

최 중  
연구보고서

축사 파리 구제용 미생물 제제의 개발

Development of microbial products which are insecticidal  
on farm flies

파리 살충성 미생물의 탐색 및 제제화

Screening for flycidal microorganisms and their product formulation

사료첨가용 미생물 탐색 및 선발균주 특성 조사

Screening for microorganisms suitable as feed aditivies and characterization

(주)중앙바이오텍 기업부설연구소

연세대학교 생물자원공학과

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “축사 파리 구제용 미생물 제제 개발에 관한 연구” 과제의  
최종 보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 일

주관연구기관명 : 중앙바이오텍

총괄연구책임자 : 복진덕

연구 원 : 구동환

연구 원 : 박승환

연구 원 : 박근수

협동연구기관명 : 연세대학교

협동연구책임자 : 정건섭

# 요 약 문

## I. 제 목

축사 파리 구제용 미생물 제제의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구 개발의 필요성

현재 국내 축산업에서 해결해야 할 문제를 꼽는다면 축사 환경 문제(악취, 파리, 모기 등 위생 곤충)와 항생제 남용으로 인한 내성 문제를 꼽을 수 있다. 가축의 주위 환경 중에서 서식하고 있는 많은 곤충류들과 병원성 균들은 가축과 직접 또는 간접으로 이해관계를 맺고 있다. 이 중 파리, 모기 등과 같은 해충은 전염병의 병원체를 전파 매개하는 수단이므로, 이들의 감염 경로를 단절하여 구제 박멸하지 않으면 안되는 실정에 놓여 있다. 현재 시판되고 있는 살충제는 화학제품이기 때문에 환경 오염뿐만 아니라 생태계에도 치명적인 손상을 입히는 문제점을 안고 있다.

또한 가축 사육 농장에서 자연적으로 생성되는 가스로 인한 악취 문제는 농업 환경 오염과 함께 사회적 문제로 대두되고 있다. 악취 성분은 주변의 신선한 공기에 순차적으로 희석되어 피해 범위를 확대시키지 않는 것이 일반적이지만, 주변 지형이나 건축물의 배치, 풍속 및 기압 등의 기상 조건에 따라서 상당한 범위로 확산되어 피해가 일어나는 경우가 있는데 계분 건조기에서 발생한 악취의 경우 7km, 양돈 농가에서는 5km까지 악취 피해가 발생했다는 보고도 있다.

양돈장의 암모니아 농도가 30ppm 이상이면 목이 따끔하고 돼지의 호흡기에 이상이 생기기 시작하며 50ppm 이상이면 머리가 아프기 시작하고 70ppm 이상에 장시간 노출되면 사망에 이르기도 한다.

유해한 장내 세균의 생육을 억제하거나 가축의 성장을 촉진하고 질병을 치료하기 위하여 많은 항생물질이 사용되고 있다. 그러나 항생 물질을 가축에게 장기간 투여하면, 내성이 강력해진 *Salmonella*와 *E. coli*와 같은 항생 물질 내성균이 출현하여 박테리아성 질병을 치료하는데 어려움을 준다.

동물 사료에 성장 촉진제로 사용되어온 항균제에 대한 일반 대중의 우려

가 높아짐에 따라 유럽에서는 인체에 사용되고 있는 항생제를 가축의 성장 촉진제로 사용할 수 없도록 규제하고 있다.

(주) 중앙 바이오텍은 동물 약품을 제조 판매하는 회사로서 축산업이 안고 있는 이런 문제점을 해결하고자 축사 환경을 개선하고 항생제를 일부 대체할 수 있는 축종 별로 전문화된 생균제를 개발 하고자 본 연구를 수행하였다.

따라서 본 연구의 목적은 화학 제제가 아닌 미생물 제제로 축사 내에 문제가 되고 있는 파리를 구제하고 가금 티푸스 원인 균인 *Sal. gallinarum*을 사멸시키고, 축사 내의 휘발성 지방산과 암모니아 농도를 감소시키는 미생물 제제를 개발하며, 가금에 사용할 수 있는 *Sal. gallinarum*에 의한 가금 티푸스를 예방할 수 있는 미생물 제제를 개발하는데 목적이 있다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 각 지방의 축산 폐수로부터 균 분리

경기도, 경상도, 전라도, 충청도와 강원도 지방의 축산 slurry의 균 분포도를 조사하기 위하여 각 농장에서 채취한 시료를 아이스박스에 담아 신속하게 실험실로 옮겨 균을 분리하고 분포도를 조사하였다.

#### 2. 생균제를 사용한 미생물의 선발 및 생산 공정 개발

##### 가. 미생물의 선발

##### 1) 파리 유충 살충성 균의 선발

유충 사육 배지 7g을 시험관(지름 45mm, 높이 71mm)에 넣고 T3 배지에서 배양된 시료 액 10ml을 첨가한 후 골고루 혼합하고 분리한 2령 총 20마리씩을 용기에 넣고 유충이 성충 될 때까지(10~15일) 항온실에서 사육한 후 파리로 깨어나는 수를 계산하여 효과가 좋은 균을 선발하였다.

##### 2) 악취 제거 미생물의 선발

황산화 배지와 질산화 배지와 암모니아 산화배지에서 잘 성장하는 균을 1차적으로 선발하였으며, 그후 돼지 분뇨 배지에서 잘 성장하는 균을 2차로 선발하였고, 마지막으로 GC를 이용하여 초산, 프로피온 산, 부틸 산, 발레익 산, 카프로피온 산의 제거 효과가 좋은 것을 선발하였다.

### 3) 가금 티푸스 원인균인 *Sal. gallinarum* 균에 항균성을 갖는 균의 선발

분리 균을 각각 TSB에 접종하여 37℃에서 24시간 동안 배양한 후 그 액을 원심 분리하였고 상등 액을 여과 멸균하여 0.5ml을 4ml 멸균 TSB배지에 첨가(10%)하여 *Sal. galinarum*과 혼합 배양했을 때 *Sal. gallinarum*이 성장하지 못하는 균을 선발하였다.

### 나. 마우스를 이용한 제품의 간이 독성 검사와 사양 효과

태어난지 2주령 되는 ICR마우스를 이용하여 혈액내의 적혈구수와 백혈구수와 사료 효율등을 통하여 간이 독성 검사를 하였다.

### 다. 분리 균주의 산업용 최적 배지 선정과 건조 후 생존율

Molasses와 CSL을 이용하여 분리 균주의 배양 조건은 건조 후의 생균수와 배양시 비용을 고려하여 최적의 배양 배지 조건을 설정하였다.

### 라. 생균제 시제품의 산업적 특성

가축의 장내에서 생존할 수 있는 조건을 고려하여 내 산성, 내 담즙성을 조사하였으며, 사료 제조 과정에 직접 첨가시 펠렛 조건에서도 살아남는 내열성 실험을 수행하였다.

### 마. 생균제 효능

#### 1) 파리 살충성 미생물의 효능

파리 살충성 생균제를 직접 사료에 첨가하여 돼지의 사료 효율과 분변의 파리 유인성, 파리 발생 감소 등을 조사하였다.

#### 2) 악취 제거 미생물의 효능

파리 살충성 미생물 2종과 악취 제거 미생물 2종으로 구성된 생균제를 직접 사료에 첨가하고 돼지의 사료 효율과 분변에서의 암모니아 감소율을 조사하였다.

#### 3) 가금 티푸스 예방용 생균제의 효능

가금 티푸스 균에 항균 활성이 높고 균주 3종을 각각 배양 건조후 혼합하여 직접 사료에 첨가하여 산란계의 산란율과 폐사율과 분변에서의 Coliform 수치를 조사하였고, 태어난 지 14일된 초생추에 *Sal. gallinarum*을 공격 접종하여 생균제의 방어 효능을 조사하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### ■ 연구 개발 결과

##### 1. 각 지방의 축산 폐수로부터 분리된 균의 분포도 조사

경기도, 경상도, 전라도, 충청도, 강원도 지방의 31개의 양돈농가의 축산분뇨로부터 총 706개의 균을 분리하였고 이중 281개가 *Bacillus* spp.이었다. 파리 발생이 적고 악취가 적은 잘 관리된 농장일수록 *Bacillus* spp.의 균수가 높았다. 각 지역의 균 분리 상황과 분포도를 정리하였고 이외에도 다양한 환경 샘플로부터 균을 분리하였다.

##### 2. 생균제로 사용할 미생물의 선발 및 생산 공정 개발

###### 가. 미생물의 선발

###### 1) 파리 살충성 미생물의 선발

*Bacillus* spp. 4개를 살충성 미생물로 최종 선발하였으며, 각각 *B. sphaericus* Gu 1-2, *B. thuringiensis* F 2, *B. licheniformis* M 10과 *B. thuringiensis* Wang 4로 동정되었다.

###### 2) 악취 제거 미생물의 선발

각각의 선발배지에서 잘 성장한 균을 동정한 결과 *B. licheniformis* KJ 12와 *B. subtilis* SUN 2와 *Al. feacalis* JTJ 18로 동정되었으며, 이 균주들을 Gas Chromatography(GC) 기기를 이용하여 휘발성 지방산 제거율을 조사한 결과 휘발성 지방산의 감소율이 대조구 보다 훨씬 높았다.

###### 3) 가금 티푸스 원인균에 항균성을 갖는 균의 선발

야외에서 분리한 *Bacillus* spp.균 203개를 대상으로 실시한 결과 2개의 균에서 *Sal. gallinarum*에 억제 활성이 강한 것으로 나타났으며, *Bacillus* sp. Gu

88과 *Bacillus subtilis* Gu 31로 동정되었다. 야외 분리 유산균에서 *Sal. gallinarum*에 길항 작용을 가지고 있는 균 1개를 분리하였으며 이 균은 *L. plantarum* Hans 1-19로 동정되었다.

### 3. ICR 마우스를 이용한 간염 독성 검사

선발된 균 10개 각각을 ICR 마우스에 급여한 결과 일당 증체량이나 사료 효율이나 사료 요구율 면에서 대조구와 비교해서 차이점이 없거나, 백혈구 수나 적혈구 수등이나 사료 효율면에서 외형상 어떤 증상도 발견되지 않았다.

### 4. 산업용 배지 최적화 및 건조 후 생존율

최종 선발된 균 10개를 산업화에 적합한 배지를 선정하기 위해 질소 원과 탄소 원을 달리한 몇 가지 산업용 배지를 사용하여 생균 수와 건조 후 생존율을 조사하였을 때 탄소 원으로 당밀과 질소 원으로 CSL을 사용한 경우가 대체로 가장 우수하였다. 이를 바탕으로 각 균의 최적 질소 원과 탄소 원을 선정하기 위하여 CSL과 당밀의 농도를 달리하여 배양 성적을 조사하여 최적의 산업용 생산 배지를 선정하였다. 선발된 배지를 이용하여 30ℓ발효기를 이용하여 발효 공정을 확립하고 캐비넷 건조기에서 건조 조건을 설정하여 시제품을 제조하여 사양 실험에 공시하였다. 개발된 제품 공정은 포자 형성을 하는 *Bacillus* spp. 8종을 건조 시 80%이상의 생존율을 보여 산업 현장에서 경제적으로 제품 생산하는데 적합하였지만 포자 형성을 하지 않는 *Al. faecalis* JTJ 18과 *L. plantarum* Hans 1-19의 경우 건조 시 생존율이 낮아 현재 개선된 공정을 개발 중에 있다.

### 5. 시제품 내 미생물의 특성 조사

#### 가. 내 산성 조사

제조된 시제품을 pH 2.0 완충 용액으로 희석 후 30분간 방치하여 생존율을 조사한 결과 49%를 보인 *Bacillus* sp. Gu 88을 제외한 *Bacillus* spp.들은 90%이상의 생존율을 보였고 유산균인 *L. plantarum* Hans 1-19만 30%로 내 산성이 가장 낮았다.

#### 나. 내 담즙성 조사

공시한 10종의 생균제들을 0.03% oxgall 용액에서 30분간 방치하여 내 담즙성을 조사한 결과 57%의 생존율을 보인 *Bacillus* sp Gu 88를 제외한 나머지 균주들은 77%이상의 생존율을 보여 내 담즙성이 강하였다.

#### 다. 내열성 조사

물로 희석한 시제품을 75℃ 항온 수조에서 30분간 방치 후 생존율을 조사한 결과 *Bacillus* spp. 들은 64%가 생존한 *B. subtilis* Gu 31을 제외한 전 종이 89%이상 생존하였고 *Al. faecalis* JTJ 18는 35%, *L. plantarum* Hans 1-19는 31%의 생존율을 보여 Pellet사료 제조와 같은 고온에서도 생존 가능성을 보였다.

### 6. 생균제 급여 효능

#### 가. 축사 파리와 암모니아 감소용 생균 제제의 급여 효과

##### 1) 사료 효능 조사

돼지에 축사 파리와 암모니아 감소용 미생물 제제를 사료내에 0.2% 혼합하여 급여한 결과 처리구에 비하여 3.3%의 사료 효율과 증체효율일 개선되었다.

##### 2) 암모니아 감소 효능

돼지에 축사 파리와 암모니아 감소용 미생물 제제를 0.2%급여한 결과, Control기간에는 14~16ppm정도이던 것이 급여 1주일 후 약 7~8ppm으로 감소하였고, 투여 8주시까지 약 4~6ppm으로 유지하여 약 70%~80%의 악취 제거 효과를 나타내었다.

##### 3) 파리 살충성 효과

각각의 미생물 제제를 파리 사료에 혼합한 후 파리 암수 각각 20마리씩을 파리 사육 망사에 방사한 후 최종적으로 발생된 파리 수를 3차에 걸쳐서 조사한 결과 각각의 균들을 혼합 처리한 실험 구에서는 평균 3.3마리의 파리가 발생되었지만 아무 것도 첨가하지 않은 대조구에서 평균 281.7마리의 파리가 발생되어 직접 살포시 파리 발생을 근본적으로 차단할 것으로 생각된다.



파리 살충성 미생물을 돼지에게 직접 급여한 돈분에 파리 암수 각각 10마리씩을 파리 망사에 방사한 후 24시간 동안 산란을 유도한 후 파리의 발생율을 조사하는데, 파리 살충성 미생물을 급여한 실험 구에서의 평균 파리 발생 수는 38.5마리로 급여하지 않은 실험 구에서의 파리 발생 수 231마리에 비해 83.3%의 파리 발생 억제율을 가지고 있었다. 또한 돈분의 파리 유인효과를 비교하기 위해서 70마리의 파리를 살포해 급여구와 비 급여구의 돈방에 앉아 있는 정도를 비교한 결과 급여구와 50%파리가 덜 앉아서 파리 유인 효과가 낮아져 축사 환경을 크게 개선할 수 있는 것으로 나타났다.

#### 나. 가금 티푸스 억제용 생균제의 급여 효능

투여 전 이 농장의 산란율은 표준 산란 곡선 대비 4%정도 낮았고 폐사율은 주 평균 0.33% 정도의 53주령 산란계 9400수 였는데 시제품 0.2%를 급여 후 표준 산란 곡선을 2 ~ 3% 상회하도록 개선되어 평균 6% 정도의 산란율 개선 효과를 보였고, 폐사율도 0.28%로 떨어져 15%정도 개선되었다. 난각과 난중 개선 효과가 뚜렷하였고 총 4, 5개월 동안 항생제를 사용하지 않고 우수한 생산성을 얻을수 있어 항생제 대체체로서 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 이 기간 중 분변의 균 분포를 조사한 결과 총 균 수와 유산균 수는 큰 변화가 없었으나, coliform 균의 수가  $10^2$ 정도 감소 유지되었다.

티푸스균에 대한 억제 효과를 검정하기 위하여 시제품을 초생추에 급여하며  $10^8$ cfu의 티푸스균을 공격 접종하여 방어 효과를 조사하였는데 대조 군은 36마리 중 22마리가 급여 구는 10마리가 폐사하여 66%의 방어 효과를 보여 티푸스균에 대한 방어 효과가 높은 것으로 나타났다.

#### ■ 활용에 대한 건의

1. 본 실험에서 분리된 파리 살충성 미생물은 총 4개로서 *B. thuringiensis* Wang 4, *B. thuringiensis* F 2, *B. licheniformis* M 10, *B. sphaericus* Gu 1-2이다. 이 균은 *Bacillus* spp. 종류로서 건조 시 건조 효율이 아주 높아 제품의 생산성에 아주 좋은 영향을 미친다. 이 균들은 장관의 산성 조건 및 담즙성 조건에 내성이 좋아 생존 경쟁이 치열한 장내에서 우선 선점 할 수 있는 좋은 조건을 갖추었으며, 분변 혹은 slurry와 같은 악조건에서 잘 생존 할 수 있기 때

문에 제품화하기에 좋은 것으로 기대된다.

2. 축사 악취 제거제로 개발된 미생물인 *B. licheniformis* KJ 2, *Alcaligenes faecalis* JTJ 18, *B. subtilis* SUN 2은 사료 효율과 암모니아 제거율이 좋은 것으로 나타났으며, 또한 분변에서 우점율도 높았다. 파리 살충성 미생물 제제와 마찬가지로 내산성 내담즙성, 내열성이 좋아 사료 첨가제로서 사용할 수 있으리라 기대된다.

3. 시험 농장에서 분리한 대장균류들이 항생제 내성이 매우 높음에도 불구하고 본 생균제 투여 시 대장균의 수치와 산란율 및 폐사율이 줄어들었다. 이것은 사료 내에 항생제 대신 개발 생균제의 투여가 가능하며 티프스 공격 접촉에서 보호 효과를 입증하였으므로 가금 티프스 상시 예방용으로서 사용하여도 무방할 것으로 판단된다. 그리고 일본 및 동남에서도 이러한 효능을 가진 생균제가 개발된 적이 없어 수출길이 열려 있어 외화 획득에 많은 도움이 되리라 생각한다.

4. 본 실험을 수행한 (주)중앙 바이오텍은 월간 150톤의 생균제를 생산할 수 있는 설비를 가진 회사로서 국내에서도 생균제 부분에서 가장 넓은 시장영역을 가지고 있으며, 수출에서도 국내 동물약품 회사 중 업계 1위를 차지하고 있다. 현재 수출 주력으로 대두되고 있는 나라들이 일본과 중국을 비롯한 동남아, 중동, 아프리카에 이르기까지 아주 넓은 시장영역을 확보하고 있으며, 본 제품이 개발됨으로 인하여 예상할 수 있는 연간 판매액은 약 50억 정도이다.

5. 주관 기관인 (주) 중앙 바이오텍은 본 연구에서 분리하여 특성화한 균주를 바탕으로 돼지용과 닭용의 전문화된 생균제로 개발하여 상품화하기로 하고 현재 산학연 컨소시엄 과제로 생명공학연구소 생물시험공장의 연구팀과 공동으로 제품화 공정을 2003년 4월말까지 완료할 계획이다.

6. 차후의 보강 실험 계획은 더 많은 현실적인 사양 농가의 사양 실험 자료를 획득하고, 이를 바탕으로 한 용법 알을 선정하는 한편, 이 제제들이 현장에서

잘 적응할 수 있도록 하는 방안을 모색해야 할 것으로 생각된다

## SUMMARY

The purpose of this project was developing the animal-specific direct-fed microbials (DFM) which could kill the farm flies, reduce ammoniacal odor from animal farm environs, and are bacteriocidal to a economically important chicken pathogen, *Samonella gallinarum*, a causative agent of chicken typhus. In summary of this projects:

1. Four species of *Bacillus* was selected for their strong fly-killing activities. These include two new *Bacillus thuringiensis* (BT) strains, *B. licheniformis* M 10 and *B. sphericus* Gu 1-2. *B. licheniformis* KJ 12, *B. subtilis* SUN 2 and *Alcaligenus faecalis* JTJ 18 were selected for their fair growth on pig slurry and highly effective odor-removing activity. Finally *Bacillus sp.* Gu 88, *B. subtilis* Gu 31 and *Lactobacillus plantarum* Hans 1-19 were selected based on their high antibacterial activity against *S. gallinarum*.

2. Economical production media, fermentation and drying processes were developed for each ten strains and test products were prepared for the field test for their effectiveness verification.

3. Microorganisms included in the test products showed high resistance to the harsh test conditions such as pH 2.0 acidity, 0.03% oxgall, and 75°C for 30 min incubation to simulate the animal intestinal and pelleting conditions.

4. Two complex DFM products for pig and chicken were prepared by appropriately mixing above test products and used for the field test. Test pig group supplemented with 0.2% DFM showed 3.3% improvement over the control in weight gain and feed efficiency, and 70% reduction of the ammonia gas production. Pig feces from test group showed 83% reduction of fly development and ca. 50% reduced fly attraction compared to the control

one. When three strains of fly-killing isolates were mixed with fly culture medium at 0.2% concentration each, fly development was reduced by 95% compared to the control, suggesting that it will be effective on direct spray to the animal farm environs. DFM for chicken was prepared by appropriately mixing three anti-Salmonella microorganisms with yeast culture and supplemented to the broiler at 0.2% concentration. After supplementation, egg production and death rate were improved 6% and 15%, respectively, egg shell thickened and egg quality was upgraded. Total bacterial and lactic acid bacterial counts were maintained evenly, but coliform bacterial number was reduced by two orders of magnitude. DFM-fed broilers performed very well in production and produce quality without any disease occurrence for 4.5 months without using any antibiotic treatment. This result suggests that developed DFM could greatly reduce antibiotic usage in broiler farming. When this product was fed to young chickens and tested the protective effects after oral injection of *S. gallinarum* ( $10^8$ cfu/chick), 22 chicks out of 36 were died in control group compared to 10 in test one, recording 66% of protection effect.

5. In conclusion, we isolated 10 strains of useful microorganisms with specific function, developed the production processes for them, formulated to two animal-specific DFMs for chicken and pig, and verified their effectiveness through *in vitro* and *in vivo* tests. Specifically, DFM for pig could reduce fly development and ammonia gas production and improves pig production. DFM for chicken gives protective effect against chicken typhus, improves production and produce quality, and works as an antibiotic alternative when they are supplemented to the feed.

## CONTENTS

Chapter 1. Outlines of the research-----	19
1. Necessity and goal of the research-----	19
1) Development of fly-killing microbial product-----	19
2) Development of ammonia gas removing microbial product-----	21
3) Development of microbial product antibacterial to chickentyphus----	22
4) Scope of the research-----	24
Chapter 2. Status of the research-----	25
1. Foreign and domestic status of related research & development-----	25
2. Evaluation of related research & development-----	29
Chapter 3. Research contents and results-----	31
1. Research contents-----	31
2. Results of the research-----	46
1) Microbial flora of pig slurry collected from all over the country-----	46
2) Screening of fly-killing microorganisms and their effectiveness-----	52
3) Characterization and identification of the isolates-----	54
4) Selection of ammonia gas removing microorganisms-----	59
5) Selection of antibacterial microorganisms against <i>S. gallinarum</i> -----	66
6) Toxicity test of the isolates using ICR mouse-----	71
7) Production method development for fly-killing microorganisms-----	74
8) Production method development for odor-removing microorganisms--	78
9) Production method development for antibacterial microorganisms----	80
10) Characterization of test products-----	83
11) Animal test results of the test products-----	86
Chapter 4. Object achievement and contribution to related field-----	95
Chapter 5. Application of research products-----	99
Chapter 6. State of the artreport-----	101
Chapter 7. Reference-----	105

## 목 차

제 1 장 연구 개발 과제 의 개요 .....	19
1절 연구 개발의 필요성 및 목적 .....	19
1. 파리 살충성 미생물의 개발 .....	19
2. 암모니아 감소 미생물의 개발 .....	21
3. 가금 티푸스 억제 미생물의 개발 .....	22
2절 연구 개발의 범위 .....	24
제 2 장. 국내외 기술개발 현황 .....	25
1절 국내,외 관련분야의 기술 개발 현황 .....	25
2 절 국내,외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치 .....	29
제 3장 연구 개발 수행 내용 및 결과 .....	31
제 1절 연구 내용 .....	31
1. 파리 살충성 미생물의 선발 .....	31
가. 균의 분리 .....	31
1) 분리 원 .....	31
2) 살충성 균의 분리 .....	31
나. 표준 균주의 분양 .....	32
다. 균의 보관 .....	32
라. 집파리 성충 및 유충의 사육 환경 .....	32
1) 집파리 성충 및 유충의 사육 .....	32
(1) 성충의 사육 .....	32
(2) 유충의 사육 .....	32
2) 집파리의 채란 .....	33
3) 집파리 유충의 분리 .....	33
4) 파리 유충 사체의 분리 .....	33
5) 파리 유충 치사율 조사 .....	33
2. 휘발성 지방산 제거 미생물의 선발 .....	34
3. 가금 티푸스( <i>Sal. gallinarum</i> )에 항균성 미생물의 선발 .....	35
가. 표준 균주의 분양 .....	35
나. 가금 티푸스 원인 균에 항균성 미생물의 선발 .....	35
다. 실험실 수준에서 <i>Sal. gallinarum</i> 에 대한 방어 능력 시험 .....	36
4. 선발 균의 In-vitro 간이 장내 유해 인자 생성 능력 조사 .....	36

가. Indole의 생성 .....	36
나. Hydrogen sulfide(H <sub>2</sub> S)생성 .....	37
다. Butandiol과 Acetoin의 생성 .....	37
라. β-hemolysis 반응 .....	37
5. 분리 균의 동정 .....	37
가. 분리 균의 family 및 genus 동정 .....	37
나. Genus 및 Species 동정 .....	38
다. 16S rRNA 유전자를 이용한 균의 동정 .....	38
6. 마우스를 이용한 분리균의 간이 독성 실험과 사양 효과 .....	38
가. 마우스 종류 및 주령 .....	38
나. 마우스의 사육 환경 .....	38
다. 마우스의 사료 섭취량 및 실험 균주 접종 .....	38
라. 일당 증체량 .....	39
마. 사료 효율 .....	39
바. 사료 요구율 .....	39
사. 적혈구 수 계산 .....	39
아. 백혈구 수 계산 .....	39
7. 분리 균주의 산업용 최적 배지 선정 .....	39
8. 제조 scale-up 공정 개발 및 생균제 시제품 제조 .....	40
9. 생균제 시제품의 산업적 특성 조사 .....	40
가. 내산성 조사 .....	40
나. 내 담즙성 조사 .....	41
다. 내열성 조사 .....	41
10. 파리 살충성 및 환경 미생물 제제의 돼지 급여 효능 .....	41
가. 생균제의 제조 및 투여 .....	41
1) 생균제의 배양 및 제조 .....	41
2) 생균제의 투여 .....	41
나. 생균제 급여 농가의 선택 조건 .....	41
다. 시험 두수 및 일령 .....	42
라. 파리 살충성 및 환경 미생물 제제의 돼지 급여 효능 .....	42
1) 체중 측정 .....	42
2) 총 사료 섭취 량 측정 .....	42
3) 일당 증체 량 .....	42
4) 사료 요구 율 .....	42



5) 파리 발생 율 .....	42
가) 파리 사육 배지에 미생물제제 0.2% 직접 혼합시 파리의 발생 율	42
나) 양돈 사료에 미생물제제 0.2%를 혼합 급여후 분변에서 파리 발생 율	43
.....	
다) 양돈 사료에 미생물제제 0.2%를 혼합 급여한 후 분변의 파리 유인 효	43
과 .....	
6) 돈 분에서 암모니아 발생 율 .....	43
7) 통계 분석 .....	43
11. 가금 티푸스( <i>Sal. gallinarum</i> )에 항균성 생균제의 급여 효능 .....	43
가. 생균제의 배양 및 제조 .....	43
나. 생균제의 투여 .....	44
다. 생균제 급여 농가의 선택 조건 .....	44
라. 시험 두수 및 일령 .....	44
마. 시험 농가에서 분리한 대장균의 항생 물질 내성 검사 .....	44
1) 표준 항생 물질 내성 검사 .....	44
2) 시판 중인 동물용 의약품 시판용 항생물질 내성 검사 .....	44
바. 생균제 급여 효능 분석 .....	44
1) 산란율 .....	44
2) 폐계율 .....	45
3) 장내 균총 .....	45
제 2절 연구 결과 .....	46
1. 각 지방의 축산 폐수로부터 분리된 균의 분포도 조사 .....	46
가. 경기도 지방의 축산 폐수로부터 호기성 균의 분포도 조사 .....	46
나. 경상도 지방의 축산 폐수로부터 호기성 균의 분포도 조사 .....	46
다. 전라도 지방의 축산 폐수로부터 호기성 균의 분포도 조사 .....	48
라. 충청도 지방의 축산 폐수로부터 호기성 균의 분포도 조사 .....	48
마. 강원도 지방의 축산 폐수로부터 호기성 균의 분포도 조사 .....	51
2. 파리 유충 살충성 균의 선발 및 치사율 조사 .....	52
가. 분리 원으로부터 살충성 미생물의 분리 .....	52
나. 화학 살충제의 파리 유충 치사율 조사 .....	52
다. 표준 균의 치사율 조사 .....	53
라. 분리 균주의 파리 유충 치사율 조사 .....	54
3. 선발된 미생물의 특성 및 동정 .....	54
4. 약취 제거 미생물의 선발 .....	59

가. 선발 기준 .....	59
나. 휘발성 지방산 정량 분석 .....	62
1) 초산의 감소 효과 .....	62
2) 프로피온 산의 감소 효과 .....	62
3) 부틸 산의 감소 효과 .....	63
4) 발레익 산의 감소효과 .....	64
5) 카프로피오닉 산의 감소 효과 .....	64
5. 가금 티푸스( <i>Sal. gallinarum</i> )에 항균성 균의 선발 .....	66
가. 가금 티푸스에 대한 항균성 균의 선발 및 동정 .....	66
나. 초생추 병아리에 가금 티푸스 공격 접종에 대한 선발 균의 방어 효과	70
6. ICR 마우스에 대한 임상 조사 .....	71
가. 파리 살충성 미생물에 대한 임상 실험 결과 .....	71
나. 약취 제거 미생물의 임상 실험 결과 .....	72
다. 가금 티푸스 원인 균에 대한 길항 균의 임상 실험 결과 .....	73
7. 파리 살충성 균의 산업용 배지 최적화의 분석 및 열풍 건조 후 생존율	74
가. <i>B. thuringiensis</i> wang 4의 생산 배지 최적화 및 건조 후 생존수 .....	74
나. <i>B. thuringiensis</i> F2의 생산 배지 최적화 및 건조 후 생존수 .....	75
다. <i>B. licheniformis</i> M10의 생산 배지 최적화 및 건조 후 생존수 .....	75
라. <i>B. sphearicus</i> Gu 1-2의 생산 배지 최적화 및 건조 .....	76
8. 약취 제거 미생물의 배지 최적화 및 건조 후 생존수 .....	78
가. <i>B. licheniformis</i> KJ 2의 생산 배지 최적화 및 건조 .....	78
나. <i>Al. faecalis</i> JTJ 18의 생산 배지 최적화 및 건조 .....	78
다. <i>B. subtilis</i> SUN 2의 생산 배지 최적화 및 건조 .....	79
9. 가금 티푸스( <i>Sal. gallinarum</i> )에 대한 항균성 균의 배지 최적화 및 건조 후 생균수 .....	80
가. <i>Bacillus</i> sp. Gu 88의 생산 배지 최적화 및 건조 .....	80
나. <i>Bacillus subtilis</i> Gu 31의 생산 배지 최적화 및 건조 .....	81
다. <i>Lactobacillus plantarum</i> Hans 1-19의 생산 배지 최적화 및 건조 .....	82
10. 시제품 내 미생물의 특성 조사 .....	93
가. 내 산성 조사 .....	93
나. 내 담즙성 조사 .....	84
다. 내 열성 조사 .....	84
11. 생균제 급여 효능 .....	86
가. 축사 파리와 암모니아 감소용 생균 제제의 급여 효과(가명 : Probio-P)	

1) 사료 효능 조사 .....	86
2) 암모니아 감소 효능 .....	87
3) 파리 살충성 효과 .....	88
(가) 시험 균 포함된 파리 사육 배지에서 파리 발생 율 .....	88
(나) 시험균 투여 후 돼지 분변에서 파리 발생 율 .....	88
(다) 시험 균 투여 후 돼지 분변의 파리 유인 효과 .....	89
나. 가금 티푸스에 대한 항균성 생균제(가칭 CYC-a)의 급여 효능 .....	90
1) 산란 율 .....	90
2) 폐계 율 .....	91
3) 장내균총 .....	92
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도 .....	95
제 1절 연구개발의 최종 목표 .....	95
제 2절 연구 개발 목표의 달성도 .....	96
제 3절 관련 분야의 기여도 .....	97
1. 파리 살충성 미생물 및 악취 제거 미생물의 개발 .....	97
2. 악취 제거 미생물 제제의 개발 .....	97
3. 가금 티푸스 억제 미생물 제제의 개발 .....	97
제 5 장. 연구 개발 결과의 활용 계획 .....	99
제 6 장. 연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보 .....	101
제 7 장. 참고 문헌 .....	105

# 제 1 장 연구 개발 과제의 개요

## 1절 연구 개발의 필요성 및 목적

### 1. 파리 살충성 미생물의 개발

산업의 발달은 고도의 경제 성장과 함께 국민 생활수준을 향상시킨 반면, 전 세계적으로 축산업이 질병 매개체(축사해충)에 의한 가축의 감염으로 많은 피해를 보고 있을 뿐만 아니라, 그로 인하여 육류를 섭취하는 사람들도 위험 인자에 노출되어 있다. 예를 들어, 홍콩의 조류 독감 혹은 영국의 CJD질병(광우병) 등도 그 대표적인 예라고 할 수 있고, 가축과 인간에 공통적인 법정 전염병들도 무시할 수 없는 위험인자이다

가축의 주위 환경 중에서 서식하고 있는 많은 곤충류들은 가축과 직접 또는 간접으로 이해관계를 맺고 있다. 이 중 파리, 모기 등과 같은 해충은 전염병의 병원체를 전파 매개하는 수단이므로, 이들의 감염 경로를 단절하여 구제 박멸하지 않으면 안 되는 실정에 놓여 있다. 현재 시판되고 있는 살충제는 화학 제품이기 때문에 환경오염 뿐만 아니라 생태계에도 치명적인 손상을 입히는 문제점을 안고 있다.

파리의 암컷은 태어난 지 2주 후면 번식할 준비를 하고 한번에 120여개 정도의 알을 낳아 파리의 숫자는 빠르게 증가한다. 돈사가 따뜻하고 습한 조건이라면 일반적으로 성충은 약 4주를 생존 가능하기 때문에 매년 20세대가 증식할 수 있다. 이러한 파리들은 먼 거리를 날아다니며 24시간에 적어도 3km~10km까지 가능하기 때문에 농장내의 감염 전파와 이웃 농장까지 전파할 충분한 기회를 가지고 있다.

양돈장에서 파리를 규제해야 하는 이유는 돼지와 돼지, 혹은 농장과 농장 간에 파리에 의해서 전파될 수 있는 병원체들 때문이다. 전형적인 돼지 위생에서 파리가 옮기는 것은 오제스키(Aujesky)병을 일으키는 *Pseudorabies*, 회충(Ascarid), 유산의 증상을 보이는 브루셀라를 일으키는 *Brucella suis*, 피사성 장염의 원인균인 돼지 콜레라와 *Clostridium perfringens* A,C형, 대장균과 돈단독균, 구제역 바이러스, 콕시듐의 원인체인 *Isospora suis*, 생식기 장애를 일으키는 랩토스피라증 원인균, 결핵과 관계가 있는 *Micobacteria*, 위축성 비염을 일으키는 *Pasturella multocida*와 *Salmonella*증, 돼지 옴의 원인인 *Sarcoptic mites*와 돈 적리의 원인체인 *Serpulina hyodysenteria*, 삼출성 표피 염의 원인

균인 *Staphylococcus hyicus* 등이 있다. 그리고 분만사에서 파리와 관계되는 문제는 포유 모돈에 감염이 심한 유방염이 있고, 자돈에서 연쇄상구균에 의한 뇌막염이 관계가 있다. 또한 파리는 돈두(Swine pox)의 숙주로 정평이 나있으며, 자돈에서는 에페리스로주노시스(Eperithrozoosis)를 일으키고, TGE의 숙주로 밝혀졌다.

파리는 미생물을 옮길 수 있고, 파리는 미생물들을 퍼뜨리는데 중요한 역할을 한다. 파리가 옮기는 미생물의 양은 매우 적고 또한 돼지에게 돈 적리(Serpulina)를 일으키는데 충분치 않을 수 있지만 파리의 구제는 필요하다. 질병의 위험뿐만 아니라 관리자와 이웃들과 동물들에게 해를 끼치는 것을 줄이기 위해서이다.

돼지에게서 파리의 번식률을 낮추기 위해서 사양 기술을 높이고, 돈사의 환경을 청결히 해야만 한다. 예를 들어, 사양 기술로는 열량이 높은 입 붙이기 사료를 최소한 14일령이 될 때까지 급여하지 말고, 돈사의 빛을 강하지 않게 하여 파리의 번식을 억제하는 방법이 있고, 돈사 환경으로는 사료 bin의 청소, 음수기의 누수 방지, 단열재의 균열이나 부서진 부분의 수리, 돈방의 표면을 건조하고 청결하게 해야 한다.

최근 파리를 구제하기 위하여 여러 가지 방법을 이용하여왔다. 첫 번째 방법은 화학적인 방법으로 파리 구더기를 죽이기 위한 살충제의 사용과 파리 성충의 유인제 사용이었다. 두번째는 파리를 유인하기 위한 페르몬과 자외선의 사용이었다. 세번째는 파리 킬러라고 불리우는 새 종류를 이용한 천적 형태가 이용되었지만, 이 방법은 돈사의 문을 열 때 도망치는 것을 주의해야 되고, 죽은 새들이 땅에 떨어지고, 새의 깃털이 병원체의 숙주가 될 수 있다는 이유로 인하여 유용하게 사용되지 않고 있다. 네 번째는 *Ophyra aenescens*라는 천적을 이용하여 집파리의 구더기를 없앤다.

파리 구제를 위하여 화학 살충제를 기피하려는 이유는 자연의 다른 곤충과 벌레 조류 등에 해를 끼치고, 화학 물질에 오랫동안 노출되면 화학 물질에 저항성이 생기기 때문에 천적이나 미생물을 이용하여 파리를 구제하려고 하는 움직임이 일어나고 있다.

따라서 본 실험의 첫 번째 목적은 가축의 분변 미생물을 이용하여 파리를 구제하는 방법을 찾는 데 그 첫 번째 목적이 있다.

## 2. 암모니아 감소 미생물의 개발

근래 가축 사육 농장에서 자연적으로 생성되는 가스로 인한 악취 문제는 농업 환경 오염과 함께 사회적 문제로 대두되고 있다. 농경지에서 악취의 주 원인은 가축 분뇨의 생산, 처리 및 시용 등에 의하며, 이는 사료의 사용과 사양 두수의 증가로 더욱 심각해지고 있다. 악취 가스의 생성은 가축 분의 저장 기간 중 혐기적 발효 과정을 통하여 가축분 속의 섬유소와 황 함유 유기 물질이 분해될 때 생성된다. 따라서 가축 분뇨를 저장, 처리 혹은 사용하는 주위에는 사람의 후각에 싫게 느껴지는 냄새가 생기게 되며, 때로는 곤충류가 번식하여 위생상 좋지 않은 영향을 미친다.

일반적으로 악취 성분은 주변의 신선한 공기에 순차적으로 희석되어 피해 범위를 확대시키지 않는 것이 일반적이다. 그러나 주변 지형이나 건축물의 배치, 풍속 및 기압 등의 기상 조건에 따라서 상당한 범위로 확산되어 피해가 일어나는 경우가 있는데 계분 건조기에서 발생한 악취의 경우 7km, 양돈 농가에서는 5km까지 악취 피해가 발생했다는 보고도 있다.

