

농생명산업기술개발사업 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002250-01

축산악취저감 및 항생제 대체용
친환경 복합 미생물 생균제의 개발

2018. 03. 23.

주관연구 기관명 : 서울대학교

참여 기관명 : 씨제이제일제당 주식회사

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “축산악취저감 및 항생제 대체용 친환경 복합 미생물 생균제의 개발”
(연구개발 기간 : 2015. 12. 18. ~ 2017. 12. 17.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 01. 31.

주관연구기관명 : 서울대학교

최 윤 재

참여 기관명 : 씨제이제일제당 주식회사

신 현 재



주관연구책임자 : 최 윤 재 교수

참여기관책임자 : 신 현 재 대표이사

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

보고서 요약서

과제 고유 번호	115084-02-22-SB010	해당 단계 연구 기간	2015.12.18. ~ 2017.12.17	단계구분	총 단계
연구사업명	중사업명	농식품기술개발사업			
	세부사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	축산악취저감 및 항생제 대체용의 친환경 복합 미생물 생균제의 개발			
	세부과제명				
연구책임자	최윤재	해당단계 참여 연구원 수	총: 14명 내부: 11명 외부: 3명	해당단계 연구개발비	정부: 180,000천원 민간: 180,000천원 계: 360,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 14명 내부: 11명 외부: 3명	총 연구개발비	정부: 180,000천원 민간: 180,000천원 계: 360,000천원
연구기관명 및 소속 부서명	서울대학교 농업생명과학대학			참여기업명	씨제이제일제당
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내·외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술요약 정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁 번호	4	2						2			

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<p>요약</p> <p>1. 목적</p> <p>본 과제는 축산악취저감 및 장내 점착능력이 우수한 다기능성 친환경 생균제 개발을 목적으로 한다.</p> <p>2. 세부 및 협동과제</p> <ul style="list-style-type: none"> - 세부과제 (서울대학교 농생명공학부) : 악취저감 능력이 우수한 복합 미생물 생균제의 개발, 장내 점착능력이 우수한 미생물 생균제 선발 및 유전자 마커 개발 - 참여기업 (씨제이제일제당) : 사양시험 및 산업화 추진 <p>3. 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - SCI 급 논문 4편(목표 4편) - 특허출원 2건 (목표 2건) - 학술발표 11건 및 발표대회 수상 1건 - 기술이전 1건(참여기업), 산업화 2건(시제품 생산 완료) <p>4. 성과활용계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 축산악취저감용 사료 첨가제 산업화 예정 - 축산악취저감 및 장내 점착능력 우수 항생제 대체용 사료첨가제 사업화 검토 	<p>보고서 면수</p> <p>106</p>
---	--------------------------

국문 요약문

연구의 목적 및 내용	<p>1. 악취저감 능력이 우수한 복합 미생물 생균제의 개발 및 제품화</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 악취저감에 효과적인 균주 및 소재 선정 2) <i>In vitro</i>, <i>In vivo</i> 평가를 통한 최적조합 선발 3) 사양실험을 통한 미생물 복합 생균제 검증 4) 참여기업을 통한 제품화 <p>2. 장내점착능력이 우수한 사료첨가용 항생제 대체 미생물 생균제 선발 및 유전자 마커 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 장내점착능력이 우수한 사료첨가용 미생균 생균제 선발 2) 장내점착능력 관련 유전인자 확인 및 우수 생균제 선발 유전자 마커 개발 3) 사양실험을 통한 미생물 생균제 검증
연구개발성과	<p>1. 악취저감 능력이 우수한 복합 미생물 생균제의 개발 및 제품화</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 악취저감 능력을 평가하기 위한 <i>In vitro</i> 평가 방법 세팅 2) 후보균주 13종, 후보소재 4종, 시중판매 제품에 대한 <i>In vitro</i> 평가 완료 3) 악취저감 효과 균주 조합 선발 4) 악취저감 효과 소재 선발 5) 악취저감 효과 균주 조합 사양시험 진행(1차, 2차 기업 연구농장) 6) 2차례 사양시험 결과를 바탕으로 대규모 현장농가 사양시험 진행 7) 대조구, 시판제품 대비 악취저감 능력 우수 확인 8) CJ제일제당에 균주 및 노하우 기술이전 진행 9) CJ제일제당 내부 제품 사용을 1차 목표로 시제품 생산 <p>2. 장내점착능력이 우수한 사료첨가용 항생제 대체 미생물 생균제 선발 및 유전자 마커 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 돼지 분변 유래 48개의 유산균 isolates 확보 2) 돼지 점막 및 소장 상피세포에서의 점착능력 기반으로 6개의 유산균 선발 3) 돼지 설사병 유발 병원성 미생물에 대한 exclusion능력 확인 4) 장내점착능력 우수균주 6종 및 저조균주 6종에 대한 sequencing 완료 5) 비교 유전체학을 이용한 두 그룹간의 비교 분석 6) 미생물 생균제 선발용의 유전자 마커 4개 개발 및 검증 7) 장내점착능력 우수균주 3종을 이용 사양실험 진행 8) 선발한 미생물 생균제 급이시 성장 증체율 증가 및 설사 발병률 감소 확인 9) 선발한 미생물 생균제 급이시 분변내 유익균 증가 및 유해균 감소 확인
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ol style="list-style-type: none"> 1) 축산악취저감 복합 미생물 생균제를 CJ제일제당을 통해 상품화 2) 악취저감 미생물 + 장점착 우수 미생물 조합의 악취저감 항생제 대체

	복합 미생물 생균제의 상품화 3) 돼지 분변량을 줄여주고, 소화 흡수율을 높여 농가의 생산성 향상과 경제적 이익을 유도 4) 축산 농가 보급을 통한 환경 개선 및 환경과 공존하는 지속가능한 축산의 방향 제시 5) 유전자 마커 개발을 통한 간편하고 정확한 생균제 선발 방법 제시 6) 축산물 생산성 증가 및 친환경 축산 구현을 통한 동물복지 구현 7) 웰빙 및 안전한 친환경 축산식품에 대한 소비자 욕구 충족 8) 항생제 미사용에 따른 양질의 분뇨발효 퇴액비 생산 가능, 환경 친화적 순환농업 가능 9) 자연계 항생제 사용 억제로 환경오염 방지 및 인류 건강 증진				
국문핵심어 (5개 이내)	친환경	축산악취저감제	항생제 대체제	사료첨가제	생균제
영문핵심어 (5개 이내)	Environment -friendly	livestock odor reduction	antibiotic alternatives	feed additives	probiotics

영문 요약문

Purpose& Contents	<p>1. Complex probiotic development and industrialization for the reduction of livestock odorous gas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Selecting effective microbial strains and materials for the purpose of reducing odorous gas 2) Selecting the most optimal combination through <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> experimentation 3) Micro-organism verification through a livestock feeding test 4) Prototype production developed by company partnership <p>2. Screening of probiotic bacteria for alternative antibiotics with high adhesion in the intestine and the development of genetic markers for effective probiotic selection</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Selection of probiotics for feed additives with high intestinal adhesive properties 2) Identification and development of genetic markers related to intestinal adhesive ability 3) Validation of probiotic bacteria by <i>in vivo</i> experiment
Results	<p>1. Complex probiotic development and industrialization for the reduction of livestock odorous gas</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Setting up the protocol for odorous evaluation <i>in vitro</i> 2) Evaluation of the 13 types of probiotic, 4 types prebiotic, and commercial product effect on decreasing odorous gas 3) Selection of a probiotic combination with an odorous gas decreasing effect 4) Selection of a prebiotic with an odorous gas decreasing effect 5) Duplicated farm-based field test for examining the combined probiotics effect on odor control 6) Large scale field test following the farm-based field test (Result #5) 7) Confirmation of superior odor control ability of probiotic combination over positive control and commercial product 8) Transfer of microbial strain and “know-how” to CJ Cheiljedang 9) Manufactured Prototype developed by CJ Cheiljedang <p>2. Screening of probiotic bacteria for alternative antibiotics with high adhesion in the intestine and the development of genetic markers for effective probiotic selection</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Isolation of 48 lactic acid bacteria species from porcine feces 2) Screening of 6 lactic acid bacteria species by porcine mucus and

	<p>intestinal epithelial cell adhesion ability</p> <p>3) Confirmation of probiotic exclusion ability against porcine diarrhea-causing pathogenic bacteria</p> <p>4) Sequencing of 6 “high” intestinally adhesive and 6 “low” intestinally adhesive bacteria</p> <p>5) Comparative genomic analysis between two groups</p> <p>6) Development and validation of 4 genetic markers for the selection of probiotics</p> <p>7) <i>In vivo</i> experiment using 3 probiotic strains</p> <p>8) Growth rate increases and decreases in diarrhea incidence in probiotics group</p> <p>9) Increase of beneficial bacteria and decrease of harmful bacteria in probiotics group</p>				
Expected Contribution	<p>1) Environmentally-friendly probiotic complexes for the reduction of livestock odor gas will be commercialized by CJ Cheiljedang</p> <p>2) Commercialization of probiotics combination(probiotics for reduction of livestock odor gas + high intestinal adhesive property)</p> <p>3) Induction of industrial farm’s productivity and economic profit by not only the reduction of livestock manure but also enhancing digestibility</p> <p>4) Representative example of sustainable livestock industry with environmentally-friendly probiotics</p> <p>5) Acquisition of an accurate and easy method for selecting probiotics by use of genetic markers</p> <p>6) Realization of animal welfare with the help of environmentally-friendly probiotics</p> <p>7) Satisfaction of needs related to well-being culture and food security</p> <p>8) Positive expectations for using high quality fermented liquid manure with the absence of antibiotics</p> <p>9) Improvement of public health and reduction of environment pollution through antibiotic alternatives</p>				
Keywords	Environment -friendly	livestock odor reduction	antibiotic alternatives	feed additives	probiotics
영문핵심어 (5개 이내)	Environment -friendly	livestock odor reduction	antibiotic alternatives	feed additives	probiotics

< CONTENTS >

1. Summary of Research	10
1) Aim of the research	10
2) Significance of the research	11
3) Range of the research	33
2. Present State of Technologies at Home and Abroad	35
1) Present state of technologies at home	35
2) Present state of technologies at abroad	37
3. Research Contents and Results	40
1) Project result for first years	40
2) Project result for second years	61
3) Research Performance	81
4. Degree of Accomplishment in Research and Contribution to Related Fields	85
1) Degree of accomplishment	85
2) Degree of contribution to related fields	86
5. Achievements of Research and Further Prospects	87
6. Information of Related Technologies Abroad	88
7. Representative Research Performance of the Project	98
8. State of registered research facilities and equipment	98
9. Performance in implementing safety measures	98
10. Reference	102

< 목 차 >

제1장 연구개발과제의개요	10
제1절 연구개발의 목적	10
제2절 연구개발의 필요성	11
제3절 연구개발 범위	33
제2장 국내외 기술개발 현황	35
제1절 국내 기술개발 현황	35
제2절 국외 기술개발 현황	37
제3장 연구수행 내용 및 결과	40
제1절 1차년도 연구수행 내용 및 결과	40
제2절 2차년도 연구수행 내용 및 결과	61
제3절 연구개발 성과	81
제4장 목표달성도 및 관련분야 기여도	85
제1절 연도별 목표달성도	85
제2절 관련분야 기여도	86
제5장 연구결과의 활용계획	87
제6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	88
제7장 연구개발성과의 보안등급	98
제8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	98
제9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	98
제10장 참고문헌	102

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목적

1. 연구개발 최종 목표

(선행 “바이오사료첨가제 개발사업단” 연구과제 결과에 기반한 후속 과제)

“축산악취저감 및 장내 점착능력이 우수한 다기능성
친환경 SYNBIOTICS 생균제의 개발”

개발 방향: 천연물과 미생물의 최적 SYNBIOTICS 조합을 통한 다기능성 극대화

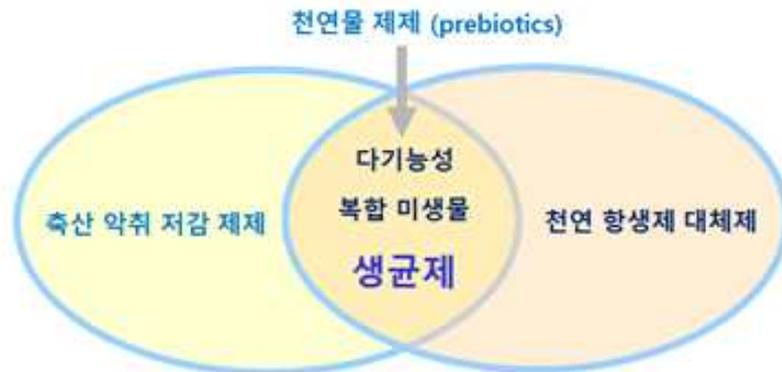


그림 1. 연구개발 최종목표

2. 세부 연구 목표

- 선행과제를 통해 기 확보된 미생물 (4종) 활용, 축산악취저감(9종) 및 장내 점착능력 우수한 미생물 재검정
- 장 점막 점착성 기반의 선발체계를 통한 생균제 활용 다기능성 미생물 (3종) 선발 및 특성규명
- 천연물 후보물질과 다기능성 미생물의 SYNBIOTICS 생균제 최적 조합 도출
- NGS (next generation sequencing) 기반 미생물 생균제 판별 유전자 마커 개발
- 연구 개발된 생균제 미생물 추적 및 기능평가 (tracing and identification)에 활용
- 새로운 생균제 최적 미생물 선발에 활용

제2절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 국내외 사료 첨가제 시장 동향 및 전망

(1) 세계 주요 사료첨가제 시장 동향 및 전망

○ 사료첨가제는 가축의 생산성 향상을 목적으로 배합사료에 첨가하는 제제로서 영양성분 강화를 위한 ‘일반 사료첨가제’와 면역력 향상, 소화율 향상, 정장작용, 항균작용 등 가축의 건강 증진이나 그 밖의 특수 용도를 위한 ‘기능성 사료첨가제’로 구분할 수 있다.

○ 세계 사료첨가제 시장은 2013년 128억 달러 규모로 약 5.1%의 성장률을 보이고 있어 2019년에는 약 173억 달러의 규모로 성장할 것으로 전망된다. 세계 3대 시장인 미국, 유럽, 아시아가 전 세계 시장의 85% 이상을 차지하고 있으며, 아시아의 소득 수준과 육류 소비량이 증가함에 따라 아시아 국가의 사료 첨가제 시장은 계속 성장할 것으로 예측되고 있다 (그림 2).

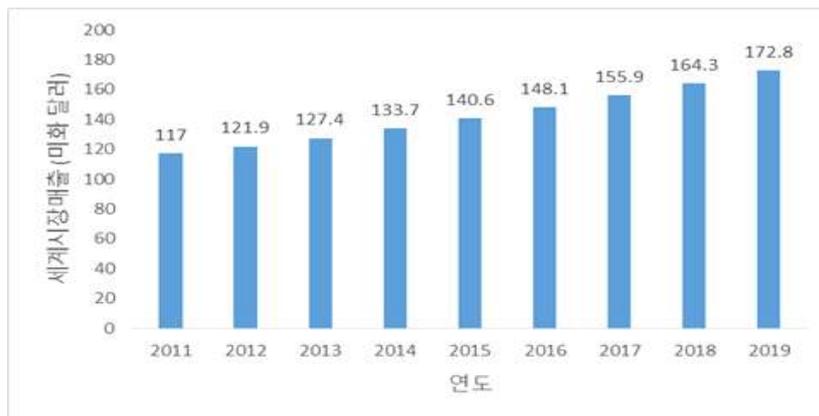


그림 2. 세계 사료첨가제 시장
(Frost와 Sullivan, 2013)

○ 목적 동물에 따른 시장 점유율을 살펴보면, 약 73.4%는 돼지 또는 닭 사료용이다. 이에 따라 사료첨가제 개별 제품군 중에서는 일반 사료첨가제로 양돈 사료에 많이 사용되고 있으며 고품질의 육류를 생산하기 위한 첨가제와 저급사료 사용 증대로 이를 보충하기 위해 사용되는 아미노산 제제의 시장규모와 성장률이 가장 높을 것으로 예상되고 있다. 한편, 세계적인 항생제 사용 저감 노력 및 친환경 축산으로의 전변을 반영하듯 기능성 사료첨가제로써 2010년 기준 1천 600만 달러 규모이던 생균제 (효모제) 시장이 2017년 7억 3천만 달러 규모로 무려 40배 성장할 것으로 예상되고 있는 것은 주목될 만한 점이다 (표 1).

표 1. 세계 주요 사료첨가제 시장 전망 표 (BCC Research, 2012)

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

(2) 국내 사료첨가제 시장 동향 및 전망

○ 현재 국내 사료첨가제 산업은 약 130여개의 회사가 각축하고 있으며, 2013년 기준 약 2,587억 원의 규모로 전 세계 사료 첨가제 시장의 약 2%를 차지하고 있다. 국내 사료첨가제 시장의 성장률은 3.5%로 전량 국내 축산업에 소요되는 전형적인 내수시장 지향 산업의 성격을 띠고, 일부 가공된 원료만을 수출하고 있어 세계 사료첨가제 시장의 성장에 비해 더디게 성장할 전망이다 (그림 3, 표 2).



그림 3. 국내 사료첨가제 시장
(농협경제연구원, 2013)

표 2. 동물용의약품 내수시장 현황 (단위: 억 원) (농림축산식품부, 2015)

구분	2010년	2011년	2012년	2013년	2014년
국내생산	3706	3615	3355	3387	3756
수입완제	1739	2185	2482	2072	2084
합계	5445	5800	5837	5459	5840

○ 1960년대 이후 가축의 생산성을 높이기 위해 배합사료의 요구량이 증가함과 더불어 사료첨가제의 일종인 동물용의약품도 같이 성장하였다. 동물용의약품을 크게 분류하자면, 미생물

에 의해 생산되는 항체의 형성을 유도하는 ‘항생제’와 ‘비항생제’로 나눌 수 있다. 비항생제 중에서는 미생물이 생산한 효소를 사료첨가제로 상품화한 ‘효소제’, 유해 미생물에 대해 저항성 증진을 통해 가축의 생산성을 증진시키고자 하는 ‘생균제’가 대표적이다. 2014년 기준 동물 의약품 제조업체는 약 230여개가 있고, 수입업체가 250여개로 국내 시장은 정체상태이나 세계시장은 증가 추세에 있어 국내 제조업체에서는 내수 위주에서 수출 확대를 통한 산업 활로를 모색 중에 있다 (표 3).

표 3. 동물용 의약품 수출 현황 (농림축산식품부, 2015)

구분	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년	2013년	2014년
업체수(개소)	28	31	38	35	42	55	60
품목수(개)	421	495	534	621	736	840	932
수출액(억원)	598	854	846	1172	1584	1670	1905

○ ‘세계 자유무역 협정 (FTA)’에 의한 농축산물 시장개방을 통해 무한경쟁에 돌입한 국내 축산업은 선진국 대비 약한 산업 경쟁력에 의한 위기의식이 한층 고조되고 있다. 세계적인 환경보전 움직임과 FTA 등 급변하는 세계시장 변화에 능동적으로 대처하기 위해서는 국내 축산업도 자연환경과의 조합 및 산업 지속성 등 질적 성장에 초점을 둔 ‘생명사회 패러다임’으로의 전면적 전환이 요구되며, 안전성과 품질 및 국가경쟁력을 갖춘 고부가가치 축산물 생산 기술 연구에 총력을 기울여야 할 필요가 있다. 특히 전술한 바와 같이 기능성이 과학적으로 증명된 대량생산이 가능한 천연제제와 같은 사료첨가제의 개발 및 활용기술이 앞으로의 축산업 발전을 견인하는 중요한 요인이 될 것으로 전망된다.

○ 기능성 사료첨가제 분야는 본질적으로 기능성 원료 발굴과 효과 규명이 중요한 기술 의존형 산업이다. 대부분의 국내 기업은 원재료를 수입하여 제형가공 후 출시하는 수준이 대부분이며, 특수 목적에 부합하는 ‘기능성’ 유무가 시장경쟁력의 핵심임에도 불구하고 국내에서 유통되는 제품의 대다수는 주장하는 기능성을 증명할 수 있는 객관적인 근거가 미약하여 제품의 단가가 경쟁력의 주요 변수로 작용하고 있는 실정이다.

○ 성장 촉진용 항생제 완전 사용 금지와 동물성사료에 따른 광우병 우려 등으로 인해 천연제제가 새롭게 주목받고 있는데, 천연제제는 복합물의 성격을 가지며 화학합성 제제와는 달리 일반적으로 대량생산 체제가 어려운 측면이 있다. 천연제제는 국내외 공통적으로 태동기 산업인데다가 기능성 사료첨가제 산업이 기술력에 의해 신규 시장이 창출되는 특성이 있기 때문에, 효과적인 천연제제를 발굴하여 대량생산이 가능할 수 있다면 기능성 사료첨가제 산업 분야에서 새로운 시장을 형성할 가능성이 있을 것으로 예상된다. 특히 사료첨가용의 경우 사용허가가 동물 의약품에 비해 간편한 보조사료의 경우 그 규모가 급격하게 성장할 것으로 기대된다.

○ 보조사료 중 생균제 시장은 30년 전 국내 축산업에 적용된 이후로 꾸준한 제품 개발이 이루어져 왔으며, 2011년 항생제 사용이 전면 금지된 이후에 급격한 성장률을 보였다 (표

4). UN 조사에 따르면 우리나라는 베트남에 이어 두 번째로 항생제 사용이 많았던 국가로 축산물에 잔류 및 축적되는 항생물질의 부작용을 근원적으로 해결하기 위한 방안으로 생균제가 각광을 받으며 그 시장이 더욱 더 성장할 것으로 전망된다.

표 4. 국내 생균제 판매현황 (단위: 톤) (단미사료협회, 2015)

구분	2010년	2011년	2012년	2013년	2014년
생균제	28,406	28,933	31,196	31,576	31,950

○ 최근에는 생균제에 프리바이오틱스를 보강하여 동물의 장내미생물을 선택적으로 성장시키는 신바이오틱 (synbiotic) 개념의 제품이 개발되었다. 더 나아가 동물의 능동적인 면역능력을 향상시키고 바이러스 증식을 억제하며, 생균제의 장내 정착력을 더욱 증진시켜 사료효율을 개선하는 효과 등 다양한 기능이 추가된 신바이오틱 제품이 개발되면서 신바이오틱의 가능성과 성장률이 증가하고 있는 추세이다. 이미 유럽, 미국 등에서는 프리바이오틱스 시장이 생균제 시장의 성장률을 넘어 증가하고 있는 추세이며, 국내에서는 현재 몇 개 업체에서 생산되고 있으며 그 효과가 유의적으로 인정받아 그 수요가 증가하고 있다는 점은 주목할 만한 점이다.

나. 사료첨가용 항생제 대체 미생물 생균제

(1) 가축 사료용 항생제 사용의 금지

○ 가축 사료용 항생제는 가축의 성장을 돕고 여러 가지 가축 질병을 사전에 예방한다는 차원에서 많은 농가에서 사료첨가제의 목적으로 이용해 왔다. 그러나 사용되는 항생제의 양이 제어되지 못하고 각 농가에서 무분별하게 많은 양을 가축에게 사용되면서 항생제 오남용의 문제가 대두되었다.

○ 항생제의 남용은 1) 일차적으로는 내성균주의 창궐을 야기해 일반적인 가축 질병에 대한 치료를 어렵게 하며, 치료제가 없는 새로운 형태의 균 혹은 바이러스가 나타나는 등의 문제를 발생시킨다. 2) 이차적으로는 축산물에 항생물질들이 잔류하여 인간에게도 교차 내성을 일으키고, 항생제남용으로 발생된 내성 균주들이 인간에게 교차 감염되는 문제 등을 발생시킨다 (그림 4).



그림 4. 사료 첨가용 항생제 남용의 유해성

○ 이에 많은 나라들이 성장 촉진 목적의 항생제 사용을 정책적으로 금하고자 했다. 가축 사료 내 항생제 사용 금지 정책은 1985년 스웨덴에서 가장 먼저 시작되었으며, 이후 95년 노르웨이, 99년 덴마크에서 차례로 시행되었다. 초기에는 자돈의 설사 증가, 증체율 일부 하락 등의 부작용이 발생했으나, 몇 년 뒤 정상 수치로 회복되는 등 극복 가능한 수준임이 밝혀졌다. EU에서는 2006년에 모든 회원국들의 배합사료 내 항생제 첨가를 금지했다 (표 5). 대한민국의 경우 2011년 7월부터 성장촉진을 목적으로 한 항생제 사료 혼합을 전면적으로 금지했다.

표 5. 유럽에서 사용이 금지된 항생제 및 사용금지 원인 (농촌진흥청, 2009)

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

(2) 항생제 대체 생균제 유통 제품 및 연구 동향

○ 사료 첨가제는 2006년 이후 세계 곡물가격의 상승으로 사료의 가격이 높아지면서 곡물의 사용을 줄이고, 동물의 성장과 건강을 증진시키기 위하여 그 중요성이 높아지고 있다.

○ 국내 및 국외시장 분석결과 2011년 이후 국내에서도 성장 촉진용 항생제 제품 사용 규제가 엄격하게 적용됨에 따라 그 대체제인 천연 항생제 또는 항생제 역할을 하는 물질 개

발의 중요성이 높아지고 있다. 그 중 생균제는 오래전부터 장내의 이상 발효, 설사, 소화불량, 변비 감소 등에 효과가 인정되어 인체용으로 사용되어 왔는데 최근에 와서는 동물의 장내 환경 개선, 생산성, 개선, 설사발생 감소, 항생제 대체제 등의 목적으로 사료에 많이 이용되고 있다.

○ 2015년 기준 국내 사료첨가용 생균제 판매규모는 약 31,950톤에 이르렀다 (단미사료협회). 사료첨가용 생균제는 내성이 없고 친환경적이면서도 면역 효과 및 성장 촉진 효과가 기대되어 현재는 아래와 같은 종류의 생균제가 사용되고 있다 (표 6).

표 6. 사료용 생균제 시장에서 사용되는 미생물의 종류 및 효과 (Frost와 Sullivan, 2010)

생균제 (Probiotics)	생균제가 가축에서 보여주는 효과
<i>Bacillus</i>	가금류에서 살모넬라균 감염 감소, 돼지의 빠른 성장, 가금류와 돼지의 뼈 강도 증가
<i>Lactobacillus</i>	돼지, 말, 가금류의 영양소 소화율 증가
<i>Enterococcus</i>	사료 변환 증가, 체중 증가와 낮은 사망률
<i>Saccharomyces</i>	사료 변환 증가
<i>Aspergillus</i>	반추동물의 질소 가용성 증대, 미네랄 흡수와 밸런스 증대

○ 기존 사료첨가용 생균제는 경구로 투여할 경우 위액의 낮은 pH나 효소에 의하여 기능을 잃을 염려가 있으므로 위에서 보호되고 장에서 오래 머물면서 흡수가 잘 되는 장내 점막점착능력이 우수한 사료첨가용 생균제 개발이 필요하다.

○ 한국의 특허에서 초반기에 해당하는 특허는 하나의 문헌에 다수종의 생물자원종을 언급하면서, 이러한 조합이 예전부터 항생역할을 하는 것으로 기술하는 특허가 많았으나, 최근 특허에서는 하나의 생물자원종에서 항생역할을 하는 물질을 추출하는 특허가 많아지고 있다.

○ 2010년 이후 특허에서는 에어로코커스 속 (등록특허 KR10001249340B1), 락토바실러스 플라타룸 (등록특허 KR10001345248B1), 바실러스 서브틸리스 NP 15 (공개특허 KR102013000047329A), 바실러스 속 KROF1 (공개특허 KR102014000091988A), 바실러스 아밀로리퀴파시엔스 (등록특허 KR10001390457B1)와 같은 생균제이면서 항생역할을 언급하고 있는 특허가 많이 출원되고 있는 것으로 나타난다.

○ 이러한 기존 특허는 단일 미생물 생균제 사용 및 미생물에서 유용 물질 분비를 증진시

키기 위한 분야에 치중되어 있으므로, 바이오사료첨가제 사업단에서 효모/바실러스/유산균 등 생균활성 및 항생제 대체 효과를 보이는 복합 미생물 생균제 개발 방향으로 연구를 추진하여 관련 기술을 국내 및 국외에 출원 혹은 등록하였다.

○ 다른 여러 논문에서도 단일 미생물을 사용한 성장증진 효과 확인이나 미생물을 통한 재조합 단백질 분비 관련 분야에 치중되어 있으므로 내산성 및 내담즙성, 항균활성 등이 증진된 효모/바실러스/유산균 등을 균주육종을 통해 개량하여 실제 동물실험을 통해 적용 및 검증하는 방향으로 본 사업단에서는 바이오사료첨가제 연구에서 관련 논문을 투고하였다.

○ 더 나아가 본 사업단은 축산분야의 경쟁력 증진을 위해 사료첨가용 복합 미생물 생균제 및 효율적인 체내 전달을 위한 점막점착성 고분자 피복제 연구를 추진하여 유산균을 근간으로 효모 및 바실러스 복합 미생물을 사료첨가용으로 생산하여 국내에는 이미 시제품을 통한 상품화 (무항생제 친환경 닭고기 “닭터의 자연”- 에스엔마니커, 무항생제 친환경 삼계탕 “닭터의자연 삼계탕”-에스엔마니커, 친환경 사료첨가제 “바이오세큐Plus”-(주)푸른들 이엠사료 등)를 달성하였다.

(3) 현 생균제의 문제점 및 본 연구의 필요성

○ 슈퍼박테리아 등 항생제로 인한 2차적인 문제점이 많이 발생함에 따라 소비자들의 무항생제 친환경 축산물에 대한 수요가 확대되고, 2011년 7월부터 국내에서도 배합사료 내 항생제의 첨가가 금지됨에 따라 사료첨가용 항생제 대체제의 개발의 필요성이 강조되고 있다.

○ 우리나라에서도 2011년에 농림축산식품부에서 ‘농생명소재 산업화기술개발사업 요약보고서’를 발간하여 ‘향후 세계시장 선점 가능 10대 농생명소재’를 선정하면서 그 중 하나로 ‘천연 항생제 대체제’를 들고 있다. 더불어 이 카테고리 안에는 미생물 생균제, 허브추출물, 농산가공부산물 및 박테리오파지 등이 포함되어 있다 (그림 5).



그림 5. 농림축산식품부 선정 10대 농생명소재 (2011년)

○ 그러나 항생제 대체제는 말 그대로 항생제를 대체하여야 하지만 항생제처럼 저렴하면서도 높은 효과를 가진 대체제의 부재로 인해 치료용 항생제가 계속 사용됨에 따라 항생제 판매량은 더디게 감소하고 있다 (표 7).

표 7. 항생제 판매량 현황 (한국동물의약품협회, 2015)

구분	2010년	2011년	2012년	2013년	2014년
항생제 판매량	1,047톤	956톤	936톤	820톤	635톤

○ 현재 광의의 항생제 대체제는 단순히 항생제가 하던 역할을 대신할 수 있는 제품에 국한되지 않고 기존 항생제가 지닌 단점은 극복하면서 항생제가 사용되지 않는 무항생제 사육시대에 적용 가능하며 가축의 생산성과 건강 증진에 도움이 될 수 있는 다양한 기술들을 의미한다.

○ 특히 병원균에 대한 항균작용과 비특이적인 성장촉진 작용을 동시에 구현할 수 있는 미생물 생균제 및 면역기능 활성인자와 같은 비항생제 바이오 사료첨가제가 주목을 받고 있는 실정이다.

○ 이렇듯 축산분야에서 생균제를 활용하여 가축의 면역력을 증진시키고 질병을 예방하려는 시도가 이루어지고 있지만, 기능이 명확한가에 대한 확신이 부족하며 효과적인 생균제로의 입증은 부족한 실정이다.

○ 현 시판되는 생균제의 문제점은 다음과 같이 크게 3가지로 나누어 볼 수 있다.

① 생균제의 효능으로서 유해균의 억제, 혈중 콜레스테롤의 감소, 유해균의 장 점착 저해, 면역 활성 증강, 항암효과가 높아야 하나 그 효과가 미미하고 뚜렷하지 않다. 또한 생균제 작용 원리에 대한 과학적인 기전 검증도 불분명하다.

② 대장과 직장까지 도달하지 못하고 위산이나 담즙 등의 효소에 분해되는 비율이 높고, 장 운동 등을 촉진시키는 부가 효과 역시 기대하기가 어렵다

③ 실제 생균수가 적고 보존성이 낮다는 문제점이 있다. 일반적으로 자연계에 있는 미생물이 위의 모든 조건을 만족 한다는 것은 매우 어려운 일이기 때문에, 그만큼 과학적으로 충분히 검증되었으면서 적절한 기술이 잘 혼합된 복합 미생물 생균제의 개발이 필요하다.

다. 가축 분뇨 악취 문제 해결 대안으로서의 미생물 생균제

(1) 축산악취 심각성

○ 근래 가축 사육 농장에서 생성되는 가축 분뇨로 인한 악취문제는 농업 환경오염과 함께 사회적 문제로 대두되고 있다. 축산물 소비량이 해마다 늘어나면서 가축 사육 두수도 꾸준히 증가함에 따라 처리해야 하는 가축 분뇨의 양도 증가하였다.

○ 축사에서 나오는 분뇨 폐기물로 인한 악취 유해 기체는 하천 토지 대기 그리고 농작물에 피해를 입히는 주요 오염원으로 작용하며, 가축전염병 및 기생충병을 전파시키는 수단이 되기도 한다.

○ 축산악취의 주요 성분에는 암모니아, 황화가스, 인돌, 페놀류 등이 있으며 사람이나 돼지의 건강에 나쁜 영향을 미친다. 사람의 경우, 가벼운 염증과 재채기, 침 흘림 등을 유발하고 심한 수준에 이르면 즉각적인 사망을 일으키기도 한다. 가축에게도 마찬가지로 성장 저해와 밀폐된 사육사 안에서 호흡기 계통의 질병을 유발하는 등 생산성을 크게 떨어뜨린다.

○ 더 나아가, 가축 축사 주변의 인근농가와 지역사회에까지 많은 피해를 주고 있다. 돈사 내에서 외부로 방출된 악취 유해 기체는 쾌적한 대기환경을 오염시키고, 비를 통해 육지와 수계에 도달하면 토양의 산성화 및 하천의 부영양화를 초래하기도 한다.

○ 미국과 유럽에서는 상당수의 돈사작업장을 대상으로 작업자 노출 정도를 파악하기 위하여 NH₃ 가스와 H₂S 가스의 현장 조사를 수행하고 있으며 대기 및 토양 환경을 보호하기 위한 측면에서 외부로 방출되는 가스발생의 배출 원 단위 산정에 관한 연구도 동시에 수행하고 있는 실정이다.

○ 국내에서도 악취로 인한 민원 발생건수는 2001년 2,700건에서 2012년 9,941건으로 12년 동안 연평균 14%씩으로 매년 꾸준히 증가하는 추세이다 (그림 6). 쾌적한 대기질과 환경을 원하는 요구가 점점 커지고 있기 때문에, 이를 충족시키기 위해서는 반드시 축사 내에서 발

생하는 악취문제를 해결해야만 한다.

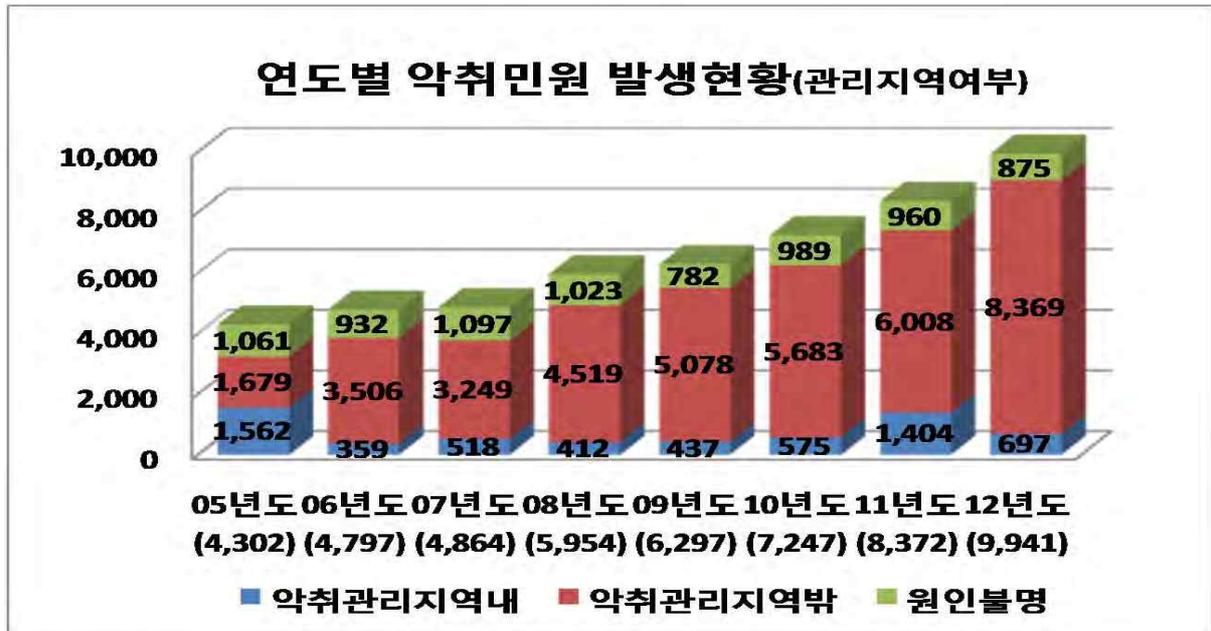


그림 6. 연도별 악취로 인한 민원 발생현황 (환경부, 2013)

(2) 축산악취 저감제 유통 제품 및 연구 동향

○ 악취제거 및 저감을 목적으로 시판되는 제품은 화학적 작용원리에 따라 방향제, 악취중화제, 소취제로 구분할 수 있다. 방향제는 악취를 원천 제거하기보다는 강력한 냄새로 악취를 마스킹(masking)하게 되고, 악취중화제는 원인 물질을 저감시켜 악취를 제거하는 제제를 말하여, 소취제는 방향제, 악취중화제를 포괄하는 개념으로 이들과의 명확한 구분은 모호하며 주로 일반 산업분야에서 활용되는 상품을 지칭한다.

