

발간등록번호

11-1543000-004681-01

# 마이크로바이옴 연구기반으로 저단백 사료를 위한 친환경 사료첨가제 개발

2024. 7. 9.

주관연구기관 / (주)진바이오텍  
공동연구기관 / 단국대학교

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

친환경 사료첨가제 개발 최종보고서  
마이크로바이옴 연구기반으로 저단백 사료를 위한

2024

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

발간등록번호

11-1543000-004681-01

# 마이크로바이옴 연구기반으로 저단백 사료를 위한 친환경 사료첨가제 개발

2024. 7. 9.

주관연구기관 / (주)진바이오텍  
공동연구기관 / 단국대학교

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “마이크로바이옴 연구기반으로 저단백 사료를 위한 친환경 사료첨가제 개발”(개발기간 : 2022.04.01 ~ 2023.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2024. 07. 09.

주관연구기관명 : (주)진바이오텍 이 찬 호



공동연구기관명 : 단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단 이 재 원



주관연구책임자 : 박 찬 수

공동연구책임자 : 김 인 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

## < 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		2022년 기술사업지원사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)		민간중심 R&D 사업화 지원		연구개발과제번호		122038-2	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0606	50 %	LB0605	40 %	LB0601	10%
	농림식품 과학기술분류	AB0299	50 %	AB0201	40 %	AB0101	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		마이크로바이옴 연구기반으로 저단백 사료를 위한 친환경 사료첨가제 개발					
전체 연구개발기간		2022. 04. 01 - 2023. 12. 31					
총 연구개발비		총 553,750천원 (정부지원연구개발비: 464,000천원, 기관부담연구개발비 : 89,750천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준( ) 종료시점 목표( )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		저단백 사료를 위한 친환경 사료첨가제 개발				
	전체 내용		[주관기관] - 사료 단백질 원료의 생체내 질소이용성을 증대시키는 이유자 돈 및 육성돈 맞춤형 사료첨가제 개발 [공동기관] - 이유자돈 및 육성돈 사양실험 기반 질소저감과 장내균총 및 단쇄지방산 상관관계 분석				
	1차년도	목표	이유자돈용 복합 사료첨가제 및 육성돈용 효소제 개발				
		내용	○ 이유자돈용 복합 사료첨가제 개발 - 선행연구에서 선발된 약취저감능 균주를 활용한 저분자화 단 백질 대량생산연구 - <i>In vitro</i> 제품특성 연구 - 사양실험용 샘플제조 - 이유자돈용 복합 사료첨가제의 사양실험 - 이유자돈 사양실험을 기반으로 장내 균총 및 단쇄지방산 조 절능 DB 구축 ○ 육성돈용 효소제 개발 - 단백질분해효소 고생산 균주 선발 및 분비효소 특성 비교 - 고상발효 기술을 활용한 효소제 생산 실험(Lab.test)				
	2차년도	목표	이유자돈용 복합 사료첨가제 및 육성돈용 효소제 제품화				
		내용	○ 이유자돈용 복합 사료첨가제 제품화 - 품질관리 기준 수립 및 제품화 ○ 육성돈용 효소제 제품화 - 효소제 대량생산 연구 - <i>In vitro</i> 제품특성 연구 - 사양실험용 샘플제조 - 품질관리 기준 수립 및 제품화 - 육성돈용 효소제의 사양실험 - 육성돈 사양실험을 기반으로 장내 균총 및 단쇄지방산 조절능 DB 구축				

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 이유자돈용 복합 사료첨가제 개발 1건</li> <li>○ 육성돈용 효소제 개발 1건</li> <li>○ 특허 출원 2건</li> <li>○ 생명정보 등록 1건</li> <li>○ 논문 2건(IF 4.2)</li> <li>○ 생물자원 등록 1건</li> </ul>												
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2050 농식품 탄소중립 추진전략으로 양돈용 배합사료 내 조단백질 함량 감축을 통한 저탄소 사양관리 정책 시행(성장 단계 별 1~3%)에 따라 생산성 우려 극복 과 배출되는 질소량을 저감시키는 솔루션을 제안하고자 함</li> <li>- 본 과제에서는 체내 질소이용성 증대시키는 사료첨가제를 개발, 저탄소 사양관리에 따른 생산성 극복 구간별 맞춤형 솔루션을 제공, 배출되는 질소 감소 효과 검증, 마이크로바이옴 연구기반 차별화된 마케팅 자료 구축하고자 함</li> <li>- 개발된 사료첨가제는 친환경적인 제조공정을 이용하여 사료급여 뿐만 아니라 생산단계에서도 탄소배출을 저감할 수 있음</li> <li>- 사료 효율의 증대로 양돈 생산비용을 절감할 수 있으며 수입제품 대체 효과도 기대됨</li> <li>- 향후 관련 기술들을 이용 및 응용하여 추가 신제품 개발을 준비중임(2024년)</li> </ul>												
연구개발성과의 비공개여부 및 사유													
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종		
	2	2						생명 정보	생물 자원		1	정보	실물
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호				
국문핵심어 (5개 이내)	사료첨가제		고상발효		효소제		마이크로바이옴		유전체				
영문핵심어 (5개 이내)	Feed additive		Solid Fermentation		Enzyme		Microbiome		Genome				

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	22
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	97
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	105
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	105
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	105

최종보고서							보안등급 일반[V], 보안[ ]				
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명	2022년 기술사업 지원사업					
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원			내역사업명 (해당 시 작성)	민간중심 R&D 사업화 지원						
공고번호	농축2022-34호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)							
				연구개발과제번호	122038-2						
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB0606	50%	LB0605	40%	LB0601	10%				
	농림식품과학기술분 류	AB0299	50%	AB0201	40%	AB0101	10%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문							영문		
연구개발과제명		국문	마이크로바이옴 연구기반으로 저단백 사료를 위한 친환경 사료 첨가제 개발						영문		
		Development of Eco-friendly Feed Additives for Low-protein Feed based on Microbiome Research									
주관연구개발기관		기관명	(주)진바이오텍		사업자등록번호	307-81-14821					
		주소	(우)32619 충청남도 공주시 계룡면 신원사로 166		법인등록번호	161211-0007815					
연구책임자		성명	박 찬 수		직위	부장					
		연락처	직장전화	041-853-9964		휴대전화	010-6727-0221				
			전자우편	cspark@genebiotech.co.kr		국가연구자번호	11130482				
연구개발기간		전체	2022. 04. 01 - 2023. 12. 31 (1년 9개월)								
		단계 (해당 시 작성)	1단계	2022. 04. 01 - 2022. 12. 31 (9개월)							
			n단계	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31 (1년)							
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담		그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금	
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금		현물
	총계	464,000	4,000	85,750	0	0	0	0	468,000	85,750	553,750
1단계	1년차	199,000	0	49,750	0	0	0	0	199,000	49,750	248,750
	2년차	265,000	4,000	36,000	0	0	0	0	269,000	36,000	305,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고		역할	기관유형	
공동연구개발기관		단국대학교 산학협력단	김 인 호	교수	010- 8803-9598	inhokim@da nkook.ac.kr	공동	대학			
연구개발담당자 실무담당자		성명	황 유 정		직위	사원					
		연락처	직장전화	070-7459-0379		휴대전화	010-8370-2354				
			전자우편	yhwang@genebiotech.co.kr		국가연구자번호	12920446				

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2024년 2월 29일

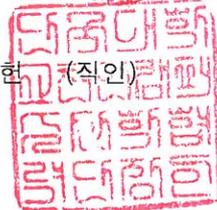
연구책임자: 박 찬 수



주관연구개발기관의 장: 이 찬 호



공동연구개발기관의 장: 백 동 현



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발의 배경

### ○ 사료첨가제 시장규모

- 세계 가축사료 시장 규모는 2019년 약 684억 달러로 평가되고 2020~2027년 동안 2.6% 이상의 꾸준한 성장률로 확대될 것으로 예측됨(Bizwit Research & Consulting LLP, 2021).
- 세계 사료 첨가제 시장은 2018년 39.6조 원 규모에서 매년 7.1%의 성장률을 보여, 2025년 기준 약 59.8조 원의 규모로 증가할 것으로 전망되며 첨가제 중 미생물제와 효소제는 약 5조 원 이상의 규모를 차지하고 있고, 2025년에는 이보다 증가하여 9조 원 이상까지 성장할 것으로 전망됨(그림 1).



그림 1. 세계 사료첨가제 시장 전망(단위, 억 원; MarketsandMarkets, 2019)

- 국내 사료첨가제 시장은 2014년 3,486억 원에서 매년 4.1%씩 성장하여 2018년에는 약 4,095억 원의 규모이며 이후에는 매년 성장률이 8.3%에 이를 것으로 예상돼 2023년에 6,094억 원 규모까지 성장할 것으로 전망되고 있음(그림 2).

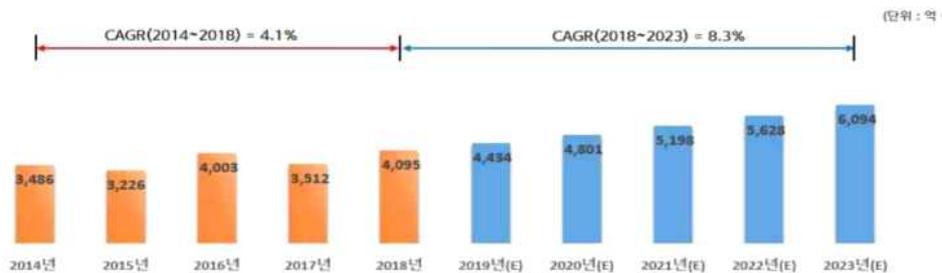


그림 2. 국내 사료 첨가제 시장 규모 및 성장률(단위, 조 원; 통계청)

- 사료 첨가제 시장의 축종별 점유율은 돼지와 닭이 73.4%로 가장 많고, 소 19.2%, 반려동물 7.4%의 점유율임. 특히, 돼지의 경우에는 생산과 관련된 총 비용 중 사료비용이 약 60 - 70%를 차지하고 있어서 사료 효율을 높이는 다양한 첨가제 및 원료 가공연구들이 계속 진행되고 있음(예: 생균제, 효소제, 발효제품, 비타민, 미네랄 등 목적에 따라 다양한 사료첨가제들이 제품화되고 있음).

○ 2030년까지 축산분야 온실가스 30% 감축 목표 및 사료내 단백질 저감 정책

- 농림축산식품부는 2030 NDC (Nationally Determined Contribution) 상향 안과 함께 2050 농식품 탄소중립 추진전략을 통해 전 산업 부분의 온실가스 감축목표 구체화 하였습니다.
- \* 축산분야 온실가스(백만톤 CO2eq) : (2018) 9.4 → (2019) 9.5 → (2020) 9.9(잠정)
- \* 2030년까지 약 22.6% 감축 목표(2018년 대비, 전체 감축량의 56.1%)
- \* 2030년 축산분야 온실가스 BAU(Business As Usual, 예상배출량) 목표 7.7(△30%)
- 지속적으로 증가하고 있는 축산분야의 온실가스를 감축할 수 있는 정책적 보완이 필요함.
- 축산환경개선 대책은 2030년까지 축산분야 온실가스 배출량을 30% 감축해 나가기 위한 다양한 정책 수단들을 담고 있음.
- 축산환경 개선을 통한 축산분야 온실가스 감축 정책방안
  - \* 사육과정에서의 불필요한 투입요소를 최소화하는 저탄소 사양관리
  - \* 정화처리·바이오차·에너지화 이용 확대 등 가축분뇨 적정처리
  - \* 축산악취 개선
  - \* 축산환경개선 기반 구축 등을 중점 추진 계획 등
- 농업부문 온실가스 배출 원인별 비율에서 가축 장내발효에 따른 배출이 약 40%로 가장 높은 비율이며(그림 3) 이를 해소하고자 농림축산식품부는 저탄소 사양관리를 위해 2022년부터 배합사료 내 조단백질 함량의 허용기준을 현행보다 성장단계별로 1~3%p 낮추는 사료 등의 기준 및 규격(농식품부 고시 제2021-99)을 개정 및 시행 예정임.

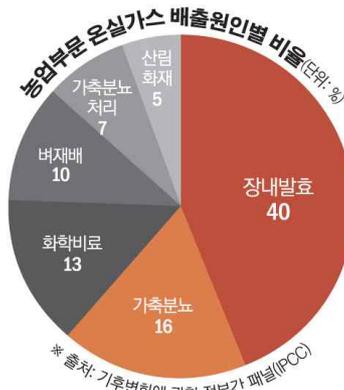


그림 3. 농업부문 온실가스 배출 원인별 비율 (2021)

- 사료의 주요성분인 단백질이 과다하게 공급되면 체내에 미소화 단백질이 증가, 분변을 통해 배출되어 암모니아 가스 발생량을 높이고 퇴비화, 액비화, 방류과정 등에서 총 질소량의 증가로 인해 법적인 규제 대상에도 포함되게 됨(그림 4).

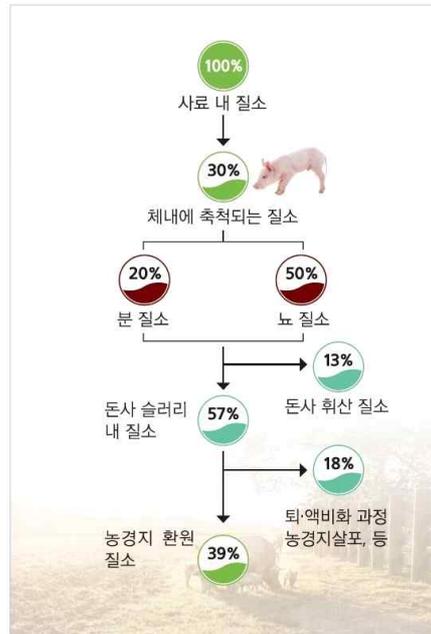


그림 4. 양돈장 냄새 물질 발생의 모식도(질소의 이용성), 축산과학원 2017

- 사료 내 단백질 함량이 1%p 감소하면 가축분의 퇴액비 부숙 과정에서 발생하는 아산화질소 배출이 줄어 연간 35만 5000톤 CO<sub>2</sub>eq(이산화탄소 환산 톤)의 온실가스 감축이 가능하고 양돈장내 암모니아 가스 배출량도 최대 10% 감소 가능함(양돈사료의 조단백질 조정안, 농식품부, 2021)
- 하지만, 최상의 생산성을 낼 수 있도록 개량된 가축에게 저단백질의 사료를 급여하는 것은 아미노산의 과부족 현상이 발생하여 생산성에 영향을 끼칠 수 있고 성장단계별 조단백질 함량 감축률에 대한 추가적인 연구가 더 필요할 뿐만 아니라 과도한 감축으로 인한 농가들의 부담이 증가될 수 있음(농축유통신문, 21. 07).
- 따라서, 탄소중립 정책에 따라 사료내 질소원인 단백질 함량을 낮추더라도 가축의 생산성은 유지되고 분뇨를 통한 질소배출을 저감할 수 있는 대응책 마련이 시급함.

#### □ 관련 연구동향

- 사료 내 단백질의 체내 질소이용성을 증대시키고 분뇨 내 질소배출량을 줄이기 위한 다양한 연구들이 진행되어 왔으며 대표적으로 사료 단백질원 저분자화, 단백질분해효소 등 다양한 사료용 효소제, 생균제 연구 등이 있음.
- 질소대사와 관련된 최근 연구 및 기술개발들은 고전적인 사양실험과 분뇨 내 질소저감 연구뿐만 아니라 마이크로바이옴을 기반한 장내균총 및 대사체 분석을 통한 메커니즘 규명 연구까지 병행되고 있음.

#### ○ 메커니즘 규명을 위한 마이크로바이옴과의 연계 연구의 필요성

- 마이크로바이옴은 기존의 개별 미생물 분석 연구에서 벗어나 기주 생물 (인체, 동 식물 등)과 미생물 간의 상호작용을 유전체학 기반 연구 및 기술을 말함.

- 제 2의 장기로 인식되는 장내 마이크로바이옴은 동물에게 미치는 영향과 미생물 군집의 복잡성 측면에서 체내 마이크로바이옴의 핵심임.
- 마이크로바이옴이 활발히 연구되는 중요한 배경은 최근 차세대 염기서열 분석 (Next-generation sequencing, NGS) 기법의 발전으로 전체 미생물 군집의 역할에 관한 효율적인 연구가 가능해짐(그림 5).

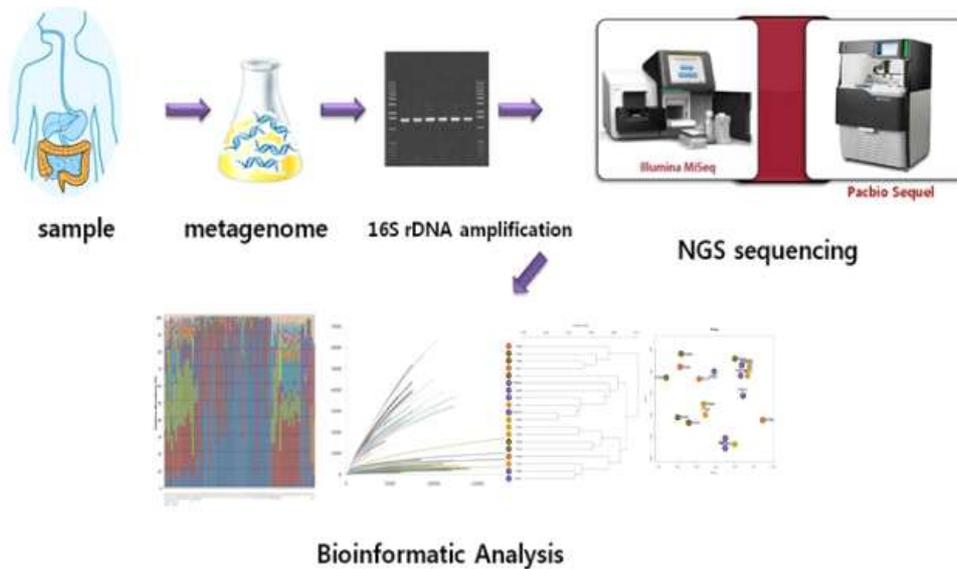
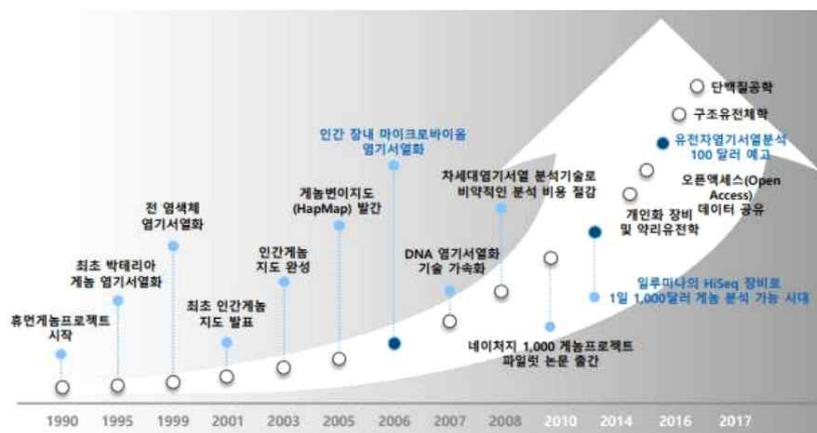


그림 5. NGS 시퀀싱을 활용한 휴먼 마이크로바이옴 군집분석 모식도

- 과거에는 30억 쌍의 유전자를 분석하는 데 15년 동안 30억 달러가 소요되었으나, NGS의 발달로 하루 동안 1,000달러로 분석이 가능해졌으며, 이제 100달러로 분석 가능한 시대가 열리고 있음(그림 6).



\* 출처: 삼성KPMG 경제연구원

그림 6. 마이크로바이옴 유전자 분석 기술의 발달(1990~2017)

- 이러한 유전체 분석기술의 비약적인 발전으로 인간 게놈보다 수백 배 이상의 유전자를 가진 마이크로바이옴 분석의 초고속 진행이 가능해졌으며 여기에 생물학을 총체적으로 이해하고 유전자, 전사물, 단백질, 대사산물 등 각 부분들의 관련성으로부터 새로운 지식을 대량으로 창출하는 새로운 연구 방법론인 '오믹스 기술'이 결합하면서 마이크로바이옴

각각의 특성과 생태계 내 작동기전 분석까지 가능해짐.

- 글로벌 마이크로바이옴 시장은 2019년 811억 달러에서 연평균 6% 성장하여 2023년 1,086억 달러 규모를 보일 것으로 전망됨(그림 7).

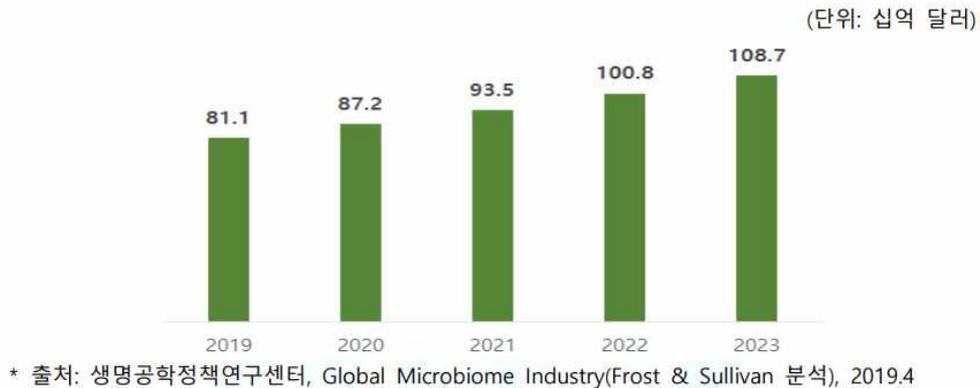


그림 7. 글로벌 마이크로바이옴 시장 전망 (2019~2023)

- 가축의 마이크로바이옴에 영향을 주는 사료첨가제의 개발은 온실가스 감축과 악취저감 등의 환경규제에 대응하는 환경 친화형 축산업으로의 전환 및 막대한 시장 창출로 이어질 것으로 전망됨.

#### <사료내 단백질원 저분자화 주요연구 및 시장동향>

- 전 세계 발효대두박 시장은 약 7천억원 규모이고 중국을 비롯한 동남아 국가의 육류 소비 증가로 매년 5% 이상 성장하고 있으며 덴마크의 HP(효모로 만든 발효대두박)와 대만의 다봄(유산균으로 만든 발효대두박)이 시장에서 앞서나가고 있지만 점유율이 6%가량에 불과할 정도로 시장 선점 업체는 없음(축산경제신문, 2014)
- 국내 대표적인 대두박 발효제품 생산 업체인 (주)진바이오텍 발효대두제품(제품명: 펩소이젠)은 분자량 29,000 Da 이하의 펩타이드 분포가 73%이며, 분자량 18,000 Da 이하의 저분자 펩타이드 함량이 45%로 *A. oryzae*와 *Bacillus subtilis* 균주를 활용한 발효과정을 거치면서 단백질이 저분자화 되어 이용성이 높은 형태로 전변되기 때문에 어린 동물의 고급 단백질원으로 사용 시 우수한 성적이 기대되어 자돈사료에 적용되고 있으며(연간 500~600톤 생산), 기타 피드업, 씨티씨바이오, CJ 제일제당 등의 생산 업체 등이 있음(그림 8).

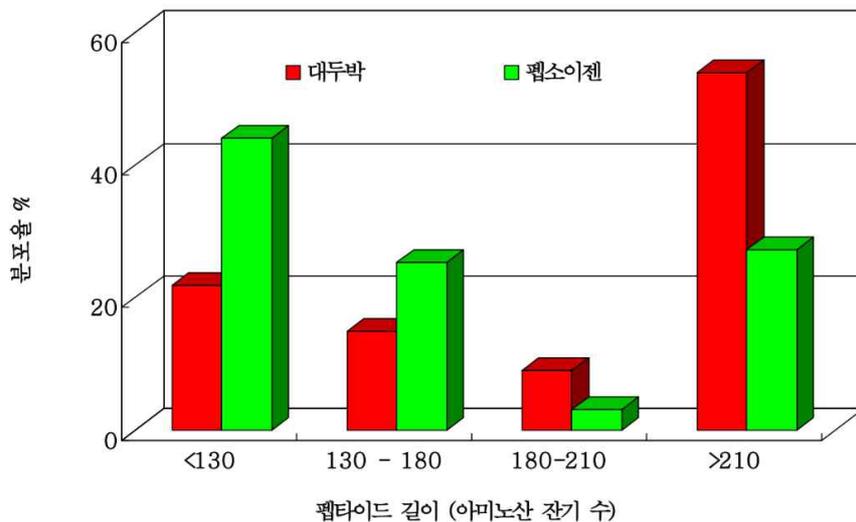


그림 8. 펩소이젠의 펩타이드 구성비

- Feng 등(2007) : 대두류를 *Aspergillus oryzae* 균주를 이용하여 발효하면 trypsin inhibitor가 감소하고 저분자 펩타이드가 증가하여 소화율이 높아지고 영양가치가 높아져 어린 동물에게 효과적이며 발효대두박 급여 시 성장률과 사료 효율이 증가, 에너지 소화율은 10% 증가시키고 십이지장의 protease 활성도 및 트립신 활성도를 증가시켰음.
  - *A. oryzae*는 hemicellulases, hydrolases, pectinases, protease, amylase, lipases 및 tannases 등의 효소에 대한 높은 생산능력을 가지고 있어 널리 사용되고 있으며, 산업용 protease를 제조하는데 사용되고 있는 *Bacillus* 속 세균과 함께 사용 시 저분자 단백질과 아미노산 함량이 증가됨(Mukherjee et al., 2016).
  - 발효대두제품은 영양의 질과 사료 활용도를 높일 뿐만 아니라 가축에게 프리바이오틱스, 건강 관련 미생물, 대사산물을 제공하여 성장 촉진 효과를 발휘(Shi et al. 2017a)하며, 위장 내 pH 감소, 후장에서 유기산, 단백질 지방산 농도를 증가(Missotten et al. 2010)시켜 장 기능을 개선시킴(Niba et al. 2009).
  - 발효사료에는 프리바이오틱스와 프로바이오틱스를 포함할 수 있으며, 올리고당 및 섬유질과 같은 프리바이오틱스는 사료 성분 또는 미생물 발효에서 유래하여 장내 미생물에 발효 가능한 영양소를 제공함.
  - 프로바이오틱스는 접종된 미생물과 그 대사산물(예: 유기산, 효소, 항균 성분, 신경 전달 물질 및 SCFA)로 발효 중 사료기질을 분해하면서 증식하는 과정에서 대사산물을 생성함.
- \* 돼지 장내 미생물총에 대한 프로바이오틱스의 주요효과(그림 9) :
- 1) 병원체 간섭, 2) 장내 장벽 기능 증가, 3) 면역 조절, 4) 신경 전달 물질 생산 등의 효과를 발휘함(Wang et al., 2018).

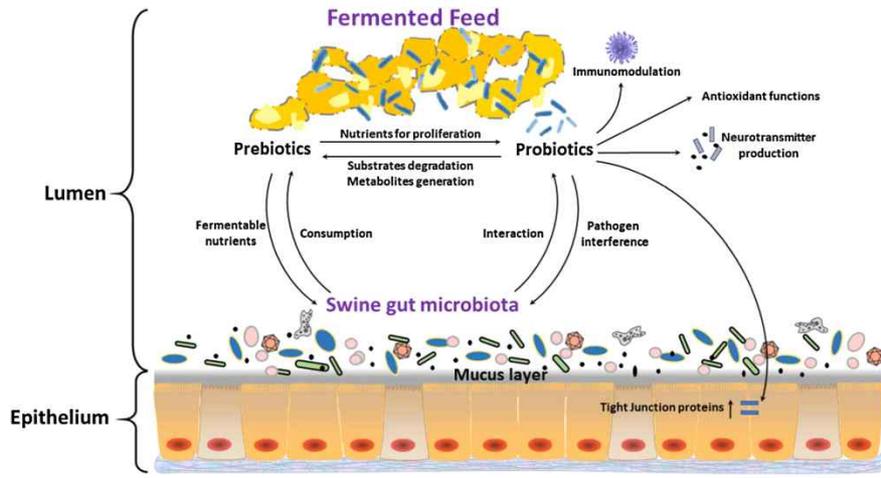


그림 9. 돼지 장내 미생물총에 대한 발효사료의 영향(Wang et al., 2018)

- 최근 마이크로바이옴 연구에서 발효사료 급여 시 돼지에서 IgG 및 IgM의 혈청 수준이 유의하게 증가하고 십이지장에서 Bacteroides와 Verrucomicrobia의 풍부도가 유의하게 감소됨. 결장에서 Firmicutes와 Actinobacteria의 풍부함을 유의하게 증가. LC-MS 데이터 분석에서(그림 10) 일반 사료와 발효사료 급여 그룹 간 총 1,351개의 현저하게 다른 대사산물을 식별함(Lu et al., 2019).

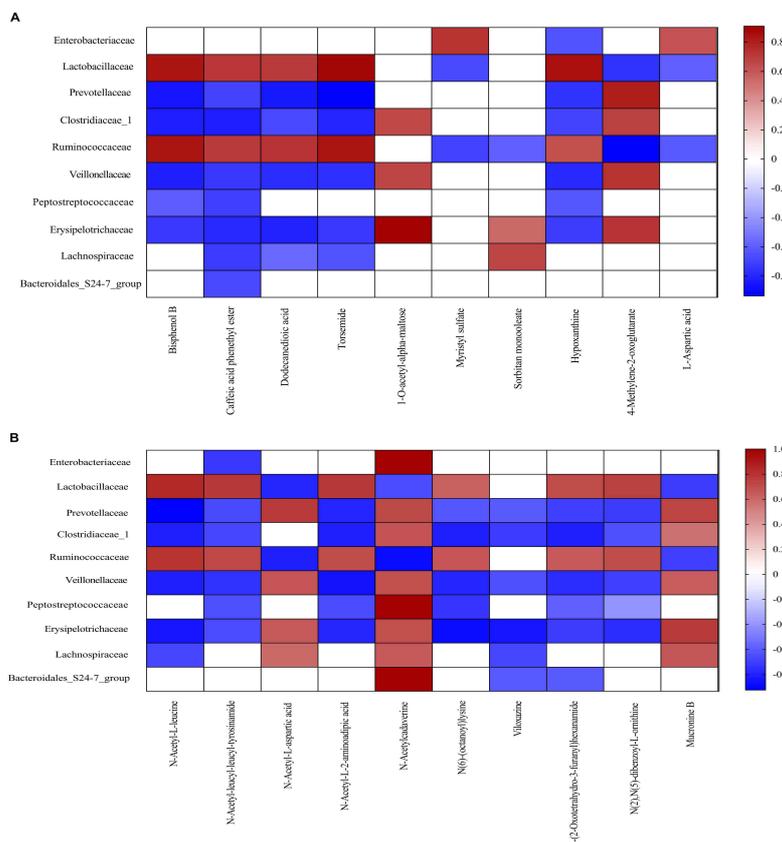


그림 10. LC-MS 데이터 분석 :에서 일반 사료와 발효사료 급여 그룹 간 대사산물 분석 (A) LC-MS (ESI-). (B) LC-MS (ESI+). The color represents a significant correlation ( $P < 0.05$ ), and the intensity of the colors represents the degree of association. Red represents significant positive correlation and blue represents significantly negative correlation ( $n = 6$ ).

- 발효사료의 급여는 혈청 및 장내 면역과 관련된 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있으며, 이는 비육돈의 장내 미생물 및 박테리아 대사산물과 관련이 있음을 확인하였으나, 아직 발효사료와 영양소 소화율과의 명확한 상관관계는 밝혀지지 않았음.

**<효소제 주요연구 및 시장동향>**

- 국내 효소 시장의 전체 규모는 2018년 기준 대략 1,884억 원 대로 추정됨. 이 중 수입 효소의 비중은 91.0% 로 수입 효소제를 대체할 국내 효소제 개발이 필요한 실정임(그림 11, 표 1).

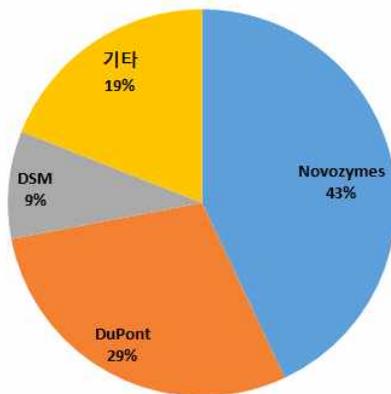


그림 11. 산업용 효소 시장의 주요 기업 현황 (Marketsand Markets, 2020)

표 1. 효소제 제품 현황

제품(해외)	기업	사용처
효소제명	기업	사용처
Enzae	cargill	가금류
Emprical	ADM	가금류, 돼지
Natugrain, Natuphos, Natuphos E	BASF	돼지, 가금류
Ronozyme NP, Ronozyme ProAct, Ronozyme MultiGrain	Novozyme	
Rovabio excel, Rovabio Advance, Rovabio Advance PHY	Adisseo	

- 출처: 사료첨가물 시장(2019. 연구개발특구진흥재단)

- 효소제 첨가는 사료 원료의 소화율, 흡수율 증가 및 영양소 이용 개선, 장내 미생물 균총 변화, 사료량 감소를 통한 비용 절감, 분뇨 내 인/질소 등의 함량 저하를 통한 환경 개선 등에 효과가 입증되고 있음(표 2).

표 2. 효소제 첨가 효과 연구 현황

구분	내용			
논문	Aspergillus oryzae 배양물이 육계의 생산성, 분변의 미생물 성장 및 암모니아 가스 발생량에 미치는 영향	1.영양소소화율,소장및대장pH조절에관여,유익균생장촉진,유해균증식억제 2.효소및대사산물분비 3..E.coli,살모넬라감소 4.분내암모니아가스저감	2007	J.H.Son, I.K.Cho
논문	산란 후기 사료 내 거미 유래 단백질 분해효소제(Arazyme)의 첨가 급여가 난 생산성에 미치는 영향	1.장내용물및장내암모니아농도저감 2.serine-protease,metallo-portease	2009	J. U. Kim et al.
논문	복합효소제의 첨가가 육성돈의 생산성, 영양소 소화율, 혈액성상 및 사료비용에 미치는 영향	1.복합효소제 첨가 처리구 일당증체량, 일당 사료섭취량증가 2.건물,질소및총에너지소화율증가 3.고에너지사료와비교하여사료생산비절감	2011	S. M. Hong et al.

논문	에너지 수준이 다른 사료에 복합효소제의 첨가가 육계의 사양성적, 영양소 소화율, 혈액성상, 장내미생물 군총 및 소장 용모에 미치는 영향	amylase+protease+mannanase_xylanase+phytase 1.효소제의 첨가로 성장률과 사료요구율개선 (소화율개선) 2.회장과 맹장에서 유익균(lactobacilluspp.)증가, 유해균(clostridiumssp.,coliformbacteria)감소	2017	Y. H. Shim <i>et al.</i>
특허	고상발효를 통하여 생산된 복합효소제를 이용한 돼지의 생산성 향상 기술	1.가축의사료섭취량증대및영양공급,증체효과 2.가축의체내암모니아,황화수소감소,배설물내질소,인분해및배변량감소	2019	

- \* 홍 등(2011)은 복합효소제의 첨가가 육성돈의 고에너지 사료 일부 대체 가능, 돼지의 장내 질소 및 에너지 소화율 증가 보고
- \* 하 등(2021)은 사료 내 단백질 수준 및 protease 첨가가 자돈의 성장, 영양소 소화율 및 분 중 유해가스 발생량 저감에 도움
- \* Ramani 등(2021)은 복합효소제 첨가가 돼지의 생산성 증가 및 장내 균총 변화(대장균(*E. coli*) 감소, 유산균(*Lactobacillus* sp. 증가)로 인한 장 건강에 도움
- \* 김 등(2019)은 복합효소제 첨가 시 돼지 생산성 증가 및 돼지 장내 유익균 비율 증가 확인
- 돼지의 소화기관 내 소화에는 한계가 있어 소화율이 높은 옥수수, 대두박 기반의 사료에서 전분, 단백질 및 지질의 85-90% 수준만이 소화되며, 소화율이 열악한 원료를 함유한 사료는 소화율이 75%수준 이하까지 떨어질 수 있음.
- 효소제 첨가를 통해 25%정도의 소화율을 개선할 수 있음(Ravindran. 2013). 효소 효과 증대를 위해 효소의 특정 촉매 활성, 펩신 등 위산에 대한 내산성, 기질 특성, 소화기관의 상태(수분 함량, pH, 온도, 음식물의 체류 시간 등)의 조건에 맞는 효소제 개발이 필요함.
- 대부분 단순추출 또는 발효에 의해 얻어진 단일효소에 대한 기능성효과 논문이나 제품들이 소개되고 있으며 경제성이 있는 축종 구간별 맞춤형 기능성 효과 연구는 미비함. 또한, 효소제 첨가에 따른 돼지의 생산성에 대한 연구는 사양실험 위주로 연구되고 있으며, 급여에 따른 장내균총 변화, 소화율, 온실가스 저감, 질소대사 등과의 상관관계 및 메커니즘에 대한 연구는 부족한 상태임.

### <생균제 주요연구 및 시장동향>

- 전 세계 동물 사료용 생균제 시장은 2020년 48억 달러에서 연평균 성장률 6.2%로 성장하여 2027년에는 73억 달러에 이를 것으로 전망됨(Probiotics in Animal Feed - Global Market Trajectory & Analytics, 2021, 그림 12).

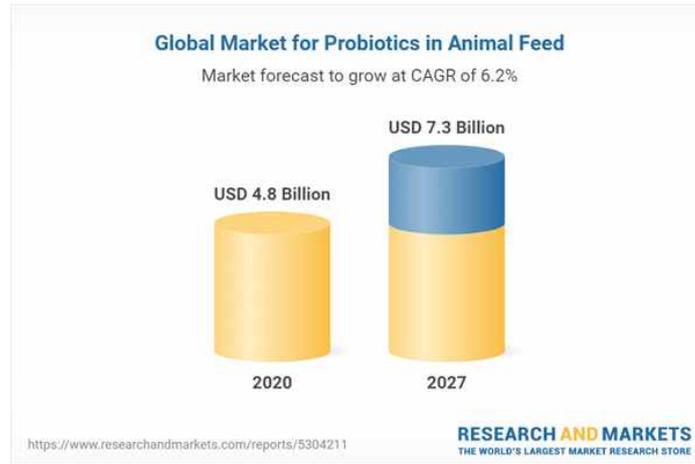


그림 12. 글로벌 동물 사료용 프로바이오틱스 시장 규모 및 전망

- 현재 판매되고 있는 생균제 제품은 항생제 사용금지에 따른 항균효과 및 면역력 증대에 초점을 맞춘 프로바이오틱스 제품이 주를 이루고 있으며, 영양소 소화율, 질소 배출 감소에 대한 제품은 부족한 실정임(표 3).

표 3. 대두박 발효에 사용된 균주 별 효과

Substrate	Microorganisms used	Animal trial carried out on	Beneficial effects/nutritional improvement	Reference
FSBM and squid by-product blend	<i>Bacillus</i> spp.	Fish	An alternative protein ingredient in aqua feed and can replace 36% FM protein in the diet of Japanese flounder	Kader et al. (2012)
Soybean meal	<i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Bacillus subtilis</i>	-	Increase in CP, small-sized proteins, arginine, serine, threonine, aspartic acid, alanine and glycine contents; decrease in TI, proline contents	Teng et al. (2012)
PepSoyGen (commercial FSBM)	<i>Aspergillus Oryzae</i> GB-107	Fish	FSBM is an acceptable alternative plant protein source that can replace up to 35% of fish meal protein in diets without significant adverse effects on growth, survival, FCR, PER, and body composition	Yuan et al. (2012)
PepSoyGen (commercial FSBM)	<i>Aspergillus Oryzae</i> GB-107	Lipopolysaccharide challenged calves	Increased higher LPS-specific IgG, concentration of serum haptoglobin; decreased weaning stress	Kwon et al. (2011)
Soybean meal	<i>Lactobacillus plantarum</i> Lp6	-	Increase in leucine, isoleucine, valine, aspartic acid and proline contents; decrease in TI content	Amadou et al. (2010)
PepSoyGen (commercial FSBM)	<i>Aspergillus Oryzae</i> GB-107	Piglets	Increased growth performance	Jones et al. (2010)
PepSoyGen (commercial FSBM)	<i>Aspergillus Oryzae</i> GB-107	Piglets	hypoallergenic fermented soybean product	Song et al. (2010)
Soybean meal	<i>Bacillus</i> spp.	Fish	A promising ingredient as the main protein source in a non-fish meal diet for rainbow trout	Yamamoto et al. (2010)
Soybean meal	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> and <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Piglets	Increase in essential and non-essential amino acid contents; decrease in IgE immunoreactivity	Song et al. (2008)
Soy flour	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> and <i>Rhizopusoryzae</i>	-	Increased amino acid content; decreased in immunire activity	Frias et al. (2008)
Soybean meal	<i>Aspergillus oryzae</i> 3.042	Poultry	Increased average daily gain, average daily feed intake, feed conversion (in growing period), phosphorus, IgM and IgA (in growing period) content in serum; decreased urea nitrogen content of serum	Feng et al. (2007a)
Soybean meal	<i>Aspergillus oryzae</i>	Piglets	Increased average daily gain, activities of total protease and trypsin; decreased feed gain ratio	Feng et al. (2007b)
Soybean meal	<i>Aspergillus oryzae</i> 3.042	Piglets	Increased average daily gain; decreased feed gain ratio, serum IgG	Liu et al. (2007)
Soybean meal	<i>Aspergillus niger</i>	Poultry	Increase in body weight, ileum villi length and width	Mathivanan et al. (2006)
Soybean and soybean meal	<i>Aspergillus oryzae</i>	Young animals	Increased small-size peptide (<20 kDa) content, CP content; decreased TI content	Hong et al. (2004)
Soybean	<i>Aspergillus awamori</i>	-	Increased cytochrome P-450 content, isoflavonoid aglycone content; decreased pentobarbital sleeping time	Kishida et al. (2000)
Soybean meal	<i>Aspergillus usanii</i>	Rats	Complete degradation of phytic acid	Ilyas et al. (1995)
Soybean meal	<i>Aspergillus usanii</i>	Poultry	Increased body weight gain, the amount of retained phosphorus, and femoral phosphorus content; decrease in phytate phosphorus (complete degradation)	Hirabayashi et al. (1998)

FSBM, fermented soybean meal; CP, crude protein; TI, trypsin inhibitor; Ig, immunoglobulin; LPS, lipopolysaccharide; FCR, feed conversion ratio; PER, protein efficiency ratio; FM, fish meal.

- Mun(2021) 등은 바실러스가 포함된 프로바이오틱스 제제 급여 시 일당증체량(ADG, average daily gain)이 유의하게 개선된 것을 확인하였으며(표 4), 16S rRNA 시퀀싱 데이터 및 분변 미생물 분석 결과, 장내 유익균이 우점하는 경향을 보였음(그림 13).

