 대한 분자생물학적 방법에 의한 동정을 하기위해 16s rDNA sequencing을 실시하였으며 결과는 다음과 같다.

agagtttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgagcggaccgacgggagcttgctcccttaggtcagcggcg
gacgggtgagtaacactgggtaacctgcctgtaagactgggataactccgggaaccggggtgtaataccggatgcttgattgaaccgcatggttcaa
tcataaaaggtggcttttagctaccacttgcatgagtgacccgcgcgacattagctagttggtgaggtaacggctcaccaaggcgacgatgcgtagccga
cctgagagggtgatcggccacactgggactgagacacggccagactcctacgggagggcagcagtagggaatctccgcaatggacgaaagtctga
cggagcaacgccgctgagtgatgaaggttttcggatcgtaaaactctgtttagggagaacaagtagcttgaataggcggtaccttgacggta
cctaaccagaaagccaggctaactacgtgccagcagccggttaaacgtagtgtaagtgttagagggttccgccccttagtctgacgaaacgcattaagca
cgcggtttctaagtctgatgtgaaagccccggctcaaccggggagggtcattgaaactggggaactgagtgcagaagaggagagtggattcca
cgtgtgacgggtgaaatgcgtagagatgtggaggaacaccagtgcggaaggcgactctctggtctgtaactgacgctgagggcggaaggcgtgggga
gcaaacaggattagataccctggtagtccacgcccgtaaacgatgagtgtaagtgttagagggttccgccccttagtctgacgaaacgcattaagca
ctccgctggggagtacggctgcaagactgaaactcaaggaattgacggggggccgcacaagcgggtggagcatgtggttaattcgaagcaacgc
gaagaacctaccaggtcttgacatcctctgacaacctagagatagggttccccctcgggggagagtgacaggtggtgcatggttctgctcagctc
gtgctgtgagatgtgggttaagtcccgaacgagcgcaacccttgatcttagttgccagcattcagttgggactctaaggtgactgccggtgacaac
cggaggaaggtgggatgacgtcaaatcatcatgcccttatgacctgggctacacacgtgctacaatgggcagaacaaagggcagcgaagccgcg
aggctaagccaatcccacaactctgttctcagttcggatcgcagctctgcaactcactgctgtaagctggaatcgctagtaatcgcgatcagcatgccg
cggatgatacgttccgggcttgtacacaccgcccgtcacaccacgagagtttgaaccccgaagtcggtgaggtaacctttggagccagccgcca
aggtgggacagatgattggggtgaagtcgtaacaaggtagccgta

그림 14. 재래 염소로부터 분리한 *Bacillus licheniformis* 의 16S rRNA sequences.

위의 염기서열 data를 NCBI BLAST에서 분석한 결과 Gene Bank에 등록된 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580과 99%의 homology를 보였다. 상기 균주의 16S rRNA 염기서열은 NCBI에 등록된 29개의 다른 *Bacillus licheniformis* strain과 phylogenetic tree 상에서 비교되었고 그림 15에서 확인할 수 있듯이 선발된 균주는 *Bacillus licheniformis* sp.인 것으로 확인되었다.

나. U.V. mutation

선발된 균주의 역가 향상 및 genome shuffling으로의 적용을 위하여 U.V. irradiation 방법이 도입되었다. 1차 U.V. mutation 적용 시, 빠른 screening을 위하여 Azo-CMC를 함유한 25cm×25cm의 대형 plate에 계대 배양 시킨 선발 균주를 평판 도말한 후, U.V. irradiation 시키는 방법을 사용하였다. 24시간 대형 plate에서 배양 시킨 후 colony주변에 colorless zone의 크기가 큰 것을 중심으로 돌연변이 균주를 선발하려 하였다(Figure 4). 약 2,000 개의 살아남은 colony를 선발하였으나, colony 주위의 환의 크기는 실제 DNS를 사용한 endoglucanase의 결과와 비례하지 않았다. 따라서 추가 실험을 진행하였다. 2차 실험에서는 1차 실험과는 달리 희석하지 않은 균주 배양액 자체를 도말하여 사용하였고, U.V. 조사 시간을 15초에서 10~12min으로 늘려 균주의 survival rate을 획기적으로 낮추려 하였다. 또한 살아남은 균주의 섬유소 분해효소 역가를 측정하기 위해 Azo-CMC가 포함된 liquid media에 계대 배양시켜 상등액을 회수한 후, precipitation solution 첨가 시 발색정도를 측정하려 하였다. 상기 방법을 사용할 경우, 1차 실험 보다는 screening이 늦어지는 단점이 있으나, 정확한 activity 측정이 가능하다는 장점과 DNS reducing sugar assay에 비해 빨리 activity를 측정할 수 있다는 장점이 있었다.

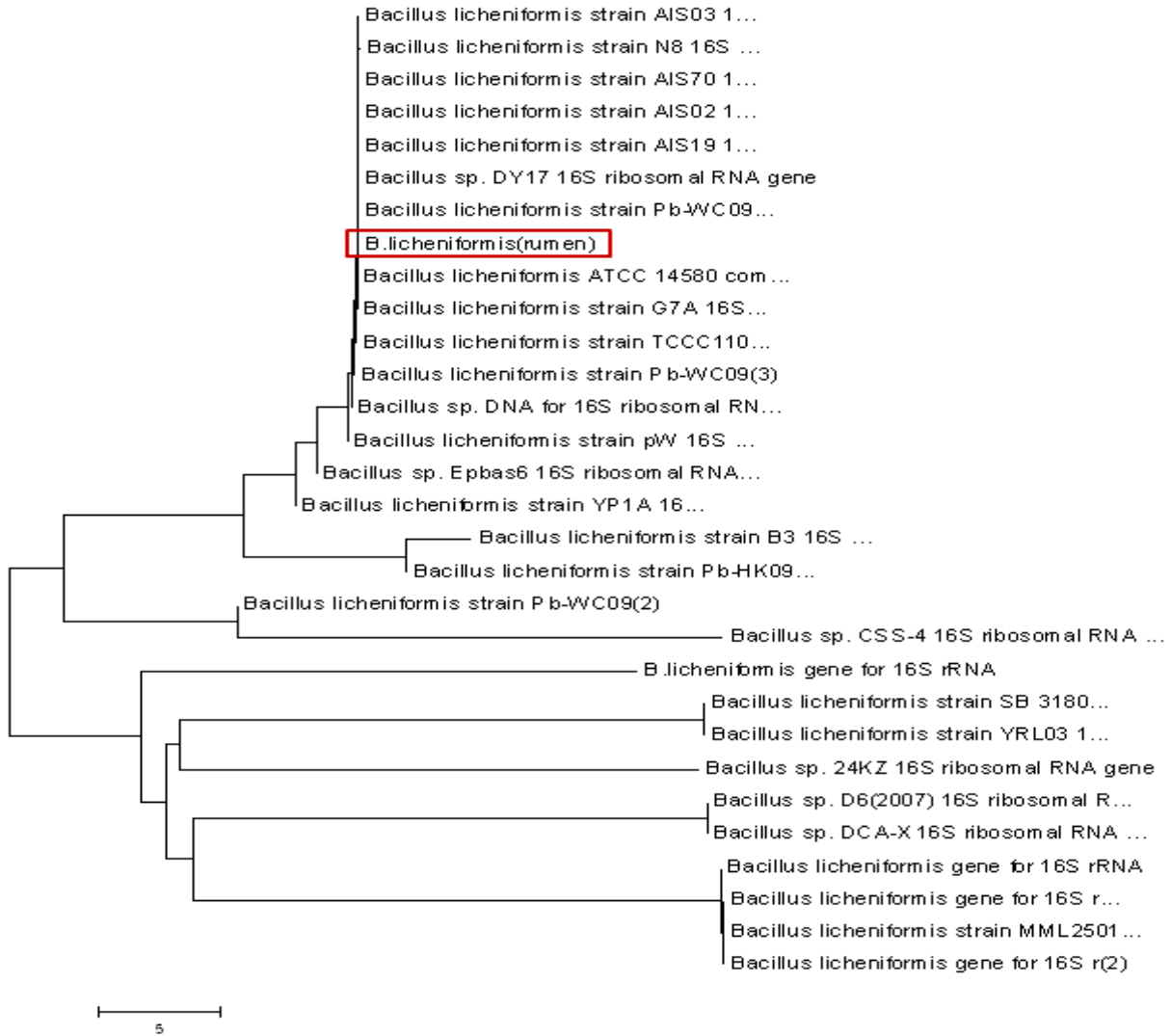


그림 17. *Bacillus licheniformis* 계통수.



그림 18. U.V. 조사 후 *Bacillus licheniformis* sp. 의 colony 모습.

2차 U.V. mutation 실험을 통해 선발된 균주는 배양 상등액의 발색정도를 이용하여 activity 측정을 하

였고, wild type 균주보다 50%에서 100%까지 역가가 증가된 균주를 확보할 수 있었다(그림 17). 확보된 mutation 균주는 지속적인 계대 배양을 통해서 증가된 역가가 유지되는 지를 확인하였다. 2차 실험에서는 약 60 colony를 선발함에도 불구하고 역가가 향상된 균주를 확보할 수 있었는데 이는 U.V. irradiation time을 1차 실험에 비해 상당히 늘림에 따라 가능할 수 있었던 것으로 사료된다.

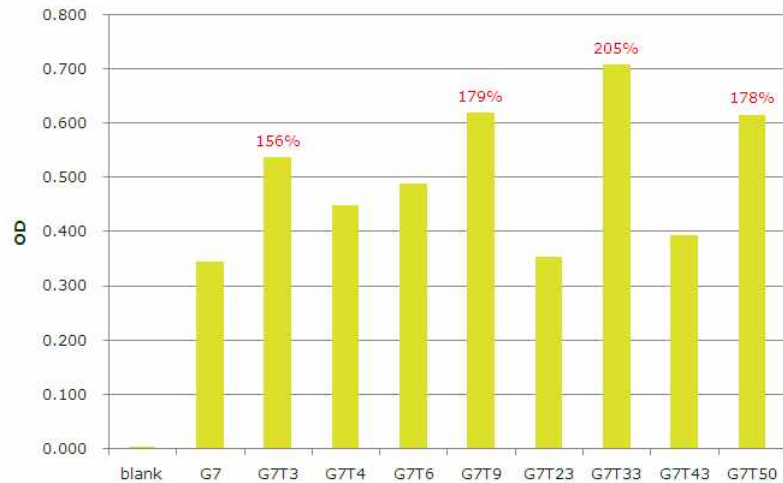


그림 19. Colorimetric degree of wild type strain(G7) and U.V. irradiated strains.

다. Genome shuffling

U.V. mutation에서 역가가 향상된 균주를 parental strain으로 하여 genome shuffling을 수행하였다. genome shuffling은 classical breeding에서 취할 수 있는 장점인 entire genome recombination과 분자 생물학적 수준에서 이루어지는 DNA shuffling의 장점을 취합한 방법이다. U.V. irradiation이나 EMS와 같은 chemical treatment를 통해 wild type을 mutation 시킨 후 genome shuffling을 위한 다수의 parental strain을 선발하고, 선발된 strain 사이의 지속적인 protoplast fusion을 유도함으로써, entire genome의 반복적인 재조합을 기대하는 것이다(Zhang et al., 2002). 본 연구의 목표는 실제로 사용가능한 생균제의 개발임에 따라 유전자 재조합이 된 균주는 사용이 제한되었다. genome shuffling을 사용할 경우 외래 유전자의 도입과 같은 유전자 재조합이 된 균주가 아니기 때문에 균주 자체를 사용할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

실제로 genome shuffling을 사용하여 미생물 유래 물질의 생산성을 높인 사례가 지속적으로 발표되고 있는 상황이다. Zhang 등(2002)은 *streptomyces fradiae*의 tylosin 생산성을 높이기 위하여 genome shuffling을 적용하였고, Genome shuffling 2 step 단계에서 wild type보다 4배 정도의 생산성을 보이는 균주를 확보하였다. 뿐만 아니라, *Bacillus subtilis*를 이용한 riboflavin의 생산성 향상(Chen et al., 2004), *lactobacillus sp.*의 내산성 및 lactic acid 생산성 향상(Patnaik et al., 2002; Wang et al., 2007) 등이 보고되었고, Cheng 등(2009)은 *Penicillium decumbens* JU-A10 균주를 genome shuffling하여 cellulase production을 향상시켰다고 보고하였다.

본 연구에서는 한국 재래 산양 반추위에서 분리된 *Bacillus licheniformis sp.*를 wild type strain으로 하여 genome shuffling을 진행하였다. 상기 균주는 호기 및 혐기 상태에서 자랄 수 있을 뿐만 아니라 반추

동물의 반추위 유래 미생물임에 따라 생균제의 조건 중 하나인 host specific한 미생물이라는 장점이 있다.

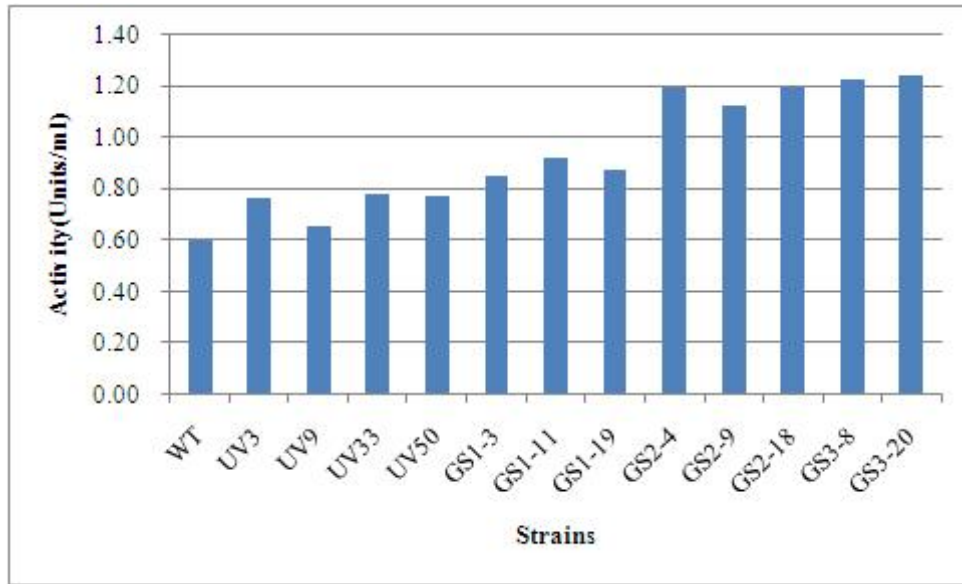


그림 20. Endoglucanase activities of wild type, U.V. mutated strains and genome shuffled strains.

U.V. mutation을 통해 선발된 총 4개의 균주(UV3, UV9, UV33, UV50)는 각각 wild type보다 27%, 8%, 30%, 29%정도의 역가 향상을 보였고, GS1균주(GS1-3, GS1-11, GS1-19)는 42%, 53%, 45%의 역가향상을 보였다. GS1균주를 parental strain으로 하여 진행된 genome shuffling 2차 실험에서 선발된 GS2균주(GS2-4, GS2-9, GS2-18)는 wild type 균주보다 87%에서 100%의 역가 향상을 보였으며, GS3균주역시 wild type 균주보다 높은 섬유소 분해 능력을 보였지만 GS2균주와는 큰 차이를 보이지 않았다.

본 연구에서는 최종적으로 섬유소 분해 효소 분비 능력이 큰 미생물로 GS2-18, GS3-8, GS3-20을 선발하여 wild type과의 시간대별 성장 및 섬유소 분해 효소 생산의 차이를 연구하였다.

wild type 균주와 genome shuffling 균주는 성장곡선 및 시간대별 효소 생산 곡선 모두에서 차이를 보였다. 모든 균주의 성장곡선과 섬유소 분해 효소 생산곡선은 seed culture 이후, 2차 계대 배양 뒤 새 배양액에 다시 접종되어 측정되었고 모든 실험은 3반복 진행되었다. WT 및 GS strains은 모두 배양 12시간을 기점으로 성장이 둔화되었다. 하지만 배양시간동안 GS 균주는 WT 균주에 비해서 높은 성장능력을 보였고, 배양 이후 8시간째 성장에서 가장 큰 차이를 보였다. 또한 GS 균주 간에 성장차이는 보이지 않았다.

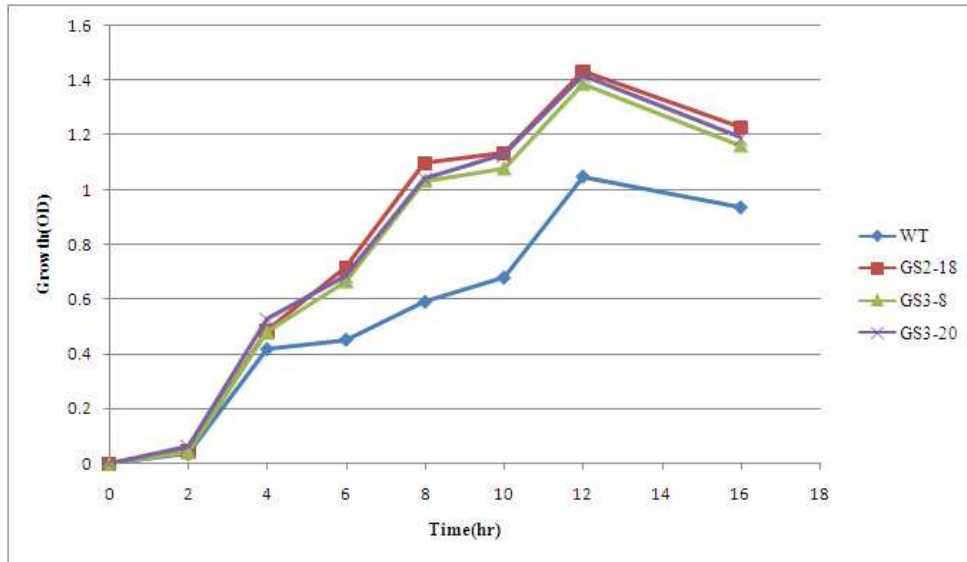


그림 21. Growth curve of wild type and genome shuffled strains.

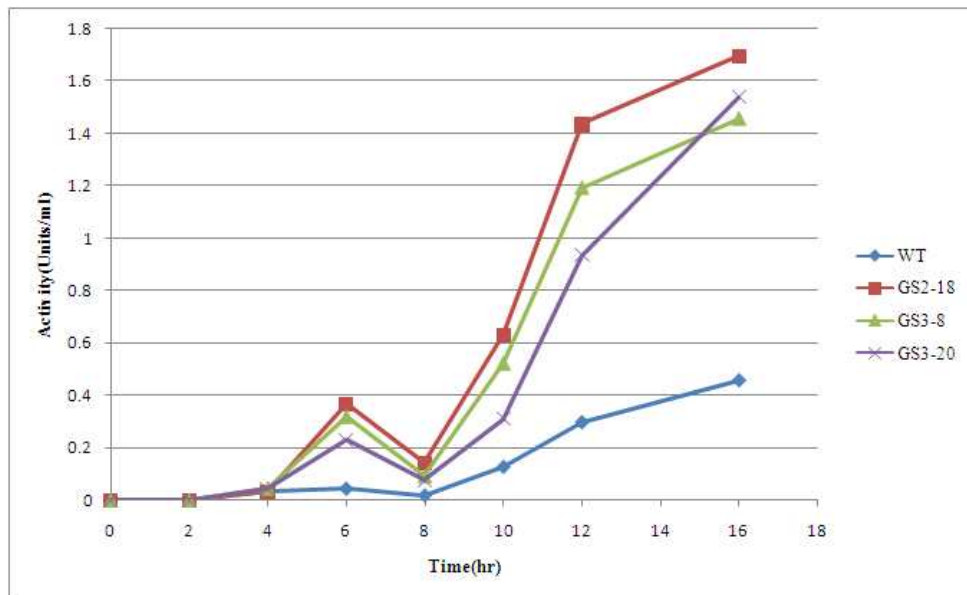


그림 22. Endoglucanase activities of wild type and genome shuffled strains in each time period.

섬유소 분해효소 생산에 있어서 모든 균주는 8시간까지 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 배양 10시간 이후부터 GS 균주의 섬유소 분해 역가는 WT 균주에 비해 높은 양상을 보였고 특히 GS2-18균주가 가장 높은 역가를 보였다. 모든 균주가 12시간 이후 성장 둔화를 보이는 반면 섬유소 분해 효소 역가는 16 시간째 가장 높았다. GS3-20 균주는 배양 12시간 까지 다른 GS균주에 비해 낮은 역가를 보였지만, 배양 종료 시에는 GS3-8번보다 높은 역가를 보였다.

genome shuffling을 이용하여 wild type에 비해 역가가 비약적으로 향상된 균주를 확보할 수 있었다. 추후 실험에서는 WT 균주와 GS 균주에서 생산된 섬유소 분해효소의 optimal pH, temperature, pH와 temperature stability에 관한 실험을 진행할 예정이다. 또한 genome shuffling이 균주의 성장에 영향을 미쳐 섬유소 분해효소의 production을 증가시킨 것인지, cellulase gene에 recombination을 일으켜

cellulase activity 자체를 증가시킨 것인지에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 따라서 차후 실험에서는 각 균주별 cellulase에 관련된 gene sequence의 차이와 2D-DIGE(Difference Gel Electrophoresis)을 통한 각 균주가 생산한 단백질의 차이를 알아볼 예정이다.

라. RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) PCR

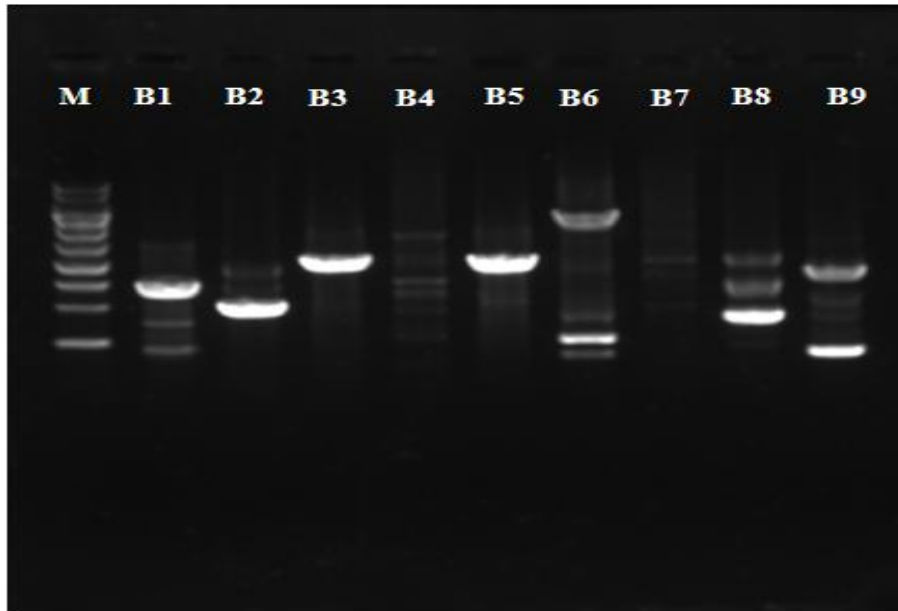


그림 23. The screening of RAPD primer used in genomic DNA of WT strain. M : DNA Marker(10kb).; B1~B9 : random oligoprimer(10bp).

lysozyme 처리 후 제조된 protoplast type 균주들이 fusion되지 않은 채 regeneration media에서 colony를 형성하는 것을 방지하기 위하여 inactivation 과정을 수행하였다. 혼합된 균주를 2부분으로 나누어 한 쪽은 heat inactivation 처리(80℃×60min)를 하였고 다른 부분은 U.V. inactivation 처리(30cm distance×30min)를 거친 후 PEG6000(polyethylene glycol 6000) solution 첨가 하에 fusion을 시도함으로써 fusion이 되지 않은 균주는 사멸할 것으로 예상되었다. 위 과정을 거쳐 선발된 균주는 WT 균주보다 높은 역가를 보이는 것을 알 수 있었고 shuffling 과정에서 fusion이 잘 이루어졌다는 것을 확인 할 수 있었지만 각 균주간의 genotype variation 차이를 통한 fusion 여부를 확인하기 위하여 RAPD PCR을 수행하였다. RAPD PCR은 10bp의 상업용 random oligoprimer(Bioneer Co. Ltd., Korea)를 사용하여 진행되었고, 염기서열이 다른 primer에 따라서 WT의 genomic DNA는 각각 다른 DNA fragment를 보였다(그림 21).

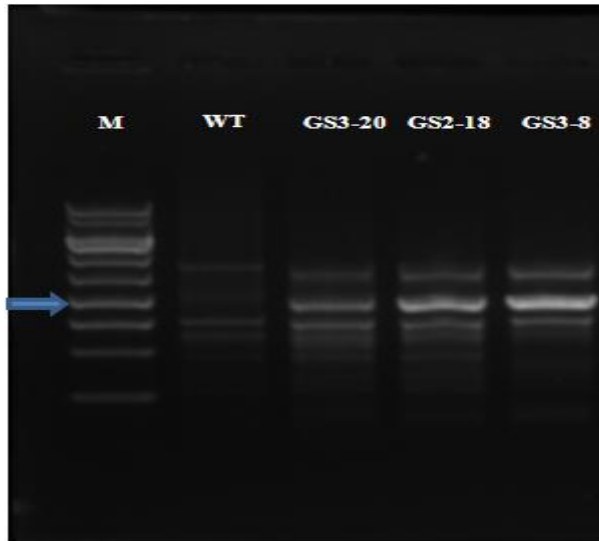


그림 24. RAPD banding patterns produced for the WT strain and GS strains using B4 (5' TACCTAAGCG 3') primer.

상기 primer 중 B4, B9 primer를 사용하였을 때 다른 primer에 비해 강한 증폭 band를 보이진 않았지만 여러 fragment가 나뉘서 증폭되었고(그림 21), 이 중에서 B4 primer가 WT 균주와 GS균주 간의 genotype variation을 확인하기 위하여 사용되었다(그림 22). GS 균주는 WT 2kbp의 크기에서 DNA fragment를 보였지만 WT 균주에서는 보이지 않았다. 또한 GS 균주간 DNA fragment 양상은 유사하였고 GS2-18과 GS3-8 균주는 2kbp에서 GS3-20 균주에 비해 훨씬 진한 fragment를 보이나 더 낮은 bp에서는 오히려 GS2-18과 GS3-20 균주가 서로 비슷한 fragment를 보였다. 이를 통해 본 연구의 genome shuffling은 parental strain 사이에서 fusion이 정확히 이루어졌다는 것을 알 수 있었다.

제 7 절. 섬유소 분해효소 유전자 선발

제 1 항. 반추동물의 반추위로부터 섬유소 분해 균주선발

섬유소 분해효소 유전자를 선발하기 위해 반추동물의 반추위에서 위액을 채취하여 1년차 과제수행 시 확립된 미생물 선발법(Azo-CMC를 첨가한 Dehority(1965) medium)을 이용하여 섬유소 분해 박테리아를 우선적으로 선발, 동정하였다.

가. 위액의 채취

위액은 거세된 Holstein 소의 반추위 cannula를 통하여 채취되었다. 채취된 위액은 미리 보온되고 CO₂ gas가 충전된 용기에 보관하여 실험실로 운반되었고, 사료입자에 부착된 미생물을 분리하기 위하여 homogenizer에 넣고 CO₂ gas를 충전하며 강하게 1분간 교반한 다음, 8겹의 cheese cloth로 여과하여 시료로 이용하였다.

나. 위액의 희석 및 배양

표 10. Modified Dehority agar media의 조성

Composition	Total 100ml
Casein(g)	2
CHO(g)	0.5
bacto agar(g)	2
Mineral sol 1.(ml)	20
Mineral sol 2.(ml)	20
Resazurine(ml)	0.1
Hemin sol.(ml)	0.1
vitamin mixture(ml)	1
VFA sol.(ml)	6.7
rumen fluid(ml)	40
Na ₂ CO ₃ (g)	5
L-cystein-HCl(g)	0.05
liquid sum.	87.9
add water	12.1

*Mineral sol 1 = mineral sol. I : KH₂PO₄ 4.5g in 1L of distilled water

mineral sol. II : CaCl₂(anhydrous) 0.25g, MgSO₄(anhydrous) 0.25g, NaCl 4.5g, (NH₄)₂SO₄ 4.5g, MnSO₄*H₂O 0.1g, FeSO₄*7H₂O 0.1g, CoCl₂*6H₂O 0.01g, ZnSO₄*7H₂O 0.1g in 1L of distilled water

채취된 위액은 수정된 Dehority media를 사용하여 10⁻¹~10⁻⁸까지 희석하였고 희석된 접종액을 섬유소 분해 활성 탐색용 screening media(표 10)에 접종하여 2~3일간 배양 후 선발하였다. Dehority media의 carbon source는 반추위 내의 미생물 중 cellulose를 주로 이용하는 미생물들만 선발하기 위하여 soluble cellulose인 CMC와 glucose, cellobiose를 이용하여 구성되었고, 선발을 위해서 CMC중의 일부가 Azo-CMC로 대체되었다. (media 300ml 당 glucose 0.2g, CMC 1.0g , Azo-CMC 0.4g, cellobiose 0.4g)

다. 섬유소 분해 활성 미생물의 선발



그림 25. Screening of the cellulolytic bacteria in the rumen.

적절히 희석된 위액을 Azo-CMC를 포함한 Dehority agar media에 접종해서 2~3일 배양 후, 섬유소 분해 역가를 보여 고체배지상에 분해환이 발생하는 colony를 1차적으로 선발한 후(그림 23), 3회의 subculture 과정을 거쳐 균주를 선발하였고, 총 18종의 미생물을 선발하여 30% glycerol 첨가 후 -80°C deep freezer에 동결 보관하였다.

(1) Chromogenic screening method

Azo-CMC(Megazyme International Ltd., Ireland)는 주로 endo-1,4-β-glucanase 의 확인을 위해 사용한다. Azo-CMC는 기존에 사용되어 왔던 Congo-Red를 이용한 섬유소 분해활성 미생물 선발(R. M. Teather and P. J. Wood, 1982) 때 수행되는 NaCl washing 과정이 생략되기 때문에 시간이 절약되며 Congo-red와 같은 시약의 독성이 미생물에 미칠 수 있는 영향을 최소화하며, agar plate 상에서 미생물에 의해 분비된 cellulase에 의해 섬유소가 분해되면 노란색 분해환이 생기는 것으로써 섬유소 분해 미생물을 간편하게 확인할 수 있다는 장점이 있었다.

Trypan blue는 생체 염색용으로써 세포의 생존유무를 판단하는데 사용되어져 왔는데, media 내의 polysaccharide와 강하게 상호작용할 수 있는 능력을 이용하여 섬유소 분해 활성 미생물 선발에 이용할 수 있다(Mosier et al., 2004; Hong et al., 2007). Trypan blue는 가격이 저렴하며 활성유무를 확인하는데 걸리는 시간이 짧다는 장점이 있으나 Congo-red 방법보다 정확성이 떨어진다는 단점이 있다. (Jo et al., 2010)

이번 실험의 섬유소 분해 미생물 선발과정에서는 Azo-CMC를 이용한 방법을 사용하였다.

라. 16S rRNA gene sequencing을 이용한 미생물 동정

선발된 18가지 균주의 cellulase activity를 비교하기 위해서 3, 5- Dinitrosalicylic acid(DNS)를 이용한 환원당 측정방법(Ghose, 1987)을 사용하였고, 그 결과 환원당 역가가 높은 C-TS-1,7,14,21 4가지 균주를 선발하여(data not shown) NCBI에 등록된 16S rRNA 유전자 염기서열과의 비교를 통해 위 균주들의 동정을 한 결과 *Eubacterium cellulosolvens* strain Ce2 와 98~99% 일치하였다.

```
>|gb|AY178842.1| Eubacterium cellulosolvens strain Ce2 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1524

Score = 535 bits (592), Expect = 8e-149
Identities = 298/299 (99%), Gaps = 0/299 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 2      GAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGTCTAACACATGCAAGTCGAGCG 61
           |||
Sbjct 2      GAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGTCTAACACATGCAAGTCGAGCT 61

Query 62     AAGCACTCTGGAAGATTCCTTCGGGATGATTCCTTAGTGACTTAGCGGCGGACGGGTGAG 121
           |||
Sbjct 62     AAGCACTCTGGAAGATTCCTTCGGGATGATTCCTTAGTGACTTAGCGGCGGACGGGTGAG 121

Query 122    TAACGCGTGGGCAACCTGCCTTGTACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACC 181
           |||
Sbjct 122    TAACGCGTGGGCAACCTGCCTTGTACAGGGGGATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACC 181

Query 182    GCATAAGCGCACAGCATGGCATCATGCAGTGTGAAAAATCCGGTGGTACAAGATGGGCC 241
           |||
Sbjct 182    GCATAAGCGCACAGCATGGCATCATGCAGTGTGAAAAATCCGGTGGTACAAGATGGGCC 241

Query 242    CGCGTTGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCGG 300
           |||
Sbjct 242    CGCGTTGGATTAGCTTGTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATCCATAGCCGG 300
```

그림 26. Sequence result of selected bacteria C-TS-1 from Holstein.

제 2 항. 섬유소 분해효소 유전자 분리 및 분석

앞서 확인된 *Eubacterium cellulosolvens* 균주는 혐기박테리아로서 특정 환경에서는 반추위내에서 우점할 수 있는 종으로 알려져 있으며 섬유소에 강하게 부착할 수 있는 CBPA(cellulose binding protein A) 등 섬유소 분해능력에 관련된 유전자를 가지고 있는 균주이다(Yoda, K., et al, 2005)(Toyoda, A., et al, 2002), NCBI에 등록된 *E. cellulosolvens*의 유전자를 조사한 결과 크게 두 가지 종류(cel5A gene ; AB179780, cel9C gene ; AB362981)의 섬유소분해 유전자를 가지고 있는 것을 확인하였다. 그 중 섬유소 분해 특성이 endoglucanase로 명확히 밝혀져 있는 cel5A 유전자를 선택하여 유전자 증폭(PCR)과정을 수행하였다.

가. 섬유소 분해효소 유전자 증폭 PCR primer 개발

Name	strain	max identity(%)
C-TS-1	Eubacterium cellulosolvens strain Ce2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
C-TS-7	Eubacterium cellulosolvens strain Ce2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	98
C-TS-14	Eubacterium cellulosolvens strain Ce2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99
C-TS-21	Eubacterium cellulosolvens strain Ce2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	99

그림 27. Max identity score of Nucleotide Blast results of selected bacteria.

먼저 위에서 선발한 4가지 균주 중 C-TS-1, C-TS-21 두 가지 균주의 genomic DNA를 추출하여 (Genomic DNA extraction kit, iNtRON) 섬유소분해 유전자를 증폭하기 위한 template를 만들었다. cel5A 유전자를 증폭하기 위하여 NCBI에 등록되어 있는 cel5A 유전자의 염기서열을 참고로 하여 primer를 만들었다. primer 염기서열은 표 11 와 같으며 이 두 가지 쌍의 primer를 이용하여 유전자 증폭을 수행하였다. 그 결과 0.8% agarose gel electrophoresis를 통해 목적하였던 약 3.5kb 정도의 유전자가 확인되었고, 이를 Qiagen 사의 gel extraction kit를 사용하여 순수한 band를 얻었고, pGEM-T easy vector(Promega)에 삽입하여 cloning 시켰다.

표 11. Primer sequence for amplifying cel5A gene

Primer design for amplifying cel5A	Nucleotide sequence
Eubac-1-f	5'-CAGGCTTTATTTTCAGTGCTC-3'
Eubac-1-r	5'-TTCTACAAAGACGGTTCCTG-3'
Eubac-2-f	5'-GAGCGTTGGGAAATACGATG-3'
Eubac-2-r	5'-GGTTCTACAAAGACGGTTCCTG-3'

나. 섬유소 분해효소 유전자 sequence 조사

표 12. Primer sequence for sequencing of cel5A gene

Primer design for cel5A sequencing	Nucleotide sequence
EC1	5'-GATCTCGAAATCCCAGGTAA-3'
EC2-r	5'-AAGCATTTTCACGCCGTATG-3'
EC3-f	5'-TGATACACTCGCCATGATG-3'
EC4-f	5'-ATATCGCGGTTAAACCGCT-3'

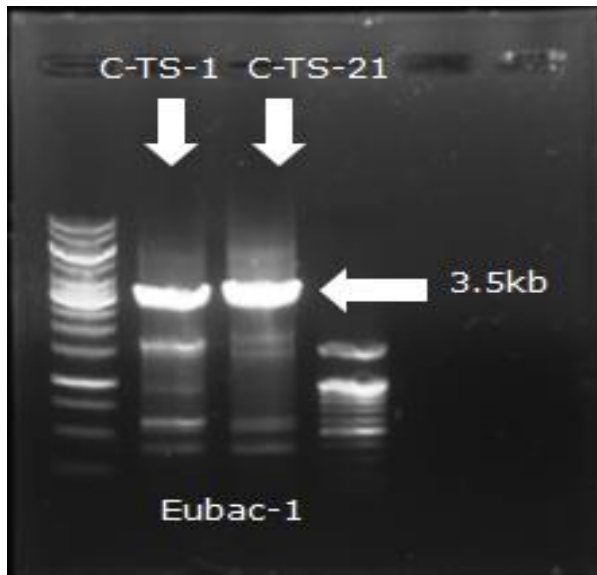


그림 28. gel electrophoresis of cel5A.

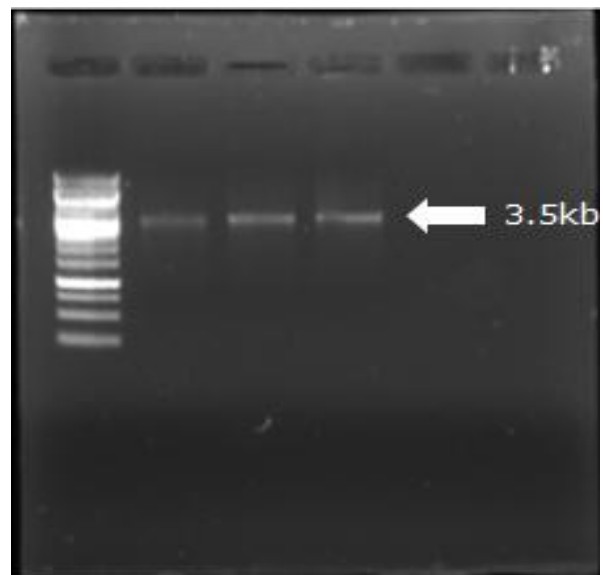


그림 29. gel extraction results.

Cloning된 목적 유전자와 기존에 NCBI에 등록된 *E. cellulosolvans*의 유전자 염기서열과의 비교분석을 위해서 목적 유전자가 삽입된 plasmid DNA를 추출하여(iNtRON 사의 plasmid DNA purification kit 이용) 서울대학교 농업과학기술기공동센터(NICEM)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열 분석에 사용한 primer는 표 12와 같다. 염기서열 분석 결과 NCBI에 등록된 *E. cellulosolvans* cel5A gene(AB179780.1)과는 97%, *Ruminococcus albus*의 beta-1,4-endoglucanase와는 68%의 상동성을 나타내었다.

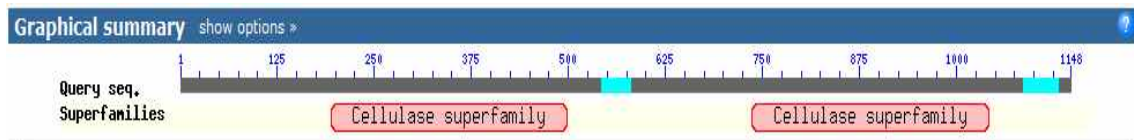


그림 30. Cellulase glycosyl hydrolase family 5.

