



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0101431
(43) 공개일자 2017년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 1/00 (2006.01) A23K 1/14 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01) C12R 1/84 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A23K 10/18 (2016.05)
A23K 10/30 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2016-0023932

(22) 출원일자 2016년02월29일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
주식회사 고려비엔피
충청남도 예산군 신암면 추사로 235-9

(72) 발명자
정청환
경기도 군포시 산본천로 12 을지 아파트 624동 1501호

김준태
충남 홍성군 홍북면 신대로 54 효성해링턴플레이스아파트 105동 2001호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **축사환경개선용 생균제 조성물**

(57) 요약

본 발명의 일 구현예는 축사악취 원인물질에 대한 탈취능 및 병원성 미생물 항균능을 갖는 균주 KBNP-BS3 (Bacillus Subtilis KBNP-BS3; KCTC 18446P)의 배양액을 포함하는 축사환경개선용 생균제 조성물에 관한 것이다.

이를 통해 본 발명은 축사악취 원인물질에 대한 탈취능이 높고, 유해세균에 대한 항균 스펙트럼이 넓으며, 항균력이 우수하여, 축사환경을 효율적으로 개선하고 산업동물의 면역력 증강 및 생산성을 향상시킬 수 있는 축사환경개선용 생균제 조성물을 제공한다. 더 나아가 본 발명의 축사환경개선용 생균제 조성물은 축사악취 원인물질 제거 효과 및 유해세균에 대한 항균 효과를 통해, 가축의 폐사율 및 질병 발생률을 낮추고, 양축 생산성 향상 효과를 증대할 수 있으며, 토양 및 대기 오염의 정도를 저감하여 민원발생을 감소시키는데 일조한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 1/16 (2013.01)

C12N 1/20 (2013.01)

C12R 1/125 (2013.01)

C12R 1/84 (2013.01)

(72) 발명자

김기세

충남 아산시 배방읍 용연로 37 용연마을 205동
1504호

김태환

경기 군포시 고산로 539번길 4 극동백두아파트 96
8동 703호

명세서

청구범위

청구항 1

축사악취 원인물질에 대한 탈취능 및 병원성 미생물 항균능을 갖는 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 (*Bacillus Subtilis* KBNP-BS3; KCTC 18446P) 균주의 배양액을 포함하는 축사환경개선용 생균제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배양액은 바실러스 리케니포미스 KBNP-DJ1(*Bacillus Licheniformis* KBNP-DJ1; KCTC 18447P) 및 피키아 쿠드리압즈비 KBNP-BF5(*Pichia kudriavzevii* KBNP-BF5; KCTC 18445P)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 균주의 배양액을 더 포함하는 축사환경개선용 생균제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 축사환경개선용 생균제 조성물은 녹차엽, 인진쑥 및 울금으로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 천연물을 더 포함하는 축사환경개선용 생균제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 축사악취 원인물질은 암모니아, 트리메틸아민, 황화수소 및 메틸머캅탄 중 1종 이상인 축사환경개선용 생균제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 병원성 미생물은 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 대장균(*Escherichia coli*), 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 엔테라이티디스(*Salmonella enteritidis*) 중 1종 이상인 축사환경개선용 생균제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 축사 악취 원인 물질에 대한 탈취능 및 병원성 미생물 항균능을 갖는 축사환경개선용 생균제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 농림수산물부는 2005년부터 배합사료 제조용 항생제 감축 정책을 추진하였다. 이에 따라, 사료관리법 관련 고시 개정사항으로 유해사료의 범위와 기준(농림수산물부 고시 제2010-142호, 2010.12.27)에 의해 2011년 7월 이후부터는 배합사료 내 항생제의 사용이 전면 금지되었다.
- [0004] 이러한 정책에 대응하기 위해 사료에 항생제를 대신할 수 있는 대체원료를 투입하는 방안이 이용되고 있으나, 이러한 대체원료들은 수입의존도가 매우 높고, 원가가 높아 이익의 창출이 쉽지 않은 단점이 있다. 이러한 경제적인 어려움은 축산 농가의 경영수지 악화로 이어지고 있는 실정이다.
- [0005] 또한, 가축의 대량사육 및 밀집 사육과정 중에서 발생하는 축사 내 악취는 축산 농가 경영의 어려움을 증가시키는 또 다른 요인이다. 축사 내 악취의 원인은 주로 분뇨 속의 미생물에 의해 생성되는 유해 가스와 악취 유발 물질 등이다.
- [0006] 축사 내 악취 유발 물질의 예로는, 암모니아, 트리메틸아민, 황화수소 등이 있다. 이러한 악취 유발 물질은 토양 및 대기를 오염시켜 축사 주변 지역에 거주하는 사람들에게 육체적, 정신적 피해를 주어 축사의 운영에 민원을 제기하는 요인으로 작용하고 있다. 뿐만 아니라, 악취 유발 물질들은 가축에게도 눈의 충혈, 호흡기 자극, 폐렴유발, 식욕감퇴, 피부염 등의 질병을 유발하여 축산업 전반의 생산성 저하를 초래하기도 한다. 특히, 축사 내의 암모니아 농도는 가축의 폐사율 및 호흡기 질병 발생률과의 연관성을 보이고 있어, 이를 저감하는 경우 가축 폐사율 및 호흡기 질병 예방률을 낮추고 생산성을 높이는 효과가 있을 것으로 생각되고 있다.
- [0007] 축사 내 악취 유발 물질 대해, 환경부에서는 악취 방지법, 가축사육 제한 구역 지정기준 권고안 등을 통해, 축산농가의 축산 분뇨 및 악취 배출기준을 지속적으로 강화하고 있다. 이러한 정책에 대응하기 위해 축산업 분야에서는 가축분뇨의 자원화, 동물복지를 적용한 사육 기술들이 제안되고 있지만, 이를 실제 현장에 적용하기 위해서는 매우 높은 투자 비용이 소요되어 널리 보편화 되기에 어려운 점이 있다.
- [0008] 따라서, 보급화에 소요되는 비용 및 원가 등을 현실적인 수준으로 낮추고, 가축의 면역력을 증강하며, 축사 주변 지역의 오염을 방지하면서도 동시에 가축의 폐사율 및 질병발생률을 효과적으로 저감하여 축산농가의 이익 창출에 기여할 수 있는 기술에 대한 요구가 증가하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 하나의 과제는 축사악취 원인물질에 대한 탈취능이 높고, 유해세균에 대한 항균 스펙트럼이 넓으며, 항균력이 우수하고, 산업동물의 면역력 증강 및 양축 생산성 향상에 효과가 있는 축사환경개선용 생균제 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 구현예는 축사악취 원인물질에 대한 탈취능 및 병원성 미생물 항균능을 갖는 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 (*Bacillus Subtilis* KBNP-BS3; KCTC 18446P) 균주의 배양액을 포함하는 축사환경개선용 생균제 조성물에 관한 것이다.
- [0013] 상기 배양액은 바실러스 리케니포미스 KBNP-DJ1(*Bacillus Licheniformis* KBNP-DJ1; KCTC 18447P) 및 피키아 쿠드리압즈비 KBNP-BF5(*Pichia Kudriavzevii* KBNP-BF5; KCTC 18445P)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 균주의 배양액을 더 포함할 수 있다.
- [0014] 상기 축사환경개선용 생균제 조성물은 녹차엽, 인진쑥 및 울금으로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 천연물을 더 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 축사악취 원인물질은 암모니아, 트리메틸아민, 황화수소 및 메틸머캅탄 중 1종 이상일 수 있다.
- [0016] 상기 병원성 미생물은 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 및 살모넬라 엔테라이트디스(*Salmonella enteritidis*) 중 1종 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 축사악취 원인물질에 대한 탈취능이 높고, 유해세균에 대한 항균 스펙트럼이 넓으며, 항균력이 우수하여, 축사환경을 효율적으로 개선하고 산업동물의 면역력 증강 및 양축 생산성을 향상시킬 수 있는 축사환경개선용 생균제 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명의 실시예 및 비교예의 축사환경개선 평가 실험을 나타낸다.
 도 2는 본 발명의 제조예 1에서 제조된 PCR 확인 결과를 나타낸 결과이다.
 도 3은 본 발명의 제조예 1에서 분리된 균주의 계통수 분석 결과이다.
 도 4는 본 발명의 제조예 1에서 분리된 균주의 그람 염색 결과이다.
 도 5는 본 발명의 제조예 1에서 분리된 균주의 아포 염색 결과이다.
 도 6은 본 발명의 제조예 1에서 분리된 균주의 SEM 이미지이다.
 도 7은 본 발명의 제조예 1에서 분리된 균주의 API 50 CH strip 분석 결과이다.
 도 8은 본 발명의 제조예 1에서 분리된 균주의 효소활성 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명의 일 구현예는 축사악취 원인물질에 대한 탈취능 및 병원성 미생물 항균능을 갖는 균주 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3(*Bacillus Subtilis* KBNP-BS3; KCTC 18446P)의 배양액을 포함하는 축사환경개선용 생균제 조성물에 관한 것이다.

