(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월12일
(11) 등록번호 10-1644085
(24) 등록일자 2016년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 61/00 (2014.01) *C02F 3/34* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 61/00 (2013.01)
A01K 61/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0090942
(22) 출원일자 2015년06월26일
심사청구일자 2015년06월26일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140074451 A*
P.S. Shyne Anand외 7, Effect of dietary supplementation of biofloc on growth performance and digestive enzyme activities in Penaeus monodon, Aquaculture 418~419(2014)108~115, 2013.10.3.(온라인 공개)*
KR100624783 B1
KR1020140119850 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
인천광역시 (인천광역시수산자원연구소장)
인천 옹진군 영흥면 영흥남로247번길 313,
(72) 발명자
강주찬
부산광역시 수영구 광안해변로 100, 213동 206호 (남천동, 비치아파트)
구자근
인천광역시 남동구 논고개길 17, 1108동 1804호
(74) 대리인
위병갑

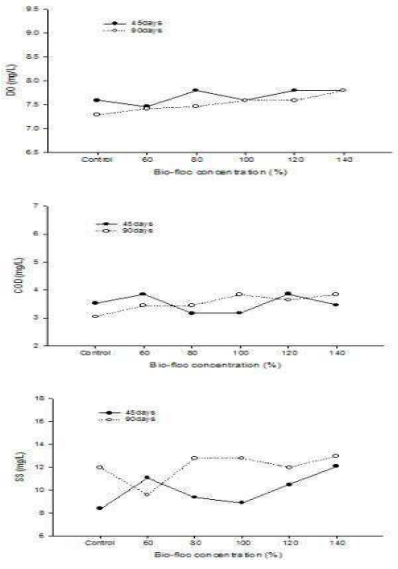
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 이원섭

(54) 발명의 명칭 **바이오 플락 양식 시스템용 미생물 제제**

(57) 요 약

본 발명은 바이오 플락 양식 시스템용 미생물 제제에 관한 것이다. 본 발명의 미생물 제제는 새우의 면역 관련 유전자가 월등히 증가하고, 새우의 성장 효과가 우수할 뿐만 아니라 생물에 의해 만들어진 부산물을 분해하고 분해된 부산물을 다시 생물양식에 필요한 양분으로 재사용될 수 있어 바이오플락 양식 시스템에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C02F 3/34 (2013.01)
C12N 1/20 (2013.01)
C12N 2500/38 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 R0000914
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 수산실용화기술개발사업
연구과제명 한국형 축제식바이오플락 새우양식 시스템 표준공정개발
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교
연구기간 2014.12.18 ~ 2015.12.17
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

해수 679.4L, 담수 380L, 당밀 20L, EM균(Effective microorganisms) 20L, 광합성 세균 0.5L, 비타민 0.1L 및 새우 양식장 세균을 유효성분으로 포함하는, 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제에 있어서, 50톤의 해수에 1L의 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제의 농도를 100 부피% 기준으로 잡았을 때 120 부피%의 농도로 혼합되어 있는 것을 특징으로 하는, 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 EM균은 방선균, 사상균, 누룩 곰팡이, 바실러스로 구성되는 호기성 미생물, 유산균 및 효모균으로 구성되어지는 통성혐기성 미생물 중 하나 이상을 포함하고, 광합성 세균은 로도박터균(Rhodobacter)인 것을 특징으로 하는, 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 새우 양식장 세균은 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실러스 메선테리쿠스(*Bacillus mesentericus*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 엔테로코커스 에시움(*Enterococcus aecium*), 비브리오 알지오리티쿠스(*Vibrio algiolyticus*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 아시네토박터 우리에(*Acinetobacter ureae*), 만헤미아 헤몰브티카(*Mannheimia haemolvtica*), 수도모나스 수투체리(*Psudomonas stutzeri*), 파스튜렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*) 및 스트렙토코커스(*Streptococcus sp.*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 바이오 플락(Bio floc) 시스템용 미생물 제제.

청구항 4

삭제

청구항 5

(a) 락토바실러스 균(*Lactobacillus sp.*) 18 ~ 22L, 바실러스 균(*Bacillus sp.*) 18 ~ 22L, 당밀 18 ~ 22L, 해수 550 ~ 650L 및 담수 350 ~ 450L을 혼합하여 35 ~ 40℃의 온도에서 10 ~ 20일간 배양하는 단계;

(b) 로도박터 균(*Rhodobactor sp.*) 0.3 ~ 0.7L, 해수 80 ~ 120L 및 비타민 0.08 ~ 0.12L을 혼합하여 35 ~ 40℃의 온도에서 1 ~ 5일간 배양하는 단계; 및

(c) 상기 (a) 및 (b) 단계에서 얻어진 배양물을 새우 양식장 세균과 혼합하는 단계를 포함하는, 새우 양식을 위한 바이오 플락(Bio floc) 시스템용 미생물 제제 제조방법에 있어서, 상기 (b)단계의 새우 양식장 세균은 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실러스 메선테리쿠스(*Bacillus mesentericus*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 엔테로코커스 에시움(*Enterococcus aecium*), 비브리오 알지오리티쿠스(*Vibrio algiolyticus*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 아시네토박터 우리에(*Acinetobacter ureae*), 만헤미아 헤몰브티카(*Mannheimia haemolvtica*), 수도모나스 수투체리(*Psudomonas stutzeri*), 파스튜렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*) 및 스트렙토코커스(*Streptococcus sp.*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이며, 50톤의 해수에 1L의 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제의 농도를 100 부피% 기준으로 잡았을 때 120 부피%의 농도로 혼합되어 있는 것을 특징으로 하며, 상기 방법은 물과 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제를 50,000:1의 부피비로 희석하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 새우 양식을 위한 바이오 플락(Bio floc) 시스템용 미생물 제제 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제5항의 방법으로 제조된 새우 양식을 위한 바이오 플락(Bio floc) 시스템용 미생물 제제를 새우에 공급하는 것을 특징으로 하는 새우 양식 방법에 있어서, 상기 새우는 20 ~ 30℃의 온도에서, 염도 20 내지 40 ‰의 해수에서 생장시키는 것을 특징으로 하는 새우 양식 방법.

청구항 8

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이오 플락 양식 시스템용 미생물 제제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전 세계적으로 식량 위기에 대응하여 양식업에 대한 관심이 집중되고 있으며, 양식업은 수산 식량 공급의 주요 원천으로 그 역할이 높아지고 있다. 최근 양식장은 어류의 대량 생산 기반을 갖추고 있고, 양식장 내의 사육수의 순환 및 배수에 관한 방식 및 장치와 관련한 기술 개발이 이루어지고 있다.

[0003] 육상에서 양식하는 경우, 사육수를 지속적으로 환수하여야 하며, 양식생물의 사육에 사용된 사육수는 사육생물이 배설한 유기물, 사료찌꺼기 등이 혼합되어 있어 이를 재사용하기 어렵다. 육상수조식이나 노지 등으로 조성된 양식장은 지속적으로 새로운 물을 공급하고 배출하는 방식으로 사육과정에서 발생하는 사육수는 시간이 경과함에 따라 사료 및 생물이 배출하는 노폐물 및 주변 환경으로부터 영양염인 질산염이나 인산염 등이 유입되어 발생되는 부영양화로 인해 수질이 악화된다.

