

발간 등록번호

11-1543000-001290-01

동물용 생균제 대량생산을 위한 위탁생산시설 구축
(Establishment of CMO for a commercial production of
veterinary probiotics)

(주)진바이오텍

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “동물용 생균제 대량생산을 위한 위탁생산시설 구축” 과제의 보고서로 제출합니다.

2016 년 1 월 일

주관연구기관명 : (주)진바이오텍

주관연구책임자 : 이 찬 호

세부연구책임자 : 이 찬 호

연 구 원 : 강 정 선

연 구 원 : 조 원 탁

연 구 원 : 조 경 진

위탁연구기관명 : 서울대학교

위탁연구책임자 : 채 찬 희

위탁연구기관명 : 건국대학교

위탁연구책임자 : 송 창 선

위탁연구기관명 : 단국대학교

위탁연구책임자 : 강 대 경

요 약 문

I. 제 목

동물용 생균제 대량생산을 위한 위탁생산시설 구축

II. 연구성과 목표 대비 실적

국내 농업바이오분야 미생물제제 전문 위탁 생산 시설은 아직 없는 실정으로 기존에 우수한 제품 아이디어를 가지고 있으나 생산기반이 없어 제품화를 하지 못하는 관련농가 또는 업체들을 대상으로 체계적인 제품생산을 위한 공정 개발, 품질관리 및 제품의 성능 검증, 임상시험 등을 지원할 수 있는 시스템을 구축하였다. 특히 동물약품으로서 안전성 확보를 위해 생산설비 및 공정에 대한 GMP+FSA (GMP+ Feed Safety Assurance) 인증을 국내 사료업체 최초로 획득함으로써 보다 안전한 생균제 생산을 위한 토대를 마련하였으며, 구축된 위탁 생산 시스템을 활용한 수익창출모델 개발을 위해 생산성 개선 및 질병 예방을 위한 항생제 대체제로서 활용 가능성이 우수한 균주를 선발하고 그 균주를 대상으로 기능성 검증 및 생산 공정 확립과 동시에 양돈 및 양계에서의 임상시험을 통한 효능평가를 실시하여 개발제품의 효과 및 우수성을 검증하였다. 이러한 기술 개발을 토대로 제품화를 통한 수익 창출 모델을 개발하였으며, 기존 산업계에서 생균제로 사용되고 있는 바실러스, 유산균, 효모, 곰팡이 균주에 대한 표준 생산 공정개발을 통한 대량생산 시스템 구축을 완료하였다.

1. 주요 연구성과 요약

가. 질병예방용 유용균주 확보 및 기능성 검증 시스템 확립

본 연구를 통해 산업가축의 소화기 질병 (양돈: 대장균 설사증, 양계: 살모넬라 증)을 예방할 수 있는 유용균주인 *L. plantarum* 균주를 2종을 최종 선발하고 균주 및 유용물질의 특성평가를 완료하였으며, 양돈 및 양계 특화용 기능성 생균제로 개발하기 위해 위탁기관을 통한 *in vivo* 검증을 완료하였다.

나. 선발균주의 최적 생산공정 확립을 통한 대량생산 시스템 확립

생균제 생산을 위한 최적 발효공정 확립을 lab scale, pilot scale 및 10톤 규모의 대량생산 공정 확립을 완료하였으며, 개발제품의 저장 안정성 및 특성에 대한 평가를 완료하였다.

다. 동물용 생균제 위탁생산 시스템 확립

동물용 생균제의 위탁생산을 위해 유산균, 바실러스, 효모 및 *A. oryzae* 균주에 대한 10톤 규모에서의 생산공정 확립을 완료하고 생산 단계별 품질관리 표준설정을 통해 안정적인 제품생산공정 및 품질관리 기준 확립을 완료하였다.

라. GMP+FSA 인증 획득

안전한 동물용 생균제 생산 및 향후 수출을 고려하여 국제기준의 품질기준인 GMP+FSA 인증을 완료 (인증번호: RQA 667630, 인증일자: 2014. 12. 10)함으로써 원료부터 제품생산에 이르기까지 전 과정에 대한 품질기준 (위해요소관리기준 포함) 및 설비관리 기준을 확립하였다.

마. 산업가축에서의 유용균주 평가 시스템 확립

선발균주를 활용한 양돈 및 양계 분야에서의 *in vitro* 및 *in vivo* 수준에서의 평가를 통한 가능성 검증 시스템 확립을 완료하였다.

바. 개발제품의 상품화를 통한 수익창출

연구과정에서 개발된 제품 (제품명: *L. plantarum*, NF-8 외)의 상품화 및 기술이전을 통해 2015년 12월까지 1억 원 이상의 수익을 창출하였다. 또한, 현재 양돈 및 양계용 특화 생균제 제품 출시를 준비 중이어서 향후 매출 실적은 더욱 늘어날 것으로 기대된다.

사. CMO 운영방안 확립을 통한 생균제 생산기반 확대

본 연구의 진행을 통해 생균제 생산 공정의 표준화 및 분석방법의 표준화를 통해 다양한 위탁생산, 제품개발 및 기술지원/개발 (MOU 체결, 8건)을 통한 수익창출을 위해 노력하고 있으며, 국내외 거래처 및 농가에서의 분석서비스 (미생물 및 일반성분 분석 등, 현재까지 589건 완료)를 통해 다양한 형태의 지원을 통해 지속적인 위탁생산 잠재 수요를 확보하고 있다.

2. 정량적 성과목표 대비 실적

구분		특 허		사 업 화		홍보 전시회	유전자원 등록	논 문	
		출원	등록	상품화	CMO 사업화			SCI	비 SCI
1차년도	목표					1	4		
	달성					1	4		
2차년도	목표	1		1		2	2	1	0
	달성	1		3		2	2	0	1
3차년도	목표	4		1	1	2		2	2
	달성	4		2	4	2		2(1)*	(1)*
계	목표	5		2	1	5	6	3	2
	달성	5		5	4	5	6	3	2

* () 논문 투고 중 (SCI- 1건: Oral administration of lactobacillus confers beneficial effects against Salmonella infection in mice and chickens, 비 SCI- 1건: 1일령 육계에서 유산균제 투여로 살모넬라의 장관내 정책 억제효능 평가)

본 연구를 통해 특허 5건 (1건 사업화 완료), 논문 5건 (SCI 3건, 비 SCI 2건), 개발제품 사업화(상품화) 5건, CMO 사업화 4건(완료), 기술이전 2건, 생물자원 기탁 6건, MOU 체결 8건, GMP+인증 1건, 신규고용 1건, 인력양성 4건의 성과를 달성하였다. 특히 상품화 부분은 현재 추가 제품에 대한 출시를 앞두고 있으며, CMO사업화의 경우 현재 8건의 MOU를 체결한 상태로 향후 추가적인 사업화가 가능할 것으로 예상된다.

<CMO사업화 및 상품화 내역>

No	제목	세부내용	상품화 (사업화)	CMO사업화
1	내열성 균주를 포함하는 생균제 개발 (제품명: NF-8, Lacto-P)	- 저가 단백질원 및 펠렛가공 용 내열성 생균제 개발 완료 - 양계 사양시험을 통한 개발제품 기능성 평가 완료	상품화 완료	
		- 발효균주 및 생산기술 지원, 제품분석 지원		CMO사업화 (완료, -기술이전), (해외 MOU 체결-2건)
2	천연소독제 개발	- 천연 소독제 개발을 위한 발효 공정(유산균, 효모) 확립을 통해 시제품 생산 완료	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중)
3	수산용 생균제 개발 (제품명: AquaPro S, AquaPro W)	- 액상발효 고농축 생균제 제조공정을 통해 시제품 생산 (기준: 유산균, 효모, 바실러스 각 1.0×10^9 cfu/g 이상)	상품화 완료	해외 MOU 체결
4	고농축 생균제 생산 (LP-10, BL-10, PP-10)	- 액상발효 고농축 생균제 제조공정을 통해 제품 생산/공급 (기준: 유산균 3.0×10^{10} cfu/g 이상) - 신규 생균제 제품개발	상품화 완료	국내 MOU 체결
5	애견사료 개발	- 탄수화물 source를 이용한 <i>A. oryzae</i> 생균제 개발		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
6	축사환경개선용 미생물 제제 개발 (제품명: 락토플랜-아몬드피)	- 아몬드피를 활용한 유산균 생균제 개발		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
7	곰팡이 독소 저감제 개발	- 곰팡이 독소 분해/저감제 개발		CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
8	기능성 생균제 개발	- 양계용 생균제 개발	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
		- 양돈용 생균제 개발	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
9	소독제 개발	- 신규 소독제 개발 및 공동마케팅		CMO사업화 (국내 MOU 체결)
10	<i>Aspergillus</i> 종균 개발	- 고체발효용 종균 생산/공급	상품화 완료	
11	생균제 생산 지원	- 발효균주 및 생균제 생산/품질 관리기술 지원		CMO사업화 (진행 중, 기술이전), (해외 MOU 체결)
12	축우용 유산균 발효촉진제 개발	- 축우용 유산균 발효촉진제 개발	상품화 완료	
13	복합생균제 생산 (제품명: Glukozy m)	- 유산균, 효모, 바실러스 균주로 구성된 복합생균제 생산 (매일 20톤 이상 생산)		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
14	기능성 생균제 생산	- 미세조류 혼합 생균제 생산 (제품화 가능성 평가 중)		

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

- 항생제 대체와 면역증강 및 성장촉진을 위한 생균제의 시장은 2008년 159억 달러, 2009~2014년까지 연평균 12.6%가 성장하여 326억 달러에 달할 것으로 예측되고 있으며 (Markets and Markets, 2009), 국내 한우농가를 대상으로 조사한 결과, 가장 선호하는 동물약품으로 생균제 (40.4%), 항생제 (19.3%), 면역제제 (12.3%) 순이며 (2011, 한우축산시설환경학회), 2007년 무항생제 축산물 인증제도 도입으로 안전축산물 생산을 위한 생균제 시장이 확대되고 있다.
- 2011년 동물용 의약품으로 판매된 생균제는 98개 품목에 1,485 톤으로 제품 당 평균 판매량은 15 톤이며 월간 판매량으로 환산 한다면 1,263 kg에 불과하여 제품의 사용량이 높지 않음을 확인할 수 있으며, 생균제 제품 중에 시장 점유율 가장 높은 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* (23.06%) 이며, 대부분의 생균제 제품이 효모, 바실러스, 유산균 등의 단일균주 (62.33%) 이고 복합균주는 이들 단일 균주들의 복합형태의 제품이 주를 이루고 있는 실정이다. 이를 기초로 볼 때 현재 시판되는 생균제의 균주 특성상 항생제 대체 효과보다는 생산성 개선에 주목적을 두고 있는 것으로 판단되고 있다. 따라서 축종별 항병력을 개선하며 생산성을 개선시킬 수 있는 기능성 생균제의 개발이 필요한 상황이다 (동물약품 협회, 2012).
- 특히, 양계의 경우 최근에는 가금티프스 예방백신을 도입하여 근절을 위해 노력하고 있지만 그 피해가 계속되고 있으며, 세계적으로 세균성 식중독의 발생이 증가하고 있는데 미국의 경우 살모넬라로 인한 식중독이 전체 식중독 발생 건수 중 가장 높은 비율을 차지하고 있다 (19,089건중 8,256건, CDC, MMWR, 2011). 양돈의 경우는 2009년 7월1일 이후 돼지 사료에 항생제 첨가를 전면 금지한 후에 돼지 설사병에 대한 발병 양상이 크게 변화하고 있다.
- 항생제를 대체하기 위한 후보 물질 중에 생균제 특히, 항균효과가 우수한 유산균에 대한 연구가 유산균 자체에 의한 효과뿐만 아니라 대사산물에 의한 효과에 대해서 활발한 연구가 진행되고 있으나 아직까지 구체적인 효과가 보고되고 있지는 않다. 특히 성장촉진제로서만 연구가 되던 유산균들에 대해 최근 장관면역을 강화하고 비특이 면역을 향상시킴으로써 병원성 미생물에 대한 잠재적 조절 기능을 갖고 있는 것으로 보고되면서 유산균의 면역조절제로서의 새로운 기능들이 밝혀지고 있기는 하지만, 기존의 항생제를 대체하기 위한 유산균 생균제의 경우 생산 공정이나 균주 자체의 특허 등으로 인해 국내에 소개되어 있는 제품은 많지 않으며 유산균의 특성을 효과적으로 잘 발현할 수 있는 경제적인 대량 생산 체계 구축 등 발효공정의 표준화 및 대량생산 공정 구축이 필요한 실정이다.
- 본 연구에서는 다양한 미생물 균주를 대상으로 항생제 대체제로서의 이용가능성이 우수한 균주를 선발하고 그 균주를 대상으로 기능성 검증 및 생산 공정 확립을 확립함과 동시에 동물약품으로서 안전성 확보를 위해 생산설비에 대한 GMP 인증을 획득함으로써 위탁생산 시스템 (CMO) 구축하고자 한다. 이러한 생산기반 기술을 바탕으로 국내 영세 업체를 비롯하여 국내외 대기업에 이르기까지 안정적인 OEM, ODM 생산을 위한 토대를 마련함으로써 국내 시장 뿐만 아니라 해외 시장에서의 지속 수익모델 개발을 통해

미래형 고부가가치 산업육성에 기여하고자 한다. 아울러 제품생산에 한계가 있는 생균제 생산업체들을 대상으로 생균제 제품화 지원을 통한 수익 창출과 생균제 제품 수요자인 배합사료회사나 농장의 특화된 목적에 맞는 제품 공급을 통해 수익창출 기회를 확보함으로써 국내 농축산업의 일자리 창출을 비롯한 관련 산업 발전에 기여하고자 한다.

IV. 연구개발 목표 및 내용

1. 최종 목표

- 생균제 위탁 대량생산을 위한 CMO 시스템 확립
- 유용생균제의 선발, 효능평가 및 안전성 확보기술 보유
- 선발된 동물용 생균제의 원료/시제품 생산 및 수익 창출

2. 동물용 생균제의 대량생산을 위한 위탁생산시설 구축 (연구책임자: 이찬호)

가. 연구개발 목표

- 1) 항병력이 있는 생균제로 사용 가능한 GRAS 균주 선발
- 2) 선발균주를 대상으로 생균제 생산 공정 확립을 통한 대량생산 시스템 구축
- 3) 개발제품의 안전성 및 유효성 확보를 위한 제형화 공정 확립
- 4) 생산 제품에 대한 공정 및 품질관리 표준화 기준 확립
- 5) CMO 운영방안 확립
- 6) 생균제 생산 설비의 GMP 인증 획득

나. 연구개발 내용 및 방법

- 1) 생균제 후보 균주 선발
 - 항균활성 및 면역증강활성 등 균주 특성이 우수한 균주를 선발하고 위탁기관에 전달하여 생균제 균주로서의 가능성을 평가함으로써 생균제로 활용가능성이 우수한 균주를 최종 선발
- 2) 동물용 생균제 제품의 유효성 조사
 - 동물용 생균제 시장에서 유통 중인 제품을 수거하여 제품을 각각 비교 평가
- 3) 선발균주의 lab scale 및 pilot scale 공정 확립
 - 선발균주의 대량생산을 위한 lab scale 및 pilot scale에서의 최적 발효공정 확립
- 4) 생균제 생산을 위한 대량생산 시스템 구축
 - Pilot 발효공정을 토대로 10톤 이상의 고체발효설비를 활용하여 대량생산 조건 확립
- 5) 개발제품의 품질관리 기준 확립을 통한 생산 공정 표준화
 - 원료부터 최종제품까지의 전 과정에 대한 품질 기준 확립
- 6) CMO 운영방안 확립
 - CMO 운영을 위한 제품별 또는 균주별 생산 공정 확립
- 7) GMP 인증 획득

- 동물용 생균제 생산을 위한 국제 품질 규격 확보

3. 양돈에서 장내세균 질병 억제 생균제 소재 개발 및 효과 규명 (연구책임자: 채찬희)

가. 연구개발 목표

- 1) 후보 유용 미생물에 대한 안정성 평가 및 실험실내 평가 방법을 이용한 효능 평가
- 2) 선정된 유용 미생물을 이용한 돼지 소화기 질병 예방 효과 평가
- 3) 선정된 유용 미생물을 이용한 돼지 소화기 질병 야외 임상효과 실시 및 평가

나. 연구개발 내용 및 방법

- 1) 선정된 개발 생균제의 안전성 검사 스크린
 - 후보 균주에 대한 *in vivo* 상황에서의 안전성 평가
- 2) 실험실내 유용 개발 생균제에 대한 스크리닝 검사법 확립
 - 후보 균주의 병원성 대장균 (10종) 및 부종병을 유발하는 대장균 (5종)에 대한 *in vitro* 억제능 평가.
- 3) 대장균 공격 접종에 대한 후보 개발 생균제의 효과 규명
 - 후보 균주의 급이를 통한 *in vivo* 상황에서의 대장균에 대한 효능 평가
- 4) 대장균 설사증에 대한 개발 생균제의 효과 규명을 위한 야외 임상 실험
 - 대장균 설사증 또는 부종병이 심한 3개의 양돈장에서의 개발 생균제 효능 평가

4. 가금용 면역활성 생균제 소재 발굴 및 유효성 평가 (연구책임자: 송창선)

가. 연구개발 목표

- 1) 후보 생균제의 *in vivo* 시험에서의 효능 평가
- 2) 개발 생균제의 임상시험 모델 확립
- 3) 선발 균주의 실험실 내 안전성 시험 및 효능 시험
- 4) 선발 균주의 야외 양계 농장에서의 안전성 시험 및 효능 시험

나. 연구개발 내용 및 방법

- 1) 후보 생균제의 *in vivo* 시험에서의 안전성 및 효능 평가
 - 후보 균주의 마우스 비강 및 경구 투여를 통한 안전성 및 항균활성, 면역활성 효과 확인
- 2) 개발 생균제의 임상시험 모델 확립
 - 가금티푸스에 대한 평가를 위한 동물 모델을 확립
- 3) 선발 균주의 실험실 내 안전성 시험 및 효능 시험
 - 확립한 식중독 원인 살모넬라 동물 모델을 이용하여 선발한 생균제의 살모넬라 억제능평가
- 4) 선발 균주의 야외 양계 농장에서의 안전성 시험 및 효능 시험
 - 실험실 내 시험을 통해 효능이 확인된 생균제를 이용하여 야외 농장에서의 투여를 통하여 생산성 증대 효능 검증

5. 산업가축의 질병 예방을 위한 유용 미생물의 규명 (연구책임자: 강대경)

가. 연구개발 목표

- 1) 항균물질의 선발 및 특성 규명

나. 연구개발 내용 및 방법

- 1) 1차 선발된 균주의 동정
 - 주관기관에서 1차 선발된 균주들을 대상으로 형태학적 성장특성 및 균주 동정을 통해 생균제 활용가능균주 선발
- 2) 선발된 균주 및 대사산물의 특성 조사
 - 균주 특성 및 대사산물 등 특성 조사

V. 연구개발결과

1. 동물용 생균제 대량생산을 위한 위탁생산시설 구축 (연구책임자: 이찬호)

가. 생균제 후보 균주 선발

- 자연계 샘플링을 통해 다양한 균주 선발하고 대장균, 살모넬라, 클로스트리디움 균주에 대한 항균활성 및 균주 특성평가를 통해 균주 특성이 우수한 1차 후보 균주 15종을 선발 완료하고 각 위탁기관으로 전달하였다.
- 선발균주에 대한 16S rRNA sequencing 분석을 통해 균주 동정을 완료하였으며, 선발균주의 고체발효물에 열처리 온도를 50~80℃로 달리하고 처리시간을 5분 및 10분간의 열처리를 통해 선발균주의 열안정성평가를 완료하였으며, 균주별 특성평가를 통해 최종 *L. plantarum* 균주 2종 (양계 및 양돈용) 선발을 완료하였다.

나. 선발균주의 lab scale 및 pilot scale 공정 확립

- 선발균주의 액상발효 및 고체발효 조건에서의 배지조성, 배양온도, 초기 수분함량에 대한 기초실험을 완료하였으며, 이를 바탕으로 선발된 15종 균주 모두에 대한 혐기 및 호기발효 실험을 통해 최적 발효조건을 확립하였다.
- 선발균주의 특성 평가를 통해 유용물질을 PLA(phenylactic acid)함량을 설정하고 기초 발효 실험결과를 토대로 유용물질 함량을 기준으로 발효형태(액상, 고상발효), 발효방식(호기, 혐기발효), 전구물질 첨가 등 액상 및 고상발효 조건에서 유용물질을 다량 생산할 수 있는 발효 조건 조사를 완료하였으며, 유용물질 생산능이 우수한 선발균주 4종에 대한 pH 및 열안정성 조사를 완료하였다.
- Lab scale 발효공정을 기초로 선발균주의 특성을 고려하여 1,000kg 수준의 pilot scale에서의 최적의 배지조성 및 초기수분함량, 발효온도, 발효시간에 대한 기준 확립을 통한 고체발효공정 확립을 완료하였다.

다. 동물용 생균제 제품의 유효성 조사

- 동물용 생균제 시장에 유통 중인 주요제품 11종을 수거하여 균수 및 6개월간의 저장안정성 평가를 실시한 결과 6개월 이후 대부분의 제품은 100배~1000배의 균수 감소가 확인되었다.
- 평가결과를 기초로 저장성 평가 방법을 개발제품 및 위탁생산 제품에 대한 주요 품질평가기준으로 설정하였다.

라. 생균제 위탁 대량생산을 위한 CMO 시스템 구축

- 생균제 위탁생산을 위한 액체발효 및 고체발효 조건에서 선발균주인 유산균 균주를 포함하여 효모, 바실러스, *Aspergillus* 균주에 대한 10톤 규모에서의 균주별로 10회 이상의 대량생산을 통한 표준화된 대량생산 공정 확립을 완료하였다.
- 대량생산 공정 중 균주별 배지조성, 발효시간, 발효온도, 건조온도, 분쇄 기준 확립을 통해 위탁생산을 대비한 대량생산 시스템 구축을 완료하였으며, 생산제품에 대한 내산성, 내열성, 저장안정성 평가를 통한 개발 및 생산제품의 품질평가 기준 확립을 완료하였으며, 균주 및 시제품에 대한 쥐 경구독성 평가를 통한 안전성 평가를 완료하였다.

마. 개발제품의 품질관리 기준 확립을 통한 생산 공정 표준화

- 대량생산 단계에서의 품질 변이 요인에 대한 확인을 완료하였으며, 제품별 표준 제조공정도 세팅을 통해 원료 및 전체 공정에 대한 GMP+FSA 규정에 따른 품질관리 기준을 확립하고, 이를 토대로 생균제 균주별 제품생산을 위한 생산 및 품질관리 표준 공정 확립을 완료하였다.

바. CMO 운영방안 확립

- CMO 운영을 위한 GMP+FSA 수준의 원료관리, 종균관리, 공정관리, 최종제품관리 기준을 확립하였으며, 향후 제품분석지원을 위한 표준 분석법 설정을 완료하였다.
- 생균제 위탁생산시설 활용을 위한 운영방안 확립을 완료하였으며, 제품생산 수요처 확보를 통해 제품개발 및 위탁생산, 분석지원업무를 지속적으로 진행하고 있으며, 현재까지 589건의 분석지원 서비스를 진행하였으며, 이를 통해 잠정 수요처를 지속적으로 확대하고 있다.

사. GMP 인증 획득

- 안전한 동물용 생균제 생산을 위해 GMP+FSA 인증 (2014. 12. 10, Lloyd's register quality assurance) 을 완료하였으며 제품생산을 위한 품질규격을 확보하였다.

2. 양돈에서 장내세균 질병 억제 생균제 소재 개발 및 효과 규명 (연구책임자: 채찬희)

가. 선정된 개발 생균제의 안전성 검사 스크린

- 5종의 선발 후보균주를 각각 2두씩의 이유자돈 (4주령)에 구강으로 2 ml (1×10^9 CFU/ml) 을 접종하여 3주간 질병 발병 양상 확인을 통해 안전성을 확인하였다.

나. 실험실내 유용 개발 생균제에 대한 스크리닝 검사법 확립

- 후보 균주의 배양액을 이용하여 이유자돈에서 설사를 유발하는 대장균 (F4⁺, LT⁺ ST⁺, 10종)과 부종병을 유발하는 대장균 (F18⁺, Shiga toxin⁺, 5종)에 대해 *in vitro* 상에서 성장 억제 능력 평가를 완료하였다.
- 이유자돈에서 설사증을 유발하는 병원성이 높은 대장균(F4⁺, LT⁺ ST⁺) 접종을 통한 분변에서의 이들 섬모(F4⁺)와 장내독소 (LT⁺와 ST⁺) 유전자를 보유한 대장균의 분변 분비 정도 및 병리조직학적으로 대장과 소장에서 대장균 유착 여부 및 유착 정도에 대한 분석을 통해 후보 균주별 효능을 평가하고 최적 균주를 선발하였다.
- 이유자돈에서 부종병 유발하는 병원성이 높은 대장균(F18⁺, Shiga toxin⁺) 접종을 통한 분변에서의 이들 섬모(F18⁺)와 시가독소 (Shiga toxin⁺) 유전자를 보유한 대장균의 분변 분비 정도 및 병리조직학적으로 대장과 소장에서 대장균 유착 여부 및 유착 정도, 뇌에 분포되어 있는 혈관에서 병변(섬유소성 변성; fibrinoid degeneration) 여부 및 정도 분석을 통해 후보 균주별 효능을 평가하고 최적 균주를 선발하였다.

다. 대장균 공격 접종에 대한 후보 개발 생균제의 효과 규명

- 국내에서 분리한 이유자돈 설사증을 유발하는 대장균을 분석하여 가장 분포도가 높고, 병원성이 높은 대장균 10종 및 시가 독소(Shiga toxin)를 분비하고, 병원성이 높은 대장균 5종을 선정하고 실험실내 증식 억제 실험을 통하여 후보 개발 생균제의 이유자돈 설사증을 유발하는 대장균에 대한 증식 억제 정도 분석을 실시하였다.
- 이유자돈에서 설사증을 유발한 병원성이 높은 대장균(F4⁺, LT⁺ ST⁺) 접종을 통한 분변에서 이들 섬모(F4⁺)와 장내독소 (LT⁺와 ST⁺) 유전자를 보유한 대장균의 분변 분비 정도 및 병리조직학적으로 대장과 소장에서 대장균 유착 여부 및 유착 정도 분석을 통해 후보 개발 생균제 효과를 분석하였다.
- 이유자돈에서 부종병을 유발한 병원성이 높은 대장균(F18⁺, Shiga toxin⁺) 접종을 통한 분변에서 이들 섬모(F18⁺)와 시가독소 (Shiga toxin⁺) 유전자를 보유한 대장균의 분변 분비 정도, 병리조직학적으로 대장과 소장에서 대장균 유착 여부 및 유착 정도 분석 및 뇌에 분포되어 있는 혈관에서 병변(섬유소성 변성; fibrinoid degeneration) 여부 및 정도, 발병 농장에서 대장균 분리하여 병원성(섬모 및 장내독소) 분석을 통한 후보 개발 생균제 효과를 분석하였다.

라. 대장균 설사증에 대한 개발 생균제의 효과 규명을 위한 야외 임상 실험

- 이유자돈 대장균 설사증이 있는 3개 농장을 선정하고 배합사료에 주관기관에서 공급하는 유산균 체제를 첨가군 25두에게는 톤당 2% 비율로 사료에 첨가하고, 무첨가군 25두에게는 동일한 일반사료를 3주령부터 10주령까지 첨가하여 농장에서 효능을 분석하였다.
- 3 곳 농장 모두에서 3~10주령 까지 일당 증체량에 있어서 개발제품 첨가군은 무첨가군에 비해 유의적으로 높은 10주령 체중과 일당 증체량 결과를 보였으며, 농장에서 부검한 이유자돈의 장 조직 병변 점수에서도 2곳의 농장에서 개발제품 첨가군에서 대조군에 비해 결장의 조직 병변이 유의적으로 낮게 확인되어 개발제품의 급이가 대장균 설사증 예방에 효과가 있음을 확인하였다.

3. 가금용 면역활성 생균제 소재 발굴 및 유효성 평가 (연구책임자: 송창선)

가. 후보 생균제의 *in vivo* 시험에서의 안전성 및 효능 평가

- 항 바이러스 능이 있는 유산균 균주의 선발 : 6주령 SPF마우스에게 2주간 유산균을 비강으로 접종한 후 인플루엔자 바이러스를 접종해 체중 감소 및 MDT(Mean Death Time)를 측정한 후 항 바이러스능이 가장 우수한 유산균 4종을 선발하였다.
- 식중독 유발 살모넬라 균에 대한 방어능을 가지는 유산균 균주 선발 : 4주령 SPF마우스에게 항 인플루엔자 능이 확인된 4종의 유산균 균주를 구강으로 접종한 후 체중 감소 및 MDT를 측정한 후 살모넬라 균에 대한 방어능이 가장 우수한 유산균 1종을 최종 선발하였다.

나. 개발 생균제의 임상시험 모델 확립

- 식중독 유발 살모넬라의 닭에 대한 공격 접종 모델 확립 : 1일령 살모넬라 부재 산란계에게 식중독 유발 살모넬라균을 구강으로 접종한 후 7일, 14일 그리고 21일 후 맹장 내의 식중독 유발 살모넬라 균의 균수를 확인한다.
- 식중독 유발 살모넬라의 닭에 대한 수평 전파 모델 확립 : 1일령 살모넬라 부재 산란계를 살모넬라균을 구강으로 접종한 공격 접종 그룹과 함께 사육한 후 7일, 14일 그리고 21일 후 맹장 내의 식중독 유발 살모넬라 균의 균수를 확인한다.
- 가금 티푸스 유발 살모넬라의 닭에 대한 공격 접종 모델 확립 : 6주령 살모넬라 부재 산란계에게 살모넬라균을 구강으로 접종한 후 3주간의 폐사율 및 항혈청 형성 여부, 그리고 접종 7일, 14일, 21일 후 장기에서의 가금 티푸스 균 분리 여부를 확인한다.
- 가금 티푸스 유발 살모넬라의 닭에 대한 수평 전파 모델 확립 : 6주령 살모넬라 부재 산란계를 살모넬라균을 구강으로 접종한 공격 접종 그룹과 함께 사육한 후 3주간의 폐사율 및 항혈청 형성 여부, 그리고 접종 7일, 14일, 21일 후 장기에서의 가금 티푸스 균 분리를 확인한다.

다. 선발 균주의 실험실 내 안전성 시험 및 효능 평가

- 선발된 액상 유산균 경구 투여군, 사료 첨가 파우더 유산균 투여군, 일반 사료 투여 대조군으로 나눈 후 7, 14, 21, 28일령이 되는 날 각 실험군의 체중을 측정하여 유산균이 생산성에 미치는 영향을 확인하였다.
- 선발된 유산균 경구투여를 통한 식중독 유발 살모넬라의 닭에 대한 방어효능확인 : 살모넬라 공격접종 군 및 공격 접종 그룹과 함께 사육한 접촉전파 감염군으로 나누어 1일령 살모넬라 부재 산란계에게 식중독 유발 살모넬라균을 구강으로 접종한 후 7일, 14일 그리고 21일 후 맹장 내의 식중독 유발 살모넬라 균의 균수를 확인하였다.
- 선발된 유산균 사료첨가투여의 식중독 유발 살모넬라의 닭에 대한 방어효능확인 : 살모넬라 공격접종 군 및 공격 접종 그룹과 함께 사육한 접촉전파 감염군으로 나누어 1일령 살모넬라 부재 산란계에게 식중독 유발 살모넬라균을 구강으로 접종한 후 7일, 14일 그리고 21일 후 맹장 내의 식중독 유발 살모넬라 균의 균수를 확인하였다.
- 선발된 유산균 사료첨가투여의 가금 티푸스 유발 살모넬라의 닭에 대한 방어효능확인 : 가금티푸스 공격접종 군 및 공격 접종 그룹과 함께 사육한 접촉전파 감염군으로 나누어 6주

령 살모넬라 부재 산란계에게 가금티푸스균을 구강으로 접종한 후 2주간의 폐사율 및 항혈청 형성 여부, 그리고 장기에서의 가금 티푸스 균 분리 여부를 확인하였다.

라. 선발균주의 야외 양계 농장에서의 안전성 시험 및 효능 시험

- 실험실 내 시험을 통해 효능이 확인된 생균제를 이용하여 야외 농장에서의 투여를 통하여 생산성 증대 효능 검증하였다. 입추부터 생균제를 급여하였으며, 사육 기간 중 계사 환경 내 살모넬라 모니터링을 진행하였다.
- 살모넬라 모니터링결과 효과적인 환경 내 살모넬라 억제를 보인 농장은 확인되지 않았으나, 기존 생균제에 비해서 살모넬라 양성율이 낮게 (62.5% → 25%) 확인되었으며, 생산성 결과가 기존 시판 생균제와 동등한 효과를 나타내어 실제 농가에서는 급여 기간을 늘릴 경우 살모넬라 예방 효과는 있을 것으로 판단된다.

5. 산업가축의 질병 예방을 위한 유용 미생물의 규명 (연구책임자: 강대경)

가. 1차 선발된 균주의 동정

- 1차 선발된 균주들을 동정하기 위하여 16S rRNA 유전자 서열을 확인하는 분자생물학적 방법을 사용하여 DNA 염기서열을 분석을 완료하였으며, 특성이 우수한 5종의 균주는 모두 *L. plantarum* 균주로 동정되었다.

나. 선발된 균주 및 대사산물의 특성 조사

- 선발 균주의 유기산 생성능은 lactic acid의 경우, *L. plantarum* 1-3 균주가 배양 48시간째에 17,731 ppm으로 가장 높은 수치를 나타내었으며, acetic acid의 경우 *L. plantarum* 3-8 균주가 배양 72시간째에 4,701 ppm으로 가장 높은 생성능을 보였다. PLA의 경우 배양 48시간째에 *L. plantarum* 2-6 균주가 157 ppm으로 가장 높은 수치를 나타내었다.
- 내산성 평가에서는 *L. plantarum* 3-5 균주와 *L. plantarum* 6-5 균주가 우수하였으며, 내담증성 평가에서는 *L. plantarum* 6-5 균주가 우수하였다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

- 본 연구과제를 통해 동물용 생균제의 위탁생산시설을 구축하였으며, 유용균주선발 및 효능 평가, 양돈, 양계에서의 세균성 질병에 대한 임상시험 모델 확립을 완료하였으며, 안전한 동물용 생균제 생산을 위해 국내 사료업체 최초로 GMP+FSA (Feed safety assurance) 인증을 획득하였음.
- 정량적인 성과로는 특허 5건 (1건 사업화 완료), 논문 5건 (SCI 3건, 비SCI 2건), 개발제품 사업화(상품화) 5건, CMO 사업화 5건(완료), 기술이전 2건, 생물자원 기탁 6건, MOU 체결 8건, GMP+인증 1건, 신규고용 1건, 인력양성 4건의 성과를 달성함.
- 위탁생산 시설을 활용한 개발제품의 사업화 (상품화) 실적은 4건으로 매출이 발생되고 있으며, 다양한 개발완료 제품 (농장특화용 천연소독제, 양돈 및 양계전용 생균제 등과 같은 기능성 생균제 등)에 대한 사업화 및 위탁생산 기반 확대를 통한 매출실적 증대가 예상됨.
- 위탁 생산시설을 활용한 위탁생산 실적은 현재 제품생산의뢰 건수의 증가 및 국내/외 기업 및 개인 농가 등 잠재 고객을 대상으로 500건 이상의 분석지원서비스를 지속하고 있어 향후 CMO 사업화 실적은 지속적으로 증가할 것으로 기대됨.

2. 성과 활용계획

- 생균제 대량생산을 위한 생산기준 및 품질기준 표준화를 통한 동물용 생균제 위탁생산
- CMO 생산 기반 구축을 통한 영세 생산업체에 대해 생균제 생산 방식의 확대 (OEM 및 ODM 생산) 및 사업화 지원에 활용
- 생균제의 효능 검증 방법에 대한 시스템 구축 및 서비스 제공

3. 기대효과

- 개발 생균제의 사용을 통한 축산농가의 항생제 사용량 절감으로 인한 내성 세균의 증가 등 공중보건학적 문제를 감소시킬 것으로 기대되며, 항생제 사용을 최소화한 고품질의 축산물 생산으로 내수 및 수출 발전에 기여
- 양돈 및 양계 농가에 큰 경제적 손실을 유발하는 세균성 질병을 효과적으로 예방할 수 있어 농가 이익증대에 기여
- 생균제 생산을 위한 CMO 시스템 구축으로 인해 생산 아웃소싱의 확대로 기술력 제고, 국내 수요대응 및 산업 성장 가능
- 우수한 제품 아이디어를 갖고 있으나 생산 설비가 없는 업체를 지원하는 새로운 사업모델의 확립으로 산업의 규모 확대에 기여
- 생산설비의 GMP 인증으로 유럽 및 미국 등 축산 선진국으로의 생균제 제품의 수출 기회 확대에 기여

SUMMARY

I. Title

Establishment of CMO for a commercial production of veterinary probiotics

II. Background & Rationale

Moreover on safety issue in the veterinary medicine industry, a drastic call has necessarily been placed for a reliable certified manufacturing system for microbial products. According to the realistic assessment it was proposed to set up certified toll manufacturing system officially named CMO (Contract Manufacturing Organization) system. It is anticipated to provide profits and benefits through the domestic and global industries providing reliable fundamentals for the variety of business model especially, OEM (original equipment manufacturing) and ODM (original development manufacturing) practice. Throughout the development of industrial system (CMO system) it gets feasible to provide variable microbial resources to the small and medium size companies which limited in microbial resources and manufacturing capacities upon intellectual properties of their own. Industrial cooperation by CMO system helps to share benefits for hardware and software, respectively and also provide more chances not only on value added profits but also reliable products to feed manufacturers and farmers as the beneficiaries of the systems through the CMO system. Besides, it also contributes better to create new job applications.

Therefore, technical approaches were placed to develop systematic manufacturing protocol to provide certified authority through GMP+ (Good Manufacturing Practice Plus) FSA (Feed Safety Assurance) as a global standard. Furthermore, research work were architected on development of novel microbial properties for reliefs for AMGP (anti-microbial growth promoter) free feed for global market. It is established through out natural selection of microbial properties under safety assurance for its manufacturing system and materials in the industry.

III. Research Plan

1. Objectives

- Concrete CMO system for reliable toll manufacturing system
- Developing industry-friendly microbial properties through compatible evaluation and safety assurance
- Stabilized manufacturing process of the selected microbial resources and profits thereof

2. Research criteria

- Characterizing microbiological properties of candidates and *in vitro*, *in vivo* validation
- Modelling clinical study on selected microbials by animal species
- Qualifying mass manufacturing system and commercialized product thereof
- Research on laboratory safety and efficiency trial by animal species
- Industrial validation through livestock (*in vivo* poultry trial at commercial farm for its safety, efficacy and efficiency)
- Certification of GMP+ FSA

IV. Results

There had been a lot of request for a reliable toll manufacturing system for microbial products in the agribio industry in Korea which had enabled tons of precious technical perceptions on novel and unique products as global competence.

A reliable CMO system is established throughout this project for below;

- 1) novel systematic manufacturing process,
- 2) validation on quality assurance and efficacy
- 3) research model on clinical study.

The most remarkable value added fruit of the project was GMP+ FSA certified manufacturing system, for the 1st in the animal agriculture industry of Korea. This provides the certified valued products of Korea into the global market which inspired the most safe and sound direct fed microbials (probiotics) to the customers through certified and well organized manufacturing system. It is more likely to provide benefits for both customers and to the companies because companies (manufacturer and developing companies) could provide qualified products to play an important role in the 'AMGP Free Feed Market' so that customers all through the industry chain get satisfied for its quality and safety.

Research activities contributed into development of novel microbial properties, validation under *in vitro* and *in vivo* evaluation process for its efficacy as alternatives against AMGP and safety as well, while it also has been studied to optimize the manufacturing system under global certification. Field trials and clinical studies were performed in swine and poultry for the technical evidence.

Conclusively, current project get CMO system into practice now available for providing reliable microbial resources with standardized and optimized manufacturing system for the commercially available microbials as Bacillus, Lactic acid bacteria, Yeast and Fungi then provide economic markups.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of research and development project	21
Chapter 2. Trends in related technology	29
Chapter 3. Research and development contents and result	37
Chapter 4. Degree of accomplishment in research and contribution to related fields	219
Chapter 5. R&D achievements and application plan	225
Chapter 6. International scientific and technological information	231
Chapter 7. Research facilities and equipment	235
Chapter 8. Safety Management of Laboratory	237
Chapter 9. Reference	239
<Appendix>	247

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표	21
제 1 절 연구개발의 목표	21
제 2 절 연구개발의 필요성	22
제 3 절 연구성과 목표대비 실적	25
제 2 장 국내외 기술개발 현황	29
제 1 절 국내외 기술개발 현황	29
제 2 절 국내외 시장현황	31
제 3 절 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과	34
제 3 장 연구개발 수행내용 및 결과	37
제 1 절 항생제 사용현황 조사	37
제 2 절 항균활성 보유 유용균주 선발	40
제 3 절 선발균주의 최적 성장을 위한 배지조성 및 발효조건 조사	47
제 4 절 선발균주의 유효물질 생산증대를 위한 발효조건 탐색	53
제 5 절 국내 시판 주요 생균제의 유효성 조사	58
제 6 절 위탁생산을 위한 생균제 대량생산 시스템 구축	61
제 7 절 위탁생산을 위한 품질관리 시스템 구축	103
제 8 절 CMO 운영방안 확립	112
제 9 절 GMP+FSA 인증	118
제 10 절 위탁생산시설을 활용한 개발제품의 기능성 검증	119
제 11 절 양돈에서 장내세균 질병억제 생균제소재 개발 및 효과 규명	140
제 12 절 가금용 면역활성 생균제 소재 발굴 및 유효성 평가	193
제 13 절 산업가축의 질병 예방을 위한 유용 미생물의 규명	209
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	219
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	225
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	231
제 7 장 연구시설·장비 현황	235
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적	237
제 9 장 참고문헌	239
<첨부1> 특허, 논문 및 시장분석 보고서	247
<첨부2> 특허출원 및 MOU 실적	257

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1절 연구개발의 목표

본 연구는 다양한 미생물 균주를 대상으로 항생제 대체제로서의 이용가능성이 우수한 균주를 선발하고 그 균주를 대상으로 기능성 검증 및 생산 공정 확립을 확립함과 동시에 동물약품으로서 안전성 확보를 위해 생산설비에 대한 GMP 인증을 획득함으로써 동물용 생균제의 위탁 생산시스템 (CMO)을 구축하는 것을 최종목표로 하고 있으며, 이러한 생산기반 기술을 바탕으로 국내 영세 업체를 비롯하여 국내외 대기업에 이르기까지 안정적인 OEM, ODM 생산을 위한 토대를 마련함으로써 국내 시장 뿐만 아니라 해외 시장에서의 지속 수익모델 개발을 통해 미래형 고부가가치 산업육성에 기여하고자 한다.

최종목표 및 연차별 주요연구내용은 아래와 같다.

최종 목표		<ul style="list-style-type: none"> - 생균제 GMP 설비/시설 구축 및 인증 - 개발 생균제의 산업 가축에 대한 항병성 및 생산성 개선효과 검증 - 개발된 생균제의 제품화 및 수익 창출 - 위탁생산시설을 통한 생균제 원료 및 제품의 생산과 이의 품질관리 시스템 구축
주요 연구 내용	1차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 시판 생균제 조사 및 유효 성분에 대한 검증 (동물용 의약품 생균제 및 보조사료분야) - 유용 미생물과 후보물질의 특성 규명 및 <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> 효과 검증 - 선발 균주의 효능 검증을 위한 축종별 (양돈, 양계) 임상시험 모델 확립 - 생균제 생산공정 표준화 방안 및 농가 서비스 범위 결정 등을 통한 CMO 운영방안 조사
	2차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 선발 균주의 생산 조건 확립 및 대량생산을 통한 제품화 - 선발 균주의 실험실 내 안전성 시험 및 효능 검증 - 선발 균주의 산업 가축 유효성 검증 (양돈 및 양계 사양시험)
	3차년도	<ul style="list-style-type: none"> - 선발 균주의 산업가축 유효성 검증 (개발 생균제의 야외 양계 농장에서의 안전성, 효능 및 생산성 개선시험) - 생균제 생산을 위한 CMO 운영체계 구축 및 품질관리 시스템 구축 - 생균제 CMO 운영을 위한 생산 표준화 및 생산설비의 GMP 인증 (GMP+ FSA)

제 2절 연구개발의 필요성

- 항생제 대체와 면역증강 및 성장촉진을 위한 생균제의 시장은 2008년 159억 달러, 2009~2014년까지 연평균 12.6%가 성장하여 326억 달러에 달할 것으로 예측되고 있음 (Markets and Markets, 2009).
- 국내 한우농가를 대상으로 조사한 결과, 가장 선호하는 동물약품으로 생균제 (40.4%), 항생제 (19.3%), 면역제제 (12.3%) 순이며 (2011, 한우축산시설환경학회), 2007년 무항생제 축산물 인증제도 도입으로 안전축산물 생산을 위한 생균제 시장이 확대됨.
- 2011년 동물용 의약품으로 판매된 생균제는 98개 품목에 1,485 톤으로 제품 당 평균 판매량은 15 톤이며 월간 판매량으로 환산 한다면 1,263 kg에 불과하여 제품의 사용량이 높지 않음을 확인할 수 있음. 생균제 제품중에 시장 점유율 가장 높은 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* (23.06%) 였음. 대부분의 제품이 효모, 바실러스, 유산균 등의 단일균주 (62.33%) 이고 복합균주는 이들 단일 균주들의 복합형태의 제품임. 이를 기초로 볼 때 현재 시판되는 생균제의 균주 특성상 항생제 대체 효과보다는 생산성 개선에 주 목적을 두고 있는 것으로 판단됨. 따라서 축종별 항병력을 개선하며 생산성을 개선시킬 수 있는 생균제를 개발할 필요가 있음 (동물약품 협회, 2012).
- *Salmonella gallinarum* 감염으로 유발되는 가금티푸스는 1900년대 초기에 전세계적으로 발생하여 가금산업에 막대한 손실을 주었으며 국내에서의 발생은 1992년 처음 보고되었고, 1994년 이후 전국적으로 발병하여 최근 양계농가에 막대한 경제적 손실을 주고 있음. 살모넬라 증은 제2종 가축전염병으로 모든 일령의 닭에서 패혈증을 유발하며 높은 폐사율을 특징으로 하며, 추백리는 주로 어린병아리에서 백색설사를 주 증상으로 하고 가금티푸스는 대부분 성계에서 발생하여 사료섭취율 감소, 산란율 저하, 벼슬 청색증 등이 관찰됨. 최근에는 가금티푸스 예방백신을 도입하여 근절을 위해 노력하고 있지만 그 피해가 계속되고 있음.
- 세계적으로 세균성 식중독의 발생이 증가하고 있는데 미국의 경우 살모넬라로 인한 식중독이 전체 식중독 발생 건수 중 가장 높은 비율을 차지하고 있음 (19,089건 중 8,256건, CDC, MMWR, 2011). 살모넬라감염증의 주원인 식품은 축산물로, 특히 가금유래 식품에 의한 살모넬라 감염 발병율이 가장 높은 것으로 알려져 있으며 이를 차단하기 위한 국가별 노력들이 진행되고 있음 (NPIP, HACCP 운영).
- 국내에서도 축산물 안전성 확보를 위하여 Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) 프로그램을 도입하였고, 2003년 7월 1일부터 모든 닭 도축장에 의무적용하고 있으며, 최근 닭 사육 농가에 대해서도 신청 농장에 한하여 확대 적용 중이다. 그러나 HACCP 인증 후 위생상태의 개선 등의 조치가 미흡한 현실임.
- 농림부 고시 (개정 제 2007-88호)에 의하여 2009년 7월1일 이후 돼지 사료에 항생제 첨가를 전면 금지한 후에 돼지 설사병에 대한 발병 양상이 크게 변화함. 사료에 항생제를 첨가하던 2008년의 경우 서울대학교 수의과대학 병리학 교실에 의뢰된 1,342건의 설사병 가검물 중에서 327건 (약 24.3%)이 4주령부터 10주령까지의 이유자돈에서 관찰되는 설사병에 관한 진단 의뢰였으나 2011년의 경우 소화기 질환으로 의뢰된 가검물 1,572건 중에 무려 47.6%인 749건이 4주령부터 10주령까지의 이유자돈에서 관찰되는 설사병에 대한 진단 가검물이었음.
- 서울대학교 수의과대학 병리학 교실에 의뢰된 2011년의 이유자돈 가검물 749건의 원인체를

분석한 결과 398건 (53.1%)이 대장균에 의한 설사증으로 국내 이유자돈에서 설사를 유발하는 가장 흔한 원인체로 판단됨.

- 최근 3년간 사료에 첨가되는 항생제의 판매량은 감소하였으나, 항생제 총 사용량은 증가하고 있는데 (2010년 항생제 판매량 43,830톤, 2011년 항생제 판매량 46,007톤으로 105% 증가, 동물약품협회, 2012) 이는 사료첨가용 항생제 사용의 감소로 발생하는 질병에 대한 치료 목적으로 치료용 항생제의 사용량이 증가하였음을 의미하는 것임. 면역력 증대를 통하여 질병을 예방할 수 있는 효율적인 물질과 항생제 대체물질의 개발이 필요함.
- 항생제를 대체하기 위한 후보 물질 중에 생균제 특히, 항균효과가 우수한 유산균에 대한 연구가 유산균 자체에 의한 효과와 함께 유산균의 대사산물에 의한 효과에 대해서 활발한 연구가 진행되고 있으나 아직까지 구체적인 효과가 보고되고 있지는 않음. 특히 성장촉진제로서만 연구가 되던 유산균들에 대해 최근 장관면역을 강화하고 비특이 면역을 향상시킴으로써 병원성 미생물에 대한 잠재적 조절 기능을 갖고 있는 것으로 보고되면서 유산균의 면역조절제로서의 새로운 기능들이 밝혀지고 있음. 그렇지만, 기존의 항생제를 대체하기 위한 유산균 생균제의 경우 생산 공정이나 균주 자체의 특허 등으로 인해 국내에 소개되어 있는 제품은 많지 않으며 유산균의 특성을 효과적으로 잘 발현할 수 있는 경제적인 대량 생산 체계 구축 등 발효공정의 표준화 및 대량생산 공정 구축이 필요한 실정임.
- 유산균은 장에서의 다른 균에 대한 경쟁적 배제 뿐 아니라 IL-6, IL-10, IFN-r 등의 cytokine 발현을 조절함으로써 Salmonella 등의 세균의 증식 및 침입을 막는 역할을 하며(Poultry Science, 2012, 91: 2139-2147), pro-inflammatory cytokine의 감소 및 non-specific cell immunity 등의 향상을 통해 바이러스에 대한 방어능 또한 높이는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라 (Antiviral Research, 2012, 93: 138-143), 닭에서의 증체율 향상에도 효과가 있는 것으로 밝혀져 있어(Poultry Science, 2007, 48: 732) 면역 증강제 및 항생제 대체제로서 높은 효과가 기대 됨.
- 동물용 생균제 및 관련 제품을 수출하기 위해서는 cGMP (미국), EU-GMP (유럽)등 국제기준에 맞게 생산해야 하나 영세한 국내 벤처기업이나 중소기업에서는 시설,경비 및 인력 문제로 인해 생산경쟁력 확보에 어려움이 있어, 수출경쟁력 강화를 위한 방안으로 GMP 획득과 위탁생산전문기관 (CMO) 구축 및 운영지원 사업이 필요함.
- 고품질의 생균제 생산을 위한 CMO 구축은 농가나 생균제 수요자의 생산시설, 제조시설 운영 및 투자에 대한 초기 투자 위험 감소 등의 장점을 갖고 있고 생산의 표준화 및 품질관리 체계의 구축을 통해 균일한 품질의 생균제를 확보할 수 있음.
- 생균제의 제품화 과정에서 가장 큰 문제점은 액상발효 공정이후 제형화 공정이 필요하며 이를 위해 여과 및 동결건조를 위한 고가의 별도 설비를 확보해야 하는 문제점이 있으며 동결건조 단계 및 제형화 단계에서 균의 안정화를 위해 고가의 stabilizer (탈지유, 글루타민산나트륨, 구연산, 젓당, 트레할로스, 소르비톨 등)를 첨가해야 하며 최종 제형화 단계에서 추가 부형제를 혼합하기는 하나 적정 균수를 고려할 경우 생산량이 제한적이어서 생산, 판매단계에서 제품 경쟁력 저하의 원인이 되고 있음.
- 대부분의 생균제생 산업체들은 생균제로 사용가능한 안전한 균주의 확보와 더불어 실제 대상 축종을 대상으로 한 기능성 검증에 많은 비용과 시간을 투자하고 있으나, 균체 및 다양한 대사산물에서의 유효성분에 대한 확인 및 검증은 현실적으로 거의 이루어지지 않고 있으며 이를 통해 생산 공정 개선 등 유효성분 생산 효율을 증가시키기 위한 기술개발 또한

미미한 실정임.

- 아울러, 항생제 대체제로서의 국내 시장에서 유통되는 다양한 생균제들은 사용균종에 따른 복합효소 및 유기산과 같은 대사산물의 생산량 및 기준, 장내 균총 유지를 위한 적절한 균수 기준, 제조 유통과정에서의 보존성에 대한 기준을 비롯하여 생균제 제조 및 유통단계에서의 표준화된 평가 기준 및 평가 방법이 확립되어 있지 않은 실정임. 실제 생산단계에서는 매 생산 batch별 일정 균수 확보에 어려움으로 말미암아 제품의 품질 변이 및 기능성 측면에서의 차이가 발생하는 문제점을 가지고 있어 미생물 종류에 따른 표준화 생산 공정 확립이 시급히 요구되고 있음.
- 국내 생균제 생산업체들 중 소규모 OEM업체 외 대량생산 공정을 바탕으로 한 CMO시스템을 도입한 업체는 없으며, ㈜진바이오텍의 경우 생산기반을 바탕으로 다년간 다양한 미생물 균주에 대해 고체발효 공정을 이용한 생산시스템을 확립하고 있으며 (2003년 이후 현재까지 8,690 Batch, 59,473톤 생산실적, 총 11기의 고체발효설비 보유), 일본 및 동남아, 미주 지역에 생산제품을 판매하고 있어 기존 유통 및 판매망의 활용이 가능함.
- 고체발효 공정의 경우 현재 보편적으로 사용하고 있는 액상발효 공정에 비해 경제성 및 친환경성이 확보된 기술이며, 생산 완료 후 제품의 안정성 측면에서도 액상발효의 경우 부형제 (안정제) 등의 혼합을 통해 생균제의 핵심인 균수를 일부 유지하고 있지만, 고체발효공정으로 생산된 제품의 균수는 6~12개월 이상 안정적으로 유지할 수 있어 다량의 제품을 저비용으로 생산할 수 있는 장점이 있음.
- 항생제 대체제 시장에서 가장 효과가 입증된 균주로는 유산균이 대표적이며 유효성분으로는 보편적으로 잘 알려진 bacteriocin을 비롯하여 lactic acid, acetic acid, propionic acid 및 phenyllactic acid, indolelactic acid, methylvaleric acid 등의 다양한 형태의 유용물질의 생산에 따른 유해균에 대한 항균활성이 있는 것으로 알려져 있어 항생제 대체제로서의 이용가능성이 가장 높다고 평가될 수 있음.
- 본 연구에서는 다양한 미생물 균주를 대상으로 항생제 대체제로서의 이용가능성이 우수한 균주를 선별하고 그 균주를 대상으로 기능성 검증 및 생산 공정 확립을 확립함과 동시에 동물약품으로서 안전성 확보를 위해 생산설비에 대한 GMP 인증을 획득함으로써 위탁생산 시스템 (CMO) 구축하고자 함. 이러한 생산기반 기술을 바탕으로 국내 영세 업체를 비롯하여 국내외 대기업에 이르기까지 안정적인 OEM, ODM 생산을 위한 토대를 마련함으로써 국내 시장 뿐만 아니라 해외 시장에서의 지속 수익모델 개발을 통해 미래형 고부가가치 산업육성에 기여하고자 함.
- 아울러 제품생산에 한계가 있는 생균제 생산업체들을 대상으로 생균제 제품화 지원을 통한 수익 창출과 생균제 제품 수요자인 배합사료회사나 농장의 특화된 목적에 맞는 제품 공급을 통해 수익창출 기회를 확보함으로써 국내 농축산업의 일자리 창출을 비롯한 관련 산업 발전에 기여하고자 함.

제 3 절 연구성과 목표 대비 실적

국내 농업바이오분야 미생물제제 전문 위탁 생산 시설은 아직 없는 실정으로 기존에 우수한 제품 아이디어를 가지고 있으나 생산기반이 없어 제품화를 하지 못하는 관련농가 또는 업체들을 대상으로 체계적인 제품생산을 위한 공정 개발, 품질관리 및 제품의 성능 검증, 임상시험 등을 지원할 수 있는 시스템을 구축하였다. 특히 동물약품으로서 안전성 확보를 위해 생산설비 및 공정에 대한 GMP+FSA (GMP+ Feed Safety Assurance) 인증을 국내 사료업체 최초로 획득함으로써 보다 안전한 생균제 생산을 위한 토대를 마련하였으며, 구축된 위탁 생산 시스템을 활용한 수익창출모델 개발을 위해 생산성 개선 및 질병 예방을 위한 항생제 대체제로서 활용 가능성이 우수한 균주를 선발하고 그 균주를 대상으로 기능성 검증 및 생산 공정 확립과 동시에 양돈 및 양계에서의 임상시험을 통한 효능평가를 실시하여 개발제품의 효과 및 우수성을 검증하였다. 이러한 기술 개발을 토대로 제품화를 통한 수익 창출 모델을 개발하였으며, 기존 산업계에서 생균제로 사용되고 있는 바실러스, 유산균, 효모, 곰팡이 균주에 대한 표준 생산 공정개발을 통한 대량생산 시스템 구축을 완료하였다.

1. 주요 연구성과 요약

가. 질병예방용 유용균주 확보 및 기능성 검증 시스템 확립

본 연구를 통해 산업가축의 소화기 질병 (양돈: 대장균 설사증, 양계: 살모넬라 증)을 예방할 수 있는 유용균주인 *L. plantarum* 균주를 2종을 최종 선발하고 균주 및 유용물질의 특성평가를 완료하였으며, 양돈 및 양계 특화용 기능성 생균제로 개발하기 위해 위탁기관을 통한 *in vivo* 검증을 완료하였다.

나. 선발균주의 최적 생산공정 확립을 통한 대량생산 시스템 확립

생균제 생산을 위한 최적 발효공정 확립을 lab scale, pilot scale 및 10톤 규모의 대량생산 공정 확립을 완료하였으며, 개발제품의 저장 안정성 및 특성에 대한 평가를 완료하였다.

다. 동물용 생균제 위탁생산 시스템 확립

동물용 생균제의 위탁생산을 위해 유산균, 바실러스, 효모 및 *A. oryzae* 균주에 대한 10톤 규모에서의 생산공정 확립을 완료하고 생산 단계별 품질관리 표준설정을 통해 안정적인 제품생산공정 및 품질관리 기준 확립을 완료하였다.

라. GMP+FSA 인증 획득

안전한 동물용 생균제 생산 및 향후 수출을 고려하여 국제기준의 품질기준인 GMP+FSA 인증을 완료 (인증번호: RQA 667630, 인증일자: 2014. 12. 10)함으로써 원료부터 제품생산에 이르기까지 전 과정에 대한 품질기준 (위해요소관리기준 포함) 및 설비관리 기준을 확립하였다.

마. 산업가축에서의 유용균주 평가 시스템 확립

선발균주를 활용한 양돈 및 양계 분야에서의 *in vitro* 및 *in vivo* 수준에서의 평가를 통한 기능성 검증 시스템 확립을 완료하였다.

바. 개발제품의 상품화를 통한 수익창출

연구과정에서 개발된 제품 (제품명: *L. plantarum*, NF-8 외)의 상품화 및 기술이전을 통해 2015년 12월까지 1억 원 이상의 수익을 창출하였다. 또한, 현재 양돈 및 양계용 특화 생균제 제품 출시를 준비 중이어서 향후 매출 실적은 더욱 늘어날 것으로 기대된다.

사. CMO 운영방안 확립을 통한 생균제 생산기반 확대

본 연구의 진행을 통해 생균제 생산 공정의 표준화 및 분석방법의 표준화를 통해 다양한 위탁생산, 제품개발 및 기술지원/개발 (MOU 체결, 8건)을 통한 수익창출을 위해 노력하고 있으며, 국내외 거래처 및 농가에서의 분석서비스 (미생물 및 일반성분 분석)를 통한 다양한 형태의 지원을 실시하고 있다.

2. 정량적 성과목표 대비 실적

구분		특 허		사 업 화		홍보 전시회	유전자원 등록	논 문	
		출원	등록	상품화	CMO 사업화			SCI	비 SCI
1차년도	목표					1	4		
	달성					1	4		
2차년도	목표	1		1		2	2	1	0
	달성	1		3		2	2	0	1
3차년도	목표	4		1	1	2		2	2
	달성	4		2	4	2		2(1)*	(1)*
계	목표	5		2	1	5	6	3	2
	달성	5		5	4	5	6	3	2

* () 논문 투고 중 (SCI- 1건: Oral administration of lactobacillus confers beneficial effects against Salmonella infection in mice and chickens, 비 SCI- 1건: 1일령 육계에서 유산균제 투여로 살모넬라의 장관내 정척 억제효능 평가)

현재 상품화 및 CMO사업화는 목표 이상의 성과를 달성하였으며, 그 외 GMP+FSA 인증 1건, 고용창출 1인, 인력양성 4인의 성과를 달성하였다. 특히 상품화 부분은 현재 추가 제품에 대한 출시를 앞두고 있으며, CMO사업화의 경우 현재 8건의 MOU를 체결한 상태로 향후 추가적인 사업화가 가능할 것으로 예상된다.

<CMO사업화 및 상품화 내역>

No	제목	세부내용	상품화 (사업화)	CMO사업화
1	내열성 균주를 포함하는 생균제 개발 (제품명: NF-8, Lacto-P)	- 저가 단백질원 및 펠렛가공 용 내열성 생균제 개발 완료 - 양계 사양시험을 통한 개발제품 기능성 평가 완료	상품화 완료	
		- 발효균주 및 생산기술 지원, 제품분석 지원		CMO사업화 (완료, -기술이전), (해외 MOU 체결-2건)
2	천연소독제 개발	- 천연 소독제 개발을 위한 발효 공정(유산균, 효모) 확립을 통해 시제품 생산 완료	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중)
3	수산용 생균제 개발 (제품명: AquaPro S, AquaPro W)	- 액상발효 고농축 생균제 제조공정을 통해 시제품 생산 (기준: 유산균, 효모, 바실러스 각 1.0×10^9 cfu/g 이상)	상품화 완료	해외 MOU 체결
4	고농축 생균제 생산 (LP-10, BL-10, PP-10)	- 액상발효 고농축 생균제 제조공정을 통해 제품 생산/공급 (기준: 유산균 3.0×10^{10} cfu/g 이상) - 신규 생균제 제품개발	상품화 완료	국내 MOU 체결
5	애견사료 개발	- 탄수화물 source를 이용한 <i>A. oryzae</i> 생균제 개발		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
6	축사환경개선용 미생물 제제 개발 (제품명: 락토플랜-아몬드피)	- 아몬드피를 활용한 유산균 생균제 개발		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
7	곰팡이 독소 저감제 개발	- 곰팡이 독소 분해/저감제 개발		CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
8	기능성 생균제 개발	- 양계용 생균제 개발	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
		- 양돈용 생균제 개발	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
9	소독제 개발	- 신규 소독제 개발 및 공동마케팅		CMO사업화 (국내 MOU 체결)
10	<i>Aspergillus</i> 종균 개발	- 고체발효용 종균 생산/공급	상품화 완료	
11	생균제 생산 지원	- 발효균주 및 생균제 생산/품질 관리기술 지원		CMO사업화 (진행 중, 기술이전), (해외 MOU 체결)
12	축우용 유산균 발효촉진제 개발	- 축우용 유산균 발효촉진제 개발	상품화 완료	
13	복합생균제 생산 (제품명: Glukozy m)	- 유산균, 효모, 바실러스 균주로 구성된 복합생균제 생산 (매월 20톤 이상 생산)		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
14	기능성 생균제 생산	- 미세조류 혼합 생균제 생산 (제품화 가능성 평가 중)		

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

오래전부터 미생물자원이 경제동물 생산에 이용되어 왔으며, 동물 사육 및 생산물 가공 산업의 급격한 발전과 더불어 미생물자원의 역할이 더욱 확대되어 왔고 미생물 자원의 이용 예로는 동물용 급여 생균제제(probiotics), 동물의 질병치료를 위한 항생물질, 항생제 대체용 미생물 유래 생리활성물질, 사료곡물의 이용성 증가 및 동물의 생산성 향상을 위한 미생물 유래 효소제, 발효유제품 및 육제품, 사일리지 생산에 사용되는 유산균, 미생물 유래의 기능성 색소, 동물생산과정에서 발생하는 폐수 및 분뇨의 생물학적 처리 등 동물산업의 거의 모든 분야에 미생물이 밀접하게 관여하고 있다.

축산용 생균제의 경우에도 이미 바실러스, 효모, 유산균 등 다양한 생균제 제품들이 판매되고 있으나 단순 경제성만 고려하여 급여하거나 작용기작 및 효능이 불분명한 경우가 많으며 항생제와 혼용 시 효과가 저감되거나 가공단계에서 생균제의 안정성이 낮아지는 경우가 많았다. 또한 기존 시장은 여러 가지 제품들이 난립되면서 과학적이며 객관적인 판단기준이 없어 가격이 저렴한 제품들만 선택하려는 시장의 반응에 따라 제품의 품질도 점점 낮아져 가고 있는 상태이다. 하지만 최근 친환경 축산에 대한 관심 증대와 배합사료 내 항생제 사용금지 시행되면서 생균제의 역할과 중요성이 다시 인식되어 지고 있다.

동물 질병 억제를 위한 친환경적 바이오제제에 대한 연구, 특히 항생제와 유사한 항균효과에 초점을 맞추어 개발되었으나 아직까지 항생제 대비 경제성과 효능을 가진 확실한 소재들을 확보하지 못하였고 현재는 농장 상황에 따라 사료첨가 또는 음수용 등으로 다양한 제품들이 사용되고 있는 실정이다. 대표적인 소재들로는 유기산, 중쇄지방산, 효소제, 생균제, 에센셜오일 등이며 여러 가지 제품들이 단일 또는 복합제제로 개발되어 시장에 판매되고 있으나 그 사용기준 및 효능에 대해서 명확하지 못한 상태이다. 이들 연구 중 최근에는 유산균에 집중되고 있으며 균주가 가진 특성뿐만 아니라 발효 과정 중 생성되는 발효 산물들의 효과에 대해서도 연구가 진행되고 있으며, 성장촉진제로서 연구가 되던 유산균들에 대해 최근 장관면역을 강화하고 비특이 면역을 향상시키므로써 병원성 미생물에 대한 잠재적 조절 기능을 갖고 있는 것으로 보고되면서(Isolauri 등, 1993; Kaila end, 1992; Hamid 등, 2006) 유산균의 면역조절제로서의 새로운 기능들이 밝혀지고 있다. 특히 생균자체로 뿐만 아니라 그람양성균의 세포벽 성분 중 하나인 리포테이코산 (LTA)은 일반적으로 글루코스 또는 D-알라닌 치환체를 갖는 폴리인산글리세롤 및 당 단위와 지방산 사슬을 포함하는 당지질의 두 개의 구조체로 구분되는데, 이 중 폴리인산글리세롤의 D-알라닌 함량에 따라서 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인의 발현이 조절된다고 알려져 있으며, 최근 장내균총 개선효과외에 면역증강, 피부미용, 체지방감소 등 다양한 형태의 제품이 개발되어 상용화되고 있다.

유럽에서 시작된 항생제의 규제는 이제 전세계적으로 규제를 추진하고 있으며, 한국도 2007년 이후 항생제의 사용을 점진적으로 규제하였으며, 2011년 이후 대부분의 항생제를 사료 첨가제로 금지하였다. 미국은 식품의약품안전국(FDA CVM)의 AGPs 사용금지를 둘러싼 최신 동향에 중대한 동향 변화를 나타내는 보고서가 공식적으로 확인됨에 따라 향후 3년의 유예기간 안

에 FAC에 등재된 모든 사료첨가제에 대해서 수의사처방에 의해서 사용할 것과 제조회사가 자율적으로 생산량을 감축시킬 것을 권장하는 결정을 내림으로써, 향후 사료첨가제의 일방적인 감축을 줄기차게 반대해온 생산자 단체와 수의학자들의 새로운 대응이 주목을 받고 있다. 중국은 2014년 7월 1일부로 사료표준 수정안을 발표하여 사료 첨가제에 대한 규제를 강화하고 있다.

국내외적으로 항생제 사용금지 및 규제가 강화되고 있으며 유럽연합 (EU)의 경우 항생제 대체제로 유기산제, 생균제, 효소제, 식물성 추출물 등의 연구가 활발히 진행되고 있으며, 2001년 성장촉진제 및 항생제 대체물질로 potassium diformate를 최초로 승인하였으며, 13종의 생균제를 항생제 대체물질로 승인한 상태이다. 또한, 유기산과 essence oil을 이용한 항생제대체 자돈 설사 치료제를 개발하여 상용화되고 있다.

특히 측면에서는 최근 항생제 대체제로서의 생균제에 대한 관심이 고조되면서 현재 국내뿐만 아니라 해외에서도 활발하게 관련분야에 대한 연구가 진행되고 있다. 면역활성, 발암물질에 의한 DNA 손상억제, 항생효과, 항바이러스 효과 등 생균제의 많은 효과에 대해 연구가 진행되고 있으나, 기존의 특허들은 많은 부분이 실험관 내 시험이 주로 진행되었고, 생체에서의 효능 확인도 생산성 향상에 대한 평가로 치우쳐 있다. 특히, 양돈 및 양계 분야 생균제에 관련된 특허의 대부분은 단순 균주의 효과 및 특정 균주를 활용한 생균제의 제조방법 또는 조성물 (주요특허 1020030062297, 1020050089669, 1020110002613)에 치우쳐져 있으며, 본 연구에서와 같이 현재 국내와 국외에서 가장 흔한 세균 병원체인 장내독소 대장균과 살모넬라균에 대한 효능에 관한 특허를 공격 접종 등을 통한 병리조직학적 병변, 생산성 증대 등 효능 중심의 연구를 통한 기술개발 및 특허출원은 전무한 실정이다.

논문측면에서는 항생제 대체물질에 대한 관심이 고조되면서 현재 국내외적으로 활발하게 생균제에 대한 연구가 진행되고 있다. 다만 국외의 경우 항생효과를 보이는 기전에 대한 연구도 비교적 활발하게 진행되고 있지만 국내의 경우 주로 효과검정 분야에 치우쳐 있으므로 각종 생균제의 작용기전에 대한 추가적인 연구개발이 필요한 실정이다. 또한, 기존의 연구들에서 설정한 생균제의 종류, 첨가량, 급여형태 등에 따라 효과에 차이를 보이는 경향이 있으므로 이러한 요소들을 종합적으로 고려하여 최적의 효과를 낼 수 있는 생균제의 활용체계에 대한 연구가 미흡한 실정이다. 특히 국내에서는 생산성 향상에 관한 연구를 위주로 생균제에 관련된 연구들이 주로 이루어 졌으나, 본 연구에서와 같이 생산성 향상을 위한 생균제 뿐만 아니라 질병 예방 목적의 기능을 평가하기 위하여 현재 국내에서 유행중인 세균성 질병 예방에 대한 공격접종 실험 등을 수반한 종합적인 평가가 반드시 이루어져야 할 것이다. 또한, 생균제에 대한 돼지에 대장균(Vet Microbiol 141:142-148, 2010와 Vet Ther 8:209-222, 2007) 연구의 경우 수많은 대장균중 하나의 대장균만의 예방 효과 및 포유자돈을 이용하여 예방 효과에 대한 연구는 많이 진행되고 있으나, 국내에서는 이유자돈에서 대장균 설사증이 발병이 증가하고 있기 때문에 이유자돈에서 다양한 대장균에 대한 예방 효과에 대한 검증연구가 미흡한 실정이다.

현재 출시된 제품에 대해 국내 및 국외시장을 분석결과 효모 배양물, 바실러스균주, 유산균주 및 이들의 복합균주를 바탕으로 한 생균제 제품의 생산 및 판매가 주로 이루어지고 있고, 현재 연간 2 ~ 5% 수준에서 지속적인 성장을 하고 있는 상황이다.

본 연구개발을 통해 세균성 질병을 유발하는 대장균 및 살모넬라 균주에 대한 항균활성을 가

지는 유산균 균주를 선발하고 제품화 함으로서 기능성이 강화된 사료첨가제 개발을 통해 기존 시장에 유통중인 제품의 저장안전성 및 효과측면에서 차별화된 제품개발을 완료하였으며, 이를 통해 양돈 및 양계의 설사 및 괴사성 장염 등을 예방할 수 있는 생균제 제품을 생산함으로써 국내 및 국외 시장에 판매할 예정이다. 아울러 본 연구를 통해 생균제를 개발함과 동시에 생산 규모가 영세한 업자를 위한 표준 생균제 생산 공정의 개발 및 품질관리 지원 등을 통해 보다 안정적으로 생균제를 생산할 수 있는 기반 구축을 위한 기술지원 서비스를 확대하여 위탁생산시설 (CMO) 구축을 통해 선발한 균주의 제품화 및 생산 기반 확보로 수요자별 특화된 제품을 생산, 공급함으로써 생균제 시장의 다양화 및 발효사료 사업의 규모 확대를 통한 새로운 시장 수요 창출에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

제 2 절 국내외 시장 현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

가. 동물용 생균제 시장 현황

1) 동물용 의약품 분야

동물용 의약품 분야의 생균제 시장현황은 단일 균주 제품과 2 ~ 4종의 균주를 혼합한 제품으로 구성되어 있다. 2012년 동물약품협회 보고에 의하면 2011년 동물용 생균제품의 총 매출액은 32.3억이고 물량으로는 1,485.0톤이다. 동물용 생균제 품목은 총 98개 품목이 판매되고 있으나 이들 제품 중 주요 균주는 효모균주인 *saccharomyces cerevisiae*로 판매 물량기준으로 MS 23.1%를 점유하고 있다. 그 외 균주에는 *bacillus subtilis*와 *lactobacillus* 계열이 있다. 동물용 의약품 분야에서 생산되고 판매되는 제품들을 상위 17개사 제품을 기준으로 분석한 결과 대부분 단일 균주로 판매되고 있다 (62.3%). 단일 균주 제품 중이 본과제를 통해 접근하고자 하는 유산균 제품의 판매는 다른 균주에 비해 매출 규모가 상대적으로 낮은 상황이다.

균주	2011년 판매량 (kg)	MS (%)	비고
<i>Bacillus subtilis</i>	205,664	28.19	단일 균주 제품 : 62.3%
<i>C. butyricum</i>	115,931	15.89	
<i>Lactobacillus spp.</i>	65,519	8.98	
<i>S. cerevisiae</i>	342,400	46.97	복합 균주 제품 : 37.7%
BA+SC+LA	440,862	37.67	
합계	1,170,376	100.0	

(동물약품 협회, 2012)

동물용 의약품 분야에서 생균제 주요 생산 업체는 다음 표와 같다. 그중에 효모 배양물을 생산하고 있는 (주)제일바이오의 생산량이 가장 많은 것으로 보고되었고, 상위 10개사에서 생산하는 생균제가 전체 생균제 판매량의 71.0%를 차지하고 있다. 이러한 결과는 몇몇 회사를 제외하고 생균제 판매 및 생산업체가 영세한 규모임을 예상할 수 있겠다.

회 사 명 (상위 10개사)	당년누계 수량 (kg)	M/S (%)
(주)제일바이오	295,400	28.01
(주)한동	228,968	21.71
(주)대호	180,621	17.13
(주)에스에프	78,439	7.44
(주)대성미생물연구소	65,519	6.21
우진비엔지(주)	47,205	4.48
이화팜텍(주)	47,000	4.46
(주)남전물산	40,660	3.86
(주)제이비솔루션	36,620	3.47
(주)대성미생물연구소	34,207	3.24
합계	1,054,639	100

(동물약품협회, 2012)

2) 보조사료 분야

보조사료 분야의 생균제 생산업체 2011년 현재 총 49개사가 12,622톤의 생균제를 생산 공급하고 있는 것으로 나타났다 (단미사료협회 편람, 2012, 섬유질 발효사료 부분 제외). 그중 생산량을 기준으로 상위 10개사가 생산하는 물량이 전체의 70.1%인 8,850kg으로 대부분의 생균제를 상위 일부 회사가 생산하는 것으로 확인되었다. 동물용 의약품으로 판매되는 생균제와 같이 보조사료 생산의 경우도 상위 10개사를 제외하고는 생산 규모가 영세한 상황일 것으로 판단된다.

회 사 명 (상위 10개사)	2011년	M/S (%)
(주)농협사료 NH바이오	2,228	25.2
(주)엠케이생명과학	1,238	14.0
(주)진바이오텍	1,180	13.3
(주)비비코리아	828	9.4
시너빅	816	9.2
(주)퓨전바이오	531	6.0
(주)바이오토피아	522	5.9
(주)씨티씨바이오	509	5.8
청미바이오(주)	507	5.7
(주)넬바이오텍	491	5.5
합계	8,850	100

(단미사료협회, 2012)

한편 보조사료에 사용하고 있는 균주의 종류나 특징을 확인하기는 어려운 상황이나 동물용 의약품분야의 균주와는 큰 차이가 없이 유산균류, 바실러스, 효모 및 유익 곰팡이인 *A. oryzae* 등일 것으로 판단된다. 왜냐하면 사료법상에 규정되어 있는 균주에 한해 보조 사료로 생산가능하기 때문이다.

보조사료로 생산된 생균제가 동물용 의약품으로 생산된 생균제보다 (12,622톤 vs 1,485톤) 더 많은 것을 확인할 수 있었는데, 이러한 이유는 보조사료로 생산되는 제품의 경우 대부분 배합 사료의 원료로 사용되고 있기 때문이다. 주요 생산 업체는 위의 표와 같이 농협사료NH바이오와 엠케이생명과학, 본과제의 주관 기관인 진바이오텍이 있다.

나. 국외 제품생산 및 시장 현황

국외 생균제 시장의 현황은 현실적으로 조사가 어려운 실정이다. 다만, 시장규모에 대한 예측을 조사한 결과 지속적으로 생균제 시장 규모가 증가할 것이라는 경향이 지배적이다. 최근 자료에 의하면 세계적인 가축용 생균제 시장의 규모는 6억 달러 규모로 추산된다고 보고되었는데 (FeedInfo, 2009), 항생제 규제 및 자연친화적 사육환경을 조성하기 위한 목적으로도 생균제 시장 규모는 지속적으로 증가할 것이다. 특히 항병력이나 면역활성 등을 갖는 기능성 생균제의 요구는 더 증가할 것으로 예상된다.

다. CMO 시장현황

국내외 CMO 시장은 현재까지 바이오, 제약분야에서 활성화되어 있으며, 글로벌 제약 CMO 시장은 세계 의약품 시장규모의 약 3% 내외로 추정되나, 연평균 성장률 10.8%로 매우 빠른 성장세를 보이고 있다. CMO 시장의 성장은 제네릭 확산 및 의약품 특허만료 증가, 생물제제 소비 증가 및 바이오 시밀러의 시장 진입에 따라 더욱 커질 것으로 예상되고 있다. 한국보건산업진흥원의 '글로벌제약 CMO 동향과 전망' 보고서에 따르면 세계 제약기업의 전체 제조비용은 연간 1500억~1900억달러에 이를 것으로 추산되고 있으며, 이로인해 CMO가 더욱 발달할 것이라고 예상하고 있다. 제약분야에서의 CMO활용 요인으로서는 기술·설비(30%), 비용절감(22%), 사업성장(16%), 효율성(12%) 확보 순으로 기술설비활용 및 비용절감 측면이 아웃소싱을 하는 주요 요인으로 분석되고 있다.

글로벌 CMO시장은 미국, EU-5(영국, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인) 등 선진국이 약 68%로 높은 점유율을 보이고 있으나, 근래 중국, 인도 등 이머징마켓(emerging market)과 동유럽 국가가 점유율을 빠르게 확대하는 추세이다.

반면, 농식품 분야는 민간부문의 연구기반이 취약한 구조적 한계가 있어 농림수산식품 산업의 민간 R&D 기반구축 및 투자활성화 촉진을 위한 CRO 전문기관과 생산 기술·시설 서비스를 담당할 CMO전문기관에 대한 육성의 필요성이 증대되고 있으며, 관련시장도 꾸준히 증가할 것으로 기대된다.

제 3 절 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1. 산업화 방향

가. 제품화 분야 : 안전하고 안정적인 유산균 생균제 산업화

대상 축종	제품 특징	기대 효과
양 계 용	살모넬라증에 효과적인 유산균 생균제	만성적으로 사료효율을 저하시키는 세균성 질병 등을 예방함으로써 사료비 절감, 사육성적 개선 등의 효과 기대
양 돈 용	독소형 대장균성 설사 예방용 생균제	자돈 (포유 및 이유자돈)과 육성돈 단계의 설사 예방을 통한 증체 및 사료효율 개선으로 농가 수익향상 효과가 기대

나. CMO 분야 : 위탁생산 기반의 구축으로 OEM 및 ODM 생산을 통해 생산기술의 저변 확대와 함께 종균 선발 및 관리 기술의 기반을 구축할 수 있는 효과가 있으며 향후 기술사업화도 가능할 것으로 예상됨.

사업 분야	특 징	기대 효과
OEM	수요자의 제품설계에 근거한 생균제 생산	생산공정 및 품질관리를 통한 수요자가 설계한 제품의 생산을 통해 생산 기반의 저변 확대 가능. 수요자별 균주 관리 기술 다양화 가능
ODM	자체보유한 제품 설계 기술 및 생산 기반을 바탕으로 한 위탁생산	보유한 균주 혹은 수요자의 요구에 부합하는 균주를 대상으로 제품 개발에 대한 기술 확보 가능. 균주 선발 기술 보유로 기술우위 선점 가능 및 수출 경쟁력 확보 가능. 특정 종균에 대한 관리 기술 확보 가능

2. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	1,005	1,675	2,679	3,349	4,019	12,727
경제적 파급효과	20,587	20,915	21,249	21,590	21,939	106,280
부가가치 창출액	300	600	1,000	1,500	2,000	5,400
합 계	21,892	23,190	24,926	26,439	27,958	124,407

- 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

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 항생제 사용현황 조사

2011년 7월 이후 적용되는 배합사료의 항생제 사용 규제에 따라 항생제 대체 제제 시장에 대한 관심이 점점 증가하고 있는 추세이며, 가장 대표적인 항생제 대체 제제는 생균제 (probiotics)를 들 수 있다. 생균제의 역할은 작용기전 측면에서 명확히 밝혀 있지는 않지만, 장내에 존재하는 미생물의 균형을 조절함과 동시에 병원성 미생물의 증식이나 체내 침입을 억제하는 작용을 하며, 특히 숙주의 면역 기능 (선천성 및 후천성 면역 기능) 및 가축의 생산성을 향상시키는 것으로 보고되고 있다. 동물 질병 억제를 위한 친환경적 바이오제제(생균제)에 대한 연구는 최근 유산균에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 균주가 가진 특성뿐만 아니라 발효 과정 중 생성되는 발효 산물들의 효과에 대해서도 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 기존의 항생제를 대체하기 위한 유산균 생균제의 경우 생산 공정이나 균주 자체의 특허 등으로 인해 국내에 소개되어 있는 제품은 많지 않고 효과적인 유산균의 특성을 잘 발현할 수 있는 경제적인 대량 생산 체계도 확립되어있지 않은 실정이다.

현재 국내 시장에서의 항생제 사용현황은 지속적으로 감소되고 있는 추세에 있으며, 2012년 축산용 항생제 전체 사용량은 약 936톤으로 2001년 대비 약 41% 감소하였다. 반면, 항생제 대체를 위한 효과가 명확하게 검증된 고품질의 생균제는 거의 미미한 수준이나, 항생제 대체제로서의 장내 정상 균총 확보, 면역 활성화 증진 효과 등 다양한 장점을 가지고 있어 전체 생균제 생산은 조금씩 증가하고 있는 추세로서 향후 항생제 대체제로서의 주요 역할을 담당할 것으로 기대된다.