표 4. 바실러스 유래 프로바이오틱 첨가제 급여에 따른 효과

Item	Dietary treatments		SEM	p-value
	CON	PRO		
Initial BW (kg)	7.01	7.02	0.41	0.917
Final BW (kg)	23.23	25.02	0.81	0.155
Feed intake (kg)	27.59	29.66	1.83	0.491
ADG (g/d)	386.19	428.57	11.85	0.040
ADFI (g/d)	656.90	706.19	43.58	0.491
G:F (g/g)	0.588	0.607	0.03	0.739
Frequency of diarrhea (%) <sup>2)</sup>	14.29	13.27		0.845

<sup>1)</sup>Each value presented as the least square mean of 5 replicates (4 pigs pen).

<sup>2)</sup>Frequency of diarrhea (%) = (Number of pigs with diarrhea / number of pen days) × 100. The data was analyzed by chi-squared test.

CON, control diet based on soy-bean meal diet; PRO, control + 0.01% *Bacillus*-based probiotics; BW, body weight; ADG, average daily gain; ADFI, average daily feed intake; G:F, gain-to-feed ratio.

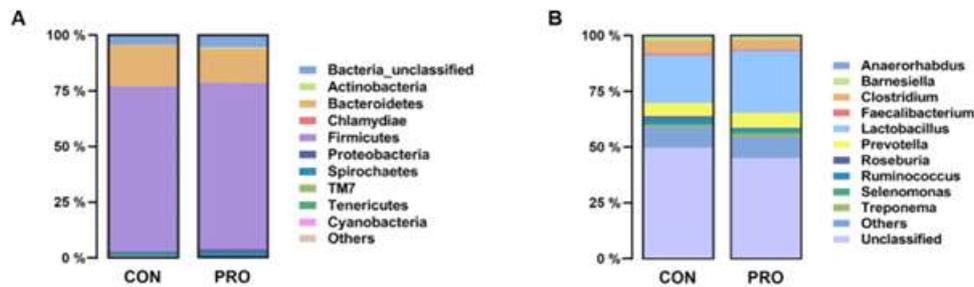


그림 13. 16S rRNA 시퀀싱 데이터 및 분변 미생물 조성

(Relative abundance of fecal microbial taxa at the phylum level (A) and genus level (B) of both groups. CON, control diet based on soy-bean meal diet; PRO, control + 0.01% *Bacillus*-based probiotics.)

- 생균제 급여에 따른 사육돈의 총 소화관 소화율과 질소보유량 분석 결과, *Bacillus*와 *Saccharomyces*, *Lactobacillus* 혼합 급여 시 장내 질소 보유가 높아 질소를 바로 배출하지 않고 보유하여 이용하는 것을 확인(표 5)하였음(Giang et al., 2011).

표 5. 생균제 급여에 따른 사육돈의 총 정상 소화율과 질소보유량 분석

Table 3. Effects of probiotics on total tract apparent digestibility of nutrients (%) and nitrogen retention (% of nitrogen intake) in grower pigs<sup>1</sup>, Exp. 2

Items	Treatment <sup>2</sup>				SEM	p value
	C	B	BS	BSL		
Crude protein	86.6 <sup>a</sup>	87.6 <sup>a</sup>	89.0 <sup>ab</sup>	90.4 <sup>b</sup>	0.62	<0.01
Crude fibre	62.2 <sup>b</sup>	64.6 <sup>a</sup>	68.0 <sup>b</sup>	68.5 <sup>b</sup>	0.62	<0.01
Organic matter	87.7 <sup>a</sup>	89.4 <sup>ab</sup>	89.1 <sup>ab</sup>	90.1 <sup>b</sup>	0.50	0.03
Nitrogen retention	55.1	56.6	58.0	58.6	0.88	0.06

<sup>1</sup> Initially 75-77 days of age and 24 days in growing period.

<sup>2</sup> C = Control; B = *Bacillus*; BS = *Bacillus*+*Saccharomyces*; BSL = *Bacillus*+*Saccharomyces*+Lactic acid bacteria complex.

<sup>a,b</sup> Means within a row with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

- 단백질원 저분자화 제품, 효소제 및 생균제 등 국내외적으로 많은 연구가 이루어지고 있으나 이 중 많은 연구들이 *in vitro* 및 *in vivo* 사양실험 연구에 국한되어 이루어지고 있으며 실제 질소 소화율 및 배출량에 끼치는 메커니즘에 대한 연구들은 미흡한 실정임.

## 1-2. 선행연구 내용

### ○ 유용미생물의 유전체 분석 및 장내균총과 대사체 분석을 통한 기작 연구 (주관기관 : (주)진바이오텍, 위탁기관 : 단국대)

- 농림식품기술기획평가원 포스트게놈 다부처 유전체 사업 ‘유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 악취개선 기능성 미생물제제 개발 (918001-4)’ 과제 연구 수행함(2018. 4. ~ 2021. 12. 45개월).
- 상기 선행 연구(918001-4)를 통해 악취 유발 물질(암모니아, 아민, 황화수소 등) 저감 실험 및 악취 발생 균주에 대한 항균 활성 실험 등을 통해 악취 저감 효과가 우수한 균주 선별을 진행하였고, 해당 균주의 조합을 통해 급여용 사료첨가제(크린바이오프리미엄산, 제 5128050801호), 분무용 악취저감제(클린케어, 제 CCBGW0046호), 퇴·액비 부속촉진제(그린케어, 제 CCBGW0053호) 제품을 개발함.
- 특히, 급여용 제품인 크린바이오프리미엄산의 경우 축산 분뇨 실험을 통해 악취 유발물질에 대한 억제능이 우수한 *Bacillus amyloliquefaciens* G10, *Bacillus subtilis* GB-BS-2020, *Lactobacillus brevis* M10, *Lactobacillus reuteri* GB-LC1 총 4종의 균주를 선별하였고, 이를 경제적인 소재로 활용 및 제품력 강화를 위해 chicory pulp 내 함유된 inulin을 prebiotics로 이용하여 synbiotics 소재로 적용함(그림 14).

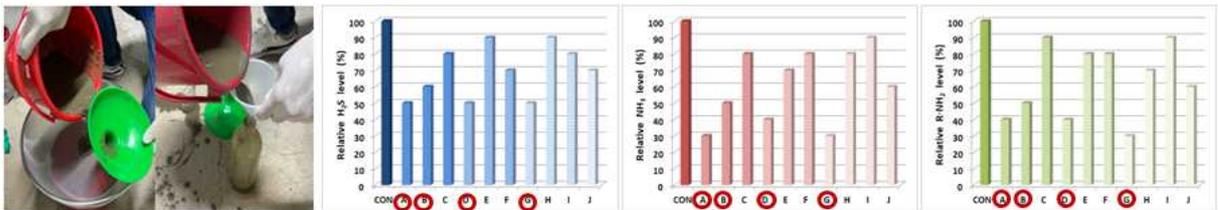


그림 14. 악취 저감 실험에 따른 균주 선별

- 크린바이오프리미엄산을 급여한 육성돈의 장내 균총의 경우, 그림 15과 같이 대조구 대비 풍부도가 증가하였고 phylum 수준에서는 F/B(Firmicutes/Bacteroidetes)의 비율이 증가했으며 이는 돼지의 증체량 증가 등에 영향을 미친다고 보고된 바 있어 생산성 증가의 역할을 기대할 수 있음. 또한, genus 수준에서는 probiotic 균주에 해당하는 미생물의 증가와 사료 효율 및 증체량 감소와 연관되어 있는 Bacteroides 등의 감소한 결과를 통해 육성돈의 강건성에 도움이 될 것이라 예상함.

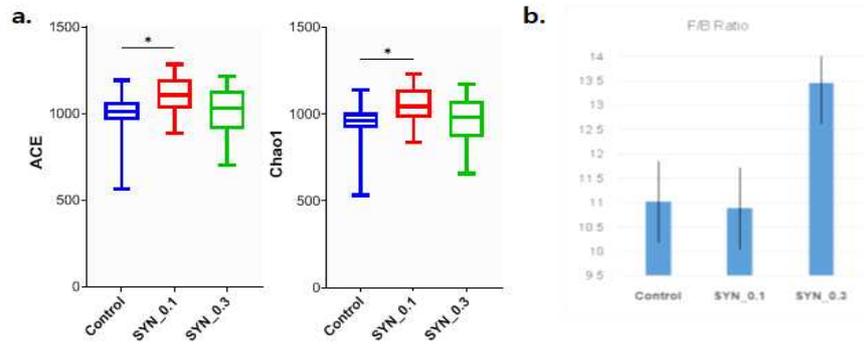


그림 15. 크린바이오프리미엄산 급여에 따른 육성돈 장내 균총 분석  
 (a) Abundance coverage estimate(ACE)와 Chao1 지수 따른 종 풍부도 비교  
 (b) F/B(Firmicutes/Bacteroidetes) ratio 비교

- 대학 농장 실험 시, 통계적으로 유의적이지는 않지만 크린바이오프리미엄산 0.3% 급여시 일당증체량이 대조구(비급여)대비 약 27% 높은 증체량이 보였음(표 6).
- 그러나, 악취 유발 물질(암모니아, 황화수소 등) 유의적으로 감소하는 효능은 확인하지 못하였는데 이는 상대적으로 청결한 대학 실험 농장이 대조구로서 적용하기에 미흡하였으며 환경적으로 불량한 요소를 포함한 대규모 농장에서의 실험이 필요하다고 판단되었으며 추가적인 메커니즘 연구가 필요함(표 7).

표 6. 크린바이오프리미엄산 급여가 생산성에 끼치는 영향

Items	TRT1	TRT2	TRT3	TRT4	SEM <sup>2</sup>	P-value
<b>Body weight, kg</b>						
Initial	21.31	21.31	21.30	21.31	0.01	0.9612
Finish	42.24	43.87	42.22	47.73	1.89	0.3685
<b>Overall</b>						
ADG, g	484	526	490	616	56	0.3882
ADFI, g	1081	1101	959	1172	91	0.4761
G:F	0.457	0.478	0.512	0.523	0.036	0.5842

표 7. 크린바이오프리미엄산 급여에 따른 악취 발생 물질 비교

Items, ppm	TRT1	TRT2	TRT3	TRT4	SEM <sup>2</sup>	P-value
<b>Finish</b>						
Methyl mercaptans	5.38	5.38	5.88	5.75	0.21	0.7082
NH <sub>3</sub>	2.50	2.25	2.50	2.25	0.58	0.7401
H <sub>2</sub> S	5.28	5.08	5.33	5.63	0.24	0.9374
Acetic acid	7.25	7.13	7.13	6.75	1.01	0.9113
CO <sub>2</sub>	16125	15150	15025	16450	438	0.7227

- Metagenome 분석을 통한 장내 균총 조성 및 생산되는 대사체 분석과 악취 유발 물질에 대한 생균제를 급여한 사양실험 간의 상관관계에 대해 충분한 연구가 규명되지 못함. 연구 내용 중 급여를 통해 sulfur metabolism 과 nitrogen metabolism이 증가할 것이라는 예측은 되었으며(그림 16), 이는 장내 균총 분포에 따라 암모니아와 황화수소의 조절이 가능하다고 보고된 참고 문헌을 통해 추가적인 연구로 상관관계에 대한 규명이 가능할 것으로 보임(Xu et al, 2021, 그림 17).

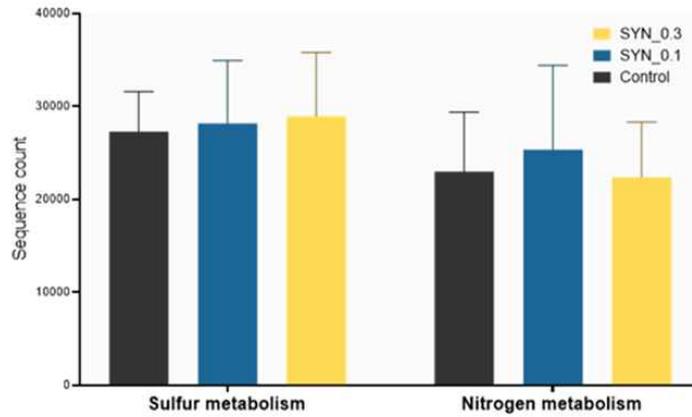


그림 16. 크린바이오프리미엄산 급여에 따른 약취 생성 pathway (KEGG pathway)

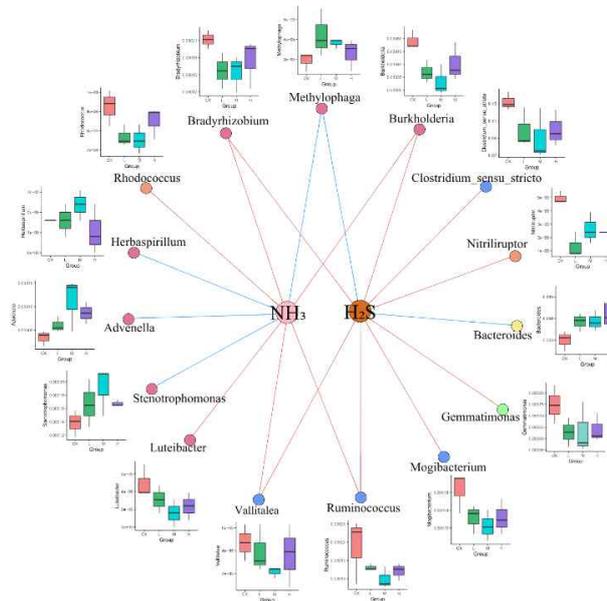


그림 17. 암모니아(NH<sub>3</sub>) 와 황화수소(H<sub>2</sub>S)와 미생물의 상관관계

(공동연구 기관 : 단국대학교\_김인호)

표 8. 생균제 급여시 생산성, 소화율, 약취물질 평가

논문명	학술지	내용
Inclusion of probiotic ( <i>Lactobacillus plantarum</i> ) in high- and low-nutrient-density diets reveals a positive result on the growth performance, nutrient digestibility, gas emission, and blood profile in growing pigs	Can. J. Anim. Sci. (2021)	high- and low-nutrient-density diets 에 probiotic ( <i>Lactobacillus plantarum</i> ) 를 첨가하여 생산성, 영양소 소화율, 약취물질 등을 평가
Effects of probiotics containing ( <i>Lactobacillus planetarium</i> ) and chlortetracycline on growth performance, nutrient digestibility, fecal microflora, diarrhea score and fecal gas emission in weanling pigs.	Livestock Science (2020)	probiotics containing ( <i>Lactobacillus planetarium</i> ) and chlortetracycline 첨가 시 생산성, 영양소 소화율, 미생물 총, 약취 물질 등을 평가

- 마이크로바이옴 기반 장내 기능성 및 장내균총 제어능 평가

: 본 연구팀은 차세대 염기서열분석법(next-generation sequencing, NGS)에 기반한 장내균총에 관한 연구를 활발히 진행하고 있으며, 프로바이오틱스와 프리바이오틱스가 동물의 장내세균에 미치는 영향에 대해 수편의 논문을 국제학술지에 발표한 바 있음. 최근에는 장 건강에 중요한 역할을 하는 단쇄지방산(short chain fatty acid)

분석시스템을 갖추고, 장내균총과의 상호관계에 관한 연구를 활발히 진행하고 있음(표 9).

표 9. 프로바이오틱스, 프리바이오틱스 동물의 장내세균에 미치는 영향 논문 발표

논문명	학술지	내용
Neogaroooligosaccharides modulate gut microbiota and alleviate body weight gain in high-fat diet induced obese rats	Functional Foods (2022)	Neogaroooligosaccharides에 의한 장내 미생물균총의 조절 및 비만과의 상관관계를 분석
<i>Cudrania tricuspidata</i> combined with <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> modulates gut microbiota and alleviate obesity-associated metabolic parameters in obese mice	Microorganisms (2021)	유산균 포함 혼합균주의 급여에 의한 장내균총의 변화 및 비만과의 상관관계 조사
Multispecies probiotics alter fecal short-chain fatty acids and lactate levels in weaned pigs by modulating gut microbiota.	J. Animal Science and Technology (2021)	프로바이오틱스 급여의 의한 돼지 장내균총 및 유기산 조성의 변화와 그 상관관계에 대해 조사
Protective effects of <i>Bacillus subtilis</i> against <i>Salmonella</i> infection in the microbiome of Hy-Line Brown layers	Asian-Aust. J. Anim. Sci. (2017)	<i>Salmonella</i> 를 공격접종한 산란계에서 <i>Bacillus subtilis</i> 급여가 장내균총 및 그 기능에 끼치는 효과 조사
Effects of <i>Bacillus subtilis</i> CSL2 on the composition and functional diversity of the faecal microbiota of broiler chickens challenged with <i>Salmonella Gallinarum</i>	J. Anim. Sci. Biotechnol. (2017)	<i>Salmonella</i> 를 공격접종한 육계에서 <i>Bacillus subtilis</i> CSL2의 급여가 장내균총 및 그 기능에 끼치는 효과 조사
Barcoded pyrosequencing-based metagenomic analysis of the faecal microbiome of three purebred piglines after cohabitation.	Appl. Microbiol. Biotechnol. (2015)	각기 다른 종의 돼지를 한 공간에서 사육하였을 때 균총의 변화를 비교

- 본 연구에서는 선행연구에서 제품화에 활용된 선발 미생물들의 연구내용을 기반으로 대표적인 사료의 질소원 원료인 대두박의 저분자화 생산기술을 적용하여 생체 내 질소 이용성을 증대시켜 효소 분비능이 낮은 어린 이유자돈용 복합 기능성 첨가제(저분자화(CP 54%이상), 생균제 및 효소제 기능)와 육성돈 이상 구간에서 사료 내 질소원의 이용성을 증대 또는 촉진시키는 경제적인 고상발효 기반 효소제를 개발하고자 함.
- 또한 상기 개발된 첨가제들의 *in vitro* 소화율 분석, 최신 마이크로바이옴 연구 및 대사체 분석을 통해 장내균총의 변화와 질소이용성 및 배출과 관련된 대사과정과 상관관계를 규명하여 차별화된 마케팅 자료를 구축하고자 함.

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 1) 이유자돈용 복합 사료첨가제 개발 및 제품화

#### (1) 선행연구에서 선발된 약취저감능 균주를 활용한 저분자화 단백질 대량생산연구

##### □ 발효 균주 선발

본 과제는 “유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 약취개선 기능성 미생물제제 개발 (2018. 04. 25 ~ 2021. 12. 31, 연구개발과제번호: 918001-4)” 후속 과제로 축산환경개선 효과가 우수한 균주들로 이유자돈용 복합 사료첨가제 개발 및 제품화를 진행하였다.

##### 가. 대두박 분해능 비교

선행연구에서 선발된 균주들을 이용하여 저분자화 단백질 생산 가능성을 확인하기 위해 대두박 발효 실험을 진행하였다. 선행 연구에서 선발된 균주 *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri* 각각의 전용배지를 이용하여 배양하였다. 바실러스 속(genus) 균주들은 TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) 배지, 유산균 속(genus) 균주들은 MRS (Difco) 배지를 이용하여 35℃의 온도조건에서 24시간 각각 배양하여 액상종균을 준비하였다. 고상발효 배지는 탈피 대두박을 이용하였고, 가수량을 40%로 조정한 후 121℃에서 15분 간 멸균하여 배지 내부의 오염균을 완전히 제거하였다. 멸균 후 실온까지 냉각한 다음 각 종균을 5% 접종하고 36℃의 발효온도에서 36시간 동안 발효를 진행하였다. 발효 후 각 샘플을 60℃에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 조단백질(CP)을 분석하였다. 조단백질은 단백질 측정기(RAPID N EXCEED, elementar)를 이용하여 Dumas 법으로 분석하였다. 분석 결과, *Bacillus licheniformis* 균주 처리구가 건물 기준 조단백질(DM CP) 함량이 가장 높았다(표 11).

표 10. 후보 균주

번호	균주명	기탁 번호
1	<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM 11599P
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KCCM 12612P
3	<i>Bacillus licheniformis</i>	KCCM 10874P
4	<i>Lactobacillus reuteri</i>	KCCM 10651P
5	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM-10670P

표 11. 대두박 발효물의 성분 비교분석

균주명	조단백질(%)	수분(%)	DM CP(%)
<i>Bacillus subtilis</i>	53.59	7.71	58.07
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	52.55	6.86	56.42
<i>Bacillus licheniformis</i>	54.33	7.34	58.63
<i>Lactobacillus reuteri</i>	51.42	9.09	56.56
<i>Lactobacillus brevis</i>	51.20	6.96	55.03

### 나. 단백질 저분자화 비교 분석

균주별 대두박 발효물의 저분자화 수준을 비교하기 위하여 상기 발효된 대두박의 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis, BIO-RAD) 분석을 진행하였다. 각 후보균주별 단백질 패턴을 분석한 결과, 바실러스 균주들에서는 분자량 25 kDa 이하로 저분자화 된 것을 확인할 수 있었다(그림 18). 위 결과를 바탕으로 조단백질 함량이 가장 높고 저분자화가 잘되는 *Bacillus licheniformis* (KCCM10874P) 균주를 최종적으로 선발하였다(그림 19). 최종 선발된 *Bacillus licheniformis* 는 “유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발(2018. 04. 25 ~ 2021. 12. 31, 연구개발과제번호: 918001-4)” 선행연구에서 개발된 퇴비부숙제용 제품인 “그린케어”에 활용된 균주로 악취저감 및 유기물 분해능이 우수한 균주이다.

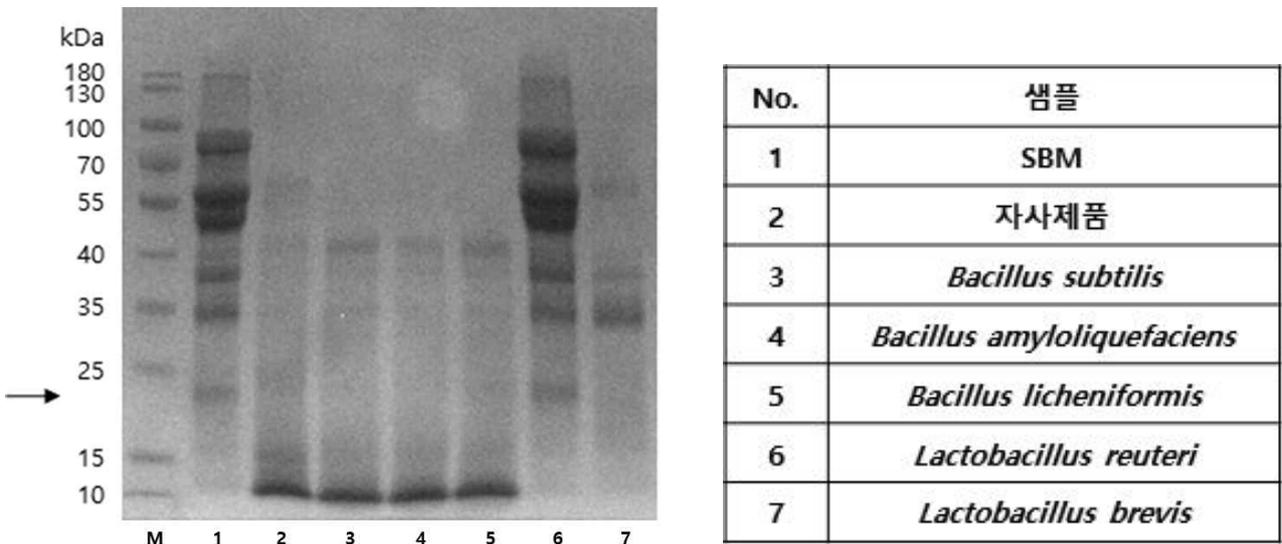


그림 18. 단백질 패턴 비교분석

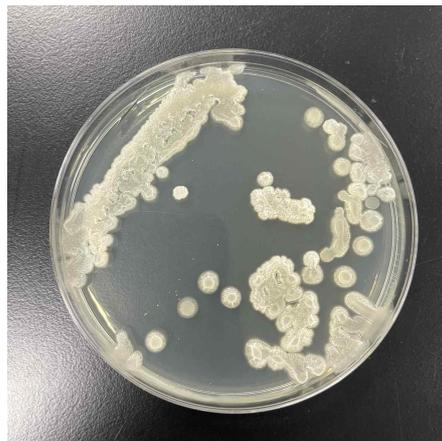


그림 19. *Bacillus licheniformis* (KCCM10874P)

### 다. 효소 활성 분석

선발된 *Bacillus licheniformis* 균주에 대한 protease (동물성, 식물성), amylase 및 cellulase 활성을 한천배지에서 기질분해능으로 평가하였다. 액체배지에 균주를 접종하여 35°C에서 130 rpm으로 24시간 진탕 배양하여 균주 배양액을 제조하였다. 그 후, 동물성 protease의 경우 skim milk 배지(skim milk, 10 g/L + agar powder, 15 g/L), 식물성 protease의 경우 isolated soy protein (ISP) 배지(ISP, 10 g/L + agar powder, 15 g/L), amylase의 경우 starch 배지(starch, 5 g/L + agar powder, 15 g/L), cellulase의 경우 carboxymethyl cellulose (CMC) 배지(CMC, 10 g/L

+ agar powder, 15 g/L)에 paper disk를 올린 후 배양액을 접종하였다. 각 배지는 35°C 에서 24 시간 배양 후, paper disk를 중심으로 생기는 둥근 투명한(clear zone)의 지름을 측정하여 효소 활성도를 평가하였다. 환의 지름이 0.5~1.0 cm인 경우 +, 1.0~1.5 cm인 경우 ++, 1.5 cm 이상인 경우 +++로 표기하였다. 분석 결과, skim milk, ISP, starch 배지 환의 지름이 1.5 cm 이상으로, protease 및 amylase의 분비능이 우수한 것으로 나타나 대두박을 이용한 단백질 저분자화 발효 공정에 적합할 것으로 기대되었다(표 12).

표 12. *Bacillus licheniformis* 균주의 효소활성도

효소	<i>Bacillus licheniformis</i> 균주 효소활성도*
동물성 protease	++
식물성 protease	+++
Amylase	+++
Cellulase	+

\*환의 지름 0.5~1 cm, +; 1~1.5 cm, ++; 1.5 cm 이상, +++

## □ 균주 배양특성 연구(Lab. test)

### 가. 액상발효 최적조건 실험

본 연구에서 사용된 *Bacillus licheniformis* 균은 TSB (tryptic soy broth, Difco) 액상배지에 접종 후 37°C, 130 rpm 조건으로 24시간동안 배양하여 액상종균을 제조하였다. 상기 배양액을 glycerol stock법으로 -70°C 조건의 초저온 냉동고에 보존하여 사용하였다.

### 이) Lab scale 발효 실험

선발된 균주 *Bacillus licheniformis* 의 액상발효 조건을 확인하기 위하여 jar-fermentor를 이용하여 성장곡선을 확인하였다. 액상종균을 제조하기 위하여 종균 stock을 50 ml TSB 배지에 접종한 다음 진탕배양기에서 37°C, 130 rpm 조건으로 24시간동안 배양하여 액상종균을 제조하였다. Jar-fermentor에 멸균한 TSB 배지를 넣고 상온까지 냉각한 다음 액상 종균 1%를 접종하여 배양을 진행하여 성장곡선을 확인하였다(그림 20). 확인 결과, 배양 16 ~ 18시간에 생균수가 가장 높았고, 20시간 이후부터는 균수가 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 위 결과로 대량생산배양 시 최적 배양 시간은 18시간으로 확립하였다.

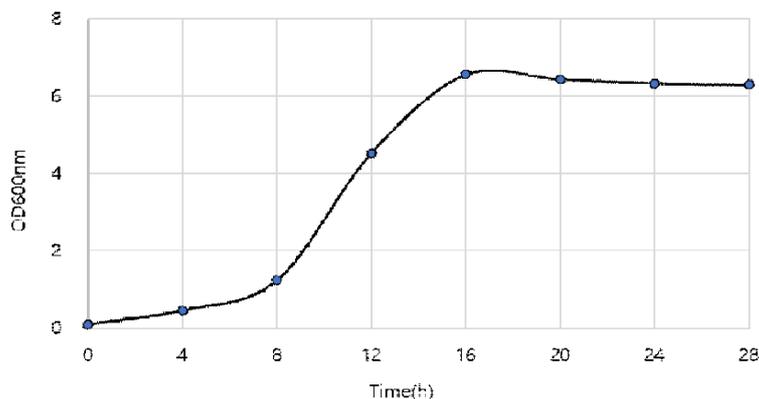


그림 20. *Bacillus licheniformis* 성장곡선

## ii) 생산용 액상배지 발효 실험

실험에 사용되는 소량 발효용 액상배지 조성은 산업적으로 사용하기에는 비용적인 측면에서 적합하지 않기 때문에 대량생산 시 보다 저렴하고 산업적으로 활용성이 높은 배지조성을 선정하고 이를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

산업적으로 널리 사용되는 2종의 액상배지 조성으로 발효실험을 진행하였다(표 13). *Bacillus licheniformis* 종균을 TSB 배지에 접종 후 37°C에서 130 rpm으로 24시간동안 배양하여 접종원을 준비하였다. 배지조성 별로 배지를 제조한 다음 각 배지에 1% 비율로 접종하고 37°C에서 130 rpm으로 24시간동안 배양하였다. 배양 완료 후 균수를 분석한 결과, 배지 2에서 가장 높은 균 성장을 보여 바실러스 균주의 대량생산용 액상배양배지로 선정하였다(표 14).

표 13. 바실러스균 액상발효용 배지 조성

배지 조성(%)	배지 1	배지 2
Yeast Extract	1.16%	1%
Bacto Peptone	-	2%
Sodium Acetate	-	-
Photassium Phosphate	-	0.20%
NaCl	0.58%	0.50%
Manganesse Chloride	-	0.01%
Magnesium Sulfate	-	0.01%
Glucose	1.16%	4%
Tween80	-	-

표 14. 배지 별 생균수 확인 결과

균주	균수(CFU/ml)	
	배지 1	배지 2
<i>Bacillus licheniformis</i>	8.83E+08	4.84E+09

## 나. 대두박 고상발효 최적 조건 실험

선발된 후보 균주 *Bacillus licheniformis*의 고상발효 조건을 확립하기 위하여 가수량, 발효온도, 발효시간, 및 종균 접종량 등을 확인하였다.

### i) 가수량

고상발효를 위한 최적 가수량을 확인하기 위하여 가수량 별로 발효를 진행하고 균수 변화를 확인하였다. *Bacillus licheniformis* 균주는 TSB 액체배지를 이용하여 37°C, 130 rpm에서 24시간 진탕 배양하여 균주 배양액을 제조하였다. 처리구별로 대두박에 가수량을 40%, 45%, 50%에 맞추어 가수한 다음 121°C에서 15분간 멸균하였다. 실온까지 냉각 후 종균을 5% 접종하여 48시간 발효를 진행하였다. 발효 후 각 샘플을 60°C에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다. 분석 결과, 가수량 40%, 45%에서는 큰 차이를 나타내지 않았으나, 50% 가수 시 균수가 저하되는 것을 확인할 수 있었다(그림 21). 바실러스 속 균주들은 호기성 균주로 가수량이 너무 높으면 곡물원료 입자 간의 공극이 수분에 의해 차단되어 혐기 조건이 형성되어 균 성장에 좋지 않은 영향을 끼친다. 건조 공정 및 원료 이동성을 고려하여 최적 가수량은 40%로 확립하였

다.

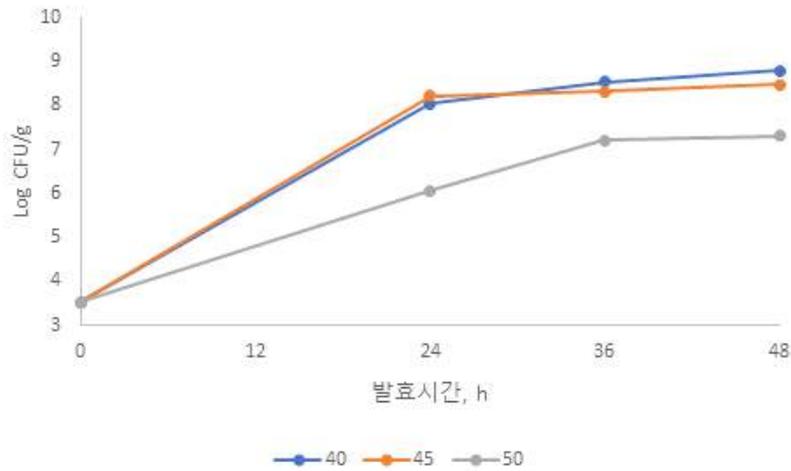


그림 21. 가수량에 따른 발효 생균수 비교

### ii) 종균 접종량

최적 종균 접종량을 확인하기 위하여 *Bacillus licheniformis* 균주를 TSB 액체배지를 이용하여 37°C, 130 rpm에서 24시간 진탕 배양하여 균주 배양액을 제조하였다. 탈피대두박 원료에 가수량을 40%로 하여 121°C에서 15분간 멸균하여 배지 내부의 오염균을 완전히 제거하였다. 실온까지 냉각 후 각 종균을 1%, 3%, 5%의 종균을 접종하여 36°C의 발효온도에서 48시간 발효를 진행하였다. 발효 후 각 샘플을 60°C에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다. 분석 결과 3% 접종 시 균수가 가장 높아 최적 접종량을 3%로 확립하였다(그림 22).

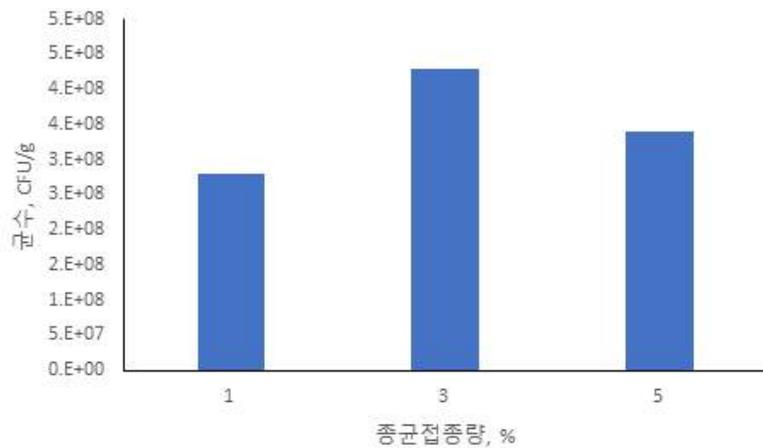


그림 22. 종균 접종량에 따른 균수의 변화

### iii) 발효 온도

최적 발효 온도를 확인하기 위하여 *Bacillus licheniformis* 균주를 TSB 액체배지를 이용하여 37°C, 130 rpm에서 24시간 진탕 배양하여 균주 배양액을 제조하였다. 탈피대두박 원료에 가수량을 40%로 하여 121°C에서 15분간 멸균하여 배지 내부의 오염균을 완전히 제거하였다. 실온까지 냉각 후 각 종균을 3% 접종하여 35°C, 40°C의 발효온도에서 48시간 발효를 진행하였다. 발효 후 각 샘플을 60°C에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다. 분석 결과 35°C, 40°C 처리 간 균수 차이가 거의 없어 경제성을 고려하여 최적 발효온도를 35°C로

결정하였다(표 15).

표 15. 발효 온도에 따른 균수의 변화(단위: CFU/g)

균주	발효온도, °C	
	35	40
<i>Bacillus licheniformis</i>	2.83.E+08	3.30.E+08

#### iv) 발효 시간

최적 발효 온도를 확인하기 위하여 *Bacillus licheniformis* 균주를 TSB 액체배지를 이용하여 37°C, 130 rpm에서 24시간 진탕 배양하여 균주 배양액을 제조하였다. 탈피대두박 원료에 가수량을 40%로 하여 121°C에서 15분 간 멸균하여 배지 내부의 오염균을 완전히 제거하였다. 실온까지 냉각 후 각 종균을 3% 접종하여 48시간 발효를 진행하였다. 발효 간 24, 36, 48시간차에 샘플링을 진행하여 60°C에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다. 분석결과, 36, 48시간에 균수차이는 거의 없어 36시간을 최적 발효 시간으로 결정하였다(표 16).

표 16. 발효 시간에 따른 선발 균주의 균수 변화(단위: CFU/g)

균주	발효 시간 (hr)		
	24	36	48
<i>Bacillus licheniformis</i>	2.1E+08	3.8E+08	4.3E+08

#### v) 건조 온도

최적 건조 온도를 확인하기 위해 이전 실험결과를 바탕으로 발효를 진행하였다. *Bacillus licheniformis* 균주를 TSB 액체배지를 이용하여 37°C, 130 rpm에서 24시간 진탕 배양하여 균주 배양액을 제조하였다. 탈피대두박 원료에 가수량을 40%로 하여 121°C에서 15분 간 멸균하여 배지 내부의 오염균을 완전히 제거하였다. 실온까지 냉각 후 각 종균을 3% 접종하여 35°C의 발효온도에서 36시간 발효를 진행하였다. 발효완료 후 40°C, 55°C 및 60°C에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다. 분석결과, 40°C 및 55°C에서 건조하였을 때가 60°C 건조에 비해 다소 높은 균수를 보였고, 40°C와 55°C 건조 간에는 차이가 거의 없었다(표 17). 건조 수율을 고려하여 최적 건조온도를 55°C로 결정하였다.

표 17. 건조 온도에 따른 균수 변화(단위: CFU/g)

균주명	건조 전	40°C 건조	55°C 건조	60°C 건조
<i>Bacillus licheniformis</i>	4.0E+08	3.0E+07	2.8E+07	2.0E+07

### □ 대량액상배양기를 이용한 대량액상배양 조건 실험(종균용)

선행 연구된 lab scale 생산조건들을 기준으로 대량생산 공정을 확립하였다. 대량액상 배양기를 이용하여 고상발효 종균을 배양하기 위해 *Bacillus licheniformis* 균주를 TSB 액상배지에 접종 후 37°C, 130 rpm 조건으로 24시간동안 배양하였다. 상기 배양액을 5 L TSB 배지에 10 % 접종 후 2차 배양한 다음 200 L 생산용 배지(표 18)에 접종 후 37°C, 100 rpm 조건으로 28시간 동안 배양하였다. 배양 시간별 균수 및 pH를 측정하여 배양 정도를 확인하였다(그림 23). 배양

결과, 균수 및 pH는 18시간 이후부터 변화가 크지 않아 성장을 완료한 것으로 보이나, 28시간 까지 균수는 다소 증가되었다. 위 결과로 대량생산 시 최적 배양시간은 18시간으로 결정하였다.

표 18. *Bacillus licheniformis* 생산용 배지 조성

원료명	Broth의 조성 (%)	200 L 기준 함량 (g)
Dextrose	1.5	3,000
Yeast extract	0.4	800
Soy peptone	0.2	400
NaCl	0.1	200
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1	200
C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NNaO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.5	1,000
MgSO <sub>4</sub>	0.1	200
MnSO <sub>4</sub>	0.01	20

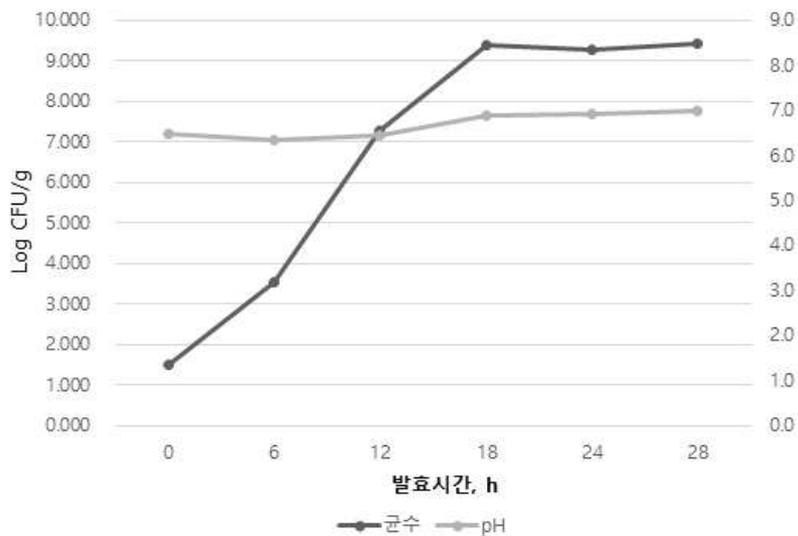


그림 23. 배양시간에 따른 *Bacillus licheniformis* 액상배양액의 균수, pH 변화

#### □ 고상발효 생산시설에서의 대량생산 조건 실험

선행 연구된 lab scale 생산조건들을 기준으로 대량고상발효 공정을 확립하였다(그림 24). 대량액상배양기를 이용하여 액상 종균을 배양하였고, 발효 배지인 탈피대두박의 증자 조건은 110℃, 30분으로 설정하였다. 가수량은 40%로 설정하였고, 종균 접종량은 배지 대비 3%, 발효 온도 및 시간은 35℃, 36시간으로 설정하였다. 발효 후 건조는 55℃에서 20시간 동안 진행하였다. 발효 시간 별로 샘플링을 진행하여 균수 및 pH를 측정하여 발효 정도를 확인하였다(그림 25). 최종 발효물은 조단백질 함량이 약 54.6%로 높은 함량을 보였으며, 균수는  $7.50 \times 10^7$  CFU/g, pH는 7.48로 확인되었다(표 19).



그림 24. 대량생산 발효 설비

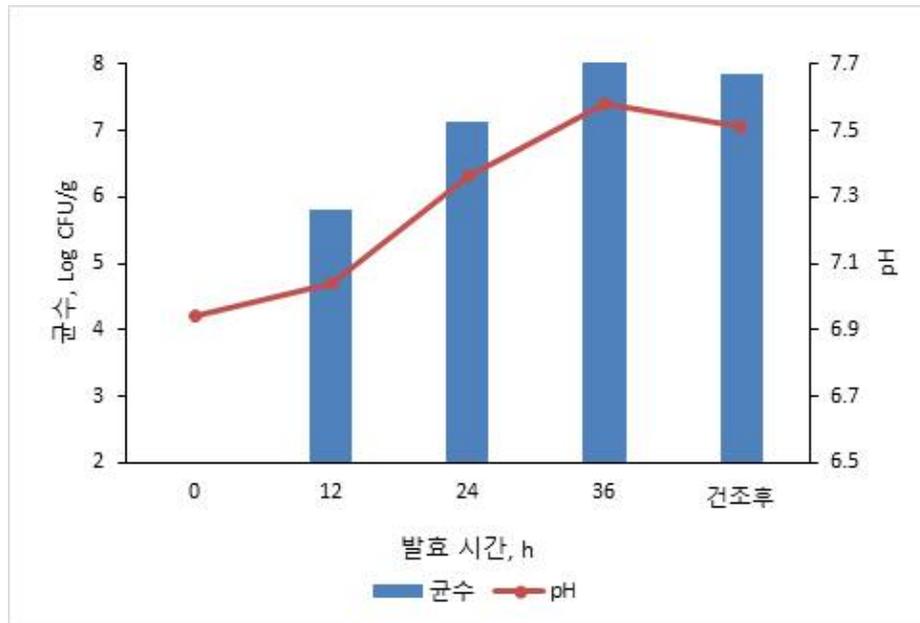


그림 25. 고상발효 시간에 따른 균수, pH 변화

표 19. 대량생산 발효물의 분석결과

균주명	조단백질(%)	수분(%)	pH	균수(CFU/g)
<i>Bacillus licheniformis</i>	54.60	7.29	7.48	$7.50 \times 10^7$

## (2) *In vitro* 제품 특성 연구

### □ *In vitro* 인공 소화액 실험을 이용한 저분자화 단백질의 특성 연구

단위동물의 입과 위, 소장에서 사료의 소화 패턴을 *in vitro* 상에서 확인하기 위해 *in vitro* 인공 소화액 실험(*in vitro* artificial gastrointestinal system, IvAGS)을 이용하여 실험을 실시하였다. 대두박, *Bacillus licheniformis* 발효 대두박(*Bacillus licheniformis* fermented soybean meal, BLF) 및 화학적 처리된 대두박(chemical treated soybean meal, CT), 총 4종의 시료를 각 100 g 씩 공시하여 실험을 진행하였다. IvAGS는 구강, 위, 소장 조건의 3개 단계로 나뉘며, 입 조건의 경우 구강 조건 buffer (NaCl 6.2 g/L, CaCl 2.2 g/L, KCl 2.2 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 1.2 g/L) 100 ml에서 5분 반응한다. 구강 조건 buffer에서 5분간 반응 후, 위 조건 buffer (pepsin 3.47 g/L, musin

7.37 g/L, HCl pH 3) 200 ml 추가 후 39°C에서 75분간 반응한다. 마지막으로 소장 조건을 위해 소장 조건 buffer A (NaHCO<sub>3</sub> 84 g/L, pancreatin 3.7 g/L, trypsin 0.2 g/L) 100 ml 및 소장 조건 buffer B (sodium succinate 13.5 g/L, bile extract 22.8 g/L) 700 ml를 추가하여 39°C에서 240분간 반응한다.

