(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0064944
(43) 공개일자 2015년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 1/20* (2006.01) *A23K 1/16* (2006.01)
*A23K 1/18* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0149895
(22) 출원일자 2013년12월04일
심사청구일자 2013년12월04일

(71) 출원인
**경상대학교산학협력단**
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
**강석중**
경남 통영시 용남면 대곡길 12, 103동 1503호 (청구아파트)
**최병대**
경상남도 통영시 진남2길 43-10 장원썬비치 905호
**정우철**
경남 통영시 용남면 대곡길 12, 107동 801호 (청구아파트)
(74) 대리인
**한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식**

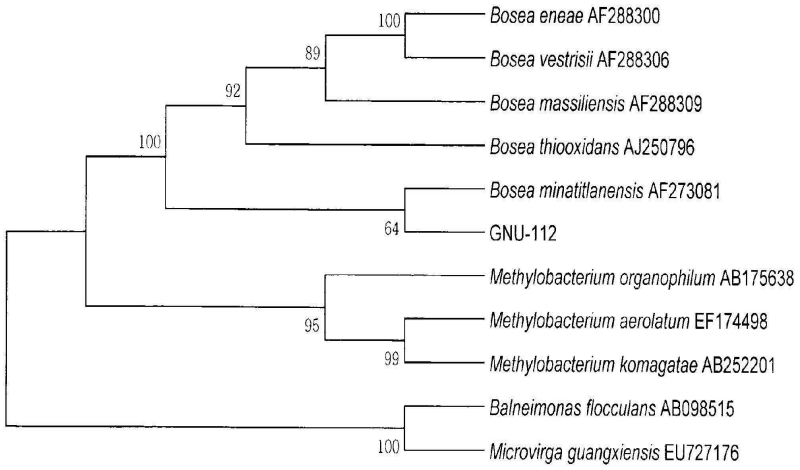
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **물벼룩 먹이 및 배양액 수질 정화용으로 사용 가능한 신규 세균 균주 및 그의 용도**

## (57) 요 약

본 발명은 물벼룩 먹이인 동시에 수질정화 작용이 우수한 보세아 속(*Bosea sp.*) 신규 균주와 바실러스 속(*Bacillus sp.*) 신규 균주, 상기 균주를 포함하는 물벼룩 사육용 사료조성물에 관한 것으로, 본 발명에 실시예에 따른 균주 수질정화 작용이 우수하고 특히 물벼룩 배양 시에 발생하는 배양수 중의 용존유기물, 입자성 유기물, 황화합물 및 암모니아성 질소를 효율적으로 처리할 뿐만 아니라, 여기에서 발생한 영양소를 기질로 하여 대량 번식한 후 물벼룩의 먹이로 활용될 수 있기 때문에, 본 발명의 신규 미생물을 이용하면 물벼룩을 고밀도 회분배양(batch culture)으로 대량생산할 수 있다.

*대 표 도* - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012-0895
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 수산특정연구과제
연구과제명 해수물벼룩의 고밀도 연속대량 배양 및 그 산업적 적용
기 여 율 1/2
주관기관 경상대학교
연구기간 2012.07.01 ~ 2013.06.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012-1042
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 수산특정연구과제
연구과제명 해수물벼룩의 고밀도 연속대량 배양 및 그 산업적 적용
기 여 율 1/2
주관기관 경상대학교
연구기간 2012.07.01 ~ 2013.06.30

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

수탁번호 KCCM11265P로 기탁된 신규 보세아 미나티틀라넨시스(*Bosea minatitlanensis*) GNU-112 균주.

### 청구항 2

수탁번호 KCCM11381P로 기탁된 신규 바실러스 퍼뮤스(*Bacillus firmus*) GNU-222 균주.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항의 균주 또는 제1항 및 제2항의 균주의 혼합균주를 포함하는 물벼룩 사육용 사료조성물.

### 청구항 4

제3항에 있어서,

단세포성 녹조를 추가로 포함하는, 사료조성물.

### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 단세포성 녹조는 클로렐라(*Chlorella sp.*) 또는 셀레나스트럼(*Selenastrum sp.*)인, 사료조성물.

### 청구항 6

제1항 또는 제2항의 균주 또는 제1항 및 제2항의 균주의 혼합균주를 유효성분으로 포함하는 물벼룩 배양액 수질 정화용 조성물.

