

농생명산업기술개발 사업 제 3차년도 최종보고서

발 간 등 록 번 호
11-1543000-002997-01

개자, 선복화, 연교의 발효물을 이용한 사료첨가제 및 방제용 소독제의 개발 최종보고서

2020. 02. 12.

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단
협동연구기관 / 씨제이제일제당(주)

농 립 축 산 식 품 부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “개자, 선복화, 연교의 발효물을 이용한사료첨가제 및 방제용 소독제의 개발”(개발기간 : 2016. 11. ~ 2019. 11.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 2. 11.

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 송창선 (인)

협동연구기관명 : 씨제이제일제당(주) (대표자) 강신호 (인)

참여기관명 : 주식회사 카브 (대표자) 송창선 (인)

주관연구책임자 : 백현동

협동연구책임자 : 홍영호

참여기관책임자 : 송창선

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116136-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.9.29. ~2019.11.28.	단 계 구 분	(3단계)/ (3단계)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명				
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	개자, 선복화, 연교의 발효물을 이용한사료첨가제 및 방제용 소독제의 개발			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 20명 내부: 20명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 300,000천원 계: 600,000천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 32명 내부: 32명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 750,000천원 민간: 750,000천원 계: 1,500,000천원	
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교 산학협력단			참여기업명: 씨제이제일제당(주)	
국제공동연구	상대국명: 해당 없음			상대국 연구기관명: 해당 없음	
위탁연구	연구기관명: 주식회사 카브			연구책임자: 송창선	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제 24조의 4에 따른 일반과제
-------------------------	---

1. 개자, 선복화 및 연교의 유효성분을 UPLC-ESI-TOF 및 Q/Ornitrap을 이용하여 정성 및 정량하여 항바이러스 유효성분을 확인함.
2. 각 약용식물 추출물의 항바이러스능을 확인함.
3. 프로바이오틱스를 이용한 약용식물 발효물을 제작하여 면역 증강능 및 항바이러스능을 확인하였으며, 발효를 통하여 독성이 감소함을 확인함.
4. 항바이러스능을 지닌 발효물의 경제적 생산을 위한 최적화 모델을 완성함.
5. 약용식물 발효물을 활용하여 소독제를 개발하였으며, 이의 바이러스 및 세균 소독제능을 확인하였음.

총 145페이지

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>조류 인플루엔자에 효능이 검증된 개자, 선복화, 연교를 이용하여 항바이러스 효과를 검증하고, 이를 분리·정제하여 유효물질을 규명하고자 함. 프로바이오틱 균주를 활용하여 약용식물을 생물전환시켜 효능을 증대시키고자 함. 또한, 이를 적용하여 시제품을 생산하고 효능을 검증함으로써, 조류 인플루엔자를 예방하는 사료첨가제 및 방제용 소독제를 개발하고자 함.</p>
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항바이러스 소재 개발을 위한 프로바이오틱 균주를 확보하였음. ○ 항바이러스 소재의 유효물질 규명, 생물전환을 통한 생체이용률 증대시키는 발효 기술 및 이를 적용한 사료첨가제 및 소독제 등에 대한 특허를 출원하여 산업재산권을 확보하였음. ○ SCI급 저널 논문게재 5건, 학술발표 5건, 특허 출원 5건 등의 정량적 성과를 얻을 수 있었음.
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>[학문적·기술적 측면]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 학술적 기초 연구자료 제공: 항바이러스 소재의 유효물질 규명, 생물전환 기술을 통해 생체이용률의 증대, 마우스 및 닭 생체 내 효능 검증을 연구함으로써 학술적으로 유의미한 이론적 배경을 확립할 수 있으며 연계 연구의 기초 자료를 제공함. ○ 저명학술지 논문게재 및 국제적 기술우위: 항바이러스 소재 및 프로바이오틱 균주를 이용한 생물전환기술은 기술개발단계부터, 실제적인 적용사례까지 종합적인 연구를 수행함으로써 국제저명학술지에 다수의 논문을 발표할 수 있음. 또한 국제 경쟁력 측면에서 기술우위를 선점할 수 있으며, 관련 연구분야에서 선도적 역할을 기대할 수 있음. ○ 전문 연구인력 양성: 본 연구과제는 소재의 물질 규명을 시작으로 기술을 적용한 소재의 기능성/생체이용률 평가 및 제품개발/산업화까지 달성하는 종합적인 프로젝트이므로, 관련기술 분야의 all-round 역량을 함양한 전문 연구인력을 양성할 수 있음. <p>[산업적·경제적 측면]</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 산업재산권 확보: 항바이러스 소재의 유효물질 규명, 생물전환을 통한 생체이용률 증대시키는 발효 기술 및 이를 적용한 사료첨가제 및 소독제 등에 대한 특허를 출원/등록함으로써 산업재산권을 확보함. ○ 고부가가치 창출 및 국민보건 안전 확보: 조류 인플루엔자 예방 및 치료를 위한 소재의 개발로 고부가가치의 창출과 아울러 국민의 안전을 확보하게 됨. 조류 인플루엔자 발생 시 가금류의 피해를 막는데 대비책이 될 수 있음. ○ 친환경 AI 방제용 사료첨가제를 경쟁국가에 비교하여 선점 확보: 조

	<p>류 인플루엔자 억제, 동물의 면역능력 강화, 질병 예방 효과 기능을 가지는 물질들로 구성된 사료첨가제 개발로 친환경 안전 축산물 생산 가능하며, 경제적이면서 친환경 AI 방제용 사료첨가제를 경쟁국가에 비교하여 선점 확보가 가능함.</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 양축산업의 피해 최소화: 항바이러스 기능성을 가진 방제용 소독제는 조류인플루엔자 바이러스 발병에 의한 양축산업의 피해를 최소화 하는데 도움을 줄 것임. ○ 수입 대체 효과: 수입 의존적인 항생제 대체용 천연 면역증강물질 시장에서의 수입 대체 효과가 있으며 수출이 가능해 짐. ○ 신약개발의 기초 자료: 본 과제로 도출되는 연구결과들은 향후 중장기적으로 신약개발의 기초 자료로도 활용이 가능할 것임. 				
국문핵심어 (5개 이내)	조류 인플루엔자	사료 첨가제	소독제	약용식물	항바이러스
영문핵심어 (5개 이내)	Avian influenza	Feed additive	Disinfectant	Medicinal plant	Antivirus

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	42
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	130
4. 연구결과의 활용 계획 등	132
붙임. 참고 문헌	132

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발 목적

1. 연구개발의 개요

가. 연구개발 대상 및 기술·제품의 개요

(1) 연구개발 개요: 기존의 조류 인플루엔자에 대한 항바이러스 효과가 검증된 약재를 생물 전환을 통하여 항바이러스 예방을 위한 사료첨가제 및 방제용 소독제로써 활용 가능성을 검증하고 산업화하고자 함.



(2) 핵심기술

- ① 항바이러스 소재 개발: 항바이러스 효과가 검증된 약용 소재를 분리·정제하여 유효 물질 규명
- ② 항바이러스 소재 발효 기술: 프로바이오틱스 균주 중 항바이러스 소재를 발효할 수 있는 균주를 선별하고 최적화
- ③ 항바이러스 효과가 있는 시제품 개발 기술: 후보물질을 이용하여 시제품(사료첨가제 및 소독제)를 개발한 후, 마우스 및 닭 모델 실험을 통해 항바이러스 효과 검증

(3) 연구개발 대상의 국내·외 현황

① 국내 기술 수준 및 시장 현황

- 항생제 사용 제한에 따른 대체 방안
 - ✓ 가축의 질병 치료 및 생산성 극대화를 위해 항생제를 이용하였으나, 최근 가축

질병 예방과 성장 촉진을 목적으로 인한 과다 사용이 문제가 되었고 이로 인해 항생제 잔류와 슈퍼박테리아 발생함에 따라 국내·외로 항생제 사용에 대한 규제가 강화되었음. 1986년 스웨덴의 성장촉진용 항생제 전면금지를 시작으로 덴마크, 독일, 유럽연합이 뒤따라 항생제 금지를 확대했으며 2006년에 유럽 전체에 항생제 사용을 제한함. 국내 역시 2011년 7월부터 사료첨가제로써 항생제 사용을 전면 금지하게 되었음.

- ✓ 농림축산식품부에서는 무항생제(친환경축산물) 인증제도를 도입하였음. 항생제, 항균제 등이 첨가되지 않은 사료를 먹이고, 생산성 촉진을 위한 성장촉진제나 호르몬제를 사용하지 않으며, 축사와 사육 조건, 질병관리 등의 엄격한 인증기준을 지킬 경우 무항생제 제품으로 등록할 수 있음.



그림 1. 무항생제 인증 마크
(농림축산식품부)

- ✓ 그러나 무항생제 사육은 면역력이 완성되지 않은 상태의 가축의 폐사율을 높이는 등 축산 생산물 공급에 문제를 야기시킴에 따라 항생제 대체제 이용에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음. 항생제 대체제는 가축의 건강을 강화시켜 면역력을 높이면서 질병 발생을 감소시킴으로써 생균제, 천연자원추출물, 면역증강제, 향산화제 등을 이용하고 있음(한국콘텐츠학회 추계종합학술대회 논문집, 2014).
- ✓ 국립축산과학원에서는 면역력을 증진시킬 수 있는 알파리포산이 첨가된 사료첨가제를 개발하여 실용화하였음. 향산화물질로 알려진 알파 리포산을 캡슐화하여 생체 이용성을 높여 적은 양으로도 닭에게 스트레스 저하, 향산화력 증진 등의 효과를 보임(농민산업, 2012).
- ✓ (주)CTC바이오가 출시한 박테리오파지 ‘백터페이즈’ 또한 항생제 대체제로 각광받고 있음. 유익균에는 영향을 미치지 않으면서 특정한 병원성 세균을 선택적으로 사멸한다는 특징을 갖고 있어 내성이 생기지 않으며 잔류 및 부작용에 대한 우려가 없음.



그림 2. 면역 증진사료첨가제인 알파리포산 및 항생제 대체제인 벡터페이즈 (국립축산과학원 및 (주)CTC바이오)

- ✓ 사료첨가제는 배합기술과 가공기술, 품질 확보 및 평가 기술에 의해 제조되며, 사료 혹은 사료첨가제 원료의 경우 수 년 이상의 개발기간이 소요되거나 원료를 배합하거나 조합하는 기술은 기술 레벨이 낮기 때문에 선두업체를 제외한 다수의 중소기업이 경쟁, 진출하고 있음(한국콘텐츠학회 추계종합학술대회 논문집, 2014).
- 사료첨가제 시장현황
 - ✓ 세계 사료첨가제 시장의 규모는 지속적으로 증가하여 왔으며, 약 5.1%의 성장률을 보여 시장 규모는 2019년 약 173억 정도의 규모로 성장할 것으로 예상됨.
 - ✓ 국내 사료첨가제 시장은 2013년 기준 약 2,587억원의 규모를 나타내고 있으며, 이는 해외 시장 대비 약 2%의 시장 비율을 나타냄(Analysis of the global animal feed ingredients market, Frost and Sullivan, 2014).
 - ✓ 2011년 7월 이후 사료에 첨가하는 성장촉진용 항생제 사용이 금지되게 됨에 따라 항생제 대체 소재의 시장 규모가 지속적으로 커질 것으로 예상되며, 가축 질병 치료용 신소재 중에서 천연물질이 차지하는 비중이 높으며, 특히 신청 기술에서 나온 AI 억제제는 사료첨가제 및 동물약품으로 상용화되면 그 시장 규모가 국내·외로 확대될 것으로 예상됨.
 - ✓ 사료 첨가제로서 항생제, 아미노산, 비타민, 효소 등이 이용되고 있으며, 시장 규모는 지속적으로 성장 추세를 보여 2011~2016년까지 약 1.57~1.92% 정도의 성장 양상을 보일 것으로 기대됨(농림축산신문).



그림 3. 현재 시판 중인 사료첨가제 현황 (씨제이제일제당(주), (주)CTC바이오, (주)한국쌈뽕 및 (주)제일바이오)

- 지식재산권 현황
 - ✓ 사료첨가제로는 한약재 및 유산균 등이 주로 사용되고 있으며(대한민국 특허 제 10-2012-0064373호), 고병원성 및 저병원성 조류인플루엔자 중 고병원성인 H5N1를 대상으로 하는 특허가 높은 비중을 차지함.
 - ✓ 국내 양계산업의 구조 상 바이러스성 질병뿐만 아니라 세균 감염에 의한 가금류 질병도 취약하므로 면역시스템을 강화할 수 있으면서 안정성에도 문제가 없는 첨가제의 개발이 진행되었음. 또한 사료 급여시, 체지방 축적을 억제하여 혈장 콜레스테롤 수치, 중성지방 과다 축적 등을 억제함으로써 고지혈증 및 동맥경화증과 같은 질병을 예방하기도 함.
 - ✓ 사료첨가제용 미생물은 항바이러스 활성을 지닌 균체를 포함한 배양원액, 균체를 제거한 배양 상등액 또는 배양액의 희석액 형태로 사용됨. 특허 균주로는 *Weissella cibaria*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Cleistocalyx operculatus* 등이 있음.
 - ✓ 사료첨가제용 한약재로는 녹차(대한민국 특허 제 10-2010-0014676호), 선복화(대한민국 특허 제 10-2011-0008483호), 울금(대한민국 특허 제 10-0962-33400호) 및 겨우살이(대한민국 특허 제 10-2010-0063224호) 등의 항바이러스 소재에서 분리·정제를 통하여 분획물을 얻어 유효성분을 검출하는데 중점을 두고 있음.
- 조류인플루엔자 관련 소독제 현황
 - ✓ 조류인플루엔자와 관련한 특허는 예방 또는 치료용 조성물 개발에 초점이 맞추어져 있어 소독제로 사용 시, 제품의 형태나 유효 농도에 대한 연구는 미미한 실정임(대한민국 특허 제 10-2013-0052258호).
 - ✓ 소독제는 화학적 분류방법에 따라 크게 산화제, 환원제, 산 및 알칼리, 알코올계, 페놀계, 색소, 세정제 및 기타 유기물질로 분류되며, 일반적으로 산화제 및 환원제는 소독효과가 빠르며, 구제역 방역용 소독제로 사용되고 있음.
 - ✓ 천연 성분이 함유된 소독제의 경우 구연산, 사양초 오일, 정향 오일, 계피 오일, 레몬그래스 오일 등이 혼합되어 제조됨(대한민국 특허 제 10-2007-0047509호).
 - ✓ 항바이러스 활성을 가진 녹차 추출물을 이용하여 세정제 및 소독제로 제조하는 방법에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있는데(대한민국 특허 제 10-2010-0014676호), 대량 제조시 유통기한이 짧아 유통이 용이하지 않은 단점이 있음.
- 사료첨가제의 기준 및 규격
 - ✓ 2015년 5월 「사료 등의 기준 및 규격」 고시 일부가 개정되었는데, 주요내용 중 조류 인플루엔자 확산을 방지하기 위해 가금류에게 남은 음식물 급여를 금지하는 조항이 포함됨. 이로 인해 식품공전에 명시된 식물성 원료임에도 불구하고

가축사료로 사용이 제한됨(단미사료의 범위, 2015).

표 1. 단미사료에 사용되는 식물성 원료의 사용 부위 및 분류

사용 부위(생약명)	분 류
과일, 열매	단미 - 과실류
견과, 씨앗	단미 - 견과·종실류
자실체	단미 - 버섯류
덩이줄기	단미 - 서류
고무수지, 수액, 액즙	보조 - 추출제(초목 추출물)
꼬투리, 새순, 순, 잎, 줄기	단미 - 섬유질류
그 외(가지, 껍질, 꽃, 꽃대, 꽃봉오리, 꽃잎, 끝가지, 나무껍질, 덩이뿌리, 비늘줄기, 뿌리, 뿌리껍질, 수피, 암술머리, 전체, 전초, 줄기의 육질, 지상부, 햇씨껍질, 화서 등)	단미 - 기타 식물류

표 2. 단미사료에 사용되는 식물성 원료의 사용 부위 및 분류

	품목명	이명 또는 영명	학 명	사용부위 (생약명)
1	겨우살이	곡기생	<i>Viscum album</i> L. v ar. <i>coloratum</i> Ohwi	잎, 줄기 및 가지* (곡기생)
2	고본	-	고본 <i>Angelica tenuissima</i> Nakai/ 중국고본 <i>Ligusticum sinense</i> Oliv./ 요고본 <i>Ligusticum jeholense</i> Nakai et Kitagawa	뿌리 및 뿌리줄기* (고본)
3	광굴나무	-	<i>Citrus aurantium</i> L.	열매*(지각)
4	구절초	-	<i>Chrysanthemum zawadskii</i> Herbich var. <i>latilobum</i> (Maxim.) Kitamura	전초*(구절초)
5	금불초	선복화	<i>Inula japonica</i> Thunberg/ <i>Inula britannica</i>	꽃*(선복화)
6	노간주 나무	노가주, Juniperberry	<i>Juniperus communis</i> , <i>Juniperus rigida</i>	열매
7	노루귀	-	<i>Hepatica asiatica</i> Nakai	뿌리
8	단삼	-	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	뿌리*(단삼)
9	달개비	-	<i>Commelina communis</i> L.	전초
10	독활	땅두릅, 땃두릅	<i>Aralia cordata</i> / <i>Aralia continentalis</i> Kitagawa	뿌리*(독활)
: 중략				

60	토사자	-	<i>Cuscuta chinensis</i> Lamark	씨앗*(토사자)
61	필발	Long pepper	<i>Piper longum</i>	열매*(필발)
62	향기제비꽃	Sweet violet	<i>Viola odorata</i>	꽃
63	황칠나무	-	<i>Textoria morbifera</i>	잎, 줄기, 뿌리
64	회화나무	괴각	<i>Sophora japonica</i> Linne	열매*(괴각)
<p>상기의 ※ 표시된 품목(생지황을 제외한 품목의 경우 건조한 것에 한함)의 납, 비소 등 개별 중금속 허용기준은 「대한민국약전」(식품의약품안전처 고시) 또는 「대한민국약전외한약(생약)규격집」(식품의약품안전처 고시)에 따른다.</p>				

- 사료의 안전성
 - ✓ 사료의 유통기한을 설정 시, 조류 인플루엔자 사멸 조건과 관련한 기준이 정해져 있음(사료의 유통기간 설정 기준, 2015).
 - 수분 14% 초과, 60% 이하 사료는 조류인플루엔자 바이러스 사멸조건에 준한 열처리 [제품의 중심온도가 63℃, 30분간] 또는 이와 동등 이상의 효력을 갖는 방법으로 열처리해서 살균하여야 하며, 제품의 내용물, 제조장소, 제조일자를 확인할 수 있는 기호를 표시하고 살균공정 작업에 대한 기록을 보관하여야 함.
 - 제품의 미생물 발생이 방지되도록 배합(또는 혼합) 시 적절한 보존제 사용, pH 조정, 포장재 내에 탈산소제 사용, 탈기 포장, 질소 충전, 수분활성도 조정(0.75 이하) 등의 조치가 되어야 함.
 - 동물성단백질류는 배합(또는 혼합) 전에 반드시 별표 9에 따라 멸균을 한 후 사용하여야 함.
 - ✓ 또한 사료의 규격은 아래 명시된 기준을 만족해야 함.
 - 성상: 내용물은 기밀포장해서 외부 오염이 방지되어야 하며, 고유의 향미, 색택, 물성을 가지고 이미·이취가 없어야 함.
 - 세균수: n=5, c=2, m=100,000, M=500,000(다만, 발효제품, 발효제품 첨가 또는 유산균 첨가제품은 제외)
 - 대장균군: n=5, c=2, m=10, M=100
 - 권장 유통기한: 18개월
- 단미사료 중 기능성이 명시된 소재(단미사료의 품목별 기준 및 규격, 2015)
 - ✓ 감귤박(citrus pulp, citrus by-products)
 - 정의: 감귤의 가공과정에서 발생하는 껍질을 비롯한 부산물의 총칭
 - 영양정보: 조단백질이 5~8%로 낮은 편이며 조섬유가 13~20%로 다소 높고, 가용무질소물(당, 펙틴, 유기산) 함량이 높음. 카로틴과 크산토펜 등의 색소 및 비타민B군 일부가 소량 함유되어 있음. 펙틴 및 항산화 작용과 항균 작용의 기능을 가진 플라보노이드류가 함유되어 있고 기호성이 우수
 - 고려사항: 제조과정 중에 많은 양의 석회수가 사용되기도 하므로 칼슘의 함량이 높아 가축 급여 시 칼슘과 인의 적정비율을 맞춰 주어야 함.
 - ✓ 사과(apple)

- 정의: 쌍떡잎식물 장미목 장미과 낙엽교목 식물인 사과나무의 열매
- 영양정보: 조단백질 0.5~3%, 수분 5~15%, 조섬유 3~10%, 조회분 3~12%
- 기타: 항산화작용(사과껍질 안의 quercetin은 항산화 작용이 뛰어나며 항바이러스, 항균작용을 함).

✓ 사과박(apple pomace)

- 정의: 사과에서 사과즙을 짜내고 남은 잔유물로 보통 건조시켜 사료로 사용
- 영양정보: 펙틴이 함유되어 있으며 건조상태에 따라 조섬유 함량이 약 15~30%
- 기타: 축우용의 섬유질공급원으로 많이 이용되며 육계사료에서 면역강화 물질로도 관심을 받고 있음(육계의 증체량의 개선효과 있다고 보고됨).

✓ 파인애플박(pineapple meal)

- 정의: 파인애플에서 파인애플즙을 짜내고 남은 잔유물로 보통 건조시켜 사료로 사용
- 영양정보: 약 17% 이상의 풍부한 섬유질을 함유하고 있음.
- 기타: 파인애플박에서 추출한 "브로멜라인" 이라는 효소물질이 체내의 면역기능 개선을 통하여 우유내 체세포수를 감소시키는 원리로 일반적으로 낙농가에서 유질 개선을 위해 많이 이용됨.

✓ 혈장단백질(blood plasma protein)

- 정의: 주로 돼지나 소의 혈액을 혈장과 혈구로 원심 분리한 후, 혈장을 스프레이 건조시켜 만든 것임 (분무건조 돼지혈장단백 등).
- 영양정보: 조단백질 함량은 약 75~80% 내외, 조회분은 8% 정도
- 기타: 분무건조한 돼지혈장단백을 어린 가축사료에 사용하면 장내 국소면역을 제공하고, 효소 및 아미노산을 공급하여 자돈의 성장률을 향상시킴.

② 국외 기술 수준 현황

✓ 사료첨가제 가공 기술

- 몇 가지 코팅 기술에 의해 반추 범주에 속하는 염소, 소, 양, 버팔로, 낙타 등을 포함하는 농업 동물의 생산율을 증가시킴. 우유 및 고기 품질을 개선할 수 있으며, 약물의 비용을 감소시킬 수 있음. 비타민, 아미노산 등의 생리활성 물질은 경구 섭취를 통해 반추위에서 미생물에 의해 분해되기 때문에 이러한 코팅 기술로 흡수율을 높일 수 있음(Transparency Market Research).

✓ 사료 생산 공정 기술

- 반추 동물 및 가금류 등 동물마다 사료 제조 시 에너지 소비가 차이 있는데, 가금류 펠릿 공정에서 더 높은 증기 사용으로 인해 전력이 소비가 큼. Tecaliman 사의 경우 사료 공정을 개선하여 에너지를 절약함.

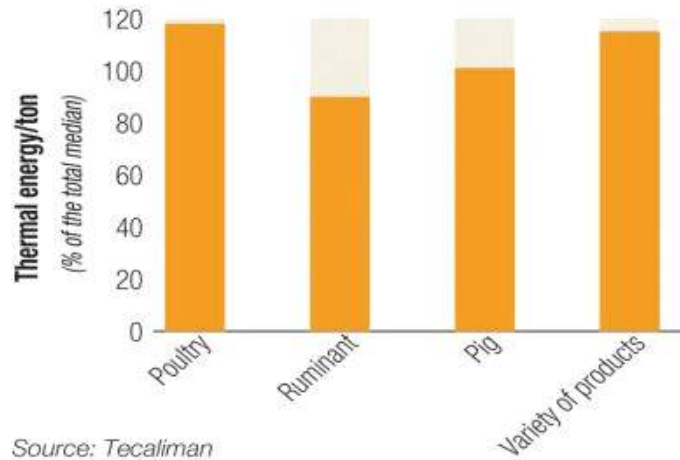


그림 4. 사료 종류에 따른 에너지 소비량
(<http://www.wattagnet.com/articles/>)

③ 시장 현황

- 육류 소비량 시장
 - 2014년 기준으로 1인당 GDP 3만 달러 이상 선진국에서는 닭고기 소비량이 호주(39.6 kg), 미국(44.5 kg), 캐나다(33.1 kg), 뉴질랜드(36.3 kg), 이스라엘(63 kg) 등으로 다른 육류보다 많았음. 농림축산식품부는 건강에 대한 관심으로 소비자의 백색육 선호도가 높아지기 때문이라고 분석하였음. 또한 GDP 2만7천970만 달러인 우리나라도 GDP 증가에 따라 앞으로 닭고기 등 백색육 소비량이 훨씬 많아질 가능성이 크다고 예상하였음.

표 3. 각 나라별 1인당 GDP와 육류 소비량(kg)

국가	1인당 GDP (\$)	1인당 육류 소비량 (kg)		
		쇠고기	돼지고기	닭고기
호주	61,925	21.6	20.1	39.6
미국	54,629	24.5	20.7	44.5
캐나다	50,235	18.0	17.1	33.1
뉴질랜드	44,342	14.5	16.4	36.3
이스라엘	37,208	19.2	2.0	63.0

(OECD data)

- 사료 첨가제 시장
 - Global Animal Feed Market 2015~2019년 보고서에 따르면 사료첨가제 생산량이 육류 소비량이 증가함에 따라 증가하여, 시장의 수요와 공급 또한 계속 증가할 것이라고 전망함.
 - 또한 낙농 및 유제품에 대한 수요의 증가로 인해 사료첨가제 시장이 차지하는 비율이 커지고 있음. 2015~2021년 사료첨가제 수익은 2016년 \$4.7억에서 2021년엔 \$5.6억으로 계속 증가할 전망이다.



그림 5. 세계 사료 시장 규모 및 전망

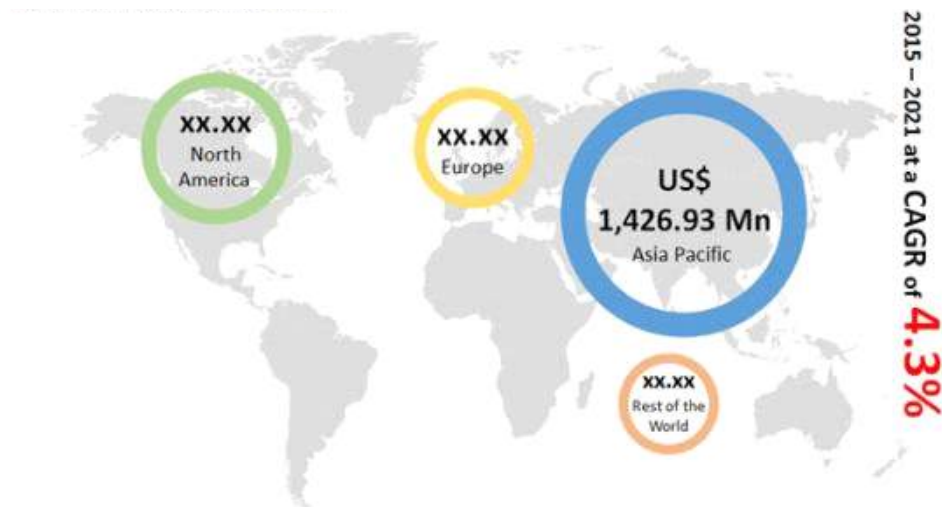


그림 6. 사료첨가제 시장 수익 (TMR analysis, 2015)

- ‘세계 동물사료 첨가제(돼지, 가금류, 축산, 양식 및 기타 - 2018년까지의 예보) (Global Animal Feed Additives(Swine, poultry, cattle, aquaculture, others for ecasts to 2018)’란 제목으로 Research and Markets사가 발간한 한 보고서에 의하면, 조류독감(bird flu) 등과 같은 전염병, 수족구병(food-and mouth-disease) 등과 같은 기타 질병과 환경문제는 전 세계적으로 동물의 건강에 대한 우려를 증대시킴으로써, 축산업체들은 사료의 품질과 인증을 받은 사료 등에 중점을 두고 있음.
- 전 세계 사료첨가제 시장의 대부분은 북미와 유럽에 집중되어 있으며, 아시아-태평양 지역의 경우, 소득 수준 향상과 육류 소비량이 증가함에 따라 지속적으

로 증가할 것으로 예상됨.

- 아시아에서의 사료첨가제 시장 규모는 전 세계의 28.5% 정도의 규모를 유지할 것으로 기대되며, 육류소비량의 증가로 4.74% 연간성장률이 전망됨.



그림 7. 현재 시판 중인 해외 사료 현황

④ 지식재산권 현황

- 조류인플루엔자와 관련된 해외 특허 건수를 보면 미국이나 유럽, 중국이 특허가 없는 반면, 일본이 1,377개로 높은 것을 알 수 있음.

표 4. 조류인플루엔자 관련 해외특허

국가	일본	PCT	미국	유럽	중국	영국	호주	합계
특허수	1,377	42	0	0	0	0	0	1,419

- 항바이러스 소재
 - 축산용 생균제 개발을 위한 균주 스크리닝이나, 식물성 추출물(galla rhois(PCT/KR2012/002450), warmwood(PCT/KR2011/000633), rice-sweetened(PCT/KR2011/003522))을 확보해 항인플루엔자 바이러스 조성물을 제조와 관련된 특허가 다수임.
- 항바이러스 소재 개발 기술
 - 항바이러스성 조성물 제조 시 분산안정제를 포함하여 콜로이드 용액을 제조하고 이 용액을 희석하여 산 촉매를 이용해 이산화티탄 나노입자를 생성해 항진균 효과도 나타내는 방법을 개발함(PCT/KR2015/010460).
 - 또한 조류 인플루엔자를 신속하게 검출하기 위한 키트 개발도 이루어짐(PCT/KR2015/010460).

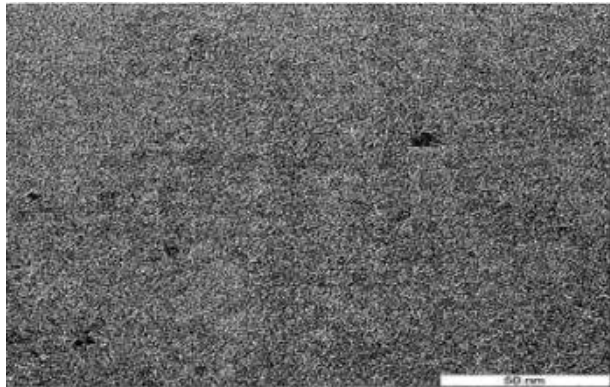


그림 8. 항바이러스성 콜로이드 입자의 혼합물 (대한민국 특허 제 10-2013-0052258호)

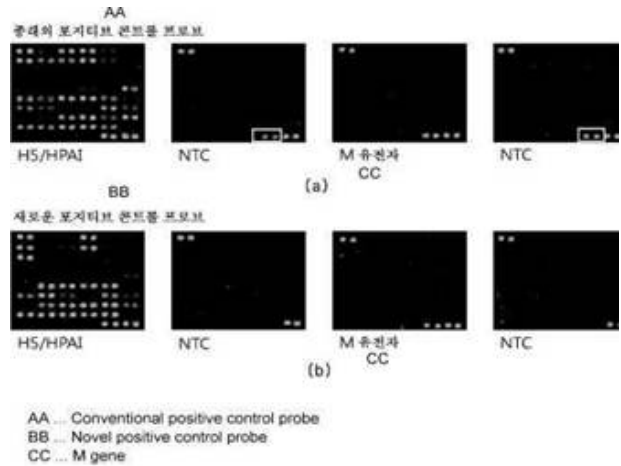


그림 9. 조류 인플루엔자 검출 키트 (대한민국 특허 제 10-1610134-0000호)

⑤ 표준화 현황

- 사료첨가제의 분류
 - 일본: 사료첨가제 중 항균효과나 특이한사료첨가제의 경우 따로 분류 함. (annotation 1: antimicrobial preparations, 2: specified feed additives)

표 5. 조류인플루엔자 관련 해외 특허

Purpose of feed additives	Classification	Name of feed additives
Prevent deterioration of feed quality	Antioxidants	Ethoxyquin, dibutylhydroxytoluene, butylhydroxyanisol
	Mold inhibitor (annotation 1)	Propionic acid, calcium propionate, sodium propionate
	Thickeners	Sodium alginate, sodium caseinate, sodium carboxymethyl cellulose, propylene glycol, sodium polyacrylate
	Emulsifiers	Glycerin fatty acid ester, sucrose fatty acid ester, sorbitan fatty acid ester, polyoxyethylene glycerol fatty acid ester, polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester,
	Adjusters	Formic acid
Supply of nutrient	Amino acids	Aminoacetic acid,

<p>ingredients and other effective ingredients of feed(88)</p>		<p>DL-alanine, L-arginine, L-lysine monohydrochloride, monosodium L-glutamate, 2-deamino-2-hydroxymethionine, taurine, DL-tryptophan, L-tryptophan, L-threonine, L-valine, DL-methionine, L-lysine sulphate</p>
	Vitamins	<p>L-Ascorbic acid, calcium L-ascorbate, sodium L-ascorbate, sodium-calcium-L-ascorbic acid-2-phosphate ester, L-ascorbic acid-2-phosphoestermagnesium, acetomenaphthone, inositol, dibenzoyl thiamine hydrochloride, ergocalciferol, choline chloride, thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride, β-carotene, cholecalciferol, DL-α-tocopherol acetate, cyanocobalamin, thiamine mononitrate, nicotinic acid, nicotinamide, P-aminobenzoic acid, calcium D-pantothenate, calcium DL-pantothenate, D-biotin, vitamin A powder, vitamin A oil, vitamin D powder, vitamin D3 oil, vitamin E powder, 25-hydroxycholecalciferol, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite, menadione sodium bisulfite, folic acid, riboflavin, riboflavin tetrabutyrate</p>
	Minerals	<p>potassium chloride, ferric citrate, calcium gluconate, iron and sodium succinate citrate, magnesium oxide, aluminum hydroxide, zinc carbonate, cobaltous carbonate, sodium bicarbonate, magnesium</p>

		carbonate, manganese carbonate, ferrous DL-threonate, calcium lactate, ferrous fumarate, zinc peptide, iron peptide, copper peptide, manganese peptide, potassium iodide, potassium iodate, calcium iodate, zinc sulfate, exsiccated, zinc sulfate, zinc methionine sulfate, cobaltous sulfate, exsiccated, cobaltous sulfate, ferric sulfate, exsiccated, copper sulfate, exsiccated, copper sulfate, Sodium sulfate, exsiccated, magnesium sulfate, exsiccated, magnesium sulfate, manganese sulfate, dipotassium hydrogen phosphate, exsiccated, disodium hydrogen phosphate, exsiccated, potassium dihydrogen phosphate, exsiccated, sodium dihydrogen phosphate, exsiccated, sodium dihydrogen phosphate
	Pigmenters	Astaxanthin, beta-apo-8'-carotenoic acid ethyl ester, canthaxanthin
Promote efficient use of feed nutrient ingredients(52)	Synthetic Antimicrobial (annotation 1)	Amprolium plus ethopabate, Amprolium plus ethopabate and sulfaquinoxaline, morantel citrate, decoquinate, nicarbazin, calcium halofuginone polystyrenesulfonate
	Antibiotics (annotation 1,2)	Zinc bacitracin, avilamycin, alkyltrimethylammonium calcium oxytetracycline, efrotomycin, enramycin, chlortetracycline, salinomycin sodium, semduramicin sodium, narasin, nosiheptide, virginiamycin, bicozamycin,

		flavophospholipol, monensin sodium, lasalocid sodium, colistin sulfate, tylosin phosphate
	Flavors	Flavour
	Sweeteners	Saccharin sodium
	Enzymes	Amylase, alkaline protease, xylanase, xylanase and pectinase complex, β -glucanase, acid protease, cellulase, cellulase, protease and pectinase complex, neutral protease, phytase, lactase, lipase
	Probiotics	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus badius</i> , <i>Bifidobacterium thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium pseudolongum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i>
	Organic acid	Fumaric acid, sodium gluconate, calcium formate, potassium diformate
		Total 157 (FAMIC)

- 미국: Food and Drug Administration(FDA)이 구충제와 더불어 향미생물제를 “약품”으로 분류하여 관리하고 있음. 이러한 이유로 이들의 사용수준, 배합 허용치와 도축 전 휴약기간은 “FDA”와 매년 발표되는“사료첨가물 일람표”에 의해 규제됨. 이밖에 다른 첨가제들에 대해서는 미국의 경우 사료 조정협회(1998)가 제정한 “동물사료에 있어 사료첨가제 사용에 대한 지침서”를 제정하고 있음.



그림 10. Association of American Feed Control Officials

2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 기술적 측면

(1) 조류인플루엔자

- 원인체는 바이러스이며 병원성에 따라 고병원성 조류인플루엔자와 저병원성 조류인플루엔자로 구분되며 고병원성 조류인플루엔자(HPAI: Highly Pathogenic Avian Influenza)는 국내에서는 제1종 가축 전염병으로 분류하고 있음.
- 임상 증상은 바이러스의 병원성에 따라 다양하며 호흡기증상, 설사, 산란율의 급격한 감소, 벼슬 등 머리 부위에 청색증을 보임. 바이러스의 병원성에 따라 폐사율은 0~100%로 다양하며 산란율도 40~50% 저하 또는 산란중지로 다양함.
- 혈청형이 다양한 것이 특징으로 144종류로 분류(H1~H16, N1~N9)되고, 혈청형은 두 종류의 단백질(HA, NA)에 의하여 분류되며 현재까지 HA는 16종류, NA는 9종류가 보고됨(농림축산식품부, 2016).
- 저병원성 조류인플루엔자 바이러스의 경우 국내에는 H9N2 바이러스가 만연되어 있어 토종닭을 중심으로 큰 피해를 일으키고 있어 현재 해당 바이러스에 대한 백신을 사용하고 있음. 중국의 경우 인체 감염형 H7N9 바이러스가 현재까지 닭에서 지속적으로 발생하고 있어 국내 유입에 대한 대비가 필요한 실정임.
- 국내의 경우 HPAI 상재국은 아니나 상재국인 중국과 인접하고 있어 야생조류를 통한 전파로 인하여 2~3년 간격으로 발생이 지속되고 있음. 2003년 이후 총 5번의 국내 HPAI 발생이 있었으며 2003년, 2006년, 2008년, 2010년에는 H5N1 아형의 HPAI 바이러스가, 2014년에는 H5N8 아형의 HPAI 바이러스가 발생하여 큰 피해를 일으킴. 국내에서는 백신을 사용하지 않고 살처분을 통해 바이러스를 박멸하는 정책을 이용하고 있음.

표 6. 국내의 고병원성 조류인플루엔자와 저병원성 조류인플루엔자 구분

구분	고병원성 조류인플루엔자(HPAI)	저병원성 조류인플루엔자(LPAI)
관리분류	제1종 가축전염병	제2종 가축전염병
방역정책	살처분을 통한 박멸정책, 백신 미사용	백신접종을 통한 발생과 확산억제관리
바이러스형	H5N1	H9N2
증상	증상과 병변을 보이기 전에 급격한 폐사 유발(거의 100%)	산란저하(농장환경에 따라 10%~산란중지). 낮은 폐사, 난각 변색, 난질 저하, 사료 섭취 저하 등
발생	2003년 10월~2004년 3월 19건 발생 2006년~2007년 동절기 발생 *현재 박멸책이 진행 중	광범위한 발생으로 산란계 및 종계 농장에서 산란율 저하를 중심으로 경제적인 피해 야기

(질병관리본부, 2010)

(2) 항바이러스 치료제

- H5N1 바이러스는 원래 조류끼리만 감염되는 독감이지만, 새로운 변이형 바이러스에 의해 사람에게도 전염이 되면서, 피해를 최소화하기 위한 연구가 진행됨.
- 조류 독감 치료제로는 스위스 제약사 로슈와 미국 제약사인 길리아드 사이언스가 합작 개발한 타미플루(성분: 오셀타미비어)와 GSK의 리렌자(성분: 자나미비어)가 있음. 독감 바이러스 표면에 있는 바이러스 증식 효소 뉴라미니다아제(neuraminidase)를 억제함으로써 바이러스가 다른 세포로 확산되는 것을 저해함.

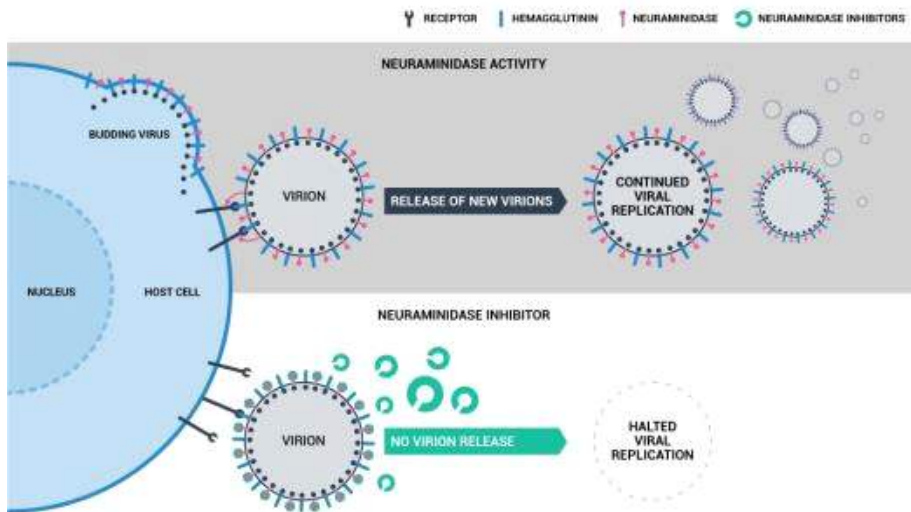


그림 11. 조류 인플루엔자 치료제(타미플루) 작용기전

(3) 백신의 부작용

- 조류 인플루엔자 바이러스는 혈청형이 다양하고 변이가 잘 되는 특성 때문에 백신 접종에 대한 효용가치가 떨어지는 것으로 평가됨. 생독백신을 사용하게 될 경우 백신주와 야외주가 조합되거나 유전자 변이가 일어나 새로운 바이러스가 생길 위험성도 있음. 사독백신의 경우 인플루엔자 감염으로 인한 폐사를 예방하고 분변을 통한 바이러스 배설을 감소시킬 순 있지만, 호흡기를 통한 전파 등 완전히 예방할 순 없음.
- 인플루엔자 감염의 초기 증상 발현 48시간 이내에 투여해야하며, 부분적으로 신종 플루 예방 효과를 낼뿐 부작용 사례가 빈번함(질병관리본부, 2010).
- 1995년, 멕시코에서 저병원성 인플루엔자가 고병원성으로 변이가 되어 사독오일 백신과 벡터백신을 접종하였지만, 그 이후에도 양계농장에서 문제가 있었음. 2012년에는 H7N3형의 고병원성 조류 인플루엔자가 발생하여 약 8,000만 수의 닭에 백

신을 접종함.

- 백신 정책을 실시하는 국가의 경우 조류 인플루엔자가 전국적으로 만연되어 있거나, 초기 방역에 실패하는 경우에 한하여 제한적으로 실시됨.
- 백신 정책을 이용하는 경우 바이러스 감염 시에도 임상 증상이 나오지 않아 바이러스 박멸을 더 어렵게 하며, 불완전 면역반응이 유도될 경우 바이러스 변이를 더욱 가속화 시킬 수 있음. 중국을 포함하여 가금 산업에 HPAI 백신을 사용하는 국가의 경우 모두 HPAI 박멸에 실패하여 상재국으로 존재하고 있으며, 이로 인해 해당 국가에서 인체 감염 사례가 빈번히 보고되고 있음.

표 7. 타미플루 복용 후 부작용 보고내역 유형별 분류

구분	환청	환각	환시	악몽/ 이상 한 꿈	이상 수면	자살 경향	충동행동/ 흥분성/ 행동과다/ 운동과다	착란	울음 이상	말하기 장애	총계
계	7	6	5	8	3	1	27	1	1	1	60
소아/ 청소년	5	4	5	6	3	0	23	0	연령 미상	0	46

(질병관리본부, 2010)

(4) 사료첨가제

- 조류 인플루엔자 백신 개발은 현실적으로 물량이 부족하며, 항바이러스 치료제의 경우 가축에 적용하기 어려운 실정임. 기존의 문제를 해결하기 위해 사료첨가용 복합 미생물 생균제 개발 및 천연물질에 대한 연구가 이루어지고 있음(바이오사료첨가제 사업단, 농림축산식품부, 2013).
- 사료란 가축이나 동물, 어류 등에 영양이 되거나 건강유지 또는 성장에 필요한 것으로 사료첨가제와 더불어 단미사료, 배합사료 등을 의미함. 단미사료를 적절한 비율로 배합하거나 가공하여 제조하는 배합사료와 달리, 사료첨가제는 배합사료에 첨가되어 소화력 향상, 병원균 저감, 지방 대사 개선, 항산화 효과, 독성 물질 제거 등의 효과를 가지게 됨.
- 사료첨가제의 종류는 매우 다양하며, 대표적인 예로는, 보존제, 향미제, 유화제, 아미노산제, 비타민제, 효소제, 생균제, 규산염제, 착색제, 추출제, 올리고당 등이 있음.
- 사료첨가제는 배합사료와 비슷하게 배합기술과 가공기술, 품질 확보 및 평가 기술에 의해 제조되며, 사료 혹은 사료첨가제 원료의 경우 수 년 이상의 개발 기간이 필요하나 원료를 조합하거나 배합하는 기술은 상대적으로 기술 레벨이 낮아 수 개의 선두업체를 제외한 다수의 중소기업이 진출, 경쟁하고 있음.

- 세계 최대 배합 기술업체인 Format Int'l과 독점 계약을 맺고 국내 대다수 배합사료 업체에 기술 용역을 제공하고 있는 (주)이지바이오는 발효 및 가공 천연제제를 독자 개발하여 항생제를 대체하고 면역력을 증강하는 제품을 개발하고 있음.