가축 배설물과 퇴비화 과정에서 주로 발생하는 악취 가스로는 암모니아를 비롯하여 메틸머캅탄(methylmercaptan), 디메틸설파이드(dimethylsulfide), 디메틸디설파이드(dimethydisulfide) 등의 황화합물, 휘발성 지방산(volatile fatty acids) 및 알콜 류등 많은 화합물들이 알려져 있다.

축산에서 발생하는 악취를 제거하기 위한 방법으로 물리적 방법과 화학적인 방법, 생물학적 방법등 여러 방법이 활용되고 있으나, 이용 처리 시스템에 따라 악취 성분의 다양성으로 인해 효율이 저하될 뿐만 아니라 근원적으로 악취를 제거하지 못하며 유지비가 많이 소요되고 국내에서 검증되지 않는 생물제제를 사용함으로써 병원성균 등에 오염을 가져와 토양시비 경우 가축이나 사람에게도 많은 영향을 미칠 수 있다.

생물학적 방법중 미생물을 이용하여 악취를 제어하는 목적으로서는 가축장기내의 미생물 상중 유익균의 인위적인 우점화를 통한 청정 축사 유도 및 육질 개선과 더불어 분뇨 처리 시 환경 오염을 최소화하는데 이용되고 있다.

Probiotics 생균제를 가축에게 급여시 가축의 장내에서 유익한 균을 증식시키고, 병원성 균을 억제시켜 가축의 장내 균총을 정상화시킨다. 일반적으로

많이 이용되고 있는 생균제는 유산균 류와 고초균 류와 효모류와 곰팡이 류로 나누어져있다.

특히, 생균제의 개발 연구 초기에는 증체량과 사료 요구율 개선과 같은 생산성 향상을 주요 목적으로 하는 연구들이 주류를 이루었으나, 최근 이러한 효과들과 함께 환경 친화적 효과에 관심이 집중되고 있다.

따라서 본 실험의 두 번째 목적은 축사 악취 성분 중의 하나인 암모니아를 효과적으로 제어 할 수 있는 미생물을 찾고 이 균을 제품화하는 목적이 있다.

### 3. 가금 티푸스 억제 미생물의 개발

1992년 8월 하순 우리나라에서 가금 티푸스가 경기도 김포군 소재 15만 수 규모의 산란계장에서 발생되어 거의 전국 일원으로 확산되었으며, 무더운 여름철에는 그 피해가 매우 심각한 양상으로 나타나지만, 점차 해를 거듭할수록 이병의 국내 오염이 증가함에 따라 다른 계절에서의 발생도 높아가는 추세에 있다. 이 병의 확산을 방제하기 위하여 백신이나 항균성 약제에만 의존했지만 방제가 매우 어렵다. 국내에서 발생하는 가금티푸스 원인 균은 병원성이 매우 강하며 한 번 발생한 농장은 거의 대부분의 경우 농장 내 닭이 모두 비위질 때까지 발생이 지속되어 각종 방역 수단을 동원한 사후 처리에도 불구하고 효과적인 단절에 실패하였다.

*Sal. gallinarum*을 비롯한 각종 살모넬라균의 시험관내 항균성 약제 감수성은 일반적으로 대장균을 비롯한 다른 장내 세균들과는 달리 국내 시판되고 있는 여러 조율의 항균제에 대하여 높은 감수성을 갖고 있어 초기에는 약제의 치료 효과가 높으나 재발 시 약제를 복합적으로 사용해도 치료효과가 오래 지속되지 않아 실제 생체 내 치료 효과는 상이한 경우가 허다하다. 따라서 매우 급성으로 진행되는 상황에서는 일반 세균성 질병에서와 같은 단순 치료로서는 일시적인 효과만을 기대할 수 있으며 특히 여름철의 더운 기온 하에서는 병계의 분변과 함께 배출된 *Sal. gallinarum*은 자연환경에서 증식되어 지속적인 오염의 원천이 되므로 세밀한 계획을 세워서 장기간에 걸친 약제의 투여가 요구되었는 상황이다.

그러나 최근 축산 선진 국가인 덴마크와 스웨덴과 네덜란드 등 일부 국

가에서는 육성 돈 및 비육 돈 그리고 젖소, 양계 등에 대한 항생제의 사용을 금지하는 등 가축에 대한 항생 물질의 이용을 심각하게 규제하고 있으며, 호르몬 제 사용도 금지하고 있고, 미국 식품 의약국(FDA)의 경우, 동물 성장 촉진용으로 페니실린이나 테라마이신 등 항생제 사용을 금지하고 있다. 또한 안전하고 위생적인 축산물에 대한 소비자의 욕구가 거세진데다가 정부 또한 검사 강화 방침을 세워 농축가들 스스로가 유해 물질 잔류에 대한 불안으로 항생, 항균제를 사용하는 대신 생균제를 사용한 제품에 대한 선호도가 증가되고 있다. 따라서 항생물질의 사용을 억제하고 *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Yeast* 등의 유용균을 함유한 생균제가 부각되기 시작하였다.

*Sal. gallinarum*에 의한 가금 티푸스의 방제대책으로 첫 번째 위생을 중점으로 하는 방법과 백신을 이용한 면역학적 방법 세 번째 생균제 투여에 의한 살모넬라의 경쟁적 축출이 있다.

생균제를 이용한 살모넬라의 경쟁적 축출 방법은 각종 유익 생균 배양액을 갓 태어난 병아리에 투여함으로써 이들 병아리의 장관내를 유익 세균 총으로 유도함으로써 이후 자연환경이나 사료로부터 감염되는 살모넬라의 장관 정착을 미리 방지하고자 하는 것이다. 현재 유럽 및 미국 등 선진 국가들에서 실제로 사용되고 있으며, 우리나라에도 이들 제품이 수입되어 일부 사용되고 있으나 아직까지 그 효용성이 미비한 실정이다.

따라서 본 실험의 세 번째 목적은 가금 티푸스 원인균인 *Sal. gallinarum*에 탁월한 방어 능력을 가진 균들을 탐색하여 제품화하는데 그 목적이 있다.



## 2절 연구 개발의 범위

축산 농가의 축사, 분변, 정화조에 서식하는 축사 파리를 구제하여 가축질병 예방과 축사 환경을 개선하기 위한 균주를 탐색·선발 및 산업화하여 축사위생 개선을 위한 환경 친화적인 미생물 제제를 개발하고자 하는 것이 우선 첫 번째 연구범위이며, 두 번째는 축산에서 가장 문제가 심각하게 대두되고 있는 것이 악취이다. 이러한 악취를 제거하기 위하여 분변 슬러지에 존재하는 휘발성 지방산을 이용하는 미생물을 선발하여 제품화하는데 있다. 세 번째 목표는 1992년 8월 하순부터 문제시되고 현재 산란계 농민의 가장 걱정거리 질병인 가금티푸스를 예방하기 위하여 *Sal. gallinarum*을 직접적으로 억제하는 미생물을 선발하여 산업화하는데 그 목적이 있다.

이 사업을 진행하기 위한 1단계 작업으로서 각 도의 축산 분변 slurry에 존재하는 균의 분포를 조사하고, 그중에서 파리 살충성 미생물과 휘발성 지방산 이용균과 항균 활성을 가진 미생물을 선별하였고, 2단계 작업으로 파리 살충성 미생물과 휘발성 지방산 미생물과 항균 활성을 가진 미생물들을 ICR 마우스에 안전성 실험을 시행하여 안전성과 사양 효과를 확인하였으며, 가금티푸스를 억제시키기 위하여 *Sal. gallinarum*을 사멸시키는 probiotic 균이 실질적으로 *in vivo* 실험에서도 가능한지 실험실 수준에서 산란계 초생추에 공격 접종하여 효과가 있다는 것을 증명하였으며, 3단계 작업으로 파리 살충성 미생물과 악취 제거 미생물과 가금티푸스 예방용 미생물을 제품화하기 위하여 가장 경제적으로 균을 생산하기 위한 생산 배지, 발효 공정, 건조 공정을 완성하였고, 각각 양돈과 양계에 사양 실험을 병행하여 효과를 검증하였다.

## 제 2 장. 국내외 기술개발 현황

### 1절 국내.외 관련분야의 기술 개발 현황

산업기술 정책 연구소(1998)에 의하면 국내에서 개발하려고 하는 환경 처리용 미생물 제제의 수준은 극히 저조하며 일반적인 사료 첨가제인 미생물에 의존하여 환경을 개선하려는 수준에 있으며, 외국 선진국의 경우에는 환경 적응성이 있고, 기능성이 뛰어난 유전자 재조합 미생물을 개발 환경을 개선하려는 움직임이 있으며, 특히 난 분해성 유기성 폐기물을 이용하는 재 조합 미생물을 개발하는 것에 중점적인 노력을 기울이고 있다(Table A).

현재, 미국, 일본등의 선진국에서는 *Bacillus thuringiensis*를 이용한 살충제 뿐만 아니라 곰팡이, 바이러스 제제등의 미생물 약제가 개발되어 상품화되고 있으며, 국내에서는 2종류의 *Bacillus thuringiensis*를 이용한 살충제가 사용되고있고, 생물 방제를 위하여 다양하게 연구되고 있다. 최근 국내에서도 *Bacillus* sp.를 이용한 새로운 농약을 개발하려고 하는 추세에 있다.

한국에서 제조 판매되고 있는 probiotics 미생물 제품은 Table B와 같으며, 외국 제품이 우리나라에 판매되고 있는 제품은 Table C와 같다. 이러한 제품들은 단독 균종 혹은 여러 가지의 균종을 혼합하여 제조 판매되고 있으며, 파우더 형태, 펠렛 형태, 그래놀 형태, 알약 형태, 반죽 형태로 가축에게 직접 경구 투여하거나 사료 혹은 물에 혼합하여 급여하고 있으며, 최근에는 갓 깨어난 병아리에게 공중 분사를 통하여 유산균을 급여한다.

Table A. Technical level of domestic and foreign on probiotic microorganism production

기술 및 전 망  기 술 분 야 명	개발동향		부족기술 (한국)	발전전망	
	선진국	한국		제품발전전망	기술발전전망
환경처리제	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 환경처리용 재조합 미생물 개발</li> <li>• 유기성 폐기물의 퇴비화 이용 개발</li> <li>• 난분해 폐수 처리제 실용화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 몇몇의 회사에서 보편적 사료첨가 미생물 환경처리제 시판</li> <li>• 개발 초기 단계</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 균주 개발 기술</li> <li>• 균주안정화 기술</li> <li>• 미생물 제제화 및 보관 기술</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고도 유기물 및 난분해성 화학물질 처리용 미생물 제제</li> <li>• 생활폐기물 미생물 이용기술 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유전자 재조합 기술</li> <li>• 미생물 고정화 기술</li> <li>• 퇴비화 기술</li> </ul>

Table B. Trade-mark and strain of probiotic microorganisms production made in domestic companies.

Microorganisms and componet	Companies	Trade-mark
<i>Bacillus subtilis</i> , phosphorus	한동	비타민-50
<i>Bacillus subtilis</i> , glucose	gksehd	아다폰 에프
<i>Bacillus subtilis</i>	삼화 동물 약품 상사	비에스케이
<i>Bacillus subtilis</i> , glucose	삼우화학공업	비오겐에스 가용산
<i>Bacillus subtilis</i> , cellulase, protease, $\alpha$ -amylase, $\beta$ -amylase, starch	삼우화학공업	비오겐
<i>Bacillus subtilis</i> , protease, lipase, glucose	삼우화학공업	비오겐아쿠아
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus lactis</i>	과학사료	비오메이트
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	한국 미생물 연구소	바이오슈퍼
<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>Bacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus delbreueck</i> , <i>Pichia farinosa</i>	진양환경산업	메가바이오
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Clostridium butyricum</i>	삼양약화학	비스라제-p
<i>Bacillus subtilis</i> , $\alpha$ -amylase, protease, cellulase	하나동물약품	액티제스트
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	우성양행	NB-슈퍼100
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	중앙바이오텍	Super CYC
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	중앙바이오텍	CYC

Table C. Trade-mark and strain of probiotic microorganisms produced in foreign companies.

Microorganisms and componet	Trade-mark	Companies
<i>L. acidophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> spp.	Probions	Pioneer Hi-Bred international
<i>L. acidophilus</i> , <i>S. faecium</i>	Culbac	Trans Agara Co
<i>L. plantarum</i> , <i>Lactobacillus</i> spp.	Feed-mate 68	Anchor-Labs,
S.fermentation residue, whey, corn extract	Biomax 40 TM	" "
<i>L</i> .fermentation product	Biofac	Peter Hand INC.
<i>L</i> .-fermentation product, <i>L. acidophilus</i>	Bacofemm	Commercial Sovlent Co.
<i>L.casei</i> <i>B. bifidum</i>	Primalac	Star labs.
<i>L. acidophilus</i> , <i>S. faecium</i> , <i>S. cerevisiae</i>	Lacto-Sacc	Alltech, Inc.
<i>S.cerevisiae</i> culture	Yea-Sacc	" "
<i>S.cerevisiae</i> culture	Diamond-V	Diamond V
<i>Bacillus cereus toyoi</i>	Toyocerin	Toyo Joso Co. Ltd.,
<i>Clostridium butyricum miyari</i>	미야리산	日本化學
<i>B.coagulans</i>	라구리스	三共, 日本
<i>B. subtilis</i> var. natto	구로겐	에사이, 日本
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	고구라구-B	日清化學, 日本
<i>S.faecalis</i> , <i>L. acidophilus</i>	비오헬민	武田藥品工業, 日本
<i>S.faecalis</i> Bio-4R	비란돌	코킹化學, 日本
<i>S.faecalis</i>	아마파드-KS	Amano製藥, 日本
<i>B.subtilis</i> , <i>A.oryzae</i>	Pitarigen-E.S.	乳兒化學工業, 日本

## 2 절 국내.외 기술 개발 현황에서 차지하는 위치

국내에서 축사 환경 개선용 미생물 제제가 많이 시판되고 있지만 실질적으로 농가가 직접적으로 피부로 효과를 느끼는 것은 부족하다. 이러한 대표적인 이유는 일반적인 환경에서는 아무런 스트레스 없이 잘 성장하던 세균이 축사환경에서 잘 적응하지 못하고 사멸하는 경우가 많으며 또한 축사에서 사용하고 있는 소독제와 사료에 들어있는 항균제가 환경 개선용 혹은 probiotics로 첨가된 생균제에 치사 독성을 일으켜 첨가된 생균제의 역할을 막는 경우가 많다. 그러나 이러한 항생제에 내성을 가진 생균제를 제조 급여하면 내성균들이 병원성 균에 대한 또다른 내성을 키울 수 있는 조건이 되어 항생제 내성 균주를 급여한다는 것은 큰 위험을 초래할 수 있다.

현재, 국내외에서 개발 판매 되고 있는 미생물 제제는 가축의 장내에서 장내 균총의 정상화로 영양분을 잘 소화하여 분변 배출량을 적게하고, 장내 분변 pH를 낮추어 악취를 유발 할 수 있는 유해 미생물의 성장을 억제하여 악취를 적게 생성해 파리의 유인을 막을 수 있는 방법을 택해왔다. 그러나 이것은 축사 파리를 구제하기 위한 간접적인 방법이다.

따라서 본 실험에서 파리 구제용 미생물 제제는 파리에 직접적으로 살충성이 있는 균주를 선발하였고, 그 균주가 가지고 있는 독소까지 규명하였으며, 실제로 축사에서 기생하고 있는 파리에 살충성이 강하며, 사료에 첨가하여 급여하였을 때 파리의 유인을 억제하는 것으로 나타났다. 축사 악취 제거 미생물 제제 또한 실질적으로 분변에서 암모니아를 제거하는 능력을 가진 것으로 조사되었으며, 대조구보다 실험구가 약 70%의 암모니아 수치를 감소시키는 것으로 나타났다. 이제품은 현재 개발된 제품의 작용 기작과는 다른 것으로 직.간접적으로 파리와 암모니아를 줄일 수 있는 획기적인 제품이다.

가금 티푸스는 서구 유럽에서는 잘 나타나지 않는 것으로 후진국형 양계 질병중의 하나이다. 이로 인하여 서구 유럽에서는 이병에 대한 약제가 크게 개발되어 있지 않으며, 실상 그다지 큰 관심을 기울이고 있지 않은 것 중의 하나이다. 그러나 동남아를 비롯한 우리나라 중국 일본에서 사육하고있는 양계의 90%이상이 가금 티푸스에 걸려있다고 해도 과언이 아니며, 이병으로 인한 손실이 크다. 현재 기술 수준상 우리나라가 가금 티푸스용 억제제를 제조하고자 하는 의욕이 높은 데도 불구하고 국내에서 유통되고있는 가금 티푸스 억제용 미

생물 제제는 가금 티푸스를 억제하지 못하고 있는 형편이다. 그러나 본제제를 가금 티푸스가 상재하고 있는 농장에 투여시 산란율이 크게 개선되고 폐사율이 줄었으며, 닭의 분변에서 검출되는 대장균의 수치가 낮아져 아주 효과가 큰 것으로 나타났고, 이 제품은 *Sal. gallinarum*을 완전히 사멸시키는 것으로 나타나 아주 획기적인 제품으로 생각된다.

## 제 3장 연구 개발 수행 내용 및 결과

### 제 1절 연구 내용

#### 1. 파리 살충성 미생물의 선발

##### 가. 균의 분리

##### 1) 분리 원

각 도의 축산 폐수, 파리 유충 사체, 퇴비, 갯벌, 토양, 벼의 왕겨, 돼지의 분변 시료로부터 균을 채취하였다.

##### 2) 살충성 균의 분리

축산폐수, 퇴비, 갯벌, 벼짚, 왕겨, 돼지의 분변 및 퇴비와 같이 부피를 측정할 수 있는 시료는 1ml을 채취하여 T3 배지에 넣어 진탕 배양하였으며, 파리의 사체와 유충 사체와 곤충의 사체는 자외선으로 2시간동안 골고루 조사한 다음 유충 1마리를 9ml의 T3 배지(Table 1)가 들어있는 시험관에 넣어 150 rpm에서 5시간동안 진탕 배양하였다. 그리고 60℃에서 10분간 열처리하고 상온에서 냉각시킨 후 내용물이 약간 가라앉을 때까지 기다린 다음 T3 agar 배지에 도말하여 30℃에서 2~3일간 배양하였다. 각각의 생성된 균락을 T3배지에 순수 배양하여 살충성 시험 균으로 선발하였다.

Table 1. Composition of T3 medium(g/L)

Ingredient	Contents
Tryptone	3.0
Sodium acetate	20.5
Tryptose	2.0
Yeast Extract	2.5
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	0.0075g

at pH 6.8± 0.2



## 나. 표준 균주의 분양

한국 유전자 은행(KCTC)으로부터 균주 3개를 분양 받고, 일본의 동경 치과 대학 위생학과에 근무하는 Hiroshi Maehashi 교수로부터 *B. thuringiensis aizawai* 균주 5개와 *B. moritai* 균주 1개를 분양 받았다.

## 다. 균의 보관

실험에 사용하기 전 모든 균은 TSA에 Glycerol 10%가 들어있는 배지 1ml을 냉동 바이얼에 넣어 무균적으로 접종한 다음 -78℃의 냉동고에 보관 하였다.

## 라. 집파리 성충 및 유충의 사육 환경

온도는 25℃ ~ 30℃ 항온실에서 습도 60 ~ 70%로 유지하였다. 조명은 명암을 반복하였고, 교미 및 산란 시(우화 5일 후)에는 하루종일 밝은 조건으로 하였다.

### 1) 집파리 성충 및 유충의 사육

#### (1) 성충의 사육

성충의 사육은 40cm 입방체의 철망 케이지를 이용하였으며, 성충의 영양 공급원은 전지분유와 흑설탕을 각각 사알렛에 넣어 주고, 물을 적신 탈지솜을 케이지의 윗면에 두어 수분을 공급하였다. 케이지에 사육하는 성충의 숫자를 대략 300 ~ 500마리로 적절하게 유지하였다.

#### (2) 유충의 사육

채란 이틀 후가 되면 알이 부화하여 1령 유충들이 생겨나기 시작하였으며, 파리 유충 치사율 조사에 이용될 2령 유충은 적절한 숫자를 유지하여 계속 사육하였다. 유충의 양이 너무 많거나, 번데기로 용화시킬 목적의 것은 다시 새로운 유충 사육 배지로 계대 하였다. 이 때는 가로 29cm, 세로 23cm, 높이 5cm의 스테인레스 용기를 사용하였다. 적절한 조건에서 2령 충은 약 1주일 후에 3령을 거쳐 번데기로 용화되는데 용화되기 전(3령 유충의 배부분에

서 배설물이 보이지 않고 맑은 윤기가 흐를때)에 철망(구경 3mm)을 이용하여 유충만을 따로 분리한 후 번데기(Pupa)가 형성되면, 성충 사육 케이지에 넣어주어 성충으로 우화시켰다. 그리고 유충의 사육 배지 조성은 표 2와 같다.

Table 2. Growth medium of house flies larvae

성분	합량
송아지 사료	200g
어분	5g
건조 효모	1g
증류수	200ml

## 2) 집파리의 채란

집파리의 유충을 획득하기 위하여 멸균된 어린 송아지 사료 40g과 멸균된 전지 분유 5g과 멸균된 어분 5g를 멸균된 물 40ml과 혼합 반죽하여 파리 사육 통에 넣어 1일 동안 방치한 후 파리 알을 받아 밖으로 꺼낸 다음 3일 동안 30℃에서 습도 70%에서 배양하였다.

## 3) 집파리 유충의 분리

송아지 사료와 함께 혼합되어 있는 파리 유충을 분리하기 위하여 스테인레스 스틸 그릇 위에 4mm 철망을 놓고 그 위에 파리 유충이 혼합되어있는 것을 부어 3시간 동안 방치하여 유충만을 분리하였다.

## 4) 파리 유충 사체의 분리

파리 유충 사육 중 상처를 입지 않고 자연적으로 치사된 유충들을 채취하였다.

## 5) 파리 유충 치사율 조사

유충 사육 배지 7g을 시험관(지름 45mm, 높이 71mm)에 넣고 T3 배지에서 배양된 시료 액 10ml을 첨가한 후 골고루 혼합하였다. 철망(구경 2mm)

을 이용하여 분리한 2령충 20마리씩을 용기에 넣고 윗 부분을 모기 망으로 막은 후, 유충이 모두 우화하여 성충이 될 때까지(10~15일) 25℃에서 60~70%의 습도를 가진 항온실에서 사육한 후 파리로 깨어나는 수를 계산하여 치사율을 구했으며, 모든 실험은 3반복하였다. 치사율 공식은 아래와 같다.

$$\text{치사율(\%)} = \frac{\text{최초 유충의 수} - \text{우화한 성충의 수}}{\text{최초 유충의 수}(20)} \times 100(\%)$$

## 2. 휘발성 지방산 제거 미생물의 선발

축 분뇨에서 성장하는 균을 1차 선발하였으며, 이 균이 황산화 배지(Table 3)와 질산화 배지(Table 4)와 암모니아 산화배지(Table 5)에서 잘 성장하는 것을 2차 선발하였다. 이렇게 선발된 균을 GC를 사용하여 휘발성 지방산의 감소 정도를 조사하였으며, GC의 분석 조건은 표 6과 같다.

Table 3. Medium composition for sulfur oxidizing microorganism

Compisition	Contents(g/L)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0
NH <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	0.4
MgCl <sub>2</sub>	0.2
FeSO <sub>4</sub>	0.01
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	8.0

Table 4. Medium composition for ammonium oxidizing microorganism

Compisition	Contents(g/L)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7
MgSO <sub>4</sub>	0.5
FeCl <sub>2</sub>	0.014
CaCl <sub>2</sub>	0.18
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 필터 멸균한것	0.5

Table 5. Medium composition for nitrite oxidizing microorganism

Compositon	Contents(g/L)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.7
MgSO <sub>4</sub>	0.1
NaHCO <sub>3</sub>	0.5
FeCl <sub>3</sub>	0.014
CaCl <sub>2</sub>	0.18
NaNO <sub>2</sub>	0.5

Table 6. Condition of gas chromatography for the assay of volatile fatty acids

Compositon	Contents(g/L)
Detector	Flame Ionization Detector(FID)
Colum	BP 20
Carrier gas	He, Air, H <sub>2</sub>
Oven temp.	70℃℃℃
Detector temp.	230℃
Injector temp.	230℃
Initial time	8 min
Ramp	20℃/min
Final temp.	230℃
Final time	6 min

### 3. 가금 티푸스(*Sal. gallinarum*)에 항균성 미생물의 선발

#### 가. 표준 균주의 분양

가금 티푸스 원인 균인 *Sal. gallinarum*을 수의 과학 검역원으로 부터 분양 받았다.

#### 나. 가금 티푸스 원인 균에 항균성 미생물의 선발

*Sal. gallinarum* 균에 항균성을 갖는 균의 선발은 시험 균을 각각 TSB에 접종하여 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 원심 분리하여 상등 액을

여과 멸균 후 0.5ml을 4ml 멸균 TSB배지에 첨가(10%)하여 *Sal. gallinarum*을 약  $1 \times 10^5$  cfu 접종하여 37°C에서 18시간 배양했을 때 *Sal. gallinarum*이 성장하지 못하는 균을 선발하였다.

다. 실험실 수준에서 *Sal. gallinarum*에 대한 방어 능력 시험

1) 1일령 갈색 산란용 병아리 72수를 36수씩 2개 시험 군으로 나누고 각 시험 군은 12수씩의 3개 반복 구로 다시 나누어 격리 사육용 isolator에 수용한다. 사료와 물은 시험 종료 시까지 무제한 급여하였다.

2) 시험 군 1의 병아리에는 1일령 부터 시험 종료 시까지 시험 제제를 0.4%농도로 사료에 섞어 투여하며 대조군은 시험 제제를 투여하지 않았다.

3) 14일령에 시험군과 대조군의 병아리는 *Sal. gallinarum* 야외 분리 주 99197(Ch3P3)로 수당  $10^8$  CFU씩 구강으로 공격 접종하였다.

4) *Sal. gallinarum* 공격 접종군은 공격 접종 10일 후(24일령)의 폐사율을 조사하였다.

#### 4. 선발 균의 In-vitro 간이 장내 유해 인자 생성 능력 조사

##### 가. Indole의 생성

MacFaddin(1980)의 방법에 따라 멸균된 1%의 Peptone수에 각각의 균을 접종하여 30°C에서 72시간 배양한 후 Kovac's시약(Table 7) 1ml을 가하여 혼탁한 다음 약 1분에서 10분 상온에 방치한 후, 분홍색을 띠면 양성, 색깔의 변화가 없으면 음성으로 판정하였다.

Table 7. Composition of Kovac's reagent

Composition	Contents
p-Dimethylaminobenazaldehyde	3g
Butanol	74ml
HCl	25ml

#### 나. Hydrogen sulfide(H<sub>2</sub>S)생성

MacFaddin(1980)방법을 변형하여 Kligler's Iron Agar(KIA)(Difco)에 배양 균을 접종한 다음 30°C에서 72시간 배양한후 Plate를 관찰하여 Plate의 색깔이 흑색이면 양성이고, 아무런 변화가 없으면 음성으로 판단된다.

#### 다. Butandiol과 Acetoin의 생성

MacFaddin(1980)의 방법을 이용하여 MRVP배지(Difco)에 균을 접종하여 30°C에서 48~72시간 동안 배양한 후 5% α-naphtol과 40% KOH용액 3ml을 가하여 밝은 분홍색이나 붉은 색이 나타나면 양성, 아무런 반응이 없으면 음성으로 판단한다. Bacillus 속 같은 경우에는 위양성을 방지하기 위하여 MRVP배지 성분 중 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>대신 NaCl을 배지에 첨가하여 배양하였다.

#### 라. β-hemolysis 반응

MacFaddin(1980)에 의하여 Sheep blood agar base(Oxoid)에 양피 5%를 첨가하여 평판 배지를 제조한 다음 각각의 균을 희석 배양하여 용혈 환이 생성되는지 조사하여 투명한 색 환이 생성되면 β-hemolysis라고 판정하고, 푸른색 환이 나타나면 α-hemolysis로 판정하고, 아무런 환이 생성되지 않으면 음성으로 판정하였다.

### 5. 분리 균의 동정

#### 가. 분리 균의 family 및 genus 동정

분리된 균을 동정하기 위하여 생화학적 실험은 다음과 같은 항목을 통하여 이분법으로 분류하였다. 그람 염색, morphology, catalase test, oxidase test, coagulase test, 포자 염색, 젤라틴 액화, 운동성, 산화 발효 실험, 색소 생성, arginine 이용성, 산소 요구성 실험, MacConkey medium 성장성, 유당 이용성, 질산 환원력, methyl red test, indole생성, urease 생성, methyl red vogues proskuer, β-hemolysis등의 생화학적 특성을 조사하였으며, Determination of systematic bacteriology(Buchanan과 Gibbons, 1986)와 MacFaddin(1980)과 Benson(1990)등의 방법에 따라서 동정하였다.

#### 나. Genus 및 Species 동정

Vitek kit와 api kit를 이용하였으며, 여기서 동정하지 못한 균주들은 16S rRNA 유전자 염기 서열을 이용하여 동정하였다.

#### 다. 16S rRNA 유전자를 이용한 균의 동정

16S rRNA 유전자 증폭을 위해 16S-F23 (ggcggcgtgcctaatacatgcaagtcg) (Ref), 16S-F310 (cggcccagactcctacgggaggcagca), 16S-R770 (gcgtggactaccagggtatctaacc) (Ref) 의 세가지 primer를 사용하였다. 94°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 40초간 annealing, 72°C에서 90초간 extension 의 과정을 30회 반복, 94°C에서 3분간 predenaturation, 72°C에서 10 분간 최종 extension하는 조건에서 유전자 증폭을 수행하였다. 증폭된 rDNA는 QuiaEx Gel Extraction Kit 에 의해 정제되었고, PE 377 DNA Sequencer에 의해 염기 서열을 결정하였다. 확인된 염기 서열은 Blast 프로그램을 이용해 GeneBank의 데이터 베이스와 비교하였다.

### 6. 마우스를 이용한 분리균의 간이 독성 실험과 사양 효과

#### 가. 마우스 종류 및 주령

ICR 마우스로 태어난 지 2주령 되는 것을 샘타코(삼육 실험 동물 연구소)로부터 분양 받아 실험 전 1주일 동안 적응을 시켰다.

#### 나. 마우스의 사육 환경

마우스의 사육온도는 21°C(±2)이었으며, 습도는 40~60%를 자동 조절하였고, 빛은 12시간씩 교대로 조절하였으며, 1개의 케이지에 4마리의 마우스를 넣어 집단 사육하였고, 마우스 케이지 내의 깔짚과 물과 사료는 3일에 한번씩 갈아주었고, 그때마다 체중을 측정하였다.

#### 다. 마우스의 사료 섭취량 및 실험 균주 접종

1일당 4마리의 마우스가 섭취하는 사료량은 15~20g/day이었으며, 사료의 1펠렛 당 약 2.5~3g 정도이었다. 실험 균주 접종량은 펠렛 사료에 균주 배양액 1.2ml을 사료 60g에 분주하여 사료 대비 균 접종액 0.2%가 되도록하여 약

20분가량 정치한 후 사료 급여 통에 투하하였다.

라. 일당 증체량

숙주 1마리가 1일당 증체된 양을 계산 측정하였다.

마. 사료 효율

사료 1kg이 숙주의 몸무게를 증가시키는 량

바. 사료 요구율

숙주의 체중 1kg을 증가시키는데 필요한 사료 량

사. 적혈구 수 계산

혈액 2 $\mu$ l을 400 $\mu$ l 희석 액(toluen blue 0.1%)에 희석 혼합한 후 Hematocount에 올려 현미경으로 직접 계수하여 나온 평균 값을 희석 배수 200을 곱하고, 눈금값 250을 곱하여 1 $\mu$ l당 적혈구 수치를 계산하였다.

아. 백혈구 수 계산

혈액 2 $\mu$ l을 400 $\mu$ l 희석액(Havem's solution)(table 8)에 희석 혼합한 후 Hematocount에 한 방울 떨어뜨린 후 현미경으로 직접 계수하여 나온 값을 눈금값 250을 곱하여 1 $\mu$ l당 백혈구 수치를 계산하였다.

Table 8. Havem's solution

Composition	Contents(g/100ml DW)
Mercuric chloride	0.25
Sodium chloride	0.5
Sodium sulfate	2.5

7. 분리 균주의 산업용 최적 배지 선정

가. CSL과 molasses의 농도 결정



분리된 균을 산업적으로 대량 배양을 하기 위하여 고가의 TSB배지를 대체할 수 있는 저렴한 가격의 CSL를 기본으로 한 산업용 배지를 검토하기 위하여  $MnSO_4$  0.004%,  $MgSO_4$  0.08%,  $KH_2PO_4$  0.4%,  $CaCO_3$  0.1%를 기본으로 함유한 배지에서 CSL농도와 molasses 농도를 1 ~ 4%로 조절하여 24시간 배양하면서 농도별 균의 생육 정도를 비교하였다.

#### 8. 제조 scale-up 공정 개발 및 생균제 시제품 제조

실험실 수준에서 선발한 산업용 배지를 사용하여 산업화를 위한 생산 시설에 적용하는 실험을 수행하였다. *Bacillus* spp. 현재 본사에서 생산하는 발효 및 건조 공정에 이를 적용하였는데 먼저, 2ℓflask에 400ml의 생산 배지에 균을 접종 후 12시간 동안 배양하고 20ℓ의 배지를 함유하는 30ℓ 발효기에 접종하여 9시간 동안 배양(1vvm, 250rpm, 37℃)하고 3톤의 발효기 1600ℓ배지에 접종하여 포자가 형성할 때(통상 20시간 이내)까지 배양(0.5vvm, 120rpm, 37℃)하였다. 배양 균액을 곡물가루(옥수수 분, 탈지강, 밀기울)에 4 : 5의 비율로 혼합한 후 수분 함량이 10%정도까지 케비넷 건조기에서 열풍 건조(45℃)한 후 20kg씩 포장하였다.

#### 9. 생균제 시제품의 산업적 특성 조사

##### 가. 내산성 조사

생균 곡물 제제 1g( $10^{8-9}$ CFU/ml)을 멸균된 증류수 9ml(pH 2)에 첨가하여 37℃의 항온 배양기에서 30분 동안 방치한 후 10배의 희석 배수로 연속 희석하여 TSA배지에 도말하여 37℃배양기에서 배양하여 성장하는 균락 수를 계산하여 산에 대한 내성을 조사하였다.

##### 나. 내 담즙성 조사

생균 곡물 제제 1g을 9ml의 0.03% Oxgall 용액에 첨가하여 37℃의 항온 기에서 30분 동안 방치한 후 10배의 희석 배수로 연속 희석하여 TSA배지에 도말하여 37℃배양기에서 배양하여 성장하는 균락 수를 계산하여 담즙 내성을 조사하였다.

#### 다. 내열성 조사

생균 곡물 제제 1g을 9ml의 TSB배지에 첨가하여 75°C의 항온기에서 30분 동안 방치한 후 10배의 희석 배수로 연속 희석하여 TSA배지에 도말하여 37°C배양기에서 배양하여 성장하는 균락 수를 계산하여 내 열성을 조사하였다.

### 10. 파리 살충성 및 환경 미생물 제제의 돼지 급여 효능

#### 가. 생균제의 제조 및 투여

##### 1) 생균제의 배양 및 제조

*Bacillus* spp.는 산업용 최적 배지를 사용하여 1vvm의 공기가 흐르는 30 liter 배양기에서 37°C에서 250rpm으로 균을 배양하여 최종적으로 *Bacillus* spp. 균이 포자를 완전히 형성한 후 곡물과 혼합하고 45°C에서 열풍 건조하여 수분 함량이 약 10%되게 하였다. 제조된 각각의 균들을 비율로 혼합하여 20kg씩 포장하였다.

##### 2) 생균제의 투여

사료 첨가용 생균제의 투여 용량은 양돈장에서 일령에 맞추어 급여하는 일반 양돈용 시판 사료에 사료 톤당 2 ~ 4kg(0.2 ~ 0.4%)용량으로 첨가하여 실험에 사용하였다.

#### 나. 생균제 급여 농가의 선택 조건

돼지의 이동이 거의 없는 슬러지 식 평사에 각각의 돈사와 돈사가 가능한 멀리 떨어져 있고, 창문이 많이 없는 돈사를 택하였다. 왜냐하면 현대 양돈은 Cage식 자동화 시스템으로 인하여 cage 바닥의 견고하지 못함 때문에 성장 단계에 따라서 옮겨다니게 되고 또한 각 돈방의 사료 급여량을 잘 조사할 수 없을 뿐만 아니라 암모니아와 파리 산란 율을 조사할 수 없다. 본 실험의 생균제 효능 실험을 위한 양돈장은 all in & all out방식을 통하여 비육 사육하는 약 1,500두의 사육 규모를 가진 경남 산청의 박종렬씨 농장을 선택하여 실시하였다.

#### 다. 시험 두수 및 일령

자돈 일령부터 비육 말기 일령 까지 투여 효능기간은 60일간이었으며, 효능 실험 두수는 80마리로 급여구와 비 급여구로 완전 분리 돈사에서 실험을 실시하였다.

#### 라. 파리 살충성 및 환경 미생물 제제의 돼지 급여 효능

##### 1) 체중 측정

본 실험에서는 무리별로 체중을 측정하였으며, 체중 측정은 개시 체중과 종료 체중을 측정하여 일당 증체량을 계산하였다.

##### 2) 총 사료 섭취 량 측정

사료 섭취 량의 측정은 개체별로 섭취량의 측정이 불가능하므로, 개체 체중 측정시 각 돈사별로의 사료 섭취량을 계산하였다. 사료 급여는 무제한 급여기를 통하여 공급하며 매일 사료 포대 수를 기록하였다. 돼지들의 습식으로 인한 사료가 바닥에 흐트러지는 양도 돼지가 섭취한 양으로 계산하였다.

##### 3) 일당 증체 량

종료 체중에서 개시 체중을 뺀 것을 시험 일수와 시험 두수로 나누어 계산하였다.

##### 4) 사료 요구 율

본 실험에서의 사료 요구 율은 시험기간 중의 총 사료 섭취 량을 총 증체량으로 나누어서 계산하였다.

##### 5) 파리 발생 율

가) 파리 사육 배지에 미생물제제 0.2% 직접 혼합시 파리의 발생 율

파리 사육 배지에 각 미생물 제제 0.2%를 혼합한 것을 파리 암수 20쌍을 망사 케이지에 넣어 24시간 동안 산란을 유도한 후 28℃ 인큐베이터에서 부화를 시킨 후에 파리의 사육 방법과 동일하게 성충의 출현 수를 조사하였다.

나) 양돈 사료에 미생물제제 0.2%를 혼합 급여한 후 분변에서의 파리 발생을

양돈 사료에 미생물 제제 0.2%를 혼합하여 매일 급여한 후 그 분변을 받아 파리 사육 케이지에 파리 암,수 100쌍을 넣어 24시간 동안 산란을 유도한 후 28℃ 인큐베이터에서 부화를 시킨 후에 파리의 사육 방법과 동일하게 성충의 출현 수를 조사하였다.

다) 양돈 사료에 미생물제제 0.2%를 혼합 급여한 후 분변의 파리 유인 효과

위의 방법과 마찬가지로 양돈 사료에 미생물 첨가제를 0.2%를 혼합하여 매일 급여한 후, 그 분변을 받아 실험실로 신속하게 이송하여 파리 암수 100마리씩을 넣어 파리의 유인효과를 분석하였다.

#### 6) 돈 분에서 암모니아 발생을

돈사 바닥에서 돼지의 코 높이 정도인 45cm에서 암모니아 농도 측정기구인 gaskit으로 실험 기간 동안 6회에 걸쳐 측정하였다. 매 측정 시간은 새벽 6시이었다.

#### 7) 통계 분석

파리 살충성 미생물의 파리 살충성에 대한 통계 처리는 다중 검정 방법인 Duncan's multiple range test로 수행하였다.

