

11-1543
000-002
245-01

발간등록번호

11-1543000-002245-01

국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물
분해효소 개발 및 응용 최종보고서

2018

농림축산식품부

기술사업화지원사업 R&D Report

국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용 최종보고서

2018 . 4 . 15 .

주관연구기관 / 조선대학교

농림축산식품부

2. 제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용”(개발기간 : 2015. 12. 18 ~ 2017. 12. 17)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 01. 31.



주관연구기관명 : 조선대학교 산학협력단 김 재 수 (인)

협동연구기관명 :

참여기관명 : 대한뉴팜(주)

배 건 우 (인)



주관연구책임자 : 유 진 철

협동연구책임자 :

참여기관책임자 : 김 재 수

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제고유번호	115073-2	해당단계 연구기간	2016. 12. 18 ~ 2017. 12. 17	단계구분	(2)/(2)
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대과제명	국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용			
	세부과제명	국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용			
연구책임자	유진철	해당단계 참여 연구원 수	총: 8명 내부: 5명 외부: 3명	해당단계 연구개발비	정부:100,000천원 민간: 34,000천원 계:134,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 14명 내부: 9명 외부: 5명	총연구개발비	정부:200,000천원 민간: 68,000천원 계:268,000천원
연구기관명 및 소속부서명	조선대학교 산학협력단			참여기업명	대한뉴팜(주)
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수	

4. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내 토착 미생물 자원으로부터 신규 고활성의 비전분성 탄수화물 분해효소를 발굴하고 이를 이용한 신규 효소 제제를 개발 ○ 미생물 유래 비전분성 탄수화물분해효소소재 개발 ○ 기능성 효소소재의 산업동물을 이용한 안전성 및 효능평가 ○ 기능성 효소소재의 기술이전을 통한 제품화 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 과제수행결과 xylanase 생산균주로서 CSB40, mannanase 생산균주로서 CSB428, CSB31, CSB39, chitinase 생산균주로서 CS242, glucanase 생산균주로서 CSB34, CSB55, pectinase 생산균주로서 CSB32, CBS3, CBS31, CSB17 등 고활성 비전분성 탄수화물 분해효소 11건 이상을 확보하였음. ○ 이 중 chitinase 생산균주인 CS242, mannanase 생산균주인 CSB31은 우수한 효능을 바탕으로 특허등록2건을 완료 하였음.(특허 제10-1780234호, 특허 제 10-1780229호) ○ 특히 xylanase 생산균주인 CSB40은 특허출원이 완료(출원번호 제 10-2016-0110051)되었으며, 이를 바탕으로 기술이전1건 (바실러스 속 세균이 생산하는 난분해성 비전분계 탄수화물을 분해하는 자일라네이즈 효소제제)을 달성하였음. ○ 이 외에도 연구 과정에서 발굴한 우수한 효능의 미생물 2건에 대하여 특허 출원을 완료함으로써 연구진행 과정동안 총 3건의 특허 출원을 달성하였음. ○ 이 외에도, 연구가치가 있다고 판단되는 균주 1종을 한국생명공학연구원에 균주기탁을 완료하였음. (Bacillus amyloliquefaciens YD1). ○ 또한 mannanase 생산균주 CSB39와 CS428, chitinase 생산균주인 CS242 등 연구과정에서 발굴한 우수한 균주 및 비전분성 탄수화물을 바탕으로 SCI급 국제학술지에 9건의 논문을 게재하였고, 비SCI급 학술지에도 1건의 논문을 게재완료 하였음. ○ 과제참여기간 동안 다수 국제학술대회에 참여하여서 고효율 비전분성 탄수화물 분해효소 관련 12편을 국제학술대회 연구발표를 하였음. ○ 과제참여기간 중 3명의 석사급 연구원 및 3명의 박사급 전문인력을 양성하였으며 해당 연구 기술을 보유하고 있는 전문인력 양성은 과제 이후에도 꾸준히 배출될 예정임. ○ 성실한 과제수행으로 2차년도 실험예정이던 육계의 안전성 및 생산성평가에 대한 급여시험을 완료함으로써 과제 기간중 제작한 비전분성 탄수화물 분해효소의 뛰어난 기능성 및 안전성을 확인하였음. 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구개발 및 기술이전에 성공한 비전분성 탄수화물분해 복합효소제제는 사료용 곡물의 소화 효율을 크게 향상 시킬 수 있음. 최근 세계적으로 급등하는 곡물가격에 능동적으로 대응할 수 있으며 큰 경제적 효과를 창출할 수 있음. ○ 개발된 효소제제는 식품의 기능성 및 영양학적 향상을 위해 식품산업에 활용될 수 있음. ○ 국내 천연 미생물 자원 및 고유효소소재 및 개발 관련 기술 보호 ○ 개발된 고기능성 효소소재는 참여기업인 대한뉴팜(주)으로 기술 이전함. ○ 대한뉴팜(주)에서는 기능성 효소 제제제품을 국내시장에 출시하고 다국적 사료회사에 납품을 타진하여 해외시장 진출 교두보를 확보함 					
중심어 (5개 이내)	비전분성 탄수화물	토착 미생물	분해효소	농식품효소제제	기능성 소재	

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

		코드번호	D-02		
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Our goal is to find out new non starch polysaccharide degrading enzyme from Korean indigenous microorganisms and develop the new enzyme product. ○ With the product, we are going to check the safety and functionality for animal industry and transfer the enzyme product and technology to our participating company for developing commercial enzyme product. 				
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Task performance results show that CSB 40 is a pre-compositive product-producing strains for xylenase production, CSB 428, CSB 31, CSB 39, and chitinase production strains. ○ Chitinase production strains CS 242 and mannanase production strains CSB 31 were registered for two patents based on excellent effects (Patent 10-17804). ○ CSB 40, especially xylanase production strain, is patented (application no. 10-16-0110051), and is responsible for producing one of the pre-technology transferase (bacidal) enzymes. ○ In addition, total 3 patent applications were completed during the course of the research by completing the patent application for 2 cases of microorganisms that have been found in the superior effect. ○ In addition, a strain of one strain, which is judged to be of value for research, has been deposited with the Korea Institute of Biological Sciences (Bacillus amyliquefacients YD1). ○ In addition, SCI based on the outstanding strains and non-conscious carbs published in the academic papers, such as CSB 39, CS 428, and CS 242, respectively. ○ During the project participation period, we participated in several international academic contests and announced 10 articles related to high efficiency non-conducting carbohydrase. ○ During project participation period, three cast-level researchers and three later-level researchers were trained, and the quantity of professional researchers with the research skills will be steadily released even after the assignment. ○ By completing the salary test for the safety and productivity evaluation of the autoclave test, which was scheduled for the next two years, the quality of the non-controlled carbohydrate decomposition enzyme produced during the task period is highly verified and verified. 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Prior to R&D and technology, the non-conventional carbodulolysis compound may greatly enhance the digestive efficiency of the food crops. ○ Developed enzyme agents can be utilized in the food industry for functional and annual improvement of food. ○ Protection of domestic natural microbial resources and unique enzyme materials and technologies related to development ○ Performance of commercial expectations : <ul style="list-style-type: none"> - Highly capable enzyme materials developed are transferred to participating company, Daehan New Pharm Company. - Daehan New Pharm Company introduces functional enzyme preparations to the domestic market and ensures a bridgehead into the overseas market by examining the supply of products to multinational feed companies operating in Korea. 				
Keywords	non-starch polysaccharide	domestic microorganisms	degrading enzyme	agricultural and food enzyme	functional material

6. English contents

< **Contents** >

1. Abstract of development research task	9
2. Domestic and Overseas Technology Development Status	14
3. Significance and result of the Research	19
4. Progress of the Research Project and Contribution	40
5. Outcome of Research Project and Future Directions	42
6. International Science and Technology Information collected during the research process	44
7. Security level of R & D achievement	44
8. Status of research facilities and equipment registered in the national scientific technology information system	44
9. Implementation of safety measures in laboratories based on R & D tasks	45
10. Representative research results of R&D tasks	49
11. Others	49
12. Reference	49

<Appendix> Self-Evaluation Statement

7. 본문목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	9
2. 국내외 기술개발 현황	14
3. 연구수행 내용 및 결과	19
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	40
5. 연구결과의 활용계획 등	42
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	44
7. 연구개발성과의 보안등급	44
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	44
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	45
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	49
11. 기타사항	49
12. 참고문헌	49

<별첨> 별첨1. 연구개발보고서 초록

별첨2. 자체평가의견서

별첨3. 연구성과 활용계획서

8. 뒷면지

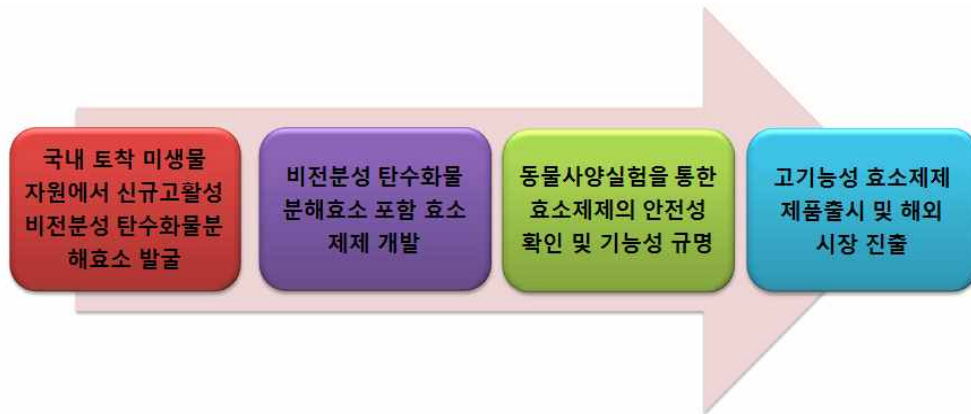
주 의

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

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적



○ 국내토착 미생물 자원으로부터 신규 고활성 비전분성 분해효소를 발굴하고, 이의 생화학적 특성을 파악하며, 이를 바탕으로 한 동물시험을 통하여 신규 복합제제 이용한 효소제제를 개발하여 이를 사업화하는 것을 목표로 함.

1-2. 연구개발의 필요성

□ 미래 유망 10대 농생명 소재

- 20세기 중후반부터 급격하게 발달한 생명공학 기술로 인하여 향후 인류는 고갈문제가 없는 생명자원소재를 인류의 미래 대체 자원으로 활용이 가능함.
- 생명자원을 활용하는 세계 바이오산업 시장규모는 2010년 약 2,500억 달러이며, 연평균 10.8%의 고 성장세를 보여 2015년 세계 바이오산업 시장규모는 3,980억 달러로 전망됨.(출처: DataMonitor, 2011a).
- 농생명자원은 미래사회를 지탱하는 무궁한 가치의 미래자원으로 농축산업, 발효산업 및 고부가가치 제품개발을 위한 필수 소재임.
- 최근 농림수산물부에서는 농생명자원을 활용한 고부가가치 소재를 개발하고, 산업화를 통한 농생명소재 산업 육성을 목적으로 미래 유망 10대 농생명소재를 선정하였음 <표 1>. (출처: 동향리포트, 2011-08, 농림수산물기술평가원)
- 그 중 5번째 소재로 선정된 “기능성 효소”는 고온, 고압 등 특수한 상황에서 산화환원, 가수분해, 이성 및 합성 반응을 촉진하는 산업용효소로 정의됨.
- 전 세계 의료용과 산업용 효소시장 규모는 연간 약 6조원 정도이며, 그중에서 비전분성 탄수화물 분해효소가 상당부분을 차지함. 특히 최근 세계적으로 급등하는 곡물가격에 능동적으로 대응하기 위하여 가축의 사료소화에서 먹이의 흡수효율을 조금만 향상시켜도 엄청난 규모의 경제적 효과를 창출할 수 있기 때문에, 비전분성 탄수화물 분해효소는 개발이 더욱 절실한 산업용 효소임. 또한 비전분성 탄수화물 분해효소는 곡물껍질이나 나무 부스러기를 이용한 바이오에너지 생산에도 요긴하게 활용될 수 있음.

< 표 1. 농림수산식품부가 선정한 10대 농생명 소재 및 정의 >

10대 농생명소재	정 의
① 천연 방부제	▪ 식품, 화장품 등의 장기보존 및 유통기한 연장을 위해 사용되는 첨가물로서 미생물에 의한 부패 방지에 사용되는 생물유래 소재
② 천연 항생제대체제	▪ 천연 항생제대체제(Antibiotics Alternatives)로서 가축의 건강을 향상시켜 질병발생 등에 대한 예방적 효과가 있는 소재
③ 천연 5미(味)	▪ 단맛, 쓴맛, 짠맛, 신맛, 매운맛 등을 낼 수 있는 천연 유래 감미 및 조미 소재
④ 기능성 아미노산	▪ 미생물 발효공정을 통해 나온 고부가가치 소재로서 항균성, 영양성, 건강기능성 등을 강화시킨 단백질 소재
⑤ 기능성 효소	▪ 고온, 고압 등 특수한 상황에서 산화환원, 가수분해, 이성 및 합성 반응을 촉진하는 산업용 효소
⑥ 천연 장기능개선제	▪ 장내 미생물 균종 개선을 통해 사람, 동물에 유익한 균주(프로바이오틱스)와 이를 증식시키는 인자(프로바이오틱스)
⑦ 바이오 향료	▪ 동·식물성 천연 향료성분과 생물전환기술공정에 의해 생산되는 바이오 향료성분을 포함하는 소재
⑧ 바이오 색소·염료·도료	▪ 바이오 색소·염료: 식품 및 화장품 등 다양한 분야에서 염색이 가능한 천연 또는 생물공정전환기술을 통해 만들어진 소재 ▪ 바이오 도료: 인체에 무해한 촉매와 산화제를 첨가해 만든 소재
⑨ 바이오플라스틱	▪ 식물 유래 자원을 원료로 하여 고분자로 합성된 생분해성 플라스틱소재
⑩ 바이오섬유	▪ 옥수수, 우유 등 바이오매스 유래 섬유소재 및 생리활성 기능을 지닌 섬유

□ 산업용 효소

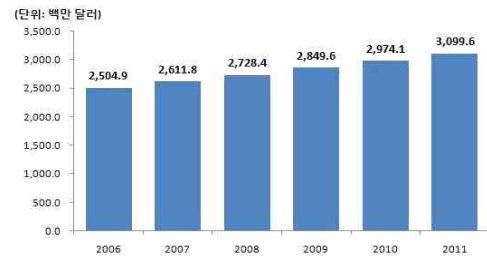
- 효소는 고도의 초정밀성, 특이성, 선택성 및 고효율성의 특성을 가진 생산수단으로 미래 친환경산업에 그 활용이 확대되고 있음.
- 최근까지 다양한 효소들이 산업용 효소로 개발되었으며 (표 2), 이러한 여러 효소 중 가수 분해효소가 가장 광범위하게 산업계에서 활용되고 있음. 가수분해효소는 효소가 분해하는 결합 형태에 따라 3종류로 나눌 수 있음.
 - 1) 펩티드 결합(peptide bond) 등 여러 가지 질소결합의 가수분해에 관여하는 효소 : 단백질 분해효소
 - 2) 에스테르 결합(ester bond) 분해효소: 지질 분해효소
 - 3) 글리코시딕 결합(glycosidic linkage) 분해효소: 아밀레이스, 셀룰레이스, 헤미셀룰레이스
- 산업용 효소 중에서 단백질 분해효소를 포함하는 세제용 효소 시장은 전체의 22%로 가장 큰 시장을 형성하고 있고, 가장 높은 성장을 보이고 있는 효소 부분은 바이오에너지 제효소로 2011년 기준으로 전체 시장의 15%를 차지함. 세제용, 에너지용, 그리고 섬유가공 및 기타 specialty enzyme을 포함하는 공업용 효소는 전체 산업용 효소의 48%이며, 식품용 효소는 33%, 동물 사료용 효소는 19%를 차지하고 있음.
- 국외 산업용 효소의 경우, 2011년 기준으로 약 30억 달러의 시장을 형성하고 있으며, 지난10년간 연평균 성장률(CAGR)은 약 4.4%임(표 3). 지역별로는 아시아 지역 산업용 효소시장이 10억 달러(30.8%)로 가장 큰 비중을 차지하고 있으며, 유럽(8억달러, 26.6%)과 북미(7억달러, 23.8%) 지역 시장이 높은 것으로 나타남(표 4).

표 2. 대표적 산업용 효소의 종류 및 응용

	효소 이름	생산 균주/장기	응용 분야
아밀라아제 (amylase)	디아스타아제(distase)	누룩	소화제, 빵에 첨가, 시럽
	아밀라아제(amylase)	Bacillus subtilis	식물의 풀 제거, 시럽, 알코올 발효공업, 포도당 생산
	아밀로글루코시디아제	Rhizopus niveu	포도당 생산
프로테아제 (protease)	트립신(trypsin)	동물 채장	의약품, 연육용, 맥주호림제거
	펩신(pepsin)	동물 위장	소화제, 연육용
	레닛(rennet)	송아지 위장	치즈 제조
	파파인(papain)	파파야	소화제, 의약품, 맥주호림제거, 연육용
	프로테아제(protease)	B. subtilis	세제, 필름에서 젤라틴 제거(은 회수), 연육용
기 타	글루코오스	Lactobacillus brevis	글루코오스를 프룩토오스로 이성질체화함
	리파아제(lipase)	채장	소화제, 우유제품 풍미첨가
	셀룰라아제(cellulase)	Trichoderma koningi Trichoderma viride	소화제, 사료
	펙티나아제(pectinase)	Sclerotina libertina	셀룰로오스 가수분해
	자일라네이즈	세균	쥬스 수율증가 및 청정화, 사료
	만네이즈	세균	식품 및 사료

표 3. 세계 산업용 효소 시장 현황

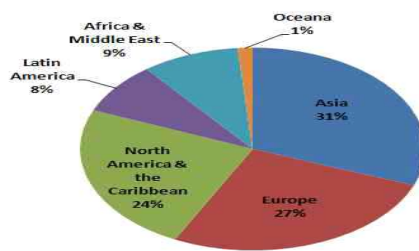
연도	시장규모 (백만 달러)
2006	2,504.9
2007	2,611.8
2008	2,728.4
2009	2,849.6
2010	2,974.1
2011	3,099.6
연평균 시장성장률	4.4%



▶ 자료: Icon Group International, Inc.(2010e)

표 4. 지역별 산업용 효소 시장 현황(2011년)

구분	시장규모	비중
아시아	956	30.8
유럽	825	26.6
북미 및 캐리비안	738	23.8
라틴 아메리카	254	8.2
중동 및 아프리카	284	9.2
오세아니아	43	1.4
전체 합계	3,100	100.0



▶ 자료: Icon Group International, Inc.(2010e)

- 산업용 효소가 사용되어 파급되는 산업의 규모는 효소 시장의 약 100배에서 1,000배에 이르는 것으로 파악되고 있기 때문에, 특히 21C 가장 유망한 산업으로 꼽히는 바이오화학 산업에서의 효소는 “부품소재”로서 그 중요성이 더욱 크게 인식되고 있으며, 이에 따라 새로운 효소 전문 회사의 설립과 글로벌 바이오-화학 소재 기업 간의 제휴가 더욱 활발해지는 추세임.
- 국내 산업계 전체 효소 시장은 약 1000억 원 정도로 추정되고 있으며, 식품, 사료, 공업 분야에서 일부 효소를 자체 생산하여 자가소비를 하고 있지만, 대부분 수입품에 의

존하고 있음. 2011년도 기준으로 산업용 효소의 총 수입액은 약 4,800만 불 정도임 (수출입 통계 자료 및 식품검사연보 참고).

