

(뒷면)

(앞면)

발간등록번호

11-1543000-000845-01

5cm



신종 효모로 구성된 프로바이오틱
생균제 효능기전 연구

A study on the mechanism of
probiotics products composed of novel
yeasts

서울대학교 산학협력단



9cm



농림축산식품부



4cm



신종 효모로

구성된 프로바이오틱

생균제

효능

기전 연구

농림축산식품부

↑
3cm
↓

주 의
(편집순서 8)

(15 포인트 고딕체열)

↑
6cm
↓

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “신종 효모로 구성된 프로바이오틱 생균제 효능기전에 관한 연구” 과제(세부과제 “신종 효모의 특성 분석 및 프로바이오틱 생균제 효능 평가”, 제 1 협동과제 “신종 효모 프로바이오틱 생균제 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2015년 1월 20일

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 김 재 홍

세부연구책임자 : 김 재 홍

연 구 원 : 권 혁 준

연 구 원 : 홍 승 민

연 구 원 : 성 원 진

연 구 원 : 박 진 미

협동연구기관명 : (주)힐링 바이오

협동연구책임자 : 전 수 호

연 구 원 : 박 병 회

연 구 원 : 김 찬 미

요 약 문

전 세계적으로 건강에 대한 인지도가 상승하고 항생제에 대한 부작용이 나타나면서 친환경적인 건강 보조제로서 프로바이오틱스가 각광을 받고 있다. 2000년대부터 지금까지 국제적으로 프로바이오틱스 시장 규모가 확장되고 있고 소비자의 요구가 반영 되면서 프로바이오틱스를 주도 하던 북미 유럽 국가뿐 아니라 한국을 비롯한 아시아의 시장 규모 역시 지속적으로 성장할 것으로 예상 되고 있다. 프로바이오틱스는 숙주 동물의 장내에 정착하여 여러 가지 대사 활성을 통해 유해균을 억제 하여 균 총을 개선하고 독성물질을 분해하여 에너지원으로 사용 하는 등 체내에서 이로온 효과들을 나타내는 미생물들을 통칭 하는데 유산균이 대표적인 균주이고 효모 로는 *Saccharomyces boulardii*가 잘 알려져 있다. 유산균에는 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 페디오코커스 속(*Pediococcus* sp.), 루코노스톡(*Leuconostoc* sp), 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp), 스포로락토바실러스(*Sporolactobacillus* sp) 및 비피도 박테리움(*Bifidobacterium*)등이 있으며 이러한 균들은 장내에서 다양한 대사활성과 항생물질 생산으로 유해균을 억제하고 독성물질 분해로 발생하는 부산물을 에너지원으로 이용한다. 그러나 프로바이오틱스로 이로온 효과를 나타내기 위해서는 장까지 안정적인 이동과 정착 및 증식 할 수 있어야 하는데 실제로 유산균의 경우 내산성, 내 담즙산성 및 장내 정착성이 약하다는 단점이 있기 때문에 관련 분야에서 수많은 연구가 진행 중에 있다. 또한 항암효과, 면역 활성, 정장, 혈압조절, 및 콜레스테롤 저하등 여러 방면으로 연구가 이루어지고 있다. 최근 유산균의 단점을 보완 할수 있는 천연 효모종의 개발로 프로바이오틱스 생균제가 널리 이용되고 있다. *Saccharomyces boulardii*는 *Saccharomyces cerevisiae*와 유전적 상동성을 갖지만 일반적으로 30℃ 이상에서 기능저하를 나타내는 기존 효모와는 달리 37℃에서 증식이 가능하고 장 정착성에서 우수한 능력을 가지고 있어 전 세계적으로 널리 이용되고 있는 효모종이지만 그 외 다른 대사 및 분해능에 관한 특성 연구는 미진하다. (주)힐링바이오의 SJP 효모로 이루어진 제품들은 현재 양돈장과 양계장에서 사용되고 있으며 악취제거와 생산성 향상 등 뚜렷한 효능을 보이고 있으나 이러한 효능에 대한 과학적 근거가 규명되지 않아 널리 보급하는데 어려움이 있고, 탁월한 효능에도 불구하고 해외 수출에 어려움을 겪고 있어 이에 대한 기초연구를 수행하였다.

1. 신종효모의 특성분석

가. 신종효모 유전자 분석

18S rRNA gene full sequence 비교 결과 SJP, CIP 및 *S. exiguus*는 모두 *S. cerevisiae*와 1개의 염기서열 차이(T1300C)를 가지고 있다. SJP와 CIP의 5.8S rRNA gene 염기서열을 *Kazachstania exigua* 및 *S. exiguus*/*S. cerevisiae*와 비교한 결과 SJP는 11개 염기서열 차이를 기존 알려진 효모와는 차이를 보였고, CIP는 2개 염기서열 차이를 보였으나 CIP의 경우 *Vanderwaltozyma tropicalis* 및 *S. servazzii*와 100% 동일한 염기서열을 보였다.

Internal transcribed spacer (ITS) 염기서열 분석을 위해 프라이머를 설계하여 PCR을 수행한 결과 증폭산물의 크기의 차이를 확인하였고, 염기서열 분석 결과 다양한 염기서열의 차이와 함께 염기서열 결손이 관찰되어 비교한 효모와 CIP 및 SJP는 뚜렷한 차이를 보임을 재확인 하였다.

나. 게놈 분석

SJP와 CIP는 NGS system을 통하여 de novo sequencing을 실시하였고 그 결과를 토대로 Genome-assemble과 Re-sequencing을 실시하였다. SJP의 유전자 contig는 총8466개로 사이즈는 다양하게 나타났고 NCBI-BlastX를 통해 가장 가까운 효모주를 선별하여 re-sequencing의 reference로 사용하였다.

SJP는 reference(*Pichia kudriavzevii*-SD108, Biosample: SAMN02952138) 대비 10Mb당 평균 coverage는 97.44%로 나타났고 그중 mapped read는 평균 94.77%로 나타났다. 전체 mapping 유전자중 총 46,719개의 site에서 유전자 삽입, 결손 및 치환의 결과가 나타났다. Matching sequence 중 0.37052402434 %의 차이를 보여 *Pichia kudriavzevii*와의 차이를 확인하였다.

다. 대사관련 유전자 분석

SJP의 대사 관련 유전자들의 증폭여부와 염기서열의 BLAST 검색 결과를 아래 그림과 표에 정리함. SJP는 14개 대사 유전자들 중 10개가 증폭되었고, 염기서열 분석 결과 각 대사 유전자에 특이적 [lane 4, Glycerol 3-phosphate dehydrogenase NAD⁺ (GPD)는 증폭되었으나 비특이]이었으며 *Pichia kudriavzevii*와 6개 유전자(98-100%), *Candida glycerinogenes*와 4개 유전자(84-99%), *Issatchenkia orientalis*와 2개 유전자(99, 100%)에서 가장 높은 상동성을 보여 유전자들의 모자이크 특성 (mosaicism)이 뚜렷하여 SJP가 기존 효모와 차별화 되는 효모임을 재확인 하였다.

라. 유용유전자 발굴

NCBI gene bank DATA base에서 Yeast URA3를 참고로 약 20개의 URA3 유전자 프라이머 설계하여 SJP와 CIP에서 genomic DNA를 추출하여 DNA PCR 하여 확인된 밴드를 cloning하였고, 염기서열을 확인 하였다.

SJP orotidine 5-phosphate decarboxylase (URA3) 유전자 클로닝(*Pichia kudriavzevii*의 URA3 유전자와 100% 일치하는 것을 확인하였고, 생명공학연구원 유전자원센터에 유전자원 등록 하였다.

마. 프로테옴 분석

S. cerevisiae (KCTC 50757), CIP, SJP에서 추출한 단백질을 2D-GE(pH3-10, 8-16% gel, 700ug) 수행한 결과 진하게 나타나는 주요 spots에서 상당히 다른 차이를 보여주고 있어 CIP와 SJP의 프로테옴은 *S. cerevisiae* 뿐 아니라 서로 큰 차이가 있다.

다양한 등전점(pI)과 분자량을 갖는 25개의 spot(위의 그림14)을 2D-Gel에서 추출한 후 trypsin 처리하여 얻어진 펩티드의 분자량을 측정하여 데이터베이스의 단백질과 일치여부를 확인하여 관련성이 높은 단백질(matched protein)을 예측하였다. 실제 spot의 분자량과 관련성이 높은 단백질의 분자량을 아래 표에 비교하였다. SJP의 경우 spot 1-6, 10-13, 18, 20, 23의 경우 일치하는 단백질을 찾을 수 없어 기존 효모의 단백질과 상당한 차이를 가지고 있는 것으로 판단하였다. 그러나 나머지 spot의 경우도 실측 분자량과 예상 분자량 및 등전점의 차이가 커 신뢰도는 낮으므로 SJP는 기존 효모와 상당한 차이를 보이는 것으로 판단 하였다.

2. 신종효모 생균제 효능 평가

가. 배양 형태 및 37℃ 배양성

SJP와 CIP의 집락 형태를 37℃에서 비교한 결과 SJP는 CIP 대비 크고 불투명한 백색 집락을 형성 하였으나 CIP는 상대적으로 작고 광택이 나는 백색의 집락을 형성하였다. SJP와 다른 *Saccharomyces exiguus* 표준 균주(KCTC 7169, KCTC 17660)의 배양 온도 비교-SJP는 개발 당시 동정 기술의 한계로 신종 효모이나 *S. exiguus*와 유사한 효모로 분류 되었으나 SJP는 37℃에서 증식성이 탁월하지만 *S. exiguus*는 증식성이 매우 낮아 뚜렷한 차이를 보였다. SJP와 다른 *Saccharomyces boulardii*(균주 분양기관)의 37℃ 배양성 비교(SJP와 *S. boulardii*를 YMA에 streaking하여 37℃에서 배양성을 비교한 결과 SJP는 18h만에 매우 활발한 성장을 보였고 *S. boulardii*는 18h 배양에서 집락을 형성하지 못하였고 24h의 추가 배양시간 후 집락을 형성하여 다시 24h의 추가 배양 후 SJP의 집락과 유사한 크기로 성장하여 SJP가 *S. boulardii*보다 37℃ 배양에서 빠르고 높은 증식을 보였다.

나. 내열성 시험

CIP(C), SJP(S), *S. cerevisiae* (KCTC 50757), *S. boulardii*(B; *S. cerevisiae*와 계능 서열상 99% 유사하나 37℃증식성을 보유함)를 55, 60, 65℃에서 10분간 열처리 한 후 YMA에 도말하여 37℃에서 배양하여 생존여부를 확인한 결과 모두 60℃에서 생존하였으나 65℃에서는 SJP만 생존하여 뚜렷한 차이를 보였다.

다. 장 정착성 시험

- 1차 실험에서 맹장변 그람당 SJP는 1.3×10^4 – 7.5×10^5 cfu, CIP는 6.6×10^3 – 3.4×10^5 cfu가 분리 되었으나 대조군과 *S. cerevisiae*는 분리되지 않아 CIP와 SJP의 위산, 담즙, 및 장내 증식성이 확인되었다.
- 2차 실험에서는 대조군과 *S. cerevisiae* 투여군은 효모가 전혀 분리되지 않았지만 맹장변 그람당 CIP는 2.4×10^4 cfu/g, SJP는 3.8×10^5 cfu/g이 분리되었다. 담즙염이 포함되어 있는 MacConkey Agar에 SJP와 *S. boulardii*를 도말하여 37℃에서 배양하여 생존 여부를 확인한 결과 SJP는 2-3일째 매우 작은 집락을 형성하였고 4-5일째 육안으로도 확인이 가능한 집락의 크기로 성장한 반면 *S. boulardii*는 같은 기간 동안 집락을 전혀 형성하지 않았다

라. 항균제 및 항진균제 감수성 조사

항균제-ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, amikacin, chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycycline, gentamicin, kanamycin, neomycin, norfoxacin, penicillin, streptomycin, sulfamethoxazole/ trimethoprim, tetracycline, enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, lincomycin, oxytetracycline, spectinomycin에 모두 내성이 있음을 확인하였다. (disk diffusion test)
항진균제-nystatin(0.625ug/ml), amphotericin B(0.156ug/ml)

마. 병원성

SJP 계태아 섬유아세포 (CEF)접종 시험-SJP 배양액(24h)을 100배 희석하여 CEF에 접종하였고, 5일 후 관찰한 결과 세포는 세포변성효과를 보이지 않았다. 종란 접종 결과-

10⁷cfu/ml을 SPF종란에 0.1ml/개씩 접종한 후 60시간 배양하여 chilling하여 종란의 생존 및 계태아의 병변을 관찰한 결과 SJP/CIP 접종군 모두 60시간동안 생존하였으며, 계태아 역시 Control과 큰 차이를 보이지 않아 계태아에 대한 병원성이 없었다.

바. 유용유전자 발현용 영양요구주(auxotroph)제작

SJP배양액을 10진 희석하여 10⁻³-10⁻⁴cfu/ml의 희석배율을 YMA에 도말하여 37℃에서 배양 후 집락이 고르게 형성되면 UV 조사기(높이-35cm)안에서 15분간 UV mutagenesis를 실시 후 모든 colony를 수거하여 PBS에 부유시켰다. UV 처리된 SJP 부유액을 10진 희석하여 YMA에 도말후 37℃에서 배양하여 집락이 100개 이하로 형성된 희석배율을 선정, replica를 이용하여 최소결손배지에 동일한 colony를 접종한 후 다시 37℃에서 배양한 결과 7종의 결손배지 중 adenine결손 배지에서 colony를 형성하지 않았고 UV mutagenesis에 의해 SJP의 adenine 생합성 관련 유전자들에 돌연변이가 있을 것으로 판단되었다.

사. 담즙염 내성 변이주 개발

SJP 배양액 10³-10⁴ cfu/ml를 Bile salt 0.15%가 함유된 YM Broth에 접종하여 37℃에서 3일간 배양하였고 다시 10진 희석 하여 같은 방법으로 두 가지 액체배지에 10³-10⁴ cfu/ml씩을 접종하여 37℃에서 1일 배양하였다. 이후 계대 배양에서는 1일을 기준으로 배양하였고 19대까지 연속 계대배양 하여 최종적으로 BT-SJP변이주를 선별하였다. BT-SJP담즙 내성 균주와 SJP모균주는 0.15% 담즙염이 함유된 YM Broth에 각각 접종하여 2시간 간격으로 배양액을 수거하여 YM agar에 도말하였고 37℃에서 배양하여 colony수를 측정한 결과 BT-SJP는 4시간 이후부터 모균주 대비 높은 증식성을 나타내었고 담즙에 대한 내성을 확인하였다.

아. 저가 배양배지 조성

사료첨가제용 효모 배지를 당밀에서 미강으로 변경하여 효모 배지의 원가를 약 70% 낮췄으며, 당밀배지에 비해 미강배지에서의 효모 최대 성장이 약 10배 증가하였고, 기존 사료첨가제보다 효모균수가 약 7-10배 증가한 사료첨가제를 생산함으로써 인해 효율 증대시켰다. 저온에서의 미강추출 시 종전보다 영양성분에서의 우위를 점하여 기존 미강배지에 비해 효모의 균수가 약 5배 증가하였다.

이러한 연구결과들은 (주)힐링바이오 효모제품의 효능 기전을 이해하는데 도움이 되며 현장에서는 가금의 소화효율 증진, 생산성 향상 및 분뇨 악취 저감을 통한 생산성 향상에 기여할 것으로 판단된다. 또한 본 연구 과제를 통해 개발한 아데닌 영양요구주는 유용한 외부 유전자 발현을 위한 벡터로 활용할 수 있으며 담즙염 내성주는 생균제로 활용 가능할 것으로 기대된다.

SUMMARY

(영문요약문)

With rising awareness of the health worldwide, the probiotics as health supplements are getting the attention, fearing the side effect of antibiotics. From 2000s to date, probiotics market expansion reflected by demand of consumers is leading to development of international market in North America and Europe, as well as Asian countries, including Korea. The world market size of probiotics was \$15.9 billion in 2008, it was one of big emerging markets expected to reach \$28.8 billion.

Probiotics are live microorganisms which confer benefit on the host. Most of probiotics are bacteria, containing *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostos*, and *Bifidobacterium*. These bacteria can improve the trait of microbiota in gastrointestinal tract of host through various metabolic activity and toxic material decomposition. However, probiotic bacteria are susceptible to gastric acid, bile salt and uneasy to settle down in GI tract. Yeast has been used as a protein and vitamin sources in feed and *Saccharomyces cerevisiae* has been used as a probiotics. The optimal growth temperature of *S. cerevisiae* is 28-30°C and it can not metabolize properly at body temperatures (37-41°C) of animals. For this reason thermophilic yeast such as *S. boulardii* has been used as a probiotics especially for prevention of diarrhea in humans.

The Healing-Bio Co. Ltd. developed commercial probiotics which have been used in pig and poultry farms and the probiotics was evaluated to be efficacious for removing odors of ammonia and H₂S, and productivity improvement. Therefore, in the present research work we characterized two yeast strains (SJP and CIP) contained in the probiotics product to understand the mechanisms of their efficacy.

The SJP strain was identified as *Pichia kudriavzevii* on the basis of genome analysis but it possessed many single nucleotide polymorphisms. SJP grew rapidly at 37 °C and resistant to heat shock at 65°C. SJP grew on MacConkey agar which contained bile salt and 1.3x10⁴-7.5x10⁵cfu of SJP were present in one gram of cecal feces. The presence of many SJP in the cecal feces may support gastric acid and bile salt tolerance and successful settle-down in the intestine. Co-culture of SJP with H₂S-producing *Salmonella* Enteritidis in TSI agar slant decreased the agar media discoloration which was caused by H₂S. SJP was non-pathogenic in SPF embryos and immunocompromised chickens when SJP was inoculated with more than 10⁷cfu of SJP via allantoic cavity and intravenous routes, respectively. SJP was resistant to most of antibiotics against procaryotes. We established an adenine auxotroph and a bile salt-tolerant mutant of SJP.

The CIP strain was not completely identified yet but it seemed to be novel on the basis of proteome and ribosomal sequence analyses. CIP grew rapidly at 37°C and

resistant to heat shock at 60°C. CIP did not grow on MacConkey agar which contained bile salt but 6.6×10^3 – 3.4×10^5 cfu of CIP were present in one gram of cecal feces. The presence of many CIP in the cecal feces may support gastric acid and bile salt tolerance and successful settle-down in the intestine. Co-culture of CIP with H₂S-producing *Salmonella* Enteritidis in TSI agar slant decreased the agar media discoloration which was caused by H₂S. CIP was non-pathogenic in SPF embryos and chickens when CIP was inoculated with more than 10^7 cfu of CIP via allantoic cavity and intravenous routes, respectively.

In conclusion, the efficacy of probiotics product of the Healing-Bio Co. Ltd. can be explained by effective settle-down of yeasts in the intestine, active metabolism at the body temperature and capability to decompose ammonia and H₂S. The non-pathogenicity in chicken embryos and immunocompromised chickens may support biosafety of SJP and CIP strains, and the adenine auxotroph of SJP may be valuable as a shuttle vector which express various functional proteins such as lysins and protective antigens.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter I. Outline of Research Project-----	11
Chapter II. Present Situation of Research-----	14
Chapter III. Methods and Results-----	16
Chapter IV. Achievement and Contribution in Relevant Research Field-----	65
Chapter V. Plan of Practical Use-----	65
Chapter VI. Data Collection during project-----	67
Chapter VII. References-----	68

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

- * 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- * 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

- * 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- * 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- * 실용화·산업화 계획(기술실시 등)
- * 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획 등
- * 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
- * 추가연구, 타 연구에 활용 계획 등
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 연구시설·장비 현황

- * 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술

제 8 장 참고문헌

- * 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

제 1 장 연구개발과제의 개요

1절. 새로운 프로바이오틱스 개발의 필요성

1. 프로바이오틱스

프로바이오틱스(probiotics)는 항생제(antibiotics)에 상대적인 개념으로 숙주 동물의 장내에 정착하여 영양분 및 섬유소를 분해하여 에너지원으로 삼고 항생물질을 생산하여 유해균을 억제 하므로써 균 총을 개선하여 숙주를 건강하게 해주는 이로운 미생물들을 통칭한다. 프로바이오틱스 균주로는 유산균이 대부분을 차지하며 효모로는 *Saccharomyces boulardii*가 잘 알려져 있다. 전 세계 프로바이오틱스 시장규모는 2008년 159억 달러(한화 약 17조5천억원) 이었고, 2015년에는 288억 달러(한화 약 31조 7천억원)에 달할 것으로 예상되어 급성장하는 시장 중의 하나이다. 건강에 대한 사회적인 관심으로 프로바이오틱 기능에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있고 과학적 근거가 소비자들의 신뢰도를 상승 시키므로써 향후 프로바이오틱스 시장을 보다 확장 될 것으로 예상하며 현재 유럽중심의 시장에서 점차 한국을 비롯한 아시아 국가의 가파른 성장이 기대된다.

2. 프로바이오틱스의 역할 및 문제점

대표적인 프로바이오틱스인 유산균은 면역강화, 유당 불내증, 급성설사, 항생제관련설사, 여행자설사, 변비, *Clostridium difficile*에 의한 장염, 식품의 상품성 개선, 혈중 콜레스테롤 농도 저하, 비타민 합성, 유기산 합성 및 칼슘 체내 흡수 진작, 유해효소 합성 억제, 장내 유해균 증식 억제, 장내 균 총 정상화, 노화방지, 피부미용 효과 등이 있는 것으로 알려져 있지만 탁월한 효능에도 불구하고 산과 담즙에 대한 내성이 약하고, 장내 정착이 용이하지 않으며 항생제에 대한 내성이 낮고, 내성이 있는 경우 다른 세균으로의 항생제 내성 전파가 일어날 수 있는 단점이 있다. 효모 프로바이오틱스인 *S. boulardii*는 이러한 단점을 보완할 수 있는 37°C에서 증식성과 장 정착성이 우수하며 유산균에서 밝혀진 효능을 대부분 가지고 있어 전 세계적으로 널리 사용되고 있다.

효모인 *S. cerevisiae*는 glucose를 탄소 원으로 하여 호기 상태에서는 에너지(ATP)와 이산화탄소 및 물을 생산하고, 혐기상태에서는 에너지와 에탄올 및 이산화탄소를 산생하므로 효모를 섭취하는 경우 위에서 일부 소화된 음식물이 십이지장으로 내려가 소화되어 발생하는 glucose는 효모에 의해 활용되어 과도한 당의 흡수를 막을 수 있어 당뇨병 완화와 다이어트에 도움을 줄 수 있다. *S. boulardii*는 *S. cerevisiae*로 분류되며 일부 유전자의 반복수와 repeat region에서 차이를 보이며 37°C 증식성이 *S. cerevisiae*에 비해 탁월하므로 이러한 능력이 더욱 뛰어날 것으로 예상된다. 또한 *S. cerevisiae*는 암모니아를 질소원(80%)으로 사용하므로 암모니아를 무독화 할 수 있으며 효모마다 암모니아 이용 능력의 차이가 보고되고 있으나 *S. boulardii*에서는 이러한 특성에 대한 연구가 활발하지 않다.