### 11. 가금 티푸스(*Sal. gallinarum*)에 항균성 생균제의 급여 효능

#### 가. 생균제의 배양 및 제조

*Bacillus* spp.는 산업용 최적 배지를 사용하여 1vvm의 공기가 흐르는 30 liter 배양기에서 37℃에서 250rpm으로 균을 배양하여 최종적으로 *Bacillus* spp. 균이 포자를 완전히 형성한 후 곡물과 혼합하여 45℃의 열풍 건조기에서 건조시켜 수분 함량이 10%가 되게 하였다. 그리고 유산균의 일종인 *Lactobacillus paracasei* Gu 2는 *Bacillus* spp. 배양 공법과는 완전히 다르게 산소를 요구하지 않으므로 37℃에서 rpm이 거의 없는 상태에서 정지 배양하였으며 위와 같이

건조 후 각각의 건조 균을 같은 비율로 혼합하여 20kg씩 포장하였다.

#### 나. 생균제의 투여

양계 사료 첨가용 생균제의 투여 용량은 양계장에서 닭의 사육 일령에 맞추어 사료 톤당 2kg(0.2%)용량으로 첨가하여 실험에 사용하였다.

#### 다. 생균제 급여 농가의 선택 조건

가금 티푸스를 앓고 있는 양계장이며, 산란수를 정확히 기재하고 계분을 매일 치우는 농가를 선택하였다. 실험에 사용된 농가는 경기도 화성시 발안읍 독정리에서 7만수를 사육하는 삼주 농장이다.

#### 라. 시험 두수 및 일령

투여 효능기간은 90일간이었으며, 효능 실험 두수는 1동은 약 10,000수이었고 투여 효과는 투여 전을 대조구로 설정하고 투여 후의 효과를 측정하고자 하였다.

#### 마. 시험 농가에서 분리한 대장균의 항생 물질 내성 검사

##### 1) 표준 항생 물질 내성 검사

Difco사에서 판매되고있는 표준 항생 물질 내성 시험용 disc paper를 구입하여 분변에서 분리한 대장균에 대한 내성 정도를 조사하였다.

##### 2) 시판 중인 동물용 의약품 시판용 항생물질 내성 검사

현재 동물용으로 판매되고있는 음수 투여용 항생제와 사료 첨가용 항생제 8개를 구입하여 사용 권장량의 0.25배에서 10배까지 구배하여 분변에서 분리한 대장균의 내성 정도를 조사하였다.

#### 바. 생균제 급여 효능 분석

##### 1) 산란율

초산을 시작한 산란계 수에 대한 일일 산란 수를 나눈 값을 취하였다.

## 2) 폐계율

산란을 시작한 동의 전체 마리수에서 일일 폐사되는 마리수를 나눈 값을 취하였다.

## 3) 장내 균총

실험 개시 후 1주일에 한번씩 총 14회에 걸쳐 분변을 채취하여 장내 세균을 검색하였다. *Salmonella*와 *Shigella*선택배지인 SS 배지(Difco)와 *Lactobacillus* 선택배지인 *Lactobacillus* MRS 배지(Difco), 일반 대장균 선택 배지인 MacConkey agar(Difco)와 총 세균수 측정용인 Standard plate count agar(Difco)를 이용하여 장내 세균 총을 검색하였다.

## 제 2절 연구 결과

### 1. 각 지방의 축산 폐수로부터 분리된 균의 분포도 조사

#### 가. 경기도 지방의 축산 폐수로부터 호기성 균의 분포도 조사

경기도 지역에서 요로 법으로 양돈업을 경영하고 있는 농장 5곳의 정화조 노 탱크로부터 시료를 채취하여 균속 및 균종의 분포도를 조사하였다. 채취한 시료 1ml을 TSA-YE(0.6%)에 도말 한 후 37℃에서 72시간 동안 배양하여 생성된 균락 141개를 선발하여 동정한 결과는 표 9와 같다.

분리 균주 중 *Bacillus* spp.가 68%를 차지하였고 그중 *Bacillus sphaericus*가 38%를 점유하고 있었다(Table 9 & 10). 여기서 우리가 유심히 관찰할 수 있었던 것은 채취한 농장의 환경이 깨끗하고 파리과 모기가 없는 곳일 수록 *Bacillus* spp.의 점유율이 높았다.

Table 9. Distribution of microorganism isolated from animal farm waste of KyongKiDo province

Strain	No. of isolates(%)
<i>Bacillus</i> spp.	95(68)
<i>Corynebacterium</i> spp.	9(7)
<i>Microbacterium</i> spp.	7(5)
<i>Pseudomonas</i> spp.	6(4)
<i>Pasterurella</i> spp.	6(4)
<i>Yersinia</i> spp.	4(3)
<i>Flavobacterium</i> spp.	4(3)
<i>Staphylococcus</i> spp.	2(1)
<i>Acinetobacter</i> spp.	2(1)
<i>Klebsilla</i> spp.	1(1)
<i>Acromonas</i> spp.	1(1)
Total	141(100)

Table 10. Distribution of *Bacillus* spp. isolated from animal farm waste of Kyong-Ki-Do province

<i>Bacillus</i> spp.	No. of isolates(%)
<i>B. sphaericus</i>	38(38)
<i>B. coagulans</i>	15(16)
<i>B. thuringiensis</i>	13(14)
<i>B. subtilis</i>	13(14)
<i>B. cereus.</i>	2(2)
<i>B. polymayxa</i>	2(2)
Unidentified <i>Bacillus</i> spp.	8(13)
Total	95

나. 경상도 지방의 축산 폐수로부터 호기성 균의 분포도 조사

경상도 지역 양돈장(정체된 정화조 폐수) 5곳에서 돈 분뇨 슬러지를 채취 하여 균의 분포도를 조사한 결과는 아래의 표 11과 같다.

경기도 지역의 호기성 정화조 상태와는 비교되게 *Bacillus* spp.의 점유율 (12%)이 낮았으며 *Escherichia* spp.가 28%를 차지하여 제일 높게 나타났고 대부분의 균주가 그람 음성 균이었다(Table 12). 이곳의 농장들은 대부분 아주 심한 악취를 풍기고 있었다.

Table 11. Distribution of microorganisms in the animal farm wastes of GyungSangDo

Strain	No. of isolates(%)
<i>Escherichia</i>	28(28)
<i>Corynebacterium</i>	18(17)
<i>Bacillus</i>	12(12)
<i>Microbacterium</i>	6(6)
<i>Lactobacillus</i>	5(5)
<i>Staphylococcus</i>	5(5)
<i>Enterococcus</i>	4(4)
<i>Streptococcus</i>	3(3)
<i>Aerococcus</i>	3(3)
<i>Acinetobacter</i>	2(2)
Total	104(100)



Table 12. Distribution of *Bacillus* spp. in the animal farm wastes of GyungSangDo

<i>Bacillus</i> spp.	No. of isolates(%)
<i>B. stearothermophilus</i>	3(25)
<i>B. subtilis</i>	2(17)
<i>B. pumilus</i>	2(17)
Unidentified <i>Bacillus</i> spp.	5(41)
Total	12(100)

다. 전라도 지방의 축산 폐수로부터 호기성 균의 분포도 조사

전라도 지역의 잘 정돈된 양돈장 6곳에서 돈 분뇨 슬러지를 채취하여 100개의 균을 분리하여 균종의 분포도를 조사하였다. 표 13에서 보여주는 바와 같이 *Bacillus* spp.가 42%이었고, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*와 *Aeromonas*가 각각 25%, 15%, 14%, 2%, 1%, 1%씩 나타났다.

분리된 *Bacillus* spp.의 분포율은 *Bacillus subtilis*가 18개로 42.8%를 차지하였으며, *B. stearothermophilus*, *B. sphaericus*, *B. alcalophilus*와 *B. pumilus*의 순으로 각각 10(23.8%), 5(12%), 3(7.1%), 1(2.3%)로 나타났으며, 동정되지 않은 *Bacillus* spp.도 5개로 12%를 차지하였다(Table 14).

라. 충청도 지방의 축산 폐수로부터 호기성 균의 분포도 조사

충청도 지역의 잘 정돈된 양돈장 7곳에서 154개의 균을 분리하여 균종의 분포도를 조사하였다. 표 15에서 보여주는 바와 같이 *Bacillus* 51개로 33.1%의 점유율을 보였으며, *Corynebacterium* 31%, *Lactobacillus* 15%, *Escherichia* 7%, *Staphylococcus* 6%, *Streptococcus* 3%, *Microbacterium* 3%, *Flavobacterium* spp. 2%로 검출되었다.

이 중 *Bacillus* spp.의 분포율은 표 16에 보여주는 바와 같이 *B. sphaericus*가 가장 많은 25.4%의 점유율을 나타내었다. 이것은 경기도 지방에서 분리하였던 순위와 비슷하며 분리되는 균주도 비슷한 양상을 보였다.

Table 13. Microflora isolated from the animal farm manure of JunRaDo.

Strain	No. of isolates(%)
<i>Bacillus</i> spp.	42(42)
<i>Corynebacterium</i> spp.	25(25)
<i>Lactobacillus</i> spp.	15(15)
<i>Aerococcus</i> spp.	14(14)
<i>Enterococcus</i> spp.	2(2)
<i>Acinetobacter</i> spp.	1(1)
<i>Aeromonas</i> spp.	1(1)
Total	100(100)

Table 14. Distribution of *Bacillus* spp. isolated from the animal farm manure of JunRaDo.

Strain	No. of isolates(%)
<i>B. subtilis</i>	18(42.8)
<i>B. stearothermophilus</i>	10(23.8)
<i>B. sphaericus</i>	5(12)
<i>B. alcalophilus</i>	3(7.1)
<i>B. pumilus</i>	1(2.3)
<i>Unidentified Bacillus</i> spp.	5(12)
Total	42(100)

Table 15. Microflora isolated from the animal farm manure of ChoongChungDo

Strain	No. of isolates(%)
<i>Bacillus</i> spp.	51(33.1)
<i>Corynebacterium</i> spp.	48(31.2)
<i>Lactobacillus</i> spp.	22(14.2)
<i>Escherichia</i> spp.	11(7.2)
<i>Staphylococcus</i> spp.	9(5.9)
<i>Streptococcus</i> spp.	5(3.2)
<i>Microbacterium</i> spp.	5(3.2)
<i>Flavobacterium</i> spp.	3(2)
Total	154(100)

Table 16. Distribution of *Bacillus* spp. isolated from animal farm manure of ChoongChung-Do

Strain	No. of isolates(%)
<i>B. sphaericus</i>	13(25.4)
<i>B. thuringiensis</i>	5(9.8)
<i>B. subtilis</i>	4(7.9)
<i>B. alcalophilus</i>	3(5.9)
<i>B. pumilus</i>	3(5.9)
<i>Unidentified Bacillus</i> spp.	23(45.1)
Total	51(100)

마. 강원도 지방의 축산 폐수로부터 호기성 균의 분포도 조사

강원도 지역의 양돈장 8곳에서 무작위로 시료를 채취한 다음 207개의 균을 Random하게 분리하여 균종의 분포도를 조사하였다(Table 17). *Bacillus*균종이 39.2%로 가장 높은 비율을 차지하였으며, *Alcaligenus*가 31.9%, *Pseudomonas* 6.4%, *Escherichia* 7%, *Flavobacterium* 7%, *Sarcinia* 1.4%, *Eripelithrix* 1.4%, *Acinetobacter* 0.9%, Yeast 0.9%로 분리되었으며, 동정되지 않는 그람 음성균이 8.7%이었고, 동정되지 않는 그람 양성균이 2.4%이었다. *Bacillus* 균이 우점하는 현상은 다른 곳에서 분리되는 것과 거의 일치하나, *Acaligenus*균이 차기 우점하는 것은 다른 지역에서 분리되는 양상과 다르게 나타났다. 분리된 *Bacillus* spp.중 *B. subtilis*가 가장 많은 28개로 34.6%를 차지하였으며, *B. circulans*가 17개(21%), *B. licheniformis* 8(9.8%), *B.sphaericus* 7(8.6%), *B. thuringiensis* 6(7.5%), *B. firmus* 2(2.5%), *B. megaterium* 2(2.5%), *B. anthracis* 2(2.5%), *B. polymyxa* 1(1.2%)이었으며, 동정되지 않은 균주가 8개로 9.5%이었다(Table 18).

Table 17. Microflora isolated from the animal farm manure of GangWonDo

Strain	No. of isolates(%)
<i>Bacillus</i>	81(39.2)
<i>Alcaligenus</i>	66(31.9)
<i>Pseudomonas</i>	13(6.4)
<i>Escherichia</i>	7(3.4)
<i>Flavobacterium</i>	7(3.4)
<i>Sarcinia</i>	3(1.4)
<i>Eripelithrix</i>	3(1.4)
<i>Acinetobacter</i>	2(0.9)
Unidentified gram negative microorganism	18(8.7)
Unidentified gram positive microorganism	5(2.4)
Yeast	2(0.9)
Total	207(100)

Table 18. Distribution of *Bacillus* spp. isolated from the animal farm manure of GangWonDo

Strain	No. of isolates(%)
<i>B. subtilis</i>	28(34.6)
<i>B. circulans</i>	17(21.0)
<i>B. licheniformis</i>	8(9.8)
<i>B. sphaericus</i>	7(8.6)
<i>B. thuringiensis</i>	6(7.5)
<i>B. firmus</i>	2(2.5)
<i>B. megaterium</i>	2(2.5)
<i>B. anthracis</i>	2(2.5)
<i>B. polymyxa</i>	1(1.2)
<i>Unidentified Bacillus spp.</i>	8(9.8)
Total	81(100)

## 2. 파리 유충 살충성 균의 선발 및 치사율 조사

### 가. 분리 원으로부터 살충성 미생물의 분리

돼지 및 소 닭의 분변 등으로부터 935개의 균을 분리하여 살충성 실험을 하였다.

### 나. 화학 살충제의 파리 유충 치사율 조사

화학 살충제로서 알려진 Larvicide와 Cyperkiler를 사용하여 파리 유충에 미치는 치사율을 조사하였다. Larvicide 0.0001%가 첨가된 시험군에서는 100%의 치사율을 가졌으며, Larvicide 0.00005%에서는 97.5%, Cyperkiller 3.6%첨가된 군에서는 95.0%, Cyperkiller 1.8%첨가된 군에서는 치사율이 87.5%이었다. 화학 살충제의 효과는 탁월하게 우수하였다(Table 19).

Table 19. Effects of chemical insecticides on house flies larvae

Sample	Note	House fly	Pupa	Death larvae	Death rate
Larvicide(0.07g)	0.0001% Cyromazine <sup>1)</sup>		13.5	6.5	100%
Larvicide(0.03g)	0.00005% Cyromazine	1	18.5		97.5%
Cyperkiller(0.1g)	3.6% Cypermethrin <sup>2)</sup>	8.5	4	6.5	95.0%
Cyperkiller(0.05g)	1.8% Cypermethrin	2.5	10.5	4.5	87.5%

<sup>1)</sup> 1% Cyromazine(2-Cyclophlamino-4,6-diamino-s-triazine)

<sup>2)</sup> 25% Cypermethrin.

#### 다. 표준 균의 치사율 조사

모기, 나방, 파리에 치사 효과를 가졌다고 보고된 표준 균주 9개를 집중하여 파리 유충에 대한 치사율을 조사한 결과 *B. moritai*(50%)와 *B. thuringiensis aizawai* 4J3(60%)을 제외하고는 효과가 거의 없었다(Table 20).

Table 20. Effects of standard microorganism on house flies larvae

<i>Bacillus</i> spp.	Death rate % (S <sup>2</sup> )
<i>B. thuringiensis aizawai</i> 4J1	10(10.0)
<i>B. thuringiensis aizawai</i> 4J5	10(10.4)
<i>B. moritai</i>	50(5.00)
<i>B. thuringiensis aizawai</i> 4J4	18.3(12.5)
<i>B. thuringiensis KCTC</i> 1034.	36.6(7.63)
<i>B. thuringiensis KCTC</i> 1507	13.3(2.88)
<i>B. thuringiensis KCTC</i> 1510	16.6(2.88)
<i>B. thuringiensis aizawai</i> 4J3	60(5.0)
<i>B. thuringiensis aizawai</i> 4J2	26.6(15.27)

S<sup>2</sup>= Standard deviation

### 라. 분리 균주의 파리 유충 치사율 조사

1,2차 년도를 통하여 분리된 균 중 파리 유충 치사율이 평균 약 50%를 상회하는 균을 총 26개 분리하였으며, 각각의 균에 대한 치사율은 표 21과 같다.

### 3. 선발된 미생물의 특성 및 동정

이러한 미생물을 동정한 결과 표 22와 같은 결과를 얻을 수 있었고, 1, 2차 연도에서 선발된 균주 26개를 가지고 2차 선발 작업을 거쳐 최종적으로 재반복 실험하여 *Bacillus* 속 4개를 살충성 미생물로 최종 선발하였다(Table 23). 4개의 *Bacillus* spp. 중 *Bacillus sphaericus* Gu 1-2는 집파리 유충의 장내에서 분리한 것이고(Fig. 1), *Bacillus thuringiensis* F 2는 충청도 증평군의 한우 분변에서 분리하였으며(Fig. 2), *Bacillus licheniformis* M 10(Fig. 3)와 *Bacillus thuringiensis* wang 4은 돼지의 폐수 슬러지 분뇨에서 분리한 것이다(Fig. 4).

Table 21. Fly-killing effects on house flies larvae of selected isolates

Source	Isolates	Death rate % (S <sup>2</sup> )
House flies larvae	3-1(1T)	73.3(22.54)
	1-2(2T)	62.5(10.60)
Swine fecal	사 4	76.6(23.62)
	사 5	53.3(22.54)
	전라 1-8	50.3(11.63)
	충청 3-9	51.1(16)
	충청 6-21	62.2(15.12)
	충청 5-13	61.4(14.6)
	강원 2-2	55.0(18.5)
	강원 7-5	52.7(8.7)
Cattle fecal	왕 4	53.3(30.13)
	아 2	55.0(35.00)
	아 4	50.0(31.22)
Fowl fecal	나 3	48.3(22.54)
	나 4	53.3(20.20)
Swine waste water	의령 5	60.0(14.14)
	의령 10	60.0(21.79)
	진주자돈사 2	53.3(17.55)
	육슬 1	58.3(25.65)
	자돈 4	56.6(20.20)
	고육평 1	55.0(21.79)
	의령 1	67.5(17.67)
Rice hulls	합천 1-1	65.0(10.33)
Straw	합천 3-3	55.3(14.60)
Muck	몽산포 3	53.3(11.83)
	몽산포 5	60.5(20.40)

S<sup>2</sup>= Standard deviation



Table 22. Characteristics and identification of insecticidal isolates

Isolates	Safety test of selected strain					Strain
	$\beta$ -hemolysis	H <sub>2</sub> S	Indole	Butanediol	Acetoin	
3-1(1T)	-	-	-	-	-	UD
1-2(2T)	-	-	-	-	-	<i>B. sphacricus</i>
왕 4	w	-	-	-	-	<i>B. subtilis(globigii)</i>
사진 5	w	-	-	-	-	<i>B. thuringiensis</i>
전라 1-8	w	-	-	-	-	<i>B. subtilis(globigii)</i>
충청 3-9	-	-	+	+	-	UD
충청 6-21	-	-	-	-	-	<i>Bacillus</i> sp.
충청 5-13	-	-	+	-	+	UD
강원 2-2	-	-	+	+	-	UD
강원 7-5	w	-	-	-	-	<i>B. thuringiensis</i>
왕자 4	-	-	-	-	-	<i>B. thuringiensis</i>
아 2	-	-	-	-	-	UD
아 4	-	-	-	-	-	<i>B. subtilis(globigii)</i>
나 3	-	-	-	-	-	UD
나 4	-	-	-	-	-	<i>B. pumilus</i>
의령 5	-	-	+	-	-	UD
의령 M 10	-	-	+	+	-	<i>B. licheniformis</i>
진주자돈사 2	-	-	-	+	-	UD
육슬 1	-	-	+	-	-	<i>Erysipelothris</i>
자돈 4	-	-	+	+	-	<i>Acineto. iwoffii</i>
고육평 1	w	-	+	+	-	<i>Acineto. innffii</i>
의령 1	+	-	+	+	+	<i>E. coli</i>
합천 1-1	-	-	-	-	+	<i>B. thuringiensis</i>
합천 3-3	-	-	-	+	-	UD
몽산포 3	-	-	+	-	-	<i>Halophilic</i> sp.
몽산포 5	-	-	-	+	+	UD

UD = Unidentified, W = Weak

Table 23. Final selection of fly-killing isolate

Strain	Death rate %(S <sup>2</sup> )
<i>Bacillus thuringiensis</i> Wang 4	69.3(18.5)
<i>Bacillus thuringiensis</i> F 2	72.1(20.2)
<i>Bacillus licheniformis</i> M 10	67.8(18.3)
<i>Bacillus sphaericus</i> Gu 1-2	61.0(14.3)

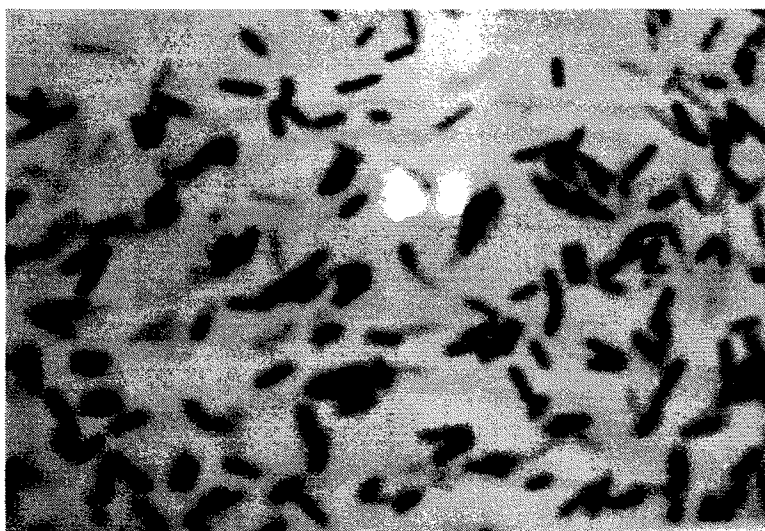


Fig. 1. Microscope picture of *Bacillus sphaericus* Gu 1-2( $\times 1,000$ )

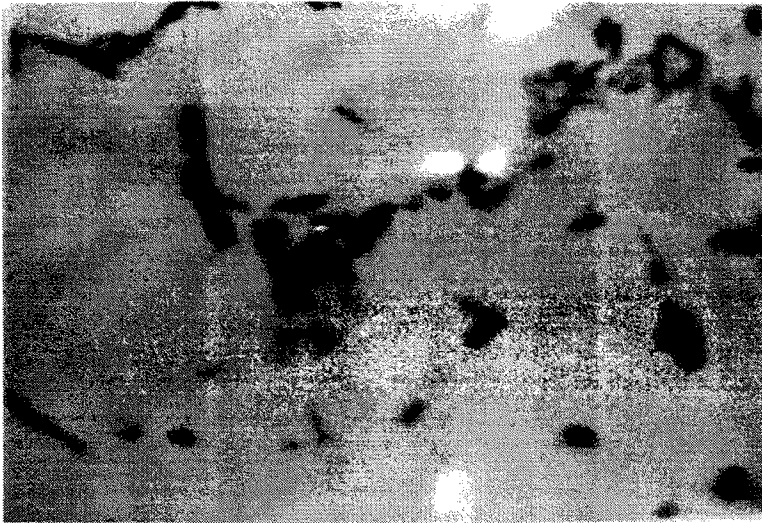


Fig. 2. Microscope picture of *Bacillus thuringiensis* F 2

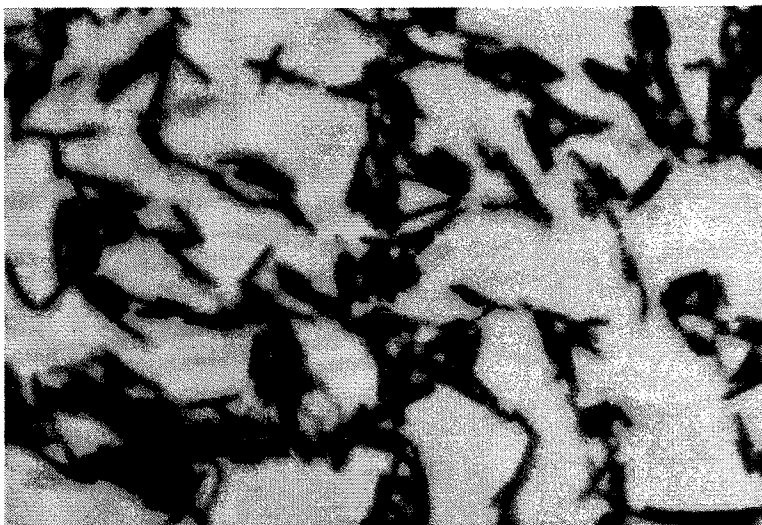


Fig. 3. Microscope picture of *Bacillus licheniformis* M 10

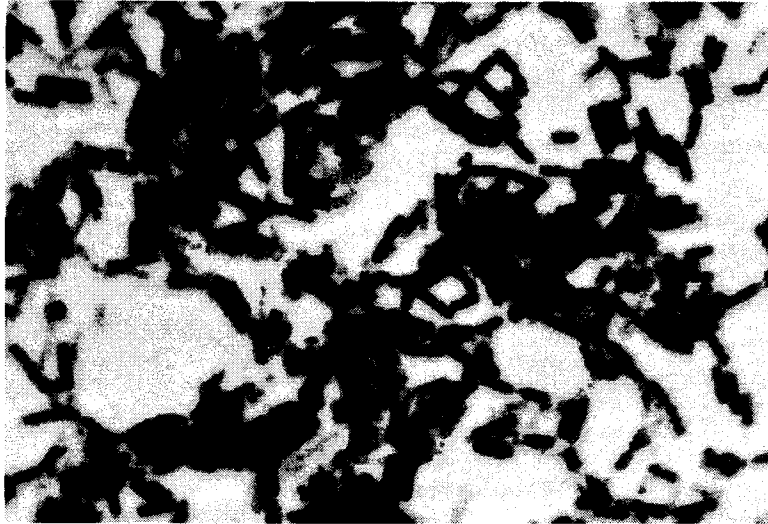


Fig. 4. Microscope picture of *Bacillus thuringiensis* wang 4

#### 4. 악취 제거 미생물의 선발

축산에 있어서 파리와 더불어 가장 문제시되고 있는 것이 악취이다. 악취의 원인은 ammonia, sulfide, skatole, indole, cresol, 휘발성 지방산등이 있고, 이처럼 축 분뇨에서 발생된 악취를 제어하기 위하여 미생물의 개발이 진행되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 휘발성 지방산 감소 효과가 뛰어난 미생물들을 분리하였다.

##### 가. 선발 기준

분리 보관하였던 균 중 돼지 분뇨 배지에서 성장하는 균을 1차 선발하였으며 이 균이 황 산화 배지와 질산화 배지와 암모니아 산화배지에서 잘 성장하면 2차 선발하였다. 이렇게 선발된 균을 GC를 사용하여 휘발성 지방산을 얼마 감소시키는지 정량 조사하였다.

돈분 슬러리 평판배지에 각각의 균을 접종한 다음 30℃에서 48시간 동안 배양한 후 성장한 균 83개를 1차 선발하였다. 이 균을 황 산화 선택 평판 배지

와 질소 산화 선택 평판 배지와 암모니아 산화 선택 평판 배지에 균을 도말하여 30℃에서 48시간동안 배양하여 성장한 균 12개를 2차 선발하여 황 산화 broth와 암모니아 산화 broth와 질산화 broth에 접종하여 30℃에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후 OD를 측정하여 가장 농도가 짙은 균 3개를 선발하여 동정한 결과 돈 분뇨에서 분리한 *B. licheniformis* KJ 12(Fig. 5)와 *B. subtilis* SUN 2(Fig. 6), 그리고 퇴비에서 분리한 *Al. feacalis* JTJ 18(Fig. 7)로 나타났다 (Table 24).

Table 24. Disodorance bacteria growing in piggery slurry

Source	Strains
돈분뇨	<i>B. licheniformis</i> KJ 2
퇴비	<i>Alcaligenes feacalis</i> JTJ 18
돈분뇨	<i>B. subtilis</i> SUN 2

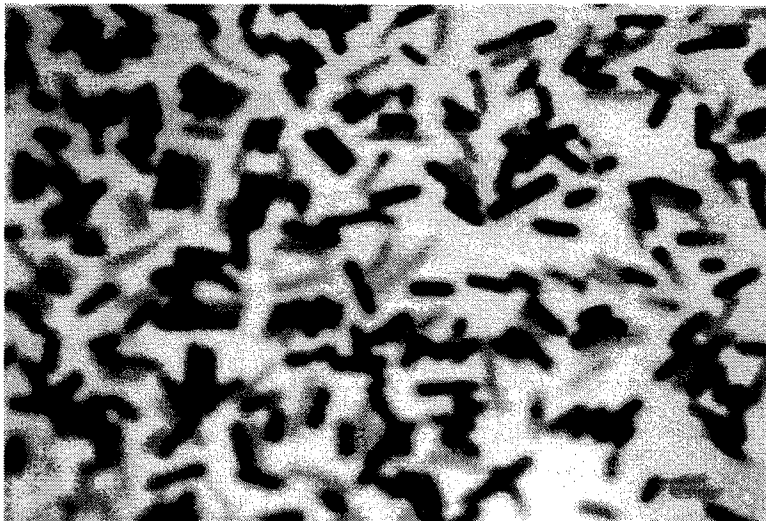


Fig. 5. Microscope picture of *B. licheniformis* KJ 2

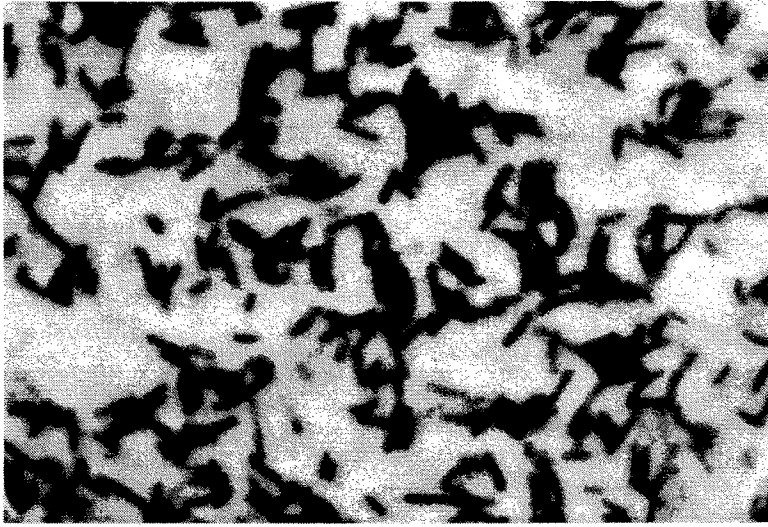


Fig. 6. Microscope picture of *B. subtilis* SUN 2

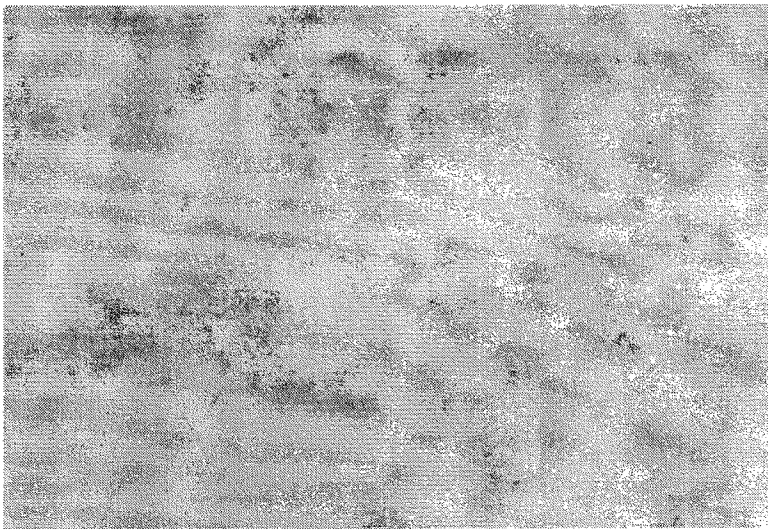


Fig. 7. Microscope picture of *Alcaligenes feacalis* JTJ 18

## 나. 휘발성 지방산 정량 분석

### 1) 초산의 감소 효과

*B. licheniformis* KJ 2 균주를 분뇨에 접종하여 배양한 결과 대조구에서는 12시간에 약 0.011%이었는데 접종 구에서는 약 0.007%로서 약 30%정도 감소효과가 있었으며, 24시간 후에는 대조구가 약 0.0058%와 접종구가 약 0.0011%로서 약 81.3%정도의 개선 효과를 보였다(Fig. 8). *Alcaligenes feacalis* JTJ 18를 분뇨에 접종해서 24시간 배양한 결과 88.23%개선 효과를 보였으며, *B. subtilis* SUN 2는 82.7%의 개선 효과를 나타내었다. 분리 균을 접종하지 않은 것 보다 접종한 것이 분뇨내의 초산을 제거하는데 좋은 효과를 내었다.

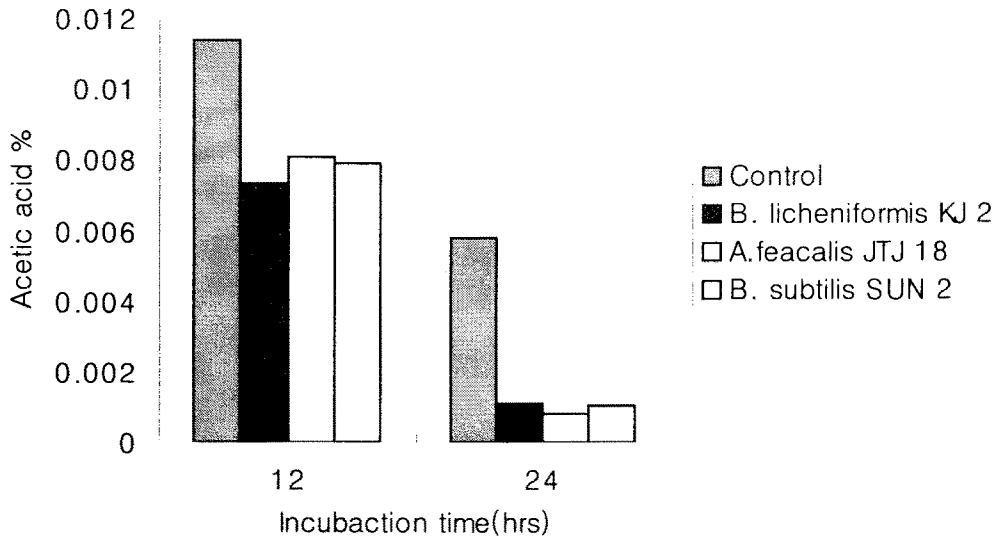


Fig. 8. Acetic acid reduction in pig slurry by the selected strain.

### 2) 프로피온 산의 감소 효과

*B. licheniformis* KJ 2와 *Al. feacalis* JTJ 18과 *B. subtilis* SUN 2를 12시간과 24시간을 각각 돈 분뇨에서 배양 후 프로피온 산에 대한 감소 효과를 조사한 결과 12시간째에는 각각 45.8%, 55.2%, 41.13%의 감소 효과가 있었으며,

24시간 배양한 후에는 53.7%, 63.2%, 60.5% 감소 시켰다. 그러나 아무 것도 접종하지 않은 대조 구에서도 24시간 경과 후 31.6%가 감소되는 것으로 나타나 균을 접종하지 않고, 공기만 충분히 공급하여도 악취 성분인 휘발성 지방산을 어느 정도 감소시킬 수 있는 것으로 나타났다(Fig. 9).

### 3) 부틸 산의 감소 효과

접종 24시간 후 *B. licheniformis* KJ 2와 *Al. feacalis* JTJ 18와 *Bacillus subtilis* SUN 2의 부틸 산 감소율은 0시간 대조 구에 비하여 각각 84.3%, 82%, 92.7%이었다. 이경우도 위와 마찬가지로 접종하지 않은 대조 구에서 24시간만 aeration하여도 50.1%의 감소 효과를 나타내었다(Fig. 10).

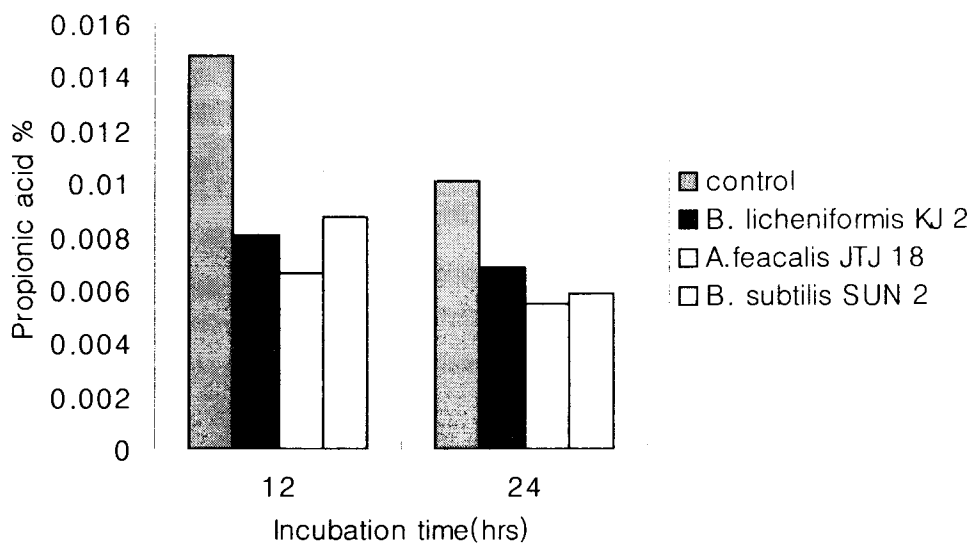


Fig. 9. Propionic acid reduction in pig slurry by the selected strain.



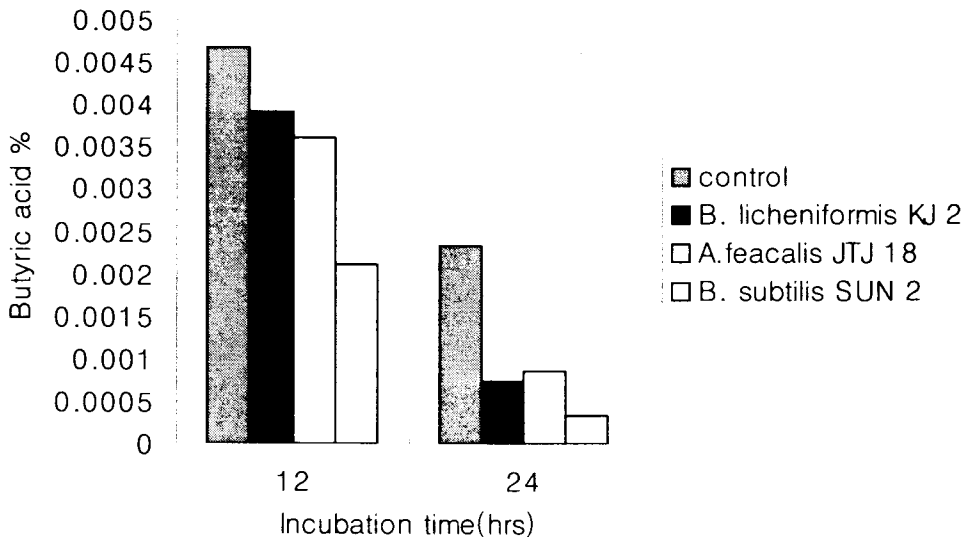


Fig. 10. Butyric acid reduction in pig slurry by the selected strain.

