

발간등록번호

11-1543000-000139-01

바이오사료첨가제 사업단
(Bio-Feed Additives Research Center)

서울대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “**바이오사료첨가제 사업단**” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2013년 7월 30일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 최 윤 재 교수

핵심연구기관명 : (주)인트론바이오테크놀로지

핵심연구책임자 : 전 수 연 박사

핵심연구기관명 : 건국대학교

핵심연구책임자 : 이 홍 구 교수

요 약 문

I. 제 목

바이오사료첨가제 사업단

II. 연구사업단 최종목표 및 사업단 소개

본 연구사업단의 연구개발 최종목표는 ‘축산물 품질의 질적 향상과 안전성 확보를 위한 천연 항생제 대체물질 및 기술을 개발’하는 것으로 기존 축산업의 항생제 오남용 문제를 해결하고, 21세기 축산업이 안전성을 확보하고 환경과 공존하는 지속가능한 산업으로 발전하기 위한 초석 마련을 위해 친환경 항생제 대체제를 개발함에 있어서 유용 미생물 자원, 병원균 특이적 박테리오파지 및 항균천연물질을 중심으로 기존 항생제가 지닌 단점을 극복하면서 가축의 생산성 향상과 질병예방에 효과적인 다양한 제품 및 기술을 개발/산업화하는 것이다.

본 연구사업단은 축산물 품질의 질적 향상과 안전성 확보를 위한 천연 항생제 대체 사료첨가제, 생리활성 제제 및 관련 첨단기술 등을 개발하여 상용화하는 것을 목적으로 하고 있는 축산관련 첨단기술 실용화에 초점을 둔 연구사업단이다.

본 연구사업단(사업단장: 서울대 최윤재교수)은 대학 (서울대학교 농업생명과학대학, 부산대학교 생명자원과학대학), 첨단 바이오 기술 보유 산업체 ((주)인트론바이오테크놀로지), 동물약품 생산업체 ((주)이지바이오시스템) 및 축산업의 현장을 담당하고 있는 사료생산업체 ((주)카길애그리퓨리나, (주)도드람B&F, (주)선진, 천하제일사료)등의 유기적인 공조체계에 의한 연구/기술개발 및 현장적용 프로세스의 효율성 극대화를 모색하고 있으며, 사업단 목표를 달성하기 위하여 경쟁력 있는 연구테마선정, 공동연구 인프라구축을 통한 효율적인 연구수행, 산학연간의 유기적 협력에 의한 산업화, 장기적으로 연구단의 자립화 및 관련분야 지식, 기술교육 등의 역할을 수행하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구사업단 과제는 3개의 핵심과제로 구성되어 있으며 각 핵심과제의 연구내용은 다음과 같다. 제1핵심과제에서는 주로 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제를 개발하는 것으로 각 축종(양돈, 양계, 송아지)별 질병원인균 방어에 전문화된 유산균과 효모, 바실러스, 생균제용 대장균을 기반으로 하는 생균제 베이스를 조합한 복합 미생물 생균제를 개발하고, 생산을 최적화하며, 또한 생균제의 산업화를 위한 효율적이고 경제적인 대량생산 배지 개발과 생균제의 효과적인 소화장관 전달을 위한 미생물 고분자 전달체를 개발하는 것이다. 제2핵심과제에서는 박테리오파지 기반의 동물 질병 예방 및 치료용 생물활성제제를 개발하는 것으로 병원균 특이적

박테리오파지를 이용한 유방염 등 황색포도상구균 관련 질환 및 살모넬라 관련 질환의 예방 및 치료제를 개발하는 것이다. 제3핵심연구과제에서는 항생제 대체 사료용 천연물질 개발 및 항생제 대체제 사양체계를 개발하는 것으로 축종(양돈, 양계, 송아지)에 전문화된 사료용 및 가축질병 내성 향상을 위한 천연물 유래 면역증강제를 개발하고 효율적 현장적용을 위한 사양체계를 확립하는 것이다.

IV. 연구개발결과

제 1핵심과제, 제1-1세부과제에서는 항생제 대체 복합 미생물 생균제를 개발하기 위하여 축산 분야에서 중요한 병원성 세균에 대해 항균 능력이 우수한 유산균을 UV mutation과 genome shuffling 기법을 통하여 육종하였다. 이를 통하여 닭에서는 *Salmonella gallinarum*에 대해 항균력이 10 배, 소와 돼지에서는 *Escherichia coli* K99과 *Escherichia coli* O157에 대해 항균력이 각각 10 배와 1.5 배 우수한 균주를 육종하였다. 이렇게 육종된 균주를 배양한 후 바실러스 및 효모와 배합하여 복합 미생물 생균제 시제품을 각 축종별로 생산하였다. 이를 축종별로 급여하였을 때 가축의 폐사율을 유의적으로 낮출 수 있었으며 이는 항생제와 버금가는 coliform bacteria에 대한 항균 효과에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

또한 *Bacillus* 균주의 경우에 병원균인 *E. coli* O157, *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*에 대해 항균능력을 보이면서, 세포독성이 없고 내산성과 내담즙성이 우수한 *Bacillus* sp. SM2를 선발하여 대두박과 유청분말을 배지성분으로 반응표면분석법(response surface methodology)에 의한 균체생산 최적화를 유도하였고, 옥수수미분 혹은 왕겨와 같은 농부산물을 부형제로 사용하여 시제품 제조 후 보관 시 실온에서 60일 동안 70%까지 균체가 생존하는 안정성을 확인하였다. 또한 사료의 영양소 이용률을 개선하는 protease, amylase 효소활성을 나타내며, 내산성과 내담즙성이 우수한 *Bacillus* sp. JSP1을 선발하여 대두박과 옥수수미분을 이용한 고체발효(solid-state fermentation)를 통해 이들 효소를 생산하였고, 생산된 효소의 온도에 대한 안정성을 조사한 결과 protease의 경우는 25°C에서 30일 간 저장시에도 80%의 효소활성을 유지하였고, amylase의 경우는 25°C, 37°C에서 80일 간 저장시에도 70%의 효소활성을 유지하였으며, 이들 효소는 세포독성을 나타내지 않았다. 따라서 가축생산에서 항균활성과 효소활성을 보이는 바실러스 균주들의 복합생균제로서의 이용가능성이 제시되었다.

또한 생균제로서 선정된 3개의 유산균 균주(*L. salivarius* Ls29, *P. acidilactici* PA175 및 *L. plantarum* LP177)의 균체생육에 미치는 배양조건 및 배지조건을 조사하였다. Molasses와 corn steep liquor(CSL)는 유산균의 성장을 위해 탄소 또는 질소 공급원으로서 배지에 첨가될 수 있는 우수한 산업용 배지로 판단되며, 생균제용 미생물 대량생산 방법과 공정 개발을 위해 최적화된 생산배지 조성인 6% Molasses와 6% CSL 및 수종의 무기염을 산업용 배지에 첨가하여 발효조 배양 실험을 수행하였다. 이렇게 대량 배양된 유산균 균주는 바실러스 및 효모와 배합하여 혼합 생균제제로 실험에 사용되었다.

제1-2세부과제에서는 생균제를 가축에 효율적으로 전달하기 위해 알지네이트/키토산/알지네이트 (ACA) 마이크로캡슐을 제작하였고 미생물 담지 및 저장 조건을 최적화하였다. ACA 마이크로캡슐에 모델 유산균을 담지한 결과 위와 소장의 *in vitro* 환경에서 효과적으로 보호되었으며 서방형으로 방출되었다. 동결건조 후 4°C 저장 시 8주까지 생존율이 60%로, 코팅되지 않

은 미생물의 생존율에 비해 2배 이상 높았다. 실험용 쥐와 육계에 경구 투여하였을 때에도 유산균의 고유한 분비 특성이 유지되었으며 장내에서 미생물의 생존율이 향상되어 생균제 코팅제로 사용하기에 적합함을 확인하였다.

제 2핵심과제에서는 황색포도상구균, 살모넬라, *E. coli* K88, K99, *Clostridium perfringens*, *Bordetella bronchiseptica* 등 다양한 병원성 미생물 특이적인 박테리오파지를 기반으로 한 시제품 7종 (사료첨가제 4종, 음수첨가제 2종 및 소독제 1종)을 개발하였고, 이들 시제품에 대한 *in vivo* 안전성, *in vivo* 효능평가 (공격접종시험 등) 및 현장적용시험 (사양시험)을 수행하였다. 특히, GLP(good laboratory practice)기관에서의 동물대상의 장기투여 안전성 시험도 수행하였다. 이러한 안전성 및 유효성 시험을 통하여 개발한 박테리오파지 기반의 생물활성제제가 매우 우수한 성능을 가지고 있음을 확인하였다. 최종적으로 시장상황 및 제반 여건을 고려하여 개발한 시제품 중 음수첨가제 1종과 사료첨가제 4종을 우선 제품화하였다. 또한 박테리오파지 리신 기반의 제제로 젖소유방염 치료제를 개발하였다. 개발한 젖소유방염 치료제는 기존 제품들에 비교하여 다양한 차별성을 가지며 우수한 치료효과를 제공할 수 있음을 확인하였다.

제 3핵심과제에서는 항생제 대체 복합생균제/천연물 혼합제제를 개발하기 위하여 agar diffusion assay를 이용하여 다양한 축종별 병원성 미생물에 대한 항균력을 보이는 천연물을 선별하였다. 높은 항균활성을 보이는 마늘 추출액과 복합생균제 혼합제제는 장관 유래 면역세포의 자극을 통한 사이토카인 분비 촉진, LPS(lipopolysaccharide) 챌린지에 의한 사이토카인 분비 억제 및 종양세포 사멸능력 증진을 *in vitro* 연구를 통해 확인하였다. 이를 산란계 큰 병아리사료에 첨가하여 사육하였을 때 LPS 공격접종시험에서 면역계의 항상성 유지와 장관 내 *E. coli*를 감소시키는 경향을 보였다. 한편, *in vitro* 실험을 통한 securitor/복합생균제 혼합제제는 장관 유래 면역세포의 증식/분화 유도, 사이토카인 분비 촉진, LPS 챌린지에 의한 사이토카인의 분비 억제 및 종양세포 사멸능력 증진효과를 관찰하였다. 이유자돈에 사료 급여 실험을 한 결과 혈액 내 사이토카인 분비가 촉진되었으며, 산란계 큰 병아리에서는 LPS 챌린지 실험에서 사이토카인 분비가 없었다. 또한 장관 내 환경 개선 효과 경향을 보였으며 무항생제 처리 구 대비 상대적으로 높은 산란수를 확인하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 복합생균제/천연물 혼합제제는 기존의 항생제를 대체할 수 있는 가능성을 시사한다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

제 1핵심과제의 결과를 활용할 경우 축종별로 가장 문제가 되는 병원균에 대해 항균력이 증진된 미생물을 급여함으로써 가축 질병을 미연에 방지할 수 있을 뿐만 아니라, 잠재적 병원성 미생물인 coliform bacteria 또한 억제함으로써 항생제를 사용하지 않고도 폐사율을 낮출 수 있다. 이는 친환경 축산 분야에서 가축의 생산성과 안전성을 높여줄 수 있을 것으로 기대된다. 본 핵심과제의 경우 양계용 복합미생물 생균제를 에스앤마니커에 기술이전을 실시하여 “닭터의 자연”이라는 친환경 계육을 상품화하였다. 또한 본 연구결과로부터 도출된 균체 및 효소생산 발효기술은 향후 산업미생물을 이용한 유용물질생산 공정의 최적화를 위한 가이드라인으로 제시될 수 있을 것이다. 기타 다른 축종별 생균제나 특정 유산균제제는 추 후 기술이전을 통해 산업화될 것이다.

또한 유산균을 이용한 사료첨가제의 경우, 대부분을 수입에 의존하기 때문에 국내에서의 유산균 대량 생산 공정은 초기단계에 있다. 따라서 가축에 유익한 생균제를 제조하기 위하여 유

용 유산균의 확보, 균주의 대량배양을 위한 배지 개발, 배양조건 확립 등을 통해 국내 사료첨가제 시장에 한국형 유산균을 사용한 사료첨가제를 도입함으로써 효과와 경제성이 있는 제품을 공급하여 수입 대체효과를 기대할 수 있다. 또한 이러한 생균제들을 고분자로 코팅하여 급여한다면 위장의 낮은 pH와 장내 소화효소에 의한 분해로부터 보호할 수 있어 생균제의 효과를 극대화 할 수 있을 것으로 기대된다.

제 2핵심과제의 결과물들은 일부가 제품화로 활용되었으며 향후 제품화된 제품들의 매출 증대를 위한 다양한 노력을 할 계획이다. 특히 해외 시장 개척을 위해 노력할 것이며, 이에 관련하여 미국, 인도네시아, 브라질, 콜롬비아 국가의 기업들과의 협력을 진행하고 있다. 본 핵심과제의 성과는 친환경 축산 구현에 직접적으로 기여할 수 있을 것으로 생각되며, 보다 안전한 축산물 생산에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 본 과제에서의 개발기술을 향후 확장하여 식품첨가제 및 동물용 의약품 개발에 활용할 계획이다.

제 3핵심과제에서 검증된 복합생균제/천연물 혼합제제는 기존에 항생제 대체 효과를 목적으로 개발한 것으로 가축의 면역증진과 사료첨가제의 안전성에 대한 추가 및 소비자 관심에 부응하는 긍정적인 효과를 가져 올 것으로 기대된다. 또한 이 복합생균제/천연물 혼합제제를 (주)푸른들이엠사료에 기술을 이전하여 친환경 사료첨가제에 응용함으로써 부가가치가 높은 제품의 개발이 가능할 것으로 사료된다.

SUMMARY

I. Title

Bio-Feed Additives Research Center (BFARC)

II. Final Goal of Bio-Feed Additives Research Center

The final goal of Bio-feed Additives Research Center (BFARC) is to develop the natural alternatives of antibiotics to improve the quality and to secure the safety of animal products. This is important for the prevention of antibiotics abuse, the safety assurance, and the development of current animal husbandry as a sustainable industry compatible with the clean environment. Therefore, our research group developed various farm products and technologies to reduce antibiotics misuse, improving animal productivity and preventing the animal disease using probiotic microorganisms, natural pathogen-suppressing phyto-chemicals, and pathogen-specific bacteriophages.

In this research project, BFARC mainly focused on the industrialization of various technologies and products such as natural alternatives of antibiotics and bio-active agents, to ensure safety of animal product in livestock industry.

III. Research Contents

This project consisted of three research teams/project groups. (1) Project I: Development of multi-species probiotics as an alternatives of antibiotics, (2) Project II: Development of bio-active phage products based on bacteriophages to prevent and cure animal infectious diseases, and (3) Project III: Development of phytochemicals as an alternatives of antibiotics and the field tests of the developed test products.

IV. Results

Project I, multi-species probiotics team: One of the two main goal of this team is to develop complex probiotics consisted of multi-species of microorganisms as an antibiotic alternatives. For this goal, firstly, three different lactic acid bacteria (LAB; *L. salivarius* Ls29, *P. acidilactici* PA175 and *L. plantarum* LP177) were went through a strain breeding protocol consisting of UV mutation/screening and genome shuffling/screening techniques to increase the bacteriocidal activity of wild type against the major pathogens in livestock industry. Through this method, the bacteriocidal activities of three LABs were improved about 10-fold against *Salmonella gallinarum*, an avian pathogen, 10-fold against

Escherichia coli K99 and 1.5-fold against *Escherichia coli* O157, respectively. These LABs were separately cultured and mixed with a yeast and *Bacillus* cultures to produce animal-specific probiotic samples and tested on chicken and cow. It showed that the mortality of both livestock animals decreased significantly due to the better bactericidal activity of strain-breeding LABs against coliform bacteria which is comparable to the effect of positive antibiotics control group, avilamycin.

Secondly, the non-toxic, and acid & bile tolerant *Bacillus* sp. SM2 was also selected based on broad anti-microbial activities against *E. coli* O157, *S. enteritidis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogens*, and *Staphylococcus aureus*. The production media for SM2 was established using response surface methodology consisted of soybean meal and whey. The fermentation product of SM2 prepared using agro-residual supplements such as soybean meals and corn flour, was stable during 60 days storage at 25°C, retaining 70% of its initial cell numbers. In addition, the acid and bile tolerant *Bacillus* sp. JSP1 was selected based on feed-digesting enzyme production such as protease and amylase. JSP1 protease and amylase were produced using soybean meal and corn flour medium by solid-state fermentation and their temperature stabilities were investigated. JSP1 protease was stable during 30 days storage at 25°C, retaining 80% of its initial activity. Amylase of JSP1 was also stable during 80 days storage at 25 and 37°C, retaining 70% of its initial activity. Both enzymes showed no cytotoxicity. Therefore, the use of *Bacillus* strain exhibiting anti-microbial activity combined with acid and bile tolerant *Bacillus* strain secreting extracellular enzymes may be an alternative to antibiotics as a feed additive in farm animal production.

We also assessed the ability of three LABs to grow in an low-cost industrial production medium containing food byproducts, molasses as a carbon source and CSL as a nitrogen source supplemented with minor nutrients. The optimal medium composition were 6% (v/v) molasses and 6% (v/v) CSL. This medium is very low-cost and highly effective for the LAB fermentation.

Other goal of this team was to develop the efficient delivery method of probiotics to livestock. For this goal, alginate/chitosan/alginate(ACA) microcapsules were designed and the formulation as well as storage conditions were optimized. Encapsulated model lactic acid bacteria (LAB) was well-protected from *in vitro* stomach and intestine conditions and released slowly. The viability of freeze-dried LABs encapsulated in ACA microcapsules until 8 weeks was above 60% which was two-fold higher than that of non-encapsulated LABs. Besides, after oral delivery of LABs encapsulated in ACA microcapsules to mice and chickens, the unique secretory characteristics were maintained and the *in vivo* viability was improved. These findings showed that ACA encapsulation of probiotics could increase the oral delivery efficiency of the probiotics.

Project II, development of bio-active bacteriophages: In this project, 7 prototypes (4 feed additives, 2 drinking water additives, 1 disinfectant) were developed using bacteriophages which are responsible for control of bacterial balance in ecosystem. *In vivo* safety tests, *in*

in vivo effectiveness tests including challenging studies, and field trial studies of these prototypes were conducted. In addition, GLP-compliant long-term administration toxicity test was also carried out. As results, sufficient safety and effectiveness were evaluated. Finally, 1 drinking water additive and 4 feed additives were commercialized. As a result of this project, therapeutic agent for bovine mastitis was developed. The effectiveness in treatment of bovine mastitis of the developed agent was evaluated.

Project III, development of natural bio-active phyto-chemicals as the feed additives: In this project, the antibacterial activity of a probiotic and natural sources against pathogenic bacteria was evaluated using agar diffusion assay. Garlic kernel and a probiotic, Securitor, showed significantly higher antibacterial activity compared with those of other natural sources. *In vitro* study demonstrated that a securitor and probiotic mixtures in isolated cell fraction from rat large intestine was elevated the cell viability, promoted TNF alpha production, regulated TNF alpha production in LPS injection, and indirectly influenced YAC-1 tumor cell viability.

Then animal trial was conducted to evaluate the effectiveness of this feed additive of Securitor and probiotic on growth performance and immune responses in Hy-Line chicken. In the feed efficiency, a mixture of the two materials was lower than that in other groups for 21 d. Such feeding exhibited to suppress production of plasma IFN gamma in LPS-induced chicken group, and tend to modulate the number of aerobic *E. coli* colony collected from cecal contents compared to 0.1% antibiotics-fed chicken group. Taken together, this product could be useful as an antibiotic alternative and may contribute to promote the livestock industry.

V. Further Prospect

The novel multi-species probiotics developed in project I showed the effectiveness in improving animal productivity by lowering mortality probably due to various infectious disease and by modulating gut microbial balance.

LABs bred for the better antibacterial activities using a strain-improvement protocol and effective encapsulation of probiotics by muco-adhesive polymers greatly improved the quality of probiotics. A part of probiotic LABs are transferred to a major chicken production company and are applied for the production of the environment-friendly no-antibiotic chicken line. Other LABs and multi-species complex probiotics will be marketed in near future in Korea.

In project II, with bacteriophage-associated products, we are planning to increase our product sales with the various methods. Especially, we will focus on entering the global market partnering with the companies in the US, Indonesia, Brazil, Columbia, etc. The outcome of this project will contribute directly to the implementation of nature-friendly and safer livestock production. We are planning to expand the application of the developed

technology of this project in food additives and veterinary drugs as platform technology.

In project III, using the novel mixture of natural phytochemicals (garlic kernel or securitor) and probiotics, we anticipate both economical and technical effects in providing safer animal products and preventing animal disease against foreign pathogens. The products developed in this project was transferred to a company and marketed.

CONTENTS

Summary	6
1. Summary of Research	12
2. Present State of Technologies at Home and Abroad	20
3. Research Contents and Results	26
1) Project I:	
(1) Sub-project 1-1: Development of probiotic mixtures as an alternatives of antibiotics for bio-feed additives usage	26
(2) Sub-project 1-2: Development of muco-adhesive carrier for efficient delivery of probiotics and phytochemicals into gut epithelium	91
2) Project II:	
(1) Development of biologicals based on bacteriophages for preventing and curing contagious animal diseases	101
3) Project III:	
(1) Development of phytochemicals as an alternatives of antibiotics, and its feeding system	141
4) Bio-Feed Additives Research Center	194
4. Degree of Accomplishment in Research and Contribution to Related Fields	197
5. Achievements of Research and Further Prospect	201
6. Information of Related Technologies Abroad	209
7. Current Research Facilities and Equipments	218
8. Reference	220

목 차

요약문	2
제 1 장 연구개발과제의 개요	12
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	26
제1절 제1핵심과제:	
1. 제1-1세부과제: 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제 개발	26
2. 제1-2세부과제: 생균제 및 천연항생제 대체제의 효과적 소화장관 전달을 위한 점막 점착 고분자 전달체 개발	91
제2절 제2핵심과제: 박테리오파지 기반의 동물질병 예방 및 치료용 생물활성제체의 개발	101
제3절 제3핵심과제: 항생제 대체 사료용 천연물질 개발 및 항생제 대체제 사양체계 개발	141
제4절 바이오사료첨가제 연구사업단 운영단	194
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	197
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	201
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	209
제 7 장 연구시설·장비 현황	218
제 8 장 참고문헌	220

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목표 및 범위

1. 연구개발의 목표

본 연구사업단의 연구개발 최종목표는 ‘축산물 품질의 질적 향상과 안전성 확보를 위한 천연 항생제 대체물질 및 기술을 개발’하는 것으로 기존 축산업의 항생제 오남용 문제를 해결하고, 21세기 축산업이 안전성을 확보하고 환경과 공존하는 지속가능한 산업으로 발전하기 위한 초석 마련을 위해 친환경 항생제 대체제를 개발함에 있어서 유용 미생물 자원, 병원균 특이적 박테리오파지 및 항균천연물질을 중심으로 기존 항생제가 지닌 단점을 극복하면서 가축의 생산성 향상과 질병예방에 효과적인 다양한 제품 및 기술을 개발/산업화하는 것을 최종 목표로 하고 있음.

- 가. 제1핵심연구과제 목표: 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제 개발 및 산업화
- 나. 제2핵심연구과제 목표: 박테리오파지 기반 동물 질병 예방 및 치료용 생물활성제제의 개발 및 산업화
- 다. 제3핵심연구과제 목표: 항생제대체 사료용 천연물질 개발 및 항생제 대체제 사양체계 개발 및 산업화

표1-1. 핵심 연구과제별 연구개발 연차별 목표

	1단계(2010년-2011년)	2단계(2012년-2013년)	3단계(과제종료이후)
제 1 핵심 연구과제	- 축종(양돈, 양계, 송아지)에 전문화된 항생제 대체 복합 미생물 제제의 상품화 3종	- 양돈의 생리적 단계별로 전문화된 복합 항생제 대체제 상품화 (포유전기, 이유후, 육성/비유기)	- 상품화된 복합 미생물 제제의 농가 보급 서비스
제 2 핵심 연구과제	- Bio-Active Agent (황색포도상구균 대상/살모넬라 대상) 개발용 박테리오파지 생산 공정 확보 및 적합 제형 확보 (사료첨가제, 음용수 첨가제, 환경정화제) - 젖소 유방염 치료 보조제 개발용 유용 리신 소재 및 제형 확보	- Bio-Active Agent 제품화 - 젖소 유방염 치료용 재조합 리신 제제 확보 - 가금티푸스 감염 예방제 - 도계용 용수 첨가제	- 가금티푸스 치료제 - 살모넬라 감염 치료제 - 젖소 유방염 치료제 - 타항생물질과 병용 제제 (제1핵심과제와의 연계)
제 3 핵심 연구과제	- 축종(양돈, 양계, 송아지)에 전문화된 항생제 대체 항균 천연물 사료첨가제 상품화 3종	- 축종별 항생제 대체제 활용 효율적 사양체계 개발 (제1, 제2 핵심과제 연계)	- 항생제 대체 사료용 천연물 미생물 발효 사료첨가제 제품 출시 (제1핵심과제연계) - 항생제 대체제 활용 무항생제 사양체계 농가보급 서비스

2. 연구개발의 범위

가. 제1핵심연구과제: 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제 개발

- (1) 축종(양돈, 양계, 송아지)에 전문화된 항생제 대체 복합 미생물 제제의 개발
- (2) 효모, 유산균, 바실러스, *E. coli* 등 다양한 생리활성 생균제 균주 발굴 및 생산최적화

- (3) 생균제 산업화를 위한 효율적이고 경제적인 대량생산 배지의 개발
- (4) 생균제의 효과적 소화장관 전달을 위한 미생물 고분자 전달체의 개발

나. 제2핵심연구과제: 박테리오파지 기반의 동물 질병 예방 및 치료용 생물활성제제의 개발

- (1) 병원균 특이적 박테리오파지를 이용한 유방염 등 황색포도상구균 관련 질환의 예방 및 치료제 개발
- (2) 병원균 특이적 박테리오파지를 이용한 살모넬라 관련 질환의 예방 및 치료제 개발

다. 제3핵심연구과제: 항생제 대체 사료용 천연물질 개발 및 항생제 대체제 사양체계 개발

- (1) 축종(양돈, 양계, 송아지)에 전문화된 항생제 사료용 천연물질 제제의 개발
- (2) 가축 질병에 대한 내성 향상을 위한 천연물 유래 면역증강제 개발
- (3) 개발된 복합 미생물 제제, 천연 항균물질의 효율적 현장적용을 위한 사양체계 개발

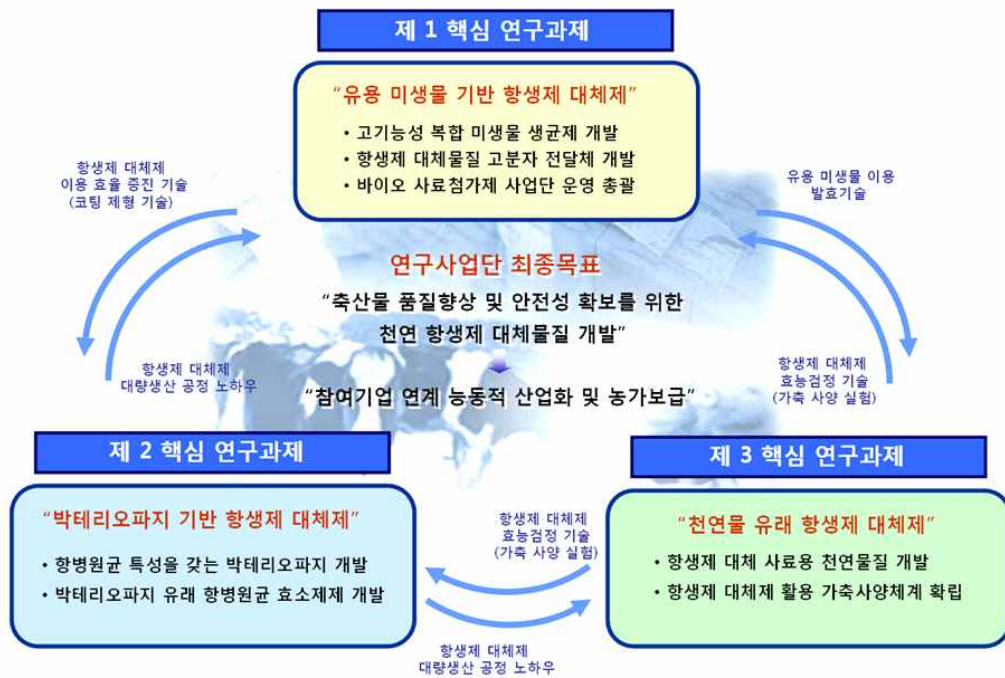


그림 1-1. 연구개발 범위 내에서의 핵심과제 간 유기적 협력관계도

제2절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 항생제 시장 현황 및 항생제 대체제의 필요성

전 세계 항생제 시장은 2002년 기준으로 260억 달러에 이르고 있고, 연평균 4.2% 정도의 성장을 보이며 (출처 : 미국 Frost & Sullivan Reports), 국내 인체용 항생제 시장은 2000년 기

준으로 6,545억 원 (산업자원부), 동물용 항생제 규모는 2001년 기준으로 4,270억 원의 시장을 형성하고 있는 것으로 보고되고 있으며(동물의약품협회), 국내 동물용 항생제 시장의 규모는 2007년 기준으로 4,816억 원(한국동물약품협회)으로 이중 1,144억 원은 사료회사에 사료첨가용으로 판매된 것으로 집계되었고, 나머지도 대부분 농가에서 자가사용용으로 판매되었다. 미국의 동물용 항생제 시장의 규모는 2007년 기준으로 미화 39억 달러 (A Global Strategic Business Report from Global Industry Analysts, 2007)에 달하고, 2010년에는 미화 42억 달러 규모의 시장으로 성장함.

그러나 이런 항생제의 개발에 소요되는 경제적 비용 및 노력, 시간뿐만 아니라 항생제의 지속적 사용 및 항생제 오남용으로 인한 내성세균의 지속적인 출현으로, 세계적으로 항생제 규제가 강화되고 있는 시점에서, 상기 항생제를 대체하고자 하는 많은 투자가 진행되고 있으며, 항생제 대체제 관련시장이 매우 빠르게 성장하고 있음. 사태의 심각성 및 구체적인 예는 아래와 같음.

나. 바이오테크놀로지 활용 사료첨가제 개발의 필요성 대두

우리나라의 축산업은 FTA 개방과 함께 위기에 봉착해 있으며, 이에 따른 축산업의 경쟁력을 높이기 위하여 값싸고 안전한 식품의 필요성이 대두되고 있음.

사료첨가제 시장의 경우 사료에서 얻지 못하는 개별적인 수요를 충족시킬 수 있기 때문에 많은 가능성을 지니고 있음.

본 사업단은 바이오 첨단기술을 실제의 현장에 직접 접목시킴으로써 우리나라 축산 농가들의 경쟁력을 높여 수입 개방의 위기를 극복하는데 도움을 주고자 함.

다. 국내 축산분야에서의 항생제 오남용 문제 심각

현재 대부분의 첨가제가 항생제 위주로 이루어져 항생제 규제라는 세계적 움직임에 대응할 필요가 있음. 2003년 기준, 육류생산량 당 항생제 사용량이 미국의 3 배, 영국의 5.5 배, 스웨덴의 24 배. 2005년 기준, 1492 톤의 항생제가 축산에 사용. 이중 6.5%만이 수의사 처방이고 대부분이 배합사료에 이용되거나 자가사용. 가축 사료 첨가용 항생제 오남용으로 인한 항생제 내성 병원균의 증가. (예) MRSA(메티실린 내성 황색포도상구균) 항생제 내성 병원균이 증가.

표 2-1. 국가별 축산용 항생제 사용 실태 비교

국 가	2002			2003		
	육 류 (천 t)	항생제 (t)	$\frac{\text{항생제}(kg)}{\text{육류}(1t)}$	육 류 (천 t)	항생제 (t)	$\frac{\text{항생제}(kg)}{\text{육류}(1t)}$
한 국	1,662	1,355	0.82	1,776	1,273	0.72
미 국	38,988	9,938	0.26	38,911	9,158	0.24
노르웨이	270	11.5	0.04	275	11.7	0.04
스웨덴	557	17.3	0.03	551	16	0.03
영 국	3,340	430	0.13	-	-	-

출처 : 한국 <월간축산>, 채형석, 2006

표 2-2. 축산농가 항생제 사용 형태

단위 : t (%)

사용 방식	2005	2004	2003	2002	2001
배합사료제조	625(41.9)	601(43.9)	671(46.7)	742(48.1)	766(48.1)
자가치료와예방	770(51.6)	666(48.7)	658(45.7)	672(43.6)	712(44.6)
수의사처방	97(6.5)	101(7.4)	109(7.6)	127(8.2)	117(7.3)
계	1,492	1,368	1,438	1,541	1,595

출처 : 한국 <월간축산>, 채형석, 2006

표2-3. 축종별 항생제 사용 실태 비교

(단위 : %)

축종	2005	2004	2003	2002	2001
돼지	55	56	57	57	58
닭	21	21	24	22	22
수산	17	16	1	2	14
소	7	7	7	8	6
계	100	100	100	100	100

출처 : 한국 <월간축산>, 채형석, 2006

라. 축산분야에서 항생제 사료 혼합 전면 금지는 전 세계적인 이슈

스웨덴(1986년)을 필두로 유럽 4개 국가가 1996년 이후 사료 내 성장촉진용 항생제(AGP, anti-microbial growth promoters) 첨가를 전면 금지. 2006년 유럽에서의 가축에 대한 사료 첨가용 항생제 사용의 전면 금지. 대한민국 농림부 2012년 항생제 사료 혼합 전면 금지.

표2-4. 유럽에서 사용이 금지된 항생제 및 사용금지 원인

항생제 명	승인 취소 사유
Zn. Bacitracin	Bacitracin 내성균 증가 Vancomycin 내성균 치료 가능성
Spiramycin	인체 사용 항생제에 대한 교차내성 우려
Virginiamycin	내성 장구균과 포도상구균은 인체의약품에 교차내성 우려
Avoparcin	당펩타이드 사용으로 인한 내성 발생 예방
2006년까지 monensin, avilamycin, salinomycin, falvomycin 사용금지, 가축사료에 항생제의 사용은 원칙적으로 금지	

마. 성장촉진용 항생제의 남용으로 인한 문제점

(1) 일차적인 유해성

(가) 특히 3-4가지 광범위 항생제를 치료수준으로 사료에 장기급여할 경우 이에 따른 내성균주의 만연으로 질병 발생 시 치료를 어렵게 하여 폐사 급증

(나) 환경적/질병적 스트레스 요인 발생 시 장내 정상세균총의 미발달로 면역력감소, 내성균의 이상증식억제 작용 부재, 치료제가 없는 바이러스 설사병의 억제력 부재로 인한 집단폐사의 원인제공 : 30%대의 폐사율 만연

(다) 항생제 과다사용으로 인한 중복감염 (super-infection)으로 정상적인 상태에서도 설사증 유발 (AAD; Antibiotic-associated diarrhea)

(2) 이차적인 유해성: 축산물에 항생제 잔류문제

(3) 가축에서 생성된 내성균주가 사람에게 전파될 가능성: Vancomycin 내성 장구균, 복합다제내성 균주인 Salmonella DT-40

바. 항생제 대체 소재는 축산의 국가경쟁력 향상의 선결 과제

FTA 및 국제 곡물 가격 상승과 같은 축산 경영 환경의 악화로 인하여 가격 및 품질 경쟁력 확보가 절실하게 요구됨. 항생제가 사용된 축산물의 국제 교역상의 어려움. 항생제 대체 소재를 개발 및 이용하여 가축의 생산성 향상 및 가축의 건강 증진. 사료첨가용 면역제제를 통하여 가축의 소모성 질병을 예방하며, 주사용 백신 사용 시 발생하는 가축 스트레스가 없고 두당 6-7차례의 주사로 인한 인건비/약제비용 절감. 이러한 기능성 사료첨가제의 사용은 생산성 향상 및 소요 비용 감소를 통해 생산비 절감으로 이어지며, 가축의 건강증진으로 인하여 축산물의 품질 경쟁력이 확보됨.

사. 축산분야에서 항생제를 대체하기 위한 농림 바이오 기술사업의 방향 제시

(1) 항생제 대체의 의미

(가) 단순히 항생제가 하던 역할을 대신할 수 있는 제품이 아닌, 기존 항생제가 지닌 단점을 극복하면서 항생제가 사용되지 않는 환경에서 가축의 생산성과 건강 증진에 도움이 될 수 있는 다양한 기술들을 총괄적으로 의미함

(2) 항생제 대체를 위한 바이오 사료 첨가제의 필요성

(가) 기존 항생제가 가지고 있던 단점을 극복할 수 있는 소재의 필요성 대두

(나) 무/저항생제 사육 시대를 겨냥한 사료첨가용 바이오 기능성 소재의 필요성 대두

(다) 특히 사료첨가용 복합 생균제, 면역제제 및 비항생제성 항균제제가 주목을 받고 있음

표2-5. 비항생제성 사료 첨가제의 예시 및 본 연구단의 보유기술

사료 첨가제	작용 기작	기존 항생제와의 차별점	연구단
생균제	유해균과의 경쟁, 유해 물질 제거, 유익한 물질의 생성, 면역 활성화	항생제는 장내 세균의 균형을 깨지만, 생균제는 장내 세균의 균형을 잡아줌	포함
항균펩타이드	저분자 펩타이드에 의한 미생물의 사멸 유도	항생제와 다른 작용 기작으로 항균 능력을 보임, 미생물의 세포막 전위 변경 및 파괴	미포함 개발가능

호르몬	호르몬에 의한 특정 조직의 반응 유도, 성장호르몬의 경우 간을 경유하여 근육, 지방, 유선 등에 영향	항생제는 어떠한 기작으로 가축 성장을 촉진하는지 구체적인 작용기작이 알려져 있지 않지만, 호르몬과 효소제에 의한 성장 촉진 기작은 분명하게 알려져 있음	미포함 개발가능
효소제	유해성분 분해 및 제거, 소화 성분 분해, 소화 흡수 촉진		미포함 개발가능
면역 조절제	면역 시스템의 활성화	면역 활성화는 병원균에 대한 동물 스스로의 대응력을 키워주므로, 기존 항생제에 의한 강제적인 대응력을 부여한 것과 차별성을 지님 또한 항생제 사용을 줄일 수 있음	포함
Herb 및 천연식물	항균물질에 의한 총 균수 조절, 폴리페놀 등에 의한 면역 활성화, 항산화 작용		포함
특정 질병 치료용 phage	병원균 특이적인 lysis 작용, lysis에 관여하는 단백질에 의한 현상, 유익균에 대한 부작용은 없음.	특정 병원균을 lysis시킴으로써, 부가적인 항생제 사용을 줄일 수 있음. 특히, 항생제 내성균에 대해서 효과적	포함
유기산	pH에 의한 유해균의 사멸	pH에 의한 다양한 유해균의 성장이 억제되므로, 부가적인 항생제 사용을 줄일 수 있음. 유산균에 의해 생성된 유산(lactic acid)은 대표적인 유기산에 해당됨.	포함

2. 핵심연구과제별 연구 필요성

가. 제 1 핵심연구과제: 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제 개발

- (1) 국내 축산업의 경쟁력은 축산선진국과 FTA를 앞둔 상황에서 생존을 걱정할 정도로 가격 및 품질경쟁력 상실. 한우의 경우 브랜드화가 비교적 잘 되어 있고 소비자의 감성과 실제적 품질 사이의 적정선에서 고급화가 이루어질 것으로 예측됨. 하지만 육계와 특히 양돈의 경우 유럽의 친환경적인 생산방식과 높은 품질경쟁력, 높은 생산성과 경쟁하기 어려운 실정임.
(예) 모돈출하두수 (MSY, 모돈 1두당 출하두수)가 한국 13.5두, 미국 17-18두, 유럽 20-22두이고 항생제 사용량은 미국의 3배 유럽의 10배-20배이고 동물의 웰빙에 대한 관심도는 비교대상이 되지 못하고 한국은 이제야 친환경 축산에 대한 관심을 가지기 시작했지만 그것이 또한 유럽과의 FTA대비명목의 관심이며, 이에 대한 기술개발과 농가보급체계를 갖추지 못하였음.
- (2) 성장촉진용 및 질병예방차원의 항생제를 제거한 양돈의 위험성에 대해 과대포장되어 있고 농가차원에서는 두려움에 접근하지 못하며 일부 농가들이 무항생제 (엄밀한 의미의 무항생제는 치료목적의 항생제도 사용하지 않는 양돈형태를 말하지만 이는 동물의 웰빙차원에서 용납하기 어려운 방식이고 일반농가에서 접근하기 어려운 방식임. 따라서 여기서는 성장촉진용/질병예방용 항생제를 제거하는 유럽방식의 축산방식을 무항생제라고 표현하고자 함) 양돈을 하고 있지만 비싼 사료첨가제에 의존하여 사료비가 10% 정도 추가되는 것이 보통이며 유럽수준의 생산성 증진을 담보해 주지도 못하여 생산성을 유럽수준으로 증진시키면서 무항생제 양돈과 약제비를 포함한 사료비를 현행보다 동등 혹은 그 이하로 낮게 운영할 수 있는 항생제 대체물질 개발이 절실히 요구되고 있음.

(3) 최근 축산분야에서 생균제를 활용하여 가축의 면역력을 증진시키고 질병을 예방하려는 시도가 이루어지고 있지만, 기능이 명확하고 유용한 생균제가 부족한 실정임. 이에 본 핵심과제에서는 기능이 명확하고 유용한 생균제만을 선별하고 육종하며, 축종에 적합한 생균제를 개발하여 항생제를 대체할 수 있는 복합 미생물제제를 개발 및 산업화하고자 함. 또한 장기적으로 농가에 보급하여 축산경쟁력을 제고하는 영속성있는 사업단으로 발전시키고자 함.

나. 제 2 핵심연구과제: 박테리오파지 기반 동물질병 예방 및 치료용 생물활성제제의 개발

- (1) 국내의 경우에도, 국내 가축에 있어서 항생제 사용량은 호주의 15배, 미국의 3배에 달할 정도(보건복지부 2004년)이며, 또한 항생제 내성 세균이 지속적으로 출현하고 있는 등 항생제 문제가 매우 심각한 상황으로, 2010년부터 세과계 항생제 사용규제는 물론, 플로르퀴놀론계 항생제의 가축 사용금지가 시행되는 등 기존 합성 항생제 규제가 강화되고 있음.
- (2) 특히, 항생제는 가축에게 무분별하게 사용되어 왔으며, 이로 인해 항생제 내성률은 점차 증가되고 있음. 국립수의과학검역원의 발표에 따르면, 소, 돼지, 닭 등에서 분리한 살모넬라, 장내구균 등의 식중독균 내성률은 퀴놀론계 항생제에 57% 내성률을 보였으며, 황색포도상구균은 테트라사이클린에 96.2%, 에리스로마이신에 57.6%, 페니실린에 32.4%의 내성률을 보이고 있는 상황임.
- (3) 항생제의 사용규제가 강화될 경우 가장 직접적 피해가 우려되는 분야가 축산업 분야라 할 수 있는데, 본 핵심연구과제는 항생제 내성률이 심각한 황색포도상구균 및 살모넬라에 있어서 기존 합성항생제를 대체할 수 있는 박테리오파지 기반의 천연 항생물질 대체제를 개발 및 제품화해냄으로써, '살모넬라 청정 축산물 생산'이라는 국가적인 목표를 달성하는데 기여하고 기존 항생제 시장을 빠르게 대체하고자 기획되었음.
- (4) 이러한 천연 항생물질 대체제 개발은, 향후 축산물 거래에 있어 항생제 사용에 의해 문제시될 무역 장벽을 해결할 대안이 될 수 있는 등, 현재의 항생제 문제도 해결하면서 미래를 대비하기 위한 자연 친화적이고 안전하면서, 축산물의 항생제 잔류문제, 내성 세균 출현 문제 및 교차내성 발생 문제에서 자유로운 신개념의 천연 항생 물질로 자리매김 할 것이라 예측됨.

다. 제 3 핵심연구과제: 항생제 대체 사료용 천연물질 개발 및 항생제 대체제 사양체계 개발

- (1) '유엔환경개발회의', '비엔나협약', '교토의정서' 등 국제사회의 환경오염 통제 강화에 따라 우리나라에서도 1990년대 중반 이후 정부를 주축으로 친환경 농업 육성을 위한 제도적 장치를 마련하는 등 적극적인 노력을 기울이고 있으나, 제한된 국토에 비해 높은 부양인구, 급속한 도시화와 이농현상에 따른 농/축산업 인구의 감소, 절대 다수를 차지하는 소규모 영세농가 등 현실적인 문제로 인해 친환경 농업 정책은 아직 큰 진전을 나타내지 못하고 있는 실정임. 그러나 이러한 산업 현실과는 대조적으로 최근 국민소득 증가와 함께 소비자의 농축산물에 대한 인식도 변화하여 과거의 가격 우선의 양적 판단기준에서 현재에는 웰빙 붐과 함께 안전성과 품질 중심의 질적 판단기준으로 급변하고 있는 추세

입.

- (2) 현재까지 가축의 질병 예방, 치료 및 성장 촉진을 위한 목적으로 사용되고 있는 항생제의 경우 내성균 출현 등 남용의 폐단에 대한 해결책 마련은 세계적인 현안으로, 이미 구미 선진국에서는 동물산업에서의 항생제 사용에 대한 강력한 규제법령을 시행 중이고 국내의 경우에도 2005년 이후 사용 가능한 항생제의 품목을 대폭 규제하는 시책이 시행중임. 동물 산업 중 현재 항생제의 의존도가 가장 높은 양돈산업을 예로 들면, 항생제를 사용하지 않는 무항생제 양돈농가에서는 사양성적이 보장되지 않고 밀집사양에 의한 여러 가지 질병 및 부작용들이 수반되어 나타나는 것을 감안하면 동물산업에서 향후 무항생제 사양에 있어 직면하게 되는 난점을 극복하기 위해서는 기존의 항생제 효과를 대체하고 축산물 안전성을 보증할 수 있는 효과적인 천연 항생물질을 발굴하는 것이 절실한 과제임.
- (3) '세계 자유무역 협정 (FTA)'에 의한 농축산물 시장개방을 통해 무한경쟁에 돌입한 국내 축산업은 현재 2008년 기준 144억 달러의 무역적자를 보이는 등, 선진국 대비 약한 산업 경쟁력에 의한 위기의식이 한층 고조되고 있음. 세계적인 환경보전 움직임과 FTA등 급변하는 세계시장의 변화에 능동적으로 대처하기 위해서는 국내 축산업도 자연환경과의 조화 및 산업 지속성 등 질적 성장에 초점을 둔 '생명사회' 패러다임으로의 전면적 전환이 요구되며, 안전성과 품질 및 국가경쟁력을 갖춘 고부가가치 축산물 생산 기술 연구에 총력을 기울여야 함.
- (4) 이러한 요구에 발맞추어 본 핵심연구과제에서는 환경오염을 야기하는 농산, 임산, 수산업 부산물의 사료자원으로서의 활용 가능성을 타진하고, 이러한 부산물에 함유되어 있는 기존 항생제를 대체할 수 있는 우수한 천연 항생제 대체제를 발굴함으로써 환경문제와 축산물의 고품질화 및 안전성 확보를 도모하고자 함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 특허, 논문, 시장분석을 통한 국내외 기술 및 시장 현황

1. 특허분석

기존 특허는 단일 미생물 생균제 사용 및 미생물에서 유용 물질 분비를 증진시키기 위한 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 효모/바실러스/유산균 등 생균활성 및 항생제 대체 효과를 보이는 복합 미생물 생균제 개발 방향으로 연구를 추진하여 관련 기술을 국내 및 국외에 출원하였음.

기존 사료첨가용 생균제는 경구로 투여할 경우 위액의 낮은 pH나 효소에 의하여 기능을 잃을 염려가 있으므로 위에서 보호되고 장에서 오래 머물면서 흡수가 잘 되게 하는 점막점착성 고분자 전달체의 개발은 이 분야의 기술개선에 있어서 중요한 의의를 지님. 이러한 점막점착성 고분자 전달체를 이용한 인체용 단백질 약물 및 미생물제제에 대한 특허와 논문은 세계적으로 증가추세에 있으나 본 연구에서 추진하려고 하는 축산업에 활용하는 항생제 대체 생균제에 대한 특허는 아직 국내외에 보고되지 않았기에 본 연구를 통한 결과를 국내외에 특허를 출원하고 산업적으로 활용하였음.

국내의 경우 박테리오파지 및 그 유래의 리신 단백질에 관련된 특허가 존재하지 않음. 해외의 경우, 박테리오파지 또는 그 유래의 리신 단백질에 관련한 기존 특허들이 존재하기는 하나 본 과제와는 상이한 박테리오파지 및 리신 단백질임. 본 과제에서 이용하고자 하는 박테리오파지들은 모두 기존 특허에서 언급되었던 것과 다를 뿐만 아니라 이미 본 연구 사업단에 의해서 특허 등록되어 있음. 따라서, 본 과제를 통하여 현재 개발 진행 중인 박테리오파지 및 그 유래의 리신 단백질을 이용한 다양한 제품화를 추진하는 데에 있어 국내외 기존 특허가 문제될 것은 없으며, 더불어 이미 확보된 본 사업단의 특허를 근간으로 하여 다양한 응용 특허의 확보가 가능하였음.

기존 특허는 단순히 천연 부산물의 사료화 또는 천연물을 추출하여 단일 성분만 출원되었음. 하지만 이것은 항생제를 대체 할 정도의 수준이 되지 않으며 가격적인 면에서 가축에 용이 불가한 것들이 대부분이다. 따라서 본 연구에서는 이들 부산물이 가축의 면역증강 및 항병성에 대해 그 효과가 경제적인 측면에서 개선된 항생제 대체 천연물을 개발하여 효과 및 경제적인 측면을 강화시키는 방향으로 연구를 추진하여 관련 기술을 국내 및 국외에 출원하였음.

2. 논문분석

기존 논문은 단일 미생물을 사용한 성장증진 효과 확인이나 미생물을 통한 재조합 단백질 분비 관련 분야에 치중되어 있으므로, 내산성 및 내담즙성, 항균활성 등이 증진된 효모/바실러스/유산균 등을 균주육종을 통해 개량하여 실제 동물실험을 통해 적용 및 검정하는 방향으로 연구를 추진하여 관련 내용을 투고하였음.

기존 논문은 점막점착성 고분자분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 점막점착성을 가지면서 pH에 민감한 고분자 미립자를 개발하는 방향으로 연구를 추진하여 pH에 민감하면서 점막점착성을 갖는 고분자에 관한 논문을 투고하였음.

국내의 경우 아직까지 박테리오파지에 대한 본격적 연구 보고는 본 사업단을 제외하고는 없음. 국외는 각 세균에 대한 박테리오파지 응용 등 case study와 응용 사례가 계속 보고되고 있어 국내에서도 기술 선점을 위해서는 박테리오파지 이용기술의 확대에 대해서 본격적으로 노력해야 할 필요성이 커지고 있다고 판단됨. 본 과제의 수행을 통해서 박테리오파지 및 리신에 관한 응용 기술이 확보될 수 있으며 이러한 내용은 국제전문저널에 게재될 수 있음. 또한 젯소 유방염에 대한 박테리오파지나 리신의 처리는 해외 저널에 투고하였음.

기존 논문은 천연 부산물의 사료화 또는 천연물을 추출하여 단일 성분내 대한 내용으로 논문이 구성되어 투고되고 있으나 본 연구에서는 이들의 효과를 극대화 시킬 수 있는 미생물의 이용에 관한 내용 및 면역증진에 관한 보다 구체적인 검증 내용을 포함하여 투고하였음.

3. 제품 · 시장분석

국내 및 국외시장 분석을 통해 2010-2012년 이후에는 국외는 물론 국내에서도 항생제 제품 사용 규제가 엄격하게 적용될 예정이며 이에 따라 사료첨가제 시장이 대폭 확대될 것으로 전망됨. 따라서 본 연구과제에서는 축산분야의 경쟁력 증진을 위해 사료첨가용 복합 미생물 생균제 및 효율적인 체내 전달을 위한 점막점착성 고분자 피복제 연구를 추진하여 유산균을 근간으로 효모 및 바실러스 복합 미생물을 사료첨가용으로 생산하여 국내에는 이미 시제품을 통한 상품화를 이룩하였으며 국외 시장의 진출도 고려중에 있음.

현재, 외국의 경우 박테리오파지를 이용한 제품들이 이 분야의 선두 기업들에 의하여 최근 몇 년 사이 출시되고 있음. 그러나 국내의 경우 관련 산업화 사례 전무함. 박테리오파지는 그 본래의 특성으로 종류마다 특이성과 역가가 다름. 따라서 신규한 박테리오파지는 신규 제품으로 개발될 수 있음. 박테리오파지에 기반한 제품화는 유사 목적에 사용되던 기존 항생제의 여러 문제들을 해결해줄 수 있으므로 이를 최대한 이용하여 제품화를 추진할 것임. 박테리오파지를 기반으로 한 제품의 큰 장점은 내성균을 유발하지 않는다는 점이며, 이는 제품 수명이 길고 가치 있는 제품의 개발을 가능하게 함. 젯소 유방염이 농가에 끼치는 피해가 매우 크다는 점과 그룹에도 불구하고 효과적 치료제가 시장에는 없는 점을 늘 잊지 않고 효과적 치료제를 개발하고자 노력할 것임. 실질적으로 축산 농가에 도움을 주고 싶음. 특히 살모넬라 관련 제품화는 국내 유행 살모넬라에 특히 효과가 좋은 박테리오파지를 활용할 것이므로 국내 축산업에서 “살모넬라 청정 축산물 생산”에 큰 도움이 되었음.

4. 생산 및 시장현황

가. 국내 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

시장현황 예측 : 항생제 대체용 제제는 말 그대로 항생제를 대체하여야 하지만 통상 항생제와 병행 사용하고 있음. 국내의 동물용 항생제 시장 규모는 2007년 기준으로 4,816억 원(한국동물약품협회)이고 2011년부터 사료 내 항생제 첨가 금지 후 대부분의 항생제 시장이 대체제로 바뀐다고 가정하면 시장확산이 현재 1000억 원 수준에서 2000억 원 수준으로 증대될 것으로 예측됨. 나머지는 다른 첨가제(효소제, 비타민제, 미네랄제 등)와 같이 생산성과 관련한

제품수요가 증대될 것임. 생균제로는 단일 종 또는 복합 미생물제제가 개발되어 시판되고 있음.

현재 국내 기능성 사료첨가제 산업은 약 130여개의 회사가 각축하고 있는 완전경쟁 시장으로 생산품이 거의 전량 국내 축산업에 소요되는 전형적인 내수시장 지향 산업의 성격을 띠고 있으며, 일부 가공된 원료만을 수출하고 있어 아직까지 국제경쟁력이 낮은 산업분야라고 할 수 있음.

표1-1. 국내 생균제 시장 예측

축종	사료시장 (만톤)	생균제 (톤)	생균제 (억원)
닭	390	7,800	234
돼지	566	11,320	340
소	467	9,340	280
기타	100	2,000	60
합계	1523	30,460	914

자료 : (단미사료협회 자료)

[계산방법]

(1) 생균제 또는 항생제 대체용제제의 국내 시장규모는 조사하기가 불가능함. 동물약품으로 등록된 제품이 일부에 한하고 대부분이 단미사료로 등록해서 판매하고 이들 대부분의 통계가 존재하지 않아 예측치를 계산하였음.

(2) 생균제 (톤) = 사료량 x 0.002 (0.2% 첨가량)

통상 사료회사에서 일부 시판사료에 생균제를 첨가하고 있지만 축산농가에서 따로 한 가지 이상의 생균제를 첨가하고 있는 실정이고 생균제마다 적정첨가량으로 0.1-0.3%를 추천하고 있어 중간점이라고 생각되는 0.2%로 계산하였음.

(3) 생균제 (억원) = 농가구입가로 3000원/kg을 평균치로 두고 계산하였으나 실제 가격은 1500-6000원/kg으로 다양함.

표1-2. 동물용의약품 내수시장 현황

(단위 : 억)

구분	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
국내생산	2912	3207	3706	3615	3355
수입완제	1296	1468	1739	2185	2482
합계	4208	4675	5445	5800	5837

출처 : 축산경제신문 : 동물용의약품 수출 현황과 과제 (상) (2013.06.22 기사)

표1-3. 동물용의약품 수출 현황

구분	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
업체수 (개소)	28	31	38	35	42
품목수 (개)	421	495	534	621	736
수출액 (억)	598	854	846	1172	1584

출처 : 축산경제신문 : 동물용의약품 수출 현황과 과제 (상) (2013.06.22 기사)

제2핵심과제와 관련되는 항생물질 시장을 살펴보면 기존 항생제에 대하여 내성을 보이는 균주가 출현하면서 현재는 기존 항생제로 치료가 불가능한 경우가 다수 보고되고 있으며 기존 항생제에 대해 내성을 지닌 세균들에 의한 질병 발병 횟수의 증가로 새로운 종류의 항생제를 얻으려는 노력이 계속되고 있음. 최근 잇따르고 있는 새로운 항생제의 출시는 지금껏 사용하던 항생제를 더 강한 제형으로 개선시킨 것이 보통임. 그러나 이는 더욱 심한 항생제 내성 문제를 초래할 것으로 전문가들은 경고하고 있음.

현재까지 수많은 항생제가 개발되었고 또한 지금도 각 연구기관 및 제약회사에서 천문학적 인 액수의 연구개발비를 투입하여 감염성 질환에 대한 새롭고 혁신적인 약물을 개발하고자 노력하고 있음. 하지만 항생제 내성 병원성 세균의 출현 및 전파는 더욱 급격해졌음. 지금까지 제약회사들이 주로 의존하고 있던 방법인 기존에 알려진 항생물질을 새롭게 조합하여 새로운 항생제로 내놓는 방법은 이제는 더 이상 큰 효과를 기대할 수 없게 되었으며 이제는 이러한 노력에도 점차 지쳐가고 있다고 해도 무방할 것임.

현재 국내의 경우 기존 항생제를 대체할 수 있는 물질의 개발도 시도되고는 있음. 새로운 small molecule drug을 개발하려는 시도와 해양이나 식물 등에서 antimicrobial material을 탐색하고 있음. 이러한 신규 항생물질은 기존 항생제의 내성문제를 해결하는 데는 일시적 효과가 있을 것으로 기대됨. 그러나 이것들에 대한 내성도 매우 빨리 발생할 것임. 따라서 현재의 시도는 내성 문제에 대한 근본적 해결책을 제시할 수 없으며 이것들을 활용하여 제품화를 한다 해도 제품수명이 매우 짧을 것임. 또한 이들 신규 항생 물질이 동물 질병을 위한 치료에 활용되기는 매우 어려울 것임. 이는 인간에서의 교차내성을 우려한 인간 위주의 항생제 규제 때문임. 그렇지만 내성을 유발하지 않는 항생 물질이 개발된다면 항생제 규제가 불필요하여 인간과 동물 모두에 적용될 수 있음.

우리나라의 가축들은 ‘과잉진료’에 시달리고 있음. 사람보다 가축에 들어가는 항생제가 더 많은 실정임. 축산·수산업에서 사용되는 사료첨가용 항생제 사용량은 전체 항생제 판매량의 54%를 차지하며, 이는 OECD 국가 중 단연 최고임. 또한 전체 56%에 달하는 항생제가 ‘예방 목적’으로 사용된다는 것이 더 심각한 점임. 예방 목적 항생제 투여는 내성균 발생 가능성을 높이기 때문임. 가축에 잔류하는 항생제는 사람에게 전달될 수 있다는 점 또한 문제임. 항생제가 육류를 통해 인체에 흡수되면 항생제 내성을 유발해 질병의 확산을 부를 수도 있음. 사료에 섞어 먹이는 항생제의 종류가 많은 것 또한 문제임. 많은 종류의 항생제를 사용하면 다제 내성균 발생 확률이 높아지기 때문임. 그렇기에 질병이 나들기 쉬운 계절에 항생제를 사료에 섞어 공급하는 이른바 ‘클리닝 서비스’는 심각한 내성 문제를 일으킬 수 있음. 이에 따라 좀 더 자연 친화적이면서도 기존 항생제의 사용에서 발생한 문제를 해결해줄 수 있는 새로운 항생 물질의 개발이 필요한 형편임.

국립수산과학원의 수의과학검역원과 동물약품협회의 자료를 분석한 결과에 따르면, 지난해 국내에서 판매·사용된 동물용 항생제의 양은 모두 1,473톤에 이룸. 이 가운데 축산용 항생제는 1,215톤(전체의 82.5%)을 차지했음. 그러나 아직 박테리오파지를 활용한 제품은 없음. 이미 외국에서는 사업화 사례가 많이 발표되고 있어 사업화에는 문제가 없다할 수 있으므로 멀지 않아 국내에도 관련 제품이 출시될 것으로 예상됨.

표1-4. 국내 동물용 항생제 관련 시장 규모 추정치

(단위: 억 원)

	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년
동물용 합성항균제	160	162	164	166	168
동물용 항생 물질	906	968	1,034	1,104	1,179
동물용 소독제	189	200	211	224	237
사료첨가제	679	739	804	875	952
출처 : 2007년 11월 한국동물약품협회 자료(http://kahpa.or.kr/index_k.htm)					

나. 국외 관련(유사) 제품의 생산 및 시장 현황

유럽연합은 양돈용으로 13개의 생균제를 인증했는데 대부분이 효모/바실러스/유산균류를 단일로 사용하고 있고 Bioplus 2B만 2종의 바실러스를 포함하고 있음. 한편 미국의 동물용 항생제 시장의 규모는 2007년 기준으로 미화 39억 달러 (A Global Strategic Business Report from Global Industry Analysts, Inc: <http://www.strategyr.com/MCP-4051.asp>)에 달하고, 2010년에는 미화 42억 달러 규모의 시장으로 성장함. 유럽의 많은 국가가 오래전부터 사료첨가용 항생제 사용을 금지하여 고기 생산량 당 항생제 사용이 한국대비 5%정도이고 나머지 유럽 국가가 전면금지를 앞두고 있어 세계시장에서 항생제 대체제의 시장규모는 계속 확산 될 것임. 한국의 현재 시장규모의 50 배로 추정하면 5조 달러 규모의 시장이 될 것으로 전망됨.

제2핵심과제와 관련되는 항생 물질 시장을 살펴보면 의약품 시장에서 항생제는 여전히 최대 시장을 형성하고 있음. 특히 감염성 세균들이 대부분의 항생제에 대한 내성을 획득하면서, 기존 항생제에 대한 사용량이 크게 증가하고 있음. 1993년 60억 달러이던 미국의 항생제 매출액이 5년 뒤인 1999년에는 약 2배 이상 급증하여 130억 달러가 되었음. 현재 세계적으로 연간 25-30만 톤 이상의 항생물질이 생산되고 있으며 Cephalosporin계 (45%), Penicillin계 (15%), Tetracycline계 (6%), Macrolide계 (5%) 등이 주를 형성하고 있으며 바이엘사, 아벤티스사, 화이자사, 애보트사 등이 세계시장을 석권 중에 있음. Frost & Sullivan Reports에 의하면 “bacterial infection therapeutic product”의 2003년도 worldwide market이 260억 달러로 추정되고 있음. 이렇듯 시장 규모는 충분하며 기존 제품의 문제점을 해결할 수만 있다면 신제품의 시장 진입이 용이할 것으로 생각됨.

항생제를 중심으로 한 항감염제의 시장은 매년 5%의 성장세를 지속해 2012년에는 610억불의 세계시장 규모가 예측됨. 특히, MRSA 대상 질환 치료용 항생제 시장은 새로 형성되는 시장으로 주목을 받고 있음. 최근 영국의 젊은 병원직원이 community-acquired (CA) MRSA에 감염되어 사망하는 사례가 발생했음. 이러한 MRSA 발생 문제는 영국만의 문제가 아닌 전 세계적인 문제임. MRSA는 메티실린에만 내성을 보이는 것이 아니고, 대부분의 항생제에 강한 내성을 지니고 있어서 치료 중 선택할 수 있는 항생제가 극히 제한되어 있으며, 감염 후 사망률이 높기 때문에 심각한 문제가 되고 있음. 이러한 MRSA 발생 사례의 증가로 제약회사는 MRSA 관련 틈새시장이 새로운 유망 시장으로 발전할 수 있다고 믿고 있음. 데이터모니터의 보고서에 따르면 MRSA 관련 시장이 영국에서만 2010년에 2억 달러로 2005년도 대비 41%의 성장을 보일 것으로 추정하고 있음.

박테리오파지 관련 외국의 제품화 사례를 일부 소개하면 다음과 같음. 박테리오파지에 관한 본격적인 연구가 재개된 계기는 "항생제 내성세균의 출현"이 심각해진 2000년대 초반임. 박테리오파지는 1915년 영국의 세균학자 Twort와 1917년 프랑스의 d'Herelle의 규명에서부터 학문적 인식이 비롯되어 1950년대 중반까지 관련된 연구가 활발하였음. 그러나 1920년대 Flemming에 의해 penicillin이 발견된 이후 지나친 항생제에 대한 믿음으로 말미암아 항생물질에 관한 연구 및 개발은 오직 합성 항생제에만 집중되었음. 반면, 박테리오파지 관련 연구는 반대로 급속히 감소하였고 일부 동유럽에서만 명맥이 유지되어 활성화되지 못했었음. 그러나 수십년간의 항생제 오남용으로 말미암아 2000년대에 이르러 인류는 드디어 "항생제 내성세균의 출현"이라는 문제점에 직면하게 되었고 이는 기존의 항생제만으로는 넘기 힘든 한계점이었음. 이때부터 "항생제 내성세균"을 제어할만한 또 다른 해결책을 찾고자 하였으며 그 과정에서 가장 주목을 받게 된 것이 바로 그 동안 묻혀 있던 박테리오파지였음. 이에 따라 박테리오파지에 관한 연구가 전 세계적으로 재개된 것임. 따라서 실질적 제품화 노력은 10년가량 계속되었다고 할 수 있음. 비록 기간은 짧지만 이미 제품화 사례가 속속 발표되고 있음. 예로, 미국 Intralytix사의 식중독균 감염 방지에 관련된 식품 첨가제 (food additive)인 LMP-102™과 대장균 O157 감염 방지에 관련된 제품인 ECP-100™가 있으며, 그 밖의 회사에 의한 대장균 감염 치료 관련 제품 (Coli-Pro™), 살모넬라 감염 치료 관련 제품(Salmo-Pro™), 심각한 안과질환 및 귀 질환 관련 제품, 화상 및 외상 보호 제품(PhagoBioDerm) 등이 이미 제품화 되어 있음.

표1-5. 국외 동물용 항생제 시장 규모 추정치

(단위: 억 달러)

	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년
동물용 항생제 및 기타 항균제	126	145	166	191	220
항균 사료첨가제	89	100	112	125	140

<참고자료>

Vivash-Jones Consultants Ltd. (2000년)의 보고에 의하면, "항생제 및 기타 항균제"는 27.4억 달러 (연평균 성장률 14.9%)이었고 "항균 사료첨가제"는 21.9억 달러 (연평균 성장률 11.9%)임을 고려.

표1-6. 세계 주요 사료첨가제 시장 전망 표

제품군	2010년 (\$ millions)	2017년 (\$ millions)
아미노산 제제	9,600	18,800
비타민 제제	2,900	3,800
미네랄 제제	2,000	3,000
생균제 (효모제)	16	730
효소제	540	720
안료 및 착색료	477	559
계	15,533	27,609

출처: 세계 배합사료시장: 기술발전과 시장변화, BCC Research (2012)

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 제1핵심연구과제: 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제 개발

제1핵심과제에서는 주로 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제를 개발하는 것으로 각 축종(양돈, 양계, 송아지)별 질병원인균 방어에 전문화된 유산균과 효모, 바실러스, 생균제용 대장균을 기반으로 하는 생균제 베이스를 조합한 복합 미생물 생균제를 개발하고, 생산을 최적화 하며, 또한 생균제의 산업화를 위한 효율적이고 경제적인 대량생산 배지 개발과 생균제의 효과적인 소화장관 전달을 위한 미생물 고분자 전달체를 개발하는 것이다. 그림 1-1에서는 같이 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제를 개발하기 위한 전략을 나타내었다.



그림1-1. 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제 개발 전략

1. 제1-1 세부과제 : 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제 개발

본 연구에서는 양돈, 양계, 축우산업에 특화된 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제 개발을 목표로 하고 있으며 유산균, 바실러스, 효모, EcN 등 생균제로 활용할 수 있는 유용 미생물을 선정하여 생균제 베이스의 축종별 수인성 질병 원인균을 효과적으로 방어하고자 하였는데 그 이유는 그림 1-2에서 나타낸 바와 같이 유산균, 바실러스, 효모, EcN 등을 복합 미생물 생균제로 투여하였을 시 각 미생물들이 지닌 다양한 장점에 의하여 방어 효능이 보다 뛰어나기 때문이다.

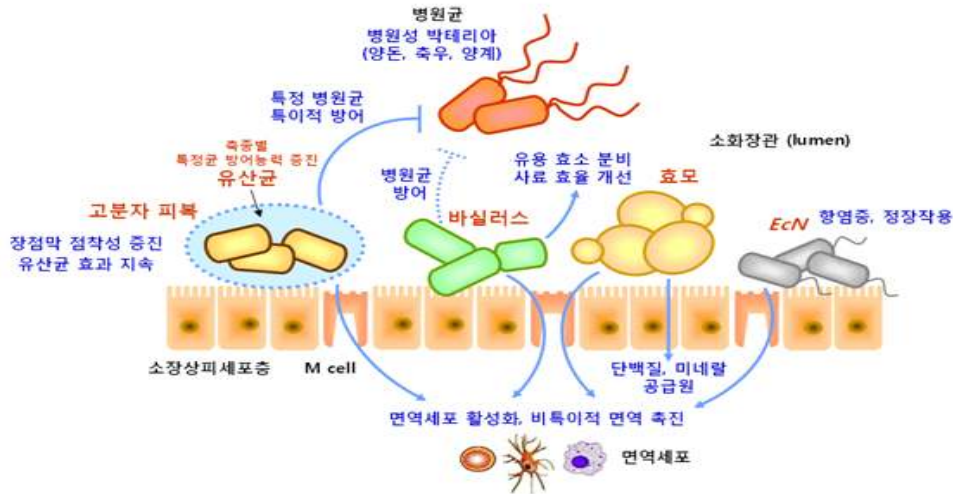


그림1-2. 항생제 대체 복합 미생물 생균제 작용 모식도

가. 생균제용 미생물(유산균, Bacillus, 효모, *E. coli*) 균주의 확보

(1) 생균제용 유산균주의 선발

병원성 미생물에 대한 항균력이 우수한 유산균은 본 과제를 통해 개발하고자하는 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 주요 구성 균주으로써 자연계에서 신규 동정한 다수의 유산균종 중 주로 항균활성을 기반으로 하여 개량대상 유산균주를 선발하였다.

(가) 가축분변으로부터 유산균의 동정

전국 6개 축우목장 및 16개 돼지농장의 소/돼지 분변으로부터 유산균 선택배지 (LAMVAB: *Lactobacillus Anaerobic MRS with Vancomycin and Bromocresol*)를 이용하여 총 900 여개의 후보 유산균 콜로니를 선발한 후 PCR-RAPD (그림 1-3), API-CHL 유산균 동정 kit (그림 1-4)을 이용하여 유산균종을 분류하여 최종적으로 400개의 후보 유산균 콜로니에 대해 16S rRNA 서열 분석을 통해 총 11종의 유산균이 동정되었다 (표 1-1). 동정된 전체 유산균주 중 대다수를 차지하는 것은 *Lactobacillus salivarius* 종이었고 (284/400), 그 밖에 *Pediococcus acidilactici* (15/400) 및 *Lactobacillus plantarum* (15/400) 등이 그 뒤를 이었다. 유산균 외의 장내 미생물인 *Enterococcus* 및 *E. coli* 도 동정되었고, 자연계에 널리 분포하는 *Bacillus* 균도 다수 동정되었다.

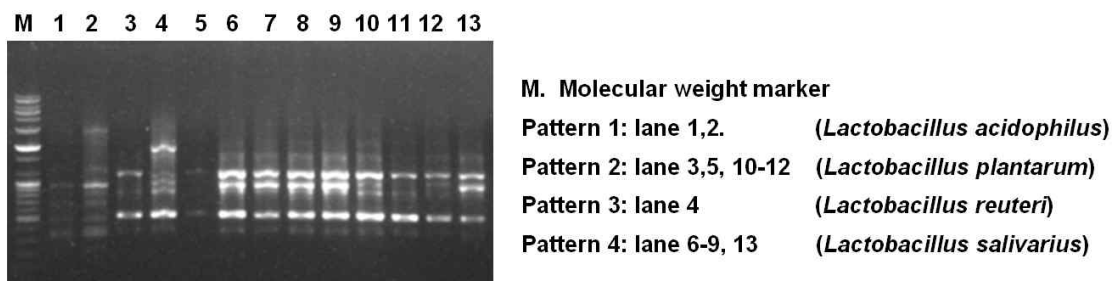


그림 1-3. PCR-RAPD를 이용한 후보 유산균 colony의 분류 예, 각 colony 유래의 genomic DNA를 template로 random primer를 이용한 PCR 후 band pattern에 따른 1차 grouping 결과

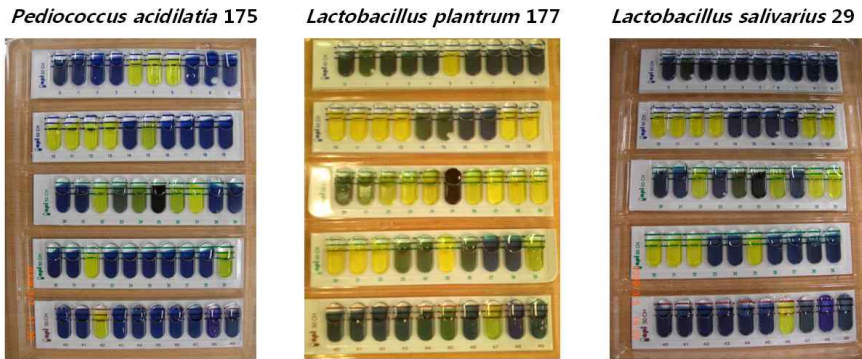


그림 1-4. API-CHL 유산균 동정 kit을 이용한 후보 유산균 동정 예, 각 group 별 콜로니 배양액에 대해 효소화학적 특성을 조사하여 기존 정립된 index와 대조하여 균주를 동정한 결과

표 1-1. 유산균 분리동정 결과

동정 균주명	API CHL kit (homology %)	16S rRNA sequence (homology %)	총분리 균주수
<i>Pediococcus acidilactici</i>	99.9	99	15
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.9	99	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	98	99	15
<i>Lactobacillus fermentum</i>	99.3	98	3
<i>Lactobacillus salivarius</i>	99.9	99	284
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	97	99	10
<i>Lactobacillus gasseri</i>	96	99	1
<i>Lactobacillus paralimentari</i>	99	98	1
<i>Lactobacillus brevis</i>	96.3	97	1
<i>Lactobacillus farciminis</i>	99.3	99	3
<i>Lactobacillus reuteri</i>	X	99	11
<i>Enterococcus faecium</i>	97.3	98	2
<i>Bacillus subtilis</i>	X	99	11
<i>Escherichia coli</i>	X	96	2
Unidentified strain	-	-	40
총균수			400

(나) 유산균의 항균특성 조사 및 개량 대상 유산균 선발

동정된 유산균을 이용하여 항생제 대체 생균제에 활용할 후보균으로 개량하기 위해 agar diffusion assay (그림 1-5)를 이용하여 각 유산균의 다양한 그람 음성 (병원성 대장균 및 살모넬라) 및 그람 양성 (포도상구균, 장구균 등) 병원성 미생물에 대한 고유 항균활성을 조사하고, 항균활성이 비교적 높은 유산균종을 항균활성 개량 대상 유산균으로 선발하였다.

Agar diffusion assay는 특정 병원균 (indicator)을 도말한 agar plate에 다수의 well을 만든 후 각 well에 검사하고자 하는 유산균 (tester)의 배양 상층액을 분주한 후 배양하여 well 주위에 형성되는 투명한 (clearing zone)의 여부에 따라 tester의 항균능력 여부를 판별하는 기법으로, 3차에 거친 selection 과정을 통해 총 11 species, 400 종 유산균 strain 중 항균력이 우수한 균주 5종의 유산균주를 선발하였다 (표 1-2).

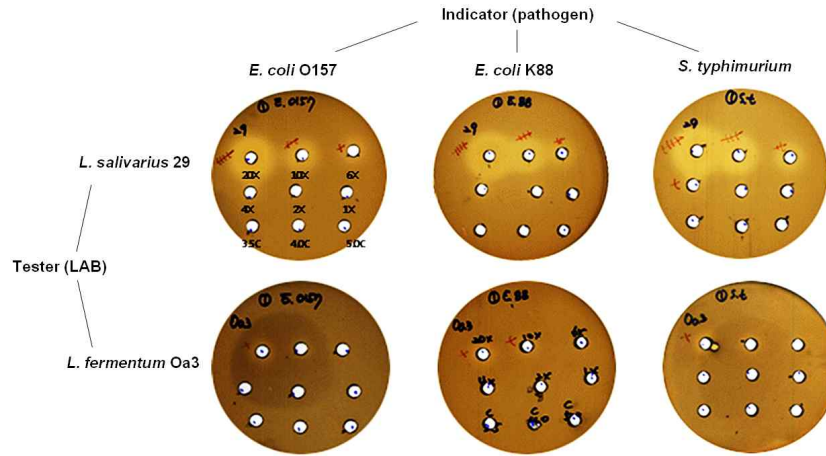


그림 1-5. Agar diffusion assay에 의한 항균활성 조사 예. 항균활성이 높은 균주 (*L. salivarius* 29)와 항균활성이 낮은 균주 (*L. fermentum* Oa3)의 병원성 균 (병원성 대장균, 살모넬라 등)에 대한 항균활성 비교 예

표 1-2. 항균활성을 기준으로 한 개량대상 유산균주의 선발

동정 균주명	총분리 균주수	1차 항균활성 균주수	2차 항균활성 균주수	최종개량대상 균주수
<i>Pediococcus acidilactici</i>	15	15	7	1
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	15	3	1	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	3	-	-	-
<i>Lactobacillus salivarius</i>	284	18	10	2
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	10	10	2	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1	1	-	-
<i>Lactobacillus paralimentari</i>	1	1	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	1	1	1	1
<i>Lactobacillus farciminis</i>	3	3	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	11	8	2	
<i>Enterococcus faecium</i>	2	2	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	11	11	-	-
<i>Escherichia coli</i>	2	2	-	-
Unidentified strain	40	-	-	-
총균수	400	75	23	5

* 최종 선발 유산균주

Lactobacillus salivarius LS21, *Lactobacillus salivarius* LS29, *Lactobacillus brevis* (salivarius) LS200, *Lactobacillus plantarum* LP177, *Pediococcus acidilactici* PA175

(2) 생균제용 바실러스 균주의 선정

바실러스(*Bacillus sp.*, 고초균)은 포자를 형성하는 GRAS 균으로 각종 병원균에 대한 항균활성이 알려진 균주가 많이 있고 단일 또는 복합생균제로 국내외에서 널리 사용되는 균주로 본 연구과제에서는 유산균과 함께 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 주요 구성 균주이다. 한편, 바실러스는 각종 영양소 분해 효소를 풍부하게 분비하여 가축의 사료효율을 개선하고 축분의 냄새저감 기능이 우수하며, 특정 종은 파리 유충의 생육을 억제하는 기능이 있어서 축사개선환경 개선에 효과적인 생균제 후보이다. (Sarah et al., 2008; Pillai et al., 2008)

본 연구단이 선행연구를 통해 기 확보한 바실러스 균주 (16s rRNA 분석 완료) 중 본 연구의 목적을 위해 선정한 생균제 후보 바실러스 균주의 종류와 특성은 아래 표 1-3과 같다.

표 1-3. 생균제 후보 바실러스 균주 및 특징

종 명	균주 특징
<i>Bacillus polymyxa</i> T1	<i>Salmonella gallinarum</i> 에 대한 항균효과 확인, 포자형성능 우수 (저장용이)
<i>Bacillus licheniformis</i> T2	축분 중 냄새저감 효과 확인 (축사 환경개선)
<i>Bacillus thuringiensis</i> T3	파리 유충 생육 억제 효과 확인 (축사 환경개선, 질병예방)
<i>Bacillus subtilis</i> T4	정장 및 소화촉진 효과가 널리 알려짐
<i>Bacillus polymyxa</i> SM2	병원성 대장균에 대한 항균효과, 서울대 균주은행 분양 균주 (IMSNU No. 12071)
<i>Bacillus</i> sp. JSP1	남극토양 분리 균주
<i>Bacillus</i> sp. LX1	남극토양 분리 균주

(3) 생균제용 효모 및 *E. coli*의 선정

효모와 비병원성 *E. coli*는 항생제 대체 복합미생물 생균제 구성에 있어서 미량 영양원소 공급 및 정장작용을 위한 보조제 역할을 담당할 예정이므로 신규동정하지 않고 이미 특성이 알려진 균주를 대상으로 선정하였다.

(가) 생균제용 효모 선정

인축용 생균제로 널리 사용되고 있는 빵 효모 *Saccharomyces cerevisiae* 797과 *Saccharomyces boulardii* 796을 ATCC로부터 분양받아 복합생균제의 효모원으로 사용하기로 하였다. 두 균주의 생균 보조제로서의 특성 및 발효특성을 조사하여 하나의 균주를 최종 선발할 예정이다.

(나) 생균제용 *E. coli* 선정

생균제용 대장균은 이미 유럽에서 인체용 및 송아지 정장작용을 위해 널리 사용되고 있는 *E. coli* Nissle 1917 균주를 선정하였다.

나. 생균제용 미생물 균주 개량 및 특성규명 (유산균)

(1) Genome shuffling을 이용한 유산균 개량 기법

Agar plate 상에서 colony를 형성한 단일종의 bacteria에 UV를 조사하게 되면 nucleotide (염기쌍) 수준의 변이를 일으킨 다양한 mutant population을 얻을 수 있는데(David et al., 2008), 이러한 mutant bacteria의 세포벽을 일시적으로 제거한 protoplast를 만든 후 세포간 융합을 유도하면 gene 단위의 형질 변이를 갖는 더욱 심화된 mutant bacteria pool을 획득할 수 있다. 이러한 기법을 'genome shuffling'이라 하며, 특정 박테리아로 하여금 원하는 형질 특성 (내산성, 항균력, 특정 효소능력 등)을 개선하기 위해 응용된다(Yu et al., 2008; Jixian et al., 2009; Zheng et al., 2010) (그림 1-6). 본 연구에서는 항생제 대체 생균제의 주요 특성인 병원

균에 대한 항균능력과 내산성을 개선한 유산균을 개량하기 위해 genome shuffling 기법을 적용 하였다.

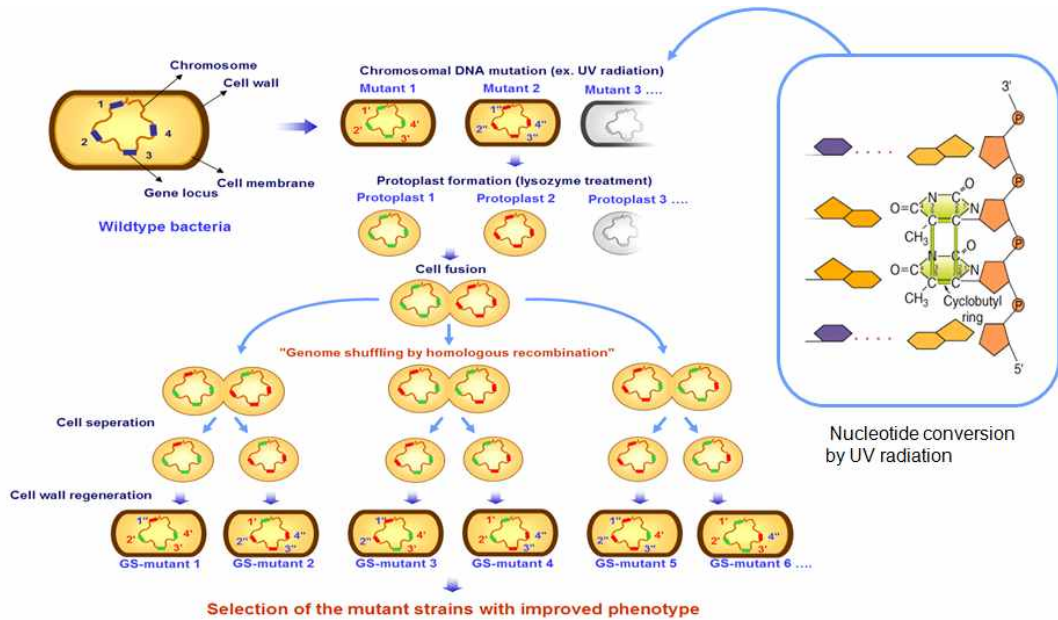


그림 1-6. UV mutation 및 genome shuffling을 이용한 mutant bacterial pool 형성 모식도

Anti-pathogenic ability standard index

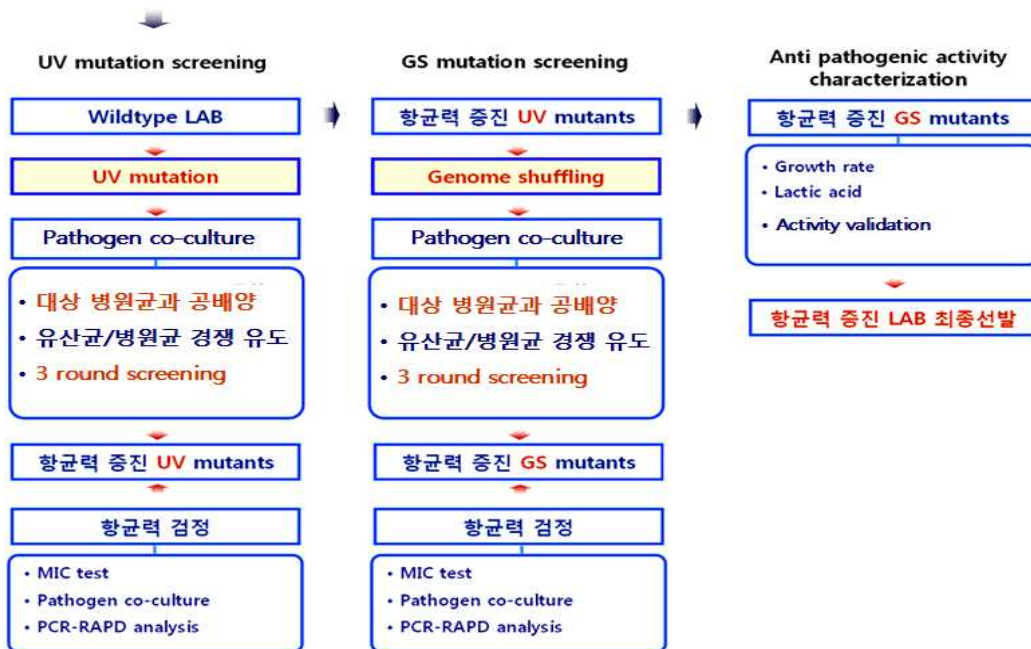


그림 1-7. Genome shuffling 및 병원균과의 공배양을 통한 항균력 증진 유산균 개량 전략

(2) *E. coli* O157에 항균력이 증진된 유산균 개량 (양돈)

(가) 유산균의 고유 항균능력 조사 및 개량대상 균주 선발

축산 (양돈, 양계, 축우)에서 빈번하게 발생하는 세균성 질병의 원인균에 대해 방어능력이 있

는 유산균을 개량하기 위해 우선 양돈관련 질병 원인균 7종에 대해 선발된 5종의 개량대상 유산균 (표 1-2 참조)의 고유 항균능력을 조사하였다. 각 유산균의 항균능력을 보다 객관적인 정량지표로 나타내기 위해 pathogen-top agar overlay assay를 적용하여 유산균 콜로니 (colony)의 직경 대비 콜로니 주변에 형성된 특정 병원균의 투명한 (clearing zone)의 직경의 비율을 측정한 후 CC ratio (clearing zone diameter/ colony diameter)로 표시한 ‘항균능력 표준표 (anti-pathogenic ability standard index)’를 작성하였다. 그 결과, *L. salivarius* LS29, *L. plantarum* LP177 및 *P. acidilactici* PA175 등의 유산균이 다양한 양돈관련 질병 원인균에 광범위하게 항균능력을 나타내는 것을 확인할 수 있었으며(Yun et al., 2009), 콜로니 수준에서 *E. coli* O157에 항균능력을 거의 나타내지 않은 다른 유산균주와 달리 *P. acidilactici* PA175의 경우에는 미약한 항균능력을 나타내었으므로 첫 번째 항균능력 개량 대상으로 *P. acidilactici* PA175 (tester)와 *E. coli* O157(indicator)을 선정하였다 (그림 1-8).