[0022] 이를 통해 본 발명은 가축의 면역력 증강 및 생산성을 향상시킬 수 있는 동시에, 축사악취 원인물질에 대한 탈취능이 높고, 유해세균에 대한 항균 스펙트럼이 넓으며, 항균력이 우수한 축사환경개선용 생균제 조성물을 제공한다. 더 나아가 본 발명의 축사환경개선용 생균제 조성물은 축사악취 원인물질 제거 효과 및 유해세균에 대한 항균 효과를 생균제로서 적용할 수 있을 뿐만 아니라, 동시에 축사환경개선제로서도 적용할 수 있다. 이를 통해, 가축의 폐사율 및 질병 발생률을 낮추고, 양축 생산성 향상 효율을 증대할 수 있으며, 토양 및 대기 오염의 정도를 저감하여 민원발생을 감소시키는데 일조한다.

[0023] 본 발명의 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주 배양액을 포함하는 생균제 조성물은 가축의 사료 첨가제 또는 보조사료로 급여됨으로써, 가축의 소화력 및 면역력을 증강하고, 유해 미생물에 대한 저항성을 향상하여 양축 생산성을 높일 수 있다. 또한, 동시에 본 발명의 생균제 조성물은 축사악취 원인물질에 대한 탈취능 및 병원성 미생물 항균능을 통해 가축의 분뇨에 작용하여 축사환경개선용 생균제 조성물로도 사용될 수 있는 점에 특징이 있다.

[0024] 본 발명에서는 축사환경개선제로 사용할 수 있는 미생물을 규명하기 위하여 청국장을 멸균 식염수에 현탁시켜 희석한 후, NA 한천배지에 도말하고, 30℃에서 24시간 배양 후 형성된 콜로니(colony)를 계대 배양하여 축사 악취 원인 물질에 대한 탈취능 및 병원성 미생물 항균능이 우수한 균주를 순수분리하였다. 상기와 같이 분리된 균주는 바실러스 서브틸러스에 속하는 신규 균주로 규명되었으며, 본 발명자들은 이와 같이 선발된 균주를 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3로 명명하고, 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 2016년 2월 17일자로 기탁하였으며, 수탁번호 KCTC18446P를 부여받았다.

[0025] 상기 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주는 청국장으로부터 분리된 균주로서, 혈액한천배지(Blood agar)를 이용한 비병원성 탐색 실험 및 가축용 생균활성 탐색 실험(α-amylase, protease, cellulase 등에 대한 효소활성)에 의해 선발된 것이다.