염기서열 분석결과를 토대로 cel5A가 가지고 있는 catalytic domain을 분석한 결과(그림 28) 2가지의 Cellulase superfamily 5로 밝혀졌고 이들 모두 Cellulase glycosyl hydrolase family 5에 속하는 것으로 밝혀졌다. 추가적으로 염기서열을 번역하여 아미노산 서열을 만들어 기존의 등록된 cel5A 유전자의 아미노산 서열과 비교한 결과는 그림 29와 같다. 기존의 *E. cellulosolvans* cel5A gene(AB179780.1)과는

91%, *Ruminococcus albus*의 beta-1,4-endoglucanase 와는 45%의 상동성을 나타내었다.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

NEWCEL5A      MKGNWLNKDVLRRAVIAAMMLVMVFTLSPATAQGTEAASGDIVLFSGSKHVEFTDWGGTDW 60
CEL5A         MKGNWLNKDVLRRAVIAAMMLVMVFTLLPATAQGTEAASGDIVLFSGSKHVEFTDWGGTDW 60
*****

NEWCEL5A      PSAYELQPPYQAMPFDLNKNFEIKVDYSGADIVLIFARWEHGSKPQIWAQISPPYVVDGT 120
CEL5A         PSAYELQPPYQAMPFDLNKNFEIKVDYSGADIVLIFARWEHGSKPQIWAQISPPYVVDGT 120
*****

NEWCEL5A      AVFTKEQIAKAYGSDDFSDLDYIGVKPLPSADGMTVTKIVASYTSGSSDDVDINLKGIAG 180
CEL5A         AVFTKEQIAKAYGSDDFSDLDYIGVKPLPSADGMTVTKIVASYTSGSSDDVDINLKGIAG 180
*****

NEWCEL5A      EWADGVKIGWNLGNTLDAYDINRFTKTKGHNNPADIEICWGNPVTTKAMIDDIKAQGFNA 240
CEL5A         EWANGVNIKWNLGNTLDAYDINRFKSSKGHNNPADIEICWGNPVTTKAMIDDIKAQGFNA 240
*****
    
```

그림 31. Amino acid sequence alignment with known cel5A.

제 8 절. 효소활성이 개선된 형질전환 균주 개발

앞선 실험에서 분석한 cel5A 유전자를 활용한 형질전환 균주의 개발 및 형질전환된 균주의 cellulase activity를 측정하여 cel5A 유전자가 가지고 있는 섬유소분해 역가와 대장균과 같은 섬유소분해능력을 가지고 있지 않은 균주 내에서의 발현양상을 확인하여 섬유소분해역가가 향상된 균주를 개발하였다.

제 1 항. 사용균주 및 plasmid

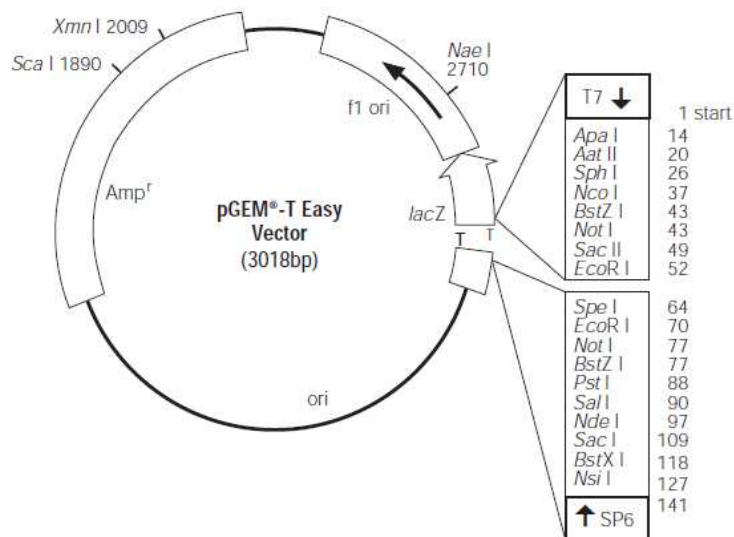


그림 32. pGEM-T easy vector circle map (Promega).

Eubacterium cellulosolvens 는 유전자 제공원으로 사용되었고, 유전자 전환을 위한 숙주균주

로는 *E. coli* Top10으로 cloning vector는 pGEM-T easy vector를 사용하였다. *E. coli* Top10은 LB(Luria-Bertani) medium(5g yeast extract, 10g bacto tryptone, 5g NaCl per liter), 37°C에서 배양하였다. cel5A 유전자는 pGEM-T easy vectop에 ligation 하여 약 8.5kb 정도의 새로운 vector를 만들었다. cel5A가 삽입되어 구축된 vector의 삽입유무는 선별배지 즉, ampicillin(10mg/ml)을 함유한 LB agar를 사용하였고, 선별된 colony를 ampicillin이 함유된 LB medium에서 overnight 배양 후, trypan blue(70mg/L) 가 첨가된 LB agar에서 분해환이 생기는지의 유무로써 형질전환체 *E. coli* Top10에서의 cellulase 활성을 확인하였다.

제 2 항. Cellulase gene cloning 및 형질전환 균주의 확인

pGEM-T easy vector를 앞서 이용한 Eubac-1-f ; 5'-CAGGCTTTATTTTCAGTGCTC-3', Eubac-1-r ; 5'-TTCTACAAAGACGGTTCCTG-3' primer로써 증폭된 cel5A와 ligation (4°C, overnight) 후 *E. coli* Top10 에 형질전환하여 ampicillin, IPTG, X-gal이 첨가된 LB agar에 도말하였으며, 37°C에서 overnight 배양 후 형질전환된 균주를 의미하는 white colony를 다수 분리하였다. 분리된 균주를 trypan blue를 함유한 선별배지에 백금니를 사용해서 긁어 37°C에서 overnight 배양 후 분해환의 유무로써 cellulase의 활성을 확인하였다.

제 3 항. CMCase 활성 측정

Cellulase 활성은 CMC를 기질로 하여 효소 반응 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 다음과 같이 정량함으로써 측정하였다. 증류수에 현탁시킨 1.0% (w/v) CMC 용액과 0.05M potassium phosphate buffer(pH6.6)를 1:2로 혼합하고 4°C, 13000rpm에서 10분 동안 원심분리한 효소 용액을 혼합하여 37°C에서 5분 또는 60분 동안 반응시켰다. DNS 시약을 첨가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 5분 동안 방치하여 발색시키고 1분간 식힌 후 540nm에서 흡광도를 측정하고, 이를 glucose를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와 비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다. 효소 활성도 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 CMC로부터 1 μ mol의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 본 실험에서는 형질전환된 *E. coli*를 lysozyme과 ultrasonication 처리를 해서 extracellular로 분비된 효소, intracellular에 존재하는 효소, whole cell extract 세 부분으로 나누어서 측정을 하였다.

제 4 항. DNA 분리와 조작

LB 액체배지에서 배양한 *E. coli*로부터 plasmid DNA를 분리하기 위해서는 Plasmid DNA purification kit (iNtRON)를 이용하였다. plasmid를 이용한 *E. coli*의 형질전환은 CaCl₂를 이용해 만든 competent cells에 45°C 열충격을 주는 방법으로 실시하였다.

제 5 항. 형질전환 균주 확인 및 효소역가 확인

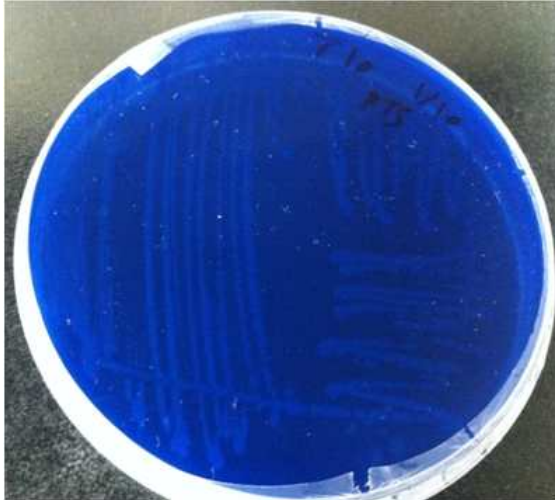


그림 33. *E.coli* Top10.



그림 34. *E.coli* Top10+cel5A.

E. coli Top10 균주는 그림 31에서와 같이 trypan blue가 함유된 LB배지 상에서 cellulase activity를 보이지 않았다. 이에 반해 cel5A가 형질전환 된 *E. coli* 균주는 같은 배지상에서 분해환을 보이는 것을 확인하였다(그림 32). 또한 CMCase 측정결과, 5분 배양 시 기존의 wild type 인 Top10 균주보다 whole cell extract, intracellular, extracellular 모든 부분의 효소역가가 증가한 것을 확인하였다(그림 33). 또한 5분 배양이 60분 배양보다 높게 측정되는 것으로 보아 효소의 반응이 단시간 내에 이루어진다는 것을 알 수 있고, extracellular activity와 whole cell extract activity를 비교해보면 전체 효소역가 중 세포 밖으로 분비되는 효소의 비율이 5min 배양 시에는 약 10.8%, 60min 배양 시에는 약 12.8% 정도여서 세포 내에 존재하는 비율이 높았다.

표 13. CMCase activity of Transformed *E. coli* (5min, 60min incubation)

	5min	60min
Whole	0.232	0.034
Intra	0.19	0.038
Extra	0.028	0.005

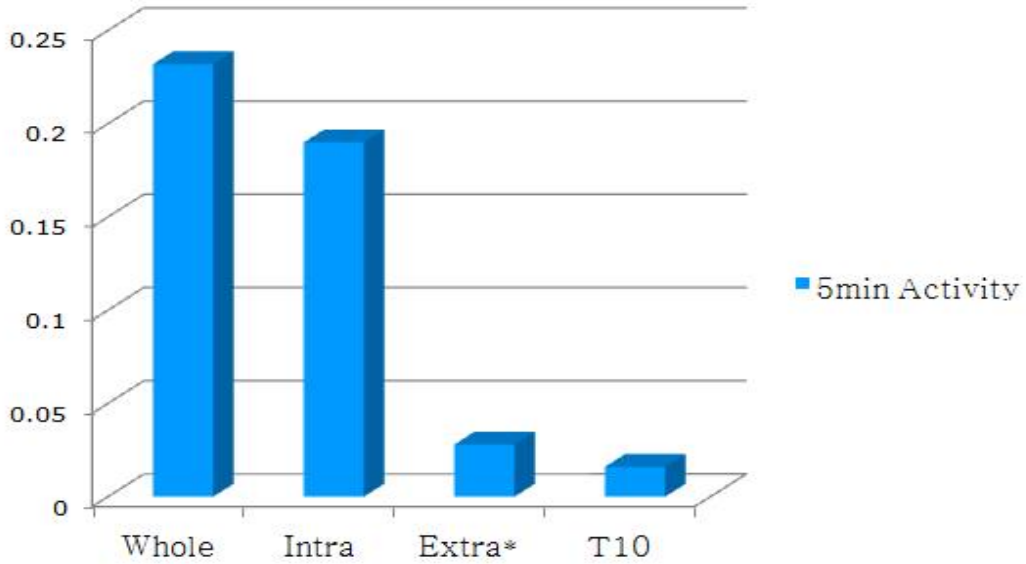


그림 35. CMCase activity with location or distribution of the enzyme.

이와 같이 형질전환 된 균주의 cellulase 활성이 크게 증가된 것으로써 *E. cellulosolvens*의 cel5A가 cellulase activity를 가지지 않는 *E. coli* 균주에서 발현되어 섬유소 분해능력을 개선시킨 것으로 결론을 내었다.

보다 정확한 확인을 위해서 colony PCR(data not shown)을 수행하여 gel 전기영동으로 확인해본 결과 형질전환된 *E. coli* 균주에서도 cel5A와 같은 크기(약 3.5kb)의 band를 확인함으로써 형질전환된 균주 내에 cel5A가 삽입되어 있다는 것을 증명하였다.

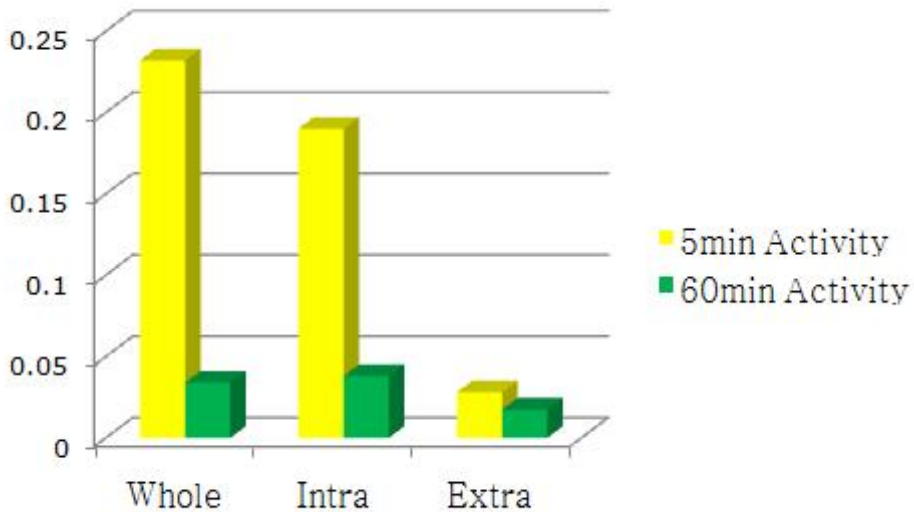


그림 36. CMCase activity distribution in different cell fractions.

제 6 항. 균주 활용방안

지금까지 수행된 cloning 및 형질전환 과정은 모두 pGEM-T easy vector 라는 기존에 유전자 cloning과 염기서열 분석에 주로 활용되는 plasmid vector를 이용한 것이었다. 앞으로 cloning 된 cel5A 유전자를 pET 계열의 효소 발현용 vector에 삽입을 하여 cel5A에 의해 분비되어 지는 endoglucanase의 특성규명을 CMC-SDS-PAGE, Thin layer chromatography analysis 등의 방법으로 수행하고, 효소활성에 가장 적절한 온도, pH, 배양시간 등도 설정해야 한다. 또한 이번 실험에서는 형질전환 대상 균주로 *E. coli*를 사용하였었는데 추가적으로는 섬유소분해능력의 향상이 더 요구되는 LAB(Lactic acid bacteria)와 같은 균주로의 형질전환과정이 수행되어야 할 필요가 있다.

제 9 절. 고상발효를 위한 최종 미생물 선발 및 특성 평가

제 1 항. 섬유소 분해력이 높은 자연계 미생물 선발 및 동정

가. 연구의 세부목표

본 연구에서는 섬유소 분해력이 높은 자연계 미생물을 확보하기 위해서 발효식품으로부터 미생물을 동정하여 cellulase activity 측정하고, 16S rRNA sequencing을 통해 선발된 균주의 identification을 확인하였다.

나. 연구 방법 및 결과

(1) Trypan blue를 이용한 screening plate 방법

전통 발효식품에서 분리한 bacterial strains을 trypan blue (0.007%, w/v)를 첨가한 LB agar plate에서 배양하였다. 이 때 LB 배지는 0.4% (w/v)의 CMC를 탄소원으로 포함하였다. 접종한 plate를 37°C의 배양기에서 overnight 동안 배양을 한 후 colony 주변에 trypan blue의 색이 연해진 환이 형성된 균을 1차적으로 선발하였다. 총 15개의 균주 중 섬유소 분해력을 보인 7개의 균주가 선발되었다. 선발된 균은 0.4% CMC를 함유한 nutrient broth에서 배양하여 30% glycerol을 함유한 상태로 -80°C에 보관하였다.

(2) DNS reagent를 이용한 CMCCase assay

1차적으로 선발된 7개 균주의 정확한 CMCCase activity를 측정하기 위해서 DNS reagent (Miller, 1959; Ghose, 1987)를 이용하여 환원당의 양을 측정하였다. 선발된 균주를 0.4% CMC를 함유한 nutrient broth에서 24시간 배양하였다. 이 배양액을 4°C에서 10분간 13000rpm으로 원심분리하여 그 상층액을 extracellular enzyme preparation으로 이용하였다. 준비된 효소를 0.05M potassium phosphate buffer (pH 6.6)와 혼합한 1% CMC 용액에 넣어 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 용액에 DNS용액을 첨가한 후 끓는 물에서 5분 동안 발색반

응을 유도하였다. UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. Glucose를 이용하여 표준곡선을 구하고 이를 이용하여 환원당의 양을 계산하였다.

CMCase activity 1U은 1분 동안 1 μ M의 환원당을 만들어내는 효소의 양으로 정의하였다.

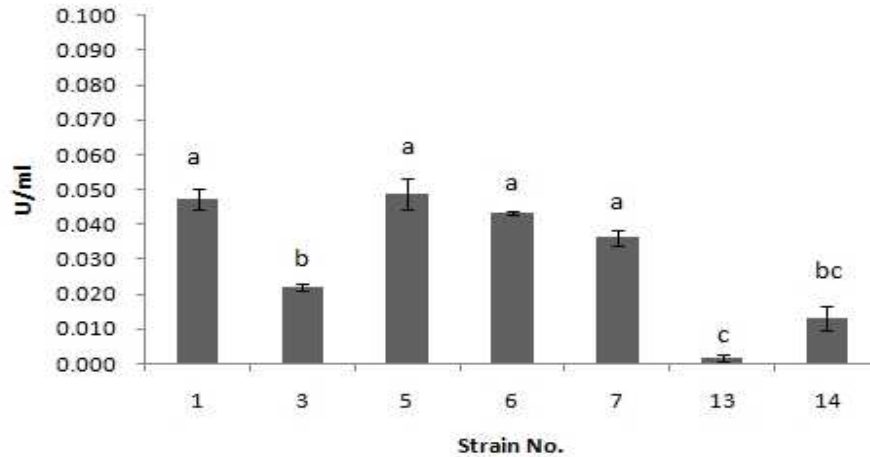


그림 35. CMCase activity of bacterial strains isolated from fermented foods.

^{a-c}: values with different superscripts differ at P<0.05.

그림 35를 보면 1, 5, 6, 7번 균주의 CMCase activity가 유의적으로 차이가 없지만, 6번 균주의 경우 배양속도가 빠르고 계대배양에서도 일정한 CMCase activity를 보였기 때문에 최종적으로 선발되었다.

(3) 16S rRNA sequence 분석을 통한 균주의 identification

조개젓으로부터 분리한 Gram-positive bacteria인 6번 균주로부터 16S rRNA를 추출하여 sequence를 분석하였고 그 결과 6번 균주는 *Bacillus subtilis*와 99%의 유사성을 보였다 (그림 36). 또한 MEGA 4 software를 이용하여 Gen Bank database와의 비교를 통해 계통분석을 하였다 (그림 37).

```

agagtttgatcatggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgagcggacagatggga
gcttgctccctgatgttagcggcggacgggtgagtaacacgtgggtaacctgcctgttagactgggat aact
ccgggaaaccggggctaataccggatggttgttgaaccgcatggttcaaacataaaagggtggcttcggcta
ccacttacagatggaccgcggcgccttagctagttggtgaggtaacggctcaccaggcggacgatgctag
ccgacctgagaggtgatcggccacactgggactgagacacggccagactcctacgggaggcagcagtagg
gaatcttcgcaatggacgaaagtctgacggagcaacggcgcgtgagtgatgaaggttttcggatcgtaaag
ctctgttgttagggaagaacaagtaccgttcgaatagggcggtaacctgacggtaacctaaccaaaaagccac
ggtaactacgtgccagcagccggtaaatcgtaggtggcaagcgttgtccggaattatggggcgtaaagg
gctcgcaggcgggttcttaagctctgatgtgaaagccccggctcaaccggggagggtcatggaaactgggg
atcttgagtgacagaagaggagagtggaattccacgtgtagcggtaaatgcgtagagatgtggaggaacacc
agtggcgaaggcagactctctggtctgtaactgacgctgaggagcgaagcgtggggagcgaacaggat taga
taccctggtagttccacggcgtaaacgatgagtgctaaagtgttaggggggttccggcccttagtgctgcagct
aacgcat taagcactccgcctggggagtagcggtcgcaagactgaaactcaaaggaattgacggggggcccga
caagcgggtggagcatgtggtttaatcgaagcaacgcgaagaaccttaccaggctctgacatcctctgacaa
tcttagagataggacgtccccttcggggggcagagtgacaggtgagtcgatggttgtcgtcagctcgtgctgtg
agatgtgggttaagtcggcaacgagcgaaccccttgatcttagttgccagcatcagttgggcactctaa
ggtgactgccgggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaaatcatcatgcccttatgacctgggct
acacacgtgctacaatggacagaacaaggcagcgaaccgcgaggttaagccaatcccacaatctgttc
tcagtccggtcgcagctcgcgaactcgcgtgaaagctggaatcgctagtaaatcgcggatcagcatgccg
cggtagaatcagttcccgggcttgcacacaccggcctcacaccacgagaggtttgtaacaccggaagtcgg
gaggtaaccttttaggagccagccggcaaggtgggacagatgatggggggaagtcgtacaaggtaccg
ta
    