2절. 신종효모의 특성 분석에 대한 연구 목적

(주)엔텍바이오의 SJP 효모로 이루어진 제품들은 현재 양돈장과 양계장에서 사용되고 있으며 악취제거와 생산성 향상 등 뚜렷한 효능을 보이고 있으나 이러한 효능에 대한 과학적 근거가 규명되지 않아 널리 보급하는데 어려움이 있고, 탁월한 효능에도 불구하고 해외 수출에 어려움을 겪고 있어 이에 대한 기초연구가 절실하다.

특히 효모 균주인 SJP6728AF1 (기탁번호 KCCM-10675P), SJP6729AF2 (기탁번호 KCCM-10677P), SJP6730AF3 (기탁번호 KCCM-10679P)는 퇴비에서 유래한 효모로 18S rDNA 염기서열 분석 결과 SJP6728AF1, SJP6729AF2는 *S. exiguus*와 97% 유사하고, SJP6730AF3는 *Candida fructus*와 97% 유사한 신종 효모라는 것이 밝혀졌으며 최근 확대된 18S rDNA 유전자 데이터베이스를 이용하여 재차 유전자 분석을 실시한 결과 SJP6728AF1은 *Candida humilis*와 98.1%(1644/1675), SJP6729AF2는 *Candida humilis*와 99.1%(1671/1687), SJP6729AF2는 *Candida fructus*와 97.1%(1694/1744)의 상동성을 보이며 서로 간에는 아래 표와 같은 상동성을 보여 신종 효모라는 사실이 확인되어 이들에 대한 계통 및 프로테옴 수준에서의 연구가 필요함.

표. Similarity (%) of nucleotide sequence of 18S rDNA

	SJP6728AF1	SJP6729AF2	SJP6730AF3
SJP6728AF1	100	97.8	88.5
SJP6729AF2		100	89.0
SJP6730AF3			100

친환경농업을 위한 ‘자연 순환농업’ 추진 시 중요한 가축분뇨 처리 과정에서는 암모니아와 황화수소와 같은 악취 유해가스가 다량 발생하며 2005년 환경부의 악취방지법은 관리 대상을 ‘시설’에서 ‘지역’으로 확대하여 이에 대한 경제적이고 효과적인 해결책이 필요한데 SJP6728AF1을 돈분뇨 1톤당 1.5L를 폭기조에 첨가하는 경우 무 처리군의 38.5% 수준으로 악취가 감소하였으며 육성돈의 사료에 효모 발효제 2.5%를 첨가하여 28일간 급여하여 항생제 투약군과 무항생제군과 비교한 결과 사료 요구율이 2.25로 항생제 투약군 2.28과 무항생제군 2.56 대비 낮았고, 돈분 유해가스의 경우 암모니아 0.3ppm으로 항생제투약군 1.4ppm, 무항생제군 1.8ppm 보다 낮았고, 황화수소는 0.1ppm, 항생제투약군 49.0ppm, 무항생제군 31.5ppm 보다 낮은 수치를 보여 신종 SJP 효모들은 생균제 효능 뿐 아니라 분뇨 처리 문제까지도 해결할 수 있는 획기적인 프로바이오틱 효모일 가능성이 매우 높아 *S. boulardii*와 차별화되므로 이에 대한 체계적인 연구가 필요하다.

특히 최근 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산 연구가 활발히 이루어지고 있는데 사료로 급여한 신종 효모가 분변으로 배출되면 발효가 일어나고 이 과정에서 유해한 암모니아와 황화수소가 저감되며 이산화탄소와 물이 만들어지므로 바이오디젤 생산용 클로렐라의 배양액으로 사용될 수 있어 분뇨의 생산적 활용 면에서 의미가 있다. 따라서 관련 유전자와 프로테옴 분석이 이루어지는 경우 효모의 부가가치를 향상시켜 농가 보급 확대와 수출 증대

가 기대된다.

신종 SJP 효모들은 대부분의 효모들이 37°C에서 증식성이 감소하는 것과 달리 *S. boulardii* 처럼 증식성이 뛰어나 동물의 체내에서 증식 및 대사활동이 활발할 것으로 예상되는데 실제로 4주령 SPF 닭에 10⁷CFU/ml을 매일 5일간 급여하면 1일 후 개체별로 맹장변 g당 6.7x10³-7.5x10⁶ CFU/ml이 분리되어 장 정착 및 증식이 이루어지고 있는 것으로 판단되어 유망한 생균제 후보로 성공가능성이 매우 높음. 또한 신종 SJP 효모들은 다양한 항생제 (ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, amikacin, chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycycline, gentamicin, kanamycin, neomycin, norfloxacin, penicillin, streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracycline, enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, lincomycin, oxytetracycline, spectinomycin)에 대한 내성을 보여 농장 적용성이 매우 뛰어나며 *Colletotrichum gloeosporides*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* 등의 곰팡이 억제효능이 확인되어 항균 효과도 있을 것으로 판단되므로 항균, 항진균 및 항바이러스 효과에 대한 면밀한 연구가 필요하다.

신종 SJP 효모들을 11일령 SPF 발육란에 요막강 경로로 접종하여 60시간 배양한 결과 계태아의 폐사가 전혀 일어나지 않았고, 무접종 계태아와 비교 시 병변이나 체중 차이를 보이지 않을 정도로 안전하였으며 6주령 SPF 닭에 10⁸CFU/수를 정맥내로 접종하여 2주간 관찰하여도 폐사나 임상증상 및 내부 장기의 병변도 전혀 관찰되지 않아 안전하므로 프로바이오틱 효모로써 안전성이 매우 높을 것으로 예상되므로 이에 대한 추가 연구가 필요하다.

따라서 신종 SJP 효모 효능의 기전 의 계놈/프로테옴 및 프로바이오틱스 연구를 통해 동물 건강을 증진시키고, 항생제 사용을 획기적으로 줄여 안전한 축산물을 생산하고, 축산분뇨 처리효율 제고와 '자연 순환농업' 정착에 이바지하며 신종 효모 생균제에 대한 기술 마케팅 자료를 제공함으로써 제품의 국내외 영업을 촉진하여 고부가가치 수익창출이 가능하므로 본 연구에 대한 지원이 절실하다.

제2장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내/외 관련기술의 현황

1. 국외현황

- 가. 미국의 프로바이오틱스 유산균 건강보조식품 수입시장 규모는 2013년 기준 약 4200만 달러로 전년대비 약 2% 증가하였고 업계에서는 세계시장이 2011년 약 27억 달러에서 2016년까지 48% 증가한 40억 달러 규모로 성장할 것으로 예상하고 있다. 특히, 프로바이오틱스 유산균 제품은 건강 보조식품분야뿐만 아니라, 유제품에서의 성장률이 두드러지게 나타나며 2011년에는 세계 요거트 판매 시장의 약 35%를 프로바이오틱스 요거트 제품이 차지한다(코트라).
- 나. 노르웨이 생명과학대학(Norwegian University of Life Sciences) 연구진은 인체 소화기계에서의 프로바이오틱스 균주들의 생존률 평가를 위하여 “위장 소화기계 모델 시스템(model gastric system)”을 개발하였다(NDSL)
- 다. 프로바이오틱스 산업에 막대한 자본을 투자한 영국은 특별한 생체 고분자를 개발하여 내산성을 가진 유익균을 개발하여 장까지 안전하게 도달하는 프로바이오틱스를 발굴해냈다(NDSL).

2. 국내현황

- 가. 최근 국내 프로바이오틱스 연구가 활발히 진행되면서 건강식품 및 의약품 제제, 사료첨가제, 천연 항균물질 등의 생산에 널리 이용되고 있으며 유산균을 이용한 치료용 단백질 유전자를 안전하게 전달하는 방법이 개발 되어 신약 개발에 접목 하는 등 의료 분야와 건강식품 분야에 크게 기여 하고 있다. 한국야쿠르트(주) 및 셀 바이오텍(주)등의 기업에서 장에 안정적으로 도달 하는 내산성 유산균, 항균작용을 가진 유산균등을 개발하였다(한국 기술 은행)
- 나. 2002년부터 2011 사이의 특허출원 분석결과 동물 사료, 올리고당, 락토 바실러스, 미생물 동정, 영양 및 질환치료 등이 가장 많은 연구가 진행되고 있고 한국에서는 락토바실러스 관련 연구외의 분야는 상대적으로 연구가 많이 이루어지지 않고 있다(한국식품연구원 연구전략실, 박정민).
- 다. 비피더스균을 이용한 유산균 유전자 발현 시스템 개발하여 기존의 유전자 발현 시스템의 안전성을 보완하였고 전통발효 식품 유래 프로바이오틱의 대부분인 유산균의 박테리오신 합성 연구에 집중하였고 그와 유사한 니신을 적용하는 연구가 증가 하고 있다(한국과학기술정보연구원 전문위원, 임번삼)

3. 관련기술 현황

- 가. 국내에서 영양요구성 선별이 가능한 마커를 사용하여 재조합 폴리 펩타이드를 제조하는 개선된 발현시스템을 개발하였고 개선된 발현 조절을 통해 숙주 세포에서 재조합 단백질을 제조하는 개선된 방법이 개발되었다.
- 나. URA3 유전자의 활성이 불활성화 되어 우리실에 대해 영양요구성 선별 마커를 가지는 유전자 재조합용 효모 및 이를 이용하여 유전자 재조합 균주를 제조하는 방법을 개발하였고 이 균주에 오탄당 발효 관련 유전자가 도입되어 오탄당 및 육탄당 발효가 가능한 산업용 재조합 효모 및 이를 이용한 오탄당 및 육탄당 포함 배지에서 에탄올을 고수율로 생산하는 방법을 개발한바 있다.
- 다. 미생물 생균제를 유효성분으로 함유하는 친환경 미생물 제제 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 바실러스균 및 스트렙토코커스균의 동결 건조물, 아스퍼질러스균의 고체 배양 건조물, 및 효모균의 액체 배양 건조물을 포함한 미생물 생 및 배양물을 유효성분으로 함유하는 축산 사료 첨가용 친환경 미생물 제제를 개발하였다.
- 라. 신규 유산균인 비피도박테리움 롱검 A24 및 이의 이용에 관하여 내산소성, 항생제에 대한 감수성이 높고, 플라스미드 DNA를 가지며, 유해병원성 미생물에 대하여 높은 항균활성을 나타내어 의약품, 사료 조성물, 식품 조성물등에 사용할 수 있다.
- 마. 중국에서 간상균, 이스트 및 락토바실러스를 각각의 비율에 따라 결합하여 혼합 조성물 생균제를 개발하였다.
- 바. 미국에서 영양 요구성 유전자를 포함 효모 형질전환 벡터 및 이스트 형질 전환체를 개발하여 기존의 산업용 효모종과 다양한 미생물을 개선하는데 사용하였다.

제 2 절 연구결과가 국내/외 기술개발 현황에 미치는 영향

1. 프로바이오틱스 개선

최근 국내외에서 프로바이오틱스에 대한 관심으로 인해 소비가 증가 하였고 시장규모 역시 커지고 있는 상황에서 현재의 프로바이오틱스가 당면한 과제는 생균제로서 장까지 안정적으로 도달 할 수 있고 인체 및 동물에서 병원성과 부작용이 나타나지 않는 것이다. 여러 연구진들이 생균제 코팅에 대한 연구에 많은 집중을 하고 있는 가운데 본 연구에 사용된 신종 효모 SJP는 37℃에서 기존의 효모에 비해 높은 증식성을 보이고 담즙에 대한 내성을 보유함과 동시에 내열성까지 갖추므로써 장까지 안정적으로 도달하면서 사료용 첨가제 제조시 발생하는 열에 대처 할 수 있는 프로바이오틱스로서 최적화를 이루었다.

2. 유용 유전자 발현용 영양요구주 국내기술 개발

유용 유전자 발현을 위한 산업용 효모 균주 개발은 국내 기술로 제작된 발현용 벡터와 함께 과학기술 연구용 발현 시스템을 구축함으로써 저렴한 가격의 우수한 국내 제품으로 생산되어 해외제품에 의존했던 산업용 발현 시스템에 경제적, 기술적인 개선이 예상된다.

3. 친환경 기술 분야

동물 사양관리에 중요한 부분을 차지하는 사료 및 분뇨처리에 있어 배양 조건 개선과 개량을 통해 타사 제품 대비 비용 절감 효과를 얻을 수 있고 악취를 완화 시켜 주어 축산업에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절

제 1 세부과제 : 신종효모의 특성 분석

1. 신종효모 계통 분석

가. 분류 및 대사관련 유전자 분석 SJP, CIP(청인) 분자동정 실험

1) SJP 18S rRNA (1.5kb) 증폭용 프라이머 설계

*S. exiguus*와 *Kazachstania exigua* strain NRRL Y-12640의 18S rRNA 유전자 염기서열을 비교하여 새로운 PCR 용 프라이머를 설계하였다.

Forward primer : GCCATGCATGTCTAAGTATA

Reverse primer : AATCAACGCAAGCTGATGAC

2) 5.8S 증폭용 프라이머 설계

*S. exiguus*와 *Kazachstania exigua* strain NRRL Y-12640의 18S rRNA 유전자 염기서열을 비교하여 새로운 PCR 용 프라이머를 설계하였다.

Forward primer : AAC TTT CAA CAA CGG ATC TC

Reverse primer : ATG ACG CTC AAA CAG GCA TG

3) Yeast genomic DNA 추출 & PCR 증폭

SJP, CIP 그리고 reference strain들의 colony을 YM Broth 25ml에 접종하여 27℃와 37℃ (SJP,CIP)에서 O.D값 0.8-1.0 까지 배양 후 3000rpm에서 원심분리 하여 상층액을 제거하고 PBS에 부유시켜 INTRON I-genomic BYF DNA Extraction Mini Kit를 이용하여 genomic

DNA를 추출하였다. Genomic DNA는 TAKARA Ex Taq polymerase와 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였고 조건은 각 유전자의 프라이머 TM값과 size에 따라 조절하였다.

4) 18S/5.8S/ITS rRNA PCR/염기서열 분석 결과

증폭된 PCR product는 1.5% Agarose gel에서 전기영동을 통해 확인 하였고 예상한 크기의 특이적인 amplicon이 증폭되었다(그림1).

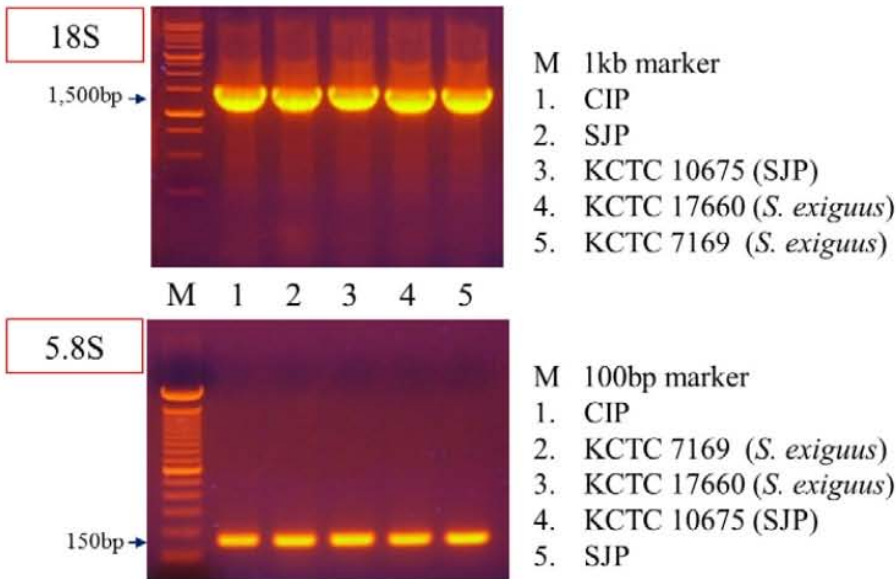


그림1)

18S rRNA gene full sequence alignment 비교 결과 SJP, CIP 및 *S. exiguus*는 모두 *S. cerevisiae*와 1개의 염기서열 차이(T1300C)를 가지고 있었다. (아래 그림, Sbjct= *S. cerevisiae*)(그림2)

```

Query 1261 GCTTAAATAGGGCTGCGAGCATCTGCTCGGGTGCTCTTCTTAGAGGGACTATGGGTATCAA 1320
Sbjct 1296 GCTTAAACAGGGCTGCGAGCATCTGCTCGGGTGCTCTTCTTAGAGGGACTATGGGTATCAA 1355
Query 1321 ACCCATGGAAGTTTGAGGCAACAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCAC 1380
Sbjct 1356 ACCCATGGAAGTTTGAGGCAACAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCAC 1415
Query 1381 GCGCGCTACACTGACGGAGCCAGCAAGTCCAACCTTGGTCGAGAGGCCCGGGTAATCTCG 1440
Sbjct 1416 GCGCGCTACACTGACGGAGCCAGCAAGTCCAACCTTGGTCGAGAGGCCCGGGTAATCTCG 1475
Query 1441 TGAAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTTTTGCTCTTCAACGAGGAATTCC 1500
Sbjct 1476 TGAAACTCCGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTTTTGCTCTTCAACGAGGAATTCC 1535
Query 1501 TAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATT 1532
Sbjct 1536 TAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATT 1567
  
```

그림2)

SJP와 CIP의 5.8S rRNA gene 염기서열을 *Kazachstania exigua* 및 *S. exiguus*/*S. cerevisiae*와 비교한 결과 SJP는 11개 염기서열 차이(치환 10, 결손 1[그림3])를 기존 알려진 효모와는 차이를 보임. CIP는 2개 염기서열 차이를 보였으나 CIP의 경우 *Vanderwaltozyma tropicalis* 및 *S. servazzii*와 100% 동일한 염기서열을 보였다(그림4).

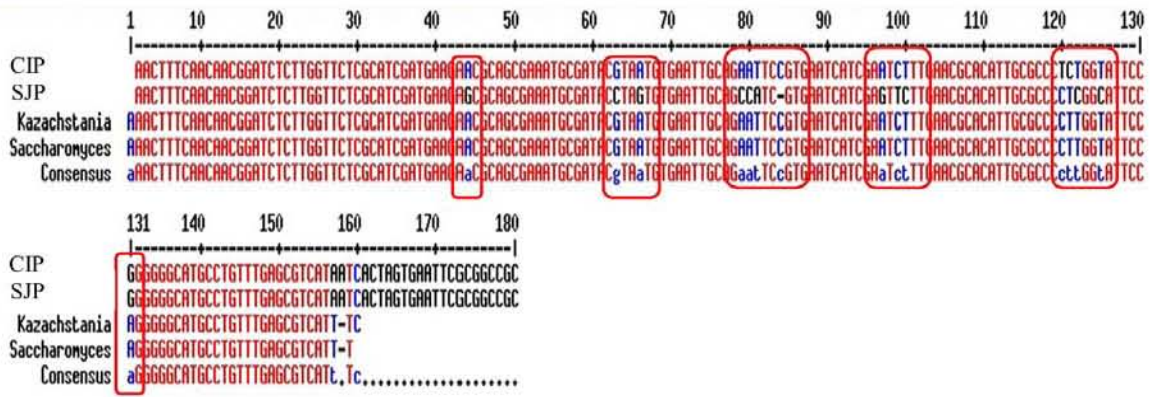


그림3)

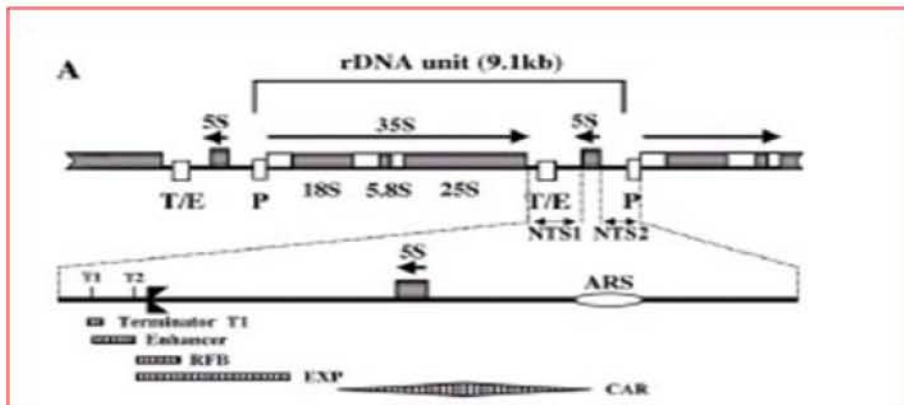
Accession	Description	Max ident	Links
HM461677.1	Vanderwaltozyma tropicalis strain NBRC 105213 internal transcribed :	100%	
HM461676.1	Vanderwaltozyma tropicalis strain NBRC 105214 internal transcribed :	100%	
FJ873442.1	Vanderwaltozyma sp. GA1S06 internal transcribed spacer 1, partial s	100%	
AY046153.1	Saccharomyces servazzii internal transcribed spacer 1, partial seque	100%	
D89895.1	Saccharomyces servazzii genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2	100%	

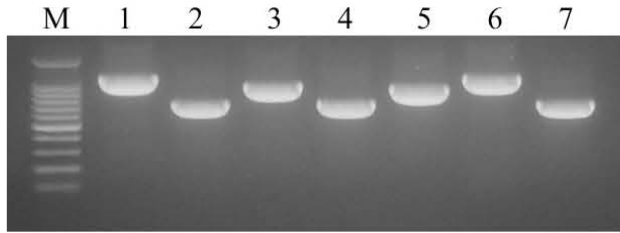
그림4)

5) Internal transcribed spacer (ITS) 증폭용 프라이머 설계

Internal transcribed spacer (ITS) 염기서열 분석을 위해 프라이머를 설계하여 PCR을 수행한 결과 증폭산물의 크기의 차이를 확인하였고(그림5), 염기서열 분석 결과 다양한 염기서열의 차이와 함께 염기서열 결손이 관찰되어 기존 효모와 CIP 및 SJP는 뚜렷한 차이를 보여 신종 효모임을 재확인 하였다.(그림6).