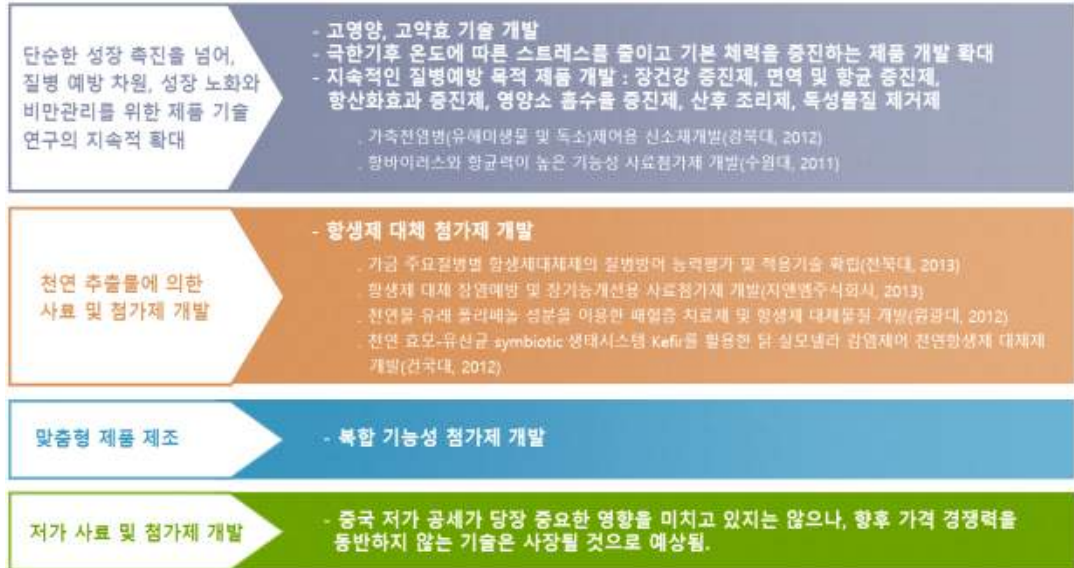


그림 12. 사료첨가제 기술 트렌드
(사료첨가제 제조기술과 시장동향 분석, 2014)

(5) 방역용 소독제

- 2016년 1월부터 5월까지 구제역 및 AI 방역용 소독약품에 대한 수거검사를 실시한 결과, 총 172품목 중 함량 부적합 3품목, 권장 희석배수 상황에서 소독 효력 미흡 26품목(함량 부적합과 중복 2건)이 확인되었음.
- 지난 3월 이후 AI가 추가 발생되지 않자 국내에서 판매되고 있는 방역용으로 허가된 220개의 소독약품에 대해 유효성분 함량검사 및 바이러스 소독 효능을 검사함. 함량검사에서는 172품목중 3품목이 부적합하였고, 구제역 소독 효력검사에서는 구제역에 허가된 150품목중 2품목이 권장희석배수 상황에서 효력이 미흡했고, AI 소독 효력검사에서는 AI에 허가된 163품목 중 26품목이 권장희석배수 상황에서 효력이 미흡하였음.
- 문제점으로 제조공정 관리 부적정으로 제품의 품질 기준을 충족하지 못하거나, 권장희석배수 설정이 부적절한 것으로 나타남(농림축산식품부, 2016).

(6) 프로바이오틱스를 이용한 사료첨가제

- 각 지자체 농업 기술센터에서는 *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lacto*

bacillus plantarum, *Saccharomyces cerevisiae* 등을 이용하나 효능이 입증된 균주를 종균으로는 사용하지 않음.

- 배양 및 공급에 치중하거나 충분한 생균수 분석 없이 공급하는 실정으로 효율성이 떨어짐.
- 대부분 TMR 사료 공장에서는 맥주박이나 감귤박 등의 자체 발효 후 사용하며, 발효물 제품의 균일성이 없고, 잡균의 오염으로 인한 안전성 문제 발생 소지를 안고 있음(발효기술을 적용한 사료첨가제 민간위탁시스템 구축, 농림축산식품부, 2016).
- 본 연구의 목적은 항바이러스 소재를 스크리닝하고 프로바이오틱스 기능이 있는 균주를 이용하여 최적화 하여 사료첨가제 및 소독제로 개발하는 것에 있음.

나. 연구개발의 경제·산업적 측면

(1) 조류인플루엔자 발생 현황 및 피해

- 2016년 3월 경기도 이천 오리농장에서 고병원성 인플루엔자가 발생함. 2003년부터 2011년까지 국내에서 발생한 AI의 혈청형은 모두 H5N1이었는데 작년부터 H5N8로 변형되었음.

표 8. 조류 인플루엔자 발생 현황 및 혈청형

구분	03/04년	06/07년	08년	10/11년	14/15년
시기	겨울철 03.12.10. ~03.3.20. (102일 간)	겨울철 06.11.22. ~06.3.6. (104일 간)	봄철 08.4.1. ~08.5.12. (42일 간)	겨울철 10.12.29. ~10.5.16. (139일 간)	겨울철 ① 14.1.16. ~7.25. (195일 간) ② 14.9.24. ~6.10. (260일 간) ③ 15.9.14. ~11.15. (62일 간)
혈청형	H5N1형	H5N1형	H5N1형	H5N1형	H5N8형
지원액	874억원 살처분보상금 458 생계소득안정 55 입식용자수매 등 361	339억원 살처분보상금 253 생계소득안정 15 입식용자수매 등 71	1,817억원 살처분보상금 683 생계소득안정 48 입식용자수매 등 1,086	807억원 살처분보상금 670 생계소득안정 39 입식용자수매 등 98	2,386억원 살처분보상금 1,392 생계소득안정 67 입식용자수매 등 916

(한국일보, 2016)

- H5N8은 기존 H5N1바이러스에 비하여 오리에서의 병원성이 낮고 증식성이 높아 오리가 폐사하지 않고 고농도의 바이러스를 배출하여 바이러스 전파가 빠르고 박멸이 매우 어려움. 닭에서의 임상 증상 또한 기존 H5N1 바이러스와 달리 느리게 나타나 진단에 혼란을 일으킴.
- 2003~2004년(정부지원액 874억원), 2006~2007년(339억원), 2008년(1,817억원), 2010~2011년(807억원)에 비해, H5N8이 원인이 된 2014~2015년 발병에서의 정부지출액이 2,386억원으로 더 큼.
- 2014년 발생한 조류 인플루엔자의 경우 최대 피해액으로 추정되었고, 정부는 AI 발생 위험지역을 'AI 방역관리지구'로 정하는 등 소독 시설 의무 설치 등 축산업 허가 기준을 강화하도록 함.

표 9. 국내 고병원성 조류 인플루엔자 피해 현황

시기	살처분 (마리)	피해액 (원)
2003년 12월 10일~2004년 3월 20일(102일 간)	392농가 528만5천	1,531억
2006년 11월 22일~2007년 3월 6일(104일 간)	460농가 280만	582억
2008년 4월 1일~5월 12일(42일 간)	1,500농가 1,020만4천	3,070억
2010년 12월 29일~2011년 5월 16일(139일 간)	286농가 647만3천	822억
2014년 1월 16일~7월 25일(91일 간)	548농가 1,396만천	4,000억(추정)

(농림축산식품부)

(2) 조류인플루엔자 인체감염 및 피해

- 조류에서 사람으로 전파가 가능한 고병원성 H5N1은 1996년 홍콩을 시작으로 아프리카, 아시아, 유럽, 중동 등 50개 이상의 국가에서도 발견됨. 유럽과 중유럽에서는 2003년 이래로 700명 이상 감염되었고, 치사율이 60%가 넘었음.

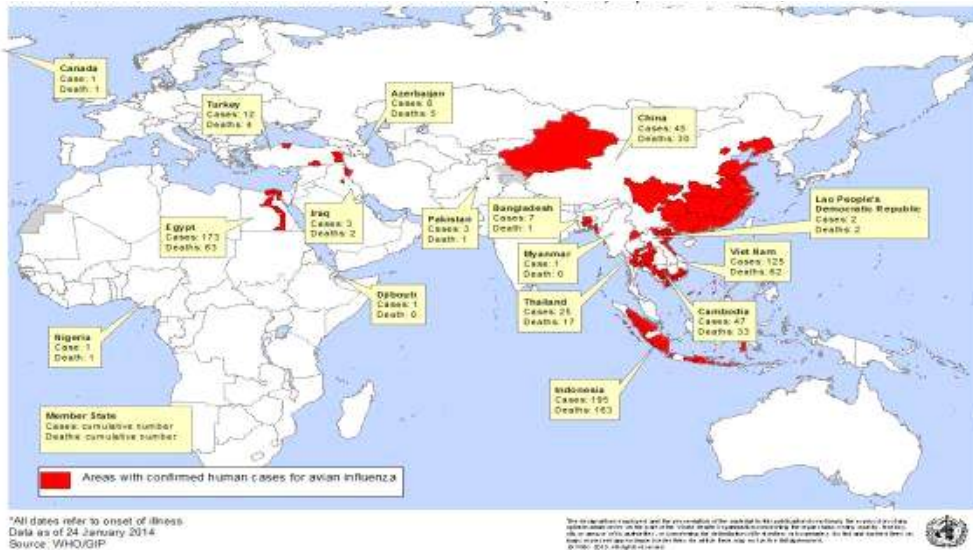


그림 13. H5N1 조류인플루엔자 발생 지역(2003~2013)(WHO)

- WHO에서 발표한 결과에 따르면, H7N9 바이러스에 걸린 571명의 환자 중 212명이 사망했고, 568건의 발생 건수 중 중국이 552건, 대만이 4건, 홍콩이 12건이 있음.

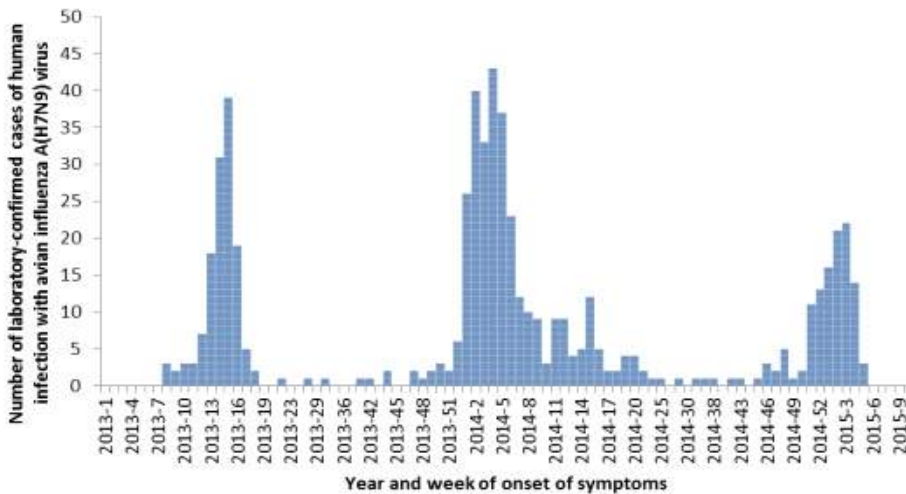


그림 14. H7N9의 사람 감염의 사례

(3) 사료첨가제 시장 동향

- 축우용 사료 시장은 2020년까지 721억 2,000만 달러에 달할 것으로 예측됨. 동남아시아 국가의 인구 1인당 쇠고기 소비량 증가, 아시아태평양 지역에서의 유제품 수요 및 미국·캐나다 비육장에서의 축군 규모 확대 등의 요인이 축우용 사료 시장 성장을 촉진하고 있음(세계의 축우용 사료 및 사료첨가제 시장 예측, 2016 Markets and markets).

-사료첨가제에 대한 엄격한 법으로 인해 EU, 일본, 한국, 북미지역에서는 가축용 항

생체의 생산량이 떨어지고 항생제 유사 물질 생산량이 증가할 것으로 고려됨. 2020년에는 아시아 시장이 전체의 35%를 차지할 것으로 예상됨.

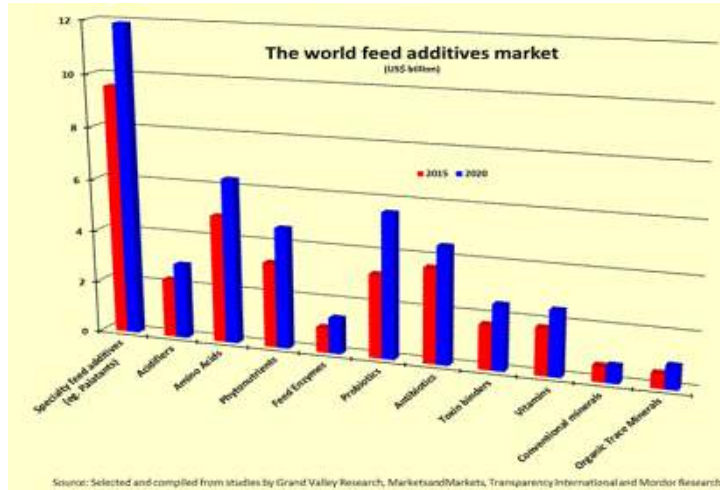


그림 15. 세계사료첨가제 시장

- 국내 시장은 2013년 기준 2,587억의 규모이며, 해외 시장 대비 약 2%의 시장 비율을 나타냄.



그림 16. 국내 사료첨가제 시장 매출
(사료첨가제 제조기술과 시장동향 분석, 2014)

- 국내 수입 사료첨가제 규모는 2012년 기준 미네랄과 비타민의 경우 각각 약 5백만 달러 증가세에 있는 반면, 항생물질은 4.2백만 달러에서 감소되는 추세임(이종택, 2014).
- 본 연구를 통해 가금류의 생산성 향상과 질병 예방에 효과적인 사료첨가제 및 방역용 소독제 개발로 축산농가의 경제적 피해액을 줄이고 사료첨가제 시장 규모 확대에 기여할 수 있음.

다. 연구개발의 사회·문화적 측면

(1) 조류인플루엔자 방역관리 대책

- 2014~2015년 AI가 발생한 이후 지역 관리, 가축 이동 추적 등 새롭게 도입된 방역조치로 인해 2016년 1월~2016년 3월에 발생한 고병원성 AI 발생 이후 초동대응과 과학적인 방역을 통해 추가 발생이 일어나지 않았음.
- 이번 방역추진 과정에서 농가의 방역의식 문제와 지자체 방역인력 부족 등 일부 문제점이 발견됨에 따라 안정적인 방역관리를 위해 대책마련을 세움.

주요 개선 내용			
	중 전	개 선	효 과
살처분	방역대 전체 예방적 살처분	위험 분석후 선역적 살처분	· 경제·사회적 비용 감소 · 농가불편 최소화
개업회사업자 방역의무	개업농가 방역관리 의무없음	방역매뉴얼, 정기관리 등 개업농가 방역관리 의무화	· 개업농가 방역관리 강화로 질병발생 최소화
역학조사	서류경사 분담 위주	GPS 축산차량 관리, 빅데이터 분석 등	· 역학조사 시간단축 · 선제적인 방역추진
살처분 보상금	보상금 감액 세부기준 미흡	감역기준 세분화(30종), 방역우수농가 인센티브 부여	· 농가에 방역책임성 강화
가축이동 시 사전검사	미실시	취약지역 가축이동시 사전검사 실시	· 가축이동으로 인한 질병전파 차단
광역별 위험관리	발생농장 중심	권역단위로 이동제한 등 방역관리	· 탁 지역 전파차단으로 확산방지

그림 17. 조류인플루엔자 방역관리 대책 (농림축산식품부)

(2) 농림축산검역본부 'One health'

- 조류인플루엔자나 구제역 등 사회적 혼란과 국민 불안을 야기하는 국가 재난형 질병에 대응하기 위해 내년까지 한국형 구제역 백신을 개발하고 인플루엔자 사전 차단을 위한 예찰 강화 및 백신 개발을 추진 중에 있음.
- 지난 5월 농림축산검역본부는 세계동물보건기구로부터 구제역 OIE 표준실험실을 인증 받았으며, 지금까지 6개 국제표준실험실을 보유하고 있음. 오는 2020년까지 총 10개의 인증 확대를 통해 OECD 10위권 수의과학기술 보유국 진입을 목표로 하고 있음.



세계동물보건기구(OIE: World Organization for Animal Health)란?

1924년 1월 25일 28개 회원국으로 출발한 이 국제기구의 본부는 프랑스 파리에 위치해 있으며, 2014년 5월 현재 회원국은 180개국에 달합니다. 우리나라는 1953년 11월에 정식으로 가입된 상황.

OIE는 국제적 협력이 필요한 가축전염병의 원인 규명 및 관리를 하고, 각국의 가축위생상황에 관한 정보교환을 하고, 질병관리규약에 관련한 국제적 협정을 검토하고 시행하는 중요한 역할을 담당합니다. 회원국 동물 및 인간에 위험한 질병발생정보를 제공하고 축산물 국제 교역시 적용되는 위생기준을 개발하는 등의 활발한 활동을 보이고 있습니다.

그림 18. 세계동물보건기구(OIE) (농수축산신문)

(3) 제3차 OIE 표준실험실 및 협력연구센터 회의

- 2014년 10월 14일~16일 인천 송도컨벤시아에서 농림축산식품부와 농림축산검역본부가 주관하고 대한수의학회가 주관한 ‘The Third Global Conference of OIE Reference Centres: Challenges and expectations for the future’ 행사가 열림.
- OIE 표준실험실과 협력연구센터 담당자 간 네트워크를 구축하고 향후 발전방안과 조류인플루엔자(AI), 구제역 등 117개 동물질병 관련 현안을 논의하였음(송도컨벤시아, 투데이, 2014).
- OIE 현재 브루셀라병, 뉴캐슬병, 사슴만성소모성질병, 광견병, 일본뇌염으로 5개의 OIE 표준실험실 보유국으로 대내외 신인도 제고 및 국제 협력 인프라를 확립함.

(3) 육계 소비 촉진

- 2015년 7월, 육계 산지가격은 kg당 1,431원으로 평년(1,883원)보다 24% 떨어짐. 이달 산지가격도 2007년 이후 가장 낮은 kg당 1,200~1,400원을 기록함.
- (사)한국육계협회에서는 AI로 인한 소비심리 위축과 닭고기 가격 폭락으로 어려움이 가중되고 있는 육계농가에 활력을 불어넣고, 최근 폭염으로 지친 소비자에게 저렴한 가격으로 닭고기를 판매해 활력을 불어넣기 위해 마련됨.
- 2014년 AI 발생으로 닭고기, 오리고기 소비량이 각각 49%, 64% 줄었음. 농림축산식품부를 비롯해 42개 정부기관은 ‘발렌타인데이’인 14일 서울 명동예술극장 앞에서 닭·오리고기 소비 촉진 캠페인을 개최하였음. 시민들에게 리플릿을 배포하며 조류인플루엔자에 걸린 닭·오리고기는 시중에 유통되지 않고, 닭·오리고기는 익혀서 먹으면 바이러스가 사멸하기 때문에 안전하다는 점을 알림.

3. 연구개발 범위

가. 연구개발의 최종목표

구분	내용
최종목표	- 조류인플루엔자에 효능이 검증된 개자, 선복화, 연교를 이용하여

	<p>항바이러스 효과를 검증하고, 이를 분리·정제하여 유효물질을 규명하고자 함.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 프로바이오틱 균주를 활용하여 약용식물을 생물전환 시켜 효능을 증대시키고자 함. - 또한, 이를 적용하여 시제품을 생산하고 효능을 검증함으로써, 조류 인플루엔자를 예방하는 사료첨가제 및 방제용 소독제를 개발하고자 함.
<p>세부목표</p>	<p>[제1세부: 개자, 선복화, 연교와 프로바이오틱 균주를 이용한 조류 인플루엔자에 항바이러스 효능 검증]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 개자, 선복화, 연교의 유용물질 분리·정제 및 항바이러스 효과 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 개자, 선복화, 연교 등의 약용식물의 항바이러스 활성 분획 제조 - 추출 조건에 따른 소재의 항바이러스 효능 검증 - 후보 물질의 항바이러스 효과 검증 - 후보 물질의 분리·정제를 통한 유효 성분 규명 2. 프로바이오틱스 균주를 이용한 약용식물의 생물전환 <ul style="list-style-type: none"> - 약용식물을 이용한 생물전환을 위한 후보 균주의 스크리닝 - 약용식물을 이용한 발효 소재 생산 최적화 - 생물전환된 물질의 분리·정제를 통한 유효 성분 규명 3. 시제품의 기능성 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 시제품의 면역 증강능 및 항염효과 검증 - 시제품의 항산화능, 항균효과 검증 <p>[제1협동: 약용식물 및 바실러스 균주를 이용한 항바이러스 예방용 사료첨가제 및 방제용 소독제 개발]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Bacillus</i> 균주를 이용한 항바이러스 후보물질 선정 <ul style="list-style-type: none"> - γ-Polyglutammic acid를 타깃으로 하여 후보 균주의 스크리닝 - 후보물질 및 기존 사료첨가제와의 배합 최적화 및 효능 검증 - 시제품 생산을 위한 후보물질 최적화 2. 시제품 개발 및 효능 검증 <ul style="list-style-type: none"> - 시제품의 제조(사료 첨가제, 방제용 소독제) - 후보물질 및 시제품의 마우스 및 닭 생체 내 항바이러스 효과 검증 - 후보물질 및 시제품의 마우스 및 닭 생체 내 면역 증강능 검증 3. 사료첨가제 및 소독제의 제품 개발 및 생산 최적화 <ul style="list-style-type: none"> - 상품화를 위한 대량생산 기술 개발

나. 연구개발의 최종목표

(1) 1차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관(건국대학교 산학협력단): 개자, 선복화, 연교의 분리·정제 및 항바이러스 효과 검증
- 협동연구기관(씨제이제일제당(주)): *Bacillus* spp.를 이용한 γ -polyglutammic acid 생산 균주의 스크리닝

② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(건국대학교 산학협력단): 개자, 선복화, 연교 등 항바이러스 소재의 분리·정제 및 항바이러스 효과 검증

✓ 개자, 선복화, 연교의 항바이러스 활성 분획 제조

- 사료로 활용 가능한 원료 중 선행 연구를 통해 항바이러스 효과가 있는 약용식물(그림 19, 20)을 다양한 추출용매로 추출하여 항바이러스 활성이 높은 추출액을 얻음.

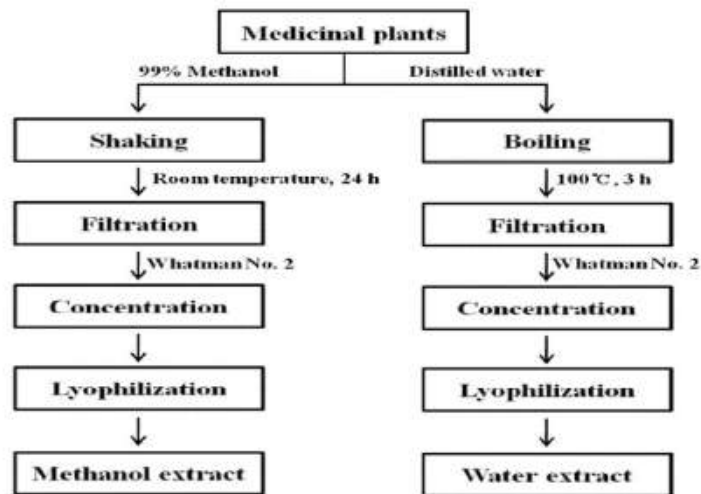


그림 19. 소재 활성물질 정제 및 분리



그림 20. 약용 식물 소재 (개자, 선복화 및 연교)

✓ 분획물의 조류 인플루엔자에 대한 항바이러스 효과 검증

- 항바이러스 효과 측정: 96-well plate에 MDCK세포를 배양한 후 100 TCID₅₀의 조류인플루엔자 바이러스를 접종함. 바이러스 접종 1시간 후 시료를 포함한 배지를 세포에 첨가함. 시료의 항바이러스 여부는 세포의 변성반응 (CPE) 및 혈구응집반응에 의해 검증함.

✓ 후보물질의 특성 규명

- Polyphenol content: 2 mL 2% Na₂CO₃에 Sample 100 μL을 3분 간 반응한 뒤, 50% Folin-Ciocalteu solution 100 μL 첨가하여 30 min 반응 후 750 nm에서 흡광도를 측정함. Gallic acid solution을 이용하여 표준곡선을 작성하여 비교 확인함.
- Flavonoid content: HPLC 분석을 위해 메탄올에 시료를 용해한 뒤, 원심분리 및 membrane filter 등을 통한 전처리 과정 후 분석에 사용함.

표 10. HPLC 분석 조건

Device condition	Information
Types of column	C ₁₈ column
Mobile phase	60% MeOH
Sample injection volume	30 μL
Wavelength	375 nm

- 협동연구기관(씨제이제일제당(주)): 항바이러스 후보물질 및 발효를 위한 후보 균주의 스크리닝

✓ 항바이러스 효과 검증을 위한 γ-PGA 생산

- 확보된 γ-PGA 생산 균주를 GYP에 배지에서 전 배양한 후, 대두박을 원료로 하여 37°C, 수분 90~95% 조건하에서 고체발효하여 γ-PGA를 생산하고 항바이러스 및 면역 증진 효과를 검증하기 위하여 crude γ-PGA를 추출함.

✓ 분자량 및 순도 측정

- 분자량 측정: Crude γ-PGA의 분자량은 gel permeation chromatography(GPC) 기기를 이용하여 분석함. 분석 컬럼은 TSKgel 컬럼을 이용하며, 이동상은 0.1 M Sodium nitrate(NaNO₃)를 사용함. 측정된 분자량은 중량 평균 분자량으로 표현함.

- 순도 측정: Crude γ -PGA의 순도를 측정하기 위하여 Eclipse AAA 아미노산 분석용 컬럼을 이용하며, 이동상은 Na_2HPO_4 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, NaN_3 를 사용함. Glutamic acid 함량을 분석하여 γ -PGA의 순도를 계산함.
- ✓ γ -PGA의 항바이러스 효과 검증
 - 항바이러스 효능 검증: 96-well plate에 MDCK세포를 배양한 후 100 TCID₅₀의 조류인플루엔자 바이러스를 접종함. 바이러스 접종 1시간 후 시료를 포함한 배지를 세포에 첨가함. 시료의 항바이러스 여부는 세포의 변성반응(CPE) 및 혈구응집반응에 의해 검증
- ✓ 면역 증강 효과 검증
 - Nitric oxide(NO) 생성능 실험: LPS(lipopolysaccharide)에 의해 유도된 대식세포 RAW 264.7 cells로부터 생성된 nitric oxide의 양을 측정함. 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 를 griess 시약을 이용하여 비색 정량함. 시료와 griess 시약을 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후, microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하고, NO_2^- 의 양은 NaNO_2 의 표준곡선을 이용하여 정량함.
 - 염증관련 cytokine 생성 저해활성 측정: RAW 264.7 cells에 단층이 형성된 후 LPS와 샘플을 처리하여, 염증 유발 억제능 측정. 염증 유발 처리 후, 세포주를 회수하여 2회 washing한 후 RNA isolation kit를 사용하여 순수한 RNA를 분리함. RT-PCR시약을 이용하여 cDNA로 전환하여 PCR실행한 후 IL-4, IL-10, IL-18, IL-1 α , TNF- α 등의 프라이머를 이용하여 cytokine 발현 여부 확인함. RT-PCR의 결과를 토대로 ELISA법으로 cytokine 생산 값 환산함.
 - 대식세포를 이용한 면역기능 평가: 시료를 THP-1세포에 4시간 동안 처리한 후 TNF- α 와 IL-6의 발현 양을 측정함. 시료를 RAW 264.7 cells에 18시간 동안 전처리한 후 LPS를 재처리하여 cytokine의 발현 억제 정도를 측정함. Cytokine의 측정은 anti-TNF- α /IL-6 capturing antibody와 biotinylated anti-TNF- α /IL-6 detection antibody를 이용한 sandwich ELISA방법을 사용함.
- ✓ 면역 증강 효과 검증
 - 균주 개량: 254 nm의 UV를 CJ 1605 균주에 조사한 후 PCA 배지에서 콜로니 형태 및 점액의 형성 여부를 분석함. 모균주 대비 높은 점액질을 형성하는 균주를 순수 분리하여 배양한 다음, γ -PGA의 생산량 및 분자량을 분석함.
 - 최적 배양 조건 확립: 선별된 개량 균주는 GYP 및 개량된 배지를 이용한 액상 배양, glutmic acid를 함유하는 대두박 등을 이용한 고체 발효를 통하여 γ -PGA 생산성을 비교 검증함.

(2) 2차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관(건국대학교 산학협력단): 프로바이오틱스 균주를 이용한 약용식물의 생물전환
- 협동연구기관(씨제이제일제당(주)): 선별된 약용식물과 균주의 항바이러스 효능 검증 및 시제품 제조

② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(건국대학교 산학협력단): 생물전환 균주 스크리닝 및 면역 활성화 검증
 - ✓ 생물전환을 위한 균주 선별
 - 프로바이오틱스 균주 중에서 선복화 추출물을 발효할 수 있는 균주 선별
 - 생균수 측정: 발효시킨 선복화 추출물을 단계별로 희석하여 TSB agar 배지에 도말하여 초기 균수와 비교하여 성장 정도를 확인함.
 - ✓ 발효물과 시제품의 면역 증강 효과
 - Nitric oxide(NO) 생성능 실험: LPS(lipopolysaccharide)에 의해 유도된 대식세포 RAW 264.7 cells로부터 생성된 nitric oxide의 양을 측정함. 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 를 griess 시약을 이용하여 비색 정량함. 시료와 griess 시약을 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후, microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하고, NO_2^- 의 양은 NaNO_2 의 표준곡선을 이용하여 정량함.
 - 염증관련 cytokine 생성 저해활성 측정: RAW 264.7 cells에 단층이 형성된 후 LPS와 샘플을 처리하여, 염증 유발 억제능 측정. 염증 유발 처리 후, 세포주를 회수하여 2회 washing한 후 RNA isolation kit를 사용하여 순수한 RNA를 분리함. RT-PCR시약을 이용하여 cDNA로 전환하여 PCR실시한 후 IL-4, IL-10, IL-18, IL-1 α , TNF- α 등의 프라이머를 이용하여 cytokine 발현 여부 확인함. RT-PCR의 결과를 토대로 ELISA법으로 cytokine 생산 값 환산함.
 - 대식세포를 이용한 면역기능 평가: 시료를 THP-1세포에 4시간 동안 처리한 후 TNF- α 와 IL-6의 발현 양을 측정함. 시료를 RAW 264.7 cells에 18시간 동안 전처리한 후 LPS를 재처리하여 cytokine의 발현 억제 정도를 측정함. Cytokine의 측정은 anti-TNF- α /IL-6 capturing antibody와 biotinylated anti-TNF- α /IL-6 detection antibody를 이용한 sandwich ELISA 방법을 사용함.
 - ✓ 발효 물질의 특성 규명

- Polyphenol content: 2 mL 2% Na₂CO₃에 Sample 100 μL을 3분 간 반응한 뒤, 50% Folin-Ciocalteu solution 100 μL 첨가하여 30분 반응 후 750 nm에서 흡광도를 측정함. Gallic acid solution을 이용하여 표준곡선을 작성하여 비교 확인함.
- Flavonoid content: 항바이러스 효과를 나타내는 발효물을 정량 및 정성 분석하기 위하여 LC/MS 이용

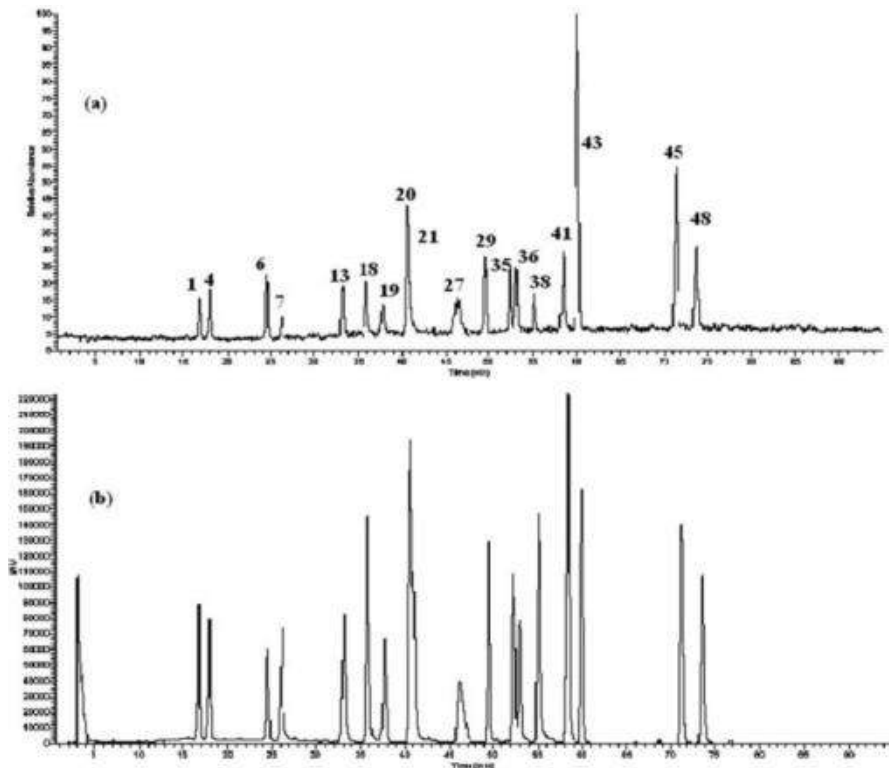


그림 21. 플라보노이드의 LC/MS 크로마토그램
(Yang, 2008)

- 협동연구기관(씨제이제일제당(주)): 생물선별된 약용식물과 균주의 항바이러스 효능 검증 및 시제품 제조
 - ✓ 최적배양 조건 연구
 - 액상 배양: 항바이러스 효과 및 면역 증강효과가 우수한 선별된 약용식물의 추출물을 액상 배지 내 1~10% 첨가한 후, γ-PGA 생산 균주를 접종하여 배양시간별로 PCA 배지에 도말하여 생균수를 측정함.
 - 고체 배양: 선별된 약용식물의 초기수분을 40~50% 조절한 후, γ-PGA 생산 균주 배양액을 원료 대비 10%(w/w) 접종한 후, 37°C, 수분 80~95% 조건 하에서 발효, PCA 배지에 도말하여 생균수를 측정함.

- 유용물질 함량 분석: 배양방법에 따른 유용물질의 함량을 분석하기 위해서 HPLC 및 GPC를 이용하여 polyphenol, flavonoid, γ -PGA, subtilisin 등의 함량을 정량 분석함.
- 생산 방법에 따른 기능성 검증: 96-well plate에 MDCK세포를 배양한 후 100 TCID₅₀의 조류인플루엔자 바이러스를 접종함. 바이러스 접종 1시간 후 시료를 포함한 배지를 세포에 첨가함. 시료의 항바이러스 여부는 세포의 변성반응 (CPE) 및혈구응집반응에 의해 검증
- ✓ 항바이러스 효과 검증 시료 제조
 - 닭 생체 내 항바이러스 효과 검증을 위하여 선별된 약용식물과 균주의 액상 발효물은 감압농축기를 이용하여 수분함량 30% 이내로 농축된 형태, 동결건조기를 이용한 분말형태로 제조하고, 고체배양물은 열풍건조를 통한 수분 12% 하의 분말로 제조함.
- ✓ 항바이러스 효과 검증 소독제 개발
 - 소독하는 대상에 따른 소독제의 개발

표 11. 소독대상에 따른 적합한 소독제의 선택

소독대상	권장소독제
축체, 사람	구연산
축사내부 (축산기구)	가축이 있을 경우: 구연산 가축이 없을 경우: 알칼리제, 염소제
축사외부	알칼리제
소독조	알칼리제, 알데히드제
차량	복합산성제, 알칼리제, 산성제제
음수소독	염소제

- 적절한 희석농도의 소독

표 12. 농장에서 사용되는 희석도구의 용량과 희석배수에 따른 소독제 사용량

희석배율	100배	200배	500배	1,000배
양동이 (10 L)	100 mL	50 mL	20 mL	10 mL
석유통 (10 L)	180 mL	90 mL	36 mL	18 mL
드럼통(200 L)	2,000 mL	1,000 mL	400 mL	200 mL

(3) 3차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관(건국대학교 산학협력단): 시제품의 기능성 검증 및 발효 소재 생산 최적화
- 협동연구기관(씨제이제일제당(주)): 약용식물을 이용하여 배양 조건 및 생산 최적화 연구
- 위탁연구기관(주식회사 카브): 항바이러스 물질의 마우스 및 닭에서 인플루엔자 바이러스에 대한 항바이러스 효능 검증

② 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(건국대학교 산학협력단): 항바이러스용 사료첨가제 및 소독제의 기능성 검증 및 발효 소재의 생산 최적화
 - ✓ 시제품의 항산화능, 항균효과 검증
 - DPPH radical 소거 활성 측정: 항산화 활성은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) free radical scavenging activity를 측정하여 분석(Brand-Williams et al., 1995).
 - ABTS radical 소거 활성 측정: 시료 추출물 20 μ L와 ABTS solution 980 μ L를 넣어 37°C에서 10분 간 반응시켜 735 nm에서 측정함.
 - β -Carotene 표백 억제 활성: Chloroform 10 mL에 β -carotene 2 mg을 혼합한 용액에 40 mg linoleic acid 및 Tween-80 200 mg을 첨가하여 β -carotene 용액을 제조함. 제조한 용액 5 mL을 round flask에 옮겨 40°C에서 감압 농축하여 chloroform을 제거함. 잔류 emulsion에 2차 증류수 100 mL를 첨가하여 강하게 진탕한 emulsion 용액 4.5 mL에 추출물 0.5 mL를 가함. 대조군으로는 추출물과 동량으로 증류수를 처리함.
 - Disc diffusion assay를 통한 항균 활성 검증: Mueller Hinton Broth(MHB)에서 24시간 배양한 *S. aureus*를 약 10^6 CFU/mL으로 조절하여 멸균된 cotton swap을 이용하여 Mueller Hinton Agar(MHA)에 도말함. 15분 후 도말이 끝난 MHA에 멸균한 8 mm 크기의 paper disc에 발효물을 50 μ L씩 분주한 뒤 24시간 배양하여 생성된 inhibition zone의 크기를 측정하여 항균 능력을 측정함.
 - ✓ 약용식물을 이용한 발효 소재 생산 최적화
 - 발효배지 선정: 약용식물에 균주를 접종하여 발효하거나 약용식물을 용매를 이용하여 추출하여 동결건조 한 후 농도를 달리하여 균주를 접종하여 최적화시킴.

- 발효 조건 최적화: 후보 균주의 성장환경을 조절하기 위해 pH, 초기 균수, 배양 시간, 배양온도 등을 고려하여 발효 효율을 최대화함.
- 협동연구기관(씨제이제일제당(주)): 약용식물을 이용하여 배양 조건 및 생산 최적화 연구
 - ✓ 최적배양 조건 연구
 - 액상 배양: 항바이러스 효과 및 면역 증강효과가 우수한 선별된 약용식물의 추출물을 액상 배지 내 1~10% 첨가한 후, γ -PGA 생산 균주를 접종하여 배양 시간별로 PCA 배지에 도말하여 생균수를 측정함.
 - 고체 배양: 선별된 약용식물의 초기수분을 40~50% 조절한 후, γ -PGA 생산 균주 배양액을 원료 대비 10%(w/w) 접종한 후, 37°C, 수분 80~95% 조건 하에서 발효, PCA 배지에 도말하여 생균수를 측정함.
 - 유용물질 함량 분석: 배양방법에 따른 유용물질의 함량을 분석하기 위해서 HPLC 및 GPC를 이용하여 polyphenol, flavonoid, γ -PGA, subtilcin 등의 함량을 정량 분석함.
 - 생산 방법에 따른 기능성 검증: 96-well plate에 MDCK세포를 배양한 후 100 TCID₅₀의 조류인플루엔자 바이러스를 접종함. 바이러스 접종 1시간 후 시료를 포함한 배지를 세포에 첨가함. 시료의 항바이러스 여부는 세포의 변성반응(CPE) 및 혈구응집반응에 의해 검증
 - ✓ 경제성 산출 및 생산최적화 모델 수립
 - 제조 방법 별 예상 투자비 및 제조원가를 산출하여 항바이러스 효과 대비 경쟁력 있는 제조 모델을 수립함. 액상 발효, 고체 발효 중 경제성 있는 모델에 대해서 pilot 스케일에서의 최적화를 진행함.
 - 액상 배양(pilot scale): 항바이러스 효과 및 면역 증강효과가 우수한 선별된 약용식물의 추출물을 액상 배지 내 1~10% 첨가한 후, γ -PGA 생산균주 전 배양액을 1% 접종하여 교반 속도, pH, DO 및 aeration에 따른 미생물 성장 및 γ -PGA 생산량을 분석하여 γ -PGA 생산을 위한 최적 배양조건을 확립함.
 - 고체 배양(pilot scale): 선별된 약용식물의 초기 수분을 40~50% 조절한 후, γ -PGA 생산 균주 배양액을 원료 대비 10%(w/w) 접종한 후, 배양온도 35~45°C, 수분 80~95%, 공조 속도 800~1,200 rpm 조건 하에서 γ -PGA 생산을 위한 최적 배양조건을 확립함.
 - ✓ 시제품 제조 및 사료 적응

- 양계 사료 적용을 위한 분말, 액상 형태의 시제품을 제조하여 옥수수-대두박 위주의 육계 사료 배합비에 적용하여 펠렛팅 가공조건에서 약용식물의 항바이러스 물질 및 γ -PGA, 바실러스 균주의 열안정성을 검증함.
- 열안정성 검증: 펠렛팅 온도 및 처리시간에 따른 사료 내 polyphenol, flavonoid, γ -PGA 함량을 HPLC 및 GPC를 이용하여 분석하며, 바실러스 생균수는 펠렛팅 가공공정을 거친 사료를 분쇄한 후, 멸균증류수로 10배수로 희석하여 PCA에 도말하여 생성되는 colony 수를 측정함.
- 위탁연구기관(주식회사 카브): 마우스 및 닭 생체 내 항바이러스 물질의 인플루엔자 방어 효능 평가

✓ 마우스 모델을 이용한 항바이러스 물질의 인플루엔자 방어 효능 평가

- BALB/c 마우스를 이용하여 항바이러스 물질 비강 투여 시 인플루엔자 억제 확인
- 바이러스 접종 전 10일 간 예방적으로 6회 항바이러스 물질 투여 후 인플루엔자 바이러스를 공격접종하여 효능을 확인함.
- 치사율 변화 확인 : 인플루엔자 바이러스 공격 접종 후 비투여 대조군 대비 치사율 변화를 관찰
- 체중변화 및 임상 증상 확인
- 폐내 바이러스 정량 분석: 공격접종 3일, 6일 후 마우스 폐의 RNA 추출 후 real-time PCR을 통하여 정량 분석 한다. CT value는 standard curve를 이용하여 EID로 환산

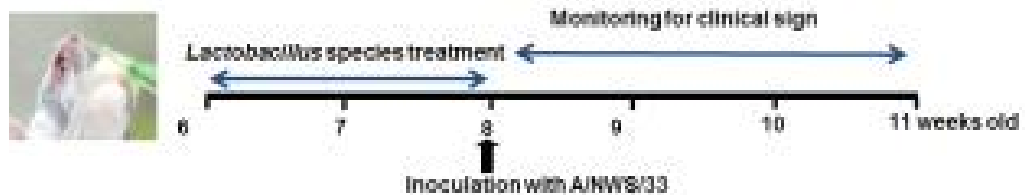


그림 22. 항바이러스 물질 평가용 마우스 모델 모식도

✓ 닭 모델을 이용한 항바이러스 물질의 인플루엔자 방어 효능 평가

- 3주령 SPF chicken을 이용하여 항바이러스 물질의 비강 및 경구 투여 시 인플루엔자 억제 정도 확인

- 바이러스 공격접종 전 항바이러스 물질의 1주일 및 접종 후 5일 동안 투여함.
- 임상 증상 변화 확인: 인플루엔자 바이러스 공격 접종 후 비투여 대조군 대비 임상 증상의 정도 관찰
- 바이러스 배출량 및 배출기간 확인: 공격 접종 후 1, 3, 5, 7, 9일의 구강 및 총 배설장 swab sample의 RNA를 추출하여 real-time PCR을 통하여 정량 분석. CT value는 standard curve를 이용하여 EID로 환산



그림 23. 항바이러스 물질 평가용 닭 모델 모식도

제 2장 연구수행 내용 및 결과

제 1절 제 1차년도 (16. 11. 29. ~17. 11. 28.)

1. 개자, 선복화 및 연교의 분리·정제 및 항바이러스 효과 검증(건국대학교 산학협력단)

가. 개자, 선복화, 연교의 추출물 제조

(1) 항바이러스 소재 탐색을 위한 추출물 제조

✓ 약용식물 구입 및 추출물 제조

- 선행 연구를 기반으로 항바이러스 가능성이 있는 3종의 약용 식물을 선별(Lee et al., 2014)
- 각 약용식물은 검수 후 voucher specimen number를 부여하여 보관하였으며(개자: KU-H13, 선복화: KU-H22, 연교: KU-H26), 각 약용식물을 물, 에탄올 및 메탄올을 사용하여 70℃에서 6시간 동안 추출하였음. 각 약용식물의 추출물은 그림 24와 같음.

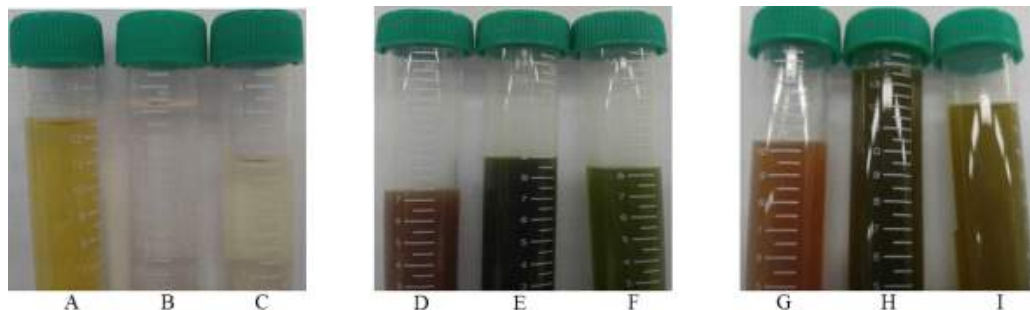


그림 24. 개자, 선복화, 연교의 열수, 에탄올, 메탄올 추출물

(A, 개자 열수 추출물; B, 개자 에탄올 추출물; C, 개자 메탄올 추출물; D, 선복화 열수 추출물; E, 선복화 에탄올 추출물; F, 선복화 메탄올 추출물; G, 연교 열수 추출물; H, 연교 에탄올 추출물; I, 연교 메탄올 추출물)

나. 후보 물질의 특성 규명

(1) 각 추출물의 phytochemical 특성 확인

✓ Total phenolic contents 확인

- 총 페놀화합물 양은 Folin-Ciocalteu assay를 통하여 확인함(Park et al., 2017). 각 추출물 90 μ L를 2% sodium carbonate 용액 1.8 mL와 혼합한 뒤, 50%(v/v)

v) Folin-Ciocalteu 용액을 첨가하여 30분 동안 암실에서 반응함. 이 후, 752 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, gallic acid 용액을 이용하여 표준곡선을 작성 후 그 값을 계산함. 각 추출물의 총 페놀화합물 함량은 표 13과 같음.

✓ Total flavonoid contents 확인

- 총 플라보노이드 함량은 aluminium chloride assay를 통하여 확인함(Friedman et al., 2017). 각 추출물 100 µL를 5% sodium nitrite 용액 20 µL와 혼합한 뒤, 60% 에탄올 800 µL를 첨가하여 6분 간 반응함. 이 후, 10% aluminium chloride 용액 20 µL과 4% sodium hydroxide 용액 60 µL를 첨가한 뒤 30분 간 암실에서 반응을 진행함. 플라보노이드는 aluminium chloride와 노란색의 복합체를 형성하며 이를 405 nm에서 흡광도를 측정하여 총 플라보노이드 함량을 확인함. 표준곡선은 quercetin을 사용하여 각 추출물 내 플라보노이드 함량을 계산함. 각 추출물의 총 플라보노이드 함량은 표 13과 같음.