[0026] 이러한 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주는 계통학적 특성 분석, 형태학적 특성 분석 및 생리학적 특성 분석 결과를 통해 바실러스 서브틸러스(*Bacillus Subtilis*)와 99% 이상의 상동성을 갖는 동속계 균주임이 확인 되었다.

[0027] 상기 계통학적 특성 분석으로는 16S rDNA 시퀀스 분석 및 PCR을 이용한 계통수(Phylogenetic tree) 분석법을 수

행하였다. 상기 형태학적 특성 분석으로는 그람 염색법(gram staining), 아포염색법(endospore staining) 및 주사 전자 현미경(SEM; Scanning Electron Microscope) 이미지 촬영법을 수행하였다. 상기 생리학적 특성 분석으로는 API® 50 CH strip 키트 분석법, 항생제 감수성 시험법, 효소활성 분석법 및 균주 동정을 위한 지방산 분석법을 수행하였다. 이와 같은, 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주의 분석은 제2조에 1에 기재된 방법과 동일한 조건으로 수행되었다.

[0028] 전술한 분석방법들에 의해 동정된 본 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주는 병원성 미생물(유해세균)에 대한 항균력 및 축사 악취 원인 물질에 대한 탈취율이 매우 우수하다. 이러한 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주를 축사환경개선용 생균제 조성물로 이용함으로써, 본 발명은 보급화 비용 및 제조단가를 낮추며, 생균제 및 축사환경개선제로서의 장점을 동시에 취할 수 있다.

[0029] 상기 축사 악취 원인 물질은 일반적으로 축사 악취 원인 물질로 알려진 화합물일 수 있고, 이의 종류가 제한되지는 않는다. 구체적으로, 상기 축사 악취 원인 물질은 암모니아, 트리메틸아민, 황화수소 및 메틸머캅탄 중 1종 이상일 수 있다.

[0030] 일 구체예에서, 상기 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주는 암모니아, 트리메틸아민, 황화수소 및 메틸머캅탄 모두에 대한 탈취율을 40% 이상으로 구현할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주는 암모니아, 트리메틸아민 및 황화수소 모두에 대한 탈취율을 96% 이상 구현하고, 동시에 메틸머캅탄에 대한 탈취율을 40% 이상 구현할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 상기 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주는 암모니아 및 황화수소 모두에 대한 탈취율을 99% 이상 구현하고, 동시에 트리메틸아민에 대한 탈취율을 96% 이상, 메틸머캅탄에 대한 탈취율을 40% 이상 구현할 수 있다. 이러한 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주의 배양액을 포함함으로써, 축사환경개선용 생균제 조성물은 다양한 종류의 축사 악취 유발 물질을 탈취하는 효과가 우수하고, 축사주변의 토양 및 대기오염 방지에 더욱 효과적이며, 암모니아 등의 자극성 물질에 의한 폐사를 및 질병발생률을 낮추어 양축 생산성을 증대시킬 수 있다.

[0031] 또한, 상기 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주는 에스테르 가수분해 효소 C4(esterase), 에스테르-지질 가수분해 효소 C8(esterase-lipase), 산성 인산 가수분해 효소(acid phosphatase), 나프톨-AS-Bi-인산화 가수분해 효소(Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase) 및 알파-글루코시드 가수분해 효소(α -glucosidase) 중 1종 이상에 대한 활성을 가질 수 있다. 이러한 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주의 배양액을 포함함으로써, 축사환경개선용 생균제 조성물은 장내 균총을 개선하고, 가축의 소화력을 향상시키며, 면역력을 증진시킬 수 있다. 또한, 동시에 상기 효소 활성을 이용하여 가축 분뇨에서 발생하는 휘발성 에스테르 화합물, 휘발성 지방산 및 산성 인산을 추가적으로 분해할 수 있으며, 이를 통해 더욱 다양한 종류의 축사 악취 및 질병 유발성 자극 물질을 높은 효율로 저감할 수 있다.

[0032] 일 구체예에서, 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주는 에스테르 가수분해효소 C4(esterase), 에스테르-지질 가수분해 효소 C8(esterase-lipase), 산성 인산 가수분해 효소(acid phosphatase), 나프톨-AS-Bi-인산화 가수분해 효소(Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase) 및 알파-글루코시드 가수분해효소(α -glucosidase) 모두에 대한 활성 효과를 동시에 구현할 수 있다. 이러한 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주의 배양액을 포함하는 경우, 축사환경개선용 생균제 조성물은 더욱 다양한 종류의 축사 악취 유발 물질을 탈취하는 효과, 축사주변의 토양 및 대기오염 방지에 더욱 우수한 효과, 암모니아 등의 자극성 물질에 의한 폐사를 및 질병발생률을 낮추어 양축 생산성을 증대시키는 효과 등을 구현할 수 있다.

[0033] 상기 병원성 미생물은 바실러스 세레우스(Bacillus cereus), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa) 및 살모넬라 엔테라이트디스(Salmonella enteritidis) 중 1종 이상일 수 있다. 이러한 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주의 배양액을 포함함으로써, 축사환경개선용 생균제 조성물은 병원성 미생물(유해세균)에 길항적으로 작용하여 장내 균총 개선 및 항균 효과를 발휘할 수 있다. 이를 통해, 축사환경개선용 생균제 조성물은 면역력이 약화된 가축에 감염되는 식중독, 설사증, 구토증, 녹농균 감염증, 급성장염 등을 예방할 수 있고, 가축의 면역력을 증강할 수 있다.

[0034] 상기 병원성 미생물(유해세균)은 예를 들면, 바실러스 세레우스KCTC1012(Bacillus cereus KCTC1012), 녹농균 KCTC1750(Pseudomonas aeruginosa KCTC1750) 및 살모넬라 엔테라이트디스 KCCM12400(Salmonella enteritidis KCCM12400)등 일 수 있다.