표 1. 연도별 항생제 판매 실적

	연도별 항생제 판매실적(kg)									
	2001년	2003년	2005년	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
총 사용량	1,594,963	1,438,533	1,553,482	1,457,808	1,526,713	1,210,616	998,167	1,046,912	956,291	936,369

(출처 : 한국동물약품협회)

축종별로는 돼지, 닭, 수산용 순으로 많이 사용되고 있으며, 소에 비해서 상대적으로 사육환경이 열악한 돼지와 닭에서 항생제 사용량이 많은 실정인 것으로 확인되었다.

표 2. 축종별 항생제 판매 실적

구분	연도별 항생제 판매실적(kg)									
	2001년	2003년	2005년	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
소	91,921	107,588	111,974	118,889	121,254	99,291	63,066	57,443	57,726	65,456
돼지	917,842	818,358	831,319	835,825	874,305	661,530	551,109	581,507	459,320	448,676
닭	358,825	347,538	334,937	281,797	280,499	256,272	205,622	204,472	199,929	194,309
수산용	226,375	165,049	275,252	221,297	250,655	193,523	178,370	203,490	239,316	227,928
계	1,594,963	1,438,533	1,553,482	1,457,808	1,526,713	1,210,616	998,167	1,046,912	956,291	936,369

(출처 : 한국동물약품협회)

표 3. 항생제 종류별 판매 실적

항생제 (계열)	연도별 항생제 사용량(kg)									
	2001년	2003년	2005년	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
Tetracyclines	752,386	723,698	723,476	629,984	624,236	470,946	287,712	283,830	308,206	281,974
Penicillins	114,466	130,016	229,462	225,089	266,968	170,721	150,589	145,466	154,724	189,748
Sulfonamides	237,012	180,651	200,010	184,259	183,209	157,455	92,122	116,797	100,334	102,273
Macrolides	59,370	47,642	55,325	74,486	75,342	68,556	88,124	90,638	60,273	55,924
Quinolones	44,645	32,726	52,854	47,637	56,585	51,257	37,418	46,102	51,066	49,149
Ionophores	72,900	61,737	63,056	51,192	58,744	46,947	51,366	35,858	52,527	47,618
Polypeptides	22,798	24,729	34,133	35,198	38,889	43,581	96,532	117,010	56,776	10,236
Phenicols	1,641	9,955	24,918	28,268	34,367	35,892	54,543	63,882	59,238	83,423
Aminoglycosides	67,088	78,775	71,863	82,130	93,727	73,188	51,209	58,975	46,185	46,071
Pleuromutilins	17,021	15,079	18,170	22,648	21,195	20,015	35,025	34,578	22,426	17,740
Lincosamides	9,734	9,848	14,433	18,084	16,373	12,048	5,674	6,886	7,506	9,172
Cephems	688	9,545	2,169	3,297	1,962	2,694	3,163	4,980	5,650	7,759
Streptogramins	6,842	4,253	4,926	4,522	4,942	5,081	8,164	5,913	3,159	889
Orthosomycins	5,463	5,405	4,039	4,660	5,429	5,203	5,566	4,214	1,261	143
Glycolipid	4,551	4,940	2,980	2,407	2,341	1,971	2,469	2,099	897	459
Quinoxalines	80,990	29,608	15,592	9,987	13,070	18,008	4,601	0	0	0
Nitrofurans	87,393	63,034	0	0	0	0	0	0	0	0
Others	9,975	6,892	36,076	33,960	29,334	27,053	23,890	29,684	26,063	33,791
계	1,594,963	1,438,533	1,553,482	1,457,808	1,526,713	1,210,616	998,167	1,046,912	956,291	936,369

(출처 : 한국동물약품협회)

항생제 중에서 tetracycline 계열이 전체 사용량의 약 30-50%로 사용량이 조금씩 줄고는 있으나, 현재까지 사용량이 가장 많은 것으로 확인되었다.

표 4. 생균제 생산 현황

(단위: 톤)

월	연도		
	2011년	2012년	2013년
1월	1,973	2,616	2,915
2월	1,348	2,560	2,489
3월	2,448	2,717	2,792
4월	2,489	2,667	2,785
5월	2,371	2,596	2,864
6월	2,466	2,647	2,386
7월	2,320	2,407	2,405
8월	2,456	2,276	
9월	2,678	2,524	
10월	2,627	2,572	
11월	2,794	2,747	
12월	2,811	2,790	
계	28,781	31,119	18,636

제 2 절 항균활성 보유 유용균주 선발

유산균의 선발은 다양한 미생물 군총이 존재할 것으로 예상되는 과일, 채소 및 이의 발효물과 건강한 자돈 및 가금류의 장에서 채취한 분변 샘플 및 전통 발효식품 등을 대상으로 하였다. 선발 방법은 각 샘플을 0.85% NaCl이 첨가된 멸균 생리식염수에 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 으로 각각 희석하여 100 μ l씩 탄산칼슘이 함유된 MRS 한천 배지 (protease peptone 10 g/L, beef extract 10 g/L, yeast extract 5 g/L, glucose 20 g/L, Tween 80 1 g/L, sodium acetate 5 g/L, ammonium citrate 1 g/L, magnesium sulfate 7H₂O 0.1 g/L, man ganese sulfate 0.05 g/L, dipotassium phosphate 2 g/L, agar 15g/L)에 도말 하고, 도말된 배지를 유산균의 성장에 적합한 조건인 30°C에서 48시간 동안 배양을 하였다. 48시간 경과 후 배양된 배지를 관찰하여 균체 주위에 투명한이 생성된 colony 120여종을 1차 선발하였다 (그림 1).

1차 선발균주를 대상으로 일반적으로 가축에 질병을 유발하는 병원균인 대장균(*E. coli*), 살모넬라(*S. gallinarum*, *S. entritidis*), 클로스트리디움(*C. perfringens*) 균주를 대상으로 항균활성 평가를 통해 병원성 지표균주에 대한 항균활성이 우수한 균주를 2차 선발하였다 (그림 2). 항균활성 평가를 통해 최종 15종을 선발하였다 (표 5). 선발한 15종을 모두 16S rRNA sequencing을 통해 균주 동정을 실시하였으며 그 결과를 표 6에 나타내었다. 균주 동정 결과 선발 균주 15종 중 *L. pentosus* 및 *L. curvatus* 균주를 제외한 나머지 13종은 모두 *L. plantarum* 으로 동정되었다.

2차 선발균주는 *in vivo* 기능성 평가 및 평가 모델 확립을 위해 위탁기관인 건국대학교 및 서울대학교에 각각 전달하였다.



그림 1. 유기산 생성능 평가를 통한 1차 유산균 균주 선발 (CaCO₃ 1% 첨가 배지)

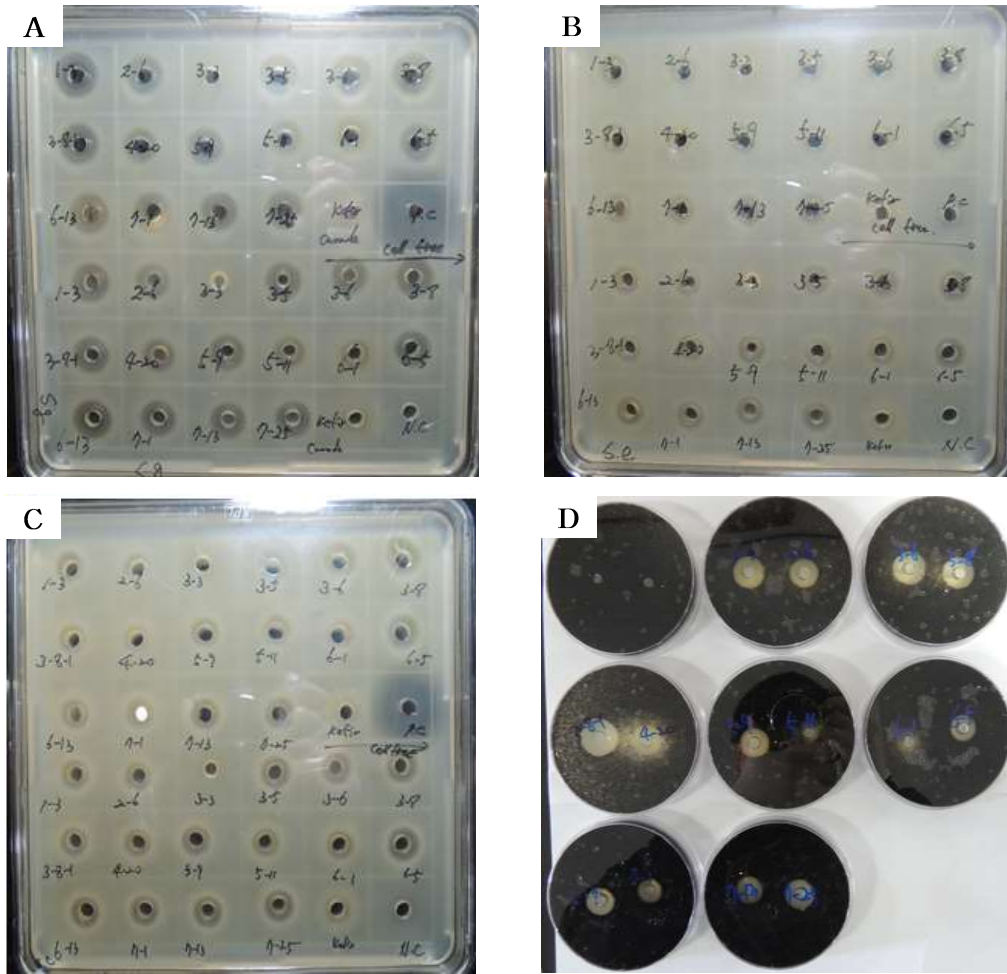


그림 2. 항균활성 평가를 통한 2차 균주 선발
 (A: *Salmonella gallinarum*, B: *S. enteritidis*, C: *E. coli*, D: *Clostridium perfringens*)

표 5. 2차 선발균주의 병원성 균주에 대한 항균활성 평가 결과

Strains	지표균주 별 항균활성			
	<i>E. coli</i>	<i>S. gallinarum</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>C. perfringens</i>
1-3	++	++	++	+++
2-6	++	++	++	+++
3-5	++	++	++	+++
3-6	+++	+++	+++	+++
3-8	+++	+++	+++	+++
3-8-1	++	++	++	+++
4-20	++	++	++	+++
5-9	++	++	++	+++
5-11	++	++	++	+
6-1	++	++	++	+
6-5	+++	+++	+++	++
6-13	+++	+++	+++	+++
7-1	++	++	+++	++
7-13	+++	+++	+++	+++
7-25	++	+++	+++	+++

표 6. 2차 선발균주의 16S rRNA sequencing 분석을 통한 균주 동정 결과

Strains	동정결과	Homology (%)	Sequence
1-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	84.2	gccgcaggggcaatctgcagtcgacgaactctggtatgattgggtcttgcacatgattacattttagtgagtgCGGAActGGTGAGTAAACAC GTGGGAAACCTGCCAGAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCT GGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCgCGGCTATTAG CTAGATGGTGTAGTAACGGCTCACCAATGGCAATGATACGTAGCCGACTGAGAGGGTAAATCGGCCAC ATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACG AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGTCTGAAAACCTCGTGTGTTAAAG AAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTAAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTGTGCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCG CAGGGCGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGA AACTGTGAGTGCAGAAAGAGCAGTGAACCTTGTGTAGCGGTAAGATCGGTAGATATATGGAAG AACACCAGTGGCGAAGCGGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCGTGAAGTATGGGTAGCAA ACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCC CTTACGTGCTGCAGTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTGAAAACCTCAA AGGAATGACGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGACTACGCGTAACGGCAAC TTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAACTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG GTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGTGAGACTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGTCAACCTCGGTACA ACGAGTTGCGAACTCCGAGAGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCA ACTCGCTACATGAAGTCGGAACTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCG GGCCTTGTACACACCGCCCTCACACCATGAGAGTTGTaAcACCCAAAGTCGGTggggTAACCTTTtag ccagccgctAAGTgggacagatgattAGGgtgagtcaaanngggggggcccaaaaa
2-6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	93.5	cccggtacgggcaaatgcagtcgactctggtatgattgggtcttgcacatgattacattttagtgagtgCGGAActGGTGAGTAAACA CGTGGGAAACCTGCCAGAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCT TGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCgCGGCTATTAG GCTAGATGGTGTAGTAACGGCTCACCAATGGCAATGATACGTAGCCGACTGAGAGGGTAAATCGGCC ACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGA CGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTGTGTTAA AGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTAAACCAGAAAGCCACGGCTAACT ACGTCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTGTGCCGATTATTGGGCGTAAAGCGGAG CGCAGGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGG GAAACTGTGAGTGCAGAAAGGAGCAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAATCGGTAGATATATGGA AGAACACCAGTGGCGAAGGGCGGTCTGTGGTCTGTAAGTACGCGTGAAGTATGGGTAGC AAACAGGATTAGATACCTGGTATGTCCTATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGGAGGGTTCCG CCCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTTCGGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAAACCT AAAGGAATTGACGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAAATTCGAAAGCTACCGAAGAA CTTACCAGGCTTGCATACACTATGCAAACTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATAACA CGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCC TTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGTGAGACTGCCGTGACAAACCGGAGGAAG TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTAC AACGAGTTGCGAACTCCGAGAGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCA AACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCC GGCCTTGTACACAcgccccgacacatgagaagtgttaaCACCCAAAGTcgggtgggtaacttttaggaaccagcccgctaggtggg acagatgtaggtgagtcfaanngggggnnntccctattnn tggggtngggngttgttt
3-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90.1	ggctgaagcgtatagcagtcgacgaactctggtatgattgggtcttgcacatgattacattttagtgagtgCGGAActGGTGAGTAAACA CGTGGGAAACCTGCCAGAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCT TGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCgCGGCTATTAG GCTAGATGGTtaggtAACGGCTCACCAATGGCAATGATACGTAGCCGACTGAGAGGGTAAATCGGCCAC ATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGAGC AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTGTGTTAAAG AAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTAAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGCAAGCGTGTGCCGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCG CAGGCGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGA AACTGTGAGTGCAGAAAGGAGCAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAATCGGTAGATATATGGAAG AACACCAGTGGCGAAGGGCGGTGTCTGGTCTGTAAGTACGCGTGAAGTATGGGTAGCAA ACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCC CTTACGTGCTGCAGTAAACCAITTAAGCAITTCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA AGGAATTGACGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAAGTACGCGAAGAACC TTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAACTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG GTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGGGAAGGT TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGTGAGACTGCGGTGACAAACGGGAGGAAAGT GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACA ACGAGTTGCGAACTCCGAGAGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCA ACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCG GGCCTTGTACACACCGCCCTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTgggGGAACCTTT AGGAAcagcgccccaaagtgggacagatgattgggtgagtcanngggggggggcccaaaaaannnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnnnnnngnnngnnngnnngngggggg
3-6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.7	cctgCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGT GCTTGCATCAAGATTATACATTTGAGTGTGGCGAACTGGTGAATAACACGTGGGAAACCTGCCAG AAGCGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAG TTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCgCGGCTATTAGCTAGATGGTGTAGGTAAC

			GGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC GGCCAACTCCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCA ACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTGTTAAAGAAGAACATCTGAGA GTAACCTGTCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTCGTCCAGCAGCCGG TAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTATTTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTAAGT CTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTCGGAAACTGAGTGCAGAAAG AGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAG GCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTAGCGTGGAGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCC TGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGTGCAGCTA ACGCATTAAGCATTCGGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCG CCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCITACCAGGCTTGTGACAT ACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCT CAGCTCGTGTCTGAGATGTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCA TTAAGTTGGGCACTCTGGTGAAGTGCAGCTGCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATC ATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGATGGTACAACAGATGGCAACTCGC GAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCAATTCAGTTCGGATTGAGGCTACGCTCCGCTACAGTAAAGT CGGAATCGTAGTAATCGCGATCAGCATGCCCGggtgaatACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCCG TCACACCATGgagGTTGTAACCCAAAGtgggGgGtaacCTTTAggAAcAgccctaaagggggacagatgatta nggtgagtcannnnnggggggcccctaaa
3-8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90.1	ccccgagggcgaatgacgagcgaactcggtagattggtgctgcatcatgattacattgagtgagtgCGAACTGGT GAGTAACA CGTGGGAACTGCCAGAAAGCGGGGATAACACTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACA ACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGTATCAGTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAG CTAGATGGTgagGTAACCGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAACTCGGCCAC ATTGGGACTGAGACACCGCCAAACTCCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACG AAAGTCTGATGGAGCAACCGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTGTTAAAG AAGAACAATCTGAGAGTAACCTGTTACGTTATGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTAC GTCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATGGCGGTAAGCGAGCG CAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGA AACTTGATGTCAGAAAGAGCAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAG AACACCAGTGGCAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA ACAGGATTAGATACCCCTGGTATCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCC CTTACGTGTCTGAGCTAACGCATTAAGCATTCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA AGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGTACGCGAAGAACC TTACCAGGCTTGTACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG GTGGTGCATGGTTGTCTGACGCTGTGTCTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTGGGCACTCTGGTGTGAGACTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT GGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGATGGTACA ACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGATGGCTGCA ACTCGCTACATGAAGTGGAACTCGTATGTAATCGCGGATCAGCATGGCGGCTTCCGCTACCGG GGCCTGTACACACCGCCCTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCCGtggGTAcCTTTTA ggaaccagcgcCTAaggtgGacagatgattaggtgatcannnnnggggggcaaaaaaannnnnnnnnnnnnnnnnn nnnnnnngngggg
3-8-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	90.1	ccggagcgggcaatgacgagcgaactcggtagattggtgctgcatcatgattacattgagtgagtgCGAACTGGT GAGTAACA GTGGGAACTGCCAGAAAGCGGGGATAACACTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACA ACTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGTATCAGTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAG CTAGATGGTgagGTAACCGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAACTCGGCCAC ATTGGGACTGAGACACCGCCAAACTCCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACG AAAGTCTGATGGAGCAACCGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTGTTAAAG AAGAACAATCTGAGAGTAACCTGTTACGTTATGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTAC GTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATGGGCGTAAAGCGAGCG CAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGA AACTTGATGTCAGAAAGAGCAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAG AACACCAGTGGCAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA ACAGGATTAGATACCCCTGGTATCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCC CTTACGTGTCTGAGCTAACGCATTAAGCATTCCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA AGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGTACGCGAAGAACC TTACCAGGCTTGTACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG GTGGTGCATGGTTGTCTGACGCTGTGTCTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCT TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTGGGCACTCTGGTGTGAGACTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT GGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGATGGTACA ACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGATGGCTGCA ACTCGCTACATGAAGTGGAACTCGTATGTAATCGCGGATCAGCATGGCGGCTGAAATACGTTCCCG GGCCTGTACACACCGCCCTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCCGtgggGTAcCTTTtagac cagccgctaaggtgggacagatgattaggtgatcannnnngggggcccctataaaa
4-20	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.1	cctgagggcgaatgacgagcgaactcggtagattggtgctgcatcatgattacattgagtgagtgCGAACTGGT GAGTAACA TGGGAACTGCCAGAAAGCGGGGATAACACTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACA ACTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGTATCAGTTTGGATGGTCCCGCGCGTATTAG ATGGTgAGGTAACCGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAACTCGGCCACATTG GGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAG TCTGATGGAGCAACCGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTGTTAAAGAAGA ACATATCTGAGAGTAACCTGTTACGTTATGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTGTC CAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATGGGCGTAAAGCGAGCGCAGG CGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAACT TGAGTGCAGAAAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACA CCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAATGGATGGTACCAACAG GATTAGATACCCCTGGTATCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCA GTGTGACGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGA




			<p>ATTGACGGGGCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACC AGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGT GCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCITTAITA TCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCGGGTACAAAACGCGGAAGGCGGGGA TGACGTAAATCATATGCCCCITATGACCTGGGTACACACGTGTACAATGGATGGTACAACGAG TTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCG CCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGCCT TGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGgtggGGtaacctTTTAGGAACca gcccCtaaggtgggacagatgattaggtgagtcannngggnnccccataaaa</p>
5-9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	73.9	<p>gggcccagcggctatctcagtcgaagaactctggtattggtgcttgcacatgattacattgagtgagTGGCGAACTGGTGTAGTAA CACGTGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAAACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAA CTTGGACCCATGGTCCGAgctTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCCCGCGGGTATT AGCTAGATGGTGGGTAAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACTGAGAGGGTAAATCGGC CACATTTGGACTGAGACACGGCCAAACTCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGG ACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTGAAAACCTGTGTGTTA AAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTACAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGTAAC TACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGA GCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTG GGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAATCGCTAGATATATGG AAGAACCACAGTGGCGAAGGCGGCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTGAGGATGTTGGTATG CAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCC GCCCTTCAGTGTGACGTAACGCATTAAGCATTCCGCTCGGGAGTACGGCGCAAGGCTGAAACT CAAAGGAATTGACGGGGCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGTACGCGAAGA ACCTTACCAGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACGTGGATAC AGGTGTGATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC CTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTGGGCACTCTGGTGAAGCTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAG GTGGGATGACGTAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCAACTGATGGATGTA CAACGAGTTCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG CAACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCC CGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTgGGtaacctTTTT Agaacagccgctaaggtgggacagatgattaggtgagtcannngggggnggggaaaaataaaa</p>
5-11	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	<p>gggacagcgcctatctcagtcgacgaactctggtattggtgcttgcacatgattacattgagtgagTGGCGAACTGGTGTAGTAAAC GTGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTT GGACCCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTGGATGGTCCCGCGGGTATTAG CTAGATGGTGGAGTAACCGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACTGAGAGGGTAAATCGGCAC ATTGGACTGAGACACGGCCAAACTCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTGCTAAAACCTGTGTGTTAAG AAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTACAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTAC GTCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTGTGGGTTATTTCGGGACTAAGCGGAGCG CAGGCGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGA AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTATGATATGGAAG AAACCAAGTGGCAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA ACAGGATTAGATACCTTGGTATGCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGGCC CTTACGTGTGACGTAACGCATTAAGCATTCCGCTCGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA AGGAATTGACGGGGCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGTACGCGAAGAACC TTACCAGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG GTGGTATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTGGTTAAGTGTGGGACTGAAACCTGAACTCT TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTGGGCACTCTGGTGAAGCTGCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT GGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGTCAAAATGGATGGTACA ACGAGTTCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA ACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCG GGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTgGGTAAacctTtAgg aaccagcccctaaggtgggacagatgattaggtgagtcannngggggnggnnccccataaaa</p>
6-1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	78.7	<p>ggaatcagcgcctatctcagtcgacgaactctggtattggtgcttgcacatgattacattgagtgagTGGCGAACTGGTGTAGTAAAC AACACGTGGTAACTGCCATAAAGTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAA ACCTAGCACCCGATGGTGAAGGTTGAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGTG CATTAGTTAGTTGGTGAAGTAAAGGCTCACCAAGACCGTGTATGATAGCCGACTGAGAGGGTAATC GGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA TGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTCGGATCTGAAAACCTCTGTG TTGGAGAAGAAGCTATTTGATAGTAACTGATCAGGTAGTACGGTATCCAAACGAAAGCCACGGCT AACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTGTGCCGATTTATTGGGCGTAAAG CGAGCGCAGGCGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAA CTGGAAACTTGAGTGCAGAAAGAGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTATGATAT GGAAGAACACAGTGGCAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGG TAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATAGTGTAGGTTGTGGAGGGTT TCCGCCCTTTCAGTGGCGAGTAAAGCATTAAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA ACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGAAGTACCGCGA AGAACCTTACCAGTCTTGACATCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGT GACAGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGTGAGATGTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA ACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGTGAAGTGGGAGTGGTGAACCGGAGGA AGGTGGGACGACGTAATCATCATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGTGATGATGGTGG TACAACGAGTTCGCGAGACCGGAGGTTTACTAATCTCTTAAACCAATCTCAGTTCGGATTGTAGGC TGCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTT CCCGGCCTTgtacACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTgaggttaacctggg gagcagcctgtaaggtgggacagatgattaggtgagtcannngggggnggnnccccataaaaannnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn ngnnnnnnnnnnnnngggggnggnnnnnngggg</p>

6-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	83.1	<p>ggcagcagggggctatctgacgtgacgaactctggtattgattggcttgcacatgattacatttgagttagtGGCGAACTGGTGAGTAAC ACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAACAACT TTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCAGTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATT AGCTAGATGGTgaggtAACGGCTACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCA CATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC GAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTGTGTTAAA GAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTCAGGTATTGACGGTATTTAACGAAAGGCCAGCGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATGGGGCTAAAGCGAGC GCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGG AAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAA GAACACCAGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGTAGCA AACAGGATTAGATACCCCTGGTAGCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGC CCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCTACGGGAAGAAC CTTACCAGGTTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG GTGGTGCATGGTTGTCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCT TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT GGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGATGGTACA ACGAGTTGCGAACTCGGAGAGTAAGCTAATCTCTAAAGCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCA ACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGCATGCCCGGTAAGTATCGGTTCCG GGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGAACCCAAAGTCGGTgGGGTAACTTTT AggACagcccgccctaggtgggacagatgattagggtagtcaannngggggggcccaataaaaggnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn nngnnccnngggggnggnngggggggngggggggggccccc</p>
6-13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	88.9	<p>ccccagcgggctatctgacgtgacgaactctggtattgattggcttgcacatgattacatttgagttagtGGCGAACTGGTGAGTAACAC GTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAACAACTT GGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCAGTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAG CTAGATGGTgaggtAACGGCTACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCA TTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGA AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTGTGTTAAAGA AGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTAGGTAATTGACGGTATTTAACGAAAGCCAGCGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTAATGGGGCTAAAGCGAGCC AGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAA ACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGA ACACCAGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAA CAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCT TCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAG GAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGTACGCGAAGAACCCTTA CCAGGTTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTG GTGCATGGTTGTCTGACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAT TATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG GATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGATGGTACAAG AGTTGCGAACTCGGAGAGTAAGCTAATCTCTAAAGCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACT CGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGCATGCCCGGTAAGTATCGGTTCCGGC CTTGTAACACCCCGCTCACACCATGAGAGTTTGAACCCAAAGTCGGTgGGGTAACTTTTAggaaca gcccctaaggtgacagatgattaggtgacaaannngggggggcccaaaaa</p>
7-1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	98.3	<p>ccccagcgggctatctgacgtgacgaactctggtattgattggcttgcacatgattacatttgagttagtGGCGAACTGGTGAGTAACAC CGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAACAACTT TGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCAGTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAG GCTAGATGGTgggGTAAACGGCTACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCA CATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC GAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTGTGTTAAA GAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTAGGTAATTGACGGTATTTAACGAAAGGCCAGCGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATGGGGCTAAAGCGAGC GCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGG AAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGGGATATGGAA GAACACCAGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGTAGCA AACAGGATTAGATAACCCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGC CCTTCAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCA AAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGTACCGGAAGAAC CTTACCAGGTTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG GTGGTGCATGGTTGTCTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCT TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT GGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGATGGTACA ACGAGTTGCGAACTCGGAGAGTAAGCTAATCTCTAAAGCATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCA ACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCG GGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGAACCCAAAGTCGGTggggTaACCTTtagg aACagcccgccctaggtgggacagatgattagggtagtcaannngggggggcccaaaaacnncnngggtttggcgcttctgtctnttttngnngtttggc gttctctcccttgggtgctgggttcccttttttgcctcttcttctctctt</p>
7-13	<i>Lactobacillus plantarum</i>	84.2	<p>ccccagcgggctatctgacgtgacgaactctggtattgattggcttgcacatgattacatttgagttagtGGCGAACTGGTGAGTAACAC GTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAACAACTT GGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCAGTTTGGATGGTCCCAGCGGCTATTAG CTAGATGGTgaggtAACGGCTACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCA ATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTGTGTGTTAAAG GAAGAACATATCTGAGAGTAACCTGTTAGGTAATTGACGGTATTTAACGAAAGGCCAGCGCTAACTA CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATGGGGCTAAAGCGAGC GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATGGGGCTAAAGCGAGC CAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGAA</p>

7-25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	84.2 AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAG AACACCAGTGGCGAAGGCGGTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAAGTATGGGTAGCAA ACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCC CTTCAGTGTGCAGTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA AGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGITTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACC TTACCAGTCTTGACATACTATGCAAACTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAG GTGGTGCATGGTGTGCTCAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCT TATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTGGGCACTCTGGTGAAGTACGGGAGTACGGGAGGAAAGT GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCATTGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACA ACGAGTTCGGAACCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA ACTCGCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCCG GGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAAACCTTta ggaaccagccgctaaggtggacagatgattaggtgagtcgtaaaggggggaaccttaaaa ccgctgggaCGAACGCTGGCGGCTGCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATGGTGCTT GCATCATGATTTACATTTGAGTGTGGGCAACTGGTGAAGTAAACGTTGGGAAACCTGCCCAGAAGC GGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGCGAAGGTTTGA AAGATGGCTTCGGCTATCATTGATGGTCCCGCGGCTATTAGTAGATGGTGGAGGTAACGGCTC ACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCC AAACTCCTACGGGAGGACAGTGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCC GCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAC TGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAATACGTGCCAGCAGCCGGTAATA CGTAGGTGGCAAGCGTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCCAGCGGTTTTTAAAGTCTGAT GTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAGTGCATCGGAACTGGGAACTTGAAGTGCAGAAGAGGAC AGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGGCGC TGTCTGGTGTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTA GTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTCAGTGTGCTCAGTAAACCA TTAAGCATTCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAATGACGGGGGGCCGCA CAAGCGTGGAGCATGTGGTAAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATACTAT GCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGTGGTGCATGGTGTGCTCAGCT CGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTCGACGATTAAG TTGGCAGCTCTGGTGAAGTTCGGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGATGACGTCAAATCATCATG CCCCATTGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGTACAACGAGTTCGGAACCTCGGAGAGT AAGCTAATCTCTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGTCGGAAT CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCGcgggtaacntccccgggcccTigtaCACAccGeCCGTACACCAAGagag fTTGTAAcAcCCAAAGTCgggtGGTAACCTTtaggaacagccgctaggtgggacaatgattaggtgatcanngggggggggg ccaacaaaa
------	--------------------------------	---

본 연구를 통해 항균활성을 갖는 유산균 균주에 대한 균주 선발 및 항균활성 평가의 단계별 내용은 표 7에서와 같이 요약될 수 있으며, 본 연구를 통해 확립된 기초적인 단계 및 방법이 향후 CMO사업화를 통해 균주 생산뿐만 아니라 신규 균주동정 및 균주 평가 등 다양한 측면의 의뢰업무에 대한 지원에 충분히 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

표 7. 균주 선발과정 요약

단 계	진행내용	비 고
샘플링	전통식품 및 자연계 샘플 등 샘플링	
균주선발	유산균 균주선발(MRS+1% CaCO ₃ 첨가 배지 활용) - 유기산 생성능 기준 121개 colony 선발	
배양	항균활성 평가를 위한 선발 균주 배양	
항균활성 평가	대장균, 살모넬라(<i>S. gallinarum</i> , <i>S. enteritidis</i>), <i>Clostridium perfringens</i> 균주에 대한 항균활성 평가를 통한 항균활성 보유균주 선발	
균주동정/보관	1차 항균활성 보유균주 15종 선발 - 양계 및 양돈에 효과적인 균주선발 및 추가 균주 특 성 분석을 위해 위탁기관 전달	

제 3 절 선발균주의 최적 성장을 위한 배지조성 및 발효조건 조사

1. 선발균주 최적 배지조성 및 실험실 수준에서의 발효조건 조사

선발균주의 최적 성장을 위한 배지조성 및 발효조건 조사는 위탁기관에서 효과가 우수한 균주로 확인된 *L. plantarum* 6-5 균주를 사용하였으며, 액상발효 및 고상발효 조건에서의 배지조성에 따른 균수변화를 조사하였다 (표 8, 표 9).

액상배지조성은 일반적으로 많이 사용되고 있는 3가지 배지를 대상으로 진행하였으며, 고체 발효 배지조성은 용이하게 구할 수 있는 원료를 대상으로 혐기발효실험을 진행하여 최적 발효 배지조성을 선정하였다. 액상발효용 배지 조성은 C-1이 가장 우수하였으며, 고상발효용 배지는 대두박/ 당밀, 대두박/ 소맥피/ 당밀 혼합배지가 균성장 측면에서 우수한 결과를 확인하였다 (그림 3, 그림 4).

표 8. 선발균주의 최적 액상발효 배지 선정을 위한 후보 배지조성

배지조성 (%)	C-1	C-2	C-3
Glucose	20	20	15
Yeast extract	15	10	5
NaCl	5		
K ₂ HPO ₄		5	5
MgSO ₄		0.75	0.75
Molasses			5

표 9. 선발균주의 최적 고체발효 배지 선정을 위한 후보 배지조성

배지조성 (%)	A	B	C	D	E	F	G	H
SBM/WB	95	95					100	
Wheat bran			50	60	50	60		100
Soybean meal			47	37	47	37		
Fructose		2			2	2		
Molasses	5	3	3	3	1	1		

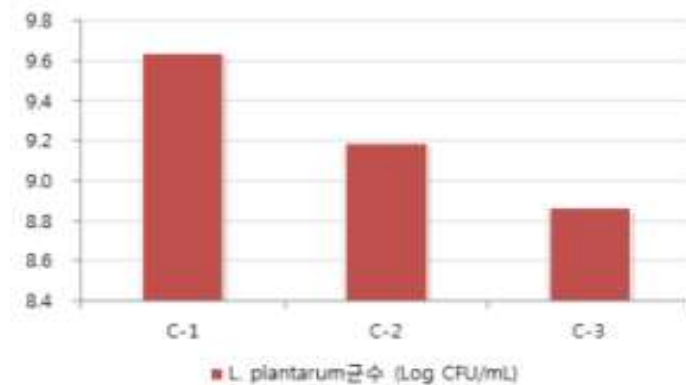


그림 3. 액상발효 조성에 따른 *L. plantarum* 6-5 균주 발효 특성

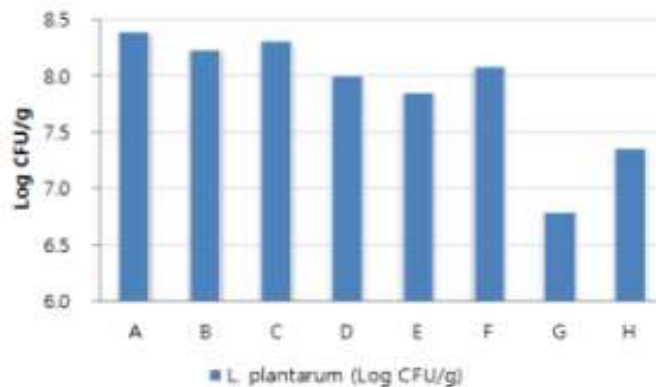


그림 4. 고상발효 배지조성에 따른 *L. plantarum* 6-5 균주의 발효 특성

또한, 선발 균주 *L. plantarum* 6-5균주를 대표균주로 하여 발효조건 조사를 위해 배양온도를 30~40℃로 달리하고 초기 수분함량을 40~60%로 달리하여 고체발효에 적합한 최적 발효조건을 조사하였다. 최적 배양온도는 35℃, 초기 수분함량은 50%에서 가장 우수한 결과를 확보하였다 (표 10).

L. plantarum 6-5 균주의 최적 배양조건을 토대로 추가 선발균주 모두를 대상으로 발효방식을 호기 및 혐기발효로 달리하여 48시간 발효를 통해 균수 및 pH 변화를 조사하였다. 15종의 선발균주의 혐기발효조건을 위주로 실험을 진행하였으며, 48시간 후 결과는 호기발효조건보다는 혐기발효조건에서 균수 및 pH 측면에서 모두 우수한 결과를 확인할 수 있어 혐기발효 공정이 유용물질 생산에 효과적일 것으로 예상되었다 (표 11).

표 10. 선발 균주 (*L. plantarum* 6-5)의 배양온도 및 가수량에 따른 고체발효 결과

배양온도 (℃)	초기 가수량 (%)	균수 (Log cfu/g)	평균 균수 (Log cfu/g)	pH
30	40	8.94	8.87	5.11
		8.72		5.05
		8.95		5.10
30	50	9.20	9.36	4.95
		9.54		4.82
		9.32		4.82
30	60	9.36	9.26	4.74
		9.52		4.71
		8.90		4.5
35	40	9.35	9.29	4.88
		9.54		4.79
		8.96		4.82
35	50	9.54	9.53	4.38
		9.68		4.25
		9.38		4.35
35	60	9.50	9.35	4.27
		9.65		4.19
		8.90		4.25
40	40	8.75	8.70	6.11
		8.80		6.20
		8.54		6.23
40	50	8.60	8.68	6.14
		8.81		6.21
		8.64		6.30
40	60	8.79	8.84	5.98
		8.91		6.10
		8.80		6.15

표 11. 최적 발효조건에서의 발효방식에 따른 균수 및 pH 변화

발효조건	균주명	균수(Log cfu/g)	pH
혐기발효	6-1	8.40	5.36
	5-9	9.76	4.65
	5-11	9.57	4.63
	4-20	9.59	4.67
	6-13	9.45	4.83
	3-8	9.62	4.70
	3-6	9.56	4.80
	3-5	9.59	4.76
	7-25	9.58	4.57
	7-13	9.51	4.93
	3-8-1	9.66	4.81
	7-1	8.34	4.51
	2-6	9.51	4.82
	1-3	9.61	4.68
	6-5	9.52	4.69
호기발효	1-3	8.72	6.01
	3-5	8.95	5.82
	6-5	8.84	6.40
	6-13	8.92	5.66

2. 선발균주의 pilot scale 발효공정 확립

선발균주 중 유용물질 생성능이 우수한 *L. plantarum* 6-5 균주에 대해 lab scale 발효조건 확립결과를 토대로 pilot scale 발효 공정 확립을 진행하였다. 총 1톤의 대두박/소맥피 혼합배지 조성에서 혐기발효공정을 통해 초기 수분함량 50%, 발효온도 35℃로 총 96시간 동안 발효를 진행하면서 균수 및 pH 변화를 조사하였다. 그 결과 발효 24시간째 1.1×10^9 cfu/g으로 10^9 cfu/g 이상까지 균 성장을 확인하였으며, 발효 60시간째 9.0×10^9 cfu/g의 균수를 확인하였다. 96시간까지의 발효에서 발효 60시간 이후 균수가 감소되는 것을 확인하고 4톤 이하의 pilot scale 발효를 위한 최적 발효시간을 60시간으로 최종 결정하였다 (그림 5a). 반면, 4톤 이상의 pilot scale 공정 규모에서의 최적 발효조건 설정을 위해서는 설비적인 측면을 고려해야하기 때문에 호기조건에서 발효를 진행해야하므로 발효조건에 대한 재확인이 필요하였다. 발효 조건은 혐기발효 조건과 동일한 조건에서 진행하였으며 발효 20시간 이후부터 10^9 cfu/g이상의 균수를 확인할 수 있었다. 이는 혐기발효보다 낮은 균수 및 pH 특성을 나타내지만, 균성장 측면에서 유리하다고 할 수 있다. 따라서 대량생산 공정에서의 최적 발효시간을 건조공정까지 고려하여 30시간으로 설정하고 추가 반복실험을 진행하여 pilot scale에서의 발효공정을 확립하였다 (그림 5b).

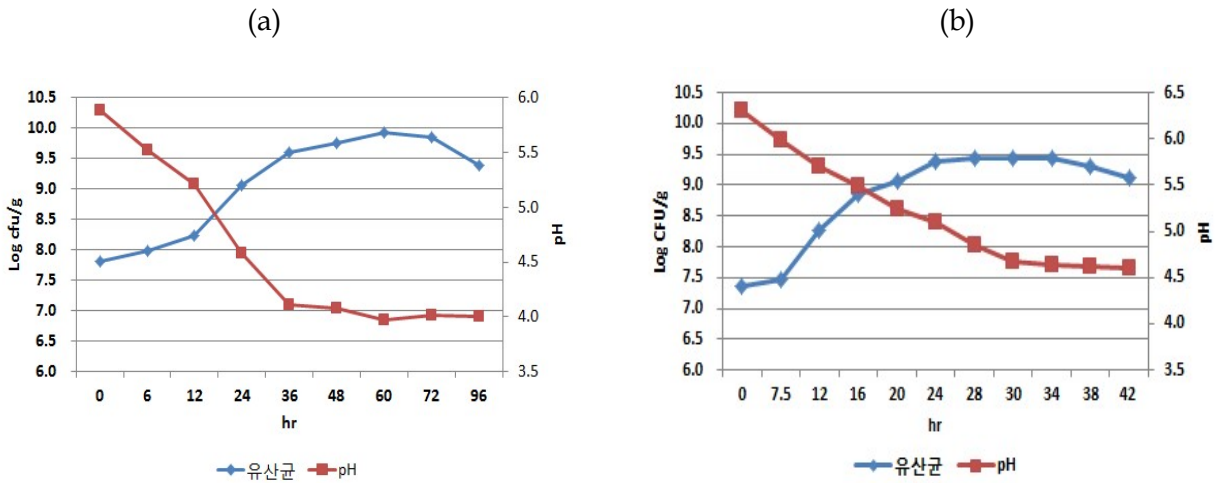
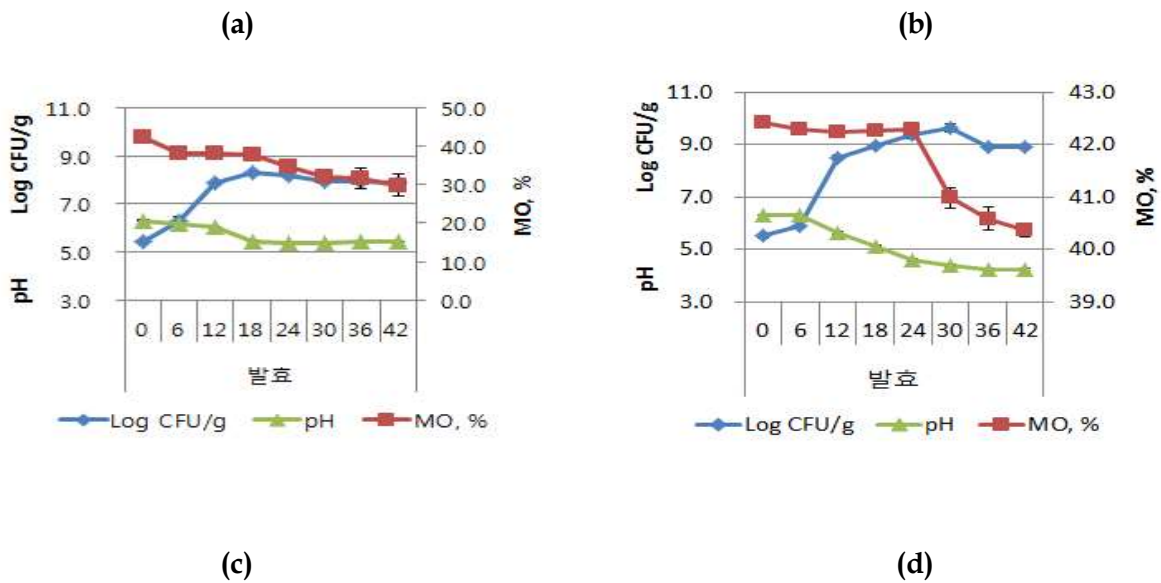


그림 5. 선발균주의 발효조건에 따른 발효시간별 균수 및 pH 변화

Pilot scale 발효공정 확립단계에서 검증되어야하는 주요 factor 중 lab scale 발효조건과 가장 큰 차이를 보이는 부분이 원료 두께에 따른 발효특성의 차이로 pilot scale 공정에 맞게 원료 두께별 발효특성을 조사하였다. 원료 두께를 10, 20, 30, 40cm로 조정한 후 대량발효설비를 활용하여 42시간 동안 고체발효를 통해 균수 및 pH 변화를 확인하였다 (그림 6). 원료 두께가 10cm일 경우는 발효 중 원료수분의 급격한 감소로 인해 균성장에 저해를 받는 것으로 확인되었으며, 원료 두께 20cm 이상에서는 균수 및 pH 측면에서 양호한 결과를 확인하였으나, pilot scale 공정에서 발효시간 및 건조공정 등을 고려할 경우 30cm 이상에서 안정적인 결과를 확보할 수 있을 것으로 판단되었다.



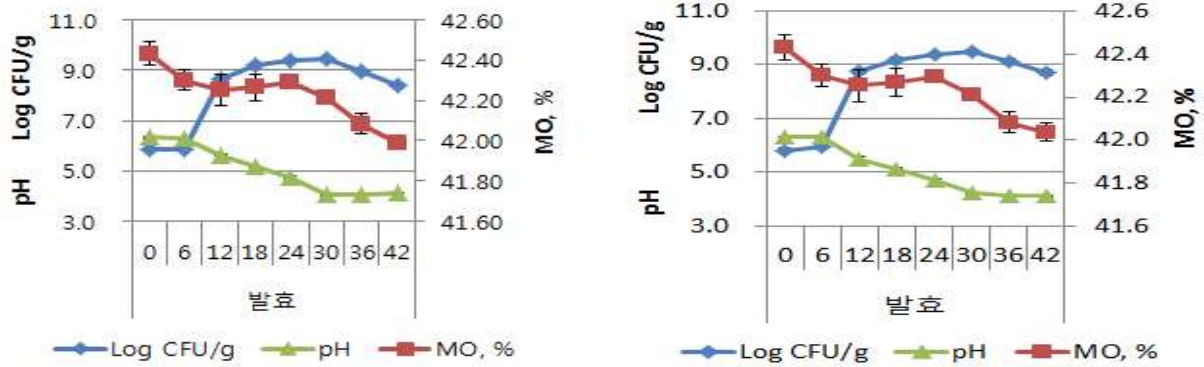


그림 6. 원료두께에 따른 발효특성 조사 (a: 10cm, b: 20cm, c: 30cm, d: 40cm)

발효 조건 외 pilot scale 공정에서 중요한 부분인 건조 조건 설정을 위해 건조 온도에 따른 균수변화 및 원료의 수분함량 변화를 각각 조사하여 최적 건조온도 조건을 확인하였다(그림 7). *L. plantarum* 6-5 균주는 50°C 이상의 온도에서는 짧은 시간의 열처리에서도 안정성이 감소하는 것으로 확인되었으며, 마찬가지로 낮은 온도에서 장시간 열처리(제품 수분함량 10% 미만)에서도 안정성이 감소하는 것으로 확인되었다. 따라서 적정 건조온도를 40~50°C 범위에서 단계적 온도 변화 등을 통해 pilot scale 또는 대량생산 단계에서의 건조시간을 15~18시간 수준에서 관리할 경우 건조를 통한 최종제품의 품질변화 요인은 최소화 될 수 있을 것으로 판단된다.

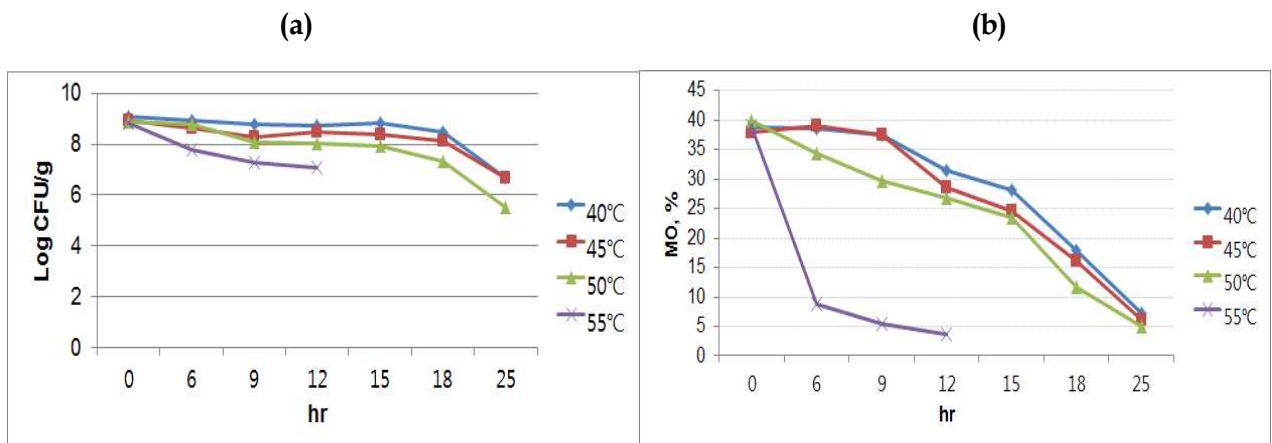


그림 7. 건조온도에 따른 균주 안정성 조사. (a) 건조온도에 따른 균수변화, (b) 건조온도에 따른 수분함량변화

제 4 절 선발균주의 유효 물질 생산증대를 위한 발효 조건 탐색

1. 선발균주의 유용물질 생성능 조사

선발균주의 유용물질 생성능 조사를 위해 먼저 배양액의 pH를 7.0으로 조정한 후 항균활성을 추가로 평가한 결과 항균활성을 나타내지 않는 것으로 확인되어 유산균이 생성하는 bacteriocin과 같은 유용물질은 아닌 것으로 판단되어, LC/MS/MS를 이용하여 유기산 (Lactic acid, Phenyllactic acid)에 대한 평가를 진행하였다 (표 12).

표 12. LC/MS/MS의 분석조건

Column	Capcell PAK MGII(3um, 2 x 100mm)
Mobile phase	Acetonitrile/H2O (50:50, v/v)
Flow rate	250ul/min
Injection volume	5 ul
Mass condition	XCALIBUR 2.0 software Spray voltage : Negative 4.0kV Transfer capillary temperature : 350C Sheath gas pressure : 40, Aux gas pressure : 20 Vaporizer Temperature : 125C Collision energy : - Lactic-acid 12, Phenyllactic-acid 36 SRM mode : Negative - Lactic acid ion transitions : m/z 88.01 > 43.2 - Phenyllactic acid ion transitions : m/z 165.0 > 147.1

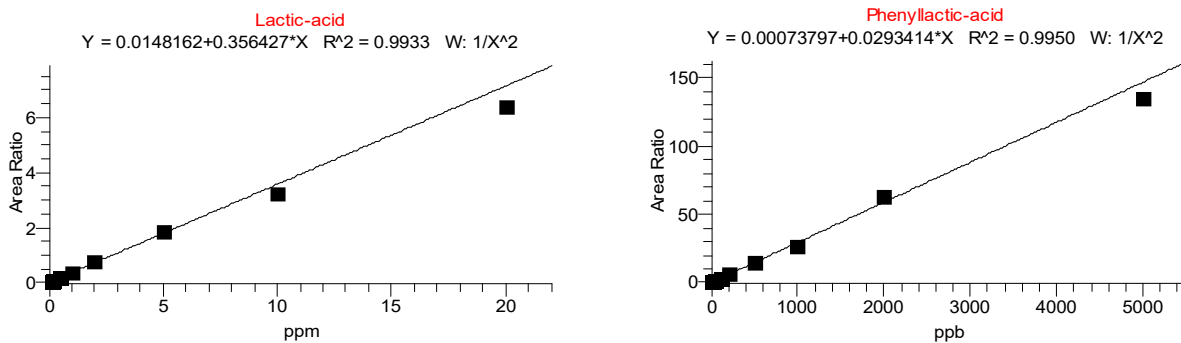


그림 8. Lactic acid 및 phenyllactic acid 표준품을 이용한 검량선

표 13. 선발균주의 유기산 생성능 평가 결과

Strains	16S sequencing	동정결과	Lactic acid(mg/L)	PLA(mg/L)
1-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>		6,145.7	116.2
2-6	<i>Lactobacillus plantarum</i>		5,125.0	97.1
3-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>		5,228.8	101.1
3-6	<i>Lactobacillus plantarum</i>		4,782.7	59.2
3-8	<i>Lactobacillus plantarum</i>		5,327.8	62.7
3-8-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>		4,829.5	60.5
4-20	<i>Lactobacillus plantarum</i>		4,906.0	84.1
5-9	<i>Lactobacillus plantarum</i>		5,242.3	60.3
5-11	<i>Lactobacillus plantarum</i>		4,009.3	69.3
6-1	<i>Lactobacillus curvatus</i>		3,642.8	1.4
6-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>		4,896.2	100.2
6-13	<i>Lactobacillus plantarum</i>		5,616.8	111.9
7-1	<i>Lactobacillus pentosus</i>		5,385.5	56.0
7-13	<i>Lactobacillus plantarum</i>		5,239.4	100.8
7-25	<i>Lactobacillus plantarum</i>		4,832.6	100.6

선발균주의 유기산 생성능 평가결과 1-3, 2-6, 3-5, 6-5, 6-13, 7-13, 7-25 균주가 높은 lactic acid 및 PLA 생성능을 가진 것으로 확인되었으며 (표 13), 이들 균주와 서울대학교 및 건국대학교 균주 선발 실험결과를 종합하여 1-3, 2-6, 3-5, 3-8, 6-5 균주를 균주 특성 및 유용물질 특성 평가를 위해 위탁기관인 단국대학교에 전달하였다.

2. 유용물질 생산 증대를 위한 발효조건 탐색

1-3, 2-6, 3-5, 3-8, 6-5 균주 중 PLA 생성능이 우수한 것으로 확인된 1-3, 3-5, 6-5, 6-13균주를 대상으로 유용물질 생산량 증대를 위한 발효조건 설정 실험을 진행하였다.

선정 균주를 대상으로 발효방식(액상 및 고상발효)에 따른 PLA 생성능을 조사하였다. 액상발효의 경우는 MRS 배지를 이용하여 33°C, 100 rpm의 조건에서 64시간 배양 후 PLA 함량을 분석하였으며, 고상발효의 경우는 대두박/ 소맥피 배지를 이용하여 초기 원료의 수분함량을 50%로 설정하고, 33°C의 배양온도에서 64시간동안 발효를 통해 PLA 함량을 조사하였다. 그 결과 액상발효 조건에서의 PLA 함량이 고상발효 조건에서보다 5~20배 높은 것으로 확인되어(표 14) 고체발효 공정에서의 유용물질 생산 시 추가 발효공정에 대한 보완이 필요할 것으로 판단되어 추가 실험을 진행하였다.

표 14. 액상발효와 고체발효에서 분리 유산균이 생성하는 유기산의 함량 변화

균주명	액상발효			고상발효		
	pH	Lactic acid (%)	PLA (mg/kg)	pH	Lactic acid (%)	PLA (mg/kg)
1-3	4.01	0.61	116.2	6.01	0.119	20.30
3-5	4.06	0.52	101.1	5.82	0.112	24.70
6-5	4.00	0.49	100.2	6.40	0.021	5.00
6-13	4.04	0.56	111.9	5.66	0.505	24.20

고체발효 공정의 경우 호기 및 혐기발효 조건에서 따른 PLA 생성량을 비교하였으며, 발효조건은 대두박/ 소맥피 배지의 초기 원료의 수분함량을 50%로 설정하고, 33℃의 배양온도에서 호기 및 혐기발효 조건으로 64시간동안 발효를 통해 발효조건에 따른 PLA 함량을 조사하였다. 발효조건에 따라서는 호기발효 보다는 혐기발효 공정 적용을 통해 2~10배 정도 높은 PLA 함량을 확인하였다 (표 15).

표 15. 고체발효의 혐기, 호기 발효방식에 따른 분리 유산균의 유기산 생성량 비교

발효조건	균주명	pH	Lactic acid (%)	PLA (mg/kg)
혐기발효	1-3	4.83	1.290	41.07
	3-5	4.76	1.126	37.00
	6-5	4.82	0.979	56.90
	6-13	4.68	1.135	44.60
호기발효	1-3	6.01	0.119	20.30
	3-5	5.82	0.112	24.70
	6-5	6.41	0.021	5.00
	6-13	5.66	0.505	24.20

유용물질인 PLA함량 증가를 위해 전구물질 첨가를 통해 액상 및 고상발효 공정에서의 PLA 함량 증가 정도를 조사하였다. 전구물질로는 PLA 생성에 관여하는 phenylalanine과 phenylpyruvic acid를 각각 1g/L 및 1g/kg 수준으로 첨가하여 PLA함량 변화를 조사하였다. 액상발효 및 고상발효 공정에서 전구물질로 phenylpyruvic acid의 첨가가 가장 효과적이었으며, 액상발효 공정에서는 841.5mg/L까지 PLA함량이 증가하였으며, 고상발효의 경우도 대조구 대비 10배 이상 높은 324mg/kg수준까지 PLA함량의 증가를 확인하였다 (표 16). 액상발효의 경우 phenylalanine 첨가가 phenylpyruvic acid 첨가에 비해 첨가효과가 낮았으나, 고상발효의 경우 phenylpyruvic acid의 첨가를 통해서도 충분한 PLA함량의 개선효과를 확인하였으며, 특히 비용적인 측면에서 phenylpyruvic acid의 비용이 고가여서 phenylalanine첨가를 통한 PLA 함량 개선 공정이 더 효과적인 것으로 확인되었다. 따라서, 고상발효공정에서의 phenylalanine의 첨가수준에 따른 PLA함량 증가에 대한 추가 조사를 통해 phenylalanine 첨가수준이 1% 수준까지 증가시킬 경우 PLA함량도 비례적으로 증가하는 것을 확인하여(표 17) 추후 pilot scale 공정 적용 측면에서 충분한 활용가치가 있을 것으로 판단된다.

표 16. 전구물질의 첨가에 따른 액상과 고상발효 비교

처리구	액상발효				고상발효			
	pH	균수 (cfu/ml)	Lactic acid (mg/L)	PLA (mg/L)	pH	균수 (cfu/g)	Lactic acid (mg/kg)	PLA (mg/kg)
대조구 1	3.83	9.1e+9	5,201.7	131.2	4.73	8.6e+9	7,202.8	28.6
대조구 2(CaCO ₃ 20g/L 첨가구)	5.01	7.5e+9	4,611.9	81.0	5.33	1.02e+10	7,489.7	30.4
Phenylalanine 1g/L	3.83	1.06e+10	4,938.6	199.0	4.71	1.35e+10	6,643.7	286.4
Phenylpyruvic acid 1g/L (6.1mM)	3.76	7.6e+9	4,836.9	841.5	4.91	7.6e+9	5,418.8	324.0

표 17. 고체발효 조건에서의 phenylalanine 첨가 수준에 따른 Phenylactic acid 생산량

Phenylalanine, %	PLA 함량 (mg/kg)
0	92.9
0.2	364.8
0.4	513.1
0.6	605.2
0.8	625.7
1.0	707.5

3. 유용물질 생산균주의 열안정성 조사

선발균주 중 유용물질 생성능이 우수한 *L. plantarum* 1-3, 3-5, 6-5, 6-13 균주에 대해 고체발효 실험을 통해 확보된 샘플을 이용하여 50~80℃의 온도조건에서 5분 및 10분간 water bath를 이용한 열처리를 통해 균주별 열안정성 평가를 실시하였다. 열안정성 조사 결과 *L. plantarum* 3-5 균주가 가장 열안정성이 우수하였으며, *L. plantarum* 6-13 균주가 열안정성이 가장 낮은 것으로 평가 되었다 (그림 9).

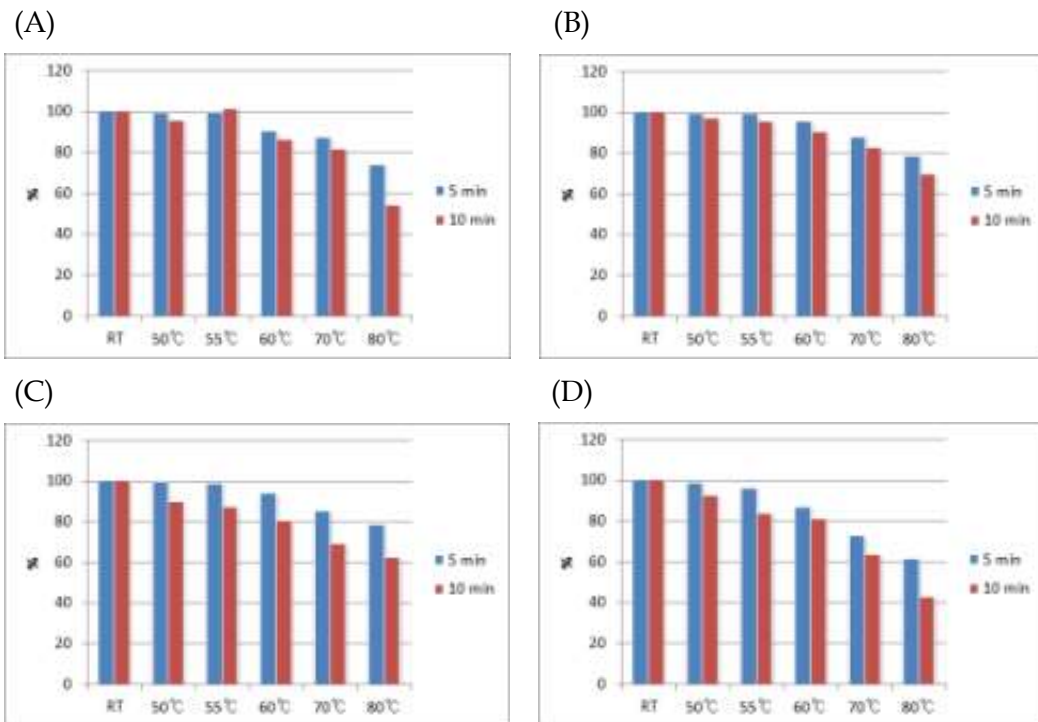


그림 9. 고체발효물의 열안정성 평가 결과(A: 1-3, B: 3-5, C: 6-5, D: 6-13)

제 5 절 국내 시판 주요 생균제의 유효성 조사

국내에서 시판중인 주요 생균제 11종을 샘플링 하여 6개월간 저장성 평가를 통해 균수 안정성을 조사하였다. 샘플링한 주요 생균제는 그림 7 및 표 18과 같으며, 실온조건(20~25℃, 30~60% RH)에서 6개월간 저장성 평가 결과는 표 19에 나타내었다. 국내 주요 생균제의 초기 균수는 높은 수준이나, 실제 보관실험을 통한 균수 변화를 조사한 결과 유통기한을 초과하는 제품도 있었으나, 대부분의 생균제가 균수 측면에서 저장안정성은 높지 않은 것으로 확인되어 이에 대한 보완이 시급할 것으로 판단된다.

국내 생균제 생산현황은 2011년 28,781톤, 2012년 31,119톤, 2013년 7월 기준 18,636톤을 생산 / 판매되고 있으며, 2011년 대비 생산량이 증가할 것으로 전망되고 있어 생균제의 저장안정성 확보가 신뢰성을 바탕으로 한 관련시장 확대의 관건이 될 것으로 예상된다.



그림 10. 국내 시판 주요 생균제 샘플링

표 18. 저장성 평가를 위한 생균제 리스트

구분	제품명
동물약품	피쉬락
동물약품	바이오프로
동물약품	프로윈
동물약품	비오쓰리-S 수용산
동물약품	Diamond V XP
동물약품	월드랩스-후레쉬
동물약품	프리마락
보조사료	락토바이오 프리미엄
동물약품	프리미엄 사카로퀼취
동물약품	한동 미-에스
동물약품	아다폰- F

표 19. 국내 주요 생균제의 6개월간의 저장안정성 평가 결과

구분	주요 성분	기준	보관일자			제조일	유효기간
		(cfu/kg)	0일	60일	180일		
동약	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2.0×10^{11}	1.0×10^{10}	2.2×10^9	3.1×10^7	2011-07-11	12개월
	<i>Clostridium butyricum</i>	2.0×10^{10}	2.1×10^{10}	9.1×10^8	1.1×10^8		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.0×10^{10}	8.1×10^9	2.1×10^8	1.3×10^6		
동약	<i>Bacillus subtilis</i>	3.5×10^{11}	5.7×10^{11}	1.1×10^{11}	3.7×10^8	2012-06-21	24개월
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.0×10^{11}	3.7×10^{11}	7.7×10^{10}	1.3×10^8		
	<i>Enterococcus faecium</i>	2.0×10^{11}	8.2×10^{10}	2.1×10^7	4.1×10^6		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.0×10^{10}	5.2×10^9	2.9×10^8	2.4×10^6		
동약	<i>Bacillus subtilis</i>	5.0×10^{10}	2.0×10^{11}	7.8×10^{10}	1.8×10^8	2012-06-11	24개월
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.0×10^{10}	1.1×10^{10}	8.0×10^9	1.7×10^7		
	<i>Enterococcus faecium</i>	2.0×10^{10}	1.2×10^{10}	5.2×10^7	2.4×10^6		
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5.0×10^9	5.2×10^9	3.5×10^8	4.3×10^6		
동약	<i>Streptococcus faecalis</i>	1.0×10^{11}	1.3×10^{11}	9.0×10^{10}	7.6×10^7	2012-06-29	18개월
	<i>Bacillus mesentericus</i>	1.0×10^9	2.9×10^9	9.2×10^8	3.4×10^6		
	<i>Clostridium butyricum</i>	1.0×10^9	2.3×10^9	5.6×10^8	1.3×10^6		
동약	<i>Lactobacillus casei</i>	1.0×10^{11}	4.1×10^{12}	2.1×10^{11}	1.5×10^9	2012-12-21	12개월
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.0×10^8	7.8×10^9	2.1×10^9	5.5×10^6		
	<i>Streptococcus griseus</i>	1.0×10^8	2.5×10^8	7.3×10^6	5.5×10^5		
	<i>Bacillus subtilis</i>	1.0×10^9	2.0×10^{10}	9.0×10^9	2.4×10^7		
	<i>Aspergillus oryzae</i>	1.0×10^8	8.1×10^8	7.2×10^8	2.1×10^6		
동약	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3.3×10^{10}	3.7×10^{10}	4.0×10^9	2.1×10^7	2012-12-21	12개월
	<i>Lactobacillus casei</i>	3.3×10^{10}	4.5×10^{10}	3.1×10^{10}	1.1×10^7		
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	3.3×10^{10}	3.7×10^{10}	1.7×10^8	7.9×10^6		
보조	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1.0×10^{10}	6.0×10^9	1.1×10^9	5.9×10^6	2012-10-12	24개월
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.0×10^9	2.5×10^9	5.1×10^8	1.9×10^6		
	<i>Bacillus subtilis</i>	1.0×10^9	8.4×10^9	5.3×10^9	8.2×10^6		
동약	<i>Bacillus subtilis</i>	1.0×10^{10}	4.0×10^{11}	8.1×10^{10}	4.9×10^9	2012-12-06	12개월
동약	<i>Clostridium butyricum</i>	1.0×10^{10}	2.1×10^{10}	1.1×10^{10}	5.8×10^8	2012-10-24	24개월
동약	<i>Bacillus subtilis</i>	1.0×10^{11}	3.3×10^{11}	8.2×10^{10}	1.4×10^9	2013-01-04	12개월
동약	<i>Bacillus subtilis</i>	3.5×10^{11}	7.6×10^{11}	7.5×10^{11}	3.1×10^8	2012-12-20	24개월

제 6 절 위탁생산을 위한 생균제 대량생산 시스템 구축

1. 생균제 대표균주에 대한 액상발효 공정 확립

가. 균주 선정

고농축 생균제 생산을 위한 공정 확립을 위해 GRAS이면서 축산업에 널리 사용되는 주요 균주인 *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* 를 대상으로 액상 발효를 통한 농축 생균제 제조공정을 확립하였다.

나. 배지조성 결정

유산균, 효모, 바실러스를 배양하기 위한 일반적인 소량 발효용 배지 조성은 산업적으로 사용하기에는 비용적인 측면에서 적합한 방법이 아니기 때문에 본 연구에서는 저비용으로 높은 수준의 균체 성장을 이룰 수 있는 배지 조성을 논문 및 관련 자료를 확인하여 대량 생산 시 산업적으로 활용성이 높은 배지조성을 선정하고 이를 확인하기 위한 실험을 진행 하였다.

유산균을 위한 배지조성은 유기산의 생성에 의하여 배양 중 스스로 불활성화 혹은 사멸하게 되기 때문에 유산균의 적절한 배양을 위하여 아래 표 20과 같이 정하였으며, 각각의 배지 조성에 대해 배양시험을 진행 하였다. 4종류의 배지 조성 중 medium 4의 조성으로 배양을 한 결과 다른 3종류의 배지 조성에 비하여 높은 수준의 균체 성장을 확인 할 수 있어서, 대량 생산용 배지 조성으로 medium 4를 선택하였다.

유산균과는 달리 효모와 바실러스는 배양 중 성장이 억제되지 않기 때문에 상대적으로 저비용의 배지를 활용하였다 (표 21, 22). 바실러스와 효모 균주를 배양하기 위한 배지를 균주별로 2종류씩 선정 하여 진행한 결과, 바실러스는 medium 6에서 $3.40E+10$ cfu/ml, 효모는 medium 7에서 $3.50E+09$ cfu/ml으로 나타나 두 균주에 대한 배지 조성으로 대량생산용 배양배지로 선정하였다.

표 20. 유산균 액상발효용 배지 조성 및 발효 결과

Composition(%)	Medium 1	Medium 2	Medium 3	Medium 4
Glucose	0.2%	0.2%	0.15%	4.0%
Yeast extract	0.15%	0.1%	0.05%	1.0%
Peptone				2.0%
C ₂ H ₃ NaO ₂				0.5%
KH ₂ PO ₄		0.05%	0.05%	0.2%
NaCl	0.05%			0.5%
MnCl ₂				0.005%
MgSO ₄		0.0075%	0.0075%	0.01%
Tween80				0.1%
Molasses			0.05%	
균수(CFU/ml)	2.30E+09	2.73E+09	4.20E+08	2.80E+10

표 21. 바실러스 액상발효용 배지 조성 및 발효 결과

Composition(%)	Medium 5	Medium 6
Yeast Extract	1.16%	1%
Bacto Peptone		2%
Sodium Acetate		
Potassium Phosphate		0.20%
NaCl	0.58%	0.50%
Manganese Chloride		0.01%
Magnesium Sulfate		0.01%
Glucose	1.16%	4%
Tween80		
균수(CFU/ml)	3.40E+08	3.40E+10

표 22. 효모 액상발효용 배지 조성 및 발효 결과

Composition(%)	Medium 7	Medium 8
Yeast Extract	2.0%	1.0%
Bacto Peptone		1.0%
Glucose	4.0%	1.0%
균수(CFU/ml)	3.50E+09	1.10E+08

다. 500L 액상 발효공정 확립

대량생산용 배양 실험을 진행하기 위하여 750L 용량의 액상 배양기에 각 균주 별로 선정된 배지를 500L 씩 준비하여 유산균과 바실러스, 효모를 각각 30시간 배양하여 최종 균수를 확인하였다. 생산된 액상배양액의 균수는 유산균: 1.13E+10 cfu/ml, 바실러스: 1.6E+10 cfu/ml, 효모: 2.3E+9 cfu/ml으로 확인 되어 실험실 규모에서의 결과와 유사한 균수를 확보 할 수 있었다 (표 23).

표 23. 각 균주별 최적 배지 조성 및 대량생산 시 균수

Composition(%)	유산균	바실러스	효모
Yeast Extract	1.0%	1.0%	2.0%
Bacto Peptone	2.0%	2.0%	
Sodium Acetate	0.50%		
Potassium Phosphate	0.20%	0.20%	
NaCl	0.50%	0.50%	
Manganese Chloride	0.01%	0.01%	
Magnesium Sulfate	0.01%	0.01%	
Glucose	4.0%	4.0%	4.0%
Tween80	0.10%		
균수(CFU/ml)	1.13E+10	1.60E+10	2.30E+09

라. 동결보호제 조성 확정

액상 배양액내의 생균들은 시간이 지남에 따라 배양액의 영양분 고갈, 대사산물 증가, 용존 산소량 감소 및 오염 등에 의하여 일정한 품질을 유지 할 수 없기 때문에 이러한 문제점을 보완하기 위하여 건조공정을 통해 저장 안정성을 확보할 필요가 있다. 액상상태의 균체를 건조하기 위해서는 우선 균체를 농축하고 이후 균의 보존성을 확보할 수 있는 건조 제형화 공정을

선택해야 한다. 일반적으로 균체의 농축은 원심분리기를 이용하여 이루어지는데 본 연구에서는 15,300rpm의 연속 원심 분리기를 이용하여 균체를 회수 하였다. 건조 공정은 보다 경제적인 방법인 동결건조 공정을 선택했는데 동결 건조에서는 농축된 균체의 안전한 회수를 위한 보호제의 선택이 중요하게 된다. 동결건조를 하게 되면 급격한 수분저하와 동결에 의한 세포체 사멸을 유도하기 때문에 부동액과 같은 동결 보호제를 첨가 해주어야 한다. 본 연구에서는 4종류의 동결건조 보호제 조성을 선정 하였으며 (표 24), 원심분리를 통하여 회수된 균체 1kg을 상기 동결건조 보호제 조성과 동량의 질량으로 혼합하여 동결건조를 진행 하였다. 동결건조가 완료된 후 샘플을 회수하여 미생물 분석을 통하여 최적의 동결건조 보호제를 선정하였다. 유산균을 대상으로 1차 시험한 결과 보호제 2에서 가장 높은 보호력을 확인 하였으며 (표 25), 다른 두 가지 균주도 이 조성을 이용하여 동결건조를 진행 하였다 (표 26).

표 24. 동결건조 보호제 조성

Composition(%)	보호제 1	보호제 2	보호제 3	보호제 4
Skim milk	5.0%	10.0%	20.0%	10.0%
Glycine	0.2M			
Glutamic acid	0.2M			
Vitamin C	0.12%	0.12%	0.12%	0.12%
Sodium alginate				1.0%
Chitosan				1.0%
CMC		5.0%	5.0%	5.0%

표 25. 동결건조 보호제 처리에 따른 유산균 (*L. plantarum*)의 최종 균수

처리구	균수 (CFU/g)
무처리	9.70E+10
보호제 1	1.20E+12
보호제 2	6.90E+12
보호제 3	4.30E+12
보호제 4	1.10E+11

마. 고농축 생균제의 생산 공정 확립

액상발효, 농축/ 동결건조, 부형제 희석 및 제품화 단계의 생산 공정을 확립하기 위해 기 확립된 액상발효용 배지 조성을 이용하여 각 균주별로 액상발효를 진행 하였으며, 배양액 500L 를 대용량 연속 원심분리기를 이용하여 균체를 회수 하였다. 그 중 유산균을 이용하여 동결건조 보호제 조성을 확립 하였고, 바실러스와 효모 균주는 유산균과 동일한 조성으로 동결건조 보호제를 첨가 하여 동결건조를 진행 하였다. 균수의 변화 즉 균체의 안정성을 확인하기 위해 각 공정 단계별로 샘플을 취하여 미생물 분석을 진행 하한 결과 바실러스와 유산균에서는 동결 건조 후의 균수가 증가 하였으나, 효모의 경우 세포체의 크기에 의하여 다른 균주에 비하여 균체의 농축정도는 유산균 및 바실러스에 비해 높지 않았다 (표 26).

표 26. 동결건조 전 후 균수 변화

균수(CFU/g)	<i>L. plantarum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
동결건조 전	5.57E+12	2.75E+12	3.50E+11
동결건조 후	1.23E+13	7.74E+13	6.60E+11

수분함량이 1% 미만인 동결건조 생균체는 수분함량이 증가하면 균체의 저장안정성이 낮아지는 것이 일반적인 현상이기 때문에 수분 흡수를 최소화 하며 저장안정성을 유지할 수 있는 부형제를 확인하기 위하여 아래 표 8과 같이 각기 다른 부형제를 대상으로 조사하였다. 부형제 혼합은 균일도를 유지하기 위해 50kg 배합기를 이용하여 적정 배합 조건을 확인 후 진행하였다 (표 27).

표 27. 동결 건조 균주의 균질화를 위한 부형제 조성 (%)

성분	조성 1	조성 2	조성 3	조성 4	조성 5
Sucrose	5				
Molasses	10				
Whey	82	82			
Silicon	2	2		2	2
Glucose		15	99		
Dextrose				97	
Lactose					97
균주	1	1	1	1	1

표 28. 혼합 시간 및 부형제 조성별 균주 혼합 균일도 조사 (단위: CFU/g)

부형제 조성	혼합 시간			
	1분	3분	5분	10분
목표균수	2.00E+10	2.00E+10	2.00E+10	2.00E+10
조성 1	5.50E+09	1.80E+10	7.30E+10	2.03E+09
조성 2	5.00E+09	1.67E+10	5.80E+10	1.74E+09
조성 3	1.80E+09	3.00E+10	1.90E+10	7.00E+09
조성 4	3.28E+09	3.82E+10	2.20E+10	1.10E+10
조성 5	7.00E+09	1.80E+10	4.10E+10	7.00E+10
평균	4.52E+09	2.42E+10	4.26E+10	1.84E+10

부형제 조성별로 혼합 균일도 분석 결과 아래 표 9에서 보는바와 같이 1분 혼합은 전체적으로 균수가 예상치인 2.0E+10 cfu/g에 비하여 낮았으며 (4.52E+09 cfu/g), 5분과 10분의 혼합 시간에서도 기대치와 차이가 있었다. 하지만 3분의 혼합시간에서는 기대치와 비슷한 수준의 균수인 2.42E+10 cfu/g으로 최적의 혼합 균일도를 확인 할 수 있었다. 5분 이상의 혼합은 각 부형제의 입자에 따라서 분리 현상이 일어나서 균수의 변이가 나타나는 것으로 판단된다. 본 결과를 바탕으로 동결건조 분말의 부형제와의 혼합 시간은 3분이 적절한 수준인 것으로 확인되었다.

각 부형제 별로 혼합을 한 후 개발 생균제의 저장안정성 평가를 위하여 가혹조건인 40℃, 수분 75%의 가속 조건에서 30일간 보관하면서 보관 중 샘플을 취하여 미생물 균수 분석을 통하여 각 부형제 별로 저장안정성을 평가 하였다 (표 29).

표 29. 부형제 조성별 저장 안정성 조사 (단위: CFU/g)

부형제 조성	0일	15일	30일
조성 1	3.17.E+10	1.09.E+09	5.30.E+07
조성 2	3.01.E+10	1.15.E+09	6.90.E+07
조성 3	3.10.E+10	1.35.E+09	2.60.E+05
조성 4	2.80.E+10	1.38.E+09	7.10.E+08
조성 5	3.40.E+10	1.21.E+09	7.60.E+08

저장안정성 평가 결과 lactose와 dextrose를 이용한 부형제인 조성 4와 5가 다른 부형제에 비하여 안정적인 저장안정성을 나타내었으며, 그 중 lactose가 dextrose에 비하여 좀 더 우수한

저장안정성을 확보할 수 있을 것으로 확인되어 최종 lactose 위주의 부형제를 추가 시제품 제조에 사용하였다.

바. 고농축 생균제 생산비용

고농축 생균제를 제작하기 위한 생산비용은 동결건조 후 균수를 기준으로 *Bacillus subtilis* (1,116,793원), *Lactobacillus plantarum* (1,091,903원), *Saccharomyces cerevisiae* (1,286,874원)으로 확인 되었다. 상기 제조된 동결건조 원말을 이용하여 4.0X10⁹CFU/g의 제품을 생산한다면, *S. cerevisiae*는 1,469kg, *B. subtilis*는 5,921kg, *L. plantarum*은 7,989kg의 생균제를 제조 할 수 있다. 이렇게 제조된 기초 제품을 바탕으로 규격 2.0X10⁹CFU/g의 시판용 제품을 생산 할 경우 *S. cerevisiae*는 2,937kg, *B. subtilis* 11,842kg, *L. plantarum* 15,978kg의 제품을 생산 할 수 있는데, 최종 시판용 규격의 제품 생산 단가는 효모는 438.16원/kg, *B. subtilis*는 94.31원/kg, *L. plantarum*은 68.34원/kg의 수준으로 생산이 가능할 것으로 확인되어 고농축 생균제 제품화를 통해 보다 경쟁력 있는 제품을 생산할 수 있을 것으로 확인 되었다 (표 30).

표 30. 개발제품 생산비용 및 균수 기준 생산 가능량

균주	농축 후 균수 (CFU/g)	동결건조 후 균수 (CFU/g)	회수량 (Kg)	고농축 생균제 총 생산비용 (원)	균수 기준 고농축 생균제 제품 생산 가능량 (kg)			
					4.0X10 ¹¹ CFU/g 기준	4.0X10 ¹⁰ CFU/g 기준	2.0X10 ⁹ CFU/g 기준	2.0X10 ⁹ CFU/g 기준 생산단가 (원/kg)
효모	2.3X10 ⁹	6.6X10 ¹¹	8.9	1,286,874	14.69	146.9	2,937	438.16
바실러스	1.6X10 ¹⁰	7.74X10 ¹³	0.306	1,116,793	59.21	592.1	11,842	94.31
유산균	1.13X10 ¹⁰	1.23X10 ¹²	2.598	1,091,903	79.89	798.9	15,978	68.34

사. 시판제품과의 경제성 분석

표 31에서 보는 바와 같이 효모, 바실러스 및 유산균 생균제 제품의 고농축 규격을 기준으로 볼 때 본 연구 과제를 통해 개발된 제품의 경제성 비교결과 기존 시판되는 제품에 비해 농장에서 사용을 위한 비용 투자 면에서 효모는 사료 kg 당 2.5원, 바실러스 제품은 3.5원, 유산균 제품은 6.0원을 절감할 수 있는 것으로 확인되었는데 모든 1,000두 규모의 농장 (연간 사료량

6,000톤) 을 대상으로 할 때 연간 절감할 수 있는 생균제 비용은 각 생균제 별로 효모제품은 1,500만원, 바실러스 제품은 2,100만원 그리고 유산균 제품은 3,600만원을 각각 절감할 수 있을 것으로 예상된다.

표 31. 개발제품의 시판제품과의 경제성 분석

균주	제품 규격 (cfu/g)		제품 판매가 (원/kg)		사료 첨가수준 (kg/사료 톤)		사료kg 당 비용(원)	
	시판제품	개발품	시판제품	개발품	시판제품	개발품	시판제품	개발품
효모 제품	1.2X10 ⁸	2.0X10 ⁹	5,500	3,000	1	1	5.5	3.0
바실러스 제품	1.2X10 ⁹	2.0X10 ⁹	12,000	2,500	0.5	1	6.0	2.5
유산균 제품	1.2X10 ⁹	2.0X10 ⁹	20,000	4,000	0.5	1	10.0	4.0



그림 11. 고농축 생균제 제조 공정



그림 12. 고농축 생균제 개발제품

A: 유산균 (*L. planatarum*), B: 바실러스 (*B. subtilis*), C: 효모 (*S. cerevisiae*)

2. 생균제 대표균주에 대한 고체발효 공정 확립

가. 균주 선정

고체발효공정 확립을 위해 대부분의 생균제에 사용되고 있는 유산균 (*Lactobacillus plantarum*), 바실러스 (*Bacillus subtilis*), 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*), 곰팡이 (*Aspergillus oryzae*) 균주를 선택하였다.

나. 생균제 대량생산 공정 확립을 위한 품질변이 요인 조사

고체발효를 위한 배지조성 및 생산 공정은 1차 년도에 확립된 표준 공정 (그림 13)에 따라 배지조성 및 발효온도, 발효시간을 동일하게 적용하여 추가 발효를 진행하였으며, 생균제 생산 공정 각 단계인 발효, 건조, 분쇄 및 포장 단계에서 균수변화를 조사하여 각 공정에서 발생할 수 있는 변수를 최소화하고자 하였다.



그림 13. 생균제 표준 생산공정 모식도

Lab-pilot-plant scale 단계에서 발효공정에 가장 큰 차이를 나타내는 부분이 발효공정으로 원료량이 증가함에 따라 발효품질의 균일성 확보가 가장 큰 문제가 될 수 있으며 건조 온도에 따른 균수 변화 등 다양한 변수가 있을 것으로 알려져 있어 발효공정 중 품질 기준 및 건조 공정 중 온도 기준에 대한 조사를 우선 진행하였다.

상기 선택된 4개의 균주에 대해 대량생산 공정에서도 품질을 확보를 위해 발효공정 중 균수 변화 및 온도변화, 수분함량 변화를 확인하였으며 이를 통해 발효공정 중 품질 변이를 최소화한 표준 발효공정을 확립하였다 (그림 14).

건조 온도를 확정하기 위해 4가지 균주에 대한 건조온도 조건을 조사한 결과는 그림 15~18에 나타내었다. 각 균주별로 발효종료 후 수분함량을 40%로 보정한 후 dry oven을 이용하여 40~55°C 범위에서의 균수 및 수분함량 변화를 조사하였으며, 유산균 및 효모 균주는 50°C 이상에서는 안정성이 낮아 최대 온도를 50°C로 설정하여 건조 테스트를 진행하였다. 건조 테스트 결과 대부분 생균제의 수분함량이 10% 이하일 경우 균수가 감소되는 경향이 확인되었다. 유산균 및 *A. oryzae*의 경우 40~45°C의 건조온도에서 최대 18~25시간까지 균수가 유지되었으며 효모는 40°C의 건조조건에서 25시간, 바실러스는 55°C의 조건에서도 안정성이 있는 것으로 확인되었다 (표 32).