✓ Total saponin contents 확인

- 총 사포닌 함량은 vanillin assay를 통하여 확인함(Chan et al., 2014). 각 추출물 100 µL를 8% vanillin 용액 100 µL와 혼합한 후, 72% 황산 용액 1 mL를 첨가하여 반응을 시작함. 반응은 60°C에서 10분 간 진행함. 이 후, 상온에서 15분 간 냉각 후 540 nm에서 흡광도를 측정함. 표준곡선으로 quillaja saponin을 사용하여 사포닌 함량을 확인함. 각 추출물의 총 사포닌 함량은 표 13과 같음.

✓ Condensed tannin contents 확인

- 축합형 타닌 함량은 vanillin-HCl assay를 통하여 확인함(Friedman et al., 2017). 각 추출물 20 µL를 4% vanillin 용액 600 µL와 혼합한 뒤, 묽은 염산 600 µL를 첨가하여 암실에서 반응을 시킴. 20분 간 반응시킨 뒤, 500 nm에서 흡광도를 측정함. 표준곡선으로 catechin을 사용하여 축합형 타닌 함량을 확인함. 각 추출물의 축합형 타닌 함량은 표 13과 같음.

✓ Reducing sugar contents 확인

- 환원당 함량은 DNS 시약을 사용하여 확인함(Ballesteros et al., 2017). 각 추출물 100 µL를 DNS 시약 100 µL와 혼합하여 10분 간 끓는 물로 가열하여 반응을 진행함. 이 후, 15분 간 얼음에서 냉각 후 1 mL의 증류수를 첨가한 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 확인함. 표준곡선으로 glucose를 사용하여 환원당 함량을 계산하였음. 각 추출물의 환원당 함량은 표 13과 같음.

표 13. 농장에서 사용되는 희석도구의 용량과 희석배수에 따른 소독제의 사용량

약용 식물	추출 용매	총 페놀화합물	총 플라보노이드	총 사포닌 함량	축합형 타닌 함량	환원당 함량 (mg GE/g)
-------	-------	---------	----------	----------	-----------	------------------

		함량 (mg GAE/g solid)	함량 (mg QE/g solid)	(mg QSE/g solid)	(mg CE/g solid)	solid)
개자	열수	17.9±0.1	4.1±0.0	62.7±0.3	0.4±0.0	3.5±0.2
	에탄올	1.4±0.1	62.6±3.4	23.5±1.4	1.4±0.1	0.7±0.0
	메탄올	2.0±0.2	9.9±0.5	18.7±0.5	0.2±0.0	1.3±0.2
선복 화	열수	50.8±2.5	51.6±1.0	82.9±2.6	0.8±0.0	5.0±0.2
	에탄올	42.1±3.3	225.7±5.1	288.1±7.8	10.2±0.3	4.5±1.6
	메탄올	33.0±1.4	214.2±0.7	201.7±0.8	3.5±0.3	6.2±1.1
연교	열수	113.3±4.3	40.7±0.2	137.1±2.2	0.7±0.0	7.6±0.2
	에탄올	147.4±5.8	242.3±3.5	439.3±4.9	14.1±0.7	8.7±0.9
	메탄올	111.2±4.8	207.0±6.3	411.3±1.8	7.3±0.3	9.2±0.3

- 총 페놀화합물의 함량은 연교에서 가장 높은 함량을 나타내었으며, 개자에서는 플라보이드 함량이 높은 것으로 확인되었음. 선복화와 연교에서는 총 사포닌 함량이 비교한 다른 물질보다 높게 확인되었음.

(2) 각 추출물의 항바이러스능 확인

✓ TCID₅₀ 측정을 통한 바이러스 증식 억제 확인

- Influenza virus H1N1 A/NWS/33 인플루엔자 바이러스는 9~11일 사이의 계대 야 종란에서 분리한 요막강액에 48시간 동안 37°C에서 배양하여 사용하였음(Re n et al., 2018). 배양한 인플루엔자 바이러스는 각 추출물과 1:1로 혼합하여 4°C에서 30분 동안 배양 후, 2×10⁴ cells/well 농도의 MDCK 세포주에 처리하여 바이러스 증식 억제를 확인함. 바이러스 및 추출물을 처리한 MDCK 세포주는 4-5일 간 37°C에서 배양한 뒤 1% crystal violet 용액을 이용하여 세포병변효과 (CPE)를 측정하여 증식 억제를 확인함(Law et al., 2017). 추출물에 의한 바이러스 증식 억제능은 표 14와 같음.

표 14. 약용식물 추출물에 의한 바이러스 증식억제능

약용식물	추출용매	바이러스 역가(TCID ₅₀ /25 μL)				
		Control	농도 (%)			
			1	10	50	100
개자	물	10 ^{4.8}	10 ^{4.9}	10 ^{4.8}	10 ^{4.9}	10 ^{4.6}
	에탄올		10 ^{4.6}	10 ^{4.1}	10 ^{3.6}	10 ^{1.5}
	메탄올		10 ^{4.6}	10 ^{4.6}	10 ^{4.3}	10 ^{1.5}
선복화	물	10 ^{4.8}	10 ^{4.4}	10 ^{4.9}	10 ^{4.6}	10 ^{3.9}
	에탄올		10 ^{4.5}	10 ^{4.1}	10 ^{2.5}	0
	메탄올		10 ^{4.8}	10 ^{4.4}	10 ^{3.3}	10 ^{2.5}
연교	물	10 ^{4.8}	10 ^{4.6}	10 ^{4.3}	10 ^{3.9}	10 ^{3.8}
	에탄올		10 ^{4.6}	10 ^{3.9}	10 ^{4.0}	10 ^{3.5}
	메탄올		10 ^{4.6}	10 ^{4.1}	10 ^{4.0}	10 ^{3.5}

- 개자 추출물은 에탄올 및 메탄올 추출물에서 최고 3.3 Log TCID₅₀/25 μL의 바이러스 증식 억제력을 보였으며, 선복화는 에탄올 추출물을 처리시 바이러스 증식에 의한 CPE가 발견되지 않았음. 연교 추출물은 모든 용매에서 약 1 Log TCID₅₀/25 μL의 증식 억제능이 확인되었으나, 개자 및 선복화 추출물에 비하여 약한 효능을 나타내었음.

✓ Cytotoxicity assay를 통한 항바이러스능 확인

- Monolayer를 형성한 MDCK 세포주에 바이러스를 40분 동안 감염시킨 후, 잔여 바이러스를 제거하고 1% agarose 및 추출물을 첨가한 배지에서 48시간 동안 인플루엔자 바이러스가 감염된 MDCK 세포주를 배양함. 배양 후, 1% crystal violet 용액을 이용하여 잔여 바이러스 plaque를 확인하여 MDCK 세포의 생존률은 neutral red를 이용하여 확인하였음. 이후 50% 세포독성을 지니는 농도(CC₅₀) 및 감염된 바이러스의 50% 증식 억제력을 지니는 농도(EC₅₀)를 통하여 selective index(SI) 수치를 계산하여 각 추출물의 항바이러스능을 확인함(Ha et al., 2014). 각 추출물의 항바이러스능은 표 15와 같음.

표 15. 약용식물 추출물에 의한 바이러스 증식억제능

항바이러스 소재		CC ₅₀ ^a (μg/mL)	EC ₅₀ ^b (μg/mL)	SI ^c
Tamiflu		569.25±13.43	1.72±0.21	330.170
Chlorogenic acid		72.34±2.21	24.77±1.03	2.920
Kaempferol		18.63±0.06	2.46±0.21	7.585
약용식물	추출용매	CC ₅₀ (mg/mL)	EC ₅₀ (mg/mL)	SI
개자	물	9.73±1.40	0.71±0.06	13.668
	에탄올	1.91±0.11	Not effective	Not effective
	메탄올	3.15±0.06	0.41±0.19	7.765
선복화	물	0.68±0.11	Not effective	Not effective
	에탄올	0.19±0.02	Not effective	Not effective
	메탄올	0.02±0.02	Not effective	Not effective
연교	물	0.10±0.02	Not effective	Not effective
	에탄올	0.02±0.00	Not effective	Not effective
	메탄올	0.01±0.00	Not effective	Not effective

- MDCK 세포주에 감염된 인플루엔자 바이러스의 억제능은 개자 열수 추출물 및 메탄올 추출물에서 효능을 나타내었으며, 선복화 및 연교의 추출물은 높은 독성을 나타내며 바이러스의 억제능 또한 나타나지 않았음. 개자 열수 추출물 및 메탄올 추출물은 각각 13.668 및 7.765 SI 값을 나타내어 항바이러스능을 지닌 플라보노이드로 보고된 chlorogenic acid 및 kaempferol보다 좋은 항바이러스 소재 가능성을 보임. 현재 시판 중인 타미플루는 SI 수치는 뛰어나나, 임신부 및 노약자 등에서 부작용이 계속 보고되는 추세임을 고려하였을 시, 개자의 항바이러스 소재 활용 가능성이 기대됨.

(3) 선복화 추출물 내 항바이러스 유효 성분 확인 (정성 검출)

✓ Mass analysis를 통한 유효성분 검출

- 각 선복화 추출물의 유효성분의 정성적 검출은 mass analysis를 이용하여 유효성분의 분자량 확인을 통하여 진행함. 각 추출물은 100배 희석하여 사용하였으며, 이동상으로 물과 ACN을 이용하여 분석을 진행함. 예상 유효성분의 base peak chromatogram 및 mass spectrum은 그림 25와 같음.

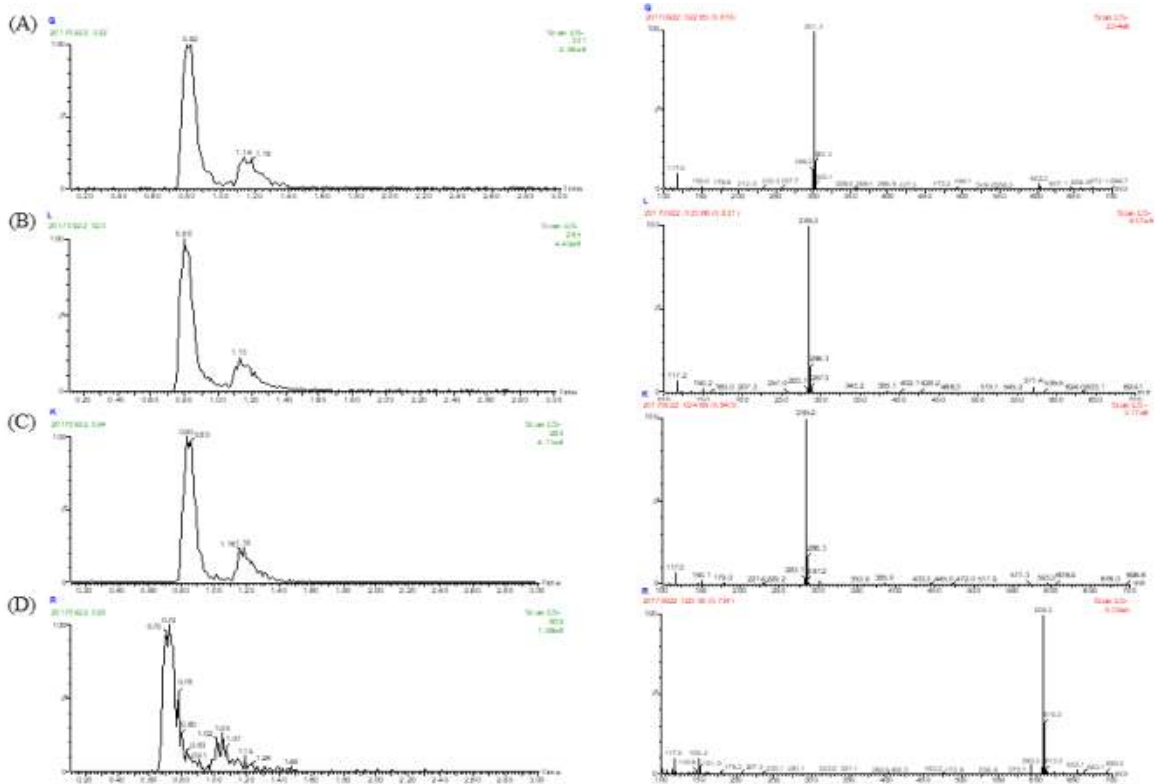


그림 25. 예상 유효물질(geurcetin, luteolin, kaempferol 및 rutin)의 base peak chromatogram 및 mass spectrum(A, quercetin; B, luteolin; C, kaempferol; D, rutin)

- 그림 25의 결과를 바탕으로 각 추출물의 분석을 진행하였으며, 그 결과는 그림 26~30과 같음.

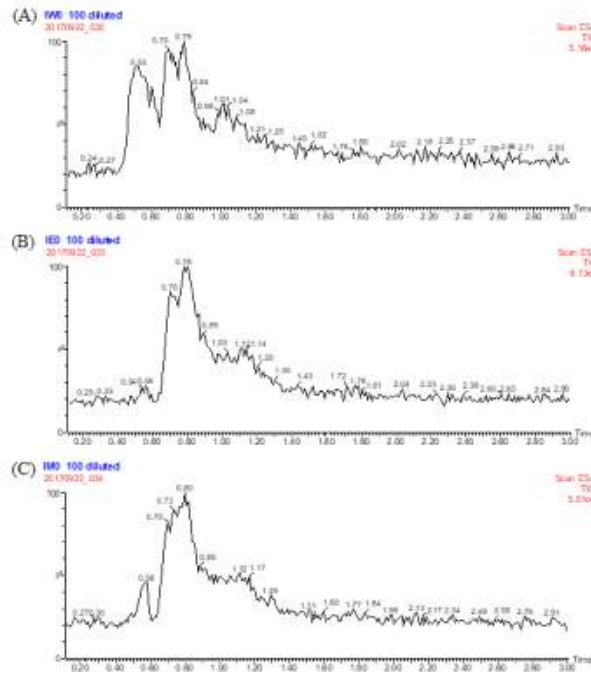


그림 26. 각 추출물의 total ion current chromatogram
 (A, 선복화 열수 추출물; B, 선복화 에탄올 추출물; C, 선복화 메탄올 추출물)

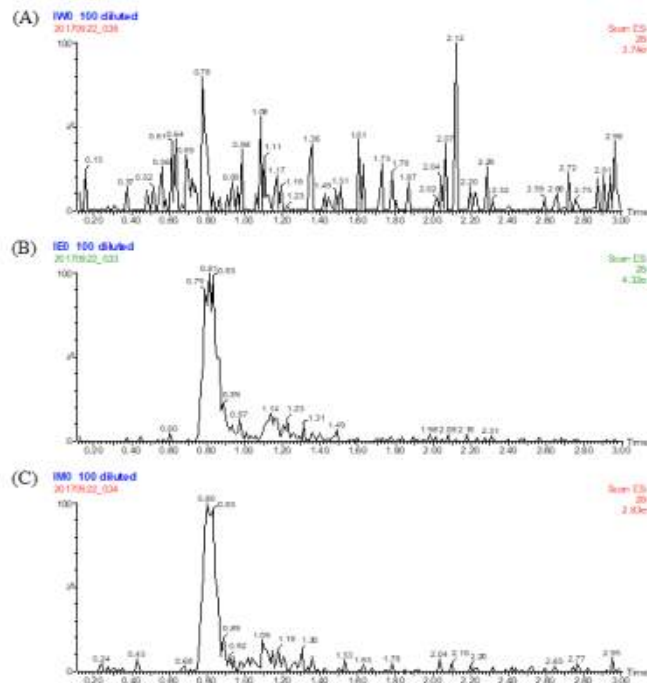


그림 27. 각 추출물의 분자량이 286인 이온에 해당하는 extracted-ion chromatogram
 (A, 선복화 열수 추출물; B, 선복화 에탄올 추출물; C, 선복화 메탄올 추출물)

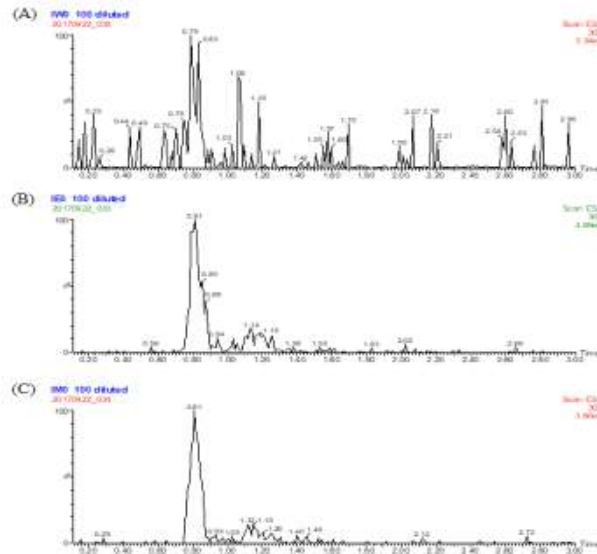


그림 28. 각 추출물의 분자량이 302인 이온에 해당하는 extracted-ion chromatogram (A, 선복화 열수 추출물; B, 선복화 에탄올 추출물; C, 선복화 메탄올 추출물)

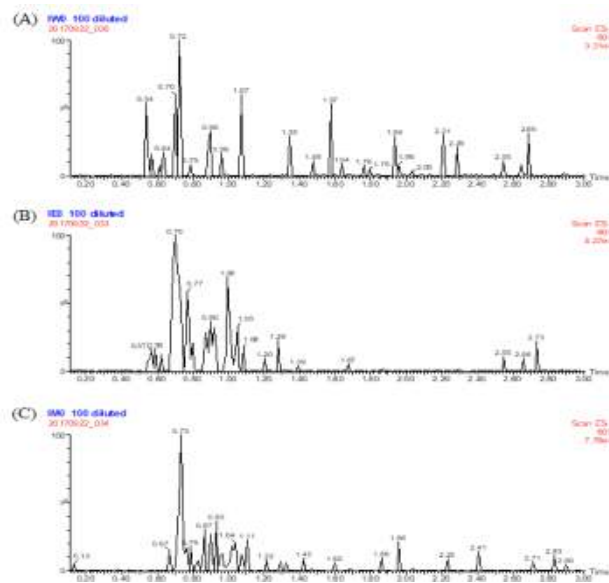


그림 29. 각 추출물의 분자량이 610인 이온에 해당하는 extracted-ion chromatogram (A, 선복화 열수 추출물; B, 선복화 에탄올 추출물; C, 선복화 메탄올 추출물)

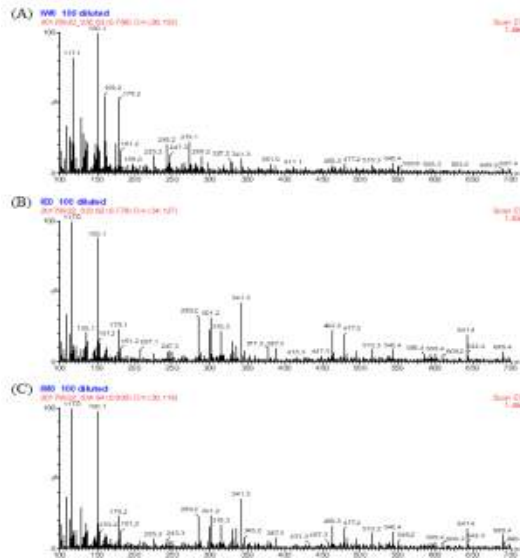


그림 30. 각 추출물의 mass spectrum

(A, 선복화 열수 추출물; B, 선복화 에탄올 추출물; C, 선복화 메탄올 추출물)

- 그림 26~30의 total ion chromatogram 및 mass spectrum에 의하면, 각 추출물은 quercetin, rutin 및 kaempferol을 유효성분으로 지니는 것으로 예상되며, kaempferol의 경우 mass analysis 만으로는 같은 분자량의 luteolin과의 차이를 확인하기가 어려움. 따라서 위의 mass analysis 결과를 바탕으로 tandem mass analysis 및 각 유효성분의 함량을 확인하고자 UPLC-ESI-Q/Orbitrap tandem mass analysis를 진행함.

(4) 선복화 추출물 내 항바이러스 유효 성분 확인 (정성 및 정량 검출)

✓ Tandem mass analysis를 통한 유효성분의 확인

- 각 선복화 추출물의 유효성분의 정성 및 정량적 검출은 UPLC-ESI-Q/Orbitrap tandem mass analysis를 이용하여 확인함. 고정상으로 Hypersil GOLD™ C18 column (2.1mm×100 mm, 1.9 μm)을 사용하였으며, 이동상으로는 0.1% 포름산이 첨가된 물과 ACN을 사용하였음. 이온화는 negative mode ([M-H])를 이용하였으며, 추출물 내 mass spectrum 및 tandem mass spectrum은 각각 35,000 및 17,500의 분해능으로 진행하였음. 모든 데이터는 Xcalibur™ software를 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 표 16과 같음.

표 16. 약용식물 추출물에 의한 바이러스 증식억제능

약용 식물	추출 용매	유효 성분	검출시간 (min)	m/z [M-H]	MS ² fragment	분자식	함량 (μg/mg)
개 자	물	Sinigrin	1.18	358.02857	96.95876	C ₁₀ H ₁₇ NO ₉ S ₂	4.116±0.129
		<i>p</i> -Coumaric acid	5.67	163.03907	119.04838	C ₉ H ₈ O ₃	< LOQ

		Kaempferol	13.43	285.04058		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	< LOQ
		Chlorogenic acid	21.86	353.20112	96.95842	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	< LOQ
	에 탄 올	Sinigrin	1.14	358.02533	96.95830	C ₁₀ H ₁₇ NO ₉ S ₂	1.458±0.027
선 복 화	물	Chlorogenic acid	18.03	353.20108	96.95840	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	< LOQ ^a
		Chlorogenic acid	0.02	353.20114	191.05487	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	< LOQ
		Caffeic acid	0.11	179.03377	135.04334	C ₉ H ₈ O ₄	2.396±0.028
		Ergolide	0.95	305.06863	96.95835	C ₁₇ H ₂₂ O ₅	< LOQ
		Quercetin	1.02	301.20163	178.99738, 151.00216	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	< LOQ
		Vanillic acid	1.41	167.03338	123.04357	C ₈ H ₈ O ₄	0.824±0.028
		Protocatechuic acid	2.03	153.01789	109.02792	C ₇ H ₆ O ₄	0.177±0.025
		6-Methoxyluteolin	2.50	315.05063	300.02761	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	< LOQ
		Kaempferol	13.36	285.04061		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	< LOQ
	에 탄 올	Protocatechuic acid	0.03	153.01790	109.02793	C ₇ H ₆ O ₄	0.428±0.010
		Caffeic acid	0.99	179.03378	135.04408	C ₉ H ₈ O ₄	< LOQ
		Chlorogenic acid	1.15	353.20122	191.05492, 96.95845	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	0.579±0.019
		Ergolide	1.17	305.07113	96.95837	C ₁₇ H ₂₂ O ₅	< LOQ
		Syringic acid	1.47	197.80735	151.06027	C ₉ H ₁₀ O ₅	< LOQ
		Isoquercetin	2.81	463.08749	300.02766	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	< LOQ
		Nepitrin	4.80	477.10246	315.05086	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	< LOQ
		Rutin	5.83	609.14910	300.02769	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	0.664±0.010
		Quercetin	5.84	301.03572	178.99742, 151.00220	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	6.142±0.390
		Kaempferol	6.34	285.04067		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	0.221±0.025
		6-Methoxyluteolin	6.50	315.05071	300.02767	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	4.261±0.137
		Patuletin	9.60	331.04501	316.02324, 285.04065	C ₁₆ H ₁₂ O ₈	< LOQ
		Ferulic acid	10.92	193.04926	147.02829	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	0.865±0.012
		Hispidulin	13.60	299.05650	284.03236	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	0.867±0.083
		Chlorogenic acid	0.02	353.20114	191.05487	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	< LOQ
		Caffeic acid	0.11	179.03377	135.04334	C ₉ H ₈ O ₄	2.396±0.028
		Ergolide	0.95	305.06863	96.95835	C ₁₇ H ₂₂ O ₅	< LOQ
		Quercetin	1.02	301.20163	178.99738, 151.00216	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	< LOQ
		Vanillic acid	1.41	167.03338	123.04357	C ₈ H ₈ O ₄	0.824±0.028
		Protocatechuic acid	2.03	153.01789	109.02792	C ₇ H ₆ O ₄	0.177±0.025
		6-Methoxyluteolin	2.50	315.05063	300.02761	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	< LOQ
Kaempferol	13.36	285.04061		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	< LOQ		
연 교	물	Forsythoside A	6.10	623.19745	179.03355	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	78.735±1.703
		Chlorogenic acid	27.76	353.20124	96.95845	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	0.530±0.014
	에 탄 올	Caffeic acid	1.05	179.03373	135.04332	C ₉ H ₈ O ₄	< LOQ
		Arctigenin	1.08	371.12045	325.18523	C ₂₁ H ₂₄ O ₆	2.270±0.122
		Vanillic acid	1.21	167.03438	123.04418, 108.02051	C ₈ H ₈ O ₄	0.653±0.131
		Protocatechuic acid	2.18	153.01786	109.02791	C ₇ H ₆ O ₄	0.426±0.026
		Astragalinalin	3.21	447.09172	269.10268	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	0.730±0.027
		Forsythoside A	3.48	623.19776	179.03370	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	168.735±1.549
		Chlorogenic acid	3.71	353.23580	191.05486, 96.95844	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	0.351±0.010
		Rutin	4.56	609.14181	300.02756	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	< LOQ

	Forsythoside G	6.26	769.25908	179.03370	C ₃₅ H ₄₆ O ₁₉	< LOQ
	Quercetin	12.27	301.03568	178.99739, 151.00303	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	0.245±0.054
	Kaempferol	12.56	285.04062		C ₁₅ H ₁₀ O ₆	< LOQ

- 분석결과 개자 및 선복화 추출물에서 항바이러스 효능을 지닌 플라보노이드 및 페놀화합물인 kaempferol 및 chlorogenic acid가 검출되었으며, 이를 통하여 표 14 및 15에서 나타난 개자 및 선복화의 항바이러스 효능을 검토할 수 있었음.

(5) 항바이러스 활성 분획 제조

✓ Column chromatography를 통한 활성 분획 제조

- TCID₅₀ value에서 가장 뛰어난 효능을 보인 선복화 에탄올 추출물의 항바이러스 활성 분획을 분리하기 위하여 column chromatography를 진행함. Chromatography는 고정상으로 C18-reversed phase silica gel을 이용하였으며, 이동상으로는 ethyl acetate, *n*-hexane 및 toluene을 혼합하여 진행함. 선복화 에탄올 추출물의 항바이러스 활성 분획 과정은 그림 31과 같음.

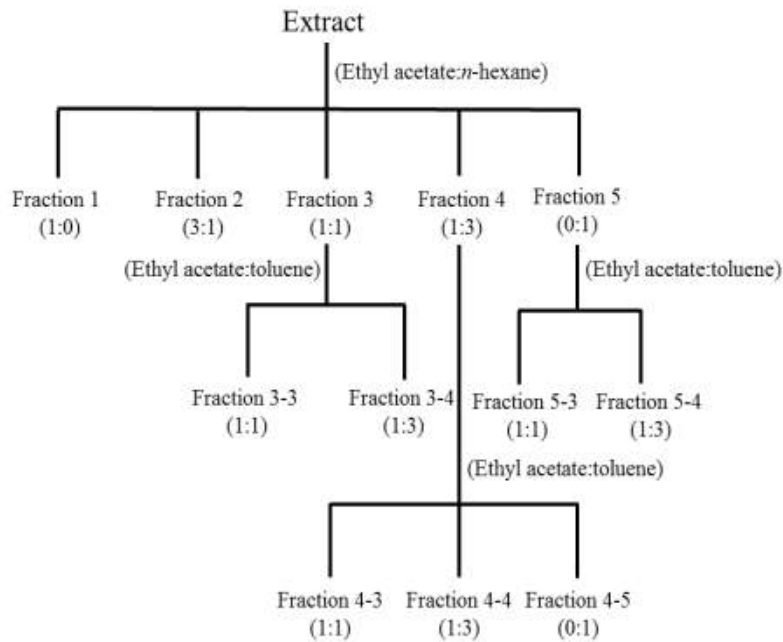


그림 31. 선복화 에탄올 추출물의 항바이러스 활성 분획 제조 과정

✓ 항바이러스 활성 분획의 항바이러스능 검증

- 그림 31의 방법에 따른 7종의 최종분획물이 지닌 항바이러스 효능을 확인하기 위하여 TCID₅₀ 측정하였음. 바이러스 및 MDCK 세포주의 준비와 항바이러스 효능 확인은 추출물을 이용한 TCID₅₀ 측정방법과 동일하게 진행함. 최종분획물의 항바이러스 효능은 표 17과 같음.

표 17. Column chromatography를 통해 획득한 선복화 에탄올 추출물 분획의 항바이러스능

선복화 에탄올 추출물 분획	바이러스 역가(TCID ₅₀ /25 μL)
Control	10 ^{4.8}
Fraction 3-3	0
Fraction 3-4	0
Fraction 4-3	0
Fraction 4-4	0
Fraction 4-5	0
Fraction 5-3	0
Fraction 5-4	0

- 각 최종분획물의 바이러스 역가는 0 TCID₅₀/25 μL를 나타내어 각 분획물은 바이러스 활성을 억제하는 것으로 확인됨.

✓ 항바이러스 활성 분획 mass spectrum 확인

- 그림 31의 방법에 따른 7종의 최종분획물이 지닌 항바이러스 효능을 지님을 확인함에 따라 각 분획물의 mass spectrum을 확인함. Mass spectrum은 선복화 추출물의 mass analysis와 동일하게 진행하였으며, 그 결과는 그림 32와 같음.

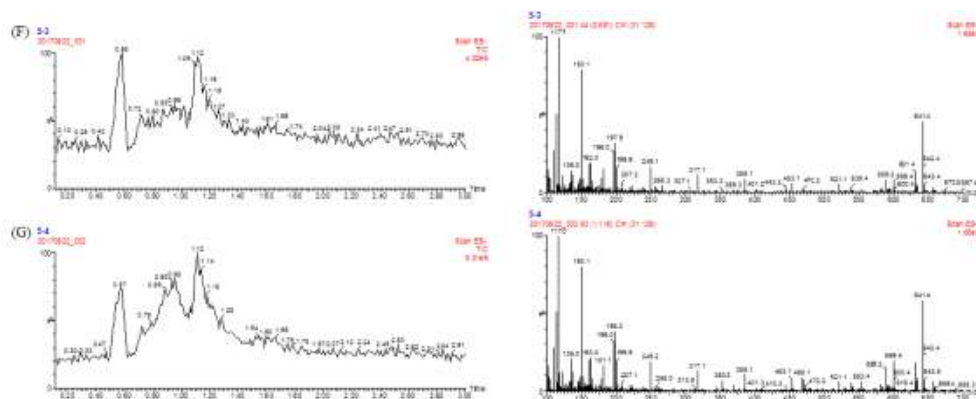


그림 32. 선복화 에탄올 추출물 분획의 mass spectrum

(A, fraction 3-3; B, fraction 3-4; C, fraction 4-3; D, fraction 4-4; E, fraction 4-5; F, fraction 5-3; G fraction 5-4)

- 각 분획물의 mass spectrum에서 m/z 641.4의 물질을 확인할 수 있었으며, 이는 플라보노이드에 당이 결합된 형태로 생각됨. 해당 물질은 열수 추출물의 mass spectrum에서도 확인되지 않았으나, 에탄올 및 메탄올 추출물에서는 확인되어 해당 물질이 용매에 따른 추출물의 항바이러스능 차이에 영향을 미치는 것으로 고려됨(표 14).

2. 바실러스를 이용한 γ -polyglutamic acid(PGA) 생산(씨제이제일제당(주))

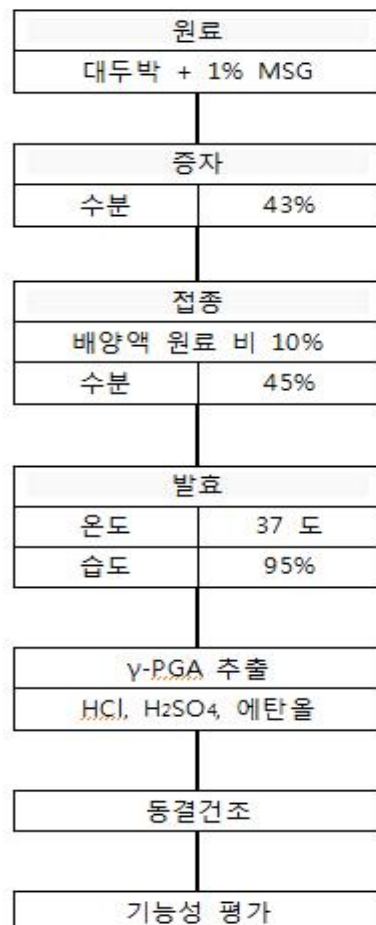
가. 항바이러스 효과 검증을 위한 γ -PGA 생산

(1) 바실러스 균주 배양 및 γ -PGA 생산

✓ γ -PGA 생산

- 대두박을 원료로 하여 고체발효를 통하여 γ -PGA 생산을 진행함. γ -PGA의 생산은 전통식품인 누룩에서 분리한 γ -PGA 생산성이 우수한 *Bacillus amyloliquifaciens* CJBA1 균주를 사용하여 진행함. GYP(glucose 1.0 g/L, yeast extract 0.8 g/L, soy peptone 0.2 g/L)배지에서 배양한 *B. amyloliquifaciens* CJBA1을 살균 대두박 원료를 이용하여 고체발효를 진행함. 수분 43%를 유지하며 증자를 진행한 뒤, 배양 원료비의 10%가 되도록 균주를 접종하여 37°C에서 95% 수분을 유지하며 발효를 진행함. 이 후, HCl, H₂SO₄ 및 에탄올을 이용하여 γ -PGA를 추출한 뒤 동결건조하여 보관하였음. 생산된 γ -PGA는 그림 33과 같음.

(A)



(B)

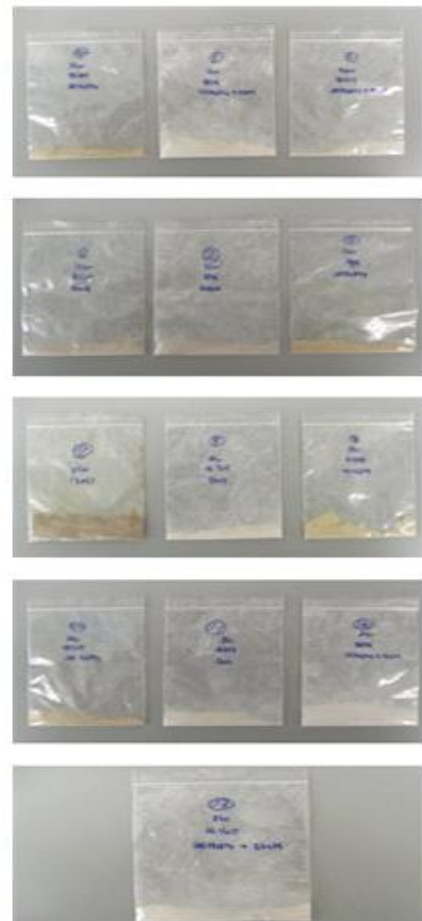


그림 33. 고체발효 생산 및 추출도(A)와 이를 통해 생산된 γ -PGA(B)

✓ γ -PGA의 분자량 및 순도 측정

- 그림 33와 같이 생산된 γ -PGA의 분자량은 gel permeation chromatography(GPC)를 이용하여 측정함. γ -PGA 10 mg을 0.1 M NaNO₃ 버퍼를 사용하여 10 배 희석 후, 5 M KOH 5 μ L를 첨가하여 용해시킨 후, 원심분리하여 획득한 상등액을 0.22 μ m 마이크로 필터로 여과하여 분석을 진행하였음. 고정상으로는 100-1,000,000 Da의 분석범위를 지닌 Tosoh TSKgel GMPWXL 컬럼을 사용하였으며, 이동상으로는 0.1 M NaNO₃를 사용함. 각 시료는 20 μ L씩 주입하여 분석하였으며, 이동상은 유속 0.5 mL/min 및 isocratic 조건으로 진행함. 컬럼은 30 $^{\circ}$ C를 유지하면서 검출기로 RID detector를 사용하여 분자량을 측정함. 분자량의 계산은 pullulan 검량곡선을 사용하여 진행하였으며(표 18 및 그림 34), γ -PGA의 분자량은 표 19와 같음.

표 18. Pullulan 표준 시약 분석 결과

표준물질	분자량	검출시간 (min)	log MW
P800	805,000	13.37	5.91
P400	366,000	13.88	5.56
P200	210,000	14.40	5.32
P100	113,000	14.97	5.05
P50	48,800	15.88	4.69
P20	21,700	16.71	4.34
P10	10,000	17.32	4.00
P5	6,200	17.87	3.79

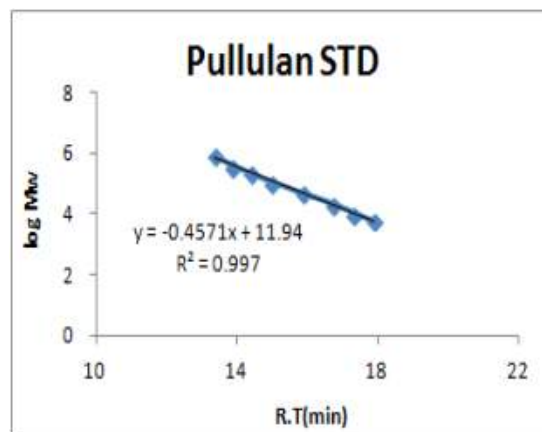


그림 34. Pullulan 검량곡선

표 19. 입국 수분에 따른 *B. amyloliquefaciens*가 생산하는 γ -PGA의 분자량

입국 수분 함량 (%)	발효시간 (시간)	수분 (%)	고형분 (%)	Crude PGA (g/발효물 50 g)	평균분자량 (kDa)
45	0	44.77	55.23	-	-

	16	35.26	64.74	4.51	243.0
	24	31.85	68.15	5.2	238.2
55	0	54.36	45.64	-	-
	16	46.26	53.74	4.26	263.5
	24	41.49	58.51	4.68	244.1

- 고체발효를 통한 γ -PGA의 분자량은 발효균주 및 발효조건에 의해 상이하였음. 누룩으로부터 분리한 *B. amyloliquefaciens* CJBA1 고체발효물의 crude γ -PGA의 함량은 입국 수분 45%에서는 238~243 kDa를 입국 수분 55%에서는 244~263 kDa를 나타내어 입국 수분 함량이 증가할수록 γ -PGA 분자량은 증가하는 경향을 나타내었으나, 발효시간이 증가함에 따라 분자량은 동일 또는 감소하는 경향을 나타냄.
- γ -PGA의 순도측정은 HPLC를 사용하여 진행함. 분석을 위한 고정상 및 이동상의 조건은 표 20과 같으며 검량곡선은 glutamic acid를 사용하여(표 21 및 그림 35) γ -PGA의 순도를 표 22 및 그림 36와 같이 확인함.

표 20. 입국수분에 따른 *B. amyloliquefaciens*가 생산하는 γ -PGA의 분자량

컬럼(고정상)	C18 Eclipse AAA
이동상	용매 A: 10 mM Na ₂ HPO ₄ dihydrate; 10 mM Na ₂ B ₄ O ₇ Sodium tetraborate decahydrate; 0.5 mM NaN ₃
	용매 B: Acetonitrile:MeOH:Water (45:45:10, v:v:v)
온도	35°C
검출기	UV detector (338 nm)
시료주입량	20 μ L
이동상의 속도	1.8 mL/min

표 21. Glutamic acid 농도에 따른 peak area 측정

Concentration (mg/mL)	Peak area
0.0625	11.6
0.125	23.8
0.25	46.6
0.5	93.8
1	169.6

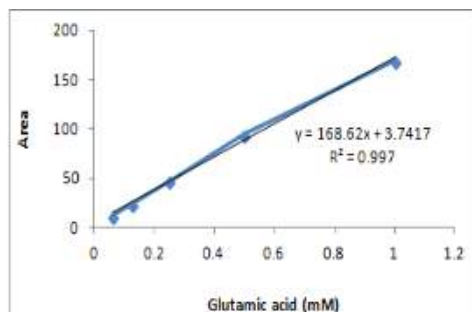


그림 35. Glutamic acid 검량곡선

표 22. 발효물 수분에 따른 γ -PGA 생산성 및 수율

발효물 수분 함량(%)	발효 시간 (h)	발효물 (g)	수분 (%)	고형분 (%)	Crude PGA (g)	Glutamic acid (g)	순도 (%)	수율 (%)
45	0	50	44.5	56.23	-	-	-	-
	16	50	35.26	64.74	4.51	1.37	30.3	4.25
	20	50	34.47	65.53	5.36	1.54	28.7	4.72
	24	50	31.85	68.15	5.2	1.59	30.6	4.69
55	0	50	54.36	45.64	-	-	-	-
	16	50	46.26	53.74	4.26	1.52	35.7	5.68
	20	50	44.67	55.33	4.54	1.68	37.0	6.11
	24	50	41.49	58.51	4.68	1.82	38.8	6.2

- 표 22에 의하면, 발효물 수분함량이 55%일 때, 45%에 비하여 수율은 증가하였으나, 고형분 함량 및 crude PGA의 함량은 감소함. 그러나 glutamic acid의 함량은 증가하였으며, γ -PGA의 순도 역시 증가함.

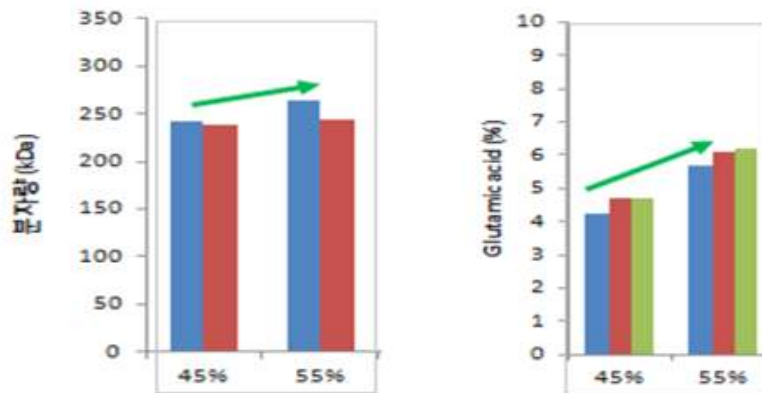


그림 36. 입국 수분에 따른 *B. amyloliquefaciens* CJBA1의 γ -PGA 분자량 및 함량

- 또한 입국 수분이 증가함에 따라 *B. amyloliquefaciens* CJBA1에 의해 생산된 γ -PGA 분자량 및 함량이 증가하였음.

(2) γ -PGA의 항바이러스 효과 검증

✓ TCID₅₀ 측정을 통한 바이러스 증식 억제 확인

- Influenza virus H1N1 A/NWS/33 인플루엔자 바이러스는 9~11일 사이의 계태아 종란에서 분리한 요막강액에 48시간 동안 37°C에서 배양하여 사용하였음. 배양한 인플루엔자 바이러스는 γ -PGA와 1:1로 혼합하여 4°C에서 30분 동안 배양 후, 2×10^4 cells/well 농도의 MDCK 세포주에 처리하여 바이러스 증식 억제를 확인함. 바이러스 및 추출물을 처리한 MDCK 세포주는 4~5일 간 37°C에서 배

양한 뒤 1% crystal violet 용액을 이용하여 세포병변효과(CPE)를 측정하여 증식 억제를 확인함. γ -PGA에 의한 바이러스 증식 억제능은 표 23과 같음.

표 23. 발효물 수분에 따른 γ -PGA 생산성 및 수율

γ -PGA	바이러스 역가 (TCID ₅₀ /25 μ L)				
	농도 (mg/mL)				
	Control	1	5	10	50
CJ #1	10 ^{4.8}	10 ^{4.9}	10 ^{4.6}	10 ^{4.6}	10 ^{4.5}
CJ #2		10 ^{4.9}	10 ^{4.6}	10 ^{4.5}	10 ^{4.4}
CJ #3		10 ^{4.9}	10 ^{4.9}	10 ^{4.8}	10 ^{4.6}
CJ #4		10 ^{4.8}	10 ^{4.5}	10 ^{4.5}	10 ^{4.4}
CJ #5		10 ^{4.4}	10 ^{4.3}	10 ^{4.1}	10 ^{3.6}
CJ #6		10 ^{4.8}	10 ^{4.6}	10 ^{4.5}	10 ^{4.0}
CJ #7		10 ^{4.8}	10 ^{4.4}	10 ^{4.4}	10 ^{4.3}
CJ #8		10 ^{4.9}	10 ^{4.8}	10 ^{4.6}	10 ^{4.5}
CJ #9		10 ^{4.6}	10 ^{4.6}	10 ^{4.5}	10 ^{4.4}
CJ #10		10 ^{4.8}	10 ^{4.5}	10 ^{4.4}	10 ^{4.3}
CJ #11		10 ^{4.9}	10 ^{4.5}	10 ^{4.4}	10 ^{4.3}
CJ #12		10 ^{4.8}	10 ^{4.8}	10 ^{4.6}	10 ^{4.4}
CJ #13		10 ^{4.8}	10 ^{4.6}	10 ^{4.1}	10 ^{3.8}

- γ -PGA의 종류에 따라 바이러스의 증식 억제능은 상이하였으나, CJ #5 및 CJ #13 시료에서 약 1.0 Log TCID₅₀/25 μ L의 증식 억제능을 보여 γ -PGA의 항바이러스 소재 가능성을 확인함.

(3) γ -PGA의 면역 증가 효과 검증

✓ Nitric oxide (NO) 생성능

- 생산된 γ -PGA의 면역 증가 효과를 검증하기 위하여 NO 생성능을 검증함. NO 생성능은 mouse 대식 세포인 RAW 264.7 cells을 이용하였으며, 2×10⁵ cells/well 농도의 대식세포에 γ -PGA를 각각 처리하여 NO 발생을 유도함. 이 후, Griess 시약을 이용하여 생성된 NO의 함량을 측정함(Yu et al., 2019). 각 γ -PGA의 NO 생성능은 표 24와 같음.

표 24. γ -PGA에 의한 NO 생성 효과

γ -PGA	NO 생성량 (μ M)		
	농도 (mg/mL)		
	0.25	0.5	1
CJ #1	19.12	25.99	29.19
CJ #2	12.25	22.96	29.86

CJ #3	23.16	24.94	27.10
CJ #4	21.54	23.29	22.48
CJ #5	15.41	20.50	20.77
CJ #6	22.38	24.24	23.63
CJ #7	16.73	15.89	10.36
CJ #8	11.41	18.24	22.99
CJ #9	22.08	25.75	26.39
CJ #10	23.36	25.41	24.34
CJ #11	10.43	17.70	21.41
CJ #12	13.23	18.34	18.78
CJ #13	20.73	23.12	22.25

- 표 24에 의하면 모든 γ -PGA 시료에서 NO의 생성능을 증가하는 것을 확인하였으며, 이 중 상대적으로 효능이 뛰어난 CJ #1, CJ #2, CJ #3, CJ #4, CJ #6, CJ #9, CJ #10, CJ #13 (8종)시료를 이용하여 더 낮은 농도에서 그 효과를 확인하고자 8종의 선별된 γ -PGA의 NO 생성능을 측정하여 표 25와 같음.