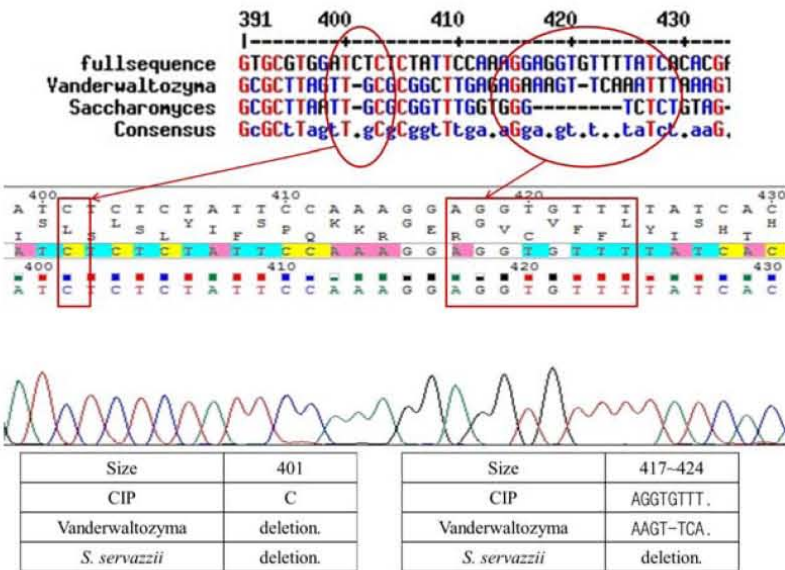
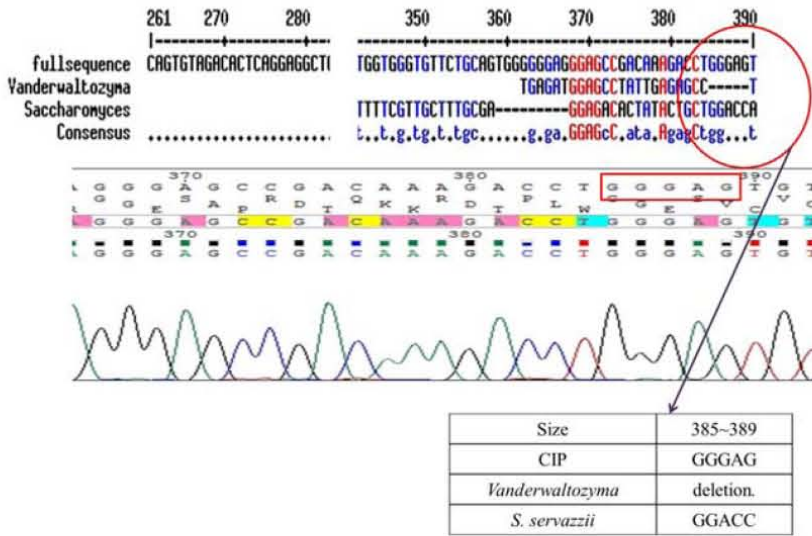
Forward primer : ACC GAT TGA ATG GGC TTA GT
 Reverse primer : ATG CTT AGT TCA GCG GGT A

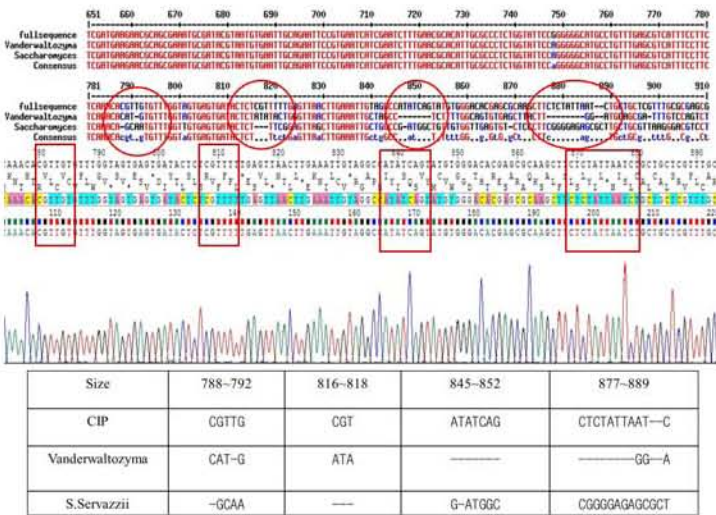
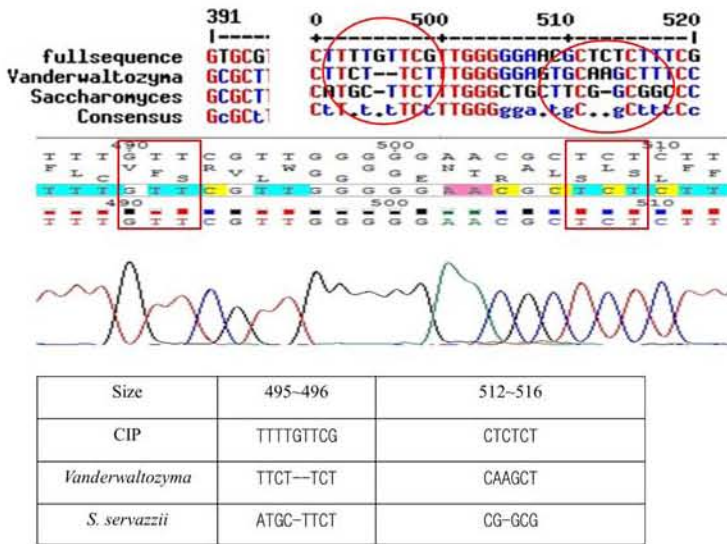
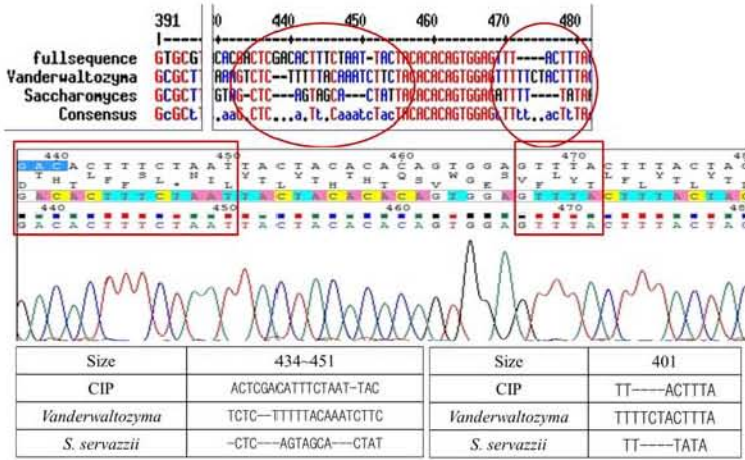




- 1 : CIP-1
- 2 : SJP-1
- 3 : KCTC 7169
- 4 : KCTC 10675
- 5 : KCTC 17660
- 6 : CIP-2
- 7 : SJP-2

그림 5)





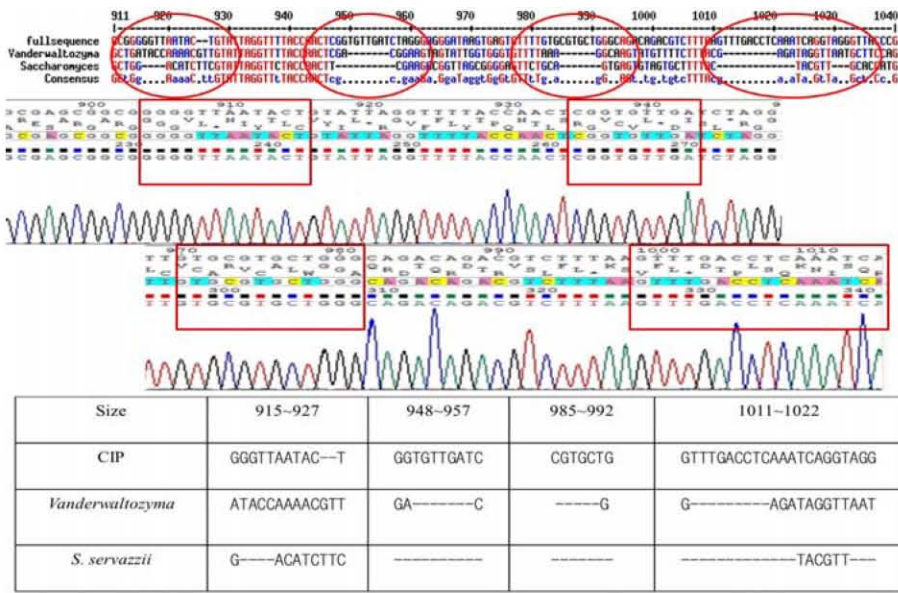


그림 6)

6) 대사관련 유전자 분석

가) CIP의 대사 관련 유전자들의 증폭여부와 염기서열의 BLAST 검색 결과를 아래 그림과 표에 정리하였다. CIP는 20개 대사 유전자들 중 17개가 증폭되었고, 염기서열 분석 결과 각 대사 유전자에 특이적이었으며 모두 *C. glabrata*의 해당 유전자와 가장 높은 상동성 (97-100%)을 보임. 3-beta-glucan synthase, ATP-binding cassette transporter, Serine/threonine protein kinase의 경우 97-98%의 비교적 낮은 상동성을 보여 CIP가 기존 효모와 차별화되는 신종 효모임을 재확인 하였다(그림7).



그림 7)

Lane	Target gene (PCR)	Sequence analysis (BLAST search)	
		The highest matched gene	Identity
1	3-beta-glucan synthase (FKS)	<i>Candida glabrata</i> strain CBS138 chromosome L	97%
2	Cytosine deaminase (FCY1)	-	-
3	ATP-binding cassette transporter (CgCDR1)	<i>Candida glabrata</i> strain CBS138 chromosome M	97%
		<i>Candida glabrata</i> ATP-binding cassette transporter (CgCDR1)	96%
4	Putative hemolysin (HLP)	-	-

5	Serine/threonine protein kinase (SNF1)	Candida glabrata serine/threonine protein kinase (SNF1) gene	98%
6	Phosphoribosyl-anthranilate isomerase (TRP1)	Candida glabrata genotype 23 phosphoribosyl-anthranilate isomerase (TRP1) gene	100%
7	Ph65 DNA replication licensing factor (MCM7)	Candida glabrata strain Ph65 DNA replication licensing factor (MCM7) gene	99%
8	Hypothetical protein (YML041c)	Candida glabrata hypothetical protein (YML041c) gene	99%
9	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP1)	Candida glabrata genotype 26 UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP1) gene	100%
10	3-isopropylmalate dehydrogenase (LEU2)	Candida glabrata genotype 36 3-isopropylmalate dehydrogenase (LEU2) gene	100%
11	Sterol reductase (ERG4)	Candida glabrata strain IHEM 21231 C24 sterol reductase (ERG4) gene	100%
12	Sterol methyltransferase (ERG6)	-	-
13	Sterol desaturase (ERG5)	Candida glabrata strain IHEM 21231 C22 sterol desaturase (ERG5) gene	99%
14	MC68 Sir3 (SIR3)	not detect	
15	ATCC 90030 Beta-1,3-glucan synthase regulatory subunit (RHO1)	Candida glabrata strain ATCC 90030 beta-1,3-glucan synthase regulatory subunit (RHO1) gene	99%
16	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase (HIS3)	Candida glabrata imidazoleglycerolphosphate dehydratase (HIS3)	99%
17	ATP-dependent RNA helicase Ded1p (DED1)	Candida glabrata putative ATP-dependent RNA helicase Ded1p (DED1) gene	100%
18	Squalene epoxidase (ERG1)	Candida glabrata CBS 138 hypothetical protein partial mRNA	99%
19	Thymidilate synthase (CDC21)	Candida glabrata strain 1085P10 thymidilate synthase (CDC21) gene	99%
20	uracil Phosphoribosyltransferase (FUR1)	Candida glabrata strain 1085P10 uracil phosphoribosyltransferase (FUR1) gene	99%

나) SJP의 대사 관련 유전자들의 증폭여부와 염기서열의 BLAST 검색 결과를 아래 그림과 표에 정리함. SJP는 14개 대사 유전자들 중 10개가 증폭되었고, 염기서열 분석 결과 각 대사 유전자에 특이적 [lane 4, Glycerol 3-phosphate dehydrogenase NAD⁺ (GPD)는 증폭되었으나 비특이]이었으며 *Pichia kudriavzevii*와 6개 유전자(98-100%), *Candida glycerinogenes*와 4개 유전자(84-99%), *Issatchenkia orientalis*와 2개 유전자(99, 100%)에서 가장 높은 상동성을 보여 유전자들의 모자이크 특성 (mosaicism)이 뚜렷하여 SJP가 기존 효모와 차별화되는 신종 효모임을 재확인 하였다(그림8).

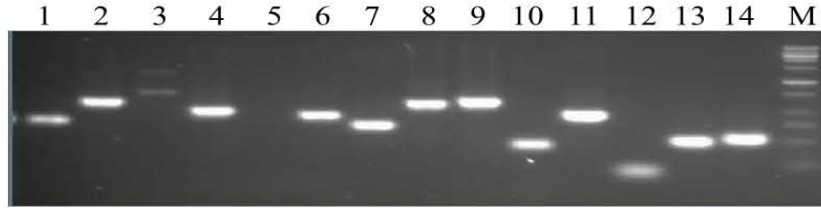


그림 8)

Lane	Target gene (PCR)	Sequence analysis (BLAST search)	
		The highest matched gene	Identity
1	URA3	<i>Pichia kudriavzevii</i> orotidine-5'-monophosphate decarboxylase (URA3) gene	100%
2	TRP1	<i>Candida glycerinogenes</i> strain WL2002-5 phosphoribosyl anthranilate isomerase (TRP1) and inorganic pyrophosphatase (IPP1) genes	99%
3	Triose phosphate isomerase (tpi1)	-	-
4	Glycerol 3-phosphate dehydrogenase NAD ⁺ (GPD)	- (unknown?)	-
5	enolase (ENO) gene	-	-
6	Glucose 6-phosphate dehydrogenase gene	<i>Candida glycerinogenes</i> glucose 6-phosphate dehydrogenase gene	97%
7	Ribosomal protein L41	<i>Candida glycerinogenes</i> ribosomal protein L41 gen	84%
8	Hog1p (hog1)	<i>Candida glycerinogenes</i> strain WL2002-5 hog1p (hog1) mRNA	99%
9	ATP-binding cassette transporter Abc1p (ABC1)	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain IFO0011 ATP-binding cassette transporter Abc11p (ABC1)	100%
		<i>Issatchenkia orientalis</i> strain IFO0011 Abc1p (ABC1) gene	100%
10	Isocitrate lyase gene	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain ATCC 6258 isocitrate lyase gene	100%
11	RRP45	<i>Pichia kudriavzevii</i> strain V2b mitochondrial Rrp45p (RRP45)	99%
		<i>Issatchenkia orientalis</i> strain B2399 mitochondrial Rrp45p (RRP45) genes for mitochondrial products	99%
12	TEF1 gene for translational elongation factor EF-1 alpha	-	-
13	PGK1 gene for 3-phosphoglycerate kinase, promoter region	<i>Pichia kudriavzevii</i> PGK1 gene for 3-phosphoglycerate kinase	99%
14	TDH1 gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<i>Pichia kudriavzevii</i> TDH1 gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	98%

나. 유용 유전자 발굴

NCBI gene bank DATA base에서 Yeast URA3를 참고로 약 20개의 URA3 유전자 프라이머 설계하였다. SJP와 CIP에서 genomic DNA를 추출한 후 PCR로 DNA증폭을 실시하였고 1.5% Agarose gel을 이용한 전기영동으로 확인된 밴드는 TA-cloning vector에 클로닝 하여, plasmid DNA에 삽입된 URA3의 염기서열을 분석 확인 하였다.

1) CIP orotidine 5-phosphate decarboxylase (URA3) 유전자 클로닝

- *C. glabrata*의 URA3 유전자와 100% 일치하는 것을 확인하였고, 생명공학연구원 유전자원센터에 유전자원 등록 하였다(그림9).

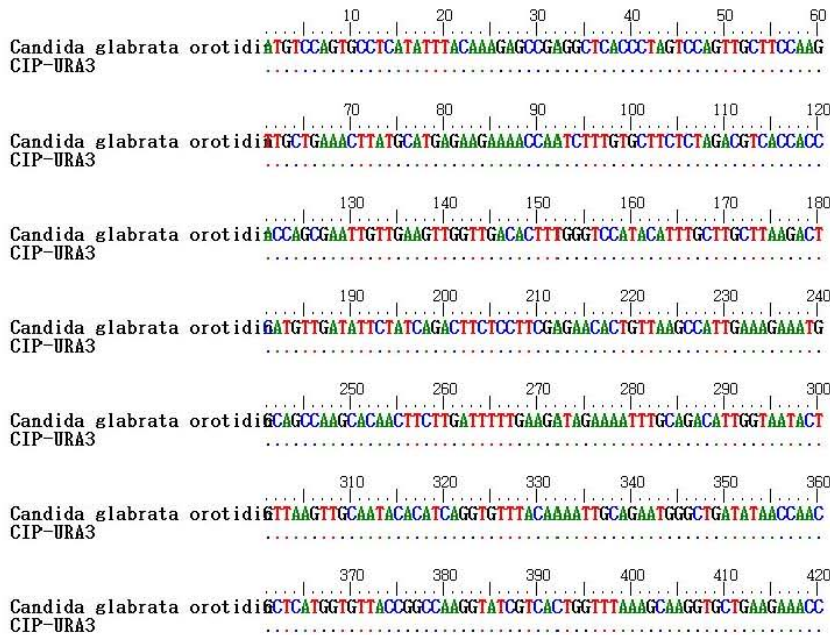


그림 9)

2) SJP orotidine 5-phosphate decarboxylase (URA3) 유전자 클로닝

- *Pichia kudriavzevii*의 URA3 유전자와 100% 일치하는 것을 확인하였고, 생명공학연구원 유전자원센터에 유전자원등록 하였다(그림10).


```

Pichia kudriavzevii orot10 20 30 40 50 60
SJP-URA3 ..TGGCGTCATACAAAGAAAGATCAGAATCACACACTTCCCTGTGCTAGGAGACTTTTC

Pichia kudriavzevii orot70 80 90 100 110 120
SJP-URA3 ..TCCATCATGGAGAAAGAAAGTCTAACCTTTGTGCATTTGGATATTACTGAAACTGAA

Pichia kudriavzevii orot130 140 150 160 170 180
SJP-URA3 ..AAGCTTCTCTATTTTGGACACTATTGGTCTTACATCTGTCTAGTTAAACACACATC

Pichia kudriavzevii orot190 200 210 220 230 240
SJP-URA3 ..GATATTGTTTCTGATTTTACGTATGAAGGAACTGTGTGCTTTGAAGGAGCTTGCCAAG

Pichia kudriavzevii orot250 260 270 280 290 300
SJP-URA3 ..AAACATAAATTTATGATTTTGAAGATAGAAAATTTGCTGATTTGGTAAACACTGTTAAA

Pichia kudriavzevii orot310 320 330 340 350 360
SJP-URA3 ..AATCAATAAATCAGGTCTTCCGTAATGCGAAATGGCTGACATCACTAATGCACAT

Pichia kudriavzevii orot370 380 390 400 410 420
SJP-URA3 ..GGTAAACGGTGCAGGTATTGTTCTGGCTTGAAGGAGCCGCCCAAGAAACAACCCAGT

```

그림 10)

2. 프로테옴 분석

가) SDS-PAGE

- *S. cerevisiae* (KCTC 50757), CIP, SJP를 파쇄하여 SDS-PAGE 한 결과 CIP와 SJP에서 *S. cerevisiae*와 다른 고유한 밴드를 보였다(화살표 표시)(그림11).

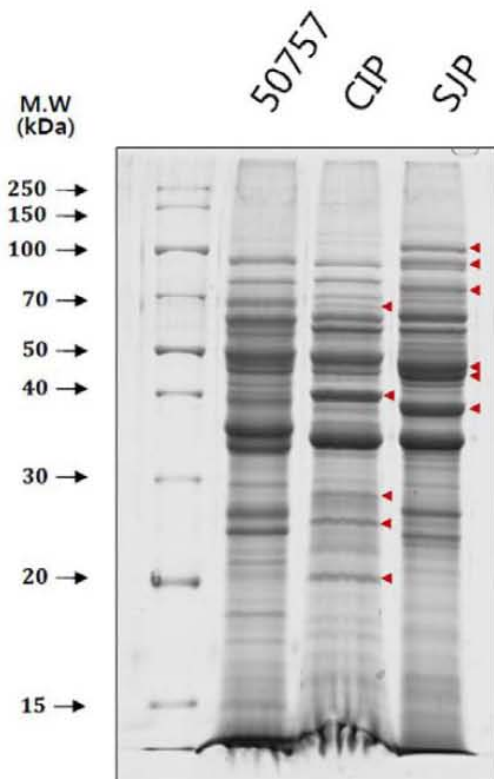


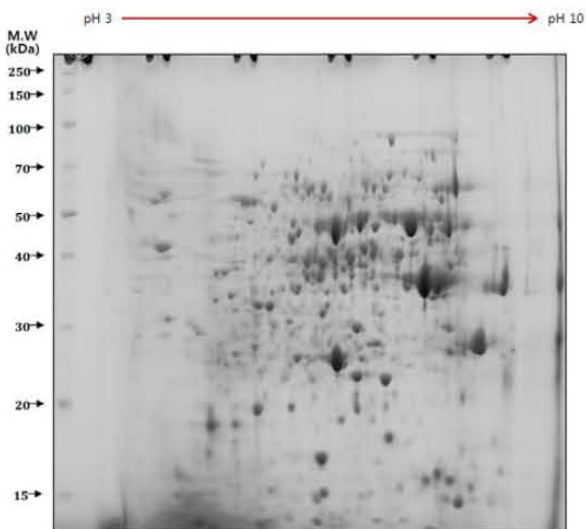
그림11)

나. 2D-GE

- 7M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 2.5% DTT buffer 사용
- Bradford 정량
- 1DE로 band 패턴 확인 (15ug)
- Sample당 700ug씩 실험 실시
- pH3-10 strip 사용
- 8-16% gradient gel 사용
- CBB staining

S. cerevisiae (KCCM 50757), CIP, SJP에서 추출한 단백질을 2D-GE(pH3-10, 8-16% gel, 700ug) 수행한 결과 진하게 나타나는 주요 spots에서 상당히 다른 차이를 보여주고 있어 CIP와 SJP의 프로테옴은 *S. cerevisiae* 뿐 아니라 서로 큰 차이가 있었다(그림12)

50757 KCCM *S.cerevisiae*



CIP

SJP

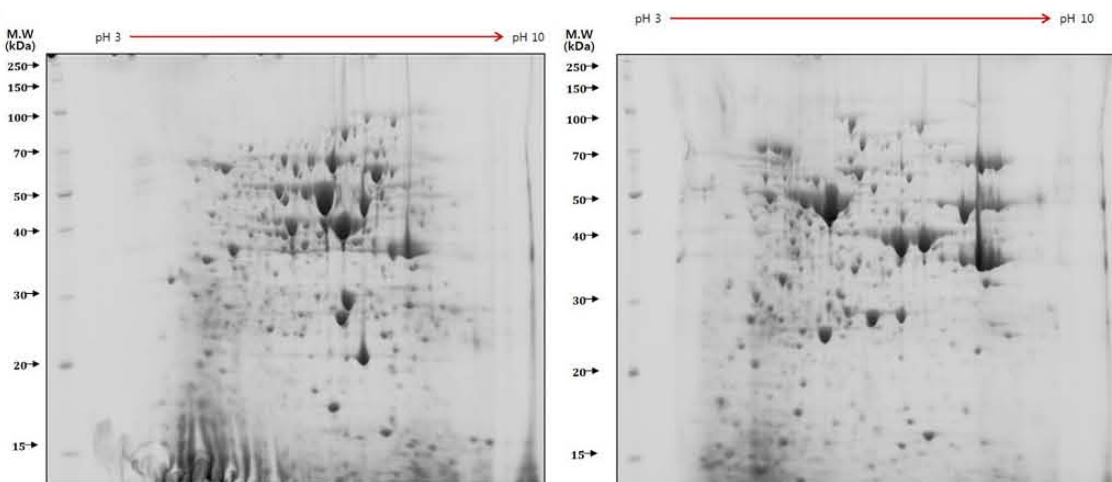


그림12)