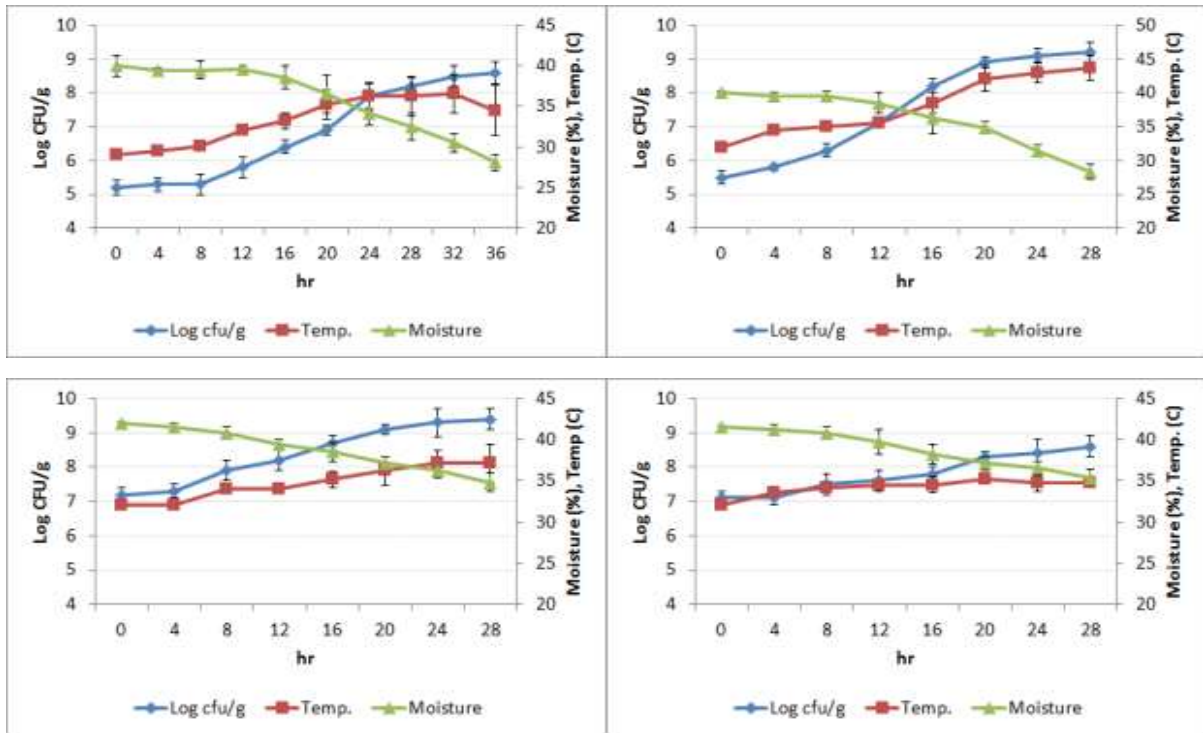


그림 14. 고체발효과정 중 주요 발효지표의 변화 (A: *A. oryzae*, B: *B. subtilis*, C: *L. plantarum*, D: *S. cerevisiae*)

표 32. 균주별 고체발효 및 건조온도 기준

균주명	원료배지조성 (C/N)	발효온도 (°C)	발효시간 (hr)	건조온도 (°C)
<i>Aspergillus oryzae</i>	소맥피 또는 대두박/소맥피 (11.6~18.1)	32	36	45
<i>Bacillus subtilis</i>	대두박 (5.2)	40	26	55
<i>Lactobacillus plantarum</i>	대두박 또는 옥수수/소맥피 (5.2~19.6)	35	28	40
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	옥수수/소맥피 (19.6)	33	28	40

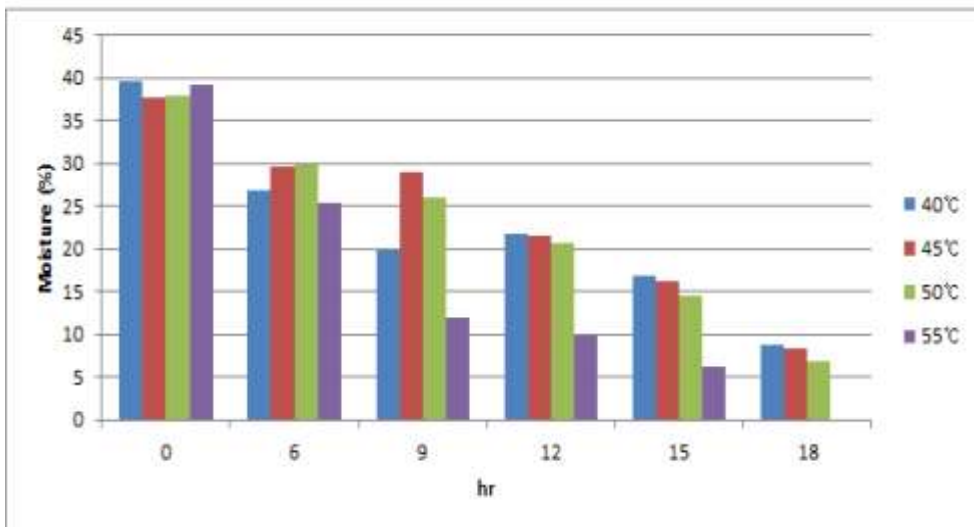
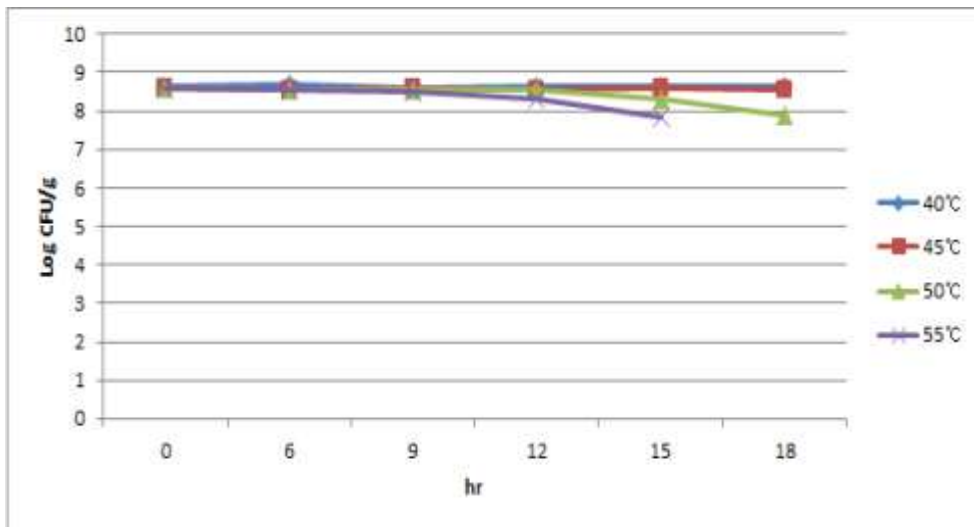


그림 15. 건조 온도 및 시간에 따른 *A. oryzae* 균수 및 수분함량 변화

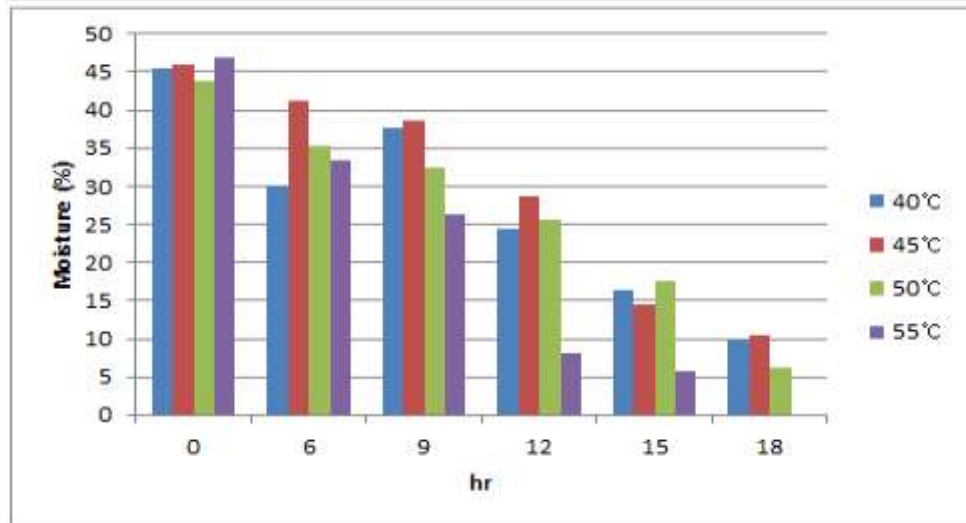
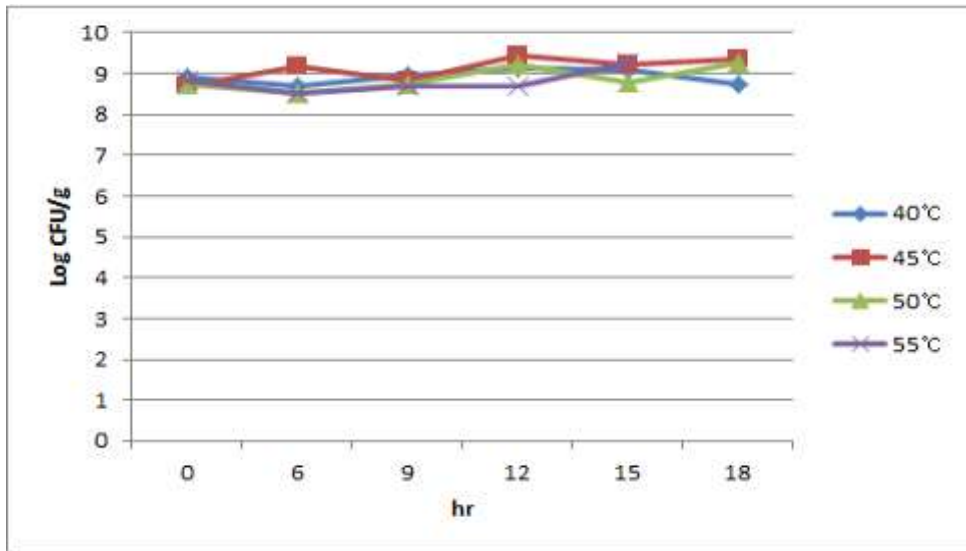


그림 16. 건조 온도 및 시간에 따른 바실러스 균수 및 수분함량 변화

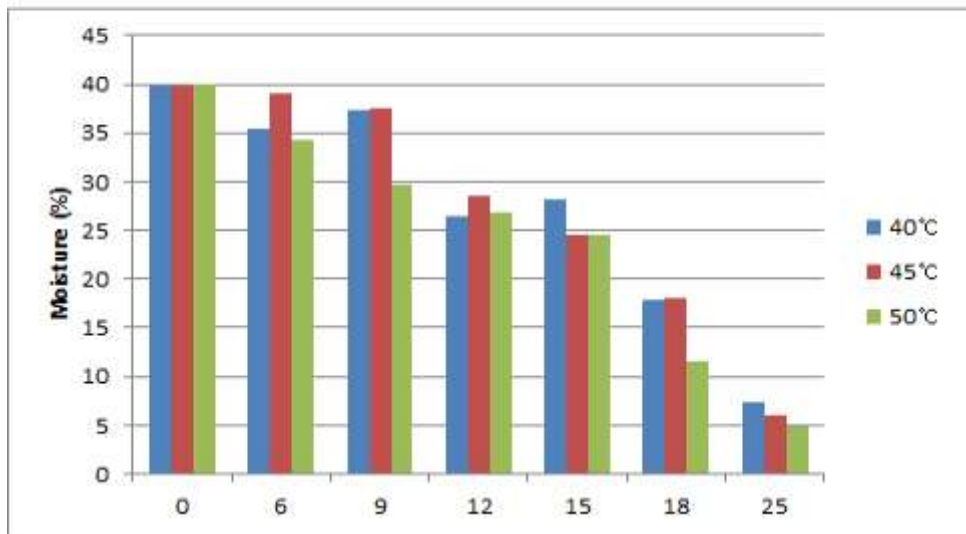
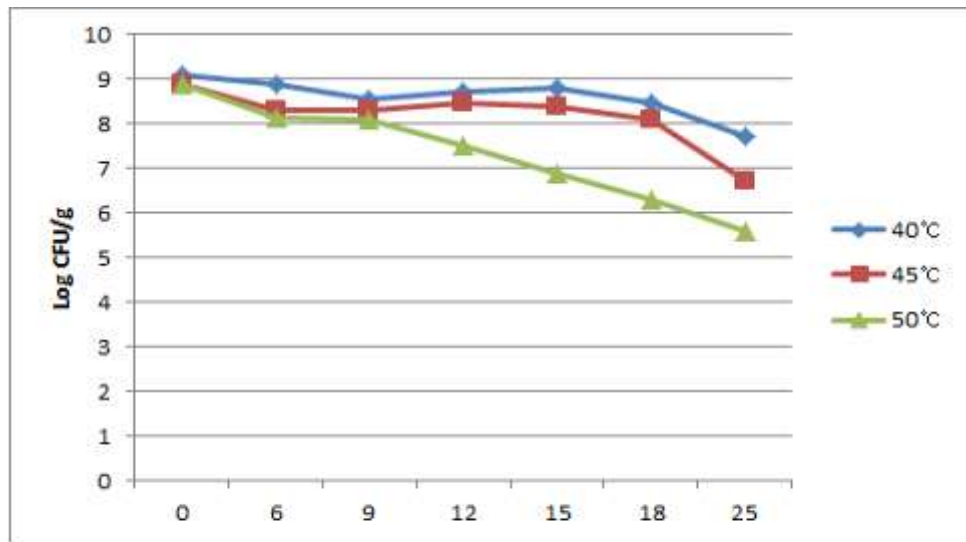


그림 17. 건조 온도 및 시간에 따른 유산균 균수 및 수분함량 변화

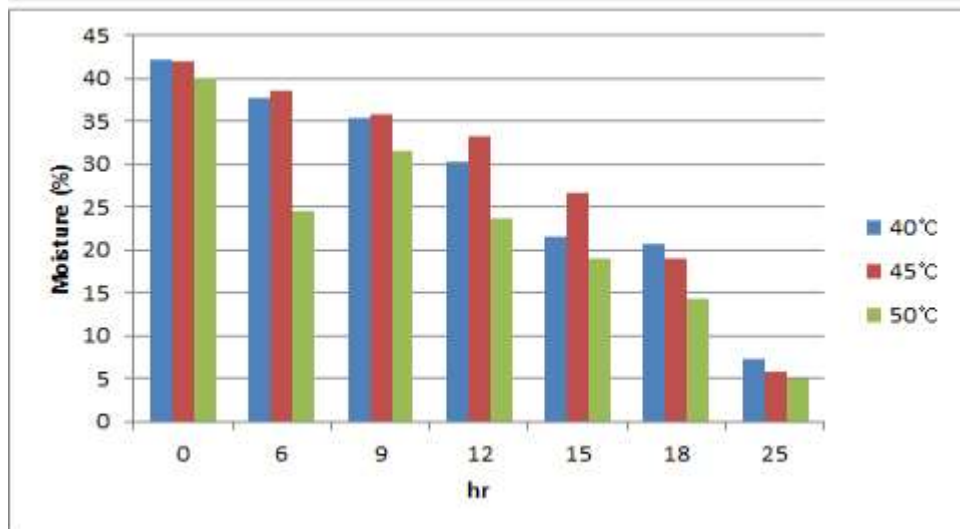
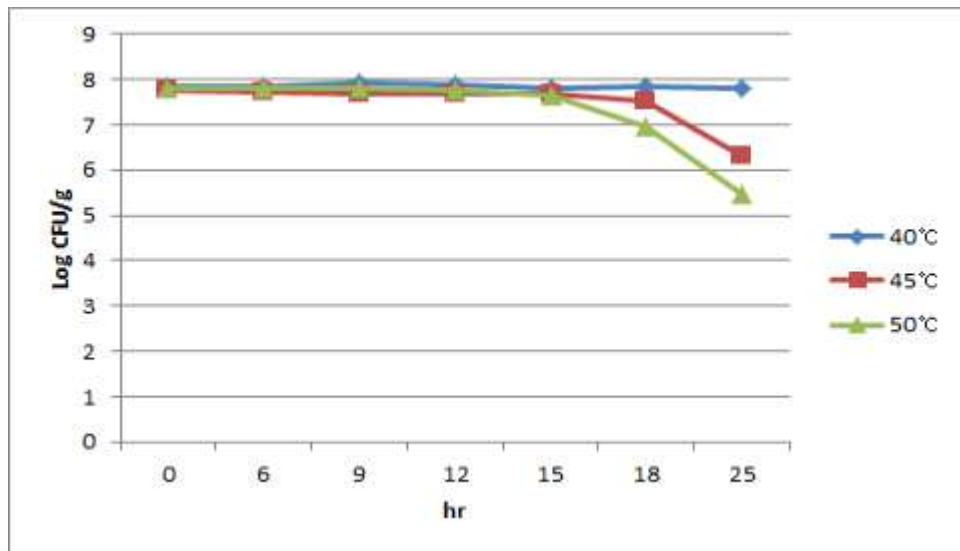


그림 18. 건조 온도 및 시간에 따른 효모 균수 및 수분함량 변화

대량생산공정에서 발효 및 건조 공정 이후에 균수 등 품질변화가 나타날 수 있는 공정은 균 일한 입자도의 제품화 과정인 분쇄공정인데 분쇄기의 형태, 원료의 투입량, 수분함량 등에 따라 다른 결과를 나타낼 수 있어 분쇄 공정 전/후의 균수 및 수분함량 변화를 조사하여 표준 제조공정에 반영하였다.

준비된 4가지 발효제품 별로 분쇄 과정 중 수분 및 균수변화를 9~10회 반복 확인한 결과 분쇄과정 중 수분 및 균수의 변화가 확인되었다 (표 33 ~ 36). 이는 고체발효 공정 자체가 곡물을 주원료로 사용하여 발효하기 때문에 곡물 원료의 입자 크기 및 분쇄 열에 의해 감소정도에 차이가 날 것으로 판단되었으며 균주별 결과를 볼 때, *A. oryzae*의 경우 분쇄 공정 후 수분함량은 약 7%, 균수는 약 5.5%정도 감소였는데 이는 분쇄 과정 중 분진을 포집하는 집진기에 의해 *A. oryzae* 포자가 유실되어 나타나는 결과로 판단된다 (표 33). 바실러스 생균제의 경우 수분함량이 약 4%, 균수는 약 3.7% 정도 감소하는 것으로 확인되었다 (표 34). 유산균 생균제는 수분은 약 8%, 균수는 약 5.7% 감소된 것으로 확인되었으며 (표 35), 효모 생균제의 경우 수분함량이 약 3.5%, 균수는 약 5.6%로 감소하는 것으로 나타났다 (표 36).

따라서 위탁 생산시설을 활용한 생균제제품의 생산을 위해서는 생산제품의 최종 규격을 고려하여 분쇄 단계에서의 원료 투입량 및 입자도 기준, 수율을 고려한 수분함량 기준에 대한 설정 후 생산이 이루어져야 할 것으로 판단된다.

표 33. 분쇄 과정 중 *A. oryzae* 생균제 균수 변화

Batch	건조 종료 후		분쇄 후 최종 제품	
	수분(%)	균수 (Log cfu/g)	수분(%)	균수 (Log cfu/g)
1	7.6	7.69	6.4	7.43
2	6.4	7.65	6.4	7.23
3	6.4	7.04	6.5	7.11
4	6.5	7.18	7.1	7.41
5	6.9	7.32	7.4	7.11
6	7.3	7.40	7.6	6.79
7	6.9	7.59	6.8	6.95
8	7.6	7.81	7.2	6.87
9	11.7	7.54	6.9	6.79
10	7.2	7.54	6.8	6.79
평균	7.5	7.53	6.9	7.12

표 34. 분쇄 과정 중 바실러스 생균제 균수 변화

Batch	건조 종료 후		분쇄 후 최종 제품	
	수분(%)	균수 (Log cfu/g)	수분(%)	균수 (Log cfu/g)
1	7.8	8.64	7.3	8.18
2	5.3	8.88	5.1	8.54
3	6.2	8.80	6.0	8.60
4	7.2	8.14	6.2	7.98
5	7.1	8.57	6.3	8.08
6	6.9	8.80	7.2	8.54
7	8.4	8.04	7.5	7.54
8	6.2	8.19	7.4	8.16
9	8.8	8.49	8.3	7.77
10	7.1	8.60	6.8	8.28
평균	8.6	8.29	8.3	7.82

표 35. 분쇄 과정 중 유산균 생균제 균수 변화

Batch	건조 종료 후		분쇄 후 최종 제품	
	수분(%)	균수 (Log cfu/g)	수분(%)	균수 (Log cfu/g)
1	7.4	8.76	7.9	8.90
2	12.6	9.18	7.8	8.64
3	10.6	9.27	8.0	8.62
4	9.7	9.08	7.9	8.93
5	9.8	9.29	9.5	8.65
6	10.6	8.87	8.2	8.52
7	7.9	9.12	7.8	8.76
8	10.2	9.90	9.5	8.91
9	8.7	8.73	8.3	8.59
10	8.1	8.91	7.9	8.62
평균	9.5	9.27	8.3	8.74

표 36. 분쇄 과정 중 효모 생균제 균수 변화

Batch	건조 종료 후		분쇄 후 최종 제품	
	수분(%)	균수 (Log cfu/g)	수분(%)	균수 (Log cfu/g)
1	8.5	8.22	7.9	7.62
2	8.6	8.58	8.3	8.08
3	8.4	8.35	8.5	7.94
4	8.4	8.26	8.2	7.62
5	8.8	8.32	8.4	7.63
6	8.5	8.26	8.3	7.76
7	8.4	8.23	7.9	7.91
8	8.8	8.11	8.4	7.86
9	8.6	8.36	8.2	7.95
10	8.8	7.83	8.7	7.49
평균	8.6	8.29	8.3	7.82

다. 생균제 대량생산 공정 확립

본 연구에서는 대량생산공정을 통한 안정적인 위탁생산을 위해 보유하고 있는 설비를 활용하여 발효조건, 건조조건, 분쇄조건을 고려하여 최적의 고체발효 생균제를 생산하기 위해 *A. oryzae*, *B. subtilis*, *L. plantarum*, *S. cerevisiae* 균주를 이용하여 10톤 이상의 고체발효 공정에 대한 반복 발효시험을 통해 최적화된 대량생산공정을 확보하고자 하였다. 대량 설비들은 주관 기관인 (주)진바이오텍에서 보유하고 있는 NK Tank (5 MT) 3기, 20 MT 고체 발효기 2기, 750L 액상 발효기 1기를 주요 설비로 이용하였다. 기존의 실험실 규모의 선행실험 결과들을 참조하여 대량 생산 공정에 적용하였다. 각각의 생균제들을 생산하기 위한 발효 조건은 표 37과 같다.

표 37. 생균제 종류에 따른 대량 생산 공정시의 가공조건

항목	발효 가공 조건 기준			
	<i>A. oryzae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>S. cerevisiae</i>
최적 발효 온도	31	31	35	34
Blower (Hz)	38	38	24	24
가습량 (kg/cm ²)	2.0	2.5	2.5	3.0

균주의 특성에 따라 온도, 풍량(aeration), 가습량을 설정하였으며 본 연구에서 목적하는 바는 축산 농가에 유용 균주의 안정적인 공급이 가능하도록 생균제 대량 생산 조건을 확립하는 것이기 때문에 1.0E + 7 cfu/g 이상의 균일한 품질이 되도록 하였다. 각 균주별로 성장에 영향을 주는 인자들에 대한 민감도를 표 38에 요약하였으며 이를 기준으로 각각의 균주에 대해 고체발효 공정으로 대량 생산하였다.

표 38. 생산 균주별 성장에 영향을 미치는 인자에 대한 민감도

Sensitivity	<i>A. oryzae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>S. cerevisiae</i>
Heat	High	Low	High	High
O ₂	High	High	Low	High
CO ₂	High	High	Low	Low
Moisture	Low	High	High	High
Shear force	High	Low	Low	Low

1) *A. oryzae* 생균제의 대량생산공정 확립

*A. oryzae*는 열에 대해 민감도가 높아 배양중의 온도가 40℃ 미만인 되도록 관리하였으며 절대 호기성 균주이기 때문에 통기량을 최소 38 Hz로 설정하여 충분히 산소와 이산화탄소의 교

환이 잘 이루어지도록 하였다. 또한 발효 중의 일정하게 35~40% 수분함량으로 유지될 수 있도록 교반 횟수 및 가습량을 설정하였다. 총 10 batch (121 MT)의 대량생산 시험을 실시하였으며 각 batch별 평균 12,099 kg을 가공하였다. 초기 수분함량은 평균 40%, 표준편차 1.27% 이었으며 초기 균수도 평균 3.77E+6 cfu/g으로 대량생산 공정의 준비단계에서 특이사항 없이 생산이 가능하였다 (표 39). 또한, 최종제품의 평균 생산량은 10,756 kg 으로 평균 생산수율은 88.9%로 나타났다.

표 39. *A. oryzae* 생균제의 대량생산 결과

Batch#	가공량 (kg)	초기 수분 (%)	초기균수 (cfu/g)	최종균수 (cfu/g)	생산량 (kg)	수율 (%)
1	12,365	42.7	1.20E+06	2.10E+08	11,067	89.5
2	11,850	40.8	2.70E+06	6.70E+08	10,511	88.7
3	11,710	39.9	4.20E+06	8.90E+08	10,340	88.3
4	11,595	38.8	4.10E+06	2.80E+08	10,146	87.5
5	12,423	40	5.50E+06	2.20E+08	11,119	89.5
6	11,681	41.1	7.60E+06	5.80E+08	10,408	89.1
7	12,445	39.8	6.60E+06	6.60E+08	11,138	89.5
8	12,473	40.2	3.30E+06	7.40E+08	11,039	88.5
9	12,260	38.5	1.10E+06	7.10E+08	10,960	89.4
10	12,190	38.7	1.40E+06	8.10E+08	10,837	88.9
평균	12,099	40	3.77E+06	5.77E+08	10,756	88.9

발효 과정에 대한 것을 볼 때, 그림 19와 같이 발효 24시간째에 최고 온도 약 40℃까지 도달하여 배양중의 온도 관리는 적정 수준이었지만 24시간째의 온도 편차가 배양중의 시간별 온도편차와 비교하였을 때 상대적으로 크게 나타나 향후 배양 20시간부터 24시간째에는 온도유지를 위한 집중적인 관리가 필요할 것으로 생각된다. 10 batch 대량 생산한 최종 제품의 평균 균수는 5.77E+8 cfu/g으로 현재 국내에서 판매되고 있는 곰팡이 생균제 제품의 기준 균수 1.0E+5 cfu/g 보다 1,000배 이상 균수가 높아 생균제로서 충분히 시장 경쟁력이 있을 것으로 확인되었다 (표 40).

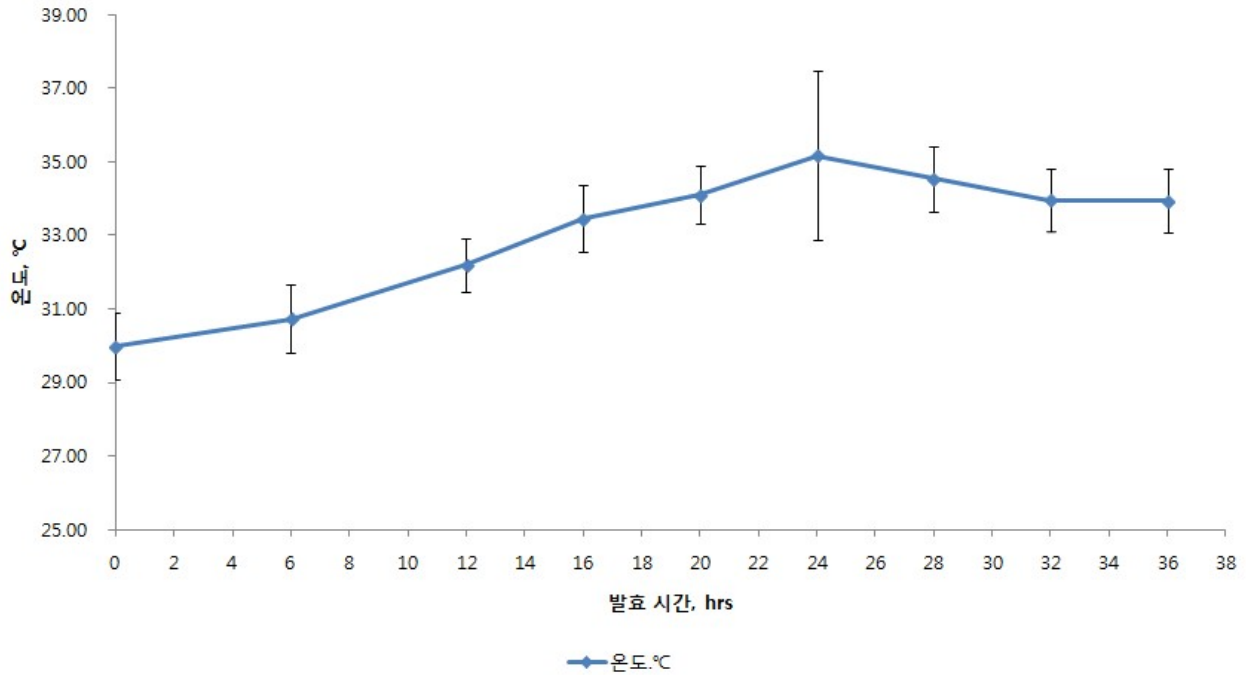


그림 19. *A. oryzae* 생균제 발효 공정 중 온도 변화

표 40. 농가에 시판되고 있는 곰팡이 생균제의 기준 균수

제품 등록 구분	제조사	기준 균수 (cfu/g)
보조사료	D	1.0E+05

2) 바실러스 (*B. subtilis*) 생균제의 대량생산 공정 확립

*B. subtilis*는 다른 균주에 비해 열에 대해 안정적이기 때문에 고체 배양중에 발생하는 대사열이 55°C 미만이 되도록 관리하였으며 통기량은 최소 38Hz 이상으로 설정하였다. 하지만 발효중의 높은 대사열과 강한 통기량에 의해 원료내의 수분이 급격히 증발하여 발효 중에 충분히 생장이 되지 않을 수 있기에 발효 전 과정 중에 수분이 35~40%으로 유지될 수 있도록 초기 수분함량, 교반 횟수, 그리고 가습량을 설정하였다. 총 9 batch (97.88 MT)의 대량생산 시험을 실시하였으며 각 batch별 평균 가공량은 10,876 kg이었다. 초기 수분함량은 평균 42.9% 표준편차 1.64% 이었으며 초기 균수도 평균 4.94E+6 cfu/g으로 *A. oryzae*생산 시와 같이 준비 단계에서 문제점은 없었다 (표 41). 그림 20과 같이 발효 24시간째에 최고 온도 약 50°C까지 도달하였으며, 다른 생균제들에 비해 배양중의 시간별 온도편차가 상대적으로 컸다. 이는 균주의 높은 성장 속도에 따라 발효의 양상이 상대적으로 빠르게 변화되는데 (예, 온도, 수분함량, 균수) 이에 따른 능동적인 대처를 통한 최종제품의 품질 (균수) 개선이 가능할 것으로 기대된다. 9 batch 대량 생산한 최종 제품의 평균 균수는 1.50E+8 cfu/g으로 현재 축산 농가에 판매되고 있는 *B. subtilis* 생균제들의 기준 균수 1.0E+6 ~ 3.5E+8 cfu/g와 차이가 없는 것으로 확인되었으며, 최종제품의 평균 생산량은 9,511 kg 으로 평균 생산수율은 87.5%로 나타났다 (표 42).

표 41. *B. subtilis* 생균제 대량생산 결과

Batch #	가공량 (kg)	초기 수분 (%)	초기 균수 (cfu/g)	최종균수 (cfu/g)	생산량 (kg)	수율 (%)
1	11,520	44.6	4.50E+06	4.70E+07	10,149	88.1
2	9,350	44.8	4.80E+06	2.20E+08	8,209	87.8
3	11,401	42.1	3.40E+06	2.10E+08	9,907	86.9
4	11,734	42.5	5.20E+06	6.40E+07	10,173	86.7
5	9,221	42.4	5.50E+06	3.50E+08	8,050	87.3
6	9,875	45.5	2.10E+06	2.55E+08	8,641	87.5
7	11,599	41.6	3.30E+06	4.10E+07	10,161	87.6
8	11,618	41.9	1.20E+07	8.90E+07	10,259	88.3
9	11,563	40.8	3.70E+06	7.70E+07	10,048	86.9
평균	10,876	42.9	4.94E+06	1.50E+08	9,511	87.5

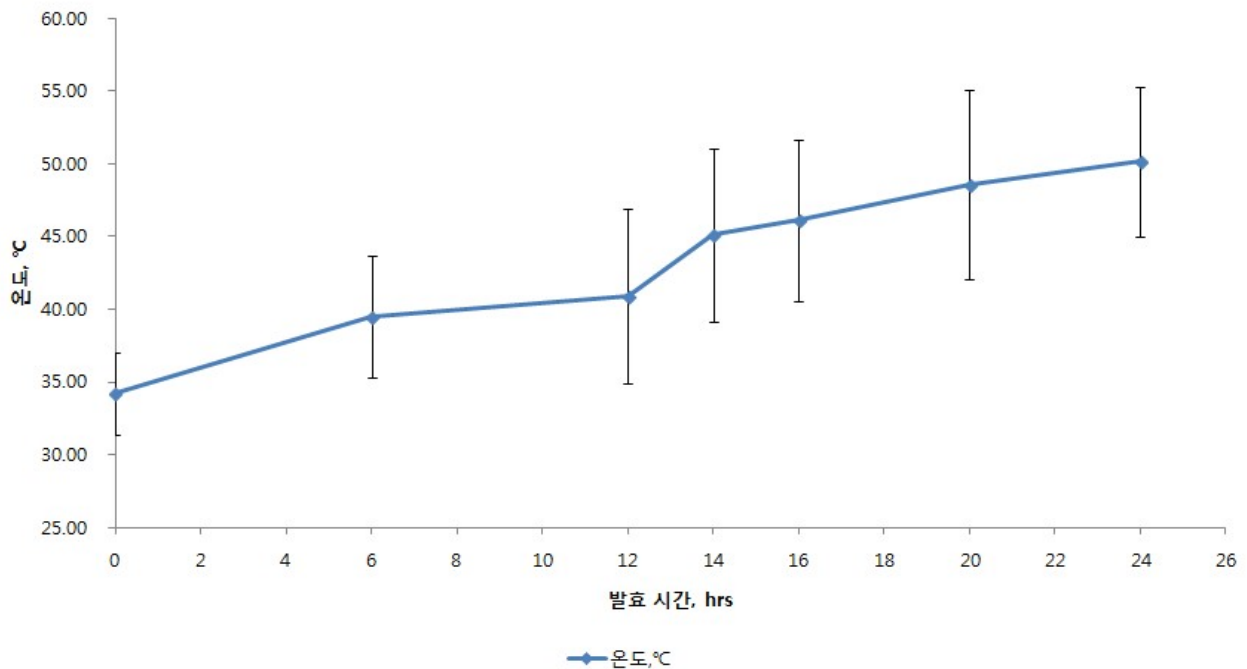


그림 20. *B. subtilis* 생균제 발효 공정 중 온도 변화

표 42. 농가에 시판되고 있는 *B. subtilis* 생균제의 기준 균수

제품 등록 구분	제조사	기준 균수 (cfu/g)
동물약품	B	3.5E+08
동물약품	C	5.0E+07
동물약품	D	1.0E+06
보조사료	E	1.0E+06
동물약품	F	1.0E+07
동물약품	G	1.0E+08
동물약품	H	3.5E+08

3) 유산균 (*L. plantarum*) 생균제의 대량생산 공정 확립

*L. plantarum*는 다른 균주에 비해 열에 대해 민감도가 높아 고체발효 공정 중 온도가 40°C 미만인 되도록 관리하였다. 또한 발효 중의 일정하게 35~40% 수분함량으로 유지되게 통기량 및 교반 횟수, 그리고 가습량을 설정하였다 (상기 표 37). 총 10 batch (115.8 MT)의 대량생산을 하였으며 각 batch별 평균 가공량은 11,581 kg이었다. 초기 수분함량은 평균 40.5% 표준편차 0.83% 이었으며 최종제품의 균수는 평균 1.39E+9 cfu/g, batch 당 평균 생산량은 10,416 kg, 평균 생산수율은 89.9%로 나타났다.

표 43. 유산균 (*L. plantarum*) 생균제 대량생산 결과

Batch #	가공량 (kg)	초기 수분 (%)	초기균수 (cfu/g)	최종균수 (cfu/g)	생산량 (kg)	수율 (%)
1	11,900	41.1	5.50E+06	2.10E+09	10,579	88.9
2	11,800	41.7	4.40E+06	1.20E+09	10,644	90.2
3	11,175	40.1	3.20E+06	1.70E+09	10,069	90.1
4	11,205	39	6.60E+06	9.80E+08	10,107	90.2
5	11,270	40.7	1.20E+06	2.10E+09	10,120	89.8
6	11,326	41.7	6.70E+06	1.32E+09	10,137	89.5
7	11,131	39.9	8.90E+05	1.90E+09	10,074	90.5
8	12,405	40.1	2.10E+06	8.90E+08	11,102	89.5
9	11,248	40.3	2.20E+06	7.80E+08	10,067	89.5
10	12,345	40.4	2.30E+06	9.70E+08	11,259	91.2
평균	11,581	40.5	3.51E+06	1.39E+09	10,416	89.9

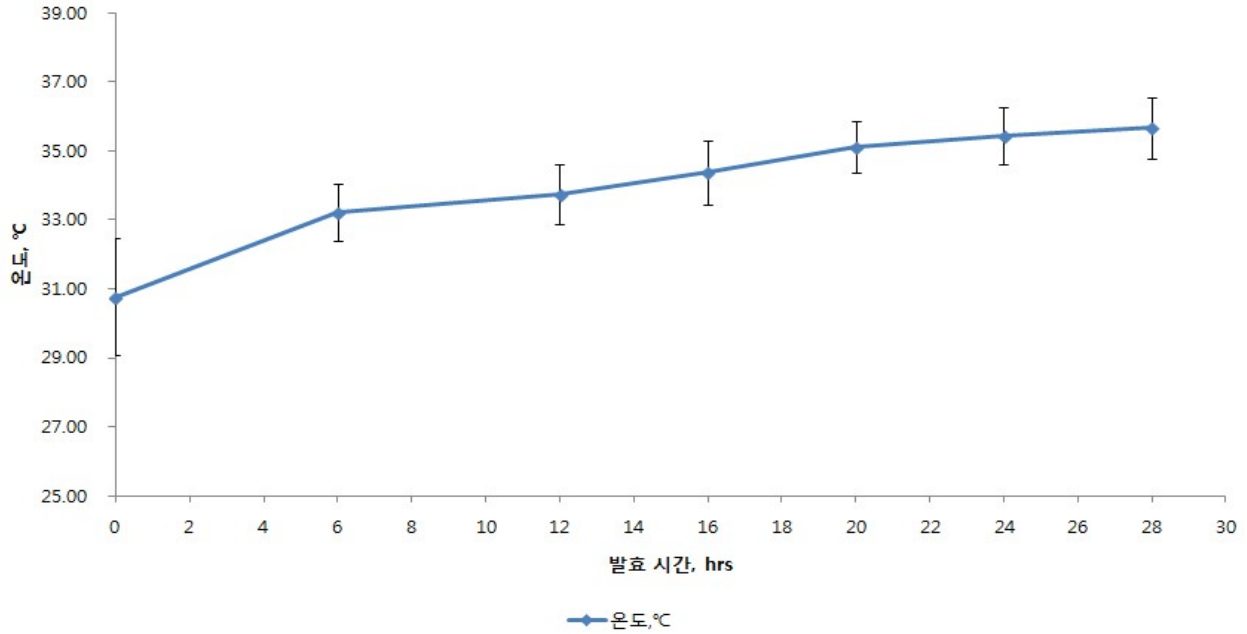


그림 21. *L. plantarum* 생균제 발효 공정 중 온도 변화

그림 21과 같이 발효 종료 시점인 28시간까지 온도의 변화 폭이 크지 않았으며 배양 시간별 온도편차도 크지 않아 균일하게 공정 관리가 된 것으로 생각된다. 10 batch 대량 생산한 최종 제품의 평균 균수는 $1.39E+9$ cfu/g으로 축산 농가에 판매되는 동약 및 보조제로서의 효모제 기준 균수 $2.0E+8$ cfu/g 보다 10배 이상 균수가 높아 시장에서의 충분한 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 판단된다 (표 44).

표 44. 농가에 시판되고 있는 *L. plantarum* 생균제의 기준 균수

제품 등록 구분	제조사	기준 균수 (cfu/g)
동물약품	B	$2.0E+08$
동물약품	C	$2.0E+07$

4) 효모 (*S. cerevisiae*) 생균제의 대량생산 공정 확립

*S. cerevisiae*는 유산균과 같이 열에 대해 불안정하기 때문에 고체발효 과정중 온도가 40°C 미만이 되도록 관리하였으며 배지에 약 5%의 당밀을 첨가하여 혐기성 조건에서도 배양이 잘 될 수 있도록 유도하였다. 또한 발효 중 수분은 35~40%로 일정하게 유지되고 효모 특유의 풍미가 생산될 수 있도록 통기량 및 교반 횟수, 그리고 가습량을 설정하였다. 총 10 batch (119.7 MT)의 대량생산 시험을 실시하였으며 각 batch별 평균 가공량은 11,970 kg이었다. 초기 수분함량은 평균 40% 표준편차 1.68% 이었으며 최종제품의 평균 균수는 $4.14E+8$ cfu/g의 안정적인 품질을 확보하였다. 최종제품의 생산량은 batch 당 평균 10,751 kg으로 평균 생산수율은 89.8%로 나타났다 (표 45).

표 45. *S. cerevisiae* 생균제 대량생산 결과

Batch #	가공량 (kg)	초기 수분 (%)	초기균수 (cfu/g)	최종균수 (cfu/g)	생산량 (kg)	수율 (%)
1	11,992	39.0	3.70E+06	2.70E+08	10,684	89.1
2	11,496	44.2	1.20E+07	9.70E+07	10,484	91.2
3	11,795	39.1	4.70E+06	3.50E+08	10,533	89.3
4	11,862	39.7	5.90E+06	5.80E+08	10,616	89.5
5	11,740	39.4	2.50E+06	2.10E+08	10,543	89.8
6	12,052	38.6	4.80E+06	1.80E+08	10,822	89.8
7	12,422	38.9	2.50E+06	5.40E+08	11,080	89.2
8	12,262	39.7	8.70E+06	6.70E+08	10,974	89.5
9	12,062	41.5	2.10E+07	5.70E+08	10,928	90.6
10	12,022	40.0	8.90E+06	6.70E+08	10,843	90.2
평균	11,970	40.0	7.47E+06	4.14E+08	10,751	89.8

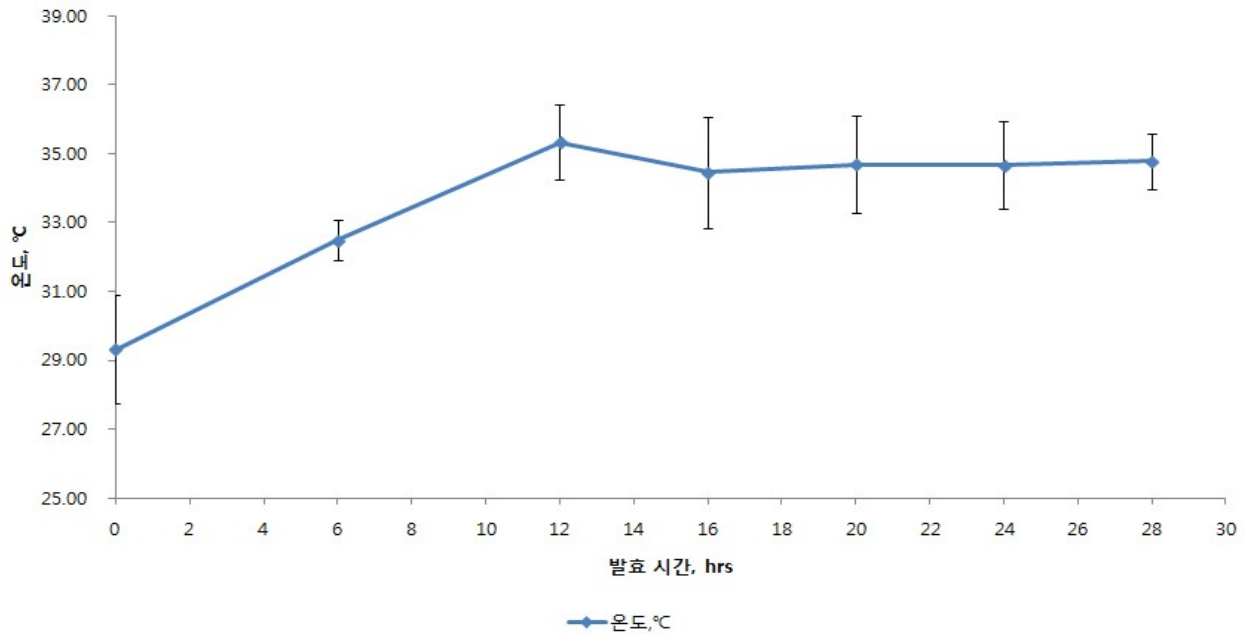


그림 22. *S. cerevisiae* 생균제 발효 공정 중 온도 변화

위의 그림 22와 같이 발효 12시간째에 최고 온도 약 35°C에 도달하여 배양중의 온도 관리는 적정 수준으로 확인되었다. 하지만 16시간째의 온도 편차가 배양중의 시간별 온도편차와 비교하였을 때 상대적으로 크기 때문에 향후 배양 12시간부터 16시간째에는 집중적인 관리가 필요

할 것으로 생각된다. 10 batch 대량 생산한 최종 제품의 평균 균수는 4.14E+8 cfu/g으로 축산 농가에 판매되는 동약 및 보조제로서의 효모제 기준 균수 2.0E+7 cfu/g 보다 10배 이상 균수가 높아 보다 경쟁력 있는 제품으로 시장 판매가 가능할 것으로 확인되었다 (표 46).

표 46. 농가에 시판되고 있는 효모 생균제의 기준 균수

제품 등록 구분	제조사	기준 균수 (cfu/g)
동물약품	A	2.0E+07
동물약품	B	1.0E+07
동물약품	C	5.0E+06
동물약품	D	1.0E+05
보조사료	E	1.0E+06

라. 개발 생균제 균주별 저장 안정성 시험

1) 액상발효 고농축 생균제의 저장안정성 평가

바실러스(*B. subtilis*), 효모(*S. cerevisiae*), 그리고 유산균(*L. plantarum*)을 대상으로 농축 및 동결건조를 하여 분말 제형화하여 저장 안정성을 시험하였다. *A. oryzae*의 경우에는 액상 배양으로 생균수를 보증하는 생균제를 만들기 어렵다. 이는 균사로 성장하면서 aeration을 위한 air flow 및 agitation에 의해 pellet형태로 전환된다. 이로 인해 pellet 내부는 영양분의 고갈에 의해 아사되어 배양액 내의 총 균수는 매우 낮게 된다. 따라서 대사산물을 목적으로 하는 경우가 아닌 생균수만을 목적으로 할 경우에는 곰팡이의 액상 배양은 부적절하다.

액상발효액의 경우 장시간 보존 시 낮은 pH와 영양분 부족 등에 의하여 균수가 저감되어 보관 저장성이 떨어지게 되는데 이 점을 보완하기 위한 방안으로 동결건조를 사용하여 저장 보관성을 높이고 있다. 하지만 동결건조 진행 시 낮은 온도와 고압 등에 의하여 대부분의 균주가 사멸하기 때문에 균체에 동결건조 보호제를 첨가하여 동결에 의한 균수 사멸을 방지하기 위한 공정을 진행한다. 이번 연구에 이용되는 균주들은 배양 후, 배양액을 15,400rpm의 연속 원심분리기를 통하여 균체만을 회수 하여 각 조성별로 동결건조 보호제를 첨가하여 동결 건조하였다. 각 균주별 동결건조 보호제 및 분말 제형화를 위한 부형제의 조성은 표 47과 같다.

표 47. 액상 배양 생균제의 분말 제형화를 위한 조성 물질

동결 보호제 조성	부형제 조성
Skim milk 10 % CMC 5%	균체 1% Lactose 97% Silicon dioxide 2%

상기 조건에서 생산한 생균제들을 가속 조건인 40°C에서 수분 75%의 환경에서 보관하면서 일정 시간별로 샘플을 취하여 생균수를 분석하였다. 다른 균주들에 비해 상대적으로 내열성을 가지는 바실러스가 저장 5개월 동안에도 다른 균주들에 비해 높은 안정성을 나타내었다. 이는 가혹한 조건에서 내생성 포자를 형성하는 균주의 특성에 의한 것으로 생각된다. 효모와 유산균은 부형제의 조성을 달리하여 추가 실험을 통해 보존 기간 중의 안정성 보완이 필요할 것으로 판단된다.

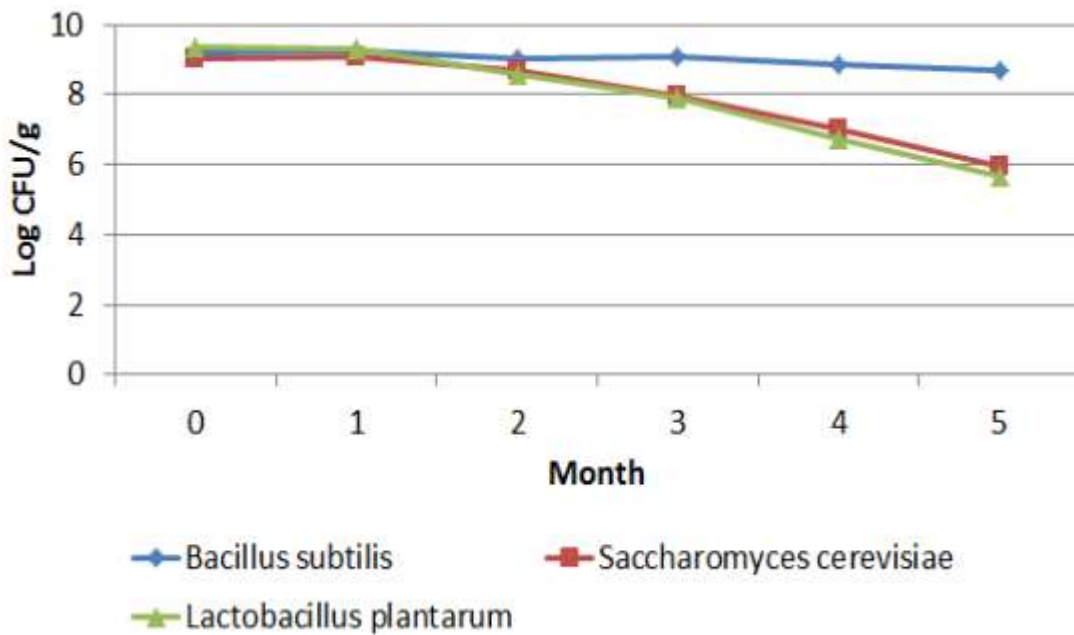


그림 23. 고농축 생균제 저장안정성 평가 결과

2) 고체발효 생균제 제품의 저장안정성 평가

고체발효에 의해 생산된 생균제들은 대량 생산된 제품들을 저장안정성 평가에 사용하였다. 가속 조건인 40°C에서 수분 75%의 환경에서 보관하면서 일정 시간별로 샘플을 취하여 생균수를 분석하였다.

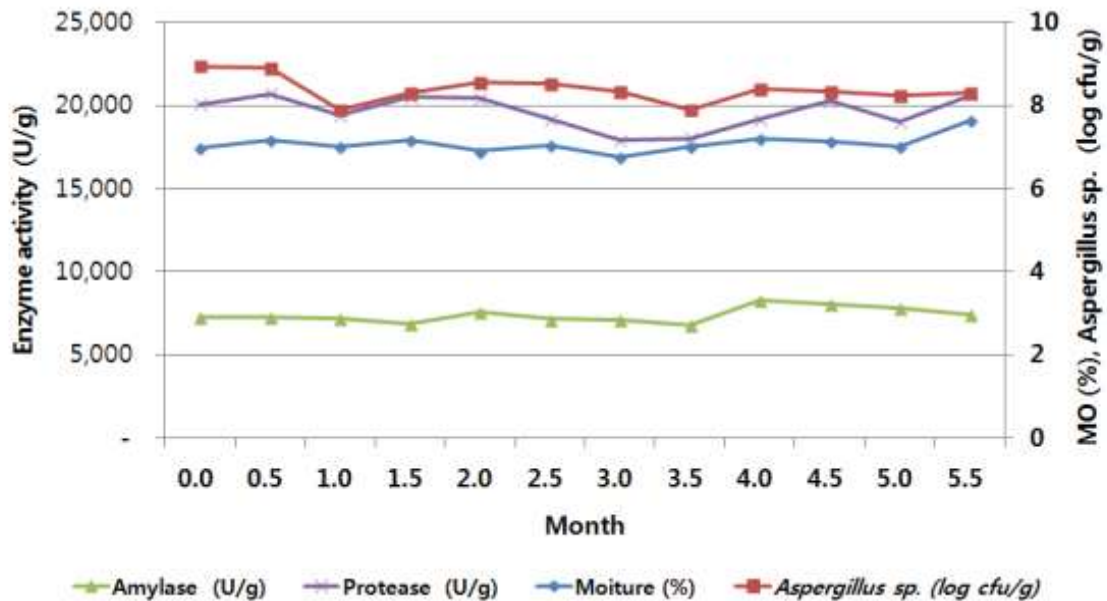


그림 24. 고체 발효에 의해 생산된 *A. oryzae* 생균제의 보존 기간중의 안정성

*A. oryzae*의 경우 생균제의 역할은 *A. oryzae*의 다량으로 발현되는 다양한 체외성 효소들에 의해 host에게 긍정적인 작용을 하는 것에 있다. 특히 고체 발효를 통한 *A. oryzae*의 배양은 다량의 Amylase와 protease 활성을 기대할 수 있다. 따라서 이번 저장성 평가에서는 균수외에 amylase와 protease 활성을 조사하였다.

그림 24에서와 같이 균수, amylase, 그리고 protease의 활성이 5개월 동안 매우 안정적으로 유지됨을 알 수 있다. 일반적으로 곰팡이류는 척박한 환경 조건에서는 spore를 형성시켜 생존 능력을 부여한다. *A. oryzae*의 Spore를 유도하는 인자로는 열, 영양분, CO₂ 농도, 수분 함량이 대표적이다. 이는 *A. oryzae*는 고체발효 배양 종료 시점에 spore를 형성하는 데, 이렇게 형성된 spore가 균주의 생존성을 크게 향상시킨다. 그리고 spore를 형성하면서 효소도 같이 포집되는데 이는 생존하기 좋은 형태의 환경이 조성될 경우를 위한 준비이다. 따라서 곰팡이 생균제를 생산하는데 있어서 고체발효 공정은 액상 발효에 비해 생산하기 유리한 방법이며 유통 과정에도 활성을 대부분 유지할 수 있는 보다 경제적인 공정으로 확인되었다.

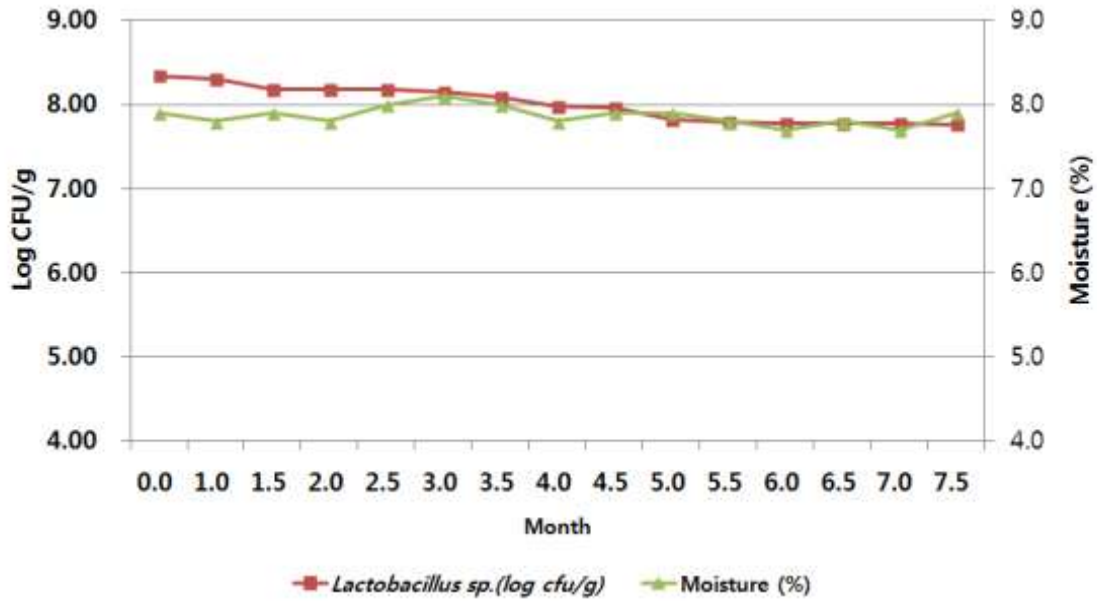


그림 25. 고체 발효에 의해 생산된 유산균 생균제의 보존 기간중의 안정성

유산균의 경우 보존 시간이 지남에 따라 균수가 감소하여 7개월째에는 $5.9E+07$ cfu/g 이었다. 소폭 감소하였지만 액상 배양을 통해 생산된 유산균제제보다는 매우 안정성이 높았다. 따라서 제조 단가 및 저장 안정성을 고려하였을 때 액상 배양 보다는 고체 배양을 통한 유산균 생균제가 축산 농가의 보급에도 전혀 문제가 없을 것으로 판단된다 (그림 25).

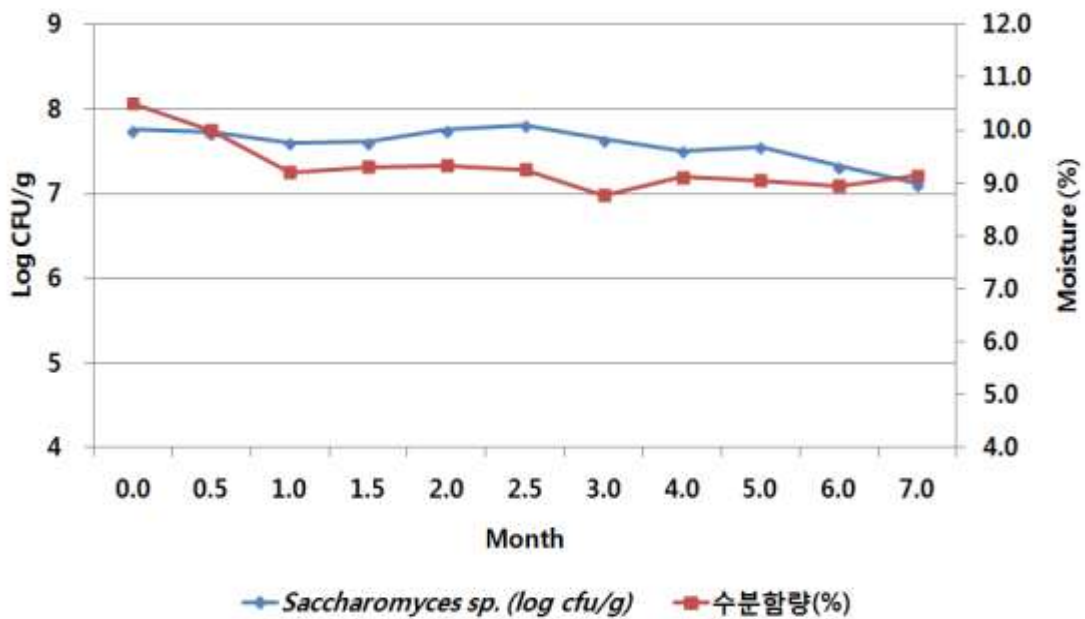


그림 26. 고체 발효에 의해 생산된 효모 생균제의 보존 기간 중의 안정성

효모의 경우 보존 시간이 5개월까지는 매우 안정적이었으며 보존 7개월째에는 $1.3E+07$

cfu/g 이었다 (그림 26). 유산균 고체 배양과 같이 효모도 액상 배양을 통해 생산된 제제보다 안정성이 높았다. 따라서 제조 단가 및 저장 안정성을 고려하였을 때 액상 배양 보다는 고체 배양을 통한 효모 생균제가 축산 농가에서도 저장 안정성을 더 오래 확보할 수 있을 것으로 판단되었다.

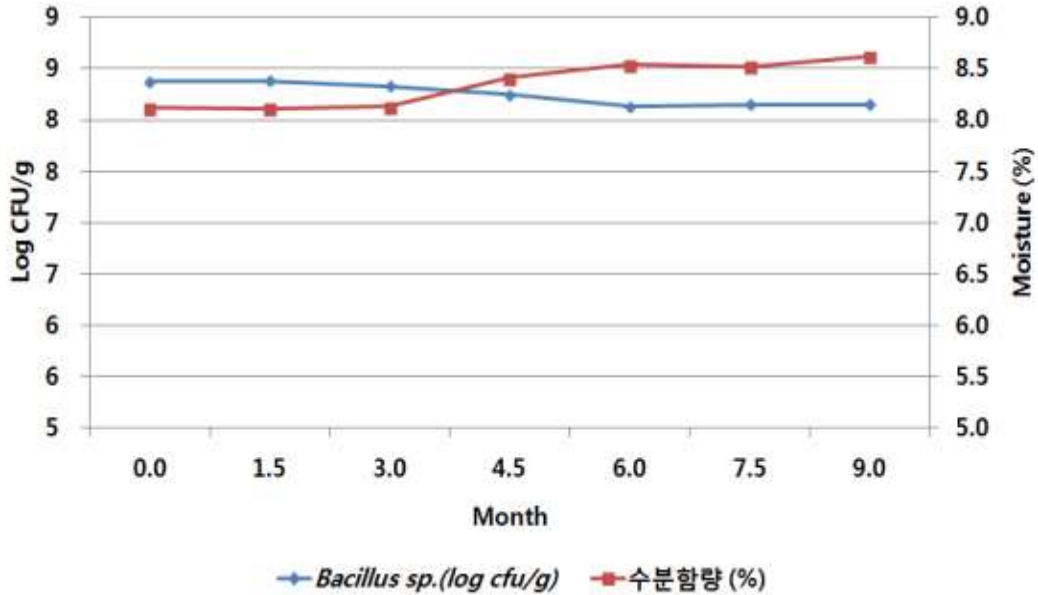


그림 27. 고체 발효에 의해 생산된 바실러스 생균제의 보존 기간중의 안정성

바실러스 생균제의 경우 보존 시간이 9개월까지는 매우 안정적이었으며 다른 생균제들 보다 더 우수한 안정성을 나타내었다 (그림 27). 내생성 포자를 형성하는 균주의 특성상 액상 배양과 고체 배양에서 안정성이 매우 높은 것으로 생각된다. 그렇지만, 생산 단가를 고려하였을 때 액상 배양 보다는 제조 단가가 저렴한 고체 배양을 통한 바실러스 생균제의 제조가 경제성 측면에서는 유리할 것으로 판단된다.

마. 개발제품의 pH 안정성 및 열안정성 평가

가축이 섭취한 이후 생균제로서 기능을 유지하기 위해서는 소화관을 통과하여도 생존할 수 있어야 하기 때문에 위장관의 낮은 pH에서 생존이 가능해야 하며, 십이지장에서 분비되는 담즙에 대한 내성이 있어야 한다. 또한 펠렛 형태로 제조되는데 있어 열처리 공정이 포함되기에 사료첨가제에서의 생균제의 요구되는 또 다른 조건은 내열성이다. 따라서 본 연구에서 개발된 생균제 제품들이 상기의 조건들에 대해 부합되는지에 대해 조사하였다.

1) 고농축 생균제의 내담즙성 평가

앞서 설명한바와 같이 *A. oryzae*의 경우 생균제로서 기능을 할 수 있는 개체수까지 액상 배양하기 어렵기 때문에 본 연구에서는 제외하였다. 액상 배양 농축 생균제들을 생균수가 10^7 cfu/ml이 되도록 대조구, 0.3% 및 1% oxgall(Difco)이 첨가된 MRS broth 배지 혹은 LB broth에 접종하고, 37°C에서 24시간 까지 진탕배양하면서 시간별 균수를 조사하였다. 생균제는 소장에 도달된 후에 담즙산염에 의한 생육저해가 극복되어야 소화관 전 부위에서 생균제로서의 기능을 기대할 수 있다.

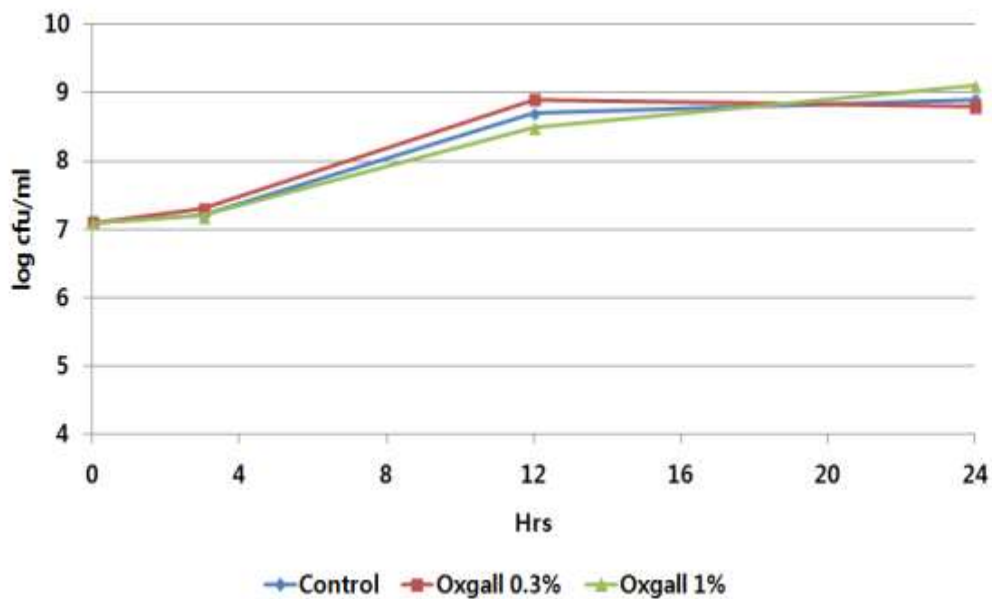


그림 28. 유산균 액상 배양 생균제에 대한 내담즙성 실험 결과

액상 배양으로 제조한 유산균 생균제는 oxgall에 대해 내성을 나타내어 내담즙성을 확인하였다 (그림 28). 상기 유산균 생균제는 oxgall 1%에 대해 내성을 나타내기 때문에 실제 가축의 소장에서도 소장의 0.06% 담즙 농도에 대해서 안전할 것으로 판단되었다.

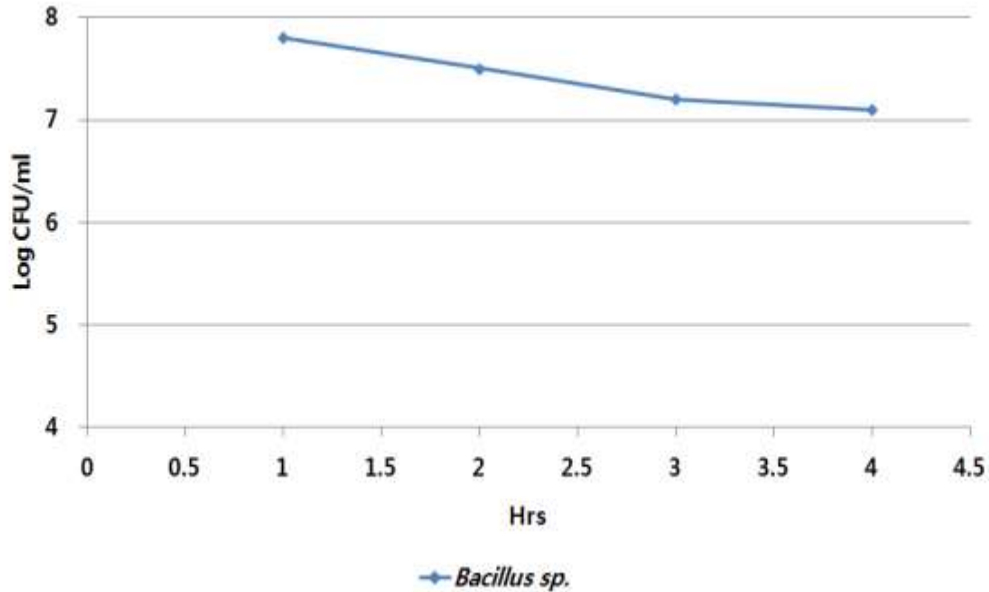


그림 29. 바실러스 액상 배양 생균제에 대한 내담즙성 실험 결과

담즙산에 대한 내성은 0.3% oxgall이 함유된 LB 배지에서의 액상 배양하여 제조한 바실러스 생균제의 균수를 조사하였다. 그림 29는 oxgall 0.3%에 대한 생육 결과를 나타낸 것으로 액상 배양을 통한 바실러스는 우수한 담즙산 내성을 보였다.

2) 고농축 생균제의 내산성 평가

본 연구에서는 개발제품을 대상으로 제품에 포함된 각 균주별로 *in vitro* 내산성 평가를 pH 2, 3, 4의 범위에서 진행하였다. 내산성 실험은 최종 액상배양 생균제 제품 3g을 정량하여 50ml Centrifuge tube 넣고 멸균수 27ml을 첨가한 후 5N HCl을 이용하여 pH를 각각 2, 3, 4로 보정 한 후 shaking water batch를 이용하여 37°C에서 70rpm으로 진탕 배양하면서 8시간까지의 균수 변화를 조사하여 생존율로 나타내었다.

유산균의 경우 pH 2를 제외한 모든 처리구에서 1시간 반응 후 초기 100% 대비 5% 정도가 감소한 95% 수준의 생존율을 보였으나 pH 2에서는 35% 감소하였다 (그림 30). 상기 결과들을 고려하였을 때 액상 배양 유산균 생균제는 신생자돈에 급여 가능할 것으로 생각된다. Fuller(1992)에 따르면 신생자돈은 위내 pH가 4.0~5.9로 성돈의 2.3~4.5에 비해 높기 때문에 포유자돈의 소화관에는 상대적으로 내산성이 낮은 생균제를 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

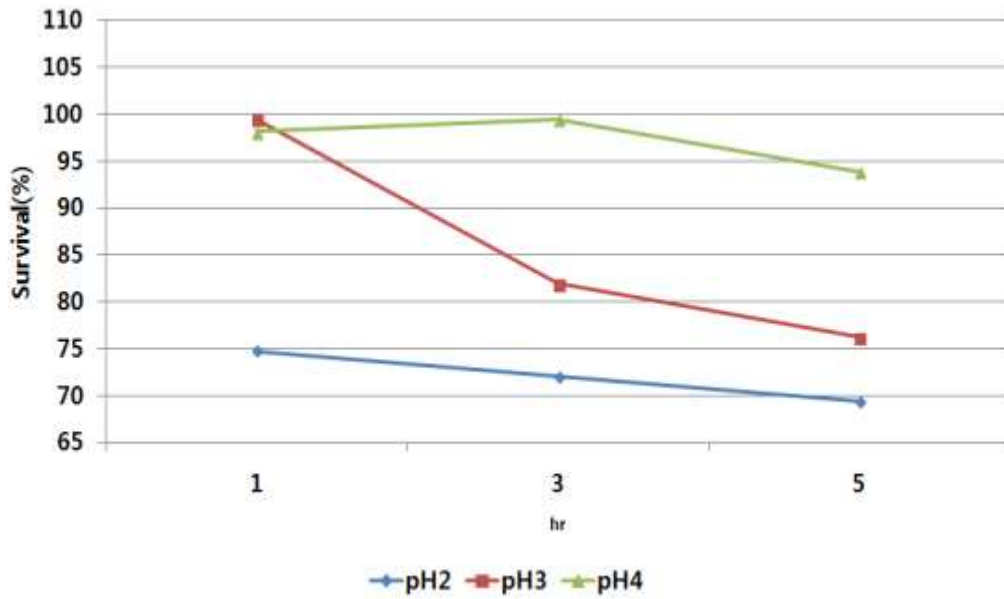


그림 30. 유산균 액상배양 생균제에 대한 내산성 실험 결과

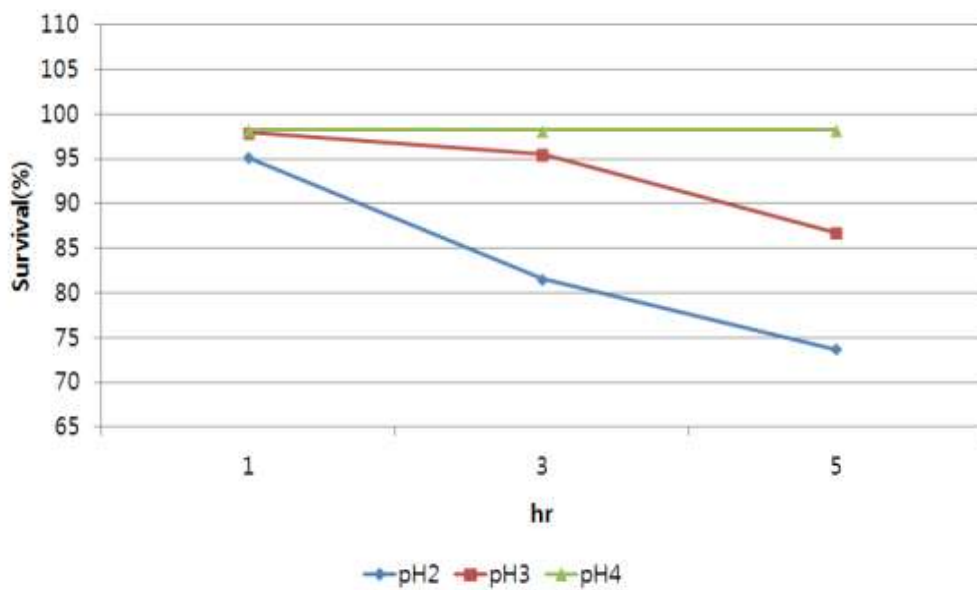


그림 31. 효모 액상 배양 생균제에 대한 내산성 실험 결과

효모균주의 경우 pH 2, 반응 1시간 동안에는 95%이상의 생존율을 나타내었으며 반응 3시간까지는 80% 이상의 생존율을 나타내어 실제 급이 시 높은 수준으로 위를 통과하여 장까지 생존하여 도달 할 수 있을 것으로 판단된다 (그림 31).

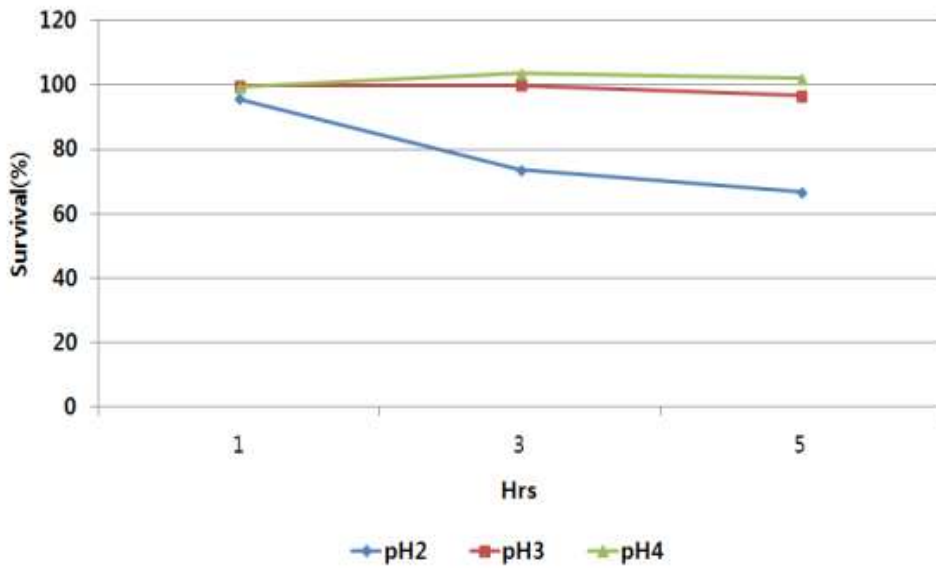


그림 32. 바실러스 액상 배양 생균제에 대한 내산성 실험 결과

바실러스 고체배양물을 pH 2, 3, 4로 조정된 용액에 방치하여 균수의 변화를 확인하였다 (그림 32). pH 3, 4로 조정된 용액에서 3시간 후의 생존율은 초기 접종 농도와 동일한 수준인 95% 이상의 생존율을 나타내었다. pH 2에서는 반응 3시간째에 73.8% 까지 생존율이 확인되어 가축에 공급하여도 균주의 안정성은 우수할 것으로 확인되었다.

3) 고농축 생균제의 열안정성 실험

본 연구에 사용된 액상 배양 미생물들은 농축 및 동결건조 공정을 통해 분말 제형화 하였으며 열에 대한 안정성 평가 실험 조건은 다음과 같다. 가열시의 열전도율을 높이고자 glass cap-tube (반지름 1cm, 높이 15cm, 샘플 1g 담을 경우 샘플 높이 약 2cm)에 각각의 액상 배양 분말 생균제들을 1g씩 담아, 37°C, 60°C, 80°C, 100°C 온도로 설정한 항온저수조 (water-bath)에서 처리 시간에 따른 생균수를 분석하였다. 열 처리된 샘플내의 생균수 분석은 각각의 샘플 1g을 멸균수 9ml 첨가하여 희석시킨 후, 단계적으로 희석하여 준비된 평판배지에 도말하여 37°C, 24시간 배양하였다. 배양 후 미생물 균집수는 각 plate의 colony-forming unit(CFU)로 계산하였다.

표 48에서와 같이 액상 배양 생균제들은 균주의 특성에 따라 열에 대한 안정성이 다르게 나타났다. 내생성 포자를 형성하는 바실러스의 경우에는 100°C에서도 내열성을 나타내었지만 효모와 유산균은 100°C에서 대부분 사멸하였다. 생균제로서 역할을 충분히 발휘하기 위한 대표적인 요건 중에 하나는 열에 대한 안정성이다. 사료 가공 생산 공정중에 발생하는 열에 민감도가 높을 경우 제품화하는데 문제가 되기에 산업체에서는 열에 대한 내성 균주들을 분리 및 확보하거나 제형화 공정을 개선하여 생균제로서의 품질을 확보하고 있다. 상기 액상 배양 생균제들을 제형화 (펠렛)를 통해 바실러스는 100°C, 10분까지의 처리조건에서도 안정성을 확보할 수

있었으나, 유산균 및 효모 균주는 60°C, 5분 열처리를 통해서도 안정성 확보가 어려워 2중 코팅 등 추가 열안정성 확보를 위한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

표 48. 액상 배양 생균제의 내열성 결과

(CFU/g)

Probiotics	Heat-treatment (min.)	Temperature			
		Room temp.	60°C	80°C	100°C
<i>Lactobacillus sp.</i>	5	1.7E+10	3.2E+6	N.D ⁽¹⁾	N.D
	10		2.7E+5	N.D	N.D
<i>Saccharomyces sp.</i>	5	8.6E+9	8.2E+7	4.7E+5	N.D
	10		2.4E+5	2.5E+3	N.D
<i>Bacillus sp.</i>	5	4.0E+9	1.9E+9	1.2E+9	9.9E+8
	10		2.3E+9	1.3E+9	7.7E+8

⁽¹⁾ Not detected

4) 고체발효 생균제의 pH 안정성 및 내열성 평가

생균제 제품에 포함되는 균주들은 일반적으로 내산성 및 내담즙성을 기본 구비 조건으로 요구되는데, 충분한 생리 활성기능을 발휘하기 위하여 공복시 강산성 조건(pH 2)의 위장을 통과하여 소장내로 도달 생존해야 하기 때문이다. 또한 많은 생균제들이 펠릿화 공정을 통해 가공이 되기 때문에 내열성에 대한 고려가 반드시 필요하다.

가) 고체발효 생균제의 내담즙성 평가

본 연구에서 고체배양물 생균제로서의 *Aspergillus* 균주는 담즙에 대해 (oxgall 0.3%) 내성을 가지고 있었다. 이는 고체 배양을 통한 *Aspergillus* 생균제는 대부분 포자 형태로 존재하기 때문에 담즙에 대한 내성을 나타내는 것으로 생각된다 (그림 33).

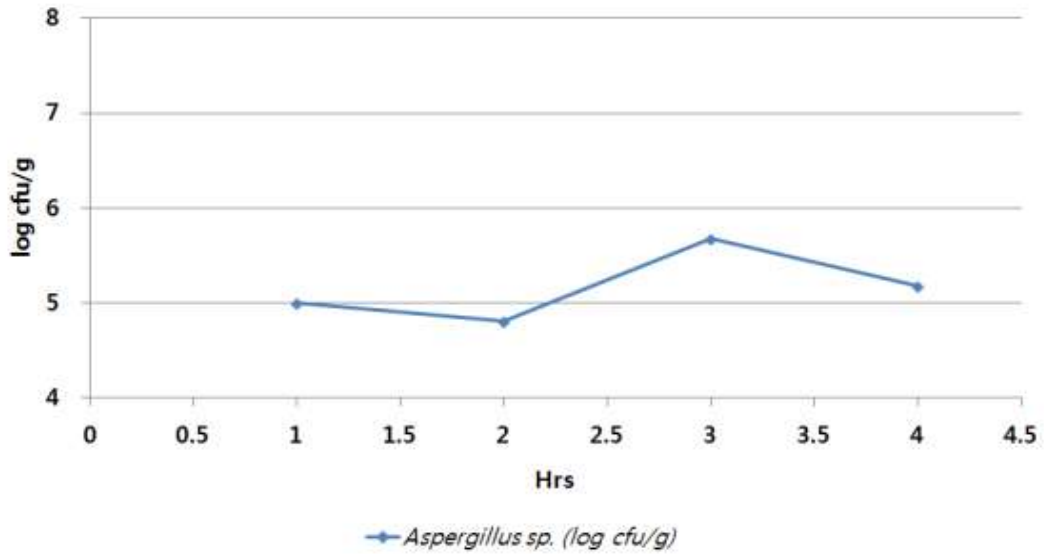


그림 33. *Aspergillus* 고체배양 생균제에 대한 내담즙성 실험 결과(Oxgall 0.3%)

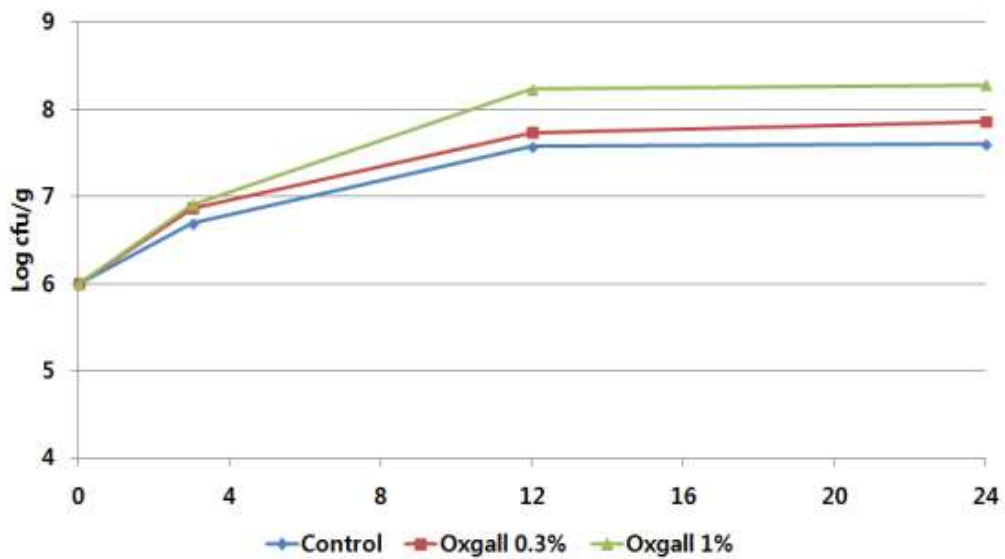


그림 34. 유산균 고체배양 생균제에 대한 내담즙성 실험 결과

유산균 고체배양물을 생균수가 10^6 cfu/ml이 되도록 대조구, 0.3% 및 1% oxgall(Difco)이 첨가된 MRS broth 배지에 접종하고, 37°C 에서 24시간 까지 진탕배양하면서 시간별 균수를 조사하였다 (Ahn et al., Kor. J. Anim. Sci. (1999) 41(3) 335-342, ; B. Hyronimus et al., International Journal of Food Microbiology(2000) 61, 193-197).