- 사료용 효소제의 국내 시장규모는 주요 판매사에서 주요 판매사에서 제공한 자료를 기준으로 연간 약 1,900톤, 총 134억 원의 규모임. 국내 가축용 기능성 발효제품 첨가제를 생산·판매업체 수는 150개 이상이나 연구개발 인력·장비 구축을 토대로 수출을 하고 있는 업체는 이지바이오, 진바이오텍, 씨티씨바이오, 중앙바이오텍 등이 있음.

□ 식품 및 사료용 효소

- 산업계에서 다양한 식품소재의 가공은 효소반응을 통하여 이루어지고 있고, 그 활용범위도 크게 확대되고 있음 (표 5).
- 특히 효소의 식품가공은 시럽제조, 맥주 등 알코올발효, 낙농, 제빵, 과일 및 야채주스, 물 가공, 식품보존, 식품유지가공, 동물사료 및 기능성식품제조 등에서 적용되고 있음.
- 최근 세계적으로 사료용 곡물 가격이 급등하면서 사료용 곡물의 소화 효율을 향상시킬 수 있는 난분해성 탄수화물 분해효소의 하나인 자일라나제와 같은 미생물유래 분해효소가 고효율 바이오 소재로 주목받고 있음.

표 5. 식품 및 사료 산업에 사용되는 효소의 종류

사용용도	사용되는 효소	효소원
물엿, 포도당, syrup	isomerase α-amylase, β-amylase, dextranase, glucoamylase, glucose	세균, 곰팡이, 방선균
알콜발효(맥주, 주정)	α-amylase, β-amylase, dextranase, glucoamylase, cellulase, pectinase	세균, 곰팡이
낙농제품	invertase rennet, chymotrypsin, lactase, lipase, penicillinase,	동물, 세균, 곰팡이, 효모
제빵 및 제과	α-amylase, β-amylase, protease, glucoamylase, lactase	곰팡이
과일 및 야채주스	pectinase, naringinase, hesperinase	곰팡이
육류가공	papain, bromolain	식물
계란가공	glucose oxidase, catalase	곰팡이, 방선균
식품유지	lipase	세균, 곰팡이
생선가공	protease, amylase, cellulase	식물, 세균
향료 및 맛제조	protease, amylase, lipase	식물, 세균
동물사료	amylase, cellulase, protease, lipase, phytase, hemicellulase	곰팡이, 세균

□ 비전분계 탄수화물과 분해효소

- 고등생명의 단백질에 결합되어 있는 탄수화물들이 생명현상에서 중요한 역할을 함이 알려지면서 탄수화물에 대한 연구가 새로이 조명되고 있음(Nature, 2015). 단백질에 결합되어있지 않은 유리 탄수화물은 생물체가 생명을 유지하는 데에 없어서는 안 될 주요 에너지원으로서의 역할을 하며, 단당이 아닌 글리칸이라는 복잡한 분자 결합체로 존재함.
- 전분(starch)은 식물체의 구성 탄수화물로 동물의 소화효소에 의하여 쉽게 단당류로 분

해되기 때문에 거의 모든 동물의 주요 에너지원으로 사용되고 있음. 식물체의 대부분의 biomass는 전분 이외의 다양한 비전분계 탄수화물[non-starch polysaccharides(NSP)]이 차지하고 있으며 동물에 의해 쉽게 분해되기 어려운 특성을 가지고 있음.

- 동물의 소화관에서 분비되는 효소에 의해 분해될 수 없어서 쓸모없는 자원으로 알려졌었던 비전분계 탄수화물은 자연계에 풍부하게 존재하기 때문에 대체 에너지원이나 기능성 생물소재로서 큰 주목을 받고 있음. 비전분계 탄수화물의 종류로는 cellulose와 xylan, arabinoxylan, mannan, glucomannan, glucan, xyloglucan, arabinogalactan 등의 hemicellulose, 그 외에도 lignin, pectin 등이 있음(European Journal of Clinical Nutrition, 2007).

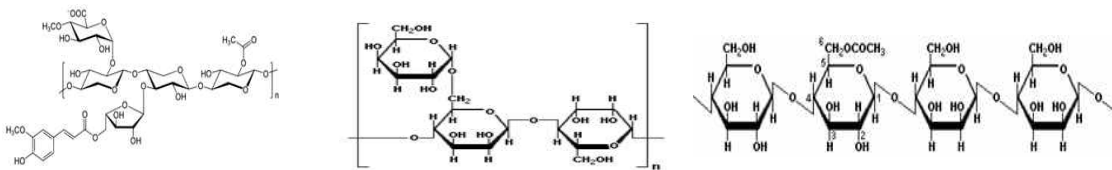


그림. Xylan, mannan, glucomannan의 구조

- 각각의 NSP는 분자량, 구조, 수용성, 점도, 양이온 교환성 및 유기화합물 흡수성 등에 있어 서로 다른 물리화학적 특성을 가지며, 생체 내에서 정상 세포와 조직 발달 및 생리 기능에 필수적인 역할을 함.
- NSP는 유래한 소재의 종류에 따라 같은 물질임에도 다른 구조로 이루어지며, 복잡한 구조를 이루고 있어 일부 NSP를 제외하고, 이들에 대한 활성, 구조 규명, 작용기, 효소 등에 대해 연구가 제한적으로 진행되어 왔기 때문에 NSP에 대한 체계적 연구를 진행하고 NSP에 대한 이해도를 높여 그 결과를 기반으로 폭넓은 NSP 응용방향에 대한 연구는 대단히 중요한 주제로 인식되고 있음(Bioresource Technology, 2013).
- NSP는 동물의 소화효소로는 분해가 어려우나 미생물 등이 분비하는 분해효소들에 의하여 분해되어 다양한 크기의 올리고당으로 분해될 수 있음. 최근의 집중적인 분해효소에 관한 연구들이 진행되어 다양한 미생물이나 곤충 등에서 NSP를 분해하는 효소들이 분리되었으며, 화학적 방법으로만 사용가능하였던 NSP자원들을 효소를 이용하여 환경 친화적으로 사용가능 하는데 성공하였음. 주요 효소로는 cellulase, xylanase, mannanase, chitinase, pectinase 등이 있으며 각각의 효소도 작용기작과 구조에 따라 다양한 종류가 있음.
- NSP 분해산물인 NSP-oligomer들은 자체로 에너지원으로 이용될 수도 있지만 다양한 생물학적 활성이 있음이 보고되면서 이들의 식품 및 의약분야에서의 활용가능성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음.
- chitin 올리고머인 chitosan은 안전성이 우수하며, 대식세포의 활성화, 콜레스테롤 저하, 항균, 항암, 항지혈 등의 다양한 생리활성이 보고되고 있음(Advances in Food and Nutrition Research, 2014)
- β -glucan 올리고머의 경우, 암세포를 공격하기 보다는 대식세포(Macrophage), 자연살해세포(NK cell), T세포 등의 정상적인 면역세포의 면역기능을 활성화시킴으로써 암세포의 증식과 재발을 억제하고 면역 세포의 증가를 촉진한다고 알려져 있으며, 1,3, β -glucans 가 Dectin-1 에 결합하여 면역기전을 활성화함.

- Mannan 올리고머의 경우 위장관 표면에 발현된 lectin과의 친화성에 의해 세균과 lectin과의 결합을 저해할 수 있으며, 간세포에 과발현된 mannose receptor에 특이적으로 결합할 수 있다는 보고가 있음. Mannose receptor의 ligand로서의 특징은 표적화 약물전달시스템에 응용될 수 있음(Cellular & Molecular Immunology 2013).

1-3. 연구개발 범위

- 국내 토착 미생물 자원(Bacillus 속) 에서 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 발굴
- 바실러스 속 및 기 확보한 방선균유래 비전분성 탄수화물 분해효소 포함 효소제제 개발
- 산업동물실험을 통한 효소제제의 안전성 확인 및 기능성 규명
- 고기능성 효소제제 기술이전 및 제품출시

☞ 본 연구진은 2007년부터 2012년 까지 진행된 농림축산부 지원과제 “항생제 대체소재 개발 및 상업화” 라는 연구를 통하여 1,000여종의 국내 토착미생물종을 독자적으로 구축하였으며, 수십 종의 유망한 미생물유래 펩타이드와 분해효소를 확보하였음.

☞ 특히 미래형 농축산 항생제 대체제로 유망 시 되는 protease, amylase, cellulase, lipase, xylanase, mannanase, chitinase 등의 효소를 다수 발굴하여 그 산업적 가치를 확인하겠음. 향후 연구를 통하여 미생물 효소의 대량생산과 산업동물에의 적용가능성을 확인하면 항생제를 대체할 수 있는 농축산업용 효소제제로 제품화되어 국내외 시장 진출이 가능할 것임.

☞ 본 연구의 목표는 효능과 안전성이 검증된 고기능성 비전분성 탄수화물 분해효소를 확보하여 농축산용 바이오소재로 제품화하는 것임. 개발된 제품은 국내시장 진입과 해외로의 진출을 타진하겠음.

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

사료첨가제는 2006년 이후 세계 곡물가격의 상승으로 사료의 가격이 높아지면서 곡물의 사용을 줄이고, 동물의 성장과 건강을 증진시키기 위하여 그 중요성이 매우 높아지고 있음.

2-1. 국내 생산 및 시장현황

- 농림식품부에서는 2012년 이후 항생제 내성균과 관련된 슈퍼박테리아의 출현과 축산물의 항생제 잔류에 대한 우려의 목소리가 높아지면서 배합사료 첨가용 항생제 감축, 축산업 허가제를 추진하면서 천연 자원을 활용한 배합사료 시장 및 관련 기술 개발이 급속도로 이뤄지고 있음. (사료 첨가제 특허분석 보고서, 농림수산식품교육문화정보원)
- 국내의 사료첨가제 시장은 2009년 860억 원에서 2010년 950억 원의 규모로 성장하였음.

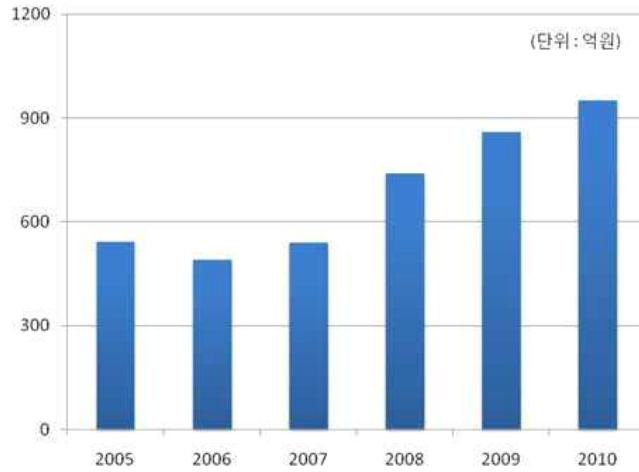


그림. 국내 사료첨가제 시장규모, 한국동물약품협회 2011

- 최근 젓소용 배합사료 생산실적 누계를 보면 2015년 대비 2016년, 2017년 사료 생산 실적은 조금씩 감소세를 보이고 있음. 이는 배합 사료 시장의 경쟁력이 약화된 게 아닌, 이상기후로 인한 기록적인 무더위로 인해 가축들의 사료 섭취량이 감소함에 기인한 것임.
- 원유감산정책 및 노동력의 부재, 국제 곡물시세의 변동 등으로 인한 배합사료 생산량의 감소는 2018년에도 지속될 것으로 보임.
- 이러한 현상을 감안하여 가축 농가의 경쟁력 확보 및 향후 사료시장의 발전을 위해 꾸준한 배합사료의 개발 및 단가 경쟁력 확보가 절대적으로 필요한 상황임.(2017년 축종별 배합사료산업 총결산, 한국사료협회)
- 사료용 효소제의 국내 시장규모는 주요 판매사에서 주요 판매사에서 제공한 자료를 기준으로 연간 약 1,900톤, 총 134억 원의 규모임.
- 국내 가축용 기능성 발효제품 첨가제를 생산·판매업체 수는 150개 이상이나 연구개발 인력·장비 구축을 토대로 수출을 하고 있는 업체는 이지바이오, 진바이오텍, 씨티씨바이오, 중앙바이오텍 등이 있음.

상품명		상품의 특징
이지 바이오	엔도파워	옥수수, 대두박에 포함된 α-galactoside, galactomannan, arabinoxylan 등 NSP를 효과적으로 분해하는 효소제
비전 바이오캡	Maxafeed Wheat	Xylanase, β-glucanase 등이 이상적으로 혼합된 복합 효소제
CTC 바이오	CTCZYME	자체 개발한 β-mannanase 효소제 <ul style="list-style-type: none"> • 옥수수, 대두박, 팥박, 야자박, DDGS 등의 ANF(항영양인자)이고 NSP인 Mannan을 mannose나 MOS(만난올리고당)으로 분해 • Glucose 흡수, insulin 분비 등을 방해하던 mannan을 분해해서 glucose 흡수율을 높이고 체내 에너지 이용을 높임 • Mannan을 MOS로 분해하여 E.coli, Salmonella, mycotoxin과 결합하여 분변 밖으로 배출시켜서 장내 영양소 이용을 도움 • 질소와 NDF 이용증가로, 분변량을 5% 감소시켜서 깔집, 분처리 비용 절감
	아비자임 1502	양계 사료에 최적화된 효소제 <ul style="list-style-type: none"> • 증체율 향상, 사료효율 개선, 깔집상태 개선 등의 효과
	포자임 9302	양돈 사료에 최적화된 효소제 <ul style="list-style-type: none"> • 증체율 향상, 사료효율 개선, 깔집상태 개선 등의 효과
	파이자임	안전성 및 안정성이 보장된 최고의 인분해효소 <ul style="list-style-type: none"> • 사료내 피틴태 인을 분해하여 인의 사용량 절감 환경오염 감소

- 이 외에도 최근 (주)두현에서 발효시킨 동충하초 및 발효 종균을 사료에 첨가하여 가축의 면역 조절, 염증억제, 기타 항바이러스 효과가 있는 사료 첨가제를 출시하여 판매하고 있으나 뛰어난 효율성을 보이고 있음. (충북 뉴스통신)

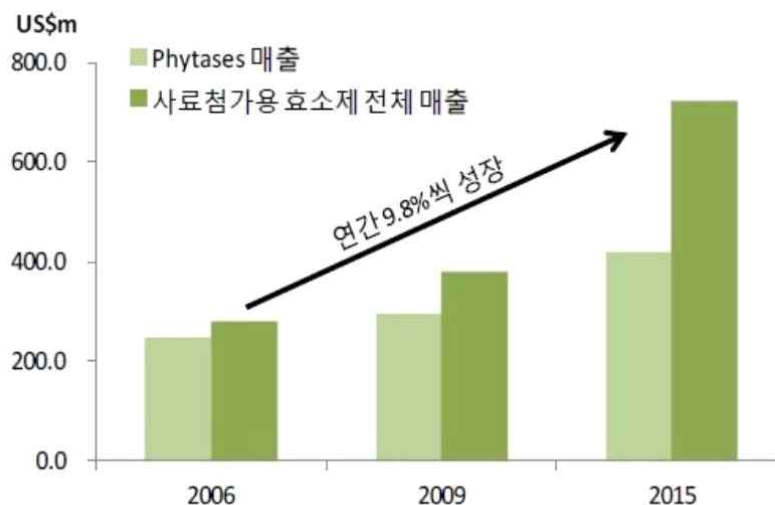
2-2. 국외 제품생산 및 시장 현황

- 향후 불확실한 국제 곡물가격 변동 추이는 곡물사료 사용량을 줄이고 우수한 소화율 및 항균활성을 제공할 수 있는 사료첨가제 시장의 확대에 이어지고 있음.
- 사료 생산 기준으로 현재까지 세계 최고 선두 사료 생산 기업은 태국 CP Group, 중국의 New Hope Group을 비롯하여 COFCO, Feed Charoen Pokphand 등이 있음. (사료 첨가제 특허분석 보고서, 농림수산식품교육문화정보원)
- 전세계 사료첨가제 시장의 경우 2012년 151억 달러로 추정되며, 2017년에는 183억 달러에 이를 것으로 예상되며 2012년부터 2017년까지 연평균 3.86% 성장 중에 있음.
- Alliedmarket research사에서 제작한 사료 첨가제 시장 분석보고서에 의하면 국제 사료첨가제 시장은 2020년 이후엔 약 200억 달러 이상으로 성장할 것으로 예측하고 있음. (Report Image Global Animal Feed Additives Market, Analysis, Growth, Trends and Forecast 2013-2020)
- 사료첨가제의 3대 시장은 미국, 유럽, 아시아이며 전 세계 시장의 75%를 차지하고 있음. (세계 사료산업 동향과 전망, 세계농업 151호)
- 유럽은 가장 큰 시장으로 예상되는데 2012년 전세계 사료첨가제 시장의 33.5%를 차지하며 그 액수는 50억7870만 달러로 추정됨.(한국단미사료 협회)
- 사료첨가제 시장은 아래 표와 같이 꾸준한 성장세를 보이고 있음.