### 청구항 7

제1항 또는 제2항의 균주 또는 제1항 및 제2항의 균주의 혼합균주를 양식 중인 물벼룩에 급이하는 단계를 포함하는 양식 물벼룩 고밀도 배양 방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 세균 균주에 관한 것으로서, 더 상세하게는 물벼룩 먹이 및 배양액 수질 정화용으로 사용 가능한 신규 세균 균주 및 그의 용도에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 일반적으로 어류와 갑각류(새우, 게)의 경우에는 산란 후 부화된 자치어의 경우에는 반드시 살아있는 먹이생물을 먹는 특성이 있다. 이들 먹이생물의 종류로서는 지각류(cladocera)인 물벼룩(water flea, *Daphnia pulex*)과 요각류(copepoda) 종류가 있다. 물벼룩은 여과섭식의 생물로 주먹이인 식물성 먹이생물은 물론 섬모충과 박테리아까지 매우 광범위하게 먹이를 이용하는 종이다(Urabe *et al.*, *Hydrobiologia* 25: 121-128, 1991; Fileto *et al.*, *Aquat Ecol* 38: 503-514, 2004; Kumar *et al.*, *International Review of Hydrobiology* 93: 284-296, 2008). 그러나 물벼룩은 공급되는 먹이의 생화학적 조성에 따라 성장률 및 생식력에 영향을 받기 때문에(Fileto *et al.*, *Aquat Ecol* 38: 503-514, 2004), 이들의 대량배양을 위해서는 양질의 적합한 먹이공급이 필수적이다. 물벼룩을 대량생산하기 위해서는 보다 더욱 경제적이면서 효율적인 대체 먹이원을 개발해야만 할 것이다. 또한 이들의 대량배양은 성공적인 어류 종묘생산을 위해서도 필수적이다. 어류 양식에서 종묘생산용 먹이생물로는 알테미아(artemia)가 사용되고 있는데, 이는 전량 외국에서 수입에 의존하고 있기 때문에 비용 면에서 큰 부담이 될 뿐만 아니라, 자연에서 채집되는 알테미아는 생산량이 일정하지 않기 때문에 물량의 공급적인 측면에서도 불

안정할 뿐만 아니라 가격폭등의 가능성을 항상 내포하고 있다. 이로 인해 물벼룩을 어류종묘생산의 먹이생물로 이용하기 위해 인공적으로 대량 생산이 가능한 배양을 시도하고 있지만(이러한 기술들로는 한국등록특허 제697238호(2007.03.13.), 제722299호(2007.05.21.), 제814262호(20080310), 제746484호(2007.07.30.), 제746483호(2007.07.30.), 제1013603호(2011.01.31.), 제426791호(2004.03.30.), 제407753호(2003.11.19.), 제958859호(2010.05.12.), 제964536호(2010.06.10.), 및 제526973호(2005.11.01.) 등이 존재한다), 아직까지 소량 배양에 불과하다. 이러한 소량 배양은 어류 종묘생산 목적이 아니라, 수질환경 독성평가를 위한 생물에 행하여지고 있다. 또한 물벼룩의 대량 생산을 위해 종래의 배양 기술의 방법에는 몇 가지 문제점이 하기와 같이 존재한다. 첫째 종래의 배양 기술은 저밀도 노지 배양 방식이다. 이는 넓은 공간의 노지에 배양수온을 25~28℃로 맞추고 식물성 플랑크톤, 효모 등을 급이하는 저밀도로 물벼룩을 배양하는 방법이다. 그러나 이러한 방법은 넓은 면적의 배양장을 필요로 하기 때문에 오염생물의 혼입을 방지하기가 어렵고 넓은 수조의 공간에 대하여 배양수온을 맞추기 위해서는 과다하게 많은 난방비를 필요로 하기 때문에 경제적이지 못하다. 두 번째 종래의 배양 기술로 고밀도 회분배양 방법이 있다. 이는 밀도에 의한 경제성 문제를 해결하기 위해서 진일보한 고밀도배양방법으로 제안되었으나(일본등록특허 제3394028호(2003.01.31.), 한국등록실용신안 제232078호(2001.05.15.), 상기 기술의 경우 고밀도 회분배양(batch culture)으로서 약 3일간 배양한 후에는 물벼룩을 회수한 후 다시 새로 배양을 시작하여야 하기 때문에 경제적 부담이 커서 실용화되지 못하였다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0003] 그러나 상기 종래의 물벼룩 배양 방법인 저밀도 노지 배양방식과 고밀도 회분배양 방법에서 담수산 농축 클로렐라와 같은 식물성 플랑크톤을 급이하였을 때 발생하는 고가인 먹이생물의 손실, 낮은 포란율 및 먹이생물의 부패에 따른 수질악화 때문에 3일 배양이라는 벽을 넘지 못하고 현재로서는 여러 가지 면에서 산업적으로 이용 가능한 수준의 생산원가를 형성하지 못하고 있는 실정이다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 물벼룩 먹이로 사용가능한 신규 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0005] 아울러 상기 신규 균주를 포함하는 물벼룩 사육용 사료 조성물을 제공하는 것을 본 발명의 다른 목적으로 한다.

