

118027-2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

농생명기술개발사업 단기소액과제 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003

152-01

육종에
의한
헴철
포함
비GMO
균체
사료
개발

최
종
보
고
서

2019

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

육종에 의한 헴철포함 비GMO 균체사료개발

최종보고서

2020.02.14.

주관연구기관 / (주)헤모랩

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘육종에 의한 험철포함 비GMO 균체사료개발(re)’(연구개발 기간 : 2018.04.26. ~ 2019.12.31.) 과제의 최종보고서를 제출합니다.

2020 . 02. 14.

주관연구기관명 : (주)헤모랩	(대표자) 김 필 (인)
협동연구기관명 :	(대표자) (인)
참여기관명 :	(대표자) (인)



주관연구기관책임자: 김 필
협동연구기관책임자:
참여기관책임자:

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 훈령 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	118027-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.26. - 2019.12.31	단 계 구 분	1단계/ 1단계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	단기소액과제			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	육종에 의한 햄철포함 비GMO 균체사료개발(re)			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 3명 내부: 3명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 150,000천원 민간: 50,001천원 계: 200,001천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 3명 내부: 3명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 150,000천원 민간: 50,001천원 계: 200,001천원	
연구기관명 및 소속부서명	(주)헤모랩			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제
-------------------------	------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호		10-201 8-0140 294						KCTC 13700 BP			
		10-201 8-0140 295						KCTC 13701 BP			

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- 헴철은 모든 생물에서 전자전달, 산소전달, 활성산소제거 등에 반드시 필요한 구성 성분이며, 생물에서의 헴철의 흡수율은 특이적 수송체를 사용하기 때문에 원소상태의 철 이온의 흡수율보다 월등히 높음.
- 식물성 원료로 구성된 사료원료(예: 콩, 옥수수)에는 이온성 철분이 존재하나 헴철은 존재하지 않음. 동물성 원료로 구성된 사료원료(예: 혈분, 육류)에는 헴철이 존재하나 질병 전염인자의 전달위험성이 높음.
- 본 과제에서는 자연상태의 세균총 (소, 돼지 유래의 분변)으로부터 높은 헴철함량을 가지는 세균종을 성장속도 점진형 연속배양을 통하여 분리하였음. 분리된 2종의 세균은 모두 자연상태의 세균총이 갖는 헴철함량보다 10배 높은 헴철 함량을 가지고 있었으며, 생물자원센터에 기탁 후 2건의 특허로 출원되었음.
- 빈혈마우스를 이용한 독성 및 유효성 실험을 통해 2종의 헴철사균체 사료소재는 장기 및 단기 독성이 없으며 헴철 공급 유효성이 있음을 검증하였음.
- 실제 농업용 경제동물에서의 유효성 실험을 통해 육계에 헴철사균체 사료소재를 공급한 결과 증체사료요구량(FCR)이 감소함(즉, 헴철사균체 사료소재를 0.5% 포함하는 사료를 식이하면 동일한 사료공급에 대한 육계의 증체량이 높아짐)을 확인하였음. 이는 닭 장내의 유산균 비중이 높아짐에 따라 사료의 효율이 증가한 것이 원인인 것으로 사료됨.
- 해당 기술은 IPET에 기술료를 납부하였으며, 사료원료 생산 및 판매업체인 (주)셀텍에 유상 기술이전하였음. (주)셀텍에서는 향후 헴철사균체 사료소재를 이용한 육계용, 산란계용, 육우용, 양돈용, 양식어용 사료제품을 추가로 개발하여 판매할 예정임.

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 장내 모사환경에서 자연상태의 세균총을 육종진화하여 헴철을 과량 생산하는 non-GMO 세균을 분리하고, 기존의 철분공급용 사료 첨가제를 대체하는 신제품으로 개발함. 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 점진형 연속배양을 통하여 자연상태의 세균총 (소 분변, 돼지 분변)으로부터 헴철 고함량 세균 2종을 분리하였으며, 생물자원센터 기탁 2건 및 특허출원 2건을 달성함(당초목표 대비 추가달성: 특허출원 1건 추가) - 당초 고용창출목표 1명 달성 이외에 기술은 IPET에 기술료를 납부하였으며, 사료원료 생산 및 판매업체인 (주)셀텍에 유상 기술이전하였음. (당초목표 대비 추가달성: 기술실시 2건, 제품화 1건, 매출발생) 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - (주)셀텍에서는 향후 헴철사균체 사료소재를 이용한 육계용, 산란계용, 육우용, 양돈용, 양식어용 사료제품을 추가로 개발하여 판매할 예정임. - 본사에서는 헴철사균체의 유산균 보존효과 및 동물 증체효과를 보이는 과학적 근거를 연구하여 홍보에 활용할 계획임. 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>헴철</p>	<p>사균체</p>	<p>사료 소재</p>	<p>세균총</p>	<p>육종진화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>heme-iron</p>	<p>microbial biomass</p>	<p>feed material</p>	<p>microbiome</p>	<p>adaptive evolution</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

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

1. 연구개발과제의 개요

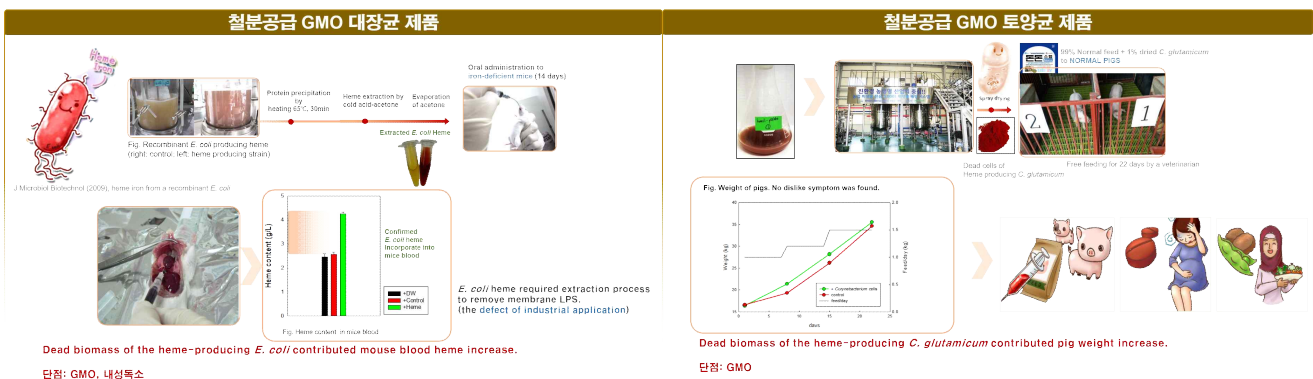
1-1. 연구개발 목적

- 장내 모사환경에서 자연상태의 세균총을 육종진화하여 헴철을 과량 생산하는 non-GMO 세균을 분리하고, 기존의 철분공급용 사료첨가제를 대체하는 신제품으로 개발함.

1-2. 연구개발의 필요성

(기존 분사제품의 단점)

- 헴철을 과생산하는 균체는 이상적인 동물의 철분공급원이며 동시에 유산균과 같은 유익균의 성장과 보존활성을 증가시키는 효과가 있음.



- 본사의 기존 제품은 헴철 생합성이 증진되도록 유전 조작(GMO)된 세균의 건조균체가 특징적인 헴철의 붉은 색을 나타내며, 소형동물의 혈액에 헴철 영양원으로 직접 사용되거나 철분결핍 상태인 중형 경제동물인 돼지의 체중증가에 효능이 있음을 확인하였음. 그러나 유전조작으로 인해 발생할 수 있는 미지의 불명확성으로 인해 허가에 어려움이 있으므로, 헴철을 함유하는 GMO균체제품은 사료로 직접 사용하지 못하며 다른 헴철 제품으로 대체하는 현실임.

1) 국내 관련제품생산 및 시장 현황

- 축산물 생산량 증가에 따라 국내 사료생산량은 '08년 대비 '09년에 2.6% 증가한 16,547천 톤으로 매년 꾸준히 증가하고 있음. 축종별로 보면, 한우·돼지·닭 사료 생산량이 특히 증가하고 있음 (생명산업의 현황 및 동향 리포트, 2010)

축종	2005 (천톤)	2008 (천톤)	2009 (천톤)	'08년 대비 '09년증감율
한우	3,293	4,165	4,310	증 3.5%
젖소	1,587	1,370	1,311	감 4.3%
돼지	5,170	5,307	5,332	증 4.7%
닭	4,203	4,286	4,463	증 4.1%

- 사료산업은 축산업 발전에 따라 매년 높은 성장률을 보이고 있으며, 사료시장 규모를 보면 '08년 72,590억원에서 '09년은 83,723억원으로 15.3% 증가함 (단미사료협회, 2010)

- 사료첨가제는 영양제, 화학요법제, 항생제, 항콕시든통제와 기타 효소·생균제로 나누어지는데 93년 매출을 보면 영양제가 603억원, 항생제가 236억원, 항콕시든통제가 49억원, 화학요법제가 21억원, 기타 효소·생균제가 65억원을 기록한 것으로 나타나 영양제와 항생제의 수요가 사료첨가제 시장의 86%로 대부분을 차지하고 있음.
- 사료첨가제는 가축과 가금의 영양분 보급, 성장촉진, 건강유지, 사료효율의 향상과 축산물 상품가치 향상 및 사료의 변질방지 등을 목적으로 첨가되는데 보통 배합사료의 0.5~1.0% 사용되고 있음. 사료첨가제의 원료로는 비타민, 아미노산, 미네랄 등의 영양물질과 칼슘, 인 등의 보충제 및 항생물질, 효소 방향물질, 착색물질 등이 사용됨.
- 특히 철, 구리, 망간, 아연, 코발트, 요오드, 셀레늄의 7가지는 부족되기 쉬운 필수 미량광물 질로서 결핍증 예방을 위한 최소요구량 보충의 개념으로 사용되었으나 최근에는 성장촉진, 사료효율 개선 등의 광범위한 목적으로 발전 활용되고 있음.
- 돼지 빈혈의 예방 및 치료용으로 사용되는 철분제 시장과 관련하여, 국내 시장 규모는 집계된 자료가 없음. 관련 제품으로는 페리에이드, 삼우철분 12주사, 페리비트, 대성 비타 철 200주, 겐터철, 겐타텍스20, 겐타론-B 주사, 아이론-겐타, 겐타론, 키토철, 글렙토실, 헤모젠 주사, 에스에프 헤로졸, 페론 200 주, 대성 훼럼200(주), 헤로판 200(주), 헤모피그 주, 우루 소페란 200, 그랩타론 주 등이 있음. 이 중 페리에이드 및 글렙토실이 시장 선도 제품임. 관련 제품을 출시하고 있는 업체로는 이글벳, 삼우메디안, 유니마이오테크, 대성미생물연구소, 녹십자수의약품, 에스에프, CTC바이오, 고려비엔피, 코미팜, 우진비엔지, 삼양애니팜, 대한뉴팜 등이 있음. 이 중 주요 기업으로는 이글벳, 대성미생물연구소, CTC바이오를 제시할 수 있음.
- 국내 돼지용 철분제 시장 분석 자료를 (주)CTC바이오의 자체 분석자료를 제시하면 다음과 같음 (단, 이는 주요 철분제에만 대해서만 분석한 수치임).