○ 축산용 악취저감(제거)제의 종류: 현재 시중에 유통되고 있는 축산용 악취저감(제거)제는 약 300~400여종에 달하며 그 명칭도 악취방지제, 축산환경개선제 등으로 혼용되고 있다. 이중 동물용의약품으로 관련 기관의 기술적인 검토과정을 거쳐 허가된 제품은 약 80여종에 달하며 그 외의 제품은 보조사료로서 판매되고 있다.

○ 축산용 악취저감(제거)제의 작용방식

① 유산균, 효소와 같은 미생물 제제는 가축의 장내 정상 미생물총의 생성 및 유지에 직접적으로 관여하여 대사활성이 높은 유용 미생물의 증식을 촉진하고 이와 함께 소화력을 향상시키고 사료효율을 높임으로써 악취의 주요 발생 원인으로 알려진 분뇨 내 유기물 농도를 저감시키게 된다. 이와 별도로 가축분뇨에 광합성세균과 같은 미생물제제를 직접 살포하기도 하는데 광합성세균이 증식과정에서 악취 근원물질인 휘발성저급지방산, 황화수소 등을 영양물질로 활용하여 악취를 원천적으로 제거하게 된다.

② 인공·합성제품이 안고 있는 독성 및 잔류성 문제를 보완할 수 있을 뿐 아니라 관습적으로 안전성이 인정되어 최근 각광을 받고 있는 천연물·생약추출물제제는 가축의 장관 내

소화효소 분비를 촉진하고 장벽으로 흡수되는 UGF (unknown growth factor, 미지성장인자)를 다량 함유한 것으로 알려지고 있어 장내 미생물과 가축의 활력을 높이고 유해, 유익균을 선별·조정하여 소화율 향상에 기여하게 된다.

③ 아연, 구리 등 광물질제제는 가축의 장내 유해성분이나 악취발생 원인물질을 흡착하고 소화 효소의 보결분자단으로서 작용함으로써 소화효율을 극대화시킨다. 고전적으로 활성탄은 표면 흡착성이 높아 암모니아 가스와 같은 악취물질을 직접 흡착하여 악취억제에 기여하는 것으로 알려져 있다.

④ 소독제와 살충제를 유효성분으로 하는 악취저감(제거)제는 축사, 분뇨 등 발생원에 직접 살포하거나 분무함으로써 부패균과 같은 유해미생물을 사멸시키고, 유해미생물의 전파매체로 생각되는 파리, 모기, 바퀴벌레와 같은 위생해충이나 유해 설치류를 제거함으로써 악취제거의 효과를 기대하게 된다.

○ 축사에서 발생하는 악취방지의 최종목표는 발생한 악취를 완전하게 제거하는 것이지만 이를 위해서는 비용부담 등 많은 제약이 따르므로 주변 생활환경을 해치지 않는 정도까지 악취 발생량을 줄이는 것이 실제 목표가 된다. 즉 주변 환경에 나쁜 영향을 주지 않고, 악취로 인한 인근 주민들로부터의 민원이 발생하지 않도록 하는 것이 최종 목표가 되는 경우가 대부분이다. 또한 축사에서 일하는 사람들에게 정신적으로 또는 육체적으로 피해를 주지 않도록 하고, 밀폐된 사육공간에서 사육되는 동물의 생산성을 떨어뜨리지 않아야 한다.

○ 그러나 축사내부에서 이미 발생한 악취를 제거하여 가축에 영향을 주지 않게 하기는 매우 어려운 문제이다. 또한 현재의 축산은 축산시설의 자동화 못지않게 축사에서 발생하는 각종 악취로 인한 민원의 증가로 축산업 자체가 위협받고 있는 실정이다. 이를 해결하기 위해 그 동안 여러 방면에서 많은 연구가 수행되었으나 만족할 만한 해결책을 찾지 못하고 있다. 지금도 선진 축산 선진국에서는 악취로 인한 민원을 해소하고 지속적인 축산업을 운영하기 위하여 끊임없는 연구를 수행하고 있다. 축산시설에서 발생하는 악취를 제거하는 방법은 현재 여러 가지 관점에서 연구가 진행되고 있다.

○ 국내연구 개발 목표 및 내용 (표 8)

표 8. 국내 축산악취저감을 위한 연구 개발 내용 (농촌진흥청, 2009)

년도	연구개발 목표	연구개발 내용
2011 ~ 2020	축사내외 환경제어를 통한 악취저감 기술 개발	- 축산악취 확산의 정성적 및 정량적 예측을 위한 공기 유동학적 모델 개발 - 축산악취저감용 공기정화 시스템 개발
	축산악취저감 미생물 선발 및 보급	- 가축분뇨 퇴비화시 악취저감 미생물 변동상 구명 - 가축분뇨 퇴액비화 과정에서 악취저감에 효과적인 미생물 선발 - 악취저감 미생물제제 선발 및 보급
	악취저감 사료 개발	- 사료급여를 통한 악취저감 기술 개발 - 육성돈 분뇨의 악취저감용 발효사료 개발
	가축분뇨 이용 개선을 통한 악취저감 기술개발	- 가축분뇨 퇴액비화 과정에서 암모니아 발생량 추정 및 저감방법 - 축사 및 농경지에서의 암모니아 발생 저감방법 - 가축분뇨 활용 퇴액비화의 악취농도 평가기준(안) 설정연구

① 일반 산업단지 등 공단에서 발생하는 악취와 관련해서는 다양한 연구가 환경공학측면에서 개발되어 산업화가 진행되어 왔으나, 축산냄새 관련 연구는 일부에서 발생된 축산냄새의 저감기술 개발위 주의 연구가 진행되어 왔다.

② 축산냄새 관련해서는 2000년도 초반에는 주로 환경부에서 연구진행 되어 왔으며, 환경부산하기관인 국립환경과학원, 한국환경관리공단 등에서 축산시설에 대하여 일부 연구조사사업이 진행된바 있다.

③ 축산업분야에서는 양돈장 냄새저감서(2012)를 기점으로 하여 축산냄새 해결을 위한 다양한 연구사업의 진행과 함께 포럼 등이 진행되어 축산산업의 현안 문제인 축산냄새저감을 위해 학계, 축산단체 및 연구기관 등에서 최선의 노력을 다하고 있다.

④ 농촌진흥청 국립축산과학원에서는 돈사에서 축산냄새 저감장치의 개발 보급 및 사료의 소화율을 향상시켜 축산냄새를 저감시키는 다양한 연구가 진행되어 왔으며, 현재에는 돈사형태별, 가축분뇨 퇴·액비화방법별 축산냄새 배출특성 및 저감기술 개발의 위한 연구사업이 진행되고 있다.

⑤ 농축산부에서는 지난 2014년부터 축산냄새 관련 기술을 종합하여 현장실증연구를 진행 중에 있으며, 대한한돈협회에서는 환경개선제의 효과 검증을 위한 사업이 진행 중에 있다.

○ 국외 연구동향 및 전망 (표 9)

표 9. 국내의 연구동향 비교 분석표 (산업정책기술연구소, 1998)

동향 및 전망 기술 분야명	개발동향		부족기술 (한국)	발전전망	
	선진국	한국		제품발전전망	기술발전전망
환경 처리제	<ul style="list-style-type: none"> - 환경 처리용 재조합 미생물 개발 - 유기성 폐기물의 퇴비화 이용 활발 - 난 분해 폐수처리제 실용화 	<ul style="list-style-type: none"> - 몇몇의 회사에서 보편적 사료 첨가 미생물 환경 처리제 시판 - 개발 초기 단계 	<ul style="list-style-type: none"> - 균주 개발기술 - 균주 안정화 기술 - 미생물 제제화 및 보관 기술 	<ul style="list-style-type: none"> - 고도 유기물 및 난분해성 화학물질 처리용 미생물 제제 - 생활 폐기물 미생물 이용개발기술 	<ul style="list-style-type: none"> - 유전자 재조합 기술 - 미생물 고정화 기술 - 퇴비화 기술

① 축산산업에서의 분뇨냄새 발생요인을 규명하여 축산냄새발생을 원천 차단하는 방법과 함께 발생된 축산냄새를 저감하는 공정에 대한 연구가 심도 있게 추진되어 현장에 적용하고 있다.

② 축사와 가축분뇨 자원화공정에서 발생하는 악취물질의 발생원인, 강도 및 제어 등에 관련된 심도 있는 연구사업의 추진으로 축산냄새의 저감효율을 높이기 위한 다양한 연구사업이 현장에 적용하는 단계에 있다.

(3) 사료첨가용 악취저감 및 항생제 대체 미생물 생균제

○ 악취 문제와 항생제 남용 문제를 해결하는 것은 시대적 요구이며 더 이상 외면할 수 없는 사회적 문제이기도 하다. 따라서 이에 대처할 수 있는 방안이 필요한데, 사료첨가제 형태로서의 복합 미생물 생균제 급여는 악취 문제와 항생제 남용 문제를 동시에 해결할 수 있는 좋은 대안이 될 수 있다 (그림 7).

○ 축산에서 발생하는 악취를 제거하기 위한 방법으로 물리적 방법과 화학적인 방법, 생물학적 방법 등 여러 방법이 활용되고 있으나, 이용 처리 시스템에 따라 악취성분의 다양성으로 인해 효율이 저하될 뿐만 아니라 근원적으로 악취를 제거하지 못하며 유지비가 많이 소요되고 국내에서 검증되지 않는 생물 제제를 사용함으로써 병원성균 등에 의한 오염을 가져와 토양에 시비할 경우 가축이나 사람에게도 많은 영향을 미칠 수 있다.

○ 악취저감에 있어서 에어커튼과 같은 물리적인 방법과 소독제나 살충제 등을 활용한 화학적인 처리를 통해 악취를 저감하는 방법 등이 존재하나 한계가 있고 가축의 생산성에 부정적인 영향을 미친다. 미생물 제재를 이용하는 것은 가축들에게 위해를 가하지 않으면서도 근원적인 악취를 예방하고 저감시켜주는 가장 효과적인 방법이다. 미생물은 직접 악취 유해 기체를 영양원소 혹은 기질로 이용해 분해시키거나, 간접적으로는 악취 기체를 발생시키는 미생물들을 줄여주는 역할을 수행한다.

○ 항생제는 인간 혹은 가축의 교차 내성 및 감염 문제 이외에도 여러 가지 문제점들을 가지고 있다. 기존 항생제들이 돼지의 장내 미생물 환경을 위협했다면, 생균제는 장내 미생물의 균형을 바로잡아 주는 역할을 수행한다. 또한, 주사 백신으로 인한 스트레스를 막고 약제 비용을 절감시켜주어 생산원가로 애를 먹고 있는 농가의 경제 수입 향상에도 큰 도움을 줄 수 있다.

○ 최근 축산업에서는 복합적인 미생물 생균제를 활용하여 악취를 저감하고 가축의 면역력 증진 및 질병 예방을 위한 여러 시도들이 있었지만, 기능이 명확히 규명되고 효과가 충분히 검증된 생균제가 부족한 실정이다. 이에 본 연구는 선행연구와 명확히 규명되고 확보된 자원을 바탕으로 한 생균제를 이용하여 악취저감 및 항생제 대체 기능을 수행할 수 있는 사료첨가제를 개발하고자 한다. 미생물을 이용하여 악취를 제어 하는 목적으로서 가축 장기내의 미생물 상중 유익균의 인위적인 우점화를 통한 청정 축사 유도 및 육질개선과 더불어 분뇨 처리 시 환경 오염을 최소화하는데 이용할 수 있다.

라. 장내 점착능력이 우수한 항생제 대체 생균제

(1) 미생물 생균제 선발에 있어 장내 점막점착능력 평가의 필요성

○ 장 (intestine)은 외부 환경에 매우 민감한 하나의 큰 생태계라고 해도 과언이 아닐 정도로 굉장히 다양한 미생물과 영양물질 등이 존재하는 기관이다.

○ 최근 들어 high-throughput sequencing 기술의 발전에 힘입어 장내 미생물에 대한 연구가 많이 진행됨에 따라 장내에 어떠한 미생물들이 얼마나 존재하는지 상이하게 구분되는 특정 그룹 별로 혹은 한 개체의 성장 시기별로 분석이 이루어지고 있다.

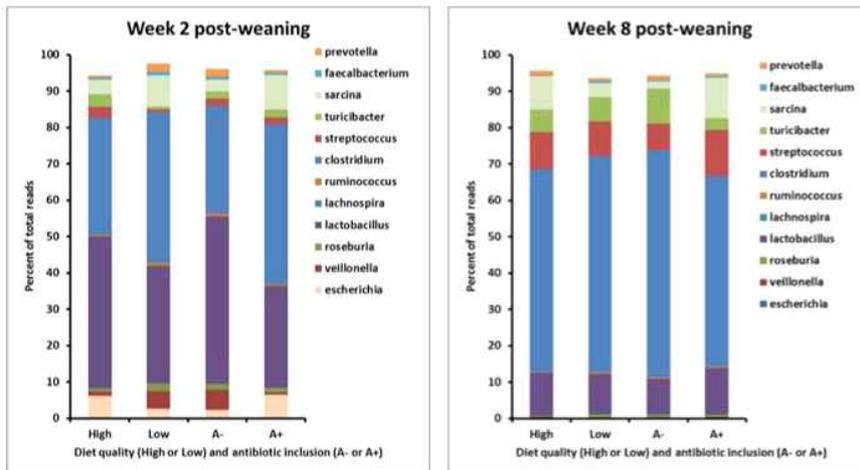


그림 7. 이유 후 2주차, 4주차 자돈에서의 영양조성이 우수한 사료를 급여한 그룹과 영양조성이 낮은 사료를 급여한 그룹, 항생제 비처리구와 처리구에 대한 장내 미생물 균총 비교 (Levesque C. L. 등, 2014)

○ 그림 8에서와 같이 전반적으로 시간이 지남에 따라 같은 그룹 내에서도 장내 미생물 균총의 다양성이 떨어짐은 물론 무엇을 처리하는가에 따라 미생물 균총이 달라지는 것을 확인할 수 있다. 또한 포유기에는 돼지의 장내 미생물이 *Lactobacillus*와 *Streptococcus*와 같은 그람 양성균인 반면, 이유 후에는 coliforms와 같은 그람 음성균이 우점하게 되는 양상을 확인할 수 있다.

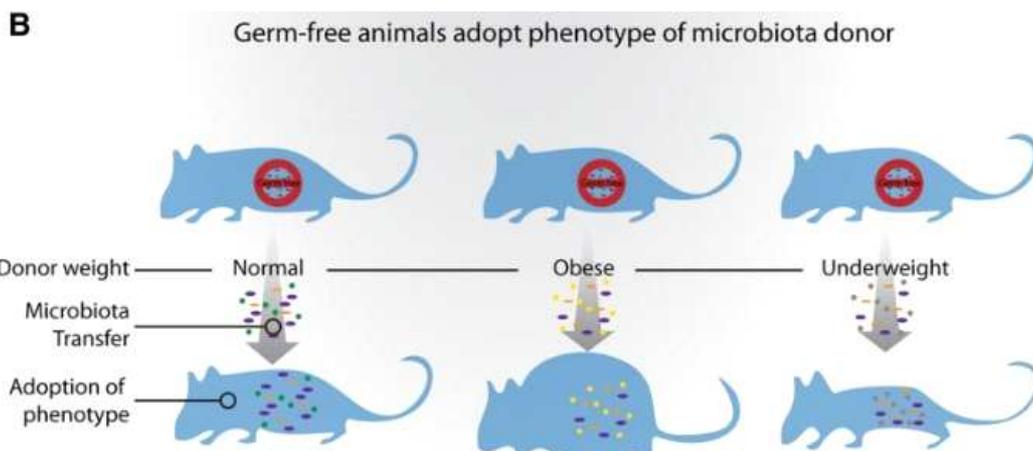


그림 8. Germ free mouse에게 donor (normal, obese, underweight)의 장내 미생물을 전이 했을 때 나타나는 phenotype이 donor의 체형과 유사해짐을 확인 (Sarah Dash 등, 2015)

○ 그림 9의 결과에서는 장내에 어떠한 미생물들이 존재하는지, 또 얼마나 많이 존재하는지 등 장내에 존재하는 미생물의 균총에 따라 숙주의 phenotype에 영향을 미치고, 그 영향이 다양한 형태로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 즉, 숙주의 성장 및 건강에 이로운 효과를 제공하는 생균제의 기능을 극대화하기 위해서는 기존 연구들이 관심을 두었던 항균활성, 효

소생산성 등 뿐만 아니라, 숙주의 장 내에 얼마나 잘 정착하고 성장할 수 있는지도 매우 큰 요소라고 할 수 있다.

○ 이에 본 연구에서는 기존의 항균력을 기준으로 한 미생물 생균제를 선발하는 연구와 달리 생균제로 처리한 미생물들이 숙주의 장내에 잘 정착 및 서식하여 유익한 기능을 효과적으로 숙주에게 발휘 할 수 있도록 장내 점막점착능력 및 성장 활성을 평가하여 미생물 생균제를 선발하고자 한다.

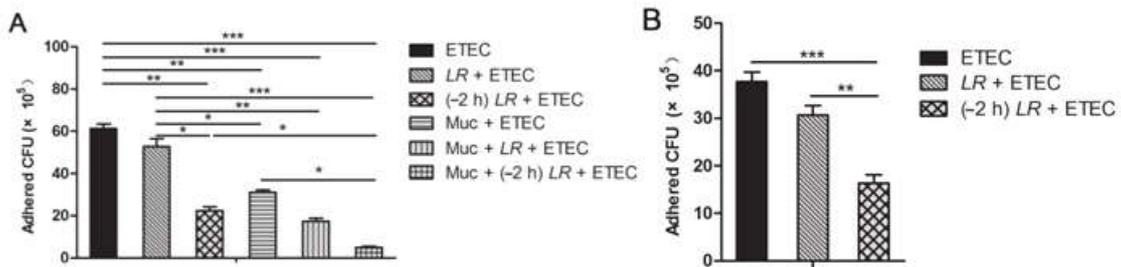


그림 9. 돼지 소장상피세포 (A)와 mucin이 코팅된 plate (B)에서 각 그룹별 점착된 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)의 CFU (colony forming unit) 수치 (Zhang 등, 2015)

(2) 미생물 생균제 선발 방법 및 연구 동향

○ 미생물 생균제에 대한 연구 및 개발이 많이 이루어졌음에도 불구하고 효과적인 미생물 생균제에 대한 요구는 아직도 그 수요가 줄지 않고 있다. 이러한 현상을 살펴보았을 때 미생물 생균제를 선발하는 방법에 문제가 있는 것은 아닌지 다시 살펴 볼 필요가 있다.

○ 미생물 생균제 선발하는 방법은 체계적으로 전형화되어 있지 않아 각 각의 연구팀마다 수행되고 있는 항목과 그 기준이 매우 다르다. 미생물 생균제 선발 시 주로 평가하는 항목을 비중이 큰 순서대로 정리하자면 다음과 같다.

- ① 항균력: 미생물 생균제 이용 시 가장 크게 기대하는 효과로 병원성 미생물의 성장을 저해 할 수 있는 기능성 평가
- ② 면역 증강 효과: 미생물 생균제를 통해 숙주의 면역체계를 modulation 할 수 있는 기능성 평가
- ③ 효소생산성: 생균제가 숙주의 소화장관에서 영양분의 소화 혹은 흡수에 도움이 되는 효소를 분비하여 숙주의 음식 (사료) 섭취의 효율을 증가시킬 수 있는지 평가
- ④ 내산성 및 내담즙성: 장내로 유입되기까지 미생물 생균제가 거쳐야 하는 소화 효소에 대한 tolerance를 확인하는 평가

○ 대체로 미생물 생균제 선발 평가는 기능성에 치우쳐 이루어지는 것을 확인할 수 있으며, 내산성 및 내담즙성의 평가도 이루어지지만 장내로 유입 후 점막에 점착되어 장내에서 계속 머물러 그 효과를 발휘하는지에 대한 입증은 부족한 것을 알 수 있다

○ 장내 점착능력을 통한 미생물 생균제 연구 동향의 경우, 국내에서 등록된 특허나 논문은 점막 점착능력을 토대로 미생물 생균제를 개발 및 연구한 사례가 매우 적다. 위에서 언급하였듯이 주로 기능성 평가를 위주로 연구가 진행되어왔다.

○ 반면 최근 들어 국외에서는 장내 점막점착능력이 우수한 유산균을 사용하여, 병원성 미생물이 장내에 부착하는 것을 억제하여 물리적으로도 병원성 미생물의 감염을 방어할 수 있음을 입증한 연구 사례가 증가하는 추세이다.

○ 2015년 PLoS One에 게재된 한 논문에서는 돼지 소장상피세포와 mucin이 코팅된 plate에 ETEC (enterotoxigenic *E. coli*)만을 처리한 그룹, *Lactobacillus rhamnosus* (LR)와 ETEC를 같이 처리한 그룹, LR을 처리 후 두 시간 뒤에 ETEC를 처리한 세 개의 그룹에서 얼마나 ETEC가 점착하여 있는가를 평가하였다.

○ 그 결과 LR를 선 처리 후 ETEC를 처리한 그룹에서 돼지 소장상피세포는 물론 mucin이 코팅된 plate에 부착한 ETEC의 CFU (colony forming unit)값이 ETEC만을 처리한 그룹에서의 CFU 값과 비교하였을 때 유의적으로 감소한 것을 확인 할 수 있으며, 소장상피세포에 mucin을 코팅 했을 때 ETEC를 처리하여 부착한 ETEC의 CFU 값이 소장상피세포에 ETEC를 처리한 그룹의 CFU 값보다도 유의적으로 감소하는 것을 알 수 있다.

○ 이 외에도 생균제로서 선발한 미생물이 소장상피세포에 점착 및 mucin 분비를 촉진하여 기회성 감염 미생물들이 소장상피세포에 부착하는 것을 물리적으로 억제하여 설사병을 예방할 수 있음을 입증한 연구 사례가 있다.

○ 이렇듯 장내 점막점착능력에 대한 미생물 생균제 선발 연구는 미생물들의 장내 서식 능력을 평가하는 것 이외에도, 병원성 미생물들에 대한 물리적 감염 방어능을 가지고 있어 그 의미가 크다 (그림 10).

○ 이에 본 연구과제에서는 미생물들의 장내 점막과 소장상피세포에 대한 점착능력 평가를 기반으로 우수한 항생제 대체용의 미생물 생균제를 개발하는 전략을 취하고자 한다.

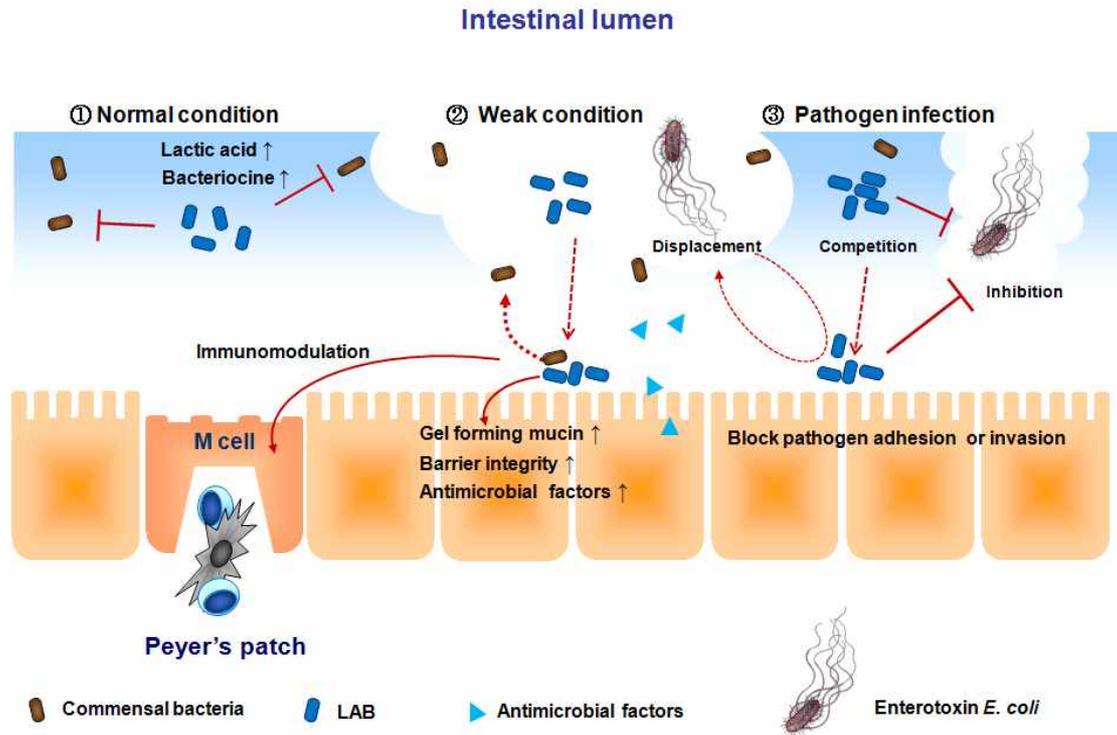


그림 10. 장내 장내점착능력이 우수한 미생물 생균제의 기능 및 역할

마. 프리바이오틱스 (Prebiotics)

(1) 프리바이오틱스의 정의 및 연구의 필요성

○ 프리바이오틱스는 건강기능성 식품, 의약산업, 축산업 등 다양한 분야에서 최근 각광받고 있는 생물학적 제재로서 1995년 Gibson과 Roberfroid에 의해 처음 제안된 개념이다. 프리바이오틱스는 락토바실러스, 비피도박테리아와 같은 장내 유용 미생물에 의해 이용되어 미생물의 생육이나 활성을 촉진함으로써 숙주 건강에 좋은 효과를 나타내게 하는 비소화성 식품 즉, 프리바이오틱스는 장내 유익균의 영양원으로 이용되는 제재라고 할 수 있다.

○ 특정 식품성분이 프리바이오틱스의 조건을 갖추기 위해서는 위장관의 상부에서 소화 또는 흡수되지 않아야 하고 장내 미생물 중 비피도박테리아와 같은 유용균을 선택적으로 활성화시키며 병원균 등의 유해균은 억제할 수 있어야 한다. 이러한 조건을 갖추는 프리바이오틱스는 탄수화물과 올리고당으로서 주로 비소화성 올리고당 (NDO, non-digestible oligosaccharides)으로 구성되어 있다.

○ 프리바이오틱스의 전통적인 기능은 장내 유익균의 우점 및 활성 촉진, 유해균의 성장 억제, 당화 발효 촉진에 따른 단쇄지방산 생성, 장 내 호르몬 분비 촉진, 장내 함수율 증가 등을 통해 장내 미생물 군총의 균형을 유도하고 장건강을 유지하는 것이다 (표 10).

표 10. 프리바이오틱스의 장 내에서의 효과 (Lee와 Salient, 2009)

위장 상부에서의 효과	위장 하부에서의 효과
소화에 있어서의 저항성	장내 유익균의 우점 및 활성 증가
위 정체시간 증가	대장내 발효에 있어서의 기질로 작용
포도당 흡수 억제 및 낮은 혈당지수	당화 발표 촉진 및 발효 부산물 생성 (주로 단쇄지방산)
소장 상피조직 증식 유도	대장 상피조직의 증식 유도
장 호르몬 분비 촉진	대대장 호르몬 펩타이드의 분비 촉진

○ 이외에도 프리바이오틱스에 대한 여러 연구들이 이루어지면서 프리바이오틱스는 장 내 유익균 성장 촉진이라는 전통적인 기능뿐만 아니라 항암작용, 항균작용, 면역반응 활성화, 무기질 흡수 및 균형 개선, 간, 뇌질환 억제, 염증성 장질환 개선 등의 다양한 건강개선 효과를 매개하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어 프럭토올리고당, 이눌린, 베타 글루칸의 경우 장 내 미생물과는 별개로 선천성 면역반응에 관여하는 세포 표면에 발현된 수용체와 작용하여 면역세포의 식세포 작용 활성화, 호중구 활성화, 보체계 활성화 등의 기능을 통해 선천성 면역 반응을 활성화하는 것으로 알려져 있다.

○ 프리바이오틱스는 이러한 다양한 활성을 통해 가축 생산성, 축산 환경 및 축산물의 안정성 측면에 있어 최근 축산업에서도 주목받고 있는 제제이다. 프리바이오틱스는 가축에게 있어 장내 유익균의 성장을 촉진하고 유해균의 성장을 억제하여 가축 생산성 및 각종 질병에 대한 저항성을 증가시키고 가축 분노 악취 억제, 반추동물에서의 메탄 생성 등 축산 환경에 있어서도 이로운 효과를 매개하는 것으로 밝혀졌다. 또한 프리바이오틱스는 축산업에 있어 항생제 대체 물질로서 주목을 받고 있는데 프리바이오틱스는 항생제에 비해 장기간 섭취시 안전하고 항생제 사용으로 유발되는 간 손상, 설사 등의 부작용들을 유발하지 않으며 항생제 저항성 유전자 발현 및 알레르기 반응을 촉진하지 않는다는 장점을 가지고 있다.

○ 농림 평가원 보고서에 의하면 전세계 프리바이오틱스의 시장성장률은 연평균 12.8% 대의 성장율을 보이고 있다. 뿐만 아니라, 유럽과 미국에서는 2015년에 11억 7,000만 달러 및 2억 2,500만 달러 규모의 시장 형성을 할 수 있을 것이라는 전망이 나왔다. 프리바이오틱스의 경우 다양한 제제가 존재하며 제제마다 그 활성이 상이하다는 점에서 앞으로의 시장가치는 무궁무진 할 것이라고 예측된다. (그림 11, 12)

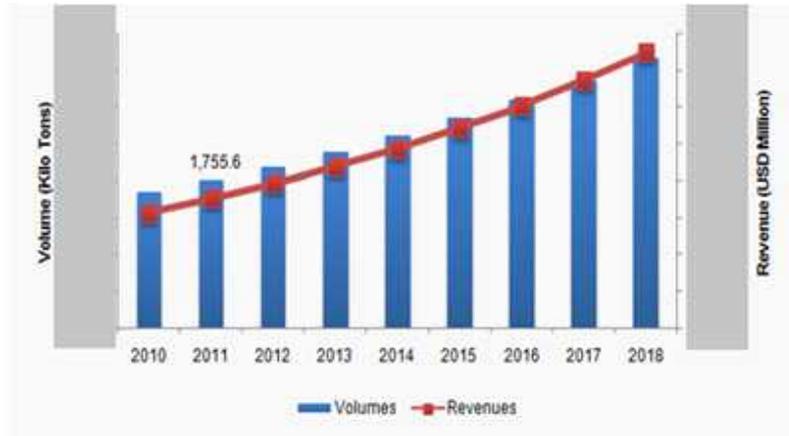


그림 11. 미국에서 프리바이오틱스의 시장규모 및 그에 따른 수입 (Transparency Market Research, 2013)

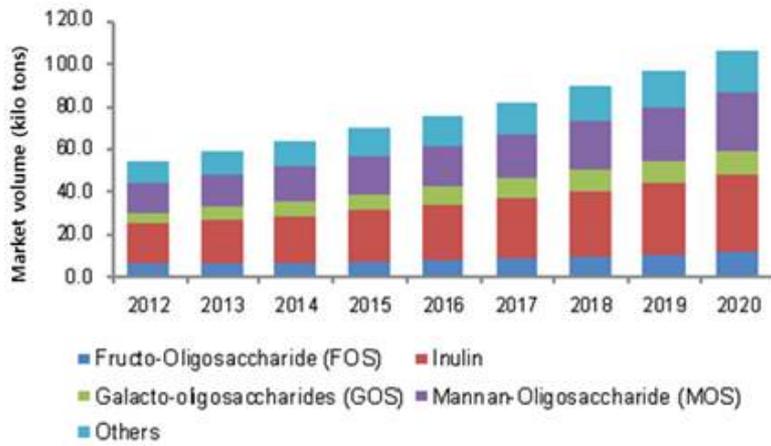


그림 12. 프리바이오틱스 제제들의 시장규모 (Grand View Research, 2014)

(2) 프리바이오틱스 연구 동향 및 전망

○ 프리바이오틱스는 다양한 분야에서 여러 대상에게 있어 다양한 효과에 대한 연구가 진행 중이다 (그림 13). 해당 연구의 예는 아래와 같다.

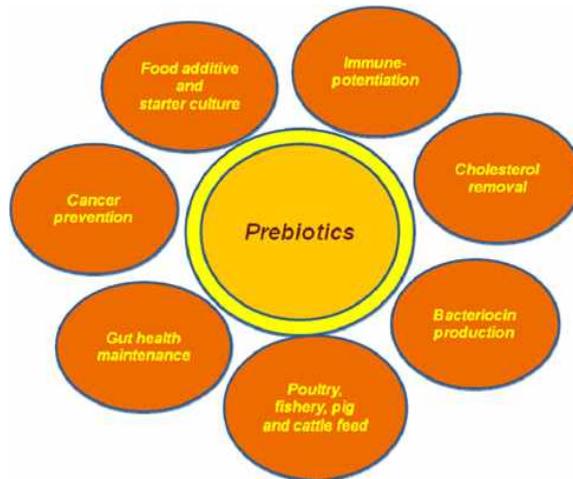


그림 13. 프리바이오틱스의 잠재적 활용 범위
(Patel과 Goyal, 2012)

① 프리바이오틱스가 직접적으로 면역증진 효과를 일으키거나 혹은 장내미생물의 성장을 촉진시킴으로써 숙주의 면역력을 증진시킬 수 있다. 특히, β -1,4-mannobiose (MNB)는 닭 대식세포의 식균 작용을 증가시켰으며, 면역작용에 필수적인 유전자들을 증가시킨다.

② Arabionoxylan-oligosaccharides (AXOS)가 풍부한 음식은 carcinogen을 처리한 랫드의 종양 생성을 저감시킨다.

③ 콜레스테롤의 수준을 낮춰 심장질환의 위험성을 감소시킨다는 보고도 존재한다. 실제로 sorbitol을 *P. acidilactici* LAB 5와 함께 Swiss albino mice에 처리하였을 때 혈중 콜레스테롤 수준이 감소한다는 보고가 있다.

○ 프리바이오틱스는 앞서 언급했듯 다양한 효과에 대한 연구가 진행 중일 뿐만 아니라, 친환경적인 제조 분야에 있어서도 연구가 진행 중이다. 특히 산업적 부산물로부터 얻은 프리바이오틱스의 활용은 경제적, 환경적으로도 큰 의미가 있다. 한 예로 두부 생산 부산물인 대두 유청은 NDO를 함유하고 있는데, 이것은 망장에서 무기질 흡수를 돕는 역할을 하는 프리바이오틱스이다.

(3) 신바이오틱스 (Synbiotics)

○ 프리바이오틱스와 함께 대두된 개념이 신바이오틱스 (synbiotics)이다. 신바이오틱스란 프리바이오틱스와 프로바이오틱스 개념을 합한 것으로 이 둘을 혼합하여 단일체제로 이용할 경우 장 내에 유용균이 잘 정착되어 그 활성효과가 훨씬 효과적으로 나타날 것으로 기대할 수 있다 (그림 14).

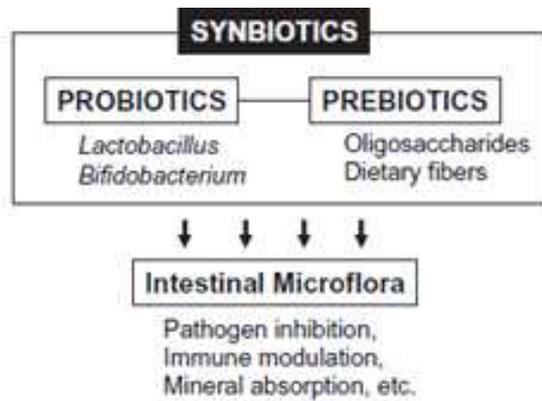


그림 14. 신바이오틱스의 개념 모식도
(Gibson과 Roberfroid, 1995)

○ 이에 본 연구에서는 신바이오틱스의 개념을 도입하여 악취저감 및 항생제 대체 생균제와 프리바이오틱스 후보 물질들간의 시너지 효과를 테스트 및 검증하여 생균제에 의한 악취저감 및 항생제 대체 기능을 최대한으로 발휘시키고자 한다.

