

최 종
연구보고서

천연물 및 미생물 urease inhibitor 개발과
복합화 제제 생산

Developments of plant extract and
microbial urease inhibitor for pig

연구기관

(주) 이지바이오시스템 생물자원연구소

고려대학교 생명산업과학부

고려대학교 식품과학부

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “천연물 및 미생물 urease inhibitor 개발과 복합화 제제 생산”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 15일

주관연구기관명 : (주) 이지바이오시스템
생물자원연구소

총괄연구책임자 : 강 대 경

연 구 원 : 박 찬 수

연 구 원 : 김 용 호

연 구 원 : 오 해 근

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 황 광 연

요 약 문

I. 제 목

천연물 및 미생물 urease inhibitor 개발과 복합화 제제 생산

II. 연구개발의 목적 및 필요성

토사에서 발생하는 악취의 원인인 ammonia는 분·뇨내 존재하는 urea가 urease에 의해서 분해되면서 발생한다. 본 과제 목적은 이러한 urease의 활력을 억제하는 urease inhibitor를 천연물 추출과 미생물에 의한 생성을 통해 생산, 제품화 하는데 있다. 제품화된 urease inhibitor는 암모니아, 악취제거 등 환경오염 개선을 위한 기능성 성분은 기존의 *Yucca schidigera* 보다 뛰어나면서 가축에게 미치는 부가적인 효과(성장을 증진, 사산자돈 감소, 폐사율 감소, 산란율증가 등)는 더욱 향상시킬 수 있도록 하는 것이 최종목표이다. 또한 미생물 내 urease 생성 억제 물질의 규명과 아울러 steroidal saponin이 함유된 약용식물 부산물을 천연물 추출원료로 사용함으로써 특이한 생리활성기능이 부가된 기능성 축산물 생산이 가능할 것으로 생각된다. 특히 천연물 추출제와 미생물 균주를 이용한 분체복합화 등 synergy 효과를 극대화하는 방안을 이용하여 기존의 유사제품과는 차별화된 효능을 갖는 신제품의 생산을 모색하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- (1) 천연물, 미생물 urease inhibitor와 Urease 생성 억제 미생물 균주의 선발 및 효능의 동물실험 검증
 - 천연물 urease inhibitor 제제 개발
 - Steroid saponin을 함유한 식물체 검색
 - 검색된 식물의 추출물에서 urease inhibitor 활성 검증

- 선발된 식물추출물의 경제성 및 효능 검토
- Urease 생성 억제 미생물 균주 개발
 - Urease 생성 미생물 균주의 검색
 - Urease 생성 억제 미생물 균주의 선발
 - Urease 생성 억제 미생물 균주의 활력 검증
- Microbial urease inhibitor 제제 개발
 - Urease 생성 억제 미생물 균주의 urease inhibitor 효능 규명
 - 미생물의 정제, 회수에 의한 microbial urease inhibitor 물질의 추출
 - Microbial urease inhibitor 물질의 활성 및 효능 검증
- 선발제제 및 균주 효능의 동물실험 검증
 - 선발제제들의 사료내 안정성 검증
 - 선발된 제제들을 돼지(자돈)에게 급여한 후 성장률, 분만자돈의 혈중 산소량과 함께 장내 urease, urease inhibitor activity 및 암모니아 함량 측정
 - 실험자돈에서 배설된 slurry의 pH, 암모니아, BOD, C/N 등 환경오염 지표의 측정

(2) 선발 제제와 균주의 복합화 및 동물실험 검증

- 선발제제 및 균주의 생산조건 확립
- 선발제제 및 균주의 복합화 조건 확립
- 선발제제 및 균주의 건조 및 분말화(활력 및 효능검증)
- 선발제제와 균주의 동물(자돈 or 모돈) 실험 검증
- 자돈의 사양성적(성장률, 섭취량, 사료효율, piglet O₂ 등)
- 모돈의 사양성적 및 번식성적(생존시자돈수, 이유자돈성적, 재발정 등) 검증

(3) 신개발 제제의 현장적용실험

- 신개발 제제의 현장적용(가축농가-양돈)실험
 - 돼지의 사육성적 및 번식성적 검증
 - 돈사 내 암모니아 가스 측정
 - 분뇨 내 urease 및 암모니아 함량 측정
 - slurry 내 pH, 암모니아, BOD, COD, C/N 등 측정
- 신개발 제제의 현장적용(가축농가-양돈)실험
- 신개발 제제의 품질검증
 - 양산된 개발제제의 품질평가

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

천연물로부터 urease inhibitor의 효능을 가지는 물질을 분리하기 위하여 다양한 약 70여종의 식물로부터 5종의 가능성 있는 식물체를 선별하였다. 녹차엽에서 추출한 추출물이 다른 추출물에 비하여 높은 urease inhibitor의 활력을 보여 녹차엽 추출물을 가능성 있는 천연물 urease inhibitor로 선정하였다.

20여가지의 천연 발효물중 가능성 있는 5종의 발효물에서 미생물을 분리 동정하여 urease 생성 억제 미생물 균주를 선별하였다. 선발된 천연발효물에는 yeast와 bacillus를 다량 함유 하고 있었는데, 그중 6종의 yeast를 분리 동정하고 API test를 통하여 확인하였다. 또한, 보유하고 있던 lactic acid bacteria로부터 가능성 있는 균주를 확인하고, 그것들을 비교해서 가장 우수한 균인 *Candida krusei/inconspicua* 204를 선별하였다.

천연물의 추출조건을 확립하기 위하여 열수와 천연물의 혼합 비율, 추출 시간, 추출 온도등에 따른 추출물의 활력과 양을 측정하여 최적의 추출 비율을 탐색하였다. 측정된 조건은 천연물의 양이 열수의 약 20%, 75℃에서 약 90분간 추출시 가장 높은 추출율을 보였다. 하지만, 활력을 고려하였을 경우 추출물의 획득 수율보다는 낮은 온도인 55℃ 정도에서 100분간 추출하는 것이 최대의 활력을 유지하면서 추출물을 얻을수 있는 조건으로 확인되었다.

선발된 미생물 균주 *Candida krusei/inconspicua* 204의 안전성을 검증하기 위하여 분자생물학적인 방법을 사용하여 균을 동정하였고, 일반적인 yeast 배지인 YM media보다 높은 수준의 glucose(12g/L)를 첨가하였을 경우 더 높은 성장을 확인하였다. 최대의 활력을 가지는 균주를 생산하기 위하여 urease inhibitor 활력을 배양 시간에 따라 측정하였다. 최적의 성장을 보이는 48시간 보다 더 오랜 시간 (52시간)배양하는 것이 더 높은 수준의 활력을 확인할 수 있었고, 이는 yeast 자체의 urease inhibitor activity 보다는 그것들의 대사물질에 의한 효과인 것을 다시한번 확인해 주는 결과이다.

천연물 제제와 미생물 제제의 혼합 비율을 탐색하여 8:2로 하였을 때 가장 높은 결과는 나타내었고, 이 복합제제의 열 안정성과 사료내 안정성을 확인하여 55℃, 7일까지는 안정성이 충분히 확보됨을 확인하였다.

복합 제제를 동물실험 이전에 사료내 혼합에 의한 안정성을 평가하였다. 사료의 보관은 실험실내의 상온이 아니라 실제 농장의 사료창고에 25kg 지대에 보관하였다. 먼저 복합 제제내의 미생물수는 18일경까지는 큰 변화가 없었다. 하지만 18일 이후부터는 살아있는 미생물의 수가 급격히 감소하였다. 또한, 사료내 혼합 비율에 따라 다른 결과를 나왔는데, 사료내 혼합 정도가 높을수록 18일 이후에 급격한 균수의 감소를 보인 반면, 낮은 경우에는 큰 차이가 없었다. 첨가수준에 따른 활력은 균수와 비슷한 양상을 보였지만, 활력이 낮아지는 보관 기간은 균수 보다는 늦었다. 약 20일 경부터 사료내 활력이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 28일 정도 보관하면 혼합 농도에 상관없이 0.2%, 0.5%, 1.0% 모두 비슷한 효과를 나타냈다. 사료내 0.2%, 0.5%, 1.0% 의 세 수준으로 복합 재제를 첨가하고, artificial slurry를 이용한 ammonia 발생 억제 정도를 측정하였다. 측정된 값은 1.0% 처리구에서 가장 높은 암모니아 억제를 보였다. 하지만, 인공 slurry의 보관 기간이 15일 이상 되었을 때는 1.0%에서 더 높은 암모니아 발생을 보였다.

복합화 제제의 열 안정성은 pelleting 시 받을 수 있는 열처리 조건으로 실시하였다. 복합화 제제는 약 65℃까지는 안정성이 확보되어 있었지만, 75℃ 이상에서는 균수가 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 또한, pH에 따른 영향에서도 4와 6에서는 큰 변화가 없었지만, 2이하의 조건에서는 낮은 균수를 보인 반면, urease

inhibitor activity는 80%정도의 수준으로 높게 유지되고 있었다.

대량 생산시 신속한 평가방법을 구축하기 위하여 indophenol method와 phenol red method, 그리고 artificial slurry를 이용한 ammonia 발생량을 비교하였다. indophenol method가 phenol red method에 비하여 높은 결과를 보였고, 첨가량이 높아질 수록 두 방법의 정확도는 감소하였다. 복합 제제의 효과를 검증하기 위해서는 복합제제의 농도가 10 ~ 40mg/ml의 수준일 때 두 방법이 정확성이 증가되는 것을 확인하였다. 또한, 이러한 결과는 artificial slurry를 이용한 평가 방법에서도 확인되었다.

본 연구에서 확인된 천연물 추출물과 미생물 제제는 비교적 높은 ammonia 발생 억제를 보였다. 하지만, 사료의 영양소 함량에 따라서는 낮은 ammonia 발생 억제를 보이기도 하였다. 따라서, 본 연구의 결과를 바탕으로 사료내 단백질 수준에 따른 첨가제의 효과와 이에 따른 다른 가능성 있는 제제에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

SUMMARY

In order to find and develop a urease inhibition-products from plants, many plant extracts were tested. Indophenol method, phenol red method, and ammonia emission from artificially slurry were conducted to select reliable plant extract. As a result, green tea extract was selected for urease inhibitor.

Extraction condition was optimized to improve efficiency and efficacy. Basically, hot water was used. First, efficiency of extraction was ensured when extraction condition was at 75°C for 90 min. However, their urease inhibiting activity was diminished. Optimal extraction condition which could ensure the urease inhibiting activity was 55°C, and incubation time was 90 min, and ratio of green tea and water was 2:8.

Many strains of microbials were isolated from various sources. Among them, *Candida krusei/inconspicua* 204 showed better urease inhibiting activity. To optimize growth of microbials, Response Surface Methodology was used to develop an optimum medium. YM media, glucose, and pH were considered as major factors for microbials and the composition of medium was determined for selected strains. Their growth was maximized in YM media supplemented with 12g/L glucose. Optimal growth condition was at 24°C for 52 hours.

Urease inhibiting activity of green tea extract and *Candida krusei/inconspicua* 204 was investigated by indophenol method and phenol red method, and artificially slurry was also used to evaluate their effect on feces and urine. They were stored at room temperature for determining their heat stability, and they were heat treated to measure heat stability. They were stable up to 55°C, this temperature is similar that of pelleting. Their stability in room temperature was up to 7 days, afterward, their activity was steeply decreased.

Produced green tea extract and *Candida krusei/inconspicua* 204 were employed to evaluate urease inhibitory effect of pigs. Weaned pigs, pregnancy sows, and lactating sows was used. Supplementation of complex mixture of green tea extract and *Candida krusei/inconspicua* 204 reduced fecal and urinal ammonia emission, which was determined by using artificial slurry from each pigs. Different growth stage reflected on the effect of urease inhibitor activity of complex mixture of green tea extract and *Candida krusei/inconspicua* 204. The complex mixture had a less effect on weaned pigs, lactating sows than pregnancy sows. this difference might be from the nutrient content of diet. However, 0.5 % of complex mixture had a positive effect on ammonia production from artificial slurry.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
1. Objective	15
2. Reasonability	15
2.1 Technical aspect	17
2.2 Economic and industrial aspect	19
2.3 Cultural aspect	20
3. Scope of research and development	23
3.1 Selection of plant extract and microbials for urease inhibitor and evaluation of their effect on pigs	23
3.2 Evaluation on complex of plant extract and microbials for pigs	23
3.3 Evaluation of complex of plant extract and microbials on field trials	23
Chapter 2. Present condition of technique	25
Chapter 3. Research contents and results	28
1. Selection of plant extract and microbials for urease inhibitor and evaluation of their effect on pigs	28
1.1 Materials and methods	28
1.2 Results and discussion	40
2. Evaluation on complex of plant extract and microbials for pigs	68
2.1 Materials and methods	68
2.2 Results and discussion	85
3. Evaluation of complex of plant extract and microbials of field trials	120
3.1 Materials and methods	120
3.2 Results and discussion	128

Chapter 4. Achievements and contributions	141
1. Selection of plant extract and microbials for urease inhibitor and evaluation of their effect on pigs	141
2. Evaluation on complex of plant extract and microbials for pigs	142
3. Evaluation of complex of plant extract and microbials of field trials	144
Chapter 5. Application	146
1. Future study	146
2. Applications	146
Chapter 6. International trend and scientific information	147
Chapter 7. References	148

목 차

제 1 장 연구개발 과제 개요	15
제 1 절 연구개발의 목적	15
제 2 절 연구 개발의 필요성	15
제 1 항 기술적 측면	17
제 2 항 경제·산업적 측면	19
제 3 항 사회문화적 측면	20
제 3 절 연구 개발의 범위	23
제 1 항 천연물, 미생물 urease inhibitor와 urease 생성 억제 미생물 균주의 선발 및 효능의 동물실험 검증	23
제 2 항 선발 제제와 균주의 복합화 및 동물실험 검증	23
제 3 항 신개발 제제의 현장적용실험	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	28
제 1 절 천연물, 미생물 urease inhibitor와 urease 생성 억제 미생물 균주의 선발 및 효능의 동물실험 검증	28
제 1 항 실험재료 및 방법	28
1. 천연물 확보 및 전처리	28
2. 스크리닝 방법	28
3. Urease 활성을 억제하는 천연물의 건조 및 분말화	29
4. Urease 활성을 억제하는 천연물의 생산 최적화	30
5. Urease 활성을 억제하는 천연물의 생산	30
6. Urease 생성 억제 천연발효물의 획득 및 검색	30
7. Urease 생성 억제 미생물 균주의 검색 및 선발	31

8. Urease 생성 억제 probiotics의 검색 및 선발	32
9. Urease 생성 억제 미생물 균주의 활력 검증	33
10. Urease 생성 억제 미생물 균주의 urease inhibitor 효능 규명 ..	33
11. Urease 억제 미생물 균주의 urease inhibitor물질의 생산 최적화	34
12. 미생물의 정제, 회수에 의한 microbial urease inhibitor 물질의 추출	35
13. 천연물 추출 제제와 미생물 균주의 동물실험 검증	36
14. 천연물 추출 제제와 미생물 균주의 slurry내 효과 검증	39
제 2 항 실험결과 및 고찰	40
1. Urease 활성을 억제하는 천연물의 1차 선별	40
2. Urease 활성을 억제하는 천연물의 2차 선별	44
3. Urease 활성을 억제하는 천연물의 건조 및 분말화	45
4. Urease 활성을 억제하는 천연물의 생산 최적화	48
5. Urease 생성 억제 천연발효물의 획득 및 검색	49
6. Urease 생성 억제 미생물 균주의 검색 및 선발	52
7. Urease 생성 억제 probiotics의 검색 및 선발	54
8. Urease 생성 억제 미생물 균주의 활력 검증	57
9. Urease 생성 억제 미생물 균주의 urease inhibitor 효능 규명	59
10. Urease 억제 미생물 균주의 urease inhibitor 물질의 생산 최적화	62
11. 천연물 추출 제제와 미생물 균주의 동물실험 검증	62
12. 천연물 추출 제제와 미생물 균주의 slurry내 효과 검증	65
제 2 절 선발 제제와 균주의 복합화 및 동물실험 검증	68
제 1 항 실험재료 및 방법	68
1. 천연물 추출물의 생산조건 확립	68
2. 선발균주의 생산조건 확립	70
3. 선발제제 및 추출물의 복합화 조건 확립	78

4. 선발제제 및 균주의 건조 및 분말화	78
5. 선발제제와 균주의 동물 실험 검증	79
제 2 항 실험결과 및 고찰	85
1. 천연물 추출물의 생산조건 확립	85
2. 선발균주의 생산조건 확립	92
3. 선발제제 및 추출물의 복합화 조건 확립	106
4. 선발제제 및 균주의 건조 및 분말화	109
5. 선발제제와 균주의 동물 실험 검증	113
제 3 절 신개발 제제의 현장적용실험	120
제 1 항 실험재료 및 방법	120
1. 복합제제(미생물과 식물성 추출물)의 사료내 안정성 검증	120
2. 복합제제(미생물과 식물성 추출물)의 분내 암모니아 발생 억제 효과 검증	120
3. 복합제제(미생물과 식물성 추출물)의 열 안정성 검증	121
4. 복합제제(미생물과 식물성 추출물)의 pH 변화에 따른 안정성 검증	121
5. 대량 생산시 품질평가 관리 및 평가방법 구축	122
6. 돼지의 사육 성적 및 번식 성적 검증	123
제 2 항 실험 결과	128
1. 복합제제(미생물과 천연물 제제)의 사료내 안정성 검증	128
2. 분체복합화된 생균제 첨가물의 안정성과 효능 검증	130
3. 복합제제(미생물과 천연물 제제)의 열 안정성 검증	130
4. 복합제제(미생물과 천연물 제제)의 pH 변화에 따른 안정성 검증	130
5. 대량 생산시 품질평가 관리 및 평가방법 구축	134
6. Artificial slurry를 이용한 생산제제의 ammonia 발생 억제 효과 평가 방법 구축	134
7. 돼지의 사육 성적 및 번식 성적 검증	137

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도	141
제 1 절 천연물, 미생물 urease inhibitor와 urease 생성 억제 미생물 균주의 선발 및 효능의 동물실험 검증	141
제 2 절 선발 제제와 균주의 복합화 및 동물실험 검증	142
제 3 절 신개발 제제의 현장적용실험	144
제 5 장 연구개발 계획의 활용계획	146
제 1 절 추가 연구의 필요성	146
제 2 절 타 연구에의 응용	146
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	147
제 7 장 참고문헌	148

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

돈사에서 발생하는 악취의 원인인 ammonia는 분·뇨내 존재하는 urea가 urease에 의해서 분해되면서 생긴다. 본 과제의 목적은 이러한 urease의 활력을 억제하는 urease inhibitor를 천연물 추출과 미생물에 의한 생성을 통해 생산, 제품화 하는데 있다. 제품화된 urease inhibitor는 암모니아, 악취제거 등 환경오염 개선을 위한 기능성 성분은 기존의 *Yucca schidigera* 보다 뛰어나면서 가축에게 미치는 부가적인 효과(성장을 증진, 사산자돈 감소, 폐사율 감소, 산란율증가 등)는 더욱 향상시킬 수 있도록 하는 것이 최종목표이다. 또한 미생물 내 urease 생성 억제 물질의 규명과 아울러 steroidal saponin이 함유된 약용식물 부산물을 천연물 추출원료로 사용함으로써 특이한 생리활성기능이 부가된 기능성 축산물 생산이 가능할 것으로 생각된다. 특히 천연물 추출제와 미생물 균주를 이용한 분체복합화 등 synergy 효과를 극대화하는 방안을 이용하여 기존의 유사제품과는 차별화된 효능을 갖는 신제품의 생산을 모색하고자 한다.

제 2 절 연구 개발의 필요성

현재 널리 사용되고 있는 urease inhibitor 물질로는 *Yucca*(유카) 추출물이다. 그러나 원료식물인 *Yucca shidigera*는 사막지대에서 재배되는 식물로서 국내에서 사용하기에는 재료단가가 너무 높아 현실적이지 못하다. 물론 최근에는 국내에서 비닐하우스를 이용한 재배가 이루어지고 있으나 아직도 *Yucca* 추출물 제제의 단가는 사용자에게는 부담이 되고 있다. 경제성면에서 *Yucca*

shidigera를 대체할 수 있는 국산 식물체를 찾아내는 것은 매우 중요하다. 문헌 검색에 의하면 steroid saponin 성분을 지닌 식물체는 녹차, 마, 맥문동, 우슬, 구기자 등 약용식물들로 알려져 있다. 또한 이들이 가진 saponin 성분은 유카의 urease inhibitor 효과와 생리활성효과를 동시에 가질 것으로 추정된다. 따라서 가축의 사양성적 향상뿐만 아니라 기능성 축산물의 생산에도 일조를 할 것으로 사료된다.

천연물 추출제보다 더 높은 경제성을 가지는 것은 미생물 추출 urease inhibitor로서 미국, 캐나다 등 선진국에서는 현재 계속 새로운 물질들의 발견을 보고하고 있다. 선발된 urease 생성 억제 미생물 균주의 경우에는 urease inhibitor 생산의 기반이 될 수 있으며 자체적으로도 가축의 성장, 생산, 번식성적에 좋은 효과를 나타낼 것이며, 배설된 분뇨의 병원균 배출억제와 2차오염문제를 현저히 줄여줄 수 있는 방안이 될 것이다.

이러한 urease inhibitor 제제의 개발은 고용 창출 효과를 수반할 것으로 예상된다. 선발된 천연물은 약용식물 부산물의 추출, 정제에 의해 생산될 가능성이 높아 부산물 가공 공정을 담당할 업체와 인력이 필요할 것으로 사료된다. 또한, 효능이 기존 유카 추출물과 유사하거나 더 좋으면서, 가격 경쟁력이 있는 제품 개발시 내수 뿐만아니라 수출에 의한 외화획득도 가능할 것으로 보인다.

기존의 단순한 암모니아, 탈취효능 물질의 범위를 넘어서, 가축 장내환경을 변화시킴으로써 가축의 사양성적을 개선하면서 환경오염의 근원적인 문제해결을 도모하며, 특히 본 개발물질의 경우에 장내에서 정상적으로 작용할 경우 배설된 분뇨 및 slurry에서 2차적인 처리를 행하지 않아도 된다. 따라서, 본 개발제제의 경우 기능성(약용식물 부산물 추출물) 효과에 의해 가축의 성장, 생산, 번식성적의 개선을 가져올 수 있으며, 더 나아가 기능성 청정 축산물의 생산방안으로 이용될 경우, 축산농가에 있어서 2중의 경제적 효과를 얻게 될 것이다.

기존의 사료업체, 사료첨가제 업체, 축산농가, 가축분뇨처리 시설업체, 가축분뇨의 비료화 업체등에 있어서 본 과제에 의해 개발될 제품은 기능성, 경제성, 환경 등 제반 문제의 해결책으로서 그 필요성이 요구되고 있는 상황이다. 특히

앞으로의 축산관련 사료첨가제, 처리제의 경우에는 전세계적으로 화학합성물질을 배제하고 천연물 위주의 개발 및 생산이 증가 될 것으로 전망되며, 본 개발 제제도 이러한 맥락에서 관련 국내 제반 기술수준을 국제적인 수준으로 도약 시키는데 일조를 할 것으로 사료된다.

제 1 항 기술적 측면

Yucca(유카) 추출물은 urease inhibitor를 함유한 물질로서 장내 그람 음성균 세포막을 파괴하여 urease의 생성을 억제하고, 단백질 분해속도를 조절하여 암모니아의 발생을 저하시킨다. 또한 장벽세포의 손상을 최소화 하여 체조직에 공급되는 산소량을 증가시켜 닭에서는 폐사율 감소, 산란율을 증가시키며, 돼지에서는 태아에 산소공급을 증가시켜 사산자돈이 감소되고 이유전 폐사율이 감소되며, 이유체중의 증가, 돈사내 악취 및 암모니아 제거효과를 나타낸다. Yucca schidigera 추출물은 saponin, Yucca saponin, Yucca extract 또는 이외의 몇가지 상품명으로 불리우고 있다. Yucca schidigera 추출물에서 활성물질은 steroidal saponin이며, 조악한 환경에서 미생물의 성장을 촉진하는 기작에 의해 암모니아와 식이물질의 이용성을 더욱 증진하여, 소화율을 개선하는 것으로 알려져 있다.

Urease inhibitor를 생성하는 미생물 균주의 선발은 자체개발한 urease 활성 검출배지로 신속하게 검색하고, 선발된 균주에서 생성되는 AHA(acetohydroxamic acid), CHPT(cyclohexylphosphoric triamide), PPDA(phenyl phosphorodiamidate) 및 NBPT(n-(n-butyl)thiophosphoric triamide) 등의 urease inhibitor 성분을 검증하고 활성이 높은 균주를 결정하여 제품생산에 이용한다.

양돈 분뇨 slurry내 질소의 절반이상이 뇨중 urea로 배출된다. Urea 질소의 대부분은 microbial urease의 작용에 의해 ammonium carbonate로 변환되어 암모니아로 전환되며 저장중이거나 비료로 사용될 때 증발한다. 따라서

microbial urease inhibitor를 사용하면 암모니아와 hydrogen sulfide의 방출을 억제할 수 있으며 양돈 분뇨에서 암모니아-질소 손실을 효과적으로 방지할 수 있다. Microbial urease inhibitor에는 AHA, CHPT, PPDA 와 NBPT 가 알려져 있다.

Urease 생산 억제 균주의 사용은 생균제와 유사한 기작으로 urease를 생산하는 장내 그람음성균을 줄여서 장내 urease의 생성량 자체를 억제하는 기술이다

유기성 폐기물의 분해능력이 탁월한 미생물균주들을 보유하고 있으며, 분뇨의 주요 냄새 성분인 para-cresol과 skatole의 분해 능력이 우수한 균주들이 선발되어 있고 장내에서 천천히 분해되도록 코팅기술을 이용함으로써 발효시 발생하는 열에 의한 균체 사멸 효과를 억제시킬 수 있는 기술을 적용할 경우 퇴비의 유기비료화 과정에서 잔존 유해균에 의한 2차 감염 및 위해요소를 감소시킬 수 있다.

천연물 및 미생물 추출 urease inhibitor 물질과 urease 생성 억제 미생물 균주의 synergy 효과를 얻기위한 복합제제의 개발은 1차적으로 장내 urease 생성균주의 전체적인 수를 감소시키며, 2차적으로는 urease inhibitor로 알려진 물질이 장내 존재하는 그람음성 세균의 세포막을 파괴하여 암모니아의 생성을 근원적으로 억제하며, 3차적으로는 urease inhibitor 활성물질인 steroidal saponin의 부가적 효과로 장관벽세포의 손상 최소화에 의한 체조직에 공급 산소량의 증가에 의한 가축의 사육 및 생산성적의 개선을 도모할 수 있을 것으로 추정된다.

축산분뇨 및 폐기물을 분해할 수 있는 천연물 및 생물학적 제제로서 폐기물의 환경오염 및 고가의 처리비용을 절감하고 폐기물의 매립, 소각에 의한 2차 감염 가능성과 폐기물의 악취를 효과적으로 줄이고 코팅기술을 통하여 생균의 활성을 유지시킨 제품으로서 낮은 생균수에 의한 시판 생균제의 미미한 효과에 뚜렷이 대비되는 제품으로서 최근 농림부에서 발표한 분뇨처리에 대한 규제 강화 시행에 적절이 부합된다.

제 2 항 경제 · 산업적 측면

기존 축산분뇨의 암모니아 발생 및 악취문제의 해결과 함께 효과적인 질소 유기질 비료제조에는 세가지 방안이 시도되고 있다.

첫 번째로 합성제제이다. 이는 제품가격은 낮으며 국지적인 부분(악취 원인 물질 자체의 중화 등)의 문제해결이 가능하나, 악취 및 암모니아 발생을 근원적으로 제거하기 어려우며, 가축생체내에서의 생리적인 부가적효과가 미미하다.

두 번째로, 천연물 및 그 추출정제물로서 대표적인 물질로 *Yucca schidigera*의 추출(정제)물을 들 수 있다. Urease inhibitor로서의 효과면에서 우수성이 입증되었으나, 기본적으로 사막에서 서식하는 식물이므로 생산 단가가 많이 들어가 제품의 가격이 높은 실정이다. 따라서 *Yucca schidigera*의 urease inhibitor 물질을 가지는 대체 식물의 천연물이 요구되고 있다.

세 번째로 미생물 대사물질 정제로 microbial urease inhibitor의 개발이 시도되어오고 있으며, *Yucca*(유카) 추출물의 특성과 같이 그람음성균 세포막의 파괴에 의해 urease의 생성을 억제하는 기작을 갖고 있다. 그러나 연구와 실용화는 아직 초보적인 단계에 머물러 있다.

앞서 설명한 천연물 및 미생물 추출 urease inhibitor 물질과 urease 생성 억제 미생물 균주의 synergy 효과를 얻기위한 복합제제의 개발은 기존의 세가지 해결방안 중 천연물 및 그 추출정제물과 미생물 대사물질의 방법을 충족하면서, urease를 생성하는 미생물군의 잔류와 화학합성제제 잔류를 최소화 함으로써 질소 유기질 비료 생산시 식물체나 인체로의 2차 오염을 방지할 수 있을 것으로 사료된다.

본 과제를 통하여 생산된 제품은 저장성이 우수하여 국내뿐만 아니라 해외로 수출될 수 있는 높은 가능성을 내재하고 있으며 현재 국내 사료시장이 2조원 이상임을 감안하여 볼 때 기술집약적인 고부가가치 사업으로의 성장이 예상된다.

제 3 항 사회문화적 측면

우리나라의 축산규모는 지속적으로 발전하여 2000년 6월 통계에 의하면 소, 돼지를 기준으로 509천호의 농가에서 10,375천두 사육 규모로 성장하여 왔다. 규모의 성장과 함께 환경문제가 대두되어 축산분뇨처리가 농장경영의 최대 관심거리가 되고 있다.

표 1. 축산분뇨 발생현황

구 분	발생량	비율(%)	오염부하량 (BOD 기준)	비율
생활오수	15,463천톤/일	78	3,093톤/일	46
산업폐수	4,065	21	2,629	39
축산폐수	193	1	985	15
계	19,724	100	6,707	100

최근 효과적인 축산분뇨의 환경오염방지 및 유기질 퇴비로의 전환이 요구되고 있다. 이에 따라 사료내에 생균제첨가가 이용되고 있으나, 그 효과가 확실히 규명된 바가 없으며, 암모니아 발생 및 악취의 근본적인 해결책은 될 수 없다.

특히, 축산폐수의 심각성이 대두되는 이유는 생활하수의 오염부하량이 L 당 200mg인데 반해 축산폐수는 L 당 1-2만mg으로서 50-100배 가량됨으로서 발생량에 비해 오염부하량이 크다는 것이다.

표 2. 전국의 1일 축산폐수 발생량

구 분	허가대상	신고대상	규제미만	계
축산농가(천호)	7	46	456	509
사육두수(천두)	4,927	3,189	2,259	10,375
분, 뇨(천 m ³ /일)	36	41	38	115
폐수량(천 m ³ /일)	67	67	66	200

표 3. 축산폐수 처리시설의 방류수 수질기준

() 수질보전특별지역의 적용기준

		축산폐수 공동처리장	개별농가		
			허가대상	신고대상	간이대상
과거 (~1999.1 2.31)	BOD(mg/L)	30	150(50)	500(350)	1,500
	SS(mg/L)	30	150(50)	500(350)	1,500
	T-N(mg/L)	120	-	-	-
	T-P(mg/L)	16	-	-	-
현재 (2000.1.1 ~)	BOD(mg/L)	30	150(50)	350(50)	-
	COD(mg/L)	50	-	-	-
	SS(mg/L)	30	150(50)	350(150)	-
	T-N(mg/L)	60	-(260)	-	-
	T-P(mg/L)	8	-(50)	-	-

축산폐수의 심각성과 장기적인 환경오염의 방지측면에서 축산폐수 처리시설의 방류수 수질기준도 2000년 1월부터 대폭 강화되었으며(표 3), 정기적인 검사에서 이 기준에 미달된 농가는 규제조치 될 예정이다.

국가적으로 현재 수입 유카추출물 및 원료를 계속 사용하거나, 환경처리미생물 및 제제를 수입품에 의존하는 것은 폐수처리 시설전문업체에 한해서는 어느정도 적용이 가능하겠지만, 장기적으로는 경제성에 있어서 문제시 될 수 밖에 없으며, 산업기반이 취약한 축산농가에서는 현실적인 적용이 어려울 것으로 사료된다.

우리나라의 경우 Yucca 추출물의 주요성분인 steroidal saponin을 갖는 식용식물과 약용식물 자원이 매우 풍부하다. 특히 기존에 steroidal saponin 성분이 함유된 식물체의 검색은 많이 진행되어 있으므로 이들중 urease inhibitor 활성을 가진 식물의 선발이 가능할 것이다(녹차부산물, 각종 차, 한약제 부산물, 인삼부산물 등).

또한, 우리나라의 경우는 4계절이 모두 존재하기 때문에 urease 생성 억제 미생물 균주의 경우에 넓은 온도범위에서의 적용이 가능한 것을 선발해야 할 것이며, 이러한 미생물에서 추출된 urease inhibitor 물질의 성상 및 기능성 또한 기존의 수입품과는 현저히 다를 것으로 추정된다.

제 3 절 연구 개발의 범위

제 1항 천연물, 미생물 urease inhibitor와 urease 생성 억제 미생물 균주의 선발 및 효능의 동물실험 검증

- 천연물 urease inhibitor 제제 개발
 - Steroid saponin을 함유한 식물체 검색
 - 검색된 식물의 추출물에서 urease inhibitor 활성 검증
 - 선발된 식물추출물의 경제성 및 효능 검토
- Urease 생성 억제 미생물 균주 개발
 - Urease 생성 미생물 균주의 검색
 - Urease 생성 억제 미생물 균주의 선발
 - Urease 생성 억제 미생물 균주의 활력 검증
- Microbial urease inhibitor 제제 개발
 - Urease 생성 억제 미생물 균주의 urease inhibitor 효능 규명
 - 미생물의 정제, 회수에 의한 microbial urease inhibitor 물질의 추출
 - microbial urease inhibitor 물질의 활성 및 효능 검증
- 선발제제 및 균주 효능의 동물실험 검증
 - 선발제제들의 사료내 안정성 검증
 - 선발된 제제들을 돼지(자돈)에게 급여한 후 성장률, 분만자돈의 혈중 산소량과 함께 장내 urease, urease inhibitor activity 및 암모니아 함량 측정
 - 실험자돈에서 배설된 slurry의 pH, 암모니아, BOD, C/N 등 환경오염 지표의 측정

제 2항 선발 제제와 균주의 복합화 및 동물실험 검증

- 선발제제 및 균주의 생산조건 확립
- 선발제제 및 균주의 복합화 조건 확립
- 선발제제 및 균주의 건조 및 분말화(활력 및 효능검증)

- 선발제제와 균주의 동물(자돈 or 모돈) 실험 검증
- 자돈의 사양성적(성장률, 섭취량, 사료효율, piglet O₂ 등)
- 모돈의 사양성적 및 번식성적(생존시자돈수, 이유자돈성적, 재발정 등) 검증

제 3항 신개발 제제의 현장적용실험

- 신개발 제제의 현장적용(가축농가-양돈)실험
 - 돼지의 사양성적 및 번식성적 검증
 - 돈사 내 암모니아 가스 측정
 - 분뇨 내 urease 및 암모니아 함량 측정
 - slurry 내 pH, 암모니아, BOD, COD, C/N 등 측정
- 신개발 제제의 현장적용(가축농가-양돈)실험
- 신개발 제제의 품질검증
 - 양산된 개발제제의 품질평가
 - 대량생산시 품질평가 관리 및 평가방법 구축

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내외 기술개발 현황과 제품 현황은 다음과 같다.