주요 철분제 매출 현황 (단위: 천원)

주요 제품명	2006년	2007년	2008년	2009년
Gleptosil	339,089	403,347	313,498	323,769
Ferriade	764,229	737,605	764,094	564,435
대성 겐타철	347,249	381,893	377,462	324,648
삼우철분12	157,551	154,390	162,398	147,764
고려 헤모젠	48,180	91,973	91,973	121,341
대성 훼럼200	124,030	113,457	96,916	77,691
합계	1,780,328	1,882,665	1,806,341	1,559,648

- 국내 수입 현황도 정확한 지료가 없으나 주요 제품의 수입 현황은 다음과 같음 (출처: (주)CTC바이오 제공 자료)

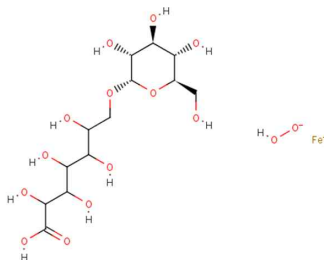
글렙토실 및 페리에이드 수입 현황 (단위: USD)

주요 제품명	2006년	2007년	2008년	2009년
Gleptosil	269,131	293,787	220,293	165,076
Ferriade	296,712	321,544	401,225	91,060
합계	565,843	615,331	621,518	256,136

- 한편, 사람 대상의 철분제 시장은 4백억원대 이상의 시장을 형성 하고 있으며 이 중 소나말의 비장에서 추출한 페리틴 성분의 빈혈치료제가 2백억원대, 헴철 성분의 빈혈치료제가 1백억원대를 차지하고 있음.

2) 국외 관련제품생산 및 시장 현황

- 돼지 빈혈의 예방 및 치료용으로 사용되는 철분제 시장과 관련하여, 미국의 경우 2006년 기준으로 년 5천만불의 시장이 형성되어 있음 (한국보건산업진흥원 사업성 평가 보고서, 2007).
- 주로 동물용 의약품, 즉 철 결핍성 빈혈(iron deficiency anaemia) 예방/치료제로 제품화 되어 있음.
- 현재 효과적 경구형 제제가 개발되지 못해 주사형 제품이 대세임. 효과적 경구형 제품에 대한 요구가 큼. 주사형의 경우도 생체 이용율의 제고가 요구되고 있음.
- 형태적으로 당류와 철 복합체가 주이며 현재 iron dextran이 널리 사용되고 있음. Iron dextran은 현재 미국 FDA에 승인되어 있음. 대표적 iron dextran 제품으로는 Pharmacosmos의 Uniferon[®] 등이 있음.
- 최근 인기가 많은 철분제로는 글렙토실(Gleptosil; colloid solution of ferric hydroxide, dextran & glucoheptonic acid)을 들 수 있음. 1970년대 출시되었지만 최근 크게 주목을 받고 있음.



- 경구형 제품으로는 황산철(ferrous sulphate) 제품 등이 있으며 물에 녹여 분만 후부터 수일

간 새끼에게 먹임.

- 자돈에게 투여하는 방식 외에 임신돈에 사료로 철분을 공급하거나 임신돈에 투여하는 방식도 적용되고 있음. 이제까지의 여러 철분제재는 임신 중의 모돈에 투여하더라도 새끼의 간에 저장되거나 유즙내로 분비되는 철분을 증가시키지 못하였으나 최근 미국에서 개발된 메타솔레이트 철(iron metasolate)을 임신돈에 투여하면 새끼의 분만 시 체중이 크게 증가될 뿐만 아니라 간에 다량의 철분이 이행되므로 새끼에게 별도로 철분을 투여하지 않더라도 빈혈증이 충분히 예방된다는 것이 밝혀진 바 있음. 현재 우리나라에도 수입되어 피탈·피(Fetal-Fe)란 이름으로 판매되고 있는데, 이것은 사료 1,000kg에 대하여 3~6kg을 첨가하여 분만 전 30~14일부터 분만 후 14~7일까지 급여함.

(본사제품의 개선 필요성)

- 안전성이 확보되도록 유전 조작과정을 거치지 않은 험철 생합성이 증진된 비유전조작생물(non-GMO) 사료첨가제로 개선하여 철분보조기능을 갖는 제품을 개발할 필요가 있음. 개선된 제품은 철분보조기능 균체사료 단독제품이나 혹은 철분공급기능과 프로바이오틱스 생균제의 보존기능이 추가된 혼합제품으로 개발될 수 있음. 따라서 본 연구 개발을 통해 별도의 유전적 조합이 없더라도 험철을 함유하는 non-GMO 균체로 개선할 필요가 있음.

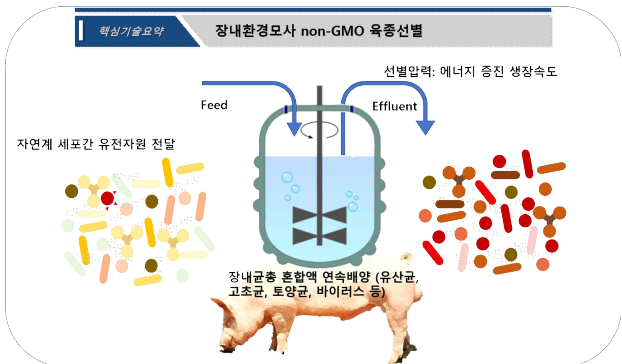
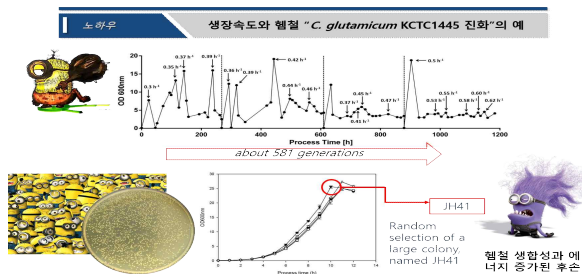
1-3. 연구개발 범위

(기존 연구보고)

- 건강한 포유류의 장내 균총에는 세균 뿐 아니라 바이러스가 동시에 존재하며, 바이러스에 의한 종간 유전물질 전달에 의한 육종이 활발히 일어나는 것으로 보고됨.

(본사의 노하우 선행연구결과)

- 성장속도를 빠르게 진화된 토양세균을 성장속도 증진을 위한 진화를 유도하는 경우 별도의 유전적 조합이 없더라도 험철을유하고 있는 시토크롬의 발현 및 험철 생합성 경로의 효소발현이 증가되는 진화체를 획득한 바 있음. 따라서 본사에서 확보하고 있는 동물의 장관을 모사한 환경에서 성장속도를 인공적으로 증가시키면 자연적인 진화와 육종의 결과로써 non-GMO인 험철 생합성 증진된 균총이 확보될 것으로 사료됨.



(본사의 선행연구결과 활용한 연구목적 달성 가능성)

- 장내 모사환경에서 자연상태의 세균총을 육종진화하여 헴철을 과량 생산하는 non-GMO 세균을 분리하고, 기존의 철분공급용 사료첨가제를 대체하는 신제품으로 개발함을 목적으로 함. 이때 육종진화라 함은 성장속도 점진적 연속배양 운전을 통해 자발적 변이에 의해 성장속도가 증가된 후순만 분리되도록 하여 육종하는 기법을 지칭함.
- 따라서 성장속도가 증가원인은 전자전달에 의한 생체에너지 생성의 증가를 의미하며 전자전달에 관여하는 철 이온(생체 내에서는 헴철의 형태로 존재)도 함께 증가하게 될 것으로 추정되므로 이를 이용하여 유전형질의 인위적 조작 없는 non-GMO인 헴철 고함량 사균체 사료소재를 개발할 가능성이 높은 것으로 사료됨.

2. 연구수행 내용 및 결과

(실시예 1) 육종 진화에 의한 성장속도 증가 균주 선별

[1-1] 건강한 가축의 장내균총 확보

건강상태가 양호한 6개월령 거세 숫소의 신선한 분변을 전국한우협 회의 한우농장에서 50g 확보하였다. 또한 건강상태가 양호한 90일령 암돼지의 신선한 분변을 양성바이오그린(주) 및 CJ제일제당 사료부문의 돼지시험농장에서 각기 50g씩 확보하였다.

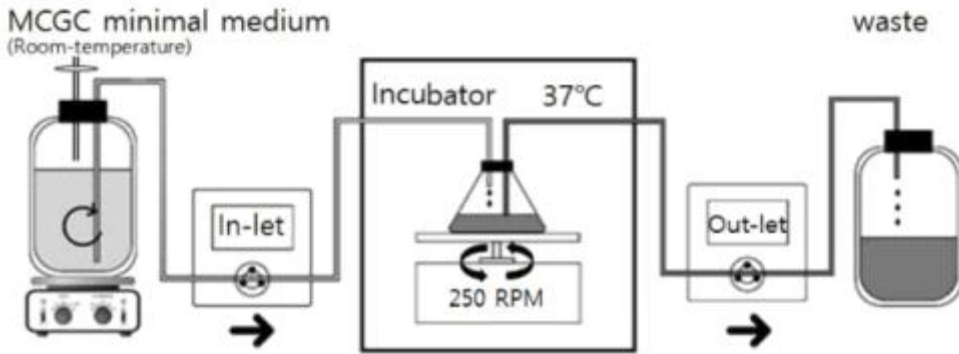
수득된 분변 시료 50 g(소 분변 50g, 돼지분변은 각 시료의 25g + 25g)을 50 mL의 생리적 식염수(0.8%)에 분산시켜 블렌딩한 후 고형분을 제외한 장내균총이 포함된 상등액 30 mL를 시료로 채취하고, 이를 육종진화 배양의 접종 및 균총 분석의 재료로 사용하였다.