[0006] 아울러, 상기 신규 균주를 포함하는 물벼룩 배양액 수질정화용 조성물을 제공하는 것을 본 발명의 다른 목적으로 한다.

[0007] 더 나아가 상기 신규 균주를 이용한 물벼룩 배양방법을 제공하는 것을 본 발명의 또 다른 목적으로 한다.

[0008] 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

### *과제의 해결 수단*

[0009] 본 발명의 일 관점에 따르면, 수탁번호 KCCM11265P로 기탁된 신규 보세아 미나티틀라넨시스(*Bosea minatitlansensis*) GNU-112 균주가 제공된다.

[0010] 본 발명의 일 관점에 따르면, 수탁번호 KCCM11381P로 기탁된 신규 바실러스 퍼뮤스(*Bacillus firmus*) GNU-222 균주가 제공된다.

[0011] 본 발명의 일 관점에 따르면, 상기 GNU-112 균주, 또는 상기 GNU-222 균주, 또는 상기 GNU-112 균주 및 상기 GNU-222 균주의 혼합균주를 포함하는 물벼룩 사육용 사료 조성물이 제공된다.

[0012] 상기 사료 조성물은 단세포성 녹조를 추가로 포함할 수 있고, 상기 단세포성 녹조는 클로렐라(*Chlorella* sp.) 또는 셀레나스트럼(*Selenastrum* sp.)일 수 있다. 단세포성 녹조가 포함되는 경우 상기 단세포성 녹조는 별도의 포장으로 제공될 수도 있고, 상기 균주와 혼합하여 제공될 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 상기 GNU-112 균주, 또는 상기 GNU-222 균주, 또는 상기 GNU-112 균주 및 상기 GNU-222 균주의 혼합균주를 유효성분으로 포함하는 물벼룩 배양액 수질정화용 조성물이 제공된다.

[0014] 본 발명은 더 나아가, 상기 GNU-112 균주, 또는 상기 GNU-222 균주, 또는 상기 GNU-112 균주 및 상기 GNU-222 균주의 혼합균주를 양식 중인 물벼룩에 급이하는 단계를 포함하는 양식 물벼룩 고밀도 배양 방법이 제공된다.

## 발명의 효과

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따른 신규 균주는 물벼룩 배양 시에 발생하는 배양수 중의 용존유기물, 입자성 유기물, 황화합물 및 암모니아성 질소를 효율적으로 처리할 뿐만 아니라, 여기에서 발생한 영양소를 기질로 하여 대량 번식한 후 물벼룩의 먹이로 활용될 수 있기 때문에, 물벼룩의 고밀도 대량생산에 활용될 수 있다. 그러나 이러한 효과는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

## 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1는 본 발명의 신규 미생물 보세아 미나티틀라넨시스(*Bosea minatitlansensis*) GNU-112 균주의 한천배지에서 배양한 모습을 촬영한 현미경 사진이다.

도 2는 본 발명의 신규 미생물 보세아 미나티틀라넨시스(*Bosea minatitlansensis*) GNU-112 균주의 16S rDNA 염기서열에 기반한 분류학상 계통수를 나타낸다.

도 3는 본 발명의 신규 미생물 바실러스 퍼뮤스(*Bacillus firmus*) GNU-222 균주의 한천배지에서 배양한 모습을 촬영한 사진이다.

도 4는 본 발명의 신규 미생물 바실러스 퍼뮤스(*Bacillus firmus*) GNU-222 균주의 16S rDNA 염기서열에 기반한 분류학상 계통수를 나타낸다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명하고자 한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

[0018] **실시예 1: 균주의 분리**

[0019] 본 발명자들은 물벼룩 배양에 있어서 수질정화 및 물벼룩 먹이로 사용이 가능한 신규 균주를 발굴하기 위해 국내 양계장, 논흙과 연안갯벌에서 210 여종 균주를 분리하여 성장률이 우수하고, 물벼룩 생존테스트를 거쳐 효과가 우수한 균주 5종을 선별하였다(표 1). 구체적으로 CYD Agar 배지와 TSA Agar 배지를 신규 미생물의 분리용 배지로 사용하였다. CYD 배지는 증류수 1.0 리터당 카제인(Pancretic Digest of Casein, Difco) 5.0 g/L, 효모추출물(Yeast Extract, Difco) 2.5 g/L, 덱스트로오스(Dextrose, Difco) 1.0 g/L 및 한천 15 g/L로 제조하였으며, pH는 7.0-7.2로 조정하였으며, TSA 한천 배지는 증류수 1.0 리터당 카제인(Pancretic Digest of Casein, Difco) 17.0 g/L, 대두박분말(Pancretic Digest of Soy Bean, Difco) 3.0 g/L, 덱스트로오스(Dextrose, Difco) 2.5 g/L, Sodium chloride 5.0 g/L, Dipotassium phosphate 2.5 g/L 및 한천(Agar) 15 g/L로 제조하였으며, pH는 7.3±0.2로 조정하여 사용하였다. 이 후 분리된 신규 미생물 균주의 배양은 SYD 배지와 LB 배지를 사용하였다. SYD 배지는 증류수 1.0 리터당 감자전분(Potato Starch, Difco) 4.0 g/L, 효모 추출물(Yeast Extract, Difco) 2.5 g/L 및 덱스트로오스(Dextrose, Difco) 10 g/L로 제조하였으며, pH는 7.0 - 7.2로 조정하였으며, LB 배지는 증류수 1.0 리터당 트립톤(Tryptone, Difco) 10.0 g/L, 효모 추출물(Yeast Extract, Difco) 5.0 g/L 및 염화나트륨 10 g/L로 제조하였다. 또한 pH는 7.0±0.2로 조정하였다. 이들은 모두 통상의 배지 멸균방법에 따라 사용 전 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