다. CIP(청인) spot 분석

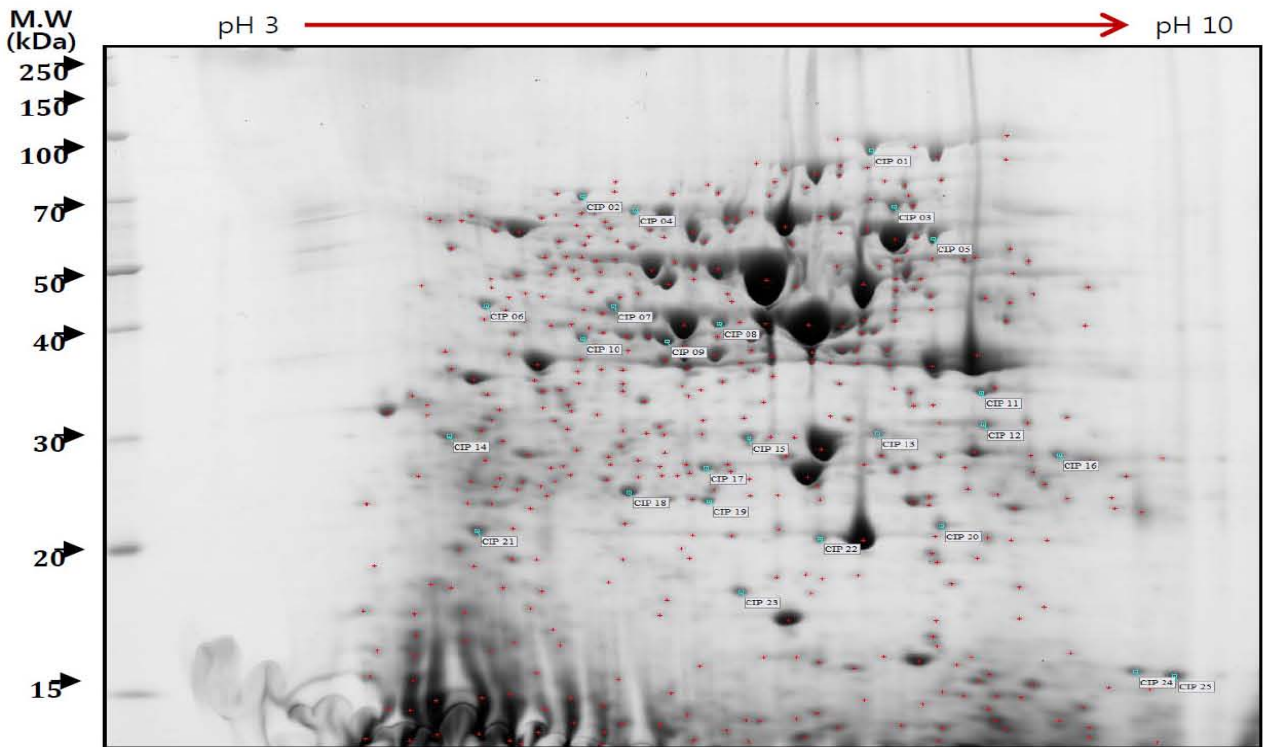


그림13)

다양한 등전점(pI)과 분자량을 갖는 25개의 spot(위의 그림13)을 2D-Gel에서 추출한 후 trypsin 처리하여 얻어진 펩티드의 분자량을 측정하여 데이터베이스의 단백질과 일치여부를 확인하여 관련성이 높은 단백질(matched protein)을 예측하였다. 그 결과 *S. cerevisiae*의 단백질과 100% 동일하였고 실제 spot의 분자량과 관련성이 높은 단백질의 분자량(소수 첫째 자리에서 반올림)을 아래 표에 비교하였다.

CIP spot	Experimental (2D-GE)	Computational	
	MW	MW	Matched protein
CIP 01	92	86	5-methyltetrahydropteroyl triglutamate homocysteine methyltransferas (pI 6.07)
CIP 02	71	63	Phosphoglucomutase (pI 6.82)
CIP 03	68	59	Acetyl-CoA hydrolase (pI 6.30)
CIP 04	67	55	Pyruvate kinase (pI 8.0)
CIP 05	58	47	Enolase (pI 6.16)
CIP 06	44	56	Cystathionine beta-synthase (pI 6.25)
CIP 07	44	55	Pyruvate kinase (pI 8.0)
CIP 08	41	47	Eno2p (pI 5.77)
CIP 09	39	47	Eno2p (pI 5.77)
CIP 10	39	45	Phosphoglycerate Kinase (pI 7.57)
CIP 11	34	36	Mdh1p (pI 8.46)
CIP 12	31	34	Mcr1p (pI 8.65)
CIP 13	30	70	Prb1p (pI 5.94)

CIP 14	30	30	BMH1 (pI 4.87)
CIP 15	30	27	Chain A, Phosphoglycerate Mutase (pI 8.86)
CIP 16	28	27	Chain A, Phosphoglycerate Mutase (pI 8.86)
CIP 17	27	27	Triosephosphate Isomerase (pI 5.75)
CIP 18	25	59	defective F1F0-ATPase alpha subunit precursor (pI 9.06)
CIP 20	22	55	pyruvate kinase (pI 8.0)

대사 관련 유전자 분석 결과 *Candida glabrata*와 가장 유사한 것으로 나타나 matched protein의 해당 아미노산 서열과 *C. glabrata*의 해당 단백질의 아미노산 서열을 비교한 결과 *C. glabrata*와 뚜렷한 차이를 보였다. 따라서 CIP는 신규한 효모임을 재확인 하였다 (이하 분석 자료).

CIP-1

1. gi|151944808 Mass: 85777 Score: 315 Matches: 20(12) Sequences: 15(9) emPAI: 0.59

5-methyltetrahydropteroyl triglutamate homocysteine methyltransferase [Saccharomyces cerevisiae YJM789]

Check to include this hit in error tolerant search

CIP vs. *S. cerevisiae* 100%

CIP vs. *C. glabrata* 96% (170/177)

Peptide	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
52	490.2576	978.5007	978.5022	-0.0015	0	39	0.13	1		K.FINSEIEK.V Common
(cerevisiae/glabrata)										
83	570.3121	1138.6097	1138.6346	-0.0249	0	60	0.0009	1		K.VIQVDEPALR.E
Different (glabrata L616I)										
90	593.2766	1184.5387	1184.5349	0.0038	0	75	2.7e-05	1		K.DDANYIAEFK.N
Common (cerevisiae/glabrata)										
94	597.2046	1192.3947	1190.6217	1.7731	0	71	7.4e-05	1		K.AVDVTALEMVK.W
+ Oxidation (M) Common (all)										
107	613.9296	1225.8447	1225.6415	0.2033	1	(19)	12	1	U	R.EGLPLREGAER.S
108	409.6459	1225.9157	1225.6415	0.2743	1	22	5.5	1	U	R.EGLPLREGAER.S
Common (cerevisiae/glabrata)										
112	616.3936	1230.7727	1230.6754	0.0973	0	73	4.8e-05	1		K.TQAMQLALALR.D
+ Oxidation (M) Common (cerevisiae/glabrata)										
113	617.8531	1233.6917	1233.6210	0.0708	0	30	1.1	1		K.GMLTGPITCLR.W +
Carbamidomethyl (C); Oxidation (M) Different (glabrata I569V)										
114	618.3466	1234.6787	1234.5805	0.0982	0	35	0.34	2		K.FWVNPDCGLK.T +
Carbamidomethyl (C) Common (all)										
129	657.4086	1312.8027	1312.6299	0.1728	1	69	0.00011	1		K.KDDANYIAEFK.N

Common (cerevisiae/glabrata)

142	697.7036	1393.3927	1392.7137	0.6791	0	77	1.9e-05	1	
K.ALDADVVSIEFSK.K Common (all)									
148	717.5236	1433.0327	1434.6568	-1.6241	0	32	0.63	1	R.SAYYTWAAEAFR.V
Different (glabrata T633V)									
166	761.5371	1521.0597	1520.8086	0.2511	1	53	0.0051	1	
K.ALDADVVSIEFSKK.D Common (all)									
167	761.5566	1521.0987	1520.8086	0.2901	1	(45)	0.032	1	
K.ALDADVVSIEFSKK.D									
174	780.4616	1558.9087	1558.7474	0.1613	0	(30)	0.9	1	
K.NVSGQDVAAALEANAK.S + 2 Deamidated (NQ) Different (glabrata A381S/E385D/S390I)									
175	781.2816	1560.5487	1559.7314	0.8173	0	47	0.02	1	
K.NVSGQDVAAALEANAK.S + 3 Deamidated (NQ)									
187	530.3242	1587.9507	1586.8304	1.1203	0	(49)	0.015	1	
K.LNGQKPVDEFLEAK.E Different (glabrata E156A)									
188	795.0531	1588.0917	1587.8144	0.2773	0	(44)	0.045	1	
K.LNGQKPVDEFLEAK.E + Deamidated (NQ)									
190	795.8996	1589.7847	1587.8144	1.9703	0	67	0.00019	1	
K.LNGQKPVDEFLEAK.E + Deamidated (NQ)									
209	570.6882	1709.0427	1708.9988	0.0439	0	14	43	3	R.YVRPPIIVGDLSPK.A

CIP-2

1. gi|6322722 Mass: 63072 Score: 124 Matches: 6(3) Sequences: 5(3) emPAI: 0.26
phosphoglucomutase PGM1 [Saccharomyces cerevisiae S288c]
Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
96	559.8256	1117.6367	1117.5267	0.1101	0	51	0.0074	1	K.FFCALFDAK.K + Carbamidomethyl (C) Common (cerevisiae/glabrata)
118	615.3901	1228.7657	1228.6299	0.1358	0	31	0.66	1	U K.EILGTDEPTVR.T Different I560L(glabrata) L561(glabrata)I
133	665.8906	1329.7667	1329.6776	0.0891	1	48	0.015	1	U K.EILGTDEPTVRT.-
169	797.8961	1593.7777	1593.8403	-0.0625	0	(41)	0.073	1	U
K.LLFDSLNGITGPYGK.A Common (cerevisiae/glabrata)									
170	798.6686	1595.3227	1594.8243	0.4985	0	89	1.2e-06	1	U
K.LLFDSLNGITGPYGK.A + Deamidated (NQ)									
293	1160.6746	2319.3347	2320.1481	-0.8134	0	16	26	1	U
K.CTGGGILTASHNPGGPENDLGIK.Y Common (cerevisiae/glabrata)									

Proteins matching the same set of peptides:

- gi|151941679 Mass: 63058 Score: 124 Matches: 6(3) Sequences: 5(3)
phosphoglucomutase minor isoform [Saccharomyces cerevisiae YJM789]
gi|190409710 Mass: 63030 Score: 124 Matches: 6(3) Sequences: 5(3)

phosphoglucomutase minor isoform [Saccharomyces cerevisiae RM11-1a]
 gil323304166 Mass: 63053 Score: 124 Matches: 6(3) Sequences: 5(3)
 Pgm1p [Saccharomyces cerevisiae FostersB]

 2. gil6323752 Mass: 63049 Score: 51 Matches: 6(1) Sequences: 3(1) emPAI: 0.06
 phosphoglucomutase PGM2 [Saccharomyces cerevisiae S288c]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
77	525.6231	1049.2317	1049.5142	-0.2825	0	37	0.21	1	U R.SFPTSGAIDR.V
Different S340A(glabrata) G341S(glabrata)									
78	525.6361	1049.2577	1049.5142	-0.2565	0	(25)	3.3	1	U R.SFPTSGAIDR.V
79	525.6786	1049.3427	1049.5142	-0.1715	0	(25)	3.4	1	U R.SFPTSGAIDR.V
80	525.7056	1049.3967	1049.5142	-0.1175	0	(26)	2.3	1	U R.SFPTSGAIDR.V
96	559.8256	1117.6367	1117.5267	0.1101	0	51	0.0074	1	K.FFCALFDAK.K +
Carbamidomethyl (C) Common (cerevisiae/glabrata)									
133	665.8906	1329.7667	1329.6776	0.0891	1	11	79	4	U K.QVLGTEEPTVRT.- +
Deamidated (NQ) Different Q558T(glabrata) V559I(glabrata)									

Proteins matching the same set of peptides:

gil151946260 Mass: 63035 Score: 51 Matches: 6(1) Sequences: 3(1)
 phosphoglucomutase [Saccharomyces cerevisiae YJM789]
 gil256269982 Mass: 63036 Score: 51 Matches: 6(1) Sequences: 3(1)
 Pgm2p [Saccharomyces cerevisiae JAY291]
 gil323303536 Mass: 63073 Score: 51 Matches: 6(1) Sequences: 3(1)
 Pgm2p [Saccharomyces cerevisiae FostersB]
 gil323332066 Mass: 61626 Score: 51 Matches: 6(1) Sequences: 3(1)
 Pgm2p [Saccharomyces cerevisiae AWRI796]

CIP-3

1. gil170980 Mass: 58731 Score: 170 Matches: 8(4) Sequences: 6(2) emPAI: 0.28
 acetyl-CoA hydrolase (ACH1) (EC 3.1.2.1) [Saccharomyces cerevisiae]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
67	467.5661	933.1177	934.5157	-1.3980	0	5	3e+02	9	U -.MTISNLLK.Q +
Oxidation (M) I3V(glabrata), Different N5K(glabrata)									
79	480.2911	958.5677	958.4872	0.0805	0	32	0.68	1	U K.FHTNLAEK.G Common
(cerevisiae/glabrata)									

109	1119.3060	1118.2987	1119.5958	-1.2971	0	0	9.9e+02	6	U
K.VVAIVESTMR.D + Oxidation (M) Different V226I(glabrata), T232K(glabrata), M233T(glabrata)									
150	657.8021	1313.5897	1313.6550	-0.0653	1	4	3.6e+02	5	U
+ Oxidation (M) Different K92R(glabrata)									
153	676.4386	1350.8627	1350.6602	0.2026	0	(63)	0.00048	1	U
R.MLNGLGGSADFLR.N + Deamidated (NQ) Common (cerevisiae/glabrata)									
155	684.6146	1367.2147	1366.6551	0.5596	0	72	6.5e-05	1	U
R.MLNGLGGSADFLR.N + Deamidated (NQ); Oxidation (M)									
208	885.0686	1768.1227	1767.8581	0.2647	0	(66)	0.00024	1	U
K.NGQYLGWSGFTGVGTPK.A Common (cerevisiae/glabrata)									
209	886.3336	1770.6527	1768.8421	1.8107	0	76	2.2e-05	1	U
K.NGQYLGWSGFTGVGTPK.A + Deamidated (NQ) Common (cerevisiae/glabrata)									

CIP-4

1. gi|4180 Mass: 54564 Score: 83 Matches: 4(2) Sequences: 3(2) emPAI: 0.14
 pyruvate kinase [Saccharomyces cerevisiae]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
168	863.0821	1724.1497	1723.8992	0.2505	0	57	0.0018	1	U
K.GVNLPGTDVDLPALSEK.D Common (cerevisiae/glabrata)									
178	874.6246	1747.2347	1748.9560	-1.7213	0	(15)	31	1	U
R.GDLGIEIPAPEVLAVQK.K + Deamidated (NQ) Common (cerevisiae/glabrata)									
179	875.0556	1748.0967	1747.9720	0.1247	0	28	1.7	1	U
R.GDLGIEIPAPEVLAVQK.K									
183	881.0546	1760.0947	1759.8741	0.2207	0	55	0.0034	1	U
K.IENQQGVNNFDEILK.V Common (cerevisiae/glabrata)									

Proteins matching the same set of peptides:

gi|6319279 Mass: 54510 Score: 83 Matches: 4(2) Sequences: 3(2)
 pyruvate kinase CDC19 [Saccharomyces cerevisiae S288c]

gi|323310254 Mass: 55592 Score: 83 Matches: 4(2) Sequences: 3(2)
 Cdc19p [Saccharomyces cerevisiae FostersO]

2. gi|323304426 Mass: 62121 Score: 67 Matches: 5(1) Sequences: 4(1) emPAI: 0.12
 Inolp [Saccharomyces cerevisiae FostersB]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
180	875.5281	1749.0417	1747.8159	1.2258	1	5	3.4e+02	4	U

R.ANNCINLDGKGNVTTR.G + Carbamidomethyl (C); 2 Deamidated (NQ) **Different** N225D(glabrata), I228L(glabrata), L230V(glabrata), deletion232P(cerevisiae, glabrata), X233E(cerevisiae) X233Q(glabrata), K234T(glabrata), N236K(glabrata), R240T(glabrata)

186	894.6231	1787.2317	1788.8312	-1.5995	1	12	61	10	U
-----	----------	-----------	-----------	---------	---	----	----	----	---

R.ANNCINLDPKGNVTTR.G + Carbamidomethyl (C); 3 Deamidated (NQ)

229	1009.0546	2016.0947	2015.8717	0.2230	0	(30)	0.88	1
-----	-----------	-----------	-----------	--------	---	------	------	---

K.VAMDEYYSELMLGGHNR.I + 2 Oxidation (M) **Common (cerevisiae/glabrata)**

230	1009.5206	2017.0267	2015.8717	1.1550	0	59	0.0013	1
-----	-----------	-----------	-----------	--------	---	----	--------	---

K.VAMDEYYSELMLGGHNR.I + 2 Oxidation (M) **Common (cerevisiae/glabrata)**

338	894.5455	2680.6147	2682.3363	-1.7216	0	33	0.47	1
-----	----------	-----------	-----------	---------	---	----	------	---

K.MSLVKPLPSIYYPDFIAANQDER.A + Oxidation (M) **Different** S203K(glabrata), L204D(glabrata), V205H(glabrata), P208K(glabrata), I210V(glabrata)

3. [gil323308576](#) Mass: 51956 Score: 67 Matches: 4(1) Sequences: 3(1) emPAI: 0.15
 Inolp [*Saccharomyces cerevisiae* FostersO]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
177	1747.0590	1746.0517	1745.7930	0.2587	0	11	79	1	U
K.QPNYFGSMTQESTLK.L + Oxidation (M) Q105E(glabrata), F109Y(glabrata), M112L(glabrata), C115S(glabrata), L118T(glabrata)									
229	1009.0546	2016.0947	2015.8717	0.2230	0	(30)	0.88	1	
K.VAMDEYYSELMLGGHNR.I + 2 Oxidation (M) common									
230	1009.5206	2017.0267	2015.8717	1.1550	0	59	0.0013	1	
K.VAMDEYYSELMLGGHNR.I + 2 Oxidation (M)									
338	894.5455	2680.6147	2682.3363	-1.7216	0	33	0.47	1	
K.MSLVKPLPSIYYPDFIAANQDER.A + Oxidation (M) S180K(glabrata), L181D(glabrata), V182H(glabrata), P186K(glabrata), I188V(glabrata)									

CIP-5

1. [gil171455](#) Mass: 46773 Score: 110 Matches: 4(3) Sequences: 4(3) emPAI: 0.26
 enolase [*Saccharomyces cerevisiae*]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
191	790.0286	1578.0427	1578.7777	-0.7350	0	20	11	3	U
K.AVDDFLISLDGTANK.S + Deamidated (NQ) Different F93L(glabrata), I95L(glabrata)									
221	878.5341	1755.0537	1754.9414	0.1123	0	43	0.049	1	
K.TAGIQIVADDLTVTNP.K Different I316V(glabrata)									
238	911.5681	1821.1217	1820.9156	0.2061	0	76	2.6e-05	1	
R.SGETEDTFIADLVVGLR.T Common (cerevisiae/glabrata)									

244 929.0776 1856.1407 1855.9098 0.2309 0 56 0.0026 1
 R.SIVPSGASTGVHEALEMR.D + Oxidation (M) **Different** V43I(glabrata)

3. gi|256268878 Mass: 53978 Score: 76 Matches: 7(2) Sequences: 6(2) emPAI: 0.14
 Lpd1p [Saccharomyces cerevisiae JAY291]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
46 465.2121	928.4097	928.5342	-0.1244	1	13	40	4	U	K.IGLEVDKR.G Different
I318L(glabrata)									
78 538.3351	1074.6557	1074.6285	0.0273	0	59	0.0013	1	U	K.IVSSTGALSLK.E
Common (cerevisiae/glabrata)									
93 590.3486	1178.6827	1179.5659	-0.8832	0	17	18	7	U	R.LVIDDQFNSK.F + 2
Deamidated (NQ) Different		D332E(glabrata), D335S(glabrata), S336T(glabrata)							
128 667.4746	1332.9347	1332.7653	0.1694	1	23	5.5	1	U	K.QLTGGVELLFKK.N +
Deamidated (NQ) Different		I123(V-cerevisiae, V-glabrata) L125M(glabrata)							
137 697.0256	1392.0367	1391.7045	0.3322	1	20	9.2	3	U	R.GRLVIDDQFNSK.F +
Deamidated (NQ) Different		D332E(glabrata), N335S(glabrata), S336T(glabrata)							
166 748.8921	1495.7697	1495.7242	0.0455	0	(23)	4.7	1	U	R.VCHAHPTLSEAFK.E
+ Carbamidomethyl (C) Common (cerevisiae/glabrata)									
167 748.9656	1495.9167	1495.7242	0.1925	0	50	0.009	1	U	R.VCHAHPTLSEAFK.E + Carbamidomethyl (C) Common (cerevisiae/glabrata)

CIP-6

1. gi|415317 Mass: 55991 Score: 56 Matches: 5(3) Sequences: 5(3) emPAI: 0.38
 cystathionine beta-synthase [Saccharomyces cerevisiae]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
58 457.7596	913.5047	913.5484	-0.0437	0	36	0.22	1	U	R.TITLPEK.M Common
(cerevisiae/glabrata)									
90 526.2951	1050.5757	1050.5022	0.0735	0	50	0.0094	1	U	K.FVDDEWLK.K
Common (cerevisiae/glabrata)									
118 595.8551	1189.6957	1189.6343	0.0615	0	44	0.044	1	U	K.LELYNPGGSIK.D
Common (cerevisiae/glabrata)									
172 731.4881	1460.9617	1461.7463	-0.7846	1	42	0.056	1	U	K.LELYNPGGSIKDR.I
+ Deamidated (NQ) Common (cerevisiae/glabrata)									
184 760.5696	1519.1247	1518.7963	0.3284	1	39	0.13	1	U	R.TITLPEKMSNEK.V
+ Oxidation (M) Common (cerevisiae/glabrata)									

CIP-7

1. gi|4180 Mass: 54564 Score: 220 Matches: 10(6) Sequences: 9(6) emPAI: 0.70
 pyruvate kinase [Saccharomyces cerevisiae]
 Check to include this hit in error tolerant search