소 및 돼지의 장내균총을 포함하는 상등액 10 mL를 50 mL의 MCGC 최소배지 (리터당, 글루코오스 40 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, KH_2PO_4 3 g, Na_2HPO_4 6 g, NaCl 1 g, 소디 움 시트레이트 디하이드레이트 1 g, 비오틴 0.2 mg, 티아민·HCl 1 mg, FeSO_4 20 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, MnSO_4 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mg, $\text{CuCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 mg, $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1mg, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.2 mg, 및 CaCl_2 70 mg)를 포함하는 엘렌마이어 플라스크(Erlenmyer flask)에 현탁시켜 육종진화 배양의 접종액으로 사용하였다.

[1-2] 성장속도 증가 유도 육종진화

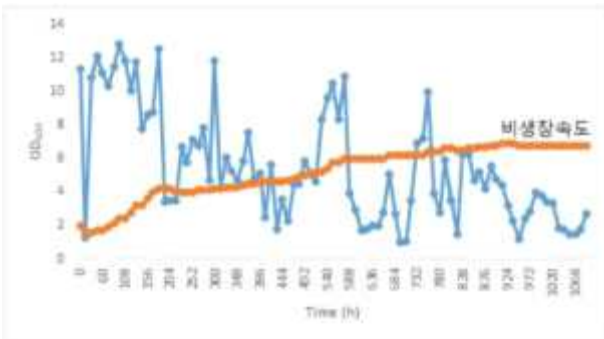
1-1에서 준비된 소의 분변에서 유래된 장내균총 시료가 접종된 MCGC최소배지를 담은 플라스크를 접종액으로 사용하여, 다음 그림에 도시된 바와 같은 연속식 육종진화 배양기에서 MCGC 최소배지를 초기 15 mL/h의 유속 (성장속도=0.3 h⁻¹에 해당)으로 페레스탈틱 펌프를 이용하여 공급하고, 오버플로우(overflow)되는 배양액은 펌프로 제거하여 인큐베이터(incubater)인 플라스크 내의 배양액은 상시적으로 50 mL로 유지시키면서, 연속배양을 수행하였다. 장내균총 시료를 포함하는 인큐 베이터의 플라스크는 250 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 유지하였다. 인큐베이터로

연속적으로 공급되는 MCGC 최소배지의 공급속도를 점진적으로 증가시키면서 4개월 간 운전하면서, 육종진화 배양기 내의 균총농도는 12시간 간격으로 오버플로우되는 배양액의 600nm OD(optical density)로 측정하였다. 건세포 중량(dry cell weight)은 1 OD600nm = 0.25 mg/mL의 흡광계수로 환산했다(AMB Express. 2014; 4: 15).

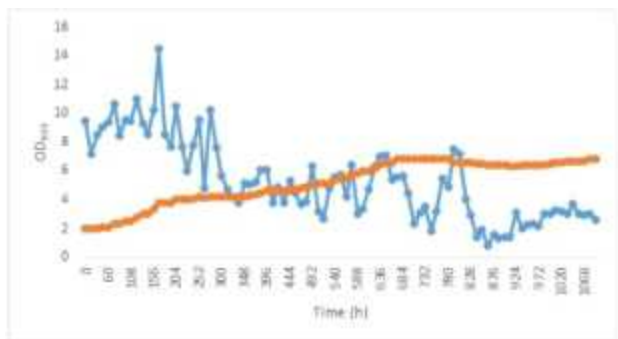


육종진화배양장치 모식도

다음 그림은 연속식 육종진화 배양 동안 측정된 OD600 및 비성장속도(specific growth rate)를 보여준다. 최종적으로 연속식 육종진화 배양기에 잔존하는 소 장내균총 및 돼지 장내균총의 성장속도는 모두 배양 초기의 성장속도 0.3 h⁻¹에 대비하여 모두 2배 이상 증가하여 각각 0.75 h⁻¹, 0.85 h⁻¹ 였고, 육종진화 후의 배양기 내 균체 농도는 각각 OD 1.7 및 OD 1.3이었다.



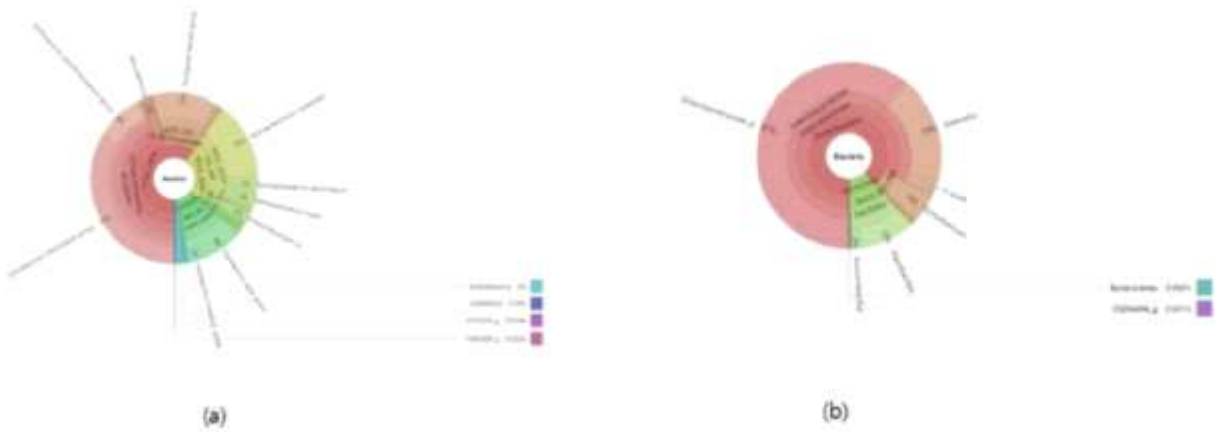
소 분변 유래 장내 모사환경에서의 육종진화배양



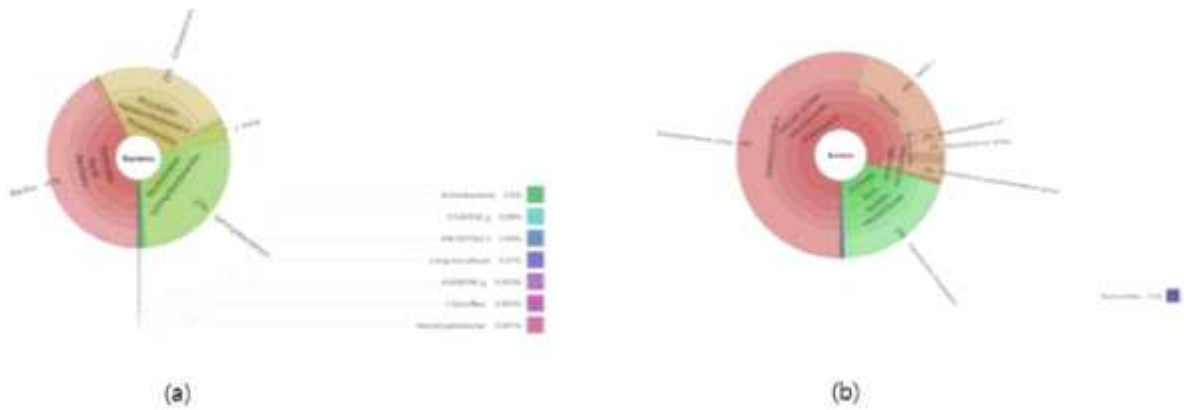
소 분변 유래 장내 모사환경에서의 육종진화배양

소 및 돼지의 장내 균총이 육종 진화 과정을 통해 인위적인 유전자 조작 없이 변화된 것을 확인하기 위해서 육종진화 이전과 이후의 메타게놈을 분리하여 비교하였다. 초기의 분변 분산액과 육종진화 3개월 후의 배양액을 시료로 사용하여, 원심분리(13,000g, 10 min)로 각 시료에 포함된 균총의 미생물시료를 펠렛으로 분리한 후 FastDNA SPIN Kit for Soil 키트(MPBio LC, Santa Ana, CA, USA)에서 제공된 프로토콜을 사용하여 메타게놈을 분리하였다. 분석 전문 기관인 (주)천랩에 의뢰하여 분리된 메타게놈 시료의 균총분석을 수행하였다. 다음 그림은 육종진화 전(a)과 후(b)의 메타게놈 분석 결과를 보여준다. 초기 균총은 다양한 미생물의 혼합 배양 물이었으나 육종진화 이후에는 빠른 성장조건에 적합하지 않은 미생물이 제거되어 균총의 종류가 감소하였다. 이는 육종 진화에 의해, 성장 속도가 빠르고 그에 의해 험철을 포함한 생산능이 높은 미

생물의 비율이 균총 내에 높아졌음을 시사한다.



소 분변 내 육종진화 전(a)과 후(b)의 미생물 균총변화



돼지 분변 내 육종진화 전(a)과 후(b)의 미생물 균총변화

또한, 성장속도가 증가된 육종진화 균총의 세포내 에너지를 비교하기 위하여 육종진화 전과 후의 균총 현탁액 시료의 ATP 농도를 측정하였다. 세포내ATP 농도는 ATP determination kit(FL-AA; Sigma Chemical, St. Louis, MO) 및 루 미노미터(luminometer)(20/20n Luminometer System, Turner Biosystems, Sunnyvale, CA)와 ATP 표준을 이용하여 나 등의 방법에 따라 측정하였다(J Ind. Microbiol. Biotechnol. 42 (6), 915-924). 하기 표 1에 기재된 바와 같이, 소 분변균총의 육종진화 개시 이전의 세포내 평균 ATP량은 $0.327 \mu\text{mole/g-DCW}$ 이었고 육종진화 이후는 $1.428 \mu\text{mole/g-DCW}$ 로써, 육종진화 전보다 2배 이상 높은 세포내 에너지량을 보였다. 성장속도의 증가를 유도하는 육종진화에 의해 수득된 균총의 평균 세포내 에너지량이 증가된 것을 확인하였다.