Micro-Aid®는 유카추출물 제제(urease inhibitor)로 가축사양성적 향상과 암모니아 및 악취제거에 효과가 있다. MERRICK'S, INC.사에서 개발한 SOWEENA® (유카추출물 제제인 Micro-Aid를 다른 생리활성물질, 기능성 사료첨가제와 배합하여 양돈용 첨가제로 만든 제품)이다. Illinois university의 Corp science department에서 개발한 AgrotaiN®은 urease inhibitor의 효과와 nitrification-inhibitor의 효과를 가지는 제품이다.

고농도 정제 유카추출물을 mineral carrier에 흡착한 제품을 Dinatex Inc.가 개발하여 Dynase®라는 제품으로 팔고 있다. 이 제품의 특징은 urease activity 억제하여 분뇨내 암모니아 가스 발생 감소시키고 PVDO(portal vein drained organs) mucosal tissue over rate 감소 및 oxygen과 nutrient demand 감소로 성장개선 및 사료효율개선, 성성숙, 산자수, 산란율, 사양성적 개선등 부가적 효과를 얻고 있다.

캐나다의 University of Guelph에서는 암모니아와 Hydrogen Sulfide(H₂S) 조절제로 미생물 urease inhibitor로 양돈 slurry 첨가제 개발연구를 진행하고 있다.

Yucca schidigera와 그것의 수용성 추출물은 사람과 가축 모두에 대한 식이 물질로서 그 안전성과 기능성에 대해 오래전부터 검증이 이루어져 왔다. 60년 전에 미국 남서부에서 수행된 사양실험에서 Yucca는 소에게 유용한 조사료임이 밝혀졌다. 1965년에 Yucca schidigera는 제한없이 식품에 사용할 수 있는 것으로 알려졌다. 이 실험은 산업체가 아닌 미국 FDA에서 수행되었다. Yucca schidigera 추출물은 미국 음료산업에서 천연적인 기포제로 가장 널리 사용되고 있으며 90년대 들어서 환경오염인식이 확산되면서 urease inhibitor 물질로 암모니아, 악취제거제로 주목받기 시작했다. 최근에는 가축의 사양성적, 번식능력등과 관련해서 부가적인 효과가 있다는 연구결과가 보고되고 있다.

식물체에서 steroid saponin의 존재를 확인하는 연구와 식물에 대한 유의적

효과에 대한 연구는 40년전에 프랑스과학자에 의해 보고되었다(Balansard and Peillissier, 1943).

분뇨의 냄새제거와 질소비료화시 효능개선 물질개발은 urease inhibitor의 작용으로 ammonia 방출 감소, 악취(odor)제거물질을 CHPT(cyclohexylphosphoric triamide) / PPDA (phosphorodiamidate) / NBPT (n-(n-butyl) thiophosphoric triamide) 등의 혼합물을 전분이나 다른 보호 물질로 encapsulation 하여 적절한 분해능을 부여하는 연구가 수행중이다(미국 USDA-ARS, Vincent H. Varel ; Meat Animal Research Center, Roman L. Hruska).

국내 현황으로는 기개발된 처리제제(주로 생균제, 미생물제제)를 축사내 분뇨 slurry 살포나 축분의 비료화 시기에 주로 적용하고 있으며, 최근에 Yucca 추출물과 같이 사료내 첨가물을 이용한 장관내 환경변화를 통해 근원적인 오염원의 차단에 관심을 가지고 있는 실정이다.

국내 개발 제품의 효능은 유카(Yucca) 추출물의 효능검증이 미약하며 활성화 과 품질관리 불량, 미생물 균주의 경우 균의 활력 부진, 생균수 저하, field 적용시 효력 미지수 (생육조건의 제한), 별도의 보조장비나 시설에 의해 처리능력이 달라짐(시설비용 추가 가능성), 미생물 제제 처리시 독성이나 유기물질 자원화(퇴비) 후 시비과정에서의 인체 2차 감염이나, 식물에 의한 간접 섭취영향(3차 감염)에 대한 고려가 미미하고, 기술 또한 단순한 균주의 제공만을 하고 있다. 특히, 업체간에 가격차이 심하여 3,500원- 45,000원/kg정도 이다.

국내에서 개발되어 판매되고 있는 제품은 아래와 같다.

신한축산에서는 유카(Yucca) 추출물 (원료를 수입하여 추출물 제조 후 사료첨가제로 공급)로 원모아 / 크린에어, 데저트킹((주)Desert King Korea)에서는 자체적인 유카재배농장(신기농장)을 이용한 유카추출물 제조 판매, LG 상사에서는 Microbe-Lift (미생물 환경처리제), (주)제노바이오텍의 엔피드(양돈용) / 엔그린(축산폐수 처리제용), 호일엔지니어링의 슈퍼바이오 2-Q, 슈퍼바이오 2-M, 엔바이오제네시스의 HAN BIO-O, HAN BIO-GR, 그린바이오텍의 가축분뇨 처리 미생물, 고려바이오연구소의 오,폐수처리용 종균제, 엔비텍의 폐수처

리미 샘플제 Premo-DA / CAMO-DA / Micro-D/ Micro-Fantasia가 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 천연물, 미생물 urease inhibitor와 urease 생성 억제 미생물 균주의 선발 및 효능의 동물실험 검증

제 1항 실험재료 및 방법

1. 천연물 확보 및 전처리

Urease inhibitor 함유 천연물을 검색하기 위해서 이미 그 구조들이 알려진 식물성 화합물질인 phytochemical 50여종과 다양한 기능을 보유한 것으로 알려진 20여종의 천연물 추출물을 확보하여 urease inhibitor 활성을 1차적으로 검색하여 선발하였다.

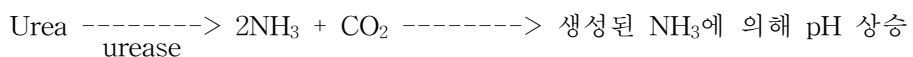
검색에서 1차 선발된 천연물 중에서 생산 현장에 적용하기 용이한 천연물을 대상으로 urease inhibitor 활성을 갖는 천연물을 선택하기 위해, 열수 추출법 (80°C, 60분)을 사용하여 얻어진 추출물을 농축하여 urease inhibitor 활성을 측정함으로써 최종 선발하고자 하였다.

2. 스크리닝 방법

Urease inhibition 활성을 측정하기 위한 방법으로,

① phenol red 법은 Shinichi와 Kobayashi 등에 의해서 설명한 바와 같이 암모니아 생성에 의한 pH의 변화를 확인하는 방법으로서, 반응전에 urease inhibitor나 candidate의 pH를 맞추어 주어야 한다.

Phenol red 법



---> 생성된 NH₃에 의해 상승한 pH를 phenol red의 변색으로 측정

또 다른 방법은 Fawcett 과 Scott, 그리고 Chaney와 Marbach에 의한 방법에 기초한 indole-phenol을 이용한 방법으로서, 암모니아 흡착효과를 가진 물질도 false positive 하게 나올 수 있다는 단점을 가지고 있다

Indole-phenol 법

Urea -----> 2NH₃ + CO₂ -----> 생성된 NH₃와 발색시약과의 반응
urease

---> indole blue 생성 -> 색깔변화 확인으로 NH₃ 발생 확인

따라서, 각각의 실험 방법이 가지는 단점을 보완하기 위해 두 가지의 방법을 모두 사용하였으며, 두 방법 모두에서 urease inhibitor 활성을 보이는 시료만을 선별하였다. 또한 urease inhibitor로 잘 알려진 합성물질인 acetohydroxamic acid (AHA)를 positive control로 사용하여 실험 결과를 비교하였다.

3. Urease 활성을 억제하는 천연물의 건조 및 분말화

녹차엽의 열수 추출을 위하여 녹차엽 10g을 50ml의 증류수를 이용하여 추출하였다. 녹차엽 열수 녹차엽 열수 추출물의 온도에 따른 추출정도를 확인하기 위하여 60~90℃에서 1시간씩 추출하였다. 또한, 추출 시간에 따른 추출 정도를 확인하기 위하여 열수 추출물의 추출 시간을 30분부터 10분간격으로 하여 1시간 30분까지 추출하였다. 각각의 추출된 녹차엽 열수 추출물은 AHA의 활성을 비교하였다. 또한 건조방법에 따른 차이를 확인하기 위하여, 녹차엽의 열수추출물을 동결건조와 spray dry 방법으로 건조하여 urease inhibiting activity를 AHA와 비교하여 보았다. 또한, 녹차엽 열수 추출물의 유효성분의 함유량을 조사하기 위하여 녹차엽 건조물과의 urease inhibitor 활성을 비교하여 보았다.

4. Urease 활성을 억제하는 천연물의 생산 최적화

전 실험에서 확인된 열수추출의 최적 조건을 이용하여, 2kg의 녹차엽을 80℃의 열수 10L에서 60분간 추출하는 조건으로 추출하였다. 또한, 생산시 소요되는 비용과 녹차엽 건조물의 생산비를 비교하였다.

5. Urease 활성을 억제하는 천연물의 생산

60℃의 열풍을 이용하여 녹차엽을 건조하고 이를 분쇄하여 녹차건조물을 생산하였다.

6. Urease 생성 억제 천연발효물의 획득 및 검색

기존 돈사 및 계사내 환경개선에 효과가 있는 것으로 알려진 천연 발효물 및 효모 혼합 배양물들을 대상으로 돼지의 분과 노를 각 개체별로 1:2의 비율로 혼합하여 제조된 slurry를 이용하여 ammonia의 감소효과에 대해 검색하였다. 천연 발효물 및 효모 혼합 배양물을 일반적으로 사용되는 사료첨가제의 농도인 0.2%와 일반적 농도의 10배인 2.0%를 첨가하여 0시간, 8시간, 24시간동안 37℃ incubator에서 배양한 후 암모니아의 감소를 측정하였다. 20여종의 천연 발효물 및 효모 혼합 배양물에 대하여 암모니아의 감소에 효과가 있는 것을 대상으로 미생물을 분리 및 동정하여 urease 억제 미생물로 선별한다.

Slurry내 ammonia의 감소는 Collins와 Falkow 및 Chen등이 사용한 방법을 변형하여 Berthelot's reaction에 기초하여 indole-phenol법으로 측정하였다. 배양된 slurry를 4℃에서 12000g로 5분간 원심분리하여 측정시까지 -20℃에서 보관하였다. 상등액은 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.01, 1mM EDTA)를 이용하여 100배 희석하여 측정하고 희석되어진 300 μ l의 시료에 phenol-nitroprusside reagent와 hypochlorite reagent를 각각 600 μ l를 혼합하여 60℃ 항온배양진탕기에서 10분간 반응 시킨 후 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정한다. 반응이 끝난 후 시료를 1:2(시료 : 3차 증류수)의 비율로 희석하여 흡광도는 630nm에서 측정한다. 표준 곡선은 10⁻³~10⁻⁴mM NH₄Cl를 이용하여 결정하였으며 시료의 암모니

아 농도를 표준곡선에 의한 방정식에 의거하여 측정하였다.

7. Urease 생성 억제 미생물 균주의 검색 및 선발

암모니아의 감소에 효과가 있는 천연 발효물 및 효모 혼합 배양물로부터 YM agar(pH 7.0) 및 bacillus agar(pH 7.0), MRS agar(pH 6.5)를 이용하여 streaking 한후 25°C incubator에서 배양하여 미생물을 배양한 뒤 형성된 colony를 분리하여 YM broth(pH 7.0) 및 bacillus broth(pH 7.0), MRS broth(pH 6.5)에 배양하였다. 분리된 미생물은 각각 2차 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 각각의 상등액은 pH를 6.80 ± 0.05 로 조정하여 2000rpm에서 20분간 원심 분리한 후 0.45 μ m microfilter (Sartorius)를 사용하여 filtration하여 동결건조하여 0.1M Tris-HCl buffer(pH 6.8)에 현탁하여 농축한 상등액을 이용하여 urease test를 실시하였다.

YM agar와 Bacillus agar의 조성은 표 4과 표 5와 같고 pH는 7.0 ± 0.05 로 조정하여 사용하였다.

표 4. Composition of YM agar

Ingredient composition of medium	g/L
glucose	10.0 g
protease peptone	5.0 g
malt extract	3.0 g
yeast extract	3.0 g
agar	15.0 g

표 5. Composition of Bacillus agar

Ingredient composition of medium	g/L
(NH ₄) ₂ PO ₄	1.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
KCl	0.2 g
yeast extract	0.2 g
glucose solution*	50 mL
agar	15.0 g

* Glucose 10.0g/D.W 100mL

Urease 억제 정도는 2% urea와 0.2% phenol red가 함유된 buffer에 urease가 포함되어 있는 것을 대조구로 하여 buffer의 알칼리화에 의해 변색되는 정도를 560nm 파장의 분광광도계를 이용하여 측정하였고, 대조구에 비하여 붉은색으로 변하지 않는 것이 urease 억제능이 있는 것으로 선별하였다.

Urease 생성 억제 미생물 균주의 선별은 상업적으로 판매되는 Jackbean urease(Sigma) 및 Bacillus pasteurii urease(Sigma)를 이용하여 urease 억제 정도를 측정하였으며, urease에 의해 분해되어 발생하는 암모니아의 양을 대조군과 비교하여 urease inhibitor를 검색하였다. Urease 생성 억제 미생물 균주의 검색은 phenol red방법에 의해 측정하였다. 분리된 미생물의 상등액의 pH를 각각 6.80 ± 0.05 로 조정하여 동결 건조하여 0.1M Tris-HCl buffer(pH 6.80)에 용해하여 상등농축액으로 사용하였다. urea 2%와 phenol red 0.2%가 함유된 0.1M Tris-HCl buffer(pH 6.80)를 이용하여 상등농축액을 첨가하여 urea가 urease에 의해 분해되어 생성되는 ammonia에 의해 buffer내 pH의 변화에 흡광도를 측정하여 urease inhibitor를 대조군과 비교하여 inhibition %을 조사하였다. 억제 정도가 7% 이상인 것을 urease 억제 미생물로 선별하여 실험에 사용하였다.

Urease inhibition 능력이 우수한 미생물에 대해 현미경 및 API 20C AUX와 API 50 CH test kit(bioMerieux)사용하여 검색하고 그 결과를 ATB Plus program을 이용하여 동정하였다.

8. Urease 생성 억제 probiotics의 검색 및 선별

실험실에서 기소장하고 있는 probiotics와 동물 및 사람의 분변으로부터 분리된 유산균주를 대상으로 urease 생성 억제 실험을 실시하였다. 기소장 균주는 MRS broth(Difco)를 이용하여 2차 계대배양하여 얻어진 상등액을 사용하였다. 새롭게 동물 및 사람의 분변으로부터 MRS agar(Difco)에 streaking하여 단일 colony를 MRS broth에 배양하고 이를 Gram 염색을 실시하여 Gram 양성인 균의 미생물을 분리하여 catalase test를 통하여 분리하여 배양하였다. 각각 배양된 상등액은 pH를 6.80 ± 0.05 로 조정하여 2000rpm에서 20분간 원심분리한 후 0.45 μ m microfilter(Sartorius)를 사용하여 filtration하여 동결건조하여 0.1M

Tris-HCl buffer(pH 6.8)에 현탁하여 농축한 상등액을 이용하여 phenol-red법을 통하여 urease test를 실시하였다.

9. Urease 생성 억제 미생물 균주의 활력 검증

Urease 억제에 효과가 있는 것으로 판명된 미생물에 대하여 균액 2%(효모), 1%(유산균)를 접종하여 25℃(효모), 37℃(유산균) incubator에서 계대 배양하며 각각의 미생물의 총균수를 측정하여 미생물 균주의 활력을 측정하였다. 총균수의 측정은 10진 희석법에 의한 혼합희석평판배양법(pour plate method)을 사용하여 YM agar 및 MRS agar에 25℃, 37℃(유산균) incubator에서 48시간 배양하여 계수하였다.

10. Urease 생성 억제 미생물 균주의 urease inhibitor 효능 규명

Urease inhibitor 활성의 신속 평가 기술

Urease 생성 억제 미생물의 urease inhibitor 효과 검증은 phenol-red법을 사용하였다. Urea 2%와 phenol red 0.2%가 함유된 0.1M Tris-HCl buffer(pH 6.8) 500 μ l에 미생물 균주 배양액의 농축상등액을 100 μ l를 희석한 후 deionized water를 375 μ l 첨가하고 urease(80 units/ml)를 25 μ l 첨가하여 최종적으로 1ml가 되도록 한 후 37℃ 항온배양진탕기에서 30분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하여 억제 정도를 대조군과 비교하여 측정하였다.

모든 실험은 3반복하여 실시하였으며, Jackbean urease와 Bacillus urease에 대하여 동시에 실험하였고, 사용되는 시약과 효소는 뚜껑이 있는 tube를 사용하여 사용 전·후에 반드시 뚜껑을 닫도록 하며 ice-cooled water에 보관하여 사용하여 효소 및 urea의 자연 분해를 방지토록 하였다.

실험에 사용된 상등액은 pH를 6.80로 조정하여 사용하였으며, 반응을 마친 후에 spectrophotometer를 이용하여 560nm파장에서 흡광도를 측정하였다. Phenol red법에 대한 검증실험으로 urease inhibitor인 AHA(Aceto-hydroxamic acid) 및 boric acid, cystamine등을 이용하여 방법적인 검증 및 urease의 억제 효과 percentage를 확인하였다.

11. Urease 억제 미생물 균주의 urease inhibitor물질의 생산 최적화

천연 발효물로부터 분리된 효모균종을 대상으로 표 6과 같은 배지 및 환경의 조정을 통하여 미생물균체의 생산 최적화 및 urease 억제물질의 성장별 생산 최적화 조건을 결정하여 미생물의 small-scale 및 대량 생산에 적용하였으며, pH, temperature, aerobic/anaerobic 조건을 조합하여 총 15가지의 조건으로 배양하여 미생물 균체 및 urease 억제정도를 측정하였다.

표 6. Levels of independent variables for experimental design

X _i	Independent variables	Levels		
		-1	0	1
X ₁	broth pH	4	6.5	7
X ₂	temperature(°C)	25	30	35
X ₃	aerobic/anaerobic		+/-	

위의 조건으로 각각의 미생물을 배양하면서 약 72시간동안 배양하며 가장 urease 억제의 효과가 좋은 조건을 결정할 것이며, 예비로서 가장 억제 능력이 좋은 *Candida krusei/inconspicua* 204균주를 이용하여 YM broth(pH 7.0)에서 72시간동안 배양하면서 매 4시간마다 상등액 및 미생물을 채취하여 동결건조에 의한 농축을 실시하고 총균수를 측정하였다. 시간에 따른 총균수에 각 성장구간 별 생성된 상등액에서의 urease의 억제 효과를 알아보았다.

Urease에 대해 가장 많은 억제 효과를 보이는 조건 및 구간을 urease 억제물질의 생산에 가장 적절한 시기로 결정될 것이며, 대량 생산시에 가장 효율적인 배지 조성에 대해 경제성을 고려하여 배지 성분을 결정하였다. 각 구간별 urease inhibitory effects는 측정하고, 가장 최적화된 배지의 조성도 결정되었다.

유산균의 대량생산은 실험실에서 이미 확립되어진 방법을 이용하여, 배양시간을 길게 하여 각 시간별 urease 억제 물질의 생산에 가장 적당한 배양시간을 결

정하였다.

12. 미생물의 정제, 회수에 의한 microbial urease inhibitor 물질의 추출

-단백질의 분리

Urease inhibitor 활성을 갖는 미생물 균주의 상등액을 동결 건조하여 0.1M Tris- HCl buffer(pH 6.8)를 이용하여 현탁한 뒤 투석하였다. 투석과정을 거친 상등액을 ammonium sulphate 또는 methanol로 단백질을 침전하여 gel-chromatography를 이용하여 단백질을 회수하였다. 회수된 각 fraction을 phenol-red법 및 indole-phenol법으로 urease inhibitor test를 실시한 후 효과가 검증된 fraction을 reverse-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC)를 통하여 분석 및 분리하였다.

-탄수화물의 분리

Urease inhibitor 활성을 갖는 미생물 균주의 상등액을 동결 건조하여 0.1M Tris- HCl buffer(pH 6.8)를 이용하여 현탁한 뒤 100℃에서 30분간 가열하여 상등액내의 효소의 활성을 제거한 뒤 12,000g로 30분간 4℃에서 원심분리후 95% ethanol을 이용하여 3회 침전 하였다. 침전물은 12,000g에서 30분간 원심분리하여 회수한뒤 Tris-HCl buffer(pH 6.8)으로 현탁한 뒤 3차 증류수를 이용하여 투석을 실시한다. 상등액 내에 단백질과 존재하는 탄수화물을 10%(w/v) trichloroacetic acid(TCA)를 사용하여 단백질을 침전 시켜 제거한뒤 상등액을 다시 3차 증류수에서 4℃에서 투석을 실시하였다. 투석으로 얻어진 투석물은 분석시까지 -20℃에서 보관하도록 하며, 투석물을 이용하여 HPLC를 통하여 배지내 탄수화물의 조성 및 함량을 측정하고 각 fraction을 회수하여 urease 억제 실험을 실시하였다.

-Organic acid

Organic acid는 chloroform을 사용하여 상등액을 stir하며 chloroform에 organic acid가 용해되도록 하며, 용해된 organic acid를 12,000g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 회수하여 HPLC를 통하여 물질을 확인하고 각 fraction별로

urease 억제 실험을 실시 하였다.

13. 천연물 추출 제제와 미생물 균주의 동물실험 검증

선발된 천연물 urease inhibitor(녹차엽 열수 추출물, Green Tea Extract)를 세가지 수준으로, urease inhibitor 생성 미생물 균주(*Candida krusei/inconspicua* 204)를 세수준으로 하여 이유자돈에게 급여한후 성장률과 장내 urease inhibitor activity 및 분·뇨 내 암모니아 함량을 측정하였다.

가) 실험사료

실험사료로는 일반시판사료를 이용하였고, 사료배합표는 표 7과 같다.

나) 공시동물

이유자돈 - 사양실험용 140두(7처리X5반복X4두)

장내용물 채취용 56두(7처리X4반복X2두)

다) 실험처리

대조구(control) : 이유자돈 사료

처리 1(GTE 1) : 대조구 사료 + urease inhibitor 함유 천연물 0.1% (Green Tea Extract, GTE)

처리 2(GTE 2) : 대조구 사료 + urease inhibitor 함유 천연물 0.2% (GTE)

처리 3(GTE 3) : 대조구 사료 + urease inhibitor 함유 천연물 0.4% (GTE)

처리 4(M 1) : 대조구 사료 + urease inhibitor 생성 미생물 균 0.1% (*Candida Krusei/inconspicua* 204)

처리 5(M 2) : 대조구 사료 + urease inhibitor 생성 미생물 균 0.2% (*Candida Krusei/inconspicua* 204)

처리 6(M 3) : 대조구 사료 + urease inhibitor 생성 미생물 균 0.4% (*Candida Krusei/inconspicua* 204)

라) 사료급여

자유급식 (1주일 단위로 사료섭취량 측정)

마) 측정항목

사료섭취량, 체중

바) 분·뇨의 채취

사양실험 개시전 돈사를 청소하여 돈사내 분·뇨를 제거한후 실험 종료시 돈사내 분뇨의 혼합된 형태인 slurry를 채취하였다. 또한, 장 내용물 채취를 위한 56두의 개체는 사양실험 종료후 각각의 개별 cage로 옮겨, 분과 뇨를 분리하여 채취하였고, 3일후 도살하여 장 내용물을 채취하였다. 채취된 장 내용물은 즉시 container에 옮겨 4℃에서 보관후 urease inhibitor activity와 ammonia의 양을 측정하였다.

Table 7. Composition of experimental diet

Ingredient	%
Corn	38.40
Soybean Meal	37.76
Wheat	20.00
Tallow	2.50
Wheat Hull	6.22
Dicalcium P.	1.00
Limestone	0.32
Mineral Mix. ¹	0.20
Vitamin Mix. ²	0.20
Salt	0.20
Antibiotics	0.20
Calculated Value	
ME, kcal/kg	3362
Crude protein, %	20.35
Ca, %	0.74
Phosphorus, %	0.69
Lys, %	1.12
Met+Cys, %	0.69

¹ The mineral contents of Mineral Mix. were met or exceeded the requirements of NRC(1998).

² The vitamin contents of Vitamin Mix. were met or exceeded the requirements of NRC(1998).

14. 천연물 추출 제제와 미생물 균주의 slurry내 효과 검증

사양실험 기간중 채취한 slurry와 개별 cage에서 채취한 분과 뇨를 Cahn 등 (1998)의 방법으로 분과 뇨를 1:2.5의 비율로 섞어 인공 slurry를 제조후 ammonia 발생정도와 pH의 변화를 측정하였다. Cahn 등(1998)의 방법을 변형하여 사용하였다. 먼저 2kg의 수거된 slurry를 내부 용량이 3000cm³인 용기에 넣은 후 뚜껑을 덮었다. 뚜껑에 silicon tube를 연결하여 공기가 통하도록 하였다. 70mL의 HNO₃(1M)가 들어있는 두 개의 집진장치를 설치하여 발생하는 암모니아를 포집하였다. 공기의 유입은 peristaltic pump를 이용하여 분당 4.2L의 공기가 유입되도록 하였다. Slurry의 pH는 slurry가 들어있는 용기의 뚜껑을 제거후 pH meter를 이용하여 측정하였다. 또한, 선발된 물질의 효과를 검증하기 위하여 대조구의 분과 뇨를 이용하여 인공 slurry를 제조한후, 선발된 물질과 균주를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0% 첨가하여 ammonia 발생 정도와 pH를 측정하였다.

제 2 항 실험결과 및 고찰

1. Urease 활성을 억제하는 천연물의 1차 선별

다양한 경로를 통해 확보된 70여종의 시료 중 두 가지 방법 모두에 positive 한 결과를 나타내는 5개의 시료를 얻었다. 그 중에서 단일 phytochemical 인 vitamin C와, 녹차 정제품 (purified green tea, PGT), 포도씨 추출물 1(grape seed polyphenol, GSP)와 포도씨 추출물 2(grape seed, a depolyphenolized product, GSM), 메밀껍질 추출물 (bulk-wheat, depolyphenolized product, BWP)에서 urease inhibitor 활성을 확인할 수 있었다.

먼저, 그 구조가 알려진 vitamin C는 천연물 유래 화합물 (phytochemical) 이었고 이는 항산화제 (antioxidant)로 잘 알려진 것이다. 1991년 Nilius M 그룹에 의해 밝혀진 바에 의하면 본 실험과 유사한 조건에서 DDW에 녹인 vit. C, 0.5 mg/ml과 vit. C, 0.5 mg/ml + Cu^{2+} , 1 mg/ml 각각이 urease의 활성을 완벽히 저해했다는 보고가 있다. 본 연구에서도 5 mM(약 0.9 mg/ml)의 vit. C를 사용한 경우 거의 100 %의 urease inhibitor 활성을 확인할 수 있었다(그림 1). 문헌과 본 연구 그룹의 실험 결과를 토대로 고찰해 보면, 항산화 효과를 가지는 phytochemical vit. C가 urease inhibitor 역할을 하는 것으로 보인다.

또한 녹차정제품(PGT)은 epigallo-cathechin gallate (EGCG), catectin, epicatechin 등의 polyphenolic compound를 90 % 이상 함유한 추출물로서 아래와 같은 공정을 거쳐 제조되었다. 매 실험 직전에 D.W에 녹여 각 농도별로 희석하여 사용하였다.

1. 녹차 + 80°C 증류수 ---> 30분간 열추 추출
2. filter paper로 여과후 감압 농축
3. ethyl acetate로 카테킨 및 카페인 성분 추출
4. chloroform으로 카페인 제거
5. sepharose column 통과(methylene chloride : methanol = 1 : 1)
6. 카테킨 분액 (그림 2) 확인 후 감압 농축
7. spray dry (또는 동결건조)

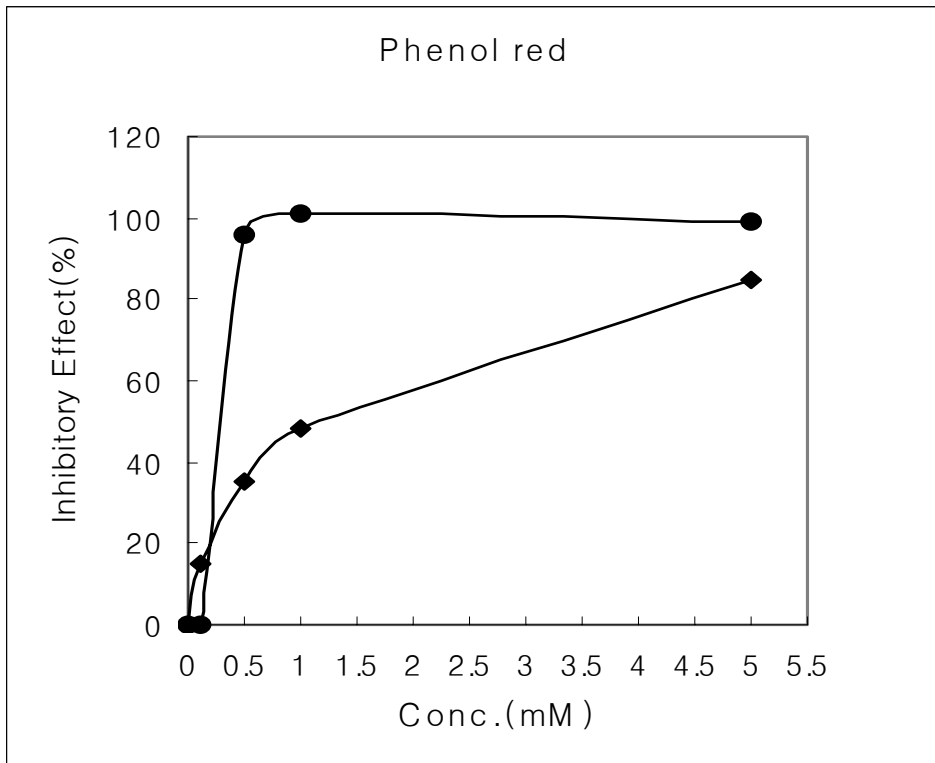


그림 1. Urease inhibitory effect of Vitamin C (-◆- positive control, AHA; -●- vit. C.)

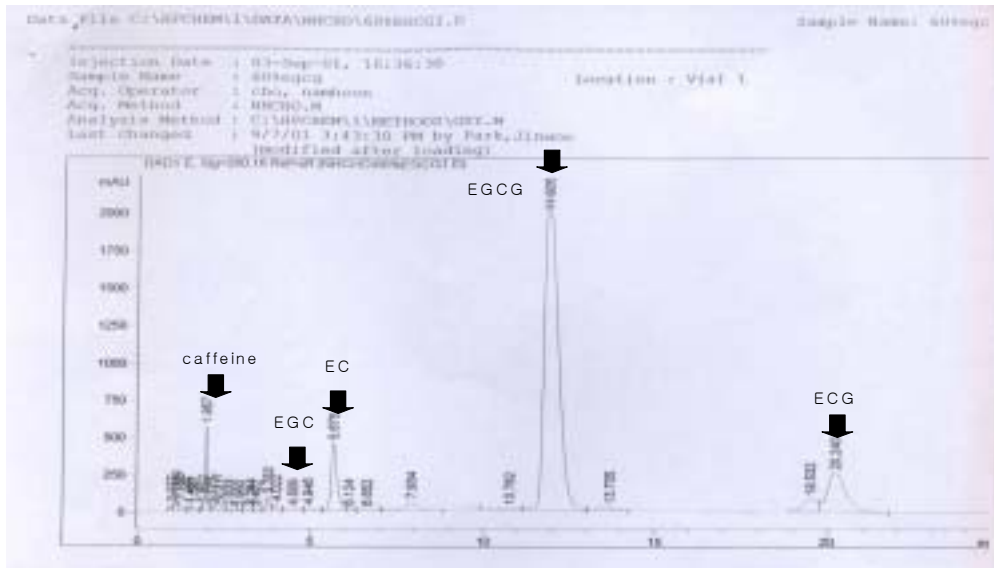


그림 2. Fraction of catectin from purified green tea

그림 3에서 보는 바와 같이 녹차정제품(PGT)은 농도 0.5 mg/ml에서 80% 이상에 이르는 최대의 urease 저해 효과를 보였다. 포도씨추출물 두 종류 중에서 polyphenol 성분을 함유한 GSP와 polyphenol 성분을 제거한 GSM 모두 urease inhibition 효과를 보였는데, 그림 4에서 보는 바와 같이 GSP는 0.5 mg/ml에서 80% 정도의 urease inhibition 활성을 보였고 GSM은 농도 0.5 mg/ml에서 40% 정도의 urease 저해 효과를 보였다. 상기의 결과에 의하면, GSM보다는 polyphenol을 함유하고 있는 GSP가 urease 저해 작용에 좀더 효과적이라는 것을 알 수 있다.

그러나, 메밀껍질 추출물 BWM은 BWP에서 polyphenol 성분을 제거한 것으로서, 포도씨 추출물과는 달리 BWM에서만 저해효과가 나타났다. 그림 3에서 보는 바와 같이 농도 1 mg/ml에서 90% 이상에 이르는 urease 저해효과를 나타내었다.

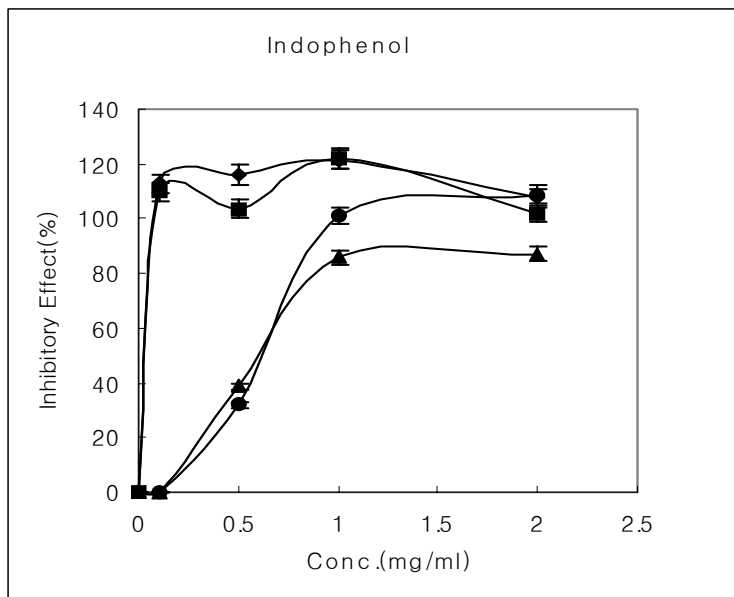
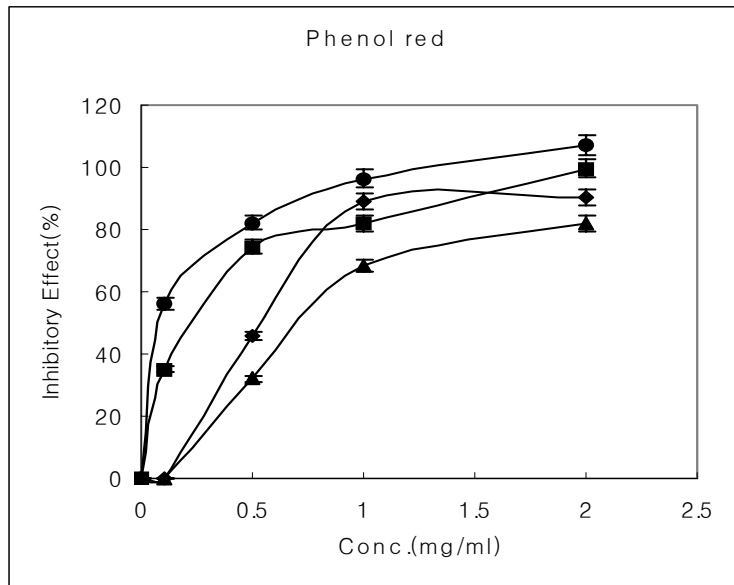


그림 3. Urease inhibitory effect of complex phytochemicals

-◆-, PGT; -■-, GSP; -▲-, GSM; -●-, BWM.