표 49. Oxgall 첨가 농도에 따른 시간대별 생존율(%)

구 분	0시간	12시간	24시간
대조구	100	100	100
Oxgall 0.3%	100	100	100
Oxgall 1.0%	100	100	100

담즙에 대한 내성을 확인하기 위해 0.3%와 1%(w/v) oxgall이 첨가된 MRS broth와 oxgall이 첨가되지 않은 MRS broth에서 배양된 생균수를 각각 측정하여 생존율을 조사한 결과, 담즙에 대한 생존율은 모두 100%로 나타내었다 (표 49). *Lactobacillus* 균주는 0.3%(w/v) bile salt 첨가 시에 100%까지 생존한 경우가 있었으며(Shin et al., 1995), 젖갈에서 분리한 유산균은 인공담즙 0.1% oxgall 첨가시에 생존율이 200%까지 되어 일부 유산균은 담즙 첨가에 의해 생육이 촉진되었음을 보고하였다 (Lee et al., 2003). 본 연구에서 나타난 oxgall에 대한 100% 생존율은 섭취한 유산균이 담즙에 의해 사멸되지 않고 장내까지 도달하여 가축에 유익한 작용을 할 수 있음을 나타낸다.

바실러스 생균제에 대한 담즙산에 대한 내성은 0.3% oxgall이 함유된 LB 배지에서의 생육 상태를 조사하였다. 그림 34는 oxgall 0.3%에 대한 생육 결과를 나타낸 것으로 고체 배양을 통한 바실러스는 사멸하지 않아 우수한 담즙산 내성을 보였다 (그림 35).

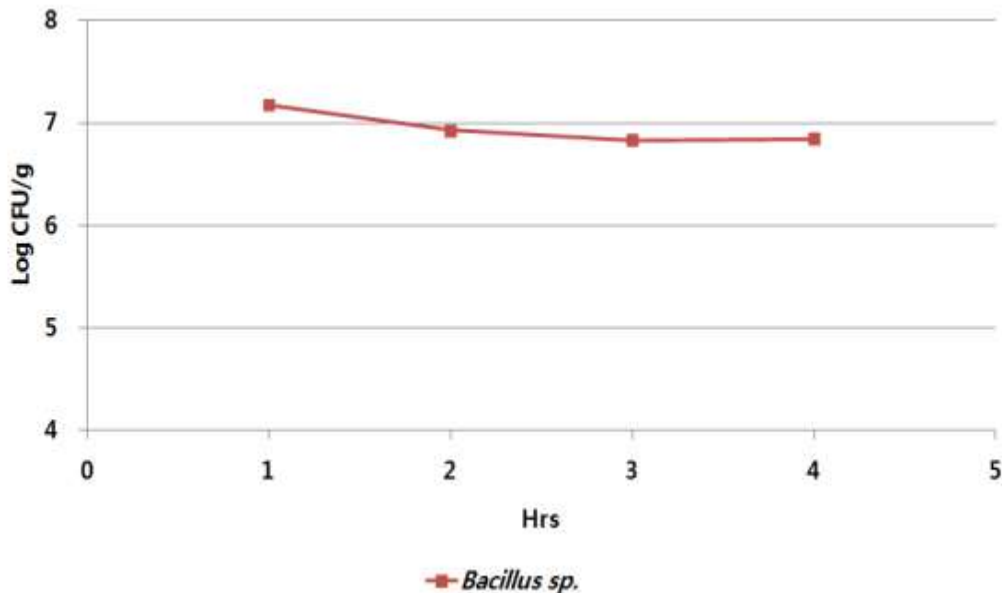


그림 35. 바실러스 고체배양 생균제에 대한 내담즙성 실험 결과 (Oxgall 0.3%)

나) 고체발효 생균제의 내산성 평가

가축에 급이하여 생균제로서 충분한 기능을 발휘하기 위해서는 pH 3이하의 낮은 pH 조건의 위장관을 통과하여 소장내로 도달하여 생존하여야만 한다(Booth, 1985, McDonald, 1990). 따라서 본 연구에서는 개발제품을 대상으로 제품에 포함된 각 균주별로 *in vitro* 내산성 평가를 pH 2, 3, 4의 범위에서 진행하였다. 내산성 실험은 최종 고체배양제품 3g을 정량하여 50ml Centrifuge tube 넣고 멸균수 27ml을 첨가한 후 5N HCl을 이용하여 pH를 각각 2, 3, 4로 보정한 후 shaking water batch를 이용하여 37°C 에서 70rpm으로 진탕 배양하면서 8시간까지의 균수 변화를 조사하여 생존율로 나타내었다.

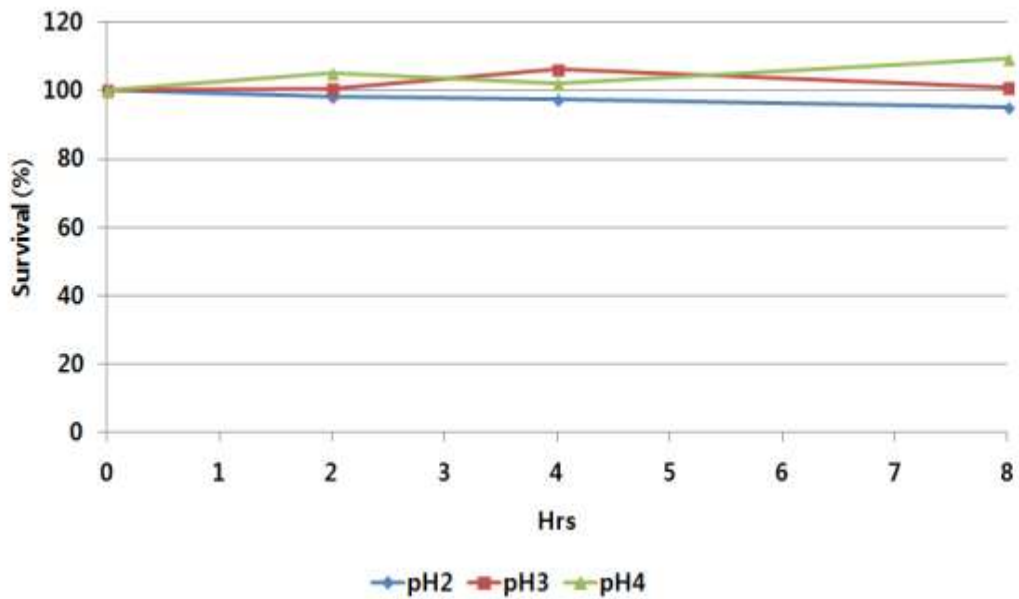


그림 36. *A. oryzae* 고체발효 생균제에 대한 내산성 실험 결과 (생균수)

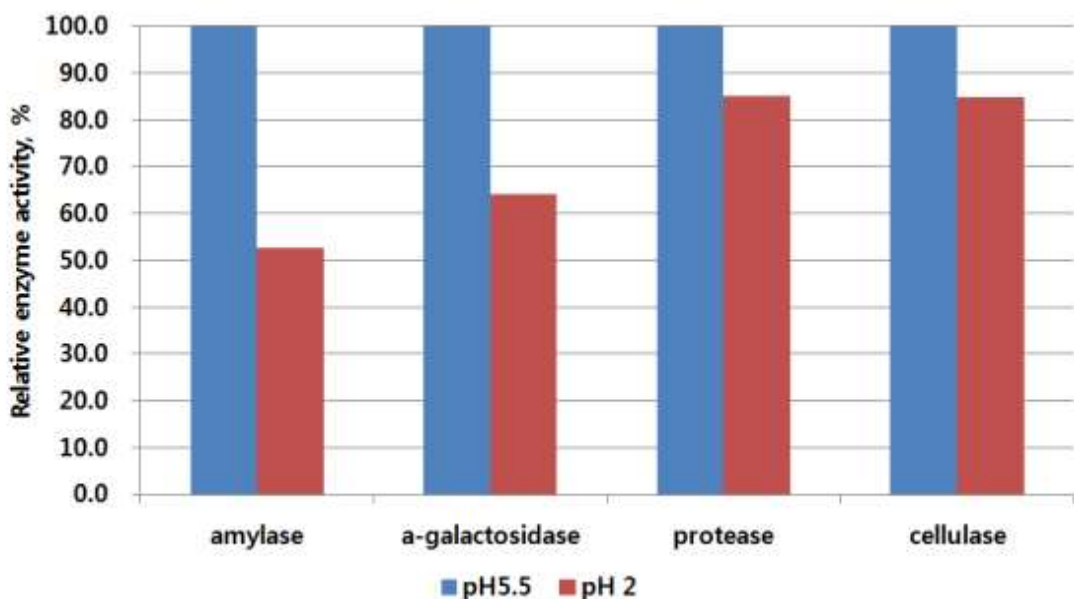


그림 37. *A. oryzae* 고체발효 생균제에 대한 내산성 실험 결과(효소활성)

A. oryzae 고체배양물을 산성 조건에서 방치하여 균수의 변화를 확인하였다 (그림 36). pH 2에서도 뛰어난 생존력을 보였으며 이는 가축의 위산에서도 동일한 결과를 나타낼 것으로 생각된다. 곰팡이 자체의 포자 형성능에 의해 생존능력이 향상되기도 하지만 고체배양물 자체의 buffer capacity에 따른 산성 pH의 완화에 의해 내산성이 부여 되는 것으로도 생각할 수 있다. 효소의 활성을 효소의 종류에 따라 다르지만 적게는 약 15%에서 많게는 약 40% 감소하였다. 이는 효소 단백질인 pH 2에서 변성이 일부 되어 활성이 소실된 것으로 생각된다 (그림 37).

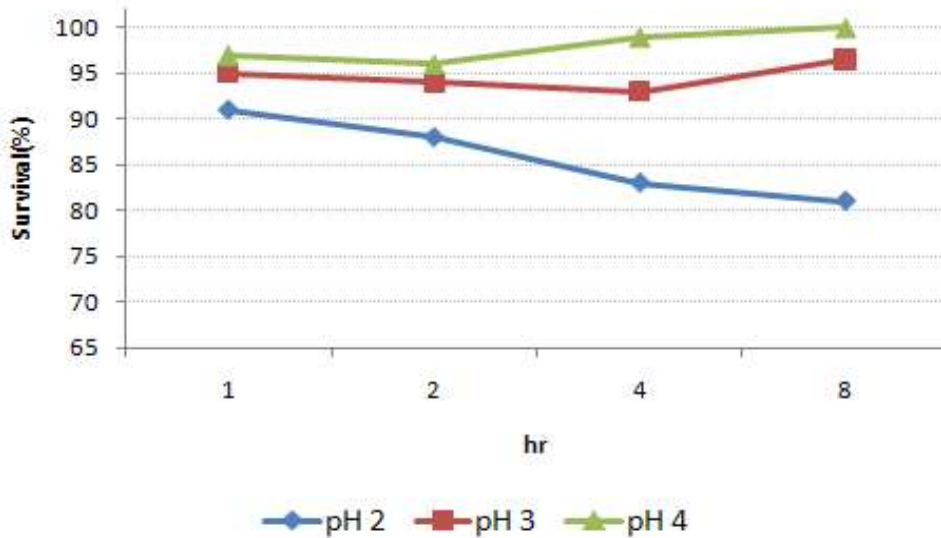


그림 28. 유산균 고체배양 생균제에 대한 내산성 실험 결과

유산균의 경우 모든 처리구에서 1시간 반응 후 초기 100% 대비 10% 정도가 감소한 90% 수준의 생존율을 보였으며, pH 4에서는 반응 2시간 이후 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 pH 3에서도 반응 4시간 이후 증가하는 경향을 나타내어 상대적으로 높은 내산성을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, pH 2에서 반응 1시간이후 93% 수준의 높은 생존율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다 (그림 38). 기존 보고에 의하면 *Lactobacillus*의 경우 pH 2.5에서 30분간 처리할 경우 생존율은 1%였으나 (Mutai, 1983), 본 연구에서는 상대적으로 높은 생존율을 나타내었다. 분비 위액은 pH 2이지만 침과 사료의 섭취에 의해 희석되어 보다 더 높은 생존율을 기대할 수 있다.

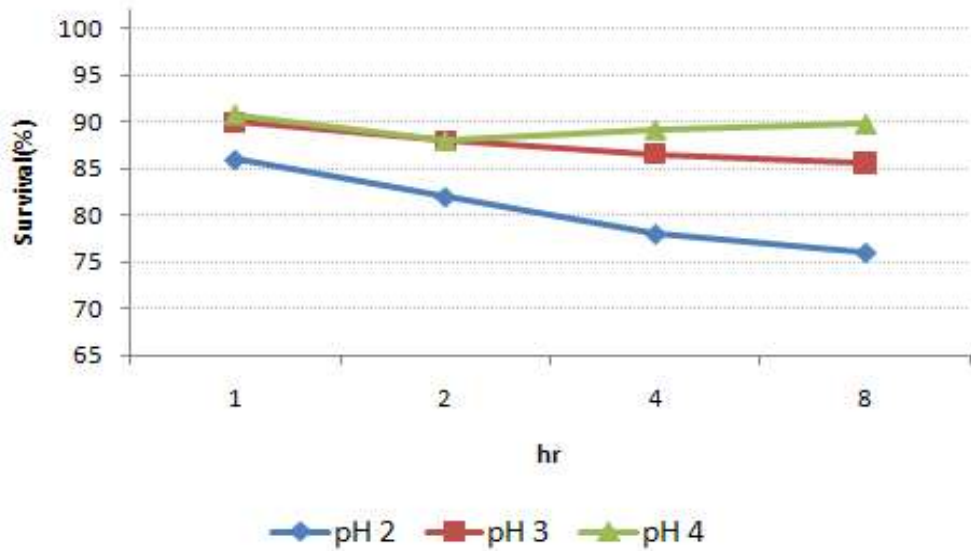


그림 39. 효모 고체배양 생균제에 대한 내산성 실험 결과

효모균주의 경우 유산균과 동일하게 pH 4에서 반응 2시간 이후에 8시간까지 균수가 약간 증가하는 경향을 나타내었으며 (그림 39), pH 2에서 최초 1시간 후 약 86%의 생존율을 확인하여 실제 급이 시 높은 수준으로 위를 통과하여 장까지 도달 할 수 있을 것으로 판단된다.

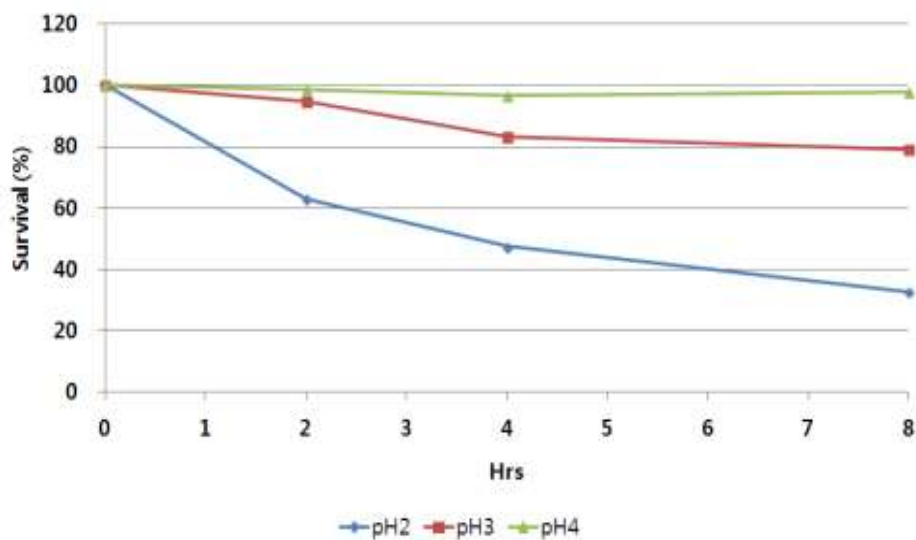


그림 40. 바실러스 고체배양 생균제물에 대한 내산성 실험 결과

바실러스 고체배양물을 산성 조건에서 방치하여 균수의 변화를 확인하였다. 본 연구에 이용되었던 다른 생균제들에 비해 pH 2에서 생존율이 상대적으로 낮게 나타났다. 이는 널리 분포하고 있는 바실러스 야생종의 일반적인 특징으로 매우 낮은 위액의 pH에서 생균수가 감소하였다. 하지만 액상 배양을 통해 생산된 바실러스는 pH 2의 조건에서 반응 2시간만에 대부분 사멸하였지만 고체 배양을 통해 생산된 바실러스는 약 60%가 생존하여 보다 더 높은 생존 능

력을 나타내었다 (그림 40).

다) 고체발효 생균제 균주별 열안정성 실험

고체발효 생균제의 열안정성을 조사하여 펠렛 가공의 가능성에 대해 알아보기 위한 목적으로 수행하였다. 본 연구에서 사용된 각각의 고체 배양 생균제들은 표 50에서와 같은 조건에서 내열성 실험을 하였다.

펠렛 가공시의 조건에 유사하게 stress를 주고자 열전도율이 높은 glass cap-tube(반지름 1cm, 높이 15cm, 샘플 1g 담을 경우 샘플 높이 약 1.5cm)에 각각의 고상 배양물 1g을 담아, 조건별 온도로 세팅한 항온저수조(water-bath)에 열처리 및 처리 시간에 따라 준비하였다. 각각의 샘플 1g을 멸균수 9ml 첨가하여 희석시킨 후, 단계적으로 희석하였다. 희석된 샘플은 평판 배지에 도말하여 37°C, 24~48시간 배양하였다 (표 51). 배양 후 미생물 균집수는 각 plate의 colony-forming unit (CFU)로 계산하였다.

표 50. 내열성 실험을 위한 실험 조건

Probiotics	Heat-treatment (min.)	Temperature(°C)							
		50	55	60	70	80	85	90	100
<i>Lactobacillus sp.</i>	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No ⁽¹⁾	Yes	No
	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No
<i>Saccharomyces sp.</i>	5	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No
	10	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	No
<i>Bacillus sp.</i>	5	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
	10	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<i>Aspergillus sp.</i>	5	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
	10	No	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes

⁽¹⁾ Not Practice

표 51. 미생물 배양 조건

Selective media	Main microorganism	Incubation time (days)	Incubation temp.(°C)	Reference
BCP agar ¹⁾	<i>Lactobacillus sp.</i>	2	37	ISO 13721
LB agar ²⁾	<i>Bacillus sp.</i>	1	37	AOAC 996.23
PDA agar ³⁾	<i>Saccharomyces sp. & Aspergillus sp.</i>	2	30	AOAC 997.02

¹⁾Lactose, broth with Bromocresol Purple (Merck, Germany)

²⁾Luria-Bertani, Miller (BD, USA)

³⁾Potato dextrose agar (Difco Laboratories, MI, USA)

펠렛 가공시의 유사한 조건에서 실험을 수행한 결과, 고상 배양에서 성장한 균체들의 열안정성은 우수하였으며, 특히 내생성 포자(endospore)를 형성하는 바실러스 생균제의 경우 매우 높은 열안정성을 나타내었다 (표 52). 이와 같은 결과를 토대로 펠렛 가공시에 유산균과 효모 고체배양물은 50~55°C, 곰팡이 고체배양물은 80°C, 5분미만이 적절하다고 사료된다.

액상 배양 생균제의 경우와 비교하였을 때 고체 배양 생균제가 더 우수한 내열성을 나타내었다. 바실러스는 균의 특성상 배양 방식에 따른 열안정성 차이를 나타내지 않았지만, 유산균과 효모의 경우에는 배양 방식에 따라 열에 대한 안정성이 다르게 나타났다. 특히 유산균의 경우 액상 배양으로 생산된 생균제는 60°C 온도에서 펠렛가공이 불가능하지만 70°C 온도에서 가공이 가능할 것으로 생각된다. 효모와 유산균의 경우 열에 대해 불안정한 특징을 가지지만 배양 공정을 달리하면 열에 대한 안정성을 높일 수 있음을 확인하였다.

표 52. 고체배양 생균제의 내열성 결과

(CFU/g)

Probiotics	Heat-treatment (min.)	Temperature								
		Room temp.	50°C	55°C	60°C	70°C	80°C	85°C	90°C	100°C
<i>Lactobacillus sp.</i>	5	4.2E+8	3.6E+8	3.8E+8	5.7E+7	2.9E+7	1.6E+6	-(1)	N.D(2)	-
	10		1.6E+8	5.5E+8	2.2E+7	8.2E+6	2.7E+4	-	N.D	-
<i>Saccharomyces sp.</i>	5	2.8E+7	5.2E+7	2.8E+7	2.4E+7	9.8E+6	1.8E+5	-	N.D	-
	10		7.3E+7	4.7E+7	1.1E+7	4.9E+6	N.D	-	N.D	-
<i>Bacillus sp.</i>	5	7.7E+8	-	-	-	-	2.1E+9	3.2E+9	2.2E+9	1.1E+9
	10		-	-	-	-	3.1E+9	2.0E+9	3.1E+9	1.6E+9
<i>Aspergillus sp.</i>	5	4.2E+8	-	-	-	-	2.3E+8	1.1E+8	8.0E+5	5.0E+3
	10		-	-	-	-	2.6E+6	2.1E+6	5.0E+3	N.D

(1) Not practice; (2) Not detected

5) 생산제품의 안전성 평가

최종 개발제품 (유산균, 바실러스, 효모 생균제)의 급성 경구 독성양상 및 독성강도를 알고자 암수 SD 랫드에 시험물질을 강제경구투여하고 14일간 관찰하면서 시험물질에 대한 기초 독성 평가를 실시하였다 (호서대학교 바이오의과학연구소). 시험군의 구성은 SD 랫드 암수 모두에 대하여 본 제품 0, 50, 300 및 2,000 mg/kg bw 용량군으로 하였으며, 용매대조군은 멸균증류수로 하였다. 단회투여 후 14일간 사망 및 빈사동물 발생여부, 임상증상 및 체중변화를 관찰하였고 관찰기간 종료 후 부검하여 개체별로 관찰하였다. 그 결과 개발제품의 경구투여를 통해 관찰종료일까지 사망동물이 관찰되지 않았으며, 임상증상, 체중 및 사료섭취/음수량에 대한 차이가 관찰되지 않았다. 또한 시험 종료 후 실시한 육안적 병리검사에서도 특이적인 소견이 관찰되지 않았다.

결론적으로 개발제품인 유산균, 바실러스, 효모 생균제는 임상증상, 체중의 변화 등이 관찰되지 않았고, 관찰기간 종료 후 실시한 육안적 병리검사에서 이상이 관찰되지 않으며, 관찰종료일까지 사망동물이 관찰되지 않았다. 이를 근거로 경구 투여 시 반수치사량(LD₅₀)은 2,000mg/kg bw (3.0×10⁸ CFU/kg bw)보다 높은 양으로 제품의 경구노출에 의한 독성이 거의 없는 안전한 물질로 확인되었다.

제 7 절 위탁생산을 위한 품질관리 시스템 구축

동물용 생균제 위탁 생산을 통한 안전한 동물용 생균제 생산을 위해 GMP+FSA 기준에 따른 표준 절차서(매뉴얼)의 작성을 통해 원료입고 ~ 최종제품생산 및 출고까지의 단계별 기준 및 모든 과정에 대한 모니터링 방법 및 절차를 규정함으로써 GMP+FSA 규정에 맞게 품질 기준 설정을 완료하였다 (그림 42~46).

1) 원료관리: 생균제 생산을 위한 주요 곡물원료 배지에 대한 주요 품질관리 기준을 표 53에 나타내었다. 원료의 분석주기는 원료입고 시 매 batch에 대해 자체 분석을 실시하나 공인기관 분석은 사용량에 따라 국내 사료법 기준 및 GMP+ 기준을 고려하여 곰팡이 독소, 중금속 등의 위해요소에 대한 추가분석을 1회/년~ 4회/년까지 분석을 통한 위해요소를 관리하고 있다.

표 53. 원료 입고관리 기준

분석항목		주요원료		
		대두박	옥수수	소맥피
NIT	CP (%)	Min 46	Min 7	Min 8
	MO (%)	Max 13	Max 14	Max 13
Wet chem.	CP (%)	Min 46	Min 7	Min 8
	MO (%)	Max 13	Max 14	Max 14
	Total count (cfu/g)	Max10 ⁴	Max10 ⁴	Max10 ⁴
	Coliforms (cfu/g)	Max10 ³	Max10 ³	Max10 ³
	<i>E. coli</i>	-*	-	-
Salmonella sp.	-	-	-	

* Negative



그림 41. 주요 생균제 발효용 곡물 원료

2) 종균관리: 생균제 생산을 위한 종균의 생산 및 관리는 종균생산 매뉴얼에 따라 액상발효 또는 고체발효를 실시하고 있으며, 종균 품질 기준은 1.2×10⁸ cfu/mL, cfu/g 으로 설정하여 운영하고 있다. 종균 생산용 배지도 원료와 동일하게 매 원료 입고 시 공급자 성적서를 수시로 관리하고 있으며, 사용량에 따라 위해요소 분석을 실시하고 있다.

3) 공정관리: 원료 입고에서부터 최종제품의 생산 단계까지의 안전과 관련된 모든 항목에 대한 철저한 분석 및 모니터링을 위한 시스템을 구축하였으며, 각 공정 단계별 품질관리 기준 설

정을 완료하였다. 각 공정별 샘플링 단계는 총 14단계이며 분석 항목은 수분, 미생물, 오염 미생물, 입자도 항목으로 확정하였다. 공정 중 중점관리항목 (CCP)에 대한 관리도 GMP+ 매뉴얼에 따라 매월 모니터링을 실시하고 상대적으로 위해요소라고 판단되는 공정에 대해서는 즉시 중점관리항목으로 설정하여 관리하고 매월 HACCP팀 회의를 통해 개선사항 및 추가조치사항에 대해 협의 후 후속조치를 실시하고 있다.


표 54. 공정 단계별 샘플링 및 분석항목

공정	샘플수	분석항목	비고
원료 입고	3	수분, 오염균, 입자도	
원료 덩핑(가공)	3	수분	1 Sample/NKT
원료 침지	3	수분	1 Sample/NKT
원료 증자	3	수분, 오염균	1 Sample/NKT
종균 접종	3	미생물, 오염균	1 Sample/NKT
발효실 입국	3	수분, 미생물, 오염균	
발효	9	미생물, 오염균	발효 단계별 샘플링
건조	3	수분, 미생물	
이송-1	2	오염균	
저장빈	2	오염균	
이송-2	2	오염균	
분쇄	2	수분, 오염균	
이송-3	2	오염균	
포장	4 ~ 10	수분, 미생물, 오염균, 입자도	1 Sample / MT

4) 최종제품: 최종제품에 대한 분석은 최종제품 검사기준에 따라 진행하고 있으며, 매 batch 자체 분석기준에 따라 분석을 진행하고 분기 또는 반기에 1회씩 사료관리법 및 GMP+ 기준에 따라 추가 공인기관 분석을 실시하고 있다.

5) 샘플보관: 제품 추적성 확보를 위해 원료입고~최종제품 생산 단계까지의 단계별 식별표시 (Lot No) 및 입고원료, 최종제품에 대해 batch 별 샘플을 6개월간 보관을 통해 문제 발생 시 문제점 확인 및 대처가 가능하도록 시스템이 구축되어 있다.

6) 설비관리: 생균제 생산에 관련된 모든 설비에 대해서도 설비관리 기준에 따라 수시 점검 및 보관을 실시하고 있으며, 매월 HACCP팀 회의를 통해 개선사항 및 후속조치를 진행하고 있다.

	검사 및 시험 지침서	문서 번호	TEST-01
		제·개정일	2015. 9. 8.
		개정번호	0
	제목 : 원료 인수검사 방법	쪽	3 / 8

1. 목적

원료 검사는 보조사료와 단미사로 제조에 품질관리의 기본이 되는 중요한 부분으로 원료별 특성에 따라 가장 적합한 방법으로 신속 정확하게 수행하는데 그 목적이 있다.

2. 적용범위

공장 내 입고되는 전 원료에 적용한다.

3. 관능검사

관능을 이용하여 가장 간편하게 검사 할 수 있으며 원료의 색상, 입자도, 냄새, 촉감, 맛, 중량, 부피 등에 의해 그 품질의 정상여부를 식별하는 방법이다.

3.1 육안에 의한 검사

원료의 모양, 색도, 이물질 혼입, 곰팡이 발생여부 등을 식별하는 방법이다.

3.2 냄새에 의한 검사

부패취, 곰팡이 냄새 또는 원료 특유의 냄새 등을 식별하는 방법이다.

3.3 미각에 의한 검사

원료 특유의 맛 또는 자극성 등을 식별하는 방법이다.

3.4 촉감에 의한 검사

촉감에 의해 건조 상태, 입자의 경도 등을 식별하는 방법이다.


4. 수분검사

적외선 수분계(Infrared moisture meter)를 이용하여 가열 감량법으로 시료의 수분함량을 측정한다. 시료 5-6g을 시료접시에 올려놓고 시료를 향량이 될 때까지 적외선으로 가열 건조시킨 후, 수분증발로 인한 시료 무게의 감소량을 측정하여 시료의 수분함량을 결정한다.

공정 검사

문서번호(Doc. No.) : TEST-02, Rev.12

제정 및 개정의 승인			
구분	작성	검토	승인
직책	사원	원부	장
성명			경영대리인
서명			
일자	15. 9. 9	15. 9. 8	2015. 9. 9

	검사 및 시험 지침서	문서 번호	TEST-01
		제·개정일	2015. 9. 8.
		개정번호	13
	제목 : 원료 인수검사 기준	쪽	5 / 8

1. 목적


원료의 검사항목, 검사횟수 및 검사기준을 규정하여 원료별 적합성 여부를 판정하는데 그 목적이 있다.

2. 적용범위

공장에 입고되는 전 원료에 적용한다.(원료에 대한 분석결과는 공판자의 분석서로 대체한다)

3. 원료 인수검사 기준

원료명	검사항목	조사내용	검사기준	검사방법	검사주기
[Blank]	수분	수분 함량 측정	400-410%	자가검사	일고시
	조단백질	조단백질 함량 측정	18.0-19.0%	자가검사	일고시
	조섬유질	조섬유질 함량 측정	18.0-19.0%	검사의뢰	필요시
	조지방	조지방 함량 측정	18.0-19.0%	검사의뢰	필요시
	조회분	조회분 함량 측정	18.0-19.0%	검사의뢰	필요시
	삼오넬라			검사의뢰	필요시
	아플라톡신M1			검사의뢰	필요시
	납	유해물질 분석		검사의뢰	필요시
	수은			검사의뢰	필요시
	카드뮴			검사의뢰	필요시
아미노산			검사의뢰	필요시	
관능검사	색상, 냄새, 입자도		별이 취가 없음	자가검사	일고시
	수분	수분 함량 측정	400-410%	자가검사	일고시
조단백질	조단백질 함량 측정	18.0-19.0%	18.0-19.0%	자가검사	일고시
	조지방	조지방 함량 측정	18.0-19.0%	검사의뢰	필요시
조섬유	조섬유질 함량 측정	18.0-19.0%	18.0-19.0%	검사의뢰	필요시
	조회분	조회분 함량 측정	18.0-19.0%	검사의뢰	필요시
관능검사	색상, 이물질, 냄새, 입자도		고유 색상 이물질 혼입 없음	자가검사	일고시
	수분	수분 함량 측정	400-410%	자가검사	일고시
조단백질	조단백질 함량 측정	18.0-19.0%	18.0-19.0%	자가검사	일고시
	조지방	조지방 함량 측정	18.0-19.0%	검사의뢰	필요시
조섬유질	조섬유질 함량 측정	18.0-19.0%	18.0-19.0%	검사의뢰	필요시
	관능검사	색상, 이물질, 냄새, 입자도	고유색상 이물질 혼입 여부, 무패취 및 산패취가 없을 것, 입자도 균일	자가검사	일고시

	검사 및 시험 지침서	문서 번호	TEST-02
		제·개정일	2015. 9. 8.
		개정번호	1
	제목 : 공정검사 개요	쪽	1 / 7

1. 목적

본 검사규정은 제품을 생산하기 위한 생산라인에 대한 오염배제 및 전 공정의 품질상태를 확인하여 설계상의 제품과 동일한 제품을 생산하는데 목적이 있다.


2. 적용범위

본 규정은 당사 공장에서 생산에 필요한 생산라인 및 생산되는 보조사료, 단미사로 제품에 적용한다.

3. 책임과 권한


품질관리 담당자는 공정검사에 관련한 전반적 업무를 총괄, 관리하고 위임받은 사항에 대하여 책임과 권한을 갖는다. 그리고 업무수행 상 필요에 따라 권한의 일부를 하위 직원에게 위임할 수 있다. 이때 위임받은 자는 권한 행사에 대하여 일차적인 책임을 지며 위임자는 전반적 책임과 의무를 면하지 아니한다. 또한 관련 부서 역시 해당업무 적용 범위 내에서 책임과 권한을 갖는다.

그림 42. GMP+ 매뉴얼 (예시자료로 일부페이지만 첨부)

	작업 공정도		문서 번호	WI-16
			제·개정일	2014. 11. 3
	제목 : <i>L. plantarum</i> 고체발효 생균제		개정 번호	0
			쪽	1 / 1


공정 순서	공정명	설비명	항목	관리/검사기준	방법	주기	기록	담당	관련문서
1	원료검사		관능검사 (육안)	검사규격에 따름	전수검사	제조시	공정표	작업자	
2	침지 및 증자	증자관	가수하여 침지 후 스팀을 증자관에 투입하여 저온증자						
3	냉각	증자관	상온으로 냉각						
4	균접종	액상탱크	종균접종						
5	발효	발효실	최적온도에서 발효						
6	건조	발효실	수분 함량 12%이하가 되도록 건조						
7	발효 검사	콜로니 카운터	생균수검사	검사규격에 따름	샘플링	제조시	공정표	담당자	
		수분 측정기	수분검사	검사규격에 따름	샘플링	제조시	공정표	담당자	
8	저장	제품빈	발효검사가 완료될 때까지 제품을 저장						
9	분쇄 및 포장	분쇄기	배양물을 분쇄 후 포장						

그림 43. GMP+ 매뉴얼 (예시자료로 일부페이지만 첨부)

	작업 공정도	문서번호	WI-20
		제·개정일	2014. 11. 3
	제목 : <i>L. plantarum</i> 액상발효 생균제	개정번호	0
		쪽	1 / 1

공정 순서	공정명	설비명	항목	관리/ 검사기준	방법	주기	기록	담당	관련문서
1	원료검사		관능검사 (육안)	검사규격에 따름	전수검사	제조시		담당자	
2	배지제조	전자저울 Jar	배합비에 따라 정량 후 액상발효기 jar에서 혼합						
3	배지멸균	고압증기 멸균기	배지멸균						
4	냉각	액상 발효기	상온으로 냉각						
5	균접종	액상 발효기	PP 종균접종						
6	배양	액상 발효기	적정 온도에서 배양						
7	원심분리	원심 분리기	원심분리기를 이용하여 Cell 회수						
8	동결건조	동결 건조기	분리된 Cell 동결건조						
9	분쇄	분쇄기	원료분쇄						
10	혼합	혼합기	배합비에 따라 계근하여 우수포도당과 혼합						
11	검사	콜로니 카운터	생균수 검사	검사규격 에 따름	샘플링	제조시	공정표	담당자	
12	포장	포장기	은박 포장						

그림 44. GMP+ 매뉴얼 (예시자료로 일부페이지만 첨부)

	검사 및 시험 지침서 제목 : 공정 샘플링 방법	문서 번호	TEST-02
		제·개정일	
		개정 번호	2
		쪽	2 / 5

1. 목적
 제품 생산라인 오염관리 및 제품을 생산하는 전 공정중의 원료, 반제품에 대한 정확한 방법, 빈도, 담당자 등을 정하여 공정상의 원료, 반제품을 대표하는 샘플을 채취하는데 목적이 있다.

2. 적용범위
 본 규정은 당사 공장에서 생산되는 보조사료, 단미사료 및 생산에 사용되는 전 생산라인에 적용한다.

3. 방법


팀별	담당자	샘플링 방법	확인 사항	기록사항
생산팀	전처리 담당자	<ul style="list-style-type: none"> 증자관으로부터 배출 30분 시점의 전처리 원료 100g을 증자관 별로 1점씩 채취 	<ul style="list-style-type: none"> 전처리원료의 입자 상태 	<ul style="list-style-type: none"> 가수량 침지시간 증자온도 증지시간
생산팀	발효실 담당자	<ul style="list-style-type: none"> Batch 별로 미생물 발효를 건조 후 발효실 앞에서 1 m 지점과 중간지점 및 뒤에서 1 m 지점에서 각각 100g씩 샘플 채취 	<ul style="list-style-type: none"> 발효제품 고유의 색상 및 향취 타 미생물 오염 여부 	<ul style="list-style-type: none"> 제품온도 배양조건 건조온도 건조시간

4. 이상발견 시 조치사항
 각 담당자별 샘플 채취 및 검사 중 표준 샘플과 비교하여 이상 발견 시 즉시 품질관리 담당자에게 연락 후 조치를 받는다. 생산라인 오염점검 결과는 즉시 생산팀에 통보하여 조치가 이루어지도록 한다.

최종 제품 검사

문서번호(Doc. No.) : TEST-03, Rev.17


제정 및 개정의 승인			
구분	작성	검토	승인
직책	사원	원부장	경영대리인
성명			
서명			
일자	15. 9. 10	15. 9. 12	2015. 9. 16

	검사 및 시험 지침서 제목 : 최종 제품 검사 개요	문서 번호	TEST-03
		제·개정일	
		개정 번호	0
		쪽	1 / 6

1. 목적
 본 검사규정은 최종제품의 품질상태를 확인하여 설계상의 제품과 동일한 제품을 생산함으로써 제품의 품질 안정과 나아가 고객의 이익 극대화 및 최종 소비자의 건강에 이바지하는 우수한 품질을 지속적으로 유지할 수 있도록 하는 것을 그 목적으로 한다.

2. 적용범위
 본 규정은 당사 공장에서 생산되는 보조사료, 단미사료 및 식품제품에 적용한다.

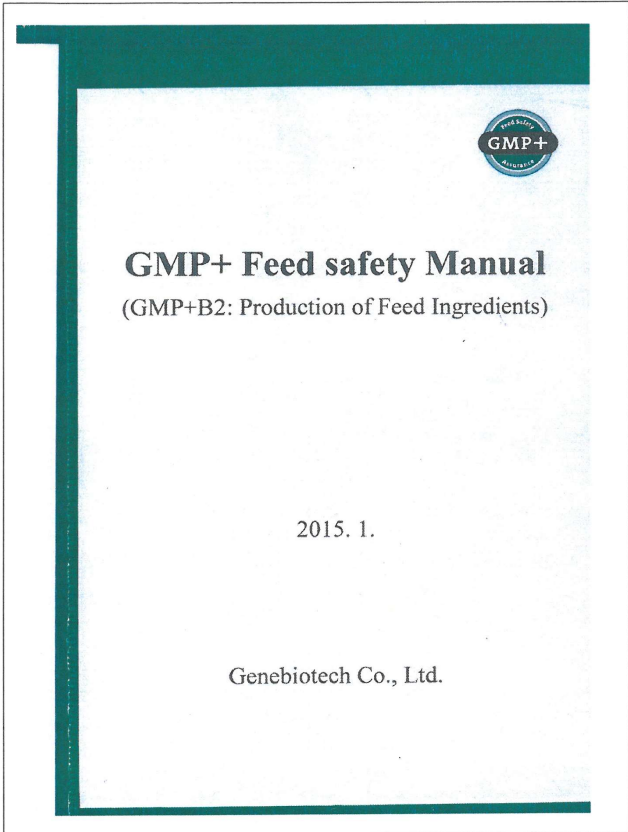
3. 책임과 권한
- 3.1 품질관리 담당자는 제품 품질에 관련한 전반적인 업무를 총괄 관리하고 위임받은 사항에 대하여 책임과 권한을 갖는다.
 - 3.2 공장에 근무하는 전 사원은 공장에서 생산되는 전 제품의 품질에 대한 책임이 있다.
 - 3.3 업무수행 상 필요에 따라 권한의 일부를 하위 직위자에게 위임할 수 있다. 이때 위임받은 자는 권한 행사에 대하여 일차적인 책임을 지며 위임자는 전반적 책임과 의무를 면하지 아니한다. 또한 관련 부시 역시 해당업무 적용 범위 내에서 책임과 권한을 갖는다.

	검사 및 시험 지침서 제목 : 최종 제품 검사 방법 및 기준	문서 번호	TEST-03
		제·개정일	2015. 11. 06
		개정 번호	17
		쪽	4 / 8

4. 최종제품검사 기준

제품명	검사항목	조사내용	적합 판정기준	검사방법	검사주기		
[Blank]	조단백질	조단백질 함량 측정	[Blank]	검사의뢰	6개월		
	조성유질	조성유질 함량 측정		검사의뢰	6개월		
	조회분	조회분 함량 측정		검사의뢰	6개월		
	수분	수분 함량 측정		자가검사	제조시		
	살모넬라	유해물질분석		[Blank]	검사의뢰	6개월	
	납				검사의뢰	6개월	
	수은				검사의뢰	6개월	
	카드뮴				검사의뢰	6개월	
	BSE				검사의뢰	6개월	
	알라민				검사의뢰	6개월	
	아플라톡신류				검사의뢰	6개월	
	오크라톡신A				검사의뢰	6개월	
	조단백질				조단백질 함량 측정	검사의뢰, 자가검사	제조시
	조성유질				조성유질 함량 측정	검사의뢰	6개월
	조회분	조회분 함량 측정		검사의뢰	6개월		
	수분	수분 함량 측정		자가검사	제조시		
살모넬라	유해물질분석	[Blank]	검사의뢰	6개월			
납			검사의뢰	6개월			
수은			검사의뢰	6개월			
카드뮴			검사의뢰	6개월			
아플라톡신류			검사의뢰	6개월			
오크라톡신A			검사의뢰	6개월			
조단백질			조단백질 함량 측정	검사의뢰, 자가검사	제조시		
조성유질			조성유질 함량 측정	검사의뢰	6개월		
조회분			조회분 함량 측정	검사의뢰	6개월		
수분			수분 함량 측정	자가검사	제조시		
납	유해물질분석	[Blank]	20ppm 이하	검사의뢰	6개월		
수은			0.5ppm 이하	검사의뢰	6개월		
카드뮴			2.5ppm 이하	검사의뢰	6개월		
아플라톡신류			50ppb 이하	검사의뢰	6개월		
오크라톡신A			200ppb 이하	검사의뢰	6개월		

그림 45. GMP+ 매뉴얼 (예시자료로 일부페이지만 첨부)



내 용

- 1. 용어 및 정의 (Terms and Definitions)
- 2. 사료 안전 시스템 (The Feed Safety System)
- 3. 필수 프로그램 (Prerequisite Programmes)
 - 3.1 인적 관리
 - 3.2 건물 관리 (구조)
 - 3.3 설비 유지관리 및 위생관리
 - 3.4 제품 식별 및 추적성 : 생표링
 - 3.5 초기 경보시스템과 피복
- 4. HACCP
 - 4.1 안전한 사료 설현을 위한 계획
 - 4.2 제품 생산 공정
 - 4.3 위험요소 분석
 - 4.4 관리 대책 수립과 위험관리 포인트 (CCP's)
 - 4.5 위험 인자 측정
 - 4.6 관찰 (Monitoring)
 - 4.7 수정 활동
 - 4.8 검증과 입증 (Validation & verification)
- 5. 공정관리 (Control of operational activities)
 - 5.1 구매
 - 5.2 원료 입고 관리
 - 5.3 보관
 - 5.4 생산
 - 5.5 판매 및 계약
 - 5.6 지대표기 및 운송 조건
 - 5.7 운송
- 6. 검증과 개선 (Verification and improvement)
 - 6.1 고객불만
 - 6.2 내부 검사
 - 6.3 관리, 점검 및 보완 (개선)

진바이오텍 GMP+Program B2

1. 용어 및 정의 (Terms and Definitions)

Feed Ingredient (사료원료 : 제품) : 가축 사료의 영양적 가치를 갖는 것으로 사료의 구성성분이 되거나 또는 단독으로 공급가능한 것으로 식물성, 동물성, 해양성의 것들로 유기태 또는 무기태 형태의 물질임을 의미한다. (단비사료 뿐만 아니라 사료첨가제, 배합사료, 프리믹스도 포함).

Raw Material (원료) : 사료 원료로서 가공이나 기타 공정에 사용되는 물질

2. 사료 안전 시스템 (The Feed Safety System)

2.1 관리 : 책임과 관여 (Management: responsibility and Involvement)

식품을 생산하는 한 과정으로서 ㈜진바이오텍에서 일어나는 모든 관리는 사료의 안전을 위한 책임을 인식하고 있다.

최고 관리자는

- a. 사료의 안전과 고객, GMP+ 표준과 사료법에 의한 요구 사항들의 중요성을 감안하여 조치구성을 한다.
- b. 안전한 사료를 생산하기 위한 사료안전 시스템을 구축해야 한다.
- c. HACCP 팀을 구성한다.
- d. 안전한 사료를 생산하기 위해 필요한 자원이 무엇인지 결정하고, 이러한 자원들을 가용할 수 있도록 한다.
- e. 최소 연간 1회 이상 사료안전 시스템의 유용성을 확인해야 한다. (6.3 항목 참고)

2.2 HACCP 팀

위험 평가시스템 구축을 위해서는 효과적인 HACCP 계획을 수립할 수 있는 구성원들로 HACCP 팀을 구성하는데 적절한 실무 경험자 기능을 갖고 있는 인력을 위주로 한다.

HACCP 팀은 사료의 안전에 부정적인 영향을 미치는 위험요소들을 규정하고 조절하기 위한 목표를 갖고 위험요소를 분석한다.

HACCP 팀은 사료안전 시스템의 관리와 구성, 위험요소 분석에 대해 풍부한 경험을 보유해야 한다. HACCP 팀원들은 HACCP 관리기준 내에서 기록 관리를 해야 한다.

HACCP 팀내에서는 개개인의 다양한 역할이 가능하며 (중복 기능), 사외의 인적자원의 활용도 가능하다.

Ver 1 (2015.1.1.) Form : FSM/QCM B2

진바이오텍 GMP+Program B2

2.3 사료 안전 시스템

(주)진바이오텍은 GMP+ 표준에 의해 사료 안전시스템을 구성하고 관련 모든 사항을 문서화하여 유지, 개선이 이루어 지도록 하는데 관계 법령이나 관련된 다른 안전 개인안들을 포함하여 운영할 수 있도록 한다. 그 외에도 사료원료의 생산, 가공의 각 단계에서 안전에 영향을 미치는 모든 활동들에 대해 규정하고 시행하고 유지할 수 있어야 한다. 그리고 사료 원료나 생산 기저의 구매에 의해 사료안전 시스템의 발위를 결정하고 기록관리 한다.

다음의 사항에 기초하여 구성요소가 결정되어야 한다.

- a. 사료 생산과정 각 부분의 책임 있는 담당자 (구성)
- b. 생산되는 모든 사료원료 (제품 규격)
- c. 사료 원료를 생산하는 모든 일련의 활동 (과정)과 외부 의뢰 생산의 모든 과정
- d. 사료 원료 생산과 관련된 사내, 외의 장소

만약 회사 외부에서 사료원료를 제조하게 될 경우에는 GMP+ 표준에서 요구하는 모든 일련의 사항들에 적합해야 하며 사료원료의 안전에 부정적인 영향을 끼치지 않는 활동이 되어야 한다.

참고사항

사료안전 시스템은 다음 항목들을 포함한다.

- a. 원료의 공급사 선택과 구매과정
- b. 운송, 보관 저장 등의 일련의 과정
- c. 사료 생산 과정
- d. 기획, 구매, 판매, 포장 등 그 외의 모든 과정

사료안전 시스템의 구조는 사료안전을 유지하기 위해 필요한 모든 문서나 요구사항, 정책 등을 포함해야 한다.

사료안전 시스템은 구성하는 모든 활동들은 제 2, 제 3의 표준들을 GMP+ 표준에 포함하여 진행되어야 한다. 담당자가 선택한 GMP+ 표준에 대한 의문이 생길 경우 담당 인증기관이나 GMP+ International에 문의를 하면 된다.

마지막 항목에 대한 유의점 : 사료와 관련 없는 작업이나 제품들은 연료, 폐인트, 농약용 기계 및 목재의 저장 같은 것들이 있다.

Ver 1 (2015.1.1.) Form : FSM/QCM B2

그림 46. GMP+ 매뉴얼 (예시자료로 일부페이지만 첨부)

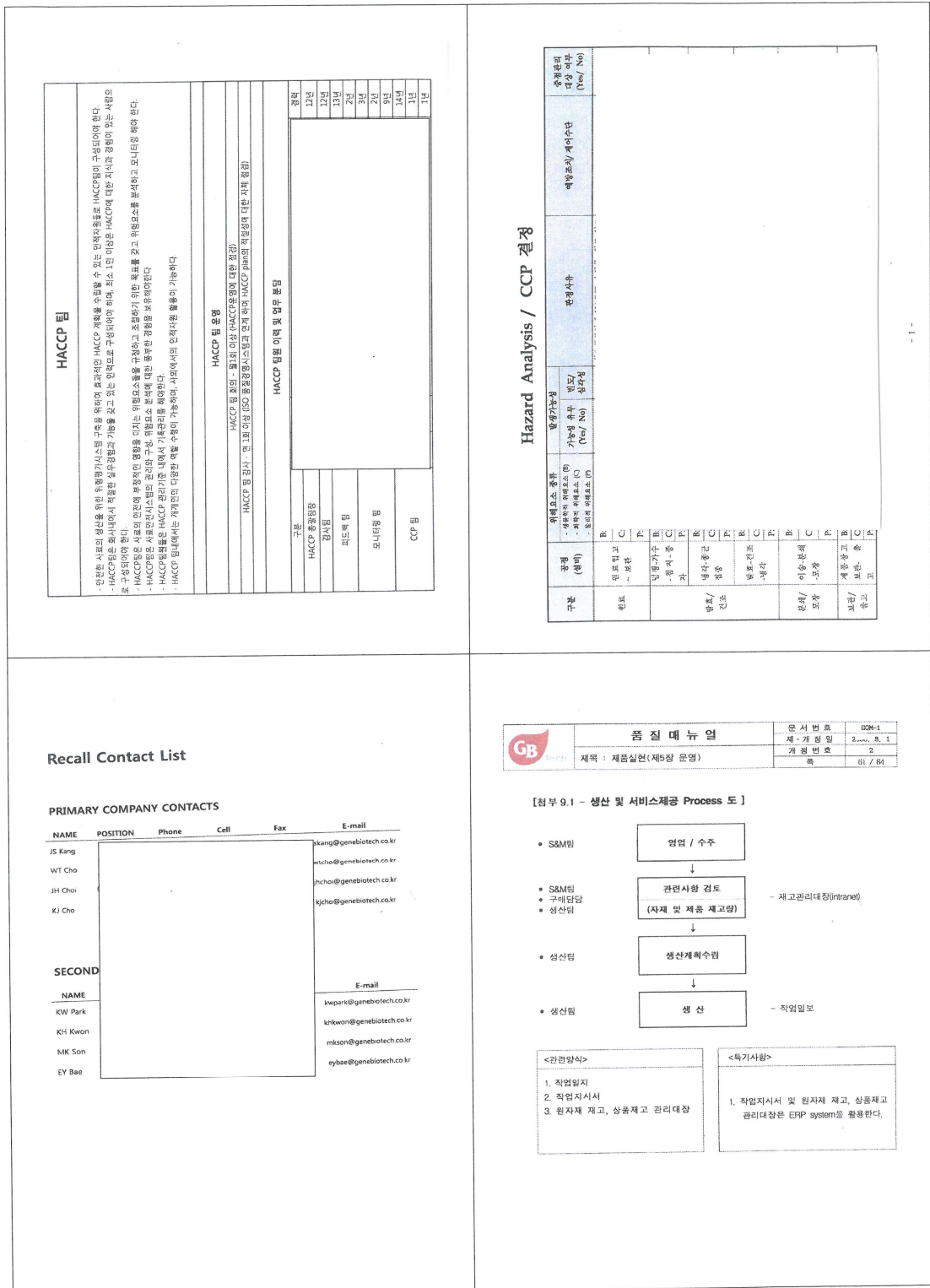
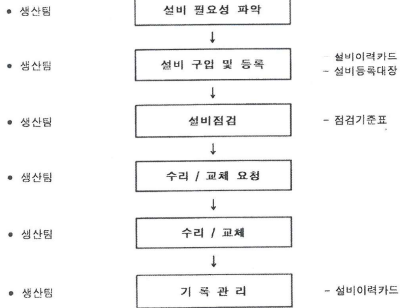


그림 47. 고체발효 생균제 제조를 위한 표준 작업공정도

	품질대뉴얼 제목 : 제품실현(제5장 운영)	문서번호	GM-1
		제·개정일	2015. 9. 8.
		개정번호	1
		쪽	62 / 84

[첨부 9.2 - 설비관리 Process 도]



<관련양식> 1. 설비등록대장 2. 설비이력카드	<특기사항> 1. 설비는 관리번호를 부여하여 식별하여야 한다. 2. 설비는 주기적으로 수량 및 성능을 파악하여야 하며, 고장, 폐기 또는 수리로 관망될 경우 관리조치를 취하여야 한다.
---	---

원료 인수 검사

문서번호(Doc. No.) : TEST-01, Rev.13

제정 및 개정의 승인			
구분	작성	검토	승인
직책	사원	부장	경영대리인
성명			
서명			
일자	15. 8. 28	15. 9. 25	2015. 9. 8.

	검사 및 시험 지침서 제목 : 원료인수검사의 개요	문서번호	TEST-01
		제·개정일	2015. 9. 8.
		개정번호	0
		쪽	1 / 8

- 목적**
본 검사규정은 보조사료, 단미사료 및 사료 제조에 이용되는 주 원료와 부 원료에 대한 구체적인 검사규격을 설정하여 적합한 원료까지 여부를 판단하고 나아가 최고의 제품생산에 하는데 그 목적이 있다.
- 적용범위**
당사 생산공장에 입고 또는 보관 중인 모든 주 원료 및 부 원료에 대하여 공히 본 규정을 적용한다.
- 책임과 권한**
품질관리 담당은 원료 품질에 관련한 전반적 업무를 총괄, 관리하고 위임받은 사항에 대하여 책임과 권한을 가진다. 그리고 업무수행 상 필요에 따라 권한의 일부를 하위 직원에게 위임할 수 있다. 이때 위임받은 자는 권한행사에 대하여 일차적 책임을 지며 위임자는 전반적 책임의무를 면하지 아니한다. 또한 관련 부서 역시 해당업무 적용 범위 내에서 공히 책임과 권한을 가진다.

	검사 및 시험 지침서 제목 : 원료샘플링 방법 및 하차여부결정	문서번호	TEST-01
		제·개정일	2015. 9. 8.
		개정번호	12
		쪽	2 / 8

- 목적**
원료의 샘플링 방법, 빈도 및 담당자 등을 정하여 하차 전에 원료의 품질을 점검함으로써 품질규격 이하의 원료가 입고되는 것을 방지하는데 그 목적이 있다.
- 적용범위**
공장에 입고, 보관되는 전 원료에 적용한다.
- 방법 및 하차 여부 결정**

구분	담당자	샘플링 방법	비고
입고 원료	원료 검수원	샘플링 도구	1. 일정한 방법에 의해 일률하여 보관하고, 개봉 후 다시 밀봉하는 것은 불가능하다. 2. 샘플은 구별하기 쉽게 라벨을 표기해야 한다. 3. 샘플은 성분변화가 일어나지 않는 특정 장소에 보관해야 한다. 4. 샘플보관기간은 현장에서 제품 사용이 완료되고 추후관찰이 지정한 기간까지이다.
보관 원료	원료 검수원	샘플링 도구	1. 보관원료는 최소 600g 이상이어야 한다. 2. 식별이 용이한 곳에 보관하며, 서로의 혼입이나 교차오염 그리고 품질 저하를 방지할 수 있는 곳이어야 한다.
- 시료 수거 방법**
 - 원료 검수원은 원료 입고시 시료를 최소 600g을 수거하여 분석 의뢰한다.
 - 품질관리 담당은 보관 중인 원료들에 대하여 시료 600g을 수거하여 관능검사를 실시하고, 이상 발견 시 관련팀에 통보한다.

그림 48. 액상발효 고농축 생균제 제조를 위한 표준 작업공정도

제 8 절 CMO 운영방안 확립

1. CMO 활용시설 내역

주관기관이 보유하고 있는 주요 발효제품 생산 설비는 아래와 같으며, 전체 장비/ 시설에 대해 위탁생산에 활용 가능하다 (표 55, 56).

표 55. 종균 생산 설비

구 분	발효 설비	비 고
액상 발효설비	500 L : 1기 750 L : 1기	유산균, 효모 및 바실러스 종균 생산에 사용. Batch 별 24시간 주기로 생산
고체 발효설비	1톤/Batch : 6 기	<i>Aspergillus</i> 속 종균 생산에 사용
포장설비	액상 종균 : 20L 단위 포장설비 1기 고체 종균 : 10 kg 단위 포장 설비 1기	
저장설비	대량 냉장 보관 설비 : 2기 (2톤 규모) 항온 보관 설비 : 1기 (10톤 규모)	액상 및 고체 종균별로 저장고 분리

표 56. 제품 생산 설비

구 분	생균제 및 발효사료 설비	비 고
발효 설비	1 톤/Batch : 6 rooms 12 톤/Batch : 2 rooms 15 톤/Batch : 2 rooms 25 톤/Batch : 1 room 해외생산기지 : 30톤 3기	각 제품 별 생산량 별로, 생산 균주별로 발효실을 분리하여 생산함으로써 균주 간 교차 오염 차단
원료 멸균 설비	3.5 M/T : 4기 5.0 M/T : 3기	원료 멸균 공정 : batch 당 1시간으로 연속 사용 가능
혼합 설비	350 kg/batch : 1기 500 kg/batch : 1기 2,000 kg/batch : 1기	생균제별로 단일 균주 제품과 혼합 균주 제품을 생산할 수 있어 축종 및 기능별로 제품의 다양화 가능
분쇄 설비	100 HP : 1기 75 HP : 2기 50 HP : 1기 30 HP : 1기	고객의 요청에 따라 제품의 분쇄 입자도 조정이 가능하고, 설비의 동시운영으로 생산량 극대화 가능
저장 설비	10톤 : 4기 15톤 : 10기 30톤 : 6기	중간제품 및 최종제품 저장설비로 포장 전 제품의 규격 품질 확인을 위한 저장 설비로 제품의 출고 전 품질 검증 가능
포장 설비	자동 로봇적재 시스템	시간 당 30톤 포장 및 적재 가능

2. CMO 활용한 지원 가능한 서비스 범위

가. CMO 활용한 서비스 범위

표 57. CMO 활용한 서비스 범위

구분	서비스 내용
대량생산 (사료회사 등)	1) 기능성 미생물 선발 및 균주 동정, 균주 보관 : 균주별 특성 고려 최적화된 균주선발 및 선발균주 보관 서비스 2) 선발 미생물의 특성 평가 : 선발균주의 기능적 특성 평가 지원 3) 선발 미생물의 대량생산 시스템 구축/ 기술이전 : 선발 미생물을 활용한 대량생산 시스템 (Pilot & Plant scale) 구축 및 관련 내용 기술이전 4) 품질관리 시스템 지원 : 생산 과정 전체에 대한 품질관리 기술이전 및 지원 5) 분석지원 서비스 : 미생물 및 일반성분 분석 지원
소량생산 (일반농가 등)	1) 미생물 균주보관, 관리 서비스 : 본 연구를 통해 확보된 균주 및 위탁생산을 통해 생산 또는 생산예정인 미생물 균주에 대해 향후 5년간 균주보관 및 관리 서비스 제공 (균주 활성 유지 관리) 2) 확보된 미생물별 생산조건 제공 : 미생물의 생리적 특성 및 기능적 목적에 맞는 발효조건 (배지 조성, 발효 시간, 온도, aeration 조건 등) 및 건조조건을 구축하여 가장 경제적인 제품화 공정 지원 3) 생산된 제품의 기능성 검증 및 품질관리 기준 제공 : 생산된 제품의 균수 시험, 기능성 검증을 위한 <i>in vitro</i> 시험 체계 구축으로 효과 검증, 제품의 열, pH 및 보관 조건별 안정성 시험을 통한 품질관리 지원 및 제품별 현장 품관 기준 제공 4) 생산 제품에 대한 추적성 확보 및 품질변이 점검 : CMO 체계를 통해 생산된 제품에 대한 추적성을 확보함으로써, 최종 소비자가 사용하기 전까지 제품의 품질변이를 기간별로 점검하여 안전하고 안정된 품질의 생균제품을 사용할 수 있는 체계 구축 5) 분석지원 서비스 : 미생물 및 일반성분 분석 지원

나. 분석/ 평가 지원 서비스

현재까지 분석지원 서비스 지원은 일차적으로 사료회사를 대상으로 실시하였고 이후 소규모 생균제 생산업체와 생균제 실제 수요자인 농가 등을 대상으로 확대하여 적용하고 있다.

생균제를 포함한 분석 및 평가지원 서비스를 구축하기 위해 국내 사료 및 동물약품 분야에서 통용되고 있는 생균제 분석방법을 다음 표 58과 같이 확립하였다. 분석 / 평가 지원 서비스의 범위는 단순히 생균제의 역가 분석에 국한하지 않고 생균제 대사 산물인 효소, 유기산, pH, 항균력 등을 포함하여 직접적인 생균의 역가와 간접적인 효능까지 검증할 수 있도록 분석

항목을 확대하고자 한다 (표 59).

본 사업개시 이후 현재까지 분석 지원 현황은 총 589건으로 (그림 49), 주요업체로는 동아원, 서울사료, 체리피드, 다원케미칼, 칼스, 카길애그리브랜드 퓨리나, 양주축협, 금강 TMR 등 배합 사료 회사 및 일부 농가위주로 분석의뢰 및 분석지원이 진행되고 있다.

표 58. 미생물 별 분석방법 확립

미생물	시료량(g)	추출	희석/ 배양	분석배지	배양온도/시간(°C/hr)
유산균	10	Bag mixer (실온, 30분)	Saline solution, Serial dilution(1:9)	MRS agar	37/24
효모	10	Bag mixer (실온, 30분)	Saline solution, Serial dilution(1:9)	Potato dextrose agar	33/28
바실러스	10	Bag mixer (실온, 30분)	Saline solution, Serial dilution(1:9)	LB agar	37/24
Aspergillus	10	Bag mixer (실온, 30분)	Saline solution, Serial dilution(1:9)	Potato dextrose agar	33/28
Salmonella	25	Pre enrichment: BPW (225mL)	Enrichment: RV, Selenite Cystine Broth	XLD, SS agar (or PCR- D group: <i>rfbS</i> , <i>rfbE</i> gene/ Kit- RapidCheck, Reveal)	40/20~24
<i>E. coli</i>	25	Pre enrichment: BPW (225mL)		Chromocult agar (or PCR)	37/20~24

표 59. 분석지원 서비스 항목

분석항목	세부내용
일반성분	수분, 조단백질
미생물	곰팡이, 효모, 유산균, 바실러스, 기타
	유해미생물(대장균, 살모넬라)
효소	Amylase, Protease, Phytase
곰팡이 독소	Aflatoxin, Ochratoxin, Zearalenone
기타	소독제 소독력, 항산화력, 산가, pH, 당도, 알코올 함량, Trypsin inhibitor, 소화도, 펩타이드 함량 등

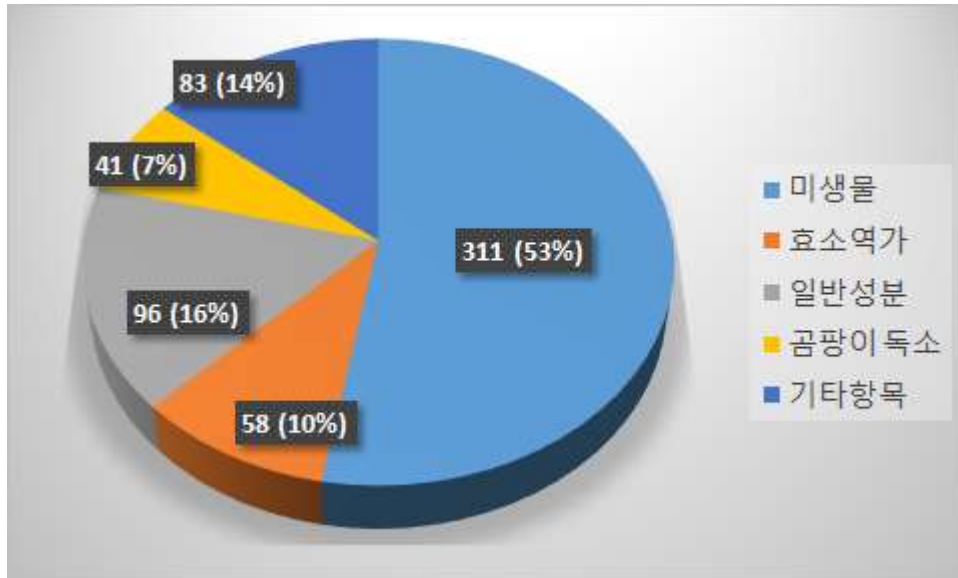


그림 49. 분석지원서비스 현황 (건수, %)

3. 위탁생산 및 사업화 실적

1) 위탁생산 및 사업화 실적

표 60. CMO 시스템을 활용한 위탁생산 및 사업화 실적

No	제목	세부내용	상품화 (사업화)	CMO사업화
1	내열성 균주를 포함하는 생균제 개발 (제품명: NF-8, Lacto-P)	- 저가 단백질원 및 펠렛가공 용 내열성 생균제 개발 완료 - 양계 사양시험을 통한 개발제품 기능성 평가 완료	상품화 완료	CMO사업화 (완료, -기술이전), (해외 MOU 체결-2건)
		- 발효균주 및 생산기술 지원, 제품분석 지원		
2	천연소독제 개발	- 천연 소독제 개발을 위한 발효 공정(유산균, 효모) 확립을 통해 시제품 생산 완료	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중)
3	수산용 생균제 개발 (제품명: AquaPro S, AquaPro W)	- 액상발효 고농축 생균제 제조공정을 통해 시제품 생산 (기준: 유산균, 효모, 바실러스 각 1.0×10^9 cfu/g 이상)	상품화 완료	해외 MOU 체결
4	고농축 생균제 생산 (LP-10, BL-10, PP-10)	- 액상발효 고농축 생균제 제조공정을 통해 제품 생산/공급 (기준: 유산균 3.0×10^{10} cfu/g 이상) - 신규 생균제 제품개발	상품화 완료	국내 MOU 체결
5	애견사료 개발	- 탄수화물 source를 이용한 <i>A. oryzae</i> 생균제 개발		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
6	축사환경개선용 미생물 제제 개발 (제품명: 락토플랜-아몬드피)	- 아몬드피를 활용한 유산균 생균제 개발		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
7	곰팡이 독소 저감제 개발	- 곰팡이 독소 분해/저감제 개발		CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
8	기능성 생균제 개발	- 양계용 생균제 개발	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
		- 양돈용 생균제 개발	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
9	소독제 개발	- 신규 소독제 개발 및 공동마케팅		CMO사업화 (국내 MOU 체결)
10	<i>Aspergillus</i> 종균 개발	- 고체발효용 종균 생산/공급	상품화 완료	
11	생균제 생산 지원	- 발효균주 및 생균제 생산/품질 관리기술 지원		CMO사업화 (진행 중, 기술이전), (해외 MOU 체결)
12	축우용 유산균 발효촉진제 개발	- 축우용 유산균 발효촉진제 개발	상품화 완료	
13	복합생균제 생산 (제품명: Glukozy m)	- 유산균, 효모, 바실러스 균주로 구성된 복합생균제 생산 (매월 20톤 이상 생산)		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
14	기능성 생균제 생산	- 미세조류 혼합 생균제 생산 (제품화 가능성 평가 중)		

2) 개발제품의 사업화 매출액

표 61. 개발제품 내역 및 매출실적

사업화명	사업화내용	2014년까지 매출액	2015년도 매출액	매출액 합계
기술실시/자체 제품화	기능성 생균제 개발 (제품명: NF8, Lacto-P)	2,256,000*	56,048,750	58,304,750
위탁생산/ 자체 제품화	유산균 고농축 생균제(제품명: LP-10, BL-10, PP-10)/ 수산용 생 균제 (제품명: AquaPro S, AquaPro W)	7,360,000	9,280,000	16,640,000
자체 제품화	축우용 유산균 발효촉진제	28,000,000	-	28,000,000
위탁생산	축사환경개선제 (제품명: 락토플 랜-아몬드피)	-	10,909,092	10,909,092
위탁생산	복합 생균제 생산 (제품명: Glukozym)	-	18,000,000	18,000,000
합계				131,853,842

* 기술료 포함

4. 향후 전망

현재 (주) 진바이오텍이 확보하고 있는 생균제 등의 수요처는 총 67개 거래처로 76.1%에 해당하는 51개 거래처가 배합사료를 생산하는 수요처이다. 이들 회사들이 생산하는 양돈, 양계 및 축우사료에 기능별, 축종의 생리적 특성별 균주를 선택하여 사용하고 있다.

배합사료 내 항생제 사용 중단 이후 항생제를 대체할 수 있는 생균제, 효소제 등에 대한 요구가 있는데, 이 중 세균에 대한 항병력을 가지며, 면역력을 증진시켜 가축의 항병력을 개선시킬 수 있는 생균제에 대한 시장의 요구가 지속적으로 증가하고 있다. 이러한 요구 중에 배합사료 업체들의 경우 개개 회사별로 생리적 기능이나 활용에서 특화된 생균제의 개발 요구가 증가하고 있어 위탁생산에 대한 의뢰 및 요청이 지속적으로 증가할 것으로 기대된다.

제 9 절 GMP+FSA 인증

동물용 생균제 위탁생산을 위해 국제수준의 품질우위 제품 생산을 위해 원료관리, 공정관리, 설비관리, 제품관리, 위해요소관리 등 전반적인 내용에 대해 기준 마련을 통해 국내 사료회사 최초로 GMP+FSA 인증을 완료하였다 (그림 50).



Lloyd's Register
LRQA

PROCESS CERTIFICATE

Genebiotech Co., Ltd
166 Sinwonsa-ro, Gyeryong-myeon
Gongju-si Chungcheongnam-do 314-831
South Korea
GMP+ International Registration number: GMP009890

Lloyd's Register Quality Assurance declares that it has justifiable confidence that the processes

Production of feed materials
Production of feed additives

at the company location **Genebiotech Co., Ltd** complies with the applicable requirements and conditions of the standard(s)

GMP+ B2 (2010): Production of Feed Ingredients

of the GMP+ FC Scheme (Based on the GMP+ C6) of GMP+ International.

This certificate is valid only in association with the certificate schedule bearing the same number on which the scope applicable to this approval is listed.

Approval Certificate No:	Original Approval	:	10 December 2014
RQA667630	Current Certificate	:	10 December 2014
	Certificate Expiry	:	9 December 2017



Issued by: Lloyd's Register Nederland B.V.



K.P. van der Mandelelaan 41a, 3062 MB Rotterdam, Nederland
 This approval is carried out in accordance with the LRQA assessment and certification procedures and monitored by LRQA.
 Lloyd's Register Quality Assurance: ID Nr.: 30073

Lloyd's Register Group Limited, its affiliates and subsidiaries, including Lloyd's Register Quality Assurance Limited (LRQA), and their respective officers, employees or agents are, individually and collectively, referred to in this clause as 'Lloyd's Register'. Lloyd's Register assumes no responsibility and shall not be liable to any person for any loss, damage or expense caused by reliance on the information or advice in this document or howsoever provided, unless that person has signed a contract with the relevant Lloyd's Register entity for the provision of this information or advice and in that case any responsibility or liability is exclusively on the terms and conditions set out in that contract.

그림 50. GMP+FSA 인증서 (LRQA)

제 10 절 위탁생산시설을 활용한 개발제품의 기능성 검증

1. 개발제품 (NF-8)의 육계 생산성 개선효과 검증

가. 개발제품 제조

축산 산업에 사용되는 생균제의 가장 기본적인 조건으로는 급이 시 소화기관에서 생존하여 장에 정착하여 host에 정장작용을 할 수 있어야 한다. 생산적인 측면에서는 제형화 공정 중에 발생하는 열에 내성을 지녀 여러 가지 제형화에 제약이 없어야 한다. 본 연구에서 분리한 균주들 중 *L. plantarum* GB-CMO2 균이 상기 생균제로서의 기본 조건에 가장 적합한 특징을 지녀 사양시험에 이용하였다. 내담즙성, 내산성, 내열성, 항균력을 지니는 *L. plantarum* GB-CMO2의 고상발효 생균제는 대두박을 기본 배지로 사용하여 제조하였다. 종배양은 유산균 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양한 후, 대두박 배지에 접종하여 30°C, 60시간 발효하였다. 발효 종료 후에는 55°C에서 8시간 건조하여 최종 수분함량이 10% 미만이 되도록 하였다. 상기 건조된 고체발효 생균제는 1mm 입자 크기로 분쇄하여 개발제품 기능성 검증을 위한 사양시험에 사용하였다.

[제조공정]

단백질 원료 (대두박 등)→ 종균접종 (유산균 외)→ 발효→ 건조→ 분쇄/ 포장

나. 육계 사료 내 신규 식물성 단백질원 첨가 효율 평가시험

1) 재료 및 방법

가) 시험동물 및 시험설계

본 시험은 1 일령 ROSS 308 (♂, ♀) 816수를 공시하였고, 개시체중은 46.7±0.9g으로 5주간 사양시험을 실시하였다. 시험설계는 1) CON (soybean meal 7.5% + 개발제품 0.0%), 2) T1 (soybean meal 5.0% + 개발제품 2.5% + 생균제 0.1%), 3) T2 (soybean meal 2.5% + 개발제품 5.0% + 생균제 0.1%) 및 4) T3 (soybean meal 0.0% + 개발제품 7.5% + 생균제 0.1%) 으로 4처리 하여 처리당 12반복, 반복당 17 수씩 완전 임의 배치하였다.

나) 시험사료와 사양관리

ROSS 308 병아리를 3단 케이지에서 사육하였으며, 처리구별 위치를 조절하였고, 사료 (표 62, 63)와 물은 자유 채식토록 하였다.

다) 조사항목 및 방법

a. 생산성: 증체량은 개시 시, 1주 3주 및 5주에 처리구별로 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 체중 측정 시 사료급여량에서 잔량을 제하여 계산하였고, 사료요구율은 사료섭취량을 증체량으로 나누어 산출하였다.

㉟ 62. Ingredient composition and nutrient content of diets (as-fed basis)

Item	Level of EP, % (Starter diet) Phase 1 (0~1 week)				Level of EP, % (Grower diet) Phase 2 (2~3 week)			
	0	2.5	5	7.5	0	2.5	5	7.5
Ingredients, %								
Corn	58.58	58.58	58.58	58.58	65.19	65.19	65.19	65.19
Soybean meal	29.86	27.36	24.86	22.36	25.90	23.40	20.90	18.40
Corn gluten meal	6.41	6.41	6.41	6.41	3.00	3.00	3.00	3.00
New protein product	-	2.50	5.00	7.50	-	2.50	5.00	7.50
Soybean oil	1.00	1.00	1.00	1.00	2.10	2.10	2.10	2.10
Dicalcium phosphate	1.80	1.80	1.80	1.80	1.70	1.70	1.70	1.70
Limestone	1.28	1.28	1.28	1.28	1.10	1.10	1.10	1.10
Sodium chloride	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Choline chloride	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
DL-methionine,98%	0.17	0.17	0.17	0.17	0.10	0.10	0.10	0.10
L-lysine ·HC	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.16	0.16	0.16
Vitamin premix ¹	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Mineral premix ²	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Chemical composition								
ME, kcal/kg	2,900	2,960	3,015	3,069	3,000	3,064	3,118	3,173
CP, %	22.0	22.2	22.3	22.5	19.0	19.2	19.3	19.5
Lysine, %	1.10	1.10	1.10	1.10	1.00	1.01	1.01	1.02
Ca, %	1.00	0.99	0.99	0.99	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P, %	0.80	0.81	0.81	0.81	0.75	0.76	0.76	0.77
Met + Cys, %	0.89	0.85	0.85	0.85	0.72	0.69	0.69	0.69

¹Provided per kilo gram of diet: 15,000 IU of vitamin A, 3,750 IU of vitamin D₃,37.5mgofvitaminE,2.55mg of vitaminK₃, 3mg of thiamin, 7.5mg of riboflavin, 4.5mg of vitaminB₆, 24μg of vitamin B₁₂, 51mg of niacin, 1.5mg of folic acid, 0.2mg of biotin, and 13.5mg of pantothenic acid.

²Provided per kilogram of diet: 37.5 mg of Zn (as ZnSO₄), 37.5mg of Mn(MnO₂), 37.5mg of Fe(asFeSO₄·7H₂O), 3.75mg of Cu(asCuSO₄·5H₂O), 0.83mg of I (asKI), and 0.23mg of Se(asNa₂SeO₃·5H₂O).

표 63. Ingredient composition and nutrient content of diets (as-fed basis)¹

Item	Level of EP, % (Finisher diet) Phase 3 (4~5 week)
Ingredients, %	
Corn	62.44
Soybean meal	25.58
Corn gluten meal	3.30
Soybean oil	4.89
Dicalcium phosphate	2.29
Limestone	0.75
Salt	0.20
DL-methionine, 98%	0.07
L-lysine HC	0.08
Vitamin premix ¹	0.20
Mineral premix ²	0.20
Chemical composition	
ME, kcal/kg	3,045
CP, %	18.90
Lysine, %	1.01
Ca, %	0.96
Total P, %	0.86
Met + Cys, %	0.73

¹Provided per kilo gram of diet: 15,000 IU of vitamin A, 3,750 IU of vitamin D₃, 37.5mg of vitamin E, 2.55mg of vitamin K₃, 3mg of thiamin, 7.5mg of riboflavin, 4.5mg of vitamin B₆, 24μg of vitamin B₁₂, 51mg of niacin, 1.5mg of folic acid, 0.2mg of biotin, and 13.5mg of pantothenic acid.

²Provided per kilogram of diet: 37.5 mg of Zn (as ZnSO₄), 37.5mg of Mn(MnO₂), 37.5mg of Fe(asFeSO₄·7H₂O), 3.75mg of Cu(asCuSO₄·5H₂O), 0.83mg of I (asKI), and 0.23mg of Se(asNa₂SeO₃·5H₂O).

- b. 장기무게 및 육질특성: 시험 종료 시 (5주) 처리구별 임의로 12수씩 선별하여 경골탈퇴 방법으로 도살 한 다음 간, 비장, 근위, F낭, 가슴육 및 복강지방의 무게를 측정하여 생체중에 대한 비율로 계산하였다. pH는 pH meter (77P, Istek, Korea)를 사용하여 측정하였으며, 육색은 색차계 (Model CR-210. Minolta Co., Japan)를 이용하여 각 가슴육 샘플 1개당 2회 반복하여 측정하였다. 이때 표준 색관은 L=89.2, a=0.921, b=0.783으로하였다. 보수력 (water holding capacity)은 Hofmann 등 (1982)의 방법으로 전체면적과 육의 면적의 비율을 기록하여 측정하였으며, 저장감량 (drip loss)은 시료를 2 cm 두께의 일정한 모양으로 정형한 후 polyethylene bag에 넣어 4°C 냉장실에서 7일간 보관하면서 1일, 3일, 5일 및 7일 후 발생하는 감량을 측정하였다.
- c. 혈액 특성: 혈액채취는 각 처리당 6마리를 임의 선별하여 14일, 21일, 28일 및 종료시 (30일)에 각각 경정맥 (Jugular)에서 vacuum tube (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, NJ)를 이용하여 혈액을 5ml 채취하여 4°C에서 2,000g로 30분간 원심분리하여 얻은 혈청을 자동생화학분석기 (HITACHI 747, Japan)를 이용하여 혈액내 glucose, creatinine 및 BUN (blood urea nitrogen)을 측정하였다.

d. 분내 미생물수: 시험 종료 시 (5주) 처리구별로 분을 채취한 뒤, 멸균된 생리식염수에 현탁하여 균질화시킨 다음 10^3 에서 10^7 까지 계단 희석하여 생균수 측정용 시료로 사용하였다. 실험처리에 의한 돈 분내의 *Lactobacillus*와 *E. coli*의 균수를 측정하기 위해 *Lactobacillus*에는 MRS agar, *E. coli*에는 MacConkey agar (Difco, USA)를 사용하였고, 37°C에서 38시간 배양 후 균수를 측정하였다.

e. 분내 악취 발생정도: 육계의 분내 가스발생은 암모니아, 황화수소, 총 메캅탄 및 아세트산의 발생을 측정하기 위하여, 시험 종료시에 각 처리구에서 동일한 시간동안 배설된 분을 채취하여 분석에 사용하였다. 암모니아, 황화수소, 총 메캅탄 및 아세트산의 측정은 분 300g을 취하여 2,600 mL 부피의 밀봉된 플라스틱 용기에 넣고 24시간 발효시킨 후 실온에 5일간 보관하면서 Gastec (Model GV - 100, Gastec, Japan)을 사용하여 보관 5일 경과시 측정하였다.

라) 통계처리

모든 자료는 SAS (1996)의 General Linear Model procedure를 이용하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 처리하여 평균간의 유의성을 검정하였다.

2) 사양시험 결과

가) 생산성

육계 사료 내 신규 식물성 단백질원의 첨가가 생산성에 미치는 영향은 표 64에 나타내었다. Phase 2의 증체량에 있어서 T3 처리구가 T1 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ($P < 0.05$), 사료 요구율에 있어서는 CON 처리구가 T2 처리구에 비해 유의적으로 높게 나타났고 ($P < 0.05$). 전체 시험 기간 동안의 증체량에 있어 T1, T2 및 T3 처리구가 CON 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ($P < 0.05$). 그러나 사료섭취량 및 사료 요구율에 있어서는 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다 ($P > 0.05$). Phase 1, Phase 3 동안 증체량, 사료섭취량 및 사료 요구율에 있어서는 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다 ($P > 0.05$).

나) 도체 및 육질특성

육계 사료내 신규 식물성 단백질원의 첨가가 도체 특성에 미치는 영향은 표 65와 같다. 저장감량에 있어 1일째에 CON 처리구가 T1, T2 및 T3 처리구에 비해 유의적으로 높게 나타났고 ($p < 0.05$), 3일째에는 CON 처리구가 T2 및 T3 처리구보다 유의적으로 높게 나타났으며 ($p < 0.05$), 5일째 및 7일째에는 CON 처리구가 T3 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ($p < 0.05$). 도체 특성에 있어서 근위, F 낭, 비장, 간, 가슴근육 및 복강지방에 있어서는 처리구간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다 ($P > 0.05$). 육색 및 pH에 있어서는 유의적 차이가 나타나지 않았다 ($P > 0.05$).

다) 혈액특성

육계 사료 내 신규 식물성 단백질원의 첨가가 혈액 특성에 미치는 영향은 표 66에 나타내었다. 혈액 내 BUN 함량에 있어서 T3 처리구가 CON 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ($P < 0.05$), Glucose 함량에 있어서는 T1, T2 및 T3 처리구가 CON 처리구보다 유의적으로 높게 나타났고 ($P < 0.05$).

표 64. The effects of new vegetable Protein supplementation on growth performance in broilers¹

Items	CON	T1	T2	T3	SE ²
Phase 1 (1-7 d)					
BWG, g	142	146	149	150	3
FI, g	213	216	216	215	1
FCR	1.511	1.480	1.463	1.448	0.026
Phase 2 (8-21 d)					
BWG, g	776 ^b	792 ^{ab}	801 ^{ab}	818 ^a	10
FI, g	908	915	903	930	11
FCR	1.171 ^a	1.156 ^{ab}	1.129 ^b	1.138 ^{ab}	0.011
Phase 3 (22-35 d)					
BWG, g	907	927	921	926	17
FI, g	1,693	1,707	1,684	1,744	28
FCR	1.885	1.852	1.839	1.898	0.062
Overall (1-35 d)					
BWG, g	1,824 ^b	1,866 ^a	1,870 ^a	1,893 ^a	14
FI, g	2,814	2,837	2,803	2,889	38
FCR	1.545	1.522	1.500	1.527	0.026

¹ Abbreviation : CON (soybean meal 7.5% + NF8 0.0%); T1 (soybean meal 5.0% + NF8 2.5%); T2 (soybean meal 2.5% + NF8 5.0%); T3 (soybean meal 0.0% + NF8 7.5%).