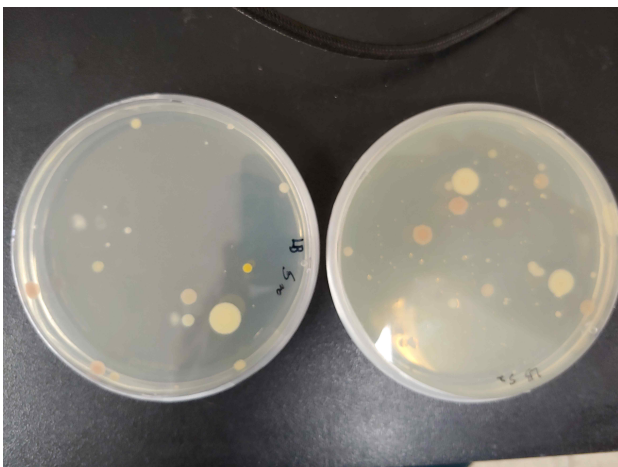
【표】 육종진화 전후 미생물 균총의 세포에너지(ATP) 농도변화

	육종진화 전 소의 장내균총	육종진화 후 소의 장내균총
	0.327 ± 0.785	1.428 ± 0.772

세포내 ATP 농도 ($\mu\text{mole/g-DCW}$)	육종진화 전 돼지의 장내균총 0.612 \pm 0.051	육종진화 후 돼지의 장내균총 1.327 \pm 0.155
--	--------------------------------------	--------------------------------------

【1-3】 육종진화에 의해 성장속도 및 헴 생산능이 증가된 균주의 선별

1-2에서 3개월의 육종진화 완료 후 수득된 연속식 육종 진화 배양기의 오버플로우 배양액 0.01 mL을 고체형 MCGC 최소배지 20 mL (조성: MCGC + 16 g agar)을 포함하는 플레이트에 도말한 후 37°C에서 72 시간 동안 정치배양하였다. 배양 후 플레이트에 형성된 콜로니(육종진화된 균총)를 1800만 화소의 카메라로 촬영한 후, IAT(Image Analysis Toolset, SMH17, 구글 플레이 스토어) 프로그램을 이용하여 콜로니 색소 중 적색(RGB중 R값)이 높은 콜로니들을 선별하였다. 헴철이 생성되면서 콜로니의 색이 적색을 띠게 되므로, 헴철의 생산능이 높을수록 적색소가 강하게 나타났다. 다음 그림은 약 100만개의 콜로니 색도분석 중 일부의 RGB 색도분석 그림 일부를 나타낸 것이다.



ImageAnalysisToolset-IAT 이용한 분변 육종진화 미생물균총의 콜로니 색도분석

육종진화에 의해 수득된 균총에서 약 100만개의 콜로니를 조사하여, 적색소(RGB의 R값)의 값이 높은 콜로니를 각각 소 분변유래 5개 및 돼지 분변유래 5개를 선별하였다. 선별된 5개의 콜로니를 15 mL의 MCGC 최소배지를 포함하는 테스트 튜브에 접종하고 2일간 37°C에서 250 rpm으로 진탕 배양한 후, 세포에 포함된 헴철을 정량하였다. 대조군으로, 그람음성 박테리아의 지표 균주인 야생형 대장균 ATCC 27325를 동일한 조건에서 배양하였다. 구체적으로, 플라스크 배양에 의해 수득된 선별 콜로니의 배양물과 대조군의 배양물을 각각 4°C에서 3,000g로 15분 동안 원심분리하여 적색으로 착색된 균체를 회수하고, 증류수로 2회 세척하였다. 수득된 균체를 15 mL의 증류수에 현탁시키고, 1초 간격의 30W로 설정된 초음파 파쇄기(sonicator)(UP200S,

Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Germany)를 이용하여, 얼음 상에서 20분 동안 파쇄시켰다. 4°C, 10,000g에서 10분간 원심분리를 수행하여 세포 파쇄물을 제거 하고, 상층액을 65°C 수조에서 30분 동안 보관하였다. 그 후, 4°C, 10,000g에서 10 분간 원심분리를 수행하여 단백질 침전물을 제거하고 그 상층액을 이용하여 헴철 추출물을 수득하였다. 적색의 색소인 헴철을 차가운 산-아세톤 추출 방법(DiIorio, E.E., Methods Enzymol, 1981. 76: p. 57-72)을 이용하여 추출하였다. 구체 적으로, 수득된 세포 추출물의 상층액을 -20°C에서 교반 하에 100 ml의 산-아세톤 (99.8 ml의 아세 톤 + 0.2 ml의 10 N HCl)에 소량씩 적가하였다. 그 후, 상기 용액 을 -20°C에서 30 분간 10,000g로 원심분리하였다. 침전물에서 적색을 완전히 제거 하기 위해 상기 추 출 과정을 반복하였다. 그 후, 수득된 산-아세톤을 10N NaOH를 첨가하여 중화시키고 회전 증발기(rotary evaporator)를 이용하여 증발시켰다. 증 발 후 잔류된 용액을 동결건조시켜 정제된 헴철 추출물 을 수득하였다. 철의 양은 [Fe(NH₄)₂(SO₄·6H₂O)]를 표준으로 이용한 오르토-페난트롤린 비색법 (Volkova, T.N.and N.V. Patrina, Lab Delo, 1967. 2: 97-8)을 이용하여 결정하였고, 헴철 농 도는 C18 컬럼(Xbridge, Waters Co.) 및 400 nm에서의 UV 검출기가 구비된 HPLC system (Waters Co., Milford, MA, USA)을 이용하여 측정했다(J Microbiol Biotechnol. 2015;25(6):880-6). HPLC 분석은 1M 암모늄 아세테이트 완충액(pH 5.16)을 메탄올과 14:86(v/v)으로 혼합한 용액을 이동 상으로 이용하여 1 mL/분의 등속 조건에서 수행하였다. 헤민 클로라이드(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 를 정량 표준 곡선을 작성하기 위해 이용했다. 헴철 정량 결과를 다음 표 에 표시하였다.

【표 2】 적색소 기반 선별된 콜로니의 헴철 생산량 비교

	헴철 함량 (microM/g-Dried Cell)
대장균 (그램음성 대조군)	0.043
코리네박테리움 글루타미쿰 (그램양성 대조군)	0.038
소 분변유래 콜로니 #1	0.075
소 분변유래 콜로니 #2	0.074
소 분변유래 콜로니 #3	0.084
소 분변유래 콜로니 #4	0.077
소 분변유래 콜로니 #5	0.118
돼지 분변유래 콜로니 #1	0.175
돼지 분변유래 콜로니 #2	0.071
돼지 분변유래 콜로니 #3	0.073
돼지 분변유래 콜로니 #4	0.069
돼지 분변유래 콜로니 #5	0.067

육종진화를 통해 수득된 균총 중에서 헴철 생산능이 가장 우수한 소 분변유래 콜로니 #5와 돼지 분변유래 콜로니 #1 균주를 모균주 대비 성장속도 및 헴철 생산능이 증가된 균주로 선별하였다.

【1-4】 선별된 균주의 동정

1-3에서 선별된 2종의 균주의 동정을 위해 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용한 분석법을 사용

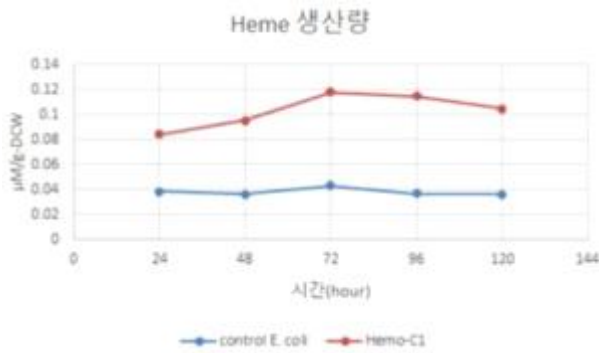
하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석은 전문기관인 (주)천랩에 의뢰하여 수행하였다. #5 균주의 16S rRNA 유전자 서열이 확보되었고, GenBank 데이터베이스를 이용한 상동성 분석을 통해 DMS 15968st 클렙시엘라 바리콜라(*Klebsiella variicola*)와 가장 높은 일치율(상동성 99.93%)을 보여 클렙시엘라 바리콜라로 동정되었다. 16S rRNA 서열에 근거하여, #5 균주를 클렙시엘라 바리콜라 HEMO-C1로 명명하고, 2018년 11월 8일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 수탁번호 KCTC13700BP로 기탁하였다.

돼지 분변유래 콜로니#1 균주의 16S rRNA 유전자 서열이 확보되었고, GenBank 데이터베이스를 이용한 상동성 분석을 통해 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032와 100% 일치하여, 코리네박테리움 글루타미쿰으로 동정되었다. 16S rRNA 서열에 근거하여, 돼지 분변유래 #1 균주를 코리네박테리움 글루타미쿰 HEMO-P1로 명명하고, 2018년 11월 8일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 수탁번호 KCTC13701BP로 기탁하였다.

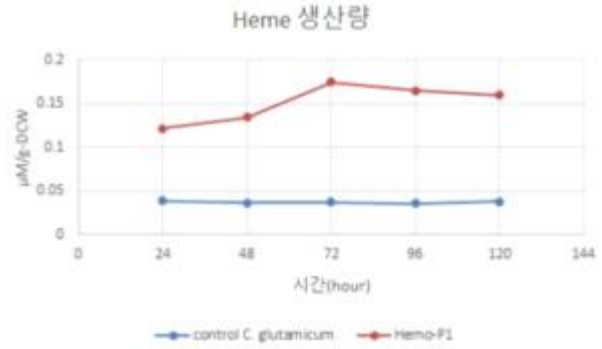
(실시예 2) 선별된 균주의 헴철 함량

실시예 1에서 육종진화를 통해 선별되고 동정된 클렙시엘라 바리콜라 HEMO-C1과 코리네박테리움 글루타미쿰 HEMO-P1의 헴철 생산성을 조사하였다. 50 mL의 MCGC 최소배지를 포함하는 삼각플라스크에 각 균주를 접종하고 2일간 37°C에서 250 rpm으로 진탕배양하면서 초기 비성장속도와 2일 후의 균체당 포함된 헴철 함량을 측정하였다. 배양액의 균체 및 상층액에서 헴철을 각각 측정하였다. 채취된 배양액 1mL를 원심분리(10 min, 4°C, 13000 rpm)하여 균체(펠렛)와 상층액을 얻었다. 펠렛은 1M NaOH에 재현탁한 후 0.2g의 비드(Glass bead acid washed 212-300 μm , Sigma Aldrich, Missouri, USA)를 바이알에 넣고 비드-파쇄기(bead-beater)(Minibead beater-16, biospec products, Oklahoma, USA)를 이용해 각각 1분간 총 5번 파쇄하고, 파쇄 후 원심분리(10 min, 4°C, 13000 rpm)하고, 상층액 200 μL 와 400 μL 의 아세토니트릴:디메틸설폭시드(DMSO)(4:1, v/v)와 혼합 후 볼텍싱하고, 원심분리(15 min, 4°C, 13000 rpm)한 후에 하층부의 용액을 PTFE 필터로 여과하여 HPLC로 실시예 1에 기재된 방법에 따라 분석하였다. 상층액은 펠렛의 파쇄 과정을 제외하고 동일하게 수행하였다.