2. Urease 활성을 억제하는 천연물의 2차 선별

상기의 실험결과를 토대로, 원료 구입의 용이성 및 생산 적용성 등을 고려하여 대상 후보물질을 2차 선별하였다. 시중에서 녹차엽, 포도씨, 메밀을 구입하여 80 ℃의 온수(중량비 5배)에서 60분간 추출한 후, 추출물의 urease inhibitor 활성을 측정하였다. 그 결과, 녹차엽의 열수추출물(green tea extract : GTE)에서 urease inhibitor 활성을 확인할 수 있었다.

Synthetic urease inhibitor인 AHA (농도: 10mM) 및 녹차정제품 (GTE, 농도: 2mg/ml)를 control로 하여 녹차엽 추출물의 urease inhibition 활성을 비교한 결과, 녹차엽 추출물의 urease inhibitor 활성이 상당히 우수하다는 것을 알 수 있었다.

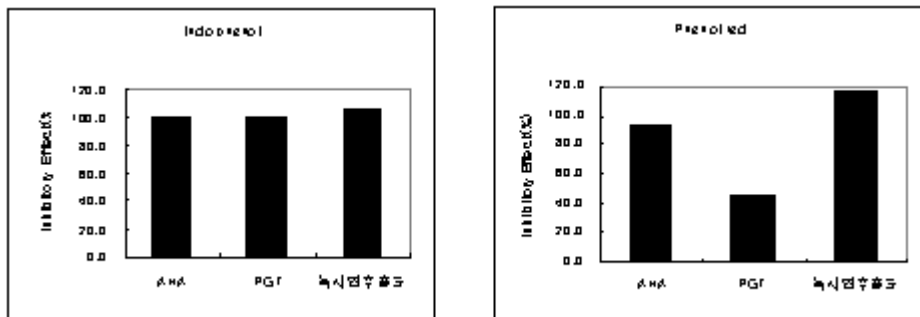


그림 4. Urease inhibitory effect of green tea extract using hot water

Control AHA는 10mM, 녹차정제품(PGT)는 2mg/ml의 농도로 사용하여 비교하였다.

3. Urease 활성을 억제하는 천연물의 건조 및 분말화

10g의 녹차엽을 60~90℃의 증류수를 이용하여 추출한 열수 추출물의 활성을 비교하였다. AHA의 활성을 100으로 하였을 때 각 조건의 활성을 상대적으로 나타내어 보았다. 추출온도를 65~75℃로 상승시에 추출물의 활성은 서서히 증가하였고, 75℃에서 80℃로 상승시 활성이 많이 증가하였다. 또한, 80℃ 이상에서는 활성의 변화가 없이 일정하였다. 따라서, 열수의 온도가 80℃ 이상에서는 일정한 추출물의 활성이 일정한 것으로 보인다. 상대적으로 저온인 60℃에서 추출시에는 낮은 활성을 가지는 것으로 나타났다.

80℃에서의 가장 효과적인 온도로 사료되어 열수의 온도를 80℃로 하여 각 시간별 추출물의 활성을 비교하여 보았다. 추출물의 활성은 60분까지는 추출시간에 따라 증가하였고, 70분까지의 활성은 비슷한 양상을 나타내었지만, 70분 이후의 추출시간은 활성이 약간 감소하는 것을 확인하였다. 이상의 결과에서 나타난 바와 같이, 녹차엽의 추출조건을 80℃에서 60분으로 하는 것이 가장 적합할 것으로 판단되었다.

추출물의 건조방법에 따른 차이는 추출액의 동결건조와 spray dry방식을 비교하여 보았다. 동결건조시 AHA에 비하여 약 110%정도의 활성을 보였으나, spray dry에 의해서는 약 102%정도의 활성을 나타내어 동결건조가 좀더 효과적인 방법으로 나타났다. 하지만, 건조녹차엽의 urease inhibitor 활성도 동결건조 추출물의 86%정도로 나타나, 산업적으로 생산시 녹차엽의 건조제품의 가능성도 확인할 수 있었다.

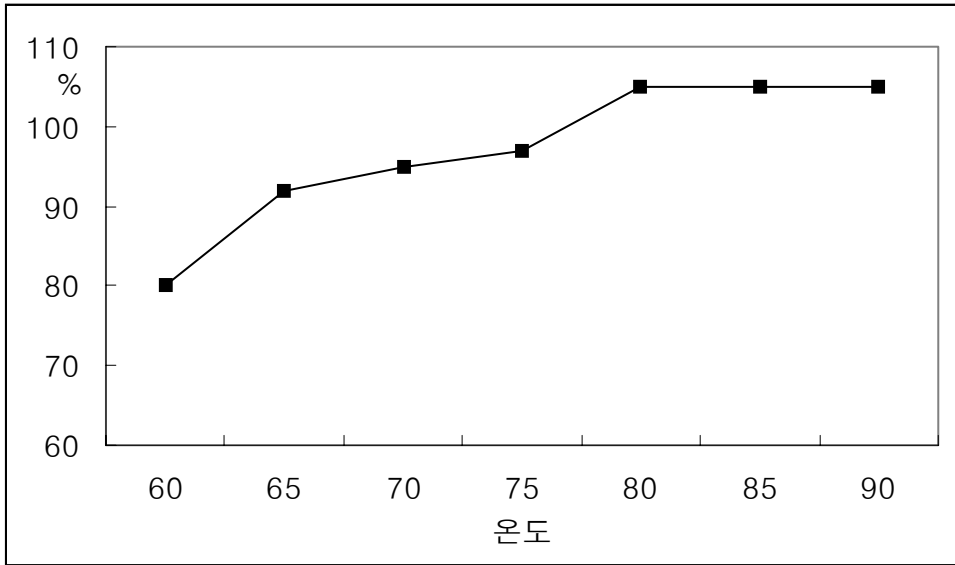


그림 5. Relative urease inhibiting activity of green tea extract to AHA among different hot water temperatures.

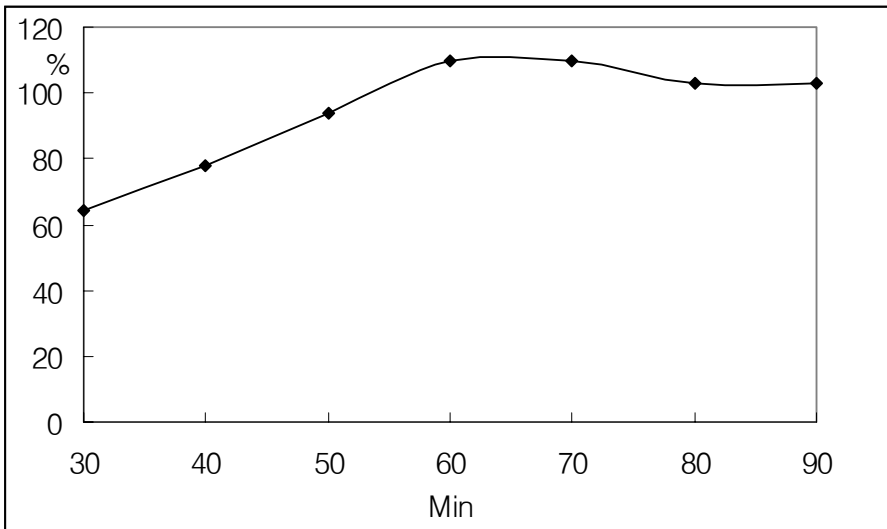


그림 6. Percentage of green tea extract among different incubation times.

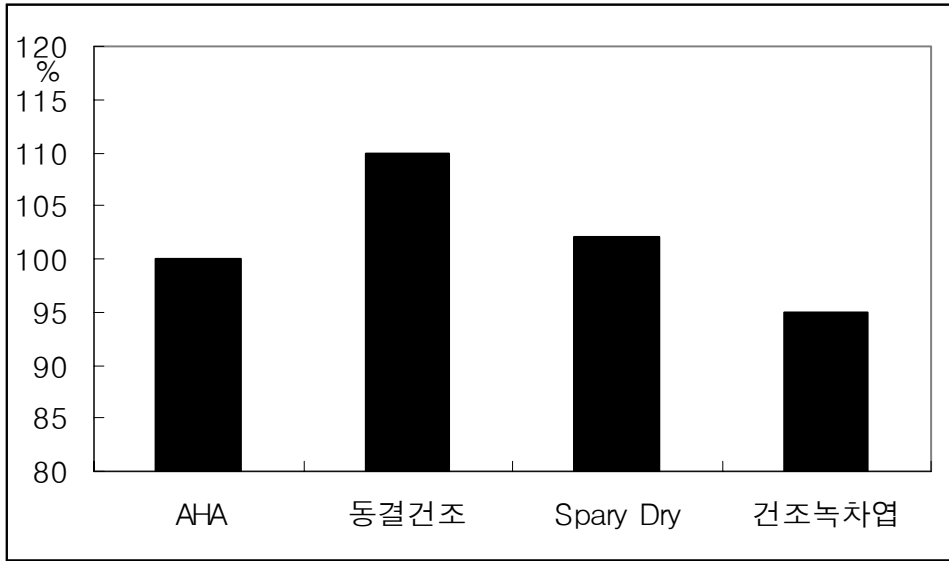


그림 7. Effect of dry method of green tea extract on urease inhibiting activity

4. Urease 활성을 억제하는 천연물의 생산 최적화

80℃의 열수 10L에 2kg의 녹차엽을 첨가하여 열수추출하였다. 추출후 spray dry하여 실험에 사용하였다. 10L scale로 녹차엽을 열수 추출시, 50ml 추출 scale 보다 약 14% 정도의 낮은 회수율을 보였다. 한편, 열수추출방법은 추출물의 건조공정과 spray dry로 인한 제조단가의 상승을 감안하면, 녹차엽을 그대로 건조한 후에 사용하는 것이 경제적인 것으로 판단되었다.

5. Urease 생성 억제 천연발효물의 획득 및 검색

기존 돈사 및 계사내 환경개선에 효과가 있는 것으로 알려진 천연 발효물 및 효모 혼합 배양물들을 대상으로 돼지의 분과 뇨를 각 개체별로 1:2의 비율로 혼합하여 제조된 slurry를 이용하여 ammonia의 감소효과에 대해 검색하였다. 천연 발효물 및 효모 혼합 배양물을 일반적으로 사용되는 사료첨가제의 농도인 0.2%와 일반적 농도의 10배인 2.0%를 첨가하여 0시간, 8시간, 24시간동안 37℃ incubator에서 배양한 후 암모니아의 감소를 알아보았다. 암모니아 농도는 indole-phenol법을 이용하였으며, standard graph는 NH_4Cl 10^{-3} ~ 10^{-4} mM을 이용하여 작성하였다. Standard graph는 그림 8에 나타난 바와 같고 그림 8에 의해 유도된 방정식에 의거하여 암모니아 농도를 시료의 흡광도를 역으로 계산하여 측정하였다.

20여가지의 천연 발효물을 대상으로 실험을 실시하였으며, 그 중에서 암모니아의 감소에 효과가 나타난 천연발효물을 5종을 선택하여 미생물을 분리하였다. 암모니아의 감소는 그림 9에 나타난 바와 같이 0.2%, 2%의 미생물 제제를 첨가하였을 경우 각각 천연발효물간의 차이는 보였으나 2%를 첨가하였을 경우 암모니아의 감소가 더 많이 되었으나 일반적으로 사료에 첨가되는 0.2%와 크게 차이가 나지 않았으며, 0.2%의 천연 발효물을 이용하여 in vitro에서 측정한 값이므로 in vivo에서와의 차이가 있을 수 있다. 각각의 천연 발효물을 첨가한 실험구에서는 대조구와 비교하였을 때 0시간에서부터 차이를 보이기 시작하였는데 이는 미생물 제제에 포함되어 있는 아직 밝혀지지 않은 성분에 의한 암모니아의 감소로 추정된다. 이로써 사료첨가제는 일반적으로 사용되는 사료에 과일을 이용한 발효물을 첨가하여 제조하는데 과일 발효물을 넣지 않은 축군과 발효물을 넣은 축군의 축사내에서 암모니아의 차이를 보이는 바 과일을 이용한 발효물에 존재하는 미생물에 의해 생성되는 물질이 암모니아의 감소에 영향을 준 것으로 추정되며, 이로써 과일 발효물에서 미생물을 분리하여 사용하였다.

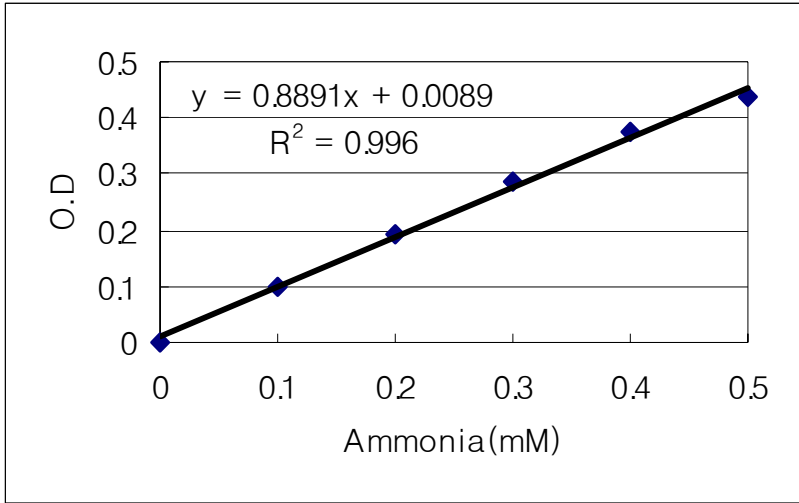


그림 8. Ammonia standard curve

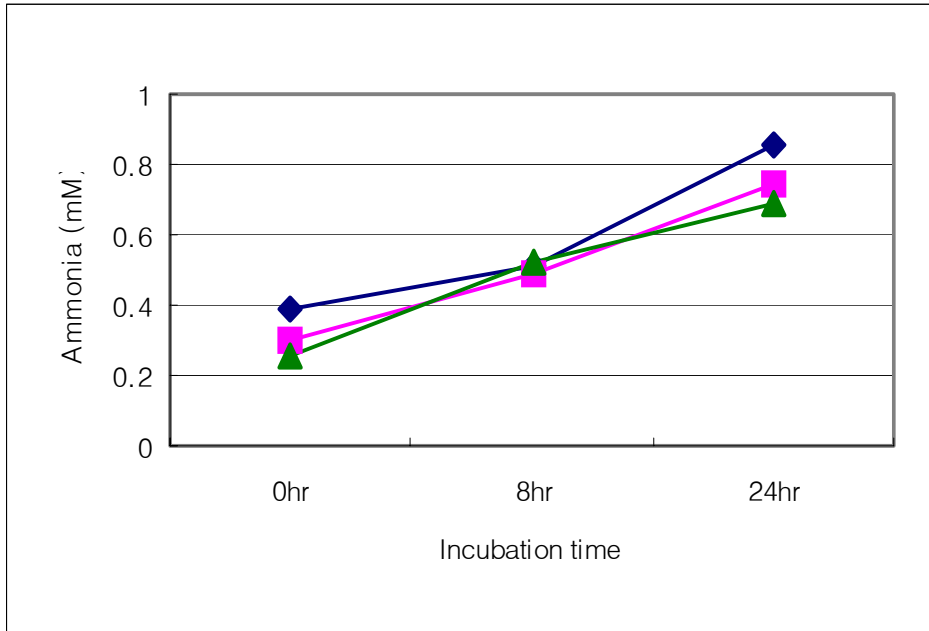


그림 9. Ammonia reduction effect of natural fermented materials

—◆—: Control ; —■—: 0.2% ; —▲—: 2.0%

6. Urease 생성 억제 미생물 균주의 검색 및 선발

앞의 실험에서 선발된 5종의 천연발효물은 yeast 및 Bacillus를 다량 함유하고 있는 것으로 알려진바 이와 같은 물질로부터 YM agar(yeast and Mold agar)와 Bacillus agar를 이용하여 미생물을 분리하였다. Streaking을 하여 25℃에서 48시간 배양 후 생성된 colony를 분리하여 동일 액체 배지에 배양하였으며, 이를 균액 2%를 접종하여 25℃에서 48시간 계대배양 하였다.

동결건조에 의한 농축된 상등액을 phenol-red법에 의해 억제정도(%)를 상등액과 동량의 0.1M Tris-HCl buffer(pH 6.8)를 첨가하여 대조구로 하였으며, 상등액에 의한 억제 정도를 측정하였다. 배지 내 성분에 의해 urease가 억제되거나 발색되는 것을 방지하기 위해 미생물이 없는 동량의 배지 성분만을 동결 건조하여 농축된 배지를 첨가하여 발색되어 측정된 흡광도 값을 감하여 억제율(%)을 측정하였다. 반복실험을 하였을 경우 균일하게 urease를 억제하는 결과와 경향성을 가지는 미생물이 microbial urease inhibitor를 분비하는 것으로 하여 미생물을 선발 동정하였다. 약 150여종의 미생물을 동정된 미생물중에서 urease억제 효과를 나타내는 미생물은 Candida종에서 약 6종이 분리되었으며 이 중에서 *Candida krusei/inconspicua* 204이 가장 urease를 억제하는 효과가 큰 것으로 조사되었다. 표 8은 당 이용성에 의해 API test kit(bioMerieux)와 ATB Plus program에 의해 동정된 6종의 효모균의 동정 결과이다. 그림 10은 *Candida krusei/inconspicua* 204을 염색하여 현미경으로 관찰하여 찍은 결과이다.

표 8. List of urease inhibition microbials.

Agar	API test kit
YM agar	<i>Candida krusei/inconspicua</i> 204
YM agar	<i>Candida pelliculosa</i> Y6
YM agar	<i>Candida pelliculosa</i> 101
YM agar	<i>Candida magnoliae</i> 102
YM agar	<i>Candida kefyr</i> BAEY1
YM agar	<i>Candida lipolytica</i> 29

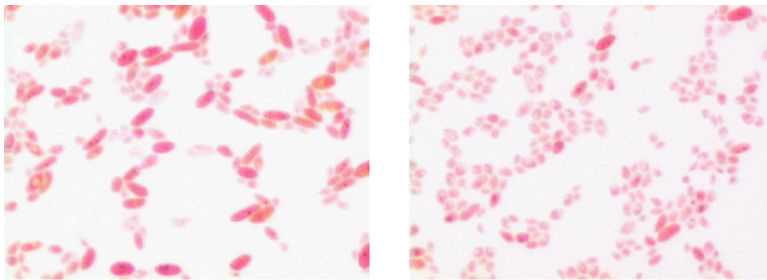


그림 10. *Candida krusei/inconspicua* 204

7. Urease 생성 억제 probiotics의 검색 및 선발

실험에 사용된 기소장 유산균 아래와 표 9과 같고 이 외에도 약 1000여개의 동물의 분변 및 사람의 분변으로부터 분리한 미생물 중에서 50개를 실험에 사용하였다. 이 중에서 urease에 억제효과를 보인 probiotics는 그림 11과 같으며, phenol red법으로 screening하였다. 이 중에서 억제정도가 약 8%가 되는 urease 억제 정도가 뛰어난 것으로 보이는 유산균 6종을 선발하여 urease 억제 물질의 추출에 사용할 것이다.

유산균의 상등액은 2000rpm으로 원심분리하여 pH를 6.8 ± 0.05 로 조정하였고, pH가 조정된 상등액을 0.45um filter를 사용하여 filtration하여 동결건조후 0.1M Tris-HCl buffer로 현탁하여 10배 농축하여 사용하였다.

☿ 9 List of lactic acid bacteria

Lactic acid bacteria

- Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469
Lactobacillus casei 911
Lactococcus lactis sup. lactis 11454
Lactococcus. acidophilus ATCC 43121
Lactobacillus acidophilus NCFM
Lactobacillus acidophilus 4356
Lactococcus lactis sup. lactis 4797
Lactobacillus acidophilus 4962
Lactobacillus casei ATCC 393
Lactobacillus brevis ATCC 8287
Lactobacillus brevis 5464
Lactobacillus acidophilus KU116
Lactobacillus acidophilus 393
Lactobacillus acidophilus GPIB
Lactobacillus acidophilus 606
*Lactobacillus acidophilus*107A
Lactobacillus acidophilus 30SC
Lactobacillus acidophilus GP2A
*Lactobacillus acidophilus*GP4A
Lactobacillus acidophilus A4
Lactococcus ssp. 449
Lactobacillus bifido 85.7
Lactobacillus helvericus Iam 1042
Lactobacillus casei 9018
Lactobacillus casei M5
Bifidobacterium longum
Lactobacillus rhamnosus 7469
Lactobacillus casei E5
Leuconostoc W20
-
-

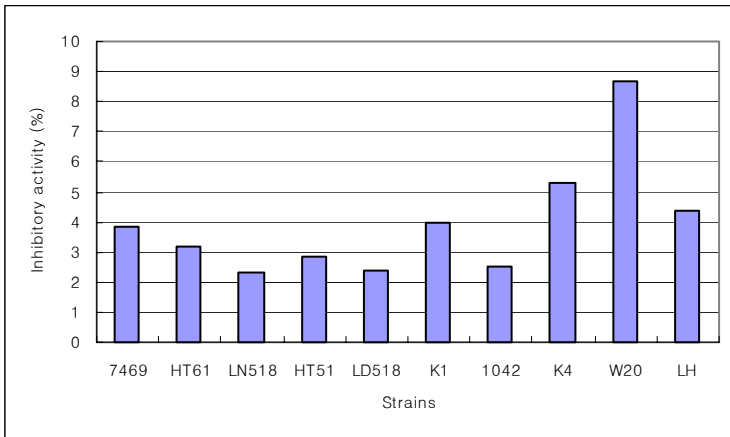
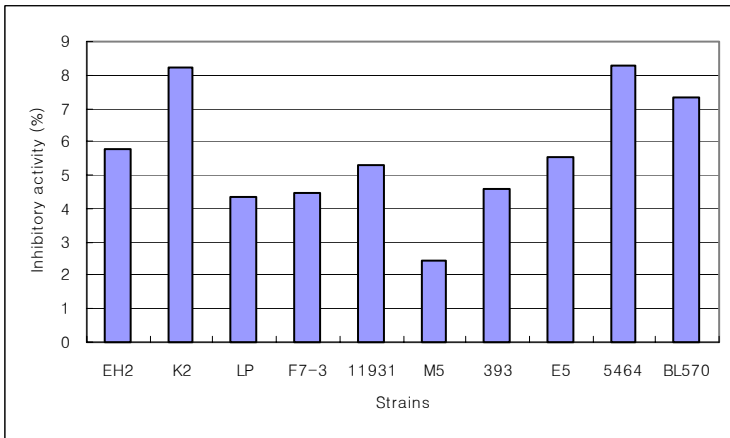
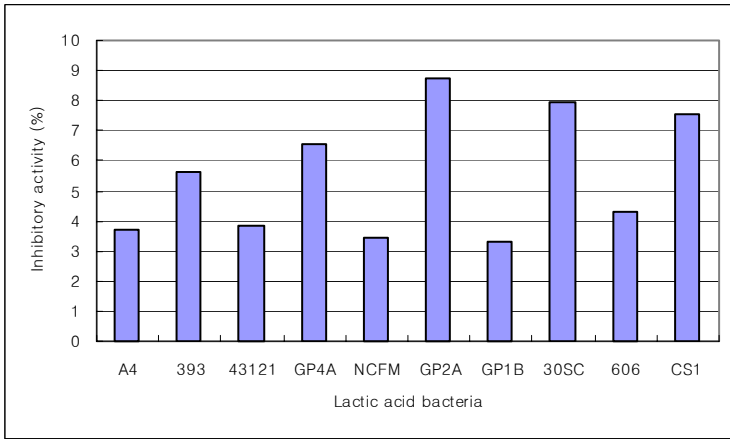


그림 11. Urease inhibiting activity of LAB

8. Urease 생성 억제 미생물 균주의 활력 검증

천연발효물로부터 분리된 각 미생물들을 2% 접종하여 48시간 동안 25℃에서 계대배양하여 아래의 그림 12과 같은 결과를 얻었고, urease억제에 효과를 보인 유산균주의 활력은 그림 13과 같은 결과를 얻었다.

유산균은 10^8 의 활력을 보였으며, 이미 실험실에서 많은 배양 실험을 하였기 때문에 배양이 용이하였다. 천연발효물로부터 분리한 미생물은 대부분 호모균종이어서 다른 미생물들에 비해 성장이 늦고 효율적으로 배양하기 위해서는 미생물을 1%를 접종하여 배양하는 것보다 2%를 접종하여 48시간이상 충분히 배양한 후 눈으로 확인하여 더 이상 성장이 멈추지 않는 시점에서 배양을 멈추어 바로 2% 접종하여 48시간동안 2차 이상 계대배양하면 가장 효과적으로 배양할 수 있다. 위와 같은 방법으로 얻어진 결과가 그림 12 이며 *Candida magnoliae* 102 같은 경우는 성장이 잘 이루어지지 않았다.

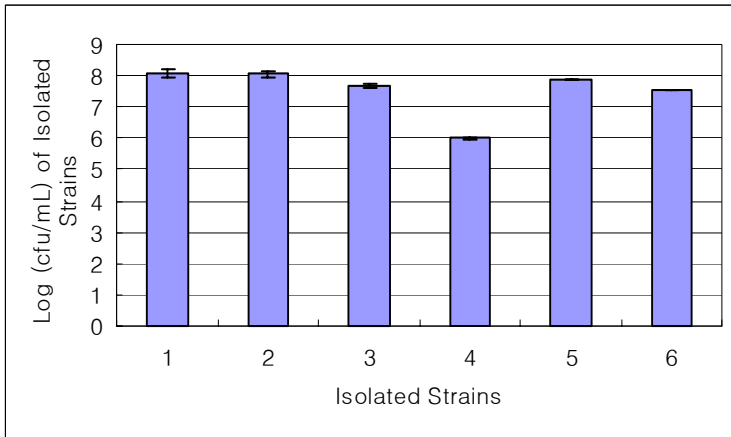


그림 12 . Activity of isolated strains

1: *Candida krusei/inconspicua* 204; 2: *Candida pelliculosa* 101; 3: *Candida lipolytica* 29; 4: *Candida magnoliae* 102; 5: *Candida kefir* BAEY1; 6: *Candida pelliculosa* Y6

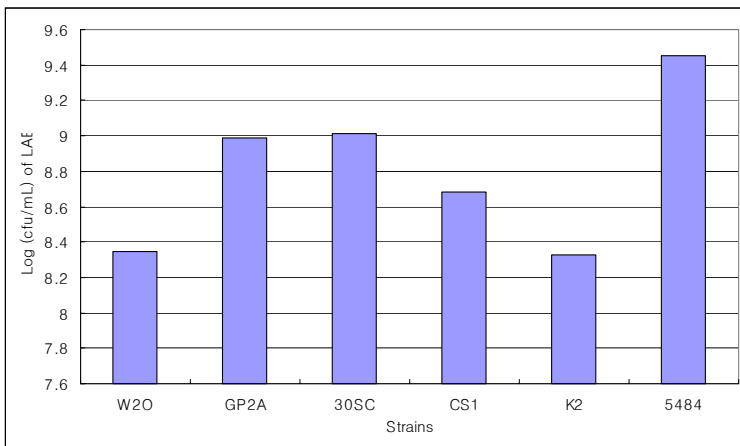


그림 13. Activity of LAB

9. Urease 생성 억제 미생물 균주의 urease inhibitor 효능 규명

미생물을 생균제로 사용하려면 건조하여 분말 상태로 제조되어야 미생물의 활력이 오래 유지 되고 보존기간이 길어질 수 있다. 따라서 분말제조과정 중에 포함되어야 하는 건조 과정은 실험 과정 중에 농축되는 것 이외에 다른 영향은 없다고 여겨지며, 상등액을 실험에 사용하였을 경우 억제 정도가 명확히 나타나지 않고 배지성분에 의해 사용되는 시약의 색이 변하게 되는 경우가 있어 결과를 확신하기가 어렵다. 그러나 농축과정을 거친 상등액은 비교적 효과가 약 19%까지 억제정도가 측정되므로 urease에 대해 억제가 된다고 할 수 있다.

Urease에 대한 억제효과 및 흡착효과가 보고된 AHA와 boric acid를 사용하여 urease 억제 실험에 대한 실험방법의 검증 및 억제 효과는 phenol-red법을 이용하였으며, 그 결과는 그림 14에 나타나 있다. AHA 100mM에서는 80%이상의 억제효과를 나타내었고 5mM에서 약 50%의 억제효과를 나타내는 것을 알 수 있다. Boric acid는 ammonia 이온과 결합하여 ammonia의 이온이 공기 중에 기화되는 것을 막아주는데 이러한 과정에서 암모니아의 흡착이 urease의 억제와 유사하게 여겨질 수 있다. 그림 14에는 나타나 있지 않지만 AHA와 boric acid는 농도에 따라 균일하게 urease의 억제효과가 나타나 positive control로서 사용하였다. 이와 유사하게 urease로서 보고되어진 cystamine의 urease 억제 효과는 그림 15에 나타내었다. Urease의 억제는 농도별로 유의성 있게 그래프의 증가 또는 감소를 보이고 있다.

그림 16에 urease 억제를 나타낸 미생물에 대한 urease 억제정도를 나타내었다. *Candida krusei/inconspicua* 204 균주가 반복실험을 통하여 가장 효과가 좋은 것으로 나타났으며, *Bacillus pasteurii* urease에 대해 Jackbean urease보다 많은 억제효과를 보이는 것으로 나타났다. 결과에 의한 표준편차는 매우 적은 수치이므로 거의 나타나지 않았고 이에 결과 값에 대한 신뢰도가 높다고 하겠다.

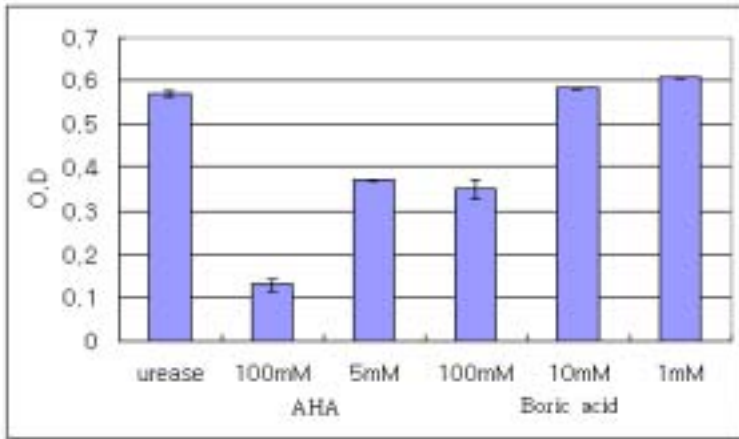


그림 14. Positive control of urease inhibitor or ammonia assimilation

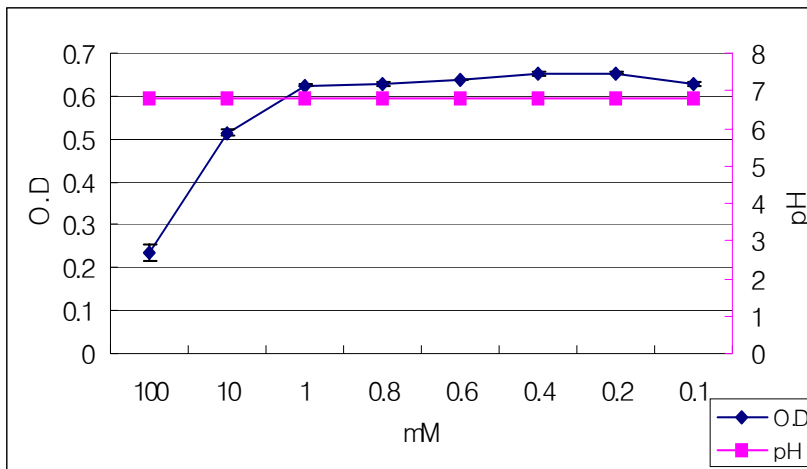


그림 15. Urease inhibiting activity of cystamine

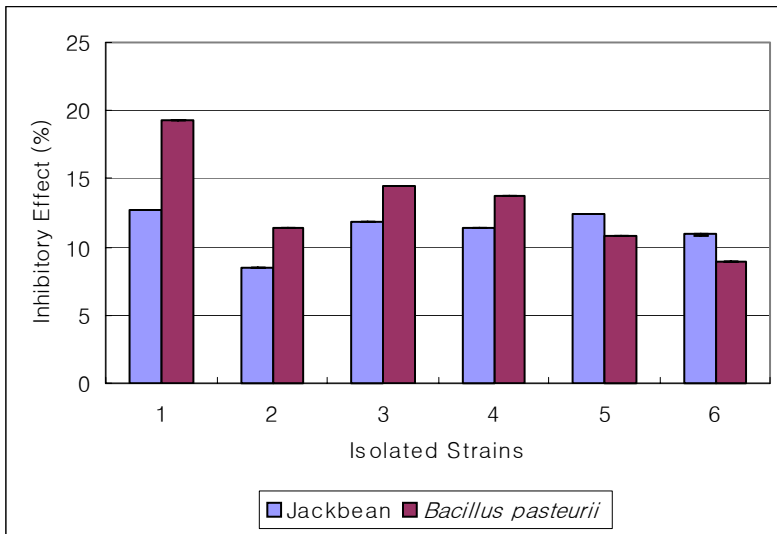


그림 16. Urease inhibiting activity of microbial supernatant concentrates

1: *Candida krusei/inconspicua* 204; 2: *Candida pelliculosa* 101; 3: *Candida lipolytica* 29; 4: *Candida magnoliae* 102; 5: *Candida kefyr* BAEY1; 6: *Candida pelliculosa* Y6

10. Urease 억제 미생물 균주의 urease inhibitor 물질의 생산 최적화

그림 17은 이미 효과가 확인되어진 *Candida krusei/inconspicua* 204에 대한 성장 곡선을 작성한 것이며 각 단계별 urease 억제정도에 대한결과이다. 배양 시간이 증가함에 따라 배지의 pH가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 배양 20~35 시간 까지는 균수가 그리 증가하지 않은 반면 35시간에서 45시간 사이에 균수가 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 본 균주의 배양 시간은 약 45시간 정도가 적절할 것으로 생각된다.