```

그림 38. 16S rRNA gene sequence of *Bacillus* sp.#6.

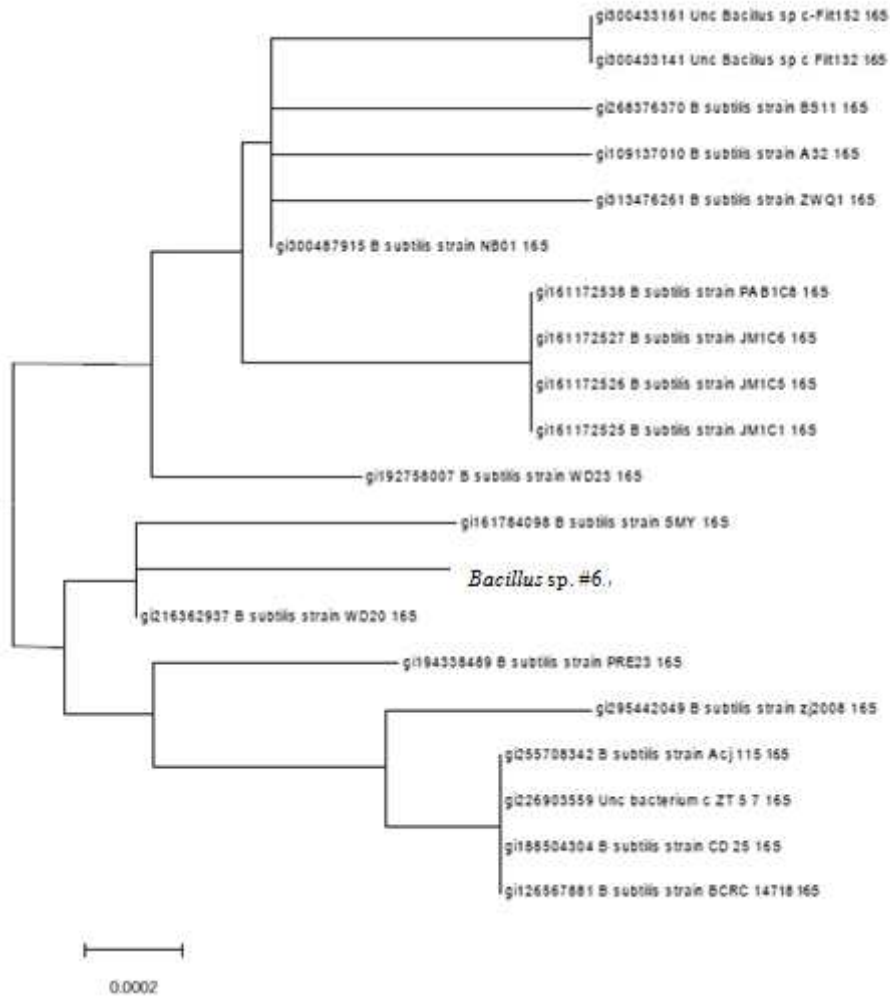


그림 39. Phylogenetic tree of 16S rRNA sequence of *Bacillus* sp.#6 based on the analysis of twenty 16S ribosomal sequences.

제 2 항. 고전적 mutation을 이용한 우수 섬유소 분해 균주 개발

가. 연구의 세부목표

본 연구는 선발된 6번 균주의 섬유소 분해력을 고전적 mutation을 이용하여 증가시킨 균주를 개발하고자 수행되었다.

나. 연구 방법 및 결과

(1) 자외선 처리

선발된 6번 균주에 자외선 처리를 하여 섬유소 분해력이 향상된 균주를 개발하고자 하였다.

6번 균주를 0.4% CMC를 함유한 nutrient agar plate에 접종하고 20W-UV lamp를 plate로부터 30cm 거리에 설치하여 plate에 자외선을 쬐었다. 이 때 자외선 처리 후 살아남는 균주의 생존율을 2%로 정하여 자외선 처리 시간을 10초로 고정하였다. 자외선 처리한 plate는 알루미늄 호일로 싸서 37°C 배양기에서 overnight 동안 배양하였다. 배양 후 생존율 2%인 plate의 colony를 trypan blue를 이용한 screening plate에 접종하여 다시 37°C 배양기에서 overnight 동안 배양하였다. Wild-type인 6번 균주보다 더 큰 환을 형성한 colony를 nutrient broth에서 배양하여 CMCase activity를 측정하였다. 돌연변이 균주 중 CMCase activity가 1.5배 이상 향상된 균주를 선발하여 계대배양을 하였다. 6EH13-2와 6EH22-4 균주는 10번째 generation에서 6번 균주와 유사하거나 그보다 낮은 activity를 나타내어, 자외선 처리로 인해 activity가 향상된 효과는 사라졌음을 확인하였다 (표 14). 이 외 다른 돌연변이들도 선발하여 계대배양 하였지만 향상된 activity가 유지되지 못하였다.

(2) EMS 처리

화학적 처리를 통해 CMCase activity를 향상시키기 위하여 EMS를 mutagen으로 이용하였다. Wild-type인 6번 균주의 배양액 1ml에 20 μ l의 EMS를 첨가하여 1시간 동안 37°C의 shaking incubator에서 반응시켰다. 반응을 멈추기 위해 5% (w/v) sodium thiosulfate 용액 4ml을 첨가하였다. EMS 처리한 배양액을 자외선 처리 방법과 마찬가지로 0.4% CMC를 함유한 nutrient agar plate에 접종하여 배양하고, 생존율 2%인 plate의 colony를 trypan blue를 이용한 screening plate에 접종하여 다시 배양하였다. Wild-type인 6번 균주보다 더 큰 환을 형성한 colony를 nutrient broth에서 배양하여 CMCase activity를 측정하였다. EMS 처리의 경우 전체적으로 자외선 처리에 비하여 CMCase activity 향상효과가 낮게 나타났다. 하지만 6번 균주에 비하여 activity가 25% 향상된 P11의 경우 10번째 generation 뿐만 아니라 그 이후 현재까지 계속 activity가 지속되고 있다 (표 14). 이 돌연변이 균주 P11이 최종적으로 선발되었다.

표 14. CMCase activity (U/ml) of mutants

	1 st generation	10 th generation
<i>Bacillus</i> sp. #6 (wild-type)	0.040 ^c	0.040 ^{ab}
6EH13-2	0.059 ^b	0.043 ^{ab}
6EH22-4	0.075 ^a	0.032 ^b
P11	0.049 ^{bc}	0.050 ^a

^{a-c}: values with different superscripts differ at P<0.05.

제 3 항. 선발된 균주의 섬유소 분해 특성 조사

가. 연구의 세부목표

본 연구에서는 선발된 6번 균주와 돌연변이 균주 P11의 섬유소 분해 특성을 살펴봄으로써

최적조건을 규명하고자 하였다. 또한 기존 생균제와의 섬유소 분해력 비교를 통해 본 연구에서 이용되는 균주의 섬유소 분해력이 어느 정도 효과가 있는지 알아보았다.

나. 연구 방법 및 결과

(1) 균주 성장곡선과 배양시간별 CMCase activity

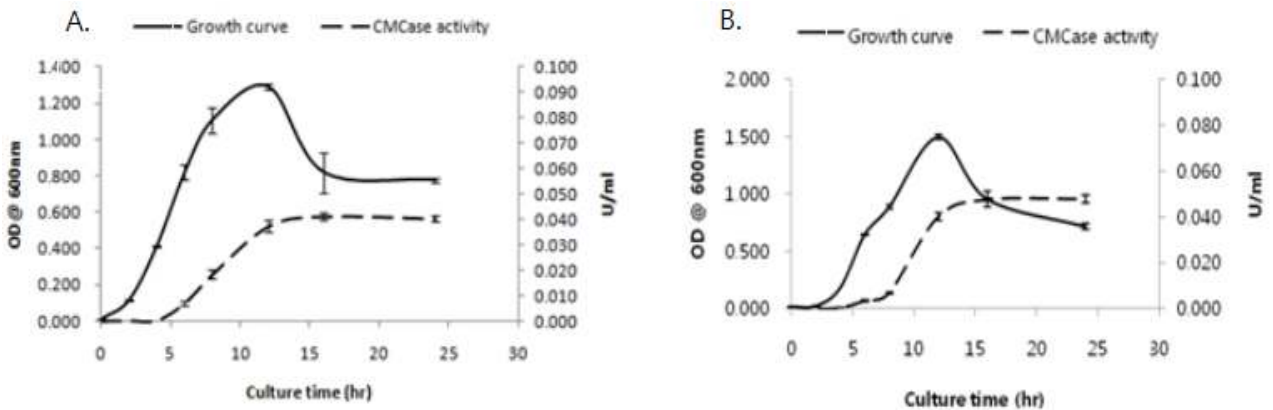


그림 40. Time course study of CMCase production (A, *Bacillus* sp.#6; B, mutant P11).

선발된 6번 균주와 돌연변이 균주 P11을 24시간 동안 배양하여 성장곡선을 구하고 각 배양 시간별 CMCase activity를 측정하였다 (그림 38). 두 균주 모두 배양 12시간째에 성장이 최고점에 달했다가 이후 감소하여 16시간 이후로는 거의 일정하였다. CMCase activity는 12시간 이후 거의 변화가 없는 것으로 보여 성장이 최고점에 달한 이후에는 CMCase activity에 차이가 없는 것으로 판단된다. 또한 배양액 1ml당 CFU는 6번 균주의 경우 10^8 , P11의 경우 그 절반 수준으로 나타났다.

(2) 최적 pH와 온도, 반응 시간에 따라 생성되는 환원당의 양

선발된 6번 균주와 돌연변이 균주 P11에 의해 분비된 extracellular enzyme이 CMC를 분해시키는 반응에서 activity를 향상시키기 위해서 최적의 pH와 온도를 조사하였다. 두 균주 모두 pH 5, 50°C에서 반응할 때 CMCase activity가 가장 높은 것으로 나타났다 (그림 39, 40). 다만 P11의 경우 pH 6.6, 37°C에서 가장 activity가 높은 균주를 선발한 것이어서 최적 조건에서 6번 균주와의 activity차이는 매우 적은 것으로 보이며, 두 균주 모두 pH에 의한 영향이 온도에 의한 효과보다 크게 나타났다. 또한 pH 3일 때 activity가 매우 낮아진 반면, 약산성인 pH 4와 5에서는 6번 균주는 activity가 높은 경향이 있었고 P11은 유의적으로 activity가 높게 나타났다. 반응 시간에 따른 환원당 생성에 관해서도 조사하였는데 두 균주 모두 반응 시간이 길어질수록 점점 생성되는 환원당의 양이 줄어드는 것으로 나타났고, 이로 인해 activity로 계산했을 때 반응 시간이 짧을수록 activity는 높게 표현되었다.

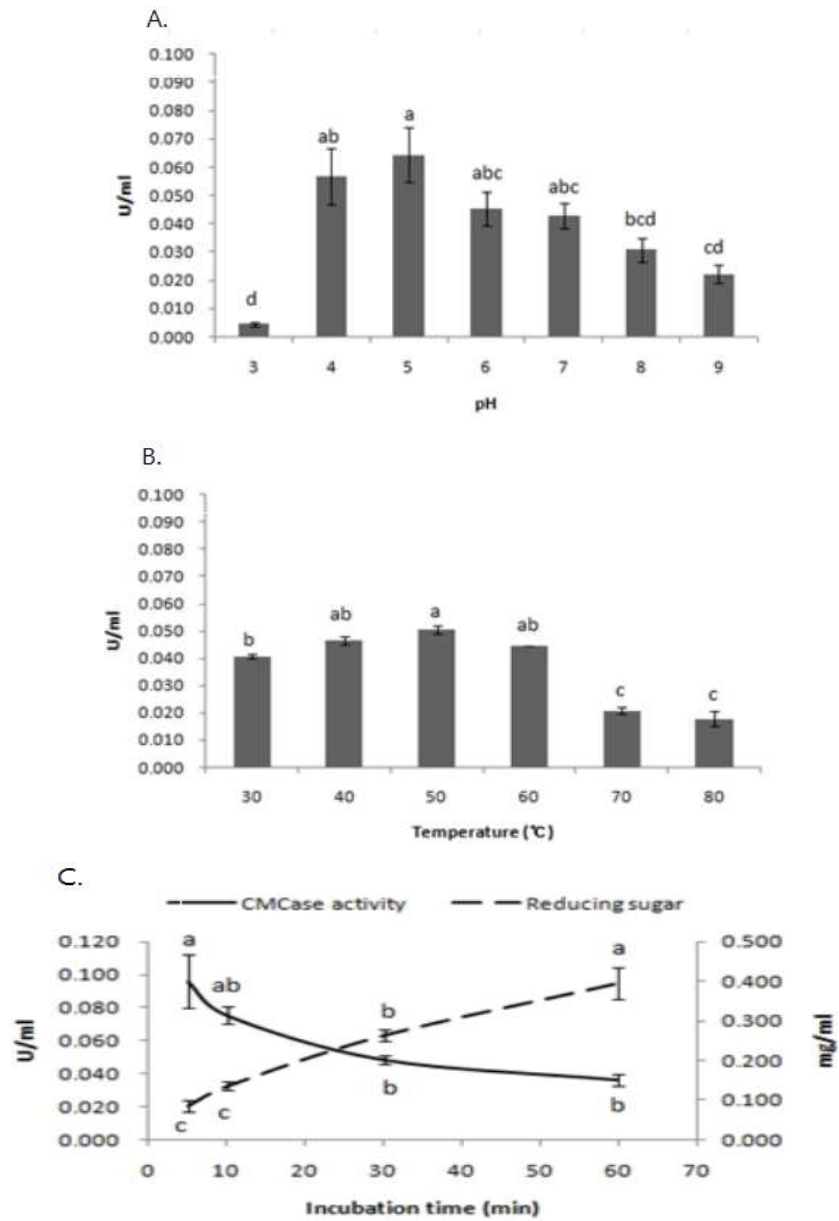


그림 41. Effects of pH, temperature and incubation time on CMCase activity of *Bacillus* sp.#6(A, pH; B, temperature; C, incubation time).

^{a-d}: values with different superscripts differ at $P < 0.05$.

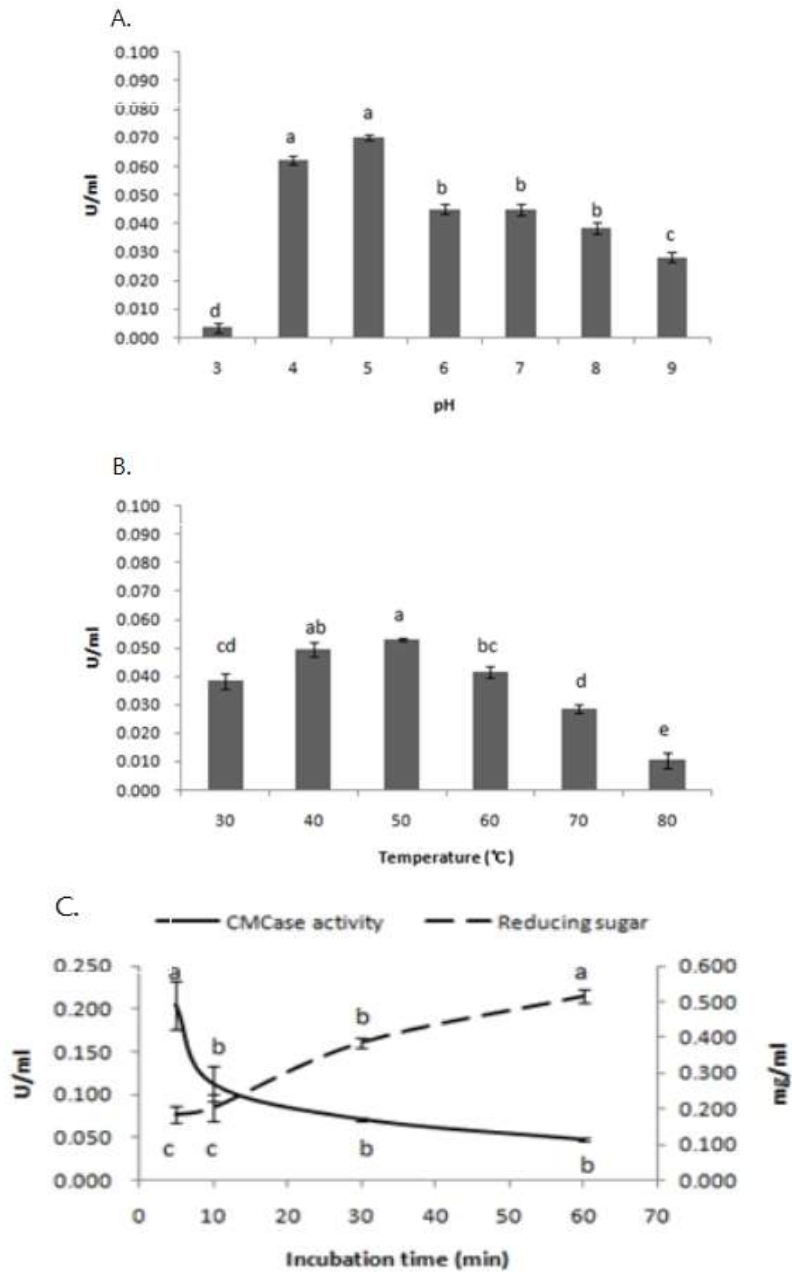


그림 42. Effects of pH, temperature and incubation time on CMCase activity of mutant P11 (A, pH; B, temperature, C; incubation time).

^{a-d}: values with different superscripts differ at $P < 0.05$.

(3) 탄소원에 따른 CMCase의 생산

균주를 배양할 때 배지에 첨가하는 탄소원의 종류에 따라 CMCase 생산에 어떤 차이가 있는지를 알아보기 위하여 6번 균주를 여러가지 탄소원을 함유한 배지에 접종하여 배양하였다. 이때 CMC, Avicel, oat spelt xylan, glucose, xylose를 각각 0.4% (w/v) 첨가한 nutrient broth를 이용하였고 CMCase, avicelase, xylanase의 activity를 측정하였다. Avicelase와 xylanase의 activity는 DNS reagent를 이용하여 CMCase activity 측정 시와 동일한 방법으로 측정하였고, avicelase는 glucose, xylanase는 xylose를 이용하여 표준곡선을 구하고 환원당을 계산하였다.

모든 탄소원에서 avicelase는 거의 발견되지 않았고, xylanase는 xylose 배지에서 조금 발견되었다. CMCase의 경우 CMC 배지와 xylan 배지에서 유의적으로 높은 수준의 activity를 나타내었다 (그림 41).

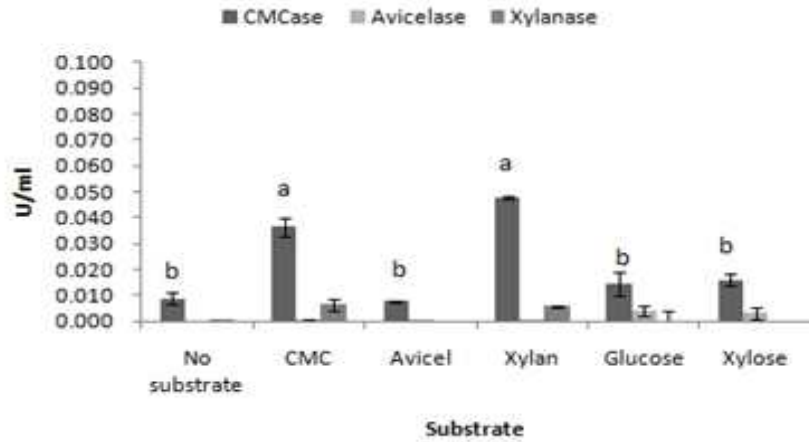


그림 43. Effects of various carbon sources on enzyme production by *Bacillus* sp.#6. ^{a-b}: values with different superscripts differ at P<0.05.

(4) 기존 생균제와의 섬유소 분해력 비교

기존의 생균제 중 *Bacillus* 균주 3종과 *Lactobacillus* 균주 2종의 CMCase activity를 측정하여 본 연구에서 개발한 6번 균주, 돌연변이 균주 P11과 비교하였다. *Bacillus* 3종은 nutrient broth에, *Lactobacillus* 2종은 MRS broth에 각각 배양하였다. 이 때 배지에 CMC를 탄소원으로 첨가하여 CMCase의 생산을 유도하였다. *Bacillus* 3종은 6번 균주에 비하여 65% 정도의 activity를 나타내었고, *Lactobacillus* 2종은 activity가 거의 없는 것으로 나타났다 (표 15). 이를 통해 본 연구에서 개발한 균주들이 기존의 생균제에 비하여 섬유소 분해력에 있어서 우수한 것으로 판단된다.

표 15. CMCase activity of commercial probiotics

Strains	CMCase activity (U/ml)	Relative activity (%)
<i>Bacillus</i> sp. #6	0.039 ^{ab}	100
Mutant P11	0.050 ^a	130.1
<i>Bacillus</i> A	0.025 ^{bc}	65.4
<i>Bacillus</i> B	0.026 ^{bc}	65.9
<i>Bacillus</i> C	0.025 ^{bc}	65.0
<i>Lactobacillus</i> A	0.007 ^{cd}	19.2
<i>Lactobacillus</i> B	0.001 ^d	3.4

^{a-d}: values with different superscripts differ at P<0.05.

제 4 항. 고상발효를 통한 섬유소 분해 효소의 생산

가. 연구의 세부목표

부산물을 기질로 이용한 고상발효를 통해 선발된 균주로부터 섬유소 분해 효소를 생산하는 조건을 확립하고자 하였다. 또한 고상발효를 통해 생산한 섬유소 분해 효소가 사료에 첨가했을 때 소화율에 어떤 영향을 미치는지 반추위액을 이용한 in vitro 실험을 통해 알아보았다.

나. 연구 방법 및 결과

(1) 고상발효를 위한 기질 선발

옥수수, 밀기울, 대두박, 밀기울과 대두박 혼합물 (6:4)을 기질로 이용하여 고상발효를 하였다. 기질 100g에 Toyama's mineral salt solution (Toyama and Ogawa, 1977) 를 50ml 첨가하여 골고루 섞어서 멸균한 후, 6번 균주와 돌연변이 균주 P11의 배양액을 멸균 증류수에 희석하여 접종하였다. 이 때 수분의 양은 Toyama's mineral salt solution과 접종원을 모두 수분으로 고려하여 기질과의 비율이 1:1이 되게 하였다. 접종한 기질은 35°C의 배양기에서 3일간 배양한 후 50°C에서 2일간 건조하였다.

네 가지 기질 중에서 밀기울과 대두박 혼합물이 6번 균주와 P11 모두에서 기질 1g당 CMCase activity가 가장 높은 것으로 나타나서 이를 고상발효 기질로 선발하였다 (그림 42). CFU의 경우 P11을 접종한 SBM을 제외하고 균주와 기질에 상관없이 모두 기질 1g당 10^9 이상의 colony를 형성하였다 (그림 43).

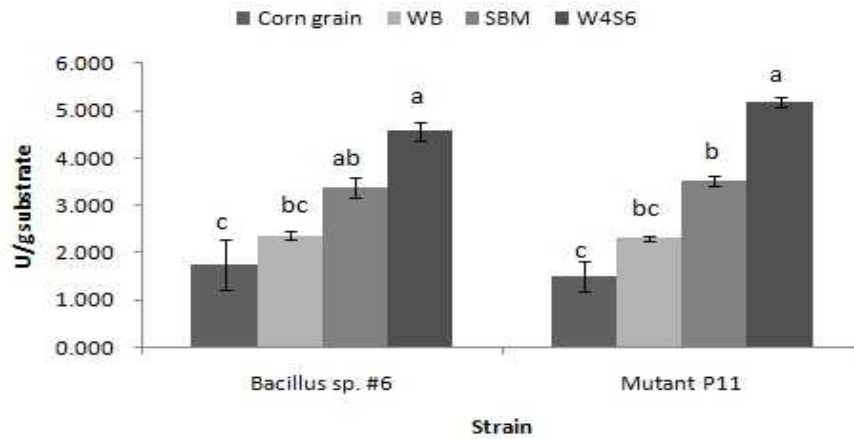


그림 44. CMCase production on various substrates in SSF.

^{a-c}: values with different superscripts differ at $P < 0.05$.

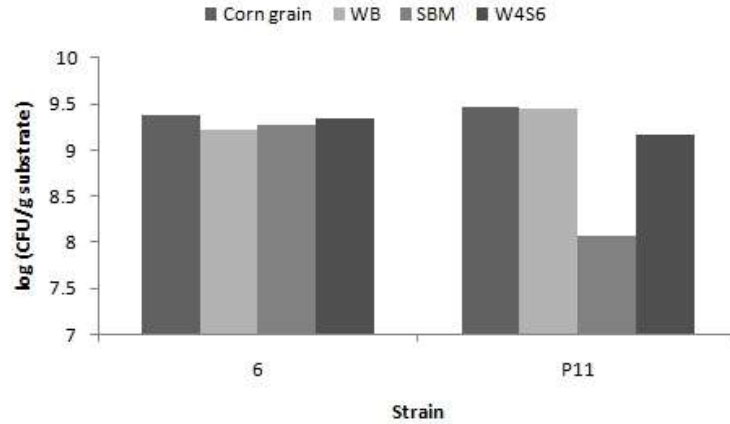


그림 45. Colony count.

(2) 발효시간별 섬유소 분해효소의 생산

각각 24, 48, 72, 96, 120 시간 발효했을 때 생산된 CMCCase activity를 측정하였다. 6번 균주의 경우 최소 72시간, P11은 48시간의 발효가 필요한 것으로 나타났다 (그림 44). 발효시간은 수분의 양과 관계가 있는데, 발효시간이 짧을 경우 수분이 너무 많고, 발효시간이 길 경우 수분이 너무 적어서 발효에 영양을 미친 것으로 보인다.

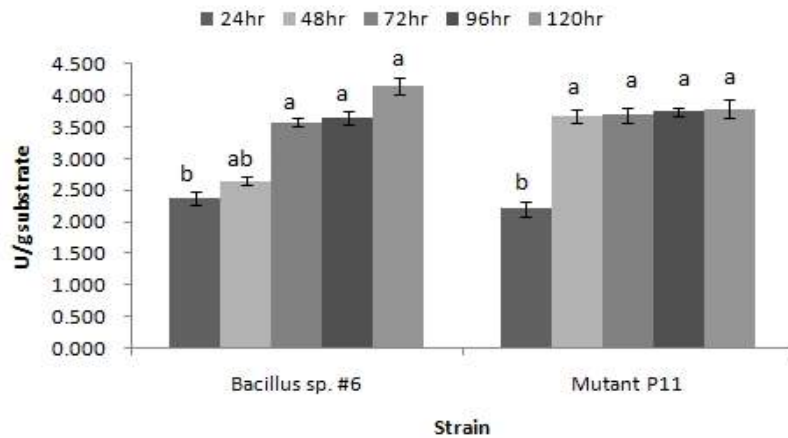


그림 46. Effects of fermentation time on CMCCase production on the mixture of wheat bran and SBM in SSF.

^{a-b}: values with different superscripts differ at $P < 0.05$.

(3) 기질 대 수분 비율과 탄소원 혹은 질소원의 첨가

기질 대 수분 비율을 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2로 하여 고상발효를 한 결과 6번 균주와 P11 모두에서 최소 1:1은 되어야 하는 것으로 나타났다 (그림 45A). 기질 대 수분 비율이 1:0.5인 경우 CMCCase activity가 유의적으로 낮았다.

CMC, peptone, yeast extract를 Toyama's mineral salt solution에 각각 기질의 2%씩 첨가하여 고상발효를 하였다. 6번 균주의 경우 세 가지 모두에서 유의적인 차이가 없었고, P11의 경

우 CMC를 첨가하였을 때 CMCase activity가 32% 정도 증가한 것으로 나타났다 (그림 45B).

(4) 반추위액을 이용한 in vitro 실험

고상발효를 통해 생산한 섬유소 분해효소를 사료 내에 첨가했을 때 건물 소실율에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 반추위액을 이용한 in vitro 실험을 수행하였다. 사료는 조사료, 농후사료, 혼합사료 (조: 농 = 5: 5)를 이용하였고 효소 첨가 수준을 0, 10, 20%로 하였다. 효소는 밀기울과 대두박 혼합 기질을 기질 대 수분 비율을 1:1로 하여 6번 균주를 접종하고 3일간 고상발효 후 2일간 건조하여 그대로 사료에 수준별로 첨가하는 것으로 하였다. 사료에 반추위액을 접종하고 각각 6, 12, 24시간씩 배양하여 시간별로 건물 소실율, gas 생산, pH변화를 조사하였다.

건물 소실율의 경우 사료 종류별, 효소 첨가 수준별로 각각 유의적인 차이를 나타내었다 (표 16). 특히 조사료의 경우 24시간 배양 결과, 20%의 효소 첨가는 효소를 첨가하지 않았을 때에 비하여 건물 소실율이 10% 정도 향상되었다. 효소와 조사료를 각각 100%씩 발효하였을 때의 건물 소실율을 통해 유추한 값에 비해 그 향상 정도가 높은 것으로 보아 효소 첨가가 건물 소실율 향상에 기여한 것으로 판단된다. Gas 생산과 pH 변화의 경우도 사료 종류별로 유의적인 차이를 보였고, 효소 첨가 수준에 있어서도 6시간, 12시간 배양의 경우 유의적인 차이를 나타냈다.

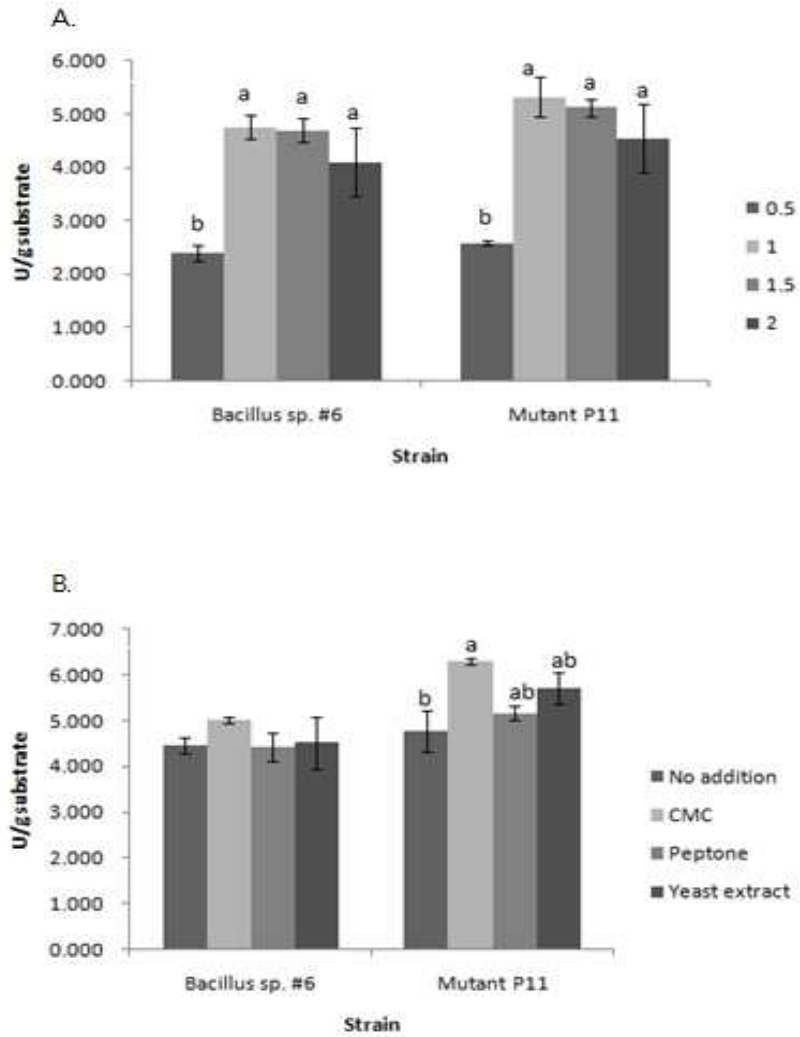


그림 47. Effects of moisture level and additives on CMCase production in SSF. (A, moisture level when substrate level is 1; B, additives).

^{a-b}: values with different superscripts differ at $P < 0.05$.

Table 16. Effects of addition of enzyme source to diets on in vitro dry matter disappearance, gas production and pH

	Time (hr)	F ¹			C ²			M ³			SEM	DT ⁴	ET ⁵	DT*ET
		0	10	20	0	10	20	0	10	20				
DM disappearance (%)	6	20.11	23.25	25.17	23.59	23.31	29.18	22.99	26.54	26.28	0.52	0.001	<.0001	0.006
	12	30.74	32.11	35.17	42.98	47.37	50.47	37.32	41.19	44.78	1.29	<.0001	<.0001	0.361
	24	37.55	42.99	47.25	59.92	60.72	62.77	52.62	56.40	55.36	1.62	<.0001	<.0001	0.012
Gas production (ml)	6	11.78	12.40	12.11	14.83	13.43	14.43	14.96	15.29	12.79	0.26	<.0001	0.025	0.000
	12	16.89	17.86	19.26	26.39	27.17	27.41	24.13	25.46	24.46	0.76	<.0001	0.000	0.010
	24	26.68	27.71	28.88	41.60	41.66	39.93	37.32	37.09	35.45	1.12	<.0001	0.233	0.005
pH	6	6.79	6.80	6.81	6.78	6.80	6.80	6.77	6.77	6.79	0.00	<.0001	<.0001	0.251
	12	6.75	6.76	6.72	6.65	6.64	6.63	6.69	6.66	6.66	0.01	<.0001	<.0001	0.016
	24	6.64	6.64	6.63	6.47	6.49	6.50	6.53	6.53	6.55	0.01	<.0002	0.177	0.220

¹F = forage

²C = concentrate

³M = mixed feed (F: C=5:5)

⁴DT = diet treatment

⁵ET = enzyme treatment

제 10 절. 선발균주별 pilot scale 공정 개발을 위한 기초자료 조사

제 1 항. C/N ratio에 따른 선발균주의 고체발효 특성

선발균주의 고체발효조건을 확립하기 위해 고체원료배지의 C/N ratio를 기준으로 고체원료배지의 조성을 선정하고 각 배지에서 선발균주 3종(*Bacillus sp.* #6, mutant strain p11, *B. licheniformis* G7)에 대한 발효특성 및 효소활성 평가를 통해 발효를 위한 기초발효배지를 선발하고자 하였다.

고체발효용 배지의 조성에 따른 C/N ratio함량을 표 17에 나타내었다. 고체발효용 원료로 사용한 원료의 C/N ratio는 5.5에서 21.1사이로, 이중 대두박과 소맥피를 혼합하여 C/N ratio 10.5를 구성하였다.

고체발효를 위해 액상중균은 nutrient broth 배지에 2% CMC를 첨가하여 35°C에서 24시간 배양 후 종균으로 사용하였다. 고체발효 조건으로 초기 수분함량을 45%로 고정하고, 종균 접종량을 고체배지의 1%(v/w, 발효 초기 균수는 1.0×10^6 CFU/g)를 첨가하였으며, 발효온도는 35°C, 발효시간은 60시간을 기준으로 하였다.

Cellulase 활성은 Carboxymethyl cellulase(CMC)를 기질로 하여 효소를 작용시켜 기질이 분해되어 생성되는 환원당(reducing sugar)을 정량하여 cellulase의 활성도를 측정하였으며, 분당 glucose 1 μ mol에 해당하는 당을 유리하는 효소량을 1unit로 정의하였다.

표 17. Carbon and nitrogen sources

Raw materials	SBM*	SW* (SBM/WB) (6:4)	B-Oat	WB*	Corn
C/N ratio	5.5	10.5	14.7	18.1	21.1

* SW: SBM(Soybean meal)+ WB(Wheat bran)

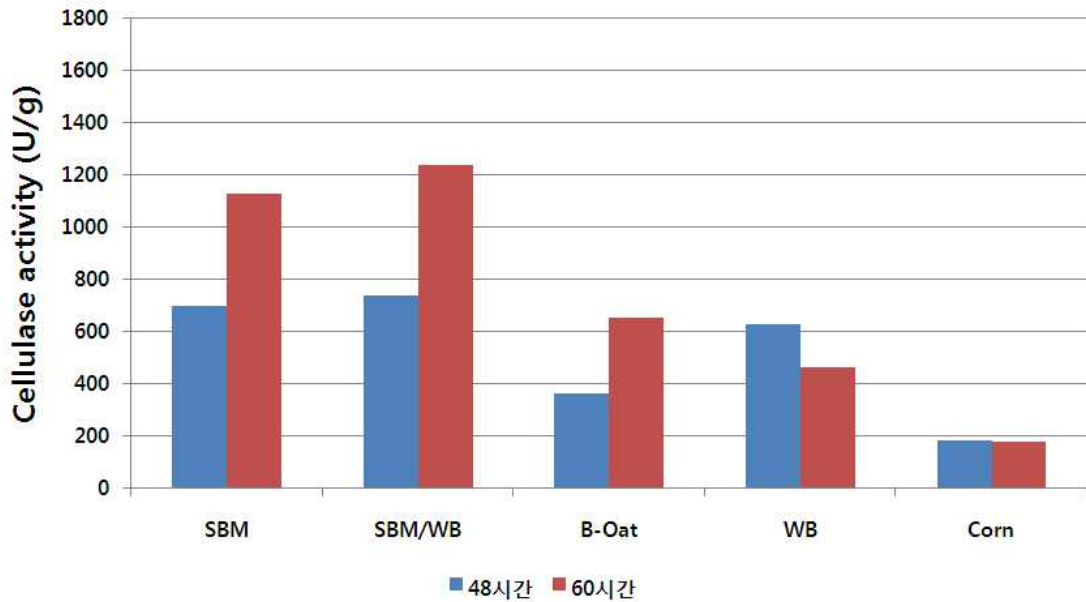


그림 49. Effect of various C/N ratio on cellulase production by *Bacillus sp.* #6.

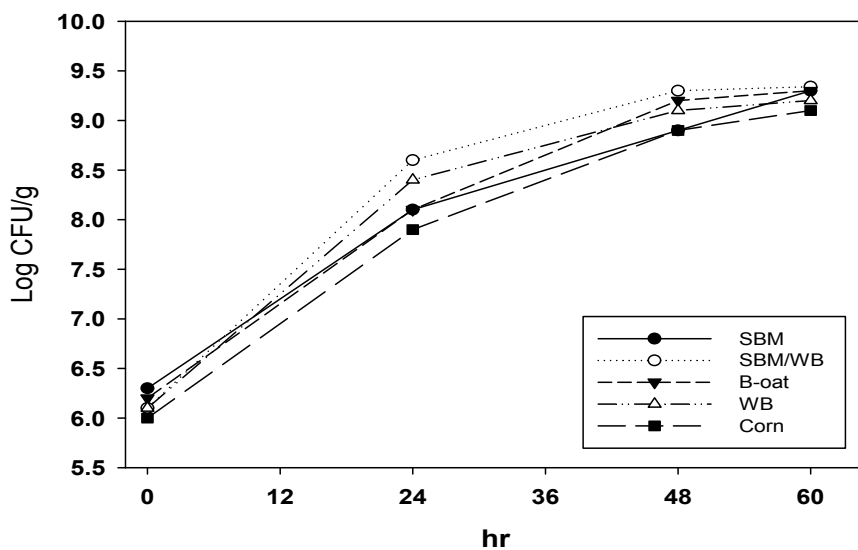


그림 50. Effect of various C/N ratio on growth of *Bacillus sp.* #6.

Bacillus sp. #6의 원료조성 별 발효실험결과 48시간 및 60시간 발효에서 각 C/N ratio별로 효소활성에 차이가 있었으며, 최적 C/N ratio는 5.5~10.5사이인 것으로 확인되었다(그림 47). 특히, C/N ratio 10.5인 SW배지(대두박/소맥피의 혼합배지)에서 60시간 발효 후 1,221U/g으로 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 또한, 60시간 발효 후 최종균수는 모든 처리구에서 10^9 CFU/g 이상의 균 성장을 보여 발효 중 미생물 균수는 C/N ratio에 큰 영향을 받지 않았다(그림 48). 이는 C/N ratio 5~10사이에서 일반적인 bacteria 성장이 우수하다는 연구결과들과 일치하는 결론을 얻었다(Ali and Sayed, 1992).

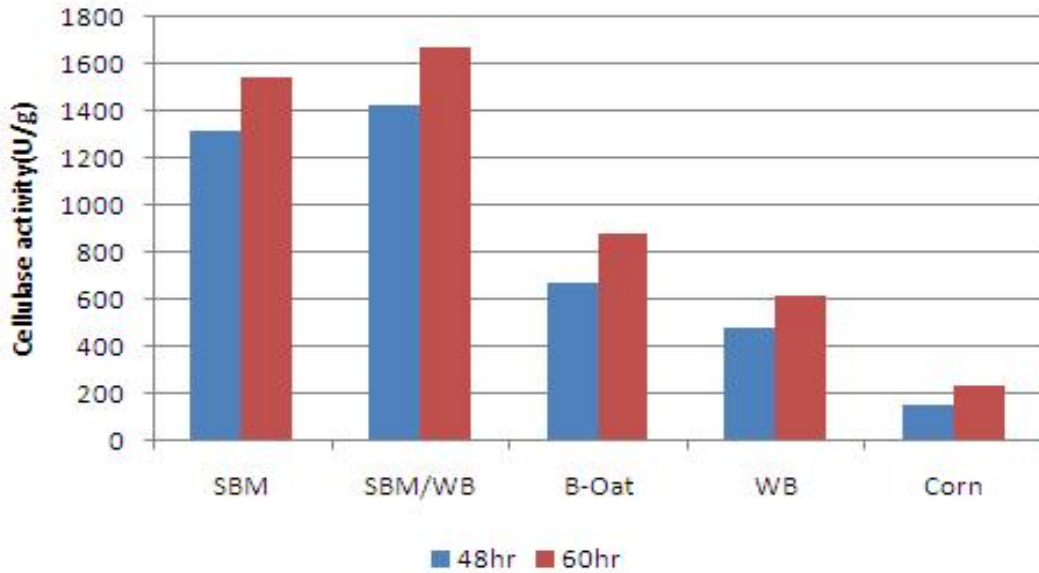


그림 51. Effect of various C/N ratio on cellulase production by mutant strain p11.

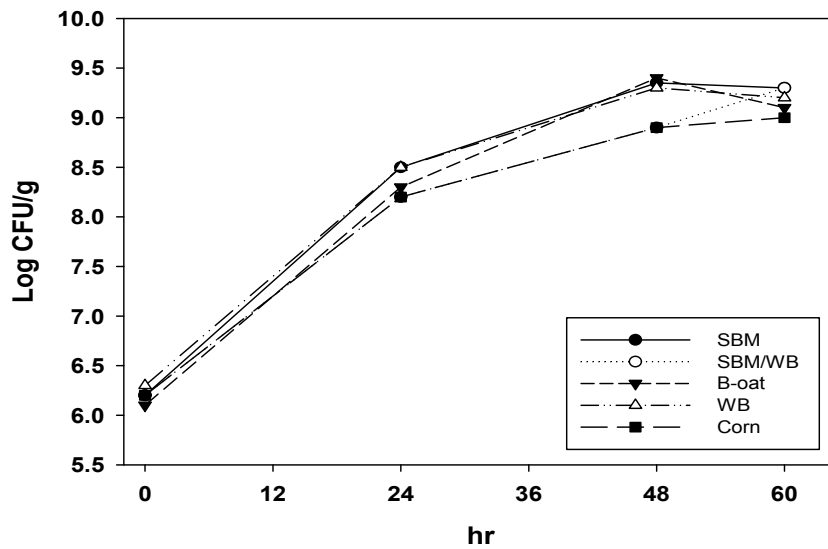


그림 52. Effect of various C/N ratio on growth of mutant strain p11.

Bacillus sp. #6 균주의 mutation 균주인 p11균주도 C/N ratio 기준 5.5~10.5에서 10^9 CFU/g 이상의 균수와 1,670U/g의 높은 효소활성을 나타내었으며, *Bacillus sp.* #6 균주와 동일한 원료 배지인 대두박 단일배지와 SW배지가 고체발효에 적합한 원료배지로 확인되었다. 효소활성 측면에서 변이주인 p11 균주는 모균주인 6번 균주대비 33~36%의 효소활성의 증가를 확인하였다(그림 49, 50).

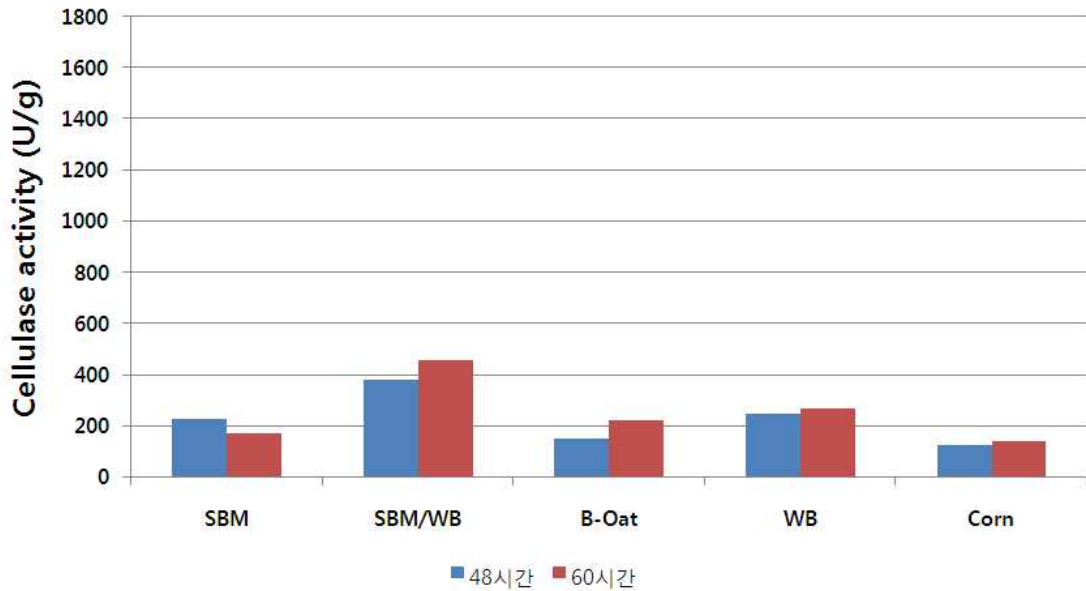


그림 53. Effect of various C/N ratio on cellulase production by G7.

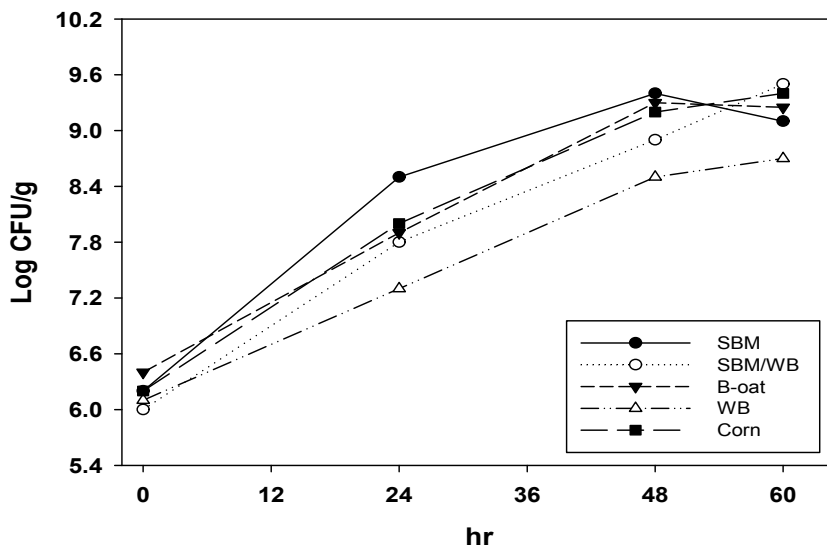


그림 54. Effect of various C/N ratio on growth of G7.

반추위 선발균주인 *B. licheniformis* G7 균주는 *B. subtilis* #6 및 p11균주에 비해 현저히 낮은 cellulase 활성을 나타내었으나, 최적 C/N ratio는 *B. subtilis* #6 및 p11의 최적 cellulase 활성을 나타내는 범위와 동일한 10.5 정도인 것으로 확인되었으며, 대두박 및 소맥피에 비해 약 50% 정도의 활성 증가를 확인하였다(그림 51, 52).

결론적으로 안정적인 균수 및 효소활성의 확보를 위해서는 C/N ratio 10정도인 SW배지(대두박+소맥피, 6:4)가 최적 배지조성인 것으로 판단되어 본 연구를 위한 기본배지로 설정하였다.

제 2 항. 탄소원의 종류에 따른 고체발효 특성

탄소원으로서 purified fiber 첨가효과를 알아보기 위해 각 선발균주별로 고체발효 예비 실험

을 진행하였으며, 기초배지로는 SW배지를 사용하고 기본 배지에 cellulose 및 cellobiose를 각각 2, 2.5%씩 첨가하여 균주별로 탄소원 첨가에 대한 영향을 조사하였다. 탄소원의 첨가 방법은 SW배지에 cellulose 및 cellobiose를 각각 2.5%씩 powder 상태로 혼합하였으며, 종균 접종 후 35°C에서 60시간 발효를 진행하였다.

균주별 예비실험결과 2.5%의 cellulose 첨가를 통해 *Bacillus sp.* #6(1,399.1 U/g으로 대조구 대비 9% 개선) 및 p11(1,742.7U/g으로 대조구 대비 5% 개선), *B. licheniformis* G7(540.8U/g으로 대조구 대비 8%개선) 및 G7 mutant(536.7U/g으로 대조구 대비 10% 개선)들에 대한 cellulase 활성 증가가능성을 확인하였다 (그림 53).

Cellulase 생산을 위해 가장 쉽게 접근할 수 있는 부분이 탄소원을 첨가하는 연구를 많이 이용하고 있으나, cellulose, lactose, 당밀 등이 주로 사용되며, glycerol 또는 glucose 등 해당과정에 관여하는 탄소원을 사용할 경우 오히려 catabolic repression을 통해 오히려 cellulase 활성이 현저히 낮아지는 경향이 있다(Moussa and Thawat, 2007). 따라서 본 연구에서는 cellulose, cellobiose, lactose 등 탄소원을 사용하였다. 또한, 일반적으로 액상발효의 경우 탄소원의 양이 1% 정도에서 최대 효소활성을 나타낸다고 보고되고 있으나(Pushelkar et al., 1995), 고체발효를 위해 원료배지에 직접 powder를 혼합하는 경우는 현저히 높은 첨가수준을 요구하는 것을 예상해 볼 수 있다. 현재 2.5% 수준까지의 첨가에서 효소활성에 대한 개선효과가 *B. subtilis* #6, mutant strain p11, G7에서 cellulose 첨가수준이 2.5%로 일반적인 액상발효에서의 경향보다 현저히 높은 수준이나 cellulase 활성의 증가를 보이고 있어 각 탄소원별 첨가수준에 대한 검증이 필요할 것으로 판단되었다. 따라서 예비실험에서 가장 효소활성이 높은 mutant strain p11균주를 이용하여 탄소원 종류에 따른 첨가수준 확인실험을 진행하였다.

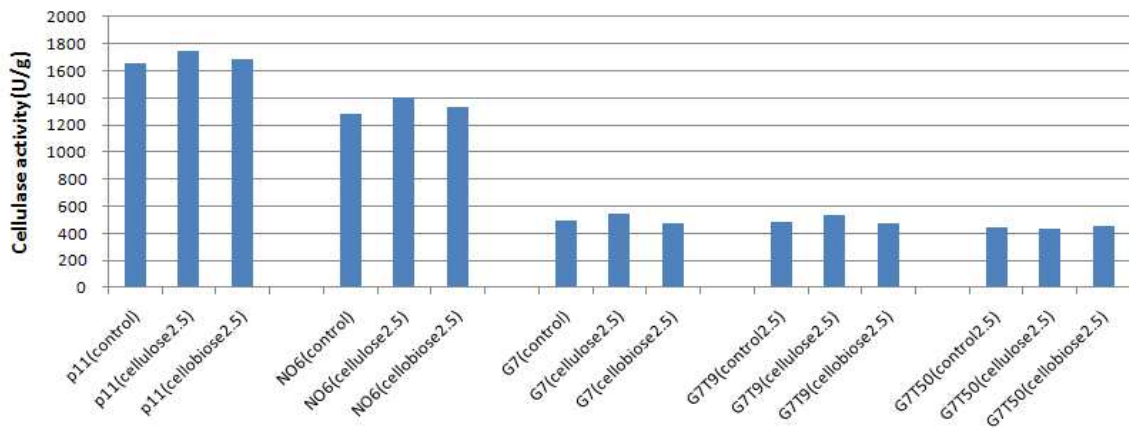


그림 55. Effect of concentration of purified carbon sources on cellulase production.

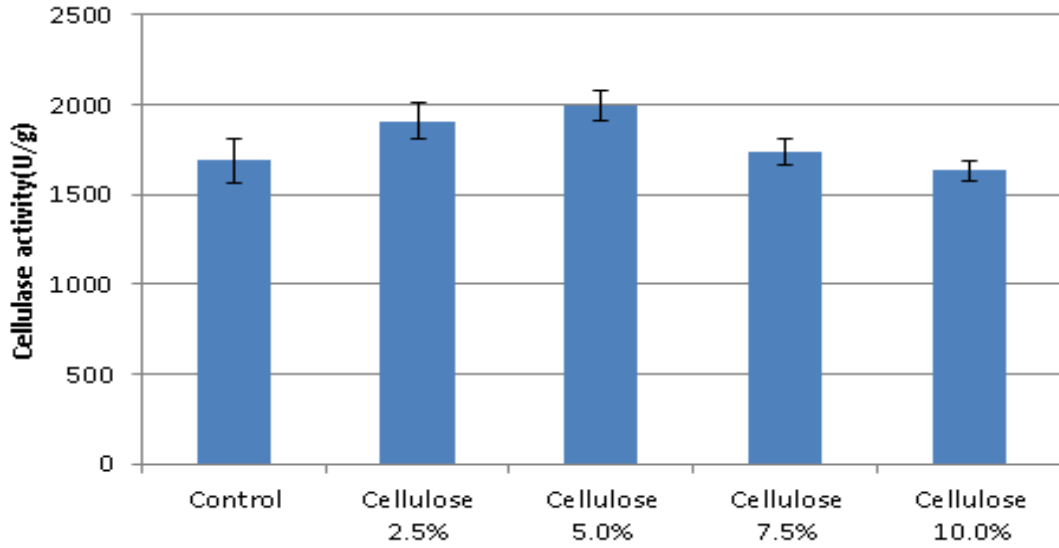


그림 56. Effect of cellulose concentration on cellulase production by mutant strain p11.

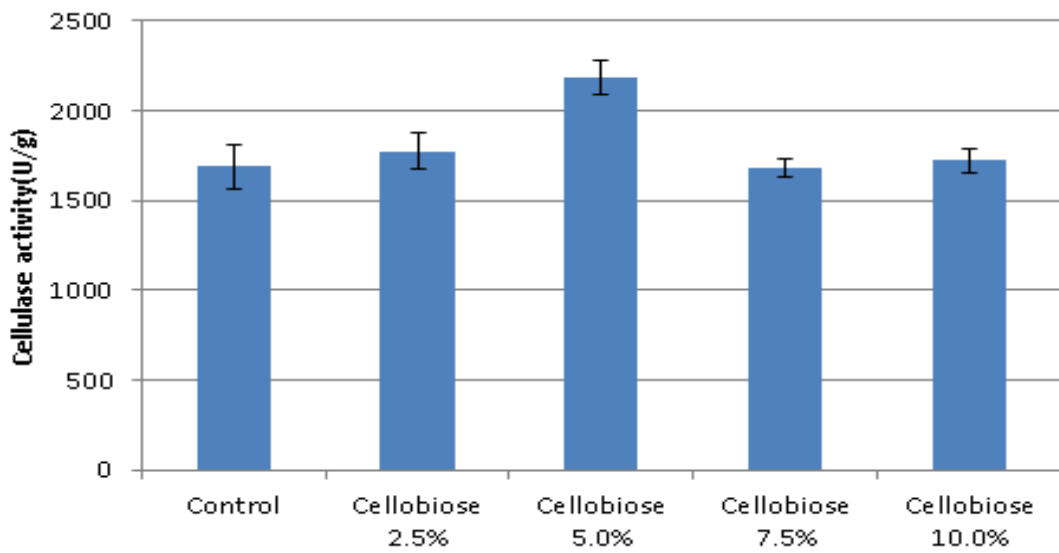


그림 57. Effect of cellobiose concentration on cellulase production by mutant strain p11.

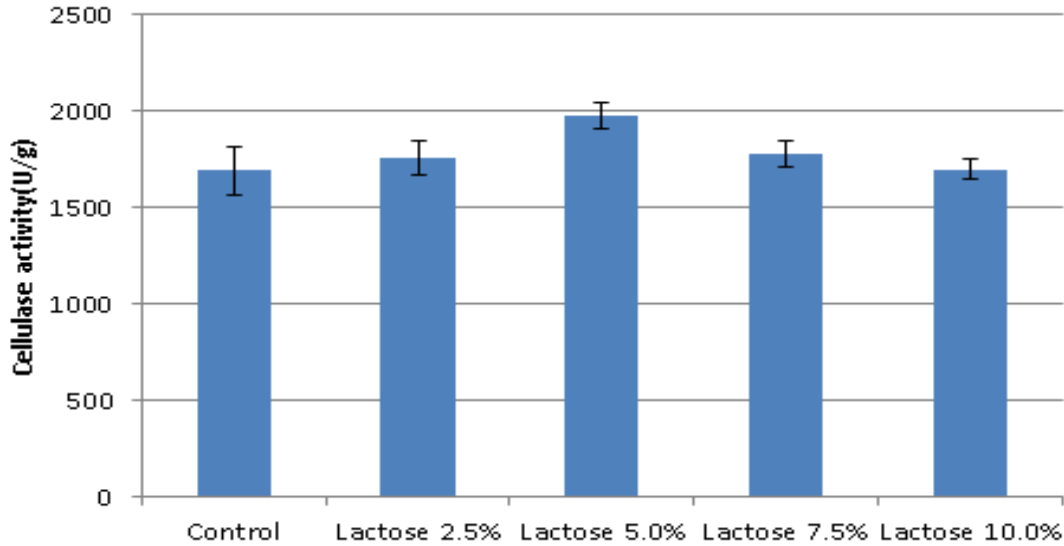


그림 58. Effect of lactose concentration on cellulase production by mutant strain p11.

Mutant strain p11의 최적 탄소원 첨가수준을 알아보기 위해 기본 배지로 SW배지를 선정하였으며 carbon source로는 cellulose, cellobiose, lactose를 각각 2.5, 5, 7.5 및 10%를 배지에 첨가한 후 배지의 수분을 45%로 보정하고, 종균 접종 후 35°C에서 60시간배양 하였다.

Mutant strain p11균주에 대한 탄소원 첨가효과는 carbon source 첨가량이 5%일 때 cellulose 처리구에서는 1,995.7 u/g(118%), lactose 처리구에서는 1,973.3 u/g(117%)의 효소활성을 나타내었으며, cellobiose 처리구에서는 2,181 u/g(129%)로 가장 우수한 cellulase 활성을 나타내었다.

탄소원 첨가 수준이 증가할수록 (~5% 까지) cellulase activity가 증가하나 일정수준 이상에서는 유의하게 감소하는 경향을 보여 탄소원의 종류에 따라서도 첨가수준에 의한 cellulase 활성이 영향을 받음을 알 수 있었다. 이는 일반적인 미생물 대사에서 탄소원의 일정수준 이상의 첨가는 미생물의 효소 분비능을 약화시키며, 더욱이 soluble 한 형태의 기질일수록 insoluble 한 형태의 기질을 첨가하는 것에 비해 enzyme inducer의 약화로 인해 효소생산능이 감소하게 된다(Margaritis and Merchant, 1986). 따라서 본 연구결과도 일반적인 액상발효의 경향인 1~1.5%내외에서 최대 활성을 나타내는 경향과 일치하지만, 최적 첨가수준은 5%인 것으로 확인되었다(그림 54, 55, 56).

제 3 항. Mineral 첨가에 따른 영향

고체발효용 배지로 선정된 SW배지에 Mineral source(g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10; KH_2PO_4 , 3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; CaCl_2 , 0.5)의 첨가가 cellulase 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 선발 균주 3종에 대해 실험을 실시하였다. Mineral source 첨가에 따라 각 균주별로 약간의 cellulase 활성화 증가는 확인되었으나, 각 처리구 별로 뚜렷한 cellulase 활성화 증가는 확인할 수 없었다 (Figure 44). 일반적으로 mineral은 효소의 생산에 중요한 요소로 작용을 하나 그 효소활성에 미치는 영향이 미미하게 나타난다. 특히, 곰팡이의 경우 NaCl, KCl 등 염의 첨가로 인해 대조구에 비해 9~10%의 개선효과를 보이는 것으로 알려져 있으며(Ja'afaru et al., 2010) 실험실 조건에서의 효소활성의 증가는 미미한 수준이어서 일반적인 실험조건보다는 효소수율이 생산단가와 직결되는 대량생산공정에서 반드시 필요한 요소이다.

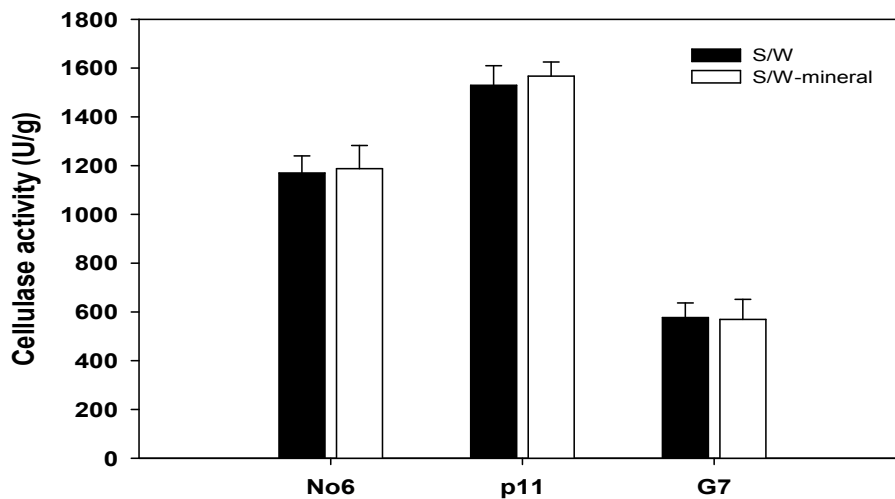


그림 59. Effect of mineral medium on cellulase production.

제 4 항. 질소원의 종류에 따른 발효특성

Cellulase 생산을 위해 SW배지에 nitrogen source의 첨가가 균수 및 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. Nitrogen source 로는 corn steep liquor(CSL), peptone, urea, ammonium nitrate, ammonium sulfate를 테스트 하였으며 각각 4%(0.04g/g)씩 SW 배지에 첨가하여 발효 특성을 평가하였다. 고체 발효 조건은 수분 45%, 35°C에서 60시간으로 배양하였다.

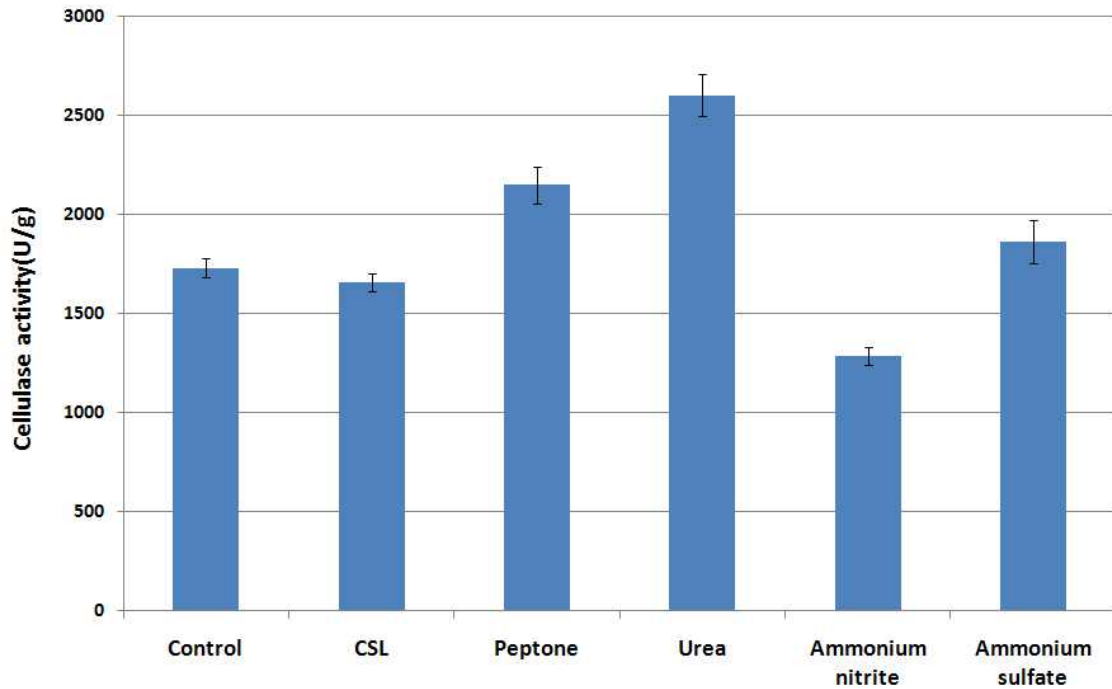


그림 60. Effect of various nitrogen source on cellulase production by mutant strain p11.

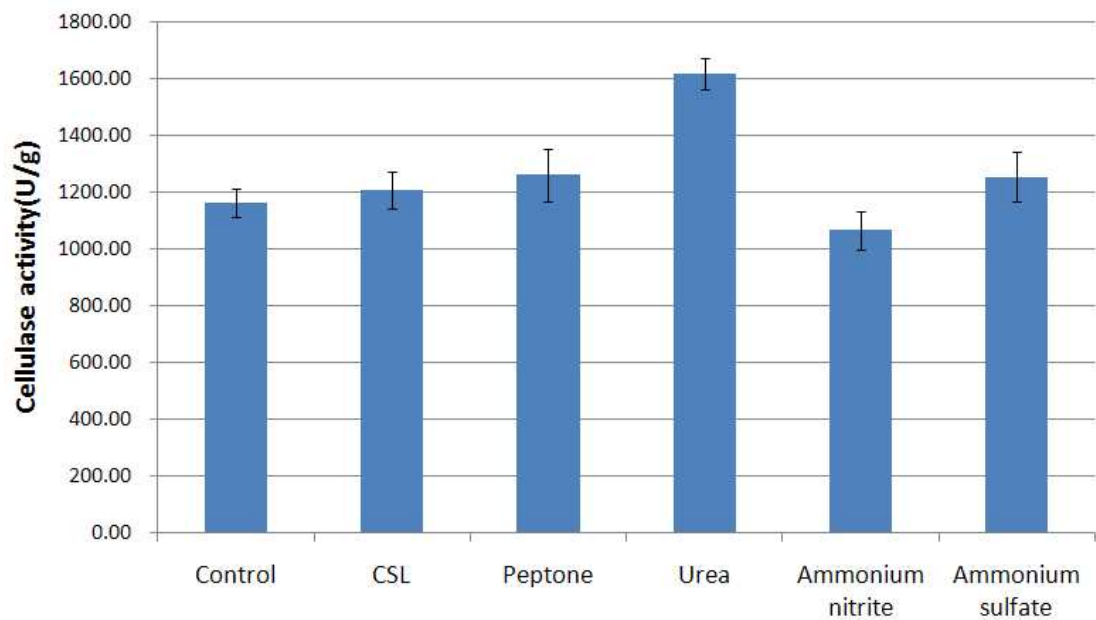


그림 61. Effect of various nitrogen source on cellulase production by *Bacillus sp.* #6.