[0035] 일 구체예에서, 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주의 배양액을 포함하는 축사환경개선용 생균제 조성물은 바실러스 세레우스(Bacillus cereus), 녹농균(Pseudomonas aeruginosa) 및 살모넬라 엔테라이트디스(Salmonella

enteritidis) 모두에 대한 활성 효과를 동시에 구현할 수 있다. 이러한 경우, 상기 축사환경개선용 생균제 조성물은 항균 스펙트럼이 넓어 더욱 우수한 축사환경개선 효과 및 가축 질병 예방의 효과를 구현할 수 있다.

- [0036] 본 발명의 바실러스 서브틸리스 KBNP-BS3 (*Bacillus Subtilis* KBNP-BS3; KCTC 18446P) 균주의 배양액은 배지에 전술한 바실러스 서브틸리스 KBNP-BS3 (*Bacillus Subtilis* KBNP-BS3; KCTC 18446P) 균주를 접종한 후 이를 계대 배양하여 수득할 수 있다.
- [0037] 상기 배지는 예를 들면, TSB(Tryptic Soy broth), BHI(Brain Heart Infusion), LB(Luria Bertani), MRS medium 및 NB(Nutrient broth) 중 1종 이상일 수 있다. 이러한 경우, 바실러스 서브틸리스 KBNP-BS3 균주의 성장 효율이 증대될 수 있다.
- [0038] 상기 배지는 예를 들면, pH 5 내지 pH 9 및 30℃ 내지 42℃ 조건에서 24시간 내지 72시간 동안 배양될 수 있다. 이러한 배양 조건은 균주 수득률 향상에 매우 우수한 효과가 있다. 이를 통해, 축사환경개선용 생균제 조성물의 생산성 및 비용 효율성을 더욱 향상시킬 수 있다.
- [0039] 일 구체예에서, 상기 배양액은 TSB(Tryptic Soy broth)배지에서 pH 7, 37℃ 조건에서 48시간 동안 배양하여 수득된 것일 수 있다. 상기 배양 조건 범위에서, 균주 수득률 및 생균수가 매우 우수한 수준으로 증대될 수 있다.
- [0040] 상기 배양액은 바실러스 리케니포미스 KBNP-DJ1(*Bacillus Licheniformis* KBNP-DJ1; KCTC 18447P) 및 피키아 쿠드리압즈비 KBNP-BF5(*Pichia Kudriavzevii* KBNP-BF5; KCTC 18445P)로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 균주의 배양액을 더 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서는 축사환경개선제로 사용할 수 있고, 상기 바실러스 서브틸리스 KBNP-BS3에 대한 활성 억제 효과 가지지 않는 미생물을 규명하기 위하여 청국장 및 누룩을 각각 멸균식염수에 현탁시켜 희석한 후, NA 한천 배지에 도말하고, 30℃에서 24시간 배양 후 형성된 콜로니(colony)를 계대 배양하여 축사 악취 원인 물질에 대한 탈취능 및 병원성 미생물 항균능이 우수하고, 바실러스 서브틸리스 KBNP-BS3와 길항적 저해효과가 없는 균주를 순수 분리하였다.
- [0042] 상기와 같이 분리된 균주 중 청국장으로부터 분리된 균주는 바실러스 리케니포미스에 속하는 신규 균주로 규명되었으며, 본 발명자들은 이와 같이 선발된 균주를 바실러스 리케니포미스 KBNP-DJ1로 명명하고, 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 2016년 2월 17일자로 기탁하였으며, 수탁번호 KCTC18447P를 부여받았다.
- [0043] 또한, 상기와 같이 분리된 균주 중 누룩으로부터 분리된 균주는 피키아 쿠드리압즈비에 속하는 신규 균주로 규명되었으며, 본 발명자들은 이와 같이 선발된 균주를 피키아 쿠드리압즈비 KBNP-BF5로 명명하고, 한국생명공학연구원 미생물자원센터에 2016년 2월 17일자로 기탁하였으며, 수탁번호 KCTC18445P를 부여받았다.
- [0044] 상기 바실러스 리케니포미스 KBNP-DJ1(*Bacillus Licheniformis* KBNP-DJ1; KCTC 18447P) 균주는 청국장으로부터 분리된 균주로서, 스kim milk agar 배지를 이용한 프로테아제(protease) 탐색 실험 등에 의해 선발된 것이다. 이러한 바실러스 서브틸리스 KBNP-BF5 균주는 계통학적 특성 분석, 형태학적 특성 분석 및 생리학적 특성 분석 결과를 통해 바실러스 리케니포미스 KBNP-DJ1(*Bacillus Licheniformis*)와 99% 이상의 상동성을 갖는 동속계 균주임이 확인 되었다.
- [0045] 상기 바실러스 리케니포미스 KBNP-DJ1(*Bacillus Licheniformis* KBNP-DJ1; KCTC 18447P) 균주는 프로테아제 활성 및 축사 악취원인 물질에 대한 탈취 효과가 매우 우수하다. 이러한 바실러스 리케니포미스 KBNP-DJ1(*Bacillus Licheniformis* KBNP-DJ1; KCTC 18447P) 균주를 축사환경개선용 생균제 조성물로 이용함으로써, 본 발명은 더욱 우수한 생균 효과 및 축사환경개선 효과를 구현할 수 있다.
- [0046] 상기 피키아 쿠드리압즈비 KBNP-BF5(*Pichia Kudriavzevii* KBNP-BF5; KCTC 18445P) 균주는 누룩으로부터 분리된 균주로서, 계통학적 특성 분석 및 생리학적 특성 분석 결과를 통해 피키아 쿠드리압즈비(*Pichia Kudriavzevii*)와 99% 이상의 상동성을 갖는 동속계 균주임이 확인 되었다.
- [0047] 상기 피키아 쿠드리압즈비 KBNP-BF5(*Pichia Kudriavzevii* KBNP-BF5; KCTC 18445P) 균주는 유해세균에 대한 항균력 및 축사 악취원인 물질에 대한 탈취 효과가 매우 우수하다. 이러한 피키아 쿠드리압즈비 KBNP-BF5(*Pichia Kudriavzevii* KBNP-BF5; KCTC 18445P) 균주를 축사환경개선용 생균제 조성물로 이용함으로써, 본 발명은 더욱 우수한 생균 효과 및 축사환경개선 효과를 구현할 수 있다.
- [0048] 일 구체예에서, 본 발명의 축사환경개선용 생균제 조성물은 바실러스 서브틸리스 KBNP-BS3 (*Bacillus Subtilis* KBNP-BS3; KCTC 18446P) 균주, 바실러스 리케니포미스 KBNP-DJ1(*Bacillus Licheniformis* KBNP-DJ1; KCTC