클렙시엘라 바리콜라 HEMO-C1은 육종진화 전 균총의 비성장속도 0.3 h⁻¹보다 약 7배 높은 2.16 h⁻¹를 보였고, 헴철의 함량은 그람음성 지표 미생물인 야생형 대장균 ATCC 27325 대비 약 2배 높은 0.112 $\mu\text{M/g-DCW}$ 였다. 코리네박테리움 글루타미쿰 HEMO-P1 육종진화 전 균총의 비성장속도 0.3 h⁻¹보다 약 2.5배 높은 0.76 h⁻¹를 보였고, 헴철의 함량은 그람양성 지표미생물인 야생형 코리네박테리움 글루타미쿰 ATCC 13032 대비 약 3배 높은 0.180 $\mu\text{M/gDCW}$ 였다. 다음 그림은 클렙시엘라 바리콜라 HEMO-C1 및 대조군으로서 그람 음성 세균의 지표 미생물인 야생형 대장균 ATCC 27325의 헴철의 생산량과 코리네박테리움 글루타미쿰 HEMO-P1 및 대조군으로써 그람 양성 세균의 지표 미생물인 야생형 코리네박테리움 ATCC 13032의 헴철 생산량을 각각 보여준다.



소 분변유래 HEMO-C1의 헴철 생산량



돼지 분변유래 HEMO-P1의 헴철 생산량

(실시예 3) 헴철 사균체 사료 소재의 소형동물 평가

【1-1】 헴철 사균체 사료소재 시제품

코리네박테리움 글루타미쿰 HEMO-P6 (이하 헤모피)과 클렙시엘라 바리콜라 HEMO-C4 (이하 헤모씨)를 YS 배지 1L (glucose 40g, yeast extract 10g, soytone 10g, MgSO₄ 1g, (NH₄)₂SO₄ 5g, K₂HPO₄ 1.5g, NaH₂PO₄ 0.5g, CaCl₂ 0.4 g, FeSO₄ 0.02g per liter)를 포함하는 대용량 플라스크 (2L) 10개에 접종한 후 30℃, 200 rpm 진탕배양기에서 96시간 동안 배양한 후 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 121℃에서 15분간 습식살균 한 이후 60℃ 순환오븐에서 24시간동안 건조하여 각각 100g씩의 건조된 헴철사균체를 제조하였다.



【1-2】 헴철 사균체 사료소재의 소형동물 단회투여 독성평가

동물(마우스)실험을 대행하는 기관 (동남의화학연구원, 부산)에 헴철사균체시료 2종의 독성평가를 의뢰하였다.

실험동물 암컷과 수컷을 사용하여 시험물질 투여 농도를 300 과 2,000mg/kg 로 나누어, 암·수 각각 군별 5 마리에 1 회 경구 투여하였다. 시험물질 투여 후 14 일간 사망률, 일반증상 및 체중 변화를 관찰하였으며, 생존 동물은 부검하여 육안적으로 장기의 이상 유·무를 확인하였다.

본 시험에 사용한 ICR 마우스, 7 주령 모델 (암컷, 수컷)은 하나바이오테크(경기도 안산, 한국)로부터 분양받아 (주)동남의화학연구원 동물사 (동물시설등록증 : 제 412 호)에서 7 일간 검역과 순화, 사육을 거친 건강한 동물로 시험하였다. 시험동물의 군 분리는 Table 1, 2 와 같이 균을 구

성하여 시험하였다. 케이지 내에서는 ear punching 으로 개체를 식별하였고, 각 군간 평균 체중 및 표준편차가 균일하도록 군 분리를 진행하였다. 사료는 실험동물용 고품사료 (샘타코 BIOKOREA, 경기도 오산시, 한국)를 자유 섭취시켰고, 사료섭취량 및 음수량을 측정하였다. 체중 변화는 시험 물질 투여 직전, 투여 후 1, 4, 7, 10, 14 일에 측정하였다. 본 연구는 (주)동남의 화학연구원 동물실험위원회 (SEMI, Institutional Animal Care and Use committee)의 방침 및 법규에 따라 진행되었다 (윤리승인번호: SEMI19-002). 시험물질은 증류수에 300 과 2,000 mg/kg 농도로 조제하여 사용하였다. 실험동물을 약 16 시간 절식시킨 후, 시험물질 조제물을 경구 투여용 존데를 이용하여 실험동물의 위 내에 1 회 투여하였다.

Table 2. Experimental design of animals-treated with orally non-GMO Heme iron microbe dead cells prototype

Sex	Group	No.	Treatment (mg/kg)	투여 경로
Male	Normal	5	D.W	P.O
	Sample C	5	300	
		5	2,000	
	Sample P	5	300	
		5	2,000	
	Female	Normal	5	
Sample C		5	300	
		5	2,000	
Sample P		5	300	
		5	2,000	

Table 1. Number of laboratory animals divided by concentration

Group	300 mg/kg		2,000 mg/kg	
	Male	Female	Male	Female
Normal (d.w)	5	5	-	-
Sample C	5	5	5	5
Sample P	5	5	5	5

관찰항목은 매일 1회 이상 (투여 당일은 투여 후 0.5, 1, 2, 3, 4시간 마다), 투여 후 14일까지 일 반증상, 독성증상, 사망 동물 유무를 관찰하였다. 체중은 투여 1, 4, 7, 10, 14일째 체중을 측정하였다. 투여 14 일 후, 모든 생존 동물의 외관 이상 유무를 관찰하였다. CO2 마취 후 회복하여, 복부대동맥을 절단하여 방혈 치사 후 육안으로 장기를 검사하고 장기의 무게를 측정하였다. 실험동물 부검 후 복부대동맥에서 채혈하여 얻어진 혈액은 약 30 분간 실온에서 방치시킨 후 3,500 rpm, 4°C에서 10 분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈장은 생화학 분석기 (Roche, Switzerland)를 이용하여 간 독성을 나타내는 혈중 지표인 ALT (Alanine transaminase), AST (Aspartateaminotransferase)를 분석하였다. 통계적 검정은 Statview 통계 프로그램을 이용하여, $p < 0.05$ 이하일 경우 통계적으로 유의한 것으로 검정하였다 ($*p < 0.05$ vs. normal, $\#p < 0.001$ vs. 10/24 normal). 각 항목에 대한 유의한 차이를 나타내는지의 비교분석은 t-test one-way ANOVA 를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

다음과 같은 결과를 얻었다. 본 실험은 (주)헤모랩에서 제공한 Non-GMO 헴철미생물 사균체 시제품 2 종 (C, P)의 독성을 확인하기 위해, 단회 투여 독성 시험을 실시하였다. ICR 마우스를 이용하여 시험물질 투여 농도를 300 과 2,000 mg/kg 로 하여, 암·수 각각 군별 5 마리에 1 회 경구 투여하였다. 14 일 간 사망률, 일반 증상, 체중 변화 및 부검 소견을 관찰하여 독성 증상 발현 여부를 확인하였다.

1. 실험 기간 중, 시험물질 투여에 의한 사망 동물 및 이상 소견은 관찰되지 않았다.
2. 생존 동물에 대한 체중 측정 결과, 모든 투여군에서 정상적인 체중 증가가 관찰되었다 (부검 전 절식 제외).
3. 생존 동물의 부검 소견 결과, 일부 장기 무게의 차이는 나타났으나, 모든 투여군에서 이상 병변 증상은 관찰되지 않았다.
4. 혈청 생화학적 분석 결과, 모든 투여군에서 정상 수치의 ALT 와 AST가 측정되었다.

본 시험에서는 (주)헤모랩에서 제공한 Non-GMO 헴철미생물 사균체 시제품 투여와 관련하여 어떠한 독성 증상도 관찰되지 않았다. 체중 변화에 있어서 모든 시험 군에서 큰 유의적 차이는 나타나지 않았으며, 일반 증상 및 부검 결과 내부 장기의 육안적 이상 또한 관찰되지 않았다. 실험 동물에서의 사망례 또한 없었다. 이상의 실험결과로 Non-GMO 헴철미생물 사균체 시제품은 실험동물 암·수 마우스에 안전한 물질로 작용하는 것으로 사료된다. (상세결과 보고자료: SEMRID19-05)

[1-3] 헴철 사균체 사료소재의 소형동물 빈혈개선 유효성평가

동물(마우스)실험을 대행하는 기관 (동남의화학연구원, 부산)에 헴철사균체시료 2종의 유효성 평가를 의뢰하였다.

실험동물은 C57BL6/N 마우스 수컷을 사용하였다. 철분결핍사료를 이용하여 3 주간 빈혈 유도 후 시험물질을 4 주간 투여하였다. 총 7 주간 빈혈을 유도하였고, 빈혈 유도 기간 동안 매주 부검하여 혈액학적 검사를 진행하였다. 시험물질을 투여하는 4 주간 매주 부검하여 조직학적 검사, 지질과산화 실험을 추가 진행하였다. 실험동물의 체중 변화, 사료섭취량 및 음수량을 주 2 회 측정하였다.

본 시험에 사용한 C57BL6/N 마우스 4 주령 모델 (수컷)은 하나바이오테크 (경기도 안산, 한국)로부터 분양 받아 (주)동남의화학연구원 동물사 (동물시설등록증 : 제 412 호)에서 7 일간 검역과 순화, 사육을 거친 건강한 동물로 시험하였다. 실험동물의 군 분리는 Table 1 같이 군을 구성하여 시험하였으며, Table 2 의 디자인으로 주 1 회 부검하였다. 케이지 내에서 ear punching 으로 개체를 식별하였고, 각 군간 평균 체중 및 표준편차가 균일하도록 군 분리를 진행하였다.