[0020] **실시예 2: 균주의 생물학적 효과**

[0021] 본 발명자는 분리된 신규 미생물 균주의 물벼룩에 대한 생물학적 효과를 조사하였다. 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 GNU-112(도 1) 및 GNU-222(도 3)가 총산자수, 1회 산란수, 총 산란횟수에서 다른 균주들에 비해 우수한 균주임을 확인 할 수 있었다. 구체적으로, GNU-112 균주는 총산자수와 1회 산란수가 가장 높아 생산성이 가장 뛰어났고, GNU-222는 산자수는 그렇게 많지는 않았으나, 물벼룩의 생존기간이 가장 길었고, 총산란 횟수 역시 가장 많아 효율적인 균주로 판명됐다. 본 실시예에서 균주를 이용한 물벼룩의 배양과 관련하여, 균주들만 단일 먹이원으로 급이하였다. 이때 상기 균주들이 각각 1 x $10^7$ CFU/㎖ 농도로 접종된 소형의 시료 바이알(40 ㎖)에 동일 시기의 성충에서 산출된 물벼룩 자충(neonate) 1 마리씩을 투하하고, 매일 물벼룩을 새로운 시료 바이알로 옮겨주면서 자연사할 때까지 산자수와 산란횟수 및 산란 간격을 측정하였으며, 20개의 병을 1개의 실험구

로 셋트화하여 실험을 수행하였다. 물벼룩 배양과정의 온도는 25℃, pH=7~8, 배양수는 지하수를 사용하였다.

표 1

[0022] 탐색 미생물의 급이에 따른 물벼룩의 생존율과 산란율

| 신규미생물의 종류 | GNU-106 | GNU-112 | GNU-135 | GNU-206 | GNU-222 |
|---|---|---|---|---|---|
| 생존기간(일) | 13.8 | 12.3 | 14.3 | 14.2 | 16.8 |
| 총 산자수(마리) | 123.7 | 158.0 | 135.2 | 123.0 | 123.0 |
| 1회 산란수(마리) | 16.2 | 18.5 | 17.2 | 15.7 | 15.6 |
| 산란 간격(일) | 1.5 | 1.3 | 1.4 | 1.3 | 1.3 |
| 총 산란횟수(회) | 7.5 | 8.3 | 7.8 | 9.2 | 9.2 |

[0023] **실시예 3: 균주의 동정**

[0024] 분리된 신규 미생물 균주 GNU-112를 분자생물학적 분석을 위하여 16S rDNA에 대한 염기서열을 분석한 결과 *Bosea minatitlanensis* AMX 51 균주(Quattara *et al.*, *J. Syst. Evol. Microbiol.* 53(Pt 5): 1247-1251, 2004, GenBank 등록번호: AF273081)의 16S rDNA 염기서열과 98%의 상동성을 가진 것으로 판정되었다(서열번호 1 및 도 2). 이들 결과를 바탕으로 분리균주를 *Bosea minatitlanensis* GNU-112 균주로 명명하였으며 이를 2012년 3월 15일자로 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁하여, 수탁번호 KCCM11265P를 부여받았다. 또한 분리된 신규 미생물 균주 GNU-222를 분자생물학적 분석을 위하여 16S rDNA에 대한 염기서열을 분석한 결과 *Bacillus firmus* IAM 12464 균주(Suzuki *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 115(1): 13-17, 1994, GenBank 등록번호: D16268)의 16S rDNA 염기서열과 99%의 상동성을 가진 것으로 판정되었다(서열번호 2 및 도 4). 이들 결과를 바탕으로 분리균주를 *Bacillus firmus* GNU-222 균주로 명명하였으며, 이를 2013년 2월 20일자로 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁하여, 수탁번호 KCCM11381P를 부여받았다.