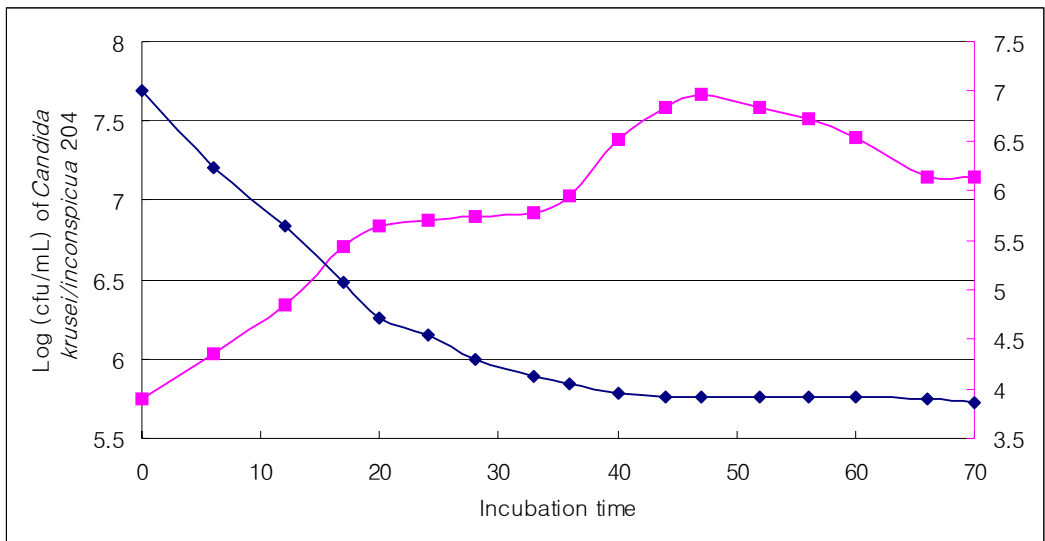


그림 17. Growth curve of *Candida krusei/inconspicua* 204

11. 천연물 추출 제제와 미생물 균주의 동물실험 검증

이유자돈의 사양성적은 표 10에 나타나있다. 체중에서 전기간에 걸쳐 처리구간의 차이는 없었다. 또한 일당증체량에서도 통계적 차이는 없었으나, 대조구에 비하여 녹차엽 열수 추출물 급여구와 *Candida krusei/inconspicua* 204 급여구가 약간 높은 일당증체량을 나타냈다. 사료 섭취량에서도 각 처리별 큰 차이는 없었으나, 녹차엽 열수 추출물 0.2% 급여구에서 다른 처리보다 많은 사료를 섭취하였다. 사료효율에서는 전 처리구에 걸쳐 차이점이 없었다.

Table 10. Growth performance of pigs fed experimental diets.

	Control	GTE 1	GTE 2	GTE 3	M1	M2	M3
Body weight(kg)							
Initial	10.32±0.82	10.38±0.74	10.30±0.84	10.37±1.20	10.35±0.65	10.33±0.84	10.39±1.12
1st week	13.27±1.20	13.45±1.15	13.25±1.28	13.48±1.13	13.22±1.28	13.19±1.10	13.31±1.41
2nd week	16.02±1.35	15.99±1.40	16.20±1.35	16.08±1.20	16.10±1.85	16.08±1.12	16.11±1.65
3rd week	20.48±1.86	20.56±1.76	21.08±1.85	20.75±1.73	20.55±1.43	20.67±1.48	20.77±1.72
Average Daily Gain(g/day)							
1st week	421±48	438±43	421±58	444±32	410±56	408±53	417±58
2nd week	392±52	362±45	421±63	371±48	411±65	412±59	400±67
3rd week	637±43	652±52	697±86	667±58	635±63	655±75	665±54
Total	483±42	484±49	513±64	494±53	485±58	492±62	494±61
Average Daily Feed Intake(g/day)							
1st week	648±21	696±28	638±35	663±38	640±39	600±52	651±32
2nd week	727±57	659±57	752±89	640±59	748±79	764±62	689±72
3rd week	1249±102	1255±114	1366±138	1308±110	1271±85	1237±98	1280±86
Total	875±78	870±85	919±98	870±86	886±92	867±86	873±74
Feed Efficiency							
1st week	0.65±0.12	0.63±0.08	0.66±0.09	0.67±0.12	0.64±0.13	0.68±0.08	0.64±0.09
2nd week	0.54±0.08	0.55±0.06	0.56±0.12	0.58±0.05	0.55±0.08	0.54±0.09	0.58±0.10
3rd week	0.51±0.03	0.52±0.04	0.51±0.05	0.51±0.03	0.50±0.03	0.53±0.05	0.52±0.03
Total	0.55±0.07	0.55±0.06	0.56±0.08	0.57±0.07	0.55±0.07	0.57±0.08	0.57±0.07

12. 천연물 추출 제제와 미생물 균주의 slurry내 효과 검증

사양 실험시 채취한 slurry와 분과 노를 따로 채취하여 혼합한 slurry의 pH와 ammonia 발생 정도는 그림 18, 19, 20, 21에 나타나 있다. 녹차엽 열수 추출물을 급여한 GTE(Green Tea Extract)와 대조구의 분뇨를 실온(20℃)에서 보관하며 각 날자별로 pH를 측정된 결과는 그림 18에 있다. 전 처리에 걸쳐 초기에는 pH가 약 7.4정도로 처리구간에 차이가 없었다. 하지만, 실온에서 보관 1일후에는 대조구의 경우 pH가 8.8로 상승하였고, 녹차엽 열수추출물 0.1%를 급여한 처리구는 8.4로 상승하였으며, 0.2%와 0.4%를 급여한 처리구는 8.1정도로 상승 하였다. 이러한 pH의 상승은 보관 기간이 증가하여도 변화가 없이 계속 일정하게 유지되는 경향을 보였다. 저장기간중 암모니아 발생 정도를 살펴본 결과는 그림 19에 나타나 있다. 2일까지의 각 처리별 암모니아 발생량은 약 19mM정도로 처리간의 차이는 없었다. 하지만, 3일째부터는 대조구와 0.1%의 녹차엽 열수추출물을 급여한 처리구가 25mM정도로 0.2%와 0.4%의 녹차엽 열수 추출물을 급여한 처리구보다 높은 경향을 나타내었다. 저장 4일째에서는 대조구의 경우에는 약 43mM의 암모니아를 발생시킨 반면, 0.1% 급여구는 37mM을 0.2%와 0.4% 처리구는 각각 25mM, 24mM정도의 암모니아를 발생하였다. 이러한 경향을 저장 7일까지 비슷한 양상을 나타내었다.

Candida krusei/inconspicua 204를 첨가한 처리구와 대조구간의 pH의 변화는 그림 20에 나타나 있다. 보관을 시작한 0일째의 pH는 7.4정도로 각 처리간의 차이가 없었다. 보관 1일후의 pH는 8.8~8.4로 각 처리간 큰 차이는 없었으나 *Candida krusei/inconspicua* 204를 0.4% 급여한 처리구가 약간 낮은 경향을 보였다. 보관 2일후부터 pH는 거의 변함이 없이 보관 1일째의 pH와 비슷한 경향을 보였다. 대조구와 0.1%의 *Candida krusei/inconspicua* 204를 급여한 처리구가 약 8.9 정도의 pH를 나타내었고, 0.2%의 *Candida krusei/inconspicua* 204를 급여한 처리구는 8.6정도의 pH를 0.4%의 *Candida krusei/inconspicua* 204를 급여한 처리구는 8.4정도의 pH를 나타내었다. 저장기간중 암모니아의 발생량을 살펴보면, 저장 1일째에는 14mM정도의 비슷한 양의 암모니아를 발생하였고, 2일째에도 약 18mM정도로 처리구간의 차이는 없었다. 하지만, 3일째에는 대조구와 0.1%, 0.2%

의 *Candida krusei/inconspicua* 204 급여 처리구가 0.4%의 *Candida krusei/inconspicua* 204 급여 처리구보다 높은 양상을 나타내었다. 저장 4일 이후에는 0.1%의 *Candida krusei/inconspicua* 204 급여 처리구와 대조구간에 암모니아 발생량을 차이가 없었으나, 0.2% 급여 처리구에서는 약 40mM 정도로 약간 낮아지는 경향을 보였고, 0.4%의 *Candida krusei/inconspicua* 204 급여 처리구는 28mM 정도로 다른 처리구에 비하여 낮은 암모니아 발생을 보였다.

Urease inhibitor로 작용할 수 있는 천연물 제제와 미생물 제제를 급여한 동물의 분과 뇨에서 직접적으로 urease inhibitor activity를 측정하기는 불가능하다. 먼저, 분내 함유되어 있는 기질인 urea와 urease의 함량이 다르기 때문이다. 따라서 천연물 제제인 GTE와 *Candida krusei/inconspicua* 204를 급여후 채취한 slurry에서의 ammonia 발생 정도를 이용하여 상대적인 비교를 하였다. 대조구의 경우 보관 7일째의 ammonia 발생량은 46mM 정도이었고, GTE를 0.1, 0.2, 0.4% 급여한 처리구는 각각 36, 26, 24mM이었다. GTE의 급여는 ammonia의 발생량을 대조구에 비하여 78, 56, 52% 정도로 감소시킴을 알 수 있다. 또한, *Candida krusei/inconspicua* 204를 급여시는 각각 91, 80, 64% 감소시켰다. GTE의 경우 0.2%에서 0.4%로 급여량을 증가시켜도 ammonia의 발생량이 크게 감소하지 않는 것으로 보아, 0.2% 정도의 급여가 효과적일 것으로 판단되고, *Candida krusei/inconspicua* 204의 경우 0.4% 급여시 0.2%보다 ammonia 발생 정도가 감소되는 것으로 보아 0.4% 또는 그 이상의 *Candida krusei/inconspicua* 204를 첨가하여야 GTE와 비슷한 효과를 보일 것으로 사료된다.

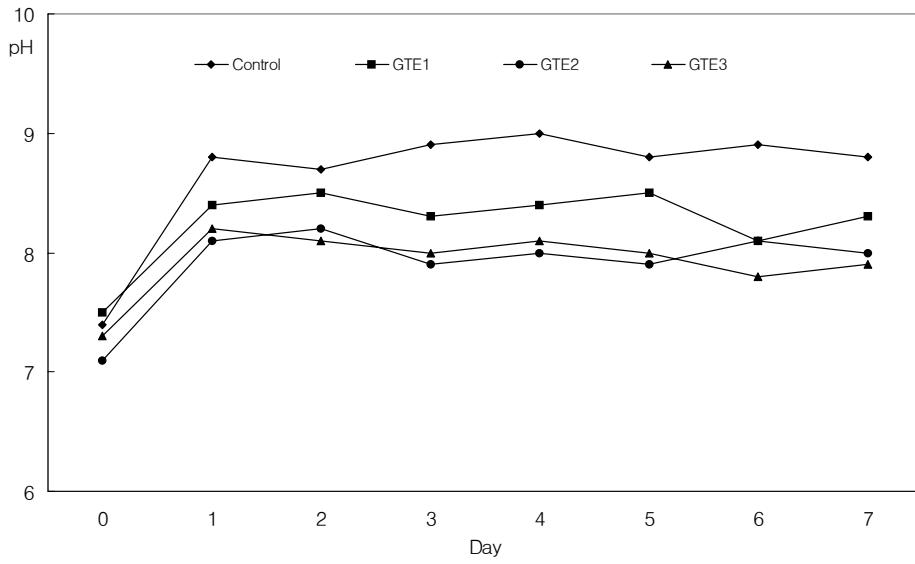


그림 18. Change of pH of slurry during storage

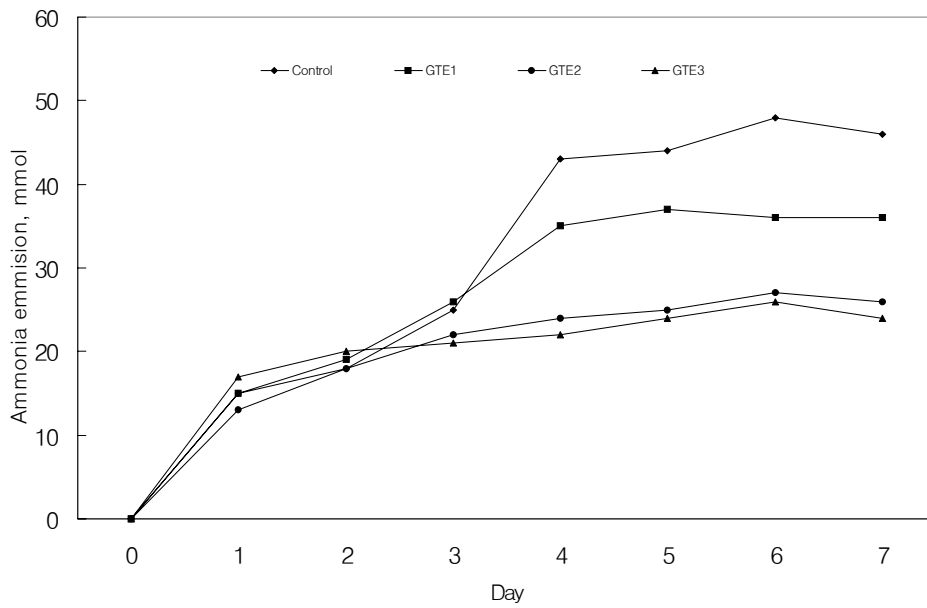


그림 19. Ammonia emission from slurry during storage

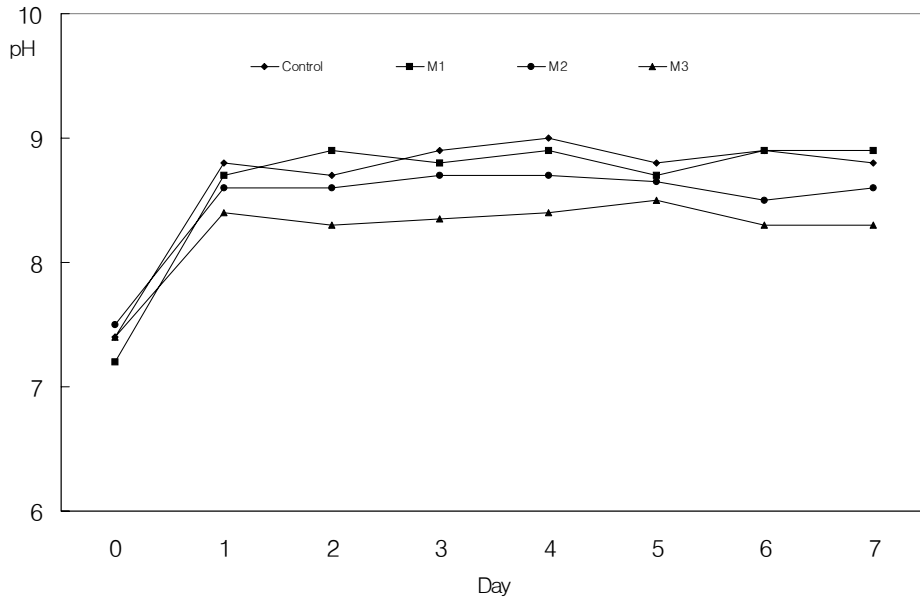


그림 20. Change pH of artificial slurry during storage

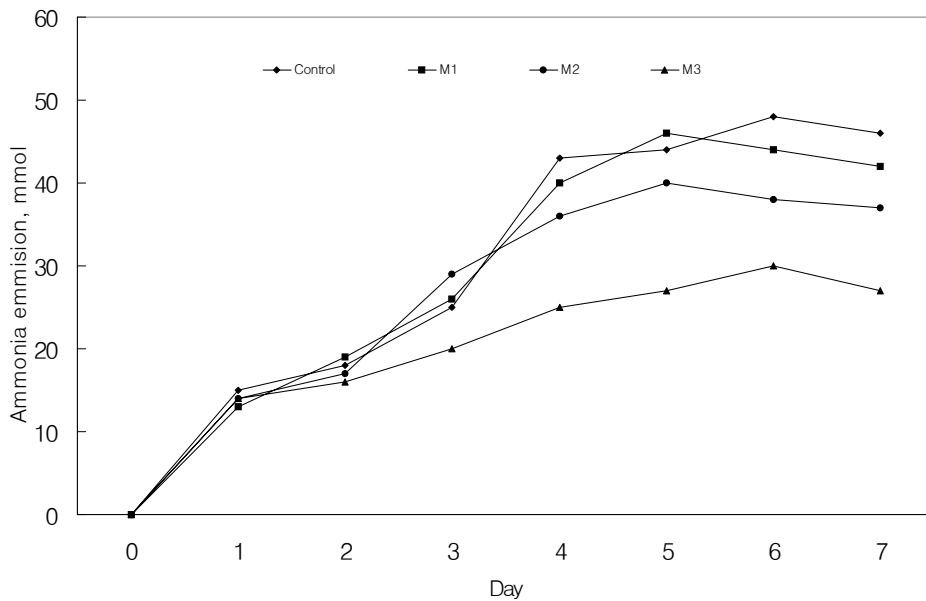


그림 21. Ammonia emission from artificial slurry during storage

제 2 절 선발 제제와 균주의 복합화 및 동물실험 검증

제 1 항 실험재료 및 방법

1. 천연물 추출물의 생산조건 확립

가) 추출 조건의 확립

(1) 열수와 천연물 제제의 비율 탐색

천연물 추출물 단위시간당 최대로 하기 위하여 천연물과 열수와의 혼합 비율을 조사하였다. 녹차엽을 analytical mill을 이용하여 분쇄한후, 1L의 증류수에 분쇄된 녹차엽을 50g부터 300g까지 50g 단위로 증가시켜 혼합하였다. 혼합시 열수의 온도는 80℃로 circulator를 이용하여 유지하였고, 열수 추출시 magnetic stirrer를 이용하여 혼합하였다. 열수 추출시간은 1시간으로 하였고, 추출후 혼합물은 원심분리(1000g, 20분, 4℃) 하여 녹차엽을 침전시켰다. 50ml의 녹차엽이 추출된 열수를 동결건조하여 추출물의 양을 비교하였다.

(2) 열수의 온도와 시간에 따른 추출물의 획득수율 탐색

적절한 비율로 실험되어진 1000:200(열수:녹차엽)로 열수의 온도와 시간에 따른 추출물의 양을 비교하였다. 10L의 증류수에 분쇄한 녹차엽 2000g을 첨가하고, 50~95℃까지 5℃ 단위로 열수의 온도를 증가시키며 혼합하였다. 혼합후 30분 이후부터 15분 간격으로 2시간 까지 100ml의 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 원심분리하여 녹차엽(1000g, 20분, 4℃)을 침전시킨후 50ml의 추출된 열수를 동결건조 하여 추출물의 양을 측정하였다.

(3) 추출물의 활력 검증

(2)에서 추출된 천연물 제제의 활력을 검증하기 위하여, Shinichi와

Kobayashi(2002)의 phenol red 법과 Fawcett과 Scott (1960), Chaney와 Marbach(1962)의 방법에 기초로한 indole-phenol법을 이용하였다. 0.2mg의 녹차 추출물을 1ml에 용해 시킨후 urease inhibitor로 알려져 있는 Acetohydroxamic acid(AHA, 10mM)를 기준으로 하여 활력을 비교하였다.

Phenol red법 urea가 ammonia로 전환되면서 일어나는 pH의 변화를 phenol red를 통하여 측정하는 방법이다. 먼저, 0.1M의 Tris-HCl(pH 6.8)를 이용하여 2%의 urea 용액을 제조하고, 이때 0.2%의 phenol red 시약을 첨가한다. 제조된 0.5ml의 urea 용액에 0.1unit/ 10 μ l로 희석한 Jackbean urease를 20 μ l(0.2unit)를 첨가한다. 동결건조된 추출물을 Tris-HCl(pH 6.8)에 용해시킨후 100 μ l을 첨가한다. 0.5ml의 증류수를 첨가한후, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 incubation후 560 nm의 파장에서 O.D.를 측정한다. 이때, AHA를 control하여 상대적인 urease inhibitor activity를 측정하였다.

Indole-phenol법 0.1mM의 EDTA가 들어있는 0.1M의 sodium phosphate buffer(pH 7.01) 980 μ l에 10 μ l의 urea 용액을 첨가한후 10 μ l의 urease 용액을 첨가하고, 30 $^{\circ}$ C의 water bath에서 5분간 incubation한다. Incubation후 phenol-nitroprusside reagent 100 μ l와 위의 용액 300ul, 그리고 hypochlorite reagent 600ul를 혼합한후 60 $^{\circ}$ C에서 10분간 incubation 한후, 증류수로 1:3의 비율로 희석하여 630nm에서 O.D.를 측정하였다. 이때, AHA를 control로 하여 urease inhibitor activity를 상대적으로 측정 하였다.

(4) 추출물의 활력과 양을 고려한 최대 추출조건 확립

온도와 시간에 따른 추출물의 양과 urease inhibitor activity를 고려하여 최대 수율을 기대할 수 있는 추출조건을 확인하였다. 동일한 양(2000g/10L)의 녹차엽에서 추출된 추출물의 무게와 그것이 가지는 활력을 곱하여 주어, 녹차엽 추출물이 100g의 녹차에서 추출할 수 있는 urease inhibitor activity를 AHA의 urease inhibitor activity와 상대적 수치로 표기하여 비교하여 보았다.

2. 선발균주의 생산조건 확립

가) 선발균주의 분자생물학적 방법의 동정 및 안전성 검증

(1) Genomic DNA의 추출

선발된 균주의 정확한 분류와 안전성을 검증하기 위해 유전자 수준에서의 균주 동정을 실시하였다. YM (Yeast and Mold) media에서 48시간 배양한 1.5ml *Candida krusei/inconspicua* 204 균주를 14,000×g에서 10분간 원심분리를 2회 실시한 후 상등액을 제거한 후 cell pellet을 회수하였다. 회수된 cell pellet은 PBS(Phosphate Buffer Saline)로 3회 세척한 후 STES buffer로 현탁하였다. 현탁한 cell pellet은 acid-washed glass bead (Sigma, USA)를 첨가하고 vortexing 하여 cell을 파쇄하였다 (1분씩 10회). 원심분리하여 상등액을 회수한 후 새로운 eppendorf tube에 담고 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)로 처리하여 단백질을 제거하였다. 최종 원심분리로 얻어진 상등액은 genomic DNA 침강을 위해 ice-cold ethanol을 첨가한 후 -20℃에서 overnight 정치하였다. 다시 원심분리 (14,000×g, 30분, 4℃)하여 침전물을 회수하고 70% ethanol로 2회 세척을 실시한다. 상등액을 완전히 제거한 후 상온에서 air dry를 30분간 실시한다. 최종적으로 얻어진 침전물을 5μl의 TE buffer (pH 7.6)에 현탁한 후 37℃에서 1시간동안 RNase 1μl를 처리하여 RNA를 제거하였으며 이를 -20℃에서 보관하면서 PCR의 template로 사용하였다.

(2) Random primer를 이용한 RAPD 동정법

본 연구에서는 선발균주의 동정을 위해 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)의 방법을 사용하였다. PCR은 Sambrook (1998)의 방법대로 standard manipulation을 실시하였다. Random primer로는 기존의 보고 (Bautista-Muoz 등, 2003)에 따라 OPE-18 (5'-GGACTGCAGA-3')를 사용하였으며 PCR machine은 GeneAmp 2400 (PE, USA) 기종을 사용하였다. PCR은 5ul의 10×PCR buffer, 4μl의 dNTP (각각 200uM) mixture, 1 μg의 DNA, 1μl의 primer

(25 pM), 그리고 0.25(2 UD) μ l의 *Taq* polymerase로 최종 volume을 50 μ l로 실시하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 initiation step을 실시하고 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 36 $^{\circ}$ C에서 1분, 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 2분의 step을 38회 반복한 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시켜 최종 중합반응을 종결시켰다.

(3) Agarose gel electrophoresis

PCR product는 0.8% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 이때 사용한 완충용액은 0.5 \times TAE (Tris-HCl/ glacial acetic acid/ EDTA, pH 8.0) buffer를 이용하여 100V에서 40분간 전기영동 한 후 EtBr로 염색하고 UV illuminator에서 band의 pattern을 관찰하였다

나) 선발균주의 추출물 성분 조사

(1) 단백질의 분리

Urease inhibitor 활성을 갖는 미생물 균주의 상등액을 동결 건조하여 0.1M Tris-HCl buffer (pH 6.8)를 이용하여 현탁한 뒤 투석하였다. 투석과정을 거친 상등액을 60% ammonium sulphate로 침전시켜 단백질을 회수하였다. 회수된 단백질은 Sephadex G-200을 이용하여 gel filtration을 실시하여 size별로 분리, 정제를 실시하였다. 각 fraction을 phenol-red법 urease inhibitor test를 실시하였다.

(2) 아미노산 조성의 분석

Candida krusei/inconspicua 204균주를 YM media와 YM agar에 spread plating 하여 25 $^{\circ}$ C 배양기에서 48시간을 배양하였다. YM media에서 배양된 *Candida krusei/inconspicua* 204 균주를 원심분리하여 상등액을 0.22 μ m membrane filter를 이용하여 제균하였고, YM agar에서 배양된 균체는 0.1M Tris-HCl buffer(pH 6.8)을 이용하여 colony만을 회수하여 원심분리 후 0.22 μ m membrane filter를 이용하여 제균하였다. *Candida krusei/inconspicua* 204 균주

를 통한 생성물들은 동결건조 후 0.1M Tris-HCl buffer(pH 6.8)로 10배 농축하였다. 농축된 생성물 1g에 10%(w/v) sulfon salialic acid로 25ml을 조정 한 뒤 20분간 초음파로 추출하고 3N 수산화나트륨 용액을 이용하여 pH 2.2로 조정하였다. 다시 초음파로 5분간 추출하고 0.45 μ m membrane으로 여과하여 아미노산 자동분석기에서 분석하였다.

아미노산의 분석은 Zorbax Eclipse-XDB-C18 Columns(4.6 \times 150mm, 35 μ m)와 Agilent 1100 HPLC alliances(Hewlett Packard, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석 조건은 표 11과 같고, injection program은 표 12와 같이 하였다.

㉟ 11. Condition of amino acid analysis

Mobile phase	A: 40mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7.8)		
	B: ACN/MeOH/Water(45/45/10, v/v)		
Gradient program	Time	A	B
	0	100	0
	1.86	100	0
	18.11	43.3	56.7
	18.57	0	100
	22.29	0	100
	23.21	100	0
	26	100	0
Column	Zorbax Eclipse-XDB-C18 Columns(4.6×150mm, 35um)		
Flow rate	2ml/min		
Inject vol.	10μl		
Oven temp.	40℃		
Detector	338nm/262nm		
Run time	20min		

㉟ 12. Injection program of Agilent 1100 alliances

Step	Description
1	Draw 2.5 μ l from vial 1(Borate pH10)
2	Draw 0.5 μ l from vial 11~14(amino acid sample)
3	Mix 3 μ l in air, max speed(2x)
4	Wait 0.5min
5	Draw 0 μ l from vial 5(needle wash using water in uncapped vial)
6	Draw 0.5 μ l from vial 2(OPA, Agilent, USA)
7	Mix 3.5 μ l in air, max speed(6x)
8	Draw 0 μ l from vial 5(needle wash using water in uncapped vial)
9	Draw 0.5 μ l from vial 3(FMOC, Agilent, USA)
10	Mix 4 μ l in air, max speed(6x)
11	Draw 32 μ l from vial 4(water)
12	Mix 18 μ l in air, max speed(2x)
13	inject

(3) SDS-PAGE 전기영동

전기영동은 0.1% SDS가 첨가된 polyacrylamide gel을 이용하였으며 Mini-Protein slab cell (Bio-rad, USA)를 이용하여 Hoffer manual의 방법에 의해 수행하였다. 12.5% polyacrylamide gel을 이용하여 4°C에서 20mA로 유지하면서 1시간동안 전기영동을 실시하였으며 Coomassie brilliant blue (Sigma, USA)를 이용하여 staining을 실시하였다. 단백질 marker로써 Prestained pro stain (Intron, Korea)을 사용하였다.

(4) 탄수화물의 분리

Urease inhibitor 활성을 갖는 미생물 균주의 상등액을 동결 건조하여 0.1M Tris-HCl buffer(pH 6.8)를 이용하여 현탁한 뒤 100°C에서 30분간 가열하여 상등액내의 효소의 활성을 제거하고, 12,000g로 30분간 4°C에서 원심분리후 95% ethanol을 이용하여 침전을 유도하였다. 침전물은 12,000g에서 30분간 원심분리하여 회수한 뒤 Tris-HCl buffer (pH 6.8)으로 현탁한 뒤 3차 증류수를 이용하여 24시간 투석을 실시하였다. 상등액 내에 단백질과 존재하는 탄수화물을 10%(w/v) trichloroacetic acid(TCA)를 사용하여 단백질을 침전 시켜 제거한 뒤 상등액을 다시 3차 증류수에서 4°C에서 투석을 실시하였다. 투석으로 얻어진 투석물은 동결건조하여 -80°C에서 보관하면서 시료로 사용하였다.

(4) 지방의 분리

지방성분은 ethyl acetate를 이용하여 용출하였다. 용출 후에 evaporation을 통해 남아있는 ethyl acetate를 제거한 후 현탁하여 시료로 사용하였다.

다) 선발균주의 최적의 성장 온도와 시간 탐색

YM broth를 담은 배양조에 pH controller를 연결시키고 *Candida krusei/inconspicua* 204을 2% 접종한 후 배양을 실시하였다. pH controller는 10% ammonia수를 연결하고 pH가 적정수준 이하로 저하되면 유입되는 방식으로 하여 pH를 유지하여 주었다. 유지된 pH는 4.0, 6.0, 8.0으로 각각 설정하여 주었

고, 또한, 배양에 적절한 온도를 확인하기 위하여 배양조의 온도는 24, 30, 36℃를 유지하였다. 배양은 총 72시간동안 실시하였고, 12시간 이후에 4시간 간격으로 시료를 추출하였다. 추출된 시료는 peptone수에 serial dilution한후 YM agar plate에 접종하여 균수를 측정 하였다. Plate내에 30~300개의 colony가 생성시 colony수를 측정하였다.

라) 선발균주의 최적의 배지조성 탐색

YM broth의 주요 성분은 glucose(10g/L), peptone(5g/L), yeast extract (3.0g/L), malt extract(3.0g/L)이다. 이 성분은 일반적인 yeast가 적절한 성장을 보이는 성분의 배합으로 특정 *Candida krusei/inconspicua* 204의 성장에는 최적의 조건이 아닐수 있다. 주요 성분인 glucose, yeast extract, peptone을 독립변수로 설정하여 각각의 함량을 변화시키며(표13) *Candida krusei/inconspicua* 204의 성장을 측정하였다. 48시간 배양후 측정된 균수에서 접종균수를 뺀 순수하게 상장한 균수를 바탕으로 하여 최적의 배지조성을 탐색하였다. YM broth의 glucose(10g/L), peptone(5g/L), yeast extract (3g/L)을 중심축으로 결정하였다. 각 성분은 3가지의 수준으로 하여 glucose (8, 10, 12g/L) × peptone (3, 5, 7g/L) × yeast extract (2, 3, 4 g/L)로 총 27개의 처리구를 결정하였다.

표 13. 최적 배지조성 탐색을 위한 배지의 성분변화

처리구	Glucose(g/L)	Peptone(g/L)	Yeast extract(g/L)
G8P3Y2	8	3	2
G8P3Y3	8	3	3
G8P3Y4	8	3	4
G8P5Y2	8	5	2
G8P5Y3	8	5	3
G8P5Y4	8	5	4
G8P7Y2	8	7	2
G8P7Y3	8	7	3
G8P7Y4	8	7	4
G10P3Y2	10	3	2
G10P3Y3	10	3	3
G10P3Y4	10	3	4
G10P5Y2	10	5	2
G10P5Y3	10	5	3
G10P5Y4	10	5	4
G10P7Y2	10	7	2
G10P7Y3	10	7	3
G10P7Y4	10	7	4
G12P3Y2	12	3	2
G12P3Y3	12	3	3
G12P3Y4	12	3	4
G12P5Y2	12	5	2
G12P5Y3	12	5	3
G12P5Y4	12	5	4
G12P7Y2	12	7	2
G12P7Y3	12	7	3
G12P7Y4	12	7	4

마) 성장조건에 따른 urease inhibitor activity 측정

나)에서 확인된 배지를 담은 배양조에 pH controller를 연결시키고 *Candida krusei/inconspicua* 204 2% 접종한 후 배양을 실시하였다. pH controller는 10% ammonia수를 연결하고 pH가 적정수준 이하로 저하되면 유입되는 방식으로 하여 pH를 유지하여 주었다. 유지된 pH는 4.0, 6.0, 8.0으로 각각 설정하여 주었고, 또한, 배양에 적절한 온도를 확인하기 위하여 배양조의 온도는 24, 30, 36°C를 유지하였다. 배양은 총 48시간동안 실시하였고, 24시간 이후에 4시간 간격으로 시료를 추출하였다. 추출된 시료는 peptone수에 serial dilution한후 YM agar plate에 접종하여 균수를 측정 하였다. Plate내에 30~300개의 colony가 생성시 colony수를 측정하였다. 또한, 시료를 -70°C로 보관한후 phenol red법과 indole-phenol을 이용하여 urease inhibitor activity를 측정하였다.

3. 선발제제 및 추출물의 복합화 조건 확립

1) 천연물 추출물과 미생물 제제의 혼합 비율 확립

추출된 천연물 제제와 미생물 제제의 synergy 효과를 확인하기 위하여 동결 건조된 천연물 제제와 미생물 제제를 혼합하였다. 천연물 제제와 미생물 제제의 혼합 비율은 10:0에서 0:10의 비율까지 11단계로 혼합하였으며, 각각의 urease inhibitor activity를 phenol-red법과 indole phenol법을 사용하여 측정하였다. 또한, ammonia의 발생 억제 정도를 확인하기 위하여 artificial slurry에 혼합물을 첨가하였다.

4. 선발제제 및 균주의 건조 및 분말화

1) 건조 조건에 따른 복합화 제제의 활력 변화

추출된 천연물 제제의 건조 조건에 따른 활력 변화를 확인하기 위하여 동결 건조, spray-dry, 그리고 60°C에서 vacuum을 이용한 건조를 실시하였다. 또한, 미생물 제제의 경우 동결건조와 40°C, 60°C에서의 vacuum을 이용한 건조를 실시하여 건조 방법에 따른 urease inhibitor activity의 변화를 측정 하였다.

2) 보존기간에 따른 복합화 제제의 활력 변화

1)에서 최고의 활력을 보이는 건조방법에 따라 혼합물을 건조하였다. 또한 가장 높은 활력을 가지는 천연물 추출물과 미생물 제제의 비율로 혼합한후 (8:2, 천연물 제제: 미생물 제제) 보존기간에 따른 제제의 활력변화를 측정 하였다. incubator를 이용하여 25°C를 유지하고, 복합화 제제를 5주간 보관 한 후 urease inhibitor activity와 생존 균수를 측정하였다. Urease inhibitor activity는 phenol-red법을 이용하여 측정하였고, 생존 균수를 serial dilution technique을 이용하였다.

5. 선발제제와 균주의 동물 실험 검증

1) 선발 제제 및 균주의 사료내 안정성 검증

복합화 된 혼합제제를 자돈 사료와 모돈 사료(0.5%)에 첨가하여 보존기간동안의 활력 변화를 측정하였다. 25°C의 incubator를 이용하여 온도를 유지하여 주었으며, 총 35일간 측정 하였다. 매 7일째에 sample을 채취하여 사료내 생존하고 있는 yeast를 측정하였다. 채취한 sample은 peptone 수를 이용하여 serial dilution후 YM agar plate에 접종하고, 48시간동안 24°C의 incubator에서 배양하였다. Plate내에 30~300개의 colony가 생성시 colony수를 측정하였다. 또한, 1g의 시료를 9ml의 0.1M의 Tris-HCl(pH 6.8)에 희석한후, 4°C에서 500g로 30분간 원심분리 하여 사료를 침전시킨후, 추출액을 phenol red법을 이용하여 urease inhibitor activity를 측정하였다.