[0004] 이를 처리하기 위해서는 많은 비용이 수반되며, 실제적으로 사육폐수의 처리시설을 정상적으로 갖추지 못하고 그대로 하천 및 지하로 배출되어 환경오염을 야기시키고 있다.

[0005] 한편 폐기물을 해양에 투입 처분하는 것은 원래 바람직한 방법은 아니지만, 폐기물관리법 및 해양오염방지법 등에서 기준을 정하여 제한적으로 실시가 인정되고 있다. 무분별한 투기 행위를 막기 위해 국제해사기구(International Maritime Organization:IMO)를 중심으로 해양오염 방지대책을 위한 조약 책정 등의 국제적인 협력이 적극적으로 추진되고 있고 이와 함께 각국에서 해양오염 대책이 정비되어 왔다. 대표적인 국제협약으로는 1972년 11월 3일 체결되고 1975년 8월에 발효된 '폐기물 및 기타 물질의 투기에 의한 해양오염 방지에 관한 협약(Convention on the Prevention of Marine Pollution by Dumping of Wastes and Other Matters)'(일명 런던협약)이 있다.

[0006] 정부는 런던협약에 따라 2012년 1월부터 하수 오니와 가축분뇨, 2013년 1월부터 음폐수(음식물 쓰레기 폐수), 분뇨, 분뇨오니, 2014년부터 산업폐수 및 폐수 오니에 대해 해양배출을 금지하였음에도 불구하고 현재 각 지자체에서는 이를 대비한 방책이 수립되지 않은 것이 현실이다.

[0007] 따라서 생물이 만들어 내는 부산물을 포함한 사육수를 배수하지 않고 사육수 안에 존재하는 단백질, 탄수화물, 지질 등과 같은 유기물을 미생물의 접종, 배양으로 미생물에 의해 자연적으로 분해하고, 분해된 부산물을 다시 생물 양식에 필요한 양분으로 사용하도록 하는 친환경적으로 양식생물을 연속적으로 생산할 수 있는 방법이 필요하나 아직 그 연구가 미미한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1270631호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1363623호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여 다양한 연구를 진행하던 중 EM균(Effective microorganisms), 광합성 세균 및 새우 양식장 세균을 새우의 양식에 사용 시 수질 개선, 새우의 성장 및 면역 관련 유전자가 월등히 증가됨을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명은 해수 679.4L, 담수 380L, 당밀 20L, EM균(Effective microorganisms) 20L, 광합성 세균 0.5L, 비타민 0.1L 및 새우 양식장 세균을 유효성분으로 포함하는, 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제에 있어서, 50톤의 해수에 1L의 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제의 농도를 100 부피% 기준으로 잡았을 때 120 부피%의 농도로 혼합되어 있는 것을 특징으로 하는, 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제를 제공하는 데 그 목적이 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 (a) 락토바실러스 균(*Lactobacillus sp.*) 18 ~ 22L, 바실러스 균(*Bacillus sp.*) 18 ~ 22L, 당밀 18 ~ 22L, 해수 550 ~ 650L 및 담수 350 ~ 450L을 혼합하여 35 ~ 40℃의 온도에서 10 ~ 20일간 배양하는 단계; (b) 로도박터 균(*Rhodobactor sp.*) 0.3 ~ 0.7L, 해수 80 ~ 120L 및 비타민 0.08 ~ 0.12L을 혼합하여 35 ~ 40℃의 온도에서 1 ~ 5일간 배양하는 단계; 및 (c) 상기 (a) 및 (b) 단계에서 얻어진 배양물을 새우 양식장 세균과 혼합하는 단계를 포함하는, 새우 양식을 위한 바이오 플락(Bio floc) 시스템용 미생물 제제 제조방법에 있어서, 상기 (b)단계의 새우 양식장 세균은 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실러스 메선테리쿠스(*Bacillus mesentericus*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 엔테로코커스 에시움(*Enterococcus aecium*), 비브리오 알지오리티쿠스(*Vibrio algiolyticus*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 아시네토박터 우리에(*Acinetobacter ureae*), 만헤미아 헤몰브티카(*Mannheimia haemolvtica*), 수도모나스 수투체리(*Psudomonas stutzeri*), 파스튜렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*) 및 스트렙토코커스(*Streptococcus sp.*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상이며, 50톤의 해수에 1L의 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제의 농도를 100 부피% 기준으로 잡았을 때 120 부피%의 농도로 혼합되어 있는 것을 특징으로 하며, 상기 방법은 물과 바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제를 50,000:1의 부피비로 희석하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 새우 양식을 위한 바이오 플락(Bio floc) 시스템용 미생물 제제 제조방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0012] 나아가 본 발명은 상기 방법으로 제조된 미생물 제제를 새우에 공급하는 것을 특징으로 하는 새우 양식 방법을 제공하는 데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 EM균(Effective microorganisms), 광합성 세균 및 새우 양식장 세균을 유효성분으로 포함하는, 바이오 플락(Bio floc) 양식 시스템용 미생물 제제을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 EM균은 방선균, 사상균, 누룩 곰팡이, 바실러스로 구성되는 호기성 미생물, 유산균 및 효모균으로 구성되어지는 통성혐기성 미생물 중 하나 이상을 포함하고, 광합성 세균은 로도박터균(Rhodobacter)일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 새우 양식장 세균은 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실러스 메선테리쿠스(*Bacillus mesentericus*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 엔테로코커스 에시움(*Enterococcus aecium*), 비브리오 알지오리티쿠스(*Vibrio algiolyticus*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 아시네토박터 우리에(*Acinetobacter ureae*), 만헤미아 헤몰브티카(*Mannheimia haemolvtica*), 수도모나스 수투체리(*Psudomonas stutzeri*), 파스튜렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*) 및 스트렙토코커스(*Streptococcus sp.*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미생물 제제는 새우, 돌돔, 양만(뱀장어), 우럭(조피볼락), 전어, 숭어, 농어, 참돔, 감성돔, 황복, 민어, 다금바리, 능성어 및 꽃게를 포함하는 어종의 양식에 사용할 수 있다.

[0017] 또한, (a) 락토바실러스 균(*Lactobacillus sp.*) 18 ~ 22L, 바실러스 균(*Bacillus sp.*) 18 ~ 22L, 당밀 18 ~ 22L, 해수 550 ~ 650L 및 담수 350 ~ 450L을 혼합하여 35 ~ 40℃의 온도에서 10 ~ 20일간 배양하는 단계;

[0018] (b) 로도박터 균(*Rhodobactor sp.*) 300 ~ 700mL, 해수 80 ~ 120L 및 비타민 80 ~ 120mL을 혼합하여 35 ~ 40℃의 온도에서 1 ~ 5일간 배양하는 단계; 및

[0019] (c) 상기 (a) 및 (b) 단계에서 얻어진 배양물을 혼합하는 단계를 포함하는, 바이오 플락(Bio floc) 시스템용 미생물 제제 제조방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 물과 미생물 제제를 50,000:1의 부피비로 희석하는 단계를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0021] 나아가, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 미생물 제제를 새우에 공급하는 것을 특징으로 하는 새우 양식 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 새우는 20 ~ 30℃의 온도에서, 염도 20 내지 40 ‰의 해수에서 생장시킬 수 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 미생물 제제는 새우의 면역 관련 유전자가 월등히 증가하고, 새우의 성장 효과가 우수할 뿐만 아니라 생물에 의해 만들어진 부산물을 분해하고 분해된 부산물을 다시 생물양식에 필요한 양분으로 재사용될 수 있어 바이오플락 양식 시스템에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 바이오플락 농도에 따른 사육수의 수질변화, DO, COD 및 SS의 변동을 나타낸 결과이다.