Product	2009	2010	2011	2016	CAGR % (2011-2016)
Antibiotics	3,300	4,185	4,400	5,120	3.08
Vitamins	1,080	1,536	1,559	1,685	1.57
Antioxidants	133	138	142	175	4.27
Feed Enzymes	442	552	585.7	740	4.79
Addifiers	938.6	1,150	1,207	1,610	5.92
Others(Trace minerals, NPN and so on)	2,358.3	3,465.5	3,494.4	4,214.6	3.82

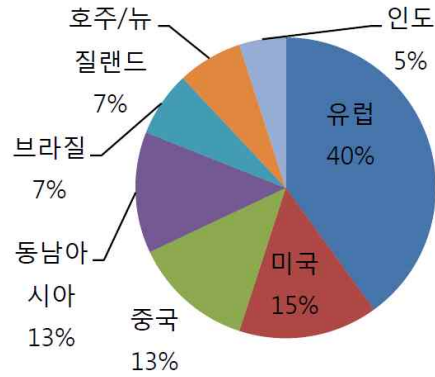
(출처 All about Feed Magazine, Market and Markets)

- 효소제는 생체 내에서 전분이나 단백질, 셀룰로오스 등의 분해 촉진으로 영양소의 흡수를 좋게 해주어 영양 이용률을 높여 주며, 생균제는 유해 미생물에 대한 저항성을 높여줌으로써 통한 가축의 생산성을 증진시키는 젖산균으로, 성장 촉진과 질병예방 및 소화율 증진 효과를 기대할 수 있음.
- 전 세계 사료첨가용 효소제제는 연간 약10%의 성장률을 기록하고 있음. 따라서 고효성의 효소는 세계 시장진입에 유망한 아이템으로 생각됨.



(전세계 사료첨가용 효소제 매출 동향(단위: 백만달러), Frost & Sullivan 2010, Leading research center)

- 전 세계 효소 사료첨가제 시장을 주로 점유한 국가는 유럽, 미국, 중국이 주로 점유하고 있음.
- 사료첨가제 산업은 참여기업이 다수인 완전경쟁 시장이며, 제품 경쟁력이 중요한 변수임. 우리나라의 사료첨가제 시장은 내수지향적인 산업으로 자리잡은 상태이며, 일부 가공원료를 수출하는 정도임.
- 미래의 사료제제산업은 친환경 고효율의 제품을 요구하는 기술의존형 산업으로 진행될 것으로 예상되며, 제품개발 성공시 주요 시장 점유국인 유럽 미국 중국 등에 수출활로가 활성화 될 것으로 예상됨.



(전세계 사료첨가용 효소제 시장, Frost & Sullivan 2010, Leading research center)

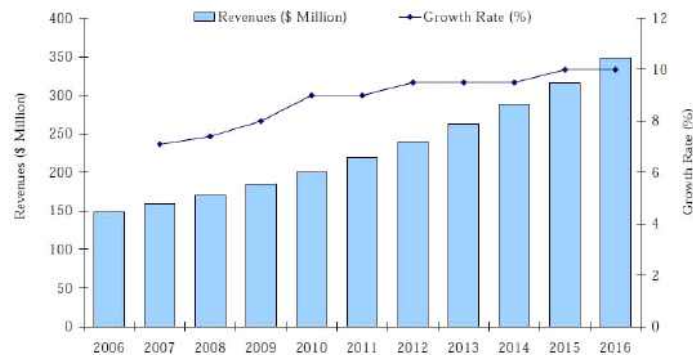
- 현재 미국에서 상용화 되고 있는 효소사료를 대표적으로 생산하는 기업은 아래와 같음.

(표. 기업별 효소 사료첨가제시장(US 2009))

Company	NSP Products	Phytase Products
DSM/Novozymes	Roxozyme	Ronozyme
Danisco Animal Nutrition	Avizyme, porzyme, Grindazyme	Phyzyme
BASF Corporation	Natugrain and Natustarch	Natuphos
Alltech	Allzyme SF	Allzyme SF
Loders Croklaan	Lodestar, Lodestar plus	-

(출처: U.S. Digestive Ingredients in Animal Feed Market, 2010 Frost & Sullivan)

- 최근에 프로바이오틱 제품에 가장 공통적으로 사용되는 미생물은 젖산균 (Lactobiacilli, Streptococci, Bifidobacteria) 임. 이들은 건강한 동물의 장에서 다수 발견되고 건강하지 않은 동물의 장에선 발견되지 않고 있음.
- 최근에는 젖산균 외에도 *Bacillus* sp., 효모(*Sacchatomyces cerevisiae*, *S.boulardii*), 섬유클로팡이(*Aspergillus Oryzae*) 같은 미생물이 Probiotics 제품에 사용되고 있음.



)그림. 세계 생균제제 시장 동향(

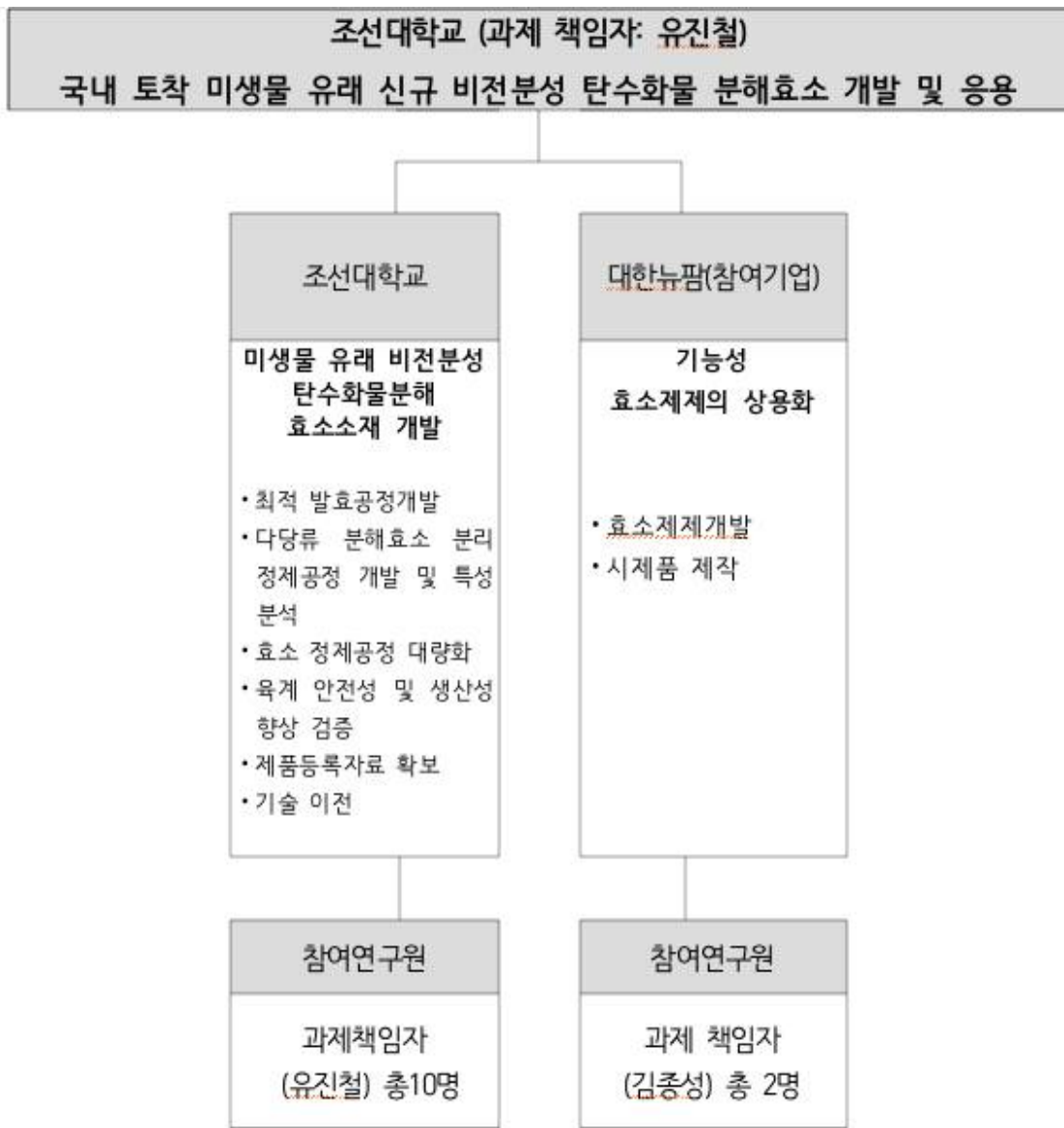
(출처 : U.S. Digestive Ingredients in Animal Feed Market, 2010 Frost & Sullivan)

3. 연구수행 내용 및 결과

3-1. 추진체계 및 추진일정

가. 추진체계

- 기능성 효소의 대량생산은 미생물 대량생산에 활용가능한 대단위 발효시스템을 보유한 전남생물방제센터와의 협력연구를 통하여, 고효율 저비용의 생산공정을 확보하였음.
- 효소제제의 안전성 및 생산성 향상평가는 전남대학교 농업생명대학 선상수 교수팀과 협력연구를 통하여 산업동물에서의 효용성 판단하였음.
- 효소제제의 제품화 및 시제품제작은 참여기업인 대한뉴팜과 협조하여 수행하였음.



나. 추진일정

연구개발 범위	세부 연구개발 내용	추진일정 (1차년도)				추진일정 (2차년도)			
		1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4
국내토착 미생물 자원으로부터 후보 효소 도출, 분리정제 및 효소학적 특성 연구	▪ 미생물을 활용하여 후보 균주 및 효소 검정	■	■	■	■				
	▪ xylanase, mannanase, chitinase 활성 분석		■	■	■	■			
	▪ 후보 효소의 부분정제 및 효소학적 활성 분석		■	■	■	■	■		
	▪ 후보 효소의 최적 정제를 통한 신규성 여부 검토		■	■	■	■	■		
	▪ 효소학적 특성 검토(최적 pH, 최적 온도, 안정성)			■	■	■	■		
후보 기능성 효소의 scale-up 및 대량생산 조건 최적화 연구	▪ lab scale에서의 발효조건 최적화	■	■	■	■				
	▪ 중소형 발효조에서 효소의 생산 및 최적화 연구			■	■	■			
	▪ 대형발효조에서의 효소의 최적 생산조건 확립 및 시제품 개발				■	■	■		
후보 기능성 효소의 동물 기능성 평가를 통한 기술이전	▪ 육계 사양시험을 통한 생산성 향상 및 사료 효율성 향상 평가			■	■	■	■		
	▪ 육계 사양시험을 통한 안전성 및 기타 기능성 평가			■	■	■	■		
	▪ 참여기업인 대한뉴팜(주)으로의 기술이전을 통한 사업화 가능성 제시					■	■	■	■

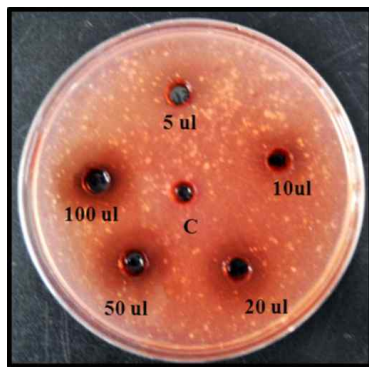
3-2. 연구범위별 연구방법, 내용 및 결과

가. 국내토착 미생물 자원으로부터 후보 효소 도출, 분리정제 및 효소학적 특성 연구

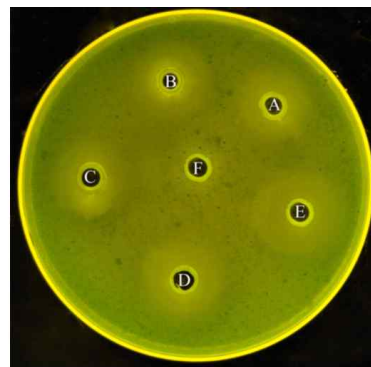
1) 미생물을 활용하여 후보 균주 탐색 및 유전학적 신규성 확인

- 확보한 800여종의 토착 미생물을 액체배지에 접종하고 37℃에서 7일간 배양함.
- 상기 LB, BHI, MRS, 한천배지는 121℃에서 15분간 멸균하여 사용함. 위의 조건 하에 선택한 균주의 배양액을 이용하여 각각 xylanase, chitinase, mannanase, glucanase, pectinase의 활성을 조사하여 20여종의 후보 균주를 1차 선정하였으며 기능성 효소 생산 균주로써 적합한 최종 균주를 선발함.

No.0	<i>Bacillus</i> sp.	Chitinase	Xylanase	Mannanase	Pectinase	Glucanase	비고
1	CSB1	++	++	+++	++	++	
2	CSB3	+	++++	+++	++++	++	국제학술대회 발표
3	CSB7	++	++	++	+++	++	
4	CSB16	++	++	+	++	++	
5	CSB17	+++	++	++	++++	+++	국제학술대회 발표
6	CSB30	+++	++	+	+++	+++	
7	CSB31	+++	++++	++++	+++	++	국제학술대회 발표
8	CSB32	+++	++	+++	++++	+++	국제학술대회 발표
9	CSB34	+++	+	++	+++	++++	국제학술대회 발표
10	CSB35	++++	++	++	++	++	
11	CSB39	++++	++	++++	+++	+++	국제학술지게제 / 시제품 생산 / 동물시험 실시
12	CSB40	+++	++++	++++	++++	+++	국제학술지게제 / 특허출원 / 시제품 생산 / 동물시험 실시 / 기술이전 실시
13	CSB45	++	++++	++	+++	+++	
14	CSB46	+++	+++	+++	++	++	
15	CSB47	+++	++	+++	+	+	
16	CSB55	++	++	+++	+++	++++	국제학술대회 발표 / 시제품 생산 / 동물시험 실시
17	CS242	++++	++++	+++	+++	++	국제학술지게제
18	CBS179	++	+++	+++	++	++	
19	CSB428	++++	+++	++++	+++	++	국제학술지게제
20	CBS31	++	+	++	++++	+	국제학술대회 발표

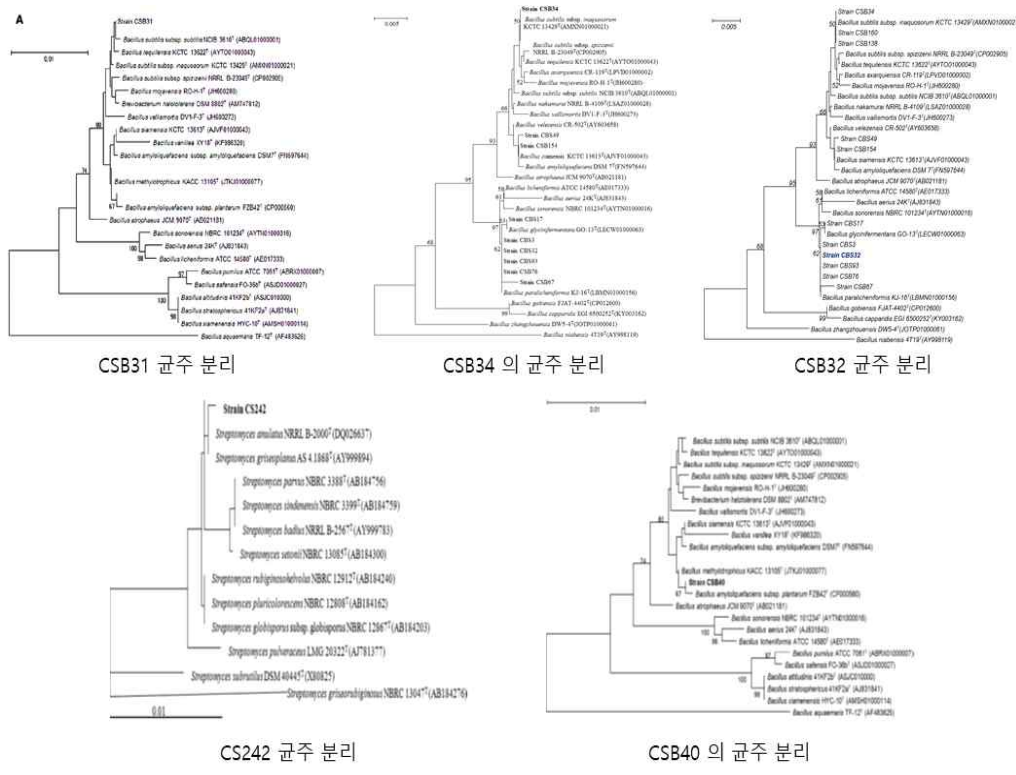


CS242 유래 Chitinase의 활성 분석



CS428 유래 Mannanase의 활성 측정

- 각각의 효소를 함유한 미생물 배양액들은 해당 염색법이나 DNS법 같은 특이적 방법으로 검색되고 활성이 측정됨.
- 16S rDNA의 염기서열분석 : 16S rDNA는 apillary rapid cycler로 증폭하며 primer로 는 27f(5'-AGAGTTTGATCTGGCT-3), 1492r(5'-AAGGAGGTGWTCCARC C-3')을 사용.



○ 분리된 주요 효소들은 각각의 다른 효소와의 생화학적 비교 분석을 통하여 기존에는 보고되지 않은 새로운 형질의 효소임을 확인함.

