



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0049233
(43) 공개일자 2010년05월12일

(51) Int. Cl.

C05F 17/00 (2006.01) C05F 9/00 (2006.01)
C05F 9/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0108321

(22) 출원일자 2008년11월03일

심사청구일자 2008년11월03일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자

김중균

부산광역시 해운대구 재송동 1200 더샵센텀파크
아파트 110동 1101호

다오 반 티녹

부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 기숙
사

(74) 대리인

이처영

전체 청구항 수 : 총 8 항

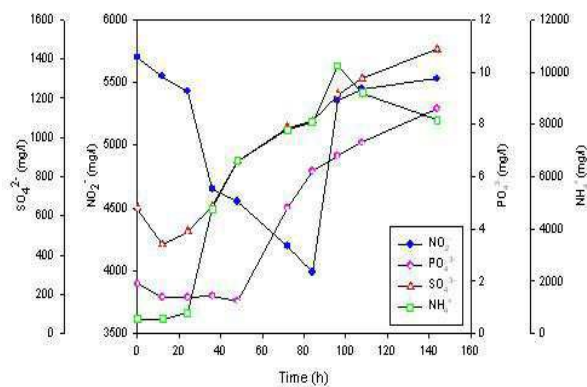
(54) 생선폐기물을 이용하여 액체비료를 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 생선폐기물을 이용하여 액체비료를 제조하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 유분을 제거한 생선폐기물을 부식토나 퇴비로부터 분리된 7종의 호기성 분해미생물균과 지렁이 내장으로부터 분리된 5종의 호기성 분해미생물균으로 구성된 생선폐기물 혼합미생물균으로 분해시키는 것을 특징으로 하는 생선폐기물을 이용한 액체비료의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 처리에 어려움이 있는 생선폐기물을 대량으로 처리가 가능하고, 액체비료로 효과적으로 재활용할 수 있어 환경보호효과가 있으며, 양질의 액체 비료를 경제적으로 농가에 보급할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

다음 공정을 포함하는 생선폐기물로부터 액체비료를 제조하는 방법:

- (a) 생선폐기물의 유분을 제거하는 공정;
- (b) 퇴비와 침출수로부터 분리한 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 써큐란(*Bacillus circulans*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 푸시포미스(*Bacillus fusiformis*) 및 바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*)로 구성된 제1 혼합미생물군과, 지렁이 내장으로부터 분리한 브레비바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*) 및 브레비바실러스 파라브레비스(*Brevibacillus parabrevis*)로 구성된 제2 혼합미생물군을 전배양하는 공정; 및
- (c) 상기 전배양된 제1 혼합미생물군과 제2 혼합미생물군을 상기 유분이 제거된 생선폐기물에 접종하고, 배양하여 유기물을 무기질로 분해하는 공정.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 제1 혼합미생물군은 한국농업미생물 자원센터에 기탁된 기탁번호 KACC 91274P인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제2 혼합미생물군은 한국농업미생물 자원센터에 기탁된 기탁번호 KACC 91409P인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, (b) 공정 및 (c) 공정의 배양은 30~60℃에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (a) 공정 이전에 생선폐기물을 120~140℃에서 10~30분 동안 멸균시키는 공정을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

퇴비와 침출수로부터 분리한 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 써큐란(*Bacillus circulans*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 푸시포미스(*Bacillus fusiformis*) 및 바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*)로 구성된 제1 혼합미생물군과, 지렁이 내장으로부터 분리한 브레비바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*) 및 브레비바실러스 파라브레비스(*Brevibacillus parabrevis*)로 구성된 제2 혼합미생물군을 포함하는, 생선폐기물 분해능을 가지는 혼합미생물군.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제1 혼합미생물군은 한국농업미생물 자원센터에 기탁된 기탁번호 KACC 91274P인 것을 특징으로 하는 혼합미생물군.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 제2 혼합미생물군은 한국농업미생물 자원센터에 기탁된 기탁번호 KACC 91409P인 것을 특징으로 하는 혼합미생물군.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생선폐기물을 이용하여 액체비료를 제조하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 뼈, 내장 등이 함유된 생선 폐기물을 효과적으로 분해하는 혼합미생물군을 이용한 액체비료의 제조방법 및 생선폐기물을 효과적으로 분해하여 액체비료를 제조할 수 있는 생선폐기물 분해능을 가지는 혼합미생물군에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식량안보를 필두로 부족한 식량을 자급자족해야 하는 우리나라의 사정상, 농업정책에 따른 증산 위주, 다수확 재배기술을 보급하는데 총력을 기울이다 보니 화학비료와 농약의 사용이 늘어날 수밖에 없었다. 그러나, 최근 각종 환경오염에 대한 문제가 이슈화되기 시작하면서 농산물의 오염, 먹거리에 대한 안전성 문제가 자주 거론되고 수입농산물에 대응하여 우수한 농산물, 안전한 농산물 생산의 필요성이 강력하게 대두되고 있다. 화학비료 및 농약 남용에 따른 부작용, 집중축산에 의한 환경오염, 그리고 강우에 의한 토양침식 등에 의한 친환경농업의 필요성이 인식되어 친환경농업에 관한 규정 확립 후 농가 보급에 심혈을 기울이고 있다.

[0003] 농작물은 성장해가면서 점점 더 많은 영양분을 필요로 한다. 농작물의 성장에는 밀거름이 주로 이용되지만, 최근 시판되는 종자와 종묘들은 정밀한 웃거름(추비) 관리를 해줘야 하는 경우가 많다. 고품질 농사에서 생육 중·후기에 주는 웃거름은 매우 중요한 관리 기술로 자리 잡았다. 각종 농업용 살포자재, 관수자재도 밀거름 위주의 관리방식에서 웃거름 쪽으로 변화 발달하고 있는 추세이다. 이러한 시비방법의 변화는 유기농업에도 그대로 적용된다. 유기농업에서 밀거름은 퇴비로 해결되지만 웃거름은 쉽지 않다. 국내에서 판매되는 많은 웃거름용 비료가 대부분 화학비료이므로 이를 사용할 수 없는 유기생산 인증 농가는 생육관리가 안될 때 발효 액비를 사용한다. 완전 분해비료인 화학비료와는 달리 대부분의 유기질비료는 고분자 화합물로 토양 분해 및 작물 흡수가 쉽지 않다. 따라서, 이를 발효시켜 액비로 만들면 흡수가 잘 될 뿐 아니라, 그 안에 미생물들이 번식해 토양을 개량하고 각종 효소를 만들어 농산물에 기능성을 더해준다.

[0004] 현재 우리나라에서 가장 널리 사용하고 있는 발효 액체비료는 돼지분뇨 액체비료이다. 그러나, 유기생산 인증을 받은 농가는 일반사료를 먹이는 공장식 축산농가에서 나오는 축분 액체비료 사용이 금지되기 때문에 문제가 되고 있다. 이밖에 웃거름용으로 농가가 직접 제조해 흔하게 사용하는 액체비료로 대표적인 것이 생육을 촉진시키는 질소성분을 포함하고 있는 깻묵액비이다. 또한, 생선혈분, 골분, 육류, 우유 등을 이용한 동물성 액체비료도 보편화되어 있고, 작물 재배 중에 정리한 싹과 숙아 내거나 비바람에 떨어진 과일, 산야초 등의 작물의 잔재물을 이용한 액체비료 제조도 널리 보급되어 있다.

[0005] 우리나라에서 발생하는 수산폐기물의 양은 회를 즐기는 인구의 꾸준한 증가로 인하여 매년 증가할 것으로 예상된다. 어분생산을 통해 수산폐기물이 감소되고 재활용되고 있다. 우리나라 어분제조 공정에서는 주로 생선 머리, 뼈 등의 폐기물을 이용하여 수산폐기물의 자숙, 압착, 분쇄 후 스팀 농축, 건조, 냉각 공정 등의 물리적 방법에 의해 제조되고 있다. 이때 스팀농축 공정을 거치면 어유와 높은 함량의 유기물질을 함유하는 액체증기가 발생하는데, 어유를 분리하고 나면 나머지 어분페액 액체는 폐수처리 된다. 어분페액의 직접적 배출은 환경오염의 심각한 문제로 일반적으로 해양투기 되고 있으며, 악취는 민원제기가 끊임없이 제기되고, 매년 환경기준의 강화로 인하여 어분제조 공장은 폐쇄해야 할 처지에 있다. 우리나라는 OECD 가입 회원국으로서 폐기물 해양투기

를 규제하는 런던협약이 채택한 '96 의정서'를 의무적으로 따라야 할 입장이어서, 이것이 발효될 경우 바다에 버릴 수 있는 폐기물 종류가 대폭 축소되면서 폐기물로 인한 대란이 벌어질 가능성을 배제할 수 없다. 따라서, 횃집에서 많이 배출되는 생선폐기물을 효과적으로 처리할 수 있는 기술개발이 필요하다.

[0006] 따라서, 본 발명자는 대한민국 등록특허 제855338호에서 어분폐액을 이용하여 액체 비료를 제조하는 방법을 개시한 바 있으나, 혼합미생물을 이용하여 어분공정 중 발생하는 액상의 폐액만을 반응시켜 액체비료를 제조하는 방법으로, 액상 시료에 비해 기질의 확산에 문제가 있어 미생물의 증식속도가 느린 생선 뼈, 내장 등이 함유된 고상의 생선 폐기물을 직접적이면서 효과적으로 처리할 수 있는 방법들은 전무한 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술의 문제점을 개선하고자 예의 노력한 결과, 다량의 기름과 뼈, 내장 등을 함유하고 있는 생선폐기물을 온수로 세척하여 유분을 제거한 다음, 상기 유분이 제거된 생선폐기물을 12종의 생선 폐기물 분해용 혼합미생물군을 이용하여 호기적으로 직접 분해시킨 경우, 분해반응을 촉진하여 다량의 폐기물 처리가 가능할 뿐만 아니라, 분해된 분해산물이 액체비료로서 탁월한 효과를 가지는 다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 뼈, 내장 등이 함유된 생선폐기물을 효과적으로 분해하는 혼합미생물군을 이용한 액체비료의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 생선폐기물을 효과적으로 분해하여 액체비료를 제조할 수 있는 생선폐기물 분해능을 가지는 혼합미생물군을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 생선폐기물의 유분을 제거하는 공정; (b) 퇴비와 침출수로부터 분리한 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 써큐란(*Bacillus circulans*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 푸시포미스(*Bacillus fusiformis*) 및 바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*)로 구성된 제1 혼합미생물군과, 지렁이 내장으로부터 분리한 브레비바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*) 및 브레비바실러스 파라브레비스(*Brevibacillus parabrevis*)로 구성된 제2 혼합미생물군을 전배양하는 공정; 및 (c) 상기 전배양된 제1 혼합미생물과 제2 혼합미생물군을 상기 유분이 제거된 생선폐기물에 접종하고, 배양하여 유기물을 무기질로 분해하는 공정을 포함하는 생선폐기물로부터 액체비료를 제조하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 퇴비와 침출수로부터 분리한 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 써큐란(*Bacillus circulans*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 푸시포미스(*Bacillus fusiformis*) 및 바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*)로 구성된 제1 혼합미생물군과, 지렁이 내장으로부터 분리한 브레비바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*) 및 브레비바실러스 파라브레비스(*Brevibacillus parabrevis*)로 구성된 제2 혼합미생물군을 포함하는, 생선폐기물 분해능을 가지는 혼합미생물군을 제공한다.