제3절 연구개발 범위

1. 주요 연구 내용

선행연구 “바이오사료첨가제사업단 (2010-2013)”과제 개발 자원 활용 단기 연구개발 산업화 추진

선행과제를 통해 확보된 항균능력 우수 유산균 POOL / 천연물 제제 후보물질군 대상

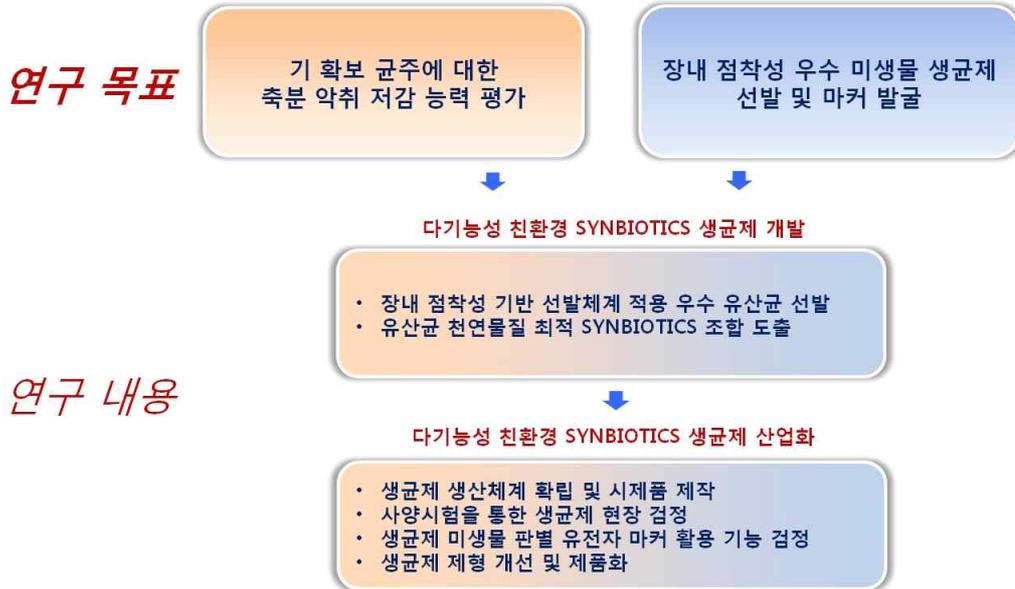


그림 15. 본 연구과제의 주요 연구 내용 및 목표 요약

- 기 확보된 축산악취저감에 효과적인 미생물 및 천연물질 검정: 국가연구개발 우수성과 100선에 선정된 농림축산식품부 주관으로 2010년 ~ 2013년 수행된 생명산업기술산업화지원사업 “바이오사료첨가제개발사업단 (단장 서울대 최윤재 교수)” 과제 결과물의 일부 이용 및 *in vitro* system 기반의 효과 검정
- 천연물질과 미생물을 기반으로 하는 축산악취저감용의 최적 조합 개발: 축산악취저감에 효과적인 천연물질 및 미생물을 이용하여 최적의 친환경 복합 미생물 생균제 조성 확립 및 대량 생산체계 확립
- 장내 점착능력이 우수한 항생제 대체용의 미생물 생균제 개발: 체계적인 *in vitro* system을 구축하여 장내 점착능력이 우수한 항생제 대체용의 미생물 생균제 개발
- 유전체 분석을 통한 생균제 선발 유전자 마커 개발: 장내 점착능력을 기반으로 선발된 미생물의 유전체 분석을 통하여 이들과 관련된 유전 인자를 분석 및 생균제 선발 유전자 마커 개발
- 사료첨가용 복합 미생물 생균제를 이용한 축산 농가의 환경 개선 및 친환경 축산 구현: 천연물질 및 미생물 기반의 축산악취저감제를 이용한 축산 농가의 환경 개선과 항생제 대체용의

2. 과제별 연구 내용

가. 세부과제 : 서울대학교 농생명공학부

- 연구목표 : 가축 분뇨 악취저감 및 항생제 대체용의 친환경 복합 미생물 생균제의 개발
- 주요 연구내용 :
 - 축산악취저감에 효과적인 천연물질과 미생물 및 장내 점착능력이 특화된 생균제 개발
 - 선행 바이오사료첨가제 개발사업단 연구과제를 통해 축산악취저감에 특화된 결과물과 본 연구를 통해 확보한 소재들의 최적 조성 확립
 - 장내 점착능력이 우수한 항생제 대체 미생물 생균제 개발
 - 사양실험을 통한 효과 검증 및 산업화

3. 연차별 연구개발 목표 및 내용

가. 세부과제 : 서울대학교 농생명공학부

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2015	축산악취저감용의 미생물 및 천연물질의 시너지 효과검정	<ul style="list-style-type: none"> ○ 악취저감에 효과적인 생균제 및 천연물질 후보 설정 ○ 생균제 후보군과 천연물질의 악취저감 능력 평가 ○ 후보 조합에 대한 안전성 및 산업적 특성 평가
		장내 점착능력이 우수한 사료첨가용 미생균 생균제 선발	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>In vitro</i> 시스템 기반의 미생물 생균제 선발 방법 체계화 ○ <i>In vitro</i> 시스템 기반의 survival rate 평가 ○ <i>In vitro</i> 시스템 기반의 장내점착능력 평가
2차년도	2016	복합 미생물 생균제 최적화 및 사양실험 기반의 생균제의 효과 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 축산악취저감용의 천연물질 및 미생물기반의 복합 미생물 생균제 최적화 ○ 사양실험 기반의 복합 미생물 생균제 효과 검증 ○ 대량생산 시스템 구축 및 산업화
		장내 점착능력이 우수한 생균제 선발을 위한 유전자 마커 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물 유전체 sequencing 및 분석 ○ 생균제 선발을 위한 유전자 마커 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 기술개발 현황

1. 축산악취저감용 생균제

○ 악취저감에 효과를 보기 위해서는 여러 가지 기존의 생균제 중에서 악취저감에 효과가 있는 것으로 알려진 균들을 조합하여 사용하면 효과가 클 것으로 판단된다. 실제로 혼합 생균제는 비육돈의 암모니아 및 황화수소 발생을 감소시킴으로써 사육환경 개선 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 이 혼합 생균제는 악취감소뿐만 아니라 체중 증가 및 사료 효율 향상에도 기여했기에 매우 가치 있는 발견이라 생각된다 (Ra 등, 2004).

○ *Lactobacillus sp.*는 여러 가지 기작을 통해 위해균을 억제함으로써 넓은 범위의 항진균 활성 및 항세균 활성을 나타내므로 사료 보존제 및 천연식품 보존제로의 활용이 가능할 뿐만 아니라 축산악취 감소를 위한 재료로 생각되어진다. 이것은 숙주에 대한 강력한 부착능을 가지고 유해균의 장내 부착 및 콜로니화를 방해하거나 부근의 pH 산성화 및 bacteriocin 과 같은 항균물질 분비를 통해 유해균의 성장을 저지시키며, 이를 통해 장내 균총을 정상화시켜 증체율과 생산성 및 사료 이용률을 증진 시켜준다 (Yang과 Chang, 2008).

○ *Bacillus sp.* 는 α -amylase와 protease 생산능력이 뛰어날 뿐만 아니라 dipicolinic acid라는 항균물질을 생성하여 유해균을 억제하고 유익균의 증식을 촉진하며, 특히 포자를 형성하기 때문에 생존율이 우수하다 (Lee, 2002).

○ *Clostridium sp.* 중 하나인 *C. butyricum*은 이름에서 알 수 있듯이 butyric acid를 생산하고, 각종 당과 아미노산을 prebiotics로 이용하여 결론적으로는 설사를 유발하는 유해균의 증식을 억제하는데 쓰인다. 특히 산과 알칼리 조건에 대한 저항성이 강해 특정 유해세균의 예방에도 유의적인 효과를 나타냄이 알려져 있다 (정과 장, 2009).

○ 생균제 발효사료를 닭에 급여하였을 때 축사 내 유해가스 (암모니아 및 황화수소)가 감소하였으며, 뿐만 아니라 닭의 일당증체량 역시 증가함이 보고되어 있다 (Kim 등, 2001).

○ *B. subtilis*는 혈액 내 요소성 질소를 감소시킴으로써 분뇨 내의 암모니아 발생량을 감소시키고, 계사 내 암모니아 가스 생성을 감소시킨다. 이는 유기물의 분해와 질소 이용율을 증가시키는 능력과 관계가 있다 (권 등, 2002).

○ *B. licheniformis*는 단백질 가수분해 저항성을 가지고 있고, 항균능과 열 안정성이 높다. 장에 도달할 때까지 활성을 유지하여 생균제로서 매우 효과적이라는 분석이다. 이 뿐만 아니라, *B. polyfermenticus*는 항진균 및 항세균 활성을 동시에 가지는 항균물질을 생산하여 유해균의 성장을 억제할 수 있다 (정과 장, 2009).

○ 미생물 칸디다 글라브라타 (*Candida glabrata* KACC93112P)가 축산분뇨의 악취저감효과 및 가축의 체중 증가 효과를 가진다는 특허가 있다. 이것을 급여하는 것만으로도 발생하는 축산분뇨의 악취 감소 및 가축의 체중증가 효과를 얻을 수 있으며, 축산 환경오염 문제를 개선하고 해충에 의한 가축과 인간의 이차적인 피해도 감소시킬 수 있는 효과를 얻을 수 있다 (출원번호 : 1020100129719).

○ 쌀의 세척수인 쌀뜨물을 이용하여 유산균을 배양 혹은 발효시켜 항균성능 또는 악취 제거 성능이 우수한 생균제 및/또는 악취 저감제를 제공하는 방법이 있다. 백미에 세척수를 사용한 세미 과정을 통해 고형물 농도가 1.5 ~ 2.0 wt%인 쌀뜨물을 준비하는 단계; 상기 쌀뜨물에 사전 배양된 유산균주와 당밀을 각각 1 wt% 및 2 wt% 첨가하여 1차 발효를 수행하는 단계; 1차 발효액을 원심분리하여 상등액을 분리하는 단계; 분리된 상등액을 여과하는 단계; 상온에서 10일간 숙성하는 2차 발효를 수행하는 단계; 및 여과 단계를 거쳐 제조되는 것을 특징으로 하며, 농가에 친환경 생균제를 공급하고 축산분뇨 악취를 효과적으로 감소시키며, 환경 오염원으로 작용할 수 있는 쌀뜨물을 효과적으로 활용할 수 있는 수단을 제공한다. 실제로 쌀의 세척수인 쌀뜨물을 *Lactobacillus sakei* 또는 *Lactobacillus plantarum* 등과 같은 유산균의 발효 혹은 생장에 적용하여 항균성능 또는 악취 제거 성능이 우수한 생균제/악취 저감제를 제공할 수 있어, 친환경 생균제 공급이 가능하고, 축산분뇨 악취를 효과적으로 감소시킬 수 있는 효과가 있다 (출원번호 : 10-2015-0172961, 출원 일자 : 2015.12.07.).

○ 바실러스 아밀로리퀴페시언스 AYE-1 (*Bacillus amyloliquefaciens* AEY-1, 기탁번호 KCTC18314P) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 건조물에서 선택된 1종 이상; 및 바실러스 부타노리보란스 AEY-2 (*Bacillus butanolivorans* AEY-2, 기탁번호 KCTC18315P) 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 건조물에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는, 암모니아 악취저감용 혼합 미생물제제 및 이의 제조방법에 관한 특허가 있으며, 암모니아 악취를 신속하고 효율적으로 저감하여 축산환경개선에 기여할 수 있다. 실제로 바실러스 아밀로리퀴페시언스 AYE-1 (*Bacillus amyloliquefaciens* AEY-1) 및 바실러스 부타노리보란스 AEY-2 (*Bacillus butanolivorans* AEY-2) 균주 미생물제제를 이용할 경우, 미생물제제 1.0 wt% 살포량에 따른 1회 살포 후 24시간 경과 후 암모니아 가스를 약 90% 저감시키는 효과를 나타냈다 (출원번호 : 10-2016-0146045, 등록일자 : 2017.11.15.).

2. 항생제 대체용 생균제

○ 최근 국내 축산에서 2011년 7월 배합사료 내 성장 촉진용 항생제 사용 금지 이후, 가축의 성장 증진 및 질병 예방을 위해 항생제를 대체할 수 있는 생균제를 활용하고자 하는 시도가 이어지고 있다.

○ 항생제를 대체하는 미생물 생균제는 숙주동물에 유익한 효과와 더불어 비병원성이며 독성이 없어야한다. 뿐만 아니라 살아있는 균주로서 그 균수가 많아야하며, 낮은 pH와

유기산으로 이루어진 장내환경에서 생존하고 대사할 수 있는 균으로 장기간동안 안정해야 하며 생존능력이 유지되어야 한다는 조건을 충족시켜야 한다.

○ 항생제 대체 생균제를 개발하는 회사로는 진바이오텍, 이지바이오, CJ사료, 농협, 바이오 &그린텍, 네오그린, 우진비엔지 등이 있으며, 대체제로는 박테리오파지, 생균제, 단미 보조사료 등이 있다. 현재 항생제 대체 생균제는 단미 보조사료로 분류가 되어 정확한 데이터를 얻기는 힘들다.

○ 보조사료 중 생균제 시장은 30년 전 국내 축산업에 적용된 이후로 꾸준한 제품 개발이 이루어져왔으며, 2011년 항생제 사용이 전면 금지된 이후에 급격한 성장률을 보였다 (표 11). UN 조사에 따르면 우리나라는 베트남에 이어 두 번째로 항생제 사용이 많았던 국가로 축산물에 잔류 및 축적되는 항생물질의 부작용을 근원적으로 해결하기 위한 방안으로 생균제가 각광을 받으며 그 시장이 더욱 더 성장할 것으로 전망된다.

표 11. 국내 생균제 판매현황 (단위: 톤) (단미사료협회, 2015)

구분	2010년	2011년	2012년	2013년	2014년
생균제	28,406	28,933	31,196	31,576	31,950

○ 가축용 생균제는 장내 유기산의 주요 구성 성분인 젖산 (lactic acid) 생성을 촉진시키고 장관 내 pH를 낮춰 줌으로써 대장균, 살모넬라 등 병원성 균의 증식을 억제하며, 유기산과 같은 항균물질을 생산하여 체내에서 항균작용을 하는 등 여러 가지 복합적인 작용에 의해 정상 균총을 유지시키고 궁극적으로 가축의 생산성 향상을 도모할 수 있다 (농림수산식품기술기획평가원).

○ 콩물 유래의 바실러스 속 균주, 락토바실러스 속 균주, 코니박테리움 속 균주, 슈도모나스 속 균주 등을 이용한 생균제 사료용 복합 미생물 제제의 경우 열에 강한 내열성 균주를 포함하고 있기 때문에 가열을 처리하여도 미생물들이 생존할 수 있으며, 내산성 균주를 포함하고 있기 때문에 장까지 도달해 제 기능을 발휘하게 한다. 이로 인해 동물들의 사료 섭취량이 증가되고 이어 증체량을 증가시키는 효과가 있는 제제로 특허 출원이 되어있다 (출원번호 10-2013-0053454, 2013. 대한민국 특허청).

제2절 해외 기술개발 현황

1. 축산악취저감용 생균제

○ 다양한 strain (multistrain)의 생균제를 사용하면 육계의 분 냄새 감소와 함께 영양분 흡수율 및 성장률 역시 증진한다는 내용의 연구가 있다. 이 연구에서는 *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum*을 육계에 투여했으며, 다른 지표들과

함께 대조구 대비 암모니아 저감율이 향상되었다 (Zhang 등, 2014).

○ 약취저감은 생균제 처리 외에 다양한 방법으로 이뤄질 수 있다. 그 중 하나가 분변에 직접 생균제나 화학약품을 처리하는 방법이다. 그 일환으로 Sebastian Borowski는 생균제와 미네랄을 섞어 사용하였다. Perlite-bentonite와 함께 생균제를 encapsulation했을 때 암모니아 저감율이 90%였으며, 이러한 형태는 상온에서 5개월동안 보존되는 높은 stability를 나타냈다 (Borowski 등, 2016).

○ *Bacillus subtilis* 2084 (NRRL B-50013), *B. subtilis* 27 (NRRL B-50105) *B. licheniformis* 21 (NRRL B-50134) *B. licheniformis* 21 (NRRL B-50134)에 대하여 동물의 waste에 처리 시 냄새가 감소하는 특허가 있으며, 세부 내용은 이들의 조성을 포함한다. 가축에 국한되지 않은 점이 있다 (출원번호 : US 13/782,470, 출원일 : 2013.3.1.).

○ *Bacillus amyloliquefaciens*라는 생균제 strain이 육계의 변 냄새 제거 및 성장률과 장내균총 조성을 변화시킨다는 내용의 연구가 있다. 이 연구에서는 *B. amyloliquefaciens*를 직접 육계에 먹여 이후 지표를 살폈으며, 대조구 대비 황화수소 가스의 양을 유의적으로 ($P < 0.001$) 감소시켰으며, 다른 지표 역시 긍정적인 방향으로 증가시켰다는데 의의가 있다 (Ahmed 등, 2014).

○ 지금까지 생균제였다면, prebiotics를 이용한 약취감소 연구도 존재한다. Yang 등은 dietary oligosaccharide의 첨가가 육계의 휘발 nitrogen 양을 감소시키며, 기타 다른 성장 지표에도 긍정적인 영향을 미침을 확인했다 (Yang 등, 2016)

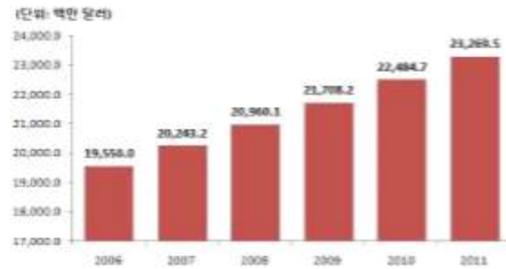
2. 항생제 대체용 생균제

○ 세계 미생물 사료첨가제 시장의 규모는 2011년 1.9조 원이고, 2018년에는 3조 원에 이를 것으로 예상되고 있으며, 연평균 성장률은 6.7%가 될 것으로 예측하고 있다 (Transparency Market Research, 2013). 사료첨가용 항생제의 사용 금지로 인해 미생물 사료첨가제 시장이 빠르게 성장하고 있다.

○ 항생제를 대체하는 생균제의 경우, 미국의 경우에는 2000년대에 특히 출원이 집중되어 있고 2007년을 정점으로 특허출원이 감소하는 경향을 보이고 있다. 일본의 경우에는 1990년 초반부터 2008년까지 특허출원이 증가하는 추세였지만, 역시 2008년 이후로는 특허 출원이 감소하고 있는 추세를 보인다. 유럽의 경우에는 사료 첨가제 시장이 크고, 경쟁의 강도가 높기 때문에 특허 출원률이 높다 (농림수산식품교육문화정보원, 2014).

○ 세계 생균제 산업은 선진국을 중심으로 급성장 하였으며, 2011년 세계 생균제 시장규모는 약 233억 달러 규모로 연평균 3.5%대의 시장성장률을 보이고 있다 (그림16).

연도	시장규모 (백만 달러)
2006	19,556.0
2007	20,243.2
2008	20,960.1
2009	21,708.2
2010	22,484.7
2011	23,269.5
연평균 시장성장률	3.5%



출처 : Icon Group International, Inc.(2010f)

그림 16. 세계 생균제 시장

○ 해외의 대표적인 미생물사료 제조업체로는 네덜란드의 DSM, 독일의 BASF Corporation, 미국을 Alltech 등이 효소 사료첨가제 대표제품을 가지고 있으며, 생균제를 주력으로 내세우는 기업으로는 덴마크의 Chr Hansen A/S, 프랑스의 LeSaffre, BioArmor Development SARL 등이 있다.

○ 유럽연합에서는 가축영양과학위원회 (SCAN)에서 *Bacillus toyoi* 제제를 처음 검토하였다. EU국가에서는 현 항생물질과 비슷한 연구자료를 구비하여 제출한 후 SCAN 심사를 통과해야 유통되고 있다. 양돈용 13개의 생균제를 인증하고 있으며, 대부분 효모, 바실러스, 유산균류이며 Bioplus 2B만 2종의 바실러스를 포함하고 있다. 유럽의 경우, 특히 사료첨가용 항생제 사용을 오래전부터 금하고 있었고 앞으로도 항생제 사용에 대한 정도가 전면적으로 금지될 예정이기 때문에 시장규모는 계속적으로 커질 것으로 예상하고 있다.

○ 막 태어난 신생자돈의 무균에 가까운 위장은 일주일 이내에 장 내 미생물 균총을 충분히 확립한다. 미생물 균총의 균종은 서로 자극하거나 억압적 영향을 미치고 숙주동물과 상호작용을 한다. 생균제 투여를 할 경우 이유 전 폐사율이 42% 감소하였으며 모돈의 유질이 개선되었다 (Jorgenean 등, 2006).

제 3 장 연구수행 내용 및 결과

제1절 1차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 축산악취저감용 미생물 및 천연물질의 시너지 효과검정

가. 악취저감에 효과적인 생균제 및 천연물질 후보 설정

(1) 선행연구를 통해 보유하고 있는 기술 및 결과물 이용

본 연구실에서 선행연구 “바이오 사료첨가제 개발사업단”을 통하여 확보한 2종의 후보 균주 *Bacillus subtilis* SNU1, *B. licheniformis* SNU2를 악취저감 후보균주로 선정하였다. 건조 시 건조 효율이 좋고, 산성 조건 및 담즙성 조건에 내성이 있어 장내에서 우점할 수 있는 조건을 갖추었으며, slurry와 같은 악조건에서도 생존능력이 우수하기 때문에 악취저감을 위한 후보균주로 선정하였다 (그림 17).

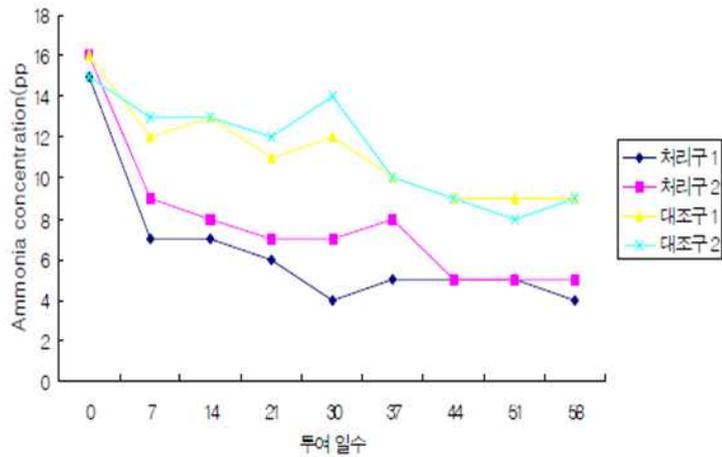


그림 17. 선행 연구를 통해 확보한 *Bacillus licheniformis* 의 돈사 내 암모니아 감소 효과.

대조구:사료에 생균제 미혼합, 처리구:사료에 암모니아 감소용 생균제를 0.2 % 혼합. 대조구 1, 2와 처리구 1, 2는 각각 동일한 처리를 하였음 (재현성 검증용).

이외에 악취저감에 효과가 있는 균주 탐색을 진행을 통하여 환경미생물 은행에서 하천과 장류로부터 분리되어 등록된 질소, 인, 황 화합물 억제 균주 9종을 추가하고, 대량생산, 제품화 가능성, 유산균 이외 균주 등을 고려하여 선정하였다. 본 연구실의 선행연구인 “바이오 사료첨가제 개발사업단”에서 genome shuffling 기법을 통하여 개발한 *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus acidilactici*도 후보로 추가하였다. 이들 균주들은 가축 병원균들에 대한 항균능력

이 우수한 균주이므로, 강한 항균능력을 바탕으로 설사병 억제효과와 더불어, 분변 악취 이유 중 하나인 장내 미생물 균총의 파괴를 막을 수 있을 것으로 판단하여 후보로 추가하였다 (그림 18).

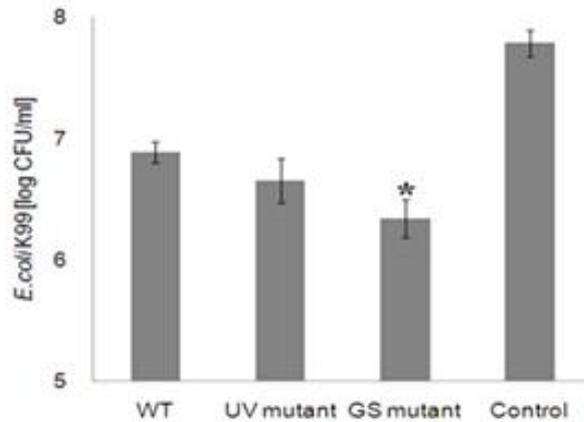
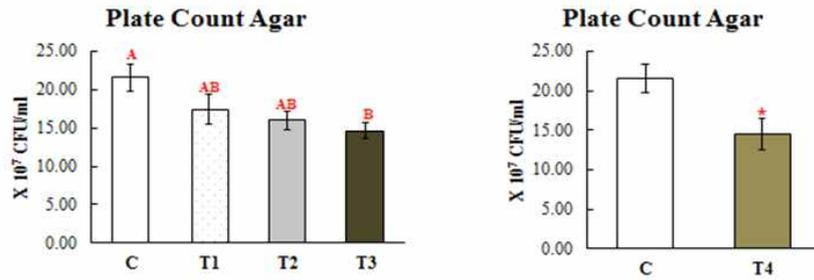


그림 18. Genome shuffling 기법을 통해 개발된 *L. plantarum*의 병원균 *E. coli* K99에 대한 항균 능력. Wild type에 비해 유의적으로 병원균을 억제함.

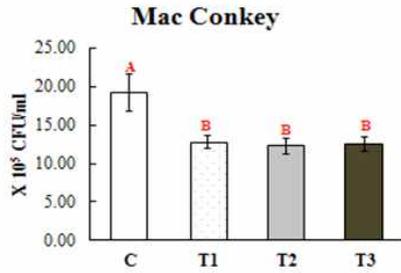
(2) 선행 연구를 통해 확보한 미생물 (probiotics) 및 천연물질 (prebiotics)을 활용하여 SYNBIOTICS 최적의 적용 범위 및 조건을 확립

Prebiotics 천연물질 후보들은 선행연구 “친환경 기능성 사료첨가제 개발을 통한 웰빙 원료육의 생산 및 산업화 (연구책임자 : 서울대학교 최윤재 교수)” 과제에서 확보하였다. 단독 혹은 앞서 언급한 생균제 후보 균주들의 능력에 영향을 주는지 확인하여 prebiotics로서 효과를 검증하고자 한다. 피톤치드, 마늘부산물, 미역부산물에 대해 prebiotics로 사용하기 위한 기본 조건들은 선행연구를 통하여 확인하였으며 이들 후보들을 *in vitro* 평가 시 적용 하였다 (그림 19). 추가적으로 대표적인 prebiotics인 이눌린도 후보 소재로 포함하여 실험을 진행하였다.

(A)



(B)



(C)

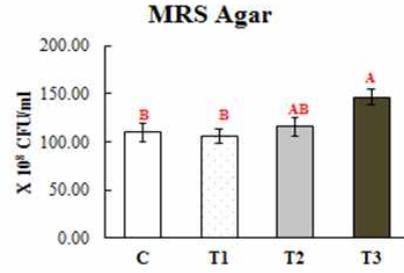


그림 19. 천연물질의 급여 시 산란계의 장내 미생물 균총 변화 양상. 일반미생물 (A), *E. coli* (B), 유산균 (C). C : 대조구 + 부형제 0.2%, T1 : 대조구 + 1% 잣 구과 0.2% (0.002%/feed), T2 : 대조구 + 2% 잣 구과 0.2% (0.004%/feed), T3 : 대조구 + 4% 잣 구과 0.2% (0.008%/feed), T4 : 대조구 + 1% 마늘부산물 0.2% (0.002%/feed), T5 : 대조구 + 100% 미역부산물 2% (2%/feed). 수치는 평균 ± 표준오차로 표기되었음 (n = 10). ^{A,B}vs. 대조구(p<0.05 by Tukey HSD), *vs. 대조구 (p<0.05 by Student's t-test).

추가로 prebiotics 후보로 inulin을 선정하였다. Prebiotics로서 inulin의 역할과 기능은 이미 비교적 널리 알려져 있으며 감자, 다알리아와 같은 식물에 많이 함유되어 있다. 동물체내에서 무해하고, 동물 급여 시, 장내에서 유해균의 먹잇감이 아닌 *Bifidobacteria*와 같은 유익균의 먹이가 되어 probiotics의 성장을 도와 장내 환경개선 및 생산성 증가에 효과가 있다는 논문들이 이미 나와 있는 prebiotic이다.

나. 생균제 후보균과 천연물질의 악취저감 능력 평가

현재 우리나라는 현재 환경부령 2005년 2월부로 “악취방지법”을 시행하고 있다. 악취방지법에서는 악취를 “황화수소, 메르캅탄류, 아민류, 그 밖에 자극성이 있는 기체상의 물질이 사람의 후각을 자극하여 불쾌감과 혐오감을 주는 냄새를 말한다.”로 정의하고 있다. 악취방지법 내에는 지정악취물질 24종을 지정하여 관리하고 있다 (표 12).

표 12. “악취방지법”에 규정된 지정악취물질

구분	배출허용기준 (ppm)		엄격한 배출허용 기준의 범위(ppm)	적용시기
	공업지역	기타 지역	공업지역	
암모니아	2 이하	1 이하	1 ~ 2	2005년 2월 10일부터
메틸메르캅탄	0.004 이하	0.002 이하	0.002 ~ 0.004	
황화수소	0.06 이하	0.02 이하	0.02 ~ 0.06	
다이메틸설파이드	0.05 이하	0.01 이하	0.01 ~ 0.05	
다이메틸다이설파이드	0.03 이하	0.009 이하	0.009 ~ 0.03	
트라이메틸아민	0.02 이하	0.005 이하	0.005 ~ 0.02	
아세트알데하이드	0.1 이하	0.05 이하	0.05 ~ 0.1	
스타이렌	0.8 이하	0.4 이하	0.4 ~ 0.8	
프로피온알데하이드	0.1 이하	0.05 이하	0.05 ~ 0.1	
부틸알데하이드	0.1 이하	0.029 이하	0.029 ~ 0.1	
n-발레르알데하이드	0.02 이하	0.009 이하	0.009 ~ 0.02	
i-발레르알데하이드	0.006 이하	0.003 이하	0.003 ~ 0.006	2008년 1월 1일부터
톨루엔	30 이하	10 이하	10 ~ 30	
자일렌	2 이하	1 이하	1 ~ 2	
메틸에틸케톤	35 이하	13 이하	13 ~ 35	
메틸아이소부틸케톤	3 이하	1 이하	1 ~ 3	
부틸아세테이트	4 이하	1 이하	1 ~ 4	2010년 1월 1일부터
프로피온산	0.07 이하	0.03 이하	0.03 ~ 0.07	
n-부틸산	0.002 이하	0.001 이하	0.001 ~ 0.002	
n-발레르산	0.002 이하	0.0009 이하	0.0009 ~ 0.002	
i-발레르산	0.004 이하	0.001 이하	0.001 ~ 0.004	
i-부틸알코올	4.0 이하	0.9 이하	0.9 ~ 4.0	

과제를 통하여 저감하고자 하는 돈사 내 target 악취물질은 주로 분뇨 분해과정 중에 발생하는 무색의 자극성 유동성 기체인 암모니아를 선택하였다. 암모니아는 발생양이 많아 낮은 농도에서도 돼지 호흡기에 영향을 주며, 축산 농가뿐만 아니라 인근 민가까지 많은 피해를 주고 있기 때문이다. 또 다른 target으로 황화수소를 선택하였다. 황화수소는 유독성 물질로 공기보다 무거운 돈사 내 피트 (pit)에 저장되어 있는 분뇨 slurry 표면에 높은 수준으로 위치하여, 사육 사에게는 중독피해를 돼지들의 안구충혈, 호흡기 이상, 심하면 폐사에 이르는 피해를 주기 때문에 저감 target으로 결정하였다.

(1) *In vitro* 기반의 생균제 후보군과 천연물질의 악취저감 능력 평가

악취저감 기능에 초점을 맞춘 복합 미생물제제 개발을 위하여, 후보 물질들의 악취저감 능력을 정량적으로 판단할 수 있는 기준이 필요하여, 이에 자문 및 논문을 바탕으로 반복 실험을 통해 *in vitro* 기반의 평가방법 확립하였다.

In vitro 기반의 평가 시 사료에 악취저감의 기능을 가진 복합 미생물제제를 첨가하여 급여하였을 때와 가장 유사한 환경으로 평가를 진행해야하므로, 돈사 내에 가장 큰 악취발생 원인이 되는 slurry를 이용하여 처리 실험을 진행하였다.

돈사 내에서 slurry를 샘플링 (같은 돈방, 위치, 깊이, 무항생제 처리구)하여 믹서기를 이용해 균질화한 뒤 처리구 별로 5반복씩 석순병에 분주하였다. 이후 혐기(황화수소 평가)상태, 호기(암모니아 평가) 상태로 각각 후보 probiotics 및 prebiotics들을 처리 후 shaking incubator에 120 rpm, 39 °C, 24 hr 동안 배양 후 포집된 기체를 기체측정기 Multi-RAE 를 이용하여 측정

하였다 (그림 20). 미생물 발효를 가장 잘 유도할 수 있는 조건으로 발효를 유도하여 암모니아, 황화수소 항목을 측정하였다.

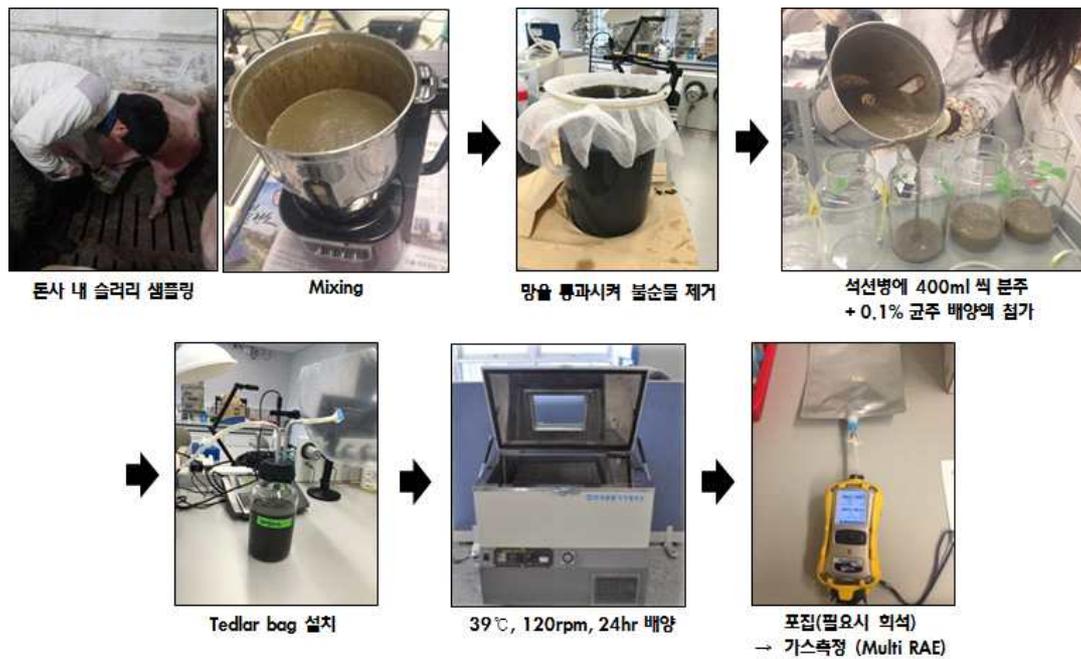


그림 20. *In vitro* 기반의 악취물질 저감 효과 평가 방법

(2) 악취저감 효과 정량화를 위한 기술

후보균주 및 소재들에 대한 악취저감 효과를 평가하여 비교하기 위해서는 정량화된 값이 필요하다. 분석해야 하는 샘플이 많은 관계로 가스 크로마토그래피를 이용하기 보다는 후보를 줄이기 위하여 전 세계적으로 사용되는 시간적, 비용적 효율이 높은 portable chemical detector 인 Multi-RAE (Rae-systems사) 기계를 이용하여 측정하였다. 암모니아, 황화수소를 측정할 수 있는 센서를 추가하여 ppm단위로 측정하였다.

후보균주 및 소재들에 대한 악취저감 능력 평가 결과는 다음과 같다. 먼저 양성 대조구 선정 을 위하여 '15년 11월 한돈 협회에서 발표한 악취저감 효과가 있는 시중 생균제 제품들에 대한 평가를 바탕으로 본 과제에서 세팅한 *in vitro* 방법을 적용하여 재평가 하였다. 평가 결과 “A 제품”이 효과가 가장 우수하여 양성대조구로 선정하였다. “A제품”은 *Bacillus subtilis* 1×10^{11} cfu/kg 에 토양 미생물, 매리골드, 민들레, 할미꽃, 복분자 추출물, 해양부산물 (다시마, 미역), 천연광물질 (맥반석, 질석, 목문석등) 혼합 발효액 등이 혼합된 제품이다.