#### 4) 발레익 산의 감소효과

접종 24시간 후 *B. licheniformis* KJ 2와 *Al. feacalis* JTJ 18와 *Bacillus subtilis* SUN 2의 발레익 산의 감소율은 0시간 대조 구에 비하여 각각 66.3%, 61.0%, 61.8%이었다. 이경우도 위와 마찬가지로 접종하지 않은 대조 구에서 24시간만 aeration하여도 25.6%의 감소 효과를 나타내었지만, 조사한 약취를 내는 휘발성 지방산중 가장 휘발성이 적은 것으로 나타났다(Fig. 11).

#### 5) 카프로피오닉 산의 감소 효과

돈 분뇨에 *B. licheniformis* KJ 2와 *Al. feacalis* JTJ 18와 *Halophilic* sp. SUN 2을 각각 접종하여 돈 분뇨중의 카프로피오닉 산에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. *B. licheniformis* KJ 2와 *Al. feacalis* JTJ 18와 *Bacillus subtilis* SUN 2는 12시간 후 각각 60.7%, 71.3%, 69.4%감소되었고, 24시간 후에는 94.4%, 82.2%, 88.2% 감소시켰다. 접종하지 않은 대조구에서 자연 휘발되는 양은 32.6%이었다(Fig. 12).

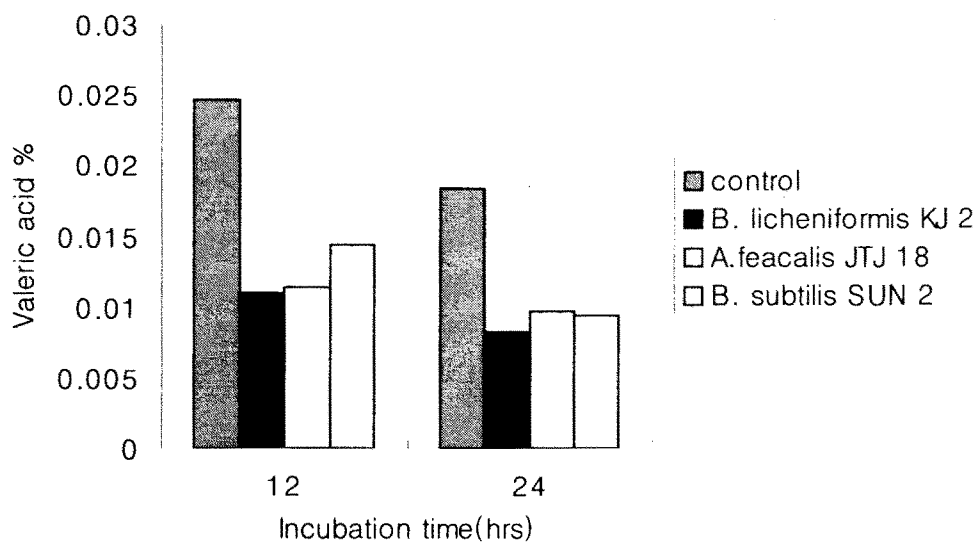


Fig. 11. Valeric acid reduction in pig slurry by the selected strain

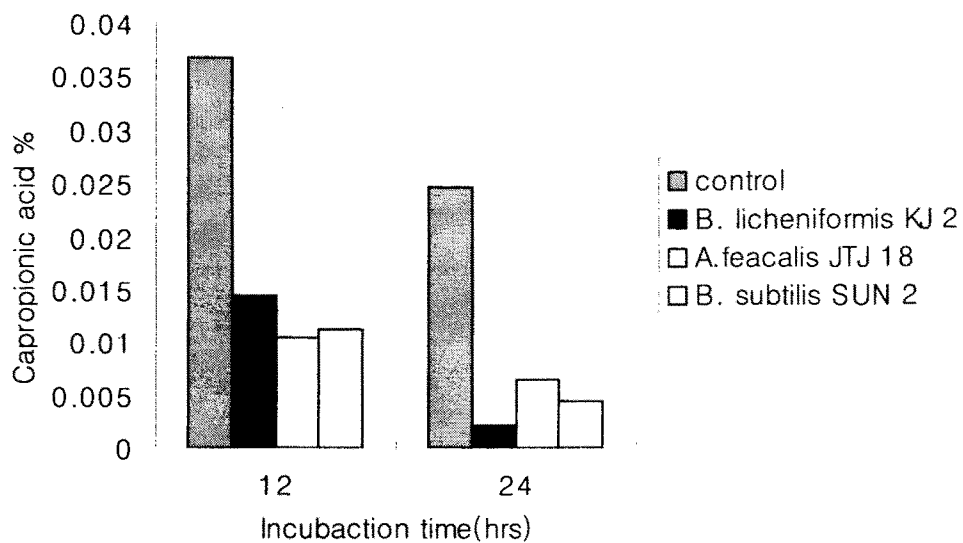


Fig. 12. Caproionic acid reduction in pig slurry by the selected strain.

5. 가금 티푸스(*Sal. gallinarum*)에 항균성 균의 선발

가. 가금 티푸스에 대한 항균성 균의 선발 및 동정

가금 티푸스 원인 균인 *Sal. gallinarum*을 사멸시킬 수 있는 균을 선별하기 위하여 우선 분리한 *Bacillus* spp.균을 대상으로 선발하였다. Wild type *Bacillus* spp.균 203개를 대상으로 실시한 결과 2개의 균에서 *Sal. gallinarum*에 억제 활성이 강한 것으로 나타났으며, *Bacillus* sp. Gu 88(Fig. 13)과 *Bacillus subtilis* Gu 31(Fig. 14)로 동정되었다. 자연 분리한 wild type 유산균에서 *Sal. gallinarum*에 길항 작용을 가지고 있는 균 1개를 분리하였으며 이 균은 *L. plantarum* Hans 1-19(Fig. 15)로 동정되었다(Table 25)

Table 25. Identification of *Lactobacillus* spp. and *Bacillus* spp. having antibacterial activity against *Sal. gallinarum*

Source of isolation	Strain
Grain	<i>Bacillus</i> sp. Gu 88
Manure	<i>Bacillus subtilis</i> Gu 31
Corn grain	<i>Lactobacillus plantarum</i> Hans 1-19

이중 특히 *Bacillus* sp. Gu 88을 37°C에서 24시간 배양하여 10배 농축하여 일반 항생제 실험에 사용하는 필터 페이퍼 방법으로 항균 활성을 조사한 결과 매우 큰 억제 환을 나타내 *Sal. gallinarum*을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다(Fig. 16). 이 균의 배양 상등액을 0.2 $\mu$ m 필터로 여과하여 약 10<sup>5</sup>cfu/ml의 *Sal. gallinarum*을 함유하는 TSB 배지에 0.3% ~ 0.5%가 되도록 첨가하여 병원균의 생육을 억제하는지를 조사했을 때 25°C이상에서 0.3% 첨가시에도 *Sal. gallinarum*을 억제할 수 있었다(Fig. 17).

이 균이 *Sal. gallinarum*의 생육을 억제하는 기작이 단순히 생육을 억제하고만 있는 것인지(bacteriostatic) 아니면 완전히 사멸시키는 것인지(bacteriocidal) 조사하기 위하여 티푸스 균(10<sup>5</sup>cfu/ml)을 *Bacillus* sp. Gu 88 배양 여액(0.5%)과 혼합하고 0 시간째와 2시간째에 희석수로 100배 희석하고 일

부를 TSA agar plate에 도말시 혼합 접종 직후인 0 시간째 *Sal. gallinarum*이 파괴되어 plate상에 균락을 전혀 형성하지 못하며 이 균의 배양 상등 액이 티푸스균을 완전히 사멸(bacteriocidal)시키는 것으로 나타났다(Fig. 18).

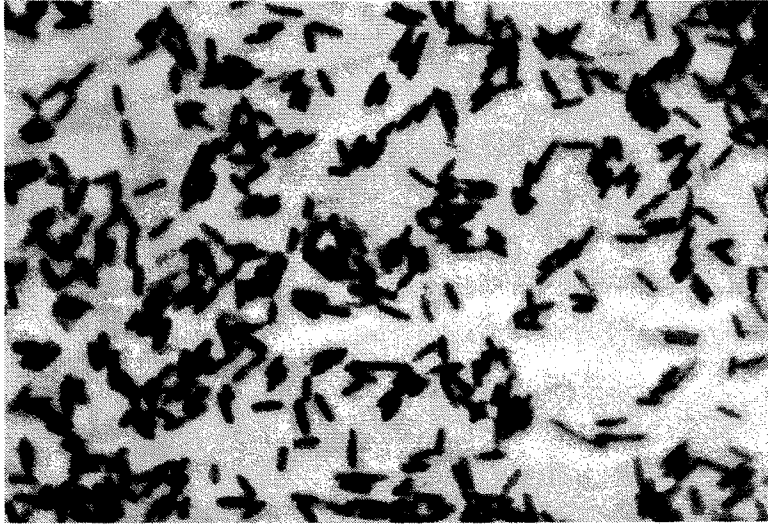


Fig. 13. Microscope picture of *Bacillus* sp. Gu 88

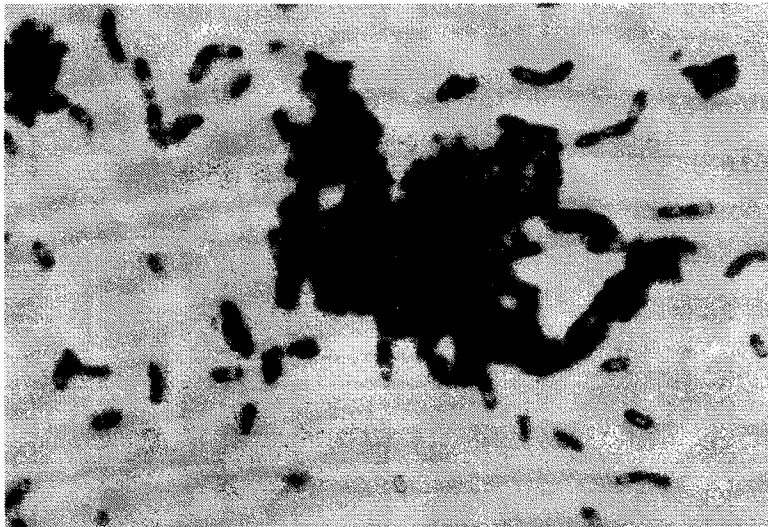


Fig. 14. Microscope picture of *Bacillus subtilis* Gu 31

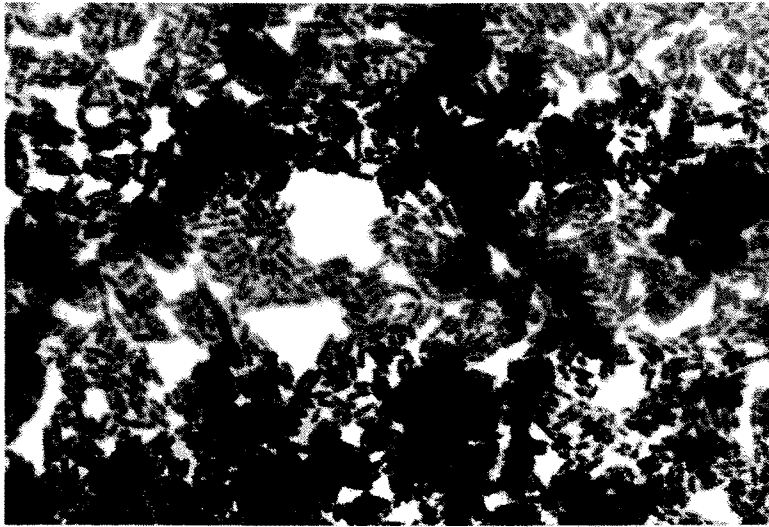


Fig. 15. Microscope picture of *Lactobacillus plantarum* Hans 1-19

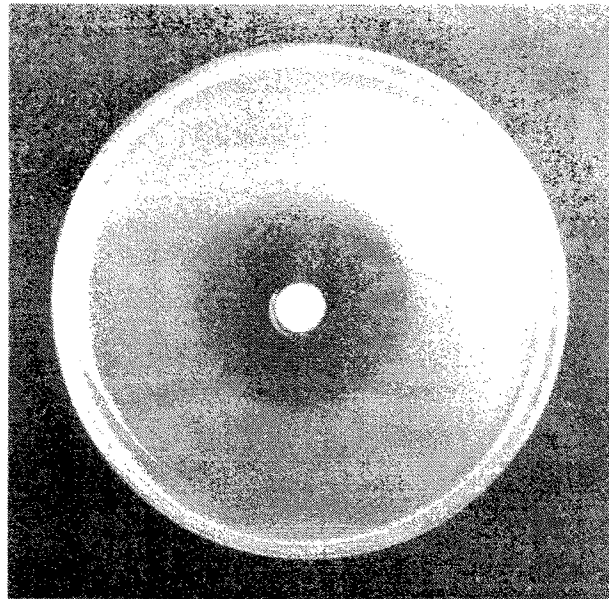


Fig. 16. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. Gu 88 culture supernatant against *Sal. gallinarum*



A1 A2 B1 B2 C1 C2 D

A1 : 0.3% culture filtrate, 25°C

A2 : 0.5% culture filtrate, 25°C

B1 : 0.3% culture filtrate, 30°C

B2 : 0.5% culture filtrate, 30°C

C1 : 0.3% culture filtrate, 37°C

C2 : 0.5% culture filtrate, 37°C

D : Control

Fig. 17. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. Gu 88 against *Sal. gallinarum*( $10^5$ cfu/ml) at various temperature culture filtrate for 24 hrs incubation.

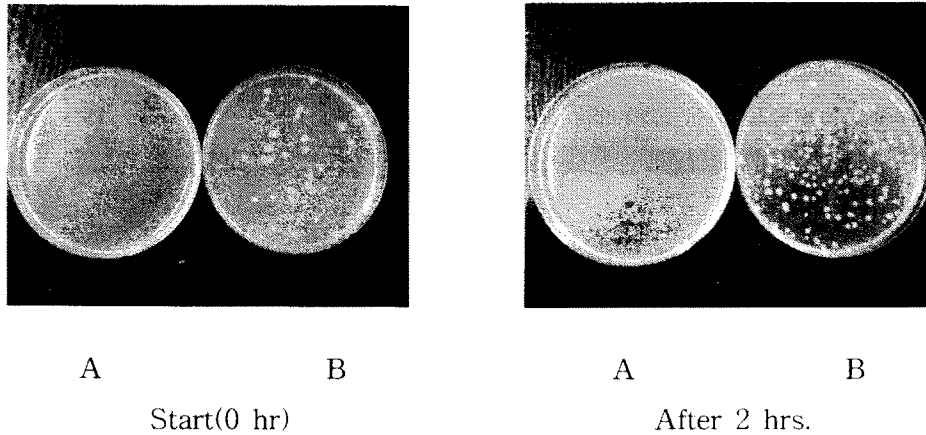


Fig. 18. Bacteriocidal activity of *Bacillus* sp. Gu 88 culture filtrate  $10^5$ cfu/ml of *Sal. gallinarum* in fresh TSB medium was mixed with (A) or without(B) 0.5% *Bacillus* sp. Gu 88 filtrate culture, incubated for 2hrs and diluted and plated on TSA plate

나. 초생추 병아리에 가금 티푸스 공격 접종에 대한 선발 균의 방어 효과

표 26은 *Bacillus* sp. Gu 88과 *Bacillus subtilis* Gu 31과 *Lactobacillus plantarum* Hans 1-19 균을 각각 배양하여 곡물에 혼합한 다음 건조하여 이를 적절히 혼합 다음 사료 급여량의 0.4%를 첨가하여 자연 급여시킨 처리구와 사료에 아무 것도 첨가하지 않은 대조구를 두어 가금 티푸스의 원인 균인 *Sal. gallinarum*을 인위적으로 공격접종 시켰을 때 선발균의 방어효과를 in-vivo실험으로 수행한 자료이다. 선발된 균을 첨가한 실험 구에서는 총 시험 병아리 36마리 중 10마리가 폐사되었고 26마리가 최종적으로 살아남아 72.2%의 생존율을 나타내었고, 폐사율은 27.7%이었다. 이와 반대로 무 첨가구에서는 시험 병아리 36마리 중 22마리가 폐사하여 61%의 폐사율이 나타났으며, 생존율은 최종 생존 수 14마리로 38.8%가 생존하는 것으로 나타났다. 이렇듯 무 첨가구 보다 첨가가 66.7%의 방어효과가 있었다.

Table 26. Defence effect of selected probiotic microorganisms on the inoculation of *Sal. gallinarum* for young hens

	Treatment			None-treatment		
	Start hens	Death hens	Final hens	Start hens	Death hens	Final hens
1st	12	0	12	12	7	5
2nd	12	4	8	12	8	4
3th	12	6	6	12	7	5
Total	36	10	26	36	22	14

## 6. ICR 마우스에 대한 임상 조사

### 가. 파리 살충성 미생물에 대한 임상 실험 결과

파리 살충성 미생물로 선발된 균 4개를 각각 독성 실험용 마우스에 급여한 결과 아래의 표와 같이 일당 증체량이나 사료 효율이나 사료 요구율 면에서 대조구와 비교해서 차이점이 없었다(Table 27). 마우스의 혈액에는 백혈구수치와 적혈구 수치는 각각 약 3,000 ~ 8,000/ml와 1,000,000/ml이 들어있다고 하며 이것은 각각의 개체마다 차이가 날 수 있다고 한다. 본 실험에서도 마찬가지로 개체마다 약간의 차이는 있었다(Table 28). 특히, *B. licheniformis* M 10의 경우 백혈구의 숫자가 1,156/ml이어서 대조구의 18%수준이었다. 하지만 부검 소견이나 외양상 또는 사양 성적 등에는 전혀 이상 증세가 나타나지 않았다.

Table 27. Effects of selected microorganisms on ICR mouse

(Unit : gram)

Strain effects	Control	<i>B. thuringiensis</i> wang 4	<i>B.thuringiensis</i> F2	<i>B.lichenifor</i> <i>mis</i> M10	<i>B. sphearicus</i> Gu 1-2
Daily gain	2.44 (0.61)	2.47(0.617)	2.5(0.625)	2.47(0.617)	2.33(0.58)
Feed efficiency	0.127 (0.031)	0.128(0.032)	0.13(0.033)	0.123(0.030)	0.128(0.032)
Feed conversion	7.83(1.95)	7.76(1.94)	7.5(1.875)	8.07(2.01)	7.96(1.99)



( ) = 1마리의 수준임

n = 4마리 × 2반복

Table 28. Red and white blood cell counts of ICR mouse.

Strain	Blood cell	Red blood cell count ( $\times 10^6$ /ml)	White blood cell count ( $\times 10^3$ /ml)
Control		8.659 $\pm$ 1.436	6.439 $\pm$ 0.879
<i>B. thuringiensis</i> wang 4		5.034 $\pm$ 0.872	5.876 $\pm$ 0.143
<i>B. thuringiensis</i> F2		4.035 $\pm$ 0.863	1.1. 3.187 $\pm$ 0.600
<i>B. licheniformis</i> M10		7.715 $\pm$ 0.212	1.156 $\pm$ 0.104
<i>B. sphearicus</i> Gu 1-2		8.923 $\pm$ 1.457	4.893 $\pm$ 1.089

나. 약취 제거 미생물의 임상 실험 결과

약취 제거 미생물로 선발된 균 3종을 각각 간이 독성 실험을 위해 마우스에 투여 한 결과 일당 증체량과 사료효율, 사료 요구율 면에서 대조구와 비교하여 차이가 없었으며(Table 29), 적혈구수치와 백혈구 수치를 비교할 때 대조구 적혈구 수치인 8.659 $\pm$ 1.436 $\times 10^6$ 와 백혈구 수치인 6.439 $\pm$ 0.879 $\times 10^3$ 에 비하여 크게 차이가 없었다(Table 30). 이러한 결과는 선발된 균이 숙주에 경구 투여시 해가 없다는 것을 증명한 것으로 생각된다.

Table 29. Effects of selected microorganisms on ICR mouse

(Unit : gram)

Strain effects	Control	<i>B.licheniformis</i> KJ 2	<i>Al. feacalis</i> JTJ 18	<i>B. subtilis</i> SUN 2
Daily gain	2.44(0.61)	2.5(0.625)	2.44(0.61)	2.52(0.632)
Feed efficiency	0.127(0.031)	0.130(0.032)	0.123(0.030)	0.129(0.032)
Feed conversion	7.83(1.95)	7.76(1.94)	8.09(2.02)	7.70(1.92)

( ) = 1마리의 수준임

n = 4마리 × 2반복

Table 30. Red and white blood cell counts of ICR mouse.

Strain	Blood cell Red blood cell count ( $\times 10^6$ /ml)	White blood cell count ( $\times 10^3$ /ml)
Control	8.659 $\pm$ 1.436	6.439 $\pm$ 0.879
<i>B. licheniformis</i> KJ 2	6.730 $\pm$ 1.868	3.687 $\pm$ 0.800
<i>A. feacalis</i> JTJ 18	8.520 $\pm$ 1.876	6.587 $\pm$ 0.989
<i>B. subtilis</i> SUN 2	8.590 $\pm$ 1.968	1.687 $\pm$ 0.425

다. 가금 티푸스 원인 균에 대한 길항 균의 임상 실험 결과

가금 티푸스 원인 균을 억제하는 균 3개를 각각 독성 실험용 ICR 마우스에 사료에 혼합 투여하여 쥐의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 표 31와 같이 아무 것도 첨가 하지 않은 대조구와 비교했을 때 아무런 차이점도 없었으며, *L. plantarum* Hans 1-19를 첨가한 구에서는 오히려 사료 효율과 사료 요구율이 대조구 보다 더 좋은 것으로 나타났다. 그리고 적혈구와 백혈구의 수치도 대조구에 비하여 큰 변화가 없는 것으로 조사되어 Probiotics로서 아무런 제약을 받지 않을 것으로 판단되었다(Table 32).

Table 31. Effects of selected microorganisms on ICR mouse

(Unit : gram)

Strain Effects	Control	<i>Papolymyxa</i> Gu 88	<i>Bacillus subtilis</i> Gu 31	<i>L.plantarum</i> Hans 1-19
Daily gain	2.44(0.521)	2.51(0.62)	2.48(0.62)	2.51(0.63)
Feed efficiency	0.127(0.031)	0.129(0.032)	0.127(0.031)	0.13(0.032)
Feed conversion	7.83	7.75(1.93)	7.82(1.95)	7.72(1.93)

( ) = 1마리의 수준임

n = 4마리  $\times$  2반복

Table 32. Red and white blood cell counts of ICR mouse.

Strain	Blood cell	Red blood cell count	White blood cell count
		( $\times 10^6$ /ml)	( $\times 10^3$ /ml)
Control		8.659 $\pm$ 1.436	6.439 $\pm$ 0.879
<i>Bacillus</i> sp. Gu 88		8.320 $\pm$ 1.089	7.126 $\pm$ 1.013
<i>Bacillus subtilis</i> Gu 31		7.245 $\pm$ 1.096	6.665 $\pm$ 1.045
<i>Lactobacillus plantarum</i> Hans 1-19		8.888 $\pm$ 0.653	7.773 $\pm$ 1.675

7. 파리 살충성 균의 산업용 배지 최적화의 분석 및 열풍 건조 후 생존율

가. *B. thuringiensis* wang 4의 생산 배지 최적화 및 건조 후 생존율

*B. thuringiensis* wang 4를 사료 첨가용 생균제로 제조하기 위하여 산업용 배지를 이용한 생산 균수를 최적화 하였다. 질소 원으로 CSL과 탄소 원으로 molasses를 이용하였다(Table 33). 생존율은 molasses이 3%와 CSL이 4%의 비율이  $4.11 \times 10^9$ cfu/ml 으로 가장 높았고, 건조 생존수도  $9.80 \times 10^8$ cfu/ml으로 가장 높았지만, 실질적인 원 생존 수 비례 건조 생존 수가 Molasses 1%에 CSL 4%비율이 26.2%( $8.93 \times 10^8$ cfu/ml)의 건조 생존율을 보여 가장 적합한 것으로 조사되었다.

Table 33. Optimization of molasses and CSL concentration for the production of *B. thuringiensis* wang 4

Source		Viable cell count	Viable cell count	Ratio(%)
Molasses(%)	CSL(%)	( $\times 10^9$ /ml)	after dry ( $\times 10^8$ /ml)	
1	1	1.31	2.71	20.8
1	2	2.20	3.42	14.2
1	3	2.81	4.20	15.0
1	4	3.42	8.93	26.2
2	1	2.33	1.81	7.8
2	2	2.80	4.79	16.8
2	3	3.61	5.52	15.3
2	4	3.94	6.43	16.4
3	1	2.50	1.33	5.2
3	2	3.01	5.30	17.7
3	3	3.72	7.21	19.5
3	4	4.11	9.80	23.9

나. *B. thuringiensis* F2의 생산 배지 최적화 및 건조 후 생균수

*B. thuringiensis* F2를 사료 첨가용 생균제로 제조하기 위하여 질소원으로 CSL과 당원료로서 molasses를 이용하여 생산 균수를 최적화 하였다(Table 34). 생균수는 위의 결과와 마찬가지로 molasses 3%와 CSL 4%가  $3.87 \times 10^9$  cfu/ml으로 가장 높았고, 건조 생균 수도  $1.02 \times 10^9$  cfu/ml으로 가장 높았지만, 실질적인 생균수 비례 열풍 건조 처리 후의 회복 율을 살펴보았을 때 Molasses 1%와 CSL 3%가 27.9%( $8.74 \times 10^8$ )로서 가장 높아 가장 합리적인 비율로서 결정되었다.

Table 34. Optimization of molasses and CSL concentration for the production of *B.thuringiensis* F 2

Source		Viable cell count ( $\times 10^9$ /ml)	Viable cell count after dry ( $\times 10^8$ /ml)	Ratio(%)
Molasses(%)	CSL(%)			
1	1	1.89	4.60	24.3
1	2	2.78	5.50	19.8
1	3	3.12	8.74	27.9
1	4	3.40	9.10	26.8
2	1	2.35	5.50	23.4
2	2	2.98	6.30	21.1
2	3	3.45	8.92	25.8
2	4	3.76	1.03	26.6
3	1	3.01	5.31	17.7
3	2	3.15	7.61	24.1
3	3	3.82	9.80	25.8
3	4	3.87	1.02	26.4

다. *B. licheniformis* M10의 생산 배지 최적화 및 건조 후 생균수

*B. licheniformis* M10를 사료 첨가용 생균제로 제조하기 위하여 질소원으로 CSL과 탄소원으로 molasses를 이용하여 산업 배지용 생산 균수를 최적화 하였다(Table 35). 생균수는 molasses 2%와 CSL 4%가  $3.54 \times 10^9$  cfu/ml으로 가장 높았으나, 열풍 건조 후 생균수는 molasses 3%와 CSL 4%가  $1.12 \times 10^9$

cfu/ml으로 32.5%의 생존율을 보였다. 그러나 이러한 조합 비율로서 이 균을 생산하기에는 경제적 비용이 너무 높아서 가장 경제적이면서 가장 효율적인 비율로 선택한 것은 molasses 1%와 CSL 4%를 선택하여 배양하기로 하였다.

Table 35. Optimization of molasses and CSL concentration for the production of *B. licheniformis* M 10

Source		Viable cell count	Viable cell count	Ratio(%)
Molasses(%)	CSL(%)	( $\times 10^9$ /ml)	after dry ( $\times 10^8$ /ml)	
1	1	1.14	6.6	57.9
1	2	1.98	6.7	33.8
1	3	2.67	8.9	33.3
1	4	3.06	10	32.7
2	1	2.08	5.4	26.0
2	2	2.76	6.5	23.6
2	3	3.08	8.8	28.6
2	4	3.54	8.2	23.2
3	1	2.11	6.5	30.8
3	2	2.88	8.9	30.9
3	3	3.12	9.5	30.4
3	4	3.45	11.2	32.5

라. *B. sphearicus* Gu 1-2의 생산 배지 최적화 및 건조

파리 살충성을 가진 *B. sphearicus* Gu 1-2 를 사료 첨가용 생균제로 제조하기 위하여 질소 원으로 CSL과 탄소 원으로 molasses를 이용하는 산업용 배지로 생산 균수를 최적화 하였다(Table 36). 생균수와 건조 후 생균수는 molasses 3%와 CSL 4%일 때 각각  $3.49 \times 10^9$  cfu/ml와  $1.29 \times 10^9$  cfu/ml로 가장 높았으나, 이 비율은 생산 비용이 높아 molasses 1%와 CSL 4%가 건조 생균수  $1.11 \times 10^9$  cfu/ml(회복율 35.5%)로 나타나 이 비율이 가장 효율적인 것으로 선택하였다

파리 살충성 균을 산업용 배지에 배양하기 위한 molasses와 CSL의 조합 비율을 정리하면 표 37과 같다. *B. thuringiensis* F2가 CSL이 3% 들어가는 것

을 제외하면 나머지 *Bacillus* spp. 균들은 CSL 4%가 최적 조건이었다. 포자를 형성하기 위해서는 당의 양은 제한되어야 하고 질소 원의 양이 비교적 많이 들어가는 것을 알 수가 있다.

Table 36. Optimization of molasses and CSL concentration for the production of *B. sphaericus* Gu 1-2

Source		Viable cell count ( $\times 10^9$ /ml)	Viable cell count after dry ( $\times 10^8$ /ml)	Ratio(%)
Molasses(%)	CSL(%)			
1	1	1.03	5.5	53.4
1	2	1.88	5.7	30.3
1	3	2.46	8.3	33.7
1	4	3.13	11.1	35.5
2	1	2.01	6.6	32.8
2	2	2.67	7.4	27.7
2	3	2.99	9.3	31.1
2	4	3.17	10.4	32.8
3	1	2.05	7.7	37.6
3	2	2.88	9.8	34.0
3	3	3.32	10.4	31.3
3	4	3.49	12.9	37.0

Table 37. Producing media for *B. thuringiensis* wang 4, *B. thuringiensis* F 2, and *B.licheniformis* M 10

Composition	Content(gram per DW 10)		
	<i>B.thuringiensis</i> wang 4	<i>B.thuringiensis</i> F 2	<i>B.licheniformis</i> M 10
Molasses	10	10	10
CSL	40	30	40
CaCO <sub>3</sub>	1	1	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4	4	4
MgSO <sub>4</sub>	0.8	0.8	0.8
MnSO <sub>4</sub>	0.04	0.04	0.04

8. 약취 제거 미생물의 배지 최적화 및 건조 후 생균수

가. *B. licheniformis* KJ 2의 생산 배지 최적화 및 건조

약취 감소 균으로 선발된 *B. licheniformis* KJ 2를 사료 첨가용 생균제로 제조하기 위하여 질소원으로 CSL과 탄소원으로 molasses를 이용하는 산업용 배지로 생산 균수를 최적화 하였다(Table 38). 생균수와 열풍 건조 후 회복 생균수는 molasses 3%와 CSL 4%일 때 각각  $3.55 \times 10^9$  cfu/ml과  $1.19 \times 10^9$  cfu/ml으로 가장 높게 나타났지만, 원료비를 고려할 때 molasses 2%와 CSL 4%일 때 열풍 회복 균 수가  $1.12 \times 10^9$  cfu/ml으로 31.5%의 회복 율을 보여 가장 적합한 것으로 선택되었다.

Table 38. Optimization of molasses and CSL concentration for the production of *B. licheniformis* KJ 2

Source		Viable cell count	Viable cell count	Ratio(%)
Molasses(%)	CSL(%)	( $\times 10^9$ /ml)	after dry ( $\times 10^8$ /ml)	
1	1	1.34	5.4	40.3
1	2	1.83	6.6	36.1
1	3	2.08	8.5	40.9
1	4	2.89	9.9	34.3
2	1	2.22	6.5	29.3
2	2	2.89	8.4	29.1
2	3	3.21	8.8	27.4
2	4	3.55	11.2	31.5
3	1	2.05	9.8	47.8
3	2	3.00	9.8	32.7
3	3	3.34	11.2	33.5
3	4	3.55	11.9	33.5

나. *Al. faecalis* JTJ 18의 생산 배지 최적화 및 건조

약취 감소 균으로 선발된 *Al. faecalis* JTJ 18를 사료 첨가용 생균제로 제조하기 위하여 질소 원으로 CSL과 탄소 원으로 molasses를 이용하는 산업용 배지로 생산 균수를 최적화 하였다(Table 39). 이 균은 내생 포자를 형성하지 않은 균으로서 그람음성에 간균이다. 이 균은 사멸이율이 높고 생균수는 아주 높은 것으로 나타났다. 생균수와 열풍 건조 후 생균 회복 수는 molasses 3%와 CSL이 4%일 때 각각  $1.95 \times 10^{10}$  cfu/ml과  $7.03 \times 10^6$  cfu/ml으로 가장 높게 나타

났지만, 생존율이 0.012로너무 낮아 산업적 생산에 적합치 못하였다. 생존율을 높이기 위해 동결 건조를 시도하여 보았지만 건조 후 생존율도 여전히 낮아 건조에 매우 민감하여 생산 비용을 고려할 때 이러한 생산 방법으로 이용하기에는 적합치 못하였다. 이균의 건조 생존율을 높이기 위한 후속 연구가 계속되어야 하며, 특히 동결 보존제를 다양화하여 시도 중에 있다.

Table 39. Optimization of molasses and CSL concentration for the production of *Al. fecalis* F2

Source		Viable cell count	Viable cell count	Ratio(%)
Molasses(%)	CSL(%)	( $\times 10^{10}$ /ml)	after dry ( $\times 10^6$ /ml)	
1	1	1.69	2.68	0.0159
1	2	2.18	3.54	0.0162
1	3	2.75	6.02	0.0218
1	4	4.78	7.76	0.0162
2	1	2.88	5.89	0.0204
2	2	3.54	7.62	0.0215
2	3	3.89	6.30	0.0160
2	4	4.67	8.12	0.0170
3	1	5.01	4.46	0.0081
3	2	5.88	7.78	0.0132
3	3	7.76	8.51	0.0109
3	4	8.91	1.07	0.0122

#### 다. *B. subtilis* SUN 2의 생산 배지 최적화 및 건조

약취 감소 균으로 선발된 *B. subtilis* SUN 2를 사료 첨가용 생균제로 제조하기 위하여 질소원으로 CSL과 탄소원으로 molasses를 이용하는 산업용 배지로 생산 균수를 최적화 하였다(Table 40). 생균수와 건조 후 생균수는 당성분과 단백질 성분이 가장 많이 들어간 3% molasses와 4% CSL의 비율이  $3.84 \times 10^9$  cfu/ml과  $1.29 \times 10^9$  cfu/ml가장 높았지만, 이것도 위의 경우와 마찬가지로 원료비를 고려하여 molasses 1%와 CSL 4%일 때 건조 생균 수가  $1.04 \times 10^9$  cfu/ml으로 36.1%의 생존율을 보여 가장 적합한 생산 배지로 선택되었다.

약취 감소용 균을 생산하기 위한 molasses와 CSL의 최적 조합 비율은 표 41과 같다. *B. thuringiensis* F2가 molasses 2%를 초과하는 것을 제외하면 *B. thuringiensis* wang 4와 *B. licheniformis* M 10은 molasses 1%가 적합하였고,



CSL은 분리균이 똑같이 4%가 최적이었다. 이 결과도 위와 마찬가지로 *Bacillus*와 같은 내생 포자 형성 균은 포자를 형성하기 위해서 당의 양이 제한되어야 하고 질소 원의 양이 풍부하게 존재해야 하는 것이 적합한 것으로 나타났다.

Table 40. Optimization of molasses and CSL concentration for the production of *B. subtilis* SUN 2

Source		Viable cell count ( $\times 10^9$ /ml)	Viable cell count after dry ( $\times 10^8$ /ml)	Ratio(%)
Molasses(%)	CSL(%)			
1	1	0.89	6.7	75.3
1	2	1.14	7.0	61.4
1	3	1.89	8.8	46.6
1	4	2.88	10.4	36.1
2	1	1.56	5.5	35.3
2	2	2.34	7.6	32.5
2	3	2.99	8.9	29.8
2	4	3.47	9.3	26.8
3	1	2.05	9.2	44.9
3	2	2.89	11.4	39.4
3	3	3.35	12.3	36.7
3	4	3.84	12.9	33.6

Table 41. Production media for odor-reducing probiotic microorganisms

Composition	Content(g/L)		
	<i>B. subtilis</i> SUN 2	<i>B. licheniformis</i> KJ 2	<i>Al. feacalis</i> JTJ 18
Molasses	20	10	10
CSL	40	40	40
CaCO <sub>3</sub>	1	1	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4	4	4
MgSO <sub>4</sub>	0.8	0.8	0.8
MnSO <sub>4</sub>	0.04	0.04	0.04

9. 가금 티푸스(*Sal. gallinarum*)에 대한 항균성 균의 배지 최적화 및 건조 후 생균수

가. *Bacillus* sp. Gu 88의 생산 배지 최적화 및 건조

이 균의 경우 당을 이용하여 점성이 높은 다당체를 세포 밖으로 분비하여 배양액의 점도가 매우 높아지는 특성이 있다. 그로 인하여 배양 후반기에 배양액 내에 용존 산소량이 낮아져 실험실내의 삼각 플라스크에서 배양하면 균수도 낮고 포자 형성율도 10%미만으로 낮아서 사양 시험용 시제품은 30ℓ배양기를 사용하였다. 1vvm 공기 주입과 회전 속도 250 rpm 조절하여 교반 시 생균수는 molasses 1.5% 와 CSL 1.5%일 때  $1.38 \times 10^8$  cfu/ml과 건조 균수  $2.23 \times 10^7$  cfu/ml로서 16.15%의 생존율을 보였고 현미경 검경시 90%이상의 포자 형성정도를 보여 점도 인해 용존 산소 공급이 생산에 가장 큰 영향을 주는 것으로 나타났다(Table 42).

Table 42. Optimization of molasses and CSL concentration for the production of *Bacillus* sp. Gu 88

Source		Viable cell count ( $\times 10^7$ /ml)	Viable cell count after dry ( $\times 10^6$ /ml)	Ratio(%)
Molasses(%)	CSL(%)			
1	1	2.08	2.13	10.24
1	1.5	10.71	13.43	12.52
1	2	4.16	9.54	22.93
1.5	1	1.02	1.31	13.10
1.5	1.5	13.82	22.32	16.15
1.5	2	4.89	1.01	20.44
2	1	1.23	0.75	6.16
2	1.5	5.88	2.08	35.37
2	2	2.08	1.62	7.78

#### 나. *Bacillus subtilis* Gu 31의 생산 배지 최적화 및 건조

표 43은 antibacterial 활력을 가진 *Bacillus subtilis* Gu 31을 산업 현장에서 배양하기 위한 생산 배지 최적 비율을 나타낸 자료이다. 이 균도 다른 *Bacillus* spp.와 마찬가지로 당밀과 CSL에서 잘 성장하였으며, molasses 2%와 CSL 2%일 때 생균수와 열풍 건조 생균수가 최적으로 나타났다.