² Standard error.

^{a,b} Means in the same row with different superscript differ significantly (p<0.05).

표 65. The effects of new vegetable Protein supplementation on carcass quality in broilers¹

Items	CON	T1	T2	T3	SE ²
Breast muscle color					
Lightness (L*)	56.79	58.63	57.91	58.59	0.92
Redness (a*)	13.35	13.13	13.89	14.20	0.68
Yellowness (b*)	11.08	10.84	11.25	12.02	0.60
pH	5.42	5.42	5.41	5.48	0.04
Drip loss, %					
1d	7.88 ^a	5.10 ^b	5.25 ^b	3.77 ^b	0.70
3d	9.45 ^a	8.22 ^{ab}	6.55 ^b	6.26 ^b	0.69
5d	10.89 ^a	9.51 ^{ab}	7.77 ^{bc}	7.13 ^c	0.72
7d	12.81 ^a	11.34 ^{ab}	10.46 ^{bc}	8.66 ^c	0.67
Relative organ weight, %					
Liver	3.44	2.94	3.34	3.15	0.17
Spleen	0.17	0.15	0.16	0.17	0.01
Bursa of Fabricius	0.14	0.14	0.15	0.16	0.01
Breast muscle	18.55	18.79	19.61	19.74	0.98
Abdominal fat	1.31	1.15	1.25	1.34	0.13
Gizzard	1.03	1.14	1.04	1.00	0.05

¹ Abbreviation : CON (soybean meal 7.5% + NF8 0.0%); T1 (soybean meal 5.0% + NF8 2.5%); T2 (soybean meal 2.5% + NF8 5.0%); T3 (soybean meal 0.0% + NF8 7.5%).

² Standard error.

^{a,b,c} Means in the same row with different superscript differ significantly (p<0.05).

표 66. The effects of new supplementation on blood profiles in broilers¹

Items	CON	T1	T2	T3	SE ²
BUN, mg/dL	1.5 ^b	1.8 ^{ab}	1.7 ^{ab}	2.3 ^a	0.2
Creatinine, mg/dL	0.18 ^a	0.12 ^{ab}	0.10 ^b	0.08 ^b	0.02
Glucose, mg/dL	130 ^b	216 ^a	237 ^a	200 ^a	18

¹ Abbreviation : CON (soybean meal 7.5% + NF8 0.0%); T1 (soybean meal 5.0% + NF8 2.5%); T2 (soybean meal 2.5% + NF8 5.0%); T3 (soybean meal 0.0% + NF8 7.5%).

² Standard error.

^{a,b} Means in the same row with different superscript differ significantly (p<0.05).

라) 분내 미생물 조성

육계 사료 내 신규 식물성 단백질원의 첨가가 분내 미생물 조성에 미치는 영향은 표 67에 나타내었다. *E. coli* 조성에 있어서 T3 처리구가 CON 처리구보다 유의적으로 낮게 나타났으나 (P<0.05), *Lactobacillus* 조성에 있어서는 유의적 차이가 나타나지 않았다 (P>0.05).

표 67. The effects of new vegetable Protein supplementation on fecal microflora in broilers¹

Items, log ₁₀ cfu/g	CON	T1	T2	T3	SE ²
<i>Lactobacillus</i>	7.38	7.32	7.21	7.53	0.14
<i>E. coli</i>	6.50 ^a	6.34 ^{ab}	6.48 ^{ab}	6.04 ^b	0.15

¹ Abbreviation : CON (soybean meal 7.5% + NF8 0.0%); T1 (soybean meal 5.0% + NF8 2.5%); T2 (soybean meal 2.5% + NF85.0%); T3 (soybean meal 0.0% + NF8 7.5%).

² Standard error.

^{a,b} Means in the same row with different superscript differ significantly (p<0.05).

마) 분내 악취 발생 정도

육계 사료 내 신규 식물성 단백질원의 첨가가 분내 악취발생 정도에 미치는 영향은 표 68 에 나타내었다. 분내 암모니아, 황화수소, 총 메캅탄 및 아세트산 발생에 있어서는 처리구간 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (P>0.05).

표 68. The effects of new vegetable Protein supplementation on noxious gas emissions in broilers¹

Items, ppm	CON	T1	T2	T3	SE ²
NH ₃	2.25	2.58	2.42	2.33	0.33
H ₂ S	22.50	19.92	19.25	19.83	1.83
R.SH	4.75	3.50	3.58	3.50	0.51
Acetic Acid	2.08	1.92	1.63	1.75	0.28

¹ Abbreviation : CON (soybean meal 7.5% + NF8 0.0%); T1 (soybean meal 5.0% + NF8 2.5%); T2 (soybean meal 2.5% + NF8 5.0%); T3 (soybean meal 0.0% + NF8 7.5%).

² Standard error.

^{a,b} Means in the same row with different superscript differ significantly (p<0.05).

3) 결론

결론적으로 신규 식물성 단백질원을 육계 사료 내에 2.5%, 5.0% 및 7.5%를 첨가 한 처리구의 육계와 신규 식물성 단백질원을 첨가하지 않은 처리구의 육계를 비교하였을 때 식물성 단백질원을 첨가한 처리구가 증체량을 증가시키는 것으로 판단된다. 지규만 등 (1982) 육계에게 식물성 단백질원인 대두박과 동물성 단백질인 Casein 을 10 주 동안 급여하였을 때 Casein 을 급여한 처리구보다 대두박을 급여한 처리구에서 섭취량 및 증체량 부분이 더 높게 나타난 것으로 보고되었다. 따라서 신규 식물성 단백질의 급여에 따른 증체량 증가는 시험사료 급여 1 주 및 전체 시험기간 동안 식물성 단백질원을 첨가하지 않은 처리구와 비교하여 사료 요구율이 감소되어 육계 사양 농가에 사료비 감소에 따른 경제적 효과를 가져 올 것으로 사료된다. 저장 감량에 있어 단백질원을 첨가하지 않은 처리구와 단백질원을 7.5% 첨가한 처리구를 비교하였을 때 단백질원을 7.5% 첨가한 처리구가 저장 감량을 감소시키는 것으로 판단된다. 본 연구 결과 신규 식물성 단백질원을 7.5% 첨가 급여한 육계의 분뇨 내 *E. coli* 수는 식물성 단백질원을 첨가하지 않은 처리구와 비교하여 분뇨 내 대장균 수를 감소시키는 것으로 판단된다.

종합적으로 본 연구를 통해 신규 식물성 단백질원을 7.5% 이상 첨가 급여할 경우 증체량 증가, 저장 감량 감소 및 소화기관 내 대장균 감소 효과를 입증하였다.

다. 육계 사료 내 신규 개발 식물성 단백질 원료의 생산성 비교 시험

1) 재료 및 방법

가) 시험동물 및 시험설계

본 시험은 1 일령 ROSS 308 (♂, ♀) 816수를 공시하였고, 시험 개시 체중은 $40.5 \pm 0.4\text{g}$ 으로 사양시험은 5주간 실시하였다. 시험설계는 1) CON (soybean meal), 2) NF-8 (CON + NF-8 3.0%), 3) Comp-1 (CON + Comp-1 3.0%) 및 4) Comp-2 (CON + Comp-2 3.0%)으로 4처리 하여 처리 당 12반복, 반복 당 17 수씩 완전 임의 배치하였다.

나) 시험사료와 사양관리

ROSS 308 병아리를 3단 케이지에서 사육하였으며, 처리구별 위치를 조절하였고, 사료와 물은 자유 채식토록 하였다.

다) 조사항목 및 방법

a. 생산성: 증체량은 개시 시, 1주 3주 및 5주에 처리구별로 체중을 측정하였다. 사료섭취량은 체중 측정 시 사료급여량에서 잔량을 제하여 계산하였고, 사료요구율은 사료섭취량을 증체량으로 나누어 산출하였다.

b. 생산지수: 육성율은 각 성장단계 마다 1처리구 1반복 당 전체 마리 수를 생존한 마리 수로 나누고 100을 곱하여 계산하였고, 폐사율은 단계별로 1처리구 1반복 당 전체 마리 수를 죽은 마리 수로 나눈 뒤 100을 곱하여 계산하였다. 전체 생산지수는 생산효율지수 (Production Efficiency Factor; PEF) 공식을 사용하여 (생체중 x 생존율) / (출하일령 x 사료요구율) * 100으로 산출하였다.

c. 분내 미생물수: 시험 종료 시 (5주) 처리구별로 분을 채취한 뒤, 멸균된 생리식염수에 현탁하여 균질화시킨 다음 10^3 에서 10^7 까지 계단 희석하여 생균수 측정용 시료로 사용하였다. 실험처리에 의한 육계 분내의 *Lactobacillus*, *E. coli*, *Clostridium perfringens* 및 TBC (Total Bacterial Count)의 균수를 측정하기 위해 *Lactobacillus*에는 MRS agar, *E. coli*에는 MacConkey agar (Difco, USA), *Clostridium perfringens*에는 *Clostridium perfringens* agar, 총 세균수 (Total Bacterial Count)에는 Plate Count agar를 사용하여, 37°C에서 38시간 배양 후 균수를 측정하였다.

라) 통계처리

모든 자료는 SAS (1996)의 General Linear Model procedure를 이용하여 Duncan's multiple range test (Duncan, 1955)로 처리하여 평균간의 유의성을 검정하였다.

2) 사양시험 결과

가) 생산성

육계 사료 내 신규 개발 식물성 단백질 원료의 첨가가 생산성에 미치는 영향은 표 72 에 나타내었다. 개발제품의 급이가 대조구 대비 증체량 개선에 효과가 있는 것으로 나타났으며, 경쟁제품 대비 유의적인 차이가 크지 않아 충분히 대체 가능할 것으로 판단된다.

표 69. Composition of basal diets (as-fed basis)

Item	Starter			
	CON	NF-8	Comp-1	Comp-2
Ingredient, %				
Corn	47.85	48.23	48.46	47.52
SBM,45	34.79	31.89	31.85	31.99
NF-8		3		
Comp-1			3	
Comp-2				3
RSM,38	2	2	2	2
DDGS	3	3	3	3
FM,68	0.77	0.5	0.5	0.5
Tallow	4.7	4.6	4.6	4.9
Soy Oil	1	1	1	1
Limestone	1.36	1.38	1.38	1.38
MDCP	1.9	1.92	1.92	1.93
Salt	0.11	0.12	0.12	0.12
NaHCO ₃	0.3	0.3	0.3	0.3
Methionine,99%	0.36	0.37	0.36	0.37
Lysine,24%	0.97	0.97	0.96	0.97
Threonine,98.5%	0.6	0.43	0.26	0.48
Tryptophan,10%				0.25
V-1000	0.03	0.03	0.03	0.03
V-2000	0.03	0.03	0.03	0.03
Vitamin E,10%	0.03	0.03	0.03	0.03
Choline,50%	0.1	0.1	0.1	0.1
M-1100	0.1	0.1	0.1	0.1
Calculated nutrient Composition				
DM, %	87.3	87.4	87.4	87.5
CP, %	22.5	22.5	22.5	22.5
Lys, %	1.43	1.43	1.43	1.43
Ca, %	1.05	1.05	1.05	1.05
Total P, %	0.76	0.76	0.76	0.76
Fat, %	7.8	7.7	7.7	8.0
ASH, %	6.8	6.9	6.9	6.9
MECH, %	3025	3025	3025	3025
Fiber, %	2.9	2.9	2.9	2.9
Met, %	0.7	0.7	0.7	0.7

☒ 70. Composition of basal diets (as-fed basis)

Item	Grower			
	CON	NF-8	Comp-1	Comp-2
Ingredient, %				
Corn	53.412	53.502	53.382	53.452
SBM,45	36.33	31.51	30.26	31.98
NF-8		3		
Comp-1			3	
Comp-2				3
RSM,38		1.72	3.00	1.31
Tallow	5.5	5.5	5.6	5.5
Soy Oil	0.5	0.5	0.5	0.5
Limestone	1.14	1.12	1.1	1.12
MDCP	1.77	1.77	1.76	1.77
Salt	0.29	0.29	0.29	0.29
NaHCO ₃	0.1	0.1	0.1	0.1
Methionine,99%	0.28	0.28	0.27	0.28
Lysine,24%	0.35	0.38	0.41	0.37
Threonine,98.5%	0.03	0.03	0.03	0.03
V-1000	0.03	0.03	0.03	0.03
V-2000	0.03	0.03	0.03	0.03
CuSO ₄	0.038	0.038	0.038	0.038
Choline,50%	0.1	0.1	0.1	0.1
M-1100	0.1	0.1	0.1	0.1
Calculated nutrient Composition				
DM, %	87.5	87.7	87.7	87.6
CP, %	21.0	21.0	21.0	21.0
Lys, %	1.24	1.24	1.24	1.24
Ca, %	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P, %	0.70	0.70	0.70	0.70
Fat, %	8.0	8.0	8.1	8.0
ASH, %	6.2	6.3	6.3	6.3
MECH, %	3102	3100	3099	3100
Fiber, %	2.7	2.7	2.8	2.7
Met, %	0.6	0.6	0.6	0.6

71. Composition of basal diets (as-fed basis)

Item	Finisher			
	CON	NF-8	Comp-1	Comp-2
Ingredient, %				
Corn	55.542	56.382	56.782	56.132
SBM,45	26.37	22.7	22.37	22.86
NF-8	.	3	.	.
Comp-1	.	.	3	.
Comp-2	.	.	.	3
RSM,38	3	3	3	3
DDGS	5	5	5	5
Tallow	5.9	5.7	5.6	5.8
Limestone	1.24	1.25	1.25	1.25
MDCP	1.57	1.58	1.58	1.58
Salt	0.23	0.23	0.23	0.23
NaHCO3	0.1	0.1	0.1	0.1
Methionine,99%	0.22	0.22	0.23	0.22
Lysine,24%	0.51	0.53	0.55	0.52
Threonine,98.5%	0.02	0.01	0.02	0.01
V-1000	0.03	0.03	0.03	0.03
V-2000	0.03	0.03	0.03	0.03
Choline,50%	0.1	0.1	0.1	0.1
CuSO4	0.038	0.038	0.038	0.038
M-1100	0.1	0.1	0.1	0.1
Calculated nutrient Composition				
DM, %	87.2	87.4	87.4	87.3
CP, %	19.0	19.0	19.0	19.0
Lys, %	1.09	1.09	1.09	1.09
Ca, %	0.90	0.90	0.90	0.90
Total P, %	8.14	7.95	7.85	8.04
Fat, %	6.0	6.0	6.0	6.0
ASH, %	6.0	6.0	6.0	6.0
MECH, %	3148	3150	3151	3151
Fiber, %	2.9	2.8	2.8	2.8
Met, %	0.5	0.5	0.5	0.5

표 72. The effects of new vegetable Protein supplementation on growth performance in broilers¹

Items	CON	NF-8	Comp-1	Comp-2	SE ²
1-10 d					
BWG, g	190.1	189.5	189.3	190.7	1.30
FI, g	300.3	299.5	301.4	301.1	1.08
FCR	1.58	1.58	1.59	1.58	0.01
11-21 d					
BWG, g	772.3 ^b	785.1 ^{ab}	797.4 ^a	784.2 ^{ab}	4.54
FI, g	1116.4	1106.6	1105.9	1107.3	9.90
FCR	1.45 ^a	1.41 ^{ab}	1.39 ^b	1.41 ^{ab}	0.01
21-35 d					
BWG, g	840.9 ^b	859.0 ^{ab}	869.1 ^a	856.2 ^{ab}	7.97
FI, g	1564.3	1541.5	1540.3	1540.8	18.5
FCR	1.86	1.81	1.77	1.8	0.03
Overall					
BWG, g	1803.5 ^c	1833.4 ^b	1855.7 ^a	1831.1 ^b	7.13
FI, g	2980.7	2947.8	2947.4	2948.9	27.5
FCR	1.65 ^a	1.61 ^{ab}	1.59 ^b	1.61 ^{ab}	0.02

¹Abbreviation: CON, Basal diet; N8, CON + NF8 3.0%; Comp-1, CON + Comp-1 3.0%; Comp-2, CON + Comp-2 3.0%;

²Standard error.

^{a,b,c}Means in the same row with different superscripts differ (P<0.05).

나) 생산지수

육계 사료 내 신규 개발 식물성 단백질 원료의 첨가가 생산지수에 미치는 영향은 표 73 에 나타내었다. 생산지수에 있어 Comp-1 처리구가 CON 처리구보다 유의적으로 높게 나타났으나 (P<0.05) NF-8 및 Comp-2 는 대조구와 의 유의성이 나타나지 않았다 (P>0.05).

다) 분내 미생물

육계 사료 내 신규 개발 식물성 단백질 원료의 첨가가 생산성에 미치는 영향은 표 74 에 나타내었다. *Lactobacillus* 조성에 있어 개발제품 처리구가 CON 처리구보다 유의적으로 높게 나타났다 (P<0.05). 그러나 *E.coli*, *Clostridium perfringens* 및 총세균수에 있어서 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (P>0.05).

표 73. The effects of new vegetable Protein supplementation on production index in broilers¹

Items	CON	NF-8	Comp-1	Comp-2	SE ²
<i>Rate of raising</i>					
10d	99.0	99.5	99.5	99.5	0.58
21d	97.5	98.5	98.5	98.5	1.08
35d	95.5	97.5	97.5	97.5	1.26
<i>Mortality rate</i>					
10d	1.0	0.5	0.5	0.5	0.58
21d	2.5	1.5	1.5	1.5	1.08
35d	4.5	2.5	2.5	2.5	1.26
<i>Production index</i>	244.08 ^b	262.92 ^{ab}	268.92 ^a	261.08 ^{ab}	7.12

¹Abbreviation: CON, Basal diet; N8, CON + NF8 3.0%; Comp-1, CON + Comp-1 3.0%; Comp-2, CON + Comp-2 3.0%;
²Standard error.
^{a,b,c}Means in the same row with different superscripts differ (P<0.05).

표 74. The effects of new vegetable Protein supplementation on fecal microflora in broilers¹
(Log cfu/g)

Items	CON	NF-8	Comp-1	Comp-2	SE ²
<i>Lactobacillus</i>	7.63 ^b	7.80 ^a	7.78 ^a	7.86 ^a	0.05
<i>E.coil</i>	6.60	6.61	6.49	6.48	0.04
<i>Clostridium perfringens</i>	2.57	2.49	2.46	2.45	0.06
<i>Total bacterial count</i>	5.67	5.59	5.61	5.61	0.03

¹Abbreviation: CON, Basal diet; N8, CON + NF8 3.0%; Comp-1, CON + Comp-1 3.0%; Comp-2, CON + Comp-2 3.0%;
²Standard error.
^{a,b,c}Means in the same row with different superscripts differ (P<0.05).

2. 농장 특화형 친환경 소독제 개발: 친환경 소독제의 소독 효능 평가 및 상주농장 환경 조사

가. 제품 제조공정

친환경 소독제 제조를 위해 천연 유기산 및 flavonoid 함량이 높은 과일을 원료로 하여 액상발효를 통해 유산균 및 효모 균주를 접종하여 90일간의 발효 및 숙성 단계를 거쳐 항균 활성이 높은 천연 소독제를 제조하였다.

[제조공정]

과일 → 파쇄 → 유산균/ 효모 균주 접종 → 발효 → 숙성 → 천연 소독제 제조

나. 친환경 소독제의 소독제 효력시험 결과

1) 재료 및 방법

가) 친환경 소독제로서의 유효농도 범위 조사

a. 공시세균: *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium fortuitum*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*

b. 친환경 소독제 희석비율: 원액, 1배, 10배, 25배, 50배, 100배, 250배, 500배, 1,000배

c. 시험방법

시험 방법은 소독제 효력시험법에 준하여 실시하며, 간략한 방법은 다음과 같다.

- ㉠ 계대 중의 세균을 배지에 심어 활력이 인정되는 24시간 동안 배양한 세균을 사용하고, 사용 세균의 농도는 ml당 1.0×10^8 CFU 이상을 사용한다.
- ㉡ 희석액으로 경수를 이용하며, 세균 시험균주는 공시균주와 같다.
- ㉢ 대조구로서 산성 및 혐기성 소독제의 희석은 친환경 소독제 희석비율과 같이 희석하여 소독액 효력을 조사하였다.
- ㉣ 37°C의 세균 4ml를 4°C의 5% 유기물 희석액 96ml에 섞은 후에, 혼합액 2.5ml를 소독제 희석액에 넣고, 4°C에서 정확히 30분간 반응을 시킨다.
- ㉤ 정확히 30분간의 반응이 끝나면 소독제의 효능을 중화하기 위하여 즉시 1.0ml를 꺼내어 37°C의 9.0 ml의 중화배지에 넣고 혼합한 다음, 각 소독제 희석별로 0.1ml씩 5개의 시험관의 영양배지가 들어있는 시험관에 넣어 혼합한 후에 37°C 항온실에서 48시간 증식시킨다.
- ㉦ 5개의 동일 소독제 희석배수의 영양배지에서 2개 이상 증식이 인정되지 않는 최종 소독희석 단계를 소독제 및 친환경 소독제의 희석배수로 1차 결정한다.

나) 친환경 소독제의 소독 효력 시험

a. 공시세균: *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Mycobacterium fortuitum*, *Escherichia coli*, *Vibrio harveyi*

b. 친환경 소독제 비교평가를 위해 산성 및 혐기성 소독제를 같이 평가하였으며, 산성 소독제는 알데히드 제제, 혐기성 소독제는 제올라이트, 토리말린, 규사문석을 주성분으로 하는 혐기성 제제를 사용하였다.

c. 산성, 혐기성 소독제 및 친환경 소독제 희석배수: 1차 소독 효과가 있는 희석배수의 123, 111, 100, 90, 80% (세균 소독효력 시험법 기준)

d. 시험방법

시험 방법은 소독제 효력시험법에 준하여 실시하여 최종 희석 배수를 결정한다.

다) 소독제의 유효농도 결과

소독제의 유효농도를 확인 하였으며, 산성 소독제의 경우 25배 희석 한 것에서 소독력을 나타내는 최소 범위를 확인 하였으며, 개발한 친환경 소독제는 10배 희석 한 것에서 소독력을 나타냈지만, 혐기성 소독제의 경우 원액에서도 소독력이 나타나지 않았다. 위 결과를 바탕으로 소독력 실험에서 산성 소독제는 25배 희석액을 100%로 친환경 소독제는 10배 희석액을 100%,

염기성 소독제는 원액을 100%로 하여 소독 효능 시험을 진행 하였다.

표 75. 산성 소독제의 소독력 평가 결과

희석배율	원액	1/2	1/10	1/25	1/50	1/100	1/250	1/500	1/1000
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>V. harveyi</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C. perfringens</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>M. fortuitum</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+

표 76. 친환경 소독제의 소독력 평가 범위

희석배율	원액	1/2	1/10	1/25	1/50	1/100	1/250	1/500	1/1000
<i>E. coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>V. harveyi</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>C. perfringens</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>M. fortuitum</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+

표 77. 염기성 소독제의 소독력 평가 범위

희석배율	원액	1/2	1/10	1/25	1/50	1/100	1/250	1/500	1/1000
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>V. harveyi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. perfringens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. fortuitum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(소독력 분석법 고시 기준)

라) 소독제의 소독력 실험 결과

소독제 효력 시험법에 준하여 실험 한 결과 산성소독제의 경우 25배 희석 후 5개 공시균주 모두에서 소독력이 나타남을 확인 하였으며 (효력시험법 기준 소독력 99.9% 이상) 천연 소독제의 경우도 10배 희석 후 모든 공시균주에 대한 소독력을 입증 하였다. 하지만 염기성 소독제의 경우 원액을 이용하였음에도 모든 공시균주에서 소독력을 입증할 만한 기준치에 미달하는 것을 확인 하였다 (표 78, 79).

표 78. Spectrophotometer를 이용한 소독력 실험 결과(100%기준, 산성 소독제 25배 희석액, 친 환경 소독제 10배 희석액, 염기성 소독제 원액)

산성소독제 소독력 실험 결과 (O.D 600nm)					
균주	E.coli	S. Typhimurium	V. harveyi	C. perfringens	M. fortuitum
123%	0.001	0	0.01	0.052	0.06
111%	0.001	0	0.01	0.055	0.065
100%	0.001	0	0.01	0.063	0.07
90%	0.002	0.001	0.02	0.064	0.076
80%	0.003	0.332	0.03	0.071	0.082
친환경 소독제 소독력 실험 결과 (O.D 600nm)					
균주	E.coli	S. Typhimurium	V. harveyi	C. perfringens	M. fortuitum
123%	0	0	0	0.067	0.083
111%	0	0	0	0.067	0.084
100%	0	0	0	0.067	0.085
90%	0	0	0.001	0.068	0.088
80%	0	0	0.018	0.075	0.095
염기성 소독제 소독력 실험 결과 (O.D 600nm)					
균주	E.coli	S. Typhimurium	V. harveyi	C. perfringens	M. fortuitum
100%	0.034	0.37	0.422	0.265	0.084
90%	0.346	0.43	0.483	0.301	0.085
80%	0.38	0.511	0.508	0.347	0.102
대조구 (O.D600nm)					
균주	E.coli	S. Typhimurium	V. harveyi	C. perfringens	M. fortuitum
	0.409	0.291	0.449	0.264	0.139

표 79. 생균수 확인을 통한 소독력 실험 결과

산성 소독제 소독력 결과 (CFU/mL)					
균주	E. coli	S. Typhimurium	V. harveyi	C. perfringens	M. fortuitum
123%	ND	ND	ND	5.0+e3	5.3+e2
111%	ND	ND	ND	3.3+e3	8.0+e2
100%	ND	ND	ND	6.0+e3	2.1+e3
90%	2.0+e2	2.0+e1	ND	4.5+e3	2.5+e3
80%	4.5+e3	6.7+e4	1.2+e4	7.3+e3	2.0+e3
친환경 소독제 소독력 결과 (CFU/mL)					
균주	E. coli	S. Typhimurium	V. harveyi	C. perfringens	M. fortuitum
123%	ND	ND	ND	4.3+e3	4.3+e2
111%	ND	ND	ND	3.3+e3	4.9+e2
100%	ND	ND	ND	6.3+e3	3.3+e2
90%	ND	ND	ND	7.0+e3	1.2+e3
80%	ND	4.3+e5	2.0+e4	1.1+e4	3.0+e3
염기성 소독제 소독력 결과 (CFU/mL)					
균주	E. coli	S. Typhimurium	V. harveyi	C. perfringens	M. fortuitum
100%	2.3+e8	4.0+e6	4.3+e7	6.0+e6	7.3+e5
90%	1.3+e8	8.3+e6	5.2+e8	6.3+e6	9.2+e5
80%	5.0+e8	5.4+e7	6.4+e8	7.0+e7	3.1+e6
대조구 (CFU/mL)					
균주	E.c oli	S. Typhimurium	V. harveyi	C. perfringens	M. fortuitum
	1.57+e8	2.0+e8	3.7+e8	1.37+e8	1.2+e7

다. 개발 친환경 소독제의 항균활성 평가 결과

농가에서의 악취 및 병원성 질환을 일으키는 유해균들을 분리하여 개발제품(천연소독제)과 화학소독제의 항균력을 agar well diffusion 방법으로 비교하였다. 동일한 농도에서 모두 비슷한 크기의 생육억제환을 확인하였다. 따라서 개발 소독제의 농장 적용을 통해 지속적으로 사용함으로써 산성 및 염기성 소독제에 비해 인체나 동물에 유해성이 전혀 없을 뿐만 아니라 소독 효과도 높아 소독제로서의 효과를 기대할 수 있으며, 개발제품의 접목을 통해 축산 농가의 주요 악취원인 황화가스를 생성하는 *Salmonella* 균주에 대해서도 항균력을 나타내어 지속적으로 사용 시 악취 저감효과도 충분히 기대할 수 있을 것으로 판단된다 (그림 51).



그림 51. 농장에서 분리한 유해균에 대한 화학 소독제와 천연 소독제의 항균력 비교

1) *S. enteritidis*, 2) *S. gallinarum*, 3) *E. coli*, left clear zone; 화학소독제(Ammonium chloride계열), Right clear zone (천연 소독제)

라. 상주 농장 환경조사

농장 환경에 적합한 친환경 소독제 개발을 위해 현재 농장의 상황을 오염 수준을 점검하고 효과적인 친환경 소독제 접목을 위한 사전조사를 실시하였다. 분만사와 자돈사를 대상으로 소독제의 살포 전, 후의 낙하 유해세균 및 유해가스의 농도를 측정하였다. 낙하세균 측정은 공중 낙하균 측정법으로 진행하였으며 준비된 Chromocult agar (Merck) 배지를 측정 장소에 3장씩 놓고 동시에 뚜껑을 열고 정치시켰다. 5분간 노출시킨 후 다시 조용히 뚜껑을 닫고 37°C에서 24시간 배양하여 대장균과 대장균군의 평균 개수를 구하였다. 유해 가스는 가스검지관이 축분 슬러리로부터 약 5 cm 간격을 유지한 다음에 측정하였다.

1) 소독 전/후 농장 내 낙하균 분석

분만사의 경우 소독제 살포 전, 후를 비교하였을 때 대장균은 최대 72.34 % (그림 52, 2월), 대장균군은 최대 27.73 % (그림 52, 2월) 감소시켰으며 5개월 이상 꾸준히 사용 시에는 분만사의 낙하 유해균이 대부분 감소하는 경향을 나타내었다 (그림 52). 그림 53에서와 같이 자돈사의 경우에도 유사한 결과를 나타내었으며 5개월 이상 소독제를 사용 시 자돈사 내부의 유해균들을 효과적으로 감소시켰다.

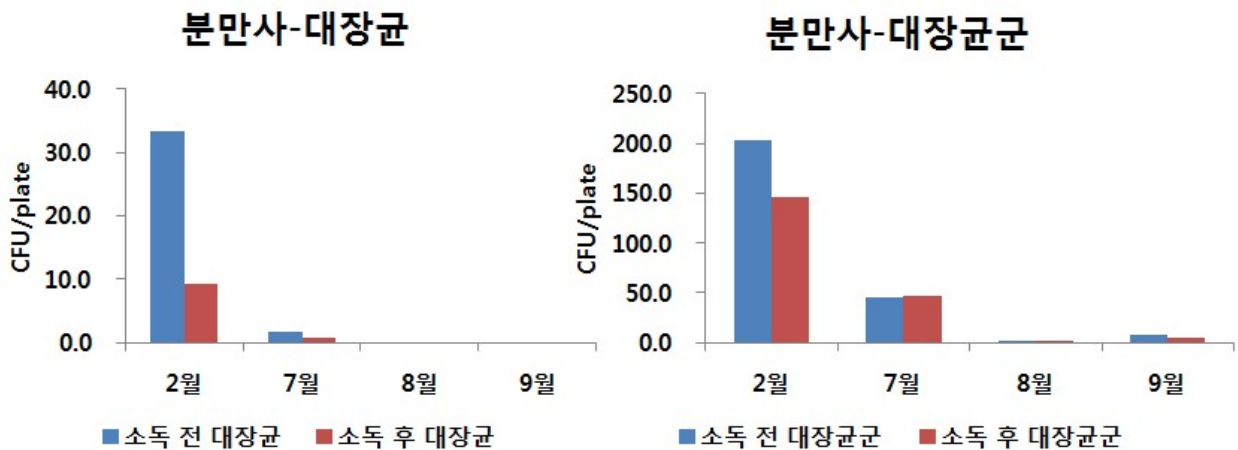


그림 52. 소독제 살포에 따른 분만사내의 유해 낙하 세균수 변화

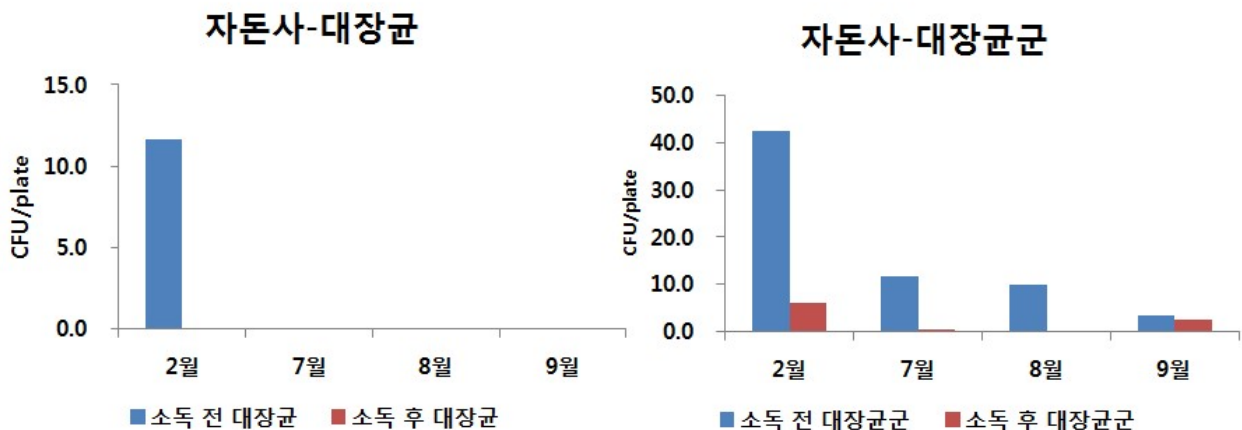


그림 53. 소독제 살포에 따른 자돈사내의 유해 낙하 세균수 변화

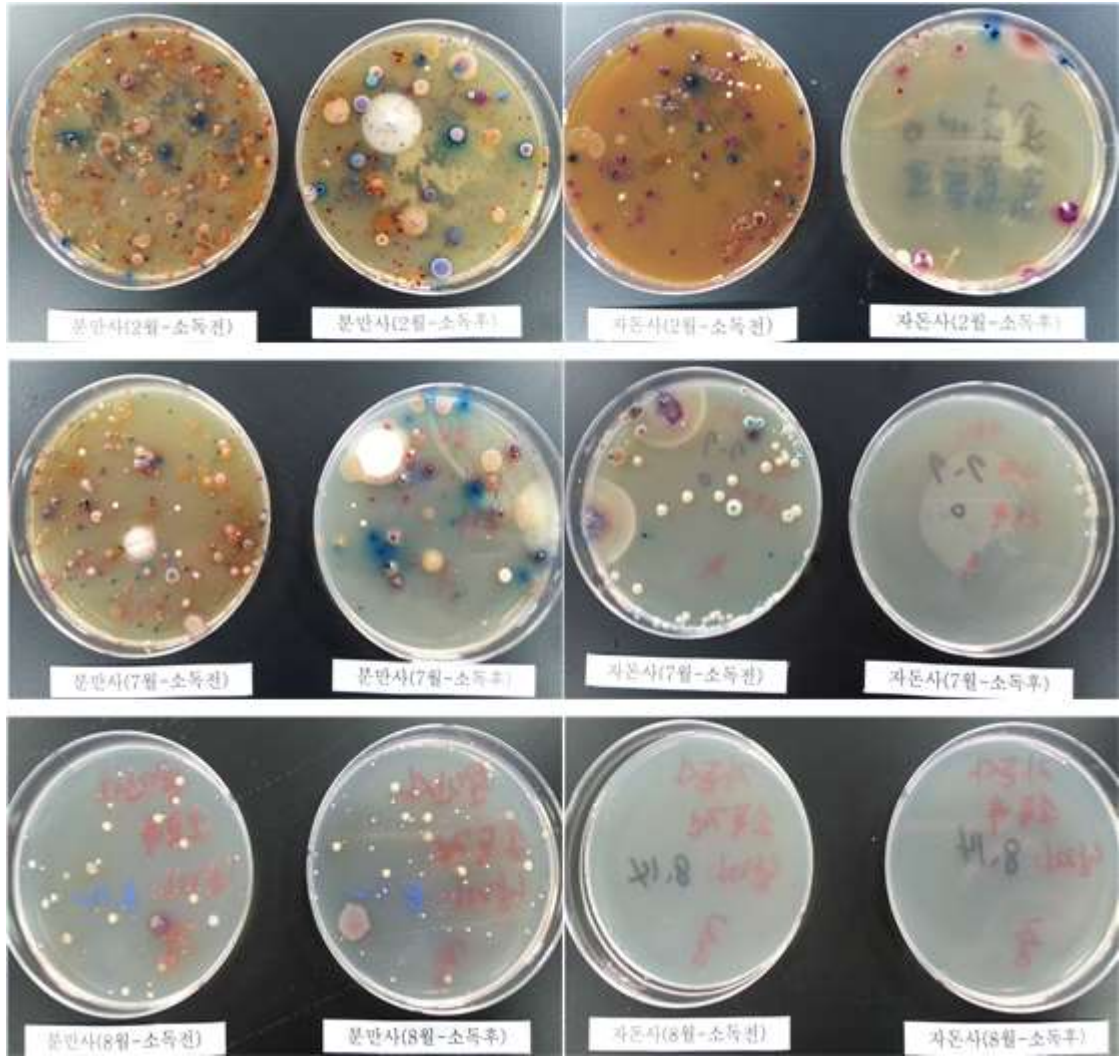


그림 54. 소독제 사용 전, 후에 따른 유해균의 감소 효과

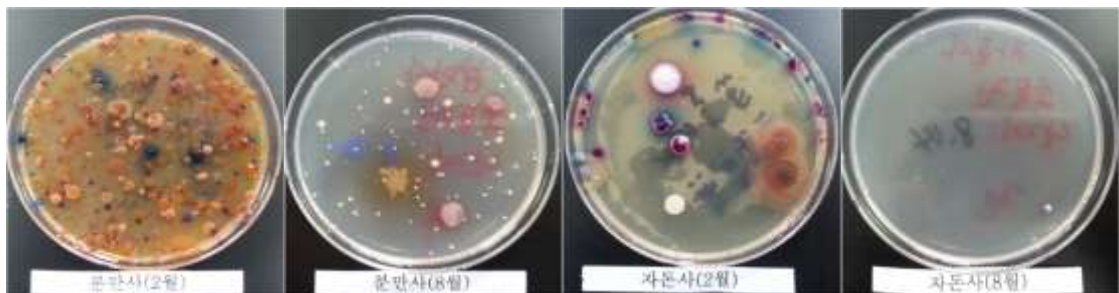


그림 55. 소독제 사용 5개월 후, 공기중의 오염균수 변화(소독전)

2) 돈사 내부 유해 가스 측정 결과

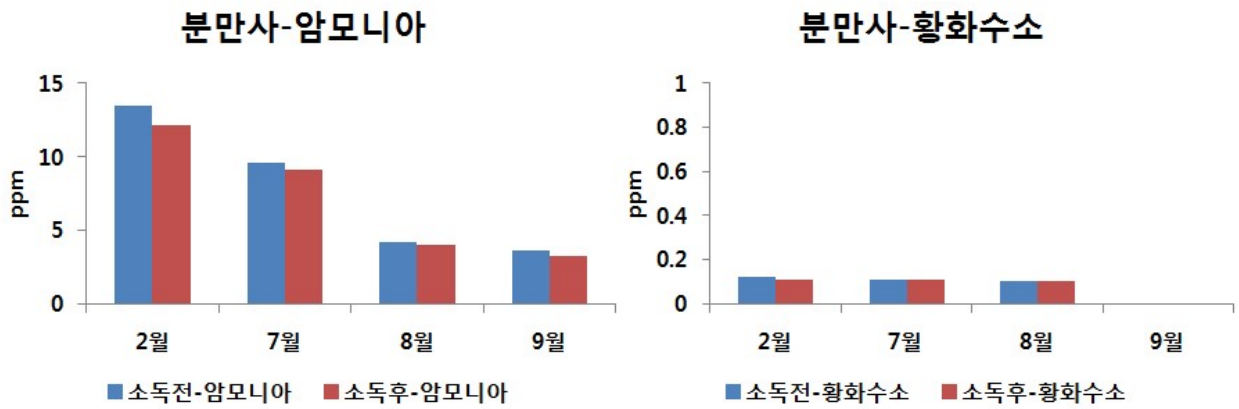


그림 56. 소독제 살포에 따른 분만사내의 유해 가스 변화

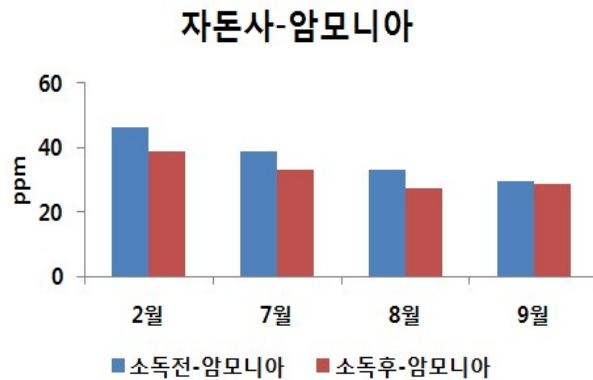


그림 57. 소독제 살포에 따른 자돈사내의 유해 가스 변화

소독제의 살포에 따른 황화수소 가스의 변화는 검출기기의 측정범위를 벗어나기 때문에 확인할 수 없었다. 하지만 암모니아의 경우에는 소독제의 살포 전, 후에 따라 농도가 변화하였다. 분만사에서는 최대 10.62 % (그림 56, 2월), 자돈사는 최대 18.39 % 감소하였다 (그림 57, 8월). 현재 농장 환경에 대한 추가 조사를 지속적으로 진행하고 있으며, 친환경 소독제 일부 사용을 통한 소독효과의 비교/평가를 진행 중에 있다.

3) 농장 환경에서의 주요 균주 분석

농장 환경 조사 단계에서 오염균으로 의심되는 colony를 무작위로 분리하여 균주에 대한 동정분석을 실시하였다. 농장에서의 주요 오염균주는 표 80와 같으며, 동정결과 토양, 흙 등에 환경에 존재하는 균주가 대부분이었으며, 일부 균주는 질병을 유발할 가능성이 있는 균주로 확인되어 개발한 친환경 소독제를 활용한 소독력 시험을 진행 중이다.

표 80. 농장에서의 분리균주 동정 결과

Strain	Genebank Accession No.	균주명	Gram	주요오염원/질병유발대상
1	KJ372209.1	Alcaligenes sp. 2AH	-	토양/물/척추동물장관
2	KJ019018.1	Alcaligenes sp. NM-4		
3	JX997986.1	Comamonas sp. KBB9	-	토양/물/진흙
4	HF678364.1	Comamonas sp. RS18		
5	JX997986.1	Comamonas sp. KBB9	-	토양/물/진흙
6	HF678364.1	Comamonas sp. RS18		
7	KC818599.1	Uncultured Stenotrophomonas sp.	-	토양/인체병원성
8	HE984675.1	Uncultured bacterium		
9	HF548369.1	Aerococcus viridans	+	요도관질환
10	KF777527.1	Aerococcus sp.		
11	KC634304.1	Aerococcus viridans strain OST12	+	요도관감염
12	KC425222.1	Aerococcus viridans strain CK3		
13	JF766697.1	Providencia sp. BIHB 1402	-	요도관감염
14	JF766697.1	Providencia sp. BIHB 1402		
15	JX997986.1	Comamonas sp. KBB9	-	토양/물/진흙
16	HF678364.1	Comamonas sp. RS18		
17	KF527824.1	Pseudomonas plecoglossicida strain AVP1	-	출혈성복수(은어,물고기)
18	GU991858.1	Pseudomonas fulva strain 2YW4		
19	JX000038.1	Uncultured bacterium clone SB-20		
20	JN092595.1	Proteus penneri strain FFL8	-	요도관감염
21	JX000038.1	Uncultured bacterium clone SB-20		
22	KC404859.1	Proteus sp. H24 16S	-	요도관감염
23	JX000038.1	Uncultured bacterium clone SB-20		
24	JN092595.1	Proteus penneri strain FFL8	-	요도관감염
25	JX000038.1	Uncultured bacterium clone SB-20		
26	JN092595.1	Proteus penneri strain FFL8	-	요도관감염
27	KC404859.1	Proteus sp. H24	-	요도관감염
28	KC211304.1	Pseudochrobactrum sp. SG-2	-	호흡기발견/자연계 잔재균
29	FJ658960.1	Uncultured bacterium		
30	JX000038.1	Uncultured bacterium		
31	JN092595.1	Proteus penneri strain FFL8	-	요도관감염
32	JQ950493.1	Bactrocera correcta strain JH36-24		
33	JN092595.1	Proteus penneri strain FFL8	-	요도관감염
34	KC046506.1	Uncultured bacterium clone		
35	KJ464995.1	Brevundimonas diminuta strain MYS 6	-	물

제 11 절 양돈에서 장내세균 질병 억제 생균제 소재 개발 및 효과 규명 (위탁과제, 서울대학교)

1. 대장균에 대한 효능평가를 위한 유산균 균주 배양

주관기관인 (주)진바이오텍 으로부터 의뢰받아 효능이 높은 유산균 균주를 선별하기 위해 검사한 유산균의 종류는 다음과 같았다.

가. 검사한 유산균 균주 목록

표 81. 균주 목록

균주 번호	1-3	2-6	3-5	3-6	6-1
	6-5	6-13	7-1	7-25	

나. 분리 유산균의 동정결과 및 lactic acid 함량 분석결과

표 82. 분리 유산균의 특성

Strains No.	16S rDNA sequencing 동정결과	Lactic acid(mg/L)	Clostridium균주에 대한 항균활성
6-1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	3642.8	+
6-13	<i>Lactobacillus plantarium</i>	5616.8	+
3-6	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	4782.7	+
3-5	<i>Lactococcus lactis</i> strain 62334.3	5228.8	+
7-25		4832.6	+
7-1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain IR BL0076 (<i>S. enteritidis</i> 에 대해 가장 강한 항균력 보유)	5385.5	+
2-6	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain NM178-5	5125.0	+
1-3	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain CJLP56	6145.7	+
6-5	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain AI2-1i	4896.2	+

* 선별한 모든 균주들은 *Salmonella gallinarum*, *Salmonella enteritidis*, *E.coli*, *Clostridium*에 대한 우수한 항균 활성을 나타냄.

다. 유산균 배양조건

MRS agar에서 24 ~ 30시간, 37°C 에서 배양한 후 single colony를 취해 MRS broth 100 mL 에 single colony를 각각 접종한 후, 37°C, 180 ~ 200 rpm 정도의 조건에서 24시간 배양하여 유산균 배양액으로 사용한다. (균수 확인- 1×10^8 cfu/mL이상/ 배양액의 특성을 포함할 경우 24 ~ 40시간 배양)

2. 검사에 사용한 대장균

가. 대장균 선발 기준

유산균의 효능시험을 위해 실험실적 효능 검사를 위하여 고병원성 대장균 균주를 선발하였다. 대장균의 고병원성을 확인하기 위해 중합효소 연쇄반응을 이용하여 이유자돈에서 설사 또는 부종병을 유발하는데 관련되어 있는 병원성 유전자를 확인하였다. 병원성 유전자의 종류는 F4, F18, Sta, LT, STx이었다.

나. 중합효소 연쇄반응에 사용하는 프라이머

다음의 프라이머를 이용하여 고병원성 유전자를 확인하기 위한 중합효소 연쇄반응을 진행하였다.

표 83. 고병원성 유전자 확인을 위한 primer 염기서열

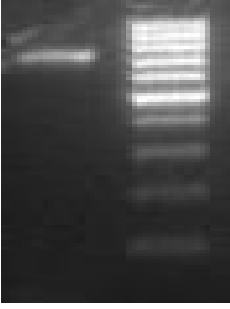
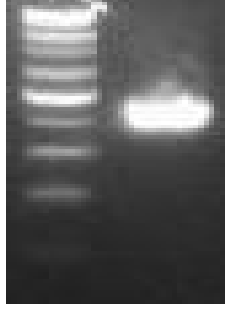

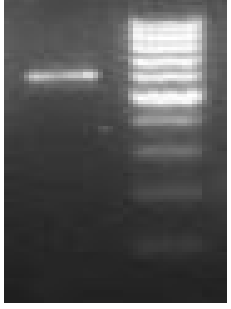
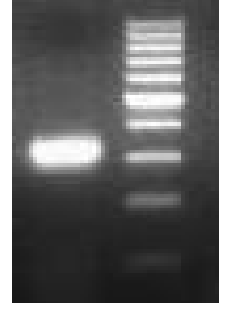
유전자	프라이머 서열		Tm (°C)	Size
F4	F	5' - GCCTGGATGACTGGTGATTT - 3'	60	709
	R	5' - TCTGACCGTTTGCAATACCC - 3'		
F18	F	5' - CTTTCACATTGCGTGTGGAG - 3'	60	441
	R	5' - ATTCGACGCCTTAACCTCCT - 3'		
STa	F	5' - GAAACAACATGACGGGAGGT - 3'	60	229
	R	5' - GCACAGGCAGGATTACAACA - 3'		
LT	F	5' - GGTTTCIGCGTTAGGTGGAA - 3'	59	605
	R	5' - GGGACTTCGACCTGAAATGT - 3'		
STx	F	5' - TGGTGTGAGAGTGGGGAGAA - 3'	60	334
	R	5' - TACCTTTAGCACAAATCCGCC - 3'		

다. 중합효소 연쇄반응 조건

중합효소 연쇄반응은 중합효소 연쇄반응은 GeneAmp PCR System 9700(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)을 사용하여 시행하였으며, F4 섬모의 경우 섭씨 95°C에서 5분 동안 가열 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초를 반응시키는 과정을 40번 반복하고, 마지막으로 72°C에서 5분 동안 반응하도록 하였다. F18 섬모와 장내독소인 열안정성 독소 (heat-stable toxin, STa), 열이열성 독소 (heat-labile, LT), 시가독소 (Shiga toxin, STx)의 경우 모두 위와 동일한 조건에서 중합효소 연쇄반응을 수행하였다.

이들 유전자의 반응이 끝난 후, 10 μ l를 0.02 % ethidium bromide를 첨가한 2 % agarose gel에 20분 동안 전기영동 하였다.

검사결과 섬모와 관련된 F4와 F18 유전자에서 분석에서는 각각 709 base pair (그림 58)와 441 base pair (그림 59)의 증폭된 유전자를 확인하였다. 또한 장내독소인 열안정성 독소 (STa)는 229 base pair (그림 60)와 열이열성 독소 (LT)는 605 base pair (그림 61)의 증폭된 유전자를 확인하였다. 시가독소(STx)는 334 base pair (그림 62)의 증폭된 유전자를 확인하였다.

그림 58. F4 gene (709bp)	그림 59. F18 gene (441bp)	그림 60. STa gene (229bp)	그림 61. LT gene (605bp)	그림 62. STx gene (334bp)
				

라. 선발된 대장균 종류

서울대학교 수의과대학 병리학교실로 의뢰된 설사병이 있는 이유자돈과 부종병이 의심되는 신경증상이 있는 이유자돈에서 분리한 대장균을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 분석하였다. 분석 결과 이유자돈에서 설사병을 유발하는 섬모인 F4와 F18을 보유하고, 장내독소인 열이열성 (heat-labile, LT)과 열안전성 (heat-stable, ST)의 유전자를 보유하고 있는 유전자를 모두 보유하고 있는 대장균을 선발하였다. 또한 이유자돈에서 부종병을 유발하는 대장균이 보유하고 있는 섬모인 F18와 시가독소 (Shiga toxin, STx)를 보유하고 있는 대장균을 선발하였다.

중합효소 연쇄반응을 통하여 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균을 선발하였다. 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균에서 F4를 보유하고 있는 대장균의 수는 총 9종이었으며 LT를 보유하고 있는 대장균의 수는 7종, STa를 보유하고 있는 대장균의 수는 6종, F18을 보유하고 있는 대장균의 수는 총 2종 이었다.

또한 5개의 이유자돈 부종병 유발 대장균에 대한 중합효소 연쇄반응 결과, 모두 시가독소 (STx)를 보유하고 있는 것을 확인하였으며 그 외에도 STa를 보유한 대장균이 2종, F18을 보유한 대장균이 4종 확인하였다.

표 84. 이유자돈 설사병 유발 대장균 목록

	Strain No.	F4	LT	STa	F18
1	SNU090382	O	O	O	X
2	SNU970173	O	X	O	X
3	SNU110083	O	O	X	X
4	SNU100822	O	O	X	X
5	SNU100012	O	O	X	X
6	SNU980238	X	X	O	O
7	SNU110123	O	X	O	X
8	SNU090376	O	O	X	X
9	SNU080293	O	O	O	X
10	SNU080113	O	O	O	O

표 85. 이유자돈 부종병 유발 대장균 목록

	Strain No.	STa	STx	F18
1	SNU090694	O	O	X
2	SNU080213	O	O	O
3	SNU110394	X	O	O
4	SNU100748	X	O	O
5	SNU980101	X	O	O

3. 유산균주의 대장균 증식억제 실험

가. 실험방법

- ① MRS, LB Agar 플레이트에 10^4 colony-forming units (CFU)/ml로 균수를 맞춘 대장균 균액을 바른다.
- ② 대장균을 바르고 30분 안에 agar 플레이트에 무균적으로 구멍을 뚫는다.
- ③ 각 구멍마다 유산균 배양액을 $200\ \mu\text{l}$ 채워 넣는다.
- ④ 37°C 에서 24시간 배양한 후 결과를 읽는다.
- ⑤ 음성대조는 멸균한 생리식염수를, 양성대조는 병원성 대장균에 대해 광범위한 활성을 나타내는 항생제 세프티포 (Ceftiofur, Neo-sensitabsTM, Taastrup, Denmark) 디스크를 사용하였다.

나. 실험결과

① 실험 결과 판별 기준

활성 유산균 균주에 의한 이유자돈 설사병 유발 대장균과 부종병 유발 대장균의 증식억제 여부는 양성 대조균과 음성대조균의 세균이 자라지 못한 반경을 상호 비교하여 판별하였다. MRS Agar에서 실험한 유산균 sample이 양성대조균의 반경 70%이상 세균억제 효과를 보였다면 강한 증식 억제 (그림 63)로 판명하고, 음성대조균의 반경(O)보다 크고 양성 대조균의 반경 10%이상 70% 이하인 경우 인 경우에는 약한 증식 억제 (그림 64)로 판명하였다. 반경 10%이하일 경우 증식 억제불가로 판단하였다. 반면 LB Agar에서 실험한 유산균 sample이 양성대조균의 반경 50%이상 세균억제 효과를 보였다면 강한 증식 억제 (그림 67)로 판명하고, 음성대조균의 반경(O)보다 크고 양성 대조균의 반경 50% 이하인 경우 인 경우에는 약한 증식 억제 (그림 65, 66)로 판명하였다. 반경(O)인 경우 증식 억제불가로 판단하였다.

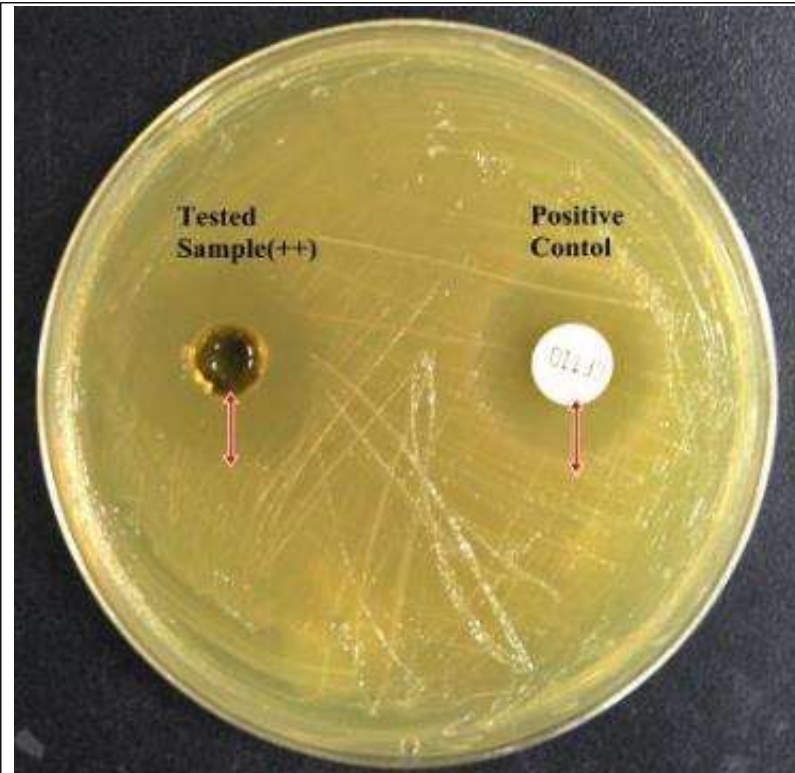


그림 63.
 MRS Agar,
 양성대조균 반경(red
 point) 75% 이상
 sample, 강한 증식 억제
 유산균주 : 1-3,
 접종 세균:SNU080113

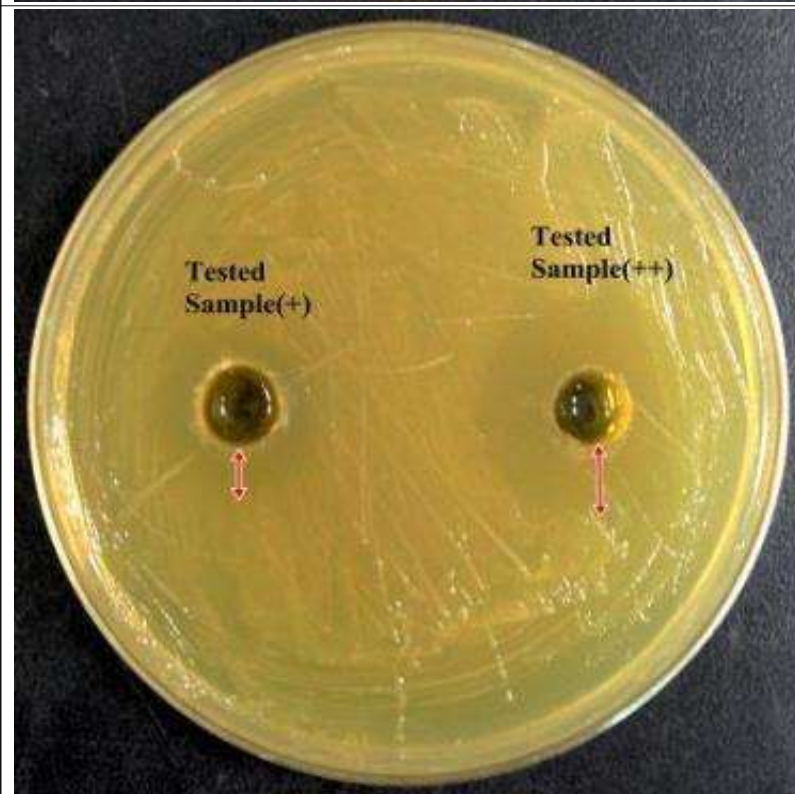


그림 64.
 MRS Agar,
 약한 증식억제 sample
 (왼), 강한 증식 억제
 sample(오른쪽)
 (좌)유산 균주 : 6-1
 (우)유산 균주 : 1-3
 접종 세균:SNU080113

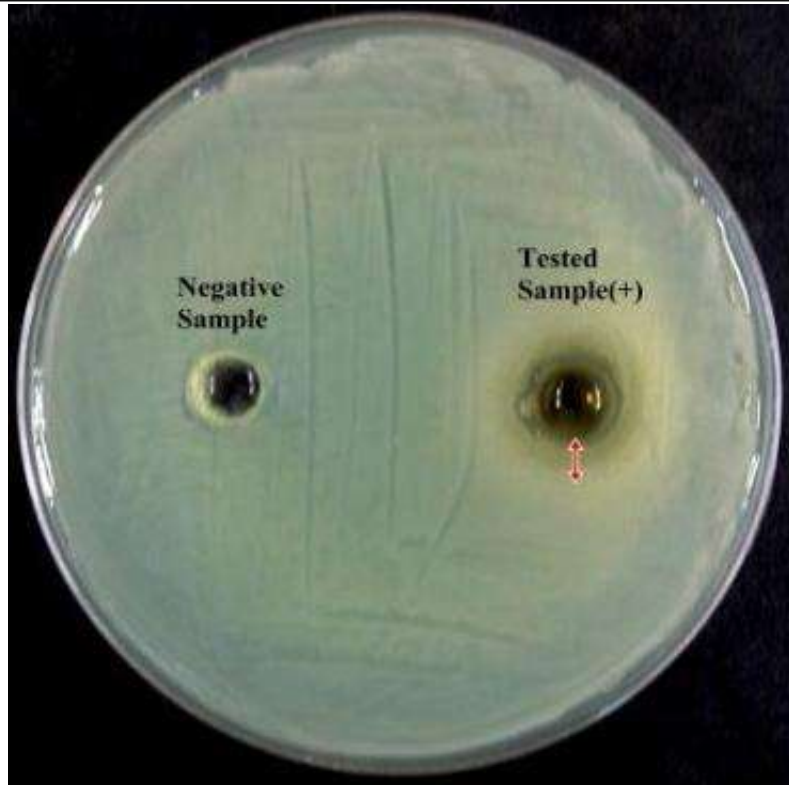


그림 65.
 LB Agar,
 음성대조군(왼)과 약한 증식 억제 sample(오른 쪽)
 유산 균주 : 7-1
 접종 세균:SNU080213

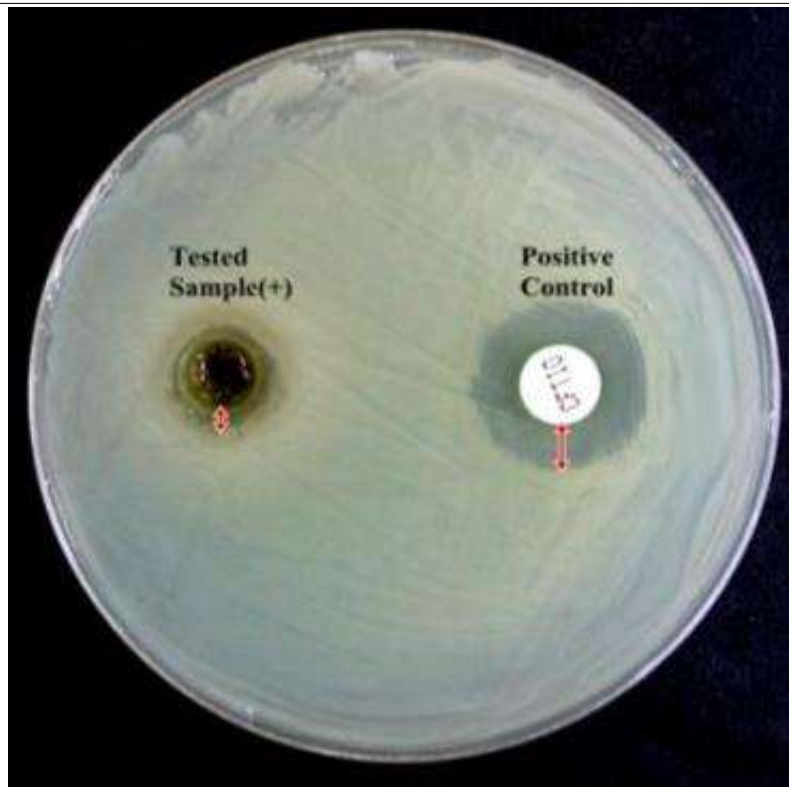


그림 66.
 LB Agar,
 약한 증식 억제 sample (왼), 양성 대조군(오른쪽)
 유산 균주 : 7-1
 접종 세균:SNU080213

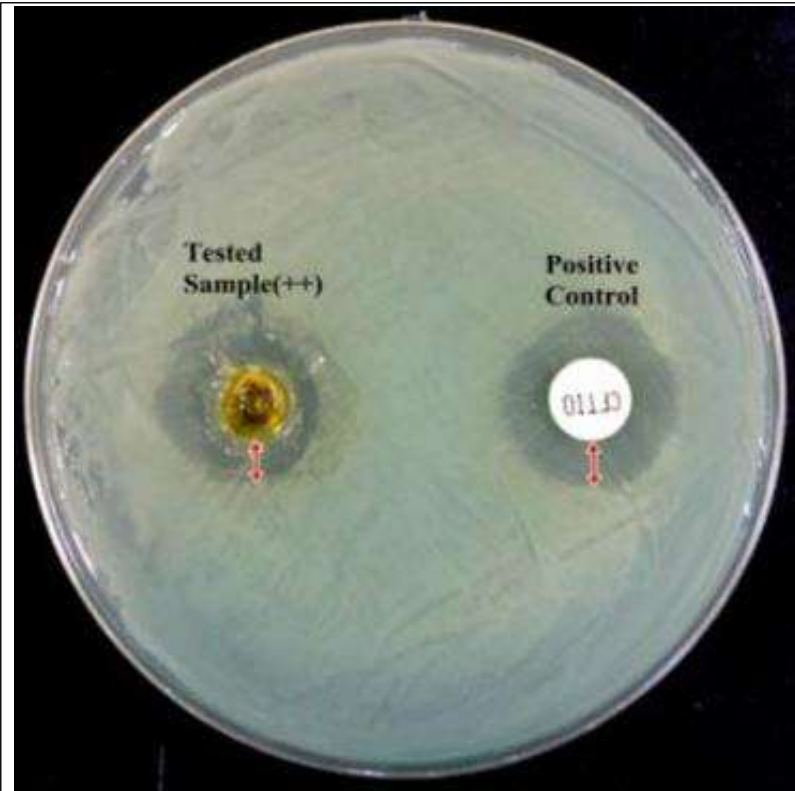


그림 67.
LB Agar,
강한 증식 억제 sample
(왼), 양성 대조군(오른쪽)
유산 균주 : 3-5
접종 세균:SNU080213

② 이유자돈 설사병 유발 대장균

대장균 증식 억제 기능을 가진 것으로 추정되는 9개의 유산균을 이용하여 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균에 대한 실험실내 증식 억제 실험을 실시하였다. 억제 정도에 대한 기준은 위에서 설명한 바와 같이 수행하여 판별하였으며, MRS, LB agar 양쪽에서 결과는 agar에 따른 차이 없이 동일하였다.

활성 유산균주인 6-1 균주는 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 5, 7에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 2, 3, 4, 8, 10에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다. 대장균 6, 9에 대해서는 억제효과를 보이지 않았다.

활성 유산균주인 6-13 균주는 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균 중에서 대장균 2, 4, 6, 8에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 1, 3, 5, 7에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다. 대장균 9, 10에 대해서는 억제효과를 보이지 않았다.

활성 유산균주인 3-6 균주는 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 3, 5, 6에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 2, 4, 7, 9에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다. 대장균 8, 10에 대해서는 억제효과를 보이지 않았다.

활성 유산균주인 3-5 균주는 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 2, 4, 5, 7, 9, 10에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 3, 6에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다. 대장균 8에 대해서는 억제효과를 보이지 않았다.

활성 유산균주인 7-25 균주는 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 3, 4에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 2, 5, 7, 9, 10에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다. 대장균 6, 8에 대해서는 억제효과를 보이지 않았다.

활성 유산균주인 7-1 균주는 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균 중에서 대장균 2, 3, 6, 7에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 1, 4, 5, 8, 9에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다. 대장균 10에 대해서는 억제효과를 보이지 않았다.

활성 유산균주인 2-6 균주는 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 3, 8에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다.

활성 유산균주인 1-3 균주는 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 4, 7에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다.

활성 유산균주인 6-5 균주는 10개의 이유자돈 설사병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 3에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 2, 4, 5, 6, 8, 10에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다. 대장균 7, 9에 대해서는 억제효과를 보이지 않았다.

표 86. 유산균주별 이유자돈 설사병 유발 대장균에 대한 증식 억제 결과

유산균주	이유자돈 설사병 유발 대장균 (균주 번호)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
6-1	○	△	△	△	○	×	○	△	×	△
6-13	△	○	△	○	△	○	△	○	×	×
3-6	○	△	○	△	○	○	△	×	△	×
3-5	○	○	△	○	○	△	○	○	○	○
7-25	○	△	○	○	△	×	△	×	△	△
7-1	△	○	○	△	△	○	○	△	△	×
2-6	○	○	△	○	○	○	○	△	△	○
1-3	○	○	○	△	○	○	△	○	○	○
6-5	○	△	○	△	△	△	×	△	×	△

③ 이유자돈 부종병 유발 대장균

대장균 증식 억제 기능을 가진 것으로 추정되는 9개의 유산균을 이용하여 5개의 이유자돈 설사병 유발 대장균에 대한 실험실내 증식 억제 실험을 실시하였다. 억제 정도에 대한 기준은 위에서 설명한 바와 같이 수행하여 판별하였으며, MRS, LB agar 양쪽에서 결과는 agar에 따른 차이 없이 동일하였다.

활성 유산균주인 6-1 균주는 5개의 이유자돈 부종병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 2, 3, 5에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 4에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다.

활성 유산균주인 6-13 균주는 5개의 이유자돈 부종병 유발 대장균 중에서 대장균 2, 3, 4에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 1, 5에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다.

활성 유산균주인 3-6 균주는 5개의 이유자돈 부종병 유발 대장균 중에서 대장균 2, 3, 4에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 1, 5에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다.

활성 유산균주인 3-5 균주는 5개의 이유자돈 부종병 유발 대장균 중에서 대장균 2, 3, 4, 5에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 1에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다.

활성 유산균주인 7-25 균주는 5개의 이유자돈 부종병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 4, 5에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 2에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다. 대장균 3에 대해서는 증식억제를 보이지 않았다.

활성 유산균주인 7-1 균주는 5개의 이유자돈 부종병 유발 대장균 중에서 대장균 3, 4에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 1, 2, 5에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다.

활성 유산균주인 2-6 균주는 5개의 이유자돈 부종병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 2, 3, 4, 5에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었다.

활성 유산균주인 1-3 균주는 5개의 이유자돈 부종병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 2, 3, 4,

5에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었다.

활성 유산균주인 6-5 균주는 5개의 이유자돈 부종병 유발 대장균 중에서 대장균 1, 4, 5에 대해서는 강한 억제 기능이 관찰되었으며 대장균 2, 3에 대해서는 약한 증식 억제 기능이 관찰되었다.

표 87. 유산균주별 이유자돈 부종병 유발 대장균에 대한 증식 억제 결과

유산균주	이유자돈 부종병 유발 대장균 (균주 번호)				
	1	2	3	4	5
6-1	○	×	○	△	○
6-13	△	○	△	○	△
3-6	△	△	○	○	○
3-5	△	○	○	○	○
7-25	○	△	×	○	○
7-1	△	△	○	○	△
2-6	○	○	○	○	○
1-3	○	○	○	○	○
6-5	○	△	△	○	○

4. 선정된 개발 생균제의 안전성 검사 스크린

가. 접종 방법

개발 생균제의 선정에 있어서 가장 중요한 항목은 개발 생균제의 안전성을 검사하는 것이다. 우선 선정된 개발 생균제로 선정된 5개의 유산균을 각각 2두씩의 이유자돈 (4주령)에 구강으로 2 mL (1×10^9 cfu/mL)을 접종하여 3주간 질병 발병 양상을 확인한다.

나. 평가방법

① 임상증상

평가방법은 임상증상 (폐사, 심한 설사, 중간 설사, 연변, 위축)을 매일 관찰한다.

② 병리조직검사

실험이 종료되는 3주후에는 각각의 이유자돈을 안락사 시킨 후에 소장 7개 부위 (십이지장 중간부위, 공장 상단부위, 공장 중간부위, 공장 하단 부위, 회장 상단부위, 회장 중간부위, 회장 말단 부위)과 대장 3개 부위 (상단, 중간, 하단)에서 장 샘플을 채취하여 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매하여 조직 블록을 만든다. 제작된 조직 블록을 5 μ m의 두께로 자른 후에 H&E 염색을 실시한다. 그 후 현미경으로 관찰한다. 현미경으로 소장과 대장을 관찰하는 경우에는 총 4개층, ①점막 (장 상피세포), ②고유층 (lamina propria), ③근육층 (muscularis layer) 및 ④장막 (serosa layer)으로 나뉘어서 각각에 병변 여부를 현미경으로 관찰한다. 첫 번째, 점막층인 장상피세포의 경우 탈락 여부와 형태의 변화 등을 관찰한다. 두 번째, 고유층 (lamina propria)에서는 호중구 (neutrophil)와 호산구 (eosinophil) 같은 염증세포 (inflammatory)의 침윤

(infiltration) 여부 등을 관찰한다. 세 번째, 근육층 (muscular layer)에서는 근육층의 비후 여부를 검사한다. 네 번째, 장막 (serosa) 층에서는 섬유소성 염증 여부를 관찰한다.

다. 검사결과

① 유산균 1-3

유산균 1-3을 투여한 이유자돈에서는 3주 동안 폐사, 심한 설사, 중간 설사, 연변, 위축 등의 증상은 관찰 할 수가 없었다.

표 88. 유산균 1-3 균주 안전성검사 결과

접종 후 일령	임상증상									
	폐사		심한 설사		중간 설사		연변		위축	
	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
15	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
17	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
18	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
21	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

유산균 1-3을 접종한 후 3주가 경과되는 시점에서 이들 2마리의 이유자돈을 안락사 시킨 후에 소장과 대장을 채취하여 병변 여부를 확인하였다.

a. 돼지 A

표 89. 소장 및 대장의 병리조직 검사 결과 (돼지 A)

검사항목		병리조직 검사									
		십이지장	공장			회장			대장		
			상단	중간	하단	상단	중간	하단	상단	중간	하단
점막층	점막탈락	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
고유층	호중구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	호산구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
근육층	비대	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
장막층	염증	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

b. 돼지 B

표 90. 소장 및 대장의 병리조직 검사 결과 (돼지 B)

검사항목		병리조직 검사									
		십이지장	공장			회장			대장		
			상단	중간	하단	상단	중간	하단	상단	중간	하단
점막층	점막탈락	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
고유층	호중구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	호산구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
근육층	비대	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
장막층	염증	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

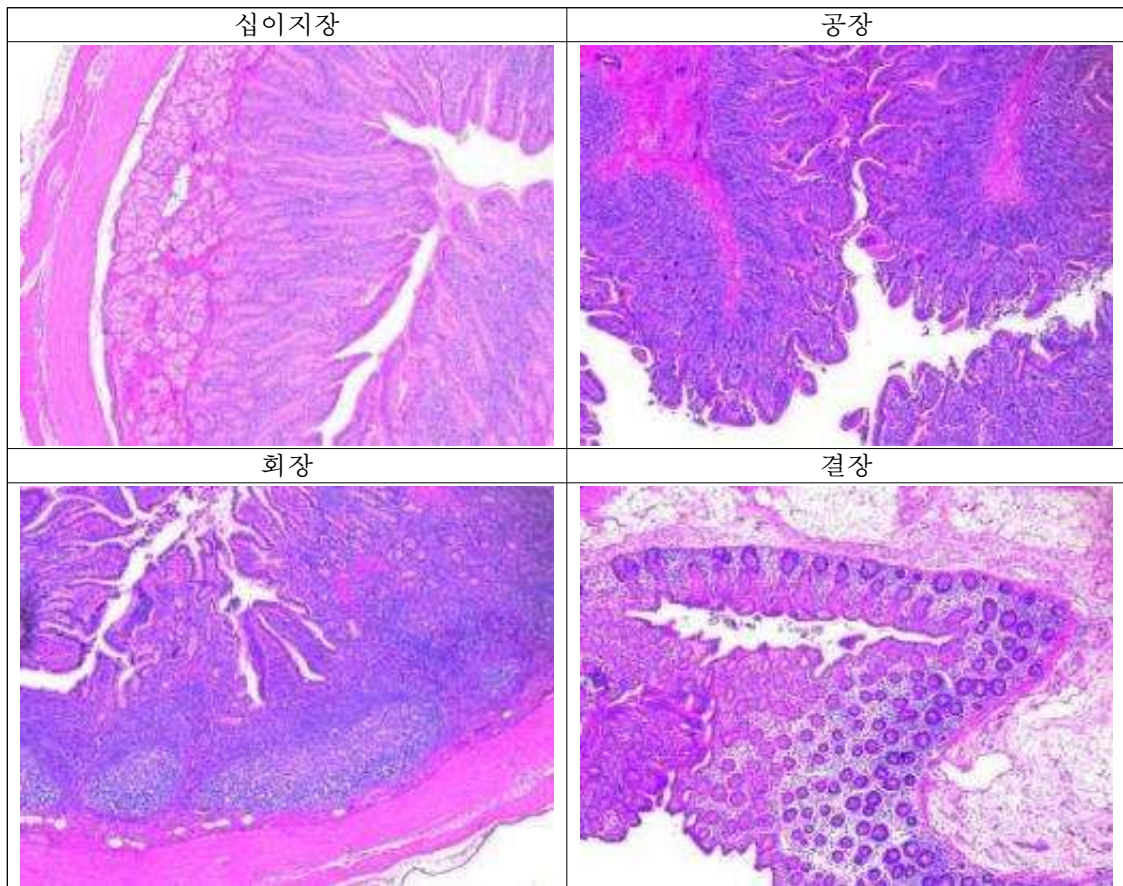


그림 68. 돼지 A, B에서 나온 소장 및 대장 조직 사진: 점막층, 고유층, 근육층, 장막층에 걸쳐 어떠한 염증세포의 침윤도 확인하지 못했다. 또한 상피세포의 괴사, 탈락의 병변도 발견하지 못했다.

② 유산균 2-6

유산균 2-6 을 투여한 이유자돈에서는 3주 동안 폐사, 심한 설사, 중간 설사, 연변, 위축 등의 증상은 관찰 할 수가 없었다.

표 91. 유산균 2-6 균주 안전성검사 결과

접종 후 일령	임상증상									
	폐사		심한 설사		중간 설사		연변		위축	
	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
15	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
17	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
18	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
21	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

유산균 2-6 을 접종한 후 3주가 경과되는 시점에서 이들 2마리의 이유자돈을 안락사 시킨 후에 소장과 대장을 채취하여 병변 여부를 확인하였다.

a. 돼지A

표 92. 소장 및 대장의 병리조직 검사 결과 (돼지 A)

검사항목		병리조직 검사									
		십이지장	공장			회장			대장		
			상단	중간	하단	상단	중간	하단	상단	중간	하단
점막층	점막탈락	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
고유층	호중구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	호산구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
근육층	비대	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
장막층	염증	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

b. 돼지B

표 93. 소장 및 대장의 병리조직 검사 결과 (돼지 B)

검사항목		병리조직 검사									
		십이지장	공장			회장			대장		
			상단	중간	하단	상단	중간	하단	상단	중간	하단
점막층	점막탈락	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
고유층	호중구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	호산구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
근육층	비대	X	X	X	X	△	X	X	X	X	X
장막층	염증	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

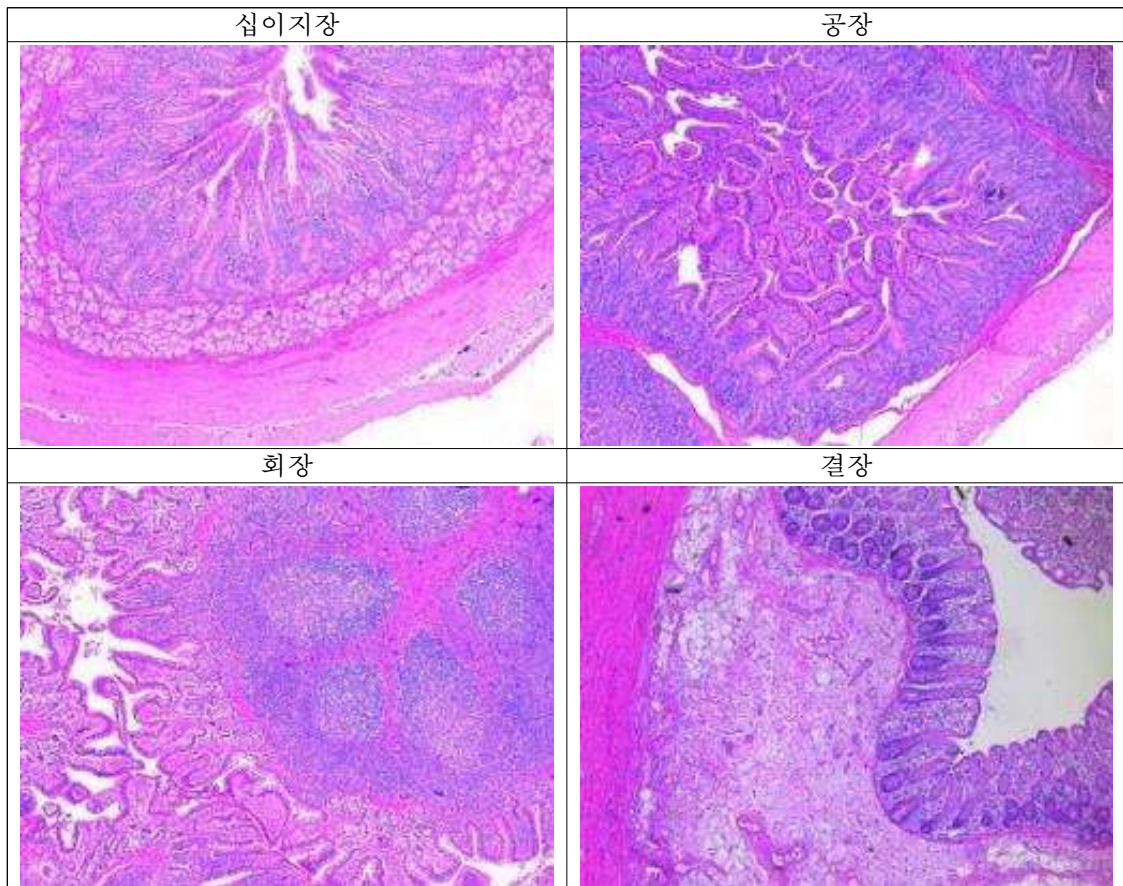


그림 69. 돼지 A, B에서 나온 소장 및 대장 조직 사진: 점막층, 고유층, 근육층, 장막층에 걸쳐 어떠한 염증세포의 침윤도 확인하지 못했다. 또한 상피세포의 괴사, 탈락의 병변도 발견하지 못했다. 다만 돼지 B의 회장 상단 부분, 일부에서 proliferative lesion을 관찰하였다.

③ 유산균 3-6

유산균 3-6 을 투여한 이유자돈에서는 3주 동안 폐사, 심한 설사, 중간 설사, 연변, 위축 등의 증상은 관찰 할 수가 없었다.

표 94. 유산균 3-6 균주 안전성검사 결과

접종후 일령	임상증상									
	폐사		심한 설사		중간 설사		연변		위축	
	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
15	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
17	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
18	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
21	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

유산균 3-6을 접종한 후 3주가 경과되는 시점에서 이들 2마리의 이유자돈을 안락사 시킨 후에 소장과 대장을 채취하여 병변 여부를 확인하였다.

a. 돼지A

표 95. 소장 및 대장의 병리조직 검사 결과 (돼지 A)

검사항목		병리조직 검사									
		십이지장	공장			회장			대장		
			상단	중간	하단	상단	중간	하단	상단	중간	하단
점막층	점막탈락	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
고유층	호중구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	호산구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
근육층	비대	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
장막층	염증	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

b. 돼지B

표 96. 소장 및 대장의 병리조직 검사 결과 (돼지 B)

검사항목		병리조직 검사									
		십이지장	공장			회장			대장		
			상단	중간	하단	상단	중간	하단	상단	중간	하단
점막층	점막탈락	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
고유층	호중구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	호산구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
근육층	비대	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
장막층	염증	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

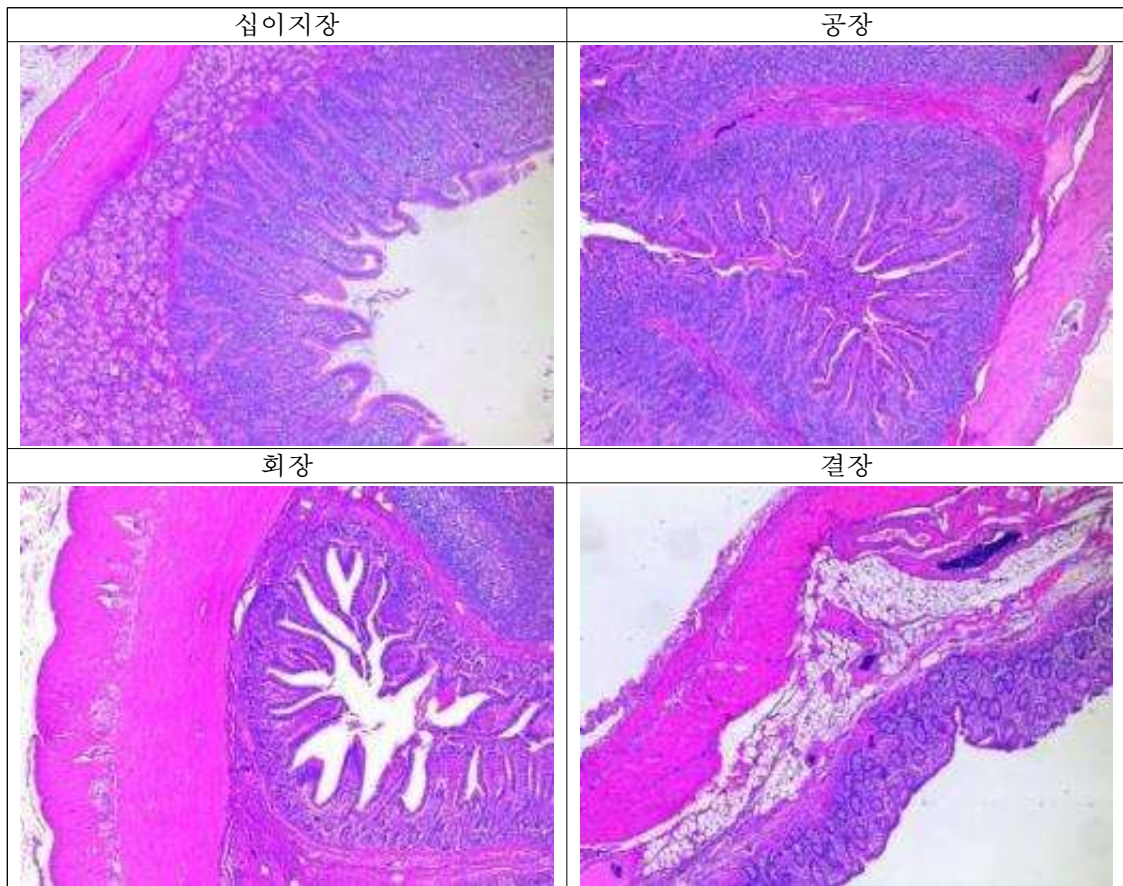


그림 70. 돼지 A, B에서 나온 소장 및 대장 조직 사진: 점막층, 고유층, 근육층, 장막층에 걸쳐 어떠한 염증세포의 침윤도 확인하지 못했다. 또한 상피세포의 괴사, 탈락의 병변도 발견하지 못했다.