표 25. γ -PGA에 의한 NO 생성 효과

γ -PGA	NO 생성량 (μ M)		
	농도 (mg/mL)		
	31.25	62.5	125
CJ #1	1.64	4.57	11.47
CJ #2	0.73	1.27	4.07
CJ #3	13.87	16.29	17.74
CJ #4	14.51	16.79	17.74
CJ #6	12.01	15.99	18.07
CJ #9	9.39	14.44	17.70
CJ #10	13.43	17.06	18.75
CJ #13	5.72	11.34	15.75

- 선별된 γ -PGA의 NO 생성능을 측정하여 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이들 8종의 시료 중 상대적으로 우수한 효과를 보인 CJ #3, CJ #4, CJ #9, CJ #10 (4종) 시료를 이용하여 대식세포의 pro-inflammatory cytokine 발현능을 측정하고자 함. CJ #6의 경우 NO 생성능은 우수하였으나, 수용성이 낮아 실제 실험에 적용하기 어려움이 많아 제외하였음.

✓ Pro-inflammatory cytokine 발현능 확인

- 표 25에서 확인된 우수한 γ -PGA시료의 pro-inflammatory cytokine 발현능을 확인하고자 RAW 264.7 cells에 100 μ g/mL의 γ -PGA를 처리하여 배양을 진행함. 배양이 끝난 세포는 RNA를 획득하여 cDNA를 합성한 뒤, pro-inflammatory cytokine primer(TNF- α , IL-1 β , IL-6, iNOS)를 이용하여 각각의 cytokine의

발현능의 증가를 확인하였음. pro-inflammatory cytokine 발현능은 quantitative real-time PCR을 이용하여 상대적인 값으로 확인하였으며, 그 결과는 표 26과 같음.

표 26. γ -PGA에 의한 pro-inflammatory cytokine 발현

γ -PGA (100 μ g/mL)	Pro-inflammatory cytokine 발현 (상대적 배수)			
	TNF- α	IL-1 β	IL-6	iNOS
CJ #3	41.59	79.90	13.97	7.97
CJ #4	20.25	53.86	7.22	6.56
CJ #9	10.34	13.99	2.13	3.27
CJ #10	15.67	39.54	3.97	4.69

- γ -PGA를 처리하지 않은 음성 대조군의 각 cytokine 발현양을 1로 설정하여 상대적 증가량을 확인한 결과, 모든 γ -PGA 시료에서 pro-inflammatory cytokine의 발현양을 증가시키는 것을 확인하였음. 가장 우수한 시료는 CJ #3으로 모든 cytokine에서 높은 발현양을 보이며 면역 증강능이 뛰어난 소재로 사료됨.

(4) γ -PGA의 생산성 향상

✓ UV 조사를 통한 돌연변이 균주 선별

- *B. amyloliquefaciens* CJBA1보다 고분자의 γ -PGA 생산 및 생산성이 개선된 균주를 개량하기 위해 GYP 배지에서 배양한 모균주에 254 nm의 UV를 조사 후, 이를 100배 희석하여 1% MSG가 포함된 선별배지에 도말함. 이 후, 12시간 이상 배양하여 콜로니 형태 및 점액질 생성정도를 비교하여 protease 및 콜로니상의 점액질 생성이 우수한 10개의 균주를 선별함 (표 27).

표 27. UV 조사를 통한 돌연변이 균주의 점도 평가

No.	Strain No.	동정 결과	점도평가결과
1	<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA001 (모균주)	<i>B. amyloliquefaciens</i>	+++
2	774	<i>B. vallismortis</i>	++
3	775	<i>B. vallismortis</i>	++
4	776	<i>B. benzoovorans</i>	-
5	778	<i>B. nematocita</i>	+++
6	782	<i>B. malacitensis</i>	+++
7	791	<i>B. sonorensis</i>	-
8	792	<i>B. licheniformis</i>	-
9	793	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
10	796	<i>B. sonorensis</i>	+
11	797	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
12	798	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
13	802	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
14	803	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-

15	804	<i>B. axarquiensis</i>	+++
16	805	<i>B. axarquiensis</i>	+++
17	806	<i>B. benzoovorans</i>	-
18	807	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
19	808	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	+++
20	809	<i>B. amyloliquefaciens</i>	-
21	810	<i>B. acidovorans</i>	+++
22	812	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
23	813	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
24	814	<i>B. licheniformis</i>	-
25	815	<i>B. nematocita</i>	-
26	817	<i>B. vallismortis</i>	-
27	820	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	+
28	821	<i>B. malacitensis</i>	+
29	822	<i>B. nematocita</i>	-
30	824	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
31	825	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	++
32	828	<i>B. velezensis</i>	+
33	833	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
34	835	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	-
35	836	<i>B. velezensis</i>	+++
36	842	<i>B. velezensis</i>	+++
37	845	<i>B. velezensis</i>	++
38	846	<i>B. velezensis</i>	-
39	847	<i>B. sonorensis</i>	+++
40	848	<i>B. sonorensis</i>	-
41	849	<i>B. velezensis</i>	+
42	850	<i>B. licheniformis</i>	-
43	851	<i>B. sonorensis</i>	-
44	852	<i>B. sonorensis</i>	+
45	853	<i>B. sonorensis</i>	-
46	854	<i>B. velezensis</i>	+++

- 총 46개의 돌연변이 균주 중 점도 평가 결과가 우수한 균주 (+++) 10종을 선별하여 대두박을 원료로 한 고체발효를 진행한 뒤, 발효물의 점도 및 glutamic acid 생산성, 분자량 등을 분석하여 최종적으로 1개의 균주를 선별함(표 28, 그림 37 및 38).

표 28. 선택배지를 이용한 돌연변이 균주의 1차 선별

균주	관능평가		분자량 (kDa)	Glutamic acid (%)
	점도 1	점도 2		
CJBA001	+++	+++	191.54	4.47
778	-	+	-	-
782	+	++	-	-
804	-	-	-	-
805	-	-	-	-
808	-	-	-	-

810	-	-	-	-
836	+++	+++	142.15	5.14
842	++	+++	224.6	5.72
847	-	+	-	-
854	+++	+++	261.59	4.98

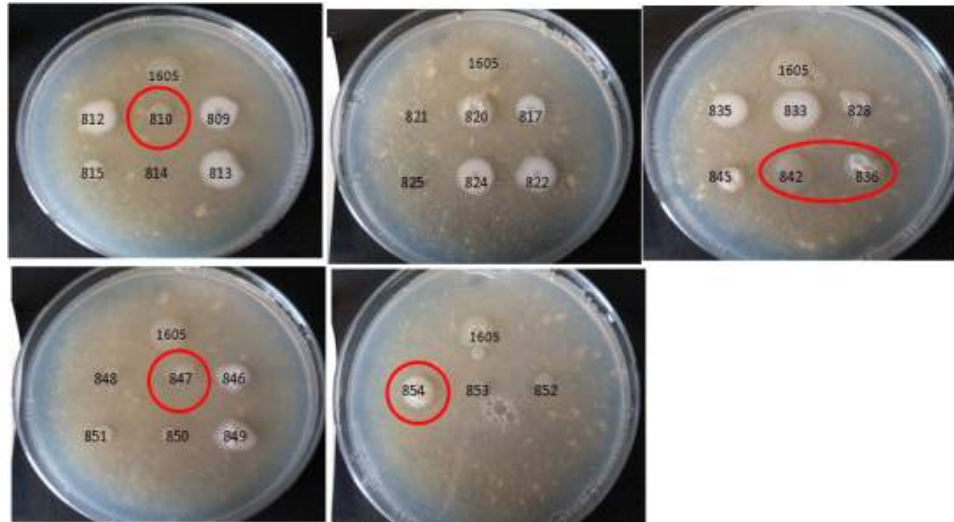


그림 37. 선택배지를 이용한 γ -PGA 생산균주 선별

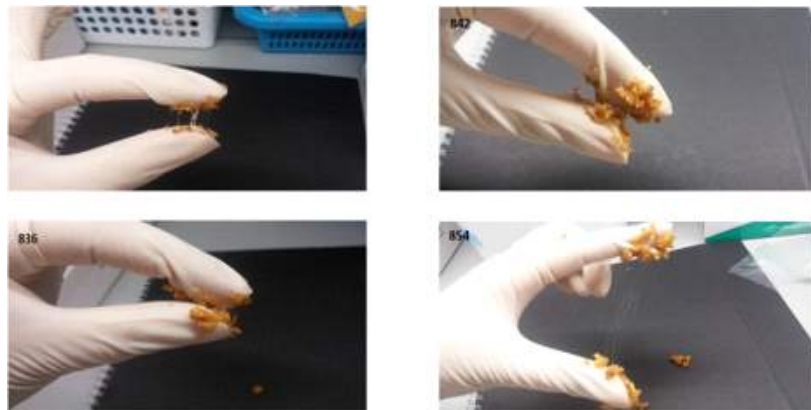


그림 38. 고체발효를 이용한 우수한 γ -PGA 생산균주 선별

(5) 최적 배양 조건 확립

✓ 발효조건 및 추출조건에 따른 특성 검증

- 선택배지 및 대두박 고체발효를 통해 접착력, γ -PGA 함량 및 분자량이 높은 854 균주를 최종적으로 선정하여 발효조건 및 추출조건에 따른 특성을 검증함. 대두박의 고체발효 조건에 따른 γ -PGA 분자량 및 glutamic acid 함량을 측정하여 최적 배양 조건을 설정하고자 하였으며, 그 결과는 표 29 및 그림 39와 같

음.

표 29. 854 균주의 최적 배양 조건 확립

온도(°C)	Time(h)	발효물 (g)	Crude PGA (g)	수분함량 (%)	분자량 (kDa)	순도 (%)	수율 (%)
37	4	50	2.19	45.38	270	27.31	4.4
	6	50	2.51	45.37	281	27.31	5.0
	8	50	4.02	44.88	289	27.56	8.0
	10	50	3.85	43.45	280	28.28	7.7
	20	50	5.89	35.51	224	32.24	11.8
42	4	50	2.13	45.38	293	27.31	4.3
	6	50	2.64	44.50	304	27.75	5.3
	8	50	3.43	44.20	304	27.90	6.9
	10	50	4.06	43.18	309	28.41	8.1
	20	50	5.27	32.25	308	33.87	10.5

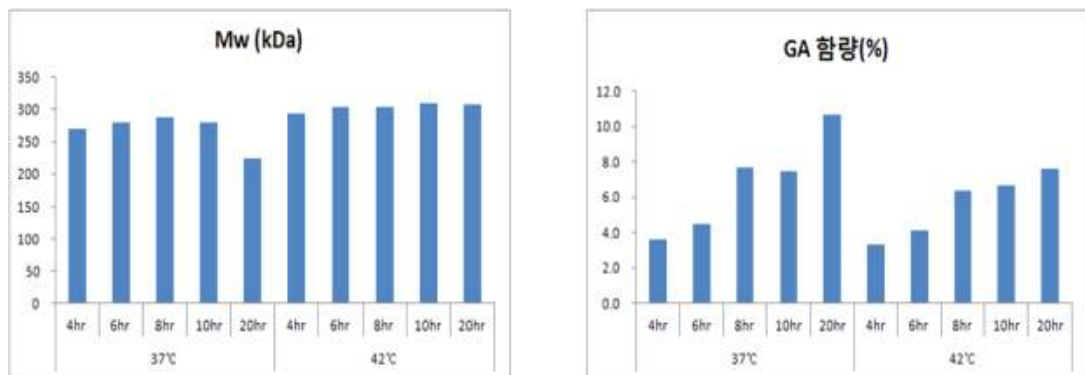


그림 39. 발효시간 및 온도에 따른 854 균주가 생산한 γ -PGA의 특성

- 대두박의 고체발효 조건에 따른 γ -PGA 분자량 및 glutamic acid 함량을 측정 한 결과, 37°C 및 42°C에서는 발효시간이 증가 할수록 γ -PGA 생산량이 증가하였으 며, 이에 따른 수율도 증가함. 분자량은 37°C에서는 발효 4~10시간까지는 270~289 kDa을 나타내었으나, 발효 20시간에서 분자량이 유의적으로 감소하였으 며 42°C에서는 293~308 kDa으로 발효시간에 따른 γ -PGA의 분자량의 유의적 차이는 없었음.

(6) 최적 추출 조건 설정 및 수용성 확인

✓ 추출 용매 조건에 따른 용해도 비교

- *B. amyloliquefaciens* CJBA001 및 개량 균주 854 균주의 항바이러스 및 면역 개선 효과 검증을 위한 crude γ -PGA의 최적 추출방법을 선택법을 기존의 6 N HCl을 이용한 추출방법 외 2 N H₂SO₄ 및 에탄올 추출법의 비교를 진행하였으

며, 추출 조건에 따른 γ -PGA의 형상 및 수용성은 그림 40과 같음.

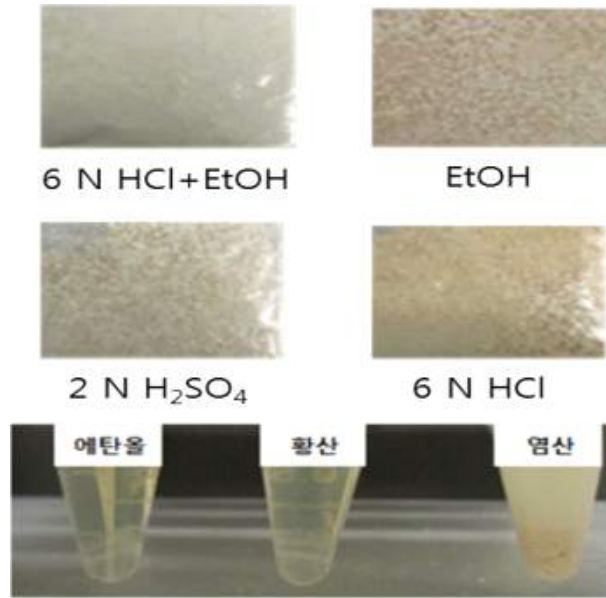


그림 40. 용매에 따른 γ -PGA의 특성 비교

- 실험 결과, HCl 추출물은 γ -PGA는 갈색, H₂SO₄ 추출물은 황색, 에탄올 추출물은 백색 또는 옅은 갈색을 나타냈으며, 수용성은 H₂SO₄ 추출물 = 에탄올 추출물 > 6 N HCl + 에탄올 추출물 > 6 N HCl 추출물 순으로 물에 대한 용해도 차이가 있었음.

(6) γ -PGA 생성 균주의 동정

✓ 16S rRNA full sequence

- 16S rRNA full sequence를 통하여 γ -PGA 생성 균주의 동정을 진행하였으며 그 결과는 그림 41과 같음.

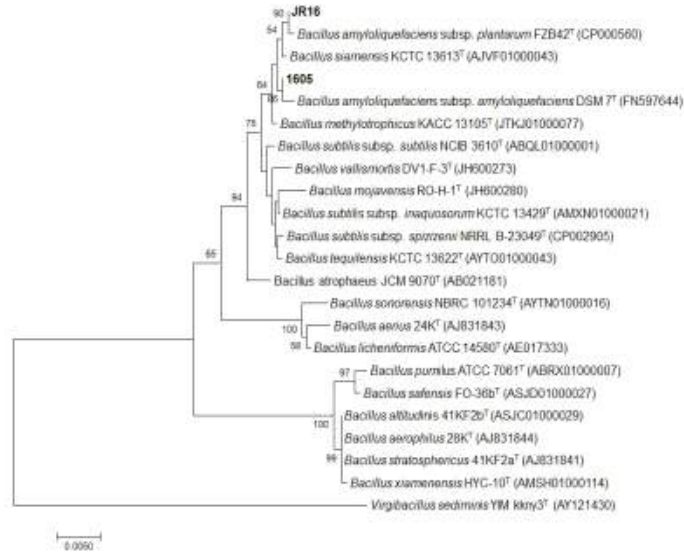


그림 41. 누룩으로부터 분리된 γ -PGA 생산 균주의 동정 결과

- 누룩으로부터 분리한 모균주인 *B. amyloliquefaciens* CJBA001은 sequencing 결과를 기존의 데이터베이스와 비교와 비교한 결과 *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens*와 상동성 99.87%를 나타내었음.

제 2절 제 2차년도 (17. 11. 29.~18. 9. 28.)

1. 프로바이오틱스 균주를 이용한 약용식물의 생물전환(건국대학교 산학협력단)

가. 항바이러스능을 지닌 발효물의 제작

(1) 항바이러스 소재 탐색을 위한 추출물 제조

✓ 생물전환을 위한 균주 선별

- 개자 및 선복화의 발효를 위한 균주의 선별은 β -glucosidase 활성을 통하여 선별함. 이는 발효 중 균주의 효소 분비를 통한 배당체의 아글리콘 전환을 통한 유효 물질의 증가를 유도하고자 하였음. β -Glucosidase는 생물전환을 유도하는 핵심 요소로 식품에 첨가한 프로바이오틱스의 β -glucosidase를 통한 아글리콘 전환을 접목한 연구들이 보고되었음(Handa *et al.*, 2014).
- 바이러스 예방을 위한 면역 활성 및 항균 효능을 지닌 4종의 *Bacillus* 균주, 3종의 *Lactobacillus* 균주 및 2종의 *Weissella* 균주를 후보로 선정하여 각 균주의 효소 활성을 실험하였음.
- *Bacillus amyloliquefaciens* KU801은 낮은 pH에서 높은 생존율을 보여 프로바

이오틱스 특성을 보유하고 있으며, DNA 손상 방지를 통한 면역 체계 활성화에 도움을 주는 것으로 보고되었음(Lee *et al.*, 2013). *Bacillus subtilis* KU43은 subtilin KU43의 생산을 통한 항균 효과를 지닌 균주로 나타났음(Kim *et al.*, 2012). *Bacillus subtilis* KU201은 김치에서 분리하였으며, 균주 자체로서 항균 및 항진균 효과를 보였음(Lee *et al.*, 2013). *Bacillus polyfermenticus* KU3는 우수한 내산·내담즙산 특성을 지니고 있으며, 염증 반응과 관련된 사이토카인인 TNF- α 및 COX-2 등의 발현을 저해하는 특징이 보고되었음(Lee *et al.*, 2015).

- *Lactobacillus plantarum* NK181은 젓갈에서 분리한 유용 균주로 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Aeromonas hydrophila* 등 다양한 그람 양성 및 음성균에서 항균 효과를 나타내었음(Lee *et al.*, 2006). *Lactobacillus salivarius* FC113 *Listeria monocytogenes* 및 *Salmonella* Typhimurium 등 다양한 종류의 병원성 미생물에 대한 항균 효과를 나타내었음(Lee *et al.*, 2013). *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033는 대표적인 프로바이오틱스 균주로 장내 질환 개선, 호흡기 질환 개선 등의 우수한 특성을 가지고 있는 균주로 보고되었음(Spacova *et al.*, 2018).
- *Weissella cibaria*는 exopolysaccharide 생성(Wolter *et al.*, 2014) 및 항암 효과(Kwak *et al.*, 2014) 등 다양한 기능성을 가진 균주로 보고되고 있으며, 본 연구실에서는 김치유래 균주인 2종의 *Weissella cibaria*를 약용 식물 발효를 위한 β -glucosidase 활성 보유를 확인하고자 함.
- 각 프로바이오틱스 균주는 celloiose를 첨가한 배지에서 12시간 간격으로 3회 계대 배양하여 효소 활성을 높인 후 pNPG와 CMC 두가지 기질의 분해능을 통하여 β -glucosidase 활성을 확인하였으며(Rai *et al.*, 2017), 그 결과는 표 30과 같음.

표 30. 발효 후보균주의 β -glucosidase 활성

균주	β -Glucosidase 활성	
	기질	
	pNPG (mM PNP/mL)	CMC (mg Glucose equivalent/mL)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KU801	0.1358	0.0078
<i>Bacillus subtilis</i> KU43	0.0877	0.0328
<i>Bacillus subtilis</i> KU201	0.1142	0.0576
<i>Bacillus polyfermenticus</i> KU3	0.1258	0.0062
<i>Lactobacillus plantarum</i> NK181	-	0.0286
<i>Lactobacillus salivarius</i> FC113	-	-
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCTC 5033	-	0.0608
<i>Weissella cibaria</i> D29	0.1308	0.0138
<i>Weissella cibaria</i> D30	0.0944	0.0286

- 표 30에 의하면 pNPG를 기질로 사용한 경우 4종의 균(*B. amyloliquefaciens* KU801, *B. polyfermenticus* KU3, *W. cibaria* D29 및 *W. cibaria* D30)에서 좋은

활성을 나타내었으며, CMC를 기질로 사용한 경우 *B. subtilis* KU201, *L. rhamnosus* KCTC 5033 2종의 균에서 좋은 활성을 나타내어 상기 6종의 균을 발효물 제작에 사용함.

✓ 프로바이오틱스 균주를 활용한 약용식물 발효물 제작

- 항바이러스 활성을 보인 개자 및 선복화의 발효를 진행함. 개자는 분쇄하여 pH 7의 증류수에서 2시간 동안 myrosinase를 활성화시킨 시료(Okunade et al, 2015)와 활성화시키지 않은 시료를 나누어 myrosinase 활성에 의하여 생성된 thiocyanate가 발효 과정에 미치는 영향이 있는지를 확인하고자 하였음. 각 샘플은 1:10(w/v)의 비율로 증류수에 첨가한 후, 1%(w/v) yeast extract를 첨가하여 12 1°C에서 15분 간 멸균하여 발효를 위한 배지를 제작하였음(Park et al., 2017). 각 배지에 6 Log CFU/mL가 되도록 균주를 접종한 후, 72시간 동안 발효를 진행하였음. 각 발효물은 10,000×g에서 10분 간 원심분리한 뒤 상등액을 사용하여 실험에 사용하였으며, 일부 상등액은 동결건조하여 분말 형태로 실험에 사용하였음. 각 발효물의 특성은 표 31와 같음.

표 31. 각 발효물의 최종 생균수 및 pH

약용 식물	발효 균주	생균수 (Log CFU/mL)	pH
개자	Control	-	5.14±0.01
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KU801	7.52±0.07	6.76±0.01
	<i>Bacillus polyfermenticus</i> KU3	8.51±0.09	7.04±0.02
	<i>Bacillus subtilis</i> KU201	7.52±0.08	6.80±0.01
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCTC 5033	8.52±0.06	4.92±0.01
	<i>Weissella cibaria</i> D29	7.79±0.03	4.71±0.02
	<i>Weissella cibaria</i> D30	7.82±0.06	4.72±0.00
Myrosinase를 활성화 한 개자	Control	-	5.25±0.03
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KU801	7.52±0.07	6.39±0.06
	<i>Bacillus polyfermenticus</i> KU3	7.86±0.07	6.77±0.01
	<i>Bacillus subtilis</i> KU201	8.26±0.04	6.61±0.02
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCTC 5033	8.64±0.06	4.71±0.04
	<i>Weissella cibaria</i> D29	7.82±0.04	4.50±0.00
	<i>Weissella cibaria</i> D30	7.49±0.07	4.72±0.00
선복화	Control	-	5.04±0.01
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> KU801	-	-
	<i>Bacillus polyfermenticus</i> KU3	-	-
	<i>Bacillus subtilis</i> KU201	-	-
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCTC 5033	8.39±0.02	5.81±0.02
	<i>Weissella cibaria</i> D29	8.76±0.06	5.84±0.00
	<i>Weissella cibaria</i> D30	8.64±0.03	5.94±0.02

- *Bacillus* 균주를 접종한 선복화 배지에서는 균수가 감소하는 등 발효가 진행되지 않아 이를 제외한 15종의 발효물을 이후 실험에 사용하였음. *Bacillus* 균주를 이용한 선복화 발효물 외 15종의 발효물은 발효가 진행됨에 따라 적정균수 유지 및 유기산 및 젖산에 의한 pH가 감소된 것이 확인되어 발효물의 기본적인

특성을 확인할 수 있었음.

(2) 각 발효물의 phytochemical 특성 확인

✓ Total phenolic contents 확인

- 총 페놀화합물 양은 Folin-Ciocalteu assay를 통하여 확인함(Park et al., 2017). 각 발효물 90 μ L를 2% sodium carbonate 용액 1.8 mL와 혼합한 뒤, 50%(v/v) Folin-Ciocalteu 용액을 첨가하여 30분 동안 암실에서 반응함. 이 후, 752 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, gallic acid 용액을 이용하여 표준곡선을 작성 후 그 값을 계산함. 각 발효물의 총 페놀화합물 함량은 표 32과 같음.

✓ Total flavonoid contents 확인

- 총 플라보노이드 함량은 aluminium chloride assay를 통하여 확인함(Friedman et al., 2017). 각 발효물 100 μ L를 5% sodium nitrite 용액 20 μ L와 혼합한 뒤, 60% 에탄올 800 μ L를 첨가하여 6분 간 반응함. 이 후, 10% aluminium chloride 용액 20 μ L과 4% sodium hydroxide 용액 60 μ L를 첨가한 뒤 30분 간 암실에서 반응을 진행함. 플라보노이드는 aluminium chloride와 노란색의 복합체를 형성하며 이를 405 nm에서 흡광도를 측정하여 총 플라보노이드 함량을 확인함. 표준곡선은 quercetin을 사용하여 각 발효물 내 플라보노이드 함량을 계산함. 각 발효물의 총 플라보노이드 함량은 표 32과 같음.

✓ Total saponin contents 확인

- 총 사포닌 함량은 vanillin assay를 통하여 확인함(Chan et al., 2014). 각 발효물 100 μ L를 8% vanillin 용액 100 μ L와 혼합한 뒤, 72% 황산 용액 1 mL를 첨가하여 반응을 시작함. 반응은 60°C에서 10분 간 진행함. 이 후, 상온에서 15분 간 냉각 후 540 nm에서 흡광도를 측정함. 표준곡선으로 quillaja saponin을 사용하여 사포닌 함량을 확인함. 각 발효물의 총 사포닌 함량은 표 32과 같음.

✓ Condensed tannin contents 확인

- 축합형 타닌 함량은 vanillin-HCl assay를 통하여 확인함(Friedman et al., 2017). 각 발효물 20 μ L를 4% vanillin 용액 600 μ L와 혼합한 뒤, 묽은 염산 600 μ L를 첨가하여 암실에서 반응을 진행함. 20분 간 반응을 진행한 뒤, 500 nm에서 흡광도를 측정함. 표준곡선으로 catechin을 사용하여 축합형 타닌 함량을 확인함. 각 발효물의 축합형 타닌 함량은 표 32과 같음.

✓ Reducing sugar contents 확인

- 환원당 함량은 DNS 시약을 사용하여 확인함(Ballesteros et al., 2017). 각 발효

물 100 μ L를 DNS 시약 100 μ L와 혼합하여 10분 간 끓는물로 가열하여 반응을 진행함. 이 후, 15분 간 얼음에서 냉각 후 1 mL의 증류수를 첨가한 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 확인함. 표준곡선으로 glucose를 사용하여 환원당 함량을 계산하였음. 각 발효물의 환원당 함량은 표 32과 같음.

표 32. 각 발효물의 phytochemical 특성

약용 식물	발효 균주	페놀화합물 함량 (mg GAE/g)	플라보노이드 함량 (mg QE/g)	사포닌 함량 (mg QSE/g)	축합형 타닌 함량 (mg CE/g)	전당류 함량 (mg SE/g)
개자	발효 전	6.19±0.07	4.81±0.50	46.30±2.48	2.42±0.05	55.23±4.50
	<i>B. amyloliquefaciens</i> KU801	9.28±0.05	3.06±0.22	52.13±0.85	2.75±0.05	36.51±2.53
	<i>B. polyfermenticus</i> KU3	9.79±0.05	3.37±0.14	50.80±3.74	2.66±0.07	3.01±1.93
	<i>B. subtilis</i> KU201	11.13±0.33	3.04±0.40	59.13±6.46	2.88±0.07	23.90±3.77
	<i>L. rhamnosus</i> KCTC 5033	8.78±0.16	2.83±0.31	41.97±3.68	2.84±0.09	23.07±1.70
	<i>W. cibaria</i> D29	8.58±0.22	3.18±0.51	37.13±4.11	2.64±0.05	32.79±1.98
	<i>W. cibaria</i> D30	8.41±0.12	4.16±0.72	36.80±2.45	2.64±0.05	33.57±1.55
Myrosinase를 활성화한 개자	발효 전	9.12±0.17	16.68±0.53	38.97±2.25	2.55±0.15	58.12±4.25
	<i>B. amyloliquefaciens</i> KU801	13.02±0.31	12.13±0.80	47.97±4.84	2.84±0.07	13.68±2.53
	<i>B. polyfermenticus</i> KU3	15.26±0.06	8.96±0.12	55.30±4.08	3.21±0.30	3.90±1.30
	<i>B. subtilis</i> KU201	15.51±0.18	9.82±0.26	48.30±1.87	2.99±0.07	7.29±1.50
	<i>L. rhamnosus</i> KCTC 5033	10.92±0.20	9.44±0.19	37.30±6.53	2.68±0.09	41.79±3.23
	<i>W. cibaria</i> D29	11.31±0.17	10.53±1.04	25.80±4.64	2.42±0.05	14.29±3.06
	<i>W. cibaria</i> D30	12.18±0.07	10.72±0.60	31.30±1.63	2.69±0.05	21.07±0.83
선복화	발효 전	27.35±0.40	28.58±1.51	129.97±1.03	6.01±0.07	30.34±0.64
	<i>L. rhamnosus</i> KCTC 5033	30.71±0.77	32.87±2.86	140.13±5.91	7.88±0.58	35.07±1.25
	<i>W. cibaria</i> D29	31.27±0.58	29.01±1.63	155.13±1.8	8.25±0.32	27.12±1.

				4		23
	<i>W. cibaria</i> D30	32.43±0.56	29.15±1.35	154.80±5.8 9	8.66±0.15	24.57±3. 30

- 모든 시료에서 총 폴리페놀 함량은 증가하였으며, 총 플라보노이드 함량은 감소하였음. 개자의 경우 *Bacillus* 균주를 이용한 발효물에서 사포닌 함량이 증가하였으나, *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 활용한 발효물은 사포닌 함량이 감소하였음. 선복화 발효물에서는 *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 활용한 발효물에서 사포닌 함량이 증가하였음. 축합형 탄닌 함량은 모든 발효물에서 증가하는 경향이 나타났음.
- 발효가 진행되는 동안 미생물이 생산하는 효소(glucosidase, amylase, cellulase, tannase, esterase, invertase, and lipase)는 식물의 세포벽 및 조직체를 분해하거나 새로운 대사 산물을 합성하여 유용한 성분을 생산하는 연구가 보고되고 있음(Hur *et al.*, 2014; Hussain *et al.*, 2016). 또한 특정 플라보노이드를 포함한 폴리페놀의 경우 미생물에 의하여 다른 물질로 전환되거나 해중합(depolymerization) 되는 것이 보고되고 있어(Othaman *et al.*, 2009) 표 3의 결과와 같이 플라보노이드의 감소 및 페놀화합물의 증가가 나타나는 것으로 고려되어짐.

(3) 발효물의 항염 효과

✓ 발효물의 세포 독성 확인

- 각 발효물의 면역 증강 효과를 확인하기 위하여 세포독성을 확인하여 발효물의 처리 농도를 확인하고자 함. 2×10^5 cells/well 농도의 RAW 264.7 cells에 각 발효물을 농도별로 처리한 뒤 MTT 시약을 이용하여 formazan의 형성을 측정하여 cells viability를 측정함(Reddy *et al.*, 2008). 각 발효물의 세포독성은 그림 4 2~46과 같음.

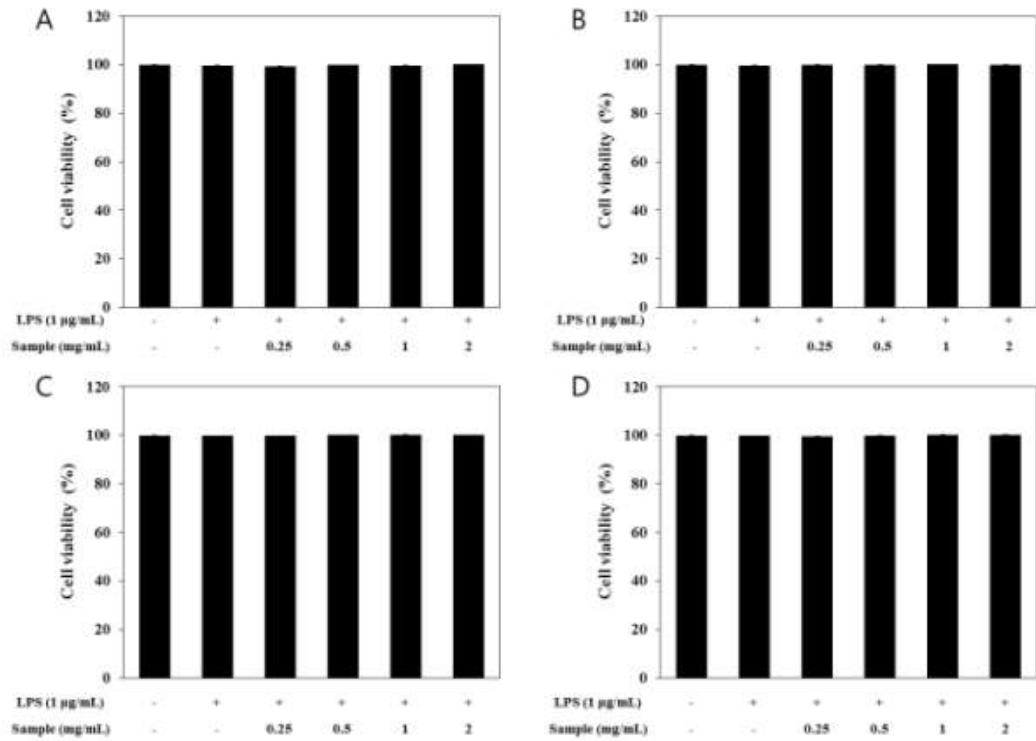


그림 42. *Bacillus* 균주를 이용한 개자 발효물의 세포 독성
 (A, Control; B, *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물;
 C, *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물; D, *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물).

- *Bacillus* 균주를 이용한 개자 발효물의 경우, 0~2 mg/mL의 농도에서 99% 이상의 cell viability를 보였음.

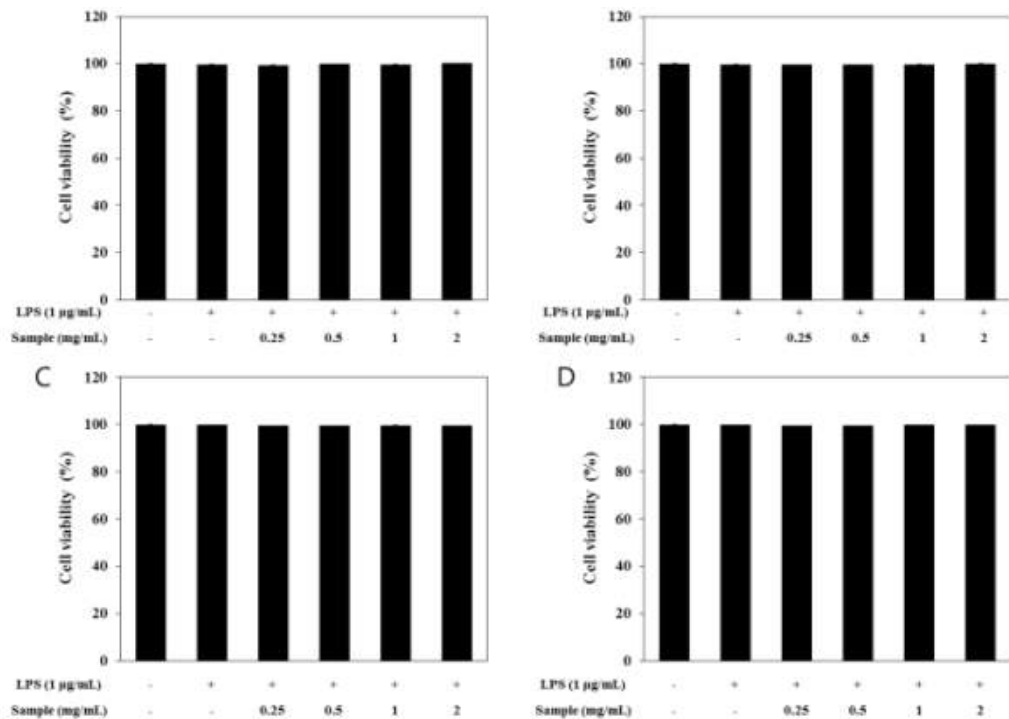


그림 43. *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 이용한 개자 발효물의 세포 독성
 (A, Control; B, *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물;
 C, *W. cibaria* D29를 이용한 발효물; D, *W. cibaria* D30을 이용한 발효물).

- 유산균을 이용한 개자 발효물의 경우, 0~2 mg/mL의 농도에서 RAW 264.7 cells에 대한 세포 독성이 발견되지 않아 염증 완화 및 면역 증강 실험의 실험 농도를 0~2 mg/mL 설정하였음.

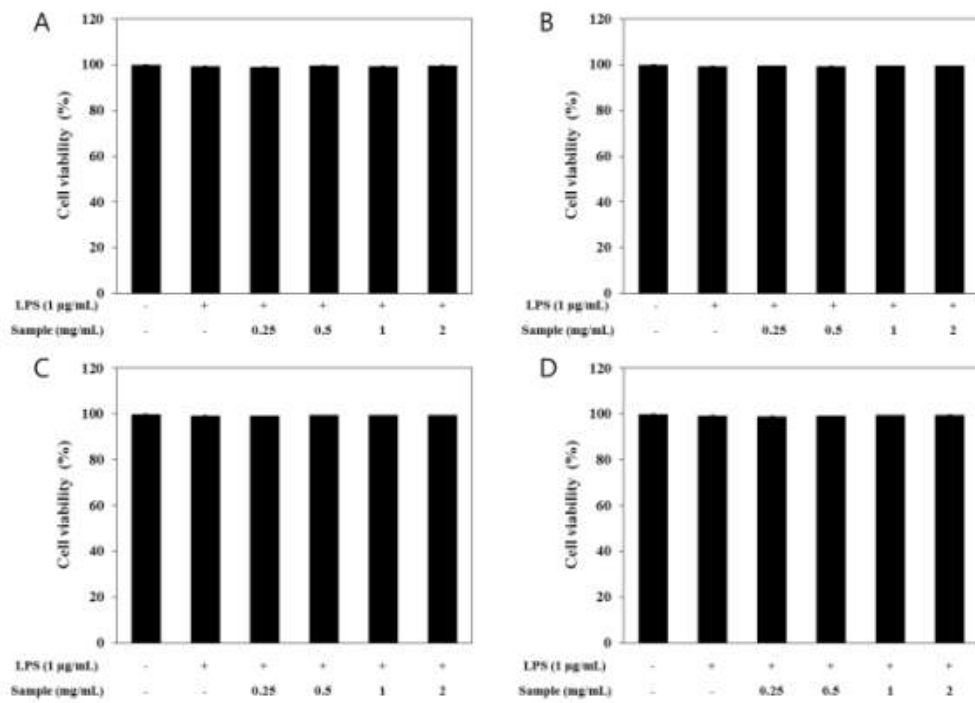


그림 44. *Bacillus* 균주를 이용한 myrosinase 활성화 개자 발효물의 세포 독성
 (A, Control; B, *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물;
 C, *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물; D, *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물).

- *Bacillus* 균주를 이용한 myrosinase 활성화 개자 발효물의 경우에도 0~2 mg/mL의 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았음.

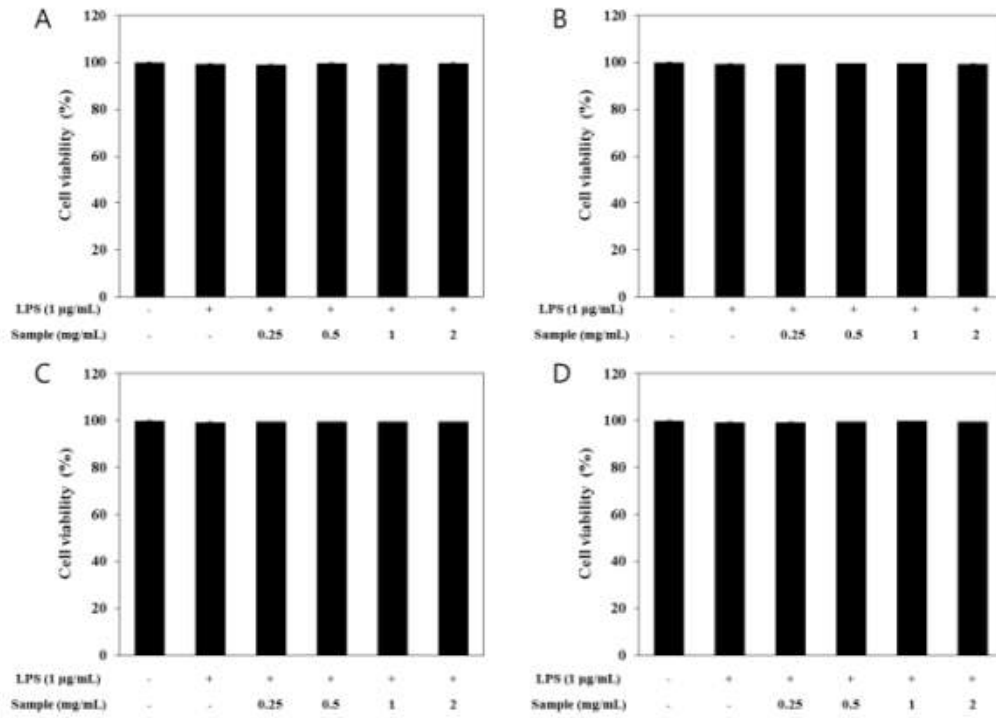


그림 45. *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 이용한 myrosinase 활성화 개자 발효물의 세포 독성 (A, Control; B, *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물; C, *W. cibaria* D29를 이용한 발효물; D, *W. cibaria* D30을 이용한 발효물).

- 유산균을 이용한 myrosinase 활성화 개자 발효물의 세포 독성을 확인한 결과, 0~2 mg/mL의 모든 농도에서 99% 이상의 cells viability를 나타내었음.

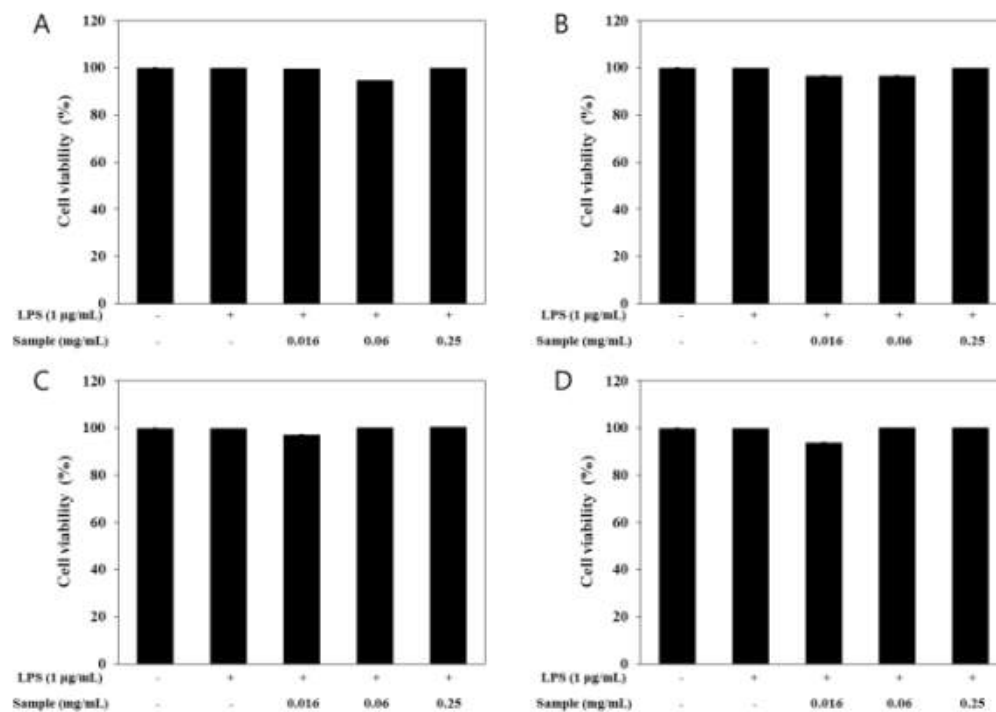


그림 46. *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 이용한 선복화 발효물의 세포 독성
 (A, Control; B, *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물;
 C, *W. cibaria* D29를 이용한 발효물; D, *W. cibaria* D30을 이용한 발효물).

- 유산균을 이용한 선복화 발효물의 경우, 0~0.25 mg/mL의 농도에서 RAW 264.7 cells에 대한 세포 독성이 나타나지 않아 해당 농도를 염증 완화 실험의 농도로 설정하였음.

✓ 발효물의 항염증 효과 확인(NO 생산 저해능)

- 각 발효물의 NO 생산 저해능은 RAW 264.7 cells를 이용하여 griess 반응을 통하여 확인하였음(Yu et al., 2019). 2×10^5 cells/well 농도로 배양한 RAW 264.7 cells에 각 발효물을 농도별로 100 μ L씩 처리한 후, 2시간 동안 전배양 과정을 진행하고 lipopolysaccharide(LPS)를 1 μ g/mL의 농도로 처리하여 염증을 유발함. 이 후, 염증반응을 통하여 생성된 NO의 양을 griess 시약을 이용하여 확인함. 발생한 NO의 양은 sodium nitrite 표준곡선을 이용하여 계산하였으며, 그 결과는 그림 47~51과 같음.

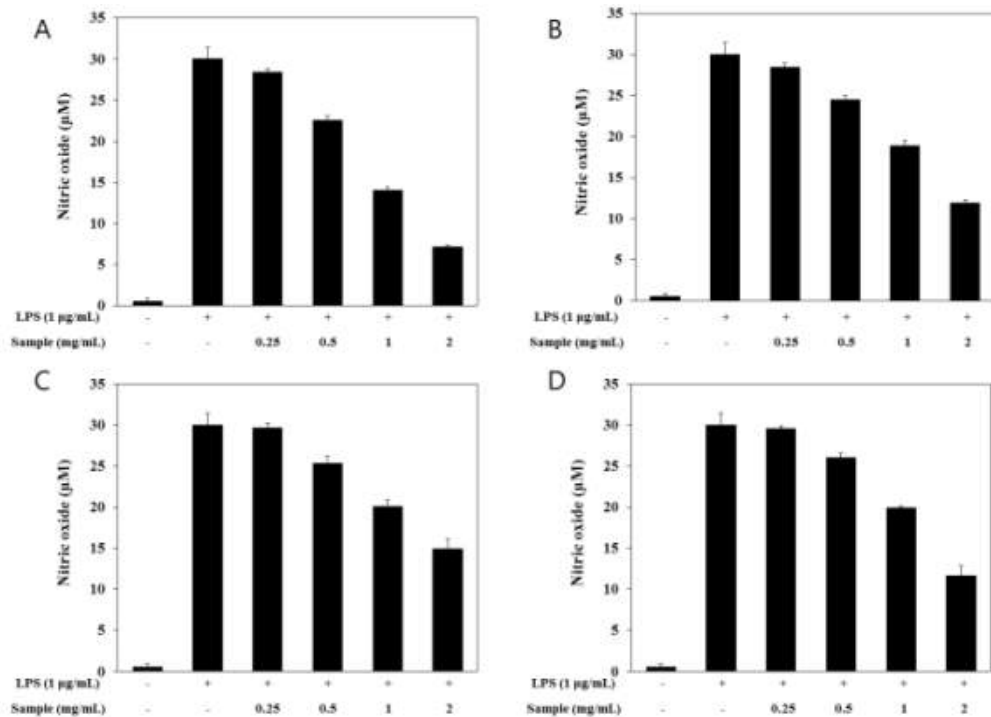


그림 47. *Bacillus* 균주를 이용한 개자 발효물의 항염 효과
 (A, Control; B, *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물;
 C, *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물; D, *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물).