Table 43. Optimization of molasses and CSL concentration for the production of *B. subtilis* Gu 31

Source		Viable cell count	Viable cell count	Ratio(%)
Molasses(%)	CSL(%)	( $\times 10^9$ /ml)	after dry ( $\times 10^8$ /ml)	
1	1	0.74	1.07	14.43
1	1.5	1.31	1.65	12.59
1	2	2.08	1.86	8.94
1.5	1	1.00	1.28	12.80
1.5	1.5	1.34	1.69	20.07
1.5	2	2.13	3.63	13.80
2	1	1.28	1.69	13.20
2	1.5	1.69	2.63	21.47
2	2	2.63	5.88	22.35

다. *Lactobacillus plantarum* Hans 1-19의 생산 배지 최적화 및 건조

유산균을 생성하는 이균은 *Bacillus* spp.와는 다르게 호기적 조건이 아닌 micro aerobic 조건에서 배양해야 하는 미생물이다. 이균은 catalase를 가지고 있지 않아 산소2개가 세포 속으로 들어오면 수소와 결합하여 superoxide dismutase에 의해서  $O_2$ 와  $H_2O_2$ 로 분리되어진다. 이때 치사 독성을 일으키는 2분자의  $H_2O_2$ 는 catalase에 의해서  $O_2$ 와 2개의  $H_2O$ 로 분리되지만, catalase를 가지고 있지 않은 혐기성 균들은  $H_2O_2$ 에 의해서 치사독성을 일으켜 사멸된다. 그러므로 이균을 배양하기 위해서는 공기를 주입하지않고 impeller를 거의 정지한 상태에서 배양하여야 한다. 표 44는 *L. plantarum* Hans 1-19을 산업 현장에서 배양하기위한 최적 배지 비율을 조사한 자료이다. 그림 에서 보는 바와 같이 molasses 5%와 CSL 5% 일 때 생균수와 열풍 건조 생균수가 가장 높지만 molasses 3%와 CSL 3% 일 때 가장 경제성이 높은 것으로 생각된다. 시판중인 고가의 MRS 배지와 비교하여 생균수는 비슷하고 건조 균수는 더 높아 산업 배지 선정은 적절하다고 보여지지만 산업화를 위해 요구되는 균수 보다는 낮아서 현재 생균수는  $5 \times 10^9$ cfu/ml과 건조 균수  $5 \times 10^8$ cfu/ml로 높이기 위한 후속 연구를 진행하고 있다.

가금 티푸스 억제용 생균제 생산을 위한 탄소원과 질소원의 최적 조합 비율을 총괄 요약하면 표 45와 같다. *Bacillus* sp. Gu 88와 *B. subtilis* Gu 31와 *L.plantarum* Hans 1-19의 당밀과 CSL의 최적 조합 비율은 각각 1% : 1.5%와

2% : 2%와 3% : 3%을 나타내었다.

Table 44. Optimization of molasses and CSL concentration for the production of *L. plantarum* Hans 1-19

Source		Viabie cell count	Viabie cell count	Ratio(%)
Molasses(%)	CSL(%)	( $\times 10^8$ /ml)	after dry ( $\times 10^7$ /ml)	
MRS broth		4.89	0.47	0.96
1	1	0.218	0.09	2.73
1	3	0.776	0.32	4.16
1	5	1.698	0.75	4.48
3	1	1.34	0.63	4.70
3	3	3.98	2.45	6.15
3	5	5.12	1.62	3.16
5	1	6.76	2.13	3.15
5	3	8.12	2.08	2.56
5	5	1.34	3.16	2.35

Table 45. Production media for the bacteriocidal probiotic microorganisms

Composition	Content(gram per DW 1ℓ)		
	<i>Bacillus</i> sp. Gu 88	<i>B. subtilis</i> Gu 31	<i>L.plantarum</i> Hans 1-19
Molasses	10	20	30
CSL	15	20	30
CaCO <sub>3</sub>	1	1	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4	4	4
MgSO <sub>4</sub>	0.8	0.8	0.8
MnSO <sub>4</sub>	0.04	0.04	0.04

## 10. 시제품 내 미생물의 특성 조사

### 가. 내 산성 조사

시제품으로 제조된 파리 살충성을 가진 미생물 제제를 각각 pH 2.0에서 30분간 방치하여 내 산성을 조사한 결과 *B. thuringiensis* wang 4은 93.2%, *B. thuringiensis* F 2는 93.1%, *B. licheniformis* M 10은 95.0%, *B. sphaericus* Gu 1-2는 94.5%가 생존하였다. 선발된 파리 살충성 미생물 전체가 산에 강한 내성

을 가진 것으로 나타났다. 이들 *Bacillus*는 제품 속에서 포자 형태로 존재하기 때문에 이런 내성이 가능한 것으로 판단된다. 악취 감소 미생물의 내 산성을 조사한 결과 *B. licheniformis* KJ 2은 89.2%, *B. subtilis* F2는 93.4%, *Al. faecalis* JTJ 18 7.7%의 생존율을 가졌다. *Al. faecalis* JTJ 18균주는 다른 선발된 균에 비해 내 산성이 낮았지만 세균 모두 건조 후에는 가축의 위를 통과하기 위한 내 산성은 충분한 것으로 판단된다. 가급 티푸스 항균성 균의 내 산성을 조사한 결과 *Bacillus* sp. Gu 88은 생균수가 7.35 log cfu/ml에서 산 처리 후 균수가 7.04 log cfu/ml으로 48.8%가 생존하였고, *B. subtilis* Gu 31은 산 처리 전 생균수가 8.43 log cfu/ml에서 산을 처리한 후의 생균수가 8.41 log cfu/ml로 95.5%, *L. plantarum* Hans 1-19 산 처리 전 생균수가 7.39 log cfu/ml에서 산을 처리한 후의 생균수가 6.88 log cfu/ml로 30.9%가 생존하였다. *plantarum* Hans 1-19는 다른 균들에 비하여 내 산성 정도가 약한 것으로 판단되지만, 산 처리 후 생균수가  $10^6$ 이상으로 존재하여 장내에서 살아남을 확률이 높은 것으로 판단된다(Table 46).

#### 나. 내 담즙성 조사

선발된 균 주들의 내 담즙성을 조사하기 위하여 제조된 건조 시험 균 1g을 9ml의 0.03% Oxgall 용액에 첨가하여 37℃의 항온기에 30분 동안 방치한 후 10배의 희석 배수로 연속 희석하여 TSA배지에 도말하여 37℃배양기에서 배양하여 성장하는 균락 수를 계산하여 담즙 내성을 조사하였다

시험균 중 대부분의 *Bacillus* spp.는 90% 생존율을 보였고 생존율이 가장 낮은 *Bacillus* sp. Gu 88도 57%가 생존하여 공시 균주들이 장내 담즙산의 공격에 충분히 생존할 것으로 판단된다. 특이적으로 포자를 형성하지 않은 *Al. faecalis* JTJ 18과 *L.plantarum* Hans 1-19 균이 각각 97.6%와 77.5% 생존하여 강한 내 담즙성을 보여주었다(Table 47).

#### 다. 내 열성 조사

선발된 균 주들의 내열성을 조사하기 위하여 제조된 건조 시험 균 1g을 9ml의 배지에 첨가하고 75℃ 항온 수조에서 30분간 방치한 후 10배 연속 희석하여 TSA 배지에 plating하여 37℃의 배양기에서 형성된 균락 수를 생존 균

수로 측정하였다. 포자 형성균인 *Bacillus* spp.들은 대부분 90%이상의 생존율을 보였고 포자를 형성하지 않는 *Al. faecalis* JTJ 18과 *L. plantarum* Hans 1-19균만 각각 35.3%와 30.9%가 생존하였다. 일반적으로 이들 균은 75°C에서 급격히 사멸하는 것으로 알려져 있지만 이 경우 건조를 거치는 동안 열에 저항성이 생긴 것으로 생각된다(Table 48).

Table 46. Acid tolerance of selected probiotic microorganisms

Strain	Viable cell count(Log cfu/ml)		Survival ratio(%)
	Before	After	
<i>B. thuringiensis</i> wang 4	8.94	8.91	93.2
<i>B. thuringiensis</i> F2	8.93	8.90	93.1
<i>B. licheniformis</i> M 10	9.00	8.98	95.0
<i>B. sphaericus</i> Gu 1-2	9.04	9.02	94.5
<i>B. licheniformis</i> KJ 2	9.08	9.03	89.2
<i>B. subtilis</i> SUN 2	9.03	9.00	93.4
<i>Al. faecalis</i> JTJ 18	6.83	5.72	7.7
<i>Bacillus</i> sp. Gu 88	7.35	7.04	48.8
<i>B. subtilis</i> Gu 31	8.43	8.41	95.5
<i>L. plantarum</i> Hans 1-19	7.39	6.88	30.9

Table 47. Bile acid tolerance of selected probiotic microorganisms

Strain	Viable cell count(Log cfu/ml)		Survival ratio(%)
	Before	After	
<i>B. thuringiensis</i> wang 4	8.91	8.90	97.5
<i>B. thuringiensis</i> F2	8.95	8.94	96.7
<i>B. licheniformis</i> M 10	9.04	9.04	98.2
<i>B. sphaericus</i> Gu 1-2	9.08	9.04	91.7
<i>B. licheniformis</i> KJ 2	9.11	9.03	83.5
<i>B. subtilis</i> SUN 2	9.09	8.99	78.8
<i>Al. faecalis</i> JTJ 18	6.83	6.82	97.6
<i>Bacillus</i> sp. Gu 88	7.35	7.11	57.2
<i>B. subtilis</i> Gu 31	8.43	8.4	93.3
<i>L. plantarum</i> Hans 1-19	7.39	7.28	77.5

Table 48. Heat tolerance of selected probiotic microorganisms

Strain	Viable cell count(Log cfu/ml)		Survival ratio(%)
	Before	After	
<i>B. thuringiensis</i> wang 4	8.96	8.95	97.8
<i>B. thuringiensis</i> F2	8.95	8.94	96.7
<i>B. licheniformis</i> M 10	9.01	9.00	99.0
<i>B. sphaericus</i> Gu 1-2	9.05	9.04	98.0
<i>B. licheniformis</i> KJ 2	9.08	9.08	89.2
<i>B. subtilis</i> SUN 2	9.09	9.00	93.4
<i>Al. faecalis</i> JTJ 18	6.77	6.32	35.3
<i>Bacillus</i> sp. Gu 88	7.35	7.30	89.2
<i>B. subtilis</i> Gu 31	8.43	8.24	64.3
<i>L. plantarum</i> Hans 1-19	7.39	6.88	30.9

### 11. 생균제 급여 효능

가. 축사 파리와 암모니아 감소용 생균 제제의 급여 효과(가명 : Probio-P)

#### 1) 사료 효능 조사

경남 산청 박종렬씨의 농장에서 축사 파리와 암모니아 감소용 미생물 제제를 0.2%급여한 결과 표 49의 결과를 도출하였다. 시험 개시 돼지 수가 각각 20마리씩을 3개 군으로 나누어서 사료 첨가제가 기존 사료의 영양학적인 면을 개선시키는지 조사하였다. 이 농장은 원래 퓨리나 사료를 사용하고 있었으며, 지대 사료로 사료를 공급하고있었다. 대조구에 비하여 급여구에서 3.3%정도의 증체율 증진과 사료 효율 개선 효과를 보여 생산성 증진 효과를 보였다. 그러나 생균제의 첨가 비용을 고려하면 농가 소득 증대는 기대에 못 미친다고 평가된다. 초기의 실험 계획에서는 파리 구제 효과와 악취 제거 성능을 검증하는 것을 1차 목표로 생균제의 formula를 설정하였지만, 향후 비육돈의 자돈 때부터 출하 시기까지의 사양실험을 계획 중이어서 이때는 생산성 향상을 좀더 고려하여 생균제 성분들의 배합 비를 조절하려고 한다.

Table 49. Effects of Probio-P treatment on the pig growth performance

Factor	Control 1	Treatment 1	Treatment 2
Start pig count	20	20	20
Start age	45day	45day	40day
Start weight	250kg	240kg	220kg
Final weight	700kg	704kg	686kg
Total feed intake	1300kg	1300kg	1300kg
Weight gain	450kg	464kg	466kg
Feed conversion	2.89kg	2.80kg	2.79kg
Feed efficiency	0.346kg	0.357kg	0.358kg

## 2) 암모니아 감소 효능

축사 파리와 암모니아 감소용 Probio-P를 0.2%급여한 결과 그림 19와 같은 결과를 도출하였다. 급여 시작 전 3주를 control기간으로 설정하여 측정한 결과를 0일로 계산하였으며, 실험 시작 후 1주일에 한번씩 돼지들의 코 높이(지면에서 30~45cm높이)에서 암모니아 농도를 gas kit으로 측정하였다. Control기간에는 14~16ppm정도이던 것이 급여 1주일 후 약 7~8ppm으로 감소하여 투여 8주시까지 약 4~6ppm으로 유지하였다. 급여 2의 경우 70%~80%의 암모니아 감소율을 나타내었다(Fig. 19). 4 ~ 6ppm 농도의 암모니아 수치는 사람의 코로는 느낄 수 없는 것으로 판단되며, 아주 쾌적한 상태의 축사 환경을 유지 시켜준다. 암모니아 가스의 발생량은 계절의 영향을 많이 받는 것으로 투여 0일째가 8월 하순이어서 늦여름이고 이후 날씨가 신선해지면서 대조구에서도 암모니아 가스가 초기에 비해 현저히 감소하였다.



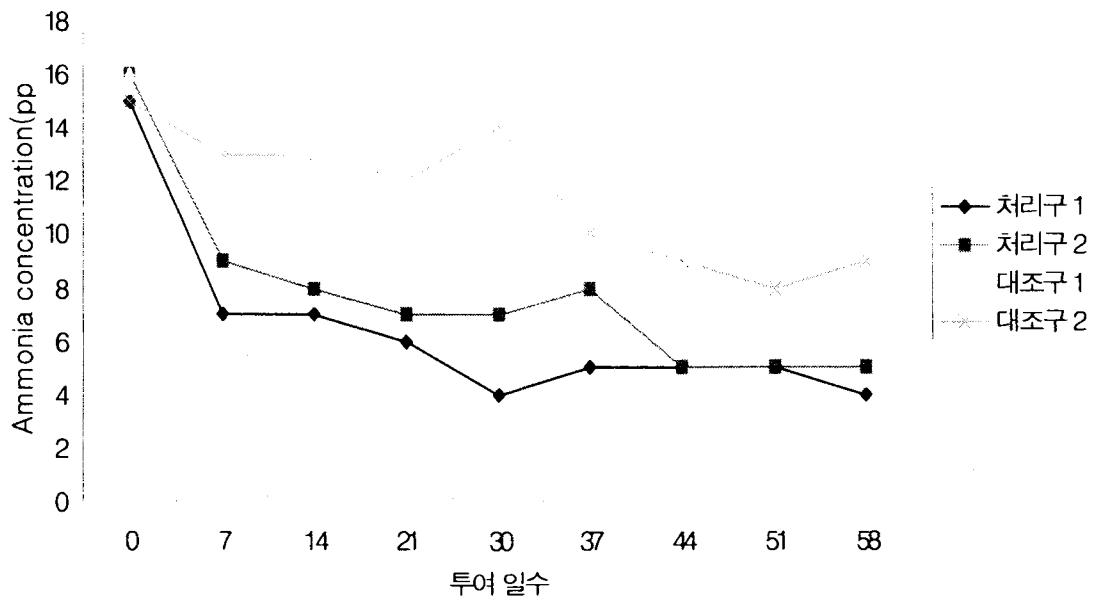


Fig. 19. Ammonia reduction in pig farm by Probio-P addition in feed

### 3) 파리 살충성 효과

#### (가) 시험 균 포함된 파리 사육 배지에서 파리 발생 율

각각의 미생물 제제를 파리 사료에 혼합한 후 파리 암수 각각 20마리씩을 파리 사육 망사에 방사한 후 최종적으로 발생된 파리 수를 3차에 걸쳐서 조사한 자료이다. *B. thuringiensis* wang 4번이 평균 1.3마리로 파리 발생수가 가장 적었으며, *B. licheniformis* M 10이 16.7마리였고, *B. thuringiensis* F 2가 27.7마리였다. 이러한 균들을 혼합 처리한 실험 구에서는 평균 3.3마리의 파리가 발생되었지만 아무 것도 첨가하지 않은 대조 구에서 평균 281.7마리의 파리가 발생되었다. 이러한 결과를 살펴볼 때 *in-vitro*에서 파리 살충성 미생물을 첨가하여 파리를 방사하여 파리 산란 율 및 파리 발생 율을 조사시 파리가 거의 발생하지 못한다는 것을 보여주고 있다(Table 50).

#### (나) 시험균 투여 후 돼지 분변에서 파리 발생 율

파리 살충성이 있는 Probio-P제제를 돈분 100g을 넣은 비이커를 24시간 동안 파리 암수 각각 20마리와 함께 파리 망사 케이지에 넣어두어 파리의 산란

을 유도하고 실험실 조건(25±2℃)에서 알이 부화하여 성충으로 발육하는 것을 3반복으로 조사하였다. 파리 살충성 미생물을 급여하는 급여 구에서는 급여 1주에서 3주 후까지 파리 발생 율이 전혀 없었으며, 6주 후에는 21마리 8주 후에는 133마리가 발생되었고, 비 급여 구에서는 1주 후에 333.4마리 3주 후 68마리, 6주 후 365마리, 8주 후 160마리로 총 927마리의 파리가 발생되었다. 파리 살충성 미생물을 급여한 실험 구에서의 평균 파리 발생 수는 38.5마리로 급여하지 않은 실험 구에서의 파리 발생 수 231마리보다 192.5마리가 적게 발생되어 83.3%의 파리 발생 억제 율을 가지고 있는 것으로 나타났다(Table 51).

Table 50. Insecticidal effects on house flies

Treatments	Replication			Total	Average	DMRT C.V.(%) = 43.6
	1st	2nd	3rd			
<i>B. thuringiensis</i> wang 4	4.0	0.0	0.0	4.0	1.3	a
<i>B.thuringiensis</i> F 2	0.0	42.0	41.0	83.0	27.7	a
<i>B. licheniformis</i> M 10	50.0	0.0	0.0	50.0	16.7	a
Mixed Strain	0.0	7.0	3.0	10.0	3.3	a
Control	253.0	342.0	250.0	845.0	281.7	b

Table 51. Reduction of Investigation of house flies outbreak in pig slurry eaten 0.2% house flies insecticidal microorganisms product

Treatments	Replication				Total	Average	DMRT C.V.(%) =
	after 1 week	after 3 weeks	after 6 weeks	after 8 weeks			
Treatment	0.0	0.0	21.0	133.0	154.0	38.5	a
Control	333.4	68.0	365.0	160.0	927.0	231.0	b

(다) 시험 균 투여 후 돼지 분변의 파리 유인 효과

파리 살충성 미생물 제제 0.2%를 먹은 돼지 분변의 파리 유인 효과를 분석한 결과는 표 52와 같다. 파리 암.수놈을 무작위로 총 70마리를 혼합 방사하여 돈분에 앉아 있는 파리의 마리 수를 시간별로 조사하였다. 총 조사된 시간에 대한 앉아 있는 마리 수를 구간 별로 조사한 결과 파리 살충성 미생물 제제를

급여한 실험에서는 총 56마리가 앉아 있어 전체 파리 중 21%정도 파리 유인 효과가 있었으며, 비 급여 구에서는 42%, 어느 곳에서도 앉지 못하고 배회하는 파리수가 37%정도로 나타났다. 이 결과는 파리 살충성과 암모니아 감소성 미생물 제제를 섭취한 돼지의 분에 파리가 덜 유인 될 뿐만 아니라 같은 파리로 산란을 유도해도 분변 속에 존재하는 Probio-P 중 파리 살충성 미생물 제제에 의해서 파리 성충의 발생이 현저히 감소하는 것을 알 수 있다. 이 결과 축사내의 파리가 번식하지 못하고 좀더 쾌적한 환경을 제공할 수 있음을 보여준다.

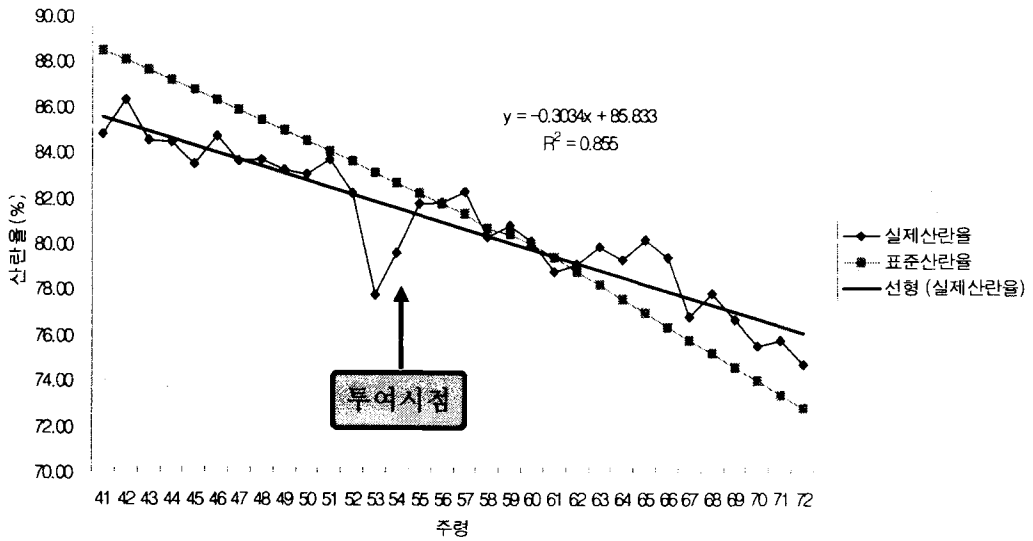
Table 52. Number of flies into the treatments after exposure each hours

Treatments	Number of fly into the treatments after exposure			
	1 hr	2 hrs	4 hrs	8 hrs
Treatment	15	11	8	22
Control	27	35	22	35
배 회	28	24	40	13

나. 가금 티푸스에 대한 항균성 생균제(가칭 CYC-a)의 급여 효능

1) 산란 율

경기도 화성시에서 산란 계를 사육하는 삼주 농장을 대상으로 가금 티푸스 억제용 생균제의 급여 효능을 조사하였다. 이 농장은 예전부터 가금 티푸스로 많은 고생을 했던 농장으로 본 실험에 앞서 control 기간에 실험 동(9,800수)의 산란 율을 조사하였다. 41주령부터 50주령 까지 본 실험동의 산란 율을 조사한 결과 표준 산란 율 보다 약 3%~4%정도 떨어져있던 것으로 관찰되었으며, Control 기간 중 마이코 플라즈마성 기관지염이 발병되어 산란 율이 갑자기 77.80%으로 떨어져 표준 산란 율 곡선 83.15%보다 약 5.35%떨어져 실험 전에 닭의 건강 상태가 좋지 않았음에도 불구하고 항생제를 사용하지 않고 본 실험을 착수하였다. 투여 1주 후인 54주령에는 투여 전보다 산란율이 약간 상승하였으며, 투여 2주 후인 55주령에는 표준 곡선에 거의 다 달았고, 투여 3주 후인 56주령 이후는 표준 산란곡선을 상회하였다. 그 후 실험 종료시인 72주령까지 표준 산란 곡선을 약 2~3%정도 상회하는 것으로 나타나 CYC-a제제가 산란 계의 산란 율을 개선시키는 것으로 나타났다(Fig. 20).

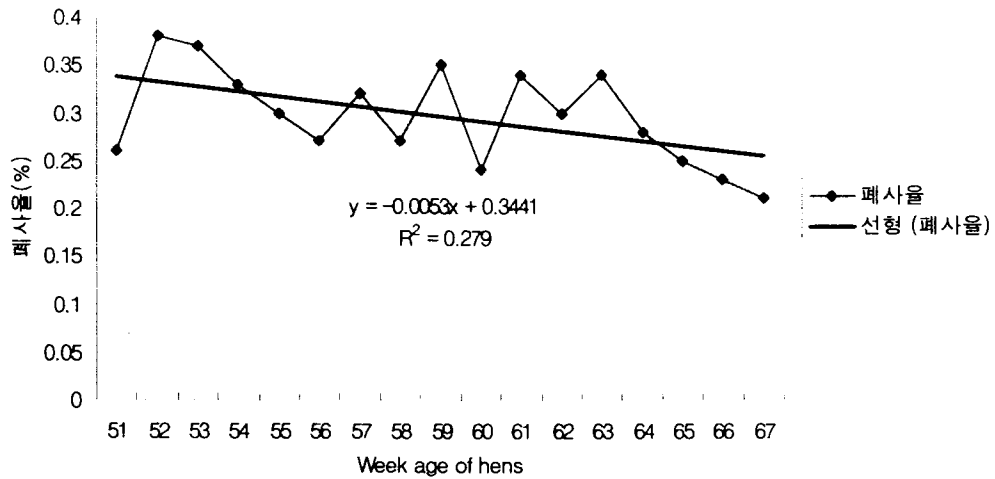


41주령(5월 1일)~50주령 (7월 8일): 실험 전 산란 율 추이  
 51주령(7월 9일)~53주령(7월 27일) : Control 기간  
 54주령(8월 16일)~68주령(11월 11일) : 생균제 투여 기간

Fig. 20. Egg production rate of hens that intaked CYC-a witch is bacteriocidal on pathogenic *Sal. gallinarum*

## 2) 폐계 율

그림 40은 본 실험동의 폐계율을 조사한 자료이다. 51주령부터 53주령까지는 control기간으로서 1주일 평균 0.33%가 폐사되는 것으로 나타났으나, 생균제 투여 후에는 0.28%가 1주일 평균 폐사 율인 것으로 나타나 0.05%가 개선되는 것으로 나타났다.



51주령(7월 9일)~53주령(7월 27일) : Control 기간

54주령(8월 16일)~68주령(11월 11일) : 생균제 투여 기간

Fig. 21. Death rate of hens that intaked CYC-a witch is bacteriocidal on Phathogenic *Sal. gallinarum*

### 3) 장내 균총

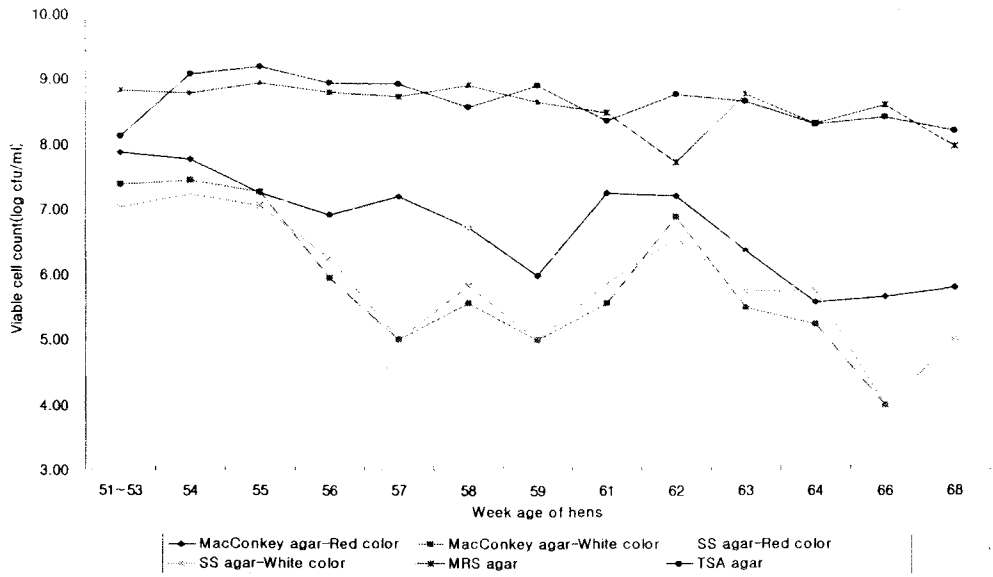
전체 실험 기간 동안 장내 총 균수를 계수하기 위하여 TSA 배지를 사용하여 계수한 결과 실험 control기간을 제외하면 평균  $10^9$ /ml이었으며, 유산균을 계수하기 위하여 *Lactobacillus* MRS 배지를 이용하여 전형적으로 우유 빛이 띄는 균락을 계수한 결과  $10^8$  후반 대를 나타내었다. 유산균 수는 62주령을 제외하면 닭이 건강할 때 통상적으로 닭의 상태를 잘 나타내 주며 통상적으로  $10^8$  후반을 유지하고 있었다. 대장균과 *Salmonella*균을 선택 계수하기 위하여 MacConkey agar와 SS agar(Difco)를 이용하는데 대장균은 이 둘다의 배지에서 전형적인 빨간색을 나타내며, *Salmonella*는  $H_2S$ 를 이용하여 균락 중앙 부분이 검게되거나, 거의 색깔이 없는 무색으로 된다. 이런 점을 이용하여 이둘다의 배지에서 빨간색을 띄는 균을 대장균으로 간주할 수 있으며 무색 혹은 검은색은 *Salmonella* spp.혹은 *Proteous* spp. 아니면 *Pseudomonas* spp. *Aeromonas* spp.로 간주하여 본 실험 결과를 해석하였다(Fig. 22). MacConkey agar-red color와 SS agar-red color를 나타내는 대장균류는 실험 control기간에는  $10^7$ /ml

중반대 이었으나, 지속적으로 감소되어 실험 마지막 주인 68주령  $10^{10}$ /ml 중반대로 약 100%정도 줄이는 효과가 있는 것으로 나타났다. MacConkey agar-white color와 SS agar-white color를 나타내는 살모넬라 계통 류의 균들은 실험 control기간에는  $10^7$ /ml 초 중반 대에 이었으나, 지속적으로 줄어들어 실험 마지막 주 령에는 plate에서  $10^5$ /ml에서 나타나지 않아 100%이상 줄어든 것으로 나타났다.

실험 중반인 62주령에 유산균 수치가 떨어지고 대장균 수 및 살모넬라 류 수치가 상승한 이유는 농장주의 농장 인부 관리 잘못으로 인한 산란계의 사료 공급이 용이하지 못하여 닭들이 stress를 받아 닭의 산란 울과 분변에서의 대장균 류의 수치가 높아졌다. 이처럼 분변에서의 세균 분포 상태는 닭의 건강 상태를 잘 말해주고 있으며, 닭의 건강 상태가 양호하면 분변의 색깔과 분변 균총이 안정한 상태를 이루고 있는 것으로 나타났다.

가금 티푸스 억제용 생균제를 0.2% 투여한 결과 산란 계의 산란 울이나 폐사 울을 개선시키고, 또한 닭의 분변에서 대장균류를 억제시키며 유산균 수를 안정화하는 효과를 지고 있는 것으로 판명되었다. 이것은 본 실험에서 분리한 대장균류들이 항생물질에 내성을 가지고 있음에도 불구하고 가금 티푸스 억제용 생균제를 급여함으로 인하여 가금 분변 내의 유산균류들은 억제시키지 않고 대장균류 만은 억제시킬 수 있었다. 이것은 이러한 균들로 인한 질병을 antibiotics를 사용하지 않고 probiotics를 사용하여 예방 치료 할 수 있는 획기적인 계기를 마련한 것이라 생각할 수 있다.

지금까지 MacConkey agar와 SS-agar에서 무색 도는 무색에 중심이 검은 균락은 *Salmonell* spp.라고 알려져 왔으나 동정결과 검은 균락은 대부분이 *Proteus* spp. 무색은 *Aeromonas* spp.가 대부분으로 밝혀졌다. 현재로서는 *Salmonella* spp.의 유무만을 알아 볼 수 있고 선택적 항생제 배지에서 증폭 방법 이외에 *Salmonella* spp.만을 특이적으로 선택하여 계수 할 수 있는 방법이 없는 것으로 알고 있다.



51주령(7월 9일) ~ 53주령(7월 27일) : Control 기간(Microplasma성 대장균 증발병)

54주령(8월 16일) ~ 68주령(11월 11일) : 생균제 투여 기간

Fig. 22. Fecal microflora of hens that intaked microorganisms inhibitive *Sal. gallinarum*

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 제 1절 연구개발의 최종 목표

축사 슬러리나 토양등의 환경에서 분리한 미생물들을 이용하여 축사의 파리 살충성 미생물을 개발하는데 그 목적이 있었다. 당초, 본 연구 과제가 선정 되는 시점에서 실제로 축산 농가에서 축사 파리 살충성 미생물 제제에 대한 필요성 뿐만 아니라, 축산에서 큰 문제가 되는 악취와 항생제를 대체할 수 있는 대체 제제를 요구하고 있었다. 그리하여 축사 악취를 감소시켜 환경을 개선시키는 미생물 제제와 항균 활성을 가진 가금 티푸스 억제 미생물 제제를 개발하는 내용을 원래 목적에 추가되었다.

구분	연구개발목표	평가의 착안점
1차 년도 (2000)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 파리 살충성 균주의 탐색</li> <li>- 선발된 균주의 안정성</li> <li>- 선발된 균주의 동정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·파리 살충성 균주 탐색</li> <li>·선발된 균주와 기존 화학 제품과의 살충성 조사 여부</li> <li>·균주 동정 여부</li> </ul>
2차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 파리 유충에 대한 살충성</li> <li>-시제품 제작</li> <li>-악취제거 미생물 선발(신규)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·Invivo와 Invitro상에서 선발 균주의 안정성과 급여 효율 조사 여부</li> <li>·악취 제거 미생물 선발 여부 (신규)</li> </ul>
3차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-가금 티푸스 억제 미생물의 선발 및 효능 실험(신규)</li> <li>-가축 사양 실험(보완)</li> <li>-고농도 배양 기술 확보</li> <li>-생산공정의 Scale-up</li> <li>- 미생물 제제의 제품화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·가금 티푸스 억제균 확보 여부 (신규)</li> <li>·가금 티푸스 억제제(신규)와 파리 살충성 미생물 제제와 악취제거 미생물제제의 첨가 효율(신규) 시험여부</li> <li>·시제품 제작 여부</li> <li>·Scale-up여부</li> <li>·제품화 여부</li> </ul>



## 제 2절 연구 개발 목표의 달성도

번호	평가 착안점	달성 내용	달성도	비고
1	축사 slurry의 균 분포도 조사	·전국 8도에 있는 양돈장 31곳으로부터 시료를 확보하고 균 분포도를 조사하였다.	100%	
2	파리 살충성 미생물의 선발	·파리 살충성이 뛰어난 미생물을 4종 분리( <i>B. thuringiensis</i> Wang 4, <i>B. thuringiensis</i> F 2, <i>B. licheniformis</i> M 10, <i>B. sphaericus</i> Gu 1-2)	100%	
3	악취 제거 미생물 선발	·휘발성 지방산 제거 및 암모니아 제거능이 뛰어난 균주 3개 분리( <i>B. licheniformis</i> KJ 2, <i>Alcaligenes faecalis</i> JTJ 18, <i>B. subtilis</i> SUN 2).	100%	
4	가금 티푸스 억제 미생물의 선발	·가금 티푸스에 특효가 있는 <i>Bacillus</i> sp. Gu 88, <i>Bacillus subtilis</i> Gu 31, <i>L. plantarum</i> Hans 1-19를 분리.	100%	추가 항목
5	특성 조사	·선정된 균 10개에 대하여 내 산성, 내 담즙성, 내 열성 조사	100%	
6	안전성 조사	·선정된 균에 대하여 간접적인 방법으로는 시험관내에서 발암 물질을 생성하는지 유무를 조사하였으며, 직접적인 방법으로 ICR마우스를 통하여 적혈구와 백혈구 수치 및 사료 효율.	100%	
7	대량 생산을 위한 생산 배지 선정	·선정된 균 10개를 대량 생산하기 위하여 산업용 배지로 최적화 하였고, 30ℓ를 배양기를 통하여 성능을 확인하고 3톤 배양기와 캐비넷 건조기를 이용하여 시제품을 제작하여 동물 시험에 공시하였다.	100%	
8	시험 생균제의 동물 효능 시험	·축사 파리 살충성 미생물 제제와 악취 제거 미생물 제제는 경남 산청의 양돈장에서 실시하여 파리 살충성 효과와 암모니아 제거 효과를 검증하였고, 가금 티푸스 억제 미생물제제의 사양 실험은 경기도 화성의 산란계장에서 실시하여 장내 대장균 억제 능력과 산란율 및 폐사율을 개선시키고 계란의 품질을 향상시키는 등 가금 티푸스 균을 공격 집중한 초생추에서 생균제 급여에 의한 효과 확인.	100%	

## 제 3절 관련 분야의 기여도

### 1. 파리 살충성 미생물 및 악취 제거 미생물의 개발

파리 살충성에 대한 제품은 국내뿐만 아니라 국외의 동물 약품 회사들이 화학 제제의 개발에 많이 의존해 왔다. 최근 Bio에 대한 관심이 높아지고 환경적인 차원에서 농약과 화학 제제의 심각성이 부각되어 현재는 이에 대한 연구가 느리게 진행되고 있다. 그러나 축사 파리 제거에 대한 실험은 아직 미비하며, 곤충의 에벌레 진딧물 응애 등에 미생물 살충제는 많이 개발되고 있으며, 현재 국내에서도 미생물 살충제만을 전적으로 연구하고 제조하는 벤처 회사들도 생겨나고 있다. 현재 국내의 동물 약품 회사에서 이러한 제품을 구상하고 제조한 것은 처음 있는 일이며, 더 좋은 파리 살충성 미생물을 제제를 만들고자 하는데 기초가 될 수 있다. 본 실험에서는 축사 파리 살충성 미생물을 선발하기 위한 하나의 방법을 정립하여 축사에서 발생된 파리의 수를 정량화 하는데 어려웠던 부분을 본 실험에서는 간접적인 방법으로 측정할 수 있었다. 이 미생물 제제는 동물 급여와 축사 주변에 살포하는 두가지 측면에서 효과를 더 검증하여 상품화할 계획이다.

### 2. 악취 제거 미생물 제제의 개발

분변에서 분리하여 분변에서 잘 성장하는 균주를 선발하고자 하는 전략이 유효하였다고 보여지며 실제 동물에 급여시에도 암모니아 가스 억제 효과가 뚜렷하여 축사 환경 개선에 큰 도움이 될것으로 기대된다. 악취 제거를 주장하는 생균제가 될것으로 기대된다. 악취 제거를 주장하는 생균제가 최근 많이 시판되고있어 비교 검정을 해 보아야 하지만 사양 실험 성적만으로 우수한 결과를 얻었다고 평가된다.

### 3. 가금 티푸스 억제 미생물 제제의 개발

현재, 국내에서 유통되고 있는 양계용 probiotics제품을 수거 검토해본 결과 효능이 입증되지 않는 제품이 난무하고있는 실정이다. 그리고 국내의 가금 티푸스 상재율은 90%이상으로서 이병에 대한 심각성은 아주 높다. 현재 가금 티푸스에대한 항생제제들이 많이 나오고 있지만, 이 항생제에 대한 내성이 심각하여 권장 항생제 용량의 10배 이상을 첨가해도 치료되기 어려운 실정이다. 서

구 선진국에서는 항생제 내성의 심각성과 차세대 항생제 개발 및 내성을 방지하기 위하여 사료에 항생제 첨가를 제한하고 있다. 국내에서도 그와 더불어 몇몇의 항생제를 사료 첨가제로서 사용 제한하고있는 실정이다.

본 연구를 통하여 가금 티푸스 예방용 미생물 제제를 초생추에 급여 티푸스 균을 공격 접종 시 방어 효과가 높음을 증명하였고, 산란계에 투여시 사양성적을 개선시키고 계란의 품질을 높였을 뿐만 아니라 시험기간 중 약 4. 5개월 항생제를 사용하지 않고 질병 발생이 없어 항생제 대체제로서 유용하다는 결과를 얻은 점등은 아직 티푸스를 예방할 수 있는 생균제에 대한 정보가 없는 상황에서 양계 농가의 소득 증대와 청정 생산에 크게 기여 할 것으로 생각된다.

## 제 5 장. 연구 개발 결과의 활용 계획

1. 본 실험에서 분리된 파리 살충성 미생물은 총 4개로서 *B. thuringiensis* Wang 4, *B. thuringiensis* F 2, *B. licheniformis* M 10, *B. sphaericus* Gu 1-2이다.

*B. thuringiensis* 균주로는 파리 살충성이 보고된 예가 소수 있지만 뒤의 2종은 아직 보고된 예가 없다. 위탁 기관에서 수행한 독소 단백질 분리를 위한 실험에서 뒤의 2종은 기존에 알려진 내독소를 발현하는 유전자를 갖고 있지 않아서 이들 균의 살충 기작에 대한 연구가 향후 진행되어야 한다.

이 균은 *Bacillus* 종류로서 건조 시 건조효율이 아주 높아 제품을 생산하기가 용이하고, 장관의 산성 조건 및 담즙성 조건에 내성이 좋아 생존 경쟁이 치열한 장내에서 우선 선점할 수 있는 좋은 조건을 갖추었으며, 분변 혹은 slurry와 같은 악조건에서 잘 생존 할 수 있기 때문에 제품화하기에 좋은 것으로 기대된다. 또한 사료 제조 시 직접 첨가하여 제조 시 열에 대한 내성이 좋아 펠렛팅의 온도에서도 생존할 수 있어, 사료 첨가제로도 유용하다.