18447P) 균주 및 피키아 쿠드리압즈비 KBNP-BF5(Pichia kudriavzevii KBNP-BF5; KCTC 18445P) 균주를 모두 포함할 수 있다. 이러한 경우, 유해세균에 대한 항균력 및 프로테아제 활성 효과가 더욱 우수할 뿐만 아니라, 더욱 다양한 종류의 축사 악취 유발 물질을 탈취할 수 있고, 축사주변의 토양 및 대기오염 방지에 더욱 효과적이며, 암모니아 등의 자극성 물질에 의한 폐사율 및 질병발생률을 낮추어 양축 생산성을 증대시킬 수 있다.

[0049] 상기 축사환경개선용 생균제 조성물은 녹차엽, 인진쑥 및 울금으로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 천연물을 더 포함할 수 있다. 이러한 경우, 축사환경개선용 생균제 조성물은 천연물을 이용으로 함으로써, 고품질 친환경 축산물을 생산할 수 있다. 이를 통해, 소비자의 안전 농산물 소비욕구를 충족시키면서도, 동시에 진술한 축사환경개선 효과, 산업동물의 면역력 증강 및 생산성 향상 효과를 구현할 수 있어, 축산 농가의 소득을 증대하는 데 기여할 수 있다.

[0050] 일 구체예에서, 축사환경개선용 생균제 조성물이 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주 및 울금을 포함하는 경우, 암모니아 및 트리에틸아민에 대한 탈취능을 동시에 우수한 수준으로 구현할 수 있다. 다른 구체예에서, 축사환경개선용 생균제 조성물이 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주 및 녹차엽을 포함하는 경우, 암모니아, 트리에틸아민 및 메틸머캅탄에 대한 탈취능을 동시에 우수한 수준으로 구현할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 축사환경개선용 생균제 조성물이 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주 및 인진쑥을 포함하는 경우, 암모니아, 트리에틸아민, 황화수소 및 메틸머캅탄에 대한 탈취능을 동시에 우수한 수준으로 구현할 수 있다.

[0052] 실시예

[0053] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 통해 본 발명의 구성 및 작용을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 다만, 이는 본 발명의 예시 중 일부로 제시된 것이며 어떠한 의미로도 이에 의해 본 발명이 제한되는 것으로 해석될 수는 없다.

[0054] 여기에 기재되지 않은 내용은 이 기술 분야에서 숙련된 자이면 충분히 기술적으로 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략하기로 한다.

[0056] 제조예 1. 균주의 준비 및 동정

[0057] <균주의 준비>

[0058] 청국장 3 g을 멸균 식염수에 현탁시켜 회석한 후, NA 한천배지에 도말하고, 30℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 형성된 콜로니(colony)를 계대 배양하여 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3을 순수분리하였다.

[0059] <균주의 동정>

[0060] 1) 계통학적 특성분석

[0061] 상기에서 순수분리된 균주로부터 16S rDNA 시퀀스 분석을 위한 DNA를 추출한 후, 27F와 1492R primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 상기 PCR을 전기영동하여 약 1.5kb의 PCR product가 얻어졌음을 확인하였다. 이러한 PCR product 확인에 대한 결과는 도 2에 나타내었다.

[0062] 상기에서 확인된 PCR product를 정제하여 DNA 분석기관((주)솔젠트)에 의뢰하여 분석한 결과, 바실러스 서브틸러스(*Bacillus subtilis*)와 99%의 상동성을 갖는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 바탕으로, 16S rDNA 시퀀스 기반의 계통수(phylogenetic tree) 분석을 수행하였고, 그 결과 순수 분리된 균주(바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3)은 *B. subtilis* (subsp. *subtilis*)에 속하는 균주임을 확인하였다. 이러한 계통수 분석 결과(neighbor-joining tree)는 도 3에 나타내었다.

[0063] 2) 형태학적 특성분석

[0064] 상기에서 순수분리된 균주에 그람 염색(gram staining)을 수행한 결과, 상기 균주(*B. subtilis* KBNP-BS3)는 그람 양성(gram positive) 균주로 확인되었다. 이러한 그람 염색 결과는 도 4에 나타내었다.

[0065] 상기에서 순수분리된 균주에 아포 염색(endospore staining)을 수행하였고, 상기 균주(*B. subtilis* KBNP-BS3)는 아포(endospore)를 형성하는 균주로 확인되었다. 이러한 그람 염색 결과는 도 5에 나타내었다. 상기 도 5에서, 아포(Endospore)는 염색되어 녹색으로 나타난다(화살표).

[0066] 상기에서 순수분리된 균주를 주사 전자 현미경(SEM; Scanning Electron Microscope) 이미지 촬영하여 형태를 관찰한 결과, 약 3~4 μm 정도의 간균의 형태로서 전형적인 Bacillus 균주의 모양임을 확인하였다. 이러한 주사 전자 현미경 촬영 이미지는 도 5에 나타내었다.