도 2는 바이오플락 농도에 따른 사육수의 영양염류, NO_3, NO_2, NH_4, 및 PO_4의 변동을 나타낸 결과이다.

도 3은 Bio-floc 농도 100 부피%와 150 부피%를 5일과 10일간 방치 한 후에 *Bacillus sp.*와 *Lactobacillus sp.*의 균수를 조사한 결과이다.

도 4는 Bio-floc 농도 100 부피%와 150 부피% 실험구를 5일과 10일간 방치 한 후에 *Rhodobactor sp.*와 총균수를 조사한 결과이다.

도 5는 Bio-floc 농도 별 새우의 일일전장성장량 및 일일체중성장량을 측정한 결과이다.

도 6은 Bio-floc 처리에 따른 대하의 비특이적 면역능, ProPhenoloxiase (proPO), Lysozyme (LYS), Serine Proteinase (SP)를 조사한 결과이다.

도 7은 바이오플락에 노출된 대하의 간췌장 내 카탈라아제 활성을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 최근 사료첨가제에 항생제 사용 규제 강화에 의해 미생물 제제의 수요와 공급이 증가하고 있다. 그러나 양식어의 사료에 사용되는 미생물 제제는 사람이나 가축에 사용되는 최적발육온도 37℃의 미생물을 이용함으로서 15℃~25℃에서 생육하 는 양식어에는 부적절하며 특히 해수 양식어의 경우 높은 염농도에도 견딜 수 없는 실정이다.

[0026] 저온·고염에서 생육 가능한 미생물 제제의 개발은 어류의 항병력 증진과 발육 및 소화를 촉진시켜 어가 소득수준 향상에 기여할 수 있고, 항생제 남용을 막을 수 있어 항생제 수입대체에 따른 외화낭비를 막을 수 있다는 점에서 그 중요성이 매우 크다.

[0027] 한편, 지난 몇십년 동안 수산양식은 세계에서 가장 빠르게 급증하여 식량 생산에서 막대한 역할을 하고 있으며 특히 새우양식은 매년 16.8%씩 증가하고 있다. 그러나, 상기와 같은 양식량의 증가에도 불구하고 새우질병에 따른 새우 손실액이 전 세계적으로 30억 달러에 이르고 있어 그 손해가 어마어마한 실정이다.

[0028] 이에 본 발명자들은 새우 성장량 및 생산량을 효과적으로 증대시킬 수 있는 방법을 연구하던 중 EM균(Effective microorganisms), 광합성 세균 및 새우 양식장 세균을 새우의 양식에 적용하였으며, (a) 락토바실러스 균(*Lactobacillus sp.*) 18 ~ 22L, 바실러스 균(*Bacillus sp.*) 18 ~ 22L, 당밀 18 ~ 22L, 해수 550 ~ 650L 및 담

수 350 ~ 450L을 혼합하여 35 ~ 40℃의 온도에서 10 ~ 20일간 배양하는 단계; (b) 로도박터 균(*Rhodobactor sp.*) 300 ~ 700mL, 해수 80 ~ 120L 및 비타민 80 ~ 120mL을 혼합하여 35 ~ 40℃의 온도에서 1 ~ 5일간 배양하는 단계; 및 (c) 상기 (a) 및 (b) 단계에서 얻어진 배양물을 혼합하는 단계를 포함하는, 바이오 플락(Bio floc) 시스템용 미생물 제제를 제조하였다.

[0029] 또한, 본 발명의 방법으로 제조된 미생물 제제가 실제 새우의 양식에 사용 시 새우의 성장 및 수질 개선 효과가 있는지를 조사하였는데, 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 방법으로 제조된 바이오플락 농도에 따른 사육수의 부유물질 및 영양염류 정도를 확인한 결과, 본 발명의 바이오플락 미생물 제제를 처리 시 부유물질 및 영양염류가 대조군에 비하여 감소하였음을 알 수 있었다(도 1 및 2 참조).

[0030] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, Bio-floc을 투입 후 45일, 90일 후에 새우의 일일전장성장량, 일일체중성장량을 측정한 결과, 45일간 사육한 대하의 체중 변화는 bio-floc 농도가 100 부피% 이상일 때, 유의하게 높은 성장률을 보였으며, 140 부피%보다는 120 부피%일 때 가장 높은 성장률을 보였다. 90일간 사육한 대하의 체중변화도 100 부피% 이상의 bio-floc 농도에서 유의하게 높은 성장률을 보였으며, 120 부피%일 때 가장 높은 성장률을 보였다. 대하의 체장 성장률도 체중 성장률과 유사하게 100 부피% 이상의 농도에서 유의하게 증가하였으며, 120 부피%에서 최대의 성장률을 보임을 알 수 있었다(도 5 참조).

[0031] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, Bio-floc 처리에 따른 대하의 비특이적 면역능, ProPhenoloxiase (proPO), Lysozyme (LYS), Serine Proteinase (SP)를 조사한 결과, ProPhenoloxiase (proPO) 활성은 대조구와 비교하여 80 부피%와 100 부피% bio-floc 농도구에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았으나, 60 부피% 구간에서 유의한 증가를 보였고, 120 부피%과 140 부피%구간에서 60 부피% 구간보다 2배 더 높은 활성을 보였다. Lysozyme (LYS) 활성은 대조구와 비교하여 bio-floc를 처리한 구간에서 증가하는 경향을 보였으나, 120부피%와 140부피% 구간에서만 유의성이 인정되었다. 또한, Serine Proteinase(SP) 활성은 140부피%의 bio-floc 구간에서만 대조구에 비하여 유의하게 높은 값을 보였으나, 그 외 농도 구간에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다(도 6 참조).

[0032] 상기의 결과로 미루어보아 상기 방법으로 제조된 바이오플락 미생물 제제는 수질 개선, 새우의 성장 및 면역관련 유전자를 월등히 증가시킬 수 있는 효과가 있다.

[0033] 따라서, 본 발명은 EM균(Effective microorganisms), 광합성 세균 및 새우 양식장 세균을 유효성분으로 포함하는, 바이오 플락(Bio floc) 양식 시스템용 미생물 제제를 제공한다.

[0034] 본 발명에서 상기 'EM균'은 방선균, 사상균, 누룩 곰팡이, 바실러스로 구성되는 호기성 미생물, 유산균 및 효모균으로 구성되어지는 통성혐기성 미생물 중 하나 이상을 포함할 수 있으며, 보다 구체적으로는 락토바실러스균(*Lactobacillus sp.*) 및 바실러스 균(*Bacillus sp.*)일 수 있다.