2. 광합성 세균을 이용하여 악취 제거를 시도하려는 움직임이 일어나고 있다. 광합성 세균은 배양 시간이 약 7~20일 정도로 길고 빛에 반감기가 짧아 처음 효과는 좋지만 지속성이 떨어진다. 그리고 배양시간이 너무 긴 관계로 인하여 다른 병원성 균에 오염이 될 수 있으며, 이러한 실증적인 예들도 있다. 광합성 세균을 사료 첨가제로 급여하여 장내에서의 생존 효율도 증명된바가 없고, 사료 효율에 대한 자료도 부족한 실증이다. 본 실험에서 축사 악취 제거제로 개발된 미생물인 *B. licheniformis* KJ 2, *Al. feacalis* JTJ 18, *B. subtilis* SUN 2은 사료 효율과 암모니아 제거율이 좋은 것으로 나타났으며, 또한 분변에서의 우점율도 높았다. 또한 이균을 제품화하기 위하여 소요되는 시간이 총 72시간이면 충분한데 반하여 광합성 세균은 약 10일 이상이 소요되어 시간 대비 경제성이 떨어짐으로서 이 연구의 효과 인정되며, 파리 살충성 미생물 제제와 마찬가지로 내 산성 내 담즙성, 내열성이 좋아 사료 첨가제로서 사용할 수 있으리라 기대된다.

3. 항생제의 과다 사용으로 인한 양계장의 대장균의 항생제 내성율이 아주 높은데도 불구하고 본 생균제 투여시 대장균의 수치와 산란율 및 폐사율이 줄어들고 산란율 및 계란의 품질이 개선되었다. 이것은 사료 내에 항생제 대신 개발 생균제의 투여가 가능하며 가금 티푸스 상시 예방용으로서 사용하여도 무

방할 것으로 판단되는 대목이다. 그리고 일본 및 동남에서도 이러한 효능을 가진 생균제가 개발된 적이 없어 수출이 용이 할 것으로 생각된다.

4. 생균제는 항생제에 비하여 우선 효과가 느리기 때문에 대상 동물의 상태, 성장 단계, 생균제의 투여 방법, 투여량 및 사육 환경 등에 의해서 효과에 영향을 받는다. 또한 모든 생균제가 모든 동물에 대하여 효과가 있을 것으로 생각되지만 적합한 생균제를 선택하여 투여해야만 효과적이다. 항생 물질의 사용은 가축의 질병 치료에 국한하고 치료 후 회복기에는 생균제를 사용하여 가축의 건강과 생산성 및 축산물의 안전성을 높이고 항생제의 오용 및 남용을 막을 수 있는 대체제로서 생균제의 활용이 예상된다.

5. 항균 활성을 가지는 균주를 선별하여 만성적이고 재발 가능한 가금 티푸스를 예방하고 치료하기 위하여 미생물 제제의 경구투여 확립과 소화 효소나 장내활성에 필수적인 성분을 생산하는 세균을 만들기 위한 유전학적인 조작기술의 도입등을 통해 기존의 제품보다 우수한 생균제 제품을 개발할 수 있다. 또한 선발된 유산균주는 가금 티푸스 원인균등 유해 미생물 억제 효과가 높아서 양돈용 및 양계용 생균제 이외에도 인체용 생균제로의 제품 개발 및 활용이 적극 기대된다.

6. 이를 요약하면, 축종 별로 전문화되고 기능이 부가된 생균제를 제품화하려는 것으로, 첫째, 축사 파리 구제 미생물과 악취 제거 미생물을 혼합하고, 효모와 유산균을 첨가하여 축사 환경을 개선 할 뿐만 아니라 생산성을 높이는 돼지용 생균제를 대량 생산하여 상품화하고, 둘째, 가금의 장내 병원성 균 특히 티푸스를 예방치료하고 생산 효율을 높이는 가능성이 있는 가금용 생균제를 상품화하며, 셋째, 향후 추가 연구를 통해 항균 활성이 높은 유산균주를 식품용으로 개발하는 것을 포함한다.

## 제 6 장. 연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술 정보

집파리인 *Musca domestica* L.은 축산 농가에 평범하게 존재하는 해충이다 (Mullens 와 Meyer, 1987 ;Lysyk, 1993). 파리의 대부분은 공공 건강에 관계되어있고, 공공 단체에 폐를 끼친다(Miller, 1993). 파리의 수는 적지만, 생산자에게 경제적인 피해를 끼치는 원인이 된다. 파리나 해충에게 물리는 것은 착유 우를 짜증나게 하는 큰 원인이며, 마굿간 파리에게 많이 물렸을 때, 착유 우는 사료를 적게 먹고, 증체율이 유효하게 감소한다(Campbell 등., 1977 ; Catangui 등., 1993).

몇몇의 곰팡이들은 마굿간 파리와 집파리를 통제하는 것으로 평가되었다. 실험상에서 *Entomophthora muscae*(Cohn) Fresenius는 집파리를 쉽게 감염시켰지만, 마굿간 파리에게는 그렇지 못하였다(Kramer와 Steinkraus, 1981).

1901년 Ishiwata가 벼에 걸린 누에 유충에서 분리한 *Bacillus sotto*(*Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*)가 최초로 발견된 *Bacillus thuringiensis*로 알려졌으며, 그람 양성의 간균으로 포자 형성시 단백질을 만드는 것이 특징이다(Ishiwata, 1901). *B.thuringiensis*의 연구 순서를 살펴보면 독일의 Berliner에 의한 *Bacillus thuringiensis* Berliner의 발견(Berliner, 1911), 나비목 회충에 대해서 살충성이 강한 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 발견(Kurstak, 1962), 살충력이 더 우수한 *B. thuringiensis* subsp. *kurstakin* HD-1 strain의 발견(Dulmage, 1970), 파리, 모기드의 파리목 해충에 살충력이 있는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*의 발견( Godberg와 Margalit, 1977), 딱정벌레목 해충에 효과가 있는 *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*의 발견으로 이어진다(Krieg등., 1983).

육계에 *B. subtilis*의 급여가 영양소 소화율과 이용율을 높이고, 질소의 배설량을 감소시켜서, 결과적으로는 NH<sub>3</sub>의 발생량을 줄이는 효과가 있다고 하고 (Santose, 1999), Yeast culture는 아미노산 조성이 우수하여 닭에 대한 아미노

산 소화률이 98%라고 한다(Allen, 1991). 또한 Yeast 성장을 위하여 필요한 Zn와 Fe등과 같은 광물질을 유기태로 전환하기 때문에 우수한 광물질 공급원이며(Brenner, 1981), 비타민의 좋은 공급원으로서 가축의 영양과 장내 미생물의 성장에 좋은 조건을 만들어 준다고 한다(Wu, 1987). 효모의 세포벽은 전체 무게의 약 30%를 차지하고 두께가 100~200nm로  $\beta$ -glucans,  $\alpha$ -mannans등의 고단위 화합물로 되어 있어 이들의 자가분해를 위한 효소가 다량 생산되어 분비된다(Lyons, 1986). 또한 장내 미생물에 대한 농축된 영양소의 공급원으로서 작용하며(Cartwright등, 1986), 산소와 강력한 친화력을 가지고 있기 때문에 장내의 Free radical한 산소를 제거하여 혐기 상태를 만들어 줌으로써 혐기적 유익균의 증식을 도와줌과 동시에 간접적으로 증체량, 사료 효율등을 개선시킨다는 보고도 있다(Rose, 1987; Pagan, 1989; Newbold등, 1990, Shin 등, 1990).

그러나 효모는 nucleic acid 함량이 높아서 육계에 과다하게 급여될 경우 혈중과 뇨중의 uric acid 함량이 급증하게 되고(Edozien등, 1970; Waslie등, 1970) 증가된 체내의 uric acid가 성장 억제 현상을 일으키는 단점이 있다고 보고하고 있다(김과 이, 1974).

돼지에게 생균제 급여시 가축의 성장률과 사료 효율의 개선효과가 있다는 보고도 있으나, 돼지에 대한 생균제의 급여 효과가 없다는 보고도 많이 발표되어, 생균제의 첨가 효과가 일관성 있게 나타나지 않음을 알 수있으며, 그 이유에 대해서도 명확히 알려져 있지 않다.

돼지의 장관에 분포하고있는 유산균으로는 *Lactobacillus acidophilus*, *L. delvruueckii*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *Enterococcus bovis*, *Ent. bovis*, *Ent. faecalis*, *Ent. faecium*, *Streptococcus intestinalis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bif. suis*등이 보고되었으며, 이중에서 *Lactobacillus* spp.나 *Streptococcus* spp.가 생균제로 많이 사용되고 있다. 이외에도 *Bacillus* spp., *Clostridium butyricum*, *Saccharomyces*, yeast등이 생균제 균주로 사용되고 있다. 가축의 소화관내에는 다양한 세균이 상존하며 장내 균총을 형성하고 있다(Conway 등, 1987; Danielson 등, 1989; Gomis등, 2002; Klaver등, 1993; Lee등, 1999; Lilly와 Stillwell, 1965). 균종과 균수는 소화관의 각 부위에 따라 다르지만 일반적으로 소화관 상부에는 호기성균, 소화관 하부로 갈수록 전반적으로 혐

기성 균이 가장 우세한 균총을 형성하고 있다(Fuller, 1992). 이들 세균은 숙주에게 유용 균과 유해 균으로 공생하면서 정상적인 장내 균총을 형성하고 있다(Robinson 등, 1984; Simon,과 Gorbach, 1984).

축분의 대사 과정에서 발생하는 악취는 가축이나 사람에게 유해한 물질이며 그 중 암모니아는 무색의 기체로서 자극성이며 특이 취를 나타내는데 가금류에는 특히 각 결막염의 주된 원인이 되며 20ppm 농도로 72시간을 지속적으로 노출 시켰을대 뉴 캐슬 질병이 발생하고 체중 감소와 생식기 질병을 가져온 것으로 보고 되고 있다(Bullis 등, 1950; Anderson 등 1964).. Bnegtsson등(1960)은 암모니아와 황화수소 가스는 반추 가축에 유해하다고 보고하였으며, Hannana(1972)는 축산 농가에서 발생하는 악취 오염의 주된 성분은 n-butyric acid, iso-butyric acid, n-valeric acid, iso-valeric acid등의 휘발성 지방산이라고 하였으며, 한 등(1984a)은 돈분의 악취 성분으로 암모니아, 황화수소, sketol, intole, cresol, 휘발성 지방산 등이 있다고 하였다.

최근 여러 가지 미생물을 이용하여 생물학적 방법을 통한 비교적 간단하게 악취를 제거하는 방법이 주목을 받고 있다. Terada 등(1993)등은 live stock clean system(BLCS)이 돈분내의 유해 세균의 성장을 억제하고 악취에 관련되는 물질인 ammonia, sulfide, skatole, indole, cresol, 휘발성 지방산 등의 함량을 낮추어 악취를 제어하는 효과가 있다고 하였다.

Ohta와 Sato(1985)은 악취 성분을 분해하는 seed culture미생물로 *Coynebacterium* spp., *Rhodococcus* spp.를 분리하였으며 가축분뇨의 무취에 성공하였고, 미생물을 이용한 무취화 방법 중 pH,온도, 통기성 등이 중요한 요인으로 작용된다고 하였다. Brock와 Mdigan(1988)은 혐기 악취 성분인 모노 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민 등이 호기성 조건하에서 메탄 자화성 균과 1가 탄소원 화합 물질 자화성 균에 의해서 분해된다고 하였다.

악취 물질의 생물 처리에 관여하는 미생물에 대한 연구보고는 간헐적으로 존재하여 황화수소를 처리한 토양 처리 여재에서 *Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Streptomyces*, *Thiobacillus* 종들이 동정되었고(Carlson과 Leiser,



1996), 황화수소, dimethyl sulfide, dimethyldisulfide, methanethiol을 분해하는 곰팡이 종류인 *Basidiomycetes*가 토양에서 분리되었으며(Phae와 Soda, 1991), 퇴비 여재를 사용한 biofilter에서는 *Actinomyces globisporus*, *Penicillium* sp., *Cephalosporium* sp., *Mucor* sp., *Micromonospora albus*, *Micrococcus albus*, *Ovularia* sp. 등이 보고되었고(Kneer, 1976), 피트 필터에서는 *Pseudomonas acidovorans*(Zhang, 1991)등이 분리되었으며, Biofilter에서는 *Corunbebacterium*, *Gordona*, *Mycobacterium*, *Arthrobacter*속을 분리하였다고 보고하였다(Bendinger, 1992).

## 제 7 장 참고 문헌

Allen, R. M. D. 1991. Ingestion and absorption of carbohydrates and proteins. In: L. R. John(Ed) Physiology of the Gastrointestinal Tract. Second Edition. Raven Press. NY. pp. 1469.

Anderson, D. P., Beard, C. W. and Hanson, R. P. 1964. The adverse effects of ammonia on chickens including resistance to infection with New castle disease virus, Avian Diseases, 8: 360 ~ 379.

Bendinger, B. 1992. Chemotaxonomic differentiation of Coryneform bacteria isolated from biofilters. Int. J. System. Bacter. 42. 474 ~ 482.

Bengtsson, G., Ekesbo, I. and Jacobsson, S. O. 1965. Ett presumtivt fall av kroni godelgasforgifning Sartryck ur Sven Veterinartidning. 8. 1 ~ 7.

Berliner, E. 1911. Uber die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe. Z. Gesamte Getreidewesen(Berlin). 3. 63 ~ 70.

Brenner. M. 1981. Institute of Brewing. 87.

Brock, T. D. and Madigan, M. T. 1988. Biology microorganisms(5th ed) Prentence Hall, P. 835.

Bullis, K. L., Snoeyenbos, G. H. and Van Roekel, H. 1950. A. Keratoconjunctivitis in chickens Poultry Sci. 29. 386 ~ 389.

Campbell, J. B., White, R. G., Wright, J. E., Crookshank, R., and Clanton, D. C. 1977. Effects of stable flies on weight gains and feed efficiency of calves on growing or finishing rations, J. Econ. Entomol. 70. 592 ~ 594.

Catangui, M. A., Campbell, J. B., Thomas, G. D., and Boxler, D. J. 1993. Average daily gains of brahman-crossbred and english X exotic feeder heifers exposed to low, medium, and high levels of stable flies(Diptera:Muscidae). J. Econ, Entomol. 86. 1144 ~ 1150.

Conway, P. L., Gorbach, S. L. and Goldin, B. R. 1987. Survival of Lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion of intestinal cells. J. Dairy Sci. 70. 1 ~ 12.

Carlson, D. A. and C. P. Leiser. 1996. Soil beds for the control of sewage odors. J. Water Pollut. Control. Fed. 38, 829 ~ 840.

Cartwright. C. P., Juroszek, J. R., Beavan, M. T., Ruby. F. M. S., de Morais, S. M. F. and Roe A. H. 1986. Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane *saccharomyces cerevisias*. J. General Microbioal. 132. 369 ~ 374.

Edozien, J. C., Udo, U. U., Joung, V. R. and Scrimshaw, N. S. 1970. Effects of high levels of yeast feeding on ruic acid metabolism of oung men, Nature, London. 228. 180 ~ 188.

Fuller, R. 1992. Probiotics : The Scientific basis. Champman and Hall. 1 ~ 13.

Goldberg, L. H. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstration rapid larvicida activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univattatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News. 37. 355 ~ 358.

Gomis S, A. K. Amoako, A. M. Ngeleka, L. Belanger, B. Althouse, L. Kumor, E. Waters, S. Stephens, C. Riddell, A. Potte, and B. Allan. 2002.

Histopathologic and bacteriologic evaluations of cellulitis detected in legs and caudal abdominal regions of turkeys. Avian Dis 46. 192 ~ 197.

Ishiwata, S. 1901. On a kind of severe flacherie(sotto disease). Dainihon Sanshi Kaiho. 114. 1 ~ 5.

Klaver, F. A. M. and R. van der Meer. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugation activity. Appl. Environ. Microbiol. 59. 1120 ~ 1124.

Kneer, F. 1976. Einrichtung Zum Abscheiden gasformiger organischer Verunreinigungen aus Abgasen. German Patent 2. 4. 45. 315(CLB0ID)

Krieg, A., Hugger, A. M., Langenbruch, G. A. and Schnetter, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebroinisein* neuer, gegen ber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. Z. Ang. Entomol. 96. 500 ~ 508.

Kurstak, E. 1962. Entomophaga, Mem. Hors. Ser. 2. 245 ~ 247.

Lee. W. K., Lee, S. M. and Bae. H. S. 1999. Effect of *Bifidobacterium longum* HY8001 administration on human fecal bacterial enzymes and microflora. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27. 267 ~ 272.

Lilly D. M and Stillwell, R. 1965. Probiotics : growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147. 747 ~ 748.

Lyons, P. 1986. Yeast : Out of the black box. feed management. Vol. 37. 8~14.

Miller, R. W. 1993. The influence of dairy operations on the urban fly

problem. In "Rural Flies in the Urban Environment?"(G. D. Thomas and S. R. Skoda, Eds) Agric. Res. Div. IANR, Univ. of Nebraska-Lincoln. Rs. Bull. No. 317.

Mullens, B. A. and Meyer, J. A. 1987. Seasonal abundance of stable flies(Diptera:Muscidae) on California dairies. J. Econ. Entomol. 80. 1039 ~ 1043.

Newbold, C. J., Williams, P. E. V., Mackin, N., Walker, A. and Wallace, R. J. 1990. Effects of yeast culture on yeast numbers and fermentation in the rumen of Nutr. Soc. 1989.

Ohta, Y. and Sato, H. 1985. An artificial medium or deodorant microorganism. Agri. Biol. Chem. 49. 1195 ~ 1196.

Pagan, J. P. 1989. Calcium, bind gut function affect phosphorus need. Feedstuffs. August. 21.

Phae, C. G. and Soda, M. 1991. A new fungus which degrades hydrogen sulfide, methanethial, dimethyl sulfide and dimethyl disulfide, Biotechnol. Lett. 13, 375.

Robinson, I. M., Whipp, S. C. and Bucklin, J. A. 1984. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. Appl. Environ., Microbiol. 24. 285 ~ 306.

Rose, A. H. 1987. Yeast. a microorganism for all species: a theoretical look at its mode of action. 113 ~ 115.

Santose, U., Ohtani, S., Tanaka, K. and Sakida, M. 1999. Dried Bacillus

subtilis culture ammonia gas release in poulter house. Asian-Aus. J. Anim. Sci. 12. 806.

Shin, H. T. Bae, H. D., Chung, K. W., Kim, Y. K., Shon, J. H. and Lee, S. K. 1990. Evaluation of live yeast culture as source of probiotics for broiler. 5th AAAP:3:1.

Simon, G. L. and Gorbach, S. L. 1984. Intestinal flora in health and disease. Gastroenterology 86. 174 ~ 193.

Terada, A., Hara, H., Li, S. T., Yagi, S., Ichikawa, H., Nichi, J., Ko, S. H. and Itsuoka, T. 1993. Effect of microbial preparation and fecal flora and fecal metabolic products of pigs. Anim. Sci. Technol. 65. 806 ~ 814.

Waslie, C. I., Calloway, D. H., Margen, S. and Casgta, F. 1970. Uric acid levels in men fed algae and yeast as protein sources. J. Food. Sci. 35. 294 ~ 297.

Wu, J. F. 1987. The microbiologist's function in developing action-specific microorganisms. Altech technical publications. 181 ~ 197.

Zhang, L. 1991. Oxidation of dimethyl sulfide pseudomonas acidovaorans DMR-11 Isolated from Peat Biofilter, Biotechnol. Lett. 13. 223 ~ 227.

협동 연구 과제

사료 첨가용 미생물 탐색 및 선발 균주  
특성 조사

Screening for microorganisms suitable as feed  
additives and characterization

2003 8월 일

연구기관명 : 연 세 대 학 교

생물자원공학과

연구책임자 : 정 건 섭

연구 원 : 고 현 정

우 석 규

## 요약문

### I. 제목

사료 첨가용 미생물의 탐색 및 선발 균주의 특성 조사

### II. 연구 개발의 목적 및 필요성

본 협동 연구 과제는 3년에 걸쳐서 이루어졌다. 1차 년도에는 항균활성을 가진 유산균을 선발하였고, 2차 년도에는 단백질 분해 효소(protease)와 인 분해 효소(phytase)를 가진 미생물을 선발하여 그 특성을 조사하였고, 3차 년도에는 중앙 바이오텍에서 개발한 파리 살충성 미생물이 분비하는 독소 단백질질을 분리 정제하여 이 균의 특성을 조사하였다.

### III. 연구 개발의 내용 및 범위

연구 개발 1년 차에는 사료 첨가용 유용 젖산균주를 선발하기 위하여 여러 지역의 원유시료와 축분과 여자의 질 분비액과 김치류와 부패과일로부터 균주를 분리하여 항균 활성과 내 산성과 내 담즙성이 있는 균주를 선발하였으며, 2차 년도에는 동물 사료 첨가용 phytase와 protease를 생성하는 균을 선발하여 효소를 정제하고, pH와 온도에 안정성과 phytase가 갖는 특이성과 phytase의 Km 및 Vmax값을 측정하였다. 그리고 마지막으로 3차 연도는 중앙바이오텍에서 분리 개발한 파리 살충성 미생물을 분양 받아 각각 균들의 DNA를 분리하고, 아포 및 살충성 내독소 결정체를 분리하였으며, SDS PAGE를 이용하여 순도와 하위 단위체의 크기 및 수를 검토하여 독소 단백질질을 확인하였다.

### IV. 연구 개발 결과

사료 첨가용 유용 젖산균을 선발하기 위하여 총 시료 994개로부터 3,041주의 미생물을 분리하여 항균 활성이 높은 균주 12주를 분리하였다. 분리주를 이용하여 내 산성을 조사한 결과 pH 3에서는 분리주 모두가 생존하였으나, pH 2에서는 23-3번 균주를 제외한 모든 균주가 사멸하였다. 내 담즙성을 조사한 결과 oxgall 0.5%에서도 분리 균주 모두가 생존하였다. 이러한 실험 결과로 보아 사료 첨가용 생균제 균주로서 검토하기에 좋은 균주로 판



단되었다.

유용 효소를 생성하는 사료 첨가용 미생물을 선발하기 위하여 돼지 및 소의 위, 장내용물 및 가축 분뇨 등으로부터 포자를 형성하는 미생물을 분리하였으며, phytase와 protease활성이 가장 높은 균주를 분리하여 동정한 결과 *Bacillus subtilis* CF 5-26이라 명명하였다. 이 균이 생성하는 phytase의 분자량을 측정된 결과 34kDa이며, 열 안정성은 100℃까지 안정하였으며, 효소 기질 특이성은 sodium phytate에 활성이 뛰어났으며, 효소의 Km과 Vmax값은 0.64mM과 4.41μmol/min이었다. 열 안정성 높은 효소를 생산하는 것으로 보아 이균 배양물을 원천 사료에 첨가하여 이용하는 것도 가능하리라고 판단된다.

중앙 바이오텍에서 총 6개 균주의 내독소 단백질 결정체의 생성유도를 위해 GYS 배지를 사용하여 배양하였다. 아포 및 살충성 내독소 결정체를 분리하기 위하여 GYS 배지에서 배양한 다음 원심분리하여 침전물을 멸균 증류수로 세척하였다. 65~85%의 sucrose 선상 구배 밀도를 조성하여 배양 침전액 3~5ml을 점종한 다음 초 원심 분리하였다. 원심분리를 통하여 1개의 단백질 층과 cell pellet를 확인하였으며, 내독소를 분리하여 현미경으로 사진 촬영한 결과 외형이 주름진 구형의 모습을 갖추고있었다. 그리고 분리된 B.t 균주는 PCR에 의해서 1529bp를 얻을 수 있었지만, *B. lichformis* M 10과 *B. subtilis* Sa 4와 *B. sphaericus* Gu 1-2균주와 *B. stearothermophilus* Na 4는 밴드가 나타나지 않았다.

본 실험에 사용한 선발 우수 젖산 균주와 유용 효소를 생성하는 균주와 주관기업에서 검증한 파리 살충성 균주를 생균제로서 활용할 경우 해외에서 수입에 의존하고있는 생균제용 균주를 국산화 할 수 있을 것으로 생각된다.

# 목 차

제 1 장 연구 개발 과제의 개요 .....	6
제 1 절 연구 개발의 목적 .....	6
제 2 절 연구 개발의 필요성 .....	6
제 2 장 국내외 기술 개발 현황 .....	7
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과 .....	8
제 1 절 연구 내용 .....	8
1. 유용 젖산 균주의 탐색 및 선발 균주의 특성 .....	8
가. 젖산균 분리 .....	8
나. 항균활성 측정 .....	8
다. 1차 선발 미생물의 특성조사 .....	8
라. 내 산성 조사 .....	9
마. 내 담즙성 조사 .....	9
2. 동물사료첨가용 유용 효소(phytase 및 protease) 생산 균주의 탐색 및 효소의 정제    가. 효소 활성 우수 균주의 분리 .....	10
나. 분리 균주의 동정 .....	10
다. 효소 활성 측정 .....	10
라. 효소의 정제 .....	11
마. 전기 영동 .....	12
바. pH 및 온도에 대한 안정성 .....	12
사. Phytase의 기질 특이성 .....	12
아. Phytase의 Km 및 Vmax 측정 .....	13
3. 파리 살충성 미생물이 분비하는 독소 단백질의 분리 정제 .....	13
가. Primer의 설정 및 DNA 분리 .....	13
나. PCR 조건 .....	11
다. 균주의 배양 및 배지 조건 .....	14
라. 아포 및 살충성 내독소 결정체의 분리 .....	14

마. 내독소 결정체의 전자현미경적 관찰 .....	15
바. 내 독소 단백질의 용해와 단백질 분해 효소에 의한 활성화 .....	15
사. SDS-PAGE .....	15
제 2절 연구 결과 .....	17
1. 유용 젖산 균주의 탐색 및 선발 균주의 특성 .....	17
가. 분리 원으로부터 젖산균주의 분리 .....	17
나. 항균활성 젖산균주의 탐색 .....	17
다. 선발 미생물의 특성조사 .....	19
라. 선발 미생물의 내 산성 조사 .....	19
마. 선발 미생물의 내 담즙성 조사 .....	21
2. 동물사료첨가용 유용 효소(phytase 및 protease) 생산 균주의 탐색 및 효소의 정제 .....	22
가. 균주의 분리 및 동정 .....	22
나. 분리 균주의 생육곡선 .....	24
다. Phytase 생산을 위한 분리 균주의 배양 조건 검토 .....	24
라. 효소의 정제 .....	25
마. 전기 영동 .....	30
바. pH 및 온도에 대한 안정성 .....	31
사. 효소의 기질 특이성 .....	33
아. 효소의 Km 및 Vmax 측정 .....	34
3. 파리 살충성 미생물이 분비하는 독소 단백질의 분리 정제 .....	34
가. PCR 실험 .....	34
나. 균주의 배양 및 배지의 조건 .....	36
다. 아포 및 살충성 내독소 결정체의 분리 .....	36
라. 내독소 결정체의 전자현미경적 관찰 .....	37
마. SDS-PAGE .....	38
(참고자료). PCR을 통하여 확인한 독소를 분비하는 영역의 DNA 염기 서열 .....	40
제 4장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도 .....	43

제 1절 목표 달성도 .....	43
제 2절 관련 분야에의 기여도 .....	44
제 5장 연구 개발 결과의 활용 계획 .....	45
제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술정보 .....	46
제 7장 참고문헌 .....	48

# 제 1 장 연구 개발 과제의 개요

## 제 1 절 연구 개발의 목적

본 협동 연구 과제는 3년에 걸쳐서 이루어졌다. 1차 년도에는 항균활성을 가진 유산균을 선발하였고, 2차 년도에는 단백질 분해 효소(protease)와 인 분해 효소(phytase)를 가진 미생물을 선발하여 그 특성을 조사하였고, 3차 년도에는 중앙 바이오텍에서 개발한 파리 살충성 미생물이 분비하는 독소 단백질을 분리 정제하여 이 균의 특성을 조사하였다.

## 제 2절 연구 개발의 필요성

현재 가축의 성장 촉진 목적으로 사용되고 있는 사료 첨가 항생제는 매년 그 사용량이 증가 하고있는 추세에 있지만, 항생제의 남용과 오용은 오히려 내성 균주의 증가로 질병예방 및 치료에 문제점이 있다. 그리하여 항생제 대신 이를 대체할 수 있는 물질 혹은 미생물 제제를 많이 연구하고있지만, 아직도 산업현장에 정착화 되고 있지 않은 실정에 처해 있다.

가축의 사료 효율을 개선시키기 위하여 사료에 여러 가지 미량 물질을 많이 첨가하고 있지만 가축의 장내에서 분해 흡수가 많지 못하고 분변으로 빠져나가는 실정이다.

Phytase는 원료 사료의 phytate분해에 따른 인을 비롯한 미네랄, 단백질, 아미노산 및 전분 등의 이용성을 증대 시켜 사료의 이용 효율 및 분변으로 배설되는 인 함량을 감소시켜 환경 오염을 줄일 수 있는 효소이고, Protease는 단백질 가수 분해 효소로서 단백질 및 아미노산의 이용 효율을 높인다.

축사 주위 환경에 서식하는 파리, 모기, 나방류 등과 같은 해충류는 병원체를 전파 매개하는 수단이므로 이들을 구제 박멸하는 것이 시급한 실정에 있다. 그러나 이들을 박멸하기 위한 구충제의 대부분이 화학 제품이므로 환경을 오염시킬 뿐만 아니라 생태계에도 치명적인 손상을 입히는 문제점을 갖고 있기 때문에 환경 친화적인 축사 파리 박멸용 미생물 제제의 개발이 시급한 실정에 있다.

## 제 2장 국내외 기술 개발 현황

가축 정장제로 현재 시판하고 생균제용 유산균주로는 정상 장내 세균총 중에서 유용한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 대표적인 유산균인 *Lactobacillus*, *streptococcus*, *Bifidobacterium* 등이 있다. 이와같은 유산균주는 위산에 대한 저항성과 담즙산에 대한 저항성과 사료 첨가시 펠렛 제조 과정에서 내열성 및 기존의 사료 첨가용 항생제에 대한 저항성이 높은 균주를 선발하고, 저장 상태에서나 사료 첨가시 안정성 및 생존성이 높은 균주를 선발하여 가축용 생균제로 사용하고 있다. 그러나 이와 같은 가축용 생균제의 원료인 원말은 거의 대부분이 외국에서 수입하고 있다.

그리고 현재 미생물 살충제들도 많이 개발되고있지만 현재 실용적으로 효과가 있는 제품이 거의 없다. 현재 고추 역병이나 오이 무름병 용 미생물 살충제가 개발 시판되고 있지만 이 미생물은 반감기가 짧아 토양에 오래 유지되지 못하며, 비가 오면 옆면 살포한 미생물이 비에 쓸려가 효과를 거두지 못하는 경우가 허다하다.

## 제 3장 연구 개발 수행 내용 및 결과

### 제 1절 연구 내용

#### 1. 유용 젖산 균주의 탐색 및 선발 균주의 특성

##### 가. 젖산균 분리

젖산균의 분리를 위해 경기 북부지역에서 돼지 및 소의 장내용물을 수집하였고, 당진, 서산 지역에서 원유시료와 축분을 수집하였다. 원주지역의 산부인과로부터 vaginal track 채취 물을 입수하였고, 그밖에 김치류와 부패 과일 등을 분리 원으로 하였다.

젖산균 분리는 MRS배지(Difco Lab.)에 bromocresol purple과 phenethyl alcohol을 각각 0.2% 첨가한 평판배지에 희석하여 37°C에서 30시간동안 배양한 후 형성된 단일 colony를 MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다.

##### 나. 항균활성 측정

항균활성 측정을 위해 사용한 지시 균으로는 가축의 질병을 유발하는 *Salmonella choleraesuis* KCCM40763, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC19615, *Streptococcus agalactiae* KCCM11957, *Listeria ivanovii* KCTC3444, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC35150와 *Lactobacillus plantarum* ATCC14917, *Leuconostoc mesenteroides* KCCM11324 등이었다.

항균활성은 paperdisk 방법으로 측정하였다. 이때 지시균의 배양은 *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* O157:H7는 Nutrient배지(Difco Lab.)로 37°C에서 행하였고, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria ivanovii*는 BHI배지(Difco Lab.)로 37°C에서 하였다. 그리고, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*는 MRS 배지로 37°C에서 배양하였다.

##### 다. 1차 선발 미생물의 특성조사

항균 활성이 우수한 1차 선발미생물의 특성을 조사하기 위하여 Gram

염색, catalase 반응시험, spore 형성유무 시험을 실시하였다. Gram 염색 후 현미경 관찰을 하였고, catalase 반응시험은 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액을 배양액과 반응시켜 기포가 발생되면 catalase 양성으로 판정하였다. Spore 형성시험은 배양액을 MRS 액체배지에 한 백금이 접종하고 70℃에서 30분간 정치시킨 후 37℃에서 24시간 배양하면서 균체가 생기는지 확인하여 균체가 생성되면 spore 형성 균주로 판정하였다.

#### 라. 내 산성 조사

1차 선발 미생물의 내산성 조사는 인공위액에서의 내성을 실험하였다. 먼저 염산으로 MRS 액체배지의 pH를 1.0, 2.0, 3.0으로 조정한 후 각각에 배양액을 10%첨가하였다. 여기에 pepsin(Sigma Chem. Co.)을 0.04% 첨가하고 염산으로 배지의 pH를 다시 조정한 후 37℃에서 2시간 배양한 뒤 MRS 평판배지에 획선하여 colony형성 유무를 관찰하였다. 이때 colony 형성 균주를 내산성 우수 균주로 판정하였다.

#### 마. 내 담즙성 조사

내 담즙 산성을 조사하기 위한 인공 담즙 액은 MRS 액체배지에 Ox Gall Powder(Sigma Chem. Co.)를 0.1%, 0.3%, 0.5% 첨가한 것을 사용하였다. 인공위액 pH3.0에서 2시간동안 37℃에서 배양한 배양액을 인공담즙액에 각각 1% 첨가한 뒤 수산화나트륨으로 pH7.0으로 조정하였다. 여기에 pancreatin(Sigma Chem. Co.)을 0.01% 첨가한 후 37℃에서 20시간 배양한 뒤 MRS 평판배지에 획선하여 colony형성 유무를 관찰하였다. Colony형성 균주를 내 담즙성 우수 균주로 판정하였다.

### 2. 동물사료첨가용 유용 효소(phytase 및 protease) 생산 균주의 탐색 및 효소의 정제 가. 효소 활성 우수 균주의 분리

Phytase 활성 및 protease 활성이 있는 포자형성 균주를 탐색하기 위하여 소의 장내용물 및 분변 등에서 얻은 시료를 5ml의 생리 식염수에 현탁하고 70℃에서 1시간동안 방치한 다음 상층액 0.1ml을 1.5%(w/v) agar를 함유



한 phytase screening 배지에 도달한후, 37°C에서 3일간 배양하여 투명한이 생기는 균주를 1차 선발하였다.

이때, 투명한은 2%(w/v) CoCl<sub>2</sub> 용액을 붓고 30분동안 방치한 다음 6.25%(w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.42%(w/v) NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> 용액을 다시 첨가하여 산에 의한 투명한 생성 균주는 배제하였다.

1차 선발한 균주들은 phytase screening 액체배지에 배양한 후 sodium phytate를 기질로 하여 phytase 활성을 측정하였고, Hammarsten casein을 기질로 하여 protease 활성을 측정하여 효소 활성이 가장 높은 1균주를 최종적으로 선발하였다.

#### 나. 분리 균주의 동정

분리 선발한 균주의 동정을 위하여 Gram 염색 후 현미경 관찰, catalase 반응시험, spore 형성유무, 운동성 유무관찰 등을 하였고, 생화학적 특성을 조사하기 위하여 API 50 CHB kit(bioMeriux Co.)를 사용하였으며, 보다 더 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene sequencing 분석을 통하여 동정하였다.

#### 다. 효소 활성 측정

Phytase 활성은 유리된 inorganic phosphate의 양을 측정하였다. 150 $\mu$ l의 효소용액과 0.2%(w/v) sodium phytate를 함유한 0.1M Tris-HCl buffer(pH7.0) 600 $\mu$ l를 37°C에서 10분간 반응시킨후 750 $\mu$ l의 5%(w/v) TCA 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고 750 $\mu$ l의 발색시약을 첨가한 다음 37°C에서 30분간 반응시킨후 UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu Co.)로 700nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 효소용액 대신 활성측정 buffer를 첨가하여 상기와 동일한 조건하에서 활성을 측정하였다. 발색 시약은 1.5%(w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>를 함유한 5.5%(v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 2.7%(w/v) FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 용액을 4 : 1(v:v)로 혼합하여 이용하였다. Phytase 효소 활성 1unit은 상기 조건하에서 1분동안 1 $\mu$ mol의 Pi를 유리하는 효소량으로 나타내었으며, specific activity는 단백질 mg당 효소활성 unit으로 나타내었다.

Protease 활성은 Hammarsten casein이 가수분해되어 유리되는 tyrosine

의 양을 275nm에서 측정하는 변형된 Casein-Folin 방법으로 측정하였다. 효소 반응은 0.1M Tris-HCl buffer(pH7.0)에 용해시킨 0.6% Hammarsten casein 용액 900 $\mu$ l에 100 $\mu$ l의 효소용액을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 후 1.5ml의 0.4M TCA 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고 미분해 casein을 침전시키기 위해 실온에서 10분간 방치한 후 14,000rpm에서 10분동안 원심분리하여 상등액을 275nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank는 효소가 첨가되지 않는 상태의 용액을 반응액으로 하여 상기와 동일한 조건하에서 활성을 측정하였다. Protease 효소 활성 1unit는 상기 조건하에서 1분동안에 Hammarsten casein으로부터 1 $\mu$ g의 tyrosine을 생성하는 효소량으로 하였다. 단백질 함량은 Lowry법을 이용하여 분석하였으며 이때 검량곡선 작성을 위해 표준단백질로는 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 사용하였다.

#### 라. 효소의 정제

효소 생산 균주의 배양액을 10,000 g에서 15분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 미리 냉각한 ethanol을 상등액의 3배 부피만큼 첨가하여 -20 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치하였다. 이를 10,000 g에서 20분간 원심 분리하여 얻어진 침전물에 20mM sodium acetate buffer(pH 5.5)를 첨가하여 paste 상태로 만들어 원심 분리한 후 buffer에 녹지않는 물질을 제거한 상등액을 조 효소액으로 사용하였다.

Gel chromatography는 Sephadex G-100(Sigma Co.) 수지를 사용하였으며 20mM sodium acetate buffer(pH 5.5)로 용출하였다. 각 분획의 단백질 함량은 280nm에서의 흡광도로 표시하였고, 동시에 phytase와 protease 효소 활성을 측정하여 각각의 활성분획을 모아 동결건조 시킨후 각각 chromatography를 실시하였다.

Phytase 정제를 위하여 이온 교환 chromatography를 실시하였다. 양이온 교환수지인 CM Sepharose CL-6B(Sigma Co.) 수지를 사용하였으며, 20mM sodium acetate buffer(pH5.0)에 NaCl을 0~0.25M 농도구배로 첨가하여 용출한 뒤 활성분획을 모아 Gel rechromatography를 실시하였다. Gel rechromatography에는 Sephacryl S-100-HR(Sigma Co.) 수지를 사용하였으며, 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 용출시켰다. Protease 정제를 위하여

Sephacryl S-100-HR(Sigma Co.) 수지를 사용한 Gel rechromatography를 실시하였고, 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)로 용출시켰다.