Enzyme	N-terminal amino acid	Identity %
Chi242	APGAPGTGAL	100
chitinase A1 from <i>Stigmatella aurantiaca</i> DW4/3-1	APGAPGTGIM	80
chitinase from <i>Amycolopsis mediterranei</i> G599	APGAPGTPOA	70
chitinase A from <i>Streptomyces</i> sp. Mg1	VPGAPGXAA	70
chitinase from <i>Streptomyces ghanensis</i> ATCC 14672	KGNAPGTGAD	60
chitinase C from <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	DGGNPGTGAE	60
chitinase from <i>Streptomyces rimosus</i> ATCC 10970	GAGGPGTGAG	60
chitinase from <i>Streptomyces</i> sp. AA4	VNQNFETGAL	40

CS242 유래 Chitinase의 다른 효소와의 비교 분석

Table 4 Alignment of N-terminal sequences of CSB40 and closely related xylanase from different sources

Enzyme	N-terminal amino acid	Identity (%)
CSB40	GIQQGDDGDKL	100
Extracellular xylanase from <i>Geobacillus stearothermophilus</i> E159q	GDDGKL	60
Extracellular xylanase from <i>Geobacillus stearothermophilus</i> T-6	GDDGKL	60
Thermostable xylanase from <i>Geobacillus kanstrophilus</i>	GDDGKL	60
Endo 1-4 β-xylanase from <i>Geobacillus</i> spp. Y412MC61	GDDGKL	60
Xylanase from <i>Geobacillus</i> sp. WB1	GDDGKL	60
Xylanase from <i>Geobacillus thermolovorans</i>	GDDGKL	60
Thermostable xylanase from <i>Geobacillus</i> sp. 71	GDDGKL	60
Endo 1,4 β-xylanase from <i>Geobacillus</i> spp. CS6-13	GDDGKL	60
β-1,4 xylanase from <i>Gymnella sunshinensis</i> YC6258	GDDGKL	60
Beta-xylosidase from <i>Madicago sativa</i>	GIQDQDDGSDSKL	60
Xylanase from <i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	IHQGEDG	50
Xylanase from <i>Bacteriodes fragilis</i>	QQGDD	50

CSB40 유래 Xylanase의 다른 효소와의 비교 분석

Table 6 Comparison of thermodynamic parameters of CSB40 with xylanase from other strains

Thermodynamic parameters	Xylanase from <i>Thermomyces lanuginosus</i> [33]		Xylanase from <i>Tribiodermis recai</i> SAF3 [34]		Xylanase from <i>Bacillus subtilis</i> (subtilisin) S831 [7]	Xylanase from <i>Spirillacton</i> sp. [35]	Xylanase from <i>Thermoplasma parviphila</i> [6]	CSB 40 (current study)
	Wild	Mutant	SnF	SSF				
Activation energy (E _a) kJmol ⁻¹	30.71	21.88	38.90	36.6	30.51	69	65.50	29.39
Enthalpy of activation (ΔH) kJmol ⁻¹	28.02	19.19	36.30	33.9	27.56	66.40	62.45	26.70
Gibb's free energy (ΔG) kJmol ⁻¹	55.97	55.48	65.60	63.7	197.65	57.60	46.18	48.62
Entropy of activation (ΔS) Jmol ⁻¹ K ⁻¹	-86.50	-112.30	-102.20	-96.80	-198.50	28.10	44.20	-60.80
Temperature quotient (Q ₁₀)	-	-	1.56	1.52	1.29	2.40	-	1.40
E _{app} kcal ⁻¹	985.30	715.87	87.600	88.800	333.800	95.000	2,137,346.15	92758.30
Free energy of substrate binding (ΔG _s) kJmol ⁻¹	-5.88	-6.24	-	-	21.15	-	-	-6.78
Free energy of transition state formation (ΔG _‡) kJmol ⁻¹	-29.23	-30.07	-	-	-24.84	-	-	-37.51

CSB40 유래 Xylanase의 다른 효소와의 비교 분석

Table 2 Properties of Chi242 compared with other chitinase from *Streptomyces*

Strain name	Mol. wt (kDa)	Optimum		Stability		Reference
		pH	Temp. (°C)	pH	Temp. (°C)	
<i>S. sp.</i> CS147	41	11	60	4-12	50	Pradep et al. (2015)
<i>S. sp.</i> M-20	20	5	30	4-8	40	Kim et al. (2003)
<i>S. roseolus</i>	40	6	60	6-8	60	Xiayun et al. (2012)
<i>S. venezuelae</i> P10	66	7.5	35-40	6.5-8	45	Mukherjee and Sen (2006)
<i>S. sp.</i> DA11	34	8	45-50	6-9	45	Han et al. (2009)
<i>S. albobivaceus</i> S-22	43	5.6	40	4-5.6	40	El-Sayed et al. (2000)
<i>S. sandae</i> TK-VL_333	45	7	30	7-8	30	Kavitha and Vijayalakshmi (2011)
<i>S. cyaneus</i> SP-27	27	7	60	5.5-8.5	60	Yano et al. (2008)
<i>S. griseus</i> (MTCC 9723)	34	6	40	5-9	20-50	Rabeeth et al. (2011)
<i>S. griseus</i> HUT 6037	49	5.5-7.0	60	5-9	40	Tambe et al. (2000)
<i>Streptomyces andarus</i> CS242	38	6	50	5-13	30-60	Current study

CS242 유래 Chitinase의 다른 효소와의 비교 분석

Strain Name	MW (kDa)	Optimum		Stability		Sp. Activity (U/mg)	Reference
		pH	Temp (°C)	pH	Temp (°C)		
<i>B. subtilis</i> B06	38	6.4	50	4.6-9.0	60	927.84	[7]
<i>B. subtilis</i> NIA-39	-	5	55	4.0-9.0	55	108	[8]
<i>B. amyloliquefaciens</i> CS47	-	6	50	5.0-9.0	-	-	[9]
<i>B. sp.</i> N16-5	55	9.5	70	9	60	5065	[10]
<i>B. sp.</i> M16-3	-	6.5	65	6.5	55-60	591.7	[11]
<i>B. subtilis</i> W134	39.6	6	65	5.5-10.1	60	8302.4	[24]
<i>B. licheniformis</i>	-	7	60	6	50	4341	[31]
<i>Paenibacillus thiamonis</i> ZF-08	60	6.0	60	5.0-7.0	60	9.3	[12]
<i>B. stearothermophilus</i> (B)	-	5.5-7.5	65	-	65	100	[40]
<i>B. subtilis</i> CSB39	30	7.5	70	4.6-11.0	70	1063.91	Current Study

CSB39 유래 Mannanase의 다른 효소와의 비교 분석

Thermodynamic parameters	Mannanase from <i>Sphingobacterium</i> sp. CN25 ⁹⁶	Mannanase from <i>Bacillus</i> sp. CFR1601 ⁹⁵	MnB31 (this study)
Activation energy (E _a) (kJ mol ⁻¹)	36.0	45.18	31.36
Enthalpy of activation (ΔH) (kJ mol ⁻¹)	33.5	362.75	28.59
Gibb's free energy (ΔG) (kJ mol ⁻¹)	77.7	101.21	42.38
Entropy of activation (ΔS) (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	-143.7	779.47	-41.39
Temperature quotient (Q ₁₀)	-	-	1.40

CSB31 유래 Mannanase의 다른 효소와의 비교 분석

Bacterial strain	Mol. wt	Optimum		Stability		References
		pH	Temp	pH	Temp	
<i>S. ipomoea</i> CECT3341	40	7.5	55	7.5-8	80	Montiel et al. (2002)
<i>Streptomyces</i> sp.	42.9	6.8	57	5.8-8.4	45-70	Takahashi et al. (1984)
<i>Streptomyces lividans</i> 66	36	6.8	58	5.5-8.0	35-70	Arcand et al. (1993)
<i>Streptomyces galvus</i> NR	-	6.5	40	5-8	50	Kansoh and Nagieb (2004)
<i>Streptomyces</i> sp. S27	37.2	7	65	5-9	50	Kim et al. (2011)
<i>Streptomyces thermotillacinus</i>	-	7	55	6-8	30-80	Kumagai et al. (2011)
<i>Streptomyces</i> sp. CS428	35	12.5	60	5-12.5	70	Current study

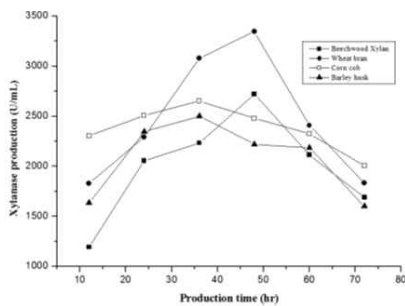
CSB428 유래 Mannanase의 다른 효소와의 비교 분석

2) 후보 효소의 최적 생산조건 확립

○ 먼저 flask 배양을 위하여 최적 배지성분의 검토를 위하여 효소의 생산능이 우수한 탄소원의 선정은 기본배지에 각종의 탄소원(D-(-)Fructose, Glucose, Lactose, D-(+)-Maltose, Mannitol, Soluble starch, D-Sorbitol, Sucrose, Glycerol)을 1%(w/v) 씩 첨가하고 NO활성을 측정하여 선정하며, 질소원은 각종의 유기질소원과 무기질소원으로 부터 효소활성을 측정하여 선정함. 또한 선정된 배지 조성 중 높은 활성을 나타내는 배지의 질소원들을 일정한 비율로 조절하여 활성을 측정하여 가장 우수한 성분을 선정하며, 금속염에 영향을 알아보기 위해서 각종 금속염(CaCO₃, NaCl, KCl, CuSO₄, K₂HPO₄, CaCl₂, FeCl₂, CoCl₂)에 0.1%(w/v)이 되도록 첨가하여 효소 생산에 미치는 영향을 조사함.

Substrate (0.5%)	Activity (%) ^a	Substrate (1 %)	Relative activity (%)
Chitin from shrimp shells	4.92 ± 0.015	Colloidal chitin	100 ± 0
Beech wood xylan	12.56 ± 0.003	Shrimp shell powder	10.7 ± 15.1
Gum arabic from acacia tree	0.26 ± 0.001	Glycol chitosan	10.5 ± 2.7
Pectin from apple	16.59 ± 0.006	Cellulose	3.9 ± 5.4
Sigma cell cellulose, Type 20	4.96 ± 0.011	Carboxymethyl cellulose	0.5 ± 0.6
Locust bean gum	100 ± 0.034		

CSB39 유래 Mannanase의 주요 기질별 활성 분석

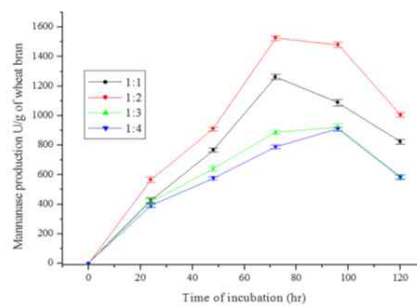


CSB40 유래 Xylanase의 중요 배지 조성별 생산능 분석

Substrates (1 %)	Relative activity (%)
Agarose	7.24 ± 1.74
Glucose	1.72 ± 0.19
Sucrose	0.34 ± 3.21
Xylose	1.60 ± 0.98
Fructose	1.15 ± 0.61
Mannose	6.16 ± 4.56
Na-CMC	0.14 ± 1.98
Avicel-101	3.69 ± 2.69
Mannitol	0.11 ± 3.11
Birchwood xylan	52.24 ± 1.37
Beechwood xylan	100 ± 0.0

CSB40 유래 Xylanase의 주요 기질별 활성 분석

CSB42 유래 Chitinase의 주요 기질별 활성 분석



CSB39 유래 Mannanase의 생산 특성 분석

3) 후보 효소의 분리 정제

○ Crude 시료는 ammonium sulfate 침전법을 이용하여 0-20% 이내로 포화하여 단백질을 침전시킨다. 침전한 단백질은 4°C에서 10,000rpm에서 20분간 원심분리하여

침전물을 얻음. 침전물은 다시 10mM, pH6-8의 인산완충액을 이용하여 최소로 녹임.

Table 1 Purification summary:

Purification steps	Total Protein (mg)	Total Activity (U)	Sp. Activity (U/mg)	Yield (%)	Purity Fold
Crude Broth	181.82	5656.06	31.16	100	1
A. Sulfate	55.92	3395.24	60.72	60.56	1.10
Sepharose CL-6B	4.07	2409.67	591.87	42.97	10.75
DEAE Sepharose Fast Flow	1.34	1427.85	1063.91	25.47	19.32

CSB39 유래 Mannanase의 정제 분석

Purification steps	Total Protein (mg)	Total Activity	Sp. Activity (U/mg)	Yield (%)	Purity Fold
Crude Broth	87.26	4654.37	53.34	100	1
Ammonium Sulfate precipitation	31.27	3156.87	100.94	67.83	1.89
Gel filtration chromatography	2.28	1477.68	648.75	31.75	12.16
Anion exchange chromatography	0.72	544.18	759.40	11.69	14.24

CSB55 유래 Glucanase의 정제 분석

Table 1 Purification summary of xylanase from CSB40

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purity fold
Crude broth	9.72	156449.66	16095.60	100.00	1.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ fractionation	2.09	73710.00	35267.94	47.11	2.19
DEAE sepharose FF	0.19	24849.06	130784.52	15.88	8.12

CSB40 유래 Xylanase의 정제 분석

Table 1 Purification summary

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Sp. activity (U/mg)	Yield (%)	Purity fold
Crude broth	201	39351.1	194.8	100.0	1.0
A. Sulfate (30-80 %) fractionation	44	29074.5	660.8	73.9	3.4
Sepharose CL-6B	6.14	14776.9	2406.7	37.6	12.4

CSB428 유래 Mannanase의 정제 분석

Table 1. Purification summary:

Purification steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	SA ^a (U·mg ⁻¹)	Yield (%)	Purity fold
Crude Broth	152.50	15282.37	100.21	100	1
A. Sulfate	21.56	7887.67	365.79	51.61	3.65
DEAE Sepharose fast flow	5.39	6370.81	1181.76	41.69	11.79
Sepharose CL-6B	1.83	3286.53	1796.13	21.51	17.92

^aSA: specific activity.

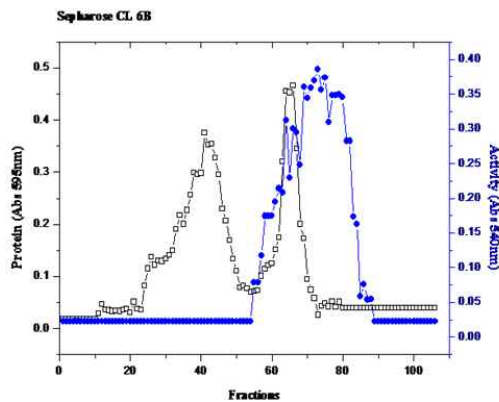
CSB31 유래 Mannanase의 정제 분석

Table 1 Summary of purification of Chi242 from *Streptomyces* sp. CS242

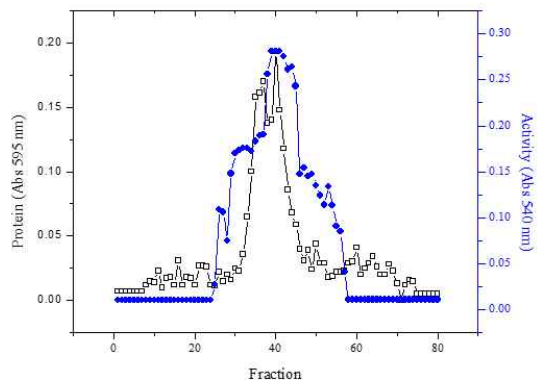
Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Fold
Broth	110	755760	6870	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	51.24	530659	10356	70.21	1.5
Sepharose CL-6B	10	270102	27010	35.73	3.93

CS242 유래 Chitinase의 정제 분석

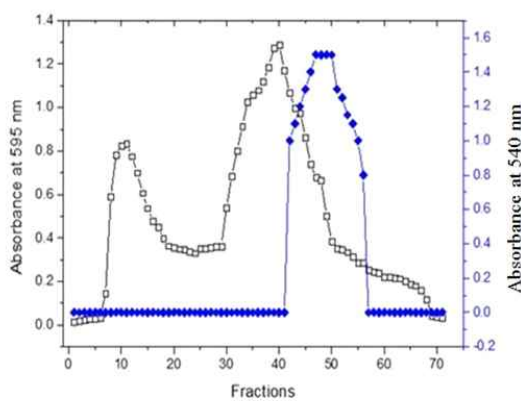
- 최소로 녹인 샘플은 gel permeation column chromatography 나 ion-exchange column chromatography를 수행하여 순수하게 분리함. SDS-PAGE를 수행하여 순수분리 정도와 분자량을 결정함.