샘플링은 입 조건 반응 완료 후 1회, 위 조건 반응 완료 후 1회, 소장 조건 반응 1, 2, 3 시간 및 반응 완료 후 총 4회 진행하였다. 소화액 샘플 내 조단백질 함량 및 균수를 확인하여 소화 기관 및 시간에 따른 단백질 및 균수의 변화를 확인하였다(그림 26, 27).

일반 대두박의 IvAGS 분석 결과 중 위에서의 소화율을 100%로 놓고 데이터들을 상대적으로 비교분석하였다. 분석 결과 미생물에 의해 발효된 BLF의 소화율이 대두박에 비해 약 120%로 확인되었고, 화학적 처리된 CT의 소화율은 대두박과 큰 차이를 보이지 않았다. 이를 통해 미생물에 의해 발효된 대두박은 무처리 혹은 화학적 처리된 대두박에 비해 위에서 단위시간 당 더 많은 소화가 발생함을 예상할 수 있다. 결과적으로 발효를 통해서 저분자된 펩타이드 및 아미노산과 같은 영양소가 이유자돈의 소장에서 빠른 흡수되기에 유리한 조건으로 작용할 수 있을 것으로 판단된다.

균 분석 결과 최초 균수 약  $8.6 \times 10^7$  CFU/g로 확인되었고, 위 조건 반응 후 약  $5.2 \times 10^7$  CFU/g, 소장 4시간 반응 후 약  $3.8 \times 10^7$  CFU/g으로 균주의 위 조건에 대한 내산성 및 소장 조건에 대한 내담즙성이 높음을 확인할 수 있었다. 이를 통해 실제 급여 시 위 이후 장관에서의 높은 생존율을 기대할 수 있다.

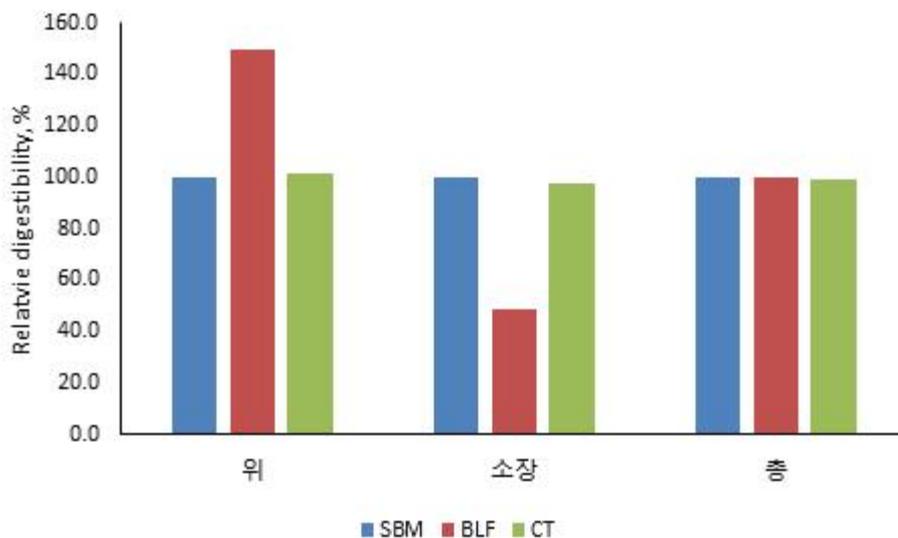


그림 26. *In vitro* 인공소화액 분석을 통한 3종류 대두박의 인공소화액 상대 소화율  
SBM, soybean meal; BLF, *Bacillus licheniformis* fermented soybean meal; CT, chemical treated soybean meal

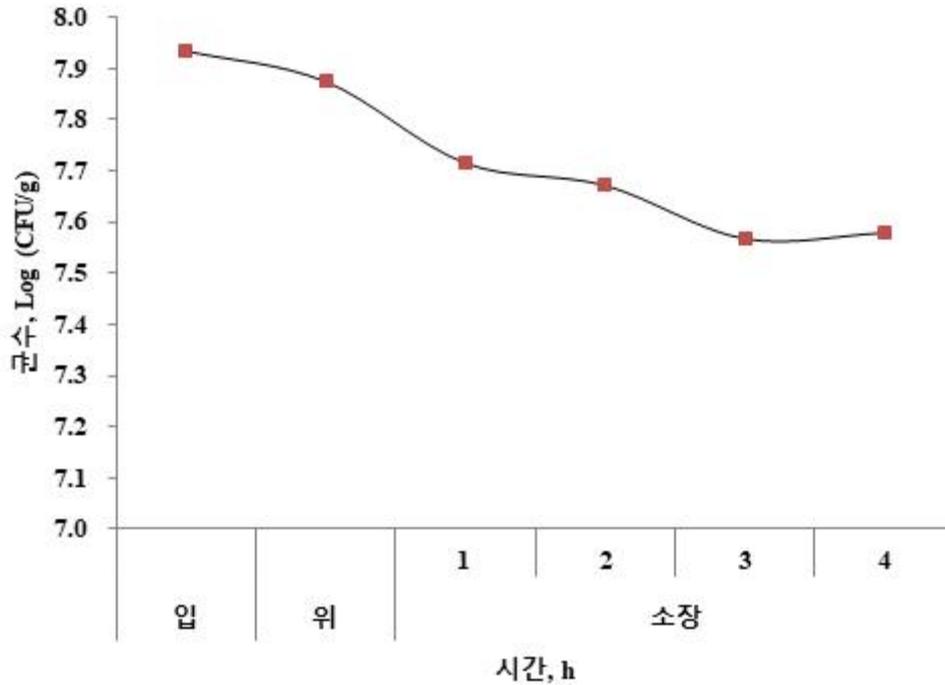


그림 27. *In vitro* 인공소화액 분석을 통한 발효대두박 미생물의 인공소화액 저항성

#### □ 제품 성분 비교 분석

개발 제품의 특성을 확인하기 위하여 조단백질 함량, pH, 수분 함량과 같은 성상 외에 수용성 단백질 함량, KOH 용해도, trypsin inhibitor (TI) 등을 분석하였다(표 20). 조단백질은 조단백질 분석기를 이용해 Dumas법으로 분석하였고, 수분은 수분 분석기(MX-50, AND)를 이용해 측정하였다. 균수는 샘플을 멸균증류수에 추출 후, 단계 희석하여 고체 LB 배지에 평판도말하여 측정하였고, pH 측정은 pH 미터(A211, ORION STAR)를 이용하였다. TI의 경우 AOCS method Ba 12-75에 따라 사료 내 TI의 총량과 잔존량을 측정하여 계산하였다.

분석 결과 일반 대두박에 비해 단백질 함량은 약 8% 증가하였고 수용성 단백질은 약 3배 증가하였고 TI 함량은 약 3.3배 감소하였는데, 이를 통해 이유자돈의 체내에서 단백질의 이용성 증대를 기대할 수 있다.

2곳의 외부 분석기관(대한사료협회, 대한단미사료협회)에 의뢰하여 제품 내 일반성분, 아미노산 및 효소 역가 등에 대한 분석을 의뢰하였다. 아미노산 분석 결과, 라이신(Lys), 메치오닌(Met) 및 트립토판(Try)의 함량이 증가하였다. 앞선 3가지 아미노산 성분들은 대두박/옥수수 위주의 사료 급여 시 제한 아미노산으로 작용할 수 있는 성분들이기 때문에, 함량의 증가로 인해 성장률에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다(표 21).

표 20. 개발제품의 특성 분석

사료명	조단백질 (%)	수분 (%)	pH	수용성 단백질 (%)	KOH 용해도 (%)	Trypsin inhibitor (mg/g)
발효 대두박	54.60	7.29	7.48	39.77	75.82	0.77
대두박	47.59	11.66	6.35	12.01	72.92	2.53

표 21. 대두박 사료 4종의 일반성분, 아미노산 및 효소역가 외부 분석치(분석 기관: 대한사료협회, 단미사료협회)

Items **	샘플명 *			
	SBM	FF	BLF	CT
DM, %	88.27	90.37	91.25	90.99
CP, %	48.34	53.75	54.98	54.12
EE, %	1.20	1.05	2.11	0.75
CF, %	3.46	3.34	4.19	3.83
Ash, %	5.99	6.68	7.19	6.84
Amino acids, %				
Asp	5.76	6.06	5.73	6.25
Thr	1.91	2.04	1.88	2.09
Ser	2.26	2.43	2.05	2.49
Glu	8.48	8.88	9.99	9.22
Gly	2.01	2.16	2.19	2.20
Ala	2.07	2.21	2.33	2.24
Val	2.22	2.38	2.52	2.39
Iso-Leu	2.21	2.38	2.40	2.39
Leu	3.74	4.02	4.03	4.06
Tyr	1.56	1.67	1.81	1.74
Phe	2.43	2.61	2.81	2.63
Lys	3.03	3.00	3.13	3.08
His	1.22	1.25	1.32	1.31
Arg	3.46	3.47	2.99	3.63
Cys	0.81	0.84	0.95	0.82
Met	0.64	0.66	0.76	0.70
Pro	2.55	2.66	3.10	2.75
Enzyme, u/g				
α-amylase	N/A	76.85	103.02	N/A
Protease acid	17.34	22.55	20.39	41.92
Protease neutral	16.96	94.62	189.39	24.32

\*SBM, soybean meal; FF, fungi fermented soybean meal; BLF, *Bacillus licheniformis* fermented soybean meal; CT, chemical treated soybean meal

\*\*일반성분 및 amino acid, 단미사료협회와 대한사료협회 분석 결과의 평균치; enzyme, 단미사료협회 분석 결과

\*\*\*N/A, not analyzed

#### □ SDS-PAGE 및 peptide gel 전기영동을 활용한 단백질 패턴 분석

저분자화된 단백질의 분자량 패턴을 분석하기 위해 SDS-PAGE와 peptide gel 전기영동 분석법을 활용하였다. 분석에 앞서 PBS (phosphate buffered saline)을 이용해 30분간 각 샘플들의 용해 단백질을 추출하였다. 이후, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취해 용해된 단백질의 양을 BCA assay (Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, USA)를 이용해 정량하였다. 정량 후, 추출액의 단백질 농도가 4 mg/ml가 되도록 희석 후 SDS-PAGE 버퍼와 1:1로 혼합해 최종적으로 2 mg/ml의 농도가 되도록 하였다. SDS-PAGE를 위한 gel의 well에 20 µl씩 분주 후, 단백질을 분리하였다. 이후, staining buffer에서 1시간, destaining buffer에서 1시간

반응하였다.

SDS-PAGE 분석 결과, 가공되지 않은 대두박은 대부분 분자량 37 kDa 이상의 단백질이 분포하였고, 화학적 처리된 대두박의 경우 25 kDa 이상의 분자량을 갖는 단백질이 많이 분포함을 확인할 수 있었다(그림 28). 이에 비해 *Bacillus licheniformis* 발효 대두박의 경우 대부분의 단백질이 분자량 10 ~ 20 kDa 내외로 저분자화 된 것을 확인할 수 있었다. 또한 peptide gel 분석 결과에서 역시 대두박과 화학적 처리된 대두박의 경우 25 kDa 이상에 대부분의 펩타이드가 분포하는 반면, *Bacillus licheniformis* 발효 대두박의 경우 25 kDa 이하에 펩타이드가 많이 분포하는 것을 확인하였다(그림 29).

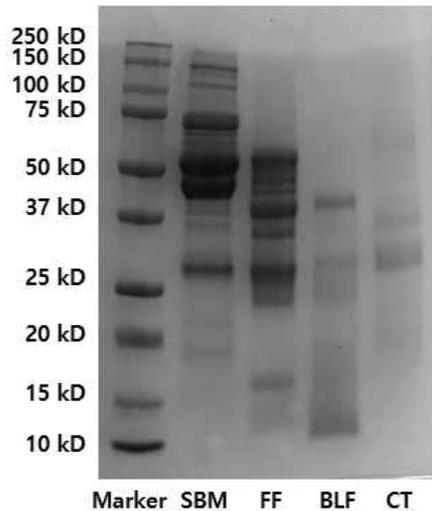


그림 28. SDS-PAGE 상 분석된 대두박 사료 4종의 저분자화 단백질 패턴  
SBM, soybean meal; FF, fungi fermented soybean meal; BLF, *Bacillus licheniformis* fermented soybean meal; CT, chemical treated soybean meal

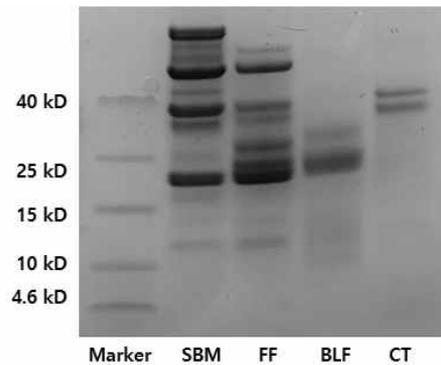


그림 29. Peptide gel 상 분석된 대두박 사료 4종의 저분자화 단백질 패턴  
SBM, soybean meal; FF, fungi fermented soybean meal; BLF, *Bacillus licheniformis* fermented soybean meal; CT, chemical treated soybean meal

### (3) 사양실험용 샘플제조

#### □ 사양실험용 시제품 생산

선행 연구된 대량생산 조건들을 기준으로 사양실험용 시제품을 생산하였다. 액상배양기를 이

용하여 액상 종균을 배양하였고, 발효배지인 탈피대두박에 40% 함량으로 가수하여 110℃, 30분 간 증자를 진행하였다. 실온까지 냉각한 다음 배지 대비 3% 비율로 종균 접종하고 발효온도 35℃로 36시간 동안 발효를 진행하였다. 발효 후 건조는 55℃에서 20시간 동안 진행하였다.

### □ 생산 SOP 및 품질 분석 기준 수립

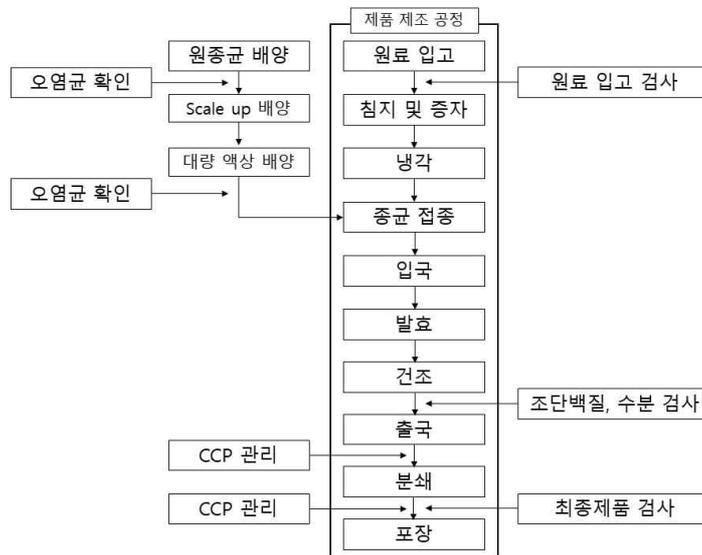
앞선 발효 실험에서 확인된 제품의 특성을 기준으로 품질기준을 수립하였다. 생산설비 내에서 시험발효를 3회 진행하여 평균적인 품질을 확인하여 품질기준으로 설정하였다(표 22, 23). 새롭게 개발된 제품의 효율적인 품질관리를 위해 위해요소 분석 및 중요관리점 분석(hazard analysis and critical control points, HACCP)을 수행하였다. ISO 9001 및 FAMI-QS (feed additives and pre-mixtures quality system)에서는 제품의 원료입고 단계에서부터 최종제품에 이르기까지 전 과정에서 품질 관리 기준을 설정하고 제조공정 상에서 중요관리점(critical control points, CCP)을 확인하여 지속적인 점검 및 관리, 개선조치를 진행할 것을 명시하고 있다. 신규 제품에 대한 제조공정도를 작성하고 제조공정 상에서의 중요관리점을 확인하여 점검 기준을 확립하였다(그림 30).

표 22. 생산설비 내 시험발효 분석

발효회차	수분(%)	조단백질(% DM)	pH	수용성 단백질(%)	KOH 용해도(%)
1	7.29	54.60	7.48	40.50	75.82
2	7.40	54.44	7.51	39.42	77.26
3	7.98	53.80	7.44	39.71	75.72

표 23. 개발제품의 품질기준 설정

조단백질	수분	pH	수용성 단백질	KOH 용해도
52% 이상	10% 이하	7.0 이상	35% 이상	70% 이상



- CCP : 금속 이물질 검출, CCP 관리 : 마그네트 점검

그림 30. 제품 제조공정 및 중요관리 지점 분석

(4) 이유자돈용 복합 사료첨가제의 사양실험 및 이를 기반으로 장내 균총 및 단쇄지방산 조절능 DB 구축

□ 시험동물 및 시험설계

가. 공시동물 : 3원교잡 [L x Y] x D] 이유자돈 200두

나. 실험기간 : 6주

다. 처리구 : 8처리구, 처리당 5반복, 펜당 5두

처리구*	Treatments			
	1단계(2주)		2단계(4주)	
	CP(%)	Lys(%)	CP(%)	Lys(%)
SBM	20	1.5	18	1.35
BLF	18	1.5	16	1.35
FF	18	1.5	16	1.35
CT	18	1.5	16	1.35

\*SBM, soybean meal; BLF, *Bacillus licheniformis* fermented soybean meal; FF, fungi fermented soybean meal; CT, chemical treated soybean meal

라. 사양실험

생산성	영양소 소화율	마이크로바이옴
2주, 6주	2주, 6주	1주, 5주

□ 시험사료와 사양관리

사양실험은 공주시에 위치한 단국대학교 시험농장에서 실시하였다. 시험사료는 NRC (2012) 요구량에 따라 배합한 옥수수-대두박 위주의 사료를 사용하였다. 시험사료는 시험농장에 위치한 배합기를 이용하여 준비하였고 자유 채식토록 하였으며, 물은 자동급수기를 이용하여 자유로이 마실 수 있도록 조절하였다(그림 31).



그림 31. 사양실험을 위한 단국대학교 시험농장(공주시)

## □ 조사항목 및 방법

### 가. 생산성 (Growth performance)

일당증체량, 일당사료섭취량, 사료요구율은 시험 개시, 시험 2주차 및 시험 종료 시(6주)에 각 개체 별로 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 체중측정 시 사료 급여량에서 잔량을 제하여 계산하였고, 사료요구율은 사료섭취량을 일당증체량으로 나누어 산출하였다.

사료 BLF (*Bacillus licheniformis* fermented soybean meal)의 첨가 급여가 이유자돈, 육성돈 및 비육돈의 생산성에 미치는 영향은 표 16에 나타내었다. 시험 6주 체중, 일당증체량 및 사료 효율에 있어 BLF 처리구가 CT (chemical treated soybean meal) 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 시험 종료 시 (6주) 일당증체량에 있어 BLF 처리구가 대조구(SBM) 및 FF (fungi fermented soybean meal)와 CT 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 또한 전체 시험기간동안 사료효율에 있어 BLF와 FF 처리구는 SBM와 CT에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 따라서, BLF의 첨가는 라이신 함량을 보완한 낮은 조단백질 사료에서 대조구에 대비해 체중과 일당증체량의 차이를 보이지 않았다. 또한, BLF의 사료첨가는 사료효율에 있어서 대조구 및 다른 처리구에 대비해 가장 좋은 결과를 나타내었다(표 24).

표 24. The effect of dietary soybean meal source<sup>1</sup> on growth performance in weaning pigs

Items	SBM	BLF	FF	CT	SEM <sup>2</sup>	P-value
Body weight, kg						
Initial	5.31	5.31	5.31	5.31	0.04	1.000
Week 2	9.66	9.87	9.58	9.51	0.21	0.639
Week 6	21.72 <sup>ab</sup>	22.83 <sup>a</sup>	21.66 <sup>ab</sup>	21.01 <sup>b</sup>	0.45	0.035
Week 0 - Week 2						
ADG, g	310	326	305	300	10.09	0.287
ADFI, g	403	417	401	394	14.30	0.752
FCR	1.29	1.28	1.32	1.32	0.03	0.719
Week 2 - Week 6						
ADG, g	430 <sup>ab</sup>	463 <sup>a</sup>	431 <sup>ab</sup>	410 <sup>b</sup>	12.44	0.027
ADFI, g	695	721	708	681	19.70	0.554
FCR	1.62	1.56	1.65	1.66	0.03	0.085
Overall						
ADG, g	391 <sup>b</sup>	417 <sup>a</sup>	389 <sup>b</sup>	374 <sup>b</sup>	9.62	0.013
ADFI, g	549	569	555	538	12.59	0.388
FCR	1.41	1.36	1.43	1.44	0.027	0.058

<sup>1</sup>SBM, soybean meal; BLF, *Bacillus licheniformis* fermented soybean meal; FF, fungi fermented soybean meal; CT, chemical treated soybean meal

<sup>2</sup>Standard error of means.

### 나. 영양소 소화율 (Nutrient Digestibility)

영양소 소화율은 시험 종료 시 (6주)에 산화크롬 (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)을 표시물로서 0.5% 첨가하여 7일간 급여 후 항문 마사지법으로 분을 채취하였다. 채취한 분은 60℃의 건조기에서 72시간 건조시킨 후 Willey mill로 분쇄하여 분석에 이용하였다. 사료의 일반성분과 표시물로 혼합된 Cr은 AOAC (2000)의 방법에 준하여 분석하였다.

사료 내 BLF의 첨가 급여가 이유자돈의 영양소 소화율에 미치는 영향은 표 25에 나타내었다. 시험 2주차 및 종료 시 (6주) Dry matter, Nitrogen, Digestible energy의 소화율에 있어 모든 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다 ( $P > 0.05$ ).

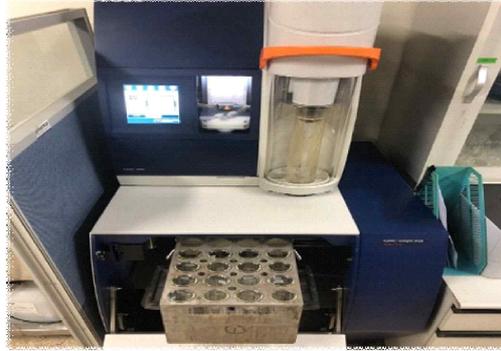


그림 32. 질소 소화율 측정을 위한 켈달 측정기

표 25. The effect of dietary soybean meal source<sup>1</sup> on nutrient digestibility in weaning pigs

Items, %	SBM	BLF	FF	CT	SEM <sup>2</sup>	P-value
Week 2						
Dry matter	88.39	90.12	89.16	88.52	0.65	0.273
Nitrogen	81.35	82.14	81.86	81.72	0.22	0.144
Energy	87.75	87.75	87.00	86.88	0.47	0.428
Week 6						
Dry matter	84.88	85.92	85.05	84.64	0.54	0.392
Nitrogen	77.97	79.08	78.73	78.17	0.47	0.307
Energy	84.26	84.63	83.68	83.84	0.4	0.368

<sup>1</sup>SBM, soybean meal; BLF, *Bacillus licheniformis* fermented soybean meal; FF, fungi fermented soybean meal; CT, chemical treated soybean meal

<sup>2</sup>Standard error of means.

#### 다. 분 내 악취물질

분 내 악취 물질 분석을 위해 시험 2주차 및 종료 시 (6주)에 각 처리구에서 동일한 시간 동안 배설된 분을 채취한 후, 신선한 분 300g을 취하여 2,600mL의 밀봉된 플라스틱 용기에 넣고 실온에서 7일간 발효 및 보관한 후 NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, Methyl mercaptan, Acetic acid 및 CO<sub>2</sub>은 복합가스 측정기(MultiRAE Lite model PGM-6208, RAE, USA)을 사용하여 측정하였다.

사료 내 BLF의 첨가 급여가 이유자돈의 분 내 악취물질에 미치는 영향은 표 26에 나타내었다. 시험 2주차 이유자돈의 분 내 Acetic acid와 CO<sub>2</sub>농도에 있어 BLF와 CT 처리구가 대조구 및 FF 처리구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 그리고 시험 종료 시 (6주) 이유자돈 분 내 NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, Acetic acid 및 CO<sub>2</sub>의 농도에 있어 BLF와 FF 처리구가 대조구 및 CT 처리구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 분 내 Methyl mercaptans의 농도는 2주차와 6주차 모두에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. BLF의 첨가는 분내 악취물질의 생산을 효과적으로 제한하였다.

표 26. The effect of dietary soybean meal source<sup>1</sup> on noxious gas emission in weaning pigs

Items, ppm	SBM	BLF	FF	CT	SEM <sup>2</sup>	P-value
Week 2						
NH <sub>3</sub>	1.23	1.23	1.22	1.21	0.13	0.999
H <sub>2</sub> S	1.53	1.55	1.66	1.60	0.37	0.246
Methyl mercaptans	2.80	2.40	3.00	2.50	0.24	0.325
Acetic acid	7.30 <sup>a</sup>	5.60 <sup>b</sup>	6.70 <sup>a</sup>	5.70 <sup>b</sup>	0.28	0.002
CO <sub>2</sub>	10160 <sup>b</sup>	9400 <sup>b</sup>	10120 <sup>a</sup>	9460 <sup>b</sup>	190.35	0.022
Week 6						
NH <sub>3</sub>	2.10 <sup>a</sup>	1.00 <sup>b</sup>	1.26 <sup>b</sup>	2.00 <sup>a</sup>	0.18	0.002
H <sub>2</sub> S	2.14 <sup>a</sup>	0.90 <sup>b</sup>	1.28 <sup>b</sup>	1.87 <sup>a</sup>	0.13	<.0001
Methyl mercaptans	3.20	2.60	2.83	3.21	0.20	0.129
Acetic acid	7.20 <sup>a</sup>	5.50 <sup>b</sup>	6.00 <sup>b</sup>	7.00 <sup>a</sup>	0.23	0.001
CO <sub>2</sub>	10500 <sup>a</sup>	10340 <sup>a</sup>	9300 <sup>b</sup>	10420 <sup>a</sup>	285.12	0.036

<sup>1</sup>SBM, soybean meal; BLF, *Bacillus licheniformis* fermented soybean meal; FF, fungi fermented soybean meal; CT, chemical treated soybean meal

<sup>2</sup>Standard error of means.

## (5) 이유자돈 사양실험을 기반으로 장내 균총 및 단쇄지방산 조절능 DB 구축

### □ 생균제 및 효소제에 의한 장내균총 및 단쇄지방산 조절능 분석

- 사양실험 시작 및 종료시점에 시료(분변)을 확보함.
- Physical disruption을 이용하는 QiaAMP PowerFecal® DNA Isolation Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 시료로부터 metagenomic DNA를 추출하며, UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 농도와 순도를 확인한 후에, 1.5% (w/v) agarose gel에 전기영동을 통하여 DNA의 순도를 검증함.
- 시료 내의 세균이 공통적으로 보유하고 있는 16S rRNA 유전자 내의 hyper-variable region 중에서 V3-V4 region을 PCR 방법으로 증폭한 후에, Illumina MiSeq 플랫폼을 이용하여 sequencing함.
- 데이터 분석프로그램인 Mothur에서 Bellropon method를 사용하여 sequence data에 포함되어 있는 chimera 시퀀스를 제거한 후에, 분석에 충분한 read 수를 확보했는지를 확인함.
- QIIME2(Quantitative Insights Into Microbial Ecology) pipeline을 기반으로 장내균총을 분석함.
- 다양성( $\alpha$ -diversity) 분석은 ‘q2-phylogeny’와 ‘q2-diversity’를 사용하며, SILVA 138\_99 데이터베이스를 참조하여 분석함.
- 각 그룹간의 균총 조성의 차이를 비교하기 위해, Principal Coordinates Analysis (PCoA) 분석을 실시함.
- PICRUSt2를 사용하여 function 분석을 진행하며, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)를 사용하여 각 그룹 간의 대사경로 차이를 비교 평가함.
- Network 분석을 위해, CoNet, Cytoscape 프로그램을 이용하여 Co-occurrence map을 작성함.
- 시료의 단쇄지방산(acetate, propionate, butyrate) 함량은 HPLC를 사용하여 분석하며, 기본적인 분석조건은 다음의 표에서 보는 바와 같음.

#### 가. 분변시료의 확보와 수분함량 및 pH 측정

- 분변시료는 각각 사양실험 개시 1주, 5주 후 확보하여  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하며 추후 분석에 사용함.
- 분변시료의 수분 함량은 moisture analyzer(Kett, USA)를 사용해 측정하였고, 분변 pH는 portable pH meter(LAQUAtwin, Horiba, Japan)을 사용해 측정함.

#### 나. 대사체(Short chain fatty acid, Branched chain fatty acid 및 lactate) 농도의 측정

- 분변시료의 Short chain fatty acid (SCFA), Branched chain fatty acid (BCFA), 및 lactate 농도는 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용해 앞선 연구의 방법을 참고해 분석함(Q. Zhang et al., 2022, *Front. Vet. Sci.*).
- 간략하게, 0.5g의 분변과 점막 시료를 1ml의 증류수에 부유시켜 3분간 vortex함. 시료는 이후  $15,000 \times g$ 로 15분간 원심분리 하였고, 상등액을 회수한 뒤  $0.22 \mu\text{m}$  PTFE syringe filter로 filtration 함. 유기산 농도의 측정에는 Agilent Infinity 1260 HPLC System(Agilent, USA), CarboMix H NP10 column( $300 \times 7.8\text{mm}$ ; Sepax, USA), 그리고 RI, UV detectors ( $\lambda = 210 \text{ nm}$ )를 사용함. 샘플은 autosampler를 이용해  $10 \mu\text{l}$ 씩 주사하였고,  $0.005\text{M H}_2\text{SO}_4$ 이동상을 사용해 flow rate  $0.6\text{ml/min}$ 으로  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 35분간 분석함.

#### 다. DNA 추출 및 16s rRNA 유전자의 염기서열 분석

- 시료의 genomic DNA는 QiaAmp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용해 제조사의 안내대로 추출하였고, 추출한 DNA의 순도는 SpectraMax M2 spectrophotometer (Molecular Devices, USA)를 사용해 확인함.
- PCR을 통한 증폭에는 16S rRNA 유전자의 V3-V4 초가변 영역에 맞는 primer를 사용하였고, PCR 조건은 아래와 같음:  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 initial denaturation 하였고, 이후 30회 동안  $94^{\circ}\text{C}$ , 30초 denaturation,  $55^{\circ}\text{C}$ , 45초 annealing,  $72^{\circ}\text{C}$ , 1분30초 extension을 반복함. 증폭한 유전자는 NucleoSpin Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Dueren, Germany)를 사용해 제조사의 안내대로 정제함.
- 정제한 DNA는 Illumina Truseq DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, California)를 사용해 library를 제작하였고, 이후 각 시료는 Illumina Miseq platform (MiSeq Reagent Kit v2)를 사용해 sequencing함. 증폭과 V3-V4 초가변영역의 sequencing은 CJ BioScience, Inc. (Seoul, Republic of Korea)에서 진행함.
- Raw sequence 데이터는 SILVA 138\_99 database를 기반으로 Quantitative Insights Into Microbial Ecology pipeline (QIIME2)를 이용해 분석함(Bolyen et al., 2019, *Nat. Biotechnol.*). ‘Cutadapt’ plugin을 사용해 Raw sequence에서 Primer와 adapter sequence를 제거함 (Martin, 2011, *EMBnet.Journal*). Sequence의 품질관리는 DADA2를 사용해 이루어짐(Callahan et al., 2016, *Nat. Methods*).
- 계통발생학적 다양성은 ‘q2-phylogeny’와 ‘q2-diversity’를 사용해 분석함. Alpha와 beta diversity 및 상대적 풍부도는 R program(v.4.0.2; R Core Team 2020)의 ‘ggplot2’를 사용해 시각화 함. 풍부도 차이 분석은 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 사용함 (Segata et al., 2011, *Genome Biol.*).
- 장내균총의 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 기능적 경로 예측을 위해 (level 1과 2), Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States(PICRUSt2) standalone pipeline를 이용해 PICRUSt를 진행함(Langille et al., 2013, *Nat*

*Biotechnol.*

- 장내균총과 유기산 농도 사이의 상관관계는 Pearson correlation coefficient를 분석함, R program의 ‘Hmisc’ 과 ‘pheatmap’ 을 사용해 시각화 함. Co-occurrence network는 Cytoscape program(v.3.8)의 CoNet plugin을 사용해 분석함.

## □ 수행내용

### 가. 분변 시료의 수분함량 및 pH

- 각 처리구의 수분 함량과 pH를 측정해 나타냄(표 27). CP의 증가와 같은 사료 조성의 변화에 따라, 돼지에서 설사와 같은 증상이 발생할 수 있음(Liu et al., 2022, *Front. Immunol.*). 본 연구에서, 각 처리구의 분변 수분은 유의적인 차이를 보이지 않았음( $p > 0.05$ ).

표 27. Moisture content and pH of fecal samples.

Items	Treatments (n=25) <sup>1</sup>			p-value <sup>2</sup>
	SBM	CT	BLF	
Moisture, %	22.52 ± 3.92	21.63 ± 4.56	23.04 ± 1.87	0.62
pH	6.49 ± 0.28	6.29 ± 0.33	6.35 ± 0.42	0.15

<sup>1</sup> Values are reported as mean ± standard deviation (SD)

<sup>2</sup> p-values are calculated using Kruskal-Wallis test

### 나. 시료의 유기산 농도 분석

- 장내균총에 의해 유도된 SCFA, BCFA와 같은 대사물질은 균총과 숙주 간 상호작용에 관여함. Acetate, butyrate, propionate, valerate와 같은 SCFA는 장내균총이 탄수화물 및 아미노산을 발효시켜 생산함(Rios-Covian et al., 2020, *Frontiers in Microbiology*). 한편, isobutyrate isovalerate와 같은 BCFA는 개체가 섭취한 단백질로부터 생산됨(Davila et al., 2013, *Pharmacol. Res.*). 이러한 대사물질은 소화기의 건강을 유지하는데 중요한 역할을 담당함.
- 사료 내 CP의 수준차이 및 첨가제의 급여가 소화기의 유기산 수준에 영향을 끼쳤는지를 알아보기 위해, SCFA, BCFA, lactate 수준을 측정하여 표 28, 그림 33에 나타냄.
- Lactate와 propionate는 SBM에 비해 CT 처리구에서 유의적으로 증가했으나( $p < 0.05$ ), BLF 처리구에서는 그렇지 않았음.
- Acetate와 butyrate는 CT 처리구에서 다른 처리구에 비해 높게 나타내는 경향을 보임.
- 한편, CT, BLF 처리구의 lactate, acetate, propionate, butyrate 수준이 SBM 그룹보다 평균적으로 높게 나타남. 그러나, 다른 연구에서 사료내 CP 수준의 감소는 이러한 대사물질을 감소시키는 것으로 나타남(Fan et al., 2017, *Sci. Rep.*; Luise et al., 2021, *Ital. J. Anim. Sci.*). 따라서, CT와 BLF 처리구에서 이러한 대사물질이 감소하지 않는 것은 CP 수준과 별개로 작용하는 요소에 의한 것일 수 있음.
- 마지막으로, valerate, isobutyrate, isovalerate농도에는 유의적인 차이가 없었음.

표 28. Fecal organic acid (SCFA, BCFA, and lactate) determination.

Items, $\mu\text{M}$ per dry weight	Treatments (n=25) <sup>1</sup>			p-value <sup>2</sup>
	SBM	CT	BLF	
Lactate	0.48 $\pm$ 0.63a	0.87 $\pm$ 0.73b	0.83 $\pm$ 0.92	0.04
SCFA				
Acetate	11.53 $\pm$ 14.05	20.74 $\pm$ 13.67	17.76 $\pm$ 17.17	0.07
Propionate	68.63 $\pm$ 40.63a	99.76 $\pm$ 41.41b	81.12 $\pm$ 48.26	0.04
Butyrate	2.23 $\pm$ 2.62	4.05 $\pm$ 3.63	3.65 $\pm$ 3.28	0.12
Valerate	22.74 $\pm$ 54.63	12.66 $\pm$ 16.27	31.32 $\pm$ 59.21	0.57
BCFA				
Isobutyrate	0.35 $\pm$ 1.74	1.18 $\pm$ 5.53	0.07 $\pm$ 0.28	0.74
Isovalerate	0.91 $\pm$ 1.23	0.75 $\pm$ 1.06	1.05 $\pm$ 1.2	0.56

<sup>1</sup> Values are reported as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

<sup>2</sup> p-values are calculated using Kruskal-Wallis test. Different superscripts denote significant difference. Abbreviations: SCFA, short-chain fatty acid; BCFA, branched-chain fatty acid.

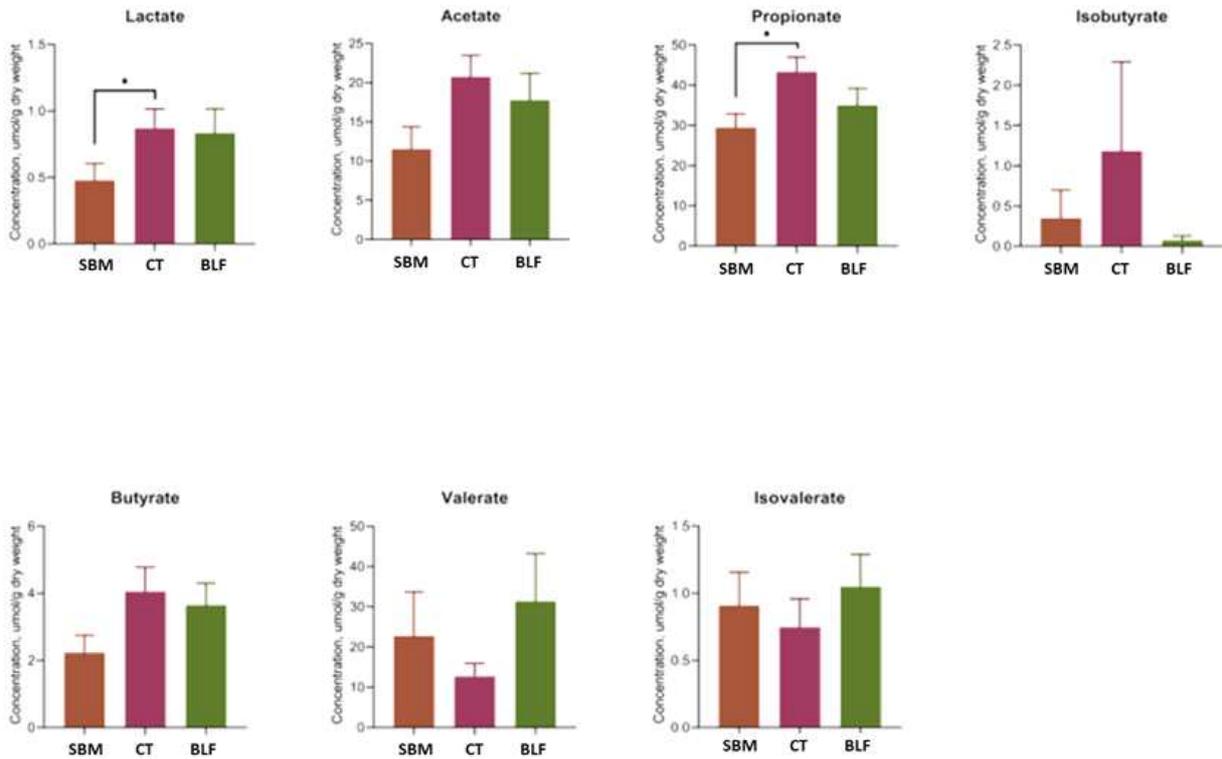


그림 33. Fecal organic acid (SCFA, BCFA, and lactate) determination(Week 5).

#### 다. 이유자돈의 장내균총 분석

##### i) 시료의 분석 적합도 확인 및 분석 데이터의 처리

[Metagenomic DNA 분리 및 분석 적합도 확인]

- 분변시료로부터 metagenomic DNA(mDNA)를 분리하여 agarose gel 전기영동을 실시함으로써 mDNA의 quality를 확인함(그림 34). UV spectrophotometer를 이용하여 DNA의 농도/순도를 측정하였으며, DNA 농도가 20ng/ $\mu\text{l}$  이상, 순도는 A280/260 비율이 1.8 이상 되는 것을 확인한 후에 NGS 분석에 사용함. 16S rRNA 유전자를 타겟으로 하는 primer를 이용한 PCR을 실

시하여 예상된 크기의 DNA가 증폭되는 것을 확인함으로써, 분리된 DNA의 PCR 유효성을 검증함.