Peptide	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
55	493.7891	985.5637	985.5808	-0.0171	0	61	0.00078	1	U	R.TSIIGTIGPK.T
Common (cerevisiae/labrata)										
104	614.3891	1226.7637	1226.6619	0.1018	0	38	0.16	1	U	K.TNNPETLVALR.K
Common (cerevisiae/labrata)										
133	678.4821	1354.9497	1355.7408	-0.7911	1	55	0.0029	1	U	K.TNNPETLVALRKA + Deamidated (NQ)
Common (cerevisiae/labrata)										
162	758.2561	1514.4977	1514.6248	-0.1271	0	39	0.11	1	U	R.MNFSGHSYEHK.S
+ Oxidation (M) Common (cerevisiae/labrata)										
197	863.0046	1723.9947	1723.8992	0.0955	0	84	3.8e-06	1	U	K.GVNLPGTDVDLPALSEK.D
Common (cerevisiae/labrata)										
202	875.8691	1749.7237	1747.9720	1.7517	0	51	0.0083	1	U	R.GDLGIEIPAEVLAVQK.K
Common (cerevisiae/labrata)										
204	881.4851	1760.9557	1760.8581	0.0977	0	60	0.0011	1	U	K.IENQQGVNDFEILK.V + Deamidated (NQ)
Common (cerevisiae/labrata)										
253	984.6901	1967.3657	1967.0211	0.3446	1	37	0.18	1	U	K.GVNLPGTDVDLPALSEKDK.E
Common (cerevisiae/labrata)										
262	1001.1706	2000.3267	2000.0942	0.2325	1	60	0.001	1	U	R.KSEELYPGRPLAIALDTK.G
Common (cerevisiae/labrata)										
263	668.0725	2001.1957	2000.0942	1.1015	1	(22)	7	1	U	R.KSEELYPGRPLAIALDTK.G
Common (cerevisiae/labrata)										

Proteins matching the same set of peptides:

gi|6319279 Mass: 54510 Score: 220 Matches: 10(6) Sequences: 9(6)
 pyruvate kinase CDC19 [Saccharomyces cerevisiae S288c]
 gi|323310254 Mass: 55592 Score: 220 Matches: 10(6) Sequences: 9(6)
 Cdc19p [Saccharomyces cerevisiae FostersO]

2. gi|323349283 Mass: 39493 Score: 104 Matches: 8(2) Sequences: 5(2) emPAI: 0.20
 Hom2p [Saccharomyces cerevisiae Lalvin QA23]
 Check to include this hit in error tolerant search

Peptide	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
159	748.8816	1495.7487	1495.7228	0.0259	0	61	0.00077	1		K.EFMEAGLIAIVSNAK.N + Deamidated (NQ); Oxidation (M)
Different I102L(glabrata), I104V(glabrata), V105I(glabrata)										

191 557.8439 1670.5097 1668.9239 1.5858 0 19 13 2 U R.FILLLANHPNFELK.V
+ Deamidated (NQ) **Different** N24D(glabrata), N29(H-cerevisiae, D-glabrata)

192 836.3001 1670.5857 1669.9079 0.6778 0 85 3.3e-06 1 U
R.FILLLANHPDFELK.V + Deamidated (NQ) **Different**

214 907.6766 1813.3387 1813.9435 -0.6048 0 36 0.23 1 U
K.QTIHVLEQPDRPQPR.L + Deamidated (NQ) **Different** P300N(glabrata)

330 1227.2906 2452.5667 2453.3053 -0.7386 0 17 20 1
R.EQDVPLIVPVVNPEHLDIVAQL + 2 Deamidated (NQ) **Different** Q115E(glabrata),
I120V(glabrata), V123I(glabrata)

CIP-8

1. gi|323348325 Mass: 46885 Score: 222 Matches: 7(6) Sequences: 5(4) emPAI: 0.59
Eno2p [Saccharomyces cerevisiae Lalvin QA23]
Check to include this hit in error tolerant search

Peptide	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
16	745.4490	744.4417	744.4381	0.0036	0	19	17	1		R.IATAIEK.K 100%
30	407.7771	813.5397	813.4960	0.0438	0	84	3.6e-06	1		K.AADALLK.V
Common (cerevisiae/glabrata)										
167	707.9561	1413.8977	1413.7762	0.1215	0	(59)	0.0012	1		U
K.LGANAILGVSMAAAR.A Common (cerevisiae/glabrata)										
172	715.9461	1429.8777	1429.7711	0.1066	0	64	0.00037	1		U
K.LGANAILGVSMAAAR.A + Oxidation (M) Common (cerevisiae/glabrata)										
234	895.4886	1788.9627	1788.8366	0.1261	0	(50)	0.0097	1		
K.AAQDSFAAGWGMVSHR.S Different G367N(cerevisiae-s288)										
238	903.5171	1805.0197	1804.8315	0.1882	0	67	0.0002	1		
K.AAQDSFAAGWGMVSHR.S + Oxidation (M)										
241	911.5346	1821.0547	1820.9156	0.1391	0	74	4.2e-05	1		
R.SGETEDTFIADLVVGLR.T Common (cerevisiae/glabrata)										

Proteins matching the same set of peptides:

gi|323337363 Mass: 46936 Score: 222 Matches: 7(6) Sequences: 5(4)
Eno2p [Saccharomyces cerevisiae Vin13]

2. gi|323337435 Mass: 46785 Score: 168 Matches: 6(4) Sequences: 5(3) emPAI: 0.36
Eno1p [Saccharomyces cerevisiae Vin13]
Check to include this hit in error tolerant search

Peptide	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
16	745.4490	744.4417	744.4381	0.0036	0	19	17	1		R.IATAIEK.K 100%

30	407.7771	813.5397	813.4960	0.0438	0	84	3.6e-06	1			K.AADALLLK.V
Common (cerevisiae/labrata)											
202	543.8409	1628.5007	1629.7861	-1.2854	1	11		75	8	U	
K.WKIGLDCASSEFFK.D Different W242V (cerevisiae, labrata)											
234	895.4886	1788.9627	1788.8366	0.1261	0	(50)		0.0097		1	
K.AAQDSFAAGWGMVSHR.S Different G362N(cerevisiae-s288)											
238	903.5171	1805.0197	1804.8315	0.1882	0	67		0.0002		1	
K.AAQDSFAAGWGMVSHR.S + Oxidation (M)											
241	911.5346	1821.0547	1820.9156	0.1391	0	74		4.2e-05		1	
R.SGETEDTFIADLVVGLR.T Common (cerevisiae/labrata)											

Proteins matching the same set of peptides:

gil323348495 Mass: 41681 Score: 168 Matches: 6(4) Sequences: 5(3)

Eno1p [Saccharomyces cerevisiae Lalvin QA23]

CIP-9

1. gil323348325 Mass: 46885 Score: 329 Matches: 13(9) Sequences: 10(7) emPAI: 1.00
 Eno2p [Saccharomyces cerevisiae Lalvin QA23]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	
Peptide										
49	407.7336	813.4527	813.4960	-0.0432	0	78	1.2e-05	1	K.AADALLLK.V	
Common (cerevisiae/labrata)										
70	451.3171	900.6197	900.5392	0.0805	1	41	0.084	1	K.RIATAIEK.K Common	
(cerevisiae/labrata)										
82	466.7261	931.4377	931.4498	-0.0121	0	44	0.042	1	U R.IEEELGDK.A	
Common (cerevisiae/labrata)										
109	550.8256	1099.6367	1099.5186	0.1181	1	38	0.15	3	K.DGKYDLDFK.N	
Common (cerevisiae/labrata)										
118	580.3641	1158.7137	1158.6033	0.1104	0	50	0.0095	1	R.IGSEVYHNLK.S	
Common (cerevisiae/labrata)										
144	644.8301	1287.6457	1287.7034	-0.0577	0	19	12	1	K.VNQIGTLSESIK.A	
Different T352S(glabrata)										
156	687.4296	1372.8447	1372.6333	0.2114	0	72	6.7e-05	1	K.IGLDCASSEFFK.D	
+ Carbamidomethyl (C) Common (cerevisiae/labrata)										
165	708.3876	1414.7607	1413.7762	0.9845	0	66	0.00026	1	U	
K.LGANAILGVSMMAAAR.A Common (cerevisiae/labrata)										
168	716.4191	1430.8237	1429.7711	1.0526	0	(56)	0.0024	1	U	
K.LGANAILGVSMMAAAR.A + Oxidation (M) Common (cerevisiae/labrata)										
208	823.6406	1645.2667	1644.8981	0.3686	1	73	5.2e-05	1	U	
K.SKLGANAILGVSMMAAAR.A + Oxidation (M) Common (cerevisiae/labrata)										
241	895.5636	1789.1127	1788.8366	0.2761	0	(92)	6.6e-07	1		
K.AAQDSFAAGWGMVSHR.S Different G367N(cerevisiae)										

246	902.4486	1802.8827	1804.8315	-1.9488	0	(10)	97	2
K.AAQDSFAAGWGVMVSHR.S + Oxidation (M) Different G367N(cerevisiae)								
247	903.5626	1805.1107	1805.8155	-0.7048	0	92	5.8e-07	1
K.AAQDSFAAGWGVMVSHR.S + Deamidated (NQ); Oxidation (M) Different G367N(cerevisiae)								

2. gi|20151217 Mass: 46626 Score: 234 Matches: 11(5) Sequences: 8(4) emPAI: 0.47
Chain A, Mg-phosphonoacetylhydroxamate Complex Of S39a Yeast Enolase 1
Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
49	407.7336	813.4527	813.4960	-0.0432	0	78	1.2e-05	1	K.AADALLLK.V
Common (cerevisiae/labrata)									
70	451.3171	900.6197	900.5392	0.0805	1	41	0.084	1	K.RIATAIEK.K Common
(cerevisiae/labrata)									
109	550.8256	1099.6367	1099.5186	0.1181	1	38	0.15	3	K.DGKYDLDFK.N
Common (cerevisiae/labrata)									
118	580.3641	1158.7137	1158.6033	0.1104	0	50	0.0095	1	R.IGSEVYHNLK.S
Common (cerevisiae/labrata)									
144	644.8301	1287.6457	1287.7034	-0.0577	0	19	12	1	K.VNQIGTLSESIK.A
Different T352S(glabrata)									
156	687.4296	1372.8447	1372.6333	0.2114	0	72	6.7e-05	1	K.IGLDCASSEFFK.D + Carbamidomethyl (C) Common (cerevisiae/labrata)
241	895.5636	1789.1127	1788.8366	0.2761	0	(92)	6.6e-07	1	K.AAQDSFAAGWGVMVSHR.S Common (cerevisiae/labrata)
246	902.4486	1802.8827	1804.8315	-1.9488	0	(10)	97	2	K.AAQDSFAAGWGVMVSHR.S + Oxidation (M) Common (cerevisiae/labrata)
247	903.5626	1805.1107	1805.8155	-0.7048	0	92	5.8e-07	1	K.AAQDSFAAGWGVMVSHR.S + Deamidated (NQ); Oxidation (M) Common (cerevisiae/labrata)
258	920.1396	1838.2647	1839.9149	-1.6502	0	(7)	2e+02	2	U
R.SIVPSGAATGVHEALEMR.D + Oxidation (M) Different A40S(cerevisiae, glabrata)									
260	921.0056	1839.9967	1839.9149	0.0818	0	10	91	2	U
R.SIVPSGAATGVHEALEMR.D + Oxidation (M)									

CIP-10

1. gi|334878440 Mass: 44649 Score: 101 Matches: 4(3) Sequences: 4(3) emPAI: 0.27
Chain A, Circularly Permuted Phosphoglycerate Kinase From Yeast: Pgk P72
Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
110	596.4426	1190.8707	1190.6659	0.2048	1	6	2.8e+02	4	U
Different K82E(glabrata)									

172	720.3986	1438.7827	1438.8143	-0.0316	0	69	0.00012	1	U
K.ASAPGSVILLENLR.Y 100%									
178	730.9356	1459.8567	1460.6718	-0.8151	0	53	0.0049	1	U
R.AHSSMVGFDLPQR.A + Deamidated (NQ); Oxidation (M) Common (cerevisiae/labrata)									
220	861.2741	1720.5337	1719.8508	0.6829	0	62	0.00056	1	U
K.TIVWNGPPGVFEFEK.F + Deamidated (NQ) 100%									

2. gi|4602 Mass: 37031 Score: 74 Matches: 5(2) Sequences: 5(2) emPAI: 0.47
 unnamed protein product [Saccharomyces cerevisiae]
 Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique
Peptide									
28	403.2091	804.4037	804.4745	-0.0708	0	35	0.35	1	U R.LLVEFGK.E Common (cerevisiae/labrata)
71	499.2406	996.4667	996.5063	-0.0395	0	41	0.06	1	U K.TIVMGASFR.S + Oxidation (M) 100%
120	617.9521	1233.8897	1233.6969	0.1929	1	55	0.0032	1	U K.LIDVAVEYGKK.H Common (cerevisiae/labrata)
138	644.9886	1287.9627	1287.7802	0.1825	1	43	0.055	1	U R.LLVEFGKEILK.I Common (cerevisiae/labrata)
258	952.4136	1902.8127	1903.9415	-1.1287	0	55	0.0029	1	U K.FQPQDSTTNPSLILAAK.Q + 3 Deamidated (NQ) Common (cerevisiae/labrata)

라) SJP spot 분석

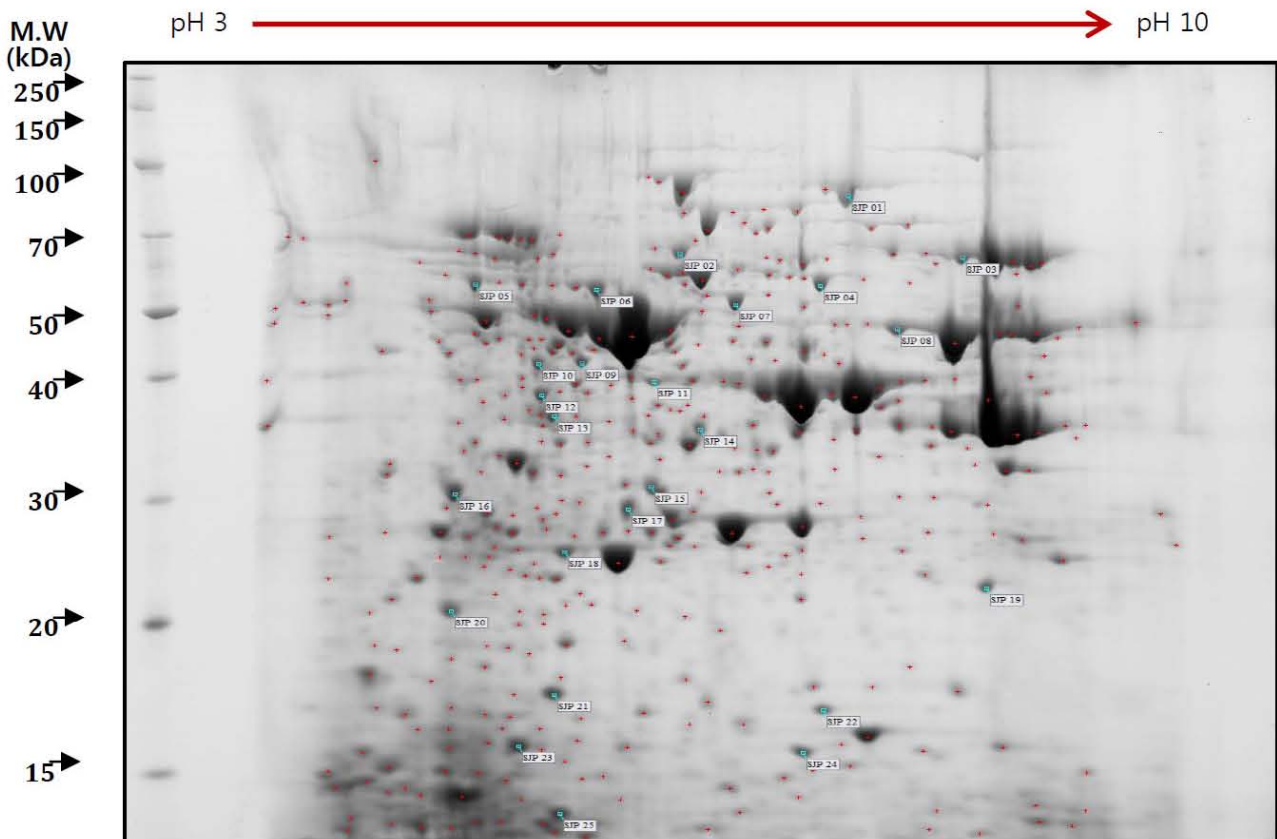


그림14)

다양한 등전점(pI)과 분자량을 갖는 25개의 spot(위의 그림14)을 2D-Gel에서 추출한 후 trypsin 처리하여 얻어진 펩티드의 분자량을 측정하여 데이터베이스의 단백질과 일치여부를 확인하여 관련성이 높은 단백질(matched protein)을 예측하였다. 실제 spot의 분자량과 관련성이 높은 단백질의 분자량을 아래 표에 비교하였다. SJP의 경우 spot 1-6, 10-13, 18, 20, 23의 경우 일치하는 단백질을 찾을 수 없어 기존 효모의 단백질과 상당한 차이를 가지고 있는 것으로 판단되었다. 그러나 나머지 spot의 경우도 실측 분자량과 예상 분자량 및 등전점의 차이가 커 신뢰도는 낮으므로 SJP는 기존 효모와 상당한 차이를 보이는 것으로 판단된다.

SJP spot	Experimental (2D-GE)	Computational	
	MW	MW	Matched protein
SJP 01	86	-	-
SJP 02	65	-	-
SJP 03	64	-	-
SJP 04	56	-	-
SJP 05	57	-	-
SJP 06	55	-	-
SJP 07	52	16	Srp14p
SJP 08	47	4	Chain A, An Anti-Parallel Four Helix Bundle
SJP 09	42	-	EC1118_1P2_3851p (unknown function)
SJP 10	42	-	-

SJP 11	39	-	-
SJP 12	38	-	-
SJP 13	36	24	Sps22p
SJP 14	35	35	NOP1(pI 10)
SJP 15	31	4	Predicted protein
SJP 16	30	51	Conserved protein (pI 5.86)
SJP 17	29	29	YJL043W(pI 5.14)
SJP 18	25	-	-
SJP 19	23	46	Transcription factor (pI 6.07)
SJP 20	21	-	-
SJP 21	17	22	YNR040W-like protein (pI 10.09)
SJP 22	17	50	Lcb2p (pI 8.90)
SJP 23	16	-	-
SJP 25	16	24	Sps22p (pI 6.62)
SJP 24	16	37	Mac1p (pI 5.55)

-: no matched protein

3. 집락 형태 및 37℃ 배양성

가. SJP와 CIP는 YM agar 평판 배지에 각각 streaking하여 37℃ 인큐베이터에서 1일동안 배양한 후 집락 형태를 비교한 결과 SJP는 CIP 대비 크고 불투명한 백색 집락을 형성 하였으나 CIP는 상대적으로 작고 광택이 나는 백색의 집락을 형성하였다(그림15).



그림 15)

나. SJP와 다른 *Saccharomyces exiguus* 표준 균주(KCTC 7169, KCTC 17660)의 배양 온도 비교

SJP와 *S.exigguis* 표준균주를 YM Broth 5ml에 접종하여 29℃와 37℃에서 각각 배양한 후 증식성을 비교 하였다. SJP는 개발 당시 동정 기술의 한계로 신종 효모이나 *S. exiguus*와 유사한 효모로 분류 되었으나 SJP는 37℃에서 증식성이 탁월하지만 *S. exiguus*는 증식성이 매우 낮아 뚜렷한 차이를 보였다(그림16).

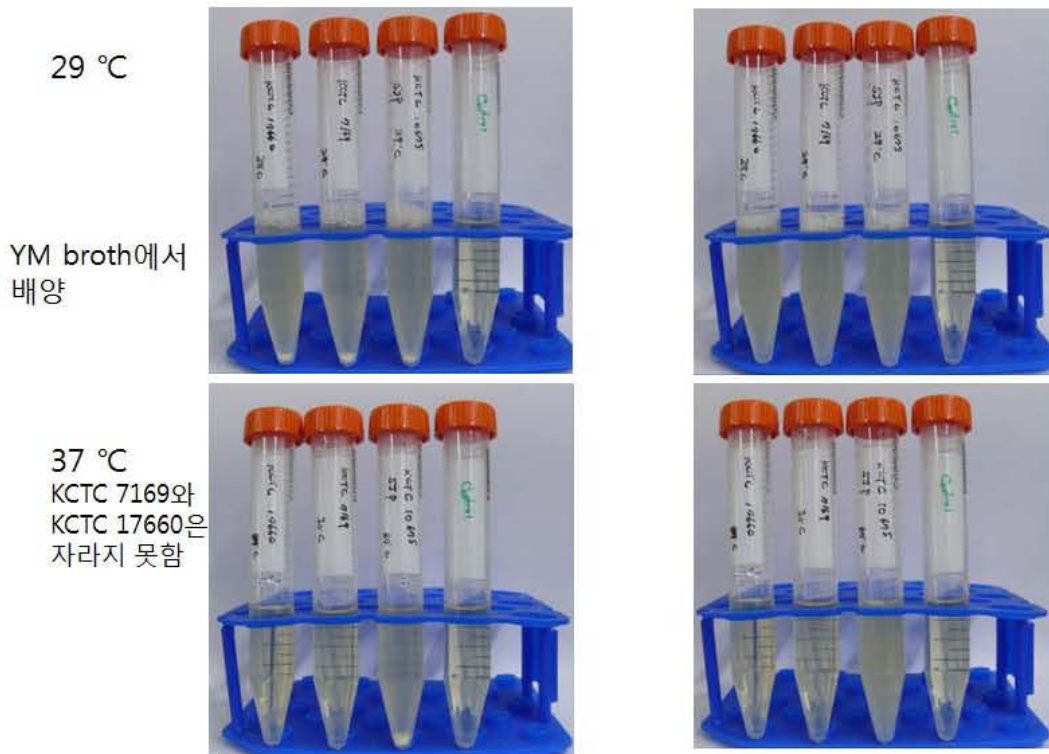


그림 16)

다. SJP와 다른 *Saccharomyces boulardii*(균주 분양기관)의 37°C 배양성 비교

SJP와 *S. Boulardii*를 YMA에 streaking하여 37°C에서 배양성을 비교한 결과 SJP는 18h만에 매우 활발한 성장을 보였고 *S. boulardii*는 18h 배양에서 집락을 형성하지 못하였고 24h의 추가 배양시간 후 집락을 형성하여 다시 24h의 추가 배양 후 SJP의 집락과 유사한 크기로 성장하여 SJP가 *S. boulardii*보다 37°C 배양에서 빠르고 높은 증식을 보였다(그림17)

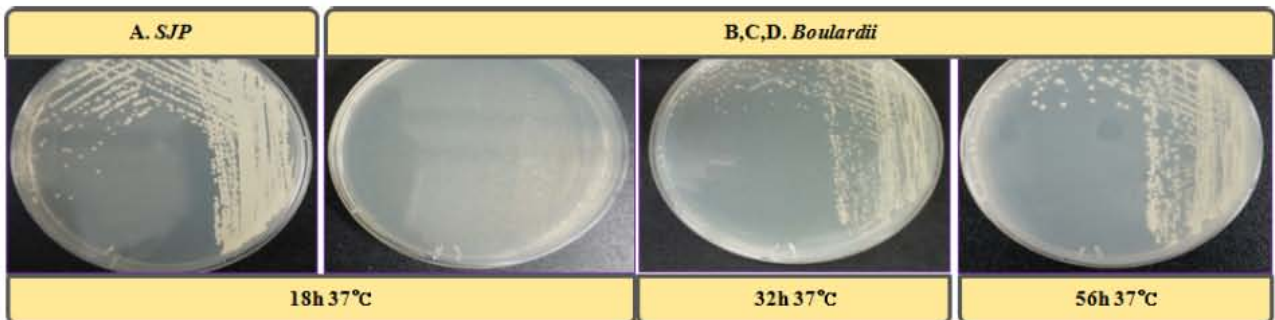


그림 17)

4. 내열성 실험

CIP(C), SJP(S), *S. cerevisiae* (KCTC 50757), *S. boulardii* (B; *S. cerevisiae*와 게놈 서열상 99% 유사하나 37°C 증식성을 보유함)를 55, 60, 65°C에서 10분간 열처리 한 후 YMA에 도말하여 37°C에서 배양한 후 생존 여부를 확인한 결과 모두 60°C에서 생존하였으나 65°C에서는 SJP만 생존하여 뚜렷한 차이를 보였다(그림18).