[0067] 3) 생리학적 특성분석

[0068] 상기에서 순수분리된 균주를 배양하여 싱글 콜로니(single colony)를 얻은 후, API 50 CHB medium에 현탁하여 2 McFarland의 현탁도로 조절하여 균주 현탁액을 제조하였다. 상기 균주 현탁액을 API 50 CH strip 키트에 첨가하고, 24시간 경과 후, 활성상태를 확인하였다. 활성상태의 확인은 phenol red 지시약의 색상 변화를 통해 관찰하였으며, 노란색으로 변하는 것으로 확인하였다. 키트의 변화 결과를 기록지에 표기하고, 웹사이트(<http://apiweb.biomerieux.com>)에 입력하여 순수분리된 균주(B. subtilis KBNP-BS3)의 생리학적 특성 분석 및 균주 동정을 수행하였다. 이러한 동정 결과, 바실러스 서브틸리스와 99.9%의 상동성을 가지는 것을 확인하였으며, 결과는 표 1 및 도 6에 나타내었다.

표 1

검체	동정결과	%ID	T Index	Test against		
제조예 1	Bacillus subtilis/amyloliquefaciens	99.9	0.72	RIB 91%	AMD 78%	GLYG 79%

[0070] 4) 항생제 감수성 프로파일

[0071] 상기에서 순수분리된 균주를 NA 배지에 스프레딩 접종하여 배양하였다. 총 17종의 항생제를 포함하는 paper disk를 상기 배양된 배지위에 올려놓은 후 37℃에서 24시간 동안 추가 배양하였다. 각 항생제의 페이퍼 디스크로부터 발생한 투명한 크기 기준에 따라 항생제에 대한 감수성 여부를 판단하여 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

구분	항생제	Disk Potency (μg)	감수성
1	Amoxicillin	30	S
2	Ampicillin	10	S
3	Apramicin	15	I
4	Cefotamime	30	I
5	Chloramphenicol	30	S
6	Ciprofloxacin	5	S
7	Colistin	10	R
8	Doxycycline	30	S
9	Enrofloxacin	5	S
10	Erythromycin	15	S
11	Gentamicin	10	R
12	Neomycin	30	R
13	Norfloxacin	10	S
14	Oxytetracycline	30	S
15	Streptomycin	10	S
16	Tetracycline	30	S
17	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	1.25/23.7	S
R: resistant I: intermediate S: susceptible			

[0074] 제조예 2. 균주의 준비(2)

- [0075] <균주의 준비>
- [0076] 청국장 3 g을 멸균 식염수에 현탁시켜 회석한 후, NA 한천배지에 도말하고, 30℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 형성된 콜로니(colony)를 계대 배양하여 바실러스 리케니포미스 KBNP-DJ1 (Bacillus Licheniformis KBNP-DJ1; KCTC 18447P)을 순수분리하였다.
- [0078] **제조예 3. 균주의 준비(3)**
- [0079] <균주의 준비>
- [0080] 누룩 3 g을 멸균 식염수에 현탁시켜 회석한 후, NA 한천배지에 도말하고, 30℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 형성된 콜로니(colony)를 계대 배양하여 피키아 쿠드리압즈비 KBNP-BF5(Pichia kudriavzevii KBNP-BF5; KCTC 18445P)을 순수분리하였다.
- [0082] **실시예 1.**
- [0083] 제조예 1에서 순수분리된 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주를 TSB 배지에 접종하여 균주 배양하여 배양액을 제조하였다(200 ml). 상기 배양액의 균수 측정 결과 7.5×10^7 CFU/ml임을 확인하였다
- [0084] **실시예 2 내지 7**
- [0085] 제조예 1에서 순수분리된 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주를 TSB 배지에 접종하고, pH 7, 35℃ 조건에서 48 시간 동안 배양하여 배양액을 제조하였다(200 ml). 상기 배양액의 균수 측정 결과 1.0×10^8 CFU/ml임을 확인하였다. 상기 배양액 10% 및 녹차엽 분말, 인진쑥 분말, 울금 분말을 하기 표 3의 배합비에 따라 혼합 교반하여, 측사환경개선훈제를 제조하였다.
- [0086] **비교예 1(증류수)**
- [0087] TSB 배지에 균주를 접종하는 대신 동량의 증류수를 첨가하고, pH 7, 35℃ 조건에서 48시간 동안 배양하여 배양액을 제조하였다.

표 3

	접종 균주	배양액	증류수	녹차엽	인진쑥	울금
실시예 1	제조예 1	10	90	0	0	0
실시예 2	제조예 1	10	85	5	0	0
실시예 3	제조예 1	10	80	10	0	0
실시예 4	제조예 1	10	85	0	5	0
실시예 5	제조예 1	10	80	0	10	0
실시예 6	제조예 1	10	85	0	0	5
실시예 7	제조예 1	10	80	0	0	10
비교예 1	없음	0	100	0	0	0

- [0089] **실시예 8 내지 10**
- [0090] 제조예 1에서 순수분리된 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주를 30℃~42℃(30℃, 37℃, 42℃) 범위에서 실시예 1과 동일한 조건으로 배양하고, 각 온도별 시간에 따른 OD₆₀₀ 및 생균수를 조사하여 최적 생장온도를 확인하였다. 실시예 8 및 10의 OD₆₀₀ 및 생균수 조사 결과는 하기 표 4에 나타내었다. 표 4의 결과를 통해 최적 생장 온도는 37℃임을 확인하였다. (생균수 단위: (Log CFU/ml))

표 4

	실시예 8(30℃)		실시예 9(37℃)		실시예 10(42℃)	
경과시간	OD ₆₀₀	생균수	OD ₆₀₀	생균수	OD ₆₀₀	생균수
0	0.017	0.000	0.007	0.000	0.010	0.000

