

발간등록번호
11-1543000-000983-01

복합생약재 및 고효율 프로바이오틱스를 이용한 가축  
생산성 향상용 사료 첨가제 개발  
(Development of feed materials for increasing livestock  
performance using medicinal herbs and probiotics having  
increased antimicrobial activity)

(주)미래자원ML

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “농림수산식품기술기획평가원(IPET) 연구개발사업에 관한 연구” 과제(세부 과제 “복합생약제 및 고효율 프로바이오틱스를 이용한 가축 생산성 향상용 사료 첨가제 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2015 년 09 월 09 일

주관연구기관명 : (주) 미래자원ML

주관연구책임자 : 한 종 권

세부연구책임자 : 한 종 권

연 구 원 : 김 성 진

연 구 원 : 지 규 만

연 구 원 : 오 미 향

연 구 원 : 남 정 옥

연 구 원 : 박 근 태

연 구 원 : 지 기 뽐

협동연구기관명 : CHA의과학대학교

협동연구책임자 : 이 부 용

## 요 약 문

### I. 제 목

복합생약제 및 고효율 프로바이오틱스를 이용한 가축 생산성 향상용 사료첨가제 개발

### II. 연구성과 목표 대비 실적

구분		특허		유전자원 등록	논문	
		출원	등록		SCI	비SCI
1차 년도	목표	1				1
	달성	1				1
2차 년도	목표	1		1	1	1
	달성	1		1	1-SCIE	0
3차 년도	목표	1	1		1	2
	달성	1	1		3	1
계	목표	3	1	1	2	3
	달성	3	1	1	4	2

(3차년도 SCI논문 1건은 올해 8월에 투고함, 현재 진행중)

### III. 연구개발의 목적 및 필요성

가축의 사양에 필요한 사료첨가제들이 개발되어 있지만 농가에서 최우선적으로 요구하는 것은 가축의 생산성 증대이다. 즉 사료 소비량은 적으면서 가축의 체중이 증가하는 생산성 면에서 도움이 되는 것을 절실히 필요로 하고 있다. 그와 연관되어 현재 사료첨가제 시장의 주요 관심사항은 2011년 7월부터 시행되고 있는 사료첨가용 항생제(AGP: antimicrobial growth promoter) 사용 금지'에 대비한 항생제 대체용 소재의 개발일 것이다. 항생제는 병원성 미생물의 성장이나 증식을 억제하고 영양소 이용율을 개선시키고 성장 촉진 효과가 있기 때문에 현재까지 가장 경제적인 사료첨가제로 사용되어왔다. 즉, 항생제를 통해 축산업의 생산성이 개선되었고, 대규모 집단 사육을 가능케 하여 축산업의 발전에 많은 기여를 해왔다.

이러한 목적을 달성하기 위하여 주관기관에서는 2006년 중기청 기업부설연구소 지원사업 과제를 수행하면서 경제성이 있고 가축의 면역력을 향상시킬 수 있는 한방 소재를 개발하였으며, 본 과제에서는 유용성을 갖는 프로바이오틱스 미생물의 축산 사료 분야 진입의 활성화를 위하여 **항박테리아/ 항진균 등의 항균 능력을 지표로 하는 프로바이오틱스 미생물의 능력을 향상시키고, 향상된 프로바이오틱스 균주의 능력을 최대한 발휘할 수 있는 제형을 제작하고자** 하며, 이러한 능력을 가축 사양 시험을 통하여 검증하고자 한다.

본 과제의 연구목표는 사료 효율을 높이고, 가축을 건강하게 성장하게 하여, 가축의 생산성을 증대시킬 수 있는 **복합 생약제 및 항균 효능이 증진된 미생물 소재**를 이용한 사료첨가제를 개발하는 것이다.

본 과제를 성공적으로 수행하기 위해서 가축 사양 시험을 통한 효능 검증이 필수적이며, 개발된 제품을 안정적으로 생산하기 위해서는 항박테리아/항진균 등의 항균력으로 표현되는 프로바이오틱스 미생물 능력의 증대가 필요하며, 이를 위해 **산업적인 미생물 개발에 사용되는 대사공학 지식 및 균주 개발 기술을 사용하여, 건강한 축산 제품의 생산을 목표로 하기 때문에** 혈액중의 사이토카인 등의 면역 분석, 육제품의 육질 평가 등의 다양한 분석을 수행하였다.

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 한방 소재를 기반으로 하는 가축 소화 흡수 향상 생약 복합제 조성물 확립
- 2) 대사공학 지식을 기반으로 하여 항박테리아/항진균 등 항균 효능이 증진된 프로바이오틱스 유산균 개량
- 3) 프로바이오틱스 유산균의 항박테리아/항진균 능력의 최대발현을 위한 제형 개발
- 4) 동물 영양 최적화 프로그램에 의한 사료 배합비 결정
- 5) 실험실 규모의 가축 사양 평가에 의한 효능 검증
- 6) 대규모 가축 사양 평가에 의한 경제성 평가
- 7) 시제품 제작 및 제품 등록
- 8) 상품화 및 마케팅

#### V. 연구개발목표 및 결과

##### 1. 연구개발 목표

###### <1차년도>

1. 항박테리아/항진균 성능 향상 균주제작
2. 대사물 생산 증가요인 실험
3. 배합비 설정 및 실험사료 제작
4. 사료 적합성 평가
5. 유산균 안정성 향상을 위한 제형개발
6. 실험 동물의 혈청 생화학적 분석

###### <2차년도>

1. 실험실 규모의 가축 사양 시험
2. 대규모 가축 사양 시험
3. 유산균 안정성 향상을 위한 제형개발
4. 실험 동물의 혈청 생화학적 분석

###### <3차년도>

1. 가축 임상시험(2,3차)
2. 사양 시험 샘플의 혈청생화학적 분석
3. 제품 분석 및 안정성시험
4. scientific marketing 자료 작성
5. W/O 에멀전 연구
6. 사양시험 결과를 이용한 시제품 정립
7. 시제품의 생산, 판매, 유통 등의 전략 수립

2. 연구개발결과

<1차년도>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012.08 - 2013.08)	항박테리아 / 항진균 효능이 증진된 신규프로바이오 틱스유산균 제작 및 가축사양 시험을 통한 사료첨가제 제제화	항박테리아/ 항진균 성능 향상 균주 제작	-유산균의 대사물인 lactic acid 내성 균주를 제 작함으로써 feedback regulation이 해제된 변이 주 제작(대사공학 지식 활용) -변이주의 배양 특성 확인 및 저가의 배양 배지 확립
		대사물 생산 증가요인 실험	-변이주의 항균(대장균), 항곰팡이(Aspergillus) 성능 확인 및 글리세롤 첨가에 의한 항곰팡이 능력향상확인 -글리세롤의 사료 첨가시 닭의 생산성 저하로 인하여 사용하지 않기로 결정하였으며, 복합 한약재 및 복합효소제(소화기능 강화 목적)의 사용으로 사료 효율이 유의적으로 개선된 사료 조성 확립
		배합비 설정 및 실험사료 제작	-NRC 사양 표준에 근거한 실험 사료 제작 및 동물 실험 수행(rat 2회, 육계 2회(challenge 포 함시 4회), 산란계 1회) -육계 생산성 향상 사료 조성 확립 -유해조건에서 유산균에 의한 숙주 면역활성화 기전 확인.
		사료 적합성 평가	-유산균 및 coated 유산균 첨가 사료의 기호성 평가 완료
	항박테리아 /항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균의 제형개발 및 시험동물의 혈청생화학적 분석	유산균 안정성 향상을 위한 제형 개발	-호화전분 및 monoolein을 기반으로 하는 저가 의 micro-encapsulation 제형 기술 확립 및 시 제품 제작, 사양실험 : 이중 코팅제제로서 위장 pH 안정성 및 장용성 확인
		실험 동물의 혈청 생화학적 분석	-challenge 실험동물(육계)의 혈청생화학적 분석 을 통하여 체액성 면역 및 세포성 면역 활성화 기전을 확인.

<2차년도>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013.08 - 2014.08)	항박테리아 / 항진균 효능이 증가된 신규프로바이오 틱스유산균 제작 및 가축사양 시험을 통한 사료첨가제 제제화	실험실 규모의 가축 사양 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험실 규모의 사양 시험을 통한 최적 급여 조건 실험(육계)</li> <li>- Performance 평가 : 증체량, 사료섭취량, 사료효율 분석 : 성장 기간 별 증체량, 사료섭취량, - 사료 효율 분석</li> <li>- 장기 및 미생물 균총 분석, 장내 pH : 시험 종료 후 해부 및 맹장의 미생물 균총 분석 및 장내 pH 측정</li> <li>- 육제품 육질 평가 : 조직의 pH, 육색, 가열감량, 보수력, 전단력 등의 육질 평가</li> <li>- 실험실 규모의 사양시험 진행(Rat)</li> </ul>
		대규모 가축 사양 시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험실에서 진행된 1차적인 시험에서 얻어진 결과를 실제 양계 필드 실험을 통하여 확인하며 효능을 검증하고 보완하여 제품 생산에 현실성을 테스트하기 위한 실험</li> <li>- Performance 평가 : 증체량, 사료섭취량, 사료효율 분석</li> <li>- 장기 및 미생물 균총 분석</li> <li>- 육제품 육질 평가 : 조직의 pH, 육색, 가열감량, 보수력, 전단력 등의 육질 평가</li> </ul>
	항박테리아/ 항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균의 제형개발 및 시험 동물의 혈청생화학학적 분석	배합비 설정 및 실험사료 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>- NRC 사양 표준에 근거한 실험 사료 제작 및 동물 실험 수행(rat 1회, 육계 2회)</li> <li>- 육계 생산성 향상 사료 조성 확립</li> <li>- 유해조건에서 유산균에 의한 숙주 - 면역활성화 기전 확인</li> </ul>
		유산균 안정성 향상을 위한 제형 개발 및 시험사료의 대량 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 호화전분 및 monoolein을 기반으로 하는 저가의 제품 제형 기술 확립 및 시제품 제작 : 이중 코팅제제로서 위장 pH 안정성 및 장용성 확인</li> <li>- microencapsulation 기반의 미생물 - 제형 기술 개발 : 장용성 코팅 소재 조사</li> <li>- 장용성 코팅 조건 연구</li> <li>- 장용성 코팅 효능 평가</li> <li>- 코팅유산균 제형의 프리믹스 제품의 대량생산</li> </ul>
		사양 시험 샘플의 혈청 생화학학적 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험실 규모 및 대규모 가축 사양시험 샘플의 혈청 생화학학적 분석 : Immunoglobulin G (IgG) Immunoglobulin A (IgA)</li> </ul>

<3차년도>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용
3차 년도 (2014.08 - 2015.08)	항박테리아 /항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균 제작 및 가축 사양 시험을 통한 사료첨가제 제제화	가축임상시험(2,3차)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-대규모 농장 규모의 사양 시험(반복당 기존 5,000수 이상 -&gt;15,000수이상으로 늘림)</li> <li>-Performance 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 증체량, 사료섭취량, 사료 효율</li> </ul> </li> <li>분석, 폐사율</li> <li>-장기 및 미생물 균총 분석</li> <li>-장내 pH</li> <li>-육제품 육질 평가               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 가열감량, 보수력, 전단력 등</li> </ul> </li> </ul>
	항박테리아 /항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균의 제형 개발 및 시험 동물의 혈청생화학적 분석	사양 시험 샘플의 혈청생화학적 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 필드 가축 사양시험 샘플의 혈청생화학적 분석               <ul style="list-style-type: none"> <li>: IgG, IgA 등</li> </ul> </li> <li>- 필드 가축 사양시험 샘플의 혈액 분석</li> </ul>
		제품 분석 및 안정성시험 scientific marketing 자료 작성	<ul style="list-style-type: none"> <li>-제작된 시제품 중의 한약재의 지표성분 함량 분석</li> <li>-제품 안정성 시험               <ul style="list-style-type: none"> <li>: 미생물 제형의 보관안정성 ( 유효기간 설정)</li> </ul> </li> </ul>
		W/O 에멀전 연구	코팅 형성 확인
	시제품 제작 및 제품 등록	사양시험 결과를 이용하여 시제품 정립	<ul style="list-style-type: none"> <li>-시제품 제작</li> <li>-시제품중의 한약재 지표성분 함량 분석</li> <li>-제품안정성 시험 및 유효기간 설정</li> <li>-제품등록</li> </ul>
상품화 및 마케팅	시제품의 생산, 판매, 유통 등의 전략 수립	<ul style="list-style-type: none"> <li>-제품세미나 개최 및 홍보</li> <li>-scientific marketing 자료작성</li> <li>-시장반응 feedback으로 상품 완성도 제고</li> <li>-일반 시장에서 사용시 가격적인 면에서 경쟁력 있는 제품으로 만들어지도록 원료 수급 및 코팅제제의 가격에서 새로운 방법 모색</li> </ul>	

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

계재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	김치유래의 유산균 변이주 Lactobacillus ML-7의 특성 및 육계 성장에 대한 영향	박근태	한종권	오미향,남정옥,지기쁨	한국식품과학회지	Vol. 46, No. 2, pp. 1~5 (2014)	국내	비 SCI
2014	Effect of Coating Method on the Survival Rate of L. plantarum for Chicken Feed	Sang-Yoon Lee	Jae-Wook Oh	Yeon-Ji Jo, Mi-Jung Choi, Boo-Yong Lee, Jong-Kwon Han, Jae Kag Lim	Korean J. Food Sci. An.	Vol. 34, No. 2, pp.1~8 (2014)	국내	SCI- E
2014	Gelidium elegans, an Edible Red Seaeed and Hesperidin Inhibit Lipid Accumulation and production of Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in 3T3-L1 and RAW264.7 Cells	Hui-Jeon Jeon	Boo-Young Lee	Min-Jung Seo, Hyeon-Son Choi, Ok-Hwan Lee	Phytotherapy Research	Vol. 3428, pp. 1701-1709 (2014)	국외	SCI
2015	Dieckol, a major phlorotannin in Ecklonia cava, suppresses lipid accumulation in the adipocytes of high-fat diet-fed zevrafish and mice: Inhibition of early adipogenesis via cell-cycle arrest and AMPKa activation	Hyeon-Son Choi,	Boo-Young Lee	Hui-Jeon Jeon, Ok-Hwan Lee	Molecular Nutrition & Food Research	Vol. 00 pp.1-14 (2015)	국외	SCI
2015	코팅 소재가 분무 건조된 유산균 분말의 저장 안정성에 미치는 효과	김수진	최미정	이상윤,한종권	한국식품과학회지	Vol.45 No.5 (2015.10.31.발행)	국내	비 SCI
2015	Effect of Lactobacillus-fermented ginger stem on Salmonella-infected broiler chicks			2015.8월 투고증 투고접수번호: 11251-080615	Journal of 'Avian disease' (England)	-	국외	SCI

출원된 특허의 경우

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013	항균성을 갖는 락토바실러스 ML-7균주 및 이의용도	주식회사 미래자원엠엘	한국	10-2013-0085808 (등록10-1507744)
2014	코팅된 유산균 분말 및 생강 분말을 함유 하는 육계용 사료의 제조 방법	주식회사 미래자원엠엘	한국	10-2014-0095479
2015	이중 코팅층을 갖는 유산균 분말 및 이의 제조방법	건국대학교 산학협력단 /주식회사 미래자원엠엘	한국	10-2015-0111557

## 2. 연구성과 계획

- 1) 본 기술의 사업화는 주관기관에서 자체 사업화를 추진하며, 주관기관의 기존 거래선인 국내 사료 업체를 대상으로한 기술기반 마케팅(Technical Marketing)을 시행하고자 함.
- 2) 각 지역의 농특산물을 활용하는 맞춤형 기능성 사료첨가제 제품 개발로 응용 확대 (브랜드 축산용 원료공급)
- 3) 국내 유용 식물자원 및 미생물 자원의 이용 효율 향상
- 4) 새로운 기능성 사료첨가 소재 개발을 통한 다양한 첨가제 개발 제품의 해외 수출 증대

## SUMMARY

### I. Title

Development of feed materials for increasing livestock performance using medicinal herbs and probiotics having increased antimicrobial activity

### II. Comparing the achievement against objectives

		patent		registration of genetic resource	paper	
		patent application	patent registration		SCI	non SCI
1 <sup>st</sup> year	objective	1				1
	result	1				1
2 <sup>nd</sup> year	objective	1		1	1	1
	result	1		1	1-SCIE	0
3 <sup>rd</sup> year	objective	1	1		1	2
	result	1	1		3	1
Sum	objective	3	1	1	2	3
	result	3	1	1	4	2

(The paper which is one of the paper we have to publish in 3<sup>rd</sup> year was also submitted in August 2015)

### III. Objectives and Necessity for Research and Development

Although various kinds of feed additives that are essential to the growth of cattle and livestock have been developed thus far, still, the one thing that farmers wish for and demand the most is an increase in the total production and yield of their animals. Farmers consistently need for their livestock to consume less while growing more, which would be beneficial from an economic and financial standpoint. This can most likely be attributed to the increase in development of other alternative antibiotic substitutes, due to the enforcement of the ban on antimicrobial growth promoters (AGPs), which came into effect in July 2011. Up to this point, antibiotics have been used as an economically viable feed additive because they inhibit the multiplication and spread of disease and harmful pathogenic microorganisms while aiding in the absorption of vital nutrients and promoting the growth and development of the animal. Contributions to the livestock industry, such as increased production yields and large-scale breeding, have been made possible through the development and use of antibiotics in animal feed.

In order to achieve this goal, the lead agency in charge, while completing a 2006 research study backed by a small-to-medium enterprise research institute, had developed an economically feasible Chinese herbal supplement that boosts an animal's immune system. In the research, the antibiotic properties of antibacterial and antifungal agents are used as indicators to improve the effectiveness of probiotic microorganisms for their introduction into livestock feed. These improved probiotic strains are formulated and manufactured to maximize their dosage and strength, and their effectiveness are being investigated through measuring and comparing the drop-offs and declines in the production of the experimental livestock.

The purpose of the study is to develop feed additives that include complex herbal supplements and probiotics with improved antibiotic properties so that, in improving the effectiveness of livestock feed, the cattle and livestock grow and develop into healthy animals that have a much higher rate of production.

In order for this study to be deemed a success, verification of livestock experiment results must become mandatory practice, and there needs to be an improvement in the effectiveness of the probiotic microorganisms to ensure their stability during production. In order for this to happen, there must be adequate knowledge and training in the procedures and techniques of creating and developing industrial microbiological cultures, and last but not least, such methods as blood cytokine analysis and closer scrutiny and inspection of meat product quality are in the process of being implemented.

#### **IV. Contents and Scope of Research**

- 1) Improving digestion function of livestock establish composition which is based on the herbal medicine
- 2) Improving the quality of lactobacillus as a making antimicrobial efficacy of probiotics better by knowledge which is based on metabolic engineering
- 3) Developing hoof shape for working at its highest efficacy of lactobacillus as a probiotics
- 4) Determination of a feed composition by optimization program of Animal nutrition
- 5) Proving the effectiveness of a feed by animal feeding evaluation in lab scale
- 6) An economic valuation of a feed by animal feeding evaluation in large scale
- 7) Prototyping production and registering product
- 8) Merchandising and marketing

## V. Objectives and results of research and development

### 1. Objectives of research and development

#### <1st year>

1. Making a improving antimicrobial performance of strain
2. Growth factor test of production metabolite
3. Manufacturing mixing ratio and making a feed for experimental animal
4. An evaluation on suitability of feed
5. Developing hoof shape of Lactobacillus for enhancing these stability
6. Analysis of serum biochemical analysis of experimental animal

#### <2nd year>

1. Experiment of animal feeding evaluation in lap scale
2. Experiment of animal feeding evaluation in large scale
3. Developing a hoof shape of Lactobacillus for enhancing these stability
4. Analysis of serum biochemical analysis of experimental animal

#### <3rd year>

1. Experiment of animal feeding evaluation in large scale
2. Analysis of serum biochemical analysis of experimental animal
3. Analysis of product and suitability test
4. Gathering data on scientific marketing
5. Research on W/O emulsion
6. Establishing prototypes using a result of animal feeding evaluation
7. Establishment of a strategy for production, marketing and distributing of prototypes

## 2. Results of research and development

Year	Project name	Specific objectives of the research	Contents of research and development
1st year (2012.08 – 2013.08)	Producing a lactic acid as probiotics which has increased a benefit of antibacterial and antifungal and manufacturing feed additives by animal feeding test	Production of and strain, which has an improved performance of antibacterial and antifungal.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Transmutator produces deactivating feedback regulation by producing metabolite of lactobacillus, lactic acid which has a strain resistant (utilization of knowledge of metabolic engineering).</li> <li>-Confirming characteristics culture of mutant and establishing low-cost culture material.</li> </ul>
		Testing of growth factor from metabolite production	- Verifying performances of anti-bacterial and antifungal establishing feed composition which has an improved feed conversion ratio by using of complexed medicinal herbs and conjugated enzyme.
		Setting the mixing ratio of feed and producing an experiment feed	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Producing a feed of animal test from NRC feeding standard and performing a animal test (rat 2, broiler 2, layer 1).</li> <li>-Establishment of feed composition which is improving a performance of productivity of broiler.</li> <li>-Check out the mechanism of host immune activation by lactic acid bacteria in hazardous conditions.</li> </ul>
		appraisals of the suitability of feed	-An assessment of the quality of feed which added Lactic acid and coated lactic acid bacillus
	Developing the form of lactobacillus with improved antibiotic properties and analysis of serum biochemical analysis of experimental animal	Developing forms of lactobacillus for the stability	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Producing prototypes</li> <li>-Establishing the technology of the micro-encapsulation form based on pre-gelatinized starch and monoolein</li> <li>-Animal test</li> </ul> : check out enteric and stability in the stomach as a double coating layer form.
		Analysis of serum biochemical analysis of experimental animal	-Check the mechanism of humoral immunity function and immune activation using a analysis of serum biochemical from animal test which is challenged.

Year	Project name	Specific objectives of the research	Contents of research and development
2nd year (2013.08 - 2014.08)	Producing a lactic acid as probiotics which has increased a benefit of antibacterial and antifungal and manufacturing feed additives by animal feeding test	Experiments of animal feeding evaluation in lab scale	-Experiment of the optimum feeding conditions through feeding trial with broiler in laboratory scale. -Assessment of performance : gain, feed intake, feed efficiency -Analysis of organ and composition of intestinal microbial flora -Analysis of meat quality : quality of tissue(pH, the color of flesh, heating loss, moisture retensien, shear force)
		Experiments of animal feeding evaluation in large scale	-Verifying the results from the pre-experiment in laboratory scale through the animal test in large scale for an experiment to test for the production of its practicality -Assessment of performance : gain, feed intake, feed efficiency -Analysis of organ and composition of intestinal microbial flora -Analysis of meat quality : quality of tissue(pH, the color of flesh, heating loss, moisture retention, shear force)
	Developing the form of lactobacillus with improved antibiotic properties and analysis of serum biochemical analysis of experimental animal	Setting up the mixing ratio and manufacturing of a feed for experimental animal	-Producing a feed of animal test from NRC <b>feeding standard</b> and performing a animal test (rat 1, broiler 2). -Establishment of feed composition which is improving a performance of productivity of broiler. -Check out the mechanism of host <b>immune activation</b> by lactic acid bacteria in hazardous conditions.
		Developing a hoof shape of Lactobacillus for enhancing these stability and mass production of feed for experimental animal	-Producing prototypes -Establishing the technology of the micro-encapsulation form based on pre-gelatinized starch and mono olein -Developing of a hoof shape technology : investigating a material of enteric coating -Researching of the enteric coating condition -Efficacy assessment of enteric coating -mass producing of the product of a coated lactobacillus
		Analysis of serum biochemical analysis of experimental animal	-Analysis of serum biochemical analysis of experimental animal in the lap and large scale : Immunoglobulin G, Immunoglobulin A,

Year	Project name	Specific objectives of the research	Contents of research and development
3rd year (2014.08 - 2015.08)	Producing a lactic acid as probiotics which has increased a benefit of antibacterial and antifungal and manufacturing feed additives by animal feeding test	Experiments of animal feeding evaluation in large scale (2,3) Experiments of animal feeding evaluation in large scale	-Field test using broilers over 15,000 -Assessment of performance : gain, feed intake, feed efficiency -Analysis of organ and composition of intestinal microbial flora -Analysis of meat quality : quality of tissue(pH, the color of flesh, heating loss, moisture retention, shear force)
	Developing the form of lactobacillus with improved antibiotic properties and analysis of serum biochemical analysis of experimental animal	Analysis of serum biochemical analysis of experimental animal	-Analysis of serum biochemical analysis of experimental animal in large scale feeding trial : Immunoglobulin G, Immunoglobulin A,
		-Analysis of product and suitability test -Gathering data on scientific marketing	-Analysis of index component in medical herbs of prototypes -Testing of stability of product : Storage stability of the microbial form
		Research on W/O emulsion	Determinating formation of coating
	Producing prototypes and Registering good	Establishing prototypes using a result of animal feeding evaluation	-Prototypes production -Analysis of index component in medicinal herbs of prototypes -Testing of stability of product and setting term of validity -Registering good
Commercialization and Marketing	Establishment of a strategy for production, marketing and distributing of prototypes	-Opening the seminar and promoting a product -Gathering data on scientific marketing -Applying a new method to save expenses from making a product	

## VI. Research result and plans of using the result

### 1. Research result

Publication year	Title	Author			Nominati on of an academic	Vol.	SCI (E)
		Lead author	Corresponding author	Co-author			
2014	Characterization of Mutant Strain, <i>Lactobacillus paracasei</i> ML-7 Isolated from Kimchi, and Its Effect on the Growth of Broiler	Keun-tae Park	Jong-Kwon Han	Mi-Hyang Oh, Jung ok Nam, Kibbeum Ji	Korean J. Food Sci. An.	Vol. 46, No. 2, pp. 1~5 (2014)	non SCI
2014	Effect of Coating Method on the Survival Rate of <i>L. plantarum</i> for Chicken Feed	Sang-Yoon Lee	Jae-Wook Oh	Yeon-Ji Jo, Mi-Jung Choi, Boo-Yong Lee, Jong-Kwon Han, Jae Kga Lim	Korean J. Food Sci. An.	Vol. 34, No. 2, pp.1~8 (2014)	SCI-E
2014	<i>Gelidium elegans</i> , an Edible Red Seaseedm and Hesperidin Inhibit Lipid Accumulation and production of Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in 3T3-L1 and RAW264.7 Cells	Hui-Jeon Jeon	Boo-Young Lee	Min-Jung Seo, Hyeon-Son Choi, Ok-Hwan Lee	Phytotherapy Research	Vol. 3428, pp. 1701-1709 (2014)	SCI
2015	Dieckol, a major phlorotannin in <i>Ecklonia cava</i> , suppresses lipid accumulation in the adipocytes of high-fat diet-fed zevrafish and mice: Inhibition of early adipogenesis via cell-cycle arrest and AMPKa activation	Hyeon-Son Choi,	Boo-Young Lee	Hui-Jeon Jeon, Ok-Hwan Lee	Molecular Nutrition & Food Research	Vol. 00 pp.,1-14 (2015)	SCI
2015	Effect of Coating Materials on the Storage Stability of Spray Dried <i>Lactobacillus</i> Powder	Su-Jin Kim	Mi-Jung Choi	Sang-Yoon Lee, Jong-Kwon Han	Korean J. Food Sci. An.	Vol, 45 No. 5 (2015.10)	non SCI
2015	Effect of <i>Lactobacillus</i> -fermented ginger stem on <i>Salmonella</i> -infected broiler chicks	Effect of Coating Materials on the Storage Stability of Spray Dried <i>Lactobacillus</i> Powder submission in 2015 application number : 11251-080615			Journal of 'Avian disease' (England)	-	SCI

Patent				
year	name of patent	applicant	country	application number
2013	<i>Lactobacillus paracasei</i> ML-7 strain having antibacterial activity and uses thereof	Milae Resource ML Corporation	korea	10-2013-0085808 (registration number: 10-1507744)
2014	Method for producing feed for broiler containing coated lactic acid bacteria powder and ginger powder	Milae Resource ML Corporation	korea	10-2014-0095479
2015	Powder of lactic acid bacteria having double coating layers and method of preparing the same	Konkuk Uni. of the Industrial-Academic Cooperation Group /Milae Resource ML Co.	korea	10-2015-0111557

## 2. plans of the research results

- 1) The commercialization of this technology will promote the commercialization of its own in the hosting institution. we would like to implement technology-based marketing to existing customer of the hosting institution, domestic feedmill company.
- 2) To expand applications as development tailored functional feed additives in each region to take advantage of the agricultural specialty product (Branded livestock)
- 3) To improve efficiency of utilization of domestic useful plant resources and microorganism resources.
- 4) To increase in foreign exports in accordance with development of various additives through development of the new functional feed materials

## CONTENTS

### **Chapter 1. Synopsis and Aim of the project of research and development**

Section 1. Aim and important contents of research and development

Section 2. Aim and important contents of research and development in each project

Section 3. Contents and scope of research and development

### **Chapter 2. Status of technical development in Korea and overseas**

Section 1. Market tendency in Feed additives Industrial(antibiotic)

Section 2. Market tendency in Feed additives Industrial

Section 3. Necessity of research and development

Section 4. Preceding research

### **Chapter 3. Contents and results of the performance of research and development**

Section 1. Contents of the performance of research and development

Section 2. Results of the performance of research and development

### **Chapter 4. Attainment and contribution for the related fields**

Section 1. Attainment of research and development

Section 2. Digitization of a research objective achievement

### **Chapter 5. Achievement and its application plan**

Section 1. Achievement of economy

Section 2. Achievement of technology

Section 3. Plans for obtainment of development result

### **Chapter 6. References**

<Attachments>

Appendix. Patents, papers, and market analysis report

## 목 차

### 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

- 1 절 연구개발의 목적/목표 및 주요내용
- 2 절 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용
- 3 절 연구 성과 목표 대비 실적

### 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 1 절 사료첨가제 시장 동향 (사료첨가용 항생제를 중심으로)
- 2 절 사료첨가제 시장 동향
- 3 절 사료 첨가용 미생물 생균제 개발의 필요성
- 4 절 선행연구

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- 1 절 연차별 연구개발수행 내용
- 2 절 연차별 연구개발수행 결과

### 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 1 절 연차별 연구개발목표에 입각한 목표달성도 및 수행내용
- 2 절 연구 개발 목표치 달성여부 수치화

### 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 1 절 기술적 성과
- 2 절 경제적 성과
- 3 절 성과활용 계획

### 제 6 장 참고문헌

<첨부>

별첨. 특허, 논문 및 시장분석보고서

# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 1 절 연구개발의 목적/목표 및 주요내용

### 1. 연구개발의 목적과 필요성

가축의 사양에 필요한 사료첨가제들이 개발되어 있지만 농가에서 최우선적으로 요구하는 것은 가축의 생산성 증대이다. 즉 사료 소비량은 적으면서 가축의 체중이 증가하는 생산성 면에서 도움이 되는 것을 절실히 필요로 하고 있다. 그와 연관되어 현재 사료첨가제 시장의 주요 관심사항은 2011년 7월부터 시행되고 있는 사료첨가용 항생제(AGP: antimicrobial growth promoter) 사용 금지'에 대비한 항생제 대체용 소재의 개발일 것이다. 항생제는 병원성 미생물의 성장이나 증식을 억제하고 영양소 이용율을 개선시키고 성장 촉진 효과가 있기 때문에 현재까지 가장 경제적인 사료첨가제로 사용되어왔다. 즉, 항생제를 통해 축산업의 생산성이 개선되었고, 대규모 집단 사육을 가능케 하여 축산업의 발전에 많은 기여를 해왔다.

이러한 목적을 달성하기 위하여 주관기관에서는 2006년 중기청 기업부설연구소 지원사업 과제를 수행하면서 경제성이 있고 가축의 면역력을 향상시킬 수 있는 한방 소재를 개발하였으며, 본 과제에서는 유용성을 갖는 프로바이오틱스 미생물의 축산 사료 분야 진입의 활성화를 위하여 **항박테리아/항진균 등의 항균 능력을 지표로 하는 프로바이오틱스 미생물의 능력을 향상시키고, 향상된 프로바이오틱스 균주의 능력을 최대한 발휘할 수 있는 제형을 제작하고자** 하며, 이러한 능력을 가축 사양 시험을 통하여 검증하고자 한다.

본 과제의 연구목표는 사료 효율을 높이고, 가축을 건강하게 성장하게 하여, 가축의 생산성을 증대시킬 수 있는 **복합 생약제 및 항균 효능이 증진된 미생물 소재**를 이용한 사료첨가제를 개발하는 것이다.

본 과제를 성공적으로 수행하기 위해서 가축 사양 시험을 통한 효능 검증이 필수적이며, 개발된 제품을 안정적으로 생산하기 위해서는 항박테리아/항진균 등의 항균력으로 표현되는 프로바이오틱스 미생물 능력의 증대가 필요하며, 이를 위해 **산업적인 미생물 개발에 사용되는 대사공학 지식 및 균주 개발 기술을 사용하여, 건강한 축산 제품의 생산을 목표로 하기 때문에 혈액중의 사이토카인 등의 면역 분석, 육제품의 육질평가 등의 다양한 분석을 수행하였다.**

### 2. 최종 목표

선행연구를 통하여 식물체로부터 선별된 프로바이오틱스 유산균을 대사공학적 기법을 활용하여 항박테리아/항진균 능력이 현저히 향상된 고성능 프로바이오틱스 유산균주 제작하고, 제형화 및 가축 사양 시험을 통하여 가축의 생산성을 증진시키는 생약제 및 프로바이오틱스 복합 유산균 사료첨가제를 개발하는 것을 목표로 함

### 3. 주요내용

- 공시균주 대비 내산성도, 내담즙성 및 내열성 증강된 유산균 균주 선별 (완료)
- 항박테리아/항진균 성능 평가
- 미생물 사료첨가제 제형 연구 (microencapsulation 등)
- 대사공학적 지식을 기반으로 하여 항박테리아/항진균 성능 향상된 개량균주 제작
- 축산 동물 급여에 의한 생리적 영향 평가
- 가축 사양시험에 의한 performance 분석
- 시제품 제작, 제품 안정성 시험을 통한 상용화 기반 구축

## 2 절 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

1. 주관기관: 항박테리아/항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균 제작 및 가축 사양 시험을 통한 사료첨가제 제제화

<1차년도>

가. 선행연구로 선발된 유용 프로바이오틱스 유산균의 기본 특성 분석

- 내산성, 내담즙산, 고온 내성 평가
- 한약초 (고상) 발효 성능 평가
- 항박테리아/항진균 성능 평가

나. 대사공학적 기법을 활용한 항박테리아/항진균 성능 향상 균주 제작 및 생육 최적화

- 유산균에서 특정 유기산 생산 생합성 경로 분석 및 생합성 영향 인자 조사
- 생합성 영향 인자의 유산균에 대한 성장 저해 시험
- 유산균을 최소 성장 억제 농도 (minimal inhibition) 에 반복적으로 노출
- 목적 유산균의 screening 용 배지 조성 확립
- 선별 균주의 생육 최적화 시험

다. 사료 적합성 평가

- 특정 제형 유산균 소재의 기호성 평가
- : 대조군 및 시험군의 사료 섭취량 비교

※ 항박테리아/항진균 효능 평가 방법 (간이 실험)

1. 각각의 균주를 두 번 활성화를 거친 후 실험에 사용하였고, *Propionibacterium* sp.는 30℃, 혐기적 조건에서 배양을, *Aspergillus* 속 곰팡이는 30℃에서 배양을, 그 외 나머지 균주는 37℃, 호기적 조건에서 배양을 한다.
2. *Lactobacillus* sp.와 *Propionibacterium* sp. 를 활성화 한 후 배지에 루프를 이용하여 배지의 삼등분이 되는 지점에 2cm 의 백금선으로 streaking 하여 24 ~ 48 시간동안 배양한다.
3. Overlay assay에 이용할 병원성 미생물은 액체배지에 overnight 배양한다. .
4. 배양한 배지와 동일한 0.7% agar 배지를 멸균한 후 45 ℃ 항온수조 담귀 온도 균일화 후, 0.1mL/4mL의 농도로 희석하여 10mL을 overlay한다.
5. Overlay assay에 이용할 곰팡이 균주는 동일한 방법으로 실험을 하였으며, 균주 희석 농도는  $1 \times 10^4$  conidias/mL 로 희석된 균주를 10mL을 overlay한다.
6. *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. marcescens*는 37℃, 호기적 조건에서 24 ~ 48시간동안 배양하며 관찰한다.
7. *Aspergillus* 속 곰팡이는 30℃, 호기적 조건에서 배양하며 관찰한다.

## <2차년도>

### 가. 실험실 규모의 가축 사양 시험 (전임상)

- 실험실 규모의 사양 평가 시설(자체 보유)에서 특정 제형 유산균 소재의 사양 시험
- : 가축의 증체량(Weight Gain), 사료 효율(FCR, Feed Conversion Ratio) 등
- 사양시험 조건
- : 복합생약재 및 성능향상 유산균 제제의 단독 혹은 복합 사용시의 performance 비교에 의한 각 성분 간의 시너지 효과 분석
- 장기 분석 및 소화기내 미생물 균총 분석, 장내 pH 측정
- 육제품 육질 평가
- ※ 미생물 : *L. plantarum* 10hk2, *Lactobacillus* LS-2 모두 사용 예정

### 나. 대규모 가축 사양 시험 (임상 1상)

- 실제 양계 농장에서의 특정 제형 유산균 소재의 사양 시험
- : 가축의 증체량(Weight Gain), 사료 효율(FCR, Feed Conversion Ratio) 등
- 장기 분석 및 소화기내 미생물 균총 분석, 장내 pH 분석
- 육제품 육질 평가

## <3차년도>

### (1) 대규모 가축 사양 시험 (임상 2, 3상)

- 실제 양계 농장에서의 특정 제형 유산균 소재의 사양 시험
- : 가축의 증체량(Weight Gain), 사료 효율(FCR, Feed Conversion Ratio) 등
- 장기 분석 및 소화기내 미생물 균총 분석
- 육제품 육질 평가

### (2) 시제품제작 및 제품등록

- 시제품 제작
- 제품 안정성 시험
- 제품 등록 추진
- 경제성 평가

### (3) 상품화 및 마케팅

- 특정 수요처 대상의 제품 설명 세미나 개최 및 홍보
- 시장반응 feedback으로 상품완성도 제고

## 2. 협동기관: 항박테리아/항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균의 제형 개발 및 시험 동물의 혈청생화학적 분석

### <1차년도>

#### (1) 미생물 제형 개발

개발되는 항박테리아/항진균 성능이 우수한 프로바이오틱스 유산균주의 제형을 위해서는 가능한 장용성 2중층 미세캡슐화 (double layer microencapsulation) 기술 적용을 시도할 예정이다.

#### ※ 참고문헌

박병규 등, Korean J. Food Sci. Technol. 38(6):767-772 (2006)

#### ① w/o형 유화액내의 중심물질 제조

- 유산균을 증류수에 1차 유화제와 함께 첨가하여 고속으로 균질화 시킨다.
- 옥배경화유 등의 1차 피복 물질을 첨가하여 다시 균질화시킴으로써 2중층 미세캡슐 형성을 위한 전단계인 w/o 형 유화액내의 중심물질을 제조한다.

#### ② 2차 피복 물질 제조

- 고구마 전분과 젤라틴을 1:4 (w/w)의 비율로 혼합하여 65℃에서 호화시켜 2차 피복물질을 제조한다.

#### ③ w/o/w형 유화액의 제조

- Microencapsulation 장치에서 항온수조에 증류수를 채우고 온도를 50℃ 로 유지시킨 후 미리 준비한 2차 중심물질과 유화제를 혼합하여 Ultra-turrax T25를 사용하여 고속으로 교반한다.
- 미리 준비한 최종피복물질을 첨가하여 60초간 교반함으로써 w/o/w형의 2중층 미세캡슐 제조를 위한 유화액 형성을 완성하였다.

#### ④ 분산매의 제조

- 증류수에 HLB가 9.6인 유화제를 0.025% 농도로 첨가하여 강하게 교반시켜 용해시킨다.
- 이를 10℃로 유지하여 보관하면서 2중층 미세캡슐 형성을 위한 분산매로 사용한다.

#### ⑤ 2중층 미세캡슐의 완성

- 미리 준비한 w/o/w형 유화액을 미세캡슐화 장치에 적용시키되, 분무기를 사용하여 분산매내로 분무함으로써 직경 10 μm 내외의 미세캡슐을 제조한다.

## <2차년도>

### (1) 사양시험용 가축의 혈청생화학적 분석

#### ① Cytokine 양을 측정

- T cell과 Macrophage에서 직접 혹은 간접적으로 염증 혹은 감염 되었을 때, 분비하는 cytokine 양을 측정
- Interferon : IFN- $\gamma$  (Macrophage activation, MHC molecule 증가, antigen processing, Ig switching 등의 현상이 있을 때 분비 됨)
- TNF family : TNF- $\alpha$  or[cachectin] (Local inflammation, endothelial activation)
- ELISA로 측정

#### ② Immunoglobulin (Ig)의 측정

- Immunoglobulin (Ig)의 양을 측정하여 면역력의 증가 여부를 확인
- IgG를 plasma에서 측정
- ELISA로 측정

## <3차년도>

### (1) 사양시험용 가축의 혈청생화학적 분석

#### ① Cytokine 양을 측정

- T cell과 Macrophage에서 직접 혹은 간접적으로 염증 혹은 감염 되었을 때, 분비하는 cytokine 양을 측정
- Interferon : IFN- $\gamma$  (Macrophage activation, MHC molecule 증가, antigen processing, Ig switching 등의 현상이 있을 때 분비 됨)
- TNF family : TNF- $\alpha$  or[cachectin] (Local inflammation, endothelial activation)
- ELISA로 측정

#### ② Immunoglobulin (Ig)의 측정

- Immunoglobulin (Ig)의 양을 측정하여 면역력의 증가 여부를 확인
- IgG를 plasma에서 측정
- ELISA로 측정

### (2) 제품 분석 및 안정성시험

- 제작된 시제품 중의 한약재의 지표성분 함량 분석

: Glycyrrhizin, decursin 등

- 제품 안정성 시험

: 미생물 제형의 보관 안정성 실험 (유효기간 설정)

### (3) Scientific marketing용 자료 작성

- 자료 작성

### 3 절 연구 성과 목표 대비 실적

<목표대비 실적표>

구분		특허		유전자원 등록	논문	
		출원	등록		SCI	비SCI
1차 년도	목표	1				1
	달성	1				1
2차 년도	목표	1		1	1	1
	달성	1		1	1-SCIE	0
3차 년도	목표	1			1	1
	달성	1			3	1
계	목표	3		1	2	3
	달성	3		1	4	2

(3차년도 목표 SCI급 논문1편은 현재 투고중- 2015.08)

<게재논문>

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	김치유래의 유산균 변이주 <i>Lactobacillus</i> ML-7의 특성 및 육계 성장에 대한 영향	박근태	한종권	오미향, 남정옥, 지기쁨	한국식품 과학회지	Vol. 46, No. 2, pp. 1~5 (2014)	국내	비 SCI
2014	Effect of Coating Method on the Survival Rate of <i>L. plantarum</i> for Chicken Feed	Sang-Yoon Lee	Jae-Wook Oh	Yeon-Ji Jo, Mi-Jung Choi, Boo-Yong Lee, Jong-Kwon Han, Jae Kga Lim	Korean J. Food Sci. An.	Vol. 34, No. 2, pp.1~8 (2014)	국내	SCI- E
2014	<i>Gelidium elegans</i> , an Edible Red Seaweed and Hesperidin Inhibit Lipid Accumulation and production of Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in 3T3-L1 and RAW264.7 Cells	Hui-Jeon Jeon	Boo-Young Lee	Min-Jung Seo, Hyeon-Son Choi, Ok-Hwan Lee	Phytotherapy Research	Vol. 3428, pp. 1701-1709 (2014)	국외	SCI
2015	dieckol, a major phlorotannin in <i>Ecklonia cava</i> , suppresses lipid accumulation in the adipocytes of high-fat diet-fed zebrafish and mice: Inhibition of early adipogenesis via cell-cycle arrest and AMPKα activation	Hyeon-Son Choi,	Boo-Young Lee	Hui-Jeon Jeon, Ok-Hwan Lee	Molecular Nutrition & Food Research	Vol. 00 pp.,1-14 (2015)	국외	SCI
2015	Effect of <i>Lactobacillus</i> -fermented ginger stem on <i>Salmonella</i> -infected broiler chicks	김수진	최미정	이상윤, 한종권	한국식품 과학회지	Vol. 45, No. 5 (2015.10 .31)	국내	비 SCI
2015	Effect of <i>Lactobacillus</i> -fermented ginger stem on <i>Salmonella</i> -infected broiler chicks	2015.8월 투고중 투고접수번호: 11251-080615			Journal of 'Avian disease' (England)	-	국외	SCI

<특허출원>

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013	항균성을 갖는 락토바실러스 ML-7균주 및 이의용도	주식회사 미래자원엠엘	한국	10-2013-0085808 (등록10-1507744)
2014	코팅된 유산균 분말 및 생강 분말을 함유 하는 육계용 사료의 제조 방법	주식회사 미래자원엠엘	한국	10-2014-0095479
2015	이중 코팅층을 갖는 유산균 분말 및 이의 제조방법	건국대학교산학협력단/ 주식회사 미래자원엠엘	한국	10-2015-0111557

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1 절 사료첨가제 시장 동향 (사료첨가용 항생제를 중심으로)

현재 사료첨가제 시장의 주요 관심사항은 2011년 7월부터 시행되고 있는 사료첨가용 항생제 (AGP: antimicrobial growth promoter) 사용 금지'에 대비한 항생제 대체용 소재의 개발일 것이다. 항생제는 병원성 미생물의 성장이나 증식을 억제하고 영양소 이용율을 개선시키고 성장 촉진 효과가 있기 때문에 현재까지 가장 경제적인 사료첨가제로 사용되어왔다. 즉, 항생제를 통해 축산업의 생산성이 개선되었고, 대규모 집단 사육을 가능케 하여 축산업의 발전에 많은 기여를 해왔다.

그러나 최근에는 항생제의 오남용으로 가축의 면역력이 저하되어 질병에 쉽게 걸리며, 많은 종류의 항생제 내성 미생물이 출현하였으며 인수공통 전염병의 경우에는 사람에게도 치명적인 위협을 가할 수 있는 위험성이 대두된 상태이다.

또한 축산물의 항생제 잔류 문제는 축산 분뇨의 자원 재활용화를 불가능하게 하여 경제적인 손실은 물론 환경오염을 가중시키는 문제가 있으며, 육류를 소비하는 사람에게 항생제가 전이 되어 축산물의 안전성이 사회적 문제로 대두되고 있다.

국내의 항생제 사용량은 매년 조금씩 줄어드는 추세이지만 2004년 현재 축/수산 항생제 사용은 1,291톤으로 축산 선진국의 소비량에 비해 2 ~ 10배 많이 사용하고 있는 실정이었다. 가축의 성장촉진 목적으로 사용되던 성장촉진용 항생제(Antibiotic growth promoters: AGP)의 사용이 2005년부터 단계적으로 금지되기 시작하여 2011년부터는 콕시듐 제제를 제외하고 전면적으로 그 사용이 금지되었다.

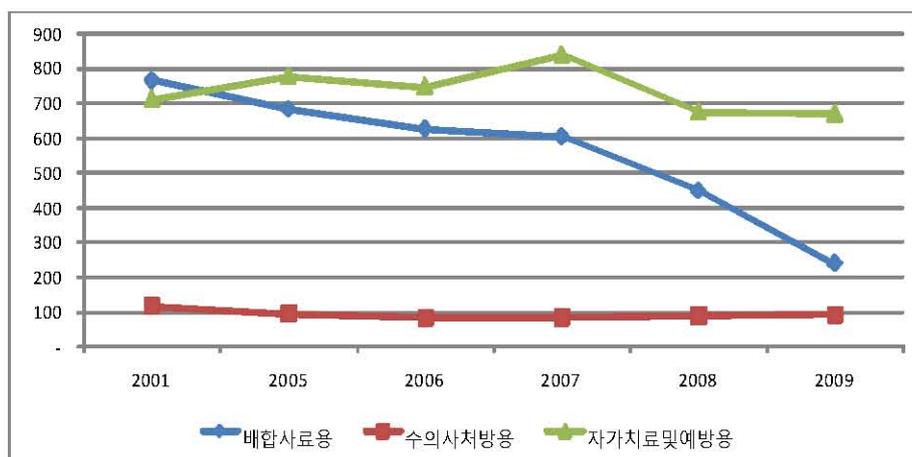


표. 용도별 항생제 판매실적  
(월간닭고기 (2010)4:61)

성장 촉진용 항생제 사용이 중단되면 사료 효율이 감소하고, 이유 후 폐사율이 증가하며, 연간 모든 생산량이 감소할 뿐만 아니라 수의학적 치료용 약품 사용으로 인한 경비가 증가되는 등의 경제적 손실이 수반된다는 분석보고가 있는 것처럼 (Hayes et al. 2002. Food Control 13:97) 축산업에서 단순히 항생제의 사용을 규제하는 것만으로는 경제적인 손실을 초래하여 근본적인 대책으로 부족하기 때문에 항생제를 대체할 수 있는 첨가제의 개발이 절실히 요구되는 실정이다.

현재 사료첨가제 시장에서 항생제 대체제로 사용되고 있는 것들은 1) 생균제 (probiotics), 2) 올리고당:  $\beta$ -glucan, lectin, mannan-oligosaccharides, fructo-oligosaccharides, 3) 효소제, 4) 유기산제(organic acids), 5) 식물 추출물, 6) 미네랄: Cu, Zn 등이 각각의 효능을 갖고 시장에서 사용되고 있다.

생균제는 항생제 대체제로 가장 널리 사용되고 있으며, 정장작용을 하는 유산균, 비타민 및 생리활성물질을 공급하는 효모(yeast), 탄수화물 분해를 돕는 고초균, 병원성 미생물의 성장을 억제하는 방선균, 누룩곰팡이균 등이 사용되고 있으며 각 미생물의 작용 기전이 다르기 때문에 복합제제로 사용되고 있다. 하지만 대부분 생균제 제품의 가격대가 10,000원/kg 이상으로 높고, 유통기간 중 유효 미생물의 생존을 적정 수준 이상으로 유지하기 어렵다는 단점을 가지고 있다.

올리고당 중  $\beta$ -glucan은 비특이적 면역에 관여하는 물질로 효모 세포벽 및 버섯에서 추출한 고분자 다당이며 macrophage(대식세포), neutrophil(호중구)등의 면역관련 세포를 활성화시키고 여러 가지 cytokine의 분비를 촉진하여 면역능력을 증진시킨다. 올리고당은 식이섬유의 기능을 하여 정장작용을 통하여 설사를 감소시키는 효능을 나타낸다. 이들 제품도 추출, 정제 공정이 들어있어 제조원가를 낮추기가 어렵기 때문에 사용량 확대가 어려운 실정이다.

프로테아제, 아밀라제, 리파아제와 같은 효소의 첨가는 영양소 소화와 흡수를 개선시키며 이를 통해 성장을 촉진시킨다. 알파-갈락토시다제, 프로테아제는 소화장애를 일으키는 대두올리고당, 트립신 저해단백질(trypsin inhibitor) 등 사료 중에 존재하는 항영양인자의 함량을 낮추는 역할을 한다. 스웨덴에서는 사료 내 성장 촉진용 항생제 금지이후 효소제 사용이 대안으로 자리잡았다. 그러나 사료용 효소분야의 경우에는 특히 진입장벽이 높고, 많은 연구개발 노력이 필요하며, 제품화 이후에도 대규모의 마케팅 노력이 필요하기 때문에 국내 유수의 대기업도 쉽게 접근하지 못하고 있는 실정이다.

유기산제는 위장 pH를 낮추고 사료의 완충작용을 개선시켜 장내 단백질 분해 및 영양소 소화율을 개선시키고 유해균의 증식을 감소시킴으로써 성장 촉진 및 사료 효율 개선 효과가 있다. 현재 사료첨가용 항생제의 작용 기전과 가장 유사하다는 평가가 있다.

식물 추출물은 고추, 오레가노, 박하, 계피 백리향 등의 추출물로서 내분비 및 면역체계를 개선시키는 것으로 알려져 있으나, 제품별로 효과의 차이가 크고, 원료 공급의 문제로 대량 생산, 사용이 어려운 실정이다.

## 2 절 사료첨가제 시장 동향

위와 같이 많은 제품들이 시장에 출시되어 있지만 기존의 항생제 대비해서 가격 혹은 성능 면에서 우월성을 확보하지 못하기 때문에 항생제를 1:1로 완전히 대체하지는 못하고 있는 실정이다. 국내에서 가축용 항생제 대체제 개발에 관한 내용을 검색하면 면역력 향상, 항균 효능 등에 의한 가축의 질병 억제에 관한 내용이 대부분을 차지한다. 하지만 유럽에서의 항생제 대체제 개발에 관한 문헌의 대부분은 사양 성적 (performance) 향상에 관한 것이다. 따라서 면역 증강, 항생 효능, 항균 효능 등의 질병 대응능력의 향상과 가축의 생산성을 향상을 동시에 만족시킬 수 있는 사료첨가용 소재의 개발이 항생제를 대체할 수 있는 소재로서 성공 가능성이 높을 것으로 예상된다.

현재 축산업과 관련하여 요구성이 높은 항목 중의 하나가 가축의 생산성 증가와 건강한 가축의 생산일 것이다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 주관기관에서는 2006년 중기청 기업부설 연구소 지원사업 과제를 수행하면서 경제성있는 가축의 면역력을 향상시킬 수 있는 한방 소재를 개발하였으며, 본 과제에서는 많은 유용성을 갖는 프로바이오틱스 미생물의 축산 사료 분야 진입의 활성화를 위하여 항박테리아/ 항진균 등의 항균 능력을 지표로 하여 프로바이오틱스 미생물의 능력을 향상시키고, 향상된 프로바이오틱스 균주의 능력을 최대한 발휘할 수 있는 제형을 제작하고자 하며, 이러한 능력을 가축 사양 시험을 통하여 검증하고자 한다.

본 과제를 성공적으로 수행하기 위해서는 가축 사양 시험을 통한 효능 검증이 필수적이며, 개발된 제품을 안정적으로 생산하기 위해서는 항박테리아/항진균 등의 항균력으로 표현되는 프로바이오틱스 미생물의 능력의 증대가 필요하며, 이를 위해 산업적인 미생물 개발에 사용되는 대사공학 지식 및 균주 개발 기술을 사용하고자 하며, 또한 건강한 축산 제품의 생산을 목표로 하기 때문에 혈액중의 사이토카인 물질 분석, 육제품의 육질 평가 등의 다양한 분석을 수행할 예정이다.

즉, 축산 농가에서 필요로 하는 가축의 질병 대응 능력 향상 및 가축의 생산성 향상을 동시에 만족하는 소재를 개발하여 이를 활용함으로써 건강한 가축을 고효율, 고생산성으로 생산할 수 있도록 연구하는 것을 목적으로 본 과제를 신청하였다.

## 3 절 사료 첨가용 미생물 생균제 개발의 필요성

프로바이오틱스(probiotics, 미생물 생균제)란 항생제(antibiotics)와 대비되는 용어로서 사용되고 있으며, 장내 미생물의 균형을 개선함으로써 숙주인 사람, 동물에 대하여 유익하게 작용하는 균주를 말한다. 또한 올리고당, 식이섬유 등과 같이 이들 장내의 유익한 미생물들을 증식시키는 인자(因子)로 장내환경 개선과 숙주의 건강개선에 유의적인 작용을 하는 물질들을 prebiotics라 하며, probiotics와 prebiotics을 포함시킨 것을 synbiotics라고 한다. 이들 prebiotics와 probiotics는 식품 및 건강관련 산업에 널리 사용되고 있는 장 건강 개선 기능성 물질로서, 장내 미생물의 균형 유지, 장내 건강을 위한 유익 세균의 제공, 장내 유익 세균을 통한 면역력 증가, 호르몬 균형 및 식품 유래 질병과 알러지 예방 등을 위해 이용되고 있다. 이러한 프로바이오틱스는 소화 흡수 개선, 유당 불내증(lactose-intolerance) 완화, 유아 설사 예방, 과민성 대장 증상 완화 효과 이외에도 항생제 섭취를 통한 소화기계 혼란 예방 및 치료, 특정 암(직장암 등) 발생 위험 감소, 혈중 콜레스테롤 감소/혈압 저하로 인한 심혈관계 질환 위험 감소, 체중 조절 보조, 비타민 B군과 엽산(folic acid)의 생성, 캔디다 균에 의한 질내 또는 구강

위험 감소, 대장암 발생 위험 감소 등의 효과가 꾸준히 보고되고 있다.