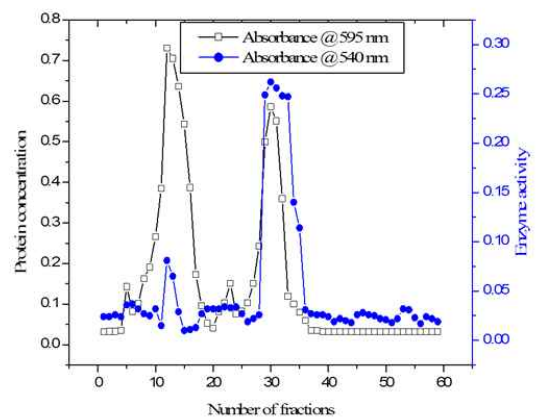
CSB31 유래 pectinase의 정제 분석



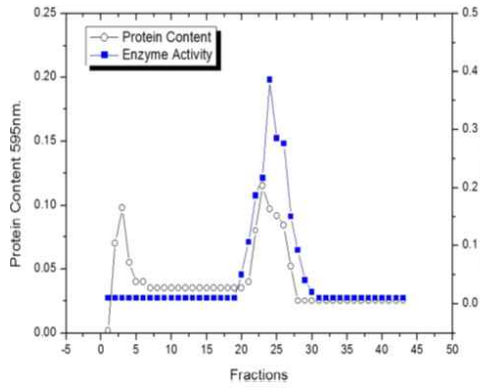
CSB32 유래 pectinase의 정제 분석



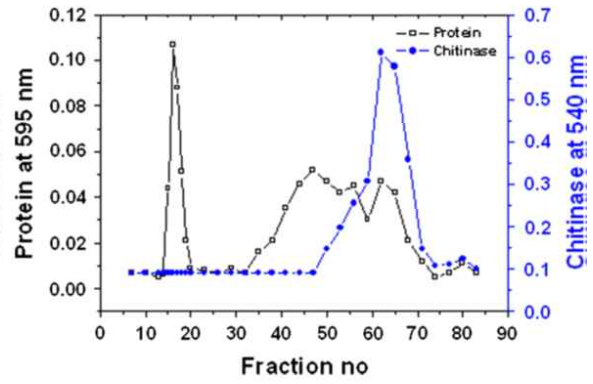
CSB34 유래 Glucanase의 정제 분석



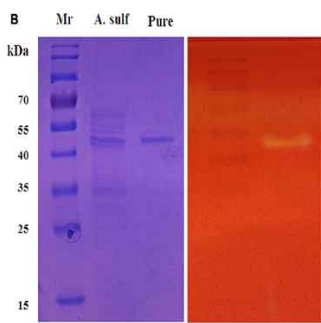
CSB55 유래 Glucanase의 정제 분석



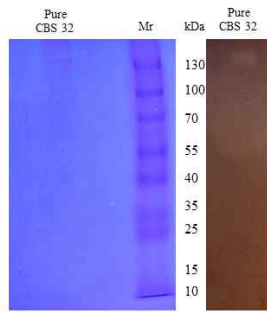
CSB40 유래 Xylanase의 정제 분석



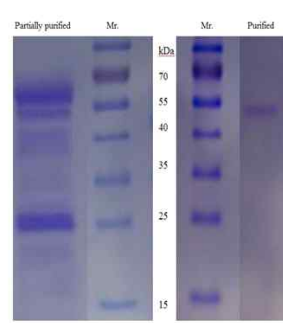
CS242 유래 Chitinase의 정제 분석



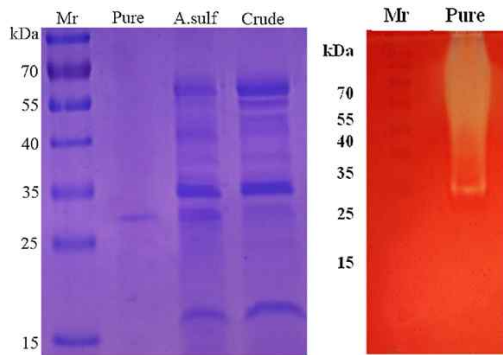
CSB31 유래 Glucanase의 SDS-PAGE 분석



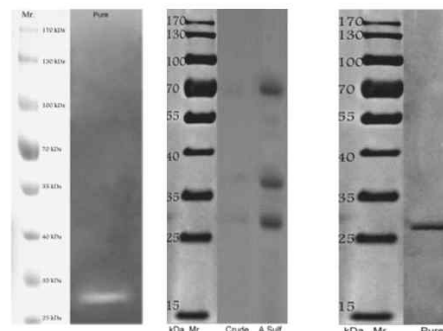
CSB32 유래 Glucanase의 SDS-PAGE 분석



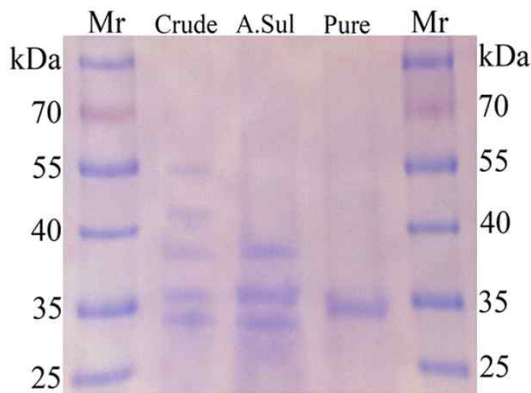
CSB34 유래 Glucanase의 SDS-PAGE 분석



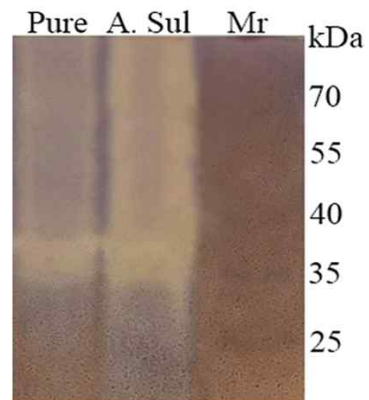
CSB39 유래 Mannanase의 SDS-PAGE 분석



CSB40 유래 Xylanase의 정제 분석



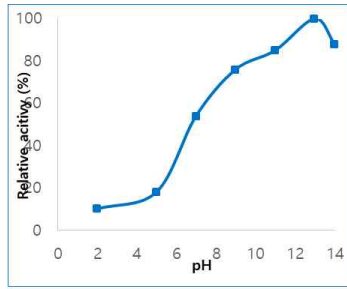
CSB428 유래 Mannanase의 균주의 효소 분석



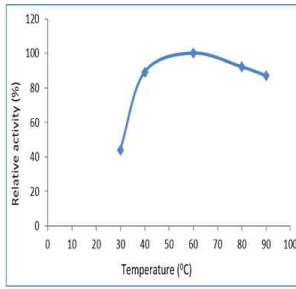
CSB428 유래 Mannanase의 균주의 효소 분석

4) 후보 효소에 대한 생화학적 효소학적 특성 평가

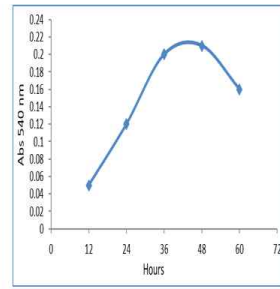
- 효소의 온도에 대한 영향은 정제된 효소를 다양한 온도 및 시간 조건에서 방치한 후 잔존하는 효소활성을 확인함. pH에 대한 영향은 정제된 효소를 2~14범위의 pH 완충액에 녹여 일정시간 방치 후 잔존하는 효소활성을 측정하여 확인함.



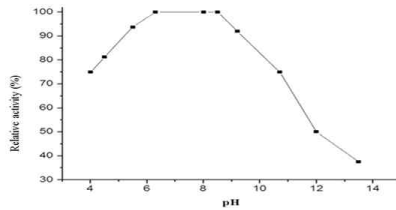
CSB32 유래 pectinase의 최적 pH 분석



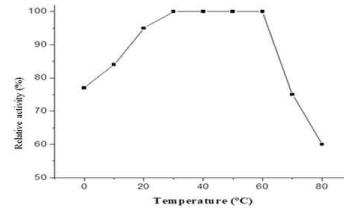
CSB32 유래 pectinase의 최적 온도 분석



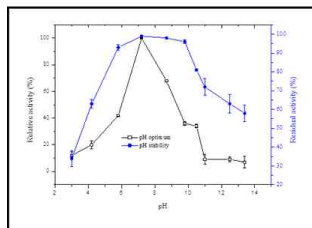
CSB32 유래 pectinase의 최적 생산 배양 시간 분석



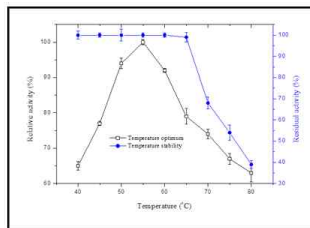
CSB34 유래 Glucanase의 최적 pH 분석



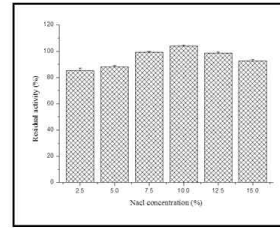
CSB34 유래 Glucanase의 최적 온도 분석



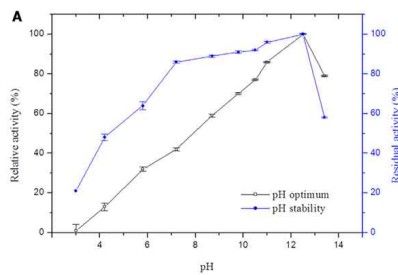
CSB55 유래 Glucanase의 최적 pH 분석



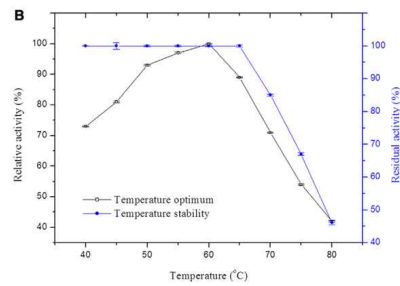
CSB55 유래 Glucanase의 최적 온도 분석



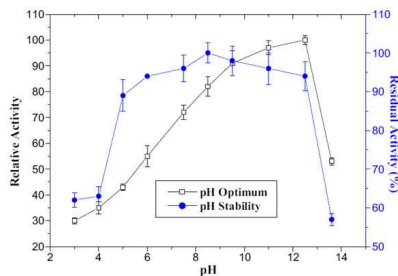
CSB55 유래 Glucanase의 내염 안정성 분석



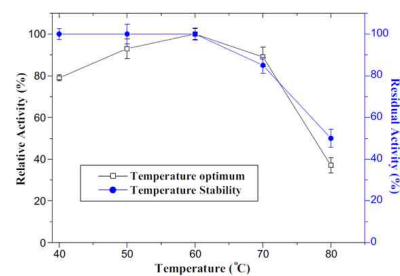
CSB31 유래 Mannanase의 최적 pH 분석



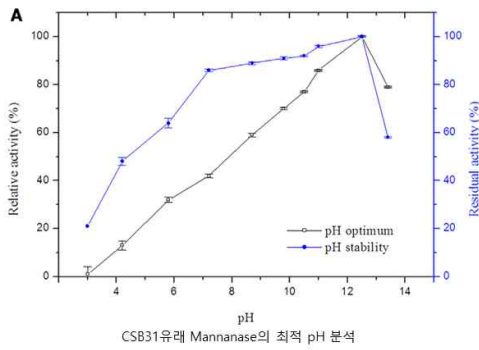
CSB31 유래 Mannanase의 최적 온도 분석



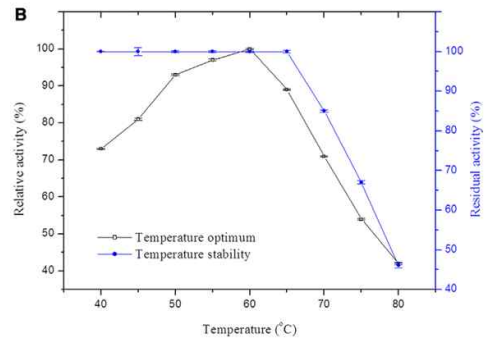
CSB428 유래 Mannanase의 최적 pH 분석



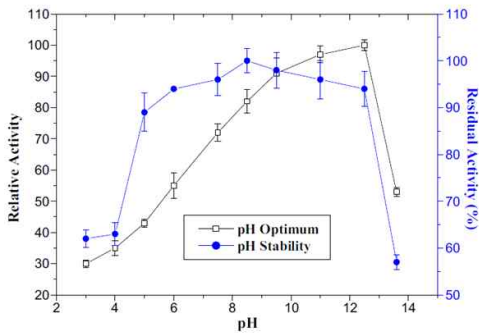
CSB428 유래 Mannanase의 최적 온도 분석



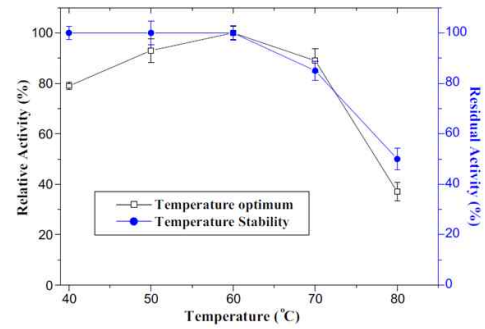
CSB31 유래 Mannanase의 최적 pH 분석



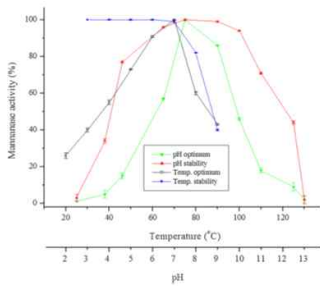
CSB31 유래 Mannanase의 최적 온도 분석



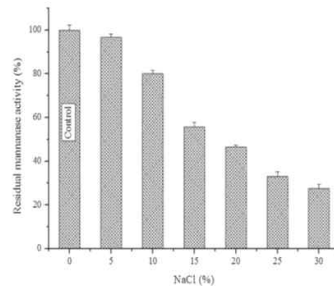
CSB428 유래 Mannanase의 최적 pH 분석



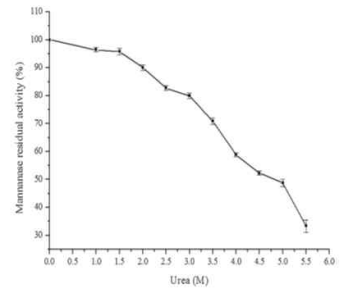
CSB428 유래 Mannanase의 최적 온도 분석



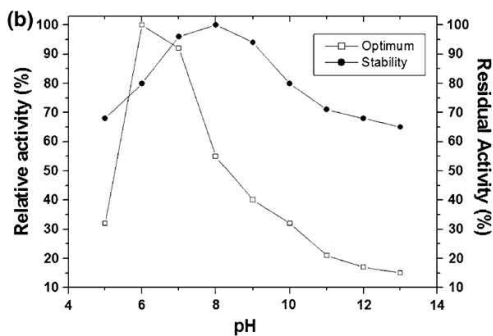
CSB39 유래 Mannanase의 최적 pH, 온도 분석



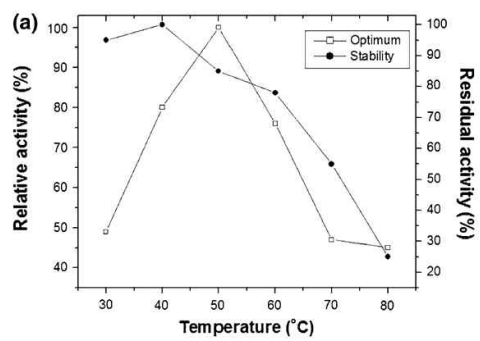
CSB39 유래 Mannanase의 내염성 분석



CSB39 유래 Mannanase의 Urea 처리에 따른 분석



CS242 유래 Chitinase의 최적 pH 분석



CS242 유래 Chitinase의 최적 온도 분석

○ 유기용매에 대한 영향은 아세톤, 클로로포름, 부탄올, 에탄올등을 이용하며 반응조건은 50%(V/V)에서 수행함. 계면활성제에 대한 영향을 보기위해서 tween20, tween80, triton X-100등을 10%(V/V)의 조건에서 수행함.

Metal ions	Concentration (mM)	Relative activity (%) ^a
Ca ²⁺	5	27.69 ± 4.84
Mg ²⁺	5	95.50 ± 4.96
Cu ²⁺	5	5.57 ± 4.19
Ni ²⁺	5	96.94 ± 2.18
Zn ²⁺	5	177.69 ± 1.73
Mn ²⁺	5	41.90 ± 4.84
Fe ²⁺	5	39.02 ± 4.00
Co ²⁺	5	55.39 ± 1.25
Na ⁺	5	91.54 ± 0.62
K ⁺	5	70.68 ± 4.18
Ba ²⁺	5	59.71 ± 2.55

CSB40 유래 Xylanase의 효소학적 활성 분석

Effects of detergents, modulators, and metal ions on the activities of mannanase from *Bacillus* sp. CSB39.

Reagents	Concentration	Relative Activity (%) ^a
Hydrogen Peroxide	5 mM	134.0 ± 0.003
Sodium Perborate	5 mM	117.4 ± 0.003
Beta-mercaptoethanol	5 mM	108.3 ± 0.004
EDTA	1 mM	8.9 ± 0.003
EGTA	1 mM	15.9 ± 0.004
Triton X-100	0.25%	114.9 ± 0.003
Tween-20	0.25%	99.7 ± 0.002
Tween-80	0.25%	107.5 ± 0.003
Deoxycholic Acid	0.25%	118.3 ± 0.004
SDS	0.25%	123.8 ± 0.003
CHAPS	0.25%	127.4 ± 0.008
Calcium	1 mM	139.7 ± 0.010
Magnesium	1 mM	88.9 ± 0.009
Cobalt	1 mM	108.7 ± 0.060
Copper	1 mM	46.7 ± 0.024
Nickel	1 mM	80.5 ± 0.055
Zinc	1 mM	30.5 ± 0.052
Manganese	1 mM	139.4 ± 0.052
Iron	1 mM	128.3 ± 0.020
Barium	1 mM	115.0 ± 0.060
Acetone	2.50%	129.7 ± 0.038
Chloroform	2.50%	129.3 ± 0.011
Dimethyl Sulfoxide	2.50%	125.9 ± 0.011
Methanol	2.50%	132.7 ± 0.049
Ethanol	2.50%	140.5 ± 0.019
2-propanol	2.50%	140.9 ± 0.008
1-Butanol	2.50%	144.3 ± 0.011
Toluene	2.50%	141.7 ± 0.009
Di-ethyl Ether	2.50%	131.6 ± 0.015
Tri Chloroacetic Acid	2.50%	0.3 ± 0.001
Sodium Chloride	2.50%	154.9 ± 0.003
Potassium Chloride	2.50%	134.9 ± 0.005

CSB39 유래 Mannanase의 효소학적 활성 분석

Additives	Concentration	Relative activity (%) ^a
Triton X-100 ^a	0.25 %	114.44 ± 3.47
Tween-80 ^b	0.25 %	61.02 ± 2.41
Tween-20 ^c	0.25 %	50.00 ± 4.33
Sodium dodecyl sulfate ^d	0.25 %	10 ± 4.33
CHAPS ^e	0.25 %	78.05 ± 4.98
Hydrogen peroxide ^b	5 mM	50.27 ± 0.96
Sodium perborate ^c	5 mM	98.05 ± 0.48
β-mercaptoethanol ^f	5 mM	153.05 ± 1.92
EDTA ^d	5 mM	49.64 ± 4.21
EGTA ^d	5 mM	21.22 ± 4.09

CSB40 유래 Xylanase의 다른 물질 첨가에 따른 활성 분석

Reagents	Concentration	Relative activity (%) ^a
Ca ²⁺	5 mM	78.6 ± 0.034
Mg ²⁺	5 mM	11.8 ± 0.007
Co ²⁺	5 mM	123.0 ± 0.086
Cu ²⁺	5 mM	82.8 ± 0.051
Ni ²⁺	5 mM	33.2 ± 0.008
Zn ²⁺	5 mM	28.5 ± 0.009
Mn ²⁺	5 mM	116.1 ± 0.027
Fe ²⁺	5 mM	57.2 ± 0.040
Ba ²⁺	5 mM	65.2 ± 0.008
Na ⁺	5.00% (w/v)	111.5 ± 0.027
K ⁺	5.00% (w/v)	125.6 ± 0.103
Hydrogen peroxide ^{a)}	5 mM	55.3 ± 0.010
Sodium Perborate ^{a)}	5 mM	67.8 ± 0.041
Beta-mercaptoethanol ^{b)}	5 mM	66.8 ± 0.048
EDTA ^{c)}	5 mM	5.3 ± 0.005
EGTA ^{c)}	5 mM	6.5 ± 0.006
Triton X-100 ^{d)}	0.25% (v/v)	59.1 ± 0.009
Tween-20 ^{d)}	0.25% (v/v)	67.6 ± 0.011
Tween-80 ^{d)}	0.25% (v/v)	67.5 ± 0.013
Deoxycholic acid ^{d)}	0.25% (v/v)	79.6 ± 0.014
SDS ^{d)}	0.25% (w/v)	73.2 ± 0.014
CHAPS ^{d)}	0.25% (w/v)	83.8 ± 0.034
Acetone	2.50% (v/v)	112.7 ± 0.058
Chloroform	2.50% (v/v)	103.2 ± 0.028
Dimethyl sulfoxide	2.50% (v/v)	103.7 ± 0.022
Methanol	2.50% (v/v)	104.3 ± 0.027
Ethanol	2.50% (v/v)	114.9 ± 0.017
2-propanol	2.50% (v/v)	110.2 ± 0.028
1-Butanol	2.50% (v/v)	111.1 ± 0.021
Toluene	2.50% (v/v)	112.4 ± 0.055
DiEthyl ether	2.50% (v/v)	117.1 ± 0.083
Tri chloroacetic acid	2.50% (v/v)	5.4 ± 0.007

CSB31 유래 Mannanase의 효소학적 활성 분석

Reagents	Concentration	Type of ion	Relative activity (%) ^a
Triton X-100	0.25 %	Non-ionic	110 ± 2.5
Tween-20	0.25 %	Non-ionic	115 ± 1.9
Tween-80	0.25 %	Non-ionic	116 ± 4.4
Polyoxyethylene-4-laurylether	0.25 %	Non-ionic	82 ± 3.9
Deoxycholic acid	0.25 %	Anionic	84 ± 2.1
Sodium dodecyl sulfate	0.25 %	Anionic	52 ± 3.1
CHAPS	0.25 %	Zwitter ionic	59 ± 2.5
Hydrogen peroxide	5 mM		7 ± 4.1
Sodium perborate	5 mM		2 ± 4.8
β-Mercaptoethanol	5 mM		101 ± 2.2
EDTA	1 mM		8 ± 3.2
EGTA	1 mM		5 ± 2.3
Ca ²⁺	1 mM		209 ± 1.5
Mg ²⁺	1 mM		115 ± 2.4
Cu ²⁺	1 mM		3 ± 1.4
Co ²⁺	1 mM		172 ± 2.6
Zn ²⁺	1 mM		24 ± 1.5
K ⁺	1 mM		137 ± 1.1
Na ⁺	1 mM		124 ± 2.1
Mn ²⁺	1 mM		99 ± 2.4
Fe ²⁺	1 mM		107 ± 4.1
None	-		100 ± 3.5

^a The results presented are the averages of three separate determinations (n = 3) ± SD

CSB428 유래 Mannanase의 효소학적 활성 분석

나. 후보 기능성 효소의 scale-up 및 대량생산 조건 최적화 연구

1) lab scale에서의 발효조건 최적화

- 생산 최적조건 파악 : flask 배양을 위하여 최적 배지성분의 검토를 위하여 효소의 생산능이 우수한 탄소원의 선정은 기본배지에 각종의 탄소원(D(-))을 1%(w/v)씩 첨가하고 NO활성을 측정하여 선정하며, 질소원은 각종의 유기질소원과 무기질소원으로 부터 효소활성을 측정하여 선정함.
- 1L baffled flask에서의 결정된 최적발효 조건을 바탕으로 산업적인 규모의 배양을 위해 7L Fermentor에서 최대생산조건을 조사하고, 세포의 성장과 효소 생산성에 미치는 영향을 조사하여 발효조에서의 최적발효조건을 결정함.