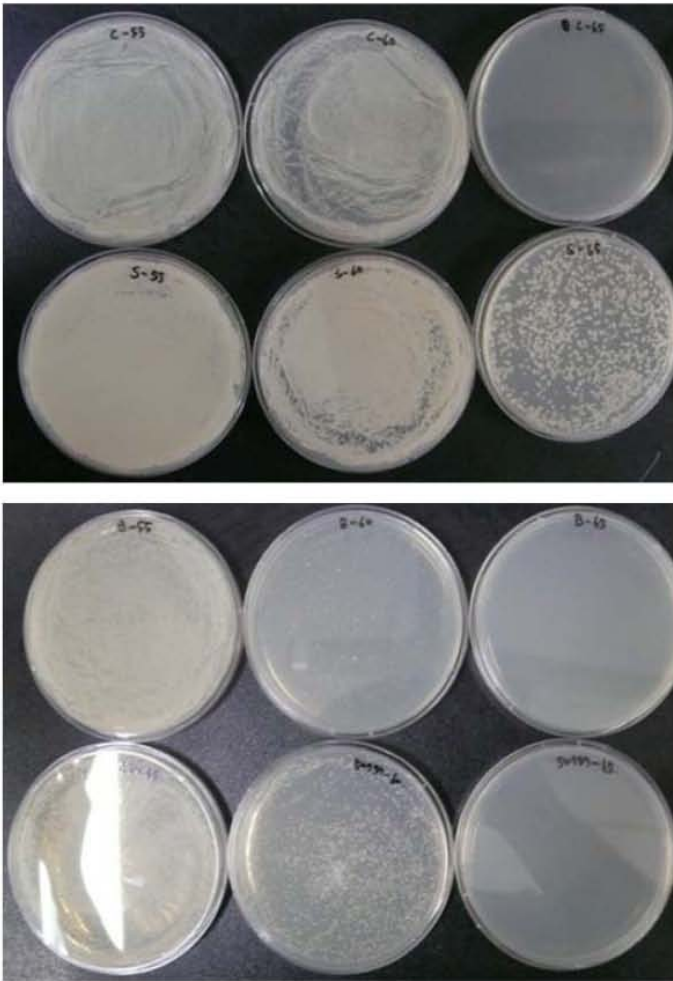


그림 18)

5. 장정착성/담즙저항성 시험

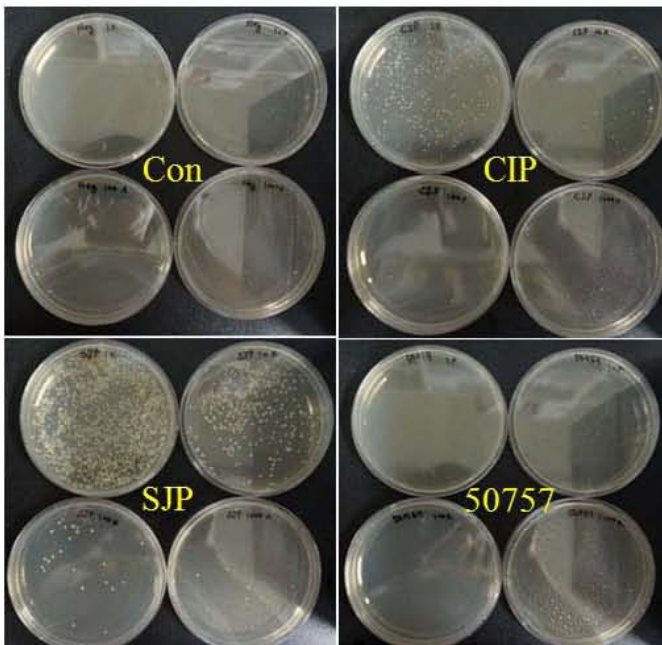
가. 장 정착성 시험(1차)

- 4주령 SPF 5마리씩 4그룹을 설정하여 10^7 CFU/ml의 SJP, CIP, *S. cerevisiae* (KCTC 7904), YM broth (YMB, Control)을 하루 1회 1ml씩 5일간 투여한 후 시험계를 희생시켜 맹장변을 채집함. 맹장변 무게를 측정하여 YMB로 10배 희석액을 만든 후, 10진 희석하여 YM 한천배지(항생제 첨가)에 300ul씩 골고루 도포 후 각각의 생장 적정온도에서 48시간 배양하여 colony 수를 측정한 결과 맹장변 그람당 SJP는 1.3×10^4 - 7.5×10^5 cfu, CIP는 6.6×10^3 - 3.4×10^5 cfu가 분리되었으나 대조군과 *S. cerevisiae*는 분리되지 않아 CIP와 SJP의 위산, 담즙, 및 장내 증식성이 확인되었다.

접종군주 / 개체NO.	1	2	3	4	5
Control	0	0	0	0	실험도중 폐사
SJP	2.8×10^4	7.5×10^5	1.1×10^5	1.9×10^5	1.3×10^4
CIP	3.4×10^5	2.0×10^5	2.5×10^4	6.6×10^3	1.8×10^5
<i>S. Cerevisiae</i> KCTC 7904	0	0	0	0	0

나. 장 정착성 시험(2차)

- 4주령(120913) SPF 3마리씩 4그룹을 설정하여 10^7 cfu/ml의 SJP, CIP, *S. cerevisiae* (KCTC 50757), PBS (대조군)를 하루 1회 500ul씩 3일간 경구투여 후 4일째 3마리의 맹장변 채취하여 pooling한 후 부계를 측정하고, 항생제-PBS(gentamycin, kanamycin, ampicilin, tetracyclin, streptomycin-50ug/ml)로 10배 희석 후, 10진 희석하여 YMA에 100ul씩 골고루 도포 후 37°C에서 18시간 배양하여 colony 수를 측정함. 그 결과 대조군과 *S. cerevisiae* 투여군은 효모가 전혀 분리되지 않았지만 맹장변 그램당 CIP는 2.4×10^4 cfu/g, SJP는 3.8×10^5 cfu/g이 분리됨(그림19).



	Counting number
Negative	-
CIP	2.4×10^4
SJP	3.8×10^5
50757	-

그림 19)

다. 담즙 저항성 시험

담즙염이 포함되어 있는 MacConkey Agar에 SJP와 *S. Boulardii*를 도말하여 37°C에서 배양하여 생존 여부를 확인한 결과 SJP는 2-3일째 매우 작은 집락을 형성하였고 4-5일째 육안으로도 확인이 가능한 집락의 크기로 성장한 반면 *S. boulardii*는 같은 기간 동안 집락을 전혀 형성하지 않았다(그림20)

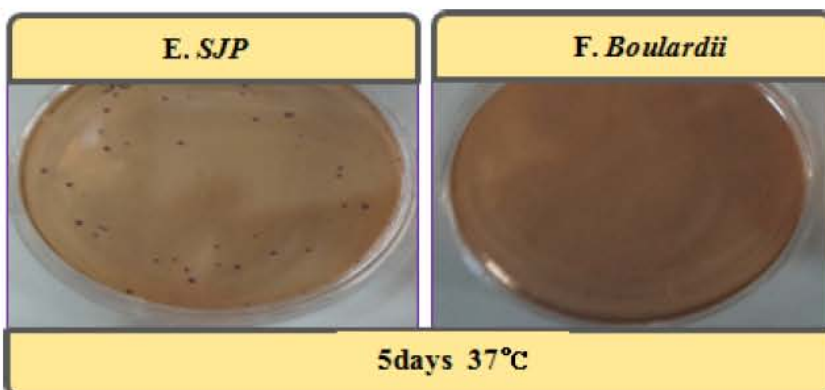


그림 20)

6. 혐기 증식성 (혐기배양)

Gas-pak system을 사용하여 CIP, SJP, *S. exiguus* 표준 균주(KCTC 7169, KCTC 17660)를 혐기상태와 호기상태로 37°C에서 48시간 배양한 결과 모두 증식이 확인 되었으나 혐기배양한 경우 집락의 크기가 상대적으로 작았다(그림).

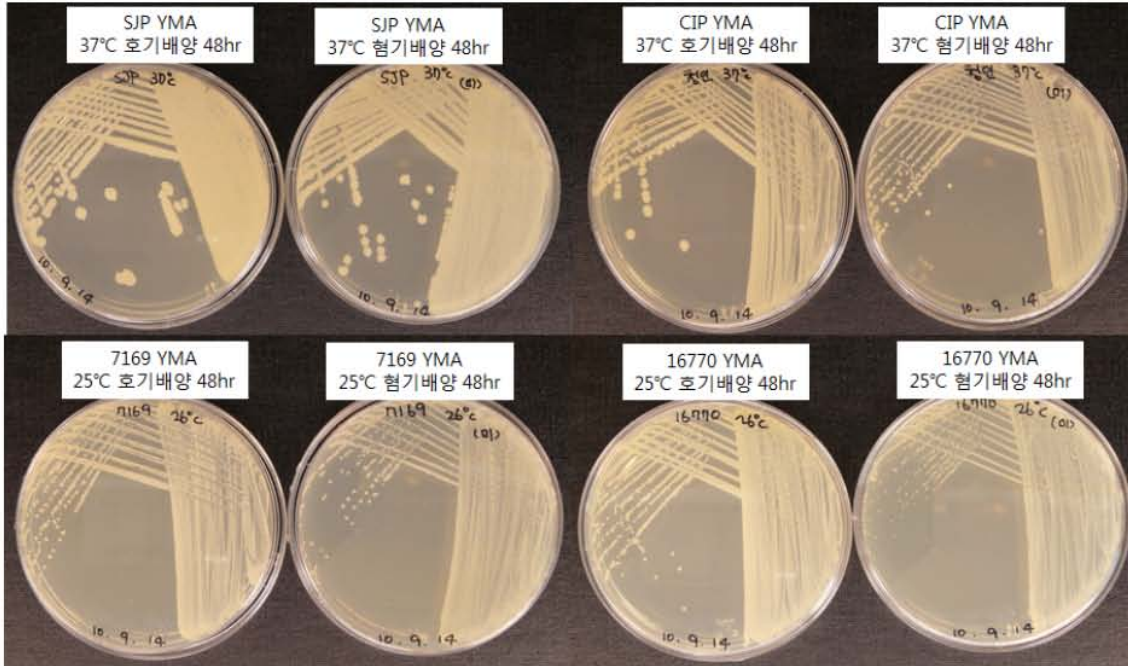


그림 21)

7. 에탄올 내성/대사성 비교

가. SJP

5%, 10%, 15% EtOH (in PBS) 에 SJP 10^6 을 접종 후 37°C에서 16시간 배양하였다. 5% EtOH에서 지시약(Phenol Red) 색이 변함으로서 EtOH가 대사되어 산이 되었을 것으로 추정된다(그림 22).

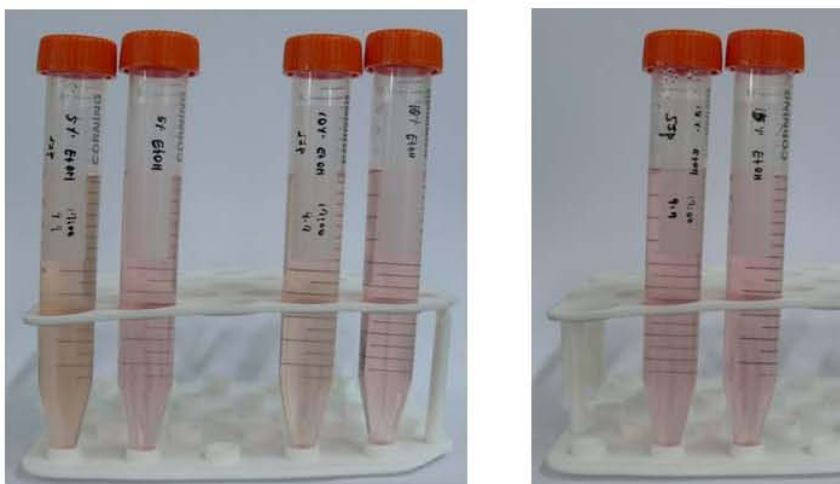


그림 22)

나. SJP와 *S. exiguus* 표준주들의 에탄올(EtOH) 분해능 비교

5%, 7.5% 10%, 15% EtOH (in PBS) 에 SJP, KCTC7169, KCTC17660 10^6 접종 후 배양 (16시간), 5% EtOH의 SJP에서 지시약(Phenol Red) 색이 변함(yellowish; acidic change;

Cornical tube 에서 배양 후 촬영 위해 시험관으로 옮김). 7.5% 10%, 15% EtOH 농도에서 는 활성이 없는 것으로 보아 이 농도에서는 내성이 없는 것(에탄올에 의한 대사 억제)으로 판단된다(그림).

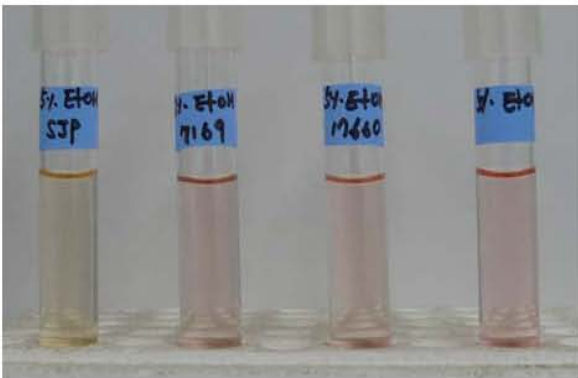


그림 23)

다. SJP, CIP, *S. exiguus* 표준주의 알코올 분해능 비교

- 모든 효모를 생체와 비슷한 37°C에서 알코올 대사 능력시험 시 *S. cerevisiae* (KCTC 7904)와 *S. exiguus* (KCTC 7169)의 대사 능력이 떨어졌으며 CIP의 대사 능력이 가장 좋은 것으로 나타났다.

	5%			10%			15%		
	1	2	평균	1	2	평균	1	2	평균
NC	7.83	7.84	7.835	7.93	7.94	7.935	8.02	8.03	8.025
7904	7.73	7.74	7.735	7.9	7.9	7.9	8.01	8.02	8.015
7169	7.75	7.77	7.76	7.89	7.9	7.895	8	8	8
SJP	7.78	7.78	7.78	7.92	7.92	7.92	8.01	8.01	8.01
CIP	7.63	7.6	7.615	7.79	7.79	7.79	7.95	7.96	7.955

8. 항균제 및 항진균제 감수성 조사

- 항균제(20종):

ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, amikacin, chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycycline, gentamicin, kanamycin, neomycin, norfoxacin, penicillin, streptomycin, sulfamethoxazole/ trimethoprim, tetracycline, enrofloxacin, ceftiofur, florfenicol, lincomycin, oxytetracycline, spectinomycin에 모두 내성(disk diffusion test)

- 진균제(2종, MIC): nystatin(0.625ug/ml), amphotericin B(0.156ug/ml)

9. H₂S 억제효과시험

TSI (triple sugar iron) 사면배지에서 H₂S 산생 *Salmonella Enteritidis* (SE) 최소 균수를 측정하기 위해 SE (4.3x10⁸cfu/ml-그림24)을 10진 희석하여 TSI 사면배지에 접종하여 10⁻⁶ 희석하여 이 후 실험을 수행하기로 하였다.

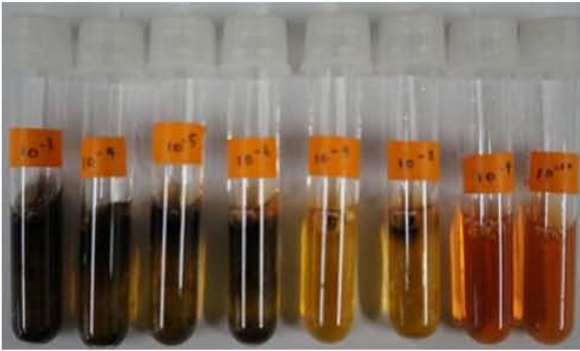


그림 24)

- CIP (2.6×10^9 cfu/ml), SJP (8.8×10^9 cfu/ml), *S. boulardii* (2×10^8 cfu/ml) 원액과 원액을 2배 희석하여 이들을 각각 10진 희석하여 각 희석효모 450ul와 상기 SE 10^{-6} 희석균 50ul를 혼합하여 사면배지에 접종한 결과 효모 수가 많을수록 H_2S 산생에 의한 배지흑변을 억제하는 경향을 관찰하였다. 따라서 검사한 모든 효모에서 H_2S 산생 억제 효능이 있는 것으로 사료됨. 그러나 *S. boulardii*의 경우 37°C에서 증식성이 상대적으로 낮아 CIP와 SJP의 활성이 탁월한 것으로 추론 되었다(그림 25).

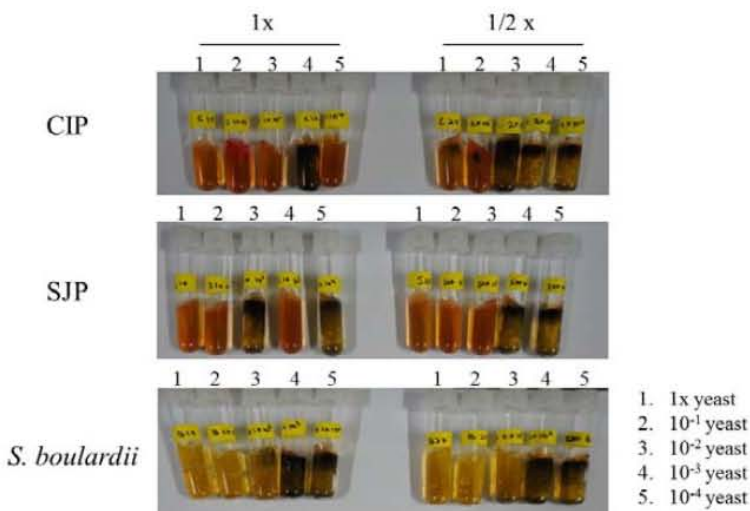


그림 25)

10. 항균 효능 평가

가. 생존율 평가

- 갈색 산란계 병아리(1일령); SJP/CIP/YMB(con) 세 그룹 24시간 효모 배양액 200ul/일/1회 10일간 급이 후 SE/SG/CP 접종 세균 접종 다음날부터 5일간 동일 방법으로 효모 배양액 급이 후 1일간 절식 후 안락사 생존율 및 SE 재분리율 측정된 결과 각 세균에 대한 유의적인 억제능력이 없음을 확인하였다.

나. SJP 배양액의 항-살모넬라 효과

- SJP 24시간 배양액과 Filtering한 배양액(pH 4.59)을 각각 준비하여 항균효과를 측정함. *Salmonella Typhimurium* 배양액을 유기물로 1/20 희석한 후, 희석된 SJP 배양액과 1:1로 섞어 4°C 30분간 반응 후, 영양배지에 접종하여 세균 증식 여부 평가한 결과 소독효과 없었다.

		1DPI	2DPI	3DPI	4DPI	5DPI	6DPI	7DPI	생존수
Control	Control			1/15	2/15				12/15 (80%)
	SJP			2/14	1/14		1/14		10/14 (71.4%)
	청인		1/9	1/9	1/9				6/9 (66.7%)
SG	Control			2/15	3/15		1/15	2/15	7/15 (46.7%)
	SJP		1/14			3/14	4/14	2/14	3/14 (21.4%)
	청인		1/15	1/15	2/15	1/15	2/15	1/15	7/15 (46.7%)
SE	Control	1/15		4/15	1/15		1/15		8/15 (53.3%)
	SJP	2/15	1/15	4/15	1/15		1/15		6/15 (40%)
	청인	1/15	1/15	3/15	2/15	1/15			7/15 (46.7%)
CP	Control		1/14	2/14	1/14				10/14 (71.4%)
	SJP			1/15		3/15			11/15 (73.3%)
	청인		1/15	1/15		1/15			12/15 (80%)

구분	SJP 배양액의 희석배수별 소독효과 ^a							대조	
	원액	1:10	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000	병원체	배지
SJP 배양액	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Filtering한 SJP 배양액	+	+	+	+	+	+	+	+	-

a +: 5개 시험관 중 3개 이상에서 증식함. / -: 5개 시험관 중 2개 이상에서 증식하지 않음

11. 항 인플루엔자 효능 실험(SJP)

YM broth에 배양된 SJP (10^8 cfu/ml)를 3ml 씩 매일 7일간 구강 투여 후 저병원성 H9N2 조류 인플루엔자 바이러스인 01310 ($E4 10^6$ EID₅₀/0.1ml)을 점안 접종한 후 5일간 SJP 계속 투여하며 임상 증상 관찰한 결과 대조군 대비 유의적인 임상증상 경감 효과가 없었다.

가. Challenge 후 임상증상 관찰

Group	1 DPI	2 DPI	3 DPI	4 DPI	5 DPI
SJP 접종군	안면중대 1	안면중대 1	안면중대 1	안면중대 1	안면중대 1
Virus Control	-	안면중대 1	안면중대 1	안면중대 1	안면중대 1

나. Virus 재분리 실험

- 부검 후 채취한 CT를 유제하여 항생제-PBS로 단계별 희석 후 종란 접종하여 3일간 37℃에서 배양한 후 4℃에서 계태아를 사멸시킨 후 요막강액을 수확하여 혈구응집법을 이용하여 바이러스 유무를 조사하였고, 수확한 요막액을 pooling하여 10진 희석한 후 각 희석액 별로 5개씩의 10일령 SPF 발육란에 접종(100ul) 하여 동일한 방식으로 혈구응집 유무를 조사하여 바이러스 농도(EID₅₀/0.1ml)를 측정된 결과 효모 투여군과 대조군 간 유의적인 차이가 없었다.