[0025] **실시예 4: 보세아 속 및 바실러스 속 균주의 생물학적 효과 및 그의 급이에 따른 물벼룩 생산**

[0026] 본 발명의 일 실시예에 따라 실험 대상 균주와 종래의 물벼룩 사료로 사용되어오던 클로렐라(*Chlorella* sp.)를 혼합하여 실험하였고, 상기 실시예 2와 마찬가지로 40 ㎖ 바이알에 본 발명의 일 실시예에 따른 실험 대상 균주와 먹이인 클로렐라를 접종한 후, 동일 시기 성체로부터 수득된 물벼룩 자충 1마리를 투하한 후, 매일 새로운 시료 바이알로 물벼룩을 옮겨주는 방식으로 실험을 수행하였다.

[0027] 이 때, 시료 바이알에 접종한 클로렐라는 담수산 농축 클로렐라(대상, 대한민국)로서 50% 침전율 제품(500 g/L)을 사용하였으며, 10% 침전율을 갖도록 희석하여 스톡용액으로 사용하였으며, 배양액에 약 1/1000 수준으로 희석하여 세포수 기준으로 $1x10^6$ cells/㎖ 수준으로 접종하였다. GNU-112 및 GNU-222 균주는 실시예 2와 마찬가지로 바이알 당 각각 $1x10^7$ CFU/㎖ 또는 GNU-112 및 GNU-222 균주의 혼합접종의 경우에는 상기 두 균주 모두 $1x10^7$ CFU/㎖로 접종하였다.

[0028] 그 결과 표 2에서 보는 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 GNU-112 균주 및 GNU-222 균주 모두 비처리 대조구에 비해 생존기간 및 총 산자수 등에서 압도적인 우위를 나타냈다. 특히, GNU-112 균주를 급이하였을 경우 생존기간은 12.3일로 비처리 대조구에 비해 2.41배 증가하였고, 총산자수는 158 마리로 비처리 대조구에 비해 무려 9.4배 증가하였으며, 총 산란횟수는 8.3회로 비처리 대조구에 비해 3.95배 증가하였다. GNU-222 균주를 급이하였을 경우, 생존기간은 16.8일로 비처리 대조구에 비해 3.29배 증가하였고, 총 산자수는 123 마리로 비처리 대조구에 비해 7.32배 증가하였으며, 총 산란횟수는 9.3회로 4.43배 증가하였다. GNU-112 균주는 총 산자수 측면에서 유리하고 GNU-222 균주는 물벼룩의 생존기간 및 총 산란횟수 측면에서 유리함을 알 수 있었다.

[0029] 이에, 본 발명자들은 두 균주를 혼합하여 급이할 경우 물벼룩의 생산성에 어떤 영향이 있는 지 조사하였다. 흥미롭게도, 두 균주를 혼합하여 급이한 경우, 생존기간, 총 산자수 및 총 산란횟수 등 지표가 각 균주를 사용하였을 경우의 최상의 값으로 나타나, 더욱 이상적인 것으로 나타났다. 통상 두 가지 이상의 균주를 혼합 배양할 때 서로에 대한 경쟁으로 인해 음성효과(negative effect)가 나타나는 경우가 많은데, 본 발명에서 두 균주는 그러한 음성효과를 보이는 대신 서로의 단점을 보완해주는 보완효과를 나타냈다. 아울러, 종래에 물벼룩 사료로 사용되어온 클로렐라의 경우 급격한 증식으로 인해 수질을 오염시키기 때문에, 배양기간이 경과하면 배양수가 탁해져서 물벼룩의 생존에 악영향을 미치는 것으로 나타났다. 그러나, 본 발명의 일 실시예에 따른 균주를 추가하여 급이할 경우, 이들 균주 자체가 물벼룩의 먹이로 사용될 뿐만 아니라, 클로렐라의 증식에 따라 악화된 수

질을 정화하는 역할을 수행하여, 물벼룩의 생존기간을 증가시키는 것으로 확인됐다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 균주들은 물벼룩의 사료뿐만 아니라, 양식어 등의 양식을 위한 수조의 수질 개선을 위해 사용될 수 있다.