효 과

[0012] 본 발명에 따르면, 처리에 어려움이 있는 생선폐기물을 대량으로 처리가 가능하고, 액체비료로 효과적으로 재활용할 수 있어 환경보호효과가 있으며, 양질의 액체 비료를 경제적으로 농가에 보급할 수 있는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 일 관점에서, (a) 생선폐기물의 유분을 제거하는 공정; (b) 퇴비와 침출수로부터 분리한 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 써큐란(*Bacillus circulans*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 푸시포미스(*Bacillus fusiformis*) 및 바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*)로 구성된 제1 혼합미생물군과, 지렁이 내장으로부터 분리한 브레비바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*) 및 브레비바실러스 파라브레비스(*Brevibacillus parabrevis*)로 구성된 제2 혼합미생물군을 전배양하는 공정; 및 (c) 상기 전배양된 제1 혼합미생물과 제2 혼합미생물군을 상기 유분이 제거된 생선폐기물에 접종하고, 배양하여 유기물을 무기질로 분해하는 공정을 포함하는 생선폐기물로부터 액체비료를 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0014] 본 발명에서는 생선폐기물로부터 불필요한 유분을 제거한 다음, 시판되는 양질의 부식토 및 식물 주변에서 수집된 퇴비와 침출수로부터 분리한 호기성 제1 혼합미생물군과 퇴비 제조공장 주변 흙 속에서 채집한 지렁이 내장으로부터 순수 분리한 호기성 제2 혼합미생물군을 각각 전배양시켜 이들 유분이 제거된 상기 생선폐기물에 접종하고, 배양하여 상기 혼합미생물군에 의해 효율적으로 생선폐기물의 유기물이 무기질로 분해한다는 것을 확인하였다. 또한, 상기 방법으로 제조된 액체비료가 식물의 발아 및 뿌리생장을 효율적으로 촉진시킨다는 것을 확인하였다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 제1 혼합미생물군은 2006년 10월 19일자로, 농업생물공학연구원의 한국농업미생물 자원센터에 기탁번호 KACC 91274P로 기탁하였고, 제2 혼합미생물군은 2008년 10월 15일자로, 농업생물공학연구원의 한국농업미생물 자원센터에 기탁번호 KACC 91409P로 기탁하였다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 제1 및 제 2 혼합미생물군의 전배양시에는 각 미생물의 배양조건에 따른 성장속도 및 혼합배양시 발생할 수 있는 균 상호간의 성장영향 등을 고려하여 각각 따로 배양하고, 최적의 배양온도인 30~60℃에서 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 생선폐기물의 유분을 제거하기 단계에서는 생선폐기물에 함유된 유해 균을 제거하기 위해 생선폐기물의 멸균과정을 추가로 포함할 수 있고, 상기 멸균과정은 120~140℃에서 10~30분 동안 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다. 이는 120℃미만의 온도범위와 10분미만 동안 생선폐기물을 멸균시킬 경우, 생선폐기물의 멸균이 제대로 수행되지 않을 수 있고, 140℃를 초과한 온도범위와 30분을 초과하여 멸균시킬 경우에는 생선폐기물의 성분들이 변질될 우려가 발생할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 생선폐기물의 유분은 소수성 성질을 가지고 있어 분해반응 동안 반응액 속에 있는 혼합미생물군의 생선폐기물 섭취를 방해함으로써, 분해속도를 감소시킨다. 따라서, 효율적인 분해반응을 위하여 효율적인 분해반응을 위하여 생선폐기물로부터 온수로 세척하는 방법 등과 같은 방법으로 유분을 제거할 수 있다.
- [0019] 본 발명은 다른 관점에서, 퇴비와 침출수로부터 분리한 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 써큐란(*Bacillus circulans*), 바실러스 안트라시스(*Bacillus anthracis*), 바실러스 푸시포미스(*Bacillus fusiformis*) 및 바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*)로 구성된 제1 혼합미생물군과, 지렁이 내장으로부터 분리한 브레비바실러스 아그리(*Brevibacillus agri*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*) 및 브레비바실러스 파라브레비스(*Brevibacillus parabrevis*)로 구성된 제2 혼합미생물군을 포함하는, 생선폐기물 분해능을 가지는 혼합미생물군에 관한 것이다.
- [0020] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0021] **실시예 1: 액체비료용 미생물의 분리**
- [0022] 1-1: 제1 혼합미생물군의 분리
- [0023] 시판되는 양질의 부식토 및 부산외곽의 시비된 식물주변에서 수집된 퇴비와 침출수에서 호기성 제1 혼합미생물군을 분리하였다. 상기 부식토와 퇴비 각각 5 g과 침출수 0.5 ml을 각각 5 ml의 멸균된 0.2% NaCl용액에 첨가하고, 교반하였다. 각 혼합용액 1 ml을 0.8% 영양배지(Nutrient broth, pH 6.8), 효모-말토스 배지(yeast

extract 3 g/L, maltextract 3 g/L, 펩톤 5 g/L, 글루코오스 10 g/L 및 암피실린 0.05 g/L, pH 6.2) 및 베넷 배지(Bennet's medium, yeast extract 1 g/L, beef extract 1 g/L, 글루코오스 10g/L, pH 7.2)가 담긴 튜브에 첨가하였다. 상기 샘플이 첨가된 배양배지들을 각각 45℃와 55℃에서 180 rpm에서 진탕배양한 후, 각각 동일한 배지에 1.5% 아가를 첨가한 고체배지에 도말하였다. 배양된 미생물들은 순수한 콜로니로 분리될 때까지 계속하여 새로운 고체배지에 도말하여 순수한 균주를 분리하였다. 분리된 순수 균주는 4℃에 보관하면서 2주에 한번씩 계대배양하였다.

[0024] 상기 분리된 순수 균주에서 유용한 미생물을 스크리닝하기 위하여, 다음의 네 가지 아가 배지에 상기 순수 균주를 도말하였다.

[0025] ① 단백질 분해 미생물의 선별을 위한 1% 스킵밀크 아가배지

[0026] ② 지방분해 미생물의 선별을 위한 3.215% 스피릿 블루 아가배지(beef extract 5 g/L, soluble starch 20 g/L, 트립토오스 10 g/L, NaCl 5g/L, 아가 15g/L, pH 7.4)

[0027] ③ 탄수화물 분해 미생물의 선별을 위한 셀룰로오스 아가배지(셀룰로오스 분말 10 g/L, yeast extract 1 g/L, NaCl 0.1 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2.5 g/L, K₂HPO₄ 0.25 g/L, MgSO₄7H₂O 0.125 g/L, FeSO₄7H₂O 0.0025 g/L, MnSO₄4H₂O 0.025 g/L, 아가 15 g/L, pH 7.2)

[0028] ④ 생선폐기물이 함유하는 염의 농도(<1%) 내에서 각 미생물들이 가진 능력 테스트를 위한 상기 ①, ② 및 ③ 아가배지들에 각각 1% 농도의 NaCl을 추가로 함유하는 아가배지

[0029] 그 결과, 상기 네 가지 배지 중 적어도 하나의 배지에서 양성환을 형성하는 46종의 순수균주를 확인하였다.

[0030] 1-2: 제2 혼합미생물군의 분리

[0031] 부산외곽의 퇴비 제조공장 주변 흙 속에서 채집한 지렁이 내장으로부터 호기성 제2 혼합미생물군을 분리하였다. 상기 지렁이 내장 5g을 5ml의 멸균된 0.2% NaCl 용액에 첨가하고, 교반한 다음, 실시예 1-1의 제1 혼합미생물군의 분리방법과 같이 분리하고, 계대배양하여 상기 네 가지 배지 중 적어도 하나의 배지에서 양성환을 형성하는 9종의 순수균주를 확인하였다.

[0032] 실시예 2: 생선폐기물 분해 미생물의 선별

[0033] 2-1: 제1 혼합미생물군의 미생물 선별

[0034] 직각도말 방법(Alippi, A. and Reynaldi, F., *J. Invertev. Pathol.*, 91: 141, 2006)을 사용하여 실시예 1-1에서 분리한 46종의 순수균주 중에서 서로에 대한 길항미생물을 스크리닝하였다. 먼저, 46종의 균주 중 무작위로 선택된 몇 종의 균주를 고체 영양 아가배지에 도말하였다. 도말된 각 균주의 고체배양접시의 표면을 4종의 구획으로 나누고, 각 구획에 4개의 다른 균주를 원래 도말된 균주의 도말선과 직각으로 도말하였다. 각각의 배지는 45℃와 55℃에서 3일 동안 배양하였으며, 각 배지에서의 균주의 성장이 저해되는지를 확인하였다.

[0035] 그 결과, 분리된 46종의 균주에 대하여 길항물질을 생산하지 않는 7종의 균주를 확인하고, 상기 7종의 균주를 JB1 ~ JB7로 명명하였다.

[0036] 2-2: 제2 혼합미생물군의 미생물 선별

[0037] 실시예 2-1에서와 같은 방법으로 실시예 1-2에서 분리한 9종의 순수균주 중에서 무작위로 선택된 몇 종의 균주를 도말하였다.

[0038] 그 결과, 분리된 9종의 균주에 대하여 길항물질을 생산하지 않는 5종의 균주를 확인하고, 상기 5종의 균주를 EW1 ~ EW5로 명명하였다.

[0039] 실시예 3: 생선폐기물 분해 미생물의 동정

[0040] 3-1: 제1 혼합미생물군의 동정

[0041] 실시예 2-1에서 확인한 균주를 그람염색(Gram staining), 콜로니 형태 및 현미경 검사를 통하여 일차적으로 동정하였다. 상기 7종의 균주는 모두 영양 상태에서 높은 운동성을 가지고, 0.5 ~ 0.7 μm 의 넓이와 3 ~ 5 μm 의 길이를 가지는 그람 양성체의 간균이었다. 그 중 JB3 균주는 액체 배양 시에 길이가 2배로 신장되었다. 7종의 균주에서 세균은 대부분 쌍으로 관찰되었으며, 이분법에 의하여 증식한다는 것을 알 수 있었다. JB1 및 JB6 균주는 장시간 배양했을 때, 지름 약 10 mm의 커다란 콜로니를 형성하였으며, 나머지 종들은 작은 콜로니를 형성하였다. 아가-스텝 배양 결과, 7종의 균주는 모두 통성 호기성을 나타내었다.

[0042] 2차 동정은 16S-rDNA 서열을 분석하여 수행하였다. 각 균주의 염색체 DNA는 AccuPrep 염색체 DNA 추출 키트(바이오니아, 한국)를 사용하여 분리하였으며, 분리된 DNA를 주형으로 하여 하기의 프라이머를 이용하여 PCR을 사용하여 수행하였으며, 그 결과, 각각의 균주에서 약 1500 bp 크기 단편의 16S-rRNA 유전자가 증폭되었다 (도 1).

[0043] 27F 프라이머: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (서열번호 1)

[0044] 1492R 프라이머: (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3' (서열번호 2)

[0045] 증폭된 PCR 단편은 전기영동하여 아가로오즈 겔 상에서 AccuPrep SV 겔 및 PCR Clean-up시스템(Promega, USA)을 이용하여 분리하고, pGEM T-easy 벡터(Invitrogen, USA)에 삽입하여, *E.coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. 상기 형질전환체를 배양하여, AccuPrep 플라스미드 추출키트(바이오니아, 한국)를 사용하여, 플라스미드를 분리하고, M13 프라이머(서열번호 3 및 서열번호 4)를 이용하여 3' 말단과 5' 말단의 서열을 결정하였다.