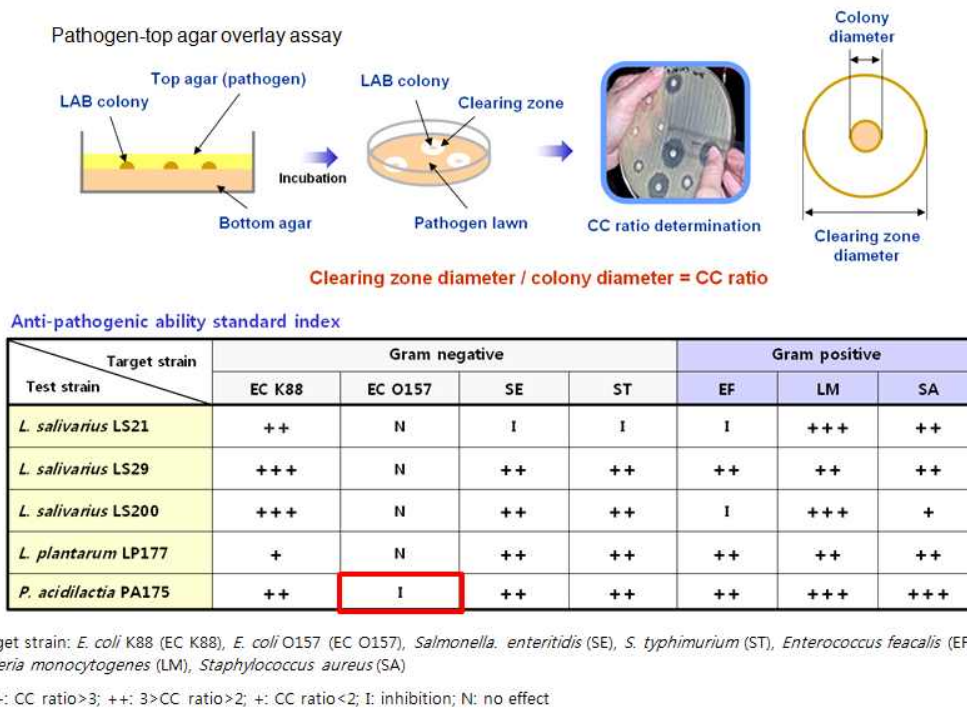


그림 1-8. Pathogen-top agar overlay assay와 개량대상 유산균의 항균능력 표준표

(나) UV mutation 및 genome shuffling을 통한 항균능력 증진 균주의 선발

P. acidilactici PA175 (tester)를 MRS agar plate 위에 colony를 형성한 후 일정시간 clean bench 하에서 UV를 조사한 후 liquid agarose (top-agar)에 혼합한 *E. coli* O157 (indicator)을 그 위에 도말한 다음 정해진 시간 동안 배양하여 항균능력 표준표 대비 CC ratio가 증진된 colony를 선발하였다. 총 15,000 여개의 colony를 screening 한 결과 wild type에 비해 CC ratio가 최대 2배 증가한 8종의 colony를 1차 선발하였다 (표 1-4).

표 1-4. UV mutation을 통한 항균력 증진 PA175 mutant 선발

	WT	UV1	UV2	UV3	UV4	UV5	UV6	UV7	UV8
Mean Ratio	1.25	2.37	2.14	2.27	2.46	2.52	2.32	2.43	2.22
Fold	1	1.89	1.71	1.81	1.96	2.01	1.85	1.94	1.77

E. coli O157에 대한 항균능력을 더욱 증진된 개체를 얻기 위해 PA 175에 대한 UV mutant 8종을 모두 동량으로 혼합한 다음 protoplast를 형성시키고, PEG (polyethylene glycol)을 첨가하여 세포 융합을 시킴으로써 genome shuffling을 유도하였다. 연이어 regeneration 배지 하에 배양하여 세포벽을 복원시킨 GS mutant를 MRS agar plate 위에 colony를 형성한 다음 *E. coli* O157 top-agar를 도말한 후 일정 시간 배양하여 UV mutant에 비해 CC ratio가 더욱 증진된 colony를 선발하였다. 총 15,000 여개의 colony를 screening 한 결과 UV mutant에 비해 CC ratio가 증가된 4종의 colony를 최종적으로 선발하였다 (표 1-5, 그림 1-9).

표 1-5. UV mutation을 통한 항균력 증진 PA175 mutant 선발

	WT	UV M5	GS1	GS2	GS3	GS4
Mean Ratio	1.25	2.52	2.77	3.1	2.89	3.12
Fold	1	2.01	2.21	2.48	2.31	2.49

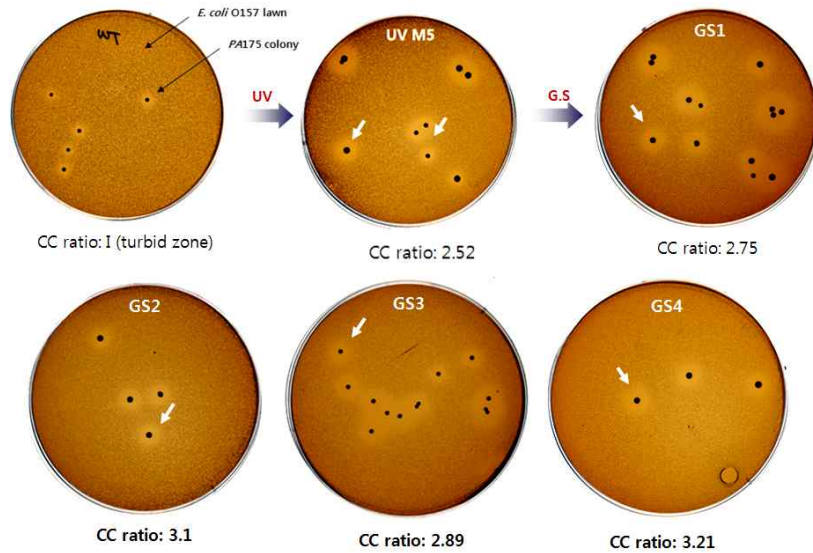


그림 1-9. UV mutation 및 genome shuffling을 통한 항균능력 증진 균주의 선발

(다) 항균능력 증진 유산균주의 특성 규명

① 병원균과의 공배양을 통한 항균능력 검증

Genome shuffling을 통해 선발한 mutant PA175의 *E. coli* O157에 대한 항균능력 증진을 정량적으로 검증하기 위해 wild type PA175 또는 GS mutant (GS1-4)를 *E. coli* O157과 18시간 공배양 하여 병원균에 대한 성장억제 효과를 조사하였다. 그 결과 CC ratio 기준으로 가장 높

은 증진을 보였던 GS4의 경우 wild type PA175에 비해 50% 이상의 병원균 억제능력이 증진된 것을 확인할 수 있었다 (그림1-10).

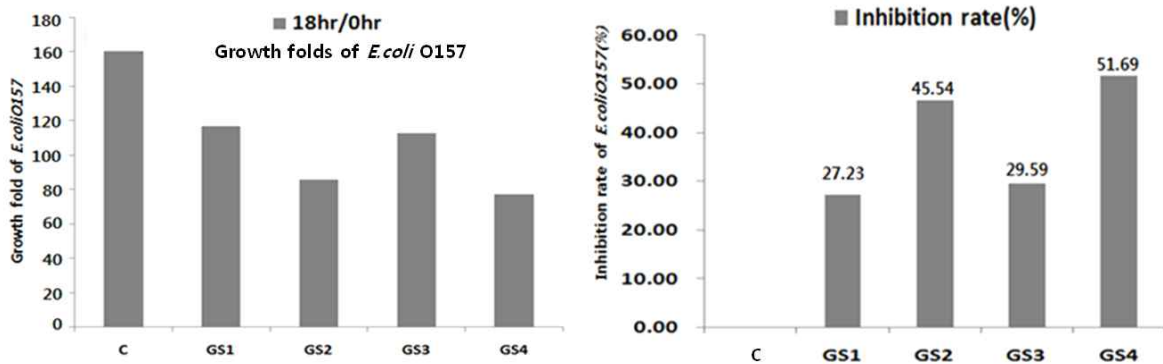


그림 1-10. 병원균과의 공배양을 통한 GS mutant의 항균능력 검정

② PCR-RAPD를 이용한 mutation 여부 조사

UV mutation과 genome shuffling을 통해 실제 PA175의 genome 상에 mutation이 유도되었는지를 알아보기 위해 random primer를 이용한 PCR-RAPD pattern을 조사하였다. 그 결과 wild type, UV mutant 및 GS mutant는 실제로 서로 상이한 band pattern을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (그림1-11).

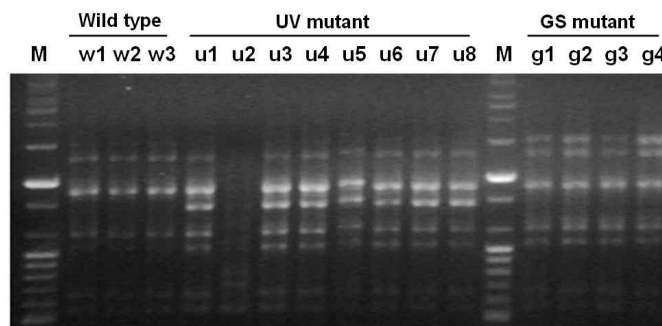


그림 1-11. wild type, UV mutant 및 GS mutant의 PCR-RAPD pattern 비교

③ GS mutant의 생리적 특성 조사

GS mutant PA175가 mutation에 의해 wild type이 가지는 생균제로서의 생리적 특성에 변화가 초래하였는지 알아보기 위해 시간에 따른 성장률과 pH 변화를 살펴보았다. 그 결과, 성장률과 산 생성능력은 wild type이나 GS mutant 간에 큰 차이를 볼 수 없었다. 따라서 GS mutant의 경우 정상적인 발효특성을 유지하면서 선택적으로 항균능력만 증진된 것으로 판단할 수 있었다 (그림 1-12).

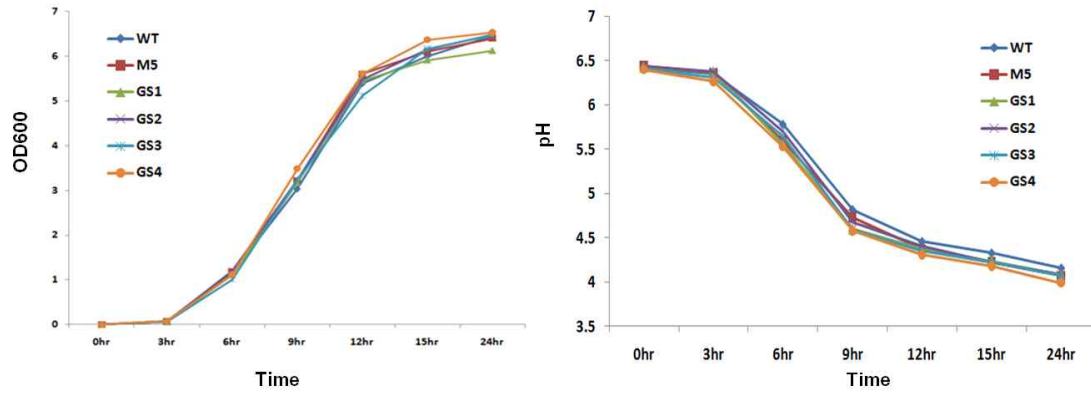


그림 1-12. wild type, UV mutant 및 GS mutant의 성장률 및 산생성 능력 비교

(라) 내산성 증진 유산균의 선발

① 유산균의 고유 내산성 조사 및 내산성 증진 대상균주 선정

생균제를 가축에게 경구급여 할 경우 위산에 의해 활성이 저해되는 측면을 보완하여 내산성이 증진된 유산균으로 개량하기 위해 5종의 개량대상 유산균 (표 1-2 참조)의 고유 내산성을 조사하였다. 그 결과 5종의 유산균의 생육한계 pH는 3.5-3.7 부근인 것으로 나타났다(표 1-6). 유산균의 특성상 내산성 특성은 대체로 유사하였으므로 genome shuffling을 통해 유산균의 내산성을 증진이 가능한지 시도하기 위해 대표 균주로 *L. plantarum* LP177을 선정하였다.

표 1-6. 개량대상 유산균의 성장한계 pH

균 종	생육한계 pH
<i>Lactobacillus salivarius</i> LS21	3.6
<i>Lactobacillus salivarius</i> LS29	3.7
<i>Lactobacillus salivarius</i> LS200	3.5
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP177	3.7
<i>Pediococcus acidilactici</i> PA175	3.5

② 유산균의 pH adaptation 및 genome shuffling을 통한 내산성 증진

L. plantarum LP177의 내산성을 증진시키기 위해 그림 1-13과 같이 MRS broth의 pH를 생육한계 pH 이하 (pH 3.0)로 조절하여 균주를 배양 (pH adaptation)한 다음 생육한계 pH (pH 3.7)의 MRS agar plate에서 colony를 형성하는 개체를 취합하여 이러한 과정을 3회 (3 round) 반복한 후, pH gradient (pH 6.6-3.0) MRS agar plate 상에 도말하여 내산성이 증진된 colony L1-L3를 선발하였다. 연이어, L1-L3를 혼합하여 genome shuffling을 실시한 후 regeneration 유도 배지 상에서 무작위로 10개의 colony를 선발한 다음 pH 2.5의 배지 하에 2시간 상온에서 방치한 후 생존율을 조사하였다. 그 결과, genome shuffling에 의해 wild type보다 내산성이 크게 증진된 GS mutant가 형성됨을 확인할 수 있었고, GS9 mutant LP177의 경우 wild type에 비해 약 30% 이상 증진된 내산성을 보였다.

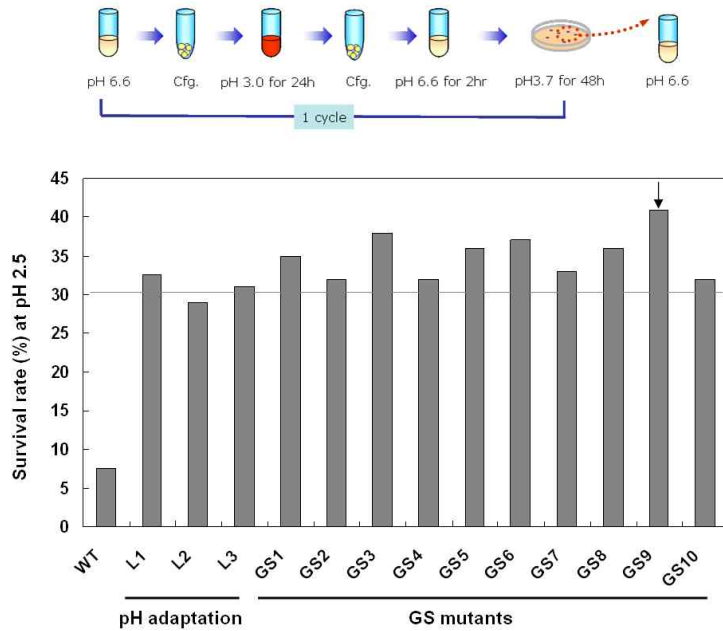


그림 1-13. pH adaptation 방법 모식도와 genome shuffling에 의한 내산성 증가 결과

(마) Genome shuffling 및 병원균과의 공배양을 통한 항균력 증진 유산균 개량 기법 확립

1차년도 (2010. 7 - 2011. 6)에 본 세부과제에서는 항생제 대체 복합 미생물 생균제를 개발하기 위해 항균능력이 우수한 유산균, 효소활성이 우수한 바실러스 및 효모와 비병원성 유용 대장균 등을 선발하였고, 이 중 유산균에 대해서는 UV mutation과 genome shuffling을 조합하여 축산 (축우, 양돈, 양계) 분야에서 빈번하게 문제가 되고 있는 병원성 세균에 대해 항균활성이 증진된 개량균주를 선발하는 기법을 확립하여 이를 통해 돼지고기에서 대표적으로 식중독의 원인이 되는 병원성 대장균인 *E. coli* O157:H7에 대해 항균능력이 wild type 대비 50% 이상 증진된 *P. acidilactici* 유산균을 개량한 바 있다. 2차년도 (2011. 7 - 2012. 6)에는 확립된 유산균 개량 기법을 이용하여 새롭게 축우 및 양계 산업에서 문제를 일으키는 병원성 세균을 특이적으로 억제하는 개량 유산균주 2종을 새롭게 선발하였다.

본 연구를 통해 확립된 유산균 개량기법의 과정을 간략히 기술하면 다음과 같다 (그림 1-7).

① 항균능력 표준표 (anti-pathogenic ability standard index) 도출

축산업 관련 질병 원인균에 대하여 개량 대상 유산균이 가지고 있는 고유의 항균능력을 정량화 한 표로, pathogen-top agar overlay assay를 통해 유산균 콜로니 (colony)의 직경 대비 콜로니 주변에 형성된 특정 병원균의 투명환 (clearing zone) 직경의 비율 (CC ratio: clearing zone diameter/colony diameter)을 통해 유산균의 병원균에 대한 항균력을 정량적으로 나타내며 향후 유산균 항균능력 개량에 있어서 기준으로 활용한다.

② UV mutation 및 표적 병원성 세균과의 공배양을 통한 항균력 증진 유산균 1차 선발

Agar plate 상에서 colony를 형성한 단일종의 미생물에 290 ~ 340 nm 파장의 자외선 (UV:

ultra violet ray)을 조사하면 chromosome 상의 염기쌍에 돌연변이 (pyrimidine dimer 등)를 유도할 수 있는데(David et al., 2008), 이렇게 얻어진 다양한 미생물 돌연변이체 중에서 우연하게도 원하는 표현형질 (phenotype)을 획득한 개체를 선발하는 기법을 UV mutation screening 기법이라고 한다.(Hironobu et al., 2011; Joshi et al., 2010; Paramjit et al., 2010) 본 연구에서는 특정 병원균에 대해 항균력이 증진된 유산균주를 선발하는 것이 목적이므로, UV mutation을 유도한 후에 표적 병원균과의 공배양 (co-culture)을 통해 병원균과의 경쟁에서 생존율이 우수한 돌연변이 유산균 colony를 선발하는 방법을 고안하였다. 3회 (3 rounds)에 걸친 UV mutation-coculture selection을 통해 1차 선발된 항균력이 증진된 유산균은 이 후 genome shuffling selection 에 이용되었다.

③ Genome shuffling 및 표적병원성세균과의 공배양을 통한 항균력 증진 유산균 2차 선발

UV mutation이 미생물 chromosome의 nucleotide (핵산) 수준의 변이를 유도하는 반면, genome shuffling의 경우에는 이러한 돌연변이체의 세포벽을 일시적으로 제거하여 protoplast를 형성한 후 세포간 융합을 통해 gene locus (유전자좌) 수준의 돌연변이를 유도함에 따라, 다양한 형질 변이를 갖는 더욱 심화된 mutant bacteria pool을 형성할 수 있는 장점이 있다.(Zhang et al., 2002) 앞서 기술한 바와 같이 UV mutation 및 표적 병원균과의 공배양을 통해 1차 선발된 유산균 colony들을 대상으로 genome shuffling을 실시한 후 다시 병원균과의 3회에 걸친 genome shuffling-coculture selection을 통해 표적 병원균에 대해 항균력이 더욱 증진된 유산균을 최종 선발하였다.

④ 항균력 증진 개량 유산균주의 특성 분석

UV mutation/genome shuffling 및 병원균과의 공배양을 통해 선발된 항균력 증진 개량 유산균주는 wild type과의 다양한 생리지표 (growth curve, lactic acid production, antimicrobial activity 등) 비교를 통해 그 특성을 검증하였다.

(3) *Salmonella gallinarum*에 항균력이 증진된 유산균 개량 (양계용)

최근 10년간 (2000~2009년 기준) 국내에서 발생한 닭 세균성 전염병 현황을 살펴보면, 가금티푸스의 발생율이 91.2%로 가장 높은 비율을 차지하고 있다. 가금티푸스는 *Salmonella gallinarum*에 의한 닭 소화기성 질병으로, 붉은 황색 설사, 탈수, 식욕부진, 높은 치사율을 특징으로 한다. 그 뒤를 이어 호흡기성 질병인 닭 마이코플라스마(6.70%), 병아리 설사병인 추백리(1.40%) 및 가금콜레라 (0.70%) 등이 국내에서 보고되고 있지만 그 발병 비율은 미미한 편이다. 따라서 90% 이상을 차지하는 가금티푸스의 원인균에 대한 예방은 국내 가금산업에서 차지하는 의미가 매우 크다고 할 수 있다 (그림 1-14).

또한 국내에서 분리되는 *Salmonella gallinarum* isolate들은 서로 높은 유전적, 표현형적 동질성을 보유하고 있기 때문에 이에 대한 항균력이 증진된 유산균을 개량하여 생균제로 활용하면 변이가 심한 다른 병원균에 비해 상대적으로 방제효과도 매우 클 것으로 예상된다.

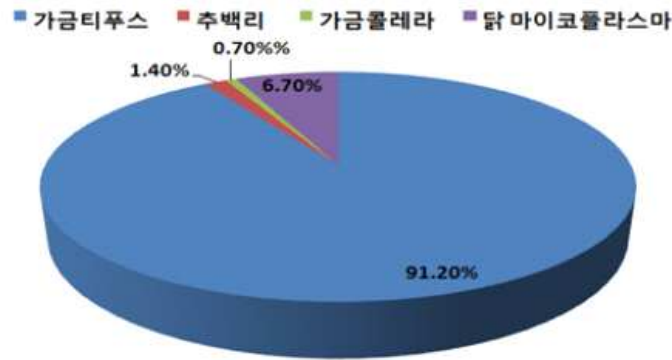


그림 1-14. 최근 10년간 (2000-2009) 국내에서 발생한 닭 세균성 전염병 현황
출처: 권용국, 최근 10년간 국내 닭 법정 전염병 발생현황 분석 (2010), 국립수의과학검역원 리포트

(가) 항균능력 표준표 도출 및 개량 대상 균주 선발

양계 산업에서 빈번하게 발생하는 세균성 질병의 원인균에 대해 방어능력이 있는 유산균을 개량하기 위해 우선 주요 가금 질병 원인균인 *S. gallinarum*과 *S. pullorum*, 2종에 대해 1차년도에 선발된 3종의 유산균에 대한 고유 항균능력을 조사하였다 (표 1-7).

그 결과 3종의 유산균 모두 *S. gallinarum*에 대해서는 항균능력을 보유하고 있는 것이 확인되었지만 *S. pullorum*에 대해서는 항균능력을 보이지 않았다. *S. pullorum*의 경우 추백리의 원인균이나 우리나라의 경우 발병율이 매우 낮고 대부분 *S. gallinarum*에 의한 가금 티푸스의 발병이 문제가 되고 있다. 따라서 *S. gallinarum*에 대한 항균 능력이 월등한 것으로 나타난 유산균, *Pediococcus acidilactici* 175 균주를 항균력 증진 개량 대상 균주로 선발하였다.

표 1-7. 보유 유산균의 가금 질병 주요 원인균에 대한 항균능력 표준표

• Anti-pathogenic ability standard index

Test strain \ Target strain	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella pullorum</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i> 177	++	No effect
<i>Lactobacillus salivarius</i> 29	Inhibition	No effect
<i>Pediococcus acidilactici</i> 175	+++	No effect

+++ : CC ratio>3; ++: 3>CC ratio>2; +: CC ratio<2; I: inhibition; N: no effect

(나) UV mutation-pathogen coculture selection

① 항균력 증진 UV mutants 선발

UV를 조사하였을 때, 0.1~1% 수준의 생존력을 나타낸 유산균 UV mutants pool (mutant *pediococcus*)과 pathogens의 조합을 이용하여 8일간 반복적인 co-cultivation을 수행하고, 이

과정에서 살아남은, 즉, 병원균에 대한 생존력이 증진된 mutant pool을 이용하여 다시 UV mutation을 유도하는 과정을 3회 반복하여, 이 과정에서 최종적으로 선발된 UV mutants pool에 대해 pathogen-top agar overlay assay를 수행하여, wild type대비 CC ratio가 증가한, 즉, 최종 항균 능력이 증진된 UV mutants를 선발하였다. 최종 선발된 병원균에 대한 생존능력이 우수한 UV mutants에 대해 pathogen-top agar overlay assay를 실시하여 CC ratio를 비교한 결과, wild type 대비 병원균에 대한 항균능력이 증진된 5개의 UV mutant colony (M3,M2',M4',M5',M6')를 선발하였다.

선발된 UV mutants의 pathogen-top agar overlay assay의 representative plate view는 ‘그림 1-15’에 나타내었고, 선발된 각각의 UV mutant colony의 CC ratio 평균값은 ‘표 1-8’에 나타내었다.

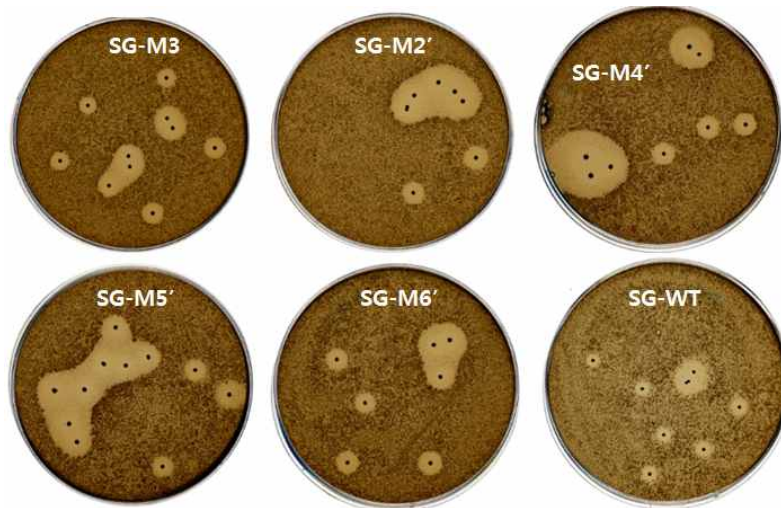


그림 1-15. 선발된 UV mutants의 pathogen-top agar overlay assay 결과
WT : wild type, M3-M6' : 항균력이 증진된 UV mutants, SG : *Salmonella gallinarum*

표 1-8. wild type과 선발된 UV mutants의 Mean CC ratio 와 Fold values

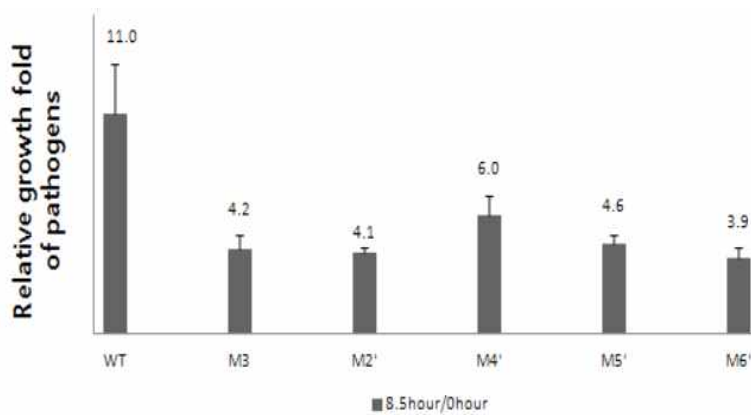
	WT	M3	M2'	M4'	M5'	M6'
Mean Ratio	3.12	3.77	4.01	3.71	3.84	4.12
Fold	1	1.20	1.28	1.19	1.23	1.32

② 선발된 UV mutants의 항균능력 정량 평가

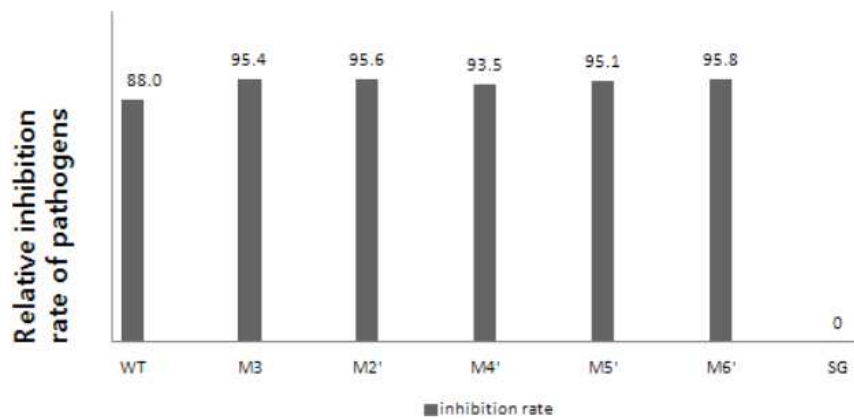
선발된 UV mutants의 정량적 항균능력을 측정하기 위해 pathogen-LAB co-cultivation assay를 수행하였다. *S. gallinarum*과 선발된 *P. acidilactici* mutants를 각각 70% (w/v)으로 희석된 modified MRS에서 배양한 후, 3.55×10^4 cfu/ml *P. acidilactici*와 3.8×10^4 cfu/ml의 *S. gallinarum*을 70% (w/v) modified MRS broth를 이용하여 37°C, 246 rpm에서 8.5시간 공배양 하였다. 동일조건에서 *S. gallianrum* 단독배양 한 경우는 control로 이용하였다. 공배양한 배양액 일부를 *Salmonella* 선택배지인 Mac-conkey agar plate에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하여 *S. gallinarum*의 생균수를 확인하였다.

Pathogen과 선발된 UV mutants를 공배양 했을 때, wild type과 pathogen을 공배양 했을 때 보다 좀더 pathogen의 생균수가 낮게 나타나는 것을 통해 UV mutants의 경우 wild type에 비해 항균능력이 약 7% 증진된 것을 확인할 수 있었다.

Pathogen-LAB co-cultivation assay의 결과는, 0시간대 대비 8.5시간 공배양한 후의 pathogen의 growth fold수 (그림 1-16.(a))로 나타내었고, 이 결과를 pathogen만 단독 배양한 control 대비 pathogen에 대한 inhibition rate (그림 1-16.(b))로 나타내었다.



(a) 0시간대비 8.5시간 공배양 후의 *Salmonella gallinarum*의 growth fold



(b) 8.5시간 공배양 후 *Salmonella gallinarum*에 대한 inhibition rate(%)

그림 1-16. Pathogen-LAB co-cultivation assay의 결과

(다) Genome shuffling-pathogen coculture selection

① 항균력 증진 genome shuffling mutants 선발

UV mutation selection을 통해 선발된 항균력 증진 *Pediococcus* mutants를 대상으로 genome shuffling을 실시하였다. 우선 각 선발된 UV mutants를 1colony씩 10ml MRS broth에 접종하여 37°C, 246rpm에서 overnight 배양한 후, 각각의 배양액을 10% (v/v)가 되도록 새로

운 MRS broth에서 2시간 subculture 한 다음, 각각의 mutant cell들을 원심분리로 회수하고 (4500g, 15min), 생성된 pellet을 pooling하여 5mg/ml lysozyme과 30ug/ml mutanolysin을 포함하는 4ml lactobacilli protoplast buffer (LPB : 10mM Tris-Cl, pH6.3, 20mM CaCl₂, 0.5M sucrose)에서 현탁하여 37°C에서 30분간 부드럽게 inverting하면서 protoplast를 형성시켰다. 형성된 protoplast는 원심분리 (3500g, 15min)를 통해 회수하여 400ul LPB에 현탁한다. 이후 cell fusion을 유도하기 위해 100ul의 protoplast mixture를 900ul의 40% (w/v) PEG 6000 (polyethylene glycol) 용액에 넣고 9분간 실온에서 incubation한 후, 원심분리로 회수하여 RM (Regeneration Medium)에 plating하여 cell wall을 복원시켰다.

Regeneration media는 20mM magnesium chloride, 2.5% gelatin, 0.5M sucrose, 0.5% BSA를 포함하는 MRS media이다.

Genome shuffling의 전반적인 과정은 아래 그림 1-17에 나타내었다.

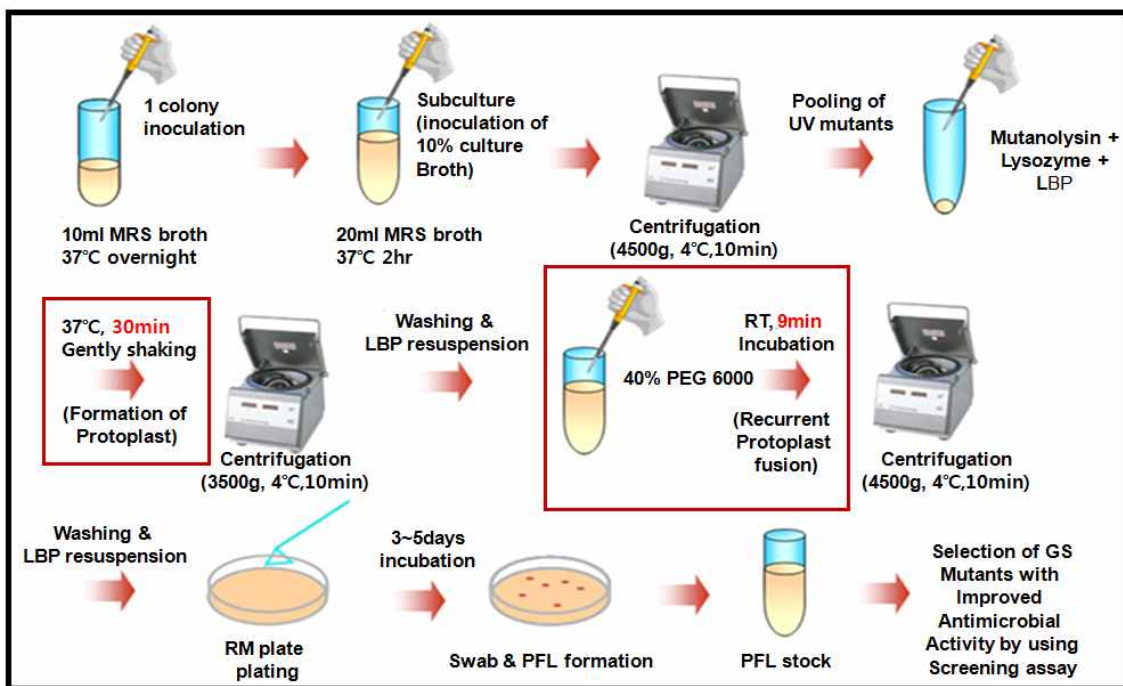


그림 1-17. *Pediococcus acidilactici*에 적용된 genome shuffling의 overall process

위에서 얻어진 genome shuffling mutants pool에서 *S. gallinarum*에 대해 항균력이 더욱 증진된 mutants를 선발하기 위해 공배양을 실시하였다. 6.56×10^4 의 *S. gallinarum*과 7.1×10^4 cells의 유산균 genome shuffling mutants pool을 8일간 공배양한 후, 생존한 유산균 mutant의 경우 병원균인 *Salmonella gallinarum*에 대해 생존력이 우수한 mutant라고 간주하고, 이와 같은 선발과정을 총 3 회 반복하였다. 최종 선발된 병원균에 대한 생존능력이 우수한 mutants에 대해 pathogen-top agar overlay assay를 실시하여 CC ratio를 비교한 결과, 최종적으로 wild type대비 병원균에 대한 항균능력이 증진된 4개의 genome shuffling mutants (GS1,GS2,GS3,GS4)를 선발할 수 있었다. 선발된 genome shuffling mutants의 pathogen-top agar overlay assay의 representative plate view는 '그림 1-18'에 나타내었고, 선발된 mutants의 CC ratio의 평균값은 '표 1-9'에 나타내었다.

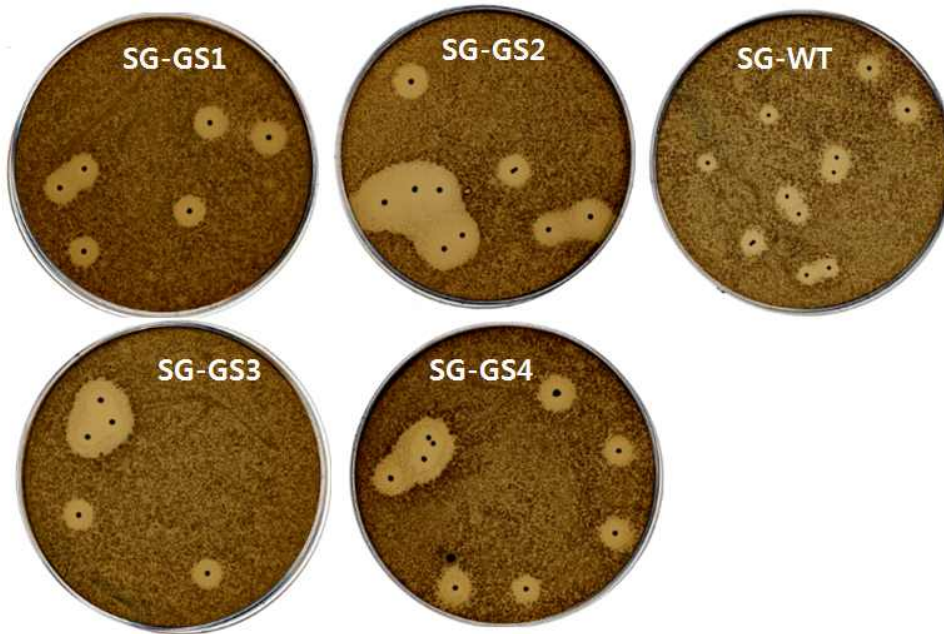


그림 1-18. 선발된 genome shuffling mutants의 pathogen-top agar overlay assay 결과
 WT : wild type, GS1, GS2, GS3, GS4 : 항균력 증진 genome shuffling mutants, SG: *S. gallinarum*

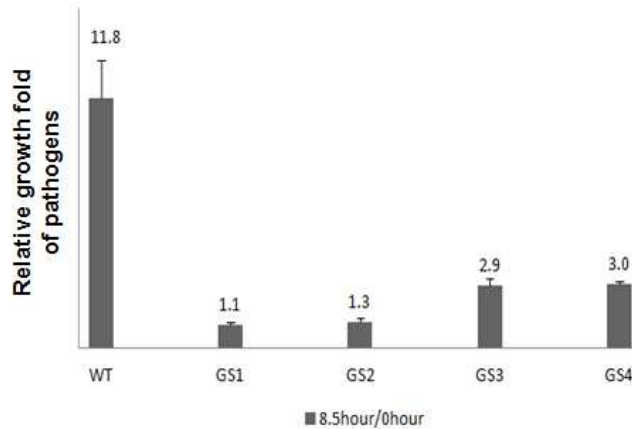
표 1-9. Wild type, UV mutant (M6'), genome shuffling mutants (GS1, GS2, GS3, GS4)의 mean CC ratio와 fold values

	WT	M6'	GS1	GS2	GS3	GS4
Mean Ratio	3.12	4.12	4.47	4.25	4.20	4.20
Fold	1	1.32	1.43	1.36	1.34	1.34

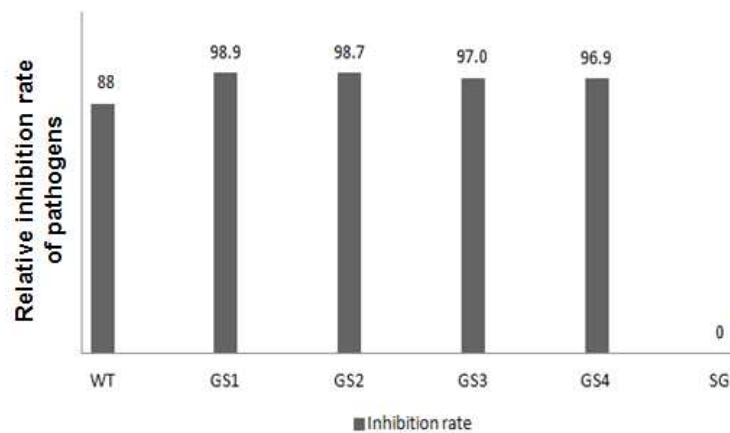
② 선발된 genome shuffling mutants의 항균능력 정량 평가

선발된 genome shuffling mutants의 정량적 항균능력을 측정하기 위해 앞서 기술한 UV mutants 검정과 동일한 방법으로 pathogen-LAB co-cultivation assay를 수행하였다. *S. gallinarum*과 genome shuffling을 통해 선발한 *P. acidilactici* mutants 및 wild type을 70% modified MRS 상에서 8.5시간 공배양한 후 배양액 일부를 Mac-conkey agar plate에 도말하여 *S. gallinarum*의 생균수를 확인하였다. 그 결과 genome shuffling mutants는 wild type에 비해 pathogen에 대한 항균능력이 최대 약 11% 증진된 것을 확인할 수 있었다.

Pathogen-LAB co-cultivation assay의 결과는, 0시간대 대비 8.5시간 공배양 한 후의 pathogen의 growth fold 수 (그림 1-19.(a))로 나타내었고, 이 결과를 pathogen만 단독배양한 control 대비 pathogen에 대한 inhibition rate (그림 1-19.(b))로 나타내었다.



(a) 0시간대비 8.5시간 공배양 후의 *Salmonella gallinarum*의 growth fold



(b) 8.5시간 공배양 후 *Salmonella gallinarum*에 대한 inhibition rate(%)

그림 1-19. Pathogen-LAB co-cultivation assay의 결과

(라) 항균능력 증진 개량 유산균의 생리적 특성 조사

선발된 GS mutants가 mutation에 의해 wild type이 가지는 생균제로서의 생리적 특성에 변화를 초래하였는지 알아보기 위해 시간에 따른 균주의 성장률과 pH 변화를 살펴보았다. 그 결과, 성장률과 산 생성능력은 wild type이나 GS mutants 간에 큰 차이를 볼 수 없었다. 따라서 본 연구를 통해 획득한 GS mutants는 정상적인 발효특성을 유지하면서 선택적으로 항균능력만 증진된 것으로 판단할 수 있었다 (그림 1-20).

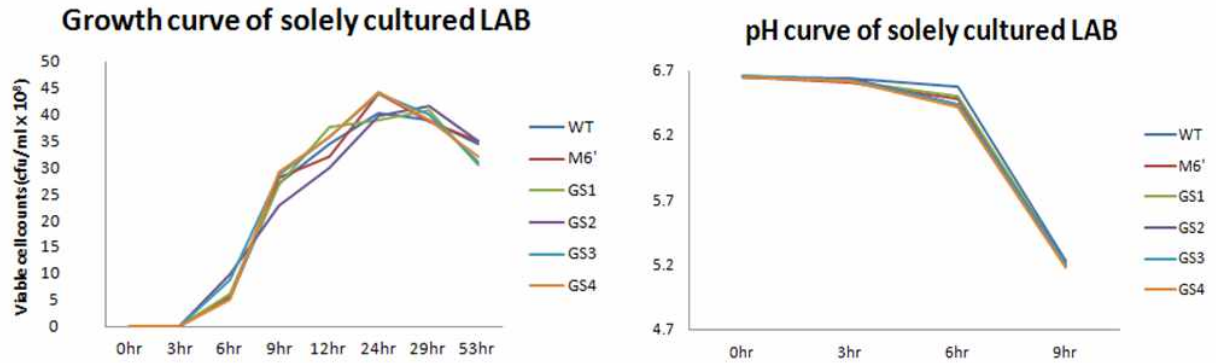


그림 1-20. wild type, UV mutant 및 GS mutants의 성장률 및 산 생성능력 비교

(4) *E. coli* K99에 항균력이 증진된 유산균 개량 (축우용)

한우의 주된 폐사 원인은 설사를 주증으로 하는 소화기 질병이다. 신생 한우의 폐사율은 5~6% 정도이며, 신생우의 설사가 다발적으로 발생하는 경우에는 폐사율이 50%를 넘기도 한다. 성장 시기별 발병 비율을 보면 포유기 (1~60일령) 중 질병발병률은 70.9%이고, 그 중 폐사율은 16.1%이며, 육성기 (61~180일령) 중 질병발병률은 27.9%이고, 그 중 폐사율은 2.3%이다.

‘2001~2008 간 질병 발생 소 11,533두 분석자료’에 의하면 법정가축전염병을 제외 하였을 때, 유방염 (mastitis)이 7,440 마리로 가장 큰 비중을 차지하고, 그리고 대장균성 설사병(1,320 마리)이 주를 이루고 있다 (표 1-10).

표 1-10. 소의 연도별 주요 감염성 질병 발생현황 (국립축산과학원, 2008)

질병명	2001년	2002년	2003년	2004년	2005년	2006년	2007년	2008년 4월
Mastitis(유방염)	1,780	1,598	1,144	860	765	457	500	125
Colibacillosis (대장균성 설사병)	160	175	160	143	155	138	237	29
Calf Diarrhoea (송아지 디프테리아)	15	51	54	53	26	37	22	6
Coccidiosis(복시등증)	46	57	47	47	47	90	126	34
BVD (소 바이러스설사병)	18	28	34	32	47	20	116	37
BRV(rotavirus, (소 로타바이러스감염증)	21	23	10	73	19	27	70	37
Neosporosis (네오스포라병)	20	24	29	38	30	35	48	14
Enterotoxemia (장독혈증)	7	14	15	25	16	17	16	7
P. Pneumonia (파스튜렐라병)	36	18	16	12	31	18	9	5
Winter dysentery (BCV, 동적리)	101	57	19	3	6	6	5	0
Theileriosis (타이레리아병)	31	15	19	6	16	2	3	0
Coronaviral infection (코로나바이러스감염증)	35	19	24	25	38	34	33	13
Salmonellosis (살모넬라감염증)	10	11	18	12	16	10	20	2
Broncopneumonia (기관지폐렴)	32	17	11	3	1	-	1	0

따라서 본 과제에서는 1차년도에 동정한 유산균을 대상으로 축우산업에 큰 피해를 주는 질병인 대장균성 설사병의 원인균인 *E. coli* K99에 대해 genome shuffling 및 병원균과의 공배양을 통해 항균능력이 증진된 유산균으로 개량하는 연구를 진행하였다.

(가) 항균능력 표준표 도출 및 개량 대상 균주 선발

축우 산업에서 빈번하게 발생하는 세균성 질병의 원인균에 대해 방어능력이 있는 유산균을 개량하기 위해 우선 주요 축우 질병 원인균인 *S. typhimurium*과 *E. coli* K99, 2종에 대해 1차년도에 선발된 3종의 유산균에 대한 고유 항균능력을 조사하였다. Wild type 유산균의 목적 병원균에 대한 항균력을 정량화하기 위하여 pathogen-top agar assay를 수행하여, 항균능력 표준표 (antipathogenic ability standard index)를 작성하였다 (그림 1-21). 그 결과, 대체로 *Lactobacillus plantarum* 177과 *Pediococcus acidilactici* 175가 *Lactobacillus salivarius* 29보다 *S. typhimurium*에 대해 항균력이 더 높았고, *Lactobacillus plantarum* 177의 경우 *S. typhimurium*에 대한 항균력은 높으나 *E. coli* K99에 대한 항균력은 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 토대로 개량 대상균과 표적 병원균으로 *Lactobacillus plantarum* 177과 *E. coli* K99를 각각 선정하였다.

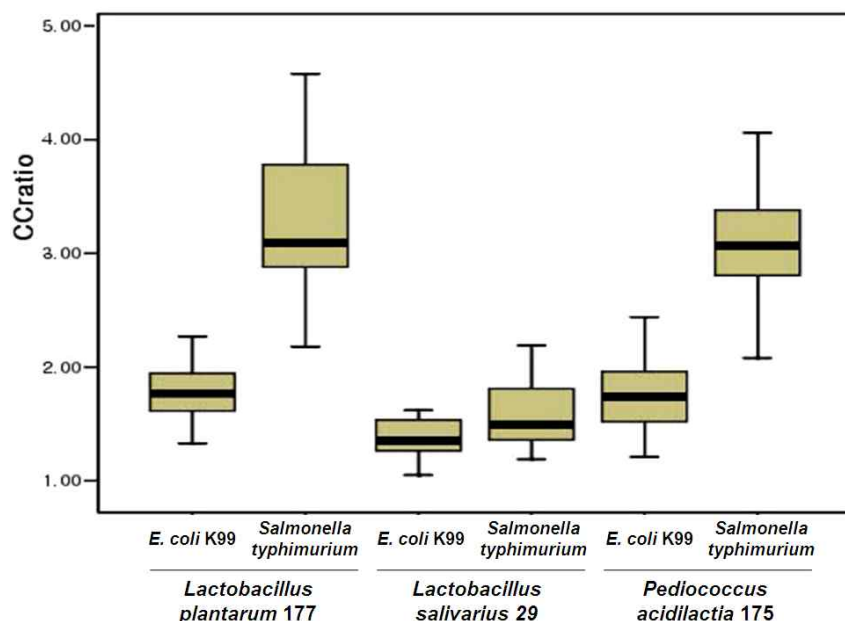


그림 1-21. 보유 유산균의 축우 질병 주요 원인균에 대한 항균능력 표준표

(나) 항균력 증진 UV mutants 선발 및 항균능력 증진 검정

UV를 조사하였을 때, 0.1~1% 수준의 생존력을 나타낸 유산균 UV mutants pool (mutant *L. plantarum*)과 pathogen의 조합을 이용하여 8일간 반복적인 co-cultivation을 수행하고, 이 과정에서 살아남은, 즉, 병원균에 대한 생존력이 증진된 mutant pool을 이용하여 다시 UV mutation을 유도하는 과정을 3회 반복하여, 최종적으로 선발된 UV mutants pool에 대해 pathogen-top agar overlay assay를 수행하여, wild type대비 CC ratio가 증가한, 즉, 최종 항균 능력이 증진된 UV mutants를 선발하였다. 최종 선발된 병원균에 대한 생존능력이 우수한 UV mutants에 대해 pathogen-top agar overlay assay를 실시하여 CC ratio를 비교한 결과, wild type 대비 병원균에 대한 항균능력이 증진된 22종의 UV mutant colony를 선발하였고, 이

러한 UV mutants를 pooling하여 표적 병원균인 *E. coli* K99와 16시간 동안 공배양을 실시한 후 *E. coli* K99의 생균수를 통해 wild type 대비 항균력 증진 여부를 검정하였다. 결과를 살펴보면 *L. plantarum*의 wild type에 비해 선발과정을 거친 UV mutants 가 병원균인 *E. coli* K99에 대해 유의적으로 높은 항균능력을 보유하고 있는 것을 확인할 수 있었으며 그 결과는 아래 '표 1-11'과 '그림 1-22'에 나타내었다.

표 1-11. *Lactobacillus plantarum* UV mutants와 *E. coli* K99와 16시간 공배양 후 *E. coli* K99의 생균수

실험군, 대조군		<i>Lactobacillus plantarum</i> 과 <i>E. coli</i> K99와의 공배양을 16시간 한 후 <i>E. coli</i> K99의 생균수
WT	Wild type <i>Lactobacillus plantarum</i> 과 <i>E. coli</i> K99와의 공배양을 한 실험군	7.67×10^3 (cfu/ml)
UV mutant	<i>Lactobacillus plantarum</i> UV mutants와 <i>E. coli</i> K99와의 공배양을 한 실험군	4.78×10^3 (cfu/ml)
Control	<i>E. coli</i> K99만 단독배양한 대조군	3.03×10^8 (cfu/ml)

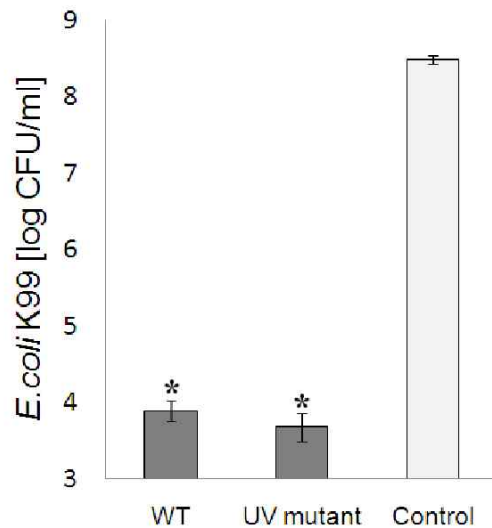


그림 1-22. *Lactobacillus plantarum* UV mutants와 *E. coli* K99와 16시간 공배양 후 *E. coli* K99의 생균수. *Significant differences ($P < 0.01$) with control treatment.

Values are means \pm SD.

(다) 항균력 증진 genome shuffling mutants 선발 및 항균능력 증진 검정

앞서 선발한 22종의 UV mutants를 pooling 한 후, 전술한 genome shuffling 기법 (그림 1-17, 그림 1-23)을 이용하여 *E. coli* K99에 항균력이 증진된 유산균 선발을 시도하였다. Genome shuffling 을 통해 획득한 GS-mutants와 *E. coli* K99와 공배양을 하여, *Lactobacillus plantarum* 측면에서 사멸기의 말기에 살아남은 GS-mutants들을 분리한 후 증식시키는 과정을 3회 반복하였다. 3회 째 공배양 단계에서 최종적으로 획득한 mutants를 이용하여 pathogen top agar assay를 하여 항균력이 뛰어난 최종 1 colony의 GS-mutant (LP-GS1)를 획득하였다.

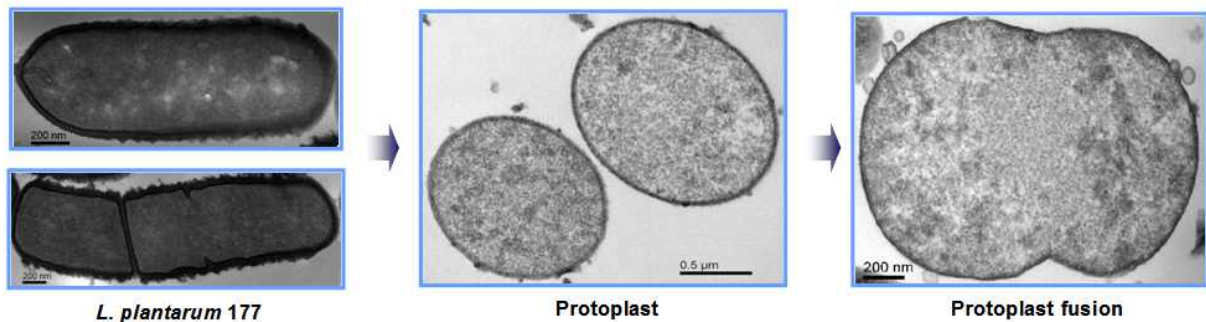


그림 1-23. *Lactobacillus plantarum* 177의 genome shuffling 과정 중 protoplast 형성 및 세포융합 관련 전자현미경 사진

LP-GS1의 항균력을 검정하기 위해 *E. coli* K99와 25시간 동안 공배양한 후 *E. coli* K99의 생균수를 측정하여 wild type 및 UV mutant와의 항균능력을 비교하였다 (표 1-12, 그림 1-24).

그 결과를 보면 wild type *Lactobacillus plantarum*, UV mutagenesis에 의해 선발된 *Lactobacillus plantarum* UV mutants, 그리고 genome shuffling에 의해 선발된 *Lactobacillus plantarum* GS mutant와 *E. coli* K99를 각각 공배양한 실험군에서, *E. coli* K99만 단독배양한 대조군보다 *E. coli* K99 생균수가 훨씬 낮은 것을 볼 수 있다. 한편, wild type *Lactobacillus plantarum*과 *E. coli* K99를 공배양한 실험구에서 *E. coli* K99의 수는 대조구에 비하여 12.6 % 였던 점에 반해, LP-GS1과 *E. coli* K99를 공배양한 실험구에서 *E. coli* K99의 수는 *E. coli* K99만 단독 배양한 대조구에 비하여 3.6% 수준이었다. 따라서 LP-GS1의 경우 wild type에 비해 정량적으로 약 9% 정도 항균능력이 증진된 것으로 확인되었다.

표 1-12. *Lactobacillus plantarum*과 *E. coli* K99의 25시간 공배양 후 *E. coli* K99의 생균수

실험군, 대조군		<i>Lactobacillus plantarum</i> 과 <i>E. coli</i> K99와 25시간 공배양 후 <i>E. coli</i> K99의 생균수
WT	Wild type <i>Lactobacillus plantarum</i> 과 <i>E. coli</i> K99와의 공배양을 한 실험군	7.637×10^6 (cfu/ml)
UV mutant	UV mutagenesis으로 선발된 <i>Lactobacillus plantarum</i> UV mutants와 <i>E. coli</i> K99와의 공배양을 한 실험군	4.05×10^6 (cfu/ml)
GS mutant	Genome shuffling으로 선발된 <i>Lactobacillus plantarum</i> GS mutant와 <i>E. coli</i> K99와의 공배양을 한 실험군	2.19×10^6 (cfu/ml)
Control	<i>E. coli</i> K99만 단독배양한 대조군	6.07×10^7 (cfu/ml)

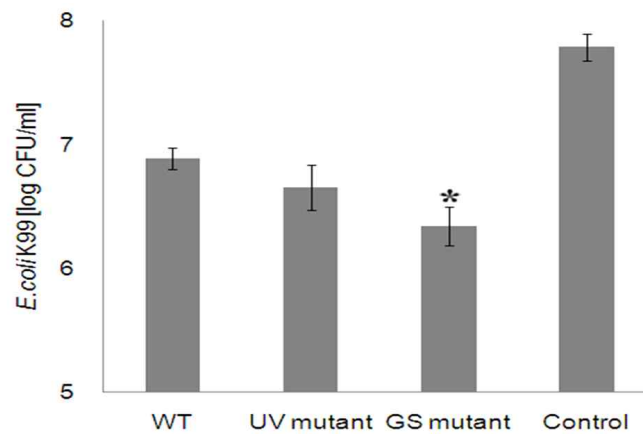


그림 1-24. *Lactobacillus plantarum*과 *E. coli* K99와 25시간 공배양 후 *E. coli* K99의 생균수
*Significant differences ($P < 0.05$) with WT group. Values are means \pm SD.

(라) 항균능력 증진 개량 유산균의 생리적 특성 조사

선발된 GS mutants가 mutation에 의해 wild type이 가지는 생균제로서의 생리적 특성에 변화를 초래하였는지 알아보기 위해 시간에 따른 균주의 성장률과 pH 변화를 살펴보았다. 그 결과, 앞서 *Pediococcus*에 대한 결과와 유사하게 성장률과 산 생성능력은 wild type이나 GS mutants 간에 큰 차이를 볼 수 없었다. 따라서 본 연구를 통해 획득한 GS mutants는 정상적인 발효특성을 유지하면서 선택적으로 항균능력만 증진된 것으로 판단할 수 있었다 (그림 1-25).

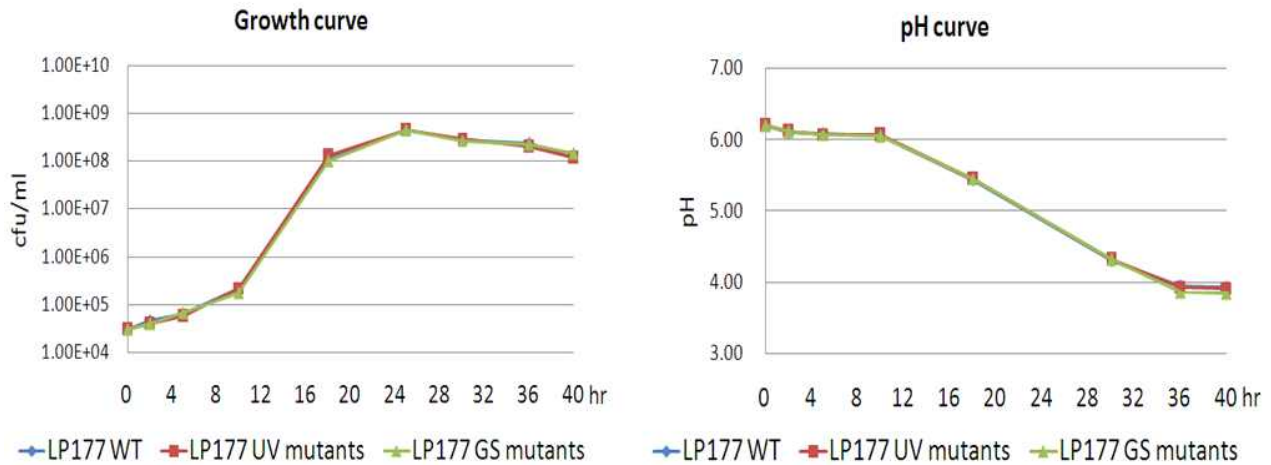


그림 1-25. wild type, UV mutant 및 GS mutants의 성장률 및 산 생성능력 비교

다. 생균제용 미생물 균주 개량 및 특성규명 (바실러스)

바실러스 (*Bacillus sp.*, 고초균)는 포자를 형성하는 GRAS 균으로 각종 병원균에 대한 항균 활성이 알려진 균주가 많이 있고 단일 또는 복합생균제로 국내외에서 널리 사용되는 균주로 본 연구과제에서는 유산균과 함께 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 주요 구성 균주이다. 한편, 바실러스는 각종 영양소 분해 효소를 풍부하게 분비하여 가축의 사료효율을 개선하고 축분의 냄새저감 기능이 우수하며, 특정 종은 파리 유충의 생육을 억제하는 기능이 있어서 축사환경 개선에 효과적인 생균제 후보이다.

본 연구단이 선행연구를 통해 기 확보한 바실러스 균주 (16s RNA 분석 완료) 중 본 연구의 목적을 위해 선정한 생균제 후보 바실러스 균주의 종류와 특성은 아래 표 1-13과 같다.

표1-13 생균제 후보 바실러스 균주 및 특징

종 명	균주 특징
<i>Bacillus polymyxa</i> T1	<i>Salmonella gallinarum</i> 에 대한 항균효과 확인, 포자형성능 우수 (저장용이)
<i>Bacillus licheniformis</i> T2	축분 중 냄새저감 효과 확인 (축사 환경개선)
<i>Bacillus thuringiensis</i> T3	파리 유충 생육 억제 효과 확인 (축사 환경개선, 질병예방)
<i>Bacillus subtilis</i> T4	정장 및 소화촉진 효과가 널리 알려짐
<i>Bacillus polymyxa</i> SM2	병원성 대장균에 대한 항균효과, 서울대 균주은행 분양 균주 (IMSNU No. 12071)
<i>Bacillus sp.</i> JSP1	남극토양 분리 균주
<i>Bacillus sp.</i> LX1	남극토양 분리 균주

(1) 생균제용 미생물의 특성규명 및 배양조건 탐색 (바실러스)

(가) *Bacillus* sp. 균주 분리/선발

*Bacillus*의 생균제 균주 발굴 및 선발을 위하여, 기분리된 서울대 *Bacillus* 균주 3종 및 남극 토양으로부터 신규 *Bacillus* sp. 균주 2종을 분리하여 선발하였다 (표 1-13).

(나) 기확보 균주 및 분리균주의 생균제 특성 조사

① 내산성조사

분리된 *Bacillus* sp. 균주를 0.3% pepsin, 0.1% peptone 그리고 0.5% NaCl이 함유된 인공위액(pH 2-3)에서 총 2시간 동안 각각 0, 30, 60, 90, 120 분 배양시 생존하는 균주수의 변화를 측정함으로써 내산성을 평가하였다. 모든 pH에서, *Bacillus* sp. JSP1는 다른 균주와 비교하여 생존수가 우수하였다(그림1-26).

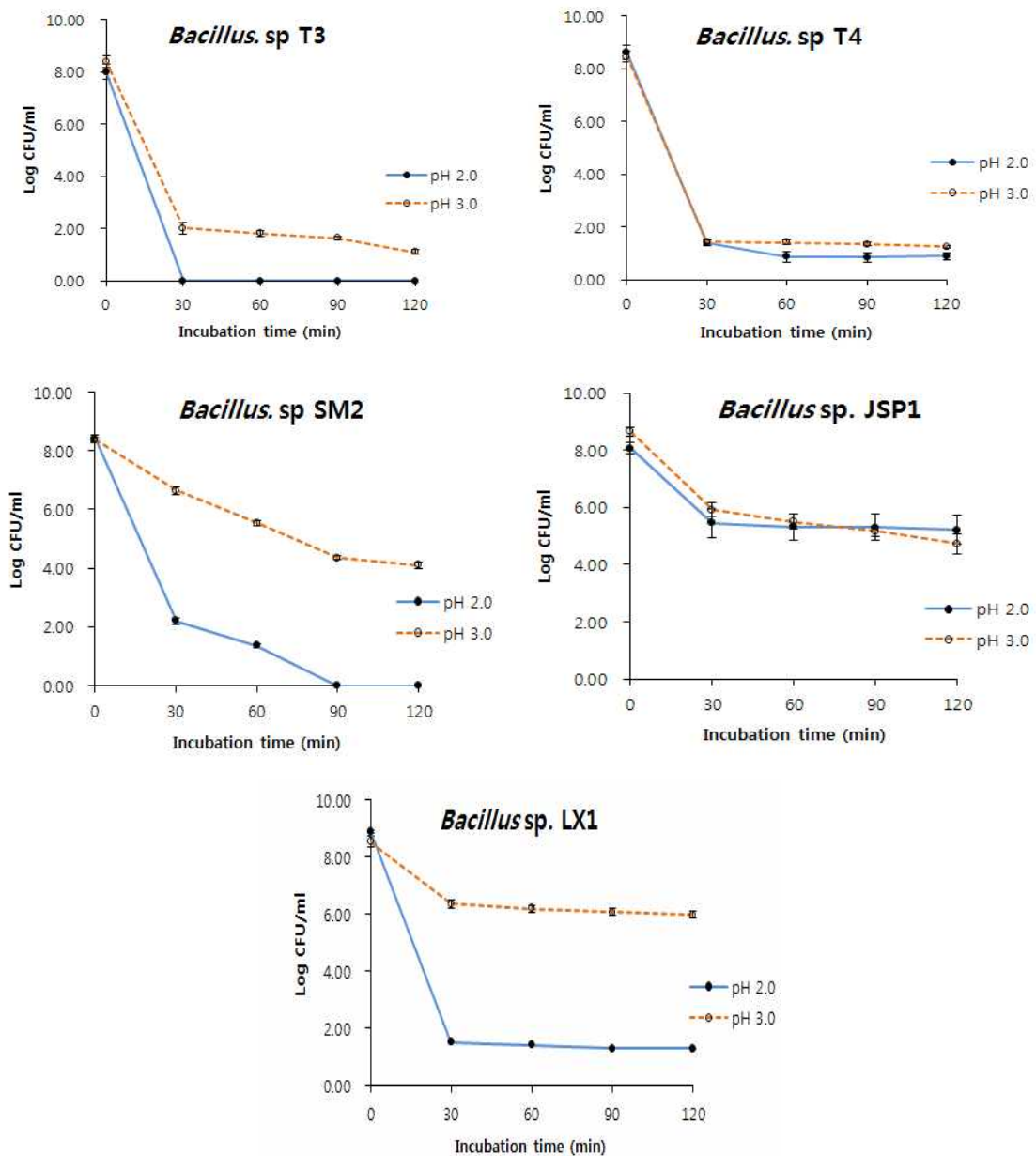


그림 1-26. 120분 동안 인공 위액(pH 2와 pH 3)에 노출된 *Bacillus* 균주 생존수

② 내담즙성 조사

분리된 *Bacillus* sp. 균주의 인공담즙산인 0.3% (w/v) oxgall이 포함된 성장배지에서 총 4 시간 동안 각각 0, 1, 2, 3, 4 시간의 성장곡선관찰을 통한 내담즙성을 평가하였다. 남극에서 분리된 *Bacillus* sp. JSP1과 *Bacillus* sp. LX1이 다른 균주에 비하여 상대적으로 인공장액에 대한 생존수가 우수하였다 (표1-14).

표 1-14. 4시간 동안 인공 장액(0.3% oxgall)에 노출된 *Bacillus*의 생존수

Strains	Viable counts (log CFU/ml)				
	0h	1h	2h	3h	4h
<i>Bacillus</i> . sp T3	8.67±0.14	7.87±0.07**	7.81±0.09**	7.68±0.08**	7.58±0.08**
<i>Bacillus</i> . sp T4	9.43±0.23	9.25±0.21	9.15±0.21	8.78±0.07	8.61±0.16*
<i>Bacillus</i> . sp SM2	8.42±0.13	7.29±0.11**	7.18±0.10**	6.97±0.20**	6.74±0.27**
<i>Bacillus</i> sp. JSP1	8.57±0.73	8.19±0.61	8.04±0.64	7.78±0.57	7.23±0.46
<i>Bacillus</i> sp. LX1	8.90±0.43	8.20±0.08	7.94±0.21	7.38±0.37	7.36±0.36

Viable counts (log CFU/ml) of each strain at 1, 2, 3, 4 h were compared with that at 0 h, *p<0.05, **p<0.01 (Student's t-test, two tailed). Results were shown as mean and standard errors from three experiments.

(다) 기확보 균주 및 분리균주의 세포의 cellulase, xylanase, amylase, α-galactosidase, protease, phytase 생산능력 및 이들 효소에 관한 배양 조건 연구

① cellulase

정성적 효소활성: 평판배지(0.5% Carboxymethyl Cellulose, 0.5% Yeast Extract, 0.45% (NH₄)₂SO₄, 1.5% Agar, 0.01% CaCl₂·2H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.01% NaCl, 0.07% KH₂PO₄, 0.001% MnSO₄·4H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O, pH6.5)에서 4일 배양 후 Congo red test를 하였고, *Bacillus* sp. SM2에서 환을 나타내었다 (그림 1-27).

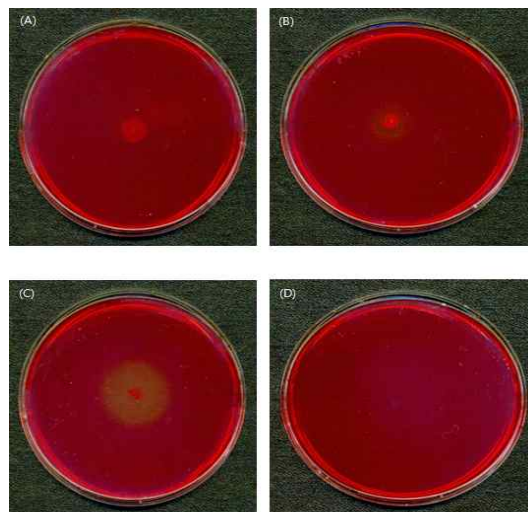


그림 1-27. 각 균주에 대한 정성적 cellulase 활성 (A)*Bacillus* sp. T3, (B)*Bacillus* sp. T4, (C)*Bacillus* sp. SM2, (D)*Bacillus* sp. JSP1

정량적 효소활성: Broth 배지조건(0.5% Carboxymethyl Cellulose, 0.5% Yeast Extract, 0.45% (NH₄)₂SO₄, 0.01% CaCl₂·2H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.01% NaCl, 0.07% KH₂PO₄, 0.001% MnSO₄·4H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O, pH6.5)에서 4일 배양 후, 원심 분리 하여 배양 상층액에서 효소 활성을 측정 하였고, *Bacillus* sp. SM2에서 0.098±0.002 U/ml의 효소 활성을 나타내었다 (표 1-15).

② xylanase

정성적 효소활성: 평판배지(0.5% Xylan, 0.45% (NH₄)₂SO₄, 0.05%Yeast Extract, 1.5% Agar, 0.01% CaCl₂·2H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.01% NaCl, 0.07% KH₂PO₄, 0.001% MnSO₄·4H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O, pH6.5)에서 4일 배양 후, Congo red test를 실시하였고, *Bacillus* sp. T4와 *Bacillus* sp. SM2에서 환을 나타내었다 (그림 1-28).

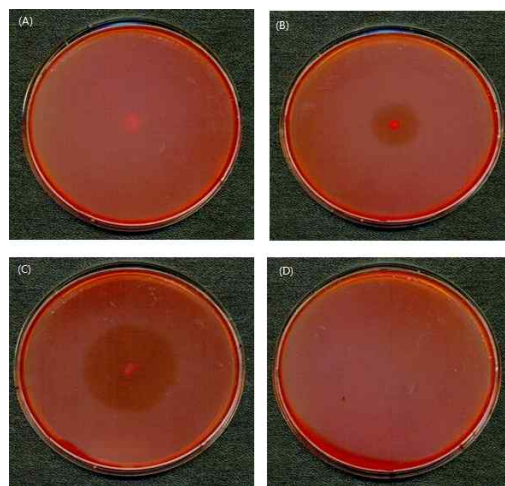


그림 1-28. 각 균주에 대한 정성적 xylanase 활성 (A)*Bacillus* sp. T3, (B)*Bacillus* sp. T4, (C)*Bacillus* sp. SM2, (D)*Bacillus* sp. JSP1

정량적 효소활성: Broth 배지(0.5% Xylan, 0.45% (NH₄)₂SO₄, 0.05% Yeast Extract, 0.01% CaCl₂·2H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.01% NaCl, 0.07% KH₂PO₄, 0.001% MnSO₄·4H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O, pH6.5)에서 4일 배양 후, 원심 분리하여 배양 상층액에서 효소 활성을 측정하였고, *Bacillus* sp. SM2에서 0.31±0.014 U/ml의 효소 활성을 나타내었다 (표 1-15)

③ amylase

정성적 효소활성: 평판배지(0.5% Bacto Yeast Extract, 0.5% starch, 0.45% (NH₄)₂SO₄, 1.5% Agar 0.01% CaCl₂·2H₂O, 0.01% MgSO₄·7H₂O, 0.01% NaCl, 0.07% KH₂PO₄, 0.001% MnSO₄·4H₂O, 0.001% FeSO₄·7H₂O, pH7.4)에서 4일 배양 후 Lugol Solution Test를 실시 하였고, *Bacillus* sp. SM2에서 가장 큰 환을 나타내었다 (그림 1-29).

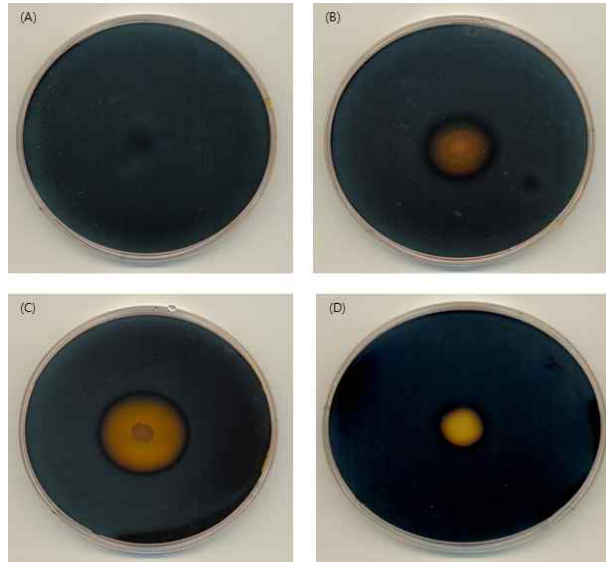


그림 1-29. 각 균주에 대한 정성적 amylase 활성 (A)*Bacillus* sp. T3, (B)*Bacillus* sp. T4, (C)*Bacillus* sp. SM2, (D)*Bacillus* sp. JSP1

정량적 효소활성: Broth 배지(0.5% Bacto Yeast Extract, 0.5% starch, 0.45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% NaCl, 0.07% KH_2PO_4 , 0.001% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH7.4)에서 4일 배양 후, 원심 분리 하여 배양 상층액에서 효소 활성을 측정하였고, *Bacillus* sp. T4, SM2, JSP1 그리고 LX1에서 각각 0.133 ± 0.001 , 0.240 ± 0.002 , 0.116 ± 0.002 , 0.118 ± 0.004 U/ml의 효소 활성을 나타내었다 (표 1-15).

④ α -galactosidase

정량적 효소활성: Broth 배지(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% galactose, pH 7.2)에서 4일 배양 후, 원심 분리 하여 배양 상층액에서 효소 활성을 측정하였고, *Bacillus* sp. JSP1과 LX1에서 0.136 ± 0.001 과 0.215 ± 0.005 U/ml의 효소 활성을 나타내었다 (표 1-15)

⑤ protease

정성적 효소활성: 평판배지(1.0% Skim milk, 0.05% Yeast Extract, 0.45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5% Agar, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% NaCl, 0.07% KH_2PO_4 , 0.001% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH6.5)에서 4일 배양 후 Clearing zone을 확인 하였고, *Bacillus* sp. T3, T4, 그리고 JSP1에서 환을 나타내었다(그림 1-30).

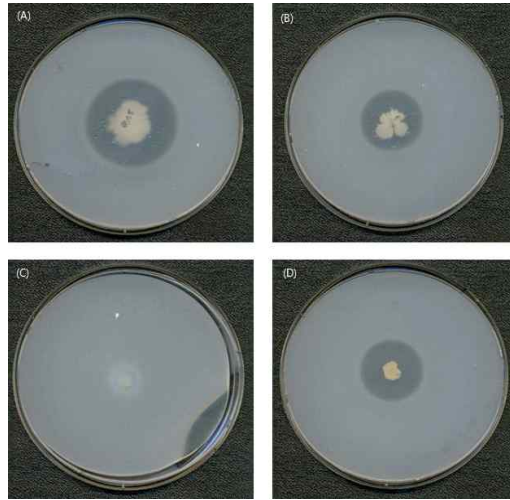


그림 1-30. 각 균주에 대한 정성적 protease 활성 (A)*Bacillus* sp. T3, (B)*Bacillus* sp. T4, (C)*Bacillus* sp. SM2, (D)*Bacillus* sp. JSP1

정량적 효소활성: Broth 배지(1.0% Skim milk, 0.05% Yeast Extract, 0.45% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01% NaCl, 0.07% KH_2PO_4 , 0.001% $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH6.5)에서 4일 배양 후, 원심 분리 후 배양 상층액에서 효소 활성을 측정하였고, *Bacillus* sp. T4, SM2, JSP1 그리고 LX1에서 각각 16.183 ± 0.025 , 1.683 ± 0.059 , 34.556 ± 0.056 , 38.822 ± 0.006 U/ml의 효소 활성을 나타내었다 (표 1-15).

⑥ phytase

정량적 효소활성: Broth 배지(1.0% Wheat bran extract, 0.04% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% KH_2PO_4 , 0.04% K_2HPO_4 , 1.0%, Casein hydrolysate, 0.2% CaCl_2 , pH6.5)에서 4일 배양 후, 원심 분리 하여 배양 상층액에서 효소 활성을 측정하였고, 균주 중 유일하게 *Bacillus* sp. T4에서 0.004 ± 0.00 U/ml의 효소 활성을 나타내었다 (표 1-15).

표 1-15. *Bacillus* 균주에 대한 정량적 세포외 효소 활성

Strains	^a Cel (U/ml)	^b Xyl (U/ml)	^c Amy (U/ml)	^d α -Gal (U/ml)	^e Pro (U/ml)	^f Phy (U/ml)
<i>B. sp</i> T3	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
<i>B. sp</i> T4	N.A	N.A	0.133 ± 0.001	N.A	16.183 ± 0.025	0.004 ± 0.00
<i>B. sp</i> SM2	0.098 ± 0.002	0.31 ± 0.014	0.240 ± 0.002	N.A	1.683 ± 0.059	N.A
<i>B. sp</i> JSP1	N.A	N.A	0.116 ± 0.002	0.136 ± 0.001	34.556 ± 0.056	N.A
<i>B. sp</i> LX1	N.A	N.A	0.118 ± 0.004	0.215 ± 0.005	38.822 ± 0.006	N.A

Data were presented as mean and standard errors from three experiments.

^aCel: cellulase, ^bXyl: xylanase, ^cAmy: amylase, ^d α -Gal: alpha galactosidase, ^ePro: protease, ^fPhy: phytase, N.A: no activity

(라) *In vitro* 항균능력 조사

Agar well diffusion method에 따라 *Bacillus* sp.를 plate에 배양하여 그 후 다양한 indicator strain (*E. coli* K88, *E. coli* O157, *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria*

monocytogens, *Staphylococcus aureus*)을 Top agar로 이용하여 억제환의 크기를 관찰함으로써 항균능력을 평가 하였다(그림 1-31, 표 1-16). 각각의 균주를 실험 해본 결과 항균 능력은 *Bacillus* sp. SM2만 존재 하였으며, 이 균주는 다양한 병원균에 대하여 고르게 항균 능력을 가지는 것으로 조사되었다.

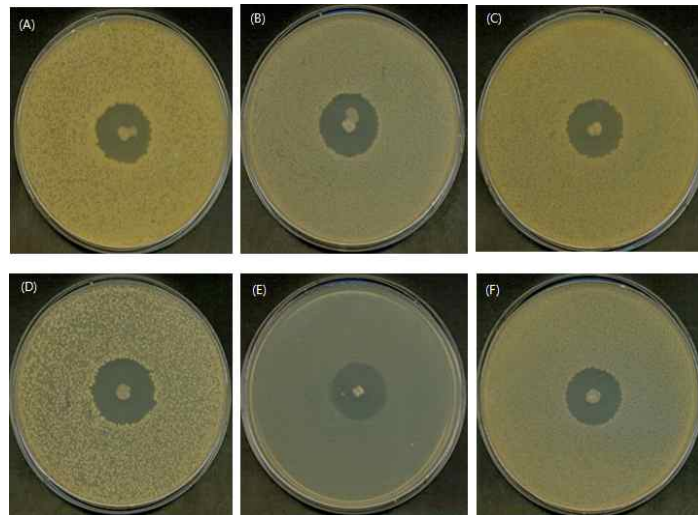


그림 1-31. 다양한 병원균에 대한 *Bacillus* sp. SM2의 항균 능력 (A) *E. coli* K88, (B) *E. coli* O157, (C) *Salmonella enteritidis*, (D) *Enterococcus faecalis*, (E) *Listeria monocytogens*, (F) *Staphylococcus aureus*

표 1-16. 다양한 병원균에 대한 *Bacillus* sp. SM2의 항균 능력

Indicator pathogens	*Inhibition diameter (mm)
<i>E. coli</i> K88	22±1.0
<i>E. coli</i> O157	21±1.8
<i>Salmonella enteritidis</i>	20±1.7
<i>Enterococcus faecalis</i>	21±2.0
<i>Listeria monocytogens</i>	24±1.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	20±2.8

Results were shown as mean and standard errors from three experiments.

(마) 1차선발 균주의 확정

상기 결과에 따라 *Bacillus* 균주 중 *Bacillus* sp. SM2는 우수한 항균능력을 나타냈고, 세포의 cellulase, xylanase, amylase, 및 protease를 생산하며, pH 3에 대한 내산성이 우수하였다. 한편, 남극에서 유래한 균주(*Bacillus* sp. JSP1과 LX1)는 비록 항균 능력은 없지만 내산성과 내담즙성에서 모두 우수했으며, 세포외 amylase, α-galactosidase, 그리고 protease를 생산하였다. 또한 *Bacillus* sp. T4는 다른 균주와 다르게 phytase를 생산하는 특징을 가졌다. 따라서 특정 목적에 따라 *Bacillus* sp. SM2, T4, JSP1 또는 LX1 균주를 상호 혼합한 복합 생균제로서 이용 가능성을 잠재하였다.

(2) 생균제용 미생물 동정 및 발효특성확인 (바실러스)

(가) *Bacillus* 균주 분리 및 동정

생균제용 *Bacillus* sp. 균주로 선발된 *Bacillus* sp. JSP1과 SM2 균주의 동정과 계통적 유연 관계를 조사하기 위하여 16S rRNA gene으로부터 염기서열을 결정하여 계통수를 작성하였으며, 그 결과는 그림 1-32에 나타내었다. 두 균주 모두 NCBI의 BLAST search 결과, *Bacillus* sp. JSP1은 *Bacillus megaterium* IAM 13418 균주와 99.7%, *Bacillus* sp. SM2는 *Bacillus polymyxa* IAM 13419 균주와 99.2% 상동성을 보였고, GenBank database에 *Bacillus* sp. JSP1은 GU014529로, *Bacillus* sp. SM2는 JQ237096으로 등록 하였다.

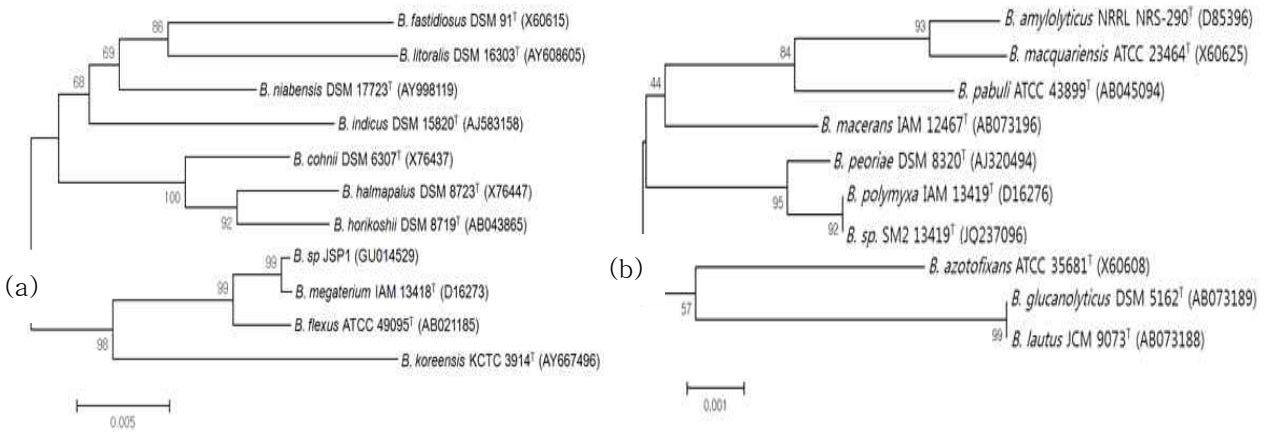


그림 1-32. *Bacillus* sp. JSP1 (a) 과 SM2 (b)의 16S rRNA 염기서열에 의한 계통수. 괄호안에 숫자는 GenBank accession number를 나타낸다. *B.*: *Bacillus* sp.의 약자. 1000회 반복 실시 한 값에 기초하여, 그 중 50% 이상만 표시하였음.

라. 생균제용 미생물 산업적 대량생산 방법과 공정 개발

(1) 생균제 후보균주(유산균)의 산업화배지 개발

생균제로서 선정된 유산균 5균주인 *L. salivarius* Ls21, *L. salivarius* Ls29, *L. salivarius* Ls200, *L. plantarum* LP177, *P. acidilactici* PA175 등의 생리학적, 배양학적 및 항균활성 정도를 고려하여 최종적으로 생균제용 유산균으로 *L. salivarius* Ls29, *P. acidilactici* PA175 및 *L. plantarum* LP177을 선정하였다. MRS배지와 산업용 배지에서 세포 성장에 가장 중요한 요인인 탄소원, 질소원인 molasses, CSL의 최적 농도를 결정하였다. *L. salivarius* Ls29, *P. acidilactici* PA175 및 *L. plantarum* LP177 균주는 6% molasses, 6% CSL, 0.31% yeast extract 및 수종의 무기염들인 0.004% $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.001% Sodium citrate, 0.4% K_2HPO_4 (di basic) 및 0.02% Tween 80의 배지조성이 최적 조건이었다. 본 연구를 통해 도출된 유산균의 산업화배지 연구개발결과는 아래와 같다 (표1-17~22).