2) 선발 제제 및 균주의 자돈 사료의 효과 검증

천연물 선발 제제와 미생물 선발제제, 그리고 복합화 제제를 이유자돈에 급여하여 분내 ammonia 발생 감소효과와 그에 따른 성장 개선 효과를 조사하였다. 3원 교잡종 (Yorkshire × Landrace × Duroc)의 이유자돈 80두를 선발제제 2종과 혼합제제, 대조구로 하여 4개의 처리에 배치하였다. 각 처리당 반복수는 4반복으로 하였고, 각 반복당 5두의 자돈을 배치하였다. 실험기간은 3주로 하였고, 매주 체중을 측정하고, 사료 효율과 일당 증체량을 측정하였다.

실험사료는 대두박과 옥수수를 기본으로 한 기초 사료를 배합하고, 선발제제 2종과 혼합제제 2종을 사료에 0.5%의 비율로 첨가하였다. 기초 사료는 NRC(1998)의 요구량에 근거하여 배합하였고, 20%의 조단백질과 3350 kcal/kg의 대사에너지를 함유하도록 하였다. 사료와 물은 실험 전기간에 걸쳐 자유채식토록 하였다. 실험 종료시 각 처리당 4두의 이유자돈을 선택하여 항문을 자극하여 분과 뇨를 분리하여 수집하였다. 수집된 분과 뇨를 ammonia 발생을 측정하여 천연물 제제와 미생물 제제의 urease inhibitor activity를 측정하였다.

3) 선발 제제 및 균주의 모돈 사료의 효과 검증

2 산차 이상의 2원 교잡종 (Yorkshire × Landrace)의 임신중인 모돈 28두를 이용하였다. 모돈이 임신 50일이 되었을때 실험사료를 급여하시 시작하였다. 천연물 제제, 미생물 제제, 천연물 미생물 혼합제제, 대조구의 4개의 처리로 하였으며, 각 처리구 별로 7두의 모돈을 두었다. 모돈의 산차는 각 처리별로 고른 분포를 보이게 배치하였으며, 실험 기간은 임신 50일부터 시작하여 이유시까지의 약 13주 동안 진행하였다. 임신기간동안의 사료 섭취량은 50일부터 85일까지는 1.25kg의 사료를 오전 7시와 오후 4시에 각각 급여하였다. 임신 86일부터는 200g의 사료를 증량하여 급여하였고, 포유기간동안의 사료의 급여는 분만일을 제외하고는 자유급여토록 하였다. 임신기간과 포유기간동안의 음수의 섭취는 자유 채식토록 하였으며, 임신 50일과 분만사로 이동시(임신 108)일, 그리고 이유시 모돈의 체중을 측정하였다. 분만시 산차수와 무게를 측정하였고, 이유시 자돈의 무게를 측정 하였다. 시험 사료 급여후 35일 뒤에 모돈으로부터 분과 뇨를 채취하였고,

분만후 14일 후에 분과 뇨를 채취하였다. 채취한 분과 뇨는 각각 container에 저장하여 4℃에 보관, ammonia 발생 정도를 측정하였다.

표 14. 이유자돈의 사료배합표

	대조구	천연물 제제	미생물 제제	천연물 + 미생물 제제
Corn	38.00	38.00	38.00	38.00
SBM	31.36	30.86	30.86	30.86
Wheat	20.00	20.00	20.00	20.00
Tallow	2.50	2.50	2.50	2.50
Wheat hull	6.22	6.22	6.22	6.22
DCP	1.00	1.00	1.00	1.00
Limestone	0.32	0.32	0.32	0.32
Vitamin Mix ²	0.20	0.20	0.20	0.20
Mineral Mix. ¹	0.20	0.20	0.20	0.20
Salt	0.20	0.20	0.20	0.20
GTE ³	-	0.5	-	0.40
Yeast ⁴	-	-	0.5	0.10
Calculated Values				
ME, kcal/kg	3362	3362	3362	3362
CP, %	20.35	20.35	20.35	20.35
Ca, %	0.74	0.74	0.74	0.74
P, %	0.69	0.69	0.69	0.69
Lys, %	1.12	1.12	1.12	1.12
Met, %	0.32	0.32	0.32	0.32
Met+Cys, %	0.69	0.69	0.69	0.69

¹ Vitamin mixture contains Vit. A 20,000,000 IU, Vit. D₃ 2,000,000 IU, Vit. E 100,000 mg, Vit K₃ 4,000 mg, Vit. B₁ 5,000 mg, Vit. B₂ 7,000 mg, Vit B₆ 5,000 mg, Vit. B₁₂ 50 mg, Pantothenic acid 20,000 mg, Niacin 50,000 mg, Biotin 200 mg, and Folic acid 1,000 mg /kg

² Mineral mixture contains Fe 100,000 mg, Cu 10,000 mg, Mn 50,000 mg, Zn 60,000 mg, I 350 mg, and Se 300 mg/kg

³ Green Tea Extract

⁴ *Candida krusei/inconspicua* 204

표 15. 임신돈의 사료 배합표

	대조구	천연물 제제	미생물 제제	천연물+ 미생물 제제
Corn	45.68	45.18	45.18	45.18
SBM	9.61	9.61	9.61	9.61
Wheat	15.0	15.0	15.0	15.0
Wheat Bran	14.0	14.0	14.0	14.0
Rice Bran	3.0	3.0	3.0	3.0
Corn Gluten Feed	5.0	5.0	5.0	5.0
Soy hells	3.75	3.75	3.75	3.75
Limestone	1.60	1.60	1.60	1.60
Tallow	1.30	1.30	1.30	1.30
Lysine	0.02	0.02	0.02	0.02
Salt	0.3	0.3	0.3	0.3
DCP	0.44	0.44	0.44	0.44
Vitamin Mix ²	0.15	0.15	0.15	0.15
Mineral Mix. ¹	0.15	0.15	0.15	0.15
GTE ³	-	0.5	-	0.40
Yeast ⁴	-	-	0.5	0.10
Calculated Values				
NE, kcal/kg	2300	2300	2300	2300
CP, %	14.0	14.0	14.0	14.0
Ca, %	0.79	0.79	0.79	0.79
P, %	0.6	0.6	0.6	0.6
Lys, %	0.67	0.67	0.67	0.67

¹ Vitamin mixture contains Vit. A 20,000,000 IU, Vit. D₃ 2,000,000 IU, Vit. E 100,000 mg, Vit K₃ 4,000 mg, Vit. B₁ 5,000 mg, Vit. B₂ 7,000 mg, Vit B₆ 5,000 mg, Vit. B₁₂ 50 mg, Pantothenic acid 20,000 mg, Niacin 50,000 mg, Biotin 200 mg, and Folic acid 1,000 mg /kg

² Mineral mixture contains Fe 100,000 mg, Cu 10,000 mg, Mn 50,000 mg, Zn 60,000 mg, I 350 mg, and Se 300 mg/kg

³ Green Tea Extract

⁴ *Candida krusei/inconspicua* 204

표 16. 포유돈의 사료배합표

	대조구	천연물 제제	미생물 제제	천연물+ 미생물 제제
Corn	59.42	58.92	58.92	58.92
SBM	24.66	24.66	24.66	24.66
Rice Bran	5.98	5.98	5.98	5.98
Corn Gluten Feed	2.00	2.00	2.00	2.00
Soy Hulls	1.70	1.70	1.70	1.70
Limestone	1.68	1.68	1.68	1.68
Tallow	3.21	3.21	3.21	3.21
Lysine	0.15	0.15	0.15	0.15
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30
DCP	0.60	0.60	0.60	0.60
Vitamin Mix ¹	0.15	0.15	0.15	0.15
Mineral Mix. ²	0.15	0.15	0.15	0.15
GTE ³	-	0.5	-	0.40
Yeast ⁴	-	-	0.5	0.10
Calculated Values				
NE, kcal/kg	2495	2495	2495	2495
CP, %	18.0	18.0	18.0	18.0
Ca, %	0.89	0.89	0.89	0.89
P, %	0.59	0.59	0.59	0.59
Lys, %	1.13	1.13	1.13	1.13

¹ Vitamin mixture contains Vit. A 20,000,000 IU, Vit. D₃ 2,000,000 IU, Vit. E 100,000 mg, Vit K₃ 4,000 mg, Vit. B₁ 5,000 mg, Vit. B₂ 7,000 mg, Vit B₆ 5,000 mg, Vit. B₁₂ 50 mg, Pantothenic acid 20,000 mg, Niacin 50,000 mg, Biotin 200 mg, and Folic acid 1,000 mg /kg

² Mineral mixture contains Fe 100,000 mg, Cu 10,000 mg, Mn 50,000 mg, Zn 60,000 mg, I 350 mg, and Se 300 mg/kg

³ Green Tea Extract

⁴ *Candida krusei/inconspicua* 204

제 2항 실험결과 및 고찰

1. 천연물 추출물의 생산조건 확립

가) 추출 조건의 확립

(1) 열수와 천연물 제제의 비율 탐색

1차년에서 선발된 녹차엽 추출물의 산업적 생산을 위한 열수와 녹차엽의 혼합 비율의 탐색 수행 결과는 그림 22에 나타내었다.

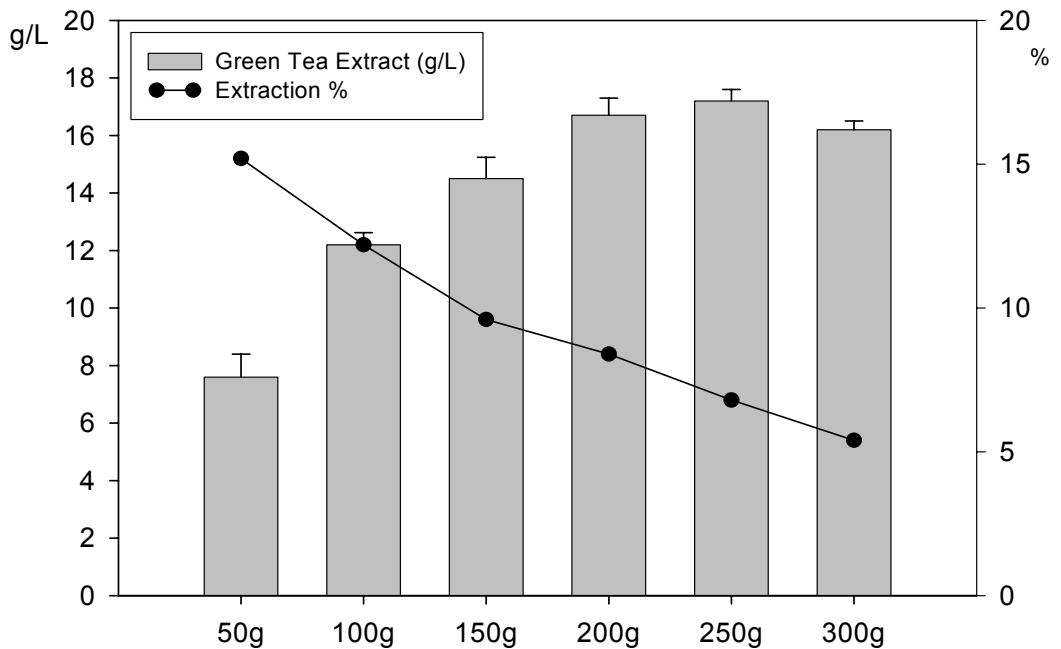


그림 22. 열수와 천연물의 비율에 따른 추출물의 양과 백분율

열수내 녹차엽의 양이 20% (200g/L) 일때까지는 녹차엽 추출물의 양이 증가하였다. 하지만, 녹차엽이 총 무게의 25%이상일때는 목차 추출물의 양이 20% (200g/L)일 때와 차이가 없었다. 열수에 첨가된 녹차엽과 추출물의 양을 비교하

여 녹차엽의 추출율(추출물의 양 / 녹차엽 × 100)을 측정하였을 때에는 녹차엽의 중량이 증가할수록 추출율은 감소하였다.

1회 녹차엽 추출시 최대로 얻을 수 있는 녹차엽 추출물의 양은 열수의 약 1.7%정도로 나타났다. 하지만, 이때의 추출율은 6.8%에 불과하기 때문에 추출물의 양은 적지만, 추출율이 비교적 높은 비율인 1000:150 ~ 1000:200 (열수:녹차엽)이 적당할 것으로 보인다.

(2) 열수의 온도에 따른 추출물의 획득수율 탐색

녹차엽과 열수의 최적 추출 비율을 이용하여 열수의 온도에 따른 녹차엽의 추출물의 양을 비교하였다(그림 23).

열수의 온도가 증가함에 따라 추출물의 양은 증가하였다. 열수와 녹차엽과의 진탕 시간이 짧을수록 추출물의 양은 온도의 영향을 더 많이 받는 것으로 나타났다. 또한, 진탕시간이 증가함에 따라 추출물의 양도 증가하였는데, 45분까지 진탕하였을 때 추출물의 양은 급격히 증가하였고, 그 후의 진탕은 추출물의 양은 증가하였지만 추출물의 증가폭은 그 전에 비하여 적었다. 열수의 온도와 열수에서의 진탕 시간에 따른 추출물의 양을 살펴보면 85℃, 90분 이상에서는 약 190g (19%)로 큰 차이가 없었다. 따라서, 본 실험에서는 추출물의 최고의 획득수율을 보장하기 위한 열수의 온도와 열수의 진탕 시간은 85℃, 90분으로 사료된다.

(3) 추출물의 활력 검증

50~90℃까지의 열수와 30~120분까지의 진탕시간동안 추출된 녹차 추출물을 동결건조 한후, 0.2mg/ml의 농도로 용매에 용해하였다. 용해된 시료를 10mM의 AHA(acetohydroxamic acid)와의 urease inhibiting activity를 그림 24에 나타내었다. Phenol red법에 의한 측정으로 열수의 온도가 증가함에 따라 추출물의 urease inhibitor activity가 감소하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 고온에서의 추출물일수록 낮은 온도(50℃)에 비하여 낮은 urease inhibiting activity를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 특히 열수의 온도가 60℃에서 70℃로 증가 할 때 urease inhibitor activity가 급격히 감소함을 확인할 수 있었다. 또한, 80℃에서 85℃로

증가시에도 이런 경향이 나타났다. 진탕 시간에 따른 변화는 낮은 온도 (50℃ ~ 60℃)에서는 발견되지 않았으나 그보다 높은 온도에서는 urease inhibiting activity가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 90℃ 이상에서는 진탕시간이 30분에서 45분 사이에 이러한 현상이 확연히 나타났다.

그림 25는 indole-phenol법에 의한 녹차 추출물(2mg/ml)의 AHA(10mM)에 대한 상대적인 urease inhibiting activity이다. Phenol red법과 동일한 형태의 상대적인 urease inhibiting activity를 보였다. 낮은 온도에서는 진탕 시간에 따라 urease inhibiting activity의 변화가 적었으나 80℃ 이상의 온도에서는 많은 차이를 나타냈다. 또한 열수의 온도가 증가할수록 urease inhibiting activity는 감소하는 경향을 보였다.

(4) 추출물의 활력과 양을 고려한 최대 추출조건 확립

표 17과 18는 각각 phenol red법과 indole-phenol법의 활력을 기준으로 하고, 열수의 온도와 진탕 시간에 따른 녹차 추출물의 양을 고려하여 계산한 상대적인 값이다. Phenol red법의 urease inhibiting activity를 기준으로 하여 추출온도와 추출시간을 살펴보면 낮은 온도(50~60℃)에서 90분 이상 추출시 비교적 높은 수율을 얻을 수 있었다. 하지만, indole-phenol법에 의한 활성을 이용하여 75℃, 또는 80℃에서 90분간 추출시 최고의 수율을 보였다. 또한, phenol red법과 동일한 조건인 50~60℃의 열수에서 90분 이상 추출시에도 높은 수율을 나타냈다.

녹차엽 열수 추출시 열수의 온도가 높고, 진탕 시간이 길수록 추출물의 양을 많아진다. 하지만, 고온에 따른 추출물의 urease inhibiting activity의 감소로 인하여 실제로 얻을 수 있는 urease inhibiting activity를 가지는 추출물의 양은 다른 조건보다 낮음을 알 수 있다. 따라서 본 실험에서는 녹차엽 추출물의 urease inhibiting activity를 유지하면서 가장 많은 양의 추출물을 얻을 수 있는 50~60℃의 열수와 90~120분의 추출시간을 확인하였고, 이를 이용한 대량생산의 조건을 확인하였다.

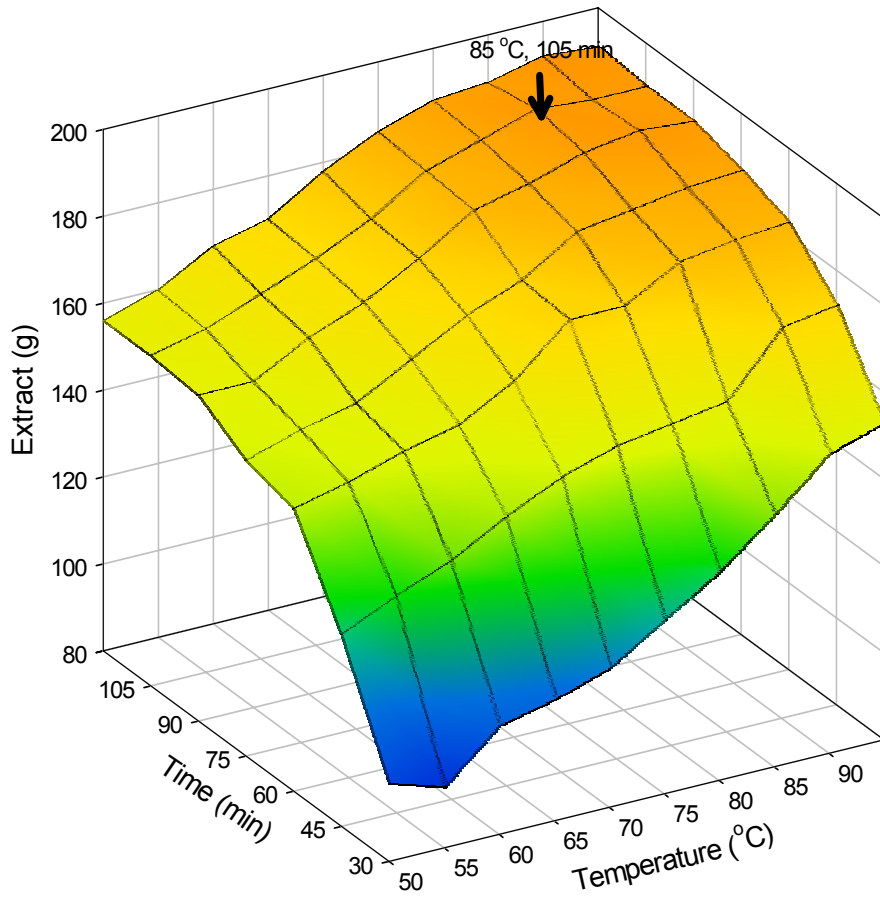


그림 23. 열수의 온도와 진탕 시간에 따른 녹차 추출물의 양

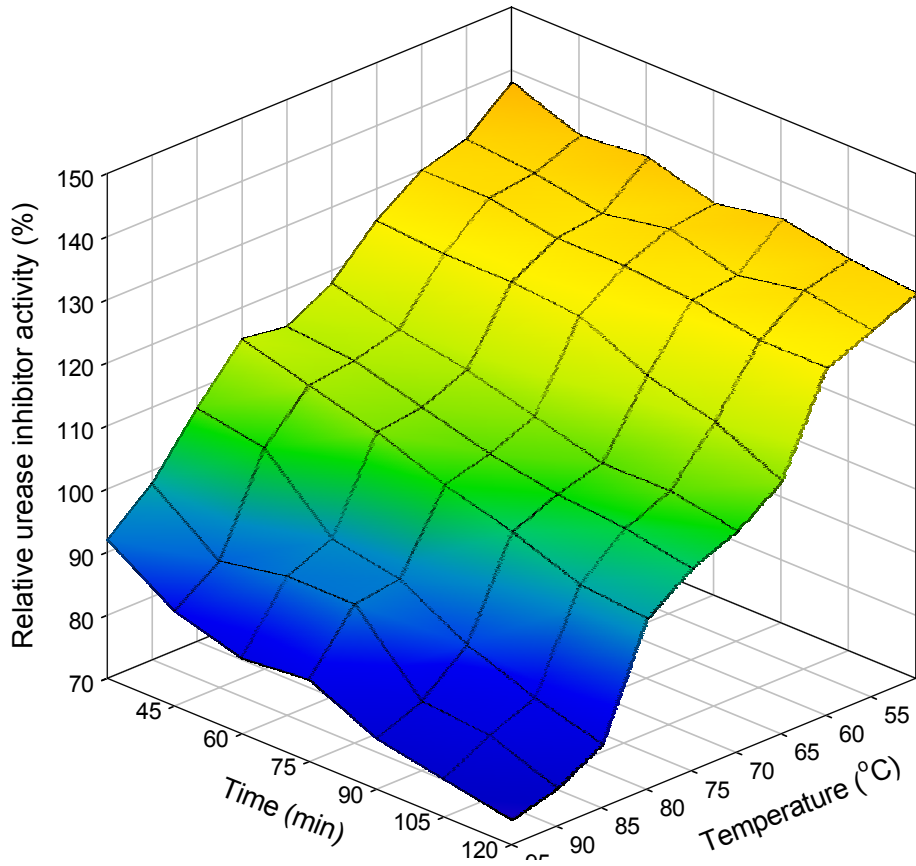


그림 24. Phenol red법에 의한 녹차 추출물(2ml/ml)의 AHA(10mM)와의 상대적 인 urease inhibiting activity

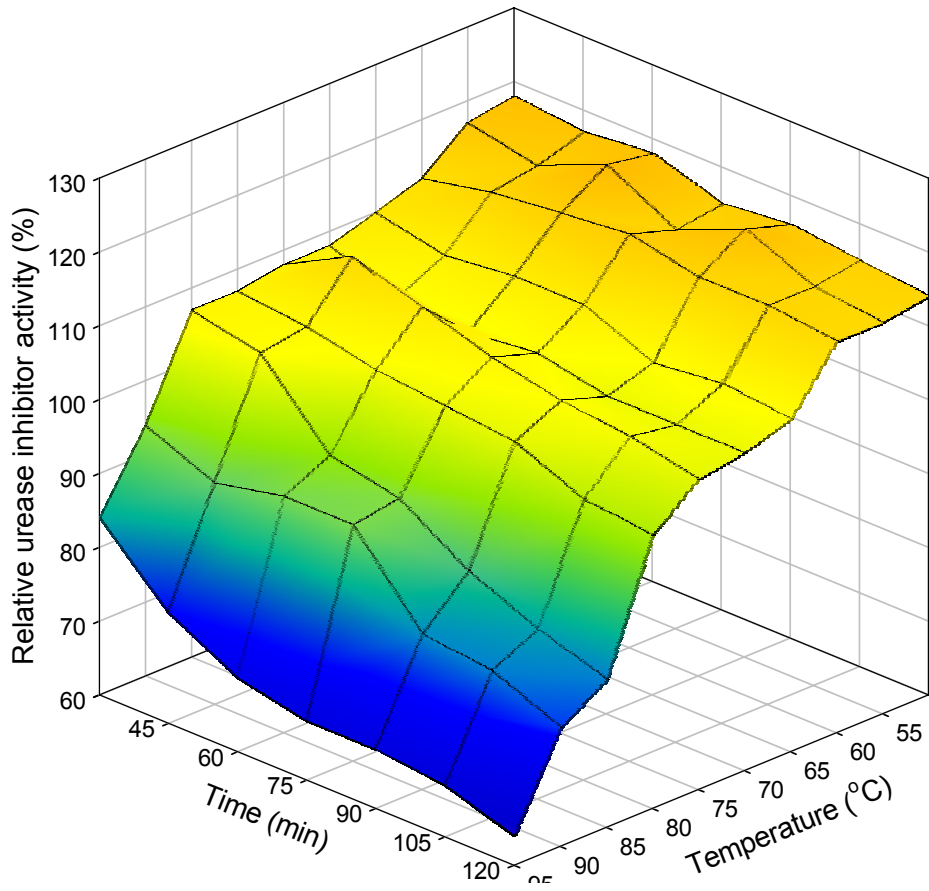


그림 25. Indole-phenol법에 의한 녹차 추출물(2ml/ml)의 AHA(10mM)와의 상대적인 urease inhibiting activity

표 17. Phenol red법에 의한 녹차엽 추출물의 상대적 urease inhibiting activity

시간(min)	온도(°C)									
	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
30	3.38	3.10	3.41	3.37	3.30	3.42	3.68	3.69	3.65	3.51
45	4.15	4.25	4.38	4.40	4.25	4.29	4.12	4.09	3.82	3.65
60	4.89	4.77	4.86	4.80	4.57	4.75	4.71	4.27	4.18	3.75
75	4.88	4.97	4.96	4.98	4.64	4.65	4.77	4.27	4.28	3.88
90	<u>5.19</u>	<u>4.96</u>	<u>5.14</u>	4.92	4.65	4.77	4.74	4.11	3.86	3.70
105	<u>5.14</u>	<u>5.16</u>	<u>5.12</u>	4.85	4.68	4.75	4.58	3.96	3.80	3.61
120	<u>5.10</u>	<u>5.12</u>	<u>5.21</u>	4.67	4.67	4.69	4.55	3.78	3.62	3.53

표 18. Indole-phenol법에 의한 녹차엽 추출물의 상대적 urease inhibiting activity

시간(min)	온도(°C)									
	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
30	2.89	2.74	2.94	2.97	3.02	3.24	3.42	3.69	3.50	3.21
45	3.62	3.73	3.84	3.83	3.88	4.29	4.08	4.09	3.82	3.22
60	4.27	4.40	4.37	4.22	4.21	4.75	4.49	4.27	4.18	3.20
75	4.25	4.33	4.49	4.41	4.43	4.65	4.68	4.27	4.27	3.17
90	<u>4.49</u>	<u>4.57</u>	<u>4.61</u>	4.38	4.48	<u>4.77</u>	<u>4.71</u>	4.11	3.86	3.23
105	<u>4.48</u>	<u>4.53</u>	<u>4.67</u>	4.47	4.50	<u>4.75</u>	4.58	3.96	3.80	3.18
120	<u>4.44</u>	<u>4.52</u>	<u>4.71</u>	4.46	4.58	4.69	4.55	3.78	3.64	3.05

2. 선발균주의 생산조건 확립

가) 선발균주의 분자생물학적 방법의 동정 및 안전성 검증

많은 연구자들이 일반적인 균주의 동정법으로 당발효 패턴을 많이 이용하고 있다. 그러나 이는 당발효 정도를 측정하는데 실험자에 따라 오차가 있을 수 있어 정확한 동정은 어렵다고 판단된다. 따라서 다양한 방법에 의한 결과와 비교하는 것이 정확하게 균주를 동정할 수 있을것으로 사료되었다. 최근 들어 균분류방법이 세분화 되면서 같은 당발효 패턴이더라도 균주가 다르게 판명되는 경우가 존재한다. 따라서 이러한 부분을 보완하기 위해 많은 연구자들이 분자생물학적 방법을 이용하고 있다. 본 연구에서도 1차년도에 당발효 패턴으로 204균주를 *Candida krusei/inconspicua*로 판정하였다. 이 균주는 많은 식품의 발효에 사용되지만 일부 균주의 특성에 따라 병원성을 나타내는 경우도 보고되고 있으므로 보다 정확한 동정과 함께 사료에의 이용 안전성을 평가하기 위해 RAPD 방법을 사용하였다. 그림 26은 RAPD방법으로 균주의 band pattern을 나타낸다. 결과와 같이 204균주는 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9080 균주와 주 band (300bp, 1.0kpb, 2.0kbp) 3개가 거의 유사한 band pattern을 나타내었다. 본 연구에 따라서 204균주는 분자생물학적 방법으로 동정했을때 *Candida krusei/inconspicua*보다는 *Saccharomyces cerevisiae*에 가까운 균종이라고 관찰되었다. *Saccharomyces cerevisiae*는 많은 식품의 경우 발효에 사용되고 있으며 실제 업계에서 사료의 단백질원으로 사용되는 효모 균주이므로 따라서 본 204균주를 사료에 이용했을 때 안전성이 확보될 수 있을 것으로 판단되었다. 차후 RFLP (Restriction enzyme length Polymorphism)과 같은 다른 방법과의 비교로 보다 정확한 동정이 필요하다고 사료된다.

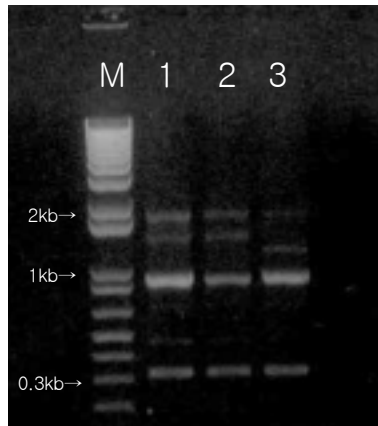


그림 26. 0.8% agarose gel electrophoresis of products (M: 1kb DNA ladder; Gibco-BRL, 1: *S. cerevisiae* ATCC 9080, 2: *S. cerevisiae*, 3: *C. krusei/inconspicua* 204)

나) 선발균주의 추출물 성분 조사

본 연구에서는 urease activity를 억제하는 fraction을 탐색하기 위해 *Candida krusei/inconspicua* 204균주에 존재하는 단백질, 탄수화물, 지방을 각각 추출하여 urease inhibiting activity를 측정하였다. 지방의 경우 urease inhibiting activity를 확인할 수 없었으며 (그림 32) 탄수화물의 경우 phenol-sulfuric acid (Dubois 등, 1956) assay을 이용하여 정량하였으며 glucose를 standard로 (그림 30) 당함량을 측정하였다. Standard 곡선과 비교한 결과 85 mg/ml의 당을 회수할 수 있었으며 탄수화물의 경우도 phenol-red test 결과 지방과 유사하게 urease inhibiting activity를 확인할 수 없었다(그림 31). 따라서 urease inhibiting activity를 가지는 주요 fraction은 단백질이라는 추정이 가능하였다. 단백질의 경우 60% ammonium sulfate를 이용하여 침전시킨 후 SDS-PAGE로 band를 확인하였다 (그림 27). 또한 단백질을 구성하는 아미노산의 조성을 측정하였다 (그림 29). 명확한 urease inhibiting activity를 가지는 단백질을 분리, 정제를 위해 이를 Sephadex G-200을 이용하였으며 3차 증류수로 용출을 실

시하였다. 각 5ml씩 fraction을 분획하여 분획별로 phenol-red 방법을 이용하여 urease inhibitory activity를 측정하였으나 회석과정에서 부피의 증가로 인해 activity가 측정되지 않았다.

YM broth를 대조구로 하고 *C. krusei/inconspicua* 204를 48시간 배양한 상등액을 처리구로 하여 아미노산 조성의 분석 결과는 그림 29와 같은 그래프가 작성되었다. 대조구에 비하여 cystine이 검출되었다. Cystine은 황을 함유하고 있는 아미노산 중 하나로 Sissons 등(2000)은 황 함유 아미노산이 urease의 활력을 저해하는 효과가 있는 것으로 보고하였다. Gel-chromatography에 의해 분리 정제된 fraction에서 효과가 나타나지는 않았으나 아미노산 조성의 분석을 통하여 urease의 효과를 억제할 수 있는 물질이 생성됨을 확인할 수 있었다. 따라서 *C. krusei/inconspicua* 204에 의한 urease의 억제 효과를 추정할 수 있다.

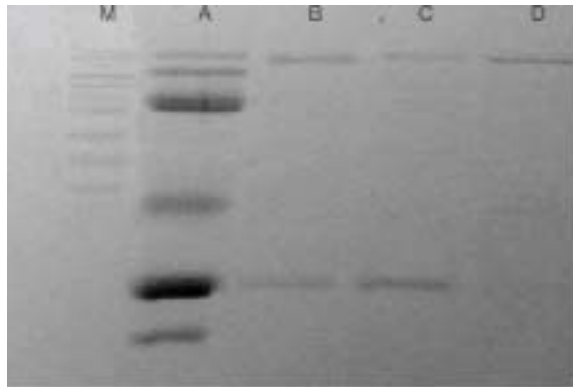


그림 27. SDS-PAGE of *C. krusei/inconspicua* 204 culture

(M: prestained protein, A: concentrated *C. krusei/inconspicua* 204 culture, B: 24hr incubated *C. krusei/inconspicua* 204 culture, C: 48h *C. krusei/inconspicua* 204 culture, D: control).

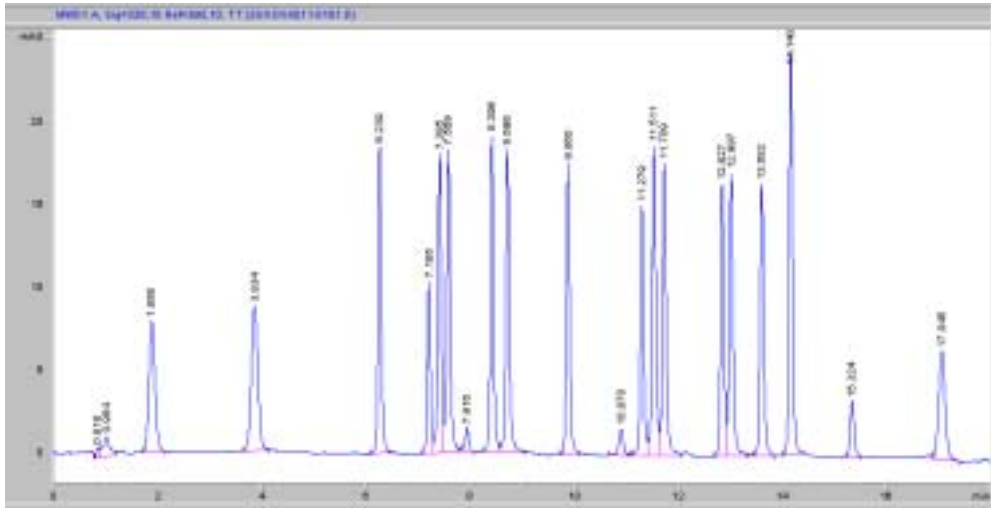


그림 28 1 nmol amino acid standard graph

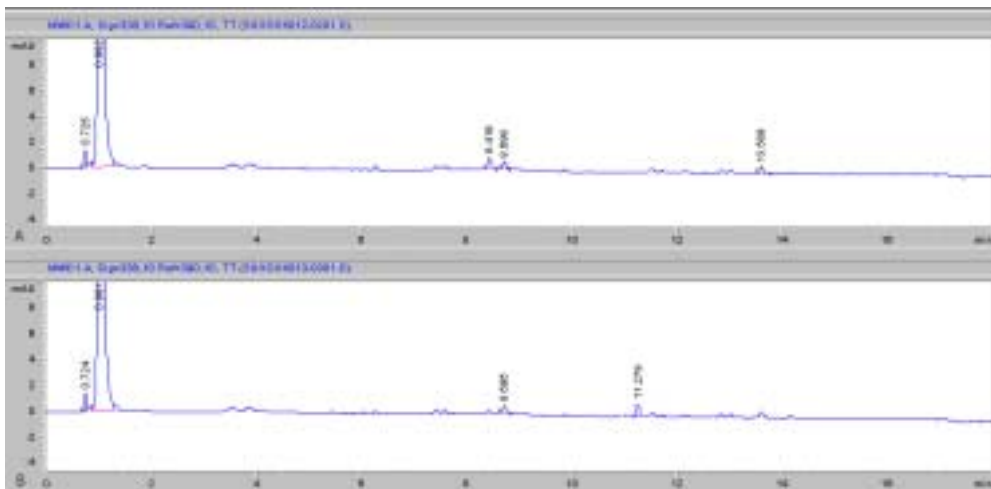


그림 29. Analysis of amino acid in supernatant of *C. krusei/inconspicua* 204.
(A: YM broth, B: *C. krusei/inconspicua* 204, 48hr incubated supernatant)

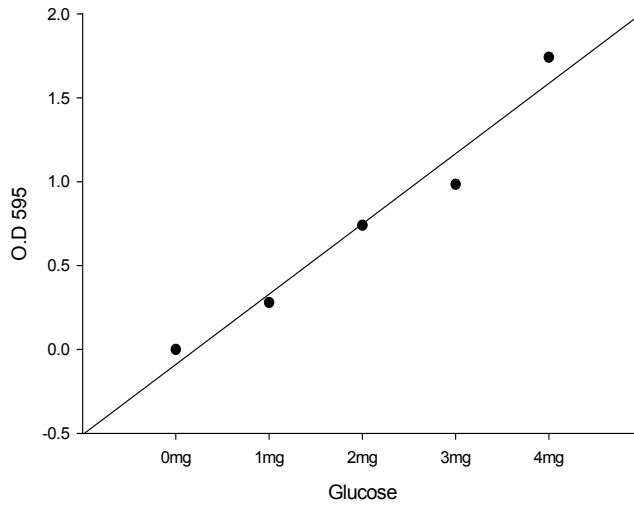


그림 30. Glucose standard curve with phenol-sulfuric acid method

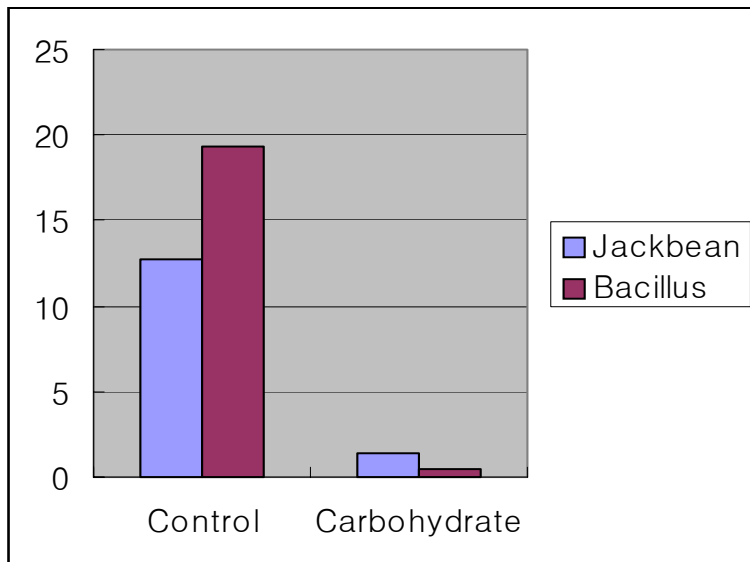


그림 31. Urease inhibiting activity of carbohydrate in supernatant of *C. krusei/inconspicua* 204.