[0046] M13 프라이머: 5' gtaaacgacggccagt 3' (서열번호 3)

[0047] M13 프라이머: 5' atttcacacaggaacagctatgac 3' (서열번호 4)

[0048] 서열이 결정된 상기 7종 균주의 16S rDNA 서열을 서열번호 5 ~ 서열번호 11에 나타내었다. 상기 결정된 부분 서열을 GenBank의 Advanced BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 상동성 검색을 수행하였다(Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389, 1997). BioEdit Sequence Alignment Editor(ver.5.0.9, Hall, T., *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95, 1999)를 이용하여 알리그먼트를 확인하였고, PHYLIP(ver. 3.5c)의 DNAdist 프로그램을 이용하여 거리 측정 전에 갭(gap)을 가지는 모든 위치를 제거하였다.

[0049] 그 결과, JB1은 바실러스 서브틸리스로 동정되었고, JB2는 바실러스 리케니포미스로 동정되었으며, JB3은 바실러스 아그리로 동정되었고, JB4는 바실러스 코아쿨란스로 동정되었으며, JB5는 바실러스 씨큐란스로 동정되었고, JB6은 바실러스 안트라시스로 동정되었으며, JB7은 바실러스 푸시포미스로 동정되었다(표 1).

[0050] [표 1]

미생물	Genbank Accession No.	균주명	상동성	서열번호
JB1	DQ219358	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	5
JB2	AY468373	<i>Bacillus licheniformis</i>	98%	6
JB3	AY319301	<i>Brevibacillus agri</i>	99%	7
JB4	AF466695	<i>Bacillus coagulans</i>	98%	8
JB5	Y13064	<i>Bacillus circulans</i>	99%	9
JB6	AY138279	<i>Bacillus anthracis</i>	99%	10
JB7	AY548950	<i>Bacillus fusiformis</i>	99%	11

[0052] 상기 7종 균주를 혼합한 혼합균주는 2006년 10월 19일자로 농업생물공학연구원의 한국농업미생물 자원센터에 기탁번호 KACC 91274P로 기탁하였다.

[0053] 3-2: 제2 혼합미생물군의 동정

[0054] 실시예 2-2에서 확인한 균주를 그람염색(Gram staining), 콜로니 형태 및 현미경 검사를 통하여 일차적으로 동정하였다. 상기 5종의 균주는 모두 영양 상태에서 높은 운동성을 가지고, 0.8 ~ 1.5 μm 의 넓이와 3 ~ 5 μm 의 길이를 가지는 그람 양성의 간균이었다. 5종의 균주에서 세균은 대부분 쌍으로 관찰되었으며, 이분법에 의하여 증식한다는 것을 알 수 있었다. EW4 균주는 장시간 배양했을 때, 지름 약 10 mm 이상의 커다란 콜로니를 형성하면서 퍼지는 특징이 있으며, EW3 균주가 조금 큰 콜로니를 형성하였고, 나머지 종들은 작은 콜로니를 형성하였다. 영양아가배지 위에서 모든 종들은 상아빛 색깔을 띠었다. 아가-스텝 배양 결과, 5종의 균주는 모두 통성 호기성을 나타내었다.

[0055] 2차 동정은 실시예 3-1에서와 같은 방법으로 실시하고(도 2), 서열이 결정된 상기 5종 균주의 16S rDNA 서열을 서열번호 12 ~ 서열번호 16에 나타내었으며, 상기 결정된 부분 서열을 GenBank의 Advanced BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 상동성 검색을 수행하였다.

[0056] 그 결과, EW1은 브레비바실러스 아그리 동정되었고, EW2는 바실러스 서브틸리tm로 동정되었으며, EW3은 바실러스 세레우스로 동정되었고, EW4는 바실러스 리케니포미스로 동정되었으며, EW5는 브레비바실러스 파라브레비스로 동정되었다(표 2).

[0057] [표 2]

미생물	Genbank Accession No.	균주명	상동성	서열번호
EW1	AJ586388	<i>Brevibacillus agri</i>	99%	12
EW2	FJ269243	<i>Bacillus subtilis</i>	98%	13
EW3	DQ923487	<i>Bacillus cereus</i>	99%	14
EW4	EF113324	<i>Bacillus licheniformis</i>	99%	15
EW5	AB215101	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	99%	16

[0059] 상기 5종 균주를 혼합한 혼합균주는 2008년 10월 15일자로 농업생물공학연구원의 한국농업미생물 자원센터에 기탁번호 KACC 91409P로 기탁하였다.

[0060] 실시예 4: 혼합미생물군을 이용한 생선폐기물의 생분해 활성측정

[0061] 4-1: 튜브단위에서의 생선폐기물 분해반응

[0062] 실시예 2에서 선별된 제1 혼합미생물군과 제2 혼합미생물군을 혼합하여 구성한 12종의 혼합미생물군 이용하여 생선폐기물을 호기적으로 생분해하여 액체비료의 재활용 가능성을 확인하였다.

[0063] 실시예 2에서 선별된 제1 혼합미생물군 7종과 제2 혼합미생물군 5종은 동량으로 혼합한 것으로, 12종 균주를 각각 배양하여 대수 증식기가 끝났을 때 원심분리로 세균을 수확한 후, 동량씩 혼합하여 혼합미생물군으로 사용하였고, 12종의 혼합미생물군의 생선폐기물의 생분해 활성측정을 비교하기 위해 비교예로 실시예 2에서 선별된 제1 혼합미생물군 7종만을 동일한 방법으로 생선폐기물의 생분해 활성을 측정하였다.

[0064] 한편, 본 실시예에서 사용한 생선폐기물은 부산 횃집에서 폐기된 것으로, 생선 내장, 뼈를 함유한 생선폐기물을 수거하였다. 수거된 생선폐기물은 작게 자르지 않고, 121℃에서 15분간 멸균하여 분해반응에 사용하였다. 멸균된 상기 생선폐기물은 생선폐기물에 함유된 유분을 제거하기 위해 80℃ 온수로 기름기가 없어질 때까지 세척하여 생선폐기물로부터 생선유분을 제거하였다. 이렇게 유분이 제거된 생선폐기물을 50 ml 주형상 튜브에 20 ml의 생선폐기물을 넣고, 여기에 12종의 순수 분리된 균들이 혼합된 혼합미생물군과 7종의 순수분리된 제1 혼합미생물군을 각각 30%(v/v) 접종 한 다음, 45℃에서 180 rpm 조건으로 5일 동안 각각 배양하였다.

[0065] 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이, 12종 혼합미생물군을 사용한 경우와 7종의 제1 혼합미생물군을 사용한 경우 모두에서 배양 2일 후부터 구수한 냄새가 나기 시작하였으며, 배양 3일 후부터는 생선폐기물 덩어리들이 뚜렷하게 분해되는 것을 눈으로 확인할 수 있었으나, 7종의 제1 혼합미생물군을 사용한 경우보다, 12종의 혼합미생물군을 사용한 경우에서 생선폐기물의 건조중량이 더 많이 줄어들음을 확인할 수 있었다.

[0066] [표 3]

[0067]

Time(day)	12종 혼합미생물군 사용 건조중량(g)	7종 제1 혼합미생물군 사용 건조중량(g)
0	2.20	2.20
1	2.13	2.15
2	1.95	2.08
3	1.85	1.89
4	1.61	1.75
5	1.49	1.58

[0068]

4-2: 반응기 단위에서의 생선폐기물 분해반응

[0069]

실시에 4-1에서 유분이 제거된 생선폐기물 2 kg을 5 ℓ의 리본타입(ribbon type) 반응기에 투입하고, 여기에 12종의 혼합미생물군 5,000 mg/L을 접종하였다. 상기 분해반응은 45℃에서 70 rpm으로 7일 동안 수행하였고, 샘플링은 매 12시간마다 채취하였다. 또한, 생선폐기물은 수분함량을 맞추기 위해 증발에 의해 감소된 양 만큼의 물을 샘플링할 때마다 보충하였다.

[0070]

생선폐기물 분해반응 중 생성되는 양이온(NH_4^+ , Na^+)과 음이온(NO_2^- , NO_3^-)의 분석은 이온크로마토그래피(Metrohm 792 Basic IC, Switzerland)로 분석하였고, 상기 이온크로마토그래피의 양이온 컬럼은 Metrosep C2-150(150×4.0 mm), 음이온 컬럼은 Metrosep Supp 5-150(150×4.0 mm)을 사용하였다. 화학적 산소요구량(COD_Cr) 및 총 질소량(TN) 농도는 다기능 수질분석기(Water-quality analyzer, Humas, 한국)를 사용하였다. 총케달질소량(TKN)은 KjeltectTM 2100(Foss, 스웨덴)을 사용하였고, 균체수는 nutrient broth agar 배지위에 형성된 콜로니 수를 측정하여 CFU/ml 단위로 얻었으며, 슬러지 건조량(dry-sludge weight, DSW)은 슬러지 샘플을 105℃ 오븐에 12시간 건조시킨 다음, 무게차이를 근거로 계산하여 측정하였다.

[0071]

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 생선폐기물의 분해반응 동안 발생하는 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 농도는 약 24시간 이후부터 증가하여 10,250 mg/L까지 증가하였으나, 반응 약 96시간 이후부터 다시 감소하였다. 이에 비해 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 농도는 반응 96시간까지 감소하는 추세이고, 이 시간 이후부터는 다시 증가하여 반응 144시간에 5,530 mg/L를 나타내었으며, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 는 거의 측정되지 않았다. 또한, $\text{PO}_4^{2-}\text{-P}$ 및 $\text{SO}_4^{2-}\text{-S}$ 농도는 분해반응이 끝날 때까지 조금씩 증가하여 반응 144시간에 8.6 및 1,450 mg/L의 값을 나타내었다.

[0072]

한편, 도 4에 나타난 바와 같이 생선폐기물 분해반응 동안 물의 함량은 초기 55%에서 시작하여 반응 내내 45 ~ 55%로 조절하였고, pH는 반응 초기 7.05%로부터 서서히 감소하기 시작하여 반응 96시간 이후에는 6이하로 떨어졌으며, 반응 144시간 후에는 약 5.62까지 떨어졌으나, 이후는 조금 상승하는 것으로 나타났다. 균체 수는 반응 초기 6.1×10^5 CFU/mL로부터 증가하여 약 반응 96시간에 최대 7.2×10^5 CFU/mL까지 증가하였다가 그 이후에는 조금씩 증가와 감소하면서 어느 정도 유지되는 것으로 나타났다.