[0030] 이어, 본 발명자들은 본 발명의 균주를 물벼룩의 대량배양에도 동일하게 사용할 수 있는지 확인하기 위해 배양규모를 1톤으로 확대하여 본 발명의 균주의 물벼룩 생산성에 미치는 영향을 조사하였다. 이때 수조는 섬유강화플라스틱(FRP) 재질의 수조를 사용하였고, 배양기간 공급한 먹이는 500 g/L로 공급되는 담수산 농축 클로렐라(대상, 대한민국)를 1일 2-3회씩, 배양 기간 중 총량으로 5 kg(총 10 L)를 공급하였으며, GNU-112 균주 및 GNU-222 균주는 각각 $1x10^6$ ~ $1x10^7$ CFU/ton의 초기농도로 접종하였고, 초기농도가 낮은 경우($1x10^6$ CFU/ton)에 한하여 1회 동일 농도로 추가 접종을 하였다. 대조구(비처리 대조구)로는 실험 대상 균주를 제외한 클로렐라만 급이한 군을 사용하였다. 물벼룩 배양과정에서 온도는 25℃이고, 배양수로는 pH=7~8의 지하수만을 사용하였다. 자충은 동일시기의 성충에서 산출된 자충(neonate)를 사용하였다. 배양일수 연장 정도를 살펴보면서 기존의 회분방법(batch culture)을 사용하였다. 구체적으로 클로렐라만 급이한 비처리 대조구와 클로렐라와 함께 GNU-112 및 GNU-222 균주를 혼합 급이한 후 물벼룩의 생존기간과, 최종 생체중량을 확인하였다. 그 결과, 표 3에 나타난 바와 같이, 비처리 대조구의 경우 물벼룩의 생존기간은 72시간으로 종래기술과 같이 3일 밖에 생존하지 못하였고, 최종 생체중량은 2.8 kg이었던 반면, 본 발명의 일 실시예에 따른 GNU-112 균주 및 GNU-222 균주의 혼합 급이시 물벼룩의 생존기간은 96시간으로 종래기술보다 1일 증가된 생존기간을 나타냈고, 최종 생체중량은 4.6 kg으로, 생산성이 64.2%나 증가하는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 균주들은 물벼룩의 배양시 사료로 매우 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

*표 2*

[0031] 보세아 속과 바실러스 속의 혼합균주의 급이에 따른 물벼룩의 생존율과 산란율

| 신규미생물의 종류 | 비처리 대조구 | GNU-112 | GNU-222 | GNU-112 + GNU-222 |
|---|---|---|---|---|
| 생존기간(일) | 5.1 | 12.3 | 16.8 | 16.9 |
| 총 산자수(마리) | 16.8 | 158.0 | 123.0 | 158.3 |
| 1회 산란수(마리) | 8.0 | 18.5 | 15.6 | 18.7 |
| 산란 간격(일) | 1.5 | 1.3 | 1.3 | 1.3 |
| 총 산란횟수(회) | 2.1 | 8.3 | 9.2 | 9.3 |

*표 3*

[0032] 1 톤 규모에서의 보세아 속과 바실러스 속의 혼합균주의 급이에 따른 물벼룩의 생산

| 신규미생물의 종류 | 비처리 대조구 | GNU-112 + GNU-222 |
|---|---|---|
| 생존기간(시간) | 72 | 96 |
| 초기 접종량(kg) | 1.0 | 1.0 |
| 최종 생산량(kg) | 2.8 | 4.6 |

[0033] **제조예 1: 액상형태의 물벼룩 사료**

[0034] 보세아 미나티틀라넨시스 GNU-112 $1x10^9$ CFU/mℓ

[0035] 바실러스 퍼뮤스 GNU-222 $1x10^9$ CFU/mℓ

[0036] 식물성플랑크톤(클로렐라) 500 g/L

[0037] 상기 각 성분들은 별도로 포장되어 공급된 후, 개별적으로 배양액에 1/50 내지 1/1000 정도로 희석되어 사용될 수 있고, 처음부터 혼합물로 조성되어 공급된 후 배양액에 1/50 내지 1/1000 정도로 희석되어 사용될 수 있다.

[0038] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구 범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

## 수탁번호

[0039]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11265P

수탁일자 : 20120315

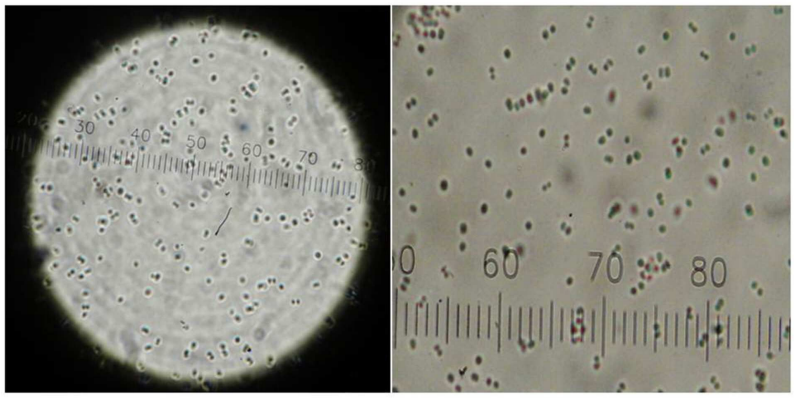
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11381P