표 1-17. 유산균 *L. salivarius* LS29의 molasses 농도에 따른 발효능력

Molasses concentrations (%)	Viable count (log(CFU/ml))	Initial pH	Final pH	Lactic acid (g/L)
0	8.83	6.78	5.88	2.23
2	9.01	6.64	4.10	16.1
4	9.11	6.30	3.91	18.6
6	9.30	6.26	3.90	20
8	9.08	6.18	3.89	17.83
10	9.05	6.17	3.96	16.88
* MRS	9.33	6.40	3.84	21.1

표 1-18. 유산균 *L. salivarius* LS29의 CSL 농도에 따른 발효능력

CSL concentrations (%)	Viable count (log(CFU/ml))	Initial pH	Final pH	Lactic acid (g/L)
0	9.05	6.43	3.77	2.41
2	9.08	7.12	3.81	15.52
4	9.11	6.63	3.80	15.93
6	9.26	6.35	3.93	17.36
8	9.11	6.20	3.87	17.19
10	9.11	6.10	3.86	17.19
* MRS	9.33	6.43	3.84	21.1

표 1-19. 유산균 *P. acidilactici* PA175의 molasses 농도에 따른 발효능력

Molasses concentrations (%)	Viable count (log(CFU/ml))	Initial pH	Final pH	Lactic acid (g/L)
0	9.04	6.23	4.98	1.57
2	9.41	6.35	4.60	4.63
4	9.45	6.17	4.29	10.33
6	9.49	5.83	4.18	13.16
8	9.50	5.91	4.22	13.37
10	9.44	5.70	4.35	14
* MRS	9.61	6.27	4.04	21

표 1-20. 유산균 *P. acidilactici* PA175의 CSL 농도에 따른 발효능력

CSL concentrations (%)	Viable count (log(CFU/ml))	Initial pH	Final pH	Lactic acid (g/L)
0	8.97	6.74	4.56	6.95
2	9.3	6.44	4.29	9.75
4	9.42	6.08	4.19	10.85
6	9.46	5.93	4.26	13.92
8	9.45	5.74	4.30	13.7
10	9.41	5.55	4.34	10.31
* MRS	9.47	6.31	4.18	21.1

표 1-21. 유산균 *L. plantarum* LP177의 molasses 농도에 따른 발효능력

Molasses concentrations (%)	Viable count (log(CFU/ml))	Initial pH	Final pH	Lactic acid (g/L)
0	8.88	6.05	4.50	4.50
2	9.01	6.12	3.76	13.4
4	9.14	5.82	3.83	14.4
6	9.20	5.68	3.78	18.31
8	9.09	5.60	3.80	18.73
10	9.10	5.64	3.86	18.95
* MRS	9.37	6.47	3.70	20.5

표 1-22. 유산균 *L. plantarum* LP177의 CSL 농도에 따른 발효능력

CSL concentrations (%)	Viable count (log(CFU/ml))	Initial pH	Final pH	Lactic acid (g/L)
0	8.81	6.58	3.74	6.03
2	8.94	6.26	3.79	17.52
4	9.11	5.92	3.83	17.7
6	9.27	5.68	3.92	18.1
8	9.14	5.56	3.93	16.6
10	9.10	5.31	3.98	17.1
* MRS	9.37	6.56	4.07	20.5

(2) 생균제 후보균주(유산균)의 고농도 배양

생균제의 대량 배양을 위한 기본적인 배양 조건을 확립하기 위해 초기 pH, total sugar 농도, 젖산생산량 등의 최적 조건을 결정하였다. *L. salivarius* Ls21의 경우, 세포의 성장은 시간이 진행됨에 따라 증가하였다. 배양 6 시간 후에 exponential phase가 시작되었으며 세포의 성장 속도는 급격히 증가하여 배양 11시간 후 세포의 농도는 A_{600} 에서 OD 9.57(MRS배지)와 7.71(산업용배지)을 나타내었다. MRS배지에서 glucose는 24시간 만에 127 g/L을 소비하면서 120 g/L의 젖산이 생성되었다. 산업용 배지에서 배양한 결과 총 당 함량은 24시간 만에 118 g/L을 소비하면서 105 g/L의 젖산이 생성되었다. 5L의 발효조에서 24시간 배양하여 *L. salivarius* Ls29의 경우 배양 24 시간 후 MRS 배지 및 산업용 배지에서 생균수가 각각 2.38×10^9 cells/mL, 2.02×10^9 cells/mL으로 나타났으며, 이와 같은 실험결과는 본 연구목표인 10^9 cells/mL에는 충분히 도달하였으며, MRS 배지에서의 세포 성장 정도와 비교해 볼 때 *L. salivarius* LS29의 경우 84.8% 이다. *P. acidilactici* PA175의 경우, 균이 새로운 배지에 곧바로 적응하여 유도기가 관찰되지 않고 바로 대수증식기로 이행되었다. 세포는 약 12시간에서 OD 10.25(MRS배지), OD 9.36(산업용배지)의 값으로 최대 성장을 나타내었다. 젖산 생성량은 MRS broth의 경우, 배양 24시간에 125 g/L 를 나타냈고, 산업용 배지를 사용하였을 경우 116 g/L를 나타내었다. 5L의 발효조에서 24시간 배양하여 *P. acidilactici* PA175의 경우 배양 24 시간 후 MRS 배지 및 산업용 배지에서 생균수가 각각 6.38×10^9 cells/mL, 4.84×10^9 cells/mL으로 나타났으며, 이와 같은 실험결과는 본 연구목표인 10^9 cells/mL에는 충분히 도달하였으며, MRS 배지에서의 세포 성장 정도와 비교해 볼 때 *P. acidilactici* PA175의 경우 84.8% 이다. *L. plantarum* LP177의 경우, 배양 9시간까지 *L. plantarum* LP177의 성장이 MRS배지에서 산

업용 배지보다 빨랐으며 9시간 이후 유산균의 성장이 정지기에 들어가며 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 세포는 발효 9시간 후 OD 13.54 (MRS배지), OD 12.9 (산업용배지)의 값으로 최대 성장을 나타내었다. 발효기간 24시간까지 MRS배지에서의 젖산 축적량이 최고농도 139.5 g/L에 달하며 산업용 배지에서는 114.3 g/L를 나타내었다. 5L의 발효조에서 24시간 배양하여 *L. plantarum* LP177의 경우 배양 24 시간 후 MRS 배지 및 산업용 배지에서 생균수가 각각 4.64×10^9 cells/mL, 3.1×10^9 cells/mL으로 나타났으며, 이와 같은 실험결과는 본 연구목표인 10^9 cells/mL에는 충분히 도달하였으며, MRS 배지에서의 세포 성장 정도와 비교해 볼 때 *L. plantarum* LP177의 경우 67% 이다. 본 연구를 통해 도출된 유산균의 고농도 배양 연구개발 결과는 아래와 같다 (그림 1-33~35)

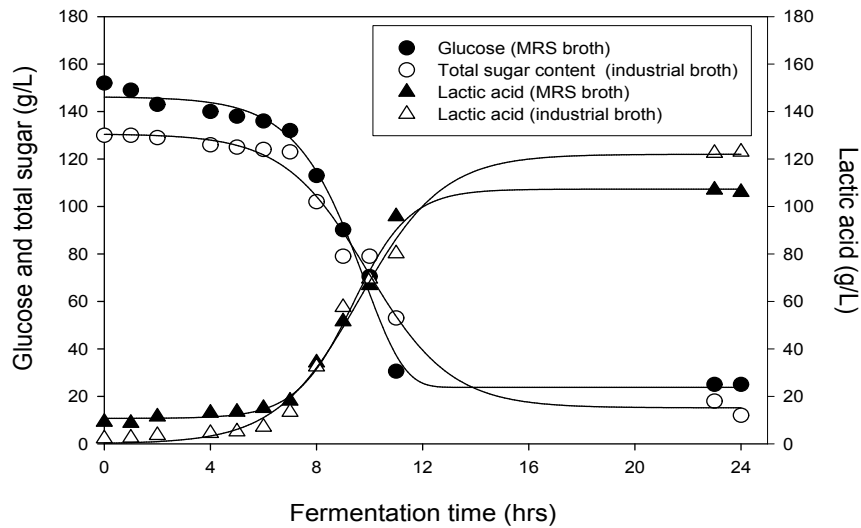


그림 1-33. *L. salivarius* LS29에 대한 MRS배지와 산업용배지에서의 당소모량 및 젖산 생성량 비교

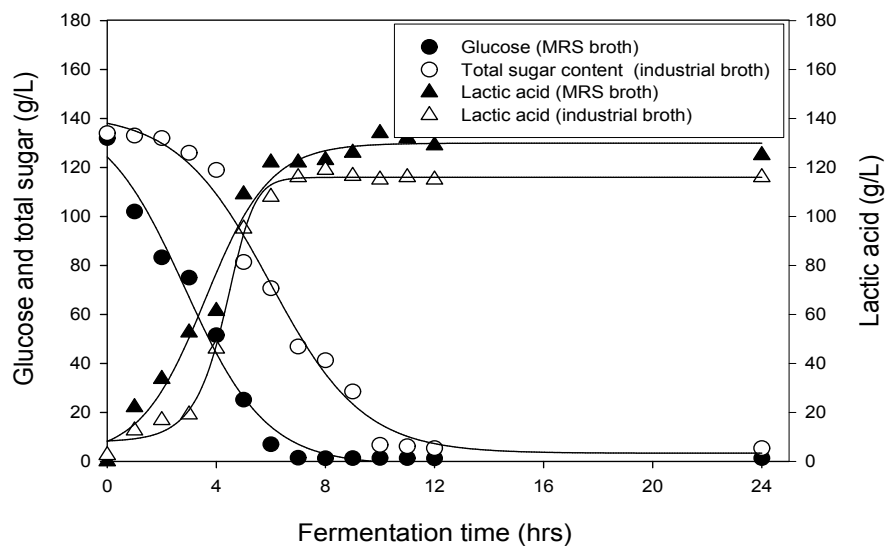


그림 1-34. *P. acidilactici* PA175에 대한 MRS배지와 산업용배지에서의 당소모량 및 젖산 생성량 비교

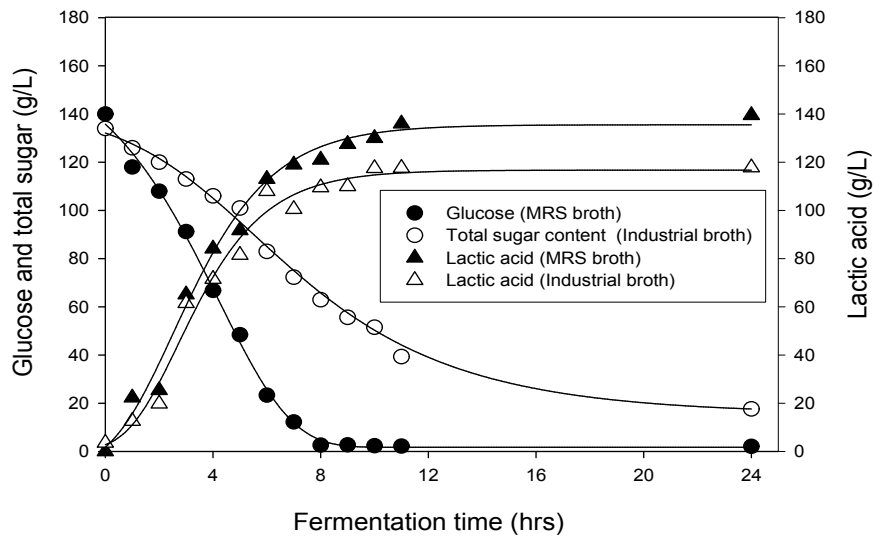


그림 1-35. *L. plantarum* LP177에 대한 MRS배지와 산업용배지에서의 당소모량 및 젖산 생성량 비교

(3) 생균체 후보균주(유산균)의 산업화배지 개발 및 고농도 배양 요약

본 실험에서는 프로바이오틱 생균인 유산균의 최적 산업용 배지를 탐색을 위해 탄소원, 질소원 최적 농도를 검토하였다. 250 mL baffle flask에서 배양을 실시한 결과, 탄소원 영양 실험에서는 molasses 6% (w/v)가 첨가되었을 때 최대 총균수를 보였다. 질소원 영양 실험에서는 CSL 6%(w/v)가 첨가되었을 때 최대 총균수를 나타내었다. 5 L 발효조에서 최적 산업용 배지를 이용하여 37°C의 온도에서 교반속도 150 rpm, pH 5.5±0.2로 맞추어 회분식 배양을 실시한 결과 최대 총균수는 *L. salivarius* LS29 (2.02×10^9 cells/mL), *P. acidilactici* PA175(4.84×10^9 cells/mL)와 *L. plantarum* LP177(3.1×10^9 cells/mL)을 나타내었다. 유산균의 배양 상층액 내에는 lactic acid와 같은 유기산이 존재하였고, 배양 중에 lactic acid 생성이 크게 증가하는 것으로 확인되었다. MRS배지와 산업용 배지에서 생산되는 균체와 당 소모량 및 젖산 생성량 정도를 비교해 볼 때 산업용 배지가 MRS 배지의 약 65~85% 수준이다. 따라서 3차년도 연구에서는 유용 프로바이오틱 생균체의 효율적인 생산을 위해 3가지 유산균을 혼합 배양하여 생육이 우수하고 유기산생성 최적조건을 얻기 위해 3가지 유산균의 접종비율을 조절하여, 발효 중 각종 균주의 상호작용에 대한 지속적인 연구를 수행하였다.

(4) 혼합 배양된 유산균 및 이의 제조방법_3차년도

본 연구는 3가지 유산균 (*L. salivarius* Ls29, *P. acidilactici* PA175 및 *L. plantarum* LP177)의 단독배양과 혼합배양을 통해 유산균들의 성장, lactic acid(유산) 생산성 및 아미노산 분비능력 등을 살펴보았다. 먼저 단독배양시, 3가지 유산균 중 *L. salivarius* Ls29이 성장력, 유산생산에 있어 가장 우수하였으며 *P. acidilactici* PA175이 아미노산 분비에 있어 가장 우수하였으며, *L. plantarum* LP177이 가장 저조하였다. *L. salivarius* Ls29은 성장을 위해 필수아미노산을 필요로 하는데, 이 중 일부 아미노산은 *P. acidilactici* PA175의 성장을 통해 분비되는 아미노산이었다. 따라서 적당한 균농도에서 위의 두 가지 균주를 혼합배양했을 경우, 각각의 균주를 단독배양했을 때보다 더 효율적인 성장력, 유산생산능력을 보였다.

(가) 균주 및 성장조건

3가지 유산균들은 포도당(glucose)이 첨가된 MRS 배지에서 37°C, 32시간 동안 혐기적 조건에서 배양되었다. 순수 또는 혼합배양 실험은 100 ml의 MRS배지를 포함한 500 ml 삼각 플라스크에서 수행되었다. (150 rpm, pH6.5, 37°C). 각 균주들의 최종 접종 농도는 1 ml이었다. 특히, 혼합배양일 경우에는 다른 접종 비율(1:1, 2:1, 5:1, 9:1; *L. salivarius* Ls29와 *P. acidilactici* PA175의 OD600 비율로 정해짐)로 혼합하였다. 별도의 설명이 없는 경우, 각각의 실험은 세 번씩 반복되었다.

(나) 분석방법

유리 아미노산들은 지정된 시간구간에서 배양 상층액을 채취하여 정량되었다. 배양샘플들은 membrane (막) (045 μm, GD; Millipore, (Bedford, U.S.A])에 의해 여과되었고, 6 M HCl에 의해 가수분해되었다 (진공상태의 110°C에서 24시간 동안 반응). 그 다음 Hitach model L8800A automated amino acid analyzer (Hitachi, Japan) 장비를 이용하여 아미노산의 정량을 실시하였다. 균들의 생장은 spectrophotometer (분광광도계)를 이용하여 측정하였다(600 nm). Fermentation broth(발효액체산물)는 원심분리 (20,000 X g, 10분)를 통해, 상층액을 수집한 후 유산과 포도당(glucose)의 농도를 refractive index detector가 장착된 HPLC를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Aminex HPX-87H(Bio-Rad Co., USA)이었고, 크로마토그래피는 40°C에서 용리제인 0.01N H₂SO₄를 사용하여 수행되었다. Flow rate (흐름속도)는 0.6 ml/min 이었다.

(다) 단독배양을 통해 플라스크 발효 수행

먼저 각 균주의 순수배양을 통해 32시간 동안 발효를 수행하였다. 8시간 이후 *L. salivarius* Ls29가 배양기간 동안 가장 높은 culture turbidity (배양 혼탁도)를 보였다(그림 1-36). 단백질 가수분해를 통한 아미노산 및 펩타이드 생성이 균 성장에 있어서 매우 훌륭한 영양 공급원이기 때문에, 테스트된 균주 중 *L. salivarius* Ls29 균주가 가장 높은 proteolytic (단백질 가수분해) 활성을 나타내었다. 즉, 상기 *L. salivarius* Ls29 균주는 성장률이 다른 균주에 비하여 매우 높은 것을 알 수 있다.

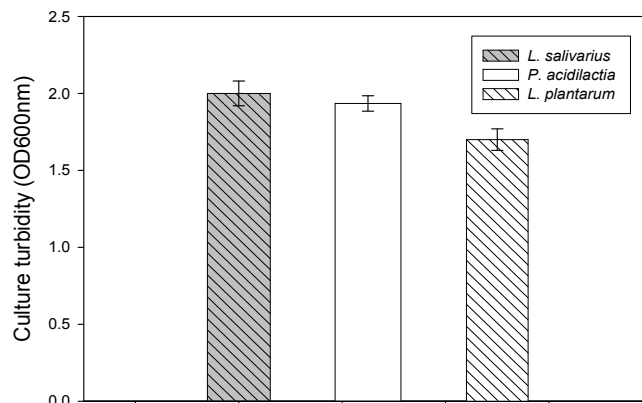


그림 1-36. 단독배양 유산균주들의 세포성장

유산생산 관점에서 볼 때(그림 1-37), *L. salivarius* Ls29가 배양기간(8시간 배양 후) 동안 최대 유산량을 보였으며, 반면에 *P. acidilactici* PA175 및 *L. plantarum* LP177 균주는 이보다 적었다.

(라) 유산균의 단독 배양시 유리 아미노산들의 변화

3가지 균주들의 8시간 배양시간에 따른 배지내의 아미노산들의 변화를 보여주고 있다(표 1-23). *L. salivarius* Ls29는 asparagine, aspartic acid, citrulline, cysteine, glutamic acid, histidine, lysine, ornithine, phenylalanine, proline, tyrosine, arginine, isoleucine, leucine, methionine, serine, threonine, tryptophan, valine 등은 8시간 배양이 이루어지는 동안 배지 내의 아미노산들의 양이 줄어들었다. 특히, 감소한 양으로 견주어볼 때, 이 균주에 있어서 필수 아미노산임을 확인하였다.

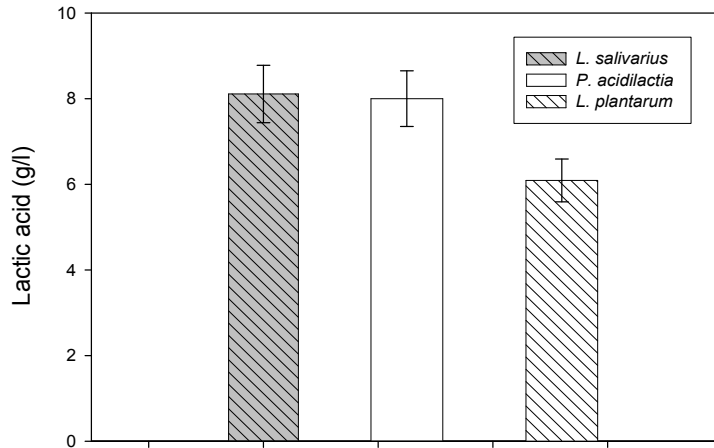


그림 1-37. 단독배양 유산균주들의 유산 생산량 변화

P. acidilactici PA175 균주는 alanine, asparagine, glutamic acid, histidine, lysine, ornithine, phenylalanine, proline, tyrosine, arginine, isoleucine, leucine, methionine, serine, threonine, tryptophan, valine을 배지 내로 테스트된 균주들 중 가장 많이 분비하였다.

L. plantarum LP177는 alanine, asparagine, aspartic acid, citrulline, cysteine, glutamic acid, glycine, histidine, lysine, phenylalanine, proline, tyrosine, arginine, isoleucine, leucine, methionine, serine, threonine, tryptophan, valine 등은 8시간 배양이 이루어지는 동안 배지 내의 아미노산들의 양이 줄어들었다. 특히, 감소한 양으로 견주어볼 때, 이 균주에 있어서 필수 아미노산임을 확인하였다.

표 1-23. 유산균들의 단독배양시 유리아미노산들의 변화 측정값 (8시간)

Amino acids Concentration (mg/l)	<i>L. salivarius</i>		<i>P. acidilactici</i>		<i>L. plantarum</i>	
	0 h	8 h	0 h	8 h	0 h	8 h
Alanine	200 ± 4	215 ± 4.3	200 ± 4	254 ± 5.1	200 ± 4	60.8 ± 1.2
Asparagine	55 ± 0.6	25.3 ± 0.3	55.2 ± 0.6	55.8 ± 0.6	55 ± 0.6	7.8 ± 0.1
Aspartic acid	124.3 ± 1	64.7 ± 0.6	124 ± 1.2	124 ± 1.2	124 ± 1.2	25.7 ± 0.3
Citrulline	45.4 ± 0.5	22.2 ± 0.2	46.4 ± 0.5	21.8 ± 0.2	46 ± 0.5	6.08 ± 0.1
Cysteine	7.48	5.23	7.48	5.73	7.48	0.53
Glutamic acid	428 ± 8.6	358 ± 7.2	428 ± 8.6	565 ± 11	428 ± 8.6	102 ± 2
Glycine	115 ± 2.3	140.7 ± 3	114 ± 2.3	40.6 ± 0.8	119 ± 2.4	38 ± 0.76
Histidine	24.5 ± 0.2	18.6 ± 0.2	23.2 ± 0.2	30.4 ± 0.3	27.9 ± 0.3	6.4 ± 0.1

Lysine	149	124	149	219	149	3.3
Ornithine	5.76 ± 0.1	5.5 ± 0.1	5.53 ± 0.1	6.1 ± 0.1	5.9 ± 0.1	21.6 ± 0.2
Phenylalanine	120.4 ± 2	82 ± 1.6	120 ± 2	144.5 ± 3	120 ± 2	11.4 ± 0.3
Proline	89.2 ± 0.9	80.6 ± 0.8	89.2 ± 0.9	121 ± 1.2	89 ± 0.9	26.4 ± 0.3
Tyrosine	59 ± 1.2	40.7 ± 0.8	59 ± 1.2	67.3 ± 1.3	59 ± 1.2	8.14 ± 0.2
Arginine	272 ± 2.7	77 ± 0.8	272 ± 2.7	427 ± 4.3	272 ± 2.7	72.1 ± 0.7
Isoleucine	104.3 ± 2	77 ± 1.5	104 ± 2.1	142 ± 2.8	105 ± 2.1	26.7 ± 0.5
Leucine	224.8 ± 4	143.6 ± 3	225 ± 5	278 ± 5	224 ± 4	52 ± 1
Methionine	49.4 ± 1	18.6 ± 0.4	50 ± 1	64.7 ± 1.3	52 ± 1	17.8 ± 0.4
Serine	109.6 ± 2	91.1 ± 1.8	109 ± 2.2	135 ± 2.7	110 ± 2.2	28.1 ± 0.6
Threonine	87.9 ± 1.8	66.7 ± 1.3	88 ± 1.8	113.5 ± 2	88 ± 1.8	22.2 ± 0.4
Tryptophan	26.8	14.4	27	43	26	6.6
Valine	155 ± 3.1	126.8 ± 3	153 ± 3	217 ± 4	155 ± 3	40.1 ± 0.8

(마) 공생의 혼합배양을 통해 발효 수행

본 실험에서는 비교적 성장 및 유산 생산이 우수하며 아미노산 분비에 있어서 큰 차이를 보이는 *L. salivarius* Ls29와 *P. acidilactici* PA175 균주의 혼합배양을 시도하였다. *L. salivarius* Ls29는 *P. acidilactici* PA175 균주 보다 높은 성장계수를 보였고, *L. salivarius* Ls29 균주에 의해 소비되는 아미노산들을 *P. acidilactici* PA175 균주에 의해 능률적으로 생산할 수 있음을 보였다. 따라서, 혼합배양시 단백질 가수분해 시스템의 촉진이 *L. salivarius* Ls29과 *P. acidilactici* PA175 균주의 성장에 꼭 필요한 필수 아미노산들의 분비를 증가시키고, 이로 인해 두 균주의 성장을 증가시키는 것이라 예상하였다. 단백질 가수분해 효율의 차이점과 한 균주의 다른 균주에 대한 우성 가능성에 기인하여, 혼합 비율은 단독배양 실험결과에 의해 조절되었다. *P. acidilactici* PA175 균주는 일정한 접종 양으로 고정된 상태에서 *L. salivarius* Ls29 균주를 달리하여 혼합 접종(1:1, 2:1, 5:1 및 9:1, *L. salivarius* Ls29와 *P. acidilactici* PA175의 OD600 비율)하였다. 그림 1-38, 39에서 보듯이 *L. salivarius* Ls29와 *P. acidilactici* PA175 균주의 혼합배양(2:1)시 가장 높은 성장률과 유산생산 능력을 보였다(8시간 배양). 혼합배양시 관찰되는 더 높은 성장률과 단백질 가수분해 그리고 아미노산 분비는 증가된 단백질 가수분해 효율과 연관되었다. *L. salivarius* Ls29 균주가 proteolytic 균주이고, 그에 따른 단백질 가수분해 산물이 혼합배양시 두 균주에 의해 사용되었다. 따라서 non-proteolytic 균주인 *P. acidilactici* PA175 균주가 *L. salivarius* Ls29 균주의 존재로 인해 생장이 촉진되었다는 추론을 낼 수 있다.

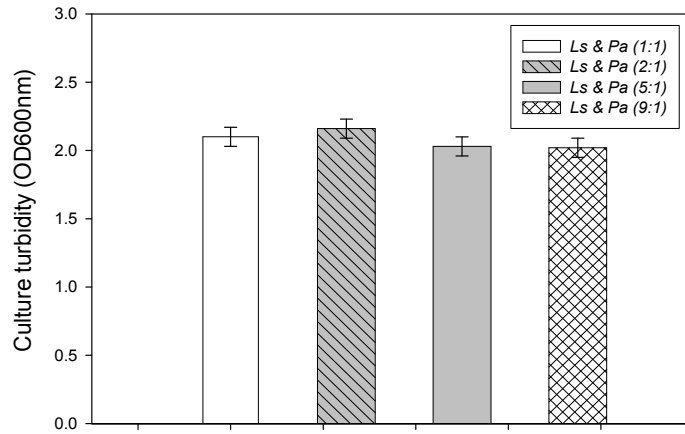


그림 1-38. 여러 비율의 혼합 배양시 유산균주들의 세포성장

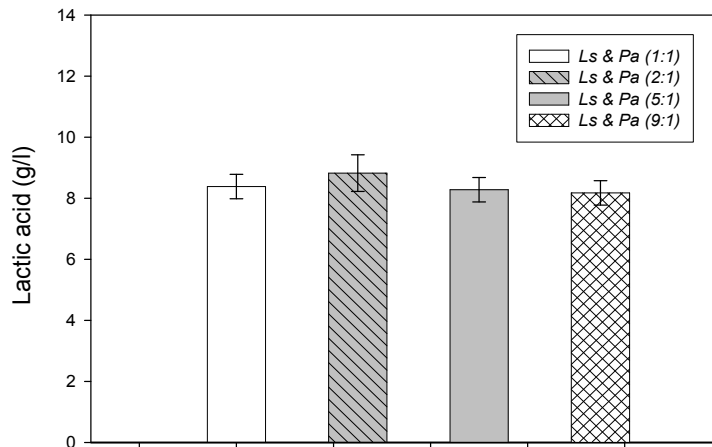


그림 1-39. 여러 비율의 혼합 배양시 유산균주들의 유산 생산량 변화

(바) 공생의 혼합배양에 의한 유산균들의 배양시 유리아미노산들의 변화

표 1-24는 두 가지 균주(*L. salivarius* Ls29는 *P. acidilactici* PA175)들의 여러 가지 혼합비율에 의한 배양시간에 따른 배지 내 아미노산들의 변화를 보여주고 있다. 불필요한 아미노산들 [alanine, glutamic acid, glycine, histidine, lysine, ornithine, phenylalanine, proline, tyrosine, isoleucine, leucine, methionine, serine, threonine, tryptophan, valine]을 배지 내로 많이 분비하였다. 반면, asparagine, aspartic acid, citrulline, cysteine, arginine]등은 8시간 배양이 이루어지는 동안 소비하였다. 상기에 소비된 아미노산들은 혼합균주의 생장에 있어 필수 아미노산이다. 전체적으로 아미노산들의 양은 혼합 비율 5:1까지 증가하였다가 더 높은 혼합 비율(9:1)에서는 감소하였다.

표 1-24. 유산균들의 혼합배양시 유리아미노산들의 변화 측정값 (8시간)

Amino acids Concentration (mg/l)	Ls & Pa (1:1)		Ls & Pa (2:1)		Ls & Pa (5:1)		Ls & Pa (9:1)	
	0 h	8 h	0 h	8 h	0 h	8 h	0 h	8 h
Alanine	200 ± 6	156 ± 5	200 ± 6	232 ± 7	200 ± 6	350 ± 9	200 ± 6	306 ± 9
Asparagine	55 ± 1.7	20.5 ± 1	55 ± 2	29 ± 1	55 ± 2	44.5 ± 1	55 ± 2	33 ± 1
Aspartic acid	124 ± 2	49.8 ± 1	124 ± 2	73 ± 1	124 ± 2	114 ± 2	124 ± 2	95.7 ± 2
Citrulline	45.4	21.2	45.4	18.2	45.4	32.6	45.4	3.12
Cysteine	8 ± 0.1	1.78	8 ± 0.1	4.04	8 ± 0.1	6 ± 0.1	8 ± 0.1	5 ± 0.1
Glutamic acid	428 ± 8	257 ± 7	428 ± 8	388 ± 9	428 ± 8	620 ± 9	428 ± 8	505 ± 9
Glycine	115 ± 2	36.8 ± 1	115 ± 2	173 ± 3	115 ± 2	257 ± 5	115 ± 2	230 ± 4
Histidine	25 ± 0.5	16 ± 0.3	25 ± 0.5	26 ± 1	25 ± 0.5	45 ± 1	25 ± 0.5	33 ± 1
Lysine	149	94	149	129	149	241	149	187.7
Ornithine	5.8 ± 0.1	73 ± 0.7	5.8 ± 0.1	115 ± 1	5.8 ± 0.1	151 ± 2	5.8 ± 0.1	79 ± 0.8
Phenylalanine	120 ± 3	39 ± 1.2	120 ± 3	68 ± 2	120 ± 3	127 ± 4	120 ± 3	113 ± 3
Proline	89 ± 0.9	63 ± 1.3	89 ± 0.9	88 ± 1.8	89 ± 0.9	134 ± 3	89 ± 0.9	120 ± 2
Tyrosine	59 ± 0.6	26 ± 0.3	59 ± 0.6	41 ± 0.4	59 ± 0.6	77 ± 0.8	59 ± 0.6	63 ± 0.6
Arginine	272 ± 3	154 ± 1	272 ± 3	268 ± 2	272 ± 3	193 ± 2	272 ± 3	222 ± 2
Isoleucine	104 ± 1	61.3	104 ± 1	87.3	104 ± 1	143 ± 1	104 ± 1	117 ± 1
Leucine	225 ± 4	112 ± 2	225 ± 4	160 ± 3	225 ± 4	258 ± 5	225 ± 4	217 ± 4
Methionine	49.4 ± 1	20 ± 0.4	49.4 ± 1	21 ± 0.4	49.4 ± 1	17 ± 0.3	49.4 ± 1	668 ± 9
Serine	110 ± 3	65 ± 2	110 ± 3	98 ± 3	110 ± 3	152 ± 4	110 ± 3	131 ± 4
Threonine	88 ± 0.9	53 ± 0.5	88 ± 0.9	76 ± 0.8	88 ± 0.9	141 ± 1	88 ± 0.9	125 ± 1
Tryptophan	27 ± 0.5	8.5 ± 0.2	27 ± 0.5	20 ± 0.4	27 ± 0.5	43 ± 0.9	27 ± 0.5	20 ± 0.4
Valine	155 ± 3	102 ± 2	155 ± 3	135 ± 3	155 ± 3	190 ± 4	155 ± 3	190 ± 4

(5) 생균제 후보균주(바실러스)의 고농도 배양

본 연구에서는 동물사료용 활성바실러스를 생산하기 위하여 *Bacillus subtilis* T4를 사용하였다. 바실러스 생산 최적 배지로는 [CaCo3 1g, MgSO4·7H2O 0.3g, FeSO4·7H2O 0.02g, ZnSO4·7H2O 0.02g, Yeast Extract 2g, Peptone 2g, Cottenseed flour 20g, Glucose 15g]에서 배양하였다. 생균제 생산을 위해 *Bacillus* sp. JSP1을 5 L 발효조에서 최적 배지(pH 7.0)에 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 종 배양(seed culture)하였다. 배양된 균주는 최적 배지에 1.0%(v/v)되게 접종하고, 30°C에서 200 rpm으로 32시간 동안 진탕 배양하였다(그림 1-40). 배양시간에 따른 *Bacillus* sp. JSP1의 성장 확인을 위해 진탕 배양한 배양액을 일정한 시간 간격으로 일정량 취하고 분광 광도계를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. pH는 접종 후 32시간 이내에 중성에서 약 알카리(pH 7.8)로 점차 상승하였다. 한편 *Bacillus* sp. JSP1의 생육을 조사한 결과 BSM-4 배지에서 생육이 좋았으며 12시간 이후 정지기에 도달하였다.

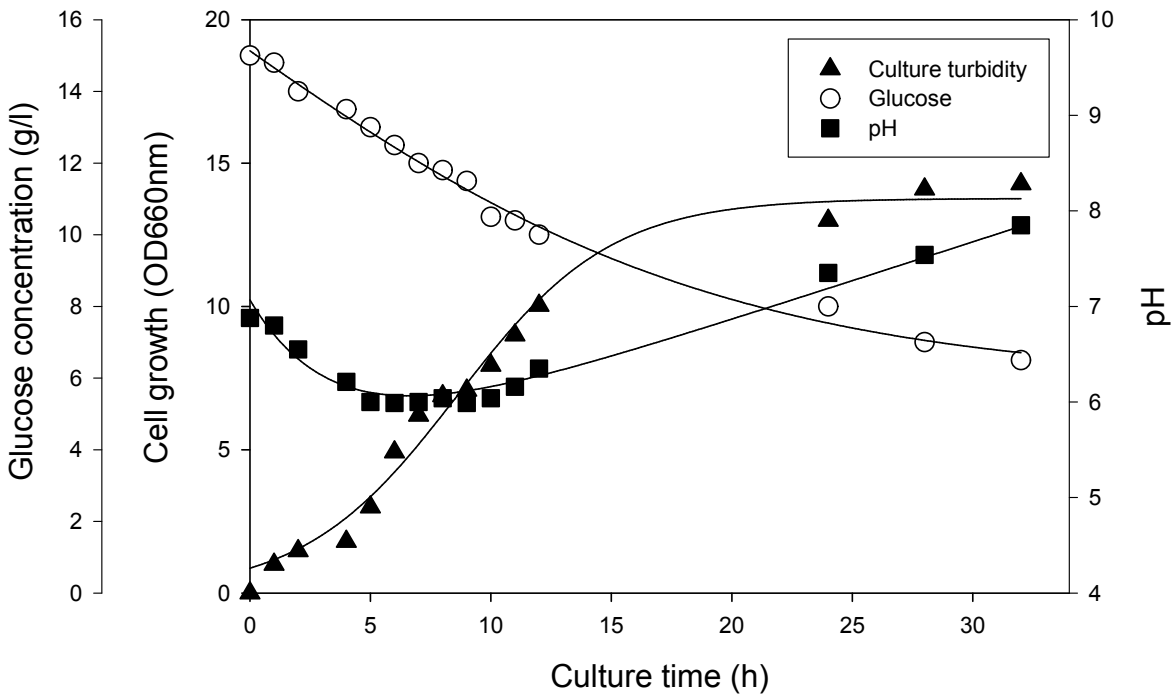


그림 1-40. *Bacillus subtilis* T4의 생육 특성

(6) 생균제 후보균주(효모)의 고농도 배양

본 연구에서는 동물사료용 활성효모를 생산하기 위하여 *Saccharomyces boulardii* 796을 사용하였다. 효모 생산 최적 배지로는 YPD 배지[peptone 20 g, yeast extract 10 g, glucose 20 g]에서 배양하였다. 생균제 생산을 위해 *Saccharomyces boulardii* 796을 YPD 50 ml가 함유된 250 ml 용량의 삼각플라스크에서부터 클로니를 백금으로 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 16시간 동안 종 배양(seed culture)하였다. 배양된 균주는 5 L 발효조 최적배지에 1.0%(v/v)되게 접종하고, 30°C에서 200 rpm으로 32시간 동안 진탕 배양하였다(그림 1-41). 배양시간에 따른 *Saccharomyces boulardii* 796의 성장 확인을 위해 진탕 배양한 배양액을 일정한 시간 간격으로 일정량 취하고 분광 광도계를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. pH의 변화는

배양 후 점점 낮아져 배양 12시간 후 거의 pH 6.0 내외로 저하되었으나 배양 32시간 후 거의 pH 7로 나타났다. 한편 *Saccharomyces boulardii* 796의 생육을 조사한 결과 YPD 배지에서 생육이 좋았으며 12시간 이후 정지기에 도달하였다.

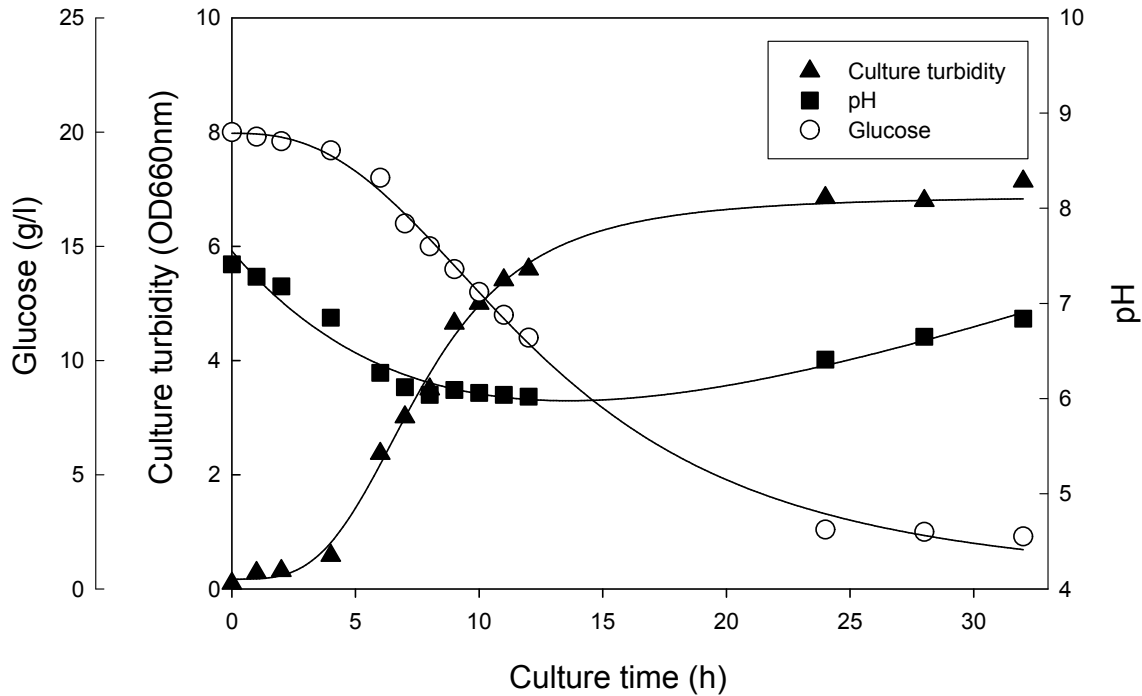


그림 1-41. *Saccharomyces boulardii* 796의 생육 특성

(7) 농부산물을 이용한 *Bacillus* sp. JSP1 효소(amylase 및 protease) 생산 최적 고체 발효배지 조성

(가) 농부산물을 이용한 *Bacillus* sp. JSP1 protease 생산 최적 고체 발효 배지 조성

① *Bacillus* sp. JSP1의 protease 생산 최적 고체 발효 배지 선별

농업 원료 중 *Bacillus* sp. JSP1 protease 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 소맥피, 대두박, 옥수수를 고체 기질로 이용하여 *Bacillus* sp. JSP1에 대한 protease 생산을 표 1-25에 나타내었다. 모든 고체 기질에서 protease가 생산 되었으며, 농업원료 중 옥수수를 이용한 고체 발효에서 2697±316 U/g으로 가장 높았다. 전체적으로는 옥수수과 영양적 성분을 혼합한 것에서 3197±94 U/g으로 가장 높았으나, 배지 조제의 편의성의 목적으로 옥수수 고체 배지를 선별 하였다.

표 1-25. 고체 기질에 대한 *Bacillus* sp. JSP1의 protease 생산

Solid substrate	Enzyme activity (U/g) ^b
wheat bran	1490±197
soybean meal	1945±221
corn flour	2697±316
wheat bran + nutritive components ^a	1164±195
soybean meal + nutritive components	2075±258
corn flour + nutritive components	3197±94

^a nutritive components는 yeast extract 5 g/l, CaCl₂·2H₂O 0.1 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/l, NaCl 0.1 g/l, KH₂PO₄ 0.7 g/l, MnSO₄·4H₂O 0.01 g/l, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/l로 구성되었다. ^b U/g은 고체 배양 기질 중량(g) 당 Unit를 나타낸다. 고체 발효는 수분 함량 50%에서 액체 종균을 4% 접종하여, 28℃, 220 rpm에서 총 4일 간 배양 하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차(standard error) 값으로 표시하였다. 별 다른 설명이 없는 한 protease 활성 측정은 50 mM Na-phosphate buffer (pH 6.0) 360 μl, 3% Azocasein 140 μl 및 조효소액 200 μl로 구성된 반응액을 30℃ 항온수조에서 적절히 배양한 후 10% TCA 700 μl를 넣고 원심분리(12000 rpm, 5 분)하여 얻어진 상층액을 366 nm에서 흡광도 측정하였으며, azocasein 분해능력이 시간당 O.D.(366nm) 0.001 증가 시킴을 1 Unit로 정의하였다.

② 고체 발효를 이용한 *Bacillus* sp. JSP1의 protease 생산에 대한 수분함량의 영향

옥수수를 선택한 고체 발효 배지에서 수분 함량을 33.3%~80%까지 변화시켜 protease 생산을 그림 1-42에 나타내었다. 수분 함량은 33.3%에서 증가하기 시작하여, 수분 66.7%에서 최대 protease 생산을 나타내었고 그 후에는 점차 감소하였다.

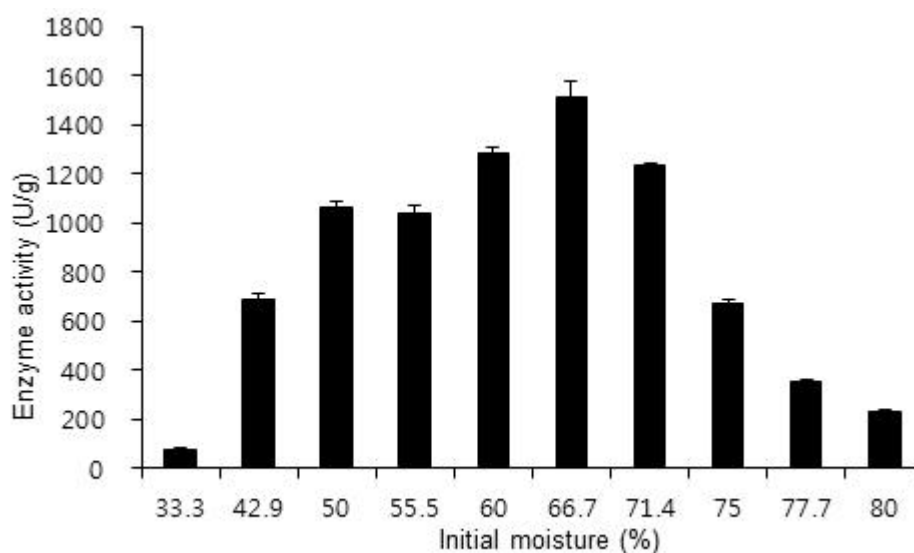


그림 1-42. 고체 발효 배양시 수분함량이 *Bacillus* sp. JSP1의 protease 생산에 미치는 영향. 고체 발효는 옥수수를 기초하여 각각의 수분함량에서 액체 종균을 4% 접종하여, 28℃, 220 rpm에서 총 4일 간 배양 하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다.

③ 배양 시간에 따른 *Bacillus* sp. JSP1의 protease 생산

전체 수분 함량 66.7%인 옥수수 고체 발효 배지를 조제하여 시간에 따른 *Bacillus* sp. JSP1에 대한 protease 생산을 조사하여 그림 1-43에 나타내었다. Protease는 24 시간까지는 매우

약하게 생산 되었으나, 그 후 다량 생산되어 약 72시간에 18480 ± 235 U/g으로 최대 생산을 보였고 72시간 이후에는 점점 감소함을 알 수 있었다.

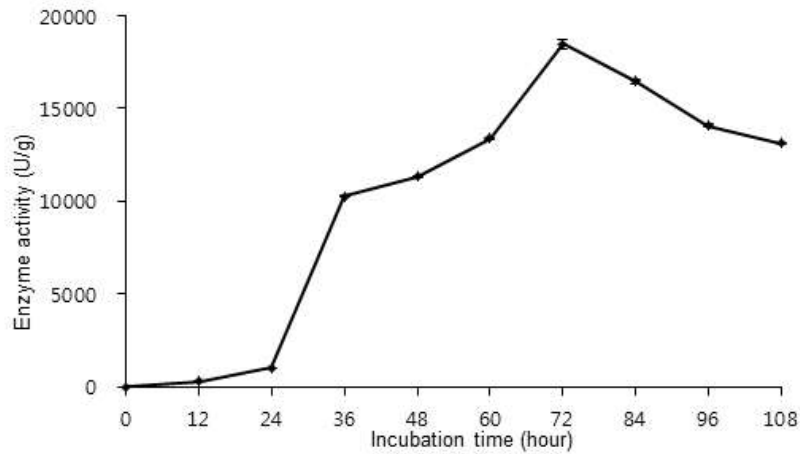


그림 1-43. 고체 발효 배양 시, 시간에 따른 *Bacillus* sp. JSP1의 protease 생산. 고체 발효는 옥수수를 기초하여 66.7% 수분함량에서 액체 종균을 4% 접종하여, 28°C, 220 rpm에서 총 5일간 배양하며, 적절한 시간 때 마다 효소 생산을 분석하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다.

④ *Bacillus* sp. JSP1의 protease 생산에 대한 탄소원 첨가의 영향

Bacillus sp. JSP1의 protease 생산에 대한 탄소원 첨가의 영향을 조사하기 위하여, 탄소원으로 sucrose, glucose, fructose, galactose, lactose, xylose, maltose을 첨가하여 3일간 배양 후, protease 생산을 확인하여 그림 1-44에 나타내었다. protease 생산은 대조구와 비교하여 sucrose, glucose 그리고 galactose을 첨가 하였을 때 증가 되었고, 그 중 galactose 첨가시 19565 ± 213 U/g 로써 가장 높은 값을 나타내었다.

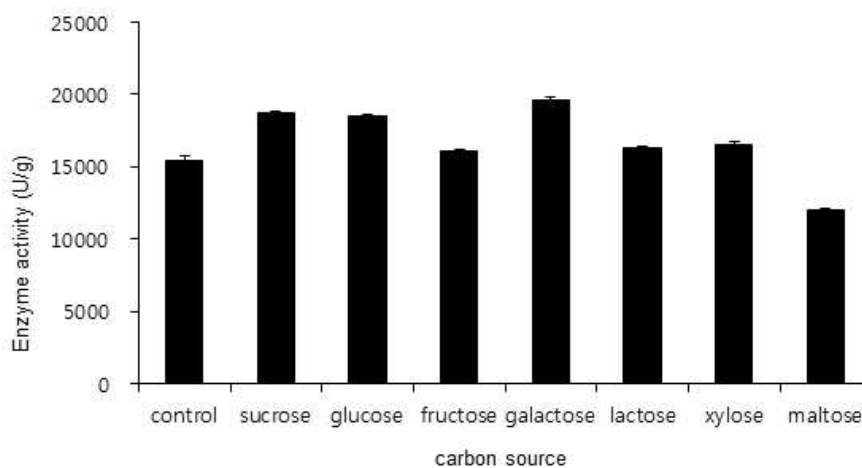


그림 1-44. 고체 발효시, *Bacillus* sp. JSP1의 protease 생산에 대한 탄소원 첨가의 영향. 고체 발효는 66.7% 수분함량에서 액체 종균을 4% 접종하였고, 28°C, 220 rpm에서 총 3일 간 배양하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다. 전체 수분 함량 66.7%인 옥수수 고체 발효 배지에 탄소원으로 기질 중량(g) 당 1% 씩 sucrose, glucose,

fructose, galactose, lactose, xylose, maltose을 각각 첨가하였다. 탄소원이 없는 것을 대조구(control)로 이용하였다.

⑤ *Bacillus* sp. JSP1의 protease 생산에 대한 질소원 첨가의 영향

Bacillus sp. JSP1의 protease 생산에 대한 질소원 첨가의 영향을 조사하기 위하여, 질소원으로 casein hydrolysate, peptone, tryptone, yeast extract, urea, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 을 첨가하여 3일간 배양 후, protease 생산을 확인하여 그림 1-45에 나타내었다. protease 생산은 대조구와 비교하여 casein hydrolysate, yeast extract 그리고 NaNO_3 을 첨가 하였을 때 증가 되었고, 그 중 NaNO_3 첨가시 30730 ± 126 U/g 로써 가장 높은 값을 나타내었다.

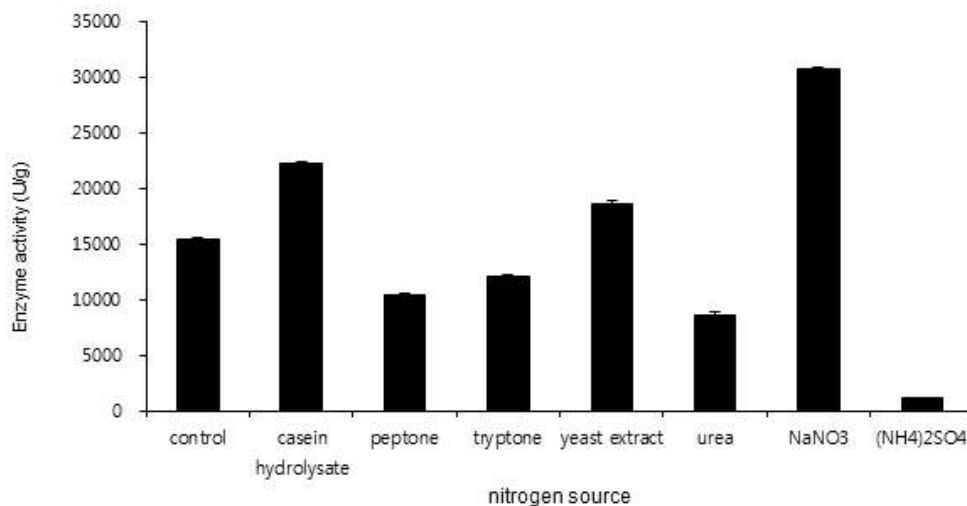


그림 1-45. 고체 발효시, *Bacillus* sp. JSP1의 protease 생산에 대한 질소원 첨가의 영향. 고체 발효는 66.7% 수분함량에서 액체 중균을 4% 접종하였고, 28°C, 220 rpm에서 총 3일 간 배양 하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다. 전체 수분 함량 66.7%인 옥수수 고체 발효 배지에 질소원으로 기질 중량(g) 당 1% 씩 casein hydrolysate, peptone, tryptone, yeast extract, urea, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 을 각각 첨가하였다. 질소원이 없는 것을 대조구(control)로 이용하였다.

따라서 결과적으로 *Bacillus* sp. JSP1은 전체 수분 66.7% 옥수수 기질로 3일간 고체 발효시 가장 높은 protease 생성을 나타내었다.

(나) 농부산물을 이용한 *Bacillus* sp. JSP1 amylase 생산 최적 고체 발효 배지 조성

① *Bacillus* sp. JSP1의 amylase 생산 최적 고체 발효 배지 선별

농업 원료중 *Bacillus* sp. JSP1 amylase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 소맥피, 대두박, 옥수수를 고체 기질로 이용하여 *Bacillus* sp. JSP1에 대한 amylase 생산을 표 1-26에 나타내었다. 모든 고체 기질에서 amylase가 생산 되었으며, 농업원료 중 대두박을 이용한 고체 발효에서 31759 ± 1091 U/g으로 가장 높았다.

표 1-26. 고체 기질에 대한 *Bacillus* sp. JSP1의 amylase 생산

Solid substrate	Enzyme activity (U/g) ^b
wheat bran	843±63
soybean meal	31759±1091
corn flour	737±135
wheat bran + nutritive components ^a	13058±2481
soybean meal + nutritive components	29939±558
corn flour + nutritive components	809±47

^a nutritive components는 yeast extract 5 g/l, CaCl₂·2H₂O 0.1 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/l, NaCl 0.1 g/l, KH₂PO₄ 0.7 g/l, MnSO₄·4H₂O 0.01 g/l, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/l로 구성되었다. ^b U/g은 고체 배양 기질 중량(g) 당 Unit를 나타낸다. 고체 발효는 수분 함량 50%에서 액체 중균을 4% 접종하여, 28℃, 220 rpm에서 총 4일 간 배양 하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차(standard error) 값으로 표시하였다. 별 다른 설명이 없는 한 amylase 활성 측정은 50 mM Na-phosphate buffer (pH 6.0) 600 μl, 2% starch 400 μl 및 조효소액 400 μl로 구성된 반응액을 30℃ 항온수조에서 적절히 배양한 후, dinitrosalicylic acid (DNS) 용액 1500 μl를 넣고 10분간 100℃에서 가열하고 40% potassium sodium tartrate 용액 500 μl를 첨가하여, 방냉 시킨다. 그 후 575 nm에서 흡광도 측정하였다. 1 unit은 조효소액이 starch를 시간당 1 nmole maltose로 유리시키는 능력으로 정의하였다.

② 고체 발효를 이용한 *Bacillus* sp. JSP1의 amylase 생산에 대한 수분함량의 영향

대두박을 선택한 고체 발효 배지에서 수분 함량을 33.3%~77.7%까지 변화시켜 amylase 생산을 그림 1-46에 나타내었다. 수분 함량은 수분 71.4%에서 최대 amylase 생산을 나타내었다.

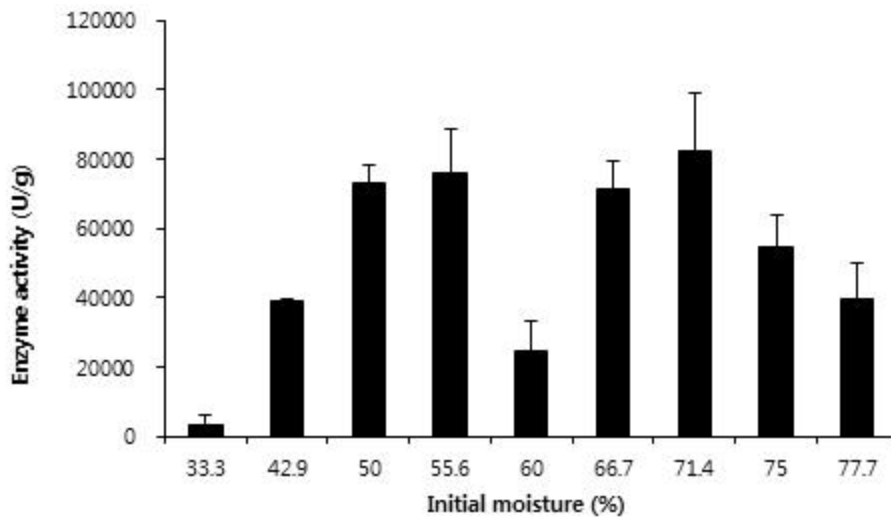


그림 1-46. 고체 발효 배양시 수분함량이 *Bacillus* sp. JSP1의 amylase 생산에 미치는 영향. 고체 발효는 대두박을 기초하여, 각각의 수분함량에서 액체 중균을 4% 접종하여, 28℃, 220 rpm에서 총 4일 간 배양 하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다.

③ 배양 시간에 따른 *Bacillus* sp. JSP1의 amylase 생산

전체 수분 함량 71.7%인 대두박 고체 발효 배지를 조제하여 시간에 따른 *Bacillus* sp. JSP1에 대한 amylase 생산을 조사 하여 그림 1-47에 나타내었다. amylase는 48 시간까지는 소량 생산 되었으나, 그 후 생산이 급증하여 약 84~120 시간 까지 116768±2183~117969±947 U/g으로 최대 생산을 보였고, 이후에는 점점 감소함을 알 수 있었다.

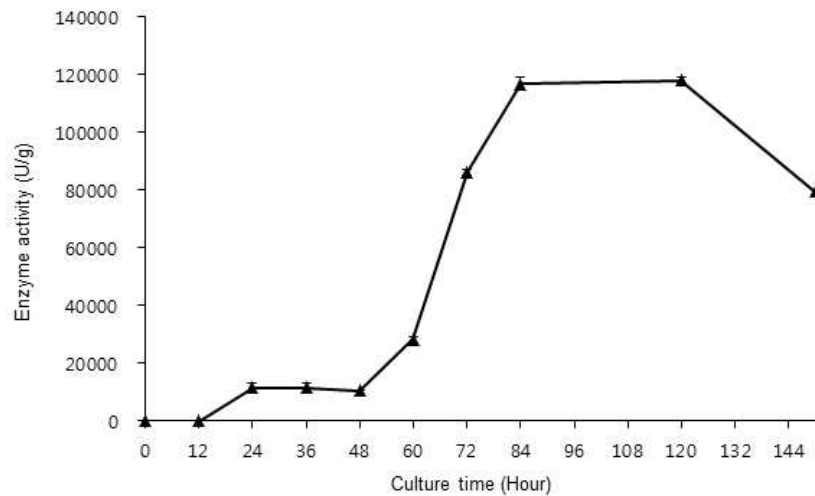


그림 1-47. 고체 발효 배양시, 시간에 따른 *Bacillus* sp. JSP1의 amylase 생산. 고체 발효는 대두박을 기초하여 71.7% 수분함량에서 액체 종균을 4% 접종하여, 28℃, 220 rpm에서 총 6일간 배양하며, 적절한 시간 때 마다 효소 생산을 분석하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다.

④ *Bacillus* sp. JSP1의 amylase 생산에 대한 탄소원 첨가의 영향

Bacillus sp. JSP1의 amylase 생산에 대한 탄소원 첨가의 영향을 조사하기 위하여, 탄소원으로 galactose, lactose, glucose, maltose, sucrose를 첨가하여 4일간 배양 후, amylase 생산을 확인하여 그림 1-48에 나타내었다. amylase 생산은 대조구와 비교하여 glucose, maltose를 첨가 하였을 때 증가 되었고, 그 중 maltose 첨가시 62145±4893 U/g 으로 가장 높은 값을 나타내었다.

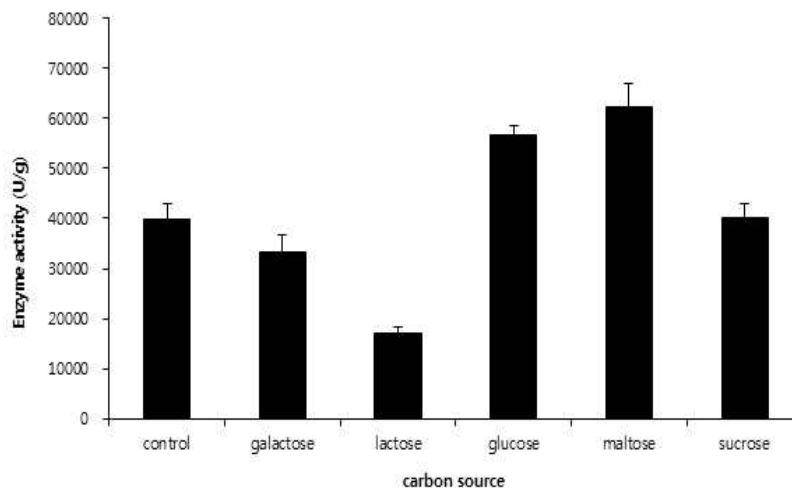


그림 1-48. 고체 발효시, *Bacillus* sp. JSP1의 amylase 생산에 대한 탄소원 첨가의 영향. 고체 발효는 대두박을 기초하여 71.7% 수분함량에서 액체 종균을 4% 접종하였고, 28℃, 220 rpm에서 총 4일 간 배양 하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다. 전체 수분 함량 71.7%인 대두박 고체 발효 배지에 탄소원으로 기질(대두박) 중량(g) 당

1% 씩 galactose, lactose, glucose, maltose, sucrose를 각각 첨가하였다. 탄소원이 없는 것을 대조구(control)로 이용하였다.

⑤ *Bacillus* sp. JSP1의 amylase 생산에 대한 질소원 첨가의 영향

Bacillus sp. JSP1의 amylase 생산에 대한 질소원 첨가의 영향을 조사하기 위하여, 질소원으로 peptone, tryptone, urea, corn steep liqour, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃를 첨가하여 4일간 배양 후, amylase 생산을 확인하여 그림 1-49에 나타내었다. amylase 생산은 대조구와 비교하여 모든 질소원 첨가시 증가 하였다. 질소원 중에서 peptone을 첨가 하였을 때 76577±5736 U/g 으로 가장 높았다.

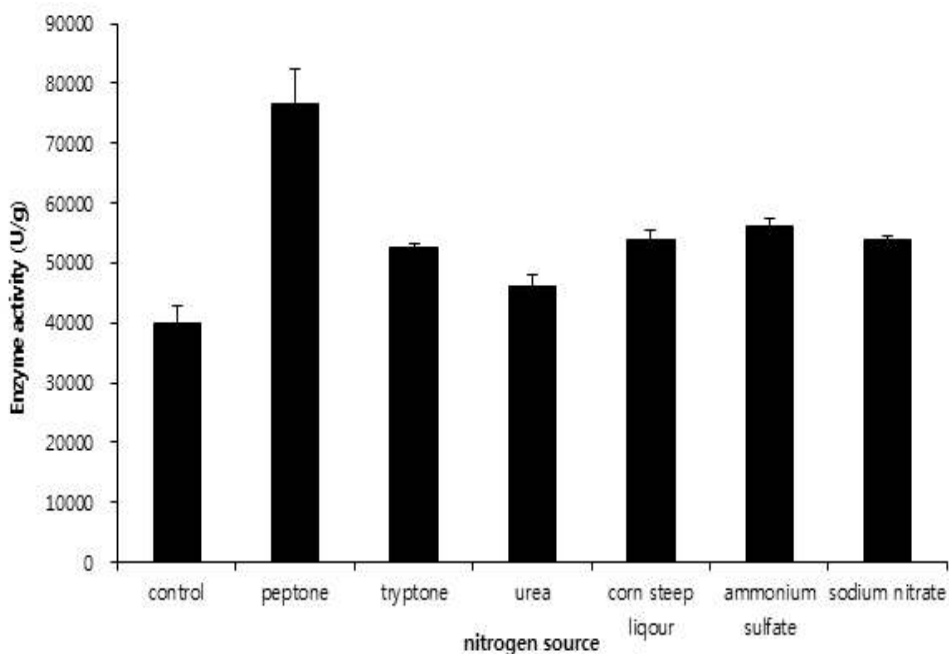


그림 1-49. 고체 발효시, *Bacillus* sp. JSP1의 amylase 생산에 대한 질소원 첨가의 영향. 고체 발효는 대두박을 기초 하여 71.7% 수분함량에서 액체 종균을 4% 접종하였고, 28℃, 220 rpm에서 총 4일 간 배양 하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다. 전체 수분 함량 71.7%인 대두박 고체 발효 배지에 질소원으로 기질 중량(g) 당 1% 씩 peptone, tryptone, urea, corn steep liqour, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃를 각각 첨가하였다. 질소원이 없는 것을 대조구(control)로 이용하였다.

따라서 결과적으로 *Bacillus* sp. JSP1은 전체 수분 71.7% 대두박 기질로 4일간 고체 발효시 가장 높은 amylase 생성을 나타내었다.

(8) *Bacillus* sp. SM2 최적 균체 생산을 위한 반응 표면법(response surface methodology)을 이용한 농부산물 액체 배지의 최적화

(가) 일회 일 요인 분석법(one-factor-at-a-time-method: OFAT)에 의한 *Bacillus* sp. SM2 균

체 생산

① *Bacillus* sp. SM2 최적 균체 생산을 위한 탄소원의 영향

생균제로서 잠재력을 가진 *Bacillus* sp. SM2의 최적화된 균주 생산을 위하여, 탄소원이 미치는 영향을 그림 1-50에 나타내었다. 탄소원으로는 당밀과 옥수수를 이용하였으며 각각 1%와 2% 첨가했을 때 균체 생산은 대조구인 tryptic soy broth와 비교하여 별 다른 차이를 보이지 않았다.

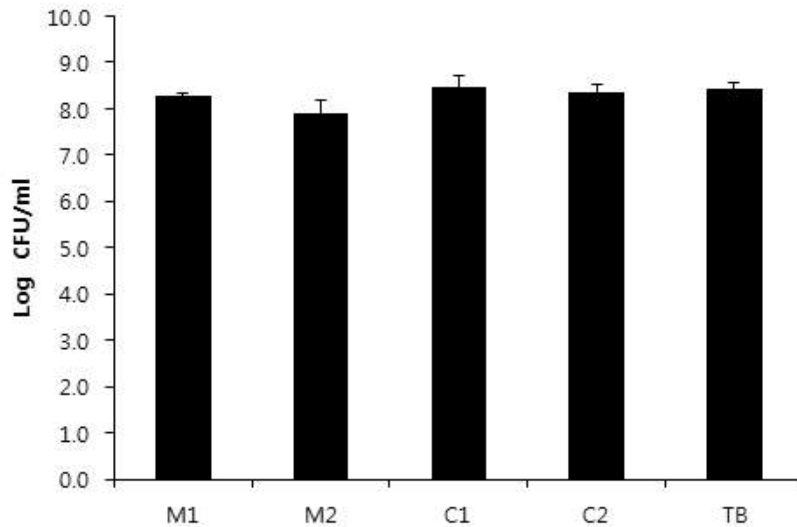


그림 1-50. *Bacillus* sp. SM2 최적 균주 생산을 위한 탄소원의 효과. M1; 1% (w/v) molasses, M2; 2% molasses, C1; 1% corn flour, C2; 2% corn flour, TB; tryptic soy broth. 질소원으로 대두박 1%를 고정시켰다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다.

② *Bacillus* sp. SM2 최적 균체 생산을 위한 질소원의 영향

생균제로서 잠재력을 가진 *Bacillus* sp. SM2의 최적화된 균주 생산을 위하여, 질소원이 미치는 영향을 그림 1-51에서 나타내었다. 질소원으로는 대두박, 유청분말 그리고 옥침수를 이용하여 각각 1%와 2% 첨가 하였다. *Bacillus* sp. SM2 균체 생산은 대조구인 tryptic soy broth와 비교하여, 옥침수 첨가시 농도와 관계없이 매우 낮았으며, 대두박과 유청 분말에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

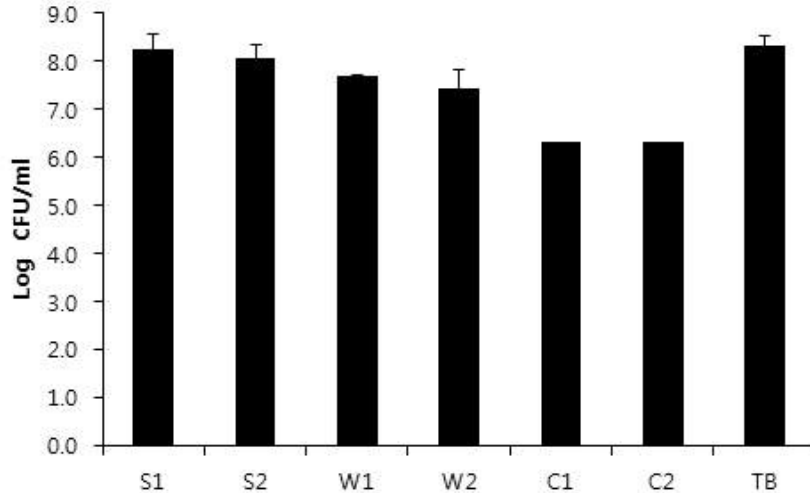


그림 1-51. *Bacillus* sp. SM2 최적 균주 생산을 위한 질소원의 효과. S1, 1% soybean meal; S2, 2% soybean meal; W1, 1% whey; W2, 2% whey; C1, 1% corn steep liquor; C2, 2% corn steep liquor; TB, tryptic soy broth. 탄소원으로 1% 당밀을 고정하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다.

③ *Bacillus* sp. SM2 최적 균체 생산을 위한 미네랄의 영향

생균제로서 잠재력을 가진 *Bacillus* sp. SM2의 최적화된 균주 생산을 위하여, 미네랄이 미치는 영향을 그림 1-52에서 나타내었다. 미네랄로는 0.01% CaCl₂, NaCl, KH₂PO₄, MgSO₄, 및 0.001% MnSO₄, FeSO₄를 첨가하였다. *Bacillus* sp. SM2 균체 생산은 대조구인 tryptic soy broth와 비교하여, CaCl₂, KH₂PO₄, 및 MgSO₄에서 높았지만 큰 차이는 보이지 않았다.

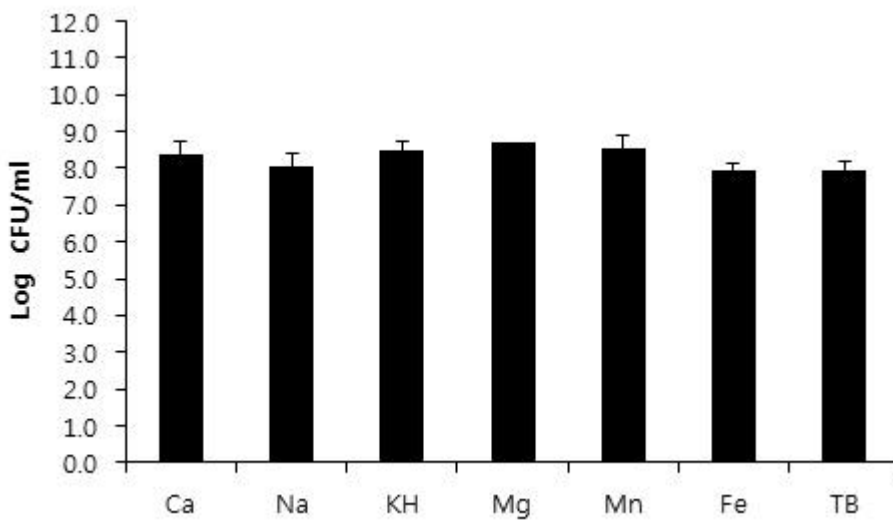


그림 1-52. *Bacillus* sp. SM2 최적 균주 생산을 위한 미네랄의 효과. Ca; 0.01% CaCl₂, Na; 0.01% NaCl, KH; 0.01% KH₂PO₄, Mg; 0.01% MgSO₄, Mn; 0.001% MnSO₄, Fe; 0.001% FeSO₄, TB; tryptic soy broth. 탄소원과 질소원은 1% 당밀과 대두박으로 고정하였다. 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값과 표준 오차 값으로 표시하였다.

(나) 반응 표면 분석 (Response surface methodology: RSM)

① Plackett-Burman design을 이용한 *Bacillus* sp. SM2 최적 균체 생산에 미치는 요소 선별 앞에서 실시한 일회 일 요인분석법으로는 탄소원, 질소원 및 미네랄이 *Bacillus* sp. 균체 생산에 미치는 영향을 찾을 수 없었다. 따라서 *Bacillus* sp. SM2 균체 생산에 중요인자를 독립변수로 두어 반응 표면 분석법을 이용하여 분석하였다. 일회 일 요인 분석으로 *Bacillus* sp. SM2 균체 생산을 향상시킬 수 있는 잠재성을 보인 7가지(당밀, 옥수수, 대두박, 유청분말, CaCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄)요인을 선별하였고, Plackett-Burman design에 의해 이들 요인을 총 15개의 실험 조건으로 실험하여 *Bacillus* sp. SM2 균체 생산에 중요한 영향을 준 요인을 표 1-27에서 나타내었다. 그 결과 대두박과 유청분말이 *Bacillus* sp. SM2 균체 생산을 향상 시키는 요인으로 확인되었다. 또한 연구 결과로 나타내지는 않았지만, 선행 실험으로 pH와 시간 또한 균체 생산에 필요한 중요한 요소가 됨을 발견함으로써 이들 4가지(대두박, 유청분말, pH, 그리고 시간)를 균체 생산에 필요한 중요한 요소로 선정하였다. 그리고 *Bacillus* sp. SM2 균체 생산의 상관관계를 조사하기 위하여 표 1-28에서 각 독립변수에 범위와 값을 코드화 하였다.

표 1-27. *Bacillus* sp. SM2 생산에 영향을 미치는 요소(Plackett-Burman design)

Runs	Variables (g/l)							Log (CFU/ml)
	Molasses	Corn flour	Soybean meal	Whey	CaCl ₂	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	
1	10	1	10	1	0.01	0.01	0.10	9.09
2	10	10	1	10	0.01	0.01	0.01	8.23
3	1	10	10	1	0.1	0.01	0.01	9.54
4	10	1	10	10	0.01	0.1	0.01	9.56
5	10	10	1	10	0.1	0.01	0.10	9.64
6	10	10	10	1	0.1	0.1	0.01	9.54
7	1	10	10	10	0.01	0.1	0.10	9.05
8	1	1	10	10	0.1	0.01	0.10	8.93
9	1	1	1	10	0.1	0.1	0.01	9.36
10	10	1	1	1	0.1	0.1	0.10	7.54
11	1	10	1	1	0.01	0.1	0.10	7.77
12	1	1	1	1	0.01	0.01	0.01	8.62
13	5.5	5.5	5.5	5.5	0.055	0.055	0.055	9.05
14	5.5	5.5	5.5	5.5	0.055	0.055	0.055	8.92
15	5.5	5.5	5.5	5.5	0.055	0.055	0.055	8.79

데이터는 3회 반복 측정하여 평균값으로 표시하였다.

표 1-28. *Bacillus* sp. SM2 최적 균체 생산을 연구(Box-Behnken design)

	Levels		
	-1	0	+1
X ₁ Soybean meal (g/l)	5	17.5	30
X ₂ Whey (g/l)	5	17.5	30
X ₃ pH	6	7	8
X ₄ Time (Hour)	12	18	24

② *Bacillus* sp. SM2 균체 생산 최적화를 위한 Box-Behnken design

독립 변수 (X_i)와 *Bacillus* sp. SM2 균체수를 나타내는 종속 변수 (Y)의 상관관계를 구해 독립변수가 종속변수에 어떠한 영향을 주는지 모니터링하고 가장 균체 생산을 최적화 할 수 있는 독립변수 범위를 구하기 위하여 Box-Behnken design을 설계하여 예측된 값과 실제로 측정된 값을 표 1-29에서 나타내었다. 총 27개의 실험조건에서 3 반복하여 실험을 실시하였다. 이 실험 모델 중 실험 14에서 가장 높은 균체 생산(10.88 Log CFU/ml)을 예측 했고, 실제 실험에서도 가장 높은 균체 생산(10.91 Log CFU/ml)을 나타냈다. 또한 실험 21에서 가장 낮은 결과를 예측(8.46 Log CFU/ml)했고, 실험(7.93 Log CFU/ml)에서도 가장 낮았다. 균체 수가 가장 높을 때와 낮은 때를 비교해보면 유청분말(X_2)의 변화 범위가 가장 넓었다.

표 1-29. *Bacillus* sp. SM2 균체 생산 최적화를 위한 Box-Behnken design

Runs	coded				Experimental (Log CFU/ml)	Predicted (Log CFU/ml)
	X_1	X_2	X_3	X_4		
1	-1	-1	0	0	10.14	10.19
2	+1	-1	0	0	10.30	10.07
3	-1	+1	0	0	9.58	10.11
4	+1	+1	0	0	10.48	10.73
5	0	0	-1	-1	10.16	10.14
6	0	0	+1	-1	10.01	9.85
7	0	0	-1	+1	8.02	8.47
8	0	0	+1	+1	10.10	10.41
9	-1	0	-1	0	9.84	9.30
10	+1	0	-1	0	9.55	9.35
11	-1	0	+1	0	9.99	9.93
12	+1	0	+1	0	10.09	10.38
13	0	-1	0	-1	10.49	10.18
14	0	+1	0	-1	10.91	10.88
15	0	-1	0	+1	10.25	10.03
16	0	+1	0	+1	9.86	9.91
17	-1	0	0	-1	10.11	10.40
18	+1	0	0	-1	10.60	10.82
19	-1	0	0	+1	10.27	10.00
20	+1	0	0	+1	10.42	10.09
21	0	-1	-1	0	7.93	8.46
22	0	+1	-1	0	10.27	10.04
23	0	-1	+1	0	10.40	10.58
24	0	+1	+1	0	10.14	9.57
25	0	0	0	0	10.09	10.21
26	0	0	0	0	10.35	10.21
27	0	0	0	0	10.18	10.21

X_1 =soybean meal, X_2 =whey, X_3 =pH, X_4 =Time, 데이터는 3회 반복 측정하여 평균값으로 표시하였다.

③ *Bacillus* sp. SM2 균체 생산에 대한 다중 회귀분석에 따른 반응표면 방정식 및 상관계수 Box-Behnken design 결과로 바탕으로 다중회귀분석 하여 *Bacillus* sp. SM2 균체 생산에 대한 반응 표면 방정식 계수 및 상관계수의 결과를 표 1-30과 식 1에 나타내었다. 방정식은 *Bacillus* sp. SM2 균체수(Log CFU/ml)를 종속변수 Y로 나타내었고, 이들에 영향을 미치는 독립변수 X_i 에 대한 방정식계수를 나타내고 있다. 방정식 계수는 1차 선형 분석에서 유청 분말 (X_2)과 pH(X_3)가 균체 생산에 유의한 영향($P<0.05$)을 나타냈으며, 상관관계를 나타내는 2차식에서 pH와 시간(X_4)이 서로 유의한 영향($P=0.026$)을 미쳤다. 또한 이에 대한 방정식은 상관계수(R)가 80.0% 만큼 유의한 결과를 나타내었다.

$$Y = -12.5454 - 0.0629X_1 + 0.04064X_2 + 0.70469X_3 - 0.6796X_4 + 0.0005X_1^2 - 0.00001X_2^2 - 0.5385X_3^2 + 0.0013X_4^2 + 0.0012X_1X_2 + 0.0081X_1X_3 - 0.0011X_1X_4 - 0.0520X_2X_3 - 0.0027X_2X_4 + 0.0930X_3X_4$$

(식 1)

표 1-30. *Bacillus* sp. SM2 균체 생산에 대한 반응 표면 방정식 및 상관계수

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	-12.5454	11.6353	-1.078	0.302
X_1	-0.0629	0.1427	-0.441	0.667
X_2	0.4046	0.1427	2.835	0.015
X_3	7.0469	2.7762	2.538	0.026
X_4	-0.6796	0.3274	-2.075	0.060
$X_1 * X_1$	0.0005	0.0012	0.371	0.717
$X_2 * X_2$	-0.0000	0.0012	-0.031	0.976
$X_3 * X_3$	-0.5385	0.1899	-2.835	0.015
$X_4 * X_4$	0.0013	0.0053	0.254	0.803
$X_1 * X_2$	0.0012	0.014	0.840	0.417
$X_1 * X_3$	0.0081	0.0175	0.459	0.654
$X_1 * X_4$	-0.0011	0.0029	-0.377	0.712
$X_2 * X_3$	-0.0520	0.0175	-2.962	0.012
$X_2 * X_4$	-0.0027	0.0029	-0.923	0.374
$X_3 * X_4$	0.0930	0.0366	2.545	0.026

S=0.4386, R-Sq=80.0%, R-Sq(adj)=55.3%, X_1 =soybean meal, X_2 =whey, X_3 =pH, X_4 =Time

위 표는 Box-Behnken design에 근거한 것임.

④ *Bacillus* sp. SM2 균체 생산에 미치는 2차 다항식의 분산분석

Bacillus sp. SM2 균체 생산에 미치는 2차 다항식의 분산분석 결과를 표 1-31에 나타내었다. 회귀 분석과 일차식에 대하여 유의한 신뢰도($p<0.05$)를 보여주었으며, 적합성 결여에서도 $P=0.076$ 으로 유의성을 인정하지 않아 결과가 적합함을 나타내었다.

표 1-31. *Bacillus* sp. SM2 균체 생산에 미치는 2차 다항식의 분산분석

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Regression	14	8.8740	8.87401	0.63386	3.29	0.023
Linear	4	3.4360	4.66091	1.16523	6.06	0.007
Square	4	2.1368	2.13678	0.53419	2.78	0.076
Interaction	6	3.3012	3.30125	0.55021	2.86	0.057
Residual Error	12	2.3085	2.30847	0.19237		
Lack-of-Fit	10	2.2724	2.27238	0.22724	12.59	0.076
Pure Error	2	0.0361	0.03610	0.01805		
Total	26	11.1825				

DF, degree of freedom; SS, sum of squares; MS, mean square.

결론적으로, 내담즙성과 내산성이 우수한 *Bacillus* sp. JSP1은 경제적으로 효과적인 농부산물 배지로 고체 발효하여 protease와 amylase 생성 및 그 특징을 확인하였고, 항균 능력이 우수한 *Bacillus* sp. SM2는 표면 반응 분석법을 이용하여 대량 균체 생산을 위한 농부산물 액체 배지 조성 최적화를 평가함으로써, 복합 생균제로써 잠재적 이용 가능성을 보다 향상시킬 수 있었다.

(9) *Bacillus* sp. SM2 균체 생산 최적화 검증

(가) RSM으로 예측된 최적화 조건과 실측 검증

그림 1-54은 각각의 독립변수(X_i)가 *Bacillus* sp. SM2 균체 생산에 미치는 상관관계를 contour plot으로 표현하였다. *Bacillus* sp. SM2 균체 생산은 대두박과 유청 분말 모두 함량이 증가할수록(a,b,d,c), pH는 중성에서(b,d,f), 그리고 시간은 12 시간 정도에서(c,e,f) 균체 생산이 최대가 됨을 알 수 있었다. 이러한 분석을 기초하여 Minitab™(ver. 14)으로 통계 분석한 결과 대두박 30 g/ℓ, 유청 분말 30 g/ℓ, pH 6.43, 그리고 시간은 12 시간일 때 11.56 CFU/ml로 *Bacillus* sp. SM2 균체 생산이 최대가 되는 것으로 예측하였다(그림 1-53). 따라서 그림 20에서 제시한 조건으로 검증 실험을 실시하였고 *Bacillus* sp. SM2 균주는 10.99 CFU/ml로 예측값과 95.07% 일치하였다(표1-32).

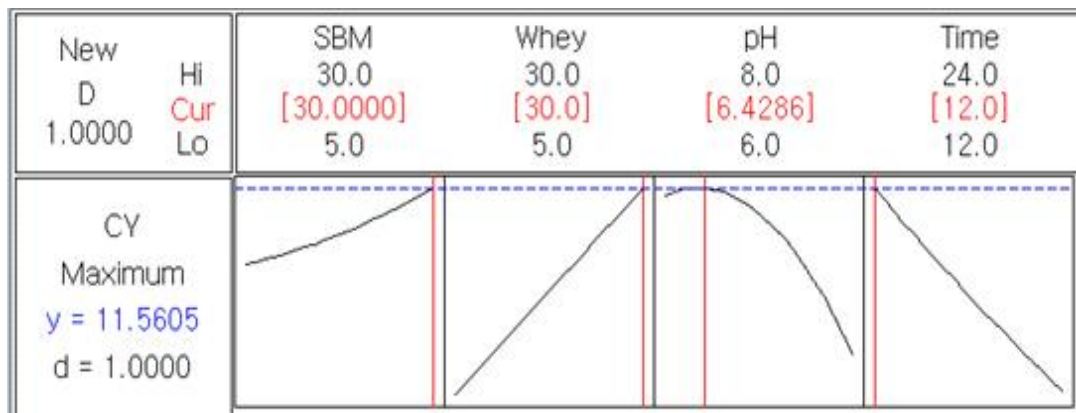


그림 1-53. *Bacillus* sp. SM2 최대 균체 생산을 위한 MiniTab 분석 예측 값.

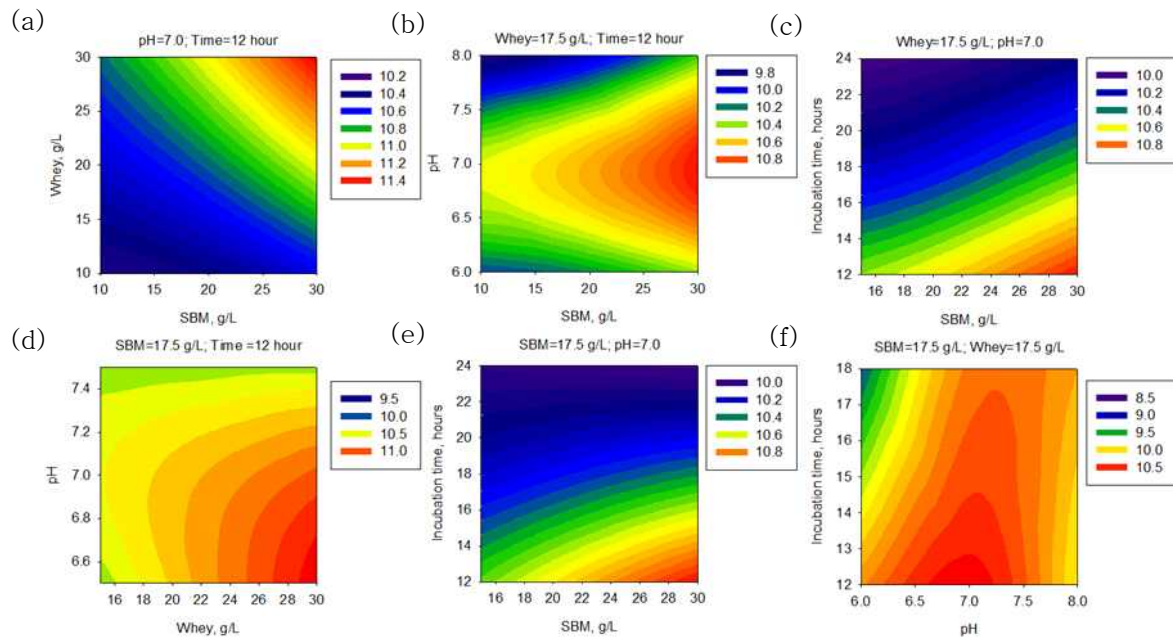


그림 1-54. *Bacillus* sp. SM2 균체 생산에 영향을 미치는 요인(X_i) 상관관계에 의한 contour plot.

표 1-32. *Bacillus* sp. SM2 균주 최대 균주 생산에 대한 예측 값과 실제 값

요인	최대 생산 조건	예측 값(CFU/ml)	실제 값(CFU/ml)
soybean meal	30 g/l		
whey	30 g/l		
pH	6.43	11.56	10.99
time	12 시간		

(10) *Bacillus* sp. 균주 시제품의 저장 및 생존율 증진기술 확립

(가) *Bacillus* sp. JSP1 고체 발효 유래 amylase 저장성

저장성 실험을 위하여 250 ml 삼각 플라스크에 amylase 생산 기질로 사용할 대두박을 10 g을 넣고 수분 함량을 71.4%로 유지하기 위하여 증류수 25 ml을 넣어 잘 혼합한 후, 121°C에서 15 분간 멸균하였다. 멸균된 배지가 식은 후, tryptic soy broth에서 24 시간 성장한 순수 *Bacillus* sp. JSP1을 총 배지의 2%인 0.7 ml 수준으로 접종하였다. 접종 후 37°C, 220 rpm으로 96 시간 배양 하였다. 배양 후 2차 증류수 40 ml을 추가로 첨가하여 37°C, 220 rpm으로 2 시간 추출한 후 5,000 rpm × 10 분간 원심 분리하여 상층액을 수집해 50 ml tube에 분주하여 4, 25, 37°C에서 보관하였다. 보관 중 정해진 시간마다 amylase 활성을 측정하여 남아있는 효소 활성을 조사하였다. 고체 발효에 의한 *Bacillus* sp. JSP1이 생산한 amylase는 저장 기간 중 4°C에서 가장 긴 활성이 존재하였으며 37°C에서 저장 40일에 완전히 효소 활성이 소멸 되었다(그림 1-55).

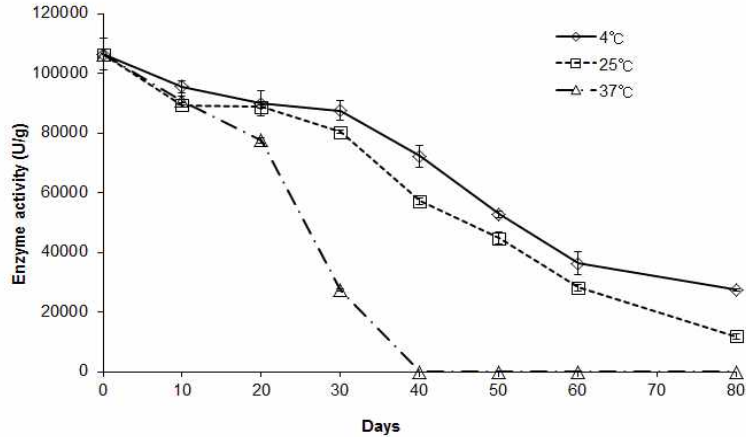


그림 1-55. *Bacillus* sp. JSP1 고체 발효 유래 amylase 저장성. 실험값(n=3)은 평균±표준오차로 표시하였다.

(나) *Bacillus* sp. JSP1 고체 발효 유래 protease 저장성

저장성 실험을 위하여 250 ml 삼각 플라스크에 protease 생산 기질로 사용할 옥수수 미분 10 g을 넣고 수분 함량을 66.7%로 유지하기 위하여 증류수 20 ml을 넣어 잘 혼합한 후, 121°C에서 15 분간 멸균하였다. 멸균된 배지가 식은 후, tryptic soy broth에서 24 시간 성장한 순수 *Bacillus* sp. JSP1을 총 배지의 8%인 2.4 ml 수준으로 접종하였다. 접종 후 37°C, 220 rpm으로 72 시간 배양 하였다. 배양 후 2차 증류수 40 ml을 추가로 첨가하여 37°C, 220 rpm으로 2 시간 추출한 후 5,000 rpm × 10 분간 원심 분리하여 상층액을 수집하였다. 수집한 상층액은 일정하게 3개로 분주하여 -70°C에 24시간 보관하였고 그 후 동결 건조하였다. 동결 건조된 효소는 각각 4, 25, 37°C에서 보관하였고, 보관 중 정해진 시간마다 protease 활성을 측정하여 남아있는 효소 활성을 조사하였다. 고체 발효에 의한 *Bacillus* sp. JSP1이 생산한 protease는 저장 기간 중 온도에 상관없이 80일 동안 약 70%의 효소 활성이 남아있었다(그림 1-56).

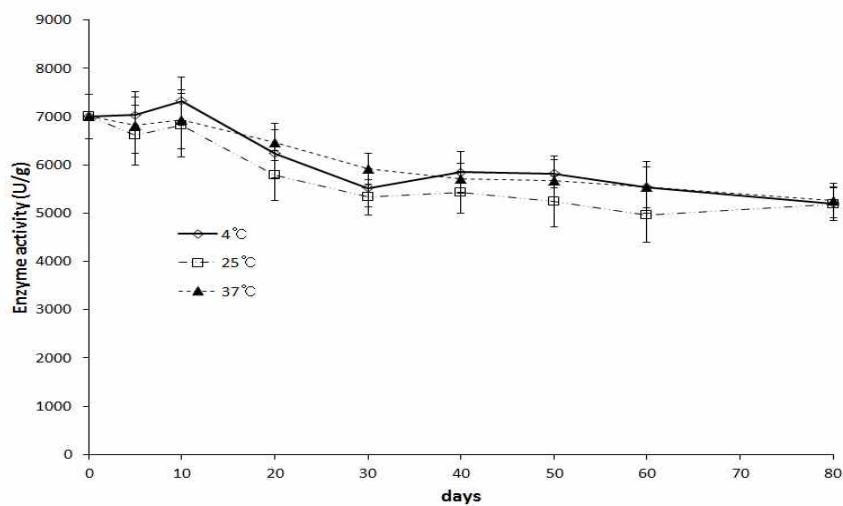


그림 1-56. *Bacillus* sp. JSP1 고체 발효 유래 protease 저장성. 실험값(n=3)은 평균±표준오차로 표시하였다.