선행과제를 통해 확보한 균주와 환경미생물 은행으로부터 분양 받은 9종의 미생물에 대해 악취저감 효과를 단독으로 평가한 결과 호기상태 배양 시 (암모니아 발생조건) 균주 3종이 반복적으로 암모니아 저감 효과를 보였고, 혐기상태 배양 시 (황화수소 발생조건) 균주 1종이 반복적으로 황화수소 저감 효과를 나타내었다 (표 13).

표 13. 악취저감 미생물 후보 처리구별 대조구 대비 악취저감율(%)

species	접종량	1차 (호기)		2차 (호기)		3차 (혐기)		4차 (혐기)	
		암모니아	황화수소	암모니아	황화수소	암모니아	황화수소	암모니아	황화수소
<i>Bacillus subtilis</i>	1%	34.7%	-88.2%	21.7%	-60.0%	17.5%	21.6%	-39.7%	3.7%
<i>Bacillus cereus</i>	1%	-38.6%	49.0%	81.8%	-134.3%	44.3%	17.7%	37.9%	29.2%
<i>Bacillus cereus</i>	1%	-54.5%	52.9%	-319.6%	100.0%	15.5%	-123.5%		
<i>Bacillus vallismortis</i>	1%	-62.4%	64.7%	-45.5%	71.4%	56.7%	58.7%	29.3%	64.8%
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1%	-62.4%	100.0%	-252.4%	-197.1%	38.1%	-72.7%		
<i>Acinetobacter junii</i>	1%	-62.4%	56.9%	-235.7%	100.0%	48.5%	-296.7%		
<i>Enterococcus hirae</i>	1%	38.6%	-103.9%	37.1%	-20.0%	52.6%	-46.5%	36.2%	65.2%
<i>Bacillus subtilis</i>	1%	32.7%	-151.0%	14.7%	71.4%	48.5%	-26.5%	37.9%	60.9%
<i>Bacillus subtilis</i>	1%	-82.2%	72.5%	-263.6%	100.0%	46.4%	-75.3%		

- 저감율이 우수한 균주 처리구 붉은색으로 표기

Prebiotics 후보들을 이용한 *in vitro* 평가 결과, 마늘부산물과 미역부산물은 악취저감 편차가 컸으며, 피톤치드의 경우 저감 효과를 반복적으로 보였다. 이눌린은 반복실험 결과 슬러리 내에 미생물들의 발효가 촉진되어 암모니아와 황화수소가 상승하는 결과를 보여 악취저감 소재 후보에서 제외하였다(표 14).

표 14. Prebiotics 처리구별 대조구 대비 악취저감율(%)

Prebiotics	접종량	1차 (호기)		2차 (호기)	
		암모니아	황화수소	암모니아	황화수소
마늘부산물	1%	-291.3%	33.3%	-75.5%	-80.7%
피톤치드	1%	53.6%	50.0%	27.3%	91.6%
미역부산물	1%	-334.3%	25.0%	-61.7%	-58.1%

- 저감율이 높은 천연물 처리구 붉은색으로 표기

미생물 후보균 중 반복 실험을 통하여 후보 유산균들보다 바실러스류들이 효과가 좋음을 확인하였고, 선발된 단독 바실러스 균주들을 이용하여 복합균주로 악취저감 효과를 평가하였다. 암모니아 저감효과가 가장 좋았던 *B. subtilis* CJ1과 황화수소 저감에 효과가 가장 좋았던 *B. subtilis* CJ2, *B. subtilis* SNU1, *B. licheniformis* SNU2를 선정하였으며, 암모니아 저감균주 1종 + 황화수소 저감균주 1종의 조합으로 총 3가지 조합을 선정 완료하였다. 이에 대해 사양시험 전 *in vitro* 로 재평가를 통해 효과를 다시 한 번 확인 검증하였다 (표 15, 그림 21).

표 15. 미생물 조합 처리구별 대조구 대비 악취저감율(%)

샘플명	암모니아	황화수소
T1 (B.S CJ1 0.2% + B.S CJ2 0.2%)	37.8%	13.0%
T2 (B.S CJ1 0.2% + B.S SNU1 0.2%)	53.3%	57.6%
T3 (B.S CJ1 0.2% + B.S SNU2 0.2%)	20.0%	17.6%

B.S CJ1 : *Bacillus subtilis* CJ1, B.S CJ2 : *Bacillus subtilis* CJ2,
 B.S SNU1 : *Bacillus subtilis* SNU1, B.S SNU2 : *Bacillus licheniformis* SNU2

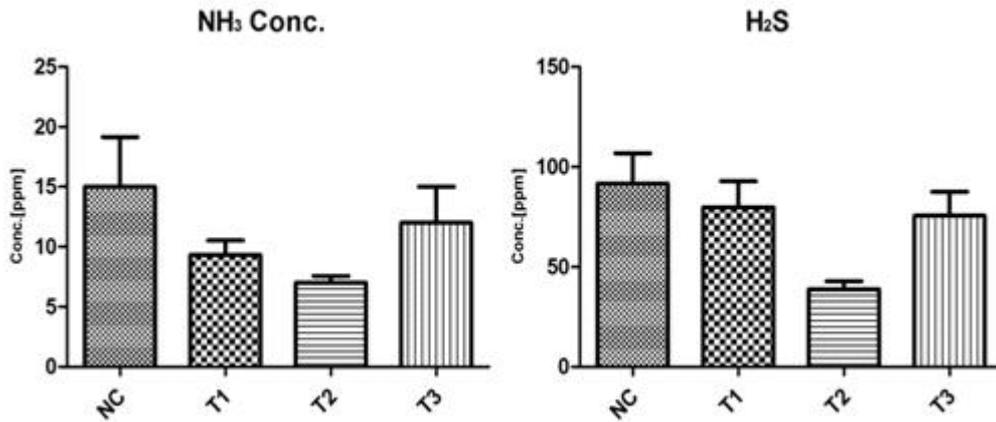


그림 21. 미생물 조합 처리구별 대조구 대비 악취저감율(%)

In vitro 평가를 통하여 악취저감에 효과가 있는 균주조합 3가지를 선정, 재검증하였고, prebiotics와의 시너지 효과를 보기 위하여 악취저감 균주조합 중 한 가지에 prebiotics를 처리하여 효과를 평가 하였다. 이눌린을 제외한 후보 prebiotics들이 대조구 대비 악취물질 (암모니아, 황화수소) 감소효과를 보였으며, 그 중에서도 피톤치드 복합 처리구가 가장 높은 암모니아, 황화수소 저감율을 보였다(표 16, 그림 22).

표 16. 미생물 조합 + Prebiotics 처리구별 대조구 대비 악취저감율(%)

샘플명	암모니아	황화수소
T1(B.S CJ1 0.2% + B.L SNU2 0.2%)	13.8%	7.2%
T2(B.S CJ1 0.2% + B.L SNU2 0.2%) + 피톤치드	65.5%	55.0%
T3(B.S CJ1 0.2% + B.L SNU2 0.2%) + 마늘	17.2%	19.2%
T4(B.S CJ1 0.2% + B.L SNU2 0.2%) + 미역	20.7%	23.7%
T5(B.S CJ1 0.2% + B.L SNU2 0.2%) + 이눌린	17.2%	-103.0%

B.S CJ1 : *Bacillus subtilis* CJ1, B.L SNU2 : *Bacillus licheniformis* SNU2
 - 저감율이 높은 복합 처리구 붉은색으로 표기



그림 22. 미생물 조합 + Prebiotics 처리구별 대조구 대비 악취 저감율(%)

다. 후보 조합에 대한 안전성 및 산업적 특성 평가

(1) *In vitro* 기반의 장내 유해인자 생성 능력 조사

미국에서는 Food Drug and Cosmetic (FD&C) Act에 의해 식품에 사용되는 미생물을 ‘Probiotic substances as ingredient in food’로 정의하고 식품 첨가물로 분류하여 관리하고 있다. 또한 GRAS (generally recognized as safe)로 인정되는 미생물을 식품에 사용할 수 있도록 하고 있다. 본 실험에서 *In vitro* 평가 완료한 미생물 균주는 모두 GRAS 균주이며, 일반적으로 사료용 생균제로 사용되는 균주들을 포함하고 있다. 그렇기 때문에 장내 유해인자 생성에 대한 우려는 없을 것으로 판단된다.

(2) 안전성 평가가 확인된 후보 조합에 대한 산업적 특성 조사

GRAS 균주를 바탕으로 진행된 실험이며, *in vitro* 실험을 진행한 4가지 균주에 대해서는 내열성을 평가하였고, *Bacillus* 특성상 포자를 형성하여 50 °C에서도 생존율을 보였다. 포자 형성을 통하여, 내열성, pH내성을 가지고 있어 유산균들에 비하여 악취 저감용 사료첨가제 용도로 적합하다.

라. 사양실험을 통한 선발된 악취저감 후보균주 능력 평가

In vitro 실험을 통하여 악취저감 효과가 검증된 후보 균주들을 대상으로 사양실험을 진행하였다. *In vitro* 평가를 통해 선발된 암모니아&황화수소 저감 균주조합의 *in vivo* 상에서의 악취저감 효과를 검증하고자 진행하였으며, 무첨가 대조구 이외에 양성 대조구로 시중 판매제품인 중 악취저감 우수제품인 "A제품"을 추가하여 상대비교 하였다.

(1) 사양시험 디자인

CJ제일제당 연구농장에서 총 5주에 걸쳐 이유자돈 대상으로 사양시험을 진행하였다. 처리구 4개, pen당 4두로 총80두로 자유급여 형태로 진행하였다 (표 17).

사양시험을 이유자돈으로 진행한 이유는 이유자돈 시기는 육성/비육돈 시기에 비하여 분변양이 적어 악취발생량은 상대적으로 적으나 급이하는 사료의 crude protein 함량이 육성/비육돈 시기보다 높은 관계로 분변으로 배출되는 소화가 되지 않은 질소 함량이 더 높기 때문이다.

평가 방법은 매주 처리구별로 신선한 분과 뇨를 샘플링하여, 믹서기를 이용하여 균질화 시킨 후 거름망에 걸러 앞서 세팅한 *in vitro* 평가 방법으로 처리구 별로 3반복씩 석손병에 분주, 호기 상태로 incubator에 120 rpm, 39 °C, 24 hr 동안 배양 후 석손병 내 기체를 포집하여 기체 측정기 Multi-RAE로 측정하였다. 암모니아, 황화수소 수치 모두 비교가능 수준인 호기조건으로 배양하였다.

표 17. 사양시험 처리군 요약

Group	Pen	두/Pen	총 두수	기간(주)	Treatment
Con	4	4	16	6	
PC	4	4	16	6	A제품 0.1%
T1	4	4	16	6	BSCJ1 0.2% +BSCJ2 0.2%
T2	4	4	16	6	BSCJ1 0.2% +BSSNU1 0.2%
T3	4	4	16	6	BSCJ1 0.2% +BLSNU2 0.2%
Total	20	20	80		

· B.S CJ1 : *Bacillus subtilis* CJ1, B.S CJ2 : *Bacillus subtilis* CJ2,

B.S SNU1 : *Bacillus subtilis* SNU1, B.S SNU2 : *Bacillus licheniformis* SNU2, 각각 1.0 x 10⁸/g 수준

· A제품 : *Bacillus subtilis* 1.0 x 10¹¹ cfu/kg, 토양미생물, 메리골드, 민들레, 할미꽃, 복분자 추출물, 해양부산물, 천연광물질 혼합 발효액

(2) 악취 발생 요인 감소효과 정량화

시험결과 악취저감 균주 조합을 5주차까지 급여한 결과, 암모니아, 황화수소 저감효과는 3주차부터 경향이 나타나기 시작해 5주차에서는 대조구(C) 및 양성대조구(PC) 대비 유의적인 차이를 나타내었다 (p<0.05). 이는 악취저감 균주가 장내에 우점하면서 섭취기간이 경과할수록 효과가 악취물질 저감 효과가 증가한 것으로 사료된다(표 18, 표 19, 그림 23).

표 18. 주차별 분뇨유래 암모니아 농도변화

암모니아 (ppm)	2주차	3주차	4주차	5주차	평균 저감율 (2회이상 효과)
C	32	32 ^b	18 ^c	35 ^a	
PC	50	26 ^b (20%)	37 ^{ab}	36 ^a	-
T1	47	65 ^a	20 ^c	28 ^a (22%)	-
T2	54	22 ^b (31%)	14 ^c (22%)	19 ^b (46%)	32.8%
T3	23 (28%)	31 ^b (4%)	27 ^{bc}	17 ^b (53%)	28.2%

- 악취저감율 우수 처리구 붉은색으로 표기

표 19. 주차별 분뇨유래 황화수소 농도변화

황화수소 (ppm)	2주차	3주차	4주차	5주차	평균 저감율 (2회이상 효과)
C	339	473 ^b	467 ^{ab}	222 ^{ab}	-
PC	608	426 ^b (10%)	680 ^a	314 ^a	-
T1	532	1076 ^a	275 ^b (41%)	115 ^{cd} (48%)	44.60%
T2	532	208 ^c (56%)	194 ^b (58%)	81 ^{cd} (63%)	59.30%
T3	150 (56%)	393 ^{bc} (17%)	476 ^{ab}	39 ^d (82%)	51.70%

- 악취저감율 우수 처리구 붉은색으로 표기

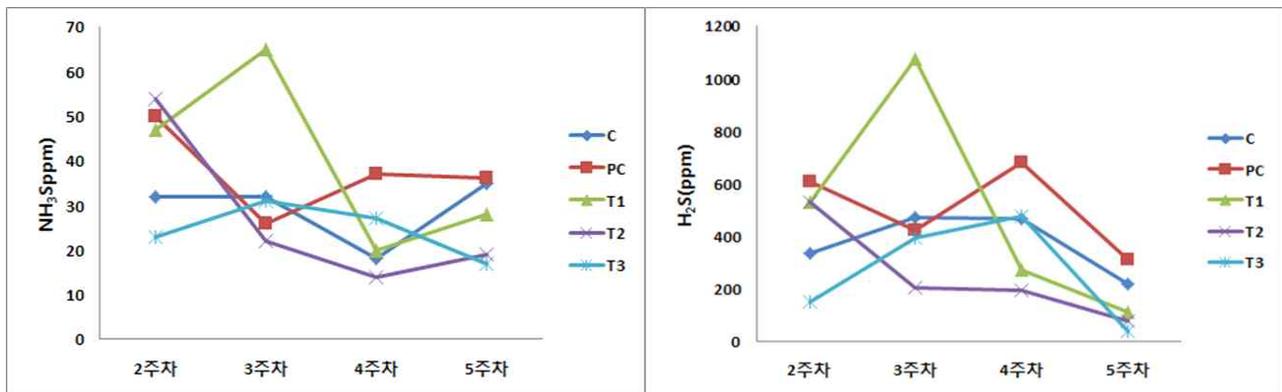


그림 23. 처리구별 악취저감 주요 결과. 암모니아 (좌측) 및 황화수소 (우측) 측정 결과.

주요 결과를 종합해볼 때 T2, T3 처리구가 악취저감 우수 조합 처리구로 판단되며 (암모니아 저감율 T2 약 30%, T3 약 28% 수준, 황화수소 저감율 T2 약 59%, T3 약 50% 수준), 악취가스 저감 효과는 T2 조합이 조금 더 우수한 것으로 판단된다.

하지만 이는 처리구들로부터 받은 신선한 분뇨를 미생물이 잘 성장할 수 있는 조건에서 배양한 후 포집한 기체를 Multi-RAE를 이용하여 측정된 값이므로, 실제 돈사 내부에서의 효과 검증이 필요할 것으로 보인다. 2차년도에는 *in vivo* 반복 사양시험을 통해 확인된 균주조합을 재검증하고, prebiotics에 대한 부분도 같이 평가하고자 한다.

2. 장내 점착능력이 우수한 미생물 선발

가. *In vitro* 시스템 기반의 미생물 생균제 선발 방법 체계화

기존 항균력이라는 기능에 초점을 맞춰 개발된 미생물 생균제들은 가축에게 급여 시, 장내 점착능력이 부족하여 그 기능을 십분 발휘하지 못하는 경우가 있다. 본 연구에서는 가축의 장내에 점착 및 생존율이 우수한 미생물 생균제의 기능을 발휘하게 할 수 있는 전략으로 생존율과 장내 점착능력을 기반으로 미생물 생균제를 선발하고자 그에 맞는 선발 방법을 체계화 하고자 한다. 또한 장내 점착능력이 우수한 미생물 생균제로서 사용가능하며 낮은 pH에서 생존율이 높아 소화계에서도 부착가능 및 pediocin 분비능이 있어 설사병을 유발하는 병원성 미생물의 감염을 효과적으로 억제할 수 있는 *Pediococcus acidilactici*를 분리 동정하여 장내 점착능력과 생존율을 각각을 평가하였다.

(1) 장내 점착능력이 우수한 미생물 선발 평가 방법의 체계화

가축의 장내 점착능력이 우수한 미생물 생균제를 선발하기 위해 돼지의 소장을 적출하여 소장내 점막을 충분히 PBS washing 및 antibiotics 처리를 하여 extraction을 진행하였다. 이렇게 구한 소장 점액은 1 mg/mL수준으로 96 well plate에 coating하여 균일한 조건하에 우수 점막 점착능력의 미생물을 선발하였다 (그림 24).

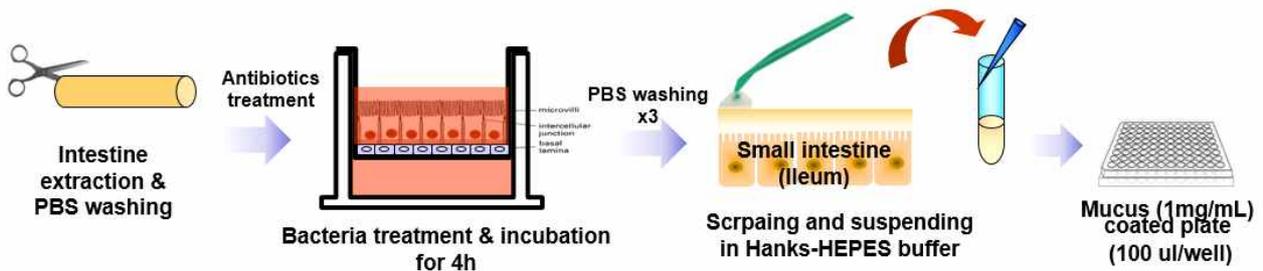


그림 24. 돼지 점막을 이용한 coated plate 제작 방법

또한 돼지 점막뿐만 아니라 돼지의 소장 상피세포 IPEC-J2 cell line을 이용하여 소장상피세포에서의 점착 능력을 평가하기로 계획하였다 (그림 25).

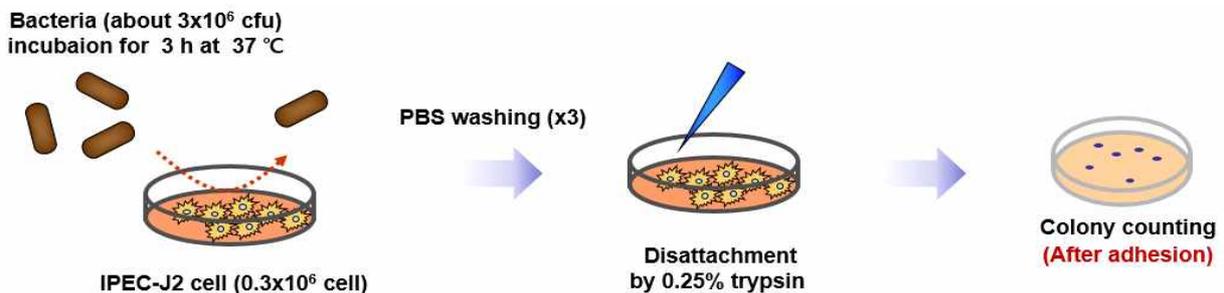


그림 25. 돼지 소장 상피세포 (IPEC-J2 cell)을 이용한 미생물의 점착능력 평가 방법

유입된 pathogen에 대한 저해 효과가 있는지 돼지 점막 및 돼지 소장 상피세포를 이용하여 pathogen exclusion assay를 계획하였다 (그림 26).

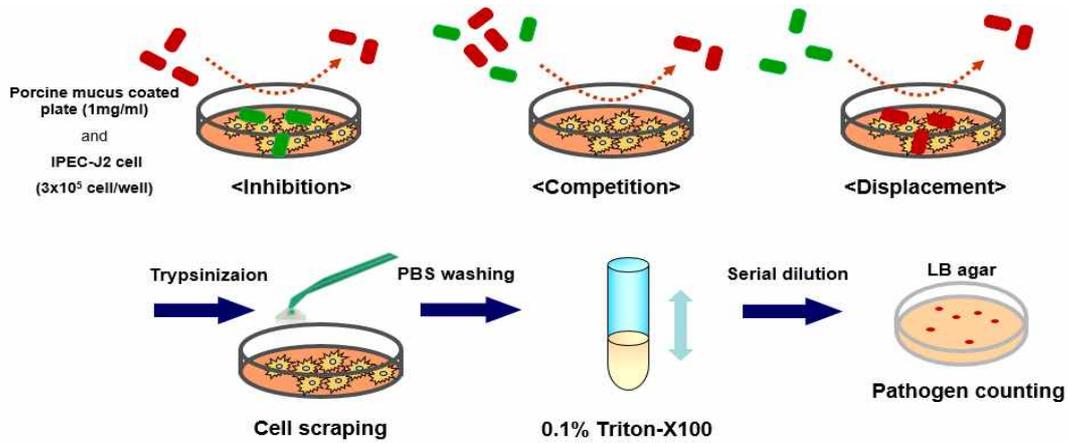


그림 26. 돼지 점막과 돼지 소장 상피 세포를 이용한 pathogen exclusion assay

이때 pathogen의 처리 순서에 따라 exclusion 능력을 inhibition, competition, displacement로 구분하였다. Inhibition assay는 생균제를 3시간 동안 선 처리 후 pathogen을 처리하였을 때 생균제에 의한 pathogen의 부착 억제효과를 확인하는 것을 의미한다. 또한 competition assay는 생균제와 pathogen을 동시에 처리하였을 때 생균제에 의한 pathogen의 부착 억제효과를, displacement assay는 pathogen을 3시간 선 처리 후 생균제를 처리하였을 때 생균제에 의한 pathogen의 부착 억제효과를 확인하는 방법이다.

(2) 생존율이 높은 미생물 선발 평가 방법의 체계화

장내 점착능력뿐만 아니라 성장활성이 미생물을 선발하고자 growth curve를 optical density 600nm (OD₆₀₀) 값을 이용하여 측정 후 doubling time을 계산하여 빠른 속도로 성장 및 활성도를 갖는 미생물을 선발하고자 계획하였다. 또한 우수한 생존율로 장내까지 도달할 수 있는지 pH 2.0의 SGF와 pH 6.8의 SIF를 이용하여 내산성과 내담즙성을 평가하였다 (그림 27).

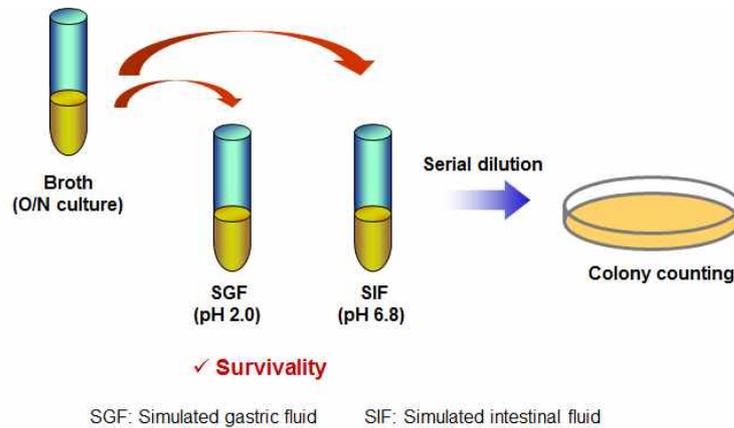


그림 27. 내산성 및 내담즙성 평가

나. *In vitro* 시스템 기반의 장내점착능력 평가

(1) Multiplex PCR 기법을 이용한 *P. acidilactici* 분리 동정

돼지의 장 점막 점착성에 대한 유전체 비교분석을 진행하기 위해 단일 종 (species)으로의 통일이 필요하다. 이에 pediocin이라는 항균물질을 분비할 수 있으며, 장관 내 colonization 할 수 있다고 알려진 *P. acidilactici*로 선정하였다. 또한 *P. acidilactici*에 의해 pathogen이라고 잘 알려진 *Shigella*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*에 대한 소장 내 감염성을 효과적으로 낮추었다는 많은 연구 사례가 있어 항생제 대체용의 생균제로써 가능성이 있음을 확인하였다. 우선, 돼지 분변으로부터 유산균 선택배지인 MRS agar plate를 이용하여 620여개의 colony를 분리 하였다. 이후 *P. acidilactici* 특이적으로 작동하는 primer를 이용하여 PCR로 증폭하여 확인하였다. 이때 다른 species에 대한 primer sets를 함께 이용하여 multiplex PCR로 진행하였다.

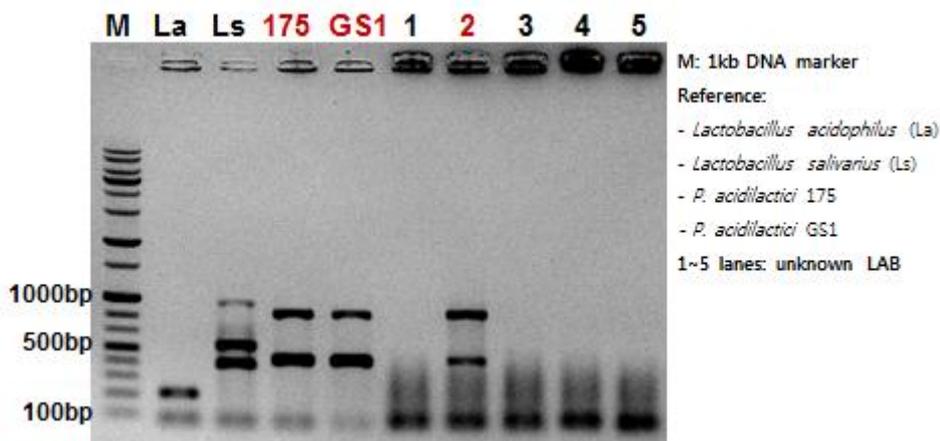


그림 28. Multiplex PCR을 통한 unknown bacteria의 identification

그림 28 결과와 같은 band 패턴을 갖는 colony를 선발 후, 16S rRNA sequencing을 진행하여 *P. acidilactici*임을 확인하였다. 최종적으로 620개의 colony 중 48개의 colony가 *P. acidilactici*

임을 확인하였다. 위에서 확인한 48개의 *P. acidilactici*와 본 연구실에서 보유하고 있는 *P. acidilactici* 175 와 *P. acidilactici* GS1를 함께 screening에 이용하였다.

(2) Autoaggregation ability 평가

미생물이 가축 장내에 유입되어 부착 및 colonization 정도를 *in vitro* 상에서 추측하기 위해 그들끼리의 aggregation ability 능력을 평가하였다. PBS 상에 suspension된 미생물의 OD₆₀₀ 값 (A₀)과 RT (room temperature)에서 4시간 incubation 후 상층액의 OD₆₀₀ (A_t)을 이용하여 autoaggregation percentage로 정량화 하였다 (그림 29).

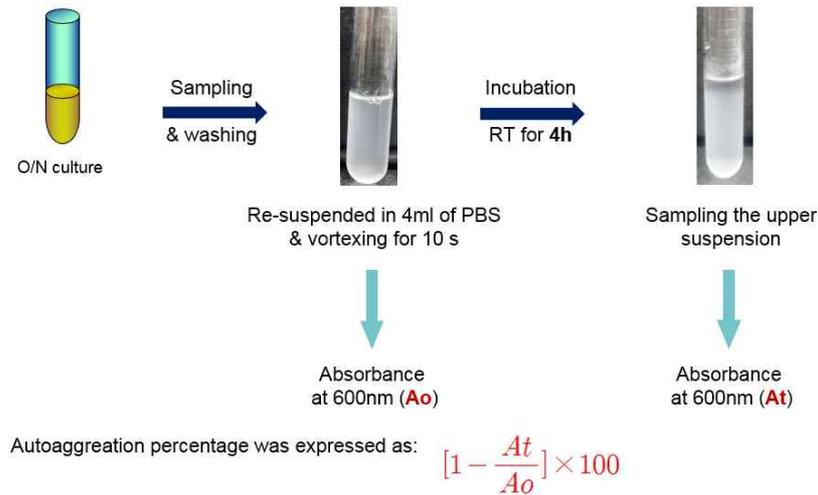


그림 29. Autoaggregation assay 방법

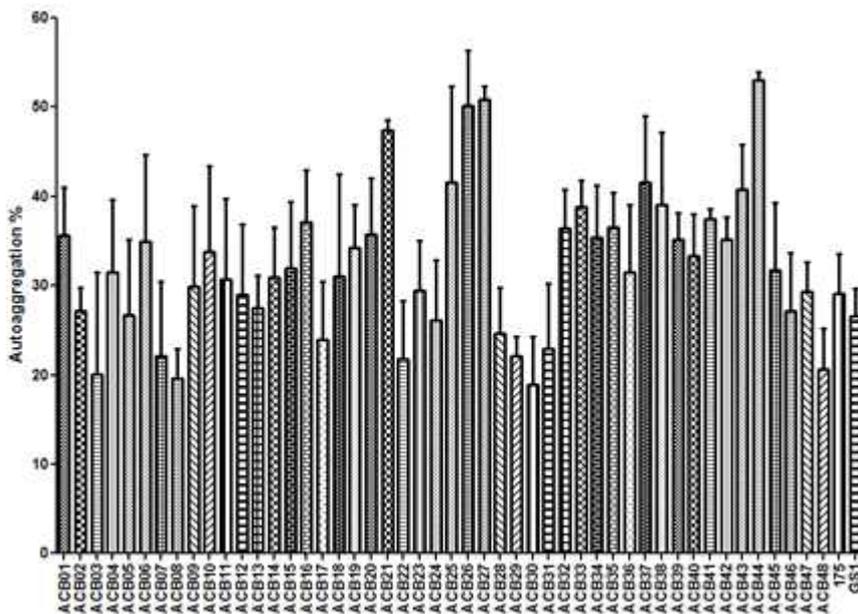


그림 30. Autoaggregation assay 결과

5 반복으로 위 실험을 진행한 결과 그림 30에서와 같이 ACB20, ACB26, ACB27, ACB44 등이 40% 이상의 autoaggregation ability로 높은 것을 확인할 수 있었다.

(3) Mucin protein에서의 장내 점착능력 평가

Microplate reader기를 이용하여 50개의 *P. acidilactici*를 crystal violet으로 염색 후 돼지 점막이 coating된 plate에 대해 점착능력이 우수한 미생물에 대해 흡광도 값으로 측정 및 정량화를 진행하였다 (그림 31). 실험은 4 반복으로 본 연구실에서 보유 및 분리 동정한 50개의 *P. acidilactici*와 대조구로 비교할 *P. acidilactici* DMS20284 strain을 KCTC에서 구매하여 총 51개의 균을 동시에 평가 진행하였다.

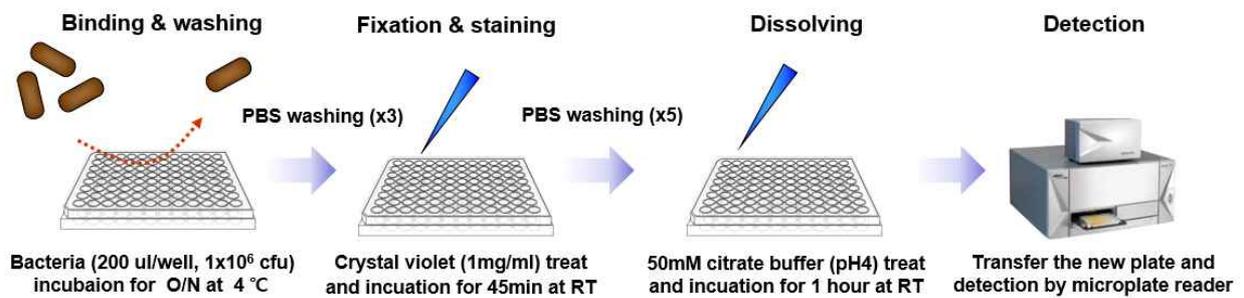


그림 31. Microplate reader기를 이용한 돼지 점막 binding assay 방법

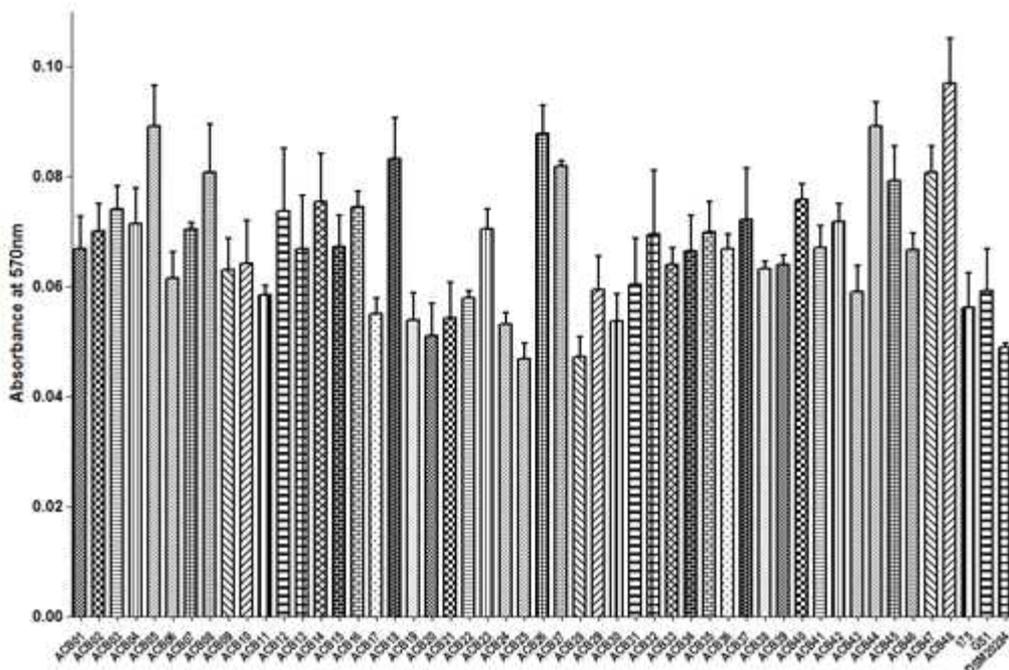


그림 32. Microplate reader기를 이용한 돼지 점막 binding assay 결과 (Red line: 돼지 점막 binding 수치가 높은 균주 cut line, PK: 대조구)

실험 결과 대조구인 PK 보다 모든 균들이 높은 binding 수치를 보이고 있으며, 그 중에서도 ACB5, ACB18, ACB26, ACB27, ACB44, ACB47, ACB48이 특히 높은 결과를 보였다 (그림 32). 이후 정확한 수치를 확인하기 위하여 돼지 점막이 coating된 plate에 미생물을 처리하기 전과 adhesion 후의 미생물을 counting하여 % adhesion 값으로 정량화하는 relative mucus adhesion assay 시행하였다 (그림 33).



그림 33. Relative mucus adhesion assay 방법

Microplate reader기를 이용한 돼지 점막 binding assay 결과에 근거하여 점착능력이 우수한 ACB5, ACB13, ACB16, ACB18, ACB23, ACB26, ACB27, ACB40, ACB44, ACB45, ACB47, ACB48 등 12개의 균과 점착능력이 저조한 ACB4, ACB11, ACB19, ACB20, ACB22, ACB25, ACB28, ACB42, ACB46, 175, GS1, DSM20284 등 12개의 균을 동시에 평가하였다.

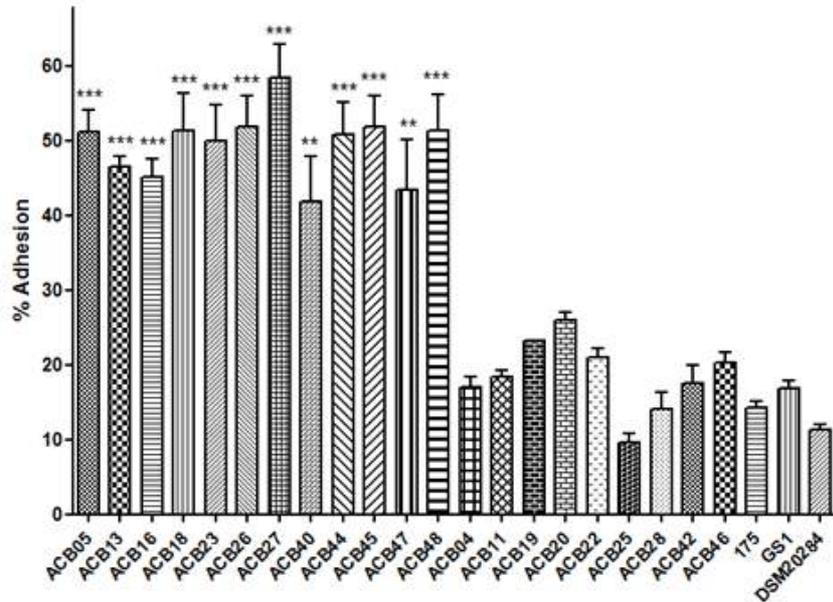


그림 34. Relative mucus adhesion assay 결과
 (One-way ANOVA with Tukey's post hoc test; *: significantly different from PK; one symbol: $P < 0.05$, two symbols: $P < 0.01$, three symbols: $P < 0.001$)

실험 결과, microplate reader기를 이용한 돼지 점막 binding assay 결과와 동일한 경향으로 점착능력이 우수한 균주의 경우 40% 이상의 adhesion 값을 보였으며, 점착능력이 저조한 균주의 경우 30% 미만으로 극명한 차이를 보였다 (그림 34). 또한 점액의 mucin은 당단백질로서, *P. acidilactici*가 보유한 이러한 점막 점착능력이 단백질과 당 부분 중 어느 영역에 더 영향을 받는지 확인하기 위하여 protease 처리에 의한 돼지 점막 adhesion 효과를 확인하였다.