동물 사료 분야에서의 프로바이오틱스 시장은 2003년의 경우 전년 대비 15% 성장한 2,630만 불 정도였으며, 유럽의 경우 사료첨가용 항생제(AGP)의 규제로 인해 동물 사료에서의 프로바이오틱스의 시장 규모가 지속적으로 증가하여 2010년까지 9,000 만불에 도달할 것으로 예측되었다. 미국의 경우에도 fluoroquinone 계 항생제의 사료 첨가 금지 이후에 프로바이오틱스의 사료 첨가가 크게 늘고 있는 추세이다. 이외에도 선진국에서는 프로바이오틱스 제품의 성공적인 시장 진입과 확대를 위해서 기술력있는 소규모 회사의 인수 합병을 통한 시장 진입과 제품 개발 기간 단축, 공동 제휴 및 조인트 벤처 (Joint Venture)등의 협력 관계 강화, 연구 개발을 위한 투자 확대 등이 이루어지고 있으며, 판매와 마케팅 측면에서는 프로바이오틱스 협회 결성을 통한 홍보 활동 강화, 학술잡지 발표를 통한 연구 결과 홍보, 특정 집단을 위한 틈새시장 제품 개발, 전문적 지식을 갖춘 훈련된 영업 사원들의 확보, 타사 제품과 구별되는 독창적인 자사 브랜드 제품 개발, 의료 및 수의관련 종사자에 대한 지속적 홍보 활동 등을 펼치고 있다. 연구 개발 측면에서는 분자생물학적 tool을 이용한 장내 다양한 균종 간의 상호 작용 이해, 제품내 산소를 차단하는 대체 포장 기술의 개발과 이를 통한 프로바이오틱스 제품의 유통기한 연장, 프로바이오틱스를 보완하여 생존력을 강화시키는 FOS와 같은 프리바이오틱스의 개발, 프로바이오틱스의 보호를 위한 미세 캡슐의 개발, 맛과 향 강화 기술, 특성 균주 선별과 입상을 통한 효능 확보 등에 노력하고 있다. (신정규, 2005, Prebiotics와 Probiotics의 해외 시장 현황 및 개발 전략)

국내의 경우에도 전문 업체들로부터 많은 프로바이오틱스 제품들이 개발되고 시장에 도입되었다. 하지만 국내 사료첨가용 프로바이오틱스 시장의 경우, 개발 초기에는 업체들이 경쟁적으로 시장에 참여하였으나, 미생물 생균제의 안정성 유지가 어려우며, 프리바이오틱스 등의 유사한 기능성 제품들과의 경쟁 심화, 효능 입증에 장기간의 연구와 비용이 투입되는 문제점으로 인해 많은 업체들이 시장 참여에 어려움을 겪고 있는 실정이다.

프로바이오틱스 균주들의 축산 분야에서의 이용성과 관련해서는 많은 견해들이 있으나 유기산 및 박테리오신(bacteriocin) 등의 프로바이오틱스 미생물 대사산물에 의한 장내 미생물(intestinal microbiome) 수의 감소 및 적절한 균형 유지, 숙주의 면역력(mucosal immunity) 향상 및 장건강 증대 등의 효능일 것이다. 이중에서도 프로바이오틱스 균주에 의해 생성되는 유기산은 사료 첨가용 항생제(AGP)와 작용 기전(mode of action)측면에서 많은 유사성을 보이고 있고, AGP 대체제 시장에서 프로바이오틱스 균주와 더불어 많이 판매되고 있는 실정이다.

본 과제에서는 이러한 유용성을 갖는 프로바이오틱스 미생물의 축산 사료 분야 진입의 활성화를 위하여 1) 항균 능력의 지표로서 연구보고 되고 있는 사용 가능할 것으로 예상되는 유기산 및/또는 박테리오신 등을 생산하는 자체 선별한 프로바이오틱스 균주의 능력을 대사공학 지식 및 기술을 활용하여 최대한 향상시키고, 2) 향상된 프로바이오틱스 균주가 사료첨가제로 첨가될 때 효능을 최대한 발휘할 수 있도록 미세캡슐화 등으로 제형화하며, 3) 이러한 능력을 가축 사양 시험을 통하여 검증하여 우수한 사료첨가제를 개발한다. 즉 기존의 가축 사료 첨가제용 프로바이오틱스 제품의 효능은 떨어지면서 값비싼 한계를 극복함으로써 본 과제에서 개발되는 사료첨가제가 축산업의 당면 과제인 효율적이고 우수한 사료첨가용 항생제(AGP) 대체제로서 성공적으로 시장에 안착할 수 있도록 한다.

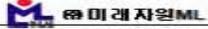
## 4 절 선행 연구

### i. 한약재 부산물 기반의 가축 번역력 향상용 사료첨가제 개발

당사에서는 국내 최대의 한약재 유통 시장인 경동시장에서 발생되는 한약재 부산물로부터 보양강장제로 사용되는 것들만 선별하여 즉시 건조 및 분쇄하여 가축용 사료 첨가제로 상품화하였으며, 관련되는 내용을 한국식품영양과학회 2010 국제심포지엄 Special Session 에 '한약 부산물의 사료로의 활용'이라는 제목으로 발표하였다.

### 제 조 과 정

원료 (선별, 건조후)	제품 (#12, Ø1.8)	포장 (25kg, 비닐)
		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료수거 : 3회/일</li> <li>- 당일수거, 당일건조</li> <li>- 원료선별 : 보양강장제</li> <li>- 건조 : 수분 8% 이하</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 건조물 공장입고 : 1회/주</li> <li>- ø1.8 분쇄 (#12)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 25kg/포, 비닐 내지</li> <li>- 사용량 : 1kg/ton</li> <li>    w/o AGP 1.5~2.0kg/ton</li> </ul>



### 한약추출물 건조

- 원료 공급처 : 서울 경동시장 (한국 최대)
- 수거 : 3회/일 (12시, 3~4시, 6~7시)
- 건조기 용량 : 1,000kg 원료 -> 350kg 건조물
- **당일수거** → **당일 건조** 원칙
- **수거 및 선별** : 10~20년 이상의 약업 경력자 3명

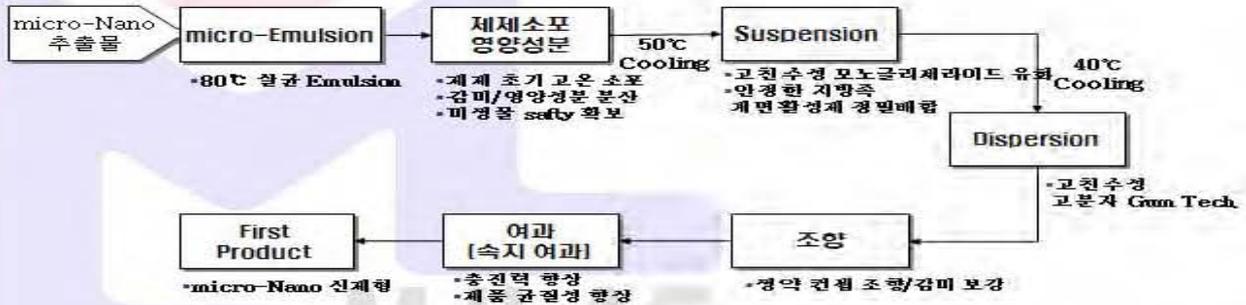
※ 한약은 대부분 조탕




본 복합생약제는 국내 최대의 한약재 유통 시장인 경동시장에서 품질 유지를 위하여 오랜 경험을 갖는 약업 경력자를 통해 보약제로 사용된 한약제만을 선별하고, 선별된 한약제를 당일 건조하였다. 일 평균 생산량은 350 kg으로 안정적인 공급이 가능한 수준으로 예측된다.

## 응용제품 제작 - 분산, 유화

### 분산/유화 응용수 제제 설계



미래자원ML

## 육계 시험 - 1차

- 장소 : 포천 C농장
- 일령 : 23 ~ 33일령 (10일간)
- 사료 : 기존 급여 사료에 0.2% (2 kg/ton) 첨가

	마리수	개시체중	종료체중	증체량	비 고
대조구	3,300		1.61	0.60	
	3,200		1.59	0.58	
	5,500	1.01	1.60	0.59	
시험구	3,140		1.57	0.76	
	3,140		1.61	0.80	
	6,280	0.81	1.59	0.78	+ 32.2%

※ 시험구 : 기존 사육구중 성장이 정체된 구를 선택

미래자원ML

이렇게 제조된 한약부산물의 경우 여러 가지 원료들이 혼합되어 있어 품질관리가 어려울 것으로 예상된다. 따라서 적절한 품질관리의 수단으로 한약제에 가장 많이 첨가되는 감초(Glycyrrhiza uralensis)와 당귀(Angelica gigas)의 주요 지표 물질인 글리시리진(glycyrrhizin)과 데컬신(decursin)의 함량을 분석한 결과, 원물 중에 존재하는 지표물질들이 상당량 잔류하고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 글리시리진과 데컬신을 품질관리를 위한 지표물질로 사용할 예정이다.

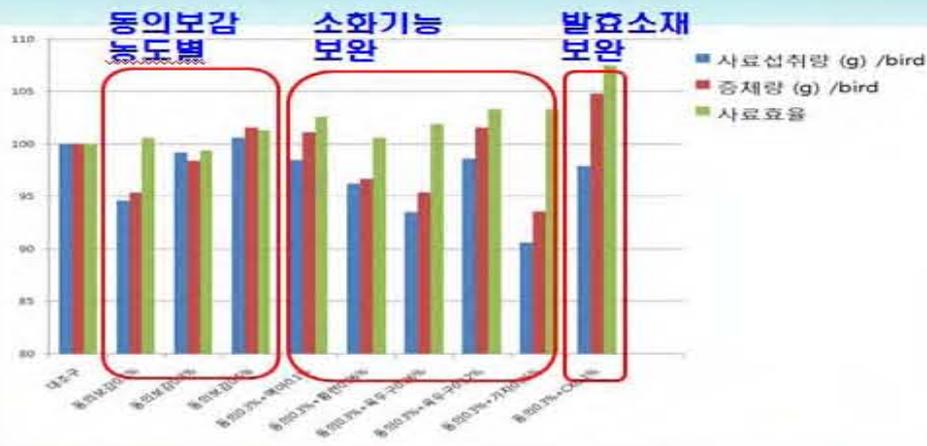
또한 이 한약 부산물 제품(제품명 “동의보감”)에 가축의 소화 활성화 기능을 추가할 목적으로 소화 촉진에 관여하는 한약제를 추가하여 가축(육계)의 생산성 증가 여부를 실험하였다. 그 결과 한약제별로 정도의 차이는 있으나, 소화 기능에 관여하는 한약제를 첨가함으로써 가축의 증체가 가능함을 확인할 수 있었다. (2011.01, (주)미래자원ML 자체시험농장)

## 주요 지표물질 함량분석

원료	제품내 함량	원생약 함량 (식약청고시)
감초 (Glycyrrhizin)	0.029% (295.7 µg/g)	2.5% 이상
당귀 (Decursin)	0.037% (372.0 µg/g)	4.9% 이상

미래자원ML

## 동의보감의 성능 개선 시험 : 생산성 (Performance)



⇒ 소화 기능 보완에 의한 가축 생산성 및 사료 효율 향상 가능성 확인

## ii. 식물 유래의 고성능 프로바이오틱스 유산균 선별

당사에서는 김치로부터 내산성도, 내담즙성, 내열성이 우수한 식물 유래의 고성능 프로바이오틱스 유산균주를 선별하였으며, 선별된 미생물의 면역 조절 기능을 평가하여 논문 발표 및 특허를 출원, 등록한 바 있다. 아래는 논문에 기재한 내용으로써 선별된 균주인 *Lactobacillus plantarum* 10hk2의 균주 특성으로 공시 균주인 *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917에 비해 산성 조건에서의 저항력, 담즙산에 대한 저항성 및 고온에 대한 내성이 모두 높은 것을 볼 수 있다

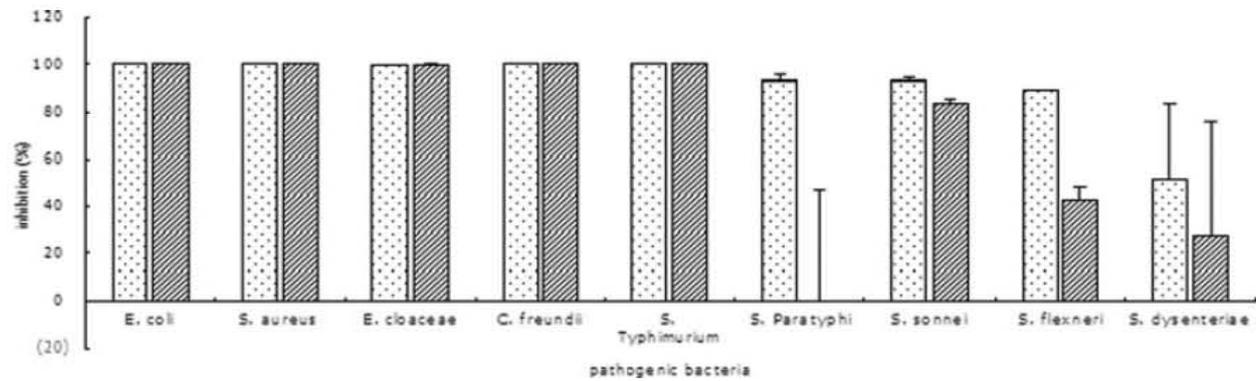
**Table 1.** Tolerance of *L. plantarum* strains to acidity, bile salts and heat

Strains	Condition <sup>†</sup>		Concentration of bile acids <sup>‡</sup>			Heat	
	Control	pH 1.5	Control	0.5%	5%	Control	90°C
<i>L. plantarum</i> 10hk2	7.12 ± 0.40	8.00 ± 0.78 (112%)	7.52 ± 0.28	7.38 ± 0.83 (98%)	6.53 ± 0.44 (87%)	8.11 ± 0.32	7.51 ± 0.79 (93%)
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917	7.72 ± 0.83	6.81 ± 0.09 (88%)	7.72 ± 0.43	7.20 ± 0.59 (93%)	5.76 ± 0.60 (75%)	8.17 ± 0.37	4.72 ± 0.90 (58%)

All values represent the average log number ± SD of three independent experiments and values in parentheses represent the percentage of surviving bacteria after treatment when the control before treatment is assumed to be 100%.

<sup>†</sup>, acid tolerance in response to 2 hr incubation at pH 1.5; <sup>‡</sup>, bile acid tolerance of the probiotic strains after 2 hr incubation at pH 1.5, estimated after 3 hr incubation in a medium containing the indicated oxgall concentrations; , each probiotic strain was treated at 90°C for 10 min.

아래의 그림은 선별 균주인 *L. plantarum* 10hk2 균주가 *S. paratyphi*, *S. sonnei* 등의 일부 유해 미생물에 대한 억제도가 공시균주에 비해 높음을 보여주는 것이다.



**Fig. 1.** Antibacterial effects of *L. plantarum* against pathogenic bacteria. The pathogenic strains used as indicators have been described in the text. Each indicator bacterium was inoculated at a concentration of 10<sup>7</sup> CFU/ml, and then co-incubated with *L. plantarum* at 37°C for 24 hr.

Antibacterial activity was determined by measuring the viability of the pathogenic bacteria and each of the pathogenic bacteria was cultured separately for the controls. (▨), *L. plantarum* 10hk2; (▩), *L. plantarum* ATCC 14917.

아래의 표는 *L. plantarum* 10hk2를 급여한 쥐에서 장내 미생물의 균총을 분석한 것으로써 다른 장내 미생물에 비해 *Salmonella*, *Shigella* 등의 유해 미생물의 성장을 억제함을 보여주고 있다.

**Table 3.** Comparison of fecal lactic acid and enteric bacteria, and *Salmonella* and *Shigella* species population of mice

		Periods			
		1st week	2nd week	3rd week	4th week
Control	LAB	7.69 ± 0.25 (80 ± 8%)	7.81 ± 0.14 (82 ± 6%)	7.79 ± 0.05 (78 ± 2%)	7.89 ± 0.07 (78 ± 2%)
	S & S <sup>†</sup>	ND	6.47 ± 0.23 (6 ± 4%)	6.65 ± 0.06 (6 ± 1%)	6.66 ± 0.17 (5 ± 2%)
	Enteric <sup>‡</sup>	7.07 ± 0.10 (20 ± 8%)	7.03 ± 0.03 (14 ± 2%)	7.10 ± 0.14 (16 ± 3%)	7.25 ± 0.07 (18 ± 1%)
<i>L. plantarum</i> 10hk2	LAB	7.56 ± 0.11 (70 ± 10%)	7.87 ± 0.05 (93 ± 1%)	7.79 ± 0.02 (92 ± 1%)	8.43 ± 0.10 (96 ± 1%)
	S & S	ND	5.93 ± 0.07 (2 ± 1%)	6.00 ± 0.15 (2%)	6.16 ± 0.10 (0.5%)
	Enteric	7.18 ± 0.17 (30 ± 10%)	6.68 ± 0.10 (6 ± 1%)	6.62 ± 0.08 (6 ± 1%)	6.90 ± 0.05 (3%)
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917	LAB	7.64 ± 0.14 (68 ± 11%)	7.82 ± 0.06 (83 ± 7%)	7.92 ± 0.04 (90 ± 1%)	8.10 ± 0.11 (90 ± 3%)
	S & S	ND	6.23 ± 0.07 (2 ± 1%)	6.16 ± 0.15 (2%)	6.32 ± 0.05 (2%)
	Enteric	7.31 ± 0.12 (32 ± 11%)	7.02 ± 0.22 (14 ± 6%)	6.87 ± 0.07 (8 ± 1%)	7.04 ± 0.09 (8 ± 2%)

All values represent the average log number ± SD and values in parentheses represent the average percentage ± SD of the total bacteria.

<sup>†</sup>, intestinal *Salmonella* and *Shigella* species were counted using MacConkey agar and *Salmonella* and *Shigella* media; <sup>‡</sup>, the other enteric bacteria apart from LAB and *Salmonella* and *Shigella* species were counted; LAB, lactobacilli; ND, not detected; S & S, *Salmonella* and *Shigella* species.

(Chon et al. Microbiol. Immunol. (2010) 54:228 The effect of a vegetable-derived probiotic lactic acid bacterium on the immune response)

이 밖에 김치 등의 식물체로부터 프로바이오틱스 유산균주의 선별 및 동물에 대한 효능 평가를 수행하였으며, 다수의 논문을 발표하였다.

ORIGINAL ARTICLE

## The effects of a vegetable-derived probiotic lactic acid bacterium on the immune response

Heeson Chon and Byungryul Choi

Research and Development Center, Milae Resources ML, 7FL, 24-3 Bangi-dong Songpa-gu, Seoul, 138-050, Korea

Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 33 (2010) e41–e49



Contents lists available at ScienceDirect  
Comparative Immunology, Microbiology  
and Infectious Diseases

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/cimid](http://www.elsevier.com/locate/cimid)



### Suppression of proinflammatory cytokine production by specific metabolites of *Lactobacillus plantarum* 10hk2 via inhibiting NF- $\kappa$ B and p38 MAPK expressions

Heeson Chon<sup>a,\*</sup>, Byungryul Choi<sup>a</sup>, Gajin Jeong<sup>b</sup>, Eungyo Lee<sup>c</sup>, Seunghui Lee<sup>c</sup>

<sup>a</sup> R&D Center, Milae Resources ML Co., Ltd., 7FL, #24-3 Bangi-dong, Songpa-gu, Seoul 138-050, Korea

<sup>b</sup> Immunology Laboratory, School of Biological Sciences, Seoul National University, 56-1 School of Biological Science, Seoul National University, 599 Gwanangno, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

<sup>c</sup> Biomedical Process Development Department, KRIBB, Daejeon 305-806, Korea

Journal of  
Applied Microbiology



Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072

ORIGINAL ARTICLE

### Immunomodulatory effects of specific bacterial components of *Lactobacillus plantarum* KFCC11389P on the murine macrophage cell line RAW 264.7

H. Chon<sup>1,2</sup>, B. Choi<sup>2</sup>, E. Lee<sup>3</sup>, S. Lee<sup>3</sup> and G. Jeong<sup>1</sup>

1 Immunology Laboratory, 56-1 School of Biological Science, Seoul National University, Seoul, Korea

2 Research Centre, Milae Resources ML Co., Ltd, Seoul, Korea

3 Biomedical Process Development Department, KRIBB, Daejeon, Korea

Avian Pathology (December 2008) 37(6), 593–597



### Evaluation system for an experimental study of low-pathogenic avian influenza virus (H9N2) infection in specific pathogen free chickens using lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum* KFCC11389P

Heeson Chon<sup>1,2</sup>, Byungryul Choi<sup>2</sup>, Gajin Jeong<sup>1</sup> and Inpil Mo<sup>3\*</sup>

### iii. 유산균주를 이용한 한약재의 발효와 가축 급여에 의한 사양 평가

선별된 유산균 중에서 *Lactobacillus* LS-2를 이용해서 각종 한약재의 발효를 수행하여 한약재의 DPPH 전자공여능과 같은 항산화 효과 등 생리적인 효능의 변화가 있는지를 확인하여 논문을 출간하였다.

<b>NPC</b>	<b>Natural Product Communications</b>	2010 Vol. 5 No. 8 1277 - 1282
<p><b>Comparison of Aqueous Plant Extracts Before and After Fermentation with <i>Lactobacillus paracasei</i> LS-2 on Cytokine Induction and Antioxidant Activity</b></p> <p>Heeson Chon*, Gyeomheon Kim and Sungkwon Kim</p> <p><i>R&amp;D Center, Milae Resources ML Co., Ltd. 7FL, #24-3 Bangi-dong Songpa-gu, Seoul, 138-050, Korea</i></p>		

또한 위 논문 data를 상용화하기 위한 목적으로 황금(*Scutellaria baicalensis*)의 주산지인 전라남도 화순군이 발주하는 과제를 수주하여, 황금 추출물을 *Lactobacillus* LS-2로 발효를 수행한 뒤, 육계를 대상으로 사양 평가를 수행하였다.

Dietary Treatments	FeedIntake	BodyWeightGain	Feed intake/Body Wt. Gain
	(g/bird)	(g/bird)	
Control	1322.3	861.7	1.53
Control+Avilamycin	1386.0	854.3	1.62
황금원물 0.5%	1375.9	855.1	1.61
황금열수처리 0.1%	1399.2	873.9	1.60
황금열수처리 0.5%	1498.0	896.4	1.67
황금열수-발효처리 0.1%	1471.2	<b>918.3</b>	1.60
황금열수-발효처리 0.5%	1341.4	844.0	1.59

사료 섭취량이 증가하기는 했지만 대조구에 비해 증체(body weight gain)가 가능함을 확인하고, 발주처인 화순군 농업기술원에 보고한 바 있다.

(지식경제부 2010 지역연교산업육성사업, 화순군 한약초를 이용한 사료첨가제 소재 개발, (주)미래자원ML)

※ 주관기관의 동물 실험 설비

주관기관인 (주)미래자원ML은 동물실험 설비를 보유하고 있으며, 육계, 산란계 등의 양계 실험 및 쥐(rat) 실험이 가능하다.

**양계용 사양시험 infra**

<위치> - 경기도 남양주시 일부음 도곡1리  
- 고려대학교 시험농장내 위치

<규모> - 육계        2실    48 cage  
- 산란계    2실    105 cage  
- Rat        1실    60 cage  
- 작업실

<시험 자원> - 고려대학교 지규만 교수님

**주요 사양시험 내용**

- 각종 영양공급원의 영양 평가 및 품질 평가
- 각종 사료첨가제의 기능성 및 생리적 영향 요인 평가
- 당사 제품 및 시장 경쟁 제품의 효능 수준 비교
- 영업 현장 의뢰 시험
- 기타 (Networking 등)

(사양실험 설비 소개자료, (주)미래자원ML)

iv. 유산균(*Lactobacillus* sp., 당사 선별균주)과 프로피오닉균(*Propionibacterium* sp., 공시균주)의 병원성 미생물성장 억제 효과 시험

유산(lactic acid)을 생성하는 당사 고유의 *Lactobacillus* sp.와 프로피온산(propionic acid)을 생성하는 *Propionibacterium* sp. 두 균주를 선정하여 항박테리아 및 항진균 효능을 시험하였다.

- 표적미생물(진균): *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*
- 표적미생물(박테리아) : *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*

※ 균주의 source 및 media 사용균주는 ATCC 혹은 임상에서 분리한 균주를 사용하였으며, 아래의 Table 과 같다.

	Source	Number	Media
<i>Propionibacterium jensenii</i> *	ATCC	4868	SL
<i>Lactobacillus LS-2</i>	patent strain		MRS
<i>Echerichia coli</i>	ATCC	25922	LB
<i>Salmonella enteritidis</i>	Clinical isolation		SS
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC	8100	Nutrient
<i>Aspergillus flavus</i> **	ATCC	22546	ME
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC	9197	ME

\* *Propionibacterium* sp. 는 30℃, 혐기적 조건에서 배양

\*\* *Aspergillus* 속 곰팡이는 30℃, 호기적 조건에서 배양

\*\*\* 그 외 나머지 균주는 37℃, 호기적 조건에서 배양

\*\*\*\* *Lactobacillus* sp. 와 *Propionibacterium* sp. 는 루프를 이용하여 배지의 삼등분 되는 지점에 2 cm 의 선으로 streaking 하여 24 ~ 48 시간동안 배양

① *Propionibacterium* sp. 에 의한 곰팡이 *A. fumigatus*과 *E. coli*의 성장억제 및 글리세롤 첨가에 따른 성장 억제 효과

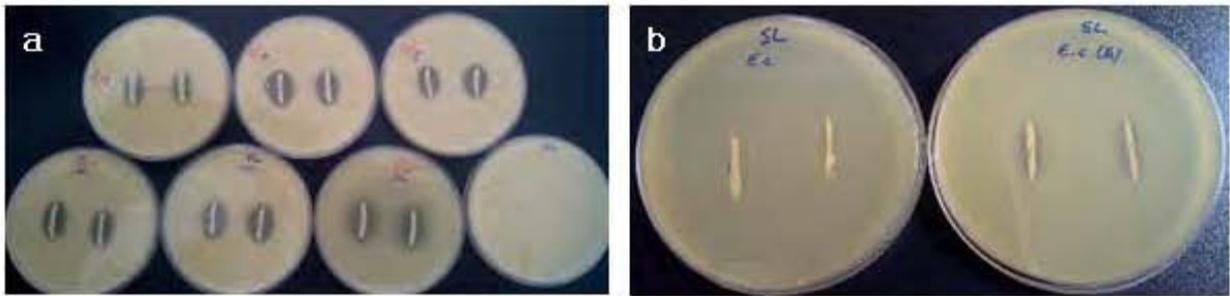


Figure 1. Growth inhibition overlay assay with *Propionibacterium* sp. against the mold *A. fumigatus*, and *E. coli*. *Propionibacterium* sp. against *A. fumigatus* on concentrations of glycerol overlaid agar are 0, 10, 50 mM in the upper row from left to right and 100, 200, and 500mM in the low row from left to right and last plate is not inoculated with *Propionibacterium* sp. (a). *Propionibacterium* sp. against *E. coli* on glycerol overlaid agar is 100mM in the right(b).

→ *Propionibacterium* sp.의 *A. fumigatus* 성장억제 효과가 있다는 것을 확인하였으며, 글리세롤 처리에 따라서도 그 억제대가 커지는 것을 확인할 수 있었고, *E. coli*에 대한 직접적인 성장억제 효과는 없었지만 glycerol 100mM을 첨가한 배지에서는 약간의 억제대가 관찰되었다.

② *Lactobacillus* sp.에 의한 곰팡이 *A. fumigatus*와 *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. marcescens*의 성장억제 및 글리세롤 첨가에 따른 억제효과

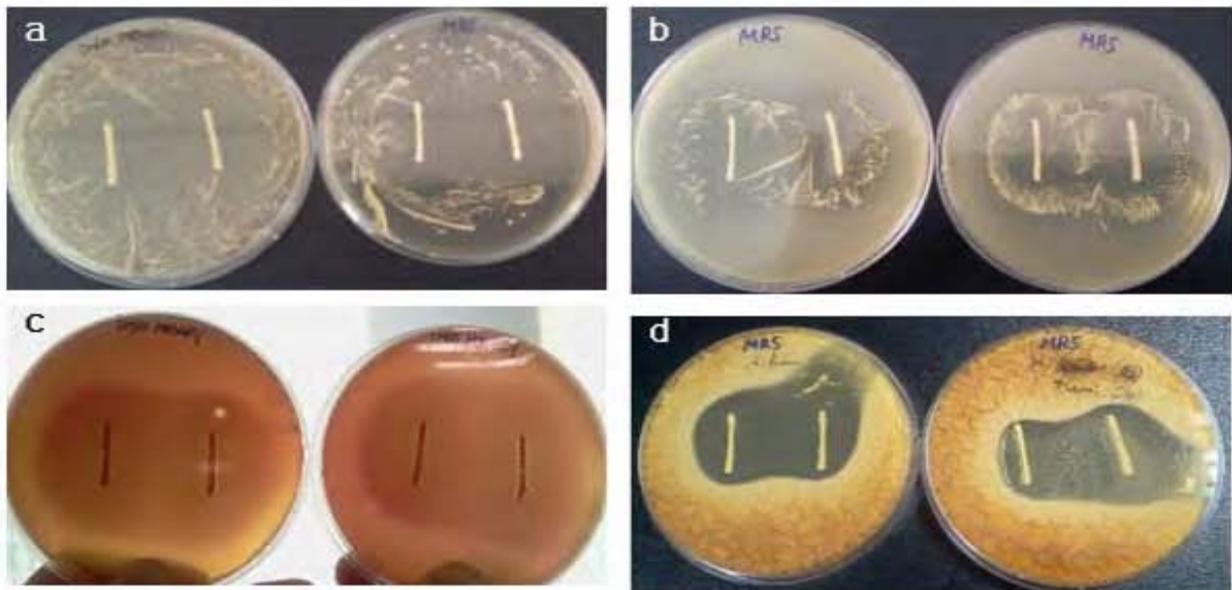


Figure 2. Growth inhibition overlay assay of *Lactobacillus* sp. on different microbes and mold on concentration of glycerol overlaid agar is 100mM in the right. a) *S. marcescens*, b) *E. coli*, c) *S. enteritidis*, d) *A. fumigatus*.

→ *Lactobacillus* sp.가 *S. marcescens*를 억제하였고, 글리세롤 100mM를 첨가한 배지에서는 억제효과가 촉진되는 것을 확인하였다. 또한 *E. coli*도 성장을 억제하였으나, 글리세롤 100mM를 첨가한 배지에서도 비슷한 억제효과가 있는 것을 확인하였다. 배지의 주변부로

는 *E. coli*가 뚜렷하게 자랐으나, *Lactobacillus* sp.의 주변부는 자라지 않았으며 분산된 작은 클로니 형태로만 자란 것을 확인하였다. *S. enteritidis* 역시 글리세롤 100mM를 첨가한 배지와 비슷한 억제효과가 있는 것을 관찰할 수 있었으며, 곰팡이 균주인 *A. fumigatus*에서 예 대해서도 명백한 성장 억제 효과를 확인할 수 있었다.

③ *Propionibacterium* sp.와 *Lactobacillus* sp.에 의한 *A. flavus*의 성장억제 비교



Figure 3. Antifungal overlay assay with *Propionibacterium* sp. compared with *Lactobacillus* sp. against the *A. flavus*.

→ *Propionibacterium* sp.는 *A. flavus*의 성장을 억제하지 못한 반면, *Lactobacillus* sp.는 억제 효과가 있는 것을 확인하였다.

④ 상대적으로 항생제 및 항곰팡이제 효과가 있는 것으로 나타난 *Lactobacillus* sp.를 spontaneous & adaptive mutation을 유도하여 변이주를 선별한 후 *A. flavus*에 대한 항곰팡이 효과를 비교 실험하였다.

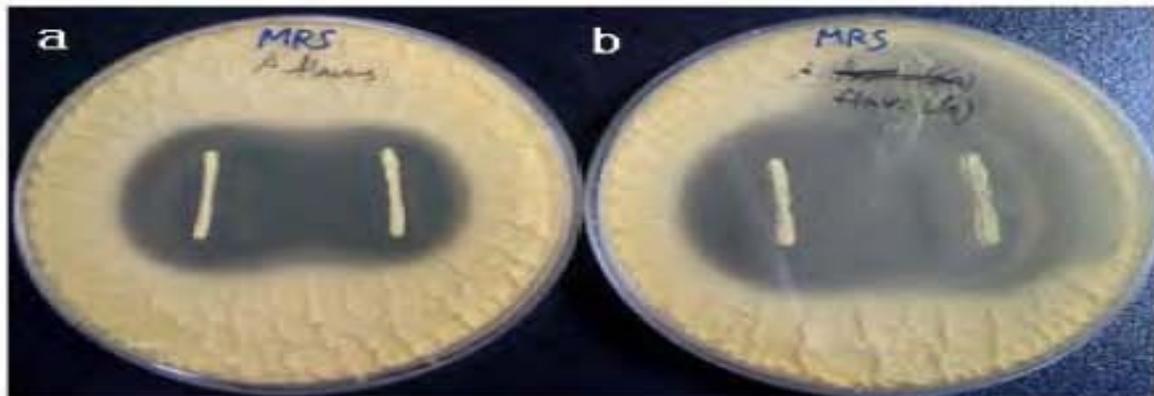


Figure 4. Antifungal overlay assay with *Lactobacillus* sp. compared with its spontaneous mutant. A) wild type strain, b) spontaneous mutant.

→ 두 균주에 대한 항곰팡이 효과 비교 실험 결과 야생형 *Lactobacillus* sp.에 비해 돌연변이 된 균주에서 *A. flavus*에 대한 억제효과가 더 높게 나타났다.

⑤ *Lactobacillus* sp. spontaneous & adaptive 변이주의 대사물 분석

: MRS borth 에 글리세롤을 3% 첨가한 배지에 *Lactobacillus* sp. 및 spontaneous & adaptive 변이주를 각각 접종한 후 37℃에서 48 시간 배양한 후에 배지 중에 축적된 유기산을 분석하였다.

유기산	<i>Lactobacillus</i> LS-2	<i>Lactobacillus</i> LS-2 sp.
Lactic acid	0.61 g/l	1.13 g/l
Acetic acid	0.02 g/l	0.05 g/l
Succinic acid	0.01 g/l	0.01 g/l

→ 표에서 보는 것처럼 변이주에서 일부 유기산 생산이 증가됨을 확인할 수 있었다. 이는 변이주의 항진균 효과 증가가 유기산의 증가에 기인함을 추정하게 해준다. 향후 추가 시험을 통하여 이를 명확히 하고 효능을 극대화 할 수 있는 인자를 찾아서 제형화 한 뒤에, 가축 사양 시험을 수행하고, 사료첨가제화 하고자 한다.

⑥ 결론 및 향후 계획

*Propionibacterium* sp.는 그람 양성균으로 spore를 생성하지 않고 SL 배지에서 성장속도가 느린 단점이 있으며, 혐기적 조건을 유지해야 하는 번거로움이 있다. 또한 *Propionibacteria*는 propionic acid를 생성하기위해 glucose와 같은 당을 사용하여 carbon dioxide를 생성하는데 그 요구조건이 *Lactobacillus*에 비해 높다. 반면에 *Lactobacillus* sp. 는 호기적 조건으로 24시간 이내 콜로니를 확인할 수 있으며 성장에 iron성분이 필요하지 않다. 또한 hydrogen peroxide에 매우 강한 내성이 있어, *Propionibacterium*에 비해 성장에 필요한 요구조건들이 적다. 선행 실험 결과 *Propionibacterium* sp. 보다 *Lactobacillus* sp.가 병원생물과 곰팡이에 대해 성장억제 효과가 높게 나타났다. *Lactobacillus* sp.의 병원성 미생물과 곰팡이의 억제하는 능력이 있어 *Propionibacterium* sp.보다 우수하였다. 실제로 *Propionibacteria*는 치즈같은 유제품을 발효시킬때 free amino acid와 peptide들이 필요한데, 이러한 요소들은 *Lactobacillus*의 proteolytic enzyme에 의해 casein이 분해됨으로서 생성, 공급되는 것들이다.

본 과제에서는 기존의 선별된 spontaneous & adaptive 우수 변이주의 유기산 생성능력을 극대화 할 수 있는 요인들을 대사공학적으로 최적화시키고, microencapsulation 등의 기술로 제형화하여 시판될 수 있는 효율적인 사료첨가제를 개발할 것이다. 또한 지속적인 경쟁력을 유지하기 위해서 위와 같이 좀 더 우수한 변이주를 얻는 작업은 지속할 예정이며, 이는 가축의 병원성 미생물과 곰팡이에 대해 탁월한 성장억제효과를 기대할 수 있을 것이다.

# 제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

## 1 절 연구개발수행 내용 및 결과

### 1. 1차 년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
항박테리아/항진균 성능확인	실험 균주 및 대상 균주의 double layer 방법 사용	대상균주를 soft agar에 혼합하고 도달한 뒤, 실험 균주를 일정한 길이로 streaking
대사물 생산 증가요인 실험	- in vitro assay : agar plate 에 배지 성분으로 혼합한 뒤에 유산균주 streaking - in vivo 실험 : 양계 사양 실험	in vitro: 위의 방법과 동일 in vivo: 유산균이 실제 작용하는 장내환경에서 유산균과 동시 급여하여 사양실험 수행
배합비 설정 및 실험 사료 제작	NRC 사양 표준에 의하여 사료 배합비 설정 및 실험사료 제작	NRC 사양 표준에 의하여 isonitrogenous, isocaloric 하도록 사료 배합비 설정 및 실험사료 제작
사료 적합성 평가	실험 사료의 기호성 평가에 의한 평가	Pair feeding 방식에 의한 사료 섭취량 비교
유산균 제형 개발	호화전분 및 monoolein을 기반으로 하는 w/o 제형 개발	호화전분 및 monoolein을 기반으로 하는 w/o 제형 개발
실험 동물 혈청생화학적 분석	Elisa kit 분석	Elisa kit를 이용하여 혈액(혈장)중의 immunoglobulin 및 각종 cytokine류 정량 분석

### 가. 유산균 인공 변이 및 변이주 특성 연구

본 연구에서는 김치에서 선별한 미래자원ML의 특허 유산균 균주인 *Lactobacillus sp.*로부터 자외선 조사 (UV irradiation) 법을 이용하여 변이주를 제작하였다. 먼저 변이주 선별을 위하여 균주의 pH 별 성장 특성을 분석하였다. 균주에 의한 lactic acid의 생산성을 향상시키기 위하여 lactic acid로 pH를 조정한 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) 평판 배지에서 *Lactobacillus sp.* 균주의 성장을 평가한 결과, pH 4.0 배지에서는 성장이 되고, pH 3.5 배지에서는 성장이 되지 못하는 것을 확인하고, 자외선 (ultraviolet) 인공변이 처리 후 pH 3.5 MRS 평판 배지에서 성장하는 변이주를 선별하였다. 자외선 인공 변이는 18시간 동안 배양한 모균주 (*Lactobacillus LS-2*)를 pH 3.5 MRS 평판 배지에 도달한 후 10W UV lamp를 30cm 거리에서 조사하였으며, 치사율이 99.99%가 되는 시간인 30초간 조사하여 mutation 시킨 후 30 °C에서 배양하였다. 도달 농도는 균주희석액을 O.D(optical density) 0.1로 맞추어  $10^{-8}$ 까지 희석하였다. *Lactobacillus LS-2*, *Lactobacillus LS-2* + UV의 두 그룹으로 나누었고, 원액에서부터  $10^{-8}$  까지 각 희석단계의 튜브에서 배지에 세장씩 도달하였다. 도달한 배지를 18시간 배양한 후 콜로니를 선별하였다.

### (1) 선별균주의 효소 및 성장도 측정

유산 생성 증강 변이주를 선별하기 위해 methyl red 지시약을 사용하였다. MRS 평판 배지에 methyl red 10ppm를 첨가한 배지에 pH 3.5 MRS 평판 배지에서 선별된 콜로니(colony)들을 배양하였다. 멸균된 이쭉시개를 사용하여 picking technique 으로 배지에 가볍게 찍었으며, methyl red MRS 평판 배지상의 콜로니 주위에 균주로부터 생성되는 유기산(주로 lactic acid)에 의해 methyl red의 색이 변하는 속도 및 크기를 측정하여 선별하였다. 선별된 변이주를 대상으로 항진균 및 항박테리아 기능 정도를 측정하여 확인하였다.

선별된 균주의 낮은 pH에서의 성장을 확인하기 위해 lactic acid로 pH를 5 ~ 3.5까지 조정된 MRS 배지에서의 성장을 확인하였다. 모균주인 *Lactobacillus LS-2*와 비교하여 가장 낮은 pH에서 자라는 균주를 선별하여 *Lactobacillus ML-7*로 명명하였으며, 이후의 실험에 사용하였다. 변이주인 *Lactobacillus ML-7*의 일반 배지에서의 성장 정도를 *Lactobacillus LS-2*와 비교하였으며 그 결과는 아래의 그림과 같다.

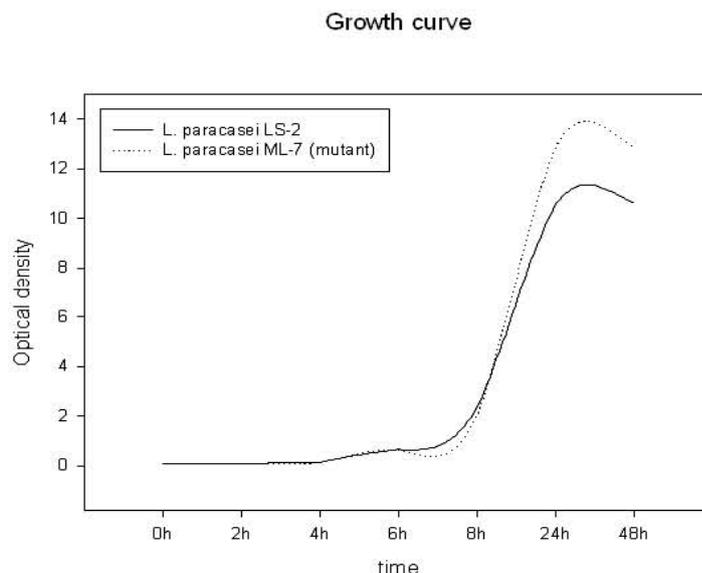


그림. 변이주 *Lactobacillus ML-7*과 *Lactobacillus LS-2*의 MRS broth 에서의 성장 비교

### (2) 선별 균주의 곰팡이 성장 억제 효과

모균주인 *Lactobacillus LS-2*와 변이주 *Lactobacillus ML-7* 균주를 각각 두 번의 활성화를 거친 후 실험에 사용하였고, *Aspergillus* 속 곰팡이는 30℃에서 배양을, *Lactobacillus LS-2* 와 그 외 나머지 균주는 37℃, 호기적 조건에서 배양하였다. *Lactobacillus LS-2* 균주 및 변이주 *Lactobacillus ML-7* 균주를 활성화 한 후 루프를 이용하여 배지의 삼등분이 되는 지점에 2cm 백금선으로 streaking 하여 24~48시간 동안 배양하였다. Overlay assay에 이용할 병원성 미생물(*Escherichia coli* ATCC 25922)은 활성화를 위하여 LB broth에 밤새(overnight) 배양하였다. 배양한 배지와 동일한 0.7% agar 배지를 멸균한 후에 45℃ 항온수조에서 온도 균일화 후, 0.1mL/4mL의 농도로 희석하여 10mL을 overlay 하였다. Overlay assay에 이용할 곰팡이 균주도 동일한 방법으로 실험을 하였으며, 균주 희석 농도는 hemocytometer를 이용하여 각각의 미

생물 수를 counting 한 후에  $1 \times 10^4$  conidias/mL 로 희석된 균주를 10mL을 overlay 하였다. Overlay 한 표적균주인 *E. coli* 는 37°C, 호기적 조건에서 24~48시간 동안 배양하며 관찰하였으며, *Aspergillus* 속 곰팡이는 30°C, 호기적 조건에서 배양하며 관찰하였다. 표적 균주와 사용한 배지는 다음 표와 같다.

표. 실험에 사용한 균주 목록

	Source	Media
<i>Lactobacillus</i> LS-2	patent strain	MRS
<i>Lactobacillus</i> ML-7	본 과제	MRS
<i>Echerichia coli</i>	ATCC 25922	LB
<i>Aspergillus flavus</i> *	ATCC 22546	ME
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 9197	ME

\* *Aspergillus* 속 곰팡이는 30°C, 호기적 조건에서 배양

\*\* 그 외 나머지 균주는 37°C, 호기적 조건에서 배양

\*\*\* *Lactobacillus* sp. 는 루프를 이용하여 배지의 삼등분 되는 지점에 2 cm의 선으로 streaking 하여 24 ~ 48 시간동안 배양

선별된 균주의 *Escherichia coli* ATCC 25922에 대한 성장 억제 효과를 실험한 결과, 모균주인 *Lactobacillus* LS-2와 변이주인 *Lactobacillus* ML-7 모두 성장 억제 효과를 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 그 결과는 아래의 사진과 같다



그림. *Escherichia coli* ATCC 25922에 대한 *Lactobacillus* LS-2 (left) 와 *Lactobacillus* ML-7(right)의 성장 억제

두 종류의 곰팡이 균주인 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus fumigatus*의 항곰팡이 효과를 비교 하였다. 먼저 *A. fumigatus*에 대한 항곰팡이 효과를 확인하였다. *Lactobacillus* LS-2는 *A. fumigatus*의 항곰팡이 효과가 미비했으나(left), 변이균주인 *Lactobacillus* ML-7에서는 성장 억제환이 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 결과는 아래의 그림과 같다.

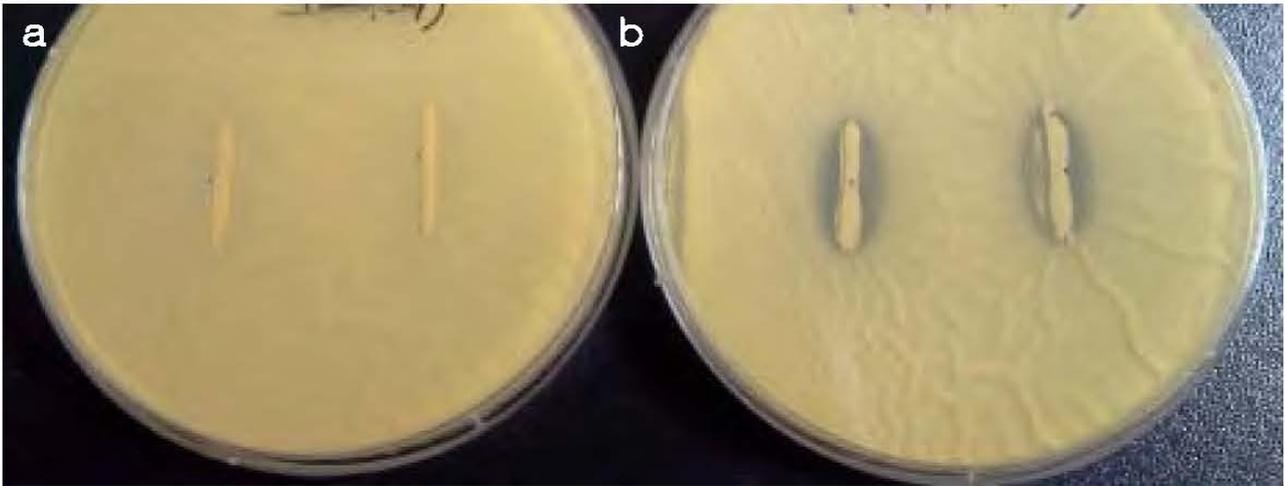


그림. *Aspergillus fumigatus*에 대한 *Lactobacillus* LS-2 균주(left)와 *Lactobacillus* ML-7 균주(right)의 성장 억제 효과

곡물에서 아플라톡신을 생성하는 *A. flavus*를 대상으로 하여 *Lactobacillus* LS-2와 *Lactobacillus* ML-7 균주의 성장억제 효과를 시험한 결과, 변이주인 *Lactobacillus* ML-7의 성장 억제환이 상대적으로 크게 형성되는 것으로 보아, 변이주인 *Lactobacillus* ML-7의 항곰팡이 효능이 모균주에 비해 높은 것을 확인할 수 있었다. 그 결과는 아래의 그림에 표시하였다.



그림. *Aspergillus flavus*에 대한 *Lactobacillus* LS-2 균주(left, a)와 *Lactobacillus* ML-7 균주(right, b)의 성장 억제 효과.

이어서 변이주인 *Lactobacillus* ML-7 균주가 곰팡이 및 유해 미생물을 억제하는 능력에 영향을 줄 수 있는 요인을 찾아내기 위하여 글리세롤이 첨가된 배지에서 항균, 항곰팡이 효과가 증대되는지 여부를 실험하였다. 글리세롤의 첨가량이 증가할수록 *A. flavus*의 성장 억제환이 커지는 경향을 볼 수 있었으며, *E. coli*에 대해 억제 효과도 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 그 결과는 아래의 그림과 같다.

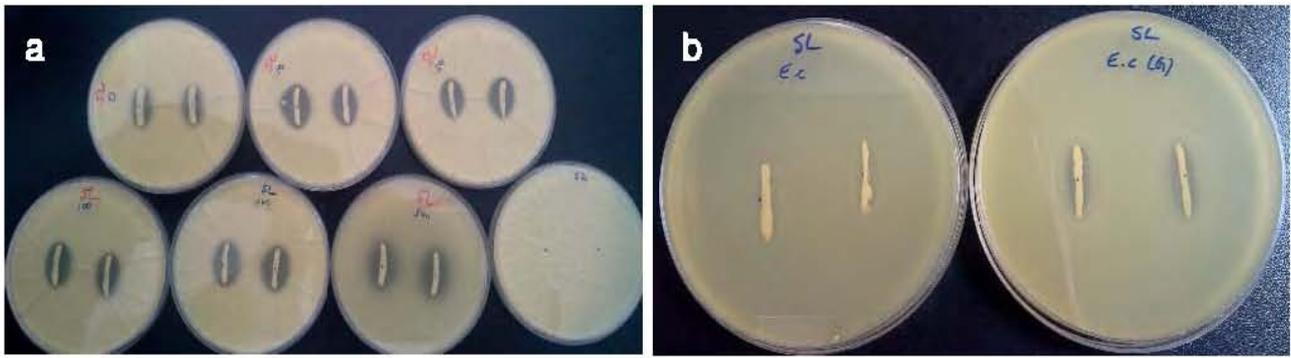


그림. 글리세롤 첨가량에 따른 *Lactobacillus* ML-7 균주의 *A. flavus* 억제 (a) 및 *E. coli* (b) 억제 효과

\*(그림 a의 글리세롤 첨가량은 좌상으로부터 10 mM, 20mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 100 mM, 0mM)

\*\*\*(그림 b의 글리세롤 첨가량은 좌로부터 0 mM, 10 mM)

### (3) *Lactobacillus* LS-2와 *Lactobacillus* ML-7의 대사물 분석

MRS broth에 글리세롤을 3% 첨가한 배지에 각각의 균주를 접종한 후, 37°C에서 48시간 배양한 후에 배지 중에 축적된 유기산을 분석하였다. 분석항목은 유산균이 생성하는 주요 유기산 3가지이며 결과는 다음의 표와 같다. 표에서 보는 것처럼 변이주에서 유기산 생산이 증가됨을 확인할 수 있었다. 이는 변이주의 항진균 효과 증가가 유기산의 증가에 기인함을 추정하게 해준다.

유기산	<i>Lactobacillus</i> LS-2	<i>Lactobacillus</i> ML-7.
Lactic acid	0.61 g/l	1.13 g/l
Acetic acid	0.02 g/l	0.05 g/l
Succinic acid	0.01 g/l	0.01 g/l

표. 유산균 *Lactobacillus* LS-2 와 *Lactobacillus* ML-7 균주에 의한 유기산 생성 비교

### (4) *Lactobacillus* LS-2와 *Lactobacillus* ML-7 의 성장도 비교 및 pH 변화

모균주와 변이주의 성장도의 차이가 O.D 상에서 차이가 있는 것을 확인하였지만, viable cell counting을 통해 실제 생균수도 차이가 있는지를 측정하였으며, 접종 48시간 후 full growth 에 도달하였을 때의 배지의 pH를 측정하였다. Cell viable counting을 통해 O.D 측정법의 결과 수치를 비교한 결과, 동일한 양상을 보였다. 48시간 후 배지의 pH를 측정한 결과, 변이주를 배양한 배지의 pH가 좀 더 떨어지는 것을 보아 배지 중에 축적되는 lactic acid, acetic acid 등의 유기산이 더 많이 생산되기 때문인 것으로 추정할 수 있으며, 이는 생균수가 많음으로서 pH의 저감 결과가 당연시 될 수 있다.

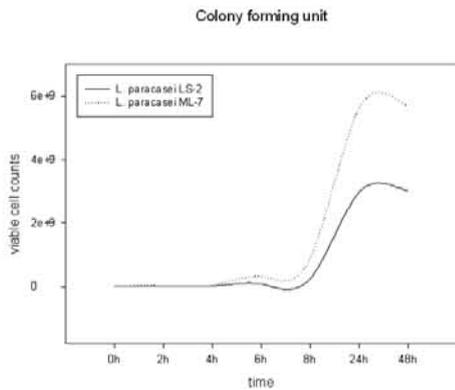


그림. 성장 중 viable cell counting

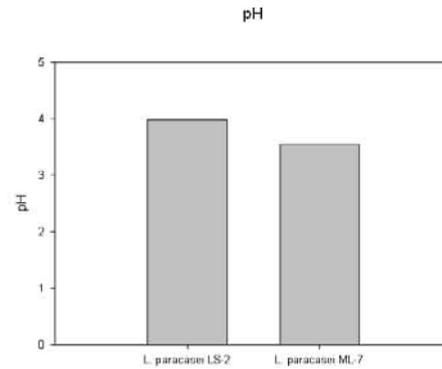


그림. 성장 배지의 pH 비교

### (5) 대량 배양을 위한 배지 원가 절감 실험

일반적으로 유산균을 배양하기 위해서는 고가의 MRS 배지를 사용하며, 사용량도 L 당 약 50g 정도로 많은 양을 사용하기 때문에 대량 배양을 위해서는 저가의 배지 성분으로 대체가 필수적이다. 문헌 조사를 통하여 MRS 배지의 주 성분을 대체 할 수 있는 저렴한 원료로서 CSL (cron steep liquor)의 이용 사례가 있음을 확인하였고 본 과제에서도 산업적으로 사용되는 CSL을 구하여 여러 가지 조건 실험을 통해 최적의 구성비를 찾는 실험을 진행하였다.

우선, CSL을 기본적인 성분으로하여 배지에 필수적으로 들어가야 하는 여러 구성물질들을 바꾸어 가며 growth curve와 end point pH를 조사하였다. 아래의 그림에서 glucose은 20g/L를 첨가하였고, ammonium citrate 2g/L, sodium acetate 5g/L, magnesium sulfate 0.1g/L, manganese sulfate 0.05g/L, dipotassium phosphate 2g/L 는 동일한 양을 첨가하였으며, salt로 표현하였다. 아래의 실험에서 CSL은 10g/L, peptone은 2.5g/L, yeast extract는 4g/L로 배지에 첨가하였다.

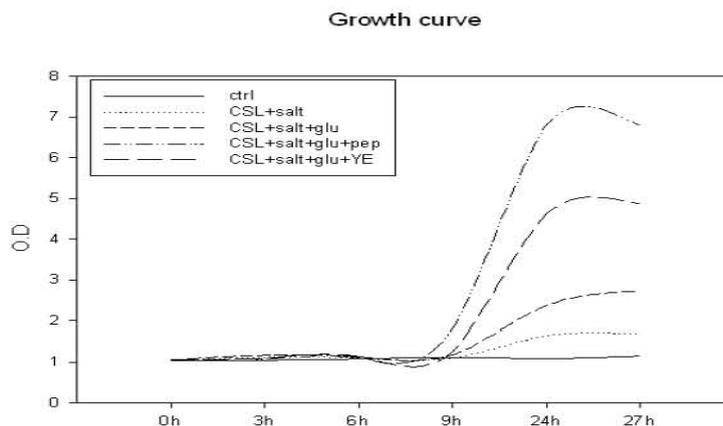


그림. *Lactobacillus* ML-7 균주의 성장을 위한 단백질원 변경 실험

그림에서 보는 바와 같이 CSL, salt, glucose만 첨가한 배지에서도 성장이 가능하며, peptone과 yeast extract 등이 추가되는 경우에 균체의 성장이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 peptone과 yeast extract는 고가의 배지 구성성분이므로 원가절감을 위해서라도 한 가지만 선

택하기로 하였으며, 추후 대량 생산시에는 배지 첨가 비용과 얻을 수 있는 균체의 상관관계를 구하여 첨가 여부를 결정할 필요가 있을 것으로 사료된다.