④ 유산균 3-5

유산균 3-5를 투여한 이유자돈에서는 3주 동안 폐사, 심한 설사, 중간 설사, 연변, 위축 등의 증상은 관찰 할 수가 없었다.

표 97. 유산균 3-5 균주 안전성검사 결과

접종후 일령	임상증상									
	폐사		심한 설사		중간 설사		연변		위축	
	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
15	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
17	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
18	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
21	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

유산균 3-5를 접종한 후에 3주가 경과되는 시점에서 이들 2마리의 이유자돈을 안락사 시킨 후에 소장과 대장을 채취하여 병변 여부를 확인하였다.

a. 돼지A

표 98. 소장 및 대장의 병리조직 검사 결과 (돼지 A)

검사항목		병리조직 검사									
		십이지장	공장			회장			대장		
			상단	중간	하단	상단	중간	하단	상단	중간	하단
점막층	점막탈락	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
고유층	호중구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	호산구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
근육층	비대	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
장막층	염증	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

b. 돼지B

표 99. 소장 및 대장의 병리조직 검사 결과 (돼지 B)

검사항목		병리조직 검사									
		십이지장	공장			회장			대장		
			상단	중간	하단	상단	중간	하단	상단	중간	하단
점막층	점막탈락	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
고유층	호중구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	호산구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
근육층	비대	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
장막층	염증	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

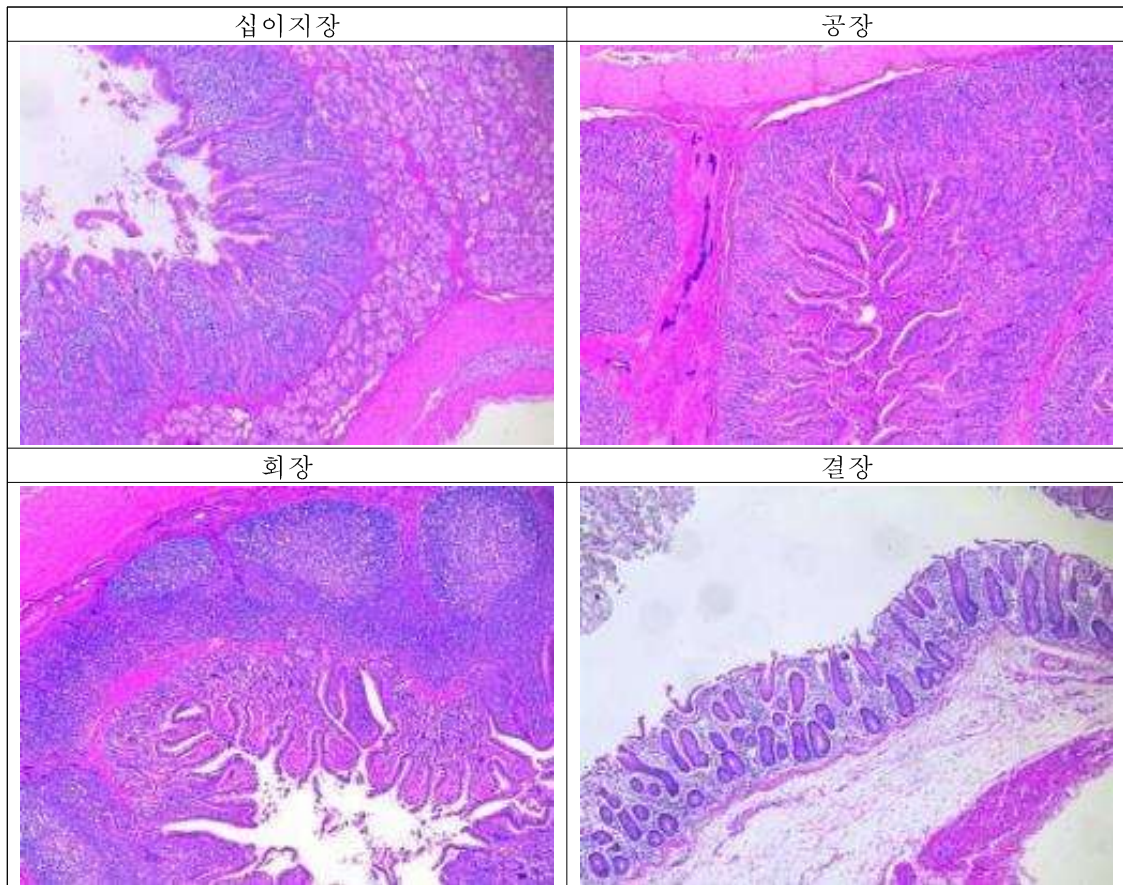


그림 71. 돼지 A, B에서 나온 소장 및 대장 조직 사진: 점막층, 고유층, 근육층, 장막층에 걸쳐 어떠한 염증세포의 침윤도 확인하지 못했다. 또한 상피세포의 괴사, 탈락의 병변도 발견하지 못했다.

⑤ 유산균 6-5

유산균 6-5를 투여한 이유자돈에서는 3주 동안 폐사, 심한 설사, 중간 설사, 연변, 위축 등의 증상은 관찰 할 수가 없었다.

표 100. 유산균 6-5 균주 안전성검사 결과

접종 후 일령	임상증상									
	폐사		심한 설사		중간 설사		연변		위축	
	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B	돼지A	돼지B
1	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
15	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
16	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
17	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
18	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
19	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
20	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
21	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

유산균 6-5를 접종한 후 3주가 경과되는 시점에서 이들 2마리의 이유자돈을 안락사 시킨 후에 소장과 대장을 채취하여 병변 여부를 확인하였다.

a. 돼지A

표 101. 소장 및 대장의 병리조직 검사 결과 (돼지 A)

검사항목		병리조직 검사									
		십이지장	공장			회장			대장		
			상단	중간	하단	상단	중간	하단	상단	중간	하단
점막층	점막탈락	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
고유층	호중구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	호산구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
근육층	비대	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
장막층	염증	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

b. 돼지B

표 102. 소장 및 대장의 병리조직 검사 결과 (돼지 B)

검사항목		병리조직 검사									
		십이지장	공장			회장			대장		
			상단	중간	하단	상단	중간	하단	상단	중간	하단
점막층	점막탈락	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
고유층	호중구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	호산구	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
근육층	비대	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
장막층	염증	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

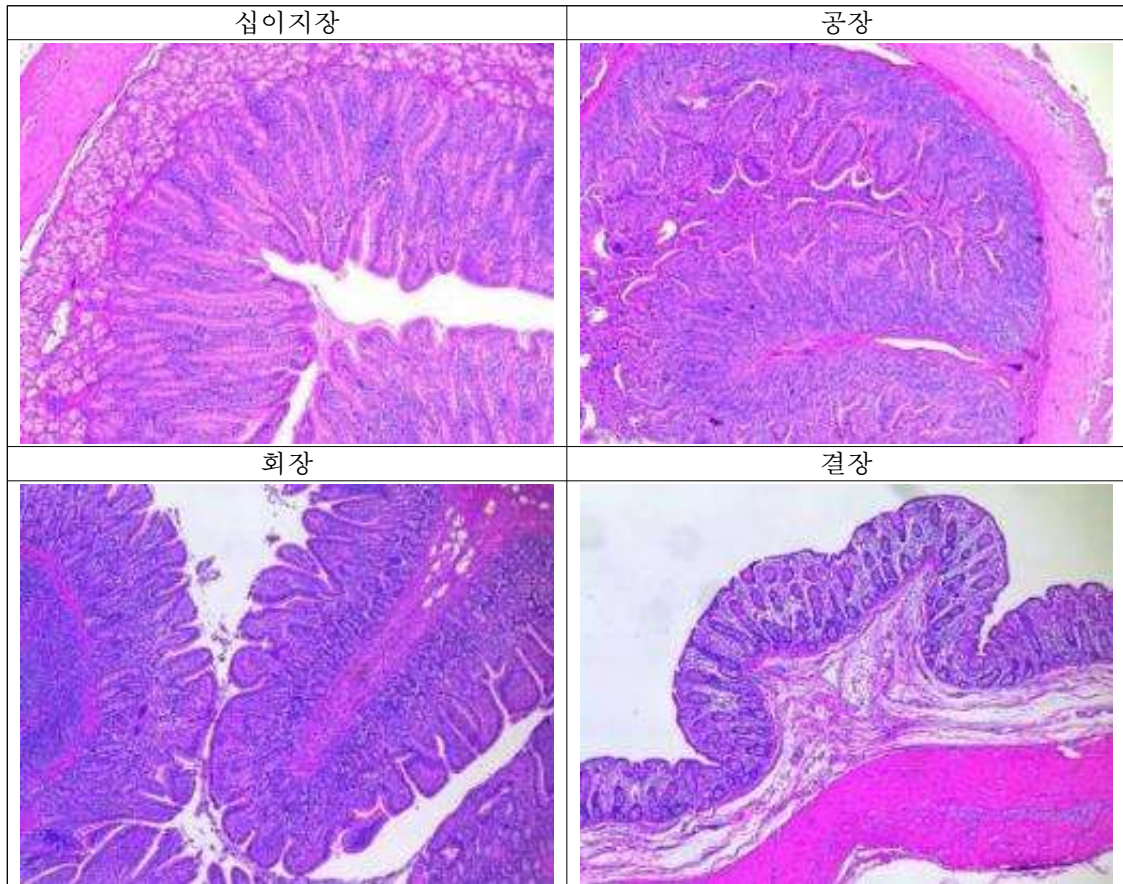


그림 72. 돼지 A, B에서 나온 소장 및 대장 조직 사진: 점막층, 고유층, 근육층, 장막층에 걸쳐 어떠한 염증세포의 침윤도 확인하지 못했다. 또한, 상피세포의 괴사, 탈락의 병변도 발견하지 못했다.

5. 예비 후보 생균제의 이유자돈 대장균 설사증에 대한 효능 평가

가. 실험 방법

1) 후보 생균제

주관 기관에서 개발한 항균력이 우수한 균주로 선발된 *Lactobacillus plantarum*을 사료첨가용 생균제로 (3.0×10^8 CFU/g) 공급받아 이유자돈 사료에 첨가하여 공급하였다.

2) 급여 방법

3주령 이유자돈에게 기본 영양소를 포함한 사료(corn extruded, 299.2; barley extruded, 71; rice flakes, 133; dried beet pulp, 40; soybean meal (44% CP) 50; soybean debitterized 77; spray-dried milk whey, 135; spray-dried skimmed milk, 135; lard, 48; HCl-lysine, 0.5; DL-methionine, 0.3; monocalcium phosphate, 10; and flavor, 1.)를 생균제 첨가군과 대조군 모두에게 공급하였다. 생균제 첨가군은 개체 당 하루 사료공급량의 2%씩 건조된 생균제 첨가물을 공급하였다. 3주령 이유자돈이 실험기간인 7주 동안 성장을 고려하여 매 주마다 사료공급량을 100g/일 씩 늘렸다.

3) 공격접종용 대장균

예비 후보 생균제의 이유자돈 대장균 설사증에 대한 효능 평가에서는 이유자돈 대장균 설사증을 가장 흔하게 유발하는 장내독소 (enterotoxigenic) 대장균으로, F4라고 하는 섬모 (fimbriae)와 2가지 장내독소 (enterotoxin)인 열이열성 (heat-labile, LT)와 열안전성 (heat-stable, ST)를 보유하여 가장 병원성이 높은 대장균을 사용하였다.

4) 실험 일정

효능 평가를 위해서 4개의 실험군으로 표 103과 같이 구성하였으며, 실험군 1과 2에는 생균제를 첨가하는 첨가군으로 실험 시작 시기인 3주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 실험 전 구간 동안 생균제를 급여하였다. 또한 7주령에 실험군 1과 3에는 이유자돈 대장균 설사증을 유발하는 장내독소 대장균을 3.0×10^9 CFU/ml로 배양된 배양액을 3ml씩 투여하였다. 그리고 실험 종료 시점인 10주령에 모든 돼지를 안락사 시켜 각각의 장기를 채취하였다.

표 103. 생균제의 효능 평가를 위한 실험 설계

처리구	두수	처리		
		생균제사료 첨가 (LP)	대장균 공격접종 (E)	부검 (10주령)
<i>L. plantarum</i> + <i>E.coli</i> Treat (LE)	5	○	F4 ⁺ LT ⁺ ST ⁺ enterotoxigenic <i>E. coli</i>	○
<i>L. plantarum</i> Treat (LP)	5	○	×	○
<i>E.coli</i> Treat (ET)	5	×	F4 ⁺ LT ⁺ ST ⁺ enterotoxigenic <i>E. coli</i>	○
Positive control (PC)	5	×	×	○

나. 실험결과

1) 임상증상 스코어

① 설사 정도 분석 방법

대장균 공격접종 이후 21일간 모든 군의 개체에서 보이는 변의 양상을 기록하였다. 표 104에 제시한 기준에 따라 변의 상태를 점수로 산출하였으며 그룹 간 평균의 유의적인 차이를 Mann Whiteny test로서 판별하였다.

표 104. 임상 증상 평가 기준

임상증상	내용	스코어(score)
심한 설사	변의 내용물이 끈기가 전혀 없고 액상을 보임, 소화되지 않은 곡물이 보이거나 출혈을 동반함	5
중간 설사	변의 내용물이 끈기가 없고 액상을 보임	4
연변	변의 내용물이 끈기가 없으나 액상을 보이지는 않음	3
약한 연변	변의 내용물이 끈기가 있으나 형태가 유지되지 못함	2
정상	변이 끈기가 있고 형태를 유지함	1

② 설사 정도 분석 결과

표 105에서와 같이 접종 이후 후보 생균제를 첨가하지 않고 대장균만 접종한 처리구 ET에서는 대장균 접종 4일 이후부터 설사가 관찰되었는데 설사는 가벼운 수양성을 보이며 끈기가 현격하게 떨어진 형태로 대장균 접종 10일차까지도 지속되는 경향을 나타냈다. 그러나 LP 생균제를 급여한 경우 대장균을 접종한 처리구 LE에서는 LP 생균제를 첨가하지 않은 처리구와는 달리 이러한 수양성 설사가 관찰되지 않았다. 생균제를 첨가하지 않고 대장균만 접종한 ET

처리구는 대장균을 강제접종하지 않은 다른 두 처리구 보다 설사 정도가 유의성($P < 0.05$) 있게 심하게 관찰되었다. 접종 7일에 후보 생균제를 첨가하고 대장균을 접종한 LE 처리구가 후보 생균제를 첨가하지 않고 대장균만 접종한 처리구 ET보다 통계적으로 유의성($P < 0.05$) 있게 경미한 설사 증상이 관찰되었다. 모든 실험군의 돼지에서 접종 8일 이후에는 설사가 관찰된 돼지는 관찰할 수가 없었다. 대장균을 접종하지 않은 두 처리구에서는 시험 전 기간 동안 설사가 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 개발된 생균제의 사료 첨가를 통해 대장균성 설사를 일부 예방할 수 있음을 의미하는 것으로 판단된다.

표 105. 개발 생균제 첨가가 이유자돈 대장균 설사증 유발 F4⁺LT⁺ST⁺enterotoxigenic *E. coli* 공격 접종 시 설사발생 정도

처리구	이유자돈 대장균 설사 유발 대장균 공격 접종 이후 날짜																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
LE	1	1.4	1.4	2.8	2.4	2.2	2.2	1.8	1.2	1.4	1.2	1.4	1	1	1	1.2	1	1	1	1	1
LP	1	1	1.2	1	1	1	1	1	1.2	1.2	1	1	1	1.2	1	1	1.2	1	1	1	1
ET	1	1.4	1.8	3.4	3.6	3.2	3.4	2.2	1.6	2.2	1.4	1.2	1.4	1	1.4	1.2	1	1	1	1.2	1.2
PC	1	1	1.4	1	1	1	1	1.2	1	1	1	1	1	1.2	1	1.2	1	1	1	1.2	1

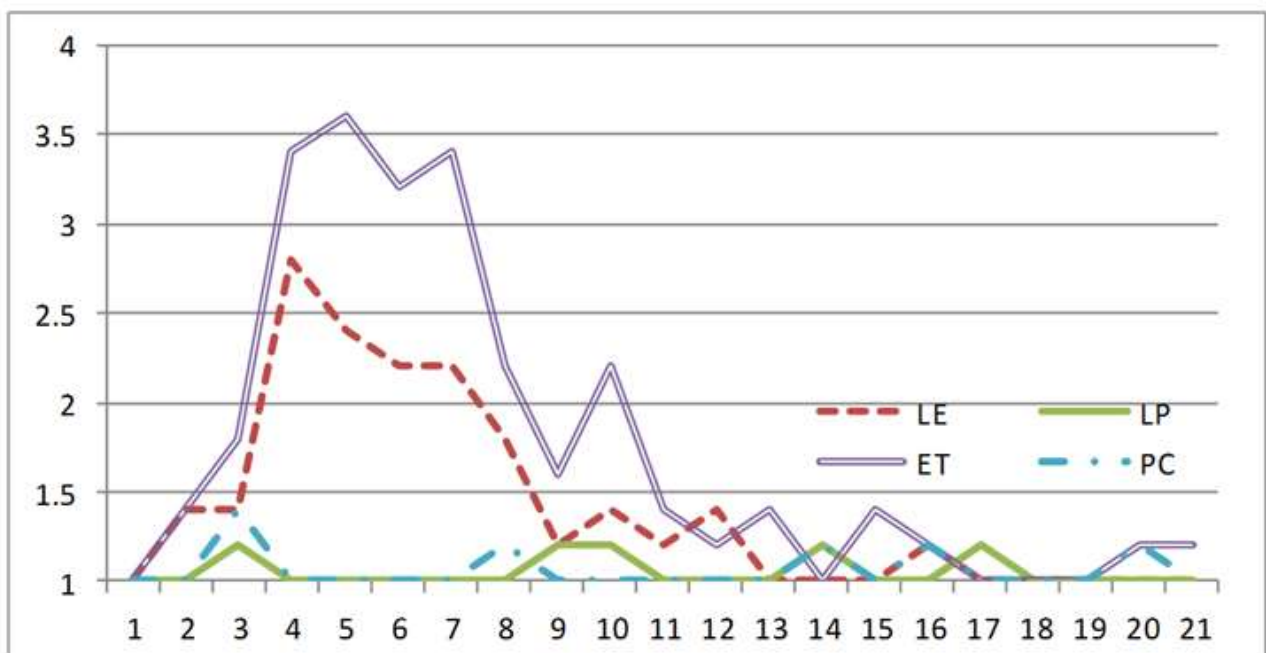


그림 73. 개발 생균제 첨가가 이유자돈 대장균 설사증 유발 F4⁺LT⁺ST⁺enterotoxigenic *E. coli* 공격 접종시 설사 발생 경향 (ET처리구는 LP 및 PC에 비해 유의적으로 설사 발생)

③ 폐사 및 위축 분석 결과

실험 기간 동안 4개의 실험군중에서 어떠한 개체도 폐사되지 않았다.

④ 일당 증체량 분석 결과

생균제 급여를 시작한 3주령부터 공격접종 전인 7주령까지 개체별 체중 증체량과 7주부터 10주령 까지 개체별 체중 증체량을 측정하였다 (표 106). 일당 증체량은 집단 별 평균 수치를 Tukey's multiple test를 이용하여 판별하였다. 실험기간 동안 각각의 처리구에서 유의적인 차이는 보이지 않았으나 (그림 74) 생균제 급여가 지속됨에 따라 (시험 7 ~ 10주령) 일당증체 증가정도는 더 크게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한 대장균을 강제접종하지 않은 처리구인 LP와 PC에서는 생균제 첨가구인 LP 처리구에서 유의적인 차이는 없었지만 꾸준히 일당증

체가 높은 경향을 보이는 것으로 확인되어 대장균성 설사 유무와 관계없이 첨가한 생균제가 증체에 긍정적인 효과를 보이는 것으로 판단된다. 이러한 효과는 보다 낮은 일령에서 더 크게 나타나고 있다.

표 106. 개발 생균제 첨가가 이유자돈 대장균 설사증 유발 F4⁺LT⁺ST⁺enterotoxigenic *E. coli* 공격 접종시 일당 증체량 변화 영향

처리구	3~7주령 (g/d)	7~10주령 (g/d)
LE	421.20	574.60
LP	429.02	605.40
ET	397.40	554.20
PC	408.60	593.80

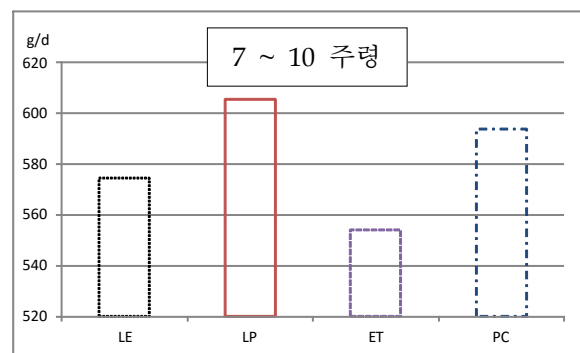
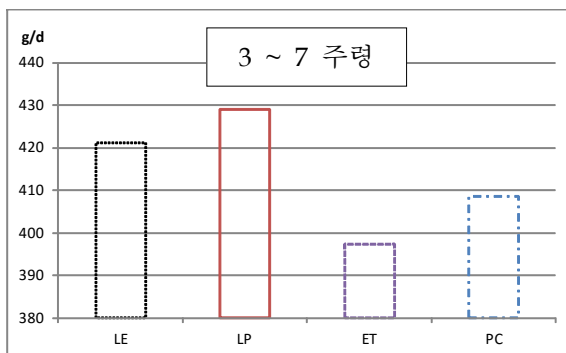


그림 74. 개발 생균제 첨가가 이유자돈 대장균 설사증 유발 F4⁺LT⁺ST⁺enterotoxigenic *E. coli* 공격 접종시 일당 증체량 변화 영향

2) 분변에서 대장균 분리를 통한 분석

공격 접종 1, 2, 3, 7, 14, 21일에 개체에서 분비된 분변을 다음의 방법으로 정량화하여 대장균 수치를 분석하였다. 각각의 날짜에 맞춰 개체별로 분변을 채취하였다. 채취한 분변은 신중하게 1g을 4ml의 Ringer's solution (1:5 vol/vol)에 희석시켰다. 이 희석액을 다시 연속으로 10배씩 10회 희석하여 준비한 뒤 각각의 희석액 100ul을 violet-red bile agar medium에 분주하고 24시간 동안 43°C에서 배양하였다. Colony-forming unit은 대략 30~300개 사이의 Colony가 관찰되는 희석배수로 수치를 결정하였다. Colony에 대한 검정은 Oxoid 사의 Kligleriron agar media에서 Wood's lamp fluorescence을 통해 확증하였다. 각각의 그룹별 평균 수치는 Tukey's multiple test를 이용하여 판별하였는데 처리구간에 분변에서 대장균 수치의 변화가 없었다 (표 107).

표 107. 개발 생균제 첨가에 의한 이유자돈 대장균 설사증 유발 F4⁺LT⁺ST⁺enterotoxigenic *E. coli* 공격 접종시 분변 대장균 변화 (log cfu/g)

처리구	1일	2일	3일	7일	14일	21일
LE	8.43	8.06	8.56	8.26	7.86	8.35
LP	7.98	8.36	8.46	8.04	8.33	8.59
ET	7.78	8.07	8.95	8.82	8.37	8.67
PC	7.35	7.86	7.34	7.95	7.38	7.66

3) 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 분변의 대장균 수치 분석

① 실시간 중합효소 연쇄반응에서 사용한 프라이머

먼저 정량 분석을 위한 표준곡선(standard curve)을 확보하였다. 먼저 접종한 대장균주의 cDNA를 pfu라고 하는 중합효소와 대장균주 각각이 보유한 특이적인 프라이머(primer)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통해 증폭시켰다. 이 때 사용한 프라이머는 서울대학교에서 자체 제작한 (Primer 3 이용) 프라이머로 그 서열은 다음과 같다 (표 108).

표 108. F4⁺LT⁺ST⁺enterotoxigenic F4⁺LT⁺ST⁺enterotoxigenic 대장균 수치 분석을 위한 primer 설계

	Forward primer	Reverse primer	Size(bp)
F4 gene	GGGTTCTGAACTCTCGGCT	CACTGGGTATTGCAAACGGT	212

② 실시간 중합효소 연쇄반응 표준곡선을 이용한 분석방법

증폭한 DNA 단편을 Enzynomics사에 출시한 Blunt core kit를 사용하여 Cloning 시킨다. 대장균이 보유한 섬모(fimbriae)의 단편이 삽입된 Plasmid는 heat shock(45도, 1분) 자극을 통해 대장균(Competent cell)에 transfection되어 다음날까지 competent cell의 증식과 더불어 증폭시킨다. Plasmid Purification kit를 이용하여 competent cell에서 plasmid를 추출한 뒤 Nanodrop을 이용하여 농도를 계산한다. 10배 씩 차례로 증류수(distilled water)로 희석한 뒤 각 희석한 샘플을 앞서 사용한 독소 특이적인 프라이머를 이용하여 각각 실시간 중합효소 연쇄반응을 실시하면 정량 분석을 위한 standard curve를 확보하였다 (그림 75). 확보한 표준곡선을 이용하여 채취한 분변 1g내 대장균의 수를 정량화하였다. 채취한 날짜별로 분변에 존재하는 섬모 보유 대장균의 수는 다음과 같았다. 그룹별 유의적인 차이는 Student t test를 이용하여 판별하였다.

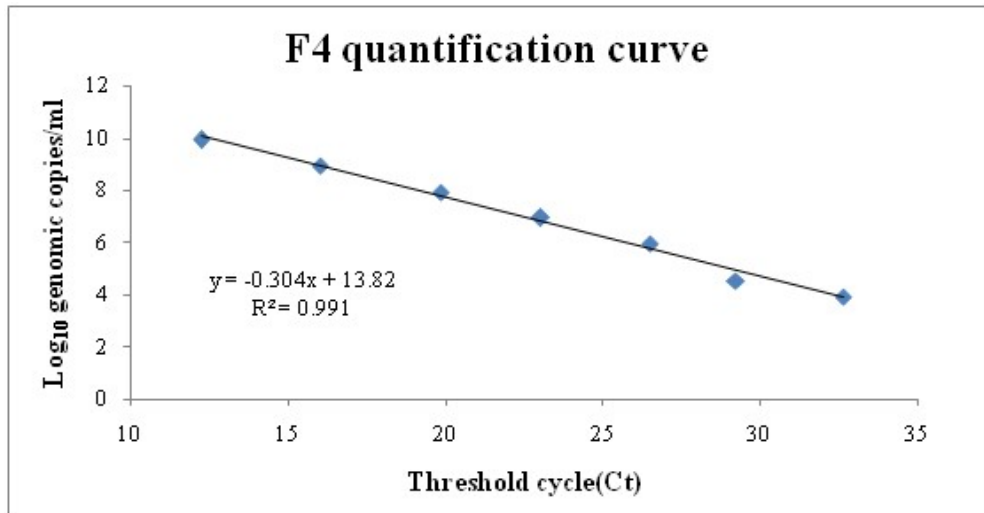


그림 75. 정량 분석을 위한 Real time PCR standard curve (F4 gene)

③ 실시간 증합효소 연쇄반응을 이용한 분변의 대장균 수치 분석 결과

분변에서 F4 섬모를 가진 대장균의 정량분석을 실시하여 후보 생균제를 첨가하고 대장균을 접종한 실험군 1에서 후보 생균제를 첨가하지 않고 대장균만 접종한 실험군 3보다 대장균 접종 후 3일과 7일에 분변에서 접종한 대장균의 수치가 유의성($P < 0.05$) 있게 낮은 것으로 확인되었다 (표 109).

표 109. 개발 생균제 첨가에 의한 이유자돈 대장균 설사증 유발 F4⁺LT⁺ST⁺enterotoxigenic *E. coli* 공격 접종 시 분변 대장균 변화 (cfu/g)

접종 이후 날짜	LE	ET
1	-	-
2	2.2E+2	1.6E+2
3	4.2E+4*	3.1E+6
7	2.1E+2*	1.7E+4
14	-	-
21	-	-

* $p < 0.05$

4) 부검 후 병변 비교

① 병리조직학적 병변 분석 방법

부검 후 병변 비교를 위해 모든 처리구를 10주령에 안락사 시켰다. 부검은 공장, 회장, 결장을 무작위로 8부위를 선정 각각 3cm씩 잘라 24시간 동안 10% 중성 포르말린에 고정 후 파린핀에 포매(embedding)하여 H&E 염색을 실시하였다. 그 후 stain이후 조직을 두 명의 실험자가

blind 검정하였다. 병리조직학적 병변 스코어(score)는 궤양(ulceration), 부종(edema), 염증세포 침윤(inflammatory cell infiltration, ICI). 혈관확장(dilation of blood vessels)의 유무를 기준으로 관찰되는 정도에 따라 0 = 정상(normal), 1 = 경미한 변화(mild alteration), 2 = 중간정도 변화(moderate alteration), 3 = 심한 변화(severe alteration)로 정해서 분석하였다. 결과는 그룹 간 평균의 유의적인 차이를 Mann Whiteny test로서 판별하였다.

② 병리조직학적 병변 분석 결과

병리조직학적 병변에서는 분석한 공장, 회장, 결장에서 후보 생균제를 첨가하고 대장균을 접종한 처리구 LE와 후보 생균제를 첨가하지 않고 대장균만 접종한 ET 처리구에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았다 (그림 76). 이는 F4⁺LT⁺ST⁺ enterotoxigenic *E. coli* 경우 소장 대장에서 상피세포에 유착하여 증식 조직의 손상을 유발하는 균이 아니고 유착 후에 장내독소를 분비하여 수양성 설사를 유발하기 때문이다.

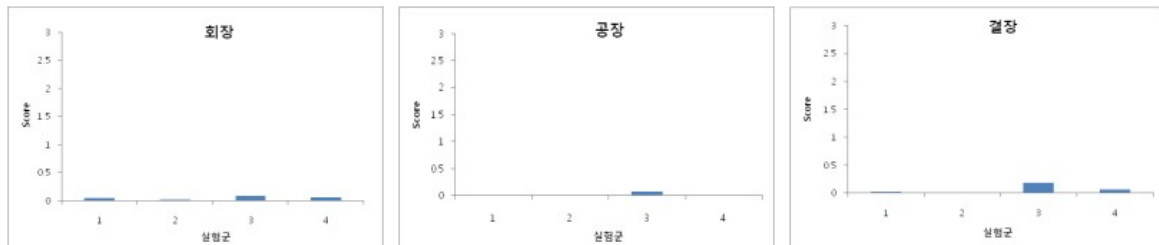


그림 76. 이유자돈 대장균 설사증 유발 F4⁺LT⁺ST⁺ enterotoxigenic *E. coli* 공격접종 균의 병리조직학적 병변

다. 결론

본 공격접종 실험 결과 후보 생균제는 이유자돈에서 대장균 설사증을 유발하는 대장균의 증식 또는 억제에 대한 효과가 있는 것을 증명하였다. 본 연구에서는 이유자돈에서 대장균 설사증을 유발하는 대장균 중에서 가장 흔한 F4 섬모를 가진 대장균을 선정하여 국내에서 유발되는 이유자돈 대장균 설사증의 대장균으로써 대표성을 가지게 하였다. 또한 열안전성 (heat-stable)과 열이열성 (heat-labile) 장내독소 모두를 가진 대장균을 선정하여 이유자돈 대장균 설사증을 유발하는 대장균 중에서 가장 병원성이 높은 대장균을 사용하여 후보 생균제의 효과를 분석하였다.

본 연구의 병리조직학적 검사 결과에서 후보 생균제를 첨가하고 대장균을 접종한 돼지와 대장균만 접종한 돼지에서 유의성은 없었다. 이는 후보 생균제의 효과가 감소한 것이 아니라, 대장균 설사증의 특성이다. 대장균 설사증을 유발하는 대장균은 장 상피세포에 섬모를 이용하여 유착만 하여 장내독소를 분비하여 설사를 유발하지만 장 상피세포의 손상을 유도하지 않기 때문에 병변은 관찰 할 수가 없다. 따라서 병리조직학적 병변 보다는 분변에서의 이들 병원성 대장균의 분비 정도를 비교 분석하는 것 방법이 매우 중요한 효능 분석 항목이다.

분변에서 대장균 숫자와 실시간 중합효소 연쇄반응의 분석 결과 후보 생균제는 이유자돈에

서 대장균 설사증을 유발하는 대장균 숫자를 감소하여 감염을 예방하는 것으로 확인되었다. 이유자돈 시기에는 포유자돈과 달리 사료를 섭취하기 때문에 장내의 세균총의 급격한 변화가 유발되고 이로 인하여 대장균의 감염이 흔하게 유발되는 시기이다. 하지만 현재 국내에서는 이유자돈 사료에 항생제의 첨가를 엄격히 규제하고 있기 때문에 이유자돈 시기에 대장균 설사증이 다발하고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서 검증된 후보 생균제는 이유자돈에서 대장균 설사증을 예방할 수 있는 중요한 첨가제로 활용성이 매우 높을 것으로 예상된다.

6. 예비 후보 생균제의 대장균에 의한 부종병에 대한 효능 평가

가. 실험 방법

1) 후보 생균제

주관 기관에서 개발한 항균력이 우수한 균주로 선발된 *Lactobacillus plantarum*을 사료첨가용 생균제로 (3.0×10^8 CFU/g) 공급받아 이유자돈 사료에 첨가하여 공급하였다.

2) 급여 방법

3주령 이유자돈에게 기본 영양소를 포함한 사료 (corn extruded, 299.2; barley extruded, 71; rice flakes, 133; dried beet pulp, 40; soybean meal (44% CP) 50; soybean debitterized 77; spray-dried milk whey, 135; spray-dried skimmed milk, 135; lard, 48; HCl-lysine, 0.5; DL-methionine, 0.3; monocalcium phosphate, 10; and flavour, 1.)를 생균제 첨가군과 대조군 모두에게 공급하였다. 생균제 첨가군은 개체 당 하루 사료공급량의 2%씩 건조된 생균제 첨가물을 공급하였다. 3주령 이유자돈이 실험기간인 7주 동안 성장을 고려하여 매 주마다 사료공급량을 100g/일 씩 늘렸다.

3) 공격접종용 대장균

예비 후보 생균제의 이유자돈에서 대장균 감염에 의하여 유발되는 부종병 (edema disease)에 대한 효능 평가에서는 부종병을 유발하는 대장균이 보유하고 F18이라고 하는 섬모 (fimbriae)와 시가독소(Shiga toxin)를 보유하여 가장 병원성이 높은 대장균을 사용하였다.

4) 실험 일정

효능 평가를 위해서 4개의 실험군으로 구성되어 있으며, 실험군 5와 6에는 생균제를 첨가하는 첨가군으로 실험 시작 시기인 3주령부터 실험이 종료되는 10주령까지 실험 전 구간 동안 생균제를 급여하였다 (표 110). 또한 7주령에 도달하면 실험군 5와 7에는 이유자돈에서 부종병을 유발하는 대장균을 3.0×10^9 CFU/ml로 배양된 배양액을 3ml씩 투여한다. 그리고 실험 종료 시점인 10주령에 모든 돼지는 안락사 시켜 각각의 장기를 채취하였다.

표 110. 생균제 급이에 따른 부종병 평가를 위한 실험 설계

처리구	두수	처리		
		생균제 사료첨가 (3~10주령)	대장균 공격접종 (7주령)	부검 (10주령)
<i>L. plantarum</i> + <i>E.coli</i> Treat (LE)	5	○	F18 ⁺ Shiga-toxin ⁺ <i>E. coli</i>	○
<i>L. plantarum</i> Treat (LP)	5	○	×	○
<i>E.coli</i> Treat (ET)	5	×	F18 ⁺ Shiga-toxin ⁺ <i>E. coli</i>	○
Positive control (PC)	5	×	×	○

나. 실험결과

1) 임상증상 스코어

① 설사 정도 분석 방법

대장균 공격접종 이후 21일간 모든 군의 개체에서 보이는 변의 양상을 기록하였다. 표 111에서 제시한 기준에 따라 변의 상태를 점수로 산출하였으며 그룹 간 평균의 유의적인 차이를 Mann Whiteny test로서 판별하였다.

표 111. 임상 평가를 위한 기준

임상증상	내용	스코어(score)
심한 설사	변의 내용물이 끈기가 전혀 없고 액상을 보임, 소화되지 않은 곡물이 보이거나 출혈을 동반함	5
중간 설사	변의 내용물이 끈기가 없고 액상을 보임	4
연변	변의 내용물이 끈기가 없으나 액상을 보이지는 않음	3
약한 연변	변의 내용물이 끈기가 있으나 형태가 유지되지 못함	2
정상	변이 끈기가 있고 형태를 유지함	1

② 설사 정도 분석 결과

접종 7일에만 후보 생균제를 첨가하고 부종병 유발 대장균을 접종한 처리구 LE는 후보 생균제를 첨가하지 않고 부종병 유발 대장균만 접종한 처리구 ET 보다 유의성($P < 0.05$) 있게 설사가 관찰되었다. 접종 4일에서 10일까지 후보 생균제를 첨가하지 않고 부종병 유발 대장균만 접종한 처리구 ET는 후보 생균제만 첨가한 LP와 어떤 처치도 하지 않은 PC보다 유의성($P < 0.05$) 있게 심함 설사가 관찰되었다 (표 112, 그림 77).

표 112. 이유자돈 부종병 유발 F18⁺ Shiga-toxin⁺ *E. coli* 공격접종 군에서 설사 정도

처리구	부종병 유발 대장균 공격 접종 이후 날짜																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
LE	1	1.4	1.6	2.6	2	2	2.2	2.2	1.2	1	1.2	1	1.2	1.4	1.2	1	1	1	1	1	1
LP	1.2	1	1	1	1.2	1.2	1	1	1	1.2	1	1	1	1	1.2	1	1	1	1	1	1.2
ET	1	1.4	2	2.6	3	3	2.8	2.8	2	2.2	1.8	1.8	1.4	1.6	1.4	1.8	1.4	1	1.2	1	1
PC	1	1.2	1	1	1	1	1.2	1	1	1	1	1	1	1	1	1.2	1	1	1	1	1

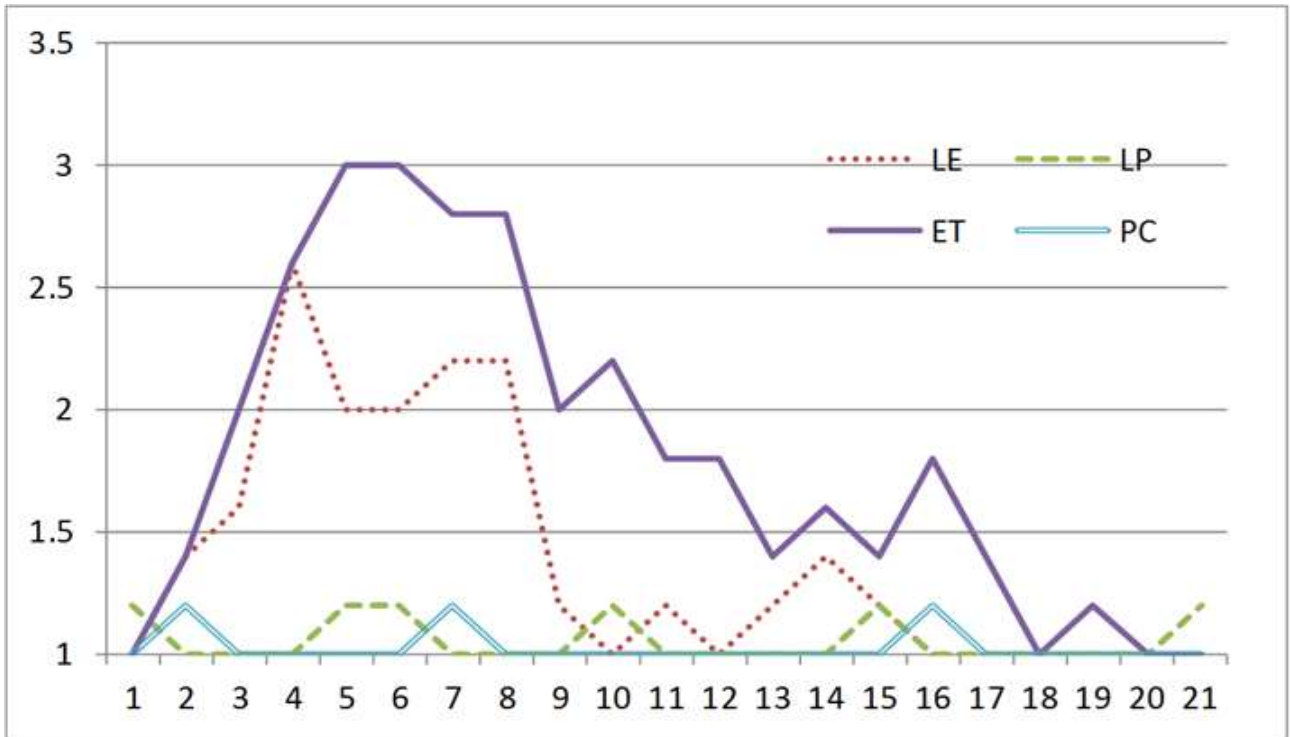


그림 77. 이유자돈 부종병 유발 F18⁺ Shiga-toxin⁺ *E. coli* 공격접종 군에서 설사 정도

③ 폐사 및 위축 분석 결과

실험 기간 동안 4개의 실험군중에서 어떠한 개체도 폐사되지 않았다.

④ 일당 증체량 분석 결과

생균제 급여를 시작한 3주령부터 공격접종 전인 7주령까지 개체별 체중 증체량과 7주부터 10주령 까지 개체별 체중 증체량을 측정하였다 (표 113). 일당 증체량은 집단 별 평균 수치를 Tukey's multiple test를 이용하여 판별하였다. 실험기간 동안 전 처리구에서 유의적인 차이는 보이지 않았다 (그림 78). 그러나 초기 3 ~ 7주령의 경우 생균제를 첨가한 처리구에서 생균제를 첨가하지 않은 처리에 비해 일당증체가 30g/d 이상 높게 나타나 어린 일령일 경우 부종병을 유발하는 대장균 접종에 의해서 영향을 받는 증체억제를 생균제 첨가로 개선될 수 있음을 확인할 수 있었다.

표 113. 이유자돈 부종병 유발 F18⁺ Shiga-toxin⁺ E. coli 공격접종 군의 기간별 일당 증체량 (g/d)

처리구	3~7주령	7~10주령
LE	429.84	586.00
LP	422.42	615.52
ET	389.74	570.34
PC	397.20	598.22

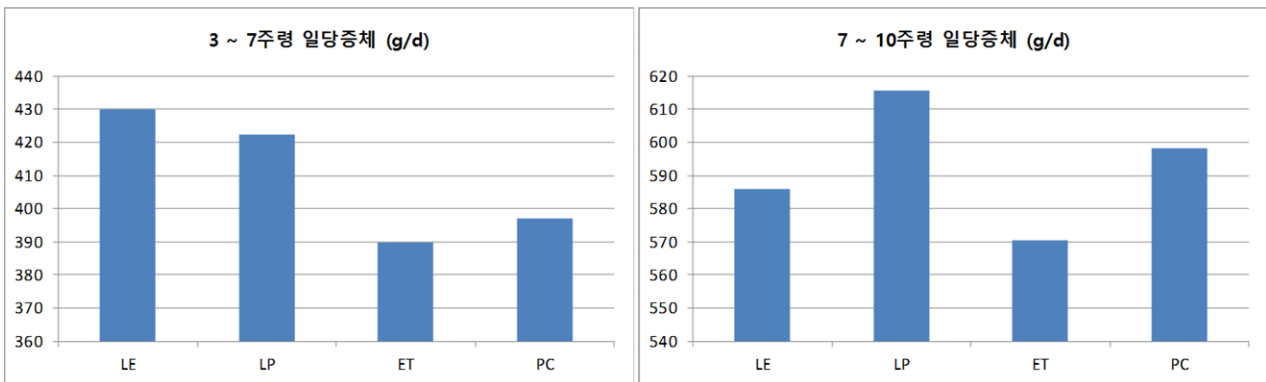


그림 78. 부종병 유발 F18⁺ Shiga-toxin⁺ E. coli 공격접종 군의 일당 증체량

2) 분변에서 대장균 분리를 통한 분석

공격 접종 1, 2, 3, 7, 14, 21일에 개체에서 분비된 분변을 다음의 방법으로 정량화하여 대장균 수치를 분석하였다. 각각의 날짜에 맞춰 개체별로 분변을 채취하였다. 채취한 분변은 신중하게 1g을 4ml의 Ringer's solution (1:5 vol/vol)에 희석시켰다. 이 희석액을 다시 연속으로 10배씩 10회 희석하여 준비한 뒤 각각의 희석액 100ul을 violet-red bile agar medium에 분주하고 24시간 동안 43°C에서 배양하였다. Colony-forming unit은 대략 30~300개 사이의 colony가 관찰되는 희석배수로 수치를 결정하였다. Colony에 대한 검정은 Oxoid 사의 Kligleriron agar media에서 Wood's lamp fluorescence을 통해 입증하였다. 각각의 그룹별 평균 수치는 Tukey's multiple test를 이용하여 판별하였다. 각각의 처리의 분변에서 대장균 수치의 변화가 없었다 (표 114).

표 114. 부중병 유발 F18⁺, Shiga-toxin⁺ E. coli 공격접종 균의 분변 대장균 수치 (log cfu/g)

처리구	1일	2일	3일	7일	14일	21일
LE	8.84	7.99	8.95	7.65	8.32	8.44
LP	7.72	8.01	7.69	8.96	7.66	7.92
ET	8.94	8.45	8.36	8.9	8.75	8.68
PC	7.89	7.96	7.63	7.68	7.42	7.32

3) 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 분변의 대장균 수치 분석

① 실시간 중합효소 연쇄반응에서 사용한 프라이머

먼저 정량 분석을 위한 표준곡선 (standard curve)을 확보하였다. 먼저 접종한 대장균주의 cDNA를 pfu라고 하는 중합효소와 대장균주 각각이 보유한 특이적인 프라이머 (primer)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 통해 증폭시켰다. 이 때 사용한 프라이머는 서울대학교에서 자체 제작한 (Primer 3 이용) 프라이머로 그 서열은 다음과 같다 (표 115).

표 115. 부중병 유발 F18⁺ Shiga-toxin⁺ 대장균 수치 분석을 위한 primer 설계

	Forward primer	Reverse primer	Size(bp)
F18 섬모 유전자	GGTTGTGCTTCCTTGTCAC	GGTTGTGCTTCCTTGTCAC	159
시가독소(STx) 유전자	TGGTGTGTCAGAGTGGGGAGAA	TTTATAACGGGCCTGTCGC	163

② 실시간 중합효소 연쇄반응 표준곡선을 이용한 분석 방법

증폭한 DNA 단편을 Enzynomics사에 출시한 Blunt core kit를 사용하여 Cloning 시킨다. 대장균이 보유한 섬모(fimbriae)의 단편이 삽입된 Plasmid는 heat shock (45도, 1분) 자극을 통해 대장균(Competent Cell)에 transfection되어 다음날까지 competent cell의 증식과 더불어 증폭시킨다. Plasmid Purification kit를 이용하여 competent cell에서 plasmid를 추출한 뒤 Nanodrop을 이용하여 농도를 계산한다. 10배 씩 차례로 증류수 (distilled water)로 희석한 뒤 각 희석한 샘플을 앞서 사용한 독소 특이적인 프라이머를 이용하여 각각 실시간 중합효소 연쇄반응을 실시하여 정량 분석을 위한 Standard Curve를 확보하였다 (그림 79, 80). 또 확보한 표준곡선을 이용하여 채취한 분변 1g내 대장균의 수를 정량화하였다. 채취한 날짜별로 분변에 존재하는 F18 섬모와 시가독소 보유 대장균의 수는 다음과 같았다. 그룹별 유의적인 차이는 Student t test를 이용하여 판별하였다.

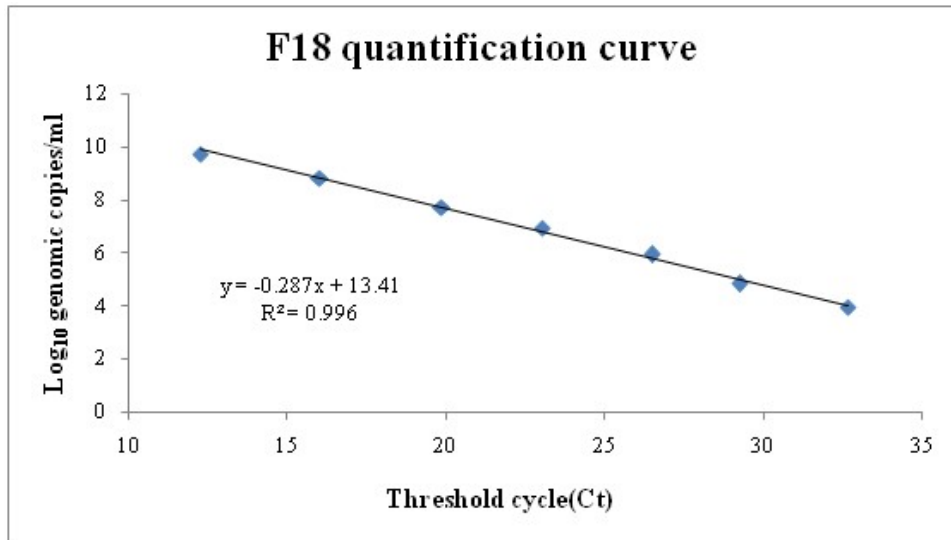


그림 79. 정량 분석을 위한 Real time PCR standard curve (F18 gene)

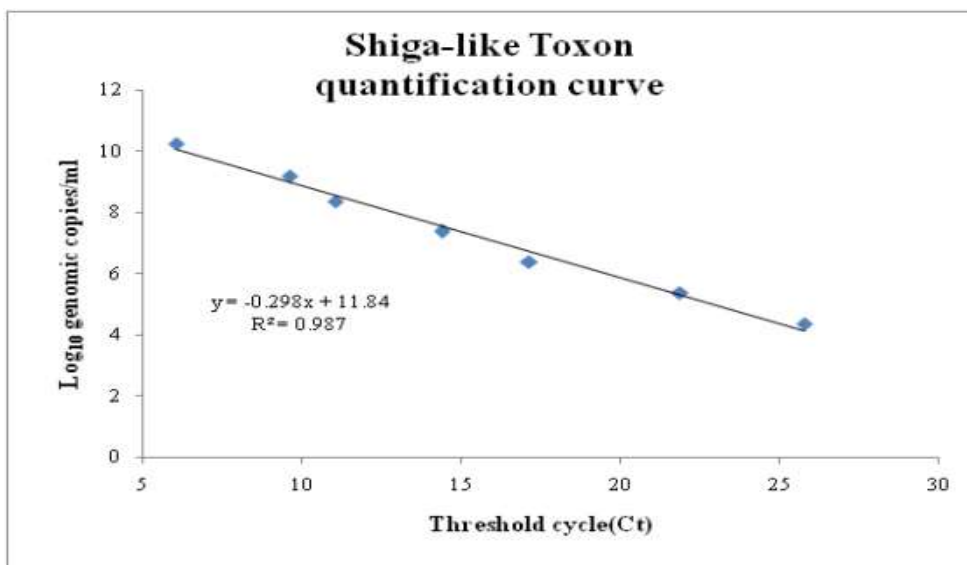


그림 80. 정량 분석을 위한 Real time PCR standard curve (STx gene)

③ 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 분변의 대장균 수치 분석 결과 분변에서 F18 섬모와 시가독소를 보유한 대장균의 정량분석을 실시한 결과 실험 전 기간 동안 유의성($P < 0.05$)이 관찰되지 않았다 (표 116, 117).

표 116. 부종병 유발 F18⁺Shiga-toxin⁺ *E. coli* 공격접종 군 분변에서 섬모(F18) 분석 (cfu/g)

접종 이후 날짜	LE 처리구	ET 처리구
1	-	-
2	3.4E+2	7.4E+2
3	4.7E+6	3.3E+6
7	5.1E+5	7.7E+5
14	4.3E+4	5.7E+4
21	4.4E+4	2.8E+4

표 117. 부종병 유발 F18⁺Shiga-toxin⁺ *E. coli* 공격접종 군 분변에서 시가독소(STx) 분석 (cfu/g)

접종 이후 날짜	LE 처리구	ET 처리구
1	-	-
2	6.2E+2	1.4E+2
3	4.5E+6	4.7E+6
7	6.1E+5	2.3E+5
14	5.9E+4	2.1E+4
21	3.4E+4	6.5E+4

4) 부검 후 병변 비교

① 병리조직학적 병변 분석 방법

부검 후 병변 비교를 위해 모든 실험군을 10주령에 안락사 시켰다. 부검은 공장, 회장, 결장을 무작위로 8부위를 선정 각각 3cm씩 잘라 24시간 동안 10% 중성 포르말린에 고정 후 파린핀에 포매(embedding)하여 H&E 염색을 실시하였다. 그 후 stain이후 조직을 두 명의 실험자가 blind 검정하였다. 병리조직학적 병변 스코어(score)는 궤양(ulceration), 부종(edema), 염증세포 침윤(inflammatory cell infiltration, ICI), 혈관확장(dilation of blood vessels)의 유무를 기준으로 관찰되는 정도에 따라 0 = 정상(normal), 1 = 경미한 변화(mild alteration), 2 = 중간정도 변화(moderate alteration), 3 = 심한 변화(severe alteration)로 정해서 분석하였다. 결과는 그룹간 평균의 유의적인 차이를 Mann Whiteny test로서 판별하였다.

② 병리조직학적 병변 분석 결과

공장, 회장, 결장의 모든 구간에서 F18⁺ Shiga-toxin⁺ *E. coli*을 접종한 실험군은 호산구(eosiphil)의 침윤이 관찰되었다. 통계적으로 후보 생균제를 첨가하고 부종병 유발 대장균을 접종한 처리구 LE와 부종병 유발 대장균만 접종한 처리구 ET 사이에서는 호산구 침윤 정도에서 차이가 없었다. 또한 후보 생균제를 첨가하고 부종병 유발 대장균을 접종한 처리구 LE와 부종병 유발 대장균만 접종한 처리구 ET는 후보 생균제만 첨가한 처리구 LP와 어떠한 처치도 하지 않은 처리구 PC보다 유의성($P < 0.05$) 있게 호산구의 숫자가 증가하였다. 증가된 호산구

은 음 상피세포(crypt epithelium)와 소장 융모 (villi) 상피세포에서 다수 관찰되었다. 모든 처리구에서 궤양과 혈관 확장은 관찰되지 않았다.

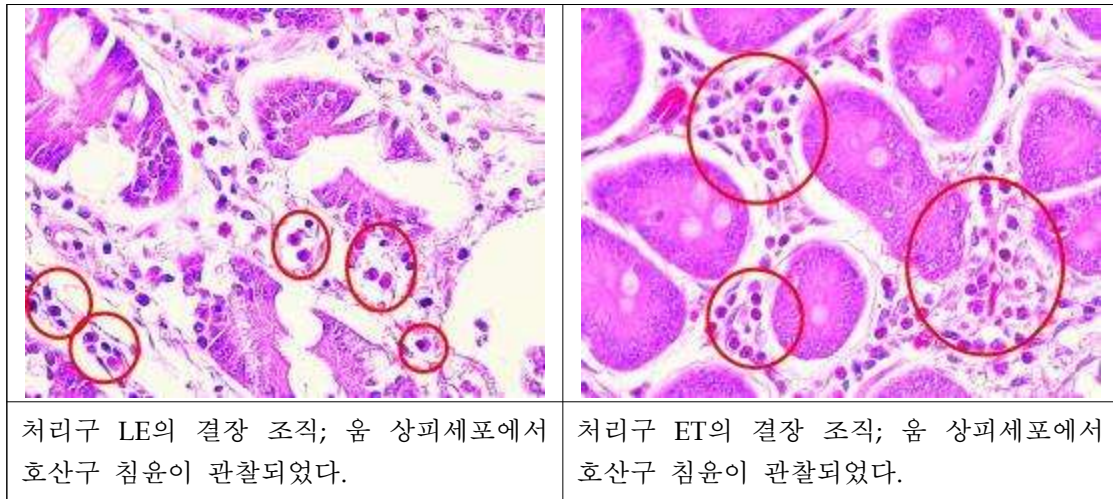


그림 81. 생균제 첨가에 따른 결장 조직의 병변학적 조직 검사 결과
(처리구 LE; 생균제 + 부중병 유발 대장균 처리구, 처리구 ET; 부중병 유발 대장균 처리구)

병리조직학적 분석에서도 후보 생균제를 첨가하고 부중병 유발 대장균만 접종한 처리구 LE와 후보 생균제 첨가없이 부중병 유발 대장균만 접종한 처리구 ET 사이에 호산구 침윤에 의한 염증 소견의 차이를 관찰할 수 없었다 (그림 81).

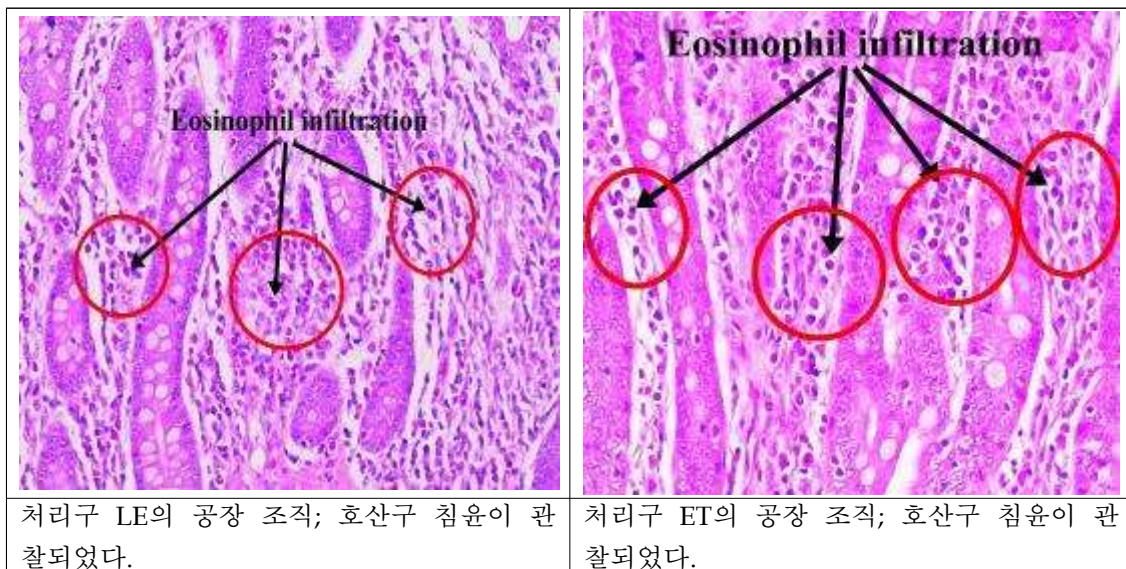


그림 82. 생균제 첨가에 따른 공장 조직의 병변학적 조직 검사 결과
(처리구 LE; 생균제 + 부중병 유발 대장균 처리구, 처리구 ET; 부중병 유발 대장균 처리구)

병리조직학적 분석에서도 후보 생균제를 첨가하고 부종병 유발 대장균만 접종한 처리구 LE와 후보 생균제 첨가 없이 부종병 유발 대장균만 접종한 처리구 ET 사이에 호산구 침윤에 의한 염증 소견의 차이를 관찰할 수 없었다 (그림 82).

다. 결론

본 공격접종 실험 결과 후보 생균제는 이유자돈에서 대장균에 의한 부종병 예방 효과가 미비한 것으로 증명되었다. 부종병을 유발하는 대장균과 설사증을 유발하는 대장균이 돼지에서 설사를 유발하는 기전이 다르기 때문에 동일한 후보 생균제의 효과에서도 차이를 나타 낼 수가 있는 것으로 추정된다. 부종병을 연구한 논문 (Tsukahara et al: Experimental infection of enterotoxemic Escherichia coli associated with porcine edema disease and its pathologic characteristics in the intestine. *Journal of Veterinary Medical Science* 67:1167-1171, 2005)에서는 호산구의 침윤이 특징적인 부종병의 병변으로 기술하고 있다. 따라서 호산구의 침윤은 중요한 예방을 평가하는 항목인데, 본 공격접종 시험에서는 후보 생균제를 첨가하고 부종병 유발 대장균을 접종한 그룹과 후보 생균제를 첨가하지 않고 부종병 유발 대장균을 접종한 그룹 모두에서 호산구의 침윤의 유의성이 없기 때문에 부종병을 유발하는 대장균에 대한 효과는 미비한 것으로 추정된다. 호산구의 침윤 이외에도 분변에서의 대장균 분비 정도에서도 생균제를 첨가하고 부종병 유발 대장균을 접종한 그룹과 후보 생균제를 첨가하지 않고 부종병 유발 대장균을 접종한 그룹 모두에서 유의성이 관찰되지 않았다.

7. 대장균 설사 및 부종병에 대한 개발 생균제의 효과 규명을 위한 야의 임상 실험

가. 실험 방법

1) 실험에 사용한 후보 생균제

*Lactobacillus plantarum*가 3.0×10^8 CFU/g으로 건조 분말된 상태로 이유자돈에 공급한다. 이 이유자돈에서 대장균에 의한 설사 및 부종 증세를 이유 후 3주령부터 10주령까지 검사한다.

2) 실험 디자인

대장균성 설사 및 부종병이 발병중이 농장 3곳을 선정하여 농장에서 유용 미생물이 첨가된 분말을 첨가한 사료를 섭취하는 그룹 25두와 섭취하지 않는 그룹 25두를 선정하여 실험을 실시한다. 사료 공급은 3곳 농장 모두 무제한 급여를 통해 자돈의 빠른 성장을 유도하는 곳으로 분말 첨가제를 톤당 2%의 비율로 공급하였다.

3) 일당 증체량 측정

실험이 시작되는 3주령 체중과 실험이 종료되는 10주령 체중을 측정하여 이유 시기엔 3주령에서부터 10주령까지의 일당 증체량을 측정하여 유용 미생물 첨가군과 미첨가군을 비교한다.

4) 분변을 통한 대장균 분비 분석 실험

유용 미생물이 첨가된 사료를 섭취하는 그룹과 미첨가 그룹간에 3주령, 4주령, 5주령, 6주령, 7주령, 8주령, 9주령, 10주령에 분변을 채취하여 분변 10 g 당 대장균 수를 계산하여 시간이 경과하면서 대장균의 분비 증감 여부를 분석하여 유용 미생물에 의한 대장균 증식의 억제 효과를 분석한다.

5) 실시간 중합효소 연쇄반응을 통한 대장균의 섬모 및 장내독소 발현 분석 실험

실시간 중합효소 연쇄반응을 통하여 섬모인 F4와 F18 독소 발현 여부를 분석하여 사료에 첨가한 유용 미생물에 의한 대장균이 설사를 유발하는데 가장 중요한 병원성 인자(virulent factor)인 섬모의 발현 여부에 미치는 영향을 분석한다.

6) 병리조직검사

실험이 종료되는 10주령 자돈 5두씩을 3개 농장에서 임의로 선정하여 안락사 시킨 후에 소장 7개 부위 (십이지장 중간부위, 공장 상단부위, 공장 중간부위, 공장 하단 부위, 회장 상단부위, 회장 중간부위, 회장 말단 부위)과 대장 3개 부위 (상단, 중간, 하단)에서 장 샘플을 채취하여 포르말린에 고정한 후 파라핀에 포매하여 조직 블록을 만든다. 제작된 조직 블록을 5 μ m의 두께로 자른 후에 H&E 염색을 실시한다. 그 후 현미경으로 관찰한다. 현미경으로 소장과 대장을 관찰하는 경우에는 총 4개층, ① 점막 (장 상피세포), ② 고유층(lamina propria), ③ 근육층(muscularis layer) 및 ④ 장막(serosa layer)으로 나뉘어서 각각에 병변 여부를 현미경으로 관찰한다. 첫 번째, 점막층인 장상피세포의 경우 탈락 여부와 형태의 변화 등을 관찰한다. 두 번째, 고유층(lamina propria)에서는 호중구(neutrophil)와 호산구(eosinophil) 같은 염증세포(inflammatory cell)의 침윤(infiltration) 여부 등을 관찰한다. 세 번째, 근육층(muscular layer)에서는 근육층의 비후 여부를 검사한다. 네 번째, 장막(serosa) 층에서는 섬유소성 염증 여부를 관찰한다.

나. 야외 임상 실험 결과

1) 농장 별 질병 상황

가) A 농장

서울대 수의과대학에서 실시한 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악 결과, A 농장은 2014년 7월에 서울대학교 병리학 교실에 의뢰된 9주령 이유자돈 3두 중 2두에서는 서혜 임파절에서 거대 대식세포가 관찰되는 육아종성 염증 반응이 관찰되었으며, 바이러스 분리에서 돼지 썬코바이러스 2형(PCV2)이 분리되었다. 또한 1두에서는 결장 장간막의 부종이 관찰되었으며 분변을 통해 분리된 대장균을 분리하였다. 이들 대장균에서는 중합효소 연쇄반응 검사에서 설사와 관련된 F4 유전자를 확인하였으며, 또 다른 대장균에서는 중합효소 연쇄반응 검사에서 F18와 Shiga toxin 유전자를 확인하였다.

나) B 농장

서울대 수의과대학에서 실시한 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악한 결과, B 농장은 2014년 9월부터 포유에서 이유로 넘어가는 이유자돈 초기인 3주령에서 8주령 사이에 항생제에 반응을 하지 않는 설사를 동반한 위축성 질병으로 심한 경제적인 피해가 유발되었다. 2두 모두에서 폐장에서 심한 폐렴 병변이 관찰되었으며, 폐장에서 폐포벽이 비후된 간질성 폐렴이 관찰되었으며, 장에서 설사증세를 확인하였다. 분변에서 분리한 대장균 검사결과, 이유자돈에서 설사를 유발하는 대장균을 분리하였다. 이러한 대장균은 중합효소 연쇄반응 검사를 통하여 F4 유전자를 확인하였다.

다) C 농장

서울대 수의과대학에서 실시한 병성감정을 통한 농장 질병 현황 파악한 결과, C 농장은 이유자돈 8주령에서 육성돈 12주령 사이에 심한 부종병을 동반한 위축성 질환과 설사 증세를 보고하였다. 분변에서 분리한 대장균 검사결과, 이유자돈에서 설사를 유발하는 대장균을 분리하였다. 이러한 대장균은 중합효소 연쇄반응 검사를 통하여 F4 유전자를 확인하였다.

2) 유산균 투약 방법

3개 농장에서 사료에 진바이오에서 공급하는 유산균 제제를 첨가군 25두에게는 톤당 2% 비율로 사료에 첨가하고, 무첨가군 25두에게는 동일한 일반사료를 3주령부터 10주령까지 첨가하여 농장에서 효능을 분석하였다.

3) 농장 별 생산성 지수

세 곳 농장 모두에서 3~10주령 까지 일당 증체량에 있어서 첨가군은 무첨가군에 비해 유의적으로 높은 10주령 체중과 일당 증체량 결과를 보였다. 그룹 간의 통계적인 차이는 모수적 통계

방법으로서 Student's *t*-test를 통해 확인하였다.

표 118. A 농장 생산성 지수

구분	3주령 체중	10주령 체중	일당증체량
첨가군	5.06	26.09	428.57
무첨가군	5.03	25.74	422.63
유의성	$P = 0.697$	$P = 0.047^*$	$P = 0.015^*$

*는 그룹 간의 유의적인 차이를 의미한다.

표 119. B 농장생산성 지수

구분	3주령 체중	10주령 체중	일당증체량
첨가군	5.06	26.38	435.62
무첨가군	5.08	25.86	424.39
유의성	$P = 0.854$	$P = 0.044^*$	$P = 0.014^*$

*는 그룹 간의 유의적인 차이를 의미한다.

표 120. C 농장 생산성 지수

구분	3주령 체중	10주령 체중	일당증체량
첨가군	4.79	25.23	417.06
무첨가군	4.86	24.68	404.63
유의성	$P = 0.474$	$P = 0.005^*$	$P = 0.000^*$

*는 그룹 간의 유의적인 차이를 의미한다.

4) 폐사율

실험 기간 동안 각각의 농장에서 아래와 같이 이유자돈에서 폐사가 관찰되었다. 세 곳 농장 모두 폐사율에서는 유의적인 차이를 전혀 보이지 않았다. 그룹 간의 통계는 비모수적인 통계 방법으로 Chi-squared test를 통해 확인하였다.

표 121. 각 농장별 폐사율

구분	A 농장	B 농장	C 농장
첨가균	2/25	1/25	3/25
무첨가균	3/25	3/25	3/25
유의성	$P = 1.000$	$P = 1.000$	$P = 1.000$

5) 7주간 분변 내 대장균 총 수의 변화

가) 대장균 총 수의 변화

세 곳 농장에서 채취한 분변 1g 당 대장균의 수를 측정하였다. 채취한 분변은 신중하게 1g을 4ml의 Ringer's solution (1:5 vol/vol)에 희석시켰다. 이 희석액을 다시 연속으로 10배씩 10회 희석하여 준비한 뒤 각각의 희석액 100 μ l을 violet-red bile agar medium에 분주하고 24시간 동안 43°C에서 배양하였다. Colony-forming unit은 대략 30~300개 사이의 colony가 관찰되는 희석배수로 수치를 결정하였다. Colony에 대한 검정은 Oxoid사의 Kligleriron agar media에서 Wood's lamp fluorescence를 통해 입증하였다. 각각의 농장의 그룹 간의 평균 수치는 먼저 Log값으로 환산한 후 모수적 통계방법으로서 Student's *t*-test를 통해 확인하였다.

결과적으로 세 곳 농장 모두에서 대장균 총 수의 그룹간의 유의적인 차이는 확인할 수 없었다. 실험기간 동안 첨가균, 무첨가균에서 나타나는 대장균 수의 양상은 유의적인 차이 없이 일정하였다.

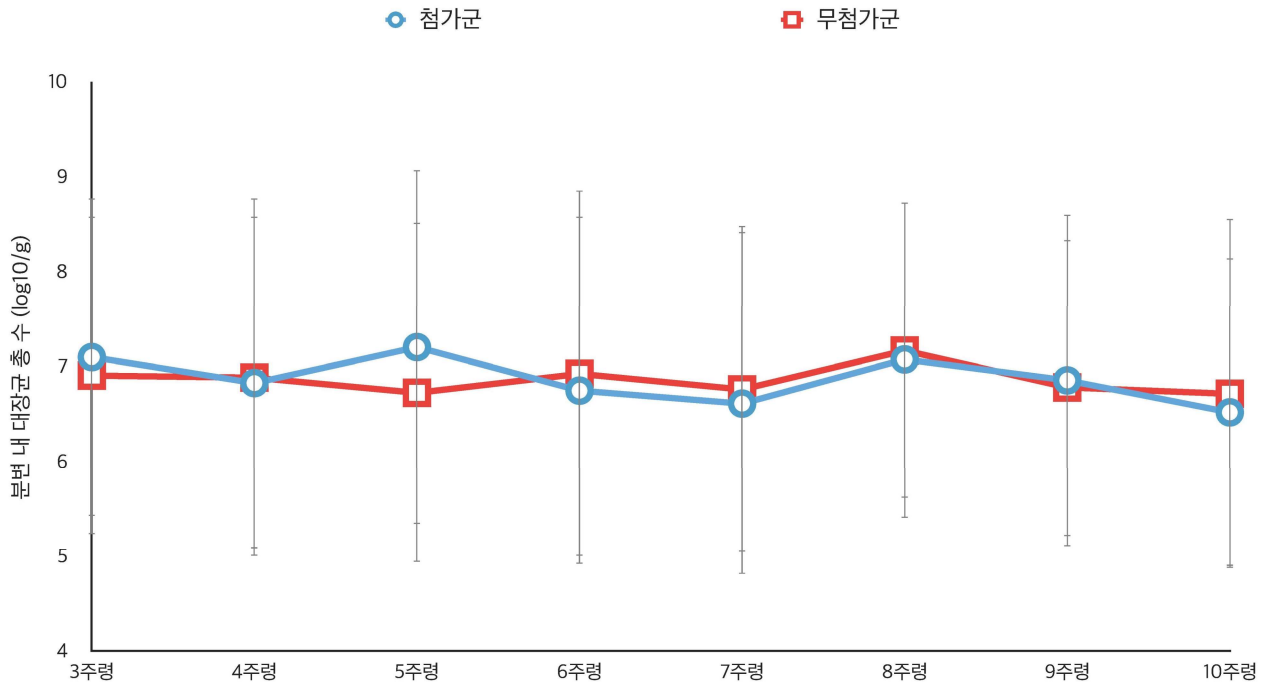


그림 83. A 농장 대장균 총 수의 변화

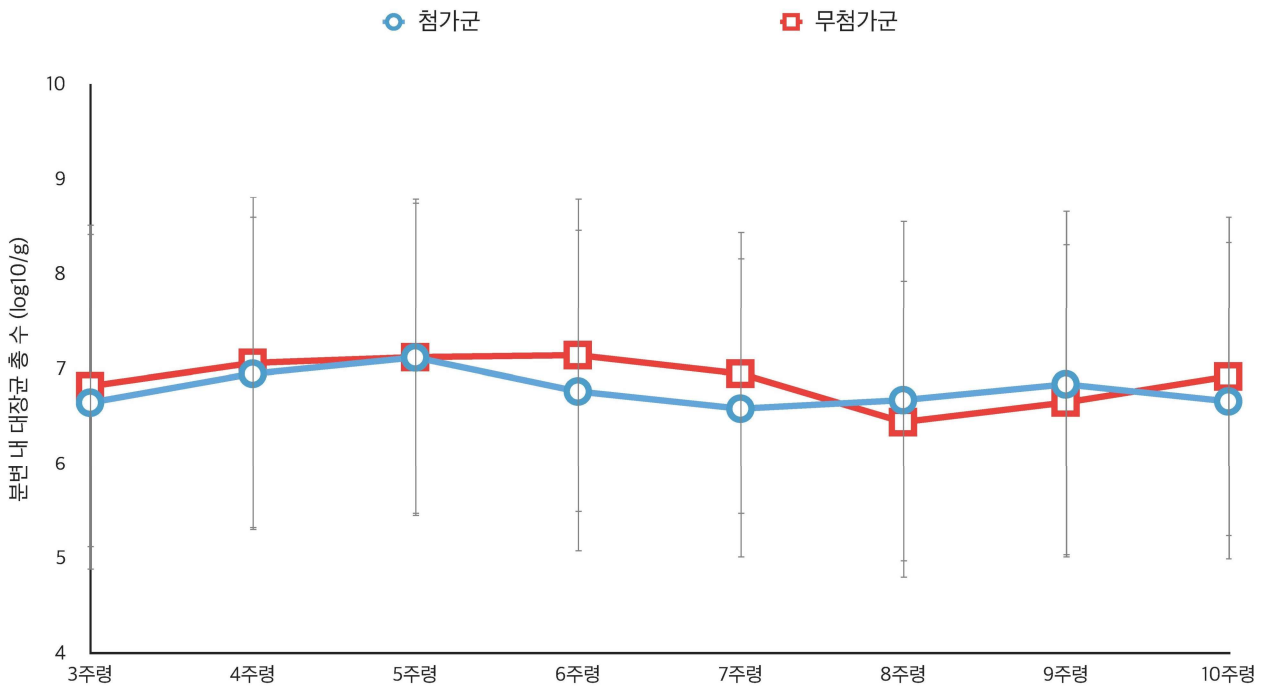


그림 84. B 농장 대장균 총 수의 변화

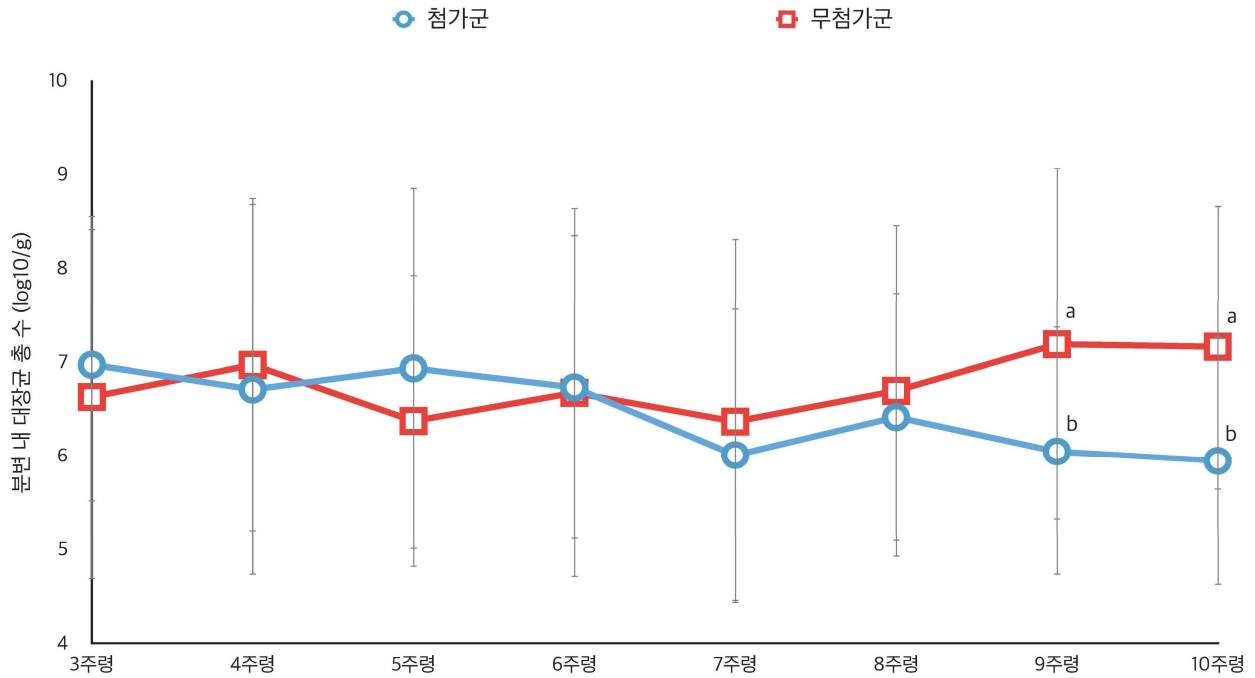


그림 85. C 농장 대장균 총 수의 변화

6) 분변 내 분리 F4, F18 유전자의 실시간 중합효소 연쇄반응을 통한 측정

분변 1g 속의 대장균 DNA를 추출하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 정량화 하였다. 모든 수치는 Log값을 변환하여 계산하였다. A 농장의 경우 F4 섬모를 보유한 대장균의 수치가 3주령에서부터 증식하여 이유 후기에 접어들수록 감소하였다. 반면 F18 유전자를 보유한 대장균은 6주령부터 증식하여 비육초기까지 증식하였다. B, C농장의 경우 F4 유전자가 탐지되지 않았으며 F18 유전자만이 탐지되었다. 모수적 통계방법으로서 Student's *t*-test를 통해 확인한 결과, 첨가군과 무첨가군 간의 유의적인 차이는 세 농장 모두에서 확인할 수 없었다.