3	0.027	4.146	0.027	4.146	0.013	3.114
6	0.040	4.230	0.033	4.415	0.013	4.000
9	0.043	4.255	0.043	4.663	0.017	4.114
12	0.047	5.146	0.047	5.892	0.027	5.362
15	0.047	7.204	0.130	7.079	0.053	7.146
18	0.057	7.204	0.220	7.176	0.113	7.204
24	0.170	7.279	0.513	7.580	0.297	7.230
27	0.223	7.255	0.543	7.633	0.290	7.146
30	0.280	7.176	0.530	7.556	0.263	6.863
33	0.290	6.982	0.517	7.556	0.263	6.863
36	0.283	7.204	0.503	7.556	0.263	6.863

[0093] 실시예 11 내지 13

[0094] 제조예 1에서 순수분리된 바실러스 서브틸리스 KBNP-BS3 균주를 pH5 ~ pH9(pH5, pH7, pH9) 범위에서 실시예 1과 동일한 조건으로 배양하고, 각 pH 별 시간에 따른 OD₆₀₀ 및 생균수를 조사하여 최적 성장 pH를 확인하였다. 실시예 11 및 13의 OD₆₀₀ 및 생균수 조사 결과는 하기 표 5에 나타내었다. 표 5의 결과를 통해 최적 성장 pH는 pH 7임을 확인하였다.

표 5

[0095]

경과시간	실시예 11(pH5)		실시예 12(pH7)		실시예 13(pH9)	
	OD ₆₀₀	생균수	OD ₆₀₀	생균수	OD ₆₀₀	생균수
0	0.010	0.000	0.010	0.000	0.010	0.000
3	0.015	4.146	0.035	4.146	0.010	3.000
6	0.055	6.000	0.130	7.591	0.020	6.301
9	0.185	7.000	0.255	8.041	0.020	6.505
15	0.285	7.146	0.500	7.594	0.160	6.845
18	0.450	7.079	0.535	7.778	0.260	7.000
24	0.525	7.000	0.505	7.699	0.375	7.699
27	0.500	7.114	0.485	7.602	0.385	7.699
30	0.480	7.204	0.455	7.663	0.360	7.863

[0097] 실시예 14 내지 18

[0098] 제조예 1에서 순수분리된 바실러스 서브틸리스 KBNP-BS3 균주를 각각 5종의 배지(Brain Heart Infusion(BHI), Luria Bertani(LB), MRS medium, Nutrient broth(NB), Tryptic Soy Broth(TSB))에 접종하여 실시예 1과 동일한 조건으로 배양하고, 시간에 따른 OD₆₀₀ 및 생균수를 조사하여 최적 성장 배지를 확인하였다. 실시예 14 및 18의 OD₆₀₀ 및 생균수 조사 결과는 하기 표 6 및 표 7에 나타내었다. 표 6 및 7의 결과를 통해 최적 성장 배지는 TSB 배지로 확인하였다.

표 6

[0099]

OD ₆₀₀	실시예 14	실시예 15	실시예 16	실시예 17	실시예 18
	BHI	MRS	LB	TSB	NB
0 시간	1.74	0.04	0.88	1.80	0.18
24 시간	1.32	1.74	0.93	0.86	0.32
48 시간	0.94	1.93	0.82	0.62	0.16
72 시간	0.55	1.53	0.32	0.37	0.14

표 7

생균수 (Log CFU/ml)	실시예 14	실시예 15	실시예 16	실시예 17	실시예 18
	BHI	MRS	LB	TSB	NB
0 시간	8.85	6.78	7.90	8.26	7.90
24 시간	8.48	8.70	8.30	9.60	7.48
48 시간	7.60	7.00	8.48	9.86	7.30
72 시간	6.60	5.60	7.30	7.00	6.00

실시예 19 내지 20

각각 제조예 2에서 순수분리된 균주를 이용하고(실시예 19), 제조예 3에서 순수분리된 균주를 이용(실시예 20) 한 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다.

<평가>

1) 비병원성 확인

실시예 1의 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주 배양액 Blood agar에 스트리킹(streaking)한 후, 37℃에서 48 시간 배양한 다음 균체 주위에 적혈구의 분해 현상인 β-용혈성 여부를 확인하였다. 확인결과 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주의 비병원성이 확인되었다.

2) 효소활성도의 확인

실시예 1의 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주 배양액에 대해, API ZYM kit를 이용하여, 효소활성을 분석하였다. 확인결과 바실러스 서브틸러스 KBNP-BS3 균주가 esterase(C4), esterase-lipase(C8), acid phosphatase, Naphthol-AS-BI -phosphohydrolase 및 α-glucosidase 등에 대한 활성을 가짐을 확인하였다. 이러한 효소활성 분석 결과는 도 8에 나타내었다.

3) 축사 환경개선 약취 저감 효과의 확인

약취제거능 시험의 객관성을 입증하고자 시험기관인 한국건설생활환경시험연구원에 실시예 1에서 제조된 배양액을 이용한 탈취효과 평가를 의뢰하였다.

(시험방법 EL608-2006/2/2012/36)

실시예 1의 배양액을 포함하는 액상시료 20 ml를 10 l 크기의 반응기 4개에 각각 넣고 밀봉하였다. 시험가스의 초기 농도를 암모니아 100 μmol/mol(ppm), 트리메틸아민 30 μmol/mol (ppm), 황화수소 50 μmol/mol(ppm), 메틸머캅탄 4 μmol/mol(ppm)으로 주입하고 시험가스의 농도를 120분에서 측정하고, 이를 시료의 농도로 정하였다. 시험가스의 농도는 가스검지관법(KS I 2218)으로 측정하였고, 시험 중 온도는 25.6℃ ± 0.6℃, 습도는 41.7% ± 0.7%를 유지하였다. 이와는 별도로 시료가 없는 상태에서 상기 과정과 동일한 시험을 진행하고 이를 blank 농도로 평가하였다. 상기에서 측정된 시험가스 농도를 하기 식 1로 계산하여 시험가스의 제거율(탈취율)을 산출하였다. 결과는 하기 표 8에 나타내었다.