희석배수	SJP 접종군	Virus control
10 ⁻³	5 / 5 ^a	5 / 5
10 ⁻⁴	5 / 5	5 / 5
10 ⁻⁵	2 / 5	2 / 5
10 ⁻⁶	1 / 5	0 / 5
EID ₅₀ /0.1ml	10 ^{5.1}	10 ^{4.9}

a. HA 양성 샘플 수 / 종란 접종 수

다. SJP 배양액의 항-인플루엔자 효과

- SJP 24시간 배양액(pH 4.59)을 여과한 후 H9N2 AIV 배양액을 유기물(5% BCS in PBS)로 1/20 희석한 후, SJP 배양액과 1:1로 섞어 4℃ 30분간 반응 후 단계별 희석하고, Egg-bit에 접종하여 Virus Control과 비교한 결과 유의적인 차이를 보였다(P<0.05). 이는 인플루엔자 바이러스의 HA 단백질이 배양액의 낮은 pH로 인해 비가역적으로 불활화 되기 때문인 것으로 판단됨.

희석배수	SJP 처리군	Virus control
10 ⁻⁴	3/4 ^a	5/5
10 ⁻⁵	1/4	5/5
10 ⁻⁶	0/5	2/5
10 ⁻⁷		1/5
10 ⁻⁸		0/5
TCID ₅₀ /0.1ml	10 ^{4.5}	10 ^{6.1}

a HA 양성 / 접종 well 수

12. 병원성

가. SJP 배양액의 계태아섬유아세포 (CEF) 접종

- SJP 배양액(24h)을 100배 희석하여 CEF에 접종하였고, 5일 후 관찰한 결과 세포는 세포 변성효과를 보이지 않았다(그림26).

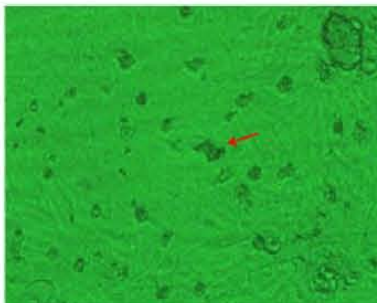


그림 26)

나. CIP 배양액의 CEF 접종

- CIP 배양액을 희석하여 10²CFU/0.1ml로 접종 후 18시간 후 관찰한 결과 대조군 세포는 정상이나 CIP 접종한 경우 효모 증식으로 탁하게 보임. 그러나 세포의 탈락이나 CPE는 관찰되지 않았다(그림 27).

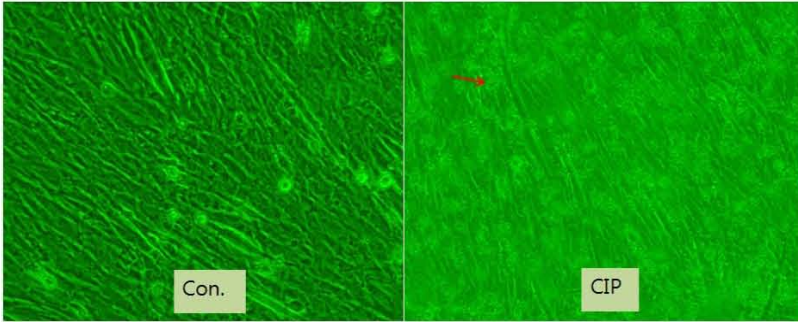


그림 27)

다. SJP/CIP SPF 종란 접종 결과

- 10^7 CFU/ml을 SPF종란에 0.1ml/개씩 접종한 후 60시간 배양하여 chilling하여 종란의 생존 및 계태아의 병변을 관찰한 결과 SJP/CIP 접종군 모두 60시간동안 생존하였으며, 계태아 역시 Control과 큰 차이를 보이지 않아 계태아에 대한 병원성이 없었다(그림 28).



그림 28)

라. 면역억제에 의한 SJP/CIP 병원성 평가

- 4주령(120913) SPF 3마리씩 4그룹을 설정하여 10^7 cfu/ml의 SJP, CIP, *S. cerevisiae* (KCTC 50757), PBS (대조군)를 하루 1회 500ul씩 3일간 경구투여 후 4일간 사료 급이를 중단(음수공급) 하여 면역을 억제(Protein-energy malnutrition 모델)시킨 후 5일째 시험계의 맹장변, 혈액을 채취하고, 신장, 간장 면봉재료를 채취하여 YM 한천배지(항생제)에 도말하여 효모의 유무를 조사한 결과 효모가 전혀 분리되지 않아 내부 장기 침습성은 없는 것으로 판단된다.

마. 성계 피하 접종 후 병원성 평가

- SPF 성계 3수에 10^9 cfu/ml/수의 SJP를 접종한 후 임상증상과 병변을 관찰하였으나 안전하였음.

13. 유용 유전자 발현용 영양요구주(auxotroph) 제작

- SJP배양액을 10진 희석하여 10^{-3} - 10^{-4} cfu/ml의 희석배율을 YMA에 도말하여 37°C에서 배양후 집락이 고르게 형성되면 UV 조사기(높이-35cm)안에서 15분간 UV mutagenesis를 실시후 모든 colony를 수거하여 PBS에 부유시켰다. UV 처리된 SJP 부유액을 10진 희석하여 YMA에 도말후 37°C에서 배양하여 집락이 100개 이하로 형성된 희석배율을 선정,

replica를 이용하여 최소결손배지에 동일한 colony를 접종한 후 다시 37℃에서 배양한 결과 7종의 결손배지중 adenine결손 배지에서 colony를 형성하지 않았고 UV mutagenesis에 의해 SJP의 adenine 유전자가 결손 된 것으로 판단되었다.

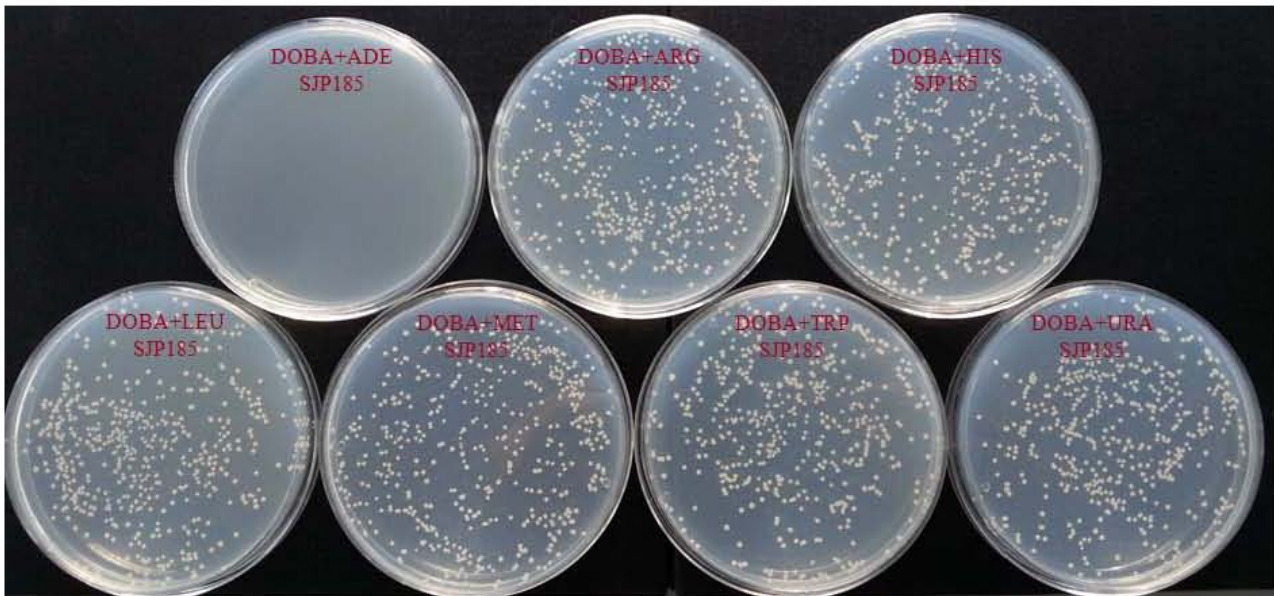


그림 29)

14. 담즙염 내성 변이주 개발

- SJP 배양액 10^3 - 10^4 cfu/ml를 Bile salt 0.15%가 함유된 YM Broth에 접종하여 37℃에서 3일간 배양하였고 다시 10진 희석 하여 같은 방법으로 두가지 액체배지에 10^3 - 10^4 cfu/ml씩을 접종하여 37℃에서 1일 배양. 이후 계대 배양에서는 1일을 기준으로 배양하였고 19대까지 연속 계대배양 하여 최종적으로 BT-SJP변이주를 선발하였다. BT-SJP담즙 내성 균주와 SJP모균주는 0.15% 담즙염이 함유된 YM Broth에 각각 접종하여 2시간 간격으로 배양액을 수거하여 YM agar에 도말하였고 37℃에서 배양하여 colony수를 측정 한 결과 BT-SJP는 4시간 이후부터 모균주 대비 높은 증식성을 나타내었고 담즙에 대해 내성을 확인하였다(그림 30)

그림 30)

15. 게놈분석(NGS)

신종효모 SJP와 CIP는 NGS(마크로젠, HiSeq2000 illumina) system을 de novo sequencing을 의뢰하였고(그림 31) 산출된 결과물 토대로 Genome assemble과 전체 염기서열을 얻었다. SJP 염기서열 contig는 총 8,466개로 사이즈는 다양하게 나타났고 이를 토대로 blastX를 검색하였을 때 가장 유사한 종이 피키아 쿠드리아브제비이(*Pichia kudriavzevii*) 균주로 확인하였고, 피키아 균주 중 전체 유전자 서열이 밝혀진 피키아 쿠드리아브제비이(*Pichia kudriavzevii*) 균주(NCBI accession: PRJNA257499)를 reference로 사용하여 서열분석을 재차 수행하였다.

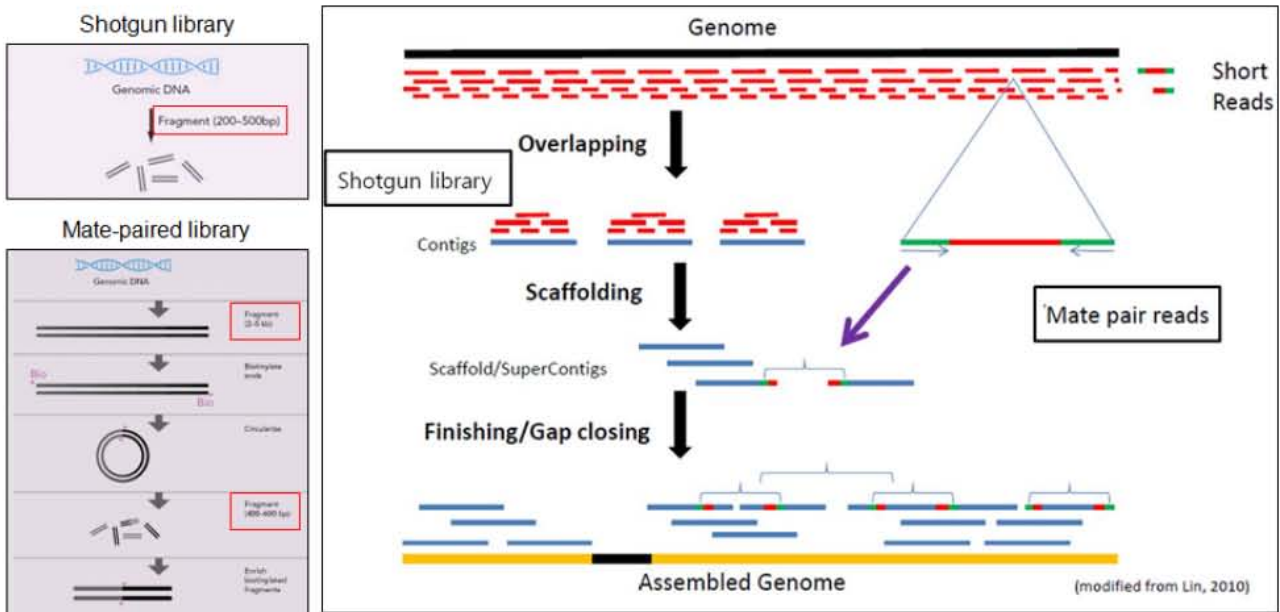


▪ De novo genome sequencing procedure

Library → PCR → Sequencing → Analysis

- Shotgun library
- Mate pair library

Read → Contig → Scaffold



(그림 31)

Sample	Sites(Ref.Length)	MappedSites(>=1x)	Coverage(>=1x)	TotalRead	MappedRead	MappedRead(%)	MappedBases	MeanDepth
SJP	12,940,563	12,608,899	97.44	28,368,400	26,883,552	94.77	2,532,790,201	195.72

(그림 32)

SJP는 reference(*Pichia kudriavzevii*-SD108, Biosample: SAMN02952138) 대비 10Mb당 평균 coverage는 97.44%로 나타났고 그중 mapped read는 평균 94.77%로 나타났다. 전체 mapping 유전자중 총 46,719개의 site에서 유전자 삽입, 결손 및 치환의 결과가 나타났다. Matching sequence 중 0.37052402434 %의 차이를 보여 기존 효모와의 차이를 확인했다.

16. 농장 효능평가

- 산란중계 농장에 효모 생균제를 사료에 배합하여 40일령(6주 4일령)부터 2개동(63동/64동)에 공급하였으며 2개동(61동/62동)은 대조군으로 평균체중, 수당 사료소비량, 폐사 및 도태 개체수를 측정 하였다. 그 결과 효모 급이군의 경우 음성대조군 대비 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

	음성대조군		효모 급이군	
	61동	62동	63동	64동
6주령말 수당 평균 체중(g)	703	686	809	740
효모 급이기간(7-11주령) 수당 사료 소비량(g)	2,033	1,995	1,897	1,960
효모 급이기간(7-11주령) 수당 증체량(g)	661	563	508	487
11주령말 수당 평균 체중(g)	1,364	1,249	1,317	1,227
효모 급이전(1일령-6주령) 수당 사료 소비량(g)	-	1,591	1,536	-
1일령-11주령 수당 사료 소비량(g)	-	3,586	3,433	-
폐사/도태(총수)	9/29(38)	11/22(33)	17/18(35)	12/13(25)

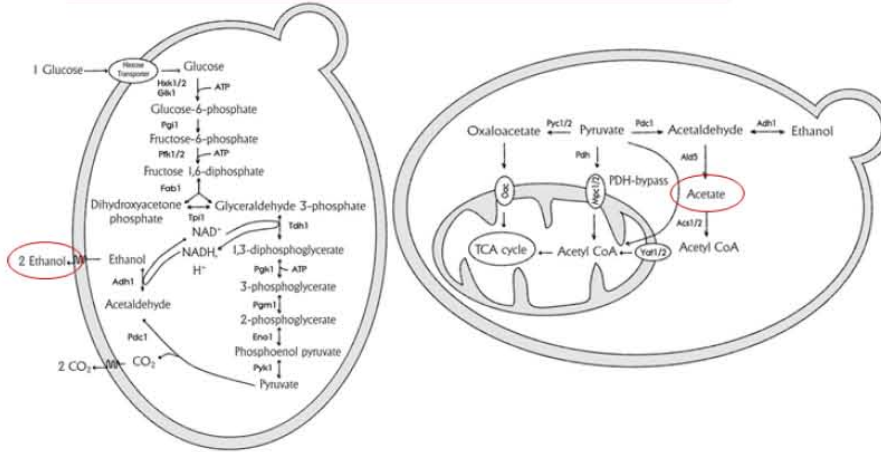
- 산란계 농장에서 효모 생균제를 사료에 배합하여 급이 한 후 산란율을 측정하였다. 그 결과 관찰 기간 동안 효모 생균제 급이군과 음성대조군간 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

	대조군(2,100수)	효모 급이군(5,717수)
급이 5일후	91.3	90.8
급이 12일후	90.8	90.2
급이 19일후	90.3	90.1

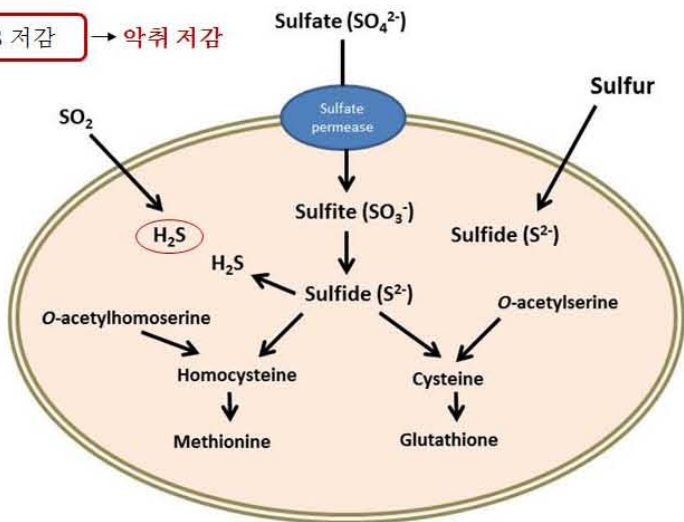
- 상기의 결과들은 단기적인 효모 생균제 급이에 의한 생산성 변화를 비교한 것으로 보다 장기적인 추적 시험(예정)이 필요할 것으로 사료됨.

17. 효모 효능기전

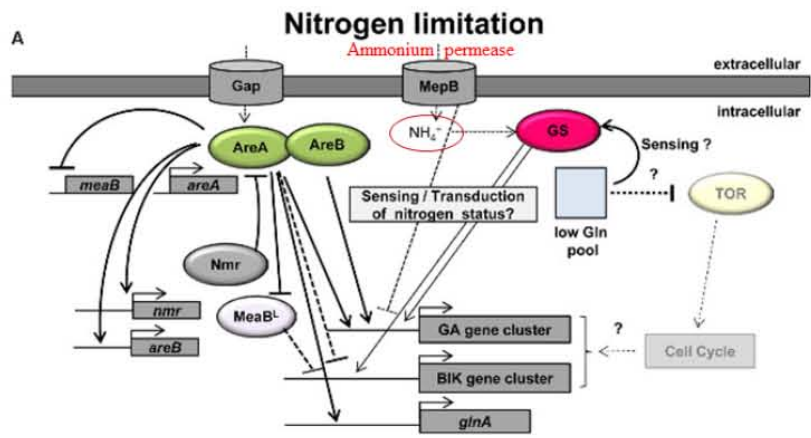
- 항균 효능: ethanol
- 항균 효능/항-인플루엔자 바이러스 효능: acetic acid



- H₂S 저감 → 약취 저감



- 암모니아 저감 → 호흡기 질병 감소



Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in Microbiology*, 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00656

제 2 절

제 1 협동과제 : 신종효모 프로바이오틱 생균제 개발

1. 물리적인 조건 최적화

가. 온도별 배양실험

기본 배지 YM broth 200ml YM broth에 효모를 접종하여 25℃에서 24시간 배양후 본배양 500ml YM broth에 1% 접종하여 온도는 20℃ ~ 45℃까지 5℃ 차이를 주며 36시간(200rpm) 4시간간격으로 균수 변화를 관찰하였다. 균수 관찰은 YM agar를 사용하며 25℃에서 3일간 배양후 나타나는 효모 colony 수를 세었다.

1) 20℃에서 효모의 균수 변화

경과시간	효모수 (CFU/ml)	비고
0	2×10^5	
4	3×10^5	
8	5×10^6	
12	1.2×10^7	
16	6×10^7	
20	4×10^7	
24	1×10^7	
28	2×10^6	
32	5×10^5	
36	1×10^5	

2) 25℃에서 효모의 균수 변화

경과시간	효모수 (CFU/ml)	비고
0	2×10^5	
4	3×10^5	
8	6×10^6	
12	2×10^7	
16	6×10^7	
20	5×10^7	
24	1×10^7	
28	3×10^6	
32	5×10^5	
36	1×10^5	

3) 30℃에서 효모의 균수 변화

경과시간	효모수 (CFU/ml)	비고
------	--------------	----

0	2×10^5	
4	3×10^5	
8	9×10^6	
12	6×10^7	
16	9×10^7	
20	1×10^8	
24	1×10^8	
28	5×10^7	
32	7×10^6	
36	5×10^5	

4) 35℃에서 효모의 균수 변화

경과시간	효모수 (CFU/ml)	비고
0	2×10^5	
4	5×10^5	
8	1×10^7	
12	5×10^7	
16	3×10^8	
20	2×10^8	
24	1×10^8	
28	9×10^6	
32	2×10^6	
36	1×10^5	

5) 40℃에서 효모의 균수 변화

경과시간	효모수 (CFU/ml)	비고
0	2×10^5	
4	6×10^5	
8	3×10^7	
12	9×10^7	
16	5×10^8	
20	5×10^8	
24	2×10^8	
28	2×10^7	
32	5×10^6	
36	6×10^5	

6) 45℃에서 효모의 균수 변화

경과시간	효모수 (CFU/ml)	비고
------	--------------	----

0	2×10^5	
4	3.5×10^5	
8	9×10^6	
12	2×10^7	
16	9×10^7	
20	1×10^8	
24	1×10^8	
28	1×10^7	
32	3×10^6	
36	4×10^5	

-위 실험 결과 35℃ - 40℃에서 최대 균수나타내고 있어 재 실험 35℃, 37℃, 39℃에서 36 시간동안 균수 관찰하였다.

7) 35℃에서 효모의 균수 변화(2차실험)

경과시간	효모수 (CFU/ml)	비고
0	1×10^5	
4	5.6×10^5	
8	2×10^7	
12	8×10^7	
16	1×10^8	
20	1.2×10^8	
24	1×10^8	
28	2×10^7	
32	6×10^6	
36	4×10^5	

8) 37℃에서 효모의 균수 변화(2차실험)

경과시간	효모수 (CFU/ml)	비고
0	1×10^5	
4	7×10^5	
8	5×10^7	
12	9×10^7	
16	5.6×10^8	
20	7×10^8	
24	4.6×10^8	
28	6×10^7	
32	7×10^6	
36	6×10^5	

* 효모 YM broth에서 최적 온도는 37℃로 결정
배지 조성 실험은 37℃에서 수행하기로 하였다

2. 배지 조성 실험

다음 배양실험은 37°C, 200rpm에서 30°C시간 동안 배양하여 5시간마다 균수 측정
중류수 500ml 에 다음 포도당 농도를 첨가하여 최대 균수를 나타내는 농도로 결정하였다.