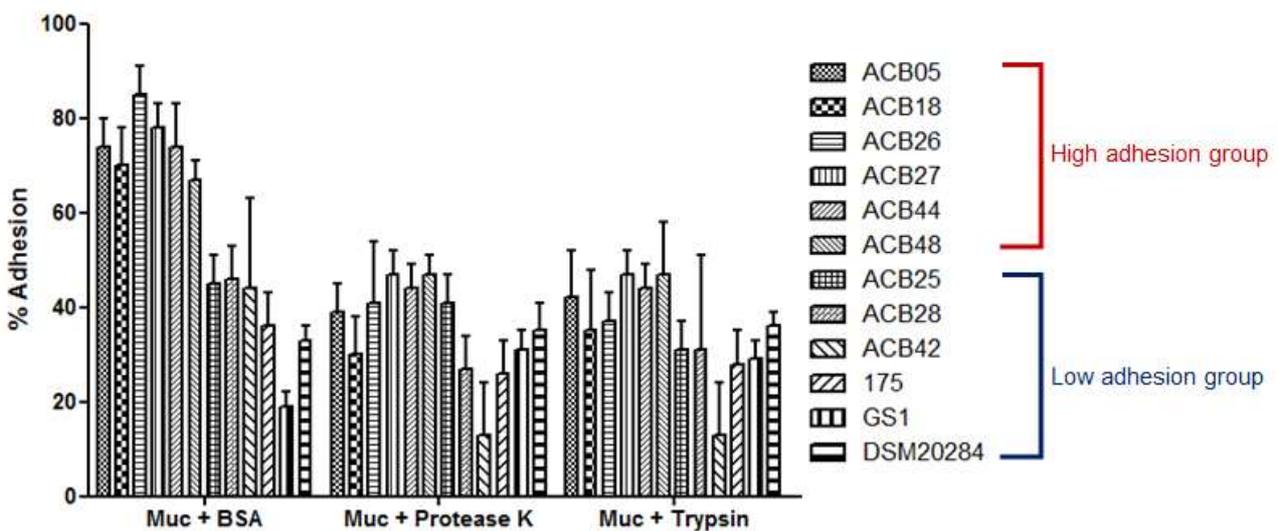


그림 35. Protease 처리에 대한 돼지 점막 adhesion assay 결과

실험결과 대조구인 BSA에 비하여 protease인 protease K, trypsin 처리 시 점착능력 우수 균

주들이 BSA 처리한 저조 균주정도의 % adhesion 수치를 보이는 것을 확인하였다. 이에 따라, 위 *P. acidilactici*가 보유한 돼지 점막 adhesion능력은 mucin에서 protein 영역에서 주로 일어나는 것을 검증 할 수 있었다 (그림 35).

(4) 돼지의 소장 상피세포에서의 장내점착능력 평가

돼지 점막에서 점착능력이 우수한 ACB26, ACB5, ACB18, ACB44, ACB27, ACB23과 저조한 PC, PG를 함께 돼지 소장 상피세포 IPEC-J2 cell을 confluent하게 배양한 6 well plate를 이용하여 점착능력을 평가하였다. 실험 결과, ACB26, ACB5, ACB44, ACB27, ACB23이 40%이상의 adhesion ability로 40% 미만의 adhesion ability를 가진 175와 GS1보다 높은 adhesion 수치를 보이는 것을 확인하였다 (그림 36). 각 각의 소장상피세포에서의 adhesion ability가 다르지만 돼지 소장점막에서의 점착능력이 생균제 선발 우선순위 이므로 이후 실험에 위 균주를 모두 사용하였다.

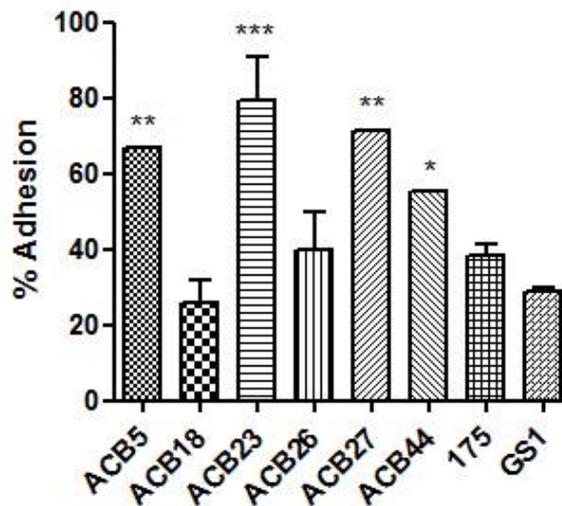


그림 36. IPEC-J2 adhesion assay 결과(One-way ANOVA with Tukey's post hoc test; *: significantly different from PC, +: significantly different from PG; one symbol: P < 0.05, two symbols: P < 0.01, three symbols: P < 0.001)

이러한 결과를 토대로, 장내 점착능력이 우수한 ACB5, ACB18, ACB26, ACB27, ACB44, ACB48 만을 이용하여 돼지 점막과 IPEC-J2에서의 pathogen의 exclusion 효과를 확인하고자 실험을 진행하였다. Pathogen으로는 돼지의 소장에서 F4, F18 fimbria를 이용하여 상피세포에 부착하여 설사병을 유발 시키는 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K88, Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 strain을 사용하였다.

Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K88

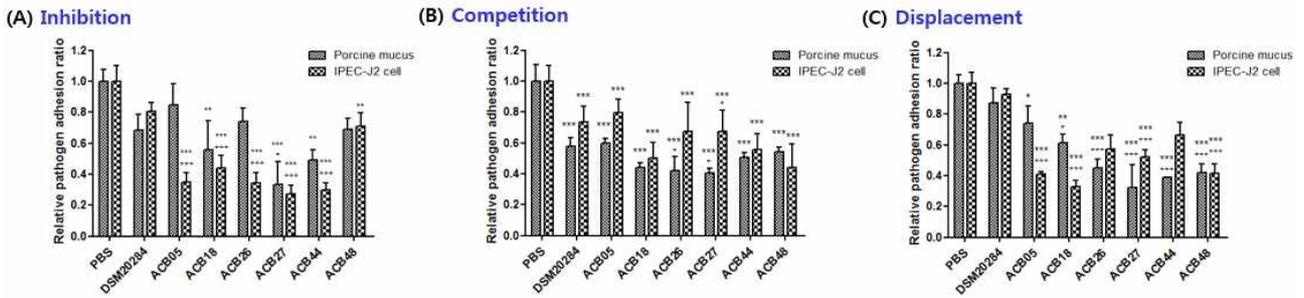


그림 37. 장내 점착능력이 우수한 *P. acidilactici*를 이용한 ETEC K88 exclusion assay 결과(PBS: instead of Pa, PBS treated; one-way ANOVA with Tukey's post hoc test; *: significantly different from PBS, +: significantly different from PK; one symbol: $P < 0.05$, two symbols: $P < 0.01$, three symbols: $P < 0.001$)

ETEC K88를 이용한 실험 결과, ACB18, ACB26, ACB27, ACB44에서 PBS와 대조구인 DSM20284보다 유의적으로 돼지 점막과 IPEC-J2 cell에서 ETEC K88을 inhibition, competition, displacement하여 exclusion 효과가 뛰어난을 확인하였다 (그림 37).

Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7

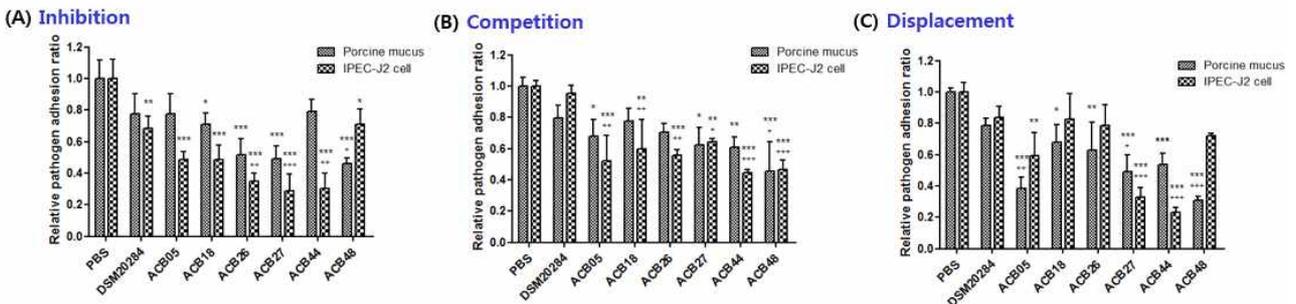


그림 38. 장내 점착능력이 우수한 *P. acidilactici*를 이용한 EHEC O157:H7 exclusion assay 결과(PBS: instead of ACB, PBS treated; one-way ANOVA with Tukey's post hoc test; *: significantly different from PBS, +: significantly different from PK; one symbol: $P < 0.05$, two symbols: $P < 0.01$, three symbols: $P < 0.001$)

EHEC O157:H7에 대한 실험 결과, ACB5, ACB26, ACB27, ACB44에서 PBS와 대조구인 DSM20284보다 유의적으로 돼지 점막과 IPEC-J2 cell에서 EHEC O157:H7을 inhibition, competition, displacement하여 exclusion 효과가 뛰어난을 확인하였다 (그림 38).

Salmonella typhimurium

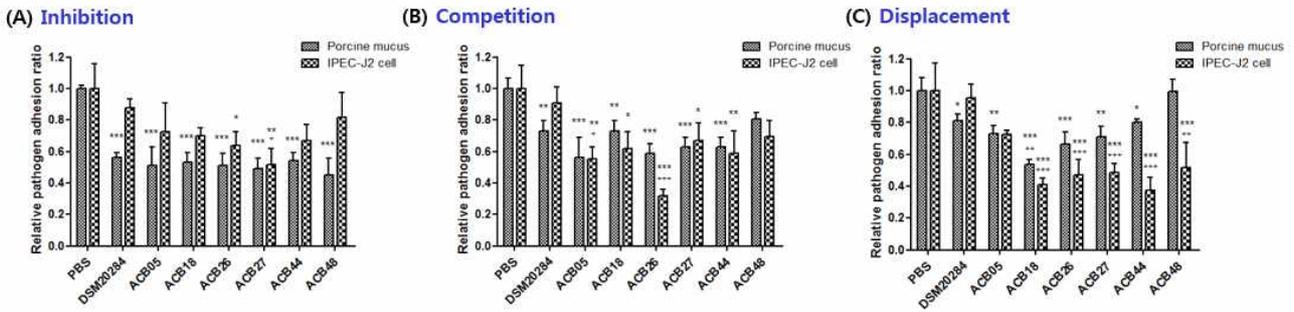


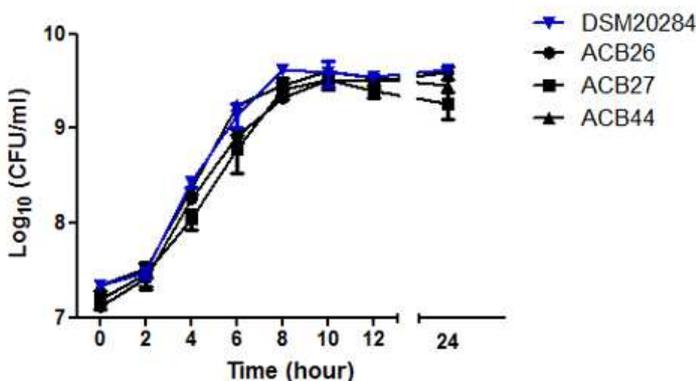
그림 39. 장내 점착능력이 우수한 *P. acidilactici*를 이용한 *Salmonella typhimurium* exclusion assay 결과(PBS: instead of ACB, PBS treated; one-way ANOVA with Tukey's post hoc test; *: significantly different from PBS, +: significantly different from PK; one symbol: $P < 0.05$, two symbols: $P < 0.01$, three symbols: $P < 0.001$)

추가적으로 돼지에게서 설사병 유발 병원균 중 하나인 *Salmonella Typhimurium*을 이용해 exclusion 실험 결과, ACB5, ACB26, ACB27, ACB44에서 PBS와 대조구인 DSM20284보다 유의적으로 돼지 점막과 IPEC-J2 cell에서 inhibition, competition, displacement하여 exclusion 효과가 뛰어난 것을 확인하였다 (그림 39). 결론적으로, 장내 점착능력이 우수한 ACB26, ACB27, ACB44에서 돼지 소장내 감염능력이 있는 pathogen (ETEC K88, EHEC O157:H7, *Salmonella typhimurium*)에 대한 exclusion 능력이 뛰어나 설사병 예방에도 효과가 있을 것으로 기대된다.

다. In vitro 시스템 기반의 survival rate 평가

(1) 장내 점착능력이 우수한 미생물의 성장활성 평가

장내 점착능력이 우수하며 pathogen에 대한 exclusion 효과도 뛰어난 ACB26, ACB27, ACB44를 O/N으로 MRS broth에 incubation 후, 0.1% 수준으로 50 ml fresh MRS broth에 접종 후 2 시간 간격으로 생균수를 측정하였다 (그림 40).



Sample	Doubling time (min)
ACB26	55.25
ACB27	55.82
ACB44	57.03

그림 40. 장내 점착능력이 우수한 미생물의 성장활성 평가 결과

(CFU: colony forming unit)

Log phase인 2~8시간 사이의 생균수 (concentration)와 시간 (duration)을 이용하여 sample에 대한 doubling time을 계산하였다. 실험 결과, 51~57분 사이로 ACB26, ACB27, ACB44 순으로 doubling time이 짧으나 균주간 차이가 크지 않음을 확인하여 추가적인 성장활성 평가는 진행하지 않았다.

(2) 장내 점착능력이 우수한 미생물의 내산성, 내담즙성 평가

장내 점착능력이 우수하며 pathogen에 대한 exclusion효과도 뛰어난 ACB26, ACB27, ACB44를 O/N으로 MRS broth에 incubation 후, 1% 수준으로 pH 2.0의 SGF (simulated gastric fluid)와 pH 6.8에 1.2%의 bile salts가 들어간 SIF (simulated intestinal fluid)에 접종하여 incubation 후 각각 30분, 1시간 간격으로 그 생균수를 확인 하였다 (그림 41).

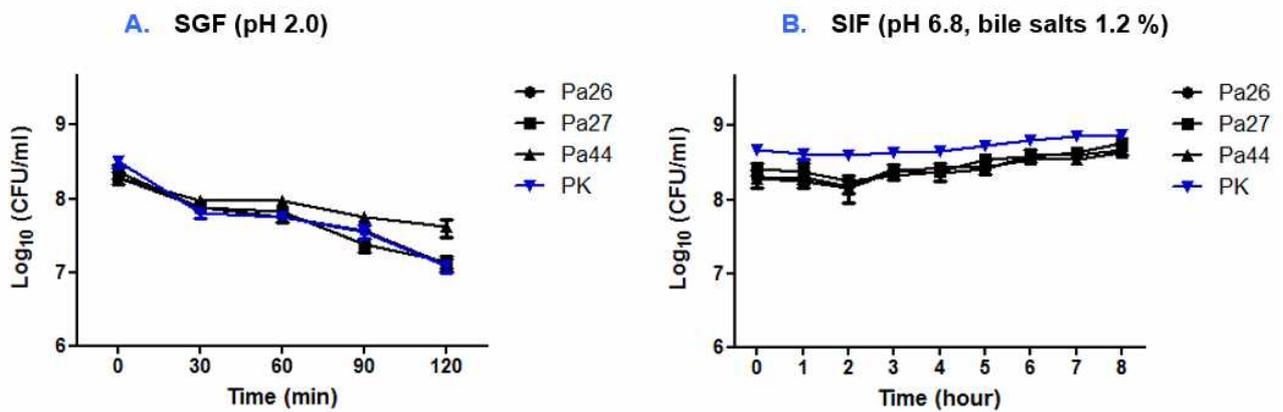


그림 41. 장내 점착능력이 우수한 미생물의 내산성, 내담즙성 평가 결과

실험 결과, 대조구인 DSM20284와 큰 차이 없이 내산성, 내담즙성이 뛰어나며 오히려 SIF에서는 생균수가 각각 증가되는 양상을 확인하였다. 이에 ACB26, ACB27, ACB44를 돼지에게 급여 시, 장 내까지 높은 생존율로 전달되어 장내 점착 및 colonization이 이루어져 유용 물질 분비 및 pathogen exclusion을 통해 돼지에게 유익한 효과를 발휘할 것을 기대할 수 있을 것으로 보인다.

제2절 2차년도 연구수행 내용 및 결과

1. 복합 미생물 생균제 최적화 및 사양실험 기반의 생균제의 효과 검증

가. 축산악취저감용의 천연물질 및 미생물 기반의 복합 미생물 생균제 최적화

(1) 천연물질 및 미생물 최적 복합 조성 확립

1차년도 *In vivo*, *In vitro* 실험 결과 *B. subtilis* CJ1, *B. subtilis* CJ2, *B. subtilis* SNU1, *B. licheniformis* SNU2 균주들을 악취저감 효과 우수 균주로 선발완료 하였다. 1차년도 실험 결과 prebiotics 후보 중 가장 효과가 좋았던 것은 피톤치드이나 돼지를 대상으로 기호성 테스트를 해본 결과 처음 접할 때 거부반응이 있었고, prebiotics 후보들은 모두 농축액으로 제품화시 제형 변경이 필요하여 경제성이 떨어지는 단점이 있었다. 저감 효과를 확인한 미생물 균주조합을 대상으로 *In vivo* 재검증 사양시험을 진행 하였다.

피톤치드를 비롯한 다른 Prebiotic를 적용하기 위해서는 코팅이나 masking 같은 추가적인 과정이 필요할 것으로 보인다.

나. 사양시험 기반의 복합 미생물 생균제 효과 검증

(1) 돈분 슬러리 샘플링 및 악취 발생 요인 감소효과 정량화

(가) 돈분 슬러리 샘플링 및 악취 발생 요인 감소효과 정량화 방법

돈사 내에서 대조구 및 처리구별 최소 6마리 이상 분, 뇨 샘플링 후 믹서기를 이용해 균질화 하였다. 처리구 별로 5반복씩(정확도 향상을 위함) 석순병에 분주하고, 39 °C incubator에 12hr, 18hr, 36hr, 42hr 동안 배양하면서(시간 흐름에 따라 발생량 체크) 포집된 기체를 기체측정기 Multi-RAE 를 이용하여 측정하였다. shaking을 하지 않고, 실제 돈사와 같은 조건인 정치 상태로 온도만 맞춰주고 배양을 진행하였다 (그림 42).

각각의 석순병별, 시간대별 데이터를 평균하여 주차별로 data 확보하였으며, 시험 기간내 주차별 전체 data를 바탕으로 저감정도 분석하였다. 각 주차별 대조구와 처리구간 data 비교 및 시작시점 대비 종료시점 data 비교 분석 하였다.

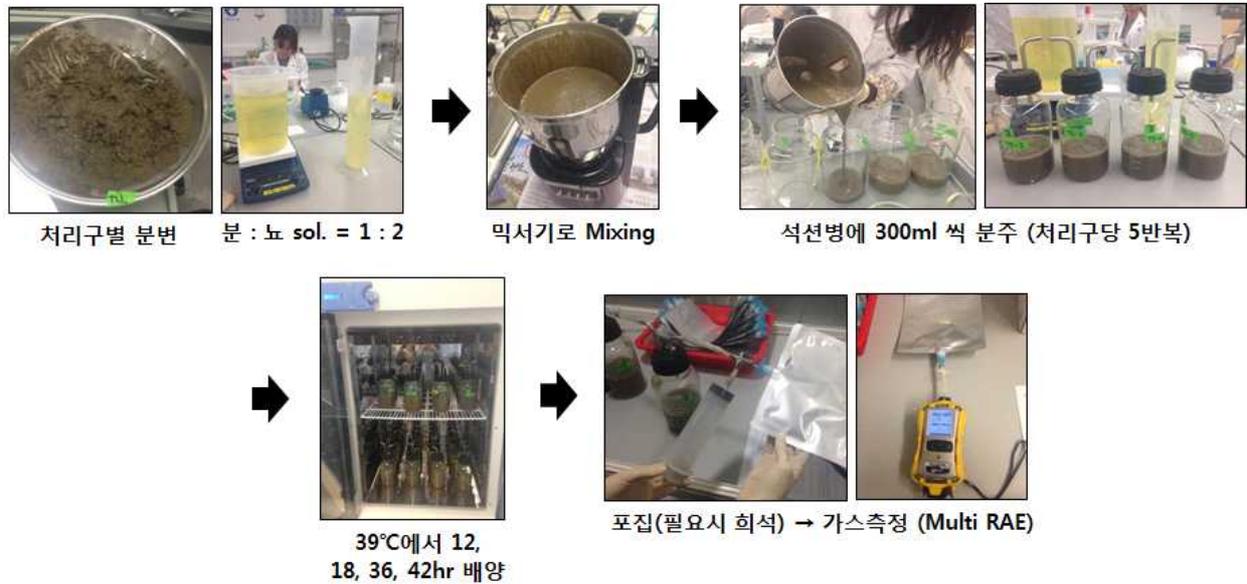


그림 42. 분뇨 유래 악취물질 *In vitro* 실험 방법

추가적으로 악취저감 미생물을 섭취 후 소화 장관을 통과하면서 균주의 효과 중 하나로 소화율 향상 정도를 평가하기 위한 실험으로, 개체별 항문자극을 통해 받은 분변에 남아 있는 NH₃-N의 함량을 측정하기 위해 CJ제일제당 분석팀에 의뢰하여 주차별 data를 확인하였다. 추가적으로 분변내에 남아 있는 내재적 인자들 인돌, 스카톨, p-크레졸 함량을 측정하기 위해 CJ제일제당 분석팀에 의뢰하였다. 인돌, 스카톨, p-크레졸은 환경부 지정 관리 항목은 아니나, 악취를 발생하는 대표적인 원인물질에 해당한다.

(나) 사양시험 디자인

CJ제일제당 안성 시험농장에서 총 5주간 육성/비육돈을 대상으로 주차별 분뇨 pH, 분뇨유래 가스 중 악취물질(암모니아, 황화수소) 농도, 분뇨유래 악취 내재적 인자 (NH₃-N, 인돌류, 페놀류) 농도 측정하였다. 개시시점, 3주, 5주 간격으로 개체별 체중 측정 및 사료섭취량 확인하였다. Control그룹 및 5개의 treatment 그룹으로 육성/비육돈 총 96두를 이용하여 5주간 사료 1 kg당 1 g (1x10⁹ CFU/g)의 악취저감 우수 균주 B.S SNU1, B.S SNU2, B.S CJ1, B.S CJ2 조합을 급여하였다.

1차년도 사양시험 처리구를 반복, 강화하여 재현성 검증 및 암모니아 저감을 증가를 기대하는 처리구를 배정하였으며, positive control로 1차년도 제품을 제외하고 새로운 해외 제품으로 변경하였다. 1차년도 *In vitro* 천연물질 (prebiotics) 중 가장 효과가 가장 좋았던 피톤치드는 기호성 편차가 발생하는 관계로 악취저감 효과가 뚜렷한 균주조합을 대상으로 사양시험을 진행하였다 (표 20).

표 20. 사양실험 처리군 요약

Group	Pen	두/Pen	총 두수	기간 (일)	Treatment
Con	4	4	16	35	
T1	4	4	16	35	BS CJ1 0.2% + BS SNU1 0.2%
T2	4	4	16	35	BS CJ1 0.2% + BL SNU2 0.2%
T3	4	4	16	35	BS CJ1 0.4% + BS SNU1 0.2%
T4	4	4	16	35	BS CJ1 0.4% + BL SNU2 0.2%
T5	4	4	16	35	B제품 0.2%
Total	24	24	96		

· B.SCJ1 : *Bacillus subtilis* CJ1, B.SCJ2 : *Bacillus subtilis* CJ2,
 B.SSNU1 : *Bacillus subtilis* SNU1, B.SSNU2 : *Bacillus licheniformis* SNU2, 생균수 1×10^9 cfu/g 수준
 · B제품: D社 제품, Total microbial count 1.2×10^{11} cfu/kg, corn-soybean meal-based diets 약취저감제

(다) 약취 감소효과 정량화 결과

① 분뇨 pH

분+뇨 혼합 배양물의 pH를 측정된 결과, 주차가 경과될수록 pH가 증가하는 경향을 보였다. 대조구 대비 pH가 지속적으로 감소하는 처리구는 없었으나 T3와 T5 처리구는 개시 시점 대비 시간이 지남에 따라 pH가 유지 또는 감소되는 경향을 보였다 (표 21).

표 21. 주차별 분+뇨 혼합물 pH 변화

pH	0주차	1주차	2주차	3주차	4주차	5주차
C	6.29	6.16	6.28	6.31	6.34	6.41
T1	6.45	6.20	6.34	6.46	6.37	6.71
T2	5.91	5.95	5.92	6.14	6.12	6.54
T3	6.11	6.40	6.28	6.15	6.52	6.19
T4	6.42	6.24	6.10	6.33	6.23	6.61
T5	6.58	6.19	6.04	6.23	6.62	6.39

② 주차별 분+뇨 유래 약취가스(암모니아)

주차별 42시간동안 시간대 별로 배출된 분+뇨유래 암모니아 가스 농도를 비교해본 결과, T1 처리구는 2~4주차 암모니아 저감효과가 유지되는 반면, T3는 5주차에 접어들어 암모니아 저감 효과가 나타났다.

주차별 평균 암모니아 저감율 비교결과 T3(34.2%) > T1(23.3%) > T5(20.2%) > T2(11.2%) > T4(5.3%) 순으로 암모니아 저감효과가 있었다 (표 22, 그림 43).

개시 전 대비 감소율 비교율 비교결과 T3 처리구만 대조구보다 감소율이 높았다.(대조구 64% 저감, T3 72% 저감)

육성/비육돈 구간이 이유자돈 시기에 비하여 기본적으로 제공되는 사료의 조단백질 함량이 낮은 관계로 암모니아 발생농도가 높지 않아, 42hr까지 배양하면서 발생하는 공기를 포집하여 Multi-RAE를 이용하여 시간대 별로 측정하였다.

표 22. 주차별 분뇨유래 암모니아 배출 농도

ppm	0주차	1주차	2주차	3주차	4주차	5주차	저감율
C	21.0 ^{ab}	9.8 ^d	10.6 ^{ab}	6.8 ^{ab}	13.0 ^{ab}	7.6 ^{bc}	
T1	18.8 ^b	11.0 ^{cd}	7.4 ^c (30%)	6.4 ^{ab} (6%)	8.6 ^b (34%)	9.8 ^b	23.3%
T2	25.8 ^a	12.0 ^{bcd}	12.4 ^a	5.7 ^b (16%)	12.2 ^{ab} (6%)	14.2 ^a	11.2%
T3	18.0 ^b	23.8 ^a	12.0 ^a	6.8 ^{ab}	14.4 ^a	5.0 ^c (34%)	34.2%
T4	17.6 ^{bc}	12.6 ^{bc}	12.0 ^a	8.0 ^a	14.8 ^a	7.2 ^{bc} (5%)	5.3%
T5	12.2 ^c	14.8 ^b	8.6 ^{bc} (19%)	8.0 ^a	13.0 ^{ab}	6.0 ^c (21%)	20.2%

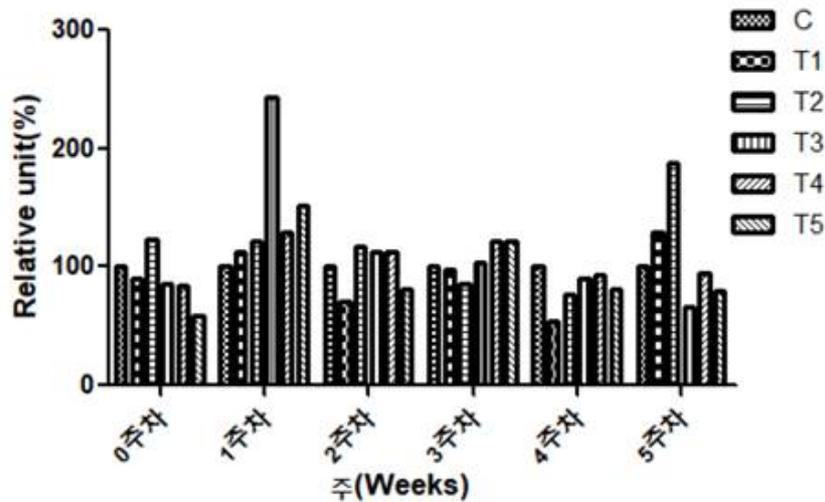


그림 43. 주차별 분+뇨 유래 암모니아 배출 농도

③ 주차별 분+뇨 유래 악취가스(황화수소)

주차별 평균 황화수소 저감율 비교결과 T5(57.8%) > T3(43.8%) > T1(36.4%) > T2(28.7%) > T4(24.1%) 순으로 황화수소 저감 효과가 있었다. T1은 초반 황화수소 저감효과가 우수하다가 4주차부터 둔화된 반면, T3는 4주차에 접어들면서 저감 효과가 강화되었다. 이는 암모니아 가스 분석에도 비슷한 경향을 보였다 (표 23, 그림 44).

개시전 대비 감소율을 비교결과 T3, T5 처리구만 대조구보다 감소율이 높았다(대조구 6% 증가, T3 -1% 저감, T5 -0.5% 저감). 황화수소 가스는 검출농도가 100~400ppm 수준으로 높기 때문에 처리구간의 유의적 차이가 분명히 나타났다.

표 23. 주차별 분+뇨 유래 황화수소 배출 농도

ppm	0주차	1주차	2주차	3주차	4주차	5주차	저감율
C	397 ^a	180 ^c	304 ^{ab}	217 ^{ab}	242 ^b	423 ^a	
T1	288 ^{ab}	198 ^{bc}	131 ^c (57%)	107 ^c (51%)	240 ^b	415 ^a (1.9%)	36.4%
T2	434 ^a	217 ^{bc}	346 ^a	155 ^{bc} (29%)	343 ^a	467 ^a	28.7%
T3	221 ^{bc}	422 ^a	208 ^{bc} (32%)	223 ^a	117 ^c (52%)	219 ^b (48%)	43.8%
T4	190 ^{bc}	266 ^{bc}	253 ^{ab} (17%)	158 ^{bc} (27%)	224 ^b (7%)	232 ^b (45%)	24.1%
T5	126 ^c	316 ^b	150 ^c (51%)	112 ^c (49%)	92 ^c (62%)	125 ^b (70%)	57.8%

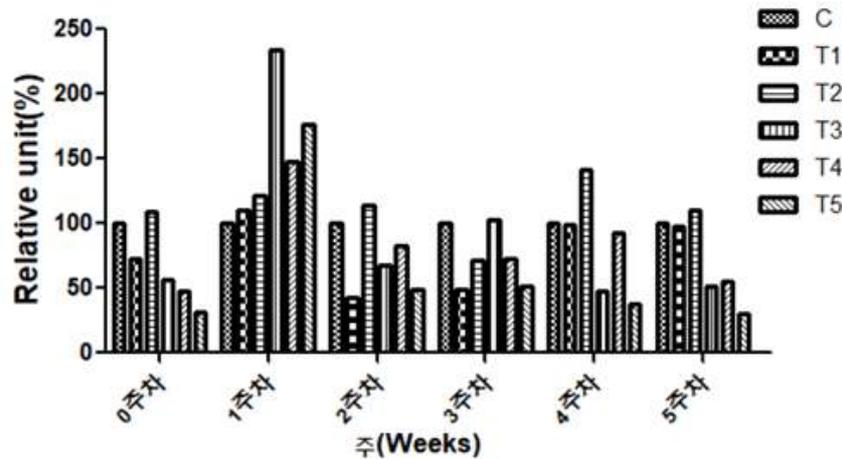


그림 44. 주차별 분+뇨 유래 황화수소 배출 농도

④ 주차별 분변유래 내재적 인자(NH₃-N)

악취저감 미생물을 섭취 후 소화 장관을 통과하면서 균주의 효과 중 하나로 소화율 개진도를 평가하기 위한 실험으로, 분내에 남아 있는 NH₃-N의 함량을 측정하기 위해 CJ제일제당 분석팀에 의뢰하였다. 분 + 뇨를 배양시 나타나는 미생물의 저감 효과가 아닌 섭취를 통한 동물체내에서의 소화율 개진 효과를 보고자 하였다.

처리구별 분변내 함유된 NH₃-N의 농도를 분석한 결과, 4주차부터 처리구간의 유의적 차이가 나타나기 시작했으며, T5(33.1%) > T3(25.8%) > T4(18.1%) > T1(17.8%) > T2(17.0%) 순으로 NH₃-N 농도가 감소하였다.

개시 전 대비 NH₃-N 감소율을 고려하면, 대조구는 52.3% 증가한 반면, T3와 T5 처리구만 감소되는 경향을 보였으며, T3, T5 처리구 균주의 효과로 대조구 대비 장내 NH₃-N 소화율이 높아졌음을 확인 할 수 있다 (표 24).

표 24. 주차별 분변 내 남아있는 NH₃-N 농도

ppm	0주차	1주차	2주차	3주차	4주차	5주차	저감율
C	331 ^b	352 ^b	324 ^c	197 ^c	429 ^a	504 ^a	
T1	353 ^b	338 ^{bc}	316 ^c	267 ^a	318 ^{bc} (25.9%)	456 ^b (9.7%)	17.8%
T2	251 ^c	348 ^b	416 ^a	200 ^c	347 ^b (19.2%)	430 ^b (14.8%)	17.0%
T3	359 ^b	453 ^a	356 ^b	281 ^a	419 ^a	256 ^e (49.3%)	25.8%
T4	282 ^c	319 ^c	342 ^b	259 ^{ab}	401 ^a	354 ^c (29.7%)	18.1%
T5	468 ^a	337 ^{bc}	368 ^b	219 ^{bc}	310 ^c (27.7%)	310 ^d (38.5%)	33.1%

⑤ 주차별 분변유래 내재적 인자(인돌류&페놀류)

인돌류, 페놀류는 환경부 지정 악취 물질은 아니지만, 악취발생의 대표적인 물질 중 하나로 알려져 있다. 악취저감 미생물을 섭취 후 효과 중 하나로 소화율 개선정도를 확인하기 위한 실험으로, 분변에 남아 있는 인돌, 스카톨, p-크레졸 함량을 측정하기 위해 CJ제일제당 분석팀에 의뢰하였다.

처리구별 분변 내 함유된 인돌류(skatoles, indole)와 페놀류(p-cresole) 농도를 분석하여 합산하여 총 발생값을 비교하였다 (표 25).

대조구 대비 비교 시, T3(23.6%) > T1(20.6%) > T4(19.0%) > T5(16.8%) > T2(15.4%) 순으로 저감효과를 확인 할 수 있었으며, 처리구별 개시시점 대비 5주차 저감율을 비교했을 때는 대조구는 농도가 50% 증가한 반면, T3와 T5 처리구는 감소하는 경향을 보였다.

표 25. 주차별 분변유래 인돌류&페놀류 농도

ppm	0주차	1주차	2주차	3주차	4주차	5주차	저감율
C	137 ^b	153 ^b	139 ^c	137 ^a	191 ^a	206 ^a	
T1	132 ^b	152 ^b	139 ^c	99 ^{cd} (27.9%)	139 ^c (27.2%)	192 ^a (6.8%)	20.6%
T2	144 ^b	135 ^c	163 ^a	95 ^d (30.3%)	169 ^b (11.5%)	197 ^a (4.3%)	15.4%
T3	137 ^b	191 ^a	152 ^b	143 ^a	165 ^b (13.4%)	137 ^c (33.7%)	23.6%
T4	115 ^c	161 ^b	138 ^c	115 ^{bc} (15.7%)	155 ^b (18.6%)	159 ^b (22.7%)	19.0%
T5	177 ^a	154 ^b	127 ^d (8.4%)	132 ^{ab} (3.6%)	135 ^c (29.1%)	153 ^{bc} (25.8%)	16.8%

(2) 급여한 생균제의 생산성 지표확인

개시시점, 3주, 5주 간격으로 각각의 개체별 체중을 측정하였고, pen 사료섭취량을 확인하였다. 측정된 값을 이용하여 body weight (BW), average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), feed conversion ratio (FCR) 등 생산성 지표를 확인 하였다.