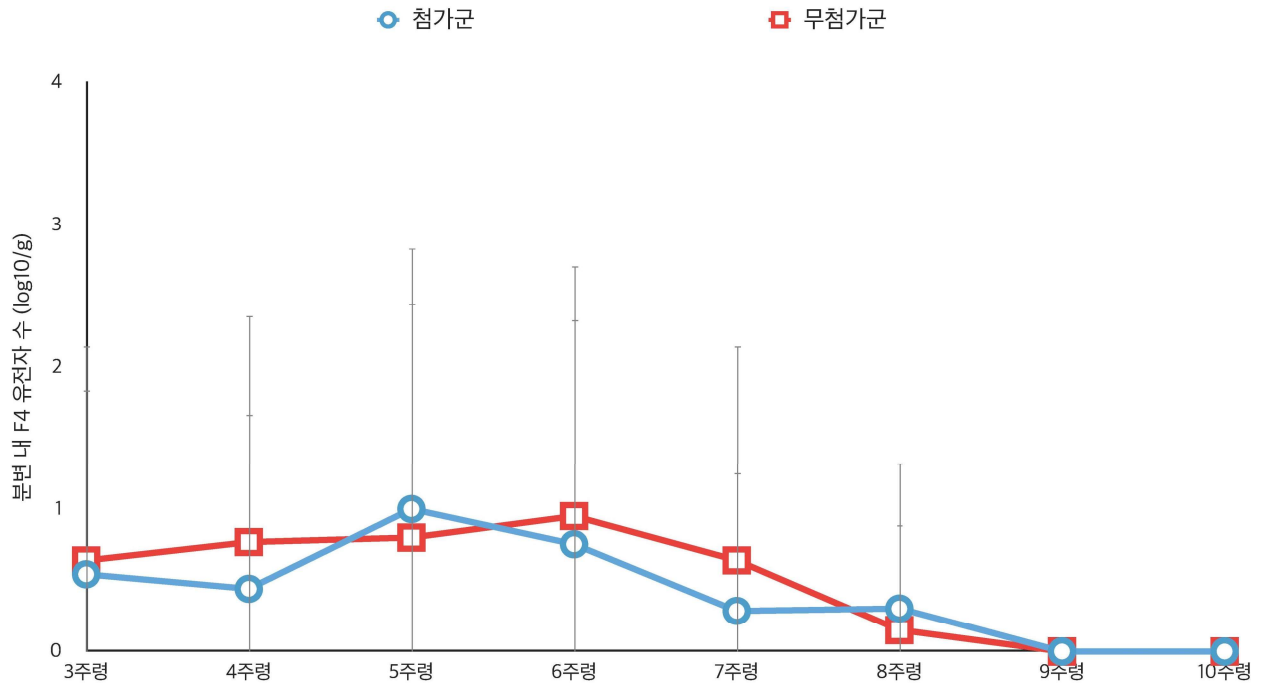


그림 86. A 농장 F4 유전자 수치

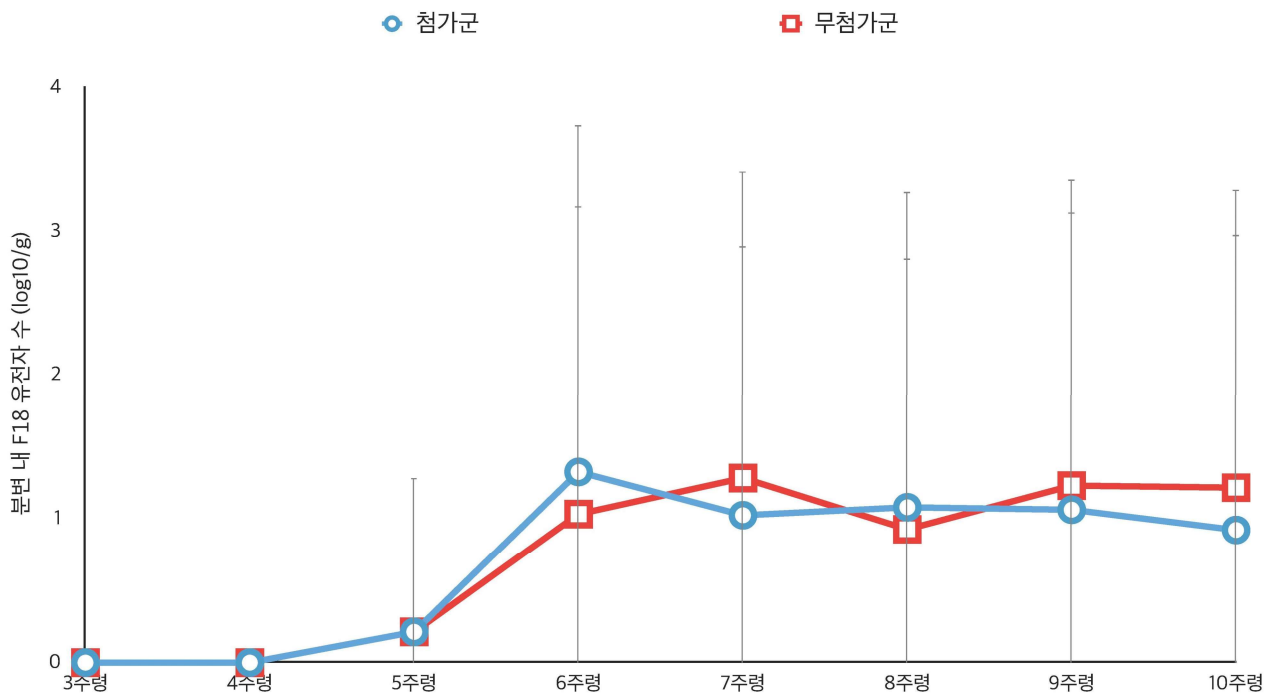


그림 87. A 농장 F18 유전자 수치

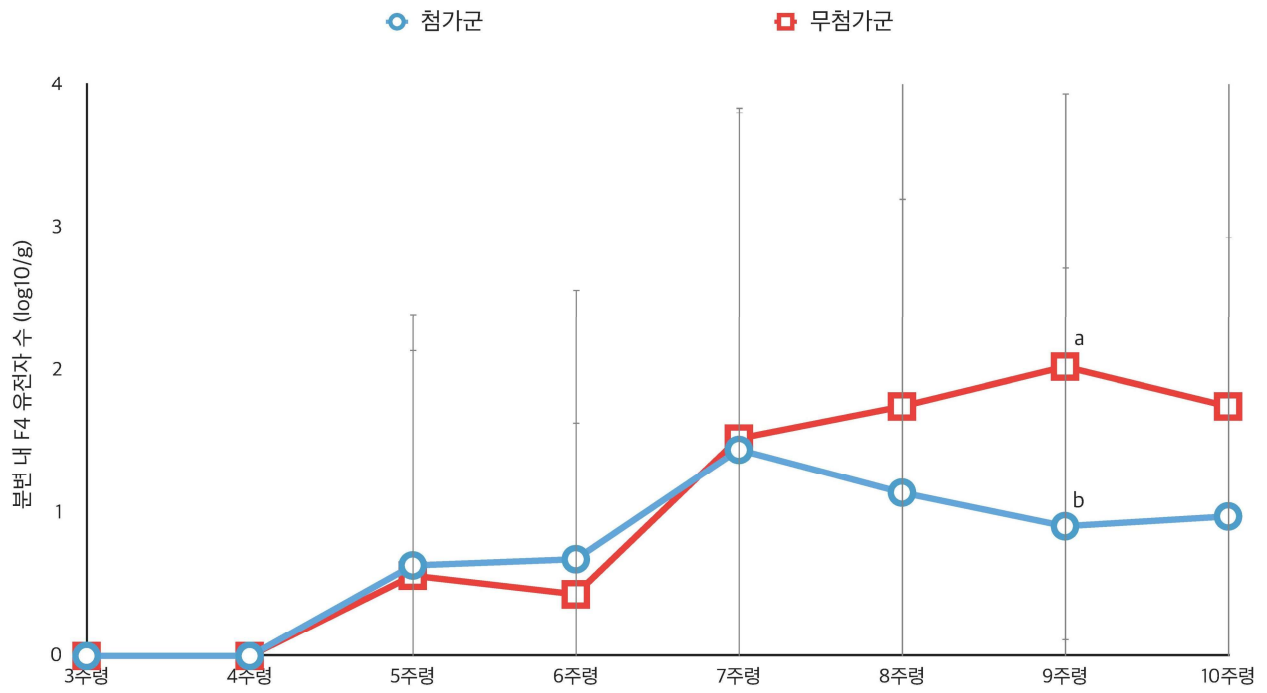


그림 88. B 농장 F4 유전자 수치

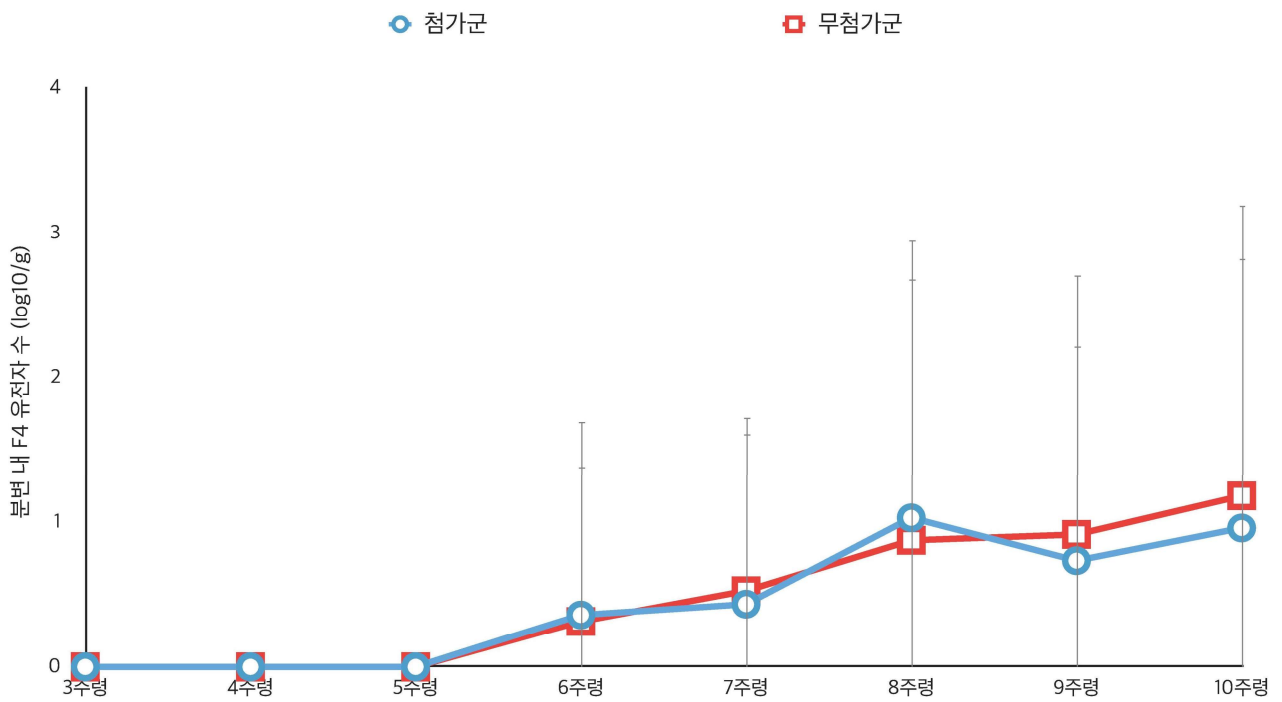


그림 89. C 농장 F4 유전자 수치

7) 농장에서 부검한 이유자돈의 장 조직 병변 점수

가) 이유자돈의 장 조직 병변 점수

세 곳 농장에서 5두 씩 부검하여 십이지장 공장 회장 결장 3부위 씩 조직을 채취하여 파라인 조직으로 제작해 병변을 평가하였다. 각 조직에서 병리조직학적 병변 스코어(score)는 궤양 (ulceration), 부종(edema), 염증세포 침윤(inflammatory cell infiltration, ICI), 혈관확장(dilation of blood vessels)의 유무를 기준으로 관찰되는 정도에 따라 0 = 정상(normal), 1 = 경미한 변화(mild alteration), 2 = 중간정도 변화(moderate alteration), 3 = 심한 변화(severe alteration)로 정해서 분석하였다. 결과는 그룹 간 평균의 유의적인 차이를 비모수적인 방법으로 Mann Whitney test로서 판별하였다.

B, C 농장에서 첨가군은 대조군에 비해 결장의 조직 병변이 유의적으로 낮았다. 유의적인 차이는 결장 조직의 염증세포의 침윤으로 확인할 수 있었다 (그림 90).

표 122. A 농장 이유자돈의 장 조직 병변 점수

	십이지장	공장	회장	결장
첨가군	0	0	0.4	0.4
무첨가군	0.2	0	1	1.4
유의성	$P = 0.690$	$P = 1.000$	$P = 0.421$	$P = 0.056$

표 123. B 농장 이유자돈의 장 조직 병변 점수

	십이지장	공장	회장	결장
첨가군	0.4	0.2	0.2	0.4
무첨가군	0.2	0	1.2	1.6
유의성	$P = 0.690$	$P = 0.690$	$P = 0.095$	$P = 0.032^*$

표 124. C 농장 이유자돈의 장 조직 병변 점수

	십이지장	공장	회장	결장
첨가군	0.4	0.2	0.6	0.4
무첨가군	0.2	0.2	1.2	2
유의성	$P = 0.690$	$P = 1.000$	$P = 0.310$	$P = 0.032^*$

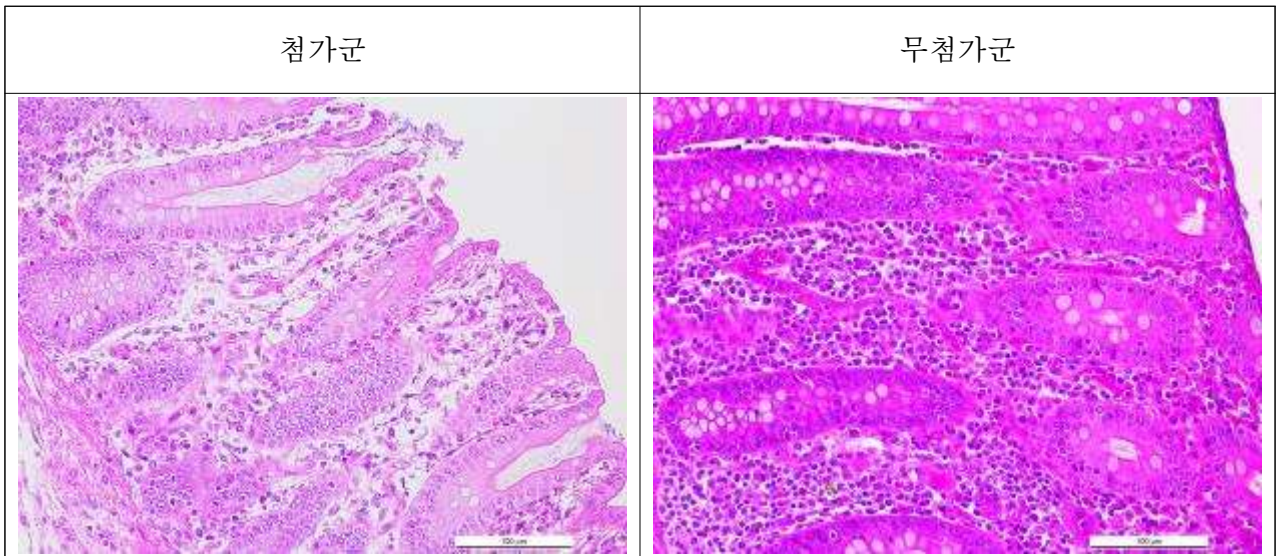


그림 90. B 농장에서 채취한 첨가군과 무첨가군의 결장 사진

제 12 절 가금용 면역활성 생균제 소재 발굴 및 유효성 평가 (위탁과제, 건국대학교)

1. *In vivo* 시험을 통해 목표 병원성균에 대한 항균효과 검증 및 최종 후보 미생물 선발

총 17종의 유산균에 대하여 SPF BALB/c 마우스 생체 내에서 인플루엔자 바이러스에 대한 방어 효능시험을 실시하여 총 4종의 유효 유산균 균주를 선발하였다.

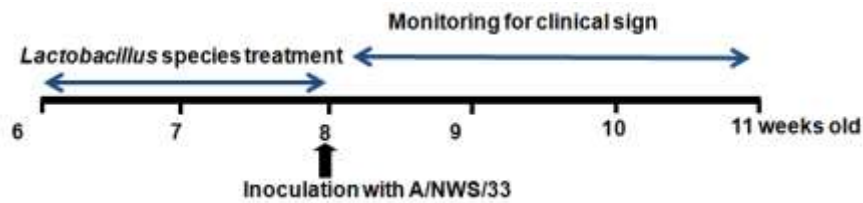


그림 91. 후보미생물 선발을 위한 인플루엔자 방어효능 시험의 개요

총 190마리의 6주령 마우스를 시험군 17구, 양성 대조군과 음성 대조군의 19구로 분리한 후, 시험구의 마우스에게 2주간 매일 1×10^8 CFU의 후보 유산균을 비강으로 접종하였다. 2주간의 유산균 접종 후 수당 $10^{4.5}$ EID₅₀의 Influenza A/NWS/33 (H1N1) 바이러스를 비강으로 접종한 후, 3주간 체중 감소 등의 임상증상 및 MDT를 측정하였다.

표 125. 후보미생물 급여 후 인플루엔자 공격접종에 대한 방어효능 결과

그룹	Chal- lenge dose (cfu/마 리) ^A	접 종 수	체중 (mean ± SD)		공격접종 결과 ^B				PI ₂₁ ^G
					입상증상 ^C		폐사 ^D		
			접종전	접종후	Sick	MTO ^E	Dead	MDT ^F	
G1	No.6-1	10	17.5 ± 0.9	18.1 ± 0.0	10/10	3	9/10	9.5	1.9
G2	No.5-9	10	18.1 ± 1.4	19.1 ± 1.8	10/10	3	6/10	10.8	1.6
G3	No.3-8-1	10	18.2 ± 1.4	20.3 ± 1.5	10/10	3	6/10	8.5	1.6
G4	No.4-20	10	17.4 ± 1.5	19.7 ± 0.8	10/10	3	7/10	10.1	1.7
G5	No.6-13	10	17.9 ± 0.9	19.1 ± 1.5	10/10	3	5/10	10.6	1.5
G6	No.3-8	10	17.7 ± 2.0	19.8 ± 1.6	10/10	3	2/10	12.0	1.2
G7	No.3-6	10	18.6 ± 0.9	19.1 ± 0.7	10/10	3	6/10	10.5	1.6
G8	No.3-5	10	17.7 ± 0.8	19.2 ± 0.7	10/10	3	2/10	10.5	1.2
G9	No.7-25	10 ^{4,5}	18.1 ± 1.0	18.5 ± 1.4	10/10	3	4/10	9.8	1.4
G10	No.7.3	10	19.4 ± 1.2	19.4 ± 0.9	10/10	3	5/10	9.0	1.5
G11	No.5-11	10	19.3 ± 1.1	19.7 ± 0.7	10/10	3	5/10	8.4	1.5
G12	No.7-1	10	19.6 ± 1.2	19.2 ± 0.1	10/10	3	8/10	10.5	1.8
G13	No.2-6	10	19.6 ± 0.8	20.5 ± 1.1	10/10	3	2/10	9.0	1.2
G14	No.1-3	10	19.6 ± 1.0	20.4 ± 1.6	10/10	3	4/10	10.0	1.4
G15	No.6-5	10	19.2 ± 1.2	19.8 ± 2.7	10/10	3	2/10	11.0	1.2
G16	<i>L. plantarium</i>	10	19.3 ± 0.9	18.2 ± 1.1	10/10	3	6/10	9.5	1.6
G17	<i>L. reuteri</i>	10	18.3 ± 1.6	19.6 ± 1.2	10/10	3	4/10	9.3	1.4
G18	양성대조군	10	18.6 ± 1.7	17.5 ± 0.0	10/10	3	9/10	9.1	1.9
G19	음성대조군	-	18.8 ± 0.9	20.1 ± 1.1	0/10	-	0/10	-	0

^A 투여량: 90ul/두, 투여기간: 공격접종 전 6회 비강 투여

^B 공격접종량: LD₁₀₀/두

^C 입상증상두수/접종두수

^D 폐사두수/접종두수

^E Mean time of onset clinical signs

^F Mean death time

^G Pathogenicity index 21 (PI₂₁): the mean score per mouse per observation over a 21 day period when each day, mouse are scored 0 if normal, 1 if sick (열, 눈꺼풀, 털 이상), 2 if dead

시험 결과, *Lactobacillus planetarium* No. 3-8, *Lactobacillus planetarium* 1 No. 3-5, *Lactobacillus pentosus* No.2-6, *Lactobacillus pentosus* No.6-5 의 총 4종의 인플루엔자 바이러스에 대한 방어 효능을 가지는 유산균을 선발하였다.

인플루엔자 바이러스에 대한 방어 효능이 확인된 4종의 유산균에 대한 SPF BALB/c 마우스 생체 내에서 대표적인 식중독 유발 살모넬라인 *Salmonella enteritidis* 에 대한 방어 효능시험을 실시하여 최종적으로 유효 유산균 균주 1종을 선발하였다.

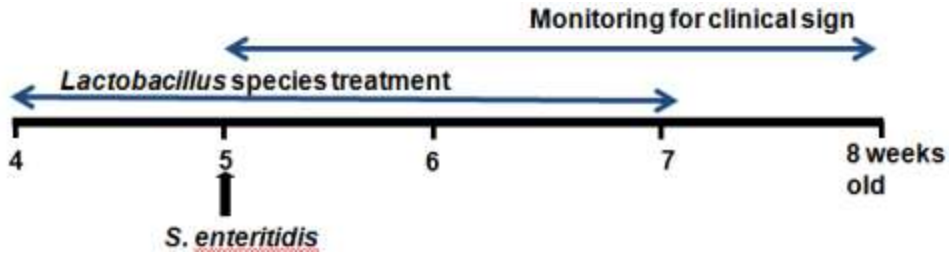


그림 92. 최종 후보미생물 선발을 위한 *Salmonella enteritidis* 방어효능 실험의 개요

총 60마리의 4주령 마우스를 시험군 4구, 양성 대조군과 음성 대조군의 6구로 분리한 후, 시험군의 마우스에게 4 주간 매일 1×10^8 CFU의 후보 유산균을 경구로 접종하였다. 유산균을 접종하기 시작한 후 1주일 이 되었을 때 수당 3×10^5 CFU의 *Salmonella enteritidis* 균을 구강으로 접종한 후, 3주간 임상증상 및 폐사율을 관찰하였다.

표 126. 후보미생물 급여 후 인플루엔자 공격접종에 대한 방어효능 결과

그룹	Challenge dose (cfu/마리)	접종수수	체중(g) (mean ± SD)		공격접종 결과				PI ₂₁ ^F	
			접종전	접종후	임상증상		폐사			
					Sick ^B	MTO (day) ^C	Dead ^D	MDT (day) ^E		
G1	No.3-8		10	16.9±0.8	18.0±1.2	10/10	3	7/10	10.4	1.7
G2	No.3-5		10	17.0±0.4	18.1±0.9	10/10	3	7/10	10.6	1.7
G3	No.2-6	3x10 ⁵	10	16.8±0.9	17.7±0.9	10/10	3	7/10	10.9	1.7
G4	No.6-5		10	16.9±0.6	18.8±1.8	10/10	3	4/10	11.8	1.4
G5	양성대조군		10	16.9±0.9	0.0±0.0	10/10	3	10/10	9.8	2.0
G6	음성대조군	-	10	16.8±0.5	18.1±0.5	0/10	-	0/10	-	-

^A 투여농도: 1일 200ul/두, 투여기간: 공격접종 전 7일 예방 및 공격접종 후 14일간 경구 투여

^B 임상증상발현수수/접종수수

^C Mean time of onset of clinical signs

^D 폐사수수/접종수수

^E Mean death time

^F Pathogenicity index: the mean score per mouse per observation over a 21 day period when each day, mouse are scored 0 if normal, 1 if sick (열, 눈꺼풀, 털 이상), 2 if dead.

시험 결과, 인플루엔자 바이러스와 *Salmonella enteritidis*에 대한 가장 높은 방어 효능을 나타낸 *Lactobacillus pentosus* No.6-5를 최종 후보 유산균으로 선발하였다.

2. 식중독 원인 살모넬라에 대한 평가를 위한 닭 실험 모델 확립

산란계를 이용하여 대표적인 식중독 원인 살모넬라인 *Salmonella enteritidis*에 대한 감염 및 전파 모델을 확립하기 위하여 동물 실험을 실시하였다.

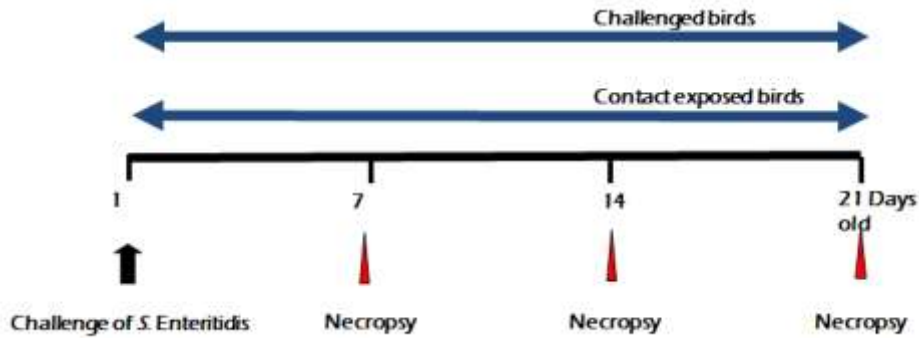


그림 93. 식중독 원인 살모넬라에 대한 평가를 위한 닭 실험 모델 확립 시험 개요

총 90수의 살모넬라 음성이 확인된 모계군 유래의 1일령 산란계를 30수씩 공격 접종 그룹과 접촉 전파 그룹, 음성 대조군의 총 3개의 시험구로 나뉘어졌다. 음성 대조군은 나머지 두 개의 그룹과 격리되어 사육되었으며, 공격 접종 그룹은 1일령에 5×10^7 CFU의 Chloramphenicol 내성 *Salmonella enteritidis*를 구강으로 접종하였으며, 접촉 전파 그룹은 공격 접종 그룹과 함께 사육해서 접촉 감염이 이루어지도록 하였다. 7일령, 14일령 그리고 21일령에 그룹별로 10수씩 부검을 하여 맹장변을 Rappaport-Vassiliadis (RV) broth에 심진 희석한 후 *Salmonella enteritidis*의 양을 Chloramphenicol이 20mg/ml 포함되어있는 Xylose-Lysine Desoxycholate (XLD) agar에서 확인하였다.

표 127. 식중독 원인 살모넬라 접종 및 접촉 시험군의 살모넬라 재분리 결과

그룹	처리방법	시험 수수	맹장변에서 재분리된 살모넬라 수 (cfu log ₁₀)		
			7일 ^A	14일	21일
1	공격접종	30	2.48E+06	3.55E+06	6.23E+06
2	공격접종과 접촉	30	1.62E+06	1.75E+06	5.01E+06
3	음성대조	30	0	0	0

^A 공격접종 후 경과된 일자

시험 결과 공격 접종 그룹과 접촉 전파 그룹 모두에서 *Salmonella enteritidis*의 배출이 확인됨으로써 식중독 유발 살모넬라인 *Salmonella enteritidis*에 대한 닭 실험 모델을 확립하였다. 또한 공격 접종 그룹과 접촉 전파 그룹 모두에서 접종 후 시간이 지날수록 살모넬라의 배출량이 늘

어남을 확인하였고 공격 접종 그룹이 접촉 전파 그룹보다 더 많은 살모넬라를 배출함을 확인하였다. 이 모델을 바탕으로 선발된 생균제제의 식중독 유발 살모넬라의 배출 억제 및 수평 전파 억제능을 확인할 수 있을 것으로 판단된다.

3. 닭의 주요 질병인 가금 티푸스 (*Salmonella* 균) 에 대한 평가를 위한 동물 모델 확립

산란계를 이용하여 가금 티푸스 원인균인 *Salmonella gallinarum*에 대한 감염 및 전파 모델을 확립하기 위하여 동물 실험을 실시하였다.

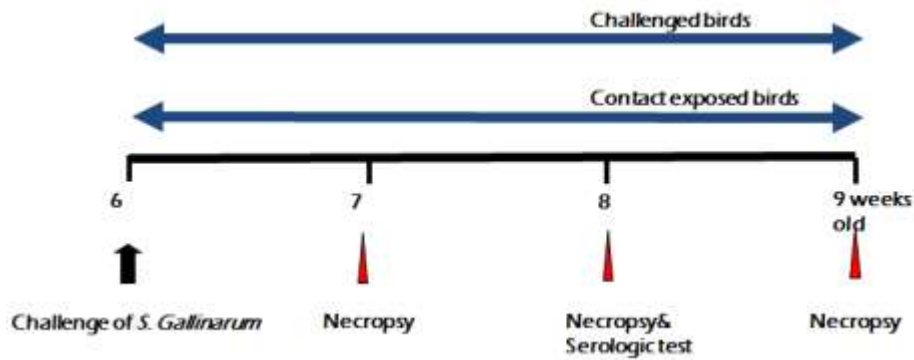


그림 94. 가금 티푸스에 대한 평가를 위한 닭 실험 모델 확립 시험 개요

총 105수의 살모넬라 음성이 확인된 6주령 산란계를 35수씩 공격 접종 그룹과 접촉 전파 그룹, 음성 대조군의 총 3개의 시험구로 나누었다. 가금티푸스의 전파에 영향을 줄 수 있는 사육 밀도의 증가를 피하기 위하여 각 시험군당 3개의 케이지에 나뉘어져서 사육되었다. (케이지 1,2 = 공격 접종 그룹 10수 + 접촉 전파 그룹 10수, 케이지 3 = 공격 접종 그룹 15수 + 접촉 전파 그룹 15수) 음성 대조군은 나머지 두 개의 그룹과 격리되어 사육되었다.

6주령 산란계에게 5×10^8 CFU씩 *Salmonella gallinarum*을 경구로 투여한 후 1,2번 케이지에 있는 그룹별 20수의 3주간의 폐사율을 관찰하였다.

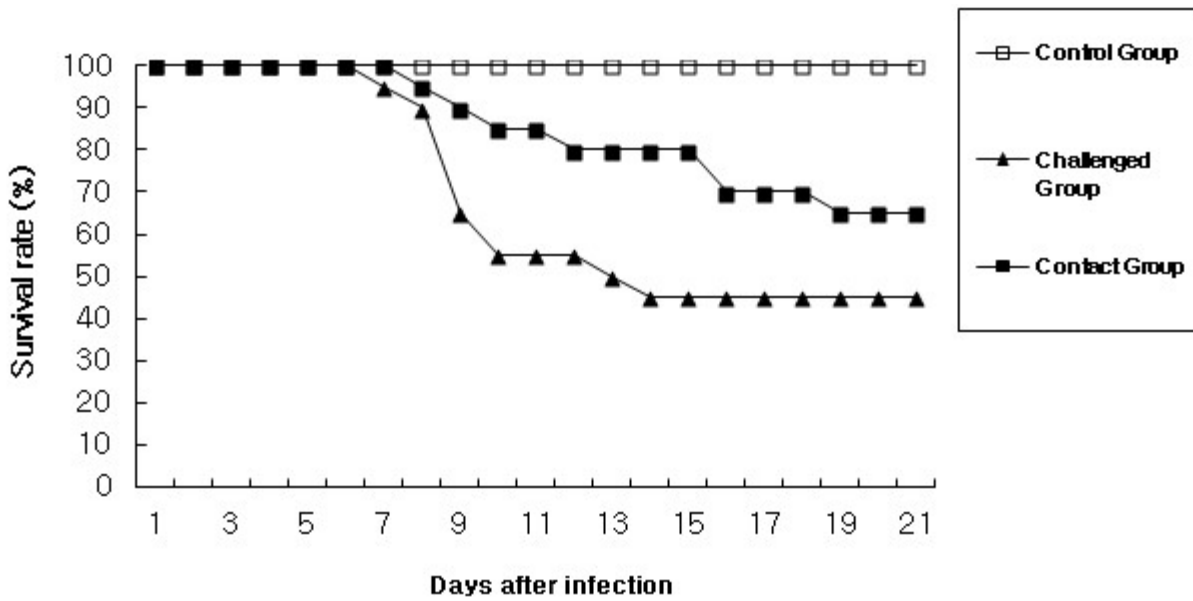


그림 95. 가금 티푸스균 공격접종 후 생존율

공격 접종 7일, 14일 그리고 21일 후에 시험계를 그룹별로 5수씩 부검하여 각각 간, 비장 및 맹장을 각각 1g씩 채취하여 10ml의 Buffered Peptone Water (BPW) broth에 24시간 증균한 후, 0.1ml의 증균액을 10ml의 Rappaport-Vassiliadis (RV) broth에 접종하여 48시간동안 선택적 증균을 하였다. 배양액을 Brilliant Green Agar(BGA)에 도말한 후, 살모넬라 특이적인 집락을 채취하여 살모넬라 항혈청을 이용하여 *Salmonella gallinarum* 재분리 여부를 확인하였다.

표 128. 공격 접종 후 항체 검사를 통한 가금티푸스 균의 수평전파 유무 결과

Group	Number of chicks	No. of chickens with SG re-isolation from organ (%)									
		7dpc			14dpc			21dpc			
		Liver	Spleen	Cecum	Liver	Spleen	Cecum	Liver	Spleen	Cecum	
1	Challenged Group	15	4/5 (80)	4/5 (80)	0/5 (0)	4/5 (80)	3/5 (60)	1/5 (20)	0/5 (0)	1/5 (20)	0/5 (0)
2	Contact Group	15	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	2/5 (40)	2/5 (40)	0/5 (0)	3/5 (60)	2/5 (40)	0/5 (0)
3	Negative control	15	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)

또한 공격 접종 2주 후에 급속 혈청응집법(RSA)를 이용하여 혈청전환(Seroconversion)의 여부를 확인하였으며 전체 시험 기간 동안의 폐사율을 구하였다.

표 129. 공격 접종 후 항체 검사를 통한 가금티푸스 균의 수평전파 유무 결과

	Group	Antibodies against SG ^A		Mortality (%)
		Prechallenge	Postchallenge	
1	Challenged Group	0/15	15/15	11/20 (55)
2	Contact Group	0/15	15/15	7/20 (35)
3	Negative control	0/15	0/15	0/20

시험 결과 공격 접종 그룹과 접촉 전파 그룹 모두에서 *Salmonella gallinarum* 에 대한 혈청 전환을 통한 항체 형성이 확인됨으로써 가금 티푸스 유발 살모넬라인 *Salmonella gallinarum* 의 수평 감염 모델을 확립하였다. 또한 공격 접종군과 접촉 전파군 모두 *Salmonella gallinarum*에 의한 폐사를 확인하였으며 3주동안 두 그룹 모두 장기에서의 *Salmonella gallinarum*을 재분리를 확인하였다. 이 모델을 바탕으로 선발된 생균제제의 가금 티푸스 유발 살모넬라에 대한 항병성 및 수평 전파 억제능을 확인할 수 있을 것으로 판단된다.

4. *In vivo* 실험을 통한 목표 병원성균에 대한 선발된 유산균의 항균 효과 확인

가. 선발된 유산균의 경구투여의 살모넬라 균에 대한 방어효능 검증 실험

총 150수의 살모넬라에 미감염된 1일령 갈색 산란계를 각 시험구당 30수씩 총 5개 시험군으로 구분하여 선발된 미생물 투여 공격접종군, 유산균 투여 접촉전파 감염군, 유산균 미투여 공격접종군, 유산균 미투여 접촉전파군, 음성 대조군으로 나눈 후 그룹별로 격리사육하였다. 유산균 투여그룹에는 매일 1.0×10^8 CFU/ml의 후보 유산균을 1일령부터 공격접종 21일 후까지 경구투여하였다. 1일령 갈색 산란계가 각각 1일령이 되었을 시 *Salmonella Enteritidis*균 ($5.0E+7$ cfu/ml)을 구강을 통해 공격접종하였다. 살모넬라 균 공격접종 후 7, 14, 21일 후 그룹별 10를 부검하여 맹장변을 채취하여 분리되는 *Salmonella Enteritidis* 균을 정량분석 하였다. 또한, *Salmonella Enteritidis* 공격접종 후 7, 14, 21일후 시험군과 대조군의 사육시설의 출입문, 바닥, 그리고 배기필터에서 *Salmonella Enteritidis*를 재분리하여 그룹별로 비교하였다.

표 130. 선발 유산균 경구투여의 살모넬라 균에 대한 방어 효능시험군의 구분

구분	시험군명	유산균 투여 A	수수	공격 접종 B
Group 1	공격접종군	O	30 수	O
Group 2	접촉전파감염군		30 수	X
Group 3	공격접종군	X	30 수	O
Group 4	접촉전파감염군		30 수	X
Group 5	대조군	X	30 수	X

^A 선발된 유산균을 1일령부터 시험 종료 시까지 매일 수당 $10^{8.0}$ cfu농도로 경구 투여한다

^B 시험계가 1일령일 때 *Salmonella Enteritidis* 균주를 1일령에 $5 \times 10^{7.0}$ cfu/수로 공격접종 한다.

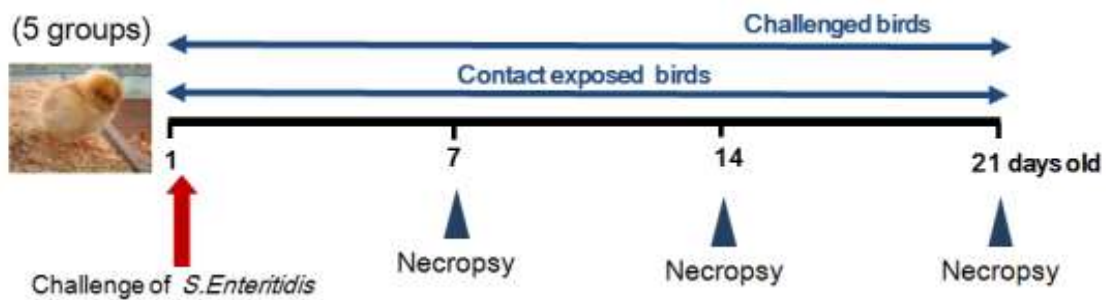


그림 96. 선발 유산균 경구투여의 살모넬라 균에 대한 방어 효능시험 개요

환경 내 *Salmonella Enteritidis* 배출억제 효능시험결과 *Salmonella enteritidis*균 공격접종 후 사육 cage의 바닥과 벽면을 swab한 샘플에서 유산균 미투여 그룹에서는 *Salmonella enteritidis*균이 83.3% 양성율에 비하여 유산균을 투여한 그룹에서는 *Salmonella enteritidis*균이 66.7% 로 양성율이 저하되어 환경으로 배출됨을 확인 할 수 있었다.

표 131. 선발 유산균 경구투여 후 맹장변 내 *Salmonella Enteritidis* 증식억제 효능결과

시험군	시험군명	유산균 투여	7 dpc ^A		14 dpc ^B		21 dpc ^C	
			SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean
			양성수수 D	Log CFU E	양성수수	Log CFU	양성수수	Log CFU
Group 1	공격접종군	O	10/10	6.27	10/10	6.30	10/10	6.36
Group 2	접촉전파감염군		9/10	6.45	9/10	6.37	8/10	6.08
Group 3	공격접종군	X	10/10	6.86	9/10	4.51	2/10	3.39
Group 4	접촉전파감염군		9/10	7.10	9/10	3.81	2/10	3.86
Group 5	대조군	X	0/10	-	0/10	-	0/10	-

^A *Salmonella Enteritidis* 균 ($5 \times 10^{7.0}$ cfu/ml/수)을 구강으로 공격 접종하고 1주 후 맹장에서 SE 양성수수/분리 균수

^B *Salmonella Enteritidis* 균 ($5 \times 10^{7.0}$ cfu/ml/수)을 구강으로 공격 접종하고 2주 후 맹장에서 SE 양성수수/분리 균수

^C *Salmonella Enteritidis* 균 ($5 \times 10^{7.0}$ cfu/ml/수)을 구강으로 공격 접종하고 3주 후 맹장에서 SE 양성수수/분리 균수

^D 맹장변에서 *Salmonella Enteritidis* 균 양성으로 확인된 수수

^E 맹장내 SE 양성 확인된 개체의 SE 정량 값(Mean Log CFU)

표 132. 선발 유산균 경구투여 후 환경 내 *Salmonella Enteritidis* 배출억제 효능결과

시험군	시험군명	유 산 균	환경 내 SE 검출A											
			7 dpc				14dpc				21dpc			
			입구	바닥	필터	총합	입구	바닥	필터	총합	입구	바닥	필터	총합
Group 1	공격접종 군	O	0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6	1/2	2/2	1/2	4/6
Group 2	접촉전파 감염군		0/2	1/2	0/2	1/6	0/2	1/2	0/2	1/6	1/2	2/2	2/2	5/6
Group 3	공격접종 군	X	0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6
Group 4	접촉전파 감염군		0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6
Group 5	대조군	X	0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6

^A 공격 접종 후 7일, 14일, 21일 후 아이솔레이터 환경 내에서의 살모넬라 검출

나. 선발된 유산균의 사료첨가투여의 살모넬라 균에 대한 방어효능 검증 실험

총 150수의 살모넬라에 미감염된 1일령 갈색 산란계를 각 시험구당 30수씩 총 5개 시험군으로 구분하여 선발된 미생물 투여 공격접종군, 유산균 투여 접촉전파 감염군, 유산균 미투여 공격접종군, 유산균 미투여 접촉전파군, 음성 대조군으로 나눈 후 그룹별로 격리사육하였다. 유산균 투여그룹에는 매일 $1.0E+8$ CFU/ml의 후보 유산균을 사료에 0.2% 첨가하여 1일령부터

시험 종료시까지 예방 및 치료 투여 하였다. 1일령 갈색 산란계가 각각 1일령이 되었을 시 *Salmonella Enteritidis* ($5.0E+7$ cfu/ml)을 구강을 통해 공격접종하였다. 살모넬라 균 공격접종 후 7, 14, 21일 후 그룹별 10를 부검하여 맹장변을 채취하여 분리되는 *Salmonella Enteritidis* 균을 정량분석하였다. 또한, *Salmonella Enteritidis* 공격접종 후 7, 14, 21일후 시험군과 대조군의 사육시설의 출입문, 바닥, 그리고 배기필터에서 *Salmonella Enteritidis*를 재분리하여 그룹별로 비교하였다.

표 133. 선발 유산균 사료첨가투여의 살모넬라 균에 대한 방어 효능시험군의 구분

구분	시험군명	유산균 투여 ^A	수수	공격 접종 ^B
Group 1	공격접종군	O	30 수	O
Group 2	접촉전과감염군		30 수	X
Group 3	공격접종군	X	30 수	O
Group 4	접촉전과감염군		30 수	X
Group 5	대조군	X	30 수	X

^A 선발된 유산균을 사료에 0.2% 첨가하여 1일령부터 시험 종료 시까지 예방 및 치료 투여한다.

^B 시험계가 1일령일 때 *Salmonella Enteritidis* $5 \times 10^{7.0}$ cfu/수로 공격접종한다

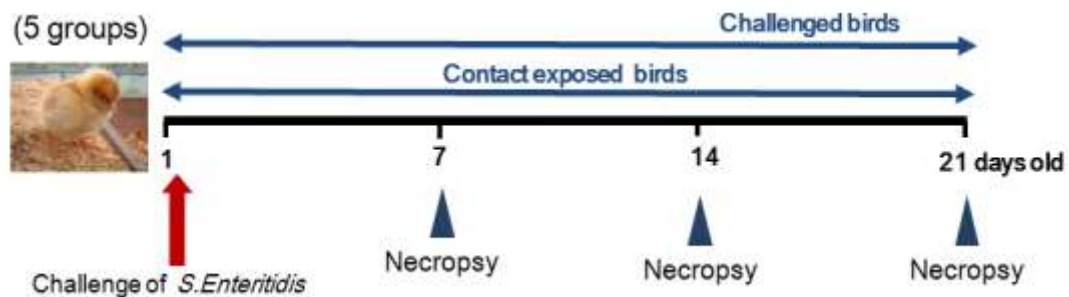


그림 97. 선발 유산균 사료첨가투여의 살모넬라 균에 대한 방어 효능시험 개요

선행실험을 통하여 선발된 유산균 사료첨가투여의 살모넬라 균에 방어효능 시험 결과 공격접종 그룹과 접촉 전과 그룹 모두에서 *Salmonella enteritidis*의 배출이 확인되었다. 공격접종 후 14일째 맹장변 내 *Salmonella Enteritidis* 재분리율을 측정된 결과 공격접종군은 90% 양성율에 비하여 유산균 투여 공격접종군에서는 70% 양성율을 확인할 수 있었다. 또한, *Salmonella enteritidis* 균 배출양에서는 공격접종 군은 $10^{4.63}$ cfu/g에 비하여 유산균 투여 공격접종군은 $10^{3.93}$ cfu/g 으로 통계학적으로 유의적이진 않지만 저하 되는 것을 확인 할 수 있었다.

표 134. 선발 유산균 사료첨가투여 후 맹장변 내 *Salmonella Enteritidis* 증식억제 효능결과

시험군	시험군명	유산균 투여	7 dpc ^A		14 dpc ^B		21 dpc ^C	
			SE 양성수수 ^D	Mean Log CFU ^E	SE 양성수수	Mean Log CFU	SE 양성수수	Mean Log CFU
Group 1	공격접종군	O	10/10	6.68	7/10	3.93	5/10	1.68
Group 2	접촉전파감염군		10/10	6.73	9/10	5.07	6/10	2.86
Group 3	공격접종군	X	10/10	6.66	9/10	4.63	5/10	1.92
Group 4	접촉전파감염군		10/10	5.97	9/10	5.86	7/10	3.12
Group 5	대조군	X	0/10	0	0/10	0	0/10	0

^A *Salmonella Enteritidis* 균 (5×10.7cfu/ml/수)을 구강으로 공격 접종하고 1주 후 맹장에서 SE 양성수수/분리 균수

^B *Salmonella Enteritidis* 균 (5×10.7cfu/ml/수)을 구강으로 공격 접종하고 2주 후 맹장에서 SE 양성수수/분리 균수

^C *Salmonella Enteritidis* 균 (5×10.7cfu/ml/수)을 구강으로 공격 접종하고 3주 후 맹장에서 SE 양성수수/분리 균수

^D 맹장변에서 *Salmonella Enteritidis* 균 양성으로 확인된 수수

^E 맹장내 SE 양성 확인된 개체의 SE 정량 값(Mean Log CFU)

또한, 공격접종 후 21일째 맹장변 내 *Salmonella Enteritidis* 재분리율을 측정된 결과 접촉전파감염군은 70% 양성율에 비하여 유산균 투여 접촉전파감염군에서는 60% 양성율을 확인할 수 있었다. 또한, *Salmonella enteritidis* 균 배출양에서는 접촉전파감염군은 10^{3.12}cfu/g에 비하여 유산균 투여 접촉전파감염군은 10^{2.86}cfu/g 으로 통계학적으로 유의적이진 않지만 저하 되는 것을 확인 할 수 있었다. 환경 내 *Salmonella Enteritidis* 배출억제 효능시험결과 *Salmonella enteritidis* 균 공격접종 후 사육 cage의 바닥과 벽면을 swab한 샘플에서 유산균 미투여 그룹에서는 *Salmonella enteritidis*균이 66.7% 양성율에 비하여 유산균을 투여한 그룹에서는 *Salmonella enteritidis*균이 50% 양성율로 저하되어 환경으로 배출됨을 확인 할 수 있었다.

표 135. 선발 유산균 사료첨가투여 후 환경 내 *Salmonella Enteritidis* 배출억제 효능결과

시험군	시험군명	유산균 투여	환경 내 SE 검출A											
			7 dpc				14dpc				21dpc			
			입구	바닥	필터	총합	입구	바닥	필터	총합	입구	바닥	필터	총합
Group 1	공격접종군													
Group 2	접촉전과 감염군	O	1/2	1/2	1/2	3/6	0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6
Group 3	공격접종군													
Group 4	접촉전과 감염군	X	1/2	1/2	2/2	4/6	0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6
Group 5	대조군	X	0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6	0/2	0/2	0/2	0/6

^A 공격 접종 후 7일, 14일, 21일 후 아이슬레이터 환경 내에서의 살모넬라 검출

다. 선발된 유산균의 사료첨가투여의 가금티푸스(*Salmonella gallinarum* KP-93 strain) 방어효능 시험

총 50수의 가금티푸스에 미감염된 6주령 갈색 산란계를 각 시험구당 10수씩 총 5개 시험군으로 구분하여 선발된 미생물 투여 공격접종군, 유산균 투여 접촉전과 감염군, 유산균 미투여 공격접종군, 유산균 미투여 접촉전과군, 음성 대조군으로 나눈 후 그룹별로 격리사육하였다. 유산균 투여그룹에는 매일 1.0E+8 CFU/ml의 후보 유산균을 사료에 0.2% 첨가하여 공격접종 7일 전부터 시험 종료시까지 예방 및 치료 투여 하였다. 6주령 갈색 산란계가 각각 7주령이 되었을 시 *Salmonella gallinarum* KP-93 strain (5.0E+7 cfu/ml)을 구강을 통해 공격접종하였다. 공격접종 후 2주간 폐사율을 관찰하고 생존계는 부검하여 간장, 비장, 맹장변으로부터 가금티푸스 균을 재분리하였다. 가금티푸스균 공격접종 직전 및 2주 후 그룹별로 투여계를 채혈하여 RSA(급속평판응집반응)을 통해 혈청 내 가금티푸스 항체의 존재 여부를 확인 하였다.

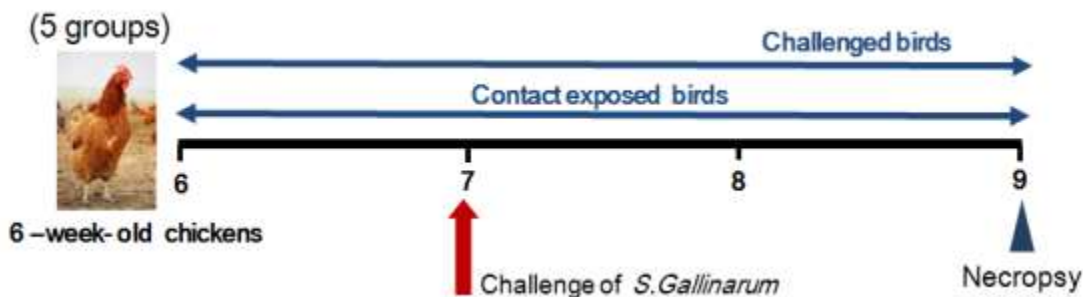


그림 98. 선발 유산균 사료첨가투여의 가금티푸스에 대한 방어 효능시험 개요

시험결과 6주령 산란계를 대상으로 공격접종 전 항체 유무를 확인하기 위하여 수집한 혈청에서 RSA 시험결과 모두 음성반응을 보여 *Salmonella* 무감염 계군임이 확인 되었다. 가금티푸스균 공격접종 2주 후 실시한 RSA 검사결과 공격접종군에서의 *Salmonella* 에 대한 항체는 유

산균 미투여군과 투여군에서 모두 형성되었다. 가금티푸스균 공격접종 2주 후 실시한 RSA 검사결과 접촉전과군에서의 *Salmonella* 에 대한 항체는 유산균 미투여군은 60% 형성된 것에 비하여 유산균 투여군에서는 40% 형성되어 통계학적으로 유의적이진 않지만 저하 되는 것을 확인할 수 있었다.

유산균 사료첨가제 투여 개시 1주 후 실시한 공격접종 시험에서 유산균 미투여 공격접종군 폐사율이 50%인데 비하여 유산균 사료첨가제 투여군의 폐사율은 40%로 확인되었다. 또한, 가금티푸스균 재분리 시험을 실시한 결과 접촉전과군에서 유산균 미투여군 간에서의 공격접종군 재분리율 40% 양성율에 비하여 유산균 투여군은 공격접종군 재분리가 확인되지 않았다.

표 136. 선발 유산균 사료첨가투여 후 가금티푸스 폐사율 감소효능 결과

구분	공격접종 구분	수 수	항체양성율		방어 효능 ^A 폐사수수/ 공격접 종수수 (폐사율 %)	공격접종주 재분리		
			공격접종 전	공격접종 후		간	비장	맹장변
			RSA ^B	RSA ^C				
유산균 투여군 ^D	공격접종군	10	0/10	5/5	4/10 (40%)	4/10	4/10	4/10
	접촉전과군	10	0/10	4/10	0/10 (0%)	0/10	0/10	0/10
유산균 미투여군 ^E	공격접종군	10	0/10	4/4	5/10 (50%)	5/10	5/10	5/10
	접촉전과군	10	0/10	6/10	0/10 (0%)	4/10	0/10	0/10
음성대조 군 ^F	-	10	0/10	0/10	0/10 (0%)	0/10	0/10	0/10
계		50						

^A 가금티푸스균 (*Salmonella gallinarum* KP-93strain:5×10^{7.0}cfu/ml/수)을 구강으로 공격 접종하고 2주간 폐사율을 관찰 함

^B 공격접종 1주 전 RSA항체: 추백리진단액 평판응집반응 양성수수/검사수수

^C 공격접종 2주 후 RSA 항체: 추백리진단액 평판응집반응 양성수수/검사수수

^D 유산균을 사료에 섞어 공격접종 1주전부터 공격접종 2주후까지 투여함

^E 일반 사료 급이 후 가금티푸스균을 공격접종 한 양성 대조군

^F 일반 사료 급이 후 가금티푸스균을 공격접종 하지 않은 음성 대조군

5. 살모넬라증에 대한 선발 유산균의 실험실내 효능 평가

가. 생균제제의 살모넬라에 대해 장내 미생물총 정착 억제 효능시험

실제 살모넬라가 만연한 농가에서 입추된 초생추에 생균제를 적용하였을 때의 효과를 확인하기 위하여, 실험실 내 분리 유산균을 이용한 실험실내 실험을 진행하였다. 본 시험 모델은 닭의 장내세균총 정착이 끝난 이후에 생균제를 투여했을 경우, 기존 장내세균에 의해 투여 생균제가 장내에 정착하지 못할 수 있다는 점을 보완한 모델에 해당한다.

총 240수의 1일령 SPF 병아리를 시험구당 20수씩 총 12개 시험군으로 구분하여 주관기관에서 추가적으로 선발된 균종별 투여그룹, 시판 생균제 투여 그룹, 양성대조군, 음성대조군으로 나눈 후 그룹별로 격리사육 하였다. 음성 대조군을 제외한 모든 시험군에 *Salmonella Enteritidis* 균을 1.0×10^4 CFU/수를 경구로 공격접종 하였다. 공격접종 한시간 후, 생균제제를 1.0×10^6 CFU/수씩 경구접종 하였다. 생균제제 접종 24시간 뒤 안락사한 후, 부검하여 맹장변을 채취하여 공격접종한 *Salmonella enteritidis* 균의 정량분석을 진행하여 생균제와 살모넬라균간의 경쟁적 배제효과를 확인 하였다.

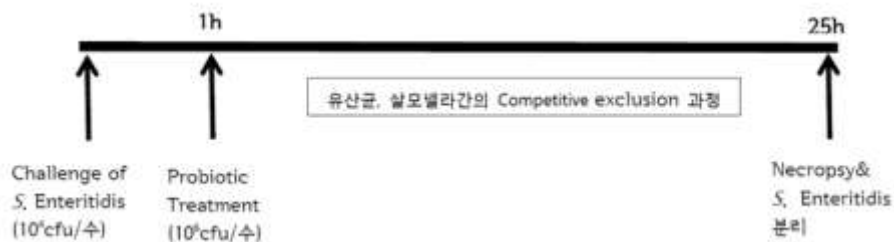


그림 99. 선발 유산균 사료첨가투여의 장내 미생물총 정착 억제시험 개요

시험 결과, 대부분의 생균제제 투여 그룹에서 장내 살모넬라균의 감소를 확인하였다. 그 중, *L. sakei* 균주를 투여한 시험군이 양성 대조군에 비해 장내 살모넬라의 유의성있는 감소를 확인하였다. 실제 환경에 초생추가 살모넬라에 노출되는 양에 비해 고농도의 살모넬라를 경구로 직접적으로 투여한 것을 감안하면, 야외 임상시험에 적용 하였을 시, 환경 내 살모넬라 균의 배출 억제뿐만 아니라 개체의 살모넬라 감염 억제 효과도 기대 할 수 있을 것이라 판단된다.

표 137. 실험실내 생균제 투여시험 결과

그룹	생균제 투여 type	SE 양성 수수	Mean Log CFU
G1	시판 생균제	20/20	8.01
G2	<i>Lactobacillus plantarum</i> -1	20/20	7.89
G3	<i>Lactobacillus brevis</i>	20/20	7.61
G4	<i>Lactobacillus sakei</i>	20/20	7.27**
G5	<i>Lactobacillus pentosus</i>	20/20	7.90
G6	<i>Lactobacillus plantarum</i> -2	20/20	8.47
G7	<i>Lactobacillus plantarum</i> -3	20/20	8.30
G8	<i>Lactobacillus plantarum</i> -4	20/20	8.08
G9	<i>Lactobacillus plantarum</i> -5	20/20	8.06
G10	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	20/20	7.45
G11	양성대조군	20/20	8.41
G12	음성대조군	0/20	0

6. 살모넬라증에 대한 개발생균제의 효과 규명을 위한 야외임상실험

가. 살모넬라 양성 농가에 대해 선발 유산균 투여로 살모넬라 저해효과 및 생산성 향상 규명

사육 기간 중에 생균제 투여는 이미 감염되어있는 살모넬라를 줄이는데 큰 역할을 하지 못하는 것으로 판단되어, 모든 야외시험은 입추부터 생균제를 투여하는 것으로 진행하였다. 사육 기간 중 계사 환경 내 살모넬라 모니터링을 진행하며, 체중 및 사료섭취량을 비교하여 생산성을 평가하였다. 총 시험은 1달간 진행되었다.

표 138. 야외시험 개요

구분	생균제 투여 type	입추일자	사육수수	투여방법	투여용량
A 농장	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2015-08-14	86,500	사료첨가	0.1g/kg(생균제/사료)
B 농장	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2015-08-14	86,500	사료첨가	0.1g/kg(생균제/사료)
C 농장	<i>Lactobacillus sakei</i>	2015-07-17	52,200	음수	수당 0.01g
대조농장	시판 생균제	2015-05-26	80,400	음수	수당 0.01g

살모넬라 모니터링 결과, A농장의 경우 입추 전에 총 8개 샘플에서 2개(25%)의 살모넬라 양성이 확인 되었고, 투여 후 8개 샘플에서는 3개(37.5%) 샘플에서 살모넬라 양성이 확인되었다. B

농장의 경우 입추 전에 총 8개 샘플에서 2개(25%)의 살모넬라 양성이 확인 되었고, 투여 후 8개 샘플에서도 2개(25%) 샘플에서 살모넬라 양성이 확인되었다. C농장의 경우 입추 전에 총 8개 샘플에서 1개(12.5%)의 살모넬라 양성이 확인 되었고, 투여 후에는 8개 샘플 모두에서 살모넬라 양성이 확인되었다. 대조농장의 경우 입추 전에 총 8개 샘플에서 모두 살모넬라 음성이 확인되었지만, 투여 후 8개 샘플에서 5개(62.5%) 샘플에서 살모넬라 양성이 확인되었다.

표 139. 야외실험 살모넬라 모니터링 결과

A농장	환경	입추 전	5주령	B농장	환경	입추 전	5주령
1동	Drag	양성 (1/2, 50%)	음성 (0/2, 0%)	1동	Drag	음성 (0/2, 0%)	음성 (0/2, 0%)
	Dust	양성 (1/2, 50%)	양성 (1/2, 50%)		Dust	음성 (0/2, 0%)	양성 (1/2, 50%)
2동	Drag	음성 (0/2, 0%)	양성 (1/2, 50%)	2동	Drag	양성 (1/2, 50%)	음성 (0/2, 0%)
	Dust	음성 (0/2, 0%)	양성 (1/2, 50%)		Dust	양성 (1/2, 50%)	양성 (1/2, 50%)
C농장	환경	입추 전	9주령	대조농장	환경	입추 전	9주령
1동	Drag	음성 (0/2, 0%)	양성 (2/2, 100%)	1동	Drag	음성 (0/2, 0%)	양성 (1/2, 50%)
	Dust	음성 (0/2, 0%)	양성 (2/2, 100%)		Dust	음성 (0/2, 0%)	음성 (0/2, 0%)
2동	Drag	양성 (1/2, 50%)	양성 (2/2, 100%)	2동	Drag	음성 (0/2, 0%)	양성 (1/2, 50%)
	Dust	음성 (0/2, 0%)	양성 (2/2, 100%)		Dust	음성 (0/2, 0%)	양성 (2/2, 100%)

표 140. 야외실험 생산성 결과

A농장	압컷	수컷	A농장	압컷	수컷
36일령 체중(g)	745	929	36일령 체중(g)	806	880
수당 누적사료 섭취량(kg)	1.421	1,978	수당 누적사료 섭취량(kg)	1.401	1,932
C농장	압컷	수컷	대조농장	압컷	수컷
63일령 체중(g)	979	1,434	65일령 체중(g)	1098	1,493
수당 누적사료 섭취량(kg)	2,219	3,318	수당 누적사료 섭취량(kg)	2.494	4,667

살모넬라 모니터링결과 효과적인 환경내 살모넬라 억제력을 보인 농장은 확인되지 않았다. 하지만, 기존 생균제에 비해서 살모넬라 양성율이 낮게 (62.5% → 25%) 확인되었으며, 동시에 생산성이 기존 생균제와 동등하게 나온 것을 확인 할 수 있다. 기존 생균제는 5종 이상의 균이 혼합된 제제이고, 시험에 이용된 생균제는 1종으로 이뤄진 생균제인 점 등을 보았을 때 경제적이며 효율적인 생균제라 할 수 있다.

제 13 절 산업가축의 질병 예방을 위한 유용 미생물의 규명 (위탁과제, 단국대학교)

1. 선발된 균주의 동정

선발된 균주의 정확한 동정을 위하여 균주의 genomic DNA를 분리하였다. 16S rRNA 유전자를 PCR 방법으로 증폭한 후에 염기서열을 분석하였으며, GeneBank에 등록된 다른 균주들의 염기서열과 비교하였다. 1-3 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 그림 100에서 보는 바와 같으며, GeneBank에 등록된 다른 균주들의 염기서열과 비교한 결과, *L. plantarum*과 99.6%의 상동성을 나타내었다. 2-6 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 그림 101에서 보는 바와 같으며, *L. plantarum*과 99.8%의 상동성을 나타내었다. 3-5, 3-8, 6-5 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열(그림 102, 103, 104)을 GenBank에 등록된 다른 균주들의 염기서열과 비교한 결과, 앞의 두 균주와 마찬가지로 *L. plantarum*과 높은 상동성을 나타내었다(표 141). 따라서 선발된 다섯 균주 모두 *L. plantarum*으로 동정하였다. 선발된 균주 모두 GRAS(generally recognized as safe) 균주로 동정되었기 때문에 생균제로 사용할 수 있을 것으로 사료되었다.

```
1 GGTTACCTTGTTACGACTTCACCCTAATCATCTGTCCCACCTTAGGCCGGCTGGTTCCTAA
61 AAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
121 AAGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTT
181 CATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTAC
241 TCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGTCATA
301 AGGGGCATGATGATTTGACGTTATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCAGGCGAGTCTCAC
361 CAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
421 ACCCAACATCTCAGCACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCCG
481 AAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC
541 GTAGCTTCGAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA
601 GTTTCAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTG
661 AAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTCCGTTGGGCGGAAGGCTTTACATCAGACT
721 TAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACG
781 TATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATAC
841 CTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTCAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCC
901 TTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTTCGTCCATTGTAGAAGATTCCCTACT
961 GCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCA
1021 GGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCTTACCATCTAGCTAATACGCCGC
1081 GGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGT
1141 TGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCAGGTTTCCC
1201 ACGTGTACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCATGATGCNAGCACCATCA
1261 ATACCAGAGTTCGTTGCACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTTCGTCTGAGCCA
1321 GGATCAAACCTCT
```

그림 100. 1-3균주의 16S rRNA 유전자 염기서열

1 GGTTACCTTGTTACGACTTCACCCTAATCATCTGTCCCACCTTAGGGCGGCTGGTTCCTAA
 61 AAGGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
 121 AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTT
 181 CATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTAC
 241 TCTCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA
 301 AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTTGTACCGGCAGTCTCAC
 361 CAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
 421 ACCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCG
 481 AAGGGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGC
 541 GTAGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA
 601 GTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTG
 661 AAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTACGGTATGGACTACCAGGGTAT
 721 CTAATCCTGTTTGTACCCATACTTTGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCG
 781 CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACAGGTTGAGCCGAA
 841 GGCTTTCACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGAC
 901 AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGG
 961 TTAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTAAACAACAGAGT
 1021 TTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTTCGTCCATT
 1081 GTGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAATGT
 1141 GGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGAGCCGTTACCTCACCA
 1201 TCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAAGTGATAGCCGAAGCCATCTTTCAAACCTCG
 1261 GACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCAGGTGTTATCCCCCGC
 1321 TCTGGGCGAGTTTCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCACTCAAATGTAAATCAT
 1381 GATGCAAGCACCAATCGATACCAGAGTTCGTTGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCA
 1441 GCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAAACCTCTAGATCTGGATCCCCTC

그림 101. 2-6균주의 16S rRNA 유전자 염기서열

1 TTACCTTGTTACGACTTCACCCTAATCATCTGTCCCACCTTAGGGCGGCTGGTTCCTAAAA
 61 GGTTACCCACCGACTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAA
 121 GGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCA
 181 TGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTC
 241 TCGCGAGTTCGCAACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAG
 301 GGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTTGTACCGGCAGTCTCACCA
 361 GAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTGATAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAAC
 421 CCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCATGTCCCCGAA
 481 GGAACGTCTAATCTCTTAGATTTGCATAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT
 541 AGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGT
 601 TTCAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCGCTTTACGC
 661 CCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA
 721 GCCGTGGCTTTCTGGTTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTT
 781 CTTTAAACAACAGAGTTTTACGAGCCGAAACCCTTCCTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATC
 841 AGACTTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTG
 901 TCTCAGTCCCAATGTGGCCGATTACCCTCTCAGGTCGGCTACGTATCATTGCCATGGTGA
 961 GCCGTTACCCACCATCTAGCTAATACGCCGCGGGACCATCCAAAGGTGATAGCCGAAGC
 1021 CATCTTTCAAACCTCGGACCATGCGGTCCAAGTTGTTATGCGGTATTAGCATCTGTTTCCA
 1081 GGTGTTATCCCCCGCTTCTGGGCGAGTTTCCACGTGTTACTCACCAGTTCGCCACTCAC
 1141 TCAAATGTAAATCATGGTGCAAGCACCAATCAATACCAGAGTTCGTTGACTTGCATGTA
 1201 TTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCTGAGCCAGGATCAA

그림 102. 3-5균주의 16S rRNA 유전자 염기서열


```

1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCACAGTCGAA
61 CGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTG
121 GTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTA
181 ATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACT
241 TTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGA
301 TACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCC
361 TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
421 CGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAG
481 AGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
541 AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC
601 AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAA
661 CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
721 GATAATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGGCTCGAAAGAATGGGTAGCAAACAGGAT
781 TAGATACCCTGGTAGTCCATACCCTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCC
841 CTTCACTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGA
901 AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGC
961 TACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCC
1021 CTTGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTG
1081 GGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACT
1141 CTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
1201 CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAGCGAGTTGCGAACTCGCG
1261 AGAGTAAAGTAACTCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC
1321 ATGAAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
1381 CTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCCGTGGGGTAAC
1441 CTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGAACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA
ACC

```

그림 103. 3-8균주의 16S rRNA 유전자 염기서열

```

1 AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTGAAC
61 GAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGG
121 TGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAA
181 TACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT
241 TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGCAACGGCTCACCATGGCAATGAT
301 ACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCT
361 ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGC
421 GTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGA
481 GTAACGTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA
541 GCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA
601 GCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAAC
661 TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
721 ATATAAGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCT
781 CGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCCTAAACGATGAA
841 TGCTAAGTGTGGAGGGTTTCGGCCCTTCAAGTCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGC
901 CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGG
961 TGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTAT
1021 GCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACTTGGATACAGGTGGTGCATGGTTGT
1081 CGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATC
1141 AGTTGCCAGCAITTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
1201 GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA
1261 TGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTC
1321 GGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
1381 TGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTG
1441 TAACACCCAAAGTCCGTGGGGTAACCTTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATG
1501 ATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC

```

그림 104. 6-5균주의 16S rRNA 유전자 염기서열

표 141. 선발 유산균의 동정 결과

N0.	Strain	Description	Diff/ Total nts*	Max ident(%)
1	1-3	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni344	5/1332	99.6
2	2-6	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni707	3/1485	99.8
3	3-5	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni729	6/1240	99.5
4	3-8	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni707	4/1503	99.7
5	6-5	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni344	5/1528	99.7

* nts : Nucleotide sequence

2. 균주의 생장에 따른 항균물질 생산 패턴 조사

선발된 균주들이 분비하는 항균물질의 특성을 파악하기 위한 사전 조사로서, 균주의 생장에 따른 항균물질 생산 패턴을 조사하였다. 다섯 균주 모두 배양 24시간째에 최대 균수($2.2 \times 10^8 \sim 6.8 \times 10^8$ cfu/mL) 까지 성장하였으며, 이때의 pH는 3.94~4.04 수준으로 배양 특성에 큰 차이가 없는 것으로 사료되었다. 반면, 기대했던 바와 다르게 일정 시간별로 채취한 배양액을 pH를 7.0 수준으로 중화한 후, *Salmonella typhimurium* KCCM40253 균주를 지시균으로 하여 항균활성을 조사한 결과, 배양 72시간까지 황균 활성이 없는 것으로 나타났다 (그림 105).

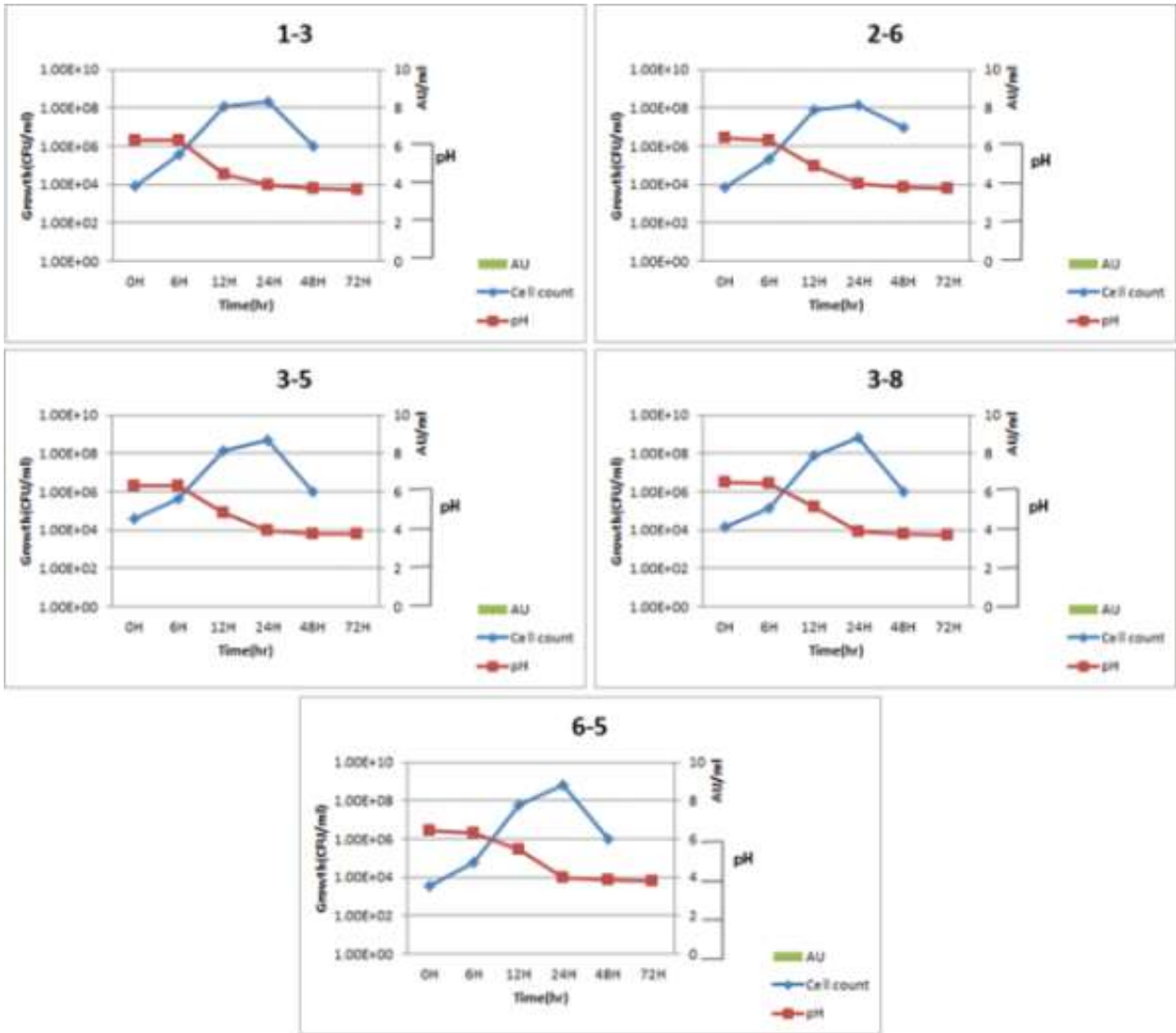


그림 105. MRS 배지에서 선발균주 성장 및 항균활성 (◆, cell growth; ■ pH; green bar, antimicrobial activity(AU/mL))

선발된 균주의 유기산 영향을 제외한 항균활성의 여부가 본 위탁과제의 목표상 상당히 중요하기 때문에 배양 48시간, 배양 72시간째의 배양 상등액을 pH 6.0, 7.0 수준으로 중화시킨 후, 지시균인 *S. typhimurim* KCCM40253과 *S. enteritidis* KVCC-BA0700654을 지시균으로 하여 항균력 실험을 재실시하였으나, 그림 105에 보는 바와 같이 항균활성을 확인할 수 없었다. 배양액 내에 항균물질의 양이 충분하지 않으면 배양액을 사용한 시험에서는 결과가 나타나지 않을 수도 있기 때문에 48시간째의 배양액에 황산암모늄을 80% 수준으로 포화시켜 단백질만을 회수하여 배양액 대비 약 100배 수준으로 농축하여 최종 검토했다. 비교물질로는 본 연구실에서 분리한 *Bacillus subtilis* RX7 균주의 항균물질을 사용하였다. *B. subtilis* RX7 균주의 항균물질에서는 well 주변에 지시균 억제환이 생성된 반면, 본 과제에서 선발된 균주들에게서는 억제환을 찾아 볼 수 없었다(그림 107).

따라서, 선발된 균주들의 유해균 억제능은 항균성물질에서 기인한 것이 아닌 유기산에 의한 효과라고 사료되었기 때문에 당초 계획되었던 연구목표였던 항균물질의 특성 및 안정성 조사

를 수행하기에 불가능하다고 판단되어 선발된 균주가 분비하는 유기산 분석 및 균주의 내산성, 내담즙성 조사로 변경하여 실험을 수행하였다.

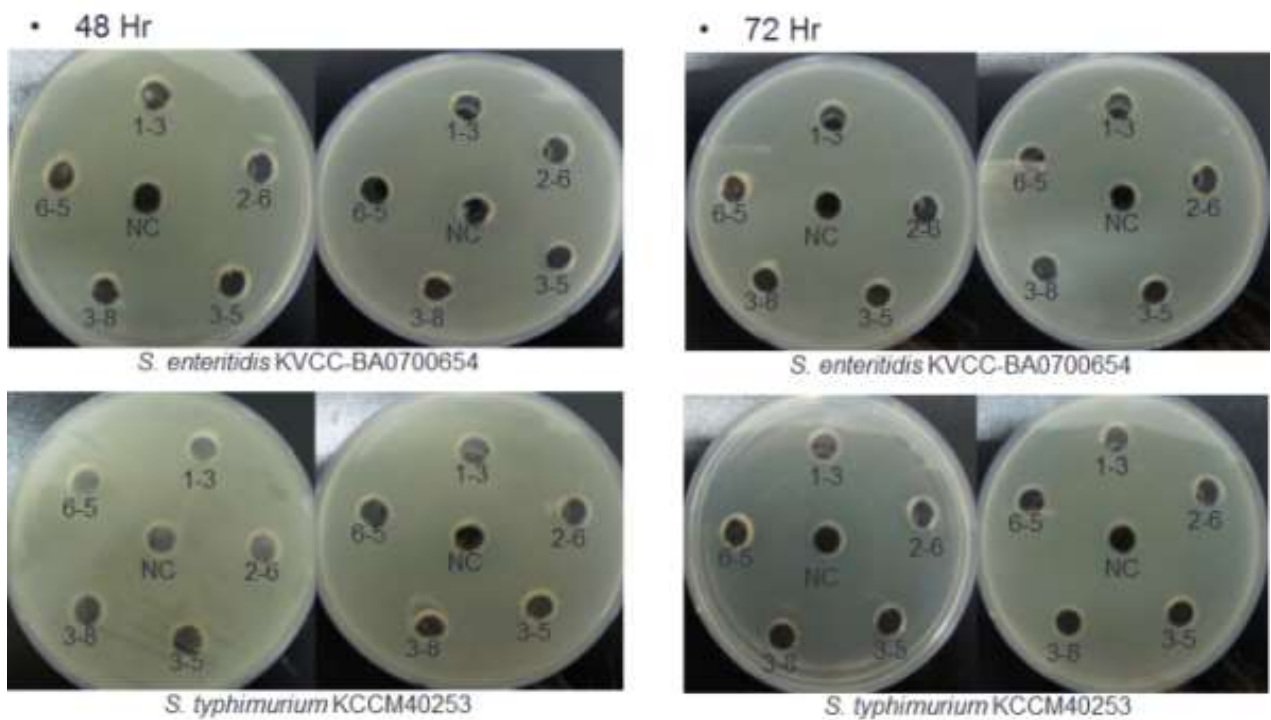


그림 106. 선발 균주 배양 상등액을 이용한 *S. typhimurim* KCCM40253 균주와 *S. enteritidis* KVCC- BA0700654에 대한 항균활성 평가

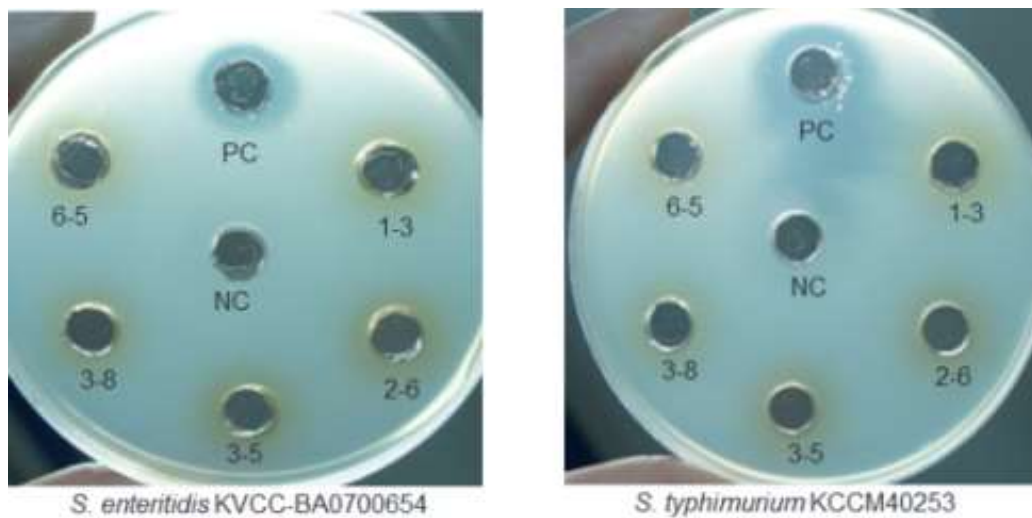


그림 107. 선발균주의 배양 상등액 농축물을 이용한 *S. typhimurim* KCCM40253 균주와 *S. enteritidis* KVCC- BA0700654 균주에 대한 항균활성 평가

3. 선발된 균주가 분비하는 유기산 분석

선발된 균주들의 배양시간에 따른 유기산함량의 변화를 관찰한 결과는 표 142에서 보는 바와 같다. 유기산은 lactic acid, acetic acid, phenyllactic acid (PLA) 총 3가지 종류를 측정하였다. 선발된 균주 모두 배양 시간이 증가함에 따라 유기산의 함량이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 대부분 배양 48시간 이후에 최대치에 도달하는 것으로 나타났다. Lactic acid의 경우, *L. plantarum* 1-3 균주가 배양 48시간째에 17,731 ppm으로 가장 높은 수치를 나타내었으나, 다섯 균주 모두 1.7% 전후의 lactic acid를 생산하였다. Acetic acid의 경우 *L. plantarum* 3-8 균주가 배양 72시간째에 4,701 ppm으로 가장 높았으나, 모든 균주가 0.45% 전후의 acetic acid를 생산하였다. PLA의 경우 배양 48시간째에 *L. plantarum* 2-6 균주가 157 ppm으로 가장 높은 수치를 나타내었다.

표 142. 선발균주의 MRS 배지에서 배양시간 동안 유기산 함량 변화

Organic acid	Strains	Time(hr)		
		24	48	72
Lactic acid (ppm)	1-3	16,867	17,731	17,239
	2-6	14,877	17,458	17,508
	3-5	17,066	17,059	17,305
	3-8	17,015	17,250	17,325
	6-5	16,737	17,296	16,698
Acetic acid (ppm)	1-3	4,439	4,436	4,400
	2-6	4,311	4,440	4,535
	3-5	4,491	4,598	4,565
	3-8	4,574	4,677	4,701
	6-5	4,461	4,584	4,538
PLA (ppm)	1-3	102	156	148
	2-6	100	157	149
	3-5	122	140	138
	3-8	106	83	75
	6-5	137	106	126

4. 선발된 균주의 내산성 및 내담즙성 조사

선발된 균주인 *L. plantarum* 1-3, *L. plantarum* 2-6, *L. plantarum* 3-5, *L. plantarum* 3-8, *L. plantarum* 6-5 균주를 대상으로 생균제적 특성을 조사하였다. 선발된 균주가 생균제로서 기능을 발휘하기 위해서는 위와 소장을 통과해야 하는데, 이때에 위의 낮은 pH와 소장 분비되는 담즙산에 견디기 위해서는 내산성 및 내담즙성이 우수하여야 한다. pH 2, 3, 4, 7로 각각 조정된 MRS 액체배지에 선발된 균주들을 접종한 후에 37°C에서 배양하면서 배양시간별로 배양액의 생균수 변화를 관찰하였다. 그림 108에서 보는 바와 같이, 다섯 균주 모두 pH 3 및 4에서

는 배양 5시간까지 초기 접종균수가 일정하게 유지되는 모습을 보였으며, pH 7에서는 배양 1시간 이후부터 성장하기 시작하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, pH 2에서는 다섯 균주 모두 생균수가 점진적으로 감소하였으며, 2-6 균주는 배양 5시간 만에 균이 검출되지 않은 것으로 조사되어 내산성이 다른 균주들에 비해 좋지 못한 것으로 사료되었다. 한편, 3-5 균주와 6-5 균주는 다른 균주들에 비해 배양 5시간까지 높은 균수를 유지하는 것으로 보아 내산성이 상대적으로 뛰어난 것으로 판단되었다. 음식물의 섭취량이나 종류에 따라 차이가 있겠지만 음식물이 위를 통과하는데 2-3 시간이 소요되며 위산의 pH가 2~3으로 희석된다는 점을 고려할 때 (Parj et al., 1998 ; Park et al., 1999), 장내에서 생균제로서의 기능을 발휘하는데 문제가 없을 것으로 사료되었다.

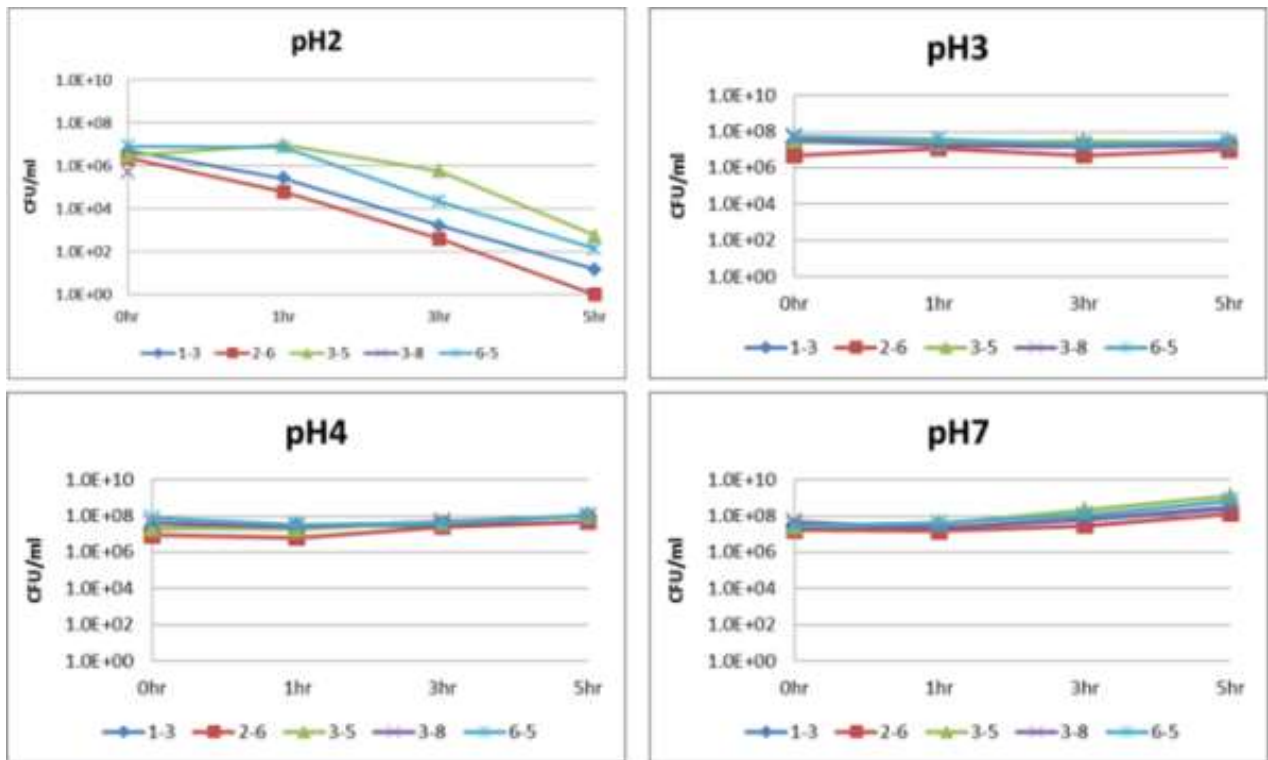


그림 108. 선발균주의 내산성 평가 결과

선발된 다섯 균주의 담즙산 내성을 측정하기 위하여, Ox-gal(Sigma, USA)이 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0%가 각각 함유된 MRS broth에 1-3, 2-6, 3-5, 3-8, 6-5 균주를 각각 접종한 후에 37°C에서 일정시간 배양하면서 배양시간별 생균수의 변화를 관찰하였다. 다섯균주 모두 Ox-gal 0.1% 처리구에서는 0% 처리구와 마찬가지로 시간이 지남에 따라 균수가 점진적으로 증가하였다. 0.3% 이상 처리구부터는 균수가 약간씩 증가하였으며, 1% 처리구에서도 초기 균수가 유지되었다. 이상의 결과로 판단해볼 때, 선발된 5종의 균주 모두 우수한 내담즙성을 가지고 있는 것으로 사료되었다. 특히 6-5 균주는 Ox-gal 1% 처리구에서도 균수가 증가하는 양상을 보여 다른 균주들에 비해 내담즙성이 상대적으로 우수한 것으로 판단되었다(그림 109). 사람의 경우 생체 내 담즙의 농도가 Ox-gal 기준으로 볼 때 십이지장에서 0.67%, 공장에서 0.33%, 회장에서 0.13%임을 감안해볼 때 (Fermont et al., 2006), 선발된 균주들은 생균제로서 이용하는데 문제가 없을 것으로 사료되었다.