#### 마. 전기 영동

정제된 phytase는 12% SDS-polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 한 후, activity staining을 실시하였다. SDS-polyacrylamide gel은 Laemmli(1970)의 방법에 따라 조제하였으며, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다. Phytase activity staining은 SDS-PAGE 후 gel에 25% isopropanol이 포함된 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.5)를 붓고 30분간 방치한 후 isopropanol이 제거된 동일 buffer에 30분 동안 방치하였다. 이것을 activity staining 용액에 침전시켜 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 증류수로 세척하였다. Activity staining 용액은 0.4% sodium phytate, 0.2% Fast Garnet GBC Salts가 포함된 0.6M sodium acetate buffer (pH 5.5)를 사용하였다.

정제된 protease는 12% nondenaturing gel 상에서 전기영동을 하였고, Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다.

#### 바. pH 및 온도에 대한 안정성

Phytase에 대한 pH의 영향을 알아보기 위해 각 pH별 용액(pH 2.0, 5.0, 7.0, 11.0) 190 $\mu$ l에 조효소액과 정제된 효소액을 각각 10 $\mu$ l씩 첨가하여 30°C에서 12시간 방치한 후 잔존효소활성을 측정하였다. 온도의 영향은 조효소액과 정제된 효소액을 30, 60, 100°C에서 각각 1시간 방치하였고, 121°C에서는 15분간 처리한 후 급냉하고 잔존 효소 활성을 측정하였다.

#### 사. Phytase의 기질 특이성

Phytase의 기질 특이성을 알아보기 위해 phosphate ester 결합을 하고 있는 adenosine monophosphate, adenosine diphosphate, adenosine triphosphate,  $\alpha$ -glycerophosphate,  $\beta$ -glycerophosphate,  $\alpha$ -naphthyl phosphate, *p*-nitrophenyl phosphate, pyrophosphate, tripolyphosphate, sodium phytate 등의 기질을 2mM 농도로 사용하여 효소 활성을 측정하였다.

#### 아. Phytase의 $K_m$ 및 $V_{max}$ 측정

Sodium phytate에 대한 기질 친화력을 측정하기 위해 농도별 기질 용액의 반응정도를 측정한후  $1/[S]$ 에 대해  $1/v$ 를 plot하는 방법인 Lineweaver-Burk 역수 plot에 의하여  $K_m$  값과  $V_{max}$  값을 계산하였다.

### 3. 파리 살충성 미생물이 분비하는 독소 단백질의 분리 정제

#### 가. Primer의 설정 및 DNA 분리

파리 살충에 효과를 나타내는 내독소( $\delta$ -endotoxin)를 포함하는 도메인(domain)은 이와 유사한 다른 단백질처럼 진화상 잘 보존(conserved)되어 왔다(14). 본 연구를 통하여 개발하고자 하는 물질은 기타 다른 저분자 물질이 아닌 단백질 독성을 나타내는 물질이어야 하기 때문에 다음과 같은 조건으로 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행하였다. 우선 독성을 나타내는 도메인이 어느 부분인지를 확인하기 위하여 PCR을 수행하기 위한 primer를 문헌 조사를 통하여 설정하였다. 문헌조사 결과 현재까지 분리된 균주로부터 단백질 내독소를 나타내는 공통 도메인을 설정하여 cry4A universal primer와 specific primer, cry11A specific primer를 주문 제작하였다(2). cry4A universal primer의 DNA 염기서열은 sense primer(5' - GCA TAT GAT GCG AAA CAA GCC - 3'), antisense primer(3' - GCG TGA CAT ACC CAT TTC CAG GTC C - 5')이며 이 primer에 의해 생산되는 PCR product는 439bp가 된다. cry4A specific primer의 DNA 염기서열은 sense primer(5' - GGG TAT GGC ACT CAA CCC CAC TT - 3'), antisense primer(3' - GCG TGA CAT ACC CAT TTC CAG GTC C - 3')이며 이 primer에 의해 생산되는 PCR product는 1529bp가 된다. cry11A specific primer의 DNA 염기서열은 sense primer(5' - CCC AAC CTA CTA TTG CGC CA - 3'), antisense primer(3' - CTC CCT GCT AGG ATT CCG TC - 5')이며 이 primer에 의해 생산되는 PCR product는 445bp가 된다. 각 균을 50ml Seed culture medium(NaCl 5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25g, Glucose 5g, Yeast

extract 1g, Tryptose 10g pH 7.5)에서 37°C, 170rpm의 조건으로 18시간 배양한 후 DNA purification kit(iNtRON Biotechnology Co. Korea)를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다.

#### 나. PCR 조건

분리된 균주의 PCR 실험을 위한 조건은, 1 $\mu$ l template DNA(50ng/ $\mu$ l), 각 10pMol sense primer, antisense primer, 2.5mM dNTPs, 10 x reaction buffer(100mM Tris-HCl, 400mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.0), 5 units Taq DNA-polymerase(BioNEER, Korea)를 첨가하고, total volume은 20 $\mu$ l로 하였고, PCR program은 denaturation 94°C, 1 min, annealing 50°C, 45 sec, extension 72°C, 50 sec, final extention 72°C 10min 이며 총 30 cycles로 수행하였다. 단, cry4A specific primer를 이용한 PCR과정은 PCR product의 크기가 약 1,500bp정도가 예상되기 때문에 extension time을 1분 30초로 설정하였다.

#### 다. 균주의 배양 및 배지 조건

균주를 배양하기 위한 기초배지로 Seed culture medium을 사용하였고, 내독소( $\delta$ -endotoxin) 단백질 결정체의 생성유도를 위해 Glucose Yeast Salt(GYS) 배지를 사용하였다. 10 ml의 Seed culture medium에 균을 접종한 후, 37°C, 170rpm의 조건으로 18시간 배양한 후, 균의 농도가 1.0 $\times$ 10<sup>9</sup> cfu/ml에 도달하게 되면, 250ml의 GYS 배지에 위의 배양액 5ml을 접종하여 완전한 autolysis(48 ~ 96시간)가 일어날 때 까지 170rpm의 조건으로 배양하였다. 사용된 균주는 Nutrient Agar에 보관 및 유지하였다.(4,5)

#### 라. 아포 및 살충성 내독소 결정체의 분리

GYS 배지에서 96 시간 배양 후 배양액을 15분간 4°C에서 15,000 x g로 원심분리한 후 침전물을 멸균 증류수로 3회 세척하였다. autolysis된 침전물을 freeze-thaw 방법으로 반복하여 세포벽을 파괴한 후 아포 및 내독소 결정체를 분리하기 위하여 65~85%의 sucrose 선상구배 밀도를 조성하고, 배양 침전액 3~5ml을 천천히 떨어뜨린 다음 4°C에서 25,000 x g로 2시간 원심분

리 하였다. 원심분리 튜브에 분리된 내독소 단백질 결정체 층을 파스퇴르 피펫으로 회수하여 멸균 증류수로 5회 이상 세척하였다.

#### 마. 내독소 결정체의 전자현미경적 관찰

정제된 내독소 결정체 현탁액을 콜로디온 막을 씌운 전자현미경 그리드 위에 떨어뜨리고 실온에 방치하여 건조한 뒤 gold 코팅하여 주사전자현미경 (Scanning Electron Micrograph:HITACHI S-3000N)으로 30Kv에서 30,000배로 관찰하였다.

#### 바. 내 독소 단백질의 용해와 단백질 분해 효소에 의한 활성화

분리된 내독소 단백질 결정체들을 10mM dithiothreitol/50mM carbonate buffer(pH 10.0)에 넣고 37℃에서 각각 10분, 20분, 30분, 1시간, 1시간 30분, 2시간, 3시간에 걸쳐서 용해하였다. 녹지 않은 침전물은 원심 분리를 하여 제거시키고, 용해된 내독소 단백질을 단백질 분해효소인 trypsin(0.25mg/ml, Sigma, U.S.A.)으로 각각 10분, 20분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간 동안 37℃에서 반응시켰다. 단백질 분해효소인 trypsin에 의한 내독소 단백질의 활성을 차단시키기 위해서 Laemmli sample buffer[60mM Tris/HCl busser, 2%(w/v) SDS(Sodium dodecyl sulfate, 25%(v/v) glycerol, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue, pH6.8]를 첨가하여 SDS-PAGE sample로 사용하였다. SDS-PAGE로 분석하기 전까지 위에서 만든 시료는 -20℃에서 보관하였다(4,8,11,16).

#### 사. SDS-PAGE

분리된 내독소 단백질 결정체를 1N NaOH로 pH가 12가 되게 조정 한 후 37℃에서 30시간 처리한 다음, 다시 pH가 7.5로 되게 조정하였다. 용해된 내독소 용액 50 $\mu$ l에 Laemmli sample buffer[60mM Tris/HCl busser, 2%(w/v) SDS(Sodium dodecyl sulfate, 25%(v/v) glycerol, 14.4mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue, pH6.8]를 50 $\mu$ l 혼합한 후에 약 3 분간 100℃에서 끓인 후, 다시 약 1분 동안 10,000 x g에서 원심분리를 하였다. 여기서 얻어진 상등액을 취하여 SDS-PAGE sample로 사용하였다.

SDS-PAGE로 분석하기 전까지 위에서 만든 시료는 -20℃에서 보관하였다.

SDS-PAGE는 Laemmli(4) 방법에 의한 불연속 완충용액 시스템을 이용하였다. Gel은 10% separating gel과 5% stacking gel을 사용하였다. 전기영동이 끝난 후 Coomassie brilliant blue R-250 염색용액(0.125% Coomassie brilliant blue R-250, 5% methanol, 7.5% glacial acetic acid)에 40~60분 동안 염색한 후, 탈색용액(12.5% methanol, 3.75% glacial acetic acid)으로 6~8 시간 동안 탈색하였다. 내독소 단백질의 분자량 측정은 protein marker(MBI protein marker #SM0661)를 사용하였다.

## 제 2절 연구 결과

### 1. 유용 젖산 균주의 탐색 및 선발 균주의 특성

#### 가. 분리 원으로부터 젖산균주의 분리

돼지 및 소의 장내용물 33종으로부터 256주의 미생물을, 축분 20종에서 133주의 미생물을 분리하였다. 원유 248종에서 755주, vaginal track 채취물 519종에서 908주, 김치 류 78종에서 521주, 부패 과일 96종에서 408주 등 총 994종의 시료로부터 3,041주의 미생물을 분리하였다(Table 1).

Table 1. Screening results of lactic acid bacteria

Source	No. of samples	No. of isolates
Pig intestine contents	13	102
Cattle intestine contents	20	154
Cattle feces	20	133
Raw milk	248	755
Vaginal track	519	908
Kimchi	78	521
Tomato	96	468
Total	994	3,041

#### 나. 항균활성 젖산균주의 탐색

분리미생물의 항균활성을 측정하여 항균범위가 넓고 항균활성이 우수한 균주를 1차 선발하였다(Table 2). 각 지시균에 대한 항균활성 정도는 그림 1과 같다.



Table 2. Antimicrobial spectrum of isolates

Source	No.	<i>S.pyrogenes</i>	<i>S.agalactiae</i>	<i>S.aureus</i>	<i>L.ivanovii</i>	<i>S.choleraesuis</i>	<i>E.coli</i>	<i>L.plantarum</i>	<i>L.mesenteroides</i>
Tomato	1-1	+	-	-	-	+	+	-	-
	5-1	+++	++	+	++	+	-	-	++
	9-1	++	+	+	++	+	-	-	-
	11-2	++	++	+	++	+	-	-	+
Vaginal track	13-1	++	+	++	+	+	-	-	-
	13-8	+	-	-	+	-	-	-	-
	51-1	++	++	+	++	+	-	-	++
Kimchi	20-4	++	+	++	+	+++	+	-	-
Raw milk	21-2	+	-	-	++	-	-	+	-
	21-5	+++	++	+	++	+	-	+	+++
	23-3	+	+	-	-	+	-	-	-
Cattle intestine	26-3	+	-	++	+	+	-	-	-

+ : antimicrobial activity, - : non-antimicrobial activity

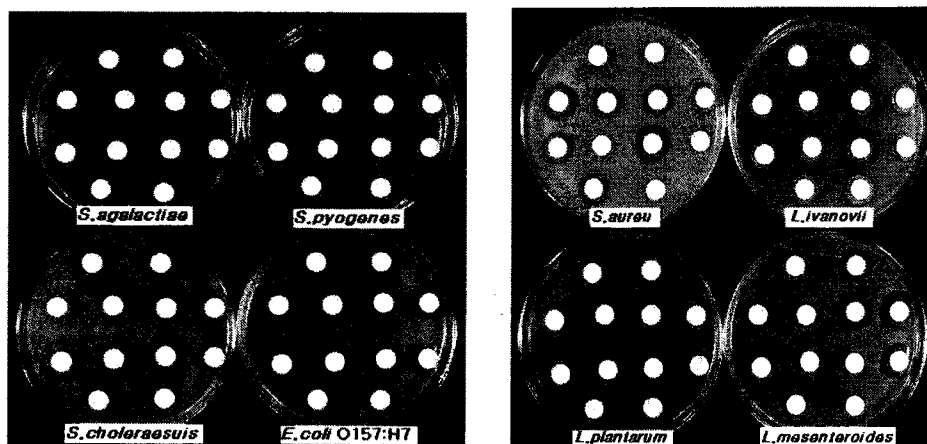


Fig 1. Antimicrobial activity of isolates

다. 선발 미생물의 특성조사

선발미생물의 미생물학적 특성을 조사하기 위하여 Gram 염색에 의한 현미경관찰, catalase반응, spore 형성유무를 실험하였다. 그 결과는 표 3에 나타낸 바와 같이 Gram 양성으로 간균과 구균형태의 2종류 이었으며, 모두 catalase 음성이며, spore를 형성하지 않았으므로 1차선발 미생물들은 모두 젖산균 group에 속하는 미생물로 잠정 동정하였다.

Table 3. Characteristics of isolates

Source	No.	Cell shape	Gram staining	Catalase reaction	Spore formation
Tomato	1-1	cocci	+	-	-
	5-1	cocci	+	-	-
	9-1	cocci	+	-	-
	11-2	cocci	+	-	-
Vaginal track	13-1	rod	+	-	-
	13-8	rod	+	-	-
	51-1	cocci	+	-	-
Kimchi	20-4	rod	+	-	-
Raw milk	21-2	rod	+	-	-
	21-5	rod	+	-	-
	23-3	rod	+	-	-
Cattle intestine	26-3	rod	+	-	-

+ : positive, - : negative

라. 선발 미생물의 내 산성 조사

선발 미생물의 내산성 조사를 위한 실험결과 인공위액의 pH가 3일 때는 모두 colony를 형성하였으나, pH 2일 때 원유에서 분리한 No.23-3 균주만이 colony를 형성하였고 pH 1에서는 선발균주 모두가 사멸하였음을 보여주었다(Table 4).

순수한 위액의 pH는 2.0정도이지만 섭취한 음식물의 완충작용에 의해 위내에

다소 pH가 높아지므로 선발 균주들은 대부분이 위내에서 생존가능성이 높을 것으로 판단되었다(Fig. 2).

Table 4. Survival of isolates at different pH values

Source	No.	different pH values		
		pH3	pH2	pH1
Tomato	1-1	+	-	-
	5-1	+	-	-
	9-1	+	-	-
	11-2	+	-	-
Vaginal track	13-1	+	-	-
	13-8	+	-	-
	51-1	+	-	-
Kimchi	20-4	+	-	-
Raw milk	21-2	+	-	-
	21-5	+	-	-
	23-3	+	+	-
Cattle intestine	26-3	+	-	-

+ : colony forming, - : colony non-forming

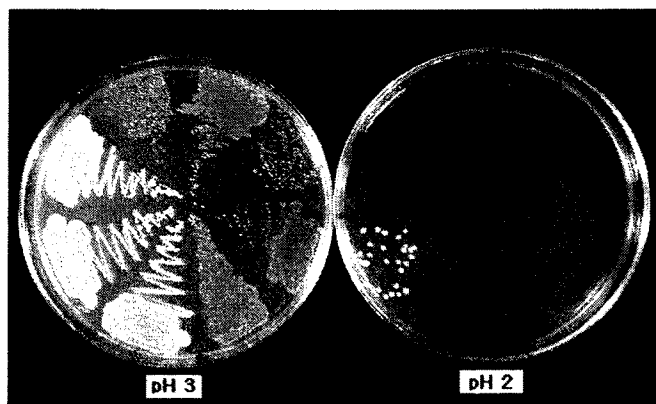


Fig. 2. Survival of isolates at different pH values

마. 선발 미생물의 내 담즙성 조사

선발미생물의 내담즙성 조사를 위해 인공담즙액에 Ox Gall Powder를 0.1%, 0.3%, 0.5%(w/v)씩 첨가하여 20시간 배양한 후 MRS평판배지에 희석하였을 때, 모두 colony를 형성하였으므로(Table 5) 선발미생물 모두 인공담즙에 대한 내성이 우수하다고 판단되었다(Fig 3).

Table 5. Survival of isolats at different ox gall powder concentration

Source	No.	different ox gall powder concentration		
		0.1%	0.3%	0.5%
Tomato	1-1	+	+	+
	5-1	+	+	+
	9-1	+	+	+
	11-2	+	+	+
Vaginal track	13-1	+	+	+
	13-8	+	+	+
	51-1	+	+	+
Kimchi	20-4	+	+	+
Raw milk	21-2	+	+	+
	21-5	+	+	+
	23-3	+	+	+
Cattle intestine	26-3	+	+	+

+ : colony forming, - : colony non-forming

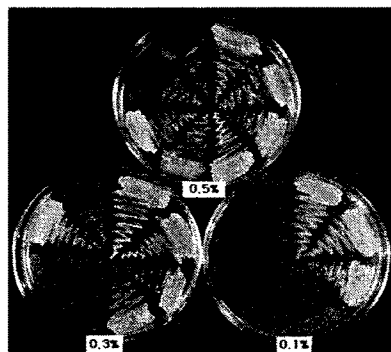


Fig. 3. Survival of isolats at different ox gall powder concentration after treated with artificial gastric juice(pH3.0) for 2hours at 37°C

2. 동물사료첨가용 유용 효소(phytase 및 protease) 생산 균주의 탐색 및 효소의 정제

가. 균주의 분리 및 동정

소의 장내용물과 분변에서 분리한 포자형성 미생물 중 phytase screening 배지에서 투명환을 형성하는 균주를 선발하였다. 1차 선발한 균주들은 액체배지에 배양하여 phytase 및 protease 활성이 가장 높은 strain CF 5-26을 최종 선발하였다. Strain CF 5-26은 소의 분변에서 분리된 미생물로서 Gram 양성, 간균이며, catalase 양성이고, spore를 형성하며, 운동성을 갖고있으므로 전형적인 *Bacillus* 속 균주였다. Strain CF 5-26은 API 50 CHB kit test를 실시하여 그 결과를 API 50 CHB database V3.3.3을 이용하여 동정한 결과 *Bacillus circulans*와 99.7%의 상동성을 보였다(Table 6).

Table 6. Characteristics of the strain CF 5-26

Characteristics	Result
Cell Shape	Rod
Gram staining	Positive
Catalase reaction	Positive
Spore formation	Positive
Motility test	Positive
Identification by API 50 CHB	<i>Bacillus circulans</i>

보다 더 정확한 동정을 위하여 16S rRNA 분석을 실시하여 얻은 염기서열을 BLASTN의 데이터와 비교하여 분자생물학적 연관성을 나타내는 계통도를 얻었다(Fig. 4). 이 결과 분리 균주는 *Bacillus subtilis*와 99%이상의 높은 상동성을 보여 API test와는 다른 결과를 보였다. 따라서 본 실험에 사용한 분리 균주를 *Bacillus subtilis*로 동정하고 *Bacillus* sp. CF 5-26이라 명명하였다.

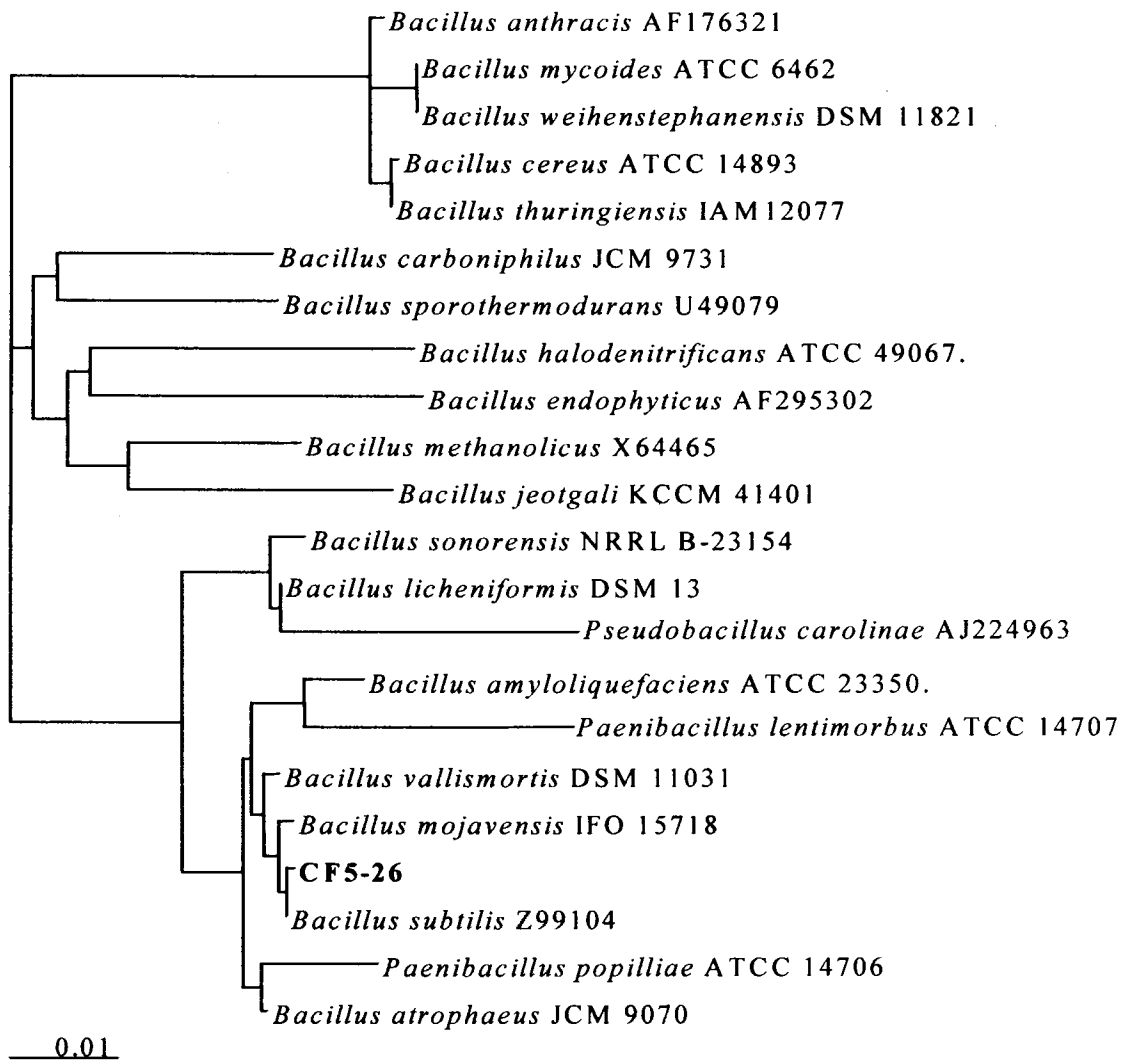


Fig. 4. Dendrogram of *Bacillus* sp. CF 5-26 through 16S rRNA gene sequence homology. Scale bar, 0.01 estimated substitution per nucleotide position.

### 나. 분리 균주의 생육곡선

Phytase 생산 균주의 배양시간에 따른 균체의 생육 및 효소 생산 정도를 경시적으로 관찰한 결과, 균체의 생육은 48시간부터 정지기에 들어갔으며, 효소의 생산은 72시간이후에 최대 활성을 나타내었다(Fig. 5). 이것은 *Bacillus* sp.가 생산하는 phytase가 균체생육이 정지기에 도달된 이후에 phytase 활성이 최대가 된다는 여러 보고와 유사하였다(Powar와 Jagannathan, 1982; Shimizu, 1992).

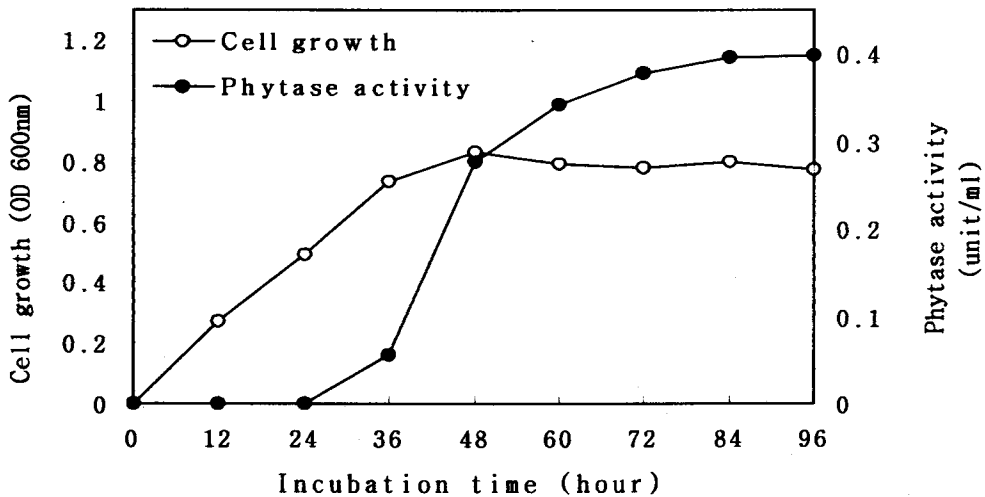


Fig. 5. Time course of growth and phytase production from *Bacillus* sp. CF 5-26. Agitation, 150rpm; culture temperature, 37°C.

### 다. Phytase 생산을 위한 분리 균주의 배양 조건 검토

Phytase 생산에 미치는 탄소원의 영향을 검토한 결과, rice bran extract 가 3% 첨가되었을 때 최대활성을 나타내었으며, rice bran extract의 농도별 효소생산 정도는 10%일 때 효소활성이 가장 좋아 최적 탄소원은 10% rice bran extract로 고정하였다.

Phytase 생산에 미치는 질소원의 영향은 질소원이 제거된 기본배지에 10% 쌀겨 추출액을 첨가한 후 whey protein, casein, ammonium sulfate, yeast extract를 각각 0.1%씩 첨가하여 효소 생산정도를 비교하였다. 그 결과, 0.1% whey protein 첨가시 가장 좋은 활성을 보여 최적 질소원으로 고정하였다.

Phytase 생산에 미치는 무기 염류의 영향은 무기염류가 완전히 제거된 배지와 CaCl<sub>2</sub>가 농도별로 첨가된 배지에서 자란 균주의 효소 활성이 비교되었다. 그 결과, 0.01% CaCl<sub>2</sub>가 첨가된 배지에서 가장 좋은 활성을 보여 최적 농도로 결정하였다.

Phytase 생산에 미치는 무기인의 영향은 인공급원인 sodium phytate 대신 inorganic phosphate(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)를 농도별로 첨가하여 활성을 비교하였다. 그 결과, 0.01% 농도에서 가장 좋은 활성을 나타내었다.

이상으로 효소 생산을 위한 최적 배양 조건은 표 7과 같다.

Table 7. Medium composition for the production of phytase from *Bacillus* sp. CF 5-26

Components	Concentration (% , w/v)
Rice bran extract	10
Whey protein powder	0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.01

#### 라. 효소의 정제

배양액을 3배의 ethanol로 침전시켜 얻은 조 효소액을 정제하기 위하여 Sephadex G-100을 이용하여 gel chromatography를 하였다. 그림 6에서 보는 바와 같이 19~24번 분획은 protease 활성을 나타내었고, phytase 활성은 29~36번 분획에서 확인되었다. 각각의 활성 분획은 동결건조 후 chromatography를 실시하였다.

Phytase 활성 분획은 CM Sepharose CL-6B 이온교환 chromatography를 실시하여 NaCl 농도 0.03~0.05M 사이인 56~60번 분획에서 phytase 활성이



용출되었다(Fig. 7). 이 활성분획을 모아 다시 gel chromatography를 수행하였다.

Sephacryl S-100-HR gel chromatography를 수행하여 그림 8과 같은 결과를 얻었고, 여기서 phytase 활성 분획인 39~44번을 모아 Sephacryl S-100-HR gel을 사용하여 rechromatography를 수행하였다(Fig. 9). Rechromatography에서 얻어진 phytase 활성 분획 40~47번을 모아 최종적으로 phytase 효소를 정제하였다

전체적인 phytase의 정제과정은 표 8에 나타난 바와 같다. 최종 정제된 효소는 배양상등액에 비해 31.2배 효소 활성이 증가되었으며, 이때 효소 단백질의 회수율은 7% 정도였다.

Sephadex G-100 gel chromatography에서 얻어진 protease 활성 분획은 Sephacryl S-100-HR 수지를 사용하여 gel rechromatography를 수행하였다. Protease 활성 분획을 skim milk 한천 배지에 접종한 결과, 그림 10과 같이 활성을 나타내었고, 이것을 nondenaturing gel 상에서 전기영동 하였는데 그것은 SDS-polyacrylamide gel 상에서 protease 활성분획이 여러 개의 단편으로 절단되는 것을 방지하기 위해서이다.

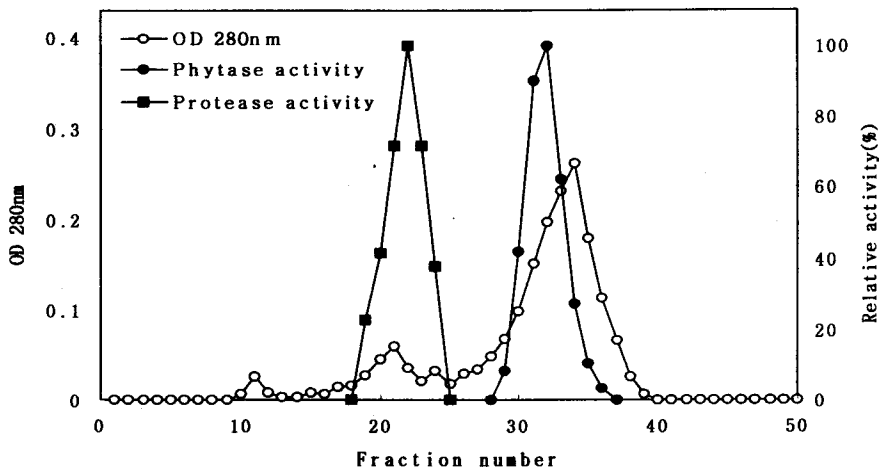


Fig. 6. Chromatogram of the crude enzyme on a Sephadex G-100 column.

Column size, 2.5cm × 40cm; Elution buffer, 20mM acetate buffer(pH 5.5);

Flow rate, 0.5ml/min; Fraction volume, 3ml.

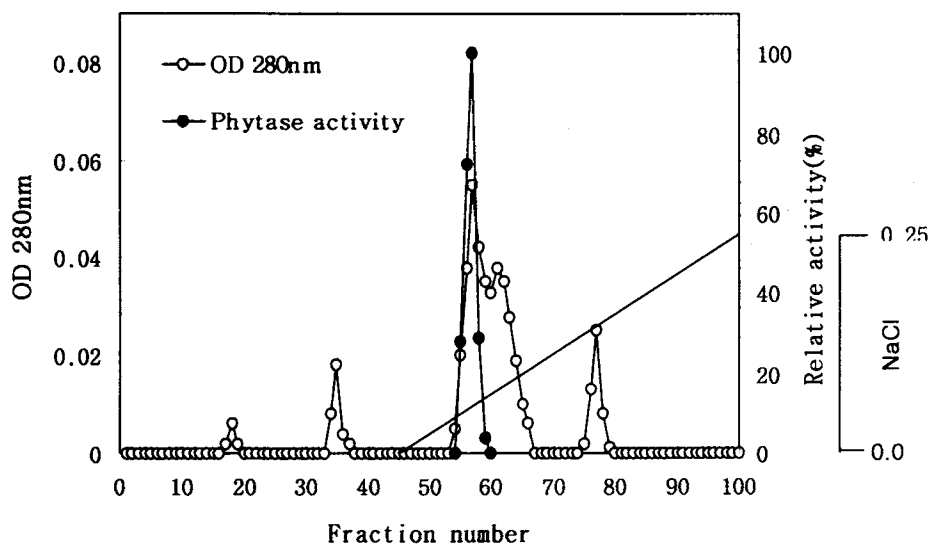


Fig. 7. CM Sepharose CL-6B column chromatogram of Sephadex G-100 phytase fractions. Column size, 2.5cm × 30cm; Elution buffer, 20mM acetate buffer(pH 5.5) with 0~0.25M NaCl linear gradient; Flow rate, 0.5ml/min; Fraction volume, 3ml.

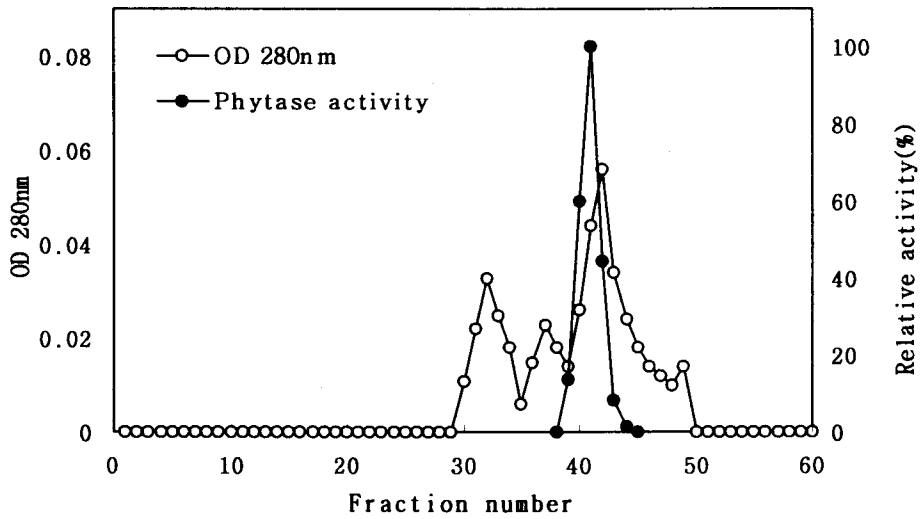


Fig. 8. Sephacryl S-100-HR column chromatogram of CM Sepharose CL-6B phytase fractions. Column size, 2.5cm × 40cm; Elution buffer, 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0); Flow rate, 0.5ml/min; Fraction volume, 3ml.

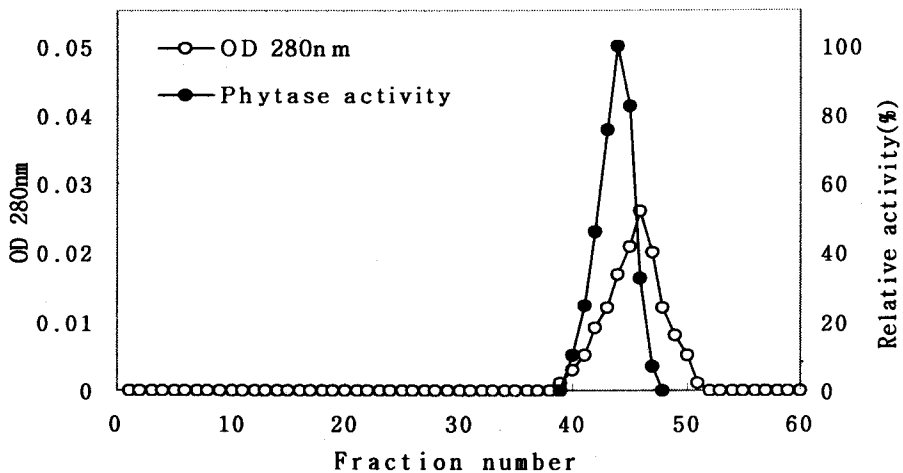
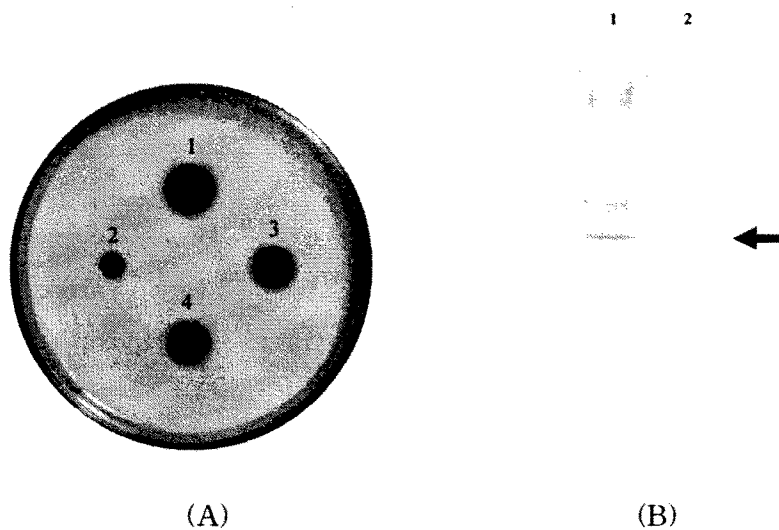


Fig. 9. Sephacryl S-100-HR column rechromatogram of Sephacryl

S-100-HR phytase fractions. Column size, 2.5cm × 40cm; Elution buffer, 20mM Tris-HCl buffer(pH 7.0); Flow rate, 0.5ml/min; Fraction volume, 2ml.

Table 8. Purification summary of the phytase from *Bacillus* sp. CF 5-26

Purification Step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Recovery (%)
Culture supernatant	773.1	1615.1	0.5	1	100
Ethanol precipitation	175.0	25.9	6.8	14.1	23
Sephadex G-100	66.6	8.6	7.9	16.4	9
CM-Sepharose CL-6B	64.8	7.4	8.8	18.4	8
1st Sephacryl S-100-HR	58.4	5.1	11.5	24.0	8
2nd Sephacryl S-100-HR	54.3	3.6	14.9	31.2	7



(A) : 1, Et-OH precipitation; 2, phytase fraction of Sephadex G-100 chromatography; 3, protease fraction of Sephadex G-100 chromatography; 4, protease fraction of Sephacryl S-100-HR rechromatography

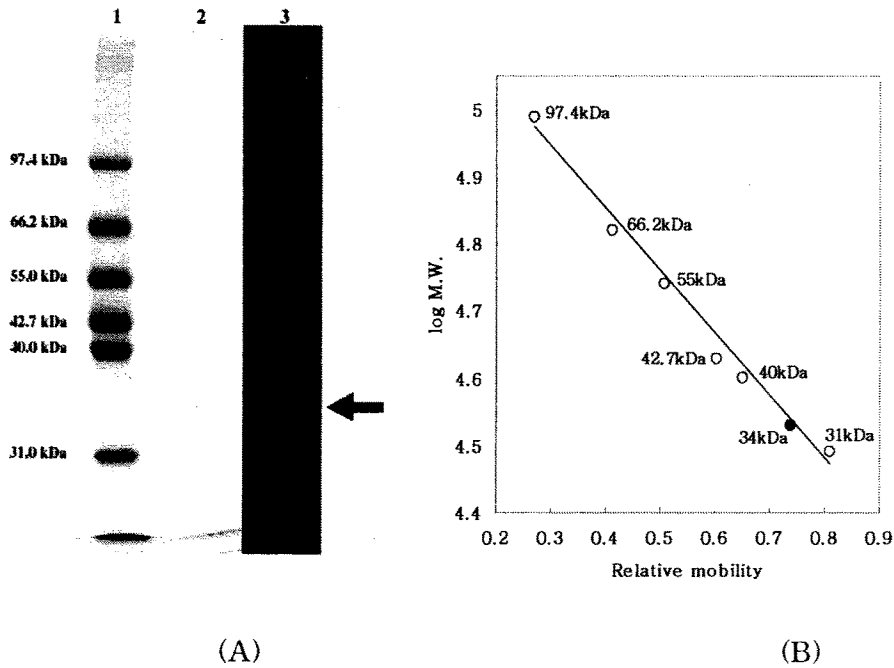
(B) : 1, Sephadex G-100 chromatography; 2, Sephacryl S-100-HR rechromatography

Fig. 10. Protease activity and nondenaturing gel electrophoresis of each purification step.