[0035] 본 발명에서 상기 '광합성 세균'은 로도박터균(Rhodobacter)일 수 있고, 상기 '새우 양식장 세균'은 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실러스 메선테리쿠스(*Bacillus mesentericus*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 엔테로코커스 에시움(*Enterococcus aecium*), 비브리오 알지오리티쿠스(*Vibrio algiolyticus*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 아시네토박터 우리에(*Acinetobacter ureae*), 만헤미아 헤몰브티카(*Mannheimia haemolvtica*), 수도모나스 수투체리(*Psudomonas stutzeri*), 파스튜렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*) 및 스트렙토코커스(*Streptococcus sp.*)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 미생물 제제는 새우, 돌돔, 양만(뱀장어), 우럭(조피볼락), 전어, 숭어, 농어, 참돔, 감성돔, 황복, 민어, 다금바리, 능성어 및 꽃게를 포함하는 어종의 양식에 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나, 가장 바람직하게는 새우의 양식에 사용할 수 있다.

[0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] **<실시예 1>**

[0039] **실험환경 및 본 발명의 바이오플락용 미생물 제제 제조방법**

[0040] 본 발명에서 사용한 실험새우는 인천수산연구소에서 분양 받은 대하, *Fenneropenaeus chinensis*로 1주간 순치시킨 후 전장 1.5cm내외, 평균체중 0.00575g의 치하를 사용하였다. 선별된 개체는 400× 400× 600mm의 원형 수조 내 해수 180L를 채워 입식하였고 모래를 3cm가량 채워 넣었다. 실험을 위한 외부온도는 24.5± 0.5℃로 일정하게 유지하였으며, 실험에 사용된 해수의 수질은 표 3과 같다.

[0041] 본 발명의 바이오플락(Bio-floc)용 미생물 제제 제조를 위하여 EM균(Effective Microorganisms), 광합성 세균(로도박터 균) 및 양식장에 존재하는 세균을 사용하였다. 이를 위한 구체적인 미생물 종류 및 배양 조건 등은 표 1에 기재되어 있으며, 새우 양식장 수질에서 분리된 12종의 세균은 표 2와 같다.

[표 1] 본 발명의 바이오플락 제조에 사용된 미생물 및 배양 조건

원료	구성	배양조건	배양기간
EM (Effective Microorganisms)	고초균 (Bacillus sp.) *Bacillus substilis* , *Bacillus licheniformis* 유산균 (*Lactobacillus* sp.)	해수(580 L) + 담수(380 L) + 당밀(20 L) + EM (20 L)	14일
광합성 세균	Rhdobactor sp.	해수(99.4 L) + 광합성세균(0.5 L) + 비타민(0.1 L)	3일
양식장 세균	*Bacillus* 3종 *Vibrio* 2종 *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus aecium* 등 총 12종	각각의 균주의 특성에 맞게 배양	

[0042]

[표 2] 새우 양식장 수질에서 분리된 세균

순번	Species
1	*Bacillus licheniformis*
2	*Bacillus megaterium*
3	*Bacillus mesuntericus*
4	*Lactobacillus acidophilus*
5	*Enterococcus aecium*
6	*Vibrio algiolyticus*
7	*Vibrio parahaemolyticus*
8	*Acinetobacter ureae*
9	*Mannheimia haemolytica*
10	*Psudomonas stutzeri*
11	*Pasteurella multocida*
12	*Streptococcus* sp.
합계	**총 12종**

[0043]

[0044] 삭제

[0045] 본 발명의 바이오플락용 미생물 제제 제조방법을 구체적으로 설명하면, 맨 먼저 락토바실러스 균(*Lactobacillus sp.*) 18 ~ 22L, 바실러스 균(*Bacillus sp.*) 18 ~ 22L, 당밀 20L, 해수 580L 및 담수 380L를 혼합하여 2주간 37℃의 온도에서 배양하는 방법으로 1차 미생물 제제를 얻었다. 또한, 로도박터(*Rhodobactor sp.*; (주)두산에코비즈넷, Korea)균 500mL, 해수 99.4L 및 비타민 100mL를 혼합하여 3일간 배양하는 방법으로 2차 미생물 제제를 얻었다.

상기 1차 미생물 제제 및 2차 미생물 제제를 10:1의 부피비로 혼합한 다음 표 2에 개시되어 있는 새우 양식장에 존재하는 세균을 혼합하여 새우 양식을 위한 바이오플락용 미생물 제제를 제조하였다.

상기 방법으로 제조된 새우 양식을 위한 바이오플락용 미생물 제제의 농도가 0, 60, 80, 100, 120, 140 부피%가 되도록 설정하였으며 이에 대한 기준으로 50톤의 해수에 1L의 새우 양식을 위한 바이오플락용 미생물 제제의 농도를 100 부피%로 기준을 잡았다.

[표 3] 본 발명 실험에 사용된 해수의 수질 조건

Item	Value
온도(℃)	24.5±0.5
pH	8.0±0.5
염도 (‰)	30.5±1.0
DO (mg/L)	7.1±0.3
COD (mg/L)	1.13±0.1
SS (mg/L)	1.22±0.5
NO_2^--N (㎍/L)	1.3±0.3
NO_3^--N (㎍/L)	11.48±1.0
NH_4^+-N (㎍/L)	12.5±0.7
PO_4^--P (㎍/L)	1.5±0.5

[0046]

[0047] **<실시예 2>**

[0048] **수질분석**

[0049] 본 발명자들은 국토해양부에서 정한 해양환경공정시험기준(2010.12.8 개정)에 따라 수질을 분석하였으며 각 실험에 따르는 방법들은 하기와 같다.

[0050] **<2-1> 용존산소(DO) 분석**

[0051] 염화망간과 알칼리 요오드화나트륨용액을 첨가하여 수산화망간 (II)을 침전시켜 용존산소량에 대응하여 유리되어진 요오드를 티오황산나트륨으로 적정하여 정량하였다.

[0052] **<2-2> 화학적 산소 요구량(COD) 분석**

[0053] 산화제인 과망간산칼륨을 넣은 후 60분간 가열 반응하여 화학적으로 산화시킬 수 있는 물질을 산화시키며 티오황산나트륨으로 적정하였다. 이때 소비되는 산소량을 측정하는 것으로 유기물의 양을 간접적으로 측정하였다.

[0054] **<2-3> 부유물질 측정**

[0055] 잘 혼합된 시료를 유리섬유여과지(GF/F filter paper, 공경 0.7㎛)에 여과한 후 105 ~ 110℃에 항량으로 건조하여 여과지의 증가된 무게를 부유물질의 양으로 하였다.

[0056] **<2-4> 총질소(Total-N)**

[0057] 아질산성 질소는 술퍼닐아미드와 반응하여 디아조늄 이온을 형성한 후 나프틸에틸렌디아미드와 반응하여 아조화합물을 생성하게 되는데 이 때 발색된 시료를 분광광도계를 이용하여 흡광도 543㎚에서 측정하였다.

[0058] 질산성 질소는 해수 중에서 질소계 화합물 중 열역학적으로 비교적 안정화 되어있으므로 구리 촉매로 처리된 카드뮴 환원관을 이용하여 아질산성 질소로 환원시킨 후 아질산성 질소의 측정원리에 의하여 측정하였다.