정상군(N)은 AIN-76A 고형사료 (두얼바이오텍, 서울, 한국), 빈혈유도군 (IDA) 및 시험물질 투여군 (SC, SP)은 철분결핍사료 (두얼바이오텍, 서울, 한국)을 자유섭취시켰다. 체중변화 및 사료섭

Table 1. Number of laboratory animals divided by treatment sample

Group	Mice	Treatment	시험물질
N	40	AIN-76A diet	D.W
IDA	40	철분 결핍 사료	
SC	20		Sample C, 1%
SP	20		Sample P, 1%

1) N: Normal, IDA: Iron deficiency anemia, SC: Sample C (1%), SP: Sample P (1%)

Table 2. Experimental design of animals with treated orally non-GMO Heme iron microbe dead cells prototype

Week	N (40)			IDA (40)			IDA + SC (20)			IDA + SP (20)		
	부검	잔여	투여	부검	잔여	투여	부검	잔여	투여	부검	잔여	투여
Initial	순화			순화			순화			순화		
1	5	35	-	5	35	-	-	20	-	-	20	-
2	5	30	-	5	30	-	-	20	-	-	20	-
3	5	25	-	5	25	-	-	20	-	-	20	-
4	5	20	-	5	20	-	-	20	Sample C (1%)	-	20	Sample P (1%)
5	5	15	-	5	15	-	5	15		5	15	
6	5	10	-	5	10	-	5	10		5	10	
7	5	5	-	5	5	-	5	5		5	5	
Final	5	0	-	5	0	-	5	0	-	5	0	-

1) N: Normal, IDA: Iron deficiency anemia, SC: Sample C (1%), SP: Sample P (1%)

취량, 음수량은 주 2 회 측정하였다. 본 연구는 (주)동남의화학연구원 동물실험위원회 (SEMI, Institutional Animal Care and Use committee)의 방침 및 법규에 따라 진행되었다 (윤리승인번호: SEMI1-19-002). 철분 결핍 사료는 총 7 주간 급이하였다. 처음 3 주간 철분 결핍 사료로 빈혈을 유도한 후, 4 주간 시험물질을 마우스용 존데를 이용하여 경구 투여 하였다.

본 연구는 철 결핍 식이를 공급하여 유도된 빈혈에 대한 non-GMO 헴철 미생물 사균체 시제품 2종의 철 결핍성 빈혈 개선에 미치는 효능을 확인한 결과이다.

1. 빈혈 유도 기간의 혈액학적 검사를 확인한 결과, RBC, HGB 및 HCT의 수치 변화가 시간이 지남에 따라 N군에 비해 IDA군에서 유의수준으로 감소한 것을 확인하였다. 이로 인해, 3주간의 철 결핍 식이 공급으로 빈혈이 유도됨을 확인할 수 있었다.
2. 철 결핍성 빈혈 유도 후, 시험물질인 SC, SP를 4주간 투여하여 혈액학적 검사 (RBC, HGB, HCT)의 변화를 확인하였다. 시료 투여 3주차에 철 결핍성 식이로 감소한 IDA군에 비해, SC와 SP군에서 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가하였다.
3. 혈액을 이루고 있는 적혈구의 크기를 나타내는 MCV의 수치를 확인한 결과, 4주 동안 N군에 비해 IDA군에서 유의적으로 감소하는 것으로 보아, 구성하고 있는 적혈구의 크기가 작음을

확인하였다. 반면, 시료 투여 4주차에 SC, SP군의 MCV 수치가 유의적으로 증가한 것으로 관찰되었다. 특별히, SC와 SP 군의 혈액학적 수치 유의적 차이는 크게 관찰되지 않았다.

4. 간 내의 철 축적으로 인한 지질과산화 반응을 확인한 결과, N군에 비해 IDA군에서 유의적으로 감소하였으나, 시료 투여 4주간 SC, SP군은 증가하는 경향을 보였으나, 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

5. 조직 내 축적된 철인 ferritin의 변화를 확인하기 위해 비장과 간 조직의 Prussian blue 염색을 시행한 결과, 간 조직에서는 군 간의 특별한 변화를 확인할 수 없었으나, 비장 조직 내에서 빈혈 유도 시 N군 대비 IDA군에서 감소하였다. 반면, 시료 투여한 SC, SP군에서는 극히 일부에서 경향만 확인되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 철 결핍성 식이로 빈혈 유도된 IDA군에 비해 SC, SP군의 혈액학적 변화, 간 내의 지질 과산화, 조직 내 철분 축적 정도는 증가하여 헴철사균체철 결핍성 빈혈에 도움을 주는 것으로 보인다. (상세결과 보고자료: SEMRID19-05)

【1-4】 헴철 사균체 사료소재의 소형동물 장내균총 평가

동물(마우스)시험을 대행하는 기관 (동남의화학연구원, 부산)에 헴철사균체시료 2종의 식이평가를 의뢰하였다. 동남의화학연구원에서 제공받은 마우스의 분변시료는 세균총 분석시험을 대행하

Non-GMO 헴철사균체 제품 독성 및 유효성

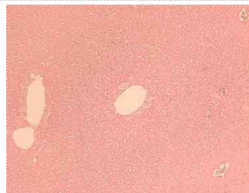
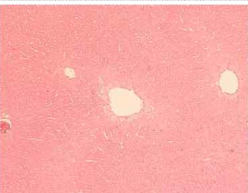
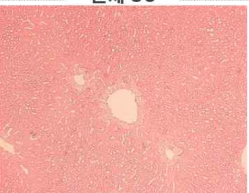
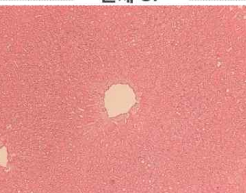
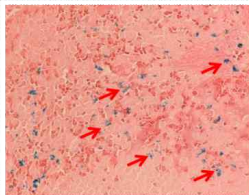

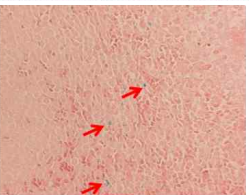
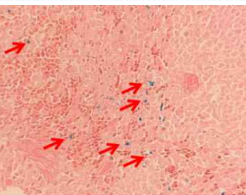

 헴철공급용도
 Non-GM 개량균의
 사균체 (1%)


 빈혈질환 마우스 모델
 3주 사양시험

◀ 철분결핍빈혈질환 유도 마우스모델에서 non-GMO 제품의 독성 및 유효성

1. 독성 검증 (체중, 임상증상, 해부 기관관찰, 병리조직적 검사)
2. 유효성 검증 (체중변화, 혈액학적 검사)

- ▲ 일반 마우스모델에서 non-GMO 사균체 2종 모두 독성 이상조건 없고, 체중 증가
- ▲ 빈혈 마우스모델에서 non-GMO 사균체 2종 모두 헤모글로빈 농도 증가.
- ▲ 빈혈 마우스모델 조직검사서 non-GMO 사균체 2종 철분 저장 농도 증가.

	정상사료식이	빈혈식이	빈혈식이 + 사균체 SC	빈혈식이 + 사균체 SP
Liver (x 100)				
Spleen (x 400)				

는 기관 (천랩, 서울)에 의뢰하여 세균총을 분석하였다.

본 시험에 사용한 ICR 마우스, 7 주령 모델은 하나바이오테크(경기도 안산, 한국)로부터 분양받아 (주)동남의화학연구원 동물사 (동물시설등록증 : 제 412 호)에서 7 일간 검역과 순화, 사육을 거친 건강한 동물로 시험하였다. 4개 군(A군: 정상사료 식이군, B군: 정상사료+유산균-시중제품-1%-군, C군: 정상사료+유산균-시중제품-1%+사균체C-1%-군, D군: 정상사료+유산균-시중제품-1%+

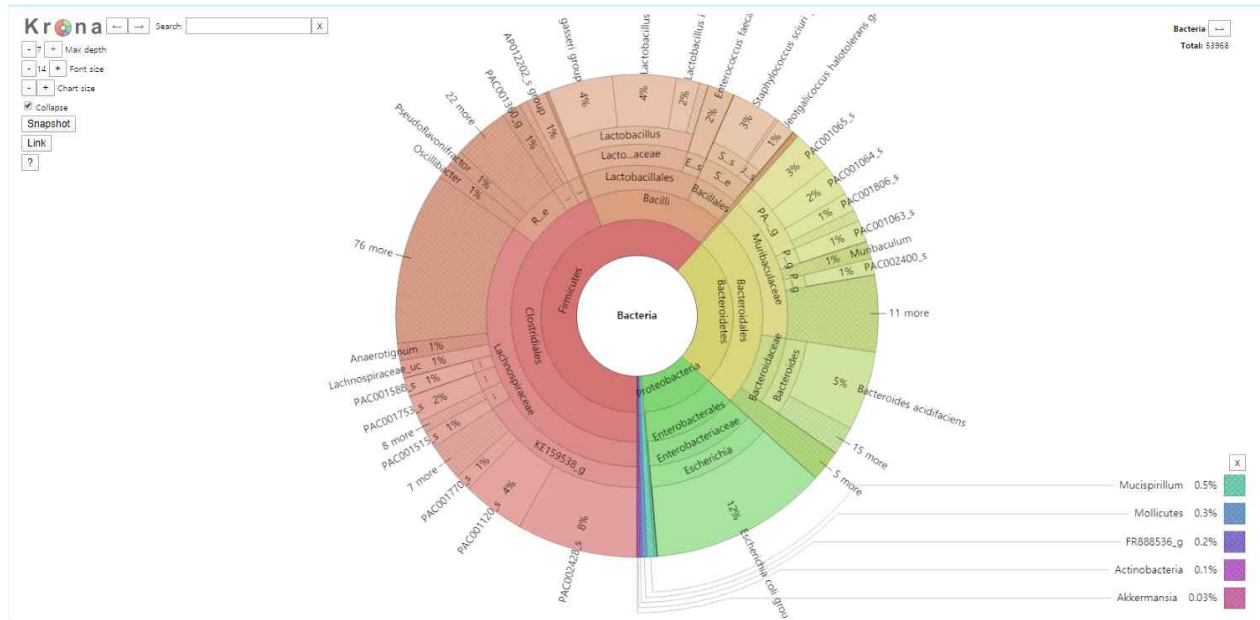
사균체P-1% - 군)으로 나누어 군별로 5 마리씩을 두었고, 7일 경과 이후 분변 1g씩을 채취하여 분변의 세균총 분석을 위한 시료로 사용하였다.