(다) *Bacillus* sp. SM2 균체 저장 중 생존율

균체 생존율을 확인하기 위하여 tryptic soy broth에 순수 분리된 *Bacillus* sp. SM2 균주를 최대 균체 생산 조건인 대두박 30 g/l, 유청 분말 30 g/l, 그리고 pH 6.43의 배지에 접종한 후 12시간 배양하였다. 저장 중 생존율 확인을 위하여 부형제로 옥수수 미분과 왕겨를 사용하였다. 옥수수 미분과 왕겨를 dry oven에서 100°C로 3시간 이상 가열하여 살균하였다. *Bacillus* sp. SM2 균주 배양액과 각각의 부형제를 1:3(v/w) 비율인 20 ml: 60 g으로 잘 혼합한 후 상온에서 1시간 정도 풍건하였다. 풍건 후, 각각의 부형제를 멸균된 50 ml에 소분하였고, 4°C와 25°C에 보관하였다. 이렇게 보관된 시료는 정해진 시간에 따라 각각의 시료 1g을 채취하여 PBS로 연속 희석한 후, tryptic soy plate에 도말하여 균수를 측정하였다. 균수를 측정한 결과 부형제의 종류와 온도에 관계없이 측정 0일에서 7.0 LogCFU/g 이었던 균체 생존이 5일 정도 지나자 약 5.0 LogCFU/g로 감소하였다. 하지만 그 후 60일까지 4.5~5.0 LogCFU/g 범위에서 생존을 유지하였다(그림 1-57).

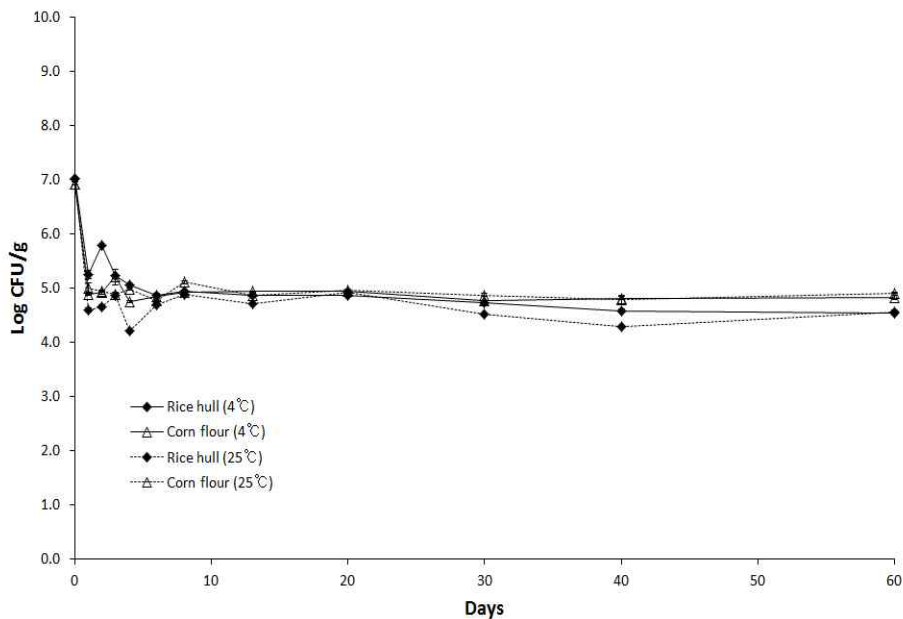


그림 1-57. *Bacillus* sp. SM2 균체 저장 중 생존율. 실험값(n=3)은 평균±표준오차로 표시하였다. Culture medium and conditions: soybean meal 30 g/l, whey 30 g/l, pH 6.43, and 12 hours

(라) *Bacillus* sp. JSP1 고체 발효 유래 amylase의 단백질 분해 효소 저항성

Bacillus sp. JSP1 유래 amylase의 단백질 분해효소에 대한 저항성을 조사하기 위하여, 단백질 분해효소로써 trypsin, pronase, pancreatin, subtilisin carlsberg, 그리고 proteinase K를 사용하였다. amylase과 단백질 분해효소의 단백질 양을 bradford법으로 측정한 후 amylase: protease 를 10:1(v/v) 비율로 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 첨가하여 37°C에서 30분간 배양한 후 효소 활성을 측정하여 상대적으로 나타내었다. 그 결과로 *Bacillus* sp. JSP1 고체 발효 유래 amylase는 모든 단백질 분해 효소에 대한 저항성을 나타내었다(그림 1-58).

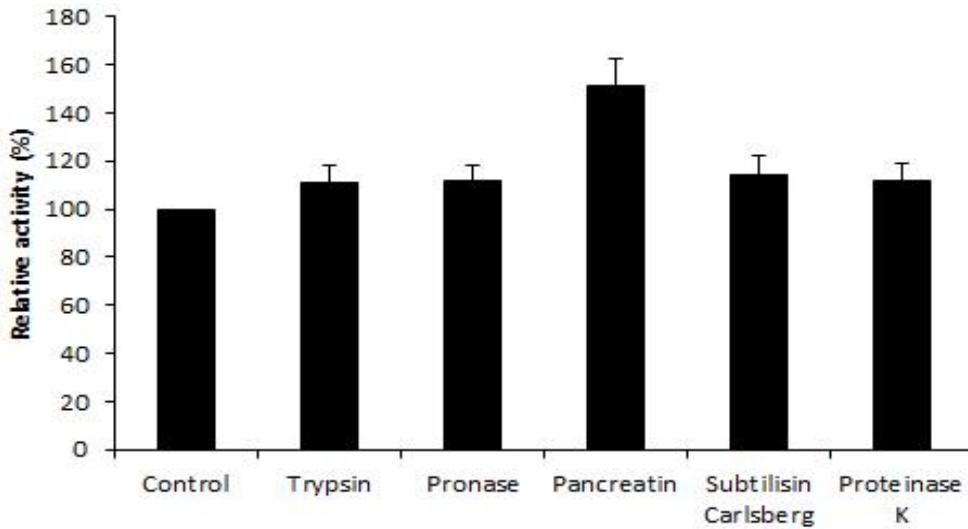


그림 1-58. 단백질 분해효소에 대한 *Bacillus* sp. JSP1 고체 발효 유래 amylase 저항성. 실험값(n=3)은 평균±표준오차로 표시하였다.

(11) *Bacillus* sp. 균주 시제품의 세포 독성 효과 조사

세포 독성 효과를 측정하기 위하여 이용된 세포로는 LMH hepatocellular carcinoma chicken cell(cat no. CRL-2117; ATCC, Manassas, VA, USA)과 HEK 293 human embryonic kidney cell(cat no. CRL-1573; ATCC)을 이용하였다. 배양 배지로는 DMEM 배지에 10% fetal bovine serum을 첨가하여 사용하였다. 배양기 내 CO₂ 함량을 5%로 조절하여 37°C에서 배양하였다. 세포 독성을 측정하기 위한 시약으로는 Ez-Cytox(대일 과학, 서울, 한국)를 사용하였다. 세포 독성을 측정하기 위하여 96 well plate에 LMH와 HEK293 세포를 1×10⁵ cells/ml만큼 배양하였다. 세포를 부착시켜 안정화 한 후 세포 밀도가 70% 되게 증식 시킨 후 , negative control로 PBS 10 μl와 각각의 *Bacillus* sp. 배양 용액을 첨가(10 μl)하였다. 여기서 *Bacillus* sp. 배양 용액이라 함은 amylase 그리고 protease 생산 시 1, 3, 그리고 5일 간 배양한 *Bacillus* sp. JSP1 고체 발효 배양액, 그리고 *Bacillus* sp. SM2 배양 상층액을 의미한다. 세포 독성을 측정 한 결과 100% 기준인 negative control과 비교하여, *Bacillus* sp. 배양 용액은 5일 동안 LMH와 HEK293 세포 성장을 90% 이하로 낮추지 않았다(그림 1-59(a),(b)).

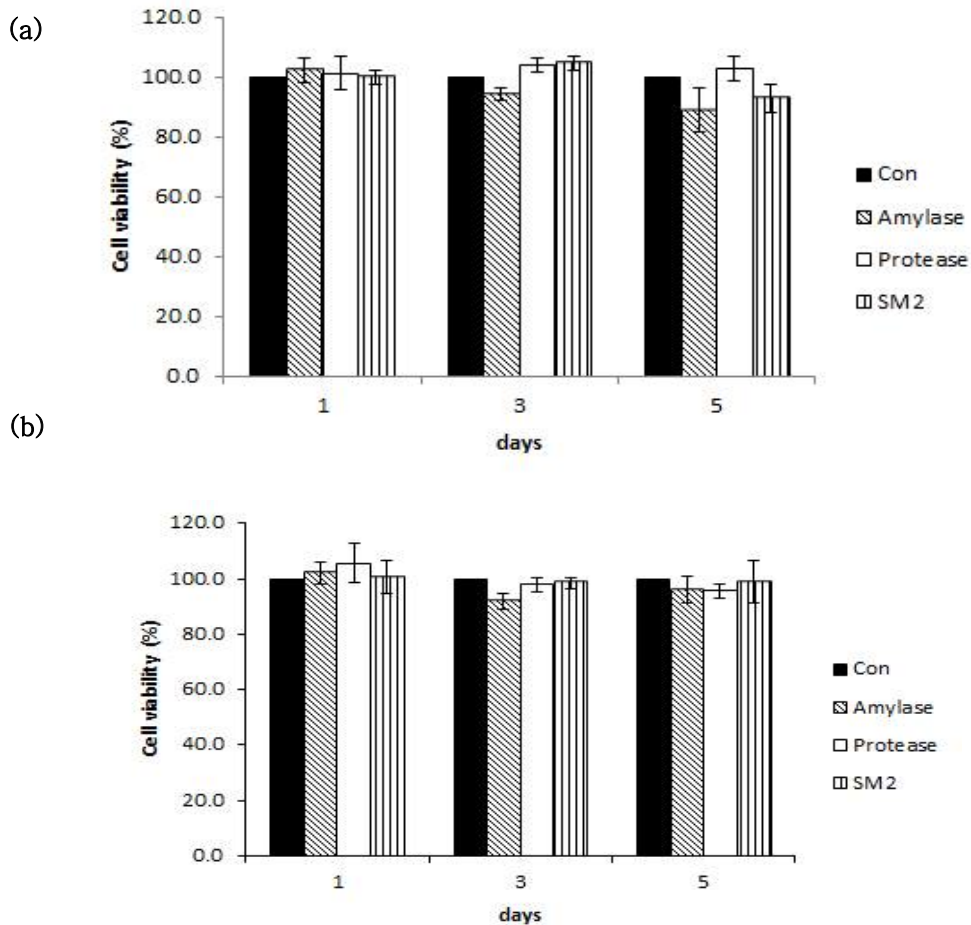


그림 1-59. *Bacillus* sp. 균주의 배양액에 대한 세포 독성 효과. 실험값(n=3)은 평균±표준오차로 표시하였다. Con: negative control(PBS), Amylase: *Bacillus* sp. JSP1 고체 발효 유래 amylase 용액, Protease: *Bacillus* sp. JSP1 고체 발효 유래 protease 용액, SM2: *Bacillus* sp. SM2 배양 상층액 (a): LMH cell line, (b): HEK293.

따라서 결론적으로 *Bacillus* sp. JPS1 고체 발효 유래 amylase 및 protease 저장성 실험에서 상온에서 80 일간 저장 가능하였으며, 세포 독성도 발견할 수 없었다. 또한 amylase 경우에는 장관 내 protease 대하여 저항성도 갖추었다. 그리고 *Bacillus* sp. SM2 균체는 옥수수 미분 또는 왕겨와 함께 저장 시 상온에서 60일 동안 4.5 LogCFU/g을 유지하였고, 세포 독성도 발견되지 않았다. 따라서 이들 균주를 복합 생균제로 사용함에 있어서, 사료의 영양적 가치를 높이는 *Bacillus* sp. JSP1과 항균 능력을 갖춘 *Bacillus* sp. SM2의 실용 가능성을 더욱 높였다.

(12) 항생제 대체 "맞춤형" 복합 미생물 생균제 시제품 제조

시제품의 제조 방법은 아래 그림 1-60에서 나타낸 바와 같이 평면 고체배지 상에서 1 colony를 선발 후 액체배지 상에서 10^{11} - 10^{12} cfu/ml 수준이 되도록 배양하였으며 최종적으로 5000rpm에서 15분 원심분리를 통하여 균을 모았다. 이렇게 모은 균은 복합 미생물 생균제 시제품을 생산을 위하여 각각의 균주를 혼합하는 작업을 수행하였다.

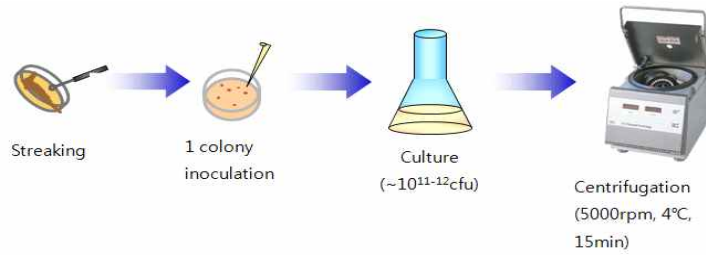


그림 1-60. 단일 미생물 생산 및 수득 공정

(가) 양계용 복합 미생물 생균제 바이오피드-C 생산 공정

PA-GS1은 가금티푸스의 원인균인 *Salmonella gallinarum*에 대해 WT 대비 약 10배의 항균 활성을 가지는데 실제로 *in vivo*에서 이러한 효과를 알아보기 위해서는 병원균의 challenge가 이루어져야 한다. 그러나 국내에는 이러한 challenge 실험을 할 수 있는 facility가 구비되어 있지 않기 때문에 복합 미생물 생균제의 성장증진효과, 정장효과, 비특이적 면역효과수준에서 검정을 수행 하였다.

양계용 복합 미생물 생균제는 효모(*saccharomyces boulardii* 796), 바실러스(*Bacillus subtilis* T4), 대장균(*E.coli* Nissle), PA, PA-GS1이 사용되었고 단일균체 배양 후 원심분리하여 동결건조하여 부형제(탈지미강)와 섞어 부형제 kg 당 각각의 미생물 $\sim 10^{11}$ cells 혼합되도록 하였다.



그림 1-61. 양계용 복합 미생물 생균제 바이오피드-C 생산 과정

(나) 축우용 복합 미생물 생균제 바이오피드-BC 생산공정

LP-GS1은 어린송아지에서 빈번하게 발생하는 송아지 설사병의 주 원인균인 *E. coli* K99에 대해 WT 대비 약 10배의 항균활성을 가지고, PA-GS4는 *E. coli* O157에 대한 항균활성이 증

진된 균주이다. 양계시험과 마찬가지로 국내에서 challenge 실험을 할 수 없으므로 성장증진효과, 설사 예방효과, 비특이적 면역효과를 검증하였다.

축우용 복합 미생물 생균제는 효모(*Saccharomyces boulardii* 796), 바실러스(*Bacillus subtilis* T4), LP-GS1, PA-GS4, LP, PA가 사용되었고 단일균체 배양 후 원심분리하여 200ml PBS에 희석하여 냉장 보관하였다. 사양시험기간 동안 각각의 미생물을 $\sim 10^{10}$ cells/tube가 되도록 혼합하여 하루에 2회씩 급여하였다.



그림 1-62. 축우용 복합 미생물 생균제 바이오피드-BC 생산 과정

마. 복합 미생물 생균제 가축 급여 효과 실증 시험



그림 1-63. 축종 맞춤형 항생제 대체 복합 미생물 생균제 제조 개요

선행연구를 통해 *Salmonella gallinarum* 특이적으로 항균력이 증진된 PA-GS1과 *E. coli* K99, *E. coli* O157 특이적으로 항균력이 증진된 LP-GS1, PA-GS4를 공통 생균제 베이스(효모/바실러스/대장균)와 혼합하여 축종별로 사양시험을 진행하였다. *Saccharomyces boulardii* 796는 설사를 예방하거나 유당불내증에 많이 사용되고 특히 항생제 남용으로 인해 장내균총이 무너져 외부 병원균에 취약한 상태가 되었을 때 발생하는 설사병의 치료에 많이 사용되는 probiotics이다.(Pozzoni et al., 2012; Dinleyici et al., 2012) *Bacillus subtilis* T4는 commensal bacteria로서 탄수화물과 단백질 분해효소를 생산한다. 현재 GRAS로 알려져 있으며 청국장, 나토같은 발효 식품에 많이 사용되고 있다. *E. coli* nissle은 non-pathogenic *E. coli*로서 유럽에서 사람에게 probiotics로 사용되고 있으며 FDA로부터 안전성을 승인받았고 IBD(Intestinal Bowel Disease)의 치료에도 사용되는 균주이다. 본 실험을 통해 새로 개발된 유산균주들이 실제 *in vivo* 상황에서도 가축에게 효과가 있는지 측정하였고 추가적으로 효모, 바실러스, 대장균과 함께 복합 생균제로서의 기능도 검증하였다.

(1) 양계용 복합 미생물 생균제 바이오피드-C

(가) 시험설계

사양시험은 Ross 308 생후 1일령 육계병아리(mixed gender)로 5 처리구 x 처리구당 4 pen(70 수/pen), 총 1,400 수로 35 일간 진행되었다. 분변섭취에 의한 오류를 배제하기 위해 추가적으로 대사실에서 5 처리구 x 처리구당 4 cage(10 수/cage), 총 200 수로 35 일간 진행하였다. 생균제는 사료 중량의 0.1%가 첨가되도록 급여하였으며(사료 kg 당 생균수 약 10^8 cfu 포함) 사양기간 동안 생균제는 매일 급여하였다.

표 1-33. 양계용 복합 미생물 생균제 사양시험 구성

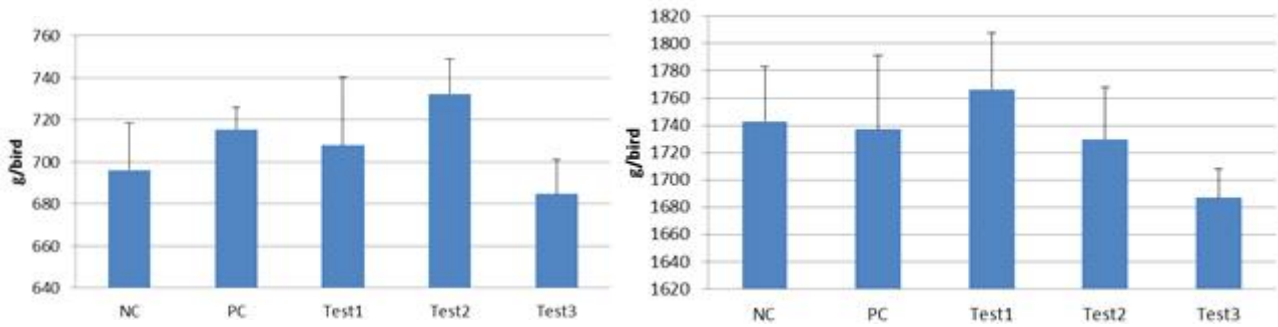
구분	시험구	비고
Control 1	표준사료 급여구	
Control 2	표준사료/항생제 급여구	아빌라마이신 (0.025%)
Test 1	표준사료/복합미생물 생균제 급여구 1	Wildtype 유산균, BS, SB
Test 2	표준사료/복합미생물 생균제 급여구 2	GS1 유산균, BS, SB
Test 3	표준사료/복합미생물 생균제 급여구 3	GS1 유산균, BS, SB, ECN

(나) 시험결과

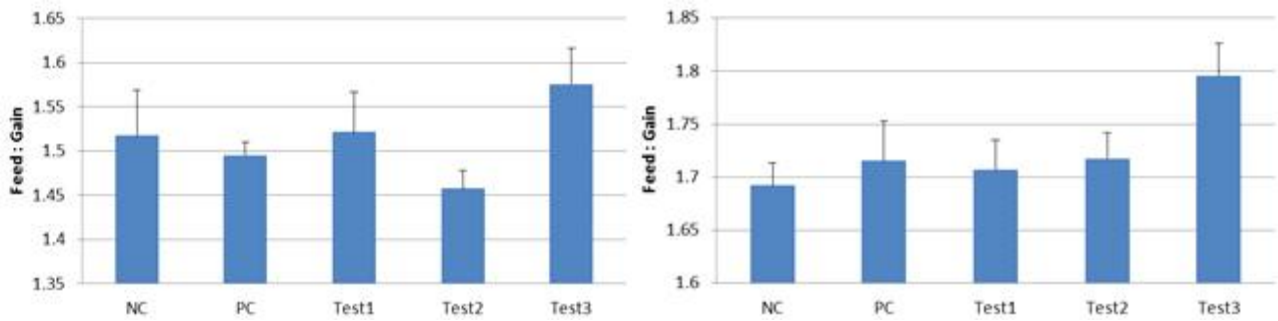
평사 시험의 경우 0-3주 동안 NC 대비 Test2에서 높은 증체율을 보였고 Test3(ECN 급여구)의 경우 다른 시험구에 비해 증체율이 떨어지는 양상이 보였다. 또한 feed conversion ratio(FCR)의 경우 NC 대비 Test2에서 낮은 사료요구율을 나타내었고 Test3는 반대로 사료요구율이 증가된 것을 확인할 수 있었다. Mortality의 경우 모든 군에서 10% 이하의 폐사율을 나타내며 차이가 없는 것으로 나타났다. 0-5주 기간을 살펴보면 Test3를 제외한 모든 그룹에서 고른 증체율을 나타내었고 FCR 역시 Test3를 제외하고 고르게 나타났다. Mortality는 모든 군에서 10%이하로 나타났다. 이러한 결과를 종합해 보았을 때 ECN을 첨가한 Test3는 사료요

구율이 증가하고 증체율에 있어서 좋지 않은 효과를 보인 반면 PA-GS1을 첨가한 Test2의 경우 육계 사양 초기에 높은 증체율과 낮은 FCR을 보임으로써 농장 환경에 조기 적응하는데 도움이 된다고 볼 수 있다.

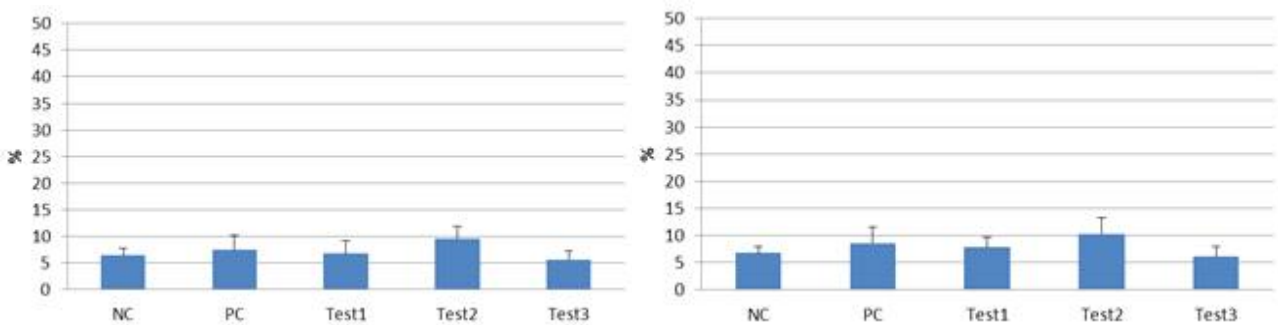
이후 분변섭취에 의한 시험결과 해석 오류를 방지하기 위해 대사실 시험을 추가적으로 진행하였다. 평사 시험과 마찬가지로 NC 대비 Test2에서 높은 증체량을 확인할 수 있었고 coli form bacteria 역시 Test2에서 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다. 소화장관 조직 성상을 확인했을 때 모든 처리구에서 이상병변 소견을 보이지 않았으므로 바이오피드-C 복합 미생물 생균제는 장관 내에서 안전하며 잠재적 병원균(coli form) 생육을 억제할 뿐만 아니라 사양 초기에 조기적응 하는데 효과적이라고 볼 수 있다.



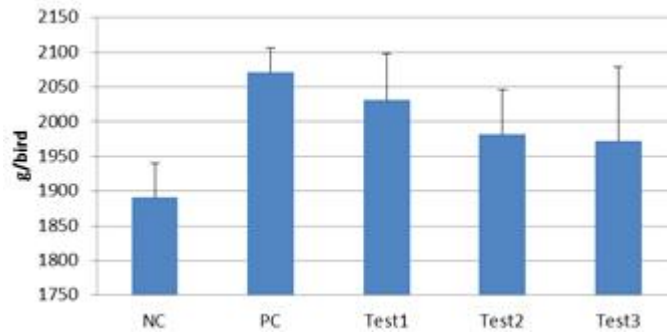
(a) Body weight gain (0-3 week, 좌), (0-5 week, 우)



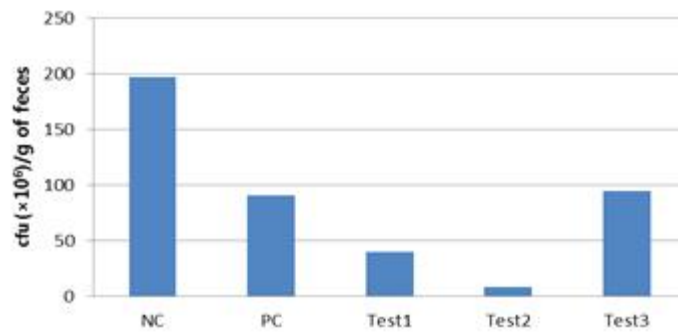
(b) Feed conversion ratio (0-3 week, 좌), (0-5 week, 우)



(c) Mortality (0-3 week, 좌), (0-5 week, 우)



(d) Body weight gain (0-5 week, 대사실)



(e) Coli form bacteria in MCK Agar

그림 1-64. 양계용 복합 미생물 생균제 사양시험 결과

(2) 축우용 복합 미생물 생균제 바이오피드-BC

(가) 시험설계

시험축으로 생후 5-18일령된 Holstein male calves를 이용하였고 4 처리구 x 처리구당 10두, 총 40 마리로 진행되었다. 생균제 급여량은 10⁹ cfu each species/d/head가 되도록 하였고 송아지 입붙이기 사료는 일반 농가와 마찬가지로 시험 시작과 동시에 자유급여하도록 하였다. 총 8주간 생균제는 대용유와 섞어서 아침저녁으로 매일 2회씩 급여하였다.

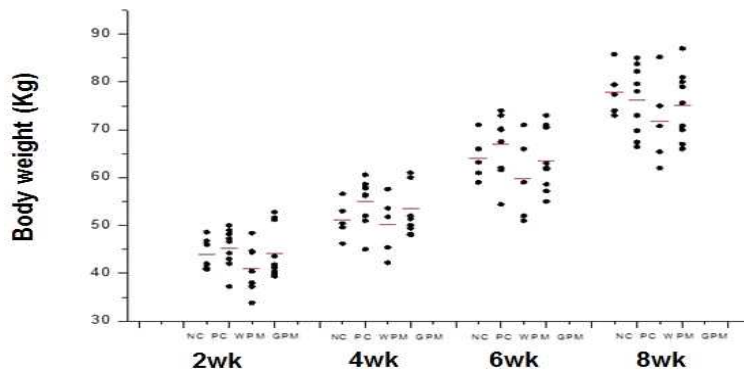
표 1-34. 축우용 복합 미생물 생균제 사양시험 구성

구분	처리구	비고
NC	표준사료 급여구	
PC	표준사료/항생제 급여구	네오마이신 (0.01%)
WPM	표준사료/복합미생물 생균제 급여구 1	Wildtype 유산균 2종, T4, SB
GPM	표준사료/복합미생물 생균제 급여구 2	GS 유산균 2종, T4, SB

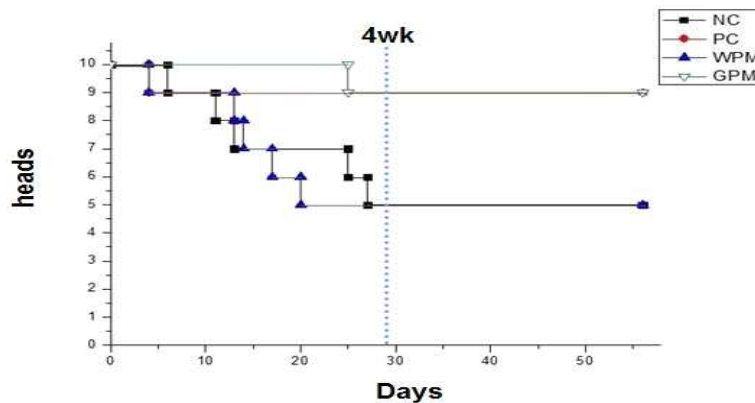
(나) 시험결과

총 8주간 진행된 사양시험기간 동안 각 처리구에서 성장률은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 혈액분석 결과 처리구 모두 혈구세포가 정상범위에 존재했다. 따라서 바이오피드-BC 복합 미생물 생균제는 초기 송아지 성장에 있어서 adverse effect를 나타내지 않는다고 볼 수 있다. 반면 특이적으로 PC(항생제 급여구)와 GPM(GS 유산균 급여구)의 경우 90%의 생존률을 보였으나 NC(항생제 미급여구)와 WPM(WT 유산균 급여구)의 경우 50%의 폐사율을 나타냈다. 이는 바이오피드-BC 복합 미생물 생균제가 항생제 급여구와 동등하게 초기 송아지 설사병에 의한 폐사율 억제 효과를 보인다는 것을 의미한다.

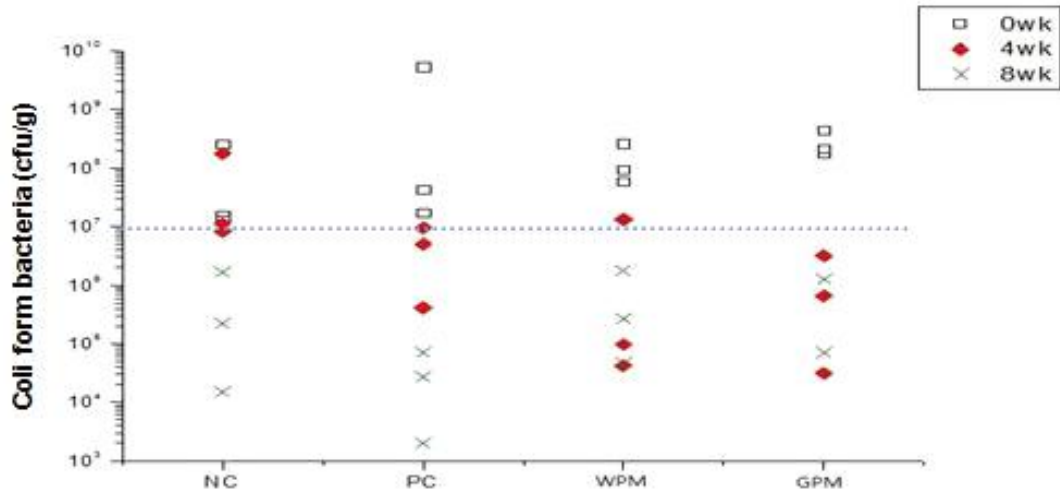
이와 관련하여 우리는 처리구당 무작위 선발 송아지 3두로부터 분변채취 후 coli form bacteria 수를 측정하였다. 무처리구(NC)와 달리 항생제 처리구(PC)에서 4주째 coli form bacteria가 현저히 감소하였고, 마찬가지로 복합 미생물 생균제 처리구인 WPM, GPM에서도 4주째 PC와 동등한 coli form bacteria 감소 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 바이오피드-BC 복합 미생물 생균제는 소화장관 내 잠재 병원성균(coli form) 생육 억제를 통해 송아지 초기 폐사율을 억제하고 조기 농장 환경 적응에 효과적이라 할 수 있다.



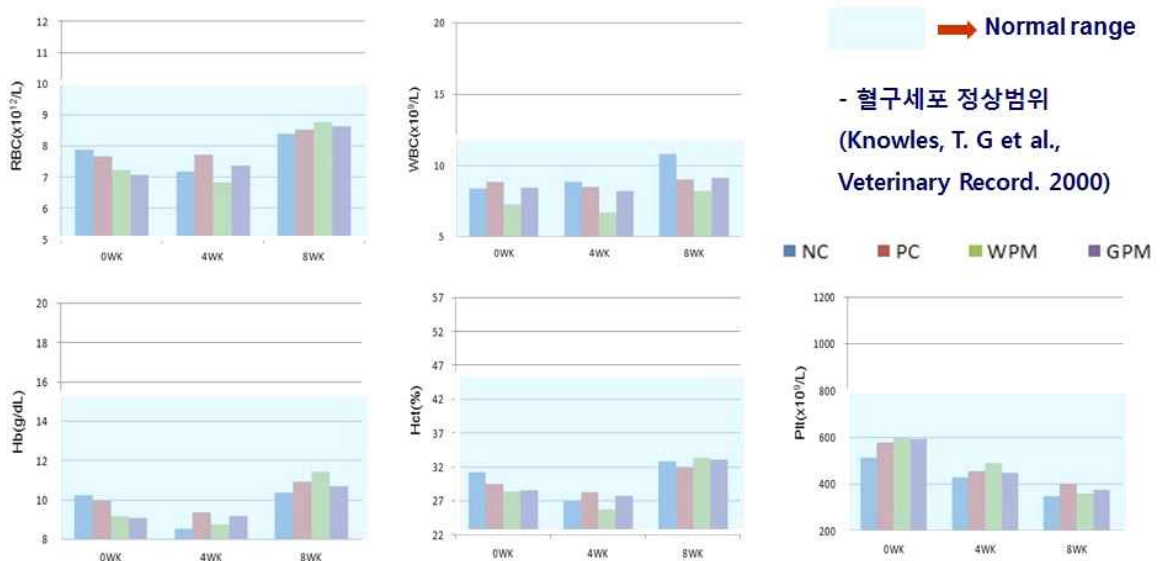
(a) Body weight gain (0-8 week)



(b) Mortality (0-8 week)



(c) Coli form bacteria in MCK Agar



(d) Hematological analysis (0-8 week)

그림 1-65. 축우용 복합 미생물 생균제 사양시험 결과

2. 제1-2세부과제: 생균제 및 천연항생제 대체제의 효과적 소화장관 전달을 위한 점막 점착 고분자 전달체 개발

가. 기능성 미생물이 담지된 고분자 마이크로캡슐의 특성조사

알지네이트/키토산/알지네이트(ACA) 마이크로캡슐 및 생균제 모델 미생물인 *Lactobacillus plantarum* 25(LP25), *Brachyspira* membrane protein B(BmpB) 백신을 생산하는 LP25

(LP25-BmpB), 소장의 M세포에 특이적으로 결합하는 펩타이드가 도입된 BmpB를 생산하는 LP25(LP25-M-BmpB) 및 대조구 펩타이드가 도입된 BmpB를 생산하는 LP25 (LP25-P-BmpB)가 담지된 마이크로캡슐을 제조하여 특성을 조사하였다.

(1) 마이크로캡슐 제조 및 특성조사

마이크로캡슐 제조는 그림 1-66에서 나타난 바와 같이 담지단계와 코팅단계의 두 단계를 거쳐서 제조하였다. LP25가 담지된 ACA와 담지되지 않은 ACA 마이크로캡슐은 크기(1.11 mm)나 구형 형태는 크게 차이가 없었다. 또한 그림 1-67에서 나타난 바와 같이 LP25, LP25-BmpB, LP25-M-BmpB 및 LP25-P-BmpB 간에도 크기나 형태는 크게 차이가 없었다.

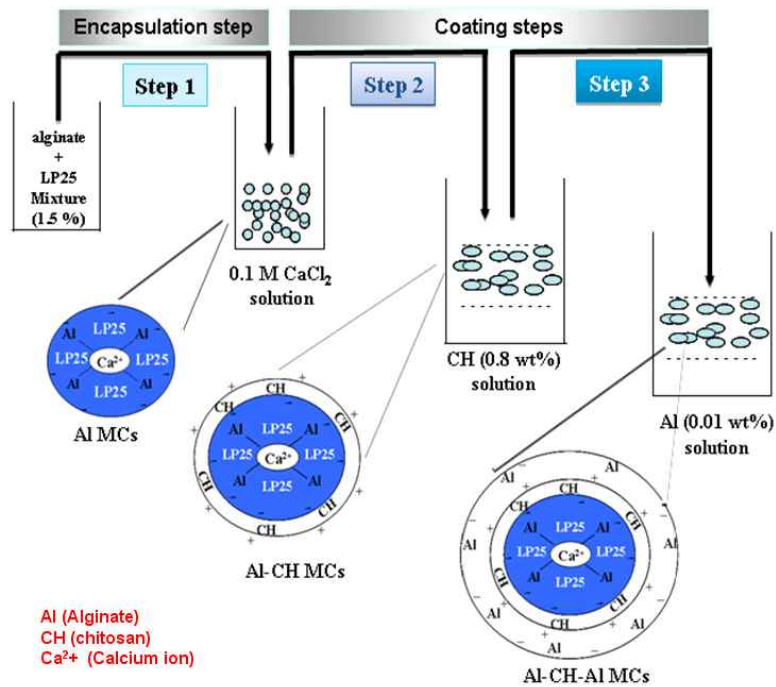


그림 1-66. 미립자 제조 공정도

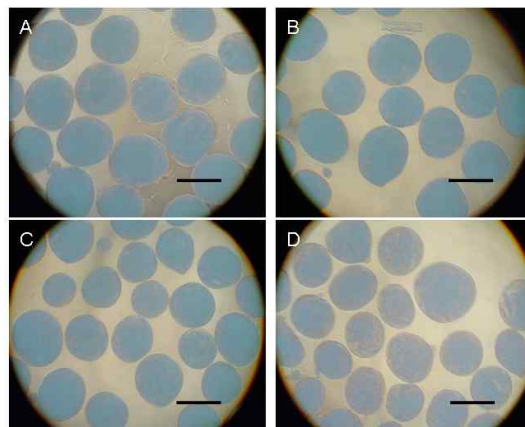


그림 1-67. 마이크로캡슐의 현미경 사진. (a) LP25가 담지된 ACA 마이크로캡슐 (b) LP25-BmpB 담지된 ACA 마이크로캡슐 (c) LP25-P-BmpB 담지된 ACA 마이크로캡슐. 막대 크기 : 1 mm.

(2) 기능성 미생물의 고분자 마이크로캡슐 담지

기능성 유산균의 LP25, LP25-BmpB, LP25-M-BmpB 및 LP25-P-BmpB 간의 담지효율은

표 1-35에서 나타낸 바와 같이 큰 차이가 없이 98-99%를 나타냈고 고분자 마이크로캡슐의 크기는 균수가 많을수록(10^7 에서 10^9 사이) 담지량이 많아 커졌지만 담지효율은 98-99%를 나타내서 큰 차이가 없었다.

표 1-35. ACA 마이크로캡슐의 담지 특성

MCs	Size (mm)	Loading content (cfu/particles)	Encapsulation efficiency (%)
LP25	1.06±0.08	1.11×10^7	98.30 ± 2.31
	1.11±0.22	2.08×10^8	98.56 ± 1.33
	2.09±0.26	1.81×10^9	97.36 ± 2.37
LP25-BmpB	1.12±0.27	1.32×10^7	97.20 ± 3.13
	1.19±0.14	1.65×10^8	98.10 ± 2.23
	2.20±0.30	1.81×10^9	97.56 ± 1.33
LP25-M-BmpB	1.18±0.13	0.96×10^7	97.42 ± 3.75
	1.09±0.27	1.87×10^8	97.82 ± 2.07
	2.33±0.24	2.10×10^9	96.66 ± 0.83
LP25-P-BmpB	0.93±0.11	2.01×10^7	99.04 ± 0.30
	0.99±0.30	1.02×10^8	98.13 ± 0.63
	2.04±0.23	1.84×10^9	97.52 ± 1.26

(3) 고분자 마이크로캡슐에 담지된 기능성 미생물의 생존율 조사

① 위장 환경에서의 기능성 미생물 보호 효과

기능성 미생물을 캡슐화하지 않으면 그림 1-68 (a)에서 나타낸 바와 같이 동물의 위 내 환경인 pH 2에서 급격히 생존율이 떨어졌고 기능성 미생물간에는 큰 차이가 없었다. 또한 펩신이 존재하면 그림 1-68 (b)에서 나타낸 바와 같이 더욱 급격하게 생존율이 감소하였다. 그러나 마이크로캡슐에 담지된 기능성 미생물은 그림 1-68 (c)에서 나타낸 바와 같이 pH 2에서 월등하게 보호되었고 펩신이 존재하여도 약간이 생존율이 감소되었을 뿐 (그림 1-68 (d)) 탁월한 보호효과를 보여주었다.

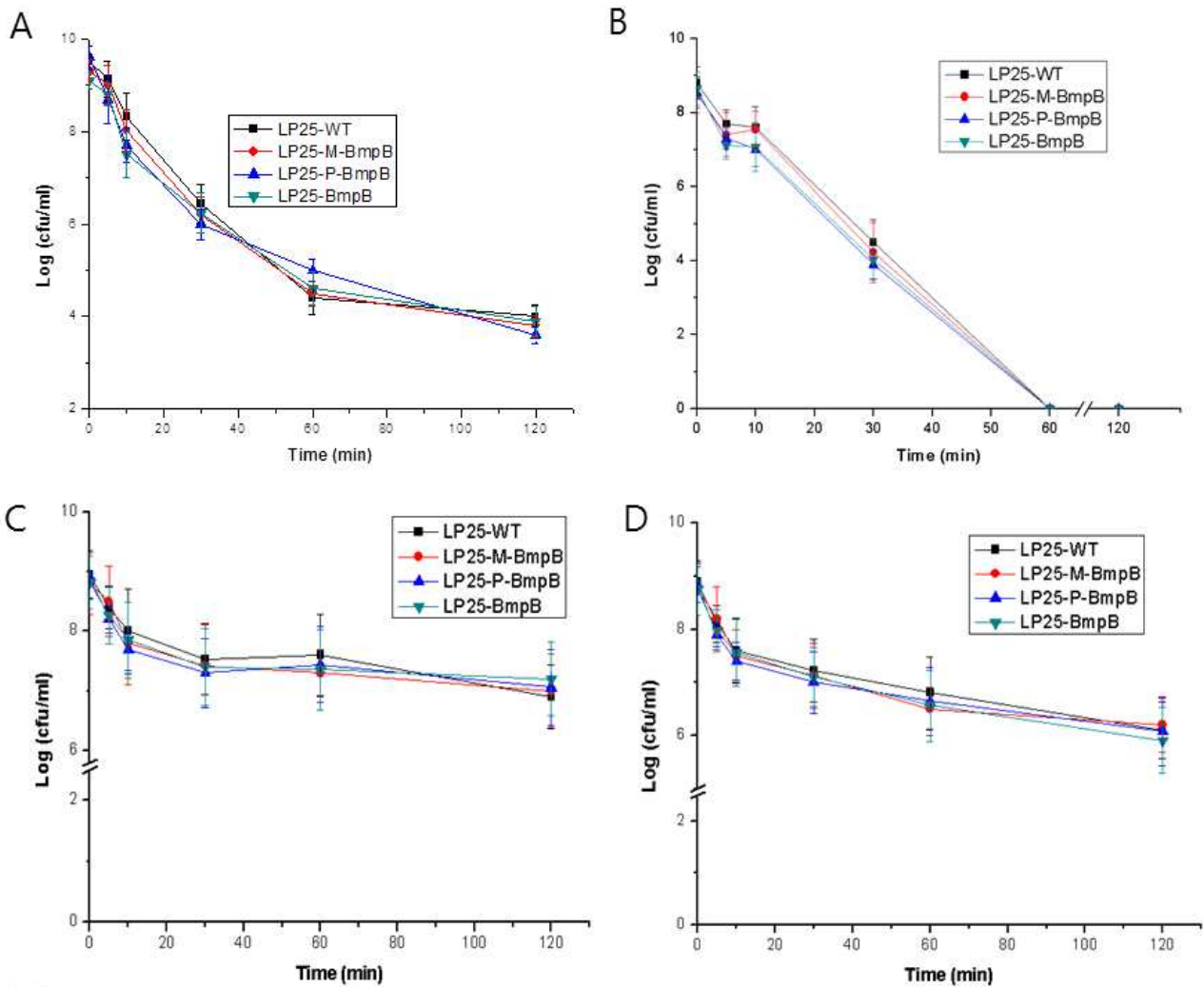


그림 1-68. 위장 내 환경에서 ACA 마이크로캡슐의 미생물 보호효과. (a) Stimulated gastric fluid(SGF), pH 2.0 환경에서의 미생물 생균수 (b) 펩신이 추가된 SGF, pH 2.0 환경에서의 미생물 생균수 (c) SGF, pH 2.0 환경에서 마이크로캡슐내 담지된 미생물의 생균수 (d) 펩신이 추가된 SGF, pH 2.0 환경에서 마이크로캡슐내 담지된 미생물의 생균수의 변화

② 담즙산에서의 기능성 미생물 보호 효과

담지되지 않은 기능성 미생물의 pH 7.2에서 생존율은 그림 1-69 (a)에서 나타낸 바와 같이 담즙산에 의하여 급격히 감소되었고 담즙산의 농도가 증가하면 더욱 감소되었다. 그러나 미생물을 ACA에 담지하면 그림 1-69 (b)에서 나타낸 바와 같이 상당히 보호되었다.

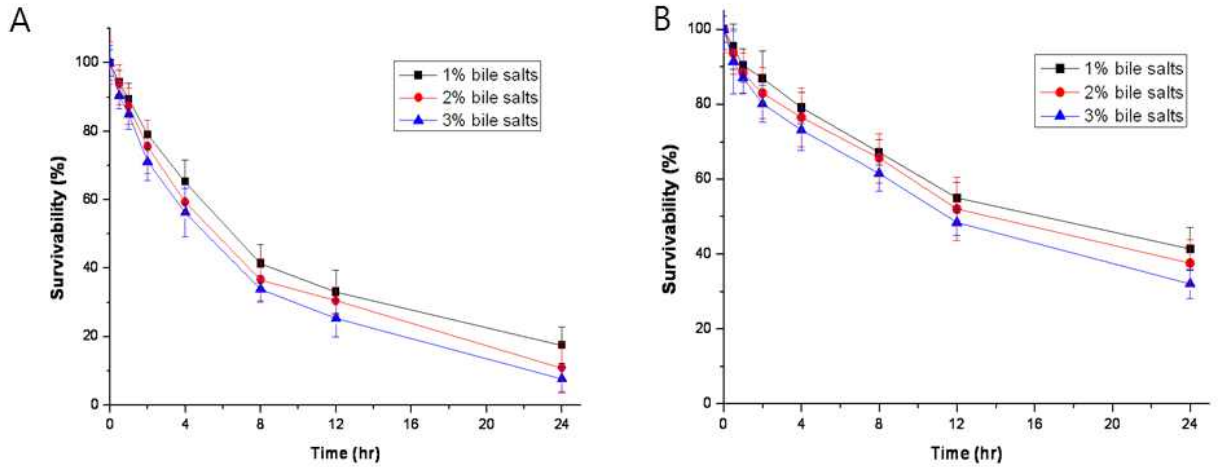


그림 1-69. 담즙산 환경에서 ACA 마이크로캡슐의 미생물 보호효과. (a) 담즙산이 첨가된 stimulated intestinal fluid(SIF), pH 7.2 환경에서 LP25의 생존율. (b) (a)와 같은 환경에서 ACA에 담지된 LP 25의 생존율.

(3) 보존온도에 따른 기능성 미생물의 보호효과

① 담지되지 않은 기능성 미생물의 온도에 따른 생존율

담지되지 않은 기능성 미생물의 보존온도가 실온일 때의 생존율은 그림 1-70 (a)에서 나타낸 바와 같이 5주째에는 0에 가까웠다. 4°C에는 그림 1-70 (b)에서 나타낸 바와 같이 생존율이 실온보다 완만하게 감소하였고 어느 온도에서도 기능성 미생물간에는 생존율의 차이를 나타내지 않았다.

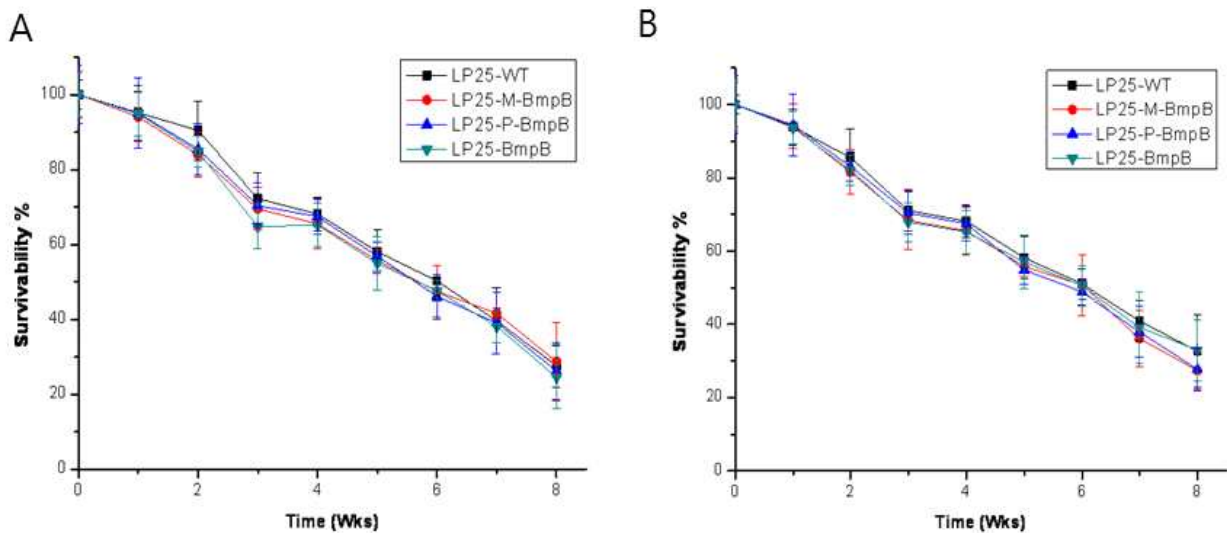


그림 1-70. LP25의 보존온도에 따른 8주간 생존율. (a) 실온에서 LP25의 생존율. (b) 4°C에서 LP25의 생존율.

② 동결건조된 마이크로캡슐에 담지된 기능성 미생물의 온도에 따른 생존율 조사

생존율을 향상시키기 위하여 기능성 미생물이 담지된 ACA 마이크로캡슐을 동결 건조하여 4°C에서 보관한 생존율은 그림 1-71 (a)에서 나타낸 바와 같이 8주에는 약 60%를 유지하였지만 실온에서의 생존율은 8주에 25%를 나타냈다(그림 1-71 (b)). 그러나 기능성 미생물 간에는 큰 차이를 나타내지 않는다.

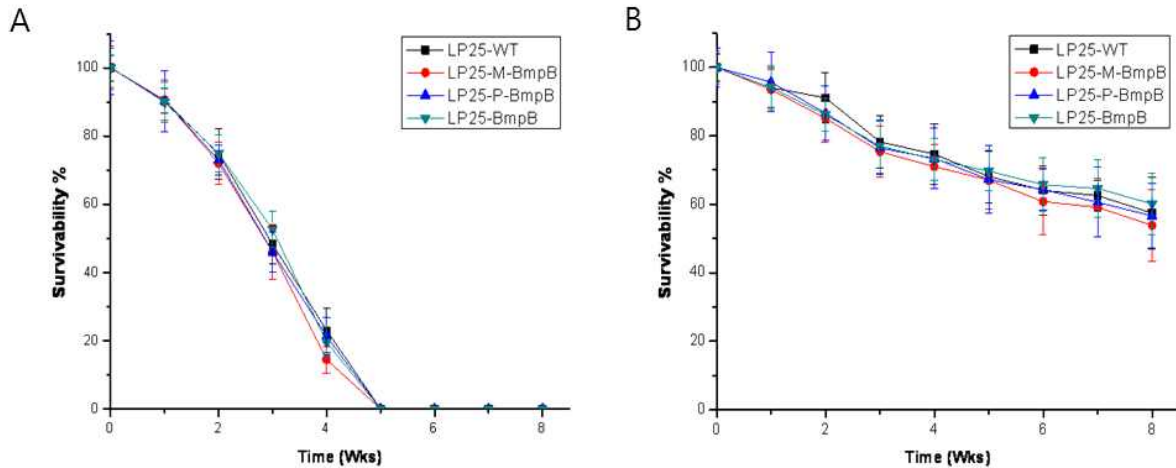


그림 1-71. 동결 건조된 ACA 마이크로캡슐에 담지된 LP25의 저장온도에 따른 8주간 생존율. (a) 4°C 저장 환경에서 LP25의 생존율. (b) 실온 저장 환경에서 LP25의 생존율.

(4) 마이크로캡슐에 담지된 기능성 미생물의 *in vitro* 방출

소장의 pH인 6.0과 대장의 pH 환경인 7.2에서 마이크로캡슐 담지 미생물의 방출 현상을 관찰하였다. 그림 1-72 (a)에서 나타낸 바와 같이 기능성 미생물이 담지된 ACA 마이크로캡슐로부터 pH 6.0에서 30분 경과 후 약 80%가 방출이 되었고 24시간째에 거의 100%가 방출되었지만 마이크로캡슐을 동결건조하면 30분에 약 70%가 방출이 되어 방출속도가 약간 늦어졌다 (그림 1-72 (b)). 대장 환경인 pH 7.2에서는 마이크로캡슐을 동결건조하지 않거나 (그림 1-72 (c)) 동결건조 (그림 1-72 (d))를 하였을 때 모두 pH 6.0에 비교하여 방출이 늦어지는 경향을 얻었지만 미생물 간에는 큰 차이를 나타내지 않는다.

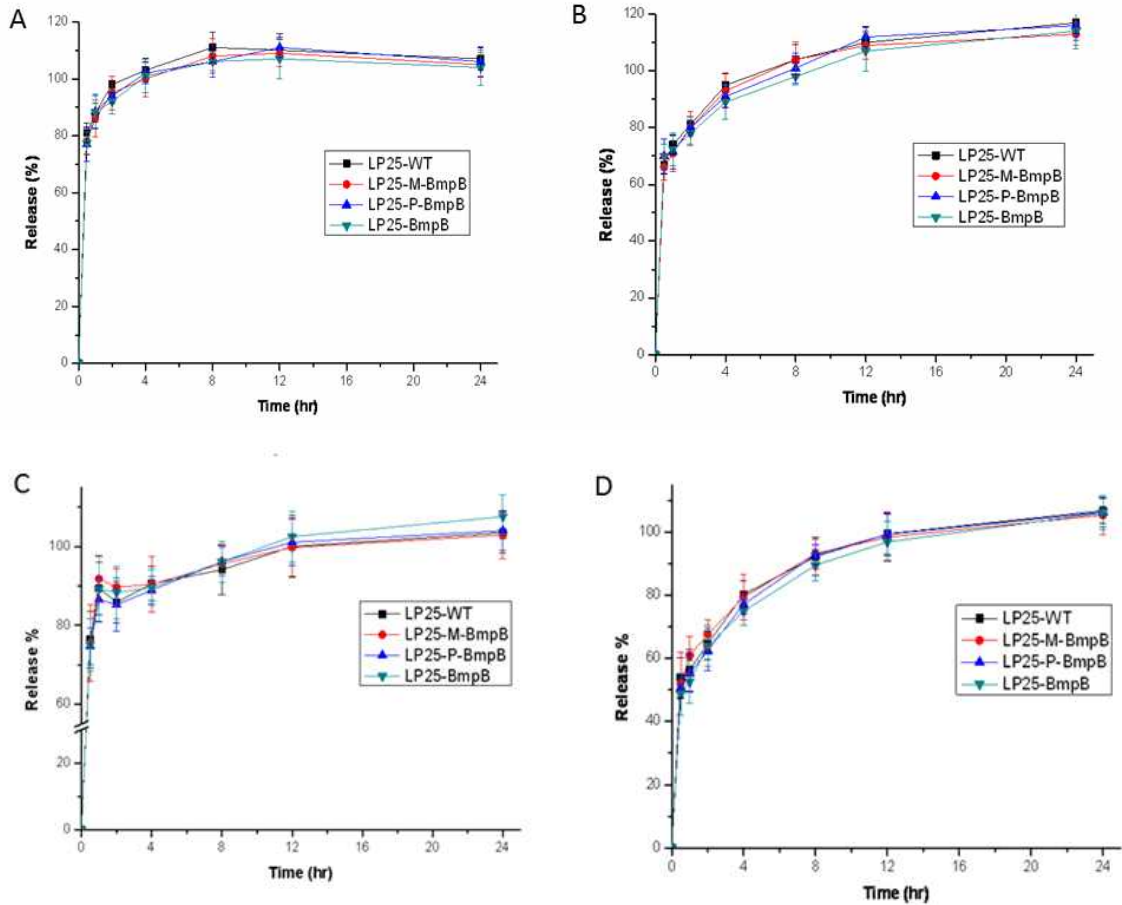


그림 1-72. ACA 마이크로캡슐의 미생물 방출 효과. (a) pH 6.0 환경에서 방출률. (b) 동결건조된 ACA 마이크로캡슐의 pH 6.0에서 방출률. (c) pH 7.2 환경에서 방출률. (d) 동결건조된 ACA 마이크로캡슐의 pH 7.2에서 미생물 방출률.

나. 고분자 마이크로캡슐에 담지된 기능성 미생물의 *in vitro* 효과 검정

(1) 기능성 LP25가 담지된 고분자 마이크로캡슐의 면역세포에서의 cytokine 분비 조사

마이크로캡슐로 미생물을 담지 하였을 때의 미생물 고유의 면역 유도 효과가 유지되는지를 관찰하였다. 대조구 (control), LPS 및 기능성 LP25가 담지된 고분자 마이크로캡슐을 macrophage 유래의 RAW 264.7 세포 (그림 1-73 (a))와 dendritic 세포에서 유래한 JAWS II 세포 (그림 1-73 (b))에 처리하였다. B cell 성숙 관련 cytokine인 IL-6의 생산은 대조구보다 향상되었으며 담지되지 않은 미생물의 cytokine 분비 유도과 비교해 보았을 때 분비 경향이 그대로 유지되었다. Pro-inflammatory cytokine인 TNF- α 도 마찬가지로 RAW 264.7 세포(그림 1-73 (c))와 JAWS II 세포 (그림 1-73 (d))에서 대조구보다 향상되었으며 분비 유도 경향도 IL-6의 경우와 같이 유지되었다.

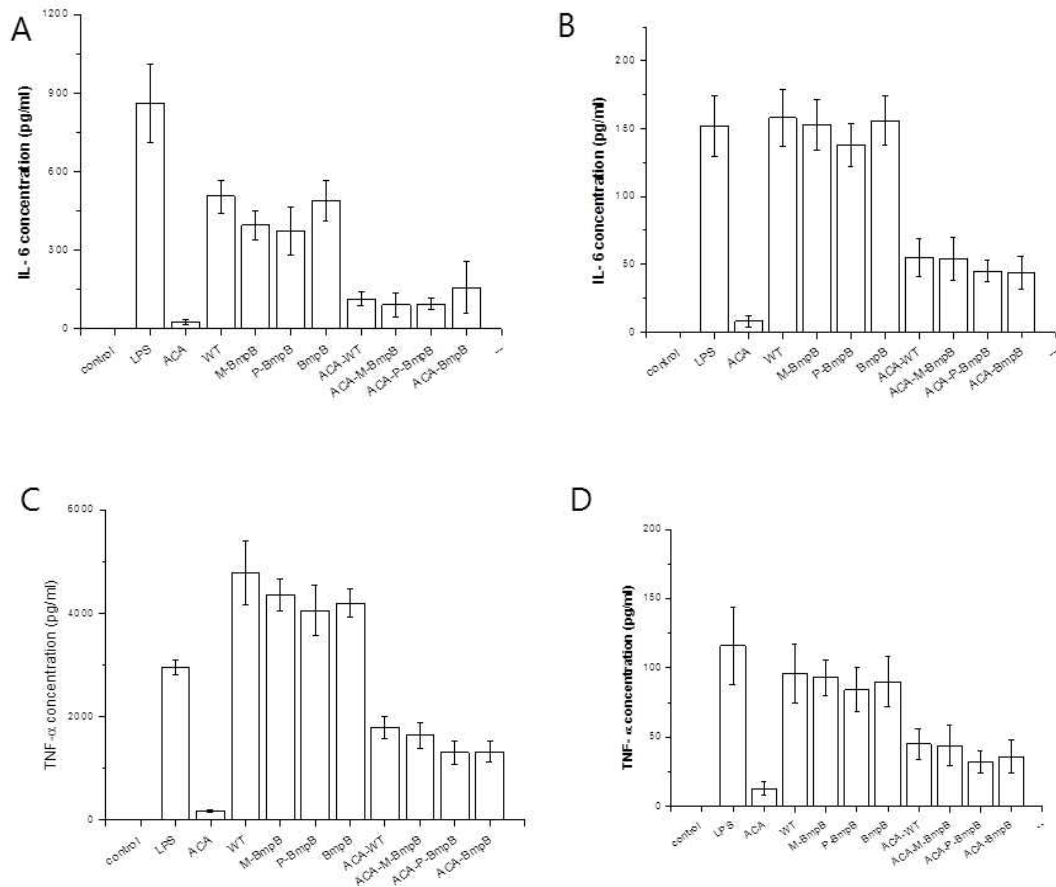


그림 1-73. 기능성 미생물이 담지된 마이크로캡슐의 cytokine 분비유도 효과. (a) RAW 264.7 세포와 (b) JAWSII 세포에서의 IL-6 유도효과. (c) RAW 264.7 세포와 (d) JAWSII 세포에서의 TNF-α 유도효과.

다. 고분자 마이크로캡슐에 담지된 기능성 미생물의 *in vivo* 효과 검증

(1) 기능성 LP25가 담지된 고분자 마이크로캡슐의 실험용 쥐 경구 투여

① 기능성 LP25 담지 ACA 마이크로캡슐의 경구 투여 방법

그림 1-74에서 나타내는 바와 같이 기능성 미생물의 효율적인 전달여부를 평가하기 위하여 6주령의 female BALB/c 쥐를 각 그룹 당 5마리씩으로 하고 총 8군으로 나누어서 1주에 한번씩 4주간에 걸쳐 경구투여를 시행하였다. 미생물 전달에 따른 생체 내 반응을 조사하기 위하여 혈청과 분변을 채취하였다.

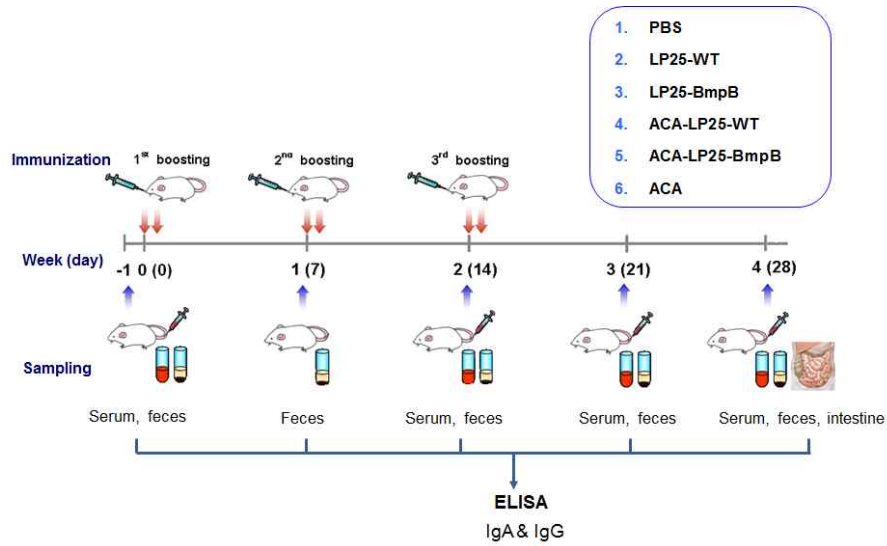


그림 1-74. 고분자 마이크로캡슐 담지 미생물의 경구투여 및 샘플링 스케줄

② *In vivo*에서 마이크로캡슐에 담지된 LP25의 분비활성유지

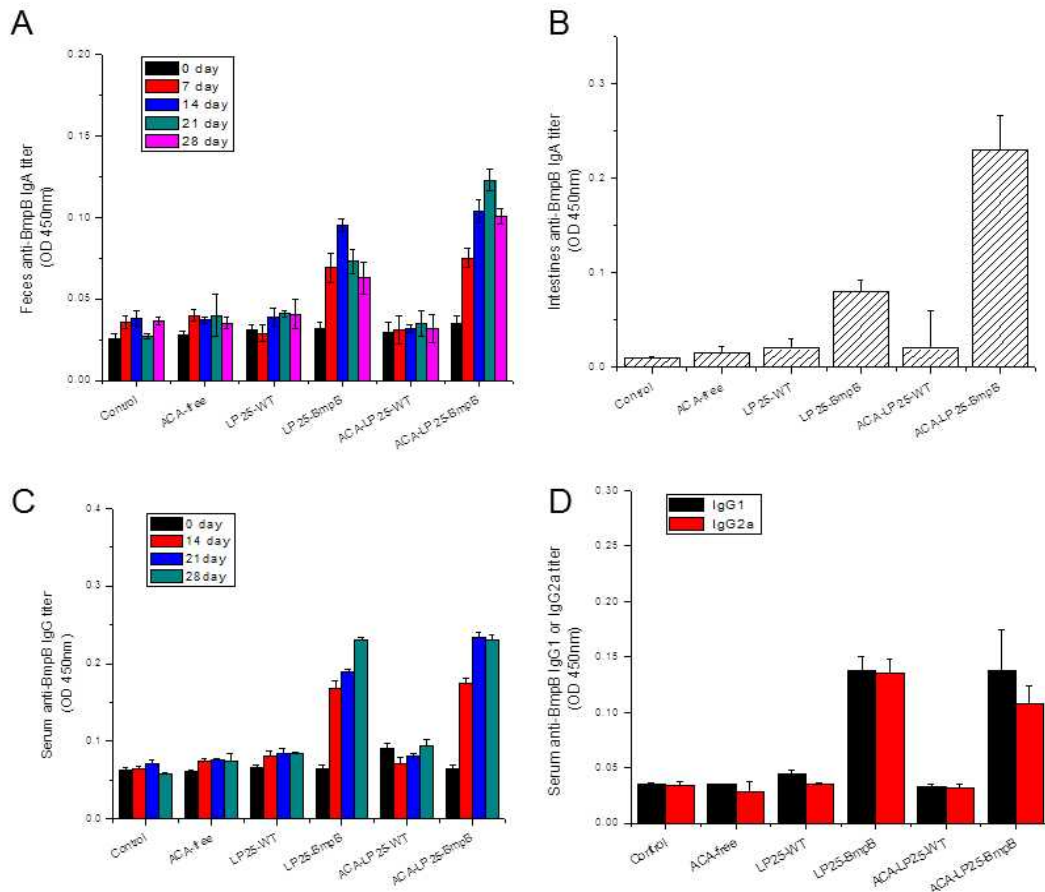


그림 1-75. ACA 마이크로캡슐 담지 미생물의 분비 효과에 따른 항체가 측정. (a) 분변 anti-BmpB IgA. (b) 소장 anti-BmpB IgG. (c) 혈청 anti-BmpB IgG. (d) 혈청 anti-BmpB IgG1과 IgG2a.

쥐에 마이크로캡슐에 담지된 기능성 미생물의 분비 활성이 장내에서 유지되는지를 평가하기 위해 BmpB를 분비하는 LP25를 경구투여 하고 BmpB 항체가를 측정하였다. 분변 (그림 1-75 (a))과 소장 (그림 1-75 (b))에서 IgA를 측정하였고 serum에서 IgG, IgG1 그리고 IgG2a의 값을 ELISA 방법으로 측정하였다. 대조구와 마이크로캡슐에 비하여 LP25-BmpB가 담지된 마이크로캡슐을 처리하였을 때 IgA의 값이 증가하였으며 이 수치는 특히 LP25-BmpB만 처리한 것에 비하여 높은 수준이었다. 또한 담지되지 않은 유산균에서 항체가가 최대도 도달하는 시간 (14일)보다 담지하였을 때 도달하는 시간 (21일)이 길어진 점을 보아 마이크로캡슐이 미생물의 활성을 더 오랜 기간 유지시키는 점을 알 수 있었다. Serum에서의 IgG (그림 1-75 (c)) 및 IgG1과 IgG2a (그림 1-75 (d))의 값도 같은 경향을 나타냈다.

(2) 항균능력이 증진·개량된 유산균이 담지된 고분자 마이크로캡슐의 육추 경구 투여

① GS1 유산균 담지 ACA 마이크로캡슐의 경구 투여 방법

그림 1-76에서 나타내는 바와 같이 기능성 미생물의 효율적인 전달여부를 평가하기 위하여 11일령의 Ross 308 육추를 각 그룹 당 6 마리씩 총 세 군으로 나누어서 하루에 두 번씩 5회 2×10^8 cfu의 GS1 (1-1세부과제를 통해 항균능력이 증진된 LP)을 경구투여하였다. 미생물 전달에 따른 생체 내 반응을 조사하기 위하여 마지막 투여 후 3시간과 6시간째에 근위, 소장, 맹장을 분리하였다.

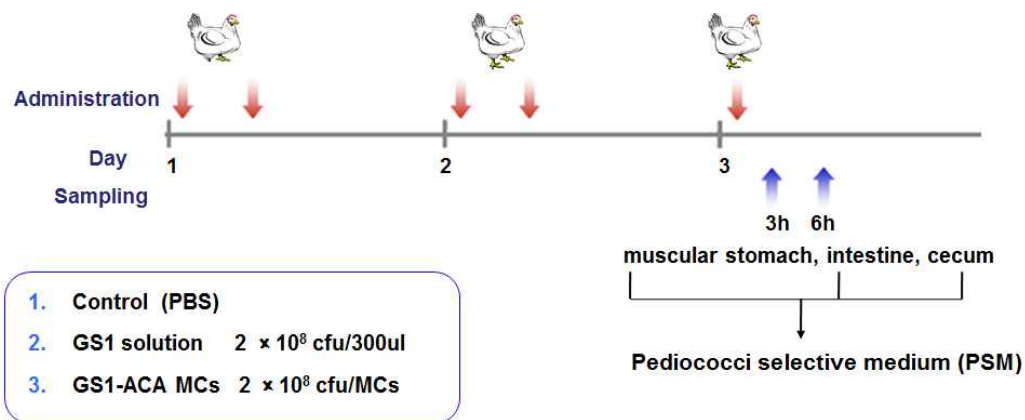


그림 1-76. 고분자 마이크로캡슐 담지 미생물의 경구투여 및 샘플링 스케줄

② 경구 투여된 ACA 마이크로캡슐 담지 GS1의 *in vivo* 활성

마이크로캡슐에 담지된 GS1을 육추에 경구 투여한 후 3시간과 6시간째에 육추의 근위, 소장, 맹장을 분리하고 pediococcus selective media (PSM)에서 내용물을 배양함으로써 각 부위에서의 LP 생균수를 측정하였다. 일반적으로 닭에서 미생물에 의한 발효가 일어나는 부위가 맹장이므로 근위, 소장에 비해 생균수가 높게 유지되는 현상을 보였다. 또한 생균제의 활성부위인 회장과 맹장에서, solution 상태의 GS1을 급여한 군보다 ACA 마이크로캡슐로 담지된 GS1을 급여한 군의 생균수가 높은 점으로 보아 ACA 마이크로캡슐의 생균제 보호효과를 확인할 수 있다.

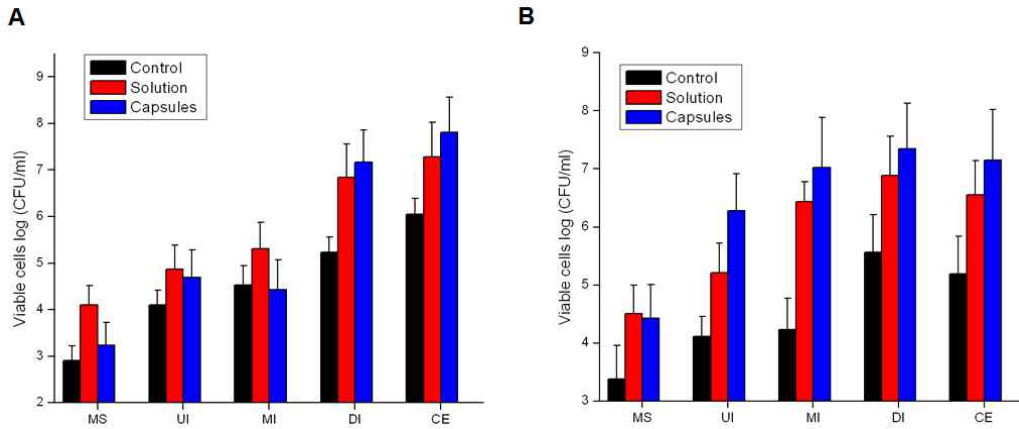


그림 1-77. ACA 마이크로캡슐 담지 GS1의 생균수 측정. (a) 경구 투여 후 3시간. (b) 경구 투여 후 6시간 뒤 각 부위 내 (MS:muscular stomach, UI:upper portion of intestine, MI:middle portion of intestine, DI:down portion of small intestine, CE:cecum) LP 생균수 측정.

제2절 제2핵심과제: 박테리오파지 기반의 동물질병 예방 및 치료용 생물활성제제의 개발

1. 박테리오파지 기반의 생물활성제제 제형 개발

제2핵심과제에서는 박테리오파지 기반의 동물질병 예방 및 치료용 생물활성제제를 개발하는 것으로 병원균 특이적 박테리오파지를 이용한 유방염 등 황색포도상구균 관련 질환 및 살모넬라 관련 질환의 예방 및 치료제를 개발하는 것이며 이러한 목표에 달성하기 위한 전략은 그림 2-1에 나타난 바와 같이 항병원균성 박테리오파지 제제와 파지유래 효소제제 개발을 병행함으로써 다양한 제품군을 확보 및 출시하는 것이다.

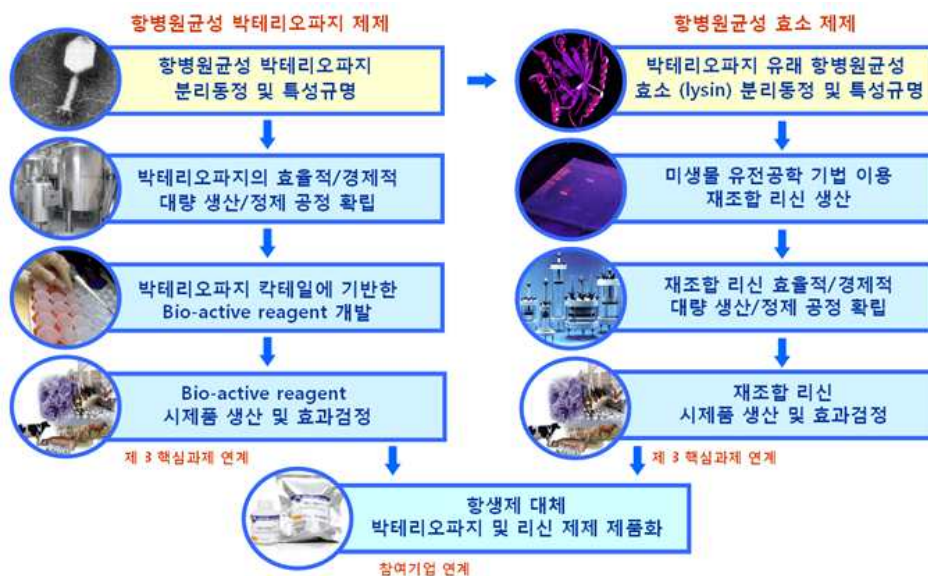


그림2-1. 박테리오파지 기반의 동물질병 예방 및 치료용 생물활성제제의 개발

가. 살모넬라 및 황색포도상구균 특이적 박테리오파지의 생산 및 정제 공정 구축과 scale-up

(1) 박테리오파지의 선발

과제 제안 시에 이미 활용할 박테리오파지들을 확보하고 있었다. 대상이 되는 박테리오파지들을 요약 제시하면 다음과 같다.

표 2-1. 대상 박테리오파지

박테리오파지 이름	특이점	기탁 번호
SAP-1	황색포도상구균 특이 박테리오파지	KCTC11153BP
SAP-2	황색포도상구균 특이 박테리오파지	KCTC11154BP
SEP-1	살모넬라 특이 박테리오파지	KCTC11173BP
SGP-1	살모넬라 특이 박테리오파지	KCTC11174BP

한편 기 확보 박테리오파지들 보다 우수한 성능의 박테리오파지의 분리 가능성 때문에 1차년도 초반에 추가 박테리오파지 확보를 시도 하였으며, 이 과정에서 다수의 박테리오파지의 확보가 가능하였다. 아래 그림은 박테리오파지 분리 과정을 개략적으로 보여주고 있다.

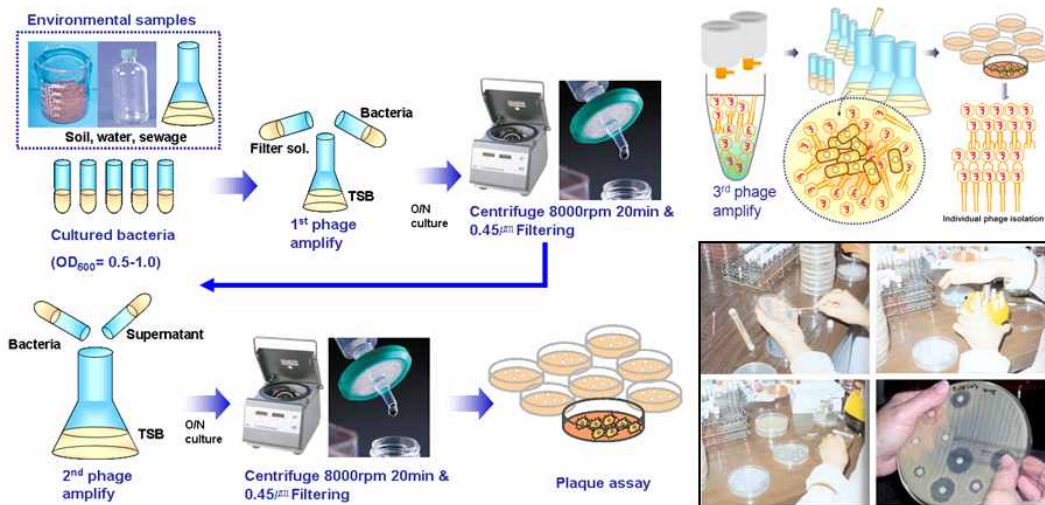


그림 2-2a. 박테리오파지 분리 과정을 보여주는 개략도

이들 추가 확보 박테리오파지들 중에 황색포도상구균과 살모넬라균에 대하여 추가로 활용될 박테리오파지는 없었다. 그러나 이번 과정에서 확보된 다양한 박테리오파지들은 향후 산업적 활용이 크게 기대되며 본 과제 수행의 추가적 성과로 생각된다. 특히 *Clostridium perfringens* 특이적 박테리오파지는 *Clostridium perfringens* 관련 질환이 양돈 및 양계 산업 모두에서 심각하다는 점을 고려할 때 그 가치는 크다고 판단할 수 있다. 추가 확보된 박테리오파지 중 주요한 박테리오파지들을 제시하면 다음과 같다. 그리고 이들 중 준비가 되는대로 유전자원으로 등록을 추진하고 있다 (과제 수행 결과로 KCTC11829BP, KCTC11830BP, KCTC11831BP, KCTC11832BP, KCTC11737BP의 총 5건의 유전자원 등록).

표 2-2. 추가 확보 박테리오파지

박테리오파지 이름	특이점	기탁 번호
K88 specific bacteriophage	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> 특이 박테리오파지	-
K99 specific bacteriophage	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> 특이 박테리오파지	-
CPP-1	<i>Clostridium perfringens</i> 특이 박테리오파지	KCTC11829BP
CPP-2	<i>Clostridium perfringens</i> 특이 박테리오파지	KCTC11830BP
CPP-3	<i>Clostridium perfringens</i> 특이 박테리오파지	KCTC11831BP
CPP-4	<i>Clostridium perfringens</i> 특이 박테리오파지	KCTC11832BP
<i>Bordetella bronchiseptica</i> specific bacteriophage	<i>Bordetella bronchiseptica</i> 특이 박테리오파지	-
SP-1	살모넬라 특이 박테리오파지	KCTC11737BP
STP-1	살모넬라 특이 박테리오파지	-

(2) 박테리오파지의 생산 (증식) 공정 구축 및 scale-up

개발한 박테리오파지에 기반한 생물활성제제 (사료첨가제 등)의 전체적 제조공정은 다음과 같이 설정하고 있다.

개별 박테리오파지의 배양/증식 (다단계 공정) ⇒ 증식된 개별 박테리오파지의 분리/정제 (다단계 공정) ⇒ 정제된 개별 박테리오파지의 QC ⇒ 정제된 개별 박테리오파지들의 혼합 ⇒ 분말형 제제 (건조원제)의 제조 ⇒ 제조된 건조원제에 대한 QC/QA ⇒ 제품 포장

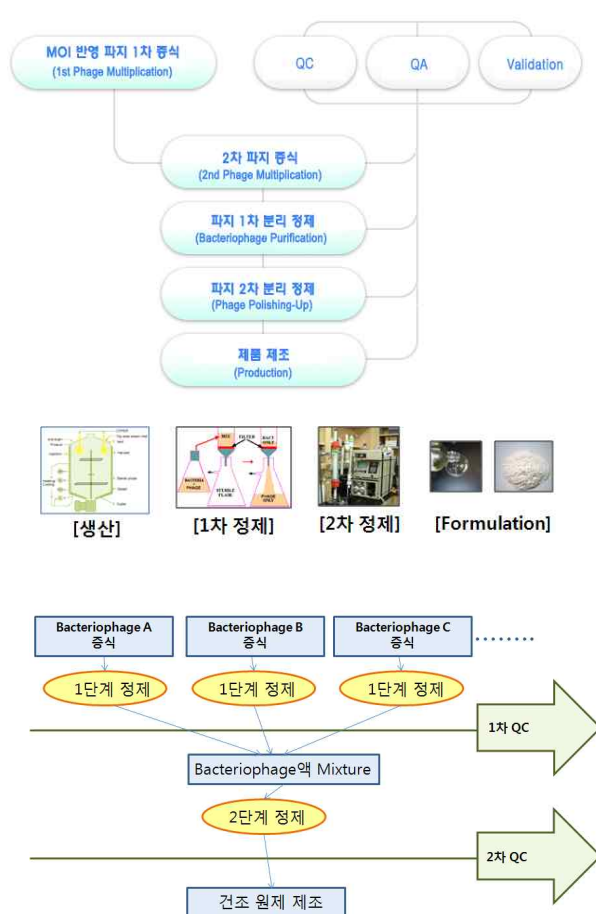


그림 2-2b. 박테리오파지 기반의 생물활성제제의 제조 공정

이를 고려하여 먼저 개별 박테리오파지의 생산 (증식) 조건을 탐색한 후 생산 (증식) 공정을 구축하였다. 생산 공정 구축에는 증식에 이용되는 박테리아 자체의 배양 조건, 박테리오파지와 박테리아의 초기 상대적 양 (MOI; Multiplicity of Infection)이 매우 중요하다.

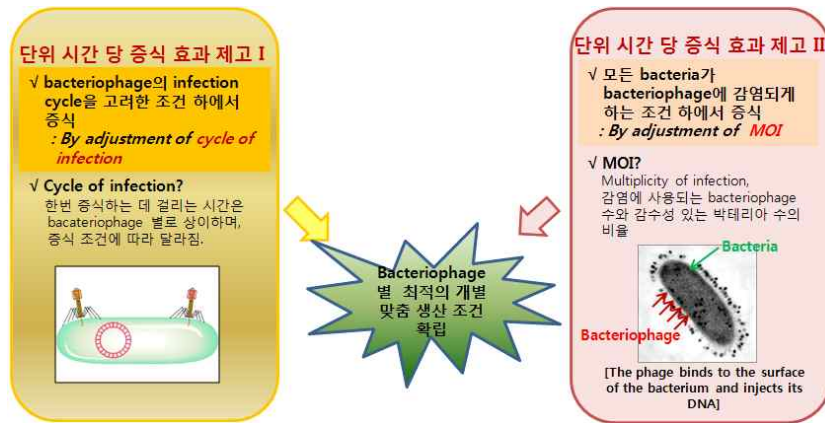


그림 2-3. 박테리오파지 증식 공정 구축 전략

최종적으로 박테리오파지의 생산 (증식) 공정을 구축하였고 관련하여 표준작업서 (SOP; Standard Operating Procedure)를 마련했다. 대표 예로 하나의 경우를 제시하면 다음과 같다. 참고로 본 SOP는 1 L 규모로 scale-up한 공정에 대한 것이다.

표 2-3. SAP-1의 증식 SOP

[BP0001] 박테리오파지 SAP-1 증식을 위한 SOP

<p>• 시약의 제조</p> <p>A) Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB) [Difco Cat. No. 211825] D.W 1 L에 30 g TSB를 넣어 잘 흔들어서 녹인 후 autoclave 실시</p> <p>B) Bacto™ Tryptic Soy Agar (TSA) [Difco Cat. No. 236950] D.W 1 L에 40 g TSA를 넣은 후 stir bar를 사용하여 잘 녹인 후 autoclave 실시</p>
--

1 일차:

박테리아의 배양 및 박테리오파지 증식 배지 준비

<p>< SA1의 증식 ></p> <p>1-1) SA1 bacteria culture ⇒ 250 ml 삼각 flask에 100 ml의 TSB를 넣은 후 20 µl의 SA1 bacteria glycerol stock (deep freezer에 보관된 bacteria)을 첨가함.</p> <p>1-2) 37°C/ 180rpm으로 setting 된 shaking incubator를 이용하여 약 13-15시간 동안 배양</p> <p><SAP-1 증식 배지 준비 ></p> <p>1-3) 2 L 삼각 flask에 D.W 1 L와 30 g TSB를 넣어 잘 흔들어서 녹인 후 autoclave 실시</p>
--

2 일차:

박테리오파지의 증식 및 plaque assay

- 2-1) 한밤 배양한 SA1 배양액 1 ml과 9 ml의 TSB를 사용하여 1/10 dilution 한 후, 여기서 1 ml을 취하여 3.5 ml용 cuvette에 넣어 spectrophotometer (Bio-Rad Smartspec™ 3000)로 OD₆₀₀값을 측정함.
- 2-2) 희석된 배양액의 OD₆₀₀값을 근거로 하여 한밤 배양한 원액의 OD₆₀₀값을 계산한 다음, 최종적으로 **OD₆₀₀값이 약 0.1**이 되도록 준비함. (참고: SA1 OD₆₀₀ 0.1 ≙ 1 × 10⁸ cfu/ml임)
- 2-3) Titer를 미리 알고 있는 SAP-1을 serial dilution 시켜서 최종 **10⁹pfu/ml**로 준비함. <Phage 희석법> 오차를 최소화하기 위하여 TSB 9 ml에 파지액 1 ml을 섞어 10 배씩 희석해 나감.
- 2-4) SA1과 SAP-1이 상기 농도로 준비되면 아래와 같이 mix함.

Volume (ml)			Total volume (ml)
SAP-1 (10 ⁹ pfu/ml)	SA1 (OD ₆₀₀ =0.1)	TSB	1000
10	100	890	

이 때, SA1 및 SAP-1의 최종 농도 및 MOI는 다음과 같음.

SAP-1 (pfu/ml)	SA1 (cfu/ml)	MOI
10 ⁷	10 ⁷	1

- 2-5) 혼합된 SAP-1 증식액을 37°C/180rpm shaking incubator로 3시간 동안 증식시킴.
- 2-6) 증식 종료 후, 증식액을 원심분리 (SUPRA22K, 5000rpm, 20min)한 상층액을 filtration (0.2µm bottle top filter) 하여 SAP-1을 분리함.
- 2-7) 분리된 SAP-1은 냉장 보관하고 일부 (약 200 µl)는 plaque assay를 통해 titer를 측정함.
- 2-8) Clean bench에 3-4개의 TSA plate를 준비하여 미리 선을 긋고 (가로3줄, 세로4줄 정도로) 희석배수를 적어 spotting 할 칸을 만들어 놓음.
- 2-9) TSA plate에 한밤 배양한 SA1 bacteria 배양액을 1 ml씩 spreading하고 clean bench 내에서 뚜껑을 열어 건조시킴.
- 2-10) 증식 후 분리해 둔 SAP-1 파지액을 10¹~10⁴⁰까지 micro-tube에 serial dilution 함. 이 때, 희석은 오차를 최소화하기 위하여 TSB 900 µl에 파지액 100 µl를 섞음.
- 2-11) 원액, 10¹~10⁴⁰까지의 희석액이 준비되면 이를 SA1이 spreading 된 TSA plate에 10 µl 떨어뜨림.
- 2-12) 떨어뜨린 spot이 건조될 때까지 clean bench에 두었다가 37°C incubator 에 넣음.

3일차:

증식된 박테리오파지의 titer 확인

- 3-1) 다음날 아침 plaque이 너무 커지지 않았는지 확인 후, plaque을 계수하여 titer를 확인함.

상업화를 보다 효율적으로 추진하기 위하여 박테리오파지 증식 공정의 scale-up을 추가 연구로 수행하였다. 기 개발 수준에서 60 L 규모의 효율적인 증식 공정을 구축하였다. 이를 위하여

자체 자금을 투입하여 150 L 규모의 발효 및 정제 설비를 구축하였다.