Bacillus sp. #6 및 p11균주를 대상으로 nitrogen source 첨가 효과를 조사한 결과 기존 결과와 동일하게 mutation 균주인 p11 균주가 #6 균주대비 50~60%의 높은 효소활성을 확인할 수 있었으며, p11균주의 경우 nitrogen source로 urea를 4% 첨가하였을 때 cellulase 활성이 2,604

u/g으로 대조구에 비해 약 50%이상의 증가효과를 확인할 수 있었다(그림 58, 59). 또한, 일반적으로 단백질 및 효소생산에 가장 많이 이용되는 nitrogen source 가 바로 ammonium 화합물로서(Rajoka, 2004), Gokhale et al.(1992), Acharya et al. (2008) 및 Narasimha et al. (2006)등의 보고에 의하면 urea 첨가를 통해 약 50~100%의 효소활성 개선효과를 얻었으며, 이는 본 과제에서 적용하는 균주 및 첨가수준이 다르지만 urea 첨가를 통해 50%이상의 효소활성 개선효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

발효 종료 후 미생물 균수는 모든 처리구에서 10^9 CFU/g이상의 균수를 확인하여 고체발효 시 urea 첨가로 인한 균수 저하 등의 문제점은 없는 것으로 확인되었다.

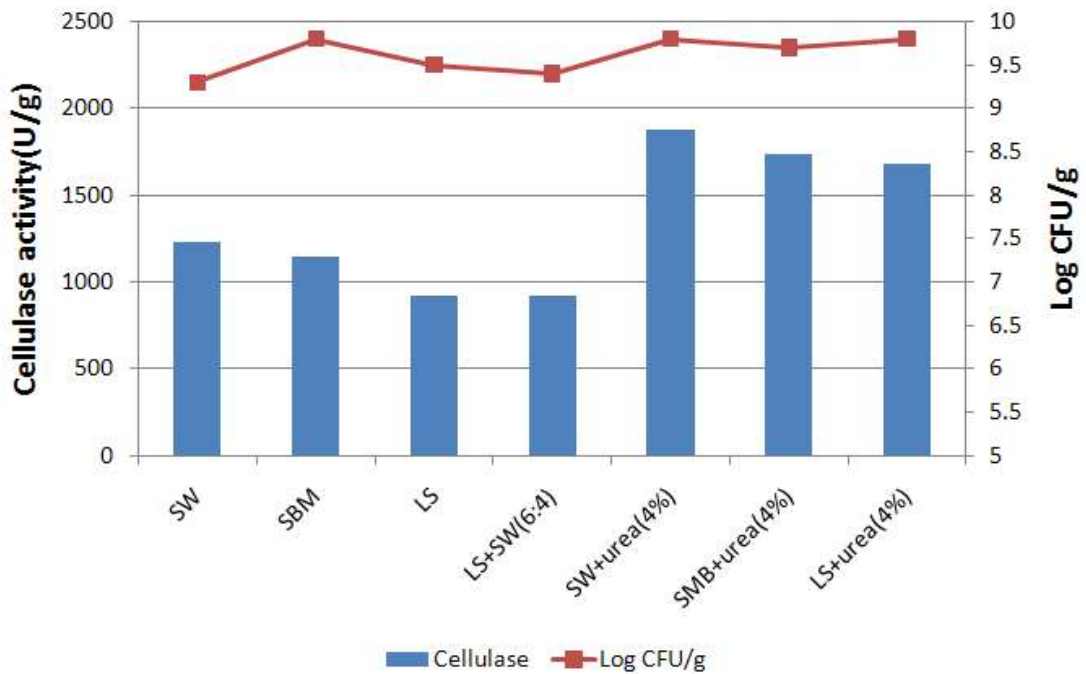


그림 62. Effect of different nitrogen sources on cellulase production and microbial growth by *Bacillus sp.* #6.

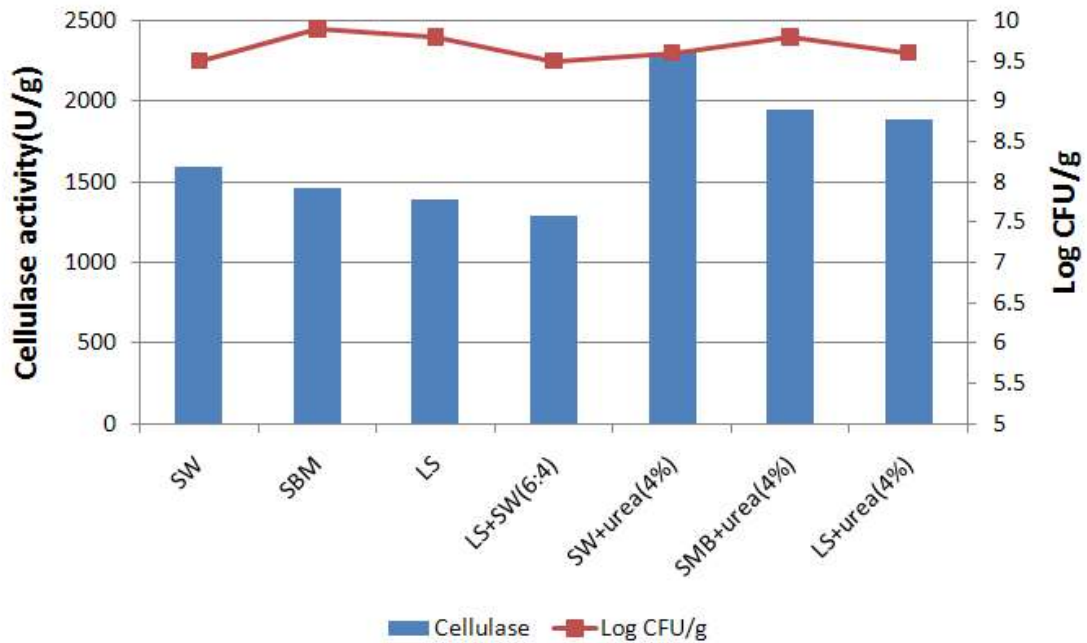


그림 63. Effect of different nitrogen sources on cellulase production and microbial growth by mutant strain p11.

질소원의 종류별 효소활성 개선효과가 우수하여 단백질원의 종류에 따른 개선효과를 조사하기 위해 사료에 단백질 원료로 가장 많이 사용되는 대두박(SBM)과 단백질 함량이 30% 수준으로 높은 루핀시드(LS)를 이용하여 cellulase 활성 개선효과를 조사하였다. *Bacillus sp.* #6 및 p11 두 종의 균주에서 대두박이 루핀시드에 비해 우수한 효소활성을 나타내었으나, 루핀시드는 기존 귀리, 옥수수 등에 비해 높은 효소활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, urea 첨가 시 기존 원료대비 최소 30% 이상의 효소활성 개선효과를 확인할 수 있었다(그림 60, 61).

질소원으로서 urea의 명확한 첨가수준을 판단하기 위해 1, 4, 8%의 urea 첨가수준에 대한 각 원료배지(SW, SBM, LS)에 대한 효소활성 개선효과 및 미생물 발효특성을 조사하였다.

그 결과 urea의 최적 첨가수준은 4%로 모든 원료에서 동일하게 4%의 urea 첨가 시 증가된 효소활성을 확인할 수 있었으며, urea 8%까지 첨가에서도 미생물적인 측면에서 발효에는 영향을 미치지 않는 것으로 확인되어 대량생산을 위한 최적 nitrogen source로 urea를 선정하고 첨가수준을 4%로 확정하였다(표 18). 액상발효공정에서 질소원의 첨가량은 0.1% 수준(Lieckfeldt et al., 2000)이 보편적인 첨가수준이나, 본 연구를 통해 고체발효의 경우 훨씬 더 많은 4%수준이 최적 첨가수준인 것으로 확인되었다.

18. Effect of concentration of urea on cellulase production and microbial growth

Media	#6			p11		
	Cellulase activity (U/g)	S. D.	Log CFU/g	Cellulase activity (U/g)	S. D.	Log CFU/g
SW+urea(1%)	1,397.75	38.29	9.64	1,726.99	38.04	9.11
SW+urea(4%)	1,888.82	69.17	9.15	2,335.26	34.58	9.60
SW+urea(8%)	1,706.14	38.04	9.08	1,985.11	69.17	9.46
SBM+urea(1%)	1,168.23	69.17	9.15	1,568.23	69.17	9.15
SBM+urea(4%)	1,756.89	58.04	9.30	1,957.00	38.04	9.38
SBM+urea(8%)	1,687.54	58.29	9.18	1,887.54	58.20	9.41
LS+urea(1%)	1,342.75	82.02	9.36	1,742.75	43.02	9.62
LS+urea(4%)	1,635.67	95.77	9.32	1,835.67	85.77	9.61
LS+urea(8%)	1,508.57	87.21	9.04	1,408.57	24.21	9.52

제 5 항. 탄소원 및 질소원의 동시 처리가 효소활성에 미치는 영향

질소원을 urea로 고정하고 탄소원의 조합을 통해 효소활성의 변화를 조사하기 위해 urea 첨가량을 4%로 고정했고 cellobiose 보다 가격적으로 경쟁력이 있는 lactose를 1~5%까지 혼합첨가하여 효소활성의 변화를 조사하였다. Urea 4%와 lactose 4%를 함께 처리한 실험구에서 높은 효소활성을 확인하였으나, 대조구인 urea 4%만을 첨가한 실험구와는 유의적인 차이는 없는 것으로 판단되어 본 연구 결과에서는 urea와 lactose의 동시첨가가 효소활성 증가에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(그림 62).

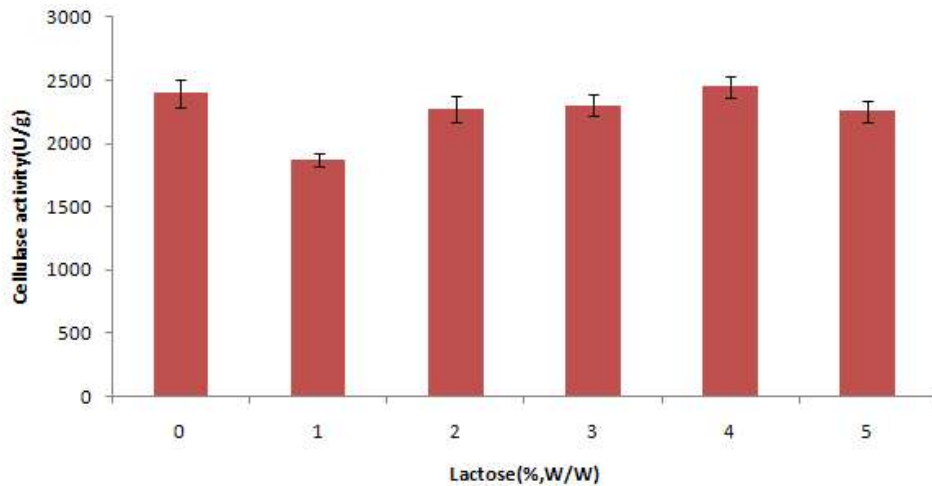


그림 64. Effect of concentration of lactose and urea combination on the production of cellulase by mutant strain p11.

제 6 항. 발효형태에 따른 효소활성 변화

Bacillus sp. #6 및 돌연변이주인 p11균주를 대상으로 대두박, 루핀시드, SW배지에 urea를 4% 첨가한 후 호기발효 및 혐기발효에 따른 발효특성을 조사하였다. 혐기발효는 종균을 접종한 후 외부공기가 전혀 유입되지 않도록 완전 밀봉하여 35℃에서 60시간동안 진행하였다.

Mutant strain p11균주는 호기발효에는 적합하나 혐기발효에서는 호기발효에 비해 현저히 낮은 효소활성이 확인되었다(그림 63). 반면, *Bacillus sp.* #6균주는 호기발효 보다는 혐기발효공정에 더 적합한 균주로 p11균주의 혐기발효공정에 비해 30%이상 높은 효소활성을 나타내어 추후 대량생산 시 혐기발효공정 개발 등에 사용될 수 있을 것으로 판단된다(그림 64).

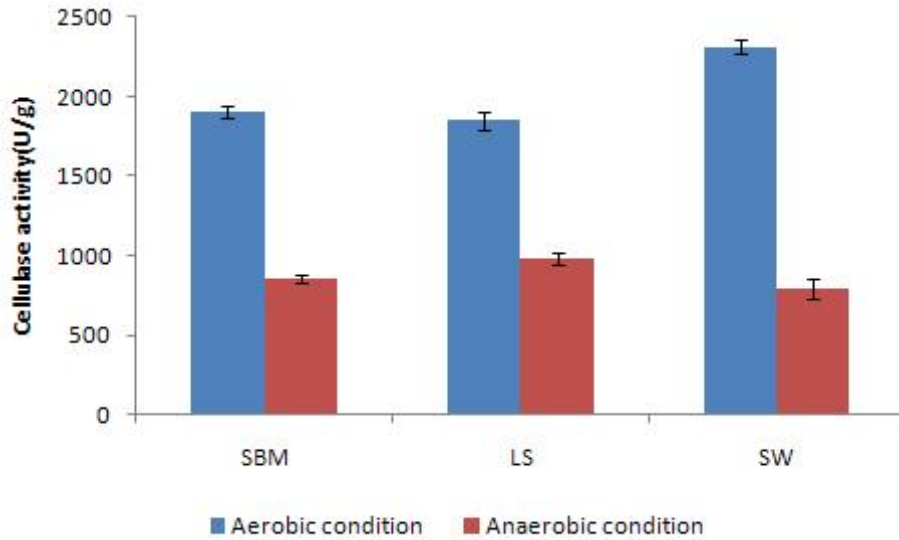


그림 65. Effect of fermentation condition on the production of cellulase by mutant strain p11.

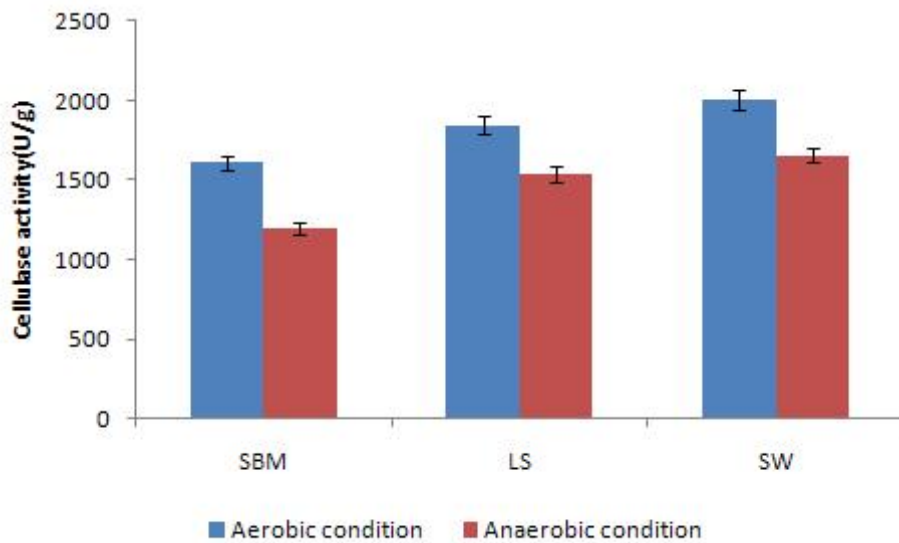


그림 66. Effect of fermentation condition on the production of cellulase by *Bacillus sp. #6*.

제 7 항. 고체배지의 초기 수분함량에 따른 발효특성

고체배양 시 초기수분함량은 미생물의 성장 및 관련 대사산물의 양을 결정하는 중요한 부분으로 초기 수분함량이 낮을 경우 미생물 성장에 저해를 받아 효소활성이 낮을 수 있으며, 너무 높을 경우 대량생산 시 원료이송 등의 문제가 발생할 수 있어 적절한 수분함량을 찾는 것이 중요하다. 본 연구에서는 초기 수분함량을 30~75%수준으로 달리하고 배양온도를 35℃, 배양시간을 60시간으로 설정하여 고체발효를 위한 최적의 초기 수분함량을 구하고자 하였다.

효소활성 분석결과 최적의 수분함량은 65%인 것으로 확인되나, 45~60%까지는 효소활성에 큰 영향을 주지 못하는 것으로 확인되었다. 대량생산에서 초기 수분함량이 65%일 경우 원료배지의 공급이 없고 중간집중 및 원료이송에 문제가 발생되어 공정지연 등 부수적인 문제가 발생되게 되므로 최적 수분함량을 50%수준으로 결정하고 pilot scale 공정을 확립하였다(그림 65).

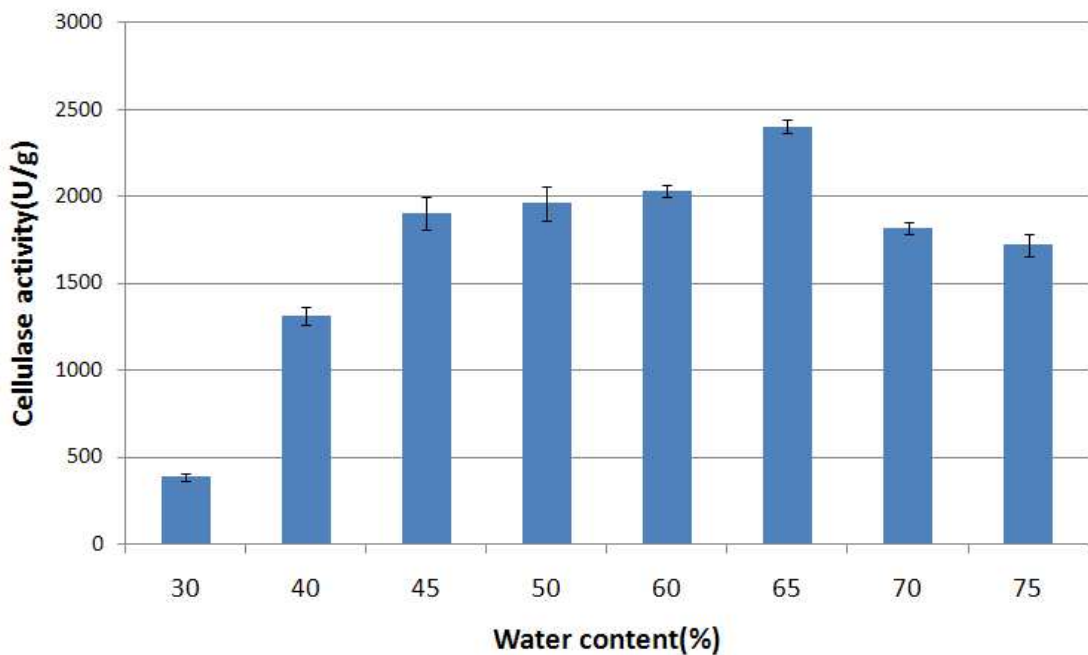


그림 67. Effect of initial water content on the production of cellulase.

제 8 항. 발효 온도에 따른 영향

Bacillus sp. #6 및 p11 균주에 대해 발효 시 최적 발효온도를 설정하기 위해 30~45℃로 온도범위를 달리하여 60시간 발효를 통해 효소활성변화를 조사하였다. 발효결과 p11균주의 최적 발효온도는40℃인 것으로 확인되었으며(그림 66), *Bacillus sp.* #6균주의 경우 35℃에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다(그림 67).

따라서 cellulase 대량생산을 위한 최적 발효온도로는 p11 균주는 38~40℃, #6 균주는 34~36℃로 결정 하였다.

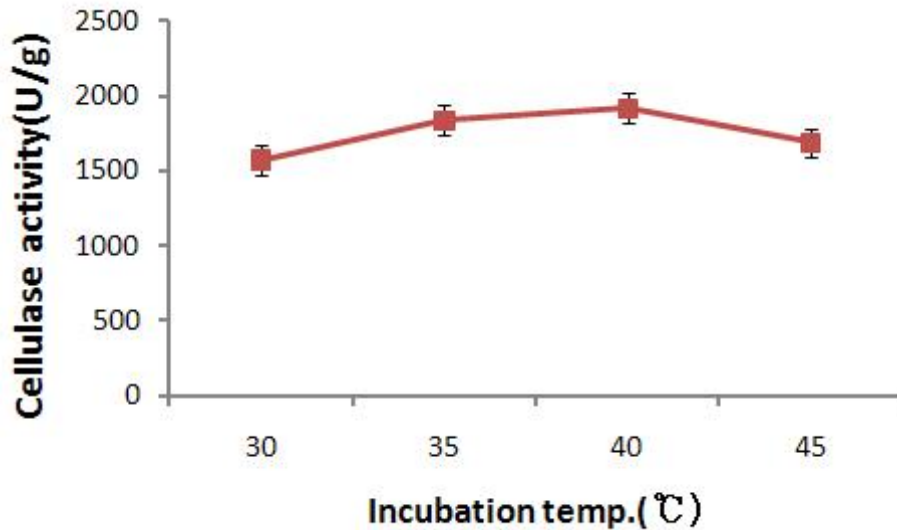


그림 68. Effect of incubation temperature on the production of cellulase by mutant strain p11.

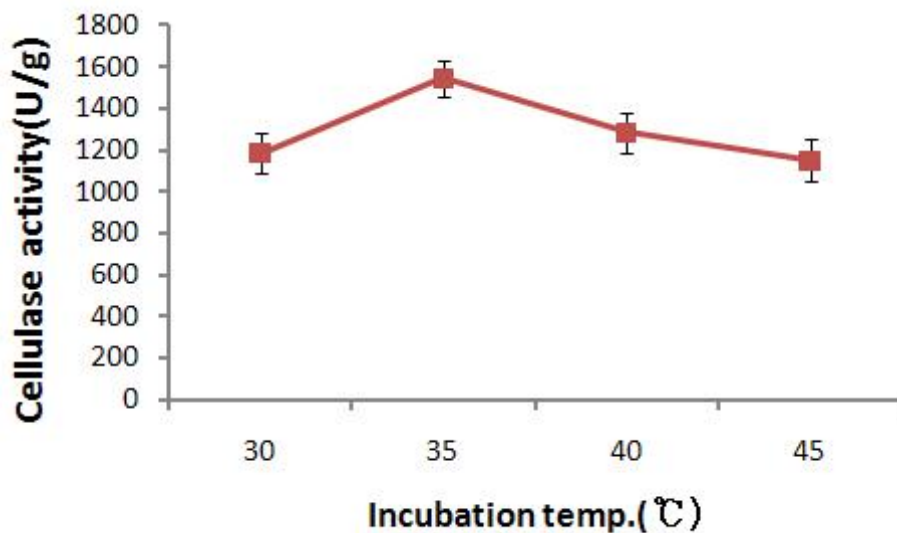


그림 69. Effect of incubation temperature on the production of cellulase by *B. subtilis* #6.

제 9 항. 종균 접종량에 따른 효소활성 변화

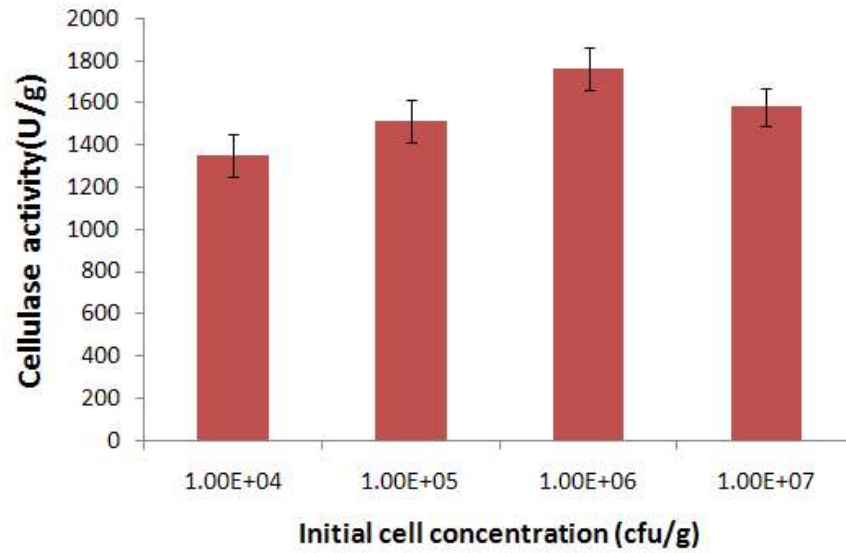


그림 70. Effect of initial cell concentration on the production of cellulase by *Bacillus sp.* #6.

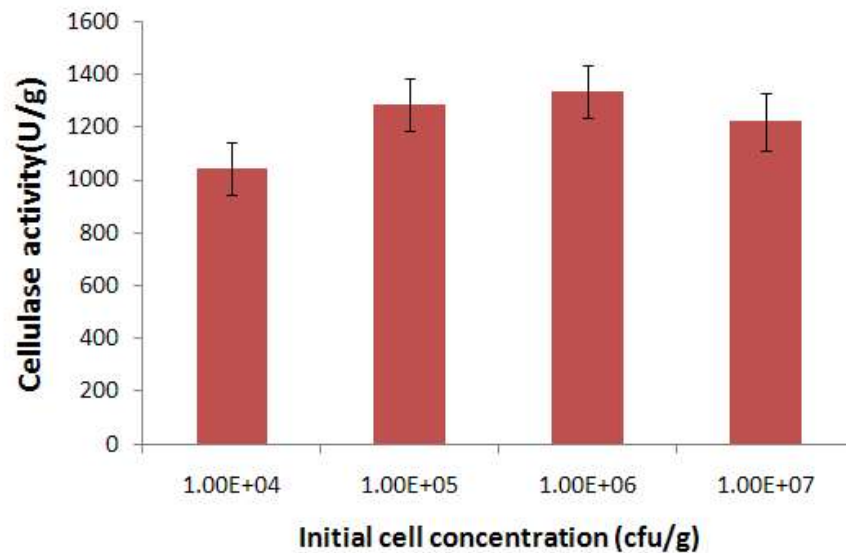


그림 71. Effect of initial cell concentration on the production of cellulase by mutant strain p11.

초기 종균 접종수준을 $10^4 \sim 10^7$ CFU/g으로 달리하여 종균 접종수준이 cellulase 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다. *B. subtilis* #6 및 p11균주의 최적 종균접종수준이 10^6 CFU/g에서 cellulase activity가 가장 높게 나타나 최적 종균 접종수준을 10^6 CFU/g으로 결정했다(그림 68, 69).

제 10 항. 초기 pH에 따른 영향 조사

초기 pH 대한 영향을 조사하기 위해 mutant strain p11균주를 대상으로 하여 초기 배지제조 시 원료의 pH를 HCl 및 NaOH 수용액을 이용하여 pH를 4~7범위로 조정한 후 38℃에서 60시간 배양하였다.

pH는 4~7 범위에서 균 성장 및 발효특성이 차이가 없는 것으로 나타나 최종 효소의 효소활성 작용 범위도 이와 같은 범위로 작용할 것으로 예상되어 산업적인 측면에서도 이용가치가 높을 것으로 예상된다. 또한, 액상발효에서의 cellulase 발현 조사를 했던 선행사례와는 달리 넓은 범주의 pH에서 cellulase 활성을 나타내어 고체발효에 의해 생산된 cellulase가 액상 발효에 의해 생산된 cellulase 보다 넓은 범주의 pH에서 activity를 나타내는 것으로 생각할 수 있다 (그림 70).

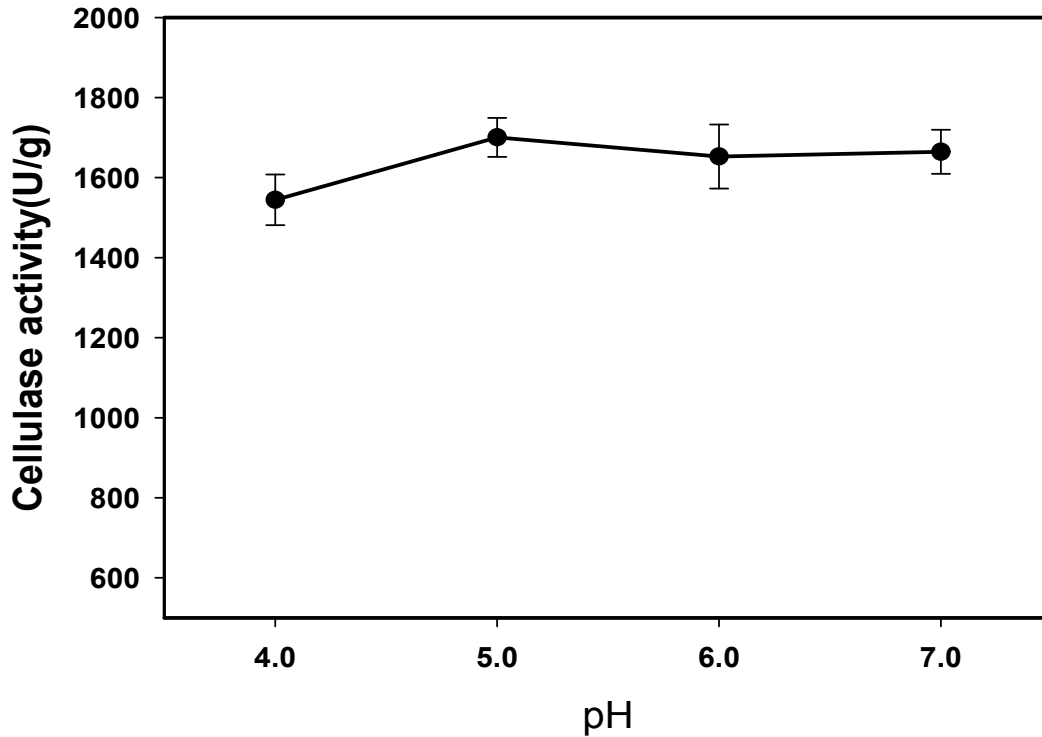
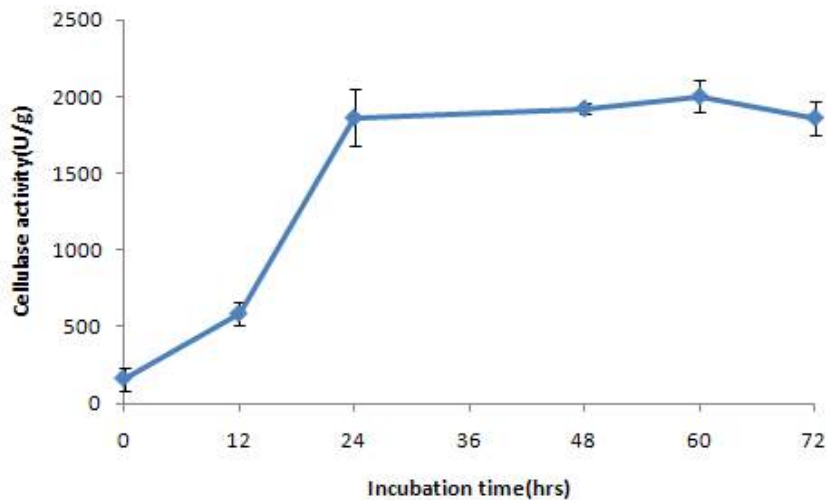
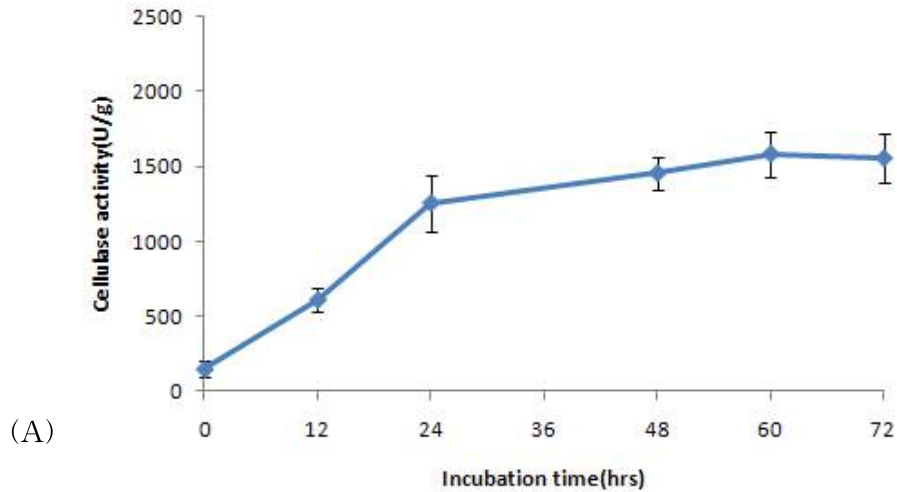


그림 72. Effect of pH of medium on cellulase activity by mutant strain p11.

제 11 항. 최적 발효시간 설정

최적 발효시간을 설정하기 위해 *Bacillus sp.* #6 및 p11 균주를 SW배지에 접종하여 72시간 까지 샘플링 및 분석을 진행하였다. 그 결과 *Bacillus sp.* #6의 최적발효시간은 60시간에서 가장높인 효소활성을 보여 pilot scale 발효를 위한 최적 발효시간을 60시간으로 설정하였다(그림 71). 반면, p11균주의 경우 24시간의 단시간에서 높은 효소활성을 나타내므로 대량생산 시 생산비 절감 등 산업적 측면에서 장점이 있을 것으로 판단된다.



(B) 그림 73. Comparison of solid state fermentation time courses for the production of cellulase by wild type strain #6(A) and mutant strain p11(B).

제 12 항. 최적 고체발효조건 결정

지금까지 선발균주의 발효공정개발을 위한 기초자료 조사결과 고체발효를 위한 최적배지로는 균 성장 및 cellulase 발현이 가장 좋았던 SW(대두박+소맥피)배지와 발효특성이 SW배지 다음으로 우수하였던 대두박 및 루핀시드를 포함하여 3종의 원료 배지를 선발하였다. 세부 발효조건으로는 질소원인 urea를 4%첨가하고 초기 수분함량을 50%, 발효온도를 *Bacillus sp.* #6은 35℃, mutant strain p11은 40℃로 설정하였으며, 최적 평균 집종량은 균수 기준으로 10⁶CFU/g, 최적 pH는 5이상, 최적 발효시간은 60시간으로 각각 설정하고 pilot scale 시험생산 조건으로 반영하였다.

제 11 절. 최적조건에서의 pilot scale 발효특성 평가

제 1 항. 액상종균의 발효조건 결정

대량생산 시 사용되는 액상종균의 양 및 액상종균의 특성에 따라 대량생산품의 특성이 달라질 수 있을 것으로 판단하여 액상종균의 발효조건을 재설정하였다. 액상종균 배양을 위해 기본 배지인 nutrient broth에 cellulose, cellobiose, S/W원료, 당밀, urea, peptone, CSL, ammonium sulfate를 각각 2~4%씩 첨가하여 발효특성을 평가하였다. 배양온도는 각 균주의 최적온도인 35℃ 및 40℃의 진탕 배양기에서 200rpm으로 78시간까지 발효하면서 발효특성을 평가하였다.

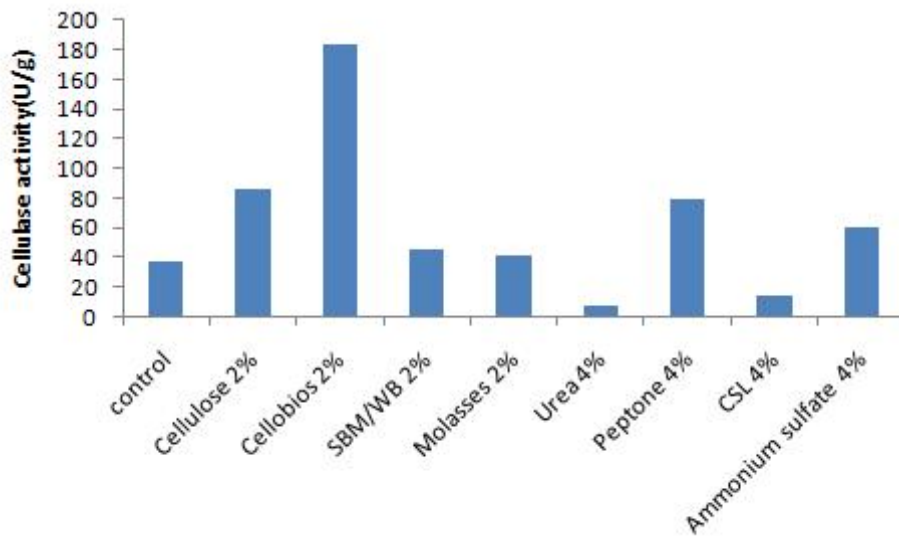


그림 74. Effects of various carbon and nitrogen sources on cellulase production by mutant strain p11 in liquid culture.

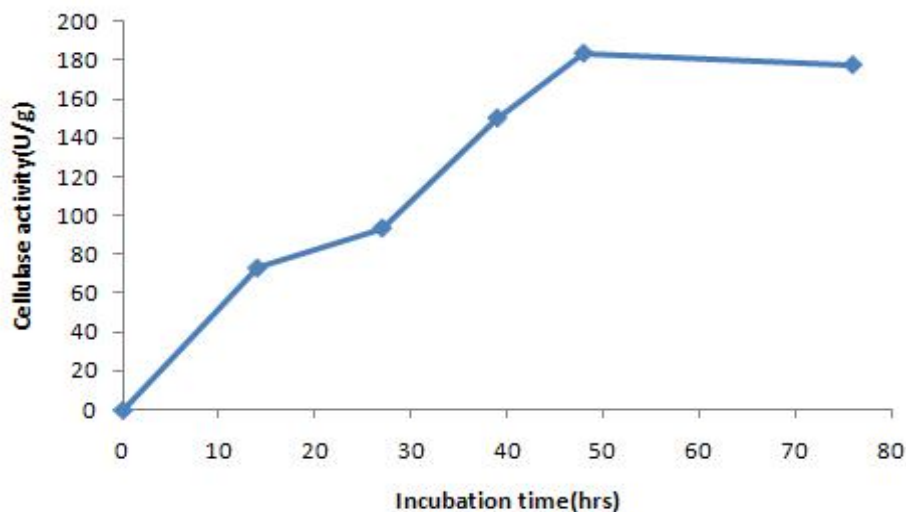


그림 75. Production of cellulase on the SW medium containing cellobiose 2% by mutant strain p11.

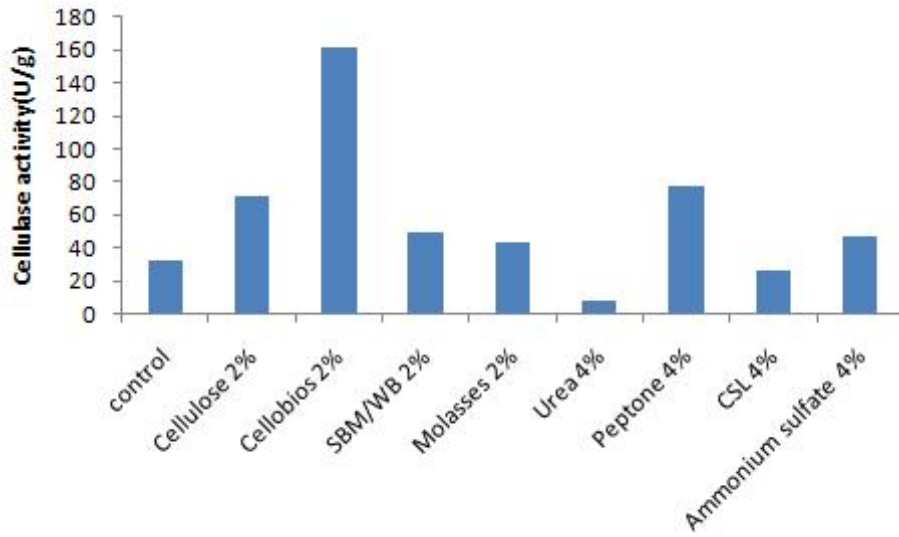


그림 76. Effects of various carbon and nitrogen sources on cellulase production by #6 in liquid culture.

Bacillus sp. #6 및 p11균주의 액상발효 조건에서 cellulase 활성이 가장 우수한 처리구는 cellobiose 2%를 첨가한 처리구(183.49U/mL)로 타 처리구에 비해 2배 이상 높은 효소활성을 확인할 수 있었다(그림 72, 74). 또한, cellobiose 첨가한 처리구의 발효시간별 효소활성 변화를 보면 mutant strain p11의 경우 최적 발효시간은 48시간으로 확인되었다(그림 73). 그렇지만, *B. subtilis* #6의 경우 48시간 이후에도 효소활성이 증가하는 것으로 확인할 수 있으나, 48시간 이후 cell lysis 등에 의한 영향 및 발효시간별 종균에 대한 고체발효 실험 등 추가 실험이 필요할 것으로 본다(그림 75).

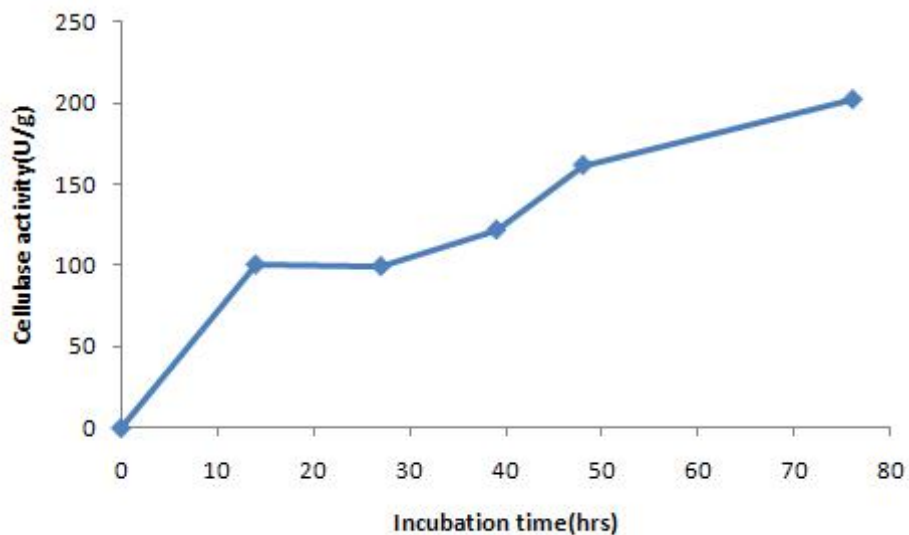


그림 77. Production of cellulase on the SW medium containing cellobios 2% by *B. subtilis* #6.

제 2 항. 최적 발효조건에서의 발효특성 평가

Pilot scale 시험생산을 위해 원료를 SW배지(대두박+소맥피)에 urea 4%를 첨가하고 121℃에서 30분간 증자한 후 실온으로 냉각시켜 mutant strain p11 균주1% 접종하고 60시간 동안 고체발효를 진행하였다.

발효 중 발효시간별 수분변화, 온도변화, 효소활성 및 pH 변화를 분석한 결과를 그림 76, 77에 나타내었다. 발효 60시간 동안 제품의 수분함량은 50%에서 36%까지 감소하였으며, 발효 중 온도는 40도 이하로 유지관리 하였으나, 30시간이후 Bacillus 균 성장과 더불어 발효온도가 50도까지 급격하게 상승하여 발효제품의 수분이 46%에서 40%까지 단시간에 급격하게 감소하는 결과를 얻었다(그림 77). 급격한 수분감소로 인해 추가적인 발효진행이 안되어 발효종료 시 효소활성은 2,500U/g으로 나타났다. 이는 발효공정관리를 통해 발효 중 수분 및 온도를 적절히 유지할 경우 지금보다 높은 효소발현을 유도할 수 있음을 시사한다. 아울러 3차년도 대량생산 공정 적용 전 이와 같은 문제들을 관리 factor로 설정하고 관리방안을 수립하여 대량생산 시행착오를 최소화하기 위한 노력을 진행할 것이다.

발효 중 pH 변화는 초기 5.7부근에서 발효 종료 전 6.4까지 바실러스의 성장과 더불어 조금씩 올라가는 경향을 나타내었다. 최종 발효결과 미생물 균수는 4.0×10^9 CFU/g, cellulase 활성은 자체분석결과 2,489U/g으로 확인되었다(표 19).

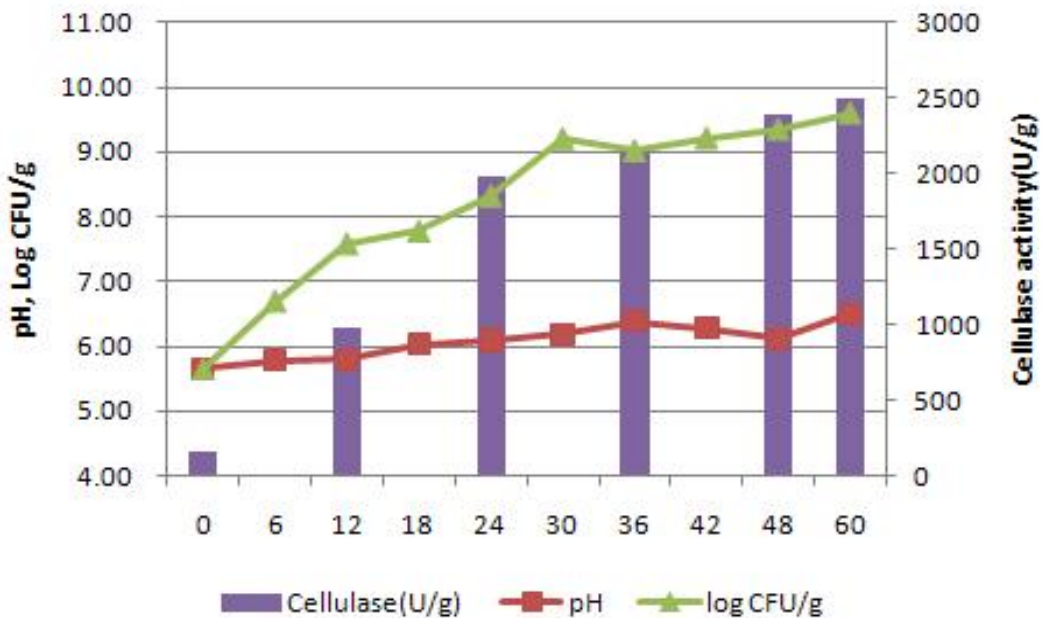


그림 78. Study of pilot scale solid state fermentation time course in mutant strain p11.

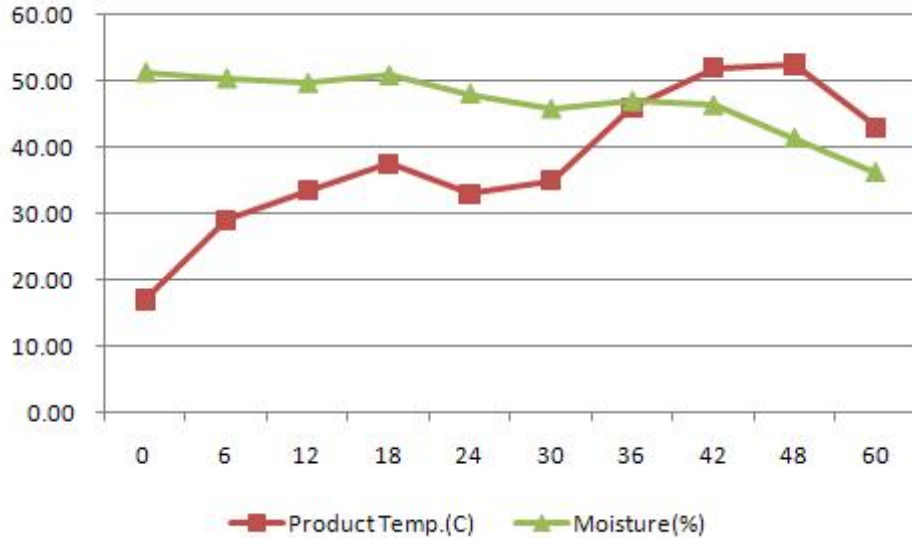


그림 79. Changes of the product temperature and moisture during the pilot scale solid state fermentation in mutant strain p11.

표 19. Results of pilot scale fermentation by mutant p11

Item	Result
Microbial growth (CFU/g)	4.0×10^9
Cellulase activity (U/g)	2,489

제 3 항. 경쟁제품 비교평가

시장에 시판중인 대표적인 생균제에 대한 cellulase 활성을 비교평가 한 결과를 표 20에 나타내었다. 생균제는 *Bacillus* 제품 2종, 유산균 제품 2종 및 효모 제품 2종으로 크게 나눠 각 제품별로 균수함량이 높은 제품과 그렇지 못한 일반 생균제 제품을 각각 비교하였다.

Pilot scale 공정을 통해 생산된 제품(mutant p11)은 타 생균제 샘플에 비해 효소활성의 측면에서 최대 80%이상 효소활성이 높은 제품이며, 균수 측면에서도 4.0×10^9 CFU/g으로 타 생균제에 비해 월등히 뛰어난 제품으로 평가될 수 있다. 유산균-A의 cellulase 활성이 개발품을 제외한 샘플링 된 타 생균제에 비해 높게 분석된 것은 DNS법에 의해 효소활성 측정 시 일반적으로 환원당을 측정하므로 동결건조 형태의 제품으로 동결건조 시 함께 포함된 당 등이 검출되어 분석된 것으로 판단할 수 있다.

비용적인 측면에서 고가 수입품인 *Bacillus-A* 제품만 10^9 CFU/g의 균수를 나타내고 있어 본 연구를 통해 개발된 제품이 안정적인 효소활성 및 균수를 확보한다면, 수입대체 효과뿐만 아니라 기존 시장에서 유통되고 있는 생균제 제품을 효과적인 대체를 통해 시장에서의 경쟁력을 충분히 가질 것으로 예상된다.

표 20. Cellulase activity and microbial count of commercial probiotic

No.	Products	Cellulase activity (U/g)	Microbial count (CFU/g)	Relative activity(%)
1	Mutant p11 (Fermented product)	2,489	4.00E+09	100
2	<i>Bacillus-A</i>	109.93	1.70E+09	4.4
3	<i>Bacillus-B</i>	115.24	8.70E+06	4.6
4	Lactic acid bacteria-A	524.15	1.30E+05	21.1
5	Lactic acid bacteria-B	374.09	4.00E+08	15.0
6	Yeast-A	92.09	2.3E+06	3.7
7	Yeast-B	75.24	8.4E+04	3.0

제 12 절. 선발 미생물의 특성평가

제 1 항. 내열성 평가

발효물의 균주 및 cellulase의 특성을 평가하기 위해 열안정성을 조사하였다. 열안정성 평가는 펠렛 가공시의 조건과 유사하게 조건을 설정하고자 열전도율이 높은 glass cap-tube(반지름 1cm, 높이 15cm, 샘플 1g 담을 경우 샘플 높이 약1.5cm)에 각각의 고상 발효물 1g을 담아, 조건별 온도로 세팅한 항온저수조(water bath)에 열처리 및 처리 시간에 따라 준비하였다. 각각의 샘플 1g을 멸균수 9ml 첨가하여 희석시킨 후, 단계적으로 희석하였다. 희석된 샘플은 평판 배지에 도말하여 37℃, 24시간 배양한 후 미생물 균집수를 colony forming unit(CFU)로 나타내었다.

표 21. Effect of heat treatments on microbial count and enzyme activity of fermented product by mutant strain p11

Item	Heat-treatment (min.)	Temperature							
		Room temp.	50℃	60℃	70℃	80℃	85℃	90℃	100℃
Mutant strain (CFU/g)	5	2.1X10 ⁹	-	-	-	2.0X10 ⁹	2.1X10 ⁹	2.2X10 ⁹	1.1X10 ⁹
	10		-	-	-	2.4X10 ⁹	2.0X10 ⁹	2.1X10 ⁹	1.6X10 ⁹
Cellulase (relative activity, %)	5	100	100	100	97	90	80	68	62
	10		100	98	89	78	71	57	52

Mutant strain p11균주 자체의 내열성은 상당히 우수한 수준으로 100℃에서 10분간 처리하여도 거의 균수의 저하는 없는 것으로 평가되었다. 반면, 효소역가는 60℃ 10분 처리까지는 안정적이었으나, 70℃이상의 온도에서는 효소활성의 저하가 확인되었으며, 100℃, 10분 처리 시 50% 수준의 효소활성을 나타내었다(표 21). 그러나 일반적인 pellet 가공온도는 80~85℃이고 시간은 1분이내의 건열방식의 가공공정이므로 pellet 사료제조로 인한 역가 손실은 크지 않을 것으로 판단된다.

제 2 항. 제품 저장성 테스트

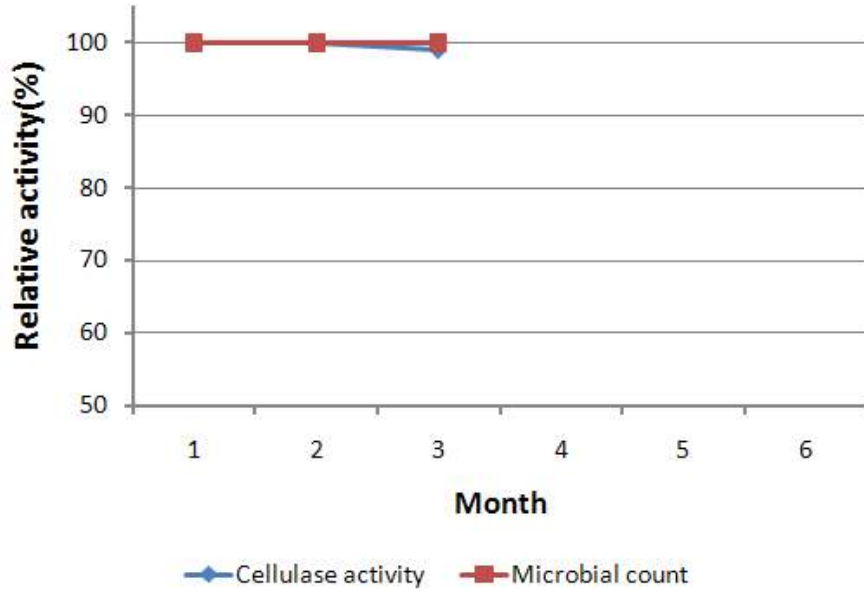


그림 80. Changes of cellulase activity and microbial count during storage at room temperature.

발효샘플의 안정성시험을 실시한 결과 3개월까지 균수 및 효소활성에서 유의적인 변화가 없는 것으로 확인되었다 (그림 78).

제 13 절. 대량 고체발효 공정 확립

제 1 항. 실험 목표

본 연구에서는 고체발효를 이용한 대량생산 공정을 확립하기 위해 선발 균주 별 단독 혹은 복합발효를 통한 고체발효 특성을 조사하고 반복 실험을 통한 미생물제제의 안정적인 대량생산 공정을 확립하고자 한다.

제 2 항. 재료 및 방법

가. 대량생산 공정확립을 위한 예비실험

대량생산 공정 확립을 위해서는 pilot scale공정에서 확립된 배지 조성 중 urea 4% 첨가부분에 대한 재점검을 실시하였다. 대량생산 및 제품화를 위해서는 경제성을 고려하여 urea 첨가 없이 공정을 확립하기 위해 선발균주 및 공정에 대한 재점검을 실시하고자 한다.

원료 배지 내 urea를 첨가하지 않을 경우 pilot scale에서와 같은 효소활성의 증가는 없을 것으로 판단되나, 대량생산을 통해 최대 효소활성 및 균수를 확보하고자 한다. 이를 위해 최초 선발된 균주인 *B. subtilis* #6 균주 및 mutant strain p11, 그리고 반추위 선발균주인 *B. licheniformis* G7균주에 대해 urea

가 빠진 SW배지에서 효소활성을 재검증하였다. 고체발효 종균제조를 위한 액상발효용 배지로는 nutrient broth에 cellobiose 2%가 첨가된 배지를 사용하였으며, 37°C에서 200rpm으로 24시간 배양 후 액상종균으로 사용하였다. 고체발효는 SW배지 1.5kg을 초기 수분함량 50%, 초기 접종수준은 10⁶ cfu/g이상을 유지하였으며, *B. subtilis* #6 균주 및 mutant strain p11 균주는 35°C에서 60시간 발효를 기준으로 하였으며, *B. licheniformis* G7 균주는 40°C에서 96시간까지의 발효를 기준으로 cellulase활성을 조사하였으며, 각 처리구별로 3반복 실험을 실시하였다.

나. 선발균주의 단독, 복합발효를 통한 고체발효 특성 평가

대량생산 공정 확립 전 선발 균주에 대해 단독 및 복합처리를 통해 고체발효 특성변화를 조사하였으며, 표 22와 같이 선발균주별 단독 혹은 복합 발효를 통해 cellulase활성 변화를 조사하였다.

표 22. 고체발효 특성 평가를 위한 처리구

No.	처리구
1	대조구(SW배지-DW만 처리)
2	<i>B. subtilis</i> #6
3	<i>B. licheniformis</i> G7
4	<i>B. subtilis</i> #6 + <i>B. licheniformis</i> G7 복합 고체발효
5	<i>B. subtilis</i> #6 및 <i>B. licheniformis</i> G7 고체발효 후 혼합

원료에 대한 정확한 효소활성 확인을 위해 대조구로 원료배지자체 만을 사용하여 다른 처리구와 동일한 조건을 설정하기 위해 원료 배지에 균주만 접종하지 않고 단순 물만 첨가하여 발효공정과 동일한 조건으로 처리하여 샘플을 제조하였다. 고체발효 공정 점검을 위한 실험방법은 다음과 같다. 각 처리구별로 4kg씩을 5회 반복 실험을 실시하였으며, 고체발효를 위한 액상종균은 기 확립된 방법으로 제조하였으며, 고체발효 공정은 예비실험에서 확인된 *B. licheniformis* G7 균주 단독 처리구만 40°C에서 96시간 발효를 진행하였으며, 나머지 처리구는 35°C에서 60시간 발효를 통해 각 처리구별로 cellulase 활성을 확인하였다.

다. 대량 고체발효 공정 확립

대량 생산 공정은 pilot scale 공정을 기준으로 대량생산 공정을 확립하였으며, 총 3차례의 생산 결과를 통해 최적 대량생산공정을 확립하였다. 대량생산을 통해 확립된 최적 고체발효 공정은 표 23과 같다.

표 23. 대량생산 시 가공조건

순서	공정명	조건	소요시간	관리항목
1	원료준비	SW배지	1시간	배합비율
2	가 수	초기 원료의 수분함량 50%가 되게끔 가수	30분	수분함량
3	증 자	온도 121℃	30분	온도
4	종균접종	초기균수 10 ⁶ cfu/g이 되게 종균 접종	1시간 30분	균수
5	발 효	온도 35~40℃, 습도 70~80%	60시간	온도, 균수, 효소 활성
6	건 조	온도 45℃, 최종 8~10%수준까지 건조	20~24 시간	수분함량
7	분쇄	입자도 0.5mm	1시간	입자도

제 3 항. 결과

가. 대량생산 공정확립을 위한 예비실험

3종의 균주를 대상으로 원료 배지 내 urea첨가 수준유무에 따른 효소활성 변화를 조사하였으며 그 결과를 그림 79에 나타내었다. Pilot scale 공정 단계까지 질소원인 urea 4% 첨가를 통해 높은 효소활성을 보였던 것과 달리 urea를 첨가하지 않을 경우 효소활성이 약 300~500U/g 수준 감소하는 것으로 확인되었다. 또한, mutant strain p11 균주의 경우 효소활성의 변이가 심하여 모 균주인 *B. subtilis* #6 균주에 비해 효소활성이 낮은 경향을 나타내는 것으로 확인되었다. 따라서 대량생산 시스템 확보를 위해 mutant 균주보다는 모균주를 이용하는 것이 안정적인 대량생산 시스템 확립에 유리할 것으로 판단되었다.

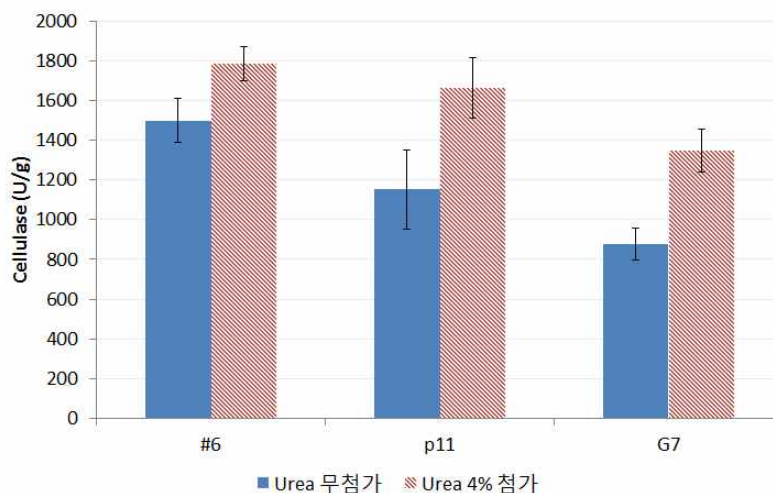


그림 81 선별 균주별 urea 첨가 유무에 따른 효소활성 비교

나. 선발균주의 단독, 복합발효를 통한 고체발효 특성 평가

고체발효 공정 확립을 위해 선발 균주별 단독 혹은 복합발효를 통한 고체발효 특성을 조사하였다(그림 98). 각 반복실험에서 *B. subtilis* #6 균주가 가장 높은 1,600~1,700 U/g의 효소활성을 나타내었으며, *B. subtilis* #6 및 *B. licheniformis* G7 균주의 복합발효에서는 *B. subtilis* #6 균주의 단독발효보다 낮은 1,200~1,600U/g의 효소활성을 나타내었으며, *B. licheniformis* G7 단독발효에서도 900~1,100U/g 수준의 낮은 효소활성을 나타내었다. 본 연구에서는 *B. licheniformis* G7균주와 *B. subtilis* #6번 균주와의 synergy효과를 기대하였으나 복합 고체발효에서는 특별한 효과가 없는 것으로 확인되었으며 *B. subtilis* #6 균주의 성장 정도에 따라 효소활성에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

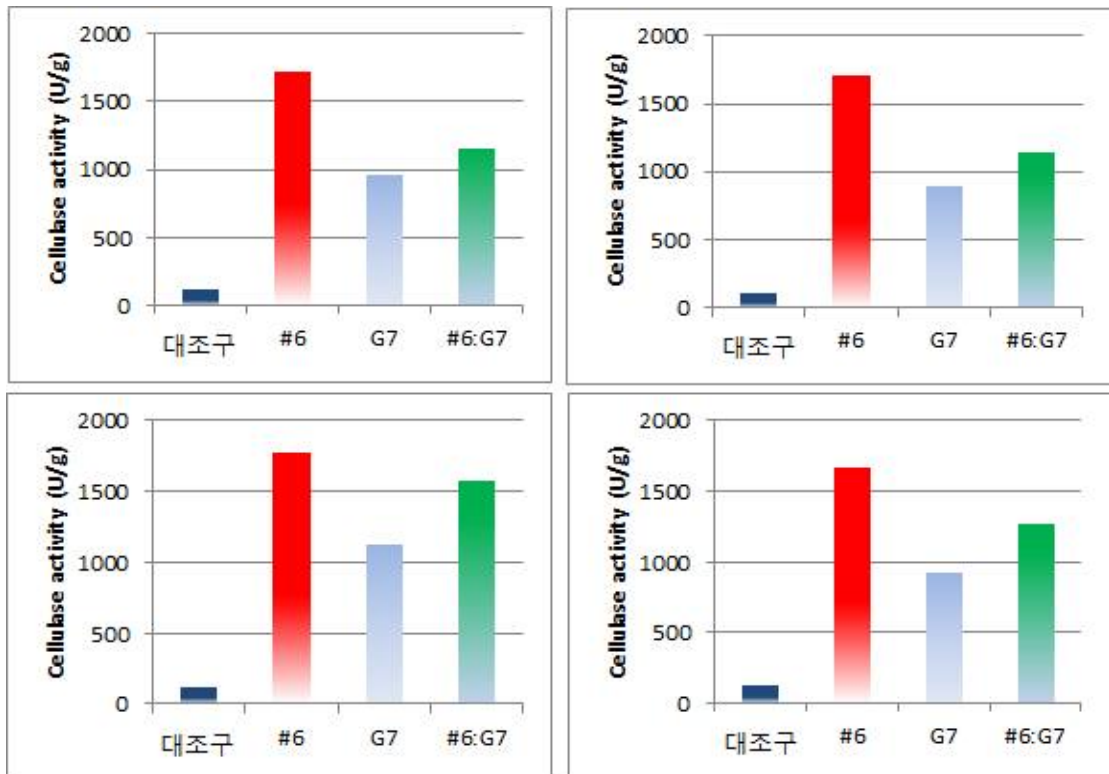


그림 82 반복, 재현성 검증 단계에서의 각 균주별 효소활성 결과.

최종 발효 종료 후 전체 혼합물에서의 효소활성의 변이가 있는지를 확인하기 위해 반복실험 샘플에 대해 전체를 배합기를 이용하여 잘 혼합 후 각 처리구별로 재분석한 결과를 표 24에 나타내었다. 각 처리구별로 효소활성은 batch별로 분석한 결과와 비슷한 경향을 보였으며, *B. subtilis* #6 균주 단독 발효가 1,713U/g으로 가장 높은 활성을 나타내었다. 반면, *B. subtilis* #6 및 *B. licheniformis* G7 균주의 복합발효 처리구에서는 샘플의 혼합, 분쇄과정으로 인해 효소활성이 약간 증가하였으나, batch별 분석결과 평균과 비슷한 경향을 나타내어 최종 대량생산을 방법으로 *B. subtilis* #6 균주 단독 발효 공정을 확립하는 것이 가장 유리할 것으로 판단되었다.

또한, 모든 처리구에서 미생물 균수는 10^9 cfu/g 수준을 확인하여 미생물제제로서의 안정적인 우수한 품질을 확보할 수 있을 것으로 확인되었다.

표 24. 최종 분쇄/ 혼합 후 효소활성 및 균수 결과

No.	샘플명	Cellulase(U/g)	CFU/g
1	대조구	104	-
2	#6	1,713	1.00E+09
3	G7	1,188	1.30E+09
4	#6 + G7	1,493	2.00E+09
5	Mix (2+3)	1,453	1.00E+09

다. 대량 고체발효 공정 확립

3차례에 걸친 대량 고체발효 실험을 통해 최적 대량생산 공정을 확립하였으며, 그 결과를 표 25에 나타내었다. 고체발효 공정은 pilot scale공정을 기초로 하였으며, SW배지에 urea를 첨가하지 않았으며 pilot scale공정 대비 원료량 증가에 따른 일정수준의 효소활성 감소 (약 200~300U/g)를 확인하였다. 이는 pilot 단계 대비 원료두께, 균성장 속도, 발효 중 원료 수분함량 등의 변화에 따른 결과로 판단된다.