[0073]

생선폐기물 분해반응 동안의 COD_Cr 및 TN 농도의 변화를 살펴보면, 도 5에 나타난 바와 같이 두 농도 모두 반응 120시간까지 증가하였다가 그 이후 조금씩 감소하였는데, 최대 농도는 211,000 및 54,500 mg/L인 것으로 나타났다. 두 농도의 증가와 감소는 거의 같은 패턴을 보여 $\text{COD}_\text{Cr}/\text{TN}$ 비가 분해반응 전체에서 거의 유지되면서 생선폐기물의 분해가 일어남을 알 수 있었다. $\text{COD}_\text{Cr}/\text{TN}$ 비는 균체의 활동도와 연관이 있어서, $\text{COD}_\text{Cr}/\text{TN}$ 비가 변하게 되면 미생물이 유기물을 이용하는 대사과정에 변화가 올 수 있지만(Ruiz *et al.*, *Biochem*, 41:1338, 2006), 본 분해실험에서는 $\text{COD}_\text{Cr}/\text{TN}$ 비가 반응 전반에 걸쳐 거의 일정하게 나타남으로써, 12종의 혼합미생물군에 의한 생선폐기물의 분해는 매우 안정적으로 일어남을 알 수 있었다. 이때, TKN의 농도변화는 TN농도의 증가와 함께 반응 120시간까지 49,500 mg/L 정도로 증가하였다가, 그 이후에는 조금씩 감소하여 반응 168시간에는 31,000 mg/L까지 감소하였다. 고체 건조중량은 반응 초기부터 지속적으로 감소하면서, 특히 반응 96시간 전후에 가장 높은 감소율을 보였는데, 초기 2,150 g에서 최종 1,290 g까지 감소됨으로써, 반응 168시간에 12종의 혼합미생물군에 의해 생선폐기물의 40%가 분해되었음을 알 수 있었다.

[0074] **실시예 5: 생선폐기물의 유분제거에 따른 생분해 활성측정**

[0075] 생선폐기물의 유분제거 유무에 따른 생분해 활성을 비교측정하였다. 실시예 4-1에서 유분이 제거된 생선폐기물과, 유분을 제거하지 않는 생선폐기물을 준비한 다음, 생선폐기물의 유분제거에 따른 생분해 활성측정은 실시예 4-2의 방법으로 동일하게 수행하였다.

[0076] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 유분을 제거시키지 않은 생선폐기물(a)을 12종의 혼합미생물을 이용하여 분해한 반응액의 pH는 7.14에서 시작하여, 반응 84시간에 5.06까지 떨어지고, 반응 144시간에 5.2 정도로 조금 증가하였다. 균체 수는 2×10^3 CFU/mL에서 반응 72시간에 5×10^4 CFU/mL까지 증가하였으나, 반응 120시간에는 1×10^4 CFU/mL로 떨어져, 분해반응에 필요한 충분한 미생물 수를 유지할 수 없는 반면, 유분을 제거시킨 생선폐기물(b)을 12종의 혼합미생물군으로 분해한 반응액의 pH는 7.1에서 시작되어 반응 144시간에 5.6으로 떨어졌다가 조금 증가하는 경향을 보였고, 균체 수는 6×10^5 CFU/mL에서 반응 96시간에 7.1×10^5 CFU/mL까지 증가하고, 그 이후는 유지되는 경향을 보였다.

[0077] 따라서, 생선폐기물 분해반응에 있어, 생선기름 추출과정의 추가는 반응액 중의 12종의 혼합미생물군이 생선폐기물에 쉽게 접근하여 생선폐기물을 분해를 더 촉진시키므로 생선기름에 의한 기질 확산 문제를 해결하여 더 활발한 분해반응을 일으키기 때문에, 반응액 중의 pH 변화가 다르며, 12종의 혼합미생물군의 균체 수도 분해반응 중에 증가한 뒤 어느 정도 지속적으로 유지될 수 있음을 알 수 있었다.

[0078] 또한, 도 7에 나타난 바와 같이 유분을 제거시키지 않은 생선폐기물(a)을 12종의 혼합미생물군을 이용하여 분해한 반응액의 COD_{Cr} 농도는 초기 74,770 mg/L에서 시작하여, 반응 48시간에 150,030 mg/L까지 증가하였다가, 그 이후는 감소하여 반응 120시간에는 86,400 mg/L를 나타내었고, TN농도는 초기 8,860 mg/L에서 반응 48시간에 22,270 mg/L로 증가하였다가, 그 이후는 감소하여 반응 120시간에 11,200 mg/L를 나타내었다. TKN 농도는 초기 1,980 mg/L에서 반응 48시간에 4,900 mg/L로 증가하였다가, 그 이후는 감소하여 반응 120시간에 3,420 mg/L를 나타낸 반면, 유분을 제거시킨 생선폐기물(b)을 12종의 혼합미생물군으로 이용하여 분해한 반응액의 COD_{Cr} 농도는 초기 76,000 mg/L에서 증가하여, 반응 120시간에 211,000 mg/L를 나타내었고, 그 이후는 조금씩 감소하였으며, TN농도는 초기 18,250 mg/L에서 반응 120시간까지 증가하여 54,000 mg/L를 나타내었고, 그 이후는 조금씩 감소하였다. TKN 농도는 초기 13,300 mg/L에서 반응 120시간에 49,500 mg/L로 증가하였다가, 그 이후는 조금씩 감소하였다.

[0079] 따라서, 생선폐기물 분해반응에 있어, 생선기름 추출과정의 추가는 반응액 중의 혼합미생물군이 생선기름에 의한 기질 확산 문제없이 생선폐기물에 더 쉽게 접근하여 생선폐기물을 분해를 더 촉진시키게 되어, 분해반응을 더 지속적으로 진행시키게 된다. 그러므로 생선기름에 의해 12종의 혼합미생물군이 48시간까지만 진행되던 분해반응이, 생선기름을 제거시켜주면 반응 120시간까지 지속될 수 있고, 그 지속적 분해반응의 결과, 반응액 중 COD_{Cr}, TN 및 TKN 농도가 훨씬 더 높았다.

[0080] **실시예 6: 생선폐기물을 이용한 액체비료의 아미노산 조성분석**

[0081] 아미노산은 비료의 중요한 유기성분 중 하나이고, 따라서 식물성장은 균형 있는 아미노산의 섭취에 영향을 받음으로써, 실시예 4-2에서 12종의 혼합미생물군에 의해 생분해된 생선폐기물의 분해 반응액 중 도 5에 나타난 바와 같이, 분해반응 84이후부터 반응액 중 TKN 농도가 많이 증가하였고, 반응 120시간에 최대 농도를 나타냄에 따라, 아미노산 성분분석은 반응 84시간과 120시간의 샘플을 분석하여 초기 아미노산 성분과 비교하여 보았다. 아미노산 분석은 부경대학교 사료영양연구소에 의뢰하여 분석하였다.

[0082] 그 결과, 표 4에 나타난 바와 같이, 글리신(glycine)을 제외한 대부분의 아미노산은 반응시간에 따라 반응 120시간까지 12종의 혼합미생물군의 분해에 의해 그 농도가 증가됨을 알 수 있었는데, 반응 초기 3.30 g/100 g에서 반응 120시간에 5.19 g/100 g으로 뚜렷하게 증가하였다. 특히, 글루탐산(glutamic acid)과 타이로신(tyrosine)의 농도 증가가 매우 높게 나타남을 알 수 있었고, 아스파르트산(aspartic acid), 글루탐산(glutamic acid), 류신(leucine) 등이 많이 존재하는 것으로 나타났다.

[표 4]

Amino acid	Protein source (g/ 100 g sample)		
	0시간	84시간 후	120시간 후
Aspartic acid	0.34	0.48	0.70
Threonine	0.16	0.20	0.27
Serine	0.17	0.19	0.23
Glutamic acid	0.18	0.56	0.71
Proline	0.21	0.29	0.24
Glycine	0.35	0.54	0.28
Alanine	0.26	0.33	0.32
Valine	0.17	0.24	0.33
Isoleucine	0.14	0.20	0.30
Leucine	0.26	0.32	0.46
Tyrosine	0.06	0.10	0.21
Phenylalanine	0.14	0.20	0.28
Histidine	0.10	0.20	0.21
Lysine	0.26	0.26	0.33
Arginine	0.22	0.29	0.32
Total	3.30	4.40	5.19

실시예 7: 생선폐기물을 이용한 액체비료의 식물 발아율 측정

생선폐기물은 반응기에서의 산소가 충분히 공급되면 유기물은 CO_2 , SO_4^{2-} , NO_3 등의 안정적인 최종산물로 완전히 전환되며, 산소공급이 불충분하면 액체비료로써 토양에 시비되었을 때 식물 생장에 문제를 일으킬 수 있는 유기산을 축적하게 된다. 12종 혼합미생물군에 의하여 최종 분해된 생선폐기물을 액체비료로 사용할 시에 식물에 대한 독성을 나타나는지 알아보기 위하여, 발아율 테스트를 실시하였다. 발아율 테스트에 사용할 액체비료로는 실시예 4-2에서 12종의 혼합미생물군에 의해 생분해된 생선폐기물의 분해 반응액 중 표 4에서 아미노산의 조성 이 가장 높았던 120시간 동안 반응시킨 생선폐기물 분해반응의 반응액을 여러 배율로 희석하여 사용하였다.

먼저, 멸균된 접시에 여과지를 넣고 냉이(*Leptidium sativum*) 씨앗을 넣은 후, 여러 배율로 희석시킨 생선폐기물 분해반응의 반응액을 첨가하였다. 배양접시는 25℃의 암소에서 75% 습도를 유지하면서 발아시켰으며, 72시간 후에 각 배양접시의 발아율(RSG: relative seed germination), 뿌리성장율(RRG: relative root growth) 및 발아인덱스(GI: germination index)을 하기 식으로 나타내었다. 식물독성을 측정하는데 있어서, 발아율 측정은 뿌리 성장율 측정에 비하여 덜 민감한 방법으로 알려져 있으며, RSG와 RRG를 곱한 GI 지수가 식물독성 측정에 가장 민감한 변수로 알려져 있다.

$\text{RSG}(\%) = \text{액체비료군에서 발아된 씨앗의 수} / \text{대조군에서 발아된 씨앗의 수} \times 100$

$\text{RRG}(\%) = \text{액체비료군의 평균 뿌리길이} / \text{대조군의 평균뿌리길이} \times 100$

$\text{GI}(\%) = \text{RSG} \times \text{RRG} / 100$

그 결과, 표 5에서 나타난 바와 같이, 500배의 희석배율에서는 GI 값이 50%를 넘어서 식물에 대한 독성이 없는 것으로 나타났다.

[표 5]

희석배율	GI(%)
50배	4
100배	24
200배	43
500배	65
1,000배	85

[0094]

[0095] 실시예 7: 생선폐기물을 이용한 액체비료의 수정배배 가능성 측정

[0096] 생선폐기물 분해반응액의 액체비료로서의 가능성을 알아보기 위하여 실시예 4-2에서 12종의 혼합미생물군에 의해 생분해된 생선폐기물의 분해 반응액 중 표 4에서 아미노산의 조성이 가장 높았던 120시간 동안 반응시킨 생선폐기물 분해반응의 반응액을 여러 배율로 희석하여 빨간 콩과 보리에 대해 수정배배를 하였다.

[0097] 그 결과, 표 6에 나타난 바와 같이, 빨간 콩의 경우, 줄기를 형성하기까지는 2-3일 정도가 소요되었으며, 여러 가지 희석배율에서 실험한 결과, 500배 이상의 희석에서 좋은 성장을 보였다. 또한, 시중에서 시판되는 2종의 액체비료(시판 액체비료 1: 액비종류-미량요소 복합비료, 상품명-쏘일-칼, 제조회사-(주)네스코; 시판 액체 비료 2: 액비종류-아미노산 발효부산비료액, 상품명-아미나, 제조회사-(주)아미텍)와의 비교실험에서, 500배 희석한 생선폐기물분해 반응액이 빠른 성장을 보이거나, 견줄만한 결과를 보여, 액체비료로서 충분히 사용될 수 있음을 보여주었다.