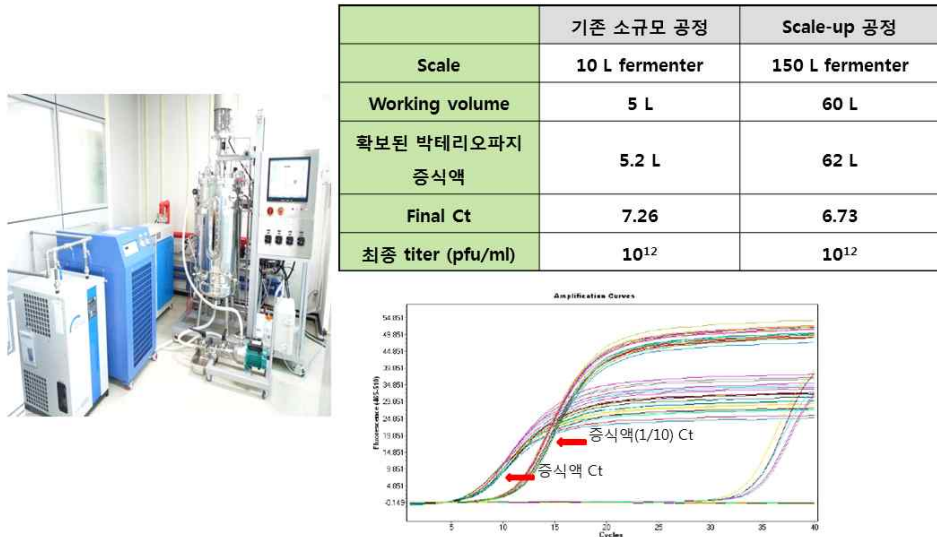


그림 2-4. 박테리오파지 증식 공정 (60 L)

(3) 박테리오파지의 정제 공정 구축 및 scale-up

박테리오파지 정제 공정은 1 L 규모의 증식에 적합하게 구축하였다. 기본적으로 polyethylene glycol (PEG) 침전에 기반한 정제 공정이다. Ion exchange chromatography 등 몇 가지의 다른 방법도 적용을 고려할 수 있으나 편의성과 경제성 때문에 PEG 침전에 기반한 정제 공정을 구축하였다. 구축된 정제 공정을 간략히 제시하면 다음과 같다.

표 2-4. 박테리오파지 정제 공정

1. After enrichment of bacteriophage, the culture broth was centrifuged for 20 minutes at 8,000 rpm.
2. The supernatant was filtered with a 0.45 μ m-filter.
3. After filtration, a 20% polyethylene glycol 8000/2.5 M NaCl aqueous solution was added to the filtrate using a volume of 1/6 of the total volume of the filtrate.
4. The mixture stood at 4°C for overnight.
5. Centrifugation was performed at 8,000 rpm for 20 minutes to obtain the bacteriophage pellet.
6. The pellet was resuspended in an appropriate volume of Tris-buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 0.1% Gelatin, pH7.5), to which 20%(v/v) polyethylene glycol 8000/2.5M NaCl aqueous solution was added using a volume of 1/6 of the total volume of the resuspended solution.
7. The mixture stood at 4°C for one hour.
8. The mixture was centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes to obtain the purified bacteriophage precipitate.
9. The precipitate was resuspended in an appropriate volume of Tris-buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 0.1% Gelatin, pH7.5).

나. 살모넬라 및 황색포도상구균 특이 박테리오파지들의 특성 규명

(1) 생물학적 특성 규명

박테리오파지들의 생물학적 특성을 조사하였다. 형태학적 특징, 구조적 특징, 부분 또는 전체

유전자 서열을 분석하였다. 이를 통하여 선별된 박테리오파지들을 타 박테리오파지들과 구분하여 특정지를 수 있었다. 아래는 특성 규명 결과의 대표적 예의 하나로, SAP-1 및 SAP-2의 전자현미경 사진과 SEP-1의 전체 유전체의 염기 서열의 일부를 제시한 것이다.

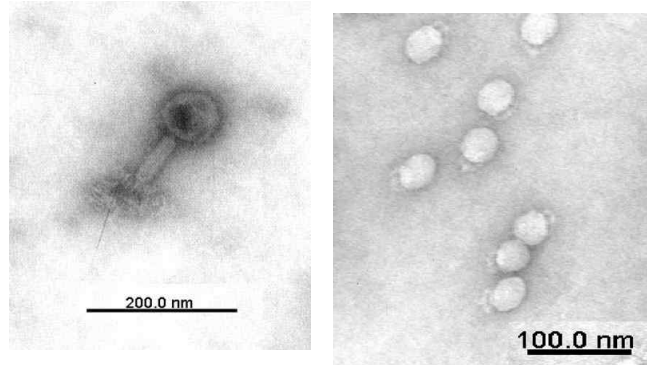


그림 2-5. 박테리오파지의 전자현미경 사진. 좌: SAP-1; 우: SAP-2

표 2-5. SEP-1의 전체 유전체의 염기서열 (부분만 제시)

1	AACTCGAACT GTGCGGCTGC GCCGTTGTCG TTAGTAATGG TGAACGTGTC
51	GATAAGTTTA AGTGGCGCGG CACCGTCATA AGCAGATACA TCAACCGATG
101	CAAACGGGCG GGCATAAAA TTAGTCGTGA AGTCGGAACC GCTAGCGCGC
<생략>	
43151	CAAGAACCGA AGATACCTCC ATTTCTGTTT CATTCCAGGA ATTTATTCAA
43201	CAACGTCAGG TCGTACAGTT TACCCGCCAA CGAGAAGGTA TTAGCGGCGC
43251	GACCGCGCTC AACAAATGCC ACGCTGTTAT TCCCC

이에 더하여 박테리오파지들의 산업적 활용을 고려하여 열안정성 및 내산성도 조사하였다. SAP-1, SAP-2, SEP-1 및 SGP-1 박테리오파지들은 50℃ 이하의 온도에서의 열자극이 가해졌을 경우에는 거의 안정하였으나 60℃부터는 안정성이 떨어졌다.

표 2-6. 박테리오파지별 온도별 안정성 (단위: pfu/ml)

박테리오파지	처리 전	40°C/24시간	50°C/24시간	60°C/24시간
SAP-1	2×10^{14}	5.7×10^{14}	5.1×10^{14}	0
SAP-2	2.5×10^{14}	1.5×10^{15}	2.8×10^{14}	0
SGP-1	1×10^{15}	8.5×10^{14}	6.6×10^{14}	6×10^5
SEP-1	6×10^{14}	3.6×10^{14}	3.7×10^{14}	3.6×10^5

참고로, 75℃의 경우는 10분 정도 안정하였다. 이 정도의 열안정성이라면 축산용 제품으로 활용하는 데에는 큰 문제가 없을 것으로 판단하였다.

사료첨가제로의 산업적 활용을 고려하여 1차년도에 이어서 개발에 활용된 박테리오파지들(SAP-1, SAP-2, SEP-1 및 SGP-1를 포함하여 지금까지 확보된 다수의 박테리오파지들을 대상으로 함)에 대한 내산성을 조사하였다. 실험 방법은 다음 표에 제시된 바와 같으며(해당 pH의 조건 하에서 4 시간 incubation 후의 박테리오파지 titer를 조사), 그 결과로 SAP-1, SAP-2, SEP-1 및 SGP-1은 pH 5부터 일부 titer가 떨어졌지만 대략적으로 pH 3까지는 안정하였다. 심하게 내산성이 떨어지는 박테리오파지들도 많았는데(pH 5에서 titer가 30% 미만으로 감소), 이들은 사료첨가제나 음수첨가제 같은 산업적 활용면에서 그 적합성이 떨어진다고 판단

하여 추후 개발 대상에서 배제하였다. 살모넬라 특이 박테리오파지(SEP-1 및 SGP-1)와 황색포도상구균 특이 박테리오파지(SAP-1 및 SAP-2)에 대한 내산성 시험 결과를 제시하면 표와 같다.

표 2-7. 살모넬라 특이 박테리오파지들 및 황색포도상구균 특이 박테리오파지들의 내산성 조사 결과

pH	살모넬라 특이 박테리오파지의 평균치 (%)	황색포도상구균 특이 박테리오파지의 평균치 (%)
2	0	0
3	81	71
4	90	88
5	99	97
6	100	100
7	100	100

해당 pH의 조건 하에서 4 시간 incubation 후 top agar assay를 통하여 박테리오파지 titer를 조사함. pH 7에서의 titer를 100%로 하여 각 pH 조건 하에서의 titer를 환산하여 %로 표기함.

박테리오파지들의 항균 특성은 자체 보유한 여러 박테리아 균종들에 대하여 일차적으로 실시하였으며, 2차적으로는 외부 기관들에서 추가 실시하였다. 자체 조사에서는 통상의 점적 실험(spot assay) 방법을 사용하였다.

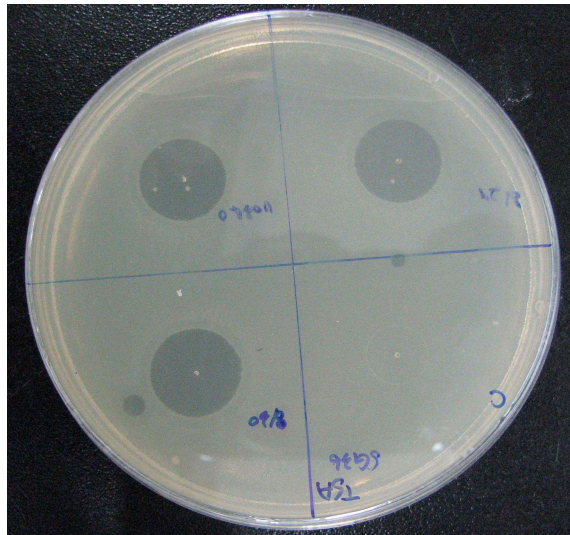


그림 2-6. 점적 실험 결과 예시

결과로, 황색포도상구균 특이 박테리오파지들은 비교적 좁은 항균 활성 범위를 나타내었으며 살모넬라 특이 박테리오파지들은 살모넬라 균들에 대해 비교적 넓은 항균 활성 범위를 나타내었다. 자체 조사로 확인된 항균 활성 범위를 개략적으로 제시하면 다음과 같다.

표 2-8. 항균 활성 범위(자체 실험 결과)

박테리오파지	항균 활성
SAP-1	- 황색포도상구균 중에는 이 박테리오파지에 저항성을 갖는 종류가 있었음. - 황색포도상구균 외의 다른 균종에는 영향을 주지 않음.
SAP-2	- 황색포도상구균 중에는 이 박테리오파지에 저항성을 갖는 종류가 있었음. - 황색포도상구균 외의 다른 균종에는 영향을 주지 않음.
SEP-1	- <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella gallinarum</i> , <i>Salmonella pullorum</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Salmonella dublin</i> , <i>Salmonella durby</i> 에 항균 활성을 나타냄. - 살모넬라 이외의 종에는 항균 활성 없음.
SGP-1	- <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Salmonella gallinarum</i> , <i>Salmonella pullorum</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Salmonella dublin</i> , <i>Salmonella durby</i> 에 항균 활성을 나타냄. - 살모넬라 이외의 종에는 항균 활성 없음.

표 2-9. 항생제내성균주은행 결과 (SAP-1)

No.	CCARM No.	Species	Resistance (MIC) ^a		분리시기	Source	Result ^b
			ORSA	Vancomyc in			
1	0027	<i>S. aureus</i>	N (≤0.5)	1	QC strain	Human	○
2	3501	<i>S. aureus</i>	Y (>128)	4	2001	Human	○
3	3502	<i>S. aureus</i>	Y (>128)	8	2001	Human	×
4	3089	<i>S. aureus</i>	Y (>64)	4	1999 이전	Human	○
5	3090	<i>S. aureus</i>	Y (>64)	4	1999 이전	Human	○
6	3091	<i>S. aureus</i>	Y (>64)	4	1999 이전	Human	○
7	3095	<i>S. aureus</i>	Y (>64)	4	1999 이전	Human	○
8	3108	<i>S. aureus</i>	Y (>64)	2	1999 이전	Human	○
9	3207	<i>S. aureus</i>	Y (>64)	2	1999 이전	Human	○
10	3209	<i>S. aureus</i>	Y (>64)	2	1999 이전	Human	○
11	3210	<i>S. aureus</i>	N (32)	2	1999 이전	Human	○
12	3222	<i>S. aureus</i>	Y (>64)	2	1999 이전	Human	○
13	3223	<i>S. aureus</i>	Y (>64)	2	1999 이전	Human	○
14	3224	<i>S. aureus</i>	Y (>64)	2	1999 이전	Human	○
44	3596	<i>S. aureus</i>	Y (>128)	2	2001	Human	○
			생략				
51	3623	<i>S. aureus</i>	N (1)	2	2001	Human	○
52	3628	<i>S. aureus</i>	Y (64)	2	2001	Human	○
53	3629	<i>S. aureus</i>	Y (>128)	2	2001	Human	×
54	3630	<i>S. aureus</i>	Y (>128)	<1	2001	Human	×
55	3634	<i>S. aureus</i>	Y (>128)	<1	2001	Human	×
56	3635	<i>S. aureus</i>	Y (>128)	<1	2001	Human	×
57	3710	<i>S. epidermidis</i>	Y (>128)	2	2003	Human	×
58	35049	<i>S. epidermidis</i>	Y (>128)	2	2003	Human	×
59	35050	<i>S. epidermidis</i>	Y (>128)	2	2003	Human	×
60	35053	<i>S. haemolyticus</i>	Y (>128)	2	2003	Human	×

^a MIC in ORSA is MIC of oxacillin.

^b ○ indicates that the efficacy was confirmed.

살모넬라 균에 대해서는 국립수의과학검역원에서 실시하였다. SEP-1 및 SGP-1 박테리오파지 각테일이 *Salmonella agona*, *Salmonella brandenburg*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella derby*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella jos*, *Salmonella kedougou*, *Salmonella london*, *Salmonella mbandaka*, *Salmonella newport*, *Salmonella ohlstedt*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella rissen*, *Salmonella ruiru*에 대하여 항균 활성이 있음이 확인되었다. 이는 상당히 이례적인 넓은 항균 활성 범위라 할 수 있으며, 감수성을 갖는 살모넬라 종류에는 실제 축산 현장에서 문제가 심각한 살모넬라는 대부분이 포함되어 있었다.

자체 조사 후, 국내 분리주들을 대상으로 외부기관에서 항균 활성 범위를 조사하였다. 항생제내성균주은행에서 실시된 황색포도상구균에 대한 항균력 시험에서는 자체 조사 결과와 유사한 결과가 나왔다. 즉, 대부분의 황색포도상구균 (MRSA 포함)에는 항균 활성을 나타내었으나 일부 종들은 저항성을 가졌다.

다. 박테리오파지 기반의 생물활성제제 제형 개발

(1) 사료첨가제 제형 개발

정확히는 사료첨가제 제조 시에 사용되는 원료인 “원제”를 개발하고자 하였다. 분말형태의 부형제들과 “원제”의 단순 혼합만으로 사료첨가제가 제조될 수 있도록 하기 위하여 건조형태의 “원제(건조원제)”를 개발하고자 하였다. 건조원제 개발에서는 다음과 같은 여러 가지 사항들을 고려하였다.



그림 2-7. 건조원제 개발 시의 기본 개념

건조원제 개발에 앞서 먼저 액상의 박테리오파지 제제를 개발했으며, 다양한 buffer(SM buffer, Tris buffer, PBS, L-Histidine buffer, phosphate buffer, HEPES buffer)를 사용하여 (a) 제조 후 원제의 안정성, (b) 분사 편의성, (c) 보관 안정성, (d) 건조 시간, (e) 건조 공정 후의 박테리오파지 활성 유지 정도의 조사를 통하여 다음 조성의 TMG buffer를 basal buffer로 최종 선정하였다. 다른 buffer들도 적용이 가능하기는 하다고 판단되나 TMG buffer가 제조 후 원제의 안정성, 건조 공정 후의 박테리오파지 활성 유지 정도, 건조원제 제조 적합성 면에

서 가장 적합하여 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 0.1% Gelatin, pH7.5를 최종 buffer 조건으로 선정하였다.

TMG buffer를 이용하여 액상의 박테리오파지 제제(bacteriophage suspension)를 개발하였으며 이를 이용하여 최종적으로 적합 건조원제를 개발하였다. 액상 박테리오파지 제제에 포함되는 개별 박테리오파지(SAP-1, SAP-2, SEP-1 및 SGP-1)는 1×10^{15} pfu/ml 이상으로 하였다. 기본적으로 건조원제는 분말의 매질에 상기 제조한 액상의 박테리오파지 제제를 분사하여 건조하는 방식으로 제조하였다. 제조공정은 적정 고품 분말 매질 양, 고품 분말 매질에 대한 박테리오파지 분사액량, 건조 시간, 진공 조건의 공정변수들에 대한 최적화를 수행하여 확립하였으며, 최종 확립된 제조공정을 제시하면 다음과 같다.

1. Maltodextran (MD) 20 g에 액상의 박테리오파지 제제(각각의 박테리오파지 Titer: 1×10^{15} pfu/ml) 2 ml을 spray를 이용하여 고르게 분사.
2. 분사 후 50 분 동안 vacuum drying.
3. Drying 후 grinding.
4. 상기 과정을 통하여 제조된 여러 batch들을 혼합.
5. 혼합한 후, 박테리오파지 titer를 top agar assay를 통하여 조사(Top agar assay에서 대상으로 한 박테리아는 *Staphylococcus aureus*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella typhimurium*이었음).
6. Titer를 1×10^{14} pfu/g이 되게 조정.
7. 이렇게 제조한 것 100 g에 중량비로 9 배의 MD를 첨가하여 잘 혼합 (최종 titer : 1×10^{13} pfu/g).

사료첨가제 제조에 사용되는 고품 분말 매질로는 여러 성분들(Glucose, Sucrose, Maltodextran, Skim milk, 및 이들의 다양한 조성의 혼합물)을 대상으로 그 적합성을 조사하였으며, 제조 편의성, 박테리오파지에 대한 적합성, 제조 후 QC의 용이성 등을 고려하여 최종적으로 말토덱스트란을 기본 분말 형태의 매질로 선정하여 건조원제를 제조하였다. 장기 보관 안정성 제고를 고려하여 실리카를 적용할 수 있음도 확인되었으나 향후 적용 가능성을 확인한 것으로 의미를 두고 채택은 하지 않았다. 개발된 건조원제는 현재까지 확보된 박테리오파지들(SAP-1, SAP-2, SEP-1 및 SGP-1)의 다양한 배합에 의한 각테일제 형태이다. 최종 도출된 건조원제의 성상은 분말 형태로 다음 그림과 같다.

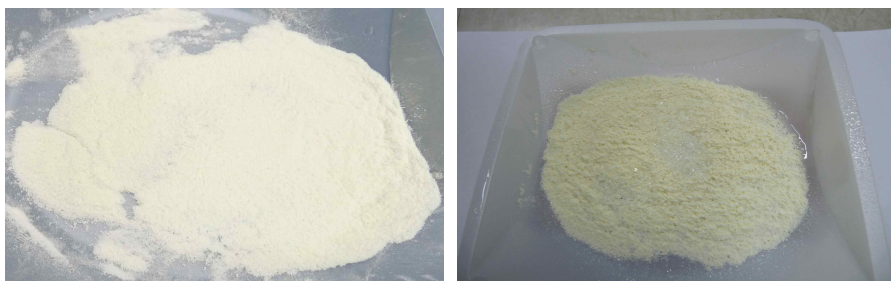


그림 2-8. 건조원제의 성상

이렇게 제조된 원제에 부형제로 옥분 및 왕겨를 다양한 비로 첨가 후 혼합하여(1 : 10,000의 비율로 혼합) 최종 사료첨가제를 제조하였다. 고른 혼합을 위하여 단계적 혼합 방식을 적용하였다.

(2) 음수첨가제 제형 개발

음수첨가제는 축산산업에서 음수 공급 시에 혼합하여 급이하는 제품이다. 박테리오파지 기반의 음수첨가제는 액상 및 이의 동결건조형 2가지 제형으로 개발하였다. 역시 박테리오파지는 현재까지 확보된 박테리오파지(SAP-1, SAP-2, SEP-1 및 SGP-1)를 다양한 비율로 혼합한 각테일제 형태로 개발하였다.

액상은 박테리오파지의 활성 유지에 가장 적합하다고 확인된 TMG buffer를 기반으로 하여 음수첨가제를 개발하였다. 동결건조형은 상기 사료첨가제 건조원제 제조에 사용한 액상의 박테리오파지 제제에 부형제(sucrose)와 동결건조 안정화제(trehalose)를 추가 적용하여 개발하였다. 역시 박테리오파지 각테일제로 개발하였다. 최종 개발된 동결건조 형태의 음수첨가제의 사진을 제시하면 다음 그림과 같다.



그림 2-9. 동결건조 형태의 음수첨가제

(3) 소독제 제형 개발

소독제는 음수첨가제와 같은 조성의 액상으로 개발하였다. 역시 박테리오파지 각테일제 형태로 개발하였다. 다음은 개발된 소독제의 사진이다.



그림 2-10. 소독제

(4) 저장안정성

분말형 사료첨가제 제형(건조원제)과 액상 음수첨가제 제형에 대하여 장기 저장안정성을 조사하였다. 보관 조건은 상온으로 하였으며, 습도 등의 보관 조건에 대한 인위적 조정은 따로 실시하지 않았다. 건조원제를 보관하면서 약 한달 간격으로 일정량을 취한 다음에 이에 대한 top agar assay를 통하여 박테리오파지 titer의 변화를 조사하는 방식으로 본 실험을 실시하였

다. 사료첨가제에 대한 저장안정성 조사 결과를 제시하면 다음과 같다.

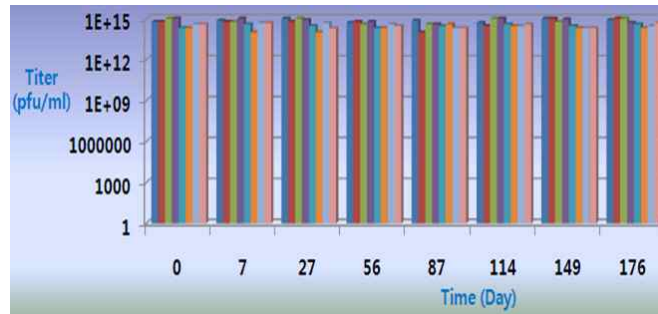


그림 2-11. 저장안정성 시험 결과

액상 음수첨가제 제형도 사료첨가제와 매우 유사한 저장안정성 결과를 보였다. 이러한 결과로부터 분말형 사료첨가제 제형과 액상 음수첨가제 제형 모두 우수한 장기 저장안정성을 갖고 있다고 할 수 있다. 170일 이상 안정함이 확인되었으며 현재도 계속적으로 장기 저장안정성 시험을 실시하는 중에 있다.

라. 생물활성제제 시제품 제작

1차년도에 박테리오파지들의 특성분석 및 각 박테리오파지별 생산공정을 개발하였고, 이어 2차년도에는 생물활성제제의 제형개발을 수행하여 기본적인 효능 검증을 완료하였다. 이러한 1차년도 및 2차년도의 연구결과를 활용하여 최종적으로 총 7종의 생물활성제제 시제품을 제작하였다.

이들 시제품들은 모두 선별된 다수의 박테리오파지들이 포함된 박테리오파지 각테일 형태의 제품이다. 구체적으로 사료첨가제 4종, 음수첨가제 2종, 소독제 1종이다. 항균범위 등의 특성분석을 통하여 제품화하기에 적합한 박테리오파지들을 선별한 후, 각 대상 축종에서 특히 심각한 문제를 유발하는 질병 원인균들을 대상으로 각테일로서 조합하여 시제품을 제작하였다. 또한 실제 field에서의 활용 범위를 고려하여 사료첨가제, 음수첨가제 및 소독제 제형으로의 시제품들을 제작하였다. 시제품 제작과 관련한 상세 사항은 다음과 같다.

구분	시제품명	설명	제형	비고
사료첨가제	벡터페이즈	육계용 및 오리용	분말형	
	벡터페이즈 S	산란계용 및 종계용	분말형	
	벡터페이즈 T	양돈용	분말형	
	벡터페이즈 C	송아지용	분말형	
음수첨가제	음수첨가제 I	양돈용 및 양계용	액상형	
	음수첨가제 II	양돈용 및 양계용	동결건조형	
소독제	PML100	양돈용 및 양계용	액상형	

그림 2-12. 개발 시제품

2. 생물활성제제의 효능 검증

가. 항균 효능

(1) *In vitro* 항균 효능 시험

본 개발에 사용된 박테리오파지들의 각테일을 대상으로 하여 국내 농장 분리 살모넬라 균(살모넬라 선택 배지를 통해 일차적으로 살모넬라로 확인되고, 이차적으로 살모넬라 특이 유전자[*invA* gene]를 대상으로 한 PCR을 통하여 살모넬라 균으로 최종 검증된 균) 및 황색포도상구균(황색포도상구균 선택 배지를 통해 일차적으로 황색포도상구균으로 확인되고, 이차적으로 16S RNA sequencing을 통하여 황색포도상구균으로 최종 검증된 균)에 대하여 항균 효과를 다음과 같은 점적 실험(spot overlay assay)을 통하여 조사하였다.

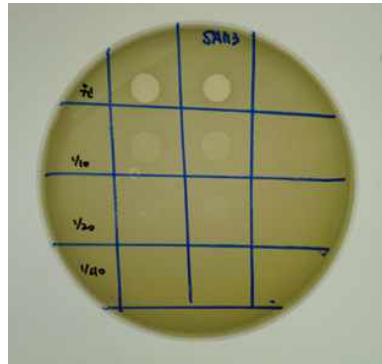


그림 2-13. 점적실험결과

본 항균 실험에서는 국내 12개의 양돈 및 양계 농장에서 자체 분리 확보한 503종의 살모넬라 균과 307종의 황색포도상구균을 대상으로 하였다. 살모넬라 특이 박테리오파지 각테일의 경우(SEP-1 및 SGP-1의 각테일)는 503종의 대상균에 대하여 100%의 항균 효과를 나타내었으며, 황색포도상구균 특이 박테리오파지 각테일의 경우(SAP-1 및 SAP-2의 각테일)는 307종의 대상균에 대하여 82%의 항균 효과를 나타내었다. 특히 살모넬라에 대한 우수한 항균 효과는 매우 놀라운 결과라 할 수 있겠다.

(2) *In vivo* 항균 효능 시험

나. 생물활성제제 시제품의 *in vivo* 안전성 조사

생물활성제제 시제품의 동물대상 *in vivo* 안전성 시험은 2가지 방향에서 수행하였다. 하나는 사료첨가제 시제품의 장기급이시험을 통하여 조사하였으며, 또 하나는 음수첨가제 시제품의 장기급이시험을 통하여 조사하였다. 사료첨가제 시제품의 장기급이시험은 통상적인 사양시험 형태로 실시하였으며 객관성을 높이기 위하여 사양 관련 전문성이 높은 국내외 대학에 의뢰하여 실시하였다. 구체적 시험은 각 의뢰 받은 교수님들이 설계하여 실시하였다. 음수첨가제를 이용한 시험은 의약품 개발 시 GLP(Good Laboratory Practice) 기준 하에 독성시험을 수행하는 CRO인 (주)캡은 비임상연구소에 의뢰하여 실시하였으며, 음수첨가제를 이용한 안전성 조사 시

험 역시 GLP 기준을 준수하여 실시하였다.

먼저 대학교들에서 실시한 시험들을 요약제시하면 다음과 같다.



그림 2-14. 대학교 장기급이시험


표 2-10. 대학교 장기급이시험

시험실시기 관	시험 내역	결과 요약
단국대학교	① 축종: 40 주령 ISA-brown (산란계) ② 시험대상동물수: 총 240수 ③ 시험방법: 6주간 급이. 옥수수-대두박 위주의 가루 형태사료에 배합하여 급이. 사 료는 제한급여를 실시. 물은 자유로 이 먹을 수 있도록 함. 시험기간 내 에 사육동물의 이상증상 발생 및 분내 미생물 조성을 조사	① 대조군에 비교하여 특이증상 발생이 관찰되지 않았음 ② 분내 Lactobacillus 등 미생물 조성 에서 특이사항 관찰되지 않았음. 즉, 분 내 미생물 조성에 있어 처리구간 유의 적인 차이가 나타나지 않았음
	① 축종: 1일령 ROSS 308 (육계) ② 시험대상동물수: 총 720수 ③ 시험방법: 5주간 급이. 3단 케이지에서 사육. 사료와 물은 자유 채식토록 함. 시 험기간 내에 사육동물의 이상증상 발생 및 분내 미생물 조성을 조사 하였으며, 시험 종료시 처리구별 임 의로 선별하여 익하정맥에서 혈액 을 채취하여 혈액 특성을 조사	① 대조군에 비교하여 특이증상 발생이 관찰되지 않았음 ② 분내 미생물 조성에 있어 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았음 ③ 적혈구, 백혈구 및 림프구 함량에 있 어서 처리구간 유의적인 차이가 나타 나지 않았음
	① 축종: 3원 교잡종	① 대조군에 비교하여 특이증상 발생이 관찰되지 않았음

	<p>[(Landrace×Yorkshire)×Duroc] (육성돈) ② 시험대상동물수: 총 96두 ③ 시험방법: 6주간 급이. 사료와 물은 자유 채식 토록 함. 시험기간 내에 사육동물의 이상증상 발생 및 분내 미생물 조 성을 조사하였으며, 시험 종료시 처 리구별 임의로 선별하여 경정맥에 서 혈액을 채취하여 혈액 특성을 조사</p>	<p>② 분내 미생물 조성에 있어 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았음 ③ 적혈구, 백혈구 및 림프구 함량에 있 어서 처리구간 유의적인 차이가 나타 나지 않았음</p>
<p>North Carolina State University</p>	<p>① 축종: 6주령 Nursery pigs (Smithfield Premium Genetics) ② 시험대상동물수: 총 150두 ③ 시험방법: 47일간 급이. 사망개체 발생 및 설 사발생 조사. 35일째와 47일째에 채 혈하여 혈액 특성 분석 (immune cell, inflammatory cytokines, immunoglobulins, plasma urea nitrogen, oxidative stress markers). 47일째에는 임의 선별한 동물을 안락사시켜 장기 조직 조사</p>	<p>① 대조군에 비교하여 특이증상 발생이 관찰되지 않았으며, 사망개체 발생이나 설사발생 측면에서는 보다 낮았음 ② 혈액 분석 결과, 특이사항 없었음 ③ 조직 검사 결과 특이 증상 없었음</p>
<p>중앙대학교</p>	<p>① 축종: 1일령 ROSS (육계) ② 시험대상동물수: 총 1,206수 ③ 시험방법: 5주간 급이. 맹장내 미생물균총 양 상 조사 및 소장의 형태학적 특성 조사. 혈액 분석 (IgG, IgM, IgA)</p>	<p>① 미생물균총에 있어 처리구간 유의적 차이가 없었음 ② 면역글로블린 (IgG, IgA, IgM)에 있 어 유의적 차이가 없었음 ③ 조직 검사 결과 특이 증상 없었음</p>

시제품의 안전성을 평가하기 위하여 CRO 기관인 (주)캠은 비임상연구소에서 GLP 기준에 따라 독성시험을 실시하였다. 본 독성시험은 비임상시험관리기준(2009-183호, KFDA, 2009년 12월 22일) 및 OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997) ENV/MC/CHEM(98)17에 따라 수행되었다. GLP 기준에 따라 실시된 독성시험의 개요를 요약 제시하면 다음과 같다.

표 2-11. GLP 장기급이 독성시험

시험개요	<p>① 시험물질을 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 4주간 반복경구 투여하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 알아보기 위하여 수행</p> <p>② 시험군으로서 박테리오파지가 1×10^9 pfu/head/day로 투여하는 시험물질 투여군과 부형제인 TMG (10 mM Tris-HCl, 10 mM MgSO₄, 0.1% Gelatin, pH 7.5)만을 투여하는 부형제대조군을 설정하여, 군당 20 마리 (암수 각 10 마리)에 4주간 반복경구투여하였음</p> <p>③ 시험항목으로 사망동물 및 일반증상 관찰, 최종 측정, 사료 및 물섭취량 산출, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 장기중량 측정 및 부검소견 관찰을 실시하였음</p>
	
시험결과 요약	<p>① 본 시험에서 사망동물은 관찰되지 않았음</p> <p>② 일반증상 관찰 결과, 암수 모든 시험군에서 이상증상은 관찰되지 않았음</p> <p>③ 체중변화 관찰 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상변화는 관찰되지 않았음</p> <p>④ 사료 및 물섭취량 측정 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상변화는 관찰되지 않았음</p> <p>⑤ 안과학적 검사 결과, 암수 모든 시험군에서 이상소견은 관찰되지 않았음</p> <p>⑥ 요검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상변화는 관찰되지 않았음</p> <p>⑦ 혈액학적 검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상변화는 관찰되지 않았음</p> <p>⑧ 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상변화는 관찰되지 않았음</p> <p>⑨ 장기중량 측정 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상변화는 관찰되지 않았음</p> <p>⑩ 부검소견 결과, 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 관찰되지 않았음</p> <p>이상의 결과를 통하여, 본 시험조건 하에서 시험물질을 1×10^9 pfu/head/day로 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 4주간 반복경구 투여하였을 때 본 시험물질은 독성을 나타내지 않는 것으로 판단되며, 랫드에 있어서 본 시험물질의 무독성량 (no-observed-adverse-effect level, NOAEL)은 1×10^9 pfu/head/day로 사료됨</p>

다. 생물활성제제 시제품의 *in vivo* 효능 조사

생물활성제제 시제품의 동물대상 효능시험은 닭, 돼지 및 마우스에 대하여 공격접종시험 방식으로 실시하였다.

닭에 대하여 실시한 공격접종시험은 *Salmonella gallinarum*균을 대상으로 실시하였으며, 소독제 시제품과 음수첨가제 시제품을 사용하여 실시하였다. 두 그룹으로 나누어 (n=15/group) 격리시킨 후 2주 동안 소독제 및 음수첨가제를 처치하였으며 2주째 되는 날 *Salmonella gallinarum*균을 1×10^6 cfu/head 씩 경구로 접종시켜 감염시켰다. 한 그룹은 박테리오파지가 첨가된 소독제 및 음수첨가제를 처치하지 않았으며 나머지 한 그룹은 박테리오파지가 첨가된 소독제 및 음수첨가제를 4주간 매일 처치하였다. 그 결과, 박테리오파지가 첨가된 소독제 및 음

수첨가제를 처치한 그룹이 유의적으로 생존률이 높음을 확인하여 우수한 치료효과를 확인할 수 있었다. 실험 결과를 요약 제시하면 다음과 같다.

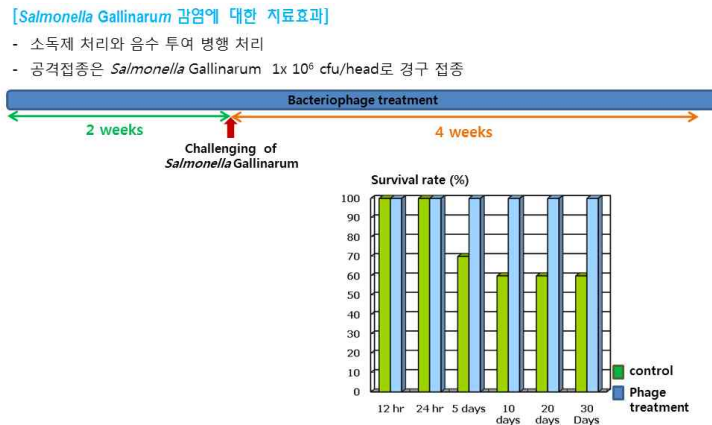


그림 2-15. 닭 대상 공격접종시험

돼지에 대한 공격접종시험은 강원대학교 수의과 대학에서 실시하였다. 생후 25일령의 이유자돈을 대상으로 4개 군으로 나누어 실험하였으며, *Salmonella thyphimurium*균의 공격 접종 후 박테리오파지가 포함된 사료첨가제를 급여하여 시제품의 효능을 확인하였다. 공격접종 후 박테리오파지 시제품 급여군과 비급여군에서의 설사지수 측정 및 분변 내 살모넬라균 수 측정 결과를 비교 분석해본 결과, 박테리오파지 시제품이 병원성 미생물 감염 치료에 우수한 효능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.



그림 2-16. 강원대 돼지 대상 공격접종시험

그 실험 결과를 요약 제시하면 다음과 같다.

실험동물

육안검사, 임상증상 (설사여부, 침울 등), 분변 PCR을 통해 살모넬라 항원 음성인 건강하다고 판단되는 24두의 생후 25일령의 이유자돈 (Landrace X Yorkshire)을 다음과 같이 4개 군으로 분류하여 실험 사육장에서 분리 사육하며 14일간 실험을 진행.

표 2-12. 시험 설계

시험군	시험두수	살모넬라 균 공격접종	박테리오파지 급여 여부
A	5	-	-
B	5	-	○
C	7	○	-
D	7	○	○

공시돈을 실험사육돈방(1.1m X 1.0m)으로 이동하여 사육하였으며 보온시설 하에 주위환경을 통제하였고 돈방의 온도와 습도는 일정하게 유지시켰으며 돈방 바닥은 매일 청소를 실시하였음.

박테리오파지 투여

시험 개시일부터 박테리오파지 투여군은 박테리오파지 시제품이 포함된 사료를 하루 2회 2주간 급여하였음. 박테리오파지 대조군은 같은 시간대에 일반 사료를 급여하였음.

살모넬라 균의 공격접종

살모넬라 균 (*Salmonella typhimurium*)을 TSB 배지를 사용하여 37°C에서 18시간 배양하여 사용하였음. 균액을 PBS (pH 7.2)로 10배 계단 희석하여 1.0×10^{11} cfu/ml로 조정된 다음 경구 주입관을 사용하여 시험 개시일부터 7일된 5주령의 실험돈에 1 ml씩 경구접종하였음.

조사항목

살모넬라 균 접종 후 매일 모든 시험동물들을 대상으로 설사 발생 상태를 조사. 설사 발생 상태는 지수화하였음. 설사지수는 Sherman 등(Sherman DM, Acres SD, Sadowski PL, Springer JA, Bray B, Raybould TJ, Muscoplat CC. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered *Echerichia coli* K99-specific monoclonal antibody. Infect Immun 1983, 42, 653-658)의 방법에 따라 fecal consistency (FC) score (정상적인 분, 0; 연변, 1; 묽은 설사, 2; 심한설사, 3)를 측정하였음.

또한, 각 균의 분변을 통한 살모넬라 균 배출 여부도 조사하였음. 이를 위하여 시험자돈의 직장에서 분변을 채취하였음. 각 분변 시료에서의 살모넬라 균의 측정은 분변시료를 PBS로 풀어준 후 원심분리로 상층액을 회수한 다음 이를 살모넬라 선택배지에 도말하는 방식으로 실시하였음.

시험결과

살모넬라 균을 공격접종한 다음 그 후 7일간 측정된 설사지수 결과는 다음과 같았음.

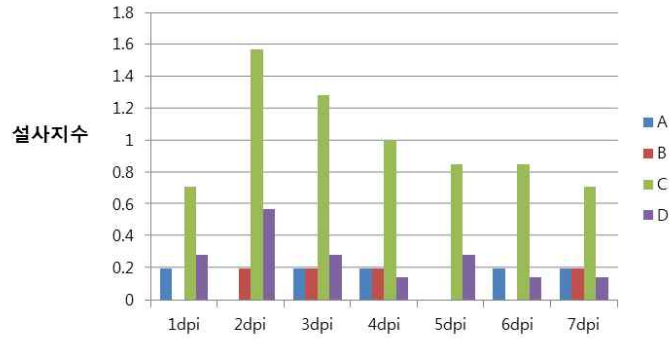


그림 2-17. 설사지수

분변에서의 살모넬라 균 검출 결과는 다음과 같았음

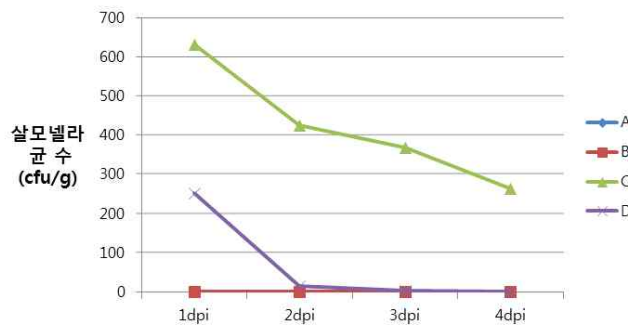


그림 2-18. 분변 내 살모넬라 수

이상의 결과로 박테리오파지 첨가 사료의 급이가 병원성 미생물 감염 처치에 매우 효과적임을 확인할 수 있었음

생물활성제제 시제품의 *in vivo* 효능 조사의 마지막 시험으로 통상의 의약품 개발에서 흔히 사용되는 방법에 따라 마우스 시험 모델에서 challenging study (mortality test)을 실시하였다. 시험은 경북대학교 의과대학의 도움을 받아 수행하였으며 생물활성제제 음수첨가제 시제품을 정맥투여 (IV injection)하는 방식으로 시험하였다. 사전 시험을 통하여 충분히 치사를 유발하는 정도의 균 cfu (5×10^6 cfu)를 확인한 후 이를 시험에 적용하였다 (하기 결과 참조). 음수첨가제 시제품의 최종 박테리오파지 pfu는 접종한 균의 cfu를 근거로 MOI 1, 10 및 100으로 설정하여 투여하였다. 시험 결과로 MOI 10 및 100의 박테리오파지 시제품 투여군의 경우, 100%의 survival rate를 보여 20%만이 생존한 대조군 (박테리오파지 시제품을 투여하지 않은 군)에 비교하여 치사를 개선에 큰 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

■ 마우스 대상 공격접종시험

Challenging Study (Mortality test; IV)

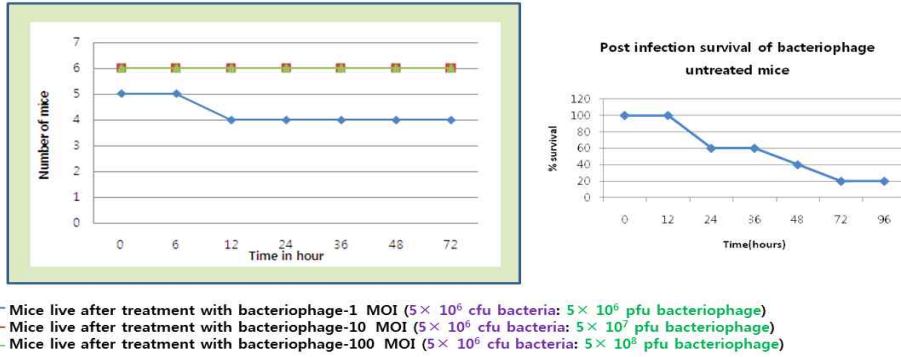


그림 2-19. 마우스 대상 공격접종시험

라. 생물활성제제 시제품의 기타 효능 조사

개발된 시제품 (소독제)의 효능 입증을 위하여 전국 도합장에서 분리된 살모넬라 균주 48주에 대하여 항균력 평가를 실시하였으며, 그 결과로 100%의 항균 효능을 확인하였다.

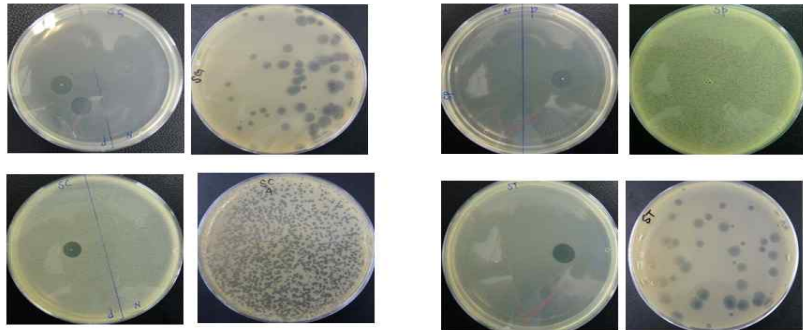
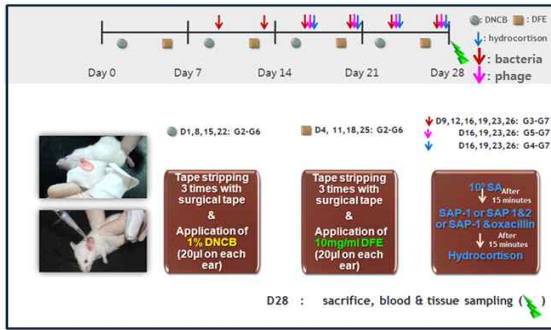


그림 2-20. 살모넬라 분리주에 대한 효능 시험

개발된 시제품 (소독제)의 향후 다양한 분야로의 산업화를 위하여, 아토피 피부염에 수반된 황색포도상구균 감염 처지에 대한 유효성 평가를 실시하였다. 아토피 피부염을 유발시킨 마우스를 대상으로 박테리오파지 소독제 시제품을 1주일에 2회씩 2주동안 처치하였다. 박테리오파지 소독제 시제품을 처치하지 않은 대조군에 비하여 상당한 감염처치 효과가 있음을 확인할 수 있었으며 관련 결과를 하기에 요약 제시한다.

Challenging Study against *Staphylococcus aureus*
(*Staphylococcus aureus* Colonization in Atopic Dermatitis Animal)

1. Method:
Treatment with N-Rephasin® bacteriophage preparation



2. Results:



그림 2-21. 아토피 피부염을 유발시킨 마우스를 대상 시험

3. 생물활성제제의 농장적용시험

가. 농장적용시험 및 사양시험

생물활성제제 시제품의 유효성 및 안전성 평가를 위하여 양돈 및 양계 분야에서 기업체 농장 시험, 대학교 사양시험, 개인 농장 적용 시험을 실시하였다. 이를 통하여 개발한 생물활성제제 시제품의 현장적용 우수성을 확인하였다. 관련 결과를 하기에 요약 제시하겠다.

(1) [실험 1. 국내 P 사료회사 사양시험 결과]

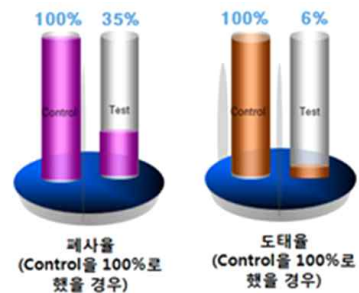
국내 P 사료회사의 협력을 받아 실시된 실제 개인 농장에서의 사양시험 결과이다. 720두의 자돈을 대상으로 실시하였으며 75일간 시험하였다. 통상적인 사양시험 항목들을 조사하였으며 특히 폐사율과 도태율이 생물활성제제 시제품을 적용하기 전에 비하여 크게 개선되는 효과를 확인하였다.

시험동물: 자돈 720두

사양시험기간: 총 75일

조사항목: 폐사율, 도태율 등

결과: 폐사율 65%, 도태율 94% 개선



(2) [실험 2. 국내 C 사료회사 사양시험 결과]

국내 C 사료회사에서 460만수 이상의 닭을 대상으로 3개월 동안 실시한 사양시험 결과를 제시한다. 이는 규모면에서 충분한 통계적 유의성을 갖는 사양시험이었다고 생각한다. 본 사양시험의 설계 및 수행 모두 C 회사가 독자적으로 결정하여 수행하였다. 사양시험 결과 박테리오파지가 포함된 사료의 급여가 사양성적 개선에서 효과적인 것으로 나타났다.

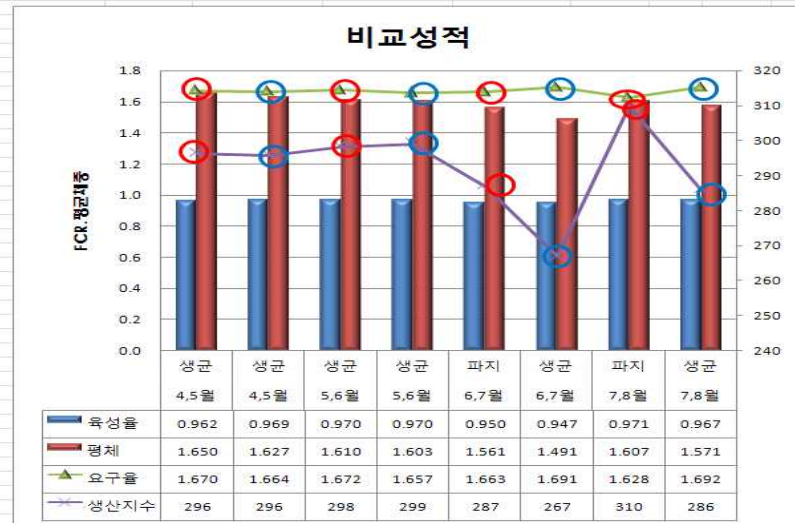
시험동물: 닭 4,665,053수

사양시험기간: 3개월

조사항목: 증체, 육성률, 사료요구율, 생산지수

결과: 하기 표에서 6월부터 8월까지가 본 사양시험의 결과에 해당하며 생산지수가 약 8% 개선되었음.

첨가제 비교														
월별	사료	구분	입주일	출하일	시험기간	입주수	출하수	증량	평체	기간	육성율	요구율	생산지수	건수
4,5월	생균	92%이상 전체	0425~0520	0527~0620	56	1,568,288	1,508,263	2,489,190	1.650	32	96.2%	1.670	296	29
					56	1,861,888	1,766,953	2,891,070	1.636	32	94.9%	1.679	290	36
	생균	92%이상 전체	0425~0520	0527~0621	57	1,659,242	1,607,794	2,615,890	1.627	32	96.9%	1.664	296	30
					57	1,945,642	1,857,694	2,994,965	1.612	32	95.5%	1.683	283	36
5,6월	생균	92%이상 전체	0523~0621	0618~0724	62	1,713,065	1,662,128	2,676,110	1.610	31	97.0%	1.672	298	38
					62	2,037,465	1,900,251	3,014,475	1.586	31	93.3%	1.693	281	45
	생균	92%이상 전체	0523~0621	0621~0721	59	1,967,240	1,907,394	3,058,380	1.603	31	97.0%	1.657	299	46
					59	2,497,540	2,345,775	3,628,200	1.547	31	93.9%	1.699	273	58
6,7월	파지	92%이상 전체	0623~0720	0722~0818	56	1,822,753	1,731,421	2,703,378	1.561	31	95.0%	1.663	287	38
					56	1,822,753	1,731,421	2,703,378	1.561	31	95.0%	1.663	287	38
	생균	92%이상 전체	0623~0719	0725~0820	58	1,514,900	1,435,186	2,139,205	1.491	31	94.7%	1.691	267	32
					58	1,514,900	1,435,186	2,139,205	1.491	31	94.7%	1.691	267	32
7,8월	파지	92%이상 전체	0721~0831	0822~0831	56	751,500	729,579	1,172,265	1.607	31	97.1%	1.628	310	16
					56	782,500	757,209	1,210,515	1.599	31	96.8%	1.624	311	17
	생균	92%이상 전체	0623~0719	0822~0831	58	575,900	556,998	875,265	1.571	31	96.7%	1.692	286	14
					58	575,900	556,998	875,265	1.571	31	96.7%	1.692	288	16
			04월 25일	08월 31일	128	24,611,476	23,490,250							



이 외에 객관성을 확보하기 위하여 사양시험을 전문적으로 수행할 수 있는 대학기관들에서의 사양시험 결과를 하기에 요약하였다.

(3) [실험 3. 이유자돈 사료 내 Bacteriophage의 적정 첨가수준에 관한 연구]

시험동물: 이유자돈 150두

사양시험기간: 5주

사양시험기관: 강원대학교

조사항목: 사양성적 (일당증체량, 일당사료섭취량, 사료요구율), 영양소 소화율, 분 및 장내 미생물, 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도, 혈액 내 GOT, GPT 농도, 설사 빈도, 소장 morphology

결과:

- ① 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 일당증체량과 사료요구율이 무첨가 대조구에 비해 유의적으로 개선되는 것으로 나타났음: 일당증체량 약 6.5% 향상, 사료요구율 5.2% 개선
- ② 영양소 소화율에서도 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 1.4% 개선되었음
- ③ 분 및 장내 미생물 관련 결과로, 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 bifidobacterium 및 lactobacillus 수치가 유의적으로 증가하였으며, Clostridium 및 Coliforms 수치는 유의적으로 감소
- ④ 박테리오파지 첨가에 의한 혈액학적 이상 소견 없음
- ⑤ 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 모든 구간 및 전체 시험기간 동안 설사 빈도가 유의적으로 감소

(4) [실험 4. 이유자돈 사료 내 Bacteriophage와 생균제의 단독 혹은 복합 첨가에 관한 연구]

시험동물: 이유자돈 200두

사양시험기간: 5주

사양시험기관: 강원대학교

조사항목: 사양성적 (일당증체량, 일당사료섭취량, 사료요구율), 영양소 소화율, 분 및 장내 미생물, 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도, 혈액 내 GOT, GPT 농도, 설사 빈도, 소장 morphology

결과:

- ① 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 일당증체량 및 사료요구율이 대조구에 비해 유의적으로 개선되는 것으로 나타났으며, 박테리오파지 및 생균제 복합 첨가구의 일당증체량이 가장 많이 개선됨: 일당증체량 4.5% 향상, 생균제 혼합시 8.5% 향상
- ② 영양소 소화율에서도 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 유의적으로 개선된 것으로 나타남
- ③ 분 및 장내 미생물 관련 결과로, 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 bifidobacterium 및 lactobacillus 수치가 유의적으로 증가하였으며, Clostridium 및 Coliforms 수치는 유의적으로 감소
- ④ 박테리오파지 첨가에 의한 혈액학적 이상 소견 없음
- ⑤ 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 모든 구간 및 전체 시험기간 동안 설사 빈도가 유의적으로 감소

(5) [실험 5. 돈사환경의 오염여부에 따른 이유자돈 사료 내 Bacteriophage 첨가에 관한 연구]

시험동물: 이유자돈 200두

사양시험기간: 5주

사양시험기관: 강원대학교

조사항목: 사양성적 (일당증체량, 일당사료섭취량, 사료요구율), 영양소 소화율, 분 및 장내 미생물, 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도, 혈액 내 GOT, GPT 농도, 설사 빈도, 소장 morphology

결과:

사육시설의 오염정도가 심할수록 박테리오파지 첨가 효과가 높게 나타났으며,

사육시설이 오염된 경우 박테리오파지 첨가로 무첨가구에 비해 일당증체량이 6.9% 향상되었음

(6) [실험 6. 육성돈 사료 내 Bacteriophage의 적정 첨가수준에 관한 연구]

시험동물: 육성돈 200두

사양시험기간: 4주

사양시험기관: 강원대학교

조사항목: 사양성적 (일당증체량, 일당사료섭취량, 사료요구율), 영양소 소화율, 분 및 장내 미생물, 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도, 혈액 내 GOT, GPT 농도, 설사 빈도, 소장 morphology

결과:

- ① 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 일당증체량과 일당사료섭취량이 유의적으로 개선된 것으로 나타남 : 박테리오파지 0.1% 첨가로 무첨가구에 비해 일당증체량 10.6% 향상
- ② 영양소 소화율에서도 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 유의적으로 개선된 것으로 나타남
- ③ 분 및 장내 미생물 관련 결과로, 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 bifidobacterium 및 lactobacillus 수치가 유의적으로 증가하였으며, Clostridium 및 Coliforms 수치는 유의적으로 감소
- ④ 박테리오파지 첨가에 의한 혈액학적 이상 소견 없음

(7) [실험 7. 육성돈 사료 내 Bacteriophage와 생균제의 단독 혹은 복합 첨가에 관한 연구]

시험동물: 육성돈 200두

사양시험기간: 5주

사양시험기관: 강원대학교

조사항목: 사양성적 (일당증체량, 일당사료섭취량, 사료요구율), 영양소 소화율, 분 및 장내 미생물, 혈중 IgG, IgA 및 IgM 농도, 혈액 내 GOT, GPT 농도, 설사 빈도, 소장 morphology

결과:

- ① 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 일당증체량과 일당사료섭취량이 유의적으로 개선된 것으로 나타남: 박테리오파지 0.1% 첨가로 무첨가구에 비해 일당증체량 10.4% 향상
- ② 영양소 소화율에서도 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 유의적으로 개선된 것으로 나타남
- ③ 분 및 장내 미생물 관련 결과로, 박테리오파지 첨가구가 무첨가 대조구에 비해 bifidobacterium 및 lactobacillus 수치가 유의적으로 증가하였으며, Clostridium 및 Coliforms 수치는 유의적으로 감소
- ④ 박테리오파지 첨가에 의한 혈액학적 이상 소견 없음

(8) [실험 8. 육계 사료내 박테리오파지 항생제 대체 효과]

육계사료에 박테리오파지를 첨가함으로써 항생제와 유사하게 육계 성장 증진 및 사료효율 개선효과를 확인할 수 있었으며, 이를 통해 항생제 대체제로서 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

시험동물: 1일령 ROSS 육계 병아리 1,206수

사양시험기간: 5주

사양실험기관: 중앙대학교

조사항목: 증체량, 사료섭취량, 사료효율, 폐사율, 맹장 내 미생물균총, 혈장 내 면역글로불린, 영양소 소화율

결과:

- ① 육계 사료 내 박테리오파지 첨가는 항생제와 유사하게 육계의 성장을 증진시키고 사료효율을 개선시키는 것으로 나타남: 박테리오파지 첨가시 무첨가구에 비해 증체 4.4% 향상
- ② 육계 사료 내 박테리오파지 첨가는 폐사율을 낮추는 것으로 나타남: 무첨가구 폐사율 8.07, 박테리오파지 첨가시 폐사율 5.36으로 개선

(9) [실험 9. 자돈과 육성돈에서의 박테리오파지 급여효과]

시험동물: 자돈 및 육성돈 (150두)

사양시험기간: 47일

사양실험기관: North Carolina State University (미국)

조사항목: 생산성, 건강

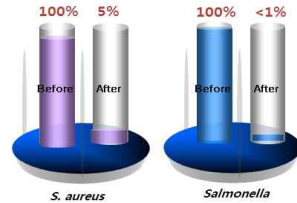
결과:

- ① 박테리오파지 사용으로 Tylan 40 사용시와 유사한 증체 효과를 얻음.
- ② 박테리오파지 사용으로 인해 돼지의 면역반응, 장 미생물균총, 장기의 건강상태에 영향이 없었으며 체내 어떠한 변화도 야기하지 않았음.

(10) [실험 10. 소독제/음수첨가제 양돈 실험 (개인 농장)]

소독제 및 음수첨가제 시제품에 대한 현장적용시험 결과를 하기에 제시한다. 본 시험을 통하여 소독제 및 음수첨가제 시제품의 오염균 저감 효과를 확인할 수 있었다.

- 4주간 실험
- 주변 환경에서의 살모넬라 균 및 황색포도상구균 오염정도 조사
- 음수제공은 매일하였고 소독제는 살포는 1주일에 2번씩 실시



나. 현장적용시험 결과를 바탕으로 생물활성제제의 최종 개선

현장적용시험에서 특별히 제품 개선 사항이 도출되지 않아 추가의 개선을 실시하지 않고 시제품을 최종 제품화하기로 하였다.

다. 생물활성제제의 제품화

제작한 시제품 중 수익성을 고려하여 우선순위가 높은 시제품을 먼저 제품화하였다. 나머지는 시장 상황을 고려하여 향후 추가 제품화할 계획이다. 제품화 내역은 다음과 같이 음수첨가제 1종, 사료첨가제 4종으로 총 5종이다.

표 2-13. 제품화 내역

구분	시제품명	설명	제형
사료첨가제	벡터페이즈	육계용 및 오리용	분말형
	벡터페이즈 S	산란계용 및 종계용	분말형
	벡터페이즈 T	양돈용	분말형
	벡터페이즈 C	송아지용	분말형
음수첨가제	Lactboss	양돈용 및 양계용 (브라질 수출용)	동결건조형

4. 재조합 리신의 산업화 준비

가. 황색포도상구균 특이 재조합 리신 생산/정제과정 구축

(1) 황색포도상구균 특이 재조합 리신의 확보

SAP-1 및 SAP-2 박테리오파지의 유전체의 서열정보를 활용하고 공지 서열을 참조하여 NCBI Blast와 Vector NTI ContigExpress 프로그램을 이용하여 리신 유전자 서열을 확보하였다. 이를 통상의 방법에 따라 벡터에 클로닝하여 발현 플라스미드를 제작하였다. 발현 시스템은 BAD promotor 시스템이었다. 확보된 리신의 아미노산 서열은 다음과 같았다. SAP-1 박테리오파지로부터 유래한 리신은 SAL-1이라 명명하였으며 SAP-2 박테리오파지로부터 유래한 리신은 SAL-2라 명명하였다.

표 2-14. SAL-1의 아미노산 서열 (전체 495 아미노산으로 구성)

Met Ala Lys Thr Gln Ala Glu Ile Asn Lys Arg Leu Asp Ala Tyr AlaLys Gly Thr Val Asp Ser Pro Tyr Arg
 Ile Lys Lys Ala Thr Ser TyrAsp Pro Ser Phe Gly Val Met Glu Ala Gly Ala Ile Asp Ala Asp GlyTyr Tyr His
 Ala Gln Cys Gln Asp Leu Ile Thr Asp Tyr Val Leu TrpLeu Thr Asp Asn Lys Val Arg Thr Trp Gly Asn Ala
 Lys Asp Gln IleLys Gln Ser Tyr Gly Thr Gly Phe Lys Ile His Glu Asn Lys Pro SerThr Val Pro Lys Lys Gly
 Trp Ile Ala Val Phe Thr Ser Gly Ser TyrGln Gln Trp Gly His Ile Gly Ile Val Tyr Asp Gly Gly Asn Thr Ser
 Thr Phe Thr Ile Leu Glu Gln Asn Trp Asn Gly Tyr Ala Asn Lys LysPro Thr Lys Arg Val Asp Asn Tyr Tyr
 Gly Leu Thr His Phe Ile Glulle Pro Val Lys Ala Gly Thr Thr Val Lys Lys Glu Thr Ala Lys Lys Ser Ala Ser
 Lys Thr Pro Ala Pro Lys Lys Lys Ala Thr Leu Lys ValSer Lys Asn His Ile Asn Tyr Thr Met Asp Lys Arg
 Gly Lys Lys ProGlu Gly Met Val Ile His Asn Asp Ala Gly Arg Ser Ser Gly Gln GlnTyr Glu Asn Ser Leu Ala
 Asn Ala Gly Tyr Ala Arg Tyr Ala Asn GlyIle Ala His Tyr Tyr Gly Ser Glu Gly Tyr Val Trp Glu Ala Ile
 AspAla Lys Asn Gln Ile Ala Trp His Thr Gly Asp Gly Thr Gly Ala AsnSer Gly Asn Phe Arg Phe Ala Gly Ile
 Glu Val Cys Gln Ser Met SerAla Ser Asp Ala Gln Phe Leu Lys Asn Glu Gln Ala Val Phe Gln PheThr Ala
 Glu Lys Phe Lys Glu Trp Gly Leu Thr Pro Asn Arg Lys ThrVal Arg Leu His Met Glu Phe Val Pro Thr Ala
 Cys Pro His Arg SerMet Val Leu His Thr Gly Phe Asn Pro Val Thr Gln Gly Arg Pro SerGln Ala Ile Met
 Asn Lys Leu Lys Asp Tyr Phe Ile Lys Gln Ile LysAsn Tyr Met Asp Lys Gly Thr Ser Ser Ser Thr Val Val
 Lys Asp GlyLys Thr Ser Ser Ala Ser Thr Pro Ala Thr Arg Pro Val Thr Gly SerTrp Lys Lys Asn Gln Tyr
 Gly Thr Trp Tyr Lys Pro Glu Asn Ala Thr Phe Val Asn Gly Asn Gln Pro Ile Val Thr Arg Ile Gly Ser Pro
 PheLeu Asn Ala Pro Val Gly Gly Asn Leu Pro Ala Gly Ala Thr Ile ValTyr Asp Glu Val Cys Ile Gln Ala Gly
 His Ile Trp Ile Gly Tyr AsnAla Tyr Asn Gly Asn Arg Val Tyr Cys Pro Val Arg Thr Cys Gln GlyVal Pro
 Pro Asn His Ile Pro Gly Val Ala Trp Gly Val Phe Lys

표 2-15. SAL-2의 아미노산 서열 (전체 250 아미노산으로 구성)

Met Lys Ser Gln Gln Gln Ala Lys Asp Trp Ile Tyr Lys His Glu Gly Val Gly Val Asp Phe Asp Gly Ala Tyr
 Gly Phe Gln Cys Met Asp Leu Ala Val Ala Tyr Ile Tyr Tyr Ile Thr Asp Gly Lys Val Arg Met Trp
 Gly Asn Ala Lys Asp Ala Ile Asn Asn Asp Phe Lys Gly Leu Ala Thr Val Tyr Glu Asn Thr Ser Ser Phe
 Lys Pro Gln Leu Gly Asp Val Ala Val Tyr Thr Asn Ser Gln Tyr Gly His Ile Gln Cys Val Thr Ser Gly
 Asn Leu Asp Tyr Tyr Thr Cys Leu Glu Gln Asn Trp Leu Asn Gly Gly Tyr Asp Gly Trp Glu Lys Ala Thr
 Ile Arg Thr His Tyr Tyr Asp Gly Val Thr His Phe Ile Arg Pro Lys Phe Ser Asn Ser Glu Ser Lys Val
 Leu Glu Gln Asn Ile Gln Leu Thr Asn Asn Trp Lys Gln Asn Gln Tyr Gly Thr Tyr Arg Asn Glu Lys
 Ala Thr Phe Thr Cys Gly Phe Leu Pro Ile Phe Ala Arg Val Cys Ser Pro Lys Leu Ser Glu Pro Asn Gly
 Tyr Trp Phe Gln Pro Asn Gly Tyr Thr Pro Tyr Asp Glu Val Cys Leu Ser Asp Gly Leu Val Trp Ile Gly
 Tyr Asn Trp Gln Gly Thr Arg Tyr Tyr Leu Pro Val Arg Gln Trp Asn Gly Lys Thr Gly Asn Ala Tyr Ser
 Ile Gly Val Pro Trp Gly Val Phe Ser

(2) 황색포도상구균 특이 재조합 리신 생산/정제 공정 구축

대장균 (BL21)을 이용하여 발현 host를 제작했으며, 이를 이용하여 재조합 리신의 생산 공정을 구축하였다. 특징적으로 저온 배양을 적용할 때에만 수용성 단백질 형태로의 생산이 가능하였다. 분리 정제는 다수의 chromatography를 이용하는 방식으로 구축하였다. 최종 생산 및 정제 공정 구축에는 한국생산기술연구원 바이오메디칼사업단의 도움을 받았다. 간략히 관련 결과만을 제시하면 다음과 같다. 최종 정제 산물의 생산성은 현재 20 mg/L 수준이다.

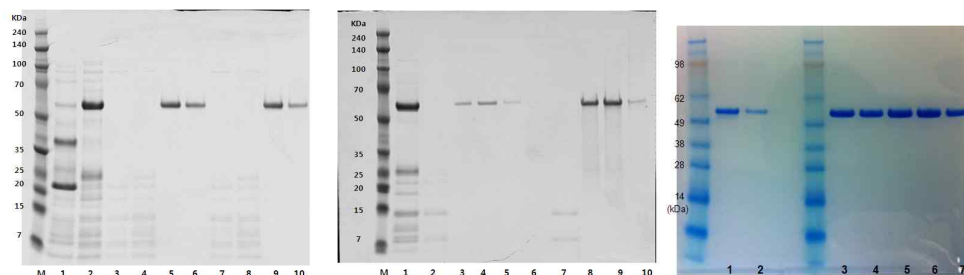


그림 2-22. SAL-1의 발현 및 정제 결과

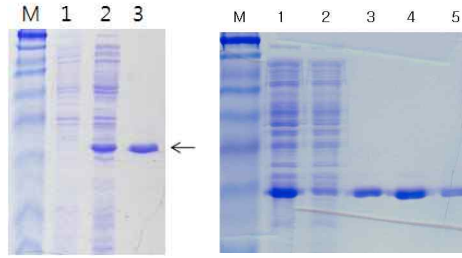


그림 2-23. SAL-2의 발현 및 정제 결과

(3) 황색포도상구균 특이 재조합 리신의 특성 규명

리신은 다음과 같이 두 종류가 확보되었으며, 이들의 항균 특성은 다음과 같았다. 특징적으로 두 경우의 리신 모두 모체가 되는 박테리오파지 자체에 비하여 넓은 항균 활성을 갖고 있었다.

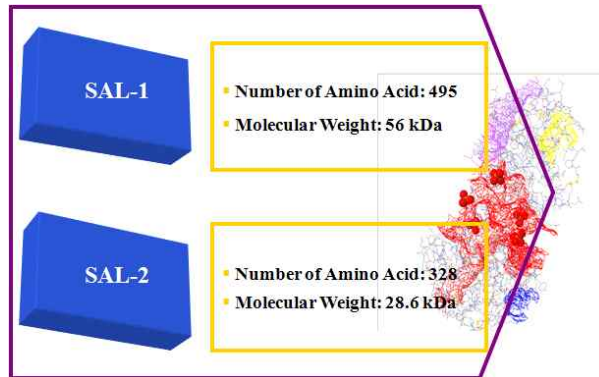


그림 2-24. 확보 리신 요약

Species	Source	Activity	Species	Source	Activity
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCARM 0027	+++	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 27956	-
<i>S. aureus</i>	CCARM 3501	+++	<i>Streptococcus agalactiae</i>	ATCC 7077	-
<i>S. aureus</i>	CCARM 3502	+++	<i>Streptococcus uberis</i>	Clinical isolate	-
<i>S. aureus</i>	CCARM 3089	+++	<i>Streptococcus uberis</i>	ATCC BAA654	-
<i>S. aureus</i>	CCARM 3090	+++	<i>Lactococcus lactis</i>	Laboratory stock	-
<i>S. aureus</i>	CCARM 3223	+++	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Laboratory stock	-
<i>S. aureus</i>	CCARM 3224	+++	<i>Streptococcus uberis</i>	Clinical isolate	-
<i>S. aureus</i>	CCARM 3229	+++	<i>Streptococcus uberis</i>	ATCC BAA654	-
<i>S. aureus</i>	Others	+++	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Laboratory stock	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	CCARM 5168	-	<i>Lactobacillus brevis</i>	Laboratory stock	-
<i>E. faecalis</i>	CCARM 5169	-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Laboratory stock	-
<i>E. faecalis</i>	CCARM 5170	-	<i>Escherichia coli</i>	Clinical isolate	-
<i>E. faecalis</i>	CCARM 5171	-	<i>Citrobacter koseri</i>	Clinical isolate	-
<i>E. faecalis</i>	CCARM 5174	-	<i>Streptococcus uberis</i>	SU-1	-
<i>E. faecalis</i>	CCARM 5177	-	<i>Streptococcus uberis</i>	SU-2	-
<i>E. faecalis</i>	CCARM 5179	-	<i>Salmonella gallinarum</i>	SG104	-
<i>E. faecalis</i>	Others	-	<i>S. Gallinarum</i>	Others	-
<i>Enterococcus faecium</i>	CCARM 5192	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	SE	-
<i>E. faecium</i>	CCARM 5193	-	<i>S. enteritidis</i>	Others	-
<i>E. faecium</i>	CCARM 5197	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	ST	-
<i>E. faecium</i>	CCARM 5198	-	<i>S. typhimurium</i>	Others	-
<i>E. faecium</i>	CCARM 5199	-	<i>Salmonella pullorum</i>	SP	-
<i>E. faecium</i>	Others	-	<i>S. pullorum</i>	Others	-

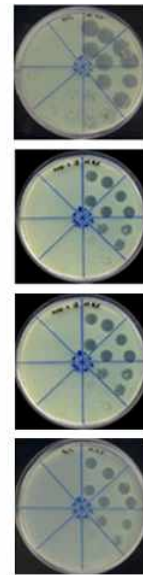


그림 2-25. SAL-1의 항균 활성

표 2-16. SAL-2의 항균 활성

Isolate or strain	Activity	Strain source
<i>Staphylococcus aureus</i> SA1	+	Environmental isolate
<i>Staphylococcus aureus</i> SA2	+	Environmental isolate
<i>Staphylococcus aureus</i> SA3	+	Environmental isolate
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 31886	+	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 35556 (SA113)	+	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 0027	+	CCARM
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3090	+	CCARM
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3095	+	CCARM
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3271	+	CCARM
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3547	+	CCARM
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCARM 3710	+	CCARM
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCARM 35049	+	CCARM
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CCARM 35050	+	CCARM
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> CCARM 35053	+	CCARM
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	Environmental isolate
<i>Lactobacillus reuteri</i>	-	Environmental isolate
<i>Escherichia coli</i>	-	Environmental isolate
<i>Citrobacter koseri</i>	-	Environmental isolate

^a Designations refer to bacterial lawn clearance and a follows: +, clearance observable at the site of SAL-2 application; -, no clearance.

두 리신 중 SAL-1이 보관 안정성 측면(37°C)에서 보다 우수하여 향후 산업적 활용에 보다 적합하다 판단되어 주요 리신으로 선정하였다. 아래에는 SAL-1의 주요 특징 관련 결과들을 제시하도록 하겠다.

(가) SAL-1의 구조적 특징

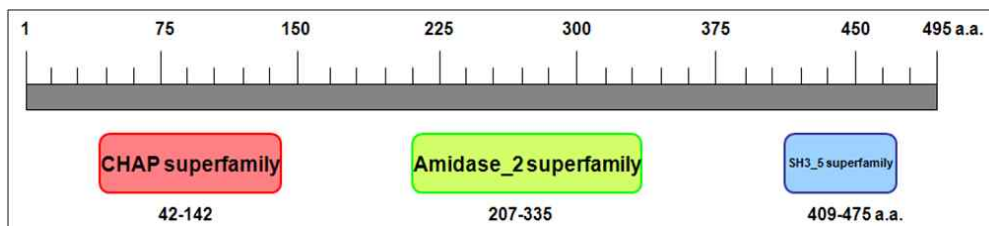


그림 2-26. SAL-1의 주요 기능적 domain

(나) SAL-1의 *in vitro* 항균 활성

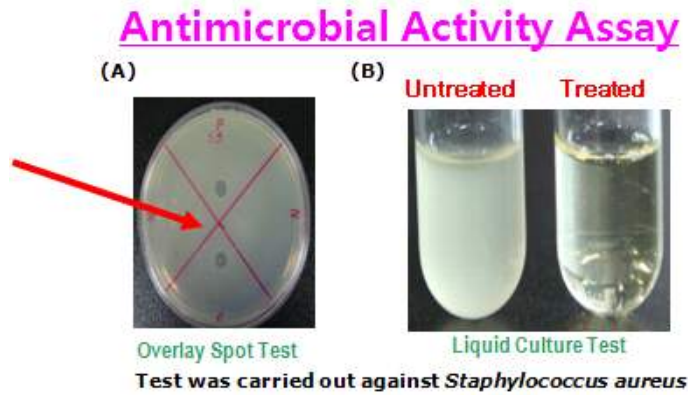


그림 2-27. SAL-1의 항균 활성 조사 실험 결과 1

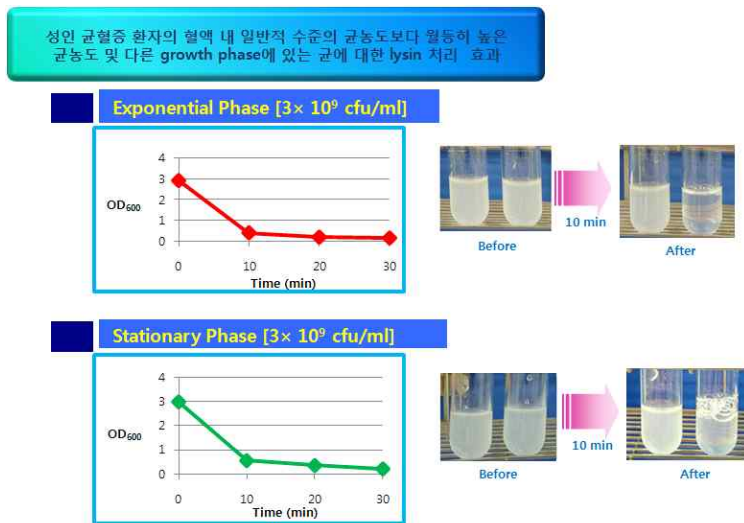


그림 2-28. SAL-1의 항균 활성 조사 실험 결과 2

SAL-1의 기본 항균 활성을 측정하기 위한 시험으로 “turbidity reduction assay” 및 “agar overlay assay”를 수행하였으며, 이 결과 기존 항생제에 내성을 갖는 황색포도상구균(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)에도 항균 활성을 보임을 확인하였다. 특히 성인 균혈증 환자의 임상적 감염 수준보다 현저히 높은 감염 수준에서도 효과를 나타내었다.

Lower MIC

- **Vancomycin과 비교하여 ≈100배 Lower MIC**

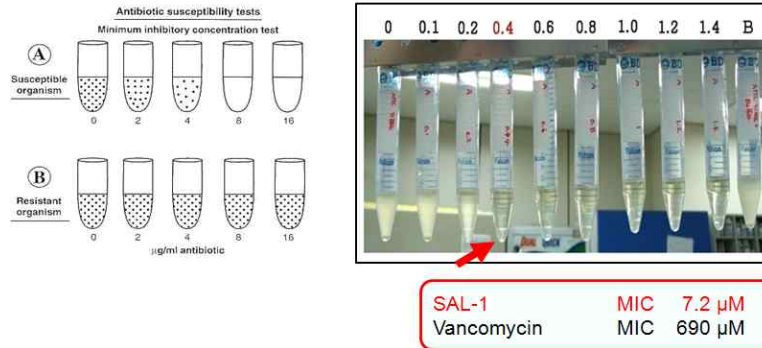


그림 2-29. SAL-1의 MIC test 결과

항박테리아제의 역가는 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration; MIC)로 알려진 생장을 저해하는 최소의 약제 농도를 측정하여 표기한다. MIC를 측정하는 일반적인 방법 중 하나인 시험관 희석법으로 시험한 결과 SAL-1의 MIC 값은 0.4 μg/ml로 측정되었으며, 이는 물 비율 환산 시 현재 MRSA 치료제로 사용되는 반코마이신제와 비교하여 약 96배 낮은 MIC이다.

Enzymatic Activity Assay (TOD₅₀)

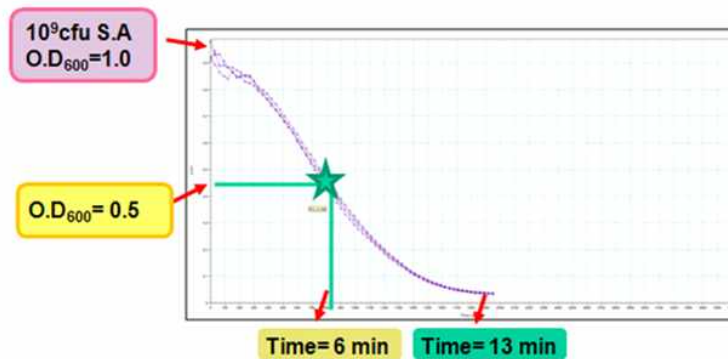


그림 2-30. SAL-1의 효소적 활성

Enzymatic activity assay에서, 기존 항생제에 내성을 보이는 황색포도상구균에 SAL-1 처리 후 OD (optical density) 측정 시 수 분 내에 TOD₅₀에 다다르며, 강한 항균 활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

(다) SAL-1의 세포 독성 (cytotoxicity)

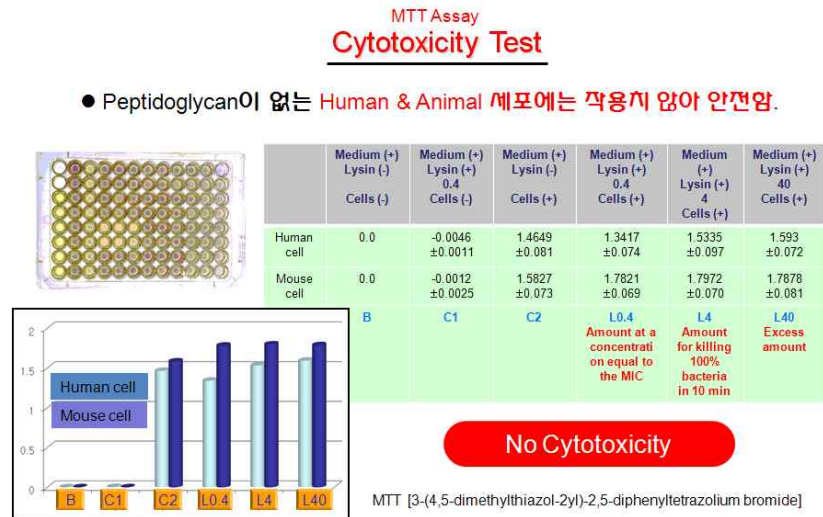


그림 2-31. SAL-1의 MTT assay 결과

MTT assay는 세포 독성을 측정하는 방법 중 하나로서, yellow tetrazolium salt MTT가 살아있는 세포에서 formazan crystal로 환원되는 원리를 이용하는 것이다. 살아있는 세포의 수가 많을수록 이 crystal의 생성도 많아지므로 생성된 crystal의 양을 분광학적인 방법으로 측정하여 세포의 성장 또는 저해 정도를 측정할 수 있다. MTT assay 결과, SAL-2이 동물세포 (human 및 mouse)의 성장에 전혀 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

(4) 재조합 리신의 대량생산 및 대량정제 공정 구축

1차년도 확보 결과를 활용하여, 2종의 박테리오파지 유래의 재조합 리신인 SAL-1 및 SAL-2에 대해서 50 L 규모(75 L 발효기를 이용한 50 L 발효)에서의 대량 생산 및 정제 공정을 성공적으로 구축하였다. 본 공정구축에는 한국생산기술연구원 바이오메디칼산업단의 기술지원을 받았다. 대량 배양을 통하여 OD₆₀₀이 27 이상 확보할 수 있었으며 대략 2 kg 이상의 wet cell weight를 얻을 수 있었다.

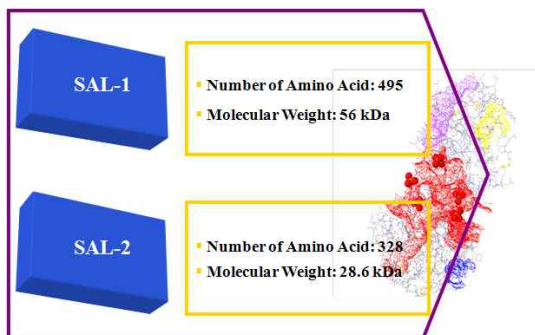


그림 2-32. SAL-1 및 SAL-2



그림 2-33. 발효기

대량정제공정도 1차년도에 확보된 결과를 활용하여 구축하였으며, 50 L 규모에서의 대량 생산에 적합한 대량정제공정을 성공적으로 구축하였다. 본 공정구축에도 한국생산기술연구원 바이오메디칼산업단의 기술지원이 있었다. 모든 정제 과정을 거친 후의 최종 수율은 SAL-1의 경우는 대략 80 mg/L였으며, SAL-2의 경우는 대략 70 mg/L였다. 간략히 관련 결과를 제시하면 그림 2-34와 같다.

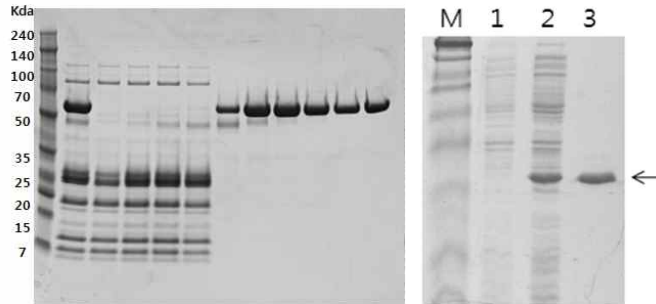


그림 2-34. 정제 결과 (좌: SAL-1; 우: SAL-2)

나. 재조합 리신 기반의 제제 제형 개발

재조합 리신 기반의 제제로 젖소유방염 치료제를 상정하고 있다. 이에 기존 젖소유방염 치료제 제형을 참고하여 리신에 적합하도록 다음과 같은 제형을 도출하였다. 본 젖소유방염 치료제에는 유효성분으로 SAL-1이 적용되었다. 이는 SAL-1이 SAL-2에 비하여 상온 안정성이 우수하기 때문에 젖소유방염 치료제의 제제로 더욱 적합하다고 판단하였기 때문이다. 개발된 제형은 냉장보관에서 4개월 이상 안정하게 활성이 유지되었다. 활성조사는 통상의 turbidity reduction assay를 통하여 실시하였다. Turbidity reduction assay는 박테리아 cell resuspension에 개발한 젖소유방염 치료제를 첨가한 후에 15분간 30초 간격으로 OD₆₀₀ 값을 모니터링 하는 방식으로 실시하였다. 개발된 재조합 리신 기반 제제의 제형은 다음과 같다.

**0.2%(w/w) Allantoin, 0.06%(w/w) Sodium benzoate,
0.3%(w/w) Sodium propionate, 5%(w/w) Propylene glycol 기반**

SAL-1: 400 μ g/syringe

개발된 제형의 유효성을 *in vitro* 활성 조사를 통하여 확인하였다. 활성 측면에서는 encapsulation이나 biofilm을 형성하는 황색포도상구균에도 작동하게 하는 것을 중요하게 고려하였다.

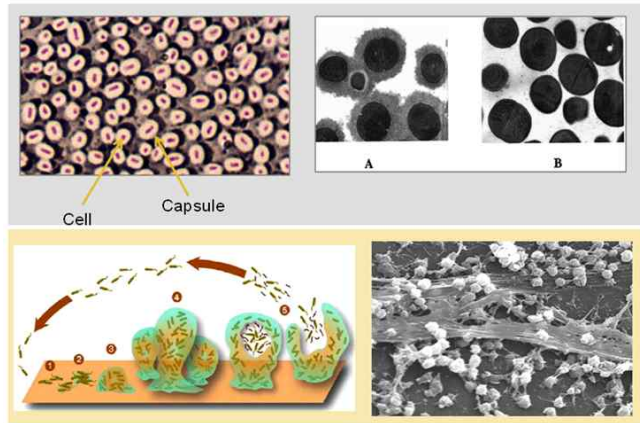


그림 2-35. Encapsulation 및 biofilm

개발 제제는 encapsulation을 형성한 황색포도상구균이나 biofilm을 형성한 황색포도상구균 모두에 대해서 우수한 사멸 효과를 나타내었다. Encapsulation을 형성한 황색포도상구균 및 biofilm을 형성한 황색포도상구균에 대한 사멸효과는 normal 및 encapsulation을 유도한 황색포도상구균을 대상으로 turbidity reduction assay를 통하여 조사하였다. 실험방법을 요약 제시하면 다음과 같다. 황색포도상구균의 encapsulation유도는 2% NaCl이 포함된 콜럼비아 아가 배지(Columbia agar medium)에서 37°C 한밤 배양하는 통상의 방법으로 유도하였다. Encapsulation이 유도된 황색포도상구균 콜로니들은 1 ml의 PBS로 씻어 내는 방식으로 아가로부터 회수하였으며, capsule 형성은 India ink 염색법을 통하여 확인하였다. Turbidity reduction assay는 박테리아 cell resuspension에 개발한 젯소유방염 치료제를 첨가한 후에 15분간 30초 간격으로 OD₆₀₀ 값을 모니터링 하는 방식으로 실시하였다. 100 µg의 SAL-1이 첨가되게 한 경우에 박테리아의 초기 OD₆₀₀ 값이 절반으로 감소하는 데에 걸리는 시간인 TOD₅₀ 값이 normal cell에서는 6.5분이었으며 encapsulated cell에서는 11분이었다. 200 µg의 SAL-1이 첨가되게 한 경우에 TOD₅₀ 값이 normal cell에서는 1.4분이었으며 encapsulated cell에서는 3.6분이었다. 이는 normal bacterial cell 뿐 아니라 encapsulated bacterial cell에 대하여서도 상당히 신속한 항균활성의 특성을 보여주는 결과라 할 수 있다.

젯소유방염 분리 균주를 이용한 in vitro efficacy test 결과

- Normal 상태의 S.A와 encapsulation이 유도된 상태의 S.A 모두에 대하여 사멸효과를 보임을 확인

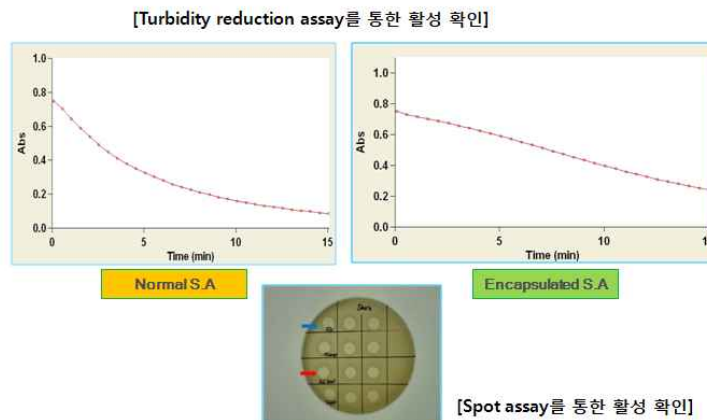


그림 2-36. In vitro efficacy test 결과 (Encapsulation, 100 µg SAL-1 첨가 경우)

개발된 젖소유방염 치료제의 황색포도상구균이 형성한 biofilm에 대한 제거능 조사는 다음과 같이 실시하였다. Biofilm 형성유전자(ica gene)를 가지고 있고 biofilm-forming activity가 사전에 확인된 황색포도상구균 strain을 0.25% (w/v) D-(+)-glucose가 포함된 TSB 배지를 사용하여 96-well microplate 상에 한밤 배양하여 microplate의 well에 황색포도상구균 biofilm이 생성되게 하였다. Biofilm이 생성된 각 well에 10, 20, 40 및 80 µg/ml의 SAL-1이 첨가되도록 젖소유방염 치료제를 첨가해 주었다. 젖소유방염 치료제를 첨가한 microplate는 37°C에서 두 시간 동안 incubation하였다. Incubation 후에 0.1% safranin을 이용한 safranin 염색법을 통하여 biofilm 제거 정도를 조사하였다. 참고로, safranin 염색법은 biofilm 분석에서 흔히 사용되는 분석 방법으로, biofilm이 강하게 형성되어 있을수록 분홍색을 강하게 띄고 biofilm이 제거되면 분홍색이 없어져 biofilm 존재여부를 육안으로도 용이하게 판별할 수 있게 하는 방법이다. 그 결과, 젖소유방염 치료제를 첨가해 주면 황색포도상구균 biofilm이 매우 효과적으로 제거됨을 확인할 수 있었다.