배지의 최종 pH를 측정한 결과, peptone 첨가군과 yeast extract 첨가군이 3.7 정도의 가장 낮은 pH를 유지하였으나, 두 그룹간의 유의한 차이는 없었다. CSL과 salt, glucose 만을 첨가한 배지의 경우에도 배지의 pH가 peptone, yeast extract를 첨가한 배지와 거의 비슷한 정도로 낮아지는 것(pH 4.2)을 확인할 수 있었으며, 이 결과로부터 기본 배지로 CSL, salt, glucose만 첨가한 배지를 사용하여도 될 것이라는 결론을 얻을 수 있었다.

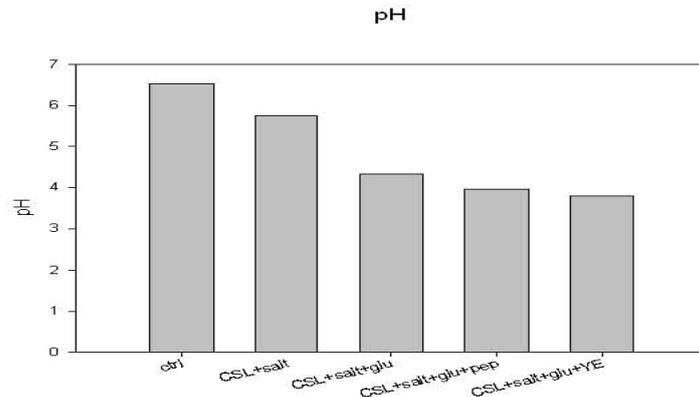


그림. 배지 종류별 *Lactobacillus* ML-7 균주 성장 배지의 pH

Section 3 - COMPOSITION / INFORMATION ON INGREDIENTS		
NAME	CAS RN	%
corn steep liquor	66071-94-1	
contains concentrate com solubles, rich in vitamins amino acids, minerals and other growth stimulants (approximately 50% solids)		
<a href="#">glucose, monohydrate</a>	14431-43-7	
<a href="#">phytin</a>	3615-82-5	
<a href="#">sulfur dioxide</a>	7446-09-5	0.2-0.5
<a href="#">water</a>	7732-18-5	>40

표. CSL 배지의 성분정보

**Section 2 - HAZARDS IDENTIFICATION**

**CHEMWATCH HAZARD RATINGS**

	Min	Max	
Flammability:	0	■	
Toxicity:	0	■	
Body Contact:	2	■	
Reactivity:	0	■	
Chronic:	0	■	

Min/Nil=0  
Low=1  
Moderate=2  
High=3  
Extreme=4

**CANADIAN WHMIS SYMBOLS**

그림. CSL 배지의 위험요소 지표정보

### (6) Glucose consumption

CLS 배지선별을 위해 접종 후 균체가 성장되는 동안 소비되는 glucose의 양을 측정하였다. 배지 내의 초기 glucose의 농도는 2,000mg/dl 첨가하였고, glucose는 9시간, 24시간, 27시간 총 세 번을 측정하였다. 그 결과 peptone과 yeast extract를 첨가한 경우 glucose의 소비 속도가 높은 것을 확인할 수 있었다.

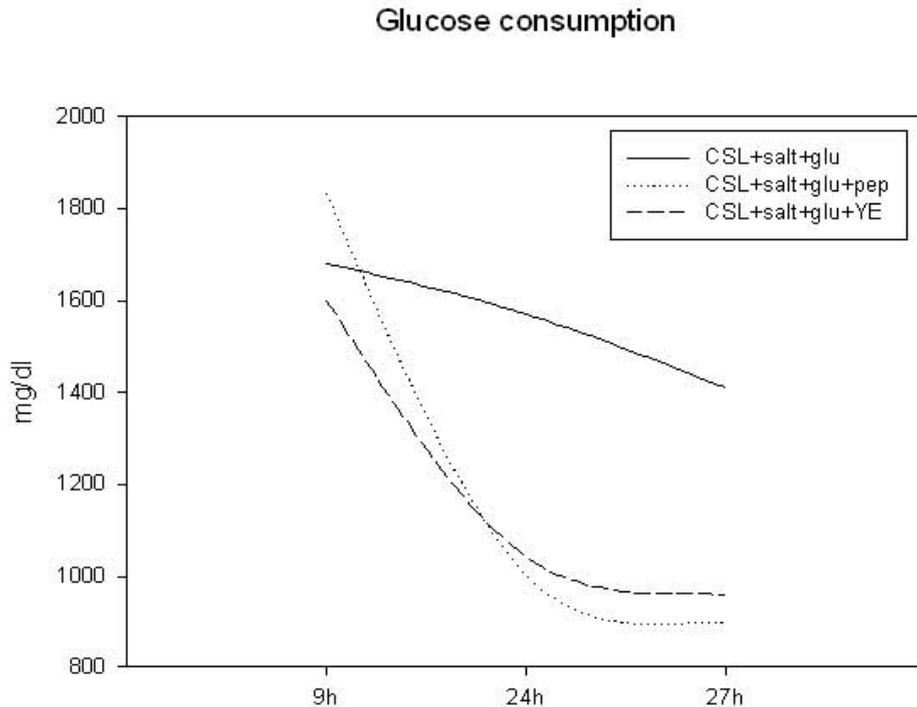


그림. 단백질원이 *Lactobacillus* ML-7 균주의 glucose 소비에 미치는 영향

### (7) CSL 농도 실험

27시간 후, peptone을 넣은 그룹에서 glucose 소비가 가장 빠른 것을 확인하고, 추가적인 질소 원으로 yeast extract 대신 peptone을 사용하기로 결정하였다. 추가적인 실험으로, salt, glucose의 농도는 고정하였고, CSL과 peptone의 농도를 바꾸어 가며 성장곡선을 측정하였다. 위의 결과와 같이 CSL은 10 g/L 에서 50 g/L 까지 변화시켰을 때, CSL의 농도가 높을수록 균체의 성장이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. CSL의 농도 50 g/L 이상의 조건에서 균체의 성장 실험을 수행하지는 않았으나, CSL의 점성이 높아 50 g/L 이상의 농도에서는 배지 조제 및 균체의 성장이 영향을 받을 수 있을 것이라고 판단하여 최대 농도를 50g/L 로 결정하였다. peptone 사용량에 있어서 2.5 g/L 와 5 g/L 에서 성장률이 비슷한 것으로 판단되어, 2.5 g/L 로 확정하였다. 따라서 MRS 배지를 대체할 수 있는 CSL 배지의 최종 구성표는 다음의 표와 같다.

Growth curve

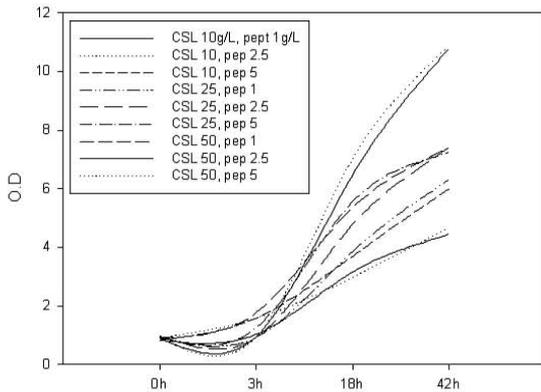


그림. CSL과 peptone이 *Lactobacillus* ML-7의 성장에 미치는 영향

CSL media components	g/L
CSL	50
peptone	2.5
sodium acetate	5
ammonium citrate	2
dipotassium phosphate	2
magnesium sulfate	0.1
manganese sulfate	0.05

표. 최적화된 CSL 배지 조성

최종적으로 최적화된 CSL 배지에서 *Lactobacillus* LS-2와 *Lactobacillus* ML-7의 growth curve 측정을 하여, 기존의 MRS 배지와 동일한 결과가 나오는지 확인하였다. 아래의 그림에서 보는 바와 같이 최적화된 CSL 배지와 MRS 배지에서 *Lactobacillus* LS-2와 *Lactobacillus* ML-7의 성장이 거의 유사한 정도로 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 추후 대량 배양시에 고가의 MRS 배지가 아닌, 저가의 CSL 최적화 배지를 사용하기로 결정하였다.

Growth curve in CSL media

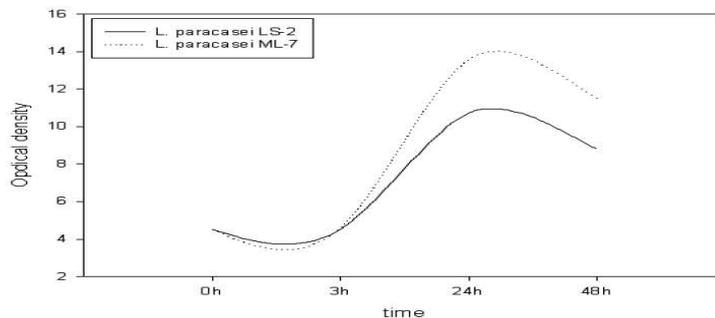


그림. 최적화된 CSL 배지에서 *Lactobacillus* LS-2와 *Lactobacillus* ML-7의 성장 비교

## 나. 유산균 코팅 연구

본 과제에서는 개발된 유산균을 축산 분야에 적용하기 위한 목적으로 경제적인 방법으로 유산균을 코팅하여 위장에서의 균주 사멸을 억제하고 장에서 코팅이 용해되어 유산균의 활성을 나타낼 수 있도록 하는 encapsulation 방법을 개발하는 것이다.

### (1) 코팅 재료에 따른 유산균의 코팅 효율

본 연구에서는 전분 입자를 활용한 유산균 코팅 및 지방산을 활용한 유산균의 고정 기법을 이용하여 유산균 코팅 기술을 개발하고자 수행되었다. 본 연구에서 사용한 유산균은 *Lactobacillus platarum*과 *Lactobacillus*를 (주)미래자원ML에서 공급받아 사용하였고, 코팅제로 옥수수전분은 대정시약에서 구입하였다. 유산균의 고정을 위하여 monoolein(분자량 356.54,

융점 35-37℃) 및 monostearate(분자량 358.56, 융점 56-61℃)을 TCI사와 대정시약에서 각각 구입하여 사용하였다. 본 유산균의 배양을 위하여 Difco™ Lactobacilli MRS broth 및 Difco™ Lactobacilli MRS agar를 사용하였다.

유산균은 제공받은 균을 한 colony 취하여 37℃ shaking incubator에서 24시간 배양하였고, 액체배지에서 자란 균을 한 colony 취하여 고체배지에 streaking한 후 37℃에서 24시간 배양시켰다. 배양된 균은 무작위 colony를 선정하여 액체배지에 넣고 37℃ shaking incubator에서 24시간 배양하였다.

유산균 코팅제로 호화전분은 3%(w/w) 전분 용액을 제조한 후 autoclave에서 멸균과 함께 호화를 진행시켰으며, 호화전분은 온도를 30℃로 낮춘 후 연구에 이용하였다. 본 호화전분 용액 100mL에 0.1 g의 monostearate 또는 monoolein을 첨가한 후 각각의 유산균주를 1 mL 첨가하였다. 이후 코팅된 유산균의 생균수 측정 및 코팅물의 미세구조를 현미경을 이용하여 관찰하였다. 유산균 고정제의 응고점은 DSC를 이용하여 측정하였다. 이때 온도는 20℃에서 200℃로 20℃/min의 속도로 가열시킨 후 210℃에서 20℃로 20℃/min의 속도로 냉각시키면서 열량변화를 측정하였다.

유산균주의 효과적인 코팅 재료 선정을 위하여 본 연구에서 사용한 코팅제들의 미세구조를 그림 1.1에 나타내었다. 전분은 직경이 작고 균일한 입자를 구성하였으며, 전반적으로 고른 입자 분포를 보이고 있는 데 비하여, monostearate는 직경이 크고 불균일한 크기의 입자들이 형성되었다. 반면 monoolein은 입자상을 보이지 않았으며, 이는 낮은 융점에 의하여 이들이 전반적으로 결정화가 이루어지지 않은 데 기인한 것으로 판단되었다.

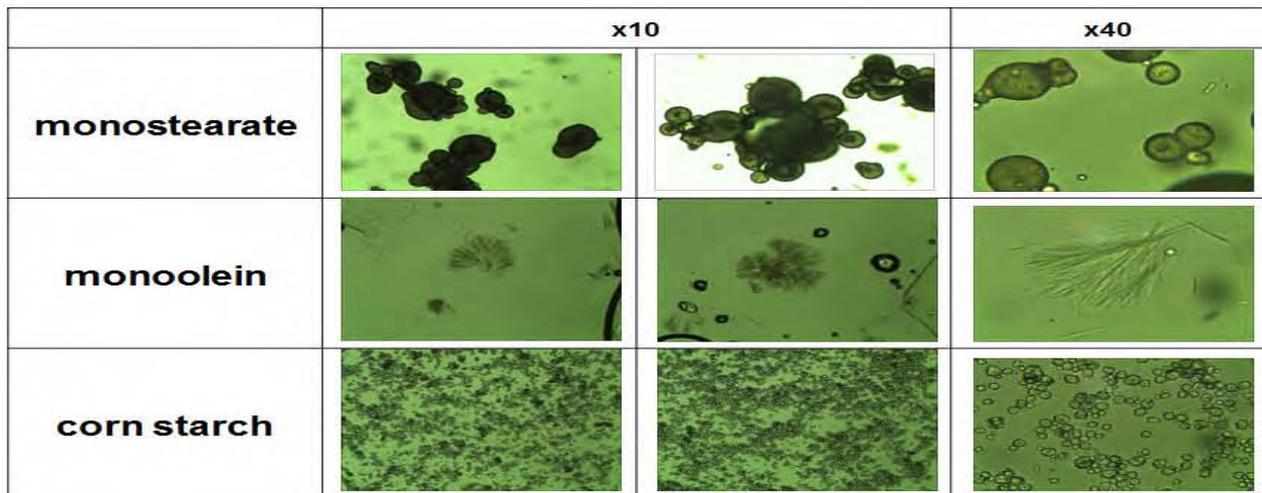


그림. 전분, monostearate 및 monoolein의 미세구조 관찰.

따라서 전분을 코팅제로 사용하였을 때, 효과적인 유산균 코팅이 가능할 것으로 판단되었고, 이들에 일부 고정제를 첨가하여 *Lactobacillus plantarum*을 코팅한 결과를 그림 1.2에 나타내었다. 전반적으로 코팅 후 미세구조는 코팅 제제 간에 큰 차이를 보이지 않았으며, 일부 응집물의 발생이 발견되었지만, 고정제로서 monoglyceride류의 첨가가 전분의 코팅 형태에 큰 영향을 미치지 않은 것으로 사료된다.

생균수 측정결과, 전반적으로 코팅 처리된 유산균은 대조구에 비하여 낮은 colony 수를 보였으며, 따라서 전분에 의한 코팅이 효과적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다(아래 그림 참조). 반면 코팅 효율은 전분에 immobilizer를 첨가하였을 때 보다 효과적이었으며, 이는

전분 외부에 존재하는 유산균류를 순차적으로 첨가된 monoglycerides에 의하여 제 코팅이 이루어짐으로서 기인한 것으로 판단된다. 특히 monostearate의 첨가가 monoolein에 비하여 낮은 생균수를 보임으로써 효과적인 immobilizer로 이용되었음이 관찰되었다. 이상의 차이는 두 immobilizer의 용점차이에 기인한 것으로 생각된다.

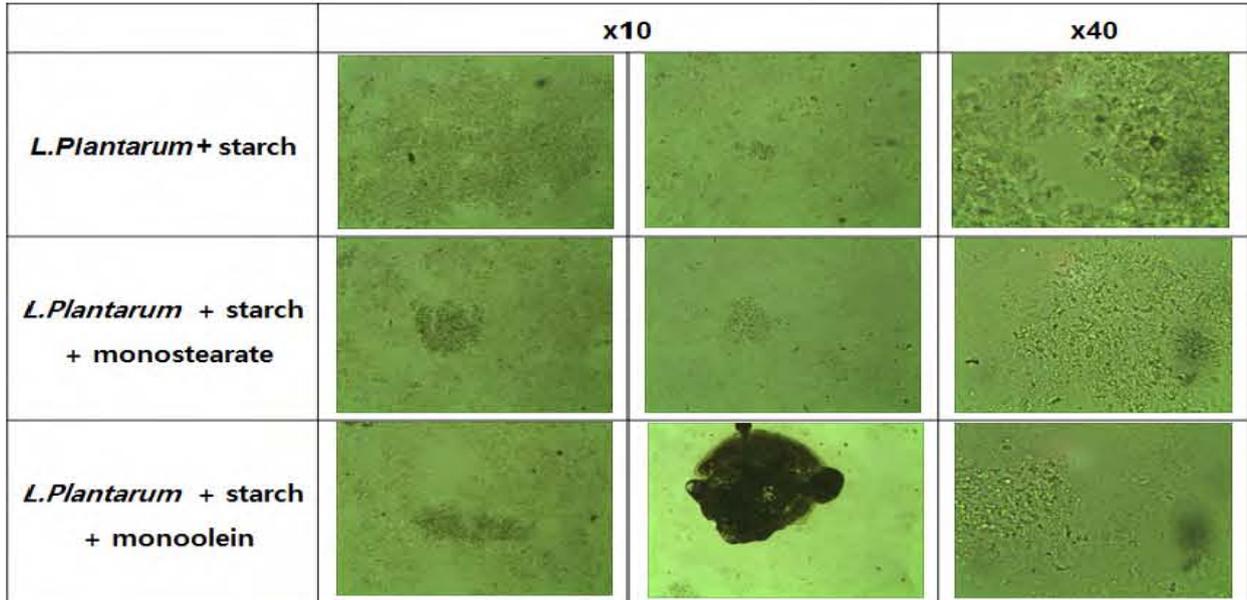


그림. 전분과 고정제에 의해 코팅된 *Lactobacillus plantarum*의 미세구조.

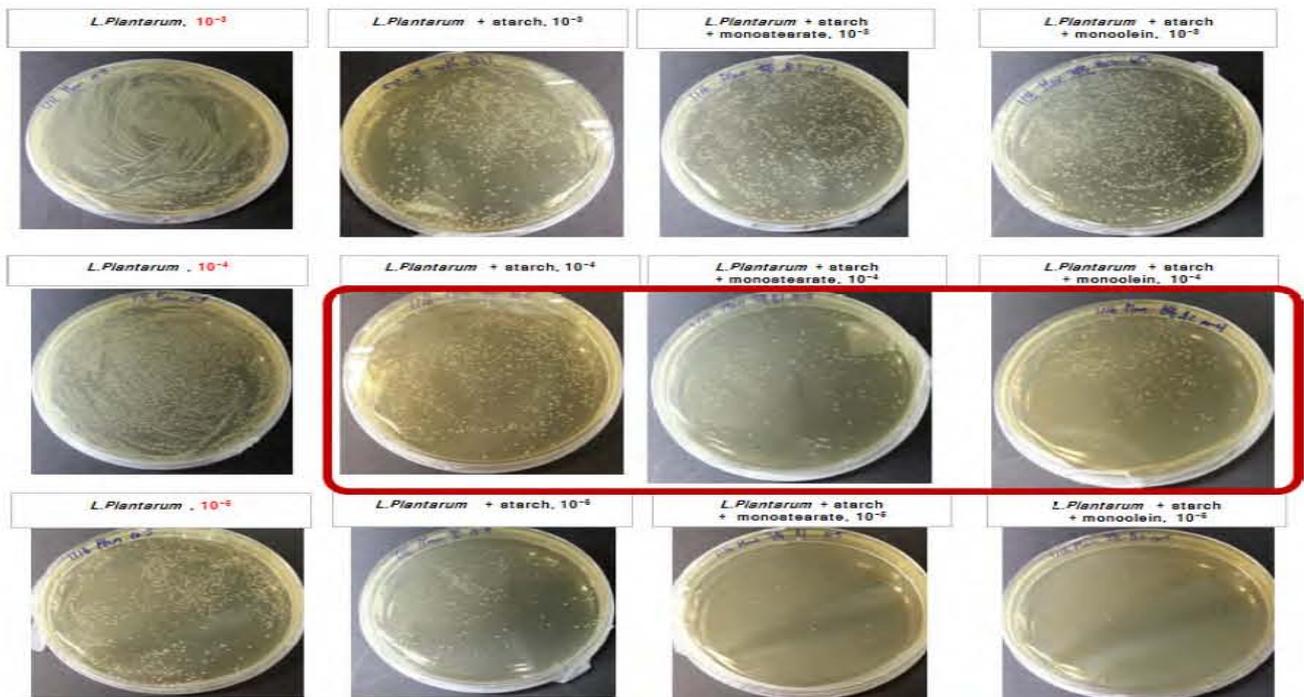


그림. 전분 및 고정제에 의해 코팅된 *Lactobacillus plantarum*의 생균수 측정.

이상의 결과는 유산균주로 *Lactobacillus*를 사용하였을 때도 동일하게 관찰되었다. 전체적으로 코팅된 유산균주간에는 차이를 보이지 않았으며(아래 그림 참조), 생균수

측정결과에서도 전분 코팅에 비하여 monoglycerides를 전분코팅에 가하였을 때 효과적으로 균수를 감소시킬 수 있었다(아래 그림 참조).

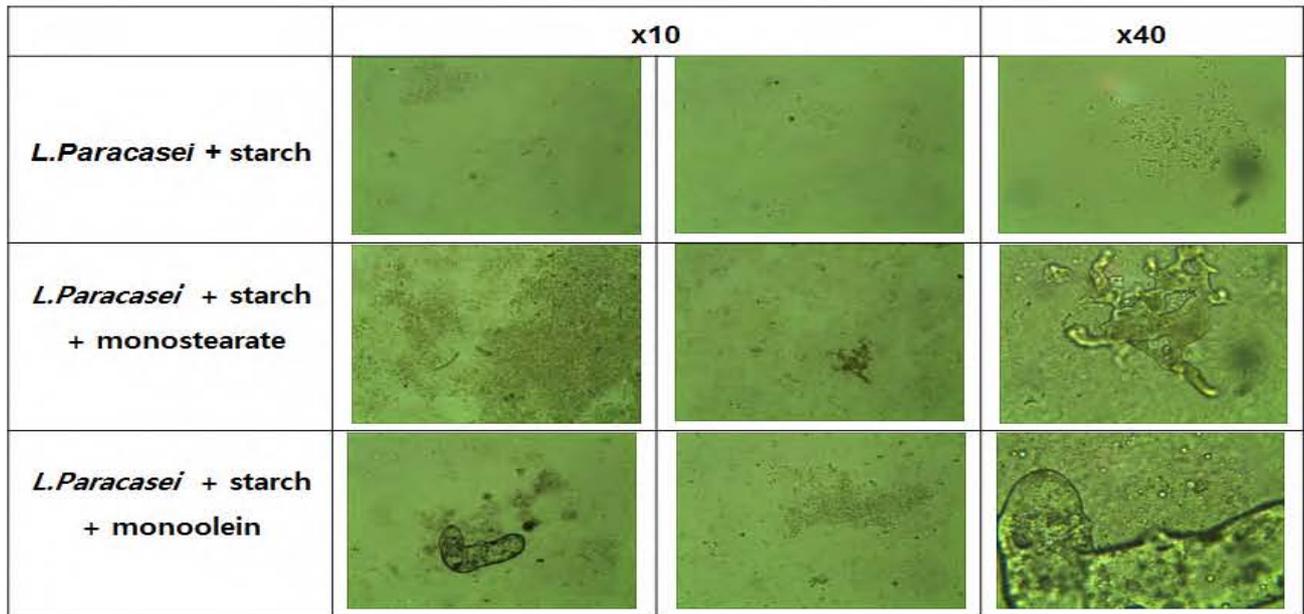


그림. 전분과 고정제에 의해 코팅된 *Lactobacillus*의 미세구조.

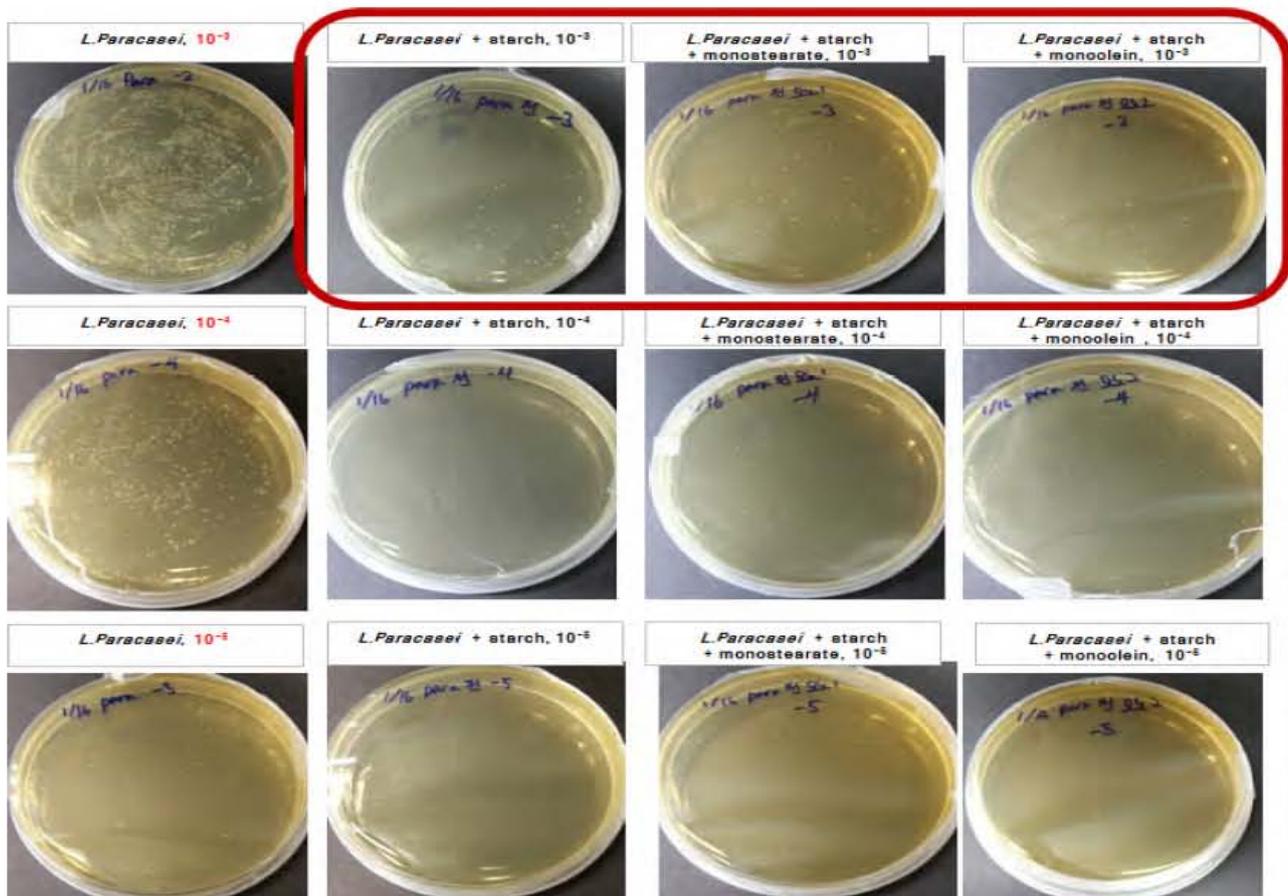


그림. 전분 및 고정제에 의해 코팅된 *Lactobacillus*의 생균수 측정.

특히 본 연구에서 사용된 monoglycerides의 융점을 비교한 결과(아래 그림 참조), monoolein은 전이 온도가 monostearate에 비하여 약 20℃ 낮은 값을 보였다. 결국 이상의 융점

차이에 기인하여 이들이 전분과 함께 고정제로 사용하였을 때 코팅 능력에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

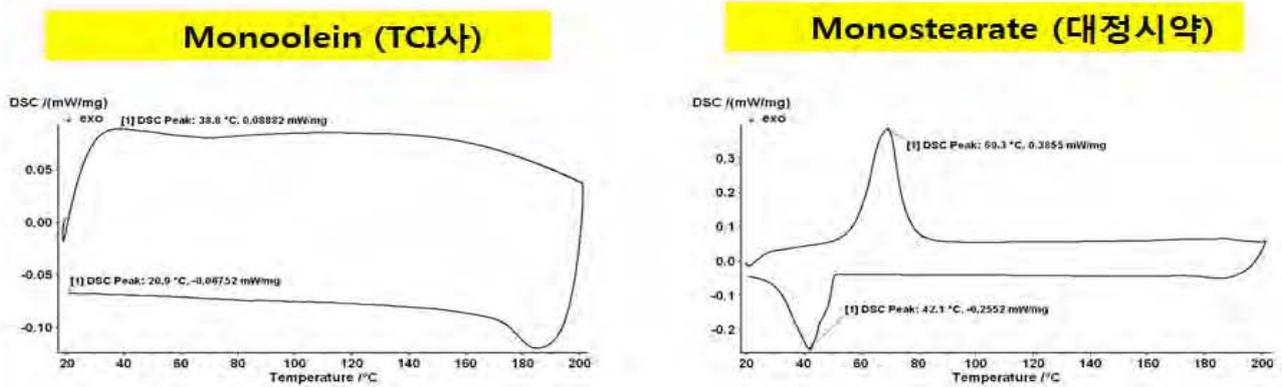


그림. 가열 및 냉각 중의 monoglyceride류의 열적 특성 변화.

## (2) 전분의 상태에 따른 유산균의 코팅 효율

본 연구에서는 코팅제인 전분의 호화상태 혹은 수화상태가 유산균 코팅 효율에 미치는 효과를 규명하고자 수행하였다. 호화전분 용액은 기존과 동일한 방법을 이용하여 제조하였으며, 수화전분용액은 3%(w/w) 전분을 stirrer를 이용해 600rpm으로 4시간동안 수화하여 제조하였다.

본 연구 결과, 유산균 중에 상관없이 수화전분은 다소 직경이 큰 코팅물을 형성하였으며, 특히 전분과 monostearate를 이용하였을 때 코팅입자의 직경이 크고 불균일한 코팅물을 형성하였다(그림 2.1; 그림 2.2).

코팅 효율에 있어서 *Lactobacillus plantarum* 및 *Lactobacillus*의 초기 균수는 각각  $1.9 \times 10^7$  및  $2.9 \times 10^7$  cfu/g으로 나타났다. 코팅 처리 된 *Lactobacillus plantarum*은 수화전분 코팅 처리구에서  $1.19 \times 10^5$  cfu/g으로 가장 효과적으로 코팅이 이루어진 것으로 관찰된 반면, 호화전분 처리구에서는 처리구 간의 큰 차이를 보이지 않았지만, 전반적으로 전분에 monoglyceride 처리를 하였을 때 유산균수가 다소 감소하였으며, monoolein 처리구가 monostearate 처리구보다 낮은 균수를 보였지만 그 차이가 현저하지 않았다(그림 2.3).

반면 *Lactobacillus*는 수화전분만으로 코팅하였을 때 균수가  $7.6 \times 10^5$ 으로 호화전분을 이용하였을 때에 비하여 코팅 효과가 매우 미비한 수준이었다(그림 2.4). 고정제를 전분에 가하였을 때 monostearate의 첨가가 monoolein에 비하여 낮은 균수를 나타내었고, 이상의 결과를 통하여 유산균 코팅에는 호화전분과 monostearate의 첨가가 매우 효과적일 것으로 판단되었다.

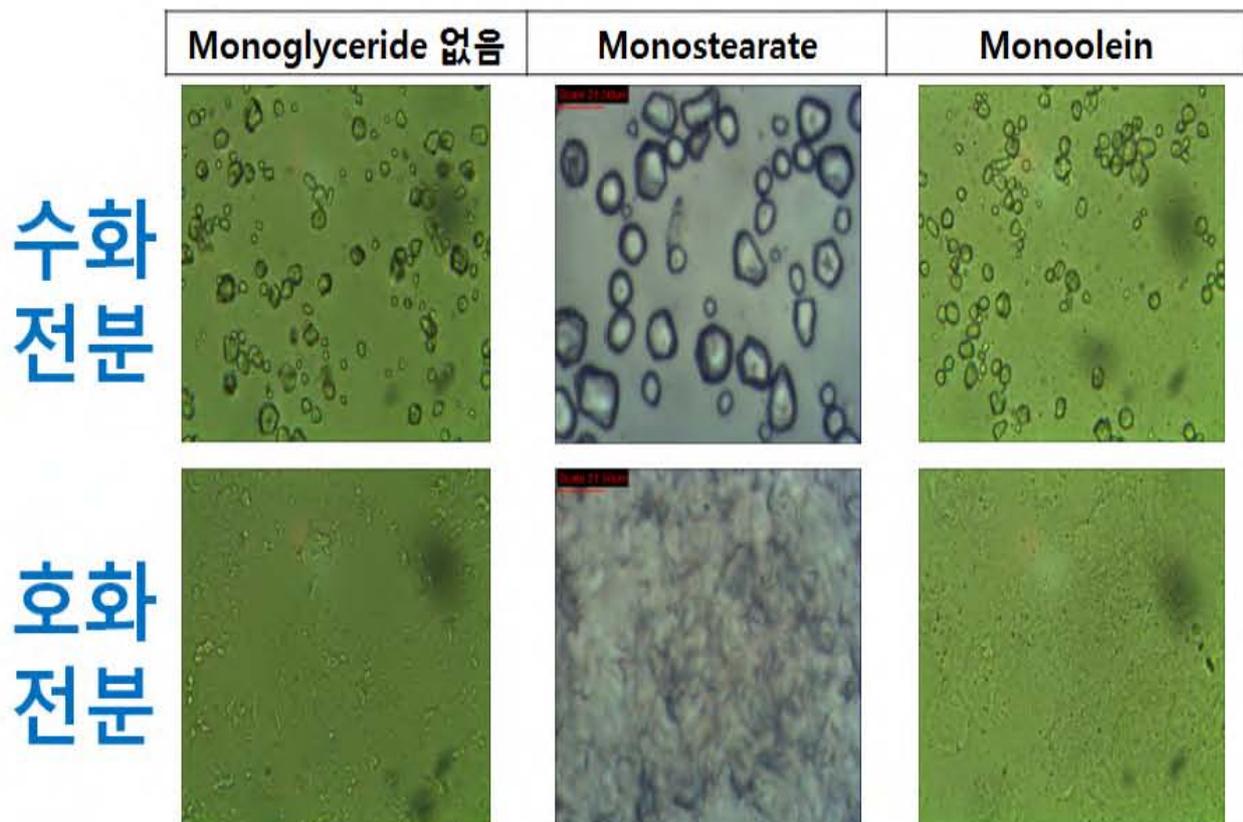


그림. 수화전분과 호화전분 및 고정제에 의해 코팅된 *Lactobacillus plantarum*의 미세구조.

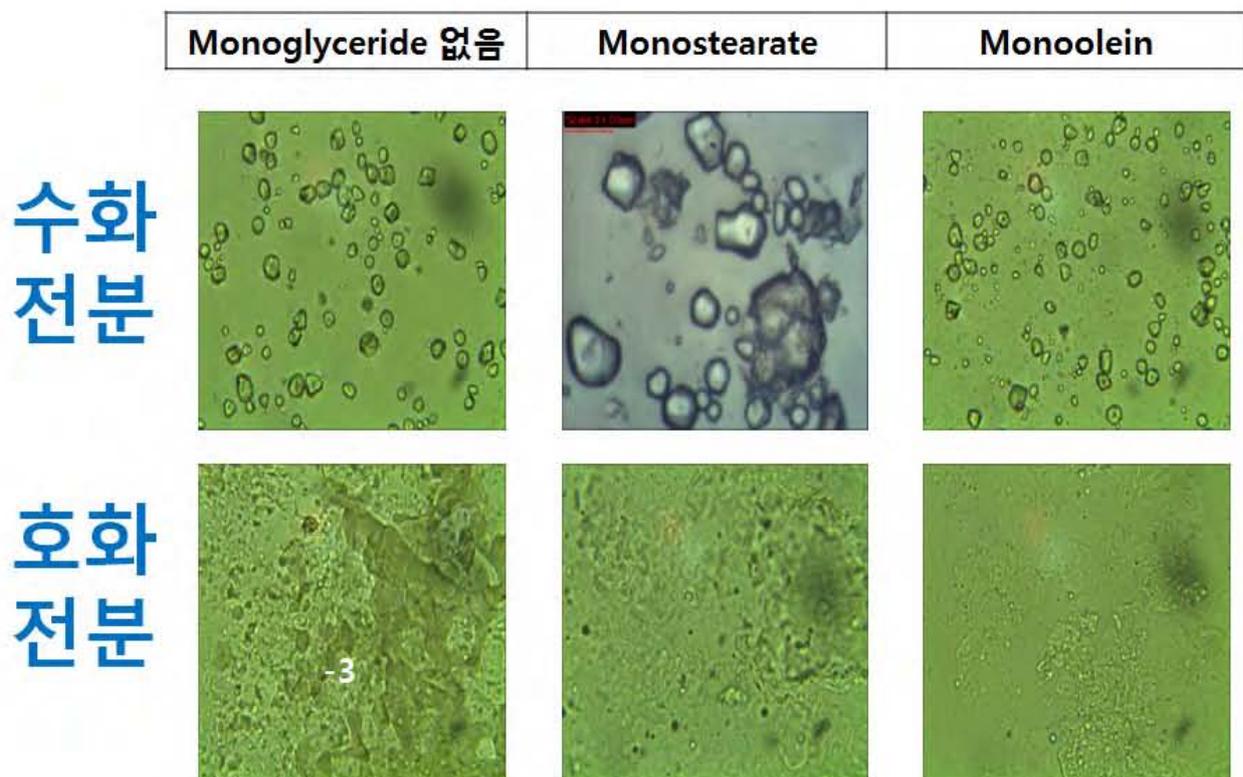


그림. 수화전분과 호화전분 및 고정제에 의해 코팅된 *Lactobacillus*의 미세구조.

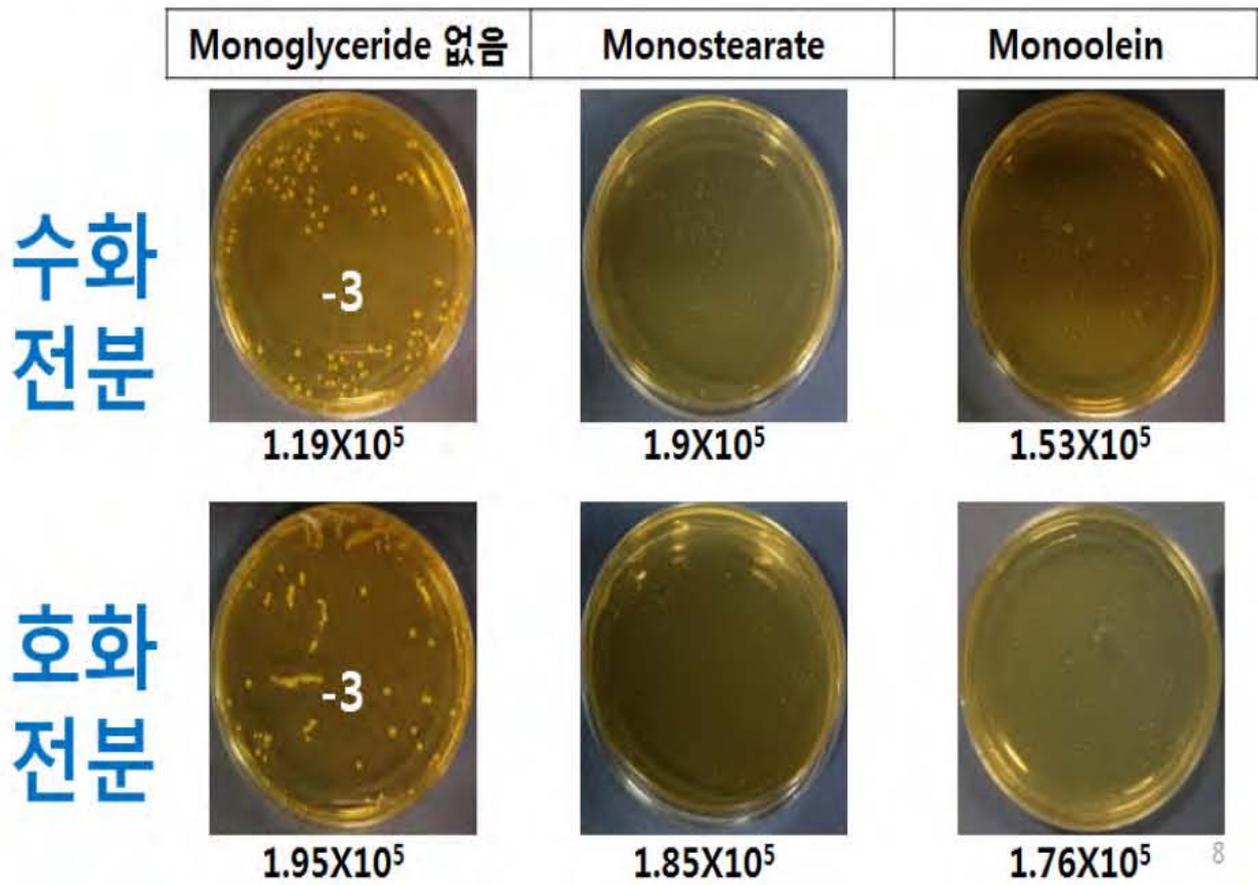


그림. 수화전분과 호화전분 및 고정제에 의해 코팅된 *Lactobacillus plantarum*의 균수 측정.

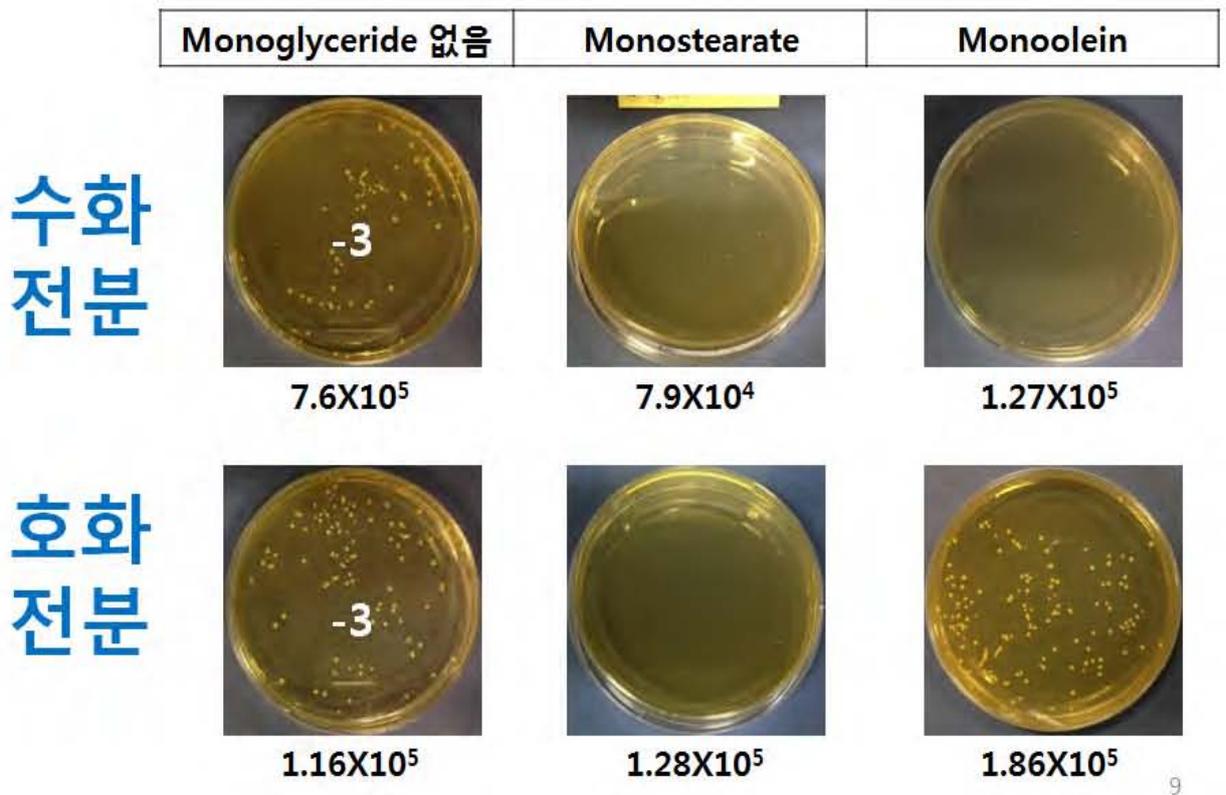


그림. 수화전분과 호화전분 및 고정제에 의해 코팅된 *Lactobacillus*의 균수 측정.

### (3) 저장기간에 따른 유산균 코팅 효과

본 연구에서는 호화전분과 monoglyceride를 이용하여 코팅 처리된 유산균의 저장기간 변화를 규명하고자 수행하였다. 유산균 코팅 샘플은 앞서 기술된 방법을 통하여 제조하였고, 이를 각각 0, 24 및 48시간 저장하였다. 각 시간 저장된 균들은 37°C에서 0, 24 및 48시간 배양하면서 균수의 변화를 관찰하였다.

*Lactobacillus plantarum*은 일부 균수의 급격한 증가가 관찰되었지만, 일반적으로 배양 48시간 까지 약 8 log cfu/mL의 균수가 관찰되었다. 따라서 코팅 처리된 유산균의 균수는 안정적으로 유지되고 있는 것으로 관찰되었다(그림 3.1).

*Lactobacillus*는 다소 불안정한 균수 변화를 보였다. 초기 0시간 저장된 시료는 배양 48시간 까지 균수의 증가를 보이지 않아 코팅이 매우 안정적으로 유지되는 것으로 관찰되었다(그림 3.2). 하지만, 24시간 저장하였을 때 전분 처리구에서 배양 0일 제 큰 폭의 균수 증가를 보였지만, 전반적으로 균수의 변화는 배양 48시간까지 큰 변동을 보이지 않았다. 반면 48시간의 저장에 따라 일부 균수의 증가가 관찰되었으며, *L. plantarum*에 비하여 배양시간 별 다소 높은 균수를 야기하였다.

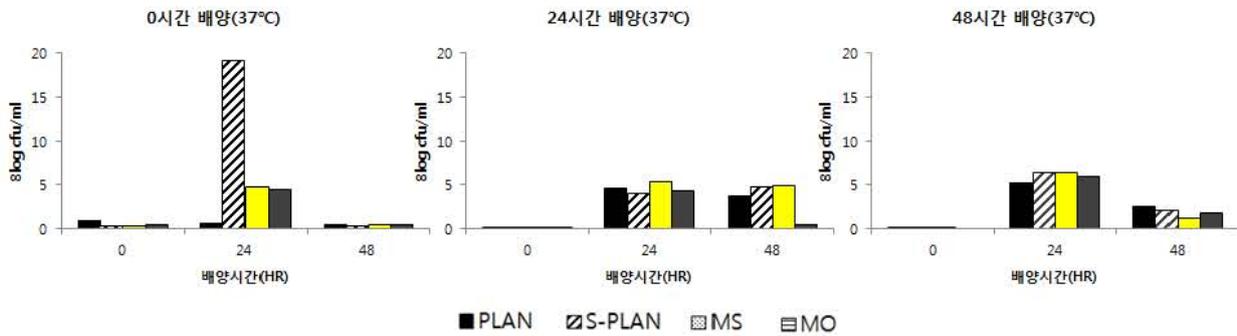


그림 3.1. 저장시간 및 배양 시간에 따른 코팅 처리 *Lactobacillus plantarum*의 균수 변화(저장시간에 따른 변화).

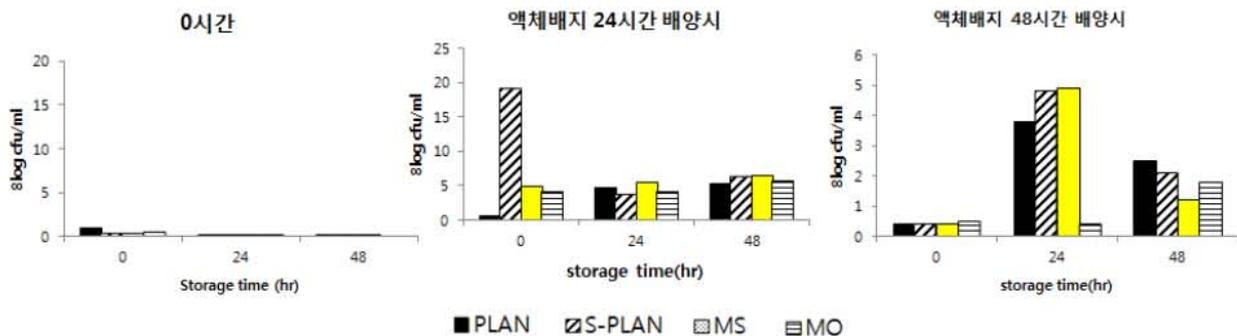


그림 3.2. 저장시간 및 배양 시간에 따른 코팅 처리 *Lactobacillus plantarum*의 균수 변화(배양시간에 따른 변화).

#### (4) 산성 pH 영향에 따른 균수 변화

본 연구에서는 위와 유사한 환경 하에서 코팅 유산균의 안정성을 규명하고자 gastric solution을 제조하여 코팅 유산균에 처리하였다. Gastric solution은 0.03% pepsin과 0.2% NaCl 용액을 제조한 후 pH 2로 조절하여 제조하였다. 이후 코팅처리된 유산균 시료 0.5 mL에 gastric solution 4.5 mL을 가한 후 42℃에서 배양시간에 따른 균수를 측정하였다.

본 연구에서 유산균의 코팅은 pH 2 혹은 단백질 가수분해 효소 존재 하에서 효과적으로 분해되지 않고 유산균의 보호 작용을 유지한 것으로 판단되었다(그림 4.1). 특히 이러한 보호 작용은 전분에 monoglyceride를 첨가하였을 때 보다 효과적이었지만, monoglyceride간의 차이는 보이지 않았다.

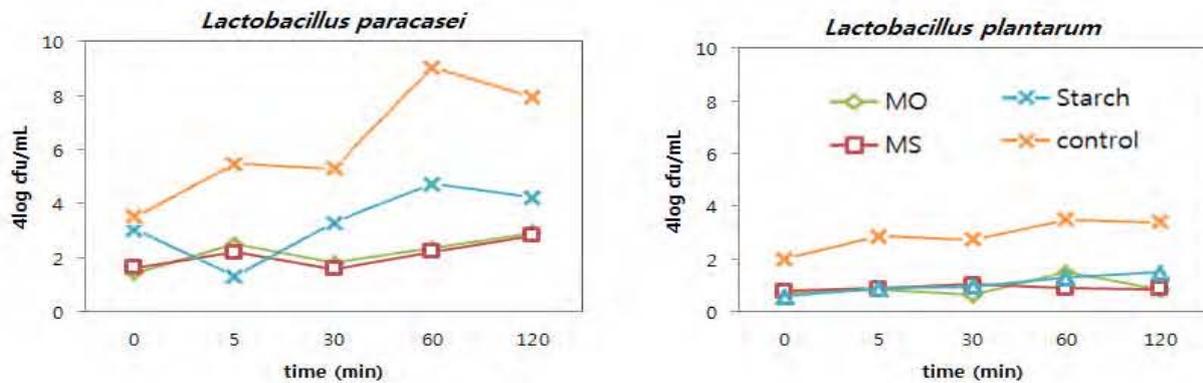


그림 4.1. 산성 pH 처리가 코팅 유산균의 균수 변화에 미치는 효과.

#### (5) W/O 에멀전을 활용한 유산균 코팅

본 연구에서는 W/O 에멀전을 활용한 유산균 코팅 기술을 개발하고자 수행되었다. W/O 에멀전 제조에서 수상(water phase)은 10%(w/v) 전분에 0.1%(w/v) monostearate를 가하여 최종 100 mL이 되도록 한 후 상온에서 600 rpm으로 30분 간 교반한 후 autoclave를 이용하여 121℃에서 15분간 멸균하였다. 이후 60℃로 냉각하여 이용하였다. 유상(oil phase)는 soybean oil을 이용하였으며, 실험 전 60℃에 보관하여 온도를 유지시켰다.

유산균 10배 농축액은 60℃의 수상에 2%(v/v)를 접종한 후 60℃의 유상과 1:2로 혼합시켰다. 이후 고속 균질기를 이용하여 11,000 rpm에서 5분 간 균질 처리를 실시한 후 급속으로 냉각하여 10 mL의 시료를 취하였다. 시료는 4℃, 800 rpm으로 10분 간 원심분리 한 후 오일부분을 제거하였다.

유화과정을 통하여 형성된 전분 bead의 구조를 그림 5.1에 나타내었다. 따라서 이상의 bead는 효과적으로 유산균을 산성 pH영역에서 보호작용을 야기하리라 기대되었고, *Lactobacillus plantarum*을 42℃에서 저장한 후 시간마다 도말하여 균수를 측정한 결과 시간에 따른 균수의 감소를 현저하게 관찰할 수 있었다(그림 5.2).

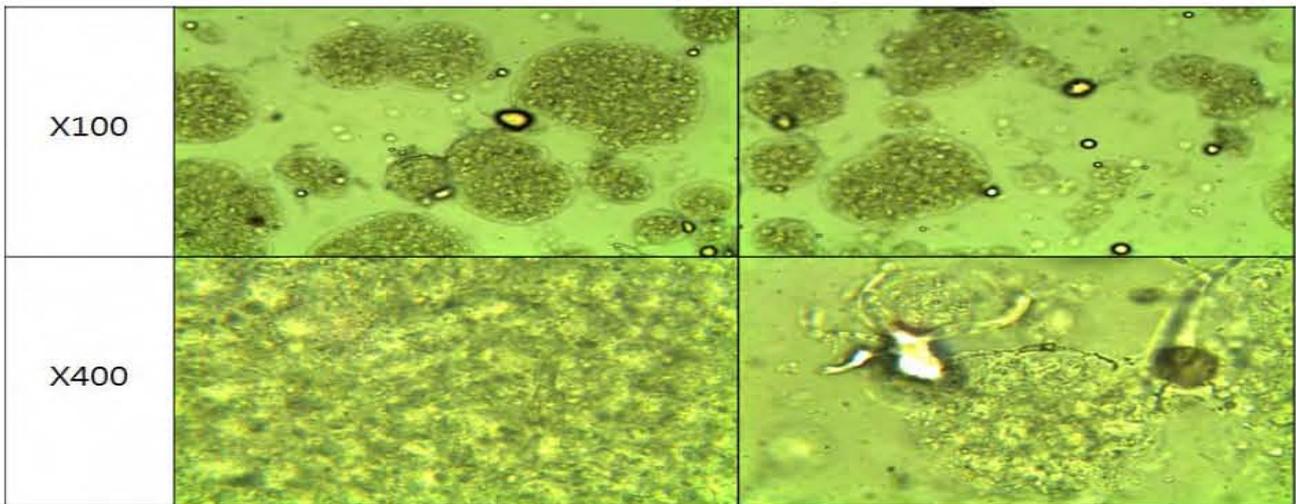


그림 5.1. W/O 에멀전을 이용하여 제조한 전분 bead의 미세구조.