[0098] [표 6]

[0099]

구분	대조군 (증류수)						50배 희석된 본 발명의 액체비료					
	Time(day)						Time(day)					
	1	3	5	7	9	11	1	3	5	7	9	11
뿌리길이(cm)	2.04	5.47	6.31	7.09	8.56	8.98	1.05	1.44	1.52	1.60	1.82	2.10
줄기길이(cm)	0	0	5.24	7.70	9.68	10.33	0	0	0.70	1.80	2.90	4.37
잎길이(cm)	0	0	1.91	2.27	2.61	2.69	0	0	0	0	1.14	1.77
구분	100배 희석된 본 발명의 액체비료						200배 희석된 본 발명의 액체비료					
	Time(day)						Time(day)					
	1	3	5	7	9	11	1	3	5	7	9	11
뿌리길이(cm)	2.10	2.12	2.27	2.82	3.90	4.45	2.50	3.37	3.50	4.60	5.78	6.80
줄기길이(cm)	0	0	2.54	3.80	5.39	7.05	0	0	3.28	6.85	7.85	8.95
잎길이(cm)	0	0	0	0.55	1.94	2.45	0	0	0.73	2.46	2.83	3.10
구분	500배 희석된 본 발명의 액체비료						1000배 희석된 본 발명의 액체비료					
	Time(day)						Time(day)					
	1	3	5	7	9	11	1	3	5	7	9	11
뿌리길이(cm)	3.25	4.42	4.66	4.80	7.97	8.51	2.90	4.17	5.30	6.10	7.69	7.85
줄기길이(cm)	0	1	6.95	8.35	9.78	10.25	0	0.85	6.59	8.20	9.58	9.95
잎길이(cm)	0	0	1.87	2.67	3.0	3.39	0	0.20	2.52	3.52	3.59	3.83
구분	시판 액체비료 1						시판 액체비료 2					
	Time(day)						Time(day)					
	1	3	5	7	9	11	1	3	5	7	9	11
뿌리길이(cm)	1.60	1.92	2.21	2.93	3.60	3.80	1.25	2.85	3.83	4.50	6.42	7.10
줄기길이(cm)	0	0	2.30	4.30	5.02	5.65	0	0	4.36	7.92	10.28	13.15
잎길이(cm)	0	0	1.01	1.39	1.76	2.21	0	0	1.15	2.72	3.18	3.44

[0100] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이

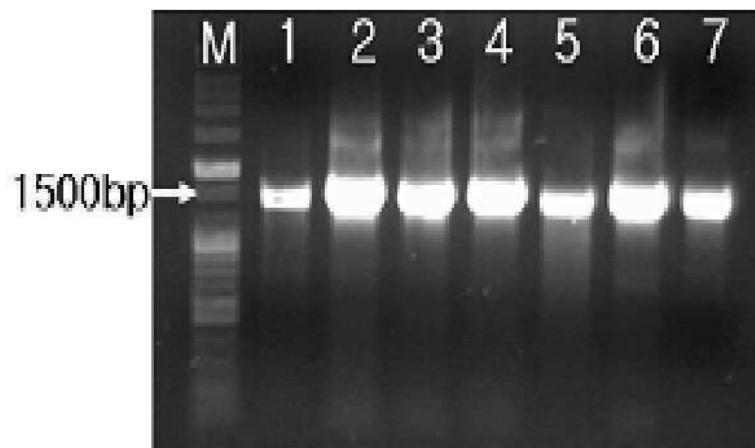
러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

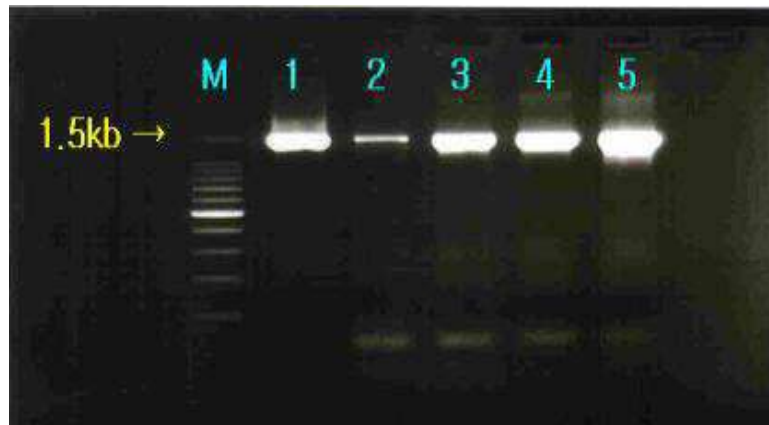
- [0101] 도 1은 본 발명에 따른 제1 혼합미생물군의 16S-rDNA 유전자의 단편을 PCR한 결과를 나타낸 것이다(레인 1: JB1; 레인 2:JB2; 레인 3:JB3; 레인 4:JB4; 레인 5:JB5; 레인 6:JB6; 및 레인 7:JB7).
- [0102] 도 2는 본 발명에 따른 제2 혼합미생물군의 16S-rDNA 유전자의 단편을 PCR한 결과를 나타낸 것이다(레인 1: EW1; 레인 2: EW2; 레인 3: EW3; 레인 4: EW4; 레인 5: EW5).
- [0103] 도 3은 본 발명에 따른 혼합미생물군을 이용한 생선폐기물의 분해반응 중 NO_2^- -N, PO_4^{3-} -P, SO_4^{2-} -S 및 NH_4^+ -N의 농도를 나타낸 것이다.
- [0104] 도 4는 본 발명에 따른 혼합미생물군을 이용한 생선폐기물의 분해반응 중 물의 양, pH 및 셀 수를 나타낸 것이다.
- [0105] 도 5는 본 발명에 따른 혼합미생물군을 이용한 생선폐기물의 분해반응 중 COD_{Cr} , TN, TKN 및 분해된 생선폐기물의 건조중량을 나타낸 것이다.
- [0106] 도 6은 본 발명에 따른 혼합미생물군을 이용한 생선폐기물의 유분제거에 대한 분해활성을 나타낸 것으로, (a)는 유분을 제거하지 않는 생선폐기물의 pH 및 셀 수를 나타낸 것이고, (b)는 유분을 제거한 생선폐기물의 pH 및 셀 수를 나타낸 것이다.
- [0107] 도 7은 본 발명에 따른 혼합미생물군을 이용한 생선폐기물의 유분제거에 대한 분해활성을 나타낸 것으로, (a)는 유분을 제거하지 않는 생선폐기물의 COD_{Cr} , TN, TKN 및 분해된 생선폐기물의 건조중량을 나타낸 것이고, (b)는 유분을 제거한 생선폐기물의 COD_{Cr} , TN, TKN 및 분해된 생선폐기물의 건조중량을 나타낸 것이다.