시료 투여량 계산 (용량: 10 mL/kg)

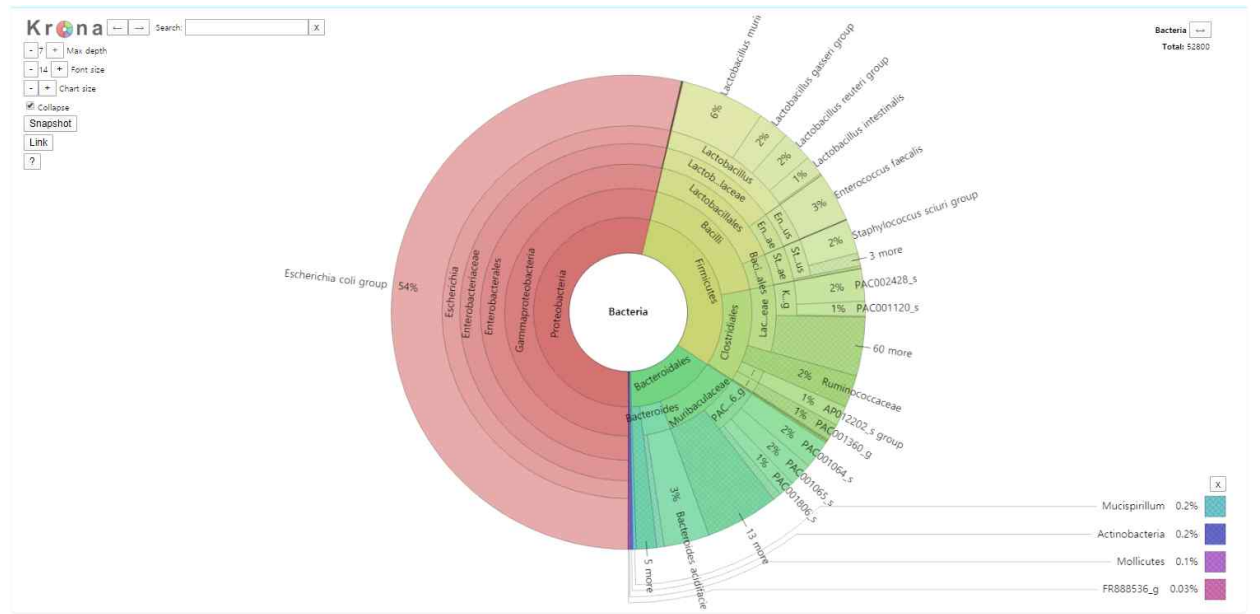
Group	Mice	19.02.21	투여량
Normal	1	35.169	0.35
	2	35.946	0.36
	3	37.469	0.37
	4	35.790	0.36
	5	34.388	0.34
유산균 (1%)	1	34.407	0.34
	2	33.764	0.34
	3	35.914	0.36
	4	32.555	0.33
	5	35.243	0.35
유산균 (1%) +사균체C(1%)	1	34.928	0.35
	2	35.928	0.36
	3	35.768	0.36
	4	36.609	0.37
	5	36.442	0.36
유산균 (1%) +사균체P(1%)	1	36.313	0.36
	2	35.987	0.36
	3	36.537	0.37
	4	34.594	0.35
	5	34.835	0.35

정상사료 A군에 비해 유산균 시중제품을 함께 식이한 B군의 분변에서는 유산균들이 차지하는 비율이 7% 증가하였으나 특이적으로 정상사료군에서 12%였던 프로테오박테리아(i.e., 대장균)의 비중이 56%까지 증가하는 특이한 증상을 보였다. 반면 유산균 시중제품과 함께 헤모피/헤모씨를 식이한 C군 및 D군에서는 유산균들이 차지하는 비율이 증가한 것은 물론이고 부작용을 나타내었던 프로테오박테리아의 비중이 각각 1%, 4%로 감소한 결과를 나타냈다. 따라서 험철사균체의 식이는 마우스 장내 세균총의 다양성 유지에 기여하였다.

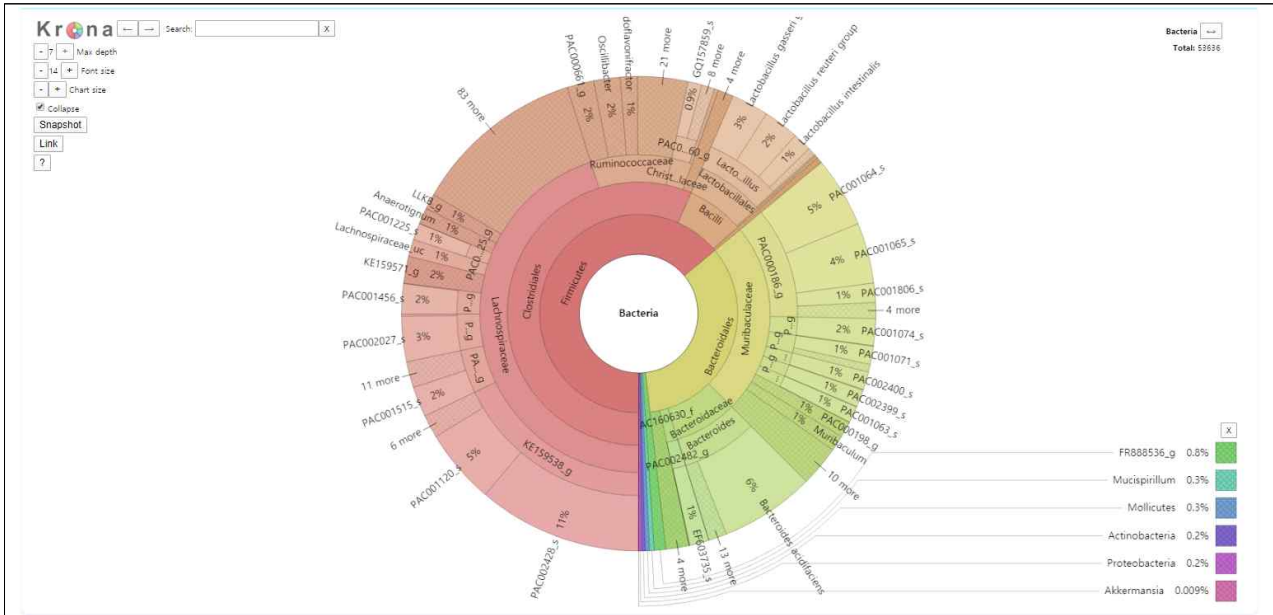
A군: 정상사료 식이 마우스의 분변



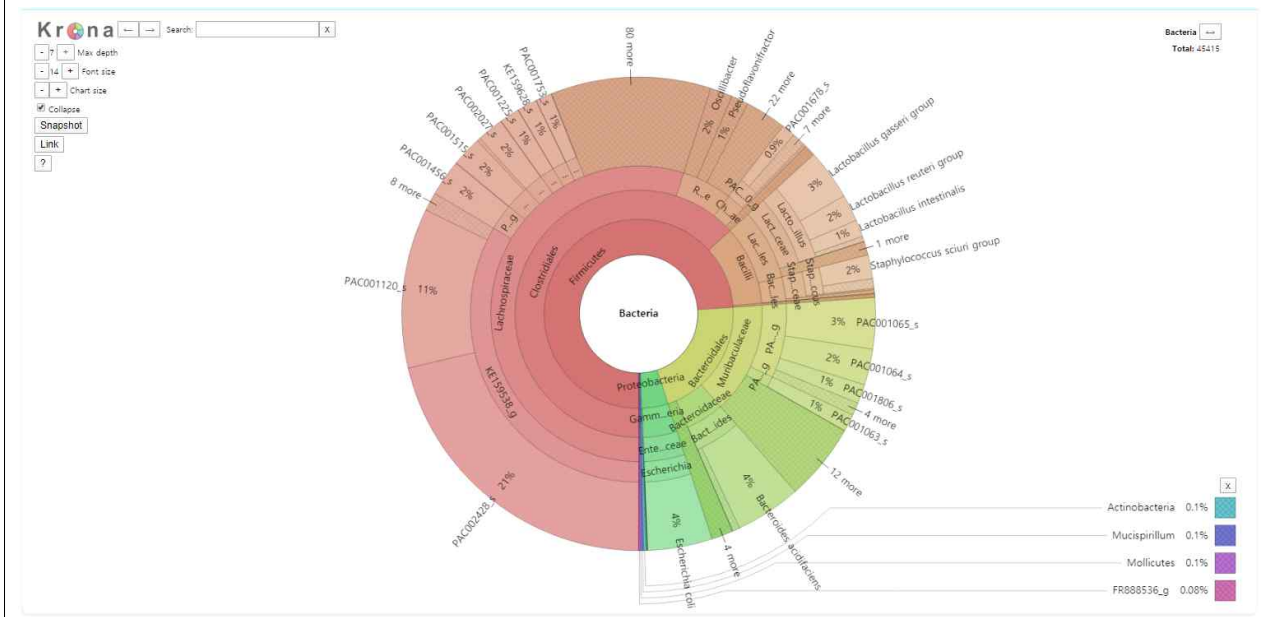
B군: 정상사료+유산균시중제품 식이 마우스의 분변



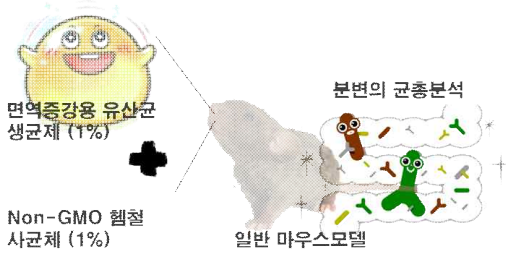
C군: 정상사료+유산균시중제품+헤모씨 식이 마우스의 분변



D군: 정상사료+유산균시중제품+헤모피 식이 마우스의 분변



헴철 사균체의 장내균총 기여효과 결과



▲ non-GMO 헴철사균체 + 유산균 생균 제품 투여시, 퍼미큐티스(유산균류 포함) 유지효과 및 프로테오박테리아 (대장균류 포함) 억제효과로 장내 세균총의 다양성에 기여 (아래 링크)

(실시예 4) 기술이전 및 헴철 사균체 사료 소재의 경제동물 평가

개발된 헴철 사균체 사료 소재인 헤모씨, 헤모피를 대량 생산하여 축산 경제동물에 사양시험 하기 위해서는 추가적인 연구비용과 시설이 필요하였으므로 여러 유관업체들과 비밀유지계약 이후 평가를 협의하였다. ((주)양성바이오, (주)비전바이오켐, (주)퓨처엔텍, (주)셀텍, 대상(주), 특허법인 PCR, (주)동남의화학연구원, (주)저스트유, 일동바이오사이언스(주), (주)샘표식품, (주)HLB생명과학 등)

비밀유지계약서 사본 (개인정보포함으로 삭제)	비밀유지계약서 사본 (개인정보포함으로 삭제)
비밀유지계약서 사본 (개인정보포함으로 삭제)	비밀유지계약서 사본 (개인정보포함으로 삭제)

이 중에 (주)셀텍과 기술이전계약(5년 기간)을 체결한 이후, 양산된 헴철사균체 소재를 경제동물에 식이하였다. (계획서 제출 당시에는 양돈용으로 목표하였으나, 아프리카돼지열병 확산방지를 위한 양돈농장 출입 제한조치로 인하여 양계농장으로 부득이 변경함.)