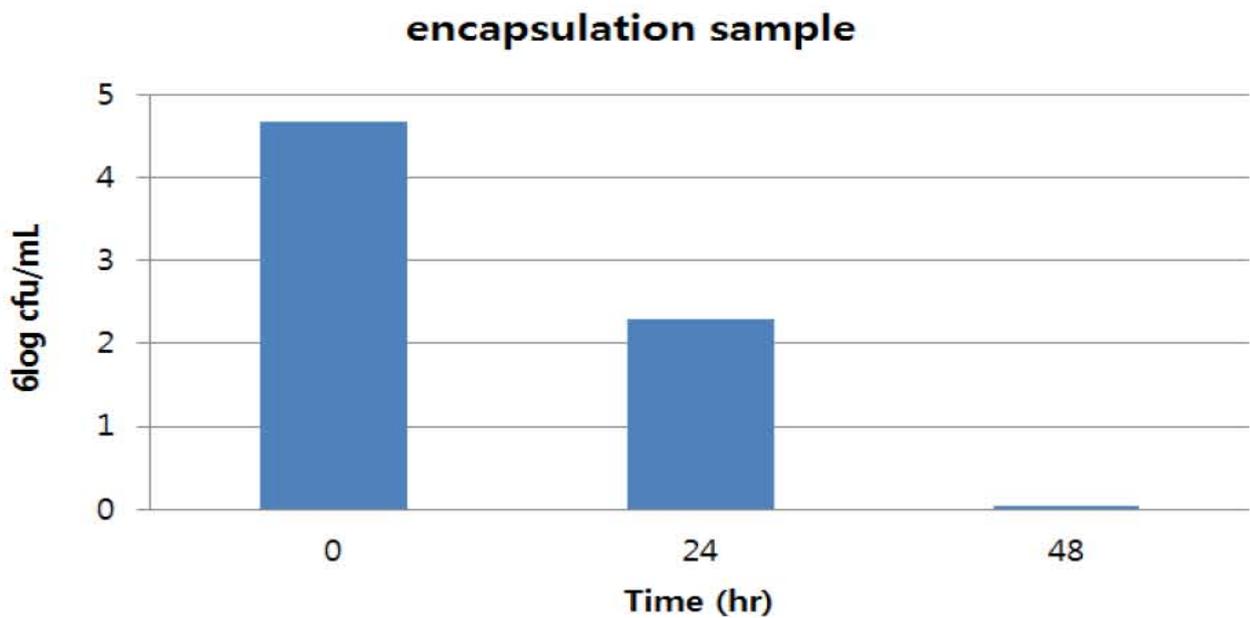


그림. W/O 에멀전 기법을 이용하여 캡슐화 시킨 *Lactobacillus plantarum*의 균수 변화

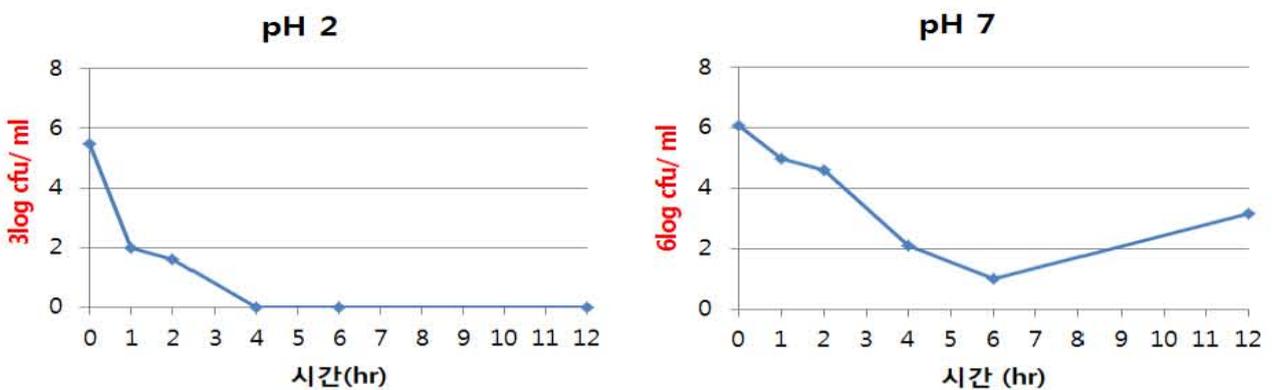


그림. W/O 에멀전 기법을 이용하여 캡슐화 시킨 *Lactobacillus plantarum*의 pH 조건에 따른 균수 변화.

따라서 캡슐화 유산균은 효과적인 코팅 기술로 이용될 수 있을 것으로 기대되었으며, 이를 확인하기 위하여 캡슐화된 유산균 시료와 캡슐화된 유산균 시료 1 mL을 9 mL의 pH 2 혹은 7용액에 혼합하여 42°C에서 저장하면서 시간에 따른 균수를 측정된 결과, 캡슐화된 유산균 시료는 24시간까지는 균이 생존하지만 48시간에는 후에는 0시간에 비해 적은 수의 균이 검출되었고(그림 5.2), pH 2에서는 시간에 따른 균수의 감소가 4시간 저장까지 관찰되었고, 이후 12시간까지 균은 검출되지 않았다(그림 5.3). 이에 반하여 캡슐화된 유산균은 pH 7조건 하에서 저장 6시간까지 꾸준히 균수가 감소한 이후 저장 12시간에는 다시 증가하는 결과를 보였다. 따라서 이상의 결과는 W/O 에멀전 기술을 통하여 유산균이 효과적으로 코팅된 것으로 기대된다.

## (6) 적요

본 연구에서는 유산균의 효과적인 코팅을 위하여 코팅제제로 가격이 저렴한 전분의 활용 및 고정제인 monoglyceride에 의한 유산균 고정효과를 비교 분석하였다. 전분 코팅을 위하여 수화 전분과 호화전분이 비교되었고, 호화전분이 매우 효과적인 유산균 코팅 효과를 보였다. 또한 전분만을 이용한 유산균 코팅에 비하여 고정제인 monoglyceride를 추가로 이용하였을 때 코팅효과를 더욱 향상시킬 수 있었으며, 고정제로서 monosaccharate를 이용하는 이중층(double-layered) coating 방법이 유산균을 코팅하는 데 매우 효과적으로 이용되었다.

이들 코팅물의 gastric solution에서의 안정성을 평가하기 위하여 코팅 처리된 유산균을 산성 pH에 처리한 결과 코팅에 의한 보호효과가 관찰되었으며, 특히 고정제들에 의하여 위산에 대한 유산균의 보호효과를 더욱 향상시킬 수 있었다.

효과적인 유산균 코팅기술로서 W/O 에멀전 제조 기법을 활용하여 유산균을 캡슐화 하였을 때, 산성 및 중성 pH 조건 하에서 이들의 코팅 효과가 매우 우수하였으며 이는 하부 전분층 및 상부 고정제 층의 다중막 형성에 기인하여 효과적으로 유산균을 극조건에서 보호한 것으로 간주된다.

따라서 다양한 캡슐화 방법에 따라 보다 효과적인 유산균 코팅이 가능할 것으로 판단된다.

## 다. 유산균의 rat 에 대한 영향

### (1) Rat의 유산균 섭취 실험

인공변이에 의하여 항균, 항곰팡이 능력 및 유기산 생성 능력이 향상된 유산균 변이주 *Lactobacillus* ML-7이 동물의 생육에 미치는 영향을 평가하기로 하였으며, 우선적으로 rat에서의 영향을 평가하였다. 약 150g의 수컷 SD (Sprague-Dawley) rat을 (주)나라바이오텍에서 공급받았으며, 1주일 동안 실험실 환경에 순화시켰다. 동물 실험실의 환경은  $22 \pm 1$  °C, 습도  $50 \pm 5\%$ , 조도 150-300 lux, 조명주기 12시간씩 밤낮을 유지하였고, 실험 전 기간 동안 사료와 정수된 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 급여하였다. 사료는 영양소 조성이 완벽한 것으로서 일반적으로 많이 사용하는 AIN-93G 사료를 사용하였으며, 그 조성은 다음 표와 같다.

AIN-93G components	g/kg diet
Cornstarch	397.486
casein	200
Dextrinized cornstarch	132
sucrose	100
soybean oil	70
fiber	50
Mineral M	35
Vit.M	10
Choline bitartrate	2.54
Tert-butylhydroquinone	0.014
Mineral Mix	g/kg mix
Ca. carbonate, anhydrous	357(179)
Pot. Phosphate, mono	196
Pot. Citrate, tri-potassium	70.78
Sod. Chloride	74
Pot. Sulfate	46.6
Mag. Oxide	24
Ferric citrate	6.06
Zinc carbonate	1.65
Mag. Carbonate	0.63
Cup. Carbonate	0.3
Pot. Iodate	0.01
Sod. Selenate, anhydrous	0.01025
Amm. Paramolybdate	0.00795

표. AIN-93G 사료의 조성

대조군, 대조군 + *Lactobacillus* LS-2, 대조군 + *Lactobacillus* ML-7 세 그룹으로 나누었으며, MRS 배지에 48 시간 배양한 유산균 배양액을 각각 0.3 % 첨가하여 사료를 배합하였다. 사료 섭취량은 3일 단위로 기록하였으며, 각 처리구간의 체중 증가량과 사료 섭취량을 3주간 측정하였으며, 이에 따라 사료 요구율을 계산하였다. 유산균을 0.3 % 섭취시킨 그룹에서 대조 그룹에 비해 다소 증체량이 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 사료 효율은 모든 그룹에서 차이는 없었으며, 유산균 섭취 그룹에서 사료 섭취량이 많았고, 증체 또한 대조구에 비해 증가한 것으로 보아 기호성의 증진 효과가 있었음을 추정할 수 있다. 유산균 그룹의 비교에서는 모균주인 *Lactobacillus* LS-2 보다 변이주인 *Lactobacillus* ML-7 이 증체량과 섭취량에서 우수한 경향을 볼 수 있었다.

	대조	<i>Lactobacillus</i> LS-2	<i>Lactobacillus</i> ML-7
Gain	193.3 ± 7.2	197.3 ± 7.9	201.6 ± 16.7
Feed	552.3 ± 26.8	560.2 ± 33.9	567.2 ± 35.2
F/G ratio	2.86 ± 0.18	2.84 ± 0.41	2.81 ± 0.22

표. 유산균 *Lactobacillus* LS-2 와 *Lactobacillus* ML-7의 rat 성장에 대한 영향

## (2) Rat의 병원성 미생물 challenge에 대한 유산균 급여 영향 실험

동물의 체내에서 병원성 미생물이 투여되었을 때 유산균에 의한 대응력을 실험하기 위하여, rat에서 설사를 유발하는 것으로 알려진 *Salmonella typhimurium* KTCT 14028을 oral sonde를 이용하여 강제 섭취시킨 뒤, 유산균 모균주 *Lactobacillus* LS-2 및 변이주 *Lactobacillus* ML-7을 배양 원액 및 코팅된 형태로 각각 급여 시켰다. Rat의 생육조건은 위의 실험과 동일하다. *S. typhimurium* KCTC 14028은 TSB에 배양한 것을  $10^5$  cfu/개체가 되도록 투여하였으며, *Salmonella*를 강제 투여한 후 일주일 뒤에 개복 및 심장 채혈을 하였다. Immunoglobulin은 Elisa kit (Cusabio<sup>®</sup> and/or USCN Life Science Inc.)를 사용하여 측정하였다.

아래의 결과에서 보는 것처럼, *Salmonella* challenge를 하지 않은 경우 Immunoglobulin A와 Immunoglobulin G 각각은 유산균 원액과 코팅 유산균 제제를 섭취한 그룹에서 별 차이를 보이지 않았다. 반면에 *Salmonella* challenge 이후 일주일 뒤에는, *Lactobacillus* ML-7 유산균 원액 및 *Lactobacillus* ML-7 유산균 코팅 제제를 급여한 경우에 Immunoglobulin A와 Immunoglobulin G 가 각각 대조군에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. *Lactobacillus* ML-7 유산균 원액 과 *Lactobacillus* 유산균 코팅 제제 간에는 유산균 원액을 급여한 경우에 immunoglobulin 의 증가의 정도가 더 높은 것을 확인 할 수 있었다. 이는 유산균의 급여가 동물체로 하여금 외부의 유해 미생물이 도입되었을 때, 동물체로 하여금 면역 체계를 활성화하여 외부 유해 미생물에 대한 방어를 효율적으로 하기 위한 수단을 제공해 주도록 하는 것으로 추정할 수 있다.

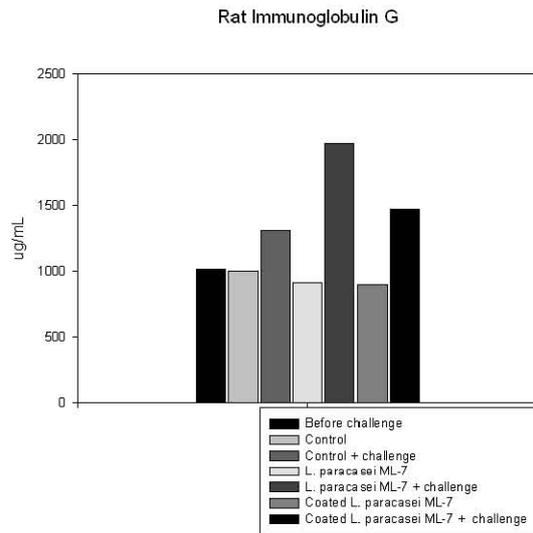
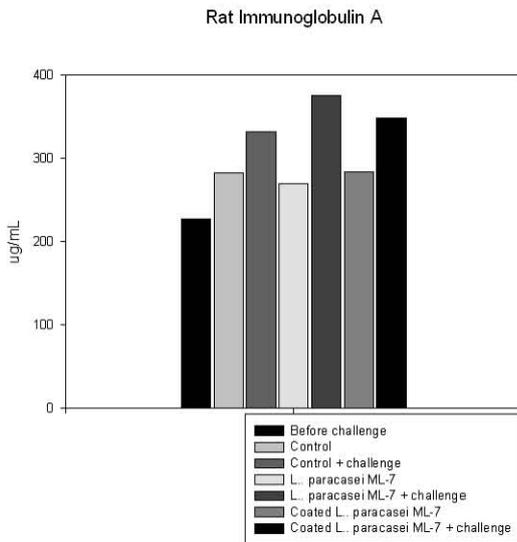


그림. *Salmonella typhimurium* KTCT 14028 강제 투여시 유산균 급여에 의한 rat의 Immunoglobulin A 생성에 대한 영향(왼쪽)

그림. *Salmonella typhimurium* KTCT 14028 강제 투여시 유산균 급여에 의한 rat의 Immunoglobulin G 생성에 대한 영향(오른쪽)

#### 라. 유산균의 양계(육계, 산란계)에 대한 영향

##### (1) 닭의 성장성에 미치는 유산균주 별 영향

###### (가) 목적

현재 (주)미래자원ML에서 보유하고 있는 특허 유산균들인 *Lactobacillus* LS-2, *Lactobacillus plantarum* 10hk-2 및 이들의 변이주인 *Lactobacillus* ML-7, *L. plantarum* 10hk-2 mut. 균주들이 닭의 성장에 미치는 영향을 확인하고자 하며, 미생물의 항균 능력에 영향을 주는 글리세롤을 함께 급여할 때의 양계 생산성 향상 여부를 평가하고자 한다.

###### (나) 실험동물

실험 처리구가 많기 때문에 개체별 체중 편차가 상대적으로 적은 산란종 초생추 (Hy-Line, brown) 수평아리를 사용하였으며, 12 처리구로 반복당 10수를 사용하여 5반복으로 총 600 수를 사용하였다.

###### (다) 실험사료

산란종 초생추 영양소 요구량(NRC)에 기준하여 각 처리구별로 isonitrogenous, isocaloric 하도록 실험사료를 제작하였으며, 대조구 사료에 각각의 유산균을 동일한 균체수로 첨가하는 방법으로 제작하였다. 유산균의 닭에 대한 농도 의존적 성장 영향 여부를 확인하기 위하여 유산균의 첨가수준은 0.1%, 0.3%로 하였다.

(라) 실험처리구

대조구

대조구 + 유산균제제 0.1% (*L. para.* LS-2) - (1)

대조구 + 유산균제제 0.3% (*L. para.* LS-2)

대조구 + 유산균제제 0.1% (*L. plan.* 10hk-2) - (2)

대조구 + 유산균제제 0.3% (*L. plan.* 10hk-2)

대조구 + 유산균제제 0.1% (*L. para.* ML-7) - (1)변이

대조구 + 유산균제제 0.3% (*L. para.* ML-7)

대조구 + 유산균제제 0.1% (*L. plan.* 10hk-2 mut.)-(2)변이

대조구 + 유산균제제 0.3% (*L. plan.* 10hk-2 mut.)

대조구 + 유산균제제 0.3% (*L. para.* ML-7) + glycerol 1%

대조구 + 유산균제제 0.3% (*L. plan.* 10hk-2 mut.)+glycerol 1%

대조구 + glycerol 1%

※ *L. plan.* 10hk-2는 *Lactobacillus plantarum* 10hk-2이며,  
*L. plan.* 10hk-2 mut.는 *Lactobacillus plantarum* 10hk-2의 변이주임.

(마) 사양관리

물과 사료는 자유 섭취토록 하였으며, 3일 단위로 사료량을 기록하였으며, 점등시간은 1일 23시간이 되도록 하였다.

(바) 조사항목 및 분석 방법

처리구간의 사양 성적을 산출하기 위하여 각 처리구간의 증체량과 사료 섭취량을 실험개시 일 7 일령, 14 일령, 실험종료일(21일)에 체중을 기록하여 사료효율을 평가하였다.

(사) 통계처리

분석된 통계자료의 처리는 SAS(2000)의 GLM procedure를 이용하여 분산분석 하였고, Duncan's multiple range test 에 의하여 95% 수준에서 처리 평균치 간의 통계적 유의성을 검증하였다. ( $p < 0.05$ )

표. 실험사료 조성

Ingredients	Contents (%)	
	대조구	+ glycerol
Item		
Corn	59.56	58.56
Glycerol	-	1.00
SBM	25.50	25.50
Soya, Heat(KR)	6.00	6.00
Corn Glut M	4.00	4.00
Animal Fat	1.00	1.00
Limestone	1.50	1.50
DCP	1.56	1.56
Vitamin mix	0.05	0.05
Mineral mix	0.05	0.05
Salt	0.30	0.30
Threonine	0.00	0.00
Lysine-HCl	0.10	0.10
DL-Methionine	0.18	0.18
L-Arginine	0.00	0.00
Choline-Cl,50%	0.20	0.20
Total	100.00	100.00
Calculated value		
ME	2945.7	2945.7
CP	20.5	20.5
Ca	1.03	1.03
Pavl	0.45	0.45
Met	0.539	0.539
Met+Cys	0.896	0.896
Lys	1.127	1.127
Trp	0.228	0.228
Thr	0.788	0.788
Arg	1.269	1.269
NaCl	0.360	0.360

(아) 실험 결과

표. 유산균주별 닭의 성장에 미치는 영향

처리구	사료섭취량(g)	증체량(g)	사료효율
대조구	345.2±13.0	164.4±4.4 a	2.10±0.05
대조구 + 유산균 (1) 0.1%	351.4±23.8	170.4±9.3 ab	2.06±0.10
대조구 + 유산균 (1) 0.3%	350.3±35.2	171.7±11.0 ab	2.04±0.17
대조구 + 유산균 (2) 0.1%	352.4±21.2	173.2±8.7 ab	2.04±0.21
대조구 + 유산균 (2) 0.3%	349.1±14.3	161.1±7.1 a	2.17±0.15
대조구 + 유산균 (1) 변이 0.1%	350.6±22.9	171.0±5.0 ab	2.05±0.11
대조구 + 유산균 (1) 변이 0.3%	362.8±35.1	173.8±8.5 ab	2.09±0.22
대조구 + 유산균 (2) 변이 0.1%	362.7±34.6	174.0±13.3 ab	2.08±0.11
대조구 + 유산균 (2) 변이 0.3%	357.5±45.1	172.2±9.4 ab	2.07±0.20
대조구 + 유산균 (1) 변이 0.3% + glycerol 1%	354.4±31.7	164.6±7.8 ab	2.15±0.15
대조구 + 유산균 (2) 변이 0.3% + glycerol 1%	340.6±31.1	161.7±6.8 ab	2.10±0.11
대조구 + glycerol 1%	331.4±26.27	161.7±7.7 ab	2.05±0.09

산란종 초생추를 이용한 각각의 유산균 첨가의 영향은 유산균을 급여한 경우 대조구에 비해 성장에 긍정적인 효과를 보이는 결과를 볼 수 있었다. 하지만 유산균 종류별 병아리의 성장에 대한 영향 요인은 사료 급여 기간 21일 동안에는 사료 섭취량에서는 처리구 간의 유의적인 차이가 없었으며 사료 효율면에서도 처리구 간의 유의성이 없었다. 이후의 실험에서는 전체적으로 균체 성장성이 좋으며, 유산균 처리 농도별로 성장성의 편차가 적은 변이주 *Lactobacillus* ML-7을 사용하기로 하였다. 글리세롤을 첨가한 경우에는 유산균의 첨가 여부와는 관계없이 성장성이 유의적으로 감소하였다.

또한 유산균이 양계 농장에서 빈번하게 발생하는 환경 스트레스 요인에 대한 저항력을 부여하는지의 여부를 확인하기 위하여 닭에서 설사 및 폐사를 일으키는 유해 미생물 challenge 실험을 수행하였다.

(2) 유해 미생물 challenge에 대한 유산균 급여의 영향

(가) 목적

유해미생물의 투여시 유산균 급여에 의해 닭의 성장이 정상적으로 회복하는지의 여부를 판단하기 위하여 설사를 유발하는 *Salmonella typhimurium* (1회차)과 *Salmonella galinarum* (2회차, 가금 티푸스균)을 강제투여하였음.

(나) 실험방법

Challenge 실험은 6주간 유산균 체제를 혼합한 사료를 먹이고, 마지막 2주간 유해 미생물 배양액을 강제 투여하였다. 처음 4주간은 첨가제를 혼합한 사료만 먹이고 5주차 시작하는 날과 6주차 시작하는 날에 *Salmonella typhimurium*과 *Salmonella galinarum*(가금 티푸스균)을 강제투여하였다. 가금티푸스 균은 임상분리 균주로서 강원대학교 수의학과 한태욱 교수로부터 분양받아 -80℃에 보관되어진 균주를 TSA (trypticase soy agar)배지에 37℃에서 두 번 계대 배양하여 활성화 시킨 후 TSB 배지에 접종하여 visible spectrophotometer를 이용하여 600nm에서 흡광도를 측정하여 균수를 조절하였다. 투여한 균주량은  $1 \times 10^6$  cfu/ml 이며, guinea pig oral injection 용 12cm oral sonde를 주사기에 결합하여 일정량을 구강투여하였다. Immunoglobulin을 측정하기 위한 혈청 샘플링은 5주차 첫 번째 challenge가 시작되기 직전 날개에서 1차 채혈을 하였고, 첫 번째 challenge를 하고 일주일 후에 2차 채혈을 하였다. 두 번째 challenge를 하고 일주일 후에 마지막 3차 채혈을 하였다. 채혈한 직후 원심분리하여 혈청을 분리한 후 immuoglobulin과 cytokine을 측정하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

(다) 실험 처리구

표. 가금 유해 미생물 처리실험 조건

	Group	Sample 수
1	BD Unchallenged	5
2	BD Challenged	5
3	BD + 생강 잎(유산균발효) 2.5% Challenged	5
4	BD + 유산균(1) Challenged	5
5	BD + 유산균(2) Challenged	5
6	BD + 유산균(1)변이 Challenged	5
7	BD + 유산균(2)변이 Challenged	5
8	BD + 유산균(1)변이 + glycerol 1% Challenged	5
9	BD + 유산균(2)변이 + glycerol 1% Challenged	5

※ 유산균(1): *Lactobacillus* LS-2

유산균(2): *Lactobacillus plantarum* 10hk-2

유산균(1)변이: *Lactobacillus* ML-7

유산균(2)변이: *Lactobacillus plantarum* 10hk-2 mut.

(라) 실험 방법

① 닭 혈청 분리 방법

실험 종료 후 각 처리별로 평균 체중과 비슷한 육계 각 5수를 선별하여 도살시켜 채혈 한 뒤 heparin 코팅된 tube에 보관하였다. 혈액을 1000xg에서 15분간 centrifuge 하여 혈청만을 분리하였다. 분리된 혈청은 -80℃에서 보관 하였다.

② Sandwich ELISA 법에 의한 면역 globulin의 측정

실험에 이용한 면역 cytokine의 인자로는 IgG, IgA를 대상으로 실시하였다. 체액성 면역의 증강여부를 확인 할 수 있는 인자로서 IgG, IgA를 실험에 적용하였다.

필요한 수만큼의 plate를 홀더에 셋팅한 후, 희석 검체, 각 농도의 닭 cytokine 표준액, 검체 희석액을 각각 plate에 100 ul 씩 주입한다. 그 후, 실온에서 30분 간 shaker위에서 방치했다. 세정액을 각 plate에 300ul 씩 5회 주입, 마지막에는 완전히 제거한다. 닭 cytokine 효소 항체액 100ul를 각 well에 주입한다. 실온에서 30분간 방치한 다음 세정액을 각 plate에 300ul 씩 5회 주입하고 마지막에는 완전히 제거한다. 발색액 200ul를 각 well에 주입한 후, 실온에서 15분간 방치한 다음, 반응 정지액 50ul를 각 well에 주입한다. ELISA reader기에서 450nm로 흡광도를 측정한다.

③ 통계학적인 처리

대조군을 비롯한 사료첨가제들 간의 평균치 유의성을 검정하기 위하여 분석치에 대하여 SAS을 사용하여 ANOVA test를 실시 하였다.

(마) 실험 결과

① 유산균 급여가 유해 미생물 challenge시 육계 성장에 미치는 영향

유산균을 급여하지 않은 경우, *S. typhimurium* 및 *S. galinarium* challenge 에 의해 성장이 저하(혹은 지체)되는 반면에, 유산균 급여를 하는 경우 대체적으로 성장 저하 현상이 나타나지 않고 정상적으로 성장하는 것을 볼 수 있었다. 글리세롤의 급여는 challenge 이전의 경우처럼 육계의 성장이 저하되는 현상을 보이지는 않고 정상 수준으로 회복되었다. 하지만 유산균의 활성을 추가적으로 높여주는 것 같지는 않다. 그 결과는 아래의 표에 게재하였다.

표. 유해 미생물 challenge시 유산균 급여가 육계 성장에 미치는 영향

	처리구	육계 구간 성장 ( $\Delta$ weight, g)
1	Unchallenged	미측정
2	Challenged	185.5
3	Challenged + 생강잎(유산균발효) 2.5%	215.7
4	Challenged + 유산균(1) 0.3%	178.7
5	Challenged + 유산균(2) 0.3%	190.1
6	Challenged + 유산균(1)변이 0.3%	213.0
7	Challenged + 유산균(2)변이 0.3%	200.1
8	Challenged + 유산균(1)변이 0.3% + glycerol 1%	201.8
9	Challenged + 유산균(2)변이 0.3% + glycerol 1%	199.4

② 유산균제제 투여 군들의 체액성 면역에 대한 영향

㉞ IgG 결과

IgG 에 대한 4주령에서의 농도를 측정 한 결과 4주령에서는 Challenged 군에서 Unchallenged군에 비해 유의적인 증가가 있었다. 특히나 유산균(1), 유산균(1) 변이주, 유산균(2) 변이주를 먹인 군이 효과적으로 immunoglobulin을 생성하였다. 유산균 제제가 체액성 면역 중 IgG의 효과적인 증진을 통해 면역을 강화시킨다고 사료된다.

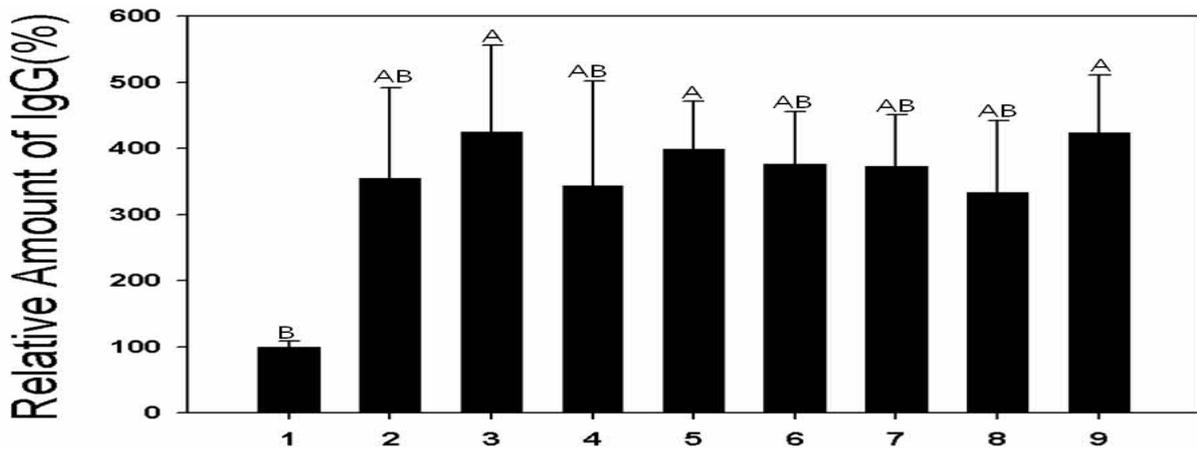


그림. 유산균 제제의 사료첨가제가 혈청 중의 면역 immunoglobulin G 농도에 미치는 영향

㉟ IgA 결과

IgA에 대한 4주령에서의 농도를 측정 한 결과, 4주령에서는 Challenged 군과 Unchallenged 군에서는 유의적인 차이가 있었다. Challenge 군에서 유산균(1) 변이주의 경우에는 IgA 생성이 유의적으로 증가가 억제되는 현상을 확인할 수 있었다. 이는 가축의 생산성 증가 측면에서 볼 때, 과도한 면역 향상을 억제한다는 긍정적인 효과를 논할 수도 있지만 확정하기 위해서 추가적인 실험이 필요할 것으로 판단된다.

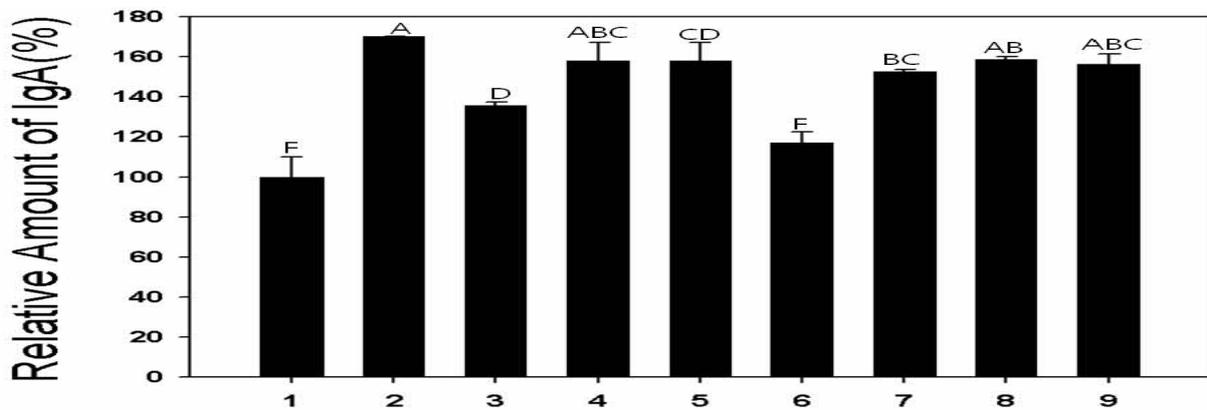


그림. 유산균 제제의 사료첨가제가 혈청 중의 면역 immunoglobulin A 농도에 미치는 영향

### (3) 유산균 encapsulation이 육계 성장에 미치는 영향

#### (가) 목적

본 실험에서는 encapsulation된 유산균(coated 유산균)이 육계의 생산성에 미치는 영향을 평가하고자 하며, 환경적인 스트레스가 없는 정상적인 환경 조건에서도 생산성 향상의 결과를 얻기 위하여 복합 효소제 및 복합 한약재를 추가적으로 급여하는 실험을 수행하였다.

#### (나) 실험동물

육계 (Loss 308) 수평아리를 입고 후 1일간의 적응기간을 거쳐 2일령에 체중 측정을 거쳐 실험구 배치한 후 전기 기간 동안(21일)의 사양성적을 실험하였다.

#### (다) 실험사료

시판중인 육계 전기 배합사료(홍성사료)를 대조구로 하여 유산균과 coated 유산균, coated 유산균과 펜자임®(복합 효소제, (주)미래자원ML), coated 유산균과 펜자임® + 복합한약재 추출물 (동의보감®)을 첨가하여 시험하였다. 각 처리구는 5 반복으로 반복당 10 마리의 병아리를 사용하였다.

#### (라) 실험처리구

대조구

대조구 + 유산균 0.3%

대조구 + Coated유산균 0.3%

대조구 + Coated유산균 0.3% + 펜자임® 0.2%

대조구 + Coated유산균 0.3% + 펜자임® 0.2% + 동의보감® 0.2%

#### (마) 사양관리

물과 사료는 자유 섭취토록 하였으며, 3일 단위로 사료량을 기록하였고, 점등시간은 1일 23시간이 되도록 하였다.

#### (바) 조사항목 및 분석 방법

처리구간의 사양 성적을 산출하기 위하여 각 처리구간의 증체량과 사료 섭취량을 실험개시일 13일령, 종료일(21일)에 체중을 기록하여 사료효율을 평가하였다. 실험 종료일에 각 처리구당 유사 체중을 갖는 병아리를 도살하여 장기 무게를 비교하였으며, 맹장 적출물을 채취하여 장내 미생물 균총을 조사하였다.

#### (사) 통계처리

분석된 통계자료의 처리는 SAS(2000)의 GLM procedure를 이용하여 분산분석 하였고, Duncan's multiple range test 에 의하여 95% 수준에서 처리 평균치 간의 통계적 유의성을 검증하였다. ( $p < 0.05$ )

표. 육계 전기 (1일령~21일령) 실험사료 조성표

Item	Control	Control + 유산균제	Control + Coated 유산균	Control + Coated 유산균 + 팬자임®	Control + Coated 유산균 + 팬자임® + 동의보감®
Ingredients	Contents (%)				
Corn	52.40	52.10	52.10	51.90	51.70
Wheat Powder	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Fish meal(55%)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Poultry by products	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Soybean meal(46%)	23.60	23.60	23.60	23.60	23.60
Full fat Soybean (Extruded)	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Limestone	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33
Salt	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Glucose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Dicalcium phosphate	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Tallow	4.90	4.90	4.90	4.90	4.90
Vitamin, Mineral Premix <sup>1)</sup>	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Lysin-HCL(50%)	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
DL-Methionine(81%)	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
Threonine	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Cholin-Hcl	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Maduramycine	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Yeast culture	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
etc	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
유산균제	0	0.30	0	0	0
Coating 유산균제	0	0	0.30	0.30	0.30
Panzyne	0	0	0	0.20	0.20
동의보감	0	0	0	0	0.20
<b>Calculated Value</b>					
Protein	20.19	20.19	20.19	20.19	20.19
Crude Fat	8.59	8.59	8.59	8.59	8.59
Calcium	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
Phosporus	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
Retain-Phosporus	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Lys	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
Met	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
Met+Cys	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
AMEn	3,150	3,150	3,150	3,150	3,150

<sup>1)</sup>Vitamin contains followings in 1kg : vit A, 10,000,000IU ; vit D<sub>3</sub>, 5,000,000IU; vitE, 20,000IU; vitK<sub>3</sub>, 3,000mg; vitB<sub>1</sub>, 2,000mg; vitB<sub>2</sub>, 6,000mg; vitB<sub>6</sub>, 3,000mg; vitB<sub>12</sub>, 16mg; niacin, 50,000mg; Ca-pantothenate, 13,000mg; Folicacid, 13,000mg; Cu, 5,000mg; I, 1,250mg; Mn, 110,000mg; Zn, 100,000mg; Se, 300mg ; Fe, 40,000mg ; Co, 5,000mg

표. Encapsulated 유산균 제제가 육계의 생산성에 미치는 영향

처리구	사료섭취량(g/b)	증체량(g/b)	FCR
대조구	940.2±35.9	670.2±25.5	1.40±0.07 a
대조구+유산균제제 0.3%	964.0±78.8	680.0±38.6	1.42±0.06 a
대조구+coated 유산균 0.3%	955.0±34.5	703.1±37.6	1.36±0.10 ab
대조구 +coated 유산균 0.3% +팬자임® 0.2%	928.9±56.8	674.0±18.2	1.38±0.10 ab
대조구 +coated 유산균 0.3% +팬자임® 0.2% +동의보감® 0.2%	895.5±48.1	711.4±33.4	1.26±0.10 b

시판사료인 육계 전기 사료를 급여한 처리구를 대조구로 하여, 전기(前期) 기간 동안의 사양 성적 결과는 전체적으로 유의적인 차이는 보이지 않았으나 유산균제제 처리구가 전반적으로 좋은 경향을 보여주었다. 사료 효율면에서는 대조구보다 유의성있게 좋은 결과를 나타내었으며, 특히 coated 유산균제제 + 효소제 (panzyme) + 동의보감 처리구에서 대조구에 비해 사료 효율 면에서 유의적으로 개선된 결과를 얻을 수 있었다. 증체 효과가 좋은 것으로 나타났다. Coated 유산균 제제 + 효소제 (panzyme) 처리구는 대조구와 비교할 때 거의 비슷한 경향을 보여주고 있는데, 이것은 아마도 유산균 제제와 효소제의 중첩된 영향으로 소화, 흡수에 방해가 된 듯한 것으로 보인다.

하지만 동의보감이 첨가된 처리구에서는 사료효율과 증체량이 대조구보다 6% 이상, 사료효율은 11% 이상의 증가 효과를 나타내고 있는데 이는 유산균 제제와 동의보감이 서로 영양적인 sparing effect가 있음을 보여주고 있다.

표. Encapsulated 유산균 급여가 육계의 장기 무게에 미치는 영향

Treatments	Heart	Liver	Abdominal Fat	Pancreas	Spleen	Bursa
%BW						
대조구	0.78±0.15	3.22±0.40 a	1.00±0.26 b	0.34±0.01 b	0.08±0.02	0.25±0.06
대조구+유산균제제 0.3%	0.78±0.09	2.56±0.26 b	1.07±0.21 ab	0.35±0.03 b	0.09±0.02	0.23±0.06
대조구+Coated 유산균 제제 0.3%	0.75±0.08	2.72±0.43 b	1.00±0.19 b	0.35±0.04 b	0.09±0.03	0.24±0.05
대조구+Coated 유산균제제 0.3%+팬자임® 0.2%	0.80±0.11	3.24±0.44 a	1.10±0.33 ab	0.37±0.05 ab	0.09±0.04	0.26±0.07
대조구+Coated 유산균 0.3% +팬자임® 0.2% +동의보감® 0.2%	0.78±0.18	3.24±0.30 a	1.27±0.23 a	0.40±0.07 a	0.09±0.04	0.26±0.07

각 장기의 무게를 측정한 결과, 대조구+Coated 유산균제+효소제 처리구의 경우 췌장의 무게가 다소 유의성있게 커지는 경향이 보였으며 간의 무게에도 약간 커지는 경향을 나타내고 있다. 복부 지방의 경우는 대조구와 거의 비슷한 경향이였다.

#### (4) 유해미생물 challenge에 대한 encapsulated 유산균의 영향

##### (가) 목적

유해미생물의 투여시 유산균 급여에 의해 닭의 성장이 정상적으로 회복하는지의 여부를 판단하기 위하여 어령 닭에서 폐사를 일으키는 *Salmonella galinarum*(가금 티푸스균)을 강제투여하였다.

##### (나) 실험방법

Challenge 실험은 6주간 유산균 체제를 혼합한 사료를 먹이고, 마지막 2주간 유해 미생물 배양액을 강제 투여하였다. 처음 4주간은 첨가제를 혼합한 사료만 먹이고 5주차 시작하는 날과 6주차 시작하는 날에 *Salmonella galinarum*(가금 티푸스균)을 강제투여하였다. 가금티푸스균은 임상분리 균주로서 강원대학교 수의학과 한태욱 교수로부터 분양받아 -80℃에 보관되어진 균주를 TSA (trypticase soy agar)배지에 37℃에서 두 번 계대 배양하여 활성화시킨 후 TSB 배지에 접종하여 visible spectrophotometer를 이용하여 600nm에서 흡광도를 측정하여 균수를 조절하였다. 투여한 균주량은  $1 \times 10^6$  cfu/ml 이며, guinea pig oral injection 용 12cm oral sonde를 주사기에 결합하여 일정량을 구강투여하였다. Immunoglobulin을 측정하기 위한 혈청 샘플링은 5주차 첫 번째 challenge가 시작되기 직전 날개에서 1차 채혈을 하였고, 첫 번째 challenge를 하고 일주일 후에 2차 채혈을 하였다. 두 번째 challenge를 하고 일주일 후에 마지막 3차 채혈을 하였다. 채혈한 직후 원심분리하여 혈청을 분리한 후 immuoglobulin과 cytokine을 측정하기 전까지 -80℃에 보관하였다.

##### (다) 실험 처리구

표. *Salmonella typhimurium* 투여 처리군

	Group	Sample
1	Unchallenged	5
2	Challenged	5
3	Challenged + 유산균 0.3%	5
4	Challenged + coated 유산균 0.3%	5
5	Challenged + coated 유산균 0.3% + 팬자임 0.2%	5
6	Challenged + coated 유산균 0.3% + 팬자임 0.2% + 동의보감 0.2%	5

##### (라) 실험 방법

###### ① 닭 혈청 분리 방법

실험 종료 후 각 처리별로 평균 체중과 비슷한 육계 각 5수를 선별하여 도살시켜 채혈 한 뒤 heparin 코팅된 tube에 보관하였다. 혈액을 1000xg에서 15분간 centrifuge 하여 혈청만을 분리하였다. 분리된 혈청은 -80℃에서 보관 하였다.

###### ② Sandwich ELISA 법에 의한 면역cytokine 및 면역 globulin의 측정

실험에 이용한 면역 cytokine의 인자로는 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IgG, IgA를 대상으로 실시 하였다. 세포성 면역의 증강여부를 확인 할 수 있는 인자로서 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6를 실험에 적용하였으며, 체액성 면역의 증강여부를 확인 할 수 있는 인자로서 IgG, IgA를 실험에 적용하였다.

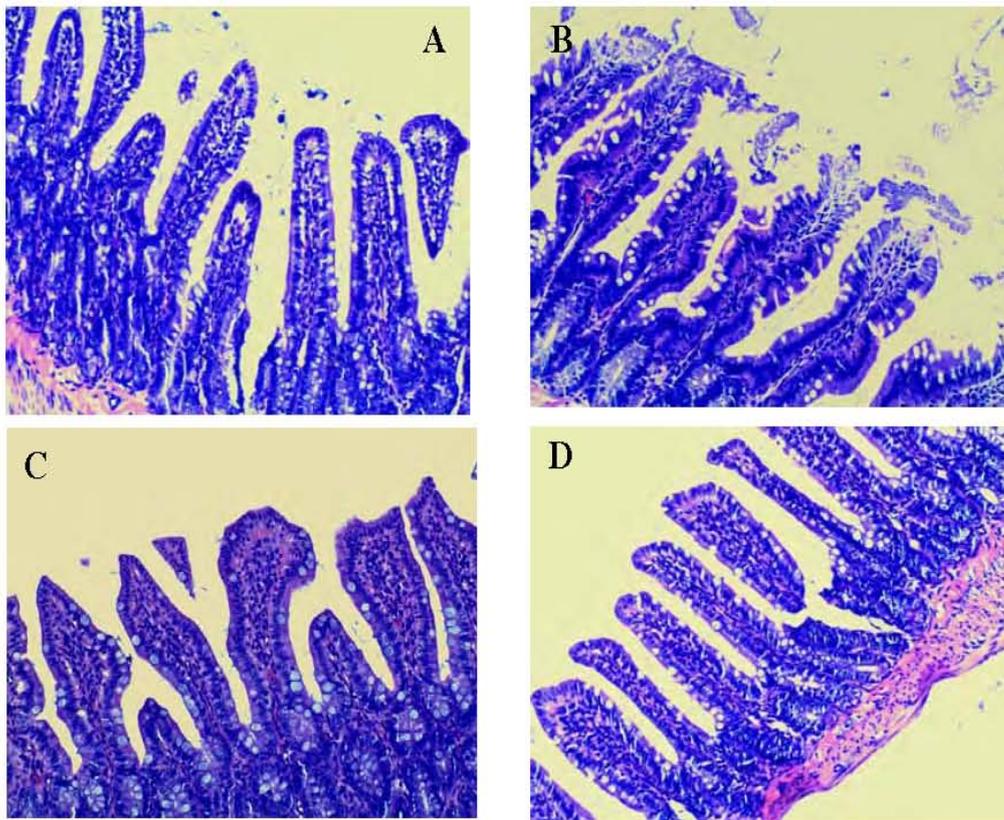
필요한 수만큼의 plate를 홀더에 셋팅한 후, 회석검체, 각 농도의 닭 cytokine 표준액, 검체 회석액을 각각 plate에 100 ul 씩 주입한다. 그 후, 실온에서 30분 간 shaker위에서 방치했다. 세정액을 각 plate에 300ul 씩 5회 주입, 마지막에는 완전히 제거한다. 닭 cytokine 효소 항체액 100ul를 각 well에 주입한다. 실온에서 30분간 방치한 다음 세정액을 각 plate에 300ul 씩 5회 주입하고 마지막에는 완전히 제거한다. 발색액 200ul를 각 well에 주입한 후, 실온에서 15분간 방치한 다음, 반응 정지액 50ul를 각 well에 주입한다. ELISA reader기에서 450nm로 흡광도를 측정한다.

③ 통계학적인 처리

대조군을 비롯한 사료첨가제들 간의 평균치 유의성을 검정하기 위하여 분석치에 대하여 SAS을 사용하여 ANOVA test를 실시 하였다.

(마) 실험 결과

① Challenge 후 도체의 용모 형태 관찰 - 닭의 가금 티프스 (clinical isolation) challenge 후 소장의 용모 세포 관찰하였다. 대조군에서는 용모가 온전한 상태로 모양을 유지하고 있으나, 가금 티프스를 섭취 시킨 그룹의 용모는 끝 부분이 훼손되어 온전한 용모 모양이 유지되지 않았다. 하지만, 유산균과 코팅 유산균을 섭취한 그룹의 용모는 가금 티프스를 challenge 했음에도 온전한 용모의 모양을 유지하고 있음을 확인하였다.



A: 대조군, B: Only challenged, C: 유산균+challenged, D: 코팅 유산균+ challenged

그림. 가금 티푸스균 challenge시 유산균 급여가 용모 형태에 미치는 영향

② 닭 맹장에서 장내세균 및 유산균 측정 - 닭 사양실험(challenge)이 종료된 후 해부하여 맹장을 적출하였다. 적출된 맹장의 내용물을 멸균된 식염수 2mL에 1g을 넣고, MRS 배지와 MacConkey 배지에 각각 도말하여 48시간 뒤 콜로니의 수를 세어 계산하였다. 그 결과 유산균의 균체수는 거의 차이가 없었으나 coated 유산균을 급여한 경우, 유산균(생균)을 급여한 처리구에 비해 일반 세균에 비해 현저히 낮은 것으로 관찰되었다. 이는 coated 유산균 제제가 유산균(생균)에 비해 장내에서 상대적으로 활성이 높기 때문에 일반 세균의 성장을 억제하기 때문인 것으로 추정된다. 즉, 본 과제에서 제작하여 급여한 coating 유산균 제제가 장용성을 갖고 있음을 추정케 해준다.

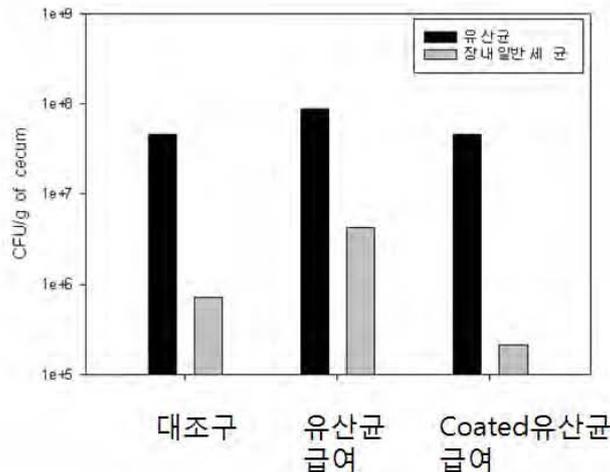


그림. 유산균 제제의 급여가 장내 미생물 성장에 미치는 영향

③ *Salmonella typhimurium* 투여 처리군들의 혈청 생화학적 분석

㉠ 유산균제제 투여 군들의 체액성 면역에 대한 영향

모든 생명체의 숙주 방어기전은 macrophage 등의 항원전달세포와 T 림프구를 중심으로 한 일련의 세포성 면역 반응과 B 림프구를 중심으로 하는 체액성 면역반응에 의하여 이루어진다. 가금류에서 공인된 immunoglobulin의 종류는 IgA, IgG, IgM의 3가지로 명명되고 있으면, 이들은 포유동물과 생물학적 특성이 유사한 것으로 보고되고 있다. IgG는 세포외부에서 toxin과 virus를 중화시키는 생물적 기능을 가진다. IgA는 horse spleen ferritin에 대해서 항체능력을 가진다고 보고는 되어 있으나 병원성 항원에 대한 임상적 가치에 대해서는 명확하게 규정되지 못하고 있다. 본 연구에서는 이러한 닭에서의 생체 면역방어기전에 있어서 중요한 역할을 하는 B 림프구의 생체 활성화를 위하여, 면역 사이토카인의 인자로서 인자로는 IgG, IgA를 대상으로 실시하였다. IgG와 IgA의 결과에서는 Challenged 군과 Unchallenged 군을 비교하였을 때 통계학적으로 유의적인 차이가 없었다. 이는 유산균 제제가 닭 생체 내 체액성 면역에는 관여하지 않은 것으로 사료된다. 이는 1차 challenge 실험에서와 다른 결과인데 그 원인은 1차에서는 2 종류의 미생물을 challenge 하였지만, 본 실험에서는 *S. galinarium* 균주 1종만을 challenge 한 데에 기인하는 것으로 판단된다. 일반적으로 *S. galinarium*은 병아리에서 치사율이 높은 반면에 성체에서는 치사율이 낮은 것으로 알려져 있다.

IgA 에 대한 4주령에서의 농도를 측정된 결과 4주령에서는 Challenged 군과 Unchallenged 군에서는 유의적인 차이가 없었다.

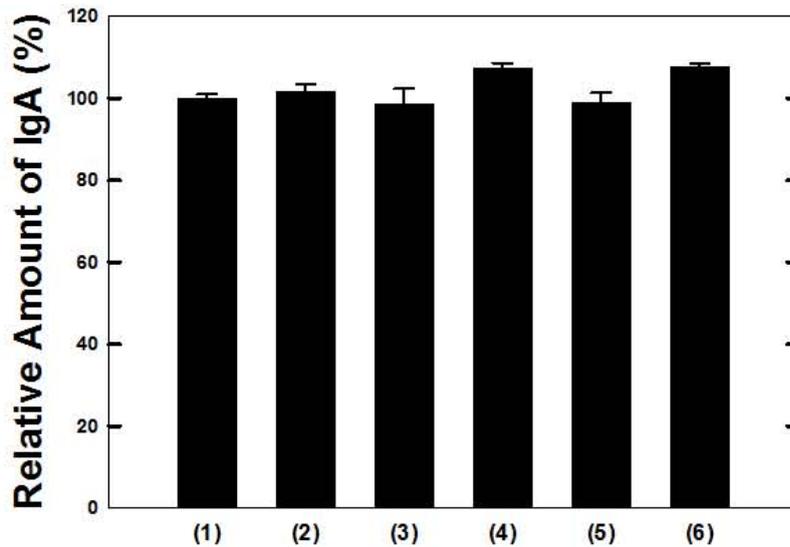


그림. *Salmonella galinarium* 강제 급여에 의한 육계의 immunoglobulin A 영향

IgG에 대한 4주령에서의 농도를 측정한 결과 4주령에서는 Challenged 군과 Unchallenged군에서는 유의적인 차이가 없었다.

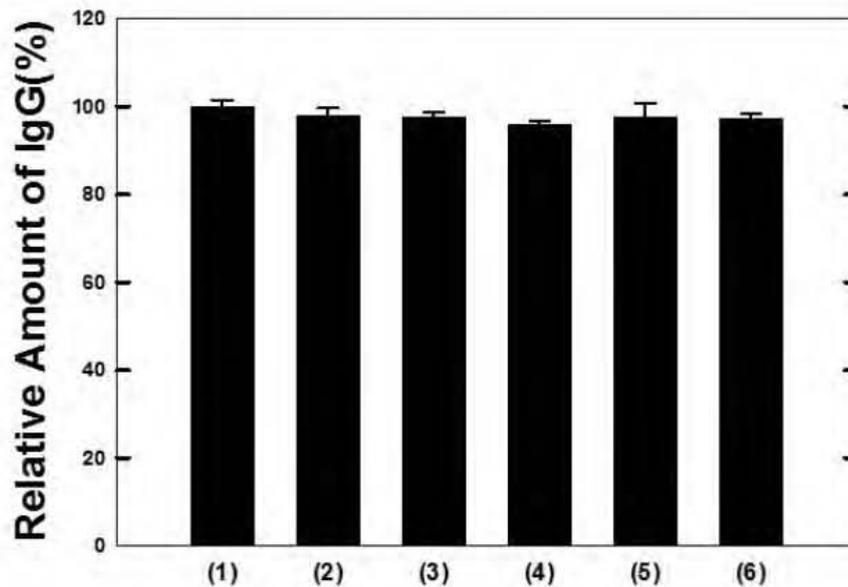


그림. *Salmonella galinarium* 강제 급여에 의한 육계의 immunoglobulin G 영향

⊕ 유산균제 투여군들의 세포성 면역에 대한 영향

T-림파구는 골수에서 생성되어 흉선에서 활성화는 세포 매개성 면역작용으로 cytotoxic T-세포는 사이토카인을 생성하여 세포사를 유발하고 대식세포를 유인하여 식작용을 유발한다. Suppressor T-세포는 세포에서의 균이 치유되면 면역반응을 종료한다. 이들 사이토카인은 IL-4와 같은 항염증인자, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 와 같은 친염증유발로 분류할수 있다. 이와 같은 사이토카인은 감염부위에 면역세포가 모여드는 작용을 활성화시킨다. 산화질소는 일종의 신호 물질로 작용해 적절한 수준은 면역계에 활성을 부여한다. 만약에 산화질소가 과다하게 만들어지면 세포사멸을 유도한다. 본 연구에서는 이러한 닭에서의 생체 면역방어기전에 있어서 중요한 역할을 하는 T

림파구의 생체 활성화를 위하여, 면역 사이토카인의 인자로서 인자로는 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 를 실험에 적용하였다. IL-6와 IFN- $\gamma$ 의 결과에서는 Challenged 군과 Unchallenged 군을 비교하였을 때 통계학적으로 유의적인 차이가 있었다. 또한 Unchallenged 군에서는 유산균 제제를 먹인 군에서 유의적인 차이가 있게 줄어드는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 에 감염 된 닭이 필요이상의 사이토카인을 분비하는 것을 막아 결국에는 산화질소의 양도 줄어들게 하여 면역반응에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료 되어진다. 즉 유산균 제제가 닭 생체 내 세포성 면역에 효과가 있는 것으로 사료 된다. 그러나 TNF- $\alpha$ 경우에는 Challenged 군과 Unchallenged 군을 비교하였을 때 통계학적으로 유의적인 차이가 있었다. 그러나 challenged군 내에서는 유의적인 차이가 없었다.

IL-6에 대한 4주령 에서의 농도를 측정 한 결과 4주령에서는 Challenged 군과 Unchallenged 군간에 유의적인 차이가 있었다. 또한 Unchallenged 군 간에 유산균 제제를 투여한 군에서 통계적으로 차이가 있었다. 유산균 제제를 투여한 군에서 효과적으로 IL-6가 줄어 들었다.

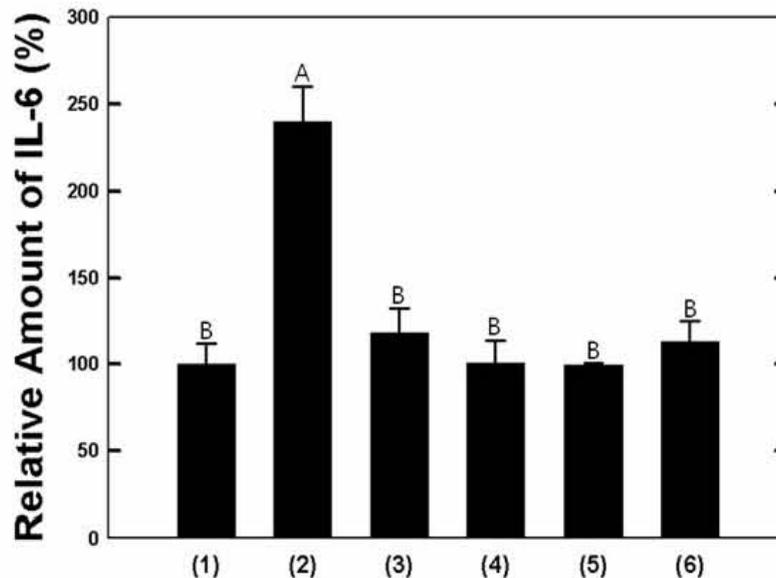


그림. *Salmonella galinarium* 강제 급여에 의한 육계의 interleukine-6 영향

IFN- $\gamma$ 에 대한 4 주령에서의 농도를 측정 한 결과 4주령에서는 Challenged 군과 Unchallenged 군 간에 유의적인 차이가 있었다. 또한 Unchallenged 군 간에 유산균 제제를 투여한 군에서 통계적으로 차이가 있었다. 유산균 제제를 투여한 군에서 효과적으로 IFN- $\gamma$ 가 줄어 들었다.