0, 3, 5주차 체중 및 사료 섭취량을 측정한 결과, 처리구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, 악취저감 균주 급여에 의한 기호성의 negative effect는 없는 것으로 판단하였다. 균주 조합을 비교해보면, T2 처리구(BSCJ1 0.2% + BLSNU2 0.2%) 가 FCR 측면에서 가장 나은 것으로

로 사료된다 (표 26).

표 26. 처리구별 체중, ADG, ADFI, FCR

Item	Treatment					
	Con	T1 (BSCJ1 0.2% +BSSNU1 0.2%)	T2 (BSCJ1 0.2% +BLSNU2 0.2%)	T3 (BSCJ1 0.4% +BSSNU1 0.2%)	T4 (BSCJ1 0.4% +BLSNU2 0.2%)	T5 (MicosourceS 0.2%)
BW, kg						
0주	73.59	73.04	73.40	73.44	73.40	73.54
3주	95.62	93.86	94.81	94.89	93.38	96.11
5주	109.72	106.88	107.90	109.10	107.74	111.04
0 to 3주						
ADG, kg	1.05	0.99	1.02	1.02	0.95	1.07
ADFI, kg	2.94	3.01	2.85	2.91	2.96	3.05
FCR	2.81	3.05	2.79	2.86	3.11	2.85
3 to 5주						
ADG, kg	1.010	0.930	0.920	1.020	1.030	1.070
ADFI, kg	2.980	2.970	2.830	3.080	3.300	3.310
FCR	2.97	3.19	3.09	3.05	3.23	3.11
0 to 5주						
ADG, kg	1.030	0.970	0.980	1.020	0.980	1.070
ADFI, kg	2.960	2.995	2.840	2.980	3.090	3.150
FCR	2.87	3.10	2.90	2.93	3.16	2.95

육성/비육구간 사양시험 종합평가는 다음과 같다. 주요 결과를 종합해볼 때, T3 처리구가 악취가스 및 악취유발 내재적 인자 저감효과가 가장 우수한 것으로 판단되며, 경쟁사 제품인 “B 제품”도 T3와 비슷한 저감효과를 보이는 것으로 확인하였다. 다만, B제품의 첨가비용이 가장 높고 (양돈 권장량 사용시), 효과가 좋았던 T3 처리구는 균주 첨가량을 늘렸던 처리구로, 상품화를 위한 가격 경쟁력을 반영한다면, T1 처리구의 BS SNU1 + BS CJ1 조합이 좋다고 판단된다. 그래서 T1 균주조합으로 대규모 현장 농가 사양시험을 진행하고자 한다.

다. 사양시험 기반의 복합 미생물 생균제 효과 검증

(1) 돈분 슬러리 샘플링 및 악취 발생 요인 감소효과 정량화

(가) 사양시험 디자인

앞선 육성/비육돈에서 효과를 보였던 균주를 대상으로 CJ돈돈팜 농장에서 7주간 육성/비육돈을 대상으로 대규모 사양시험을 진행하였다. 돈 방 2동(각 819두, 868두)으로 총 1,687여두 대규모 시험으로 현장 농가 수준의 조건으로 효과를 검증하고자 진행하였다. 돈사 내부 온도는 평균 24도로 유지하였고, 자동화된 환기 시스템에 의해 온도와 습도, 환기는 조절 되었다 (표 27).

개시 전 두 돈방 모두 슬러리를 비우고 시작 하였으며, 개시 후 매일 오전 9시, 같은 위치(5

번, 9번, 13번 pen안 가운데), 50cm높이에서 Multi-RAE로 측정하여 일 별로 평균값 확인하였다.

표 27. 사양시험 처리군 요약

Group	총 두수	기간(주)	Treatment
Con	819	7	
T1	868	7	BS CJ1 0.2% + BS SNU1 0.2%
Total	1,687		

· BSCJ1 : *Bacillus subtilis* CJ1, BSSNU1 : *Bacillus subtilis* SNU1, 각각 1×10^9 cfu/g 수준

(나) 악취 감소효과 정량화 결과

① 일자별 돈사내 악취가스(암모니아) 농도 변화

3주차까지는 일별로 대조구와 처리구의 농도 높고 낮음이 자주 바뀌다가 4주차에 접어들어 처리구의 암모니아 농도가 지속적으로 대조구보다 낮게 측정됨(처리구가 대조구보다 돼지 약 60두가 더 많음)

사료 내 악취저감 미생물이 장내 정착하여 효과를 나타내기까지 3주정도의 시간이 소요되고,(앞선 사양시험에서도 3주차 이후 효과가 나타남), 그에 따라 돈사 내 악취가스 저감 효과도 4주차부터 보이기 시작하는 것으로 사료된다 (그림 45).

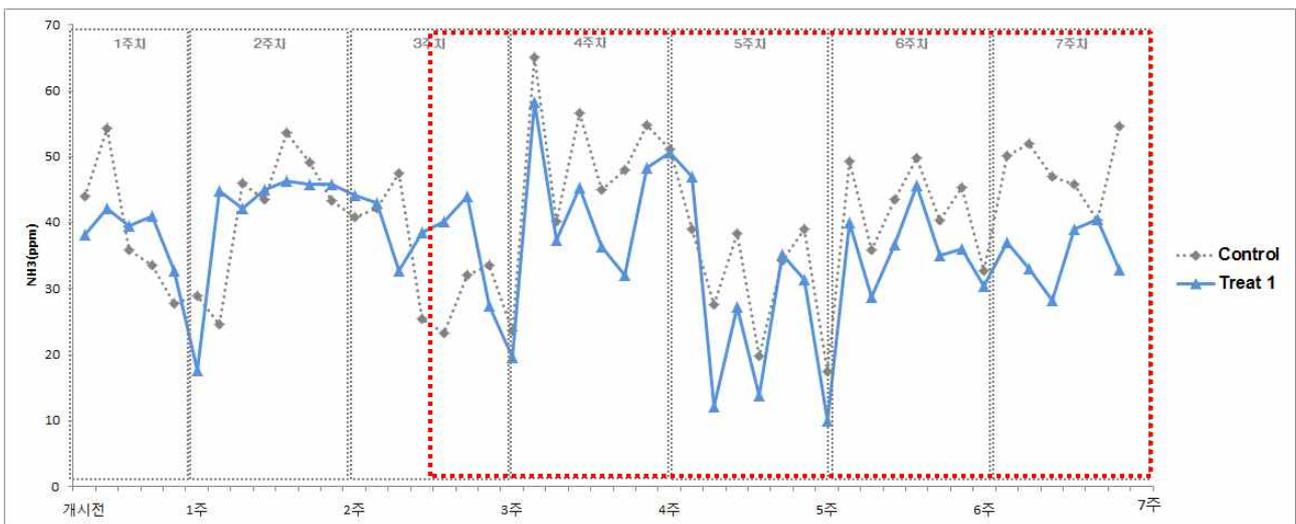


그림 45. 주차별 돈사내 암모니아 농도 변화

② 일자별 돈사내 악취가스(메틸머캅탄 CH₃SH) 농도 변화

황화수소는 측정기기(Multi-RAE)의 최저 검지농도 이하로 측정이 어려운 관계로 황화수소와 양의 상관관계가 있는 메틸머캅탄으로 황 계열 저감효과 확인하였다. 처리구의 메틸머캅탄의 저감 폭이 크며, 4주차부터는 대조구보다 더 낮은 농도로 저감됨을 확인 하였다 (그림 46).

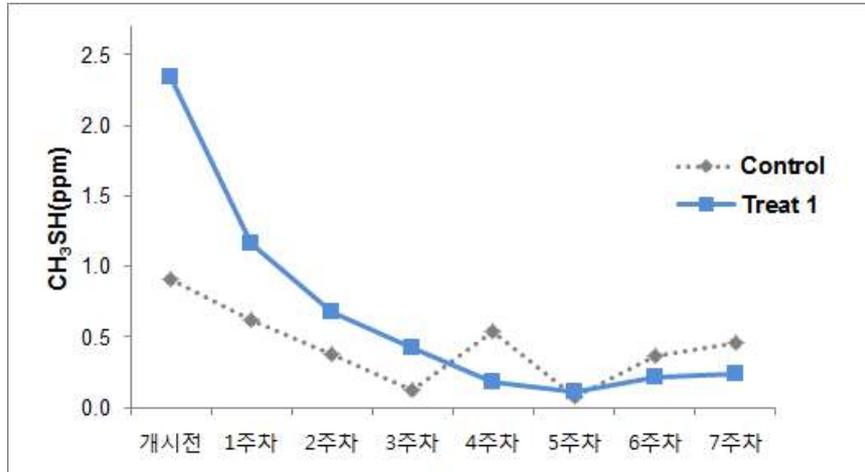


그림 46. 주차별 돈사내 메틸머캡탄 농도 변화

대규모 사양시험 종합결과는 다음과 같다. 대기 중 악취가스 저감효과 4주차부터 나타나며, **대조구비, 암모니아 16.8%, 메틸머캡탄 65.8% 저감 되었다.** 코로 맡는 수준에서는 대조구, 처리구 돈사간의 악취강도 차이는 느껴지지 않는았다(이미 사람이 느낄 수 있는 최저 감지농도 이상의 농도이기 때문에 코로 인지되는 냄새는 유사한 것으로 사료됨).

하지만, Multi-RAE 기계를 이용하여 측정시 저감 효과가 지속적으로 있으므로, 사육사나 돼지 개체의 건강에 도움이 될 것으로 판단된다.

추가적으로 돈방 관리 사육사들의 의견으로 4주차 대조구의 슬러리 양이 많아, 처리구 대비 하루 먼저 슬러리를 비웠으며(개시 전 두 돈 방 모두 동일하게 슬러리를 비우고 시작, 처리구 돈방이 약 60 여두 더 많음), 돈사내 작업시 처리구 돈방이 눈 따가움이 덜하였다고 의견을 주었다. 7주후 출하시 기침이 심한 개체가 대조구 돈사에 약 8% 정도 많다는 의견도 주었다.

라. 대량생산 시스템 구축 및 산업화

(1) 친환경을 위한 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 대량 생산 시스템 구축

CJ제일제당의 균주 생산 노하우를 적용하여, 외부 업체를 통한 대량 생산 시스템 구축 완료 하였다. 균주별로 원하는 수준의 균수에 맞춰 생산할 수 있도록 최적화 하였다.

(2) 시제품 개발을 통한 제품화

사양시험을 통하여 효과를 확인한 축산악취저감용 미생물 생균제 2종에 대해 시제품을 생산 하였으며 (그림 47), CJ 제일제당 내부 사용을 1차 목표로 하고 있다. 먼저 내부 사용을 통하여 시장에 인지도를 확보한 후 외부 판매용 제품 생산을 계획하고 있다.

2018년 추가 사양시험시 장내 점착능력이 우수한 미생물들과 복합사용을 통하여 축산악취저감 및 항생제 대체용 친환경 복합 미생물 생균제를 개발 하고자 한다



그림 47. 축산악취저감용 미생물 생균제 시제품 2건

2. 장내 점착능력이 우수한 미생물 선발을 위한 유전자 마커 개발

가. 미생물 유전체 분석을 위한 gDNA library 구축

기존의 계획서 상에는 장 점막 점착능 우수 균주 5종과 저조 균주 5종에 대해 sequencing 진행을 계획하였으나, 본 연구에서는 1차년도에 선발한 장 점막 점착능 우수 균주 6종과 저조 균주 6종으로 총 12종의 *P. acidilactici*의 gDNA를 추출하였다. 이때, sequencing 및 assembly가 제대로 이루어졌는지 판단하기 위하여 control 균주이자 본 연구에서 장 점막 점착능이 저조하다고 평가된 DSM20284 균주 또한 함께 진행하였다. 12종의 추출한 gDNA를 이용하여 각 미생물에 대한 gDNA library를 그림 48과 같은 방법으로 구축하였다.

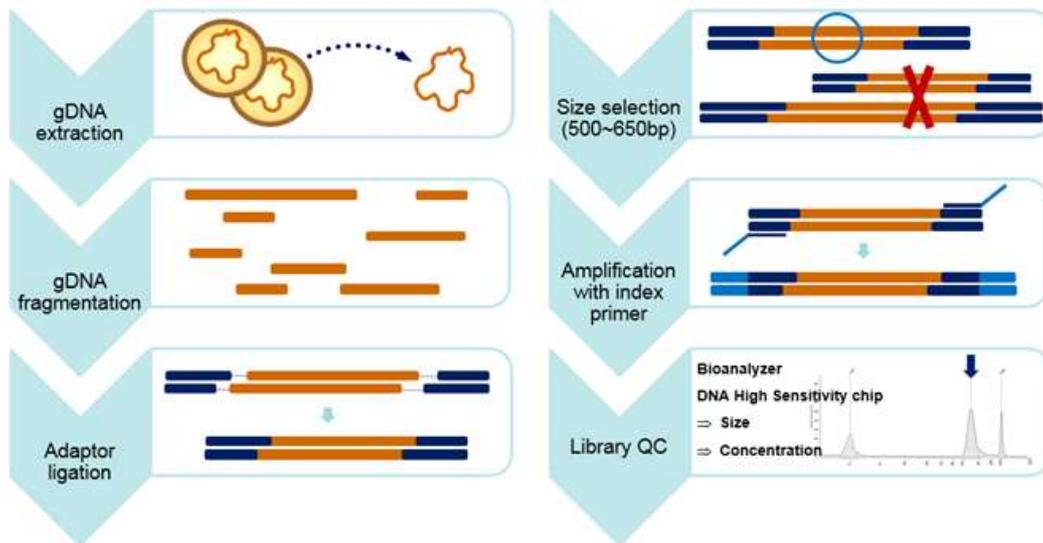


그림 48. 미생물 gDNA 추출 및 library 구축 모식도

최종적으로 장 점막 점착능 우수 균주 6종 및 저조 균주 6종을 포함한 *P. acidilactici* 12종의 gDNA library를 구축완료하였다. 12개의 gDNA는 Bioanalyzer를 통해 size, concentration, 순도를 확인하여 이상 없음을 확인하였다.

나. 미생물 유전체 sequencing 및 genome assembly

미생물 생균제의 유전체 분석을 위해 high-throughput sequencing 장비인 Illumina HiSeq 2500 sequencer (Macrogen, South Korea)를 활용하여 12종의 *P. acidilactici*의 genome sequencing을 진행하였다. FastQC를 통해 12개의 raw data에 대한 sequencing quality를 확인하였다. 12개 큰 이상이 없음을 확인하고, adapter sequence를 제거하였으며, 그 이후로 FastQC로 quality가 개선되었음을 확인하였다. SPAdes assembler를 이용하여 sequencing된 여러 서열을 contig 수준으로 assembly를 진행하였고, 500bp 이상의 contig만 선발하여 fasta file로 저장하였다. 최종적으로 sequencing 및 assembly된 결과를 total length (bp, base pair), Number of contig (Contig No.), N50, number of coding sequences (No. CDSs), GC content %, average nucleotide identity based on Blast to the reference strain DSM20284 (ANIb) 등의 지표를 이용하여 genome quality를 확인하였다.

표 28. 미생물 유전체 sequencing 및 assembly 결과

Group	Strain	Total length (bp)	Contig No.	N50	No. of CDSs	GC content (%)	ANIb (%)
High adhesion group (HG)	ACB05	2,022,066	12	432,362	1,921	42.13	97.04
	ACB18	2,037,862	25	275,530	1,936	42.1	97.04
	ACB23	2,022,543	14	432,363	1,923	42.13	97.05
	ACB26	2,024,880	20	188,569	1,929	42.16	97.03
	ACB27	2,023,983	20	213,393	1,928	42.13	97.02
	ACB44	2,086,097	25	432,307	1,995	41.98	97.05
Low adhesion group (LG)	ACB04	2,083,601	45	410,520	1,985	42.03	97.01
	ACB25	2,059,420	11	525,484	1,966	42.04	97.05
	ACB28	2,024,590	21	324,832	1,928	42.13	97.04
	175	2,198,770	75	147,835	2,145	41.64	99.25
	GS1	2,008,379	30	157,835	1,958	41.96	98.66
	DSM20284	2,176,584	70	255,161	2,120	41.68	99.97

12종 모두 control strain DSM20284 균주와 비슷한 수준으로 sequencing 및 assembly가 이루어진 것을 확인 할 수 있었다 (표 28). 유전체 분석에 12종 모두 활용 할 수 있음을 확인하여 이후 분석을 진행하였다.

다. 미생물 유전체 이용 phylogenetic tree 작성

본 연구를 통해 선발된 장 점막 점착능 우수 균주 6종 및 저조 균주 6종 뿐만 아니라, NCBI에 등재된 *Pediococcus acidilactici* 19종에 대한 유전체 정보 (fasta file)를 확보 및 비교 분석에 진행하였다.

(1) Multilocus sequence typing (MLST) 분석

MLST 분석을 진행하기 위해 *P. acidilactici* 내 housekeeping gene으로 알려진 7개의 유전자를 선행 논문들을 통해 다음과 같이 선별하였다. Housekeeping gene인 *atpD*, *groEL*, *ldhD*, *ldhL*, *metS*, *pheS*, *rpoD* 유전자들에 대한 서열만을 각 종에서 선별하여 fasta file로 저장 후, 서열간의 차이를 분석 진행 하였다. MLST분석 프로그램으로 Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 (MEGA7)을 이용하였으며 비교 분석 시 사용한 방법은 UPGMA 기법이다 (그림 49).

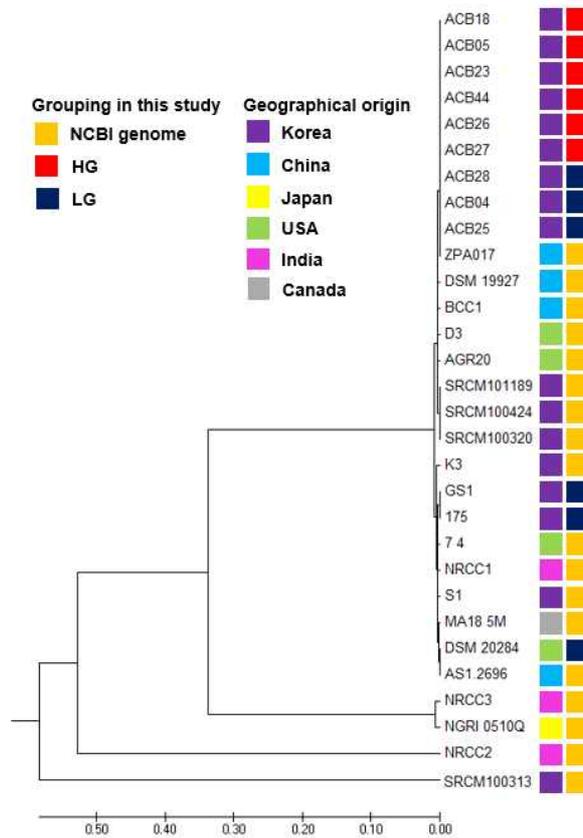


그림 49. Unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) 기반의 phylogenetic tree 결과

7개의 housekeeping gene만을 비교하였을 때 장 점막 점착능 우수 균주와 저주 균주가 크게 차이나지 않으나 31개의 종 사이에서 grouping 되는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 49). 전체 유전체가 아닌 7개의 유전자만으로 비교 분석하는 것에 한계가 있어 전체 유전체 서열을 비교하는 방법으로 clustering을 확인하였다.

(2) RAST 기반의 hierarchical clustering 분석

유전자 전체서열을 이용하는 RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) web tool을 이용 31종의 전체 유전정보에 대해 annotation 진행하였다. 31종의 전체 유전정보를 annotation기반으로 subsystem 단위로 구분하여 그 분포 차이로 hierarchical clustering을 진행하였다 (그림 50).

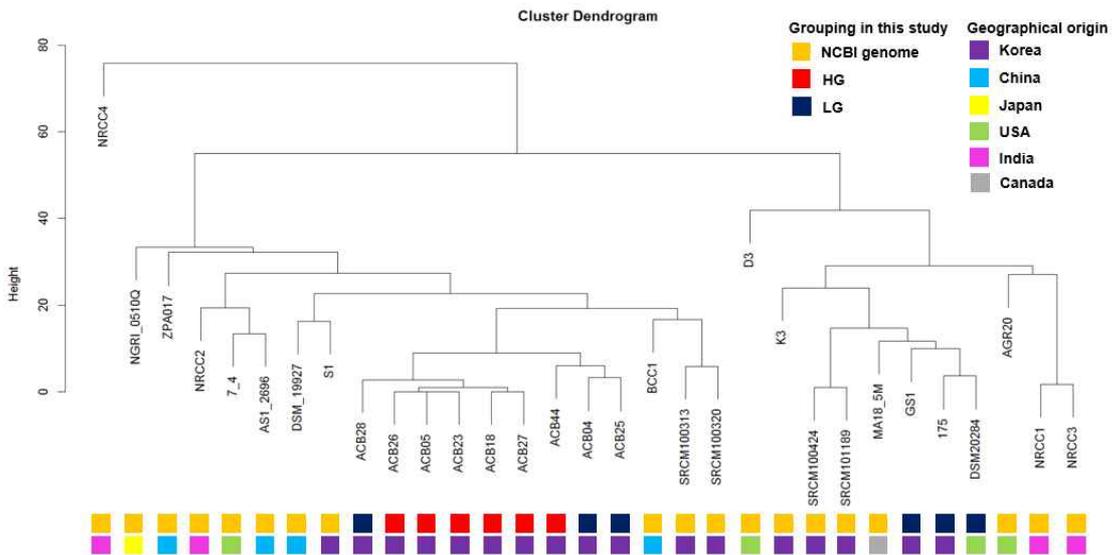


그림 50. RAST annotation 기반의 hierarchical clustering 분석 결과

장 점막 점착 우수 균주 ACB05, ACB18, ACB23, ACB26, ACB27 중 끼리 grouping 되는 것을 확인하였다. 반면 장 점막 점착 저조 균주는 175, GS1, DSM20284끼리만 grouping 되는 것을 확인하였다. 이에 유전자 비교 분석 시 장 점막 점착 우수 균주와 저조 균주에 대한 group 차이가 유전적으로 있을 것이라 판단하여 이후 분석을 진행하였다.

라. 유전자 서열의 유사성 비교 분석

Whole genome이 알려진 *Pediococcus acidilactici* ZPA017을 reference로 이용하여 genome alignment를 통해 장 점막 점착성 우수 균주 6종과 저조 균주 6종의 유전자 서열의 유사성 비교 분석 하였다. 분석 프로그램으로 BLAST ring image generator (BRIG)을 이용하여 유전자 유사성 100, 50, 30 %를 기준으로 확인하였다 (그림 51).

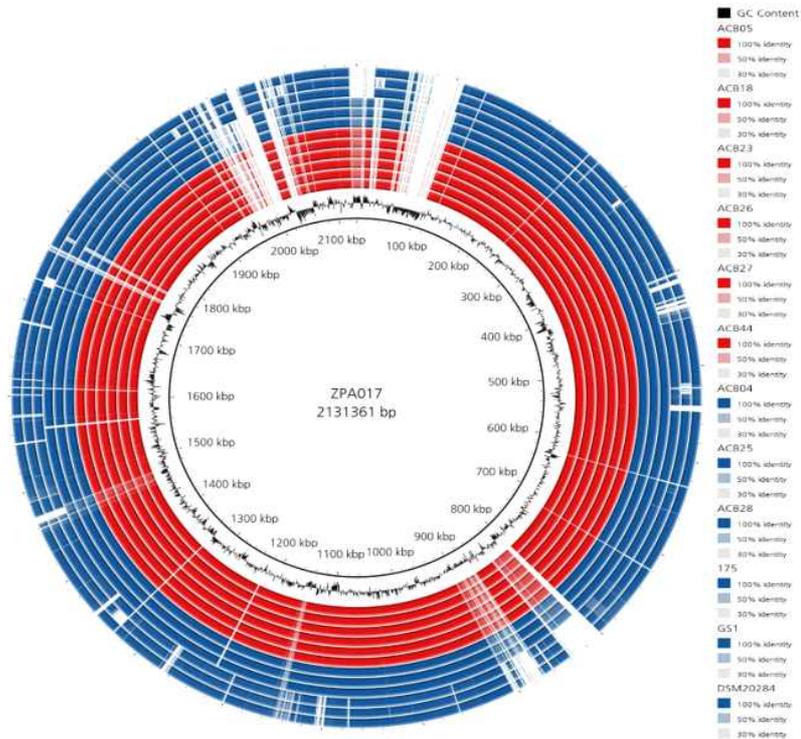


그림 51. Reference ZPA017와 12종의 genome alignment 결과

장 점막 점착성 저조 균주 175, GS1, DSM20284가 reference ZPA017 뿐만 아니라 본 연구를 통해 선발된 나머지 9종에 대해서도 차이가 크게 나는 것을 확인 할 수 있었다. 장 점막 점착성 우수 균주와 저조 균주의 차이를 이해하기 위해 target 유전자의 유무 수준에서의 비교 분석 필요하여 추후 분석을 진행하였다.

(1) RAST subsystem 기반의 유전체 비교 분석

RAST subsystem으로 분류된 유전자의 개수 차이를 이용하여 장 점막 점착성 우수 균주 6종과 저조 균주 6종에 대한 두 그룹간의 차이를 비교하였다 (그림 52).

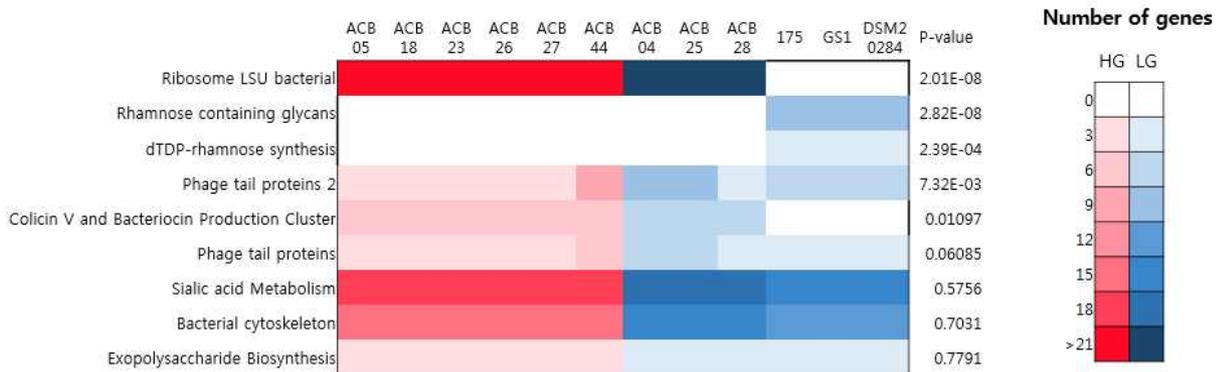


그림 52. RAST subsystem 기반의 유전체 비교 분석 결과

장 점막 점착성 저조 균주 175, GS1, DSM20284 균주가 가장 큰 차이가 나는 것을 확인하였다. 또한 가장 차이를 보이는 유전자는 ribosome LSU bacterial, Rhamnose containing glycans, dTDP-rhamnose synthesis, phage tail protein 2, colicin V and bacteriocin production cluster 등이 유의적으로 차이가 나는 것을 확인하였다.

(2) Ortholog 기반의 유전체 비교 분석

Ortholog는 한 조상에서 진화한 같은 기능의 유전자로, 12 종의 유전체를 이용하여 ortholog를 선발하고 각 ortholog의 기능을 예측하였다. 각 ortholog의 id와 기능적 특성을 이용하여, 해당 ortholog의 유무로 두 그룹간의 차이를 비교하였다 (그림 53).

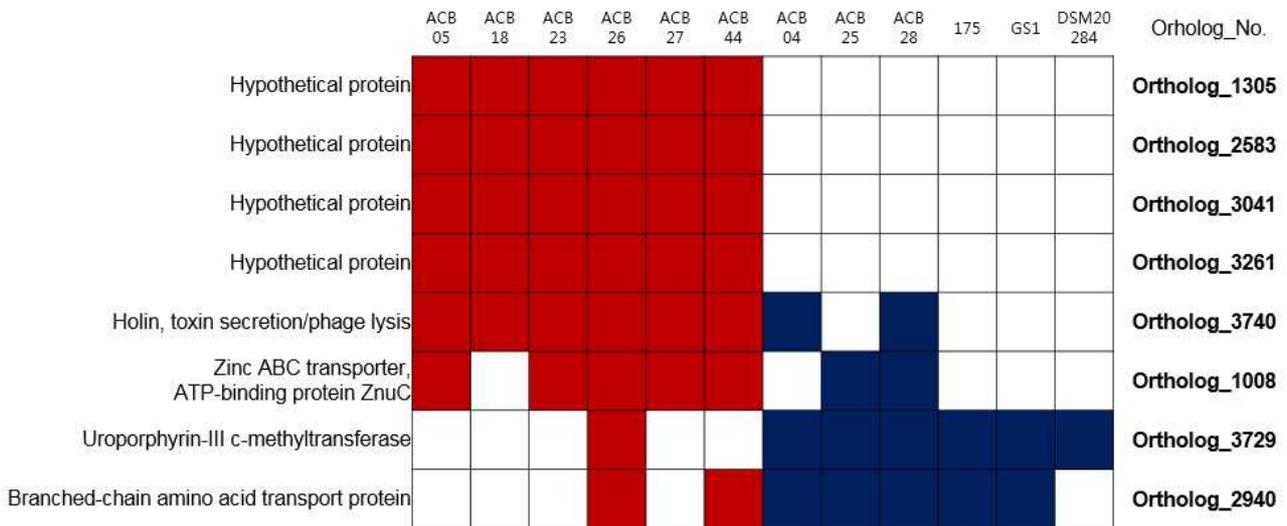


그림 53. Ortholog 기반의 유전체 비교 분석 결과

장 점막 점착성 우수 균주와 저조 균주, 두 그룹간의 차이가 확연히 나는 것을 확인하였다. 주로 hypothetical protein, holin, toxin secretion, phage lysis, zinc ABC transporter, ATP-binding protein ZnuC, uroporphyrin-III c-methyltransferase, Branched-chain amino acid transport protein 등이 그룹간 차이가 확실하게 나는 것을 확인 하였다.

바. 생균제 선발을 위한 유전자 마커 개발 및 검증

(1) 생균제 선발을 위한 유전자 마커 개발

장 점막 점착성은 물론 미생물의 기능성 평가 지표로 활용 가능한 유전자 마커의 선발을 위해 그림 53에서와 장 점막 점착성 우수 균주에만 존재하는 ortholog 서열을 이용하여 이를 specific하게 증폭시킬수 있는 primer set를 제작하였다 (표 29).

표 29. 생균제 선발을 위한 유전자 마커용 primers

Ortholog No.	Primer name	Sequence (5'-3')	Length (bp)	Tm (°C)	GC (%)	Product size (bp)
Ortholog_1305	1305_F	GGTTAAGCAATTGGTCCCTAATT	23	55.7	39	134
	1305_R	GCAAAAAACGCCTTGATTTTGC	22	55.9	40	
Ortholog_2583	2583_F	AAATACCGGCTCAATCGCC	19	58.8	52	111
	2583_R	TTAACCGGAGAGAGCTGGG	19	59.6	57	
Ortholog_3041	3041_F	GGCTCTATTGAAGACAAAACACC	23	57.2	43	131
	3041_R	CAATCTCTGTTGATTTTGGCTG	23	55.6	39	
Ortholog_3261	3261_F	TTGGCACACGTTTTGGCT	18	58.2	50	105
	3261_R	CATTGAAGTTAAAGTGAAGTTCAGCG	26	58	38	

제작한 유전자 마커용 primer는 모두 Tm값 56~60 °C사이로 증폭되는 product size는 105~134 bp로 비슷한 크기로 설정하였다. 유전자 마커용 primer가 목적과 예측대로 잘 작동하는지 본 연구에서 선발한 장 점막 점착 우수 균주 6종과 저조 균주 6종에 대해 검증 절차가 필요하다.

(2) 생균제 선발을 위한 유전자 마커 검증

장 점막 점착성 우수 균주 선발을 위한 유전자 마커용 primer와 장 점막 우수 균주 6종 및 저조 균주 6종의 colony를 이용하여 아래의 조건으로 PCR을 수행하였다 (그림 54).

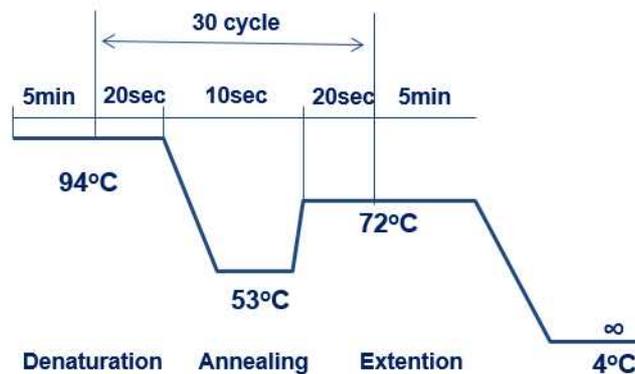


그림 54. Colony PCR 진행 조건

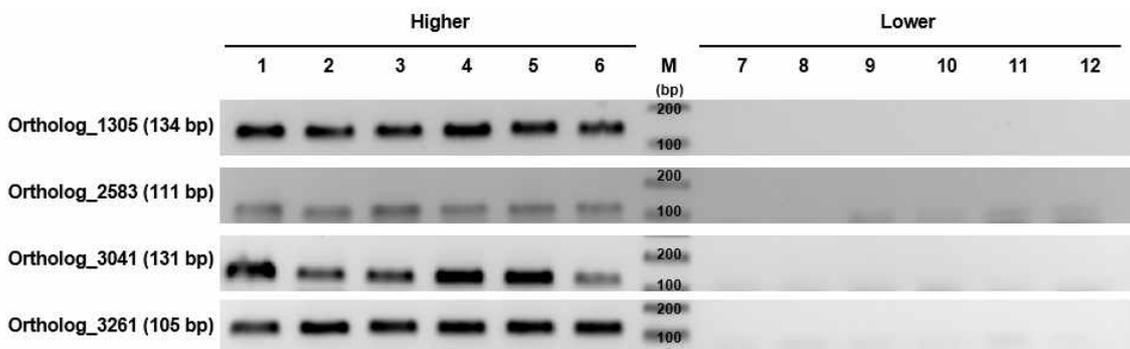


그림 55. 유전자 마커 기능 검정 결과

PCR 진행 후, 1.5 % agarose gel을 이용 전기영동 (80 V, 40 min)으로 band가 떴는지, 그 크기가 어떤지 유전자 마커로써의 가능성을 확인하였다 (그림 55). 그 결과, 장 점막 점착성 우수 균주 6종에 대해서만 유전자 마커가 specific하게 잘 작동하는 것을 확인하였다. 본 연구에서 개발한 유전자 마커를 이용, 효율적인 미생물 생균제 선별 및 기능 평가가 가능 할 것으로 기대한다.

3. 사양실험을 통한 선별된 장내 점착능력이 우수한 미생물의 효과 검증

가. 4주령 자돈을 이용한 사양실험 디자인

4주령 자돈을 이용하여 4주간 급이 및 2주 간격으로 몸무게 측정과, 혈액, 분변 샘플링을 진행하였다 (그림 56). 또한 매일 사육사가 직접 설사 발병률을 하루 2회 확인하여 처리한 생균제의 효과를 검증하였다. 사양 실험 장소는 CJ돈돈팜에서 자돈 (28~30일령)을 이용하여 컨테이너 pen사를 이용하였다 (그림 57). 사용한 장내 점착능력이 우수한 미생물은 ACB26, ACB27, ACB44로 pathogen ETEC K88, EHEC O157:H7, *Salmonella typhimurium*에 대해 exclusion 효과가 뛰어나 이를 10% skim milk에 suspension하여 deep freezer에 O/N incubation 후 freezing dry (FD)를 진행하여 준비하였다.

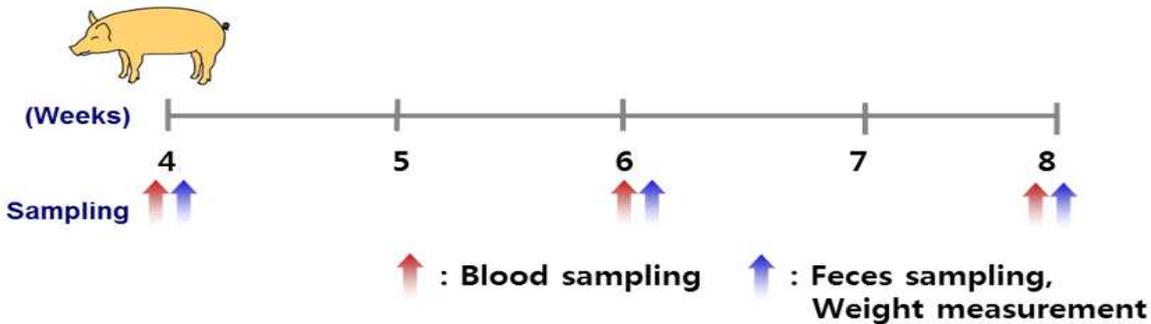


그림 56. 4주령 자돈을 이용한 사양실험 스케줄



그림 57. 사양실험을 진행한 CJ 완주 시험농장 돈돈팜 컨테이너 pen사.