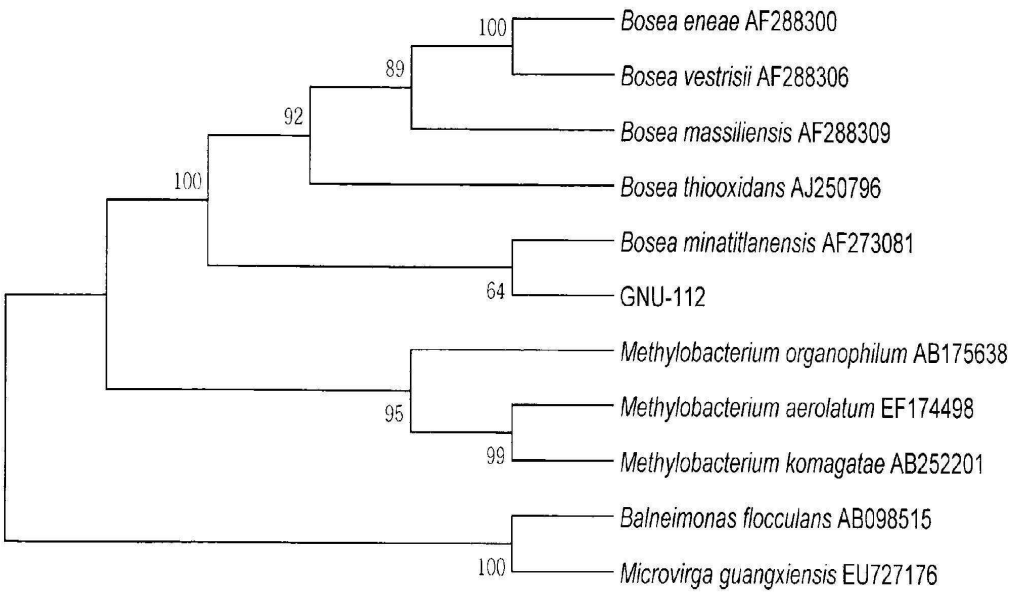
수탁일자 : 20130220

## 도면

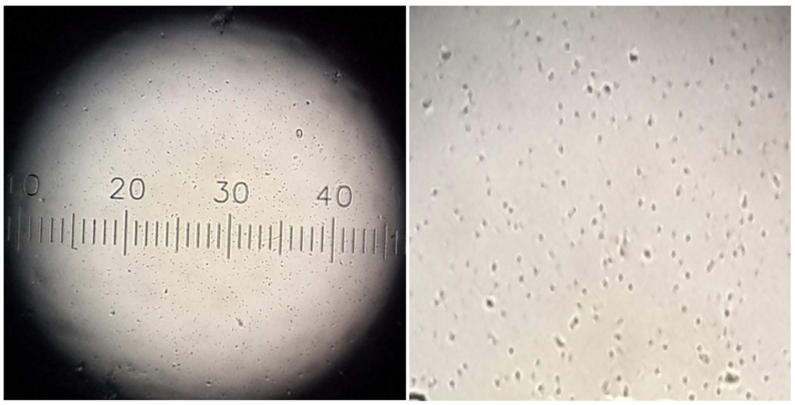
### 도면1



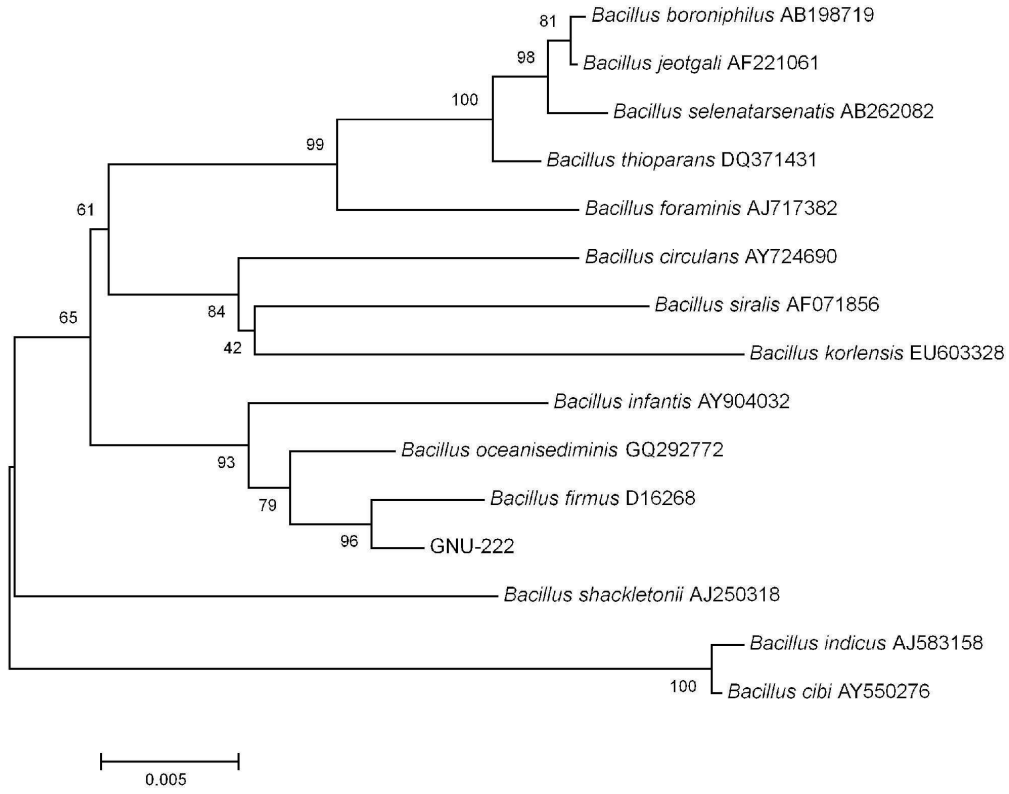
### 도면2



도면3




도면4




서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> A novel Bosea sp. bacterium and a novel Bacillus sp. bacterium and uses thereof

<130> PD13-0651

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 884

<212> DNA

<213> Bosea sp. GUN-112

<400> 1

taaatgacag tcgacgggca cttcggtgct agtggcagac gggtgagtaa cgcgtgggaa 60

cgtgcctttc ggttcggaat aatccaggga aacttggact aataccggat acgcccttcg 120

ggggaaagat ttatcgcaga aagatcggcc cgcgtctgat tagctagttg gtgaggtaaa 180

ggctcaccaa ggcgacgatc agtagctggt ctgagaggat gatcagccac attgggactg 240

agacacggcc caaactccta cgggaggcag cagtggggaa tattggacaa tgggcgcaag 300

cctgatccag ccatgccgcg tgagtgatga aggccttagg gttgtaaagc tcttttgtcc 360

gggaagataa tgactgtacc ggaagaataa gccccggcta acttcgtgcc agcagccgcg 420

gtaatacgaa gggggctagc gttgctcgga atcactgggc gtaaagggcg cgtaggcgga 480

cttttaagtc ggaggtgaaa gcccagggct caaccctgga attgccttcg atactgggag 540

tcttgagttc ggaagaggtt ggtggaactg cgagtgtaga ggtgaaattc gtagatattc 600

gcaagaacac cggtggcgaa ggcggccaac tggtccgaaa ctgacccctg acgcgcgaaa 660

gcgtggggag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgaatgcca 720

gccgttgggg agcttgctct tcagtggcgc agctaacgct ttaagcattc cgcctgggga 780

gtacggtcgc aagattaaaa ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca 840

tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgcagaac cttaccagct tttg 884

<210> 2

<211> 1395

<212> DNA

<213> Bacillus sp. GUN-222

<400> 2

tcaagcggac ggatgggagc ttgctccctg aagtcagcgg cggacgggtg agtaacacgt 60