가. 포도당 농도 결정 실험

1) 포도당 0.5%

시간	균수	비고
5	1×10^5	
10	2×10^5	
15	2×10^6	
20	5×10^6	
25	6×10^5	
30	0.9×10^5	

2) 포도당 1%

시간	균수	비고
5	1×10^5	
10	2.1×10^5	
15	3×10^6	
20	4×10^6	
25	3×10^5	
30	1×10^5	

3) 포도당 1.5%

시간	균수	비고
5	1×10^5	
10	3×10^5	
15	5×10^6	
20	9×10^6	
25	8×10^5	
30	2×10^5	

포도당 농도는 1.5%로 결정

나. 건조효모분말(AGGL) 농도 결정 실험

다음 배양실험은 37°C, 200rpm에서 30°C시간 동안 배양하여 5시간마다 균수 측정
중류수 500ml 에 다음 포도당 1%와 건조효모분말을 0.5, 1, 1.5 % 씩을 첨가하여 최대 균수
를 나타내는 농도로 결정하였다.

1) 건조효모분말(AGGL) 0.5%

시간	균수	비교
5	2×10^5	
10	5×10^6	
15	9×10^7	
20	1×10^8	
25	6×10^7	
30	6×10^6	

2) 건조효모분말(AGGL) 1%

시간	균수	비교
5	2×10^5	2×10^5
10	3×10^5	3×10^5
15	3×10^6	3×10^6
20	6×10^6	6×10^6
25	5.5×10^5	5.5×10^5
30	1×10^5	1×10^5

3) 건조효모분말(AGGL) 1.5%

시간	균수	비교
5	2×10^5	
10	2×10^6	
15	4×10^7	
20	6×10^7	
25	5×10^7	
30	2×10^6	

건조효모분말 농도 0.5%로 결정

다. 황산마그네슘, 제2인산칼륨, 나트륨, 글루타민, 라이신, 알라닌, 비타민 B1 농도 결정 실험물에 건조효모분말 0.5%와, 포도당 1.5% 농도에서 황산마그네슘과 제2인산칼륨, 나트륨, 글루타민, 라이신, 알라닌, 비타민 B1을 농도별로 실험한 결과 황산마그네슘 5%, 제2인산칼륨 5%, 나트륨 0.18%, 글루타민 0.5%, 라이신 0.5%, 알라닌 0.5%, 비타민 B1 0.5%로 결정하였다.

위 실험 결과를 토대로 사료용 효모배지의 조합은 다음과 같다 분말 1kg당 가격은 타사에 비해 약 15% 저렴하며 1×10^8 이상의 균수를 나타내어 뛰어난 저가형 배지로 사료됨, 농가에서 사용하기 쉽게 물에 잘 녹으며 효모의 사료효과가 나타나는 10^7 이상의 균수를 나타내는 온도가 광범위하여 쉽게 배양하여 사료에 첨가할 수 있는 장점이 있다.

사료용 효모 배지 조성

조성	분말 조성	물 L당 함량(%)
	%	
AGGL (건조효모분말)	19	0.5
무수포도당	57	1.5
황산마그네슘	5	5
제2인산칼륨	5	5
나트륨	7.7	0.18
글루타민	4	0.5
라이신	1.1	0.5
알라닌	1.1	0.5
비타민B1	0.1	0.5

타사 사료용 효모배지 53,900원/kg

엔텍바이오 사료용 효모배지 46,000원/kg

타사 효모배지에 비해 약 18% 절감

- 자체 저가용 미강 배지

가) 사료첨가제용 효모 배지 개선 - 1차

기 존		개 선 후	
성 분	함량(2톤기준)	성 분	함량
당밀(6,000원/kg)	40L(240,000원)	미강(300원/kg)	120kg(36,000원)
설탕(1,200원/g)	30kg(36000원)	설탕(1200원/kg)	40kg(48,000원)
원 가	276,000원	원 가	84,000원

추출조건(공통) : 120℃ 4시간 멸균 및 추출 하여 배양기로 이송하여 37℃ 감온하여 접종
 -사료첨가제용 효모 배지를 당밀에서 미강으로 변경하여 효모 배지의 원가를 약 70% 낮췄으며, 당밀배지에 비해 미강배지에서의 효모 최대 성장이 약 10배 증가. - 기존 사료첨가제보다 효모균수가 약 7-10배 증가한 사료첨가제를 생산함으로 인해 효율 증대

조건 : 온도37℃, 교반속도 100rpm, 2톤기준

날자	당밀배지	미강배지
2013.1.14	2*10 ⁷ CFU/g	1.5*10 ⁸ CFU/g
2013.1.16	2.5*10 ⁷ CFU/g	1.2*10 ⁸ CFU/g

2013.1.21	2.3*10 ⁷ CFU/g	3.5*10 ⁸ CFU/g
2013.1.23	1.8*10 ⁷ CFU/g	2.9*10 ⁸ CFU/g
2013.1.28	3*10 ⁷ CFU/g	1.6*10 ⁸ CFU/g

나) 사료첨가제용 효모 배지 개선 - 2차

기 존		개 선 후	
성 분	함량(2톤기준)	성 분	함량
미강(300원/kg)	120kg(36,000원)	미강(300원/kg)	80kg(24,000원)
설탕(1,200원/g)	40kg(48,000원)	설탕(1200원/kg)	40kg(48,000원)
원 가	84,000원	원 가	72,000원
추출온도	120℃	추출온도	1차추출: 70℃, 12시간 2차추출: 120℃, 15분
추출시간	4시간	추출시간	총 12시간 15분

개선후 추출시간이 총 12시간 15분이 걸리나 실제 보일러 가동시간은 기존의 4시간 보다 적은 3시간걸림(1시간단축) - 1차 추출시 70℃ 도달하면 스위치를 off 시킴. 추출기 온도는 12시간 유지

-추출온도 및 추출 조건을 변경함으로 인해 미강 함량을 낮추는 동시에 효모 균수 증가 효과
조건 : 온도37℃, 교반속도 100rpm, 2톤기준

날자	미강배지(기존)	미강배지(개선)
2013.3.4	1.2*10 ⁸ CFU/g	8.1*10 ⁸ CFU/g
2013.3.6	1.5*10 ⁸ CFU/g	6.7*10 ⁸ CFU/g
2013.3.11	2.6*10 ⁸ CFU/g	9.4*10 ⁸ CFU/g
2013.3.13	1.8*10 ⁸ CFU/g	8*10 ⁸ CFU/g
2013.3.18	2.4*10 ⁸ CFU/g	1*10 ⁹ CFU/g

저온에서의 미강추출시 종전보다 영양성분에서의 우위를 점하여 기존 미강배지에 비해 효모의 균수가 약 5배 증가하였음.

-사료첨가제용 효모 배지인 미강을 추출방식 변경으로 1차 개선 대비 약 14% 원가 절감을 하였으며 효모의 최대 균수가 약 5배 증가하였음.

* 1차 개선과 2차 개선을 통해 기존 효모의 최대 균수보다 약 40 - 50배의 균수 증가 효과를 보였음

3. 효모 내산성 실험

인공위액 : 0.5M sodium citrate 완충액을 0.05M로 희석하여 HCl을 첨가하여 pH를 2.5 또는 3.0으로 지정하여 사용.

YM broth 100ml에 1ml 접종하여 18시간 전배양후 YM broth 90ml에 전배양액 10ml 접종하여 37°C 18시간 정치배양

배양액을 pH 2.5와 3.0의 인공위액 90ml에 10ml 접종하여 37°C에서 정치배양하면서 0, 0.5, 1.0, 1.5 및 2시간 간격으로 각 농도별로 희석하여 희석액 100ul 씩을 YM agar에 접종하여 37°C, 20시간 배양하여 자란 콜로니수 계수

2. 결과 (1차실험): AF1과 AF2는 SJP와 CIP 효모 둘 중 하나임.

- AF1

	0		30분		1시간		1시간30분		2시간	
pH 2.5	10^5	10^6	10^5	10^6	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4	10^5
	101	14	114	13	*	53	*	110	*	109
	평균 : 1.2×10^7		평균 : 1.2×10^7		평균 : 5.3×10^6		평균 : 1.1×10^7		평균 : 1.1×10^7	
pH 3.0	10^5	10^6	10^5	10^6	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4	10^5
	101	14	102	9	*	51	196	82	*	103
	평균 : 1.2×10^7		평균 : 9×10^6		평균 : 5.1×10^6		평균 : 5.1×10^6		평균 : 1×10^7	

- AF2

	0		30분		1시간		1시간30분		2시간	
pH 2.5	10^5	10^6	10^5	10^6	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4	10^5
	33	3	27	3	*	132	232	26	196	16
	평균 : 3.2×10^6		평균 : 2.9×10^6		평균 : 1.3×10^7		평균 : 2.5×10^6		평균 : 1.8×10^6	
pH 3.0	10^5	10^6	10^5	10^6	10^4	10^5	10^4	10^5	10^4	10^5
	33	3	14	5	467	103	158	13	126	14
	평균 : 3.2×10^6		평균 : 3.2×10^6		평균 : 7.5×10^6		평균 : 1.4×10^6		평균 : 1.3×10^6	

3. 결과 (2차실험)

- AF1

	0		30분		1시간		1시간30분		2시간	
pH 2.5	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶
	132	11	106	15	99	8	80	- (오염)	90	14
	평균 : 1.2*10 ⁷		평균 : 1.3*10 ⁷		평균 : 9.0*10 ⁶		평균 : 8.0*10 ⁶		평균 : 1.2*10 ⁷	
pH 3.0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶
	132	11	103	14	61	9	105	11	88	11
	평균 : 1.2*10 ⁷		평균 : 1.2*10 ⁷		평균 : 7.5*10 ⁶		평균 : 1.1*10 ⁷		평균 : 9.9*10 ⁶	

- AF2

	0		30분		1시간		1시간30분		2시간	
pH 2.5	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶
	29	2	21	1	11	0	13	0	14	1
	평균 : 2.5*10 ⁶		평균 : 1.6*10 ⁶		평균 : 1.1*10 ⁶		평균 : 1.3*10 ⁶		평균 : 1.2*10 ⁶	
pH 3.0	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁶
	29	2	17	2	14	0	15	3	23	3
	평균 : 2.5*10 ⁶		평균 : 1.9*10 ⁶		평균 : 1.4*10 ⁶		평균 : 2.3*10 ⁶		평균 : 2.7*10 ⁶	

4. 효모 내열성 실험

AF1, AF2 본배양 18시간 후 균수 측정 후 각 유리병에 100ml씩 분주

: 50℃, 60℃, 70℃, 80℃, 90℃의 온도에서 10분, 20분, 30분 방치 후 균수 감소 측정

가. 결과: AF1

	초기균수		10분	20분	30분	
	검경	배양	배양	배양	배양	
50℃	2.2×10 ⁸	10 ⁶	2.2×10 ⁸	2.1×10 ⁸	1.7×10 ⁸	1.8×10 ⁸
				2.2×10 ⁸	2.0×10 ⁸	1.6×10 ⁸
2.2×10 ⁸			3.2×10 ⁸	0	0	0
				0	0	0
60℃		10 ⁶		0	0	0
				0	0	0
70℃		10 ⁶	0	0	0	
			0	0	0	
80℃	10 ⁷	3.2×10 ⁸	0	0	0	
			0	0	0	
90℃		10 ⁷	0	0	0	
			0	0	0	

평균

	초기균수	10분(%감소)	20분(%감소)	30분(%감소)
50℃	2.7×10 ⁸	2.2×10 ⁸ (18%감소)	1.9×10 ⁸ (30%감소)	1.7×10 ⁸ (37%감소)
60℃		10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하
70℃		10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하
80℃		10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하
90℃		10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하

나. 결과: AF2

	초기균수		10분	20분	30분	
	검경	배양	배양	배양	배양	
50℃	1.2×10 ⁸	10 ⁶	5.7×10 ⁷	6.4×10 ⁷	9.1×10 ⁷	8.1×10 ⁷
				1.3×10 ⁸	8.0×10 ⁷	8.0×10 ⁷
10 ⁶			8.0×10 ⁷	1.4×10 ⁷	0	0
				3.0×10 ⁷	0	0
60℃		10 ⁶		0	0	0
				0	0	0
70℃		10 ⁷	8.0×10 ⁷	0	0	0
				0	0	0
80℃	10 ⁷		0	0	0	
			0	0	0	
90℃	10 ⁷	0	0	0		
		0	0	0		

평균

	초기균수	10분(%감소)	20분(%감소)	30분(%감소)
50℃	8.0×10 ⁷	9.7×10 ⁷ (21%증가)	8.6×10 ⁷	8.1×10 ⁷
60℃		2.2×10 ⁷	10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하
70℃		10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하
80℃		10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하
90℃		10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하	10 ⁵ 이하

5. 본 연구성과의 산업적 활용

- 본 연구과제를 통해 확립된 효모 배양 조건과 배지 조성은 현재 제품 생산에 활용되고 있음.
- 담즙 내성 변이주에 대한 산업적 활용성 평가 시험 준비 중에 있음.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 연도	연구개발 목표	연구개발 내용	달성도
2012~2014 (총2년)	신종효모의 특성분석	대사관련 유전자 분석 및 유전자 발현용 auxotroph 개발을 위한 유전자 발굴	100
		유용유전자 발굴	100
		프로테옴 분석	100
		집락형태 및 37℃배양성 고증식성 효모 선발	100
		내열성	100
		내산성	100
		장 정확성	100
		담즙저항성	100
		혐기증식성	100
		계놈분석	80
		영양분석	100
		항균제 감수성	100
		대사능력평가 (유당, 암모니아 이용성, 황화수소 발생 억제능)	100
	고에탄올 내성	100	
	신종효모의 생균제 효능 평가	닭의 생산성 및 면역력 향상 효능 평가(동물/농장시 험)	90
		병원성 세균 억제 효능 평가: 그람음성세균억제효능, <i>Salmonella Enteritidis</i> 배출 억제 및 독소 불화화 효능 평가	100
	신종효모 생균제 개선	사료용 신종효모 배양용 저가매지 개발	100
		물리화학적 배양조건 확립 및 보존성 평가	100
		개량 효모 제품 개발 및 산업화	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 신종효모 특성분석

- 유전자 및 프로테옴 수준에서의 차별성 부각으로 기술 마케팅 활용
- 신종효모 생균제 생리 활성 규명을 위한 과학적 근거로 활용
- 신기능 유전자 및 SNP 발굴에 활용

2. 신종효모의 프로바이오틱 생균제로서 효능 평가

- 신종효모 동물용 사료첨가제 기존 제품 농가 보급 확대 및 수출 증대
- 농장환경 개선 및 친환경, 유기 축산물 생산으로 국내 축산업 경쟁력 증대
- 동물용 프로바이오틱 생균제로서 우수한 장내 정착/증식성에 대한 학문적 근거제시로 수출 촉진
- 동물 제품의 효능 및 과학적 근거를 활용하여 인체용 프로바이오틱스 생균제 제품 업그레이드

3. 신종효모 SJP의 유용유전자 발현용 영양요구주 개발

- 지적재산권 획득(국제특허)
- 항생제 대체 신규 천연 항생물질 발현용 효모균주로 활용
- 국내기술 유전자 발현 시스템 개발

4. 담즙 내성 변이주 개발

- 지적재산권 획득(국제특허)
- 담즙 내성으로 인한 장 정착성 효율 증대
- 장내 유해균 억제제 개발에 활용

5. 국내 및 국외시장 분석결과 프로바이오틱 생균제로써 *S. boulardii*가 판매되고 있으나 유산균 대비 차별화 하지 못하고 있어 시장이 정체되어 있으나 본 연구를 통해 동물용의 경우 신종 효모로써 생균제 효능 뿐 아니라 축분의 친환경적인 처리가 가능하다는 점에서 차별화를 시켜 국내외 시장 점유율과 판매를 확대할 계획임. 또한 인체용의 경우 당 조절, 다이어트, 아토피, 소화불량, 설사, 변비, 숙취해소 효능 증명과 작용기전 규명을 통해 생균제품 아니라 효모 추출액(효소제)으로도 제품화를 추진해 매출을 극대화 할 계획임.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

세계적으로 프로바이오틱스에 대한 연구가 활발히 진행 되면서 다양한 분야에서 산업적으로 적용되고 있고 대부분 세균 유래 프로바이오틱스 연구가 이루어지고 있는 반면 세균 프로바이오틱스의 한계점을 극복하는 효모 유래 프로바이오틱스에 대한 연구도 많이 진행되고 있다. 대표적인 예로 이미 오래전부터 식품 첨가용으로 많이 사용되어 온 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*)와 유전적 상동성을 지니지만 37℃에서의 좋은 배양성으로 각광 받고 있는 사카로마이세스 보올라디(*Saccharomyces boulardii*)는 건강 보조제와 사료 첨가제로 널리 이용중이다. 본 연구에서 사용한 피키아 쿠드리아브제비이(*Pichia kudriavzevii*)는 바이오 연료 생산에 가장 많이 사용하는 효모종으로 에탄올을 다량 생산할수 있는 특징이 있고 또한 D-xylonic acid 생산과 xylose-fermenting 효모종으로 알려져 있다. 최근 피키아 쿠드리아브제비이(*Pichia kudriavzevii*)의 게놈 분석이 이루어 졌고 이 효모종에서 추출한 RY55 killer toxin 은 새로운 antimicrobial chmotherapeutic agent로 매우 충분한 능력 가지고 있어 bio-base 안전 한 생균제라는 것이 보고된바 있다. 또한 내열성 피키아 쿠드리아브제비이(*Pichia kudriavzevii*)효모종을 이용하여 에탄올 생산을 증가시키는 연구 역시 활발히 진행되고 있어 친환경적 생물학 제제로 관심이 집중되고 있다. 프로바이오틱스로서 이로운을 주기 위해서 장 까지 안전하게 생존하는 것 때문에 encapsulation과 material에 관련된 다양한 연구가 진행되었고 산업용 효모로 일부 유전자를 결손 시켜 특정 유전자가 존재하는 배지에서만 성장 할수 있는 영양 요구주가 개발 되어 유전자 발현 및 drug-delivery system을 구축하고 있다. 이러한 영양요구주 개발 방법에도 전통적인 UV mutagenesis를 비롯하여 화학적 변이와 non-homologous end joining(NHEJ) 방법이 개발되어 다각적인 발전이 이루어지고 있다. 이 밖에도 프로바이오틱스에 대한 다양한 접근과 시도 및 보고를 본 연구를 진행 하면서 접할 수 있었고 효모종 분류 및 특성 분석에 관련된 논문 및 연구 수행 방법에 대한 문헌을 참고 하였다. 또한 최근 발표된 프로바이오틱스 연구동향과 보도 자료를 수집 하였으며 과제를 진행하면서 참고 했던 논문은 제 8장에 수록하였다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

본 연구에서 구입했거나 개발한 연구시설·장비 없음

제 8 장 참고문헌

Bougnoux, M. E., et al. (2002). "Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*." JClinMicrobiol40(4): 1290-1297.

Douradinha, B., et al. (2014). "Novel insights in genetic transformation of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*." Bioengineered5(1): 21-29.

Fidel, P. L., Jr., et al. (1999). "*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*." ClinMicrobiolRev12(1): 80-96.

Gevaert, K. and J. Vandekerckhove (2000). "Protein identification methods in proteomics." Electrophoresis21(6): 1145-1154.

Gorg, A., et al. (2004). "Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics." Proteomics4(12): 3665-3685.

Hamedi, H., et al. (2013). "Generation of a Uracil Auxotroph Strain of the Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii* as a Host for the Recombinant Protein Production." AvicennaJMedBiotechnol5(1): 29-34.

Hong, S. G., et al. (2001). "*Metschnikowia koreensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from flowers in Korea." IntJSystEvolMicrobiol51(Pt 5): 1927-1931.

Issaq, H. and T. Veenstra (2008). "Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives." Biotechniques44(5): 697-698, 700.

James, S. A., et al. (1997). "A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov." IntJSystBacteriol47(2): 453-460.

Janisiewicz, W. J., et al. (2014). "Yeasts associated with plums and their potential for controlling brown rot after harvest." *Yeast*31(6): 207–218.

Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett (2003). "Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses." *FEMSYeastRes*3(4): 417–432.

Kurtzman, C. P., et al. (2008). "Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia* and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen. nov., *Lindnera* gen. nov. and *Wickerhamomyces* gen. nov." *FEMSYeastRes*8(6): 939–954.

Landell, M. F., et al. (2010). "*Candida aechmeae* sp. nov. and *Candida vrieseae* sp. nov., novel yeast species isolated from the phylloplane of bromeliads in Southern Brazil." *IntJSystEvolMicrobiol*60(Pt 1): 244–248.

Lee, C. F., et al. (2009). "*Vanderwaltozyma verrucispora* sp. nov., a new ascomycetous yeast species." *FEMSYeastRes*9(1): 153–157.

Montrocher, R., et al. (1998). "Phylogenetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* group based on polymorphisms of rDNA spacer sequences." *IntJSystBacteriol*48 Pt 1: 295–303.

Nguyen, N. H., et al. (2007). "Five novel *Candida* species in insect-associated yeast clades isolated from Neuroptera and other insects." *Mycologia*99(6): 842–858.

Oda, Y., et al. (1997). "A phylogenetic analysis of *Saccharomyces* species by the sequence of 18S–28S rRNA spacer regions." *Yeast*13(13): 1243–1250.

Romanos, M. A., et al. (1992). "Foreign gene expression in yeast: a review." *Yeast*8(6): 423–488.

Roy, A., et al. (1990). "cis- and trans-acting regulatory elements of the yeast URA3 promoter." *MolCellBiol*10(10): 5257–5270.

Sa-Correia, I. and M. C. Teixeira (2010). "2D electrophoresis-based expression proteomics: a microbiologist's perspective." *ExpertRevProteomics*7(6): 943-953.

Suh, S. O., et al. (2006). "Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts." *Mycologia*98(6): 1006-1017.

Tavanti, A., et al. (2003). "Optimization and validation of multilocus sequence typing for *Candida albicans*." *JClinMicrobiol*41(8): 3765-3776.

Tohru Yarimizul, et, al. (2013). "Identification of auxotrophic mutants of the yeast *Kluyveromyces marxianus* by non-homologous end joining-mediated integrative transformation with genes from *Saccharomyces cerevisiae*" *Yeast*; 30: 485 - 500.

Sunita Grover et al (2012). "Probiotics for human health - new innovations and emerging trends" *Gut Pathogens*, 4:15

Jack T. Pronk, et al (2002) "Auxotrophic Yeast Strains in Fundamental and Applied Research" *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, p. 2095 - 2100

Hassan Hamed, et al (2013) "Generation of a Uracil Auxotroph Strain of the Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii* as a Host for the Recombinant Protein Production" *Avicenna J Med Biotech*; 5(1): 29-34

QURAT UL AIN RIAZ, et al, (2013) "Recent Trends and Applications of Encapsulating Materials for Probiotic Stability" *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53:231 - 244

Harinder Singh Oberoi, et al, (2012) "Ethanol production from alkali-treated rice straw via simultaneous saccharification and fermentation using newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1" *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:557 - 566

Bijender Kumar Bajaj et al, (2012) "Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity" *J. Basic Microbiol*, 53, 645 - 656

Giek Far Chan, et al, (2012) "Genome Sequence of *Pichia kudriavzevii* M12, a Potential Producer of Bioethanol and Phytase" *Eukaryotic Cell* p. 1300 - 1301

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명 산업기술개발사업(해당사업 표기)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명 산업기술개발사업(해당사업 표기)의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.