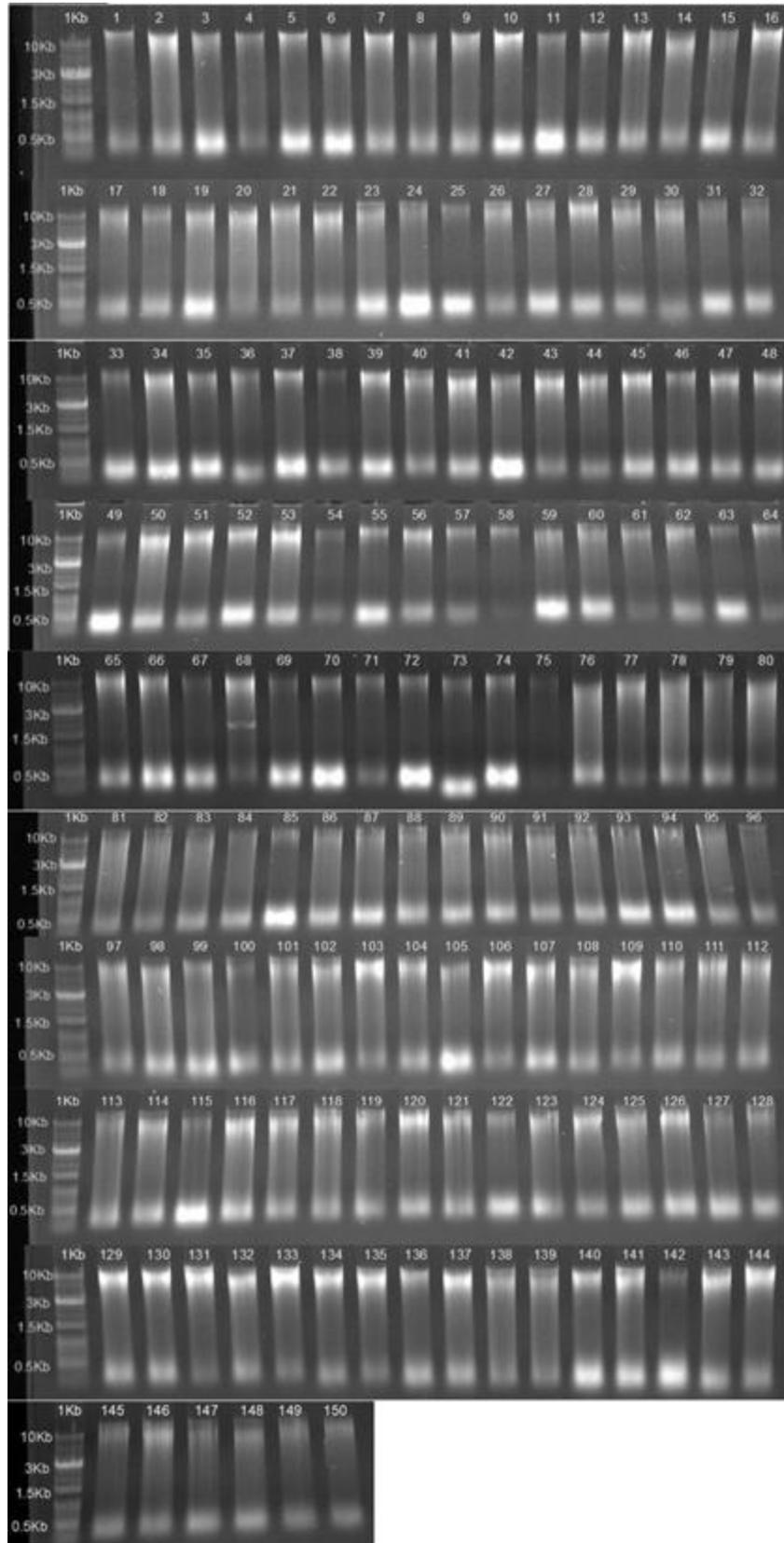


그림 34. Gel electrophoresis of genomic DNA extracted from sample. 1% agarose gel (1X TAE buffer), 100V 25min, sample 1  $\mu$ l loading. Data from CJ Bioscience QC report.

[분변시료에서 분리한 차세대 염기서열 분석 데이터의 처리]

- 분석에 사용된 시퀀싱 데이터는 개시시점 11,873,342 개의 리드(read), 종료시점 11,553,835

개의 리드 수를 확보하였으며, chimera와 low-quality 염기서열을 제거한 뒤 각 7,103,557개, 6,388,144개의 valid 리드를 분석에 사용함. 그룹별 평균 리드 수는 표 29에 나타냈으며, 분석에 충분히 사용할 정도로 판단됨.

- 확보한 시퀀싱 데이터가 각 실험구의 미생물 군집을 대변할 수 있는지를 확인하기 위해, 그래프의 완만한(plateau) 정도를 나타내는 rarefaction curve와 Good's coverage(90 이상)를 사용함. Rarefaction curve는 97% 상동성 기준으로 결정된 PD\_whole\_tree와 시퀀스 리드수를 사용하였으며, 그 결과는 그림 35에서 보는 바와 같음. 즉, 시퀀스의 리드수가 증가할수록 그래프가 완만해지는(plateau 현상) 것을 볼 수 있었기 때문에, 확보한 시퀀싱 데이터는 각 처리구의 미생물 군집을 충분히 대변할 수 있다고 판단되어, 추가적인 분석에 사용함.

표 29. Quality of the sequencing reads before and after pre-processing.

Items	Treatments (n=25) <sup>1</sup>		
	SBM	CT	BLF
Week 1			
Raw reads	153953.6 ± 32650.56	163088.60 ± 37757.15	157891.50 ± 28329.95
Valid reads	95422.80 ± 20059.70	95048.84 ± 20618.80	93670.64 ± 18109.40
Good's coverage	0.99 ± 0.0002	0.99 ± 0.0002	0.99 ± 0.0002
Week 5			
Raw reads	149413.10 ± 16934.60	158479.6 ± 24624.50	154260.3 ± 28741.00
Valid reads	84842.96 ± 13926.10	86154.76 ± 13130.30	84528.04 ± 20820.40
Good's coverage	0.99 ± 0.0002	0.99 ± 0.0003	0.99 ± 0.0003

<sup>1</sup> Values are reported as mean ± standard deviation (SD).

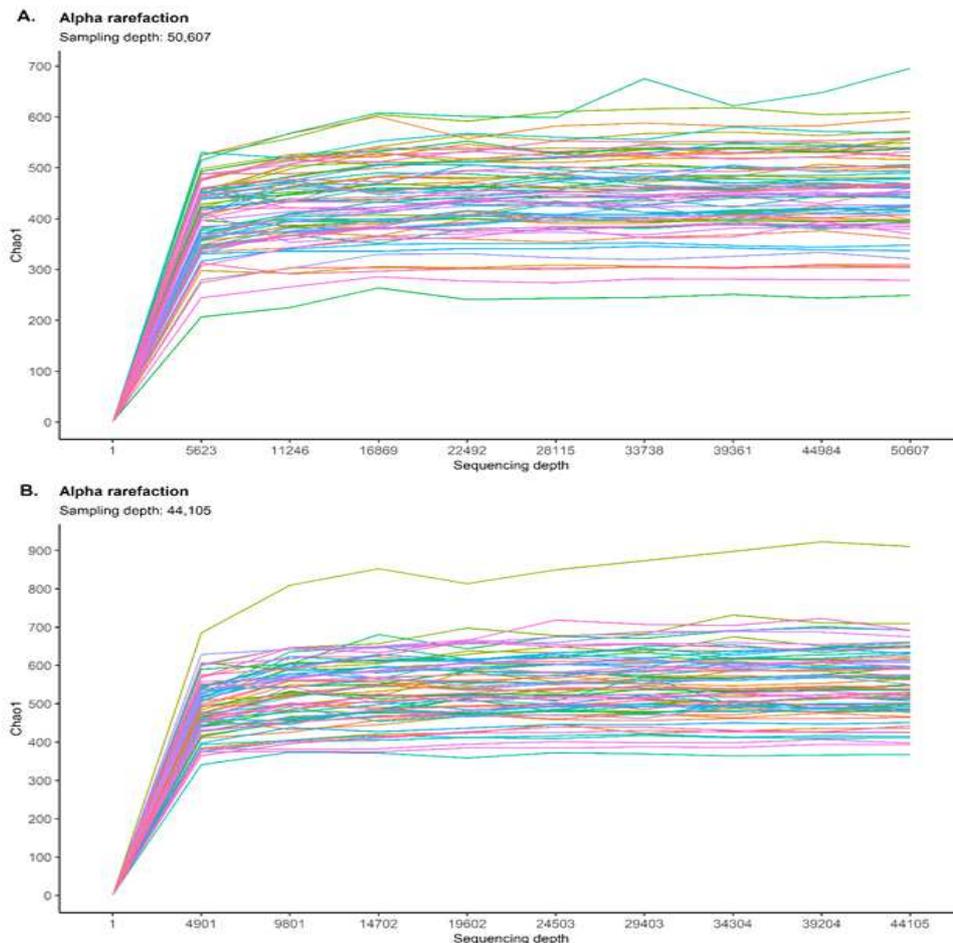


그림 35. Rarefaction curves based on Chao1 index for week 1 and 5 feces samples at 50,607 and 44,105 sequencing depth, respectively.

ii) 이유자돈 분변시료의 장내균총 분석

○ 미생물의 풍부도 및 다양성 지수 분석(Alpha diversity)

- SBM, CT, BLF의 급여에 따른 장내균총 조성의 변화를 파악하기 위해 종의 풍부도 (Chao1), 다양성 (Shannon), 균일성 (Simpson) 지수를 측정함(그림 36).
- 개시시점 분변 시료 분석 결과, 각 그룹 간의 alpha diversity 지수들은 유의적인 차이가 없었음( $p > 0.05$ ).
- 한편, 종료시점 BLF 처리구의 alpha diversity 지수가 SBM, CT에 비해 유의적이지는 않으나 감소하는 것을 볼 수 있었음( $p > 0.05$ ). 유사한 연구에서, CP수준이 낮은 사료를 급여한 돼지에서 alpha-diversity가 감소하였다는 보고가 있음(Cho et al., 2015, *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*; Fan et al., 2017, *Sci. Rep.*).

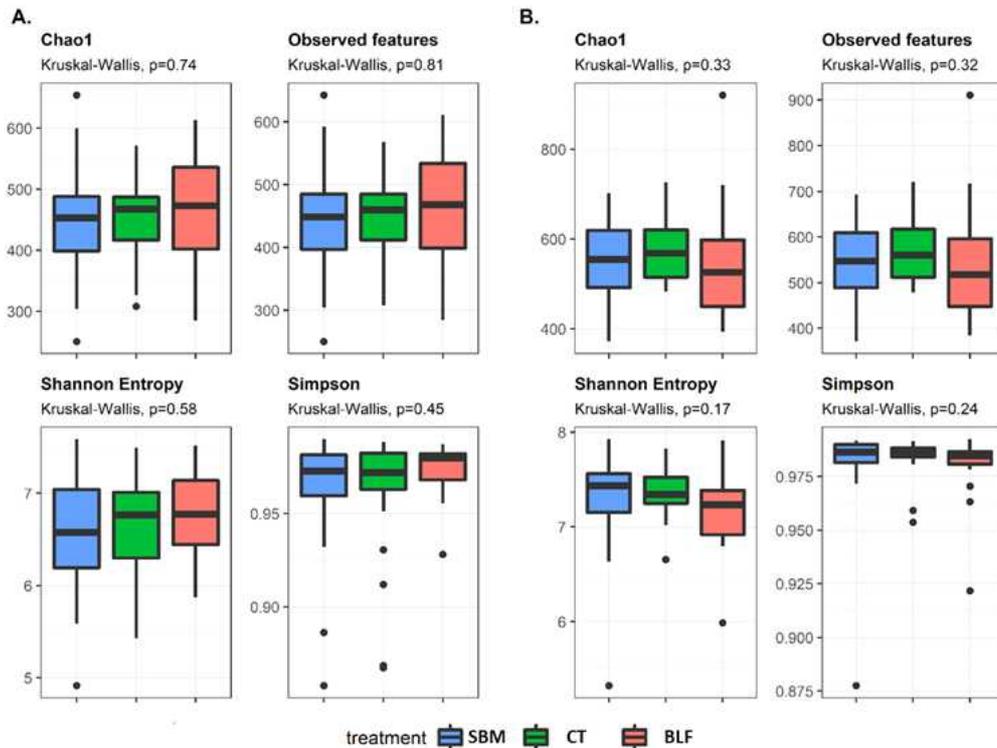


그림 36. Alpha-diversity indices Chao1, Observed features, Shannon, and Simpson for week 1 (A) and week 5 (B) fecal samples. P values were calculated with Kruskal-Wallis with pairwise comparison ( $p < 0.05$ ).

[장관내 미생물 군집분석(Beta diversity analysis of gut microbiota)]

- Bray-Curtis dissimilarity measure 방법은 처리구별 균총의 상대적 분포도(abundance)를 이용하여 각 그룹간 미생물 분포 차이를 거리로 나타낸 것으로서, Principal Coordinate Analysis (PCoA) 방법으로 도표화 함(그림 37).
- Alpha diversity 지수와 유사하게, PCoA 방법으로 도표화한 개시시점 자돈의 장내균총은 그룹 간에 유의적인 차이를 보이지 않았음(PERMANOVA,  $P > 0.05$ ).
- 종료시점, BLF 처리구의 균총이 SBM, CT 처리구와 유의적인 차이를 보임( $p = 0.006$ ,  $p = 0.014$ ). 더욱이, SBM 처리구는 CT 처리구와 유의적인 차이를 보임( $p = 0.006$ ). 이로 미루어 보아, 각 처리구의 CP 수준 차이 및 첨가제의 급여에 의해 돼지의 장내균총 구조가 변화한 것을 알 수 있음.

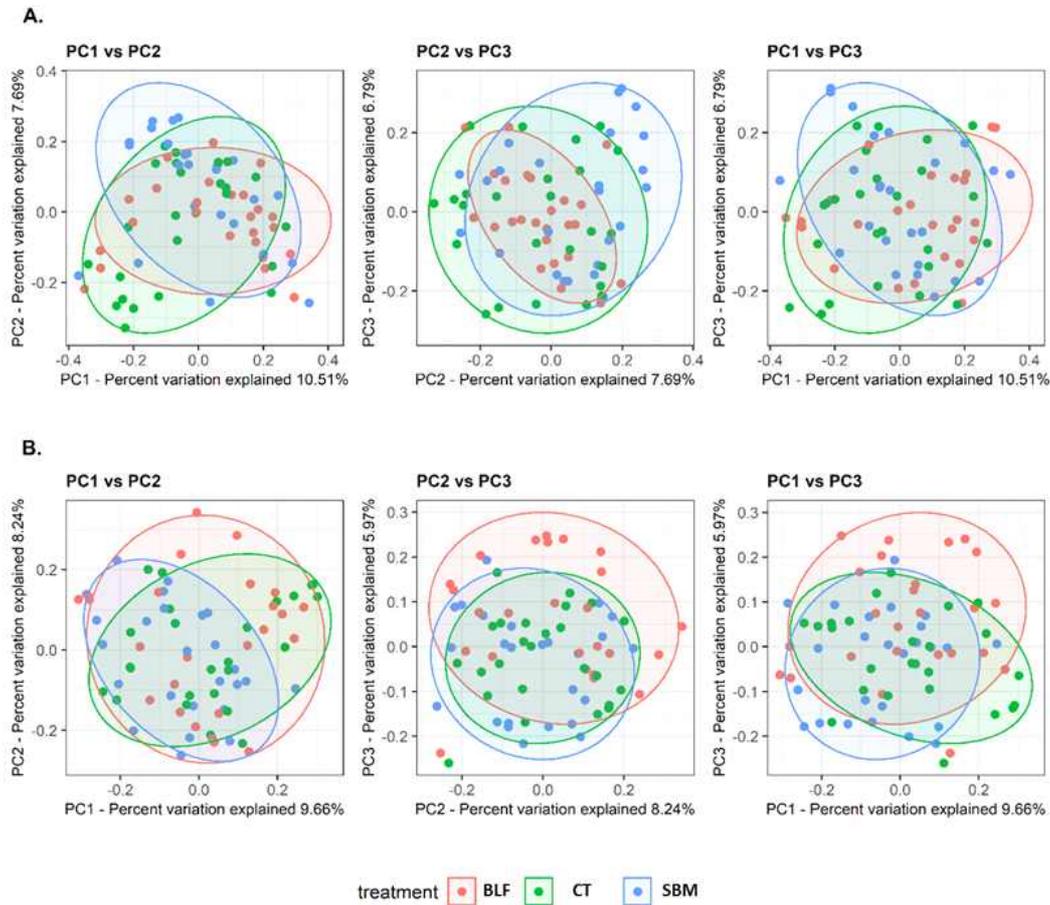


그림 37. Principal coordinate analysis (PCoA) plot based on Bray-Curtis distance matrix for week 1 (A) and week 5 (B) feces samples. P value was calculated using permutational ANOVA ( $p < 0.05$ ).

[분변시료 장내균총 풍부도 비교 분석]

- 개시시점 분변시료의 장내균총을 문(Phylum), 속(Genus), 종(Species) 수준에서 그 풍부도를 비교분석함(표 30).
- 문 수준에서 보았을 때, 모든 처리구에서 Firmicutes와 Bacteroidetes가 우점하는 것으로 나타남.

Table 30. Relative abundance at phylum, genus, and species level for week 1 feces samples.

Taxa	Treatment (n=25), %			p-value <sup>1</sup>
	SBM	CT	BLF	
<b>Phylum</b>				
Firmicutes	49.42 <sup>ab</sup>	52.77 <sup>a</sup>	42.89 <sup>b</sup>	0.04
Bacteroidetes	44.73 <sup>ab</sup>	42.41 <sup>a</sup>	52.7 <sup>b</sup>	0.02
Spirochaetes	3.13	1.84	1.60	0.41
Tenericutes	1.78	1.99	1.79	0.51
Actinobacteria	0.48	0.52	0.50	0.70
Proteobacteria	0.27	0.27	0.37	0.68
Fibrobacteres	0.04	0.11	0.04	0.52
Cyanobacteria	0.06	0.04	0.03	0.58
Chlamydiae	0.06	0.01	0.02	0.96
Synergistetes	0.03	0.01	0.02	0.50
Verrucomicrobia	0.01	0.01	0.01	0.43
Fusobacteria	0	0.01	0.01	0.47
Other phyla	0.01	0.01	0.02	0.04
<b>Genus</b>				
<i>Prevotella</i>	13.3	11.51	16.57	0.11
Muribaculaceae PAC001286_g	8.7	8.24	12.4	0.21

<i>Clostridium</i>	6.6	12.81	6.89	0.16
<i>Lactobacillus</i>	10.87 <sup>a</sup>	6.13 <sup>ab</sup>	3.17 <sup>b</sup>	0.03
<i>Sporobacter</i>	3.11	3.83	4.05	0.31
Bacteroidales HQ716269_g	2.22	3.34	2.57	0.40
<i>Eubacterium_g23</i>	2.82	2.57	2.43	0.55
<i>Parabacteroides</i>	1.92	2.57	2.04	0.78
<i>Treponema</i>	2.98	1.76	1.48	0.42
Lachnospiraceae unclassified	1.8	2.07	1.98	0.82
Bacteroidales AB494828_g	2.34	1.48	1.81	0.56
Muribaculaceae unclassified	2.17	1.55	1.62	0.08
<i>Alloprevotella</i>	1.94	1.22	1.98	0.21
Bacteroidales PAC002374_g	1.57	1.44	2.12	0.48
Bacteroides	1.44	1.2	1.75	0.47
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.18	1.47	1.55	0.83
<i>Subdoligranulum</i>	1.37	1.27	1.53	0.92
<i>Terrisporobacter</i>	0.9	1.76	1.18	0.42
<i>Roseburia</i>	1.09	1.67	1.03	0.95
<i>Oscillibacter</i>	0.84	1.25	1.65	0.55
<i>Anaerocella</i>	0.31 <sup>a</sup>	1.22 <sup>ab</sup>	2.08 <sup>b</sup>	0.02
Bacteroidales PAC002482_g	1.15	1.09	1.35	0.30
Faecalibacterium	1.07	0.69	1.66	0.24
Pseudoflavonifractor	1.66 <sup>a</sup>	0.94 <sup>ab</sup>	0.77 <sup>b</sup>	0.03
Bacteroidales PAC001134_g	1.3	1.15	0.86	0.69
Bacteroidales PAC001421_g	1.3	1.01	0.97	0.85
Other genera	24.04	24.76	22.52	0.53
<b>Species</b>				
<i>Clostridium</i> PAC001136_s	5.25	10.79	5.85	0.12
Muribaculaceae EU472573_s	5.41	5.04	7.50	0.19
<i>Lactobacillus</i> unclassified	8.09 <sup>a</sup>	2.71 <sup>ab</sup>	1.22 <sup>b</sup>	<0.001
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2.48	3.13	1.80	0.07
Bacteroidales GQ134264_s	1.98	2.63	2.51	0.24
Lachnospiraceae unclassified	1.80	2.07	1.98	0.82
Muribaculaceae unclassified	2.17	1.55	1.62	0.08
Muribaculaceae PAC001286_g	1.45	1.25	1.88	0.96
<i>Prevotella</i> unclassified	1.27	1.18	1.72	0.55
<i>Subdoligranulum</i> unclassified	1.26	1.21	1.47	0.78
<i>Terrisporobacter</i> unclassified	0.90	1.76	1.18	0.42
Bacteroidales EU462269_s	1.69	0.88	1.13	0.58
<i>Prevotella</i> PAC001292_s	0.9	1.14	1.65	0.92
<i>Parabacteroides</i> EU728718_s	1.07	1.84	0.77	0.16
<i>Anaerocella</i> AF371924_s	0.31 <sup>a</sup>	1.22 <sup>ab</sup>	2.08 <sup>b</sup>	0.02
Bacteroidales AB506391_s	1.17	0.85	1.49	0.61
Bacteroidales HQ716545_s	1.05	1.22	1.19	0.38
Bacteroidales GQ448784_s	1.1	1.05	1.26	0.25
<i>Roseburia</i> unclassified	0.83	1.50	0.87	0.97
<i>Prevotella</i> HQ716429_s	1.29	0.93	0.97	0.90
<i>Prevotella</i> AF371872_s	0.96	0.62	1.52	0.15
Muribaculaceae FJ680302_s	0.69	0.60	1.67	0.26
<i>Prevotella</i> EF031003_s	0.54	1.16	1.26	>0.99
Muribaculaceae FJ679515_s	0.88	1.43	0.56	0.50
<i>Sporobacter</i> unclassified	0.98	1.08	0.79	0.19
Other species	54.5	51.15	54.08	0.66

<sup>1</sup> p-values are calculated using Kruskal-Wallis test. Different superscripts denote significant difference.

- 종료시점 분변시료의 장내균총을 문(Phylum), 속(Genus), 종(Species) 수준에서 그 풍부도를 비교분석한 결과를 표 31, 그림 38(A)에 나타냄.
- 한편, 종료시점 장내균총의 문, 과, 종 abundance를 분석한 결과는 표 8에 나타냄.
- 문(phylum) 수준에서 살펴보았을 때, 모든 처리구는 Bacteroidetes, Firmicutes가 90% 이상으로 가장 높은 비율을 차지하는 것으로 나타남. 그러나, 각 처리구의 Firmicutes/Bacteroidetes 비율에 유의차는 없었음.
- 속(genus) 수준에서 살펴보았을 때, Bacteroidetes 문에 속하는 *Prevotella*, Muribaculaceae PAC001286\_g 속이 모든 처리구에서 가장 풍부한 속으로 나타남.
- SBM 처리구에 비해 CP 수준이 낮은 두 처리구(CT,BLF)에서 *Prevotella*의 풍부도가 감소하는

경향을 보임. 이는 *Bacteroides*가 단백질과 동물성 지방 위주의 식이와 연관이 있으며, *Prevotella*는 섬유질과 같은 복합 탄수화물 급여에 의해 풍부도가 증가한다는 기존의 보고와 유사한 경향을 나타냄(Ley RE., 2015, *Gut microbiota*; Kovatcheva-Datchary et al., 2015, *Cell Metab.*).

- BLF 처리구에서 SBM 처리구에 비해 *Clostridium* (p < 0.05), *Terrisporobacter* (p < 0.05), *Alloprevotella* 속의 상대적 풍부도는 증가하였고, *Phascolarctobacterium*, *Lactobacillus* (p < 0.001)의 상대적 풍부도는 감소함.
- 종 수준에서, 다른 처리구에 비해 BLF 처리구에서 *Prevotella* AF371872\_s, unclassified *Terrisporobacter*, unclassified *Clostridium*, Muribaculaceae FJ679515\_s 종의 풍부도가 유의적으로 증가한 반면(p < 0.05), *Eubacterium\_g23* PAC001035\_s, *Treponema porcinum*, *Prevotella* EF445225\_s, *Treponema* EU459743\_s, Muribaculaceae PAC001286\_s unclassified, Muribaculaceae HQ716545\_s, *Prevotella* EU472322\_s, *Lactobacillus reuteri*, *Prevotella* DQ797020\_s, Prevotellaceae DQ795941\_s의 상대적 풍부도가 유의적으로 감소함(p < 0.05).
- 한편, 대장염과 설사 등의 증상을 유발하는 것으로 알려진 균이 속하는 *Campylobacter jejuni*, *Escherichia*, *Helicobacter*(Horrocks et al., 2009, *Anerobe*; Holmer et al., 2019, *Helicobacter*; Nakajima et al., 2006, *Helicobacter*)가 BLF 처리구에서 SBM 처리구에 비해 유의적이진 않으나 그 풍부도가 낮게 나타나는 경향을 보임.
- BLF 처리구에서 유의적으로 그 풍부도가 증가한 *Terrisporobacter*는, 기존의 보고에서 acetate의 생산과 관련이 있다고 알려져 있음. 이로 미루어 보아, BLF 처리구의 acetate가 증가하는 경향이 *Terrisporobacter* 풍부도의 증가에 의한 것일 수 있음(Liu et al., 2021, *Animals*; Cho et al., 2018, *Chemosphere*).
- *Treponema*에 속하는 몇몇 strain들은 병원성을 나타내는 것으로 알려져 있으며(Karlsson et al., 2017, *Porcine Health Management*), 이는 BLF 처리구에서 다른 두 처리구에 비해 유의적으로 낮은 풍부도를 지닌 것으로 나타났음.

표 31. Relative abundance at phylum, genus, and species level for week 5 feces samples.

Taxa	Treatment (n=25), %			p-value <sup>1</sup>
	SBM	CT	BLF	
<b>Phylum</b>				
Bacteroidetes	51.11	47.31	49.86	0.24
Firmicutes	41.18	44.62	42.74	0.39
Spirochaetes	3.58	3.55	3.53	0.77
Tenericutes	2.03	2.09	2.01	0.65
Proteobacteria	1.31	1.58	1.06	0.97
Fibrobacteres	0.23	0.35	0.25	0.96
Actinobacteria	0.30	0.26	0.18	0.09
Cyanobacteria	0.13	0.14	0.17	0.68
Other phyla	0.13	0.10	0.21	0.28
<b>Genus</b>				
<i>Prevotella</i>	19.47	16.87	15.85	0.24
Muribaculaceae PAC001286_g	9.01	8.82	10.14	0.97
<i>Clostridium</i>	4.36 <sup>a</sup>	6.32 <sup>ab</sup>	6.82 <sup>b</sup>	0.01
<i>Sporobacter</i>	4.58	4.64	4.74	0.96
<i>Treponema</i>	3.49	3.49	3.41	0.66
<i>Eubacterium_g24</i>	3.58	2.86	2.59	0.06
<i>Oscillibacter</i>	2.55	2.59	2.47	0.76
Bacteroidales PAC002374_g	2.37	2.82	2.10	0.18
<i>Alloprevotella</i>	1.52	2.84	2.71	0.04
Lachnospiraceae unclassified	2.35	1.91	2.65	0.23
Bacteroidales HQ716269_g	2.54	2.28	1.93	0.73
<i>Phascolarctobacterium</i>	2.75 <sup>a</sup>	2.09 <sup>ab</sup>	1.64 <sup>b</sup>	0.03
Bacteroidales PAC001134_g	2.04	1.50	1.87	0.44
Bacteroidales AB494828_g	2.00	1.49	1.77	0.29

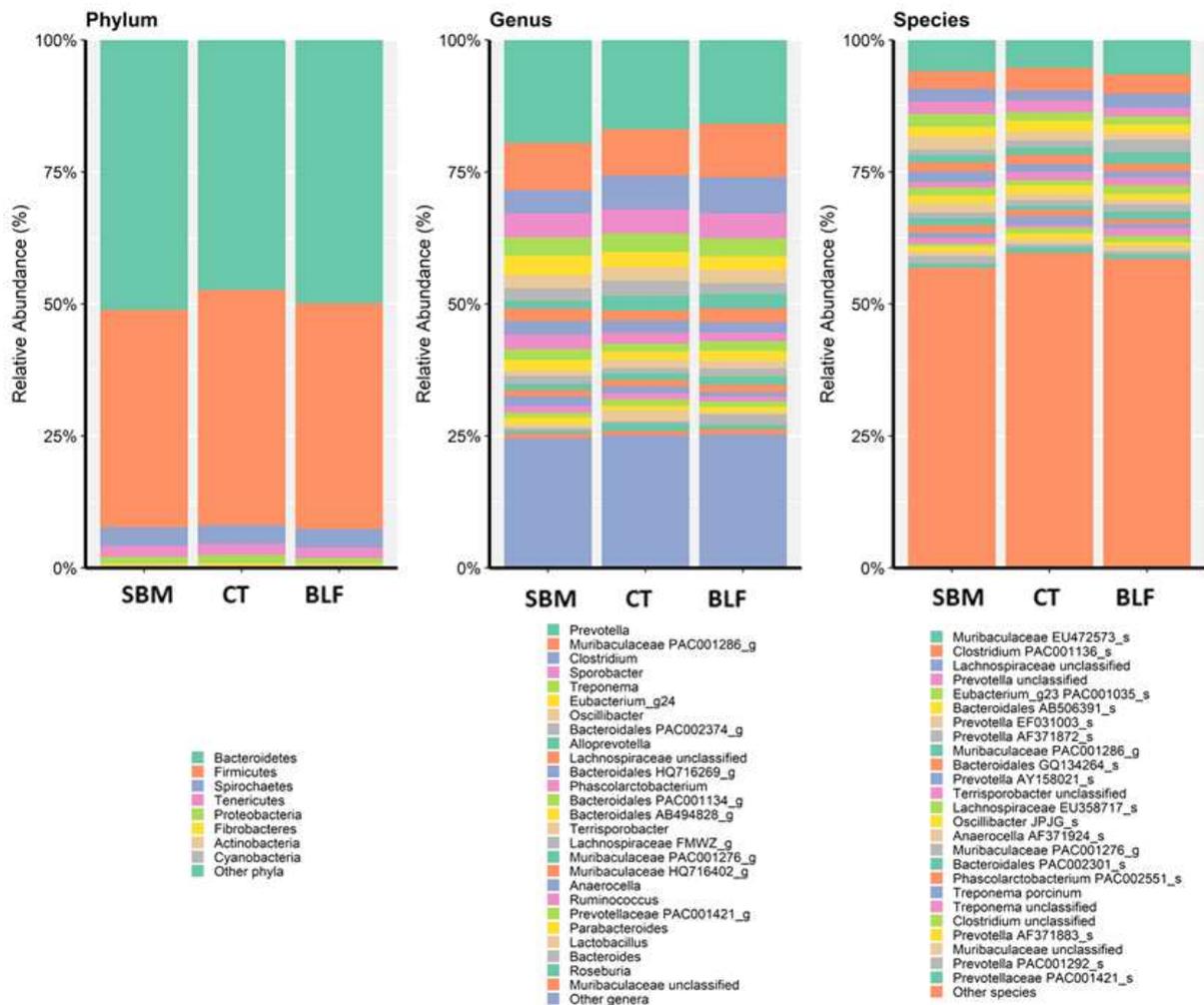
	<i>Terrisporobacter</i>	1.01 <sup>a</sup>	1.62 <sup>b</sup>	1.54 <sup>b</sup>	<0.001
	Lachnospiraceae FMWZ_g	1.55	0.99	1.57	0.76
	Muribaculaceae PAC001276_g	1.15	1.27	1.51	0.24
	Muribaculaceae HQ716402_g	1.20	1.32	1.41	0.64
	<i>Anaerocella</i>	1.82	1.22	0.83	0.34
	<i>Ruminococcus</i>	1.26	1.12	0.89	0.13
	Prevotellaceae PAC001421_g	0.91	1.25	1.06	0.54
	<i>Parabacteroides</i>	1.37	0.80	1.03	0.15
	<i>Lactobacillus</i>	0.64 <sup>a</sup>	2.09 <sup>b</sup>	0.41 <sup>c</sup>	<0.001
	<i>Bacteroides</i>	0.52	0.43	1.94	0.07
	<i>Roseburia</i>	0.51	1.42	0.86	0.09
	Muribaculaceae unclassified	0.86	0.87	1.02	0.49
	Other genera	24.59	25.09	25.25	0.99
Species					
	Muribaculaceae EU472573_s	5.87	5.23	6.49	0.86
	<i>Clostridium</i> PAC001136_s	3.39	4.34	3.67	0.04
	Lachnospiraceae unclassified	2.35	1.91	2.65	0.23
	<i>Prevotella</i> unclassified	2.40	2.18	1.69	0.27
	<i>Eubacterium_g23</i> PAC001035_s	2.47 <sup>a</sup>	1.65 <sup>ab</sup>	1.45 <sup>b</sup>	0.04
	Bacteroidales AB506391_s	1.79	2.04	1.68	0.30
	<i>Prevotella</i> EF031003_s	2.47	1.66	1.24	0.09
	<i>Prevotella</i> AF371872_s	1.13 <sup>a</sup>	1.36 <sup>a</sup>	2.42 <sup>b</sup>	0.01
	Muribaculaceae unclassified	1.36	1.40	2.15	0.67
	Bacteroidales GQ134264_s	1.70	1.72	1.42	0.30
	<i>Prevotella</i> AY158021_s	1.99	1.46	1.15	0.22
	<i>Terrisporobacter</i> unclassified	1.01 <sup>a</sup>	1.62 <sup>b</sup>	1.54 <sup>b</sup>	<0.001
	Lachnospiraceae EU358717_s	1.55	0.99	1.57	0.76
	<i>Oscillibacter</i> JPJG_s	1.38	1.55	1.14	0.48
	<i>Anaerocella</i> AF371924_s	1.82	1.22	0.83	0.34
	Muribaculaceae unclassified	1.06	1.08	1.48	0.16
	Bacteroidales PAC002301_s	1.34	0.82	1.38	0.35
	<i>Phascolarctobacterium</i> PAC002551_s	1.50	1.17	0.86	0.09
	<i>Treponema porcinum</i>	0.93 <sup>a</sup>	1.62 <sup>b</sup>	0.80 <sup>a</sup>	0.02
	<i>Treponema</i> unclassified	1.11	0.55	1.50	0.09
	<i>Clostridium</i> unclassified	0.52 <sup>a</sup>	1.09 <sup>b</sup>	1.15 <sup>b</sup>	0.01
	<i>Prevotella</i> AF371883_s	0.93	1.14	0.69	0.28
	Muribaculaceae unclassified	0.86	0.87	1.02	0.49
	<i>Prevotella</i> PAC001292_s	1.40	0.65	0.66	0.31
	Prevotellaceae PAC001421_s	0.80	1.01	0.84	0.61
	Erysipelotrichaceae AM275412_s	0.75	1.11	0.79	0.43
	Muribaculaceae FJ679515_s	0.55 <sup>a</sup>	0.80 <sup>ab</sup>	1.26 <sup>b</sup>	0.03
	<i>Prevotella</i> EF445225_s	1.64 <sup>a</sup>	0.77 <sup>ab</sup>	0.16 <sup>b</sup>	0.01
	Ruminococcaceae PAC001247_s	1.01	0.93	0.63	0.45
	Muribaculaceae HQ716474_s	0.80	0.97	0.71	0.40
	<i>Roseburia</i> unclassified	0.45	1.27	0.70	0.15
	<i>Sporobacter</i> PAC001162_s	0.71	0.81	0.84	0.66
	<i>Treponema</i> EU459743_s	0.99 <sup>a</sup>	0.92 <sup>a</sup>	0.44 <sup>b</sup>	0.02
	<i>Sporobacter</i> unclassified	0.71	0.76	0.80	0.90
	<i>Prevotella</i> NPJG_s	0.73	0.72	0.80	0.58
	<i>Prevotella</i> NPJH_s	0.76	0.71	0.75	0.64
	Bacteroidales EU462269_s	0.79	0.60	0.77	0.26
	<i>Escherichia</i> unclassified	0.52	1.10	0.41	0.64
	<i>Alloprevotella</i> AF371901_s	0.39	0.62	1.02	0.32
	Muribaculaceae FJ680302_s	0.61	0.57	0.76	0.72
	Bacteroidales AB506388_s	0.69	0.65	0.59	0.91
	Muribaculaceae PAC001286_s	0.74 <sup>a</sup>	0.84 <sup>a</sup>	0.35 <sup>b</sup>	0.01
	Bacteroidales HQ716269_s	0.85	0.56	0.51	0.23
	<i>Sporobacter</i> PAC001161_s	0.61	0.74	0.55	0.40
	<i>Prevotella</i> HQ716429_s	0.49	0.52	0.82	0.16
	Bacteroidales PAC002374_s	0.58	0.78	0.41	0.24
	<i>Sporobacter</i> PAC001055_s	0.68	0.52	0.49	0.11
	<i>Alloprevotella</i> HQ716431_s	0.28	0.96	0.42	0.05
	<i>Lactobacillus</i> unclassified	0.20 <sup>ab</sup>	1.11 <sup>a</sup>	0.32 <sup>b</sup>	0.02
	Muribaculaceae HQ716545_s	0.43 <sup>a</sup>	0.77 <sup>a</sup>	0.39 <sup>b</sup>	0.01
	<i>Parabacteroides</i> EU728718_s	0.58	0.44	0.52	0.77
	<i>Clostridium bornimense</i>	0.20	0.39	0.95	0.10
	Ruminococcaceae PAC001468_s	0.48	0.64	0.41	0.51
	<i>Subdoligranulum</i> unclassified	0.50	0.56	0.42	0.29
	<i>Prevotella</i> EU472322_s	0.74 <sup>a</sup>	0.50 <sup>ab</sup>	0.23 <sup>b</sup>	0.02
	<i>Prevotella</i> stercorea	0.79	0.37	0.31	0.09

<i>Prevotella copri</i>	0.39	0.60	0.44	0.28
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0.42 <sup>a</sup>	0.90 <sup>b</sup>	0.08 <sup>c</sup>	<0.001
<i>Oscillibacter</i> PAC001130_s	0.34	0.49	0.56	0.31
<i>Sporobacter</i> PAC001259_s	0.44	0.50	0.42	0.58
<i>Parabacteroides</i> unclassified	0.64	0.30	0.35	0.07
Lachnospiraceae PAC001046_s	0.31	0.26	0.71	0.25
<i>Prevotella</i> PAC001206_s	0.24	0.57	0.47	0.38
<i>Phascolarctobacterium</i> PAC001311_s	0.46	0.43	0.37	0.68
<i>Prevotella</i> DQ797020_s	0.57 <sup>a</sup>	0.47 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.01
Muribaculaceae HQ716402_g	0.38	0.31	0.54	0.44
<i>Ruminococcus</i> g2 unclassified	0.22	0.70	0.31	0.29
<i>Phascolarctobacterium succinatutens</i>	0.54	0.35	0.30	0.15
<i>Bacteroides</i> unclassified	0.22	0.16	0.80	0.23
Lachnospiraceae AB034116_s	0.04	0.02	1.10	0.25
Prevotellaceae DQ795941_s	0.51 <sup>a</sup>	0.40 <sup>ab</sup>	0.24 <sup>b</sup>	0.03
Bacteroidia HQ716382_s	0.49	0.23	0.32	0.47
<i>Prevotella</i> HQ716519_s	0.07	0.48	0.47	0.13
<i>Ruminococcus bromii</i>	0.26	0.40	0.35	0.35
<i>Alloprevotella</i> HQ716537_s	0.35	0.37	0.30	0.49
Other species	29.73	28.72	31.66	0.53

<sup>1</sup> p-values are calculated using Kruskal-Wallis test. Different superscripts denote significant difference.

<sup>2</sup> Compared to SBM group, significantly increased species in the BLF group are indicated in red, and significantly decreased species are indicated in blue.

(A)



(B)

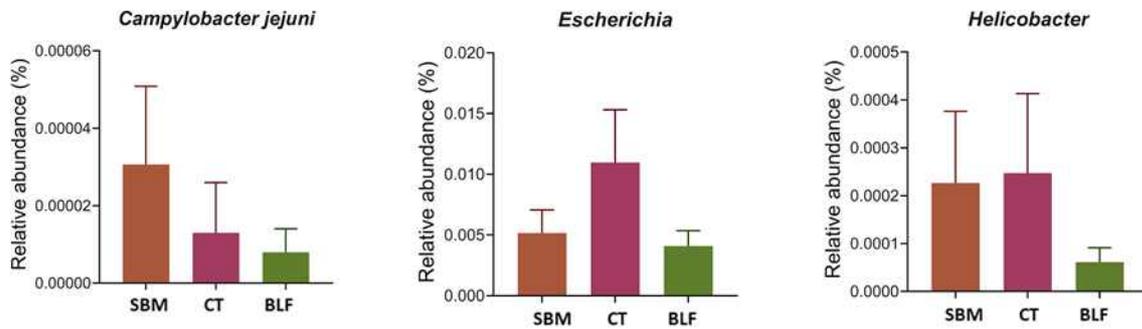


그림 38. Relative abundance at phylum, genus, and species level for week 5 feces samples(A). Relative abundance of species those are generally known as pathogen(B).

[장내균총의 taxonomic marker]

- 각 처리구별 장내균총의 taxonomic marker를 파악하기 위해, 미생물 풍부도의 상대적 차이를 판별하는 LEfSe 분석을 진행함(그림 39).
- 분석 결과, *Prevotella* AF371872\_s, Muribaculaceae FJ679515\_s, *Clostridium butyricum*, *Clostridium* AF371841\_s, *Prevotella* AB185797\_s, *Clostridium chartatabidum*, Rhodocyclaceae AF371865\_s, *Romboutsia timonensis*, Mollicutes PAC002151\_s 의 풍부도가 BLF 처리구에서 다른 처리구에 비해 높게 나타났으며, 이 균들은 SCFA와 BCFA를 생산하는 균으로 보고된 바 있음(Basen & Kurrer, 2021, *FEBS J.*; Kang et al., 2019, *BMC Nephrol.*; Kelly et al., 1987, *Arch. Microbiol.*; Wang et al., 2020, *Sci. Rep.*).
- 한편, CT 처리구에서 그 풍부도가 높게 나타난 균은 Firmicutes 문에 속하는 *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Eubacterium* 및 Lachnospiraceae 과에 속하는 속(Family)으로, 불용성 탄수화물을 발효시켜 SCFA와 BCFA를 생산하는 균으로 보고되어 있음(Biddle et al., 2013, *Diversity*; Zhu et al., 2022, *Trends Biotechnol.*).