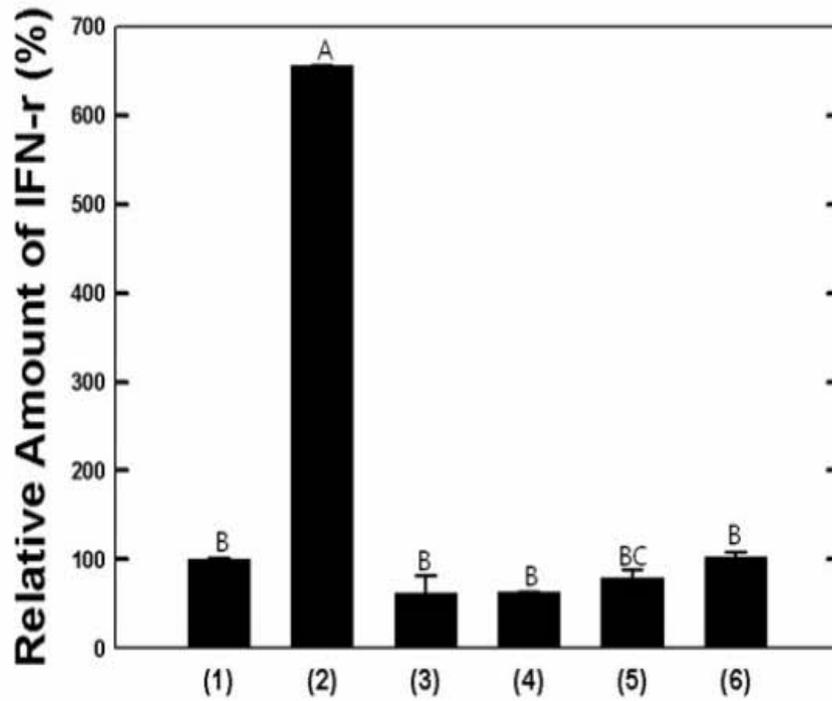


그림. *Salmonella galinarium* 강제 급여에 의한 육계의 interferon- $\gamma$  영향

TNF- $\alpha$ 에 대한 4주령 에서의 농도를 측정한 결과 4주령에서는 Challenged 군과 Unchallenged군에서는 유의적인 차이가 있었다. 그러나 challenged군 내에서는 유의적인 차이가 없었다.

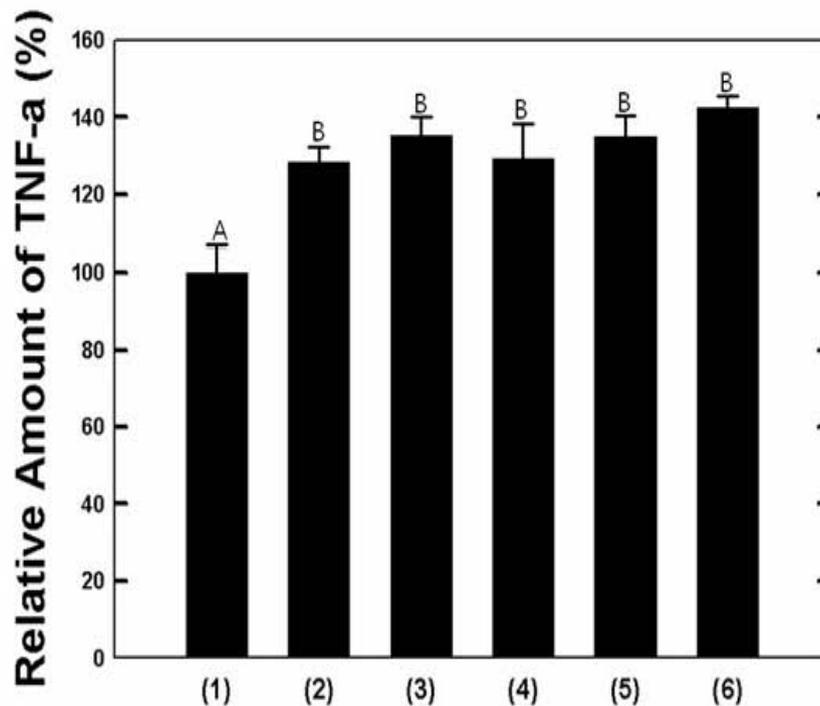


그림. *Salmonella galinarium* 강제 급여에 의한 육계의 TNF- $\alpha$  영향

## (5) 유산균 encapsulation 이 육계의 사료 기호성에 미치는 영향

### (가) 목적

호화 전분 및 monoolein 을 기반으로 하는 유산균 encapsulation 제제가 육계의 사료 기호성에 미치는 영향을 파악하고자 함

### (나) 실험동물

육계 (loss 308) 수평아리 21 일령으로 1 처리구당 10마리로 총 40 마리를 사용하여 2 주 동안 사료를 급여하였다.

### (다) 실험사료

시판중인 육계 전기 배합사료(홍성사료)를 대조구로 하여 유산균과 coated 유산균, coated 유산균과 팬자임®(복합 효소제, (주)미래자원ML), coated 유산균과 팬자임® + 복합한약재 추출물 (동의보감®)을 첨가하여 시험하였다. 사료 급여 방법은 pair feeding으로 케이지 당 2개의 사료통을 동시에 설치하여 사료의 기호도를 평가하였다.

### (라) 실험처리구

대조구 + 유산균제제 0.3%

대조구 + Coated 유산균 0.3%

대조구 + Coated 유산균 0.3% + 팬자임® 0.2%

대조구 + Coated 유산균 0.3% + 팬자임® 0.2% + 동의보감® 0.2%

### (마) 사양관리

각각의 케이지에 닭을 1마리씩 독립적으로 수용한 후에 사료는 pair feeding 방식으로 2개의 사료통을 사용하여 자유 선택 섭취도록 하였으며, 사료통의 위치를 매일 변경하여 사료통 위치 인식에 따른 섭취를 하지 못하도록 하였고, 섭취량은 매일 기록하였다. 점등시간은 1일 23 시간이 되도록 하였으며, 물은 자유 급이되도록 하였다.

### (바) 조사항목

사료섭취량을 산출하여 처리구 사료의 기호성을 평가하였다.

### (사) 통계처리

분석된 통계자료의 처리는 SAS(2000)의 GLM procedure를 이용하여 분산분석 하였고, Duncan's multiple range test 에 의하여 95% 수준에서 처리 평균치 간의 통계적 유의성을 검증하였다. ( $p < 0.05$ )

### (아) 시험사료 조성

육계 사양 시험에 사용한 조성과 동일

### (자) 실험결과

육계를 이용한 encapsulated (coated) 사료의 기호성을 평가한 결과는 아래의 표와 같다.

No.	처리구		사료 섭취량 (g)	
1	대조	대조구+유산균제제 0.3%	624.3	625.7
2	대조	대조구+coated 유산균 0.3%	631.7	645.8
3	대조	대조구+coated 유산균 0.3% + 팬자임® 0.2%	638.1	622.
4	대조	대조구+coated 유산균 0.3% + 팬자임® 0.2% + 동의보감® 0.2%	621.4	615.4

표. 유산균 encapsulation 이 사료 기호성에 미치는 영향

21 일령의 육계 수평아리를 이용하여 2 주간의 실험사료 섭취량을 산출한 결과, 유산균제제를 첨가한 처리구에서 섭취량이 미미하나마 증가하는 경향이 있었으며, 특히 coated 유산균제제를 급여한 처리구에서 기호성이 가장 좋게 나타난 것으로 보인다. 하지만 이 정도의 수치적 차이로 명확한 기호성의 차이가 있다고 판단하기는 어려우며, 대체적으로 유산균제제의 첨가가 사료의 기호성에 부정적인 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.

#### (6) 유산균 encapsulation 이 산란계의 산란율에 미치는 영향

##### (가) 목적

본 실험에서는 encapsulation 된 유산균(coated 유산균)이 산란계의 산란율에 미치는 영향을 평가하고자 한다.

##### (나) 실험동물

산란계 (Hy-Line) 48 주령으로 실험구 배치한 후 21일간의 생산된 계란의 성적으로 실험하였다.

##### (다) 실험사료

시중에서 사용되고 있는 산란계 사료를 대조구로 하여 coated 유산균제와 효소제 (팬자임®), 복합 한약 추출물(동의보감®)을 첨가하여 실험사료로 사용하였으며, 처리구는 대조구와 대조구 사료에 coated 유산균제 0.3%와 효소제 (팬자임®) 0.2% , 복합 한약 추출물(동의보감®) 0.2%를 첨가한 사료를 급여하였다. 각 처리구는 15 반복으로 총 30 마리의 산란계를 사용하였다.

##### (라) 실험처리구

대조구

대조구 + Coated 유산균 0.3% + 팬자임® 0.2% + 동의보감® 0.2%

##### (마) 사양관리

물과 사료는 자유 섭취토록 하였으며, 잠등시간은 5:00에 켜지고, 22:00에 소등하게 하여 일조 시간은 17 시간이 되도록 하였다. 실험 기간 (21일) 중에 매일 난중을 기록하였으며, 4일 간격으로 생산된 계란 중 10개를 선택하여 계란 품질 분석에 사용하였다.

(바) 조사항목 및 분석 방법

처리구간의 생산된 계란 품질 분석을 위하여 Haugh Unit, 난황색, 난중, 난각 두께, 산란율을 분석하였다.

(사) 통계처리

분석된 통계자료의 처리는 SAS(2000)의 GLM procedure를 이용하여 분산분석 하였고, Duncan's multiple range test 에 의하여 95% 수준에서 처리 평균치 간의 통계적 유의성을 검증하였다. (p<0.05)

표. 산란계 중기 사료 조성표

Item	Contents(%)	
Corn	55.40	54.70
Wheat	3.00	3.00
Fish meal(55%)	1.00	1.00
Soybean meal(44%)	23.4	23.4
Rapeseed Meal	3.00	3.00
DDGS	2.00	2.00
Limestone	9.34	9.34
Salt	0.22	0.22
Dicalcium phosphate	0.52	0.52
Tallow	1.60	1.60
Phytase	0.01	0.01
Vitamin, Mineral Premix <sup>1)</sup>	0.10	0.10
DL-Methionine(81%)	0.11	0.11
Cholin-Hcl	0.05	0.05
Coated 유산균	0	0.30
팬자임 <sup>®</sup>	0	0.20
동의보감 <sup>®</sup>	0	0.20
etc	0.25	0.25
Nutrients Calculated Values(%)		
Protein	18.08	18.08
Crude Fat	4.46	4.46
Crude fiber	2.94	2.94
Crude Ash	12.56	12.56
Calcium	3.75	3.75
Phosporus	0.46	0.46
Retein-Phosporus	0.32	0.32
Lys(D Lys)	0.86(0.75)	0.86(0.75)
Met(D Met)	0.40(0.35)	0.40(0.35)
D Met (% of D Lys)	47	47
Met+Cys(D SAA)	0.73(0.62)	0.73(0.62)
D Met+Cys (% of D Lys)	83	83
ME(layer)(kcal/kg)	2,907	2,907

<sup>1)</sup>Vitamin contains followings in 1kg: vit A, 10,000,000IU; vit D<sub>3</sub>, 3,500,000IU; vitE, 15,000IU; vitK<sub>3</sub>, 2,000mg; vitB<sub>1</sub>, 1,500mg; vitB<sub>2</sub>, 5,000mg; vitB<sub>6</sub>, 3,000mg; vitB<sub>12</sub>, 20mg; niacin, 25,000mg; Ca-pantothenate, 6,000mg; Folic acid, 500mg; Cu, 9,000mg; I, 1,500mg; Mn, 80,000mg; Zn, 80,000mg; Se, 250mg; Fe, 50,000mg; Co, 100mg

(아) 산란계 시험 결과

표. Coated 유산균 및 복합천연물, 복합 효소제의 급여가 산란계에 미치는 영향

Treatments	Feed Intake (g/b)	Egg Production (%)	Egg mass (g)	Egg Weight (g)	Haugh unit	Thickness (x10um)	Egg Yolk Color Score
대조구	144.7 ± 9.2	91.7 ± 7.5	57.0 ± 7.4	63.3 ± 3.7	97.5 ± 1.86	37.0 ± 1.4	9.1 ± 0.7
처리구	140.4 ± 5.3	89.4 ± 9.8	55.9 ± 5.0	62.7 ± 6.0	97.8 ± 1.80	37.2 ± 2.4	9.2 ± 0.9

산란 피크 시기를 지난 48 주령의 산란계를 이용하여 coated 유산균 + 췌자임® + 동의보감® 급여가 산란율에 미치는 영향을 실험한 결과, 난중, 사료섭취량, 산란율, 난각 두께, 난황색 등 측정된 모든 항목에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

## 2. 2차년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
배합비 설정 및 실험 사료 제작	NRC 사양 표준에 의하여 사료 배합비 설정 및 실험사료 제작	NRC 사양 표준에 의하여 isonitrogenous, isocaloric 하도록 사료 배합비 설정 및 실험사료 제작
유산균 제형 개발	호화전분 및 monoolein을 기반으로 하는 w/o 제형 개발	호화전분 및 monoolein을 기반으로 하는 w/o 제형 개발
사료 적합성 평가	실험 사료의 기호성 및 생산향상을 위한 시험	Rat, Broiler 등의 실험동물을 이용하여 사양실험 진행
사양 가축의 육제품 생산 평가	실험사료별 생산된 가축의 육제품 평가	도살한 실험동물의 가슴살과 다리살을 이용하여 가열감량, 진단력, 보수력, 육조직의 색, 육조직의 pH 측정
실험 동물 혈청생화학적 분석	Elisa kit 분석	Elisa kit를 이용하여 혈액(혈장)중의 immunoglobulin 및 각종 cytokine류 정량 분석

### 가. 유산균 코팅 연구

#### (1) W/O 에멀전을 활용한 코팅의 유산균 보호 효과

본 연구는 W/O 에멀전을 활용한 유산균 코팅 기술을 통해 얻은 유산균 캡슐의 유산균 보호 효과를 측정하기 위해 수행되었다. 유산균 캡슐과 처리되지 않은 유산균을 배양한 후 균수 측정 실험을 통해 배양 시간에 따른 균수의 변화를 측정해 유산균 캡슐의 보호 효과를 조사하였다.

캡슐의 유산균 보호 효과를 조사하기 위해 유산균 농축액과 유산균 캡슐 시료가 사용되었다. 유산균 농축액과 유산균 캡슐 시료 1mL을 각각 0.9% NaCl 용액, pH 2 buffer solution, pH 7 buffer solution 9mL에 희석해 총 6종류의 시료를 제조하였다. 제조된 시료를 shaking incubator를 이용해 40°C에서 배양하는 도중, 특정 시간마다 0.1mL씩 취해 희석한 후 Difco™ Lactobacilli MRS agar plate에 도말하였다. 도말한 plate를 incubator를 이용해 37°C에서 48시간 배양한 후 균수를 측정 및 비교하였다.

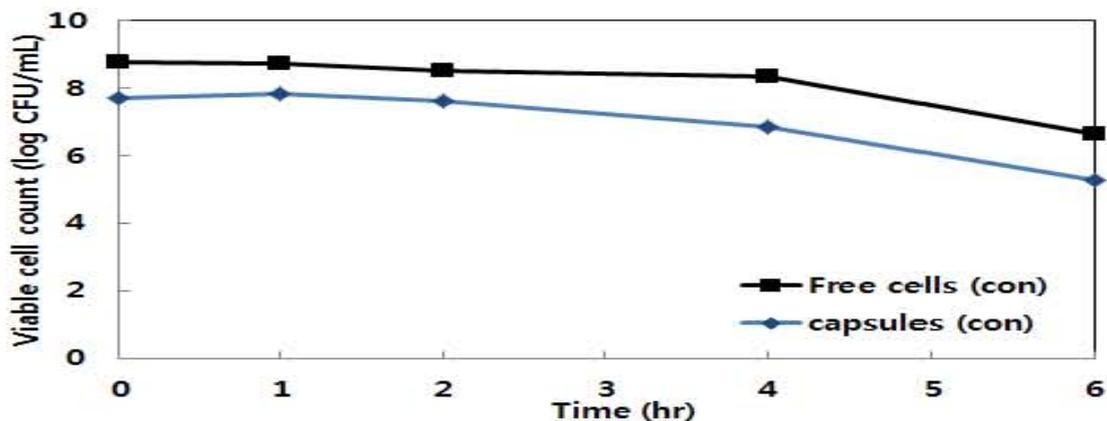


그림. W/O 에멀전 기법을 이용하여 캡슐화 시킨 *Lactobacillus plantarum*과 처리되지 않은 유산균의 균수 변화

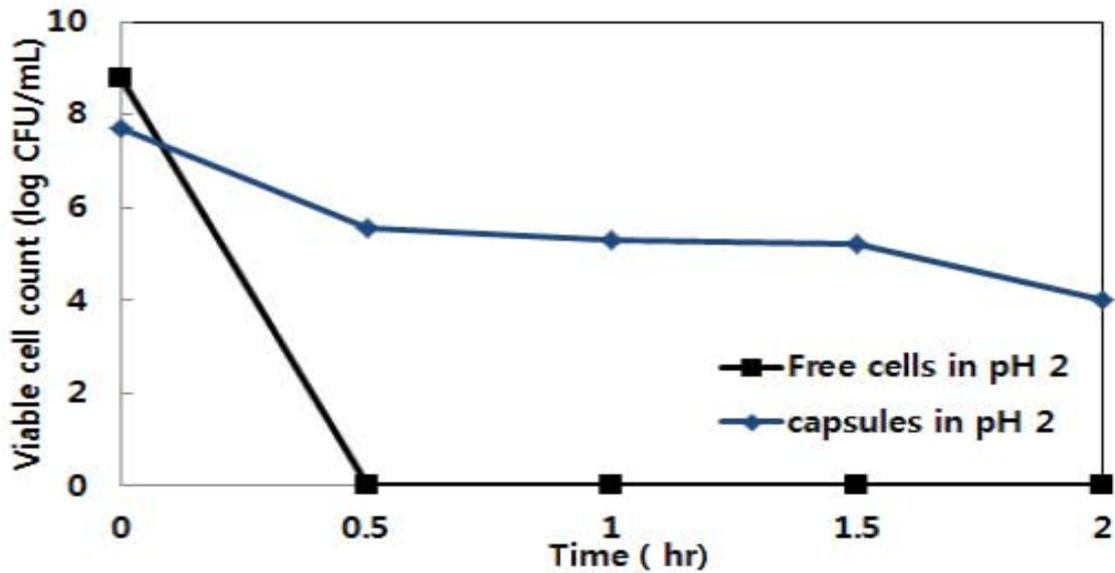


그림. W/O 에멀전 기법을 이용하여 캡슐화 시킨 *Lactobacillus plantarum*과 처리되지 않은 유산균의 pH 2 환경에서의 균수 변화

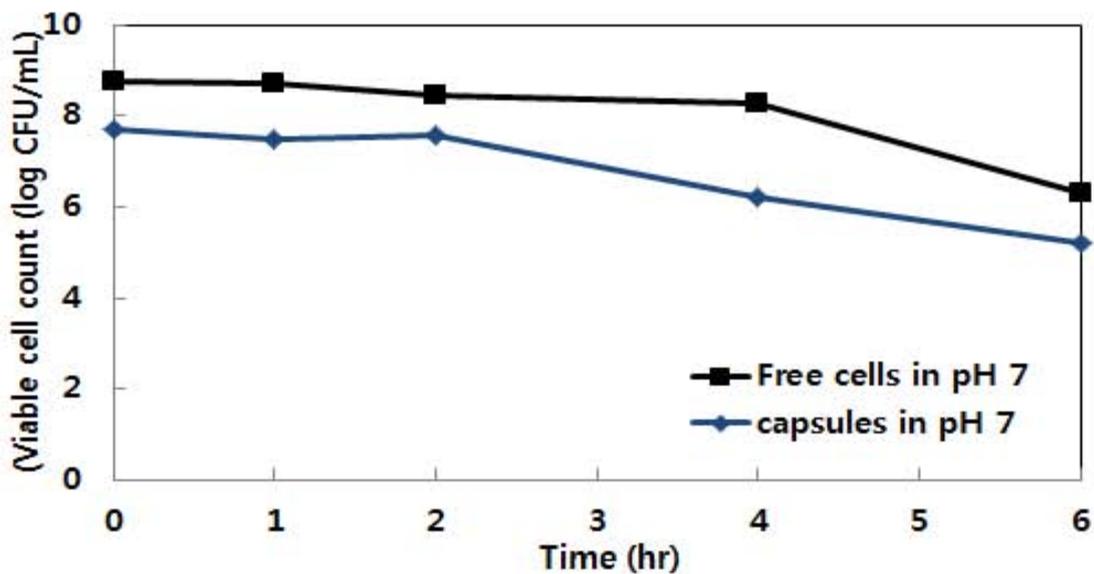


그림. W/O 에멀전 기법을 이용하여 캡슐화 시킨 *Lactobacillus plantarum*과 처리되지 않은 유산균의 pH 7 환경에서의 균수 변화

pH 처리를 하지 않았을 경우와 pH 7의 조건 하에서 배양하였을 경우 캡슐화된 유산균과 캡슐화되지 않은 유산균 모두 균수에서 큰 변화를 관찰할 수 없었으나, pH 2의 조건 하에서 캡슐화되지 않은 유산균은 1시간 내에 급격히 사멸했으나 캡슐화된 유산균은 2시간까지 균수의 감소가 측정되었다. 따라서 W/O 에멀전을 활용한 유산균 코팅 기술을 통해 얻은 유산균 캡슐의 유산균 보호 효과를 확인하였다.

## (2) 분무건조를 이용한 유산균 코팅 캡슐의 분말화

본 연구는 W/O 에멀전 기법을 이용하여 캡슐화 시킨 *Lactobacillus plantarum*을 가금류의 사료에 적용하기 위하여 분말화 하고자 수행되었다. 이전 실험과 동일한 방법으로 제조한 유산균 코팅 캡슐을 분무건조하여 유산균 코팅 캡슐 분말을 수득하였다. 분무건조를 위해 W/O 에멀전 기법을 이용하여 *Lactobacillus plantarum*을 캡슐화 한 후 이를 다시 멸균된 0.9%(w/v) NaCl 수용액에 현탁하여 10%(w/v) 농도의 유산균 코팅 캡슐 현탁액을 제조하였다. 이 현탁액을 Spray drier (EYELA SD-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Japan)를 이용하여 분무건조 하였으며, Inlet temperature는 160℃, Blower rate는 0.60 m<sup>3</sup>/min, Atomizing은 220 kPa, 시료의 주입 속도는 400 mL/h로 설정하였다. 분무건조 후 수기병에 모인 시료들만을 회수하였으며, 이 때의 수율은 건물 대비 26.27±16.84%로 측정되었다. 이를 통해 분무건조를 통한 유산균 코팅 캡슐의 분말화 공정을 확립하였다.



그림. 분무건조를 통해 분말화 한 W/O 에멀전 기법을 이용하여 캡슐화 시킨 유산균 코팅 캡슐 분말

## (3) 분무건조를 이용해 분말화된 유산균 코팅 캡슐의 소화 모방 실험

본 연구는 분무건조를 통해 분말화된 유산균 코팅 캡슐의 활성을 측정하기 위하여 수행되었다. 본 연구에 사용된 *L. plantarum* 현탁액과 분무건조 전의 유산균 코팅 캡슐과 분무건조 후의 유산균 코팅 캡슐을 이용해 균수 측정 실험을 수행하여 캡슐 내의 유산균의 활성을 측정하였다. 3가지 시료를 각각 pH 2 buffer solution에 현탁한 후 닭의 체온과 유사한 40℃에 보관하여 위장에서의 소화를 모방하였고, 보관 30분 후 NaOH 수용액을 이용하여 시료의 pH를 7로 보정하여 소장에서의 소화를 모방하였으며, 특정 시간마다 시료를 취해 균수 측정 실험을 수행하였다.

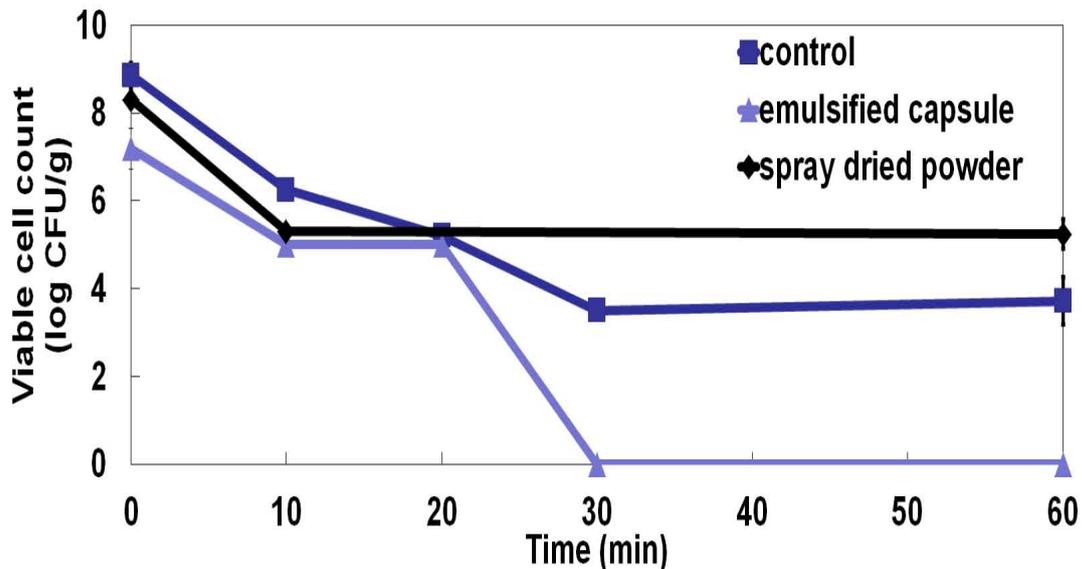


그림. 코팅 여부 및 분무건조 여부에 따른 닭의 소화 모방 실험 결과

세 시료 모두 pH 2 조건 하에서 균수가 감소하였지만 분무건조를 통해 분말화된 유산균 코팅 캡슐의 균수 감소 폭이 가장 작은 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 분무건조를 통해 분말화된 유산균 코팅 캡슐이 닭의 사료로 사용되었을 경우 유산균이 효과적으로 대장에 도달할 것으로 기대되었다.

#### (4) 분무건조를 이용해 분말화된 유산균 코팅 캡슐의 저장 실험

본 연구에서는 분무건조를 이용해 분말화된 유산균 코팅 캡슐을 각각 다른 온도에 저장하며 균수 측정을 수행함으로써, 저장 온도에 의한 유산균 코팅 캡슐의 활성 변화를 측정하고자 하였다.

유산균 코팅 캡슐 분말을 각각 4°C와 35°C에 저장하여 겨울과 여름 환경을 모방하고자 하였고, 3개월간 저장하며 특정 시간마다 균수 측정 실험을 수행하였다(그림 1.4.1)

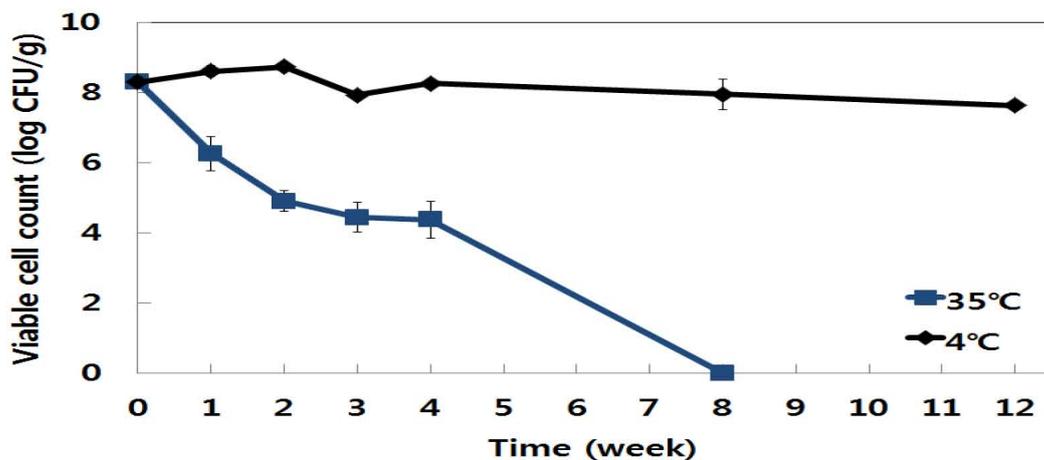


그림. 분무건조를 통해 분말화 한 유산균 코팅 캡슐의 저장 온도에 따른 활성화

유산균 코팅 캡슐 분말을 35℃에 저장한 경우 균의 활성이 지속적으로 감소하였으며, 저장 8주 후에는 균수가 측정되지 않았다. 반면 분말을 4℃에 저장한 경우 12주 후에도 균의 활성이 분말 1 g당 8.29 log CFU에서 7.69 log CFU로 그 감소폭이 35℃에 저장한 시료보다 확연하게 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 유산균 코팅 캡슐 분말을 냉장보관하였을 경우 3개월 후에도 유산균의 활성을 유지한 것을 확인하였으며, 냉장보관 혹은 냉암소 보관이 요구됨을 확인하였다.

#### (5) 분무건조를 이용해 분말화된 유산균 코팅 캡슐의 대량 생산 예비 실험

본 연구는 유산균 코팅 캡슐 분말의 대량 생산에 앞서 예비실험을 위해 수행되었다. W/O 에멀전 기법은 고속 균질이 필요하며 많은 양의 Oil이 필요한 점과 대량 생산시 water phase와 oil phase의 분리가 용이하지 않아 oil을 사용하지 않고 10% 전분 수용액을 호화시킨 후 물을 추가하여 5% 수용액을 제조하였고 이를 고속 균질하여 전분의 입자를 작게 하였다. 유산균의 첨가 여부는 분무건조 수율에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 판단하여 첨가하지 않았다. 상기 방법대로 제조된 전분 시료를 춘천바이오산업진흥원 소재 중형 분무건조기를 이용하여 inlet temperature 180℃, 시료 공급 속도 10 L/h의 조건으로 분무건조하였다. 분무건조 후 건조된 시료를 모두 회수하였으며, 이 때의 수율은 63%로 측정되었다. 이를 통해 대형 분무건조기를 사용하여 유산균 코팅 캡슐 분말의 대량 생산이 가능할 것으로 사료되었다.

#### (6) 감태 및 생강을 첨가한 기능성 유산균 코팅 캡슐 분말 개발

본 연구는 유산균 코팅 캡슐에 부가적인 기능성을 추가하고자 수행되었다. 분무건조 소요 시간 및 비용을 절감하고자 16%(w/v) 전분 용액을 호화시킨 후 온도가 60℃로 냉각되었을 때 유산균을 첨가하였고, 물과 함께 1%(w/v) 호화된 감태 분말 용액 혹은 1%(w/v) 생강 분말 용액을 첨가하여 전분의 최종 농도를 8%로 설정하였다. 그 후 이를 고속 균질한 후 분무건조를 통해 코팅하였다.



그림. 분무건조를 통해 분말화된 유산균 코팅 캡슐(왼쪽)  
 그림. 분무건조를 통해 분말화된 감태 첨가 유산균 코팅 캡슐(가운데)  
 그림. 분무건조를 통해 분말화된 생강 첨가 유산균 코팅 캡슐(오른쪽)

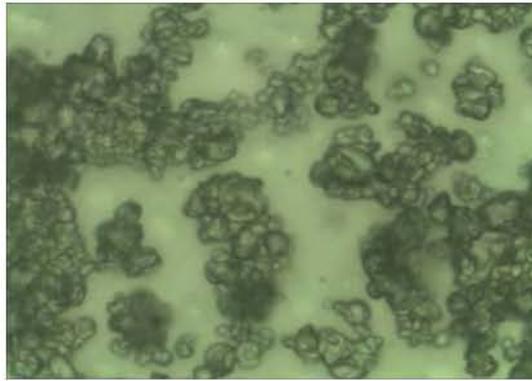


그림. 분무건조를 통해 분말화된 유산균 코팅 캡슐의 미세구조

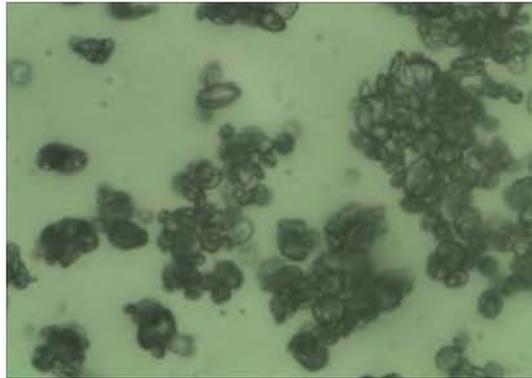


그림. 분무건조를 통해 분말화된 감태 첨가 유산균 코팅 캡슐의 미세구조

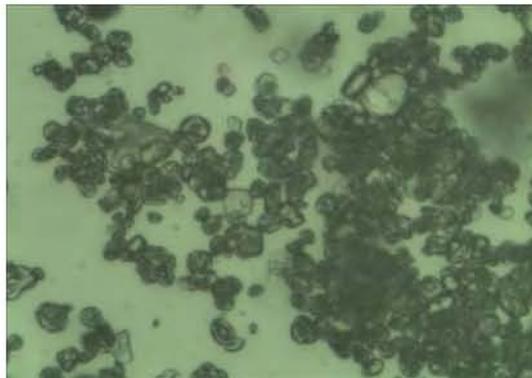


그림. 분무건조를 통해 분말화된 생강 첨가 유산균 코팅 캡슐의 미세구조

감태 및 생강이 첨가되지 않은 기존의 유산균 코팅 캡슐 분말은 백색을 띠는 데 반해 감태, 생강이 첨가된 분말은 각각 감태와 생강 고유의 색을 나타내었다. 유산균 코팅 캡슐의 입자 크기는 3 종류 모두 약 13  $\mu\text{m}$ 로 측정되었으며, 감태와 생강 분말은 미세구조에 영향을 주지 않은 것으로 보아 감태 및 생강 또한 전분 내부에 코팅된 것으로 사료된다

## 나. 유산균의 rat 에 대한 영향

### (1) Rat의 감태와 유산균의 섭취 사양 실험

#### (가) 목적

본 실험은 동물 체내에서의 감태와 유산균의 안정성을 평가하고 최소 dosage를 평가함과 동시에 이들의 효능을 향상시키는 방법을 모색하기 위하여 수행하였다.

#### (나) 실험 동물

약 80g의 수컷 SD (Sprague-Dawley) rat(30마리)을 (주)나라바이오텍에서 공급받았으며, 1일동안 실험실 환경에 순화시켰다.

#### (다) 실험사료

사료는 영양소 조성이 완벽한 것으로서 일반적으로 많이 사용하는 AIN-93G 사료를 사용하였으며, 그 조성은 다음 표와 같다.

표. Rat 사료 조성

AIN-93G components	g/kg diet
Cornstarch	397.486
casein	200
Dextrinized cornstarch	132
sucrose	100
soybean oil	70
fiber	50
Mineral M	35
Vit.M	10
Choline bitartrate	2.54
Ter-butylhydroquinone	0.014
Mineral Mix	g/kg mix
Ca. carbonate, anhydrous	357(179)
Pot. Phosphate, mono	196
Pot. Citrate, tri-potassium	70.78
Sod. Chloride	74
Pot. Sulfate	46.6
Mag. Oxide	24
Ferric citrate	6.06
Zinc carbonate	1.65
Mag. Carbonate	0.63
Cup. Carbonate	0.3
Pot. Iodate	0.01
Sod. Selenate, anhydrous	0.01025
Amm. Paramolybdate	0.00795

(라) 실험 처리구

1처리구	대조구
2처리구	대조구+감태 0.05%+유산균0.05%
3처리구	대조구+감태 0.025%+유산균0.05%
4처리구	대조구+감태 0.025%+piperine 1ppm

(마) 사양 관리

동물 실험실의 환경은  $22 \pm 1$  °C , 습도  $50 \pm 5\%$ , 조도 150-300 lux, 조명주기 12시간씩 밤낮을 유지하였고, 실험 전 기간 동안 사료와 정수된 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 급여하였다.

(바) 조사항목 및 분석 방법

처리구 간의 사양 성적을 산출하기 위하여 각 처리구간의 증체량을 알기위하여 실험 개시일, 개시일로부터 10일령, 20일령에 측정하여 체중을 기록 하였다. 실험 종료일에 각 처리구 당 유사 체중을 갖는 rat 4 마리씩 도살하여 심장 채혈을 통하여 혈액을 분석하였고, 간과 소장을 적출하여 간의 조직을 촬영하고 소장의 용모 길이를 측정하였다.

(사) 실험 결과

표. Rat의 사양 체중 측정

	실험 개시일(g)	개시 10일후(g)	개시 20일후(g)
대조구	79.0	135.6	218.4
대조구+감태 0.05%+유산균0.05%	77.8	141.3	225.1
대조구+감태 0.025%+유산균0.05%	79.3	139.2	204.9
대조구+감태 0.025%+piperine 1ppm	79.5	142.6	218.2

표. Rat의 사양 증체율

	실험 개시일(g)	개시 20일후(g)	증체량(g)	증체율 (대조대비%)
대조구	79.0	218.4	139.4	100.0
대조구+감태 0.05%+유산균0.05%	77.8	225.1	147.3	111.0
대조구+감태 0.025%+유산균0.05%	79.3	204.9	125.6	80.8
대조구+감태 0.025%+piperine 1ppm	79.5	218.2	138.7	99.0

(2) Rat 사양실험 중 감태와 유산균이 혈액에 미치는 영향

표. Rat 혈액 분석 결과

	WBC (10 <sup>3</sup> /μl)	RBC (10 <sup>6</sup> /μl)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
1	4.62	6.8	13.65	46.5	68.68	20.15	29.38
2	3.84	6.8	13.55	46.3	68.45	20.08	29.33
3	4.96	7.2	13.53	46.2	68.58	20.08	29.25
4	4.89	6.7	13.35	44.95	67.65	20.05	29.65
	AST (U/L)	ALT (U/L)	Cholesterol (mg/dL)	HDL/C (mg/dL)	Ca + (mmol/L)	EPO (mIU/mL)	Platelet (10 <sup>3</sup> /μl)
1	139.3	56.8	374.9	72	1.49	0.56	952.5
2	130.5	59.8	333.2	68	1.52	0.73	877.5
3	130.8	39.5	385.3	71.5	1.42	0.56	954.2
4	136	55.5	373.4	76.3	1.39	0.58	898.7
1	대조구			3	대조구+감태 0.025%+유산균0.05%		
2	대조구+감태 0.05%+유산균0.05%			4	대조구+감태 0.025%+piperine 1ppm		

1~4번의 처리구는 위의 표의 내용과 같다. 실험 종료시에 각 실험동에서 10마리씩 무작위 선별하여 심장채혈을 실시하였다. 채혈한 혈액은 혈청 분리 및 분석을 위해 항응고제가 없는 plain tube에, CBC(complet blood count)을 위해 EDTA tube에 각각 sampling 하였다. Plain tube는 채혈 후 삼십 분간 방치 후 원리분리 하였고, EDTA tube는 채혈 즉시 냉장보관하여 5시간 이내에 분석하였다.

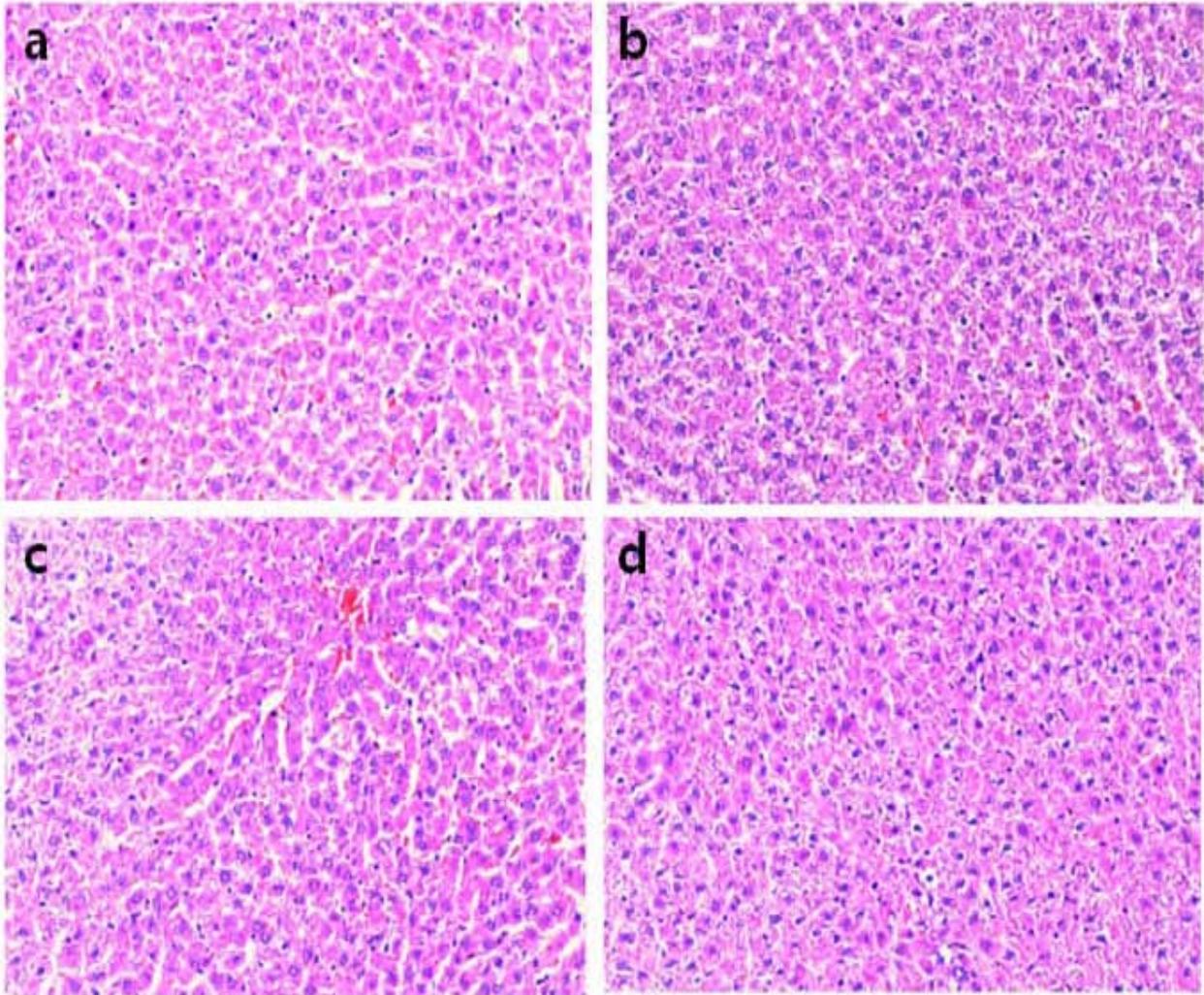
Rat의 백혈구 수치에서는 큰 차이를 보이지 않았으며, 그 이유는 rat은 육계보다 사육 환경이 critical하며 스트레스가 거의 없는 최적의 환경에서 사육되기 때문이라 생각된다.

콜레스테롤 수치에서 대조구에 비해 다소 떨어지는 결과를 확인하였으며, 이는 감태에 함유되어 있는 씨늘과 같은 유효성분으로 인해 감소된 것이라 판단된다. 실제로 씨늘과 같은 성분은 콜레스테롤이 감소시키며, 당노를 낮춰주는 기능이 있다.

EPO 수치 역시 증가하는 경향이 있었으나 적혈구(RBC)는 증가하지 않았으며, 적혈구 이상시에 간접적으로 볼 수 있는 Hct, MCV, MCHC 역시 차이가 없음으로 보아 EPO가 증가하였다고 전부 적혈구 생성이 높아지지 않는다고 생각된다. 간에서 생성되는 EPO는 성인의 상태에서 생성되는 EPO보다 훨씬 적기 때문에 아직까지 적혈구 생성으로의 발현이 미비했을거라 예상된다.

(3) Rat 사양실험 중 유산균 및 감태가 간과 소장의 조직에 미치는 영향

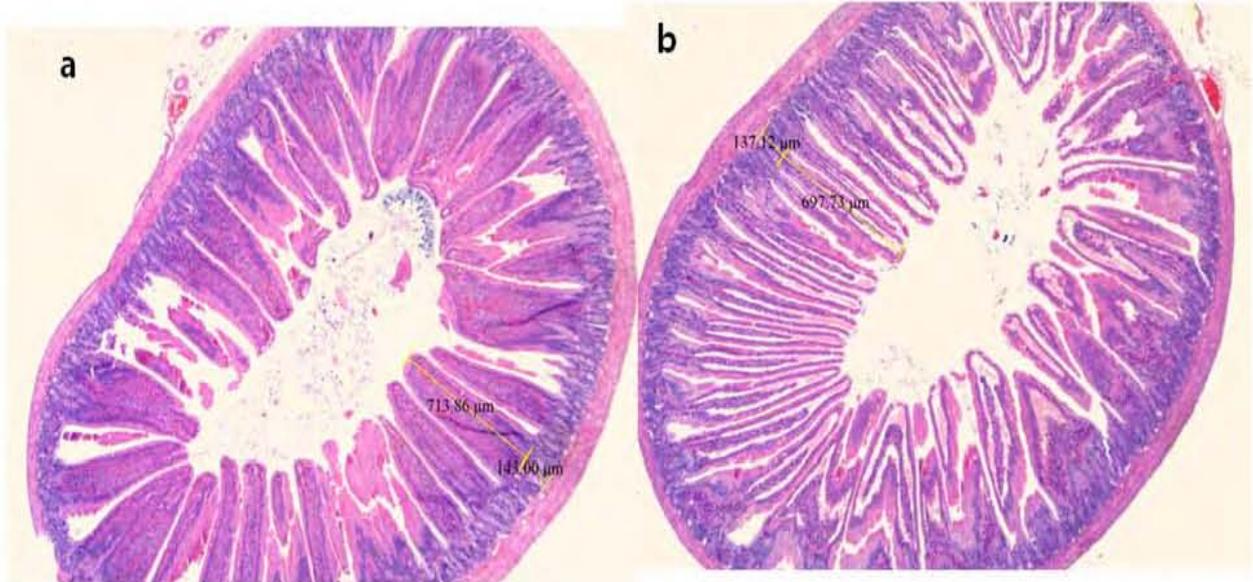
그림1. 간 조직 사진



Effects of *Ecklonia cava* and *Lactobacillus paracasei* LS-2 in rat liver. Morphology is visualized with Hematoxylin & Eosin stain (100x). (a) Control group; (b) 0.05% *Ecklonia cava* and *L. paracasei* 0.05%; (c) 0.025% *Ecklonia cava* and 0.05% *L. paracasei* ; (d) 0.025% *Ecklonia cava* and piperine.

a	대조구	c	대조구+감태 0.025%+유산균0.05%
b	대조구+감태 0.05%+유산균0.05%	d	대조구+감태 0.025%+piperine 1ppm

그림2. 소장 의 용모 길이



Effects of *Ecklonia cava* and *Lactobacillus paracasei* LS-2 in rat small intestine. Morphology is visualized with Hematoxilin & Eosin stain (100x). (a) Control group; (b) 0.05% *Ecklonia cava* and 0.05% *L. paracasei*.

a	대조구	b	대조구+감태 0.05%+유산균0.05%
---	-----	---	-----------------------

위에 있는 그림1과 그림2의 그림과 같이 간의 조직과 소장의 용모 길이를 측정한 결과사진이다. 소장의 회장(ileum)과 간독성을 확인하기 위해 시험동물을 도살시킨 후 각각의 조직을 채취하였다. 간은 가로세로 1cm 정도를 채취하였고 회장 부분은 길이 약 2cm 정도를 채취하여, 생리식염수로 세척한 후 10% formalin 용액에 고정시켰다. 각 조직은 24시간 고정시킨 후 H&E(Hematoxilin & Eosin) 염색을 실시하였다. 고정된 시료를 paraffin으로 고정시킨 후 5um 두께로 절단하여 주사현미경으로 100배의 배율로 검정하였다. 소장의 용모 높이(villus height), 용와 깊이(crypt depth)를 측정하였으며, 용모 높이와 용와 깊이의 비율(VH/CD)은 용모 높이와 용와 깊이로 나누어 산출하였다.

각 그룹의 V/C ratio를 측정하여 산출한 결과 별다른 특이점은 확인하지 못했으며, 감태코팅 유산균 및 생강 코팅유산균이 소장의 소화 흡수에 영향을 주지는 않는 것으로 판단된다.

각 그룹의 간조직을 검정한 결과는 지방간이나 조직의 괴사, 염증 등 임상적인 증상은 확인되지 않았으며, 감태 및 생강 코팅 유산균이 독성으로 작용하지 않는 것으로 판단된다.

## 다. 유산균의 양계(육계)에 대한 영향

### (1) 원료 선별 실험(육계)

#### (가) 목적

본 실험은 복합 생약제의 단일원료와 유산균의 코팅을 통하여 실험을 진행하여 추가적으로 각 원료의 성능을 확인하며, 성능이 좋은 원료선별을 위하여 실험을 수행하였다.

#### (나) 실험동물

육계 (300수)를 입고 후 1일간의 적응기간을 거쳐 2일령에 체중 측정을 거쳐 실험구 배치한 후 전기 기간 (22일), 후기 기간 (8일)을 거쳐 총 30일령의 사양성적을 실험하였다.

#### (다) 실험사료

시판중인 육계 전기 배합사료(홍성사료)를 대조구로 하여 대조구 + 코팅유산균 0.1% , 대조구 + 감태 0.1% + 코팅유산균0.1%, 대조구 + 산사 0.1% + 코팅유산균0.1%, 대조구 + 생강 0.1% + 코팅유산균0.1%를 첨가하였다.

#### (라) 사양관리

물과 사료는 자유 섭취토록 하였으며, 3일 단위로 사료량을 기록하였고, 점등시간은 1일 23 시간이 되도록 하였다.

#### (마) 조사항목 및 분석 방법

처리구 간의 사양 성적을 산출하기 위하여 각 처리구간의 증체량과 사료 섭취량을 실험개시일, 전기기간종료(22일령), 후기기간종료(30일령)에 체중을 기록하여 사료효율을 평가하였다.

#### (바) 실험 결과

생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 Performance에 미치는 영향

	전기기간			후기기간			전체기간		
	Gain	섭취	FCR	Gain	섭취	FCR	Gain	섭취	FCR
대조구	657	983	1.50	584	912	1.57	1241	1895	1.53
대조구 + 코팅유산균0.1%	686	973	1.42	604	903	1.50	1290	1876	1.46
대조구 + 감태0.1%+코팅유산균0.1%	683	959	1.41	617	901	1.46	1300	1860	1.44
대조구 + 산사0.1%+코팅유산균0.1%	678	950	1.40	609	889	1.46	1287	1839	1.43
대조구 + 생강0.1%+코팅유산균0.1%	676	969	1.44	626	908	1.45	1302	1877	1.44

시판사료인 육계 사료(홍성사료)를 급여한 처리구를 대조구로 하여, 전기 및 후기기간 동안의 사양성적을 조사하고 분석한 결과는 전반적으로 유의적인 차이가 있었다. 대조구에 비하여 전기기간 및 후기기간의 전기기간에서 증체량이 증가하였는데, 산사를 첨가한 처리구에서는 코팅유산균만을 첨가한 처리구에 비하여 성적이 좋지 않은 것을 확인 할 수 있었다. 이로써, 원료선별에 있어 생강과 감태를 선별하여 추가적인 실험을 진행하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

## (2) 실험실 규모의 사양 실험

### (가) 목적

본 실험은 복합 생약제와 유산균의 코팅을 통하여 항균성을 높인 제품이 육계의 생산성에 미치는 영향을 평가하고자 하여 실험을 수행하였다.

### (나) 실험동물

육계 (1200수)를 입고 후 1일간의 적응기간을 거쳐 2일령에 체중 측정을 거쳐 실험구 배치한 후 전기 기간 (21일), 후기 기간 (12일)을 거쳐 총 33일령의 사양성적을 실험하였다.

### (다) 실험사료

시판중인 육계 전기 배합사료(홍성사료)를 대조구로 하여 대조구+감태 0.1%, 대조구+감태 0.1%+유산균0.1%, 대조구+Coated유산균0.1%, 대조구+ Coated (감태0.1%,유산균0.1%)0.2%, 대조구+Coated(생강0.1%,유산균0.1%)0.2%를 첨가하였다.

### (라) 실험처리구:

1 처리구	대조구
2 처리구	대조구 + 유산균제 0.1%
3 처리구	대조구 + 감태 0.1%+유산균 0.1%
4 처리구	대조구 + coated 유산균 0.1%
5 처리구	대조구 + coated(유산균 0.1%, 감태 0.1%) 0.2%
6 처리구	대조구 + coated(유산균 0.1%, 생강 0.1%) 0.2%

### (마) 사양관리

물과 사료는 자유 섭취토록 하였으며, 3일 단위로 사료량을 기록하였고, 점등시간은 1일 23 시간이 되도록 하였다.

### (바) 조사항목 및 분석 방법

처리구 간의 사양 성적을 산출하기 위하여 각 처리구간의 증체량과 사료 섭취량을 실험개시일, 초기기간종료(5일령)시, 전기기간종료(21일령)시, 후기기간종료(33일령) 시점에 체중을 기록하여 사료효율을 평가하였다. 실험 종료일에 각 처리구 당 유사 체중을 갖는 병아리를 도살하여 채혈과 해부를 통하여 혈액 분석과 장기 무게를 비교하였으며, 맹장 적출물을 채취하여 장내 미생물 균총을 조사하였다. 또한 같은 날 처리구당 4마리씩 도살하여 육질평가를 실시하였다.