2) 중대형 발효조에서의 효소의 최적 생산조건 확립 및 시제품 생산

- 50L 발효조에서 대상 미생물을 최적 배지, 최적 발효 조건하에서 배양함. 배양 시 적절한 산소공급 및 교반을 하고, 시간별로 시료를 확보하여 각각의 xylanase, mannanase, glucanase, chitinase, pectinase 활성이 가장 뛰어난 조건을 탐색하며, pH 변화 및 균체수를 모니터링 함.
- 발효조 배양과 동결건조를 통하여 얻어진 각각의 효소를 적정 비율로 배합하고 적정한 부형제를 섞어, 동물 시험에 적용할 시제품의 최적 생산을 위한 연구를 진행함.

다. 후보 기능성효소의 육계 혼합급여를 통한 기능성 및 특성 평가

1) 공시동물 및 사양관리

- 공시 동물은 1일령 Ross 종 육계 125수를 공시하여 처리당 25수씩 임의배치함.
- 5개 처리구는 대조구(Control) 와 효소 4처리 (0.5MXG, 1.0 MXG, 2.0 MXG, 1.0G).
- 병아리 입식 후 1주일간 적응기간을 거친 후 2주째부터 효소를 육계용 시판사료에 첨가 급여하고 온도는 입식당일(1일령) 34℃ 부터 1주일 단위로 2℃씩 낮추어서 26℃를 유지함. 습도는 60%, 점등은 18시간 유지함.

Table1. The component of former and latter period broiler feeding

Component	Items	Former Period of Broiler Feed (C)	Latter Period of Broiler Feed (P)
Moisture(%)		11.37	11.62
Crude Protein(%)		21.25	19.13
Crude Fat(%)		5.06	5.51
Crude Fiber(%)		2.71	2.95
Crude Ash(%)		5.51	5.62
Ca(%)		1.12	0.94
P(%)		0.67	0.55
Methionine+ Cysteine(%)		0.95	0.81
Aflatoxin(ppb ¹)		0.00	0.65
Ochratoxin A(ppb)		1.50	1.20

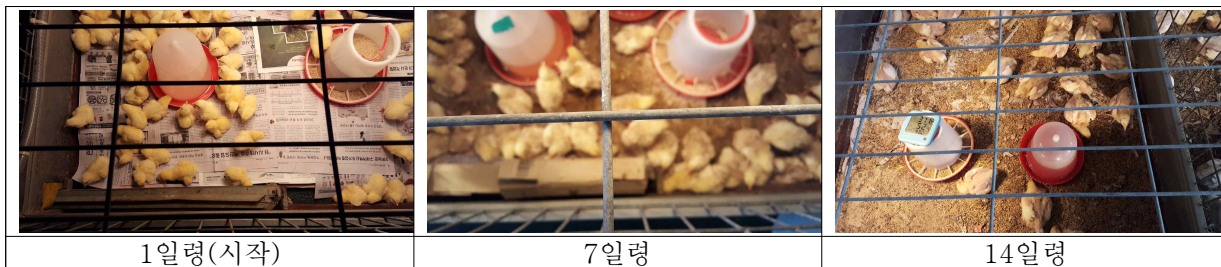


Figure 1. Feeding of Ross broiler on 1, 7 and 14 days.



Figure 2. Feeding of Ross broiler on 22, 26, and 34 days.

2) 기능성효소 배합

- 효소제는 Mannanase(200U/kg), Xylanase(1,000U/kg), Glucanase(500U/kg) 첨가제로 사료내 첨가수준은 3가지 효소제를 혼합하여 0.5MXG, 1.0MXG, 2.0MXG 과 단독으로 1.0G을 급여함.

Table 1. Enzyme sources and addition level in feed for broiler chicken.

Enzymes	Sources	Feed Add
Mannanase	18.6만 U/kg	200 U/kg
Xylanase	8.2만 U/kg	1,000 U/kg
Glucanase	3.4만 U/kg	500 U/kg

* Control : Commercial diet, MXG : Mannanase + Xylanase + Glucanase, G: Glucanase

3) 생산성 및 생산지수

- 사료섭취량은 급여량에서 남은 사료량을 측정하여 일 2회 반복 실시하였으며, 체중은 개체별로 1주일 단위로 측정함. 증체량은 실험종료시 체중에서 입주시 체중을 뺀 값으로 측정하였으며 사료 효율과 사료요구량은 사료섭취량과 증체량을 토대로 산출함.
- 육성률은 실험기간동안 생존율을 나타낸 것이며 생산지수는 평균생체중, 육성률, 사육기간과 사료요구율을 토대로 산출함.

사료효율 = 증가체중/사료섭취량

사료요구율 = 사료섭취량/증체량

육성률 = 생존 마리 수 / 입식 마리 수 × 100

생산지수(PN) = [[평균생체중(g) x 육성률(%)] ÷ [사육기간(일) x 사료요구율]] ÷ 10

Table 2. The effect of mannanase, xylanase and glucanase addition on feed consumption and daily gain of broiler chicken.

Treatment \ item	Weight (g)	Feed Consumption (g)	Weight Gain(g)	Daily Gain(g)
Control	2302	4916	2197	41.45
0.5 MXG	2425	4639	2279	43.01
1.0 MXG	2367	5007	2224	41.96
2.0 MXG	2531	4979	2379	44.89
1.0 G	2378	5223	2231	42.09

- 체중, 사료섭취량, 및 일당증체량은 대조구에 비하여 MXG 효소 처리구에서 모두 높게 나타났으나 통계적인 유의차는 보이지 않음. 2.0 MXG 급여구에서 가장높은 44.89g을 나타냄.

Table 3. The effect of mannanase, xylanase and glucanase addition on productivity of broiler chicken.

treatment \ item	Feed Efficiency	Feed Requirement	Rate of Raising(%)	Production Index
Control	0.447	2.238	95	184.4b
0.5 MXG	0.491	2.036	100	224.8d
1.0 MXG	0.444	2.251	100	198.4c
2.0 MXG	0.478	2.093	85	194.0c
1.0 G	0.427	2.341	90	172.5a

- 혼합효소 MXG 급여에 의하여 사료효율은 대조구에 비하여 0.5 MXG 와 2.0 MXG 급여구에서 높았으나 통계적인 유의차는 나타나지 않음.
- 결과적으로 생산성 지수는 1.0G 급여구를 제외하고 대조구의 생산성 지수에 비하여 모든 MXG 급여구에서 유의적으로 높게 나타남. 또한 갯벌 미생물 유래 단백질 분해효소를 육계에 급여한 결과 육계의 생산성이 유의적으로 증가함.

4) 장기무게 및 맹장내용물 추출

- 실험 종료 후 처리구별로 5수씩 경추 탈골법으로 희생시킨 후 간, 선위 근위, 심장, 십이지장, 소장, 맹장, 직장을 분리시킨 후 멸균증류수로 세척하여 미세저울을 이용해 장기별로 무게를 측정.
- 맹장내용물은 도체에서 맹장을 분리시킨 후 맹장 내 들어있는 내용물 전부를 튜브에 담고 그중 1g씩 취함.

Table 4. The effect of mannanase, xylanase and glucanase addition on internal organs weight of broiler chicken.

treatment \ item	Carcass (g)	Liver (g)	Glandular Stomach (g)	Muscular Stomach (g)	Cardiac (g)
Control	1968±50	70a±8	11±1	43±1	13±1
0.5 MXG	2219±41	62b±4	13±1	60±6	14±2
1.0 MXG	1993±21	51c±1	11±1	52±10	14±0
2.0 MXG	2127±51	52c±0	13±1	48±4	15±3
1.0 G	2184±76	58b±6	11±1	44±2	16±4

- 도체중, 근위, 심장의 무게는 대조구에 대비 효소 첨가구에서 높게 측정되었으며, 이는 도체중의 증가에 대한 영향으로 보임. 간장의 무게는 대조구에 비하여 처리구에서 유의적으로 낮게 측정됨.

Table 5. The effect of mannanase, xylanase and glucanase addition on intestine weight of broiler chicken.

treatment \ item	Small Intestine (g)	Appendix (g)	Rectum (g)
Control	63±5	12±2	2±0
0.5 MXG	69±3	19±1	3±1
1.0 MXG	73±3	23±1	3±1
2.0 MXG	60±0	11±1	2±0
1.0 G	65±7	15±3	4±0

- 효소 첨가 급여에 따른 소장, 맹장, 직장의 무게는 대조구에 대비 유의적인 차이를 보이지 않음.

5) Total Bacteria, E. Coli, and Salmonella

- 배지는 일반세균과 대장균에 각각 3M Petrifilm AC, 3M Petrifilm EC를 사용함.
- 일반세균의 경우 30~300cfu 판독범위 내 집락 중 붉은 집락만 체크하고, 대장균의 경우 15~150cfu 판독범위 내 집락 중 붉은 집락(대장균)과 푸른 집락(대장균)의 주위에 기포를 형성하고 있는 집락만 체크하여 그 집락수에 희석배수를 곱하여 세균수(CFU/g)를 측정함.
- 맹장내용물을 이용한 일반세균 및 대장균 검출은 맹장 내 내용물을 양쪽 다 채취하여 혼합한 뒤 각 균주의 선택용 배지에 분주하여 35±1℃에서 24~48시간 배양하여 각각의 선택배지에서 생육한 미생물 수는 시료 g당 Colony forming unit(CFU)로 나타냄.

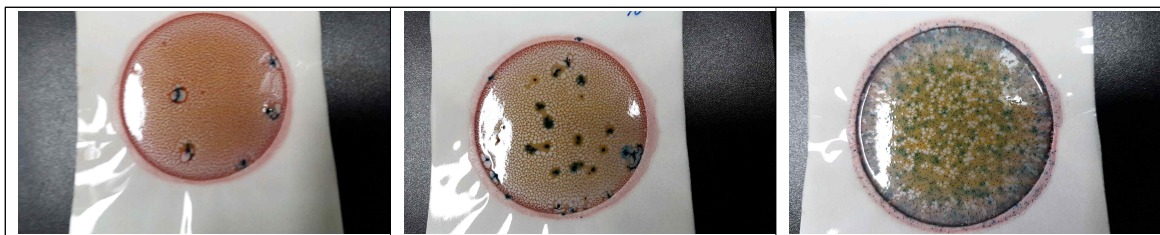


Figure 5. Culture plates of E.Coli after 48 hours of inoculation from intestine contents of broiler chicken.

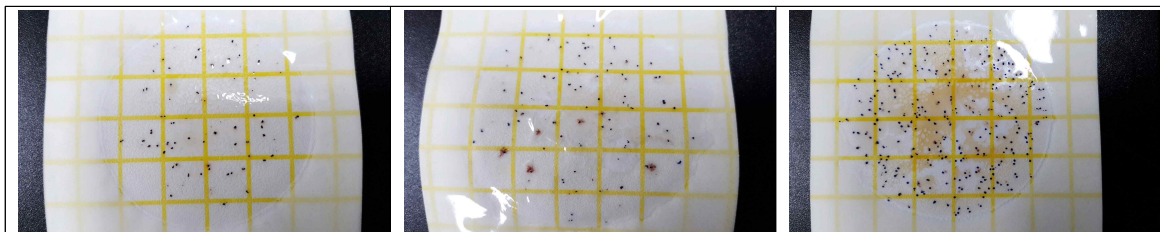


Figure 6. Culture plates of total bacteria after 48 hours of inoculation from intestine contents of broiler chicken.

Table 6. The effect of mannanase, xylanase and glucanase addition on bacteria and E.Coli in intestinal contents of broiler chicken.

Treatment	Items	total Bacteria (x10 ⁷ CFU/g)	E. coli (x10 ⁵ CFU/g)	Salmonella (CFU/g)
Control		12.40a±1.26	8.28±2.06	7.36±0.57
0.5 MXG		9.04ab±0.96	7.18±1.86	5.93±0.71
1.0 MXG		10.68a±2.17	5.25±1.40	6.78±0.27
2.0 MXG		6.36c±0.27	4.07±2.21	4.20±0.36
1.0 G		8.29b±1.30	6.33±3.63	6.18±1.14

- 장내 전체 세균수는 대조구에 비하여 효소 첨가구(MXG)에서 유의적으로 감소함.
- E. Coli 와 Salmonella는 모두 대조구에 비하여 효소 급여구(MXG)에서 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의차는 나타나지 않음. 결과적으로 효소(MXG) 급여에 의하여 육계의 장내 유해 미생물의 숫자는 줄어들고, 유익균들은 늘어날 수 있음.

6) 혈액 분석

- 혈액 내 분석성분은 혈액자동분석기를 이용하여 HDL과 LDL-cholesterol, 포도당 농에서 흡광도를 측정함.

Table 7. Effect of MXG enzymes on total protein and BUN concentration in blood of broilers.

Treatment	Items	Total Protein (g/dL)	BUN (mg/dL)	IgG (mg/ml)
Control		3.28±0.27	1.84±0.12	11.26a±0.37
0.5 MXG		4.08±0.24	1.05±0.09	13.27ab±1.62
1.0 MXG		3.73±0.84	1.25±0.11	15.92b±1.93
2.0 MXG		4.16±0.31	1.29±0.24	21.63c±2.12
1.0 G		5.05±1.18	1.63±0.08	10.05a±1.82

- 혈액내 total protein 과 혈중요소태질소(BUN) 함량은 변화가 없음.
- 면역 단백질인 IgG 농도는 대조구에 비하여 MXG 혼합 급여구에서 유의적으로 높음.

Table 8. Effect of enzymes on chelesterol, LDH, and glucose concentration in blood of broilers

Treatment	Items	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol	LDH	Glucose
Control		134.7a±4.64	122.6±4.27	815.0±74.2	225.1±27.3
0.5 MXG		146.2b±3.03	114.5±6.28	725.8±56.0	231.6±12.5
1.0 MXG		153.2b±5.11	112.8±5.16	901.5±63.1	241.6±25.1
2.0 MXG		158.3bc±3.91	118.9±3.76	883.8±81.0	229.8±15.4
1.0 G		155.8b±4.03	123.1±6.10	735.2±70.0	215.9±22.5

- MXG 효소 급여에 의하여 혈중 LDH 와 glucose 농도는 변화가 나타나지 않음.
- MXG 급여구에서 대조구에 비하여 혈중 HDL-cholesterol은 유의적으로 증가함.
- LDL-cholesterol은 비록 통계적인 차이는 나타나지 않았지만 대조구에 비하여 MXG 급여구에서 낮게 측정됨. 결과적으로 혈중에 높은 HDL과 낮은 LDL 농도는 건강한 육계와 양질의 계육을 생산할 수 있음.

7) ND 와 IBD에 대한 항체 역가측정

- 뉴캐슬병 (Newcastle disease, ND)과 전염성 낭병(Infectious Bursal disease, IBD)에 대한 백신을 혼합하여 시험동물 모두에 음용 투여하였으며, ELISA 방법으로 역가를 측정함.
- ND 와 IBD를 각각 coating buffer (1ug/ml) 100uL 씩 96 well plate를 상온에서 12시간 coating 시켰다. PBS-Tween 20 buffer (0.05% Tween 20) 로 plate를 3회 세척한후, 5% BSA 용액으로 37℃ 에서 1시간 blocking 시킨다음 다시 세척함. ABTS 기질용액을 각 well에 분주하고 37℃에서 30분간 반응 시킨후 ELISA reader 로 405 nm 에서 흡광도를 측정함.

Table 9. The effects of dietary mixture on the antibody titer against of Newcastle disease(ND) and infectious bursal disease(IBD) in broiler chicks' serum

Treatment \ Items	Anti-ND Ab titer (x10 ⁴)	Anti-IBD Ab titer (x10 ⁴)
Control	12.84±3.02	11.74±4.01
0.5 MXG	13.17±2.86	13.53±3.88
1.0 MXG	15.83±4.15	14.28±5.19
2.0 MXG	14.56±3.34	15.20±3.25
1.0 G	13.94±2.71	14.06±2.93

- 혈중 ND 와 IBD 항체는 대조구에 비하여 MXG 급여구에서 높게 유지되었으나 통계적인 유의차는 나타나지 않음.
- 효소제 급여는 항체의 역가를 유지하여 육계의 ND 와 IBD에 대한 면역력을 높여서 질병에 대한 항병력을 높일 수 있음.

라. 후보 기능성효소의 육계 혼합급여를 통한 독성 및 안전성 평가

1) 낮은 유해성이 입증된 효소 생산 균주 사용

- 후보 기능성효소의 생산을 위해 사용하는 미생물은 식품의약품안전처를 통해 인체 및 동물 급여시 안전성이 입증된 미생물 균주를 사용함으로써 1차적으로 미생물을 활용한 기능성 효소 적용의 안전성을 확보함.