1차~3차 실험 결과에서 발효시간별 효소활성 및 균수변화를 그림 81에 나타내었다. 최종 60시간 발효 결과 효소활성은 약 1,400U/g, 미생물 균수는 10^9 cfu/g을 확보하였다. 발효시간별 효소활성 및 미생물 균수를 조사한 결과 최적 효소활성 및 미생물 균수를 나타내는 시간이 42~45시간으로 확인되어 추후 대량생산 공정에서는 발효시간을 기존 60시간에서 42~45시간으로 단축시킬 수 있을 것으로 확인되었다. 최종 분쇄 후 원료량 대비 제품 회수율은 최종제품의 수분함량 8.5~9.5% 기준으로 89~91% 수준을 안정적으로 확보하였다.

표 25. 대량 고체발효 결과

샘플링 위치	1차	2차	3차
1	1,315.95	1,103.30	1,366.35
2	1,412.55	1,065.25	1,381.55
3	1,401.60	938.95	1,461.32
평균	1,376.70	1,035.83	1,403.07

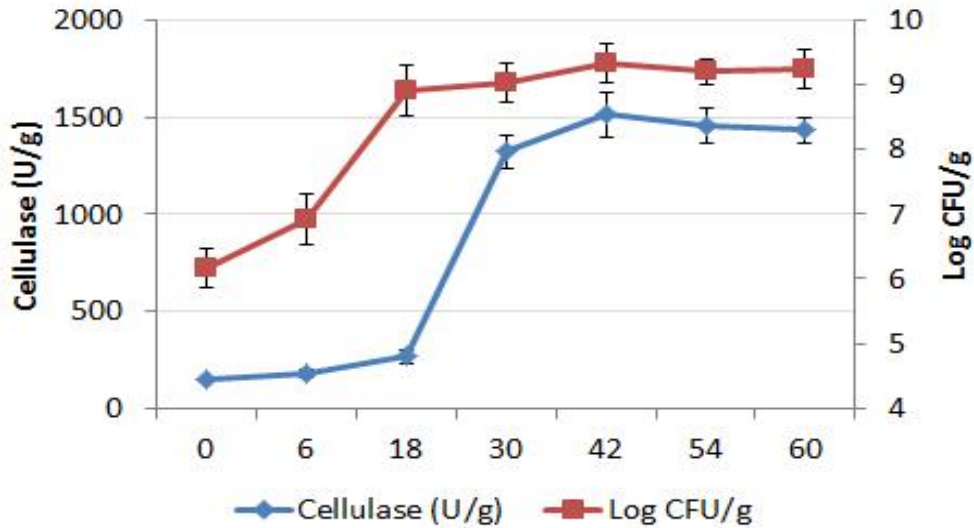


그림 83. 대량생산 공정에서의 발효시간별 효소활성 및 미생물 균수 변화.

제 4 항. 고찰

당초 원료배지 내 urea첨가시보다 약 300U/g 낮은 효소활성을 확인하였으나, 대량생산 시 경제성 및 수급, 제품의 안전성 등을 고려하여 urea를 첨가하지 않고 대량생산 공정을 확립하였다. 또한 선발균주 측면에서 mutation을 통해 확보된 균주의 효소활성의 변이가 큰 것을 확인하여 안정적인 제품화를 위해서 모균주를 이용하여 대량생산 공정을 확립하였다. 대량생산 공정 확립 전 단독 발효 공정보다는 복합발효공정을 통해 제품특성의 변화를 기대하였으나, 2균주 모두 동일한 *Bacillus* 속 균주로 발효특성 개선에는 큰 효과가 없는 것으로 확인되었다. 대량 발효공정 확립을 위해 발효시간 별 효소활성 및 미생물 균수변화를 조사하였으며, 대량생산 공정에서의 발효 42시간에서 가장 높은 균수 및 효소활성을 보여 제품화 단계에서는 적정 발효시간을 42~45시간으로 설정해도 문제가 없을 것으로 판단된다. 특히 cellulase는 cell dependent metabolite로서 미생물의 균체수와 밀접한 관계를 가지고 있어 대량생산공정에서의 aeration 량에 따른 균성장 속도의 증가로 기인한 결과로 판단되며, 제품화 단계에서의 공정단축 및 생산비 절감효과를 기대할 수 있을 것이다. 또한, 대량생산 공정을 통해 최종제품의 균수는 pilot scale단계에서와 동일한 10^9 CFU/g 수준임을 최종 확인하여 섬유소 분해활성을 가진 미생물제제로서의 우수한 품질 특성을 확보하였다.

제 14 절. 저장안정성 평가

제 1 항. 목적

개발제품의 유통기간을 설정하기 위해 6개월간 장기보관을 통해 효소활성 및 미생물 균수변화를 조사하고자 하였다.

제 2 항. 재료 및 방법

개발제품에 대한 저장성을 평가하기 위해 별도의 소형 종이 지대를 제작하여(20 cm X 25 cm) 개발 제품을 150g씩 담아 6개월간 실온조건(온도: 10~25°C, 습도: 40~70%)에서 저장테스트를 하였다. 미생물 균수 및 효소활성의 감소 정도 확인을 통해 개발제품의 저장성을 평가 하였다 (그림 82).



그림 84 개발제품의 저장성 test 샘플.

제 3 항. 결과

6개월간 저장성 실험결과를 그림 83에 나타내었다. 초기 3개월까지는 cellulase활성의 변화가 거의 없는 것으로 확인되었으나, 3개월 이후부터는 cellulase활성이 조금씩 감소하는 것으로 확인되었으며, 최종 6개월 후 cellulase 활성은 초기 대비 약 87% 수준까지 감소하는 것으로 확인되었으나, 미생물 균수는 10^9 cfu/g 수준을 유지하는 것을 확인되어 6개월 보관에서도 미생물 측면에서의 저장안정성은 문제가 없는 것으로 판단된다.

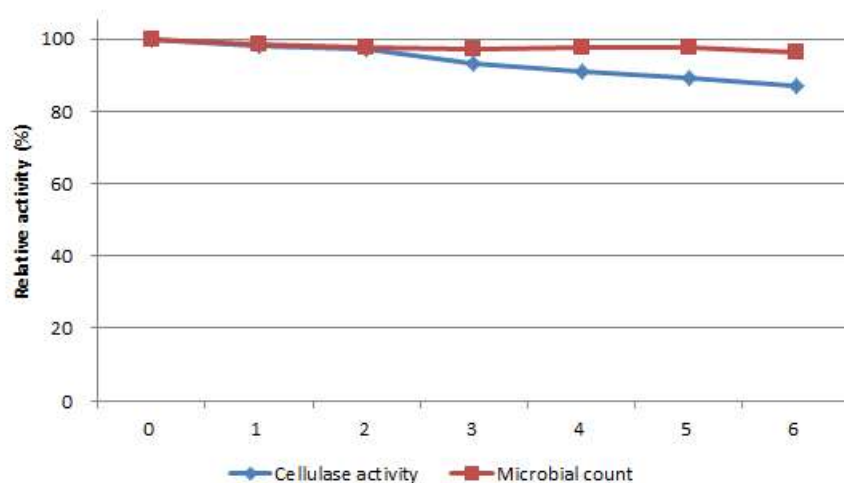


그림 85. 개발제품의 보관기간에 따른 효소활성 및 미생물 균수 변화

제 15 절. 고상발효 미생물제제의 효능평가

제 1 항. 실험 목표

본 연구에서는 고상발효된 *Bacillus* 6번 균주와 대조구를 In situ, In vitro 실험을 통해 원료적 측면에서 섬유소 분해 효과를 알고자 수행하였다.

제 2 항. 실험 재료 및 방법

가. nylon bag을 이용한 건물 소실율 평가 및 성분 분석

건물 소실율을 측정하기 위하여 *Bacillus* 6번 균주 고상발효(BS)와 대조구 고상발효를 nylon bag 방법을 이용해 실험을 진행하였다. 1개 nylon bag 당 50g씩 넣어 총 42 nylon bag (30×50 mm, 53-um pore size)을 준비하여 (0, 3, 6, 9, 12, 24, 48h) 배양 시간에 맞춰 6 : 4 비율의 일정한 양의 사료를 급여 받고 있는 홀스타인 거세우의 반추위 안으로 투여하였다. 일정 배양시간이 지난 후 반추위로부터 nylon bag을 꺼내어 수돗물에 반추위 액의 색깔이 묻어 나오지 않을 때까지 행구어 씻겨내었다. 이 후 65°C 건조기에 48시간 동안 건조한 후 무게를 측정하여 건물 소실율을 계산해 내었다. nylon bag안의 시료는 꺼내어 일반성분 분석을 진행하였고 건물 소실율 결과를 통해 분해 계수를 계산해 얻어내었다. 계산과정은 다음과 같다.

$$P = a + b (1 - e^{-ct})$$

P = 배양시간 t 에서의 영양소 분해율 (%); a = 반추위내에서 바로 분해되는 부분 (%); b = 반추위내에서 서서히 분해되는 부분 (%); c = b fraction 이 분해되는 속도 (%/h); t = 반추위내 배양 시간 (hour). 잠재적 분해 가능량은 a+b 로 계산하였다.

Wash out 과정이 Orskov와 McDonald (1979)의 exponential curve fitting 에 미치는 영향을 평가하기 위하여 wash out 의 유무에 따라 다르게 평가한 후 비교하였다.

유효분해도 (ERD: effective ruminal degradability) 는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$ERD = a + [b \times c / (c + k)]$$

k = 반추위 내용물의 flow rate (%/h), 시간당 5% 로 추정

나. In vitro batch culture 건물 소화율 평가 및 성분 분석

건물 소화율과 반추위 대사성상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 *Bacillus* 6번 균주 고상발효(BS)와 대조구 고상발효를 batch culture (Tilley and Terry, 1963) 방법으로 실험을 진행하였다. In situ 실험과 동일한 6 : 4 비율의 일정한 양의 사료를 급여 받고 있는 홀스타인 거세우로부터 반추위액을 채취한 후, 8겹의 cheesecloth로 이물질질을 걸러내고 그 후 반추위액을 McDougall buffer와 1:4 비율로 희석하고 난 후 CO₂ 을 15분간 충전하여 혐기상태를 유지 시켰다. 1g의 시료가 들어간 60ml serum bottle

안에 25ml의 희석된 반추위액을 넣고 곧바로 rubber 와 aluminium cap으로 bottle을 봉하였다. 각 샘플마다 3반복으로 진행하였고, 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 h 으로 39°C incubator에서 발효시켰다.

각 시간 때 별로 샘플을 꺼내어 원심분리기에 3000rpm으로 15분 동안 진행한 후 pH meter (Delta 340, Mettler Toledo co.) 이용해 pH를 측정하였다. 상층액은 NH₃-N 나 Volatile fatty acid (VFA)를 분석하기 위해 1.5ml tube에 옮겼다. NH₃-N 분석은 (Chaney and Marbach, 1962) colorimetric 방법을 사용하였고, UV spectrophotometer (UV-1601PC, Shimadzu co.)로 OD를 측정하였다. VFA 분석은 샘플 상층액이 담긴 1.5ml tube에 200ul metaphosphoric acid 첨가하고 silica capillary column (30 × 0.25mm × 0.25um, Supelco) 을 사용한 gas chromatography (Agilent Tech. co.)로 분석하였다. bottle 안에 있는 시료들은 filter paper (110mm, 22um pore size)로 필터링을 하고 65°C 건조기에서 48시간동안 건조시킨 후 각각의 샘플의 무게를 측정하여 건물 소화율을 계산하였다.

미생물의 정량은 Real time PCR을 이용하였는데, 이를 위해 고상발효 Product를 첨가한 in vitro rumen sample을 액체질소로 얼린 후 grinder로 분쇄하고 CTAB extraction buffer를 이용하여 total DNA를 추출하였다 (CTAB DNA extraction protocol from Qiagen Corp. for higher plant DNAs를 참조). 분리된 DNA를 주형으로 하고, target rumen bacteria 의 16s ribosomal RNA gene을 특이적으로 증폭할 수 있는 primer set을 이용하여 total DNA 에 존재하는 미생물을 탐지하였다. 그리고 KAPA SYBR mix. 와 LightCycler 480을 이용하여 PCR 증폭산물의 형광정도를 측정하고 이를 통하여 미생물 군집의 정량을 실시하였다. 정량을 실시할 target bacteria 로는 *Fibrobacter succinogens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Eubacterium ruminantium*, *Methanogen*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amylophilus*, *Streptococcus bovis*를 설정하였다, 검량선은 target 미생물의 PCR product를 pGEM-T easy vector에 삽입한 것을 DNA농도와 plasmid copy number를 고려하여 10배씩 serial dilution 해서 사용하였다. 희석한 plasmid DNA에서 검출되는 형광물질의 crossing point를 기준으로 하여 total DNA에 존재하는 각 target bacteria 의 log copy number를 1ml rumen fluid 당량으로 표시하였다.

데이터 통계분석은 Statistical analysis system (SAS, 2002)의 ANOVA 로 분석하였고 평균 간의 차이는 Tukey Test (Snedecor and Cochran, 1967)로 분석하였다.

다. 생균제 특성 평가 : 내산성, 내담즙성

고상발효 미생물 제제 3g을 27ml 의 멸균한 증류수에 희석시키고, 30분간 상온에서 shaking 시켜준 후 4°C 3,000 rpm × 15min에서 centrifuge 하여 그 상층액을 선발균주의 내산성을 측정하기 위하여 사용하였다. 상층액은 pH를 산성조건으로 조절시킨 LB broth (pH 2.5 or pH 3) 700ul 와 300ul 0.5% NaCl 용액과 섞어준 후 37°C 로 맞춘 진탕배양기에서 시간대별(0, 60, 120, 180분)로 배양시킨다. 각 시간대별로 100ul 의 배양액을 LB agar plate 에 도말한 후 37°C 배양기에서 12~15시간정도 배양시킨 후 CFU(colony forming unit)를 계산한다. Control 로는 고상발효 미생물제제의 최대 효소 역가를 나타내었던 pH 5 로 조절한 LB broth를 사용하였다.

Bacillus 6번 균주의 하부장기에서의 유효성을 검증하기 위하여 0.05, 0.1% oxgall (Sigma)를 30ml LB broth에 첨가한 후 121°C 15분 동안 가압멸균기를 이용하여 멸균시킨다. 멸균시킨 배지에 위의 내산성 실험에 이용되었던 고상발효 미생물 제제의 희석액을 1% (30ul) 접종한다.

접종시킨 배지를 37°C 진탕배양기에서 배양을 시키면서 #6 균주의 성장곡선을 각 시간대 (0, 2, 4, 6, 8시간) 마다 분광광도계를 이용하여 600nm 의 흡광도를 측정하여 계산한다. Control 로 는 oxgall을 첨가하지 않은 LB broth를 사용하였다.

표 26. Chemical composition of diet (DM basis %)

Item	Timothy	Concentrate
Dry matter	90.42	86.61
Crude protein	8.13	14.09
Ether extract	1.70	5.14
Crude fiber	37.54	6.94
Crude ash	6.02	4.77
ADF	41.82	10.29
NDF	71.49	20
Hemicellulose	29.67	9.71
Lignin	0.48	0.44
Silica	1.02	0.05
Ca	0.90	0.75
P	0.66	0.35

표 27. The composition of MaCdougall buffer

Chemicals	Amount (/ 1.5L)
NaHCO ₃	11.76 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	5.544 g
KCl	0.684 g
NaCl	0.564 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.045 g
4% CaCl ₂ solution	1.2 ml

표 28. Primer sequences used in real-time PCR analyses

Primer	Sequence 5'-3'	Annealing temp(°C)
<i>Fibrobacter succinogens-For</i>	gttcggaattacgcgtaaa	58
<i>Fibrobacter succinogens-Rev</i>	cgctgcccctgaactatc	58
<i>Ruminococcus albus-For</i>	ccctaaaagcagtcttagttcg	55
<i>Ruminococcus albus-Rev</i>	cctccttgcggttagaaca	55
<i>Ruminococcus flavefaciens-For</i>	tctggaaacggatggta	54
<i>Ruminococcus flavefaciens-Rev</i>	ccttaagacaggagtttataa	54
<i>Eubacterium ruminantium-For</i>	gcataagcgcacagtaccgca	61
<i>Eubacterium ruminantium-Rev</i>	gagatacttcactcactcagcg	61

<i>Methanogen-For</i>	gtctctggtgaaatcctgtagctta	60
<i>Methanogen-Rev</i>	gcagctcaaagccaccaaca	60
<i>Prevotella ruminicola-For</i>	cgatggatgcccgctgtttg	61
<i>Prevotella ruminicola-Rev</i>	gacaaccatgcagcacctcc	61
<i>Ruminobacter amylophilus-For</i>	gcgacgatctctagctggtc	63
<i>Ruminobacter amylophilus-Rev</i>	cggagttagccggtgcttctt	63
<i>Streptococcus bovis-For</i>	gctaccaaggcgcgcatac	61
<i>Streptococcus bovis-Rev</i>	gtagttagccgtccctttctgg	61

제 3 항. 결과

가. 고상발효 샘플의 일반성분 및 총 아미노산 분석 결과

Bacillus 6번 균주 고상발효 (BS) 와 대조구 고상발효의 일반성분 분석과 17가지 아미노산 성분 분석 결과는 표 29, 30 에서 보는 바와 같다.

BS 고상발효가 대조구에 비해 2% 정도 수분함량이 높고 단백질 함량 역시 상대적으로 조금 높은 수치를 나타내었으며 조지방, 조섬유, 조회분 그리고 ADF함량은 대조구에 비해 높은 함량을 나타내었다. 반면, NDF, 리그닌, 헤미셀룰로스는 대조구에 비해 낮은 수치를 보였다. 총 아미노산 함량은 대조구에 비해 처리구에서 증가하였다.

표 29. Chemical composition of SSF product (DM basis %)

Item	Control	BS
Dry matter	92.45	90.53
Crude protein	39.74	43.95
Ether extract	2.09	2.76
Crude fiber	7.21	7.81
Crude ash	6.50	7.38
ADF	11.57	18.05
NDF	49.72	43.12
Hemicellulose	38.15	25.07
Lignin	2.54	2.11
Silica	1.12	0.66
Ca	0.38	0.25
P	0.82	0.80

*Control : No microorganism were treated.

BS : *Bacillus subtilis* was inoculated.

표 30. Total amino acid contents of SSF product (%)

Item	Control	BS
Total (%)	27.84	30.63
Asparagine	3.28	3.5
Threonine	1.22	1.28
Serine	1.55	1.52
Glutamine	6.01	7.09
Glycine	1.37	1.43
Alanine	1.36	1.58
Valine	1.19	1.35
Isoleucine	1.12	1.19
Leucine	2.25	2.45
Tyrosine	0.87	1.1
Phenylalanine	1.33	1.62
Lysine	1.65	1.86
Histidine	0.7	0.71
Arginine	2.1	1.86
Proline	0.96	1.07
Methionine	0.43	0.51
Cysteine	0.45	0.51

나. In situ nylon bag 실험

(1) 건물 소실율

in situ nylon bag을 이용한 조사료의 건물 소실율을 조사한 결과 BS 처리구에서 대조구에 비해 시간대별로 유의적으로 높은 것으로 확인할 수 있었다.

(2) 조단백질 소실율

대조구과 BS 의 CP 소실율에서 유의적인 차이를 보이면서 특히, 0h에서 이미 10%정도의 소실율을 보였고, 그 이후 6h에서 48h 까지 30%가 넘는 차이를 각각의 배양시간에 따라 나타내었다. 이에 따라 건물소실율과 비슷한 패턴의 결과를 확인할 수 있었다.

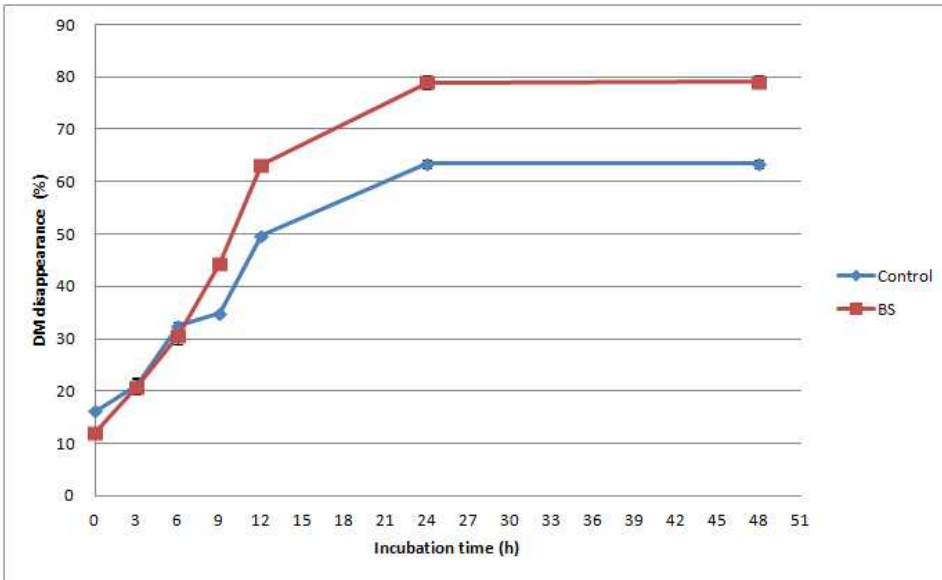


그림 86. In situ dry matter disappearance rate of solid state fermentation product in the rumen.

*Control : No microorganism were treated.

BS : *Bacillus subtilis* was inoculated.

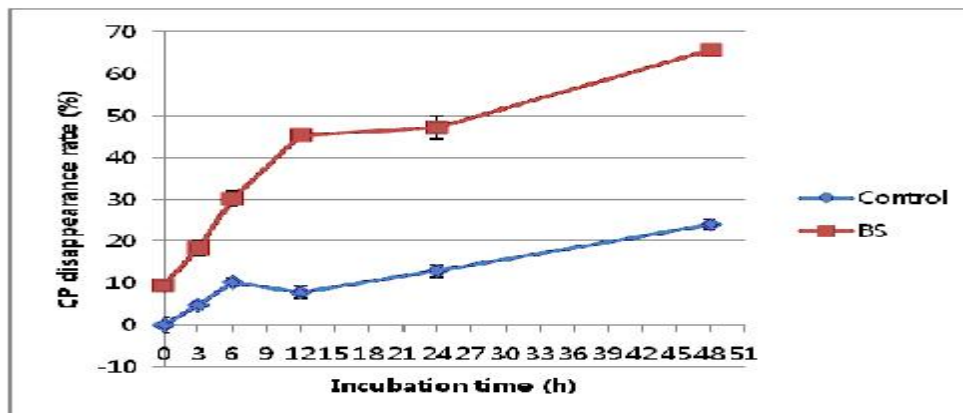


그림 87. In situ CP disappearance rate of solid state fermentation product in the rumen.

*Control : No microorganism were treated.

BS : *Bacillus subtilis* was inoculated.

(3) In situ 분해 계수 특성 비교

대조구와 BS 건물의 A fraction은 각각 13.4%, 7.24%이지만, B fraction에서는 BS가 대조구에 비해 높은 수치를 나타내었다. 유효 분해도는 $K = 0.05/h$ 의 outflow rate에 따라 계산된 수치이며 대조구보다 BS가 훨씬 높은 수치를 보였다.

대조구와 BS CP의 A fraction은 상대적으로 BS가 높았으나 B fraction에서는 반대로 대조구가 높았다.

표 31. In situ DM and CP degradability and effective degradability of SSF (%)

Parameter	Control	BS SSF
DM		
A	13.04	7.24
B	54.61	77.45
c (%/h)	0.08	0.08
ED (k=0.05)	46.00	55.39
CP		
A	2.694	9.9161
B	60.8405	54.9949
c (%/h)	0.0088	0.0678
ED (k=0.05)	11.80	41.57

다. In vitro batch culture 실험

(1) 건물 소화율

In vitro 건물 소화율은 앞서 진행했던 In situ 건물 소실율과 비슷한 결과를 나타내었다. 그러나 BS의 초기 0h 소화율이 In situ BS의 초기 소실율에 비해 조금 높아진 것과 48h에서 상대적으로 낮아진 경향을 볼 수 있다. 전반적으로, BS가 대조구에 비해 10% 이상 유의적으로 높은 소화율을 나타내었다.

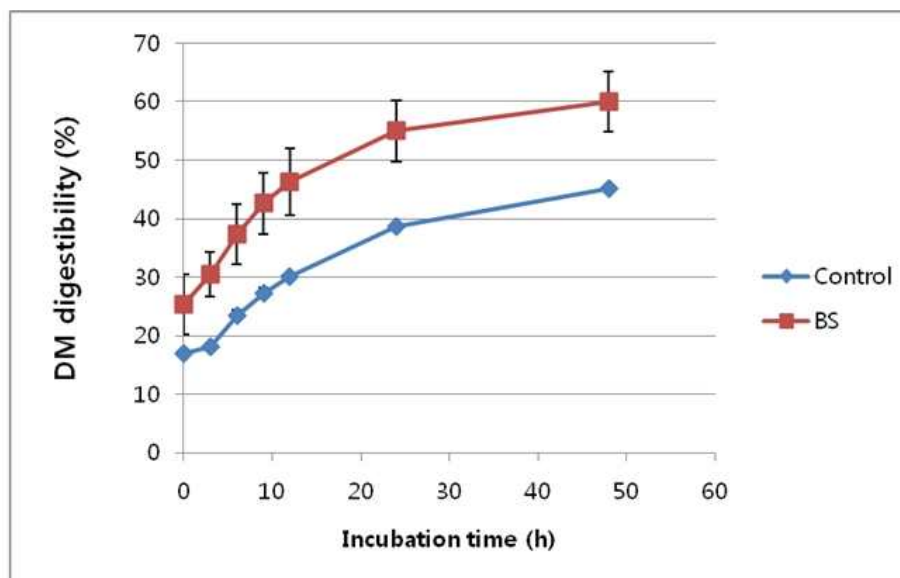


그림 88. In vitro DM digestibility of solid state fermentation.

(2) 반추위내 발효 특성

pH variation에 관한 결과는 다음 그림 87에 제시되었다. In vitro 건물 소화율과 반대로 pH 농도는 12h부터 48h 까지 유의적으로 차이를 보이면서 BS가 대조구에 비해 높은 결과를 나타내었다. NH₃-N 농도 결과는 다음 그림 88에 제시되어 있다. 0h에서 3h 까지 큰 변화가 없다가 6h에서 48h 동안 BS와 대조구에서 20% 이상의 현저한 차이를 나타내었다. In vitro 반추위 대사성상에 관한 표는 표 30에 제시되어있다. 대조구와 BS에서 acetic acid와 propionic acid의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 그러나 iso-butyric acid, iso-valeric acid을 포함한 butyric acid, valeric acid에서 대조구에 비해 BS에서 유의적으로 높은 수치를 보였다. 이에 따라, 총 VFA 함량에서도 대조구에 비해 BS가 유의적으로 높은 결과를 확인할 수 있었다.

in vitro 소화실험 시 추출된 DNA sample의 Real-time PCR 결과를 통해 target bacteria의 배양시간별 군집변화를 관찰하였다 (그림 89~96). *Fibrobacter succinogens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* 는 고상발효 product를 첨가한 처리구에서 유의적으로 낮게 탐지되었다. *Methanogen* 은 배양시간이 지남에 따라 고상발효 처리구에서 유의적으로 낮게 측정되었고 *Ruminobacter amylophilus* 의 군집이 처리구에서 증가, *Streptococcus bovis* 같은 경우는 대조구에서 유의적으로 더 높았다.

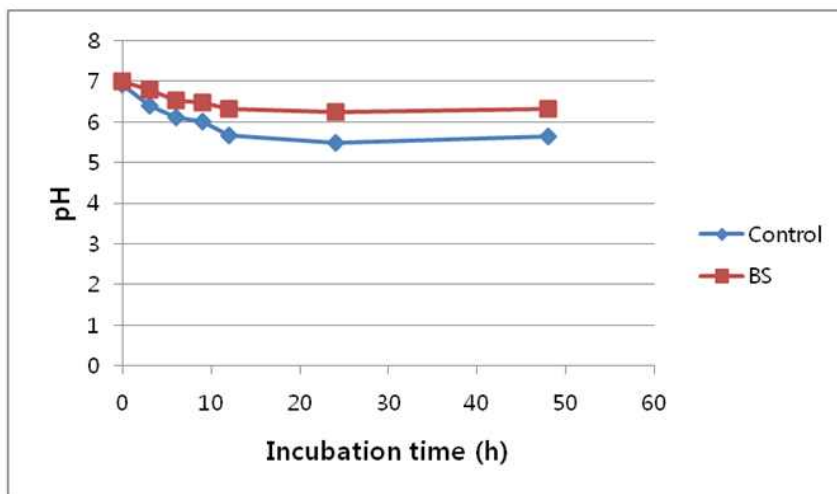


그림 89. Variation of pH in the incubation medium as influenced by solid state fermentation product.

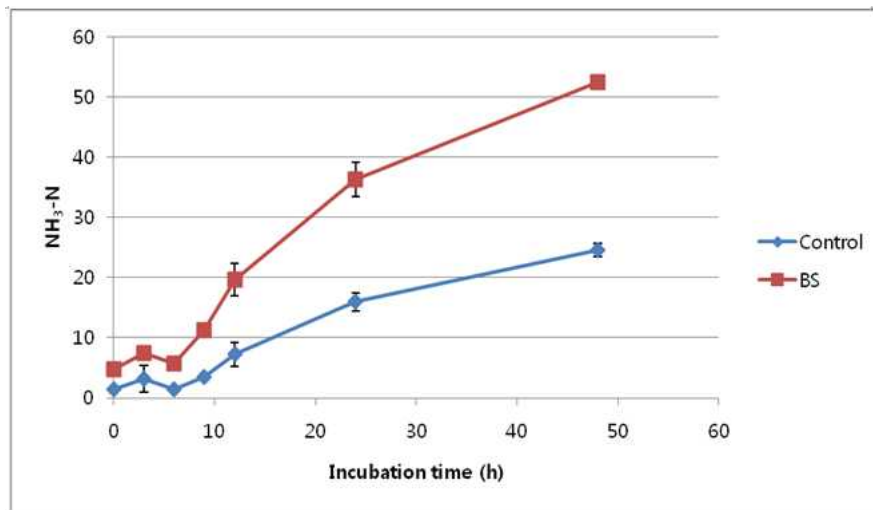


그림 90. NH₃-N concentration of incubation medium as affected by solid state fermentation product.

표 32. Rumen pH, VFA concentration (mMol/L), and NH₃-N(mg/100ml)in the incubation medium as affected by solid state fermentation product

Item	Treatments		SEM	P value
	Control	BS		
VFA (mM)				
Acetic acid (A)	47.04	48.86	0.61	0.151
Propionic acid (P)	27.82	28.60	0.34	0.300
Isobutyric acid	0.57 ^b	2.29 ^a	0.39	0.001
Butyric acid	10.21 ^b	10.79 ^a	0.16	0.041
Isovaleric acid	0.90 ^b	3.32 ^a	0.54	0.001
N-valeric acid	1.21 ^b	2.09 ^a	0.20	0.001
Total VFA	87.76 ^b	95.96 ^a	2.03	0.013
A : P ratio	2.26	2.25	0.01	0.532
PH				
PH	6.04 ^b	6.52 ^a	0.11	0.001
NH ₃ -Nmg/100ml	8.21 ^b	19.66 ^a	2.58	0.0001

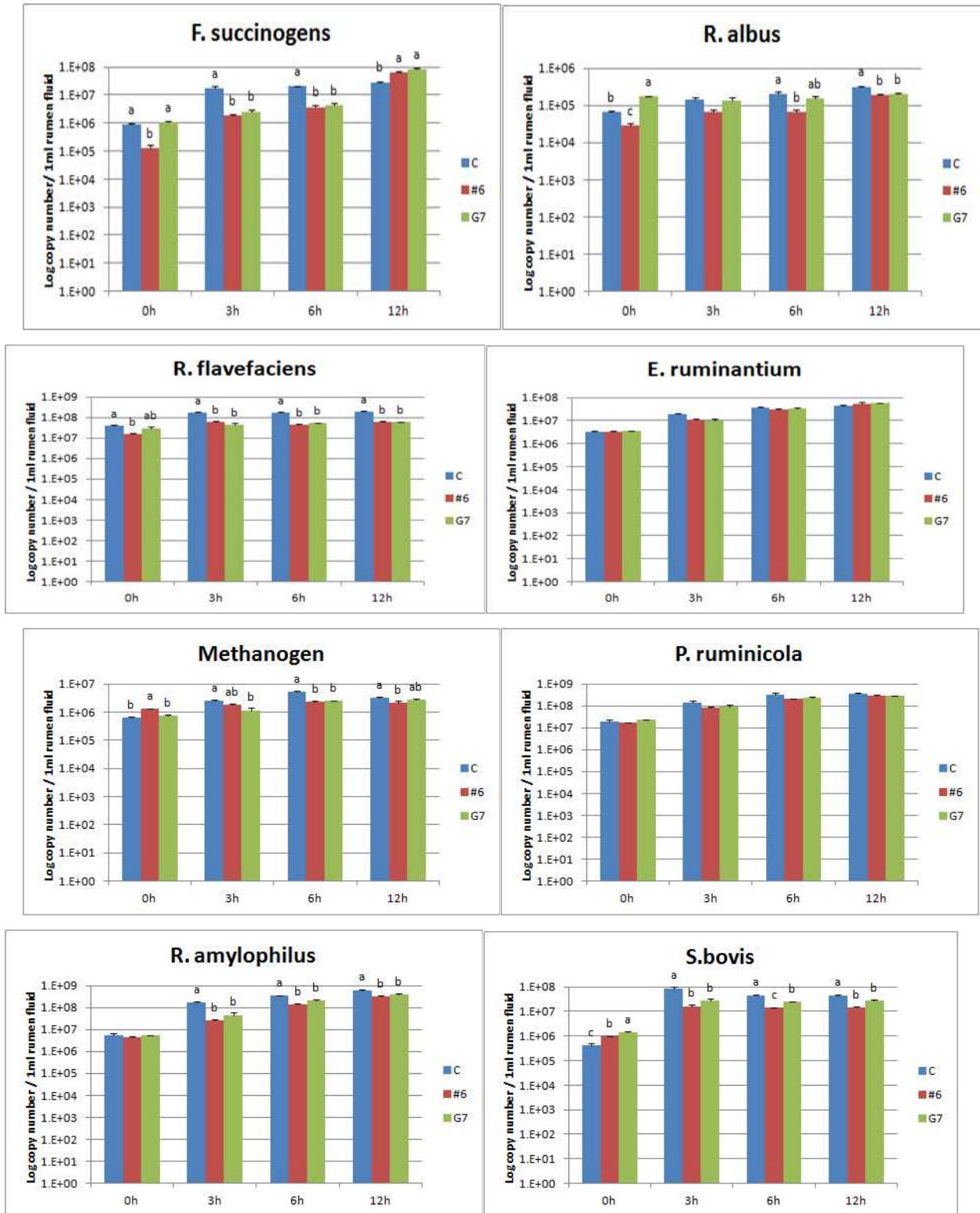


그림 89~96. 8 rumen microbes enumeration through real time PCR using in vitro rumen sample as DNA template.

라. 생균제 특성 평가 : 내산성, 내담즙성

0.3, 0.5% 의 oxgall을 배지에 첨가하여 8시간 배양시킨 결과 선발된 균주의 흡광도에 유의적인 변화가 관찰되지 않았다 (data not shown). 추가적으로 배지에 첨가하는 oxgall 농도를 0.05, 0.1%까지 조절하여 미생물 성장곡선을 측정하였고, 그림 97과 같은 결과를 얻었다. 0.1%에서는 앞선 실험에서와 같이 선발된 균주의 growth 가 관찰되지 않았지만, 0.05% oxgall을 첨가한 처리구에서는 37℃에서 6시간 이상 배양했을 경우에 유의적인 흡광도 차이를 보였다.

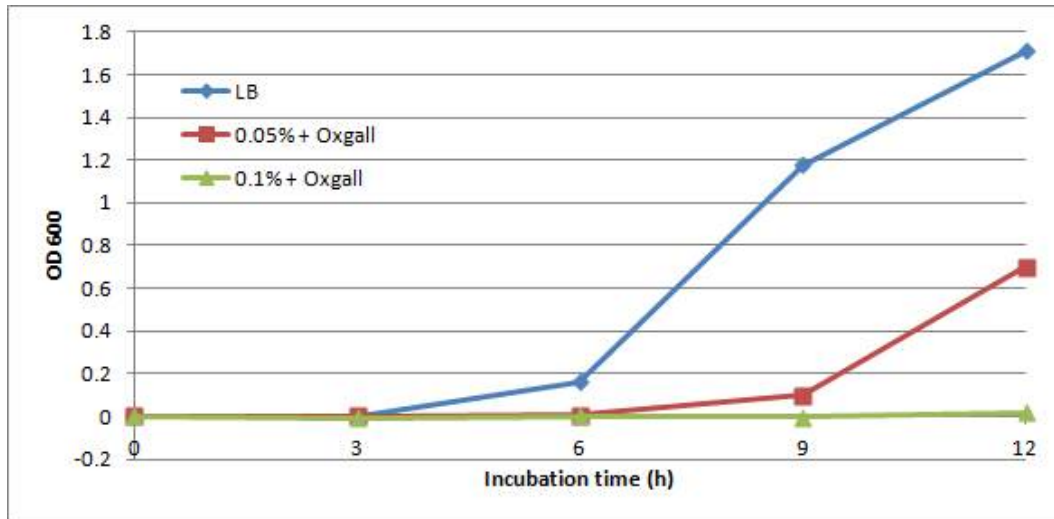


그림 99. Growth curve of Bacillus #6 with and without 0.05% and 0.1% oxgall.

본 실험에서는 LB broth 배지의 pH를 2.5과 3 으로 조절한 후 시간대별로 배양 시킨 후 LB agar plate 에 도말시키고 이를 대조구와의 colony forming unit (CFU) 차이를 비교해봄으로써 선발된 균주가 가지고 있는 내산성을 평가하였다. 표 33과 같이 처리구와 대조구의 CFU는 각 시간대별로 차이는 있으나 전체적으로 유의적인 차이가 나타나지는 않았다.

표 33. Effect of low pH on viability of *Bacillus* #6

Strain	pH	Viable count (CFU/ml)			
		0min	60min	120min	180min
<i>B. subtilis</i> #6	Control	8.00×10 ⁶	7.80×10 ⁶	6.95×10 ⁶	6.70×10 ⁶
	pH2	6.25×10 ⁶	8.20×10 ⁶	8.80×10 ⁶	5.40×10 ⁶
	pH3	8.00×10 ⁶	9.65×10 ⁶	8.25×10 ⁶	5.85×10 ⁶

제 4 항. 고찰

본 연구의 목적은 고상발효된 *Bacillus* 6번 균주 (BS) 와 대조구를 In situ, In vitro 실험을 통해 소실율을 측정함으로써 원료적 측면에서 섬유소 분해 효과를 알고자 실험을 진행하였다.

일반성분 분석 결과에서 BS 처리구가 대조구에 비해 CP, EE에서 높은 수치를 나타내었는데

이것은 미생물의 작용과 확산 그리고 고상발효 제제의 발효시기 동안에 기질의 헤미셀룰로스가 줄어든 것으로 짐작할 수 있겠다. 더욱이, *Bacillus* 6번 균주 (BS)의 첨가로 인해 BS 처리구에서 총 아미노산 함량이 증가하였고, 그로 인해 In vitro 실험에서 $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도에 영향을 미치게 된 것이다.

고상발효의 BS 첨가시의 기질의 섬유소 분해 효과를 보기 위해 In situ 실험을 진행되었다. BS 처리구의 In situ 건물 소실율은 대조구에 비해 9h에서 48h 동안 유의적인 차이를 나타내었는데 이 역시 *Bacillus* 6번 균주 (BS)가 4 대 6으로 혼합된 밀기울과 대두박 기질을 효과적으로 분해하였기 때문이라고 판단된다. 단백질 소실율에서도 마찬가지로 In situ 건물소실율의 결과와 비슷한 패턴을 보였고, 대조구와 BS 처리구의 6h에서 48h 동안에 20%가 넘는 유의적인 차이를 나타내었다($P < 0.05$). (Hristov, 1993)의 의하면, In situ 건물 소실율에서 미생물 제제를 첨가한 알팔파 사일리지의 단백질 소실율이 50~60%의 유의적인 결과를 나타내었다. 그 결과, 알팔파 사일리지에 단백질과 암모니아 함량이 향상되어 긍정적인 효과를 입증하였다고 보고 하였다.

In situ 건물 소실율의 결과를 바탕으로 분해계수율과 유효 분해도를 도출하였다. (표 31). 건물 소실율의 0h에서 BS 처리구가 대조구에 비해 낮은 결과를 보인 것은 BS 처리구의 A fraction이 대조구에 비해 낮은 수치이기 때문이라고 볼 수 있다. 또한, BS의 B fraction과 높은 수치의 유효 분해도(ED)가 건물 소실율과 상관관계가 있는 것으로도 알 수가 있다. 단백질 소실율에서 0h의 BS 처리구가 대조구에 비해 10%이상 차이를 보였는데 이것은 BS의 A fraction이 대조구에 비해 높았고 이로 인해 처리구간의 차이를 만들어 낸 것으로 확인 할 수 있다. 한편, B fraction에서 BS 처리구는 대조구에 비해 낮은 수치를 보였지만 BS 처리구의 상수 C 값에서 대조구 보다 높은 수치를 나타냈고 그로 인해 유효 분해도(ED)값 역시 BS 처리구가 높아진 것으로 인해 전반적인 단백질 소실율의 유의적인 차이를 나타낸 것으로 판단된다.

다음 In vitro 소화율 실험의 결과는 BS 처리구가 상대적으로 대조구보다 월등히 유의적인 차이를 나타내었다($P < 0.05$). 뿐만 아니라 휘발성 지방산(VFA)에서도 많은 차이를 보였다. 이러한 이유는 고상발효 제조의 배양시간동안에 *Bacillus* 6번 균주 (BS)를 첨가한 BS 처리구에서 섬유소 분해가 유도되고 기질 안의 CHO, CP 등을 A fraction으로 변환시킴으로써 많은 대사산물들을 생산하였기에 대조구와 큰 차이를 낼 수 있었다고 짐작된다. 그러나 pH 농도는 In vitro 건물 소화율과 반대의 결과를 보였는데 이러한 이유는 BS 처리구의 $\text{NH}_3\text{-N}$ 농도가 대조구에 비해 현저한 차이를 보였고, 이것은 알칼리성으로 pH 농도를 높이는데 작용을 했을 것이라고 판단된다.

Real time PCR 에 template 으로 사용된 DNA sample 은 in vitro 소화실험이 진행됨에 따라 추출되었고 (0, 3, 6, 12 시간), 위 결과를 통해 target bacteria 의 배양시간별 군집변화를 관찰할 수 있었다. 하지만 이번결과에서는 미생물 군집의 변화를 in vitro 소화실험의 결과와 직접적으로 연관짓기는 힘들었다. 먼저 반추위내에 존재하는 대표적인 fibrolytic bacteria (*Fibrobacter succinogens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*) 가 처리구에서 유의적으로 낮게 탐지되었다는 것은 고상발효 미생물제제 내에 존재하는 cellulase 와 1g 당 10^9 CFU 정도인 *Bacillus sp.* 에 의해 기타 fibrolytic bacteria 의 성장을 억제하는 효과나 나타났다고 할 수 있다. 하지만 기존 fibrolytic bacteria 의 activity 가 첨가한 고상발효 product 에 의해 대체 혹은 첨가 된 것이기 때문에 이들의 군집감소가 소화율에 부정적인 영향을 주지