[식 1]

시험가스의 제거율(%) = [(blank 농도)-(시료의 농도)/(blank 농도)] X 100

축사 약취 원인물질에 대한 탈취율은 암모니아 99.6%, 트리메틸아민 96.0%, 황화수소 99.3%, 메틸머캅탄 40.0%로 나타났고, 이는 축사 약취 개선제로서 이용 가능한 수준으로 판단됨.

표 8

	암모니아	트리메틸아민	황화수소	메틸머캅탄
실시예 1	99.6%	96.0%	99.3%	40.0%

[0118] 5) 항균력의 평가

[0119] 미생물자원센터(KCTC)와 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 6종의 유해세균(B. cereus KCTC1012, E. coli KCTC1467, E. faecalis KCTC2011, L. monocytogenes KCTC3567, P. aeruginosa KCTC1750, S. enteritidis KCCM12400)을 각각 NA 배지에 배양하였다. 상기 각 배지에 실시예 1의 배양액을 적신 페이퍼 디스크를 올려놓은 후, 37℃에서 24시간 동안 추가 배양하였다. 각 배지의 페이퍼 디스크로부터 발생한 투명한 크기 기준에 따라 항균 여부를 판단하여 결과를 하기 표 9에 나타내었다. 실험결과, 실시예 1은 B. cereus KCTC1012, P. aeruginosa KCTC1750, S. enteritidis KCCM12400 균주에 대한 항균력이 있음을 확인하였다.

표 9

[0120]

유해세균	항균력 (유 +, 무 -)
B. cereus KCTC1012	+
E. coli KCTC1467	-
E. faecalis KCTC2011	-
L. monocytogenes KCTC3567	-
P. aeruginosa KCTC1750	+
S. enteritidis KCCM12400)	+

[0121] 6) 축사 환경개선 효과의 평가

[0122] 상기 실시예 1 내지 7 및 비교예 1 내지 2에서 제조된 축사환경개선제를 준비하였다. SPF 닭을 구입한 후 동물사에서 사육하여 닭의 분변 500 g을 2 L 밀폐 회전병에 담아 준비하였다. 상기 축사환경개선제를 닭 분변에 분무하여 처리한 후, 악취 초기농도와 24시간 농도를 비교하여 최종 악취저감 효과를 시험하였다. 결과는 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

[0123]

단위(%)	암모니아	트리에틸아민	황화수소	메틸머캅탄
실시예 1	99.6	96	99.3	40
실시예 2	60	90	-400	-13
실시예 3	71	95	-846	47
실시예 4	80	90	10	41
실시예 5	90	97	88	100
실시예 6	0	98	-691	-163
실시예 7	88	92	-1366	-3
실시예 19	99.6	96	80	30
실시예 20	99.6	96	26.7	16.7
비교예 1	-23	-200	-471	0

수탁번호

[0125]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원 미생물자원센터

수탁번호 : KCTC18446P

수탁일자 : 20160217

기탁기관명 : 한국생명공학연구원 미생물자원센터

수탁번호 : KCTC18447P

수탁일자 : 20160217

기탁기관명 : 한국생명공학연구원 미생물자원센터

수탁번호 : KCTC18445P

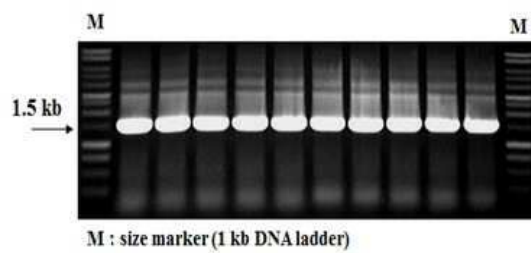
수탁일자 : 20160217

도면

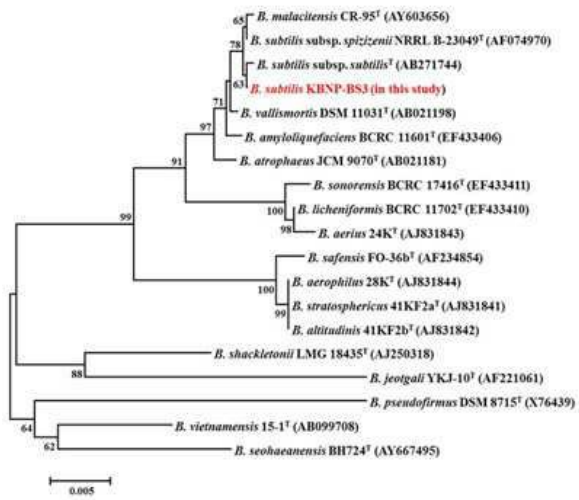
도면1



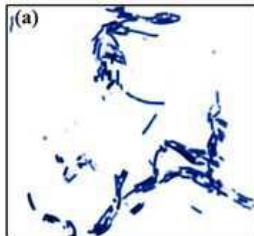
도면2



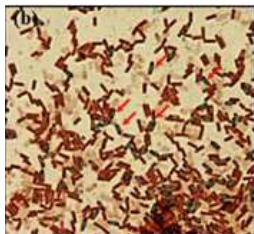
도면3



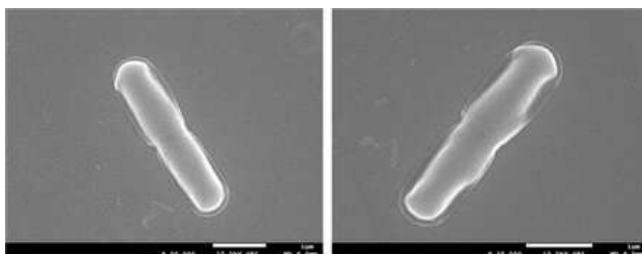
도면4



도면5



도면6



도면7



도면8