[표 1] 국내에서 시판이 가능한 미생물

구분	포함되는 미생물
유익균 <i>Lactobacillus</i>	락토바실러스 락티스, 락토바실러스 루데리, 락토바실러스 불가리쿠스, 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 살리바리우스, 락토바실러스 애시도필러스, 락토바실러스 카제이, 락토바실러스 커바투스, 락토바실러스 크리스파투스, 락토바실러스 파라카제, 락토바실러스 퍼멘텀, 락토바실러스 페롤렌스, 락토바실러스 프란타럼, 락토바실러스 헬베티쿠스
유익균 <i>Bacillus</i>	바실러스 켄투스, 바실러스 리체니포미스, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 세레우스(도요이에 한함), 바실러스 코아글란스, 바실러스 클라우지, 바실러스 폴리프멘티쿠스, 바실러스 푸밀루스
유익균 <i>Bifidobacterium</i>	비피도박테리움 롱검, 비피도박테리움 비피덤, 비피도박테리움 서모필럼, 비피도박테리움 인판티스
유익균 기타	로돕슈도모나스 캡슐레이타, 모나스커스 퍼퓨리어스, 엔테로코커스 락티스, 엔테로코커스 써오필러스, 엔테로코커스 웨시엄, 클로스트리듐 브리티컬럼, 페디오코커스 세레비지아, 페디오코커스 애시디락티시, 페디오코커스 펜토사세우스
유익곰팡이	아스퍼질러스 나이거, 아스퍼질러스 오리제
유익효모	맥주효모, 양조효모, 잔토피로마이세스 덴드로하우스, 제빵효모, 조사건조효모, 토롤라효모, 피키아 파리노사, 효모배양물
박테리오파지 <i>Bacteriophage</i>	살모넬라 갈리나룸 박테리오파지, 살모넬라 엔테라이티디스 박테리오파지, 살모넬라 티피유리움 박테리오파지, 클로스트리듐 퍼프린젠스 박테리오파지

2) 기능성 효소의 육계 급여시험을 통한 안전성 및 독성 평가

- 기능성 효소를 혼합하여 육계를 대상으로 하는 급여시험 기간 동안 육계의 폐사 사례는 발생하지 않았음.
- 또한 급여시험 기간동안 육계의 질병은 발생하지 않았으며 급여시험 이후 희생시킨 육계의 경우 기능성 효소제제를 급여한 동물의 장내 유익균은 증가함을 보임으로써 독성으로부터 안전함을 입증하였음.

3-3. 연구개발 성과

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	게재일	비고
1	A novel antioxidant peptide, purified from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , showed strong antioxidant potential via Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression	Food Chemistry	Md. Saifur Rahman	2018.01	SCI
2	Glycin-rich antimicrobial peptide YD1 from <i>B. amyloliquefaciens</i> , induced morphological alteration in and showed affinity for plasmid DNA of <i>E. coli</i>	Md. Saifur Rahman	AMB Express	2017.12	SCI
3	Antimicrobial Peptide from <i>Bacillus</i> Strain K1R Exhibits Ameliorative Potential Against Vancomycin-Resistant <i>Enterococcus</i> Group of Organisms	International Journal of Peptide Research and Therapeutics	Sandesh Panthi	2017.12	SCI
4	A novel multifunctional peptide oligomer of bacitracin with possible bioindustrial and therapeutic applications from a Korean foodsource <i>Bacillus</i> strain	Plos One	Yun Hee Choi	2017.11	SCI
5	Prospects for Bio-Industrial Application of an Extremely Alkaline Mannanase From <i>Bacillus subtilis</i> sub sp. <i>inaquosorum</i> CSB31	Biotechnology Journal	Sudip Regmi	2017.11	SCI
6	Antimicrobial peptide from <i>Bacillus subtilis</i> CSB138: characterization, killing kinetics, and synergistic potency	International Microbiology	Sudip Regmi	2017.03	SCI
7	Antimicrobial peptide isolated from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> K14 revitalizes its use in combinatorial drug therapy	Folia Microbiol	Sudip Regmi	2017.03	SCI
8	A multi-tolerant low molecular weight mannanase from <i>Bacillus</i> sp. CSB39 and its compatibility as an industrial biocatalyst	Enzyme and Microbial Technology	Sudip Regmi, Pradeep G.C.	2016.10	SCI
9	An extremely alkaline mannanase from <i>Streptomyces</i> sp. CS428 hydrolyzes galactomannan producing series of mannooligosaccharides	World Journal of Microbiology and Biotechnology	Pradeep G.C.	2016.05	SCI
10	Antimicrobial and Antioxidant Peptide from <i>Bacillus</i> Strain CBS731 isolated from Korean Food	Miri Kim	J. Chosun Natural Sci.	2017.10	비SCI

나. 학술대회발표

No	발표제목	회의명칭	발표자	발표일시
1	Purification, characterization of mannanase from <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> CSB31 isolated from fermented food Kimchi.	2016 Spring Interantional Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	Regmi Sudip	2016-04-18
2	Pectinolytic enzyme screening and production from <i>Bacillus</i> strains isolated from Korean fermented food.	2016 Interantional Symposium and Annual Meeting of The KSABC	Md.Saifur Rahman	2016-06-18
3	Identification and characterization of a novel pectinolytic enzyme CBS 31 produced by <i>Bacillus subtilis</i> isolated from fermented vegetable	2016 KSBB Fall Meeting and International Symposium	Md.Saifur Rahman	2016-10-14
4	Section of pectinolytic enzyme producing strains isolated from Korean fermented food and characterization potential pectinases.	2016 KSBB Fall Meeting and Interantional Symposium	Md.Maruf Khan	2016-10-14
5	A newly purified an extremely alkaline pectinolytic enzyme CBS 32 from <i>Bacillus</i> strain.	Interantional Conference on 70th Anniversary of The Pharmaceutical Society of Korea	Md.Saifur Rahman	2016-10-19
6	Endo- β -glucanase from Kimchi with high catalytic activity as a candidate for future bio-industrial enzyme.	2017 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	Regmi Sudip	2017. 10. 19
7	A novel alkaline pectinolytic enzyme PE3 Purified from <i>Bacillus paralicheniformis</i> CBS3 Exhibits Efficient activity for Pectin Degradion.	2017 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	Md.Maruf Khan	2017. 10. 19
8	Partial Purification and Characterization of an extremely alkaline thermotolerant pectinase from <i>Bacillus glycinifermentans</i> CSB17 isolated from Korean fermented food.	2017 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	Md.Maruf Khan	2017. 10. 19
9	β -glucanase from <i>Bacillus</i> sp. CSB34: Screening, Production, Partial Purification and Biochemical Characterization.	2017 Fall International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	Regmi Sudip	2017. 10. 19
10	β -glucanase from <i>Bacillus</i> sp. CSB55 : prospects for bio-industrial applications	2017 International Convention of Microbiology & Biotechnology	Regmi Sudip	2017.06.28.
11	A Novel alkaline pectinase PN32 purified from <i>Bacillus paralicheniformis</i> CBS32 exgibits efficient for degumming ramie and pectin degradation	2017 International Convention of Microbiology & Biotechnology	Md.Maruf Khan	2017.06.28.
12	Partial purification and characterization of pectinolytic enzyme from <i>Bacillus glycinifermentans</i>	2017 Spring International Convention of The Pharmaceutical Society of Korea	Md.Maruf Khan	2017.04.20.

다. 특허성과 : 출원 / 등록

No	구분	지식재산권 등 명칭	국 명	출원			등 록	
				출원인	출원일	출원번호	등록일	등록 번호
1	등록	스트렙토마이세스 아놀라투스 CS242 유래의 항진균, 생분해성 키틴나아제 및 그의 용도	대한민국	조선대학교 산학협력단	2016.09.05	10-2016-0113690	2017.09.14	10-1780234
2	등록	한국 전통 발효 식품인 김치로부터 분리한 바실러스 셉틸리스 CSB31 유래의 극 알칼리성 만산 분해효소	대한민국	조선대학교 산학협력단	2016.09.05	10-2016-0113693	2017.09.14	10-1780229
3	출원	바실러스 속 균주 CSB40 유래의 저분자량 자일란분해효소 및 그의 용도	대한민국	조선대학교 산학협력단	2016.05.27	10-2016-0065920		
4	출원	바실러스 아밀로리퀴파시엔스 K14로부터 단리된 신규 항균 펩타이드 및 그의 용도	대한민국	조선대학교 산학협력단	2016.11.25	10-2016-0157873		
5	출원	신규한 바실러스 테퀴렌시스 균주 유래의 항균성 펩타이드 및 그의 용도	대한민국	조선대학교 산학협력단	2016.11.25	10-2016-0157878		

라. 기술이전

기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시대상기관	계약기간	기술료
기술이전	바실러스 속 세균이 생산하는 난분해성 비전분계 탄수화물을 분해하는 자일라네이즈 효소제제	대한뉴팜(주)	2017.05.02. ~ 2027.05.01	5,000,000원

마. 생물자원기탁

No	생물자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> YD1	KCTC18507P	한국생명공학연구원	2016

바. 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	석사급연구원	2016		2			1	1				1	1
2	석사급연구원	2017		1			1					1	
3	박사급연구원	2016	1				1					1	
4	박사급연구원	2017		2			2						2

No	분류	인력양성	인력양성년도	성과 기여율
1	석사	김미리	2016	100%
2	석사	판띠 산데쉬	2016	100%
3	박사	신지훈	2016	100%
4	석사	김용균	2017	100%
5	박사	라흐만 사이피	2017	100%
6	박사	레그미 수딕	2017	100%

3-4. 연구결과

가. 기술적 성과

- 과제수행결과 xylanase 생산균주로서 CSB40, mannanase 생산 균주로서 CSB24, CSB31, CSB39, chitinase 생산균주로서 CS242, glucanase 생산균주로서 CSB34, CSB55, pectinase 생산균주로서 CSB32, CBS3, CBS31, CBS17등 고효성 비전분성 탄수화물 분해효소 11건 이상을 확보함.
- 이 중 chitinase 생산균주인 CS242, mannanase 생산균주인 CSB31은 각각의 substract를 분해하는데 매우 우수한 활성을 보였으며, 이를 바탕으로 2건의 특허등록을 완료하였음.
- Xylanase생산균주인 CSB40은 과제수행 1차년도에 특허출원이 완료되었으며 해당 기술을 바탕으로 2차년도에 1건의 기술이전 실시를 완료하였음.
- 이 외에도 연구과정에서 확보한 2건의 미생물 균주에 대해서도 특허출원을 완료함으로써 높은 기술적 가치를 인정받음.
- 또한 비전분성 탄수화물 및 우수한 활성의 식의약펩타이드 소재로써 가능성을 보여준 *Bacillus amyloliquefaciens* YD1 는 1건의 생물자원균주기탁으로 등록함으로써 향후 연구에도 활용할 계획임.
- 연구수행기간동안 mannanase 생산균주인 CSB39와 CS428, chitinase 생산균주인

CS242등은 SCI급 국제학술지에 9건, 비SCI급 국내학술지에 1건의 논문을 게재함.

- 본 연구를 종료하는 시점에서 확보한 비전분성 탄수화물의 분리 및 정제, 대량 정제 기술 등을 바탕으로 박사급 전문인력 3명, 석사급 전문인력 3명을 배출하였음.
- 본 연구를 수행하기 위해 수차례의 미생물 대량 배양 공정을 시도함으로써 원하는 예상물질의 대량 확보 및 정제기술을 확보함.
- 이는 해당 기술이 단순히 연구실 수준에서만 머무는 것이 아니라 산업 현장에도 즉시 적용이 가능한 부분으로서 대표적인 연구 성과중 하나로 주목할 수 있음.
- 미생물 제제의 제품화 기술 및 사료첨가제 제품의 품질관리 방안 또한 마련함으로써 향후 다양한 형태의 탄수화물 분해효소 및 사료 첨가용 복합소제에 대응할 수 있음.
- 현재 개발된 국내 토착 미생물이 생산하는 신규 비전분성 탄수화물 분해효소는 기존의 탄수화물 분해효소와는 다른 신규성을 띠는 물질임으로 특허 출원 및 등록을 통해 새롭고 우수한 물질로써 의미가 있음.

나. 경제적 성과

- 본 연구팀에서 개발한 신규 비전분성 탄수화물 분해효소는 사료 첨가용 및 항생제 대체물질로서 산업, 경제적 중요성 및 효과를 나타냄.
- 연구를 통해 확보한 비전분성 탄수화물 분해효소는 제작 단가에 비해서 가축의 건강, 면역력 생산성 등 효율이 뛰어나.
- 새로운 항생작용 및 동물성 성장촉진 효과가 뛰어난 천연생리활성물질 유도체 개발을 통한 국내 바이오 시장의 보호 및 수입 대체효과가 있음
- 산업용 유용미생물을 이용한 국내 발효산업의 선진화 및 농축산 산업의 발전
- 가축사료 첨가제로서 사료에 적정한 투입량은 1톤 사료당 1kg으로 적은 양을 투입하여 다양한 효과를 기대할 수 있음.
- 사료에 투입되는 제품단가도 효과에 비해 저렴한 수준임.

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

	코드번호	D-06		
<p>○ 과제수행결과 xylanase 생산균주로서 CSB40, mannanase 생산균주로서 CSB428, CSB31, CSB39, chitinase 생산균주로서 CS242, glucanase 생산균주로서 CSB34, CSB55, pectinase 생산균주로서 CSB32, CBS3, CBS31, CSB17 등 고효율 비전분성 탄수화물 분해효소 11건 이상을 확보하였음.</p> <p>○ 이 중 chitinase 생산균주인 CS242, mannanase 생산균주인 CSB31은 우수한 효능을 바탕으로 특허등록 2건을 완료하였음.(특허 제10-1780234호, 특허 제 10-1780229호)</p> <p>○ 특히 xylanase 생산균주인 CSB40은 특허출원이 완료(출원번호 제 10-2016- 0110051) 되었으며, 이를 바탕으로 기술이전1건 (바실러스 속 세균이 생산하는 난분해성 비전분계 탄수화물을 분해하는 자일라네이즈 효소제제)을 달성하였음. (성과목표 초과달성)</p> <p>○ 이 외에도 연구 과정에서 발굴한 우수한 효능의 미생물 2건에 대하여 특허 출원을 완료함으로써 연구진행 과정동안 총 3건의 특허 출원을 달성하였음. (성과목표 150% 달성)</p> <p>○ 이 외에도, 연구 가치가 있다고 판단되는 균주를 한국생명공학연구원에 1종 균주기탁을 완료하였음(<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> YD1).</p> <p>○ 또한 mannanase 생산균주 CSB39와 CS428, chitinase 생산균주인 CS242 등 연구 수행과정에서 발굴한 우수한 균주 및 비전분성 탄수화물을 바탕으로 SCI급 국제학술지에 9건의 논문을 게재하였고, 비SCI급 학술지에도 1건의 논문을 게재완료 하였음. (성과목표 200%이상 초과달성).</p> <p>○ 과제참여기간 동안 다수 국제학술대회에 참여하여서 고효율 비전분성 탄수화물 분해 효소 관련 12편을 국제학술대회 연구발표를 하였음(성과목표 200%).</p> <p>○ 과제참여기간 중 3명의 석사급 연구원 및 3명의 박사급 전문인력을 양성하였으며 해당 연구 기술을 보유하고 있는 전문인력 양성은 과제 이후에도 꾸준히 배출될 예정이다.(성과목표 초과달성)</p> <p>○ 성실한 과제수행으로 2차년도 실험예정이던 육계의 안전성 및 생산성평가에 대한 급여시험을 완료함으로써 과제 기간 중 제작한 비전분성 탄수화물 분해효소의 뛰어난 기능성 및 안전성을 확인하였음.</p>				

성과목표		사업화지표										연구기반지표							
		지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과		교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용-홍 보		기 타 (타 연구 활 용 등)
		특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료 (백만 원)	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
SC I	비 SC I																		
최종목표		3			1								5	6					
1차 년 도	목표	2		1									2	3					
	실적	3		1									2	5		3			
2차 년 도	목표	1			1	5							3	3					
	실적		2		1	5							7	1	7		3		
소 계	목표	3			1								5	6					
	실적												9	1	12		6		
합 계		3	2	1	1								9	1	12		6		

5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

가. 연구 성과 활용 방안

- 친환경 소재를 이용한 동물의학, 사료산업의 선진화 및 농축산 산업의 발전 활용 및 기여
- 미생물 대량 발효 기술 축적 및 개선
- 미생물 제제 제품화 기술 및 사료첨가제 제품의 품질관리 방안 제시
- 조사료 기능성 강화 효소제제 개발기술 확보 및 수출지향형 제제 상용화
- 국내 토착 미생물자원을 바탕으로 하는 기술 이전 실시
- 항생제 대체용 농축산업 효소제제 개발 및 관련 기술 확보
- 사료소재의 해외의존도 감소 기여
- 국내 천연 사료소재 및 개발 기술 보호

나. 참여기업의 기술 활용 및 판매 방안

- 참여기업의 기술개선 및 시제품 생산 공정 확립
- 기술이전 실시에 따른 상용화 전략 도출 및 활용

년도	내용	판매 목표
중료1차년도 (2018)	올해 말 출시목표	세계 수준의 고기능성 효소 배합제 출시
중료2차년도 (2019)	국내 출시	처리사료 : 0.2%(30000톤) 판매량 : 30톤 (120,000천원)
중료3차년도 (2020)	국내 출시 확대	처리사료 : 0.4%(60000톤) 판매량 : 50톤 (200,000천원)
중료4차년도 (2021)	국외 출시	처리사료 : 국내(150,000톤) / 국외(100,000톤) 판매량 : 250톤 (1,000,000천원)
중료5차년도 (2022)	국외 출시 확대	처리사료 : 국내(150,000톤) / 국외(600,000톤) 판매량 : 750톤 (3,000,000천원)

- 고기능성 효소제품의 국내외 시장 진출을 통한 기업 매출 증대

◆ 대한 뉴팜의 상용화 및 수출 전략



◆ 판매 목표/ 전략

- 1. 2차 년도 : 국내 only**
 - 처리 사료 : 0.2%(30,000 톤)
 - 판매량 : 30톤 (120,000천원)
- 2. 3차 년도 : 국내 only**
 - 처리 사료 : 0.5%(60,000 톤)
 - 판매량 : 60톤
- 3. 4차 년도 (과제 종료 후 1년) : 국내 + 수출**
 - 처리사료 : 국내(150,000 톤)
해외(100,000 톤)
 - 판매량 : 250톤
- 4. 5차 년도 (과제 종료 후 2년) : 국내 + 수출**
 - 처리사료 : 국내(150,000 톤)
해외(300,000 톤)
 - 판매량 : 450톤
- 5. 6차 년도 (과제 종료 후 3년) : 국내 + 수출**
 - 처리사료 : 국내(150,000 톤)
해외(600,000 톤)
 - 판매량 : 750톤 (3,000,000천원)