는 낮은 것으로 판단된다. 더불어 Methanogen 은 배양시간이 지남에 따라 고상발효 처리구에서 유의적으로 낮게 측정되었고, 이는 propionate 생성박테리아인 *Ruminobacter amylophilus* 의 군집이 처리구에서 증가하는 것과 더불어 in vitro 환경내의 발효성상을 동물 생산에 긍정적인 방향으로 변화시켰다고 할 수 있다. *Streptococcus bovis* 같은 경우는 대조구에서의 pH 가 처리구보다 낮게 유지된 것과 같이 대조구에서 유의적으로 더 높게 탐지되었다.

내담즙성은 DFM 과 같은 미생물제제가 동물의 소장상부와 같은 부위에서의 증식과 기능에 있어 중요한 것으로서 본 실험에서는 선발된 균주의 내담즙성을 알아보기 위하여 LB broth 에 oxgall 농도를 조절해 가면서 미생물 성장곡선을 그려보았다. 위 결과로서 선발된 균주 *Bacillus* 6번 균주는 oxgall 0.05% 이하의 농도에서는 일정수준의 저항성을 가지며 성장할 수 있는 것으로 나타났다. 이는 DFM 제제로 주로 이용되는 균주인 *Lactobacillus spp.* 의 내담즙성과는 차이를 보이는 것으로서 Cho et al (2000), 에 따르면 *L. johnsonni* 는 0.3, 0.5% 농도의 oxgall을 첨가한 MRS 배지에서 oxgall 첨가하지 않은 대조구와 성장곡선의 차이를 거의 보이지 않았고, *L. gasserii* 또한 0.3% 의 oxgall을 첨가한 처리구에서 일정수준의 growth를 보이는 것으로 나타났다. 하지만 다른 species 인 *L. bulgaricus* 와 *L. lactis* 균주의 경우에는 0.05%보다 낮은 bile acid 농도에서도 성장에 민감한 영향을 받는 것으로 나타났다 (Gilliland SE and Speck ML., 1977; Toit et al., 1998). 다른 생균제로 이용되는 균주들과의 비교를 통해 선발된 균주 *Bacillus* 6번은 동물에 적용하였을 때 하부장기에서 일정 수준의 활성을 보일 수 있을 것으로 기대된다.

미생물제제의 내산성은 반추동물의 제 4위나 단위동물의 위내의 강력한 산성조건에서 증식할 수 있는지 여부를 판별하는 지표로 쓰인다. 위 결과로서 *Bacillus* 6번 균주는 기존의 미생물제제로 쓰이고 acidophilic 이라고 알려져 있는 *Lactobacillus spp.* 가 산성조건에서 수 시간동안 control과 비슷한 CFU를 보이는 것 (Charteris WP et al., 1998; Conway PL et al., 1987; Klein G et al., 1998)과 큰 차이를 보이지 않았다. 이 결과로서 선발된 균주가 hydrochloric acid 와 gastric acid 가 분비되는 생리적 조건 내에서도 일정시간동안 생균제로서의 역할을 원활하게 수행할 수 있을 것으로 판단할 수 있겠다.

제 16 절. 고상발효 미생물 제제의 반추동물 대사 실험

제 1 항. 실험 목표

본 연구에서는 고상발효된 *Bacillus* 6번 균주 (BS)와 대조구를 In vivo 실험을 통해 고상발효 첨가 측면에서 섬유소 분해 효과를 알고자 수행하였다. 이에 따른 반추동물의 소화율, 질소 고정율 및 반추위 내 미생물체 단백질 합성량에서 미치는 영향을 관찰하였다.

제 2 항. 실험 재료 및 방법

반추위에 누관이 장착된 홀스테인 거세우 (450kg±30kg) 3두를 이용하였고 3×3 Latin square 인 실험방법으로 7일간 적응기를 두고 4일간 샘플 수집하였으며 2일간 In situ 나일론 백 실험

을 하였다. *Bacillus* 6번 균주 (BS) 고상발효를 첨가제로 사용을 하였고 세 처리구로 대조구 (무첨가), 처리구1 (0.67×10^{11} cfu per 100g per day), 처리구2 (1.34×10^{11} cfu per 200g per day) 로 기본 급여 사료 위에 top dressing 형태로 급여 하였다. 사료 급여량은 영양소 요구량을 고려하여 평균 체중의 2% 이내로 급여하였고 60%의 Timothy 와 40%의 농후사료 (TDN 71.50%, Cagill & Purina co.,LTD)를 8:00 와 20:00에 2회 균등 급여하였다. Mineral mixture는 자유로이 섭취하도록 하였고 음수는 하루 3번씩 급여시켰으며 실험동물은 본 실험 전 기간 동안 대사실에서 사육되었다. 뇨 샘플은 4일간의 샘플링 기간에 stainless 용기에 4 N H₂SO₄ 500ml 을 담아놓고 아침부터 그 다음날 아침까지 각 그룹 개체의 뇨를 받았다. 받은 뇨 무게를 재고 그중에서 2%만 수집해서 -20°C 냉동실에 분석하기 전 까지 저장하였다. 뇨의 질소 함량은 Kjeldalh method (AOAC, 1990) 로 측정하였고, 퓨린 유도체는 George et al (2006) modified method로, 뇨 중 uric acid 와 allantoin 의 함량을 측정하였다. 그리고 미생물체 질소 함량은 Chen et al (1992)의 방법으로 uric acid 와 allantoin의 수치를 이용하여 계산해냈다. 다음 분 샘플도 4일간의 샘플링 기간에 아침 사료 급여 전 분 샘플을 수거하여서 무게 재고 그중에서 2%만 수집해서 65°C dry oven에서 72시간 건조시키고 그 다음 믹서기로 갈아서 가루 상태로 만들었다. (DM, CP, Crude Fat, Crude Fiber, NDF, ADF, Ca, P)의 일반성분 분석을 건물 AOAC (1990) method, Van Soest (1991), Kheldalh method (AOAC, 1991) 등으로 측정하였다. 위액 샘플은 샘플링 마지막 날 사료 급여 전부터 2시간의 간격으로 (0, 2, 4, 6, 8, 12h post-feeding) 위액 샘플을 수집하였고 실험실로 옮겨와서 pH meter (Mettler, Delta 340)로 pH 를 측정하고 그 다음 위액을 원심분리기 (3,000 rpm, 15 min)로 돌려 상청액을 샘플링해서 암모니아농도와 휘발성지방산 (VFA)의 농도 측정을 위해 냉동실에 저장하여 두었다. 암모니아농도는 modified colorimetric method (Chaney and Marbach, 1962)로 측정하였고, 휘발성지방산의 농도는 gas chromatography (Agilent Tech 7890A)로 Supelco column (30m × 0.25mm × 0.25µm, fused silica capillary column) 을 사용하여 측정하였다.

섬유소 분해 효과를 보기 위해 Timothy로 In situ 나일론 백 실험을 In vivo 실험 중 각 period 당 마지막 날 2일 동안 (0, 3, 6, 12, 24, 48h) 실시하였다. 총 한 period 당 54개 백으로 (30×50 mm, 53-µm pore size) 각각의 백에 3g의 Timothy를 넣어 봉합하였고, 6개의 mesh bag에 시간대별로 분배하여 넣었다(3 nylon bags per mesh bag per steer). 그 후 배양 시간에 맞춰 6 : 4 비율의 일정한 양의 사료를 급여 받고 있는 홀스타인 거세우의 반추위 안으로 투여하였다. 일정 배양시간이 지난 후 반추위로부터 nylon bag을 꺼내어 수돗물에 반추위 액의 색깔이 묻어 나오지 않을 때까지 행구어 씻겨내었다. 이 후 65°C 건조기에 48시간 동안 샘플의 수분을 제거하고 무게를 측정하여 건물 소실율을 계산해 내었다. nylon bag안의 시료를 꺼내어 일반성분 분석을 진행하였고 건물 소실율 결과를 통해 분해 계수율 계산을 얻어내었다. 계산과정은 다음과 같다.

$$P = a + b (1 - e^{-ct})$$

P = 배양시간 t 에서의 영양소 분해율 (%); a = 반추위내에서 바로 분해되는 부분 (%); b = 반추위내에서 서서히 분해되는 부분 (%); c = b fraction 이 분해되는 속도 (%/h); t = 반추위내 배양 시간 (hour). 잠재적 분해 가능량은 a+b 로 계산하였다.

Wash out 과정이 Orskov와 McDonald (1979)의 exponential curve fitting 에 미치는 영향을

평가하기 위하여 wash out 의 유무에 따라 다르게 평가한 후 비교하였다. 유효분해도 (ERD: effective ruminal degradability) 는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$ERD = a + [b \times c / (c + k)]$$

k = 반추위 내용물의 flow rate (%/h), 시간당 5% 로 추정

고상발효 미생물 제제를 이용한 반추동물 대사실험 시 각 period 때 채취한 위액과 분 샘플을 앞서 in vitro sample을 이용한 CTAB extraction method를 이용하여 total DNA를 추출하였다. 추출한 DNA와 앞서 Table 3.에 표시한 primer를 이용하여 target 미생물 군집의 변화를 Real-time PCR을 통하여 관찰하였다.

데이터 통계분석은 Statistical analysis system (SAS, 2002)의 ANOVA 로 분석하였고 평균간의 차이는 Tukey Test (Snedecor and Cochran, 1967)로 분석하였다.

제 3 항. 결과

가. In vivo 사료 원료 일반성분 분석

사료 원료의 일반성분 분석결과는 표 34, 35와 같다. Experiment 2 와 같은 원료를 이 실험에서도 동일하게 사용하였다. 농후사료의 수분함량은 다른 원료에 비해 조금 높은 편이며, BS 고상발효가 원료들 중에서 가장 높은 단백질 함량을 나타냈다. 사료 원료 중 Timothy의 조섬유, ADF, NDF, 헤미셀룰로스 구성이 다른 원료에 비해 상대적으로 높은 함량을 보이고 있다.

표 34. Chemical composition of experimental diets of each treatment (DM basis %)

Item	Control	Treatment 1	Treatment 2
Nutrient			
Crude protein	10.51	10.52	10.52
Ether extract	3.08	3.08	3.08
ADF	29.20	29.21	29.21
NDF	50.89	50.90	50.90
Ca	0.84	0.84	0.84
P	0.54	0.54	0.54

표 35. Chemical composition of experimental diets (DM basis %)

Item	Timothy	Concentrate	BS SSF ¹⁾
Dry matter	90.42	86.61	90.53
Crude protein	8.13	14.09	43.95
Ether extract	1.70	5.14	2.76
Crude fiber	37.54	6.94	7.81
Crude ash	6.02	4.77	7.38
ADF	41.82	10.29	18.05
NDF	71.49	20	43.12
Hemicellulose	29.67	9.71	25.07
Lignin	0.48	0.44	2.11
Silica	1.02	0.05	0.66
Ca	0.90	0.75	0.25
P	0.66	0.35	0.80

1) BS SSF : *Bacillus subtilis* under solid state fermentation

나. 외관상 소화율

외관상 소화율 (건물, 원물, ADF, NDF) 그리고 질소 고정율은 표 36에 제시되어 있다. 처리구 2의 건물과 원물 소화율이 수치상 다른 처리구에 비해 높았지만 전반적으로 유의적인 결과를 보이지 않았다. 또한, 처리구 1의 ADF와 NDF 소화율도 대조구와 처리구 2에 비해 수치상 높았으나 유의적인 차이를 나타내지 못했다. Intake 질소, Fecal 질소 그리고 Urinary 질소 또한 서로간의 차이를 보이지 못하였다. 반면, 질소 고정율에서도 유의적인 차이는 아니었지만, 대조구에 비해 처리수준이 높을수록 높아지는 경향을 보였다.

다. 반추위 대사 특성

반추위 대사 특성에 관한 결과는 표 37에 제시되어 있다. 세 처리구의 총 휘발성 지방산 (VFA)은 유의적인 결과를 보이지 않았으나, 처리구 2의 propionic acid의 농도가 대조구와 처리구1에 비해 수치적으로 높은 결과를 나타냈다. 전반적으로 모든 처리구에서 A:P 비율이 유의적인 결과가 나타나지 않았다. 처리구1의 pH와 처리구2의 암모니아에서 각각 수치상 높게 나타났으나 통계적으로 역시 유의적인 결과를 가져오지 못했다.

라. 퓨린 유도체와 미생물체 단백질 합성

각 개체들의 하루 동안 뇨 중 퓨린 유도체의 분비량과 미생물체 단백질 합성량은 표 38에서 확인 할 수 있다. 3가지 그룹간의 뇨 중 allantoin, uric acid, creatinine의 분비량은 역시 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않았고 퓨린 유도체 농도에 따라 계산해 낸 미생물체 단백질 합성량도 수치상에서 약간의 차이는 있었지만 통계적으로 유의적인 차이가 보이지 않았다.

Table 36. Apparent total tract digestibility (%) and nitrogen balance

Item	Treatments			SEM ¹⁾	P value ²⁾
	Control	Treatment 1	Treatment 2		
Digestibility (%)					
Dry matter	64.52	64.85	66.37	0.64	0.51
Organic matter	61.35	63.51	63.89	1.34	0.76
ADF	51.42	55.25	53.16	1.26	0.52
NDF	67.44	71.82	70.32	1.54	0.57
Nitrogen balance (g/d)					
Intake N	109.00	115.51	122.01	3.11	0.26
Fecal N	37.30	36.98	37.62	0.65	0.94
Urinary N	45.46	43.12	43.78	1.64	0.87
Retention N (%)	23.54	30.89	33.24	2.01	0.11

1) SEM : standard error of the mean

2) P : probability

37. Rumen fermentation characteristics of steers as affected by solid state fermentation

Item	Treatments			SEM	P value
	Control	Treatment 1	Treatment 2		
VFA (mM)					
Acetic acid (A)	66.03	62.44	65.59	2.48	0.85
Propionic acid (P)	14.39	14.57	15.49	0.72	0.84
Isobutyric acid	0.97	0.83	0.97	0.07	0.70
Butyric acid	10.72	10.33	9.85	0.64	0.89
Isovaleric acid	1.80	1.48	1.69	0.14	0.70
N-valeric acid	0.97	0.84	0.91	0.07	0.80
Total VFA	94.88	90.50	94.50	3.43	0.88
A : P ratio	4.62	4.38	4.30	0.17	0.77
PH	6.24	6.30	6.22	0.05	0.78
NH ₃ -Nmg/100ml	9.81	9.65	10.07	0.45	0.95

1) SEM : standard error of the mean

2) P : probability

표 38. Purine derivatives and microbial N synthesis

Item	Treatments			SEM ¹⁾	P value ²⁾
	Control	Treatment 1	Treatment 2		
Urinary PD (g/d)					
Total					
Allantoin	11.85	16.22	10.88	1.50	0.34
Uric acid	1.25	1.43	1.34	0.22	0.96
Creatinine	7.57	9.34	6.51	0.86	0.45
Microbial N (g/d)	39.32	63.06	34.79	7.41	0.28

1) SEM : standard error of the mean

2) P : probability

마. Timothy 건초의 분해율

Timothy의 건물 소실율에 관한 결과는 다음 그림 98 에 제시 되어있다. In vivo 실험에서 BS 고상발효 급여량을 달리해도 Timothy 건물 소실율에는 유의적인 차이를 나타내지 못하였다.

바. 분해 계수율과 유효 분해도

Timothy의 분해 계수율과 유효 분해도(ED)의 결과는 다음 표 39에 제시되어있다. 처리구1의 A fraction 과 B fraction 부분에서 다른 처리구들에 비해 상대적으로 조금 높은 수치를 나타내고 있고, 반추위의 (k=0.05/h) outflow rate 에 따라 계산한 유효 분해도는 처리구 1이 약간 높았다.

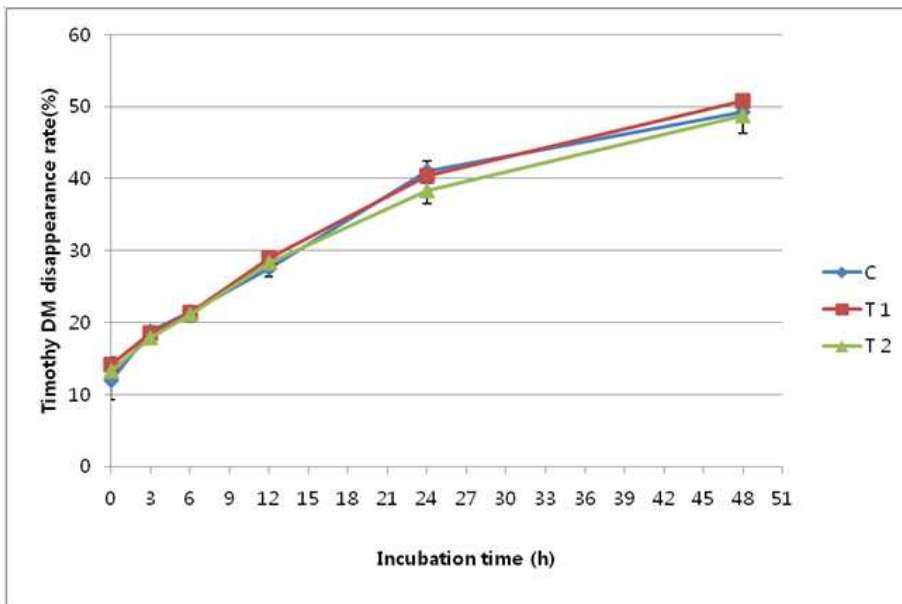


그림 100. Dry matter disappearance rate of timothy.

표 39. Ruminal degradability coefficient of timothy (%)

Parameter	Control	Treatment 1	Treatment 2
DM			
a	12.39	13.70	13.25
b	43.32	46.32	43.70
c (%/h)	0.04	0.03	0.04
ED ¹⁾ (k=0.05)	31.94	32.45	31.25

1) ED: Effective degradability

사. 반추위 내 미생물 균총 변화

본 대사실험에서 얻은 DNA 샘플로부터 계산한 미생물의 균집변화를 보면 *R. amylophilus* 가 대조구에서 유의적인 차이를 보이긴 했지만 나머지 rumen bacteria 들과 분에서 탐지한 Bifidobacteria, *E. coli* O157 모두에서 대조구와 처리구 사이에 유의적인 차이를 보이진 않았다.

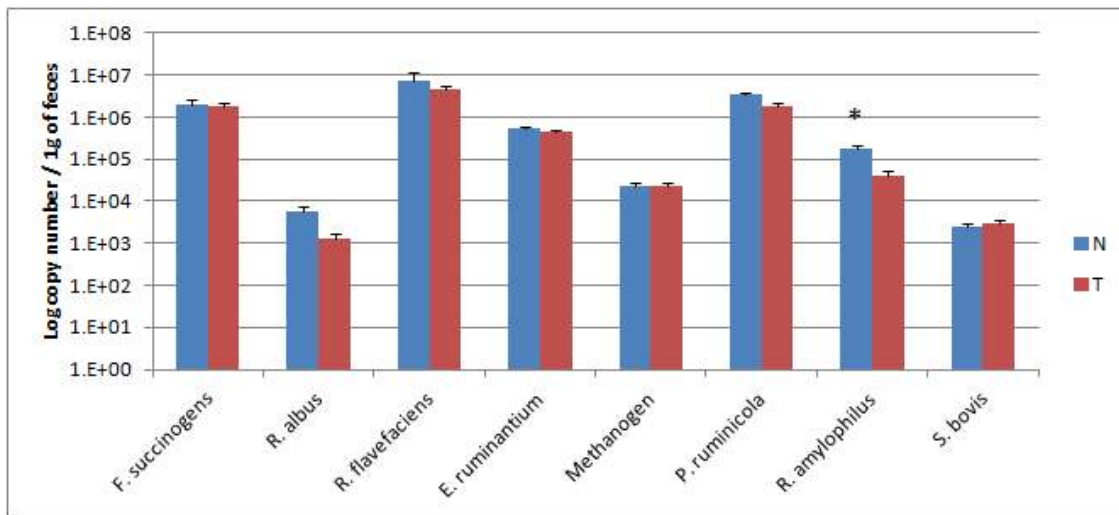


그림 101. Rumen microbes enumeration through real time PCR using in vivo rumen sample as DNA template.

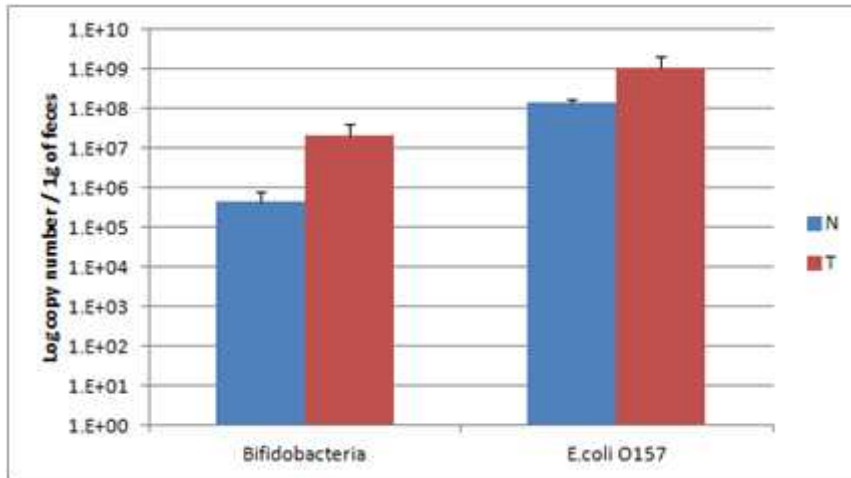


그림 102. Enumeration of Bifidobacteria and *E. coli* O157 through real time PCR using in vivo fecal sample as DNA template.

제 4 항. 고찰

이 실험의 가설은 endo-glucanase 생산을 유도하는 *Bacillus subtilis* 6번 균주를 고상발효 방법으로 제조한 효소 첨가제가 섬유소 분해 향상으로 반추위 대사 특성을 변화 시켜 궁극적으로 반추동물의 긍정적 효과를 보는 것이며 이 실험의 목적은 효능평가를 거친 BS 고상발효를 실제 반추동물에게 수준별 급여를 함으로써 나타날 수 있는 효과; 섬유소 분해, 사료 소화율, 미생물체 단백질 합성량 등을 검증하기 위한 것이다.

외관상 소화율과 질소 평형에서 BS 고상발효의 수준별 급여 효과는 전반적으로 유의적인 결론을 얻어 내지 못하였다. 하지만, 질소 고정율의 결과에서 대조구와 처리구 1 보다 처리구 2에서 수치가 갈수록 높아지는 경향을 보였다. Yang et al. (1999) 의 연구에 의하면 미생물체제의 첨가 효과에 있어서 약간의 유량과 미생물체 단백질 합성량만이 증가했을 뿐 외관상 소화율이나 ADF, NDF 그리고 여타 결과들에서 유의적인 차이를 나타내지 못했다. 일반적으로, 반추동물 대사실험 연구결과 보고에 의하면 가설과 불일치하는 결과들의 주요 원인은 균주의 효소활성, 미생물 체제의 첨가량, 기본 사료의 급여량, 첨가제의 급여방법 등 여러 가지 요인이 작용할 수 있다고 보고했다 (Chen et al., 1995). 반추위 대사특성 결과에서도 처리구간에 유의적인 차이를 확인할 수 없었다. 오히려 처리구1과 propionate를 제외한 처리구2에서 acetic acid 와 butyric acid가 대조구에 비해 낮은 결과를 보였고 pH와 암모니아에서 서로간의 상관관계를 볼 수 있었지만 전반적으로 통계적으로 유의적인 결과를 얻을 수 없었다.

퓨린 유도체와 미생물체 단백질 합성량에 있어서도 처리구 1이 다른 처리구에 비해 수치상 높은 결과를 보였지만, 유의적인 차이는 보이지 않았다. 일반적으로, 반추위내에서 생성된 암모니아는 미생물체 단백질 합성을 하는데 쓰이거나 반추위 내로 다시 흡수되어 간을 통해 urea로 재순환이 된다. 이러한 유의적이지 않은 결과는 반추위 내의 낮은 암모니아 농도의 결과와 관계가 있는 것으로 판단된다. 다음으로 BS의 고상발효 첨가제의 섬유소 분해 효능을 알고자 In situ 나일론 백 실험을 수행을 하였다. Timothy 건물 소실율의 결과는 기대와 달리 유의적인 차이를 얻을 수가 없었지만, 처리구 1의 A, B fraction과 유효 분해도(ED)값에서 상대적으로 다른 처리구에 비해 높은 결과를 나타내었다. Yang et al. (1999) 보고에 의하면 대조구와 효소제가 급여된 처리구에서 alfalfa를 이용한 In situ 건물 소실율의 통계

적으로 유의적인 차이를 확인할 수 없었다고 보고하였다. 하지만, 분해 계수율의 A fraction과 유효 분해도에서 높이 효소 첨가된 처리구에서 상대적으로 대조구에 비해 높은 결과를 나타내었다. Sutton et al.(2003) 연구논문에서 효소제를 첨가한 TMR이 비록 섭취량과 유량에 수치상 높은 결과를 보였지만, 전체적으로 처리구간에 유의적인 차이를 볼 수 없었고 외관상 건물, 원물 소화율이나 섬유소 분해효과에 있어서도 뚜렷한 효과를 보지 못하였다. 또한, Raethknight et al. (2007)의 보고에 의하면 *L. acidophilus* 와 *P. bacteria* 를 이용해 DFM(direct fed microbes) 방식으로 실험을 수행한 결과, 유량, 외관상 소화율, 섭취량 그리고 전반적인 일반성분 분석 결과나 반추위 대사 정상에서 유의적인 효과를 얻을 수 없었다고 보고 하였다. 그리고 이번 대사 실험에서 얻은 DNA 샘플에서의 미생물 군총변화 역시 위액과 분모두에서 크게 유의적인 차이를 보이진 않았다. 이는 다른 결과들을 통해서도 알 수 있듯이 고상발효 미생물제제가 반추위내의 발효정상조절에 큰 영향을 끼치지 못했다는 것을 나타낸다고 할 수 있다.

이 실험을 종합해보면, *Bacillus subtilis* 6번 균주를 첨가한 고상발효 제제는 원료적 측면의 효능평가 (In situ, In vitro)에서 실질적으로 미생물 작용을 통해 CMCase, Xylanase 생산을 유도하여 섬유소 분해를 일으킴으로써 전체적인 소화율을 높였다. 또한, 일반성분분석에서 확인했듯이 미생물체 단백질의 영향으로 전반적인 단백질 함량도 향상 된 것을 알 수 있었다.

그러나 전반적으로 대사 실험 결과를 보았을 때, *Bacillus subtilis* 6번 균주를 첨가한 고상발효 사료 첨가제는 반추동물에게 있어서 섬유소 분해, 외관상 소화율 그리고 미생물체 단백질 합성에 효과적으로 영향을 끼치지 못해 가설과 반대되는 결과를 도출하였다. 이러한 상반된 결과는 앞부분의 고찰 부분에서 언급했듯이 여러 가지 원인이 있을 수 있지만, 특히 반추동물의 반추위 안에는 무수히 많은 미생물들이 서식하고 있으며 그들이 다량의 효소 생산으로 인해 일정량의 고상발효 사료 첨가제가 급여 될지라도 그 효과는 미미한 수준일 것이다. 이러한 결과를 토대로 소화 시스템을 고려했을 때, 고상발효 미생물 사료 첨가제는 단위동물에게 급여할 경우 더욱더 효과적인 결과를 가져올 것이라고 판단된다.

제 17 절. 단위동물 사양실험을 통한 고상발효제제의 효과 평가

제 1 항. 실험 목표

섬유질 분해 효소의 활성이 우수한 미생물 균주를 통해 선발된, 효소활성이 극대화된 미생물 제제를 첨가 급여했을 때

- 성장 성적 및 소화율에 미치는 영향을 조사하고,
- 도체중 및 경제적 지표에 미치는 영향을 평가하며,
- 이를 통해 생산된 양계산물의 물리·화학적 특성을 규명함으로써,

섬유소 분해활성이 우수한 미생물제제의 기능성과 고부가가치 양계산물 생산을 위한 특화된 첨가제로서의 활용 가능성을 제시하고자 하였다.

제 2 항. 실험 1 : 섬유소 분해활성이 우수한 미생물제제의 급여가 육계의 성장, 도체중 및 장내균총에 미치는 영향

가. 실험 재료 및 방법

- 공시동물 : Ross 육계 수평아리
- 사육기간 : 총 5주
- 실험설계 : 4처리 × 6반복 × 반복당 20수 = 총 480수 공시

처리구	비 고
대조구 1 (- Control)	
시험구 1 (0.1%)	Cellulase 1,500 unit/g, Bacillus subtilis 10 ⁶ cfu/g 제품
시험구 2 (0.2%)	Cellulase 1,500 unit/g, Bacillus subtilis 10 ⁶ cfu/g 제품
시험구 3 (+ Control)	시판 cellulase

나. 결과

표 40. The dietary effects of enzyme supplementation on feed intake and performance in broiler^{1,2}

Items	Control	T1	T2	T3	SEM	P-value
Body Weight, g/bird						
1day	41.13	41.10	41.13	41.13	0.03	0.8018
8day	157.00	162.57	159.63	166.67	3.46	0.3031
15day	455.33	468.57	459.23	478.53	7.31	0.1918
22day	975.67	1031.53	1003.57	1000.23	16.85	0.2178
Feed Intake, g/bird/day						
2~7day	34.72	30.33	31.56	31.43	1.52	0.2784
8~14day	55.89	58.08	72.35	60.77	6.86	0.3897
15~21day	116.70	117.24	112.88	116.84	3.54	0.8029
2~21day	70.88	70.36	74.05	68.77	3.79	0.7965
Body Weight Gain, g/bird/day						
2~7day	19.31	20.25	19.74	20.93	0.58	0.2989
8~14day	42.62	43.71	42.80	44.56	0.88	0.4247
15~21day	74.33	80.42	77.76	74.52	2.16	0.2228
2~21day	46.73	49.52	48.12	47.96	0.84	0.2170

Feed Conversion Ratio

2~7day	1.81	1.50	1.60	1.50	0.10	0.1926
8~14day	1.31	1.33	1.68	1.36	0.14	0.2717
15~21day	1.57	1.46	1.45	1.58	0.08	0.5556
2~21day	1.52	1.42	1.54	1.44	0.08	0.7033

¹Control, basal diet; T1, basal diet + 0.1% fermentation enzyme; T2, basal diet + 0.2% fermentation enzyme; T3, basal diet + 0.1% enzyme.

²Values are presented as the mean (n = 3, each group).

ㄎ 41. The dietary effects of enzyme supplementation on feed intake and performance in broiler^{1,2}

Items	Control	T1	T2	T3	SEM	P-value
Body Weight, g/bird						
29day	1693.23	1756.47	1721.50	1700.90	20.20	0.1988
36day	2169.44 ^c	2327.84 ^a	2269.11 ^b	2255.13 ^b	9.58	0.0001
Feed Intake, g/bird/day						
22~28day	168.70	180.43	184.49	178.28	3.92	0.1007
29~35day	163.11	178.02	174.62	170.41	5.73	0.3522
22~35day	165.90	179.25	179.57	174.35	3.41	0.0697
2~35day	110.04	114.65	117.18	114.08	2.74	0.3833
Body Weight Gain, g/bird/day						
22~28day	102.51	103.57	102.56	100.09	2.98	0.8618
29~35day	68.03 ^b	81.62 ^a	78.23 ^a	79.18 ^a	2.34	0.0150
22~35day	85.27	92.60	90.40	89.64	2.34	0.2619
2~35day	62.60 ^c	67.26 ^a	65.53 ^b	65.12 ^b	0.50	0.0013
Feed Conversion Ratio						
22~28day	1.65	1.74	1.80	1.78	0.04	0.0935
29~35day	2.42	2.18	2.24	2.15	0.13	0.5266
22~35day	1.95	1.94	1.99	1.94	0.04	0.8254
2~35day	1.76	1.70	1.79	1.75	0.03	0.3073

¹Control, basal diet; T1, basal diet + 0.1% fermentation enzyme; T2, basal diet + 0.2% fermentation enzyme; T3, basal diet + 0.1% enzyme.

²Values are presented as the mean (n = 3, each group).

표 42. The dietary effects of enzyme supplementation on carcass yield in broiler^{1,2}

Items	Control	T1	T2	T3	SEM	P-value
Carcass Weight, g	1644.81	1624.46	1587.02	1624.32	18.27	0.2238
Carcass Yield, %	70.64	70.52	69.60	70.95	0.61	0.5219
% of Carcass						
Left Breast	14.34	14.81	14.10	13.78	0.33	0.1742
Left Leg	13.51	13.43	13.12	13.28	0.18	0.4840

¹Control, basal diet; T1, basal diet + 0.1% fermentation enzyme; T2, basal diet + 0.2% fermentation enzyme; T3, basal diet + 0.1% enzyme.

²Values are presented as the mean (n = 8, each group).

실험1에서 고상발효제제 0.1, 0.2% 첨가한 효과는 실험개시 후 28일 동안은 크게 나타나지 않았다. 하지만 29~35일 사이의 증체량이 모든 enzyme 처리구에서 유의적인 증가를 보였고, 이로 인해 전체 실험기간 동안의 증체량이 처리구에서 증가함을 확인하였다. 사료섭취량의 경우에는 실험기간 동안 대조구와 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 사료요구율의 경우에도 전 실험기간 동안 대조구와 처리구사이의 유의적인 차이는 없었으나 고상발효제제 0.1% 처리구에서 대조구보다 낮아지는 경향성을 보였다. 도체중과 도체량에서는 유의적인 차이가 보이지 않았다.

제 3 항. 실험 2 : 섬유소 분해활성이 우수한 미생물제제의 강제급여가 소화율에 미치는 영향 측정

가. 실험설계

- 공시동물 : Ross 육계
- 사육기간 : 총 2주
- 실험설계 : 4처리 × 1반복 × 반복당 8수 = 총 32수 공시

처리구	비 고
대조구 1 (- Control)	
시험구 1 (0.1%)	Cellulase 1,500 unit/g, Bacillus subtilis 10 ⁶ cfu/g 제품
시험구 2 (0.2%)	Cellulase 1,500 unit/g, Bacillus subtilis 10 ⁶ cfu/g 제품
시험구 3 (+ Control)	시판 cellulase