[0059] **<2-5> 암모니아성 질소(NH^{4+}) 분석**

[0060] 해수중의 암모니아(NH^{4+})는 염기성 차아염소산용액과 산화 반응하여 모노크롤아민을 생성하며 이를 페놀과 촉매인 니트로프러시드, 차아염소산에 의해 인도페놀을 형성시켜 발색된 시료를 분광광도계를 이용하여 흡광도 640nm에서 측정하였다.

[0061] **<2-6> 인산 인(PO_4^--P) 분석**

[0062] 인산 인은 산성조건에서 인산몰리브덴산암모늄과 주석산안티몬칼륨과 반응하여 인산몰디브덴산 착화합물을 형성하는데 이는 아스코르브산에 의해 환원되어 푸른색의 용액을 생성하게 된다. 이렇게 발색된 시료를 분광광도계를 이용하여 흡광도 885nm에서 측정하였다.

[0063] 본 발명자들은 상기와 같이 측정한 바이오플락 농도에 따른 사육수의 수질변화, DO, COD 및 SS의 변동을 도 1에 나타내었다. 용존산소량 (DO), 화학적산소요구량 (COD)는 Bio-floc 농도와 시간에 따른 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 부유물질 (SS)은 실험시작 45일째, bio-floc 농도 60부피% 구간을 제외하고는 bio-floc 농도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였으나, 90일 째는 bio-floc 농도 60부피% 구간을 제외하고는 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

[0064] 또한, 바이오플락(Bio-floc) 농도에 따른 사육수의 영양염류, NO_3, NO_2, NH_4, 및 PO_4의 변동을 도 2에 나타내었다.

[0065] 사육수의 영양염류는 시간이 지남에 따라 대조구와 비교하여 Bio-floc을 처리한 구간에서 감소되는 경향을 나타내었다. 그러나 Bio-floc 농도 구간에 따른 유의적인 변화는 관찰되지 않았다.

[0066] **<실시예 3>**

[0067] **미생물 조성**

[0068] 바이오플락의 농도가 100, 150 구간에 5일, 10일 후의 미생물 조성에 따라 각각의 수조에서 물을 채수하여 10배씩 희석하여 각 단계별로 1ml씩 하기와 미생물 종류에 따라 배지에 분주하여 35℃의 온도에서 48시간 후 집락의 수를 조사하였다.

[0069] **<3-1> 전세균수 측정**

[0070] 전세균수는 1% NaCl, Nutrient Agar(NA) 23g을 1L 3차 증류수에 넣어 녹인 후 121℃의 온도에서 15분간 멸균기에서 고압 멸균 시켰다. 그 후 페트리디시(petridish)에 부운 후 각 농도별의 시료를 단계 희석하여 집락의 수를 확인하였다.

[0071] **<3-2> 락토바실러스 균(*Lactobacillus sp.*)**

[0072] 락토바실러스 균은 MRS Broth 55g, 1.7% Agar, 1% NaCl을 1L 3차 증류수에 넣어 녹인 후 121℃의 온도에서 15분간 멸균기에서 고압 멸균 시켰다. 45 ~ 50℃ 정도 식힌 후 12.5ml Egg Yolk Enrichment 50%와 4.1ml 폴리믹신을 넣어준 후 잘 섞었다. 그 뒤 페트리디시에 부운 후 각 농도별의 시료를 단계 희석하여 집락의 수를 확인하였다. API(E&50CHB&CHL) 등의 생화학적 테스트를 통하여 세균을 확인하였다.

[0073] **<3-3> 바실러스 균(*Bacillus sp.*)**

[0074] 바실러스 균은 MYP(Mannitol-Egg yolk-polymyxin) Agar 46g에 1% NaCl을 첨가하여 3차 증류수 1L에 넣어 녹인 후, 121℃에서 15분간 autoclave에 고압 멸균 시켰다. 45~50℃ 정도 식힌 후 12.5mℓ Egg yolk enrichment 50%

와 4.1㎖ 폴리믹신(polymyxin)을 넣어 준 후 잘 섞어 주었다. 이를 페트리디시(petridish)에 부어 평판 배지를 제조하고, 이 배지에 단계 희석된 각 농도별의 시료를 배양하여 집락의 수를 확인하였다. API (E & 50CHB 부피% CHL) 등의 생화학적 검사를 통하여 세균을 확정하였다.

[0075] **<3-4> 로도박터(*Rhodobactor sp.*)**

[0076] 로도박터 균의 배양을 위한 배지 제조과정은 다음과 같다. Malate basal broth에 1.7% Agar, 1% NaCl을 1L의 3차 증류수에 넣어 녹인 후, 121℃에서 15분간 멸균기에 고압 멸균 시켰다. 이를 페트리디시(petridish)에 부어 평판 배지를 제조하고, 이 배지에 단계 희석된 각 농도별의 시료를 배양하여 집락의 수를 확인하였다. (주)두산 에코비즈넷을 통하여 세균을 확정하였다.

[0077] 상기와 같이 실험을 진행한 결과, Bio-floc 농도 100부피%와 150부피%를 5일과 10일간 방치 한 후에 *Bacillus sp.*와 *Lactobacillus sp.*의 균수를 조사한 결과는 도 3과 같다. Bio-floc 제조한 당시의 *Bacillus sp.*의 균수는 100부피%와 150부피%에서 5~7.8 × 10^8 cfu/ml의 수치를 보였으나, 5일 후에는 확연하게 그 수가 감소하여 1.5~3.5 × 10^8 cfu/ml의 수치를 보였다. 10일 후에는 이마저도 현저하게 감소하여 거의 균을 찾아 볼 수 없었다.

[0078] Bio-floc 제조한 당시의 *Lactobacillus sp.*의 균수는 100부피%와 150부피%에서 4~6 × 10^7 cfu/ml의 수치를 보였으나, 5일 후에는 확연하게 그 수가 감소하여 0.5~0.8 × 10^7 cfu/ml의 수치를 보였다. 10일 후에는 이마저도 현저하게 감소하여 거의 균을 찾아 볼 수 없었다. 특히, Bio-floc의 농도가 높을수록 이 두 균의 농도가 줄어드는 경향이 작았다.

[0079] Bio-floc 농도 100부피%와 150부피% 실험구를 5일과 10일간 방치 한 후에 *Rhodobactor sp.*와 총균수를 조사한 결과는 도 4와 같다. Bio-floc 제조한 당시의 *Rhodobactor sp.*의 균수는 100부피%와 150부피%에서 1~1.5 × 10^9 cfu/ml의 수치를 보였으나, 5일 후에는 확연하게 그 수가 감소하여 0.3~0.5 × 10^9 cfu/ml의 수치를 보였다. 10일 후에는 이마저도 현저하게 감소하여 거의 균을 찾아 볼 수 없었다.

[0080] Bio-floc 제조한 당시의 총 균수는 100부피%와 150부피%에서 4.5~7 × 10^9 cfu/ml의 수치를 보였으나, 5일 후에는 확연하게 그 수가 감소하여 1.5~2 × 10^9 cfu/ml의 수치를 보였으며, 10일 후에는 0.2 10^9 cfu/ml 이하로 감소하였음을 알 수 있었다.