도면

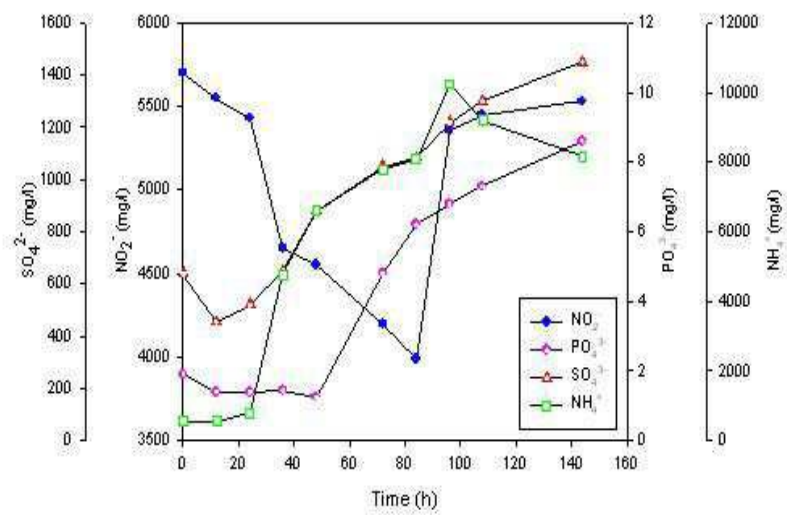
도면1



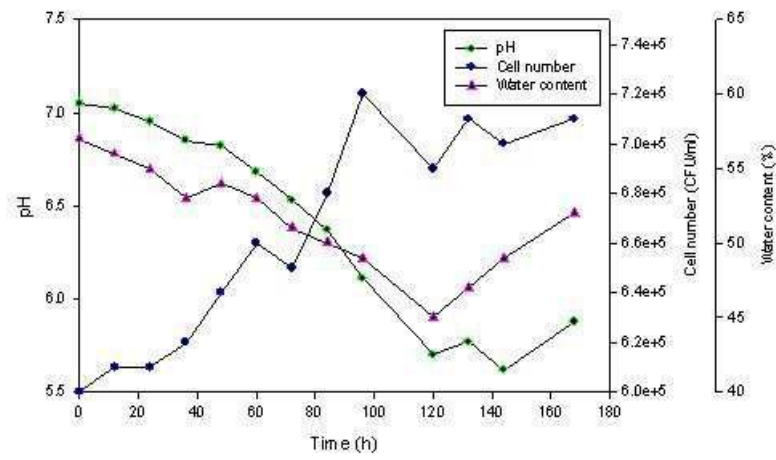
도면2



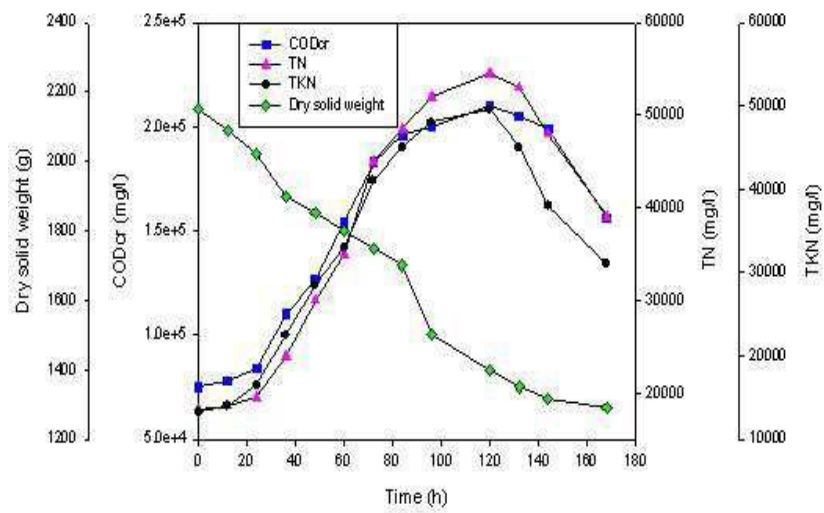
도면3



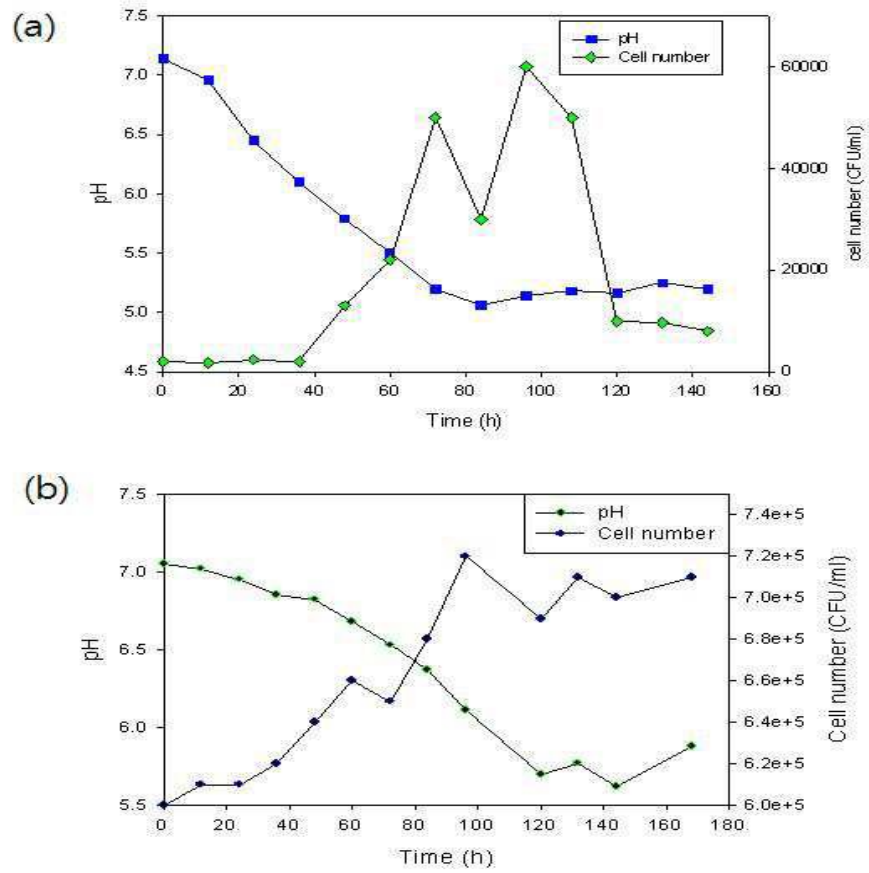
도면4



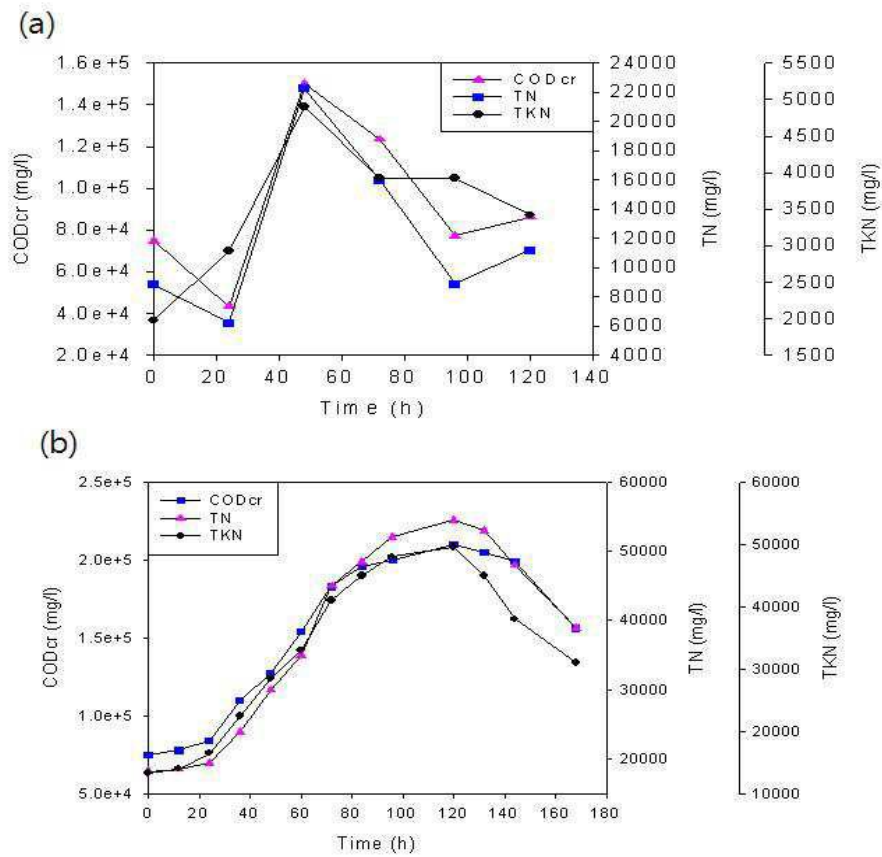
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110> Pukyong National University Business Incubator Center
 <120> Method for Preparing Liquid-fertilizer Using Fish Waste

<130> P08-B140

<160> 16

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1
agagtttgat cctggctcag 20

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 2
ggttaccttg ttacgactt 19

<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 3
gtaaaacgac ggccagt 17

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 4
atttcacaca ggaaacagct atgac 25

<210> 5

<211> 1447
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis JB1

<400> 5
 ggggaagagg tgggctatct gcagtcgagc ggacagatgg gagcttgctc cctgatgtta 60
 gcggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat aactccggga 120
 aaccggggct aataccggat gcttgtttga accgcatggt tcaaacataa aaggtggctt 180
 cggctaccac ttacagatgg acccgcggcg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac 240
 caaggcaacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg 300
 gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg caatggacga aagtctgacg 360
 gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtttt cggatcgtaa agctctgttg ttagggaaga 420
 acaagtaccg ttcgaatagg gcggtacctt gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa 480
 ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa ttattgggcg 540
 taaagggtc gcagcggtt tcttaagtct gatgtgaaag ccccggtc aaccggggag 600
 ggtcattgga aactggggaa cttgagtga gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg 660
 gtgaaatcgc tagagatgtg gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac 720
 tgacgtgag gagcgaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtccacgc 780
 cgtaaacgat gagtgctaag tgtagggggg tttccgcccc ttagtgctgc agctaacgca 840
 ttaagcactc cgcctgggga gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg 900
 cccgcacaag cggtaggagca tgtggtttta ttcgaagcaa cgcaagaac cttaccaggt 960
 cttgacatcc tctgacaatc ctagagatag gacgtcccct tcgggggcag agtgacaggt 1020

ggatgcatggt tgcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcctg caacgagcgc	1080
aaccttgat cttagttgcc agcattcagt tgggcactct aagtgactg ccggtgacaa	1140
accggaggaa ggiggggatg acgtcaaac atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac	1200
gtgctacaat ggacagaaca aagggcagcg aaaccgcgag gttaagccaa tcccacaaat	1260
ctgtttctcag ttcggatcgc agtcgtcaac tcgactgcgt gaagctggaa tcgctagtaa	1320
tcgcgatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca	1380
ccacgagagt ttgtaacacc cgaagtcggt gaggtaacct ttggagccgc gcgaagtggc	1440
gtgatgg	1447
<210> 6	
<211> 1518	
<212> DNA	
<213> Bacillus licheniformis JB2	
<400> 6	
agagtttgat cctggctcag gacgaacgt ggcggtgtgc ctaatacatg caagtcgagc	60
ggaccgacgg gagcttgctc tcttaggtca gcggcggtgc ggtgagtaac acgtgggtaa	120
cctgcctgta agactgggat aactccggga aaccggggct aataccggat gcttgattga	180
accgcatggt tccaatcata aaaggtggct ttcagctacc attacagat ggaccgcgg	240
cgcattagct agttggtgag gtaacggctc accaaggcga cgatgcgtag ccgacctgag	300
aggtgatcg gccacactgg gaccgagaca cgccccagac tcctacggga ggcagcagta	360
gggaatcttc cgcaatggac gaaagtctga cggagcaacg ccgctgagt gatgaaggtt	420
ttcgatcgt aaaactctgt tgtagggaa gaacaagtac cggtcgaata gggcggtacc	480
ttgacggtac ctaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt	540

agggtggcaag cggtgtccgg aattattggg cgtaaagcgc gcgcaggcgg tttcttaagt	600
ctgatgtgaa agcccccggc tcaaccgggg agggtcattg gaaactggga acttgagtgc	660
agaagaggag agtggaaatc cacgtgtagc ggtgaaatgc gtagagatgt ggaggaacac	720
cagtggcgaa ggcgactctc tgggtctgta ctgacgtga ggcgcgaaag cgtggggagc	780
gaacaggaat agataccctg ggtagtcca cccgttaaac gaatgagtgt taagttttag	840
aggggtttcc gcccctttag tgctgcagca aaggcattaa gcactccgcc ctggggagta	900
cggtcgcaag actgaaactc aaaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg	960
tgttttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcctc tgacaacct	1020
agagataggg cttcccttc gggggcagag tgacaggtgg tgcatggttgc tcgtcagctc	1080
gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa ccttgatct tagttgccag	1140
cattcagttg ggcactctaa ggtgactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac	1200
gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg gcagaacaaa	1260
gggcagcgaa gccgcgagc taagccaatc ccacaaatct gttctcagtt cggatcgag	1320
tctgcaactc gactgcgtga agctggaatc gctagtaatc gcggatcagc atgccgcggt	1380
gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc acgagagttt gtaacaccgc	1440
aagtcggtga ggtaaccttt tggagccagc cgccgaaggt gggacagatg attggggtga	1500
agtcgtaaca aggttaacc	1518

<210> 7
 <211> 1438
 <212> DNA
 <213> Brevibacillus agri JB3

<400> 7
ggagcgcggc tatctgcagt cgagcgagtc ccttcggggg ctagcggcgg acgggtgagt 60

aacacgtagg caacctgcct ctgagactgg gataacatag ggaaacttat gctaataaccg 120

gataggtttt tggatcgcat gatctgaaaa gaaaagatgg cttttcgcta tctactgggag 180

atgggcctgc ggcgattag ctagttggtg gggtaacggc ctaccaaggc gacgatcgct 240

agccgacctg agaggggtgac cggccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg 300

gaggcagcag tagggaattt tccacaatgg acgaaagtct gatggagcaa cgccgcgtga 360

acgatgaagg tcttcggatt gtaaagttct gttgtcaggg acgaatacgt accgttcgaa 420

cagggcggta ccttgacggt acctgacgag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc 480

gcgtaatac gtaggtggca agcgttgtcc ggattttattg ggcgtaaagc gcgcgcaggc 540

ggctatgtaa gtctggtgtt aaagcccggg gctcaacccc ggttcgcac cggaaactgtg 600

tagcttgagt gcagaagagg aaagcgggtat tccacgtgta gcggtgaaat gcgtagagat 660

gtggaggaac accagtggct aaggcggctt tctggtctgt aactgacgct gaggcgcgaa 720

agcgtgcgga gcaaacagga ttatataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgagtgt 780

aggtgttggg ggtttcaata ccttcagtgc cgcagctaac gcaataagca ctccgcctgg 840

ggagtacgct cgcaagagtg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcgttgga 900

gcatgtggtt taattcgaag caacgcgaag aaccttacca ggtcttgaca tcccgtgac 960

cgctctggag acagagcttc ccttcggggc agcggtgaca ggtggtgcat ggttgtcgtc 1020

agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt atctttagtt 1080

gccagcattc agttgggcac tctagagaga ctgccgtcga caagacggag gaaggcgggg 1140

atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca cacgtgtac aatggttgg 1200