나. 사양관리

공시계는 가로x세로x높이가 각각 45×62×66 cm인 3단 철제 케이지에 케이지당 1수 씩 배치하여 실험을 실시하였다. 실험 전 24시간 동안 절식시킨 후 강제급여를 실행한 후 24시간동안

나오는 배설물을 채취하였다. 니플의 숫자는 반복구별로 동일하게 배치하였다. 점등은 16L : 8D로 일정하게 유지하였다.

다. 조사항목

(1) 진정 대사 에너지(TME, TME_n)

TME 측정을 위해 Sibbald(1976)가 제안한 강제 급여 방법을 사용하여 실시하였다. 강제 급여를 시작하기 직전에 24시간 동안 절식시켰다. 그 후 배합된 사료를 각각 30g씩 강제 급여시킨 후 24시간동안 배설된 모든 배설물을 채취하였다. 또한 기초 대사량 측정을 위하여 절식구를 배치하였다. 채취된 모든 배설물은 깃털과 이물질 등을 제거한 후 60도에서 24시간 동안 건조시키고 분쇄하여 분석에 이용하였다.

각 사료와 배설물을 건조 후 bomb calorimeter를 사용하여 gross energy를 측정하여 대사에너지를 계산한 후 사료에 기인되지 않은 대사성 분에너지와 마멸된 장점막, 담즙, 소화액 등의 에너지를 포함한 내인성 노 에너지를 보정하여 TME 값을 계산하였다. TME_n 값은 질소가 체내에서 0인 상태로 보정하여 체내 축적에 의한 배설물의 변이를 줄여 준 것이다.

TME(kcal/g)의 계산식은 Sibbald 방법에 준하였고 질소 보정 상수는 8.73(Titus 등, 1959)을 사용하였다.

TME의 계산식은 다음과 같다.

$\text{TME(kcal/g)} = \frac{(\text{GEi} * \text{X}) - (\text{EEf} - \text{EEe})}{\text{X}}$

- GEi = 섭취한 총 사료 에너지(kcal/g)
- EEf = 사료를 섭취한 배설물 에너지(kcal/g)
- EEe = 대조구의 배설물 에너지(endogenous) (kcal/g)
- X = 사료 급여량(g)

TME_n의 계산식은 다음과 같다.

$\text{TME}_n(\text{kcal/g}) = \frac{\text{GEi} - [\text{EEf} + (\text{Ni} - \text{Ne}) * 8.73] + [\text{EEe} + (\text{Ni} - \text{Ne}) * 8.73]}{\text{X}}$

- GEi = 섭취한 총 사료 에너지(kcal/g)
- EEf = 사료를 섭취한 배설물 에너지(kcal/g)
- EEe = 대조구의 배설물 에너지(endogenous) (kcal/g)
- Ni - Ne = Nitrogen balance (N 섭취량 - N 배설량)
- X = 사료 급여량(g)

표 43. Formula and chemical composition of experimental diet

Ingredients (%)	Starter	Finisher
Yellow corn	40.83	43.40
Soybean meal	26.24	23.84
Wheat bran	15.00	15.00
DDGS	3.00	3.00
Whole soybean	5.00	5.00
Fish meal	1.50	1.50
호분	1.40	1.37
Vit. mixture	0.20 ¹	0.15 ²
Min. mixture ³	0.12	0.12
Lysine (98.5%)	0.04	0.06
Dicalcium phosphate	0.88	0.72
DL-methionine (98%)	0.33	0.20
Tallow	4.88	5.08
Choline chloride(50%)	0.13	0.15
Salt	0.25	0.25
Total	100.00	100.00
Calculated values		
TMEn, kcal/kg	3,150	3,200
Crude protein, %	21.00	20.00
Fat	8.15	8.39
Fiber	3.61	3.54
Ash	5.35	5.05
Ca, %	0.90	0.85
Available P, %	0.45	0.40
Lysine, %	1.25	1.15
Met + Cys, %	1.00	0.85

¹ Vitamin mixture provided the following nutrients per kg: vitamin A, 26,000,000 IU; vitamin D₃, 6,000,000 IU; vitamin E, 63,750 IU; vitamin K₃, 4,800mg; vitamin B₁, 2,400mg; vitamin B₂, 9,800mg; vitamin B₆, 5,400mg; vitamin B₁₂, 40,000 μ g; niacin, 55,000mg; pantothenic acid, 20,000mg; folic acid, 8,000mg.

² Vitamin mixture provided the following nutrients per kg: vitamin A, 20,000,000 IU; vitamin D₃, 4,500,000 IU; vitamin E, 53,250 IU; vitamin K₃, 3,600mg; vitamin B₁, 1,800mg; vitamin B₂, 7,400mg; vitamin B₆, 4,200mg; vitamin B₁₂, 30,000 μ g; niacin, 47,500mg; pantothenic acid, 15,000mg; folic acid, 6,500mg.

³ Mineral mixture provided the following nutrients per kg: Fe, 57,630mg; Zn, 72,000mg; Mn, 86,400mg; Co, 288mg; Cu, 6,000mg; I, 1,200mg; Se, 216mg.

라. 결과

Starter 와 Finisher 사료에 있어서 진정 대사에너지는 처리구1과 처리구3에서 증가하는 경향을 보였고 fermentation enzyme 0.2%를 첨가한 처리구2에서는 두 가지 사료 모두에서 대조구와 큰 차이를 보이지 않았다 (표 44). 또한 진정 대사에너지의 이용효율에 있어서는 처리구1과

3에서 일정수준의 증가를 보였고, 특히 fermentation enzyme 0.1%를 첨가한 처리구1이 두 가지 사료 모두에서 가장 큰 폭의 증가를 나타냈다.

표 44. The dietary effects of enzyme supplementation on true metabolize energy (TME) and its efficacy in broiler

kcal/g	Control	T1	T2	T3
Starter	2513.7	2554.65	2518.11	2539.84
	79.8%	81.1%	79.94%	80.63%
Finisher	2546.56	2588.8	2555.52	2578.24
	79.58%	80.90%	79.86%	80.57%

¹Control, basal diet; T1, basal diet + 0.1% fermentation enzyme; T2, basal diet + 0.2% fermentation enzyme; T3, basal diet + 0.1% enzyme.

제 4 항. 고찰

총 5주간의 사양실험 중 첫 3주간에는 처리구와 대조구 사이의 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 하지만 실험의 후반기 (3~5주)동안에 BWG에 있어서 모든 처리구에서 유의적으로 증가한 결과를 보였다. 이는 실험 종료체중에서의 유의적인 차이를 낳았고, 특히 처리구1에 있어서는 늘어난 증체량이 사료효율에서 긍정적인 영향을 끼쳤음을 확인할 수 있다.

첨가제의 강제급여를 통한 소화율 측정 실험의 결과로부터도 본 실험에 활용된 고상발효 미생물제제의 긍정적인 효과를 확인할 수 있었다. 모든 처리구에서 대조구보다는 진정 대사에너지와 그 이용효율이 긍정적으로 재고되었고, 특히 처리구1 에서의 증가폭이 가장 컸다.

위의 두 가지 결과로서 *Bacillus* 6번 균주를 이용한 고상발효 미생물 제제는 단위동물에 있어서 기존의 효소제와의 비교에서도 증체량, 사료효율, 에너지 이용효율에서 보다 긍정적인 효과를 나타내었고, 이로써 단위동물 생산성 증대에 있어서 역할을 할 수 있는 가능성을 검증했다고 할 수 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 1~3차년도 연구내용 및 달성도

구분 (연도)	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발의 내용
1차년도 (2009)	미생물 선발방법 확립	100	dyed-cellulose를 이용한 screening 기법 확립.
	미생물 선발 및 동정	100	반추위에서 38종, 발효 식품군에서 10종의 미생물을 분리, 역가 측정 실험을 진행.
	미생물의 섬유소 분해효소 활성 증가 및 효율화 방안	100	고전적인 mutation, genome shuffling 기법을 통한 효소 활성 증가방안 모색.
	미생물 발효 방법에 따른 효소특성 자료조사	100	액상 및 고상발효를 통해 생성된 효소활성 비교.
	원료별 dietary fiber 분획조사	100	원료사료에 대한 일반성분 및 dietary fiber 분획 조사. 사료배지조성 및 발효조건 확립.
	효소활성 분석법 확립	100	효소활성 분석방법 확립.
2차년도 (2010)	섬유소분해활성 증가 미생물개발	100	선발된 균주의 섬유소 분해 역가 향상을 위하여, U.V. irradiation, EMS treatment, genome shuffling 처리.
	상업화균주와의 섬유소분해역가비교	100	현재 상업화 된 생균제 균주를 선발하고 본 연구 개발 균주와의 섬유소 분해 역가차이를 비교하였음.
	섬유소분해효소 유전자선발 및 형질전환균주개발	100	<i>Eubacterium cellulosolvens</i> 의 endoglucanase gene(<i>Cel5A</i>)을 선발함.
	고상발효를 위한 최종 미생물 선발 및 특성평가	100	최종 선발된 균주의 고상발효 제품개발, 최적 효소생산조건확립 및 in vitro소화실험을 수행.
	선발 균주 별 발효공정 개발을 위한 기초자료조사	100	최적원료배지 선정을 완료, 최적 발효조건에 대해 자료조사를 완료.
	Pilot scale 공정 개발	100	고체발효 공정개발을 위한 최적 발효조건 설정 완료.
	선발 미생물 특성분석	100	미생물 및 효소에 대한 내열성검증.
3차년도 (2011)	고상발효 제품의 <i>In situ</i> 테스트	100	nylon bag을 이용, 고상발효 제품이 원료사료의 반추위내 분해율에 미치는 영향을 평가.
	고상발효 제품의 <i>In vitro</i> 테스트	100	in vitro test를 통해 소화율, 반추위 발효성상, 내산성·내담즙성을 확인.
	고상발효 제품의 <i>In vivo</i> 테스트	100	대사실험을 통해 소화율, 반추위 발효성상, 균총변화 평가. 육계사료 내의 첨가 또는 강제급여를 통한 소화율, 사료급여 효율평가.
	대량생산 공정 확립	100	대량생산 공정 확립을 위해 B. subtilis #6균주를 최종선발하고, pilot scale공정에 대한 검증을 완료. 사양시험용 시제품 생산.
	개발제품의 안정성 테스트	100	6개월간의 안정성 테스트 시, 미생물 균수는 10 ⁹ cfu/g 수준유지, 효소활성은 87% 수준유지.
	경쟁사 제품 비교분석	100	시판제품 대비 개발제품의 균수도 우수, 효소활성 또한 약 10배 이상 높은 것으로 확인됨.

본 연구는 동물의 배설량에 가장 큰 영향을 주는 요소인 섬유소를 보다 효율적으로 이용하기 위하여 섬유질 분해 효소 활성이 우수한 미생물 균주를 반추위와 자연계로부터 분리, 동정하여 효소활성이 극대화 될 수 있도록 미생물 제제를 개선한 후 이들의 경제성과 이용가치를 높이기 위한 방법으로 고상발효를 이용하여 대량 생산하기 위하여 수행하였다.

본 과제 중 1년차에는 섬유소분해 미생물을 탐색하는 방법을 확립하고 이를 통해 반추동물의 반추위와 자연계에 존재하는 미생물 중에서 섬유소 분해 활성이 우수한 박테리아를 선발하였다. Holstein 거세우에서 30종, 재래 산양에서 8종의 미생물을 선발하여 이중 *Bacillus licheniformis*를 선발하였으며, 또한 젓갈류에서 *Bacillus subtilis*를 분리 동정하였다. 또한 효소활성 측정방법을 정립하고 고상발효 최적 조건 구명을 위한 예비조사도 실시하였다.

본 과제 중 2년차에서는 섬유소 분해 활성 증가 미생물을 개발하기 위하여 Cellulase production 및 activity가 향상된 균주를 고전적 mutation과 genome shuffling을 이용하였다. 다양한 실험을 실시한 결과 87~100%의 역가가 향상된 균주를 확보할 수 있었다. 추후 실시된 실험에서 이들 균주의 효소생산에 필요한 다양한 조건을 규명하였으며 선발균주의 pilot scale 공정 개발을 위한 최적발효조건 설정을 위한 실험을 수행하였다. 시판중인 대표적인 생균제와 cellulase 활성을 비교평가하기 위해 *Bacillus* 제품 2종, 유산균 제품 2종 및 효모 제품 2종으로 크게 나눠 비교한 바 Pilot scale 공정을 통해 생산된 제품 (mutant p11)은 타 생균제 샘플에 비해 효소활성의 측면에서 최대 80%이상 효소활성이 높은 제품이며, 균수 측면에서도 4.0×10^9 CFU/g으로 타 생균제에 비해 월등히 뛰어난 제품으로 평가될 수 있었다. 내열성 평가 결과를 분석해 봤을 때 mutant strain p11균주 자체의 내열성은 상당히 우수한 수준으로 100°C에서 10분간 처리하여도 거의 균수의 저하는 없는 것으로 평가되었다. 또한 섬유소 분해효소 유전자 선발을 위하여 반추동물의 반추위로부터 섬유소 분해 균주를 선발 (*Eubacterium cellulosolvens*) 하고 확보된 미생물의 endoglucanase gene sequence를 이용하여 대장균에 도입시켜 발현시킨 후 그 특성구명을 실시하였다.

3년차 연구과제에서는 대량생산을 위해 선발된 균주들에 대한 활성을 재점검하기 위해 *Bacillus subtilis* #6, mutant strain p11, 반추위 선발균주 *B. licheniformis* G7 균주에 대해 SW패지를 이용하여 대량생산 공정 확립을 위한 활성 검증실험을 실시한 결과, 효소활성이 우수한 *B. subtilis* #6균주를 최종 선발하고, pilot scale공정에 대한 반복, 재현성 검증을 통해 고체발효 공정에 대한 검증을 완료하였다. 확립된 Pilot scale공정을 기준으로 *B. subtilis* #6균주의 대량생산을 통해 사양시험용 시제품 생산을 실시하였고, 이를 Holstein steer를 이용한 반추동물 대사실험 및 육계 사양실험에 도입하였다. 개발제품의 6개월간 실온에서의 보관실험을 통해 미생물 균수 및 효소활성 변화 조사를 완료하였고, 미생물 균수는 10^9 cfu/g수준으로 변화가 없었으며, 효소활성은 87% 수준의 효소활성 유지를 확인하였다. 이를 통해 미생물 측면에서의 저장안정성은 문제가 없는 것으로 판단할 수 있다.

결론적으로 본 연구를 통하여 섬유소 분해 활성이 우수한 미생물 균주의 선발과 이를 이용하여 고상발효 미생물 제제를 생산하였고, 생산된 제품의 특성평가 및 동물실험을 통하여 단위동물에 있어서 기존의 효소제와의 비교에서도 증체량, 사료효율, 에너지 이용효율에서 보다 긍정적인 효과를 나타내었음을 검증하였다. 이로써 섬유소 분해 촉진을 통한 소화계 질병예방 및 환경개선을 통한 생산비용 절감 및 농가소득증대를 꾀할 수 있고, 항생제 대체제 시장의 확대를 도모하고 사료용 미생물제제 시장의 선점을 통한 수출증대효과를 볼 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

가. 산업화 방향

- (1) 내열, 내산성의 안정성을 보유한 가축의 에너지 이용효율 증진용 기능성 생균제
- (2) 단위동물 사료 시장 중 어린 단계 가축 사료 시장을 대상 (연간 판매 목표 : 600톤)
- (3) 가축의 원료 이용 효율 증진 및 사육 환경의 개선으로 농장 생산성 개선 (연간 사료비 절감으로 경제적 파급효과 : 10,500 백만원)

나. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과		480	600	720	1,200	1,200	4,200
경제적 파급효과		1,200	1,500	1,800	3,000	3,000	10,500
부가가치 창출액		90	180	180	360	360	1,170
합 계		1,770	2,280	2,700	4,560	4,560	15,870

- ※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- ※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- ※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

제 2 절. 핵심개발기술 및 균주등록

(1) 개발 핵심기술 및 활용계획

구분	핵심 기술 명
①	효소활성 증가를 위한 균주선발 방법 및 mutation과 genomic shuffling 기술을 이용한 선발균주의 효소활성 개선 균주개발 기술
②	고체발효기술을 이용한 섬유소 분해활성을 가진 미생물제제 생산기술

- ① 의 기술 : 본 연구과제를 통해 개발된 균주를 현재 제품화되고 있는 공정 및 다양한 제품 제조 공정에 적용하여 신제품 개발에 적극 활용할 예정임. Cellulase 외 xylanase 활성 등 추가 효소활성 개선 균주개발을 통해 효소제 생산에 활용.
- ②의 기술 : 고체발효기술을 이용한 섬유소 분해활성이 우수한 미생물 제제 개발은 과제종료 후 2

년 이내 제품화를 추진할 예정이며 추가적인 연구를 통해 다양한 효소활성을 가진 미생물 제제 개발을 추진할 예정임. 단위동물(양돈, 양계용) 신제품 출시 예정 (2013년 하반기 목표)

(2) 균주등록

특허 출원 과정의 일환으로 과제 기간 동안에 분리, 동정되었던 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* 각각 2균주 씩의 등록을 진행하였다. 등록번호는 INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY 에 의해 발급받았다.

- *Bacillus subtilis* GB-CNO6, Accession number : KCCM11170P
- *Bacillus licheniformis* GB-AN9, Accession number : KCCM11239P
- *Bacillus subtilis* GB-P11, Accession number : KCCM11174P
- *Bacillus licheniformis* GB-CG7, Accession number : KCCM11169P

제 3 절. 과제 기간 중 논문 실적

(1) 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Direct-fed Microbials for Ruminant Animals	J. K. Seo	J. K. Ha	S. W. Kim M. H. Kim Santi D. Upadhaya D. K. Kam	Asian-Australasian Journal of Animal Science	23 (12)	국외	SCI

최근에 동물 생산성 향상에 피하기 위해 DFM (direct-fed microbials) 제제가 많이 사용되어 지고 있는데 주관기관에서 작성한 review 논문을 통하여 기존 연구들에서 반추동물의 생산성 향상을 위하여 사용되었던 미생물들과 그들의 기대되어 지는 역할 및 실제 사양성적 등을 서술하여 미생물 제제의 효과적인 이용에 기여할 수 있는 역할을 수행하였다고 본다. 위 논문은 Asian-Australasian Journal of Animal Science 학술지에 2010년에 게재되었다.

(2) 논문게재 계획

- Characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes of *Bacillus licheniformis* JK7 isolated from the rumen of Korea native goat

위 논문은 현재 학술지 게재를 위하여 수정중인 것으로, 한국 재래 산양에서 분리, 동정한 섬유소분해 박테리아인 *Bacillus licheniformis* JK7의 cellulolytic, xylanolytic 효소 역가와 특성규명을 실시한 실험을 바탕으로 작성되었으며, Asian-Australasian Journal of Animal Science나 Applied Microbiology and Biotechnology 등의 학술지에 게재할 계획이다.

- Production of endoglucanase, β -glucosidase and xylanase by *Bacillus licheniformis* JK7 grown on minimal nutrient medium containing agriculture residues and its characterization.

위 논문은 한국 재래 산양에서 분리, 동정한 섬유소분해 박테리아인 *Bacillus licheniformis* JK7 균주에서 경제적인 농축산 부산물을 기질로써 이용하여 endoglucanase, β -glucosidase 와 xylanase를 효율적으로 생산하는 방법을 연구했던 실험을 바탕으로 작성되어 졌고, 현재 Livestock science 나 Asian-Australasian Journal of Animal Science 등의 학술지에 게재할 목적으로 수정중이다.

- Enhanced production of cellulase by the mutant strain 'P11' of *Bacillus subtilis* isolated from salted clams.

위 논문은 한국에서 주로 이용되는 젓갈과 같은 발효식품에서 섬유소분해 박테리아 (*Bacillus subtilis*)를 분리, 동정하여 이 균주의 섬유소분해 효소 역가를 증진시키기 위하여 고전적인 mutation 방법을 도입하여 mutant strain P11을 확보하였고, mutant 균주의 효소 역가 및 계대배양 시의 역가 안정성 등을 검토한 실험을 바탕으로 작성되었다. FEMS microbiology 나 Asian-Australasian Journal of Animal Science 등의 학술지에 게재할 목적으로 수정 중에 있다.

(3) 국제학회발표 실적

구분		학술회의명	개최국가	개최일 (YYYY MMDD)	발표논문명
국제	포스터	The 14th AAAP	대만	20100823	Carboxymethyl Cellulase Production by <i>Bacillus</i> sp. Isolated from Salted Clams and Development of Mutants by UV-Irradiation and EMS Treatment.
	포스터	ISNH8	영국 (Aberystwyth)	20110906	Effect of genome shuffling on endo- β -1,4-glucanase production in <i>Bacillus licheniformis</i> JK7 isolated from the rumen of Korean native goat.
	구두 발표	8th JRS symposium	일본(Hokkaido University)	20111016	Molecular cloning, purification, and characterization of endoglucanase gene(Cel5A) from <i>Eubacterium cellulosolvens</i> isolated from Holstein steer.
	포스터	8th JRS symposium	일본(Hokkaido University)	20111016	Carboxymethyl cellulase production by <i>Bacillus</i> sp. #6 and its mutant P11 in solid-state fermentation.
	초록	8th JRS symposium	일본(Hokkaido University)	20111016	Production and characterization of cellulolytic and xylanolytic enzymes from <i>Bacillus licheniformis</i> JK7 isolated from Korea native goat's rumen

제 4 절. 제품 및 시장분석 측면

(1) 국내 및 국외시장 분석결과 생균 함유 위주의 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 산업적 어려움이 가격 인하 경쟁이 시작되어 가축의 생산성을 개선하기 위한 제품의 판매 보다는 가격위주의 판매가 가속화 되고 있음. 따라서 본 연구과제에서는 기능성을 갖는 미생물 제제를 개발하여 경제적이면서도 특정 기능을 추가하는 방향으로 연구를 추진하여 가축의 에너지 이용 효율을 최적화 할 수 있는 안전하면서도 경제적 효과가 있는 제품을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

(2) 또한 참여 기업의 경우 해외 생산기지를 보유하고 있어 본 과제를 통해 개발된 제품을 외에서의 양산을 통해 미국 및 유럽 등의 선진 축산 시장에 판매할 계획임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절. 균주의 활성증가 방안 탐색 및 활용

mutation은 DNA sequencing의 변화로 인해 후대로 전해질 수 있는 유전형질의 돌연변이를 일컫는다. 자연선택적으로 돌연변이는 항상 일어나고 있으며 몇몇의 돌연변이는 산업적으로 매우 유용하게 작용한다. 따라서 산업적으로 이용 가능한 미생물의 능력을 향상시키기 위한 연구는 많이 이루어져 왔고 앞으로 계속 진행될 것으로 사료된다. 선택된 미생물들은 여러 가지 처리에 의해서 mutation 될 수 있는데 conventional method로서 화학적 처리 방법과 U.V radiation 방법이 많이 이용되었다(그림 101).

Table 11.3 Chemical and physical mutagens and their modes of action

Agent	Action	Result
Base analogs		
5-Bromouracil	Incorporated like T; occasional faulty pairing with G	AT → GC and occasionally GC → AT
2-Aminopurine	Incorporated like A; faulty pairing with C	AT → GC and occasionally GC → AT
Chemicals reacting with DNA		
Nitrous acid (HNO ₂)	Deaminates A and C	AT → GC and GC → AT
Hydroxylamine (NH ₂ OH)	Reacts with C	GC → AT
Alkylating agents		
Monofunctional (for example, ethyl methane sulfonate)	Puts methyl on G; faulty pairing with T	GC → AT
Bifunctional (for example, mitomycin, nitrogen mustards, nitrosoguanidine)	Cross-links DNA strands; faulty region excised by DNase	Both point mutations and deletions
Intercalating dyes		
Acridines, ethidium bromide	Inserts between two base pairs	Microinsertions and microdeletions
Radiation		
Ultraviolet	Pyrimidine dimer formation	Repair may lead to error or deletion
Ionizing radiation (for example, X-rays)	Free-radical attack on DNA, breaking chain	Repair may lead to error or deletion

그림 103. 돌연변이를 일으키는 mutagen과 그 작용기전(fundamentals of microorganism, 2003).

상기 방법을 통한 mutation으로 cellulase의 역가를 향상시키기 위한 노력 또한 많이 보고되었다. Kuhad 등(1994)은 *Fusarium oxysporum*에 U.V 조사와 NTG (N-methyl-N-nitrosoguanidine) 처리를 통하여 target 미생물의 mutant를 제조하였고 역가의 향상을 보고하였다. Fang 등(2009)이 발표한 논문 또한 U.V radiation에 의해 mutation된 *Acremonium cellulolyticus*의 역가 향상을 보고하였다.

상기의 방법들은 미생물들의 역가를 향상시키기 위해 많이 이용되어 왔으나 원하는 효소의 역가를 얻기 위해서 상당한 양의 노동력과 시간을 필요로 한다는 단점을 가지고 있다. 이를 해결하기 위한 방법으로 ‘genome shuffling’이 제시되었다(Zhang et al., 2002). genome shuffling 기법은 protoplast fusion을 통하여 미생물끼리 random mutation을 일으키고 이를 여러 번 반복함으로써, gene 단위에서 할 수 있었던 DNA shuffling 기법을 미생물 단위로 확대한 방법이라고 볼 수 있다. genome shuffling 기법은 종이 다른 미생물의 gene을 도입하는 genetic transformation과는 차이를 가지고 있음에 따라, mutation된 미생물 자체를 probiotics로 이용하는데 제한이 없으며, conventional mutation 기법보다 시간과 노동력을 현저히 줄일 수 있는 장점을 가지고 있다. Cheng 등(2009)은 genome shuffling 기법을 이용하여 *Penicillium decumbens* JU-A10를 mutation 시켰고 2대에 걸친 shuffling을 통해서 본 균주인 *P. decumbens* JU-A10보다 cellulase의 역가가 2배 이상 향상된 돌연변이 균주를 개발하였다고 보고하였

다.

제 2 절. 액상발효 및 고상발효 공정 비교

효소제 시장은 생명공학에서 가장 빨리 성장하는 분야로서 연간 20억 달러의 규모의 시장을 가지고 있다. 이러한 산업효소는 지금도 매년 4~5%의 증가율을 나타내고 있으며, 특히 동물 사료용 효소 시장은 phytase 효소와 함께 사료자원의 이용성을 높이기 위한 NSP효소 등 효율성 개선을 위한 효소의 요구량이 증가함에 따라 매년 4%이상의 시장 성장이 예측되고 있다. 현재 효소들의 생산은 주로 유전적으로 변형된 균주를 통해 Submerged fermentation(SmF, 액상발효)으로 이루어지고 있지만, 동물 사료용 효소의 측면에서는 여러 종류의 산업 효소 생산을 위한 방법으로 Solid-state fermentation(SSF, 고상발효) 기술에 대한 관심이 증대되고 있다.

산업효소를 생산하기 위한 액상발효와 대비되는 고상발효의 장점은 다음과 같다.

- ① SSF는 낮은 수분 활력에 의해 오염균의 생장이 제한되므로, SmF처럼 심각한 오염 유발하지 않는다.
- ② 동일 균주로 SmF와 SSF로 효소를 생산하였을 때, 기질 친화성이 높아 SSF에 의한 효소가 높은 활성을 나타낸다.
- ③ SSF 방법으로 생산된 효소는 SmF에서 생산한 효소에 비해 별도의 공정이 필요하지 않아 안정성이 높다.
- ④ SSF에서는 균주가 효소를 생산할 때 catabolic repression을 낮은 수준으로 제어를 받아 더 많은 양의 효소가 발현이 된다.
- ⑤ 가공 중에 폐수가 거의 발생하지 않으며, 발효 잔물들은 수분함량이 낮아 동물 사료나 비료로 활용이 가능하다.