4주령 자돈 72두를 이용하여 4주간 사료 1 kg당 1 g (2×10^9 CFU/g)의 장 점막 점착능력이 우수한 균주 ACB26, ACB27, ACB44를 각각 T1, T2, T3 그룹으로 grouping하여 그룹당 3pen (pen당 6두)로 총 18두의 자돈을 이용하였다 (표 30).

표 30. 사양실험 처리군 요약

Group	Pen	두/Pen	총 두수	시험기간 (일)	Treatment
Con	3	6	18	28	Non
T1	3	6	18	28	ACB26
T2	3	6	18	28	ACB27
T3	3	6	18	28	ACB44
Total	12	24	72	112	

나. 사양실험을 통한 선발된 미생물 생균제의 효과 검증

2주간격으로 개체별 몸무게 측정 및 사료섭취량 확인하여 그 측정된 값을 이용하여 body weight (BW), average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), feed conversion ratio (FCR) 등을 확인하였다 (표 31). 대조군 대비 유의적으로 증가된 그룹은 없으나, 14~27일 사이 ACB26을 처리한 T1 그룹의 ADG, ADFI 값이 가장 높은 것을 확인하였다. 또한 실험 종료일인 27일 차에 T1그룹의 BW가 가장 높은 것을 확인하였다. 성장 증체율과 사료 섭취량 결과를 토대로 본 실험에 사용한 미생물 생균제 균주가 크게 돼지에 해가 없으면서 어느정도 성장 증체율에 도움이 되는 것을 최종적으로 알 수 있었다.

표 31. 성장 증체율 및 사료 섭취량

Item	Treatment				
	Con	T 1	T 2	T 3	
BW (kg)	0 d	7.06	7.06	7.06	7.07
	14 d	12.54	12.20	11.62	11.88
	27 d	19.83	19.93	19.34	19.45
0 to 14 d	ADG, kg	0.391	0.367	0.326	0.344
	ADFI, kg	0.418	0.425	0.381	0.392
	FCR	1.068	1.158	1.170	1.141
14 to 27 d	ADG, kg	0.561	0.595	0.594	0.582
	ADFI, kg	0.893	0.963	0.890	0.859
	FCR	1.592	1.620	1.499	1.475
0 to 27 d	ADG, kg	0.473	0.477	0.455	0.459
	ADFI, kg	0.647	0.684	0.626	0.616
	FCR	1.368	1.435	1.376	1.343

4주간의 설사와 연변 발생률은 0~7일 사이가 모든 그룹이 가장 높았으나, 14~21일 사이와 4주차에서는 T1 그룹이 0 %로 가장 낮은 설사와 연변 발생률을 보였다 (표 32와 33). 또한 control 그룹에 비해 처리구 모두 연변 발생률이 낮아지는 것을 확인했다. 특히 0~7일, 14~21일은 2주 간격으로 무게 측정과 혈액 샘플링 함으로써 물리적 스트레스로 인한 설사와 연변이 높아진 것으로 추측된다. 이에 물리적 스트레스성 설사와 연변에 대한 발생률 감소에 선발된 미생물 생균제가 효과를 보였으며, 특히 T1그룹에 처리한 ACB26이 가장 효과가 좋은 것을 확인할 수 있었다.

표 32. 설사 발생률 (%)

	Con	T1	T2	T3
0 to 7 d	8.7	11.1	9.5	15.1
7 to 14 d	0.8	0.0	0.8	0.0
14 to 21 d	0.0	3.2	1.6	1.6
21 to 28 d	0.8	0.0	1.6	0.8

표 33. 연변 발생률 (%)

	Con	T1	T2	T3
0 to 7 d	4.8	2.4	8.7	3.2
7 to 14 d	0.0	0.0	3.2	0.8
14 to 21 d	4.8	4.8	1.6	5.6
21 to 28 d	2.4	0.0	0.8	3.2

다. 분변내 미생물 분포 확인

처리한 미생물 생균제가 장내 미생물에는 어떠한 영향을 주었는지 알아보기 위하여, 2주 간격으로 샘플링한 분변으로부터 gDNA를 추출하여 장내 특정 미생물의 분포를 qRT-PCR 기법을 이용하여 확인하였다. 우선, 분변내 *P. acidilactici*의 상대적인 양을 비교하였다 (그림 58).

Control 대비 유의적으로 2주차 T1의 *P. acidilactici*가 가장 높게 나왔으며 4주차에도 T1이 높은 것을 확인하였다. 또한 target pathogen인 enterotoxigenic *E. coli*의 대표 adhesin인 F4, F18, Intimin에 대해서는 2, 4주차에 control보다 T1이 적게 나온 것을 확인할 수 있었다.

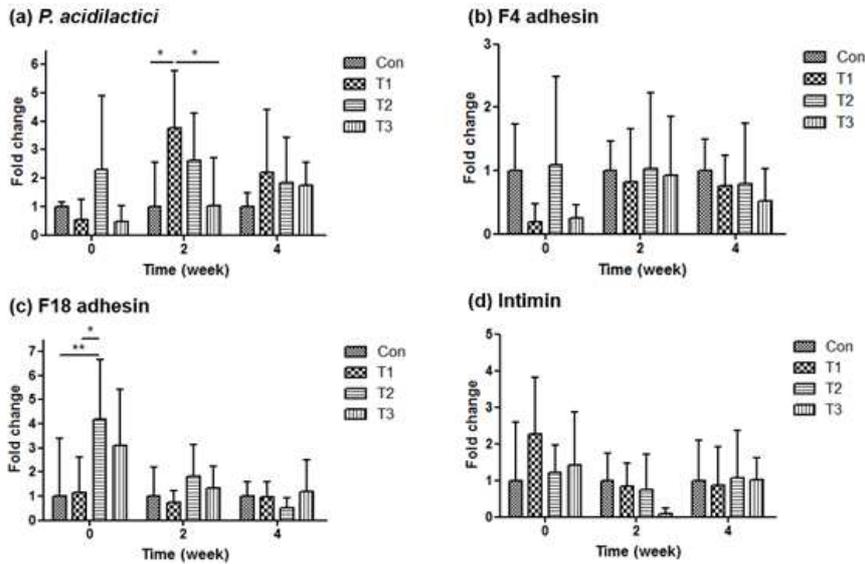


그림 58. qRT-PCR을 이용한 분변내 *P. acidilactici* (a), enterotoxigenic *E. coli* 유래 F4 fimbrea (b), F18 fimbrea (c), intimin adhesin (d) 의 상대적인 양 확인

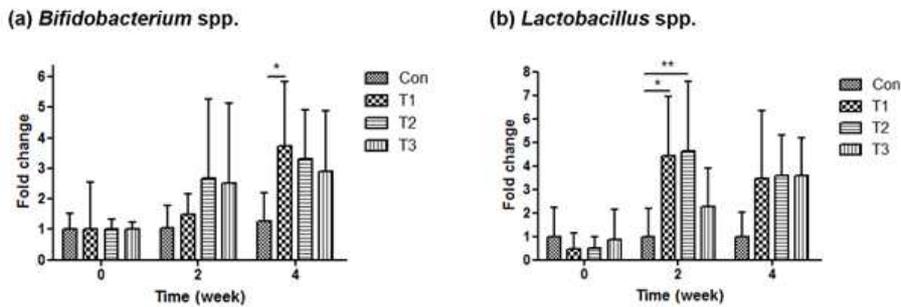


그림 59. qRT-PCR을 이용한 분변내 *Bifidobacterium* spp. (a)와 *Lactobacillus* spp. (b)의 상대적인 양 확인

또한 분변내 유익균으로 알려진 *Bifidobacterium* spp.와 *Lactobacillus* spp.에 대해 확인하였다 (그림 59). 그결과 control 대비 *P. acidilactici*를 처리한 test그룹 모두에서 *Bifidobacterium* spp.와 *Lactobacillus* spp.가 증가하였다. 결과적으로, 본 연구에서 선발한 ACB26을 이용하여 (4~8주령) 이유자돈의 설사 발병률을 낮추고, 유해균인 enterogenic *E. coli*의 감염을 억제 시킬 수 있으며, 유익균인 *Bifidobacterium* spp.와 *Lactobacillus* spp.를 증가 시킬 수 있음을 최종적으로 확인할 수 있었다.

제3절 연구개발 성과

1. 논문게재 성과 : SCI 4건

- 2017, Comparative genomics of *Lactobacillus salivarius* strains focusing on their host adaptation, JY Lee *et al.*, Microbiological Research, 205, 국외, SCI, ISSN 0944-5013
- 2017, Prohibition of antibiotic growth promoters has affected the genomic profiles of *Lactobacillus salivarius* inhabiting the swine intestine, JY Lee *et al.*, PloS one, 12(10), 국외, SCI, ISSN 1932-6203
- 2017, Comparative analysis of the microbial communities in raw milk produced in different regions of Korea, IS Kim *et al.*, Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 30(11), 국내, SCI, ISSN 1011-2367
- 2017, Improved antimicrobial activity of *Pediococcus acidilactici* against Salmonella Gallinarum by UV mutagenesis and genome shuffling, GG Han *et al.*, Applied Microbiology and Biotechnology, 101, 국외, SCI, ISSN 0175-7598

2. 특허성과 : 출원 특허 2건

- 2017, 신규한 페디오코커스 악시딜락티시를 이용한 돼지 설사증 예방 또는 치료용 조성물, 서울대학교산학협력단, 대한민국, 출원등록번호 10-2017-0158436
- 2018, 바실러스 서브틸리스 균주를 유효성분으로 포함하는 가축 배설물 악취저감용 사료 조성물, 서울대학교산학협력단, 씨제이제일제당(주)BLOSSOM PARK, 대한민국, 출원등록번호 10-2018-0006619

3. 기술요약정보

- 2017, 미생물 균주(가칭: Bacillus subtilis T4) 및 이에 대한 지식재산권에 대한 실시 허여 계약, 악취저감을 위한 미생물 균주 배양 및 사용 노하우, 기술개발완료단계, 균주기탁번호 KCTC18656P, 특허출원번호 10-2018-0006619
- 2016, 항생제 대체용의 장내점착 능력이 뛰어난 미생물 생균제(*Pediococcus acidilactici* ACB26) 특허, 균주기탁 및 특허출원, 기탁번호 KCTC18512P, 특허출원번호 10-2017-0158436

4. 생물자원(연도, 생물자원명, 기탁일, 등록·기탁 번호)

- 2016, *Pediococcus acidilactici* ACB26, 2016.11.18, 기탁번호(KCTC18512P)

○ 2018, *Bacillus subtilis* T4, 2018.1.17. 기탁번호(KCTC18656P)

5. 학술대회 발표

○ Young-Mu Choi et al, 2017, Development and industrialization of environment-friendly complex probiotics for the reduction of livestock odor, 한국축산학회 학술발표회, 전남대학교, 광주

○ Geon Goo Han et al, 2017, Changes of the intestinal microbiota with growth stage in commercial pigs, 한국축산학회 학술발표회, 전남대학교, 광주

○ In-Seon Kim et al, 2017, Evaluation of potential probiotic *Pediococcus acidilactici* with adhesive ability to intestinal mucus in weaning pig, 한국축산학회 학술발표회, 전남대학교, 광주

○ Whee-Soo Kim et al, 2017, Internalized prebiotic nanoparticles enhanced antimicrobial property of probiotics against pathogens by altering bacterial metabolism, 한국축산학회 학술발표회, 전남대학교, 광주

○ Seo-Ho Oh et al, 2017, Refolding of truncated spike protein of porcine epidemic diarrhea virus from inclusion bodies in *Escherichia coli* using various mild solubilization, 한국축산학회 학술발표회, 전남대학교, 광주

○ Liang Hong et al, 2017, Studies of synbiotics combination for maintaining gut immune homeostasis through enhancing gut barrier function, 한국축산학회 학술발표회, 전남대학교, 광주

○ Sang-mok Lee et al, 2017, Growth performance and gut microbiota compositions in broilers when fed diet with particulated inulin as a prebiotics, 한국축산학회 학술발표회, 전남대학교, 광주

○ Ki-June Lee et al, 2017, Mutual synergy effects of co-treating α -lipoic acid and conjugated linoleic acid on egg production, egg quality and anti-inflammatory stress index in, 한국축산학회 학술발표회, 전남대학교, 광주

○ In-Seon Kim et al, 2016, Characterization and validation of the modified *tuf* promoter to develop the efficient recombinant protein expression vector system for *Lactococcus lactis* IL1403, MSK2016, 광주김대중컨벤션센터, 광주

○ In-Seon Kim, 2016, Screening of a novel *Pediococcus acidilactici* with potent

adhesive property in porcine intestine, 한국동물자원과학회 학술발표회, 서울대학교, 서울

6. 수상실적

○ 2017 한국축산학회 구두발표 우수상 수상

Ki-June Lee, 2017, 알파리포산과 CLA의 혼합급여가 산란계의 항스트레스지표 개선과 난질, 달걀 생산량에 미치는 영향

○ 2016 한국동물자원과학회 구두발표 우수상 수상

Ki-June Lee, 2016, Investigation of synergistic effects of alpha lipoic acid and conjugated linoleic acid on anti-inflammatory modulation in Raw 264.7 cell

○ 2016 한국동물자원과학회 구두발표 우수상 수상

In-Seon Kim, 2016, Screening of novel *Pediococcus acidilactici* with potent adhesive property in porcine intestine

7. 연구결과

가. 기술적 성과

○ 국내 출시된 제품과 *In vitro*, *In vivo* 사양시험을 한 결과 현 개발 균주 조합이 국내 일부 제품들보다 우위에 있다고 판단됨.

○ 해외 출시제품을 권장량 사용하여 *In vivo* 사양시험을 한 결과 개발 균주 사용량을 늘렸을 경우 해외제품과 비슷한 수준의 첨가비용, 섭취량 및 FCR을 보였으며, 암모니아 악취저감 효과는 더 우수함을 확인함.

나. 경제적성과: 기술이전 1건, 산업화 2건(시제품)

○ 본 과제에서 검증된 악취저감 우수균주에 대해 기술이전 1건 완료(참여기업)

○ CJ제일제당 사료 제품내 자체적 사용을 위한 시제품생산, 산업화 예정, 균주조합 및 Prebiotics 적용, Masking 소재 적용을 통한 제품 확장 검토 중.



그림 60. 축산악취저감용 미생물 생균제 시제품 2건

(1) 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	37억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0억원	
			향후 3년간 매출	60억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 7% 국외 : 0%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 13% 국외 : 0.8%	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			-위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			6위

(2) 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		2년		
	소요예산(백만원)		10 백만원		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0억원	37억원	60억원
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0%	7%	13%
		국외	0%	0%	0.5%
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		- 신규 균주 개발 및 prebiotics 조합, Masking 소재 적용을 통한 제품 다양화 계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0억원	15억원	23억원	
	수 출	0억원	0억원	18억원	

제 4 장 목표달성도 및 관련분야 기여도

제1절 연도별 목표달성도

1. 1차년도 목표달성도

가. 미생물 및 천연물질의 시너지 효과검정

(1) 1차년도 목표 : 축산악취저감용의 미생물 및 천연물질의 시너지 효과검정

- 악취저감에 효과적인 생균제 및 천연물질 후보설정 (100%)
: 균주 13종, prebiotics 소재4종 확보 및 Positive control로 시중제품 평가 완료
- 생균제 후보균과 천연물질의 악취저감 능력 평가 (100%)
: *In vitro* 기반의 평가 방법 세팅 완료, 후보 균주 및 소재에 대한 악취저감 능력 평가 완료
- 후보 조합에 대한 안정성 및 산업적 특성 평가 (100%)
: GRAS 균주로 안정성 확보 완료, 포자 형성을 통한 내열성, pH내성 확인 완료
- (추가) *In vivo* 기반 악취저감 후보균주 능력 평가 (100%)
: 사양시험을 통한 후보균주의 악취저감 능력 평가 완료

나. 장내 점착능력이 우수한 사료첨가용 미생균 생균제 선발

(1) 1차년도 목표 : 장내 점착능력이 우수한 미생물 선발

- *In vitro* 시스템 기반의 미생물 생균제 선발 방법 체계화 (100 %)
- *In vitro* 시스템 기반의 장내점착능력 평가 (100 %)
: 620개의 유산균을 이용하여 6종의 점착능력이 우수한 미생물 선발 완료
- *In vitro* 시스템 기반의 survival rate 평가 (100 %)
: 선발된 장내 점착능력이 우수한 미생물의 성장활성, 내산성, 내담즙성 평가 완료

2. 2차년도 목표달성도

가. 복합 미생물 생균제 최적화 및 사양실험 기반의 생균제의 효과 검증

(1) 2차년도 목표 : 복합 미생물 생균제 최적화 및 사양실험 기반의 생균제의 효과 검증

- 축산악취저감용의 천연물질 및 미생물 기반의 복합 미생물 생균제의 최적화 (100%)
: 후보 중 가장 효과가 좋은 균주조합, 가장 효과가 좋은 소재를 선정 완료
- 사양실험 기반의 복합 미생물 생균제 효과 검증 (100%)
: 사양실험을 통한 후보 균주 조합의 효과 확인 완료
- 대량생산 시스템 구축 및 산업화 (100%)
: 대량생산 시스템 구축 완료 및 CJ제일제당 제품 적용을 1차목표로 시제품 생산 완료

나. 장내 점착능력이 우수한 사료첨가용 미생균 생균제 선발

- (1) 2차년도 목표 : 장내 점착능력이 우수한 생균제 선발을 위한 유전자 마커 개발
 - 미생물 12종에 대한 유전체 sequencing 및 분석 (100%)
 - : 미생물 10종에 대한 sequencing 및 분석을 계획했으나, 12종으로 초과 달성
 - 생균제 선발을 위한 유전자 마커 개발 (100%)
 - : 유전자 마커 4건에 대해 개발 및 검정 완료

제2절 관련분야 기여도

- 본 연구에서 개발한 약취저감 능력을 평가하기 위한 *in vitro* 실험방법을 체계화 하여 동일 조건하 균주 단독, 균주 조합 등을 평가하여 후보간 우위를 확인할 수 있었다. 이 방법을 통하면 비교적 손쉽고 높은 정확도로 후보들 간의 저감 효과를 평가하여 활용할 수 있다.
- *in vitro*, *in vivo* 반복 사양시험을 통하여 최종 선발된 약취저감 우수 균주 조합은 국내 시판중인 제품대비 저감효과가 좋음을 확인하였고, 외국제품 수준의 효과를 보여주었다. 관련하여 기업체에 기술이전하였고, 시제품 생산이 완료된 상태이다. 국내 약취저감 복합 미생물 생균제와 관련하여 기여도가 높다고 판단되며, 외국 제품 대비 가격 경쟁력을 고려하였을 시 경쟁력이 있으며, 나아가 추가 개선도 가능하다고 판단한다.
- 본 연구에서 개발한 장내 점착능력이 우수한 미생물은 항균력 기반의 생균제 개발과는 다른 측면의 접근으로, 아무리 유산균의 대사산물의 pH가 낮아져도 기본적으로 장내에 점착하여 우점하지 못하면, 큰 효과를 보기 어렵다. 이를 보완하기 위해 다양한 유산균 후보를 가지고 장내 점착능력을 평가하고, 이들 중 점착 능력이 좋은 균주들을 가지고 사양시험을 진행하였다. 그 결과 병원성 미생물을 억제하고, 설사가 감소는 것을 확인할 수 있었다. 이는 항생제 대체 생균제 개발과 관련하여 그 기여도가 높다 하겠다.
- 본 연구에서 개발한 생균제의 효과적인 선발을 위한 유전자 마커는 장내 점착능력 우수 균주 6종과 저조 균주 6종에 그 효과를 테스트 하여 검증을 완료한 마커로, 이 후 유산균 생균제 선발시 그 기여도가 높다 하겠다.

제 5 장 연구결과의 활용계획

- 복합 미생물 생균제 기반의 축산악취저감제 다양화 및 CJ제일제당을 통한 상품화
- 악취저감 미생물 + 장점착 우수 미생물 조합의 악취저감 항생제 대체 복합 미생물 생균제의 상품화
- 추가 연구를 통한 경제성과 고객의 니즈를 맞춘 균주조합 및 소재 다양화 상품 개발
- 돼지 분변량을 줄여주고, 소화 흡수율을 높여 농가의 생산성 향상과 경제적 이익을 유도
- 축산 농가 보급을 통한 환경 개선 및 환경과 공존하는 지속가능한 축산의 방향 제시
- 유전자 마커 개발을 통한 간편하고 정확한 생균제 선발 방법 제시
- 축산물 생산성 증가 및 친환경 축산 구현을 통한 동물복지 구현
- 웰빙 및 안전한 친환경 축산식품에 대한 소비자 욕구 충족
- 항생제 미사용에 따른 양질의 분뇨발효 퇴액비 생산 가능, 환경 친화적 순환농업 가능
- 자연계 항생제 사용 억제로 환경오염 방지 및 인류 건강 증진

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 축산악취 관련 생균제

가. 단일 균주 급여에 의한 축산악취저감

최근 가축에 단일 생균제를 급여하면 가축의 생산성을 증진시킬 뿐만 아니라 분변 악취가 감소할 수 있다는 여러 연구들이 보고되고 있다. 2016년 Animal Feed Science and Technology에 발표된 Lan 등의 연구에 의하면 이유자돈 사료 내 *Lactobacillus acidophilus*를 0.1% 첨가했을 때, 미첨가구에 비하여 성장 성적이 개선되었고 장 내 *Lactobacillus*의 수가 증가했다. 또한 분변 내 황화수소, 아세트산과 같은 유독 가스의 발생이 감소하였다 (그림 61).

Table 6
Effects of *Lactobacillus acidophilus* supplementation in different energy and nutrient density diets on fecal noxious gas emissions in weaning pigs^a.

Items	ND		LA		SE ²	P-value		
	Low	High	-	+		ND	LA	ND × LA
d 14								
NH ₃	12.72	12.71	13.02	12.41	0.52	0.989	0.253	0.939
Total mercaptans	3.78	3.86	3.98	3.66	0.11	0.411	0.002	0.301
H ₂ S	6.09	6.18	6.49	5.77	0.14	0.545	<0.0001	0.916
Acetic acid	0.58	0.63	0.68	0.53	0.03	0.141	<0.0001	0.728
d 42								
NH ₃	12.38	12.33	12.85	11.86	0.40	0.912	0.015	0.784
Total mercaptans	2.93	2.93	3.01	2.85	0.09	0.938	0.077	0.912
H ₂ S	5.21	5.75	5.64	5.32	0.10	0.001	0.035	0.013
Acetic acid	0.45	0.56	0.63	0.47	0.02	0.015	<0.0001	0.016

^a Used 140 pigs with an initial BW of 7.51 ± 0.79 kg. Each mean represents 7 pens with 5 pigs/pen. ND = nutrient density, LA = *Lactobacillus acidophilus*, Low = low energy and nutrient density diet, High = high energy and nutrient density diet, and + and - = supplementation with or without 0.1% *L. acidophilus*.

그림 61. *Lactobacillus acidophilus* 급여에 따른 이유자돈에서의 분변 내 유독가스 발생량 변화 (Lan 등, 2016)

2017년 Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology에 발표된 Hmani 등의 연구에 따르면 이들은 효소 생산 능력이 뛰어난 신규 균주인 *Bacillus subtilis* HB2를 분리하였다. HB2 균주의 경우, 내산성, 내담즙성과 항균력이 뛰어났으며, 병아리의 장 세포에 부착능이 뛰어났다. HB2 균주의 *in vivo* 효과를 검증하기 위해 1일령 육계 병아리에 효소 생산 능력이 뛰어난 HB2 균주와 효소 생산 능력이 저조한 DB430을 각각 10⁶ CFU/ml 수준으로 음용수에 첨가하여 사육하였고 균주 미첨가구를 대조구로 사용하였다. 35일 후, HB2 첨가구는 대조구 대비 높은 성장 성적을 나타냈고 공기 중 암모니아 냄새가 감소했다 (그림 62).

Table 4 Effect of dietary treatment on the performance of broiler chickens at 35 days age (mean \pm SE)

	Control group (A)	HB2 group (B)	DB430 group (C)
Final body weight (kg)	1.909 \pm 0.03	2.030 \pm 0.08*	1.975 \pm 0.04*
Feed intake (kg)	3.510 \pm 0.01	3.434 \pm 0.01*	3.496 \pm 0.01
Feed conversion ratio	1.83 \pm 0.01	1.68 \pm 0.01*	1.76 \pm 0.01*
Mortality (%)	10 \pm 0.463	5 \pm 0.378*	8 \pm 0.463*
Ammonia odor	+++	+	+
Litter humidity	+++	+	++

* Significant result ($P < 0.05$)

그림 62. *Bacillus subtilis* 균주 급여에 따른 육계의 성장 성적 및 암모니아 냄새 저감 효과 (Hmani 등, 2017)

나. 복합 균주 급여에 의한 축산악취저감

최근 연구에 따르면 단일 균주 급여뿐만 아니라 복합 미생물 생균제를 사료 내 첨가하였을 때, 가축의 생산성을 증진시키고 악취를 저감시킨다는 연구들이 보고되고 있다. 2016년 Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition에 발표된 논문에서 Lan 등은 28일령 이유 자돈의 사료에 복합 미생물 생균제 Synerzyme F10 (*Bacillus coagulans*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Clostridium butyricum*)을 다양한 수준 (0.01%, 0.03%, 0.06%, 0.1%)으로 첨가하여 그 효과를 평가하였다. 복합 미생물 생균제를 급여한 자돈의 경우 대조구에 비해 높은 성장 성적을 나타냈다. 특히, 복합 미생물 생균제를 사료 내 0.1% 수준으로 첨가했을 때, 분변 내 암모니아, 황화수소, mercaptan과 같은 유독가스의 발생량이 대조구 대비 유의적으로 감소하였다 (그림 63).

Table 6 Effects of multistrain probiotics on faecal noxious gas emissions in weaning pigs*,†

Items, ppm	CON	PC1	PC2	PC3	PC4	SE	p-value			
							Linear	Quadratic	Cubic	Quartic
NH ₃	13.44 ^a	12.46 ^{ab}	12.36 ^{ab}	12.32 ^{ab}	11.72 ^b	0.41	0.014	0.601	0.284	0.954
H ₂ S	6.32 ^a	5.1 ^{bc}	5.32 ^b	5.34 ^b	4.38 ^c	0.24	0.0002	0.728	0.006	0.677
Total mercaptans	3.48 ^a	2.84 ^b	2.66 ^b	2.66 ^b	2.10 ^c	0.16	0.0001	0.572	0.057	0.732

Means in the same row with different superscripts differ ($p < 0.05$).

*Used 125 pigs with an initial BW of 7.26 \pm 0.76 kg. Each mean represents 5 pens with 5 pigs/pen.

†CON, basal diet; PC1 diet, control diet + 0.01% multistrain probiotics; PC2 diet, control diet + 0.03% multistrain probiotics; PC3 diet, control diet + 0.06% multistrain probiotics; PC4 diet, control diet + 0.1% multistrain probiotics.

그림 63. 복합 미생물 생균제 급여에 따른 이유자돈 분변 내 유독가스 발생량 (Lan 등, 2016)

2014년 Poultry Science에 발표된 결과에 따르면 *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*,

*Clostridium butyricum*으로 구성된 복합 미생물 제제를 1일령 육계 사료에 10^5 CFU/kg 수준으로 35일간 급여했을 때, 대조구 대비 성장 성적이 유의적으로 증가하였고 맹장에서 *Lactobacillus*의 수는 증가하고 *E. coli*의 수는 감소하였다. 또한 분변 내 암모니아의 발생량을 감소시켰다 (Zhang과 Kim, 2014), (그림 64).

Table 5. The effect of a multistrain probiotic preparation on cecal counts of *Lactobacillus* and *Escherichia coli* as well as the odor emission in excreta of broilers¹

Item	CON	ANT	P1	P2	SEM ²	P-value
<i>Lactobacillus</i> , log ₁₀ cfu/g	7.43 ^b	7.55 ^{ab}	7.88 ^a	7.89 ^a	0.214	0.02
<i>Escherichia coli</i> , log ₁₀ cfu/g	6.49 ^a	6.25 ^{ab}	5.92 ^b	5.89 ^b	0.187	0.03
NH ₃ , mg/m ³						
d 1	38.3 ^a	35.2 ^{ab}	32.4 ^{bc}	31.0 ^c	0.95	<0.01
d 3	56.2 ^a	55.4 ^a	48.3 ^b	50.5 ^b	1.06	0.01
d 5	82.5 ^a	78.5 ^{ab}	76.3 ^b	77.4 ^b	1.55	0.04
H ₂ S, mg/m ³						
d 1	1.6	1.7	1.4	1.6	0.24	0.89
d 3	2.3	2.4	2.1	2.2	0.16	0.24
d 5	3.5	3.8	3.6	3.3	0.25	0.90

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

¹CON = antibiotic-free diet; ANT = CON + 5 mg/kg of avilamycin; P1 = CON + 1×10^5 cfu of multistrain probiotics/kg of diet; P2 = CON + 2×10^5 cfu of multistrain probiotics/kg of diet.

²Each mean represents 15 observations per treatment.

그림 64. 복합 미생물 생균제 급여에 따른 육계 맹장 내 *Lactobacillus*, *E. coli* 수 변화와 분변 내 악취 물질 발생량 (Zhang과 Kim, 2014)

2. 장내점착 우수능력 생균제

가. 장내점착능 우수능력 생균제의 효능 및 기전 규명 연구

미생물 생균제가 장내에서 생존하여 생리작용을 하기 위해서는 장 상피세포 또는 장 점막에 점착할 수 있는 능력이 매우 중요하다. 이러한 장내 점착능은 생균제의 표면에 존재하는 수용체가 숙주의 장상피세포의 수용체 또는 장점막간의 강한 상호작용에 의해 형성 될 수 있다. 최근 *Frontiers in microbiology*에서 Mercier-Bonin 등은 숙주의 점막에 부착할 수 있는 transient microbiota에서 점막점착능을 갖는 표면단백질의 특성과 점착능을 분석방법을 리뷰하였다. 일반적으로 *Lactococcus. lactis* strain은 포유류의 GIT에 상존할 수 없지만, 일부 strain은 점막점착능이 있는 표면단백질을 생산하기 때문에 숙주의 점막에 일시적으로 colonization할 수 있다. 대표적인 단백질로는 점막 성분과 비특이적 hydrophobic interaction을 하는 aggregation factor AggL, protease PrtP와 뮤신 글리칸과 특이적으로 결합하는 mucus binding protein (MUBs), pilin containing lectin 도메인 등이 있다 (그림 65).

Protein (length)	Characteristics	Adhesion test	Reference
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGKP1 (dairy)			
MbpL (998 a.a.) (plasmid)	Signal peptide	<i>In vitro</i> : pig gastric mucin in microtiter plate	Kojic et al., 2011
	LPxTG motif	<i>In vitro</i> : HT29-MTX intestinal epithelial cell line (muco-secreting)	Lukic et al., 2012
	Three MucBP domains		
AggL (1767 a.a.) (plasmid)	Signal peptide	<i>In vitro</i> : pig gastric mucin in microtiter plate	Kojic et al., 2011
	LPxTG motif	<i>Ex vivo</i> colonic mucus	Lukic et al., 2012
	Four Collagen_bind domains (PF05737)	<i>In vivo</i> in rat	
	Six CnaB domains (PF05738)		
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> TIL448 (NCDO2110) (plant)			
Muc (1130 a.a.) (plasmid)	Signal peptide	<i>In vitro</i> : pig gastric mucin by AFM	Meyrand et al., 2013
	LPxTG motif	<i>In vitro</i> : pig gastric mucin in shear stress flow chamber	Le et al., 2013
	Two Mub domains		
Pili (Tip pilin) (817 a.a.) (plasmid)	Signal peptide	<i>In vitro</i> : pig gastric mucin by AFM	Meyrand et al., 2013
	LPxTG motif	<i>In vitro</i> : pig gastric mucin in shear stress flow chamber	Le et al., 2013
	Lectin_legB domain		
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> IBB477 (dairy)			
AJ89_07570 (956 a.a.) (chromosome)	Signal peptide	<i>In vitro</i> : pig gastric mucin in microtiter plate	Radziwill-Bienkowska et al., 2016
	One DUF285 domain		
	One MucBP domain		
	Four Big_3 domains		
PrtP (1960 a.a.) (plasmid)	Signal peptide	<i>In vitro</i> : pig gastric mucin in microtiter plate	Radziwill-Bienkowska et al., 2017
	LPxTG motif	<i>In vitro</i> : HT29-MTX intestinal epithelial cell line (muco-secreting)	
		<i>In vivo</i> in mice	

그림 65. *L.lactis*에서 점막점착능에 관여하는 표면 단백질과 점막점착 효능평가 실험 방법 (Mercier-Bonin 등, 2017)

나. 생균제의 장내점착능 증진을 위한 첨가제 조성 개발 및 분자기전 규명 연구

프리바이오틱스를 이용하여 생균제의 장내점착능을 증진시키는 연구가 2013년 PLoS One에 소개되었다. *Bifidobacterium longum*을 인유 올리고당의 일종인 6' siallylactose와 함께 HT-29 세포주에 처리한 결과 부착능이 약 4.7배 증진되었다. 또한 3' siallactose와 6' siallactose을 1:1 비율로 함께 처리하였을 때 대조군 대비 부착능이 약 9.8배 향상되었다 (그림 66).

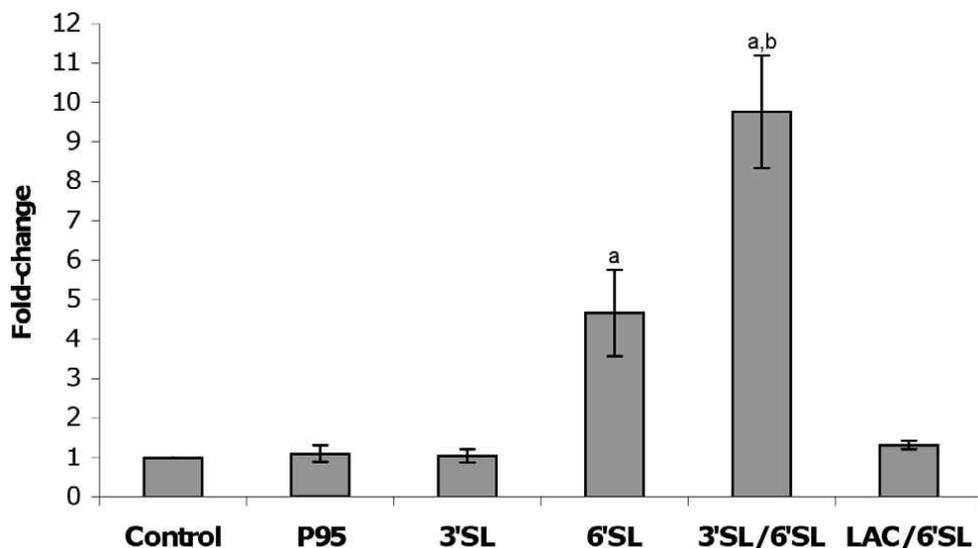


그림 66. 인유 올리고당 동시처리에 따른 *B. longum*의 장상피세포 부착능 증가 (Kavanaugh 등, 2013)

또한 본 연구진은 프리바이오틱스 처리에 따른 장내점착능 증진 기전을 분자수준에서 밝히기 위하여 microarray 기법을 이용하여 부착능 및 대사조절과 관련된 트랜스크립토를 분석하였다. 분석결과에 따르면 프리바이오틱스 처리가 생균제의 DNA 결합 단백질-페리틴 (DNA 보호), Gro EL (샤페론 단백질) 등의 발현 증가를 유도함으로써 스트레스 환경인 장내에서의 colonization에 유리하게 작용한 것으로 설명된다.