- 발효하지 않은 개자(control)의 경우, 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL 처리군에서 각각 28.46, 2

2.56, 14.09, 7.22 μM 의 NO가 생산되었으며 시료 농도에 비례하여 NO 생산이 감소됨을 확인하였음. *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물에서는 각각의 농도에서 28.42, 24.54, 18.93, 11.94 μM NO가 생성되었으며, 이는 발효물에 의하여 NO의 생산이 억제되는 것으로 고려됨. *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물에서는 각각의 농도에서 29.66, 25.42, 20.10, 14.98 μM 의 NO가 생성되었으며, 이는 발효물을 처리하지 않은 대조군에 비하여 NO 생산이 감소되었음을 확인하였음. *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물에서는 각각의 시료 처리 농도에서 29.66, 25.42, 20.10, 14.98 μM 의 NO가 생성되었으며, 발효물에 의하여 NO의 생산량이 감소되어 항염 활성이 있는 것으로 고려됨. 발효 전·후 NO 생성을 모두 감소할 수 있음을 확인하였으나, 발효를 진행함에 따라 NO저해능이 감소함을 확인함. 따라서 개자 발효물의 경우 NO 생산량 저해를 통한 항염증 효능이 아닌 면역 증강능에 초점을 두고 실험을 진행함.

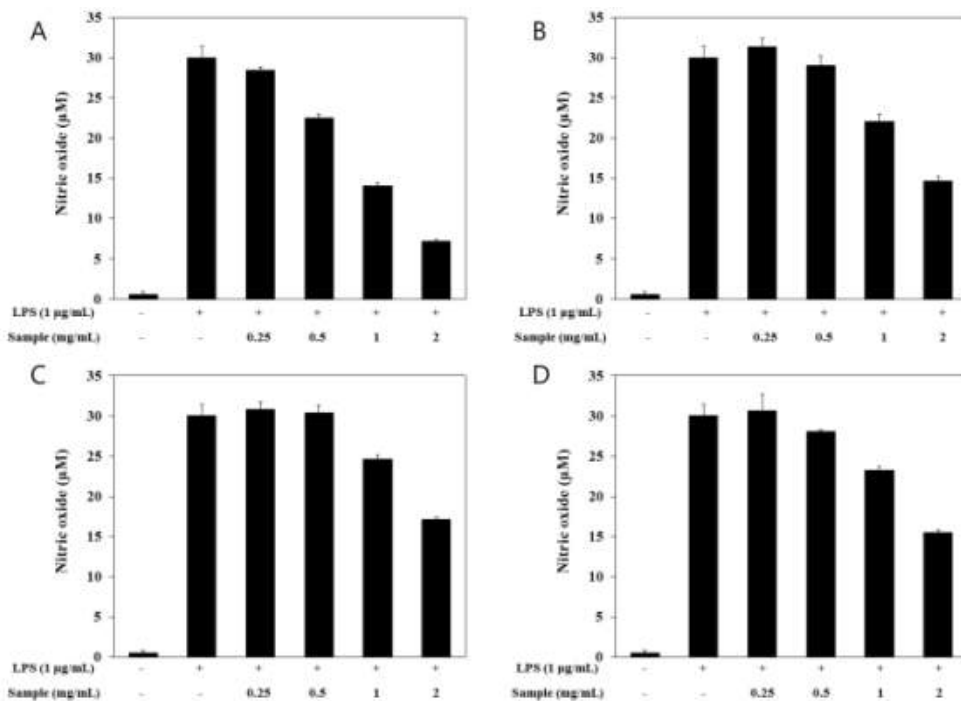


그림 48. *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 이용한 개자 발효물의 염증 완화 효과 (A, Control; B, *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물; C, *W. cibaria* D29를 이용한 발효물; D, *W. cibaria* D30을 이용한 발효물).

- *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물을 처리한 실험군에서는 발효물의 농도에 따라 31.43, 29.13, 22.11, 14.70 μM 의 NO가 생성되었으며, 0.5, 1.0 및 2.0 mg/mL의 농도에서 대조군에 비하여 NO 생성이 감소함을 확인하였음. *W. cibaria* D29를 이용한 발효물에서는 각각의 농도에서 30.86, 30.43, 24.69, 17.13 μM 의 NO가 생산되었으며, 1.0 및 2.0 mg/mL의 농도에서 NO 생산량이 각각 17.84 및 43.00% 감소함을 확인하였음. *W. cibaria* D30을 이용한 발효물에서는 농도가 증가함에 따라 30.65, 28.15, 23.31, 15.51 μM 의 NO가 생산되었으며, 0.5 mg/mL 이상의 농도에서 NO 생성이 감소함을 확인하였음. *Bacillus* 균주와 비교하였을 때, 유산균보다 *Bacillus* 균주를 활용하여 개자를 발효하였을 시 NO 생성 저해능이 높은 것을 확인하였으며, B

acillus 균주를 활용한 발효물과 마찬가지로 발효 후 NO 생성 저해능이 감소되어 면역 증강능에 초점을 두고 실험을 진행함.

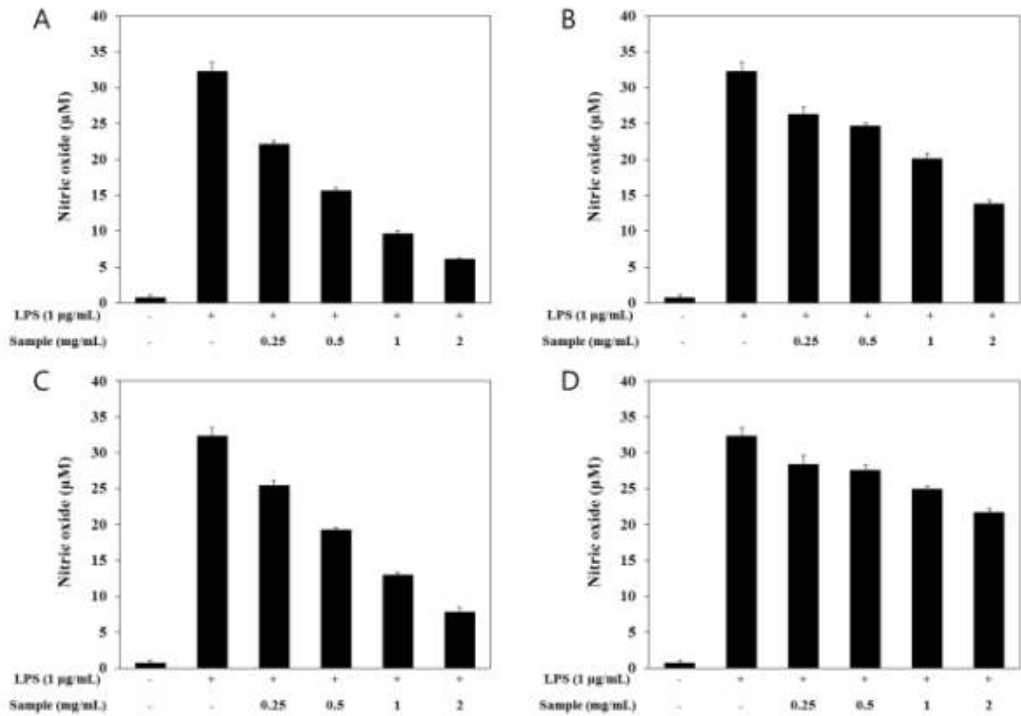


그림 49. *Bacillus* 균주를 이용한 myrosinase 활성 개자 발효물의 염증 완화 효과
(A, Control; B, *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물;
C, *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물; D, *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물)

- 발효하지 않은 myrosinase 활성 개자(control)의 NO 생산능을 확인한 결과, 각각의 농도에서 22.15, 15.69, 9.69, 6.09 µM의 NO가 생산되었으며, 이는 LPS를 통한 염증 발현 유도만 발생한 대조군에 비해서 NO 생성능이 감소함을 확인하였음. *B. amyloliquefaciens* KU801을 발효물을 처리한 RAW 264.7 cells에서 NO 생산량은 발효물의 농도가 증가함에 따라 26.35, 24.65, 20.17, 13.82 µM까지 감소하는 것을 확인하였으며, *B. amyloliquefaciens* KU801을 활용한 발효물에서 NO 생성 저해를 통한 항염 활성을 확인함. *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물에서는 0.25~2.0 mg/mL의 처리 농도에 따라 25.50, 19.32, 13.01, 7.85 µM의 NO가 생산되었으며, 발효물을 처리함에 따라 각각 21.17, 41.28, 59.78 및 75.73% 감소함을 확인하였음. *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물에서는 농도가 증가함에 따라 28.42, 27.58, 25.00, 21.69 µM의 NO가 생성되는 것을 확인하였으나, NO 생성 저해능은 *B. amyloliquefaciens* KU801 및 *B. polyfermenticus* KU3 발효물에 비해 낮음을 확인하였음. Myrosinase를 활성화 시킨 개자를 발효하였을 시, 활성화하지 않은 개자와 NO 발생량의 차이를 보임. 이는 myrosinase 활성화에 의한 hydrolyzed glucosinolate의 영향으로 고려됨.

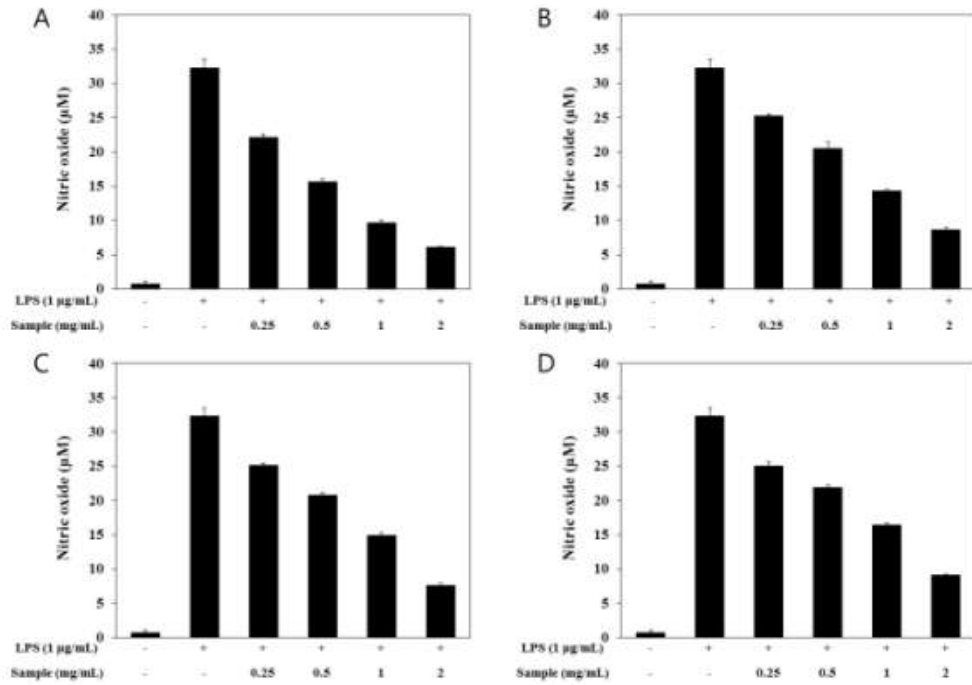


그림 50. *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 이용한 myrosinase 활성 개자 발효물의 염증 완화 효과(A, Control; B, *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물; C, *W. cibaria* D29를 이용한 발효물; D, *W. cibaria* D30을 이용한 발효물).

- *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물을 처리한 실험군에서는 발효물의 농도에 따라 25.29, 20.52, 14.38, 8.70 µM의 NO가 생성되었으며, 발효물에 의하여 LPS에 의한 염증 유발을 억제하고 NO 생성이 감소함을 확인하였음. *W. cibaria* D29을 이용한 발효물에서는 각각의 농도에서 25.14, 20.80, 14.91, 7.68 µM의 NO가 생산되었으며, 이는 23.26, 36.68, 54.90 및 76.25% 감소함을 나타내었음. *W. cibaria* D30을 이용한 발효물에서는 농도가 증가함에 따라 25.03, 21.97, 16.43, 9.12 µM의 NO가 생산되었으며, 발효물의 농도가 증가함에 따라 NO 생성 저해능도 증가함을 확인하였음. *W. cibaria* D29를 이용한 발효물의 경우 *L. rhamnosus* KCTC 5033 및 *W. cibaria* D30 비해 NO 생성 저해능이 우수함이 확인됨.

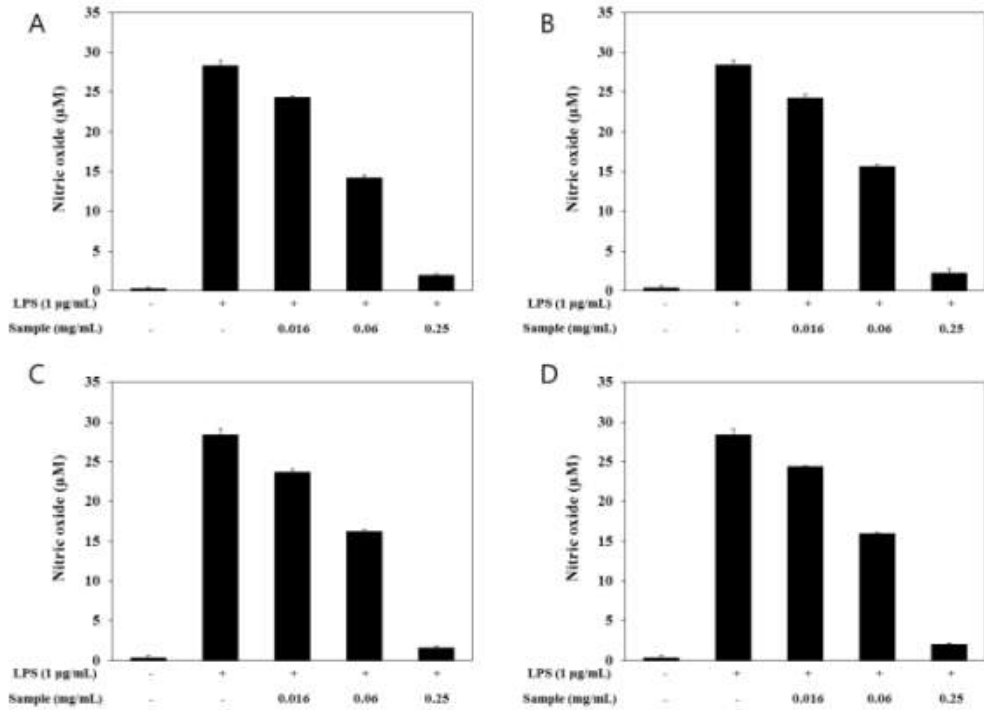


그림 51. *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 이용한 선복화 발효물의 염증 완화 효과 (A, Control; B, *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물; C, *W. cibaria* D29를 이용한 발효물; D, *W. cibaria* D30을 이용한 발효물).

- 모든 선복화 발효물은 0.25 mg/mL의 농도에서 90% 이상의 NO 생성 억제능을 보여, 선복화 발효물에 의한 항염 효과를 확인할 수 있었음. 선복화의 경우 발효 전의 높은 독성으로 인하여 개자 및 myrosinase 활성 개자 발효물과 비교하여 낮은 농도(0.25 mg/mL 이하)로 진행되었으나, 발효 후 독성이 감소됨이 확인되어 발효를 통한 독성 감소를 확인 후, 발효 선복화의 항염 효과를 실험하고자 함.

(4) 발효를 통한 세포 독성 감소 및 이의 항염 효과

✓ 발효를 통한 세포 독성 감소 확인

- 선복화 발효물의 세포 독성 효과 감소를 확인하기 위하여 MTT assay를 통한 formazan 형성을 통하여 cells viability를 확인하였으며, 그 결과는 그림 52와 같음.

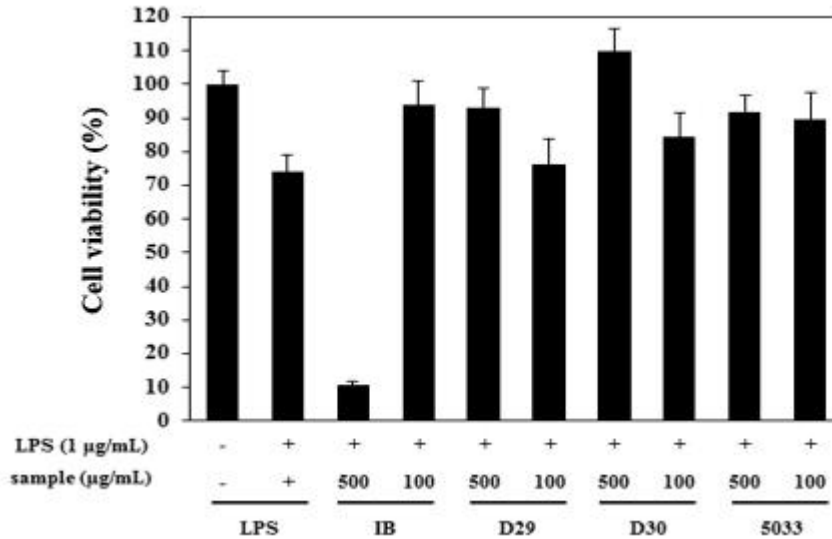


그림 52. *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 이용한 선복화 발효물의 세포 독성 비교 (IB, 발효 전 선복화 추출물; D29, *W. cibaria* D29를 이용한 발효물; D30, *W. cibaria* D30을 이용한 발효물; 5033, *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물).

- 그림 52의 결과 선복화 발효물은 500 µg/mL의 농도에서 모두 90% 이상의 생존률을 보인 반면, 발효하지 않은 선복화 추출물은 세포 생존률이 10%를 보이며 발효를 통한 세포 독성의 감소를 확인할 수 있었음. 이중 가장 높은 생존률을 보인 *W. cibaria* D30를 선정하여 발효 전·후 세포 독성 감소 및 발효물의 항염효과를 확인함.
- 발효하지 않은 선복화 추출물과 *W. cibaria* D30 발효물의 독성 차이를 500 µg/mL보다 낮은 농도에서 진행하여 좀 더 세부적인 독성 감소를 확인하였으며, 그 결과는 표 33과 같음.

표 33. 발효 전·후 세포 독성의 차이

	농도 (µg/mL)/세포 생존률 (%)			
	100	200	300	400
선복화 추출물	93.77±7.27	98.06±6.38	71.34±1.79	31.73±1.79
선복화 발효물	87.73±6.90	99.51±10.07	95.74±16.96	94.53±14.29

- 발효 전·후 세포독성은 300 및 400 µg/mL의 농도에서 차이를 보였으며, 200 µg/mL 이하의 농도에서는 큰 차이를 보이지 않았음. 그림 52 및 표 33을 종합하였을 때, 발효는 선복화 추출물의 독성을 감소시킴을 확인함.

✓ 발효를 통한 독성물질의 변화

- 선복화는 페놀화합물, 플라보노이드 및 세스퀴테라핀 락톤 등의 유효성분이 함유되어 있음이 보고됨(Khan et al., 2013). Ergolide는 세스퀴테라핀 락톤 계열의 phytochemical compounds로 DNA fragmentation 및 capsase 활성을 통한 세포 자가사멸을 유도하는 물질로 보고되었음(Song et al., 2002). 따라서 발효 전·후 세포 독성 감소의 원인으로 ergolide의 감소를 확인하고자 HPLC analysis를 진행함. 분석은 Eclipse XDB-C18(4.6 mm×150 mm, 5 μm)를 고정상으로 사용하였으며, 이동상으로는 0.1% ortho-phosphoric acid가 첨가된 물 및 ACN을 사용하였음. Ergolide의 검출은 UV-detector를 사용하여 210 nm에서 검출하였으며, 발효 전·후 ergolide의 함량 변화는 그림 53과 같음.

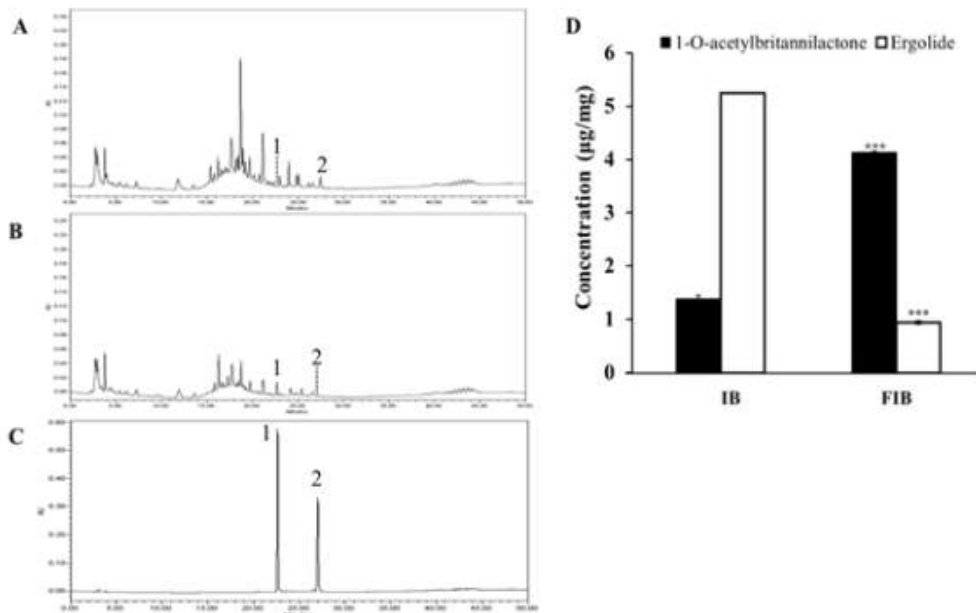


그림 53. 선복화 발효를 통한 ergolide 함량 변화
(A, 발효 전; B, 발효 후; C, 표준 물질 D, ergolide의 함량)

- *W. cibaria* D30을 이용한 발효를 진행시, ergolide의 함량은 5.24에서 0.94 μg/mg으로 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 선복화 발효를 통한 세포 독성 감소에 영향을 미치는 것으로 사료됨.

✓ 선복화 발효물의 NO 생성 저해 및 pro-inflammatory cytokine 억제

- 선복화 발효물의 NO 생성 저해 및 pro-inflammatory cytokine 억제 확인을 통하여 선복화 발효물이 지닌 항염 효과를 확인하고자 함. 선복화 발효물의 NO 생성 저해능은 griess 반응을 통하여 확인하였으며, pro-inflammatory cytokine 억제능은 1×10^6 cells/well 농도의 RAW 264.7 cells에 NO 생성 억제능과 같은 시료 처리시간 및 염증 반응 유도를 진행하여 pro-inflammatory cytokine 생성 억제를 확인함. Pro-inflammatory cytokine 생성은 RNA를 추출 및 cDNA 합성을 진행하여 real-time PCR을 진행하여 확인하였으며, 실험에 사용된 primer의 종류는 표 34와 같음. 선복화 발효물의 NO 생성 저해 및 pro-inflammatory cyt

okine 생성은 그림 54와 같음.

표 34. Pro-inflammatory cytokine primer

Anti-inflammatory cytokine		Primer 서열	Base pair
iNOS	Sense	5-CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C-3'	496 bp
	Anti-Sense	5-GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G-3'	
COX-2	Sense	5-CAC TAC ATC CTG ACC CAC TT-3'	696 bp
	Anti-Sense	5-ATG CTC CTG CTT GAG TAT GT-3'	
IL-1 β	Sense	5-CAG GAT GAG GAC ATG AGC ACC-3'	447 bp
	Anti-Sense	5-CTC TGC AGA CTC AAA CTC CAC-3'	
IL-6	Sense	5-GTA CTC CAG AAG ACC AGA GG-3'	308 bp
	Anti-Sense	5-TGC TGG TGA CAA CCA CGG CC-3'	
TNF- α	Sense	5-TTG ACC TCA GCG CTG AGT TG-3'	364 bp
	Anti-Sense	5-CCT GTA GCC CAC GTC TA GC-3'	
β -Actin	Sense	5-GTG GGC CGC CCT AGG CAC CAG-3'	603 bp
	Anti-Sense	5-GGA GGA AGA GGA TGC GGC AGT-3'	

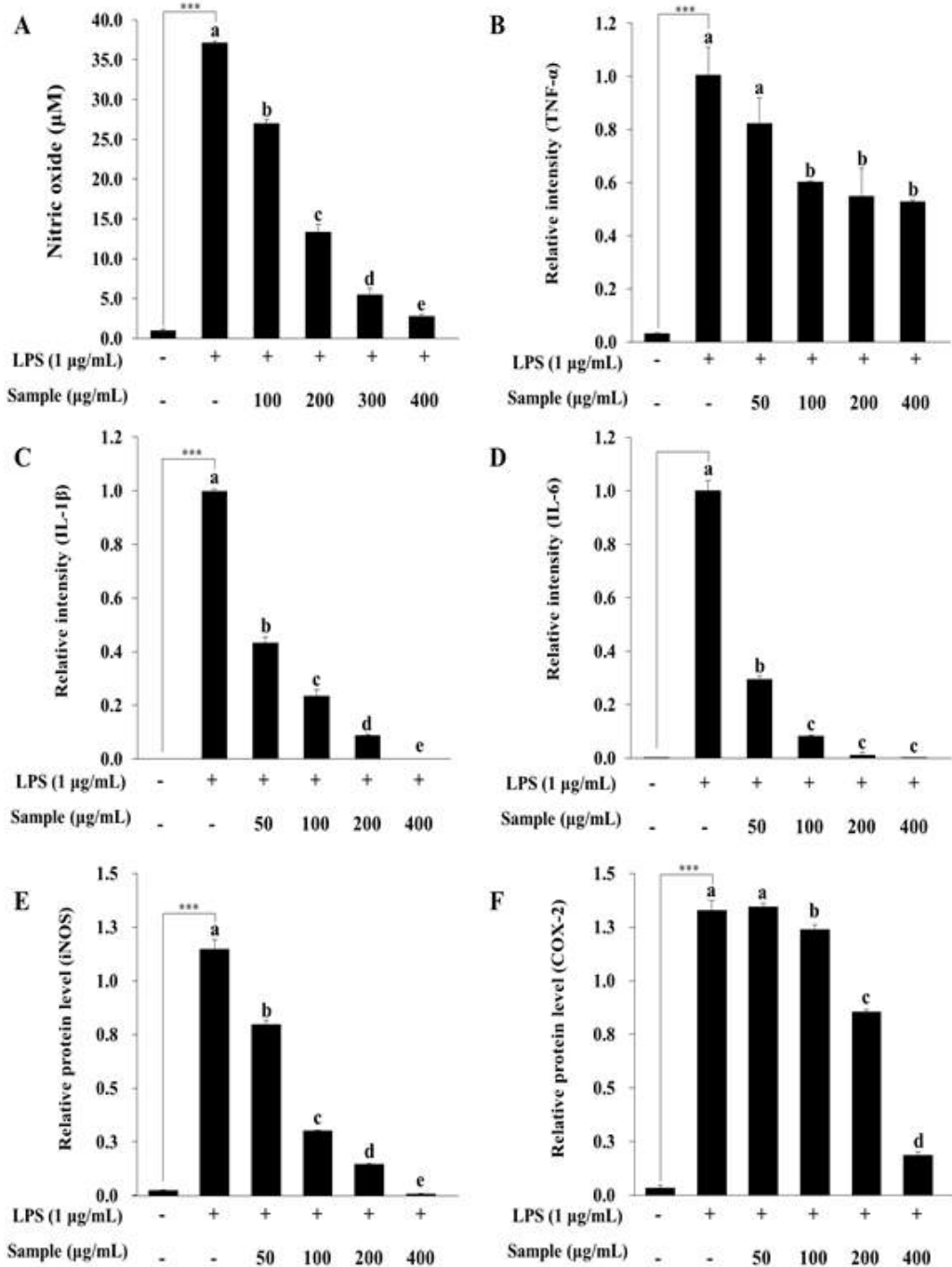


그림 54. 선복화 발효물의 NO 생성 저해 및 pro-inflammatory cytokine 억제능

- 선복화 발효물은 400 µg/mL의 농도에서 NO 생성량을 92.4%까지 억제할 수 있으며 pro-inflammatory cytokine인 iNOS, COX-2, IL-1β, IL-6 및 TNF-α 억제에 효과적으로 나타남.

✓ 선복화 발효물의 NF-κB 활성 억제

- NF-κB 경로는 iNOS, COX-2, IL-1β, IL-6 및 TNF-α 등과 같은 pro-inflammatory 유전자의 발현을 유도하므로(Kim et al., 2013), 선복화 발효물의 NF-κB

활성 억제를 통한 항염 효과를 확인하고자 함. 선복화 발효물의 NF- κ B 활성 억제는 그림 55와 같음.

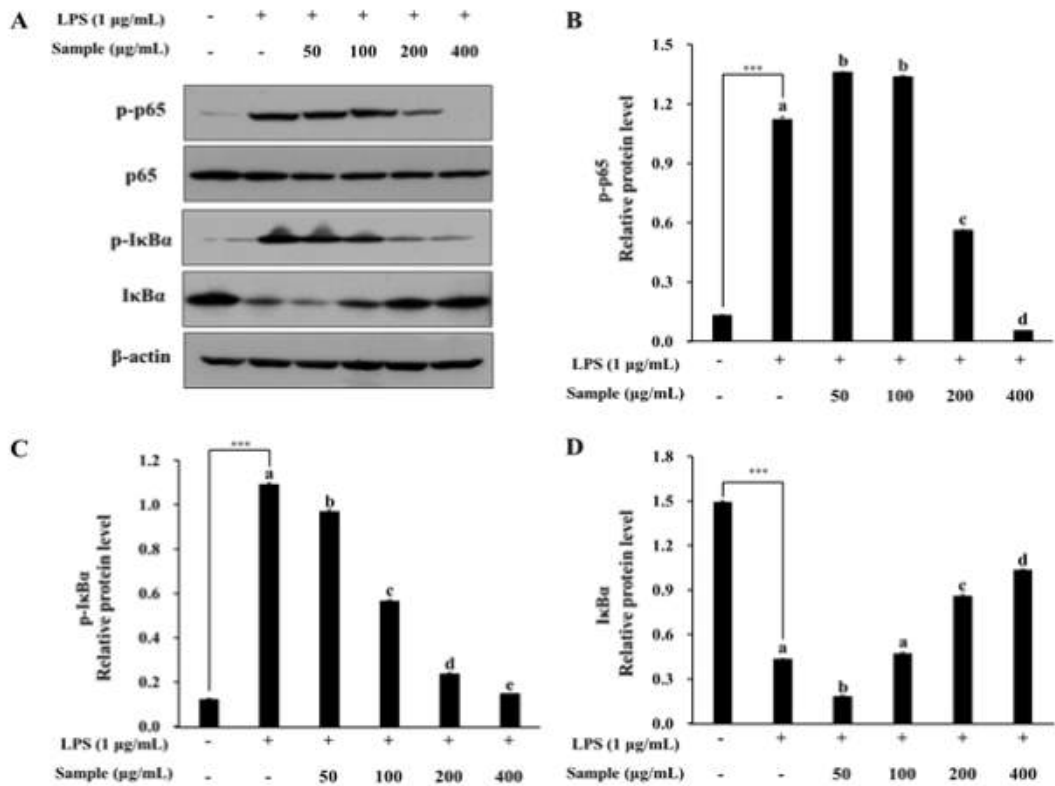


그림 55. 선복화 발효물의 NF- κ B 활성 억제

- 선복화 발효물은 NF- κ B p65의 인산화를 억제하여 NF- κ B 경로 활성을 억제하고 NF- κ B 활성을 저해하기 위한 I κ B α 의 인산화를 촉진시켜 LPS에 의한 염증 반응을 억제하는 것으로 나타남.

✓ 선복화 발효물의 MAPKs 활성 억제

- LPS에 의한 염증반응은 MAPKs를 과발현하고 이를 통하여 염증관련 유전자의 발현을 유도하는 것으로 알려져있음. 따라서 선복화 발효물의 MAPKs 활성억제를 통하여 LPS에 의한 염증반응의 완하 및 억제를 확인하고자 함(Glushkova et al., 2013). 배양된 RAW 264.7 cells에 선복화 발효물을 2시간 처리한 뒤, LPS를 통한 염증발현을 유발하였을 시, 선복화 발효물에 의한 MAPKs 활성 억제를 확인하였으며, 이는 그림 56과 같음.

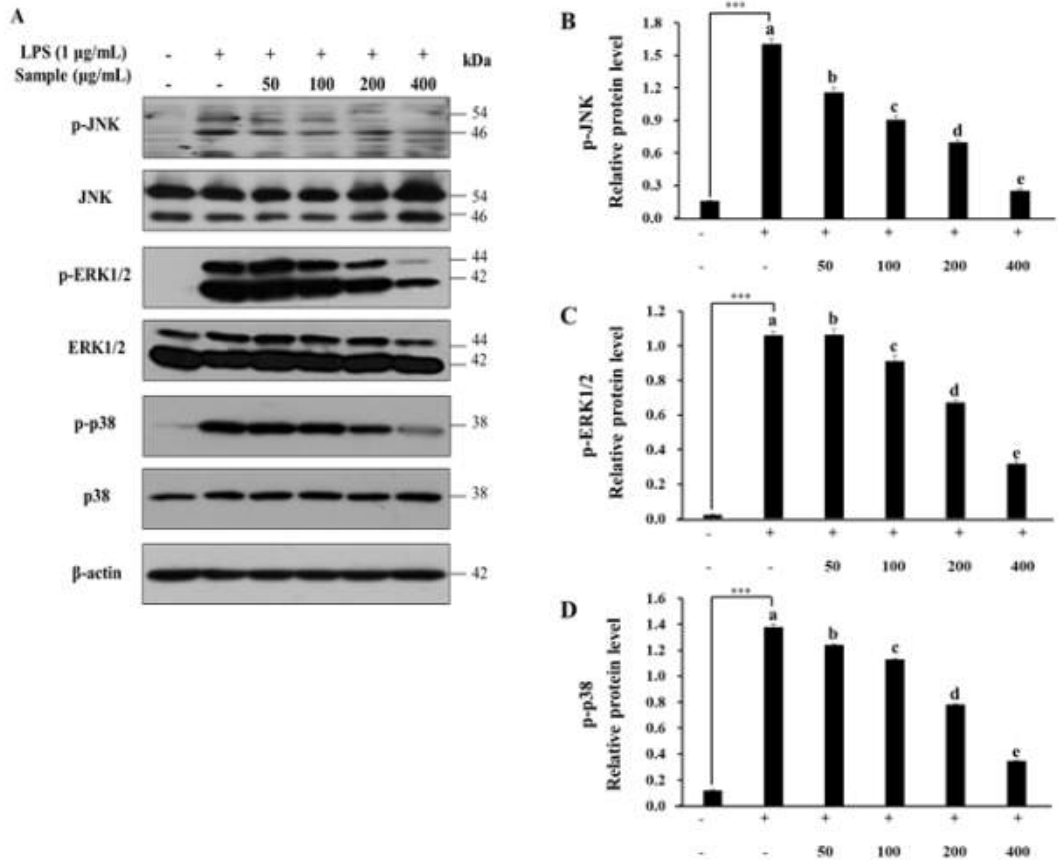


그림 56. 선복화 발효물의 MAPKs 활성 억제

- 선복화 발효물은 농도에 따라 JNK, ERK 1/2 및 p38의 인산화를 억제하고 이를 통하여 MAPKs pathway의 활성을 억제하는 것으로 나타남. 400 µg/mL의 선복화 발효물을 처리하였을 시, 음성 대조군에 비하여 약 4~5배 활성이 억제된 것으로 확인되어 선복화 발효물이 MAPKs 활성을 억제하고 염증 반응을 완화할 수 있음이 확인되었음.

(5) 약용식물 발효물의 면역 증강 효과

✓ 약용식물 발효물의 NO 생성 확인

- 약용식물 발효물의 면역 증강 효과를 검증하기 위하여 NO 생성능을 검증함. NO 생성능은 mouse 대식 세포인 RAW 264.7 세포주를 이용하였으며, 2×10^5 cells/well 농도의 대식세포에 발효물을 각각 처리하여 NO 발생을 유도함. 이후, griess 시약을 이용하여 생성된 NO의 함량을 측정함(Yu et al., 2019). 각 약용식물 발효물의 NO 생성능은 그림 57~61과 같음.

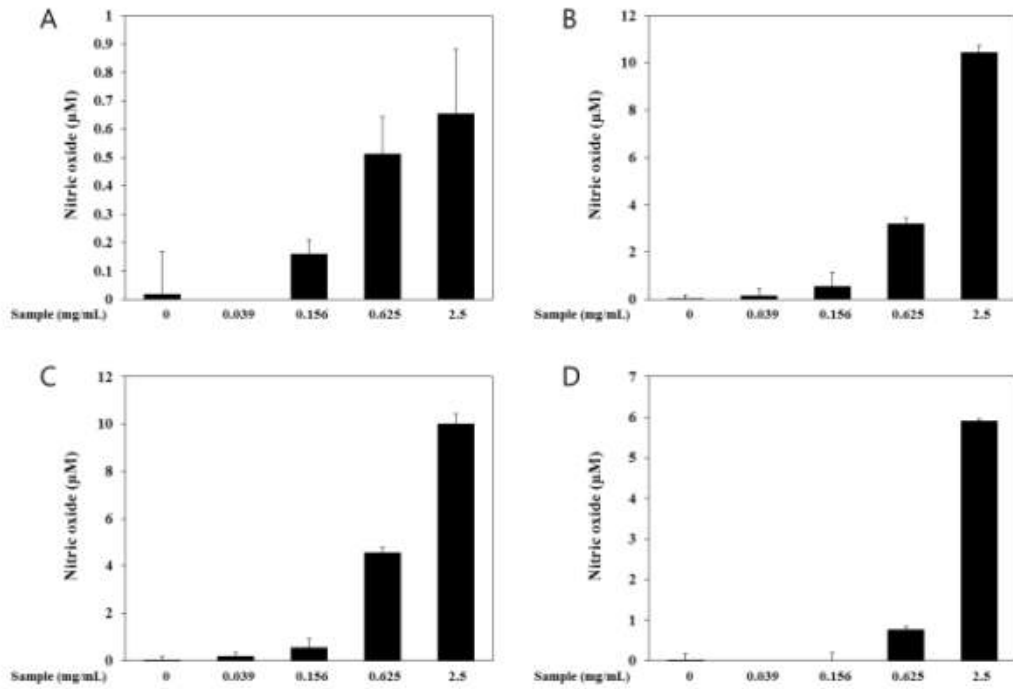


그림 57. *Bacillus* 균주를 이용한 개자 발효물의 면역 증강 효과 (A, 발효 전; B, *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물; C, *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물; D, *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물).

- 발효하지 않은 개자의 NO 생산능은 5종의 농도(0, 0.039, 0.156, 0.625 및 2.5 mg/mL)의 실험군에서 확인하였으며, 각각 0.02, 0.00, 0.16, 0.51, 0.65 μM 의 NO가 생산되었음. *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물에서는 각각의 농도에서 0.02, 0.16, 0.54, 3.19, 10.46 μM 에서 NO가 생성되었으며, 발효물을 처리함에 따라 LPS와 유사한 pro-inflammatory mediator 생산이 가능함을 확인하였음. *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물의 NO 생산능은 0~2.5 mg/mL의 농도에서 각각 0.02, 0.20, 0.55, 4.57, 10.00 μM 이 생성됨을 확인하였으며, 이는 pro-inflammatory mediator 생산을 통한 면역 증강 가능성이 있을 것으로 고려됨. *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물을 처리한 RAW 264.7 cells에서는 농도가 증가함에 따라 0.02, 0.00, 0.00, 0.76, 5.91 μM 의 NO가 생성되었으며, 0.625 mg/mL 이상의 농도에서 NO 생성이 가능할 것으로 판단됨. 각각의 발효물은 발효 전에 비하여 NO 생성이 가능하며 이를 통한 면역 증강 효과가 있을 것으로 예상되며 *B. amyloliquefaciens* KU801 및 *B. polyfermenticus* KU3 발효물에서 NF- κ B 경로 축진을 통한 면역 증강 반응이 기대됨.

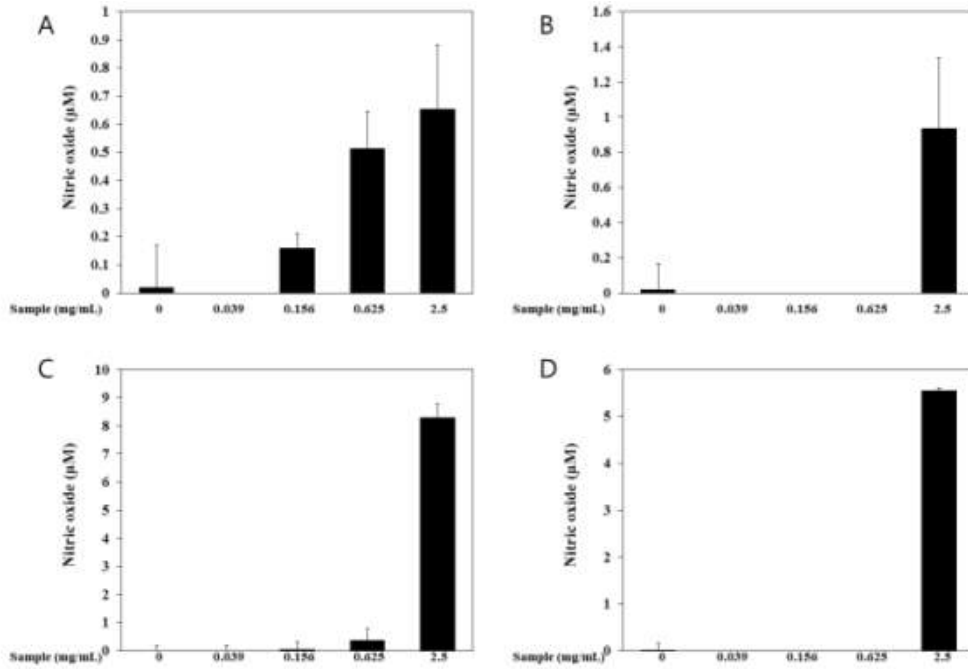


그림 58. *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 이용한 개자 발효물의 면역 증강 효과 (A, 발효 전; B, *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물; C, *W. cibaria* D29를 이용한 발효물; D, *W. cibaria* D30을 이용한 발효물).

- *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물을 0, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5 mg/mL 처리한 실험군에서 각각 0.02, 0.00, 0.00, 0.00, 0.93 µM의 NO가 생성되어 면역 증강 가능성이 낮을 것으로 고려됨. *W. cibaria* D29을 이용한 발효물에서는 각각의 농도에서 0.02, 0.00, 0.05, 0.37, 8.31 µM의 농도가 생산되었으며, 0.625 mg/mL 이상의 농도에서 LPS와 유사한 pro-inflammatory mediator 생산을 통한 면역 증강 가능성이 확인됨. *W. cibaria* D30을 이용한 발효물에서는 2.5 mg/mL를 처리한 실험군에서 5.56 µM의 NO가 발생되며 해당 농도에서는 NO 발생을 통한 면역 증강이 가능할 것으로 고려됨. *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물에서는 NO가 생성되지 않았으나 2종의 *Weissella* 균주를 활용한 발효물에서는 2.5 mg/mL의 농도에서 NO 생성이 가능하여 이를 통하여 면역 증강능의 가능성이 있다고 예상됨.

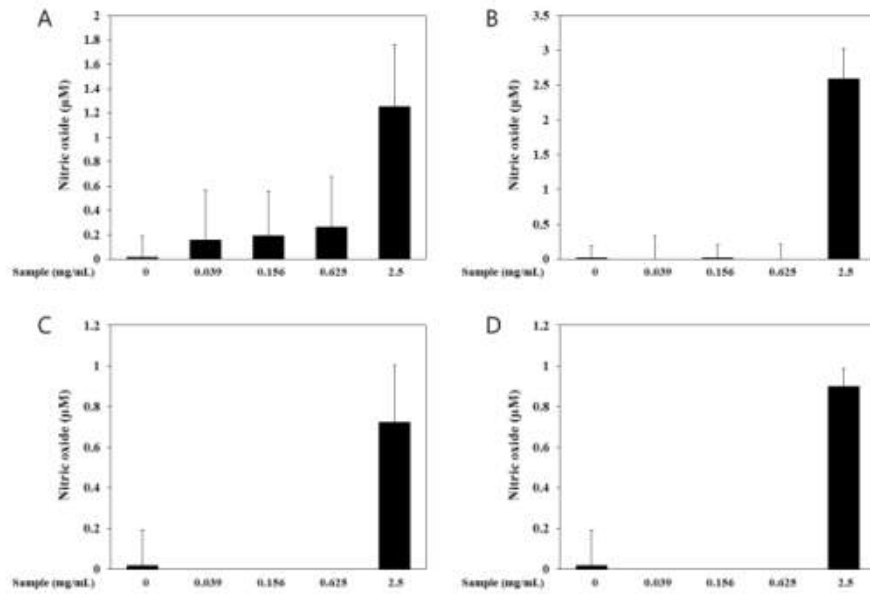


그림 59. *Bacillus* 균주를 이용한 myrosinase 활성 개자 발효물의 면역 증강 효과 (A, control; B, *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물; C, *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물; D, *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물).

- 발효하지 않은 myrosinase 활성 개자 추출물을 처리한 RAW 264.7 cells에서 각각의 농도마다 0.02, 0.16, 0.20, 0.26, 1.25 μM 의 NO가 생성되었음. *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물에서는 2.5 mg/mL의 발효물을 처리하였을 시, 2.60 μM 의 NO가 생성되었음을 확인하였으며, 2.5 mg/mL 이하의 농도에서는 NO의 발생을 유도하기 어려운 것으로 고려됨. *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물에서는 0~2.5 mg/mL의 농도에서 각각 0.02, 0.02, 0.00, 0.00, 0.00, 0.72 μM μM 의 NO가 발생함을 확인하였으며, NO의 발생을 유도하기 어려운 것으로 사료됨. *B. amyloliquefaciens* KU201을 이용한 발효물에서는 최대 2.5 mg/mL의 농도에서 0.90 μM 의 NO 생성이 확인되었음. *B. amyloliquefaciens* KU801 발효물에서 면역 증강 효과가 나타날 것으로 생각되며, *B. polyfermenticus* KU3 및 *B. amyloliquefaciens* KU201의 발효물에서는 면역 증강 효과를 기대하기 어려울 것으로 판단됨.