육계에 대한 사료첨가효율 사양시험은 (주)셀텍에서 실시하였다. 180두의 육계를 대상으로 60두씩 3개의 군 (기존사료[대조군], A군[기존사료 99.5% + 10배 농축 헴철사균체 0.5%], B군[기존사료 99.5% + 1배 농축 헴철사균체 0.5%])으로 분류하였다. 3개 군의 육계에게 30일 동안 자유급식한 후 사료소모량 대비한 체중증가를 비교하여 사료요구율(FCR: 1g 육류 생산을 위한 투입 사료비)을 비교하였다. 헴철 사균체 0.5%를 첨가한 A군과 B군에서 각각 6.8%, 6.0%의 투입사료가 감소하였다.

(주)헤모랩 개발 헴철사균체의 닭(육계)-사료 첨가효율 사양시험



대상: 육계 180두
 기간: 30일 (2019.11.)
 대조군 (60두): 보통사료 100%
 시험군A (60두): 10X헴철사균체 (0.5%) + 보통사료 (99.5%)
 시험군B (60두): 1X헴철사균체 (0.5%) + 보통사료 (99.5%)

시험군	체중증가(g)	소모사료량(g)	사료요구율(FCR)	사료효율(%)
대조군	1579.3 \pm 21	2247.0 \pm 10	1.42 \pm 0.08	100.0
시험군A	1559.3 \pm 43	2088.1 \pm 41	1.34 \pm 0.04	106.0
시험군B	1533.9 \pm 31	2040.9 \pm 57	1.33 \pm 0.06	106.8

시험군	맹장 유산균수(CFU/g)
대조군	3.7 X 10 ⁸
시험군A	8.8 X 10 ⁸
시험군B	6.9 X 10 ⁸



사양시험 및 제품구입문의: (주)셀텍 (celltechfeed.com)

30일 이후 도축한 육계의 맹장을 적출하여 MRS 배지에서 성장하는 유산균의 총 수를 검정하였을 때, 대조군 대비하여 헴철 사균체 0.5%를 첨가한 A군과 B군에서 각각 2.3배, 1.9배 높은 유산균 수가 검출되었다.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 장내 모사환경에서 자연상태의 세균총을 육종진화하여 헴철을 과량 생산하는 non-GMO 세균을 분리하고, 기존의 철분공급용 사료첨가제를 대체하는 신제품으로 개발함.

3-2. 목표 달성여부

- 기술적 목표

1. 장내 모사환경으로부터 헴철 과량 생산 non-GMO 세균-헴철 사균체 소재-의 분리: 당초 계획 특허출원 1건 대비 특허출원 2건으로 초과달성
2. 헴철사균체 소재 시제품의 소형동물(마우스) 식이 독성 및 철분 공급용 유효성 검증: 당초 목표 100% 달성
3. 헴철사균체 소재 시제품의 소형동물(마우스) 성장기능 확인: 당초 목표에 없던 추가적 기술성과.
4. 헴철사균체 소재 시제품의 경제동물(육계) 유효성 검증: 당초 목표에 없던 추가적 기술성과.

- 사업화 목표

1. 기술료 납부: 당초 종료2년 후 달성목표대비, 과제수행 기간 내 발생하여 성과 조기달성.
2. 기술이전 사업화: 당초 종료3년 후 달성목표대비, 과제수행 기간 내 발생하여 성과 조기 달성.
3. 제품화 및 매출발생: 당초 종료3년 후 달성목표였으나, 과제수행 기간 내 발생하여 성과 조기달성.

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 당초 과제목표는 충분히 달성하였음. 단지, 개발된 헴철사균체 제품의 사양시험에서 다음과 같은 분석에 따라 차후 대책이 필요함.

(사양시험 결과 헴철사균체제품의 개선방안 분석)

- 육계에서 초기의 사료공급효율이 증가하였으나, 유효성이 편차범위 이내이므로 헴철사균체의 첨가량을 조절할 필요성이 있음.
- 헴철공급이나 성장기능은 소형동물 결과와 동일하게 확인되었음. 그러나 사양동물에서 공급한 헴철사균체의 소화능과 잔존물 여부를 추가적으로 확인하며, 면역반응 역시 추가적으로 확인할 필요성이 있음.
- 양돈용 개발에서 긴급상황 발생(ASF 확산에 의한 양돈농가 접근 불가)으로 긴급히 양계용으로 변경하였으므로 양돈농가 접근이 허용되는 대로 양돈 사양시험을 추가할 필요가 있음.

- 헴철미생물을 배양하는 초기 비용은 1톤 배양기 기준으로 약 30만원의 비용이 소모되었으며, 생산된 헴철사균체는 2-3 kg이었음. 따라서 고농도 배양과 적절한 배지최적화를 통해 생산단가를 더 낮출 필요성이 있음.

- 후속연구의 필요성

1. 여러 축종을 대상으로 한 헴철사균체 소재의 응용제품 개발 필요성

헴철사균체 소재의 철분공급 및 사료효율 증진효과는 다른 축종들을 대상으로 한 철분 공급/사료효율 증진에도 효과가 있을 것으로 추정됨. 단지 축종별로 헴철사균체를 공급하는 제형과 공급방법을 다르게 적용해야 하는 후속연구가 필요함.

2. 인간을 대상으로 한 헴철사균체 소재의 한시적 식품소재 개발 필요성

헴철사균체 소재의 철분공급 및 정상기능 증진효과는 인간을 대상으로도 동일한 헴철공급/정상기능 증진효과가 있을 것으로 추정됨. 인간을 대상으로 하여 본 과제 발생 성과를 활용하기 위해서는 헴철사균체 소재의 안전성과 유효성을 인체 대상으로 실시하여 새로운 한시적 식품소재 인증등록이 추가적으로 필요함.

4. 연구결과의 활용 계획 등

1. 여러 축종을 대상으로 한 헴철사균체 소재를 응용한 사료제품 개발 필요성

헴철사균체 소재의 철분공급 및 사료효율 증진효과는 본 과제를 통하여 소형동물(마우스), 육계에서 확인된 바 있으며 산란계, 소, 돼지, 오리, 어류 등 경제동물과 개나 고양이와 같은 반려동물 등 다른 축종들을 대상으로 한 철분공급/사료효율 증진 효과가 있을 것으로 추정됨. 따라서 여러 축종을 대상으로 하여 본 과제 발생 성과를 활용하여 여러 축종을 대상으로 한 헴철사균체 소재를 응용제품들을 개발하는 후속연구가 필요함. 사료원료 생산업체인 (주)셀텍과 기술이전계약을 이미 체결하였고, 여러 축종을 대상으로 한 제품개발을 진행할 예정이며, 기술개발업체인 (주)헤모랩에서는 철분공급과 사료효율 증진효과의 원인을 탐색하여 과학적 근거를 제시함으로써 마케팅에 활용하도록 할 예정이다. 대상 동물의 잔존량, 면역반응 등 부작용 가능성도 염두에 둔 추가적인 연구가 필요함.

본 과제 성과로 도출된 non-GMO 헴철사균체 사료 소재 성과

소형실험동물(마우스), 육계 대상으로 안전한 철분공급효과



후속연구 필요분야 1 (여러 축종 대상 헴철사료제품)

타 축종의 철분공급효과, 사료효율 증진효과 검증

사료

경제동물 사료제품

병원성 인자의 확산을 방지 안전성 헴철 공급



사료

반려동물 사료제품

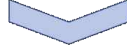
생체이용률이 높은 헴철을 공급하는 임신 애란동물용 기능성사료



2. 인간을 대상으로 한 헴철사균체 소재의 한시적 식품소재 개발 필요성

헴철사균체 소재의 철분공급 및 정장기능 증진효과는 본 과제를 통하여 소형동물(마우스), 육계에서 확인된 바 있으며 인간을 대상으로 한 헴철공급/정장기능 증진효과가 있을 것으로 추정됨. 따라서 인간을 대상으로 하여 본 과제 발생 성과를 활용하여 헴철사균체 소재를 새로운 한시적 식품소재화 하여 응용제품들을 개발하는 후속연구가 필요함. 이를 달성하기 위하여 본 기술개발업체인 (주)헤모랩에서는 사균체 유래의 추출물 (헴철 추출물)의 인체안전성, 인체독성을 검증하여 한시적 식품원료로 허가를 받아 사업을 영위할 계획임. 식품원료 허가에 소요되는 비용은 전문투자회사의 투자유치에 활용하고자 함.

본 과제 성과로 도출된 non-GMO 험철사균체 사료 소재 성과
소형실험동물(마우스), 육계 대상으로 안전한 험철공급+정상효과



후속연구 필요분야 2 (험철정상기능 한시적 식품소재)

인간 대상 험철공급효과, 정상기능 증진효과 검증

식품	험철 공급제품 소화흡수율이 높고, 전염인자 오염이 없는 안전한 험철제공 식품	
식품	생균제제 제품 생균제제의 보존증대 기능성 프리바이오틱스 식품	
식품	고기맛 인공육 제품 고기맛을 내는 인공육 식품	

붙임. 참고문헌

- Hallberg L, Bjorn-Rasmussen E, Howard L, Rossander L. 1979. Dietary heme iron absorption. A discussion of possible mechanisms for the absorption-promoting effect of meat and for the regulation of iron absorption. *Scand. J. Gastroenterol.* 14: 769-779.
- Frykman E, Bystrom M, Jansson U, Edberg A, Hansen T. 1994. Side effects of iron supplements in blood donors: superior tolerance of heme iron. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 561-564.
- Denic S, Agarwal MM. 2007. Nutritional iron deficiency: an evolutionary perspective. *Nutrition* 23: 603-614.
- Hoppe M, Brun B, Larsson MP, Moraesus L, Hulthen L. 2013. Heme iron-based dietary intervention for improvement of iron status in young women. *Nutrition* 29: 89-95.
- Kwon OH, Kim S, Hahm DH, Lee SY, Kim P. 2009. Potential application of the recombinant *Escherichia coli*-synthesized heme as a bioavailable iron source. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 604-609.
- Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW. 2012. Diseases of Swine, pp. 199. 10th Ed. Wiley-Blackwell, New York
- Choi, S., Park J., Kim, P. 2017. Heme Derived from *Corynebacterium glutamicum*: A Potential Iron Additive for Swine and an Electron Carrier Additive for Lactic Acid Bacterial Culture. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 500-506

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.