Locus tag	Gene Description	3'SL		6'SL		3'+6'SL	
		FC	pval	FC	pval	FC	pval
Blon_0029	Ferritin, Dps family protein	1.67	0.0002	1.72	0.0002	2.79	0.0002
Blon_0036	FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	1.31	0.017	1.26	0.036	1.78	0.0001
Blon_0392	Cation efflux protein	1.66	0.006	1.84	0.0001	3.04	0.00001
Blon_0460	Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component	1.32	0.037	1.38	0.02	1.81	0.001
Blon_0617	Glutamate-cysteine ligase, GCS2	1.32	0.022	1.63	0.0009	1.37	0.014
Blon_0758	Glutaredoxin-like protein	1.45	0.004	1.45	0.004	1.99	0.0007
Blon_0759	ABC transporter related	1.42	0.029	1.37	0.05	1.93	0.0007
Blon_0902	Initiation factor 3	1.65	0.005	1.59	0.008	1.43	0.012
Blon_0947	helix-turn-helix domain protein	1.32	0.01	1.35	0.007	1.54	0.0002
Blon_0948	hypothetical protein	1.3	0.02	1.3	0.02	1.5	0.003
Blon_0992	hypothetical protein	1.43	0.021	1.98	0.004	2.47	0.002
Blon_1687	TfoX, C-terminal domain protein	1.56	0.009	1.93	0.0006	2.26	0.001
Blon_1688	transcription activator, effector binding	1.78	0.0005	2.35	0.00002	2.88	0.00006
Blon_1950	hypothetical protein	1.26	0.01	1.2	0.03	1.35	0.001
Blon_1951	UMUC domain protein DNA-repair protein	1.28	0.012	1.22	0.03	1.41	0.001
Blon_2191	ribose 5-phosphate isomerase	1.23	0.025	1.25	0.016	1.58	0.001
Blon_2370	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	1.71	0.0002	1.83	0.00008	2.09	0.00001
Blon_2371	Glutamate-tRNA ligase	1.45	0.002	1.75	0.0001	2.29	0.000005
Blon_2372	ATPase AAA-2 domain protein	1.7	0.0002	1.88	0.00004	2.45	0.000004
dnaK	chaperone protein DnaK	1.44	0.002	1.57	0.0005	1.97	0.00006
groEL	chaperonin GroEL	1.33	0.02	1.37	0.015	2.11	0.0022
recA	recA protein	1.19	0.044	1.26	0.014	1.21	0.027

그림 67. Oligosaccharide 처리에 따라 발현수준이 증진된 *B. longum*의 유전자 분석 (Microarray) (Kavanaugh 등, 2013)

생균제의 뮤신 부착능 역시 장내점착능에 중요한 요소로 작용한다. 2016년 *Microbial & Biochemical Technology* 저널에 게재된 논문에서는 프리바이오틱스가 생균제의 뮤신 점착능에 미치는 영향을 평가하였다. 실험에 사용한 생균제는 *Lactobacillus delbrueckii* 등 5종의 락토바실러스로, 다양한 이눌린 타입 프럭토올리고당을 동시에 처리해 주었을 때 돼지 유래 뮤신을 코팅한 플레이트에서의 부착능 변화를 확인하였다. 그 결과, 이눌린 프리바이오틱스가 *Lactobacillus gasseri* PHM-7E1의 뮤신 점착능을 증가시키는 데에 기여함을 알 수 있었다 (그림 68).

	Orafit GR	Orafit P95	Orafit Synergy	Glucose	blank
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> -CCDM 66	2.85 ± 0.34*↓	1.92 ± 0.29*↓	1.51 ± 0.17*↓	3.56 ± 0.56*↓	22.04 ± 1.05
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>paracasei</i> -PE1TB-P	2.00 ± 0.41*↓	2.50 ± 0.56*↓	2.35 ± 0.29*↓	0.98 ± 0.37*↓	12.90 ± 1.54
<i>Lactobacillus fermentum</i> -RL 25	5.10 ± 0.53*↓	8.39 ± 0.37*↓	5.76 ± 0.89*↓	11.13 ± 0.56*↓	32.29 ± 1.61
<i>Lactobacillus animalis</i> -CCDM 382	26.69 ± 0.89*↓	35.25 ± 0.87*↓	25.45 ± 0.30*↓	20.08 ± 0.55*↓	55.87 ± 1.34
<i>Lactobacillus gasseri</i> -PHM-7E1	8.50 ± 1.34*↑	9.22 ± 1.46*↑	5.22 ± 0.46 ↓	4.50 ± 0.87 ↓	5.50 ± 0.34

Prebiotics: Orafit P95, Orafit GR, Orafit Synergy, glucose; blank, a sample without the addition of prebiotics or sugar; ↓ lower adherence than that of the blank; ↑ higher adherence than that of the blank; * statistically different from the sample without prebiotics (blank). $P < 0.05$.

그림 68. 유산 코팅된 플레이트에서의 프리바이오틱스 처리에 따른 *Lactobacillus*의 부착능 비교 (Krausova 등, 2016)

다. 생균제의 장내점착능 평가를 위한 신규한 지표 연구

생균제의 장내 점착능은 생균제와 숙주 장상피세포 및 점막 간의 특이적인 상호작용 뿐만 아니라 비특이적인 상호작용에 의해서도 결정된다. 숙주의 장내에서 생균제가 colonization함에 있어 영향을 미치는 물리화학적인 요소를 규명하는 연구가 2015년 PLoS One에 발표되었다. Wouters 등에 따르면 생균제의 장점막 점착능은 hydrophobicity, Zeta potential, interfacial elasticity와는 양의 상관관계를, 그리고 interfacial tension과는 부의 상관관계를 가진다 (그림 69).

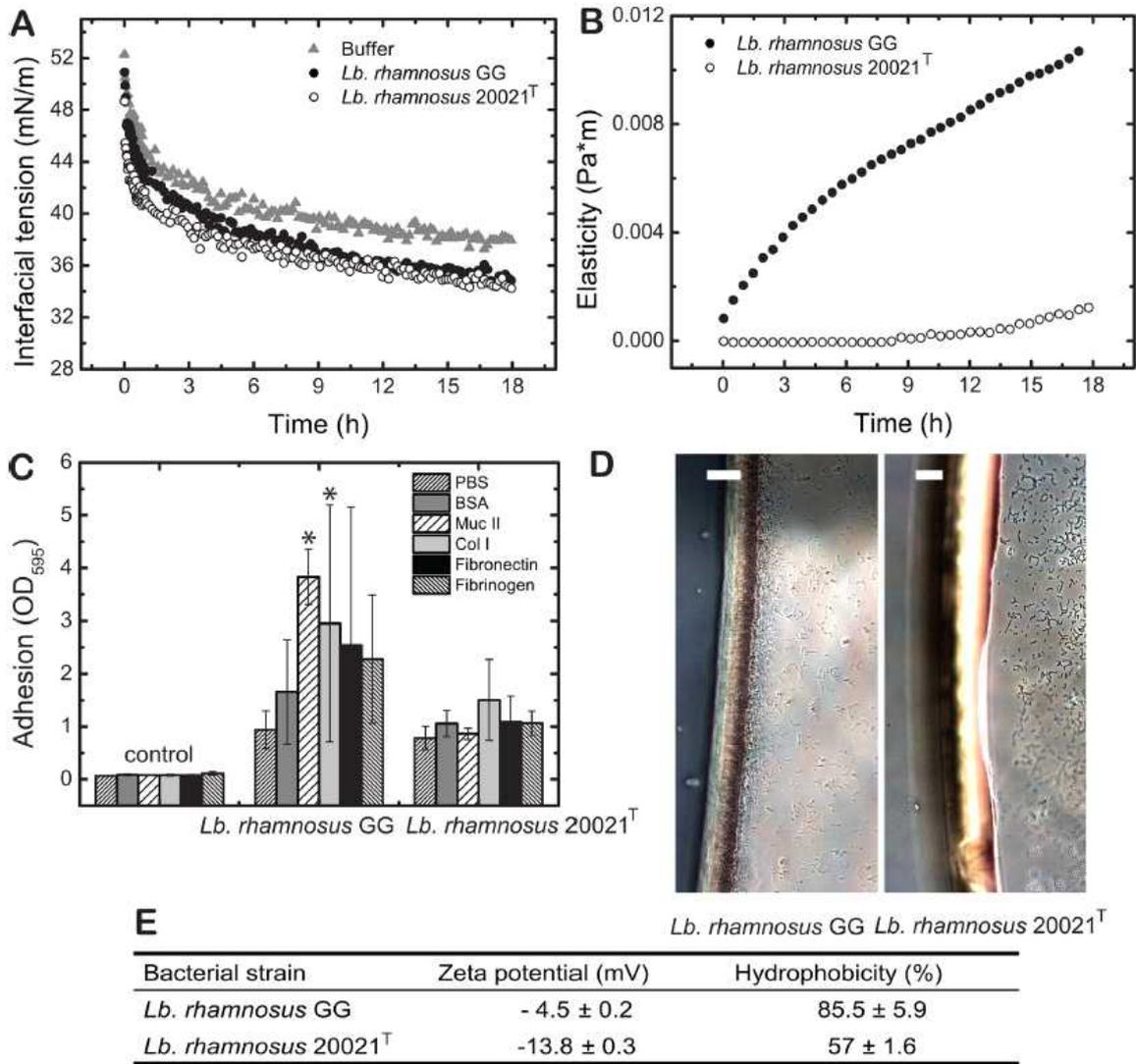


그림 69. 생균제의 점착능에 관여하는 물리화학적인 요소 (Wouters 등, 2015)

3. 미생물 생균제용 유전자 마커

현재 신규한 미생물 생균제를 동정하고 효능을 평가하기 위해서는 *in vitro*에서 다양한 test를 진행하여 그 특성을 평가하여야만 하며 이는 굉장히 많은 시간과 노동력을 요구하는 과정이다. 만약 뛰어난 특성을 가지는 생균제에서 나타나는 특정 유전자 마커를 개발한다면 간단하게 PCR 과정을 통해 분리한 미생물이 생균제로써 뛰어난 효과를 가지는지 아닌지를 쉽게 판단할 수 있을 것이다. 2017년 *Microbial Ecology*에 발표된 연구에서 Lee 등은 돼지의 분변에서 104 종의 *Lactobacillus reuteri* 균주를 분리하여 병원균인 *E. coli* K88과 *Salmonella* Typhimurium에 대한 항균력에 따라 항균력 우수 그룹 (HS)과 항균력 저조 그룹 (LS) 각각 8 균주씩을 선발하였다. 두 그룹에 속한 16 균주의 genome을 sequencing하고 pan-genome 분석을 진행하였을 때, HS 그룹과 LS 그룹 간에 몇몇 유전자 그룹이 차이를 보였다. 특히 항균물질인 reuterin과 cobalamin 합성에 관계하는 *pdu-cbi-cob-hem* gene cluster가 두 그룹 간에 확연한 차이를 보였다. 이 중 6개의 유전자는 HS 그룹 specific하게 존재하여 항생제 대체 생

균체의 가장 중요한 특징인 항균력이 뛰어난 *L. reuteri* 균을 선발하는데 바이오마커로써 사용될 수 있을 것으로 기대된다 (그림 70과 71).

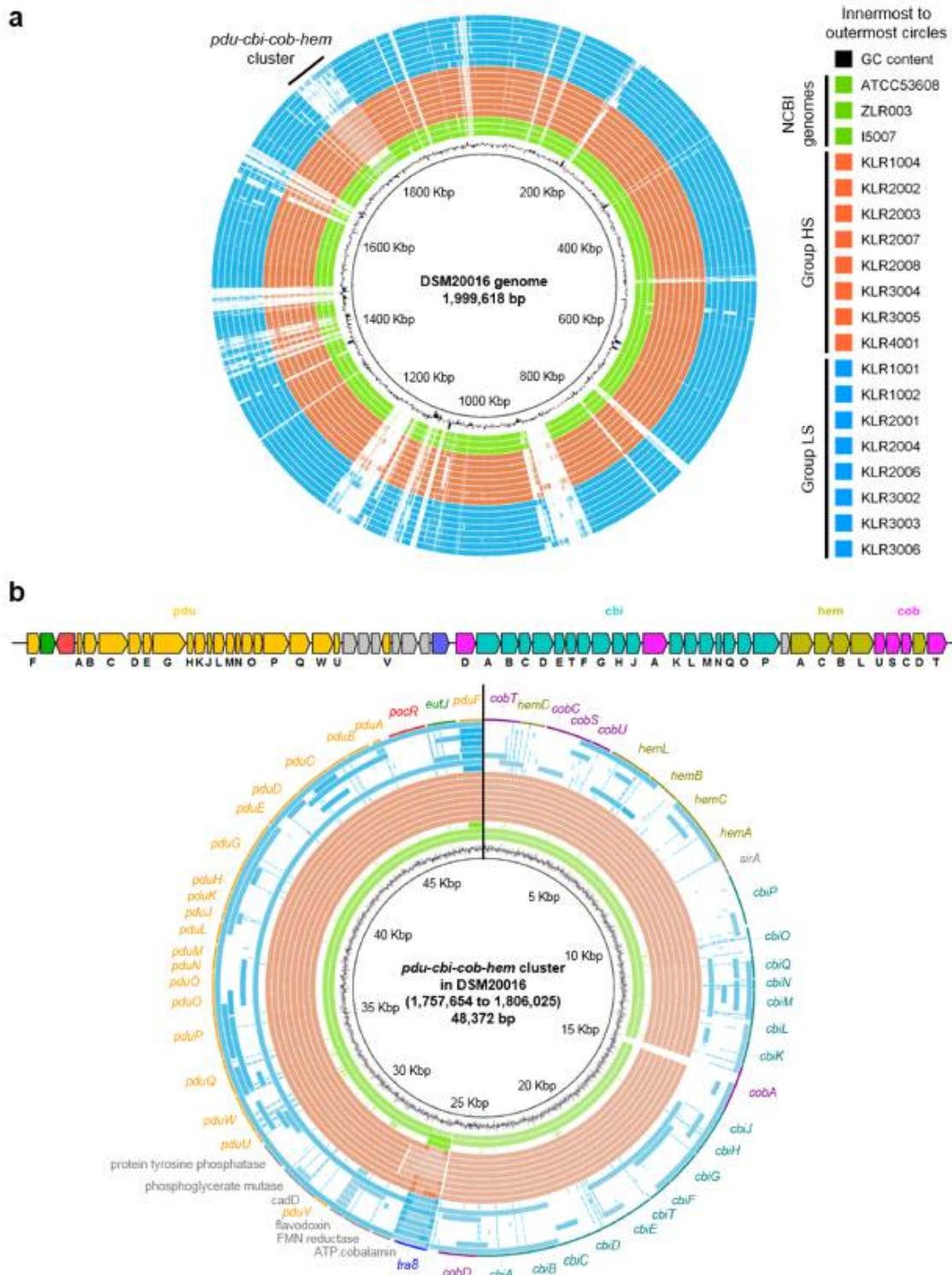


그림 70. *Lactobacillus reuteri*의 항균력 우수 그룹 (HS)과 항균력 저조 그룹 (LS) 간에 전체 유전자 (A)와 *pdu-cbi-cob-hem* gene cluster (B) 비교 (Lee 등, 2017)

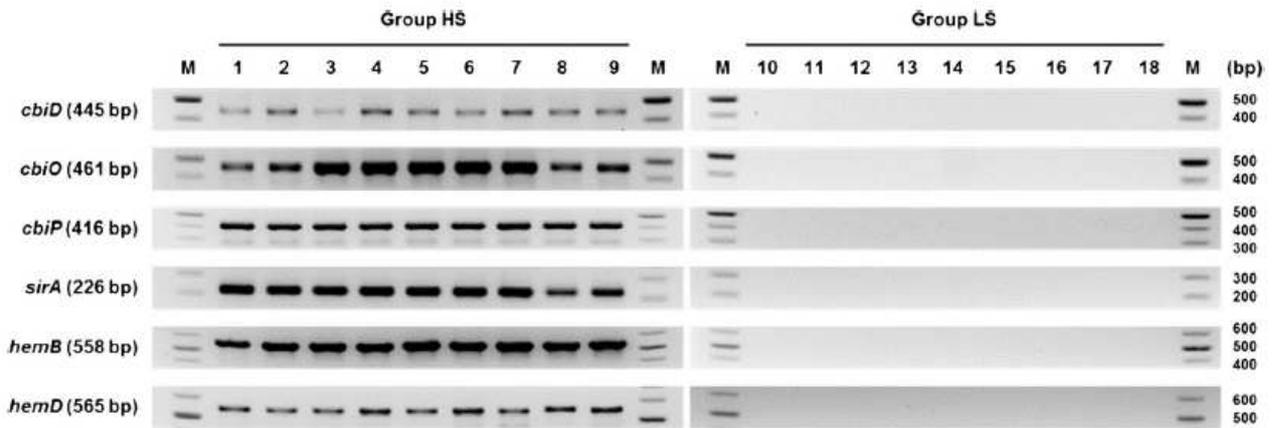


그림 71. PCR을 통한 *Lactobacillus reuteri* 내 *pdu-cbi-cob-hem* gene cluster의 특정 유전자 존재 유무 확인. 이 6개의 유전자는 HS 그룹에는 존재하고 LS 그룹에는 존재하지 않는 것으로 나타나 바이오마커로서의 가능성이 확인됨

HS: 항균력 우수 그룹. LS: 항균력 저조 그룹. (Lee 등, 2017)

2014년 *Applied and Environmental Microbiology*에 발표된 연구에서는 비교유전체학적 접근을 통해 *Enterococcus faecium* 균주가 clinical strain (CL)인지 non-clinical strain (NC)인지에 따라 유전자 수준에서 특징을 가진다는 것을 밝혔다 (Kim과 Marco, 2014). 이 연구에서 NC *E. faecium*은 CL 균주들에 비해 genome size가 작았고 mobile genetic elements (ME), virulence factors (VF), antibiotic resistance (AR)와 관련된 유전자들이 적었다. 이러한 특징들은 새롭게 분리한 *E. faecium* 균주가 clinical한 strain인지 non-clinical strain인지 구분하는데 사용할 수 있는 바이오마커로 이용될 수 있을 것이다 (그림 72).

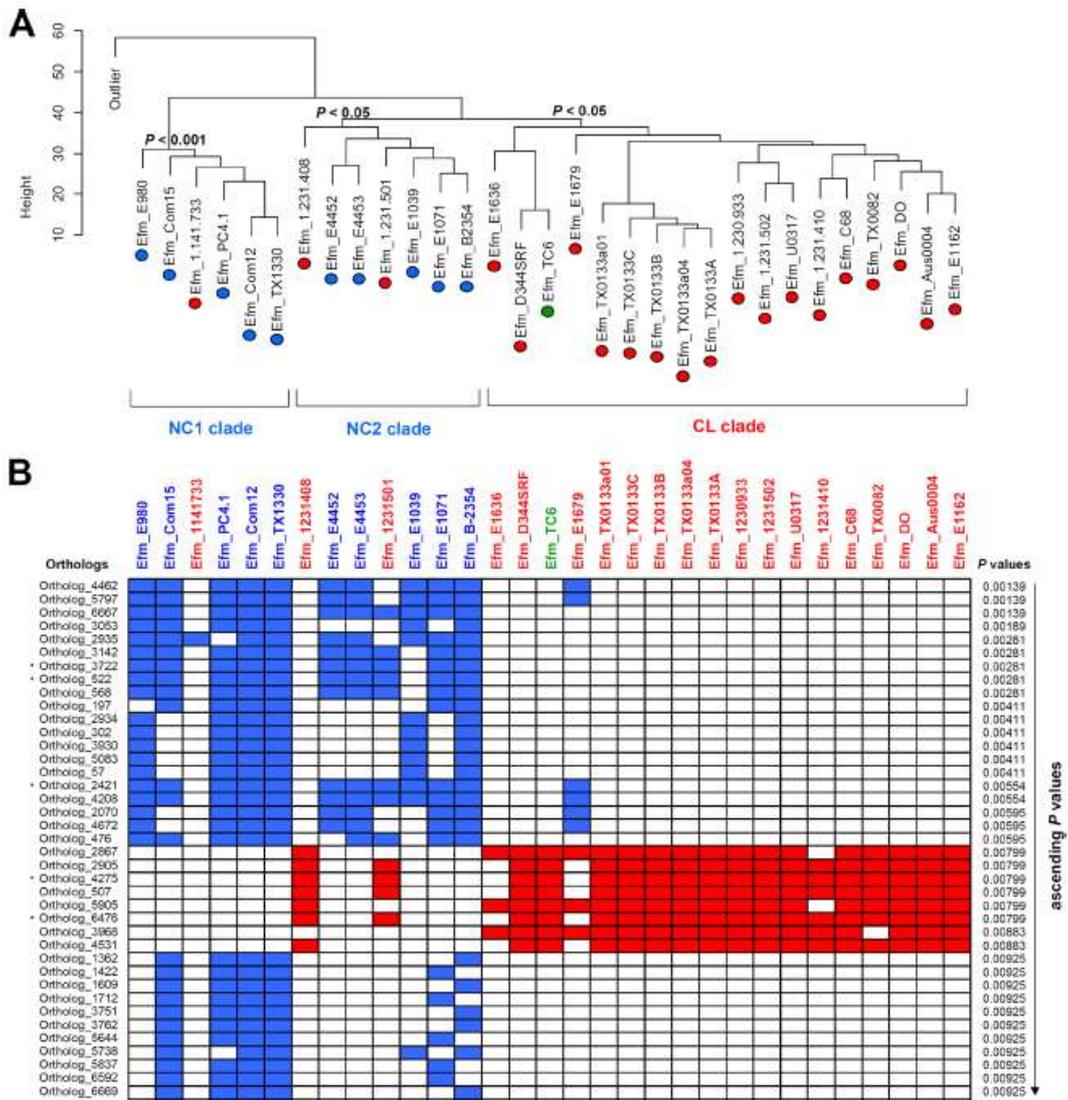


그림 72. *Enterococcus faecium* 균주의 NC/CL-enriched gene에 따른 계층학적 분류. (A) Hierarchical clustering. (B) NC-CL 균주의 39개 유전자에 대한 heat map. NC: 파란색, CL: 빨간색. (Kim과 Marco, 2014)

제 7 장 연구개발결과의 보안등급

- 일반과제

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설,장비 현황

- 해당사항 없음

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

- 아래의 서울대학교 환경안전원의 안전관리 기준 하에 연구를 진행하였음.

제1조(목적)

이 규정은 서울대학교 환경 안전을 위한 환경오염방지·환경안전교육·안전 점검·안전사고대책 등에 관하여 필요한 사항을 규정함을 목적으로 한다.

제2조(적용 범위)

이 규정은 실험·실습을 수행하는 대학(원), 연구소 및 부속기관 (이하“관리기관”이라 한다)과 이에 종사하는 교직원, 학생 및 연구원에 적용한다.

제3조(환경안전관리위원회)

①환경 및 방사선안전관리에 관한 중요 사항을 심의하기 위하여 환경안전관리위원회(이하 ‘위원회’라 한다)를 둔다.

②위원회는 다음 사항을 심의한다.

③위원회는 15인 이내의 위원으로 구성하되, 부총장을 위원장으로 하고, 환경안전원장(이하 “안전원장”이라 한다)을 부위원장으로 하며, 연구처장, 시설관리국장, 생물안전위원회 위원장을 당연직 위원으로 하고, 그 밖의 위원은 본교 교수 중에서 위원장의 추천으로 총장이 임명한다.

④위원장은 위원회를 소집하고, 그 의장이 된다.

⑤위원회는 다음 각 호의 사항을 심의한다.

1. 환경안전교육에 관한 사항
2. 실험·실습실 안전 점검 및 사용제한에 관한 사항
3. 실험폐액의 처리 및 관리에 관한 사항
4. 중대한 안전사고의 처리에 관한 사항
5. 관리기관의 장 및 환경안전관리자의 제재에 관한 사항
6. 기타 환경 및 방사선안전관리에 필요한 제반 사항

⑥위원회는 재적위원 과반수의 출석으로 개최하며, 출석위원 과반수의 찬성으로 의결한다.

제4조(관리기관)

관리기관의 장은 환경안전관리를 위하여 다음 각 호의 업무를 수행한다.

1. 환경안전관리자의 지정
2. 환경안전교육 대상자 선정
3. 실험·실습관련 유해물질의 관리
4. 실험실 안전사고 발생시 원인, 경위 조사, 사후처리 및 대책강구
5. 기타 환경안전관리에 관한 업무

제5조(관리기관별 환경안전위원회)

- ①관리기관의 장은 제4조 규정의 업무수행을 위하여 관리기관별 환경안전위원회(이하‘관리기관 위원회’라 한다)를 두고 동 위원회의 위원장이 된다.
- ②관리기관위원회 위원은 관리기관의 장이 임명한다
- ③관리기관위원회는 다음의 사항을 심의한다.
 - 1. 환경안전관리 준수사항 제정
 - 2. 실험·실습실, 안전관리시설의 정기점검에 관한 사항
 - 3. 안전교육 미 이수자의 제재에 관한 사항
 - 4. 실험실 안전사고 대책
 - 5. 기타 실험실 안전관리에 필요하다고 인정하는 사항

제6조(환경안전관리자)

- ①관리기관의 장은 실험·실습실별로 당해 실험실을 사용하는 전임교수 중에서 환경안전관리자(이하 “관리자”라 한다)를 지정하여야 한다.
- ②관리자는 실험·실습실 자체 안전 점검, 실험실 종사자의 환경안전교육 이수 조치, 안전사고의 예방, 폐기물의 관리, 기타 환경안전과 관련된 업무를 담당한다.

제7조(환경안전교육)

- ①안전원장은 환경안전교육을 주관한다.
- ②교육대상자는 관리기관에 종사하는 교직원, 학생 및 연구원으로 한다. 다만 관리기관의 장은 환경안전교육이 필요하지 않다고 인정되는 자에 한하여 교육대상에서 제외할 수 있다.
- ③관리기관의 장은 교육대상자 명단을 안전원장에게 제출하고, 안전원장은 교육일정 등을 관리기관에 통보한다.
- ④관리기관의 장은 교육대상자 중 교육을 미 이수한 자에 대하여 실험·실습실의 출입을 제한하여야 한다.

제8조(실험·실습실 안전점검)

- ①안전원장은 실험·실습실의 안전관리상태를 점검한다.
- ②안전원장은 실험·실습실의 안전관리가 미흡한 경우, 일정기간 해당 실험·실습실의 사용을 제한할 수 있다.
- ③안전원장이 안전점검에 필요한 행정적 편의를 요청할 경우 관리기관의 장은 이에 협조하여야 한다.

제9조(실험폐기물의 수집 및 처리)

- ①안전원장은 실험폐기물의 수집 및 처리에 관한 지침(이하 “처리지침”이라 한다)을 정한다.
- ②관리자는 처리지침에 의거 실험폐액을 분별 수집하여 그 처리를 안전원장에 의뢰하여야 한다.

제10조(실험폐기물 등 처리 부담금)

- ①안전원장은 실험폐기물 등의 관리업무를 수행하는데 필요한 비용을 해당기관에 부과할 수

있다.

②제1항과 관련된 부과금액·부담금 사용 등 세부사항은 위원회의 심의를 거쳐 정한다.

제11조(오염도 측정 및 배출규제)

①안전원장은 환경오염물질을 배출하는 기관의 오염도를 측정, 매년 총장에게 보고하여야 한다.

②안전원장은 환경오염물질을 배출하는 기관이 교직원 및 학생의 건강과 지역환경에 위해를 가져올 우려가 있다고 인정될 때에는 당해 배출기관의 실험·실습실 사용을 제한할 수 있다.

제12조의1(안전사고처리)

①안전사고가 발생한 경우 관리자는 사고경위서를 3일 이내에 관리기관의 장 및 안전원장에게 제출하여야 한다. 다만, 사망, 신체장해 또는 1억원 이상의 대물피해 등 중대한 안전사고가 발생한 경우 관리자는 관리기관의 장 및 안전원장에게 사고내용을 즉시 보고하여야 한다.

②중대한 안전사고 이외의 사고가 발생한 경우 해당 관리기관의 장은 관리기관위원회를 소집하여 사고처리를 하고, 그 결과를 안전원장에게 15일 이내에 보고하여야 한다.

③안전원장은 제2항의 사고처리 결과보고가 미흡한 경우 해당 관리기관의 장에게 보완을 요구할 수 있다.

④중대한 안전사고가 발생한 경우 해당 관리기관장, 위원회의 당연직 위원 및 전문가 약간 명으로 사고 대책위원회를 구성 운영하되 그 위원장은 부총장이, 부위원장은 관리기관의 장이 된다.

⑤안전원장은 안전사고의 경위 또는 사후처리 결과를 검토한 후 필요하다고 판단되는 경우에는 사고내용을 연구위원회에 보고하고 공개할 수 있다.

제12조의2(시정요구 등)

①위원장은 관리기관의 장 및 관리자가 안전관리에 관하여 다음 각 호와 같이 그 업무를 소홀히 한 때에는 그 위반의 정도에 따라 경고 또는 시정요구를 할 수 있다.

1. 안전사고가 발생한 경우 관리자가 사고경위서를 3일 이내에 관리기관의 장 및 안전원장에게 제출하지 아니한 경우

2. 관리기관의 장이 부적격자를 관리자로 임명한 경우

3. 관리기관의 장이 환경안전교육 미 수료자의 실험실 출입을 방치한 경우

4. 관리기관의 장이 안전사고 처리 결과를 15일 이내에 보고하지 아니한 경우

②안전원장은 관리기관 및 관리자가 「처리지침」을 위반한 경우 관리기관의 장 또는 관리자에게 위반사항을 통보하고, 다음 각호의 필요한 조치를 할 수 있다. 다만, 조속한 시일 내에 위원회의 추인을 받아야 한다.

1. 실험폐액 및 방사성폐기물 수집 중단

2. 관리기관의 장에게 해당 실험실의 경고 또는 폐쇄 요구

제13조(보험가입 의무)

관리기관의 장은 위원회에서 정한 보험금액 이상의 책임보험에 가입하여야 한다.

제14조(시행세칙)

이 규정 시행에 필요한 세부사항은 위원회의 심의를 거쳐 따로 정한다.

부칙(제1656호, 2008. 2. 19.)

이 규정은 공포한 날부터 시행한다.

제 10 장 참고문헌

- Ahmed ST, Islam MM., Mun HS, Sim HJ, Kim YJ and Yang CJ. 2014. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. *Poultry Science* 93:1963-1971.
- Borowski S, Matusiak K, Powałowski S, Pielech-Przybylska K, Makowski K, Nowak A, Rosowski M, Komorowski P and Gutarowska B. 2017. A novel microbial-mineral preparation for the removal of offensive odors from poultry manure. *International Biodeterioration & Biodegradation* 119:299-308.
- Brosnahan AJ and Brown DR. 2012. Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations. *Veterinary Microbiology* 156:229-237.
- Byun JW, Jung BY, Kim HY, Fairbrother JM and Lee WK. 2012. Real-time PCR for differentiation of F4 (K88) variants (F4ab, F4ac, F4ad) of enterotoxigenic *Escherichiacoli* from diarrhoeic piglets. *The Veterinary Journal*. 193:593-594.
- Chang YH, Kim JK, Yoon JH, Kim WY, Choi YW, Lee WJ, Kim YB and Park YH. 1999. Characteristics of *Lactobacillus reuteri* BSA-131 isolated from swine intestine. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:23-27.
- Collado MC, Meriluoto J and Salminen S. 2007. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology* 226:1065-1073.
- Crystal L, Levesque, Seema H, Kelly S, Swanson and Kees L. 2014. Alterations in ileal mucosa bacteria related to diet complexity and growth performance in young pigs. *PLoS One* 9:e108472
- Wouters T, Jans C, Niederberger T, Fischer P and Rühls PA. 2015. Adhesion potential of intestinal microbes predicted by physico-chemical characterization methods. *PLoS One* 21:e0136437.
- Delroisse JM, Boulvin AL, Parmentier I, Dauphin RD, Vandenbol M and Portetelle D. 2008. Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal samples by real-time PCR. *Microbiological Research* 163:663-670.
- Dowarah R, Verma AK, Agarwal N, Patel BHM and Singh P. 2017. Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of

grower–finisher crossbred pigs. *Livestock Science* 195:74–79.

Giancamillo AD, Vitari F, Savoini G, Bontempo V, Bersani C, Dell’Orto V and Domeneghini C. 2008. Effects of orally administered probiotic *Pediococcus acidilactici* on the small and large intestine of weaning piglets. *Histology and Histopathology* 23:651–664.

Gibson GR and Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125:1401–1412.

Hmani H, Daoud L, Jlidi M, Jalleli K, Ali MB, Brahim AH, Bargui M, Dammak A and Ali MB. 2017. A *Bacillus subtilis* strain as probiotic in poultry: selection based on in vitro functional properties and enzymatic potentialities. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 44:1157–1166.

Hong JU, Kim IH, Kwon OS, Kim JH, Min BJ and Lee WB. 2002. Effects of dietary probiotics supplementation on growth performance and fecal gas emission in nursing and finishing pigs. *Journal of Animal Science and Technology* 44:305–314.

Kavanaugh DW, O’Callaghan J, Buttó LF, Slattery H, Lane J, Clyne M, Kane M, Joshi L and Hickey RM. 2013. Exposure of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* to milk oligosaccharides increases adhesion to epithelial cells and induces a substantial transcriptional response. *PLoS One* 8: e67224.

Kim EB and Marco ML. 2014. Nonclinical and clinical *Enterococcus faecium* strains, but not *Enterococcus faecalis* strains, have distinct structural and functional genomic features. *Applied and Environmental Microbiology* 80:154–165.

Kim KY, Choi HL, Ko HJ, Lee YG and Kim CN. 2006. Evaluation of odor reduction in the enclosed pig building through spraying biological additives. *Journal of Animal Science and Technology* 48:467–478.

Kim YJ, Kim JH, Hur J and Lee JH. 2010. Isolation of *Escherichia coli* from piglets in South Korea with diarrhea and characteristics of the virulence genes. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 74:59–64.

Ko TG. 2000. Study for the development of antibiotics–free diet for weanling pigs. *Korean Journal of Animal Science* 42: 37–44.

Krausova G, Hyrslova I, Jakubec M and Hynstova I. 2016. In vitro evaluation of prebiotics on adherence of Lactobacilli. *Microbial & Biochemical Technology* 8:006–008.

- Lan RX, Koo JM and Kim IH. 2016. Effects of *Lactobacillus acidophilus* supplementation in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbiota shedding, and fecal noxious gas emission in weaning pigs. *Animal Feed Science and Technology* 219:181–188.
- Lan RX, Lee SI and Kim IH. 2016. Effects of multistrain probiotics on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbial shedding, faecal score and noxious gas emission in weaning pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100:1130–1138.
- Lee JY, Han GG, Choi J, Jin GD, Kang SK, Chae BJ, Kim EB and Choi YJ. 2017. Pan-genomic approaches in *Lactobacillus reuteri* as a porcine probiotic: investigation of host adaptation and antipathogenic activity. *Microbial Ecology* 1–13.
- Lee YK and Salient S. 2009. Wiley & Sons. *Handbook of probiotics and prebiotics*.
- Li XJ, Yue LY, Guan XF and Qiao SY. 2000. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology*. 104:1082–1091
- Mercier-Bonin M and Chapot-Chartier MP. 2017. Surface proteins of *Lactococcus lactis*: bacterial resources for muco-adhesion in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Microbiology*. 8:2247.
- Mora D, Fortina MG, Parini C and Manachini PL. 1997. Identification of *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* based on 16S rRNA and ldhD gene-targeted multiplex PCR analysis. *FEMS Microbiology Letters* 151:231–236.
- Morelli L. 2000. In vitro selection of probiotic Lactobacilli: A critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1:59–67.
- Sharma V. 2003. Detection of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 by using a multiplex real-time PCR assay for genes encoding intimin and Shiga toxins. *Veterinary Microbiology*. 93:247–260.
- Sarah D, Gerard C, Michael B, Felice N. 2015. The gut microbiome and diet in psychiatry: focus on depression, *Current Opin Psychiatry*, 28:1–6.
- Valeriano VD, Parungao-Balolong MM and Kang DK. 2014. In vitro evaluation of the

mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. Journal of Applied Microbiology 117:485-497.

Vesterlund S, Paltta J, Karp M and Ouwehand AC. 2005. Measurement of bacterial adhesion-in vitro evaluation of different methods. Journal of Microbiological Methods 60:225-233.

Yadav AK, Tyagi A, Kumar A, Panwar S, Grover S and Saklani AC. 2017. Adhesion of Lactobacilli and their anti-infectivity potential. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57:2042-2056.

Yang GQ, Yin Y, Liu HY and Liu GH. 2016. Effects of dietary oligosaccharide supplementation on growth performance, concentrations of the major odor-causing compounds in excreta, and the cecal microflora of broilers. Poultry science 95:2342-2351.

Zhang W, Zhu YH, Yang JC, Yang GY, Zhou D and Wang JF. 2015. A selected *Lactobacillus rhamnosus* strain promotes EGFR-independent Akt activation in an enterotoxigenic *Escherichia coli* K88-infected IPEC-J2 cell model. PLoS One 10:e0125717.

Zhang ZF and Kim IH. 2014. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. Poultry science 93:364-370.

이은경, 임정수. 2010. 양돈 분뇨의 악취특성 및 문제 해결을 위한 환경개선제 사용 현황 및 전망. Kor. J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 38, No. 3, 244 - 254

농림수산식품기술기획평가원 바이오사료첨가제개발사업단 3차년도 연구보고서 (2013)

농림축산식품부 보도자료: 동물용의약품의 진입규제 완화로 산업 경쟁력 강화 및 투자확대 유도(2015)

농생명소재산업화학기술개발사업요약보고서, 농림축산식품부 (2011)

농촌진흥청: 유럽에서 사용이 금지된 항생제 및 사용금지 원인 (2009)

농촌진흥청: 국내 축산악취 저감을 위한 연구 개발 내용 (2009)

농협경제연구원: 국내 사료첨가제 시장 (2013)

농촌진흥청: 유럽에서 사용이 금지된 항생제 및 사용금지 원인 (2009)

생명자원정보서비스 기능 고도화 사업, 사료첨가제 특허분석 보고서 (2014)

세계 배합사료시장: 기술발전과 시장변화, BCC Research (2012)

식품기술 제17권 제 3호, Probiotics의 기술 및 시장 동향 (2004)

월간 한돈, 최근 양돈질병과 신 기능성생균제 (2006)

한국동물의약품협회 (2015)

한국콘텐츠학회 2014 추계종합학술대회, 사료첨가제 제조기술과 시장동향 분석 (2014)

환경부 연도별 악취민원 발생현황 (2013)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.