젖소유방염 분리 균주 biofilm에 대한 *in vitro* efficacy test 결과
- Biofilm은 형성한 S.A에 대하여 시력효과를 보임을 확인

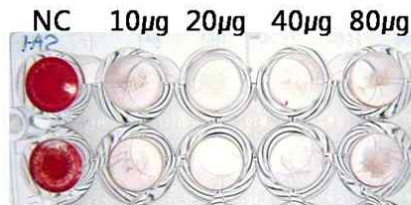


그림 2-37. *In vitro* efficacy test 결과 (Biofilm)

개발된 젖소유방염 치료제의 황색포도상구균 biofilm 제거능은 전자현미경 분석을 통하여 추가적으로 검증하였으며 그 결과로 황색포도상구균 biofilm이 젖소유방염 치료제 처리로 완전히 제거됨을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 SAL-1을 유효성분으로 포함한 젖소유방염 치료제는 황색포도상구균을 주원인으로 하는 젖소유방염의 치료에 효과적으로 적용될 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 SAL-1 기반의 젖소유방염 치료제는 일반적으로 항생제 기반의 기존 치료가 매우 어려운 경우에 속하는 capsule을 형성하거나 biofilm을 형성한 황색포도상구균에 의한 감염에도 효과적임을 확인할 수 있었다. 이러한 특성은 SAL-1 기반의 젖소유방염 치료제의 성공가능성 및 잠재성을 높게 평가하게 한다고 생각한다.

다. 치료용 재조합 리신 제제 확보

1차년도에 리신에 대한 특성규명 및 제조 공정을 개발하였고, 2차년도에 재조합 리신의 대량 생산 및 대량정제공정을 구축하였다. 1차년도 및 2차년도 연구에 이어 치료용 재조합 리신 제제 확보를 위한 규격화 실험을 수행하여 의약품 수준에 적합한 젖소유방염 치료제 제제 1종을 도출하였다. 동물용 의약품으로의 허가 기준에 적합하도록 원료의약품의 경우 GMP (Good Manufacturing Practice)에서 생산된 리신을 적용하였다. 도출한 제제는 동물용 의약품으로의 허가 기준에 적합하다. 그 상세 내역을 하기에 제시한다.



그림 2-38. 젖소유방염 치료제 사진

<젖소유방염치료제 규격 (성분 및 분량)>

[완제의약품의 성분 및 분량]

전체단위	1 실린지 (10 ml) 중				
배합목적	원료명	규격	분량	단위	비고
주성분	SAL200 (SAL-1로서 7 mg)	별규	0.39	mL	제조원: (주)바이넥스
부형제	Allantoin	EP	20	mg	제조원: Sigma Aldrich
안정화제	Sodium benzoate	USP	6	mg	제조원: Sigma Aldrich
안정화제	Sodium propionate	USP	30	mg	제조원: Chemkind
부형제	Propylen glycol	EP	500	mg	제조원: DOW

[주성분 SAL200 원료의약품의 성분 및 분량]

전체단위	SAL200 1 L 중				
배합목적	원료명	규격	분량	단위	비고
주성분	SAL-1 (SAL-1로서 18 g)	별규	1	리터	제조원: (주)바이넥스
안정화제	L-히스티딘	USP	1.56	그램	제조원: Sigma Aldrich
부형제	D-소르비톨	KP	50	그램	제조원: Sigma Aldrich
안정화제	염화칼슘수화물	KP	1.47	그램	제조원: Sigma Aldrich
안정화제	플록사머 188	EP	1.0	그램	제조원: BASF

제조공정도 (Manufacturing Process Chart)

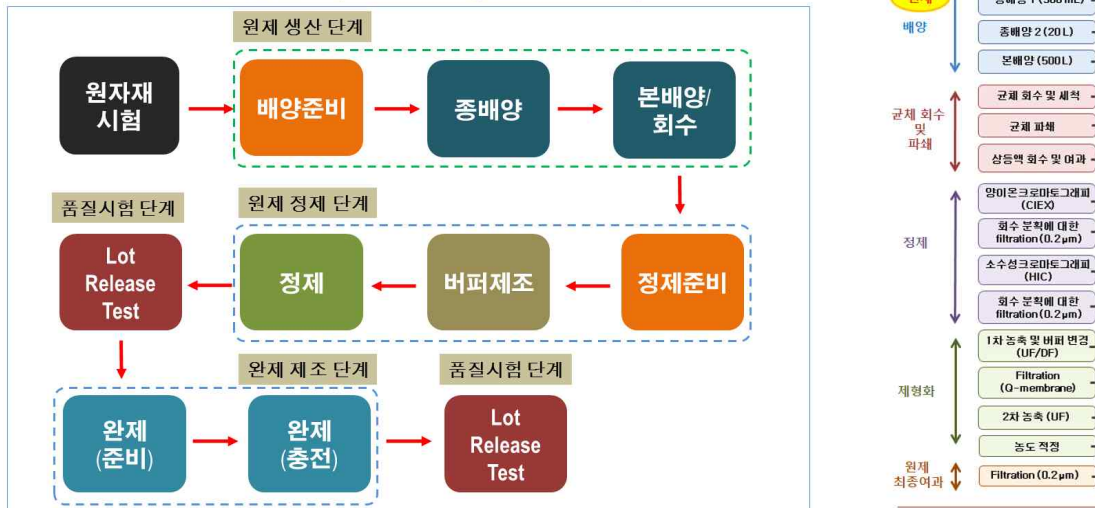


그림 2-39. 제조공정

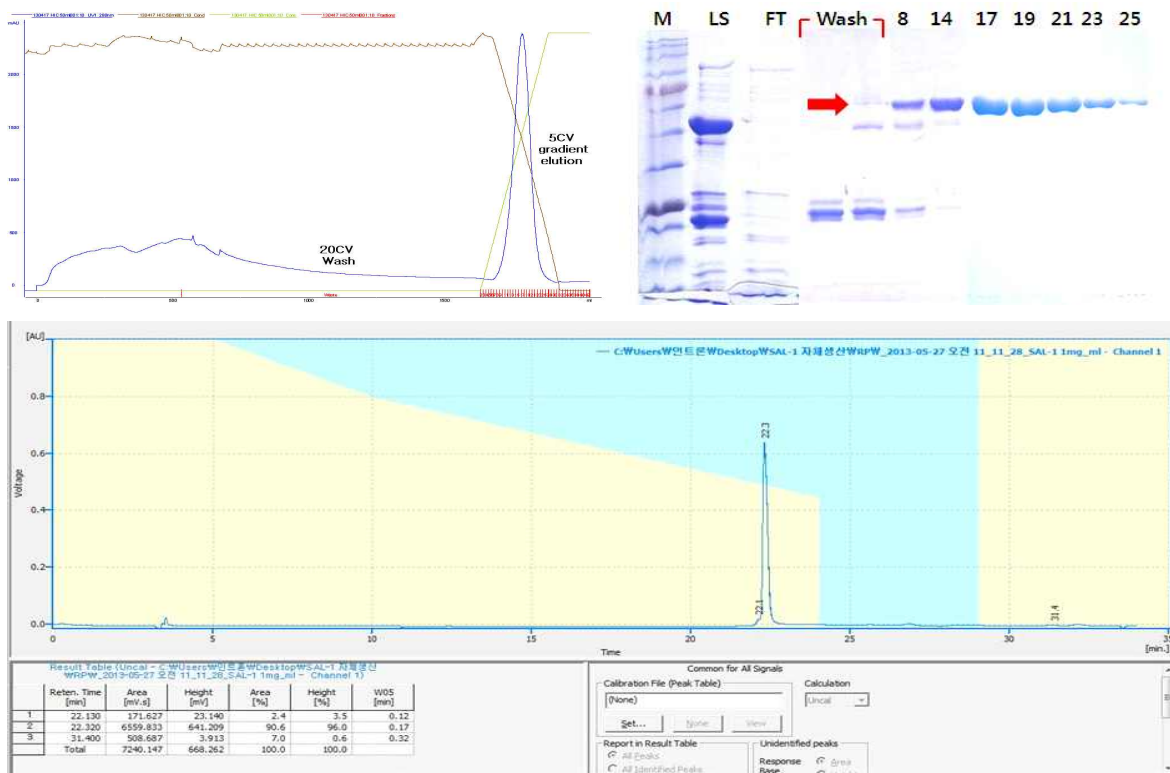


그림 2-40. 원료 정제 결과

라. 장기보관안정성 시험

개발한 젯소유방염 치료제 제제에 대한 장기보관안정성 시험도 실시하였으며 그 결과는 다음과 같다.

(1) 젖소유방염 치료제의 함량 및 역가측정에 대한 분석법을 개발하여 ‘기준 및 시험법’을 설정한 후, 이를 기반으로 여러 온도 조건 하에서 6개월 간의 젖소유방염 치료제의 안정성 data를 확보.

(2) 안정성 시험은 (가) 4℃, 20℃ (가속 조건), 30℃ (가혹 조건), 및 35℃ (가혹 조건) 온도 조건에서 실시하였으며, (나) 함량분석을 위하여 RP-HPLC 분석을 실시하였고, (다) 역가측정을 위하여 turbidity reduction assay를 실시.

(3) 사용한 RP-HPLC 분석 및 turbidity reduction assay를 간략히 제시하면 다음과 같음.

1. RP HPLC 분석을 통한 순도 및 함량 확인법

1-1) Buffer 제조

이동상 A: 0.1% TFA in water

이동상 B: 0.1% TFA in ACN

1-2) 분석조건

파장: 280 nm

컬럼: 00G-4053-E0, Phenomenex, 5 μm, C18, 300 Å, 250 mm × 4.6 mm

컬럼온도: 25℃

유속: 1 ml/min

주입량: 50 μl

분석시간: 35 min

2. Turbidity reduction assay를 통한 역가 측정법

2-1) 분석조건

파장: 600 nm

큐벳: MICRO CELL 0.9 ml, 4 mm × 10 mm

측정간격: 2 cycle/min

균체량: 0.9 ml (OD₆₀₀ : 0.65)

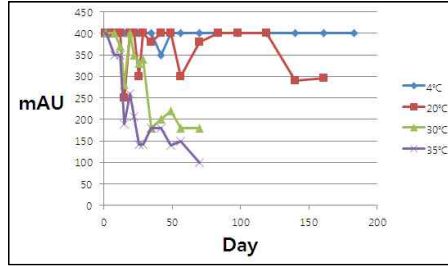
시료량: 100 μl

분석시간: 20 min

(4) 6개월 간 분석된 안정성 data를 요약 제시하면 다음과 같았음.

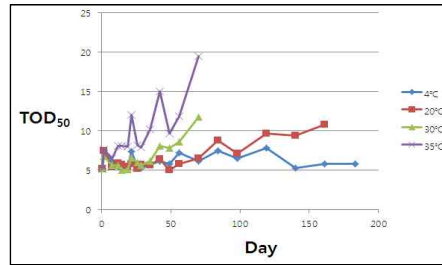
1. RP HPLC 분석을 통한 순도 및 함량 확인 결과

보관온도 (°C)	측정일*	함량감소율 (%)
4	183일	0
20	161일	26.5
30	70일	55
35	70일	75
* 제시일까지만 측정 수행. 즉, 4°C 경우만 183일 (6개월) 동안 측정		



2. Turbidity reduction assay를 통한 역가 측정



보관온도 (°C)	측정일*	활성감소율 (%)
4	183일	0
20	161일	48
30	70일	54
35	70일	69
* 제시일까지만 측정 수행. 즉, 4°C 경우만 183일 (6개월) 동안 측정		



(5) RP-HPLC 및 turbidity reduction assay 결과를 기반으로 종합적으로 검토해 볼 때, 30°C와 35°C (가혹 조건)의 경우는 보관일로부터 12일이 지난 시점부터 함량 및 활성 감소가 시작되어 70일 경과 시점에는 함량은 75%, 활성은 69% 감소. 20°C (가속 조건)의 경우에는 140일 경과 시점부터 함량 및 활성 감소가 시작하여 161일 경과 시점에서는 함량은 26.5%, 활성은 69% 감소. 이에 반해, **4°C (권장 보관 조건)의 경우에는 183일 경과 시점 (약 6개월)까지 함량 및 활성 감소가 없었음.**

마. 동물적용 시험을 통한 효능 조사

젖소유방염 치료제 제제에 대한 동물 적용시험을 다음과 같이 실시하였다. 실제 젖소유방염을 가진 젖소 7두를 대상으로 실시하였으며, 시험 방법 및 결과를 요약 제시하면 다음과 같다. 결과로, 개발된 젖소유방염 치료제가 황색포도상구균이 원인이 되어 발병한 젖소유방염의 증상 완화 및 치료에 효과적임을 확인할 수 있었다.

Protocol	① 주사 전 CMT 검사를 통한 체세포 수 조사 ② 유두 세정 ③ 시제품 투입 (각 개체에 유두를 통하여 유방에 주사) 									
	④ 주사 후 마사지 ⑤ 마사지 후 침지소독제로 소독 									
Result	⑥ 체세포 수를 계속 조사하면서 5일간 위의 ②~⑤ 단계 반복하여 처치									
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">체세포수 (cells/ml; 시험 7두 평균)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>처치 전 당일</td> <td>352만</td> </tr> <tr> <td>처치 후 1일</td> <td>222만</td> </tr> <tr> <td>처치 후 3일</td> <td>133만</td> </tr> <tr> <td>처치 후 5일</td> <td>62만</td> </tr> </tbody> </table>	체세포수 (cells/ml; 시험 7두 평균)		처치 전 당일	352만	처치 후 1일	222만	처치 후 3일	133만	처치 후 5일
체세포수 (cells/ml; 시험 7두 평균)										
처치 전 당일	352만									
처치 후 1일	222만									
처치 후 3일	133만									
처치 후 5일	62만									

제3절 제3핵심과제: 항생제 대체 사료용 천연물질 개발 및 항생제 대체제 사양체계 개발

1. 축종별 병원성 미생물에 대한 천연물과 복합생균제의 복합 항균효과 조사



그림 3-1. 항생제 대체 사료용 천연물질 및 항생제 대체제 사양체계 개발 전략

본 연구는 농수산 유래 각 종 천연 부산물들의 소, 돼지, 닭 유래 대표 병원성 미생물(*E. coli* K99, *E. coli* K88, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*)에 대한 항균력을 조사하고, 제1핵심과제에서 목장토양에서 분리 동정한 유산균(*Lactobacillus plantarum* 177, *Pediococcus acidilactici* 175, *Lactobacillus salivarius* 29) 및 목장토양과 돼지 분변에서 자체 분리 동정한 유산균(CAM1, 175: *Pediococcus acidilactici*; LP177: *Lactobacillus plantarum*), 효모균(Sb796: *Saccharomyces boulardii*), 고초균(T-1: *Bacillus polymyxa*, T-4: *Bacillus subtilis*)의 복합생균제와의 복합 항균효과를 검증함으로써 항생제 대체 물질 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

가. 연구방법

(1) 축종별 병원성 미생물 선정

천연물의 항균력 조사를 위하여 현재 문제가 되고 있는 소, 돼지, 닭 유래 대표 병원성 미생물(*E. coli* K99, *E. coli* K88, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*)을 표 3-1와 같이 선정하였다.

표 3-1. 축종별 병원성 미생물의 종류 및 특징

	종 류	특 징
Pathogen <Pathogenic bacteria>	<i>Escherichia coli</i> K99	소(송아지) / 설사 (대장균)
	<i>Escherichia coli</i> K88	돼지 / 설사 (대장균)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	닭, 돼지 / 설사 (장티푸스)
	<i>Salmonella enteritidis</i>	닭 / 설사 (장염균)
	<i>Salmonella gallinarum</i>	닭 / 설사, 폐혈증 (가금티푸스)
	<i>Salmonella pullorum</i>	닭 / 설사 (추백리)

(2) 병원성 미생물에 대한 천연물질의 항균력 조사

선정된 축종별 대표 병원성 미생물에 대한 천연물의 항균효과를 검증하기 위하여 천연물 증 논문에서 항균효과가 검증된 천연물을 선정하여 MIC test 및 Agar diffusion assay를 통하여 항균력을 검증하였다.

(가) 천연물 준비

미리 시료 제조에 사용되는 모든 실험기구 및 용품은 멸균한 뒤 신선한 시료(표 3-2)를 박피하여 사용하였고, 특히 마늘, 과, 고추는 부분별로 분리시킨 뒤 수돗물로 수세한 다음 3회, 3차 증류수로 세척하였다. 세척한 내용물은 거즈로 물기를 제거하고 세절한 후 각각 멸균된 mixer기로 분쇄하고 거즈로 착즙하였다. Securitor (Artimon, France) 는 마늘 추출액과 호유실 추출물 그리고 비타민을 혼합한 제품이며, Phytoncide (Phylus, Korea) 는 Terpene, α -pinene, 3-carene, Bornyl acetate 등을 주성분으로 하는 잣나무에서 분비되는 액으로 Securitor과 Phytoncide는 원액을 그대로 사용하였다. Securitor 및 착즙액은 멸균된 0.45 μ m bottle top filter(Corning)로 여과한 후 여액을 즉시 실험에서 사용하였으며 상 기 조작은 가급적 무균 상태에서 신속하게 실시하였다.

표 3-2. 실험에 사용한 천연물

종류	상태	종류	상태
마늘	알맹이	강황	알갱이
	껍질	양파	알갱이
	대	쑥갓	알갱이
	줄기	흑마늘	알갱이
	뿌리	비단초	알갱이
과	줄기	폐배지	전체
	뿌리	피망	전체
고추	알맹이	Securitor	시제품
	잎	Phytoncide	시제품
깨	잎	β -glucan	시제품
망아	잎	유기산	시제품
생강	알갱이	리모나이트	시제품
산초	알갱이	은물	시제품
오미자	알갱이	알칼리수	시제품
매실	알갱이	산성수	시제품

(나) 천연물 항균력 테스트

① MIC(Minimal Inhibition Concentration) test

96-well cell culture plate(1), (2)를 이용하여 병원성 미생물 *E. coli* K88를 plate(1)에 100ul씩 분주하고, 천연물 추출액을 plate(2) 1열에 300ul, 2열부터 희석 단계까지 0.85% NaCl 150씩 분주하여 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 계단 희석을 실시하였다. 병원성 미생물(1)과 천연물 추출 희석액(2)을 혼합한 후 37°C, Overnight 배양하였으며, 배양 후 ELISA (OD 600nm)에서 측정하였다.

② Agar diffusion assay

Agar diffusion assay(well, paper disc) 중 Agar well diffusion assay를 실시하였다. Bottom agar는 TSA(1차)와 MRSA(2차)를 먼저 분주하여 굳힌 후 Top agar(TSB + 0.7% Agarose)를 제조하여 병원균 희석액 10^{-3} (K99, K88, SP), 10^{-2} (SE, ST, SG)을 넣고, Bottom agar 위에 분주하여 굳혔다. 굳힌 후 plate 3부분에 well을 Cork bore로 뚫고 천연물 추출액을 60ul(1차)와 40ul(2차)를 분주한 후 37°C, Overnight 배양하였다.

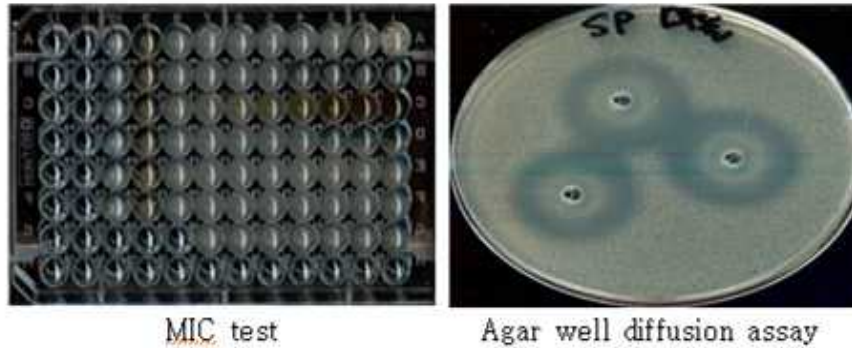


그림 3-2a. 항균력 조사에 이용된 MIC test 와 agar well diffusion assay 사진

(3) 병원성 미생물에 대한 천연물과 복합생균제의 복합 항균효과 조사

(가) 천연물과 혼합할 유산균 선정

천연물질과 혼합하여 복합 항균 효과를 검증하기 위하여 제1핵심과제의 목장토양에서 분리 동정한 유산균에 대한 정보는 표3-3과 같다.

표 3-3. 제1핵심과제로부터 분양 받은 유산균

	종 류
LAB <Lactic acid bacteria>	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP 177
	<i>Pediococcus acidilactici</i> PA 175
	<i>Lactobacillus salivarius</i> LS 29

① 실험방법

처리균 시험배지(20ml)내 천연물 시료 각각 0.5, 1.5, 2.5% 함유하도록 설계하여 시료액 1, 3, 5ml를 멸균식염수와 혼합하여 희석 시료액 10ml을 만든 후 40°C로 유지시킨 시험배지 19ml와

희석 시료액 1ml 섞어 혼합액을 만들었다. 혼합액(20ml)를 Petri dish에 취하여 굳히고, 희석 균액($10^{-\text{희석배수}}$)을 50ul 도말 또는 top agar 분주법을 이용하여 균수를 측정하였다.

② 실험 설계

실험 설계는 4가지로 설계하였다. (1) 기초배지와 시료를 혼합하여 굳힌 후 희석 균액(병원균)을 도말하였다. (2) 기초배지와 시료를 혼합하여 굳힌 후 희석 균액(병원균)을 Top agar에 섞어 분주하였다. (3) 기초배지를 굳힌 후 유산균을 도말하고, 희석 균액(병원균)을 Top agar에 섞어 분주하였다. (4) 기초배지에 시료를 혼합하여 굳힌 후 유산균을 도말하고 그 위에 희석 균액(병원균)을 top agar에 섞어 분주하였다.

(나) 천연물과 복합생균제의 복합 항균력 조사

제1핵심과제에서 목장토양과 돼지 분변에서 자체 분리 동정한 유산균(CAM1, 175: *Pediococcus acidilactici*; LP 177: *Lactobacillus plantarum*), 효모균(SB 796: *Saccharomyces boulardii*), 고초균(T-1: *Bacillus polymyxa*, T-4: *Bacillus subtilis*)을 이용하여 실험한 결과를 바탕으로 유산균 단일 혼합(CAM1, 175, LP 177)을 SNU 1, 유산균(CAM1, 175, LP 177), 효모균(SB 796), 고초균(T-1, T-4) 혼합을 SNU 2로 선정하여 실험을 진행하였다(표 3-4).

표 3-4. 선정된 복합생균제의 혼합 균주와 균수

	Lactic acid bacteria :		Yeast :	<i>Bacillus</i> :	
	$1.9 \times 10^9/\text{ml}$		$3.4 \times 10^8/\text{ml}$	$4.7 \times 10^9/\text{ml}$	
SNU 1	CAM1, 175	LP177			
SNU 2	CAM1, 175	LP177	SB796	T-1	T-4

선정된 복합생균제와 비교 검증을 위하여 시중에 시판되고 있는 (주)푸른들 EM 바이오 회사의 복합생균제인 α-Gold 제품(PEM 1)과 Max 제품(PEM 2)을 이용하였다 (표 3-5).

표 3-5. 비교 검증 제품의 혼합 균주와 균수

	Lactic acid bacteria (<i>Lactobacillus</i> sp.)	Yeast (<i>Saccharomyces</i> sp.)	<i>Photosynthetic bacterium</i> (<i>Rhodobacter capsulatus</i>)	<i>Bacillus</i> (<i>Bacillus subtilis</i> .)
PEM 1	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}	1.0×10^8	
PEM 2	1.0×10^{10}	1.0×10^{10}		1.0×10^{10}

¹⁾ *Photosynthetic bacterium* colony count of PEM 1 : more than 1.0×10^8

① 복합생균제의 균수 보정 조사

선정된 복합생균제와 비교 제품에서 명시된 균수를 보정하기 위하여 조사하였다. 각 균주(10 μl)를 액체 배지(10ml)에 접종한 후 배양(37°C, 240rpm)하면서 각 시간대 별(1hr, 3hr, 5hr, 8hr)로 100μl를 채취하여 표 3-4와 3-5에 명시된 균수까지 희석하였다. 희석된 균을 배지에 100μl 도말한 후 배양(37°C, 24h)시켜 각 시간대 별로 균수를 확인하였다. 균수와 희석 배수를 역산하

여 표 3-4와 3-5에 명시된 균수와 동일한 배양시간을 기록하였다.

② 복합생균제 제조 및 천연물 혼합

각 균주마다 명시된 균수까지 증식되는 배양시간에 맞춰 배양 후 먼저 배양이 끝난 균주는 4℃ 냉장고에 보관하고, 차례대로 시간에 맞춰 4℃에 보관하였다. 모든 균주가 배양이 끝나면 복합생균제의 설계에 따라 각 균주 1ml씩 10ml round tube에 혼합시킨 후 최종적으로 혼합된 복합생균제 1ml와 천연물 1ml를 섞어 복합 항균력 측정 시료를 이용하였다.

③ Agar diffusion assay

천연물 선정 조사와 동일한 방법인 agar diffusion assay를 이용하여 축종 별 병원성 미생물이 분주된 plate 각 well에 혼합된 복합 항균력 측정 시료를 40 μ l씩 넣고 37℃에서 24시간 동안 배양시켰다. 배양 후 clear zone이 형성되었으면, plate를 스캔하고 clear zone을 제어 수치화 시켰다. 수치는 측정 불가(-), 15mm보다 작음(+), 15~25mm(++), 26~35mm(+++), 35mm보다 큼(++++)으로 표현하였다.

④ 실험 설계

실험 설계는 천연물 단독, 복합생균제 단독, 복합생균제와 천연물 복합 3가지로 설계를 하였으며, 총 9개의 세부 항목으로 설계하였다(표 3-6).

표 3-6. 천연물과 복합생균제의 복합 항균력 측정 시료 설계

천연물 단독		복합생균제 단독			복합생균제와 천연물 복합			
천연물	SNU1	SNU2	PEM1	PEM2	SNU1 천연물	SNU2 천연물	PEM1 천연물	PEM2 천연물
Group1	Group2	Group3	Group4	Group5	Group6	Group7	Group8	Group9

나. 연구결과

(1) 병원성 미생물에 대한 천연물질의 항균효과 조사

(가) MIC (Minimal Inhibition Concentration) test

항균 대상물질 (*E. coli* K88)에 대한 항균 검정물질 (마늘, 양파, 칩, 오미자, 버섯, 미역)의 항균력을 조사하였다(표 3-7). ELISA (OD 600nm)로 96well cell culture plate를 측정된 결과 마늘, 양파에서 1/16가 최소억제농도로 가장 항균력이 뛰어났고, 오미자(1/8), 미역(1/4)의 항균력을 나타냈으며, 버섯은 항균력이 없고, 칩은 유색 추출물이기에 MIC test로 흡광도 값을 나타내기에 부적절하다고 판단되었다.

표 3-7. *E. coli* K88에 대한 천연물의 MIC test 결과

	원액	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
마늘	0.506	0.467	0.482	0.492	0.537	1.121	1.157	1.084
양파	0.713	0.859	0.842	0.820	0.837	1.165	1.151	1.069

취	2.099	1.407	1.150	1.306	1.183	1.164	1.137	1.015
오미자	0.204	0.225	0.545	0.651	1.097	1.092	1.107	1.070
버섯	1.231	1.028	1.175	1.154	1.111	1.109	1.096	1.033
미역	0.745	0.763	0.958	1.074	1.100	1.105	1.111	1.037
유기산	0.544	0.566	0.568	0.645	0.627	0.963	0.996	1.063
β-글루칸	0.601	0.651	1.119	1.121	1.124	1.116	1.127	1.123
천연물	마늘	양파	취	오미자	버섯	미역	유기산	β-glucan
최소억제농도 reader	1/16	1/16	측정불가	1/8	없음	1/4	1/16	1/2

(나) Agar well diffusion assay

① 병원성 미생물에 대한 항균력 테스트

항균 대상물질(*E. coli* K99, *E. coli* K88, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*)에 대한 항균 검정물질 천연물(마늘, 양파, 취, 오미자, 버섯, 미역, 뽕나무, 뽕잎)과 항균력과 항균 검정물질 유산균(*Lactobacillus plantarum* LP 177, *Pediococcus acidilactici* PA 175, *Lactobacillus salivarius* LS 29)의 효과를 조사하였다(표 3-7).

축종별 병원성 미생물에 대한 천연물의 항균력 테스트를 실시한 결과 마늘에서 모든 축종의 병원성 미생물에 대한 항균력을 나타내었다. 오미자는 *Salmonella pullorum*에서 높은 항균력을 나타내었으며, *Salmonella typhimurium*는 미약하나마 항균력을 나타내었고, 버섯 또한 *Salmonella typhimurium*에서 약간의 항균력을 나타내었다(표 3-8).

표 3-8. 병원성 미생물에 대한 천연물의 항균력 테스트 (1차)

	<i>Escherichia coli</i> K99	<i>Escherichia coli</i> K88	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>	<i>Salmonella pullorum</i>
마늘	+++ ¹⁾	+++	++++	++++	++++	++++
양파	-	-	-	-	-	-
취	-	-	-	-	-	-
오미자	-	-	+	-	-	+
버섯	-	-	+	-	-	-
미역	-	-	-	-	-	-
뽕나무	-	-	-	-	-	-
뽕잎	-	-	-	-	-	-
유기산	++	++	++	++	++	++
β-글루칸	-	-	-	-	-	-

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 5mm; ++, 5~10mm; +++, 11~15mm; +++, large than 16mm.

LP 177와 LS 29에서 *Salmonella typhimurium*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella pullorum*의 병원성 미생물에 대해 항균력이 있는 것으로 나타났으나, PA 175에서는 어떠한 축종 별 병원성 미생물에서 항균력을 나타내지 않았다 (표 3-9). 제1핵심과제에서 분리 동정하여 최종 선 발된 유산균 *Lactobacillus plantarum* 177, *Pediococcus acidilactici* 175, *Lactobacillus salivarius* 29은 표 1-2에서 이미 항균력이 검증된 유산균이다. 하지만 이번 실험에서는 천연물

과 동일한 조건을 만들기 위해 유산균 추출액을 천연물과 같이 0.45um filter를 사용하여 filtering을 시키는데, 이 경우 유산균은 분비액만 추출되고, 자체 균은 걸러졌기 때문에, 본 결과는 곧 유산균의 분비액의 효과만 나타났다고 사료된다(그림 3-2).

표 3-9. 병원성 미생물에 대한 천연물의 항균력 테스트 (2차)

	<i>Escherichia coli K88</i>	<i>Escherichia coli K99</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella pullorum</i>
마늘	알	+++ ¹⁾	+++	+++	+++	+++
	껍	-	-	-	-	-
	대	-	-	-	-	-
	줄뿌	++	++	+++	++	+
파	줄	-	-	-	+++	+++
	뿌	-	-	-	+++	++
고추	알	-	-	-	++	++
	잎	-	-	-	++	++
	깻잎	-	-	-	++	++
	방아잎	-	-	-	++	++
	생강	-	-	-	++	++
	산초	-	-	-	-	+++
	오미자	+	+	+	++	++
	매실	+	+	++	+	-
	강황	-	-	-	-	++
	양파	-	-	-	-	-
	쭈갓	-	-	-	-	-
	Securitor	+++	+++	+++	+++	+++

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, larger than 35mm.

축종별 병원성 미생물에 대한 천연물의 항균력 조사를 한 결과 전체적인 병원성 미생물에서 골고루 항균력 효과를 보인 마늘 알맹이, 마늘 줄기, 오미자, Securitor 4가지를 천연물과 복합생균제의 복합 항균력 조사의 시료로 선정하였다.

(2) 병원성 미생물에 대한 천연물과 복합생균제의 복합 항균효과 조사

(가) 병원성 미생물에 대한 유산균의 항균력 조사

표 3-10. 병원성 미생물에 대한 유산균의 항균력 테스트

	<i>Escherichia coli K99</i>	<i>Escherichia coli K88</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>	<i>Salmonella pullorum</i>
LP 177*	- ¹⁾	-	+	-	+	++
PA 175	-	-	-	-	-	-
LS 29	-	-	++	-	+	+

* LP 177 : *Lactobacillus plantarum* 177, PA 175 : *Pediococcus acidilactici* 175, LS 29 : *Lactobacillus salivarius* 29

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 5mm; ++, 5~10mm; +++, 11~15mm; +++++, larger than 16mm.

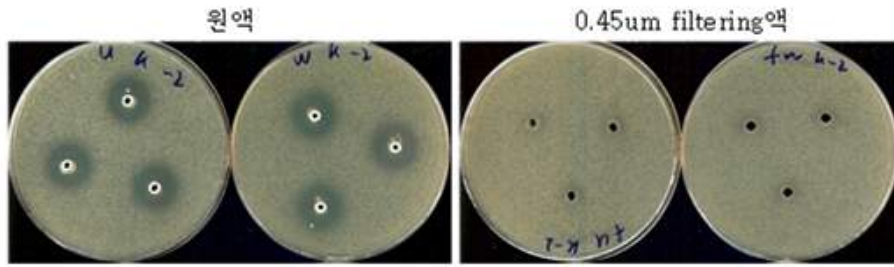


그림 3-2b. *E. coli* K99에 대한 *Pediococcus acidilactici* 175의 원액과 0.45um filtering시 항균력 비교

(나) 유산균에 대한 천연물의 항균력 조사

항균 대상물질 유산균(*Lactobacillus plantarum* 177, *Pediococcus acidilactici* 175, *Lactobacillus salivarius* 29)에 대한 항균 검정물질 천연물(마늘, 양파, 칩, 오미자, 버섯, 미역, 빵나무, 빵잎)의 항균력을 조사하였다(표 3-11).

마늘은 병원성 미생물에서와 마찬가지로 유산균에서도 항균력을 나타내었다. 하지만 그 억제 정도는 병원성 미생물 보다 현저하게 낮은 수준이므로 대체제로 사용하여도 무방할 것으로 사료된다(그림 3-3). 양파 (LP 177)와 버섯(LP 177, PA 175, LS 29)에서 유산균에 대한 약간의 항균력을 나타내었다.

표 3-11. 유산균에 대한 천연물의 항균력 테스트

	<i>Lactobacillus plantarum</i> 177	<i>Pediococcus acidilactici</i> 175	<i>Lactobacillus salivarius</i> 29
마늘	++ ¹⁾	++	++
양파	+	-	-
칩	-	-	-
오미자	-	-	-
버섯	+	+	+
미역	-	-	-
빵나무	-	-	-
빵잎	-	-	-

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 5mm; ++, 5~10mm; +++, 11~15mm; +++++, large than 16mm.

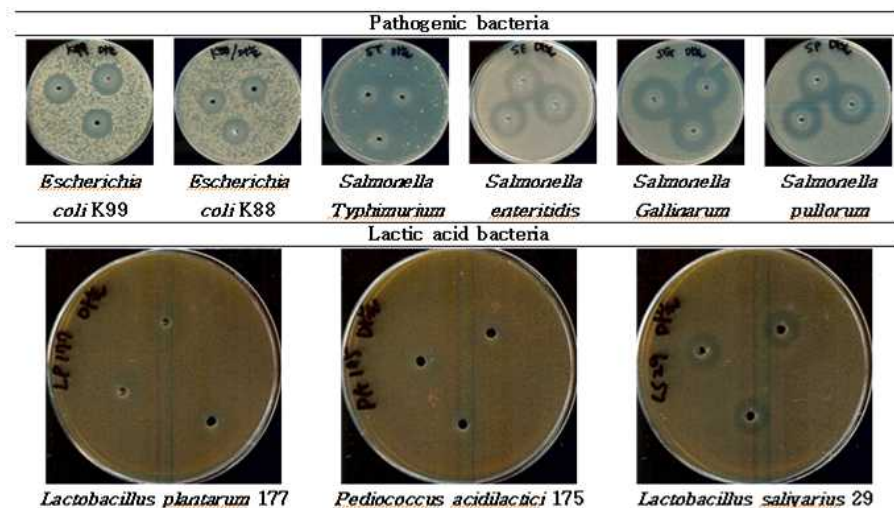


그림 3-3. 마늘의 병원성 미생물과 유산균에 대한 항균력 비교

(다) 병원성 미생물에 대한 천연물과 유산균의 복합 항균력 조사

항균 대상물질(*E. coli* K99)에 대한 항균 검정물질 천연물(마늘)과 항균 검정물질 유산균 (*Lactobacillus plantarum* LP 177)에 대한 복합 항균력 조사를 하였다.

실험 설계(1), *E. coli* K99에 대한 마늘 추출액의 항균력 테스트인 병원성 배지와 시료를 혼합하여 균현 후 top agar 분주(K99 10^{-2})를 실시한 결과 마늘 추출액 1.5% 수준에서 *E. coli* K99를 완전히 억제하였다(그림 3-4).

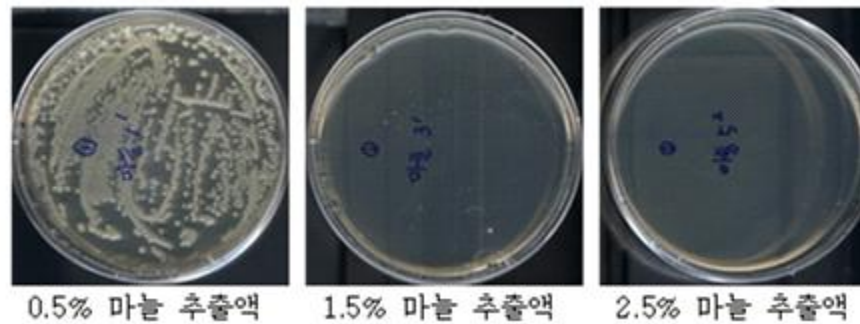


그림 3-4. *E. coli* K99에 대한 마늘 추출액 수준별 항균력 조사(1)

실험 설계 (2), *E. coli* K99에 대한 마늘 추출액의 항균력 테스트인 병원성 배지와 시료를 혼합하여 균현 후 Top agar 분주(K99 10^{-2})를 실시한 결과 위의 조건과 동일하게 마늘 1.5% 수준에서 *E. coli* K99를 완전히 억제하였다(그림 3-5).

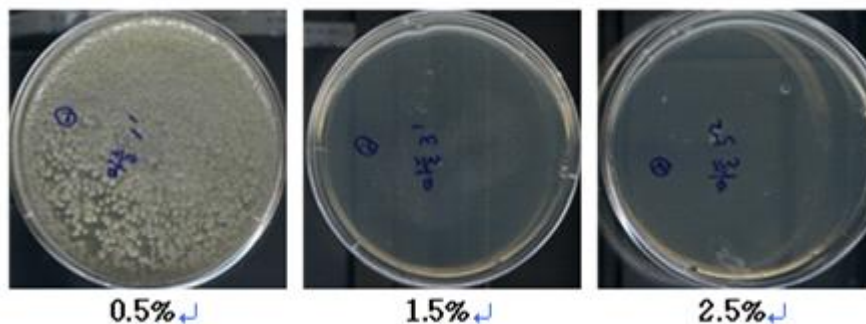


그림 3-5. *E. coli* K99에 대한 마늘 추출액 수준별 항균력 조사(2)

실험 설계 (3), *E. coli* K99에 대한 유산균 LP 177(*Lactobacillus plantarum* 177)의 항균력 테스트 인 유산균 배지에 LP 177를 도달한 후 top agar 분주(K99 10^{-2})를 실시한 결과 LP 10^{-2} 와 LP 10^{-3} 수준에서 *E. coli* K99가 어느 정도 억제 효과를 보였으나(Clear zone), LP 10^{-4} 수준에서는 *E. coli* K99가 전체적으로 뿌옇게 증식된 것으로 확인되었다(그림 3-6).

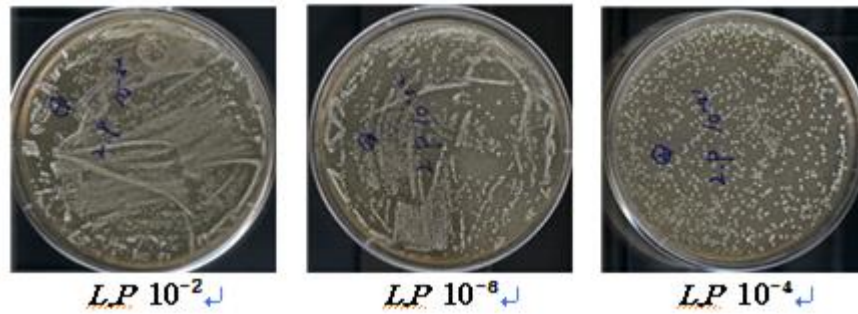


그림 3-6. *E. coli* K99에 대한 유산균 수준별 항균력 조사(3)

병원성 미생물의 분주 조건을 동일시한 실험 설계 (마늘 0.5%)과 실험 설계 (LP 10^{-2})에서 병원성 미생물(*E. coli* K99 10^{-2})이 앞선 결과(그림 3-5, 6)에서 증식하였다. 하지만 실험 설계 (4)에서와 같이, *E. coli* K99에 대한 마늘과 유산균(*Lactobacillus plantarum* 177)의 혼합 항균력 테스트인 유산균 배지와 0.5% 마늘 추출물을 혼합하여 균현 후 LP 177(10^{-4})을 도말하고 그 위에 Top agar에 *E. coli* K99 10^{-2} 분주를 실시한 결과 병원성 미생물 (*E. coli* K99 10^{-2})이 억제되었다(그림 3-7). 실험 설계 (4)에서 마늘 0.5%이 유산균의 억제능력은 없었고, 병원성 미생물(*E. coli* K99 10^{-2})만 억제시킨 것은 마늘과 유산균의 혼합 효과로 사료된다.

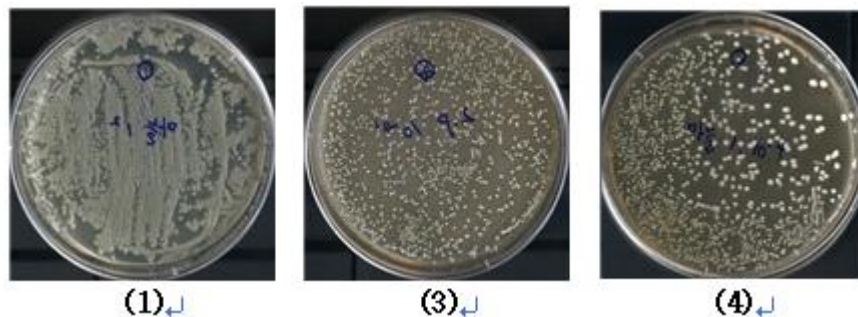


그림 3-7. *E. coli* K99에 대한 마늘과 유산균(*Lactobacillus plantarum* 177)의 혼합 항균력 테스트 비교

(라) 천연물과 복합생균제의 복합 항균력 조사

천연물 단독 효과는 표 3-11의 결과와 동일하게 마늘 알맹이와 Securitor에서 마늘 줄기와 오미자보다 높은 항균력을 보였다(표 3-12).

표 3-12. 천연물 단독 효과

	마늘 알맹이	마늘 줄기	오미자	Securitor
<i>E. coli</i> K88	+++	++	+	++
<i>E. coli</i> K99	+++	++	+	+++
<i>S. Enteritidis</i>	+++	+++	++	++++
<i>S. Typhimurium</i>	+	+	++	+++
<i>S. Gallinarum</i>	++++	+	+	+++
<i>S. Pullorum</i>	+++	++++	+	+++

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, large than 35mm.

생균제 제품 단독 효과는 PEM 1(유산균, 효모균, 광합성균)과 PEM 2(유산균, 효모균, 고초균)의 비교에서 고초균이 추가 첨가된 PEM 2에서 *E. coli K88*을 제외한 *E. coli K99*, *SE*, *SG*에서 더 항균 효과가 큰 것으로 나타났으며, SNU 1(유산균 단일 혼합)과 SNU 2(유산균, 효모균, 고초균 복합 혼합)의 비교에서는 복합 혼합된 SNU 2에서 *SE*에서 더 효과가 큰 것으로 나타났다. 결과적으로는 비교 물질인 PEM 복합생균제보다 자체 동정하여 검정된 SNU 복합생균제가 *E. coli K88*과 *SE*에서 항균력 효과가 큰 것으로 나타났다(표 3-13).

표 3-13. 복합 생균제 단독 효과

	PEM 1	PEM 2	SNU 1	SNU 2
<i>E. coli K88</i>	++	+	++	++
<i>E. coli K99</i>	++	+++	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i>	++	+++	+++	++++
<i>S. Typhimurium</i>	++	++	++	++
<i>S. Gallinarum</i>	+++	++++	+++	+++
<i>S. Pullorum</i>	++++	++++	++++	++++

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, large than 35mm.

마늘 알맹이 첨가 효과는 *E. coli K88*와 *SG*에서는 SNU 2를 제외한 나머지 복합생균제에서 오히려 항균력이 낮은 것으로 나타났다. *E. coli K99*에서는 복합 처리에 따른 변화가 없었으나, *SE*, *SP*에서는 모든 복합생균제에서 항균력이 높아졌고, *ST*에서는 SNU 복합생균제에서 복합 효과가 뛰어난 것으로 확인되었다(표 3-14).

표 3-14. 복합 생균제와 마늘 알맹이 첨가 효과

	마늘 알맹이	마늘 알맹이		마늘 알맹이	
		PEM 1	PEM 2	SNU 1	SNU 2
<i>E. coli K88</i>	+++	++	++	++	+++
<i>E. coli K99</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i>	+++	++++	++++	++++	++++
<i>S. Typhimurium</i>	+	+	+	++	+++
<i>S. Gallinarum</i>	++++	++	++	++	+++
<i>S. Pullorum</i>	+++	++++	++++	++++	++++

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, large than 35mm.

마늘 줄기 첨가 효과는 *E. coli K88*과 *SP*를 제외한 나머지 병원성 미생물(*E. coli K99*, *SE*, *ST*, *SG*)에서 복합생균제를 복합 처리한 결과가 항균력이 뛰어난 것으로 나타났다. 마늘 줄기와 복합생균제의 복합 효과 또한 SNU 2에서 가장 항균력이 뛰어난 것으로 나타났다(표 3-15).

표 3-15. 마늘 줄기 첨가 효과

	마늘 줄기	마늘 줄기		마늘 줄기	
		PEM 1	PEM 2	SNU 1	SNU 2
<i>E. coli</i> K88	++	++	++	++	++
<i>E. coli</i> K99	++	++	+++	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i>	+++	++++	+++	++++	++++
<i>S. Typhimurium</i>	+	+	++	++	++
<i>S. Gallinarum</i>	+	++	++	+	+++
<i>S. Pullorum</i>	++++	++++	++++	++++	++++

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, large than 35mm.

오미자 첨가 효과는 *ST*를 제외한 모든 병원성 미생물에서 복합 처리한 결과가 항균력이 뛰어난 것으로 나타났다(표 3-16).

표 3-16. 오미자 첨가 효과

	오미자	오미자		오미자	
		PEM 1	PEM 2	SNU 1	SNU 2
<i>E. coli</i> K88	+	++	++	++	++
<i>E. coli</i> K99	+	++	+++	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i>	++	++++	+++	++++	+++
<i>S. Typhimurium</i>	++	++	++	++	++
<i>S. Gallinarum</i>	+	++	++	+	++
<i>S. Pullorum</i>	+	++++	++++	++++	++++

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, large than 35mm.

Securitor 첨가 효과는 *SP*에서 단독 처리보다 복합생균제의 모든 복합 처리에서 높은 항균력을 나타내었으며, PEM 1은 *ST*, SNU 2는 *E. coli* K88에서 단독 처리보다 복합 처리에서 높은 항균력을 나타내었다(표 3-17).

표 3-17. Securitor 첨가 효과

	Securitor	Securitor		Securitor	
		PEM 1	PEM 2	SNU 1	SNU 2
<i>E. coli</i> K88	++	++	++	++	+++
<i>E. coli</i> K99	+++	++	++	++	+++
<i>S. Enteritidis</i>	++++	++++	+++	+++	++++
<i>S. Typhimurium</i>	+++	++++	+++	+++	+++
<i>S. Gallinarum</i>	+++	++	+++	+++	+++
<i>S. Pullorum</i>	+++	++++	++++	++++	++++

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, large than 35mm.

복합생균제 PEM 1과 마늘 알맹이, 마늘 줄기, 오미자, Securitor 모든 천연물이 병원성 미생물 *SE*에서 복합에 의한 항균력이 촉진되는 효과를 나타내었다. 그리고 Securitor는 병원성 미생물 *ST*에서 또한 PEM 1과의 복합에 의해 항균력이 촉진되는 효과를 나타내었다. PEM 2는

SE에서 마늘 알맹이와, *E. coli K88*에서 오미자와의 복합에 의해 항균력이 촉진되는 효과를 나타내었다. 그러나 SG에서 PEM 1은 마늘 알맹이와 Securitor, PEM 2에서는 마늘 알맹이에서 오히려 복합 처리가 단독처리보다 항균 효과가 억제되는 것으로 나타났다. 대체적으로 광합성균이 추가 첨가된 PEM 1이 고초균이 추가 첨가된 PEM 2보다 복합 처리에 의한 항균력이 촉진되는 것으로 나타났다(표 3-18).

표 3-18. PEM 복합생균제와 천연물 복합효과

	PEM 1					PEM 2				
	C	마늘 알맹이	마늘 줄기	오미자	Securitor	C	마늘 알맹이	마늘 줄기	오미자	Securitor
<i>E. coli K88</i>	++ ¹⁾	++	++	++	++	+	++	++	++	++
<i>E. coli K99</i>	++	+++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	++
<i>S. Enteritidis</i>	++	++++ ²⁾	++++	++++	++++	+++	++++	+++	+++	+++
<i>S. Typhimurium</i>	++	+	+	++	++++	++	+	++	++	+++
<i>S. Gallinarum</i>	+++	++ ³⁾	++	++	++	++++	++	++	++	+++
<i>S. Pullorum</i>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

C : only probiotics without natural source

¹⁾ Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, large than 35mm.

²⁾ Red color + : promoting effect of natural substance and probiotics

³⁾ Orange color + : Inhibiting effect of natural substance and probiotics

복합생균제 SNU 1에서는 천연물과 복합 처리에 의해 *E. coli K99*에서 마늘 줄기와 SE에서 마늘 알맹이, 마늘 줄기, 오미자에서 항균력 효과가 촉진되는 것으로 나타났으나, SG에서 마늘 알맹이와 복합 처리는 오히려 항균력이 억제되는 결과를 나타내었다. SNU 2에서는 마늘 알맹이와 복합 처리에 의해 ST에서 항균력 효과가 촉진되는 것으로 나타났다(표 3-19).

표 3-19. SNU 복합생균제와 천연물 복합효과

	SNU 1					SNU 2				
	C	마늘 알맹이	마늘 줄기	오미자	Securitor	C	마늘 알맹이	마늘 줄기	오미자	Securitor
<i>E. coli K88</i>	++ ¹⁾	++	++	++	++	++	+++	++	++	+++
<i>E. coli K99</i>	+++	+++	++++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i>	+++	++++ ²⁾	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	++++
<i>S. Typhimurium</i>	++	++	++	++	++	++	+++	++	++	+++
<i>S. Gallinarum</i>	+++	++ ³⁾	+	+	+++	+++	+++	+++	++	+++
<i>S. Pullorum</i>	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

C : only probiotics without natural source

1) Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, large than 35mm.

2) Red color + : promoting effect of natural substance and probiotics

3) Orange color + : Inhibiting effect of natural substance and probiotics

천연물과 복합생균제의 복합 효과 최종 선정 물질은 축종 별 병원성 미생물 6종류에서 모두 뛰어난 항균 효과를 보인 SNU 2와 마늘 알맹이 및 Securitor의 복합 물질로 선정되었다(표 3-20). 이 복합 물질 중 모든 축종의 병원성 세균에 가장 효과가 좋은 SNU2 + 마늘알맹이 복합제를 *in vitro* 실험을 통해 면역증강 효과 조사를 거친 후 사료 급여 실험을 실시하였다(표 3-21).

표 3-20. 천연물과 복합생균제의 복합 효과 최종선정

	SNU 2		
	C	마늘 알맹이	Securitor
<i>E. coli</i> K88	++ ¹⁾	+++	+++
<i>E. coli</i> K99	+++	+++	+++
<i>S. Enteritidis</i>	+++	++++	+++
<i>S. Typhimurium</i>	++	+++	+++
<i>S. Gallinarum</i>	+++	+++	+++
<i>S. Pullorum</i>	++++	++++	++++
Clear zone No. ²⁾	17	20	19

C : only prebiotics without natural source

1) Growth inhibition size of clear zone; -, not detected; +, smaller than 15mm; ++, 15~25mm; +++, 26~35mm; +++++, large than 35mm.

2) Clear zone No. : Total clear zone number

2. 항생제 대체용 느타리버섯 부산물의 사료 평가 실험

본 실험은 반추위가 발달된 반추동물에 있어서 느타리 버섯 부산물에 대한 반추동물 사료로의 이용관련 평가 및 이용성 증진을 위한 연구를 실시하였다.

가. 연구방법

(1) 느타리버섯 부산물에 대한 *in situ* 실험

TMR 사료(control), 느타리버섯 자실체 및 느타리버섯 톱밥부산물을 드라이오븐에 60°C에서 48시간동안 건조한 후 분쇄하였다. Pore-size 45um nylon bag (8x15cm)에 분쇄한 샘플 25g을 넣어 캐놀라가 장착된 홀스타인 거세우(약 600kg)의 반추위에 각각 6, 12, 24, 48시간 동안 배양시켰다. 배양시간이 지난 nylon bag을 꺼내어 흐르는 물에 washing하여 반추위액을 제거한 후 다시 드라이오븐에 60°C 에서 48시간동안 건조시킨 후, 소실율을 측정하였다.

표 3-21. TMR¹⁾ 과 sawdust-based OMSS 의 일반성분

Variable (%)	<i>In situ</i>		
	TMR	OMMM ²⁾	OMSS ³⁾
Moisture	54	84	72
Crude Protein	15.8	22.0	15.4
Ether Extract	7.8	1.0	0.4
Crude Fiber	15.1	30.0	40.5
Ash	6.2	6.5	5.2
Ca	0.2	0.3	0.5
P	1.2	0.6	0.3
ADF ⁴⁾	18.3	33.8	49.4
NDF ⁵⁾	33.5	49.1	65.1

¹⁾ TMR: Total mixed ration.

²⁾ OMMM: Oyster mushroom mycelium mass collected from the mushroom culture bottle neck.

³⁾ OMSS: Sawdust-based oyster mushroom spent substrate.

⁴⁾ ADF: Acid detergent fiber.

⁵⁾ NDF: Neutral detergent fiber.

(2) 느타리버섯부산물물의 발효를 위한 유산균의 선별

유산균은 37°C에서 MRS배지에 24시간 동안 배양하였고, 바실러스균은 37°C에서 0.5% yeast extract가 포함된, TBS배지에 overnight, 효모균은 30°C에서 YPD배지에 24시간 동안 배양시켰다. 축우 사료원료인 미강, 소맥피, 옥피 75g과 당밀 50g, 물 75ml에 느타리버섯 톱밥부산물과 배양된 유산균, 바실러스균, 효모균을 첨가하여 3일, 10일, 17일 동안 30°C 에서 배양(발효)시켜 pH를 측정하였고, 연구실에서 여러 종의 유산균을 이용하여 동일한 방법으로 30°C 에서 2일 동안 배양하여 가장 낮은 pH를 확인하였다. 실험설계 및 배합비는 표 3-22, 23과 같다.

표 3-22. Sawdust-based OMSS (oyster mushroom spent substrate)발효 미생물 선정 실험설계(trial 1)

Feedstuff (g)	Con1	Con2	T1	T2	T3	T4
Brewer's grain	-	125	125	125	125	125
Rice bran	-	75	75	75	75	75
Corn hull	-	75	75	75	75	75
Molasses	-	50	50	50	50	50
Water	-	25	25	25	25	25
OMSS	500	150	150	150	150	150
Total wet weight	500	500	500	500	500	500
----- Inoculant mix (ml) -----						
Lactic acid bacteria (CAM1, 175, LP177) ¹⁾			25	12.5	8.3	
1.9 x 10 ⁹ /ml						
Yeast (Sb796) ²⁾				12.5	8.3	
3.4 x 10 ⁸ /ml						
<i>Bacillus</i> (T-1, T-4) ³⁾					8.3	25
4.7 x 10 ⁹ /ml						

¹⁾ CAM1, 175: *Pediococcus acidilactici*; LP177: *Lactobacillus plantarum*.

²⁾ Sb796: *Saccharomyces boulardii*.

³⁾ T-1: *Bacillus polymyxa*; T-4: *Bacillus subtilis*

표 3-23. Sawdust-based OMSS(oyster mushroom spent substrate)발효 미생물 선정 실험설계(trial 2)

Feedstuff (g)	Con1	Con2	T1	T2	T3	T4
Rice bran	-	75	75	75	75	75
Wheat bran	-	75	75	75	75	75
Corn hull	-	75	75	75	75	75
Molasses	-	50	50	50	50	50
Water	-	75	75	75	75	75
OMSS	500	150	150	150	150	150
Total wet weight	500	500	500	500	500	500
----- Inoculant mix (ml) -----						
Lactic acid bacteria (CAM1, 175, LP177) ¹⁾ 1.9 x 10 ⁹ /ml			25	12.5	8.3	
Yeast (Sb796) ²⁾ 3.4 x 10 ⁸ /ml				12.5	8.3	
<i>Bacillus</i> (T-1, T-4) ³⁾ 4.7 x 10 ⁹ /ml					8.3	25

¹⁾ CAM1, 175: *Pediococcus acidilactici*; LP177: *Lactobacillus plantarum*.

²⁾ Sb796: *Saccharomyces boulardii*.

³⁾ T-1: *Bacillus polymyxa*; T-4: *Bacillus subtilis*.

(3) 발효 느타리버섯 부산물의 *in vitro* 실험

(가) 실험 처리구 및 사료의 일반성분

실험은 발효 느타리버섯 부산물(fOMSS)을 수준별로 첨가하여 *in vitro* 반추위 발효성상을 조사한 것으로, 대조구(0%), 5%, 10%의 세 수준의 실험구를 설정하였다. 기초사료는 한우 육성우 TMR 사료를 이용하였다. 그 배합비는 표 3-24와 같다.

표 3-24. 시험사료의 일반성분

	Control	5% fOMSS ¹⁾	10% fOMSS
Chemical composition			%
TDN	72.24	71.04	71.24
CP	16.54	16.32	16.11
EE	4.19	4.05	4.02
NDF ²⁾	31.22	31.44	31.56
ADF ³⁾	16.50	16.50	16.50
Ca	0.83	0.83	0.83
P	0.16	0.16	0.16

¹⁾ fOMSS (10% fermented oyster mushroom spent substrate)

²⁾ NDF: Neutral detergent fiber.

³⁾ ADF: Acid detergent fiber.

(나) Rumen inoculum 준비와 배양 방법

배양에 사용된 rumen inoculum은 반추위 cannulae가 정착된 Holstein cow로부터 얻어 rumen buffer 용액(McDougal's buffer)과 1:1로 혼합하여 이를 rumen inoculum으로 사용하였다. 기질 0.25g을 120ml serum bottle에 넣고 혐기상태에서 rumen inoculum 25ml을 주입하고 bottle은 butyl-rubber stopper와 aluminum cap으로 막은 후 39°C로 설정된 항온교반기 (SI-600R, Lab.companion. KOREA)에서 120rpm으로 교반 배양하였으며 배양시간은 3, 6, 9, 12, 24, 48시간으로 하였다.

(다) 분석 방법

실험에 이용된 기초사료 및 느타리 버섯 배양 부산물의 영양성분은 AOAC(1995)의 방법에 따라 분석하였고, ADF(acid detergent fiber)와 NDF(neutral detergent fiber)는 Van Soest 등 (1991)의 방법에 따라 분석하였다. Ammonia-N의 분석은 Chaney와 Marbach(1962)의 방법에 따라 phenol과 alkali를 동량으로 발색시킨 후 spectrophotometer(Optizen 1142H, MECASYS CO., LTD, KOREA)를 이용하여 630nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 이유 송아지 급여시험

(가) 공시동물 및 실험설계

이유 송아지 급여시험은 2회(봄, 가을) 진행하였고, 4~5일령의 홀스타인 송아지를 대용유를 급여하여 사육한 후, 55일령에 이유를 실시하고 5일간의 시험사료를 적응시킨 후 60일령에 급여시험을 시작하여 90일령에 종료시켰다. 30일 동안 아침, 저녁으로 사료는 2kg(시험사료 10% 수준, 200g), 브롬그라스 200g으로 제한급여 하였고, 물은 자유 채식시켰다. 발효 느타리버섯 부산물(fOMSS)은 미강 15%, 소맥피 15%, 옥피 15%, 당밀 10%, 물 15%에 유산균 혼합물 (*Lactobacillus plantarum* LP1, *Pediococcus acidilacticii* PA 193, *Lactobacillus plantarum* LP 2M)을 첨가하여 30°C 에서 2일 동안 배양(발효)하였으며, 1차 급여시험은 항생제 처리구 (Antibiotic), 발효 느타리버섯 톱밥부산물 처리구(10% fOMSS), 발효사료 처리구(10% fCon), 2차 급여시험은 무항생제 처리구, 항생제 처리구(Antibiotic), 유산균 경구투여 처리구(DFM), 발효 느타리버섯 톱밥부산물 처리구(10% fOMSS)로 시험 설계하였다. 그 시험 사료의 배합비는 표 3-25과 같다.

표 3-25. 시험사료¹⁾의 일반성분

Variable (%)	Trial I			Trial II			
	AB	fOMSS	fConc	Control	AB	DFM	fOMSS
Moisture	12.28	15.59	14.52	12.28	12.28	12.28	15.59
Crude Protein	16.52	15.92	15.73	16.52	16.52	16.52	15.92
Ether Extract	3.24	3.30	3.45	3.24	3.24	3.24	3.30
Crude Fiber	11.11	11.52	10.44	11.11	11.11	11.11	11.52
Ash	5.72	5.62	5.63	5.72	5.72	5.72	5.62
Ca	0.71	0.67	0.66	0.71	0.71	0.71	0.67
P	0.51	0.52	0.53	0.51	0.51	0.51	0.52
ADF ²⁾	12.43	12.99	11.64	12.43	12.43	12.43	12.99
NDF ³⁾	26.04	26.32	24.77	26.04	26.04	26.04	26.32
TDN ⁴⁾	72.15	68.48	70.68	72.15	72.15	72.15	68.48

Control diet was commercial calf starter and test groups were supplemented with:

¹⁾ AB (colistin 0.08% and oxyneo110/110 0.1%); fOMSS (10% fermented oyster mushroom spent substrate); fConc (10% fermented concentrates); DFM (direct-fed microbials, lactic acid bacteria mix used for the fermentation of fOMSS and fConc).

²⁾ ADF: Acid detergent fiber.

³⁾ NDF: Neutral detergent fiber.

⁴⁾ TDN: Total digestible nutrients; calculated using the equation of NRC (2001).

(나) 혈액채취 및 분석

시험시작 60일, 75일, 90일령에 아침 사료를 급여하고 3시간이 지난 후, 송아지의 경정맥을 통해 혈액을 채취한 후 4°C에서 15분간 3,000rpm 원심분리를 통해 혈장을 분리하여 ELISA 분석방법을 통해 IgG, IgA를 분석하였고, 자동혈액분석기(Sysmex, XE-2100D, Japan)를 이용하여 적혈구, 혈소판, 헤모글로빈, 헤마토크릿을 분석하였다.

(다) 통계분석

통계 분석은 SAS®(2002) package의 GLM Procedure로 분산분석을 실시한 후 Duncan's의 NEW multiple range test(Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 유의성 검정하였다.

나. 연구 결과

(1) 느타리 버섯 부산물에 대한 *in situ* 실험

느타리버섯 부산물의 동물사료로의 가능성을 조사하기 위해 pistula가 장착된 홀스타인 수소를 이용하여 *in situ* 소화율 실험을 실시하였다. 느타리버섯 톱밥부산물(Sawdust-based OMSS)의 *in situ* 소화율은 반추위내 24시간 배양 동안에 증가하였으나 48시간 배양에서는 TMR(대조구)사료와 느타리버섯 자실체(OMSS) 보다 낮은 결과를 보였다(그림 3-8). 이는 반추동물에 느타리버섯 톱밥부산물의 이용성을 높이기 위해서는 락토바실러스와 같은 미생물에 의한 발효를 통하여 그 이용성을 높일 필요성이 있음을 시사하고 있다.

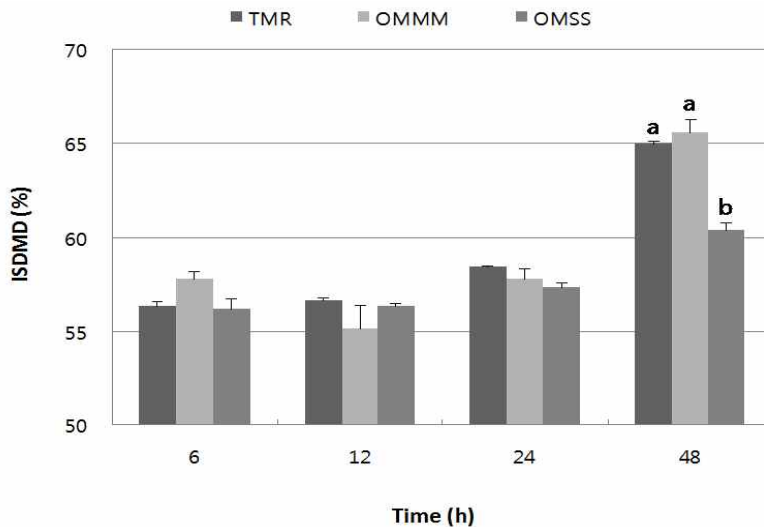


그림 3-8. OMSS과 Sawdust-based OMSS의 *in situ* 소화율. OMMM : Oyster mushroommy celiamass, sawdust-based OMSS : oyster mushroom spent substrate, ^{a, b} Means with different superscripts in the same row are different at $P < 0.05$.

(2) 느타리버섯부산물의 발효를 위한 유산균의 선별

본 연구에서는 느타리버섯 부산물의 보존과 영양적 가치를 증진시키기 위해 락토바실러스, 효모, 바실러스 균주를 이용하여 최적 발효조건을 조사하였다. 그 결과 락토바실러스 균주만을 이용한 발효가 가장 낮은 pH를 보이는 것으로 조사되었다. 최적의 유산균주를 선별하기 위해 3 round의 선별과정을 거쳤고 각 round 마다 균주들의 조합을 통하여 *Lactobacillus plantarum* LP 1', *Pediococcus acidilactici* PA 193, *Lactobacillus plantarum* LP 2M의 유산균 조합이 가장 낮은 pH(3.81) 값을 나타내는 것으로 나타났다. 이는 발효과정에 있어 동물사료의 보존을 위해 락토바실러스가 필수적인 균주라는 기존의 보고를 증명한 결과이다.

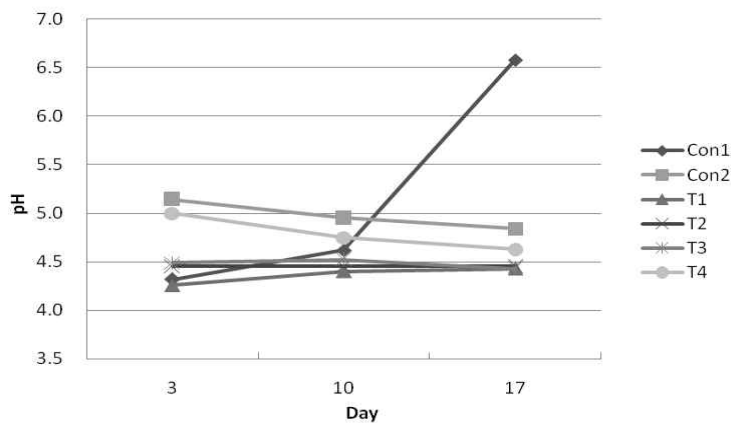


그림 3-9. Sawdust-based OMSS (oyster mushroom spent substrate)의 미생물 발효에 의한 pH변화 (실험 1). TMR mix was prepared by mixing OMSS with brewer's grain, rice bran, corn hull, molasses and water, inoculated with various combinations of microbial culture mixtures, incubated at 30°C for 17 days and pH was measured at 3, 10 and 17 days after incubation. See table 14 legend for group names.

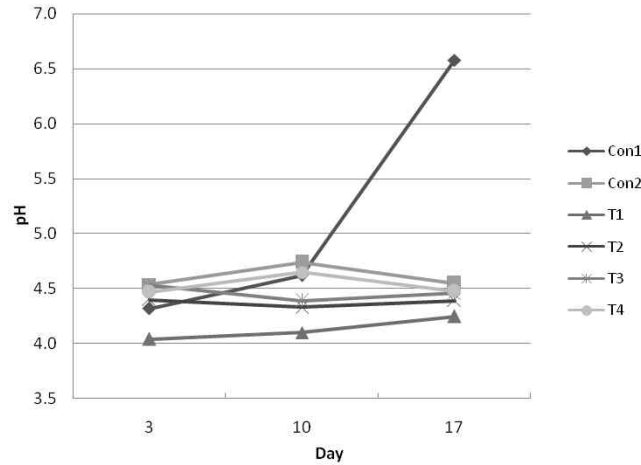


그림 3-10. Sawdust-based OMSS (oyster mushroom spent substrate)의 미생물 발효에 의한 pH변화 (실험 2). TMR mix was prepared by mixing OMSS with rice bran, wheat bran, corn hull, molasses and water, inoculated with various combination of microbial culture mixtures, incubated at 30°C for 17 days and pH was measured at 3, 10 and 17 days after incubation. See table 15 legend for group names.

표 3-26. Lactic acid bacteria 발효 과정중 pH 변화 (3 round 실험)¹⁾

	Treatment	Con	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
	pH	4.49	4.4	4.46	4.3	4.3	4.35	4.61	4.49	
1st ²⁾ round	Treatment	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
	pH	4.34	4.43	4.58	4.34	4.41	4.45	4.45	4.52	4.62
	Treatment	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25
	pH	4.45	4.7	4.46	4.55	3.99	4.06	4.08	4.36	4.52
2nd ³⁾ round	Treatment	Con	PA186	LP1'	Oa2	Ob8	PA120	PA193	LP2M	
	pH	4.49	4.52	4.05	4.20	4.74	4.17	4.15	4.16	
	Treatment	Lr2M	Rd2							
	pH	4.22	4.66							
3rd ⁴⁾ round	Treatment	Con	T1	T2	T3	T4				
	pH	4.51	3.86	3.87	3.81	3.92				

¹⁾ The 5% level of lactic acid bacteria was cultured at 30°C during the 2 days. Lactic acid bacteria of low pH were selected through 3 round of fermentation.

²⁾ T1: Aa4, Fd2, Oc5; T2: NC1, La1, 21; T3: Fd6, 38, Oa3; T4: 37, Oa4, 105; T5: Ib3, 28, 2'; T6: 3, 4, 5; T7: 6, 7, 8; T8: 9, 10, 11; T9: 12, 13, 16; T10: 17, 18, 24; T11: 25, 26, 27; T12: 30, 32, 33; T13: 34, 35, 39; T14: 40, 41, 42; T15: 43, 44, 45; T16: 46, 47, 48; T17: 49, 50, 51; T18: 52, 53, 54; T19: 55, 56, 57; T20: 58, 59, 60; T21: LP1', PA193, PA186; T22: PA120, Ob8, Oa2; T23: LP2M, Lr2M, Rd2; T24: Rd3, PA111, PA194; T25: LS22, LS20, LS19.

³⁾ PA186, PA120, PA193:

Pediococcus acidilactici: LP1', Oa2, Ob8, LP2M; *Lactobacillus plantarum*: Lr2M; *Lactobacillus reuteri*: Rd2; *Enterococcus faecium*.

⁴⁾ T1: *L. plantarum* LP1', *P. acidilactici* PA 120, *P. acidilactici* PA 193 ; T2: *L. plantarum* LP1', *P. acidilactici* PA 120, *L. plantarum* LP 2M ; T3: *L. plantarum* LP1', *P. acidilactici* PA 193, *L. plantarum* LP 2M ; T4: *P. acidilactici* PA 120, *P. acidilactici* PA 193, *L. plantarum* LP 2M.

(3) 발효 느타리버섯 부산물의 *in vitro* 실험

발효 느타리버섯 부산물(fOMSS)의 반추위 pH에 대한 영향은 표 3-27에 나타내었다. 결과에서 보면 발효 12시간에서 모든 발효 느타리버섯 배양 부산물 첨가구가 대조구와 비슷한 pH를 나타내었으며 발효 24시간에서 48시간에는 모든 첨가구가 대조구의 6.47보다 높은 pH를 나타냈다. 발효 6시간에서 10% fOMSS첨가구가 6.95로 대조구와 5% fOMSS 첨가구보다 낮은 경향(p=0.0540)을 나타냈으며 발효 12시간에서는 대조구가 6.76 5% fOMSS가 6.75, 10% fOMSS는 6.74으로 대체로 비슷한 결과를 나타낸 외에 발효 12, 24, 48시간에서는 생균제 혼합한 느타리버섯 부산물 첨가구가 대조구보다 높게 나타났다. 반추위 암모니아태 질소에 대한 영향은 표 3-27에서 나타내었다. 반추위 내 암모니아태 질소농도에서는 발효 6시간까지 생균제 혼합한 느타리버섯 부산물 첨가구가 대조구에 비해 낮은 농도를 나타낸 반면 12시간부터는 높은 농도를 나타냈다. 이와 같은 결과는 발효 느타리버섯 부산물은 반추위내 발효에 있어서 안정한 발효 양상을 보이고 있음을 시사하고 있다.

표 3-27. fOMSS에 대한 *in vitro* pH 와 ammonia-N 변화

Incubation time(h)	Treatments ¹⁾		
	Control	fOMSS 5%	fOMSS 10%
pH			
0	7.28	7.22	7.17
6	7.11	7.00	6.95
12	6.76	6.75	6.74
24	6.47	6.49	6.53
48	6.38	6.45	6.43
NH ₃ -N(ppm)			
0	81.45	61.69	73.39
6	90.66	75.28	81.79
12	90.00	99.48	92.36
24	101.70	94.65	96.34
48	114.55	106.93	101.38

¹⁾ All values represent the mean of triplicates;

fOMSS : fermented oyster mushroom spent substrate

(4) 이유 송아지 급여시험

In vivo 실험 결과 실험 1에서 이유 후 30일 동안의 성장성적은 항생제 처리구(AB) 0.63±0.07 kg, 10% 발효 느타리버섯 톱밥부산물 처리구(fOMSS) 0.68±0.05kg, 10% 발효 농후 사료원료 처리구(fConc) 0.64±0.08 kg의 일당증체량 결과를 보였다. 실험 2에서는 항생제 처리구(AB) 0.67±0.008 kg/d, 항생제가 제거된 어린 송아지사료 대조구(Control) 0.63±0.03 kg/d, 10% 발효 느타리버섯 톱밥부산물 처리구(fOMSS) 0.68±0.02 kg/d, 경구 투여 복합생균제 처리구(DFM) 0.66±0.01 kg/d의 일당증체량을 보였다. 실험 1과 2에서 10% 발효 느타리버섯 톱밥 배지 처리구(fOMSS)의 성장성적은 항생제 처리구(AB)과 비교하여 높은 결과를 보여 항생제 대체제로의 가능성을 보이거나 처리구간의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 그리고 실험 2에서의 경구 투여 복합생균제 처리구(DFM)과 10% 발효 느타리버섯 톱밥부산물(fOMSS)의 성장성적을 비교했을 시, 10% 발효 느타리버섯 톱밥부산물 처리구(fOMSS)가 높은 결과를 보여 톱밥부

산물과 복합생균제의 발효과정을 거치면서 성장성적의 향상을 가져오는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 사료적 가치가 낮은 느타리버섯 톱밥배지를 미생물 처리를 통하여 발효시킨다면 유용한 사료자원으로의 이용 가능성을 시사하고 있다.

표 3-28. 이유 송아지에 있어서 발효 OMSS (oyster mushroom spent substrate)가 성장성적에 미치는 영향

Variable	Trial I				P-value	Trial II				P-value	
	AB	fOMSS	fConc	SE		Control	AB	DFM	fOMSS		SE
Calves(no.)	6	6	6			7	8	8	8		
Initial BW, kg	78.63	72.53	72.63	1.49	0.24	65.54	66.55	68.15	70.25	0.84	0.49
Final BW, kg	97.63	93.16	92.00	1.84	0.47	84.54	86.82	87.97	90.82	0.80	0.19
ADG, kg	0.63	0.68	0.64	0.03	0.74	0.63	0.67	0.66	0.68	0.01	0.90
FE	0.317	0.344	0.323	0.01	0.93	0.317	0.338	0.330	0.343	0.005	0.90

Weaned calves were fed with commercial calf starter (control) supplemented with AB (colistin 0.08% and oxyneol110/110 0.1%); fOMSS (10% fermented oyster mushroom spent substrate); fConc (10% fermented TMR supplements); DFM (direct-fed microbials, lactic acid bacteria mix used for the fermentation of fOMSS and fConc).

3. 육계에 있어서 복합 생균제 및 면역 증강제의 혼합제제에 대한 항생제 대체효과 규명

본 연구는 복합 생균제와 면역 증강제로 알려져 있는 유기산 또는 β -glucan의 혼합급여가 육계의 생산성, 분 내 암모니아 가스 발생량 및 장내 병원성 미생물 변화에 미치는 영향을 조사하여 항생제 대체물질로 이용가능성을 확인함은 물론 육계를 이용한 항생제 대체제 사양시험 검증시스템을 구축하고자 실시하였다.

가. 연구방법

(1) 공시동물 및 시험장소

1일령 육계 병아리 중 임의로 120수를 선정하여 부속농장에서 사육하였다.

(2) 실험 설계 및 사양기준

토종 육계 1일령 병아리 120수를 C(대조구), T1(항생제구), T2(Probiotics A), T3(Probiotics B), T4(Probiotics C)로 구분 배치하였고, 실험설계는 처리 구당 8수씩 3반복으로 완전임의 배치하였으며, C구는 기초사료 단독 급여, T1구는 기초사료에 항생제(2% Avilamycin) 10 ppm 첨가 급여, T2구는 기초사료에 복합 생균제A 0.5% 첨가 급여, T3구는 기초사료 + 복합 생균제B 0.5% 첨가급여, T4는 기초사료에 복합 생균제A 0.5% 와 면역증강 제 A와 B를 첨가 급여시켰다.

표 3-29. 처리구별 복합 생균제 및 면역증강제의 첨가량

생균제	첨가량		
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Yeast</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
복합생균제 A	4.45×10 ⁶	1.51×10 ⁶	3.50×10 ⁵
복합생균제 B	6.70×10 ⁷	3.10×10 ⁶	
면역증강제	종 류 (순도)	첨가량	
Anti-biotics	Avilamycin (2%)	10ppm	
면역 증강제 A	β-glucan (50%)	0.6g/kg	
면역 증강제 B	Organic acid (44%)	3.0g/kg	

(3) 기초사료

항생제를 포함하지 않은 육계전용 사료(6주령 이전: 육계전기사료, 6주 이후 : 육계후기사료)를 기초사료로 사용하였다.

(4) 조사항목 및 실험방법

증체량, 사료섭취량 및 사료효율은 체중, 사료섭취량(매주 마다), 증체량(종료시 체중 - 개시시 체중), 사료섭취량(사료급여량 - 사료잔량), 사료효율(증체량 / 사료 섭취량)로 조사하였다. 도체특성은 시험 종료 시 생체중(Live Weight)을 측정하고, 외면혈관 절단법을 이용하여 방혈한 후 중탕탈모법(59~60 °C, 20~60 sec)으로 탈모시켜 도체 조사(전도체, 도체 중, 총 가식내장)에 이용하였다. 계분의 가스 발생량은 손장호 (2005)의 방법을 이용하였다. 실험 방법은 신선 배설물을 수거한 후 처리구 당 3반복 순수 배설물 70g을 페트병에 넣고 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15일 가스 포집기를 이용하여 NH3 가스를 측정하였다. 장내 병원성 미생물 조사 또한 손장호 (2005)의 방법을 이용하였다. 실험 방법은 체중 측정 종료 시 Ethyl ether로 마취시키고, 오른 쪽 복부를 절개한 후 맹장, 회장을 분리 채취하였다. 맹장, 회장 각각 1cm 정도를 절개하여 내용물 3g 정도를 수거하여 멸균 식염수로 10⁻¹~10⁻⁹ cfu까지 계단 희석 실시하였다. 희석된 재료 중 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶에서 각각 0.1ml를 선택 배지에 접종하여 37°C에서 배양하였고, S, S agar 와 MacConkey agar를 이용하여 미생물 수 log10을 취하여 나타내었다.

(5) 통계 분석은 SAS®(2002) package의 ANOVA Procedure로 분산분석을 실시한 후 Duncan's 의 NEW multiple range test(Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

나. 연구결과

(1) 성장 성적

총 증체량은 항생제가 첨가된 T1에서 가장 높았으나, 대조구와 생균제 급여구 간에는 차이가 없었다. 각 처리 별 사료 섭취량 3~6주령에서는 유의성은 나타나지 않았으나, 3~9주령에서는 T1과 T2에서 유의적인 차이를 보였던바 항생제 급여 시 섭취량이 가장 증가 하는 경향을 보였다. 사료효율 또한 복합생균제 처리구인 T2, T3처리구가 대조구와 T1인 항생제처리구보다 낮게 나타났으나(p<0.05), β-glucan과 유기산제를 혼합한 T4처리구는 대조구와 항생제 처리구

와 유의한 차이가 나타나지 않았다.

표 3-30. 복합 생균제 및 면역 증강제의 첨가가 육계의 성장성적에 미치는 영향

	Week	Treatment*					SEM
		C	T1	T2	T3	T4	
Body Weight	initial	293.3±4.40	293.3±3.63	292.1±12.00	292.5±12.58	292.0±9.85	3.06
	final	1994.5±19.74 ^a	2024.2±24.76 ^a	1899.2 ±19.88 ^b	1936.0± 26.99 ^{ba}	1978.0±30.53 ^{ba}	15.11
Weight gain (g/d)	3~6	703.5±7.25	706.3±9.01	694.5±7.06	682.5±8.50	713.5±3.53	4.01
	7~9	997.7±22.06 ^{ba}	1024.6±30.89 ^a	912.6±15.31 ^b	961.0±39.50 ^{ba}	972.4±4044 ^{ba}	15.03
	3~9	1701.1±17.19 ^{ba}	1730.8±23.36 ^a	1607.1±19.42 ^{bc}	1643.5±36.08 ^{a^{bc}}	1685.9±37.07 ^{a^{bc}}	15.51
Feed intake (g/d)	3~6	1500.8±35.34	1506.0±10.71	1514.7±22.33	1486.7±12.42	1509.9±3.26	8.94
	7~9	2420.3±20.98 ^a	2469.5±17.98 ^a	2409.3±72.30 ^a	2419.3±50.77 ^a	2388.8±15.29 ^a	28.38
	3~9	3921.1±55.47 ^{ba}	3975.6±14.92 ^a	3936.3±90.40 ^a	3913.4±36.85 ^{ba}	3886.8±22.62 ^{ba}	33.66
Feed conversion*	3~6	2.13±0.068	2.13±0.018	2.18±0.018	2.18±0.011	2.15±0.012	0.01
	7~9	2.43±0.035	2.41±0.064	2.64±0.125	2.53±0.135	2.47±0.120	0.04
	3~9	2.31±0.018 ^b	2.30±0.032 ^b	2.45±0.030 ^a	2.38±0.029 ^{ba}	2.31±0.047 ^b	0.02
Feed efficiency*	3~6	0.47±0.015	0.47±0.006	0.46±0.006	0.47±0.000	0.47±0.000	0.01
	7~9	0.41±0.006	0.41±0.009	0.38±0.015	0.40±0.021	0.41±0.020	0.03
	3~9	0.43±0.003 ^a	0.43±0.007 ^a	0.41±0.003 ^b	0.42±0.006 ^{ba}	0.43±0.009 ^a	0.01

a,b,c : Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly(p<0.05)

* C: control, T1: antibiotics, T2: pro-biotics 1, T3: pro-biotics 2, T4: pro-biotics 3

* Feed conversion: Feed intake / Weight gain

* Feed efficiency: Weight gain / Feed intake

(2) 도체 특성

생체중과 도체중은 생균제 첨가 급여구에서 대조구보다 높게 나타났다. 도체율은 66.5~69.2%의 범위를 보였으며, 특히 생균제 첨가 급여구인 α-Gold®제품 T3와 복합생균제 T4에서 다른 처리구보다 높게 나타났다. 가식 내장 무게는 Total Giblets, Liver, Heart에서 β-glucan과 유기산제를 추가 급여시킨 복합 생균제 T4에서 유의하게 높게 나타났다(p<0.05). Komegay 등(1995)은 효모가 단백질, 효소, 비타민뿐만 아니라 미지 성장 인자를 포함하고 있어 가축 생산에 긍정적인 영향을 주며, Zhang 등(2005)은 *Saccharomyces cerevisiae* 효모 성분이 육계의 장 점막세포와 용모 발달에 도움을 준다고 하였다. 본 결과는 생균제뿐만 아니라 면역증강제인 β-glucan과 유기산제를 혼합 급여시킴으로써 나타나는 혼합 효과에 의한 결과인 것으로 사료된다.

표 3-31. 복합 생균제 및 면역 증강제의 첨가가 육계의 성장성적에 미치는 영향

	Treatment *					SEM
	C	T1	T2	T3	T4	
Live Weight (g)	1694.5±49.38	1736.7±20.21	1745.0±20.09	1758.3±4.41	1780.0±65.62	16.54
Carcass Weight (g)	1137.1±30.47	1174.3±23.98	1159.8±19.68	1217.1±6.48	1209.2±37.14	12.61
Carcass ratio (%)	67.1± 0.19	67.6± 0.76	66.5± 0.39	69.2±0.42	68.2± 3.98	0.74
Total Giblets (g)	207.4± 3.01 ^b	199.4± 3.75 ^b	209.9± 2.79 ^b	205.3±2.58 ^b	222.3± 6.10 ^a	2.49
Gizzard (g)	32.5± 0.41	31.2± 0.55	31.3± 1.21	32.7±0.49	31.9± 0.62	0.31
Liver (g)	29.7± 0.25 ^b	29.8± 0.59 ^b	31.0±0.86 ^{ab}	30.7±0.36 ^{ab}	32.1± 0.98 ^a	0.35
Heart (g)	10.0± 0.77 ^b	11.2±0.28 ^{ab}	10.9±0.35 ^{ab}	10.3±0.50 ^b	12.3± 0.72 ^a	0.30

a,b,c,d: Values(Mean±SE) within row with no common superscript differ significantly (p<0.05)

* C: control, T1: antibiotics, T2: pro-biotics 1, T3: pro-biotics 2, T4: pro-biotics 3

(3) 계분의 가스 발생량

계분 중의 암모니아가스 발생량은 3일부터 증가하여 6일에 최고치에 이르렀으며 9일 이후 감소하였다. 항생제 첨가 급여구에서 암모니아가스 발생량이 현저하게 감소하였으며, 복합 생균제 제품에서는 암모니아 가스 생산량에 대한 영향이 적게 나타났으나 a-Gold®제품 T3와 면역증강제 추가 제품 T4에서 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 결과적으로 항생제 첨가가 암모니아가스 발생량을 감소시키는 효과를 나타낸 반면 복합 생균제에서 항생제를 대체할 만한 효과를 나타내지 못하였다. 그러나, 대조구에 비교하여 볼 때 pro-biotics첨가와 β-glucan 및 유기산제의 혼합급여는 통계적 유의차는 보이지 않지만 약간의 개선된 정도를 보이고 있어 이후 투여량과 시기를 보완한다면 비록 항생제정도의 효과는 없지만 무첨가구에 비하여 암모니아 발생량을 줄일 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

표 3-32. 복합 생균제 및 면역 증강제의 첨가가 계분의 가스발생량에 미치는 영향

Treatment *	Day						
	0	1	3	6	9	12	15
C	0.7 ^{ab}	0.7	303.3 ^a	520.0 ^{bc}	90.7 ^{ab}	5.1	3.8 ^a
T1	0.7 ^{ab}	0.6	62.0 ^b	359.7 ^c	78.0 ^{ab}	3.3	2.1 ^b
T2	1.3 ^a	0.8	327.5 ^a	537.3 ^a	93.7 ^a	5.5	3.6 ^a
T3	0.5 ^b	0.4	286.3 ^a	494.0 ^{bc}	64.3 ^b	4.3	3.6 ^a
T4	0.6 ^b	0.7	340.0 ^a	429.7 ^{bc}	70.0 ^{ab}	4.9	3.6 ^a
SEM	0.09	0.43	26.62	31.92	3.83	0.30	0.18

a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

* C: control, T1: antibiotics, T2: pro-biotics 1, T3: pro-biotics 2, T4: pro-biotics 3

(4) 장내 병원성 미생물 변화

생균제의 육계에 첨가 급여 시 맹장 내 salmonella 수는 T4에서 현저히 감소하였고, 회장 내에서는 T2와 T4에서 감소하였다. 맹장 내 *E. coli* 수는 T4에서 현저히 감소하였고, 회장 내에서는 T1, T2와 T4에서 유의적으로 감소하였고(P<0.05), 또한 T4에서 β-glucan과 유기산을 추가 급여시킴으로 생균제의 장내 병원성미생물 억제효과를 증가시킴은 확인하였다. 이는 육계의 장내 감염원에 대한 저항성을 증가시키고 점막 면역계를 조절하여(Chateau 등, 1993; Stem 등, 2001), 유익균의 우점과 면역증강제로서의 다른 처리구에 비하여 병원성 미생물의 감소에 뚜렷한 효과를 보였을 것으로 사료된다.