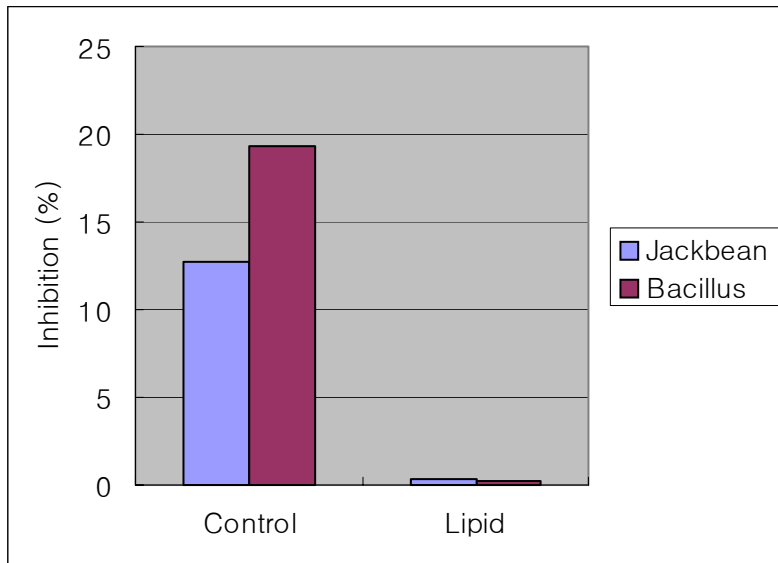


그림 32. Urease inhibiting activity of lipid in supernatant of *C. krusei/inconspicua* 204.

다) 선발균주의 최적의 성장 온도와 시간 탐색

그림 33, 34, 35에는 온도와 시간, 그리고 pH에 따른 *C. krusei/inconspicua* 204의 성장 곡선을 나타내었다.

적정 pH를 4로 하였을때의 성장곡선은 그림 33이다. *C. krusei/inconspicua* 204는 온도가 높아 질수록 낮은 colony forming unit(CFU)를 보였다. 24°C에서는 배양후 48시간 후에 $10^{7.8}$ 의 최고의 균수를 보였고, 30°C에서는 접종후 44시간 이후에 $10^{6.4}$ 의 균수를 보였다. 반면, 36°C에서는 배양후 32시간에 $10^{4.5}$ 의 균수를 보였다. 적정 pH를 6으로 해 주었을때는 그보다 낮은 CFU를 보였다. 24°C에서는 36시간에, 30°C에서는 32시간에, 36°C에서는 32시간에서 각각 $10^{6.2}$, $10^{6.0}$, 그리고 $10^{4.3}$ 의 균수를 보였다. 하지만, pH를 4로 적정하여 주었을때와는 다르게 낮은 균수를 보였다. 모든 온도에서 pH를 적정하기 시작한 시간부터 균수의 증가가 없이 계속 일정한 수를 유지하고 있는 현상을 보였다. 30°C와 36°C에서의 *C. krusei/inconspicua* 204의 성장은 pH를 4로 적정해 주었을때와는 균수에서 차이가 없었으나, 24°C에서는 100배 정도의 낮은 균수를 보였다. 적정 pH를 8로 하였을때는 그보다 더 낮은 성장을 보였고, 24°C와 30°C에서도 균수의 차이가 거의 없었다. 특히, 36°C에서 배양하였을때는 더 낮은 균수를 보였고 측정을 시작한 12시간 이후부터 계속 균수가 낮아지는 것을 확인하였다.

본 실험을 통하여 *C. krusei/inconspicua* 204의 성장을 위한 최적의 조건은 온도가 24°C이고, 배지의 pH를 4이고 이때 최고의 균수를 보이는 시간은 접종후 48시간인 것을 확인하였다.

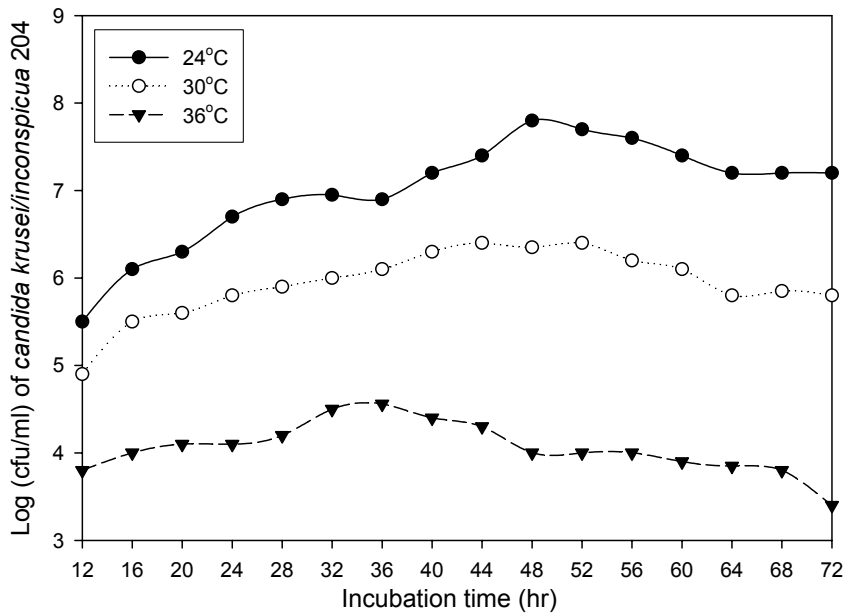


그림 33. 적정 pH 4에서의 온도별 *C. krusei/inconspicua* 204의 성장곡선

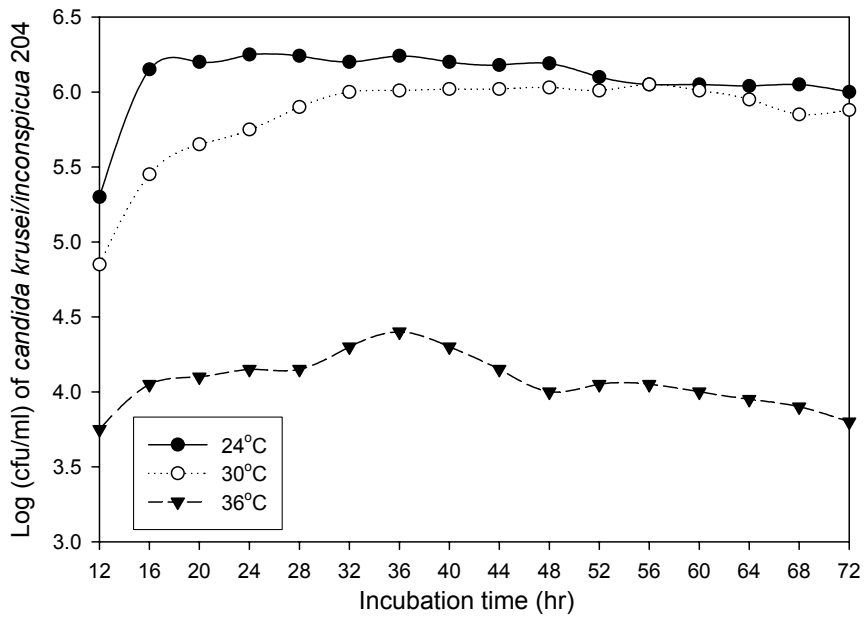


그림 34. 적정 pH 6에서의 온도별 *C. krusei/inconspicua* 204의 성장곡선

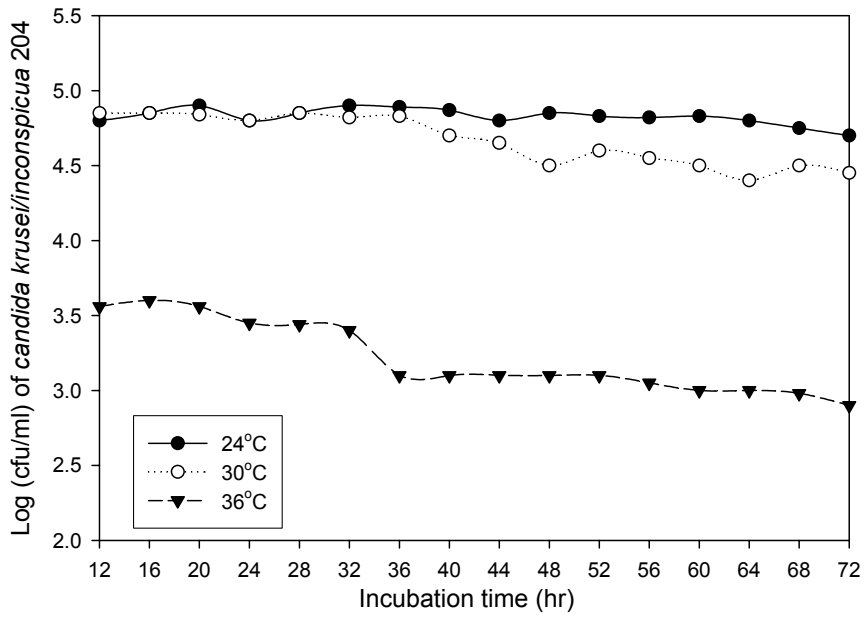


그림 35. 적정 pH 8에서의 온도별 *C. krusei/inconspicua* 204의 성장곡선

라) 선발균주의 최적의 배지조성 탐색

다)의 실험결과를 바탕으로 적정 pH를 4로 유지하고, 온도는 24℃로 유지하면서 배지의 조성을 변경하여가며 48시간후의 *C. krusei/inconspicua* 204의 균수를 측정하였다.

각각의 조건에 따른 CFU(colony forming unit)을 표 19에 나타나있다.

Glucose가 8%로 낮은 수준에서는 yeast extract나 peptone의 배지내 함량을 늘려 주었을 때 균수가 증가하는 경향을 보였다. peptone의 배지내 농도가 7g/L 일때는 5g/L나 3g/L에 비하여 높은 수의 균수를 보였다. YM media와 같은 수준의 glucose(10g/L) 조건에서도 peptone과 yeast extract의 함량을 증가시켜 주었을 때 균수가 늘어나는 것을 확인할 수 있었다. Glucose를 12g/L로 하여 주었을 때는 YM media보다 높은 수의 균수를 나타내었고, 특히 peptone을 5g/L, yeast extract를 3g/L로 넣어주었을 때 가장 높은 균수인 $10^{7.95}$ 를 보였다.

본 실험에서는 *C. krusei/inconspicua* 204를 최대로 생산하기 위한 배지의 조건은 YM media보다 높은 수준의 glucose(12g/L)와 같은 수준의 peptone(5g/L), Yeast extract(3g/L)로 확인되었다.

표 19. 배지 성분의 변화에 따른 *C. krusei/inconspicua* 204의 CFU(Colony Forming Unit)

처리구	Log CFU
G8P3Y2	4.23
G8P3Y3	4.32
G8P3Y4	4.45
G8P5Y2	4.5
G8P5Y3	4.52
G8P5Y4	4.58
G8P7Y2	5.64
G8P7Y3	5.72
G8P7Y4	5.84
G10P3Y2	6.42
G10P3Y3	6.50
G10P3Y4	6.58
G10P5Y2	7.45
G10P5Y3	7.75
G10P5Y4	7.80
G10P7Y2	7.64
G10P7Y3	7.69
G10P7Y4	7.78
G12P3Y2	7.80
G12P3Y3	7.84
G12P3Y4	7.89
G12P5Y2	7.95
G12P5Y3	7.95
G12P5Y4	7.90
G12P7Y2	7.90
G12P7Y3	7.87
G12P7Y4	7.85

다) 성장조건에 따른 urease inhibitor activity 측정

나)에서 탐색된 최적의 배지 조성을 이용하여, pH를 4.0, 온도를 24, 26, 28℃로 유지한 후 *C. krusei/inconspicua* 204의 균수와 urease inhibitor activity를 측정된 결과를 각각 그림 36, 37에 나타내었다.

일반적으로 사용하는 YM media에 비하여($10^{7.8}$) 높은 CFU($10^{7.95}$)를 보였다. 26℃와 28℃에서의 균수는 32시간까지는 24℃에 비하여 높은 균수를 유지하고 있었으나, 48시간에서는 24℃에서 배양한 *C. krusei/inconspicua* 204가 더 높은 균수를 보였다. 각 시간별 *C. krusei/inconspicua* 204의 urease inhibiting activity는 그림 37에 나타나 있다. Urease inhibiting activity는 AHA와 상대적인 값을 비교한 것으로 균수와 비슷한 경향을 보였다. 특히, 24℃에서 배양한 *C. krusei/inconspicua* 204는 다른 조건에 비하여 높은 urease inhibiting activity를 보이고 있었다. 28℃에서 배양할 경우 시간이 지남에 따라 urease inhibiting activity가 감소하는 경향은 보였다.

본 실험에서는 *C. krusei/inconspicua* 204의 최고 균수를 얻기 위한 조건으로는 pH 4를 유지하며, 24℃에서 48시간 동안 배양하는 것이 가장 좋은 것으로 확인 되었고, 최고의 urease inhibiting activity를 얻기 위해서는 pH 4를 유지하며, 24℃에서 52시간 동안 배양하는 것으로 확인되었다.

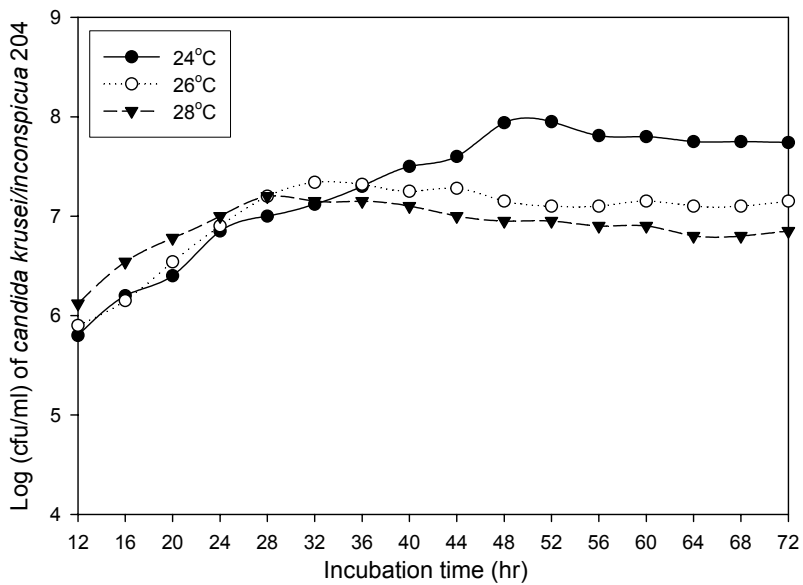


그림 36. pH 4에서 배양 시간에 따른 *C. krusei/inconspicua* 204의 CFU 변화

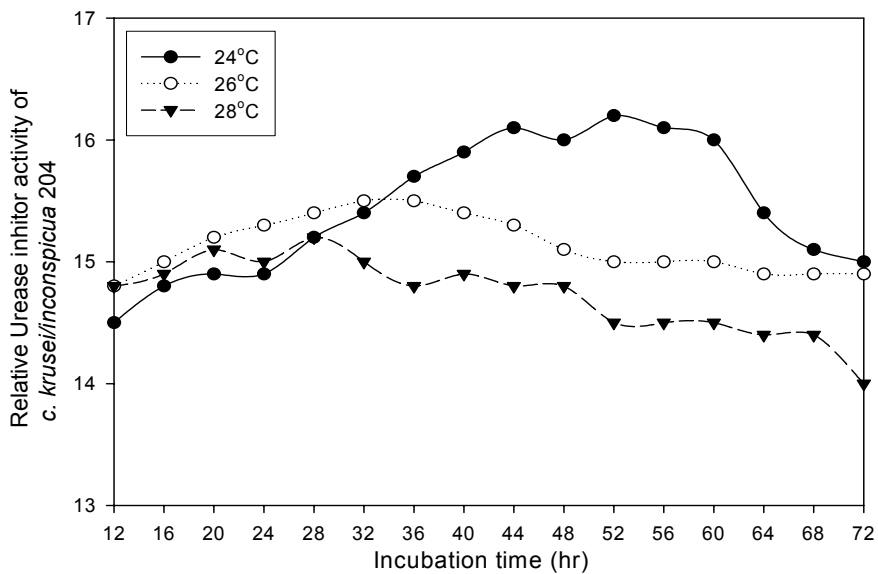


그림 37. pH 4에서 배양 시간에 따른 *C. krusei/inconspicua* 204의 상대적 urease inhibiting activity 변화

3. 선발제제 및 추출물의 복합화 조건 확립

1) 천연물 추출물과 미생물 제제의 혼합 비율 확립

Phenol red법과 indole phenol법에 의한 결과를 표 20에 나타내었다. Indole phenol법이 phenol red법에 비하여 높은 값을 나타냈다. 천연물 제제와 미생물 제제를 혼합하였을 때 최적의 혼합비는 8:2(천연물 제제: 미생물 제제)의 비율인 것으로 확인되었다.

그림 38은 artificial slurry의 4일후 ammonia의 발생이 최고점에 도달하였을 때의 천연물 제제와 혼합제제 비율에 따른 ammonia 발생의 양이다. 천연물 제제와 미생물 제제를 혼합하지 않은 상태에서 각각 넣어 주었을 때는 27mmol 정도의 ammonia의 발생이 확인되었지만, 두 제제를 혼합하였을때는 그보다 낮아지는 경향을 확인하였다. 천연물 제제와 미생물 제제의 혼합비가 8:2로 하였을 때, 가장 낮은 수준(20mmol)의 ammonia가 발생하였다.

indole phenol법과 phenol red법을 통한 결과는 artificial slurry를 이용한 결과와 동일한 결과를 확인할 수 있었고, 이에 따른 혼합제제의 생산 비율은 8:2(천연물 제제: 미생물 제제)가 가장 효과적인 것으로 확인되었다.

표 20. 선발제제의 혼합 비율에 따른 AHA와의 상대적 urease inhibiting activity

천연물 제제	미생물 제제	Phenol red	Indole phenol
10	0	114	120
9	1	117	124
8	2	118	126
7	3	114	126
6	4	106	118
5	5	108	114
4	6	105	105
3	7	100	100
2	8	95	85
1	9	90	70
0	10	70	65

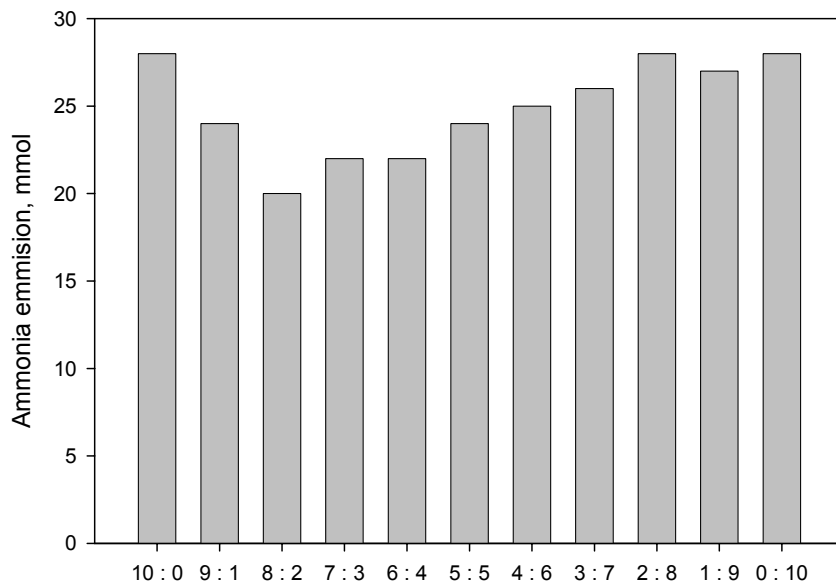


그림 38. 천연물 제제 : 미생물 제제의 비율에 따른 artificial slurry에서의 ammonia 발생량

4. 선발제제 및 균주의 건조 및 분말화

1) 건조 조건에 따른 복합화 제제의 활력 변화

천연물 제제와 미생물 제제의 건조 조건에 따른 urease inhibiting activity를 그림 39와 40에 나타나 있다. 천연물 제제의 경우 동결 건조시 약 120%의 활력을 유지하고 있었던 반면 spray-dry나 vacuum-dry시 80%정도의 urease inhibiting activity를 가지고 있는 것으로 확인 되었다. 미생물 제제의 경우도 동결건조에서 18%정도의 활력을 가지고 있었고, 건조시 온도가 높아짐에 따라 활력이 저해되는 것을 확인하였다. 또한, 건조후 살아있는 *C. krusei/inconspicua* 204도 동결건조시 10^7 으로 높게 유지되었던 반면, 건조시 온도가 높아짐에 따라 생존하고 있는 균수가 감소하는 것을 확인하였다. 천연물 제제와 미생물 제제의 활력을 최대한 유지하기 위한 조건으로는 동결건조가 가장 효과적인 방법임을 본 실험을 통하여 확인하였다.

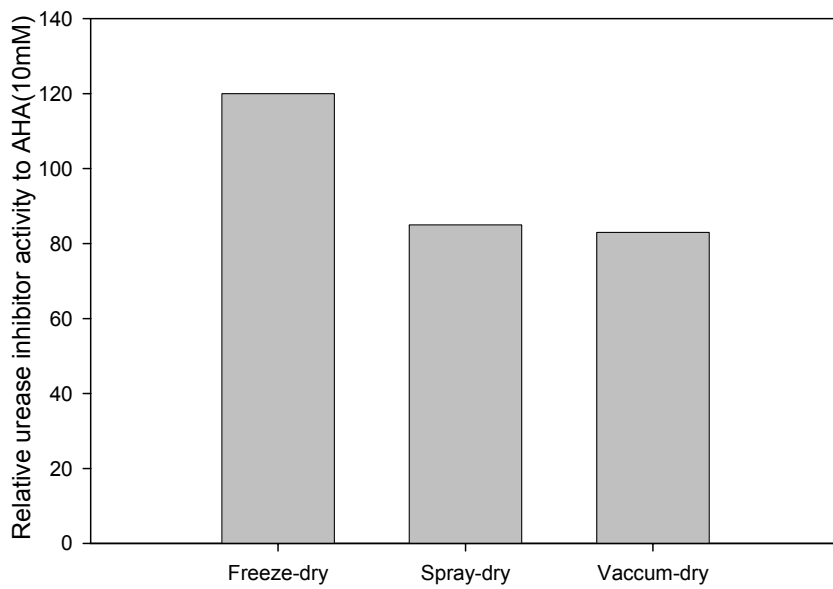


그림 39. 건조조건에 따른 천연물 제제의 phenol red법에 의한 AHA와의 상대적 urease inhibiting activity

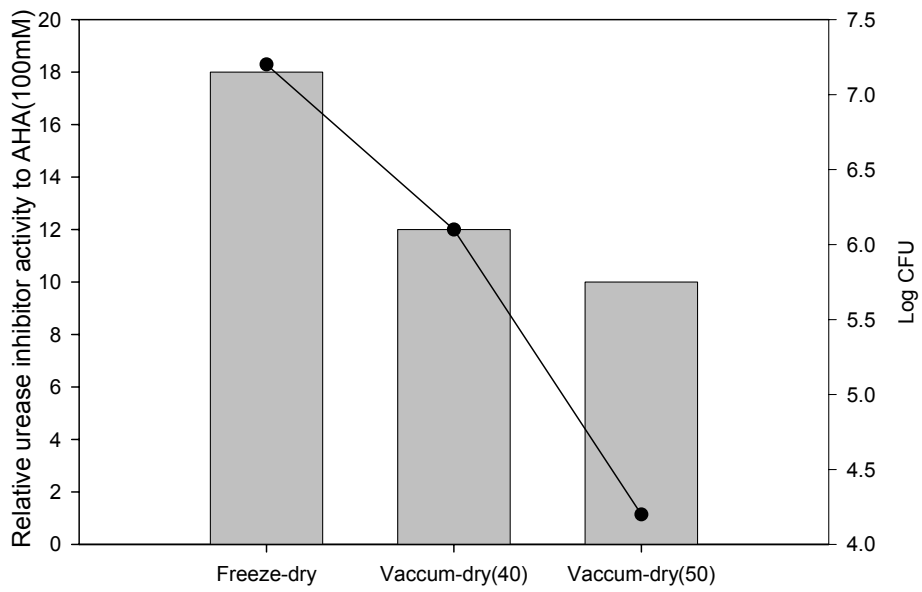


그림 40. 건조조건에 따른 미생물 제제의 phenol red법에 의한 AHA와의 상대적 urease inhibiting activity와 생존 균수

2) 보존기간에 따른 복합화 제제의 활력 변화

25°C의 incubator에서 5주간 보관한 복합제제의 urease inhibitor activity는 그림 41에 나타나있다. 25°C에서 보관시 15일까지는 약 10%정도의 활력의 저하가 관찰되었다. 15일 이상의 저장에서는 급격한 활력 저하가 관찰되었는데 저장 개시에 비해 약 75%의 활력을 유지하고 있었다. 저장기간동안의 생존하고 있는 균수도 활력과 비슷한 경향을 보여 보존 20일부터 급격한 감소를 보였다. 본 실험에서는 복합 제제의 보존기간에 따른 안정성을 유지할 수 있는 기간은 상온(25°C)에서 20일 정도로 확인되었다.

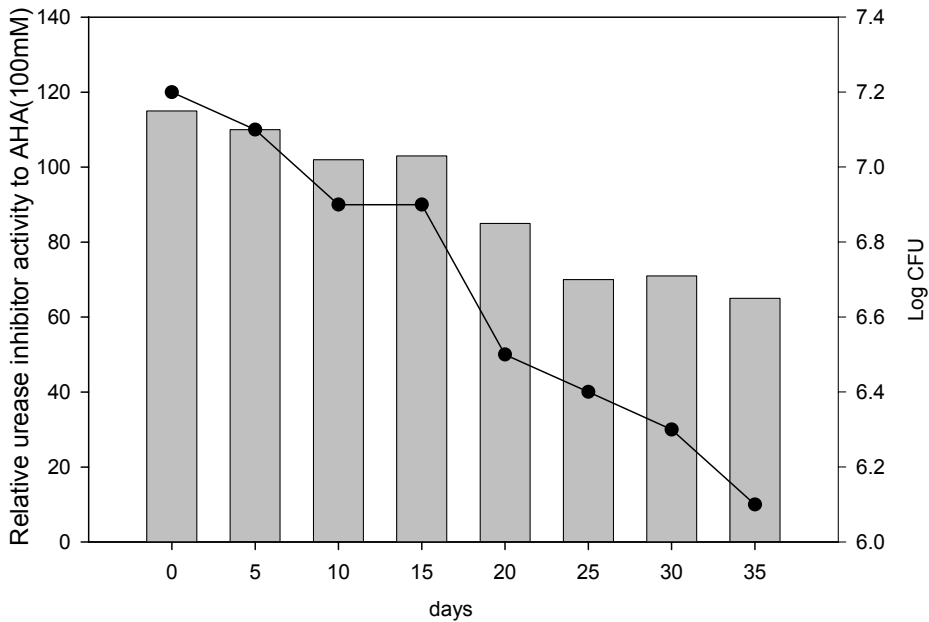


그림 41. 25°C에서 보존 기간에 따른 복합화 제제의 urease inhibiting activity 변화와 CFU

5. 선발제제와 균주의 동물 실험 검증

1) 선발 제제 및 균주의 사료내 안정성 검증

사료에 혼합한 뒤 보존기간동안 복합제제의 urease inhibiting activity를 측정 한 것은 그림 42에 나타나 있다. 보존 14일 때 까지는 urease inhibiting activity의 활력이 서서히 감소하다가 21일째에는 급격한 활력의 감소를 보였고, 35일에는 그 활력이 유지되고 있었다. 살아있는 *C. krusei/inconspicua* 204는 저장 7일 까지는 큰 차이가 없었으나, 14일에는 급격히 적어지는 것을 확인할 수 있었다.

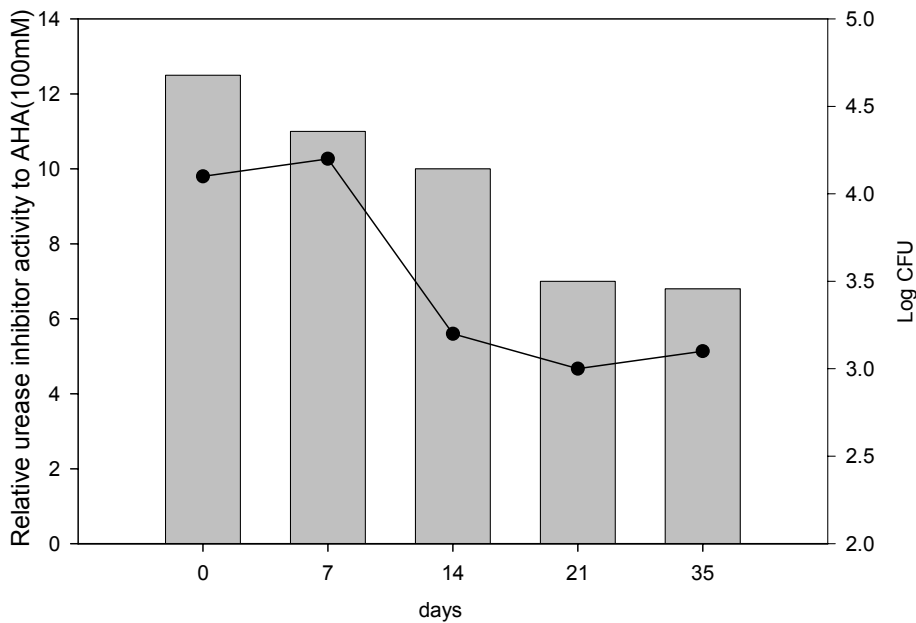


그림 42. 사료내 혼합제제의 혼합시 보존 기간에 따른 urease inhibiting activity 변화와 CFU

2) 선발 제제 및 균주의 자돈 사료의 효과 검증

천연물 제제와 미생물 제제, 그리고 복합화 제제를 자돈 사료에 첨가하였을 때의 성장 성적은 표 21에 나타나 있다.

체중의 변화에서는 처리구간의 차이가 없었다. 실험 전 기간에 걸쳐 모든 처리구에서 비슷한 체중을 나타냈다. 미생물 제제 처리구에서 약간 높은 체중이 확인되었으나 다른 처리구와 차이는 없었다. 일당 증체량, 일당 사료섭취량, 사료효율에서도 처리구간의 차이는 확인되지 않았다.

이유자돈의 분과 뇨를 수거하여 artificial slurry를 배합하여 ammonia 발생정도를 확인한 것은 그림 43에 나타나 있다. 3일째까지는 모든 처리구에서 비슷한 양의 ammonia가 방출되었다. 하지만, 4일째부터는 생성되는 ammonia의 농도에서 차이가 있었는데, 대조구의 경우 추출물 처리구들 보다 높은 수준의 ammonia를 방출하였다. 천연물 제제나 미생물 제제의 경우 대조구 보다 낮은 수준의 ammonia의 방출이 확인되었고, 천연물 제제와 미생물 제제의 혼합물의 경우 그보다 낮은 수준의 ammonia가 방출되는 것을 확인하였다.

본 실험에서는 천연물 제제나 미생물 제제, 그들의 복합제제가 이유자돈의 성장에는 영향이 없이 분·뇨에서 ammonia의 방출을 저해하는 효과를 확인하였다.

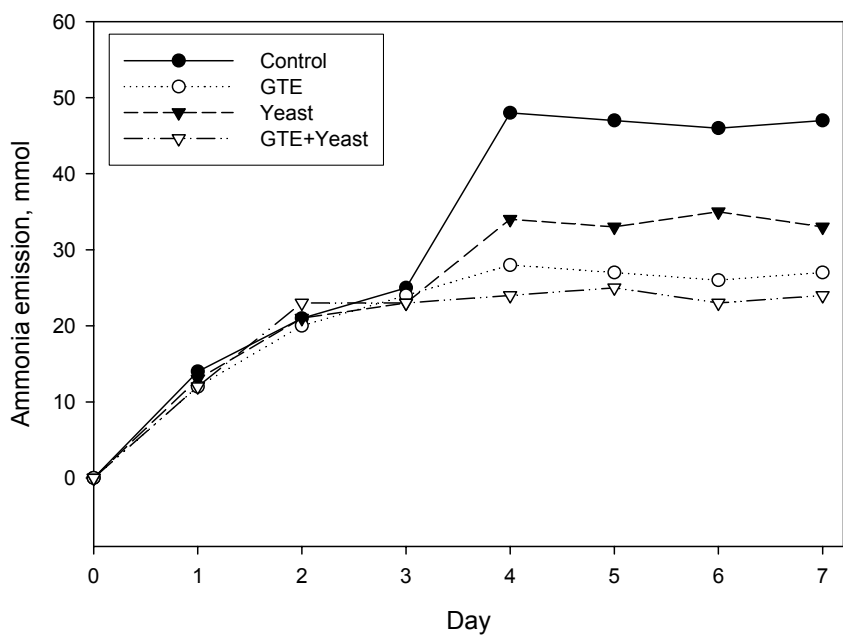


그림 43. 혼합제제 급여후 자돈의 분·뇨의 ammonia 발생 수준

표 21. 천연물 및 미생물 제제의 자돈 급여시 성장 성적

	대조구	천연물제제	미생물제제	복합제제
체중	----- kg -----			
0 주	10.34	10.37	10.36	10.39
1 주	13.27	13.32	13.21	13.30
2 주	16.04	16.10	16.08	16.09
3 주	20.18	20.20	20.24	20.23
일당증체량	----- g/d -----			
0~1주	419	421	407	416
1~2주	396	397	410	399
2~3주	591	586	594	591
0~3주	468	468	470	468
일당사료섭취량	----- g/d -----			
0~1주	532	536	538	524
1~2주	721	718	722	718
2~3주	810	819	815	824
0~3주	687	691	691	688
사료효율	-----			
0~1주	0.79	0.79	0.76	0.79
1~2주	0.55	0.55	0.57	0.56
2~3주	0.73	0.72	0.73	0.72
0~3주	0.68	0.68	0.68	0.68

3) 선발 제제 및 균주의 모돈 사료의 효과 검증

모돈의 포유기간동안의 체중 변화는 표 22에 나타나 있다.