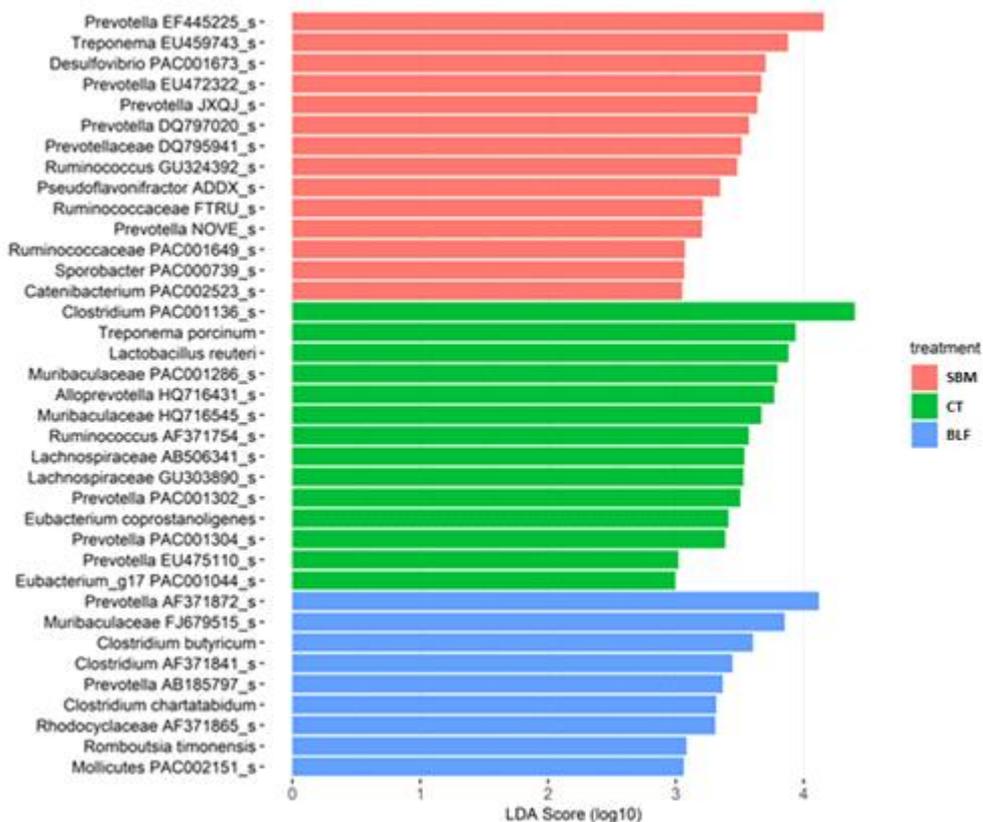


그림 39. Taxonomic markers from week 5 feces samples as identified by LEfSe.

[장내균총의 기능성 유전자 발현 예측]

- 장내균총의 기능적 유전자 발현 예측은 PICRUSt2를 사용해 KEGG pathway를 기반으로 분석함.
- 단백질 소화, 흡수와 같이 단백질 대사에 관련된 KEGG pathway 분석 결과, alanine, aspartate, glutamine, tyrosine, tryptophan, nitrogen 대사, valine, leucine, isoleucine, lysine분해 및 단백질 소화, 흡수와 같이 단백질 대사에 관련된 KEGG pathway는 각 처리구 간 유의차를 확인할 수 없었음(그림 40).
- 보고된 바에 따르면, CP 급여 수준을 낮추는 것이 이러한 단백질 대사 경로의 발현을 낮추는 것으로 보고되어 있으나(Spring et al., 2020, *Sci. Rep.*), SBM 처리구에 비해 낮은 CP 수준을 지닌 CT, BLF 처리구에서 이러한 차이는 나타나지 않았음.

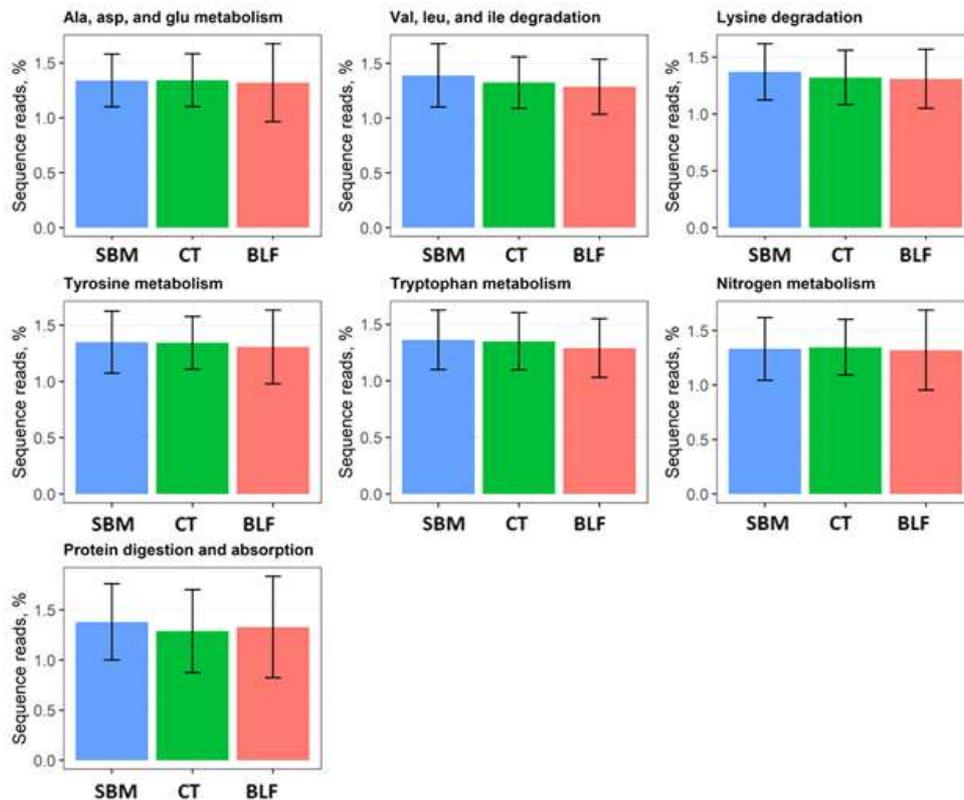


그림 40. Enriched KEGG pathways relative with protein metabolism as predicted by PICRUSt.

- 다음으로, 질소 대사에 관련된 유전자를 분석함(그림 41). 사료 내 CP 수준의 감소는 장에서 이용 가능한 질소의 수준을 감소시킴(Zhao et al., 2020, *Anim. Nutr.*). 반면, 불용성 식이섬유 이용성 증가는 질소 고정을 통한 세균의 단백질 생합성을 증가시켜 결과적으로 소변을 통한 암모니아의 배출을 감소시킴(Bindelle et al., 2007, *Livest. Sci.*; Loh et al., 2010, *J. Appl. Anim. Res.*; Lynch et al., 2007, *Animal*).
- 이와 관련된 유전자들의 풍부도를 heatmap으로 나타냄(Fig. 9). CT에 비해 BLF 처리구에서 *narG, narH, narI*와 같이 질소로부터 암모니아를 생산하는 한 경로인 ‘dissimilatory nitrate reduction’ 경로의 유전자와 *nifB, nifE*와 같은 ‘nitrogen fixation’ 경로의 유전자 풍부도가 유의적으로 낮은 수준일 것으로 예측됨( $p < 0.05$ ).
- 이에 더해, BLF에서 암모니아를 생산하는 또 다른 경로인 ‘assimilatory nitrate reduction’에 관련된 *nirA, narB, NRT* 유전자와 ‘dissimilatory nitrate reduction’ 경로에 관련된 *nirD, napB, napC, napD* 유전자가 감소하는 경향을 보일 것으로 예측됨.
- CT 처리구와 비교하였을 때, BLF 처리구에서 ‘nitrogen fixation’에 관련된 몇몇 유전자

(*nif*HD1, *nif*HD2)의 발현이 유의적으로 높게 나타날 것으로 예측되었으며( $p < 0.05$ ), 이외의 관련 유전자도 높게 발현될 것으로 예측되는 경향을 보임.

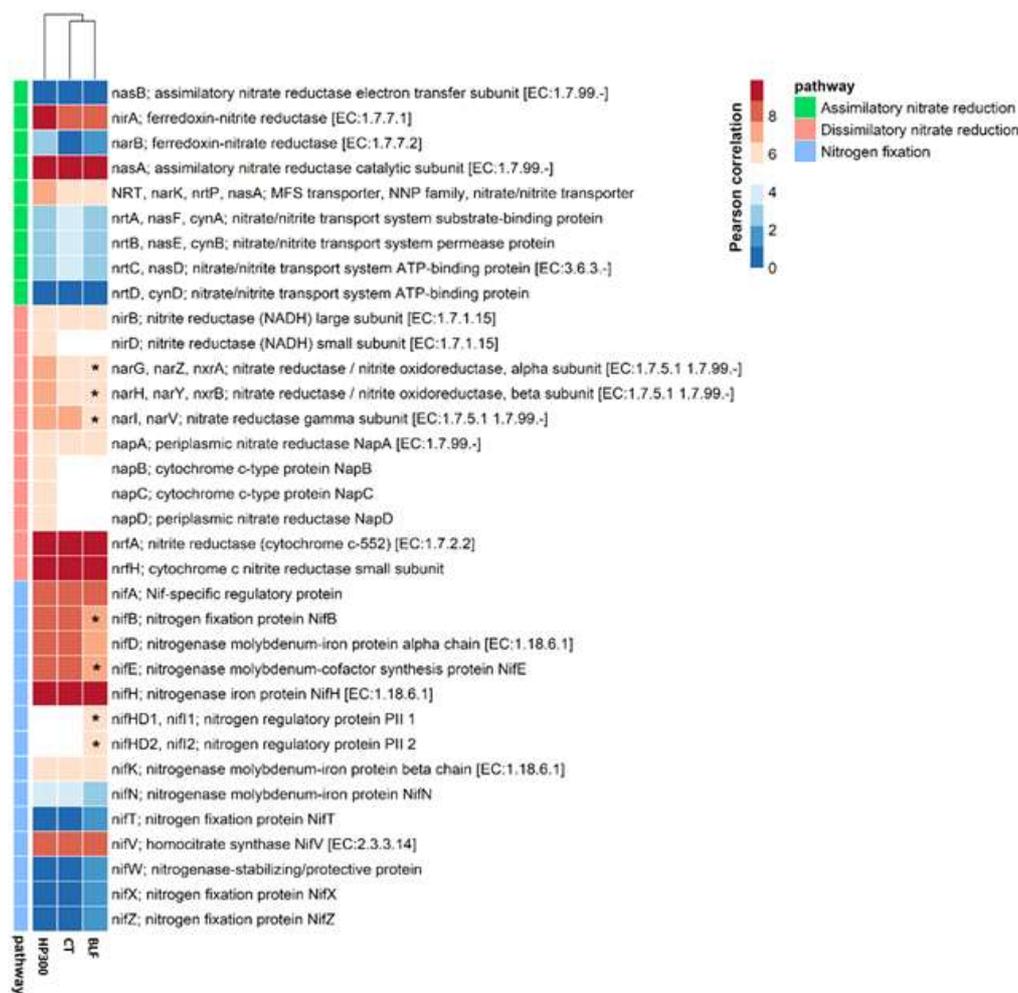


그림 41. Abundances of KO genes that are involved in nitrogen metabolism. (\*) denotes significant difference compared with CT.

[장내균총, 대사체 및 사양성적간 상관관계 분석(correlation analysis)]

- 장내균총, 대사체 및 사양성적 간의 상관관계 분석을 위해서, pearson correlation 분석 결과를 heatmap 형태로 나타냄(그림 42). BLF 처리구에서 풍부도가 증가한 *Prevotella* AB185797 과 AF371872 종은 최종 체중 및 일당증체량과 양의 상관관계를 보였음. 타 연구에서, *Prevotella*는 돼지의 사양성적 및 사료섭취량의 개선과 관련이 있는 것으로 보고된 바 있음 (Amat et al., 2020, *Microorganisms*).
- Isobutyrate와 isovalerate 같은 BCFA 생산의 증가는 직장의 단백질 발효 대사의 증가를 나타냄(Vasquez et al., 2022, *J. Anim. Sci. Technol.*). BLF 처리구에서 그 풍부도가 증가한 *Prevotella* AB185797, AF371872는 분변의 isovalerate와 양의 상관관계를 보임. *Prevotella*는 선행 연구에서 SCFA, BCFA 생산, 탄수화물 및 단백질 대사의 증가와 관련되어 있는 것으로 보고된 바 있음(McCann et al., 2014, *PLoS One*; Wu et al., 2022, *Microorganisms*).
- BLF 처리구에서 풍부도가 증가한 *Prevotella* AF371872\_s, *Muribaculaceae* FJ679515\_s, *Clostridium butyricum*, *Clostridium* AF371841\_s, *Prevotella* AB185797\_s, *Clostridium chartatabidum*, *Rhodocyclaceae* AF371865\_s, *Romboutsia timonensis*, *Mollicutes* PAC002151\_s 는, 분변내 대사체(propionate, valerate, acetate, butyrate)와 강한 양의 상관관계를 보임. 이러한 결과는 이 균들이 식이섬유 및 단백질을 이용하여 SCFA를 생산한다는 기존의 보고와

일치함(Basen & Kurrer, 2021, *FEBS J.*; Kang et al., 2019, *BMC Nephrol.*; Kelly et al., 1987, *Arch. Microbiol.*; Wang et al., 2020, *Sci. Rep.*).

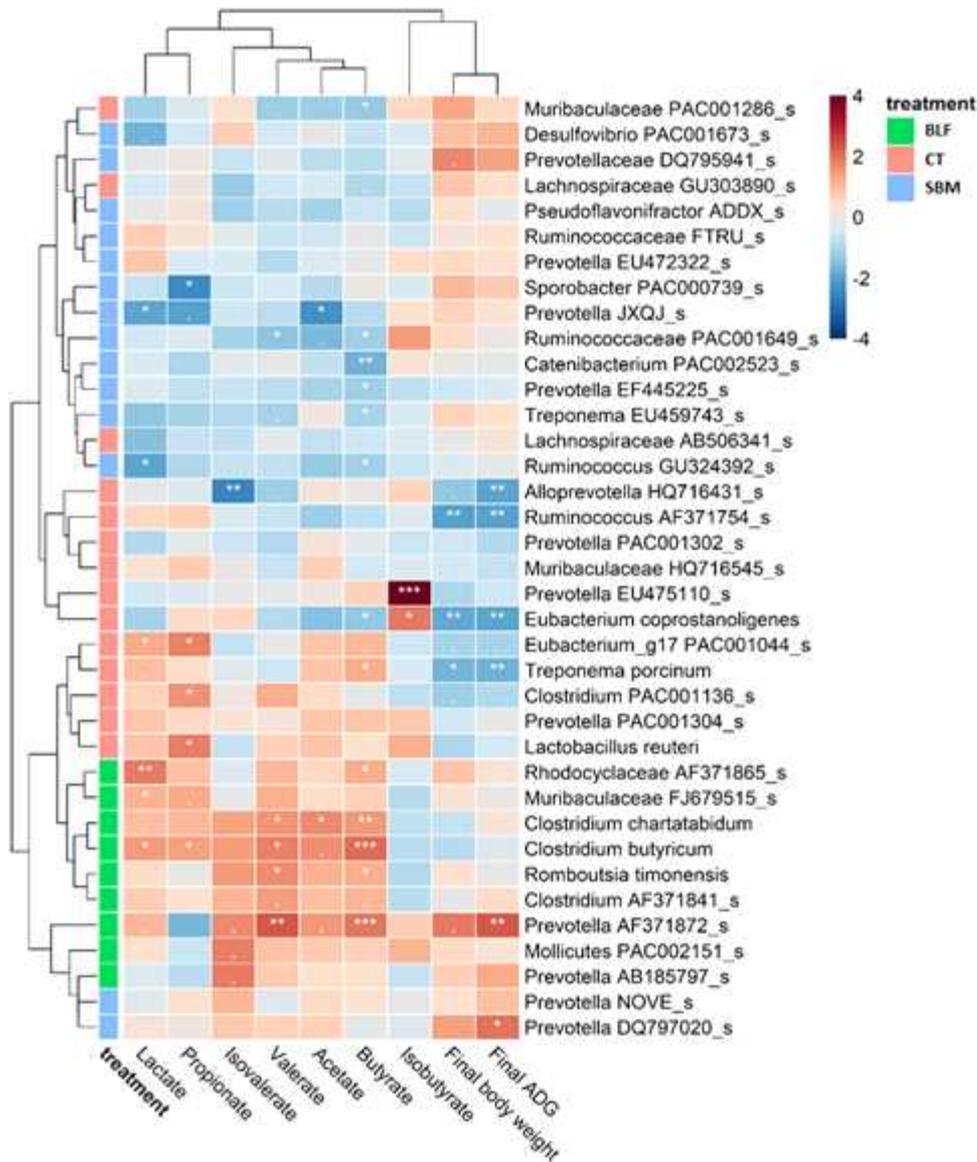


그림 42. Heatmap showing the relationship between gut microbiome, fecal organic acid, and growth performance of the pigs. P-values are denoted as \* and \*\* for P<0.05 and P<0.01, respectively.

[장내균총과 단백질 대사의 네트워크 분석(Network analysis)]

- 장내균총과 예측되는 기능성과의 상관관계 분석을 위해, Cytoscape program을 이용해 시각화한 network map을 그림 43에 나타냄. 분석 결과, BLF 및 CT 처리구에서 풍부도가 증가한 균과 단백질 대사경로가 양의 상관관계를 보임.
- 특히, BLF 처리구에서 그 풍부도가 증가한 Muribaculaceae FJ679515, *Clostridium butyricum*, *Prevotella AF371872*, Rhodocyclaceae AF371865는 단백질 소화 및 흡수와 양의 상관관계를 나타냄.

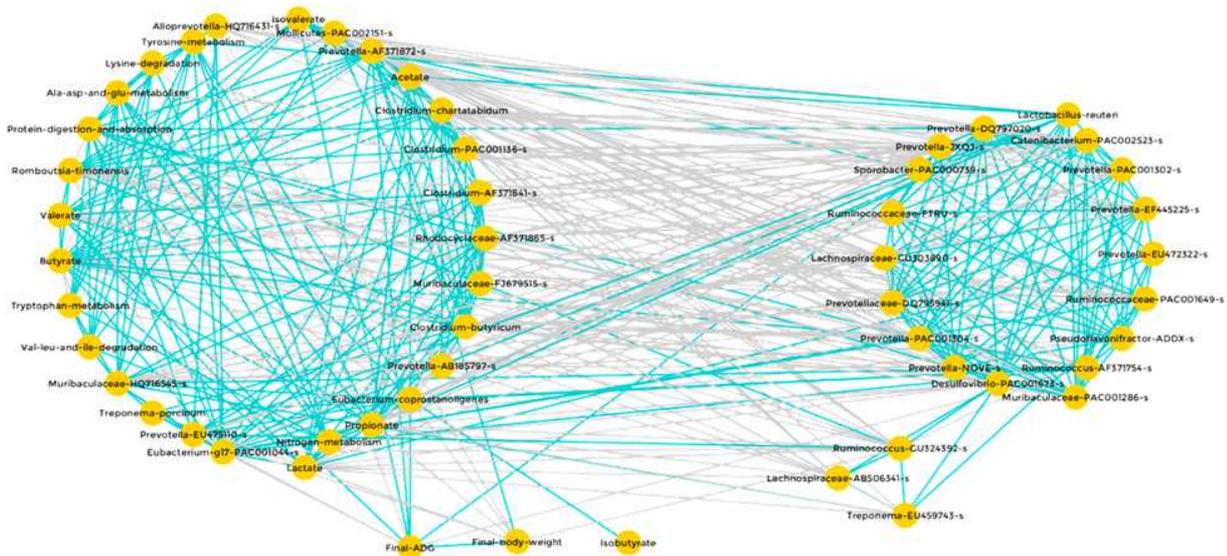


그림 43. Network map showing the relationship between gut microbiome, its metabolites, and the pathways involved in protein metabolism. Blue line denotes positive association (co-occurrence); gray line denotes negative association (mutual exclusion).

○ 장내균총과 악취성 화합물의 잠재적 상관관계 분석

- 타 연구에서 발효사료의 급여는 대장의 가용 단백질 양을 감소시키며 섬유질의 발효를 촉진시켜 대장의 pH를 감소시킴. 이러한 단백질과 pH의 감소는 악취성 화합물의 배출을 낮춤.
- 발효 사료의 급여는 분변의 pH를 낮추며 악취성 화합물로 알려진 skatole, indole의 농도를 낮추는 것으로 보고된 바 있음(Zhu et al., 2023, Poult. Sci.).
- 타 연구에서 *B.subtilis*와 *B.licheniformis*의 급여는 NH<sub>3</sub>의 배출을 감소시키는 것으로 보고된 바 있음(Hu et al., 2022, Animals).
- 본 연구에서 발효사료의 급여는 장내균총의 구조를 변화시켰음. 장내균총은 단백질을 발효시켜 악취성 화합물을 생산하는데 기여함. *Lactobacillus*는 악취성 물질의 생산을 감소시키는 것으로 가장 잘 알려져 있으나, 본 연구에서는 증가하지 않았음(Jeong et al., 2015, Ann. Anim. Sci.).
- 반면, *Prevotella*와 *Clostridium*은 섬유질을 대사하여 악취 방출을 줄이는 데 기여하는 것으로 알려져 있는데, 이는 단백질 발효보다 탄수화물 발효가 더 증가하여 악취가 나는 화합물의 발생을 줄이는 기작을 통함.
- *Prevotella*는 수소를 프로피온산 등 물질의 생산에 사용해 악취물질인 메탄 생성을 감소시킴 (Betancur-Murillo et al., 2022, Microorganisms).
- 한편, *Robusta*는 돼지의 악취 원인이기도 한 생체 아민의 생성과 음의 상관관계가 있는 것으로 보고되었음(Vasquez et al., 2023, Front. Microbiol.).
- 악취 배출에 있어서 Muribaculaceae의 구체적인 역할에 대해서는 많이 알려져 있지 않지만, 이 장내 세균 그룹은 돼지의 영양 소화율을 향상시키는 것과 관련되어 있으며, 이는 소화되지 않은 단백질과 비전분 탄수화물을 줄여 결장에서 악취 화합물 생성을 낮출 수 있음 (Hossain et al., 2024, J. Anim. Technol., C. Hu et al., Front).
- 마이크로바이옴의 유전자 발현은 결장 내 단백질 발효가 감소될 것으로 예측되며 이는 악취 가스 배출을 감소시킬 수 있음. 발효사료를 급여하면 다른 그룹에 비해 발린, 류신, 이소류신 분해와 트립토판 대사가 감소하는 것으로 알려짐. 트립토판 대사는 인돌과 스카톨을 생성하여 돼지의 유해 가스 배출에 기여함(Zhu et al., 2023, Poult. Sci.).

- 발린, 류신 및 이소류신 대사는 돼지 농장의 가스 배출과 관련된 악취가 나는 화합물인BCFA를 생성함(Vasquez et al., 2022, J. Anim. Sci. Technol.).
- 마이크로바이옴 분석을 통해 급여한 발효사료가 악취물질의 배출을 감소시킬 것으로 예상됨.

#### (4) 품질관리 기준 수립

##### □ 제품 저장 안정성 평가

제품의 생산 SOP 및 품질 분석 기준을 수립한 후, 사양실험을 위한 시제품을 이용하여 저장 안정성 평가를 수행하였다. 시제품을 상온에서 총 18개월간 보관하여 3개월 단위로 균수를 측정하여 상온 저장안정성을 평가하였다(그림 44). 균수 분석 결과 상온 조건에서 약 12개월까지는  $5.0 \times 10^7$  CFU/g 이상의 균수를 유지하였다. 이후 15개월 차에  $5.0 \times 10^7$  CFU/g 미만으로 감소하는 것을 확인하였다. 결과적으로 제품 12개월까지는 균수  $5.0 \times 10^7$  CFU/g 이상을 유지할 수 있을 것으로 기대된다.

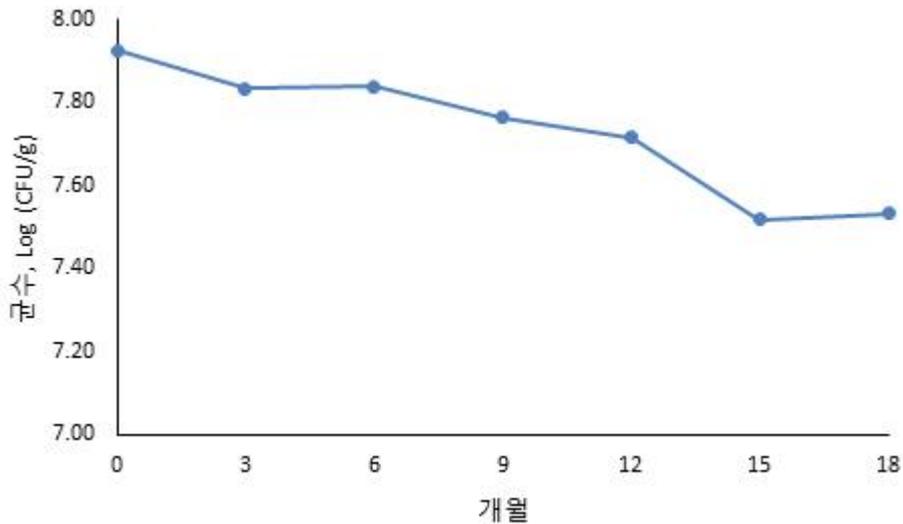


그림 44. 총 18개월 동안의 실온 저장 시 균수 변화

#### (5) 제품화

##### □ 제품화

##### 가. 제품 안전성 평가

제품의 급여 안전성을 평가하기 위해 랫드를 이용한 급성경구독성시험을 진행하였다. 분석은 외부분석으로 진행하였고, (주)센트럴바이오에 의뢰하여 진행하였다. 시험에 사용된 동물은 Sprague-Dawley계 랫드 44마리(수컷, 22마리; 암컷, 22마리)를 공시하였고, 총 2주간 급여를 진행하였다. 투여 용량은 0, 500, 1000, 2000 mg/kg B.W.로 설정하여 1회/일 단회 경구투여로 진행하였다.

급여 기간동안 일반증상 관찰 및 체중측정을 하였고 급여 15일 째 안락사 후 부검을 진행하였다. 일반증상은 매일 1회 이상, 투여 후 30분 이내 및 이후 4시간 째 까지 매시간 관찰을 실

시하였다. 체중은 시험 전 2회 측정하였고(입수일 및 군분리일), 실험 개시 이후 급여 1(급여 전), 2, 4, 8, 15(부검전)일차에 측정하였다. 부검은 관찰 기간 종료 후 모든 동물을 안락사 시키고 육안적 부검소견을 관찰하였다(그림 45).

시험 결과 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 및 체중변화 또한 관찰되지 않았다. 마지막으로 부검소견 역시 이상소견은 관찰되지 않았다. 이를 토대로 위 실험 조건에서 개발된 단백질 분해 효소제를 Sprague-Dawley계 랫드에 단회 경구투여했을 때 개략의 치사량(approximate lethal doses)은 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 판단할 수 있다.

## 요약

본 시험은 시험물질인 에코프로를 Sprague-Dawley계 랫드에 단회 경구투여했을 때 나타나는 개략의 치사량 및 독성을 알아보기 위해 수행하였다.

투여용량은 250, 500, 1,000 및 2,000 mg/kg으로 설정하였고, 군당 암수 각 5 마리에 단회경구투여 후, 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 사료 및 음수섭취량 변화를 관찰하였으며, 14 일간 관찰 후 부검하여 장기에 대한 육안소견 관찰을 실시하였다.

- 1) 사망동물  
사망동물은 관찰되지 않았다.
- 2) 일반증상  
시험물질에 의한 일반증상은 관찰되지 않았다.
- 3) 체중변화  
시험물질에 의한 체중 변화는 관찰되지 않았다.
- 4) 사료섭취량  
시험물질에 의한 사료섭취량 변화는 관찰되지 않았다.
- 5) 음수섭취량  
시험물질에 의한 음수섭취량 변화는 관찰되지 않았다.
- 6) 부검소견  
시험물질에 의한 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 본 시험조건에서 에코프로를 Sprague-Dawley계 랫드에 단회경구투여했을 때 개략의 치사량(Approximate lethal doses)은 2,000 mg/kg를 상회하는 것으로 판단한다.

그림 45. 제품의 급여 안전성을 평가하기 위한 랫드를 이용한 급성경구독성시험 요약(분석기관: 센트럴바이오)



2023년 매출액 3,370만원을 달성하였다.



그림 47. 영업 및 홍보를 위한 에코타이드의 리플렛



그림 48. 피그엔포크에 게재된 제품 출시 기사(2023, vol. 12)

라. 개발 제품의 경제성 평가

제품의 시장에서의 경쟁력을 확인하기 위해 타사제품과 경제성 비교 평가를 진행하였다. 모든

사료 비용은 배합사료의 원료 가격을 기준으로 하였고, 대두박을 사용한 배합사료의 경우 CP 함량 20%, 가공 대두박을 사용한 배합사료의 경우 CP 함량 18%를 기준으로 계산하였다. 대두박 사용 배합사료(CP 20%)의 경우 kg 당 734원, 가공 대두박을 사용한 배합사료(CP 18%) 중 에코타이드 및 자사 기존 제품을 사용한 경우 kg 당 708원, 타사 제품을 사용한 경우 kg 당 727원으로 계산되었다. 배합사료 비용에 사료요구율과 평균증체량, 그리고 사육두수를 모두 고려하여 농가 예측 사료비를 계산하였고, 결과는 아래와 같다.

[계산식 = 사료요구율 × 사료비 × 평균증체량 × 규모(3,000두)]

대두박 사용:  $1.41 \times 734 \times 16.4 \times 3,000 = 50,919$ 천원

자사 기존제품 사용:  $1.43 \times 708 \times 16.4 \times 3,000 = 49,812$ 천원

에코타이드 사용:  $1.36 \times 708 \times 16.4 \times 3,000 = 47,374$ 천원

타사제품 사용:  $1.44 \times 727 \times 16.4 \times 3,000 = 51,507$ 천원

대두박 대비 타사제품은 588천원의 비용이 추가될 것으로 예측되었고, 자사 기존제품은 1,107천원, 에코타이드는 3,545원의 비용이 절약될 것으로 예측되어 결과적으로 에코타이드의 경제성이 가장 우수할 것으로 예측되었다.

## 2) 육성돈용 효소제 개발

### (1) 단백질 분해효소 고생산 균주 선발 및 분비효소 특성 비교

#### □ 후보 균주 스크리닝

단백질 분해 효소제 생산을 위한 후보 균주는 선행 과제에서 선발한 균주 및 썩은나무, 폐사료 등에서 확보한 균주, 기존 보유중인 균주 등으로부터 선발하였다. 후보 균주는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*로 총 7종의 균주로 스크리닝을 진행하였다. 활성 평가용 배지는 동물성 protease를 위한 skim milk 배지(skim milk 10 g/L + Agar powder 15 g/L) 및 식물성 protease를 위한 isolated soy protein (ISP) 배지(ISP, 10 g/L + agar powder, 15 g/L)를 만들어서 이용하였으며, 실험을 위해 후보 균주 중 바실러스 균은 TSB 배지에서, 유산균은 MRS 배지에서 24시간 동안 배양하여 준비하였다. 곰팡이균은 PDA배지에서 48시간 동안 배양하여 준비하였다. 바실러스 및 유산균은 기질을 포함한 한천배지에 paper disk를 올린 후 액상 배양액 200 $\mu$ l를 접종하였고, 곰팡이균은 천공기를 이용하여 배양배지에서 분리하여 기질을 포함한 한천배지에 접종하였다. 바실러스류 접종 배지는 37 $^{\circ}$ C 항온배양기에서 24시간동안 배양하였고, 유산균류 접종배지는 혐기조건으로 37 $^{\circ}$ C 항온배양기에서 24시간 배양하였다. 곰팡이균은 30 $^{\circ}$ C 항온배양기에서 24시간 배양을 진행하였다. 배양 완료 후 paper disk를 중심으로 생기는 둥근 환의 지름을 측정하였다. 환의 지름이 0.5~1.0 cm인 경우 +, 1.0~1.5 cm인 경우 ++, 1.5 cm 이상인 경우 +++로 표기하였다(표 32). 분석 결과 식물성 단백질 분해능이 우수한 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* 4종을 후보균주로 1차 선발하였다.

표 32. 선발된 균주들의 protease 활성 평가

후보균주 명	기탁번호	동물성 protease 활성 평가	식물성 protease 활성 평가
<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM 11599P	++	+++
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KCCM 12612P	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i>	KCCM 10874P	++	+++
<i>Lactobacillus reuteri</i>	KCCM 10651P	+	++
<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM 10670P	++	+
<i>Aspergillus oryzae</i>	KCCM 11125P	++	+++
<i>Aspergillus niger</i>	KCCM 11127P	++	+++

## □ 균주 별 단백질 분해효소 분비능 평가

1차 선발 균주들의 단백질 분해효소 분비능을 평가하기 위해 대두박을 기본배지로 하여 발효 실험을 진행하였다. 수분함량을 40%로 조절하고 121°C에서 15분간 멸균한 후 1차 선발한 각각의 후보 균주를 1%가 되게 접종한 다음 35 °C에서 각각 48시간씩 배양한 후 55°C에서 20시간 동안 건조하여 샘플을 제조하였다. 제조한 샘플을 이용하여 중성 및 산성 protease 역가 분석을 통해 단백질 분해 효소 분비능을 평가하였다.

중성 및 산성 protease 역가 분석은 Matsuzawa et al. (1983)의 방법을 일부 수정 및 응용하여 진행하였다. 중성 protease 역가 분석에 사용할 조효소액은 샘플을 10배 볼륨의 tris 완충액 (pH 7.0)에서 1시간 동안 추출하였다. 이후 4,000 rpm에서 20분간 원심분리한 상등액을 효소분석에 사용하였다. 기질 용액은 McIlvaine 완충액에 기질인 casein을 2% (w/v) 첨가하여 사용하였다. 산성 protease 역가 분석 역시 상기 Matsuzawa et al. (1983)의 방법을 일부 수정 및 응용하여 진행하였다. 샘플 추출을 위한 조효소액은 sodium lactate 완충액 (pH 2.6)에서 추출였고, 기질 용액은 sodium lactate 완충액에 casein을 0.6% (w/v) 첨가하여 사용하였다. 반응 완료 후 660 nm에서 흡광도를 측정하여 효소의 활성도를 측정하였다. 효소의 활성 단위는 1분 동안에 1 µg의 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit (U)로 정의하였다.

역가 분석 결과 중성 protease 분비능은 *Aspergillus oryzae* 및 *Bacillus subtilis* 균주, 산성 protease 분비능은 *Aspergillus niger* 균주가 가장 우수한 것을 알 수 있었다(표 33). Protease 역가 분석 결과를 통해 *Bacillus subtilis* 및 *Aspergillus oryzae* 균주를 중성 protease 생성을 위한 균주로, *Aspergillus niger* 균주를 산성 protease 생성을 위한 균주로 최종 선발하였다. *Bacillus subtilis* (KCCM 11599P)는 선행연구에서 급여용(크린바이오프리미엄산) 및 부숙촉진용(그린케어) 제품과 활용되고 있다. 최종 균주들을 이용한 추후 연구는 중성 protease의 경우 고상발효로 진행하였고, 산성 protease의 경우 고상발효 시 *Aspergillus niger* 균주의 검은 포자 발생으로 대량 생산라인의 오염 이슈로 인해 액상발효로 진행하였다.

표 33. 선발 균주의 고상발효 후 중성 및 산성 protease 분비능 평가

후보균주 명	중성 protease 역가(U/g)	산성 protease 역가(U/g)
<i>Bacillus subtilis</i>	1,169	N/A*
<i>Bacillus licheniformis</i>	893	N/A
<i>Aspergillus oryzae</i>	1,347	63
<i>Aspergillus niger</i>	953	842

\*N/A (not analyzed), ≤50 U/g

## (2) 고상발효 기술을 활용한 효소제 생산 실험(Lab. test)

### □ 최적배지 조성 연구

중성 protease 생산을 위한 미생물 고상발효 시 사용할 최적 고상배지를 확인하기 위하여 사료산업에서 가장 널리 사용되는 사료곡물인 소맥피, 대두박, 옥수수, 당밀 및 DDGS 등을 이용하여 단일 및 탄소, 질소 함량을 고려한 혼합원료로 고상발효 실험을 진행하였다(표 34). 총 4개의 원료 후보 별로 수분함량을 40%로 조절하고 121 °C에서 15분간 멸균한 후 TSB 및 PDB 배지에 액상배양된 후보 균주들(각각 *Bacillus subtilis* 및 *Aspergillus oryzae*)의 배양액을 각 후보 배지에 1%씩 총 2%가 되게 접종한 다음 35°C에서 48시간 공발효(co-fermentation)한 후 55°C에서 20시간 동안 건조하여 샘플을 제조하였다. 제조된 효소제 샘플들의 중성 protease 역가 분석은 상기 Matsuzawa et al. (1983) 방법을 수정 및 응용하여 진행하였다. 곡물 배지에 따른 중성 protease 역가 분석 결과 배지 조성 A에서 가장 좋았다(표 35).

산성 protease 생산을 위한 미생물 액상발효 시 사용할 최적 액상배지를 확인하기 위하여 문헌 조사를 통해 3개의 후보 액상배지 조성을 선정하여 최적의 액상배지 연구를 진행하였다(표 36). 총 3개의 액상 배지를 121 °C에서 15분간 멸균한 후 PDB 배지에 액상배양된 균주 배양액을 각 후보 배지에 1%가 되게 접종한 다음 30 °C 조건에서 48시간 진탕배양하여 샘플을 제조하였다. 제조된 액상 샘플의 산성 protease 역가 분석은 상기 Matsuzawa et al. (1983) 방법을 수정 및 응용하여 진행하였다. 액상배지 조성에 따른 산성 protease 역가 분석 결과 배지 조성 A에서 가장 좋았다(표 37).

표 34. 고상발효 후보 배지 조성

고상배지 조성, g/kg	A	B	C	D
소맥피	350	940	800	800
대두박	300	10	200	-
옥수수	315	-	-	-
당밀	35	50	-	-
DDGS	-	-	-	200

표 35. 후보 고상배지에 따른 *Bacillus subtilis* 및 *Aspergillus oryzae* 균주 공배양 시 중성 protease 역가

배지 조성	중성 protease 역가(U/g)
A	1,734
B	821
C	618
D	649

표 36. 액상발효 후보 배지 조성

액상배지 조성, g/L	A	B	C
--------------	---	---	---

CaCl <sub>2</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.4	0.8	0.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.0	2.0	7.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5	1.6	2.5
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.5	1.0	0.5
ZnCl <sub>2</sub>	0.1	0.2	0.1
NaCl	0.3	0.6	0.3
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	3.5	-	2.0
Wheat	10	10	10
Fish flour	5	5	5

표 37. *Aspergillus niger* 균주의 후보 액상배지 별 산성 protease 역가

배지 조성	산성 protease 역가(U/mL)
A	1,359
B	1,157
C	1,217

### (3) *In vitro* 제품특성 연구

#### □ pH 별 역가 분석

개발된 단백질 분해 효소제의 pH 별 역가를 확인하기 위해 샘플을 이용해 중성 및 산성 조건에서의 역가를 분석하였다. 기질 용액은 카제인을 용매로 제조하며, pH 조절을 위해 NaOH 및 HCl을 이용하여 pH3, 5, 7, 9, 11의 기질 용액을 제조하였다. 이후 tris buffer를 이용해 샘플을 추출한 후, 상기 효소 역가 분석 방법에 따라 샘플의 protease 역가를 분석하였다(그림 49).

기존 중성 효소제의 경우 pH 7에서 가장 높은 역가를 보이고, pH 9에서 약 80% 수준의 활성을 보였다. 그 외 조건에서는 효소 활성을 보이지 않음을 확인할 수 있었다. 타사 중성 효소제 역시 pH 7에서 활성을 보였고, 오히려 pH 11에서 가장 높은 활성을 보였다. 반면 개발된 제품의 경우 pH 7에서 가장 높은 역가를 보였고, pH 3에서도 중성 조건 대비 약 70%의 역가를 보임을 확인할 수 있었다. 따라서, 개발된 제품의 최적 pH가 실제 단위동물의 위(산성)와 소장(중성)에서 각각 이중효과(double action) 효소 작용이 기대된다.

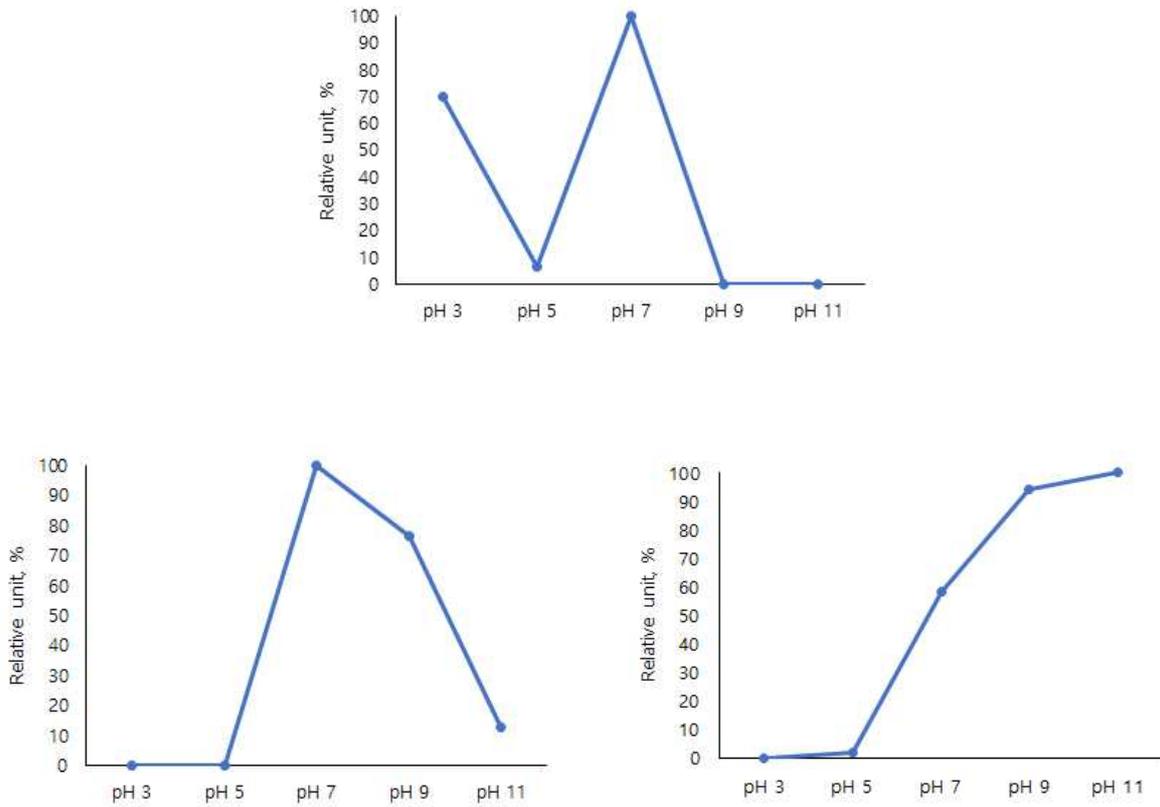


그림 49. 단백질 분해 효소제의 pH 별 protease 역가(상, 개발된 제품; 좌, 기존 중성 효소제; 우, 타사 중성 효소제)

### □ 열안정성 분석

개발된 단백질 분해 효소제의 배합사료 등 제조 시 열에 대한 내열성을 확인하기 위해 열안정성 분석을 진행하였다. 효소제의 열안정성을 분석하기 위해 샘플을 각각 80, 100, 120°C로 예열해놓은 드라이오븐에 1시간 열을 가한 후 상기 수정 및 응용된 Matsuzawa et al. (1983) 방법에 따라 효소제의 역가를 분석하였다(그림 50). 분석 결과 무처리 효소제에 비해 120°C 온도에서 약 90%의 효소 활성도가 유지되는 것을 확인하였다. 이를 통해 펠렛 등의 공정에서 안정성을 가질 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

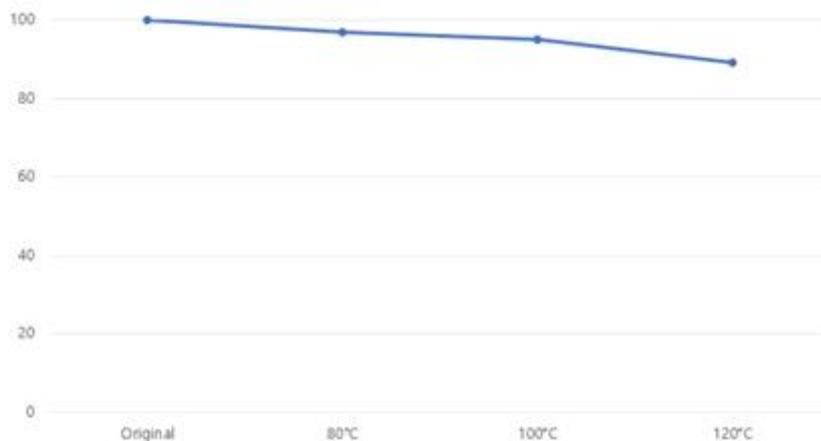


그림 50. 단백질 분해 효소제의 처리 온도에 따른 열안정성

## □ 단백질 분해 효소제의 기질 분해도 분석

개발된 단백질 분해 효소제의 기질 분해능 평가 및 타사 제품 2종(타사 A, B)과의 분해능 비교를 위한 분석을 진행하였다. 분석에 사용된 기질은 대표적인 식물성 단백질 사료 원료인 대두박과 동물성 단백질 원료인 혈장단백질을 사용하였다. 개발된 제품의 경우 중성 protease의 역가가 약 1,500 U/g, 산성 protease의 역가가 약 1,000 U/g으로 대략 2,500 U/g의 역가를 가진다고 판단하였으며, 이와 동일하게 타사 제품의 protease 역가를 모두 2,500 U/g (중성 역가 기준)으로 맞춘 후 분석을 진행하였다. 반응을 위한 buffer는 실제 소화관의 pH 조건과 최대한 유사하게 중성(pH 7.0) 및 산성(pH 2.6) 조건에서 진행하였다. 기질 분해도는 기질과 단백질 분해 효소제를 함께 첨가 후 최대 4시간까지 반응 후 기질(대두박 및 혈장단백질)에서 분해되는 tyrosine의 양을 측정하였다.