결론적으로 생균제 및 면역증강제의 첨가는 육계의 성장성적 및 NH₃가스발생량 감소에는 항생제대체효과가 증명되지 못하였으나 *Lactobacillus*와 yeast로 구성된 복합생균제에 면역증강제인 β-glucan과 유기산의 추가급여는 도체성적 및 맹장과 회장 내 병원성 미생물 (*Salmonella*와 *E. coli*) 억제효과가 항생제를 대체할 수 있는 효과가 있음이 증명된바 항생제 대체물질로 이용가능성이 인정된다.

표 3-33. 복합 생균제 및 면역 증강제의 첨가가 장내 병원성 미생물 변화에 미치는 영향

Treatment *	Cecum		Ileum	
	<i>Salmonella</i> (CFU/g)	<i>E. coli</i> (CFU/g)	<i>Salmonella</i> (CFU/g)	<i>E. coli</i> (CFU/g)
C	5.4×10 ⁶ ab	6.7×10 ⁶ a	2.2×10 ⁴	2.1×10 ⁴ a
T1	4.5×10 ⁶ ab	6.2×10 ⁶ ab	2.0×10 ⁴	1.8×10 ⁴ b
T2	4.9×10 ⁶ ab	6.0×10 ⁶ ab	1.9×10 ⁴	1.5×10 ⁴ b
T3	6.0×10 ⁶ a	6.8×10 ⁶ a	2.1×10 ⁴	2.2×10 ⁴ a
T4	4.2×10 ⁶ b	5.1×10 ⁶ b	1.5×10 ⁴	1.5×10 ⁴ b
SEM	0.2×10 ⁶	0.3×10 ⁶	0.1×10 ⁴	0.1×10 ⁴

* a,b,c,d : Values(Mean±SE) within columns with no common superscript differ significantly(p<0.05)

* C: control, T1: antibiotics, T2: pro-biotics 1, T3: pro-biotics 2, T4: pro-biotics 3

4. 복합 생균제/securitor 혼합제제의 항생제 대체효과 조사

본 연구는 천연물(securitor)과 복합 미생물(SNU2)의 혼합제제의 면역증강 효과를 검증하고 실제 가축에 미치는 영향을 조사함으로써 항생제 대체 물질로의 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

가. 연구방법

(1) *In vitro* 면역력 조사

(가) 공시동물

본 실험의 공시동물은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 실험을 진행하였다 (PNU-2012-0047). 6주령의 수컷 Sparague Dawley 흰쥐는 (주)샘타코(Kyeonggi, South Korea)에서 구입 후, 부산대학교 동물청정센터(Miryang, South Korea)에서 사육하였다. 실험 기간 동

안 흰쥐는 물과 사료를 자유섭식 시켰으며, 온도($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), 습도($55\pm 5\%$), 12-h photoperiod (light on, 08:00-20:00 h)로 컨트롤 된 사육환경에서 1주일간의 순치기간을 거친 뒤 본 실험에 사용하였다.

(나) 시료 준비

선행 연구의 병원성 미생물에 대한 항균력 테스트 결과를 토대로 securitor와 복합생균제 및 이들에 대한 혼합제제를 사용하여 본 실험을 진행하였다. 시료 제조에 사용되는 모든 실험기구 및 용품은 미리 멸균한 뒤 사용하였으며, 실험 재료 또한 가급적 무균 상태의 조건에서 신속하게 실험을 진행하였다.

복합생균제(SNU2)는 목장토양과 돼지 분변에서 자체 분리 동정한 유산균(CAM1, 175: *Pediococcus acidilactici*; LP177: *Lactobacillus plantarum*), 효모균(Sb796: *Saccharomyces boulardii*), 고초균(T-1: *Bacillus polymyxa*, T-4: *Bacillus subtilis*)을 혼합한 것으로 실험을 진행하였다. 각각의 복합생균제와 Securitor(Arrimon, Plerin, France)를 1% penicillin-streptomycin(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)이 포함된 RPMI1640(Thermo Fisher Scientific Inc.) 배지와 순차적으로 희석하여 1%와 5%(v/v)로 배합한 샘플을 본 실험에 사용하였다.

복합생균제 제조 및 천연물 혼합은 각 균주마다 명시된 균수까지 증식되는 배양시간에 맞춰 배양 후 먼저 배양이 끝난 균주는 4°C 냉장고에 보관하고 순차적으로 시간에 맞춰 4°C 에 보관하였다. 모든 균주의 배양이 종료 되었을 때, 복합생균제의 설계에 따라 각 균 주 1 mL씩 10 mL round tube에 혼합시킨 후, 최종적으로 혼합된 복합생균제 1mL와 securitor 1mL을 섞어 혼합제제 시료를 준비하였다.

(다) 장관 내 면역세포의 분리

1주일 동안 순치 시킨 흰쥐를 이산화탄소로 마취 한 후, 소장과 대장(맹장 포함)을 적출하였다. 소장과 대장 점막 내 lamina propria(LP)층에 산재하고 있는 면역세포(lamina propria leukocyte;LPL)는 선행 연구(Lee et al., 2009)를 토대로 분리 실험을 진행하였다.

분리 방법은 다음과 같다. 적출 된 소장과 대장을 PBS로 내용물을 세정한 후, 소장 내 파이어반(peyer's patch) 및 복부지방 내 결합조직(connective tissue)을 제거하였다. 다음으로 절개 및 수술용 가위로 약 2 ~ 3 cm로 단편화 시킨 조직 샘플을 실리콘으로 미리 코팅 된 유리 플라스크에 옮겨 담은 후, 50 mL의 DTT-Hank's solution을 넣어 실온에서 30분간 교반 배양을 하여 뮤신(mucin)을 제거하였다. 순차적으로 EDTA-Hank's solution 및 collagenase를 녹인 RPMI1640배지를 실온에서 각각 30분간 3반복의 교반과정으로 장 상피세포 및 LP층을 효율적으로 제거하였다. Collagenase 과정으로 얻어 진 용액을 원심분리($400 \times g$, 10 min, R.T)한 후, 상층액이 제거 된 pellet를 40%의 percoll gradient를 분주하여 새 15 mL tube에 pooling하였다. 2mL의 75% percoll gradient를 다시 분주 한 후, 원심분리($400 \times g$, 15 min, R.T)를 거쳐 40%와 75% percoll gradients층 사이에 존재하는 세포용액을 새 15 mL tube에 취하였다. 다시 RPMI1640배지로 린스와 원심분리($400 \times g$, 10 min, R.T)과정을 거친 소장과 대장 점막 유래 세포용액을 trypan blue로 염색하여 cell counting을 실시하였다. 또한 분리 된 세포용액에 FITC-anti-CD8 mAbs (clone OX-8; AbD Serotec, Morphosys UK Ltd., Oxford, UK)와 RPE-anti-CD161 mAbs(clone 10/78; AbD Serotec)를 각각 10 mL씩 첨가하여 30분간 염색시

킨 후, flow cytometry를 통해 CD8⁺세포와 CD161⁺Natural Killer 세포의 분포를 관찰하였다.

(라) 면역세포의 생존률

Securitor와 복합생균제 및 혼합제제가 소장 및 대장 유래 면역세포의 증식에 미치는 실험은 다음과 같이 진행하였다.

흰쥐의 장 조직에서 분리된 면역세포용액을 원심분리(400 x g, 10 min, R.T)하여 상층액이 제거된 pellet에 각 1% 및 5% 농도로 희석된 샘플을 첨가하였다. 96-well culture plate를 이용하여 면역세포(5×10^4 cells)를 각 well에 100 mL씩 분주한 후, 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 12시간 배양시켰다. WST-8 용액(Cell counting kit-8; Dojindo Inc., Tokyo, Japan)을 각 well에 10 mL씩 첨가한 후 1시간 뒤 Multiskan EX Microplate Reader기(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 흡광도(OD 450 nm)를 측정하였다.

(마) 사이토카인 조사

Securitor와 복합생균제(SNU 2) 및 혼합제제에 대한 장관 유래 면역세포의 면역매개물질의 분비능력을 anti-rat sandwich ELISA kits(Abcam plc., Cambridge, MA, USA)내 Instruction's guide에 따라 측정하였다.

흰쥐의 장관 유래 면역세포(5×10^5 cells)를 securitor, 복합생균제 또는 혼합제제가 포함된 배지와 혼합하였다. 또한 혼합 배지에 lipopolysaccharide(LPS; 100 mg/mL) 첨가군 및 비(非)첨가군으로 나누어 면역매개물질에 대한 각 시료의 항염증 효과(anti-inflammatory effect)를 평가하였다. 위의 시료와 혼합된 세포용액을 96-well culture plate 내 각 well에 300μL 분주 하고, 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 24시간동안 배양시켰다. 배양된 시료 내 상층액의 Tumor necrosis factor-alpha(TNFα) 및 Interferon-gamma(IFNγ)의 농도를 Multiskan EX Microplate Reader기(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 흡광도(OD 450 nm)에서 측정하였다.

(바) 직/간접적 종양세포사멸 능력

YAC-1 cell line(NK sensitive YAC-1 virus-induced mouse T cell lymphoma cell)을 target 세포로 지정하여, 천연물 또는 복합생균제의 세포사멸 능력을 측정하였다. 우선 YAC-1 target 세포에 대한 securitor와 복합생균제 및 혼합제제의 직접적 세포사멸 능력(Direct cytotoxicity)을 평가하였다. 이 평가는 96-well culture plate를 이용하여 1%와 5% securitor, 복합생균제 또는 혼합제제를 YAC-1 target 세포(5×10^4 cells)에 각각 첨가한 후, 각 well에 100 μL씩 분주하였다. 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 12시간 배양 후, WST-8 용액(Cell counting kit-8; Dojindo Inc., Tokyo, Japan)을 각 well에 10 mL씩 첨가한 후 1시간 뒤 Multiskan EX Microplate Reader기(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 흡광도(OD 450 nm)를 측정하였다.

간접적 세포사멸 능력 (Indirect cytotoxic activity)의 평가 방법은 다음과 같이 수행하였다. 흰쥐의 소장조직 및 대장조직 점막에서 시술을 하여 분리된 면역세포 (Effector cell)와 3,3'-diiodo-4,4'-dimethyl-5,5'-diphenylsulfonium tetrasulfonate (DiOC₁₈(3))으로 염색된 YAC-1 target cell을 10:1의 비율로 분주한 후, 각 천연물과 복합생균제 및 혼합제제가 포함된 배지를 각각 200 μL씩 첨가하였다. 혼합된 시료를 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 4시간 배양 시킨 후, Propidium

iodide(PI)을 10 mL씩 첨가하고, 30분 동안 다시 배양 시켰다. Flow cytometry를 이용하여 전체 DiOC₁₈(3) 염색된 YAC-1 target 세포 대비 PI로 염색된 YAC-1 target 세포의 %를 구하여 세포사멸 능력을 측정하였다.

(사) 통계분석은 분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 mean ± SEMs으로 표현 하였다. JMP 5.0 software package(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 통해, 두 그룹간 및 다중그룹간의 통계적 비교는 Student's *t*-test와 Turkey HSD Kramer test를 이용하여 5% 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

(2) 이유 자돈에 대한 급여 실험

본 연구는 *in vitro* 실험에 의해 검증된 securitor 및 복합생균제의 혼합제제를 이용하여 산란계 큰 병아리 및 이유자돈 시기의 생산성 및 면역증강 비교를 통해 항생제 대체 가능성을 평가하였다.

(가) 공시 동물

이유자돈은 38일령 69두를 사용하였으며, 23두씩 하여 3개의 돈 방에 임의 배치하였다. 공시 동물은 1주일의 순치기간을 거쳐 securitor와 복합생균제의 혼합제제의 급여에 따른 생산성 및 면역증강 평가 실험을 진행하였다.

(나) 시초 사료 및 혼합제제의 준비

이유자돈 실험 내 실험사료는 NRC의 요구수준과 같거나 높게 배합되어 급여되었으며, 복합 제조 공정은 배양 및 준비과정을 거쳐 푸른들EM사료 회사에 전달하여 H₂O+균주 및 시료를 1:1 비율로 혼합하여 분사, 교반, 숙성 및 건조하여 포장하였다. 항생제 처리구에 있어서 이유 자돈은 tetracycline(33 g/kg body weight)를 첨가하여 제조 사용하였다.

(다) 시험 설계 및 기간

실험 설계는 무항생제 처리구를 기본 사료로 하여 항생제 처리구 및 Securitor + SNU 2 (0.2%/feed)로 설계하여 45일 동안 실시하였다. 체중과 사료섭취량은 시험 개시일(0일)과 종료 일(45일)에 실시하였다.

(라) 성장성적

체중은 시험 개시일(0일)과 종료일(45일)에 두 번에 걸쳐 조사를 하였으며, 일 당 증체량 (Weight gain)은 45일간의 증체량을 1일로 나누어 1두 당 1일 증체량 (Dairy weight gain)으로 표시하였다. 일 당 사료섭취량(Feed intake)은 사료 총 급여량에서 잔량을 제하여 총 섭취량을 구하고 사육 두수로 나누어 1두 당 섭취량으로 표시하였으며, 45일을 나누어 1두 당 1일 사료섭취량(Dairy feed intake)로 표시하였다. 사료요구율 (Feed/Gain)은 일 당 사료섭취량을 일 당 증체량으로 나누어 계산하였다.

(마) 혈액 생화학적 분석

혈액 생화학적 분석은 0일과 45일에 EDTA 튜브 (BD Vacutainer, BD Franklin, USA)에 채

혈한 혈액을 이용하였다. 4°C 하에 EDTA 튜브에 보관된 혈액은 자동혈액분석기(ACT-Diff, Beckman-Coulter, USA)를 이용하여 WBC(백혈구; white blood cells), RBC(적혈구; red blood cells), HGB(혈색소; hemoglobin concentration), HCT(헤마토크리트; hematocrit), MCV(평균적혈구용적; mean corpuscular volume), MCH(평균혈구혈색소량; mean corpuscular hemoglobin), MCHC(평균혈구혈색소농도; mean corpuscular hemoglobin concentration), PLT(혈소판; platelet)를 측정하였다.

(바) 혈장 내 사이토카인

Cytokine production의 농도 분석은 시험 종료일(30일)에 각 그룹으로부터 채혈한 혈액 내 혈장을 이용하였다. 혈장 내 TNF- α 와 IFN- γ 의 cytokine production 농도는 sandwich ELISA kits(Abcam plc., Cambridge, MA, USA)내 Instruction's guide에 따라 측정 후, 혼합제제에 급여에 따른 면역세포의 반응을 평가하였다.

(사) 통계 분석은 시험 및 분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 SPSS 14.0K를 사용하여 ANOVA procedure을 통해 분산분석을 실시하였다. 그리고 여러 처리구간의 유의성 검정은 Duncan's의 New multiple range test를 이용하였으며, 처리구간의 비교는 Student t -test를 이용하였다. 이 때 유의수준은 $p < 0.05$ 일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

(3) 산란계 큰 병아리에 대한 급여 실험

(가) 공시 동물 및 시험장소

14주령의 Hyline brown종 큰 병아리를 처리당 5반복, 반복당 20수 및 케이지당 2수씩 수용하여 완전 임의 배치를 하였으며 부산대학교 부속 농장(Miryang, South Korea)에서 실험을 진행하였다.

공시 동물은 1주일의 순치기간을 거쳐 securitor와 복합생균제의 혼합제제의 급여에 따른 생산성 및 면역증강 평가 실험을 진행하였다.

(나) 기초 사료 및 혼합제제 준비

큰 병아리의 실험사료는 NRC의 요구수준과 같거나 높게 배합되어 급여되었으며, 복합 제조 공정은 배양 및 준비과정을 거쳐 푸른들EM사료 회사에 전달하여 H₂O+균 주 및 시료를 1:1 비율로 혼합하여 분사, 교반, 숙성 및 건조하여 포장하였다. 항생제 처리구에 있어서 큰 병아리는Ampicillin trihydrate(1 kg/t feed; Ampigold, Sung-Won Co. Ltd., Kimpo, South Korea)를 첨가하여 제조 사용하였다.

(다) 시험 설계 및 기간

실험설계는 무항생제 사료 처리구, 항생제 처리구 및 무항생제 사료 내 0.5% securitor + 복합생균제로 설계하여 5주 동안 실험사료 및 물을 자유급여 하였다.

(라) 성장성적도

체중은 시험개시(0일)로부터 1주일 단위로 총 21일 동안 조사를 하였으며, 일 당 증체량(weight gain)은 7일간의 증체량을 1일로 나누어 그룹 내 반복 수 당 1일 증체량(Daily weight gain)로 표시하였다. 일 당 사료섭취량(Feed intake)은 사료 총 급여량에서 잔량을 제하여 총 섭취량을 구하고 사육 두수로 나누어 1두 당 섭취량으로 표시하였으며, 21일을 나누어 1두 당 1일 사료섭취량(Daily feed intake)로 표시하였다. 사료 요구율(Feed/Gain)은 일 당 사료섭취량을 일 당 증체량으로 나누어 계산하였다.

(마) 도체 측정

시험 종료일에 각 그룹에서 10두를 임의적으로 선택 후 도체중 및 각 조직들의 무게를 측정하였다. 1두의 큰 병아리의 목을 잘라 피를 충분히 제거 후, 온수에 침전 후 털을 제거하였다. 머리와 다리가 제거 된 큰 병아리로부터 비장, 간 및 소장을 적출한 후, 도체중의 무게를 잰 후, 목, 날개, 가슴, 흉부, 요부 및 대퇴로 부위를 나누어 각각의 무게 측정을 하였다. 또한 각 처리군에서 적출 된 비장과 간의 무게 측정 및 소장의 길이를 측정하였다.

(바) LPS 챌린지에 따른 혈장 내 사이토카인 변화

시험 종료일(21일)의 도축 4시간전에 각 처리군 당 5마리씩 익하정맥(wing vein)을 통해 LPS(1 mg/kg body weight)를 투여하였다. 익하정맥으로부터 채혈 된 혈액을EDTA 튜브 (BD Vacutainer, BD Franklin, USA)에 넣고 4°C에 보관하였다. 이 들 보관 된 혈액 샘플들을 원심분리(1,800 x g, 30 min, 4°C)를 후, 혈장을 새 1.5 mL tube에 옮겨 담았다. 혈장 내 TNF α 및 IFN γ 의 농도는anti-chicken sandwich ELISA kits(Abcam plc., Cambridge, MA, USA)내 Instruction's guide에 따라 흡광도(O.D. 450 nm)를 측정하였다.

(사) 산란초기 산란수 측정

시험 종료일(21일)로부터 7일간의 2차 순치 기간을 두고 산란초기의 큰 병아리의 산란 수를 하루씩 총 14일 동안 측정하였다. 산란수를 통해 혼합제제의 급여에 따른 큰 병아리의 생산성을 평가하고자 하였다.

(아) 통계분석은 분석 등을 통해서 얻어진 성적들은 mean \pm SEs으로 표현 하였다. JMP 5.0 software package(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 통해, 두 그룹간 및 다중그룹간의 통계적 비교는 Student's *t*-test와 Turkey HSD Kramer test를 이용하여 5% 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

나. 연구결과

(1) 복합생균제/securator 혼합제제에 대한 *in vitro* 실험

(가) 장관 유래 면역세포 분리 검증

anti-rat CD8과 CD161 surface markers를 이용하여 흰쥐의 소장 및 대장 LP층에서 분리 한 용액 내 면역세포들의 분리 여부를 검증하였다(그림 3-11). 그림 3-11 에서 보는 바와 같이

소장 점막에서 분리된 면역세포(S-LPLs) 용액 내에는 CD8+ cytotoxic T 세포와 CD161+ natural killer 세포를 비롯하여 CD8+CD161+ natural killer T 세포군이 flow cytometry를 통해 검출되었다. 아울러 대장 유래 세포용액에서도 소장의 그 세포군들이 검출되었다. 이는 흰쥐의 각 소장과 대장 점막으로부터 선천적/후천적으로 관련된 면역세포군들이 성공적으로 분리가 되었다는 것을 보여주는 증거이다.

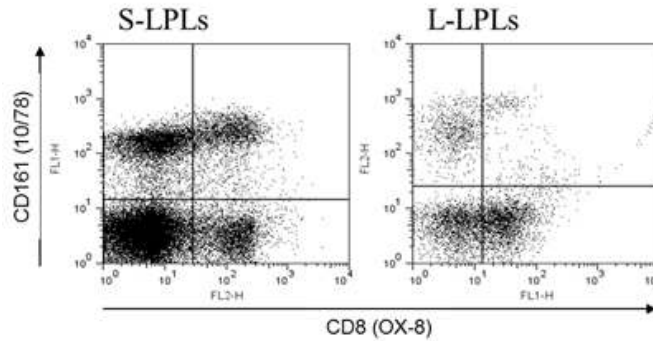


그림 3-11. Flow cytometry를 통한 쥐 장관 내 면역세포의 분리 검증

(나) 장관 유래 면역세포의 생존력

Securitor, 복합생균제(SNU2) 및 혼합제제의 자극에 의한 면역세포의 증식 능력을 평가하였다. 그 결과, 대조군(Control; 점선)과 비교하여 5%의 securitor는 소장 점막에서 분리된 면역세포의 증식을 증진하는 것으로 보였다. 더불어, 1%와 5%의 securitor와 혼합제제는 대장 유래 면역세포의 생존을 증진시키는 결과를 보였다(그림 3-12). 따라서 securitor(1%와 5%)는 소장 점막 내 존재하는 면역세포보다는 대장 내 면역세포의 증식에 효과적일 것이라 사료된다.

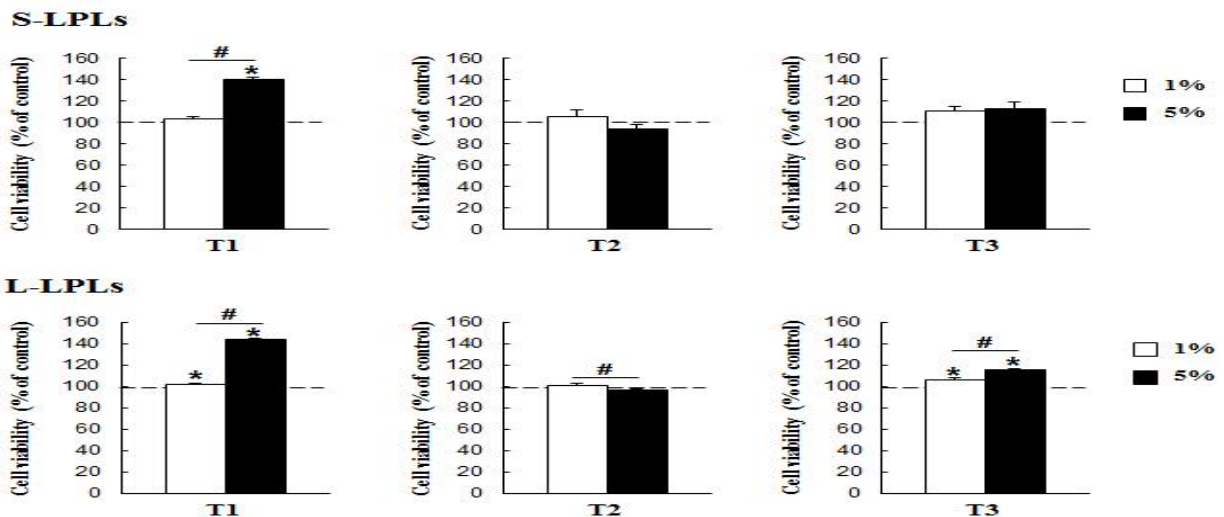


그림 3-12. Securitor, 복합생균제 및 이들 혼합제제에 따른 장관 유래 면역세포의 생존력
 Values are expressed as the mean±SEs (n=4). *vs. untreated cells (P < 0.05 by student's t-test). #1% vs. 5%-treatment in an each group(P<0.05 by student's t-test). T1, securitor; T2, probiotic; T3, securitor and probiotic mixture.

(다) 장관 유래 면역세포의 사이토카인

Securitor, 복합생균제(SNU2) 및 혼합제제에 의해 장에서 분리된 면역세포로부터 생산되는 TNF α 의 농도를 측정하였다(그림 3-13). 소장 점막에 존재하는 면역세포는 5%(v/v)의 복합생균제의 그룹에서만 TNF α (주로 Macrophage에서 생성되는 cytokine)의 농도가 증가를 보였다. 대장 점막 유래 면역세포에 대한 반응에 있어서 1%와 5%의 Securitor, 복합생균제(SNU2) 및 혼합제제는 대조군(Vehicle)과 비교하여 높은 농도의 TNF α 가 검출되었다.

위 실험과 동일한 조건으로 교배양된 상층액 내 IFN γ 의 농도를 ELISA kit을 이용하여 측정하였다(그림 3-14). 측정 결과, 소장 및 대장 점막 유래의 면역세포는 모든 농도의 Securitor, 복합생균제 및 혼합제제에 무반응을 보였음을 관찰하였다.

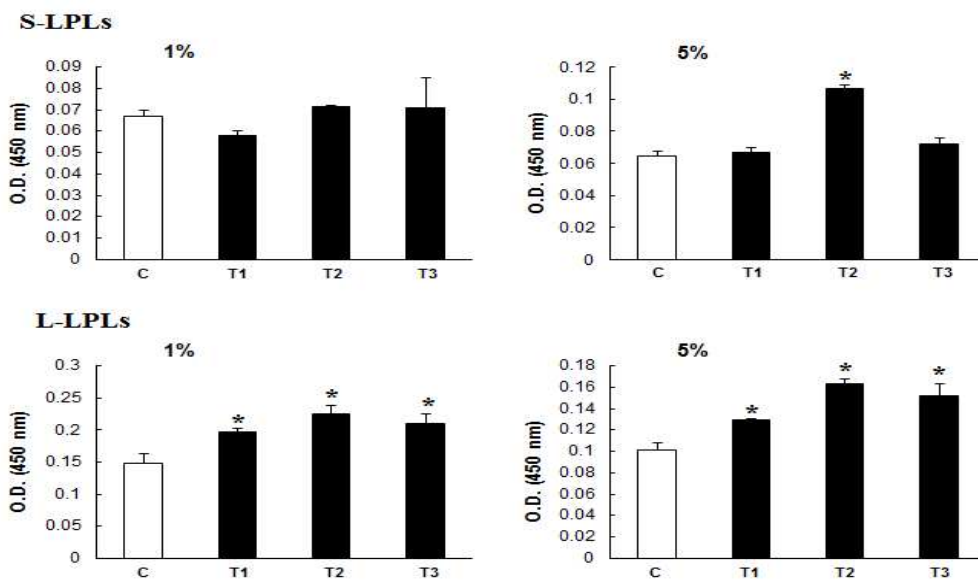


그림 3-13. Securitor, 복합생균제 및 이들 혼합제제에 따른 장관 유래 면역세포의 TNF α 변화
Values are expressed as the mean \pm SEMs (n=4). *vs. vehicle (P < 0.05 by Dunnett's test). C(control), vehicle; T1, securitor; T2, probiotic; T3, securitor and probiotic mixture.

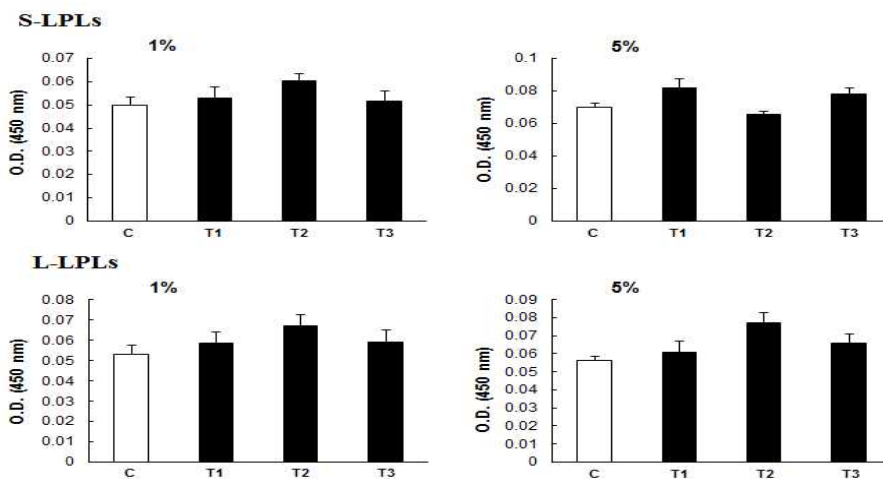


그림 3-14. Securitor, 복합생균제 및 이들 혼합제제에 따른 장관 유래 면역세포의 IFN γ 변화
Values are expressed as the mean \pm SEMs (n=4). *vs. vehicle (P < 0.05 by Dunnett's test). C(control), vehicle; T1, securitor; T2, probiotic; T3, securitor and probiotic mixture.

T2, probiotic; T3, securitor and probiotic mixture.

(라) LPS 챌린지에 따른 면역세포의 사이토카인 변화

Lipopolysaccharide (LPS; 100 mg/mL)으로 자극 또는 비(非)자극한 소장 및 대장 점막에서 분리된 면역세포를 각각 두 그룹으로 나누어 천연물(Securitor), 복합생균제 및 혼합제제의 항염증(抗炎症)효과를 평가하였다(그림 3-15). 1%의 Securitor, 복합생균제 및 혼합제제는 대조군(vehicle)과 비교하여 유의적으로 낮은 수치를 보였다. 또한 5%의 Securitor는 소장 점막 유래 면역세포의 TNF α 의 농도를 억제하는 것으로 나타났다. 따라서, 대장 점막 유래 면역세포의 항염증 효과에 있어 1%의 농도의 시료에서는 아무런 효과가 보이지 않았으나 5%의 Securitor 및 혼합제제에서는 TNF α 농도의 억제효과가 관찰되었다.

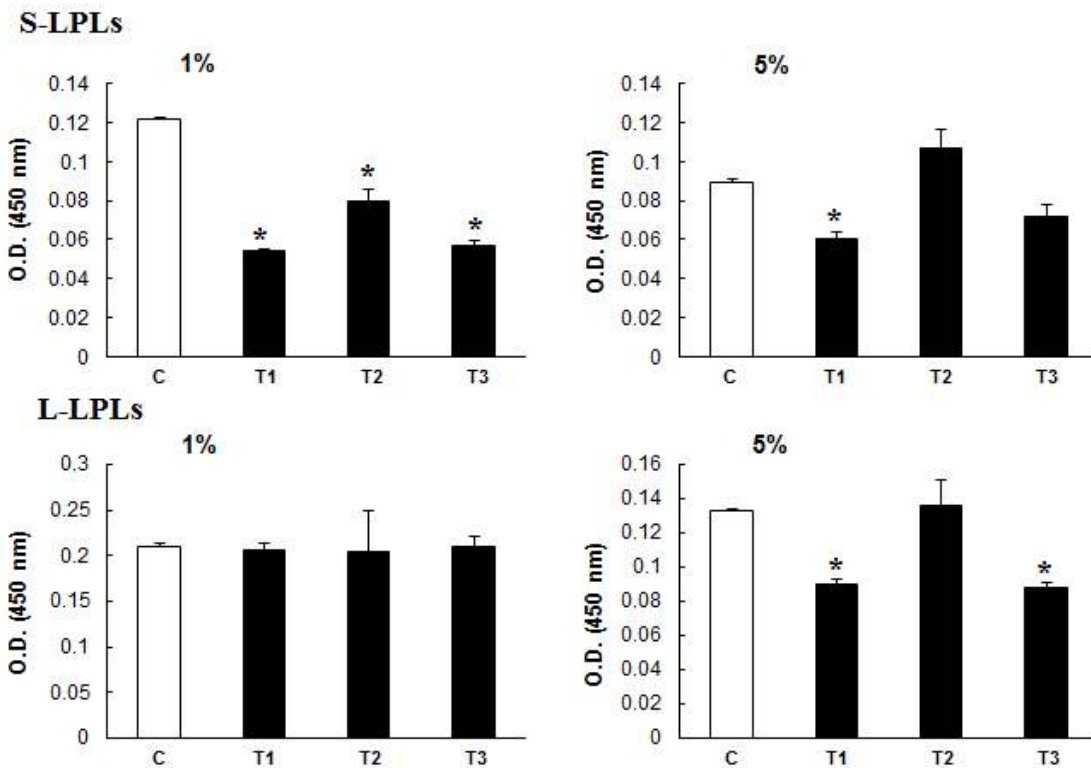


그림 3-15. LPS 챌린지에 따른 장관 유래 면역세포의 TNF α 분비에 대한 천연물(Securitor), 복합생균제 및 이들 혼합제제의 영향.

Values are expressed as the mean \pm SEMs (n=4). *vs. vehicle (P < 0.05 by Dunnett's test). C(control), vehicle; T1, securitor; T2, probiotic; T3, securitor and probiotic mixture.

(마) 직/간접적 종양세포의 사멸 능력

YAC-1 종양세포를 이용하여 천연물, 복합생균제 및 혼합제제에 대한 면역세포의 세포사 증진 능력을 평가하였다. 복합생균제의 경우, 5%의 그룹에서 소장 및 대장 점막 유래의 면역 세포가 YAC-1 종양세포 사멸을 유도하는 반면, Securitor는 모든 농도에서 소장 및 대장 점막 유래 면역세포의 종양세포 사멸 능력을 증진시키는 효과를 보였다. 아울러, Securitor와 복합생균제의 혼합제제도 모든 농도에서 높은 YAC-1 종양세포 사멸 능력을 보였다. 따라서, YAC-1 종양세포에 대한 소장과 대장 점막 유래 면역세포의 사멸 능력을 비교 한 결과, 대장 점막 유래 면역세포의 면역반응은 소장 점막 유래의 그것들보다 비교적 자극 물질에 더 민감한 반응

을 보여짐이 추론되었다.

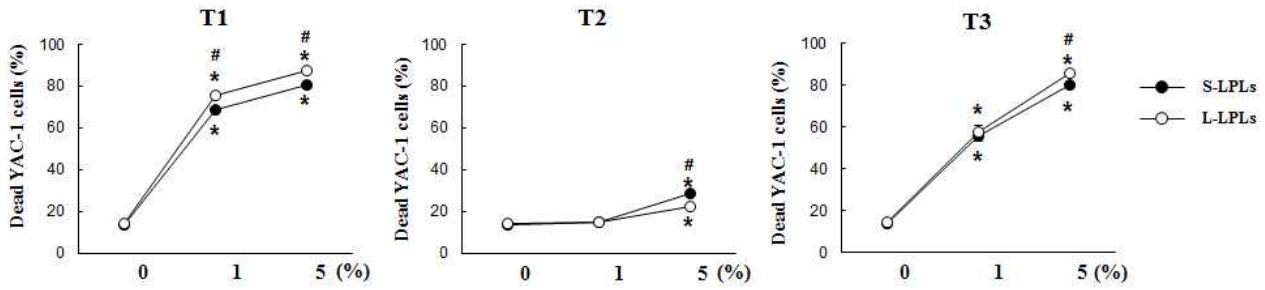


그림 3-16. Securitor, 복합생균제 및 혼합제제에 따른 면역세포의 세포사멸 능력 변화.

Values are expressed as the mean \pm SEs (n = 4). *vs. vehicle ($P < 0.05$ by Dunnett's test). #S-vs.L-LPLs in an each group ($P < 0.05$ by Student's t-test). T1, securitor; T2, probiotic; T3, securitor and probiotic mixture.

(2) 이유 자돈에 대한 급여 실험

(가) 성장성적도

개시체중에 대한 평균 몸무게를 비교한 결과, 항생제 처리구 10.22 kg, 무항생제 처리구 9.65 kg 및 0.2% 혼합제제 처리구 9.99 kg으로 모든 처리구 간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 아울러 시험 종료일(45일)의 증체량을 포함하여 일일 증체량의 결과 평가에 있어서도 처리구간에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 한편 0.2%의 혼합제제 사료 급여에 따른 이유 자돈의 사료 섭취량 및 일일 사료 섭취량은 대조군(control)과 비교하여 유의적으로 낮은 수치를 보였다 ($p < 0.05$). 이를 다시 항생제 처리구와 비교해 볼 때, 0.2% 혼합제제의 45일 기간 동안의 사료 급여는 항생제 처리구의 사료 섭취량 결과와 동등한 경향을 보였으며 무항생제 처리구의 일일 사료 섭취량보다는 낮은 수치의 경향을 보였다($p < 0.05$). 따라서, 0.2% 혼합제제는 무항생제 처리구에 비해 높은 사료 효율성을 보였으며, 항생제 처리구와 동등한 효율성을 보인다고 사료된다.

표 3-34. 일당 증체량, 일당 사료섭취량 및 사료요구율

	Days	Treatment ¹⁾		
		C	T1	T2
Body Weight (kg)	0	9.65 \pm 0.272	10.22 \pm 0.215	9.99 \pm 0.287
	45	36.80 \pm 0.695	37.60 \pm 0.500	37.57 \pm 0.929
Weight Gain (kg/head)	1-45	27.16 \pm 0.795	27.38 \pm 0.584	27.58 \pm 0.851
Daily Weight Gain	1-45	0.60 \pm 0.017	0.60 \pm 0.013	0.61 \pm 0.019
Feed Intake (kg/head)	1-45	42.25 \pm 0.164 ^a	40.99 \pm 0.174 ^b	41.37 \pm 0.170 ^b
Daily Feed Intake	1-45	0.93 ^a	0.90 ^c	0.91 ^b
Gain/Feed (Feed Efficiency)	1-45	0.64 \pm 0.019	0.67 \pm 0.014	0.67 \pm 0.022
Feed/Gain (Feed Conversion Ratio)	1-45	1.59 \pm 0.057 ^a	0.151 \pm 0.031 ^{ab}	1.53 \pm 0.052 ^{ab}

^{a,b,c}Values (Mean \pm SEs) within columns with no common superscript differ significantly (n=23, $P < 0.05$ by Turkey HSD Kramer test).

¹⁾C: non-antibiotic(control), T1: 0.1% antibiotic, T2: 0.2% mixture of securitor and probiotic

(나) 혈액 생화학적 분석

결과를 살펴보면 0.2% 혼합제제 사료의 급여는 다른 두 처리구와 비교 해 볼 때, WBC(백혈구)의 수치가 높은 경향을 보였으며($p < 0.05$), MCV(평균 적혈구 용적)와 MCH(평균 혈구 혈액소) 및 PLT(혈소판)는 다른 두 처리구에 비해 상대적으로 낮은 수치 결과를 보였다($p < 0.05$). 그러나 이 유의성은 개시일인 0일부터 나타난 결과로 시험 종료일(45일)에 채혈된 혈액에서는 유의성을 보이지 않거나 그 경향이 감소되었으므로 0.2% 혼합제제 급여군의 실험동물 개체 자체가 외부 환경 물질에 대해 약한 개체일 가능성이 사료된다. 오히려 45일 동안 0.2% 혼합제제 사료를 급여함으로써 면역학적으로 WBC(백혈구)와 PLT(혈소판)이 다른 두 처리구의 결과와 유사한 형태를 보이는 점은 0.2% 혼합제제 사료의 급여가 면역력의 개선을 이끌 수 있다고 사료됨.

표 3-35. Securitor와 복합생균제인 혼합제제의 급여에 따른 이유자돈의 혈액 생화학적 변화

	Treatment			
	Days	C	T1	T2
WBC ($10^3/\text{mL}$)	0	20.62±2.456 ^{abc}	16.41±2.663 ^b	26.20±2.871 ^a
	45	22.90±2.843	27.70±1.941	27.18±2.364
	AVG	21.38±1.854 ^{ab}	19.73±2.318 ^b	26.48±2.112 ^a
RBC ($10^6/\text{mL}$)	0	6.75±0.087	6.31±0.223	6.80±0.250
	45	6.52±0.648	7.57±0.216	7.60±0.148
	AVG	6.68±0.210	6.68±0.220	7.03±0.206
HGB (g/dL)	0	9.55±0.166	9.01±0.413	8.96±0.424
	45	10.26±0.871	11.28±0.231	10.83±0.246
	AVG	9.79±0.304	9.68±0.392	9.49±0.384
HCT (%)	0	30.54±0.485	28.09±1.347	28.33±1.450
	45	31.78±2.643	35.38±0.721	33.78±0.894
	AVG	30.95±0.889	30.24±1.268	29.89±1.248
MCV (fL)	0	45.24±0.341 ^a	44.39±0.705 ^a	41.56±1.101 ^b
	45	49.121.238 ^a	46.84±1.112 ^{ab}	44.48±1.242 ^b
	AVG	46.53±0.659 ^a	45.11±0.640 ^a	42.39±0.913 ^b
MCH (pg)	0	14.15±0.119 ^a	14.23±0.205 ^a	13.19±0.403 ^b
	45	15.84±0.397 ^a	14.96±0.409 ^{ab}	14.30±0.381 ^b
	AVG	14.71±0.258 ^a	14.44±0.199 ^a	13.51±0.330 ^b
MCHC (g/dL)	0	31.24±0.143 ^b	32.09±0.099 ^a	31.69±0.452 ^{ab}
	45	32.26±0.147	31.94±0.108	32.13±0.202
	AVG	31.58±0.165	32.05±0.077	31.18±0.327
PLT ($10^3/\text{mL}$)	0	431.80±40.486 ^a	532.60±68.119 ^a	266.50±47.217 ^b
	45	64.75±39.552	219.60±43.335	182.33±65.953
	AVG	319.20±51.813 ^{ab}	428.27±61.013 ^a	247.08±39.475 ^b

Values are expressed as mean±SEs(n=20). ^{a,b,c} values sharing no common superscripts were differ significantly($P < 0.05$ by Tukey HSD Kramer test).

¹C: non-antibiotic(control), T1: 0.1% antibiotic, T2: 0.2% mixture of securitor and probiotic

²Abbreviations: WBC, White blood cell; RBC, Red blood cell; HGB, Hemoglobin concentration; HCT, Hematocrit; MCV, Mean corpuscular volume; MCH, Mean corpuscular hemoglobin; MCHC, Mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT, Platelet.

(다) 혈장 내 사이토카인 변화

시험 종료일(45일)의 무항생제 처리구의 혈장 내 TNF α 생산 수치와 비교하여 항생제 처리구의 사료 급여는 이유 자돈 면역체계 내 TNF α 분비 유도에 아무런 영향을 주지 않으나 0.2% 혼합제제 처리구에서는 개체의 혈장 내 TNF α 생산 수치가 유의적으로 증가됨이 관찰되었다($p < 0.05$). 아울러, 무항생제 처리구의 이유 자돈의 혈장 내 IFN γ 산물 수치와 비교 해 볼 때, 45일 기간 동안의 0.2% 혼합제제의 사료급여는 양돈 혈장 내 IFN γ 유도에 아무런 영향을 주지 않았다. 반면, 흥미롭게도 항생제 처리구의 혈장 내 IFN γ 생산 수치가 무항생제 처리구과 비교하여 유의적으로 감소됨을 보였다($p < 0.05$). 이런 항생제 처리구의 IFN γ 생산 수치의 감소 경향은 항생제에 따른 장관 환경 내 내재성 박테리아들의 변화에 대응한 항바이러스 인자(IFN γ)의 역할 감소로 사료된다.

결과적으로 0.2% 혼합제제의 사료는 이유 자돈 내 면역반응에 있어 기능적으로 TNF α 분비를 유도 및 조절 할 수 있는 물질로 평가된다. 이는 다른 면역세포의 증식 또는 분화를 자극 및 유도하여 숙주 내 면역 항상성(homeostasis)에 기여할 것으로 사료된다.

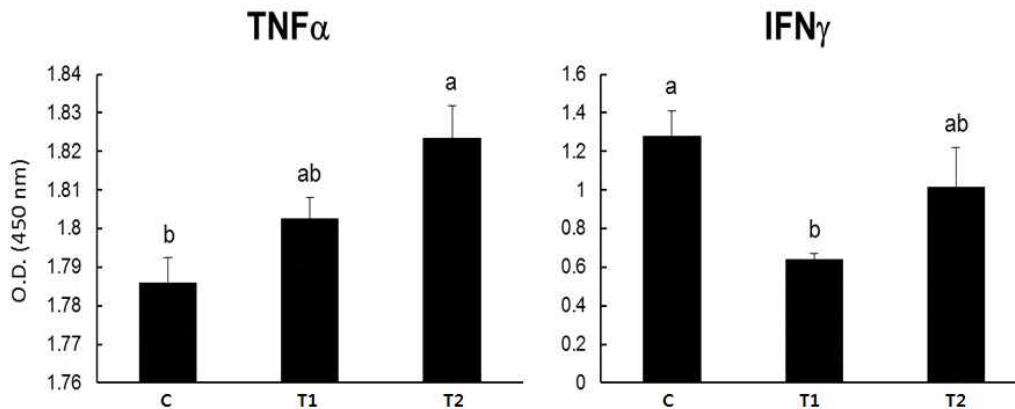


그림 3-17. 복합생균제/securator 혼합제제의 급여에 따른 혈장 내 사이토카인 변화.

Values are expressed as the mean \pm SEs ($n = 5-6$). ^{a,b}vs.control($P < 0.05$ by Tukey Kramer HSD test). C: non-antibiotic(control), T1: 0.1% antibiotic, T2: 0.2% mixture of securitor and probiotic.

(3) 산란계 큰 병아리에 대한 급여 실험

(가) 성장성적도

개시체중에 대한 7일까지 증체량은 무항생제구는 41.60 g, 항생제구는 61.00 g, 0.2% 혼합제제구는 41.50 g으로 대조구(무항생제)와 비교하여 유의적 차이는 보이지 않았으나 항생제구와 비교하여 유의적으로 낮은 수치를 보였다($P < 0.05$). 하지만 8-14일까지의 0.2% 혼합제제 급여군 내 증체량을 다른 두 사료 급여군과 비교 한 결과 흥미롭게도 유의적으로 증가한 결과를 나타내었다($P < 0.05$). 이러한 증가 경향은 시험종료일(21일)의 무항생제구 및 항생제구의 증체량과 비교해 급격히 감소하는 결과를 보였다($P < 0.05$). 시험 개시일로부터 종료일까지의 일일 증체량을 비교한 결과 세 처리구에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 섭취량의 결과에 있어서 시험 개시일(1일)로부터 14일까지는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 하지만 15-21일 기간 동안의 0.2% 혼합제제 급여군 내 사료 섭취량은 무항생제의 그것과 동일한 경향을 보였으며, 항생

제 급여군의 사료 섭취량과 비교 했을 때 유의적으로 높은 수치의 결과를 가져왔다. 일일 섭취량의 결과를 볼 때, 무항생제구, 0.2% 혼합제제구 및 항생제구의 순서로 감소하는 패턴을 보였으며, 항생제구는 무항생제구의 사료 섭취량을 비교하였을때 낮은 수치를 보였다. 사료 효율의 결과를 볼 때, 8-14일 기간 동안 0.2%의 혼합제제의 급여는 큰 병아리의 모델에 있어 높은 사료효율을 보이거나, 일일 사료 효율에 있어서는 무항생제 급여군과 비교 할 때 높은 효율 형태를 보이며 항생제 급여군의 그것과 비교하여 유의적으로 낮은 수치를 보이는 것으로 나타났다.

표 3-36. 일당 증체량, 일당 사료섭취량 및 사료요구율

	Days	Treatment ¹⁾		
		C	T1	T2
Body Weight (kg)	0	1355.50±4.835 ^a	1323.50±9.172 ^b	1324.50±9.434 ^b
	7	1397.10±7.683	1384.50±7.558	1366.00±10.204
	14	1524.50±3.657	1510.50±8.566	1528.50±11.953
	21	1588.50±3.588	1579.50±9.334	1562.00±13.657
Weight Gain (kg/head)	1-7	41.60±5.562 ^b	61.00±3.588 ^a	41.50±1.275 ^b
	8-14	127.40±4.797 ^b	126.00±3.921 ^b	162.50±3.062 ^a
	15-21	64.00±2.318 ^a	69.00±4.077 ^a	33.50±5.624 ^b
	1-21	233.00±3.742	256.00±7.483	237.50±7.665
Daily Weight Gain	1-21	11.10±0.178	12.19±0.356	11.31±0.365
Feed Intake (kg/head)	1-7	614.00±8.239	605.50±7.391	601.50±7.272
	8-14	668.00±3.571	639.50±13.449	655.00±8.478
	15-21	696.00±7.689 ^a	656.50±5.099 ^b	687.50±6.801 ^a
	1-21	1978.00±11.869 ^a	1901.50±23.380 ^b	1944.00±14.440 ^{ab}
Daily Feed Intake	1-21	94.19±0.565 ^a	90.55±1.113 ^b	92.57±0.688 ^{ab}
Gain/Feed (Feed Efficiency)	1-7	0.067±0.0082 ^b	0.101±0.0060 ^a	0.069±0.0018 ^b
	8-14	0.191±0.0064 ^b	0.197±0.0029 ^b	0.248±0.0058 ^a
	15-21	0.092±0.0033 ^a	0.105±0.0059 ^a	0.049±0.0079 ^b
Daily Gain/Feed	1-21	0.118±0.0020 ^b	0.135±0.0031 ^a	0.122±0.0031 ^b

Values are expressed as the mean±SEs (n=5). ^{a,b}vs .Control(P<0.05 by Turkey HSD Kramer test).

¹⁾C: non-antibiotic(control), T1: 0.1% antibiotic, T2: 0.2% mixture of securitor and probiotic.

(나) 도체 측정

시험 종료일(21일)의 각 처리군에서 도축 후 도체중을 비롯하여 비장, 간의 무게 및 소장 길이를 측정하였다. 각 처리군 내 시험 종료일(21일)의 무게 결과에 있어 도체중을 비롯하여 목, 날개, 가슴, 흉부, 요부 및 대퇴의 무게는 세 그룹간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 아울러 비장과 간의 무게 결과에 있어서도 차이를 보이지 않았으며, 소장의 길이에 있어서도 사료 급여에 따른 차이를 보이지 않는 것으로 관찰되었다.

표 3-37. 산란계 큰 병아리의 각 부위별 도체 측정

Items	Treatment ¹⁾		
	C	T1	T2
도체중((g)	993.25±20.186	1008.95±17.894	942.20±21.699
목(g)	100.70±2.978	103.10±1.770	89.50±9.635
날개(g)	130.45 ±3.611	133.15±2.952	122.70±2.978
가슴(g)	241.65±6.266	246.80±6.565	235.10±4.736
흉부(g)	87.80±2.993	91.55±4.879	83.80±2.757
요부(g)	114.75±3.774	112.30±3.871	108.95±3.643
대퇴(g)	317.90±7.249	322.05±6.445	302.15±6.780
비장(g)	3.98±0.255	4.61±0.275	4.31±0.232
간(g)	42.38±1.485	42.09±1.444	42.28±2.060
소장(cm)	120.05±2.592	117.82±4.531	113.03±2.355

Values are expressed as the mean±SEs (n=5).

¹⁾C: non-antibiotic(control), T1: 0.1% antibiotic, T2: 0.2% mixture of securitor and probiotic

(다) LPS 챌린지에 따른 securitor와 복합생균제인 혼합제제의 영향

시험 종료일(21일), LPS 투여에 따른 각 시료의 면역학적 효과를 큰 병아리의 익하정맥(wing vein)을 통해 채혈 된 혈장 내 TNFα와 IFNγ의 농도를 측정하여 평가하였다. 무항생제구 내 TNFα 농도 결과에 있어서 LPS 투여구의 수치는 비LPS 처리군 내 수치와 비교하여 유의적으로 높은 수치를 보였다. 이는 LPS 투여로 염증모델을 유도했다는 것을 시사한다. 아울러, 항생제구 내 TNFα의 증감 형태도 무항생제구의 그것과 동일한 결과를 보이는 것으로 나타났다. 흥미롭게도 0.2%의 혼합제제를 급여한 그룹의 혈장 내 TNFα의 농도는 LPS의 투여에도 불구하고 비LPS 투여군과 비교하였을 때 유의적 차이를 보이지 않았다. 또한 항바이러스 면역매개물질인 IFNγ의 수치 변화 추세를 관찰한 결과 무항생제구의 IFNγ는 LPS에 대하여 무자극을 보인 반면, 0.2% 혼합제제의 사료 급여는 LPS의 유도에도 불구하고 무항생제구, 즉, 생리적 조건의 IFNγ의 수치와 동일한 억제 효과를 보였다. 이는 항생제와 동일한 효과를 보인다는 것을 시사한다.

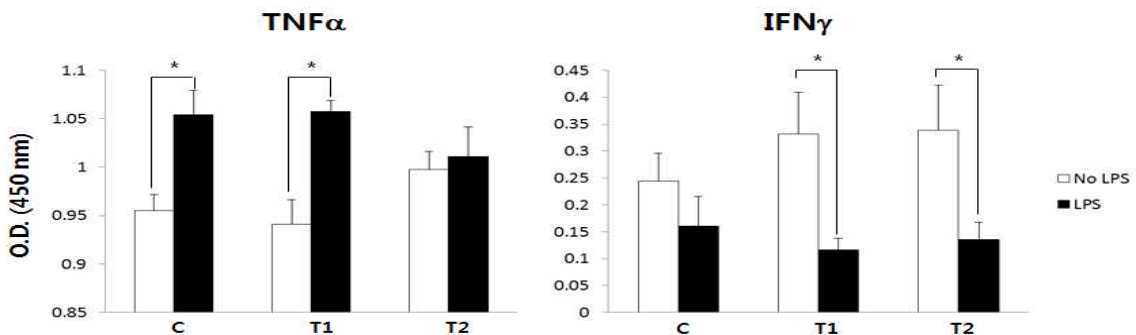


그림 3-18. LPS 챌린지에 따른 혈장 내 사이토카인 변화.

Values are expressed as the mean±SEs (n=5). *indicated comparison between LPS injection in an each group (P < 0.05, by student's *t*-test). ¹⁾C: non-antibiotic(control), T1: 0.1% antibiotic, T2: 0.2% mixture of securitor and probiotic.

(라) 장내 환경 개선 효과

시험 종료일(21일) 각 처리구의 맹장 내용물 내 *E. coli*의 균수를 측정하였다. 비록 세 처리구간에 유의적 차이를 보이지 않는 것으로 나타났으나 0.2% 혼합제제 급여는 무항생제구와 비교하여 낮은 수치를 보였으며, 항생제구의 균주와 동일한 형태의 결과를 보이는 것으로 관찰되었으므로 항생제의 기능과 동일한 역할을 가지는 것으로 사료된다.

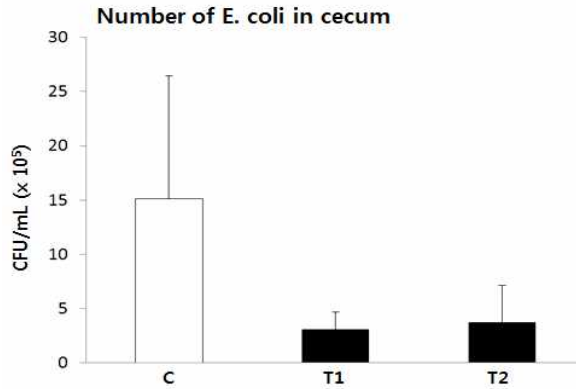


그림 3-19. 맹장 내 *E. coli*의 집락수.

Values are expressed as the mean±SEs (n=5).¹C: non-antibiotic(control), T1: 0.1% antibiotic, T2: 0.2% mixture of securitor and probiotic.

(마) 산란초기 산란수

1차 시험 종료일(21일) 및 순치기간을 거쳐 14일 동안 산란 초기의 큰 병아리의 달걀 생산지수를 측정하였다. 일일 생산지수의 결과를 볼 때, 0.2% 혼합제제를 급여한 그룹 내 큰 병아리는 다른 두 사료 급여군과 비교하여 산란 능력이 빠른 형태를 보이고 있다(0~2일). 한편, 0.2% 혼합제제구 내 14일 동안의 총 달걀 생산량에 있어서 그 생산 수치는 항생제구에 비해 낮은 수치를 보이나 무항생제구의 그것과 비교하여 비교적 높은 달걀 생산성을 보이는 것으로 나타났다.

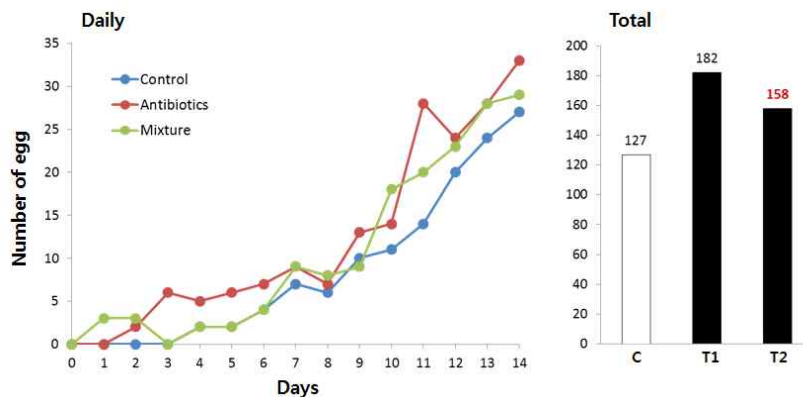


그림 3-20. 일일 달걀 생산수 및 총 달걀 생산수

C: non-antibiotic(control), T1: 0.1% antibiotic, T2: 0.2% mixture of securitor and probiotic.

5. 복합생균제/마늘추출물 혼합제제의 항생제 대체효과 조사

본 연구는 천연물(마늘 알갱이 추출물)과 복합 미생물(SNU2)의 면역증강 효과를 검증 및 가축에 미치는 영향을 조사함으로써 항생제 대체 물질 이용 가능성을 확인하고자 하였다.

가. 연구방법

(1) *In vitro* 면역력 평가

(가) 시료 준비

마늘 줄기와 알갱이(Miryang, South Korea)는 신선한 재료를 이용하였으며, 마늘알갱이는 시료를 박피하고 부분별로 분리시킨 뒤 수돗물로 수세한 다음 3회, 3차 증류수로 세척하였다. 세척한 내용물은 멸균된 거즈를 이용하여 물기를 제거한 후 적당한 크기로 세절한 후 각각 멸균된 믹서기로 분쇄하였다. 분쇄된 내용물은 거즈 4겹을 이용하여 착즙하였다. 마늘 알갱이 착즙액은 멸균된 0.45 mm bottle top filter(Corning Inc. NY, USA)로 여과한 후, 여과액을 1% penicillin-streptomycin(Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)이 포함된 RPMI1640(Thermo Fisher Scientific Inc.) 배지와 순차적으로 희석하여 1%와 5%(v/v) 농도의 마늘알갱이 추출물 샘플(T1)을 본 실험에 사용하였다.

복합생균제는 목장토양과 돼지 분변에서 자체 분리 동정한 유산균(CAM1, 175: *Pediococcus acidilactici*, 1.9×10^9 /mL; LP177: *Lactobacillus plantarum*, 1.9×10^9 /mL), 효모균(Sb796: *Saccharomyces boulardii*, 3.4×10^8 /mL), 고초균(T-1: *Bacillus polymyxa*, 4.7×10^9 /mL; T-4: *Bacillus subtilis*, 4.7×10^9 /mL)을 각 균 주마다 명시된 균 수까지 증식되는 배양시간에 맞춰 배양 했다. 먼저 배양이 끝난 균주는 4°C 냉장고에 보관하고 순차적으로 시간에 맞춰 4°C에 보관하였다. 모든 균주의 배양이 종료 되었을 때, 복합생균제의 설계에 따라 각 균주의 상층액을 1mL씩 10mL round tube에 혼합(T2)된 것을 본 실험에 사용하였다. 또한 이 복합생균제와 마늘 추출물을 1 : 1의 비율로 섞어 혼합제제(T3) 시료를 준비하였다.

시료 제조에 사용되는 모든 실험기구 및 용품은 미리 멸균한 뒤 사용하였다. 또한 실험 재료는 즉시 실험에 사용하였으며, 가급적 무균 상태의 조건에서 신속하게 실험을 진행하였다.

(나) 공시동물 및 장관 내 면역세포의 분리

본 실험의 공시동물은 부산대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 실험을 진행하였다(PNU-2012-0047). 6주령의 수컷 Sparague Dawley 흰쥐는 (주)샘타코(Kyeonggi, South Korea)에서 구입 후, 부산대학교 동물청정센터(Miryang, South Korea)에서 사육하였다. 실험 기간 동안 흰쥐는 물과 사료를 자유섭식시켰으며, 온도($23 \pm 1^\circ\text{C}$), 습도($55 \pm 5\%$), 12-h photoperiod (light on, 08:00-20:00 h)로 컨트롤 된 사육환경에서 1주일간의 순치기간을 거친 뒤 본 실험에 사용하였다. 1주일 동안 순치시킨 SD흰쥐를 이산화탄소로 마취 한 후, 비장 및 소장과 대장(맹장 포함)을 적출하였다. 비장의 면역세포 (splenocyte) 및 소장과 대장 점막 내 lamina propria(LP)층에 산재하고 있는 면역세포(lamina propria leukocyte;LPL)는 선행 연구(Lee et al., 2009)를 토대로 분리 실험을 진행하였다.

분리 방법은 다음과 같다. 적출된 소장과 대장을 PBS로 내용물을 세정한 후, 소장 내 파이어반(peyer's patch) 및 복부지방 내 결합조직(connective tissue)을 제거하였다. 다음으로 절개 및 수술용 가위로 약 2 ~ 3 cm로 단편화시킨 조직 샘플을 실리콘으로 미리 코팅된 유리 플라스크에 옮겨 담은 후, 50 mL의 DTT-Hank's solution를 넣어 실온에서 30분간 교반 배양을 하여 뮤신(mucin)을 제거하였다. 순차적으로 EDTA-Hank's solution 및 collagenase를 녹인 RPMI1640 배지를 실온에서 각각 30분간 3반복의 교반과정으로 장 상피세포 및 LP층을 효율적으로 제거하였다. Collagenase 과정으로 얻어진 용액을 원심분리(400 x g, 10 min, R.T)한 후, 상층액이 제거된 pellet를 40%의 percoll gradient를 분주하여 새 15 mL tube에 pooling하였다. 2 mL의 75% percoll gradient를 다시 분주 한 후, 원심분리(400 x g, 15 min, R.T)를 거쳐 40%와 75% percoll gradients층 사이에 존재하는 세포용액을 새 15 mL tube에 취하였다. 다시 RPMI1640 배지로 린스와 원심분리(400 x g, 10 min, R.T)과정을 거친 소장과 대장 점막 유래 세포용액을 trypan blue로 염색하여 cell counting을 실시하였다. 또한, 분리된 세포용액에 FITC-anti-CD8 mAbs (clone OX-8; AbD Serotec, Morphosys UK Ltd., Oxford, UK)와 RPE-anti-CD161 mAbs(clone 10/78; AbD Serotec)를 각각 10 mL씩 첨가하여 30분간 염색시킨 후, flow cytometry를 통해 CD8⁺세포와 CD161⁺Natural Killer세포의 분포를 관찰하였다.

적출된 비장은 PBS로 내용물을 세정한 후 결합조직(connective tissue)을 제거한 다음, 수술용 가위로 약 1 ~ 2 cm로 단편화시켰다. 단편화 된 조직은 serum free-RPMI1640 배지가 포함된 tissue grinder에 투입 후 조직을 충분히 분쇄시켰다. 분쇄된 세포용액은 cell strainer (40mm pore Nylon; BD Falcon™, Franklin Lakes, NJ, USA)에 통과시켜 분쇄된 조직을 여과한 다음, 여과된 세포용액을 원심분리(400 x g, 10 min, R.T)하였다. 상층액을 제거한 후, hypotonic buffer (8.26 g/l of NH₄Cl, 1g/lofKHCO₃, and 0.037g/lofEDTA, at pH 7.4)를 3 mL 분주, 2분간 정치, PBS를 3 mL 분주 및 원심분리(400 x g, 10 min, R.T)의 반복과정을 통해 적혈구를 제거하였다. 적혈구가 충분히 제거된 상태의 pellet은 위에서 서술한 percoll centrifugation 과정을 통해 비장에서 분리된 세포용액을 trypan blue로 염색하여 cell counting을 실시하였다.

(다) 면역세포의 생존률

마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 혼합제제가 소장 및 대장 유래 면역세포의 생존에 미치는 실험은 다음과 같이 진행하였다.

흰쥐의 비장 및 장 조직에서 분리된 면역세포용액을 원심분리(400 x g, 10 min, R.T)하여 상층액이 제거된 pellet에 회석된 처리구 샘플을 분주하였다. 96-well culture plate를 이용하여 면역세포(비장, 1 x 10⁵ cells; 장관, 5 x 10⁴ cells)를 각 well에 100 μL씩 분주한 후, 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 12시간 배양했다. WST-8 용액(Cell counting kit-8; Dojindo Inc., Tokyo, Japan)을 각 well에 10 μL씩 첨가한 후 1시간 뒤 Multiskan EX Microplate Reader기(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 흡광도(OD 450 nm)를 측정하였다.

(라) 직/간접적 종양세포사멸 능력

YAC-1 cell line(NK sensitive YAC-1 virus-induced mouse T cell lymphoma cell)를 target 세포로 지정하여 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 혼합제제의 직접 또는 간접적인

세포사멸 능력을 평가하였다.

우선 YAC-1 target 세포에 대한 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 혼합제제의 직접적인 세포사멸 능력을 평가하였다. 그 평가는 96-well culture plate를 이용하여 1%와 5% 마늘 알갱이 추출물, 복합생균제 또는 혼합제제를 YAC-1 target 세포(5×10^4 cells)에 각각 첨가한 후, 각 well에 100 μ l 씩 분주하였다. 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 12시간 배양 후, WST-8 용액(Cell counting kit-8; Dojindo Inc., Tokyo, Japan)을 각 well에 10 μ l 씩 첨가한 후 1시간 뒤 Multiskan EX Microplate Reader기(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 흡광도(OD 450 nm)를 측정하였다. 간접적인 세포사멸 능력 조사 방법은 다음과 같이 수행하였다. 흰쥐의 소장 및 대장 점막에서 분리된 면역세포(Effector cell)와 3,3'-diocadecyloxycarbocyanine (DiOC₁₈(3))으로 염색된 YAC-1 target cell을 10:1의 비율로 분주한 후, 각 시료를 각각 200 mL 씩 첨가하였다. 혼합된 시료를 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 4시간 배양 후, Propidium iodide(PI)을 10 mL 씩 첨가하고, 30분 동안 다시 배양하였다. Flow cytometry를 이용하여 전체 DiOC₁₈(3)염색된 YAC-1 target 세포 대비 PI로 염색된 YAC-1 target 세포의 %를 계산하여 세포사멸 능력을 측정하였다.

(마) 사이토카인 조사

마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 혼합제제에 대한 장관 유래 면역세포의 면역매개물질의 분비능력을 anti-rat sandwich ELISA kits(Abcam plc., Cambridge, MA, USA) 내 Instruction's guide에 따라 측정하였다.

흰쥐의 비장 유래 면역세포(1×10^6 cells) 또는 장관 유래 면역세포(5×10^5 cells)를 마늘 알갱이 추출물, 복합생균제 또는 혼합제제가 포함된 배지와 혼합하였다. 또한 혼합 배지에 lipopolysaccharide(LPS; 100 mg/mL) 첨가군 및 비(非)첨가군으로 나누어 면역매개물질에 대한 각 시료의 면역 억제효과를 평가하였다. 위의 시료와 혼합된 세포용액을 96-well culture plate 내 각 well에 300 μ l 씩 분주하고, 배양기(5% CO₂, 37°C)에서 24시간 동안 배양시켰다. 배양된 시료 내 상층액의 Tumor necrosis factor- α (TNF α) 및 Interferon- γ (IFN γ)의 농도를 Multiskan EX Microplate Reader기(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 흡광도(OD 450 nm)를 통해 측정하였다.

(바) 통계분석은 분석 등을 통해서 얻어진 성적들을 mean \pm SEMs으로 표현하였다. JMP 5.0 software package(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 통해, 두 그룹 간 및 다중 그룹 간의 통계적 비교는 Student's *t*-test와 Turkey HSD Kramer test를 이용하여 5% 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

(2) 산란계 큰 병아리에 대한 급여 실험

(가) 공시 동물 및 사양 관리

본 실험은 14주령의 Hy-Line brown종의 산란계 큰 병아리 암컷 총 300수를 공시하여 처리 5반복, 반복당 20수 및 케이지당 2수씩 수용하여 완전 임의 배치 후, 1주일간의 순치 기간을 거쳐 부산대학교 부속 농장에서 3주간 시험을 실시하였다. 처리는 항생제를 첨가하지 않은 처리구(C, control), 항생제 0.1%/feed 처리구(T1), 및 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제(T2)

0.2%/feed 처리구로 나누어 실험하였다. 항생제(Ampicillin trihydrate; Ampigold, Sung-Won Co. Ltd., Kimpo, South Korea) 및 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제의 혼합제제는 균 배양 및 준비과정을 거친 샘플을 푸른들 EM 사료 회사에 전달하여 H₂O+균주 및 시료를 1:1 비율로 혼합하여 분사, 교반, 숙성 및 건조하여 포장된 것을 농협사료에서 구입한 산란용 큰 병아리사료(에그미인; Seoul, South Korea) 내 첨가하여 급여하였다. 사료와 물은 자유채식 및 자유음수 시켰으며, 실험 전 기간동안 12시간(07:00-19:00)의 주기로 점등을 실시하였다.

(나) 생산성 조사

체중은 시험개시로부터 1주일 단위로 총 3주 동안 조사를 하였으며, 일당 증체량은 7일간의 증체량을 1일로 나누어 그룹 내 반복 수당 1일 증체량으로 표시하였다. 일당 사료섭취량은 사료 총 급여량에서 잔량을 제하여 총 섭취량을 구하고 사육 두수로 나누어 1 두당 섭취량으로 표시하였으며, 21일을 나누어 1 두당 1일 사료섭취량(Daily feed intake)으로 표시하였다. 사료 요구율은 조사된 일당 사료섭취량을 일당 증체량으로 나누어 계산하였다.

(다) 도체 측정

시험 종료일에 각 그룹에서 10두를 임의적으로 선택 후 도체중 및 각 조직들의 무게를 측정하였다.

1두의 큰 병아리의 목을 잘라 피를 충분히 제거 후, 온수에 침전 후 털을 제거하였다. 머리와 다리가 제거된 큰 병아리로부터 비장, 간 및 소장을 적출한 후, 도체중의 무게를 잰 후, 목, 날개, 가슴, 흉부, 요부 및 대퇴로 부위를 나누어 각각의 무게 측정을 하였다. 또한 각 처리구에서 적출된 비장과 간의 무게 측정 및 소장의 길이를 측정하였다.

(라) LPS 쉐린지에 따른 혈장 내 사이토카인 변화

시험 종료일(21일)의 도축 4시간전에 각 처리군 당 5마리씩 익하정맥(wing vein)을 통해 LPS(1 mg/kg body weight)를 투여하였다. 익하정맥으로부터 채혈된 혈액을 EDTA 튜브 (BD Vacutainer, BD Franklin, USA)에 넣고 4°C에 보관하였다. 이들 보관된 혈액 샘플들을 원심분리(1,800 x g, 30 min, 4°C)를 후, 혈장을 새 1.5 mL tube에 옮겨 담았다. 혈장 내 TNF α 및 IFN γ 의 농도는 anti-chicken sandwich ELISA kits(Abcam plc., Cambridge, MA, USA)내 Instruction's guide에 따라 흡광도(O.D. 450 nm)를 측정하였다.

(마) 장내 환경 개선 효과

장내 미생물은 시험 종료 시 산란계 큰 병아리를 처리별 10수씩 임의적으로 선별한 후 맹장 내용물 양쪽 모두를 채취하여 조사하였다. 채취된 내용물은 멸균생리수를 이용하여 10⁴으로 계단 희석하여 McConkey plate(E. coli; Difco 1262002)에 접종하여 장내 미생물을 조사하였다. MacConkey의 배양조건은 37°C로 38시간 배양 후 colony를 계수하였다.

(바) 산란초기 산란수 측정

시험 종료일(21일)로부터 7일간의 2차 순치 기간을 두고 산란초기의 큰 병아리의 산란 수를 하루씩 총 14일 동안 측정하였다. 산란수를 통해 혼합제제의 급여에 따른 큰 병아리의 생산성을 평가하고자 하였다.

(사) 통계분석은 분석 등을 통해서 얻어진 성적들을 mean ± SEs으로 표현하였다. JMP 5.0 software package(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 통해, 두 그룹 간 및 다중 그룹 간의 통계적 비교는 Student's *t*-test와 Dunnett's test를 이용하여 5% 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

나. 연구결과

(1) 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제인 혼합제제에 대한 In vitro 실험

(가) 비장 유래 면역세포의 생존력

선행 결과에서 축종 병원성 미생물에 대한 항균력을 보이는 마늘알갱이 추출물(T1), 복합생균제(T2) 및 혼합제제(T3)의 자극에 의한 면역세포의 증식 능력을 평가하였다. 비장 유래 면역세포의 생존률 평가에 있어서도 5%와 10%의 마늘알갱이 추출물(T1)과 10%의 복합생균제와 혼합제제는 대조구와 비교하여 면역세포의 생존을 감소시키는 것으로 나타났다. 하지만, 1% 혼합제제는 대조구와 비교하여 면역세포의 증식을 촉진하는 효과를 보이는 것으로 나타났다.

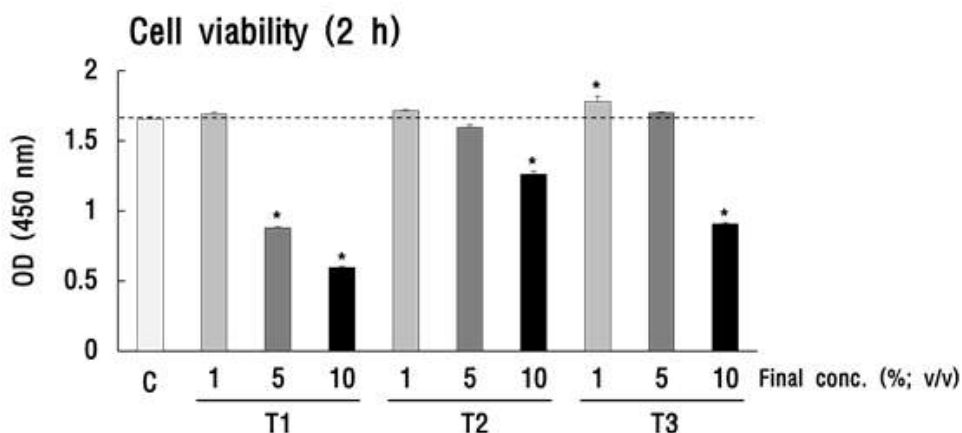


그림 3-21. 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 이들 혼합제제에 따른 면역세포의 생존력

Values are expressed as the mean±SEMs (n=4). *vs. untreated cells (P < 0.05 by Dunnett's test).

C(control), vehicle; T1, garlic kernel extract; T2, probiotic; T3, garlic kernel extract and probiotic mixture

(나) 비장 유래 면역세포의 사이토카인

마늘 알갱이 추출물(T1)과 복합생균제(T2) 및 혼합제제(T3)의 자극에 따른 비장 유래 면역세포의 cytokine production의 농도 변화를 조사하였다(그림 3-22, 23). 그 결과, LPS 비처리 그룹 간 비교에 있어서 1%와 5%의 복합생균제와 1%의 혼합제제(T3) 처리는 대조구(C)와 비교하여 비장 유래 면역세포의 TNF α 생산을 촉진하는 것으로 나타났다. 또한 이 처리구들은 LPS에 의한 유도된 면역세포의 TNF α 분비를 억제하지 못하는 것으로 관찰되었다.

IFN γ 생산의 조사 결과에 있어서, 1%와 5%의 복합생균제(T2) 및 1%의 혼합제제(T3)의 처리는 대조구(C)와 비교하여 비장의 면역세포의 IFN γ 생산을 촉진하는 것으로 나타났다. 특히, LPS 처리로 유도된 IFN γ production 수치는 1%의 혼합제제의 처리로 그 농도 수치가 감소되

는 결과로 나타났다.

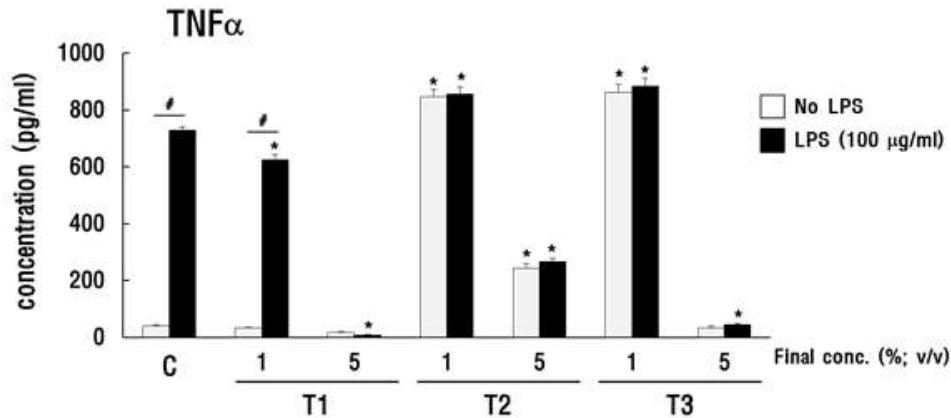


그림 3-22. 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 이들 혼합제제에 따른 면역세포의 TNFα 변화

Values are expressed as the mean±SEMs (n=4). *vs. vehicle (P < 0.05 by Dunnett's test). #No LPS vs. LPS stimulation (P < 0.05 by student's *t* test). C(control), vehicle; T1, garlic kernel extract; T2, probiotic; T3, garlic kernel extract and probiotic mixture.

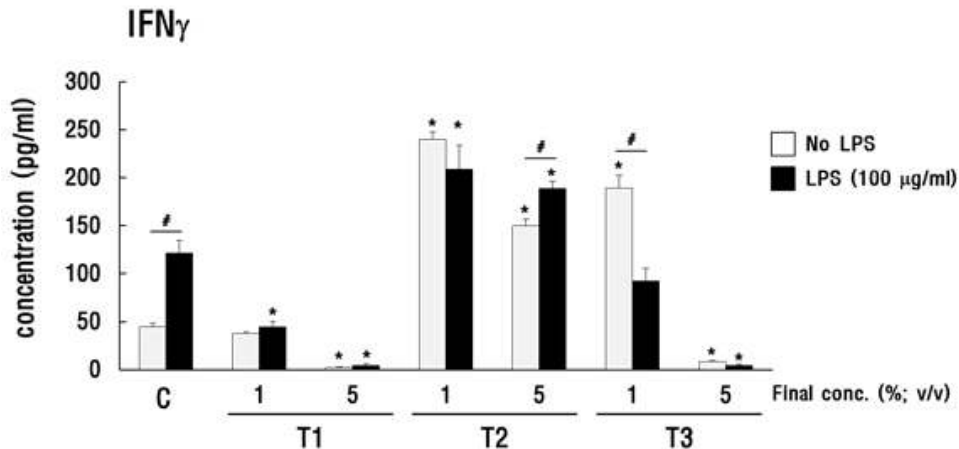


그림 3-23. 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 이들 혼합제제에 따른 면역세포의 IFNγ 변화
Values are expressed as the mean±SEMs (n=4). *vs. vehicle (P < 0.05 by Dunnett's test). #No LPS vs. LPS stimulation (P < 0.05 by student's *t* test). C(control), vehicle; T1, garlic kernel extract; T2, probiotic; T3, garlic kernel extract and probiotic mixture.

(다) 장관 유래 면역세포 분리 검증

우선 anti-rat CD8과 CD161 surface markers를 이용하여 흰쥐의 소장 및 대장 lamina propria층에서 분리한 용액 내 면역세포들의 분리 여부를 검증하였다. 그림 3-24에서 보는 바와 같이 소장 점막에서 분리된 면역세포(S-LPLs) 용액으로부터 CD8⁺ cytotoxic T세포와 CD161⁺ natural killer세포를 비롯하여 CD8⁺CD161⁺ natural killer T세포군이 flow cytometry를 통해 검출되었다. 아울러 대장 유래 세포용액에서도 소장의 그 면역세포군들이 검출되었다.

이는 흰쥐의 각 소장과 대장 점막으로부터 선천적/후천적으로 관련된 면역세포군들이 성공적으로 분리가 되었다는 것을 보여주는 증거이다.

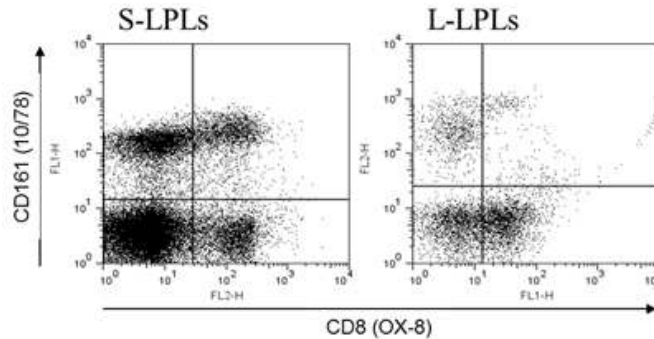


그림 3-24. Flow cytometry를 통한 쥐 장관 내 면역세포의 분리 검증

(라) 장관 유래 면역세포의 생존력

마늘알갱이 추출물(T1), 복합생균제(T2) 및 혼합제제(T3)의 자극에 의한 면역세포의 증식 능력을 평가하였다(그림 3-25). 그 결과 소장(S) 및 대장(L) 유래 면역세포(LPL)의 생존률 평가를 통해 1%와 5%의 마늘알갱이 추출물과 혼합제제는 면역세포의 생존을 감소시키는 것으로 나타났다, 하지만 1%와 5%의 복합생균제 및 1%의 혼합제제는 면역세포의 생존에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

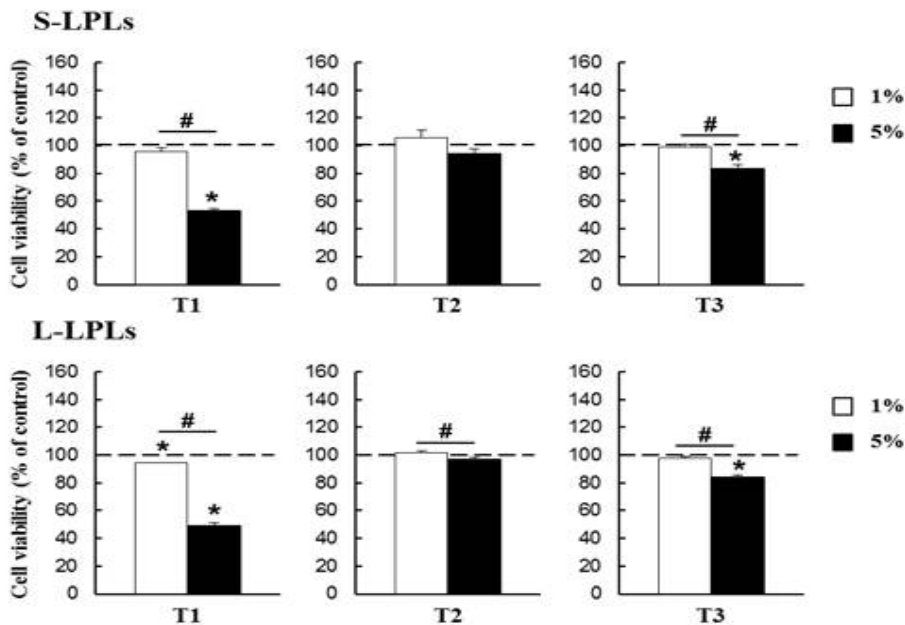


그림 3-25. 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 이들 혼합제제에 따른 면역세포의 생존력

Values are expressed as the mean±SEMs (n=4). *vs. untreated cells (P < 0.05 by student's *t*-test). #1% vs. 5%-treatment in an each group (P < 0.05 by student's *t*-test). Control(dashed line), vehicle; T1, garlic kernel extract; T2, probiotic; T3, garlic kernel extract and probiotic mixture.

(마) 직/간접적 종양세포의 사멸 능력

YAC-1 종양세포를 타겟으로 지정하여 마늘알갱이 추출물, 복합생균제 및 혼합제제의 직접적인 종양세포 사멸 능력(A) 및 장관 점막 유래 면역세포들에 대한 세포 사멸 증진 능력(B)을 조사하였다. YAC-1 타겟세포에 대한 시료들의 직접적인 사멸 능력은 1%, 5%와 10%의 마늘알갱이 추출물(T1)과 복합생균제(T2) 및 혼합제제(T3) 처리는 2 h의 교배양 동안 target 세포에 아무런 영향을 주지 못한 것으로 관찰되었다. 이 결과를 바탕으로 소장 및 대장 점막에서 분리된 세포용액을 가지고, YAC-1 target 세포에 대한 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 혼합제제의 간접적인 세포 사멸 증진 능력을 조사 한 결과, 흥미롭게도 동일 농도의 혼합제제는 짧은 시간의 교배양 조건에서 S-LPLs 및 L-LPLs의 세포 사멸 능력을 증진시키는 것으로 나타났다. 또한 1%의 마늘 알갱이 추출물과 5%의 복합생균제에서도 장 유래 면역세포의 세포 사멸 능력을 유의적으로 증진시키는 결과를 보였다. 따라서, 이 실험을 통해 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 혼합제제는 소장 및 대장 점막에 존재하는 면역세포 내 cytotoxic granules의 exocytosis를 활성화시킬 수 있는 물질로 사료된다.

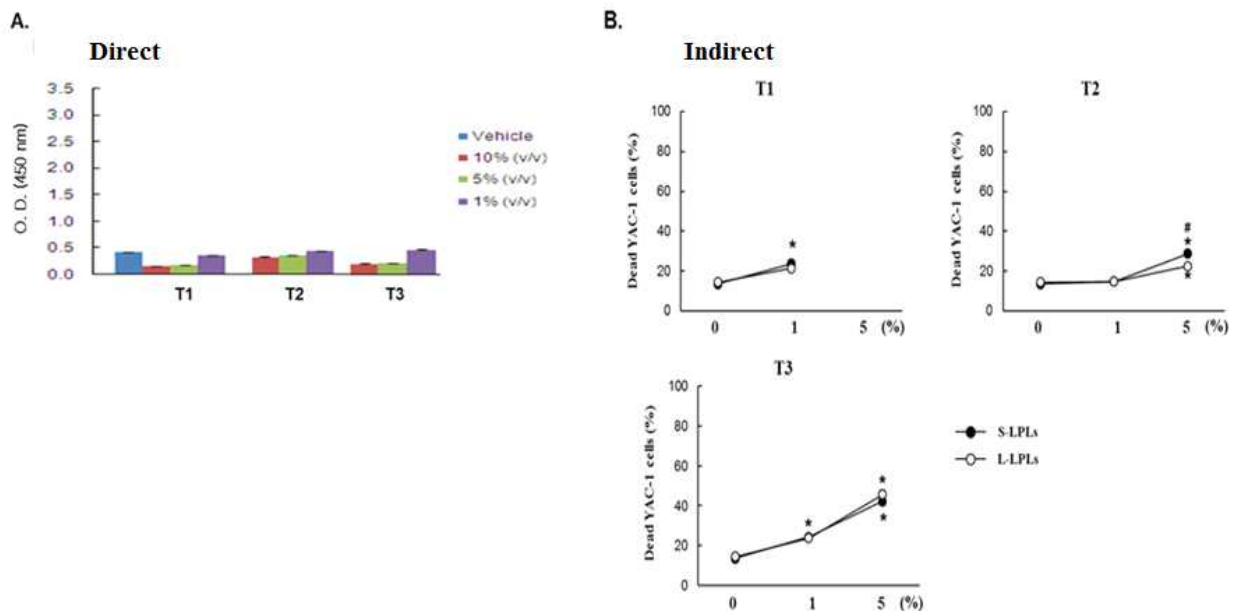


그림 3-26. 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 이들 혼합제제에 따른 면역세포의 세포사멸 능력 영향.

Values are expressed as the mean \pm SEMs (n = 4). *vs. vehicle ($P < 0.05$ by Dunnett's test). #S- vs. L-LPLs in an each group ($P < 0.05$ by Student's t-test). T1, garlic kernel extract; T2, probiotic; T3, garlic kernel extract and probiotic mixture.

(바) 면역세포의 사이토카인 변화

마늘 알갱이 추출물(T1)과 복합생균제(T2) 및 혼합제제(T3)의 자극에 따른 장관 점막 유래 면역세포의 cytokine의 농도 변화를 조사하였다. 조사 결과, 대조구(C)와 비교하여 1%의 마늘알갱이 추출물과 복합생균제의 혼합제제(T3) 처리구에서 소장 유래 면역세포(S-LPL)의 IFN γ 생산을 촉진하는 것으로 나타났다.

위 실험과 동일한 조건으로 교배양 된 상층액 내 TNF α 농도를 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 그 결과, 1%의 마늘알갱이 추출물과 복합생균제의 혼합제제(T3) 및 5%의 복합생균제

(T2)과 마늘알갱이 추출물과 복합생균제의 혼합제제(T3) 처리는 소장 점막 유래 면역세포의 TNF α 생산을 촉진 시키는 결과를 보였다. 아울러 대장 점막 유래 면역세포는 1% 및 5%의 혼합미생물(T2) 처리로 TNF α 생산을 증진시키는 결과를 보였다.