[0081] **<실시예 4>**

[0082] **생산성 분석**

[0083] **<4-1> 성장**

[0084] 실험에 사용한 새우는 실험에 들어가기 전 전장과 체중을 측정하였으며, Bio-floc을 투입 후 45일, 90일 후에 전장과 체중을 측정하였다. 일일전장성장량, 일일체중성장량은 다음과 같이 측정하였다.

[0085]

일일 성장률 (Daily growth gain) = (Wf - Wi)/day

Wf = Final length or weight

Wi = Initial length or weight

[0086] 측정 결과, 45일간 사육한 대하의 체중 변화는 bio-floc 농도가 100부피% 이상일 때, 유의하게 높은 성장률을 보였으며, 140부피%보다는 120부피%일 때 가장 높은 성장률을 보였다. 90일간 사육한 대하의 체중변화도 100부피% 이상의 bio-floc 농도에서 유의하게 높은 성장률을 보였으며, 120부피%일 때 가장 높은 성장률을 보였다. 대하의 체장 성장률도 체중 성장률과 유사하게 100부피% 이상의 농도에서 유의하게 증가하였으며, 120부피%에서 최대의 성장률을 보임을 알 수 있었다(도 5 참조).

[0087] **<4-2> 면역**

[0088] 새우의 간췌장의 면역 유전자 발현을 측정하기 위해 테플론-글라스 균질기(teflon-glass homogenizer; 099CK4424, Glass-Col, Germany)를 이용하여 트리솔(Trisol)로 조직을 균질화하였다. 그 뒤 클로로폼(Chloroform)을 첨가하여 볼텍싱(vortexing) 시킨 후 이것을 4℃의 온도에서 12000g로 15분간 원심 분리하여 상등액을 분리하였다. 상층액과 동량의 아이소프로파놀(Isopropanol)을 넣고 4℃의 온도에서 12000g로 15분간 원심 분리하여 펠렛을 만들었다. 80% 에틸-알콜(ethyl-alchol)로 첨가 후 4℃, 12000g로 15분간 원심 분리하여 세척하였다.

[0089] NFW를 이용하여 RNA를 희석 후 1㎍/㎕ 정량하여 cDNA 합성 키트 (Promega)를 이용하여 cDNA로 합성시켰다. 합성된 cDNA를 하기 표 3에 따른 프라이머(primer)를 사용하였으며 하우스키핑 유전자(House keeping gene)로서는 β-actin을 사용하였다. 프라이머 제작은 primer3 프로그램을 이용하여 제작 후 bioneer에서 프라이머를 공급받았다.

[0090] TOPreal qPCR 2X Premix (Enzynomics, SYBR Green)로 real-time PCR (Roche)을 이용하여 Relative mRNA expression을 확인하였다. PCR의 조건은 표 4와 같고, 각각의 유전자 발현을 위해 사용된 specific primer set은 표 5와 같다.

[표 4] Real-time PCR 조건

	Temperature (℃)	Time	cycle
Pre-incubation	95	10 min	1
Denaturation	95	10 sec	
Annealing	60	15 sec	45
Extension	72	25 sec	
Melting curve	95, 60, 72	10, 15, 25 sec	1

[0091]

[표 5] Real-time PCR 실험에 사용된 specific primer set

Primer		Sequence (5′ to 3′)
β-actin	Forward	CGA GGT ATC CTC ACC CTG A
	Reverse	CGG AGC TCG TTG TAG AAG G
ProPhenoloxiase (proPO)	Forward	GAT ATC CTC GGC GAT GTG T
	Reverse	AGG GTC ATG CGA GAA AGC T
Lysozyme (LYS)	Forward	GTA ACA AAC GCG ACC TCG A
	Reverse	CCG TGC CAG GCT GTA TAT C
Serine Proteinase (SP)	Forward	TAT GTG GCG GAT CCC TTA T
	Reverse	GGT GAT AGT CCC CAA GAC G

[0092]

[0093] 상기와 같은 방법으로 Bio-floc 처리에 따른 대하의 비특이적 면역능, ProPhenoloxiase (proPO), Lysozyme

(LYS), Serine Proteinase (SP)를 조사한 결과는 도 6에 나타내었다.

[0094] 다양한 스트레스 요인은 새우의 면역력을 저하시킴으로써 병원생물의 침입을 허용하며 결국 질병 발생으로 이어진다. 따라서 면역력 저하는 발병의 결정적인 원인이 되며, 면역력 향상은 곧 질병에 대한 저항성 향상과 직접적으로 연관되어 있다고 할 수 있다. 그러나 새우와 같은 무척추동물은 척추동물과 달리 비특이적 면역계만 갖고 있기 때문에 이에 대한 이해가 필요하다. 새우는 단지 혈림프에 몇몇 방어인자를 가지고 질병에 대항한다. 혈림프에 있는 방어인자로는 항균소, 응집소, 보체성 성분, prpPO 계 (ProPhenoloxiase-activating system)가 있으며 이와 동시에 혈구들은 식세포 활동에 의해서 세균 등을 제거한다.

[0095] ProPhenoloxiase (proPO) 활성은 대조구와 비교하여 80부피%와 100부피% bio-floc 농도구에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았으나, 60부피% 구간에서 유의한 증가를 보였고, 120부피%과 140부피% 구간에서 60부피% 구간보다 2배 더 높은 활성을 보였다. proPO계는 갑각류의 방어기작에서 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다. proPO계는 과립구에 존재하는데 균류의 세포벽에서 분비되는 글루칸(glucan)이나 그람음성균 (비브리오)에서 분비되는 지질다당류에 의해 불활성의 세린프로테아제는 활성의 세린프로테아제로 전환된다. 이것은 다시 페놀 산화효소를 활성화시킨다. 이러한 반응에 의해 proPO계는 신호인자의 일종인 옵소닌(opsonin)을 생산함으로써 혈구의 식세포 활동과 이물질에 대한 피복작을 촉진시키며 또한 혈액응고 반응에 참여하기도 한다.

[0096] Lysozyme (LYS) 활성은 대조구와 비교하여 bio-floc를 처리한 구간에서 증가하는 경향을 보였으나, 120부피%와 140부피% 구간에서만 유의성이 인정되었다. 또한, Serine Proteinase(SP) 활성은 140부피%의 bio-floc 구간에서만 대조구에 비하여 유의하게 높은 값을 보였으나, 그 외 농도 구간에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았다(도 6 참조).

[0097] **<실시예 5>**

[0098] **생화학 분석**

[0099] 새우 간췌장의 효소 활성을 측정하기 위해 조직을 washing buffer (0.1M KCl, pH 7.4)로 세척한 후, homogenizing buffer (0.1M PBS, pH 7.4)로 teflon-glass homogenizer (099CK4424, Glass-Col, Germany)를 이용하여 균질화 하였다. 이것을 4℃의 온도에서 10,000g로 30분간 원심 분리하여 상등액을 실험에 사용하였다. SOD 활성을 측정하기 위해 1X 라이시스 버퍼(10mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1 mM EDTA)를 사용하여 조직을 균질화한 후, 이것을 4℃, 12000g로 10분간 원심 분리하여 상등액을 실험에 사용하였다. 모든 상층액은 실험 전까지 -75℃ (MDF-U53V, SANYO Electric Co. Ltd., Japan)에 보관하였으며, 조직의 단백질 함량은 Bradford 방법을 이용한 키트(Biorad. Co., Ltd.)를 이용하여 정량하였다.