분석 결과 중성 조건에서는 타사 A 제품의 대두박 분해도가 가장 높았다(그림 51). 개발된 제품의 경우 반응 1시간까지는 타사 A 제품과 유사한 대두박 분해도를 보였으나, 이후 분해 속도가 점차 감소하여 최종적으로 타사 B 제품과 유사한 분해도를 보였다. 하지만 산성 조건에서 분석 결과 타사 제품 2종의 경우 반응 10분 이후부터 더 이상 분해가 진행되지 않았으나, 개발된 제품의 경우 10분 이후 분석 종료 4시간까지 기질 분해력을 보이는 것을 확인하였다(그림 52). 최종적으로 중성 및 산성 조건에서 대두박의 분해도 결과를 합하여 나타낸 종합 분해도 수치의 경우 개발된 제품의 분해도가 가장 높은 것을 확인할 수 있었다(그림 53).

혈장단백질 분해의 경우 중성 조건에서는 타사 A 제품이 가장 낮았으나, 3종 효소제 모두 비슷한 수치를 보였다(그림 54). 하지만 산성 조건에서 타사 제품 2종의 경우 거의 분해가 되지 않았으나, 개발된 제품의 경우 4시간 이후까지 분해가 계속되는 것을 확인할 수 있었다(그림 55). 중성과 산성 조건 결과를 합한 종합 분해도의 경우 개발된 제품의 분해도가 2배 가량 높은 것을 확인할 수 있었다(그림 56).

최종적으로 개발된 제품의 대두박 및 혈장단백질 분해도는 중성 조건에서는 타사 2 제품과 큰 차이가 나지 않았으나, 산성 조건에서는 더 높은 분해도를 보여 최종적인 기질의 분해도는 타사 2종에 비해 높은 것을 확인하였다. 실제 장관의 환경은 산성 및 중성 조건 모두 존재하기 때문에, 개발된 제품은 산성 및 중성 조건에서 모두 높은 분해도를 보여 사료 효율 증대에 효과적일 것으로 기대할 수 있다.

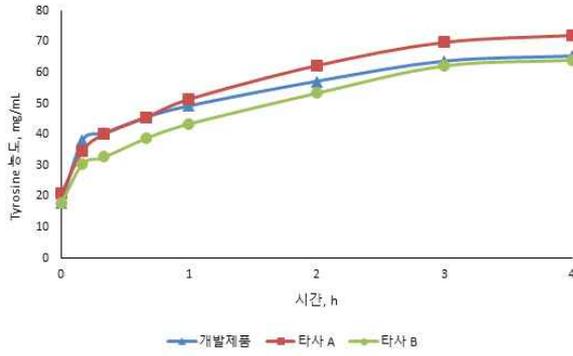


그림 51. 중성 조건에서 단백질 분해 효소제 3종의 대두박 분해도

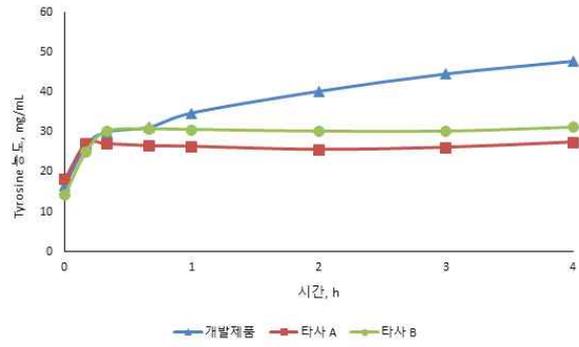


그림 52. 산성 조건에서 단백질 분해 효소제 3종의 대두박 분해도

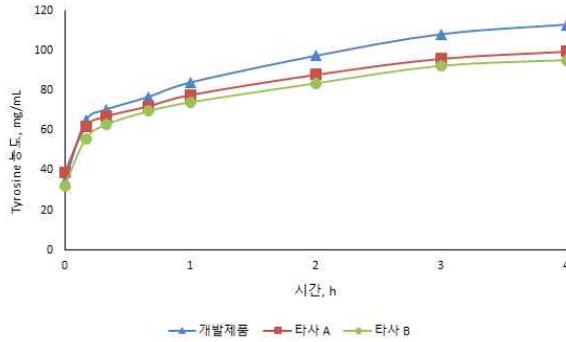


그림 53. 중성 및 산성 조건에서 단백질 분해 효소제 3종의 대두박 총 분해도(중성+산성)

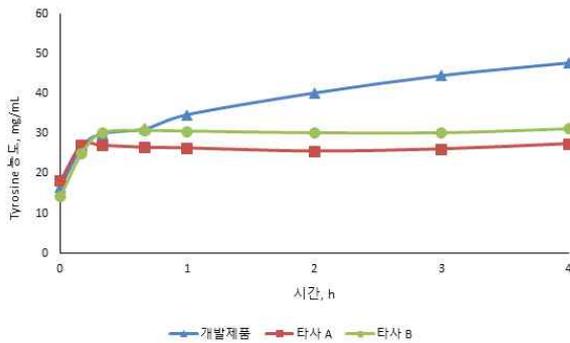


그림 54. 중성 조건에서 단백질 분해 효소제 3종의 혈장단백질 분해도

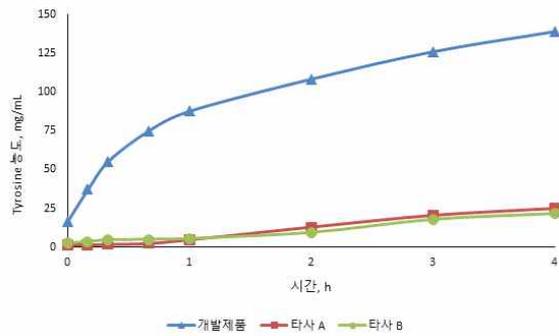


그림 55. 산성 조건에서 단백질 분해 효소제 3종의 혈장단백질 분해도

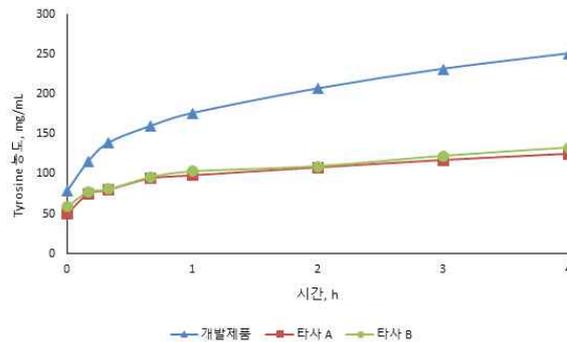


그림 56. 중성 및 산성 조건에서 단백질 분해 효소제 3종의 혈장단백질 총 분해도

## □ NSP (non starch polysaccharide) 효소제와의 시너지 확인

개발된 단백질 분해 효소제의 NSP (non starch polysaccharide) 분해 효소제와의 시너지 효과를 확인하기 위한 분석을 진행하였다. 분석에 사용된 NSP 분해 효소제로는 cellulase 및 xylanase를 사용하였다. 단백질 분해 효소제의 NSP 분해 효소제와 시너지 분석 방법은 ‘사료 등의 기준 및 규격[농림축산식품부]’에 명시된 ‘사료표준분석방법’ 상 셀룰라아제(섬유당화력 시험법) 분석법, 키시라나제(키시란당화력) 및 중성프로테아제[단백질소화력(protease) 시험법] 분석법을 일부 수정 및 응용하여 진행하였다. 분석에 사용된 기질로는 널리 쓰이는 단백질 사료 원료인 대두박과 섬유질 사료 원료인 소맥피를 사용하였고, buffer는 tris 완충액(pH 7.0)를 사용하였다.

Tris 완충액에 기질(대두박 및 소맥피)을 넣은 후, cellulase 및 xylanase를 각각 기질의 1% 만큼 넣어주었다. 그 후 protease를 각각 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1% 까지 달리 첨가한 뒤 protease 농도에 따른 cellulase 및 xylanase의 역할을 확인하였다(그림 57, 58). 분석 결과 대두박과 소맥피 모두 protease의 농도가 높아짐에 따라 유리되는 glucose 및 xylose의 농도가 높아졌고, 결과적으로 NSP 분해 효소제들의 역할이 높아짐을 확인하였다. 그 중 단백질 함량이 높은 대두박의 경우 protease 1% 첨가 시 약 360%의 수준까지 증가함을 확인하였다. 또한 섬유소 원료인 소맥피 역시 xylanase와는 최대 약 150%, cellulase와는 최대 약 120%의 시너지를 내는 것으로 확인되었다. 이를 통해 개발된 protease 제품과 NSP 분해 효소제를 함께 사용하면 시너지 효과를 예상할 수 있고, 특히 단백질 원료의 에너지 효율 증가를 기대할 수 있을 것이다.

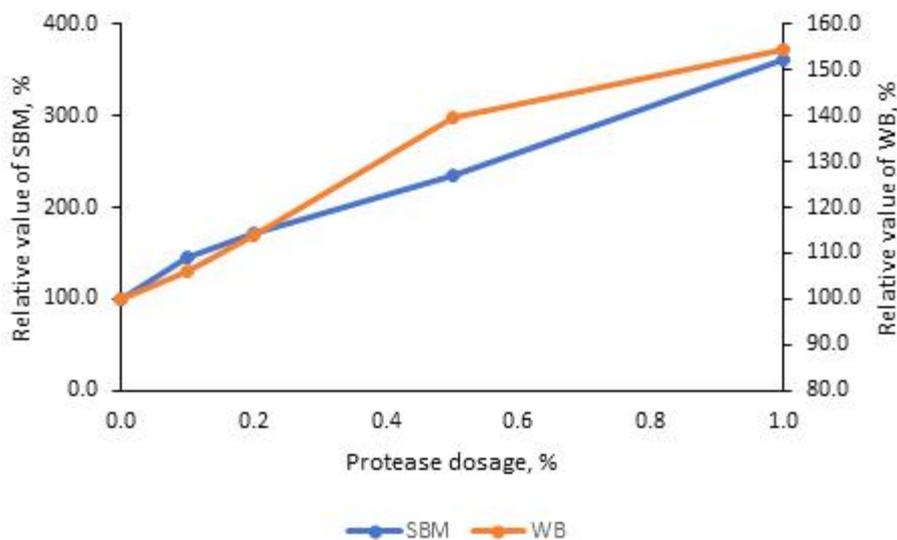


그림 57. Xylanase와 protease의 시너지 효과  
SBM, soybean meal; WB, wheat bran

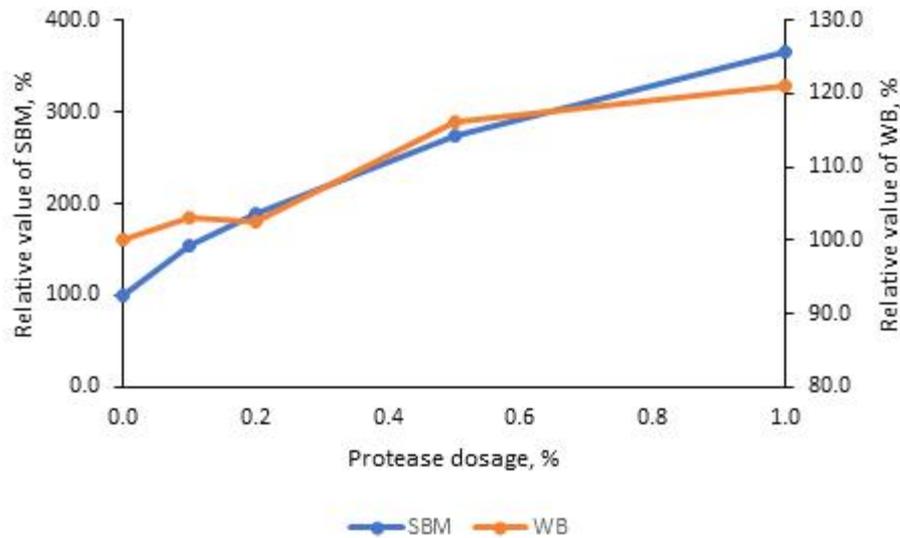


그림 58. Cellulase와 protease의 시너지 효과  
SBM, soybean meal; WB, wheat bran

#### □ *In vitro* 인공 소화액 실험을 이용한 효소제 특성 연구

단위동물의 입과 위, 소장에서 효소제의 분해능을 *in vitro* 상에서 확인하기 위해 *in vitro* 인공 소화액 실험(*in vitro* artificial gastrointestinal system, IvAGS)을 이용하여 실험을 실시하였다. 분해를 위한 기질로는 대표적인 단백질 원료인 대두박을 사용하였고, 100 g의 대두박에 개발된 효소제(Enz A) 및 타사 중성 효소제(Enz B)를 각각 0, 1, 2.5, 5%씩 혼합하여 실험을 진행하였다. 모든 효소제는 최종 역가(중성+산성 protease 역가)를 2,500 U/g으로 동일하게 맞춘 후 분석을 진행하였다. IvAGS는 구강, 위, 소장 조건의 3개 단계로 나뉘며, 입 조건의 경우 구강 조건 buffer (NaCl 6.2 g/L, CaCl 2.2 g/L, KCl 2.2 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 1.2 g/L) 100 ml에서 5분 반응한다. 구강 조건 buffer에서 5분간 반응 후, 위 조건 buffer (pepsin 3.47 g/L, musin 7.37 g/L, HCl pH 3) 200 ml 추가 후 39°C에서 75분간 반응한다. 마지막으로 소장 조건을 위해 소장 조건 buffer A (NaHCO<sub>3</sub> 84 g/L, pancreatin 3.7 g/L, trypsin 0.2 g/L) 100 ml 및 소장 조건 buffer B (sodium succinate 13.5 g/L, bile extract 22.8 g/L) 700 ml를 추가하여 39°C에서 240분간 반응한다.

샘플링은 입 조건 반응 완료 후 1회, 위 조건 반응 완료 후 1회, 소장 조건 반응 2시간 및 반응 완료 후 총 2회 진행하였다. 샘플 내 조단백질 함량을 확인하여 소화 기관 및 시간에 따른 단백질 분해량을 확인하였다(그림 59).

IvAGS 분석 결과 중 각 구간에서 효소제 0% 첨가구의 단백질 분해량을 100%로 놓고 데이터들을 상대적으로 비교분석하였다. 분석 결과 타사 중성 제품의 경우 위 조건에서는 큰 차이를 보이지 않았고, 소장 조건에서 분해량이 높아짐을 확인할 수 있었다. 하지만 개발된 제품의 위 조건에서 단백질 분해량이 최대 약 20% 수준까지 높아짐을 확인하였다. 이렇게 위에서 빠르게 분해된 펩타이드 및 아미노산과 같은 영양소는 소장에서 흡수되기에 유리한 조건으로 작용할 수 있을 것으로 판단된다.

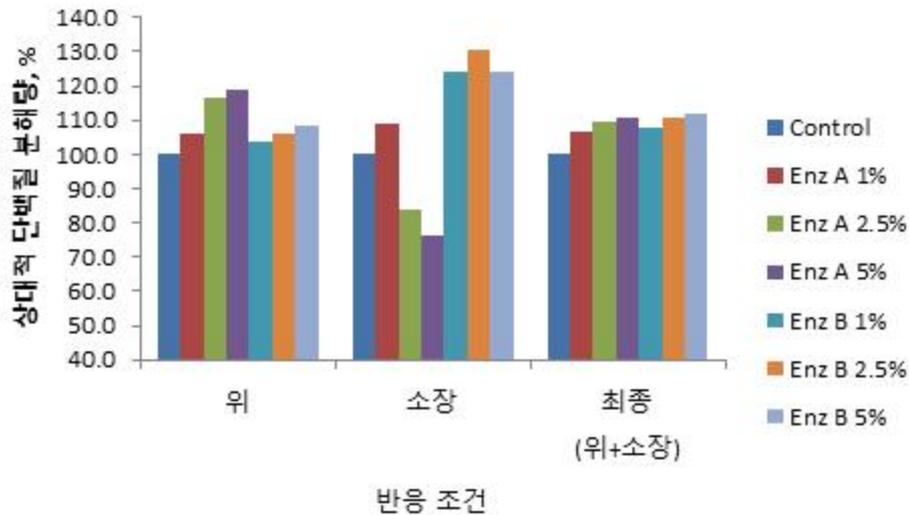


그림 59. 반응 조건 및 시간에 따른 대두박 단백질 분해량, Control, 효소제 무첨가; Enz A, 개발된 효소제(중성+산성); Enz B, 타사 중성 효소제

#### (4) 효소제 대량생산 연구

##### □ 대량생산 시설에서 대량 배양 및 생산 조건 실험

###### 가. 종균배양

선행 연구된 lab scale 생산조건들을 기준으로 대량고상발효 공정을 확립하였다(그림 8). *Aspergillus oryzae* 균주의 경우 접종원 배양을 위해 실험실에서 접종원을 준비하였다. 보관된 seed를 PDA에 도말하여 30 °C 항온배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 배양된 배지에서 포자를 수거하기 위하여 멸균된 증류수를 배지에 넣고 spreader를 이용하여 포자현탁액을 제조하였다. 제조된 포자현탁액을 miracloth를 이용, 순수한 포자만을 수거하였다. 수거된 순수 포자현탁액을 멸균된 소맥피 배지에 접종하여 배양을 진행하였다. 소맥피에 40% 비율로 가수한 다음 30분 간 침지하였다. 침지 후 고압멸균기를 활용하여 121 °C, 15분 조건으로 멸균을 진행하였다. 멸균된 배지를 냉각한 다음 상기 포자현탁액을 1% 비율로 접종하고 30 °C 항온배양기에서 48시간 동안 배양 후 55 °C 건조기에서 24시간 동안 건조하여 고상접종원을 제조하였다.

*Bacillus subtilis* 균주는 바실러스 종균의 접종원 생산을 위해 seed를 멸균된 LB배지에 1% 비율로 접종하고 35°C 진탕배양기에서 130 rpm 조건으로 18 시간 동안 배양하였다. 배양된 접종원의 오염여부 확인을 위해 1 ml 샘플링하여 LB고체배지에 serial dillution하고 35°C 항온배양기에서 24시간 배양하여 오염 여부를 확인하였다. 확인된 액상 배양액을 대량액상배양의 접종원으로 사용하였다.

*Aspergillus niger* 균주는 산성프로테아제 제조을 위한 액상 접종원을 제조하였다. 앞선 실험에서 확인된 최적배지를 제조하여 고압멸균기를 이용, 121 °C, 15분 조건으로 멸균을 진행하였다. 멸균된 배지에 종균을 1 % 비율로 접종하고, 진탕배양기에서 30 °C, 250 rpm 조건으로 48 시간 동안 배양하였다.

###### 나. 대량생산 조건 실험

중성 protease는 상기 제조된 접종원을 이용하여 대량생산 조건 실험을 진행하였다. 중성 protease 생산을 위한 고상발효 실험을 위해 앞선 실험에서 확인된 최적 곡물배지인 옥수수 45

%, 소맥피 50 %, 당밀 5% 배지 5 톤을 준비하였다. 증자 조건은 110℃, 30분으로 설정하고. 가수량은 47 %(3,396 L)로 설정하였다. 준비된 종균 접종량은 배지 대비 *Aspergillus oryzae* 1 %, *Bacillus subtilis* 1 % 로 접종을 진행하였다. 발효 온도 및 시간은 35℃, 40 시간으로 설정하여 진바이오텍 내 대량배양설비에서 발효를 진행하였다(그림 60). 발효 후 건조는 55℃에서 9 시간 동안 진행하였다. 발효 시간 별로 샘플링을 진행하여 균수 및 효소역가를 측정하여 발효 정도를 확인하였다. 3회 반복실험 결과, 균수는 평균 *Aspergillus oryzae*이  $2.2 \times 10^8$  CFU/g, *Bacillus subtilis*이  $6.3 \times 10^8$  CFU/g로 확인되었으며, 중성 protease 역가는 평균 1,694 U/g로 확인되었다(표 38).

산성 프로테아제 효소첨가제의 경우 상기 제조된 *Aspergillus niger* 접종원을 이용하여 대량생산 조건 실험을 진행하였다. 산성 프로테아제 생산을 위한 액상발효 실험을 위해 앞선 실험에서 확인된 최적 배지 조건(표 39)으로 액상배지를 제조하였다. 700 L 대량액상 배양기에서 배지를 제조 후 121 °C, 15분 조건으로 멸균한 다음 상기 제조된 준비된 종균을 1 % 비율로 접종하였다(그림 61). 발효온도 및 시간은 30 °C, 48 시간으로 설정하여 발효를 진행하였다. 3 회 반복실험 간 배양액을 샘플링하여 균수 및 효소역가를 분석하였다. 분석 결과, 균수는 평균  $2.2 \times 10^8$  cfu/g, 산성 프로테아제 함량은 평균 1,694 U/g로 확인되었다.(표 40).

혼합 프로테아제 효소첨가제 생산: 고상 발효한 중성 프로테아제와 액상 발효액을 혼합 후 건조해서 중성 및 산성 혼합 프로테아제를 제조하였다. 상기 고상 발효한 중성 프로테아제 발효물을 증자관에 투입하고 입국을 진행하고, 액상 접종기를 활용, 액상 발효 상등액을 1:1 비율로 혼합한 다음 제국실 내에서 건조를 진행하였다. 건조는 55 °C에서 24시간 동안 건조를 진행하여 최종 수분을 9.8 %로 건조를 진행하였다. 3회 반복 실험 후, 건조된 프로테아제 효소첨가제를 샘플링하여 중성 및 산성 프로테아제 역가를 분석하였다. 분석방법은 사료표준분석법을 이용하여 진행하였다. 분석 결과, 중성 프로테아제 역가는 평균 1,552 u/g, 산성 프로테아제 역가는 평균 1,071 u/g로 확인 되었다(표 41).



그림 60. 대량생산을 위한 발효 설비

표 38. 대량생산 발효물의 중성 protease 효소 역가

실험생산	균주명	균수(CFU/g)	중성 프로테아제 역가 (u/g)
1	<i>Aspergillus oryzae</i>	$2.4 \times 10^7$	1,684
	<i>Bacillus subtilis</i>	$7.3 \times 10^7$	
2	<i>Aspergillus oryzae</i>	$8.9 \times 10^6$	1,696
	<i>Bacillus subtilis</i>	$6.3 \times 10^7$	
3	<i>Aspergillus oryzae</i>	$3.3 \times 10^7$	1,702
	<i>Bacillus subtilis</i>	$5.4 \times 10^7$	
평균	<i>Aspergillus oryzae</i>	$2.2 \times 10^7$	1,694
	<i>Bacillus subtilis</i>	$6.3 \times 10^7$	

표 39. *Aspergillus niger* 배양을 위한 최적 액상배지 조성

액상배지 원료	혼합량(g/L)
CaCl <sub>2</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.4
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	0.5
ZnCl <sub>2</sub>	0.1
NaCl	0.3
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	3.5



그림 61. 700 L 액상배양기

표 40. 대량생산 발효물의 균수 및 산성 protease 효소 역가

실험생산	균주명	균수(cfu/g)	산성 프로테아제 함량 (u/g)
1	<i>Aspergillus niger</i>	1.8 x 10 <sup>7</sup>	1,388.2
2	<i>Aspergillus niger</i>	1.2 x 10 <sup>7</sup>	1,429.3
3	<i>Aspergillus niger</i>	2.3 x 10 <sup>7</sup>	1,402.1
평균	<i>Aspergillus niger</i>	1.8 x 10 <sup>7</sup>	1,406.5

표 41. 혼합 protease의 효소 역가

실험 생산	중성 프로테아제 역가 (u/g)	산성 프로테아제 역가 (u/g)
1	1,564	1,130
2	1,512	1,023
3	1,582	1,061
평균	1,553	1,071

### (5) 사양실험용 샘플 제조

#### □ 사양실험용 시제품 생산

선행 연구된 대량생산 조건들을 기준으로 사양실험용 시제품을 생산하였다. 액상배양기를 이용하여 *Bacillus subtilis*의 액상 종균을 배양하였고, 앞서 생산한 *Aspergillus oryzae* 고상 접종원을 이용하여 고상발효를 진행하였다. 최적배지인 옥수수 45 %, 소맥피 50 %, 당밀 5% 배지에 47% 함량으로 가수하여 110°C, 30 분간 증자를 진행하였다. 실온까지 냉각한 다음 배지 대비 각각 1% 비율로 접종한 다음 발효온도 35°C로 40 시간 동안 발효를 진행하였다. 발효 후 건조는 55°C에서 18 시간 동안 진행하였다.

*Aspergillus niger* 대량 액상발효를 위해 선행 연구된 배지를 제조 후 1% 비율로 접종하여 30° C의 진탕배양기에서 250 rpm으로 48 시간 동안 배양하였다. 발효 완료 후 10,000 rpm에서 원심분리하여 상등액을 수거하였다. 수거된 상등액과 고상발효물을 1:1 비율로 혼합 후 55°C에서 20 시간 동안 건조를 진행하여 시제품을 제조하였다.

#### □ 생산 standard operating procedure (SOP) 및 품질 분석기준 수립

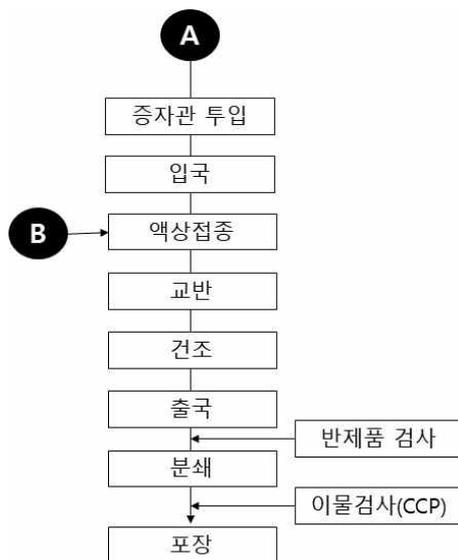
앞선 발효 실험에서 확인된 제품의 특성을 기준으로 품질기준을 수립하였다. 생산설비 내에서 시험발효를 3회 진행하여 평균적인 품질을 확인하여 품질기준으로 설정하였다(표 42, 43). 새롭게 개발된 제품의 효율적인 품질관리를 위해 위해요소 분석 및 중요관리점 분석(hazard analysis and critical control points, HACCP)을 수행하였다. ISO 9001 및 FAMI-QS (feed additives and pre-mixtures quality system)에서는 제품의 원료입고 단계에서부터 최종제품에 이르기까지 전 과정에서의 품질 관리 기준을 설정하고 제조공정 상에서 중요관리점(critical control points, CCP)을 확인하여 지속적인 점검 및 관리, 개선조치를 진행할 것을 명시하고 있다. 신규 제품에 대한 제조공정도를 작성하고 제조공정 상에서의 중요관리점을 확인하여 점검 기준을 확립하였다(그림 62).

표 42. 생산설비 내 시험발효 분석

발효회차	수분(%)	중성 프로테아제 역가 (u/g)	산성 프로테아제 역가 (u/g)
1	9.27	1,564	1,130
2	9.38	1,512	1,023
3	8.96	1,582	1,061

표 43. 개발제품의 품질기준 설정

중성 프로테아제 역가 (u/g)	산성 프로테아제 역가 (u/g)	수분
1,500 이상	1,000 이상	12% 이하



- CCP : 금속 이물질 검출, CCP 관리 : 마그네트 점검

그림 62. 제품 제조과정 및 중요관리 지점 분석

(6) 육성돈용 복합 사료첨가제의 사양실험 및 이를 기반으로 장내 균총 및 단쇄지방산 조절능 DB 구축

□ 시험동물 및 시험설계

가. 공시동물 : 3원교잡 [L x Y) x D] 육성돈 100두

나. 실험기간 : 6주

다. 처리구 : 5처리구, 처리당 4반복, 펜당 5두

	Treatment
PC	High nutrition value(CP 16%)
NC	Low nutrition value(CP 14%)
TRT1	Low nutrition value + 개발 효소제(Protease A) 0.1%
TRT2	Low nutrition value + 개발 효소제(Protease A) 0.2%
TRT3	Low nutrition value + 타사 효소제(Protease B) 0.2 %

라. 사양실험

Growth performance	Gas emission	Nutrient digestibility	N retention	Microbiome
개시, 6주	개시, 6주	개시, 6주	개시, 6주	개시, 6주

□ 시험사료와 사양관리

사양실험은 공주시에 위치한 단국대학교 시험농장에서 실시하였다. 시험사료는 NRC (2012) 요구량에 따라 배합한 옥수수-대두박 위주의 사료를 사용하였다. 시험사료는 시험농장에 위치한 배합기를 이용하여 준비하였고 자유 채식토록 하였으며, 물은 자동급수기를 이용하여 자유로이 마실 수 있도록 조절하였다(그림 63).



그림 63. 사양실험을 위한 단국대학교 시험농장(공주시)

□ 조사항목 및 방법

가. 생산성

일당증체량, 일당사료섭취량, 사료요구율은 시험 개시 및 시험 종료 시 (6주)에 각 개체 별로 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 체중측정시 사료 급여량에서 잔량을 제하여 계산하였고, 사

료요구율은 사료섭취량을 일당증체량으로 나누어 산출하였다.

저단백 사료 내 효소복합제의 첨가 급여가 육성돈의 생산성에 미치는 영향은 Table 44에 나타내었다. 시험 6주 체중, 일당증체량에 있어 PC 처리구, Protease A 0.2% 첨가한 TRT2 처리구 및 Protease B 0.2% 첨가한 TRT3 처리구가 NC 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 또한, 전체 시험기간동안 전체 시험기간동안 사료요구율에 있어 NC 처리구가 TRT2 처리구 및 TRT3 처리구에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 따라서, Protease A 및 B의 첨가는 아미노산 함량을 보완한 낮은 조단백질사료에서 효소복합제를 첨가하지 않은 NC 처리구에 비하여 체중과 일당증체량에서 높은 효과를 나타내었다.

표 44. The effect of dietary Genebiotech additive supplementation on growth performance in growing pigs<sup>1</sup>

Items	PC	NC	TRT1	TRT2	TRT3	SEM <sup>2</sup>
Body weight, kg						
Initial	24.71	24.72	24.71	24.72	24.72	0.03
Week 6	51.23 <sup>a</sup>	49.07 <sup>b</sup>	50.28 <sup>ab</sup>	51.66 <sup>a</sup>	51.34 <sup>a</sup>	0.63
Overall						
ADG, g	631 <sup>a</sup>	580 <sup>b</sup>	609 <sup>ab</sup>	642 <sup>a</sup>	634 <sup>a</sup>	15
ADFI, g	1721	1641	1700	1733	1718	42
FCR	2.725 <sup>ab</sup>	2.834 <sup>a</sup>	2.791 <sup>ab</sup>	2.701 <sup>b</sup>	2.711 <sup>b</sup>	0.036

<sup>1</sup>Abbreviation: PC, High nutrition value (CP 16%); NC, Low nutrition value (CP 14%); TRT1, Low nutrition value + 개발 효소제 0.1%; TRT2, Low nutrition value + 개발 효소제 0.2%; TRT3, Low nutrition value + 타사 효소제 0.2 %.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscript differ significantly ( $P < 0.05$ ).

#### 나. 분 내 악취물질

분 내 악취 물질 분석을 위해 시험 개시 및 종료 시 (6주)에 각 처리구에서 동일한 시간 동안 배설된 분을 채취한 후, 신선한 분 300g을 취하여 2,600mL의 밀봉된 플라스틱 용기에 넣고 실온에서 7일간 발효 및 보관한 후 NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, Methyl mercaptan, Acetic acid 및 CO<sub>2</sub>은 복합가스 측정기(MultiRAE Lite model PGM-6208, RAE, USA)을 사용하여 측정하였다.

저단백 사료 내 효소복합제의 첨가 급여가 육성돈의 분 내 악취물질에 미치는 영향은 Table 45에 나타내었다. 시험 종료 시 (6주) 육성돈의 분 내 NH<sub>3</sub>에 있어 TRT1, TRT2 및 TRT3 처리구가 PC 처리구에 비하여 유의적으로 낮게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 따라서, 효소복합제 Protease A 및 B는 체내 단백질 소화율을 향상시켜 배출되는 잉여 질소 함량을 효과적으로 낮출 수 있다.

표 45. The effect of dietary Genebiotech additive supplementation on gas emission in growing pigs<sup>1</sup>

Items, ppm	PC	NC	TRT1	TRT2	TRT3	SEM <sup>2</sup>
Initial						
NH <sub>3</sub>	3.38	3.88	4.00	3.88	4.38	0.75
H <sub>2</sub> S	3.95	3.40	3.05	3.48	3.63	0.84
Methyl mercaptans	5.50	6.63	6.13	5.50	6.75	0.88
Acetic acid	8.38	7.63	8.50	7.75	8.50	0.97
CO <sub>2</sub>	11775	11800	11025	10550	11150	661
Week 6						
NH <sub>3</sub>	8.13 <sup>a</sup>	6.25 <sup>ab</sup>	5.25 <sup>b</sup>	4.88 <sup>b</sup>	5.00 <sup>b</sup>	0.75
H <sub>2</sub> S	5.03	5.33	5.13	4.98	4.65	0.44
Methyl mercaptans	7.38	7.88	7.63	7.13	5.50	1.21
Acetic acid	11.13	11.38	11.25	11.00	10.75	1.27
CO <sub>2</sub>	14375	14700	14500	14100	12825	757

<sup>1</sup>Abbreviation: PC, High nutrition value (CP 16%); NC, Low nutrition value (CP 14%); TRT1, Low nutrition value + 개발 효소제 0.1%; TRT2, Low nutrition value + 개발 효소제 0.2%; TRT3, Low nutrition value + 타사 효소제 0.2 %.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscript differ significantly (P < 0.05).

#### 다. 영양소 소화율

영양소 소화율은 시험 개시 및 종료 시 (6주)에 산화크롬 (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)을 표시물로서 0.5% 첨가하여 7일간 급여 후 항문 마사지법으로 분을 채취하였다. 채취한 분은 60°C의 건조기에서 72시간 건조시킨 후 Willey mill로 분쇄하여 분석에 이용하였다. 사료의 일반성분과 표시물로 혼합된 Cr은 AOAC (2000)의 방법에 준하여 분석하였다.

저단백 사료 내 효소복합제의 첨가 급여가 육성돈의 영양소 소화율에 미치는 영향은 Table 46에 나타내었다. 시험 종료 시 (6주) Nitrogen의 소화율에 있어 PC 처리구가 NC 처리군에 비하여 유의적으로 높게 나타났고 (P < 0.05), NC 처리군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다 (P > 0.05).



그림 64. 질소 소화율 측정을 위한 켈달 측정기

표 46. The effect of dietary Genebiotech additive supplementation on nutrient digestibility in growing pigs<sup>1</sup>

Items, %	PC	NC	TRT1	TRT2	TRT3	SEM <sup>2</sup>
Initial						
Dry matter	79.42	79.32	79.69	79.41	79.33	0.95
Nitrogen	76.10	76.19	76.47	76.52	76.40	1.72
Energy	78.37	78.27	78.15	78.12	77.66	1.96
Week 6						
Dry matter	76.92	75.83	76.36	76.94	77.50	1.70
Nitrogen	75.06 <sup>a</sup>	71.79 <sup>b</sup>	71.40 <sup>b</sup>	71.11 <sup>b</sup>	71.34 <sup>b</sup>	0.77
Energy	73.86	73.12	73.53	74.63	74.37	1.34

<sup>1</sup>Abbreviation: PC, High nutrition value (CP 16%); NC, Low nutrition value (CP 14%); TRT1, Low nutrition value + 개발 효소제 0.1%; TRT2, Low nutrition value + 개발 효소제 0.2%; TRT3, Low nutrition value + 타사 효소제 0.2 %.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscript differ significantly (P < 0.05).

## 라. 분, 뇨 내 질소함량

분, 뇨 내 질소함량 측정은 시험 개시 시 및 시험 종료 시 (6주)에 분변은 항문 마사지법으로, 뇨는 대사틀을 사용하여 채취하였다. 분석은 AOAC (2000)의 방법에 준하여 분석하였고, 분, 뇨를 통해 배설된 질소함량을 질소섭취량으로 제하여 체 내 질소의 잔량을 산출하였다.

저단백 사료 내 효소복합제의 첨가 급여가 육성돈의 분, 뇨 내 질소함량에 미치는 영향은 Table 47에 나타내었다. 시험 종료 시 (6주) PC 처리구가 NC 처리구 및 TRT 처리군에 비하여 유의적으로 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). NC 및 TRT 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다 ( $P > 0.05$ ).

표 47. The effect of dietary Genebiotech additive supplementation on nitrogen retention in growing pigs<sup>1</sup>

Items	PC	NC	TRT1	TRT2	TRT3	SEM <sup>2</sup>
Initial						
N intake, g/day	24.90	24.72	24.60	24.34	24.93	0.83
Urine N excreted, g/day	7.37	7.29	7.32	7.45	7.39	0.16
Fecal N excreted, g/day	5.73	5.59	5.77	5.79	5.70	0.17
N retention, g/day	11.80	11.85	11.51	11.10	11.83	0.84
Week 6						
N intake, g/day	46.78 <sup>a</sup>	39.87 <sup>b</sup>	39.61 <sup>b</sup>	39.43 <sup>b</sup>	39.54 <sup>b</sup>	1.51
Urine N excreted, g/day	13.03	11.90	12.34	12.74	12.50	0.96
Fecal N excreted, g/day	10.69	9.26	9.43	9.77	9.54	0.93
N retention, g/day	23.06	18.71	17.84	16.92	17.50	2.55

<sup>1</sup>Abbreviation: PC, High nutrition value (CP 16%); NC, Low nutrition value (CP 14%); TRT1, Low nutrition value + 개발 효소제 0.1%; TRT2, Low nutrition value + 개발 효소제 0.2%; TRT3, Low nutrition value + 타사 효소제 0.2 %.

<sup>2</sup>Standard error of means.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscript differ significantly ( $P < 0.05$ ).

## (7) 육성돈 사양실험을 기반으로 장내 균총 및 단쇄지방산 조절능 DB 구축

### □ 생균제 및 효소제에 의한 장내균총 및 단쇄지방산 조절능 분석

- 사양실험 시작 및 종료시점에 시료(분변)을 확보함.
- Physical disruption을 이용하는 QiaAMP PowerFecal® DNA Isolation Kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 시료로부터 metagenomic DNA를 추출하며, UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 농도와 순도를 확인한 후에, 1.5% (w/v) agarose gel에 전기영동을 통하여 DNA의 순도를 검증함.
- 시료 내의 세균이 공통적으로 보유하고 있는 16S rRNA 유전자 내의 hyper-variable region 중에서 V3-V4 region을 PCR 방법으로 증폭한 후에, Illumina MiSeq 플랫폼을 이용하여 sequencing함.
- 데이터 분석프로그램인 Mothur에서 Bellropon method를 사용하여 sequence data에 포함되어 있는 chimera 시퀀스를 제거한 후에, 분석에 충분한 read 수를 확보했는지를 확인함.
- QIIME2(Quantitative Insights Into Microbial Ecology) pipeline을 기반으로 장내균총을 분석함.
- 다양성( $\alpha$ -diversity) 분석은 'q2-phylogeny' 와 'q2-diversity' 를 사용하며, SILVA 138\_99 데이터베이스를 참조하여 분석함.
- 각 그룹간의 균총 조성의 차이를 비교하기 위해, Principal Coordinates Analysis (PCoA) 분석을 실시함.
- PICRUSt2를 사용하여 function 분석을 진행하며, KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)를 사용하여 각 그룹 간의 대사경로 차이를 비교 평가함.
- Network 분석을 위해, CoNet, Cytoscape 프로그램을 이용하여 Co-occurrence map을 작성함.
- 시료의 단쇄지방산(acetate, propionate, butyrate) 함량은 HPLC를 사용하여 분석하며, 기본적인 분석조건은 다음의 표에서 보는 바와 같음.

#### 가. 분변시료의 확보와 수분함량 및 pH 측정

- 분변시료는 각각 사양실험 개시 시 및 6주에 확보하여 -80°C에 보관하며 추후 분석에 사용함.
- 분변시료의 수분 함량은 moisture analyzer(Kett, USA)를 사용해 측정하였고, 분변 pH는 portable pH meter(LAQUAtwin, Horiba, Japan)을 사용해 측정함.