표. 육계 전기 (1일령~33령) 실험사료 조성표

Item	Control	Control + 감태 0.1%	Control + 감태 0.1% + 유산균 0.1%	대조구+ 코팅유산균 0.1%	대조구 + 코팅(감태0.1 %,유산균0.1% )0.2%	대조구 + 코팅(생강0.1 %,유산균0.1% )0.2%
<b>Ingredients</b>	<b>Contents (%)</b>					
Corn	52.40	52.30	51.20	52.30	52.20	52.20
Wheat Powder	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Fish meal (55%)	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Poultry by products	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Soybean meal(46%)	23.60	23.60	23.60	23.60	23.60	23.60
Limestone	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33	1.33
Salt	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Glucose	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Dicalciumphosphate	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Tallow	4.90	4.90	4.90	4.90	4.90	4.90
Vitamin <sup>1)</sup> , Mineral Premix <sup>1)</sup>	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
Lysin-HCL(50%)	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
DLMethionine(81%)	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
Threonine	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
Cholin-Hcl	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Maduramycine	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Yeast culture	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
etc	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
유산균제	0	0.1	0.1	0	0	0
감태	0	0	0.1	0	0	0
생강	0	0	0	0	0	0
Coating 유산균	0	0	0	0.1	0.1	0.1
Coating 감태	0	0	0	0	0.1	0
Coating 생강	0	0	0	0	0	0.1
<b>Calculated Value</b>						
Protein	20.19	20.19	20.19	20.19	20.19	20.19
Crude Fat	8.59	8.59	8.59	8.59	8.59	8.59
Calcium	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92	0.92
Phosporus	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
Retain-Phosporus	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Lys	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35	1.35
Met	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77
Met+Cys	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91	0.91
AMEn	3,150	3,150	3,150	3,150	3,150	3,150

<sup>1)</sup>Vitamin contains followings in 1kg : vit A, 10,000,000IU ; vit D<sub>3</sub>, 5,000,000IU; vitE, 20,000IU; vitK<sub>3</sub>, 3,000mg; vitB<sub>1</sub>, 2,000mg; vitB<sub>2</sub>, 6,000mg; vitB<sub>6</sub>, 3,000mg; vitB<sub>12</sub>, 16mg; niacin, 50,000mg; Ca-pantothenate, 13,000mg; Folicacid, 13,000mg; Cu, 5,000mg; I, 1,250mg; Mn, 110,000mg; Zn, 100,000mg; Se, 300mg ; Fe, 40,000mg ; Co, 5,000mg

(사) 실험 결과

① 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 Performance에 미치는 영향

표. 초이기간 동안 Encapsulated 유산균 복합제제가 육계생산성에 미치는 영향

처리구	증체량(g/b)	사료섭취량(g/b)	FCR
대조구	122.9 ± 5.53	141.2 ± 6.93	1.15 ± 0.04
대조구 + 유산균제 0.1%	107.7 ± 5.97	139.9 ± 7.27	1.30 ± 0.04
대조구 + 감태 0.1% + 유산균 0.1%	102.3 ± 6.11	132.5 ± 11.01	1.29 ± 0.09
대조구 + coated 유산균 0.1%	107.2 ± 6.59	138.3 ± 8.80	1.29 ± 0.15
대조구 + coated (유산균 0.1%, 감태 0.1%)0.2%	113.1 ± 2.52	140.2 ± 3.31	1.24 ± 0.10
대조구 + coated (유산균 0.1%, 생강 0.1%)0.2%	111.9 ± 6.39	144.1 ± 5.57	1.29 ± 0.08

표. 전기기간 동안 Encapsulated 유산균 복합제제가 육계생산성에 미치는 영향

처리구	증체량(g/b)	사료섭취량(g/b)	FCR
대조구	722 ± 12.4	868 ± 21.8	1.20 ± 0.02
대조구 + 유산균제 0.1%	729 ± 21.8	1063 ± 24.6	1.46 ± 0.07
대조구+감태 0.1%+유산균 0.1%	741 ± 18.8	997 ± 21.7	1.35 ± 0.07
대조구 + coated 유산균 0.1%	741 ± 12.4	1054 ± 31.1	1.43 ± 0.08
대조구 + coated (유산균 0.1%, 감태 0.1%)0.2%	737 ± 13.5	873 ± 17.8	1.18 ± 0.1
대조구 + coated (유산균 0.1%, 생강 0.1%)0.2%	748 ± 13.8	955 ± 22.2	1.28 ± 0.05

표. 후기기간 동안 Encapsulated 유산균 복합제제가 육계생산성에 미치는 영향

처리구	증체량(g/b)	사료섭취량(g/b)	FCR
대조구	994 ± 25.4	1630 ± 48.7	1.64 ± 0.12
대조구 + 유산균제 0.1%	1000 ± 11.8	1673 ± 53.2	1.67 ± 0.13
대조구 + 감태 0.1% + 유산균 0.1%	1009 ± 14.0	1767 ± 58.9	1.75 ± 0.05
대조구 + coated 유산균 0.1%	1015 ± 10.7	1727 ± 42.7	1.70 ± 0.09
대조구 + coated (유산균 0.1%, 감태 0.1%)0.2%	1025 ± 17.6	1723 ± 37.5	1.68 ± 0.12
대조구 + coated (유산균 0.1%, 생강 0.1%)0.2%	1032 ± 18.5	1768 ± 41.2	1.71 ± 0.12

표. Encapsulated 유산균 복합제제가 육계생산성에 미치는 영향(전체기간)

처리구	증체량(g/b)	사료섭취량(g/b)	FCR
대조구	1839 ± 13.3	2639 ± 56.6	1.44 ± 0.07
대조구 + 유산균제 0.1%	1837 ± 23.0	2876 ± 51.6	1.57 ± 0.07
대조구 + 감태 0.1% + 유산균 0.1%	1853 ± 19.3	2897 ± 42.5	1.56 ± 0.04
대조구 + coated 유산균 0.1%	1863 ± 15.3	2920 ± 60.5	1.57 ± 0.04
대조구 + coated (유산균 0.1%, 감태 0.1%)0.2%	1887 ± 18.9	2837 ± 48.8	1.50 ± 0.06
대조구 + coated (유산균 0.1%, 생강 0.1%)0.2%	1894 ± 15.3	2967 ± 51.6	1.56 ± 0.05

시판사료인 육계 사료(홍성사료)를 급여한 처리구를 대조구로 하여, 초기기간, 전기기간, 후기기간 동안의 사양성적을 조사하고 분석한 결과는 전반적으로 유의적인 차이가 있었다. 대조구에 비하여 대조구에 유산균0.1%를 첨가한 처리구를 제외한 나머지 처리구에서 증체가 좋았으나 사료 섭취량도 함께 높은 경향이어서 사료 효율은 대조구와 비슷하거나 높은 경향을 보인다.

사육 기간별로 결과를 검토해 보면, 초기기간(-7day)에서는 대조구가 다른 처리구들 보다 증체, 사료섭취 및 사료 효율의 전체적인 면에서 더 좋은 경향을 나타내다가 전기에 들어서면서 대조구를 제외한 다른 처리구들의 성장과 사료섭취량이 좋아지는 것을 볼 수 있다. 결과적으로 증체면에서 볼 때 대조구에 비하여 생강 및 감태를 유산균과 코팅한 유산균제제 처리구(5,6처리구)가 대조구에 비하여 2.5~3.0%의 증체 효과를 나타내는 것을 확인 할 수 있다. 사료 효율 측면에서는 대조구에 비하여 다소 높은 경향이 있지만 사료 섭취량이 높은 것을 통하여 기호성에서도 대조구보다 높은 것을 유추해 낼 수 있었다. 하지만 전체적인 결과를 보았을 때 대조구 + 코팅(생강0.1%,유산균0.1%)0.2% 첨가한 처리구와 대조구 + 코팅(감태0.1%,유산균 0.1%)0.2% 첨가한 처리구의 증체율이 3%정도 개선 된 것은 좋은 결과로 해석할 수 있을 것으로 사료된다.

② 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 장기 무게에 미치는 영향

표. 체중에 비례한 장기무게Encapsulated 육계의 장기 무게에 미치는 영향

Treatments	Heart	Liver	Spleen	Pancreas	Bursa	Abdominal Fat
	%BW					
대조구	0.58±0.08	3.56±0.43	0.17±0.02	0.23 ±0.01	0.17 ±0.03	1.75±0.16
대조구+ 유산균제 0.1%	0.66±0.19	3.24±0.48	0.19±0.04	0.25±0.01	0.14±0.03	1.52±0.32
대조구 + 감태 0.1% + 유산균 0.1%	0.77±0.19	3.95±0.47	0.15±0.03	0.27±0.02	0.14±0.03	1.55±0.46
대조구 + coated 유산균 0.1%	0.70±0.14	3.18±0.42	0.15±0.04	0.27±0.03	0.16±0.05	1.52 ±0.23
대조구+coated (유산균 0.1%, 감태 0.1%)0.2%	0.65±0.10	3.81±0.73	0.15±0.04	0.29±0.02	0.15±0.02	1.55±0.08
대조구+ coated (유산균 0.1%, 생강 0.1%)0.2%	0.70±0.28	3.72±0.22	0.16±0.04	0.29±0.07	0.19±0.10	1.49±0.21

각 장기의 무게를 측정한 결과, 전반적으로 대조구와 유의적인 차이를 나타내지는 않지만, 췌장(Pancreas)의 경우 대조구에 비하여 다른 처리구들의 췌장(Pancreas)무게가 다소 유의성 있게 커지는 경향이 보이며, 복부지방(Abdominal Fat)의 경우 대조구에 비하여 전반적으로 감소하는 경향을 나타내는 것을 통하여, 대조구보다 전체 Performance(증체)가 좋은 것에 비하여 복부 지방이 감소하는 것은 현재 실험에 사용되는 전 제품들이 복부지방 감소에 효과가 있는 것으로 사료된다.

③ 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 장내 환경에 미치는 영향

㉔ 복합생약제 및 유산균의 코팅제제가 육계 장내 pH에 미치는 영향

표. 유산균 코팅제제 급여가 육계의 장내 pH에 미치는 영향(birth 2 day)

	초기 pH (birth 1 day)	
	소장 blank	맹장 blank
대조구	6.46 ± 0.18	6.38 ± 0.18
대조구 + 감태 0.1%		
대조구 + 감태0.1% + 유산균0.1%		
대조구 + coated 유산균 0.1%		
대조구+coated(감태0.1%,유산균0.1%) 0.2%		
대조구+coated(생강0.1%,유산균0.1%) 0.2%		

위의 표는 육계 병아리를 각 처리구 대로 선별 한 후 처리구 당 2마리씩 임의선별 한 후 소장과 맹장에서 pH를 측정한 결과이며 각 처리구의 평균적으로 소장과 맹장의 생시 pH의 평균값은 소장(6.46), 맹장(6.38) 값을 나타낸다.

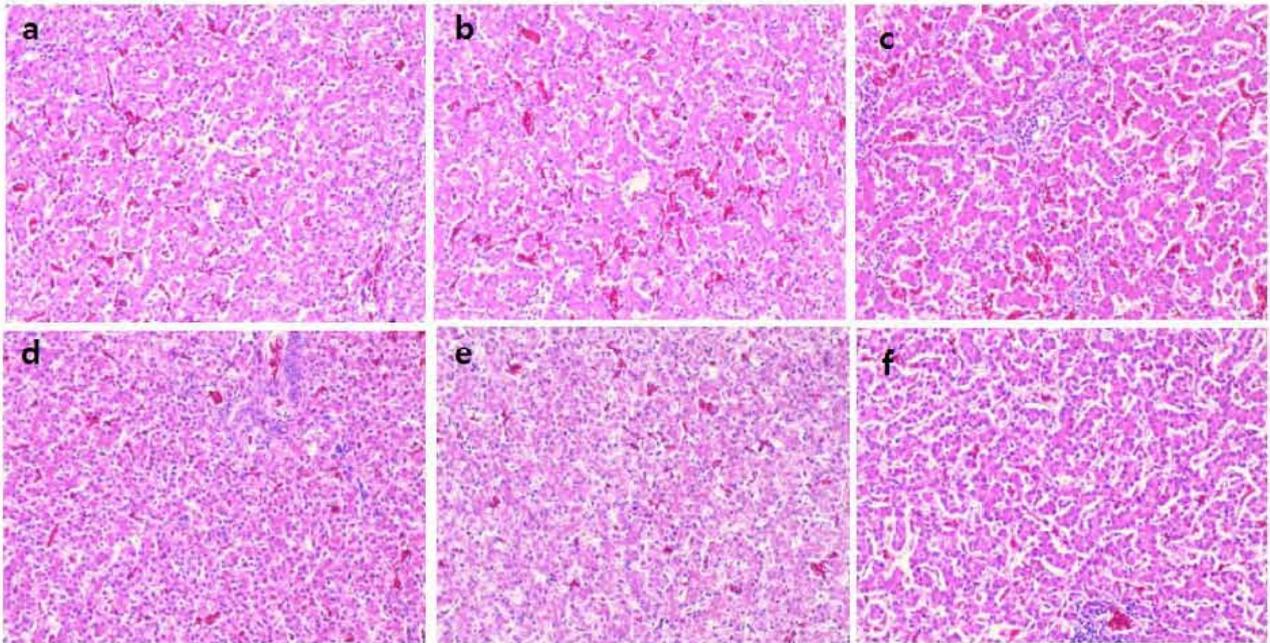
표. 복합생약제 및 유산균 코팅제제 급여가 육계의 장내 pH에 미치는 영향

	초이기간		전기기간		후기기간	
	소장	맹장	소장	맹장	소장	맹장
대조구	6.36	6.30	6.48	6.58	6.99	6.67
대조구 + 감태 0.1%	6.02	5.73	6.10	6.36	6.59	6.53
대조구 + 감태0.1% + 유산균0.1%	6.01	5.75	6.34	6.38	6.47	6.35
대조구 + coated 유산균 0.1%	6.13	5.86	5.99	6.49	6.58	6.38
대조구+coated(감태0.1%,유산균0.1%) 0.2%	5.98	5.80	6.29	6.27	6.65	6.34
대조구+coated(생강0.1%,유산균0.1%) 0.2%	5.79	5.66	6.11	6.25	6.34	6.38

위의 표는 육계 생시 초이기간 7일령, 전기기간 21일령, 후기기간 33일령에 각각 2마리씩 임의 선별하여 소장과 맹장의 pH를 측정한 결과이다. 초이기간에서 후기기간까지의 전체 기간에서 각 기간마다 대조구에 비하여 소장과 맹장의 pH가 전반적으로 내려 간 것을 확인할 수 있는데, 이는 아마도 유산균에 활성에 의한 장내 환경이 변화된 것으로 생각된다.

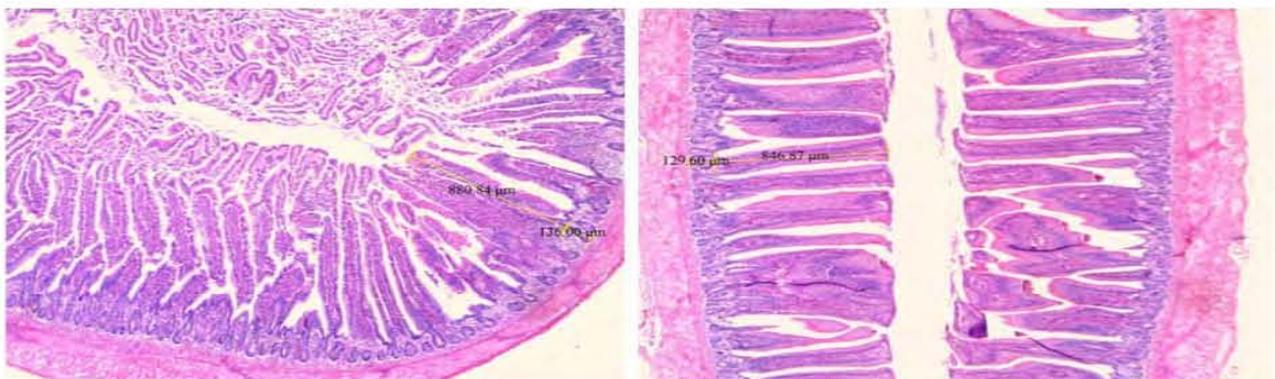
④ 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 간, 소장 조직에 미치는 영향

그림1. 간 조직 사진



a	대조구	d	대조구 + coated 유산균 0.1%
b	대조구+ 감태 0.1%	e	대조구+coated(감태0.1%,유산균0.1%) 0.2%
c	대조구+감태0.1% + 유산균0.1%	f	대조구+coated(생강0.1%,유산균0.1%) 0.2%

그림2. 소장의 용모길이



위에 있는 그림1 은 간의 조직사진이고 그림2는 소장의 용모 길이를 측정한 결과사진이다. 소장의 용모 길이는 대조에 비하여 차이가 없기 때문에 그림은 두장만 올렸다.

소장과 회장(ileum)의 샘플 채취방법 및 조직염색 방법은 Rat의 실험방법과 동일하다.

각 그룹의 V/C ratio를 측정하여 산출한 결과 별다른 특이점은 확인하지 못했으며, 감태코팅 유산균 및 생강 코팅유산균이 소장의 소화 흡수에 영향을 주지는 않는 것으로 판단된다.

각 그룹의 간조직을 검경한 결과는 지방간이나 조직의 괴사, 염증 등 임상적인 증상은 확인되지 않았으며, 감태 및 생강 코팅 유산균이 독성으로 작용하지 않는다는 것으로 판단된다.

⑤ 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육질 평가에 미치는 영향

㉞ 분석 개요

본 분석은 감태 및 유산균 급여에 따른 계육의 육질 평가를 비교·분석하기 위하여 실시하였다.

㉟ 분석 내용

6개 처리구에 대한 다리 및 가슴육의 육질 평가 분석

㊱ 재료 및 방법

공시재료

도체는 6가지 처리구(1-6번)와 각각 처리구에 있어 4마리의 시료(총 24 마리)를 각각 가슴육과 다리살을 발골한 이후 육질 평가 분석에 사용하였다.

㊲ pH 측정

pH는 시료 5 g을 취하여 증류수 20 mL과 혼합한 뒤, Ultra Turrax(Janken and Kunkel, Model No. T-25, Germany)를 이용하여 8,000 rpm에서 1분간 균질한 후 pH meter(Mettler Toledo 340, Switzerland)를 사용하여 측정하였다.

㊳ 육색 측정

시료의 표면을 Colorimeter(Chromameter, CR210, Minolta, Japan)를 사용하여 명도(lightness)를 나타내는 CIE L\*-값, 적색도(redness)를 나타내는 CIE a\*-값과 황색도(yellowness)를 나타내는 CIE b\*-값을 측정하였다. 이때의 표준색은 CIE L\*-값은 97.83, CIE a\*-값이 -0.43 및 CIE b\*-값이 +1.98인 백색 표준판을 사용하였다.

㊴ 보수력 측정

가슴과 다리육의 보수력은 Grau-Hamm의 여과지 압착법을 이용하여 측정하였다(Grau and Hamm, 1953).

$$\text{보수력}(\%) = \frac{\text{육조직이 묻어 있는 면적}(M)}{\text{수분이 젖어 있는 총 면적}(T)} \times 100$$

㊵ 가열감량 측정

가슴과 다리는 근육부위를 사용하여 polyethylene bag에 넣어 75°C water bath(Dae Han Co, Model 10-101, Korea)에서 30분간 가열하였다. 가열된 시료는 상온에서 60분간 방냉시킨 후 가열감량을 측정하였다. 가열감량은 가열전 무게에 대한 체중손실을 백분율로 환산하여 계산하였다.

$$\text{가열감량}(\%) = \frac{\text{가열전 시료 체중}(g) - \text{가열후 시료 체중}(g)}{\text{가열전 시료 체중}(g)} \times 100$$

㊶ 전단력(shear force) 측정

가열된 가슴과 다리근육은 근섬유와 평행하게 동일한 모양으로 시료를 취하여 분석에 사용하였다. 전단력의 측정은 blade set(Warner-Bratzler blade)가 장착된 Texture

analyzer(TA-XT2i, Stable Micro Systems, England)로 수행하였다.

그림. 계육 가슴살과 다리살에서 샘플의 채취 모식도 (모든 처리구에서 위와 같이 동일한 근육 부위를 채취하여 시료로 사용함)

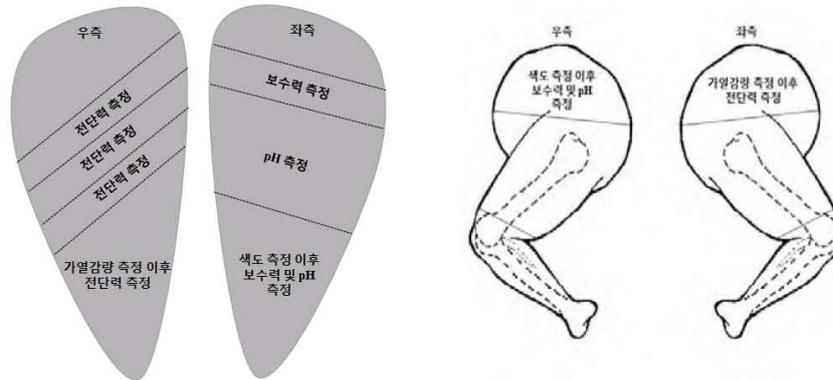


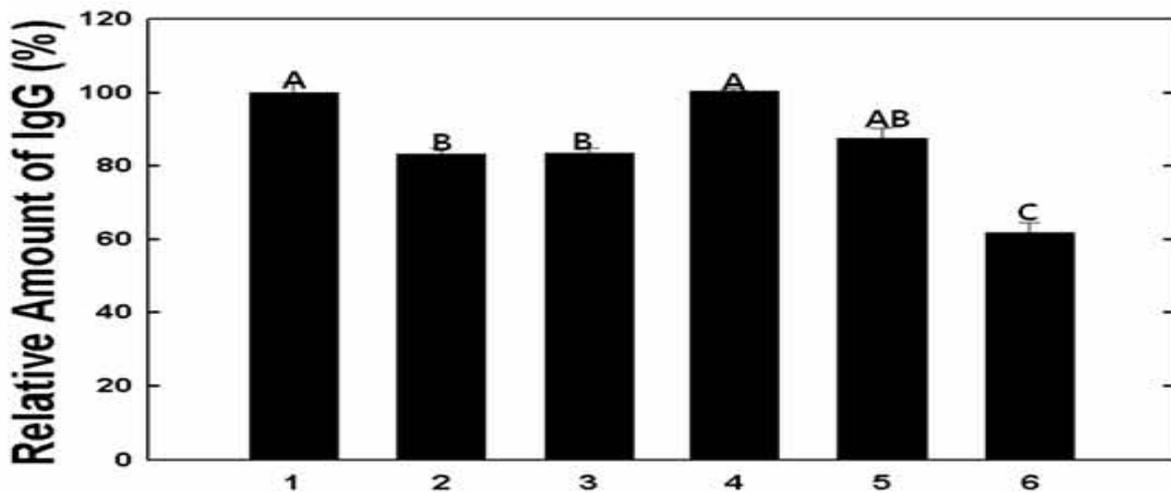
표. 육질평가 분석 결과

		대조구	대조구+ 감태0.1%	대조구+ 유산균0.1% +감태0.1%	대조구+ 코팅유산균 0.1%	대조구+코팅 (감태0.1%+ 유산균0.1%) 0.2%	대조구+코팅 (생강0.1%+ 유산균0.1%) 0.2%
가열 감량 (%)	가슴	15.08	15.04	15.86	14.94	13.29	13.21
	다리	23.60	24.25	25.45	25.23	26.26	25.53
pH	가슴	5.92	5.91	5.91	5.98	5.84	5.89
	다리	6.14	6.13	6.10	6.14	6.00	5.99
육색	가슴						
	L	54.08	54.46	53.70	54.48	54.68	54.39
	a	11.01	10.77	11.56	10.97	11.17	10.35
	b	9.68	9.85	9.85	9.50	9.10	9.03
	다리						
	L	55.63	55.26	55.57	54.62	56.37	56.17
	a	15.39	14.42	14.53	14.55	14.25	14.23
b	8.34	8.41	8.35	7.40	8.29	8.27	
전단력 (kg/cm <sup>2</sup> )	가슴	13.49	12.79	12.92	14.57	13.12	13.59
	다리	6.62	6.97	6.92	6.80	6.52	6.48
보수력 (%)	가슴	41.74	40.13	40.41	41.42	40.64	41.46
	다리	39.42	40.67	38.67	39.72	37.70	37.19

위의 표에서 볼 수 있듯이 육질평가를 한 경우 가슴살과 다리살의 두 곳의 경향이 비슷하지 않는데, 이것은 육질의 가슴과 다리의 육질 조직적 성상이 다르기 때문으로 생각된다. 가열감량의 경우 대조구에 비하여 다리살은 전체적으로 다 높은 것으로 보아 수율이 다소 낮게 나왔으나 가슴살의 경우 코팅 처리를 한 처리구에서 가열감량이 조금은 개선 된 것을 알 수 있다. 보수력은 가열감량과 같은 경향을 보였다. pH의 경우 가슴살에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 다리살의 경우 대조에 비하여 pH가 낮게 측정 되었으며 전단력은 가슴살의 경우 코팅하지 않은 곳에서 낮게 측정된 것으로 보아 대조에 비하여 좀 더 부드럽게 나타났으며 가슴살의 경우에는 그와 반대로 코팅한 쪽에서 더 육질이 부드러운 경향을 보였다. 육색은 고기의 품질을 평가하는데 있어서 매우 중요하게 평가되는 요소인데, 전반적으로 대조구에 비하여 코팅한 처리구에서 redness, yellowness 가 낮게 나타났다.

⑥ 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 면역력 변화에 미치는 영향

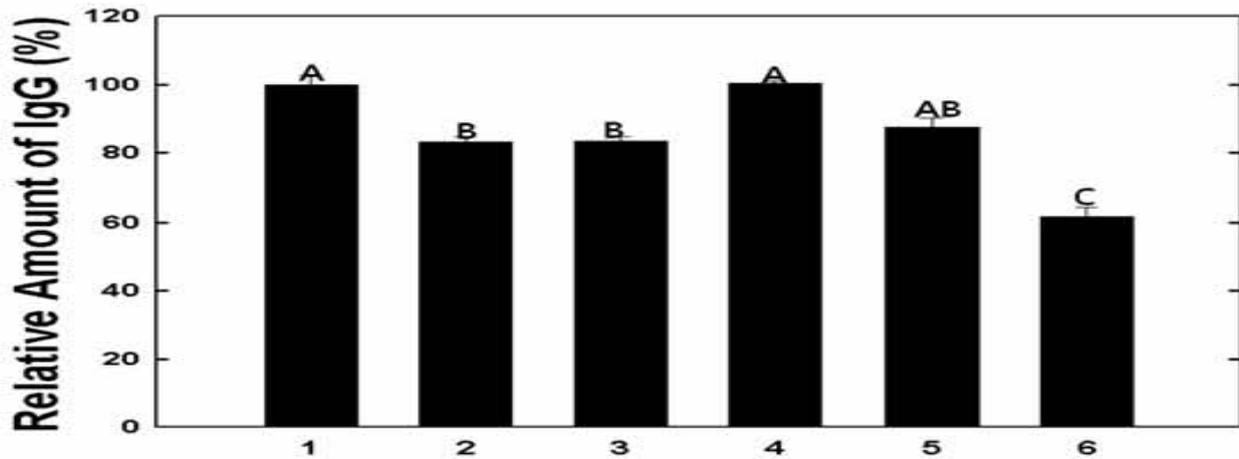
그림. IgA에 대한 영향



1 처리구	대조구	4 처리구	대조구+coated 유산균 0.1%
2 처리구	대조구+감태 0.1%	5 처리구	대조구+coated (감태0.1%,유산균0.1%) 0.2%
3 처리구	대조구+감태0.1%+유산균0.1%	6 처리구	대조구+coated (생강0.1%,유산균0.1%) 0.2%

일반 적인 사양 현장의 어느 정도 스트레스를 받는 사육 환경에서의 투여 결과를 보면 모두 유의차가 있는 것으로 나타났지만, 4,5,6 투여 group에서 IgA가 좀 더 크게 감소하는 경향성을 나타내었다. 이는 Coating 유산균을 단독 투여할 경우, coating 유산균제와 감태 혹은 생장을 같이 투여하였을 경우에 먹인 기간 동안 면역력이 축적되어, 외부 자극에 대응하기 위하여 IgA를 많이 생성할 필요가 없었기 때문에 IgA값이 낮게 나타난 것으로 판단된다.

그림 . IgG에 대한 영향



1 처리구	대조구	4 처리구	대조구+coated 유산균 0.1%
2 처리구	대조구+감태 0.1%	5 처리구	대조구+coated (감태0.1%,유산균0.1%) 0.2%
3 처리구	대조구+감태0.1%+유산균0.1%	6 처리구	대조구+coated (생강0.1%,유산균0.1%) 0.2%

일반 적인 사양 현장의 어느 정도 스트레스를 받는 사육 환경에서의 투여 결과를 보면 대체적으로 유의차가 있는 것으로 나타났다. 특히 2,3,6 group에서는 크게 감소하는 결과를 나타내었다.

이는 코팅유산균을 단독으로 투여하였을 때 보다는 유산균에 감태 혹은 생강 등을 혼합하여 투여하였을 경우에 외부 자극에 대항하는 저항력이 커져서, 스트레스와 같은 외부로부터 자극이 들어올때, 이에 대항 하기 위해서 IgG를 많이 생성할 필요가 없었기 때문에 결과적으로 IgG값이 적게 나타난 것으로 판단된다.

특히 4, 5 group에서와 같이 coating 유산균을 단독으로 투여 할 때 혹은 coating 유산균과 감태를 같이 혼합하여 투여하였을때는 외부 자극에 대항 효과가 별로 없는 것으로 나타났지만, 6 group과 같이 coating 유산균과 생강을 혼합하여 투여했을 때는 시너지효과에 의해 IgG가 낮게 나타나 스트레스에 저항하는 효과가 큰 것으로 나타났다.

한편 위의 일반 적인 사양 현장의 어느 정도 스트레스를 받는 사육 환경에서 coating 유산균, 감태, 그리고 생강 투여에 따른 면역력의 변화를 측정한 IgG와 IgA의 결과를 종합해보면, IgA보다는 IgG값의 변화를 갖고 얼마나 외부 자극에 대항하여 견디는지를 판단하는 것이 좋을 것으로 판단된다. 그 이유는 아래와 그림에서와 같이 IgG와 IgA가 모두 1차면역반응을 담당하지만, 가금류에서는 IgA는 15%정도밖에 안되지만, IgG는 약 75%정도로 비중이 높아서 외부환경으로부터의 자극에 반응과 항체형성능력에 IgG가 보다 크게 기여하기 때문이다.(Fellenberg, R. von. 1987, Higgings, D. A. 1975)

따라서 IgG와 IgA의 결과로 종합적인 판단을 해보면, Coating 유산균을 단독으로 투여하거나, coating 유산균에 감태 혹은 생강을 혼합하여 투여한 군에서 외부 자극에 대항하는 효과가 크게 나타나는 것으로 판단되었다.

⑦ 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 혈액에 미치는 영향

표. 혈액분석 결과

	WBC	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC
	( $10^3/\mu\text{l}$ )	( $10^6/\mu\text{l}$ )	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)
1	360.88	2.27	8.10	32.14	129.44	31.65	24.56
2	365.31	2.59	8.16	33.28	129.04	31.58	24.64
3	361.40	2.04	7.80	32.41	129.34	31.10	25.60
4	345.50	2.18	7.94	33.63	129.91	32.48	24.10
5	325.90	2.51	8.21	33.98	132.43	32.45	24.75
6	311.40	2.65	8.11	31.28	130.38	31.20	23.94
	T3	T4	AST	ALT	LDH	EPO	Platelet
	(ng/mL)	(ug/dL)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mIU/mL)	( $10^3/\mu\text{l}$ )
1	1.58	0.35	1.24	56.9	1941.85	3.53	3.0
2	1.78	0.49	1.50	62.1	1112.00	3.55	3.4
3	1.54	0.40	1.88	54.8	2443.13	3.50	3.6
4	1.36	0.37	2.05	60.8	1891.18	3.67	3.1
5	1.55	0.45	2.13	58.9	2257.00	3.95	3.6
6	1.45	0.36	1.50	60.9	1017.88	4.25	3.5

실험 종료시에 각 실험동에서 (??) 10마리씩 무작위 선별하여 심장채혈을 실시하였다. 채혈한 혈액은 혈청 분리 및 분석을 위해 항응고제가 없는 plain tube에, CBC(complet blood count)을 위해 EDTA tube에 각각 sampling 하였다. Plain tube는 채혈 후 삼십분간 방치 후 원리분리 하였고, EDTA tube는 채혈 즉시 냉장보관하여 5시간 이내에 분석하였다. 육계에서 고온 스트레스 및 일반 환경적 스트레스로 인해 WBC(white blood cell, 백혈구)가 상승한다는 보고와 일치하는 경향을 나타내었다. 이는 감태코팅 유산균과 생강 코팅 유산균에서 대조구에 비해 WBC 수치가 떨어지는 결과를 판단했을 때, 환경적인 스트레스를 방어하는 측면을 엿볼 수 있으며, 육계 각 개체의 면역 측면에서 도움을 줄 수 있다고 생각된다. EPO는 적혈구 생성을 촉진시키는 호르몬으로 신장과 간에서 생성, EPO가 높아지면 적혈구수가 늘어나면서 산소공급이 원활해지며 활동성 및 근지구력이 향상된다. EPO 분석 결과에서 다소 상승하는 수치를 보였으나 적혈구(RBC)는 증가하지 않았으며, 적혈구 이상시에 간접적으로 볼 수 있는 Hct, MCV, MCHC 역시 차이가 없음으로 보아 EPO가 증가하였다고 전부 적혈구 생성이 높아지지는 않았다고 생각된다. 간에서 생성되는 EPO는 성인의 상태에서 생성되는 EPO보다 훨씬 적기 때문에 아직까지 적혈구 생성으로의 발현이 미비했을거라 예상된다.

### (3) 대규모의 필드 사양 실험

(가) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 Performance에 미치는 영향

#### ① 목적

본 실험은 1차적인 실험실규모의 실험에서 나온 결과로 복합 생약제와 유산균의 코팅을 통하여 제품이 실험실 규모실험에서의 추론된 결과를 실제 대규모에서 그 효능을 평가하고자 하여 실험을 수행하였다.

#### ② 실험동물

육계 (35,400수)를 입추 후 생시체중을 측정하고 실험구 배치한 후 전기 기간 (23일), 후기 기간 (12일)을 거쳐 총 35일령의 사양성적을 실험하였다.

#### ③ 실험사료

시판중인 육계 전기 배합사료(서부사료)를 대조구로 하여 대조구+Coated(감태0.1%,유산균0.1%)0.2%, 대조구+Coated(생강0.1%,유산균0.1%) 0.2%를 첨가하여 실험하였다.

#### ④ 실험처리구

1 처리구	대조구
2 처리구	대조구+Coated(감태0.1%,유산균0.1%)0.2%
3 처리구	대조구+Coated(생강0.1%,유산균0.1%)0.2%

#### ⑤ 사양관리

물과 사료는 자유 섭취토록 하였으며, 육계 3동을 사용하여 각각의 동으로 사료섭취를 조절하여 기록하였고, 점등시간은 1일 23 시간이 되도록 하였다.

사양시험 1일령에 초이사료를 주었으며 사양시험 개시 2일령부터는 초이사료와 전기사료를 병행하여 섭취하게 하였다. 시험개시일 24일령부터 후기사료를 급여하였다.

#### ⑥ 조사항목 및 분석 방법

사양실험 성적을 전기기간(23일령), 후기(35일령)에 나누어 조사하였으며 실험 종료 5일전에 각 처리구 당 유사 체중을 갖는 병아리를 도살하여 채혈과 해부를 통하여 혈액분석 및 장기 무게를 비교하였으며, 맹장 적출물을 채취하여 장내 미생물 균총을 조사하였다. 또한 같은 날 처리구당 10마리씩 도살하여 육질평가를 실시하였다.

표. 복합생약제와 유산균 코팅 제제가 육계의 사양성적에 미치는 영향(전기)

처리구		증체(g)	사료섭취량(g)	사료효율 (feed/gain)
1	대조구	668	1000	1.50
2	대조구+Coated(감태0.1%,유산균0.1%)0.2%	698	1014	1.45
3	대조구+Coated(생강0.1%,유산균0.1%)0.2%	718	1019	1.42

표. 복합생약제와 유산균 코팅 제제가 육계의 사양성적에 미치는 영향(후기)

처리구		증체(g)	사료섭취량(g)	사료효율 (feed/gain)
1	대조구	960	1529	1.59
2	대조구+Coated(감태0.1%,유산균0.1%)0.2%	980	1546	1.58
3	대조구+Coated(생강0.1%,유산균0.1%)0.2%	1020	1615	1.58

표. 복합생약제와 유산균 코팅 제제가 육계의 사양성적에 미치는 영향(전체)

처리구		증체(g)	사료섭취량(g)	사료효율 (feed/gain)
1	대조구	1628	2539	1.56
2	대조구+Coated(감태0.1%,유산균0.1%)0.2%	1678	2567	1.53
3	대조구+Coated(생강0.1%,유산균0.1%)0.2%	1738	2641	1.52

사양시험 종료일(35일령)에 육계의 종료 체중과 사료섭취량을 각각 계산하여 사료효율을 평가하였다.

감태와 유산균을 코팅한 제제를 급여한 처리구에서는 대조구에 비하여 전기기간에는 4.5%, 후기기간에는 2.0%, 전체기간으로 3.0%의 증체 효과가 있으며 생강과 유산균을 코팅한 제제를 급여한 처리구는 대조구에 비하여 전기기간에는 7.5%, 후기기간에는 6.2%, 전체기간으로 6.8%의 증체율이 개선된 것으로 나타났다.

표. 복합생약제와 유산균 코팅 제제가 육계의 폐사율에 미치는 영향(전기기간)

처리구		입추수 (마리)	종료일 (마리)	도폐사 (마리)	도폐율 (%)
1	대조구	12000	11382	618	5.2
2	대조구+Coated(감태0.1%,유산균0.1%)0.2%	11700	11258	442	3.8
3	대조구+Coated(생강0.1%,유산균0.1%)0.2%	11700	11208	492	4.2

도폐율은 사양실험 종료일까지 죽은 총 도폐수를 계산한 후 입추수에 비례한 도폐율을 계산하였다. 위의 표에서 볼 수 있듯이 대조구에 비하여 코팅 처리한 두 처리구에서 폐사율이 감소한 것을 확인 할 수 있다.

(나) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 장기 무게에 미치는 영향

표. 복합생약제 및 유산균 encapsulation제제가 육계의 장기무게에 미치는 영향

Treatments		Heart	Liver	Spleen	Pancreas	Bursa	Abdominal Fat
		%BW					
1 처리구	MEAN	0.71	2.90	0.14	0.39	0.08	1.46
	STEV	0.013	0.051	0.003	0.006	0.003	0.022
Treatments		Heart	Liver	Spleen	Pancreas	Bursa	Abdominal Fat
		%BW					
2 처리구	MEAN	0.58	2.46	0.12	0.36	0.06	1.26
	STEV	0.007	0.026	0.002	0.006	0.001	0.026
Treatments		Heart	Liver	Spleen	Pancreas	Bursa	Abdominal Fat
		%BW					
3 처리구	MEAN	0.56	2.32	0.10	0.27	0.06	1.25
	STEV	0.004	0.038	0.003	0.004	0.002	0.020

\*\*1 처리구 : 대조구, 2 처리구 : 대조구+Coated(감태0.1%,유산균0.1%)0.2%, 3처리구 :대조구+Coated(생강0.1%,유산균0.1%)0.2% 이다.

각 장기의 무게를 측정한 결과, 처리구에서 심장, 간, 비장, 췌장, F낭, 복부지방의 체중대비 비율이 대조구에 비하여 감소하였다. 특히 복부지방(Abdominal Fat)의 경우 대조구에 비하여 전반적으로 감소하였는데, 이것은 실험에 사용되는 제제들이 복부지방 감소에 효과가 있는 것으로 사료된다.

(다) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 장내 환경에 미치는 영향

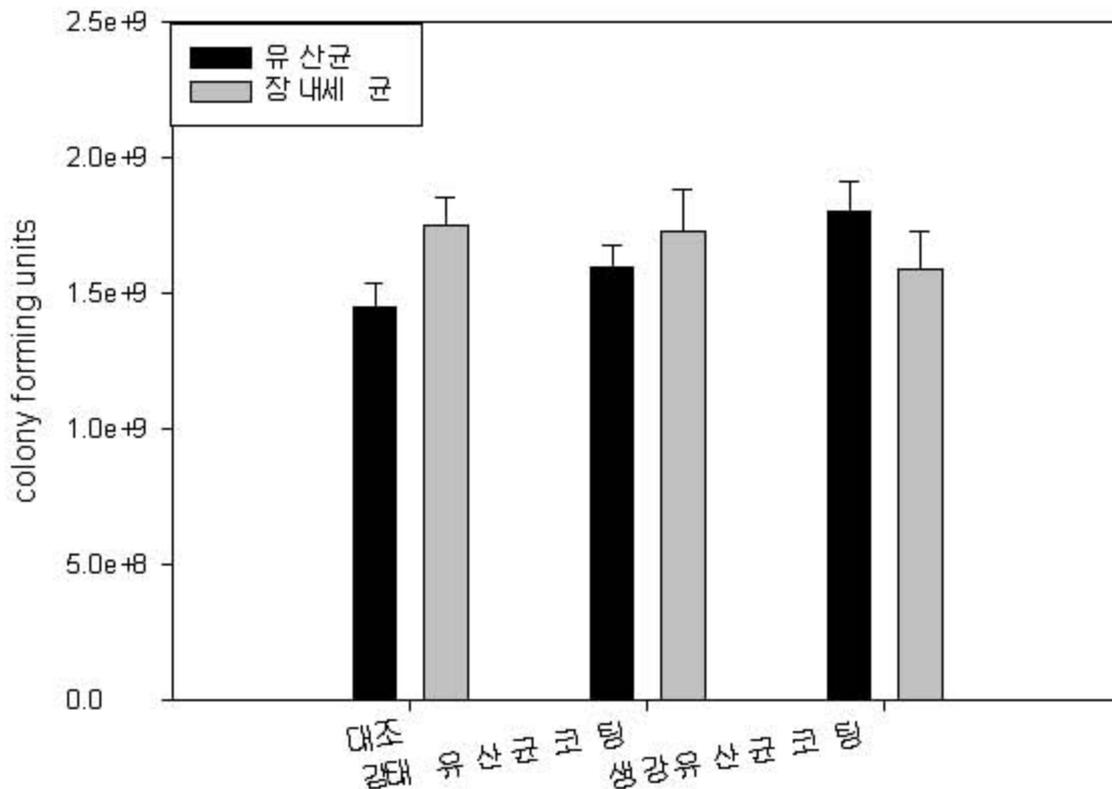
표. 장내 유산균총수

	유산균	S.D.	장내세균	S.D.
1	1.E+09	9.E+07	2.E+09	1.E+08
2	2.E+09	8.E+07	2.E+09	2.E+08
3	2.E+09	1.E+08	2.E+09	1.E+08

- |                                   |
|-----------------------------------|
| 1. 대조구                            |
| 2. 대조구+Coated(감태0.1%,유산균0.1%)0.2% |
| 3. 대조구+Coated(생강0.1%,유산균0.1%)0.2% |

그림. 육계 맹장 미생물 카운팅 그래프

육계 맹장 미생물 counting



맹장 미생물을 조사하기 위해 실험 종료시에 도살한 육계의 맹장에서 내용물을 채취하여 1.5ml micro tube에 넣어 파라필름으로 밀봉하였다. 맹장 내용물은 채취 후 4°C를 유지하였고 실험실로 옮겨 각각의 배지에 spreading하였다.

맹장 내용물 100mg을 멸균된 생리 식염수 900uL에 섞어 1차로 희석하였고, 10<sup>-8</sup> 까지 계대희석하였다. 각각 희석된 맹장미생물을 유산균 배지인 MRS(de Man, Rogosa and Sharpe)배지와 장내세균 배지인 MacConkey 배지에 각각 100uL씩 도말하였다. 각각 배지의 배양조건은 MRS는 혐기적 조건이며\_Gas Pac system(BBL)을 이용하였고, MacConkey배지는 호기적 조건에서 배양하였다.

배양한 후 세균의 수는 각 plate의 colony forming unit (CFU)로 계산한 후 log10으로 환산하였다. 배양시간은 48시간 동안 배양하였다.

맹장 미생물에서 감태 코팅 유산균 및 생강코팅 유산균을 첨가함에 따라 증가하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 해조류의 풍부한 다당류 등은 장내 균의 에너지원으로 사용되어, 유익균종을 형성하며, 유해균을 억제한다는 보고와 일치하는 경향을 보였으며, 생강코팅 유산균 역시 유산균의 영향으로 유산균이 증가한 것으로 판단된다. 또한, 장내 미생물 총균은 전체적으로 적어지는 경향을 확인하였으나 유의적이진 않았다.

하지만, 전체적인 장내미생물은 줄어들고 유산균은 증가하는 것으로 보아 장내건강에 유의한 효과를 주는 것으로 사료된다.

(라) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육질 평가에 미치는 영향

표. 복합생약제 및 유산균 encapsulation 제제가 육질 평가에 미치는 영향

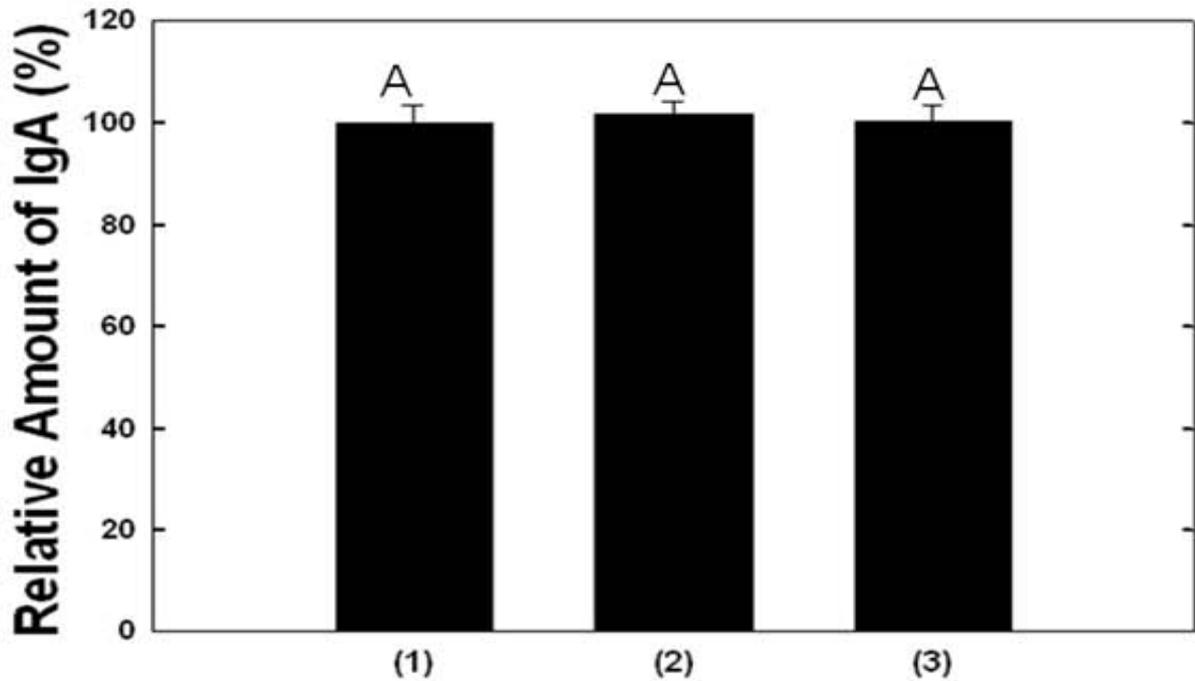
		대조구	대조구 + 코팅(감태0.1%, 유산균0.1%) 0.2%	대조구 +코팅(생강0.1%, 유산균0.1%) 0.2%
가열감량 (%)	가슴살	25.56	25.48	24.12
	다리살	29.15	24.45	25.90
pH	가슴살	5.61	5.65	5.68
	다리살	6.19	6.21	6.33
육색	가슴살			
	L	56.07	59.17	58.48
	a	2.20	2.29	2.75
	b	13.10	14.89	15.27
	다리살			
	L	60.36	57.76	57.60
	a	6.34	6.20	6.62
	b	16.80	12.84	15.68
전단력 (kg/cm <sup>2</sup> )	가슴살	4.00	3.99	3.99
	다리살	3.97	3.98	4.00
보수력 (%)	가슴살	42.39	47.62	37.06
	다리살	64.02	56.89	50.57

위의 표에서 확인 할 수 있듯이 대조구와 처리구의 육질평가 결과는 조직의 pH, 가열감량, 보수력에서 약간의 차이가 있었으나, 전단력은 대조구와의 차이가 없었다.

가열감량의 경우 다리살에서 가열하였을 때 조직에서 손실되는 부분이 대조구보다 감태나 생강을 첨가한 군에서 조금 덜 손실되었다. 이는 제품생산이 될 때 수율의 측면에서 좋은 점을 가지고 있다고 볼 수 있다. 보수력의 경우 대조구에 비하여 보수력이 작아지는 경향이 있는데, 이는 앞의 가열감량에서도 볼 수 있듯이 대조에 비하여 육질이 더금고 있는 수분의 양이 적기 때문에 나타나는 결과라고 판단된다.

(마) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 면역력 변화에 미치는 영향

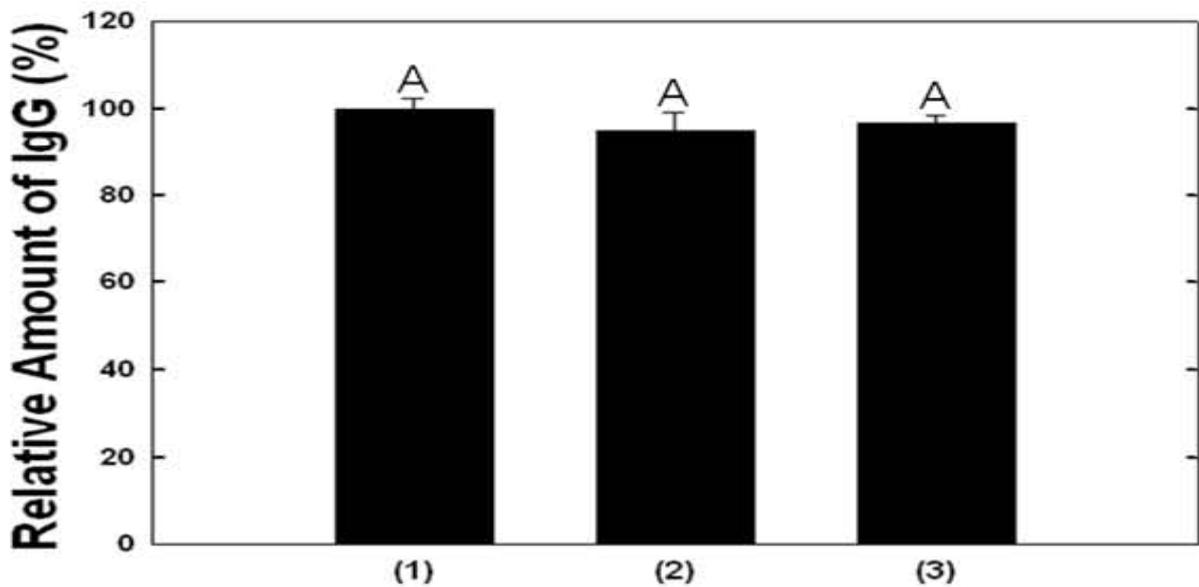
① IgA에 대한 영향



(1)	대조구
(2)	대조구 + Coated(감태 0.1%, 유산균 0.1%) 0.2%
(3)	대조구 + Coated(생강 0.1%, 유산균 0.1%) 0.2%

위의 결과는 밀집 사양이나, 온도 등 어느 정도 환경적인 스트레스를 받는 일반적인 사양시  
 험 현장에서 얻은 결과로서 모두 유의차가 없는 것으로 나타났다. 이는 사료첨가제가 가축들의  
 면역력의 항상성 유지에 도움을 주고 있는 것으로 판단 된다.

② IgG에 대한 영향



(1)	대조구
(2)	대조구 + Coated(감태 0.1%, 유산균 0.1%) 0.2%
(3)	대조구 + Coated(생강 0.1%, 유산균 0.1%) 0.2%

어느 정도 스트레스를 받는 사육 환경인의 일반 적인 사양 현장의 투여 결과를 보면 2번 group에서는 약 5% 정도, 3번 group에서는 2% 정도 감소 하였으나, 통계적인 유의차가 없는 것으로 나타났다.

유산균에 감태나 생강을 혼합하여 투여하였을 경우 사양시에 외부 자극에 대항하는 저항성을 유지하고 있어서, 일반적인 사양에서 오는 스트레스와 같은 외부로부터 자극이 가해졌을때, 이에 대항하기 위해서 특별히 IgG를 많이 생성할 필요가 없었기 때문에 결과적으로 IgG값이 유의차가 없게 나타난 것으로 판단된다.

한편 일반 적인 사양 현장의 스트레스를 받는 사육 환경에서 coating된 유산균과 감태 혹은 coating된 유산균과 생강 투여에 따른 면역력의 변화를 측정 한 IgG와 IgA의 결과를 종합해보면, IgA보다는 IgG값의 변화를 갖고 얼마나 외부 자극에 대항하여 견디는지를 판단하는 것이 좋을 것으로 판단된다. 그 이유는 아래와 그림에서와 같이 IgG와 IgA가 모두 1차면역반응을 담당하지만, 가금류에서는 IgA는 15%정도밖에 안되지만, IgG는 약 75%정도로 비중이 높아서 외부환경으로부터의 자극에 반응과 항체형성능력에 IgG가 보다 크게 기여하기 때문이다.(Fellenberg, R. von. 1987, Higgings, D. A. 1975)

따라서 IgG와 IgA의 결과로 종합적인 판단을 해보면, coating 유산균에 감태를 혼합하여 급여한 처리구에서 외부 자극에 대항하는 효과가 크게 나타나는 것으로 판단되었다.

(바) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 혈액에 미치는 영향

표. 혈액분석 결과

	WBC	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	Platelet
	( $10^3/\mu\text{l}$ )	( $10^6/\mu\text{l}$ )	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	( $10^3/\mu\text{l}$ )
1	295.9	2.1	7.4	32.5	137.5	32.6	23.6	13.7
2	287.9	2.2	7.5	31.4	133.8	31.4	23.9	13.9
3	253.6	2.2	7.6	32.4	132.9	31.3	23.5	14.5
	T4	T3	AST	ALT	Cholesterol	HDL/C	LDH	EPO
	(ug/dL)	(ng/mL)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(U/L)	(mIU/mL)
1	0.46	1.36	234.8	6.4	97.5	62.1	1392.2	5.7
2	0.48	1.37	238.9	6.4	95.8	61.9	1561.6	5.9
3	0.74	1.44	233.8	7.0	96.7	66.8	1522.6	7.8

혈액 분석은 위의 실험실규모에서 실험한 것과 동일한 방법으로 진행하였다. 육계는 각 처리구 당 10마리씩 도살되었고 총 30마리의 육계에 대한 혈액분석을 진행하였다.

혈액 분석 결과 감태코팅 유산균 처리구와 생강 코팅 유산균 처리구는 대조구에 비해 WBC 수치가 떨어지는 결과를 판단했을 때, 환경적인 스트레스를 방어하는 측면을 엿볼 수 있으며, 육계 각 개체의 면역 측면에서 도움을 줄 수 있다고 생각된다. 또한 EPO 분석 결과는 다소 상승하는 수치를 보였으나 적혈구(RBC)는 증가하지 않았으며, 적혈구 이상시에 간접적으로 볼 수 있는 Hct, MCV, MCHC 역시 차이가 없음으로 보아 EPO가 증가하였다고 전부 적혈구 생성이 높아지는 것은 아니라고 생각된다. 간에서 생성되는 EPO는 성인의 상태에서 생성되는 EPO보다 훨씬 적기 때문에 아직까지 적혈구 생성으로의 발현이 미비했을거라 예상된다. 본 시험에 사용된 육계는 28일령이었다. 28일령은 성숙이지만 닭의 총 수명에 비해서는 아직까지는 어린 상태이기 때문일 거라 예상된다. 실제로 EPO는 어릴때 간에서, 성숙일 때는 신장에서 생성되며 신장에서 합성되는 EPO가 80~90%를 차지한다.

### 3. 3차년도

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
배합비 설정 및 실험 사료 제작	NRC 사양 표준에 의하여 사료 배합비 설정 및 실험사료 제작	NRC 사양 표준에 의하여 isonitrogenous, isocaloric 하도록 사료 배합비 설정 및 실험사료 제작
유산균 제형 개발	호화전분 및 monoolein을 기반으로 하는 w/o 제형 개발	호화전분 및 monoolein을 기반으로 하는 w/o 제형 개발
사료 적합성 평가	대규모 가축 사양실험을 통하여 기호성 및 생산향상을 위한 시험	각기 다른 사양실험 환경에서 진행된 Broiler 실험을 통하여 사료첨가제 효능의 재현성을 보기위하여 진행(대규모로 진행됨)
사양 가축의 육제품 생산 평가	실험사료별 생산된 가축의 육질평가	도살한 실험동물의 가슴살과 다리살을 이용하여 가열감량, 전단력, 보수력, 육조직의 색, 육조직의 pH 측정
실험 동물 혈청생화학적 분석	Elisa kit 분석	Elisa kit를 이용하여 혈액(혈장)중의 immunoglobulin 및 각종 cytokine류 정량 분석
지표성분 분석	첨가된 원료 중 지표성분을 분석	주원료의 대표물질을 추출하여 효능을 나타내는 지표물질의 함량을 분석
유통기한 설정	온도 및 습도에 따른 생균수확인	미생물 제형의 보관안정성의 기한을 설정하기 위한 실험진행

#### 가. 유산균 코팅연구

##### (1) 실험방법

##### (가) 유산균 코팅 분말 제조

1차년도 및 2차년도에서 최적 유산균 코팅 조건으로 제조 후, 3차년도에서는 액상상태의 코팅 유산균의 저장 시간을 연장하기 위해 분무건조를 통해 분말상태의 코팅 유산균을 제조하였다. 코팅의 1차 목적인 위액에서 최대 유산균 활성을 높이기 위해 실시해 주었다면, 이러한 코팅 막이 분말 상태로 저장 및 유통과정에서 동일한 유산균의 활성이 안전하게 유지되는지 알아보기 위해 서로 다른 온도 및 상대습도에서 저장하면서 유산균 활성을 측정하였다.