[0100] **<5-1> SOD 측정**

[0101] SOD activity는 chromagen reduction의 inhibitor rate로 측정하는 SOD Assay Kit (Cell biolabs Inc)를 이용하였다. 각 상등액은 5의 배수씩 0.1mM PBS로 희석 후 분광광도계를 이용하여 흡광도 490nm에서 측정하였다. 측정값으로 inhibitor rate를 구하여 unit/mg protein으로 표시하였다. SOD 활성은 다음과 같이 계산하였다.

[0102] SOD activity (inhibition %) = $(OD_{blank}-OD_{sample}) / (OD_{blank}) \times 100$

[0103] 바이오플락에 노출된 대하의 간췌장 내 SOD 활성 결과는 도 7에 나타내었다. SOD 활성은 대조구와 비교하여 바이오플락이 증가함에 따라 농도가 80에서부터 유의한 활성 감소를 나타냈고, 바이오플락의 농도가 높은 구간인 120, 140에서 가장 낮은 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

[0104] **<5-2> 카탈라아제 활성 측정**

[0105] Catalase activity는 과산화수소의 분해의 비율에 따른 catalase의 농도에 대하여 남아있는 과산화수소에 반응하는 양을 측정하는 Catalase Assay Kit (Cell biolabs Inc)를 이용하였다. 2가지 Reaction 반응을 통하여 분광광도계를 이용하여 흡광도 520nm에서 측정하였다. Catalase activity assay standard curve를 이용하여 OD값에 대한 Catalase activity를 측정하였고 unit/mg protein으로 표시하였다.

[0106] 바이오플락에 노출된 대하의 간췌장 내 카탈라아제 활성 결과를 도 7에 나타내었다. 카탈라아제 활성은 대조구와 비교하여 바이오플락의 농도가 120, 140에서 유의한 감소를 나타냈고 120에서 가장 낮은 활성을 보임을 알 수 있었다(도 7 참조).

[0107] **<5-3> 글루타티온(GSH) 함량 측정**

[0108] 환원된 글루타티온 함량의 측정을 위하여 Beutler 등의 방법을 이용하였다. 상등액에 precipitation solution(metaphosphoric acid, Na2EDTA, NaCl)을 첨가하여 혼합 후 4500g에 10분간 원심분리 하였다. 그 상등액에 0.3M Na2HPO4을 넣고, 0.5mM DTNB로 발색시켜 분광광도계로 412nm에서 흡광도를 측정하였다. GSH 함량은 환원된 글루타티온 스탠다드 커브(reduced glutathione standard curve)를 이용하여 측정하였고, nmol GSH/mg protein으로 표시하였다.

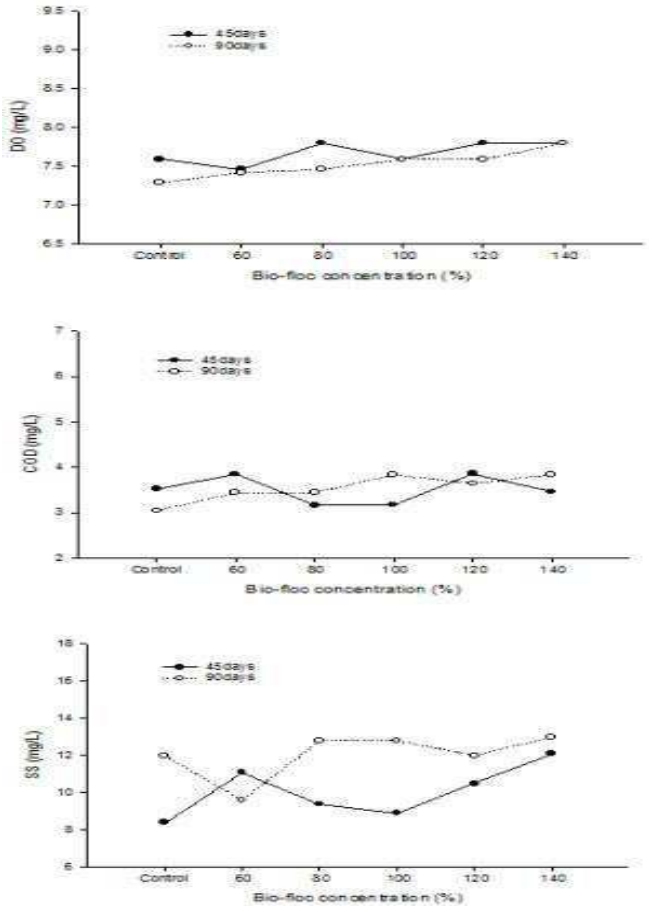
[0109] 바이오플락에 노출된 대하의 간췌장 내 환원된 글루타티온 함량의 결과를 도 7에 나타내었다. GSH 함량은 대조구와 비교하여 유의한 감소를 나타냈지만, 바이오플락의 농도별로 보았음을 때는 유의한 차이를 보이지 않음을 알 수 있었다(도 7 참조).

[0110] 따라서, 상기의 결과로 미루어보아 본 발명에서는 새우의 성장에 있어서 바이오플락의 사용이 매우 효과적이고, 본 발명의 방법으로 제조된 바이오플락 미생물 제제를 50,000:1의 비율로 희석하여 이를 100부피%로 하였을 때, 바이오플록을 120부피% 처리한 군에서 수질 개선, 새우의 성장 및 면역관련 유전자가 월등히 증가하였음을 확인하였다는 점에 기술적 특징이 있다.

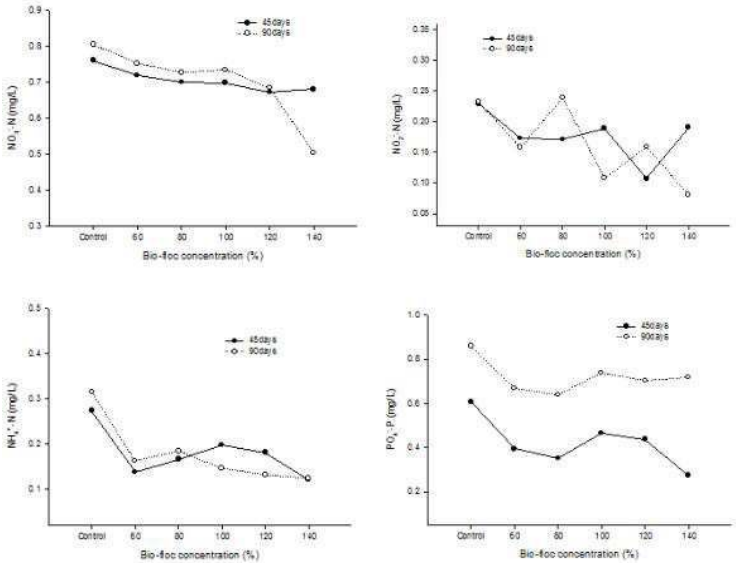
[0111] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