#### 마. 전기 영동

Gel rechromatography에서 얻어진 정제된 phytase는 12% SDS-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동을 한 후, activity staining을 하였다. 표준단백질과 비교한 분자량 측정에서 약 34kDa 정도로 추정되었다 (Fig. 11).

기존에 보고되었던 곰팡이 유래 phytase중 *A. ficuum* NRRL 3135 phytase는 85~100kDa, *A. niger* phytase는 200kDa으로 비교적 큰 분자량인 것에 비해 세균유래 phytase인 *B. subtilis* natto N-77 phytase는 36~38kDa, *B. amyloliquefaciens* DS11 phytase는 44kDa이었으며, *E. coli* phytase는 42kDa으로 본 연구에서 분리된 *Bacillus* sp. CF 5-26이 생산하는 phytase도 유사한 크기를 보였다.



(A) : 1, molecular weight marker; 2, purified phytase; 3, activity staining of SDS-PAGE gel

(B) : phosphorylase B (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), glutamate dehydrogenase (55 kDa), ovalbumin (42.7 kDa), aldolase (40 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa).

Relative mobility = protein mobility / dye mobility.

Fig. 11. Determination of molecular weight of the purified phytase by SDS-PAGE.

#### 바. pH 및 온도에 대한 안정성

효소에 대한 pH와 온도의 영향을 조사하였다. 각 pH의 buffer와 효소액을 혼합하여 방치한 후 잔존효소활성을 측정하였다. 그 결과, pH 5와 7에서는 조효소액과 정제된 효소액 모두 안정하였으며, pH 11에서는 정제 후 잔존

활성 86%로 약간 활성이 소실되었으나 안정함을 보였다(Table 9). *B. subtilis* natto N-77이 생산하는 phytase는 pH 5부터 11까지 안정하다고 보고하였고, *B. amyloliquefaciens* DS11 phytase는 pH 4부터 8까지 안정하다고 보고하였다.

Table 9. Effect of pH on the phytase stability

pH	Relative activity (%)	
	Crude enzyme	Purified enzyme
2.0	90	69
5.0	100	100
7.0	100	100
11.0	100	86

효소에 대한 온도의 영향은 30, 60, 100, 121℃에서 실시하였다. 그 결과, Table 10과 같이 조효소액은 100℃까지 100% 안정함을 보였고, 정제된 효소액은 100℃에서 50%정도의 안정성을 보였으며 121℃에서는 활성이 소실되었다. 이것은 다른 미생물 유래 phytase인 *B. subtilis* natto N-77이 생산하는 phytase가 20-60℃, *Entoerobacter* sp.4가 생산하는 phytase가 30-55℃, *B. amyloliquefaciens* DS11 phytase가 40℃까지인 것에 비해 높은 열 안정성을 보였다. 그러나 *B. amyloliquefaciens* DS11 phytase는 칼슘이 첨가되면 열 안정성이 증가된다고 보고한바 있다. 이러한 열 안정성은 phytase를 산업적으로 이용할 때 사료로 가공하는 동안 열에 의한 효소의 불활성을 건디는데 매우 유용하기 때문에 산업적으로 이용가치가 높다고 생각된다.

Table 10. Effect of temperature on the phytase stability

Temperature (°C)	Relative activity (%)	
	Crude enzyme	Purified enzyme
30	100	100
60	100	96
100	100	50
121	--	0

#### 사. 효소의 기질 특이성

효소의 기질 특이성을 알아보기 위해 phosphate ester 결합을 하고 있는 기질을 2mM 농도로 사용하여 효소 활성을 측정하였다. 그 결과, sodium phytate를 기질로 사용하였을 때 분해활성이 뛰어났으며, tripolyphosphate와 pyrophosphate에도 분해활성을 보였다(Table 11). 그러나 acid phosphatase의 기질인 *p*-nitrophenyl phosphate는 분해하지 못하였다. *B. subtilis* natto N-77이 생산하는 phytase는 phytate 분해활성이 우수하였고, 다른 phosphorylated compound에도 약간의 분해활성이 있다고 보고하였다. *Bacillus* sp. CF 5-26이 생산하는 phytase는 *B. subtilis* natto N-77이 생산하는 phytase와 유사한 기질 특이성을 보였다.

Table 11. Substrate specificity of the phytase from *Bacillus* sp. CF 5-26

Substrate (2mM)	Relative activity (%)
Adenosine monophosphate	0
Adenosine diphosphate	0
Adenosine triphosphate	0
$\alpha$ -Glycerophosphate	0
$\beta$ -Glycerophosphate	0
$\alpha$ -Naphthyl phosphate	0
<i>p</i> -Nitrophenyl phosphate	0
Pyrophosphate	25
Tripolyphosphate	41
Sodium phytate	100



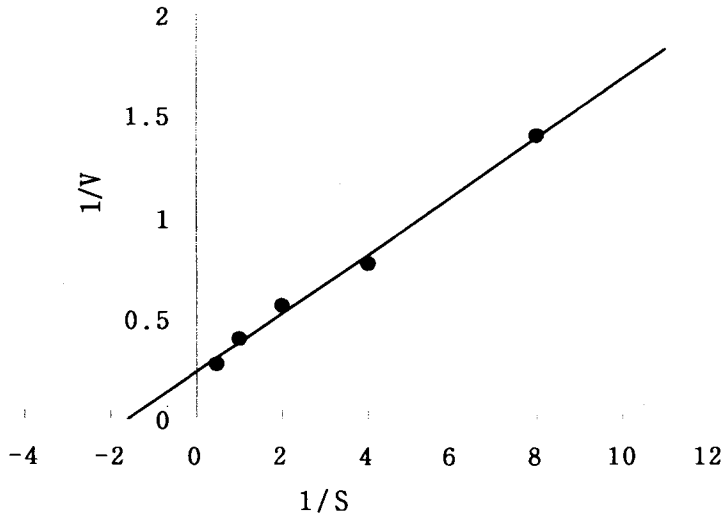


Fig. 12. Lineweaver-Burk plot of the phytase on sodium phytate.

#### 아. 효소의 Km 및 Vmax 측정

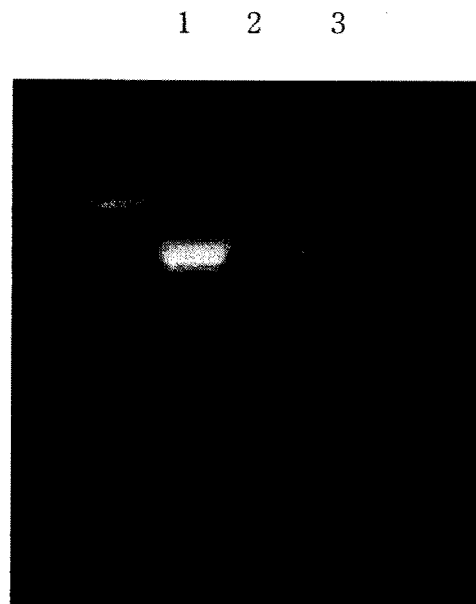
Sodium phytate에 대한 기질 친화력을 측정하기 위해 농도별 기질 용액의 반응정도를 측정한 후 Lineweaver-Burk 역수 plot에 의하여 Km과 Vmax를 계산하였다. 이 plot으로부터 산출된 Michaelis constant (Km)는 0.64mM 이었고, Vmax는 4.41 $\mu$ mol/min이었다(Fig. 12). 이것은 *A. oryzae*가 분비하는 phytase의 Km이 0.47mM이었고, *B. subtilis* natto N-77 이 생산하는 phytase의 Km은 0.5mM, *B. amyloliquefaciens* DS11 phytase의 Km은 0.55mM인 것에 비해 기질친화도가 낮으나 효소 정제도 및 실험 조건에 따라 다를 수 있어 일률적으로 비교하기는 어렵다.

### 3. 파리 살충성 미생물이 분비하는 독소 단백질의 분리 정제

#### 가. PCR 실험

실험에 사용된 6개의 균주는 각각 *Bacillus thuringiensis* Wang 4, *Bacillus thuringiensis* F 2, *Bacillus licheniformis* M 10, *Bacillus subtilis*

Sa 4, *Bacillus sphaericus* Gu 1-2, *Bacillus stearothermophilus* Na 4이며, 이 균주들을 대상으로 PCR 실험을 수행하였다. PCR 실험 결과 다른 균주들은 예상되는 밴드가 나타나지 않았지만, *Bacillus thuringiensis* Wang 4와 *Bacillus thuringiensis* F2는 Cry4A specific primer에 의해 예상했던 PCR product인 1529bp band를 얻을 수 있었다(Fig. 13).



Lane 1. PCR marker(3kb, 2kb, 1.5kb),  
Lane 2. *Bacillus thuringiensis* Wang 4),  
Lane 3. *Bacillus thuringiensis* F 2

Fig. 13. Cry 4A-specific primer on *Bacillus thuringiensis*

DNA 염기서열을 확인하기 위하여 PCR product를 SolGent(solution for genetic technology, Korea) 회사에 의뢰하였고, 그 결과를 NCBI BLAST를

이용하여 DNA sequence를 분석해 본 결과, 두 균주 모두가 *Bacillus thuringiensis* 와 관련된 sequence를 가진 것으로 나타났다(별첨 참고자료).

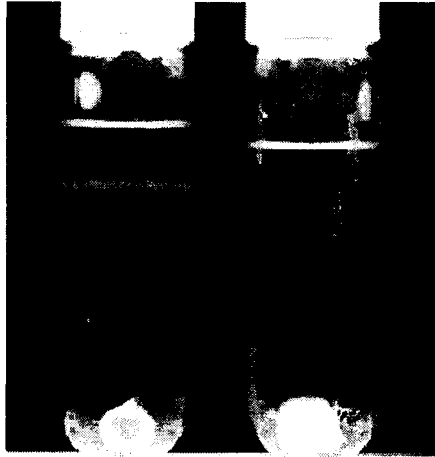
#### 나. 균주의 배양 및 배지의 조건

일반적으로 아포 및 내독소가 생산되기 위해서는 영양분이 고갈되어야만 된다는 점, 한 개의 세포내에 한 개의 아포와 통상 한 개 또는 두 개의 내독소를 생산하기 때문에 아포의 수는 내독소의 수와 비례한다 점과 carbon source가 많이 첨가된 배지에서는 성장률은 매우 높으나 내독소 생산은 매우 적고, carbon source가 적고 nitrogen source가 많이 첨가된 배지에서는 성장률은 낮으나 내독소 생산이 많다는 점을 고려하여 GYS 배지를 조제하였다. 초기배양에서는 균의 성장률이 높아야하기 때문에 carbon source가 많이 첨가된 배지를 사용해서 배양을 한 후 nitrogen source가 많이 첨가된 배지에 재접종 하였다. 이 배양과정에서 열악한 성장 환경 때문에 autolysis가 일어나게 되어 cell debris, 내독소 단백질, 아포 등에 의해 배양액의 투명도가 매우 탁하고, 점성이 있는 상태로 나타났다. 내독소 단백질의 유무를 확인하기 위해 주기적(24시간)으로 광학 현미경(Axioskop2 plus. CARL ZEISS)으로 관찰한 결과 rod type의 cell이 깨져있는 형태, 원형(아포)과 내독소 단백질의 형태(아포보다 작은 원형)를 관찰할 수 있었다.

#### 다. 아포 및 살충성 내독소 결정체의 분리

96시간 배양한 배양액을 15분간 4℃에서 15,000 x g로 원심분리한 후 침전물을 멸균 증류수로 3회 세척하였다. 침전물에는 배양과정에서 autolysis가 이루어져 형성된 일부 cell debris, 내독소 단백질, 아포 및 autolysis가 안된 cell들이 있었다. 따라서 autolysis가 안된 cell들의 세포벽을 파괴하기 위해 freeze-thaw 방법을 추가적으로 수행하였다. freeze-thaw 방법은 액체질소 가스를 침전물에 넣고 급속 냉동 후 60℃ water bath에서 2~3분 동안 녹였다. 이런 과정을 3~5회 정도 반복하였다. 아포 및 내독소 결정체를 분리하기 위하여 85%는 5ml, 80%,75%,70%는 6ml, 65%는 5ml을 고농도순으로 각각 넣고 침전물 용액을 4~5ml정도 접종하고, 25,000 x g로 2시간 원심분리 한 결과 내독소 결정체 밴드가 70%~75%(w/v) 사이에 형성되었고, 아포 및 cell

debris는 튜브 밑에서 pellet을 형성하였다(Fig. 14).



(위쪽-내독소 결정체 밴드, 아래쪽-cell debris)

Fig. 14. 65% to 85% sucrose 농도구배에 의해 분리된 endotoxin crystal band.

#### 라. 내독소 결정체의 전자현미경적 관찰

분리된 내독소 밴드를 회수하여 멸균 증류수로 5회 이상 세척한 후 주사전자현미경(SEM:HITACHI S-3000N)에 의해 외부구조를 관찰한 결과 분리된 내독소 결정체의 모양은 구형에 가까웠으며 외형에 주름이 잡혀 있었다 (Fig. 15).

Fig. 15. 65% to 85% sucrose 농도 구배에 의해 분리된 endotoxin crystal의 Scanning Electron Micrograph(SEM).

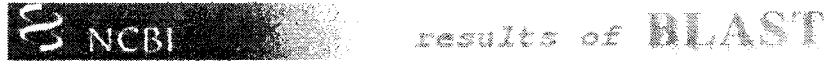
#### 마. SDS-PAGE

Sucrose 밀도 구배를 통해 정제한 내독소 단백질을 1N NaOH로 pH가 12가 되게 조정한 후 37°C에서 30시간 처리한 다음, 다시 pH가 7.5로 되게 조정하였다. 그후 10% SDS-polyacrylamide 전기영동 분석에 의해 그 순도 (실질적인 molecular weight)와 하위 단위체의 크기 및 수를 검토하여 protein marker와 비교한 후 독소단백질을 확인하였다.

(참고자료). PCR을 통하여 확인한 독소를 분비하는 영역의 DNA 염기서열

RID=1038938725-024488-6728,

페이지 1 / 16



BLASTN 2.2.5 [Nov-16-2002]

Reference:

Allischul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1038938725-024488-6728

Query=

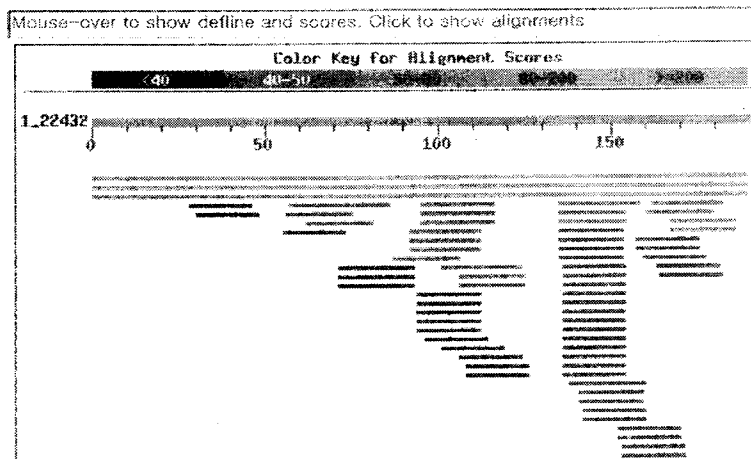
(190 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DBJ+POB sequences (but no EST, STS, GSS, or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)  
1,524,526 sequences: 7,500,225,409 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQ](#)

[Taxonomy reports](#)

### Distribution of 70 Blast Hits on the Query Sequence



Sequences producing significant alignments:

Sequence	Score	E Value
g1140351[emb]Y00423.1[BTTX01: Bacillus thuringiensis gene f...	359	9e-97

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

2002-12-15

gi 21685410 emb AL731825.1 BT870XIS	Bacillus thuringiensis...	359	9e-97
gi 216289 db 000248.1 BAC18PH4	Bacillus thuringiensis isra...	359	9e-97
gi 18997243 gb AC008965.6	Homo sapiens chromosome 5 clone ...	44	0.067
gi 14573575 gb AC010219.7 AC010219	Homo sapiens chromosome ...	44	0.067
gi 14326058 gb AC008660.5 AC008660	Homo sapiens chromosome ...	44	0.067
gi 17977979 emb AJ251977.1 BT1251977	Bacillus thuringiensis...	44	0.067
gi 21598163 gb AC122721.2	Homo sapiens chromosome 5 clone ...	42	0.27
gi 18445937 gb AC094104.2	Homo sapiens chromosome 5 clone ...	42	0.27
gi 15281200 gb AC010596.2	Homo sapiens chromosome 5 clone ...	42	0.27
gi 21895706 emb AL807742.7	Human DNA sequence from clone R...	42	0.27
gi 24950931 gb AC015879.1	Shewanella oneidensis MR-1 centi...	40	1.0
gi 24211070 gb AC073964.29	Homo sapiens 12 BAC RP11-227821 ...	40	1.0
gi 14280397 gb AC078127.33	Homo sapiens 12 BAC RP11-148P3 ...	40	1.0
gi 20977025 gb AC081042.6	Homo sapiens chromosome 13, clone...	40	1.0
gi 11128428 gb AC015600.7 AC015600	Homo sapiens, clone RP11...	40	1.0
gi 98901931 gb AC000107.2 AC000107	Genomic sequence for Arabid...	40	1.0
gi 14715491 emb AL858240.4 CNS05TER	Human chromosome 14 DNA...	40	1.0
gi 14176355 gb AC005500.1 AC005500	Homo sapiens chromosome 4...	40	1.0
gi 26105308 db AK089477.1	Mus musculus 88-derived CD11 tr...	40	1.0
gi 129893026 emb AL772377.6	Mouse DNA sequence from clone R...	40	1.0
gi 14189746 db AP000872.5	Homo sapiens genomic DNA, chrom...	40	1.0
gi 18488752 db AP000857.4	Homo sapiens genomic DNA, chrom...	40	1.0
gi 24762251 ref NM_033778.2	Drosophila melanogaster chromo...	38	4.1
gi 14573090 gb AC0055717.38	Homo sapiens 12 BAC RP11-673021 ...	38	4.1
gi 25046694 gb AC121908.3	Mus musculus chromosome 8 clone ...	38	4.1
gi 24862038 gb AC0092819.4	Homo sapiens chromosome 6, clone...	38	4.1
gi 9900309 ref NM_031954.1	Rattus norvegicus Dylachroma Pd...	38	4.1
gi 21200141 gb AC122893.1	Homo sapiens 3 BAC RP11-373023 ...	38	4.1
gi 22946381 gb AC171801.3	Mus musculus chromosome 8 clone...	38	4.1
gi 22533629 gb AC115116.7	Homo sapiens 3 BAC RP11-710F20 ...	38	4.1
gi 22948563 gb AC000046.2	Drosophila melanogaster chromo...	38	4.1
gi 15093029 gb AC010434.7	Homo sapiens chromosome 8, clone...	38	4.1
gi 18405745 ref NM_129727.1	Arabidopsis thaliana chromosome...	38	4.1
gi 21307399 gb AC021556.10	Homo sapiens chromosome 8, clone...	38	4.1
gi 20564491 gb AC073587.6	Homo sapiens chromosome 10 clone...	38	4.1
gi 20190946 gb AC0002510.3	Arabidopsis thaliana chromosome ...	38	4.1
gi 19570211 gb AC078895.5	Homo sapiens BAC clone RP11-828N ...	38	4.1
gi 19774459 gb AC081894.3	Homo sapiens chromosome 5 clone ...	38	4.1
gi 19747232 gb AC016380.5	Homo sapiens chromosome 1 clone ...	38	4.1
gi 6888988 gb AC010202.3	Homo sapiens 12q BAC RP11-210L7 (...)	38	4.1
gi 19308283 gb AC105900.2	Homo sapiens chromosome 3 clone ...	38	4.1
gi 18266859 gb AC016194.7	Homo sapiens chromosome 8, clone...	38	4.1
gi 18756373 gb AC009328.4	Homo sapiens BAC clone RP11-847K ...	38	4.1
gi 18042305 gb AC091615.3	Homo sapiens chromosome 1 clone ...	38	4.1
gi 18001680 gb AC025881.6	Homo sapiens chromosome 8, clone...	38	4.1
gi 17223193 gb AC087280.11	Homo sapiens chromosome 11, clo...	38	4.1
gi 18860450 gb AF419579.1 AF419579	Arabidopsis thaliana At2...	38	4.1
gi 15718547 gb AC091926.4	Homo sapiens chromosome 5 clone ...	38	4.1
gi 15145637 gb AC098096.1	Drosophila melanogaster, chromo...	38	4.1
gi 14800259 gb AF388809.1 AF388809	Dictyostelium discoideum...	38	4.1
gi 14575110 gb AC082229.1 AC082229	Drosophila melanogaster...	38	4.1
gi 15730157 gb AF165124.1 AF165124	Homo sapiens chromosome 6...	38	4.1
gi 18162935 gb AC076848.3 AC076848	Homo sapiens BAC clone G...	38	4.1
gi 13877088 gb AF370802.1 AF370802	Arabidopsis thaliana Unk...	38	4.1
gi 25129882 emb AL845366.8	Zebrafish DNA sequence from clo...	38	4.1
gi 24395237 emb AL845312.3	Zebrafish DNA sequence from clo...	38	4.1
gi 3250073 emb AL024406.1 ATT1815	Arabidopsis thaliana DNA ...	38	4.1
gi 2266744 emb AL161551.2 ATCH11951	Arabidopsis thaliana CN...	38	4.1
gi 15875591 emb AJ332163.1 HS432163	Homo sapiens genomic s...	38	4.1
gi 22877264 gb AF003413.1 DH034DH07	Drosophila melanogaster...	38	4.1
gi 18973057 emb AL590092.8	Human DNA sequence from clone R...	38	4.1

gi 17127893 emb AL590904.2	Human DNA sequence from clone R...	38	4.1
gi 29095864 db AK053565.1	Mus musculus 0 day neonate eyeb...	38	4.1
gi 22759510 emb AL772292.9	Mouse DNA sequence from clone R...	38	4.1
gi 29330308 emb AL672208.11	Mouse DNA sequence from clone ...	38	4.1
gi 944945 gb U33173.1 RFU33173	Rattus norvegicus cytochrome...	38	4.1
gi 299867 gb J02857.1 RA1CYPM1	Rat cytochrome P-450(M-1) mR...	38	4.1
gi 15384920 emb AL513424.2 HS109M15	Homo sapiens chromosome...	38	4.1
gi 4579993 db AP000072.1	Homo sapiens genomic DNA, chrom...	38	4.1

Alignments

Get selected sequences     Select all     Deselect all

>gi|40351|emb|Y00423.1|BTQX21 Bacillus thuringiensis gene for 130 kDa delta-endotoxin  
 Length = 3543  
 Score = 359 bits (181), Expect = 9e-97  
 Identities = 187/190 (98%)  
 Strand = Plus / Plus

Query: 1    aaaaacatatctctgtggtttaaagcttcggatgtaataacaaacaaacagtaacttattg 60  
 |||||  
 Sbjct: 1948 aaaaacatatctctgtggtttaaagcttcggatgtaataacaaacaaacagtaacttattg 2008

Query: 81    ataaaatfgaattctgccaattactcgttctataagagaggatagagagaaacaaaaat 120  
 |||||  
 Sbjct: 2009 ataaaatfgaattctgccaattactcgttctataagagaggatagagagaaacaaaaat 2068

Query: 121    tgaaaacngtacacaataatfaatacaatttatgcaaatcctataaaaacacctttac 180  
 |||||  
 Sbjct: 2069 tgaaaacngtacacaataatfaatacaatttatgcaaatcctataaaaacacctttac 2128

Query: 181    aatcagaact 190  
 |||||  
 Sbjct: 2129 aatcagaact 2138

>gi|21685410|emb|AL731825.1|D1P6T9.15  Bacillus thuringiensis subsp. israelensis plasmid c  
 Length = 127928  
 Score = 359 bits (181), Expect = 9e-97  
 Identities = 187/190 (98%)  
 Strand = Plus / Minus

Query: 1    aaaaacatatctctgtggtttaaagcttcggatgtaataacaaacaaacagtaacttattg 60  
 |||||  
 Sbjct: 94580 aaaaacatatctctgtggtttaaagcttcggatgtaataacaaacaaacagtaacttattg 94621

Query: 61    ataaaatfgaattctgccaattactcgttctataagagaggatagagagaaacaaaaat 120  
 |||||  
 Sbjct: 94620 ataaaatfgaattctgccaattactcgttctataagagaggatagagagaaacaaaaat 94661



Strand = Plus / Minus

Query: 96 apagaggatagagagaacaaa 117  
|||||  
Sbjct: 31830 apagaggatagagagaacaaa 31809

>gi|14324059|gb|AC008680.5|AC008680 Homo sapiens chromosome 5 clone C16-5319, complete st  
Length = 229045

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.067  
Identities = 22/22 (100%)  
Strand = Plus / Minus

Query: 96 apagaggatagagagaacaaa 117  
|||||  
Sbjct: 217270 apagaggatagagagaacaaa 217249

>gi|12977978|emb|AJ251977.1|BT251977 Bacillus thuringiensis subsp. medea lin cry2Ba gene f  
protein  
Length = 5009

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.067  
Identities = 28/30 (93%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 58 ttgataaaattgaattttgccaaattactc 87  
|||||  
Sbjct: 2486 ttgataaaattgaattttgacaaattactc 2517

>gi|21589163|gb|AC122721.2| Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-91113, complete sequence  
Length = 137867

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.27  
Identities = 21/21 (100%)  
Strand = Plus / Minus

Query: 93 atagagaggatagagagaaz 113  
|||||  
Sbjct: 133220 atagagaggatagagagaaz 133200

>gi|18449667|gb|AC094104.2| Homo sapiens chromosome 5 clone RP11-439C19, complete sequenc  
Length = 199531

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.27  
Identities = 21/21 (100%)  
Strand = Plus / Minus

Query: 93 atagagaggatagagagaaz 113  
|||||

## 제 4장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 제 1절 목표 달성도

구분	연구 내용	달성도
유용 전산 균주 탐색 (1차 년도)	총 시료 994개로부터 3,041주의 미생물을 분리하여 항균 활성이 높은 균주 12주를 분리하였다. 분리주를 이용하여 내 산성을 조사한 결과 pH 3에서는 분리주 모두가 생존하였으나, pH 2에서는 23-3번 균주를 제외한 모든 균주가 사멸하였다. 내 담즙성을 조사한 결과 oxgall 0.5%에서도 분리 균주 모두가 생존하였다.	100%
유용 효소 활성 균주 탐색 (2차 년도)	돼지 및 소의 위, 장내용물 및 가축 분뇨 등으로부터 포자를 형성하는 미생물을 분리하였으며, phytase와 protease활성이 가장 높은 균주를 분리하여 동정한 결과 <i>Bacillus subtilis</i> CF 5-26이라 명명하였다. 이 균이 생성하는 phytase의 분자량을 측정한 결과 34kDa이며, 열안정성은 100℃까지 안정하였으며, 효소 기질 특이성은 sodium phytate에 활성이 뛰어 났으며, 효소의 Km과 Vmax값은 0.64mM과 4.41μmol/min이었다.	100%
파리 살충성 균주 특성 조사 (3차 년도)	(주)중앙 바이오텍에서 분리한 파리 살충성 균주6개를 분양받아 이 균이 분비하는 독소 단백질을 분리. 정제하고 특성을 조사하였다. <i>B.t</i> wang 4와 <i>B.t</i> F2는 Cry4A specific primer에 의해서 1529bp band를 획득하였지만, 다른 균들은 이와같은 밴드를 얻지 못하였다. 내독소의 결정체를 분리하기 위하여 sucrose 농도 구배가 65%~85%일 때 분리되었으며, 전자 현미경으로 사진 촬영한 결과 외형에 주름이 잡힌 구형에 가까운 형태를 가지고있었다.	90% <sup>^</sup>

## 제 2절 관련 분야에의 기여도

- 항균 활성 유산균의 사료 첨가로 인한 항생제 내성을 절감
- 저공해(low-pollution) 사료 개발에 활용
- 사료 중의 인 및 단백질효율을 높이는 기술로 활용
- Pytase 및 protease의 복합효소 생산 포자형성미생물을 활용하므로써 사료첨가제에 의한 사료원가 상승의 최소화에 기여
- 환경 친화적 살충제 개발
- 저공해(low-pollution) 사료 첨가제로 활용
- 환경 처리제제의 수출 증대 효과와 수입 대체 효과
- 생물 공학적 기술 축적

## 제 5장 연구 개발 결과의 활용 계획

이 결과는 주관 기관인 (주)중앙 바이오텍과 협의하에 이루어 질 것이며, (주)중앙 바이오텍은 생균제를 생산할 수 있는 국내 굴지의 동물 약품 회사로 이 분야에서 앞선 기술을 보유하고 있고 또한 제품의 생산화에 유리한 위치를 차지하고 있다.

## 제 6장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술정보

최근 축분이나 축사의 하수에 의해 발생하는 환경, 수질오염의 문제가 심각히 대두되고 있는 추세이다. 이러한 문제를 해결하기 위해 가축이 사료 내의 오염원을 모두 이용할 수 있는 저공해(low-pollution) 사료의 개발이 시급한 실정이다. 저공해사료 개발의 경우, 많은 연구가 가축 분뇨에서 유기인(organic phosphorus)과 질소(nitrogen) 양을 줄이는 것에 중점을 두고 있다. 특히 인은 nucleic acids, coenzyme, phospho-protein, phospho-lipid등과 같은 생화학적 중요 구성성분이다. 그러나 사료 중 유기인의 20-30%만을 이용하고 나머지는 배설되므로 환경오염의 주원인이 되고 있다. 또한 낮은 인 이용률 때문에 사료 내에 값비싼 무기 인을 첨가해야하는 문제점이 부각되고 있다.

가금류와 돼지의 사료는 주로 식물에서 기인한 것이다. 이들 사료에서 ⅔ 이상의 인이 phytate-P 상태로 존재하고 있으며, 이를 단위동물은 이용할 수 없다는 데에 그 문제점이 있다. 이러한 이유로 인해 집약적 사육을 주로 하는 한국, 일본, 네덜란드에서 phytate-P가 인의 오염문제를 유발한다. Phosphate의 주요한 저장 대사물질인 phytic acid(myo-inositol hexakis-phosphate)는 단자 엽이나 쌍자 엽 식물의 종자에 존재하고 있다(Gibbins and Norris, 1962). Phytic acid에 유기적으로 결합된 phosphate는 phytase(myo-inositol hexakisphosphohydrolase)를 갖고 있지 않은 돼지와 가금류의 단위동물은 이용할 수 없으며, phytic acid는 칼슘, 마그네슘, 아연과 같은 여러 금속과 chelate를 형성하여 이들 물질을 동물이 이용할수 없도록 하는 항영양성 인자로 작용하기도 한다(Taylor, 1965; Nelson, 1967; Sharma et al., 1978; Graf and Dintzis, 1982; Graf, 1983). 그러므로 효소 분해에 의해 phytic acid가 가축이 이용할 수 있는 상태로 변화되어야할 필요성이 대두되고 있다.

Phytase(myo-inositol hexakisphosphohydrolase)는 phytic acid를 myo-inositol과 inorganic phosphate(무기인)로 분해하는 효소이다(Nelson

and Peeler, 1961; Ullah 1988). Phytase는 식물에 존재(Lalas and Markakis, 1977; Ullah and Gibson, 1987)하거나, bacilli, yeasts, filamentous fungi를 포함한 다양한 미생물에 존재한다(Shieh and Ware, 1968; Howson and Davis, 1983). Phytase 활성을 갖는 다양한 미생물의 screening중 filamentous fungus *Aspergillus niger* NRRL3135에서 생산된 세포의 phytase는 동물사료 첨가제 사용이 가능한 것으로 알려졌다(Howson and Davis, 1983; Nair and Dunjak, 1990; Simons and Versteegh, 1990).

축산에서 영양물질의 소화와 이용을 증진시키는 효소를 동물 사료에 첨가하는 것이 공통 실천과제가 되고 있다(Cowan, 1992). Phytase 효소는 다른 효소처럼 동물 사료의 첨가제로 사용되고 있는 추세이다. 사료에 phytase를 첨가하는 것은 인 이용성을 증진시키고, 돼지와 가금의 분에서 phosphate의 분비를 줄인다는 많은 보고가 있다(Beudeker, 1991; Simons and Versteegh, 1990; Nasi, 1990). 또한 사료의 단백질 효율을 높이기 위하여 단백질분해효소를 첨가하기도 한다.

## 제 7장 참고문헌

Alejanda Bravo, Sergio Sarabia, Lorena Lopez, Hernesto Ontiveros, Carolina Abarca, Anabel Ortiz, Miriam Ortiz, Laura Lina, Maria Eugenia Nunez-Valdez, Mario Soberon and Rodolfo Quintero. Appl Environ Microbiol. Dec. Vol. 64, No. 12, p. 4965-4972.

Beudeker, R. F., C. Geerse, and G. J. Verschoor. 1991. Biotechnology products for the compound feed industry. p. 340 ~ 343. In: Biotechnology international. North, K.(Ed.). Century Press, London.

Cowan, D. 1992. Advances in feed enzyme technology. Agrofood Ind. Hi-Tech. May/June:9 ~ 11

D. L. Prieto-Samsonov, R. I. Vazquez-Padron, C. Ayra-Pardo, J. Gonzalez-Cabrera and G. A. de la Riva, *Bacillus thuringiensis*: from biodiversity to biotechnology, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 19, 202-219 (1997)

Eitan Ben-Dov, Arie Zaritsky, Edith Dahan, Ze'ev Barak, Rosa Sinai, Robert Manasherob, Allovuddin Khamraev, Eugenia Troitskaya, Anatoly Dubitsky, Natasha Berezina and Yoel Margalith.(1997) Extended Screening by the Seven cry-Group Genes from Field-Collected Strains of *Bacillus thuringiensis*. Vol. 63. No. 12. p.4833-4890

E. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean, *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 775-806 (1998)

Geoghiou, G. P. 1994. Mechanism and microbial characteristic of invertebrate resistance to bacterial toxins, pp. 48-50. Processings of the

Vith International Colloquium on invertebrate Pathology and Microbial Control, vol. 1. Society of Invertebrate Pathology, Montpellier, France.

Gibbins, L. N. and F. W. Norris. 1962. Phytase and acid phosphatase in the Dwarf Bean, *Phaseolus vulgaris*. Biochem. J. 86: 67 ~ 71.

Graf, E. 1983. Calcium binding to phytic acid. J. Agric. Food Chem. 31(4): 851 ~ 855.

Gi-Bum Nam, Jae-Min Cho, Soon-Bok Hong, Hyung-Hoon Lee and Myung-Hwan Lee(1996) In Vitro Dissolution Pattern of *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 23, No.6, 730-736

Graf, E. and F. R. Dintzis. 1982. Determination of phytic acid in foods by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 30: 1094 ~ 1097.

Howson, S. J. and R. P. Davis. 1983. Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. Enzyme Microb. Technol. 5: 377 ~ 382.

Herman Hofte and H.R. Whiteley, Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*, Microbiological Review, 53, 242-255 (1989)

Ho San Kim, Dae Won Lee, Soo Dong Woo, Yong Man Yu, Seok Kwon Kang(1998) Distribution, Serological Identification, and PCR Analysis of *Bacillus thuringiensis* Isolated from Soils of Korea. Current Microbiology. Vol.37, pp. 195-200

Hyung-Hoan Lee, Jae-Jung Lee, Jung Hee Suh(1986) Studies on the Development of the *Bacillus thuringiensis* Pesticide(Media compositions for the endotoxin production by *B.thuringiensis* var *israelensis*. Kor. J. Appl.



Microbiol. Biotechnol. Vol. 14, No.4, 329-334

Hyung-Hoan Lee, Tae-Sook Kang, Chang Keun Oh(1986). Studies on the Development of the *Bacillus thuringiensis* Pesticide(Purification of *B. thuringiensis* subsp. endotoxin crystals). Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 14, No.1, 91-95.

J. Thomas McClintock, Cindy R. Schaffer and Roy D. Sjoblad, A comparative Review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides, Pestic. Sci., 45, 95-105 (1995)

Joel E. Lopez-Meza and Jorge E. Ibarra.(1996) Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol. Apr. Vol. 62, No.4, p. 1306-1310

Joel E. Lopez-Meza, Brian A. Federici, William J. Poehner, Ana Martienz-Castillo and Jorge E. Ibarra.(1995) Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol. May. Vol. 23, No.5, p. 461-468.

Joo-Yeon Lee, Gap-JU Park and Hyung-Hoan Lee(1993) Growth and Production of Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Isolates. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol. 21, No.3, 193-199

Laemmli,U.K.(1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bactriophage T4, Nature(London) 227: 680-685

Lolas, M and P. Markakis. 1977. Phytase of navy beans. J. Food Sci. 42: 1094 ~ 1097.

Michawl D. Kawal<sup>1</sup>, Seleena Benjamin, Han L. Lee and Sarjeet S. Gill, Isolation and identification of novel toxins from a new mosquitocidal isolate from Malaysia, *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*, Applied and Environmental Microbiology, 61, 2965-2969 (1995)

Miller, L. H. 1992. The challenge of malaria. Science 257: 36-37.

Nair, V. C. and Z. Dunjak. 1990. Reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus ficuum* in solid state fermentation process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 183 ~ 188.

Nasi, M. 1990. Microbial phytase supplementation for improving availability of plants phosphorus in the diet of growing pigs. J. Agr. Sci. Finland. 62: 435 ~ 442.

Nelson, T. S. 1967. The utilization of phytate phosphorus by poultry- A review. Poultry Sci. 46: 862 ~ 871.

Nelson, T. S. and H. T. Peeler. 1961. The availability of phosphorous from single and combined phosphates to chicks. Poultry Sci. 40: 1321 ~ 1328.

Olga Ravoahangimalala and Jean-Francois Charles.(1995) In Vitro binding of *Bacillus thuringiensis* var, *israelensis* individual toxins to midgut cells of *Anopheles gambiae* larvae (Diptera: Culicidae). FEMS Letters 362(1995) 111-115.

Round A. de Maagd, Alejandra Bravo and Neil Crickmore.(2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. TRENDS in Genetics. April. Vol. 17, No. 4. p.193-199.

Sharma, C. B., M. Goel and M. Irshad. 1978. Myo-inositol hexaphosphate as a potential inhibitor of  $\alpha$ -amylases of different origins. *Phytochemistry*. 17: 201 ~ 204.

Shieh, T. R. and J. H. Ware. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.* 16: 1348 ~ 1351.

Simons, P. C. M. and H. A. J. Versteegh. 1990. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broilers and pigs. *Brit. J. of Nutr.* 64: 525 ~ 540.

Tabashnik BE, Roush RT, Earle ED, Shelton AM (2000). Resistance to Bt toxins. *Science* 287(5450): 42-44.

Taylor, T. G. 1965. The availability of the calcium and phosphorus of plant materials for animals. *Prod. Nutr. Soc.* 43: 94 ~ 98.

Ullah, A. H. J. 1998. Production rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum*. *Prep. Biochem.* 18(4): 443 ~ 458.

Wi-Jong Kim and Kwang-Hyeon Kim(1999) Characterization of a Mosquitocidal Delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp guiyangiesis strain 21-2(H serotype 43). *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 27, No.5, 359-363.

Yasunori Nagamatsu, Yuichi Ltai, Chitoshi Hatanaka, Gunki Funatsu and Katsuya Hayashi(1984), A Toxic Fragment from the Entomocidal Crystal Protein *Bacillus thuringiensis*, *Agric. Biol. Chem.* 48(3): 226-237