유산균은 MRS 액체 배지 (Difco, Detroit, MI, USA)에서 배양된 *Lactobacillus plantarum* 균주는 원심분리 (4,000 rpm, 4°C, 10 min) 하여 멸균 식염수로 두 번 세척하여 분리하였고, 멸균 식염수 150 mL 로 희석하여 유산균 현탁액을 준비하였다. 전분 50 g 을 증류수 450 mL 로 수화시킨 후 autoclave 를 이용하여 호화시켜 준비하였다. 호화된 전분을 60°C로 냉각시킨 후 유산균 현탁액 50 mL 을 첨가하였고 (처리구 S+L (starch with *lactobacillus*), 1% (w/v) 감태 현탁액 50 mL 또는 1% (w/v) 생강 현탁액 50 mL 을 각각 첨가한 후, 증류수를 이용하여 총 부피를 1000 mL 로 정량하였다. 대조구를 유산균이 처리되지 않은 전분을 사용한 이유는 등온흡습곡선의 경향이 전분에 의존적일 것을 가정하여 설정해 주었다. 각각의 시료별 약어는 S: 전분, S+L: 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, S+E+L: 감태 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, S+G+L: 생강 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum* 으로 표기 하였다. 균질기 (ULTRA-TURRAX® T25, IKA® Labortechnik, Staufen, Germany)로 11,000 rpm 에서 5 분 동안 균질한 후 분무건조하여 분말화 하였다. 이때 분무건조의 최적 조건은 160°C의 온도에

서 0.7 m<sup>3</sup>/min 의 분출 속도(blower), 500 mL/h 의 주입 속도(feeding rate) 및 200 kPa 의 분사 압력(atomizing power)으로 실시하였다.

**(나) 유산균 코팅 분말의 등온흡습곡선 측정**

유산균 코팅 분말의 평형수분함량을 측정하기 위해 각각의 시료 0.3 g을 칭량병에 넣은 다음 포화 염 용액을 이용하여 상대습도를 조절한 용기에 저장하였다. 상대습도는 염화 리튬(LiCl), 염화 마그네슘(MgCl<sub>2</sub>), 탄산 포타슘(K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), 브로민화 소듐(NaBr), 염화 소듐(NaCl), 염화 포타슘(KCl)의 포화 용액을 사용하여 항온기에서 각각 20, 30, 40℃로 유지하였다(표 1). 평형수분함량은 매 2시간 마다 꺼내어 테시케이터에서 30분간 방랭(放冷) 후 무게를 측정하였고, 평형 상태에 도달할 때까지 (±0.5 mg) 반복하는 단계적 측정 방법을 이용하였다.

표 1. 포화 염 용액의 온도에 따른 상대습도

Salts	Relative humidity (%)			Amount	
	20℃	30℃	40℃	Salt (g)	Water (mL)
LiCl	11.31	11.28	11.21	150	85
MgCl <sub>2</sub>	33.07	32.44	31.60	200	25
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	43.18	43.17	43.13	200	90
NaBr	59.14	56.03	52.83	200	80
NaCl	75.47	75.09	74.68	200	50
KCl	85.11	83.62	82.32	200	80

또한 수분함량의 평행이 완료된 후 적정 저장 안정 수분함량인 단분자층 수분함량을 산출하기 위하여 다음과 같은 Brunauer-Emmett-Teller(BET) 식을 이용하였다.

$$\text{BET equation: } \frac{Aw}{m(1-Aw)} = \frac{1}{m_1 C} + \frac{C-1}{m_1 C} \cdot Aw$$

(Aw: 수분활성도, m: 평형수분함량 (g), m<sub>1</sub>: 단분자층 수분함량 (g), C: 상수)

**(다) 분말 유산균 코팅 분말의 소화 모방 실험**

유산균 코팅 분말을 이용한 닭의 소화 모방 실험을 수행하기 위해 pH 2인 위의 환경을 모방하고자 각 시료 0.1 g에 0.01 N 염산(HCl) (Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Korea) 9.9 mL을 첨가하여 완전히 녹인 다음, 10분 동안 교반한 후 MRS 배지 (Difco, USA) 배지에 배양하였다. 이후 소장의 환경을 모방하고자 2 N 수산화 소듐(NaOH) (Duksan Pure Chemical Co., Ltd., Korea)를 이용하여 pH를 7로 보정한 후 시간에 따라 균수를 측정하였다.

(2) 실험 결과

(가) 전분 코팅된 유산균 분말의 등온흡습곡선

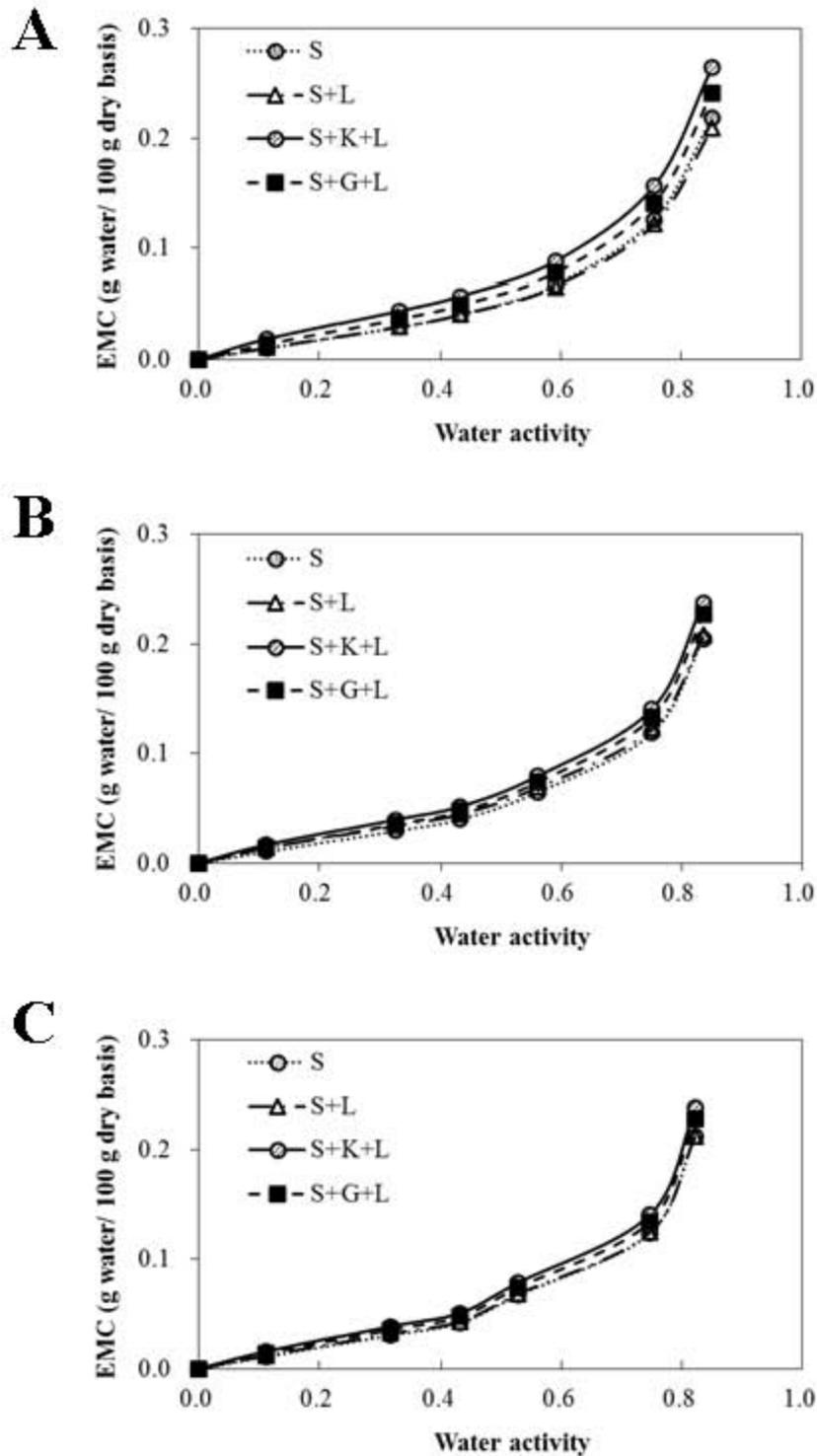


그림 1. 유산균 코팅 분말의 온도에 따른 등온흡습곡선.

A: 20°C, B: 30°C, C: 40°C.

S: 전분, S+L: 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, S+E+L: 감태 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, S+G+L: 생강 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*.

전분으로 코팅한 유산균의 흡습 특성을 알아보기 위하여 20, 30, 40℃의 온도에서 수분활성도에 따른 평형수분함량을 그림 1에 나타내었고, BET 식을 통해 산출된 상수값과 단분자층 수분함량을 표 2에 나타내었다. 일반적으로 대부분의 식품의 등온흡습곡선은 sigmoid형을 나타내는데 본 연구에서도 수분활성도에 따라 평형수분함량이 빠르게 증가하는 형태를 나타내었다. 20, 30, 40℃ 온도에서 감태 추출물을 첨가한 유산균 코팅 분말(S+E+L)의 평형수분함량이 가장 높은 것으로 나타났으며, 그 다음으로 생강 추출물을 첨가한 유산균 코팅 분말(S+G+L)의 평형수분함량이 높았다. 하지만 전분 분말과 전분만 넣은 유산균 코팅 분말의 평형수분함량은 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

표 2. 온도에 따른 유산균 코팅 분말의 상수와 단분자층 수분함량

Temperature(℃)	Treatment	C	m <sub>1</sub>
20	S	2.687	0.035
	S+L	3.122	0.033
	S+K+L	5.275	0.041
	S+G+L	3.884	0.037
30	S	3.223	0.032
	S+L	5.014	0.032
	S+K+L	5.292	0.037
	S+G+L	4.197	0.035
40	S	3.290	0.033
	S+L	3.817	0.033
	S+K+L	4.796	0.037
	S+G+L	4.223	0.035

C: 상수

m<sub>1</sub>: 단분자층 수분함량 (g)

#### (나) 상대습도에 따른 유산균 코팅 분말의 유산균 보호 효과

다양한 상대습도에 따른 유산균 코팅 분말의 유산균 보호 효과를 측정하기 위해 유산균 코팅 분말의 수분함량의 평형이 완료된 후 각각 20, 30, 40℃에서 일주일 동안 저장하여 유산균 수를 측정하였다(그림 2, 3, 4).

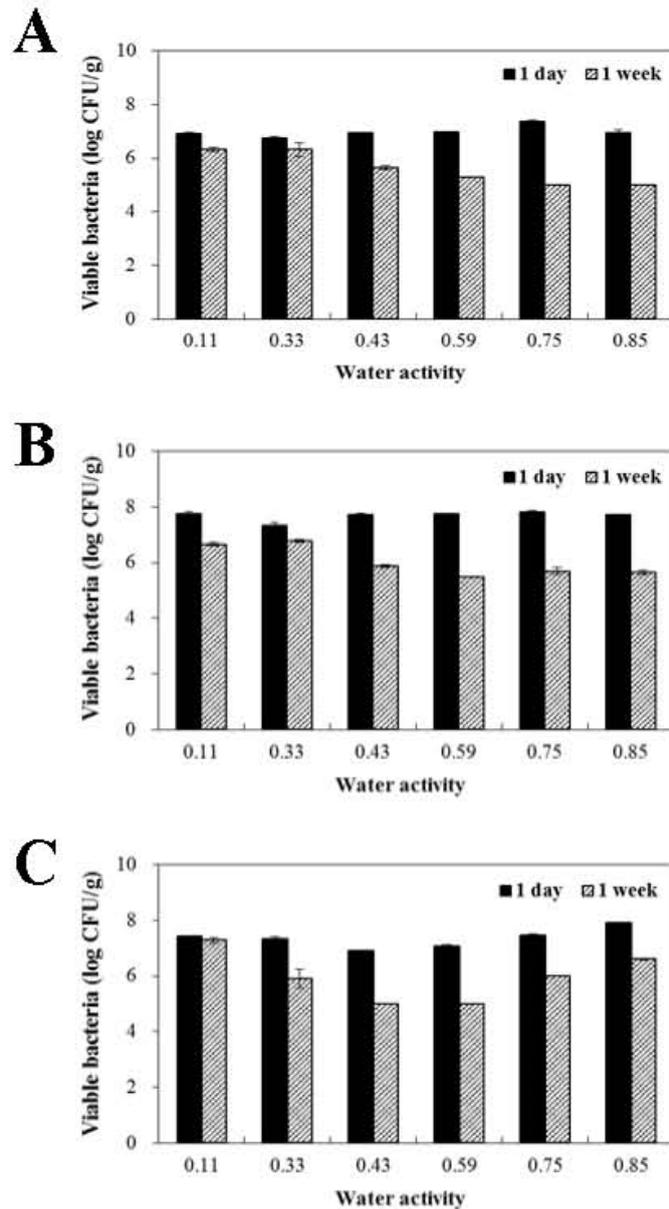


그림 2. 20℃에서 저장한 유산균 코팅 분말의 수분활성도 및 저장기간에 따른 *L. plantarum*의 활성.

A: 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, B: 감태 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, C: 생강 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*.

전분으로 코팅한 유산균 분말과 감태 추출물을 첨가하여 코팅한 유산균 분말의 경우 20℃에서 일주일 동안 보관한 후 수분활성도가 높을수록 유산균의 수가 감소하였으나, 반면 생강 추출물을 첨가하여 코팅한 유산균 분말의 유산균 수는 수분활성도가 0.43와 0.59일 때 가장 많이 감소하였다.

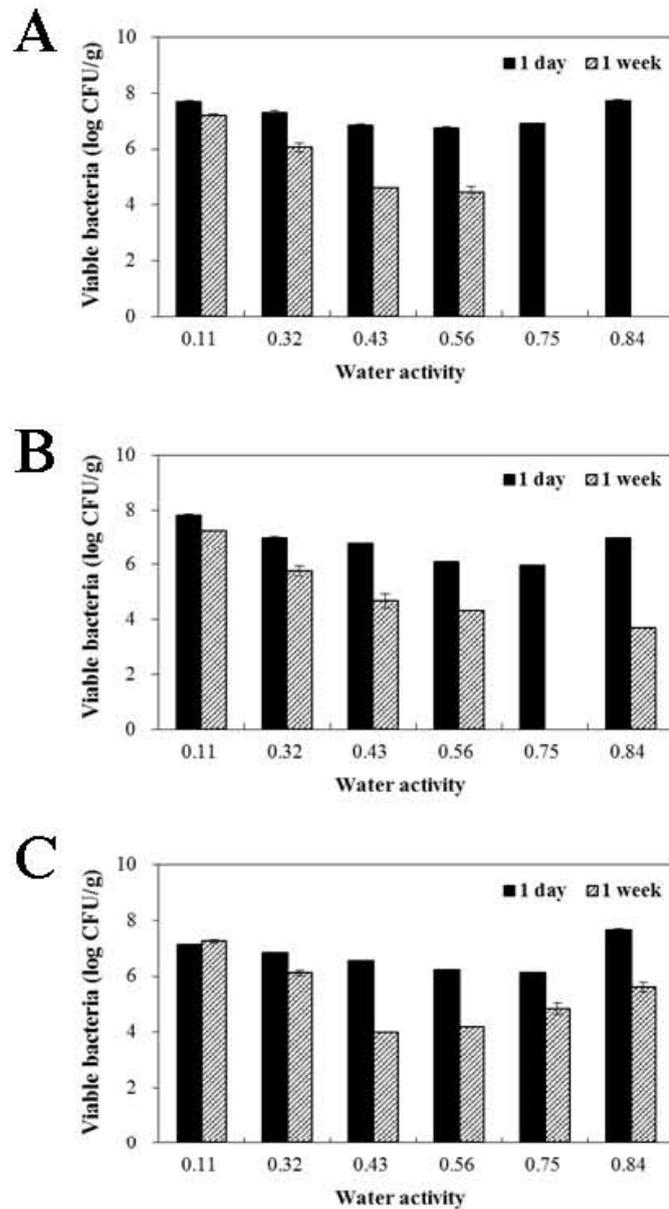


그림 3. 30℃에서 저장한 유산균 코팅 분말의 수분활성도 및 저장기간에 따른 *L. plantarum*의 활성.

A: 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, B: 감태 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, C: 생강 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*.

30℃에서 일주일 동안 저장하였을 때, 전분으로 코팅한 유산균의 수는 높은 수분활성도에서 크게 감소하여 검출되지 않은 반면, 생강 추출물을 첨가하여 코팅한 유산균은 높은 생존율을 나타내었다.

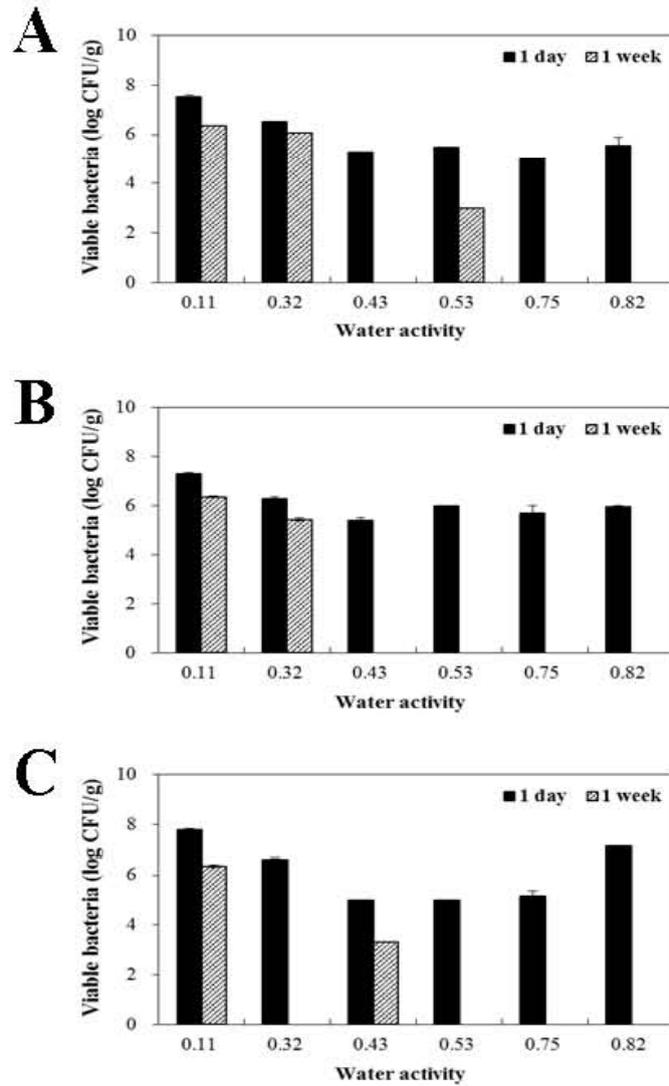


그림 4. 40°C에서 저장한 유산균 코팅 분말의 수분활성도 및 저장기간에 따른 *L. plantarum*의 활성.  
 A: 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, B: 감태 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*,  
 C: 생강 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*.

유산균 코팅 분말을 40°C에서 일주일 동안 저장하였을 때, 수분활성도가 낮은 경우를 제외하고 대체적으로 유산균의 수가 크게 감소하여 검출되지 않았다.

따라서 결과적으로 20°C에서 저장한 분말은 수분활성도에 따른 유산균 수의 차이가 없었고, 일주일 동안 저장 후 다소 감소하였으나 약 6 log CFU/g 을 유지하였으나, 하지만 40°C에서 저장하였을 경우, 수분활성도가 낮은 경우를 제외하고 모든 분말의 유산균이 검출되지 않았다. 30°C에서 일주일 동안 저장하였을 때 전분으로만 코팅한 유산균 분말(S+L)과 감태 추출물을 첨가한 유산균 코팅 분말(S+E+L)의 경우 수분활성도가 높은 환경에서 유산균이 검출되지 않은 반면, 생강 추출물을 첨가한 유산균 코팅 분말(S+G+L)의 유산균은 약 5~6 log CFU/g 을 유지하여 가장 높은 보호 효과를 나타내었다.

(다) 저장 기간에 따른 유산균 코팅 분말의 저장성

일정한 상대습도에서 저장 온도에 따른 유산균 코팅 분말의 유산균 보호 효과를 측정하기 위해 우리나라의 연평균 상대 습도인 약 75%의 환경에서 연평균 기온인 20℃와 혹서기 기온인 35℃에서 유산균 코팅 분말을 4주 동안 저장하여 균수를 측정하였다(그림 5).

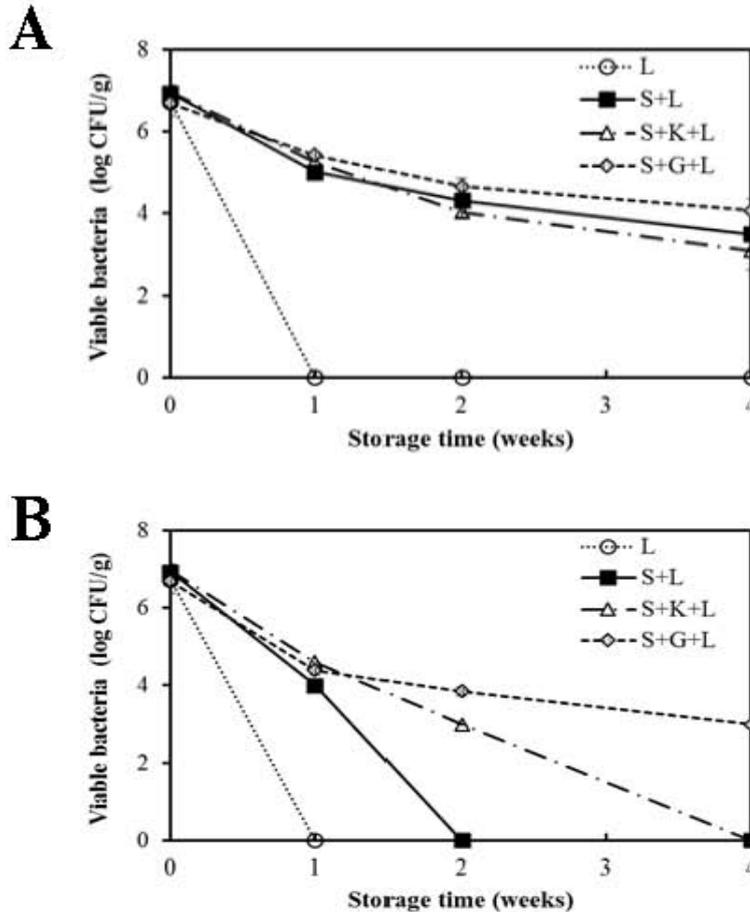


그림 5. (A) 20℃와 (B) 35℃에서 저장한 유산균 코팅 분말의 *L. plantarum*의 활성. L: 코팅하지 않은 *L. plantarum*, S+L: 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, S+E+L: 감태 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, S+G+L: 생강 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*.

저장 온도에 관계없이 저장 1주 후 코팅하지 않은 유산균 분말(L)의 유산균은 사멸되어 검출되지 않았고, 전분으로 코팅한 유산균 분말(S+L)의 유산균은 35℃에서 저장 시 2주 후 검출되지 않았다. 생강을 첨가해 코팅한 유산균 분말(S+G+L)의 유산균 수도 저장 기간에 따라 감소하였으나, 다른 분말에 비해 가장 높은 생존율을 나타내었다. 생강 성분 중 페놀 화합물인 gingerone, schogaol, zingerone 에 의한 활성이 유산균의 보호에 도움을 준 것으로 사료된다<sup>1)</sup>. 또한 저장 기간과 관계없이 온도가 낮은 20℃에서 보관한 분말의 유산균 수가 더 많은 것으로 나타났다.

1) Shoo HJ. The antibacterial action of garlic, onion, ginger and red pepper juice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 94-99 (1999)

### (라) 분말 유산균 코팅 분말의 소화 모방 실험

코팅하지 않은 유산균(L)은 섭취 시 위에서 머무는 10분 동안 위액의 강산 (pH 2)에 의해 사멸되는 결과를 보인 반면, 유산균 코팅 분말(S+L, S+E+L, S+G+L)의 유산균은 약 5~6 log CFU/g로 감소하였다. 소화 과정에 따라 위를 거쳐 pH 7인 소장으로 가게 되는데 pH 7인 소장 환경에서 S+L와 S+G+L의 유산균은 그대로 유지되는 반면, S+E+L의 유산균은 소화 30분 후 약 4 log CFU/g로 감소하였다. 이를 통해 유산균의 캡슐이 pH의 변화에 대해 안정성을 부여하여 균의 보호막 역할이 가능함을 확인할 수 있다. 게다가 생강 추출물을 첨가한 후 전분으로 코팅했을 경우 시간에 따라 *L. plantarum*의 활성이 가장 높은 것을 통해 생강이 유산균의 활성에 도움을 주는 것으로 사료된다.

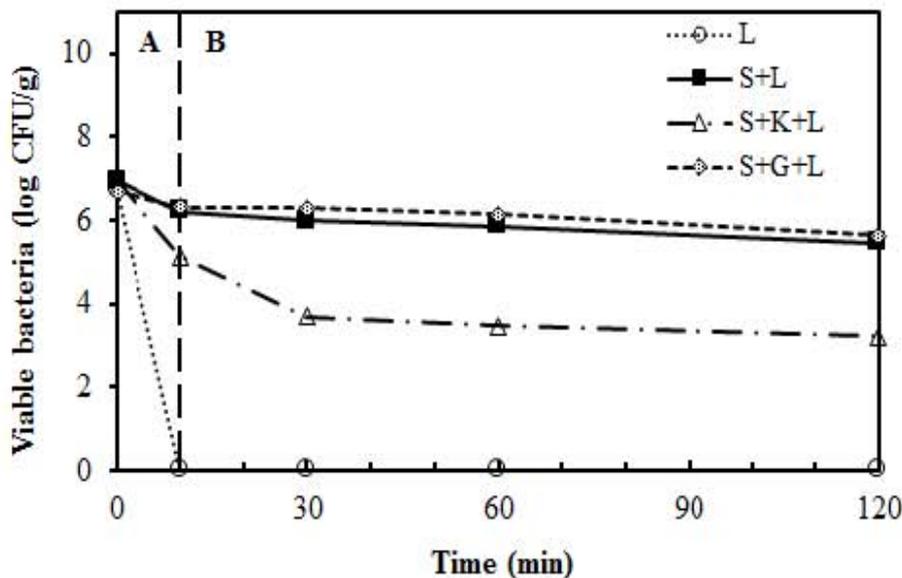


그림 6. pH에 따른 유산균 코팅 분말의 *L. plantarum*의 활성.

A: pH 2, B: pH 7. L: 코팅하지 않은 *L. plantarum*, S+L: 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, S+E+L: 감태 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*, S+G+L: 생강 추출물을 첨가하여 전분으로 코팅한 *L. plantarum*.

### (3) 결론

분무건조법을 이용하여 유산균을 전분으로 캡슐화한 분말을 제조하고, 제조한 유산균 코팅 분말을 이용하여 다양한 수분활성도에 따른 평형수분함량을 측정하여 등온흡습곡선을 확립하고, pH 및 상대습도, 온도에 따른 유산균의 보호 효과를 알아본 결과, 상대습도가 낮고 저장 온도가 낮을수록 유산균의 생존율이 높았으며, 시료들 중 생강을 첨가하여 코팅한 유산균 분말의 유산균 생존율이 가장 높았다. 또한 75%의 상대습도에서 20℃와 35℃에서 각 4주간 저장 실험한 결과, 코팅하지 않은 유산균은 1주 후 사멸한 반면, 코팅한 유산균은 유지되었으며 특히 생강을 첨가하였을 경우 유산균 보호 효과가 가장 높았다. 게다가 닭의 소화 모방 실험을 통해 위액의 낮은 pH에서 전분 코팅의 보호막 효과를 확인하였다. 이를 통해 전분으로 코팅한 유산균 분말은 사료 조성물, 사료 첨가용 조성물로 이용 가능하다고 사료된다.

## 나. 유산균의 양계(육계)에 대한 영향 - 2, 3 차 필드실험

본 실험은 1,2차년도 실험 결과 및 3차년도 유산균 코팅 실험의 결과로 복합 생약제와 유산균의 코팅을 통하여 최종적인 시제품의 효능을 평가하고자 하여 실험을 수행하였다. 실험은 총 2회 진행되었고 사육환경에 대한 재현성을 test 하기 위하여 다른 농장 2곳에서 각자 진행되었다.

2차에 걸친 필드사양실험에서는 전체 사양실험기간 동안의 퍼포먼스로 조사하였으며 실험 종료 4일전에 각 처리구 당 유사 체중을 갖는 병아리를 도살하여 채혈과 해부를 통하여 혈액분석 및 장기 무게를 비교하였으며, 맹장 적출물을 채취하여 장내 미생물 균총을 조사하고 장내 pH를 조사하였다. 또한 같은 날 2차 사양실험 주환농장에서는 대조구 10마리 실험구 15마리, 3차 사양실험 안골농장에서는 대조구와 처리구 각각 10마리 씩을 도살하여 육질평가를 실시하였다.

### (가) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 Performance에 미치는 영향 <주환농장 - 2 차 필드실험>

#### ① 실험 설계

##### - 실험일정

2015.03.12. - 04.10

##### - 실험동물

육계 (40,000수)를 입추 후 생시체중을 측정하고 실험구 배치한 후 전기 기간 (21일), 후기 기간 (8일)을 거쳐 총 29일령의 사양성적을 실험하였다.

##### - 실험처리구

1 처리구(대조구)	대조구
2 처리구(시험구)	대조구+Coated(감태0.1%,생강0.1%, 유산균0.1%)0.3%

##### - 사양관리

물과 사료는 자유 섭취토록 하였으며, 전체 5개 동을 사용하여 각각의 동으로 사료섭취를 조절하여 기록하였고, 점등시간은 1일 23 시간이 되도록 하였다. 1,4,5 동은 대조구(23,630 수), 2,3동은 시험구(16,370 수)로 사용 하였다. 사양시험 1일령에 전기사료를 섭취하게 하였고 시험 개시일 21일령부터 후기사료를 급여하였다.

② 실험결과

표1. 2차 육계 필드실험 각 동별 최종 사육결과

항 목	1동	2동	3동	4동	5동	누계 <sup>◎</sup>	평균
	(대조구)	(시험구)	(시험구)	(대조구)	(대조구)		
입추수 (증3%비포함) : a	8,140	8,160	8,210	7,880	7,610	40,000	8,000
1일-8일 폐사수 : b	230	160	150	390	150	1,080	216
실시험두수 (a-b) : d	7,910	8,000	8,060	7,490	7,460	38,920	7,784
폐사수 : e	456	415	529	937	543	2,880	576
출하수(a-e) : f	8,047	8,138	8,127	7,513	7,495	39,320	7,864
출하율 : g	98.90%	99.70%	99.00%	95.30%	98.50%	491.40%	98.30%
사료 사용량 : i	17,900	17,900	18,700	16,800	15,800	87,100	-
닭 체중 : j	11,790	12,000	12,470	10,850	10,380	57,490	-
평균체중kg(j/f)	1.46	1.47	1.53	1.47	1.38	7.31	1.462
사료 요구율(I/j)	1.518	1.492	1.500	1.549	1.522	7.581	1.516
생산지수	327	336	348	312	306	1,629	325.8
사료 공급 환경	b	b	b	b	c		
급수 공급 환경	b	c	c	b	c		
환기 환경	b	b	b	b	b		
온도 및 습도	b	b	c	b	c		

표2. 2차 육계 필드실험 대조구 vs 시험구 사양성적 비교

	대조구	시험구
사육동	1,45	2,3
입추수(증3%비포함)	23,630	16,370
출하수	23,055	16,265
1일-8일 폐사수:b	770	310
폐사수	1,936	944
출하율(%)	97.57	99.35
평균체중(kg)	1.44	1.50
사료요구량(kg)	50,500	36,600
사료효율	1.53	1.49

사양시험 종료일(29일령)에 체중, 사료섭취량을 기록하여, 그 결과로 사료효율을 평가하였다. 표1과 2에서 감태, 생강과 유산균을 코팅한 제제를 사용한 처리구에서 대조구에 비하여 4.0%의 증체 효과가 있었다.

또한 사육 기간동안 발생한 폐사율은 대조구에서 8.20%, 처리구에서 5.77%로 2.5% 이상 개선되었다.

<안골농장 - 3 차 필드실험>

① 실험 설계

- 실험일정

2015.03.30. - 2015.04.30.

- 실험동물

육계 (27,800수)를 입추 후 생시체중을 측정하고 실험구 배치한 후 전기 기간 (23일), 후기 기간 (9일)을 거쳐 총 32일령의 사양성적을 실험하였다.

- 실험처리구 : 주환 농장과 같은 처리로 실험하였다.

- 사양관리

물과 사료는 자유 섭취토록 하였으며, 2 개 동을 사용하여 각각의 동별로 사료섭취량을 기록하였다. 1동은 대조구(13,900 수), 2동은 시험구(13,900 수)로 사용 하였다. 사양시험 1일령에 전기사료를 섭취하게 하였고 시험개시일 23일령부터 후기사료를 급여하였다.

② 실험결과

표1. 3차 육계 필드실험 각 동별 최종 사육결과

항 목	3동	4동	누계◎	평균
	(대조구)	(시험구)		
입추수 (중3%비포함) : a	13,900	13,900	27,800	13,900
폐사수 : e	850	380	1,230	615
출하수(a-e) : f	13,050	13,520	26,570	13,285
출하율 : g	93.88%	97.27%	191.15%	95.58%
사료 사용량 : i	35,125	37,125	72,250	36,125
닭 체중 : j	21,141	21,767	42,908	21,454
평균체중kg(j/f)	1.62	1.61	3.23	1.61
사료 효율(I/j)	1.66	1.72	3.38	1.69
생산지수	353	349	702	351
사료 공급 환경	b	b		
급수 공급 환경	c	c		
환기 환경	b	c		
온도 및 습도	b	d		

표2. 3차 육계 필드실험 대조구 vs 시험구 사양성적 비교

	대조구	시험구
사육동	1동	2동
입추수	13,900	13,900
출하수	13,050	13,520
폐사수	850	380
폐사율(%)	6.12	2.73
평균체중(kg)	1.62	1.61
사료요구량(kg)	35,125	37,125
사료효율	1.66	1.72

사양시험 종료일(32일령)에 체중, 사료섭취량을 기록하여 사료효율을 평가하였다.

표1과 2에서 나타난 것 같이 대조구와 처리구간의 증체의 유의차는 없었다. 반면, 처리구의 폐사수가 현저히 낮아 대조구의 폐사율은 6.12 %, 처리구의 폐사율은 2.73 %로 3.4 % 이상 개선되었다.

(나) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 장기무게에 미치는 영향

<주환농장 - 2 차 필드실험>

표1. 복합생약제 및 유산균 encapsulation제제가 육계의 장기무게에 미치는 영향

Treatments		body weight	Heart	Liver	Spleen	Pancreas	Bursa	Abdominal Fat
		(g)						
1처리구	MEAN	1102.80	5.83	26.55	1.17	3.17	1.86	12.53
	STEV	136.46	1.48	2.09	0.32	0.42	0.88	3.81
2처리구	MEAN	1147.60	5.57	27.51	1.03	3.10	1.89	12.16
	STEV	157.96	0.82	3.51	0.25	0.49	0.49	3.45

\*\*1 처리구 : 대조구, 2 처리구 : 대조구+Coated(감태0.1%,생강0.1%,유산균0.1%)0.3%표2. 복합생약제 및 유산균 encapsulation제제가 육계의 장기무게에 미치는 영향(% B.W)

Treatments		body weight	Heart	Liver	Spleen	Pancreas	Bursa	Abdominal Fat
		%Body Weight						
1처리구	MEAN	100	0.53	2.41	0.11	0.29	0.17	1.14
2처리구	MEAN	100	0.49	2.40	0.09	0.27	0.16	1.06

\*\*1 처리구 : 대조구, 2 처리구 : 대조구+Coated(감태0.1%,생강0.1%,유산균0.1%)0.3

<안골농장 - 3 차 필드실험>

표1. 복합생약제 및 유산균 encapsulation제제가 육계의 장기무게에 미치는 영향

Treatments		body weight	Heart	Liver	Spleen	Pancreas	Bursa	Abdominal Fat
		(g)						
1처리구	MEAN	1292.5	6.80	34.28	1.71	3.76	0.95	12.45
	STEV	101.57	1.11	6.63	0.36	0.57	0.23	3.85
2처리구	MEAN	1382.4	7.42	39.89	1.91	3.62	0.99	12.80
	STEV	118.89	1.65	7.62	0.57	0.55	0.44	5.79

\*\*1 처리구 : 대조구, 2 처리구 : 대조구+Coated(감태0.1%,생강0.1%,유산균0.1%)0.3%

표2. 복합생약제 및 유산균 encapsulation제제가 육계의 장기무게에 미치는 영향(% B.W)

Treatments		body weight	Heart	Liver	Spleen	Pancreas	Bursa	Abdominal Fat
		%Body Weight						
1처리구	MEAN	100	0.53	2.65	0.13	0.29	0.07	0.96
2처리구	MEAN	100	0.54	2.89	0.14	0.26	0.07	0.92

\*\*1 처리구 : 대조구, 2 처리구 : 대조구+Coated(감태0.1%,생강0.1%,유산균0.1%)0.3%

필드 2,3차 실험에서 각 장기의 무게는 대조구와 처리구에서 유의차가 없으나, 복부지방은 처리구에서 감소되었다. 이는 유산균 코팅제제가 복부지방 감소에 효과가 있는 것으로 사료된다.

(다) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 장내 환경에 미치는 영향

① 장내 pH (맹장, 소장)

<주환농장 - 2 차 필드실험>

	대조구		처리구	
	맹장	소장	맹장	소장
Mean	7.10	5.97	6.58	6.30
Stedv	0.94	0.47	0.47	0.22

<안골농장 - 3 차 필드실험>

	대조구		처리구	
	맹장	소장	맹장	소장
Mean	6.54	5.70	6.03	5.89
Stedv	0.37	0.74	0.47	0.37

두 시험농장의 육계의 장내 pH의 결과는 대조구와 처리구에서 비슷하였는데, 맹장에서는 대조구가 처리구 보다 pH 가 높고, 소장에서는 대조구가 처리구 보다 pH 가 낮게 나타났다.

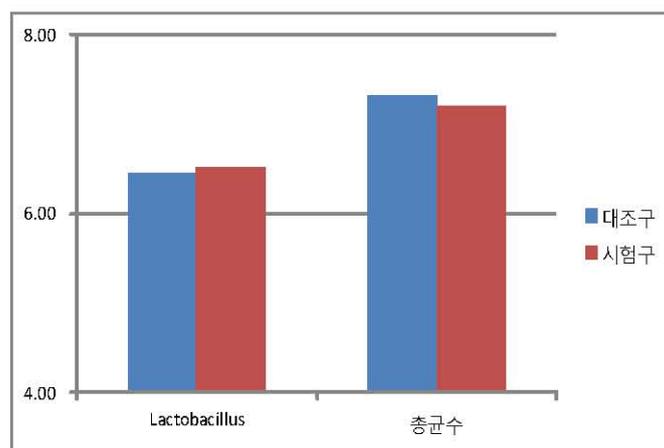
① 장내 균총수(유산균, 장내총균)

<주환농장 - 2 차 펠드실험>

표1. 장내 유산균총수(주환농장)

대조구			시험구		
	Lactobacillus	총균수		Lactobacillus	총균수
C1	5.76	6.70	T1	6.27	7.34
C2	6.14	6.30	T2	6.95	7.35
C3	6.23	7.82	T3	6.39	7.11
C4	5.68	6.67	T4	6.53	7.29
C5	7.83	7.13	T5	6.32	7.18
C6	6.23	8.10	T6	6.58	7.19
C7	5.04	7.95	T7	6.34	7.07
C8	6.71	7.29	T8	6.25	7.06
C9	7.28	8.22	T9	6.15	6.83
C10	6.35	7.01	T10	6.51	7.26
			T11	7.01	7.06
			T12	6.56	7.25
			T13	6.29	7.12
			T14	6.15	7.26
			T15	6.09	7.65
<b>CFU log</b>	<b>6.32</b>	<b>7.32</b>	<b>CFU log</b>	<b>6.43</b>	<b>7.20</b>

그림1. 주환농장 육계 맹장 미생물 카운팅 그래프

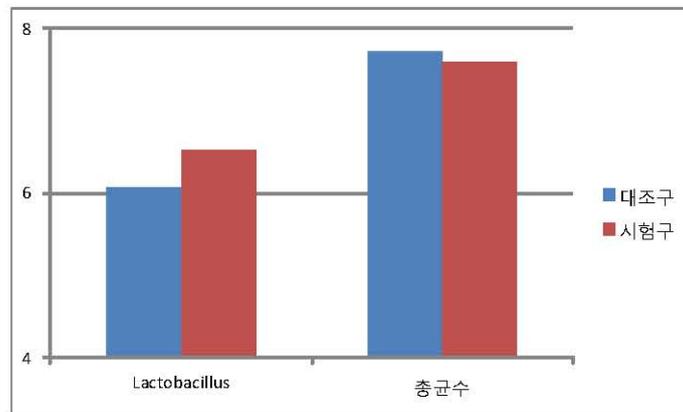


<안골농장 - 3 차 펠드실험>

표2 . 장내 유산균총수(주환농장)

대조구			시험구		
	Lactobacillus	총균수		Lactobacillus	총균수
C1	5.18	8.08	C1	6.34	8.08
C2	6.30	7.55	C2	6.13	8.25
C3	6.95	8.39	C3	6.24	6.77
C4	6.46	8.23	C4	6.78	7.97
C5	5.09	7.97	C5	5.97	7.99
C6	5.57	6.96	C6	7.15	7.14
C7	5.95	8.09	C7	7.19	8.07
C8	6.58	7.99	C8	6.04	6.79
C9	6.20	6.79	C9	7.56	8.18
C10	6.46	7.19	C10	5.83	6.88
<b>CFU log</b>	<b>6.07</b>	<b>7.73</b>	<b>CFU log</b>	<b>6.52</b>	<b>7.61</b>

그림2. 안골농장 육계 맹장 미생물 카운팅 그래프



맹장내 미생물을 조사하기 위해 실험 종료시에 도살한 육계의 맹장에서 내용물을 채취하여 1.5ml micro tube에 넣어 파라필름으로 밀봉하였다. 맹장 내용물은 채취 후 4°C를 유지하였고 실험실로 옮겨 각각의 배지에 spreading하였다.

맹장 내용물 100mg을 멸균된 생리 식염수 900uL에 섞어 1차로 희석하였고, 10<sup>-7</sup> 까지 계대희석하였다. 각각 희석된 맹장미생물을 유산균 배지인 MRS(de Man, Rogosa and Sharpe)배지와 장내세균 배지인 MacConkey 배지에 각각 100uL씩 도말하였다. 각각 배지의 배양조건은 MRS는 혐기적 조건이며\_Gas Pac system(BBL)을 이용하였고, MacConkey배지는 호기적 조건에서 배양하였다.

배양한 후 세균의 수는 각 plate의 colony forming unit (CFU)로 계산한 후 log10으로 환산하였다. 배양시간은 48시간 동안 배양하였다.

맹장내 미생물에서는 감태, 생강과 코팅 유산균을 첨가함에 따라 증가하는 경향이었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 해조류의 풍부한 다당류 등은 장내 균의 에너지원으로 사용되어, 유익균총을 형성하며, 유해균을 억제한다는 보고와 일치하는 것이다. 또한, 장내 미생물 총균은 전체적으로 줄어드는 경향을 확인하였으나 유의적이진 않았다.

하지만, 전체적인 장내미생물은 줄어들고 유산균은 증가하는 것으로 보아 장내건강에 유의한 효과를 주는 것으로 사료된다.

(라) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육질 평가에 미치는 영향

<주환농장 - 2 차 필드실험>

표. 복합생약제 및 유산균 encapsulation 제제가 육질 평가에 미치는 영향

육질평가		2차 필드실험(주환)		
		대조	처리	
보수력(%)	다리살	22.31	25.96	
	가슴살	23.04	30.66	
가열감량(%)	다리살	15.13	14.28	
	가슴살	14.81	14.31	
전단력(kg/cm <sup>2</sup> )	다리살	4.73	4.72	
	가슴살	4.65	4.73	
육질 pH	다리살	6.09	6.26	
	가슴살	5.79	5.97	
육색	다리살	L	55.60	55.17
		a	8.81	9.47
		b	13.98	13.96
	가슴살	L	52.59	53.45
		a	6.97	5.72
		b	15.89	15.91

<안골농장 - 3 차 필드실험>

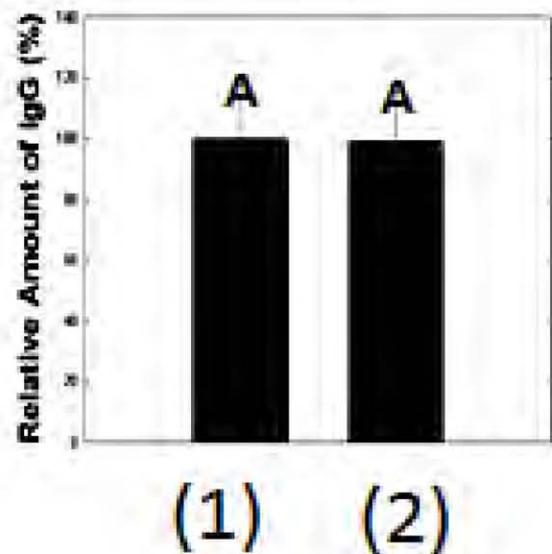
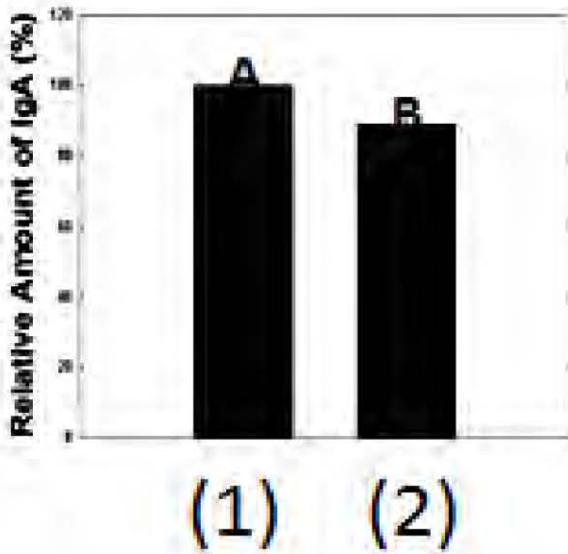
표. 복합생약제 및 유산균 encapsulation 제제가 육질 평가에 미치는 영향

육질평가		3차 필드실험		
		대조	처리	
보수력(%)	다리살	23.21	30.99	
	가슴살	23.06	26.38	
가열감량(%)	다리살	20.91	19.20	
	가슴살	20.67	19.56	
전단력(kg/cm <sup>2</sup> )	다리살	3.93	3.88	
	가슴살	3.92	3.91	
육질 pH	다리살	6.69	6.60	
	가슴살	5.86	5.93	
육색	다리살	L	53.61	53.85
		a	5.77	5.55
		b	8.15	5.59
	가슴살	L	53.96	51.09
		a	4.96	5.82
		b	13.58	14.00

대조구와 처리구의 육질평가 결과는 (표) 보수력과 가열감량에서 차이가 있었으나 유의차는 없었다. 하지만 대조구에 비하여 처리구에서 보수력은 증가하고 가열감량은 적은 것으로 보아 육질 내 수분 함량이 육질 조직감을 개선하여 기호성을 향상시켰으며, 처리구의 가열감량은 대조구보다 조직의 손실을 적게 하는 것으로 평가되었으며 이는 제품생산이 될 때 수율의 측면에서 좋은 점을 가지고 있다고 판단된다. 또한, 이것은 1차 사양실험의 결과와 비슷한 경향이였다.

(마) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 면역력 변화에 미치는 영향

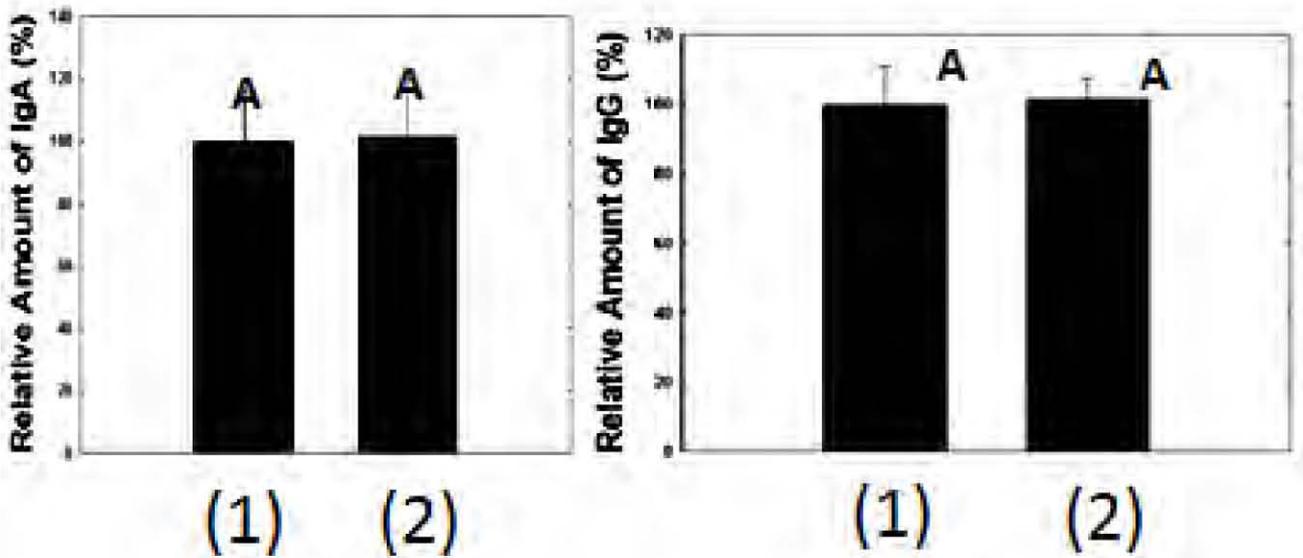
<주환농장 - 2 차 펠드실험>



(1)	대조구
(2)	대조구 + Coated(감태 0.1%,생강 0.1%, 유산균 0.1%) 0.3%

다음 실험은 육계에게 코팅(감태 0.1% + 생강 0.1% + 유산균 0.1%) 한 사료첨가제를 29일 동안 투여한 후 혈청을 분리한 후 IgA, IgG의 양을 분석하였다. IgA는 대조구에 비하여 처리구에서 약 12%정도 감소하고, IgG는 유의차를 보이지 않았다. IgA 분석에서는 약간의 변동이 나타났지만 외부 자극에 대한 1차 면역반응에서는 IgG의 비중이 약 75%정도 높으므로 IgG 결과값을 더 신뢰해야 하는 것으로 보인다. 그러므로 사료첨가제의 투여 시 면역력의 항상성이 유지되는 것으로 판단 된다.

<안골농장 - 3 차 펠드실험>



(1)	대조구
(2)	대조구 + Coated(감태 0.1%,생강 0.1%, 유산균 0.1%) 0.3%

육계에게 코팅(감태 0.1% + 생강 0.1% + 유산균 0.1%) 한 사료첨가제를 32일 동안 투여한 후 혈청을 분리한 후 IgA, IgG의 양을 분석하였다. 위 그림에서 보는 것처럼 대조구와 처리구 간에는 IgA, IgG 모두 유의차가 없는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 사료첨가제의 투여 시 면역력의 항상성이 유지되는 것으로 판단 된다. 위 결과들을 종합해 보았을 때, 코팅된 유산균 제제의 급여시, 살모넬라 등의 유해균 또는 고온스트레스와 같은 외부 환경으로부터 오는 자극이 주어져도 이에 대응하는 면역 체계의 항상성을 유지할 것으로 판단 된다.

(바) 복합생약제 및 유산균의 encapsulation이 육계의 혈액에 미치는 영향

표. 2차, 3차 혈액분석 결과

sample name.		WBC	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	Platelet
		(10 <sup>3</sup> /μl)	(10 <sup>6</sup> /μl)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(%)	(10 <sup>3</sup> /μl)
주환 농장	대조구	13.6	2.4	7.3	28.3	130.2	31.0	23.8	4.1
	시험구	13.6	2.3	7.4	31.1	131.0	31.3	23.7	4.2
안골 농장	대조구	15.1	2.4	7.7	30.7	128.2	32.2	25.1	3.0
	시험구	13.3	2.4	7.5	30.9	129.9	32.2	24.9	3.2

혈액 분석은 육질평가와 마찬가지로 2차 필드실험에서는(주환농장) 대조구 10마리, 시험구 15마리를, 3차 필드실험에서는(안골농장) 대조구와 처리구 당 10마리씩 도살하였고 총 25마리, 20마리의 육계에 대한 혈액분석을 진행하였다.

혈액 분석 결과 감태와 생강첨가 코팅 유산균(시험구) 대조구에 비해 WBC 수치가 떨어졌는데 이는, 환경적인 스트레스를 스스로 방어하여 면역력 증진에 도움을 주는 것으로 판단된다. 또한 2차년도에 실시한 필드실험과 실험실 규모의 결과와 동일하게 적혈구(RBC)는 증가하지 않았으며, 적혈구 이상시에 간접적으로 볼 수 있는 Hct, MCV, MCHC 역시 차이가 없었다. 본 시험에 사용된 육계는 29일과 32일령이었다.

#### 다. 복합생약제의 지표물질 분석(감태 폴리페놀, 생강 진저롤 분석)

##### (1) 감태에 있는 유효성분 지표 분석 ( 폴리페놀 함량 분석 )

###### (가) 재료

제주자생 감태에 있는 폴리페놀 총 함량을 확인하기 위해서는 재료를 용해하여 분석에 사용해야 한다. 그러나 감태의 경우 불용성 성분이 많아 분석에 사용하기에 적합하지 않다. 따라서 용매를 사용하여 5회 추출한 후, 추출물을 혼합하여 분석시료로 사용하여 폴리페놀 함량을 측정하였다.

###### (나) 추출물 제조

감태 100g에 30% 주정 5배를 넣어 90℃에서 1시간 동안 추출한다. 추출이 끝나면 여과하여 농축하고, 이때 나오는 감태추출박을 다시 위와 동일한 방법으로 추가로 4회 반복 추출하였다.

###### (다) 폴리페놀 함량 측정 방법

폴리페놀 함량은 Folin-Denis법으로 측정하였다. 시료를 0.5mg/mL의 농도로 50% 에탄올에 녹인 다음 시료 50uL에 Folin-Ciocalteu's phenol reagent(Merck, Germany) 250uL를 첨가한 후 혼합하여 1분간 실온에서 방치하였다. 여기에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 700uL를 가하여 혼합하고 37℃ 배양기에서 3시간동안 반응시킨 후 725nm에서 흡광도를 측정하였다. Phloroglucinol(Sigma, USA)을 이용하여 표준곡선을 작성하고 이로부터 폴리페놀 함량을 계산하였다.