#### 나. 대사체(Short chain fatty acid, Branched chain fatty acid 및 lactate) 농도의 측정

- 분변시료의 Short chain fatty acid (SCFA), Branched chain fatty acid (BCFA), 및 lactate 농도는 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용해 앞선 연구의 방법을 참고해 분석함(Q. Zhang et al., 2022, Front. Vet. Sci.).
- 간략하게, 0.5g의 분변과 점막 시료를 1ml의 증류수에 부유시켜 3분간 vortex함. 시료는 이후 15,000 x g로 15분간 원심분리 하였고, 상등액을 회수한 뒤 0.22  $\mu$ m PTFE syringe filter로 filtration 함. 유기산 농도의 측정에는 Agilent Infinity 1260 HPLC System(Agilent, USA), CarboMix H NP10 column(300x7.8mm; Sepax, USA), 그리고 RI, UV detectors ( $\lambda$  = 210 nm)를 사용함. 샘플은 autosampler를 이용해 10  $\mu$ l씩 주사하였고, 0.005M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>이동상을 사용해 flow rate 0.6ml/min으로 65°C에서 35분간 분석함.

#### 다. DNA 추출 및 16s rRNA 유전자의 염기서열 분석

- 시료의 genomic DNA는 QiaAmp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용해 제조사의 안내대로 추출하였고, 추출한 DNA의 순도는 SpectraMax M2 spectrophotometer (Molecular Devices, USA)를 사용해 확인함.
- PCR을 통한 증폭에는 16S rRNA 유전자의 V3-V4 추가변 영역에 맞는 primer를 사용하였고, PCR 조건은 아래와 같음: 94°C에서 5분간 initial denaturation 하였고, 이후 30회 동안 94°C, 30초 denaturation, 55°C, 45초 annealing, 72°C, 1분30초 extension을 반복함. 증폭한 유전자는 NucleoSpin Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Dueren, Germany)를 사용해 제조사의 안내대로 정제함.
- 정제한 DNA는 Illumina Truseq DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, California)를 사용해 library를 제작하였고, 이후 각 시료는 Illumina Miseq platform (MiSeq Reagent Kit v2)를 사용해 sequencing함. 증폭과 V3-V4 추가변영역의 sequencing은 CJ BioScience, Inc. (Seoul, Republic of Korea)에서 진행함.
- Raw sequence 데이터는 SILVA 138\_99 database를 기반으로 Quantitative Insights Into Microbial Ecology pipeline (QIIME2)를 이용해 분석함(Bolyen et al., 2019, Nat. Biotechnol.). 'Cutadapt' plugin을 사용해 Raw sequence에서 Primer와 adapter sequence를 제거함(Martin, 2011, EMBnet.Journal). Sequence의 품질관리는 DADA2를 사용해 이루어짐(Callahan et al., 2016, Nat. Methods).
- 계통발생학적 다양성은 'q2-phylogeny' 와 'q2-diversity' 를 사용해 분석함. Alpha와 beta diversity 및 상대적 풍부도는 R program(v.4.0.2; R Core Team 2020)의 'ggplot2' 를 사용해 시각화 함. 풍부도 차이 분석은 Linear discriminant analysis effect size (LEfSe)를 사용함(Segata et al., 2011, Genome Biol.).
- 장내균총의 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 기능적 경로 예측을 위해 (level 1과 2), Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States(PICRUSt2) standalone pipeline를 이용해 PICRUSt를 진행함(Langille et al., 2013, Nat Biotechnol.).

- 장내균총과 유기산 농도 사이의 상관관계는 Pearson correlation coefficient를 분석함, R program의 ‘Hmisc’ 과 ‘pheatmap’ 을 사용해 시각화 함. Co-occurrence network는 Cytoscape program(v.3.8)의 CoNet plugin을 사용해 분석함.

## □ 연구 수행 내용

### 가. 분변 수분 및 유기산 농도 분석

- 단백질 함량과 같은 사료 조성의 변화는 돼지의 설사에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있음 (Liu et al., 2022, *Front. Immunol.*).
- 분변 수분 농도를 측정해 각 조단백질 함량 및 protease가 분변의 질에 주는 영향을 분석함 (Table 48). 분석결과 분변 수분 함량은 급여기간과 처리구에 관계없이 유의적인 차이를 보이지 않음. 이는 본 실험의 조단백질 함량 차이와 protease 첨가 유무가 설사 유발에 영향을 주지 않음을 의미함.

표 48. Moisture content and pH of fecal samples.

Moisture, %	Treatments (n=20) <sup>1</sup>					p-value <sup>2</sup>
	PC	NC	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	
Week 0	22.60 ± 4.23	24.61 ± 4.94	23.10 ± 3.29	22.91 ± 3.58	23.89 ± 3.70	0.50
Week 6	22.26 ± 2.58	22.53 ± 4.09	23.19 ± 2.88	22.49 ± 3.25	22.18 ± 2.81	0.31

Abbreviation: PC, High nutrition value (CP 16%); NC, Low nutrition value (CP 14%); TRT1, Low nutrition value + 개발 효소제 0.1%; TRT2, Low nutrition value + 개발 효소제 0.2%; TRT3, Low nutrition value + 타사 효소제 0.2 %.

<sup>1</sup> Values are reported as mean ± standard deviation (SD).

<sup>2</sup> p-values are calculated using Kruskal-Wallis test.

- SCFA, BCFA와 같은 장내균총 유래의 대사물질은 숙주와 장내미생물의 상호작용하는 중요 요소임. 이 중 acetate, butyrate, propionate, valerate와 같은 SCFA는 장내미생물이 식이섬유 혹은 alanine, aspartate, glutamine, lysine과 같은 아미노산을 발효시켜 생성함(Rios-Covian et al., 2020, In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11)). 한편, isobutyrate, isovalerate와 같은 BCFA는 장내미생물이 valine, leucine, isoleucine과 같은 아미노산을 발효시켜 생성함(Davila et al., 2013, *Pharmacol. Res.*). 이러한 대사물질은 장건강을 유지하는데 중요한 역할을 담당함. 돼지에게 급여하는 단백질의 양이나 protease의 존재유무는 이러한 대사물질 생산에 영향을 줄 수 있음.

- 단백질 함량과 protease 첨가가 장관 유기산 농도에 주는 영향을 분석하였으며, 이는 Table 49, Figure 65에서 보는 바와 같음. 단백질 함량이 감소함에 따라 lactate의 함량도 감소하였으나, protease 첨가에 의해 증가하는 경향을 나타내었음. Acetate의 경우, Treatment3의 분변 acetate 농도가 유의적으로 적게 나타났으며, 이는 Treatment2와 비교하였을 때 두드러졌음 (p=0.03). 한편, Treatment1의 propionate, valerate의 농도는 각각 PC 대조구, Treatment3과 비교해 유의적으로 높게 나타남. 분변 butyrate 수준의 경우, 단백질 함량 감소에 따라 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었으나, Treatment3에서는 이러한 경향이 뚜렷하지 않았음(p<0.001).
- Isobutyrate, isovalerate와 같은 BCFA 농도는 유의적인 차이를 보이지 않았음(p>0.05).

표 49. Fecal organic acid (SCFA, BCFA, and lactate) determination.

Items, $\mu\text{M}$ per dry weight	Treatments (n=20) <sup>1</sup>					p-value <sup>2</sup>
	PC	NC	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	
Lactate	142.30 $\pm$ 40	98.40 $\pm$ 30	111.90 $\pm$ 41	168.60 $\pm$ 56	173.90 $\pm$ 45	0.58
SCFA						
Acetate	30.19 $\pm$ 2.6	26.70 $\pm$ 1.7	30.64 $\pm$ 2.6	30.00 $\pm$ 1.9a	22.18 $\pm$ 1.7b	0.03
Propionate	4.79 $\pm$ 0.51a	7.17 $\pm$ 0.56	7.97 $\pm$ 0.78b	7.65 $\pm$ 0.93	5.73 $\pm$ 0.78	0.009
Butyrate	2.57 $\pm$ 0.27a	4.79 $\pm$ 0.37b	4.24 $\pm$ 0.55	4.10 $\pm$ 0.41	2.98 $\pm$ 0.48a	<0.001
Valerate	1.90 $\pm$ 0.22	1.56 $\pm$ 0.22	2.53 $\pm$ 0.28a	1.72 $\pm$ 0.23	1.20 $\pm$ 0.24b	0.005
BCFA						
Isobutyrate	0.002 $\pm$ 0.002	0.011 $\pm$ 0.1	0.009 $\pm$ 0.009	0.04 $\pm$ 0.004	0.0 $\pm$ 0.0	0.99
Isovalerate	45.52 $\pm$ 25.1	51.32 $\pm$ 23.7	73.56 $\pm$ 29.1	57.74 $\pm$ 28.2	33.58 $\pm$ 18.1	0.99

Abbreviation: PC, High nutrition value (CP 16%); NC, Low nutrition value (CP 14%); TRT1, Low nutrition value + 개발 효소제 0.1%; TRT2, Low nutrition value + 개발 효소제 0.2%; TRT3, Low nutrition value + 타사 효소제 0.2 %.

<sup>1</sup> Values are reported as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

<sup>2</sup> p-values are calculated using Kruskal-Wallis test. Different superscripts denote significant difference.

Abbreviations: SCFA, short-chain fatty acid; BCFA, branched-chain fatty acid.

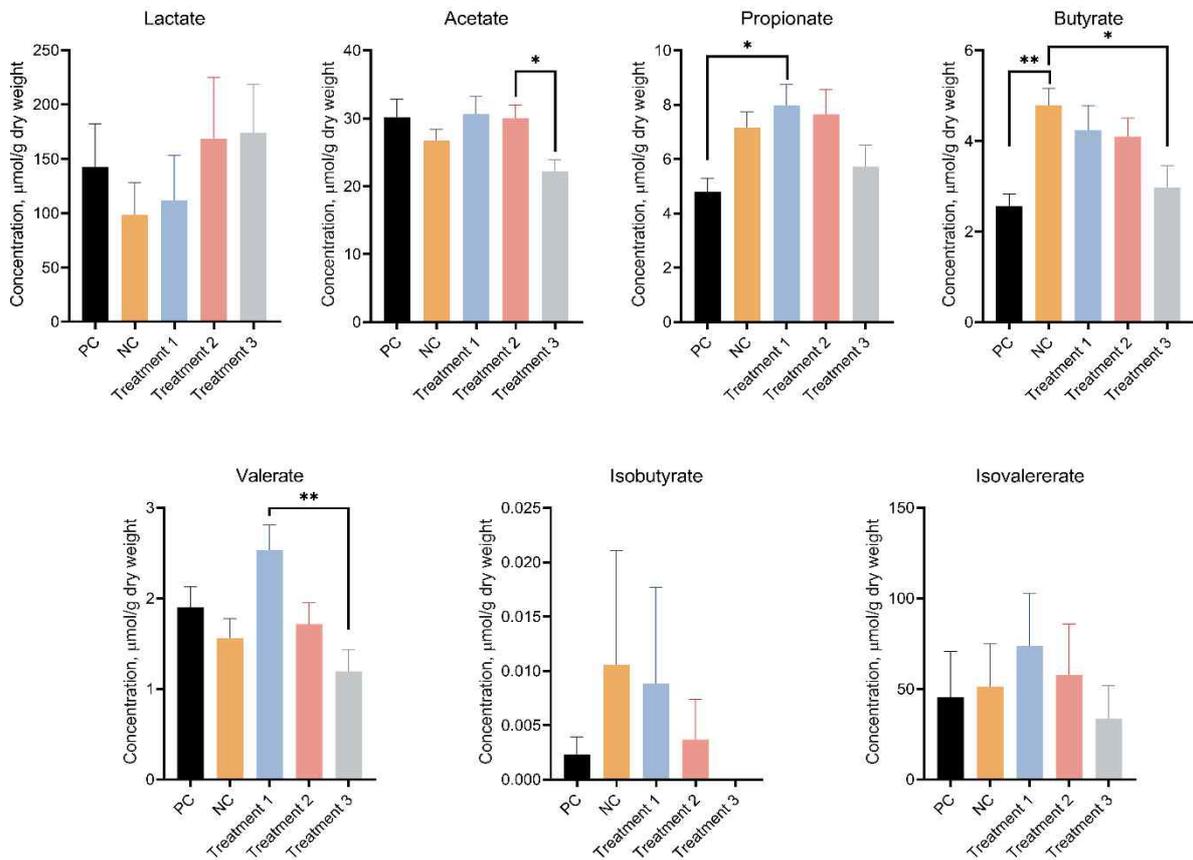
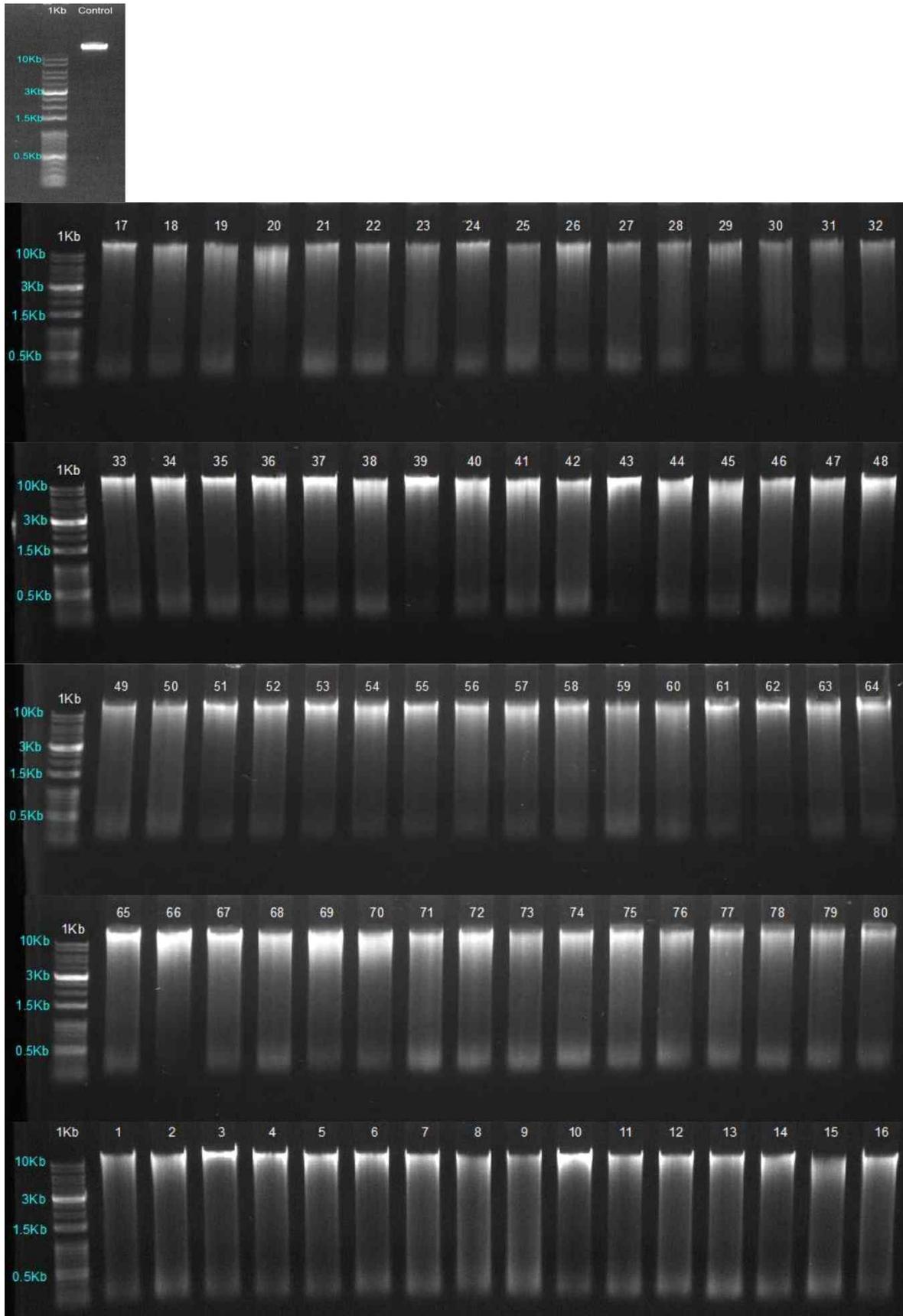


Figure 65. Concentration of fecal lactate, SCFAs, and BCFAs. Abbreviation: PC, High nutrition value (CP 16%); NC, Low nutrition value (CP 14%); TRT1, Low nutrition value + 개발 효소제 0.1%; TRT2, Low nutrition value + 개발 효소제 0.2%; TRT3, Low nutrition value + 타사 효소제 0.2 %, Values were reported as mean  $\pm$  standard deviation (SD). P values were obtained using one-way ANOVA with Tukey post hoc test (p < 0.05). P values are denoted as \* and \*\* for p < 0.05 and p < 0.01 respectively.

## 나. Metagenomic 분석

**i) Metagenomic DNA 염기서열 분석**

- 돼지의 분변에서 추출한 DNA의 질을 확인하기 위해 1% agarose gel을 사용한 전기영동을 실시함. DNA의 농도와 순도는 UV spectrophotometer를 사용해 측정했으며, DNA의 농도는 20ng/ul 이상, 순도는 A280/260 비율이 1.8 이상임을 확인하였고(그림 66), 확인한 DNA는 16S rRNA 유전자의 증폭에 사용함.



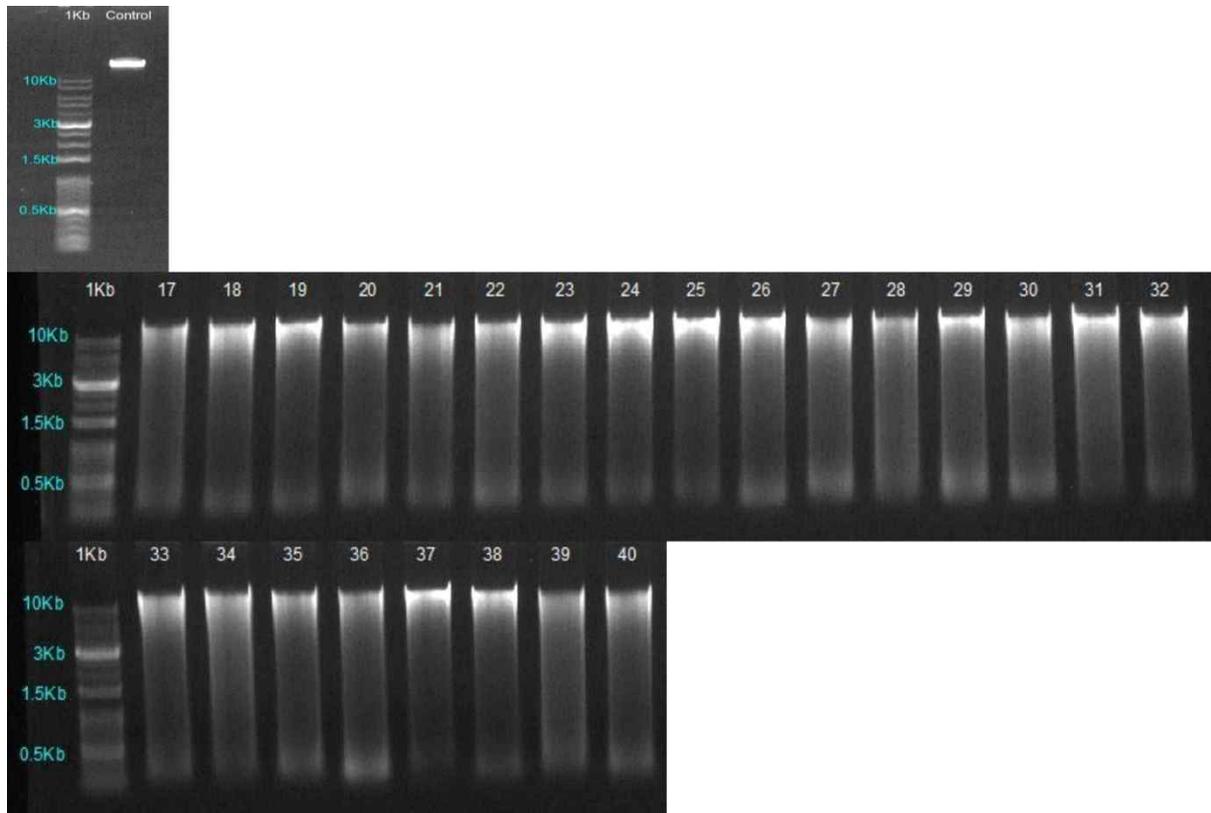


그림 66. Gel electrophoresis of genomic DNA extracted from sample. 1% agarose gel (1X TAE buffer), 100V 25min, sample 1ul loading. Data from CJ Bioscience QC report.

ii) Next-generation 염기서열 데이터 처리

- 분변시료의 염기서열 분석 결과, 개시시점과 종료시점 시료에서 각각 7,861,882, 10,995,255의 raw read를 얻었음. Chimera, Low quality read를 제거한 뒤, 개시시점과 종료시점 시료에서 각각 4,299,223, 5,806,208의 valid read를 얻었으며 평균 길이는 각각 414.9bp, 412.7bp였음. 각 그룹의 평균 raw, valid read를 Table 50에 나타냄.
- 확보한 read가 돼지 장관의 미생물군집을 대표할 수 있는지를 확인하기 위해 Chao1 index에 기반하여 alpha rarefaction curve를 작성하였으며(그림 67), 개시시점과 종료시점에서 각각 19,952, 14,230의 sequencing depth를 보임. 이에 더해, Good's coverage 값은 모든 그룹에서 0.99로, 확보한 염기서열이 추가적인 metagenomic analysis에 적합함을 확인함.

표 50. Quality of the sequencing reads before and after pre-processing.

	Treatments (n=20)				
	PC	NC	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3
Week 0					
Raw reads	93837.6	67761.15	97748.8	69536.95	63231.8
Valid reads	52860.2	34916.2	56023.68	36788	33582.2
Good's coverage	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
Week 6					
Raw reads	115126.1	124297.6	111320.2	104314.5	95655.85
Valid reads	60566.13	65066.45	59056.88	54811.1	51187.15
Good's coverage	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99

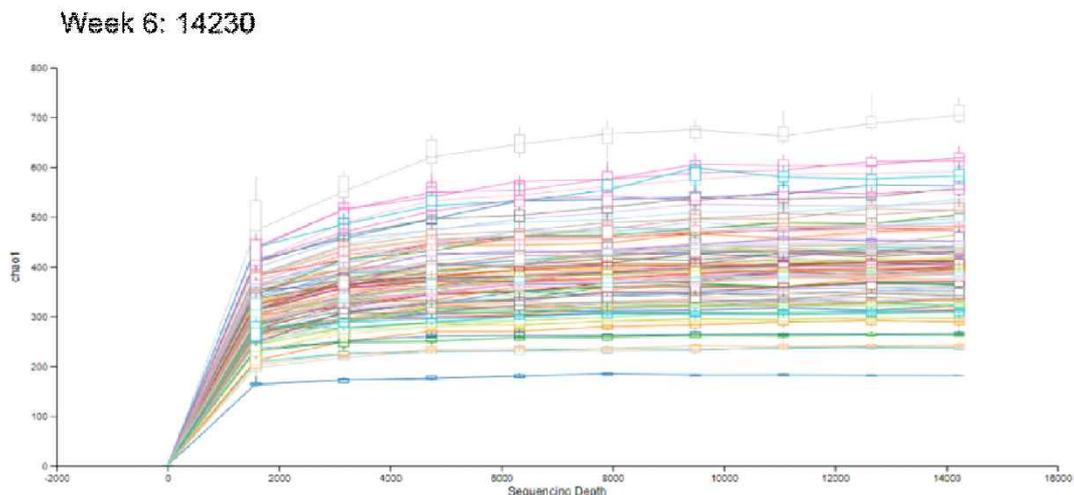
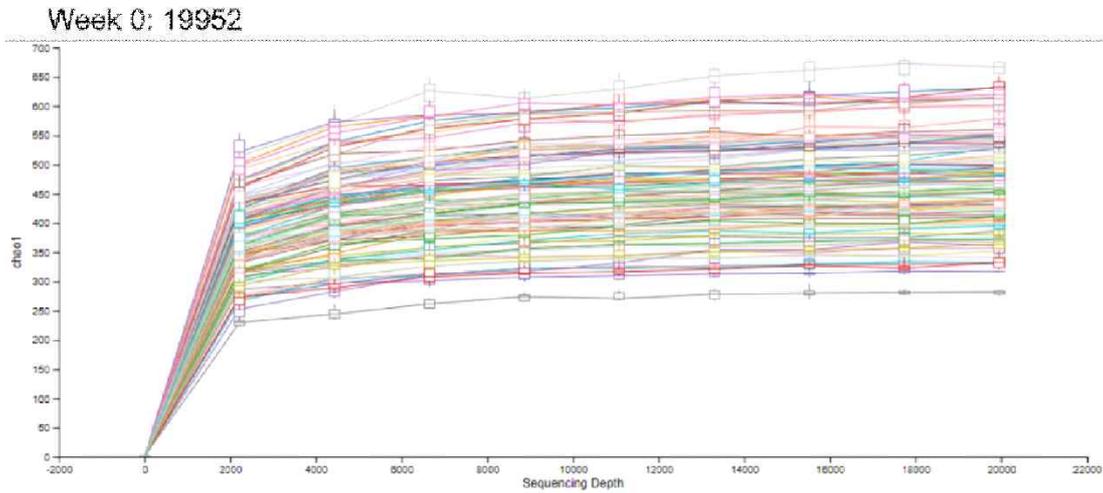


그림 67. Rarefaction curves based on Chao1 index for week 0 and 6 feces samples at 19,995 and 14,230 sequencing depth, respectively.

### iii) 미생물 군집의 종 풍부도와 다양성 지수(Alpha diversity)

- 확보한 valid read를 이용해 alpha diversity 지수인 Chao1, Observed features(풍부도), Shannon(다양성), Simpson(균일성) 지수를 측정함(그림 68).
- 개시시점 Treatment3의 Chao1 지수가 다른 처리구에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, 특히 Treatment2와 비교했을 때 Chao1( $p=0.03$ )과 Observed feature( $p=0.05$ ) 지수 모두 유의적으로 높게 나타나 상대적으로 높은 종 풍부도를 보임. Shannon, Simpson 지수는 각 처리구간 유의적인 차이를 보이지 않음.
- 종료시점 Shannon, Simpson지수가 Treatment2 처리구에서 급격하게 감소했으며, 이는 특히 Treatment1과 비교했을 때 그 차이가 두드러짐( $p=0.007$ ,  $p=0.004$ ). Chao1, Observed features 지수는 다른 처리구와 유의적인 차이를 보이지 않음.
- 비슷한 연구에서, 조단백질 함량이 적은 사료를 급여한 돼지의 alpha-diversity가 낮게 나타남(Cho et al., 2015, Asian-Australasian J. Anim. Sci.; Fan et al., 2017, Sci. Rep.). 또한, Protease의 첨가는 돼지의 장내균총 alpha diversity에 다양한 영향을 주는 것으로 보고된 바 있음(Kim et al., 2022, Sci. Total Environ.; Peng et al., 2022, Anim. Nutr.).

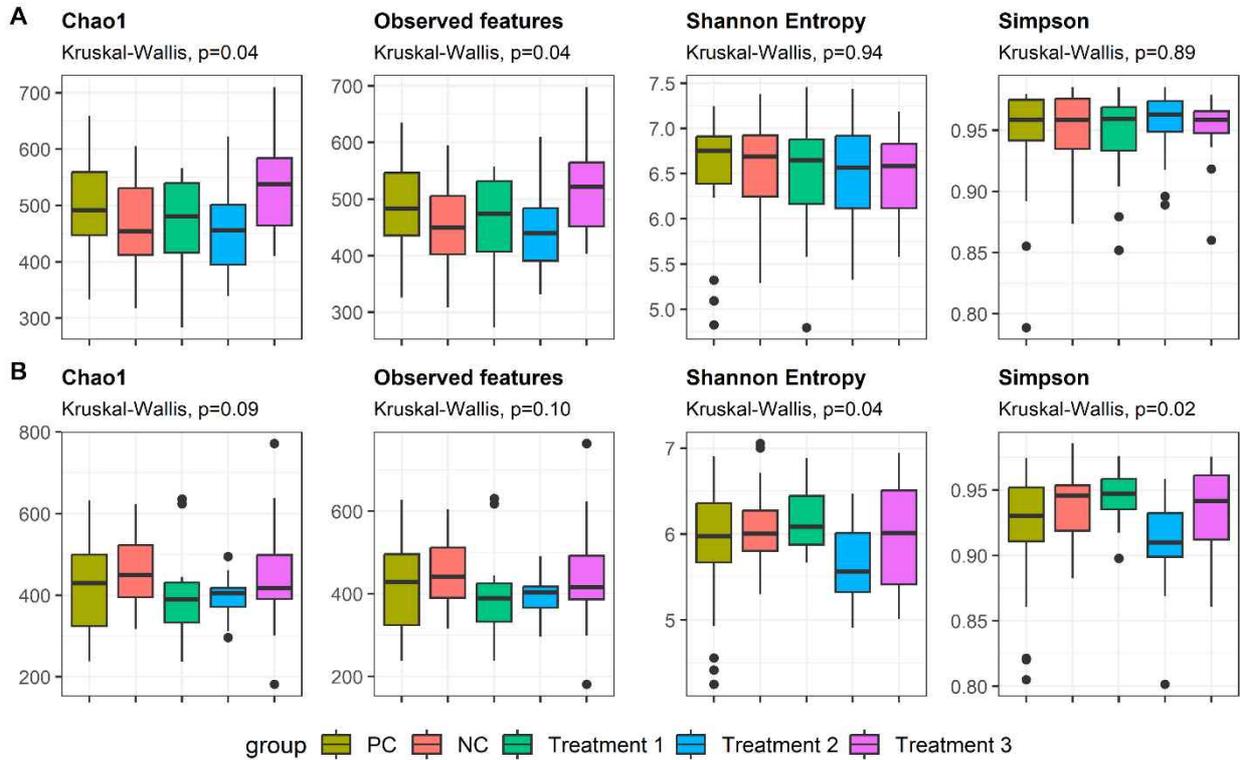


그림 68. Alpha-diversity indices Chao1, Observed features, Shannon, and Simpson for week 0 (A) and week 6 (B) fecal samples. P values were calculated with Kruskal-Wallis with pairwise comparison ( $p < 0.05$ ).

#### iv) Beta diversity

- 각 처리구의 장내균총 차이를 조사하기 위해, Bray-Curtis dissimilarity matrix에 기반한 principal coordinates analysis(PCoA)를 진행함(그림 69).
- Beta-diversity 분석 결과, 개시시점 분변 시료의 장내미생물 구조는 각 처리구간 유의적인 차이를 보이지 않음(PERMANOVA,  $p > 0.05$ )
- 종료시점 분변시료 중, 모든 protease 처리구는 PC 대조구의 장내균총과 유의적인 차이를 보였음( $p < 0.05$ ). 또한, Treatment2의 장내균총은 PC 대조구 뿐 아니라 NC 대조구, Treatment3와 유의적인 차이를 보임( $p < 0.05$ ). 한편, Treatment1 처리구의 장내균총은 Treatment3과 유의적인 차이를 보임( $p < 0.05$ ). 이에 따라, protease의 종류에 따른 장내균총 구조의 차이가 발생함을 알 수 있음.
- Treatment1,2의 장내미생물 구조는 서로 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 이는 protease의 농도 차이에 의한 장내균총의 변화가 두드러지지 않았음을 의미함.
- 이러한 결과는, 사료내 조단백질 함량 차이 및 protease와 같은 효소의 첨가가 돼지의 장내균총을 변화시킨다는 선행 연구결과와 일치함(Kim et al., 2022, Sci. Total Environ.; 2023, Animals; Peng et al., 2022, Anim. Nutr.; Poudel et al., 2022, J. Anim. Sci. Biotechnol.; Vasquez et al., 2023, Front. Microbiol.).

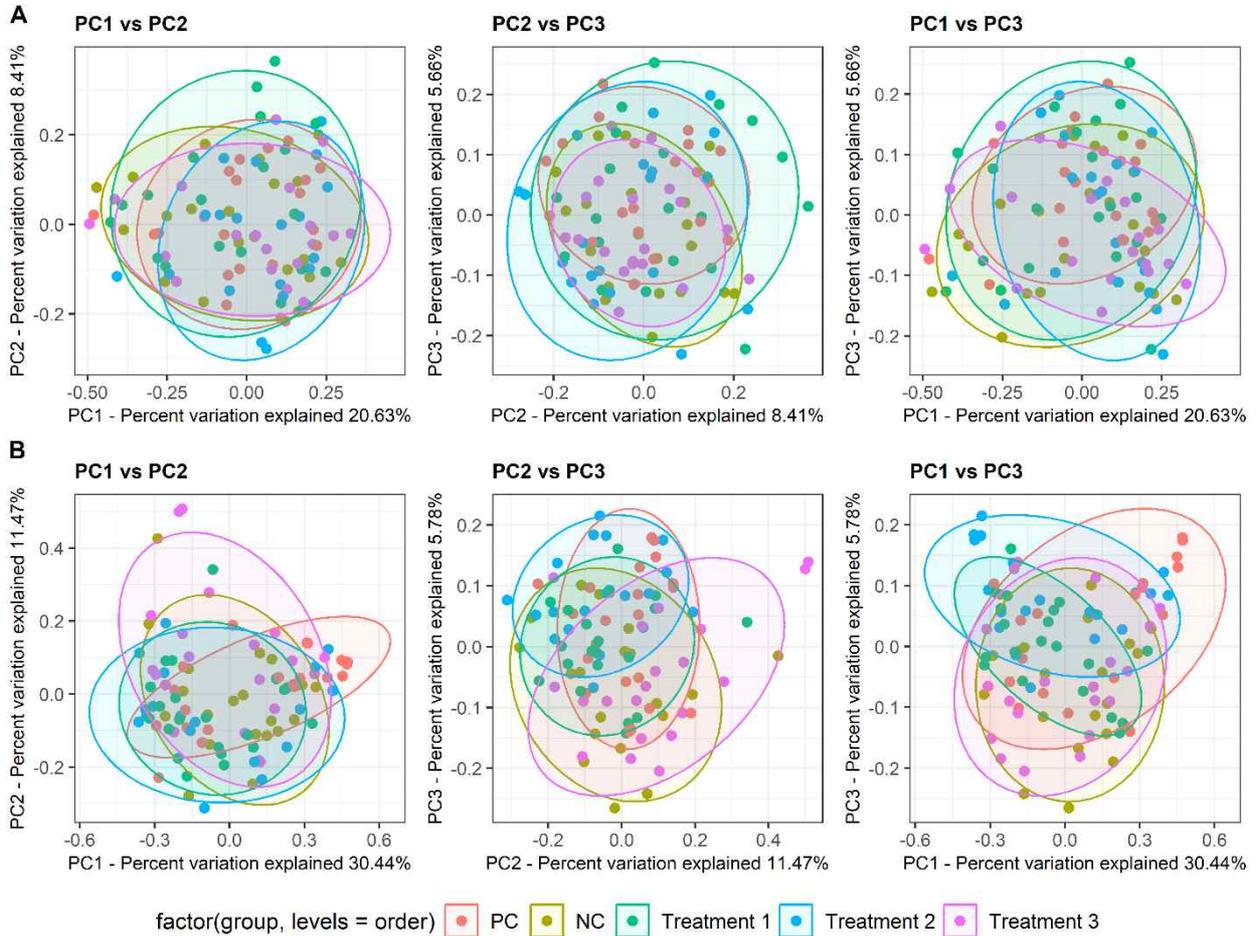


그림 69. Principal coordinate analysis (PCoA) plot based on Bray-Curtis distance matrix for week 0 (A) and week 6 (B) feces samples. P value was calculated using permutational ANOVA ( $p < 0.05$ ).

#### v) 처리구간 장내미생물 조성 분석

- 사양실험 종료 후 처리구별 장내균총 조성의 차이를 분석하기 위해, 여러 수준에서 미생물 분류군의 상대적 풍부도를 분석함.

○ 개시시점 분변시료의 장내미생물 조성 분석

- 개시시점 분변시료의 상대적 풍부도 분석 결과는 그림 70과 표 51에 나타내었음.
- 문 수준에서, 각 처리구간 유의적이거나 두드러지는 차이는 없었음
- 과 수준에서, Treatment1은 다른 처리구에 비해 Streptococcaceae의 풍부도가 감소했으며, Acidaminococcaceae의 풍부도가 증가함( $p < 0.05$ ). NC 대조구는 Selenomonadaceae의 상대적 풍부도가 다른 처리구에 비해 높게 나타남( $p < 0.05$ ). Treatment3 처리구는 Atopobiaceae의 풍부도가 높게 나타남( $p < 0.05$ ).
- 속 수준에서, Treatment1의 Streptococcus의 풍부도가 낮게 나타났으며, NC 대조구의 uncultured Selenomodaceae, Megaspheera가 높게 나타남( $p < 0.05$ )

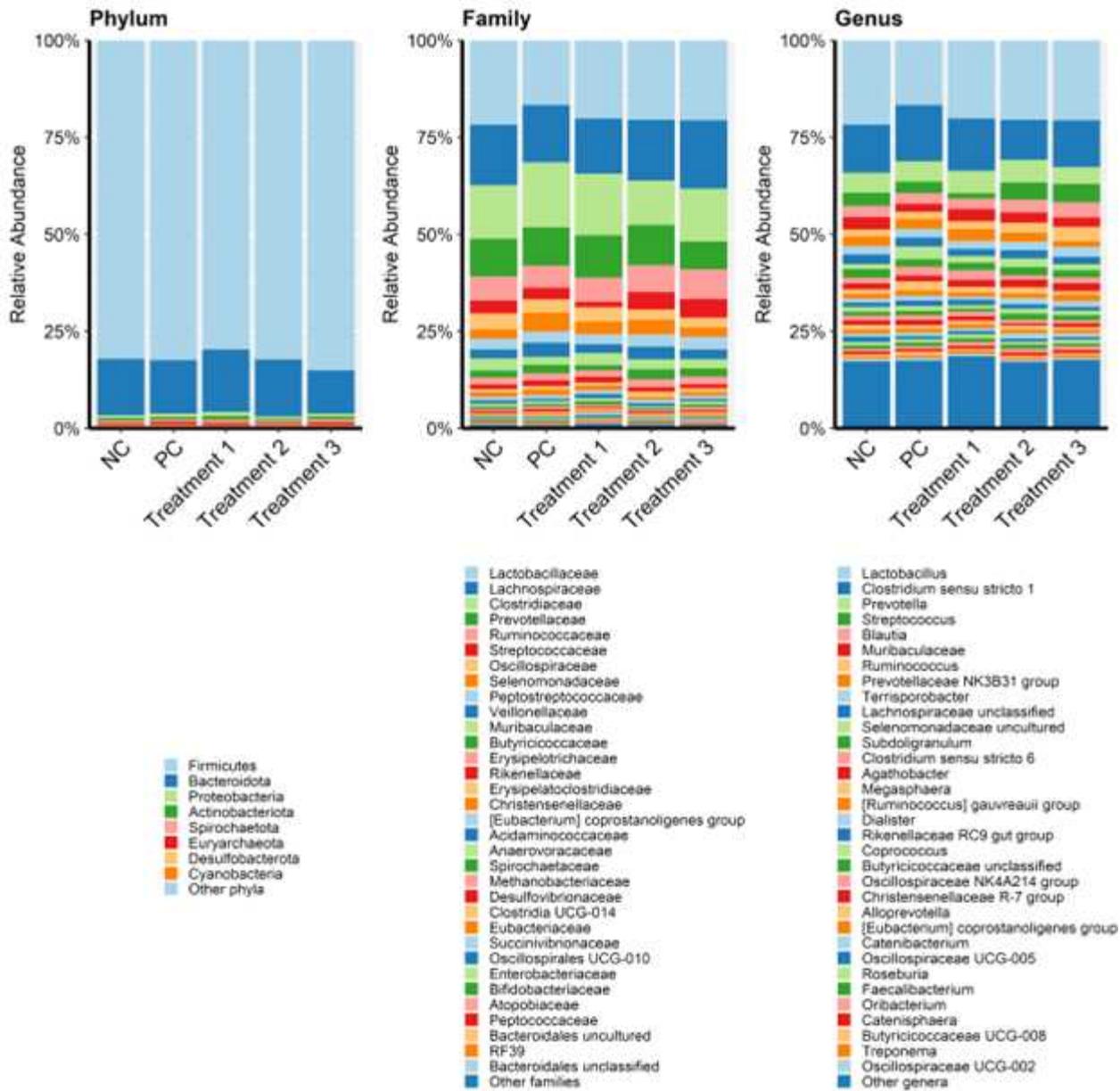


그림 70. Relative abundance (in %) of the gut microbiota at phylum, family, and genus levels at week 0.

표 51. Relative abundance at phylum, genus, and species level for week 0 feces samples.