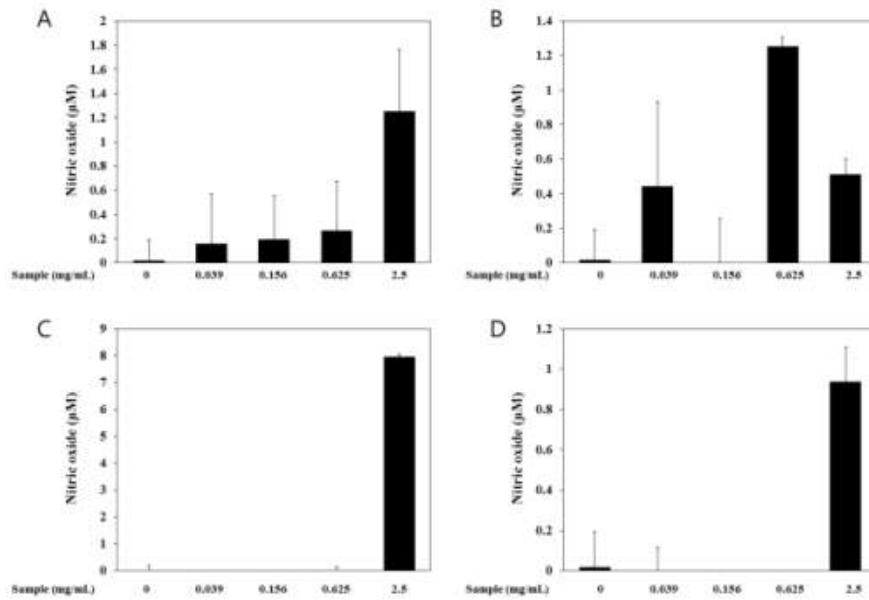


그림 60. *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 이용한 myrosinase 활성 개자 발효물의 면역 증강 효과

(A, Control; B, *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물; C, *W. cibaria* D29를 이용한 발효물; D, *W. cibaria* D30을 이용한 발효물).

- *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물에서는 0, 0.039, 0.156, 0.625, 2.5 mg/mL 처리한 실험군에서 각각 0.02, 0.44, 0, 1.25, 0.51 μM 의 NO가 생성되어 면역 증강 가능성이 없을 것으로 예상됨. *W. cibaria* D29를 이용한 발효물에서는 각각의 농도에서 0.02, 0.00, 0.00, 0.02, 7.95 μM 의 농도가 생산되었으며, 2.5 mg/mL 이상의 농도에서 LPS와 유사한 pro-inflammatory mediator 생산을 통한 면역 증강 가능성이 있을 것으로 고려됨. *W. cibaria* D30을 이용한 발효물 2.5 mg/mL를 처리한 RAW 264.7 cells 실험군에서 0.94 μM 의 NO가 발생되었으나 면역 증강의 가능성은 낮은 것으로 확인되었음.

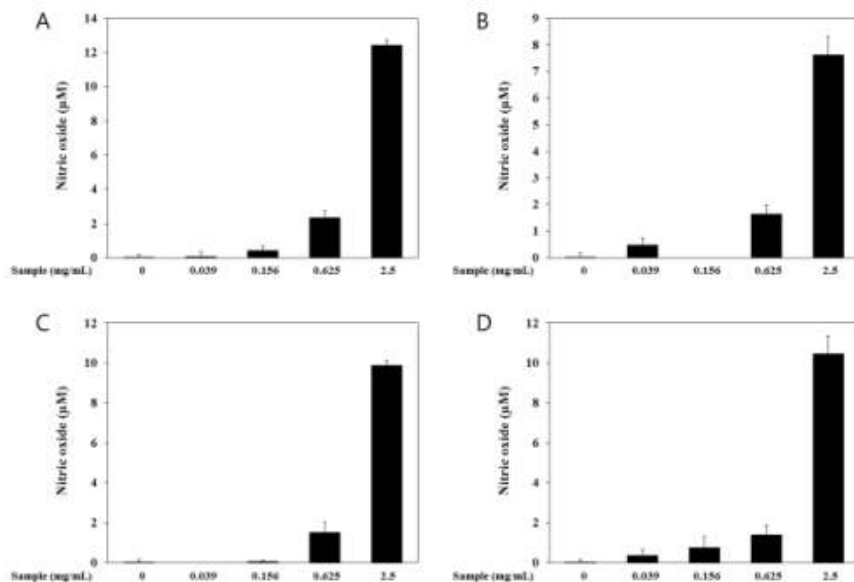


그림 61. *Lactobacillus* 균주 및 *Weissella* 균주를 이용한 선복화 발효물의 면역 증강 효과
 (A, Control; B, *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물;
 C, *W. cibaria* D29를 이용한 발효물; D, *W. cibaria* D30을 이용한 발효물).

- 발효하지 않은 선복화 추출물을 처리한 경우, 0, 0.02, 0.078, 0.313, 1.25 mg/mL의 농도에서 각각 0.02, 0.09, 0.11, 2.34, 12.44 μ M의 NO가 생성되었음. *L. rhamnosus* KCTC 5033을 이용한 발효물에서는 각각의 농도에서 0.02, 0.48, 0, 1.64, 7.64 μ M의 NO가 생산되었으며, LPS 처리 시와 유사한 pro-inflammatory mediator 생산을 통한 면역 증강 가능성이 있을 것으로 판단됨. *W. cibaria* D29을 이용한 발효물을 처리한 RAW 264.7 cells에서 발효물에 농도가 증가함에 따라 최대 9.90 μ M의 NO가 생성되었음. *W. cibaria* D30을 이용한 발효물의 NO 생성능은 0~2.5 mg/mL의 농도에서 각각 0.02, 0.37, 0.76, 1.40, 10.46 μ M의 NO가 생성됨을 확인하였으며, 이는 pro-inflammatory mediator 생산을 통한 면역 증강 가능성이 있을 것으로 예상됨. 유산균을 활용한 선복화 발효물의 경우, 발효 전보다 NO 생성능은 낮은 것으로 확인되었으나 발효를 진행하였을 시, 세포 독성이 감소하여 안전성이 개선됨에 따라(그림 52 및 표 33) 면역 증강 소재로 가능성이 있음이 고려됨.
- 그림 57~61을 종합하여 고려하였을 시, 약용식물의 발효물 중 면역 증강 가능성이 높을것으로 예상되는 *Bacillus*를 이용한 개자 발효물 3종의 pro-inflammatory cytokine 생성을 통한 면역 증강능을 확인하고자 함.
- ✓ 약용식물 발효물의 pro-inflammatory cytokine 생성능 확인
 - 3종의 선별된 약용식물 발효물이 지닌 pro-inflammatory cytokine 생성을 통한 면역 증강능을 확인하고자, RAW 264.7 cells에 약용식물 발효물을 처리하여 iNOS, IL-1 β , 및 TNF- α 의 상대적 발현량을 비교하고자 함. Pro-inflammatory cytokine은 1×10^6 cells/well 농도의 RAW 264.7 cells에 NO 생성 억제능과 같은 시료 처리시간 및 염증 반응 유도를 진행하여 관련 유전자가 발현될 수 있도록 함. Pro-inflammatory cytokine 생성은 RNA를 추출 및 cDNA 합성을 진행하여 real-time PCR을 진행하여 확인하였으며, 실험에 사용된 primer의 종류는 표 34와 같음. *Bacillus*를 이용한 3종의 개자 발효물의 pro-inflammatory cytokine 생성은 그림 62와 같음.

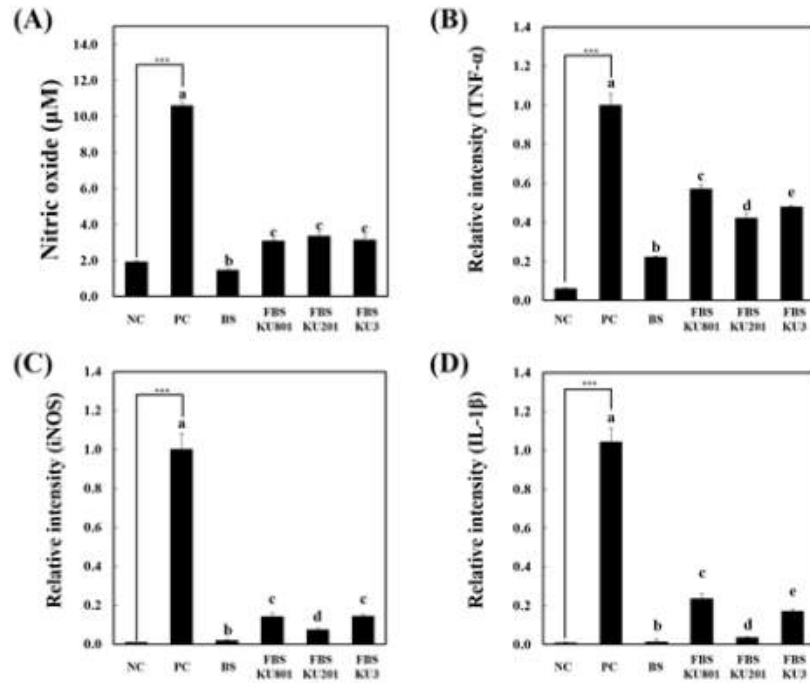


그림 62. *Bacillus*를 이용한 3종의 개자 발효물의 NO 발생 및 pro-inflammatory cytokine 생성

(FBS KU801, *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물; FBS KU201, *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물; FBS KU3, *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물).

- 3종의 발효물 모두 그림 57과 같이 발효 전에 비하여 NO 생성이 증가되었으며, pro-inflammatory cytokine 모두 발효 전에 비하여 유의적으로 증가함이 확인되었음.

✓ 약용식물 발효물의 MAPKs 및 NF-κB 활성 확인

- Pro-inflammatory cytokine은 MAPKs 및 NF-κB의 활성화를 통하여 발현이 유도되므로 약용 식물 발효물의 MAPKs 활성을 측정하여 면역 증강 소재로의 가능성을 확인하고자 함. MAPKs 및 NF-κB 활성을 측정하기 위하여 1×10^6 cells/well 농도의 RAW 264.7 cells에 NO 생성 억제능과 같은 시료 처리시간 및 염증 반응 유도를 진행하여 MAPKs 및 NF-κB 활성을 유도한 후 western blot analysis를 통하여 확인하였음. 각 약용식물 발효물의 MAPKs 활성은 그림 63과 같음.

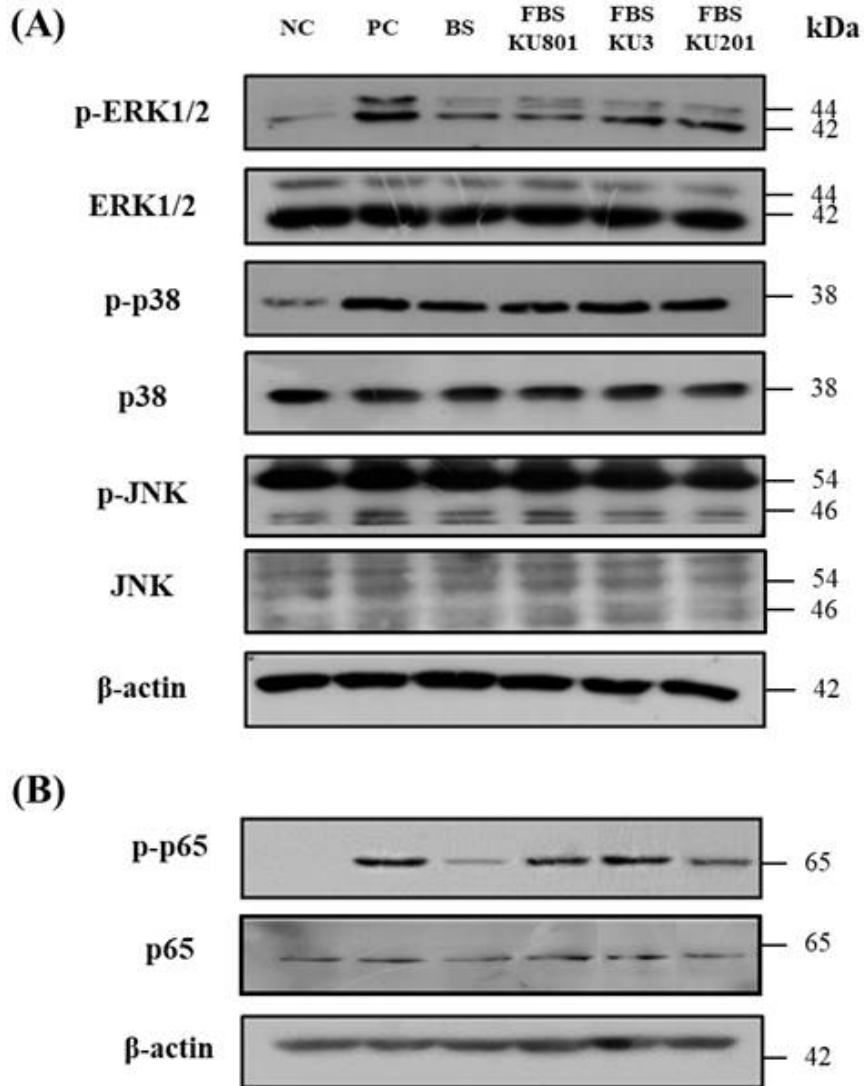


그림 63. *Bacillus*를 이용한 3종의 개자 발효물의 MAPKs 및 NF- κ B 활성화 확인 (FBS KU801, *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물; FBS KU201, *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물; FBS KU3, *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물).

- 각 발효물은 p38의 인산화를 통한 p38의 발현은 발효전과 차이가 없었으나, *B. amyloliquefaciens* KU801을 이용한 발효물은 JNK의 인산화를 발효전에 비해 증가시켰으며, *B. polyfermenticus* KU3을 이용한 발효물 *B. subtilis* KU201을 이용한 발효물은 ERK 1/2의 인산화를 촉진함이 확인되었음. 또한 각 발효물은 NF- κ B p65의 인산화를 증가시켜 발효전에 비해 발효 후 NF- κ B 경로 활성을 통한 면역 증강능이 있음이 확인되었음.

(6) 약용식물 발효물의 항바이러스능 검증

- ✓ TCID₅₀ 측정을 통한 바이러스 증식 억제 확인

- Influenza virus H1N1 A/NWS/33 인플루엔자 바이러스는 9~11일 사이의 계태아 종란에서 분리한 요막강액에 48시간 동안 37°C에서 배양하여 사용하였음(Re n et al., 2018). 배양한 인플루엔자 바이러스는 각 발효물과 1:1로 혼합하여 4°C에서 30분 동안 배양 후, 2×10^4 cells/well 농도의 MDCK 세포주에 처리하여 바이러스 증식 억제를 확인함. 바이러스 및 발효물을 처리한 MDCK 세포주는 4~5일 간 37°C에서 배양한 뒤 1% crystal violet 용액을 이용하여 세포병변효과(CPE)를 측정하여 증식 억제를 확인함(Law et al., 2017). 발효물에 의한 바이러스 증식 억제능은 표 35와 같음.

표 35. 약용식물 발효물의 항바이러스능

약용 식물	발효 균주	바이러스 역가 (TCID ₅₀ /25 µL)				
		희석 배수				
		대조군	×100	×50	×10	×1
개자	Control	10 ^{4.6}	10 ^{4.8}	10 ^{5.0}	10 ^{5.0}	10 ^{4.9}
	<i>B. amyloliquefaciens</i> KU801		10 ^{4.9}	10 ^{4.9}	10 ^{4.9}	10 ^{5.1}
	<i>B. polyfermenticus</i> KU3		10 ^{4.9}	10 ^{4.8}	10 ^{4.6}	10 ^{4.8}
	<i>B. subtilis</i> KU201		10 ^{4.8}	10 ^{4.8}	10 ^{5.0}	10 ^{4.9}
	<i>L. rhamnosus</i> KCTC 5033		10 ^{4.8}	10 ^{4.8}	10 ^{5.0}	10 ^{4.9}
	<i>W. cibaria</i> D29		10 ^{4.9}	10 ^{4.9}	10 ^{4.9}	10 ^{4.8}
	<i>W. cibaria</i> D30		10 ^{4.9}	10 ^{5.0}	10 ^{5.1}	10 ^{5.0}
Myrosinase를 활성화한 개자	Control	10 ^{4.6}	10 ^{4.8}	10 ^{4.9}	10 ^{5.0}	10 ^{4.6}
	<i>B. amyloliquefaciens</i> KU801		10 ^{4.8}	10 ^{4.8}	10 ^{5.0}	10 ^{4.9}
	<i>B. polyfermenticus</i> KU3		10 ^{4.9}	10 ^{4.9}	10 ^{4.8}	10 ^{4.9}
	<i>B. subtilis</i> KU201		10 ^{4.9}	10 ^{5.0}	10 ^{4.8}	10 ^{4.8}
	<i>L. rhamnosus</i> KCTC 5033		10 ^{4.9}	10 ^{4.9}	10 ^{4.8}	10 ^{4.6}
	<i>W. cibaria</i> D29		10 ^{4.9}	10 ^{4.9}	10 ^{4.6}	10^{2.9}
	<i>W. cibaria</i> D30		10 ^{4.9}	10 ^{4.9}	10 ^{4.8}	10 ^{4.9}
선복화	Control	10 ^{4.6}	10 ^{4.8}	10 ^{4.8}	10 ^{5.0}	10 ^{4.9}
	<i>L. rhamnosus</i> KCTC 5033		10 ^{4.8}	10 ^{4.9}	10 ^{4.9}	10 ^{4.8}
	<i>W. cibaria</i> D29		10 ^{4.8}	10 ^{4.9}	10 ^{4.8}	10 ^{4.8}
	<i>W. cibaria</i> D30		10 ^{4.9}	10 ^{4.8}	10 ^{4.6}	10 ^{4.6}

- 약용식물 발효물의 항바이러스능을 확인한 결과, *W. cibaria* D29 균주를 이용한 myrosinase 활성화 개자 발효물에서 약 2 Log TCID₅₀/25 µL의 바이러스 증식 억제능이 확인되었음. 발효를 진행하지 않은 myrosinase 활성화 개자 추출물에서는 바이러스 억제능이 나타나지 않았음을 고려하였을 시, *W. cibaria* D29 균주를 이용한 발효 시 항바이러스 효능이 증가됨을 확인하였음.

2. 약용식물 및 바실러스 균주를 이용한 항바이러스 예방용 사료첨가제 및 방제용 소독제 개발 (씨제이제일제당(주))

가. 선별된 약용식물과 균주의 항바이러스 효능 검증 및 시제품 제조

(1) 최적 배양 조건 확립

✓ 약용식물 성분 분석

- 고체발효를 통한 사료첨가제 제조 원료로서 항바이러스 효과가 검증된 개자, 선복화 원료의 일반성분 및 아미노산 조성 분석을 진행하였음. 각 약용식물의 일반성분 및 아미노산 조성은 표 36과 같음.

표 35. 약용식물 발효물의 항바이러스능

분석항목		약용식물	
		개자	선복화
일반성분 (%)	수분	1.6	8.2
	조지방	34.6	4.9
	조단백	24.8	13.4
	조섬유	22.8	29.8
	조회분	4.4	11.2
구성 아미노산 (mg/100 g)	티로신	525.3	316.7
	글리신	1280.9	643.2
	세린	1093.5	613.9
	알라닌	1108.5	582.4
	글루탐산	4428.2	1231.0
	라이신	1352.9	572.9
	로이신	1711.3	784.3
	메티오닌	387.4	120.2
	발린	986.0	506.2
	아르기닌	1669.2	561.4
	아스파라긴산	1625.0	1185.3
	이소로이신	890.5	462.5
	트레오닌	1043.2	555.7
	페닐알라닌	1035.7	545.9
	프롤린	1378.8	450.1
	히스티딘	686.5	229.4
	시스틴	348.9	78.1
	트립토판	116.4	82.0

- 일반 성분 중 개자의 조단백, 조지방 함량은 각각 34.6%, 24.8%로 선복화 4.9%, 13.4% 보다 높은 함량을 나타내었으며, 조섬유 함량은 선복화 29.8%, 개자 22.8%로 선복화가 높은 경향을 나타내었음.

✓ 약용식물 고체 발효 최적화

- γ -PGA 우수 생산 균주인 *B. amyloliquetfaciens* CJBA1을 발효 균주로 사용하여 개자와 대두박의 혼합비에 따른 발효성상 및 최종 발효물의 폴리페놀 및 γ -PGA 함량 등을 분석하였음. 고체 발효를 통한 사료첨가제 제조 원료로서 항바

이러스 효과가 검증된 개자, 선복화 원료의 일반성분 및 아미노산 조성 분석을 진행하였음. 고체 발효를 위한 원료 혼합비는 개자(또는 선복화):대두박의 비율을 100:0~50:50로 조정하였으며, 고체 발효를 위한 입국수분은 *B. amyloliquetfa* CJBA1 배양액 포함 45~46%, 증자는 100℃, 30분, 고체발효는 37℃, 상대습도 95%조건의 항온항습기에서 16시간 동안 진행하였음. 약용식물 발효물의 제조 공정 및 고체 발효물의 특성은 그림 64 및 65와 같음.

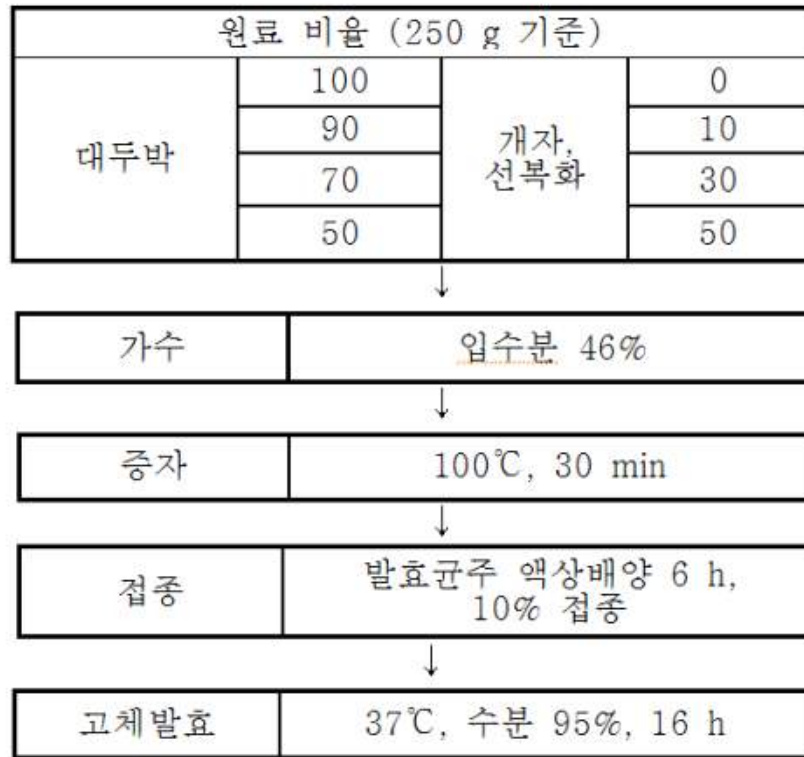


그림 64. 약용 식물 발효물 제조 공정

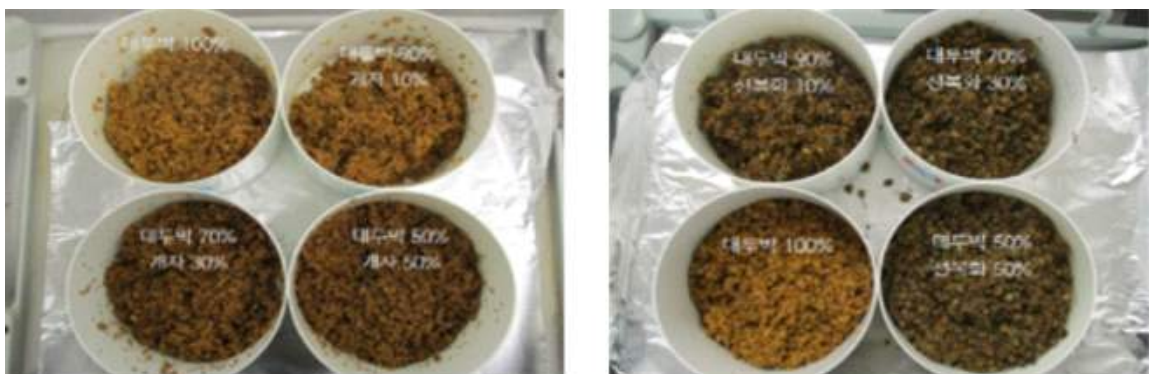


그림 65. 개자, 선복화 첨가비율에 따른 고체 발효물 특성

- 개자 및 선복화와 대두박 함량 비율에 따른 고체발효 시 수분함량, 생균수 및 pH를 측정하여 발효물의 기본적인 특성을 확인하였으며, 그 결과는 표 36 및 37과 같음.

표 36. 개자와 대두박의 함량 비율에 따른 수분, 발효 균수 및 pH의 변화

발효시간 (h)	혼합비율 (대두박:개자)	수분함량 (%)	생균수 (CFU/g)	pH
0	10:0	46.13	2.8×10^7	6.55
	9:1	45.00	2.8×10^7	6.53
	7:3	47.16	4.1×10^7	6.51
	5:5	45.58	6.9×10^7	6.48
16	10:0	37.17	1.6×10^{10}	7.63
	9:1	38.22	1.2×10^{10}	7.53
	7:3	33.63	1.5×10^{10}	7.09
	5:5	35.97	1.1×10^{10}	7.04

- γ -PGA 생산균주인 *B. amyloliquefaciens* CJBA1의 생균수 변화는 초기 균수는 $2.8 \sim 6.9 \times 10^7$ CFU/g을 나타내었으나, 발효 16시간 후에는 $1.1 \sim 1.6 \times 10^{10}$ CFU/g으로 증가하였음. 개자 및 대두박 함량에 따른 생균수의 변화를 고려하였을 시, 개자의 첨가량을 50%까지 증가시켜도 발효균주 성장에는 영향이 없음이 확인되었음.

표 37. 선복화와 대두박의 함량 비율에 따른 수분, 발효 균수 및 pH의 변화

발효시간 (시간)	혼합비율 (대두박:선복화)	수분함량 (%)	생균수 (CFU/g)	pH
0	10:0	45.61	4.7×10^7	6.63
	9:1	45.60	4.9×10^7	6.54
	7:3	46.30	4.9×10^7	6.32
	5:5	44.32	2.9×10^7	6.28
16	10:0	37.40	9.2×10^9	7.43
	9:1	38.19	1.1×10^{10}	7.81
	7:3	45.24	9.4×10^9	7.51
	5:5	45.79	1.4×10^{10}	6.8

- γ -PGA 생산균주인 *B. amyloliquefaciens* CJBA1의 생균수 변화는 초기 균수는 $2.9 \sim 4.9 \times 10^7$ CFU/g을 나타내었으나, 발효 16시간 후에는 $9.2 \times 10^9 \sim 1.4 \times 10^{10}$ CFU/g으로 증가하였음. 선복화 및 대두박 함량에 따른 생균수의 변화를 고려하였을 시, 선복화의 첨가량을 50%까지 증가시켜도 발효균주 성장에는 영향이 없음이 확인되었음.

✓ 약용식물을 포함한 발효물의 γ -PGA 함량 분석

- 약용식물을 함유한 발효물의 γ -PGA 함량 분석을 위하여, 발효물 50 g을 1차 증류수에 1:4(w/v)의 비율로 65°C에서 1시간 동안 shaking incubator에서 180 rpm을 유지하며 액화를 진행하였음 (그림 66). 액화가 끝난 반응액을 8,000 rpm에서 25분 동안 원심분리한 후, 침전물과 상층액을 분리하였음. 생산 균주 발

효물은 원심분리를 진행하여도 이물이 잘 풀어지는 특성을 지니고 있어 체를 사용하여 이물을 제거하였음. 이 후, 회수한 상등액을 2 N 황산으로 pH 3까지 적정한 뒤 침전물을 원심분리(8,000×g, 20분)를 통해 회수하여 동결건조 하여 γ -PGA를 획득한 후 함량 분석을 실시하였음. γ -PGA를 분석하기 위한 시료의 준비는 그림 66과 같으며, 개자 및 선복화와 대두박의 혼합비에 따른 crude γ -PGA, 에탄올 추출물 생산량은 표 39 및 40과 같음.



그림 66. γ -PGA 및 플라보노이드 함량 분석을 위한 추출물 제조

표 39. 개자와 대두박의 혼합비에 따른 crude γ -PGA, 에탄올 추출물 생산량

혼합비 (개자:대두박)	발효시간 (시간)	Crude PGA (g)	수분함량 (%)	DS	회수율 (%)
10:0	16	5.52	37.17	31.41	11.0
9:1		4.97	38.22	30.89	9.9
7:3		4.03	33.63	33.19	8.1
5:5		2.08	35.97	32.01	4.2
혼합비 (개자:대두박)	발효시간 (시간)	에탄올 추출물 (g)	수분함량 (%)	DS	회수율(%)
10:0	16	0.43	37.17	15.71	1.7
9:1		0.53	38.22	15.45	2.1
7:3		0.31	33.63	16.59	1.2
5:5		0.25	35.97	16.01	1.0

- Crude γ -PGA는 개자 함량이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었으며, 이는 대두박으로부터 유래하는 glutamic acid의 함량 감소와 연관이 있는 것으로 사료되며, 폴리페놀 및 플라보노이드를 함유하고 있는 에탄올 추출물의 경우, 대두박과 개자를 9:1로 혼합한 발효물에 가장 높은 함량을 나타내었음.

표 40. 선복화와 대두박의 혼합비에 따른 crude γ -PGA, 에탄올 추출물 생산량

혼합 비율 (대두박:선복화)	발효시간 (시간)	Crude PGA (g)	DS	회수율 (%)
10:0	16	4.78	50.00	9.6
9:1		4.79	50.00	9.6
7:3		3.62	50.00	7.2

5:5		0.92	50.00	1.8
혼합 비율 (대두박:선복화)	발효시간 (시간)	에탄올 추출물 (g)	DS	회수율 (%)
10:0	16	0.42	25.00	1.7
9:1		0.59	25.00	2.4
7:3		0.93	25.00	3.7
5:5		0.98	25.00	3.9

- Crude γ -PGA는 선복화 함량이 증가할수록 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히, 5:5 혼합물에서는 γ -PGA가 생성되지 않는 것을 확인하였음. 폴리페놀 및 플라보노이드를 함유하고 있는 에탄올 추출물의 경우, 선복화 함량이 증가할수록 높은 함량을 나타내었음.
- γ -PGA의 분자량은 gel permeation chromatography(GPC)를 이용하여 측정함. γ -PGA 10 mg을 0.1 M NaNO₃ 버퍼를 사용하여 10배 희석 후, 5 M KOH 5 μ L를 첨가하여 용해시킨 후, 원심분리하여 획득한 상등액을 0.22 μ m 마이크로 필터로 여과하여 분석을 진행하였음. 고정상으로는 100~1,000,000 Da의 분석범위를 지닌 Tosoh TSKgel GMPWXL 컬럼을 사용하였으며, 이동상으로는 0.1 M NaNO₃를 사용함. 각 시료는 20 μ L씩 주입하여 분석하였으며, 이동상은 유속 0.5 mL/min 및 isocratic 조건으로 진행함. 컬럼은 30 $^{\circ}$ C를 유지하면서 검출기로 RID detector를 사용하여 분자량을 측정함. 분자량의 계산은 pullulan 검량곡선을 사용하여 진행하였으며(표 41 및 그림 67), γ -PGA의 분자량은 표 42 및 43과 같음.

표 41. Pullulan 표준 시약 분석 결과

표준물질	분자량	검출시간(분)	log MW
P800	805,000	13.26	5.91
P400	366,000	13.81	5.56
P200	210,000	14.37	5.32
P100	113,000	14.96	5.05
P50	48,800	15.57	4.69
P10	10,000	17.29	4.00
P5	6,200	17.86	3.79

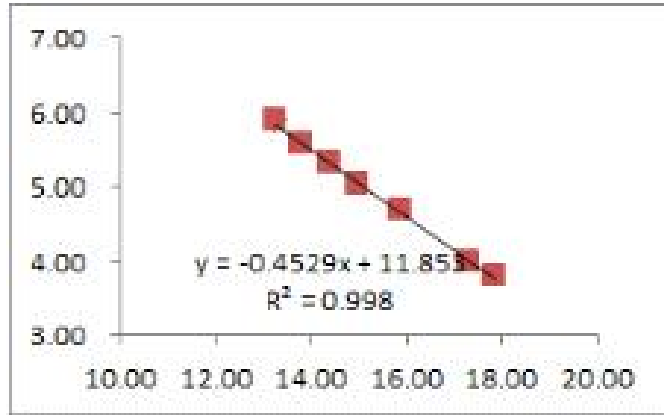


그림 67. Pullulan 검량곡선

표 42. 개자 및 대두박 혼합 비율에 따른 γ -PGA의 분자량

혼합비	발효시간 (시간)	검출시간 (분)	log MW	MW (Da)	MW (kDa)	증가율
10:0	16	11.86	6.48	3,040,638	3041	100
9:1		11.80	6.51	3,236,970	3237	106
7:3		12.17	6.34	2,184,718	2185	72
5:5		12.24	6.31	2,030,918	2031	67

- 개자와 대두박의 함량 비율에 따른 γ -PGA의 분자량을 측정된 결과, 대두박과 개자를 9:1 비율로 혼합한 발효물의 γ -PGA 분자량이 3,237 kDa으로 가장 높았으며, 5:5로 혼합한 발효물은 가장 낮은 2,031 kDa을 나타내었음

표 43. 선복화 및 대두박 혼합 비율에 따른 γ -PGA의 분자량

혼합비율	발효시간 (시간)	검출시간 (분)	log MW	MW (kDa)	증가율
10:0	16	12.85	6.04	2627	100
9:1		11.93	6.45	3294	125
7:3		11.86	6.48	3489	133
5:5		12.32	6.27	1881	71

- 선복화와 대두박의 혼합 비율에 따른 γ -PGA의 분자량을 측정된 결과, 대두박과 선복화를 7:3 비율로 혼합한 발효물의 γ -PGA 분자량이 3,489 kDa으로 가장 높은 반면 5:5로 혼합한 발효물은 가장 낮은 1,881 kDa을 나타내었음. 선복화, 개자 함유에 따른 γ -PGA의 분자량은 공통적으로 증가하는 경향을 나타내었음.

✓ 약용식물을 포함한 발효물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석

- 약용식물을 함유한 발효물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 분석을 위해서 발효물 25 g을 에탄올과 1:10(v/w)의 비율로 70°C 6시간 동안 shaking incubator를 사용하여 180 rpm에서 액화를 진행하였음. 발효물은 8,000×g에서 25분 동안 원심분리한 후, 체를 사용하여 상등액 회수하였음. Whattman 여과지를 이용

하여 여과를 진행한 후, 감압응축기를 사용하여 추출물 농축을 진행하였고 이후 40 mL 증류로 희석하여 동결건조 용기에 담아 동결건조를 진행하여 건조물을 회수하였음. 총 폴리페놀 및 플라보노이드 분석을 위한 시료의 준비는 그림 66과 같음.

- 총 페놀화합물 양은 Folin-Ciocalteu assay를 통하여 확인함(Park et al., 2017). 각 발효물 90 μ L를 2% sodium carbonate 용액 1.8 mL와 혼합한 뒤, 50%(v/v) Folin-Ciocalteu 용액을 첨가하여 30분 동안 암실에서 반응함. 이후, 752 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며, gallic acid 용액을 이용하여 표준곡선을 작성 후 그 값을 계산함. 각 발효물의 총 페놀화합물 함량은 표 44 및 45와 같음.
- 총 플라보노이드 함량은 aluminium chloride assay를 통하여 확인함(Friedman et al., 2017). 각 발효물 100 μ L를 5% sodium nitrite 용액 20 μ L와 혼합한 뒤, 60% 에탄올 800 μ L를 첨가하여 6분 간 반응함. 이후, 10% aluminium chloride 용액 20 μ L과 4% sodium hydroxide 용액 60 μ L를 첨가한 뒤 30분 간 암실에서 반응을 진행함. 플라보노이드는 aluminium chloride와 노란색의 복합체를 형성하며 이를 405 nm에서 흡광도를 측정하여 총 플라보노이드 함량을 확인함. 표준곡선은 quercetin을 사용하여 각 발효물 내 플라보노이드 함량을 계산함. 각 추출물의 총 플라보노이드 함량은 표 44 및 45 같음.

표 44. 개자 및 대두박 혼합 비율에 따른 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

혼합 비율	총 폴리페놀 (μ g GAE/mL DW)	총 플라보노이드 (μ g QE/mL DW)
10:0	16.8	6.3
9:1	18.0	103.2
7:3	24.3	385.4
5:5	30.1	500 \uparrow

- 개자와 대두박의 혼합 비율에 따른 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분석한 결과, 개자 함유량이 증가할수록 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 증가하였으며, 1차년도 연구를 통하여 개자의 항바이러스 효과를 나타내는 유용 물질은 플라보노이드 계열인 것을 확인하였음.

표 45. 선복화 및 대두박 혼합 비율에 따른 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

혼합 비율	총 폴리페놀 (μ g GAE/mL DW)	총 플라보노이드 (μ g QE/mL DW)
10:0	11.8	572.8
9:1	26.4	1796.5
7:3	34.4	3037.3
5:5	41.2	\geq 5000

- 선복화와 대두박의 혼합 비율에 따른 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 분

석한 결과, 선복화 함유량이 증가할수록 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 증가하였으며, 1차년도 연구를 통하여 개자의 항바이러스 효과를 나타내는 유용 물질은 플라보노이드 계열인 것을 확인하였음

(2) 항바이러스 효과 검증 시료 제조 및 항바이러스 효과 검증

✓ 유효성분층의 분리

- 개자 및 선복화를 적용한 *B. amyloliquefaciens* CJBA1 발효물의 항바이러스 효과를 검증하기 위하여 γ -PGA 층과 폴리페놀 분획층으로 분리함.

✓ TCID₅₀ 측정을 통한 바이러스 증식 억제 확인

- Influenza virus H1N1 A/NWS/33 인플루엔자 바이러스는 9~11일 사이의 계태아 종란에서 분리한 요막강액에 48시간 동안 37°C에서 배양하여 사용하였음(Re n et al., 2018). 배양한 인플루엔자 바이러스는 각 발효물과 1:1로 혼합하여 4°C에서 30분 동안 배양 후, 2×10^4 cells/well 농도의 MDCK 세포주에 처리하여 바이러스 증식 억제를 확인함. 바이러스 및 발효물을 처리한 MDCK 세포주는 4~5일 간 37°C에서 배양한 뒤 1% crystal violet 용액을 이용하여 세포병변효과(CPE)를 측정하여 증식 억제를 확인함(Law et al., 2017). 발효물에 의한 바이러스 증식 억제능은 표 46과 같음.

표 46. 약용식물 및 고체 발효물 분획별 항바이러스 효과

시료 번호	바이러스 역가 (TCID ₅₀ /25 μ L)				
	농도 (μ g/mL)				
	대조군	125	250	1250	12500
대두박 100% PGA 추출물	10 ^{4.6}	10 ^{4.8}	10 ^{4.4}	10 ^{4.5}	10 ^{4.6}
대두박 90%, 선복화 10% PGA 추출물		10 ^{4.6}	10 ^{4.8}	10 ^{4.8}	10 ^{4.4}
대두박 70%, 선복화 30% PGA 추출물		10 ^{4.5}	10 ^{4.8}	10 ^{4.6}	10 ^{4.6}
대두박 100% PGA 추출물		10 ^{4.6}	10 ^{4.8}	10 ^{4.6}	10 ^{4.8}
대두박 90%, 개자 10% PGA 추출물		10 ^{4.6}	10 ^{4.8}	10 ^{4.8}	10 ^{4.8}
대두박 70%, 개자 30% PGA 추출물		10 ^{4.9}	10 ^{4.8}	10 ^{4.8}	10 ^{4.6}
대두박 100%, 폴리페놀 추출물		10 ^{4.8}	10 ^{4.6}	10 ^{4.6}	10 ^{4.6}
대두박 90%, 선복화 10% 폴리페놀 추출물		10 ^{4.9}	10 ^{4.6}	10 ^{4.8}	10 ^{4.5}
대두박 70%,		10 ^{4.8}	10 ^{4.5}	10 ^{4.6}	10 ^{4.5}

선복화 30% 폴리페놀 추출물					
대두박 100%, 폴리페놀 추출물		$10^{4.9}$	$10^{5.0}$	$10^{4.9}$	$10^{4.9}$
대두박 90%, 개자 10% 폴리페놀 추출물		$10^{5.0}$	$10^{5.0}$	$10^{4.9}$	$10^{4.9}$
대두박 70%, 개자 30% 폴리페놀 추출물		$10^{4.9}$	$10^{4.8}$	$10^{4.8}$	$10^{4.8}$

- 발효 전 개자 및 선복화 추출물의 바이러스 억제능(표 14 및 15)에 비하여, γ -PGA가 포함된 발효물에서는 바이러스 억제능이 약한 것으로 확인됨. γ -PGA가 포함된 발효물의 경우 단독으로 사용하는 것 외에 바이러스 증식능을 억제할 수 있는 보조 소재로의 활용이 좋을 것으로 사료됨.

(3) 소독제 적용을 위한 항균 효과 검증

✓ 액상 발효물 제작

- 소독제 적용을 위한 제형은 분산성, 안정성, 지속성 등을 감안하여 고체보다는 액상 형태가 적합할 것으로 사료되며, 이에 개자, 선복화 에탄올 추출물의 *B. amyloliquefaciens* CJBA1의 액상 발효물을 제작함. 액상 발효를 위한 조건은 *B. amyloliquefaciens* CJBA1의 기본배지인 GYP배지(glucose 10 g/L, yeast extract 8 g/L 및 soy peptone 2 g/L)에 개자 및 선복화 각각의 에탄올 추출물을 0.5~2.5%씩 첨가하여 37°C에서 180 rpm을 유지하며 6시간 동안 배양한 후, 균체를 제거한 상등액을 분리하여 항균 효과를 검토하였음. 액상 발효물은 그림 68과 같으며, 액상 발효물 내 *Bacillus* 생균수는 표 47과 같음.

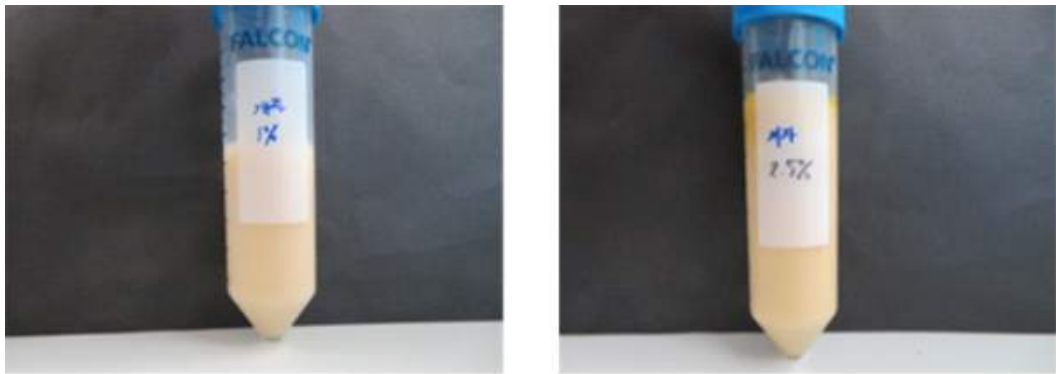
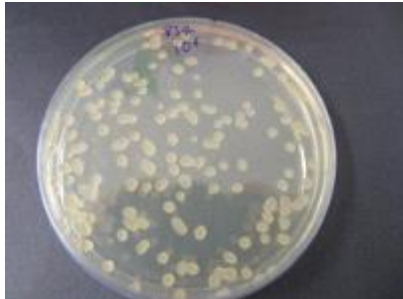
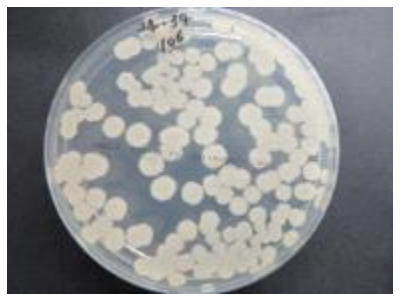

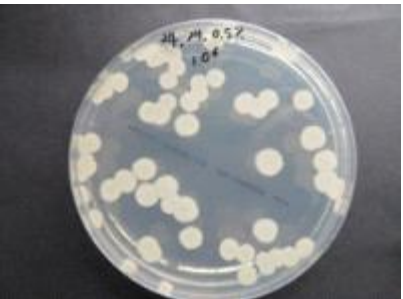

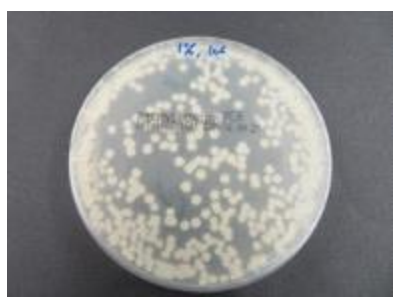
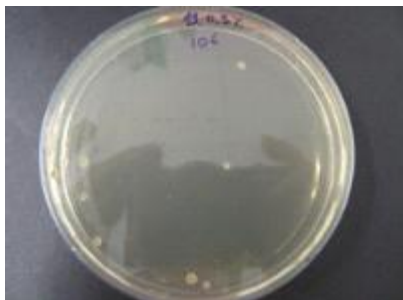
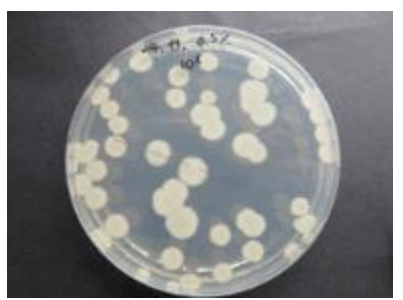


그림 68. 항균력 측정을 위한 액상 약용식물 발효 상등액

표 47. *B. amyloliquefaciens* CJBA1 및 *B. amyloliquefaciens* 24-34의 약용식물 에탄올 추출물 함량별 액상 발효 결과

약용식물	첨가량 (%)	<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1	<i>B. amyloliquefaciens</i> 24-34
무첨가	0	1.6×10^8 CFU/mL	1.7×10^8 CFU/mL

			
		2.0×10^8 CFU/mL	7.0×10^7 CFU/mL
개자	0.5		
		3.4×10^8 CFU/mL	5.7×10^8 CFU/mL
	1.0		
		5.0×10^6 CFU/mL	2.6×10^8 CFU/mL
선복화	0.5		
		8.0×10^6 CFU/mL	4.3×10^7 CFU/mL
	1.0	3.4×10^7 CFU/mL	성장 저해

			
	2.5	성장 저해	성장 저해

✓ 액상 발효물의 병원성 미생물 저해 효과

- 액상 발효물의 병원성 미생물 저해 효과는 microdilution assay를 통하여 미생물의 성장 저해를 확인함(Abdollahzadeh et al., 2014). Avian pathogenic *Escherichia coli* (B/06/31), Avian pathogenic *Escherichia coli* (B/06/63), Avian pathogenic *Escherichia coli* (B/06/80), *Staphylococcus aureus* SE (A/C/E), T-C, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Pullorum ATCC 10398, *Salmonella* Gallinarum ATCC 9184의 7종의 조류 병원성 미생물을 37°C에서 24시간 배양 후, 6 Log CFU/mL의 농도로 희석하여 액상 발효물과 1:1의 비율로 혼합하여 배양함. 24시간 후, 성장 억제 정도를 확인하였으며, 그 결과는 표 48~50과 같음.