(라) 결과

① 추출 수율

추출 횟수	수율(%)					평균
	1회	2회	3회	4회	5회	
1차	8.30	8.41	8.28	8.25	8.36	8.32
2차	2.47	2.43	2.49	2.51	2.41	2.46
3차	1.67	1.60	1.68	1.61	1.59	1.62
4차	0.90	0.81	0.89	0.91	0.84	0.87
5차	0.10	0.08	0.09	0.10	0.07	0.09
<b>Total</b>	<b>13.44</b>	<b>13.33</b>	<b>13.43</b>	<b>13.38</b>	<b>13.27</b>	<b>13.36</b>

② 추출물 및 감태막지의 폴리페놀 함량

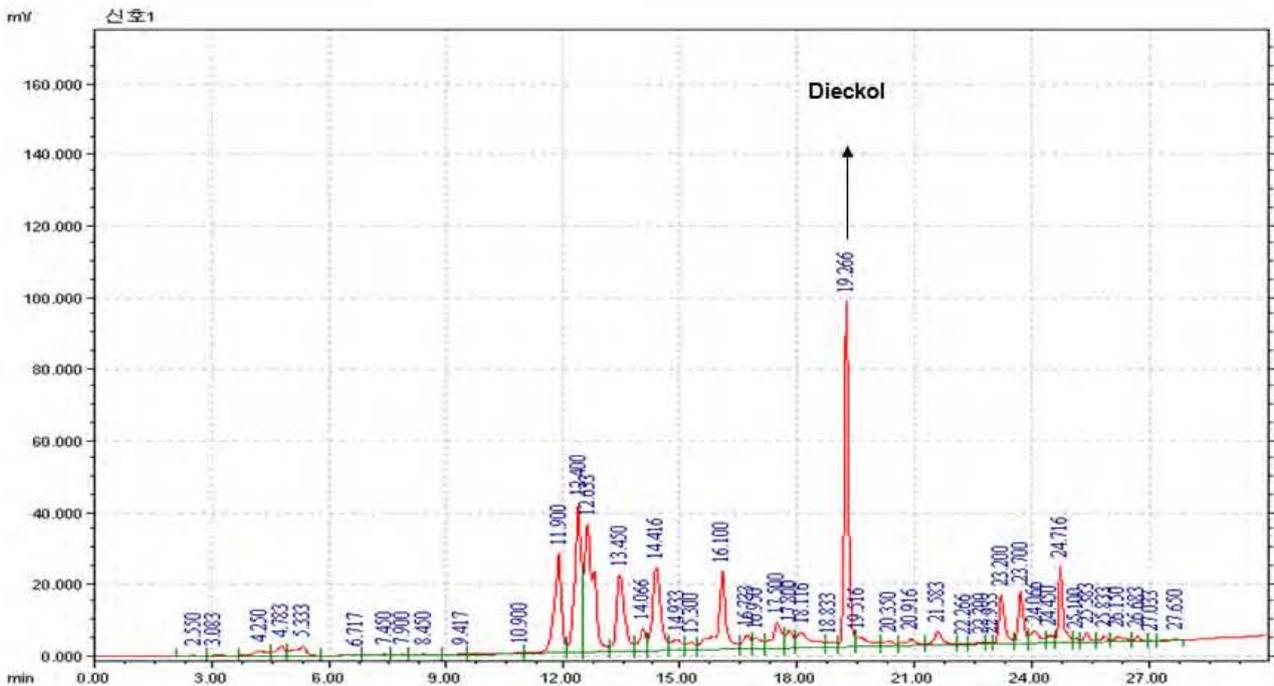
시험수	추출물의 PPC(%)
1회	24.25
2회	24.46
3회	24.47
4회	24.43
5회	24.35
<b>평균</b>	<b>24.39</b>

→  
추출물의  
수율 적용

감태막지의 PPC(%)
3.26
3.26
3.29
3.26
3.23
<b>3.26</b>

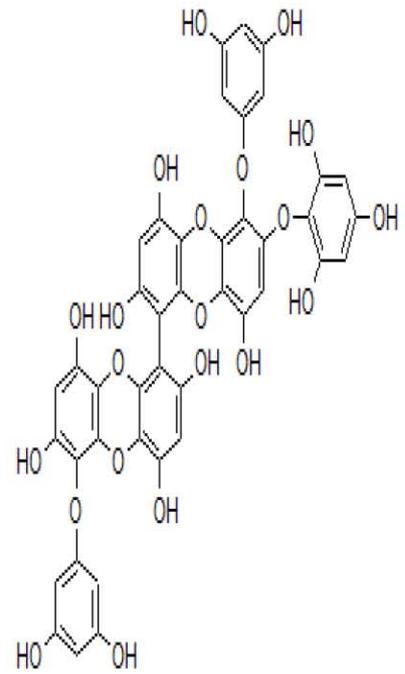
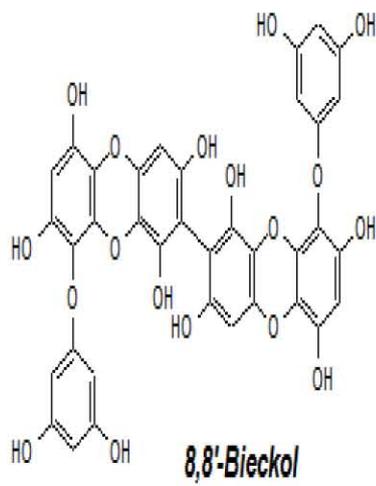
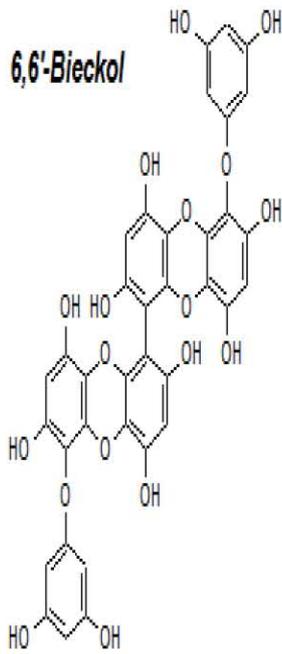
③ 추출물 및 감태막지의 폴리페놀 함량(HPLC)

그림. HPLC를 통한 폴리페놀 중 Dieckol 분석 크로마토그램

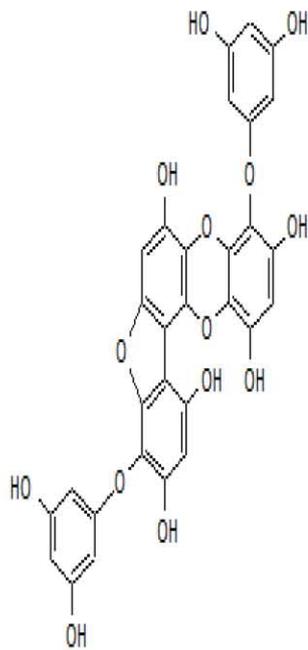
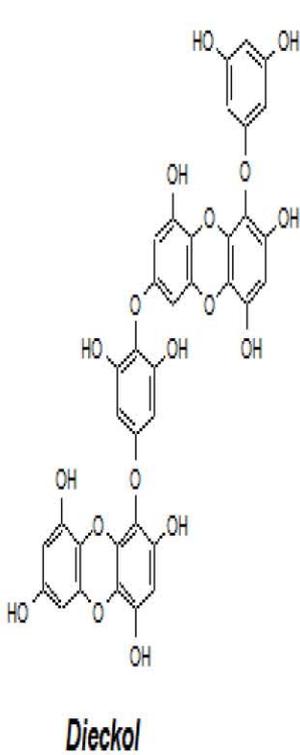


\*\*\* 폴리페놀중에는 가장 많이 함유되어 있는 것이 dieckol 이며 위의 크로마토그램에서 확인 된 폴리페놀들 성분과 구조식은 아래와 같다

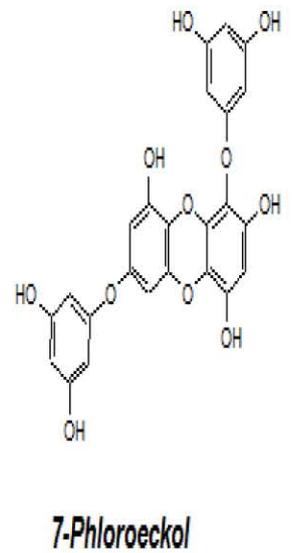
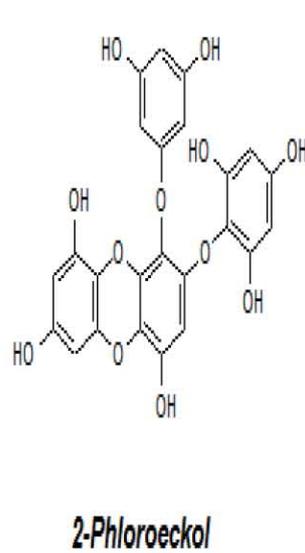
그림. 폴리페놀들 성분과 구조식



**2-O-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-6,6'-bieckol**



**Phlorofucofuroeckol (PFF)**



(2) 감태의 영양성분 (에탄올 추출 후)

# 검 사 성 적 서

발급번호 : IB20150611-0004

접수번호 : 일반-15-0383

제품명	감태막지	제조일자나 유통기한 또는 제조번호	2015. 5. 20	
의뢰 업소명	(주)보타메디	의뢰 대표자	김성호	
의뢰 소재지	제주특별자치도 제주시 제주대학교로 102(아라일동, 제주바이오산업센터 A동 307호)			
접수년월일	2015. 5. 29	검사완료일	2015. 6. 11	
식품유형	-	검사목적	기타	
<b>시험 항목 및 결과</b>				
시험항목	기준	결과	단위	시험방법
열량	-	323.2	kcal/100g	식품공전 제9.1.1.6
탄수화물	-	67.8	g/100g	식품공전 제9.1.1.4
당류	-	0.0	g/100g	식품공전 제9.1.1.4.1.4
단백질	-	12.4	g/100g	식품공전 제9.1.1.3.1
지방	-	0.3	g/100g	식품공전 제9.1.1.5.1
포화지방	-	0.3	g/100g	식품공전 제9.1.1.5.4
트랜스지방	-	0.0	g/100g	식품공전 제9.1.1.5.4
콜레스테롤	-	0.0	mg/100g	식품공전 제9.1.1.5.5
나트륨	-	1711.1	mg/100g	식품공전 제9.1.2.1.6
판정 : -	검사자 : 조은빛, 이주연, 류제빈, 오현정			
비고 :	책임자 : 오현정			
※상기 판정은 의뢰된 시험항목에 한함				
위와 같이 검사성적서를 발급합니다.				
2015 년 6 월 11 일				
<b>제주대학교생명과학기술혁신센터장</b> 				

## (2) 생강에 있는 유효성분 지표 분석 ( gingerol 함량 분석 )

### (가) 재료

생강의 주요 효능 물질인 gingerol (C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>, (S)-5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone)의 함량을 분석하였다. 생강에 있는 진저롤 함량을 확인하기 위해서는 재료를 용해하여 분석에 사용하여야 한다.

### (나) 추출물 제조

생강에 있는 유효 성분을 추출하기 위하여 건조분말하여 그 원물을 열수나 에탄올에 추출한 후, 추출물을 혼합하여 분석시료로 사용하여 진저롤의 함량을 측정하였다.

생강 200 mg에 methanol 5 ml를 첨가하여 1시간 동안 추출한다. 추출이 끝나면 여과하여 분석에 이용하였다.

### (다) 진저롤 함량 측정 방법

진저롤 함량은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)로 측정하였다. 시료를 40mg/mL의 농도로 100% 메탄올에 녹인 다음 시료액을 60분간 sonication 시켜 유효성분을 추출하여 0.45 um 필터로 여과 후 기기를 이용하여 측정하였다.

분석 기기에 사용되는 용매 조건은 Acetonitrile 55% (Acetonitrile 55 : water 45 = v:v)를 사용하였고, C18 (150\*4.6 mm i.d, 30℃.) Column을 이용하였고, UV detector를 이용하여 파장 284 nm에서 검출하였다.

분석 스탠다드는 100 ~ 500 ppm (5 point) calibration curve 작성하였고 methanol에 녹여 제조하였다.

### (라) 샘플 준비

1	생강건조분말
2	생강열수추출물건조분말
3	생강에탄올추출물건조분말

### (마) 결과

그림1. HPLC에 의한 Gingerol 함량 분석(스탠다드-표준물질)

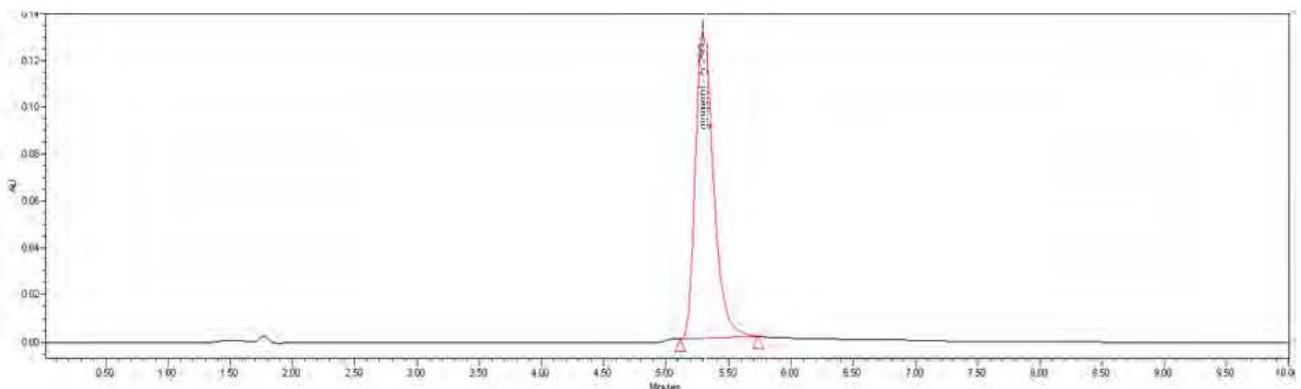


그림2. HPLC에 의한 Gingerol 함량 분석(원물)

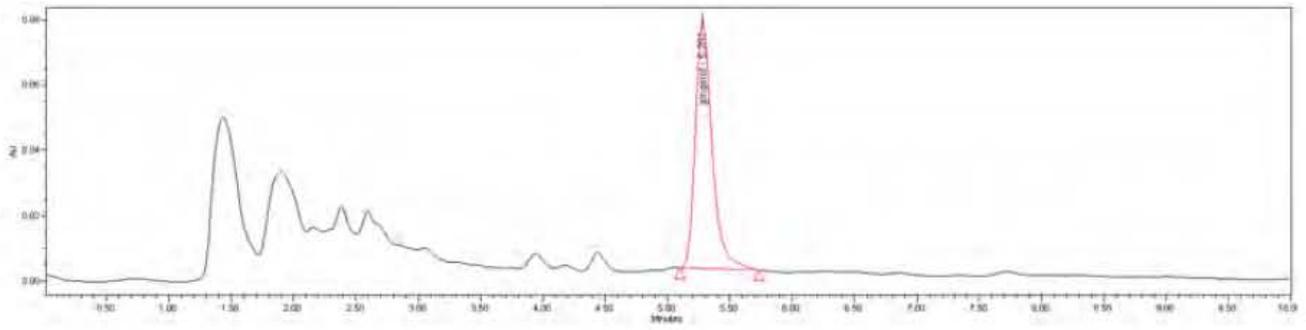


그림3. HPLC에 의한 Gingerol 함량 분석(열수추출)

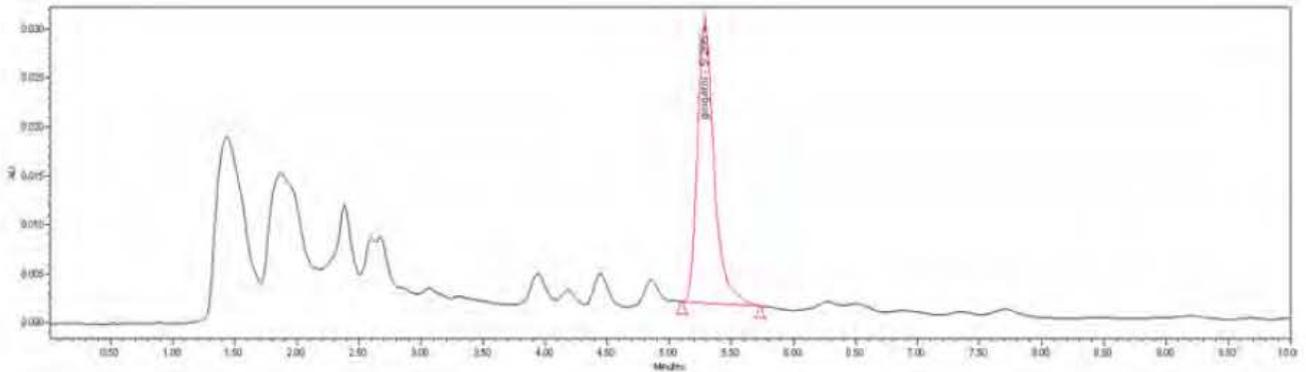


그림4. HPLC에 의한 Gingerol 함량 분석(에탄올추출)

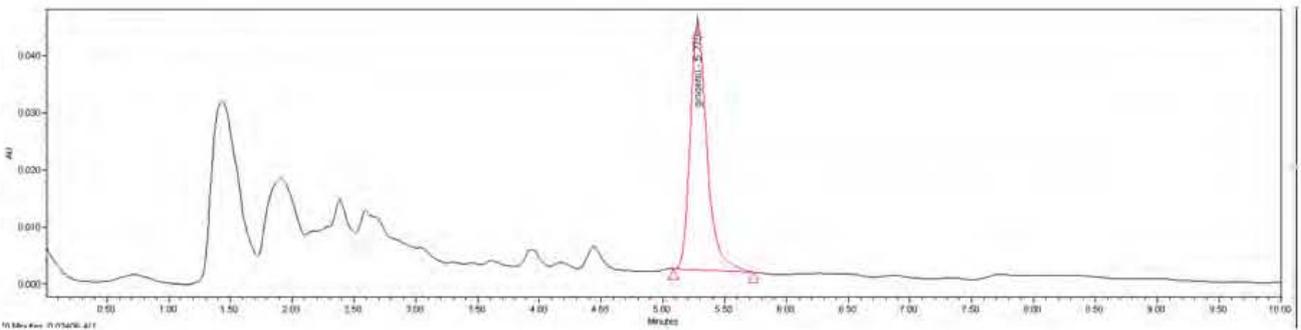


표. 생강 원물, 추출물 및 부산물의 gingerol 함량

	함량 (mg/100g)
생강건조분말	1,281.6
생강 열수 추출물 건조 분말	639.0
생강 70% 에탄올 추출물 건조 분말	863.7

## 2 절 연차별 연구개발수행 결과

### 1. 1차년도

- 가. (주)미래자원ML이 보유한 특허 유산균주 *Lactobacillus* LS-2로부터 대사공학적인 지식 및 기술에 의해 유산균 생성능 및 항균, 항곰팡이 능력이 향상된 변이주 *Lactobacillus* ML-7 균주를 제작하였으며, 배양 특성 파악 및 저가 배양 배지를 확립하였다.
- 나. 축산분야에서의 요구사항인 유산균의 위장에서의 생존 및 장용성을 갖는 저렴한 가격의 encapsulation 방법을 수립하기 위하여, (호화)전분, monoolein 기반의 coating 기술을 확립하였으며, 육계 대상의 사양실험을 통하여 유산균의 성능이 정상적으로 발현되는 것을 확인하였다. 즉, 장내에서 유산균의 작용에 의한 일반 세균의 감소 결과를 얻었다.
- 다. Rat을 대상으로 하는 동물 실험에서 유산균 급여에 의한 증체 및 *Salmonella* 미생물 challenge 시 면역을 활성화 시키는 것을 확인할 수 있었다.
- 라. 육계 및 산란계를 대상으로 하는 사양 실험을 통하여, 유산균 변이주중 *Lactobacillus* ML-7 균주가 육계의 생산성 향상에 긍정적임을 확인하였으며, coated 유산균 변이주와 복합 한약제 및 복합 효소제의 동시 사용에 의해 유의적인 생산성(사료 효율) 향상의 결과를 얻을 수 있었다.

따라서 당초 목표했던 1년차의 목표를 성공적으로 달성하고, 2차년도에 예정된 육계 대상의 대량 사양실험을 위한 기반을 갖춘 것으로 판단된다.

### 2. 2차년도

- 가. 1차년도에 연계된 코팅유산균의 안정성실험을 진행하였는데, 닭의 체온과 유사한 40℃에 보관하여 위장에서의 소화조건을 모방하여 pH 2, 7 조건에서의 실험을 진행하였고 또한 열에 대한 안정성을 테스트하기 위하여 냉장온도 4℃, 여름철 온도 35℃에서 실험을 진행하였다. 그 결과 코팅하지 않은 유산균 보다 코팅한 유산균의 안정성이 위장간의 각각의 pH 조건에서 더 오랫동안 유지 되는 것을 확인 할 수 있었으며, 고온 조건(35℃)에서도 유산균의 안정성이 8주까지 지속 되는 것을 알 수 있었다.
- 나. Rat을 대상으로 하는 동물 실험을 통하여 감태와 유산균의 안정성을 조직과 혈액분석을 통하여 분석하여 평가하고 최소 dosage를 측정하며 동시에 이들의 효능을 향상시키는 방법을 모색하기 위해 실험을 진행하였다. 그 결과 동물실험 내에서 코팅감태유산균 처리군이 증체면에서 향상되었으며, 감태와 유산균의 코팅비율이 1:1로 하는 것이 좋은 것을 알 수 있었다.
- 다. 육계를 대상으로 하는 사양 실험을 통하여, 유산균 변이주중 *Lactobacillus* ML-7 균주가 육계의 생산성 향상이 실험실 규모에서 뿐만 아니라 대규모의 필드 사양실험 조건에서도 긍정적임을 확인하였으며, 또한 보다 더 스트레스를 받는 공간, 더러운 사육환경에서의 그 성적이 더 효과적임을 알 수 있었다. 또한 육질평가, 혈액분석 및 장내 균총 분석을 통하여 육질면에서도 개선되는 것을 알 수 있었다.

따라서 당초 목표했던 2년차의 목표를 성공적으로 달성하고, 3차년도에 예정된 육계 대상의 대량 사양실험 2, 3차를 위한 기반을 갖추었으며 결과물인 제품생산도 실현 가능한 조건을 갖추었다고 판단된다.

## 2. 3차년도

- 가. 1, 2차년도에 연계된 유산균 저장 기간에 따른 유산균 코팅 분말의 저장성 및 상대습도에 따른 유산균 코팅 분말의 유산균 보호 효과를 실험하여 사료첨가제 개발의 유효기간을 실험하였다. 실험은 4계절 기후를 가지고 있는 우리나라의 특성상으로 여름과 겨울의 습도 및 온도별로 설정하여 진행되었고, 소화기관의 환경을 맞추기 위하여 pH 2에서의 저장성실험을 진행하였다.
- 나. 2차년도의 사양실험 결과를 바탕으로 각각의 원료 생강과 감태의 성적결과가 우수함을 확인하였고, 3차년도 코팅의 안정성실험을 통하여 생강과 유산균, 감태와 유산균을 각각 혼합하여 코팅하고 각각의 소재를 이용하여 대규모 필드실험을 진행하였다.
- 다. 육계를 대상으로 하는 대규모 사양 실험을 통하여, 1차 필드실험의 후속 실험으로 2,3차 실험을 진행하여 육계의 사양성적에 긍정적인 효과를 줄 수 있음을 확인하였으며, 또한 육계의 폐사율을 감소시킴으로써 생산성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 특히 2차 필드실험 초기에 실험농장에 질병으로 인해 초기폐사가 증가되었을 때에도 본 개발 소재의 유해 미생물 억제(대응)효과를 확인 할 수 있었던 좋은 기회였다. 또한 육질 평가, 혈액분석 및 장내 균총 분석을 통하여 육질면에서도 개선되는 것을 알 수 있었다.
- 라. 코팅 유산균 제제의 육계 생산성 향상 및 질병 대응 능력을 극대화하기 위하여 유산균 제제와 혼합하여 사양실험을 진행한 사료첨가제 원료인 생강과 감태의 유효성분지표를 분석하여 수치화하는 실험을 진행하였고, 생강과 감태의 원료의 가격 및 경제성을 높이기 위하여 유효성분의 효과를 극대화하기 위한 추출실험을 진행하였으며, 부가적으로 식품 원료로 폴리페놀 성분을 추출하고 남은 감태 폐기물과 생강 수확 후에 버려지는 생강 줄기 및 잎 등의 부산물들을 활용하는 방법을 모색하고 있다.

따라서 당초 목표했던 3년차의 목표를 성공적으로 달성하고, 3년에 걸친 사양실험 및 과제 수행의 결과 제품에 사용되는 코팅유산균을 성분등록 하였으며 결과물인 제품생산을 보다 효율적으로 진행하기 위해 필요한 조건을 갖추었다고 판단된다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1 절 연차별 연구개발목표에 입각한 목표달성도 및 수행내용

<1차년도>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012.08 - 2013.08)	항박테리아/항진균 효능이 증가된신규 프로바이오틱스 유산균 제작 및 가축사양시험을 통한 사료첨가제 제제화	항박테리아/항진균 성능 향상 균주 제작	100	-유산균의 대사물인 lactic acid 내성 균주를 제작함으 로써 feedback regulation이 해제된 변이주 제작 (대사공학 지식 활용) -변이주의 배양 특성 확인 및 저가의 배양 배지 확립
		대사물 생산 증가요인 실험	100	-변이주의 항균(대장균),항곰팡이(Aspergillus) 성능 확 인 및 글리세롤 첨가에 의한 항곰팡이 능력향상확인 - 글리세롤의 사료 첨가시 닭의 생산성 저하로 인하여 사용하지 않기로 결정하였으며, 복합 한약재 및 복합 효소제(소화기능 강화 목적)의 사용으로 사료 효율이 유의적으로 개선된 사료 조성 확립
		배합비 설정 및 실험사료 제작	100	-NRC 사양 표준에 근거한 실험 사료 제작 및 동물 실험 수행(rat 2회, 육계 2회(challenge 포함시 4회), 산란계 1회) -육계 생산성 향상 사료 조성 확립 -유해조건에서 유산균에 의한 숙주 면역활성화 기전 확인.
		사료 적합성 평가	100	-유산균 및 coated 유산균 첨가 사료의 기호성 평가 완료
	항박테리아/항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균의 제형개발 및 시험 동물의 혈청생화학적 분석	유산균 안정성 향상을 위한 제형 개발	100	-호화전분 및 monoolein을 기반으로 하는 저렴한 가격 의 micro-encapsulation 제형 기술 확립 및 시제품 제작, 사양실험 : 이중 코팅제제로서 위장 pH 안정성 및 장용성 확인
		실험 동물의 혈청 생화학적 분석	100	-challenge 실험동물(육계)의 혈청생화학적 분석을 통 하여 체액성 면역 및 세포성 면역 활성화 기전을 확 인

<2차년도>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2013.08 - 2014.08)	항박테리아/항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균의 제형 제품의 시험 동물을 통한 효능 검증	실험실 규모의 가축 사양 시험	100	-실험실 규모의 사양 시험을 통한 최적 급여 조건 실험(육계) - Performance 평가 : 증체량, 사료섭취량, 사료효율 분석 : 성장 기간 별 증체량, 사료섭취량, -사료 효율 분석 -장기 및 미생물 균총 분석, 장내 pH : 시험 종료 후 해부 및 맹장의 : 미생물 균총 분석 및 장내 pH 측정 -육제품 육질 평가 : 조직의 pH, 육색, 가열감량, 보수력, 전단력등의 육 질 평가 -실험실 규모의 사양시험 진행(Rat)
		대규모 가축 사양 시험	100	-실험실에서 진행된 1차적인 시험을 통하여 얻어진 결 과를 필드를 통하여 확인하며 효능을 검증하고 보완 하여 제품 생산에 현실성을 테스트하기 위한 실험 - Performance 평가 : 증체량, 사료섭취량, 사료효율 분석 - 장기 및 미생물 균총 분석 - 육제품 육질 평가 : 조직의 pH, 육색, 가열감량, 보수력, 전단력 등의 육 질 평가
	항박테리아/항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균의 제형 개발 및 시험 동물의 혈청생화학적 분석	배합비 설정 및 실험사료 제작	100	-NRC 사양 표준에 근거한 실험 사료 제작 및 동물 실험 수행(rat 1회, 육계 2회) -육계 생산성 향상 사료 조성 확립 -유해조건에서 유산균에 의한 숙주 -면역활성화 기전 확인
		유산균 안정성 향상을 위한 제형 개발 및 시험사료의 대량 생산	100	-호화전분 및 monoolein을 기반으로 하는 저렴한 가격 의 제품 제형 기술 확립 및 시제품 제작 : 이중 코팅제제로서 위장 pH 안정성 및 장용성 확인 - microencapsulation 기반의 미생물 -제형 기술 개발 : 장용성 코팅 소재 조사 -장용성 코팅 조건 연구 -장용성 코팅 효능 평가 - 코팅 유산균 제형의 프리믹스 제품의 대량 생산
		사양 시험 샘플의 혈청 생화학적 분석	100	-실험실 규모 및 대규모 가축 사양시험 샘플의 혈청 생화학적 분석 : Immunoglobulin G, Immunoglobulin A,

<3차년도>

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성 도 (%)	연구개발 수행내용
3차 년도 (2014.08 - 2015.08)	항박테리아/항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균 제작 및 가축 사양 시험을 통한 사료첨가제 제제화	가축 임상시험(2,3차)	100	-대규모 농장 규모의 사양 시험(반복당 기준 5,000수 이상 ->15,000수이상으로 늘림) -Performance 평가 : 증체량, 사료섭취량, 사료 효율 분석, 폐사율 -장기 및 미생물 균총 분석 -장내 pH -육제품 육질 평가 : 가열감량, 보수력, 전단력 등
	항박테리아/항진균 효능이 증가된 신규 프로바이오틱스 유산균의 제형 개발 및 시험 동물의 혈청생화학적 분석	사양 시험 샘플의 혈청생화학적 분석	100	-Field 가축 사양시험 샘플의 혈청생화학적 분석 : IgG, IgA 등 -Field 가축 사양시험 샘플의 혈액 분석
		제품 분석 및 안정성시험 scientific marketing 자료 작성	100	-제작된 시제품 중의 한약재의 지표성분 함량 분석 -제품 안정성 시험 : 미생물 제형의 보관안정성 ( 유효기간 설정)
		W/O 에멀전 연구	100	코팅 형성 확인
	시제품 제작 및 제품 등록	사양시험 결과를 이용하여 시제품 정립	100	-시제품 제작 -시제품중의 한약재 지표성분 함량 분석 -제품안정성 시험 및 유효기간 설정 -제품등록
	상품화 및 마케팅	시제품의 생산, 판매, 유통 등의 전략 수립	100	-제품세미나 개최 및 홍보 -scientific marketing 자료작성 -시장반응 feedback으로 상품 완성도 제고 -일반 시장에서 사용시 가격적인 면에서 경쟁력 있는 제품으로 만들어 지도록 원료 수급 및 코팅체제의 가격에서 새로운 방법 모색

## <사료 성분등록>

등록번호 제 88CCP0003 호

### 사료 성분등록증

대표자: 김성진

생년월일: 1963년 02월 13일

업체명: (주)미래자원ML

제조(수입)업등록번호: 4070000-034-2013-0005

소재지: 경기도 이천시 호법면 덕평로 248-7

사료의 종류: 보조사료/미생물제/미생물제-유익균

사료의 형태: 가루

사료의 명칭: 락토바실러스 플란타럼

제조국가: 국내산

사료의 용도: 사료원료용

제품명(영문명): 코팅유산균

#### 사료의 성분량

성분명	락토바실러스 플란타럼							
성분량	2.3 x 10의 8승 cfu/g 이상							

※ 추가 사료성분량 :

사료관리법 제12조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제3항에 따라 위와 같이 사료의 성분등록을 하였음을 증명합니다.

2015년 08월 06일

경기도 이천시



## 2 절 연구 개발 목표치 달성여부 수치화

평가항목	비중 (%)	개발목표치	평가방법	평가
1 항균성능 개량균주 제작	15	- 항균력 10%이상 - 유기산생성 10%이상	inhibition zone 크기 배양플 분석	항진균 효과를 알 수 있는 유기산 측정(Lactic acid, Acetic acid, Succinic acid 생성양 확인) : 미래자원 보유균주에서의 활성도 높지만 보유균주의 변이균주에서 더 높은 항진균 효과 도출
2 미생물 사료첨가제 제형개발	15	장용성 여부	장용성제제 용출시험	전분 코팅을 통하여 유산균의 활성 을 높여주고, 위장의 조건 pH 2, 7 에서 유효성 검사진행 : 미처리 코팅유산균보다 코팅 처 리 유산균의 위장내 유효성 높음
3 가축 사양 시험에 의한 생산성 향상 (실험실)	15	증체량 5% 향상	실험실 사양시험	실험종료 후 전체 기간의 증체확인 - 3% 이상의 증체 효과 개선
4 가축 사양 시험에 의한 생산성 향상 (Field)	15	생산성 5% 향상	Field 사양시험	실험 종료 후 전체 기간의 증체확 인 - 1차 필드실험 : 6.8 % 개선 - 2,3차 필드실험 : 4.0% 개선
5 개발제품의 경제성 평가	15	수익성 개선	원가분석	생강과 감태의 유효성분을 극대화 하기 위하여 추출 방법을 모색하였 으며, 생강 부산물과 감태 부산물 을 원료로 사용 유산균 배양 배지로서 고가의 MRS 배지를 대체하는 CSL (Corn Steep Liquor) 배지 조성 확립 경제성있는 유산균 코팅을 위하여 저가의 (호화)전분 및 monoolein을 기반으로하는 코팅 기술 확립 → 첨가비용 3원/kg feed 이내 예 상
6 제품 안정성 평가	10	3개월	유통, 저장기간내 성분 변화 조사	겨울철, 여름철에 맞추어 온도 및 습도별 균의 활성 조사 : 습도에 영향을 받지 않도록 밀봉 하였을 경우 효과 지속 가능

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 1 절 기술적 성과

증체효과를 극대화 할 수 있는 한방지식 기반의 증체 소재 및 한약재 부산물, 미생물 발효를 접목한 사료첨가제 개발을 하기 위해 기기분석을 통한 주요 성분의 함량 분석을 진행하였고, 사양시험을 통한 개발 소재의 증체 효과 및 장기 무게 분석과 혈액 분석 등을 통한 유용성을 확인하였다.

또한 위와 같은 결과를 토대로 논문 ‘김치유래의 유산균 변이주 *Lactobacillus* ML-7의 특성 및 육계 성장에 대한 영향’ 외 4편을 게재하였으며 현재 1편은 투고 중이다.

‘Effect of Coating Method on the Survival Rate of *L. plantarum* for Chicken Feed’,

‘*Gelidium elegans*, an Edible Red Seaweed and Hesperidin Inhibit Lipid Accumulation and production of Reactive Oxygen Species and Reactive Nitrogen Species in 3T3-L1 and RAW264.7 Cells’,

‘Dieckol, a major phlorotannin in *Ecklonia cava*, suppresses lipid accumulation in the adipocytes of high-fat diet-fed zebrafish and mice: Inhibition of early adipogenesis via cell-cycle arrest and AMPK $\alpha$  activation’

‘코팅 소재가 분무 건조된 유산균 분말의 저장 안정성에 미치는 효과’

‘Effect of *Lactobacillus*-fermented ginger stem on *Salmonella*-infected broiler chicks’

또한 ‘항균성을 갖는 락토바실러스 파라카제인 ML-7균주 및 이의용도’, ‘코팅된 유산균 분말 및 생강 분말을 함유 하는 육계용 사료의 제조 방법’, ‘이중 코팅층을 갖는 유산균 분말 및 이의 제조방법’을 개발하여 관련특허를 3건 출원하였으며 그 중 1건을 등록하였다.

- 출원번호 : 10-2013-0068608 (등록번호 10-1507744)

- 출원번호 : 10-2014-0095479

- 출원번호 : 10-2015-0111557

### 2 절 경제적 성과

현재 유산균 배양에 사용되는 배지 MRS 는 배양하기에 좋은 조건을 지닌 배지이지만 가격적으로 대량생산에 적합한 배지가 아니기에 대량 생산 시에 필요한 배지를 MRS를 대체 할 수 있는 저렴한 원료로서 CSL로 선택하여 유산균의 대량생산을 가능하게 하였다.

현재 사용된 유산균 1ton 생산시, 유산균 배양액 제조할 때 드는 MRS 배지 가격은 1,300만원의 금액이 발생 되는 데 이에 반하여 CSL배지 생산 가격은 100만원 미만으로 10배 이상의 비용을 절감 할 수 있다.

생강의 국내 생산량은 연간 3만 톤에 이르며, 그 중 생강 부산물은 3천 톤 이상 발생하고

있다. 또한 감태의 국내 생산량은 800톤에 이르며, 감태를 사용하고 남은 감태 부산물(감태70% 주정추출박)을 감태 막지라 불리 우는데, 이러한 감태 막지와 생강 부산물은 거의 대부분 폐기되고 있는 실정이다. 현재는 생강과 감태의 원물을 이용하여 실험을 통하여 증체효과를 확인하였지만, 원료의 유효성분분석을 통하여 부산물에도 다량 함유되어 있는 것을 확인하였으며, 추후 사료 첨가제로서의 이용이 가능할 경우 부산물 폐기 처리 비용을 줄일 수 있다는 측면에서 경제성을 가질 것으로 예상된다. 원재료비를 낮추면서 증체에 효과가 있는 사료 첨가제 개발을 통해 농가 뿐 아니라 사료 업계에서도 큰 관심을 얻을 수 있을 것으로 예상된다. 또한 경제성 있는 유산균 코팅을 위하여 저가의 (호화)전분 및 monoolein을 기반으로하는 코팅 기술 확립함으로써 첨가비용 3원/kg feed 이내 예상된다.

### 3 절 성과활용 계획

1. 본 기술의 사업화는 주관기관에서 자체 사업화를 추진하며, 주관기관의 기존 거래선인 국내 사료 업체를 대상으로 한 기술기반 마케팅을 시행하고자 함.
2. 각 지역의 농특산물을 활용하는 맞춤형 기능성 사료첨가제 제품 개발로 응용 확대 (브랜드 축산)
3. 국내 유용 식물자원 및 미생물의 이용 효율 향상
4. 새로운 기능성 사료첨가 소재 개발을 통한 다양한 첨가제 개발에 따른 대외 수출 증대

#### 가. 제품 수명 주기

- 본 개발소재는 소화성 질병에 대한 대응 능력을 갖춘 가축 생산성 향상 제제이므로, 기술의 수명주기는 응용시장을 기준으로 도입기로 구분할 수 있으며, 현재 성장기 초기에 해당하는 것으로 판단된다.
- 본 개발 기술이 적용되는 시장은 단기적으로 육계용 사료 첨가제 시장과 산란계용 사료첨가제 시장 등의 양계용 사료첨가제 시장이다. 본 기술로 개발되는 첨가제 소재는 기존 경험적으로 사용되는 사료첨가제 제품들의 효능 불균일 등의 문제점을 해결하고, 또한 보관, 유통상의 문제점들을 해결함으로써 이들 시장을 주도적으로 대체할 수 있을 것으로 보여 기존 제품의 대체 제품으로 성공적으로 시장에 진입할 수 있을 것으로 예상된다.

#### 나. 부가가치 극대화

- 고품질 제품의 가치를 최대한 활용하는 판매 전략으로 제품 부가가치를 극대화하고자 한다.
- 주관기관의 기존 거래선인 국내 배합사료 업체에 대한 B2B 판매를 기반으로 하여 판매선 확대를 추진하고, 신사업으로써 양계 대군 농가(인티업체)를 대상으로하는 B2C 판매로 매출을 확대하고자 하며, 이를 위해 농축산 농가를 대상으로 하는 필드전문 판매사 연계 비즈니스 육성하고자 한다.

- 또한 주관기관(미래자원ML)의 싱가포르, 중국 등의 해외 지사를 활용한 수출 비즈니스 모델로도 개발하고자 한다.

- 고객만족 모니터링 tool 개발, VOC (Voice of Customer) Survey tool 개발 등의 Customer Outreach Program 개발을 통하여 제품 판매 확대 및 지속화를 유도하고자 한다.

다. 이러한 목표로 본 과제에서 개발될 제품을 기존의 거래선 및 신규 거래선에 대한 판매 확대를 지속적으로 추진할 예정이다.

라. 주관기업인 (주)미래자원ML은 1997년 창업이래 사료첨가제 및 단미사료 원료 분야에서 지속적으로 매출을 확대하고 있으며, 아래의 표에서 보이는 것처럼 국내의 대형 배합 사료 업체를 고객사로 두고 있으며, 사료첨가제 및 단미사료 원료를 연간 200~300억원 정도 판매하고 있기 때문에 본 제품의 개발시 이들 대형 배합사료 회사들을 상대로 마케팅을 시행할 예정이다.

판매처	국가 명	판매 단가 (천원)	예상 연간 판매량 (개)	예상 판매기간 (년)	예상 총판매금 (억원)	관련제품
대한제당(주)	국내			12년	12억	단미사료원료 및 사료첨가제
씨제이(주)	국내			12년	7억	단미사료원료 및 사료첨가제
한국유업(주)	국내			12년	19억	단미사료원료 및 사료첨가제
(주)에이티생명	국내			5년	12억	단미사료원료 및 사료첨가제
바이엘코리아	국내			12년	7억	단미사료원료 및 사료첨가제
(주)카길퓨리나	국내			12년	7억	단미사료원료 및 사료첨가제
AT생명과학	국내	12		5년	25억	전축종
대한사료	국내	12		5년	50억	전축종
동원팜스	국내	12		5년	50억	전축종
CJ	국내 및 인도네시아	12		5년	70억	전축종
퓨리나코리아	국내	12		5년	25억	전축종
싱가폴	국외	12		5년	50억	가축 및 양어
중국(자체)	중국	12		5년	100억	전축종
중국(Cofeed)	중국	12		5년	20억	전축종(양돈)

## 제 6 장   참고문헌

- 1) Fellenberg, R. von.(1987) Kompendium derallgemeinen Immunologie. Verlage Paul Parey, Berlin und Hamburg.
- 2) Higgings, D. A. (1975) Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins. The Vet. Bull. 45:139-154
- 3) Sheo HJ.(1999) The antibacterial action of garlic, onion, ginger and red pepper juice. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 28: 94-99
- 4) Chon et al.(2010) The effect of a vegetable-derived probiotic lactic acid bacterium on the immune response. Microbiol. Immunol. 54:228
- 5) 이상진, 김지혜, 정용우, 박선영, 신우창, 박천석, 홍성렬, 김계원(2011) Composition of organic acids and physiological functionality of commercial makgeolli. Korean J. Food SCI, Technol. VOL.43, NO. 2, pp. 206~212
- 6) Suriya Priya S1, \*Sudha K.2, Mathangi S.K3 and Thygarajan D4 (2012) Incidence of Aflatoxin Contamination and assessment of physico-chemical parameters in breakfast cereals. International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences Vol. 2 (3) September-December, pp.13-19/
- 7) Helena Lind, Anders Broberg, Karin Jacobsson, Hans Jonsson, and Johan(2010) Glycerol Enhances the Antifungal Activity of Dairy Propionibacteria. Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology Volume, Article, 9 pages
- 8) 김상호, 박수영, 유동조, 나재천, 최철환, 박용윤, 이상진, 류경선 (2000) Effects of supplemental Lactobacillus spp. on Performance and Cecum Microflora in Broiler. 한국가금학회지 Vol. 27, No. 1, 37-41
- 9) L.Z. Jin, Y.W.Ho, N.Abdullah, S.Jalaludin(1996) Influence of dried Bacillus subtilis and Lactobacilli cultures on intestinal Microflora and Performance in Broiler AJAS Vol. 9(No. 4), 397-403
- 10) R.F. Burkitt, R.H. Thayer, R.D. Morrison(1977) Supplementing Market Broiler rations with Lactobacillus and Live Yeast Culture. Animal Science research Report 137
- 11) A.A. Olkowski, C. Wojnarowicz, M. Chirino-Trejo , M.D. Drew(2006). Responses of

broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. *Research in Veterinary Science* 81, 99 - 108

12) Oyetayo, V.O, Adetuyi, F.C. Akinyosoye, F.A(2003) Safety and protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* used as probiotic agent in vivo. *African Journal of Biotechnology* Vol. 2 (11), pp. 448-452, November 2003

13) Prabhu Balan, Kyoung-Sik Han, Kay Rutherford-Markwick, Harjinder Singh, and Paul J. Moughan(2011) Ovine Serum Immunoglobulin Has Immunomodulatory Effects in Growing Rats Gavaged with *Salmonella enteritidis*. *The Journal of Nutrition Nutritional Immunology* 950~956

14) P.Spring, C.Wenk, K.A.Dawson, K.E Newman(2000) The Effects of Dietary Mannanligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentrations of Enteric Bacteria in the Ceca of *Salmonella*-Challenged Broiler Chicks. *Poultry Science* 79:205-211

[별첨4]

**특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서**

<b>신청과제명</b>	복합생약재 및 고효율 프로바이오틱스를 이용한 가축 생산성 향상용 사료첨가제 개발		
<b>주관연구책임자</b>	한 종 권	<b>주관기관</b>	(주)미래자원ML

**1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교**

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
(기술 1)	일본				
(기술 2)	일본				

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
- 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
- 4) 부가설명이 필요한 경우 비교란에 작성

**2. 특허분석**

**가. 특허분석 범위**

<b>대상국가</b>	국내, 국외(미국, 일본)
<b>특허 DB</b>	Kipris
<b>검색기간</b>	최근 10년간
<b>검색범위</b>	probiotic

**나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성**

개발기술명		(기술 1)	(기술 2)
Keyword		dairy, probiotics, lactobacillus, antimicrobial	dairy, probiotics, lactobacillus, antifungal
검색건수		491	77
유효특허건수		120	9
핵심특허 및 관련성	특허명	Probiotic strains from Lactobacillus salivarius and antimicrobial agent obtained therefrom	Method for inhibiting yeast growth
	보유국	미국	미국
	등록년도	2007	2005
	관련성(%)	60%	45%
	유사점 차이점	유산균을 이용한 항생제 개발 표적 균주의 범위, 균주개발 여부	유산균을 이용한 항곰팡이제 개발 특허의 목표의 차이, 균주개발 여부

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총 검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

### 3. 논문분석

#### 가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	pubmed D)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

#### 나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	(기술 1)	(기술 2)	
Keyword	dairy probiotics antimicrobial	probiotics antifungal	
검색건수	69	53	
유효논문건수	24	10	
핵심논문 및 관련성	논문명	In vitro inhibition of Escherichia coli O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin	Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings
	학술지명	International journal of food microbiology	Critical review in microbiology
	저자	melanie gagnon	Muhammad Irfan
	게재년도	2003	2011
	관련성(%)	45%	35%
	유사점	병원성 미생물의 성장을 저해하는 유산균	병원성 진균의 성장억제와 인체에 유익한 유산균
	차이점	표적균주와 이용균주의 차이	기술개발의 목적(인간/축산)

- 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미
- 3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

### 4. 제품 및 시장 분석(최신의 자료로 작성하되, 반드시 출처 명시)

#### 가. 생산 및 시장현황

- 1) 국내 제품생산 및 시장 현황

젖산균의 일종인 비스판균에 락토페린 유전자를 재조합하여 항균성과 항암성 및 콜레스테롤 저해기능을 가진 유산균 제제를 개발, 출시하였고, 2000년대 초에는 가금 및 양돈용 사료첨가제인 프로바이오틱과 아스타산신(astaxanthine)을 개발하여 사료시장에 도입하였다. 그 외 많은 건강 보조식품을 생산하고 있으며, 대장암을 억제하는 식품소재로 개발하였고, 면역강화물질 및 GRAS 항목으로 분류된 안전한 비피더스균을 이용한 식용 수준의 미생물유전자의 발현시스템을 개발하였다. 국내 발효유 시장으로만 볼 때 현재 1조원이 넘는 시장을 구성하고 있으며, 액상, 호상, 드링크 발효유 순으로 시장을 점유하고 있다. 그 외 프로바이오틱 미생물 시장으로는 1000억 원 정도로 추정이 되며, 각광을 받은 비스판 균은 대부분 일본에서 수입하여 부형제를 첨가하여 혼합 제제화한 것이 대부분이며, 이것을 이용한 발효유 산업의 성장과 더불어 점차 시장이 크게 확대될 것으로 보인다. (RESEAT, Probiotics와 prebiotics의 개발 및 시장 동향, 민태익)

## 2) 국외 제품생산 및 시장 현황

프로바이오틱스를 이용한 세계 발효유시장은 연평균 4%의 신장률을 나타내며, 유산균 제품의 선두주자라고 할 수 있는 일본에서 유산균 음료가 1000억 엔, 발효유가 3000억 엔을 점유하고 있다. 유산균 또는 비피더스균을 주성분으로 하여 정장효과를 인정받은 제품만 61 품목에 이른다. 이 밖에도 여러 종류의 Lactobacillus를 사용하여 생산한 제품들을 판매되고 있으며, 구미는 물론 중남미에도 판매를 확대하고 있다. (RESEAT, Probiotics와 prebiotics의 개발 및 시장 동향, 민태익)

동물 사료 분야에서의 프로바이오틱스 시장은 2003년의 경우 전년 대비 15% 성장한 2630만 불 정도였으며, 유럽의 경우 사료첨가용 항생제(AGP)의 규제로 인해 동물 사료에서의 프로바이오틱스의 시장 규모가 지속적으로 증가하여 2010년까지 9000 만불에 도달할 것으로 예측되었다. 미국의 경우에도 fluoroquinone 계 항생제의 사료 첨가 금지 이후에 프로바이오틱스의 사료 첨가가 크게 늘고 있는 추세이다. 이외에도 선진국에서는 프로바이오틱스 제품의 성공적인 시장 진입과 확대를 위해서 기술력있는 소규모 회사의 인수 합병을 통한 시장 진입과 제품 개발 기간 단축, 공동 제휴 및 조인트 벤처 (Joint Venture)등의 협력 관계 강화, 연구 개발을 위한 투자 확대 등이 이루어 지고 있으며, 판매와 마케팅 측면에서는 프로바이오틱스 협회 결성을 통한 홍보 활동 강화, 학술잡지 발표를 통한 연구 결과 홍보, 특정 집단을 위한 틈새시장 제품 개발, 전문적 지식을 갖춘 훈련된 영업 사원들의 확보, 타사 제품과 구별되는 독창적인 자사 브랜드 제품 개발, 의료 및 수의관련 종사자에 대한 지속적 홍보 활동 등을 펼치고 있다. 연구 개발 측면에서는 분자생물학적 tool을 이용한 장내 다양한 균종 간의 상호 작용 이해, 제품내 산소를 차단하는 대체 포장 기술의 개발과 이를 통한 프로바이오틱스 제품의 유통기한 연장, 프로바이오틱스를 보완하여 생존력을 강화시키는 FOS와 같은 프리바이오틱스의 개발, 프로바이오틱스의 보호를 위한 미세 캡슐의 개발, 맛과 향 강화 기술, 특성 균주 선별과 임상을 통한 효능 확보 등에 노력하고 있다. (신정규, 2005, Prebiotics와 Probiotics의 해외 시장 현황 및 개발 전략)

## 나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

### 1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 최근 사료의 첨가용의 경우 프로바이오틱과 프리바이오틱을 혼합한 신바이오틱(synbiotic)의 형태로 제품이 개발되고 있다. 프로바이오틱의 효능은 동물에 대해서도 인체와 유사하므로,

사료첨가제로서의 수요가 확대되고 있다. 인체에 대해서도 장 기능의 증진점차 수요가 증가하고 있으며 이를 통해 생균제의 장내 정착력을 매우 증진시키며, 사료효율을 개선할 수 있다. 이러한 장점에도 불구하고 프로바이오틱 생균 제제가 국내의 축산 시장에서 성공적으로 정착하지 못하는 이유는 충분한 수의 미생물을 안정적으로 유지하는 안정화 기술의 부족과 오랜 기간 사용으로 인한 미생물의 특성 변화 등을 들 수 있다. 본 과제에서는 산업미생물 개발의 원리인 대사공학적 지식과 기술을 바탕으로 하여 프로바이오틱 균주의 항진균 능력/항박테리아 능력을 현저히 높임으로써 가축에서의 안정적인 효능 유지를 가능하게 하고, 경제성을 확보하고자 한다.

## 2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	1000	1200	1500	1900	2500	8,100
경제적 파급효과	5000	6000	7500	10000	12500	41,000
부가가치 창출액						
합 계	6,000	7,200	9,000	11,900	15,000	49,100

- 1) 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
- 2) 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
- 3) 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

## 5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

### 가. 분석결과 향후 연구계획(특허, 논문, 제품 측면에서 연구방향 제시)

#### 1) 특허분석 측면

○ 기존 특허는 일부 프로바이오틱스 미생물의 외래 유전자 발현시스템에 대한 개발이 부분적으로 완성단계이고, 응용면에서 신바이오틱의 형태로 성장할 가능성이 크지만 출발단계이고, 또한 피부미용 효과와 여드름치료제로의 이용도 확대되고 있으나 역시 발전단계이다.

○ 또한 현재 출원된 대부분의 특허는 의미생물, 효소 또는 그 증식물, 의료, 치과, 화장품 분야 순으로 점유를 하고 있으며, 축산사료에 대한 특허는 큰 비중을 두고 있지 않다. 세계 프로바이오틱 관련 출원 기술 분석에 의하면 3분의 1이 생화학, 미생물학, 효소학, 유전공학 관련분야이며, 그와 비슷한 비중으로 식품 및 식료품 분야가 차지하고 있다. 최근에는 미생물을 유전공학 적 처리로 개량하여 특정 효소활성을 향상시켜 그로부터 생성되는 특정 대사산물을 식, 의약품 또는 사료용으로 사용하는 특허가 점차 늘어나고 있다.

○ 본 과제에서는 개별적인 유전자 조작 등의 균주 개발에 의한 특정 대사산물의 생성 증가 보다는 대사공학적 지식을 통하여 가축의 체내에서 실제적으로 필요한 기능인 항박테리아/항진균 능력을 배가시킴으로써 가축에 대한 적용성을 높이고자 한다.

## 2) 논문분석 측면

○ 논문 분석에 의하면 유산균 유전자에 대한 체계적인 연구가 진행되어 왔음을 알 수 있다. 바이오화학 분야의 주요 물질인 생분해성 고분자 생산을 위한 원료 물질로서 젖산(lactic acid)을 대량 생산하기 위한 대규모 프로젝트를 통해 균주의 개량, 대사회로의 규명과 수식, 유용물질의 생산개발을 추진하고 있다. 하지만 프로바이오틱스로서의 유산균주에 대한 연구의 대부분은 유럽 연합 등을 통해 면역증강, 변비예방, 콜레스테롤 저하, 암 예방, 에너지 충전, 소화기 건강 등에 관한 문헌 들이며, 미국에서는 저열량 감미료 및 면역강화나 병원성 억제용 유산균 음료가 주류를 이루어 주로 인체건강에 관한 문헌들이 보고되어 있다. 또 다른 학술연구로는 유전자 조작에 의한 유산균 유전자의 대한 연구와 유산균의 장에 대한 부착실험이 활발하다. 유럽에서는 클로닝을 통해 염기서열과 발현 및 전사부위를 규명하는 한편 특정 셔플벡터를 이용하여 모균보다 특정 효소의 활성이 강한 형질전환체를 얻기도 하였다. 그 밖에 *L. casei* 등에 대한 형질전환이 성공하여 다양한 생리활성 기능과 면역 증진 및 광범위한 살균효능에 집중적으로 연구 하였다. 하지만 이렇게 개발된 미생물의 경우 GMO(Genetically Modified Organisms)의 문제가 있어 별도의 안전성 평가(safety assessment)를 거치거나, 제품에 표기를 해야하는 문제점이 발생한다.

○ 본 과제에서 개발되는 항박테리아 및 항진균 효능이 증가된 프로바이오틱스 변이 균주의 경우 가축 사양 시험을 통해 항균능력 및 가축 사양의 performance의 개선 효과만 입증되면 상용화가 가능할 것으로 판단되며, 미생물 발효시의 달라지는 프로파일 혹은 새로 만들어지는 생리활성물질의 항산화 및 면역증강 효과 분석, 혈액학적 분석 등을 시행할 계획이다. 또한 *in vitro* 상의 실험데이터를 기반으로 하는 최적의 사료 조성 및 최상의 성능을 발휘할 수 있는 프로바이오틱스 제형의 가축 사양시험을 통해 사료의 기호성 평가, 증체량, 폐사율 감소 등을 평가할 예정이다. 또한 병원성 균주의 challenge 시험을 통해 가축 질병에 대한 대응력 향상 여부를 입증할 것이고, 나아가 그 작용기작에 대한 연구를 추진하여 SCI 등급의 국제 학술지에 게재할 계획이다.

## 3) 제품 및 시장분석 측면

○ 국내 및 국외시장 분석결과 일본에서는 건강기능 식품 시장의 소화기계 제품이 주도하고 있다. 또한 유가공업체가 중심이 되어 요구르트 등의 다양한 유산균 음료를 개발 및 출시를 하고 있다. 품목으로는 1995년, 10개 품목이, 97년에는 100개 품목이, 최근에는 167개의 품목에 2,000억 엔 규모의 시장으로 성장하였다. 국내에서는 장에 도달하는 내산성 유산균, 헬리코박터 세균을 죽이는 박테리오파지 합성 유산균, 노화방지 기능을 가진 유산균 등을 개발하였고, 유산균을 위산이나 담즙산 및 내열성을 보강하기 위해 코팅기술을 이용하여 제품을 개발하였다.

○ 프로바이오틱스 미생물을 이용하여 축산사료에서의 항박테리아 및 항곰팡이제의 성능을 갖는 제품의 개발은 미미한 실정이다. 축산사료의 항생제 사용금지, 고가의 기존 항생제 대체제 (alternative growth promoter), 자체적인 사료비용의 폭등으로 효과가 우수하고 저렴한 항생제 대체제의 개발이 시급하다. 본 연구에서는 프로바이오틱스 미생물의 성능 개선을 통하여 축산농가에서 병원성으로 인해 피해를 끼치고 있는 요 균주에 대한 대응능력 뿐만아니라, 사료에 첨가되어 사료내 독성을 생성해내는 곰팡이까지 성장을 저해하는 프로바이오틱스 유산균을 개발하여 시판할 계획이다. 이러한 다기능성 프로바이오틱스 신소재를 개발하여 축산농가의 부담을 줄여줄 뿐만 아니라 수입에 의존하고 있는 가축용 항생제 대체제를 국내기술 개발로 대체하고 해외 수출까지 진행할 예정이다.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.