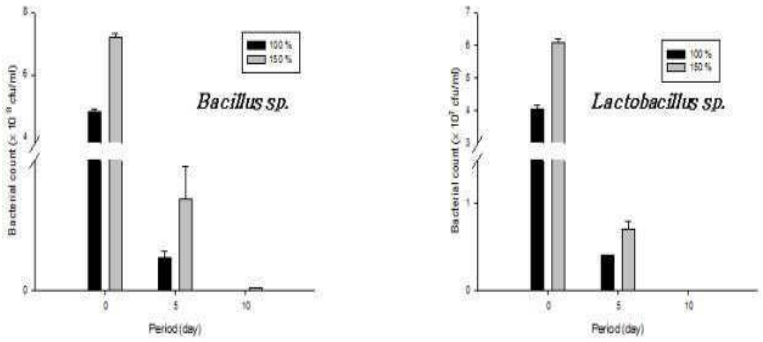
도면1


45days
90days
DO (mg/L)
COD (mg/L)
SS (mg/L)
Control
60
80
100
120
140
Bio-floc concentration (%)

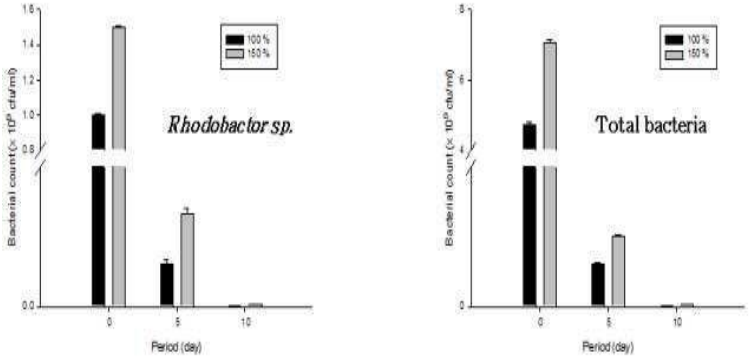
도면2


45days
90days
Bio-floc concentration (%)

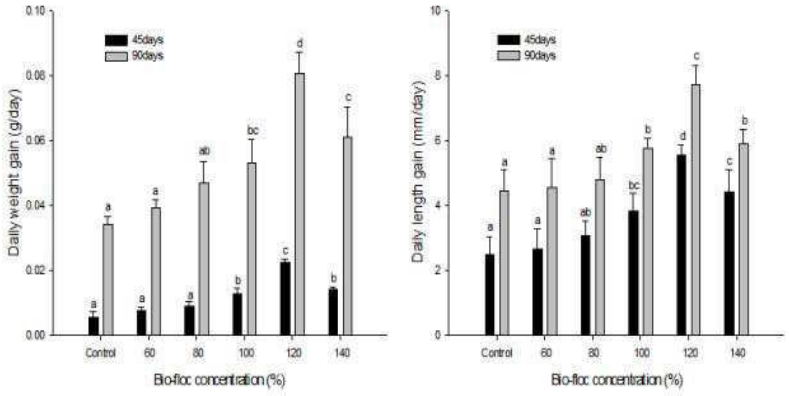
도면3


Bacillus sp.
Lactobacillus sp.
100 %
150 %
Period (day)

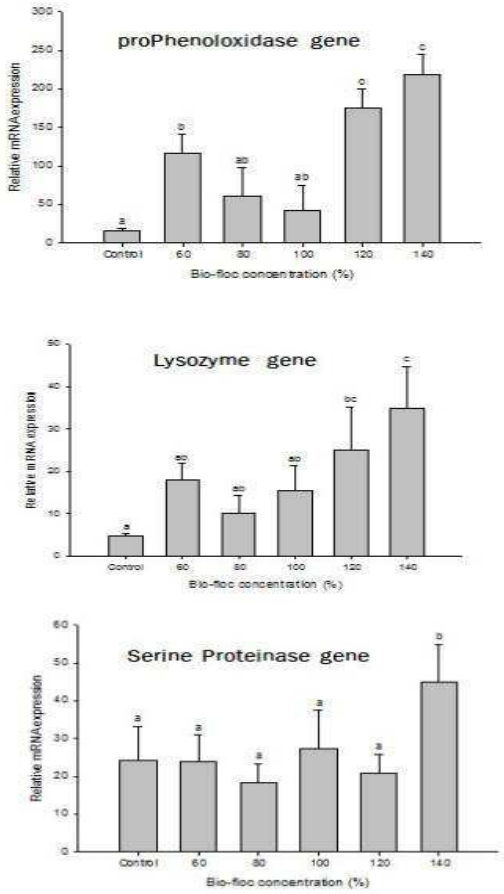
도면4


Rhodobactor sp.
Total bacteria
100 %
150 %
Period (day)

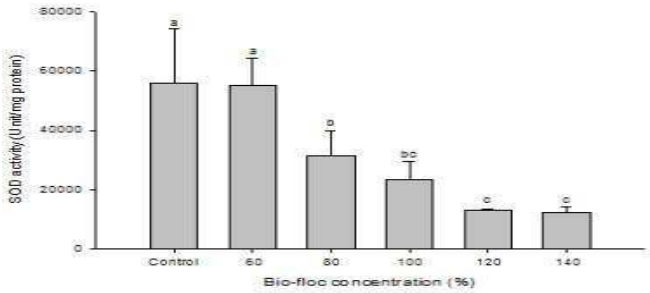
도면5

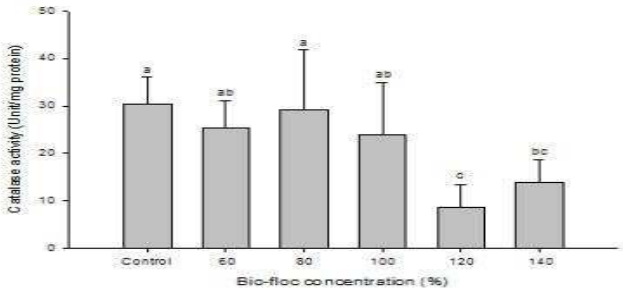

45days
90days
Daily weight gain (g/day)
Daily length gain (mm/day)
Control
60
80
100
120
140
Bio-floc concentration (%)

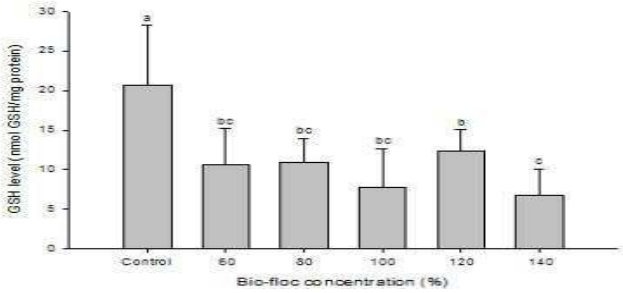
도면6


proPhenoloxidase gene
Relative mRNAexpression
Control
60
80
100
120
140
Bio-floc concentration (%)
Lysozyme gene
Relative mRNA expression
Control
60
80
100
120
140
Bio-floc concentration (%)
Serine Proteinase gene
Relative mRNAexpression
Control
60
80
100
120
140
Bio-floc concentration (%)

도면7







【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2 및 3항

【변경전】

바이오 플락(Bio floc) 시스템용 미생물 제제

【변경후】

바이오 플락(Bio floc) 새우 양식 시스템용 미생물 제제