표 48. *B. amyloliquefaciens* CJBA1 및 *B. amyloliquefaciens* 24-34 발효물의 조류 유래 병원성 미생물 성장 억제 효과 (Avian pathogenic *Escherichia coli*)

시료	억제 정도		
	균주		
	Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> (B/06/31)	Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> (B/06/63)	Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> (B/06/80)
24-34	-	-	-
24-34(0.5% 선복화)	++	++	++
24-34(1.0% 선복화)	++	++	++

24-34(2.5% 선복화)	++	++	++
24-34(0.5% 개자)	-	-	-
24-34(1.0% 개자)	-	-	-
24-34(2.5% 개자)	++	++	++
24-34(5.0% 개자)	++	++	++
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1	+	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (0.5% 선복화)	+	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (1.0% 선복화)	+	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (2.5% 선복화)	+	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (0.5% 개자)	-	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (1.0% 개자)	-	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (2.5% 개자)	-	-	-

-, 저해되지 않음; +, control에 비해 저해 효과가 있음; ++, broth에서 성장을 저해가 확인됨;
+++, 성장이 완벽하게 저해됨.

- *B. amyloliquefaciens* CJBA1를 이용한 선복화 발효물은 조류 병원성 대장균에 대한 성장 저해 효과를 나타내었음.

표 49. *B. amyloliquefaciens* CJBA1 및 *B. amyloliquefaciens* 24-34 발효물의 조류 유래 병원성 미생물 성장 억제 효과 (*Staphylococcus aureus* 및 *Salmonella* Enteritidis)

시료	억제 정도	
	균주	
	<i>Staphylococcus aureus</i> SE (A/C/E), T-C	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076
24-34	+++	-
24-34(0.5% 선복화)	+	+
24-34(1.0% 선복화)	+	+

24-34(2.5% 선복화)	+	+
24-34(0.5% 개자)	-	-
24-34(1.0% 개자)	-	-
24-34(2.5% 개자)	+	+
24-34(5.0% 개자)	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (0.5% 선복화)	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (1.0% 선복화)	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (2.5% 선복화)	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (0.5% 개자)	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (1.0% 개자)	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (2.5% 개자)	+	+

-, 저해되지 않음; +, control에 비해 저해 효과가 있음; ++, broth에서 성장을 저해가 확인됨;
+++, 성장이 완벽하게 저해됨.

- *B. amyloliquefaciens* CJBA1를 이용한 선복화 및 개자 발효물에서 조류 병원성 황색 포도상구균 및 살모넬라에 대하여 성장 저해 효과를 확인하였음.

표 50. *B. amyloliquefaciens* CJBA1 및 *B. amyloliquefaciens* 24-34 발효물의 조류 유래 병원성 미생물 성장 억제 효과 (*Salmonella Pullorum* 및 *Salmonella Gallinarum*)

시료	억제 정도	
	균주	
	<i>Salmonella Pullorum</i> ATCC 10398	<i>Salmonella Gallinarum</i> ATCC 9184
24-34	-	-
24-34(0.5% 선복화)	-	++
24-34(1.0% 선복화)	-	++
24-34(2.5% 선복화)	-	++
24-34(0.5% 개자)	-	-
24-34(1.0% 개자)	-	-
24-34(2.5% 개자)	-	++
24-34(5.0% 개자)	-	++
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1	-	+

<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (0.5% 선복화)	-	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (1.0% 선복화)	-	++
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (2.5% 선복화)	-	++
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (0.5% 개자)	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (1.0% 개자)	-	-
<i>B. amyloliquefaciens</i> CJBA1 (2.5% 개자)	-	-

-, 저해되지 않음; +, control에 비해 저해 효과가 있음; ++, broth에서 성장을 저해가 확인됨;
+++, 성장이 완벽하게 저해됨.

- *B. amyloliquefaciens* CJBA1를 이용한 선복화 발효물은 *Salmonella Gallinaru m*의 억제능은 좋은 효능을 보였으나, *Salmonella Pullorum*의 억제능을 보이지 않았음. 개자 발효물의 경우 2종의 살모넬라 모두 효능이 나타나지 않음.

제 3절 제 3차년도 (18. 9. 29.~19. 11. 28.)

1. 약용식물 및 프로바이오틱스 균주를 활용한 항바이러스 효능 소재 개발(건국대학교 산학협력단)

가. 약용식물을 이용한 발효 소재 생산 최적화

(1) 발효를 통한 생물전환

✓ 생물전환을 통한 항바이러스 성분 전환

- 높은 항바이러스능을 지닌 선복화를 발효하여 항바이러스 유효 성분을 증가시키고 안정성을 확보하고자 함. 발효에 사용된 유산균은 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P으로 β -glucosidase 활성 및 우수한 프로바이오틱스 성질을 지닌 균주를 사용함(Lee et al., 2014). 발효는 선복화를 60℃에서 24시간 동안 열수 추출한 뒤, yeast extract 및 peptone을 첨가하여 121℃에서 15분 간 멸균하여 사용하였음. 멸균이 끝난 선복화 발효배지에 12시간 간격으로 3회 계대배양한 *L. plantarum* KCCM 11613P 균주를 약 6 Log CFU/mL의 농도로 접종한 뒤 37℃에서 72시간 동안 배양을 진행하였음. 배양 후, 원심분리를 통하여 균체를 제거한 뒤 상등액을 동결건조하여 유효성분 분석을 진행함.

✓ 선복화 발효물의 유효성분 분석

- Epigallocatechin gallate(EGCG)는 항바이러스능을 지닌 카테킨 유도체로 보고 되었음(Randazzo et al., 2017). 따라서 선복화 발효물 내의 카테킨 유도체의 생물전환을 확인하여 발효를 통한 항바이러스능의 개선을 기대하고자 함. 선복화 발효물의 유효성분 분석은 HPLC analysis를 통하여 진행함. 분석은 Eclipse X DB-C18(4.6 mm×150 mm, 5 μm)를 고정상으로 사용하였으며, 이동상으로는 0.1% formic acid가 첨가된 물 및 ACN을 사용하였음. EGCG의 검출은 UV-detector를 사용하여 280 nm에서 검출하였으며, 발효 전·후 EGCG의 함량 변화는 표 51 및 그림 69와 같음.

표 51. EGCG의 HPLC 분석 정보

물질	검출시간 (분)	R ²	Limit of detection (μg/mL)	Limit of quantification (μg/mL)
EGCG	11.521	0.9974	0.192	0.641

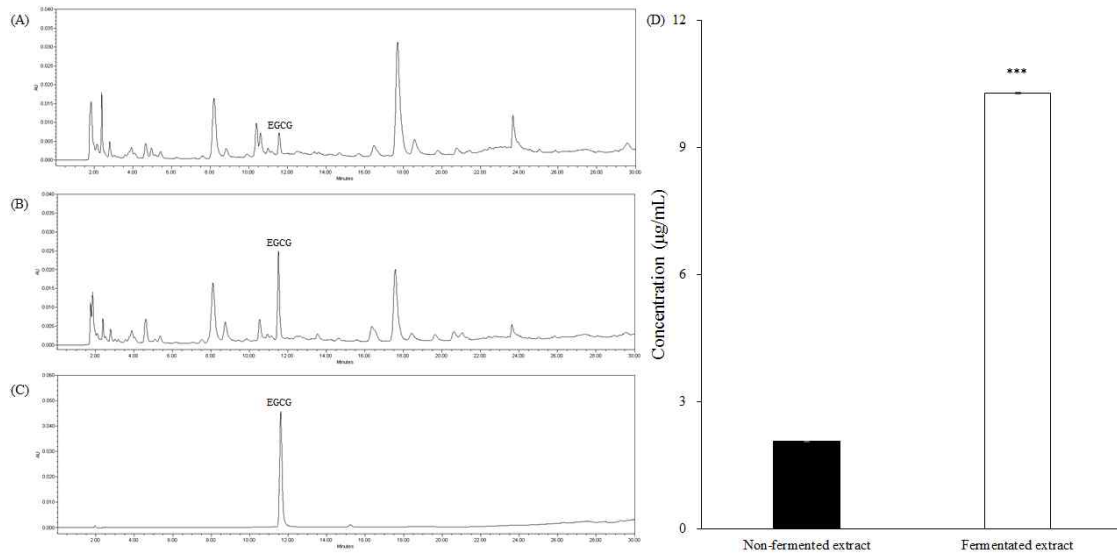


그림 69. 발효 전·후 EGCG의 함량 비교

(A, 발효 전; B, 발효 후; C, EGCG 표준물질; D, 발효 전·후 EGCG의 함량 비교)

- 발효 후, EGCG의 함량은 2.06 μg/mg에서 10.28 μg/mg까지 증가하였으며 *L. p. plantarum* KCCM 11613P 균주를 사용한 발효 시 항바이러스능을 지닌 소재로 개발 가능성이 고려되어 *L. plantarum* KCCM 11613P 균주의 발효를 위한 탄소원 및 질소원 선정을 진행함.

✓ 최적 배양을 위한 탄소원 및 질소원의 선정

- 최적 배양을 위한 탄소원 및 질소원의 선정은 Plackett-Burman Experimental Design을 사용하여 진행하였음(Brinques et al., 2010). 탄소원으로 glucose, fruc

tose, galactose, xylose, sucrose, maltose, lactose and malt extract의 8종을 사용하였으며, 질소원으로 yeast extract, soytone, beef extract and peptone의 4종을 사용하였음. 탄소원 및 질소원에 따른 EGCG 생산량의 차이는 표 52와 같으며, 각 영양원이 EGCG 생산에 미치는 영향은 표 53과 같음.

표 52. Plackett-Burman experimental design을 통한 EGCG의 생산

시행	Variables ^a /level ^b															EGCG 함량 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	D ₁	D ₂	D ₃	
1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	99.217 \pm 1.181
2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	107.095 \pm 2.448
3	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	106.176 \pm 3.387
4	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	99.273 \pm 2.134
5	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	97.448 \pm 2.109
6	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	94.419 \pm 0.252
7	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	92.916 \pm 0.718
8	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	95.594 \pm 0.534
9	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	101.533 \pm 4.792
10	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	98.195 \pm 0.507
11	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	98.550 \pm 1.098
12	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	95.945 \pm 0.764
13	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	109.739 \pm 0.861
14	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	106.324 \pm 0.433
15	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	104.717 \pm 0.919
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	110.109 \pm 1.957
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	101.890 \pm 1.038
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	103.354 \pm 1.996
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	102.318 \pm 1.160

X₁, Glucose; X₂, fructose; X₃, galactose; X₄, xylose; X₅, sucrose; X₆, maltose; X₇, lactose; X₈, malt extract; X₉, yeast extract; X₁₀, soytone; X₁₁, beef extract; X₁₂, peptone; D₁, D₂ and D₃ are dummy variables.

표 53. 각 영양원이 EGCG의 생산에 미치는 영향

Nutrients	Effect	p-Value
Glucose	-0.42	0.548
Fructose	-1.34	0.252
Galactose	0.66	0.475
Xylose*	4.12	0.006
Sucrose	0.06	0.903
Maltose	0.82	0.390
Lactose	-0.57	0.655
Malt extract	0.19	0.901
Yeast extract	-0.28	0.739
Soytone*	8.51	0.000
Beef extract*	3.57	0.013
Peptone	2.33	0.065

- EGCG 생산에 가장 큰 영향을 미치는 영양원은 탄소원으로 xylose가 선정되었

으며, 질소원으로는 soytone 및 beef extract가 선정되었음. 그 외의 영양원은 E GCG 생산에 유의적인 영향을 미치지 않는 것으로 확인됨.

✓ Xylose, soytone 및 beef extract를 사용한 EGCG 생산 최적 모델

- 선정된 3종의 영양원을 사용한 EGCG 생산의 최적 모델은 Central Composite Design(CCD)를 이용한 response surface model을 통하여 3종의 영양원이 미치는 영향을 분석하고자 함(Khan et al., 2015). CCD는 중앙의 center point로부터 cube point 및 star point 까지의 거리를 고려하여 최적의 조건을 확인하는 방법으로(그림 70), 실험 설계 수는 다음 식과 같음.

$$N = 2^k + 2k + C_n$$

- N은 실험 설계 수, K는 실험 설계에 사용된 요인의 수 및 Cn은 center point로부터 반복된 수로 정의하며, center point와 star point 사이의 거리(α)는 $\alpha = 2^{k/4}$ 로 정의함. 3종의 영양원은 $-\alpha, -1, 0, +1$ 및 $+\alpha$ 의 5가지 수준으로 설정하여 실험하여 각 실험 설계 수 당 요인의 수준은 표 54와 같음. 각 요인과 EGCG 생산량 사이의 관계는 response surface model을 통하여 확인하였으며, 각 요인과 EGCG 생산량 사이의 관계는 다음식과 같다.

$$Y = A_0 + \sum_{i=1}^n A_i X_i + \sum_{j \leq i}^n B_{ij} X_i X_j$$

- Y는 예상되는 EGCG 생산량, A_0 는 상수항, X_i 및 X_j 는 각 요인의 변수 수준, A_i 는 선형계수 및 B_{ij} 는 이차모델계수로 정의하며 그 결과는 그림 71과 같다.

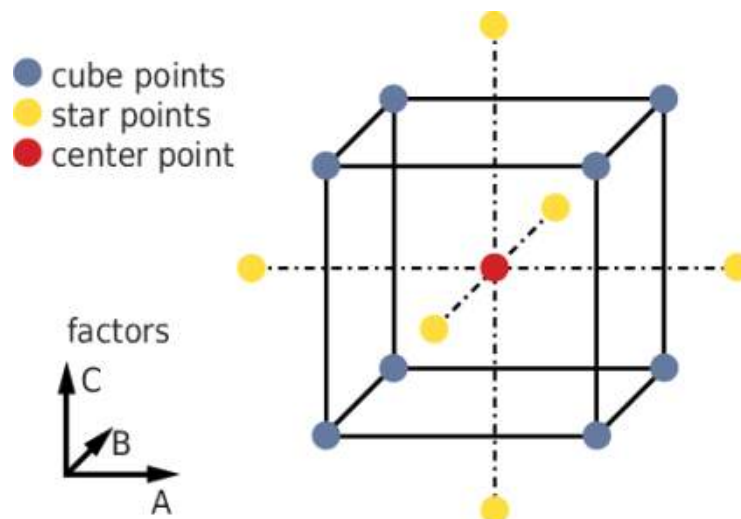


그림 70. Central Composite Design 모델
(Hetzner et al., 2014)

표 54. 각 영양원이 EGCG의 생산에 미치는 영향

Run	Xylose	Soytone	Beef extract	EGCG contents ($\mu\text{g/mL}$)
1	2 g	2 g	2 g	109.71 \pm 2.24
2	2 g	2 g	5 g	127.11 \pm 0.80
3	2 g	5 g	2 g	131.25 \pm 1.12
4	2 g	5 g	5 g	143.24 \pm 0.75
5	4 g	2 g	2 g	121.61 \pm 0.40
6	4 g	2 g	5 g	206.27 \pm 1.26
7	4 g	5 g	2 g	157.99 \pm 1.57
8	4 g	5 g	5 g	228.33 \pm 1.52
9	1.318 g	3.5 g	3.5 g	118.59 \pm 0.94
10	4.682 g	3.5 g	3.5 g	190.78 \pm 0.66
11	3 g	0.977 g	3.5 g	126.54 \pm 1.02
12	3 g	6.023 g	3.5 g	189.55 \pm 1.45
13	3 g	3.5 g	0.977 g	106.82 \pm 1.76
14	3 g	3.5 g	6.023 g	233.70 \pm 1.73
15	3 g	3.5 g	3.5 g	137.11 \pm 1.42
16	3 g	3.5 g	3.5 g	138.34 \pm 0.72
17	3 g	3.5 g	3.5 g	135.19 \pm 0.70
18	3 g	3.5 g	3.5 g	138.47 \pm 2.15

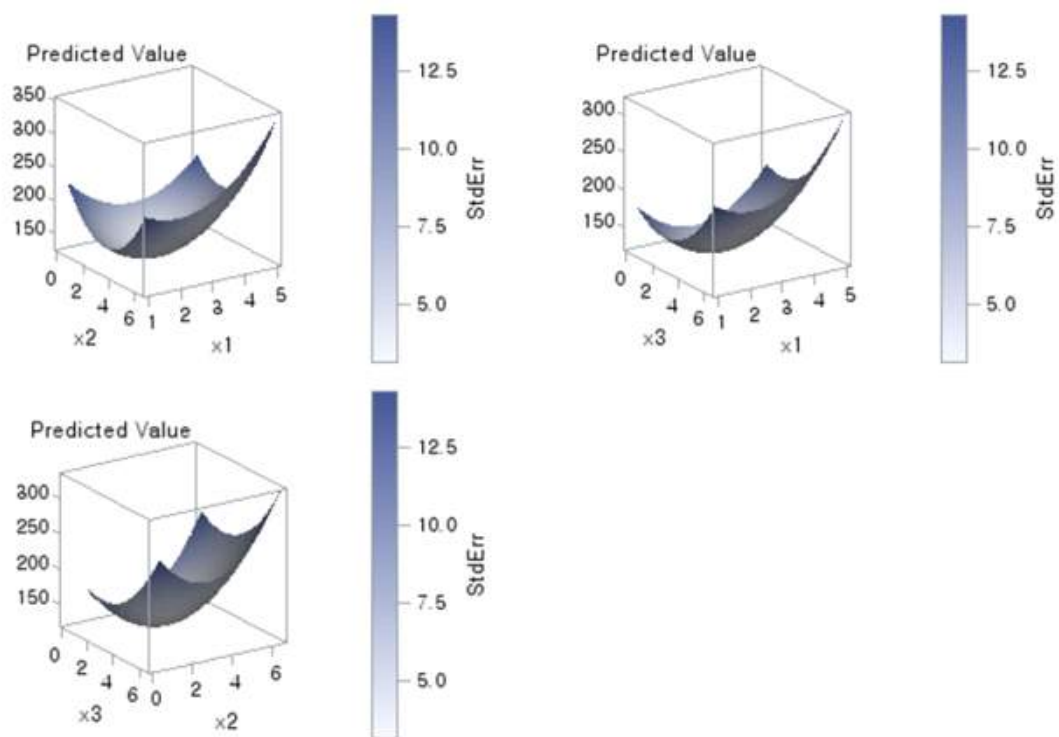


그림 71. Xylose, soytone 및 beef extract를 이용한 EGCG 생산 모델의 최적화

- 표 53 및 그림 71을 고려하였을 때, xylose 2%, soytone 2.5% 및 beef extract 2.5%씩 첨가하여 발효를 진행하는 것이 경제성 및 EGCG 생산성에 좋을 것으

로 예상된다.

나. 소독제의 항산화능 및 항균효과 검증

(1) 소독제의 개발

✓ 시제품 제조

- 약용식물 발효물 및 γ -PGA 발효물을 기반으로 한 소독제를 제조하였음. 사용된 발효물로는 항바이러스 소재인 EGCG가 포함된 선복화 발효물과 γ -PGA 발효 균주를 사용한 개자 발효물 및 유산균을 활용한 선복화 발효물을 사용하였음. 완성된 소독제의 조성은 표 55와 같으며, 완성된 소독제는 그림 72와 같음.

표 55. 약용식물 및 γ -PGA 발효물을 이용한 소독제의 조성

성분	함량 (발효물 1 L 기준)
Benzalkonium chloride	200 g/L
Citric acid	100 g/L
Phosphoric acid	60 g/L

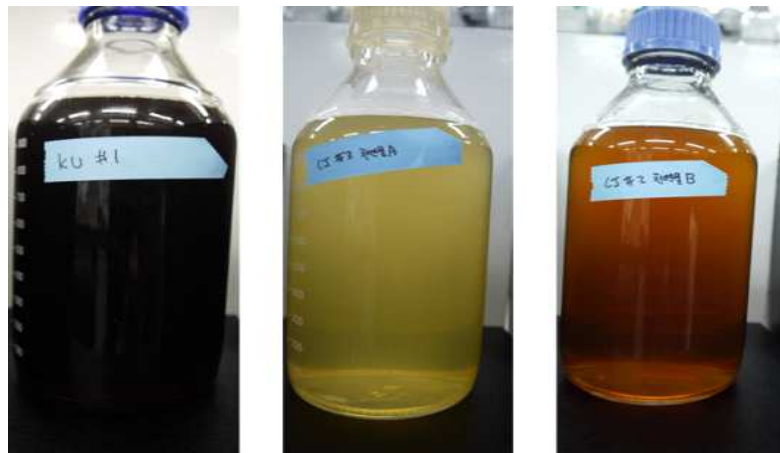


그림 72. EGCG가 포함된 선복화 발효물, γ -PGA 생산균주에 의한 개자 발효물 및 유산균을 이용한 선복화 발효물을 기반으로 한 소독제

(2) 소독제의 항산화능 평가

✓ DPPH 라디칼 소거능

- 각 소독제를 일정 농도로 희석하여 DPPH 라디칼 소거능을 확인하였음(Hwang et al., 2017). 각 소독제 희석액 100 μ L를 0.1 mM DPPH 용액 1 mL와 혼합하여 암실에서 15분 간 반응함. 이 후, 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 각 소독제의 DPPH 라디칼 소거능은 표 56과 같음.

✓ ABTS 라디칼 소거능

- 각 소독제를 일정 농도로 희석하여 ABTS 라디칼 소거능을 확인하였음(Bursal and Gulcin, 2011). 미리 준비한 2.45 mM potassium persulfate가 함유된 7 mM ABTS 용액 1 mL와 각 소독제 희석액 50 μ L를 혼합하여 암실에서 30분 간 반응함. 이 후, 735 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과는 표 56과 같음.

표 56. 약용식물 및 γ -PGA 발효물을 이용한 소독제의 조성

소독액	희석배수	DPPH 라디칼 소거능 (%)	ABTS 라디칼 소거능 (%)
EGCG가 포함된 선복화 발효물	100	23.27 \pm 6.95	88.19 \pm 1.63
	10	84.66 \pm 0.20	96.24 \pm 0.04
	원액	86.14 \pm 2.11	99.42 \pm 0.12
γ -PGA가 포함된 개자 발효물	100	3.84 \pm 2.54	9.99 \pm 0.61
	10	11.45 \pm 3.02	17.35 \pm 0.61
	원액	60.49 \pm 0.69	46.22 \pm 0.56
유산균을 이용한 선복화 발효물	100	7.57 \pm 2.01	45.19 \pm 0.96
	10	28.27 \pm 4.52	95.55 \pm 0.07
	원액	72.65 \pm 1.91	94.58 \pm 0.04

- 각 소독제는 ABTS 라디칼 소거능에서 좋은 효능을 보였으며, DPPH 라디칼 소거능 또한 50% 이상의 소거능을 보임. 그러나 100배 이상의 희석을 사용 시, 그 효과가 급격히 감소함을 확인함.

(2) 소독제의 항균능력 평가

✓ Disc diffusion assay

- 각 소독제의 조류 병원성 미생물의 증식 억제를 확인하였음. Mueller Hinton Broth(MHB)에서 24시간 배양한 조류 병원성 미생물을 약 10^6 CFU/mL으로 조절하여 멸균된 cotton swap을 이용하여 Mueller Hinton Agar(MHA)에 도말함. 15분 후 도말이 끝난 MHA에 멸균한 8 mm 크기의 paper disc에 발효물을 50 μ L씩 분주한 뒤 24시간 배양하여 생성된 inhibition zone의 크기를 측정하여 항균 능력을 측정함. 시험에 사용된 미생물은 Avian pathogenic *Escherichia coli* (B/06/31), Avian pathogenic *Escherichia coli* (B/06/63), Avian pathogenic *Escherichia coli* (B/06/80), *Staphylococcus aureus* SE (A/C/E), T-C, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Salmonella* Gallinarum ATCC 9184의 조류 병원성 미생물 7종을 사용함. Disc diffusion assay를 통한 각 소독제의 항균력은 표 57과 같음.

표 57. 각 소독제의 조류 병원성 미생물 성장 억제 효과

조류 병원성 미생물	소독제		
	EGCG가 포함된 선복화 발효물	γ -PGA가 포함된 개자 발효물	유산균을 이용한 선복화 발효물
<i>E. coli</i> (B/06/31)	33.75±0.75	30.75±0.75	30.00±1.00
<i>E. coli</i> (B/06/63)	31.50±0.50	30.25±0.25	32.25±0.25
<i>E. coli</i> (B/06/80)	32.50±1.00	32.38±0.13	33.00±1.00
<i>S. aureus</i> SE (A/C/E), T-C	45.50±1.50	44.50±0.50	41.00±2.00
<i>S. Gallinarum</i> ATCC 9184	28.50±0.50	29.50±0.50	30.50±0.50
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	24.50±0.50	27.50±0.50	29.50±0.50

- 각 소독제는 조류 병원성 미생물에 대하여 높은 증식 억제능을 보였으며, 양계장 내 건조한 환경 시 닭의 감염되기 쉬운 황색 포도상구균 억제에 뛰어난 효능을 나타냄.

2. 약용식물 및 바실러스 균주를 이용한 항바이러스 예방용 사료첨가제 및 방제용 소독제 개발(씨제이제일제당(주))

가. 최적 배양 조건 연구

(1) 약용식물 추출물의 제조

✓ 발효물의 제작

- 선복화, 개자의 페놀화합물 및 유용 성분 추출을 위한 에탄올 추출물을 제조하였으며, 액상 배양을 위한 기본배지(glucose 1%, yeast extract 0.8%, soy peptone 0.2%)에 각 추출물을 1~5% 첨가하여 5 L jar fermenter(CNS, Korea)에서 약용식물 발효물을 제조하였음. 약용식물 추출물을 포함하는 *B. amyloliquefaciens* CJBA1의 액상 배양 조건은 37°C, 1 vvm, 초기 pH는 6.5~6.8로 8시간까지 배양하여 시간별 균수를 측정하였으며, 그 결과는 표 58 및 그림 73과 같음.

표 58. 선복화, 개자 에탄올 추출물 함량별 *B. amyloliquefaciens* CJBA1 배양 결과

구분	발효시간(h)	에탄올 추출물 함량별 생균수(CFU/mL)			
		0.5%	1.0%	3.0%	5.0%
선복화	0	5.0×10^5	5.0×10^5	5.2×10^5	4.8×10^5
	2	5.4×10^5	5.4×10^5	5.5×10^5	4.9×10^5
	4	5.4×10^5	6.5×10^5	8.0×10^5	4.9×10^5

	6	2.0×10^7	5.0×10^7	1.8×10^6	7.8×10^6
	8	5.4×10^7	6.2×10^7	6.5×10^7	6.8×10^6
	0	4.8×10^5	4.9×10^5	4.7×10^5	5.1×10^5
	2	4.7×10^5	4.8×10^5	4.9×10^5	3.0×10^5
	4	7.3×10^6	6.5×10^6	2.5×10^6	7.4×10^5
	6	5.0×10^7	2.4×10^7	1.8×10^7	9.0×10^5
	8	1.3×10^8	8.0×10^7	6.2×10^7	1.3×10^6

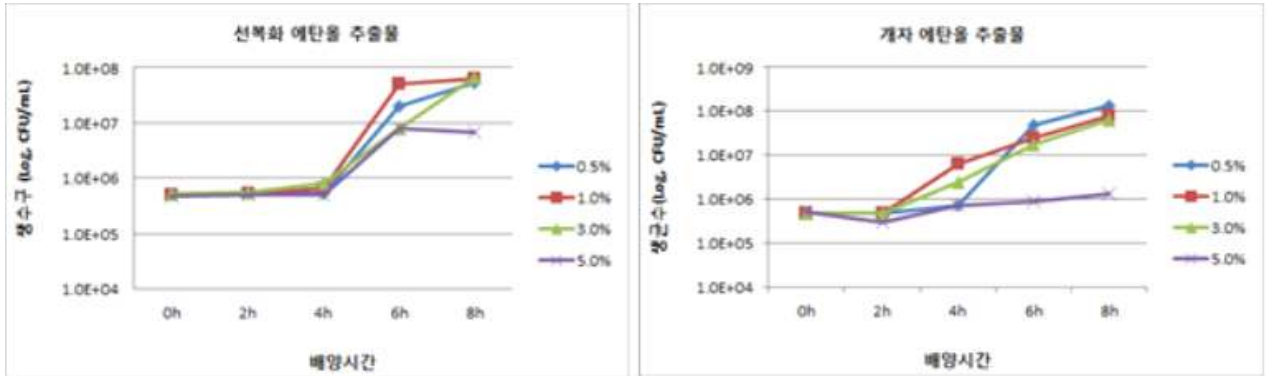


그림 73. 선복화, 개자 에탄올 추출물 함량별 *B. amyloliquefaciens* CJBA1의 성장 곡선

- 선복화, 개자 에탄올 추출물의 함유량 별 γ -PGA 생산균주인 *B. amyloliquefaciens* CJBA1의 5 L jar fermenter 배양결과, 3%까지는 균 성장에 영향을 미치지 않았으나 5%이상에서는 성장이 지연되는 결과를 나타내었음. 선복화, 개자가 함유하고 있는 polyphenol, 사포닌 등 항균성 phytochemical의 에탄올 추출과정에서 농축되어 배지 내 일정 수준 이상 함량 시 균 성장저해 요인으로 분석됨.

✓ 개자 원료의 발효 적합성 평가

- 선복화, 개자의 영양성분, 고체 발효성을 평가한 2차년도 결과 및 각 약용식물 에탄올 추출물을 첨가한 액상 배양 결과를 종합적으로 검토하여 향후, 조류 인플루엔자 저감소재로서 개자의 활용성이 우수할 것으로 판단되어 개자 원물을 이용한 추가 액상 배양 테스트를 진행하였음. 개자의 myrosinase 활성이 열처리 과정에서 증가하는 점을 참고하여 개자 원료를 싸이클론밀로 분쇄 후, 동일 성분의 액상배지에 3%, 5% 첨가하여 생균수를 분석하였으며, 그 결과는 그림 74와 같음.

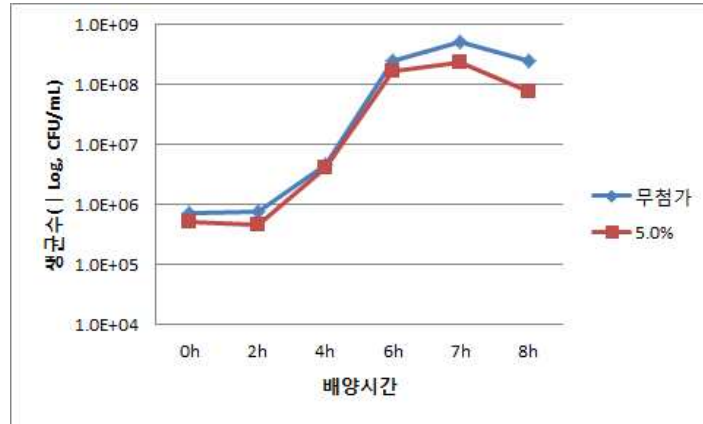


그림 74. GYP 및 개자 분말 첨가배지의 *B. amyloliquefaciens* CJBA1 성장 곡선

- *B. amyloliquefaciens* 전배양액 1%를 개자 분말 5%를 포함한 GYP배지에 접종하여 배양시간 별 생균수를 측정된 결과, 초기 5.0×10^5 생균수가 배양 7시간 후 2×10^8 CFU/mL까지 상승하여 개자 분말 무첨가구와 유의적 차이가 없음을 확인하였음.

나. 인플루엔자 방어 효능 평가

(1) 종란 내 인플루엔자 증식 억제를 통한 인플루엔자 방어 효능 평가

✓ Endpoint dilution assay

- 천연물 유래 항바이러스 후보물질 희석액과 저병원성 인플루엔자 바이러스를 1:1동량으로 혼합처리한 후, 혼합액을 4°C에서 30분 간 반응을 시키며 도중에 10분마다 혼합하였음. 반응 후 항생제를(1%)첨가한 멸균 PBS를 이용하여 1/10부터 9/10까지 희석하고 희석 배수당 5개의 11일란 발육란에 희석액을 각각 0.2 mL씩 접종하여 37°C에서 3~4일동안 배양하며 매일 검란을 실시함. 접종 24시간 이내에 죽은 발육란은 사고사로 간주하고 시험성적에서 제외하였음. 접종 24시간 후부터 4일 이내에 죽은 접종란은 모두 4°C에 보관하고 접종 4일 후까지 살아남은 모든 발육란과 4°C에 보관된 죽은 접종란으로부터 요막강액을 각각 채취하고 1% 닭적혈구를 사용한 혈구응집반응을 실시하여 바이러스의 존재 유무 및 바이러스 역가를 최종 판정하였으며, 그 결과는 표 59와 같음.

표 59. 선복화, 개자 에탄올 추출물 함량별 *B. amyloliquefaciens* CJBA1 배양 결과

물질명	바이러스 역가(EID ₅₀ /mL)
<i>B. amyloliquefaciens</i> 24-34 배양액	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 24-34 발효물(개자 추출물 1% 첨가)	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 24-34 발효물(개자 추출물 5% 첨가)	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 24-34 발효물(개자 추출물 10% 첨가)	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 24-34 발효물(선복화 추출물 1% 첨가)	0

<i>B. amyloliquefaciens</i> 24-34 발효물(선복화 추출물 5% 첨가)	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 24-34 발효물(선복화 추출물 10% 첨가)	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 854 배양액	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 854 발효물(개자 추출물 1% 첨가)	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 854 발효물(개자 추출물 5% 첨가)	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 854 발효물(개자 추출물 10% 첨가)	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 854 발효물(선복화 추출물 1% 첨가)	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 854 발효물(선복화 추출물 5% 첨가)	0
<i>B. amyloliquefaciens</i> 854 발효물(선복화 추출물 10% 첨가)	0
대조군	10 ⁶

- SPF발육란 내 저병원성 인플루엔자 바이러스 증식이 억제되었음을 확인하였으며, 2종의 발효 균주 및 발효물의 항바이러스 소재로의 가능성을 확인하였음.

다. 소독제의 제조 및 효능 시험

(1) 소독제 제조

- ✓ 발효물을 함유한 소독제의 제조

- 그림 75와 같이 생산한 발효물을 기반으로 한 소독제를 제조하였음. 완성된 소독제의 조성은 표 55와 같으며, 완성된 소독제는 그림 72와 같음.



그림 75. 소독제 제조를 위한 선복화 및 개자 발효물

(1) 소독제의 효력시험

- ✓ 바이러스 및 세균의 소독제 효력 시험

- 소독제 효력 시험은 농림축산검역본부 소독제 효력시험 지침(고시번호 제 2018-16호)에 의거하여 진행하였음.
- 바이러스는 (주)바이오엔텍에서 2002년 분리한 저병원성 가금 인플루엔자 바이러스(등록번호 33, 자체 관리 번호 02-8, 균독주명 K228(H9N2))를 사용하였으며, 공시동물로는 SPF 발육난을 사용하였음.
- 세균은 일반세균의 대표 균주로 *Salmonella* Typhimurium, 아포세균의 대표 균주로 *Clostridium perfringens* 및 항산성세균의 대표 균주로 *Mycobacterium fortuitum*을 사용하였음. 일반세균의 배지로는 고압 멸균된 영양배지(nutrient broth)를 사용하며 아포세균배지는 thioglycollate broth를 사용하여 완전 혐기 조건을 유지하며 배양하였음. 항산성세균은 항산성배지인 middlebrook 7H9 broth를 사용하여 0.05% Tween 80을 첨가하여 사용하였음.
- 각 소독제의 효력시험 결과는 표 60~65와 같음.

표 60. 바이러스 소독제 시험 결과(EGCG가 함유된 선복화 발효물 기반 소독제)

처리구	경수	유기물	소독제	비고	조사 항목	1 차 시험	2 차 시험	3 차 시험	중위수
유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	500	500	500	500
유기물 (고)	+	+	+	유기물/경수 조건	배수	150	150	150	150
병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조					

표 61. 바이러스 소독제 시험 결과(γ -PGA 생산 균주를 이용한 개자 발효물)

처리구	경수	유기물	소독제	비고	조사 항목	1 차 시험	2 차 시험	3 차 시험	중위수
유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	500	500	500	500
유기물 (고)	+	+	+	유기물/경수 조건	배수	150	150	150	150
병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조					

표 62. 바이러스 소독제 시험 결과(유산균을 이용한 선복화 발효물)

처리구	경수	유기물	소독제	비고	조사	1 차	2 차	3 차	중위수
-----	----	-----	-----	----	----	-----	-----	-----	-----

					항목	시험	시험	시험	
유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	500	500	500	500
유기물 (고)	+	+	+	유기물/ 경수 조건	배수	150	150	150	150
병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조					

표 63. 세균 소독제 시험 결과(EGCG가 함유된 선복화 발효물 기반 소독제)

처리구		경수	유기물	소독제	비고	조사 항목	1 차 시험	2 차 시험	3 차 시험
일반 세균	유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	240	240	240
	유기물 (저)	+	+	+	유기물/ 경수 조건	배수	200	200	200
	병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조				
아포 세균	유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	240	240	240
	유기물 (저)	+	+	+	유기물/ 경수 조건	배수	200	200	200
	병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조				
항산성 세균	유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	180	180	180
	유기물 (저)	+	+	+	유기물/ 경수 조건	배수	160	160	160
	병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조				

표 64. 세균 소독제 시험 결과(γ -PGA 생산 균주를 이용한 개자 발효물)

처리구		경수	유기물	소독제	비고	조사 항목	1 차 시험	2 차 시험	3 차 시험
일반 세균	유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	200	200	200
	유기물	+	+	+	유기물/	배수	160	160	160

	(저)				경수 조건				
	병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조				
아포 세균	유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	200	200	200
	유기물 (저)	+	+	+	유기물/ 경수 조건	배수	160	160	160
	병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조				
항산성 세균	유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	240	240	240
	유기물 (저)	+	+	+	유기물/ 경수 조건	배수	160	160	160
	병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조				

표 65. 세균 소독제 시험 결과과(유산균을 이용한 선복화 발효물)

처리구		경수	유기물	소독제	비고	조사 항목	1 차 시험	2 차 시험	3 차 시험
일반 세균	유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	180	180	180
	유기물 (저)	+	+	+	유기물/ 경수 조건	배수	160	160	160
	병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조				
아포 세균	유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	200	200	200
	유기물 (저)	+	+	+	유기물/ 경수 조건	배수	160	160	160
	병원체 대조	+	-	-	처리구 1,2 의 대조				
항산성 세균	유기물 (저)	+	-	+	경수 조건	배수	180	180	180
	유기물 (저)	+	+	+	유기물/ 경수 조건	배수	160	160	160
	병원체	+	-	-	처리구				

	대조				1,2의 대조				
--	----	--	--	--	---------	--	--	--	--

3. 마우스 및 닭 생체 내 항바이러스 물질의 인플루엔자 방어 효능 평가(주식회사 카브)

가. 마우스 모델을 이용한 발효물의 인플루엔자 바이러스에 대한 방어효능 평가

(1) 발효물 급여에 따른 바이러스 예방 효과

✓ 발효물 급여에 따른 임상 증상 및 폐사율의 변화

- BALB/c 마우스 6주령을 이용하여 발효물 9종을 공격접종 전 비강투여를 실시한 후, 인플루엔자 바이러스를 공격접종하여 임상 증상 및 생존율을 관찰함. 6주령의 SPF BALB/c 마우스 110수를 그룹당 10수씩 총 11개의 그룹(발효물 비강투여 시험군 9개, 공격접종 양성대조군 1개, 공격접종 음성대조군 1개)으로 나누고 마우스 전수에 대한 체중을 측정함. 발효물 비강투여 그룹(90 µL/마리/일)은 인플루엔자 바이러스($10^{4.5}$ /90 µL/dose) 공격접종 전 3주 동안 6회 비강투여를 통하여 예방함. 공격접종 양성대조군은 PBS를 시험군과 동일한 방법으로 투여하였음. 그룹별 시험물질 투여 전 및 인플루엔자 바이러스 공격접종 전 각각 체중을 측정한 뒤, 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 3주간 임상 증상 및 폐사율 감소 효과를 관찰하고 생존한 개체에 대한 체중을 측정하여 인플루엔자 바이러스 방어효능 평가를 측정함. 각 실험군의 투여그룹 설정은 표 66 및 67과 같으며, 인플루엔자 바이러스 방어 효능에 따른 임상 증상, 폐사율 및 체중 변화는 표 68 및 69과 같음.

표 66. 실험군 설정 및 투여그룹 설정(1)

Sample	후보물질	투여농도
Sample 1	32677-850-62	8 Log CFU/mL(100 g/L)
Sample 2	97948-885-32	8 Log CFU/mL(100 g/L)
Sample 3	14587-552-96	9 Log CFU/mL(100 g/L)
Sample 4	63589-417-87	8 Log CFU/mL(100 g/L)
Sample 5	61178-411-72	9 Log CFU/mL(100 g/L)
Sample 6	22369-710-96	8 Log CFU/mL(100 g/L)
Sample 7	11457-553-87	9 Log CFU/mL(100 g/L)
Sample 8	44861-667-13	8 Log CFU/mL(100 g/L)
Sample 9	15587-669-88	8 Log CFU/mL(100 g/L)

표 67. 실험군 설정 및 투여그룹 설정(2)

시험군	공시수수	그룹	투여물질
Group 1	10	비강투여군	32677-850-62

Group 2	10	비강투여군	97948-885-32
Group 3	10	비강투여군	14587-552-96
Group 4	10	비강투여군	63589-417-87
Group 5	10	비강투여군	61178-411-72
Group 6	10	비강투여군	22369-710-96
Group 7	10	비강투여군	11457-553-87
Group 8	10	비강투여군	44861-667-13
Group 9	10	비강투여군	15587-669-88
Group 10	10	공격접종 양성대조군	PBS
Group 11	10	공격접종 음성대조군	PBS

표 68. 인플루엔자 바이러스에 대한 생존율 시험결과

그룹 ^A		접종 수수	공격접종 결과				PI ₂₁ ^F
			임상 증상		폐사		
			Sick ^B	MTO (day) ^C	Dead ^D	MDT (day) ^E	
G1	32677-850-62	9	9/9	3	9/9	7.0	2.0
G2	97948-885-32	7	7/7	3	2/7	8.0	1.3
G3	14587-552-96	10	10/10	3	8/10	7.9	1.8
G4	63589-417-87	9	9/9	3	8/9	8.0	1.9
G5	61178-411-72	9	9/9	3	4/9	7.0	1.4
G6	22369-710-96	10	10/10	3	3/10	7.3	1.3
G7	11457-553-87	9	9/9	3	3/9	7.0	1.2
G8	44861-667-13	10	10/10	3	5/10	7.4	1.5
G9	15587-669-88	9	9/9	3	5/9	7.2	1.6
G10	공격접종 양성대조군	10	10/10	3	10/10	7.9	2.0
G11	공격접종 음성대조군	10	0/10	-	0/10	-	-

^A농도: 씨제이제일제당 주식회사에서 제조한 농도 원액 비강투여(90 uL/day)

투여기간: 공격접종 전 6회 예방

^B임상 증상발현수수/접종수수

^CMean time of onset of clinical signs

^D폐사수/접종수

^EMean death time

^F Pathogenicity index: the mean score per mouse per observation over a 21 day period when each day, mouse are scored 0 if normal, 1 if sick (열, 눈꺼풀, 털 이상), 2 if dead.

- SPF BALB/c 마우스를 이용한 생체 내 인플루엔자 바이러스 A/NWS/33 (H1N1) 공격접종 후 임상 증상 발현 억제효과를 시험한 결과, 바이러스 공격접종 후 양성 대조군의 경우 공격접종 후 7.9일 만에 100% 폐사하였음. 발효물의 급여 시, 그룹 1 32677-850-62 발효물, 그룹 3 14587-552-96 발효물, 그룹 4 63589-417-87 발효물을 공격접종 전 6회 비강 투여한 처리군은 예방을 실시하지 않은 양성대조군에 비하여 각각 80~100% 폐사율을 보이며, 그룹 5 61178-411-72 발효물, 그룹 8 44861-667-13 발효물, 그룹 9 15587-669-88 발효물을 공격접종 전 6회 비강 투여한 처리군은 예방을 실시하지 않은 양성대조군에 비하여 각각 45~55% 폐사율을 기록함. 가장 낮은 폐사율을 보인 발효물은 총 3종으로 그룹 2 97948-885-32 발효물, 그룹 6 22369-710-96 발효물, 그룹 7 11457-553-87 발효물로, 공격접종 전 6회 비강 투여한 처리군은 예방을 실시하지 않은 양성대조군에 비하여 각각 30~35% 폐사율을 확인할 수 있었음.

표 69. 인플루엔자 바이러스 감염후 생존개체에 대한 체중 측정 결과

그룹	마우스 체중(g) (Mean±SD)		
	시험물질 투여 전 ^A	공격접종 전 ^B	공격접종 3주후 ^C
Group 1	18.3±0.6	18.1±0.6	0.0±0.0
Group 2	18.9±1.3	18.8±1.3	19.6±0.9
Group 3	18.7±0.8	19.2±0.9	18.1±1.4
Group 4	18.2±0.9	18.7±0.8	19.8±0.0
Group 5	18.9±0.8	19.3±1.1	20.1±0.6
Group 6	18.6±1.0	19.1±1.0	18.6±0.8
Group 7	19.0±1.1	19.3±1.0	19.3±1.5
Group 8	18.3±0.8	18.9±1.0	17.8±1.3
Group 9	19.2±0.9	19.9±0.6	19.2±1.7
Group 10	18.5±0.9	19.2±0.7	0.0 0.0
Group 11	18.4±0.9	18.8±0.4	20.5±0.7

^A 시험물질 투여 전 체중 및 표준편차

^B 공격접종 전 체중 및 표준편차

^C 공격접종 3주후 생존 개체에 대한 체중 및 표준편차

- 시험물질 투여 전 및 공격접종 전 마우스 체중측정결과 PBS를 비강투여한 대조군에 비하여 9종의 발효물을 비강투여한 그룹에서 체중이 감소하거나 증가하지 않았음을 확인할수 있었음. 인플루엔자 바이러스 공격접종 3주 후 생존 개체에 대한 체중 측정 결과, 전수 폐사한 그룹 1 32677-850-62 발효물, 그룹 3 14587-552-96 발효물, 그룹 4 63589-417-87 발효물을 제외한 그룹에서 공격접종을 하지않은 음성대조군과 비슷한 체중으로 회복되었음을 확인할 수 있었음.