분만시 모돈의 체중은 처리구간의 차이가 없었다. 또한, 이유시에도 처리구간의 차이는 없었으나, 미생물 제제와 천연물 미생물 혼합제제 급여한 모돈이 약간 높은 경향이 있었다. 포유기간동안 자돈의 성장은 미생물 제제 처리구가 다른 처리구에 비하여 높은 경향이 있었다 하지만, 유의적인 차이는 없었다.

그림 44, 45에는 임신 85일째와 분만 14일에 채취한 분뇨에서의 암모니아 발생 정도를 나타내었다. 임신기간 동안 모돈의 분뇨에서 발생하는 ammonia의 양은 천연물 제제, 미생물 제제, 천연물+미생물 제제를 급여하였을 경우 감소하는 경향이 있었다. 자돈의 결과와는 다르게 미생물 제제를 급여하였을 경우 천연물 제제에 비하여 높은 감소를 나타내었다. 천연물 미생물 혼합제제의 급여는 미생물 제제의 급여보다 높은 ammonia 발생 억제를 보였지만 그 차이는 크지 않았다.

포유기간동안의 분과 뇨에서의 암모니아의 발생은 임신 기간동안과는 다른 형태를 보였다. 대조구에 비하여 천연물 제제, 미생물 제제, 천연물 미생물 혼합제제의 급여가 암모니아의 발생을 감소시켰지만, 임신 기간동안의 효과보다는 낮았다. 임신 기간동안의 사료내 단백질 함량은 14%였던 반면, 포유기간동안의 사료에는 18%정도의 높은 단백질을 함유하고 있어 urease inhibitor 제제의 효과보다 많은 양의 단백질을 섭취 한 것으로 생각된다. 또한, 포유기간동안의 수분의 섭취량은 일반적으로 임신기간동안 많기 때문에, 뇨로의 urea의 배출이 증가 하였을 것이지만, 임신기간과 같은 비율의 분과 뇨로 artificial slurry를 제조 하였기 때문에 그 차이가 존재할 수 있다.

표 22. urease inhibitor 제제에 의한 모돈과 자돈의 분만시 체중과
이유시 체중

	대조구	천연물 제제	미생물 제제	천연물+ 미생물 제제
모돈				
분만시 체중	232.42±5.52	235.55±4.66	235.55±5.73	231.48±4.87
이유시 체중	210.48±5.47	211.54±4.17	217.48±6.78	215.89±7.48
자돈				
분만시 체중	1.43±0.07	1.49±0.08	1.46±0.05	1.44±0.06
이유시 체중	6.17±0.31	6.34±0.27	6.57±0.25	6.48±0.26

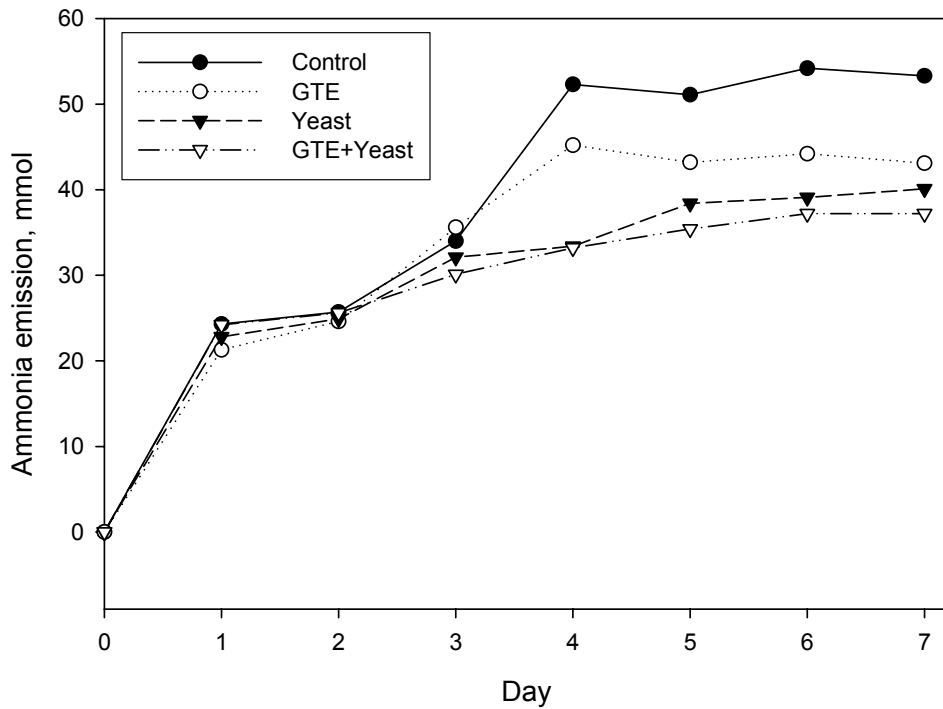


그림 44. 모돈의 임신기간동안의 분뇨에서의 ammonia 발생량

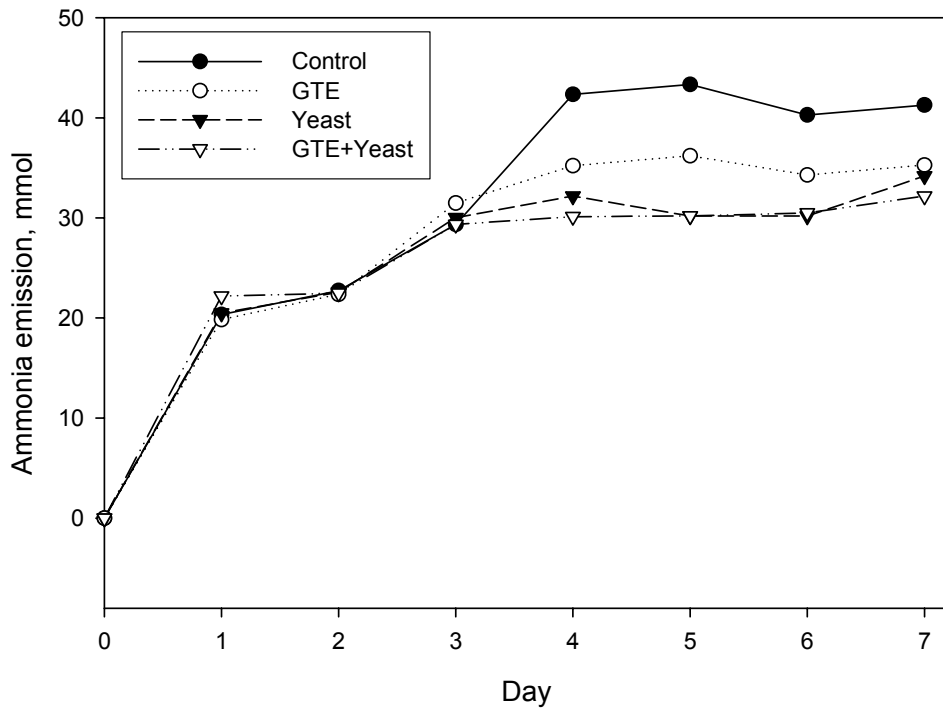


그림 45. 포유돈에게 복합제제 급여서 분,뇨에서의 ammonia 발생량

제 3 절 신개발 제제의 현장적용실험

제 1 항 실험재료 및 방법

1. 복합제제(미생물과 식물성 추출물)의 사료내 안정성 검증

2차년에서 얻어진 추출조건 (50~60℃, 90~120분)으로 녹차엽을 추출 하였고, 미생물 성장 조건(pH4, 24℃, 52시간)에 따라 미생물을 배양후 동결건조하여 녹차엽 추출물과 미생물 배양체를 8:2로 혼합하였다. 혼합된 복합제제는 사료내 0.2, 0.5, 1.0%로 혼입하여 25℃ 인큐베이터에서 42일간 보관하며, 28일까지는 4일 간격으로 시료를 채취하였고, 그 후는 7일간격으로 시료를 채취하였다. 채취한 sample은 peptone 수를 이용하여 serial dilution 후 YM agar plate에 접종하고, 48시간동안 24℃의 인큐베이터에서 배양하였다. Plate내에 30~300개의 colony가 생성시 colony수를 측정하였다. 또한, 1g의 시료를 9ml의 0.1M 의 Tris-HCl(pH 6.8)로 희석한후, 4℃에서 500g로 30분간 원심분리하여 사료를 침전시키고, 상등액을 추출하여 phenol red법을 이용하여 urease inhibitoyr activity를 측정하였다.

2. 복합제제(미생물과 식물성 추출물)의 분내 암모니아 발생 억제 효과 검증

분과 뇨를 1:2로 혼합하여 artificial slurry를 제조하였다. 분내 0.1, 0.5, 1.0%의 혼합제제를 첨가한 후 상온에서 21일간 배양하여 ammonia를 발생시켰다. 발생된 암모니아는 tube를 이용하여 4% boric acid에 포집하였다. boric acid는 3일 간격으로 회수 하여, 3일 동안 발생한 암모니아의 양을 측정하였다. 포집된 암모니아는 0.01N HCl을 이용하여 적정하였고, 적정량에 따른 N 양을 계산하여 생성된 ammonia양을 계산하였다. 암모니아의 포집과 적정은 Kjeldahl 방법을 이용하였다.

3. 복합제제(미생물과 식물성 추출물)의 열 안정성 검증

사료의 생산 과정중 많은 공정들이 사료에 열처리를 실시하다. 가장 좋은 예가

pelleting인데, 이 경우 고압, 고온에서 사료를 성형하게 된다. 따라서 복합제제를 사료에 첨가후 5분간 55, 65, 75°C의 세가지 조건에서 열처리를 실시하고 그에 따른 미생물의 수와 urease inhibiting activity를 측정하여 복합제제의 열안정성을 검증하였다.

4. 복합제제(미생물과 식물성 추출물)의 pH 변화에 따른 안정성 검증

사료를 동물이 섭취하게 되면, 소화기관을 거쳐 분해, 흡수가 일어나게 된다. 특히, 위는 염산을 분비하여 소화물의 pH를 낮춘다. 따라서, 복합제제가 pH에 의한 변화가 적어야 그 안정성이 확보된 것이다. 0.01M의 PBS를 HCl을 이용하여 pH를 변화시켰다. 사용된 PBS의 pH는 2.0, 4.0, 6.0으로 하였다. 복합제제가 첨가된 사료와 PBS를 1:2의 비율로 혼합한후, 37°C 인큐베이터에서 3시간 동안 배양하였다. 배양후 4°C에서 500g로 30분간 원심분리하여 사료를 침전시키고 상등액을 채취하였다. 채취한 상등액내의 미생물 수와 urease inhibiting activity를 측정하였다.

5. 대량 생산시 품질평가 관리 및 평가방법 구축

1) Phenol red method와 indophenol method를 이용한 생산제제의 효과 평가 방법 구축

Phenol red법 urea가 ammonia로 전환되면서 일어나는 pH의 변화를 phenol red를 통하여 측정하는 방법이다. 먼저, 0.1M의 Tris-HCl(pH 6.8)를 이용하여 2%의 urea 용액을 제조하고, 이때 0.2%의 phenol red 시약을 첨가한다. 제조된 0.5ml의 urea 용액에 0.1unit/ 10 μ l로 희석한 Jackbean urease를 20 μ l(0.2unit)를 첨가한다. 동결건조된 추출물을 Tris-HCl(pH 6.8)에 용해시킨후 100 μ l을 첨가하여 측정하였다. 0.5ml의 증류수를 첨가한후, 37°C에서 30분간 incubation후 560 nm의 파장에서 O.D.를 측정하고, AHA를 control하여 상대적인 urease inhibiting activity를 측정하는 방법이다.

Indole-phenol법 0.1mM의 EDTA가 들어있는 0.1M의 sodium phosphate buffer(pH 7.01) 980 μ l에 10 μ l의 urea 용액을 첨가한후 10 μ l의 urease 용액을 첨가

하고, 30°C의 water bath에서 5분간 incubation 후 phenol-nitroprusside reagent 100 μ l와 위의 용액 300 μ l 그리고 Hypochlorite reagent 600 μ l를 혼합하여 60°C에서 10분간 incubation, 증류수로 1:3의 비율로 희석한 후 630nm에서 O.D를 측정하고 AHA를 control로 하여 urease inhibiting activity를 상대적으로 측정 하는 방법이다.

두 방법 모두 순수한 urease용액에서의 발색의 변화를 측정하는 방법으로 slurry와 같은 혼합물에서의 변화를 대변하기 어렵다. 따라서, 두 방법에 따라 측정된 복합제제의 효능을 비교하였다.

생산된 복합제제를 10, 20, 40, 80, 200mg/ml의 농도로 희석하여 phenol red method와 indophenol method의 결과와 비교하였다.

2) Artificial slurry를 이용한 생산제제의 ammonia 발생 억제 효과 평가 방법 구축

지금까지 artificial slurry를 이용한 방법은 배양후 slurry의 pH의 변화를 측정하거나 ammonia의 발생량을 전기적인 센서를 이용하여 측정되었다. 하지만, 전기적인 센서의 수명이 그리 길지 않아 실험실에서 사용하기에는 좋은 방법이 아니었다. Kjeldahl방법은 농황산으로 시료를 소화후 distillation하여 발생하는 암모니아를 4%의 boric acid에 포집한후, 다시 HCl로 적정하여 발생한 N의 양을 측정하는 방법이다. 이 원리를 이용하여 artificial slurry에서 발생하는 ammonia의 양을 측정하였다. 1000cc의 플라스틱 용기에 artificial slurry를 넣은후 포기장치를 이용하여 계속하여 공기를 혼합하였다. 이때 발생하는 공기를 튜브를 이용하여 boric acid가 용해되어 있는 용액에 통과시켜 발생하는 암모니아를 포집한 후 HCl로 적정하여 암모니아의 양을 측정하였다. Ammonia 수를 이용한 예비실험에서 포집은 boric가 들어있는 2번째 튜브에서까지만 발생하였고, 3번째와 4번째의 튜브에서는 발생하지 않았다. 또한, 첫 번째와 두 번째의 tube에 포집된 ammonia양은 98%정도의 회수율을 보여 발생하는 암모니아를 포집하기에는 좋은 방법이었다.

6. 돼지의 사육 성적 및 번식성적 검증

양돈 사료에 복합제제의 첨가에 의한 분뇨내의 암모니아 발생 억제를 측정하기

위하여 모돈을 대상으로하여 실험을 실시하였다.

1. 임신돈의 분뇨내 암모니아 억제 검증

1) 실험사료

모돈의 사료 배합표는 표 23에 나타나 있다. 처리구 사료에는 제조된 복합제제를 0.2%, 0.5%, 1.0%의 세가지 수준으로 첨가하였다.

2) 공시동물

모돈 24두 (4처리 × 6반복)

3) 사료급여

임신돈의 사료는 1일 2회에 걸쳐 약 2.4kg을 급여하였다. 모돈의 임신 단계별로 사료 급여량을 조절하여 임신 말기에는 약 3kg의 사료를 섭취하도록 하였다.

4) 측정항목

사료 급여 개시후 14일부터 7일 간격으로 3회동안 모돈의 분과 뇨를 수거하였다. 수거한 분과 뇨는 1:2의 비율로 섞은후 암모니아 발생량을 측정하였다.

2. 포유돈의 분뇨내 암모니아 발생 억제와 포유 자돈의 이유 성적 검증

임신시간 동안 복합제제를 첨가한 사료를 급여한 모돈을 이용하여 포유 기간동안에도 같은 처리를 하여 분뇨내 암모니아 발생과 모돈의 번식성적을 측정하였다.

1) 실험사료

모돈의 사료 배합표는 표 24에 나타나 있다. 처리구 사료에는 제조된 복합제제를 0.2%, 0.5%, 1.0%의 세가지 수준으로 첨가하였다.

2) 공시동물

모돈 24두 (4처리 × 6반복)

3) 사료급여

포유돈의 사료는 1일 2회에 걸쳐 무제한 급여하였다.

4) 측정항목

사료 급여 개시후 14일과 21일에 포유돈의 분과 뇨를 채취하였다. 채취한 분과 뇨는 1:2의 비율로 섞은 후 암모니아 발생량을 측정하였다.

모돈의 번식 성적을 확인하기 위하여 이유후 재귀 발정 일수와 수태율을 측정하였다. 또한, 포유돈에의 급여가 포유자돈의 성적에 미치는 영향을 확인하기 위하여 포유자돈이 이유후 체중을 측정하였다.

3. 이유 자돈의 사료내 복합제제 첨가시 분뇨내 암모니아 발생 억제와 사양 성적 이유후 자돈을 모돈의 처리구에 따라 배치한후, 이유 자돈의 사료에 모돈 실험과 같은 수준의 복합제제를 혼합하여 급여 하였다. 이유 자돈 사료의 배합비는 표 25와 같다.

각 처리별 7두의 자돈으로부터 항문을 자극하여 분을 채취하고 뇨를 채취하여 1:2의 비율로 혼합하여 ammonia의 발생량을 측정하였다.

☿ 23. Composition of experimental diets for gestation period

	Control	0.2%	0.5%	1.0%
Corn	44.08	43.88	43.58	43.08
SBM	9.50	9.50	9.50	9.50
Wheat	15.00	15.00	15.00	15.00
Wheat Bran	16.00	16.00	16.00	16.00
Rice Bran	3.00	3.00	3.00	3.00
Corn Gluten Feed	5.00	5.00	5.00	5.00
Soy hells	3.50	3.50	3.50	3.50
Limestone	1.60	1.60	1.60	1.60
Tallow	1.30	1.30	1.30	1.30
Lysine	0.02	0.02	0.02	0.02
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30
DCP	0.40	0.40	0.40	0.40
Vitamin Mix ²	0.15	0.15	0.15	0.15
Mineral Mix. ¹	0.15	0.15	0.15	0.15
Urease inhibitor	-	0.2	0.5	1.0
Calculated Values				
NE, kcal/kg	2300	2300	2300	2300
CP, %	14.0	14.0	14.0	14.0
Ca, %	0.79	0.79	0.79	0.79
P, %	0.6	0.6	0.6	0.6
Lys, %	0.67	0.67	0.67	0.67

¹ Vitamin mixture contains Vit. A 20,000,000 IU, Vit. D₃ 2,000,000 IU, Vit. E 100,000 mg, Vit K₃ 4,000 mg, Vit. B₁ 5,000 mg, Vit. B₂ 7,000 mg, Vit B₆ 5,000 mg, Vit. B₁₂ 50 mg, Pantothenic acid 20,000 mg, Niacin 50,000 mg, Biotin 200 mg, and Folic acid 1,000 mg /kg

² Mineral mixture contains Fe 100,000 mg, Cu 10,000 mg, Mn 50,000 mg, Zn 60,000 mg, I 350 mg, and Se 300 mg/kg

³ Green Tea Extract

⁴ *Candida krusei/inconspicua* 204

표 24 . Composition of experimental diets for lactation period

	Control	0.2%	0.5%	1.0%
Corn	41.24	41.04	40.74	40.24
Wheat	18.00	18.00	18.00	18.00
Rice hull	4.00	4.00	4.00	4.00
Soybean meal	23.50	23.50	23.50	23.50
Animal Fat	6.00	6.00	6.00	6.00
Molasses	4.00	4.00	4.00	4.00
Limestone	0.70	0.70	0.70	0.70
TCP	1.80	1.80	1.80	1.80
Salt	0.40	0.40	0.40	0.40
Lysine-HCl	0.01	0.01	0.01	0.01
Choline-Cl	0.15	0.15	0.15	0.15
Mineral mixture ¹	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin mixture ²	0.10	0.10	0.10	0.10
Urease inhibitor	-	0.2	0.5	1.0
Calculated Values				
NE, kcal/kg	3257	3257	3257	3257
CP, %	16.00	16.00	16.00	16.00
Ca, %	0.95	0.95	0.95	0.95
P, %	0.4	0.4	0.4	0.4
Lys, %	0.81	0.81	0.81	0.81

¹ Mineral mixture contains Fe 100,000 mg, Cu 10,000 mg, Mn 50,000 mg, Zn 60,000 mg, I 350 mg, and Se 300 mg/kg

² Vitamin mixture contains Vit. A 20,000,000 IU, Vit. D₃ 2,000,000 IU, Vit. E 100,000 mg, Vit K₃ 4,000 mg, Vit. B₁ 5,000 mg, Vit. B₂ 7,000 mg, Vit B₆ 5,000 mg, Vit. B12 50 mg, Pantothenic acid 20,000 mg, Niacin 50,000 mg, Biotin 200 mg, and Folic acid 1,000 mg /kg

ㄎ 25. Composition of experimental diets for weaned pigs

	Control	0.2%	0.5%	1.0%
alpha-Pro	15.00	15.00	15.00	15.00
Dried whey	24.00	24.00	24.00	24.00
Sucram	0.02	0.02	0.02	0.02
Vitamin mixture	0.15	0.15	0.15	0.15
Mineral mixture	0.20	0.20	0.20	0.20
Corn	18.00	17.80	17.50	17.00
Oat	3.01	3.01	3.01	3.01
Soybena meal	15.00	15.00	15.00	15.00
SPC	5.25	5.25	5.25	5.25
Fish meal	4.02	4.02	4.02	4.02
Fat powder	3.20	3.20	3.20	3.20
MCP	1.30	1.30	1.30	1.30
Salt	0.22	0.22	0.22	0.22
CaCo3	0.68	0.68	0.68	0.68
Lysine-HCl	0.12	0.12	0.12	0.12
Methionine	0.03	0.03	0.03	0.03
Choline	0.10	0.10	0.10	0.10
CuSO4	0.05	0.05	0.05	0.05
Tocopherol	0.05	0.05	0.05	0.05
ZnO	0.30	0.30	0.30	0.30
Potato protein	4.02	4.02	4.02	4.02
Lactose	5.08	5.08	5.08	5.08
Antibiotics	0.2	0.2	0.2	0.2
Urease inhibitor	0	0.2	0.5	1.0
Calculated Values				
NE, kcal/kg	3435	3435	3435	3435
CP, %	24.70	24.70	24.70	24.70
Ca, %	0.95	0.95	0.95	0.95
P, %	0.75	0.75	0.75	0.75
Lys, %	1.70	1.70	1.70	1.70

¹ Vitamin mixture contains Vit. A 20,000,000 IU, Vit. D₃ 2,000,000 IU, Vit. E 100,000 mg, Vit K₃ 4,000 mg, Vit. B₁ 5,000 mg, Vit. B₂ 7,000 mg, Vit B₆ 5,000 mg, Vit. B₁₂ 50 mg, Pantothenic acid 20,000 mg, Niacin 50,000 mg, Biotin 200 mg, and Folic acid 1,000 mg /kg

² Mineral mixture contains Fe 100,000 mg, Cu 10,000 mg, Mn 50,000 mg, Zn 60,000 mg, I 350 mg, and Se 300 mg/kg

제 2 항 실험 결과

1. 복합제제(미생물과 천연물 제제)의 사료내 안정성 검증

보존기간 42일동안의 사료내 존재하는 미생물의 CFU는 그림 46과 같다.

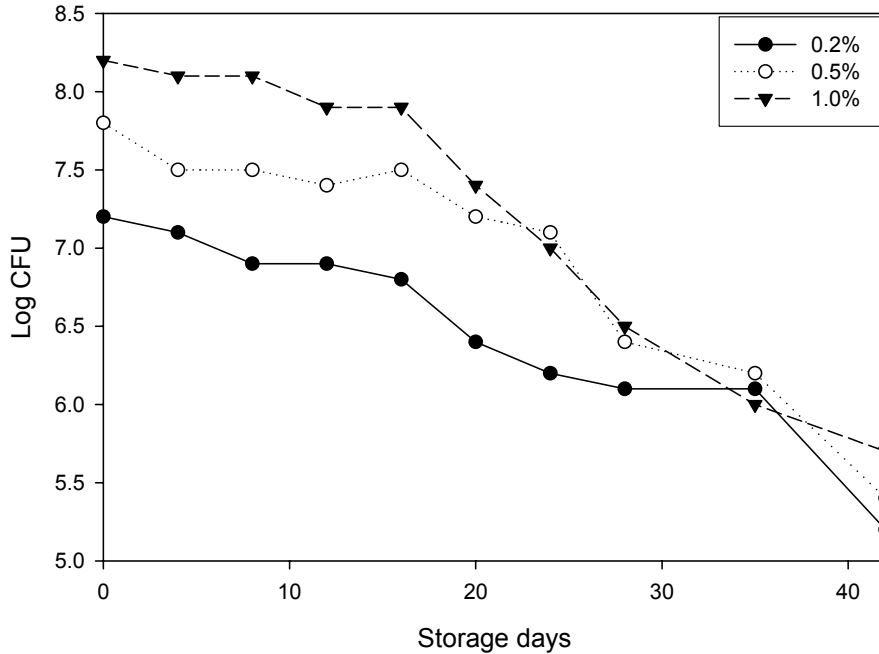


그림 46. 보존기간동안 사료내 복합제제 첨가수준에 따른 미생물의 CFU

사료내 복합 제제의 첨가수준이 높을수록 사료내에 존재하는 미생물의 수도 높았다. 보존기간동안 살아있는 미생물의 수는 점차적으로 감소하였다. 특히, 18일까지는 살아있는 미생물의 감소가 그리 크지 않았으나 그 이후로는 현격히 감소함을 알 수 있다. 35일 이상의 보존기간에서는 사료의 첨가수준에 따라 조금의 차이는 있었으나, 사료내 살아있는 미생물의 수는 그리 큰 차이가 없었다.

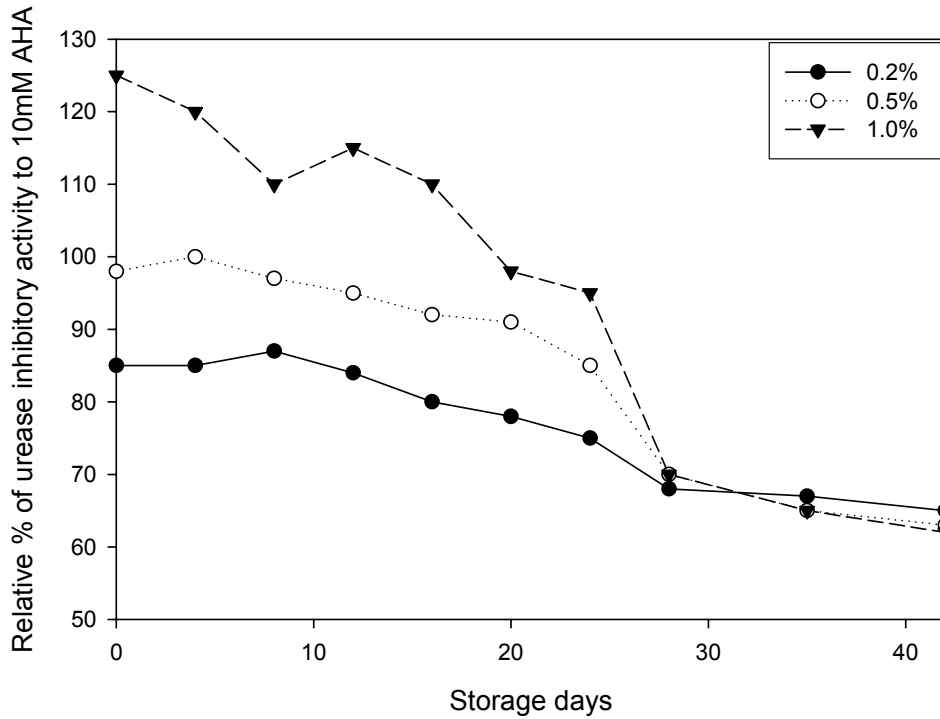


그림 47. 보존기간동안 사료내 복합제제 첨가수준에 따른 urease inhibiting activity

그림 47에는 사료내 복합제제를 첨가후 보존기간에 따른 urease inhibiting activity를 나타내었다. 사료내 첨가 수준이 높을수록 AHA에 대한 상대적인 inhibiting activity도 높음을 알 수 있다. 첨가수준이 높은 경우 보존 24일이후부터 급격히 그 역가가 감소함을 확인할수 있었다. 첨가 수준이 낮은 경우에는 그 역가가 서서히 감소하였고, 보존 42일에는 높은수준(1.0%, 0.5%)와 비슷한 역가를 나타냈다.

2. 복합제제(미생물과 천연물 제제)의 분내 암모니아 발생 억제 효과 검증

인공 slurry의 실온에서 배양에 따른 암모니아 발생 양을 그림 48에 나타나 있다. 매 3일간 발생한 암모니아의 양은 사료내 혼합제제의 첨가수준이 높아질 수록 낮아지는 경향을 보였다. 하지만, 배양 15일후에는 발생하는 암모니아의 양은 1.0% 처리구가 0.5%와 0.2% 처리구보다 높은 결과를 나타냈다. 배양 기간동안에 발생된 총 암모니아의 양은 0.1% 처리구의 경우 228mM, 0.5% 처리구의 경우는 217mM, 그리고 1.0% 처리구의 경우에는 214mM로 측정되었다. 0.5%처리구와 1.0% 처리구간에는 총 암모니아 발생량의 경우 차이점이 없는 것으로 나타났고, 0.1% 처리구에 비하여는 낮은 수준의 암모니아 발생을 보였다.

3. 복합제제(미생물과 천연물 제제)의 열 안정성 검증

열처리를 실시함에 따라 복합제제의 urease inhibiting activity는 감소하였다. 55℃에서 65℃로 온도를 증가시켜 주었을 때 보다 65℃에서 75℃로 증가시켜주었을 때 더 많은 활력을 잃었다. 또한, 열처리에 의해 살아있는 미생물의 수도 감소하였는데, 75℃에서 열처리시 55℃에 비하여 log 1정도의 균수가 감소하였다. 이는 약 1/10로 살아있는 미생물의 수가 감소한 것을 의미한다. 따라서 65℃정도의 열처리는 복합제제의 활력이 크게 변하지 않지만, 75℃ 이상에서는 그 활력이 감소함을 알 수 있었다.

4. 복합제제(미생물과 천연물 제제)의 pH 변화에 따른 안정성 검증

pH가 6과 4에서는 혼합제제내에 살아있는 미생물의 수는 변화가 없었다. 하지만, urease inhibiting activity는 108%에서 94%로 감소하였다. pH를 2로 위내의 수준으로 하여주었을 때는 미생물의 수가 급격히 감소하여 pH 6에 비하여 1/1000수준으로 낮게 측정되었다. 하지만, urease inhibiting activity는 약 80% 정도로 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

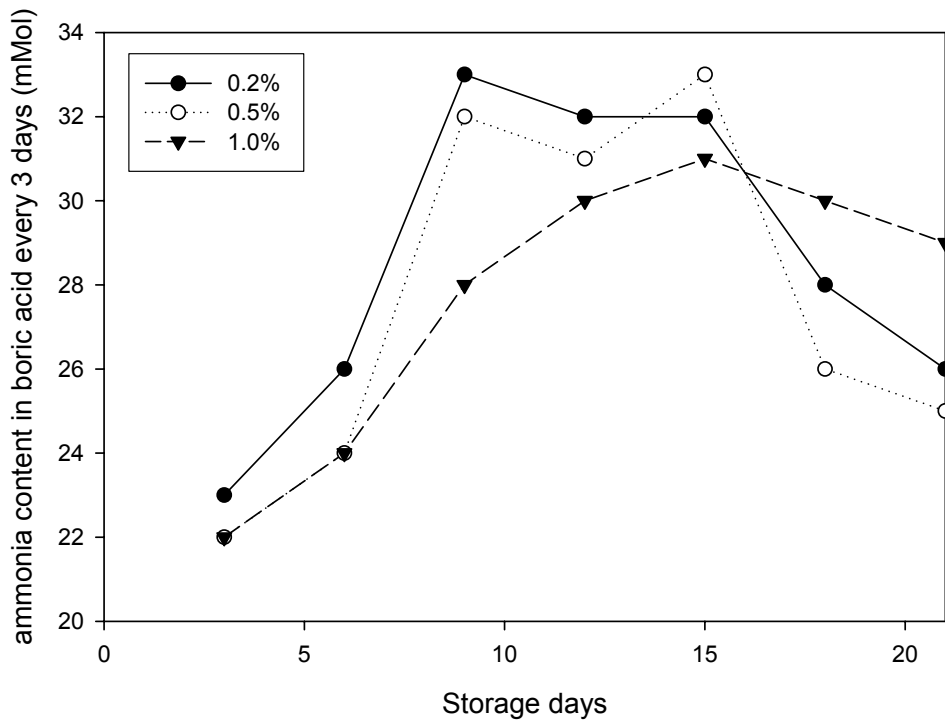


그림 48. Artificial slurry를 이용한 혼합제제의 ammonia 발생 억제 효과

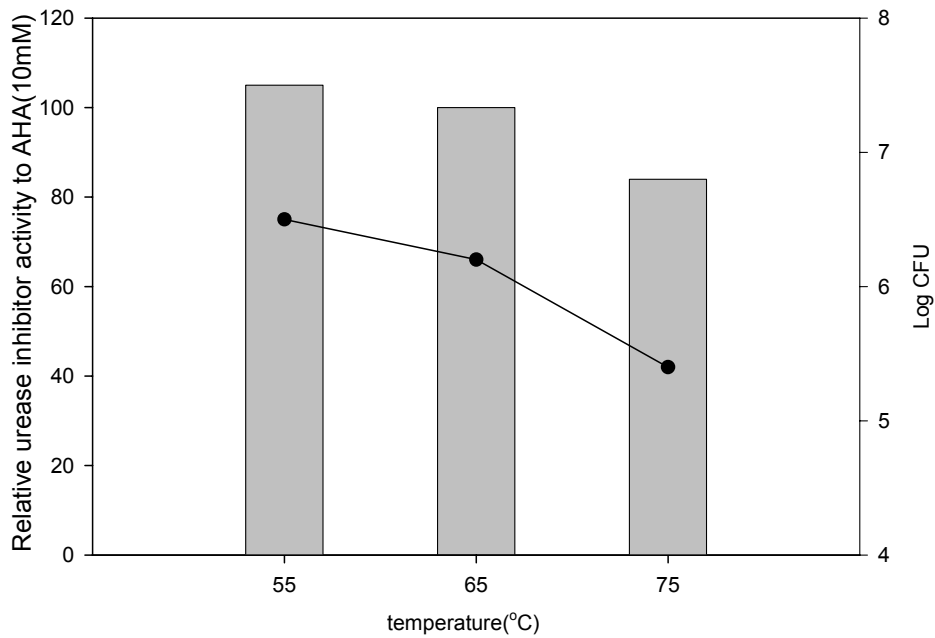


그림 49. 열처리후 복합제제의 미생물 수와 urease inhibiting activity의 변화

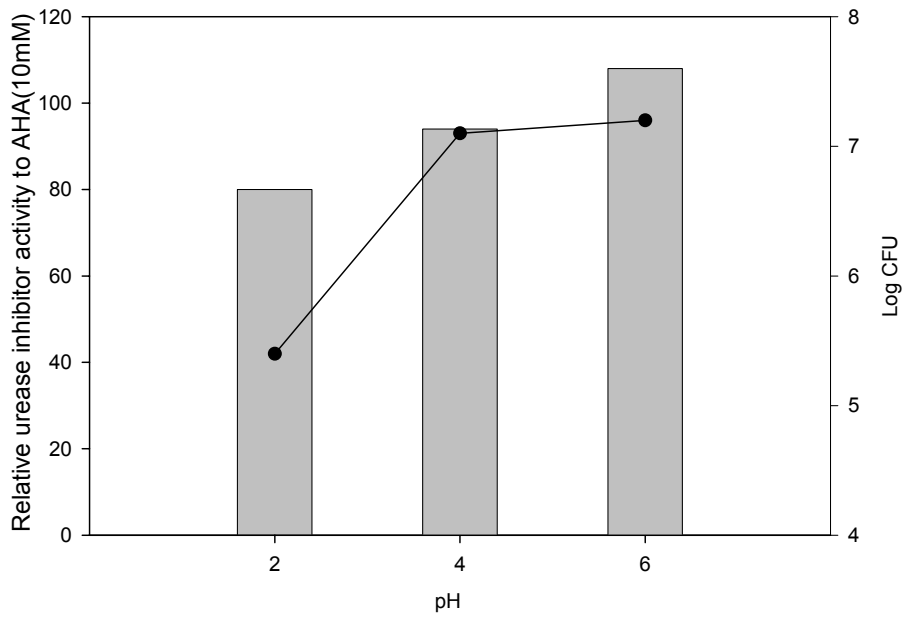


그림 50. pH에 따른 혼합제제의 미생물 수와 urease inhibiting activity의 변화

5. 대량 생산시 품질평가 관리 및 평가방법 구축

- Phenol red method와 indophenol method를 이용한 생산제제의 효과 평가 방법 구축

전 농도에 걸쳐 indophenol method가 phenol red법에 비하여 복합제제의 효과가 높게 평가되었다. 특히 80mg과 200mg의 농도에서는 첨가량의 차이가 2.5배 정도임에도 AHA에 대한 상대적 효능은 약 34% 정도밖에 높게 평가되지 않았다. 또한, 혼합제제의 농도의 증가와 AHA에 대한 상대적인 효능도 선형적인 증가보다는 지수적인 증가를 따랐다. 선형적인 형태의 값을 가지는 10~40mg/ml의 농도로 복합제제의 농도를 조절하여, indophenol method가 phenol red method로 측정하는 것이 정확한 간접적인 측정 방법으로 생각된다. 또한, 두 방법간의 결과에 대한 차이는 좀더 심도있는 연구가 필요할 것으로 생각된다.