Taxa	Treatments (n=20)					p-values
	PC	NC	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	
<b>Phylum</b>						
Firmicutes	82.15	82.47	79.73	82.32	85.12	0.06
Bacteroidota	14.51	13.83	16.06	14.71	11.14	0.08
Proteobacteria	0.71	0.82	1.06	0.69	0.75	0.70
Actinobacteriota	0.7	0.64	0.97	0.49	0.74	0.32
Spirochaetota	0.62	0.62	0.82	0.5	0.72	0.71
Euryarchaeota	0.5	0.73	0.6	0.42	0.73	0.27
Desulfobacterota	0.6	0.71	0.37	0.59	0.54	0.32
Cyanobacteria	0.07	0.09	0.12	0.12	0.07	0.61
Other phyla	0.13	0.1	0.26	0.18	0.19	0.87

**Family**

Lactobacillaceae	21.77	16.72	20.18	20.5	20.61	0.68
Lachnospiraceae	15.57	14.75	14.19	15.65	17.65	0.31
Clostridiaceae	13.85	16.77	15.96	11.45	13.58	0.76
Prevotellaceae	9.71	9.84	10.85	10.36	7.2	0.11
Ruminococcaceae	6.2	5.76	6.25	6.98	7.66	0.43
Streptococcaceae	3.34	2.96	1.4	4.46	4.79	0.01
Oscillospiraceae	4.1	3.45	3.76	2.68	2.54	0.04
Selenomonadaceae	2.39	4.83	3.17	3.71	2.37	0.02
Peptostreptococcaceae	2.79	2.93	2.64	3.2	3.31	0.69
Veillonellaceae	2.29	3.65	2.22	3.25	2.45	0.33
Muribaculaceae	3.15	2	3.16	2.62	2.4	0.14
Butyricocccaceae	1.8	2.17	1.33	2.55	2.08	0.19
Erysipelotrichaceae	1.79	1.85	1.67	2.03	2.03	0.40
Rikenellaceae	1.15	1.45	1.48	1.18	1.01	0.27
Erysipelatoclostridiaceae	0.85	1	0.81	1.48	1.01	0.75
Christensenellaceae	1.15	1.34	1.13	0.58	0.93	0.04
[Eubacterium] coprostanoligenes group	0.97	1	1.05	0.9	0.89	0.70
Acidaminococcaceae	0.84	0.58	1.03	0.75	0.56	0.02
Anaerovoracaceae	0.68	0.7	0.8	0.45	0.75	0.05
Spirochaetaceae	0.62	0.62	0.82	0.5	0.72	0.71
Methanobacteriaceae	0.5	0.73	0.6	0.42	0.73	0.27
Desulfovibrionaceae	0.57	0.68	0.34	0.56	0.52	0.25
Clostridia UCG-014	0.41	0.49	0.63	0.57	0.49	0.44
Eubacteriaceae	0.27	0.49	0.41	0.31	0.5	0.34
Succinivibrionaceae	0.2	0.5	0.75	0.3	0.23	0.05
Oscillospirales UCG-010	0.42	0.38	0.51	0.29	0.33	0.19
Enterobacteriaceae	0.36	0.29	0.23	0.35	0.47	0.52
Bifidobacteriaceae	0.44	0.37	0.34	0.24	0.16	0.69
Atopobiaceae	0.09	0.11	0.5	0.13	0.45	0.03
Peptococcaceae	0.27	0.22	0.18	0.22	0.23	0.33
Bacteroidales uncultured	0.19	0.18	0.2	0.16	0.21	0.96
RF39	0.19	0.25	0.16	0.15	0.16	0.32
Bacteroidales unclassified	0.18	0.19	0.12	0.16	0.06	0.37
Other families	0.88	0.73	1.14	0.87	0.89	0.46

**Genus**

Lactobacillus	21.77	16.72	20.18	20.5	20.61	0.68
Clostridium sensu stricto 1	12.4	14.45	13.44	10.34	12.08	0.95
Prevotella	5.16	5.28	5.78	5.81	4.29	0.57
Streptococcus	3.34	2.96	1.4	4.46	4.79	0.01

Blautia	2.94	2.77	2.7	3.31	3.92	0.35
Muribaculaceae	3.15	2	3.16	2.62	2.4	0.14
Ruminococcus	1.85	1.98	2.04	2.57	3.71	0.05
Prevotellaceae NK3B31 group	2.42	2.45	3.02	2.32	1.48	0.27
Terrisporobacter	2.2	2.25	2.09	2.19	2.58	0.75
Lachnospiraceae unclassified	2.46	2.3	1.8	2.12	1.89	0.17
Selenomonadaceae uncultured	1.3	3.31	1.73	2.24	1.5	0.01
Subdoligranulum	2.26	1.89	1.91	2.15	1.86	0.46
Clostridium sensu stricto 6	1.44	2.32	2.51	1.1	1.5	0.28
Agathobacter	1.5	1.43	1.82	1.97	2.02	0.6
Megasphaera	1.27	2.36	1.44	1.63	0.9	0.03
[Ruminococcus] gauvreauii group	1.15	1.38	1.08	1.11	1.68	0.22
Dialister	1.01	1.27	0.77	1.6	1.52	0.14
Rikenellaceae RC9 gut group	1.12	1.37	1.4	1.14	0.97	0.29
Coprococcus	1.24	1.27	0.92	1.31	1.13	0.25
Butyricoccaceae unclassified	1.03	1.09	0.72	1.63	1.39	0.14
Oscillospiraceae NK4A214 group	1.23	1.24	1.23	0.8	0.79	0.06
Christensenellaceae R-7 group	1.14	1.33	1.13	0.58	0.92	0.04
Alloprevotella	1.29	0.95	0.95	1.13	0.67	0.14
[Eubacterium] coprostanoligenes group	0.97	1	1.05	0.9	0.89	0.7
Catenibacterium	0.78	0.94	0.71	1.39	0.94	0.58
Oscillospiraceae UCG-005	1.37	0.79	0.86	0.79	0.7	0.08
Roseburia	0.92	0.83	1	0.73	1.02	0.98
Faecalibacterium	0.85	0.86	0.95	1.07	0.72	0.49
Oribacterium	0.72	0.76	1.01	0.96	0.91	0.57
Catenisphaera	0.71	0.7	0.7	0.79	0.89	0.35
Butyricoccaceae UCG-008	0.6	1	0.52	0.7	0.53	0.41
Treponema	0.59	0.59	0.77	0.46	0.7	0.76
Oscillospiraceae UCG-002	0.64	0.73	0.68	0.49	0.46	0.07
Other genera	17.2	17.42	18.52	17.06	17.6	0.9

<sup>†</sup> p-values are calculated using Kruskal-Wallis test. Different superscripts denote significant difference.

#### [종료시점 분변시료의 장내미생물 조성 분석]

- 개시시점 분변시료의 상대적 풍부도 분석 결과는 그림 71과 표 52에 나타내었음.
- 문 수준에서, NC 대조구, Treatment1에 비해 Treatment2의 Firmicutes의 풍부도가 유의적으로 증가했으며, Bacteroidota의 풍부도가 유의적으로 감소했음. 또한, Treatment 2처리구의 Firmicutes/Bacteroidetes 비율이 다른 처리구에 비해 유의적으로 높게 나타남.
- Protease를 돼지에게 급여하는 경우, Firmicutes의 풍부도가 증가하며 Bacteroidota의 풍부도

가 감소했다는 보고가 있음(Kim et al., 2022, Sci. Total Environ.; 2023, Animals). 돼지 장내균총에서 Firmicutes의 상대적 풍부도가 증가하면, 영양소 흡수와 체중이 증가하는 것으로 알려져 있음(Guo et al., 2008, Lett. Appl. Microbiol.; Pajarillo et al., 2015, Anim. Feed Sci. Techn.).

- 과 수준에서, Clostridiaceae, Lachnospiraceae, Lactobacillaceae, Prevotellaceae, Ruminococcaceae가 모든 그룹에서 우점종으로 나타남. Treatment2에서 Lactobacillaceae의 풍부도가 다른 처리구에 비해 유의적으로 높게 나타남( $p < 0.001$ ). 한편, NC 대조구와 Treatment1에서는 Muribaculaceae, Rikenellaceae의 상대적 풍부도가 유의적으로 높게 나타남( $p < 0.05$ ). 또한 NC그룹의 uncultured Bacteroidales family의 풍부도가 다른 그룹에 비해 높게 나타남( $p < 0.001$ ). Treatment3에서, Selenomonadaceae의 풍부도가 유의적으로 증가했음( $p < 0.001$ ). PC 대조구에서는 p-2534-18B5 group, Enterobacteriaceae의 풍부도가 유의적으로 높게 나타남( $p < 0.05$ ).

- 속 수준에서, Treatment1,2에서 Lactobacillus 풍부도가 유의적으로 증가했으며, 이러한 현상은 Treatment2에서 더 높게 나타났음( $p < 0.001$ ) NC 대조구, Treatment1에서 Muribaculaceae, Rikenellaceae RC9가 유의적으로 증가함( $p < 0.05$ ). 한편, Treatment3에서는 Shuttleworthia, unclassified Ruminococcaceae이 유의적으로 증가하였으나, Muribaculaceae는 유의적으로 감소함( $p < 0.05$ ).

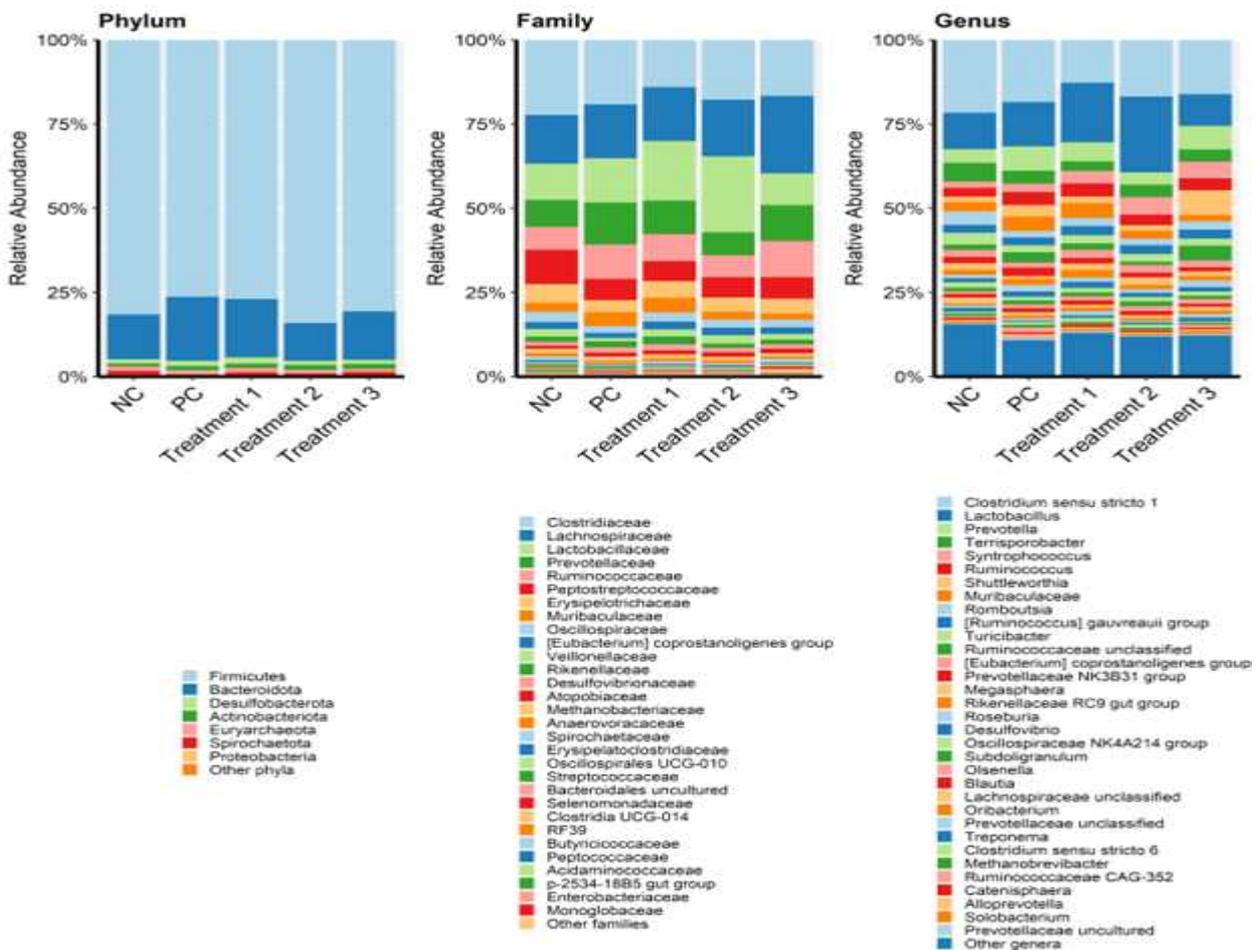


그림 71. Relative abundance (in %) of the gut microbiota at phylum, family, and genus levels at week 6.

☒ 52. Relative abundance at phylum, genus, and species level for week 6 feces samples.

Taxa	Treatments (n=20)					p-values
	PC	NC	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	
<b>Phylum</b>						
Firmicutes	81.6	76.29	76.98	84.14	80.62	0.0004
Bacteroidota	13.29	19.04	17.35	11.15	14.4	0.0003
Desulfobacterota	1.2	1.57	1.8	1.25	1.28	0.73
Actinobacteriota	0.91	1.24	1.32	1.47	1.47	0.73
Euryarchaeota	1.35	1.21	1.27	1.08	0.86	0.06
Spirochaetota	1.16	0.4	0.84	0.58	1.14	0.23
Proteobacteria	0.27	0.12	0.2	0.15	0.08	0.25
Other phyla	0.23	0.12	0.23	0.18	0.15	0.06
F/B ratio	7.02	4.89	4.84	8.43	6.40	0.001
<b>Family</b>						
Clostridiaceae	22.3	19.2	14.05	17.79	16.66	0.42
Lachnospiraceae	14.47	15.97	15.99	16.8	23	0.32
Lactobacillaceae	10.8	13.18	17.69	22.54	9.39	0.0004
Prevotellaceae	8.01	12.44	10.03	6.89	10.7	0.01
Ruminococcaceae	6.81	10.21	7.96	6.46	10.75	0.16
Peptostreptococcaceae	10.16	6.33	5.94	6.06	6.4	0.19
Erysipelotrichaceae	5.54	3.54	4.94	4.17	4.36	0.01
Muribaculaceae	2.71	4.21	4.39	2.41	1.87	0.0001
Oscillospiraceae	3.05	1.97	2.66	2.38	2.26	0.07
[Eubacterium] coprostanoligenes group	2.08	1.51	2.35	2.23	1.98	0.2
Veillonellaceae	2.21	1	2.08	2.47	1.7	0.44
Rikenellaceae	1.56	1.8	2.35	1.32	1.39	0.02
Desulfovibrionaceae	1.2	1.57	1.8	1.25	1.28	0.73
Atopobiaceae	0.82	1.15	1.17	1.37	1.36	0.81
Methanobacteriaceae	1.35	1.21	1.27	1.08	0.86	0.06
Anaerovoracaceae	0.95	0.73	0.84	0.85	0.77	0.45
Spirochaetaceae	1.16	0.4	0.84	0.58	1.14	0.23
Erysipelatoclostridiaceae	0.6	0.43	0.48	0.58	0.35	0.95
Oscillospirales UCG-010	0.53	0.24	0.58	0.42	0.39	0.02
Streptococcaceae	0.59	0.65	0.22	0.21	0.16	0.05
Bacteroidales uncultured	0.22	0.54	0.45	0.25	0.27	0.0007
Selenomonadaceae	0.26	0.4	0.19	0.17	0.67	0.0001
Clostridia UCG-014	0.11	0.1	0.06	0.05	1.03	0.04
RF39	0.21	0.15	0.18	0.11	0.11	0.05
Butyricicoccaceae	0.23	0.09	0.16	0.16	0.1	0.23
Peptococcaceae	0.19	0.1	0.1	0.17	0.14	0.13
Acidaminococcaceae	0.14	0.11	0.11	0.17	0.09	0.18

p-2534-18B5 gut group	0.47	0.01	0	0	0.06	0.0011
Enterobacteriaceae	0.22	0.08	0.11	0.10	0.05	0.02
Monoglobaceae	0.09	0.11	0.15	0.08	0.09	0.7
Other families	0.96	0.58	0.86	0.87	0.6	0.18
<b>Genus</b>						
Clostridium sensu stricto 1	21.66	18.43	12.76	16.81	16.17	0.33
Lactobacillus	10.8	13.18	17.69	22.54	9.39	0.0004
Prevotella	4.03	7.28	5.6	3.68	6.98	0.01
Terrisporobacter	5.62	3.86	2.96	3.65	3.61	0.31
Syntrophococcus	1.87	2.46	3.64	5.23	4.96	0.53
Ruminococcus	2.62	3.85	3.92	3.15	3.6	0.65
Shuttleworthia	1.63	3.45	1.97	1.6	7.34	0.02
Muribaculaceae	2.71	4.21	4.38	2.41	1.87	0.0001
Romboutsia	4.04	2	2.35	1.94	2.44	0.13
[Ruminococcus] gauvreauii group	2.32	2.31	2.78	2.56	2.71	0.69
Turicibacter	3.49	2.03	2.43	2.31	2.06	0.12
Ruminococcaceae unclassified	1.63	3.13	1.95	1.00	4.45	0.0045
[Eubacterium] coprostanoligenes group	2.08	1.51	2.35	2.23	1.98	0.2
Prevotellaceae NK3B31 group	1.81	2.44	1.65	1.4	1.18	0.5
Megasphaera	2.02	0.83	1.89	2.25	1.4	0.32
Rikenellaceae RC9 gut group	1.48	1.78	2.29	1.26	1.29	0.01
Roseburia	1	2	1.27	1.08	2.06	0.23
Desulfovibrio	1.2	1.57	1.8	1.25	1.28	0.73
Oscillospiraceae NK4A214 group	1.64	1.03	1.34	1.29	1.21	0.09
Subdoligranulum	1.02	1.22	1.17	1.47	1.05	0.39
Olsenella	0.82	1.15	1.17	1.37	1.36	0.81
Blautia	1.06	1.18	1.31	1.25	0.89	0.78
Lachnospiraceae unclassified	1.77	0.94	0.83	0.96	1.16	0.15
Oribacterium	0.6	0.86	1.11	0.76	0.96	0.38
Prevotellaceae unclassified	0.66	0.74	1.19	0.49	1.09	0.24
Treponema	1.15	0.39	0.82	0.57	1.13	0.22
Clostridium sensu stricto 6	0.53	0.77	1.15	0.94	0.41	0.21
Methanobrevibacter	0.81	0.77	0.7	0.67	0.52	0.36
Ruminococcaceae CAG-352	0.49	1.48	0.12	0.13	0.9	0.01
Catenisphaera	0.67	0.55	0.75	0.55	0.53	0.38
Alloprevotella	0.46	0.71	0.55	0.46	0.52	0.38
Solobacterium	0.47	0.22	0.6	0.45	0.86	0.14
Prevotellaceae	0.31	0.85	0.51	0.35	0.48	0.12

uncultured						
Other genera	15.55	10.81	13.01	11.91	12.18	0.02

<sup>†</sup> p-values are calculated using Kruskal-Wallis test. Different superscripts denote significant difference.

#### vi) 장내균총의 Taxonomic marker

- LEfSe 분석을 통해 각 처리구에서 다른 처리구에 비해 특이적으로 나타나는 장내균총 조성인 taxonomic marker를 결정함(그림 71).
- PC 대조구에서는 Lachnospiraceae NK4A136 group, ND3007 group, Faecalibacterium, Peptococcus, Campylobacter, Eubacterium sireum group, Butyricicoccaceae UCG-008가 taxonomic marker로 나타남. Peptococcus는 돼지의 장관에서 흔하게 발견되는 공생균으로, 아미노산을 주요 질소원 및 에너지원으로 사용함(ROGOSA, 1971, Int. J. Syst. Bacteriol.). 한편, Campylobacter 대표적인 공생균으로, 상황에 따라 병원균으로 작용할 수 있는 균임(Duarte & Kim, 2022, Pathogens). Peptococcus, Campylobacter는 protease의 급여에 의해 낮아진다고 보고된 바 있음(Kim et al., 2023, Animals).
- Peptococcus는 돼지의 장관에서 흔하게 발견되는 공생균으로, 아미노산을 주요 질소원 및 에너지원으로 사용함(ROGOSA, 1971, Int. J. Syst. Bacteriol.). 이는, 타 그룹에 비해 PC 그룹에 단백질 함량이 높은 사료를 급여하였으며, protease를 급여하지 않아 숙주의 소장에서 흡수되지 않아 대장으로 이동한 단백질의 양이 높기 때문일 수 있음. 한편, Campylobacter 대표적인 공생균으로, 상황에 따라 병원균으로 작용할 수 있는 균임(Duarte & Kim, 2022, Pathogens). 이러한 균들은 Peptococcus, Campylobacter는 protease의 급여에 의해 낮아진다고 보고된 바 있음(Kim et al., 2023, Animals).
- NC 대조구에서는 Prevotella, uncultured Bacteroidales, Mogibacterium, Pygmaibacter가 taxonomic marker로 나타남. Prevotella, Bacteroidales, Mogibacterium은 돼지의 소화기에서 핵심 균총으로 꼽히는 대표적인 공생균임(Nowland et al., 2019, Animals; Wang et al., 2019, Microbiome). 한편, Pygmaibacter는 돼지의 균총에서 그 역할이 잘 알려져 있지 않음.
- 기존 보고된 바에 따르면, protease와 같이 사료에 효소를 첨가했을 때 SCFA 생산 균주, 유산균을 포함한 유익균이 증가했음.
- Treatment1에서는 Muribaculaceae, Erysipelotrichaceae UCG-006, Oscillospirales UCG-010, Oscillospiraceae UCG-002, Bifidobacterium가, Treatment2에서는 Lactobacillus가, Treatment3 처리구에서는 Shuttleworthia, uncultured Selenomonadaceae, Clostridia UCG-014, Mitsukella가 taxonomic marker로 나타남.
- *Lactobacillus*와 같은 lactic acid bacteria와 *Bifidobacterium*은 육성돈의 건강과 성장 효율에 이로운 영향을 끼치는 probiotics로 알려져 있음. (Poudel et al., 2022, J. Anim. Sci. Biotechnol.; Valeriano et al., 2017, J. Appl. Microbiol.; Vasquez et al., 2022, J. Anim. Sci. Technol.). 이용 가능한 단백질의 감소는 장내균총을 조절하고 주로 *Lactobacillus*와 같은 유익한 박테리아의 풍부도를 증가시키며(Rist et al., 2014, Anaerobe), 따라서 protease의 급여는 이러한 프로바이오틱스의 풍부도를 높여주는 효과가 있음(Kim et al., 2022, Sci. Total Environ.; 2023, Animals; Peng et al., 2022, Anim. Nutr.).
- 또한, Protease의 급여는 Muribaculaceae, Clostridium, Oscillospiraceae, Selenomodaceae family 과 같은 SCFA 생산 박테리아를 증가시키는 효과가 있는 것으로 알려짐(Kim et al., 2022, Sci. Total Environ.; 2023, Animals; Vasquez et al., 2023, Front. Microbiol.).

#### ○ 장내균총과 악취성 화합물의 잠재적 상관관계 분석

- Protease의 급여는 소장에서 단백질 흡수를 증가시키고 후장에서 단백질 발효를 감소시킬 수 있음(Kim et al., 2022, J. Anim. Sci. Technol.). 이는 결국 장내 미생물에 의한 단백질의 제한된 활용으로 인해 NH<sub>3</sub> 및 H<sub>2</sub>S와 같은 악취 화합물의 생성을 감소시킴(Zhao et al., 2020, Anim. Nutr.).
- 또한, 결장에서 이용 가능한 단백질의 감소는 장내균총을 조절하고 주로 *Lactobacillus*와 같은 유익한 박테리아의 풍부도를 증가시킴(Rist et al., 2014, Anaerobe).
- *Lactobacillus*는 병원성 세균의 억제와 대장의 pH를 감소시켜 악취 화합물의 생성을 저해하는 것으로 보고되었으며(Zhang et al., 2023, mSystems), 실제로 돼지 분뇨의 악취를 저감시키는 효과가 있음(Yan et al., 2017, Environ. Eng. Manag. J.). 또한, *Lactobacillus*의 증가는 악취생성에 기여하는 대장균군의 풍부도를 감소시킴(Rist et al., 2014, Anaerobe).
- Protease의 급여는 결장에서 단백질의 가용성을 낮추고 섬유질의 가용성을 높임. 이는 장내 미생물의 발효 활성을 악취물질의 방출(질소 배설)에서 단백질 합성(질소 고정)으로 변화시켜 소변 내 암모니아 방출을 감소시킴(Bindelle et al., 2007, Livest. Sci.; Loh et al., 2010, J.Appl.Res., 2007, Animal). 본 연구에서, protease 급여구의 단백질 소화 및 흡수, 질소 및 황 대사 경로가 감소할 것으로 예측되어 해당 기작을 통해 악취물질인 암모니아 배출을 감소시킬 것으로 예상됨.
- 후장에서 질소 및 황 화합물의 대사는 각각 암모니아와 H<sub>2</sub>S생산의 주요 경로이며, 장내 미생물은 이러한 대사 과정을 조절함(Ni et al., 2022, Sci. Rep.).
- 따라서, protease의 급여가 *Lactobacillus*의 성장을 촉진하고 장내 미생물의 단백질 발효를 제한함으로써 악취 화합물의 배출을 감소시킬 수 있음.

## (8) 품질관리 기준 수립

### □ 제품 저장 안정성 평가

제품의 생산 SOP 및 품질 분석 기준을 수립한 후, 사양실험을 위한 시제품을 이용하여 저장 안정성 평가를 수행하였다. 시제품을 상온에서 총 12개월간 보관하여 3개월 단위로 protease 역가를 측정하여 상온 저장안정성을 평가하였다(그림 ). Protease 역가 분석 결과 상온 조건에서 약 12개월까지는 중성 protease 1,500, 산성 protease 1,000 U/g 이상의 역가를 유지하였다. 실온 저장안정성 분석 결과를 바탕으로 제품의 품질보증기간은 12개월로 설정하였다.

## (9) 제품화

### □ 공인기관 분석 및 제품화

#### 가. 제품 안전성 평가

제품의 급여 안전성을 평가하기 위해 랫드를 이용한 급성경구독성시험을 진행하였다(그림 72). 분석은 외부분석으로 진행하였고, (주)센트럴바이오에 의뢰하여 진행하였다. 시험에 사용된 동물은 Sprague-Dawley계 랫드 44마리(수컷, 22마리; 암컷, 22마리)를 공시하였고, 총 2주간 급여를 진행하였다. 투여 용량은 0, 500, 1000, 2000 mg/kg B.W.로 설정하여 1회/일 단회 경구투여로 진행하였다.

급여 기간동안 일반증상 관찰 및 체중측정을 하였고 급여 15일 째 안락사 후 부검을 진행하였다. 일반증상은 매일 1회 이상, 투여 후 30분 이내 및 이후 4시간 째 까지 매시간 관찰을 실

시하였다. 체중은 시험 전 2회 측정하였고(입수일 및 군분리일), 실험 개시 이후 급여 1(급여 전), 2, 4, 8, 15(부검전)일차에 측정하였다. 부검은 관찰 기간 종료 후 모든 동물을 안락사 시키고 육안적 부검소견을 관찰하였다.

시험 결과 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 및 체중변화 또한 관찰되지 않았다. 마지막으로 부검소견 역시 이상소견은 관찰되지 않았다. 이를 토대로 위 실험 조건에서 개발된 단백질 분해 효소제를 Sprague-Dawley계 랫드에 단회 경구투여했을 때 개략의 치사량(approximate lethal doses)은 2,000 mg/kg B.W. 이상으로 판단할 수 있다.

## 요약

본 시험은 시험물질 지프로를 암컷 Sprague-Dawley계 랫드에 단회 경구투여했을 때 나타나는 독성반응을 관찰하고, 개략의 치사량을 알아보고자 수행하였다. 투여용량은 500, 1,000 및 2,000 mg/kg b.w.으로 설정하였고, 군당 암수 5 마리에 단회경구 투여 후, 14 일간의 사망률, 일반증상, 체중변화를 관찰하였으며, 14 일간 관찰 후 부검하여 장기에 대한 육안소견 관찰을 실시하였다.

- 1) 사망동물  
실험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다.
- 2) 일반증상  
시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 3) 체중변화  
시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
- 4) 부검소견  
시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 본 시험조건에서 지프로를 Sprague-Dawley계 랫드에 단회경구투여했을 때 개략의 치사량(Approximate lethal doses)은 2,000 mg/kg b.w. 이상으로 판단한다.

그림 72. 제품의 급여 안전성을 평가하기 위한 랫드를 이용한 급성경구독성시험  
요약(분석기관: 센트럴바이오)

### 나. 제품 성분등록 및 제품화

제품 성분등록을 위해 제품의 역가를 분석하였고 보증 역가를 설정하였다. 보증 항목은 산성 프로테아제와 중성프로테아제로 설정하였고, 각각 1,000 U/g, 1,500 U/g 이상으로 등록하였다 (그림 73). 제품명은 에너밴스피(에너밴스P)로 하였고, 보조사료/효소제-합제로 2023년 11월 8일 등록하였다.

등록번호 제 CCBLE0012 호

## 사 료 성 분 등 록 증

대 표 자 이찬호 생년월일 :1964년 4월 5일

업 체 명 :(주)진바이오텍 제조(수입)업등록번호 : 6440000-502-2008-0027

소 재 지 :충청남도 공주시 계룡면 신원사로 166

사료의 종류 : 보조사료/효소제-합제 사료의 명칭 : 단백질분해효소 합제 1

사료의 형태 : 가루 사료의 용도 : 사료원료용, 양축농가용

제조국가 : 국내산

제품명(영문명) : 에너밴스피(에너밴스P)

사료의 성분량

성분명	산성프로테아제	중성프로테아제							
성분량	1,000 u/g 이상	1,500 u/g 이상							

『사료관리법』 제12조제2항 및 같은 법 시행규칙 제 12조제3항에 따라  
위와 같이 사료의 성분등록을 하였음을 증명합니다.

2023년 11월 8일

충청남도지사



210mm×297mm [백상지 120g/㎡]

그림 73.. 에너밴스P의 사료성분등록증

#### 다. 영업 및 홍보를 위한 마케팅

제품의 영업 및 홍보를 위해 리플렛을 제작하였다(그림 74). 제작한 리플렛을 농가 및 기업에 배포하여 영업 및 홍보를 진행할 예정이다. 또한 2023년 12월 22일 축산경제신문에 제품 출시에 대한 홍보 기사를 게재하여 홍보를 진행하였다(그림 75).

**에너밴스P**는 위(산성)와 소위(중성)에서 모두 작용하는 단백질 분해 효소제로, 단백질 소화율을 높여 생산성을 개선하고 분뇨의 악취저감에 기여할 수 있는 제품입니다.

**더블 액션 효소제** **에너밴스P**

**에너밴스P의 특징점**

- 최적 pH**: 산성과 중성의 라테에서 모두 높은 효소 활성을 보임. (pH 3, 5, 7, 9, 11)
- 최적 온도**: 동물의 체온에 가까운 40°C에서 효소 활성이 가장 우수함. (30°C, 40°C, 50°C, 60°C)
- 열안정성**: 고온에서도 효소 활성을 크게 유지하며 사료 가공 과정에서 손실을 최소화함. (Original, 80°C, 100°C, 120°C)

GB (주)진바이오텍

일당용량 (g) | FCR | 암모니아 (ppm)

조단백질을 2% 저감한 육성용 사료에 **에너밴스P**를 첨가하여 6주간 급여한 결과, 사료성적은 일반 사료와 유사한 수준으로 유지하면서 분뇨 내 암모니아 발생량을 40% 감소

**효능 및 효과**

**성분 및 함량**

**용법 및 용량**

에너밴스P는 농림축산식품과학기술연구원(농기원)의 기술사업화지원사업의 연구비를 지원받아 개발된 제품입니다. (마이크로바이옴 연구기반으로 치단백 사료를 위한 친환경 사료첨가제 개발, 2022~2023년)

GB (주)진바이오텍

그림 74. 영업 및 홍보를 위한 에너밴스P의 리플렛

**축산경제신문**  
The Livestock Economic News

정책 축종 관련산업 농협중앙회 지역축협 기획 인물 Opinion Plaza 관련사이트 검색어를 입력해주세요

2023-12-22 15:10 (금) 처음으로 로그인 회원가입 전체기사

HOME > 관련산업 > 동약

**(주)진바이오텍 「에너밴스P」 출시**

김기슬 기자 | 승인 2023.11.24 14:03 | 댓글 0

단백질 분해 흡수 돕는 효소제  
육성도 일당 증체량 10% 개선  
암모니아 농도 최대 22% 줄여

인터넷신문위원회  
윤리강령을 준수합니다

그림 75. 축산경제신문에 게재된 제품 출시 기사(2023. 11. 24)

**라. 개발 제품의 경제성 평가**

제품의 효소제 시장에서의 경쟁력을 확인하기 위해 타사제품과 경제성 비교 평가를 진행하였다. 모든 사료 비용은 배합사료의 원료 가격을 기준으로, 고단백사료의 경우 CP 함량 16%, 저단백 사료의 경우 CP 함량 14%로 설정하였다. 저단백 사료에 타사제품은 첨가 기준량인 0.2%, 에너밴스 P는 0.1% 및 0.2% 첨가할 경우를 가정하여 배합사료 비용을 계산하였다. 고단백 사료의 경우 kg 당 471원, 저단백 사료의 경우 kg 당 454원으로 계산되었다. 저단백 사료에 에너밴스 P를 0.1% 첨가한 경우 kg 당 456.5원, 0.2% 첨가한 경우 kg 당 459원으로 계산되었고, 타사제품을 0.2% 첨가한 경우 kg 당 459원으로 계산되었다. 배합사료 비용에 사료요구율과 평균 증체량, 그리고 사육두수를 모두 고려하여 농가 예측 사료비를 계산하였고, 결과는 아래와 같

다.

[계산식 = 사료요구율 × 사료비 × 평균증체량 × 규모(3,000두)]

고단백 배합사료:  $2.725 \times 471 \times 26.52 \times 3,000 = 102,113$ 천원

저단백 배합사료 + 에너밴스 P 0.1:  $2.791 \times 456.5 \times 26.52 \times 3,000 = 101,367$ 천원

저단백 배합사료 + 에너밴스 P 0.2%:  $2.701 \times 459 \times 26.52 \times 3,000 = 98,635$ 천원

저단백 배합사료 + 타사제품 0.2%:  $2.711 \times 459 \times 26.52 \times 3,000 = 99,000$ 천원

기존 고단백 사료와 비교하여 저단백 사료에 에너밴스 P를 0.1% 첨가할 경우 747천원, 0.2% 첨가할 경우 3,478원이 절약될 것으로 예측되었고, 타사제품을 첨가할 경우 3,113천원이 절약될 것으로 예측되었다. 에너밴스 P는 글로벌 타사 제품과 유사한 경제성을 보였고, 이를 통해 시장에서 충분한 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 예측된다.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

---

###### ○ 이유자돈용 복합 사료첨가제 개발

- 선행연구에서 선발된 약취저감능 균주를 활용한 저분자화 단백질 대량생산연구
- *In vitro* 제품특성 연구
- 사양실험용 샘플제조
- 이유자돈용 복합 사료첨가제의 사양실험
- 이유자돈 사양실험을 기반으로 장내 균총 및 단쇄지방산 조절능 DB 구축
- 품질관리 기준 수립 및 제품화(에코타이드)

###### ○ 육성돈용 효소제 개발

- 단백질분해효소 고생산 균주 선발 및 분비효소 특성 비교
  - *In vitro* 제품특성 연구
  - 효소제 대량생산 연구
  - 사양실험용 샘플제조
  - 육성돈용 효소제의 사양실험
  - 육성돈 사양실험을 기반으로 장내 균총 및 단쇄지방산 조절능 DB 구축
  - 품질관리 기준 수립 및 제품화(에너지P)
- 

##### (2) 정량적 연구개발성과

---

- 특허출원 - 2건
  - 제품화 - 2건
  - 매출액 - 3,370만원
  - 고용 - 1명
  - 인력양성 - 1명
  - 생명자원 등록 - 1건
  - 논문 - 2건(평균 IF 4.2)
  - 홍보 - 2건
-

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Dietary Supplementation of Limosilactobacillus mucosae LM1 Enhances Immune Functions and Modulates Gut Microbiota Without Affecting the Growth Performance of Growing Pigs	Frontiers in Veterinary Science	Qianqian Zhang	9	Switzerland	Frontiers	SCIE	22.06.30	2297-1769	100
2	Multispecies probiotic supplementation in diet with reduced crude protein levels altered the composition and function of gut microbiome and restored microbiome-derived metabolites in growing pigs	Frontiers in Microbiology	Robie Vasquez	14	Switzerland	Frontiers	SCIE	23.07.07	1664-302X	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Bacillus licheniformis GB-BL-2022	KFCC11950P	한국미생물보존센터	2022

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	바실러스 리체니포미스 균주를 활용한 친환경 저분자화 단백질 사료 첨가제	대한민국	(주)진바 이오텍	2022.12.08	10-2022-0170988					100	V
2	바실러스 서브틸리스, 아스퍼질러스 오라이제 및 아스퍼질러스 나이거 균주를 활용한 친환경 단백질 효소제	대한민국	(주)진바 이오텍	2023.12.14	10-2023-0181884					100	V

지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									
2	√									

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

표준화

국내표준

번호	인증구분 <sup>1)</sup>	인증여부 <sup>2)</sup>	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 <sup>3)</sup>	제안/인증일자

- \* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

국제표준

번호	표준화단계구분 <sup>1)</sup>	표준명	표준기구명 <sup>2)</sup>	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 <sup>3)</sup>	제안자	표준화 번호	제안일자

- \* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- \* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	에코타이드	2023	(주)진바이오텍	(주)진바이오텍	이유자돈용 사료첨가제	2		
2	에너밴스P	2023	(주)진바이오텍	(주)진바이오텍	육성돈용 효소제	2		

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	특허출원 및 신제품 개발	국내	이유자돈용 사료첨가제 '에코타이드' 제품화	이유자돈용 사료첨가제 '에코타이드' 제품화에 따른 매출발생	(주)진바이오텍	33,700		2023	5
2	자기실시	특허출원 및 신제품 개발	국내	육성돈용 효소제 '에너밴스P' 특허출원 및 제품화	육성돈용 효소제 '에너밴스P' 특허를 출원하여 해당 기술을 자기실시	(주)진바이오텍	-		-	5

\* 1) 기술이전 또는 자기실시  
 \* 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등  
 \* 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
이유자돈용 사료첨가제 '에코타이드' 제품화	2023	33,700		33,700	매출에 따른 금액
합계		33,700		33,700	매출에 따른 금액

□ 사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과

성과		이유자돈용 복합 사료첨가제 “에코타이드” 제품출시 및 매출 육성돈용 복합효소제 “에너밴스P”출시			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	5			
	소요예산(천원)	200,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		33,700	150,000	450,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			국내	0.5	1.5
국외			-	-	0.1
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		에코타이드와 에너밴스 중성 Protease 합제 구성제품 (시장니즈에 따라 복합제품 개발 예정, 2024년)			
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
		-	-	-	
	수출	-	-	-	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2022년	2023년	
1	마이크로바이옴 연구기반으로 저단백 사료를 위한 친환경 사료첨가제 개발	(주)진바이오텍	1 (직접고용)	-	1
합계			1	-	1

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	5	
		생산인력	15	
	개발 후	연구인력	7	
		생산인력	15	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

□ 설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황												
			학위별				성별		지역별						
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타		
1	인력양성	2023	1				1			1					

□ 산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

□ 다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

□ 국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	월간잡지	피그앤포크	단백질을 저분자화한 발효 대두박 '에코타이드' 생산성 'UP' (㈜진바이오텍 「에너밴스P」 출시	2023.11.15
2	중앙전문지	축산경제신문	단백질을 저분자화한 발효 대두박 '에코타이드' 생산성 'UP' (㈜진바이오텍 「에너밴스P」 출시	2023.11.24

□ 포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

□ 연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

\* 「과학기술기초법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

해당사항 없음

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

- 생명정보 등록 1건

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<p>○ 사료 단백질 원료의 생체내 질소이용성을 증대시키는 이유자돈 및 육성돈 맞춤형 사료첨가제 개발</p>	<p>○ 우수성과로 선정된 선행연구(“유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발(2018. 04. 25 ~ 2021. 12. 31, 연구개발과제번호: 918001-4)”)에서 선발된 악취저감능 균주들을 활용하여 최적의 대량생산조건 연구, 특허출원 2건, 제품화 2건을 달성하였음</p> <p>○ 제품의 효능을 검증과 차별화된 마케팅 자료를 준비하기 위해 제품특성 연구를 진행함(<i>In vitro</i> 인공소화액 실험, peptide gel 전기영동 활용한 단백질 분해능 패턴 분석, 기질 분해도 분석, pH 별 역가 분석 등).</p> <p>○ 균일한 제품 품질을 확보하기 위해서 생산 SOP 및 품질관리 기준을 ISO와 FAMI-QS의 표준기준에 기반하여 수립함.</p> <p>○ 동물에 대한 제품 안전성을 확보하고자 외부 전문기관에서 급성경구독성시험을 진행하였음.</p> <p>○ 공인기관 분석 및 역가 분석을 통해 보증 수치를 설정하였고, 이유자돈 및 육성돈 맞춤형 사료첨가제 제품 2건을 등록하였으며 매출목표 3천만원 이상을 달성하였음.</p> <p>○ 리플렛 및 축산신문에 홍보기사를 게재하여 영업과 홍보를 위한 마케팅을 실시함.</p>	<p>100</p>
<p>○ 이유자돈 및 육성돈 사양실험 기반 질소저감과 장내균총 및 단쇄지방산 상관관계 분석</p>	<p>○ 이유자돈용 복합 사료첨가제의 사양실험을 진행함.</p> <p>○ 육성돈용 복합 사료첨가제의 사양실험을 진행함.</p> <p>○ 사양실험을 기반으로 장내 균총 및 단쇄지방산 조절능 DB를 구축함.</p>	<p>100</p>

#### 4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

##### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 해당사항 없음

##### 2) 자체 보완활동

- 해당사항 없음

##### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

- 주관연구기관 및 공동연구기관 모두 연구개발을 성실히 수행하여 연차별로 설정한 목표를 전부 달성하였음.

###### ○ 주관연구기관\_(주)진바이오텍

- 선행연구에서 선발된 약취저감능 균주를 활용하여 저분자화 단백질 대량생산연구를 수행하였으며 *In vitro* 제품특성 연구를 통해 제품의 효능 검증, 안전성·안정성 평가를 기반으로 품질관리 기준을 수립하고 이를 통해 대량생산 공정을 확립하여 제품화를 달성함.

- 단백질분해효소 고생산 균주 선발 및 분비효소 특성 비교연구와 고상발효 기술을 활용한 효소제 생산 실험을 수행하였으며 *In vitro* 제품특성 연구를 통해 제품의 효능을 검증하고 품질관리 기준을 수립하여 이를 기반으로 대량생산 공정을 확립하여 제품화를 달성함.

###### ○ 공동연구기관\_단국대학교

- 이유자돈용 복합 사료첨가제 및 육성돈용 효소제 개발을 위해 사양실험을 통한 DB를 구축하였으며(생산성, 영양소 소화율, 분변내 약취물질 및 총질소 등) 장내균총 조절능·장내 단쇄지방산 조절능 평가와 질소저감과 장내균총 및 단쇄지방산과의 상관관계 분석을 통해 사양실험을 기반으로 장내 균총 및 단쇄지방산 조절능 DB를 구축함.

---

#### 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

- 2050 농식품 탄소중립 추진전략으로 양돈용 배합사료 내 조단백질 함량 감축을 통하여 저탄소 사양관리 정책 시행에 따라 생산성 우려 극복과 배출되는 질소량이 저감됨.

- 개발제품은 친환경적인 제조공정을 이용하여 사료급여 뿐만 아니라 생산단계에서도 탄소 배출이 저감됨.

- 본 제품들을 통해 체내 질소이용성이 증대하여 저탄소 사양관리에 따른 생산성 극복 구간별 맞춤형 솔루션을 제공하고 배출되는 질소 감소 효과를 기대함.

- 사료 효율의 증대로 양돈 생산비용 절감 및 수입제품 대체효과를 지님.

- 마이크로바이옴 및 사양실험을 통하여 장내 균총 및 단쇄지방산 조절능 DB를 구축함.

---

#### 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

---

- 본 과제 종료 후 개발하는 제품들은 과제를 수행하며 설립한 친환경적인 제조공정을 응용하여 생산할 예정이며 앞으로 축산업계에서의 사료첨가제 및 효소제는 이와 같은 친환경적인 공정을 기반으로 질소 감소 효과뿐만 아니라 탄소 배출 저감 효과까지 기대할 수 있음.

- 탄소 배출이 저감되는 친환경적인 생산공정은 추가 연구를 통해 사료첨가제 및 효소제뿐만 아니라 여러 방면에서 응용이 가능할 것으로 사료됨.

- 실제 효능 검증, 특허출원 성과를 달성하며 국내 축산업계의 위상 및 기술 발전에 이바지할 것으로 예상됨.

---

#### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 2022년 기술사업 지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 2022년 기술사업 지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.