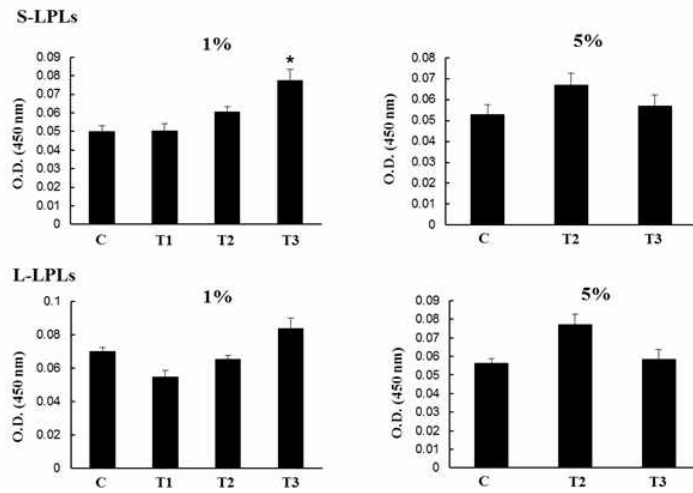


그림 3-27. 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 이들 혼합제제에 따른 면역세포의 IFN γ 변화
 Values are expressed as the mean \pm SEMs (n=4). *vs. vehicle (P < 0.05 by Dunnett's test). C(control), vehicle; T1, garlic kernel extract; T2, probiotic; T3, garlic kernel extract and probiotic mixture.

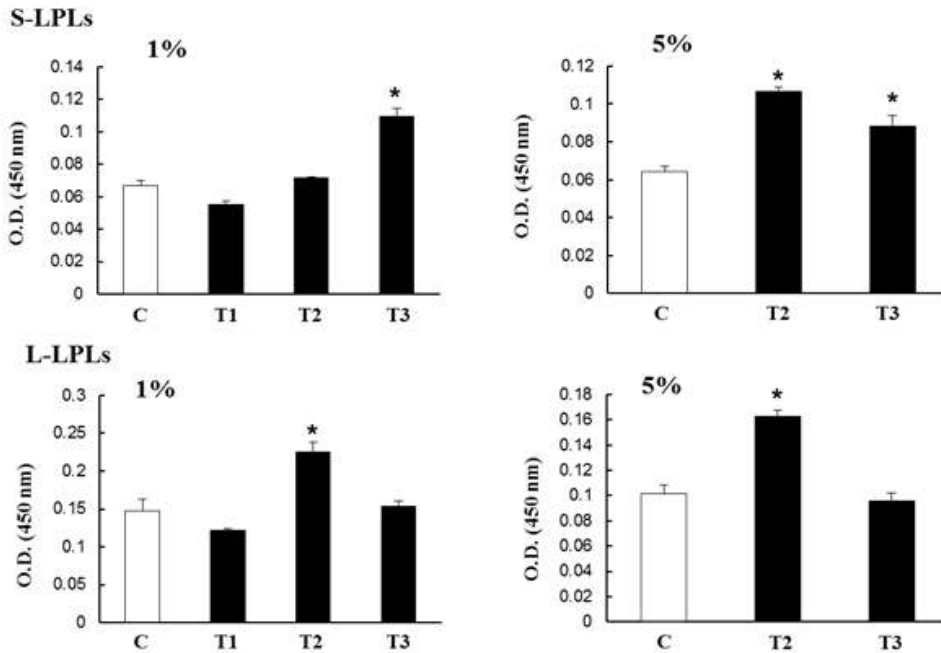


그림 3-28. 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 이들 혼합제제에 따른 면역세포의 TNF α 변화

Values are expressed as the mean \pm SEMs (n=4). *vs. vehicle (P < 0.05 by Dunnett's test). C(control), vehicle; T1, garlic kernel extract; T2, probiotic; T3, garlic kernel extract and probiotic mixture.

(사) LPS 켈린지에 따른 면역세포의 사이토카인 변화

아울러 장관 점막 유래 면역세포용액에 Lipopolysaccharide (LPS; 100 mg/mL) 자극 유도

유무로 마늘알갱이 추출물(T1), 복합생균제(T2) 및 혼합제제(T3)의 염증성 매개물질에 대한 억제효과를 조사하였다(3-29). 1%의 복합생균제(T2) 단독 처리는 대조군과 비교하여 소장 유래 면역세포의 TNF α 생산에 억제효과를 보였다. 아울러 5%의 마늘알갱이 추출물과 복합생균제의 혼합제제(T3) 처리는 대장 유래 면역세포의 TNF α 생산에서 대조군(C)에 비하여 유의적으로 억제효과를 보이는 것으로 나타났다. 따라서 cytokines 분비 조절 기능을 보이는 혼합제제를 산란계 큰 병아리에게 사료 내 첨가하여 항생제 대체 효능을 검증하였다.

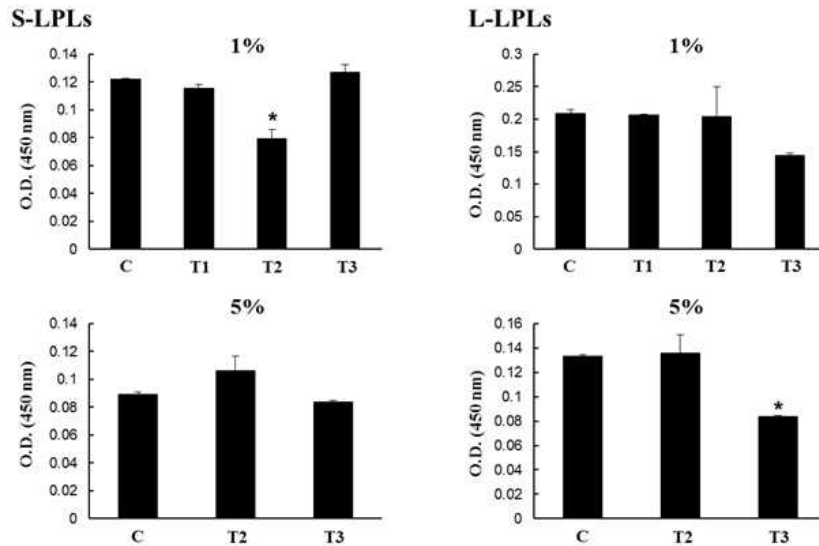


그림 3-29. 췌린지에 따른 장관 유래 면역세포의 TNF α 분비에 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제 및 이들 혼합제제의 영향.

Values are expressed as the mean \pm SEMs (n = 4). *vs. vehicle ($P < 0.05$ by Dunnett's test). C(control), vehicle; T1, garlic kernel extract; T2, probiotic; T3, garlic kernel extract and probiotic mixture.

(3) 산란계 큰 병아리에 대한 급여 실험

(가) 성장성적도

개시체중에 대한 7일까지 증체량은 무항생제구(C)는 41.60 g, 항생제 처리구(T1)는 61.00 g, 0.2% 혼합제제(T2) 처리구는 45.00 g으로 무항생제와 비교하여 유의적 차이는 보이지 않았으나 항생제구와 비교하여 유의적으로 낮은 수치의 증체량 결과를 보였다. 하지만 흥미롭게도 8-14일까지의 0.2% 혼합제제 처리구 내 증체량은 다른 두 사료 처리구와 비교하여 유의적 차이를 보이지 않았다. 이러한 경향을 15-21일 시험구간의 무항생제구 및 항생제구의 증체량과 비교한 결과, 급격히 감소하는 결과를 보였다. 또한 시험 개시일로부터 종료일까지의 일일 증체량을 비교한 결과, 세 처리구에서 유의적 차이를 보이지 않았다. 섭취량의 결과에 있어서 시험 개시일(1일)로부터 14일까지는 뚜렷한 차이를 보이지 않으나 8-14일 기간 동안의 0.2% 혼합제제 처리구 내 사료 섭취량은 무항생제와 항생제 처리구와 비교하여 유의적으로 감소하는 결과를 보였다. 또한 혼합제제 처리구의 일일 섭취량은 무항생제구와 비교하여 항생제 처리구와 동일하게 유의적으로 낮은 수치의 결과를 보였다. 증체량과 사료섭취량을 이용하여 계산한 사료 효율성을 살펴보면 2주간(1-14일)의 시험기간 동안 0.2%의 혼합제제의 사료급여는 산

란계 큰 병아리에 있어 높은 사료효율을 보이고 일일 사료 효율에 있어서는 무항생제 처리구와 동일한 결과 형태를 나타냈으며, 항생제 처리구의 그것과 비교하여 상대적으로 낮은 수치를 보이는 것으로 나타났다.

표 3-38. 일 당 증체량, 일 당 사료섭취량 및 사료요구율

	Days	Treatment ¹⁾		
		C	T1	T2
Body Weight (kg)	0	1355.50±4.835	1323.50±9.172	1344.00±14.199
	7	1397.10±7.683	1384.50±7.558	1389.00±14.089
	14	1524.50±3.657	1510.50±8.566	1524.50±12.535
	21	1588.50±3.588	1579.50±9.334	1524.50±12.535
Weight Gain (kg/head)	1-7	41.60±5.562 ^a	61.00±3.588 ^b	45.00±3.062 ^b
	8-14	127.40±4.797	126.00±3.921	135.50±3.298
	15-21	64.00±2.318 ^a	69.00±4.077 ^a	48.00±5.087 ^b
	1-21	233.00±3.742 ^{ab}	256.00±7.483 ^a	228.50±7.441 ^b
Daily Weight Gain	1-21	11.10±0.178 ^{ab}	12.19±0.356 ^a	10.88±0.354 ^b
Feed Intake (kg/head)	1-7	614.00±8.239	605.50±7.391	630.00±6.982
	8-14	668.00±3.571 ^a	639.50±13.449 ^a	601.50±7.272 ^b
	15-21	696.00±7.689 ^a	656.50±5.099 ^b	675.50±7.558 ^{ab}
	1-21	1978.00±11.86 ^{a9}	1901.50±23.380 ^b	1907.00±17.165 ^b
Daily Feed Intake	1-21	94.19±0.565 ^a	90.55±1.113 ^b	90.81±0.817 ^b
Gain/Feed (Feed Efficiency)	1-7	0.067±0.0082 ^b	0.101±0.0060 ^a	0.071±0.0048 ^a
	8-14	0.191±0.0064 ^b	0.197±0.0029 ^b	0.225±0.0059 ^a
	15-21	0.092±0.0033 ^{ab}	0.105±0.0059 ^a	0.071±0.0070 ^b
Daily Gain/Feed	1-21	0.118±0.0020 ^b	0.135±0.0031 ^a	0.120±0.0033 ^b

Values are expressed as the means±SE (n=5). ^{a,b} P < 0.05 by Turkey HSD Kramer test.

¹⁾C(control), non-antibiotic; T1, antibiotic (0.1%/feed); T2, garlic kernel extract and probiotic mixture (0.2%/feed).

(나) 도체 측정

시험 종료일(21일)의 각 처리군에서 도축 후 도체중을 비롯하여 비장, 간의 무게 및 소장의 길이를 측정하였다. 각 처리군 내 시험 종료일(21일)의 도체중을 비롯하여 목, 날개, 가슴, 흉부, 요부 및 대퇴의 무게는 세 그룹 간에 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 아울러 비장과 간의 무게 결과에 있어서도 차이를 보이지 않았으며, 소장의 길이에 있어서도 사료 급여에 따른 차이를 보이지 않는 것으로 관찰되었다.

표 3-39. 산란계 큰 병아리의 각 부위별 도체 측정

Items	Treatment ¹⁾		
	C	T1	T2
도체중((g)	993.25±20.186	1008.95±17.894	976.65±24.684
목(g)	100.70±2.978	103.10±1.770	96.85±3.442
날개(g)	130.45 ±3.611	133.15±2.952	127.30±2.136
가슴(g)	241.65±6.266	246.80±6.565	230.25±13.898
흉부(g)	87.80±2.993	91.55±4.879	87.90±3.500
요부(g)	114.75±3.774	112.30±3.871	117.55±3.141
대퇴(g)	317.90±7.249	322.05±6.445	316.80±7.065
비장(g)	3.98±0.255	4.61±0.275	4.59±0.323
간(g)	42.38±1.485	42.09±1.444	40.56±1.133
소장(cm)	120.05±2.592	117.82±4.531	119.79±2.827

Values are presented as means±SE (n=5).

¹⁾C(control), non-antibiotic; T1, antibiotic (0.1%/feed); T2, garlic kernel extract and probiotic mixture (0.2%/feed).

(다) LPS 챌린지에 따른 복합생균제/마늘 추출물 혼합제제의 영향

시험 종료일, 5수의 큰 병아리의 익하정맥(wing vein)을 통해 채혈 된 혈장 내 TNF α 와 IFN γ 의 농도를 측정하여 LPS 투여 유무에 따른 각 처리구의 면역반응 변화를 조사하였다. 무항생제구(C) 내 TNF α 농도 결과에 있어 LPS 투여로 인한 수치는 비LPS 처리군 내 수치와 비교하여 유의적으로 높은 수치를 보였다. 이는 LPS 투여로 염증모델을 유도했다는 것을 시사한다. 아울러 항생제 처리구(T1) 내 TNF α 의 증감 형태도 무항생제구의 그것과 동일한 결과를 보이는 것으로 나타났다. 흥미롭게도 0.2%의 혼합제제 처리구(T2)의 혈장 내 TNF α 의 농도는 LPS의 투여에도 불구하고 비LPS 투여군과 비교하였을 때 유의적 차이를 보이지 않았다. 또한 항바이러스 면역매개물질인 IFN γ 의 수치 변화 추세를 관찰한 결과 무항생제구의 IFN γ 는 LPS 자극에도 불구하고 아무런 변화를 보이지 않았다. 또한 이러한 생리적 수준의 수치경향은 0.2% 혼합제제 처리구에서도 동일한 결과를 보였다. 선행연구의 보고에 따르면 마늘 알갱이 추출물은 cytokines의 분비를 자극하는 것으로 보고되었고(Kim et al., 2005; Kim et al., 2009), 이 cytokines은 장 점막 항상성 유지 및 면역세포의 면역 감시 역할에 중요한 인자로 평가되는 것으로 많은 연구를 통해 보고되었다(Chen, 2009; Francoeur, 2004; Stallmach, 1999). *In vitro* 선행연구 결과에서도 마늘알갱이 추출물을 포함하여 복합생균제와 혼합제제는 장관 점막에서 분리된 면역세포들에 대해 cytokines의 분비 촉진 및 억제효과를 보였다. 하지만, *in vivo* 연구 결과에서 이 혼합제제는 산란계 큰 병아리의 혈중 내 cytokines의 분비 촉진과 LPS 투여 조건에서 cytokines의 억제 효과에도 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 이는 사료 내 0.2%의 혼합제제 처리의 급여는 산란계 큰 병아리에 있어 우선적으로 면역 항상성 유지에 기여하여 질병 예방적 효과가 있는 것으로 판단된다.

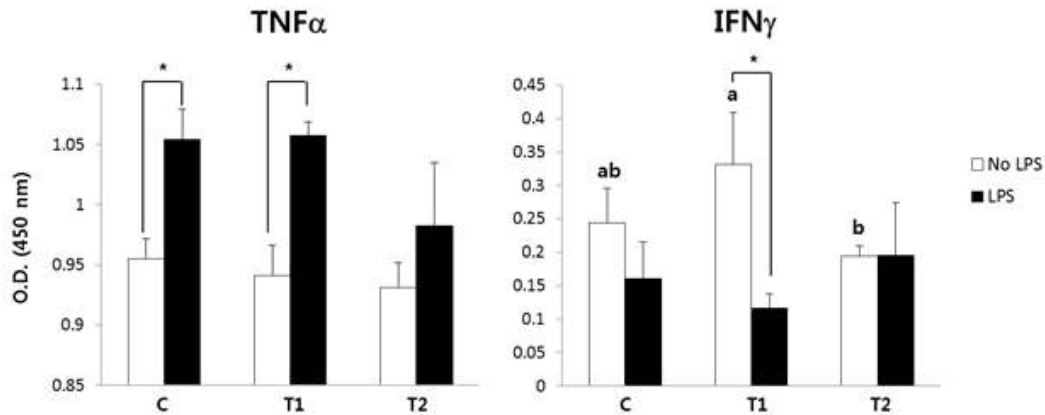


그림 3-30. LPS 쉐린지에 따른 혈장 내 사이토카인 변화.

Values are expressed as the mean±SE (n=5). ^{ab}vs control (P < 0.05, by Tukey HSD Kramer). *No LPS vs LPS in an each group (P < 0.05, by student's *t*-test). C(control), non-antibiotic; T1, antibiotic (0.1%/feed); T2, garlic kernel extract and probiotic mixture (0.2%/feed).

(라) 장내 환경 개선 효과

각 처리구간에 따른 산란계 큰 병아리의 맹장 내용물을 채취한 후, MacConey plate에 이를 접종하여 호기성 *E. coli* colony의 수를 측정하였다. 비록 세 처리구간에 유의적 차이를 보이지 않는 것으로 나타났으나, 0.2%의 혼합제제 처리구(T2)는 무항생제구(C)와 비교하여 상대적으로 감소된 수치 경향을 보였으며, 항생제구(T1)의 균수와 동일한 경향의 수준을 보이는 것으로 관찰되었다. 따라서 항생제 처리구와 동등한 수준의 효과를 나타내는 0.2% 혼합제제 처리 사료의 급여는 산란계 큰 병아리에 있어 장 내 미생물의 개선효과에 기여할 가능성이 큰 것으로 사료된다.

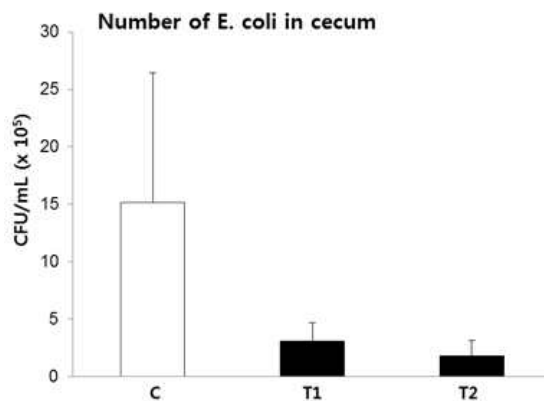


그림 3-31. 맹장 내 *E. coli*의 집락수. .

Values are expressed as the mean±SEs (n=5).C(control), non-antibiotic; T1, antibiotic (0.1%/feed); T2, garlic kernel extract and probiotic mixture (0.2%/feed).

(마) 산란초기 산란수

1차 시험 종료일(21일) 및 순치기간을 거쳐 14일 동안 산란 초기의 큰 병아리의 달걀 생산지수를 측정하였다. 달걀의 일일 생산지수 및 총 생산량의 결과를 볼 때, 0.2% 혼합제제를 급여한 그룹 내 큰 병아리는 항생제구와 비교하여 낮은 수치를 보이나 무항생제구와 비교하여 동

등한 결과를 확인하였다.

결론적으로 *in vitro* 연구를 통해 마늘 알갱이 추출물과 복합생균제의 혼합제제는 병원성 미생물에 대해 우수한 항균효과를 보였으며, 장관 점막 유래 면역세포의 세포 사멸 능력 증진과 cytokines의 분비 촉진 및 억제효과 기능을 보유하고 있는 것으로 나타났다. 한편 *in vivo* 연구 결과에서 사료 내 혼합제제(0.2%/feed) 처리의 급여는 산란계 큰 병아리의 면역 항상성 유지에 기여와 장관 내 미생물의 환경 개선효과를 가지는 것으로 판단되었다. 이는 항생제 대체가 가능한 동물용 사료 첨가제로의 이용가능성을 시사하고 있다.

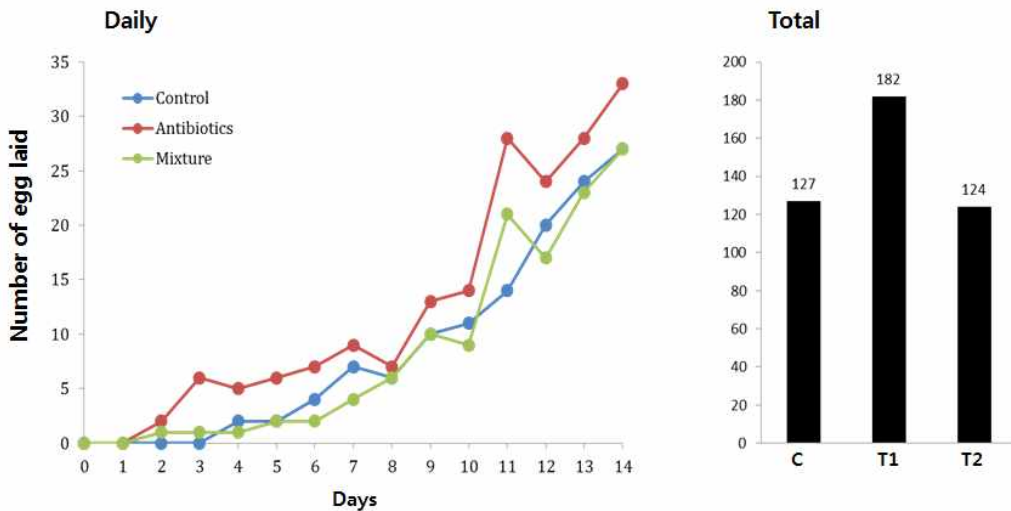


그림 3-32. 일중 달걀 생산수 및 총 달걀 생산수

C(control), non-antibiotic; T1, antibiotic (0.1%/feed); T2, garlic kernel extract and probiotic mixture (0.2%/feed)

제4절 바이오사료첨가제 연구사업단 운영단

가. 전략기술기획단 정기회의 개최

(1) 전략기술기획단 회의

본 세부과제에서는 2010년 6월부터 2013년 7월까지 바이오 사료첨가제 연구 사업단을 보다 효율적으로 운영하기 위하여 연 2회, 과제수행기간 내 총 6회의 전략기술기획단 정기회의를 개최한바 있다. 회의를 통하여 각 핵심/세부과제의 목표대비 연구진행 상황을 점검하였고 문제점 등을 해결하기 위한 방안을 모색하였으며 도출가능 예상성과 등을 미리 확정지어 그 이후 사업단 과제 운영이 계획대로 원활하게 진행되도록 하였다.

나. 연구 실무자 세미나 개최

(1) 연구원 기술교류 세미나

각 핵심/세부과제 연구원 및 대학원생 간 유기적 협력과 연구내용 및 기술 공유를 위해 연 내 수시 기술교류 세미나를 개최하였으며 그 회수는 30여차에 달하였다. 세미나 개최를 통하여

각 핵심/세부과제의 연구내용, 방법 및 결과를 실무자들로 하여금 서로 공유할 수 있게 하여 유기적인 협력 관계가 형성되도록 하였다.

다. 기술동향 분석 및 수용

(1) 특허 출원 전략 컨설팅 의뢰

“국가 R&D 특허기술동향조사사업 (주관기관: R&D 특허센터, 사업기관: 특허법인 태백)” 지원 하에 연구단 관련 국내외 대응특허에 대한 전략적 회피 출원을 위한 컨설팅 진행, 각 핵심/세부과제에 보고서 배포 및 검토회의 수행

(2) 전문가 초청 세미나 개최

연사: 호주 CSIRO 연구소 책임연구원 강승하 박사, 주제: 장내 분포 미생물의 다양성과 생균제 활용 가능 미생물 고찰(Understanding of gut microbial diversity using phylogenetic custom microarray)

일시: 2010년 7월 3일 (토), 장소: 서울대학교 농업생명과학대학

(3) 전문가 초청 세미나 개최

연사: 미국 University of California, Davis, Post Dr. 김은배 박사, 주제: 차세대 유전체분석을 이용한 장내 미생물 및 생균제 계통 분석

일시: 2013년 7월 27일 (토), 장소: 서울대학교 농업생명과학대학

라. 기타

(1) 연구성과 특허 출원 및 등록 업무지원

출원 : Method for prevention and treatment of *Salmonella* infection(US 13/176,458) 외 5건

등록 : *Podoviridae* bacteriophage having killing activity specific to *Staphylococcus aureus* (US 8,043,613) 외 1건

(2) 한국동물자원과학회 참석 및 발표: (일시 : 2011년 6월 23, 24일, 장소:부산대학교 밀양캠퍼스)

박테리오페이지 은행 심포지움 참석: (일시 : 2011년 9월 27일, 장소:한국외국어대학교 글로벌캠퍼스)

마. 산업화 활성화

(1) 박테리오파지 기반 사료첨가제 품목 2종 등록 (2010년 9월, 2011년 4월)

(2) 박테리오파지 기반 Bio active agent 제형 개발

(3) 박테리오파지 기반 천연 항생제 대체제 시제품 개발 및 언론 홍보

(4) 에스엔마니커 “닭터의 자연” 친환경 닭고기 상품 출시

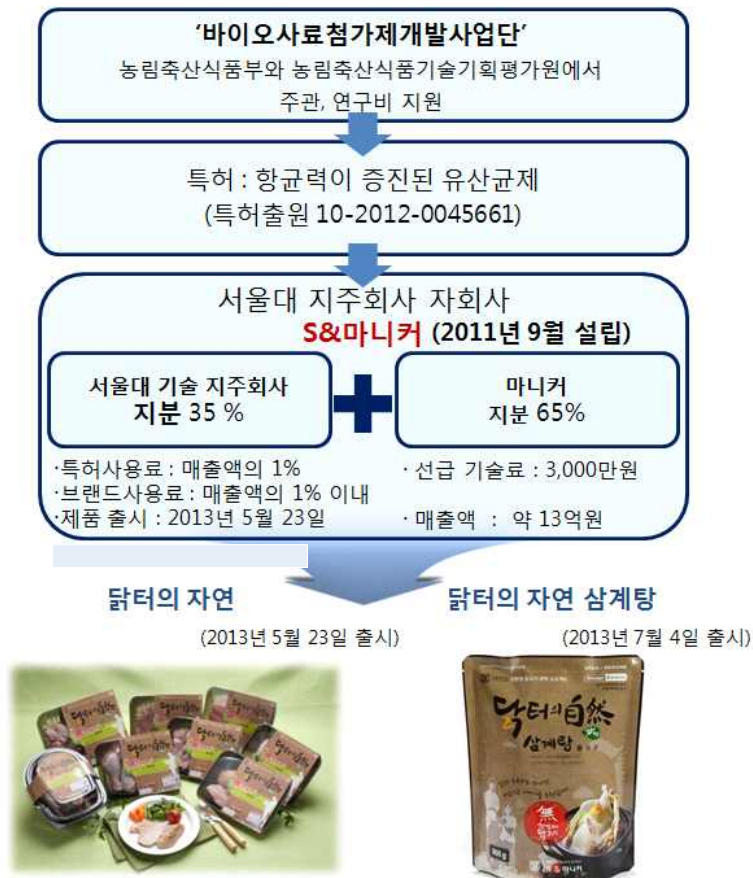


그림 4-1. 무항생제 친환경 계육제품 “닭터의 자연”

“바이오사료첨가제개발사업단” 과제를 통해 도출한 연구 성과를 서울대 지주회사의 자회사인 “에스앤마니커”에 기술 이전하여 무항생제 친환경 계육제품인 “닭터의 자연” 브랜드가 제품화 됨

서울대·마니커 합작법인, 친환경 닭고기 ‘닭터의 자연’ 출시(뉴스1 2013-05-22)
(전략) (주)S&마니커의 ‘닭터의 자연’은 농림축산식품부와 농림축산식품기술기획 평가원(농기평) 에서 주관하고 연구비를 지원한 ‘바이오사료첨가제 사업단’ 의 연구 성과인 유산균제를 통한 제품생산을 특징으로 한다. 향균력이 증진된 유산균제는 현재 특허 출원중이다. 특허 출원된 유산균제는 항생제 대체제로 사용돼 닭고기의 향균력과 면역력을 증진시켜 건강하고 안전한 제품생산을 가능하게 했다. (후략)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연도별 목표달성도

1. 연도별 목표달성도

가. 1차년도 목표달성도

(1) 제1핵심 연구과제

과제 구분	목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1-1	생균제용 미생물 균주확보	효모 2종, 유산균 10종, 바실러스 5종, 대장균 1종 확보	100
	균주 특성규명/생산방법 확립	선발균주의 내산성, 항균활성, 배양특성 규명	100
	균주개량 및 특성확인	유산균에 대한 내산성 및 항균활성 증진 균주 개발	100
	균주 발효조건 및 생산배지확립	경제적인 유산균 발효조건 및 배지조성 제시	100
1-2	미생물 전달용 점막점착성 고분자 확보	천연고분자 2종, 합성고분자 1종	100
	미생물의 안정성과 흡수율 향상을 위한 고분자 미립자 제조방법 확립	점막 점착성 및 미립자 특성 규명	100
	미생물이 담지된 고분자 미립자의 <i>in vitro/in vivo</i> 특성 확인	<i>In vivo/ in vitro</i> system에서 고분자 미립자에 담지된 미생물의 안정성, 방출성 및 흡수성 규명	100
1-3	연구사업단 연구보고회	연 6회 실시, 연구보고서 작성	100
	전문/운영/평가위원회	각 연 1회 실시, 활동보고서 작성	100

(2) 제2핵심 연구과제

과제 구분	연구범위	연구개발 수행내용	달성도 (%)
2-1	박테리오파지 생산공정 개발	4종 박테리오파지의 개별 생산공정 구축	100
	리신 제조공정 개발	2종의 리신의 개별 제조공정 개발	100
	박테리오파지 특성규명	4종의 박테리오파지 특성 규명	100
	리신 특성규명	2종의 제조함 리신의 특성 규명	100

(3) 제3핵심 연구과제

과제 구분	연구범위	연구개발 수행내용	달성도 (%)
3-1	천연 부산물 탐색	느타리버섯, 마늘, 미역, 쑥, 양파, 오미자, 유기산, β -글루칸	100
	항생제 대체용 천연물 확보	항병력, 항생제 대체능력, 환경개선 확인	100
	반추위 발효성상 확인	<i>In vitro</i> 에서 반추위를 모방하여 발효 특성 규명	100
	<i>In vivo</i> 실험 기반 구축	송아지 및 육계 실험 수행	100

나. 2차년도 목표 달성도

(1) 제1핵심 연구과제

과제 구분	목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1-1	생균제용 미생물 균주 2종의 개량	<i>Lactobacillus plantarum</i> 및 <i>Pediococcus acidilactici</i> 유산균주에 대해 각각 병원균인 <i>E. coli</i> K99(송아지설사) 및 <i>S. gallinarum</i> (가금설사) 대해 항균활성이 증진된 개량균주를 선발	100
	생균제용 미생물 발효특성 확인	농부산물을 이용한 <i>Bacillus sp.</i> SM2 균체 생산 최적 액체 배양 배지 조성 및 <i>Bacillus sp.</i> JSP1 효소(amylase 및 protease) 생산 최적 고체 발효 배지 조성 확립	100
	생균제용 미생물 대량생산 방법과 공정 개발	5 L 발효조에서 최적화된 산업용 배지를 이용하여 회분식 배양 실시	100
	3핵심과제 연계 시험용 시제품 효과 검증	3핵심과제 공조 시제품 효과검정을 위한 선발 미생물, 배양조건 및 항균력 평가 기법 제공	100
1-2	기능성 미생물의 고분자 미립자 담지	고분자 마이크로캡슐에 담지된 여러 기능성 미생물의 안정성, 방출성 및 생존성 규명	100
	분자 미립자에 담지된 미생물의 <i>in vitro</i> 평가	고분자 마이크로캡슐에 담지된 여러 기능성 미생물에서 면역력에 관련된 TNF-알파 및 IL-6를 생산하는지 면역세포를 이용하여 평가	100
	분자 미립자에 담지된 미생물의 <i>in vivo</i> 평가	고분자 마이크로캡슐에 담지된 여러 기능성 미생물을 실험동물인 쥐에 4주간 투여하여 면역력에 관련된 TNF 및 IL-6를 생산하는지를 평가	100
1-3	연구사업단 연구보고회 및 전략기술기획단 회의	연구사업단 연구보고회 6회 실시 전략기술기획단 회의 개최 (2012. 11. 12)	100
	연구단 운영	연구단 연구성과 특허 및 논문투고 지원 (특허: 건, 논문: 2 편)	100

(2) 제2핵심 연구과제

과제 구분	연구범위	연구개발 수행내용	달성도 (%)
2-1	박테리오파지 기반의 생물활성 제제 제형 개발 (3종)	분말형 사료첨가제 제형 1종, 액상 및 동결 건조형의 음수첨가제 제형 각 1종, 액상의 소독제 제형 1종을 개발. 총 4종의 제형을 개발 완료.	100
	생물활성제제의 효능 검증	항균 효능, 내산성, 및 저장 안정성을 조사 완료	100
	제조합 리신의 대량생산 및 대량정제공정 구축	50 L 규모의 제조합 리신의 생산 및 정제 공정을 개발 완료.	100

(3) 제3핵심 연구과제

과제 구분	연구범위	연구개발 수행내용	달성도 (%)
3-1	천연물 10종 축종별 병원성 세균에 대한 항균력 조사	1차년도 연구를 이어서 10종이상의 천연물에 대한 소, 돼지, 닭 유래의 병원성 세균에 대한 항균력 조사를 실시하여 항균력이 우수한 천연물을 최종 선발	100
	1핵심과제 선정 미생물과의 혼합효과 조사	1핵심과제에서 검증된 복합생균제와 본 과제에서 선발한 천연물과의 혼합에 의한 항균력 조사를 실시하여 천연물 혼합 생균제를 선정	100
	<i>In vivo</i> 실험을 통하여 효과 검증	최종 선정된 천연물 혼합 생균제에 대한 면역증강 효능검사를 흰쥐를 이용하여 실시하고, 비육돈에 미치는 효과를 사양시험을 통하여 검증	100

다. 3차년도 목표 달성도

(1) 제1핵심 연구과제

과제 구분	목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1-1	최종 선발 생균제 균주에 대한 최적 발효조건 결정	2차년도 연구를 통해 최종 선발한 유산균 및 바실러스 균주를 산업배지를 이용하여 배양하여 최적 발효 조건 결정	100
	복합 생균제 개발을 위한 균주 혼합 발효조건 결정	유산균, 바실러스, 효모, ECN 등 생균제 활용 균주 및 천연물 혼합 비율 및 혼합 배양 조건 결정	100
	복합 생균제 시제품 효과 검증	3핵심과제와 공조를 통한 가축사양 실험	100
	복합 생균제 제품등록 및 상품화	축종별 복합미생물 시제품 개발	100
1-2	미생물이 담지된 고분자 마이크로캡슐의 양계에서 평가	양계에 경구투여 후 생균수 측정 및 활성 평가	100
	미생물이 담지된 고분자마이크로캡슐의 실험동물에서 평가	실험동물에 경구투여 후 생균수측정 및 활성 평가	100
	미생물이 담지된 고분자 제제의 최적화	미생물 방출, 담지 효율 등을 고려한 고분자 제제의 최적화	100
1-3	바이오사료첨가제 연구단 운영	전략기술기획단 회의 및 연구단 연구보고회	100
		천연항생제 대체제 제품 등록 및 상품화 지원	100

(2) 제2핵심 연구과제

과제 구분	연구범위	연구개발 수행내용	달성도 (%)
2-1	생물활성제제 시제품 제작 (3종)	사료첨가제 4종, 음수첨가제 2종, 소독제 1종의 시제품을 제작 (총 7종 제작)	100
	생물활성제제 시제품의 <i>in vivo</i> 안전성 조사	<i>In vivo</i> 안전성 조사는 사양시험을 통한 장기급이시험과 의약품 평가 수준의 GLP 기관에서의 장기급이 독성시험을 실시하여 충분한 안전성을 확인	100
	생물활성제제 시제품의 <i>in vivo</i> 효능 조사	양돈 및 양계에서의 공격집중시험을 실시하여 의약품 평가 수준으로 마우스에서의 공격집중시험도 실시하여 우수한 효능을 확인	100
	생물활성제제 시제품의 현장적용시험(Field Test)	양돈 및 양계 분야에서 기업체 농장 시험, 대학교 사양시험, 개인 농장 시험을 실시	100
	현장적용시험 결과를 바탕으로 생물활성제제의 최종 개선	현장적용시험에서 제품 개선 사항이 도출되지 않아 추가의 개선을 실시하지 않고 시제품을 최종 제품화하기로 함	100
	생물활성제제의 제품화 (3종)	음수첨가제 1종, 사료첨가제 4종을 제품화 (총 5종)	100
	치료용 재조합 리신 제제 확보 (1종)	재조합 리신 기반의 젓소유방염 치료제 1종을 확보	100

(3) 제3핵심 연구과제

과제 구분	연구범위	연구개발 수행내용	달성도 (%)
3-1	복합 미생물 및 천연물에 대한 면역력증진효과 시험	제1핵심과제 시험으로부터 추가 선정된 복합 미생물 및 항균력이 인정된 천연물에 대한 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 면역증진효과 검증	100
	복합 미생물 및 천연물 혼합제 사양시험	복합 미생물 및 천연물 혼합제의 성장촉진 효과 검증 복합 미생물 및 천연물 혼합제의 항생제 대체효과 규명	100
	복합 미생물 및 천연물 혼합제 시제품 제작	복합 미생물 및 천연물 혼합제 시제품 등록	100

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연차별 목표

1. 제1핵심 연구과제: 사료첨가용 항생제 대체 복합 미생물 생균제 개발

개발 기술(예, 기술에 대한 구체화)	목표(수준, 성능, 품질)				
	1차년도 (2010-2011)	2차년도 (2011-2012)	3차년도 (2012-2013)	4차년도 (2013-2014)	5차년도 (2014-2015)
1. 생리활성 미생물 항균력 증진 개량기술	UV mutation 과 genome shuffling을 결합한 항균력 증진 개량기술 확립	확립된 개량기술을 이용한 병원성 미생물 내성 균주 개량	병원균 내성 생리활성 미생물의 특성규명	병원균 내성 생리활성 미생물 활력개선	기술의 문제점 보완
2. 생리활성 미생물 내산성 증진 개량기술	Chemical adaptation을 통한 내산성 증진 개량기술 확립	확립된 개량기술을 이용한 내산성 생리활성 균주 개량	내산성 증진 생리활성 미생물의 특성규명	내산성 증진 생리활성미생물의 활력개선	기술의 문제점 보완
3. 복합 미생물 대량 발효기술	경제적인 산업용 배지 성분 탐색	Batch type fermenter를 이용한 개별 미생물 발효조건 확립	복합 미생물 대량 발효 및 특성규명	복합 미생물 대량 발효기술 확립	Scale up을 통한 복합 미생물 생균제 대량생산 공정 확립
4. 항생제 대체 복합 미생물 생균제	효모, 바실러스, 유산균, 대장균 등을 대상으로 생균제 후보 미생물 선발	선발된 미생물을 대상으로 항균력 및 내산성 증진 개량	항균력 및 내산성 증진 생리활성 미생물의 복합발효 생산	최적 복합발효 조건 확립	대량생산공정을 통한 산업화 및 제품출시
5. 고분자 제제의 최적화 및 제품화	천연고분자 및 합성고분자 선발	<i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 방출성 최적화	기술전수 및 제품화	제품화의 문제점 보완	제품화의 문제점 보완

2. 제2핵심 연구과제: 박테리오파지 기반의 동물질병 예방 및 치료용 생물활성제제의 개발

개발 기술(예, 기술에 대한 구체화)	목표(수준, 성능, 품질)				
	1차년도 (2010-2011)	2차년도 (2011-2012)	3차년도 (2012-2013)	4차년도 (2013-2014)	5차년도 (2014-2015)
1. Bio-Active Agent	대량생산 공정 구축 (4건)	제형 개발 (3종)/ 효능 검증	제품화 (2건)	제품의 다양화	제품의 다양화
2. 치료용 재조합 리신 제제	생산공정 구축 (2건)	대량생산 공정 구축 (2건)/ 제형 개발 (1종)	제제 개발	제품화	타 항생제와의 병용 제제 개발

3. 제3핵심연구과제: 항생제 대체 사료용 천연물질 개발 및 항생제 대체제 사양체계 개발

개발 기술(예, 기술에 대한 구체화)	목표(수준, 성능, 품질)				
	1차년도 (2010-2011)	2차년도 (2011-2012)	3차년도 (2012-2013)	4차년도 (2013-2014)	5차년도 (2014-2015)
1. 항생제 대체 해조류 부산물 사료첨가제	사료평가 및 알긴산 저분자화	면역기능 및 항병력 조사	축종별 효과 검증 및 제품화	제품 보완 및 기타 항균 및 면역증강용 천연물 소재 탐색	제품 보완 및 기타 항균 및 면역증강용 천연물 소재 탐색
2. 항생제 대체 느타리버섯 부산물 사료첨가제	사료평가 및 저장성 증진 방안 모색	면역기능 및 항병력 조사	축종별 효과 검증 및 제품화	제품 보완 및 기타 항균 및 면역증강용 천연물 소재 탐색	제품 보완 및 기타 항균 및 면역증강용 천연물 소재 탐색
3. 항생제 대체 마늘 부산물 사료첨가제	사료평가 및 기호성 조사	면역기능 및 항병력 조사	축종별 효과 검증 및 제품화	제품 보완 및 기타 항균 및 면역증강용 천연물 소재 탐색	제품 보완 및 기타 항균 및 면역증강용 천연물 소재 탐색
4. 항생제 대체 사료첨가제 사양시스템 구축	<i>In vivo</i> 프로토콜 작성을 위한 자료조사	<i>In vivo</i> 프로토콜 완성	실용화를 위한 사양시스템 구축	핵심과제별 출시 상품 사양시험 평가	핵심과제별 출시 상품 사양시험 평가

제2절 연차별 연구성과

1. 정량적 연구목표 및 성과

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	2					1	1		
	달성	2	3				5	5		
2차년도	목표	4	2				1	4	1	
	달성	6	2				3	2	1	
3차년도	목표	3	4					4	1	
	달성	1	6				1	4	1	
총계	목표	9	6				2	9	2	
	달성	9	11				9	11	2	

2. 연구종료 후 연구결과 활용성과

(단위 : 건수)

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	8	8		18		
	달성	2	24		20	15	

가. 제1핵심

(1) 기술실시(이전)

신규한 페디오코쿠스 아시딜락티시, 이의 제조방법 및 이를 이용한 가금 티푸스 예방 또는 치료용 조성물. 2013년 (주)에스앤마니커 (이지바이오 그룹) 기술이전 (선급기술료 : 3,000만원, 매출액 : 현재 약 13억원)

(2) 상품화

(가) 무항생제 친환경 닭고기 “닭터의 자연” - 에스앤마니커

(나) 무항생제 친환경 삼계탕 레토르트 제품 “닭터의 자연 삼계탕” - 에스앤마니커

(다) 바이오피드C 시제품 제조 (총 3종)

① formulation 1 : wild type 유산균/바실러스/효모

② formulation 2 : genome-shuffled 유산균/바실러스/효모

③ formulation 3 : genome-shuffled 유산균/바실러스/효모/*E. coli* nissle

(라) 바이오피드BC 시제품 제조 (총 2종)

① formulation 1 : wild type 유산균/바실러스/효모

② formulation 2 : genome-shuffled 유산균/바실러스/효모

나. 제2핵심

(1) 기술이전 및 상품화

(가) 생물활성제제 시제품 제조 (총 8종)

① 벡터페이즈: 육계용 및 오리용 분말형 사료첨가제

② 벡터페이즈 S: 산란계용 및 종계용 분말형 사료첨가제

③ 벡터페이즈 T: 양돈용 분말형 사료첨가제

④ 벡터페이즈 C: 송아지용 분말형 사료첨가제

⑤ 음수첨가제 I: 양돈용 및 양계용 액상형 음수첨가제

⑥ 음수첨가제 II: 양돈용 및 양계용 동결건조형 음수첨가제

⑦ PML100: 양돈용 및 양계용 액상형 소독제

⑧ 젓소유방염치료제

(나) 생물활성제제 상품화 (총 5종)

① 벡터페이즈: 육계용 및 오리용 분말형 사료첨가제

② 벡터페이즈 S: 산란계용 및 종계용 분말형 사료첨가제

③ 벡터페이즈 T: 양돈용 분말형 사료첨가제

- ④ 벡터페이즈 C: 송아지용 분말형 사료첨가제
- ⑤ LactoBoss: 양돈용 및 양계용 동결건조형 음수첨가제

다. 제3핵심

(1) 기술실시(이전)

(가) 천연물과 미생물 중 Securitor 및 SNU2 복합 미생물 제제. 2013년 (주)푸른들이엠사료 기술이전 (선급기술료 : 1,365만원)

(2) 상품화

(가) 친환경 사료첨가제 “바이오세큐Plus” - (주)푸른들 이엠사료

(나) 천연물 복합생균제 시제품 제조 (총 3종)

- ① formulation 1 : Securitor+SNU 2 (유산균/바실러스/효모) 복합 미생물 제제
- ② formulation 2 : Securitor+SNU 1 (유산균2종) 복합 미생물 제제
- ③ formulation 3 : 마늘 추출액+SNU 2 (유산균/바실러스/효모) 복합 미생물 제제

3. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	Characterization of <i>Staphylococcus aureus</i> derived from bovine mastitis and isolation of two lytic bacteriophages	손지수	최윤재	김은배, 이세정, 전수연, 윤성준, 강상현	J. Gen. Appl. Microbiol.	56(4)	국외	SCI
2010	Microencapsulation of live probiotic bacteria	모아매드 아리폴 이슬람	조종수	윤철희, 최윤재	J. Microbiol. Biotechnol.	20(10)	국내	SCI
2011	Comparison of the antibacterial properties of phage endolysins SAL-1 and LysK	전수연	강상현	정기모, 손지수, 윤성준, 최윤재	Antimicrob. Agents chemother.	55(4)	국외	SCI
2011	Recycling of Fermented Sawdust-based Oyster Mushroom Spent Substrate as a Feed Supplement for Postweaning Calves	김민국, 이홍구	최윤재	박정아, 강상기	Asian-Aust. J. Anim. Sci.	24(4)	국내	SCIE
2011	Effect of Feeding Direct-fed Microbial as an Alternative to Antibiotics for the Prophylaxis of Calf Diarrhea in Holstein Calves	김민국, 이홍구	최윤재	박정아, 강상기	Asian-Aust. J. Anim. Sci.	24(5)	국내	SCIE
2011	토종 육계에 있어서 복합 생균제 및 면역증강제의 항생제 대체 효과	이상범	이홍구	김병국, 박창호, 박건현, 김영성, 강한석, 김영철, 김윤철, 배승철, 김선구, 최윤재	한국동물자원 과학회	53(5)	국내	SCIE

2011	Mucoadhesive Alginate/Poly (L-Lysine)/Thiolated Alginate Microcapsules for Oral Delivery of <i>Lactobacillus Salivarius</i> 29	모하메드 이슬람 아리폴	조종수, 최윤재	프라티, 강상기, 윤철희, 김은미, 정환정, 김은배	J. Nanosci. Nanotech.	11(8)	국외	SCI
2012	Effect of Microencapsulation of <i>Lactobacillus Salivarius</i> 29 into Alginate / Chitosan / Alginate Microcapsules on Viability and Cytokine Induction	프라티	조종수, 최윤재	장도, 강상기, 이스람	J. Microencapsul.	29(5)	국외	SCI
2012	<i>Bacillus</i> strains as feed additives: <i>In vitro</i> evaluation of its potential probiotic properties	이재구, 박인경	조재순	최윤재	Rev. Colomb.Cienc. Pecu	25(4)	국외	SCIE
2013	Effect of Microencapsulation of <i>Lactobacillus plantarum</i> 25 into Alginate / Chitosan / Alginate Microcapsules on Viability and Cytokine Induction	장도	조종수, 최윤재	김유경, 강상기, 비제이 싱	J. Nanosci. Nanotech.	13(8)	국외	SCI
2013	A low-cost <i>Lactobacillus salivarius</i> L29 growth medium containing molasses and corn steep liquor allows the attainment of high levels of cell mass and lactic acid produciton	이기범	이기범, 최윤재	강상기	Afr. J. Biotechol.	12 (16)	국외	SCI
2013	Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1	전수연	강상현	정기모, 윤성준, 오명돈, 최윤재, 이우중, 공준찬, 설재구	Int. J. Antimicrob. Agents	41(2)	국외	SCI
2013	팽이버섯 균사체의 급여가 닭고기의 이화학적 특성과 영양성분에 미치는 영향	이상범	이홍구	김지희, 정수연, 왕도, 조성근, 신태순, 강한석, 김윤철, 김선구	한국생명과학회지	Manuscript No. JLS_130108	국내	

4. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록 연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	경구투여용 마이크로캡슐 및 이의 제조방법	최윤재, 조종수, 강상기, 모아메드 아리폴 이슬람	대한민국	10-2011-0041930	2010	박테리오파지 유래 용균단백질 작용에 의해 제조된 세균과쇄물 및 이를 포함하는 동물질병 예방용 백신조성물	(주)인트론바이오테크놀로지	대한민국	10-0974185

2011	Method for prevention and treatment of infection of Salmonella Choleraesuis or Salmonella Dublin	iNtRON Biotechnology, Inc.	PCT	PCT/KR2011/004066	2010	엔테로코쿠스 및 스트렙토코쿠스 특이적 사멸능을 갖는 신규한 리신 단백질	(주)인트론바이오테크놀로지	대한민국	10-0988771
2011	Method for prevention and treatment of Salmonella infection	iNtRON Biotechnology, Inc.	미국	US 13/176,458	2011	박테리아 특이적 넓은 항균 활성을 갖는 신규한 리신 단백질	(주)인트론바이오테크놀로지	대한민국	10-1016918
2011	Method for prevention and treatment of Salmonella Typhimurium infection	iNtRON Biotechnology, Inc.	PCT	PCT/KR2011/006728	2011	Podoviridae bacteriophage having killing activity specific to Staphylococcus aureus	iNtRON Biotechnology, Inc.	미국	US patent 8,043,613
2011	살모넬라 티피무륨 감염을 방지 및 치료하는 방법	인트론바이오테크놀로지	대한민국	10-2011-0091699	2011	Bacteriophage having killing activity specific to Staphylococcus aureus	iNtRON Biotechnology, Inc.	미국	US patent 8,071,352
2012	신규한 페디오코커스 아시딜락티시, 이의 제조방법 및 이를 이용한 가급티푸스 예방 또는 치료용 조성물	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0045661	2011	유효성분으로 박테리오파지를 포함하는 선박평형수 처리용 조성물 및 이를 이용한 선박평형수에 존재하는 박테리아의 생물학적 제거방법	인트론바이오테크놀로지	대한민국	10-1021041
2012	신규한 락토바실러스 플라타룸, 이의 제조방법 및 이를 이용한 대장균성설사병 예방 또는 치료용 조성물	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0045662	2011	Novel lysin protein having broad antibacterial activity specific to bacteriophage	iNtRON Biotechnology, Inc.	미국	US patent 8,066,990
2012	락토바실러스 살리바리우스 29의 마이크로캡슐화	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0043850	2012	Antimicrobial protein specific to <i>Staphylococcus aureus</i>	iNtRON Biotechnology, Inc.	미국	US patent 8,232,370
2012	락토바실러스 속 미생물의 마이크로캡슐화	서울대학교 산학협력단	대한민국	10-2012-0067349	2012	A composition for the treatment of ballast water containing bacteriophage as an effective component and biological method with the same for	iNtRON Biotechnology, Inc.	미국	US patent 8,329,165

						removing bacteria present in ballast water			
					2013	Bacteriophage or lytic protein derived from the bacteriophage which effective for treatment of <i>Staphylococcus aureus</i> biofilm	iNtRON Biotechnology, Inc.	미국	US patent 8,377,431
					2013	Antimicrobial protein derived from Podoviridae bacteriophage specific to <i>Staphylococcus aureus</i>	iNtRON Biotechnology, Inc.	미국	US patent 8,377,866

5. 기술료 징수 현황

	기술명	기징수액	향후 징수액	합계
제1핵심	신규한 페디오코커스 아시딜락티시, 이의 제조방법 및 이를 이용한 가금 티푸스 예방 또는 치료용 조성물	3,000만원	매출액의 1% 경상기술료 징수예정	3,000만원+매출액의 1%
제3핵심	천연물과 미생물 중 Securitor 및 SNU2 복합 미생물 제제	1,365만원	해당사항없음	1,365만원

6. 사업화 현황

가. 제1핵심

서울대학교와 마니커의 합작회사인 에스앤마니커에 기술이전을 통해 무항생제 친환경 닭고기인 “닭터의 자연”과 삼계탕 레토르트 제품인 “닭터의 자연 삼계탕” 생산

나. 제2핵심

(주) 인트론바이오테크놀로지에서 자체사업화를 통해 육계용 및 오리용 분말형 사료첨가제(백터페이즈), 산란계용 및 종계용 분말형 사료첨가제(백터페이즈S), 양돈용 분말형 사료첨가제(백터페이즈T), 송아지용 분말형 사료첨가제(백터페이즈C), 양돈용 및 양계용 동결건조형 음수첨가제(LactoBoss) 생산

다. 제3핵심

(주)푸른들이엠사료에 기술이전을 통해 친환경 사료첨가제인 “바이오세큐Plus” 생산

7. 인력활용/양성 성과

가. 인력지원 성과

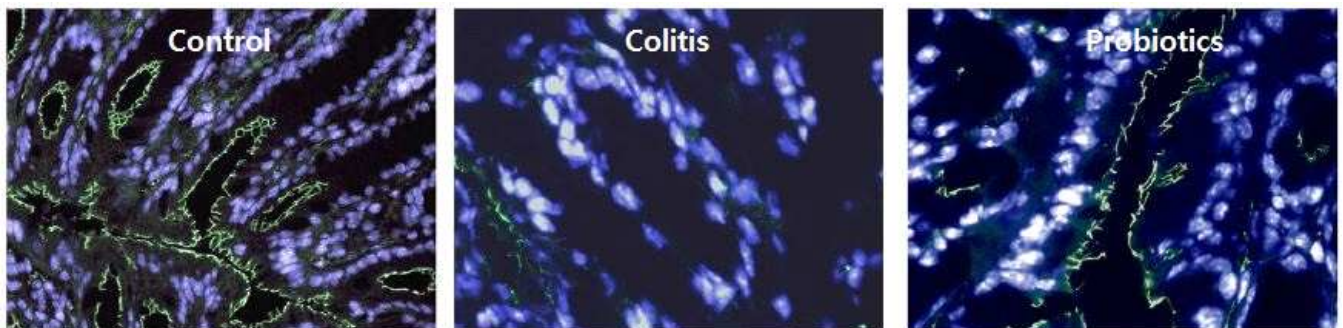
구분	지원 총인 원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
1차 년도	6	3	2		1	6		4		2
2차 년도	7		6		1	3	4	4		3
3차 년도	7	2	4		1	4	3	5		2
총계	20	5	12	0	3	13	7	13	0	7

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 유산균, 바실러스, 효모, *E. coli* 등 생균제 관련 해외과학기술 정보

생균제로 이용되는 유산균은 FDA에서 지정한 안전하다고 여겨지는 수준인 GRAS(generally recognized as safe)로 알려져 있다. 이들의 역할은 다양하지만 주로 병원성 세균이 소화관 상피에 부착하는 것을 방해하여 epithelial cell이 무너지거나 질병이 발생하는 것을 막아주며, 유산균에 의해 생성된 항생물질은 병원성 미생물이나 장내 유해균을 죽이거나 증식을 억제하는 효과가 있다. Schiffrin 등에 따르면 유산균은 면역세포를 활성화하여 유해균의 포식작용을 돕는 기능이 있으며 최근 국제학술지인 American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver physiology 에 발표된 논문에 의하면 Mennigen 등은 복합미생물 생균제를 인위적으로 대장염이 유발된 mouse에게 급여했을 때 epithelial cell의 구조를 유지하고 세포간 물질이동을 조절하는 tight junction protein이 보호되는 효과를 관찰하였다고 하였다. 따라서 본 연구에서 사용된 것처럼 복합미생물 생균제는 외부로부터 침입한 유해균으로부터 host의 소화장관을 보호하여 epithelial cell barrier가 손상되는 것을 막으며 면역세포를 활성화 하여 침입한 병원균을 빠르게 제거함으로써 질병의 예방과 건강을 증진 시킬 수 있는 가능성을 시사한다.



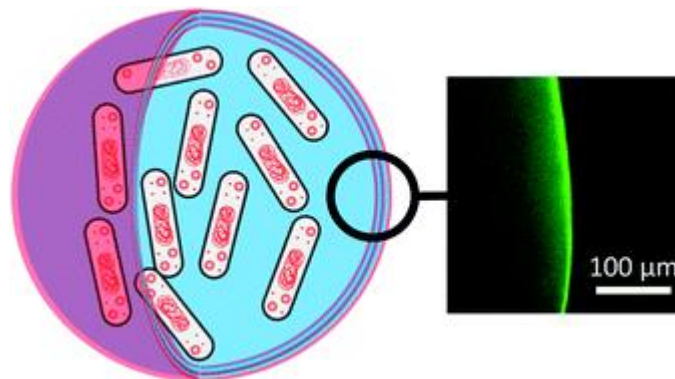
복합미생물 생균제를 대장염이 유발된 mouse에 급여 시 Tight junction의 보호 효과

출처: Mennigen et al., 2009

Bacteroidetes 와 Firmicutes 박테리아 그룹들의 비율은 장내에서 영양소 흡수 능력에 영향을 줄 수 있다. 연구진은 생균제로써 *Bacillus subtilis*의 효과를 조사하기 위하여 생균제 급여 시 성장수준, 지방조성, 혈중지질, 분에서 Bacteroidetes 와 Firmicutes의 분포 및 mRNA의 발현에 대하여 연구하였다. 실험동물로는 Duroc x Meishan 교잡종으로 8주령인 돼지(10.28 ± 0.59 kg) 24마리 사용하였고, 급여 식단은 두 가지로 옥수수과 대두를 기반으로 *B. subtilis* 생균제를 급여한 그룹과 급여하지 않은 대조군 그룹으로 나누었다. 생균제의 급여는 평균일당증체량과 사료요구율의 상당한 증가를 유도하였다. 생균제가 급여된 경우 등지방 두께의 평균이 증가와 동시에 leaf lard weights는 감소하였다. 프로바이오틱스의 섭취는 혈중 중성 지방과 포도당 농도를 감소하지만, 총 콜레스테롤과 혈청 지방산의 수준을 변경하지 않았다. 지방산 합

성 효소 (FAS)와 간에서 아세틸 - CoA의 carboxylase α (ACCa)의 mRNA 발현은 생균제의 급여로 하향 조절되었다. 반대로 지방조직에서 FAS 와 ACCa 의 유전자 발현은 증가되었다. 생균제 급여 식단은 분변 성분 중에서 Bacteroidete 들의 복제 수나 그 비율을 감소시키면서, Firmicutes의 비율은 증가하게 하였다. 본 연구진은 *B. subtilis*가 장에서 Bacteroidetes 와 Firmicutes의 비율을 조절 함으로써 돼지의 성장 수준 및 지방대사에 영향을 준다고 결론을 내렸다. (출처: Cui et al., 2013)

생균제의 저장 및 가공 과정에서 안정성을 부여하고 소화 기관 내에서 pH와 소화 효소에 의한 분해를 막기 위해 코팅하는 다양한 기술에 대해 오랜 기간 연구 되어 왔다. 특히 알지네이트는 가장 일반적인 코팅용 고분자로서 가볍게 젤화되기 때문에 GRAS의 활성화에 큰 영향을 미치지 않으며 독성도 낮다. Kim 등의 연구에 따르면 *L. acidophilus*를 알지네이트로 코팅하였을 때 소화장관 조건에서 생존률을 높이며 콜레스테롤에 의한 분해율을 낮춘다고 하였다. 또한 생균제가 소장 상피세포 (HT-21)에 부착하는 효율에 거의 차이를 보이지 않는 실험결과를 통해 colonization에 부정적인 영향이 없다는 점을 증명하였다 (Kim et al., 2008) 키토산은 알지네이트와 함께 가장 대중적인 코팅 물질 중 하나로, 위산 환경에서 생균제를 보호한다고 알려져 있다. Cook 등에 따르면 알지네이트로만 코팅하는 것보다 키토산으로 한 겹 더 코팅하는 것이 생균제의 생존률을 높이고, 건조 중에 보호 효과를 나타낸다고 한다 (Cook et al., 2013). 따라서 알지네이트와 키토산의 장점을 결합하여 multi-layer로 디자인 한 본 연구의 코팅제는 하나의 물질만 이용하는 것에 비해 큰 상승효과를 가져올 것으로 기대된다.



*B. brevis*의 키토산-알지네이트 코팅

출처 : Cook et al., 2013

2. 박테리오파지 관련 해외 과학기술정보

가. 미국 FDA GRAS에 박테리오파지 등재

미국 FDA(United States Food and Drug Administration)는 다수의 사례들에서 박테리오파지를 Generally Recognised As Safe(GRAS)로 인정하고 있다. 이는 박테리오파지의 안전성을 보여 주는 대표적인 사례라 할 수 있다. 미국 FDA의 경우, 박테리오파지 관련 다수의 GRAS No.가 공지되어 있으며, 예로서 치즈에서 *L. monocytogene* 균을 control하기 위한 박테리오파지

과지, meat product에서 살모넬라균을 제거하기 위한 항균제 용도로 사용하는 박테리오파지 및 일반 식품에서 *E. coli* O157:H7 균을 제거하기 위한 목적으로 사용하는 박테리오파지가 있음.

GRAS Notice Inventory
 FDA Home | GRAS Notice Inventory | GRAS Notice Inventory | GRAS Detail

GRN No. 198
 EBI Food Safety B.V.
 Johan v. Oldenbarneveltlaan 9, 2582 NE Den Haag, The NETHERLANDS
 Return to Listing

Substance: Bacteriophage P100 preparation from *Listeria innocua*
Intended Use: Antimicrobial to control *Listeria monocytogenes* in brie, cheddar, Swiss, and other cheeses that are normally aged and ripened
Basis: Scientific procedures
Date of filing: 20-APR-06
Date of closure (select to view letter): 17-OCT-06
GRAS Notice (disclosable information): GRN 198

Page Last Updated: 01/31/2013
 Note: If you need help accessing information in different file formats, see Instructions for Downloading Viewers and Players.

나. 미국 농림부 박테리오파지 활용

또한, 미국농림부(USDA, United States Department of Agriculture) 산하의 식품안전검사국(Food Safety and Inspection Service, FSIS)은 지침서를 통해 박테리오파지가 "Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products"임을 인정한다(USDA의 FSIS directive, 7120.1 Revision 13). 이는 사람이 직접 섭취하는 축산물 생산에 박테리오파지를 활용하더라도 문제가 없을 만큼 박테리오파지가 안전함을 보여주는 사례라 할 수 있다.

USDA (United States Department of Agriculture)
 Food Safety and Inspection Service

MISSION STATEMENT: The Food Safety and Inspection Service (FSIS) is the public health agency in the U.S. Department of Agriculture responsible for ensuring that the nation's commercial supply of meat, poultry, and egg products is safe, wholesome, and correctly labeled and packaged.

Advisory Committees
 FSIS engages the National Advisory Committees on:
 • Meat and Poultry Inspection (NACMPI)
 • Microbiological Control for Poultry (NACMCP)

Faces of Food Safety
 Consumer confidence in our food supply comes as a result of the work of the men and women of FSIS. "Faces of Food Safety" introduces you to employees who play a key role in making our food safe.

Civil Rights Information
 Includes Civil Rights Division contacts and programs, provides information on receiving discrimination and sexual harassment complaints.
 • Special Employment Events

Structure & Organization
 Includes frontline contact information as well as a listing of the different offices that make up the Food Safety and Inspection Service.

Faces of Food Safety

Table 2. Table of Safe and Suitable Ingredients

SUBSTANCE	PRODUCT	AMOUNT	REFERENCE	LABELING REQUIREMENTS
Antimicrobials				
Bacteriophage preparation (<i>Salmonella</i> targeted)	On the hides of live animals in the holding pens prior to slaughter	Applied as a spray mist or wash	Acceptability determination	None under the accepted conditions of use (1)
Bacteriophage preparation (<i>E. coli</i> O157:H7 targeted)	On the hides of live animals (cattle) in the holding pens prior to slaughter and hide removal	Applied as a spray, mist, rinse or wash to the hides of live animals (cattle) within lairage, restraining areas, stunning areas, and other stations immediately prior to hide removal.	Acceptability determination	None under the accepted conditions of use (1)
Bacteriophage preparation (<i>Salmonella</i> targeted)	On the feathers of live poultry prior to slaughter	Applied as a spray mist or wash	Acceptability determination	None under the accepted conditions of use (1)
Bacteriophage preparation (a)	Various RTE meat and poultry products	Applied as a spray at a level not to	21 CFR 172.785	Listed by common or usual name (i.e.,

다. 유럽 및 캐나다 등

이외에, 유럽식약청(European Food Safety Authority, EFSA), 캐나다 보건부(Health Canada) 및 호주 뉴질랜드 식품기준청(Food Standards Australia New Zealand, FSANZ)이 박테리오파지의 안전성을 인정하여 축산물의 "processing aid"로서 박테리오파지가 적합함을 승인한 바도 있다(EFSA Journal 2012; 10(3): 2615; Health Canada File No. ADDPS09060102;

라. 식품 관련 제품 허가 사례

미국의 Intralytix社의 ListShield™는 2006년 8월 USFDA와 USDA로부터 식품첨가제로서 사용이 승인된 바 있으며(21 CFR §172.785.), 이에 따라 현재 햄버거 등의 즉석 섭취(Ready-to-eat) 식품에 첨가되고 있다.



또한, ListShield™는 USEPA(U.S. Environmental Protection Agency)로부터 식품 관련 시설 및 설비 표면에서의 적용도 승인받은 바 있다(EPA registration #74234-1).

한편, ListShield™는 0.1%의 독성도 없음을 의미하는 유대교식품적법인증(KOSHER)을 받았으며, 이슬람음식 및 영향협회(HALAL, IFANCA)와 유기자재심사협회(OMRI-listed) 인증도 받은 바 있다. 이는 박테리오파지를 식품 분야에 사용해도 안전함을 보여 주는 것이다.

제품명: LISTEX™

제품설명:

- ① 네덜란드 기업인 Microos社에서 출시
- ② 식품 또는 식품가공 시 *Listeria monocytogenes* 오염을 방지하기 위한 제품
- ③ 미국, 캐나다, 독일, 스위스에서 품목허가

제품명: EcoShield™

제품설명:

- ① 미국 Intralytix社에서 출시
- ② 식품 또는 식품가공 시 *E. coli O157:H7* 오염을 방지하기 위한 제품
- ③ 본 제품 사용 시 다양한 식품에서 *E. coli O157:H7* 오염률을 95-100% 저감시킬 수 있음
- ④ 본 제품은 미국에서 허가를 받아 시판 중에 있으며, 식품과 직접적으로 닿는 물질 중 신규한 경우 FDA 규정에 적합한지를 판단하는 FCN(Food Contact Notification)을 수행하여 안전성을 인정받은 바 있음



EcoShield™ (formerly ECP-100) is a unique and proprietary blend of three individual phages. EcoShield™ is FDA-cleared as "Food Contact Notification" or FCN, for use on red meat parts and trim intended to be ground (FCN No. 1018)

- ⑤ 그 외 다양한 인증(Star K-certified kosher, IFANCA-certified halal)을 획득한 바 있음



제품명: SalmoFresh™

제품설명:

- ① 미국 Intralytix社에서 출시
- ② 식품 또는 식품가공 시 *Salmonella* spp. 오염을 방지하기 위한 제품
- ③ 본 제품은 미국에서 허가를 받아 시판 중에 있음

SalmoFresh™, which is FDA-approved as GRAS (Generally Recognized As Safe), is specifically designed for treating foods that are at high risk for *Salmonella* contamination



- ④ 그 외 다양한 인증(Star K-certified kosher, IFANCA-certified halal)을 획득한 바 있음

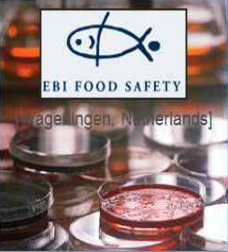


마. 축산분야에서의 박테리오파지 활용 예


축산물 육가공 분야에서도 박테리오파지 관련 항균 물질들이 다양하게 활용되고 있다.

Food/meat production processing

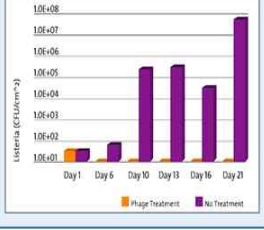


EBI FOOD SAFETY
[agellingen, Netherlands]



- Prevention of the outgrowth of *Listeria* strains on food during processing (cheese production; cooked, fresh and Ready-to-heat meat products)

LISTEX™ P100




Day	Phage Treatment	No Treatment
Day 1	~10 ^{0.0}	~10 ^{0.0}
Day 6	~10 ^{0.0}	~10 ^{1.5}
Day 10	~10 ^{0.0}	~10 ^{5.0}
Day 13	~10 ^{0.0}	~10 ^{5.0}
Day 16	~10 ^{0.0}	~10 ^{4.5}
Day 21	~10 ^{0.0}	~10 ^{7.5}

The graph demonstrates recent results of successful eradication of *Listeria* in a cheese production environment

축사나 가축 주변에의 박테리아 오염 제어 목적으로 박테리오파지가 포함된 제품들의 사용이 허가되어 있다.

Applications for veterinary




OMNILYTICS™
THE PHAGE COMPANY
[Salt Lake City, U.S.A.]

BacWash™: Utilized to reduce the level of *Salmonella* contamination on the hides of livestock

Bacteriophages have been reported to be a safe and effective preventive/treatment modality against numerous bacterial infections of animals. Some examples would include:

- Salmonella* infections in poultry
- Escherichia coli* infections in mice, poultry, calves, piglets, and lambs
- Clostridium difficile* infections in hamsters
- Acinetobacter baumannii* infections in mice
- Pseudomonas aeruginosa* infections in mice
- Staphylococcus aureus* infections in mice and cows






Intralytix, Inc.

The company has developed and licensed bacteriophage-based animal health care products effective against *Salmonella* (SPLX-1™ and PLSV-1™) and *Clostridium perfringens* (INT-401™) in poultry.

바. 농업 분야에서의 박테리오파지 사례

농약 대체 제품으로 박테리오파지 관련 제품들이 허가 된 사례도 있다.

Applications in agriculture




[Salt Lake City, U.S.A.]

AgriPhage™: Prevents and controls harmful bacteria on plants

[Customer success stories]

Jan. 2006 Patrick Mobley
Mobley Greenhouses, Moultrie, GA

“We tried **AgriPhage** in a few of our houses, and felt like we finally had a good alternative to copper that was safe and effective.....Many of our customers in the area, including our own field operation, have begun using AgriPhage in the fields, and have seen **positive results controlling bacteria in the fields.**”



사. 의약품으로서 박테리오파지 활용 사례

박테리오파지를 유효성분으로 포함한 제품들이 의약품으로도 개발되고 있으며, 미국의 경우 인체 대상 의약품으로 임상시험이 허가된 다수의 사례들이 있다. 임상시험 승인은 그 안전성이 동물시험에서 충분히 확보되었을 때에만 승인이 된다는 점을 고려하면 이러한 임상시험 승인 사례들은 박테리오파지의 안전성을 입증하는 주요한 사례들이라 할 수 있다.

인체 대상 의약품으로 임상시험이 미국 FDA로부터 허가된 다수의 사례들이 있다. 다음은 미 국립보건원(National Institute of Health, NIH)에서 제공하는 박테리오파지가 적용된 의약품들의 임상시험 승인 목록의 일부이다.

Rank	Status	Study
2	Unknown †	<p>Experimental Phage Therapy of Bacterial Infections</p> <p>Condition: Bacterial Infections</p> <p>Intervention: Other: Bacteriophage preparation</p>
3	Completed	<p>A Prospective, Randomized, Double-Blind Controlled Study of WPP-201 for the Safety and Efficacy of Treatment of Venous Leg Ulcers</p> <p>Condition: Venous Leg Ulcers</p>
4	Recruiting	<p>Antibacterial Treatment Against Diarrhea in Oral Rehydration Solution</p> <p>Condition: Diarrhea</p> <p>Interventions: Other: T4 phage cocktail test; Other: Commercial T4 phage cocktail; Other: standard oral rehydration solution (ORS)</p>

미국 FDA의 임상시험 승인 사례 중 대표 사례로 네슬레(Nestle)사가 실시하고 있는 영유아 대상의 경구투여형 설사증 치료제의 임상시험 사례를 제시할 수 있다. 네슬레사는 병원성 대장균인 ETEC 및 EPEC로 인해 설사를 앓고 있는 영유아들(6-24 개월)을 대상으로 임상시험을

실시하고 있다. 5일 간 *E. coli* specific bacteriophage(10^6 pfu/ml)를 어린 아이들에게 경구투여 후 안전성 및 효과를 검증하는 임상시험으로 2014년 10월에 종료 예정이다. 본 임상시험 사례는 영유아에게까지도 경구투여를 할 만큼 박테리오파지가 안전하다는 것을 보여준다.

ClinicalTrials.gov
A service of the U.S. National Institutes of Health

Search for studies: Search

Advanced Search | Help | Studies by Topic | Glossary

Find Studies | About Clinical Studies | Submit Studies | Resources | About This Site

Home > Find Studies > Search Results > Study Record Detail

Trial record for: bacteriophage

Antibacterial Treatment Against Diarrhea in Oral Rehydration Solution

This study is currently recruiting participants. Verified June 2012 by Nestlé

Sponsor: Nestlé

Information provided by (Responsible Party): Nestlé

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00937274

First received: July 8, 2009
Last updated: June 21, 2012
Last verified: June 2012
History of Changes

- 본 임상시험은 미 FDA 승인 하에 ETEC 및 EPEC로 인한 diarrhea children (6-24 month)을 대상으로 실시되고 있음
- 5일 간 *E. coli* bacteriophage (10^6 pfu/ml)를 어린 아이에게 경구투여 후 safety 및 effect를 검증하는 임상시험임
- Sponsor: Nestlé
- Estimated Study Completion Date: October 2014

Descriptive Information

Brief Title ICMJE: Antibacterial Treatment Against Diarrhea in Oral Rehydration Solution

Official Title ICMJE: Randomized, Double Blind Placebo-controlled Study to Evaluate the Effect of an Orally-fed Escherichia coli (E. coli) Phage on the Management of ETEC and EPEC Induced Diarrhea in Children

Brief Summary: This study hopes to demonstrate the potentials of a new form of therapy for childhood diarrhea, a major cause of morbidity and deaths in Bangladesh and other developing countries, and thus a priority for improving child health.

Intervention ICMJE:

- Other: T4 phage cocktail test
- T4 phages 106 PFU/ml up to 5 days
- Other: Commercial T4 phage cocktail
- Treatment as recommended by the manufacturer (Microgen phages)
- Other: standard oral rehydration solution (ORS)

Eligibility Criteria ICMJE:

Inclusion Criteria

- Sex: male
- Age: 6 - 24 months
- 3. Better nourished (weight for age > 60 NCHS median)
- 4. H/o diarrhea of less than 48 hours
- 5. Written informed consent from either parents/guardian (thumb impression for those who are not literate) for children
- 6. Negative test results for dark field microscopy of Vibrio cholerae and ELISA test for rotavirus in initial stool samples

그루지아에서는 1940년대부터 다양한 형태의 박테리오파지 기반의 제제들을 임산부 및 어린 아이들에게까지도 복용하게 하고 있다. 한 예로, 그루지아의 JSC Biochimpharm社에서 판매하고 있는 박테리오파지 기반의 인체용 의약품들은 다음과 같다.

Trade name	Therapeutic indications	Administration method
Phagesti	Treatment and prophylaxis of gastro intestinal infections, caused by the following microorganisms - Shigella, Salmonella, E. coli, Proteus, Staphylococcus, Pseudomonas, Enterococcus and their combinations.	Oral or rectum administration (Sterile liquid 20 ml in vials)
Phagyo	Treatment and prophylaxis of bacterial purulent-inflammatory infections, caused by the following microorganisms; Streptococcus, Staphylococcus, E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus and their combinations	
Phagedys	Treatment and prophylaxis of dysentery, caused by the Shigella in all age and high risk groups	Tablet (~0.13 g)
Phagetyph	Treatment and prophylaxis of enteric fever, caused by the Salmonella in all age and high risk groups	
Phagestaph	Treatment and prophylaxis of bacterial purulent-inflammatory infections, caused by the - Staphylococcus aureus	Oral or rectum administration (Sterile liquid 20 ml in vials)
PHAGESAL	Treatment and prophylaxis of Salmonellosis, caused by the Salmonella groups: A,B,C,D,E	Tablet (~0.13 g)
PHAGEPY	Treatment and prophylaxis of bacterial purulent-inflammatory infections, caused by the - Pseudomonas aeruginosa	Oral or rectum administration (Sterile liquid 20 ml in vials)

3. 항생제 대체 천연물 사료첨가제 관련 해외 과학기술정보

면역계는 외부 이물질로부터 생체를 방어하며 그 중 면역세포들은 외부 자극이 있지 않은

이상 휴지기에 머무르고 있으며 다양한 종류의 자극에 의해 증식, 분화 및 작용기전이 조절되고 활성화된다. 이런 관점에서 질병상태는 면역 반응성이 저하된 상태라고 전제되며 이 면역반응을 증진시킬 수 있는 물질, 즉 면역증강제를 적용하여 면역반응성을 활성화시킴으로써 질병을 예방 또는 치료할 수 있다. 1970년대 이후 세균제, 균사체, glucan 등이, 1980년대부터는 cytokine, lymphokines, growth factor 등이 연구되어 왔으나, 기대 이하의 효과와 독성 등 많은 문제점들이 제기되었다. 이에 독성이 거의 없고 여러 면역세포를 자극하여 cytokine을 유도할 수 있는 천연물이 주목하게 되었다. 국외의 경우에 있어 미역의 알긴산(Otterlei et al., 1991), 마늘의 알리신(Keiss et al., 2003), 표고버섯 다당체의 lentinan(Murata et al., 2002), 침엽수의 피톤치드(Li et al., 2009) 등 무수한 연구자들이 인수공통을 대상으로 면역증강제 개발을 진행하고 있다. 따라서 본 과제에서 연구된 것처럼 복합생균제/천연물 혼합제제는 휴지기의 면역세포들을 자극하여 면역반응성을 활성화시킴으로써 질병을 예방할 수 있는 가능성을 제시하였으며, 이는 곧 가축의 폐사율을 감소시키고 생산성을 증진시킬 수 있음을 시사한다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

제1절 주요활용 시설 및 장비 현황

1. 주요 활용 시설

시설명	면적(평)	위치	활용가능내용
동물세포공학연구실	25	서울대학교 200동 4204호	Bacteriophage 및 동물세포배양 관련 연구
미생물 자원 연구실	15	서울대학교 200동 1034호	유산균 및 미생물 관련 연구
미생물 자원 생산 연구실	15	서울대학교 200동 1035호	생균제 미생물 발효 및 생산
동물세포배양실	5	서울대학교 200동 4206호	동물세포배양 전용 연구
생체고분자 및 조직공학연구실	25	서울대학교 200동 5211호	고분자합성 및 물성실험, 약물의 담지와 방출실험
세미나실	25	서울대학교 200동 4214호	연구보고, 운영회 개최
농생명과학공동기기원(NICEM)	300	서울대학교 201동	NMR, DLS, AFM, confocal laser scanning microscope, SEM, TEM
연구소	49.2	(주)인트론바이오테크놀로지	실험 및 연구
공장 1	70	(주)인트론바이오테크놀로지	시제품 및 출시제품 제조
공장 2	70	(주)인트론바이오테크놀로지	시제품 및 출시제품 제조
사무실	98.4	(주)인트론바이오테크놀로지	사무업무
동물영양생리 및 단백질 연구실	30	부산대학교 생명자원과학대학 3322호	혈액 분석 연구, 항생제 대체 물질 개발 연구, 미생물 배양 실험
세포배양실	10	부산대학교 동물영양생리 및 단백질 연구실 3322호	Cell culture
실험 준비실	10	부산대학교 동물영양생리 및 단백질 연구실 3322호	실험실원 연구 준비
암실	5	부산대학교 동물영양생리 및 단백질 연구실 3322호	Western Blotting 및 암실 활용
세미나실	20	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	실험실 임원 과제 수행 점검 및 발표
청정실험동물센터	50	부산대학교 청정실험 동물센터 연구동	무균동물 <i>In vivo</i> 실험, 대사실험
합계	822.6		

2. 주요 활용 연구기기

구분 (보유/활용)	기기현황			기기책임자	
	기기명	수량	설치장소	성명	사업단참여
보유	Real-time PCR machine	1	서울대학교 농생대 200-4204호	최윤재	참여
보유	Gene electrophorator	1	서울대학교 농생대 200-4204호	최윤재	참여
보유	CO2-humidified incubator	3	서울대학교 농생대 200-4206호	최윤재	참여
보유	Fermenter	1	서울대학교 농생대 200-4204호	최윤재	참여
보유	Deepfreezer	2	서울대학교 농생대 200-4204호	최윤재	참여
보유	Gel-document system	1	서울대학교 농생대 200-4204호	최윤재	참여
보유	Fluorescent microscopy	1	서울대학교 농생대 200-4206호	최윤재	참여
활용	Confocal	1	서울대학교 농생대 201-210호	조종수	참여
활용	SEM TEM	1	서울대학교 농생대 201-211호	조종수	참여
보유	Deep freezer	1	서울대학교 농생대 200-5211호	조종수	참여
보유	Ultracentrifuge	1	서울대학교 농생대 200-5211호	조종수	참여
보유	CO ₂ incubator	2	서울대학교 농생대 200-5211호	조종수	참여
활용	DLS	1	서울대학교 농생대 201-207호	조종수	참여
활용	AFM	1	서울대학교 농생대 201-211호	조종수	참여
보유	Deep Freezer	1	(주)인트론바이오테크놀로지	박지성	미참여
보유	FPLC system	1	(주)인트론바이오테크놀로지	박상균	참여
보유	Fermenter	1	(주)인트론바이오테크놀로지	백형록	참여
보유	Water purification system	1	(주)인트론바이오테크놀로지	박보나	미참여
보유	High speed centrifuge	1	(주)인트론바이오테크놀로지	정기모	참여
보유	Freezer Dryer	1	(주)인트론바이오테크놀로지	최윤혁	미참여
활용	자동혈액분석기	1	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
활용	가스크로마토그래피	1	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
보유	단백질분석기	1	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
보유	혈액자동분석기	1	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
보유	PCR Work star ion System	1	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
보유	원심분리기	2	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
보유	Clean Bench	2	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
보유	Shaking Incubator	1	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
보유	이산화탄소배양기	1	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
보유	미량원심분리기	1	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
보유	형광디지털카메라	1	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
보유	실체 현미경	2	부산대학교 생명자원과학대학 3346호	이홍구	참여
합계		39			

제 8 장 참고문헌

- Cui C, Shen CJ, Jia G, and Wang KN. (2012). Effect of dietary *Bacillus subtilis* on proportion of Bacteroidetes and Firmicutes in swine intestine and lipid metabolism. *Genetics and molecular research*. 12(2): 1766-1776.
- Choi JH, Choi SJ and Kim YH. (2008). Hydrodechlorination of 2,4,6-trichlorophenol for a permeable reactive barrier using zero-valent iron and catalyzed iron. *Korean J. Chem. Eng.* 25: 493-500.
- Chateau N, Castellanos I and Deschamps AM. (1993). Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of a commercial probiotic consortium. *Journal of Applied Microbiology*. 74(1): 36-40.
- Chen H, Xu H, Dong J, Li J and Ghishan FK. (2009). Tumor necrosis factor- α impairs intestinal phosphate absorption in colitis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 296: 775 - 781.
- Cook MT, Tzortzis G, Khutoryanskiy VV and Charalampopoulos D. (2013). Layer-by-layer coating of alginate matrices with chitosan - alginate for the improved survival and targeted delivery of probiotic bacteria after oral administration. *Journal of Materials Chemistry B*. 1(1): 52-60.
- Dinleyici EC, Eren M, Ozen M, Yargic ZA and Vandenplas Y. (2012). Effectiveness and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute infectious diarrhea. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 12: 395 - 410.
- David LN and Michael MC. (2008). *Lehninger principles of biochemistry*, New York: W. H. Freeman and Company. 291.
- Enioutina EY, Visic D, McGee ZA and Daynes RA. (1999). The induction of systemic and mucosal immune responses following the subcutaneous immunization of mature adult mice: characterization of the antibodies in mucosal secretions of animals immunized with antigen formulations containing a vitamin D3 adjuvant. *Vaccine*. 17: 3050-3064.
- Francoeur C, Escaffit F, Vachon PH and Beaulieu JF. (2004). Proinflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ alter laminin expression under an apoptosis-independent

mechanism in human intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*. 287: 592 - 598.

- Hironobu I and Tetsuya O. (2011). The Mechanisms of UV Mutagenesis, *J. Radiat. Res.* 52: 115-125.
- Gong J, Zheng H, Wu Z, Chen T and Zhao X. (2009). Genome shuffling: Progress and applications for phenotype improvement. *Biotechnology Advances*. 27: 996-1005.
- Joshi DS, Singhvi MS, Khire JM and Gokhale DV. (2010). Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for D-lactic acid production, *Biotechnol Lett.* 32: 517-520.
- Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T, Haffner T, Trueman L, Auger J, Kahane R and Vollmar AM. (2003). Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF-kappaB activity. *Journal of Nutrition*. 133: 2171-2175.
- Kim KJ, Choi MJ and Lee KS. (2005). Antimicrobial, antihypertensive and anticancer activities of garlic extracts. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 37: 228-232.
- Kim SI, Yim SH, Sohn DW, Lee SJ, Ha US, Han CH and Cho YH. (2009). Preventive effect on inflammation and anti-inflammatory and anti-microbial effects of garlic extract in a rat model of chronic bacterial prostatitis. *Korea Journal of Urology*. 50: 602-608.
- Kornegay ET, Rhein-Welker D, Lindemann MD and Wood CM. (1995). Performance and nutrient digestibility in weanling pigs as influenced by yeast culture additions to starter diets containing dried whey or one of two fiber sources. *Journal of animal science*. 73: 1381-1389.
- Lee BJ, La T, Mikosza ASJ, and Hampson DJ. (2000). Identification of the gene encoding BmpB, a 30 kDa outer envelope lipoprotein of *Brachyspira* (Serpulina) *hyodysenteriae*, and immunogenicity of recombinant BmpB in mice and pigs. *Veterinary Microbiology*. 76(3): 245-257.
- Lee JS, Oka K., Obara M, Nishimukai M, Yoo YC, Yamada K, Tsukahara T, Nakayama K, Hara H and Ishizuka S. (2009). Improved isolation methods for mucosal leukocytes from small and large intestines in rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 73: 1732-1740.

- Li Q, Kobayashi M, Wakayama Y, Inagaki H, Katsumata M, Hirata Y, Hirata K, Shimizu T, Kawada T, Park BJ, Ohira T, Kagawa T and Miyazaki Y. (2009). Effect of phytoncide from trees on human natural killer cell function. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 22: 951-959.
- Leuschner RGK, Jan B, Paul S. J, Ross PR and Stanton C. (2003). Enumeration of probiotic pediococci in animal feed: interlaboratory study. *Journal of AOAC International*. 86(4): 791 - 801.
- Murata Y, Shimamura T, Tagami T, Takatsuki F and Hamuro J. (2002). The skewing to Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content. *International immunopharmacology*. 2: 673-689.
- Otterlei M, Ostgaard K, Skjåk-Braek G, Smidsrød O, Soon-Shiong P and Espevik T. (1991). Induction of cytokine production from human monocytes stimulated with alginate. *Journal of immunotherapy*. 10: 286-291.
- Pozzoni P. (2012). *Saccharomyces boulardii* for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Adult Hospitalized Patients: A Single-Center, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Am J Gastroenterol*. 107; 922 - 931.
- Paramjit KB, Dominic P, Vincent JJM, Jack TT and Lee H. (2010). Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling, *Journal of Microbiological Methods*. 81; 179-186.
- Pillai A and Nelson R. (2008). Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst. Rev*. CD004611.
- Sarah L, Jos V and Sigrid CJ De K. (2008). Genes and Molecules of *Lactobacilli* Supporting Probiotic Action. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*. 72; 728-764.
- Son. JH. (2005). A study on the mudfish raising using of raw hens excreta. *Korean Journal of Organic Agriculture*. 13: 113-122.
- Stallmach A, Wittig B, Giese T, Pfister K, Hoffmann JC, Bulfone-Paus S, Kunzendorf U, Meuer SC and Zeitz M. (1999). Protection of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis by an interleukin 2 - IgG2b fusion protein in mice. *Gastroenterology*. 117: 866 - 876.

- Yoo MK, Kang SK, Choi JH, Park IK and Na HS. (2010). Targeted delivery of chitosan nanoparticles to Peyer's patch using M cell-homing peptide selected by phage display technique. *Biomaterials*. 31: 7738-7747.
- Yun JH, Lee KB, Sung YK, Kim EB, Lee HG and Choi YJ. (2009). Isolation and characterization of potential probiotic *Lactobacilli* from pig feces. *J. Basic Microbiol.* 49; 220-226.
- Yu L, Pei X and Lei T. (2008) Genome shuffling enhanced L-lactic acid production by improving glucose tolerance of *Lactobacillus rhamnosus*. *J Biotechnol.* 134(1-2); 154-9.
- Zhang YX, Perry K, Vinci VA, Powell K, Stemmer WP and del Cardayre SB. (2002). Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature*. 415; 644-6.
- Zheng, H., Gong, J., Chen, T., Chen, X. and Zhao, X. (2010). Strain improvement of *Sporolactobacillus inulinus* ATCC 15538 for acid tolerance and production of D-lactic acid by genome shuffling. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85: 1541 - 1549.
- Zhang AW, Lee BD, Lee SK, Lee KW, An GH, Song KB and Lee CH. (2005). Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. *Poultry Science*. 84: 1015-1021.
- 권용국. (2010). 최근 10년간 국내 닭 법정 전염병 발생현황 분석. 국립수의과학검역원 리포트.
- 동물용의약품 수출 현황과 과제 (상). (2013). 축산경제신문(2013.06.22. 기사).
- 세계 배합사료시장: 기술발전과 시장변화. (2012). BCC Research.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술산업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술산업화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.