✓ 발효물 급여에 따른 폐 내 바이러스 역가 확인

- 6주령의 SPF BALB/c 마우스 56수를 시험물질 비강투여 시험군, 공격접종 양성대조군 및 공격접종 음성대조군으로 나누고 마우스 전수에 대한 체중을 측정함. 시험물질 비강투여 그룹(90ul/마리/day)은 인플루엔자 바이러스($10^{4.5}/90 \mu\text{L}/\text{dose}$) 공격접종 전 3주 동안 6회 비강투여 하여 예방함. 공격접종 양성대조군은 PBS를 시험군과 동일한 방법으로 투여하며, 그룹별 시험물질 투여 전 및 인플루엔자 바이러스 공격접종 전 각각 체중을 측정하였음. 인플루엔자 바이러스 공격접종 3일, 6일 후 시험군 및 대조군 각 7수씩 체중측정 후 안락사 하여 폐를 채취한 뒤 무게를 측정하고 멸균 PBS를 이용하여 유제(폐 무게의 10% 유제액)하고 역가검정을 실시함. 역가검정은 유제액을 antibiotic-antimycotic($1\times$) 첨가한 MEM배지를 사용하여 폐 유제액을 원액, 10^{-1} , 10^{-2} , $10^{-3}\sim 10^{-9}$ 로 희석하고 MDCK(Mardin-Darby canine kidney)가 monolayer된 96well culture plate에 희석배수 당 8 well에 well당 희석액 25 μL 을 접종함. 세포 접종 후 37°C 5% CO_2 배양기에서 40분 반응시킨 후, plate를 꺼내서 well당 175 μL 씩 유지배지(MEM trypsin $1\times$)를 분주한 뒤 37°C 5% CO_2 배양기에서 배양한다. 배양기에서 4~5일 동안 배양하며 매일 현미경으로 Cytopathic effect (CPE) 형성 유무를 확인한 뒤, tissue culture infective dose₅₀ (TCID₅₀)/ml로 나타냄. 마우스는 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 6일간 임상증상을 관찰하였으며, 그 결과는 표 70~73 및 그림 76과 같음.

표 70. 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 임상증상 시험결과

그룹	농도 ^A	접종 수수	공격접종 결과	
			임상증상	
			Sick ^B	
G1	11457-553-87	100mg/mL	14	14/14
G2	22369-710-96	100mg/mL	14	14/14
G3	공격접종 양성대조군	PBS	14	14/14
G4	공격접종 음성대조군	PBS	14	0/14

^A투여량: 비강투여(90ul/day)/투여기간: 공격접종 전 6회 예방

^B임상증상발현수수/접종수수

표 71. 마우스 체중측정 결과

그룹	체중(g) (Mean±SD)			
	시험물질 투여 전 ^A	공격접종 전 ^B	3 dpc ^C	6 dpc ^D
Group 1	19.0±0.3	18.3±0.3	16.0±0.6	13.6±0.8
Group 2	19.0±0.2	18.2±0.8	15.9±0.5	13.2±0.8
Group 3	19.1±0.2	19.6±0.8	15.6±0.4	14.4±0.4
Group 4	17.4±0.5	18.7±0.3	18.9±0.2	19.0±0.2

^A 시험물질 투여 전 체중 및 표준편차

^B 공격접종 전 체중 및 표준편차

^C 공격접종 3일 후 부검개체 체중 및 표준편차

^D 공격접종 6일 후 부검개체 체중 및 표준편차

표 72. 공격접종 3일 후 폐의 무게 측정 및 인플루엔자 바이러스 함량시험 결과

그룹		3 dpc		
		폐 무게 (Mean ± SD) ^A	Virus shedding log ₁₀ titer (Mean± SD) ^B	양성률 ^C
G1	11457-553-87	0.28±0.03	3.9±0.2	7/7
G2	22369-710-96	0.25±0.04	3.9±0.2	7/7
G3	공격접종 양성대조군	0.20±0.02	5.8±0.2	7/7
G4	공격접종 음성대조군	0.17±0.01	0.0±0.0	0/7

^A 공격접종 3일 후 채취한 폐 무게 평균 및 표준편차

^B 공격접종 3일 후 채취한 폐 유제액의 MDCK를 이용한 인플루엔자 바이러스 함량시험의 평균 및 표준편차 (log₁₀값)

^C 공격접종 3일 후 채취한 폐 유제액의 MDCK를 이용한 인플루엔자 바이러스 함량시험의 양성수수/접종수수

표 73. 공격접종 6일 후 폐의 무게 측정 및 인플루엔자 바이러스 함량시험 결과

그룹		3 dpc		
		폐 무게 (Mean ± SD) ^A	Virus shedding log ₁₀ titer (Mean± SD) ^B	양성률 ^C
G1	11457-553-87	0.41±0.04	4.8±0.2	7/7
G2	22369-710-96	0.38±0.05	4.9±0.3	7/7
G3	공격접종 양성대조군	0.38±0.02	5.8±0.1	7/7
G4	공격접종 음성대조군	0.17±0.01	0.0±0.0	0/7

^A 공격접종 6일 후 채취한 폐 무게 평균 및 표준편차

^B 공격접종 6일 후 채취한 폐 유제액의 MDCK를 이용한 인플루엔자 바이러스 함량시험의 평균 및 표준편차 (log₁₀값)

^C 공격접종 6일 후 채취한 폐 유제액의 MDCK를 이용한 인플루엔자 바이러스 함량시험의 양성수수/접종수수

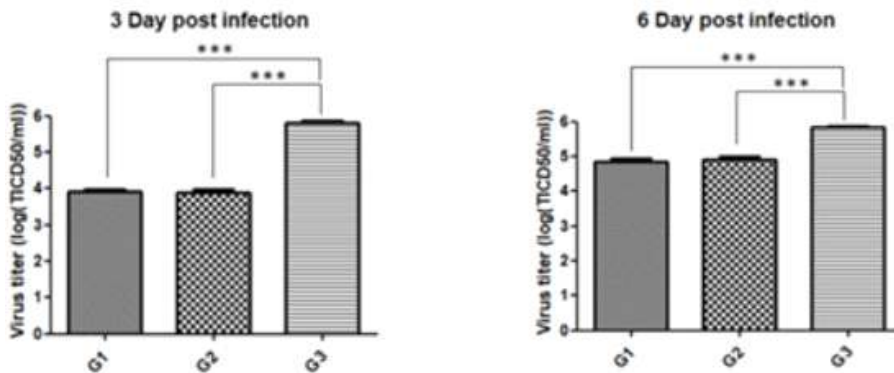


그림 76. 소공격접종 3일 및 6일 후 폐 내 바이러스 함량 측정 결과

- 11457-553-87(발효물)과 22369-710-96(발효배양액)을 6회 예방투여한 뒤 공격접종 3일 후 부검 하여 폐 내 바이러스 함량시험을 진행한 결과, 비강투여 그룹이 공격접종 양성대조군에 비하여 폐 내 바이러스 역가가 유의적으로 감소한 것으로 확인되었다.

나. 닭 모델을 이용한 발효물의 인플루엔자 바이러스에 대한 방어효능 평가

(1) 발효물 급여에 따른 바이러스 예방 효과

✓ 발효물 급여에 따른 바이러스 배출량 확인

- 4주령 SPF 닭 60수를 공격접종군과 접촉감염군을 동거 사육하였음. 4주령의 SPF 닭에 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 공격접종 2주 전부터 공격접종 후 14일간 시험물질은 하루 1회 0.5ml씩 비강투여 하였음. 시험그룹에서 시험물질 투여 14일 후 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 $10^{6.0}$ EID₅₀/100 μ L를 비강으로 공격접종 후, 1, 3, 5, 7, 9, 11 dpc 그룹별 구강 및 총 배설장에서 배출된 바이러스를 면봉으로 채취 한 후 real-time RT-PCR을 이용하여 바이러스 배출량을 측정함. 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 공격접종 후 14일 동안 임상 증상 발현 및 폐사율을 관찰하여 시험물질에 의한 저병원성 조류인플루엔자 바이러스 방어효능을 평가하였음.
- ‘접촉감염군의’ 경우 SPF닭에 저병원성 조류인플루엔자를 직접적으로 공격접종 하지 않고 시험물질만을 강제 투여한 뒤 ‘공격접종군’과 같은 공간에서 사육시킨 실험군을 총칭함. 조류인플루엔자가 구강과 총배설장에서 지속적으로 배출되며, 이를 통한 접촉감염군의 감염이 일어남.

표 74. 공격접종 후 14일간 구강에서의 real-time RT-PCR 결과

그룹	Virus replication					
	1 dpc	3 dpc	5 dpc	7 dpc	9 dpc	11 dpc
G1	4/4 ^A (27.60±2.80)	4/4 (25.55±0.82)	4/4 (25.03±6.26)	4/4 (27.60±5.07)	4/4 (31.13±1.50)	4/4 (29.83±1.39)
G2	4/6 ^C (31.99±2.09)	4/6 (30.77±0.67)	5/6 (30.49±5.37)	6/6 (30.30±0.79)	6/6 (23.76±1.33)	6/6 (27.07±2.51)
G3	4/4 (23.44±2.77)	4/4 (21.89±0.82)	4/4 (24.38±2.90)	4/4 (24.38±5.07)	4/4 (31.87±1.57)	3/4 (31.92±1.47)
G4	4/6 (33.43±0.42)	6/6 (26.54±4.33)	6/6 (23.00±0.91)	6/6 (22.40±4.79)	6/6 (28.40±2.94)	5/6 (32.48±0.83)
G5	4/4 (21.76±2.65)	4/4 (20.81±1.30)	4/4 (22.15±1.88)	4/4 (28.34±2.03)	3/4 (32.80±0.98)	3/4 (33.06±1.00)
G6	6/6 (33.18±1.32)	6/6 (22.89±6.00)	6/6 (22.54±2.33)	6/6 (21.19±5.46)	6/6 (31.79±3.02)	5/6 (33.82±0.71)
G7	4/4 (25.50±1.71)	4/4 (24.69±2.51)	4/4 (23.38±1.47)	4/4 (29.35±1.63)	4/4 (31.84±1.46)	4/4 (33.39±1.24)
G8	4/6 (34.04±0.65)	4/6 (28.48±4.63)	6/6 (24.77±5.24)	6/6 (29.10±2.75)	6/6 (27.20±1.91)	5/6 (28.81±4.81)
G9	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

	(25.74±5.92)	(21.43±3.15)	(21.72±2.09)	(22.96±4.78)	(30.85±1.18)	(28.81±2.86)
G10	4/6 (24.23±3.94)	5/6 (21.27±4.97)	6/6 (25.72±0.84)	6/6 (26.39±5.21)	6/6 (28.81±2.24)	6/6 (31.38±1.16)
G11	0/10 (0.00±0.00)	0/10 (0.00±0.00)	0/10 (0.00±0.00)	0/10 (0.00±0.00)	0/10 (0.00±0.00)	0/10 (0.00±0.00)

^A 감염수수/공격접종수수

^B 구강에서의 real-time RT-PCR(rRT-PCR)을 이용하여 cycle threshold (Ct) value 평균 ± 표준편차
 rRT-PCR eference: Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A
 Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes: Spackman E, 2002.
 ct value 35이상의 값은 위양성으로 판단하여 평균 값에서 제외

^C 감염수수/접촉전파수수

표 75. 공격접종 후 14일간 총 배설강에서의 real-time RT-PCR 결과

그룹	Virus replication					
	1dpc	3dpc	5dpc	7dpc	9dpc	11dpc
G1	3/4 ^A (33.61±1.13)	3/4 (31.50±0.54)	4/4 (28.78±5.58)	4/4 (28.68±1.19)	4/4 (29.81±5.76)	4/4 (32.26±0.95)
G2	4/6 ^C (25.86±2.76)	4/6 (25.25±1.17)	4/6 (26.14±0.69)	6/6 (26.53±2.81)	6/6 (26.45±6.47)	6/6 (24.75±4.20)
G3	2/4 (34.38±0.66)	3/4 (28.62±4.57)	4/4 (20.28±4.05)	4/4 (29.07±1.21)	4/4 (30.70±4.25)	4/4 (34.53±0.48)
G4	2/6 (34.21±0.98)	3/6 (28.34±8.81)	6/6 (23.38±7.06)	6/6 (25.38±2.92)	6/6 (24.68±4.06)	5/6 (31.70±1.61)
G5	1/4 (32.89±0.00)	4/4 (26.55±7.10)	4/4 (18.97±6.53)	4/4 (29.65±1.03)	3/4 (33.51±1.09)	3/4 (34.27±0.62)
G6	5/6 (32.48±2.32)	6/6 (31.10±3.95)	6/6 (22.05±7.35)	6/6 (27.94±2.98)	6/6 (27.49±5.29)	6/6 (32.09±2.50)
G7	2/4 (34.30±0.72)	2/4 (34.48±0.71)	3/4 (28.15±8.18)	6/6 (27.94±2.98)	3/4 (31.72±1.06)	3/4 (32.86±0.86)
G8	1/6 (34.08±0.00)	2/6 (33.45±0.68)	5/6 (31.99±3.43)	6/6 (26.66±2.96)	5/6 (28.12±0.39)	5/6 (29.87±2.40)
G9	2/4 (24.31±14.40)	3/4 (23.31±9.92)	4/4 (17.52±4.08)	6/6 (26.66±2.96)	4/4 (28.36±1.09)	4/4 (29.56±2.88)
G10	3/6 (20.76±0.21)	5/6 (33.85±0.95)	6/6 (28.13±3.92)	6/6 (24.77±1.27)	6/6 (27.92±1.22)	6/6 (31.43±0.68)
G11	0/10 (0.00±0.00)	0/10 (0.00±0.00)	0/10 (0.00±0.00)	0/10 (0.00±0.00)	0/10 (0.00±0.00)	0/10 (0.00±0.00)

^A 감염수수/공격접종수수

^B 구강에서의 real-time RT-PCR(rRT-PCR)을 이용하여 cycle threshold (Ct) value 평균 ± 표준편차
 rRT-PCR eference: Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A
 Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes: Spackman E, 2002.
 ct value 35이상의 값은 위양성으로 판단하여 평균 값에서 제외

^C 감염수수/접촉전파수수

표 76. 공격접종 후 14일간 임상증상 및 폐사율 결과(1 dpc~7 dpc)

그룹		저병원성조류인플루엔자바이러스 공격접종 후 일자별 임상증상						
		1dpc	2dpc	3dpc	4dpc	5dpc	6dpc	7dpc
G1	임상증상	0/4 ^A	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/4
	폐사율	0/4 ^B	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

G2	임상증상 폐사율	0/6 ^C 0/6 ^D	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6
G3	임상증상 폐사율	0/4 0/4	1/4 0/4	1/4 0/4	2/4 0/4	3/4 0/4	2/4 0/4	0/4 0/4
G4	임상증상 폐사율	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	2/6 0/6	3/6 0/6	4/6 0/6	3/6 0/6
G5	임상증상 폐사율	0/4 0/4	2/4 0/4	3/4 0/4	1/4 0/4	1/4 0/4	1/4 0/4	1/4 0/4
G6	임상증상 폐사율	0/6 0/6	2/6 0/6	3/6 0/6	4/6 0/6	3/6 0/6	2/6 0/6	2/6 0/6
G7	임상증상 폐사율	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	1/4 0/4	1/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4
G8	임상증상 폐사율	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	1/6 0/6
G9	임상증상 폐사율	0/4 0/4	1/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4
G10	임상증상 폐사율	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	1/6 0/6	0/6 0/6	2/6 0/6
G11	임상증상 폐사율	0/10 0/10	0/10 0/10	0/10 0/10	0/10 0/10	0/10 0/10	0/10 0/10	0/10 0/10

표 77. 공격접종 후 14일간 임상증상 및 폐사율 결과(8 dpc~14 dpc)

그룹		저병원성조류인플루엔자바이러스 공격접종 후 일자별 임상증상							
		8dpc	9dpc	10dpc	11dpc	12dpc	13dpc	14dpc	
G1	임상증상 폐사율	0/4 ^A 0/4 ^B	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	1/4 0/4	0/4 0/4
G2	임상증상 폐사율	1/6 ^C 0/6 ^D	1/6 0/6	1/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6
G3	임상증상 폐사율	0/4 0/4	1/4 0/4	1/4 0/4	2/4 0/4	3/4 0/4	2/4 0/4	0/4 0/4	
G4	임상증상 폐사율	4/6 0/6	3/6 0/6	3/6 0/6	2/6 0/6	3/6 0/6	4/6 0/6	3/6 0/6	
G5	임상증상 폐사율	0/4 0/4	2/4 0/4	3/4 0/4	1/4 0/4	1/4 0/4	1/4 0/4	1/4 0/4	
G6	임상증상 폐사율	0/6 0/6	2/6 0/6	3/6 0/6	4/6 0/6	3/6 0/6	2/6 0/6	2/6 0/6	
G7	임상증상 폐사율	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	1/4 0/4	1/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	
G8	임상증상 폐사율	1/6 0/6	1/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	1/6 0/6	
G9	임상증상 폐사율	0/4 0/4	1/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	0/4 0/4	
G10	임상증상 폐사율	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	0/6 0/6	1/6 0/6	0/6 0/6	2/6 0/6	
G11	임상증상 폐사율	0/10 0/10	0/10 0/10	0/10 0/10	0/10 0/10	0/10 0/10	0/10 0/10	0/10 0/10	

^A 감염수수/공격접종수수

^B 구강에서의 real-time RT-PCR(rRT-PCR)을 이용하여 cycle threshold (Ct) value 평균 ± 표준편차
 rRT-PCR eference: Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A
 Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes: Spackman E, 2002.
 ct value 35이상의 값은 위양성으로 판단하여 평균 값에서 제외

제 4절 대표 연구 개발 성과

1. 국내외 논문 게재 현황(5건)

논문명	학술지명	주저자명	호	게재일	SCI여부
Evaluation of probiotic <i>Bacillus subtilis</i> P229 isolated from cheonggukjang and its application in soybean fermentation	LWT-Food Science and Technology	Hye-Lin Jeon	97	2018. 11.	SCI
Inhibitory effects of <i>Inula britannica</i> extract fermented by <i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM 11613P on coagulase activity and growth <i>Staphylococcus aureus</i> including methicillin-resistant strains	Journal of Food Biochemistry	Won-Young Bae	43	2019. 4.	SCI
Improved <i>in vitro</i> antioxidant properties and hepatoprotective effects of a fermented <i>Inula britannica</i> extract on ethanol-damaged HepG2 cells	Molecular Biology Reports	Won-Young Bae	46	2019. 12.	SCI
Investigation of <i>Brassica juncea</i> , <i>Forsythia suspensa</i> , and <i>Inula britannica</i> : phytochemical properties, antiviral effects, and safety	BMC Complementary and Alternative Medicine	Won-Young Bae	19	2019. 12.	SCI
<i>Inula britannica</i> fermented with probiotic <i>Weissella cibaria</i> D30 exhibited anti-inflammatory effect and increased viability in RAW 264.7 cells	Food Science and Biotechnology	Hyeong-Yeop Kim	https://doi.org/10.1007/s10068-019-00690-w		

2. 국내 및 국제학술회의 발표(5건)

회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
7차 유럽미생물학회(FEMS) (Improved radical-scavenging, metal ion-reducing, and <i>ex vivo</i> antioxidant activity of water extract of <i>Inula britannica</i> fermented by <i>Lactobacillus plantarum</i> in HepG2 cells)	배원영	2017. 7. 10.	Valencia	Spain
7차 유럽미생물학회(FEMS) (Antimicrobial activity of <i>Inula britannica</i> extract fermented by <i>Lactobacillus plantarum</i>)	배원영	2017. 7. 10.	Valencia	Spain
2018년 한국미생물·생명공학회 (Phytochemical properties and antiviral activity of three Korean traditional medicinal herbs)	배원영	2018. 6. 28.	여수	대한민국
미국식품과학회(IFT) (<i>Inula britannica</i> fermented with probiotic <i>Weissella cibaria</i> D30 exhibited anti-inflammatory effect and increased viability in RAW 264.7 cells)	김형엽	2019. 6. 4.	New Orleans	USA
미국미생물학회(ASM) (Synergy effect of three medicinal herbs against avian pathogenic <i>Salmonella</i> induced by cellular damage and membrane permeability)	천민정	2019. 7. 21.	San francisco	USA

3. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품종, 프로그램)(5건)

지식재산권 명칭	국명	출원	
		출원일	출원번호
신규 바실러스 서브틸리스 균주 및 이를 포함하는 식중독 원인균 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	2017. 9. 13.	10-2017-0117039호
연교 추출물을 포함하는 병원성 미생물에 대한 항균용 조성물	대한민국	2017. 9. 25.	10-2017-0123259호
바실러스 아밀로리퀘페시엔스 CJABA1 및 그를 이용한 감마-폴리글루탐산을 생산하는 방법	대한민국	2018. 8. 13.	10-2018-0094629호
발효된 선복화 추출물을 포함하는	대한민국	2018. 1. 8.	10-2020-0002405호

항인플루엔자 바이러스용 조성물			
약용식물 추출물의 혼합물을 포함하는 살모넬라 엔테리티디스에 대한 항균용 조성물	대한민국	2018. 1. 8.	10-2020-0002406호

제 3장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

제 1절 목표

1. 조류 인플루엔자에 효능이 검증된 개자, 선복화, 연교를 이용한 항바이러스 효과를 검증
2. 개자, 선복화, 연교를 내 유효물질을 규명
3. 프로바이오틱 균주를 활용한 약용식물의 생물전환을 통한 효능의 극대화
4. 약용식물 발효물을 적용한 시제품의 생산 및 효능 검증
5. 조류 인플루엔자를 예방용 사료첨가제 및 방제용 소독제를 개발

제 2절 목표 달성 여부

목표	달성여부
조류 인플루엔자에 효능이 검증된 개자, 선복화, 연교를 이용한 항바이러스 효과를 검증	100%
개자, 선복화, 연교를 내 유효물질을 규명	100%
프로바이오틱 균주를 활용한 약용식물의 생물전환을 통한 효능의 극대화	100%
약용식물 발효물을 적용한 시제품의 생산 및 효능 검증	100%
조류 인플루엔자를 예방용 사료첨가제 및 방제용 소독제를 개발	100%

제 3절 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 해당 연구 기간 동안 항바이러스능을 지닌 사료 첨가제 및 방제용 소독제를 개발하고자 한 목표를 달성하였음. 각 발효물을 활용한 소독제는 바이러스 소독제의 경우 유기물 함유 조건에서 150배 희석농도까지 효능을 확인하였으며, 세균 소독제의 경우 최대 240배까지 희석하여 사용 가능성이 확인되었음. 효능이 검증된 소독제의 경우 시제품 출시의 필요성이 요구되며 종료 1차년도 이후부터 사업화를 진행할 예정임.

제 4절 경쟁력 확보를 위한 차별화 방안

1. 조류 인플루엔자 예방소재 개발 현황
 - 2017년 국립축산과학원 모든 종류의 핵산을 분해할 수 있는 미니항체 단백질(3D8 scFV)이 항바이러스 소재 물질의 기능을 밝힘. 미니항체가 발현된 닭의 구강과 항문에서 분비되는 바이러스 배출량이 대조군 닭보다 평균 30%이상 줄어들어 조류인플루엔자 바이러스에 대해 항바이러스 기능이 있음을 확인.
 - 산업용 조류인플루엔자 예방용 사료첨가제 및 소독제는 바이러스가 강산성(pH 4)의 조건

에서 활성이 떨어지는 특성에 착안하여 주로 유기산 또는 유산균 발효물, 혼합제 형태의 제품이 대부분임. 하지만 유산균의 경우 열에 약한 단점이 있고, 생균수 확보를 위한 고농도 배양, 동결건조 등의 공정으로 생산비용의 상승으로 인한 양계사료 적용의 한계가 있음.

2. 경제형 발효공법 및 소재 확보

- 고체발효는 기질의 탄소, 질소원 등을 이용하여 발효하는 공법으로 발효 후, 별도의 분리공정이 없으며, 폐수 발생이 없어 액상발효와 비교하여 경제성있는 가공비 산출이 가능한 장점이 있음. 생리 기능성 물질인 γ -PGA를 생산하는 바실러스 균주와 기능성 폴리페놀을 함유하고 있는 약용식물의 고체발효를 통한 사료첨가제는 경제성을 중요시하는 양계 사료 시장에 진입 가능 예상

제 4장 연구결과의 활용 계획 등

제 1절 예상되는 연구 성과의 활용분야 및 활용방안

1. 조류 인플루엔자 예방 사료 첨가 소재로 활용이 가능함.
2. 면역 증강 효능 등이 기대되는 성장촉진용 항생제 대체 소재 활용이 가능
3. 조류 인플루엔자 대응 방제용 소독제의 활용

제 2절 추가 연구의 필요성

1. 바이러스의 성장 억제는 확인하였으나, 돌연변이를 통한 새로운 종의 바이러스의 출현 시 대응 가능 여부에 관한 연구가 필요함.
2. 현재 시판중인 타미플루에 비하여 상대적인 독성이 낮음이 확인되었으나, 효능은 타미플루에 비하여 다소 약한편인점을 고려하여 계속되는 균주 개량 및 발효 조건 수정 등을 통하여 개선된 항바이러스능을 지닌 소재 연구가 요구됨.
3. 조류 외에 양돈, 양어의 바이러스성 질병에 대한 예방 효과를 추가 검증하여 포트폴리오 확장 가능성 검토

제 3절 기술이전

1. 종료 1차년도 상반기 내 항바이러스 효과 균주 및 물질 제조방법에 대한 기술이전 완료 및 하반기에 각각 1,000만원에 해당하는 기술이전을 실시할 예정임.

세부내용	20년 1월	20년 2월	20년 3월	20년 4월	비고
연구결과에 따른 내부 기술이전계획 수립					
기술이전 계약서 작성 및 법무팀 검토					
주관기관 계약서 검토					
기술이전 협약 및 전문기관 발송					
2차 기술이전 사항 검토					20년 하반기 2차기술이전 협약예정

붙임. 참고문헌

1. Lee NK, Lee JH, Lim SM, Lee KA, Kim YB, Chang PS, Paik HD. Antiviral activity of subcritical water extract of *Brassica juncea* against influenza virus A/H1N1 in non

- fat milk. *J. Dairy Sci.* 97: 5383–5386 (2014)
2. Park EH, Bae WY, Kim JY, Kim KT, Paik HD. Antimelanogenic effects of *Inula britannica* flower petal extract fermented by *Lactobacillus plantarum* KCCM 11613P. *J. Zhejiang Univ.-Sci. B.* 8: 816–824 (2017)
 3. Friedman M, Kozukue N, Kim HJ, Choi SH, Mizuno M. Glycoalkaloid, phenolic, and flavonoid content and antioxidative activities of conventional nonorganic and organic potato peel powders from commercial gold, red, and Russet potatoes. *J. Food Compos. Anal.* 62: 69–75 (2017)
 4. Chan KW, Iqbal S, Khong NMH, Ooi DJ, Ismail M. Antioxidant activity of phenolics - saponins rich fraction prepared from defatted kenaf seed meal. *LWT-Food Sci. Technol.* 56: 181–186 (2014)
 5. Ballesteros LF, Teixeira JA, Mussatto SI. Extraction of polysaccharides by autohydrolysis of spent coffee grounds and evaluation of their antioxidant activity. *Carbohydr. Polym.* 157: 258–266 (2017)
 6. Ren T, Dormitorio TV, Qiao M, Huang TS, Weese J. N-halamine incorporated antimicrobial nonwoven fabrics for use against avian influenza virus. *Vet. Microbiol.* 218: 78–83 (2018)
 7. Law AHY, Yang CLH, Lau ASY, Chan GCF. Antiviral effect of forsythoside A from *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl fruit against influenza A virus through reduction of viral M1 protein. *J. Ethnopharmacol.* 209: 236–247 (2017)
 8. Ha SY, Youn H, Song CS, Kang SC, Bae JJ, Kim HT, Lee KM, Eom TH, Kim IS, Kwak, HH. Antiviral effect of flavonol glycosides isolated from the leaf of *Zanthoxylum piperitum* on influenza virus. *J. Microbiol.* 52: 340–344 (2014)
 9. Yu HS, Lee NK, Choi AJ, Choe JS, Bae CH, Paik HD. Anti-inflammatory potential of probiotic strain *Weissella cibaria* JW15 isolated from *kimchi* through regulation of NF- κ B and MAPKs pathways in LPS-induced RAW 264.7 cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 1022–1032 (2019)
 10. Handa CL, Couto UR, Vicensoti AH, Georgetti SR, Ida EI. Optimisation of soy flour fermentation parameters to produce β -glucosidase for bioconversion into aglycones. *Food Chem.* 152: 56–65 (2014)
 11. Lee NK, Kim SY, Chang HI, Park E, Paik HD. Immunomodulatory and antigenotoxic properties of *Bacillus amyloliquefaciens* KU801. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 41: 249–252 (2013)
 12. Kim SY, Lee NK, Han EJ, Paik HD. Characterization of subtilin KU43 produced by *Bacillus subtilis* KU43 isolated from traditional Korean fermented foods. *Food Sci. Biotechnol.* 21: 1433–1438 (2012)
 13. Lee NK, Kim SY, Choi SY, Paik HD. Probiotic *Bacillus subtilis* KU201 having antifungal and antimicrobial properties isolated from kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* 22: 1–5 (2013)
 14. Lee NK, Son SH, Jeon EB, Jung GH, Lee JY, Paik HD. The prophylactic effect of probiotic *Bacillus polyfermenticus* KU3 against cancer cells. *J. Funct. Food.* 14: 513–518 (2015)

15. Lee NK, Kim HW, Chang HI, Yun CW, Kim SW, Kang CW, Paik HD. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* NK181 isolated from Jeotgal, a Korean fermented Food. Food Sci. Biotechnol. 15: 227–231 (2006)
16. Lee NK, Lee EK, Paik HD. Potential probiotic properties of phytase-producing *Lactobacillus salivarius* FC113. Ann. Microbiol. 63: 555–560 (2013)
17. Spacova I, Petrova MI, Fremau A, Pollaris L, Vanoirbeek J, Ceuppens JL, Seys S, Lebeer S. Intranasal administration of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents birch pollen induced allergic asthma in a murine model. Allergy 74: 100–110 (2019)
18. Kwak SH, Cho YM, Noh GM, Om AS. Cancer preventive potential of Kimchi lactic acid bacteria (*Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum*). J. Cancer Prev. 19: 253–258 (2014)
19. Rai AK, Sanjukta S, Chourasia R, Bhat I, Bhardwaj PK, Sahoo D. Production of bioactive hydrolysate using protease, β -glucosidase and α -amylase of *Bacillus* spp. isolated from kinema. Bioresource Technol. 235: 358–365 (2017)
20. Okunade OA, Ghawi SK, Methven L, Niranjana K. Thermal and pressure stability of myrosinase enzymes from black mustard (*Brassica nigra* L. W.D.J. Koch. var. *nigra*), brown mustard (*Brassica juncea* L. Czern. var. *juncea*) and yellow mustard (*Sinapsis alba* L. subsp. *maire*) seeds. Food Chem. 187: 480–490 (2015)
21. Hur SJ, Lee SY, Kim YC, Choi I, Kim GB. Effect of fermentation on the antioxidant activity in plant-based foods. Food Chem. 160: 346–356 (2014)
22. Hussain A, Bose S, Wang JH, Yadav MK, Mahajan GB, Kim H. Fermentation, a feasible strategy for enhancing bioactivity of herbal medicines. Food Res. Int. 81: 1–16 (2016)
23. Othman NB, Roblain D, Chammen N, Thonart P, Hamdi M. Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of Chétoui olives. Food Chem. 116: 662–669 (2009)
24. Reddy BS, Reddy RKK, Reddy BP, Ramakrishna S, Diwan PV. Potential *in vitro* antioxidant and protective effects of *Soymida febrifuga* on ethanol induced oxidative damage in HepG2 cells. Food Chem. Toxicol. 46: 3429–3442 (2008)
25. Khan AL, Hussain J, Hamayun M, Gilani SA, Ahmad S, Rehman G, Kim YH, Kang SM, Lee IJ. Secondary metabolites from *Inula britannica* L. and their biological activities. Molecules 15: 1562–1577 (2013)
26. Song QH, Kobayashi T, Hong T, Cyong JC. Effects of *Inula britannica* on the production of antibodies and cytokines and on T cells differentiation in C57BL/6 mice immunized by ovalbumin. Am. J. Chinese Med. 30: 297–305 (2002)
27. Kim MJ, Kim KBWR, Jeong DH, Ahn DH. Anti-inflammatory activity of ethanolic extract of *Sargassum sagamianum* in RAW 264.7 cells. Food Sci. Biotechnol. 22: 1113–1120 (2013)
28. Glushkova OV, Parfenyuk SB, Khrenov MO, Novoselova TV, Lunin SM, Fesenko E, Novoselova EG. Inhibitors of TLR-4, NF- κ B, and SAPK/JNK signaling reduce the toxic effect of lipopolysaccharide on RAW 264.7 cells. J. Immunol. 10: 133–140 (2013)
29. Abdollahzadeh E, Rezaei M, Hosseini H. Antibacterial activity of plant essential oils

- and extracts: The role of thyme essential oil, nisin and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35: 177–183 (2014)
30. Lee NK, Kim SY, Han KJ, Eom SJ, Paik HD. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. *LWT-Food Sci. Technol.* 58: 130–134 (2014)
 31. Randazzo W, Falcó I, Aznar R, Sánchez G. Effect of green tea extract on enteric viruses and its application as natural sanitizer. *Food Microbiol.* 66: 150–156 (2017)
 32. Brinques G, do Carmo Peralba M, Ayub MAZ. Optimization of probiotic and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* in submerged bioreactor systems. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 205–212 (2010)
 33. Khan A, Vu KD, Riedl B, Lacroix M. Optimization of the antimicrobial activity of nisin, Na-EDTA and pH against gram-negative and gram-positive bacteria. *LWT-Food Sci. Technol.* 61: 124–129 (2015)
 34. Hetzner H, Schmid C, Tremmel S, Durst K, Wartzack S. Empirical-statistical study on the relationship between deposition parameters, process variables, deposition rate and mechanical properties of a-C:H:W coatings. *Coatings.* 4: 772–795 (2014)
 35. Hwang JS, Cho CH, Baik MY, Park SK, Heo HJ, Cho YS, Kim DO. Effects of freeze-drying on antioxidant and anticholinesterase activities in various cultivars of kiwifruit (*Actinidia* spp.). *Food Sci. Biotechnol.* 26: 221–228 (2017)
 36. Bursal E, Gülçin İ. Polyphenol contents and *in vitro* antioxidant activities of lyophilized aqueous extract of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Food Res. Int.* 44: 1482–1489 (2011)

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 개자, 선복화, 연교의 발효물을 이용한 사료 첨가제 및 방제용 소독제의 개발				
	(영문) Development of feed additives and disinfectant using fermented <i>Brassica juncea</i> , <i>Inula britannica</i> , and <i>Forsythia suspensa</i> extract				
주관연구기관	건국대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 건국대학교 산학협력단	
참 여 기 업	씨제이제일제당(주)			(성명) 백 현 동	
총연구개발비 (1,500,000천원)	계	1,500,000	총 연 구 기 간	2016. 11.~2019. 11. (3년)	
	정부출연 연구개발비	750,000	총 연 구 원 수	총 인 원	32
	기업부담금	750,000		내부인원	32
	연구기관부담금	-		외부인원	0
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 조류 인플루엔자에 효능이 검증된 개자, 선복화, 연교를 이용하여 항바이러스 효과를 검증하고, 이를 분리·정제하여 유효물질을 규명하고자 함. 프로바이오틱 균주를 활용하여 약용식물을 생물전환시켜 효능을 증대시키고자 함. 또한, 이를 적용하여 시제품을 생산하고 효능을 검증함으로써, 조류 인플루엔자를 예방하는 사료 첨가제 및 방제용 소독제를 개발하고자 함. - 항바이러스 소재의 유효물질 규명, 생물전환을 통한 생체이용률 증대시키는 발효 기술 및 이를 적용한 사료첨가제 및 소독제 등에 대한 특허를 출원/등록함으로써 산업재산권을 확보함. 또한 SCI급 저널 논문게재 및 학술발표 등의 우수한 연구 성과를 기대할 수 있으며, 관련 시제품 제조 및 관련기술 분야의 전문성을 가진 연구 인력 양성을 달성하고자 함. <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 항바이러스능을 지닌 소재인 개자, 선복화 및 연교에서 chlorogenic acid 및 kaempferol 등과 같은 항바이러스 관련 유효 성분을 정성 및 정량 검출함. 또한 면역 증강능 및 항바이러스능이 기대되는 프로바이오틱스와 γ-PGA 생산 균주를 활용하여 약용 식물 발효물을 제조하고 이의 항바이러스능 및 면역 증강능 소재의 가능성을 확인하였음. 최종적으로 상기 발효물을 활용한 소독제 제조 및 이의 효능을 실험하여 항바이러스 소재의 제품화를 위한 기반을 마련함. <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p>					

- 현재 조류 인플루엔자 바이러스는 확산 이후 살처분을 통한 확산 방지법 이외의 치료법은 전무함. 본 연구에서 개발한 소독제 및 소독제의 기반이 되는 발효물은 바이러스의 증식 억제만이 아닌 면역 반응 활성을 유도하는 소재로의 활용이 가능한 점을 이용하여 사료 첨가제 등의 활용을 통하여 조류 인플루엔자 예방제로의 활용이 가능할 것으로 보임. 또한 소독제 효능 실험을 통하여 120배 가량의 희석 후 축사에 사용 가능한 방제용 소독제로의 활용도 가능성에 따라 시제품 제조 및 관련 성과를 달성하고자 함.

[별첨 2]

자체평가의견서

1.

		과제번호	116136-3		
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	농림식품 융복합/농생명 신소재·시스템/기능성소재		과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	개자, 선복화, 연교의 발효물을 이용한 사료 첨가제 및 방제용 소독제의 개발		과제유형	개발	
연구기관	건국대학교 산학협력단		연구책임자	백현동	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.11.~2017.11.	250,000	250,000	500,000
	2차연도	2017.11.~2018.9.	200,000	200,000	400,000
	3차연도	2018.9.~2019.11.	300,000	300,000	600,000
	계	2016.11.~2019.11.	750,000	750,000	1,500,000
참여기업	씨제이제일제당(주)				
상대국	해당 사항 없음	상대국연구기관	해당 사항 없음		

2. 평가일 : 2020. 1. 10.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
건국대학교 산학협력단	교수	백현동

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	
-----	--

1. 연구개발실적

다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (우수)

본 연구는 프로바이오틱스 및 생리 활성 물질인 γ -PGA 생산 균주를 활용하여 항바이러스 소재로 기대되는 전통 약용 식물의 발효물을 제작, 이를 활용한 조류 인플루엔자 소독제 및 사료 첨가제의 활용성을 확인함. 각 균주를 활용한 발효물은 조류 인플루엔자 바이러스의 증식 억제 및 관련 성분의 증가를 유도하였으며, 기존의 약용식물이 지닌 우수한 기능성은 증가시키면서 약용식물이 지닌 독성 감소 등을 통한 안전성을 확보하는 등 기존의 약용식물을 활용한 기능성 소재 개발과는 차별화된 연구 결과를 달성하였다고 고려됨.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (우수)

현재 미국, 유럽 및 국내에서는 안전 축산물 생산을 위하여 성장촉진용 항생제의 사용을 전면 금지하였음. 금지된 항생제를 대체하기 위하여 생균제 및 효소제 등을 사용하고 있으나, 생균제의 경우 정상적인 사양 환경에서는 유해 미생물의 억제를 기대하기 어려우며, 효소제의 경우 영양인자에 따라 성장 지연, 가스 발생량 증가 및 설사 등의 동물에게 부정적인 영향을 미칠 수 있음이 보고되었음. 본 연구에서는 유용 프로바이오틱스를 이용한 약용식물의 발효물을 이용하여 항바이러스 소재 연구를 진행하였음. 약용식물은 페놀산 및 플라보노이드 등의 기능성 페놀화합물뿐만 아니라 약용식물이 지니고 있는 당류 등으로 프리바이오틱스 소재로도 활용이 가능함. 따라서 프로바이오틱스를 활용한 발효물은 프로바이오틱스 및 프리바이오틱스 혼합 소재로의 활용을 통하여 기존의 생균제제가 지닌 단점을 보완하고 우수한 사료 첨가제 및 방제용 소독제제로 기대됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (우수)

조류 인플루엔자는 매년 겨울부터 봄 사이 창궐하였으며, 바이러스의 특성 상 돌연변이 출현 빈도가 높아 이를 예방하는 것에 어려운 점이 많음. 또한 사료 유통 등의 경로로 잠복기의 인플루엔자 바이러스가 전국으로 확산되는 점이 많아 인플루엔자 유행 시 치료가 어려움. 본 연구에서는 프로바이오틱스 및 γ -PGA 생산균주를 이용한 발효물을 개발하였으며, 이는 면역증강 활성 등을 통하여 조류 인플루엔자 예방 소재로 가능성이 높음. 또한 국내 양계 산업 특성상 밀집된 공간에서 사육하는 경우가 많아 유해 미생물 및 전염병의 감염시 빠르게 확산되는 경우가 많은 점을 고려하였을 시, 면역력 증강 소재로서 약용식물의 발효물은 높은 활용가치를 지니고 있음이 예상됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (우수)

본 연구를 진행하는 동안 우수한 균주를 확보하기 위하여 돌연변이 균주의 개발을 지속적으로 진행하였음. 또한 발효 배지의 개발을 위하여 다양한 조건에서 약용식물의 추출 및 유효성분의 평가를 진행하였으며, 사업화를 위한 최적의 조건을 확인하였음. 연구기간 동안 5건의 국제 학술 논문을 게재하였으며, 4건의 국제 학술 대회 발표와 1건의 국내 학술 대회 발표 및 5건의 특허 출원을 진행하는 등 당초 목표 이상의 정량적 목표 달성을 위하여 3년 동안 과제 수행에 성실하게 임하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (우수)

본 연구를 진행하는 동안 LWT-Food Science and Technology를 포함한 5건의 국제 SCI 학술 논문을 게재하였으며, 유럽미생물학회(FEMS), 미국식품과학회(IFT) 및 미국미생물학회(ASM)의 국제 학술 대회에서 4건의 학술 발표를 하였음. 또한 연구 개발 기간 동안 진행한 균주 개량 및 발효물 등의 내용을 포함한 5건의 특허 출원을 진행하였으며, 발효물을 이용한 소독제를 시제품화 하는 과정에 있음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
조류 인플루엔자에 효능이 검증된 개자, 선복화, 연교를 이용한 항바이러스 효과를 검증	20	100	각 추출 용매별 항바이러스능 검증 및 발효 소재로의 가능성 확인
개자, 선복화, 연교를 내 유효물질을 규명	20	100	각 약용식물의 항바이러스 관련 성분 규명 및 함량을 분석함
프로바이오틱 균주를 활용한 약용식물의 생물전환을 통한 효능의 극대화	20	100	프로바이오틱스를 이용한 약용식물 발효를 통하여 항바이러스 소재 EGCG의 함량 증가 및 안정성 확보
약용식물 발효물을 적용한 시제품의 생산 및 효능 검증	20	100	약용식물 발효물의 바이러스 및 소독제 효력 시험 실시를 통하여 사용가능한 희석배수 확보
조류 인플루엔자를 예방용 사료첨가제 및 방제용 소독제를 개발	20	100	약용식물 발효물을 기반으로한 소독제 개발 및 사료첨가제로 활용 가능성을 확인하였음.
합계	100점	100	연구기간 동안 발효물을 이용한 항바이러스 소재 개발을 달성함.

III. 종합의견

1. 대한 종합의견

개자, 선복화 및 연교의 약용식물의 유효성분 규명 및 항바이러스능을 확인하였으며, 프로바이오틱스 및 γ -PGA 생산 균주를 이용하여 항바이러스 소재 개발을 수행함. 또한 이를 기반으로 한 소독제를 개발하였으며, 유효 효능범위를 확인하는 등 성실히 과제를 수행하였음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

연구기간동안 5건의 저명한 국제학술지를 게재하였으며, 4건의 국제 학술 대회 발표 및 5건의 특허 출원을 달성하였음. 또한 바이러스 및 세균 소독제를 개발하여 이의 효능을 확인하였으며 제품화를 위한 기반을 마련함.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

약용식물 발효물이 포함된 소독제의 시제품 개발이 종료 제 1차년도 및 제 4차년도에 진행될 예정임. 또한 후속연구를 통한 국제 저명 SCI 학술지 논문 게재가 예정되어 있음.

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농림식품 융복합/농생명 신소재·시스템/기능성소재	
연구과제명	개자, 선복화, 연교의 발효물을 이용한 사료 첨가제 및 방제용 소독제의 개발			
주관연구기관	건국대학교 산학협력단	주관연구책임자	백현동	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	750,000 천원	750,000 천원	-	1,500,000 천원
연구개발기간	2016. 11. 29 - 2019. 11. 28. (36 개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
조류 인플루엔자에 효능이 검증된 개자, 선복화, 연교를 이용한 항바이러스 효과를 검증	각 추출 용매별 항바이러스능 검증 및 발효 소재로의 가능성 확인
개자, 선복화, 연교를 내 유효물질을 규명	각 약용식물의 항바이러스 관련 성분 규명 및 함량을 분석함
프로바이오틱 균주를 활용한 약용식물의 생물전환을 통한 효능의 극대화	프로바이오틱스를 이용한 약용식물 발효를 통하여 항바이러스 소재 EGCG의 함량 증가 및 안정성 확보
약용식물 발효물을 적용한 시제품의 생산 및 효능 검증	약용식물 발효물의 바이러스 및 소독제 효력 시험 실시를 통하여 사용가능한 희석배수 확보
조류 인플루엔자를 예방용 사료첨가제 및 방제용 소독제를 개발	약용식물 발효물을 기반으로한 소독제 개발 및 사료첨가제로 활용 가능성을 확인하였음.

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표				연구기반지표				
	지식 재산권	기술 실시	사업화	기 술	학술성과	교 육	인 력	정책 활용-홍보	기 타

	(이전)										인 증	논문			지 도	양 성	정 책 활 용	홍 보 전 시	(타 연구 활용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		SC I	비 SC I	논 문 평 균 IF						학 술 발 표
단 위	건	건	건	건	만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가 중 치																				
최 종 목 표	4			2	10						3			3	3					
연 구 기 간 내 달 성 실 적	5										5			5	3					
달 성 율 (%)	125										166			166	100					

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
1	발효를 통한 녹차카테킨 성분 증가
2	발효를 통한 약용식물의 독성 감소

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소 화·흡 수	외국기술 개 선·개 량	특 허 출 원	산업체이전 (상품화)	현 장애로 해 결	정 책 자 료	기 타
발효를 통한 녹차카테킨 성분 증가	v					v	v			
발효를 통한 약용식물의 독성 감소						v	v			

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
발효를 통한 녹차카테킨 성분 증가	발효를 통하여 녹차카테킨 중 가장 기능성이 뛰어난 EGCG를 생산가능하며, 약산성 조건을 통하여 안정성이 확보됨.
발효를 통한 약용식물의 독성 감소	선복화는 유용한 기능성이 많은 반면 강한 독성으로 사용에 어려운 점이 많음. 따라서 발효를 통한 독성감소는 선복화 다양한 기능성을 제품화하고 기능성 소재로 활용하는 것에 용이해질 것으로 예상됨.

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문 SC I	비 SC I	논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용	
단위	건	건	건	건	만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표	1	3		2	20	2	68,600	34,300	10			2					1	5	
연구기간내 달성실적																			
연구종료후 성과창출 계획	1	3		2	20	2	68,600	34,300	10			2					1	5	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	발효를 통한 선복화 내 EGCG 생산 및 독성 감소		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	1,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1개월	실용화예상시기 ³⁾	2020년
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			

1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성

2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권

리

통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리

3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등

4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.