acaacgggat gctacctcgc gagaggacgc caatctctta aaaccaatct cagttcggat 1260

tgtaggctgc aactgccta catgaagtcg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc 1320

gcggtgaata cgttcccgga ccttgtacac accgccgctc acaccacggg agtttgcaac 1380

accgcaagt cggtgaggtg accgcaagga gccagccgcc gaancgtgga ggtgtatt 1438

<210> 8

<211> 1514

<212> DNA

<213> Bacillus coagulans JB4

<400> 8

agagtttgat cctggctcag gacgaacgct ggcggtgtgc ctaatacatg caagtcgtgc 60

ggacctttta aaagcttgct tttaaaaggt tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggc 120

aacctgcctg taagatcggg ataacgccgg gaaaccgggg ctaataccgg atagtttttt 180

cttcgcgatg gaggaaaaag gaaagacggc ttcggctgtc acttacagat gggcccgcgg 240

cgcattagct agttggtggg gtaatggctc accaaggcaa cgatgcgtag ccgacctgag 300

agggtgatcg gccacattgg gactgagaca cgcccaaac tcctacggga ggcagcagta 360

gggaatcttc cgcaatggac gaaagtctga cggagcaacg ccgctgagt gaagaaggcc 420

ttcgggtcgt aaaactctgt tgccggggaa gaacaagtgc cgttcgaaca gggcggtgcc 480

ttgacgttac ccggccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggttaatacgt 540

aggtggcaag cgttgtccgg aattattggg cgtaaagcgc gcgcaggcgg cttcttaagt 600

ctgatgtgaa atcttgcggc tcaaccgcaa gcggtccatg gaaactggga ggcttgagtg 660

cagaagaaga gagtgaatt cccgtgtagc ggtgaaatgc ctagagatgt ggagggacac	720
cagtggcgga ggccggttct ctggctctga actgaacctg aagcccgaaa agcgggggaa	780
caaacaggat tagttacctt ggtagtgcag ccgtaaacga tgagtgttaa gtgttagagg	840
gtttccgccc tttagtgtg cagctaacgc attaacact cgcctgggg agtacggccg	900
caaggctgaa actcaaagga attgacgggg gccgcacaa gcggtggagc atgtgttta	960
attcgaagca acgcaagaa cttaccagg tcttgacatc ctctgacctc cctggagaca	1020
gggccttccc ctccggggga cagagtaca ggtggtgcat ggtgtctgc agctcgtgc	1080
gtgagatgtt gggtaagtc ccgaacgag cgcaacctt gacctagtt gccagcattg	1140
agttgggcac tctaaggta ctgccgtga caaacggag gaagtgagg atgacgtcaa	1200
atcatcatgc cccttatgac ctgggtaca cagtgctac aatggatgt acaaagggt	1260
gcgagaccgc gaggttaagc caatcccaga aaaccattcc cagttcgat tgcaggctgc	1320
aaccgcctg catgaagccg gaatcgctag taatcgcgga tcagcatgcc gcggtgaata	1380
cgttcccggt cctgtacac accgcccgtc acaccagag agtttgtaac accgaagtc	1440
ggtgaggtaa ccttacgga gccagccgcc gaagtgagg cagatgattg ggtgaagtc	1500
gtaacaaggt aacc	1514

<210> 9
 <211> 1449
 <212> DNA
 <213> Bacillus circulans JB5

<400> 9	
aagaggcgcg tctatactgc agtcgagcga accataagaa gcttgctttt tgttggttag	60

cggcggacgg gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcctgtaa gaccgggata actccgggaa	120
accggtgcta ataccggata gattatcttt ccgcctggag agataaggaa agatggctat	180
tgccatcact tacagatggg cccgcggcgc attagctagt tggtaggta acggctcacc	240
aaggcgacga tgcgtagccg acctgagagg gtgatcgcc acactgggac tgagacacgg	300
cccagactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttcgc aatggacgaa agtctgacgg	360
agcaacgccg cgtgagcgaa gaaggtcttc ggatcgtaaa gctctgtgt tagggaagaa	420
caagtatcgg aggaaatgcc ggtacctga cggtacctga cgagaaagcc acggctaact	480
acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt gtccggattt attgggcgta	540
aagcgcgcgc agcggtcct ttaagtctga tgtgaaatct tgcggctcaa ccgcaagcgg	600
tcattggaaa ctgggggact tgagtgcaga agaggaaagc ggaattccac gtgtagcgg	660
gaaatgcgta gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc ggctttctgg tctgtaactg	720
acgtgaggc gcgaaagct ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg	780
taaacgatga gtgctaagt tggagggtt tccgcccttc agtgcctgag ctaacgcatt	840
aagcactccg cctggggagt acggtcgaa gactgaaact caaaggaatt gacgggggcc	900
cgacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccagttct	960
tgacatctcc tgaccgcct ggagacaggg tcttccttc ggggacagga tgacagtg	1020
tgcattggtg tcgtcagtc gtgtcgtgag atgttggtt aagtcgcga acgagcgcaa	1080
cccttggttc tagttgccag cattcagttg ggcaacttag agcactgcc ggcgacaagt	1140
cggaggaagg tgggatgac gtcaaatcat catgccctt atgacctggg ctacacagct	1200
gtacaatgg atggtacaaa gggcagcgaa gcggcgacgc atgagcgaat cccagaaaac	1260

cattctcagt tcggattgca ggctgcaact cgcctgcatg aagccggaat cgctagtaat 1320

cgcggtacag catgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac 1380

cacgagagtt tgtaacaccc gaagtcgggt aggtaaccgt aaggagccag cgcggaagt 1440

gacgatgaa 1449

<210> 10
 <211> 1447
 <212> DNA
 <213> Bacillus anthracis JB6

<400> 10
 gggggcgggg cgctatctgc agtcagcgaa ggattaagag ctgtctctta tgaagttagc 60

ggcggacggg tgagtaacac gtgggtaacc tgcccataag actgggataa ctccgggaaa 120

ccggggctaa taccggataa cattttgaac cgcattgttc gaaattgaaa ggcggtctcg 180

gctgtcactt atggatggac ccgcgtcgca ttagctagtt ggtgaggtaa cggctcacca 240

aggcaacgat gcgtagccga cctgagaggg tgatcgcca cactgggact gagacacggc 300

ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttccgca atggacgaaa gtctgacgga 360

gcaacccgc gtgagtgatg aaggctttcg ggtcgtaaaa ctctgttgtt aggaagaac 420

aagtgttagt tgaataagct ggcaccttga cgttacctaa ccagaaagcc acggctaact 480

acgtgccagc agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt atccggaatt attgggcgta 540

aagcgcgcgc aggtgggttc ttaagtctga tgtgaaagcc cacggctcaa ccgtggaggg 600

tcattggaaa ctgggagact tgagtgcaga agaggaaagt ggaattccat gtgtacgggt 660

gaaatgcgta gagatatgga ggaacaccag tggcgaaagc gacttcttgg tctgtaactg 720

acactgacgc gcgaaagcgt ggggagcaaa caggattaga taccctggta gtccacgccg	780
taaacgatga gtgctaagtg ttagagggtt tccgcccttt agtgctgaag ttaacgcatt	840
aagcactccg cciggggagt acggccgcaa ggctgaaact caaaggaatt gacgggggcc	900
cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct	960
tgacatcctc tgacaacct agagataggg ctctccttc gggagcagag tgacaggtgg	1020
tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa	1080
cccttgatct tagttgcat catttagttg ggcaactctaa ggtgactgcc ggtgacaaac	1140
cggaggaagg tgggatgac gtcaaatcat catgccctt atgacctggg ctacacacgt	1200
gctacaatgg acggtacaaa gagctgcaag accgcgaggt ggagctaac tcataaaacc	1260
gttctcagtt cggattgtag gctgcaactc gcctacatga agctggaac gctagtaac	1320
gcggatcagc atgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc	1380
acgagagttt gtaacacccg aagtcggtgg ggtaccttt gagccagccg ctaagtgacg	1440
atgtatg	1447

<210> 11
 <211> 1449
 <212> DNA
 <213> Bacillus fusiformis JB7

<400> 11	
aaaagtgagg cggggtctat acatgcagtc gagcgaacag aaaaggagct tgctcctttg	60
acgttagcgg cggacgggtg agtaacacgt gggcaaccta ccctatagtt tgggataact	120
ccgggaaacc ggggctaata ccgaataatc tcttttgctt catggtgaaa gactgaaaga	180
cggtttcggc tgtcgtata ggatgggcc gcggcgcat agctagttgg tgaggtaacg	240

gtcaccaag gcgacgatgc gtagccgacc tgagagggtg atcggccaca ctgggactga	300
gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccacaat gggcgaaagc	360
ctgatggagc aacgccgcgt gagtgaagaa ggttttcgga tcgtaaaact ctgttgtaag	420
ggaagaacaa gtacagtagt aactggctgt accttgacgg taccttatta gaaagccacg	480
gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata cgtagggtggc aagcgttgtc cggaattatt	540
gggcgtaaag cgcgcgagg cggtccttta agtctgatgt gaaagccac ggctcaaccg	600
tggagggtca ttgaaactg ggggacttga gtgcagaaga ggaaagtgga attccaagtg	660
tagcggtgaa atgcgtagag atttgaggga acaccagtgg cgaaggcgac ttcttggtct	720
gtaactgacg ctgaggcgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc	780
cacgcgtaa acgatgagt ctaagtgtta gggggtttcc gcccttagt gtgcagcta	840
acgcattaag cactccgct ggggagtacg gtcgcaagac tgaaactcaa aggaattgac	900
gggggccccg acaagcgtg gagcatgtgg ttaattcga agcaacgca agaacttac	960
caggtcttga catccggtg accactgtag agatatagtt tccccttcgg gggcaacggt	1020
gacaggtggt gcatggtgt cgtcagctcg tgcgtgaga tgttgggtta agtcccga	1080
cgagcgcaac cctgatctt agttgccatc atttagttgg gcactctaag gtgactgccg	1140
gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcatc atgcccctta tgacctgggc	1200
tacacacgtg ctacaatgga cgatacaaac ggttgccaac tcgcgagagg gagctaatcc	1260
gataaagtcg ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gccggaatcg	1320
ctagtaatcg cggtacgca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc	1380

cgtcacacca cgagagtttg taacacccga agtcggtgag gtaacctttg agccgcgcga	1440
aggagtgt	1449
<210> 12	
<211> 1438	
<212> DNA	
<213> Breviballus agri EW1	
<400> 12	
ggagggggct atcatgcagt cgagcgagtc ccttcggggg ctacgggcgg acgggtgagt	60
aacacgtagg caacctgcct ctcagactgg gataacatag ggaaacttat gctaataccg	120
gataggtttt tggatcgcat gatctgaaaa gaaaagatgg cttttcgcta tcaactggag	180
atgggcctgc ggcgcattag ctagttggtg gggtaacggc ctaccaaggc gacgatgcgt	240
agccgacctg agagggtgac cggccacact gggactgaga cacggcccag actcctacgg	300
gaggcagcag tagggaattt tccacaatgg acgaaagtct gatggagcaa cgccgcgtga	360
acgatgaagg tcttcggatt gttaaagtct gttgtcaggg acgaacacgt accgttcgaa	420
cagggcggta ccttgacggt acctgacgag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc	480
gcggttaatac gtaggtggca agcgttgtcc ggattttattg ggcgtaaagc gcgcgcaggc	540
ggctaigttaa gtctggtgtt aaagcccggg gctcaacccc ggttcgcac cggaaactgtg	600
tagcttgagt gcagaagagg aaagcgggtat tccacgtgta gcggtgaaat gcgtagagat	660
gtggaggaac accagtggcg aaggcggctt tctggtctgt aactgacgct gaggcgcgaa	720
agcgtgggga gcaaacagga ttagataccc tggtagtccc ccccgtaaaa cgatgaatgc	780
taggtgttgg gggtttcaat accctcagtg ccgcagctaa cgcaataagc actccgcctg	840
gggagtacgc tcgcaagagt gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgcg caagcgttg	900