- ⑥ SSF에 이용되는 배지는 SmF에 사용되는 인공합성배지에 비해 상대적으로 단순하며 가격이 저렴하다.
- ⑦ SmF에서 요구되는 생산설비에 비해 경제적이다.
- ⑧ SSF 방법은 SmF 방법에 비해 aeration이나 온도를 조절하는데 사용되는 에너지도 비교적 낮게 요구된다.

액상발효 및 고상발효를 통해 생산된 효소제의 효소활성을 비교하여 표 1에 나타내었다. 실제 액상발효 공정보다는 고상발효 공정을 이용한 효소제 생산을 통해 최소 약 6배에서 최대 약 177배의 높은 효소활성을 가진 제품을 생산할 수 있으며, 특히, cellulase의 경우 약 62배의 높은 효소활성을 가질 수 있어 액상발효보다는 고상발효공정을 이용한 효소제 생산이 더 유리할 수 있다. 또한, 액상발효공정을 이용한 효소제 생산의 경우 액상발효 후 농축 및 제형화하는 공정을 별도로 필요로 하므로 생산비용적인 측면에서도 더 유리한 공정이라고 할 수 있다(표 45).

액상 및 고상발효 공정을 이용한 곰팡이 균주의 cellulase 생산수율을 비교하면 표 46와 같다. 생산수율 측면에서도 고상발효 공정을 이용한 효소제 생산이 액상발효 공정을 통한 효소제 생산보다 *A. terrestris* 균주를 이용한 endo- β -D-glucanase와 β -D-glucosidase를 제외하고 높

은 수율을 가지는 것을 확인할 수 있다.

표 45. 액상발효 및 고상발효를 이용한 효소활성 비교

Enzyme	Submerged fermentation	Solid-state fermentation
	(SmF, U/ml)	(SSF, U/g)
Acid carboxypeptidase	0.09	16
Neutral protease	550	3,400
Acid protease	11	260
α -Amylase	640	19,000
Pectinase	0	28
Cellulase	1.4	87

(C. Asha Poorna, 2006)

표 46. 곰팡이 균주별 액상(SmF) 및 고상발효(SSF) 공정에서의 cellulase 생산 수율 비교

Microorganisms	Enzymatic activities IU/L of culture volume					
	Exo- β		Endo- β		β -D-glucosidase	
	-D-glucanase		-D-glucanase			
	SmF	SSF	SmF	SSF	SmF	SSF
<i>Aspergillus fumigatus</i>	50	67	70	370	1	554
<i>Allescheria terrestris</i>	60	84	1,460	302	1,242	50
<i>Humicola lanuginosa</i>	50	50	30	167	6	4,676
<i>Mucor pusillus</i>	10	71	30	332	2	2,361
<i>Sporotrichum thermophile</i>	660	1,215	2,460	10,914	873	1,215
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	280	1,322	560	53,260	937	8,974

(W.Grajek, 1987)

일반적인 효소를 생산하는 액상발효 및 고상발효 공정을 그림 102에 나타내었다. 액상발효의 경우 총 6개의 단계를 거쳐 효소제 제품을 생산 가능하다. 특히 액상발효 종료 후 효소의 농축 및 제형화 단계를 필요로 하므로 생산비용 증가로 이어진다. 반면, 고상발효의 경우 3단계로 효소제 제품의 생산이 가능하고 별도의 제형화 공정이 필요 없어 생산시간 및 생산단가를 낮춰 경쟁력을 확보할 수 있다.

효소제 1kg 생산단가를 비교하면, 액상발효공정에서는 발효공정에 따른 추가 설비의 사용 (seed fermenter, concentrator, freeze dryer)으로 인한 설비비용이 가장 크게 작용하고 균주의 액상발효를 위한 인공 영양배지(nutrient media)를 사용하므로 raw material 비용 또한 생산단

가에 미치는 영향이 크다. 고상발효공정의 경우 생산단계가 짧고 원료배지로 사료곡물 또는 부산물을 사용하므로 액상발효에 비해 생산단가가 50% 이상 저렴한 경제적인 생산방법이 될 수 있다 (그림 103).

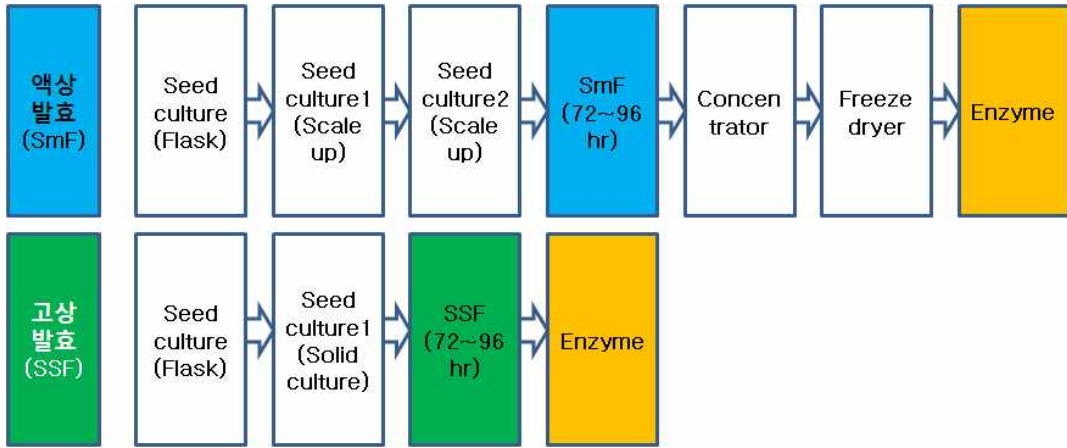


그림 104. 액상발효 및 고상발효 공정도.

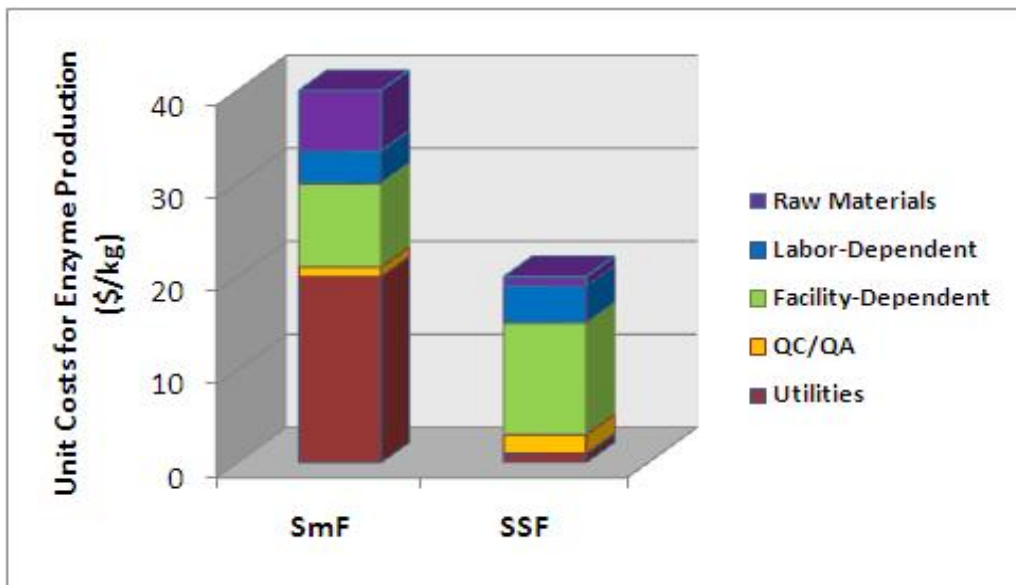


그림 105. 액상 및 고상발효 생산단가 비교. (Jun Zhuang et. al., 2004)

제 7 장 참고문헌

- Abu, O.A., Tewe, O.O., Losel, D.M., Onifade, A.A., 2000. Changes in lipids, fatty acids and protein composition of sweet potato (*Ipomoea batatas*) after solid-state fungal fermentation. *Bioresour. Technol.* 72, 189 - 192.
- Acuna-Argnelles, M.E., Gutierrez-Rojas, M., Viniegra-Gonzalez, G., Favela-Torres, E., 1995. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 808 - 814.
- Aguilar, C.N., Contreras-Esquivel, J.C., Rodriguez, R., Prado, L.A., Loera, O., 2004. Differences in fungal enzyme productivity in submerged and solid state cultures. *Food Sci. Biotechnol.* 13, 109 - 113.
- Alazard, D., Raimbault, M., 1981. Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, 113 - 117.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th Edn. Association of official analytical chemists, Arlington, Virginia.
- Auria, R., Hernandez, S., Raimbault, M., Revah, S., 1990. Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Tech.* 4, 391 - 396.
- Baird, S. D., D. A. Johnson, and V. L. Seligy. 1990. Molecular cloning, expression, and characterization of endo-beta-1,4-gluconase genes from bacillus polymyxa and bacillus circulans. *J. Bacteriol.* 172: 1576-1586.
- Barreto De Menezes, T.J., Salva, T.J.G., Baldini, V.L., Papini, R.S., Sales, A.M., 1989. Protein enrichment of citrus wastes by solid substrate fermentation. *Process Biochem.* 24, 167 - 171.
- Battaglino, M., Hergo, M., Pilosof, A.M.R., Bartholomai, G.B., 1991. Culture requirements for the production of protease by *Aspergillus oryzae* in solid fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 292 - 296.

Bayley, H. S., J. D. Summers and S. T. Slinger. 1968. Effect of heat treatment on the metabolizable energy value of wheat germ meal and other wheat milling by-products. *Cereal Chem.*, 45:557-563.

Binod, P., Pusztahelyi, T., Nagy, V., Sandhya, C., Szakács, G., Pócsi, I., Pandey, A., 2005. Production and purification of extracellular chitinases from *Penicillium aculeatum* NRRL 2129 under solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 36, 880 - 887.

Birney, M., H. D. Um, and C. Klein. 1996. Novel mechanisms of *Escherichia coli* succinyl-coenzyme A synthetase regulation. *Journal of Bacteriology* 178: 2883-2889.

Chahal, D.S., 1987. Growth characteristics in solid state fermentation for upgrading of protein values of lignocelluloses and cellulases production. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.* 207, 421 - 442.

Chaney, A. L. and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical chemistry* 8(2):130.

Chantasartrasamee, K., Israngkul, D., Intarareugsorn, A.S., Dharmsthiti, S., 2005. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Process Biochem.* 40, 2285 - 2289.

Chen, K., J. Huber, J. Simas, C. Theurer, P. Yu, S. Chan, F. Santos, Z. Wu, R. Swingle and E. DePeters. 1995. Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. *Journal of dairy science* 78(8):1721-1727.

Cheng, Y., X. Song, Y. Qin, and Y. Qu. 2009. Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* ju-a10. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1837-1846.

Chen.X.B., Y.K.Chen., M.F.Franklin., E.R.Orskov and W.J.Shand. 1992. The effect of feed intake and body weight on purine derivative excretion and microbial protein supply in sheep. *J.Anim.Sci.* 70:1534-1542.

Couto, S.R., Sanroman, M.A., 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production - review. *Biochem. Eng. J.* 22, 211 - 219.

Fang, X., S. Yano, H. Inoue, and S. Sawayama. 2009. Strain improvement of *Acremonium cellulolyticus* for cellulase production by mutation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107: 256-261.

- Farrell, D. J. 1978. Rapid determination of metabolizable energy of foods using cockerels. Br. Poult. Sci., 19:303-308.
- Fisher, C. and D. W. Shannon. 1973. Metabolizable energy determinations using chicks and turkeys. Br. Poult. Sci., 14:609-613.
- Garzon, C.G., Hours, R.A., 1992. Citrus waste: an alternative substrate for pectinase production in solid-state culture. Bioresour. Technol. 39, 93 - 95.
- George, S.K., M.T. Dipu., U.R. Mehra., P. Singh., A.K. Verma and J.S. Ramgaokar. 2006. Improved HPLC method for the simultaneous determination of allantoin, uric acid and creatinine in cattle urine. J. Chromatogr. B. 832:134-137.
- Gervais, P., Marrchal, P.A., Molin, P., 1996. Water relations of solid state fermentation. J. Sci. Ind. Res. 55, 343 - 357.
- Gervais, P., Molin, P., 2003. The role of water in solid-state fermentation. Biochem. Eng. J. 13, 85 - 101.
- Ghose, T. K., 1987. Measurement of cellulase activities. Pure Appl. Chem. 59(2): 257-268
- Grajek, W., Gervais, P., 1987. Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activity produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. Enzyme Microb. Technol. 9, 658 - 662.
- Hesseltine, C.W., 1972. Solid state fermentations. Biotechnol. Bioeng. 14, 517 - 532.
- Holker, U., Hofer, M., Lenz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 175 - 186.
- Hong, S.-Y., J.-S. Lee, et al. 2007. Construction of the bifunctional enzyme cellulase- β -glucosidase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. Biotechnology Letters 29(6): 931-936.
- Hristov, A. N. 1993., Effect of a commercial enzyme preparation on alfalfa silage fermentation and protein degradability. Animal feed science and technology 42(3-4):273-282.
- Ibrahim, A. S. S., and A. I. El-diwany. 2007. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the

crude enzyme. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 1: 473-478.

Ilyemi, F.B., Hanafi, M.M., Radziah, O., Kamarudin, M.S., 2006. Fungal solid-state culture of plam kernel cake. Bioresour. Technol. 97, 477 - 482.

Jatinder, K., Chadha, B.S., Saini, H.S., 2006. Optimization of culture conditions for production of cellulases and xylanases by *Scytalidium thermophilum* using response surface methodology. World J. Microbiol. Biotechnol. 22, 169 - 176.

Jørgensen, H., Olsson, L., 2005. Production of cellulases by *Penicillium brasilianum* IBT 20888—effect of substrate on hydrolytic performance. Enzyme Microb. Technol. 38, 381 - 390.

Jo, W. S., Bae, S. H., Choi, S. Y. Park, S. D. Yoo, Y. B. and Park, S. C., 2010. Development of detection methods for cellulolytic activity of *Auricularia auriculajudae*. Mycobiology. 38(1): 74-77

Kalogeris, E., Christakopoulos, P., Katapodis, P., Alexiou, A., Vlachou, S., Kekos, D., Macris, B.J., 2003. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. Process Biochem. 38, 1099 - 1104.

Kashyap, D.R., Soni, S.K., Tewari, R., 2003. Enhanced production of pectinase by *Bacillus* sp. DT7 using solid state fermentation. Bioresour. Technol. 88, 251 - 254.

Kuhad, R. C., M. Kumar, and A. Singh. 1994. A hypercellulolytic mutant of *Fusarium oxysporum*. Letters in Applied Microbiology 19: 397-400.

Leeson, S., K. N. Boorman, D. Lewis and D. H. Shrimpton. 1974. Metabolizable energy studies with turkes, Metabolizable energy of dietary ingredients. Br. Poult. Sci., 15:183-189.

Lodhi, G. N., r. Renner and D. R. Clandinin. 1969. Studies on the metabolizable energy of rapeseed meal for growing chickens and laying hens. Poult. Sci., 48:964-970.

Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Butiatman, S., Ramakrishma, S.V., 1985. Engineering aspects of solid state fermentation. Enzyme Microb. Technol. 7, 258 - 265.

Mazutti, M., Bender, J.P., Treichel, H., Di Luccio, M., 2006. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. Enzyme Microb. Technol. 39, 56 - 59.

- McNab, J. M. and C. Fisher. 1981. The choice between apparent and true metabolizable energy systems—recent evidence. pp. 45–55. In: Proc. 3rd European Symposium on Poultry Nutrition, Edinburgh, U.K.
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3): 426–428
- Mosier, N. S., Wilker, J. J. and Ladisch, M. R., 2004. Rapid chromatography for evaluating adsorption characteristics of cellulase binding domain mimetics. *Biotechnology and Bioengineering*. 86(7):756–764
- Nandakumar, M.P., Thakur, M.S., Raghavarao, K.S.M.S., Ghildyal, N.P., 1999. Studies on catabolite repression in solid state fermentation for biosynthesis of fungal amylases. *Lett. Appl. Microbiol.* 29, 380 - 384.
- Orskov, E. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science* 92(02):499–503.
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. *Ind. Crop. Prod.* 18, 37 - 45.
- Papagianni, M., Nokes, S.E., Filer, K., 1999. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solidstate fermentation. *Process Biochem.* 35, 397 - 402.
- Patnaik, R. et al. 2002. Genome shuffling of lactobacillus for improved acid tolerance. *Nat Biotech* 20: 707–712.
- Raeth-knight, M., J. Linn, and H. Jung. 2007. Effect of Direct-Fed Microbial on Performance, Diet Digestibility and Rumen Characteristics of Holstein Dairy Cows¹. *Journal of dairy science* 90(4):1802–1809.
- Rahardjo, Y.S.P., Sie, S., Weber, F.J., Tramper, J., Rinzema, A., 2005. Effect of low oxygen concentrations on growth and α -amylase production of *Aspergillus oryzae* in model solid-state fermentation systems. *Biomol. Eng.* 21, 163 - 172.
- Romero, M.D., Aguado, J., Gonzalez, L., Ladero, M., 1999. Cellulase production by

Neurospora crassa on wheat straw. *Enzyme Microb. Technol.* 25, 244 - 250.

SAS. 2002. SAS user's guide: Statistics (Version 9.01 Ed). SAS Inst. Inc., Cary, N.C. USA.

Shires A., A. R. Robblee, R. T. Hardin and D. R. Clandinin. 1980. Effect of the age of chickens on the true metabolizable energy values of feed ingredients. *Poult. Sci.*, 59:396-403.

Shojaosadati, S.A., Faraidouni, R., Madadi-Nouei, A., Mohamadpour, I., 1999. Protein enrichment of lignocellulosic substrates by solid state fermentation using *Neurospora sitophila*. *Resour. Conserv. Recyc.* 27, 73 - 87.

Sibbald, I. R. 1975. The effect of level of feed intake on metabolizable energy values measured with adult roosters. *Poult. Sci.*, 54:1990-1998.

Sibbald, I. T. 1976. A bioassay for true metabolizable energy in feedstuffs. *Poult. Sci.*, 55:303-308.

Slinger, S. J., I. R. Sibbald and W. F. Pepper. 1964. The relative abilities of two breeds of chickens and two varieties of turkeys to metabolize dietary energy and dietary nitrogen. *Poult. Sci.*, 43:329-333.

Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1967. *Statistical Methods* (6th Ed.). Iowa State Univ. Press, Ames.

Sutton, J., R. Phipps, D. Beever, D. Humphries, G. Hartnell, J. Vicini and D. Hard. 2003. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. *Journal of dairy science* 86(2):546-556.

Teather, R. M. and Wood, P. J., 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(4): 777-780

Techapun, C., Poosaran, N., Watanabe, M., Sasaki, K., 2003. Thermostable and alkaline-tolerant microbial cellulase-free xylanases produced from agricultural wastes and the properties required for use in pulp bleaching bioprocesses: a review. *Process Biochem.* 38, 1327 - 1340.

Tilley, J. and R. Terry. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and Forage Science* 18(2):104-111.

Toyama, N., Ogawa, K., 1977. In: Ghose, T. (Ed.), International Course on Biochemical Engineering and Bioconversion. Biochemical Engineering Research Centre, IIT, New Delhi, India.

Toyama, N., Ogawa, K., 1978. Cellulase production by *Trichoderma viride* in solid and submerged culture conditions. In: Ghose, T.K. (Ed.), Proceedings of the Symposium for the Bioconversion of Cellulosic Substances into Energy, Chemicals and Microbial Protein. IIT, New Delhi, India, pp. 325 - 327.

Toyoda A. and H. Minato 2002b. Identification of the cellulose-binding and the cell wall-binding domains of eubacterium *cellulosolvens* 5 cellulose-binding protein a (cbpa). FEMS Microbiology Letters 214: 113-118.

Van Soest.P.J., J.B.Robertson and B.A.Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J.Dairy.Sci. 74:3583.

Virupakshi, S., Gireesh Babu, K., Gaikwad, S.R., Naik, G.R., 2005. Production of a xylanolytic enzyme by a thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in solid state fermentation. Process Biochem. 40, 431 - 435.

Wang, Y., Y. Li, X. Pei, L. Yu, and Y. Feng. 2007. Genome-shuffling improved acid tolerance and l-lactic acid volumetric productivity in *Lactobacillus rhamnosus*. Journal of Biotechnology 129: 510-515.

Wolynetz, M. S. and I. R. Sibbald. 1984. Relationships between apparent and true metabolizable energy and the effects of a nitrogen correction. Poult. Sci. 63:1386-1399.

Yang, W., K. Beauchemin, and L. Rode. 1999. Effects of an Enzyme Feed Additive on Extent of Digestion and Milk Production of Lactating Dairy Cows¹. Journal of dairy science 82(2):391-403.

Yazdi, M.T., Radford, A., Keen, J.N., Woodward, J.R., 1990. Cellulase production by *Neurospora crassa*: purification and characterization of cellulolytic enzymes. Enzyme Microb. Technol. 12, 120 - 123.

Yoda K., A. Toyoda, Y. Mukoyama, Y. Nakamura and H. Minato 2005. Cloning, sequencing, and expression of a eubacterium *cellulosolvens* 5 gene encoding an endoglucanase (cel5a) with novel carbohydrate-binding modules, and properties of cel5a. Appl. Environ. Microbiol 71: 5787-5793.

Zadrazil, F., Puniya, A.K., 1995. Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. *Bioresour. Technol.* 54, 85 - 87 (Short communication).

Zhang, Y.-H.P., Himmel, M.E., Mielenz, J.R., 2006. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 24, 452 - 481.

Zhang, Y. X. et al. 2002. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature* 415: 644-646.