6. Artificial slurry를 이용한 생산제제의 ammonia 발생 억제 효과 평가 방법 구축

AHA를 artificial slurry에 첨가함에 따라 암모니아의 발생량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 높은 농도 (25mM)의 AHA를 첨가하였을 때는 암모니아의 발생 정도의 감소가 그리 크지 않았다. 또한, 첨가하지 않은 것과 5mM을 첨가하였을 때의 차이는 선형적인 감소를 보이지 않았다. 따라서, 선형적인 감소를 보인 5, 10, 15, 20mM의 AHA를 첨가한 부분을 표준 곡선으로 하여 복합제제의 효과를 측정하였다. 10mg의 복합제제를 첨가하였을 때, 암모니아의 발생량은 48mM로서 약 12mM의 AHA와 같은 효능을 나타냈다.

Artificial slurry를 사용하여 *in vivo* 상의 실험을 대신할 수 있는 방법으로 연구하였으나, 실제 artificial slurry를 제조하여, 발생하는 암모니아를 측정하는 것 또한 약 7일 정도의 시간이 걸렸다. *In vivo*보다는 간편하고 빠른 측정을 할 수 있었지만, 제품의 평가를 위한 방법으로는 오랜 시간이 걸린다. 온도와 배양 조건에 관한 더 심도있는 실험을 통해 좀더 개연성 있는 결과를 얻을수 있는 조건을 찾아야 할 것이다.

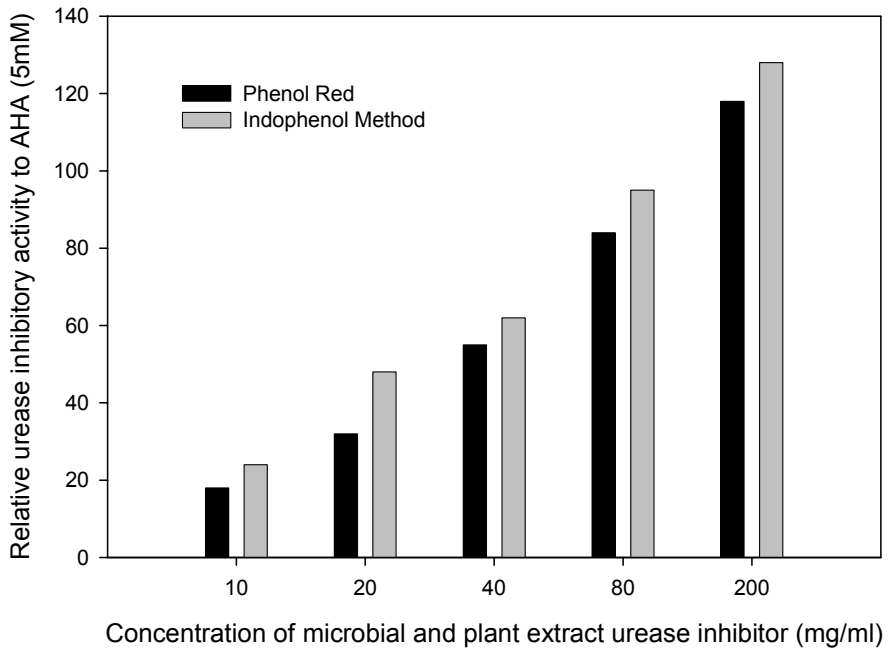


그림 51. Phenol red법과 indophenol법에 의한 복합제제의 AHA에 대한 상대적인
 표 이

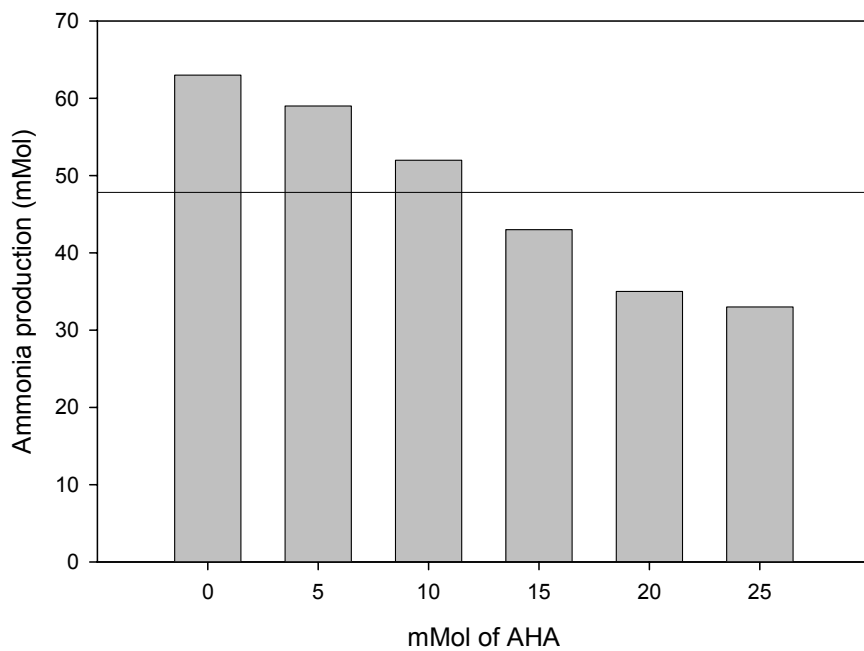


그림 52. AHA의 첨가에 의한 artificial slurry에서의 ammonia 발생 감소 효과

7. 돼지의 사육 성적 및 번식 성적 검증

1) 모돈의 사육 성적 및 번식 성적 검증

임신돈의 사료에 복합제제를 첨가하고 수거한 분과 뇨를 혼합한 뒤 실온에서 배양해서 측정된 암모니아 발생량은 그림 53에 표시하였다.

사료 급여 후 7, 14, 21에 측정된 분뇨에서 발생하는 암모니아는 실험사료 급여 기간이 길수록 적어지는 경향을 나타내었다. 또한, 복합제제의 첨가 수준이 증가할수록 암모니아의 발생량은 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 하지만, 0.5%와 1.0% 첨가구의 차이는 급여 기간이 짧을수록 암모니아 발생 억제 효과가 1.0%에서는 크게 나타났지만, 급여 기간이 증감함에 따라 0.5%와 1.0% 사이에서는 큰 차이가 없었다. 다량의 첨가제(1.0%)를 급여하는 것은 빠른 시간내에 암모니아 발생 억제 효과를 얻을수 있으나, 지속적으로 급여하여 0.5% 수준으로 급여하는 것이 좀더 바람직 할 것으로 생각된다.

포유 모돈의 사료내 복합제제 첨가시 분과 뇨에서 암모니아 발생량 억제는 그림 54에 표시하였다. 포유돈에서는 7일간 급여시 임신돈에서와 같은 양상의 결과가 나왔다. 사료내 복합제제의 첨가 수준이 증가할수록 분뇨에서의 암모니아 발생량은 감소하는 경향을 보였다. 하지만, 14일간 급여하였을 경우에는 처리구간의 큰 차이는 없었으나, 1.0% 처리구에서 다른 처리구에 비해 높은 암모니아 억제 효과를 보였다. 급여후 21일이 경과한후 채취한 분과 뇨에서 발생하는 암모니아의 양을 첨가수준에 따라 큰 영향은 없었고, 0.2% 수준과 1.0% 수준 모두 비슷한 정도의 암모니아 억제 효과를 보였다.

이유 자돈에서의 복합제제의 첨가수준에 의한 암모니아 발생 억제 효과는 그림 55에 나타나 있다. 일반적으로 이유 자돈의 사료는 높은 소화율을 가지는 좋은 원료를 사용하기 때문에 모돈에 비하여 높은 소화율보이는 것으로 알려져 있다. 소화율이 높기 때문에 분과 뇨에서 발생하는 암모니아의 양도 모돈에 비하여 상대적으로 낮게 나타났다. 특히, 복합제제 급여후 7일에는 처리구간의 차이점이 발견되지는 않았지만, 복합제제 첨가에 따라 암모니아 발생량이 감소하였다. 대조구와 암모니아 발생량에서 큰 차이가 없는 것은 사료의 소화율이 높기 때문인 것으로 생각된다. 하지만, 급여후 14일에 채취한 분과 뇨에서는 첨가수준이 증가할 수록 암모니아 발생량이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한, 급여후 21

일에 채취한 분에서도 이러한 결과를 나타내었지만, 첨가수준에 따른 특이성은 보이지 않았다. 특히, 0.2%처리구와 1.0% 처리구간의 차이는 그리 크지 않게 나타났기 때문에, 0.2% 첨가수준으로도 충분한 암모니아 발생 억제 효과를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

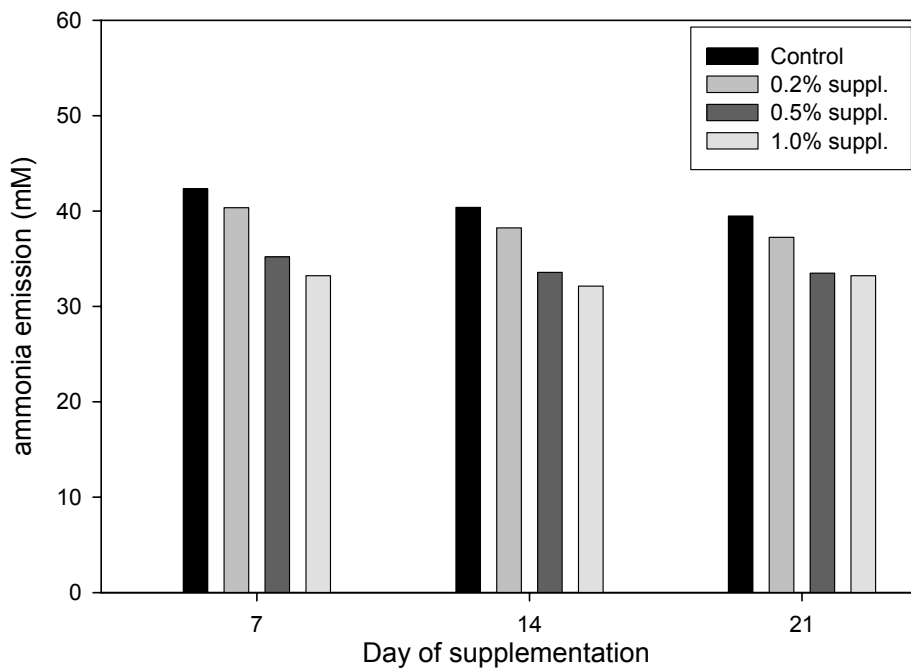


그림 53. 임신돈에게 복합제제를 급여하였을때 분,뇨의 암모니아 발생량

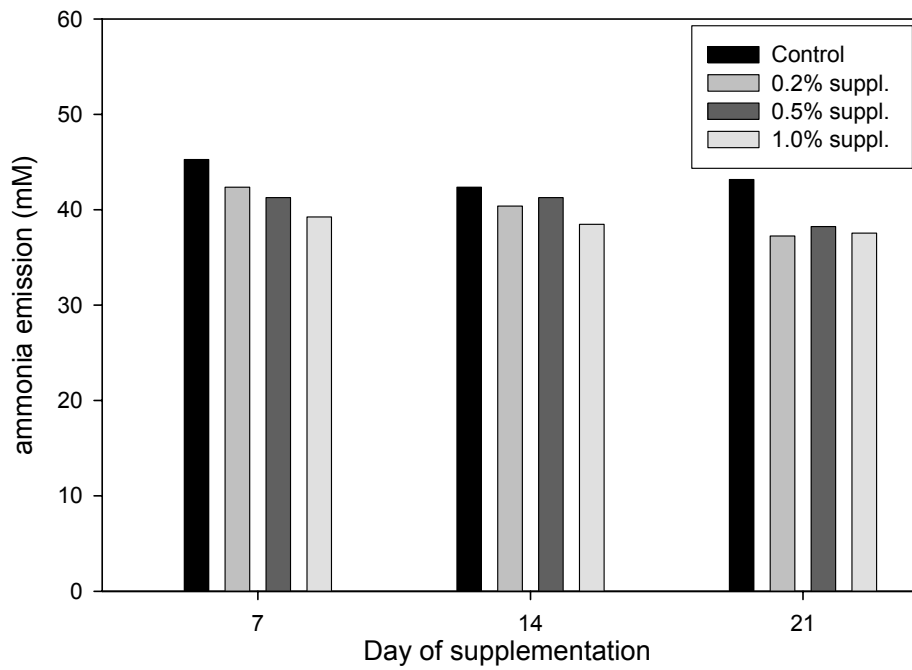


그림 54. 포유돈에게 복합제제를 급여하였을때 분,뇨의 암모니아 발생량

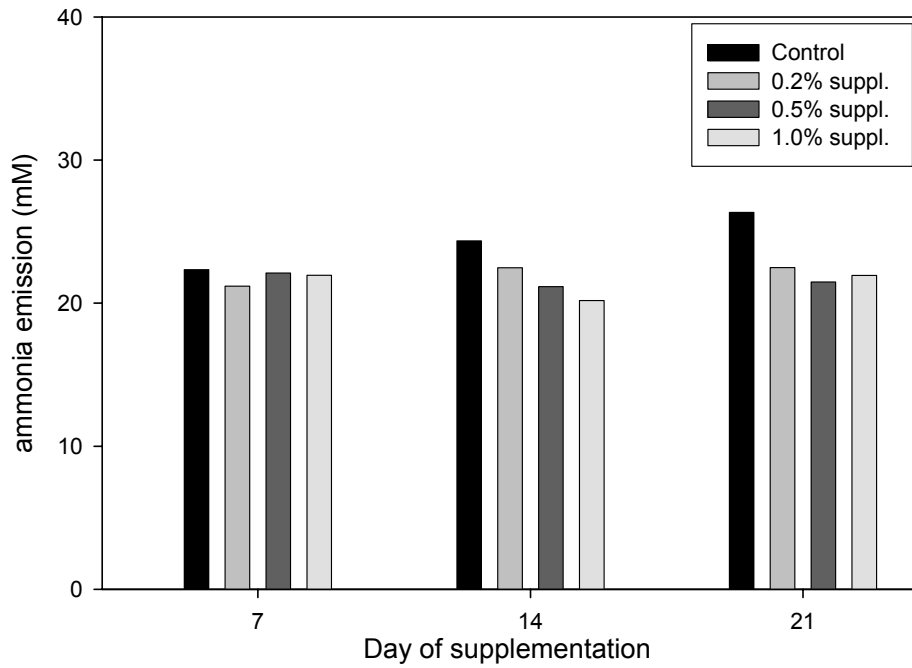


그림 55. 이유자돈에게 복합제제를 급여하였을때 분,뇨의 암모니아 발생량

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 천연물, 미생물 urease inhibitor와 urease 생성 억제 미생물 균주의 선발 및 효능의 동물실험 검증

천연물로부터 urease inhibitor의 효능을 가지는 물질을 분리하기 위하여 다양한 약 70여종의 식물로부터 5종의 가능성 있는 식물체를 선별하였다. Phytochemical 인 vitamin C, 포도씨 추출물 2종, 메밀 껍질 추출물, 녹차 정제품에서 다른 식물체 보다 높은 urease inhibitor의 활력을 가지는 물질을 추출하였다. 그중 녹차엽에서 추출한 추출물이 다른 추출물에 비하여 높은 urease inhibitor의 활력을 보여 녹차엽 추출물을 가능성 있는 천연물 urease inhibitor로 선정하였다. 녹차엽에서의 추출 조건을 탐색하기 위하여 열수의 온도와 시간을 변화시켜 추출물의 양과 활력을 측정하여 75℃정도의 열수의 추출이 가장 높은 활력과 높은 수율을 가지는 것을 확인하였다. 또한, 추출물의 건조방법에 따른 활력의 변화를 측정하여 동결건조시 가장 높은 활력을 보이는 것을 확인하였다.

20여가지의 천연 발효물중 가능성 있는 5종의 발효물에서 미생물을 분리 동정하여 urease 생성 억제 미생물 균주를 선별하였다. 선별된 천연발효물에는 yeast와 bacillus를 다량 함유 하고 있었는데, 그중 6종의 yeast를 분리 동정하고 API test를 통하여 확인하였다. 또한, 보유하고 있던 lactic acid bacteria로부터 가능성 있는 균주를 확인하고, 그것들을 비교해서 가장 우수한 균인 *Candida krusei/inconspicua* 204를 선별하였다. 선별된 *Candida krusei/inconspicua* 204의 성장 곡선과 성장에 따른 inhibiting activity를 측정하여 최적의 배양 시간을 확인하고 미생물 균주를 생산하였다.

이유 자돈의 사양실험을 통하여 확인된 천연물 추출물과 미생물 추출물의 성장개선 효과는 뚜렷이 확인되지 않았다. 하지만, 천연물 추출물과 미생물 추출물의 급여한 자돈으로부터 수거한 분,뇨를 이용하여 인공 slurry를 제조하여 측정

한 분과 뇨에서의 ammonia 발생량은 대조구에 비하여 감소하였다. 미생물 제제 보다는 천연물 제제가 높은 감소를 보였고, 인공 slurry의 pH 역시 낮아지는 결과를 확인할 수 있었다.

제 2절 선발 제제와 균주의 복합화 및 동물실험 검증

열수와 천연물의 혼합 비율에 따른 추출물의 활력과 양을 측정하여 최적의 추출 비율을 탐색하였다. 측정된 조건은 천연물의 양이 열수의 약 20% 정도일때 가장 높은 추출율을 보였다. 또한, 추출 시간과 추출 온도에 따른 획득 수율을 여러 가지 온도와 시간에 따라 측정하여, 최고의 획득수율을 보이는 조건을 탐색하였다. 탐색된 조건은 85℃에서 약 90분간 추출시 가장 높은 추출율을 보였다. 최적의 획득수율을 보이는 조건뿐만 아니라, 활력이 가장 높은 조건을 확인하기 위하여 추출물의 urease inhibitor 효과를 측정하였다. 열수의 온도에 따라 추출물의 활력의 변화를 보였고, 90℃이상의 열수를 사용하였을때 더 많은 활력감소를 확인할수 있었다. 추출물의 획득 수율보다는 낮은 온도인 55℃정도에서 100분간 추출하는 것이 최대의 활력을 유지하면서 추출물을 얻을수 있는 조건으로 확인되었다.

선발된 미생물 균주 *Candida krusei/inconspicua* 204의 안전성을 검증하기 위하여 분자생물학적인 방법을 사용하여 균을 동정하였다. 또한, *Candida krusei/inconspicua* 204가 생산하는 물질중 cysteine을 함유하고 있는 단백질이 높은 urease inhibiting activity를 가지는 것을 확인하였고, 최적의 성장 조건을 탐색하기 위하여 배지의 조성, 배양 온도, 배양 시간을 탐색하였다. 먼저 배양 온도와 시간으로는 24℃에서 48시간 이상 배양해 주어야만 적절한 성장이 확인될 뿐만 아니라 urease inhibitor의 활력도 보장되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 일반적인 yeast 배지인 YM media보다 높은 수준의 glucose(12g/L)를 첨가하였을 경우 더 높은 성장을 확인하였다. 최대의 활력을 가지는 균주를 생산하기 위하여 urease inhibitor 활력을 배양 시간에 따라 측정하였다. 최적의 성장을 보이는 48시간 보다 더 오랜 시간(52시간) 배양하는 것이 더 높은 수준의 활력을 확

인할 수 있었고, 이는 yeast 자체의 urease inhibiting activity 보다는 그것들의 대사물질에 의한 효과인 것을 다시한번 확인해 주는 결과이다.

천연물 제제와 미생물 제제의 배합 비율에 따른 synergy 효과를 확인하기 위하여 두가지 제제의 혼합 비율을 달리 하여 활력을 측정하였다. 천연물 제제나 미생물 제제를 단독으로 사용하였을 때보다, 천연물 제제:미생물 제제가 8:2일 경우 더 높은 활력을 나타내었다. AHA를 기준으로 사용한 indophenol method와 phenol red method의 결과와 분과 노를 혼합하여 생산한 artificial slurry를 제조하였을 때 같은 결과를 나타내었다.

미생물 제제의 건조 조건에 따른 활력을 freeze dry, vacuum dry 방법 간에 비교하여 최적의 활력의 가지는 방법과 균수를 보장할 수 있는 방법으로 freeze dry방법을 선택하였다.

천연물 제제와 미생물 제제의 복합제제의 보존기간에 따른 활력과 균수를 검증하기 위하여 35일간 상온에서 혼합물을 보존하여 균수와 활력을 확인하였다. 보존기간이 15일이 되었을때는, 활력의 변화가 없었던 반면, 20일 이상 경과시 활력과 미생물 균수가 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 복합제제는 상온에서 보관시 15일까지는 충분히 안전성을 가지고 있지만, 그 이상의 보관은 활력을 크게 낮추는 것을 확인하였다. 또한, 복합 제제를 사료와 혼합하여 보관하였는데, 그에 따른 안정성은 복합제제만 보관할 때 보다 낮은 것으로 나타났다. 사료에 혼합하여 보관시 약 7일 까지는 높은 활력을 확인할 수 있었지만, 14일 이후는 활력이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 보관 21일 이후부터는 활력의 변화가 적은 것을 확인하였다. 특히, 균수에서는 7일까지는 균수의 변화가 없었다. 하지만, 14일 이상의 보관은 살아있는 yeast의 균수가 급격히 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

복합 제제를 자돈과 모돈의 사료에 첨가하여 ammonia 저해 효과를 확인하였다. 천연물과 미생물 제제를 혼합하였을때 미생물 제제나 천연물 제제의 단독급여보다 낮은 수준의 ammonia 발생을 확인할 수 있었다. 하지만, 복합 제제의 급여에 의한 성장 개선효과는 그리 크지 않음을 확인하였다. 모돈의 임신 기간과 이유 기간동안의 체중도 큰 차이는 없었으나, 포유 자돈의 이유시 체중은 복합제

제 미 첨가구에 비하여 높아지는 경향을 보였다. 모돈의 분과 뇨를 수거하여 혼합한 artificial slurry에서도 복합제제의 첨가에 의한 ammonia 발생 억제 효과를 확인할 수 있었다. 모돈의 사료에 첨가한 혼합제제는 단일 제제에 비하여 높은 ammonia 발생 억제 효과를 보였다. 자돈의 사료에서는 녹차 추출물의 급여가 높은 결과를 나타낸 반면, 모돈에서는 yeast의 급여가 더 높은 ammonia 발생 억제 효과를 보였다. 포유기간동안에도 비슷한 결과를 보였으나, 혼합 제제와 yeast의 ammonia 발생 억제 효과가 비슷하게 나타났다.

제 3절 선발 제제와 균주의 복합화 및 동물실험 검증

복합 제제를 동물실험 이전에 사료내 혼합에 의한 안정성을 평가하였다. 사료의 보관은 실험실내의 상온이 아니라 실제 논장의 사료창고에 25kg 지대에 보관하였다. 먼저 복합 제제내의 미생물수는 18일경까지는 큰 변화가 없었다. 하지만 18일 이후부터는 살아있는 미생물의 수가 급격히 감소하였다. 또한, 사료내 혼합 비율에 따라 다른 결과를 나았는데, 사료내 혼합 정도가 높을수록 18일 이후에 급격한 균수의 감소를 보인 반면, 낮은 경우에는 큰 차이가 없었다. 첨가수준에 따른 활력은 균수와 비슷한 양상을 보였지만, 활력이 낮아지는 보관 기간은 균수 보다는 늦었다. 약 20일 경부터 사료내 활력이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, 28일 정도 보관하면 혼합 농도에 상관없이 0.2%, 0.5%, 1.0% 모두 비슷한 효과를 나타냈다. 사료내 0.2%, 0.5%, 1.0% 의 세 수준으로 복합 재제를 첨가하고, artificial slurry를 이용한 ammonia 발생 억제 정도를 측정하였다. 측정된 값은 1.0% 처리구에서 가장 높은 암모니아 억제를 보였다. 하지만, 인공 slurry의 보관 기간이 15일 이상 되었을 때는 1.0%에서 더 높은 암모니아 발생을 보였다.

복합화 제제의 열 안정성은 pelleting 시 받을 수 있는 열처리 조건으로 실시하였다. 복합화 제제는 약 65℃까지는 안정성이 확보되어 있었지만, 75℃ 이상에서는 균수가 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 또한, pH에 따른 영향에서도 4.6에서는 큰 변화가 없었지만, 2이하의 조건에서는 낮은 균수를 보인 반면, urease inhibitor activity는 80%정도의 수준으로 높게 유지되고 있었다.

대량 생산시 신속한 평가방법을 구축하기 위하여 indophenol method와 phenol red method, 그리고 artificial slurry를 이용한 ammonia 발생량을 비교하였다. indophenol method가 phenol red method에 비하여 높은 결과를 보였고, 첨가량이 높아질수록 두 방법의 정확도는 감소하였다. 복합 재제의 효과를 검증하기 위해서는 복합재제의 농도가 10mg/ml~40mg/ml의 수준일 때 두 방법이 정확성이 증가되는 것을 확인하였다. 또한, 이러한 결과는 artificial slurry를 이용한 평가 방법에서도 확인되었다.

임신통, 포유돈, 이유 자돈의 사료내 복합제제를 첨가하여 얻어진 ammonia 발생 억제 효과를 0.5% 수준과 1.0% 수준에서 큰 차이가 없었다. 또한 사료의 종류에 따라 다른 결과를 보였는데, 단백질 함량이 낮은 사료인 임신통의 사료에서 더 높은 암모니아 억제 효과를 확인할 수 있었다. 이유 자돈의 경우 처리구 간의 큰 차이는 없었으나, 이유자돈이 성장하여 소화율이 감소할 때는 복합제제의 첨가가 암모니아 발생을 억제하는 것으로 판단되었다.

천연물과 미생물에서 얻어진 urase inhibitor는 분내 암모니아 발생을 감소 시켜 주는 것으로 확인되었다. 또한, 천연물 추출 조건에서 얻어진 결과는 획득수익 뿐만 아니라 활력을 동시에 고려하여 추출조건을 확립하여야 한다는 사실을 확인할 수 있었다. 일반적인 yeast보다 높은 수준의 glucose 함량에서 미생물의 성장이 잘 된다는 사실 또한, 각 균주에 따른 배양 조건의 확립을 위해 필요한 요소이다.

동물실험을 통한 미생물과 천연물 혼합 제제의 분뇨내 암모니아 발생 감소는 축산업에서 대두되고 있는 환경문제에 대한 하나의 방법이 될 것으로 생각된다. 또한, ammonia 발생 억제 뿐만 아니라 성장 개선 효과를 동시에 가지고 있는 균주와 천연물의 선발은 두가지 이점을 모두 획득할 수 있는 방법으로 생각된다.

제 5 장 연구개발 계획의 활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

In vitro 상에서 선정된 균주와 천연물 제제의 시너지 효과가 사료의 영양소 함량 특히 단백질 함량에 따라 다른 결과를 나타냈다. *in vitro* 상에서 활력이 입증된 천연물 추출물과 미생물 제제가 실제적인 환경에서는 다른 양상을 나타낼 수 있음을 시사한다. 하지만, 모든 균주와 모든 천연물 제제를 *in vivo* 상에서는 확인하는 것이 불가능하다. 따라서, *in vitro* 상에서 개연성 있는 결과를 얻을수 있는 방법의 모색이 중요하다. 또한, 천연물 추출물과 미생물 제제의 어떤 유효 성분이 urease inhibitor의 역할을 하는지에 대한 연구도 필요할 것이다.

제 2 절 타 연구에의 응용

본 연구는 천연물과 미생물에서 urease inhibitor의 활력을 가지는 물질을 획득, 제품화 하는데 목적을 두고 있다. 천연물에 따라 다른 추출 조건뿐만 아니라, 활력과 수율을 최대한 얻을수 있는 조건의 검색이 중요함을 이번 연구를 통하여 확인 할 수 있었고, 또한, 미생물의 배양 역시 각 종에 따른 특이적이 환경이 있다는 것을 다시 한 번 확인 할 수 있었다. 특히, 본 연구에서 선택된 균주와 같이 낮은 pH에서도 성장이 억제되지 않는 균주의 경우 위에서의 산성 조건에 높은 내산성을 보일것이라는 가정이 가능할 것이다. 또한, 동물이 섭취하는 사료의 영양분 함량에 따라 분내에서 발생 할 수 있는 ammonia의 양이 차이가 있기 때문에, 각 사료의 조건에 따른 첨가수준에 변화를 주어야 한다는 것을 시사해 주고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재 축산 분뇨에 대한 규제 강화는 생산비 상승으로 이어지고, 그에 따라 소비자의 부담이 증가되고 있다. 특히, 축산 분뇨에서 발생하는 ammonia 이외에 황화수소와 같은 물질에 대한 관심도 증대되고 있다. 또한, 분뇨 함유되어 있는 중금속이 토양에 미치는 영향에 관한 연구도 진행되고 있다. 현재 urease inhibitor를 이용한 첨가제의 개발의 많이 이루어지고 있지 않다. 하지만, 항생제 사용 금지에 대한 대책으로 천연물과 미생물에 관한 연구가 진행되고 있다.

스위스의 pancosmasms 식물성 추출물 제제인 eXtract란 제품을 시판하고 있다. 이러한 제품은 현재까지는 항생제 대체 가능 물질로 target을 하고 있지만, 실제 효용은 더 클 것으로 예상된다.

항생제 대체 가능한 식물성 추출물과 미생물에 대한 연구는 많이 진행되고 있는 실정이지만, 환경과 연관되어 있는 ammonia에 대한 연구는 그리 크지 않은 실정이다.

제 7 장 참고문헌

- Apsimon, H.M. and M. Kruse-Plass. 1990. The role of ammonia as an atmospheric pollutant. In: V.C. Nielson, J.H. Woorburg, and P.L'Hermite(Ed.) Odor and ammonia emissions from livestock farming. p 17. Elsevier Applied Science, London
- Canh, T.T., A.L. Sutton, A.J.A. Aarnink, M.W.A. Vestergren, J.W. Scharf. 1998. Influence of dietary factors on the pH and ammonia emission of slurry from growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 76: 1123-1130
- Canh, TT, A.L. Sutton, A.J.A. Aarnink, M.W.A. Verstergen, J.W. Schrama and G.C.M. Backer. 1998. Dietary carbohydrates alter the fecal composition and pH and the ammonia emission from slurry of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 1998. 76: 1887-1895
- Chaney AL, Marback EP: Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8: 130, 1962.
- Easter R.A., N.L. Troitter, J.L. Cline and K.Y. Whang. 1996. The effects of micro-aid on sow reproduction. Dept. of Anim. Sci. Univ. of Illinois. USA.
- Fawcett Jk, Scott JE: A rapid and precise method for the determination of urea. *J. Clin. Pathol.* 13: 156, 1960.
- Johnston, N.L., C.L. Quarles, D.J. fagerberg and D.D. Caveny. 1981. Evaluation of yucca saponin on broiler performance and ammonia suppression. *Poultry Sci.* 60: 2289-2295
- Mobley, H.L.Y. and R.P. hausinger. 1989. Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiology Reviews.* 53: 85-108
- Nilius M.B. Lehnhardt G. and Malfertheiner P. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* urease: biochemical and ultrastructural analysis. *European Journal of Clinical Investigation.* 21(5):551-7, 1991 Oct.

- Rideout, T., M.A. Fan, Y. Gao, D. lackeyram, M. Borysenko, R.R. Hacker, ElK. Squires and T. Archbold. 2002. Treating swine slurry microbial urease inhibitor 새 control ammonia and hydrogen sulfide emission. Ministry of agricural food and rural affairs. Dept. of Animal and Poultry Sci. Univ. of Guelph. Canada.
- Shinichi U, Yuichiro H, Masaru N, Yasuo N, hiroshi k: N-substituted hydroxyureass as urease inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.* 50(9): 1280-1282, 2002.
- Van Slyke DD, Archibald RM: *J. Biol. Chem.* 154: 623-642, 1944.
- Varel, V.H. 1997. Use of urease inhibitors to control nitrogen loss from livestock waste. *Bioresource Techenology* 62: 11-17
- Whitelaw, F.G., J.S. Milne and S.A. Wright. 1991. Urease(EC 3.5.1.5) inhibition in the sheep rumen and its effect on urea and nitrogen metabolism. *British Journal of Nutrition.* 66: 209-225
- Yan, W., K. O\htani.,R. Kasai and K. Yamasaki. 1996. Steroidal saponins from fruits of *Tribulus terrestris*. *Phytochem.* 42: 1417-1422
- 고용균. 1998. 유카, 효소 및 생균제의 첨가가 부로일러의 성장에 미치는 영향. *동물자원 연구* 9: 38-45

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.