agcatgtggt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac atccccgtga 960

ccgctctgga gacagagctt cccttcgggg cagcggtgac aggtggtgca tggttgtcgt 1020

cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tatctttagt 1080

tgccagcatt cagttgggca ctctagagag actgccgtcg acaagacgga ggaaggcggg 1140

gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta caatggttgg 1200

tacaacggga tgctacctcg cgagaggacg ccaatctctt aaaaccaatc tcagttcgga 1260

ttgtaggctg caactcgctt acatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcatgc 1320

cgcggtgaat acgttcccg gccttgtaga caccgcccgt cacaccacgg gagtttgcaa 1380

cacccgaagt cggtagaggaa ccgcaaggag ccagccgccg aaggtggaga gagggaaa 1438

<210> 13
 <211> 1459
 <212> DNA
 <213> Bacillus subtilis EW2

<400> 13
 tcccttttac atggcaaggt ccgagcggac agatgggagc ttgctccctg atgttagcgg 60

cggacgggtg agtaacacgt gggtaacctg cctgtaagac tgggataact ccgggaaacc 120

ggggctaata ccggatggtt gtttgaaccg catggttcaa acataaaaagg tggcttcggc 180

taccatttac agatggaccc gcggcgcatc agctagtgg tgaggtaacg gtcaccaag 240

gcaacgatgc gtagccgacc tgagagggtg atcgccaca ctgggactga gacacggccc 300

agactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc 360

aacgccgct gagtgatgaa ggttttcgga tcgtaaagct ctgttgtag ggaagaacaa 420

gtaccgttcg aatagggcgg taccttgacg gtacctaacc agaaagccac ggctaactac 480

gtgccagcag ccgcggtaat acgtagggtg caagcgttgt ccggaattat tgggcgtaaa 540

gggctcgag gcggtttctt aagtctgatg tgaaagcccc cggctcaacc ggggagggtc 600

attgaaact ggggaacttg agtgcagaag aggagagtgg aattccacgt gtacggtga 660

aatgcgtaga gatgtggagg aacaccagtg gcgaaggcga ctctctggtc tgtaactgac 720

gctgaggagc gaaagcgtgg ggagcgaaca ggattagata ccctggtagt ccacgccgta 780

aacgatgagt gctaagtgtt aggggggttc cggcccttag tgctgcagct aacgcattaa 840

gcactccgcc tggggagtac ggtcgcaaga ctgaaactca aaggaattga cgggggcccc 900

cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg aagcaacgag aagaacctta ccaggtcttg 960

acatcctctg acaatcctag agataggacg tcccccttcgg gggcagagtg acaggtggtg 1020

catggttgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc 1080

cttgaictta gttgccagca ttcagttggg cactctaagg tgactgccgg tgacaaaccg 1140

gaggaaggtg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat gacctgggct acacacgtgc 1200

tacaatggac agaacaaagg gcagcgaaac cgcgaggtta agccaatccc acaaatctgt 1260

tctcagttcg gatcgcatgc tgcaactcga ctgcgtgaag ctggaatcgc tagtaatcgc 1320

ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgcca gtcacacca 1380

cgaagagttg taacaccccc aagtcggtg aagtaaacct tttagcggag ccaagcggcc 1440

gaaaagggtg tgggacagg 1459

<210> 14
<211> 1438
<212> DNA

<213> Bacillus cereus EW3

<400> 14

gaggggcgct atcatgcagt cgagcgaagg attagagctt gctcttatga agttagcggc	60
gccattagga gtaaccgtgg gtaacctgcc cataagactg ggcatactcc gggaaaccgg	120
ggctaatacc ggataacatt ttgaaccgca tggttcgaaa ttgaaaggcg gcttcggctg	180
tcacttatgg atggaccgc gtcgcattag ctagttggtg aggtaacggc tcaccaaggc	240
aacgatgcgt agccgacctg agagggtgat cgccacact gggactgaga cacggcccag	300
actcctacgg gaggcagcag tagggaatct tccgcaatgg acgaaagtct gacggagcaa	360
cgccgcgtga gtgatgaagg ctttcgggtc gtaaaactct gttgttaggg aagaacaagt	420
gctagttaa taagctggca cttgacggt acctaaccag aaagccacgg ctaactacgt	480
gccagcagcc gcgtaatac gtaggtggca agcgttatcc ggaattattg ggcgtaaagc	540
gcgcgcaggt ggtttcttaa gtctgatgtg aaagcccacg gctcaaccgt ggagggtcat	600
tggaaactgg gagacttag tgcagaagag gaaagtggaa ttccatgtgt agcggcgaaa	660
tgcgtagaga tatggaggaa caccagtggc gaaggcgact ttctggtctg taactgacac	720
tgaggcgca aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa	780
cgatgagtgc taagtgttag agggtttccg ccctttagtg ctgaagttaa cgcattaagc	840
actccgctg gggagtacgg ccgcaaggct gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccga	900
caagcgtgg agcatgtgt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac	960
atcctctgac aaccctagag atagggcttc tccttcggga gcagagtac aggtggtgca	1020
tggttgctgt cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct	1080

tgatcttagt tgccatcatt aagttgggca ctctaagggtg actgccggtg acaaaccgga	1140
ggaaggtggg gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggctac acacgtgcta	1200
caatggacgg tacaaagagc tgcaagaccg cgaggtggag ctaatctcat aaaaccgttc	1260
tcagttcgga tttaggctg caactcgcct acatgaagct ggaatcgcta gtaatcgcg	1320
atcagcatgc cgcggtgaat acgttccccg gccttgtaca caccgcccgt cacaccggga	1380
gagtttgtaa caccgaagt cgggtgggaa ccttgagacc accgctaagt gacgaggg	1438
<210> 15	
<211> 1448	
<212> DNA	
<213> Bacillus licheniformis EW4	
<400> 15	
ggaggcgggt gctatcatgc agtcgagcgg acgacgggag cttgctccct taggtcagcg	60
gcggaccgtt aagtaaccgt gggtaacctg cctgtaagac tgggataact ccgggaaacc	120
ggggctaata ccgatgctt gattgaaccg catggttcaa tcataaaagg tggcttttag	180
ctaccactta cagatggacc cgcgcgcat tagctagtgt gtgaggtaac ggctcaccaa	240
ggcgacgatg cgtagccgac ctgagagggt gatcgccac actgggactg agacacggcc	300
cagactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttcgcaa tggacgaaag tctgacggag	360
caacgccg cg tgagtatga aggttttcgg atcgtaaaac tctgttgta gggaagaaca	420
agtaccgttc gaatagggcg gtaccttgac ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta	480
cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgttg tccggaatta ttgggcgtaa	540
agcgcgcgca ggcggtttct taagtctgat gtgaaagccc ccggtcaac cggggagggt	600
cattgaaaac tggggaactt gagtgcctaa gaggagagtg gaattcccc tgataccgtg	660

aaatgcctaa agacttggag gaacaccagt ggcgaaggcg actctctggt ctgtaactga 720
 cgctgaggcg cgaaagcgtg gggagcgaac aggattagat accctggtag tccacgccgt 780
 aaacgatgag tgctaagtgt tagagggttt ccgcccttta gtgctgcagc aaacgcatta 840
 agcactccgc ctggggagta cggtcgcaag actgaaactc aaaggaattg acgggggccc 900
 gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt 960
 gacatcctct gacaacccta gagataggcg ttccccttcg ggggcagagt gacagtggt 1020
 gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccga cagcgcaac 1080
 ccttgatctt agttgccagc attcagttgg gcactctaag gtgactgccg gtgacaaacc 1140
 ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcctc atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg 1200
 ctacaatggg cagaacaaag ggcagcgaag ccgcgaggct aagccaatcc cacaatctg 1260
 ttctcagttc ggatcgagc ctgcaactcg actgcgtgaa gctggaatcg ctagtaatcg 1320
 cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacaacg 1380
 cgagagtttg taacaccga agtcggtgag gtaacctttg gagccagccg ccgaaggtga 1440
 cagaatgg 1448

<210> 16
 <211> 1432
 <212> DNA
 <213> Brevibacillus parabrevis EW5

<400> 16
 ggaggcgcgg ctatactgca gtcgagcgag ggttttcgga ccctagcggc ggacgggtga 60
 gtaacaccta ggcaacctgc ctctcagacc gggataacat agggaaactt atgctaatac 120

cggataggtt tttggattgc atgatccgaa aagaaaagat ggcttcggct atcactggga	180
gatgggcctg cggcgcatga gctagtgtgt ggggtaacgg cctaccaagg cgacgatgcg	240
tagccgacct gagagggtga ccggccacac tgggactgag acacggccca gactcctacg	300
ggaggcagca gtagggaatt ttccacaatg gacgaaagtc tgatggagca acgccgcgtg	360
aacgatgaag gtcttcggat tgtaaagttc tgttgtcagg gacgaacacg tgccgttcga	420
ataggcggtt accttgacgg tacctgacga gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc	480
cgcggttaata cgtagggtgc aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaag cgcgcgcagg	540
cggctatgta agtctggtgt taaagcccgg agctcaactc cggttcgcat cggaaactgt	600
gtagcttagt tgcagaagag gaaagcggta ttccacgtgt agcggtgaaa tgcgtagaga	660
tgtggaggaa caccagtggc gaaggcggct ttctggtctg taactgacgc tgaggcgca	720
aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgagtgc	780
taggtgttgg gggtttcaat accctcagtg ccgcagctaa cgcaataagc actccgcctg	840
gggagtlacg tcgcaagagt gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccga caagcgtgg	900
agcatgtgtt ttaattcgaa gcaacgcgaa gaaccttacc aggtcttgac atcccgtga	960
ccgtcttgga gacagagctt cccttcgggg cagcggtgac aggtggtgca tggttgtcgt	1020
cagctcgtgt cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaaccct tatctttagt	1080
tgccagcatt cagttgggca ctctagagag actgccgtcg acaagacgga ggaaggcggg	1140
gatgacgtca aatcatcatg ccccttatga cctgggttac acacgtgcta caatggttgg	1200
tacaacggga tgctacctcg cgaggggacg ccaatctctg aaaaccaatc tcagttcgga	1260
ttgtaggctg caactcgctt acatgaagtc ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcatgc	1320

cgcggtgaat acgttccgg gccttgtaga caccgccgt cacaccacgg gagtttgaa 1380

caccgaagt cgtgaggta accgaagga gccgccgaa gtgggagg aa 1432