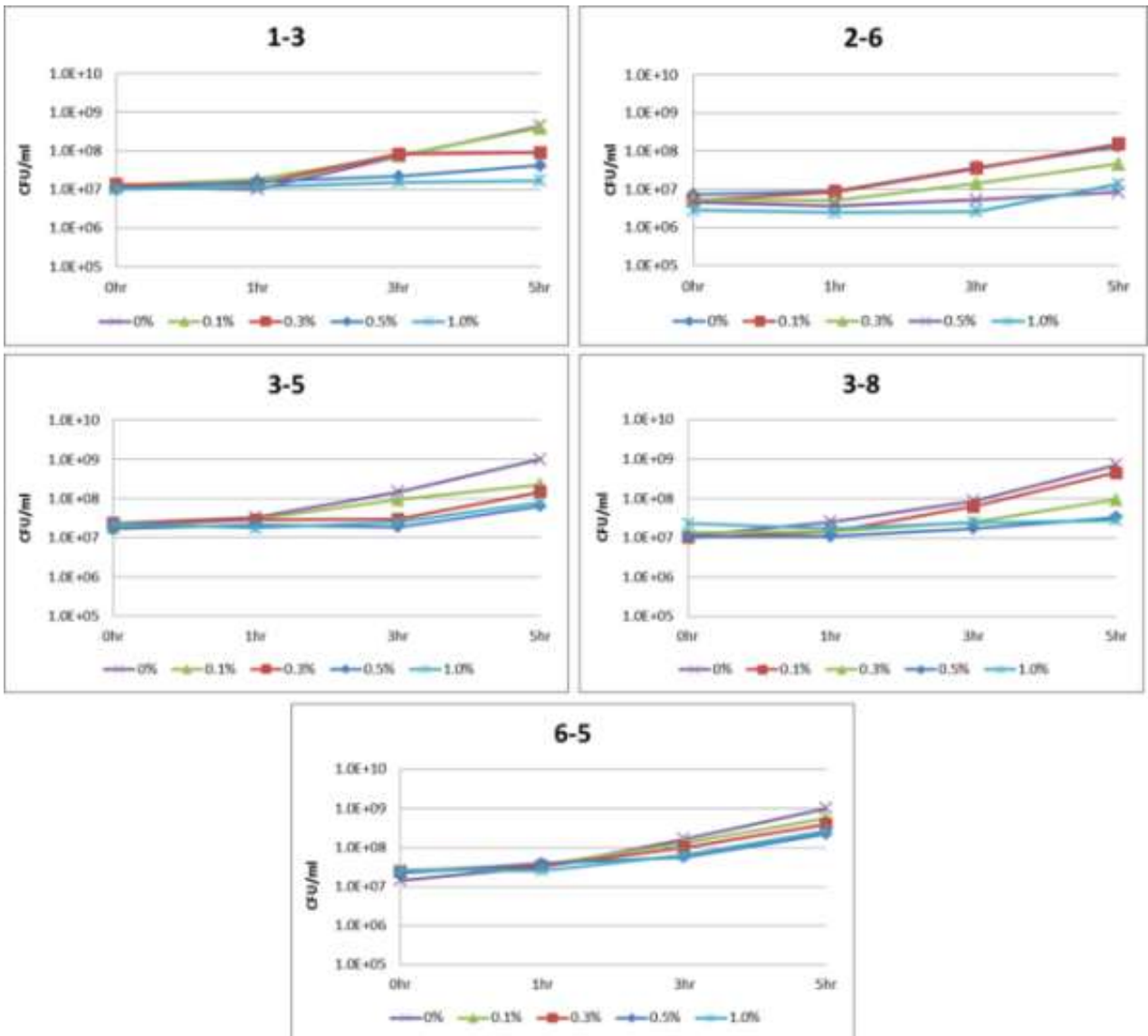


그림 109. 선발균주의 내담즙성 평가 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	유용 미생물과 생균제 후보물질의 확보 (주관, 위탁)	○ 현재 소화기 질병에 대해 사용되는 항생제 및 항생제 대체 생균제 사용 현황 파악 (주관)	100	동물약품협회 및 농림축산식품부 등 기관 자료를 활용하여 항생제 사용현황 및 생균제 사용현황 조사 완료
		○ 자연계에서 확보한 신규 미생물에 대한 시험관내 항균력 스크리닝을 통해 유용 균주 선발(주관)	100	자연계 샘플을 대상으로 항균력을 가진 유산균 균주 15종 선발을 통해 유용 균주선발방법 확립
		○ <i>In vivo</i> 시험을 통해 목표 병원성균에 대한 항균효과 검증 및 최종 후보 미생물 선발(위탁: 건국대학교)	100	주관기관에서 선발한 균주를 대상으로 마우스에서의 인플루엔자 및 식중독 유발 살모넬라에 대한 항균효과 검증 및 최종 후보 미생물 선발 완료
	후보 생균제의 효능평가, 유효물질 선발 및 특성 규명 (위탁)	○ 항균물질의 선발 및 특성 규명 (위탁: 단국대학교)	100	주관기관에서 선발한 균주 5종을 대상으로 세부적인 균주특성 및 유용물 조사 완료 - 선발 균주 동정 - 선발균주 생장에 따른 항균물질 생산 패턴 조사 - 선발 균주가 분비하는 유기산 분석 - 선발 균주의 내산성, 내담즙성 조사
	선발된 유효 균주의 임상시험 모델 확립 (위탁)	○ 식중독 원인 살모넬라에 대한 평가를 위한 동물 모델 확립 (위탁: 건국대학교)	100	닭에서의 식중독 유발 살모넬라에 대한 감염 및 수평 전파 모델 확립
		○ 닭의 주요 질병인 가금 티푸스 (<i>Salmonella</i> 균) 에 대한 평가를 위한 마우스 모델 확립(위탁: 건국대학교)	100	닭에서의 가금 티푸스 유발 살모넬라에 대한 감염 및 수평 전파 모델 확립
	선발된 유효 균주의 임상시험 모델 확립 (위탁)	○ 실험실내 유용 개발 생균제에 대한 스크리닝 검사법 확립(위탁: 서울대학교)	100	후보 생균제로 선정된 생균제의 배양액을 이용하여 이유자돈에서 설사를 유발하는 대장균 (10종)과 부종병을 유발하는 대장균 (5종)의 성장 억제 능력 평가 완료
		○ 선정된 개발 생균제의 안전성 검사 (위탁: 서울대학교)	100	선정된 개발 생균제로 선정된 5개의 유산균을 각각 2두씩의 이유자돈 (4주령)에 구강으로 2 ml (1×10^9 CFU/ml)을 접종하여 3주간 질병 발병 양상을 확인 완료

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2013)	선발 균주의 발효 조건 탐 색(주관)	○ 선발균주의 최적 성장을 위한 배지조성 및 발효 조건 조사	100	선발균주의 액상발효 및 고상발효 조건에서의 배지조성, 배양온도, 초기 수분함량에 대한 기초실험을 완료하였으며, 이를 바탕으로 선발된 15종 균주 모두에 대한 혐기 및 호기발효 실험을 통해 최적 발효조건 확립
		○ 선발균주의 유효 물질 생산증대를 위한 발효 조건 탐색	100	선발균주의 특성 평가를 통해 유용물질을 PLA(phenylactic acid)함량을 설정하고 기초 발효실험결과를 토대로 유용물질 함량을 기준으로 발효형태(액상, 고상발효), 발효방식(호기, 혐기발효), 전구물질 첨가 등 액상 및 고상발효 조건에서 유용물질을 다량 생산할 수 있는 발효조건 조사 완료
		○ 선발 균주의 pH 및 열안정성 조사	100	유용물질을 다량생산 하는 선발균주 4종에 대한 pH 및 열안정성 조사 완료
	CMO 운영방 안 조사(주관)	○ 축산분야 미생물제제 생산 현황 및 생균제품의 유효성 조사	100	현재 축산분야 주요 생균제 제품의 6개월간 평가를 통해 균수 유효성 조사 완료
		○ 생균제 생산공정의 표준화	100	주요 생균제인 <i>Aspergillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Lactobacillus</i> 속에 대한 5batch 이상의 고체발효 공정을 통해 생산공정 표준화 완료
		○ 위탁 생산 시설 및 제품을 통한 농가 서비스 범위 결정	100	위탁 생산시설 및 제품을 통한 농가의 애로사항 및 개선방향등이 반영된 분석지원서비스 및 제품개발/생산 대상 및 범위 결정
		○ 개발 기술의 수요처 확보 및 잠정 수요처 확보 방안조사	100	개발기술의 일부 수요처 확보를 통해 제품개발 및 생산업무 (3건 진행-1건 완료/ 2건 진행 중), 분석지원업무(32건 진행 완료)가 진행되고 있으며, 국내(4개 업체), 국외(1개 업체)를 잠정 수요처로 확보하였음.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구범위
2차 년도 (2014)	CMO 위탁 생산시설 구축을 위한 생균제 생산 공정 표준화 (주관기관)	선발 유산균 균주 및 대표 생균제 균주인 바실러스, 효모, <i>A. oryzae</i> 균주에 대한 대량생산 공정 확립 및 생산 공정단계별 품질평가 기준 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생균제 대표 균주(유산균, 바실러스, 효모)에 대한 액상 발효 공정 확립 ○ 생균제 대표 균주(유산균, 바실러스, 효모, <i>A. oryzae</i>)에 대한 고체 발효 공정 확립 ○ 위탁 생산을 위한 Lab - pilot - plant 단위로 생산 scale up 조건 및 고상발효를 통한 대량 생산 공정 확립 ○ 생균제 제품화를 위한 생산 공정 단계별 유효성분 및 균수 평가를 통한 품질평가 기준 확립
	개발 생균제의 안정성 확보 (주관기관)	공정 표준화를 통해 생산된 대표 생균제의 균주별 저장 안정성 및 내산성, 내열성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생균제 균주별 저장 안정성 시험을 진행하여 실용화 가능성을 확인 ○ 단위동물의 위산에 대한 저항 및 사료 가공 시 가열에 의한 생균제의 역가 보존정도 조사
	생균제 위탁생산을 위한 GMP 인증준비(주관기관)	GMP 인증 및 생산공정 적용을 위한 GMP 공정서 구축	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ GMP 공정을 활용한 생균제 생산을 위해 GMP 공정서 구축
	개발 생균제의 안전성 확보 시험 (위탁기관: 건국대학교)	선발 유산균 투여 여부 및 경로에 따른 안전성 및 닭의 생산성 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산업 가축에 대한 선발 유산균의 실험실내 안전성 및 생산 지수 평가
		선발 유산균 투여에 따른 식중독 원인 살모넬라와 가금티푸스의 배출 억제 및 폐사를 감소 여부 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 닭의 가금티푸스 발병모델 및 식중독 원인 살모넬라 감염 모델에서의 선발 유산균제제의 항병성 평가

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구범위
2차 년도 (2014)	양돈에서 장내 세균 질병 억제 생균제 소재 개발 및 효과 규명 (위탁기관: 서울대학교)	이유자돈 대장균 설사증에 대한 후보 개발 생균제의 효과 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 공격 접종을 통하여 이유자돈 대장균 설사에 대한 후보 개발 생균제의 효과를 규명한다. ○ 공격 접종 후에 이유자돈에서 병원성 대장균의 분변으로 분비 정도를 중합효소 연쇄반응을 통하여 분석한다. ○ 공격 접종 종료 후에 부검을 통하여 이유자돈 소장과 대장에서 병변을 관찰한다.
		이유자돈 부종병에 대한 후보 개발 생균제의 효과 규명	100	<ul style="list-style-type: none"> ○ 공격 접종을 통하여 이유자돈 대장균에 의한 부종병에 대한 후보 개발 생균제의 효과를 규명한다. ○ 공격 접종 후에 이유자돈에서 병원성 대장균의 분변으로 분비 정도를 중합효소 연쇄반응을 통하여 분석한다. ○ 공격 접종 종료 후에 부검을 통하여 이유자돈의 뇌와 소장, 대장에서 병변을 관찰한다.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도 (%)	연구범위
3차 년도 (2014)	CMO 운영방안 확립 (주관기관)	생균제 생산공정 표준화 및 관련 설비관리 기준 확립을 통한 위탁생산시설 운영방안 확립	100	○ 생균제 생산 공정의 표준화 및 품질관리 기준 확립 (원료입고 부터 최종제품 출고까지 전체 과정) ○ 위탁생산 시설 및 제품을 통한 제품생산/분석 서비스 범위 결 정 ○ 중점관리기준 설정 및 수시 모 니터링 실시 ○ CMO 운영방안 확립
	생균제 생산 GMP 인증 (주관기관)	개발 제품 생산라인에 대한 GMP 인증	100	○ 생균제 제품 생산에 대한 GMP+ FSA 인증 완료
	수익 창출 (주관기관)	위탁생산시설, 제품의 사업 화	100	○ 개발 제품의 기술이전 및 상품 화를 통한 수익 창출
	개발제품의 산업가축 에 대한 유효성 검증 (위탁기관: 건국대학 교)	살모넬라 증에 대한 개발 생 균제의 효과 규명을 위한 야 외 임상 실험	100	○ 개발 제품의 야외 임상실험을 통해 개발생균제의 효능 평가 완료
	양돈에서 장내 세균 질병 억제 생균제 소 재 개발 및 효과 규 명 (위탁기관: 서울대학 교)	대장균 설사증에 대한 개발 생균제의 효과 규명을 위한 야외 임상 실험	100	○ 실제 야외 임상에서 대장균 설 사병이 심한 돼지를 대상으로 3~10주령동안 분변, 일당중체 량, 조직 내 병변 검사를 통한 개발생균제의 효능 평가 완료

본 연구는 동물용 생균제의 위탁생산시설 (CMO) 구축하기 위한 과제로서 실제 동물용 생균제를 생산하고 기능성을 평가하는 과정을 함께 진행함으로써 실제 사료회사 및 농가에서 요구하는 제품을 보다 용이하게 위탁생산할 수 있는 기술 및 대학 기관과의 네트워크 구축을 완료하였다.

1차년도에서는 생균제로 개발하기 위한 미생물 균주를 자연계 샘플에서 분리/동정하여 특성을 평가하고 가축 질병예방에 가장효과적인 균주선발을 완료하였다. 또한, 선발균주에 대한 실험실 수준 및 pilot scale 수준에서의 발효조건을 확립하고 유용물질 생산에 대한 기초연구를 수행하였다. 또한, 시중에 유통 중인 동물용 생균제를 수거하여 실제 제품 품질을 평가함으로써 시중에 유통 중인 제품의 품질수준을 확인할 수 있었다. 위탁기관에서는 선발균주를 대상으로 돼지 및 닭에서의 안전성 평가 및 실제 농가에서 만연해있는 질병에 대해 *in vitro* 및 실험실 규모의 *in vivo* 실험을 통해 후보 균주 중 질병예방에 가장효과가 있는 균주선발을 완료하였다. 그 결과 이유자돈의 대장균 설사증 예방에 가장효과적인 균주, *L. plantarum* 1-3 균주 및 양계 살모넬라증 예방에 가장효과적인 균주, *L. plantarum* 6-5 균주를 각각 선발을 완료하였다.

2차년도에서는 위탁생산시설을 활용한 생균제의 대량생산을 위해 생균제로 가장 많이 사용되는 대표 균주인 유산균, 효모, 바실러스, *A. oryzae* 균주에 대한 액상발효공정 및 고체발효공정을 이용한 대량생산공정을 확립하였다. 이 과정에서 품질적인 측면에서 영향을 미칠 수 있는 다양한 변수를 확인하고 단계별 품질지표 설정에 대한 기초연구를 수행하였다. 위탁기관에서는 1차년도 선발균주를 대상으로 시제품 형태의 제품을 제조하여 실험실 규모에서 *in vivo* 평가를 실시하였다. 이 과정에서는 이유자돈 및 산란계/육계에서의 질병모델 확립하고 선발균주의 급이를 통한 안전성 평가 및 효능 평가를 실시하여 양돈 및 양계 세균성 질병에 대한 평가 방법 확립을 완료하였다. 또한, 최종 제품화를 위해 선발균주에 대한 쥐 경구독성 평가를 통해 생균제로 활용가능한 안전한 균주임을 확인하였다.

3차년도에서는 위탁생산시설로서의 국내 및 국외 기준에 맞는 발효제품 생산을 위해 GMP+FSA 인증을 국내 사료회사 최초로 완료하여 이를 통해 국제 수준의 품질을 가진 안전한 생균제 생산의 기틀을 마련하였다. 위탁기관에서는 개발제품의 기능성 평가를 위해 야외 임상 시험을 수행하여 대장균 설사증이 있는 농장에서의 개발제품에 대한 평가에서는 긍정적인 결과를 확인할 수 있었다. 생균제의 특성상 단기 급이를 통한 효과 검증보다는 지속적인 급이를 통해 실제 질병예방효과에 대한 추가 검증이 필요할 것으로 판단된다. CMO사업화 측면에서 다양한 제품의 위탁생산 및 기술지원을 통해 수익을 창출하고 있으며, 향후 관련 시장에서의 꾸준한 성장 및 매출증대가 기대된다.

결론적으로 본 연구를 통해 질병예방에 효과적인 균주를 선발하고 이를 이용한 생균제 제조 및 기능성 평가에 대한 전체적인 기본 프레임 구축을 완료하였으며 실제 생균제로 주로 사용되는 균주에 대해서도 액상발효 및 고체발효공정을 통해 제품화 공정을 확립함으로써 품질 표준화 생산공정 확립을 통한 균일한 품질의 제품생산이 가능하게 되었으며, 실제 축산농가에 경제적 손실을 유발하는 세균성 질병에 대한 생균제의 효능 검증 방법에 대한 모델 확립을 통해 다양한 제품의 평가를 용이하게 지원할 수 있을 것이다. 또한, 생균제의 GMP 인증을 통해 미국 및 유럽시장에의 수출의 기회도 확대될 것으로 기대되며, 이러한 기 구축된 설비 및 기능성 검증 모델 활용한 영세 생산업체의 제품화 활용을 통한 사업화 및 수출기회 확대에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발성과

1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분		특 허		사 업 화		홍보 전시회	유전자원 등록	논 문	
		출원	등록	상품화	CMO 사업화			SCI	비 SCI
1차년도	목표					1	4		
	달성					1	4		
2차년도	목표	1		1		2	2	1	0
	달성	1		3		2	2	0	1
3차년도	목표	4		1	1	2		2	2
	달성	4		2	4	2		2(1)	(1)
계	목표	5		2	1	5	6	3	2
	달성	5		5	4	5	6	3	2

가. 특허 성과

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2014	생균제 기능을 지니는 신규 식물성 단백질 공급원	(주) 진바이오텍	대한민국	10-2014-0160921
2015	생균제 기능을 지니는 신규 천연 소독제	(주) 진바이오텍	대한민국	10-2015-0175274
2015	특정 유산균 균주를 활용한 농장 특화용 천연소독제	(주) 진바이오텍	대한민국	10-2015-0181105
2015	유산균 균주를 포함하는 생균제	(주) 진바이오텍	대한민국	10-2015-0181313
2015	양돈용 기능성 생균제	(주) 진바이오텍	대한민국	10-2015-0181319

나. 논문게제 성과

투고연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2014	Intranasal administration model for evaluating protection against Influenza virus in mice	Soo-Won Choi	Chang-Seon Song	Ha-Na Youn, Wootack Hong, Jae-Keun Park, Seong-Su Yuk, Jung-Hoon Kwon, Jin-Yong Noh, Jung-Sun Kang, Kyung-Jin Cho, Jeoung-Jin Ryu, Joong-Bok Lee, Seung-Yong Park, In-Soo Choi, Sang-Won Lee	The Journal of Bacteriology and Virology	45(1)	국내	비SCI
2015	Inhibition of in vitro growth of porcine enterotoxigenic and shiga toxin-producing Escherichia coli by Lactobacillus plantarum strains	Changhoo Park	Chanhee Chae	Jiwoon Jeong, KYUHYUNG Choi, JAE CHUL Lee, OH SUNG Kwon, SUNG-HOON Kim,	Acta Veterinaria-Beograd	65(3)	국외	SCI
2015	In vivo Activity of Lactobacillus plantarum on Reduction in Enterotoxigenic Escherichia coli and Shiga Toxin-Producing E. coli in Postweaning Pigs	Changhoo Park	Chanhee Chae	Jiwoon Jeong, Kyuhyung Choi, Duck-Il Shin, A Rong Jeong, Sung-Hoon Kim	Thai J Vet Med	45(3)	국외	SCI
2015	Oral administration of lactobacillus confers beneficial effects against Salmonella infection in mice and chickens	Soo-Won Choi	Chang-Seon Song	Ha-Na Youn, Jae-Keun Park, Seong-Su Yuk, Erdene-Ochir TO, Jung-Hoon Kwon, Jin-Yong Noh, Soo-Won Choi, Woo-Tack Hong, Jung-Sun Kang, Kyung-Jin Cho, Joong-Bok Lee, Seung-Yong Park, In-Soo Choi, Sang-Won Lee	Poultry Science	Under Review	국외	SCI
2015	1일령 육계에서 유산균계 투여로 살모넬라의 장관내 정착력 평가	홍우택	송창선	권경빈, 강정선, 조경진	한국가금학회지	Under review	국내	비SCI

다. 유전자원 등록 (6건)

생명자원명	균주 등록번호
<i>Lactobacillus plantarum</i> GB-PLA1	KCCM11452P
<i>Lactobacillus plantarum</i> GB-PLA2	KCCM11453P
<i>Pediococcus pentosaceus</i> CM02	KCCM11600P
<i>Lactobacillus plantarum</i> GB-PLA2-6	KCCM11460P
<i>Bacillus subtilis</i> CM01	KCCM11599P
<i>Lactobacillus plantarum</i> GB-PLA1-3	KCCM11459P

라. 상품화 및 위탁생산 실적

No	제목	세부내용	상품화 (사업화)	CMO사업화
1	내열성 균주를 포함하는 생균제 개발 (제품명: NF-8, Lacto-P)	- 저가 단백질원 및 펠렛가공 용 내열성 생균제 개발 완료 - 양계 사양시험을 통한 개발제품 기능성 평가 완료	상품화 완료	
		- 발효균주 및 생산기술 지원, 제품분석 지원		CMO사업화 (완료, -기술이전), (해외 MOU 체결-2건)
2	천연소독제 개발	- 천연 소독제 개발을 위한 발효 공정(유산균, 효모) 확립을 통해 시제품 생산 완료	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중)
3	수산용 생균제 개발 (제품명: AquaPro S, AquaPro W)	- 액상발효 고농축 생균제 제조공정을 통해 시제품 생산 (기준: 유산균, 효모, 바실러스 각 1.0×10^9 cfu/g 이상)	상품화 완료	해외 MOU 체결
4	고농축 생균제 생산 (LP-10, BL-10, PP-10)	- 액상발효 고농축 생균제 제조공정을 통해 제품 생산/공급 (기준: 유산균 3.0×10^{10} cfu/g 이상) - 신규 생균제 제품개발	상품화 완료	국내 MOU 체결
5	애견사료 개발	- 탄수화물 source를 이용한 <i>A. oryzae</i> 생균제 개발		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
6	축사환경개선용 미생물 제제 개발 (제품명: 락토플랜-아몬드피)	- 아몬드피를 활용한 유산균 생균제 개발		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
7	곰팡이 독소 저감제 개발	- 곰팡이 독소 분해/저감제 개발		CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
8	기능성 생균제 개발	- 양계용 생균제 개발	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
		- 양돈용 생균제 개발	상품화 (예정)	CMO사업화 (진행 중) (해외 MOU 체결)
9	소독제 개발	- 신규 소독제 개발 및 공동마케팅		CMO사업화 (국내 MOU 체결)
10	<i>Aspergillus</i> 종균 개발	- 고체발효용 종균 생산/공급	상품화 완료	
11	생균제 생산 지원	- 발효균주 및 생균제 생산/품질 관리기술 지원		CMO사업화 (진행 중, 기술이전), (해외 MOU 체결)
12	축우용 유산균 발효촉진제 개발	- 축우용 유산균 발효촉진제 개발	상품화 완료	
13	복합생균제 생산 (제품명: Glukozy m)	- 유산균, 효모, 바실러스 균주로 구성된 복합생균제 생산 (매월 20톤 이상 생산)		CMO사업화 (완료, 위탁생산)
14	기능성 생균제 생산	- 미세조류 혼합 생균제 생산 (제품화 가능성 평가 중)		

* 시제품 및 생산제품 내역

▶ 시제품 생산



▶ 자체 제품화



▶ 위탁생산



마. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해년도 징수액	향후 징수액	합계
2,256,000	-	-	2,256,000

바. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
기술실시 및 자체 제품화	단백질 공급원 개발 (NF-8, Lacto-P)	CTC Bio Vina/ (주)진바이 오텍	이찬호	40	제조	2,256,000	56,048,750	58,304,750
자체 제품화	유산균 고농축 생균제(LP-10, BL-10, PP-10)/ 수산용 생균제 (AquaPro S, AquaPro W)	(주)진바이 오텍	이찬호	40	제조	7,360,000	9,280,000	16,640,000
자체 제품화	유산균 생균제 (축우)	(주)진바이 오텍	이찬호	40	제조	28,000,000	-	28,000,000
위탁생산	축사환경 개선 제(락토플랜-아 몬드피)	(주)진바이 오텍	이찬호	40	제조	-	10,909,092	10,909,092
위탁생산	복합 생균제 생산 (Glukozyum)	(주)진바이 오텍	이찬호	40	제조	-	18,000,000	18,000,000

사. 인력활용/ 양성 성과

1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
4	1	1	2		4		4		

- 서울대학교 : 박창훈(박사), 건국대학교 : 최수원(석사), 권경빈(학사), 이지호(학사)

아. 홍보 실적

행사명칭	전시/홍보내용	장소	일자
위탁생산시설 및 제품 홍보 (자체 세미나)	위탁생산시설/ 생균제	(주)진바이오텍	2013. 3. 22
IPPE 2014 (International Production and Processing Expo)	위탁생산시설/ 생균제	Atlanta, USA	2014. 1. 28 ~ 30
Iowa Pork Congress 2014	위탁생산시설/ 생균제	Des Moines, USA	2014. 1. 22 ~ 23
2014 World Pork Expo	위탁생산시설/ 생균제	Des Moines, USA	2014. 6. 4 ~ 6
IPPE 2015	위탁생산시설/ 생균제	Atlanta, USA	2015. 1. 27 ~ 29

2. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
목표	1	2		3	3	
활용건수	2	5		3	3	

가. 기술실시(이전)

- 1) 생균제 제조공정(개발제품) 기술실시 : 위탁생산시설을 활용한 제품의 생산종균 및 생균 기술 이전 (CTC Bio Vina, 베트남)
- 2) 생균제 대량생산 기술실시 : 개발 생균제의 대량생산 공정을 위한 생산기술 및 품질관리 기술 이전 (Nutraferma Inc, 미국)

나. 상품화

- 1) 제품 개발/생산 의뢰를 통해 개발 및 생산된 제품에 대한 상품화를 완료하였음 (5건 완료).
- 2) 양돈 및 양계용 질병 예방용 생균제 제품: 생산공정 확립을 완료하고, 제품 출시를 위한 마케팅자료 준비 단계 임 (2건 진행 중).

다. 교육지도

- 1) 제품 생산을 위한 생산공정 및 제품 분석을 위한 품질관리 교육 (3회): CTC Bio Vina. (2회) 및 Nutraferma Inc. (1회)

라. 언론홍보

- 1) GMP+FSA 인증 (축산신문, 2015. 5. 13/ 축산경제신문, 2015. 07. 17, 2회)
- 2) 인터넷 홍보 (위탁생산시설 구축: www.genebiotech.co.kr)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 사료첨가제 시장 및 기술동향

1. 사료첨가제 시장 동향

세계 사료첨가제 시장은 약 5.1%의 성장률을 나타내며, 2019년 약 173억불의 규모를 가질 것으로 예상된다.

전 세계 사료첨가제 시장의 85% 이상은 북미와 유럽에 집중되어 있으며, 아시아-태평양 지역의 경우, 소득 수준 향상과 육류 소비량이 증가함에 따라 지속적으로 증가할 것으로 예상된다. 타깃 동물에 따라서 시장 점유율을 살펴보면, 약 73.4%는 돼지 또는 닭 사료용이며, 그 외 소(19.2%), 수중배양/애완동물 등(7.4%)이 그 뒤를 따른다. 특히 애완동물 관련 산업과 사료첨가제 시장을 밀접하게 연관되어 있다. 2010년 이후 경기 침체기에도 애완동물 관련 물품의 지출액은 계속 증가되었고, 이는 가족 규모 축소에 따라 애완동물의 수요가 증가하고, 애완동물이 반려 동물이 되어 가는 현상과 무관치 않다. 소비자의 취향이 고급화되면서 애완동물의 건강을 고려한 고품질 사료 소비가 증가하는 것도 사료첨가제 시장을 성장시키는 원인 중 하나이다. 국내 사료첨가제 시장은 2013년 기준 약 2,587억의 규모를 나타내고 있으며, 이는 해외 시장 대비 약 2%의 시장 비율을 나타낸다.

2012년 기준 국내 수입 사료첨가제 규모를 살펴보면, 미네랄과 비타민의 경우 각각 약 5백만 달러이고 증가세에 있는 반면, 항생물질의 경우 4.2백만 달러에서 점차 감소되는 추세다. Novus, Evonik과 같은 유럽과 미국의 해외 주요 업체는 합병과 통합을 통해 관련 사업을 수직/수평 계열화 시키고 있다. Cargill (배합사료 선두업체)이 Provimi (사료 첨가제 선두업체)를 인수한 것도 이와 같은 맥락이다.

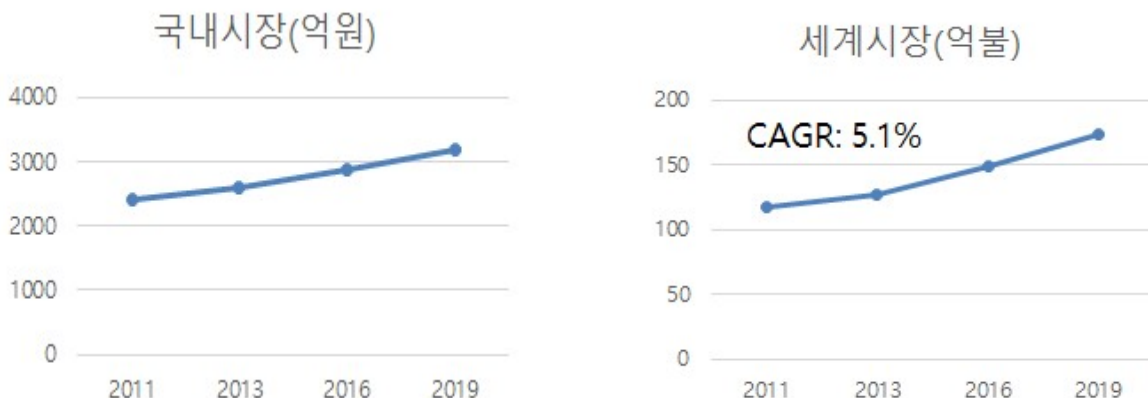


그림 110. 사료첨가제 시장 (국내 및 국외시장, 농협경제연구원, 2013)

2. 사료첨가제 기술 동향

사료첨가제는 배합사료와 비슷하게 배합기술과 가공기술, 품질 확보 및 평가 기술에 의해 제조되며, 사료 혹은 사료첨가제 원료의 경우 수 년 이상의 개발 기간이 필요하나 원료를 조합하거나 배합하는 기술은 상대적으로 기술 레벨이 낮아 수 개의 선두업체를 제외한 다수의 중소 기업이 진출, 경쟁하고 있다. 국내의 경우 코페벤스페셜, 미래자원ML, 제일바이오, 이지바이오, CTCBio, 아미바이오, 진바이오텍, 대호 등이 선두업체이며, 최근 5년 국내 업체의 활발한 연구 개발을 통해 해외 선두 업체의 70~80% 기술 수준에 육박하고 있으며, 관련 제품 매출도 지속적으로 증가하고 있다. 2010년 Novus와 CTCZyme 글로벌 판권 계약으로 Novus 판매망과 아웃소싱 네트워크를 활용하고 있는 CTCBio는 생균제, 효소제 계통의 면역 강화제를 개발하였고, 주정제조 부산물에 생균제를 접종한 고품질 기능성 생균제, 효모제를 개발하였다. 세계 최대 배합 기술업체인 Format Int'l과 독점 계약을 맺고 국내 대다수 배합 사료 업체에 기술 용역을 제공하고 있는 이지바이오는 발효 및 가공 천연제제를 독자 개발하여 항생제를 대체 하고 면역력을 증강하는 제품을 개발하고 있다.

향후 사료첨가제 산업은 가격 경쟁력, 원료 수급력, 효과적인 공급망, 기능성, 위생적 축산물에 대한 소비자의 요구에 따라 다양한 제품과 맞춤형 제품의 개발로 대응해야 할 것이다. 특히 사료첨가제의 기능적 특성상 단미사료와 대비하여 효능과 기능이 중요한 경쟁 요소이므로 제품 효능에 대한 기술 마케팅이 중요하고 판매 전후 지속적인 기술 설명과 제사한 지도의 제공이 필수적이다. 또한, 제조 산업은 단미사료, 배합사료와 마찬가지로 환경오염 및 생산 비용을 최소화하는 방향으로 제조 기술이 고도화될 필요가 있을 것이다.

제 2 절 국외 CMO 동향

국내외 CMO 시장은 현재까지 바이오, 제약분야에서 활성화되어 있으며, 글로벌 제약 CMO 시장은 세계 의약품 시장규모의 약 3% 내외로 추정되나, 연평균 성장률 10.8%로 매우 빠른 성장세를 보이고 있다. CMO 시장의 성장은 제네릭 확산 및 의약품 특허만료 증가, 생물제제 소비 증가 및 바이오 시뮬러의 시장 진입에 따라 더욱 커질 것으로 예상되고 있다. 한국보건산업진흥원의 '글로벌제약 CMO 동향과 전망' 보고서에 따르면 세계 제약기업의 전체 제조비용은 연간 1500억~1900억달러에 이를 것으로 추산되고 있으며, 이로 인해 CMO가 더욱 발달할 것이라고 예상하고 있다. 제약분야에서의 CMO활용 요인으로는 기술·설비(30%), 비용절감(22%), 사업성장(16%), 효율성(12%) 확보 순으로 기술설비활용 및 비용절감 측면이 아웃소싱을 하는 중요 요인으로 분석되고 있다.

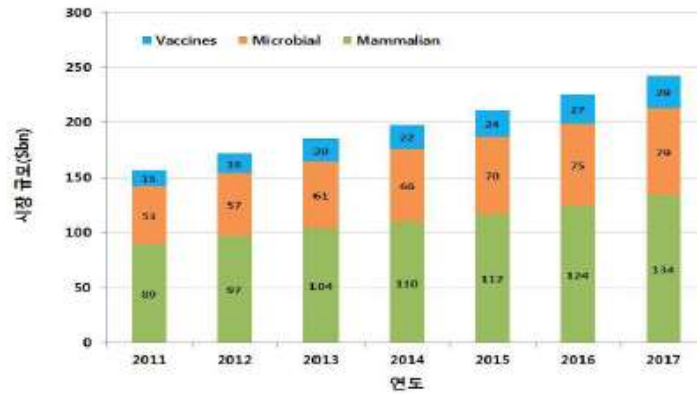


그림 111. 세계 바이오의약품 CMO 시장 전망

(The Contract Biomanufacturing Market Outlook to 2017, Datamonitor(2013.2))

글로벌 CMO시장은 미국, EU-5(영국, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인) 등 선진국이 약 68%로 높은 점유율을 보이고 있으나, 근래 중국, 인도 등 이머징마켓(emerging market)과 동유럽 국가가 점유율을 빠르게 확대하는 추세이다.

반면, 농식품 분야는 민간부문의 연구기반이 취약한 구조적 한계가 있어 농림수산식품 산업의 민간 R&D 기반구축 및 투자활성화 촉진을 위한 CRO 전문기관과 생산 기술·시설 서비스를 담당할 CMO전문기관에 대한 육성의 필요성이 증대되고 있으며, 관련시장도 꾸준히 증가할 것으로 기대된다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음.

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

가. 연구실 안전조치

1) 실험실 안전 점검 체계

점검구분	점검내용	실시주기	점검주체
일상점검	연구실정리/정돈상태 재료,시약식별표부착상태 실험기기및재료이상유무	매일	연구원
월간점검	연구실시설외관상태점검 일상점검일지및안전교육대장 MSDS등안전자료점검	매월	연구소장
정밀진단	시약, 전기, 기계, 가스 등 각 분야 전문가에 의한 점검	2년	전문기관

○ 연구실 일상점검 실시

- 연구활동종사자가 육안으로 연구활동 시작 전 매일 1회 실시

○ 연구실 정밀안전진단 실시

- 연구시설 및 유해화학물질 관리를 포함한 정밀 안전진단을 외부 전문기관에 의뢰하여 진행하며, 그 결과에 따라 보완을 실시함.

2) 연구실안전관리규정 작성 : 연구실 안전관리 규정 준수 여부 수시 점검

나. 보험 가입 현황

- 매년 주관부서에서 갱신

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
일반상해보험	상해사망, 후유장해 : 1.5억원 상해 의료실비 : 실비	연구원	경영지원팀

다. 연구활동종사자 건강검진 실시

- 소속 연구원 대상 매년 정기 건강검진 실시

라. 추가 이행

- 1) 연구실환경개선공사 : 연구실 정기점검결과를 근거로 문제점 개선 및 연구시설 안전 확보에 만전을 기하고 있음.
- 2) 실험실 폐기물처리 : 별도 보관 후 외부 처리업체에 위탁처리 실시

제 9 장 참고문헌

Aboubakr HA, El-Banna AA, Youssef MM, Al-Sohaimy SA, Goyal SM. (2014) Antiviral Effects of *Lactococcus lactis* on Feline Calicivirus, A Human Norovirus Surrogate. *Food Environ Virol.*

Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF. (2011) Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol* 34:148-55.

Baker DR, Billey LO and Francis DH (1997) Distribution of K88 *Escherichia coli*-adhesive and nonadhesive phenotypes among pigs of four breeds. *Vet Microbiol.* 54: 123132.

Beaver BV, Reed W, Leary S, McKiernan B, Bain F, Schultz R, Bennet BT, Pascoe P, Shull E, Cork LC, Francis-Loyd R, Amass KD, Johnson R, Schmidt RH, Underwood W, Thornton GW and Kohn B (2001) 2000 Report of the AVMA panel on euthanasia. *J Am Vet Med Assoc.* 218: 669-696.

Beaulieu L, Groleau D, Miguez CB, Jette JF, Aomari H, Subirade M. (2005) Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material. *Protein Expr Purif* 43,111-125

Bosi P, Casini L, Finamore A, Cremokolini C, Merialdi G, Trevisi P, Nobili F and Mengheri E (2004) Spray-dried plasma improves growth performance and reduces inflammatory status of weaned pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J Anim Sci.* 52: 1764-1772.

Brown M (2011) Modes of action of probiotics: recent developments. *J Anim Vet Adv.* 10: 1895-1900.

Chang Y-H, Kim J-K, Kim H-J, Kim W-Y, Kim Y-B and Park Y-H (2001) Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 80: 193-199.

Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. (2011) Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol* 149:185-93.

- Chapman CMC, Gibson GR. (2013) Comparative in vitro inhibition of urinary tract pathogens by single- and multi-strain probiotics. *Eur J Nutr* DOI 10.1007/00394-013-0501-2
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock EW. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat protoc* 3, 163-175
- Chiu SS, Lo JY, Chan KH, Chan EL, So LY, Wu P, *et al.* (2014) Population-based hospitalization burden of influenza A virus subtypes and antigenic drift variants in children in Hong Kong (2004-2011). *PLoS One* 9:e92914.
- de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, Hu J, Lei Y, Li N, ToomingKlunderud A, Heederik DJJ, Fluit AC, Bonten MJM, Willems RJL, de la Cruz F and van Schaik W (2014) Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and human by specific plasmid lineages. *PLoS Genet.* 10: e1004776.
- Guarner F1, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, *et al.* (2012) World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. *J Clin Gastroenterol* 46:468-81.
- Guerra-Ordaz AA, Gonzalez-Ortiz G, La Ragione RM, Woodward MJ, Collins JW, Perez JF and MartinOrue SM (2014) Lactulose and *Lactobacillus plantarum*, a potential complementary synbiotic to control postweaning colibacillosis in piglets. *Appl Environ Microbiol.* 80: 4879-4886.
- Fairbrother JM and Gyles CL (2012) Colibacillosis. In: *Diseases of Swine* JJ Zimmerman, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, and Stevenson GW (ed.) West Sussex, UK 723-749.
- Fensterl V, Sen GC. (2009) Interferons and viral infections. *Bio Factors* 35:14-20.
- Fooks LJ, Gibson GR (2002) In vitro investigation of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiol Ecol*, 39: 67-75.
- Franz CM, Huch M, Mathara JM, Abriouel H, Benomar N, Reid G, *et al.* (2014) African fermented foods and probiotics. *Int J Food Microbiol* 190:84-96.
- Haarman M and Knol J (2006) Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol.* 72: 2359-2365.

Harata G, He F, Hiruta N, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, *et al.* (2010) Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. *Lett Appl Microbiol* 50:597-602.

Hori T, Kiyoshima J, Shida K, Yasui H. (2011) Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* Shirota on influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 8:593-7.

Huang C, Qiao S, Li D, Piao X and Ren J (2004) Effects of *Lactobacillus* on the performance, diarrhea incidence, VFA concentration and gastrointestinal microbial flora of weaning pigs. *Asian-Austr J Anim Sci.* 17: 401-409.

Imberechts H, de Greve H, Schlicker C, Bouchet H, Pohl P, Charlier G, Bertschinger H, Wild P, Vandekerckove J, van Damme J, van Montagu M, Lintermans P (1992) Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which cause edema disease in pigs, and nucleotides sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, *fedA*. *Infect Immun* 60: 1963-1971.

Jang SE, Hyun YJ, Oh YJ, Choi KB, Kim T, Yeo IH, *et al.* (2011) Adhesion Activity of *Lactobacillus plantarum* PM 008 Isolated from Kimchi on the Intestine of Mice. *J Bacteriol Virol* 41:83-90.

Jin D, Kim BW, Cho HC, Yoon SS, Park YS, Kim SK. (2010) Immunoregulation of Murine Immunocytes to Bifidobacteria Strain Isolated from Feces of Healthy Korean Children: IL-10 Release and Proportional Change of CD4+CD25+ Cells. *J Bacteriol Virol* 40:171-7.

Kaboosi H. (2011) Antibacterial effects of probiotics isolated from yoghurts against some common bacterial pathogens. *Afr J Microbiol Res* 5:4363-7.

Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, Koutsonanos D, Hua T, Nakaya HI, *et al.* (2011) Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 470:543-7.

Katarína K, Peter R, Herbert S, Martina B, Balász K (2014) Influence of beta-glucan and vaccination against *Lawsonia intracellularis* on selected immune indices in weaned piglets. *Acta Vet-Beograd* 64:105-114.

Konstantinov SR, Smidt H, Akkermans ADL, Casini L, Trevisi P, Mazzoni M, De Filippi S, Bosi P and de Vos WD (2008) Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS Microbiol Ecol.* 66: 599-

607.

König R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, *et al.* (2010) Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 463:813-7.

Kwon D, Choi C, Jung T, Chung H-K, Kim J-P, Bae S- S, Cho W-S, Kim J and Chae C (2002) Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F41 and F18) and toxins (LT,STa, STb and STx2e) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhea or oedema disease in Korea. *Vet Rec.* 150: 35-37.

Kwon, D, Kim O, Chae C (1999) Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and of O serogroups in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *J Vet Diagn Invest* 11: 146-151.

Lee JS, Awji EG, Lee SJ, Tassew DD, Park YB, Park KS, Lim MK, Kim B and Park SC (2012) Effect of *Lactobacillus plantarum* CJLP243 on the growth performance and cytokine response of weaning pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Anim Sci.* 90: 3709-3717.

Li GM, Chiu C, Wrammert J, McCausland M, Andrews SF, Zheng NY, *et al.* (2012) Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:9047-52.

Lim YJ, Jo YH, Kim HJ, Park JK. (2013) The Synergistic Effects of Antimicrobial Peptides on the Growth Inhibition of *Salmonella Typhimurium* through Imd Pathway in *Drosophila* Intestine. *J Bacteriol Virol* 43:120-30.

MacLeod DL, Gyles CL, Wilcock BP (1991) Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Vet Pathol* 28: 66-73.

Marques LRM, Peiris JSM, Cryz SJ, O'Brien AD (1987) *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol Lett* 44: 33-38.

Mesch GS, Schwirian KP, Kolobov T. (2013) Attention to the media and worry over becoming infected: the case of the Swine Flu (H1N1) Epidemic of 2009. *Sociol Health Illn* 35:325-31.

Murry Jr. AC, Hinton Jr. A, Morrison H. (2004) Inhibition of growth *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus*

salivarius and *Lactobacillus plantarum*. *Int J Poul Sci* 3, 603-607

Nemcová R, Bomba A, Gancarcikova S, Reiffova K, Guba P, Koscova J, Jonecova Z, Scirankova L and Bugarsky A (2007) Effects of the administration of lactobacilli, maltodextrins and fructooligosaccharides upon the adhesion of *E. coli* O8:K88 to the intestinal mucosa and organic acid levels in the gut contents of piglets. *Vet Res Commun*. 31: 791-800.

Oh MH, Lee SG, Paik SY. (2010) Antiviral Activity of *Lactobacillus* spp. and Polysaccharide. *J Bacteriol Virol* 40:145-50.

Puvanalingam A, Rajendiran C, Sivasubramanian K, Ragunathanan S, Suresh S, Gopalakrishnan S. (2011) Case series study of the clinical profile of H1N1 swine flu influenza. *J Assoc Physicians India* 59:14-6.

Ramos I, Bernal-Rubio D, Durham N, Belicha-Villanueva A, Lowen AC, Steel J, et al. (2011) Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response. *J Virol* 85:4421-31.

Reid G, Friendship R (2002) Alternatives to antibiotic use: probiotics for the gut. *Anim Biotechnol* 13: 97-112.

Rigobelo EE, Karapetkov N, Maestá SA, Avila FA and McIntosh D (2014) Use of probiotics to reduce faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep. *Benef Microbes*. 6: 1-8.

Rizzello V, Bonaccorsi I, Dongarrà ML, Fink LN, Ferlazzo G. (2011) Role of Natural Killer and Dendritic Cell Crosstalk in Immunomodulation by Commensal Bacteria Probiotics. *J Biomed Biotechnol*.

Servin AL (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2: 405-440.

Seyda C, Gökçen D, Mehtap Ünlü S (2014) Detection of several virulence properties, antibiotics resistance and phylogenetic relationship in *E. coli* isolated originated from cow mastitis. *Acta Vet-Beograd* 64:413-425.

Shoaf-Sweeney KD and Hutkins RW 2008. Adherence, anti-adherence, and oligosaccharides: preventing pathogens from sticking to the host. *Adv Food Nutr Res*. 55: 101-161.

Suo C, Yin YX, Wang LX, Song D, Wang X and Gu Q (2012) Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. *BMC Vet Res.* 8: 89.

Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1967) Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40: 722-756.

Uemura R, Sueyoshi M, Nagayoshi M and Nagatomo H (2003) Antimicrobial susceptibilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from pigs with edema disease in Japan. *Microbiol Immunol.* 47: 57-61.

West DM, Sprigings KA, Cassar C, Wakeley PR, Sawyer J and Davies RH 2007. Rapid detection of *Escherichia coli* virulence factor genes using multiplex real-time TaqMan PCR assays. *Vet Microbiol.* 122: 323-331.

Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J (2004) Characterization of multiple-antimicrobial-resistance *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J Clin Microbiol* 42: 3483-3489.

Yang OO, Kelesidis T, Cordova R, Khanlou H. (2014) Immunomodulation of Antiretroviral Drug-Suppressed Chronic HIV-1 Infection in an Oral Probiotic Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *AIDS Res Hum Retroviruses* 30:988-95.

Yang KM, Jiang ZY, Zheng CT, Wang L and Yang XF (2014) Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young. *J Anim Sci.* 92: 1496-1503.

Yoshida K, Nasu Y, Shitami N, Toyoda H, Takemura H, Oomuri K. (2009) A novel convenient method for high bacteriophage titer assay. *Nucleic acids symposium series No.* 53, 315-316

Youn HN, Lee DH, Lee YN, Park JK, Yuk SS, Yang SY, et al. (2012) Intranasal administration of live *Lactobacillus* species facilitates protection against influenza virus infection in mice. *Antiviral Res* 93:138-43.

Weichert S, Schrotten H, Adam R. (2012) The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. *Pediatr Infect Dis J* 31:859-62.

Widmer K1, Zhu Y, Williams JV, Griffin MR, Edwards KM, Talbot HK. (2012) Rates of hospitalizations for respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and influenza virus in older adults. *J Infect Dis* 206:56-62.

Wierup M (2000) The control of microbial diseases in animals: alternative to the use of antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 14: 315-319.

Zhang L, Xu YQ, Liu HY, Lai T, Maa JL, Wang JF and Zhu YH (2010) Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of piglet diarrhoea: Effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and immune responses. *Vet Microbiol.* 141: 142-148.

Zhang Y, Zhang L, Du M, Yi H, Guo C, Tuo Y, et al. (2011) Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiol Res* 167:27-31.

<첨부 1> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

신청과제명	동물용 생균제의 대량생산을 위한 위탁생산시설 구축		
주관연구책임자	이 찬 호	주관기관	(주) 진바이오텍

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
양계에서 생균제의 살모넬라 감염 억제	미국	70	90	95	
양돈에서 생균제의 대장균 감염 억제	미국	65	95	90	
고체발효 대량생산기술	일본	80	95	90	

- 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 비고란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		고체발효를 이용한 항균활성 보유 유산균의 대량생산 공정 개발	
Keyword		축산, 항생제 대체제, 생균제, 고체발효, 유산균	
검색건수		24	
유효특허건수		2	
핵심특허 및 관련성	특허명	- 박테리오신을 생산하는 유산균주 및 이를 함유하는 가축용 복합 생균제 조성물(10-2010-0030984)	사료 첨가물 및 그 제조 방법
	보유국	대한민국	일본
	등록년도	2010	2000
	관련성(%)	60	70
	유사점	항균활성 보유 유산균 발효물	고체발효를 이용한 생균제 제조방법
차이점	3종의 복합 유산균 혼합물로서 액상발효 후 동결건조 공정을 통해 제조. 안정성 및 경제성 측면에서 생산 및 적용에 한계가 있을 것임.	고체 원료배지를 사용하지 않고 음식물찌꺼기를 비롯한 콘스타치, 깻묵 등을 혼합하여 원료배지로 사용 소량생산에 적합할 것이나 상업화/제품화에 문제가 있을 것임.	

개발기술명		생균제의 살모넬라 감염 억제	
Keyword		닭, 생균제, 살모넬라	
검색건수		81	
유효특허건수		12	
핵심 특허 및 관련성	특허명	가금분변에서 분리한 항생제저항성 포도상구균과 살모넬라를 억제하는 신규유산균	
	보유국	대한민국	
	등록년도	2014	
	관련성(%)	50	
	유사점	살모넬라 억제 유산균	
차이점	본 특허에서는 생산한 생균제를 이용하여 살모넬라에 대한 항균성을 아가 확산 방법을 이용하여 실시하였지만 본 연구과제에서는 동물 발병 모델을 개발하고 그에 대한 <i>in vivo</i> 실험을 통해 생균제의 효과를 확인한 것이 다름		

- 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 DB(www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 5년간
검색범위	Solid state fermentation, antibiotic alternative, animal feed additive, Lactic acid bacteria

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		고체발효를 이용한 항생제 대체제 생산기술	고체발효 기술을 이용한 생균제 생산
Keyword		SSF, antibiotic alternatives, Lactic acid bacteria, animal feed, solid state fermentation, probiotic	Solid state fermentation, SSF, animal feed additive, lactic acid bacteria, probiotic, solid substrate
검색건수		268개	188 개
유효논문건수		1 개	1 개
핵심 논문 및 관련성	논문명	Characteristics of Solid-state Fermented Feed and its Effects on Performance and Nutrient Digestibility in Growing-finishing Pigs	Evaluation of Multi-microbial Probiotics Produced by Submerged Liquid and Solid Substrate Fermentation Methods in Broilers
	학술지명	Asian-Aust. J. Anim. Sci.	Asian-Aust. J. Anim. Sci.
	저 자	Jiankun Hu et al.	Y. H. Shim et al.
	게재년도	2008	2010
	관련성(%)	50 %	50 %
	유사점	고체발효물에 의한 양돈의 생산성 개선	액상 및 고체발효물에 의한 양계에서의 생산성 비교
	차이점	유산균, 효모, 바실러스의 혼합 단순 배양 및 유효물질 검증 안됨	유산균, 바실러스, 효모, 곰팡이의 혼합 단순 배양 및 유효물질 검증 안됨

- 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

개발기술명		생균제의 살모넬라 감염 억제	생균제의 대장균 감염 억제
Keyword		salmonella, infection, probiotic, chicken	<i>Escherichia coli</i> , infection, probiotic, pigs
검색건수		29	6
유효논문건수		10	2
핵심 논문 및 관련성	논문명	Oral administration of a combination of select lactic acid bacteria strains to reduce the Salmonella invasion and inflammation of broiler chicks.	Evaluation of <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG using an <i>Escherichia coli</i> K88 model of piglets diarrhoea: Effects pm diarrhoea incidence, faecal microflora and immune response
	학술지명	Poultry Science	Veterinary Microbiology
	저자	C.-Y. Chen 등	Lu Zhang 등
	게재년도	2012	2010 (141: 142-148)
	관련성(%)	80	40
	유사점	동물 모델을 이용하여 생균제의 살모넬라 감염에 대한 억제에 대한 연구를 하였다.	동물(돼지) 모델을 이용하여 생균제의 대장균 감염에 대한 억제에 대한 연구를 하였다.
차이점	이 시험은 6일간 진행되는 시험이고 한가지 유산균에 대해서만 진행가능한 반면, 본 연구에서는 만 하루에 시험이 끝나고 여러 가지 유산균을 비교할 수 있는 모델을 이용하였음.	이 시험은 포유자돈을 이용하여 실험을 실시하였는데, 현장에서 분석하면 생균제는 포유자돈에서는 실제적으로 투약하기가 매우 어렵다. 반면에 이유자돈에서는 사료 첨가를 통하여 쉽게 첨가할 수 있다. 본 실험의 경우 1가지 대장균에 대한 실험만 실시하여 다양한 대장균에 대한 효능을 평가하는데 제한이 있다.	

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

가) 동물용 생균제 시장 현황

① 동물용 의약품 분야

동물용 의약품 분야의 생균제 시장현황은 단일 균주 제품과 2 ~ 4종의 균주를 혼합한 제품으로 구성되어 있다. 2012년 동물약품협회 보고에 의하면 2011년 동물용 생균제품의 총 매출액은 32.3억이고 물량으로는 1,485.0톤이다. 동물용 생균제 품목은 총 98개 품목이 판매되고 있으나 이들 제품 중 주요 균주는 효모균주인 *Saccharomyces cerevisiae*로 판매 물량기준으로 MS 23.1%를 점유하고 있다. 그 외 균주에는 *Bacillus subtilis*와 *Lactobacillus* 계열이 있다. 동물용 의약품 분야에서 생산되고 판매되는 제품들을 상위 17개사 제품을 기준으로 분석한 결과 대부분 단일 균주로 판매되고 있다 (62.3%). 단일 균주 제품 중이 본과제를 통해 접근하고자 하는 유산균 제품의 판매는 다른 균주에 비해 매출 규모가 상대적으로 낮은 상황이다.

균주	2011년 판매량 (kg)	MS (%)	비 고
<i>Bacillus subtilis</i>	205,664	28.19	단일 균주 제품 : 62.3%
<i>C. butyricum</i>	115,931	15.89	
<i>Lactobacillus spp.</i>	65,519	8.98	
<i>S. cerevisiae</i>	342,400	46.97	
복합균주	440,862	37.67	복합 균주 제품 : 37.7%
합 계	1,170,376	100.0	

(동물약품 협회, 2012)

동물용 의약품 분야에서 생균제 주요 생산 업체는 다음 표와 같다. 그중에 효모 배양물을 생산하고 있는 (주) 제일바이오의 생산량이 가장 많은 것으로 보고되었고, 상위 10개사에서 생산하는 생균제가 전체 생균제 판매량의 71.0%를 차지하고 있다. 이러한 결과는 몇몇 회사를 제외하고 생균제 판매 및 생산업체가 영세한 규모임을 예상할 수 있겠다.

회 사 명 (상위 10개사)	당년누계 수량 (kg)	M/S (%)
(주)제일바이오	295,400	28.01
(주)한동	228,968	21.71
(주)대호	180,621	17.13
(주)에스에프	78,439	7.44
(주)대성미생물연구소	65,519	6.21
우진비앤지(주)	47,205	4.48
이화팜텍(주)	47,000	4.46
(주)남전물산	40,660	3.86
(주)제이비솔루션	36,620	3.47
(주)대성미생물연구소	34,207	3.24
합계	1,054,639	100

(동물약품협회, 2012)

② 보조사료 분야

보조사료 분야의 생균제 생산업체 2011년 현재 총 49개사가 12,622톤의 생균제를 생산 공급하고 있는 것으로 나타났다 (단미사료협회 편람, 2012, 섬유질 발효사료 부분 제외). 그중 생산량을 기준으로 상위 10개사가 생산하는 물량이 전체의 70.1%인 8,850kg으로 대부분의 생균제를 상위 일부 회사가 생산하는 것으로 확인되었다. 동물용 의약품으로 판매되는 생균제와 같이 보조사료 생산의 경우도 상위 10개사를 제외하고는 생산 규모가 영세한 상황일 것으로 판단된다.

회 사 명 (상위 10개사)	2011년	M/S (%)
(주)농협사료 NH바이오	2,228	25.2
(주)엠케이생명과학	1,238	14.0
(주)진바이오텍	1,180	13.3
(주)비비코리아	828	9.4
시너빅	816	9.2
(주)퓨전바이오	531	6.0
(주)바이오토피아	522	5.9
(주)씨티씨바이오	509	5.8
청미바이오(주)	507	5.7
(주)넬바이오텍	491	5.5
합계	8,850	100

(단미사료협회, 2012)

한편 보조사료에 사용하고 있는 균주의 종류나 특징을 확인하기는 어려운 상황이나 동물용

의약품분야의 균주와는 큰 차이가 없이 유산균류, 바실러스, 효모 및 유익 곰팡이인 *A. oryzae* 동일 것으로 판단된다. 왜냐하면 사료법상에 규정되어 있는 균주에 한해 보조 사료로 생산가능하기 때문이다.

보조사료로 생산된 생균제가 동물용 의약품으로 생산된 생균제보다 (12,622톤 vs 1,485톤) 더 많은 것을 확인할 수 있었는데, 이러한 이유는 보조사료로 생산되는 제품의 경우 대부분 배합사료의 원료로 사용되고 있기 때문이다. 주요 생산 업체는 위의 표와 같이 농협사료NH 바이오와 엠케이생명과학, 본과제의 주관 기관인 진바이오텍이 있다.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

국외 생균제 시장의 현황은 현실적으로 조사가 어려운 실정이다. 다만, 시장규모에 대한 예측을 조사한 결과 지속적으로 생균제 시장 규모가 증가할 것이라는 경향이 지배적이다. 최근 자료에 의하면 세계적인 가축용 생균제 시장의 규모는 6억 달러 규모로 추산된다고 보고되었는데 (FeedInfo, 2009), 항생제 규제 및 자연친화적 사육환경을 조성하기 위한 목적으로도 생균제 시장 규모는 지속적으로 증가할 것이다. 특히 항병력이나 면역활성 등을 갖는 기능성 생균제의 요구는 더 증가할 것으로 예상된다.

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1) 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 제품화 분야 : 안전하고 안정적인 유산균 생균제 산업화

대상 축종	제품 특징	기대 효과
양 계 용	괴사성 장염, 가금 티푸스에 효과적인 유산균 생균제	만성적으로 사료효율을 저하시키는 괴사성 장염 등을 예방함으로써 사료비 절감, 사육성적 개선 등의 효과 기대
양 돈 용	살모넬라성 및 독소형 대장균성 설사 예방	자돈 (포유 및 이유자돈)과 육성돈 단계의 설사 예방을 통한 증체 및 사료효율 개선으로 농가 수익향상 효과가 기대

○ CMO 분야 : 위탁생산 기반의 구축으로 OEM 및 ODM 생산을 통해 생산기술의 저변 확대와 함께 종균 선발 및 관리 기술의 기반을 구축할 수 있는 효과가 있음.

사업 분야	특 징	기대 효과
OEM	수요자의 제품설계에 근거한 생균제 생산	생산공정 및 품질관리를 통한 수요자가 설계한 제품의 생산을 통해 생산 기반의 저변 확대 가능. 수요자별 균주 관리 기술 다양화 가능
ODM	자체보유한 제품 설계 기술 및 생산 기반을 바탕으로 한 위탁생산	보유한 균주 혹은 수요자의 요구에 부합하는 균주를 대상으로 제품 개발에 대한 기술 확보 가능. 균주 선발 기술 보유로 기술우위 선점 가능 및 수출 경쟁력 확보 가능. 특정 종균에 대한 관리 기술 확보 가능

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목	산업화 기준					
	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	1,005	1,675	2,679	3,349	4,019	12,727
경제적 파급효과	20,587	20,915	21,249	21,590	21,939	106,280
부가가치 창출액	300	600	1,000	1,500	2,000	5,400
합 계	21,892	23,190	24,926	26,439	27,958	124,407

- 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

- 생균제에 대한 관심이 고조되면서 현재 국외 뿐만 아니라 국내에서도 활발하게 관련분야에 대한 연구가 진행 되고 있음. 면역활성, 발암물질에 의한 DNA 손상억제, 항생효과, 항바이러스 효과 등 생균제의 많은 효과에 대해 연구가 진행되고 있음.
- 기존의 특허들은 많은 부분이 실험관 내 시험이 주로 진행되었고, 생체에서의 효능 확인도 생산성 향상에 대한 평가로 치우쳐 있음. 본 연구과제를 통해 단순한 생산성 향상을 위한 생균제 만이 아닌 국내 산업동물업계에서 많은 피해를 입히고 있는 질병을 대상으로 질병의 예방을 목적으로 한 연구를 추진하여 생균제가 투여된 숙주의 세균 감염 반응 등을 평가하여 선발된 생균제의 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획임.

- 양돈의 생균제에 관한 기존의 특허는 모두 33개 특허로 대부분의 기존 특허 (출원번호 1020030062297, 1020050089669, 1020110002613) 등의 경우 제조방법 또는 조성물에 치우쳐져 있다. 하지만 본 연구를 통한 특허의 경우 현재 국내와 국외에서 가장 흔한 세균 병원체인 장내독소 대장균과 살모넬라균에 대한 효능에 관한 특허를 공격 접종 등을 통한 병리조직학적 병변, 생산성 증대 등 효능 중심의 연구를 수행하여 국내 및 국외에 특허를 출원할 계획임.
- 양계분야에서의 생균제 관련 특허는 대부분 유산균의 *in vitro* 항균 효과를 바탕으로 작성된 특허임. 하지만 본 연구에서 도출된 유산균주는 동물실험을 근거로 살모넬라에 대한 억제 효능을 확인한 균주로 기존 특허와 다른 신규성이 있다고 판단되고, 이를 바탕으로 국내외 특허를 출원할 예정임.

2) 논문분석 측면

- 항생제 대체물질에 대한 관심이 고조되면서 현재 국외 뿐만 아니라 국내에서도 활발하게 생균제에 대한 연구가 진행되고 있다. 다만 국외의 경우 항생효과를 보이는 기전에 대한 연구도 비교적 활발하게 진행되고 있지만 국내의 경우 주로 효과검정 분야에 치우쳐 있으므로 각종 생균제의 작용기전에 대한 연구가 필요함.
- 기존의 연구들에서 설정한 생균제의 종류, 첨가량, 급여형태 등에 따라 효과에 차이를 보이는 경향이 있으므로 이러한 요소들을 종합적으로 고려하여 최적의 효과를 낼 수 있는 생균제의 활용체계에 대한 연구가 필요함.
- 국내에서는 생산성 향상에 관한 연구를 위주로 생균제에 관련된 연구들이 주로 이루어졌으나, 본 연구를 통해 생산성 향상을 위한 생균제 뿐만 아니라 질병 예방 목적의 기능을 평가하기 위하여 현재 국내에서 유행중인 세균성 질병 예방에 대한 공격접종 실험 등을 수반한 종합적인 평가가 이루어져야 함.
- 생균제에 대한 계군의 임상증상 및 사육 실적 변화등을 관찰하여 생균제가 투여된 숙주의 세균 감염 반응 연구 등을 주제로 SCI (Avian diseases, Avian pathology 등) 및 학진 등재지급의 저명한 학술지에 게재할 계획임.
- 생균제에 대한 돼지에 대장균 연구의 경우 수많은 대장균중 하나의 대장균만의 예방 효과를 실시하였고, 또한 포유자돈을 이용하여 예방 효과를 관찰하였는데, 국내에서는 이유자돈에서 대장균 설사증이 발병이 증가하고 있기 때문에 이유자돈에서 다양한 대장균에 대한 예방 효과를 실험실내에서 공격 실험을 실시 할 예정이다. 또한 대부분의 논문에서는 수행하지 않은 양돈장에서 야외 임상 실험도 실시하여 SCI 논문에 게재할 계획임.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 국내 및 국외시장 분석결과 효모 배양물, 바실러스균주, 유산균주 및 이들의 복합균주를 바탕으로 한 생균제 제품의 생산 및 판매가 이루어지고 있고, 현재 연간 2 ~ 5% 수준에서 지속적인 성장을 하고 있는 상황이다. 본 연구과제에서는 시장에 판매되고 있는 다양한

균주들 중에 장내 세균에 대한 항병력을 갖는 유익균을 선발하여 기능성을 강화하고, 시장 유통 중 품질 유지 기간을 연장시킬 수 있는 제형화 방법을 통하여 양돈 및 양계의 설사 및 괴사성 장염 등을 예방할 수 있는 생균제 제품을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

- 생산 규모가 영세한 업자를 위한 표준 생균제 생산 공정의 개발 및 품질관리 지원 등을 통해 보다 안정적으로 생균제를 생산할 수 있는 기반 구축을 위한 기술지원 서비스 확대할 계획임.
- CMO 구축을 통해 선발한 균주의 제품화 및 생산 기반 확보로 수요자별 특화된 제품을 생산, 공급함으로써 생균제 시장의 다양화 및 발효사료 사업의 규모 확대를 지원할 예정임.

<첨부 2> 특허출원 및 MOU체결 실적

출원번호통지서

페이지 1 / 3

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2014.11.18
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2014-0160921 (접수번호 1-1-2014-1110252-01)
출원인명칭 (주)진바이오텍
대리인성명 박종혁
발명자성명 이찬호 강정선 조원탁 조경진 유정진
발명의명칭 생균제 기능을 지니는 신규 식물성 단백질 공급원

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2015.12.09
 특기사항 심사청구(무)공개신청(무)
 출원번호 10-2015-0175274 (접수번호 1-1-2015-1207254-78)
 출원인명칭 (주)진바이오택
 대리인성명 박종혁
 발명자성명 이찬호 강정선 조원탁 조경진
 발명의명칭 생균제 기능을 지니는 신규 천연 소독제

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
 ※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
 ※ 특허모(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
 ※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
 ※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2015.12.17
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2015-0181105 (접수번호 1-1-2015-1239896-53)
출원인명칭 (주)진바이오텍
대리인성명 박종혁
발명자성명 이찬호 강정선 조원탁 조경진
발명의명칭 특정 유산균 균주를 활용한 농장 특화용 천연소독제

특 허 청 장

<< 안내 >>

- 1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
- 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드)+접수번호
- 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
- 4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
- 5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
- 6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- 7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략 출원번호통지서

출원일자 2015.12.17
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2015-0181313 (접수번호 1-1-2015-1241327-00)
출원인명칭 (주)진바이오텍
대리인성명 박종혁
발명자성명 이찬호 강정선 조원탁 조경진
발명의명칭 유산균 균주를 포함하는 생균제

특 허 청 장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드)+ 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
 ※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
 ※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교관허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

관인생략
출원번호통지서

출원일자 2015.12.17
특기사항 심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호 10-2015-0181319 (접수번호 1-1-2015-1241338-02)
출원인명칭 (주)진바이오텍
대리인성명 박종혁
발명자성명 이찬호 강정선 조원탁 조경진
발명의명칭 양돈용 기능성 생균제

특허청장

<< 안내 >>

1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다.
2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다.
※ 납부자번호 : 0131(기관코드) + 접수번호
3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.
※ 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다.
5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허·실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다.
※ 제도 안내 : <http://www.kipo.go.kr>-특허마당-PCT/마드리드
※ 우선권 인정기간 : 특허·실용신안은 12개월, 상표·디자인은 6개월 이내
※ 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다.
6. 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다.
※ 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

Memorandum Of Understanding

duly established company under the laws of the Republic of Korea with its office located at 166 Shinwonsaro, Gyeryongmyeon, Gongju City, Chungcheongnamdo, Korea. The MOU sets forth the Parties' understandings with respect to mutual cooperation on developing probiotic product for the aqua market.

NOW THEREFORE, in consideration of the mutual interest, the Parties agree as follows:

- The product is aiming to improve the aquaculture environment of Vietnam with the use of probiotics and it will be customized formulation to be suited for the specific aquatic environment. The specification for the formulation will be originating from the technologies developed by GBT.
- GBT will be responsible for selecting the prospective strains, standardizing the manufacturing process and providing products of standard quality.
- CTC Vina, once the product is developed and confirmed for the agreed quality standard, agrees to import this product with the quantity and price to be decided by mutual agreement.
- The specifications of products are as follows.

Products	Microbes	Specifications
Probiotic 1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4x10 ⁹ cfu/g
	<i>Bacillus subtilis</i>	6x10 ⁹ cfu/g
	<i>Bacillus licheniformis</i>	6x10 ⁹ cfu/g
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4x10 ⁹ cfu/g
Probiotic 2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	6x10 ⁹ cfu/g
	<i>Bacillus subtilis</i>	4x10 ⁹ cfu/g
	<i>Bacillus licheniformis</i>	4x10 ⁹ cfu/g
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6x10 ⁹ cfu/g

The foregoing is in accordance with our understanding:

Genebiotech Co., Ltd.

Memorandum of Understanding

between

II. PURPOSE

This agreement aims to consolidate the cooperation of each party for the purpose of the discovery, evaluation and applied scientific research to better the quality and value of the GBT Zeaxanthone microbial globally

- Technical and scientific cooperation on development of mycotoxin degrading enzymes
- Fundamentals for scientific and technical evaluation on fermented enzyme

III. RESPONSIBILITIES OF THE PARTIES

- The Parties agree to jointly participate in the design, development, and evaluation of finished product that should be in a transparent, non-arbitrary, and reasonable manner.
- The Parties agree that the mechanisms, methods, and procedures developed under the cooperation of each party will be kept confidential.
- Both Parties shall act in a non-arbitrary and reasonable manner with respect to design, development, and evaluation of finished product and marketing goods globally.

IV. PERIOD OF AGREEMENT AND MODIFICATION/TERMINATION

This MOU will become effective when signed by all parties. The Agreement will terminate on January 31, 2018, but may be extended by the mutual agreement without any further renewal of documentation, and may be amended at any time by mutual agreement of each party. Either party may terminate this Agreement by providing sixty (60) days written notice to the other party. In the event this Agreement is terminated, each party shall be solely responsible for the payment of any expenses it has incurred.

Memorandum of Understanding

between

I. PARTIES

II. PURPOSE

This Agreement aims to consolidate the cooperation of each party for every process to establish a good manufacturing practice through technical and scientific background to develop novel manufacturing process, and provide for marketing and sale for the better quality and value of the Product globally. "Products" shall mean those final products of GBT sold, in any country, which GBT and NF either develop, market and/or commercialize with joint effort or which they otherwise choose to add to this Agreement.

- Technical and operational set up for fermentation of novel strains of lactic acid bacteria
- Fundamentals for scientific and technical evaluation process of fermented food preparations
- Technology transfer including intellectual properties

III. RESPONSIBILITIES OF THE PARTIES

- The Parties agree to jointly participate in the design, development, and testing of the manufacturing facilities, and marketing of Product that should be in a transparent, non-arbitrary, and reasonable manner. Each party shall pay its own costs related to such participation.
- The Parties agree that the proprietary mechanisms, methods, and procedures and trade secrets developed under the cooperation of each party will be kept confidential.
- Nothing in this Agreement is intended to prevent GBT or NF from taking reasonable steps that are necessary to protect the operational stability of the manufacturing system in the event of financial failure or other emergencies.
- Both Parties shall act in a non-arbitrary and reasonable manner with respect to design, development, and testing of the manufacturing facilities, and marketing goods globally.
- NF shall be granted a royalty-free license from GBT, during the term of this MOU, to use any intellectual properties of GBT related to the Product, its manufacture, marketing and sale (including without limitation any modifications, improvements and derivative works resulting from the cooperation provided above), as necessary for NF to perform its obligations and engage its rights hereunder. GBT and NF shall jointly own any modifications, improvements and/or derivative works resulting from their joint cooperation. NF shall solely own any modifications, improvements and/or derivative works resulting from its sole efforts. NF agrees to maintain the level of quality established in the Products by GBT and the goodwill established therein, and agrees to provide samples of marketing material and packaging upon written request from GBT regarding the use of any trademark on the

Products.

- NF shall be entitled to 50% of the net profit arising from the sales of Product sold globally.
- NF shall be entitled to market, promote and sell the Product(s) throughout the world except in Korea which shall be handled by GBT.

IV. PERIOD OF AGREEMENT AND MODIFICATION/TERMINATION

This Agreement will become effective when signed by all parties. The Agreement will terminate on January 31, 2018, but may be extended by the mutual agreement without any further renewal of documentation, and may be amended at any time by mutual agreement of each party. Either party may terminate this Agreement due to material breach by the other party of any obligation(s) under this Agreement by providing no less than sixty (60) days written notice to the other party. In the event this Agreement is terminated, each party shall be solely responsible for the payment of any expenses it has incurred.

IN WITNESS whereof this Agreement/MOU was duly signed for and on behalf of each parties.

Memorandum of Understanding
between

II. PURPOSE

This Agreement aims to consolidate the cooperation of each party for every process to establish a good manufacturing practice through technical and scientific background to develop novel manufacturing process, and provide for marketing and sale for the better quality and value of the Product globally. "Product(s)" shall mean those feed products fermented with *Lactobacillus plantarum* GB-PLA2 (KCCM 11433) of the intellectual property of GBT, which GBT and NF either develop, market and/or commercialize with joint effort or which they otherwise choose to add to this Agreement.

- a. Technical and operational set up for fermentation of novel strains of lactic acid bacteria
- b. Fundamentals for scientific and technical evaluation process of fermented feed preparation
- c. Technology transfer including intellectual properties

III. RESPONSIBILITIES OF THE PARTIES

- a. The Parties agree to jointly participate in the design, development, and testing of the manufacturing facilities, and marketing of Product that should be in a transparent, non-arbitrary, and reasonable manner. Each party shall pay its own costs related to such participation.
- b. The Parties agree that the proprietary mechanisms, methods, and procedures and trade secrets developed under the cooperation of each party will be kept confidential.
- c. Nothing in this Agreement is intended to prevent GBT or NF from taking reasonable steps that are necessary to protect the operational stability of the manufacturing system in the event of financial failure or other emergencies.
- d. Both Parties shall act in a non-arbitrary and reasonable manner with respect to design, development, and testing of the manufacturing facilities, and marketing goods globally.
- e. NF shall be granted a royalty-free license from GBT, during the term of this MOU, to use any intellectual properties of GBT related to the Product, its manufacture, marketing and sale (including without limitation any modifications, improvements and derivative works resulting from the cooperation provided above), as necessary for NF to perform its obligations and engage its rights hereunder. GBT and NF shall jointly own any modifications, improvements and/or derivative works resulting from their joint cooperation. NF shall solely own any modifications, improvements and/or derivative works resulting from its sole efforts. NF agrees to maintain the level of quality established in the Products by GBT and the goodwill established therein, and agrees to provide samples of marketing material and

packaging upon written request from GBT regarding the use of any trademark on the Products.

- f. NF shall be entitled to 50% of the net profit arising from the sales of Product sold globally.
- g. NF shall be entitled to market, promote and sell the Product(s) throughout the world except in Korea which shall be handled by GBT.

IV. PERIOD OF AGREEMENT AND MODIFICATION/TERMINATION

This Agreement will become effective when signed by all parties. The Agreement will terminate on July 31, 2018, but may be extended by the mutual agreement without any further renewal of documentation, and may be amended at any time by mutual agreement of each party. Either party may terminate this Agreement due to material breach by the other party of any obligation(s) under this Agreement by providing no less than sixty (60) days written notice to the other party. In the event this Agreement is terminated, each party shall be solely responsible for the payment of any expenses it has incurred.

IN WITNESS whereof this Agreement/MOU was duly signed for and on behalf of each parties.

TECHNICAL ASSISTANCE AGREEMENT

originals provided that no Party shall be bound to this Agreement unless and until all Parties have executed one original of each language version.

IN WITNESS WHEREOF, the Parties have caused this Agreement to be executed and delivered by their duly authorized representatives on the day and year first written above.

For and on behalf of
TRANSFEROR

For and on behalf of
TRANSFEEEE

Genebiotech Co., Ltd.

양해각서 (MOU)

제 1 조 [목적]

본 양해각서는 '갑', '을', '병'이 신규 소독제를 개발함에 있어 원료 및 제품의 유효성분 및 조성 및 구성을 제공하여 상호 공동이익의 증진을 도모함에 그 목적이 있다.

제 2 조 [협력분야]

본 양해각서에 의한 제휴협력관계의 내용은 다음과 같다.

1. 신규 소독제 개발에 대한 기술교류
2. 신규 소독제의 인허가 지원
3. 신규 소독제에 대한 공동 마케팅

제 3 조 [협력 추진방법]

1. '갑', '을', '병' 모두는 신규 소독제 개발의 유효성분 및 조성을 상호 공유하기로 한다.
2. 상호 개발논의에 따라 제공받은 유효성분 및 조성으로 시제품을 생산하여, 동물용의약외품 인허가 절차를 진행한다.

제 4 조 [보 안]

본 양해각서에 의하여 교환되는 모든 기술정보 및 문서는 외부유출을 엄격히 제한한다.

제 5 조 [비 음]

본 양해각서에 의하여 발생하는 방문 등 업무협력 비용은 당사자간 협의에 의해 부담한다.

제 6 조 [계약 기간]

본 협약의 유효기간은 체결일로부터 1년간으로 하고, 기간 만료 3개월 전까지는 어느 일방의 서면 통보가 없는 한 1년간씩 자동적으로 연장되는 것으로 한다.

제 7 조 [기타사항]

본 양해각서 상에 명시되지 않은 기타 사항은 별도로 협의 하여 처리한다.

위와 같이 본 양해각서의 유효한 성립을 각 당사자는 증명하면서 본 양해각서 2통을 작성하여, 각각 서명 날인 후 '갑', '을', '병'이 각각 1부씩을 보관한다.

2015 년 / 월 20 일

갑:
을:
병:

Memorandum of Understanding between

I. PARTIES

II. PURPOSE

This Agreement aims to consolidate the cooperation of each party for every process to establish a good manufacturing practice through technical and scientific background to develop novel manufacturing process, and provide for marketing and sale for the better quality and value of the Product globally. "Product(s)" shall mean those feed products fermented with *Lactobacillus plantarum* GB-PLA2 (KCCM 11453P) of the intellectual property of GBT, which GBT and NF either develop, market and/or commercialize with joint effort or which they otherwise choose to add to this Agreement.

- a. Technical and operational set up for fermentation of novel strains of lactic acid bacteria
- b. Fundamentals for scientific and technical evaluation process of fermented feed preparation
- c. Technology transfer including intellectual properties

III. RESPONSIBILITIES OF THE PARTIES

- a. The Parties agree to jointly participate in the design, development, and testing of the manufacturing facilities, and marketing of Product that should be in a transparent, non-arbitrary, and reasonable manner. Each party shall pay its own costs related to such participation.
- b. The Parties agree that the proprietary mechanisms, methods, and procedures and trade secrets developed under the cooperation of each party will be kept confidential.
- c. Nothing in this Agreement is intended to prevent GBT or NF from taking reasonable steps that are necessary to protect the operational stability of the manufacturing system in the event of financial failure or other emergencies.
- d. Both Parties shall act in a non-arbitrary and reasonable manner with respect to design, development, and testing of the manufacturing facilities, and marketing goods globally.
- e. NF shall be granted a royalty-free license from GBT, during the term of this MOU, to use any intellectual properties of GBT related to the Product, its manufacture, marketing and sale (including without limitation any modifications, improvements and derivative works resulting from the cooperation provided above), as necessary for NF to perform its obligations and engage its rights hereunder. GBT and NF shall jointly own any modifications, improvements and/or derivative works resulting from their joint cooperation. NF shall solely own any modifications, improvements and/or derivative works resulting from its sole efforts. NF agrees to maintain the level of quality established in the Products by GBT and the goodwill established therein, and agrees to provide samples of marketing material and

packaging upon written request from GBT regarding the use of any trademark on the Products.

- f. NF shall be entitled to 50% of the net profit arising from the sales of Product sold globally.
- g. NF shall be entitled to market, promote and sell the Product(s) throughout the world except in Korea which shall be handled by GBT.

IV. PERIOD OF AGREEMENT AND MODIFICATION/TERMINATION

This Agreement will become effective when signed by all parties. The Agreement will terminate on July 31, 2018, but may be extended by the mutual agreement without any further renewal of documentation, and may be amended at any time by mutual agreement of each party. Either party may terminate this Agreement due to material breach by the other party of any obligation(s) under this Agreement by providing no less than sixty (60) days written notice to the other party. In the event this Agreement is terminated, each party shall be solely responsible for the payment of any expenses it has incurred.

IN WITNESS whereof this Agreement/MOU was duly signed for and on behalf of each parties.

양 해 각 서

(Memorandum Of Understanding)

제 1 조 목적

본 양해각서는 '갑', '을'이 신규 직성물체체를 개발함에 있어 상호 및 각종의 중요성분 및 조성 및 구성을 제공하며 상호 공동이익의 증진을 도모함에 그 목적이 있다.

제 2 조 협력분야

신규 기술 및 양어물 고능도 상관계 개발을 위한 의성을 차함에 대한 기술교류 및 상호 제공

제 3 조 협력 추진방법

1. '갑', '을', 모두는 신규 직성물체체 개발의 중요성분 및 조성을 상호 공유하기로 한다.
2. 상호 개발분야에 따라 제공받은 중요성분 및 조성으로 시제품을 생산하여, 보호서류 인허가 절차를 진행한다.

제 4 조 (보 인)

본 양해각서에 의하여 교환되는 모든 기술정보 및 문서는 의무유출을 엄격히 제한한다.

제 5 조 (비 출)

본 양해각서에 의하여 발생하는 상호 중 업무협력 비용은 당사자간 협의의 의해 부담한다.

제 6 조 (계약 기간)

본 협력의 유효기간은 체결일로부터 1년간으로 하고, 기간 만료 3개월 전까지는 계속 일방적 서면 특지 통보가 없는 한 1년간씩 자동적으로 연장되는 것으로 한다.

제 7 조 (기타사항)

본 양해각서 상에 명시되지 않은 기타 사항은 별도로 협의 하여 처리한다.

위와 같이 본 양해각서의 유효한 성립을 각 당사자는 증명하면서 본 양해각서 교체를 작성하여, 각각 서명 날인 후 '갑', '을'이 각각 1부씩을 보존한다.

2015 년 6 월 3 일

(갑)

(을)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 동물용 생균제 대량생산을 위한 위탁 생산시설 구축사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 동물용 생균제 대량생산을 위한 위탁 생산시설 구축사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.