gggcaacctg cctgtaagac tgggataact ccgggaaacc ggggctaata ccggataact 120

cttttcctca catgaggaaa agctgaaaga tggtttcggc tatcacttac agatgggccc 180

gcggcgcatt agctagttgg tgaggtaacg gctcaccaag gccacgatgc gtagccgacc 240

tgagagggtg atcggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc 300

agtagggaat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgcgt gagtgatgaa 360

ggttttcgga tcgtaaaact ctgttgtcag ggaagaacaa gtaccggagt aactgccggt 420

accttgacgg tacctgacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata 480

cgtaggtggc aagcgttgtc cggaattatt gggcgtaaag cgcgcgcagg cggttcctta 540

agtctgatgt gaaagccccc ggctcaaccg gggagggtca ttggaaactg gggaacttga 600

gtgcagaaga gaagagtgga attccacgtg tagcggtgaa atgcgtagag atgtggagga 660

acaccagtgg cgaaggcgac tctttggtct gtaactgacg ctgaggcgcg aaagcgtggg 720

gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtta 780

gagggtttcc gcccttta gctgcagcaa acgcattaag cactccgcct ggggagtacg 840

gccgcaaggc tgaaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg 900

tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caggtcttga catctcctga caaccctaga 960

gatagggcgt tcccttcgg gggacaggat gacaggtggt gcatggttgt cgtcagctcg 1020

tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac ccttgatctt agttgccagc 1080

attcagttgg gcactctaag gtgactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg 1140

tcaaatcatc atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga tggtacaaag 1200

ggctgcaaga ccgcgaggtt aagcgaatcc cataaaacca ttctcagttc ggattgcagg 1260

ctgcaactcg cctgcatgaa gccggaatcg ctagtaatcg cggatcagca tgccgcggtg 1320

aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca cgagagtttg taacacccga 1380

agtcggtggg gtaac 1395