마케팅 전략

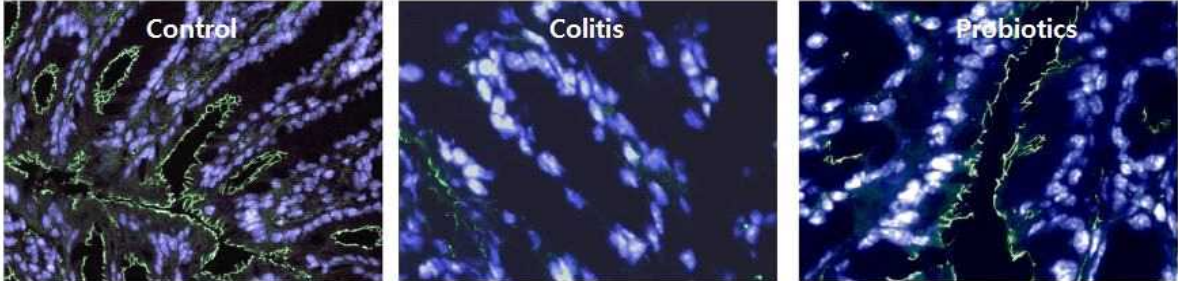
- 1. Flexible Cocktail formulation :**
곡물 종류와 사양환경에 조응하는 single 효소제를 복합
- 2. High quality & economic price**
한국의 토착 미생물로부터 엄선한 균주로서 역가가 뛰어나며, 여러 환경에서도 품질이 안정되며, 경제적으로도 우수한 효소제
- 3. 정기적 현지 방문을 통해 한국과 다른 국가의 경험 및 Know-how 전달**
- 4. 현지 권위자와의 공동시험 및 자료 Generation**

○ 고기능성 효소제품의 상용화 및 주요 수출 전략

1차 Target	2차 Target	3차 Target
◆ 국내 사료공장 1. Danisco/ 제품 사용 고객 1) 다국적기업 : Cargil, Purina 2) 해외 진출 사료공장 : 우성사료, CJ, 대한제당, 대상 등 3) 기타 사료공장 : 농협 등	◆ 해외 사료공장 - 동남아 1. Cargil, Purina(중국, 동남아, 북미) 2. 중국, 동남아 진출 한국 기업 3. CP(태국, 중국, 베트남, 말레이..) 4. 기존 대한뉴팜의 해외 거래선 적극 활용	◆ 해외 - 북미, 유럽 1. 전략적 제휴 모색



6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<p>○ 오래 전부터 미생물자원이 경제동물 생산에 이용되어 왔으며, 동물 사육 및 생산물 가공 산업의 급격한 발전과 더불어 미생물자원의 역할이 더욱 확대되고 있음.</p> <p>○ 일본에서는 <사료 첨가물 및 그 제조방법> 의 특허를 등록한 바 있음. 해당 특허는 음식물찌꺼기를 비롯하여 콘 스타치, 깻묵등을 혼합하여 원료배지를 제조하고 발효과정을 거침으로써 생균제를 제조하는 기술임. 하지만 대량 생산 및 유효물질에 대한 검증이 불확실하다는 한계점을 보이고 있음.</p> <p>○ American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver physiology에 게재된 논문에 의하면 복합미생물로 구성된 생균제를 대장염 모델의 mouse에 급여했을 때 epithelial cell의 구조를 유지함과 동시에 tight junction protein이 보호되는 효과를 보고한 바 있음.</p>		
		
<p>○ 미국은 생물자원을 이용한 바이오에너지 관련 연구를 추진하고 있는데, 특히 Zymetis는 해양 습지에서 다당류 다중 분해 미생물인 Saccharophagus degradans를 분리하여 바이오에너지 생산을 통해 높은 기업가치를 평가받고 있음.</p> <p>○ 생물연료 전문회사인 Verenium은 생물다양성을 기반으로 산업용 효소를 발굴, 생산하고 있으며 특히 바이오에탄올 등 연료산업용 효소개발에 주력하고 있음.</p>		

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 해당사항 없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

		코드번호	D-11
가. 연구실 안전관리 및 실험실 안전진단 실시			
1) 실험실 안전관리 조직도			



교육안내 Safety Education
HOME > 안전교육 > 교육안내



안전교육은 법정의무교육입니다.

각종 위험요소에 대한 정보를 제공하고 제공하고 실험실 사용에 따르는 안전성 확보 및 사고예방을 위해 **안전교육을 계획하여 실시**하고 있습니다.
미이수시 **실험실 출입제한**, 실험실 사고발생시 **보험혜택이 차등적용** 될 수 있습니다.

▶ 관련근거

- 연구실 안전환경 조성에 관한 법령 제 18조, 동법 시행령 제17조 및 동법 시행규칙 제9조
- 조선대학교 안전관리 규정 제24조(안전교육)

▶ 안전교육 대상

- **실험실을 출입하는 모든 이용자.**
(대학생, 대학원생, 등록된 연구원 및 연구보조원)

▶ 안전교육 시간 및 수료인정기간

- 출입하는 실험실의 위험등급(A,B,C등급) 및 전공특성에 따라 안전교육을 받아야 하며, **1년에 12시간 이상 교육**을 받아야 합니다.
수료인정기간은 수료종의 수료인정기간 까지입니다.
(유효기간이 지나면 안전교육을 다시 받아야 합니다.)

▶ 안전교육절차

1 교육대상자확인

>>

2 안전교육수강

>>

3 평가문제풀이

>>

4 수료증출력

실험실 출입

수료증

학과: 화학실험실
학번: 20-1234567
이름: 홍길동
교육번호: A20237021 (유료기간 2009년 12월까지)

본 시험은 본교에서 실시하는
환경안전 교육을 수료한 것으로
이제 실험실을 출입할 수 있습니다.
2009년 3월 22일
조선대학교 산학협력단장

- ※ 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리
- ※ 관리위험등급의 지정
- ※ 실험실 분류
- A등급 : 미생물 동물, 방사성동위원소 물질 등을 사용하는 실험실

B등급 : 화학약품 등을 사용하는 실험실

C등급 : 기계 전기/전자/통신 설비 등을 사용하는 실험실

D등급 : 실험 실습을 수행하지 않는 설계 컴퓨터 관련 등의 실험실

LMO 1등급 : 건강한 성인에게는 질병을 일으키지 아니하는 것으로 알려진 유전자변형생물체와 환경에 대한 위해를 일으키지 아니하는 것으로 버려진 유전자변형생물체를 개발하거나 이를 이용하는 실험실

LMO 2등급 : 사람에게 발병하더라도 치료가 용이한 질병을 일으킬 수 있는 유전자변형생물체와 환경에 방출되더라도 위해가 경미하고 치유가 용이한 유전자변형생물체를 개발하거나 이를 이용하는 실험실

LMO 3등급 : 사람에게 발병하였을 경우 증세가 심각할 수 있으나 치료가 가능한 유전자변형생물체와 환경에 방출되었을 경우 위해가 상당할 수 있으나 치유가 가능한 유전자변형생물체를 개발하거나 이를 이용하는 실험실

LMO 4등급 : 사람에게 발병하였을 경우 증세가 치명적이며 치료가 어려운 유전자변형생물체와 환경에 방출되었을 경우 위해가 막대하고 치유가 곤란한 유전자변형생물체를 개발하거나 이를 이용하는 실험실

방사선 : 방사선을 사용하는 실험실

2) 실험실 정밀안전진단 실시

- 진단목적 : 우리대학의 안전관리 활동 및 실험·실습실에 대한 분야별 안전관리상태를 점검하여 위험요인을 발견하고 연구실안전환경조성에 관한 법률 및 산업안전보건법, 각종 규정 등과 비교/분석하여 실험실에 적합한 개선대책을 수립/제시함으로써 각종 재해를 예방하고자 함
- 대상 : 조선대학교 실험·실습실 397개소
- 실시 : 2년마다 1회, 10월 ~ 12월경 실시하여 교육과학기술부에 보고

3) 실험실 정기점검 실시

- 점검목적 : 실험실 내에 발생할 수 있는 위험요소를 예측하여 보완함으로써 실험실 안전사고를 미연에 방지하고 쾌적한 연구 환경을 조성하여 연구활동종사자의 건강을 증진하고 연구성과를 높이기 위함.
- 대상 : 조선대학교 실험·실습실 397개소
- 실시 : 매년마다 1회, 10월 ~ 12월경 실시

나. 교육 훈련

- 1) 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강
- 2) 교육대상 : 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등
- 3) 교육안내 : <http://safetylabs.chosun.ac.kr/>

4) 안전교육콘텐츠 : 4개과정 20차시

- 연구활동종사자가 전공특성에 따라 차시를 선택하여 이수할 수 있도록 함

과정	차시명	세부내용
연구실안전 및 안전일반과정	연구실 안전법 및 규정	1) 일반적인 법의 이해 2) 연구실안전환경 조성에 관한 법률 3) 안전관리 규정
	연구실 관리와 MSDS	1) 연구실의 위험성 2) 안전표지 3) 물질안전 보건자료(MSDS)
	안전관 심리	1) 불안정한 행동과 불안정한 상태 2) 인간의 심리 3) 휴먼에러
	캠퍼스 안전	1) 캠퍼스 내 상해사고 발생사례 및 예방법 2) 교통안전 3) 보안
화재 및 폭발	화재 및 폭발	1) 화재의 정의, 발생원인 및 대책 2) 소화의 원리 3) 폭발정의와 원인 및 폭발의 분류 4) 폭발예방 및 방지대책 5) 정전기에 의한 화재폭발 사례
	화재로 인한 신체피해	1) 화재의 특성 2) 화재 시의 연소생성물 3) 열과 화상
	소방안전설비 사용요령	1) 소화기 2) 옥내소화전 설비
	화재 시 행동요령	1) 화재 시 행동요령 2) 응급처치 요령 3) 화재발생 후 조치사항
연구실내 위험요인	전기안전	1) 전기 안전사고 및 예방 2) 전기작업 안전수칙 3) 전기화재 예방
	가스안전	1) 가스의 분류 및 유해성 2) 가스의 안전한 취급 3) 독성가스 제독설비
	기계안전	1) 기계재해 발생원인 2) 기계설비 안전의 기본 3) 기계설비의 안전한 사용 4) 전동공구 안전
	건설안전	1) 사고사례 2) 건축/토목 실험의 위험요인 3) 안전사고예방을 위한 조치 4) 보호장비 및 사고 시 대응법
	화학안전	1) 연소와 화재 2) 소화와 대피 3) 생활화재
	화학사고 시 대응요령	1) 사고사례 2) 사고시 대응법 3) 보호장비 및 폐액처리법
	생물학안전	1) 생물학안전이란 2) 위해성평가능력이란 3) 물리적밀폐란 4) 생물안전 관리 조직 및 운영 5) 생물학 실험실 안전수칙 6) 유전자 변형 생물체란 7) LMO법이란

		8) 연구시설 운영기준 9) 소독, 멸균 및 폐기처리 10) 생물 안전 사고 및 응급처치
	사고대응 및 처리	1) 사고대응 방법 2) 보험처리
생물/방사선 안전	유해화학물질 취급 및 관리방법	1) 유해화학물질의 운반 2) 유해화학물질의 취급 시 요령 3) 유해화학물질의 성상별 취급 4) 유해화학물질의 저장
	시험연구용 LMO안전관리	1) LMO 개요 2) 바이오안전성의정서 3) LMO법 4) LMO법 시행에 따른 절차 5) LMO 운영기준 6) 폐기물 처리
	방사선 안전	1) 방사선 개요 2) 방사선 안전관리 3) 방사선 시설의 안전관리 4) 방사선 발생장치의 안전관리 5) 방사선이 인체에 미치는 영향 6) 사고시 대응법 7) 방사선 안전수칙
	사고사례	1) 환산사용에 의한 화상사고 2) 폐놀 시약용기 파열 흡입사고진 3) 열기구에 의한 과열 사고

5) 단계별 교육 이수과정

- 특별교육: 해당기관에서 자체 또는 외부의 전문기관에 의뢰하여 위탁교육 실시

다. 보험 가입 현황

보험명	보상내용	대상	주관부서
연구실 안전 공제 (교육시설재난공제회)	가입대상 :국적, 소속, 전공, 신분, 연령 등과 관계없이 조선대학교가 인진라는 연구활동종사자	피보험자	실험관리팀
	사망·질병 사망·치료 중 사망 보장한도 : 1억원	“	“
	후유장해 보장한도 : 1억원, 상해 보장한도 : 1천만원	“	“
	가입인원 : 11,327명(학부 및 대학원 : 자연,이공계)	“	“
학생단체 상해보험	상해사망, 후유장해 : 2억원 의사상자 상해위험 : 1억원 상해, 후유정도에 따른 보상 : 약관보상	학부생, 대학원생	학생지원팀
교직원 보험	상해사망, 상해후유장해 : 3천만원/인 질병사망 : 1천만원/인 암진단비 - 일반암 : 1천만원/인 - 갑상샘암,경계성종양 : 3백만원/인 - 상피내암,기타피부암 : 2백만원/인 노출중/급성심근경색 : 5백만원/인 입원비 : 2만원/1일당	정규교직원 및 계약직원	직원인사팀

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	A novel antioxidant peptide, purified from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , showed strong antioxidant potential via Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression	조선대학교	교신저자	Food Chemistry	4.529	2018.01.15	중복사사	SCI(E) 인용횟수 1회 JCR 기준 상위 4.61%
2	논문	A Novel Multifunctional Peptide Oligomer of Bacitracin with Possible Bioindustrial and Therapeutic Applications from a Korean Food-source <i>Bacillus</i> Strain	조선대학교	교신저자	Plos One	2.806	2017.05.11	중복사사	SCI(E) 인용횟수 1회 JCR 기준 상위 23%
3	논문	Prospects for Bio-Industrial Application of an Extremely Alkaline Mannanase From <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> CSB31	조선대학교	교신저자	Biotechnology Journal	3.649	2017.12.01	중복사사	SCI(E) 인용횟수 1회 JCR 기준 상위 25%
4	특허	스트렙토마이세스 아놀라투스 CS242 유래의 항진균, 생분해성 키틴나아제 및 그의 용도	조선대학교	발명자	대한민국		2017.09.14	중복사사	
5	특허	한국 전통 발효식품인 김치로부터 분리한 바실러스 섭틸리스 CSB31 유래의 극 알칼리성 만난 분해효소 및 그의 용도	조선대학교	발명자	대한민국		2017.09.14	중복사사	

11. 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
<ol style="list-style-type: none"> 1. 생명자원을 활용하는 세계 바이오산업 시장규모는 2010년 약 2,500억 달러~ [DataMonitor, 2011a 보고서] 2. 최근 농림수산식품부에서는 농생명자원을 활용한 고부가가치 소재를 개발하고~ [동향리포트, 농림수산식품기술기획평가원, 2011-08] 3. 표 1. 농림수산식품부가 선정한 10대 농생명 소재 및 정의 [농생명소재산업 국내외 시장현황 및 연구개발 동향, 농림수산식품기술기획평가원, 2012-05] 4. 표 3. 세계산업용 효소 시장 현황 [Icon Group International. 2010e] 5. 표 4. 	

[Icon Group International. 2010e]

6. 국내 산업계 전체 효소 시장은 약 1000억 원 정도로 추정되고 있으며~
[식품의약품안전처, 2017년도 수입식품등 검사연보, 2017.12]
7. 표 5. 식품 및 사료 산업에 사용되는 효소의 종류
[식품의약품안전처]
8. NSP는 유래한 소재의 종류에 따라 같은 물질임에도 다른 구조로 이루어지며~
[Bioresource Technology, 2013]
9. chitin 올리고머인 chitosan은 안전성이 우수하며~
[Advances in Food and Nutrition Research, 2014]
10. Mannan 올리고머의 경우 위장관 표면에 발현된 lectin과의~
[Cellular & Molecular Immunology 2013]
11. 농림식품부에서는 2012년 이후 항생제 내성균과 관련된~
[사료 첨가제 특허분석 보고서, 농림수산물교육문화정보원]
12. 그림. 국내의 사료첨가제 시장은 2009년 860억 원에서~
[국내 사료첨가제 시장규모, 한국동물약품협회 2011]
13. 이러한 현상을 감안하여 가축 농가의 경쟁력 확보 및~
[2017년 축종별 배합사료산업 총결산, 한국사료협회]
14. 이 외에도 최근 (주)두현에서 발효시킨 동충하초 및 발효 종균~
[충북 보은군 업체 ‘발효 동충하초 사료첨가제 개발’ 출시, 충북 뉴스통신, 2018]
15. 사료 생산 기준으로 현재까지 세계 최고 선두 사료~
[사료 첨가제 특허분석 보고서, 농림수산물교육문화정보원]
16. Alliedmarket research사에서 제작한 사료 첨가제 시장 분석보고서에 의하면~
[Report Image Global Animal Feed Additives Market, Analysis, Growth, Trends and Forecast 2013-2020]
17. 사료첨가물의 3대 시장은 미국, 유럽, 아시아이며~
[세계 사료산업 동향과 전망, 세계농업 151호]
18. 유럽은 가장 큰 시장으로 예상되는데 2012년 전세계 사료첨가제~
[한국단미사료 협회]
19. 그림. 사료첨가제 시장은 아래 표와 같이 꾸준한 성장세를 보이고 있음.
[All about Feed Magazine, Market and Markets]
20. 그림. 전세계 사료첨가용 효소제 매출 동향
[Frost & Sullivan 2010, Leading research center]
21. 그림. 전세계 사료첨가용 효소제 시장
[Frost & Sullivan 2010, Leading research center]
22. 표. 기업별 효소 사료첨가제 시장(US 2009)
[U.S. Digestive Ingredients in Animal Feed Market, 2010 Frost & Sullivan]
23. 그림. 세계 생균제 시장 동향
[U.S. Digestive Ingredients in Animal Feed Market, 2010 Frost & Sullivan]

<별첨작성 양식>

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용				
	(영문) Development and applications of NSP (non-starch polysaccharides) degrading enzyme from domestic microorganisms				
주관연구기관	조선대학교 산학협력단		주 관 연 구 책 임 자	(소속) 조선대학교 산학협력단	
참 여 기 업	대한뉴팜(주)			(성명)유진철	
총연구개발비 (268,000천원)	계	268,000	총 연 구 기 간	2015. 12. 18. ~ 2017. 12. 17. (2년)	
	정부출연 연구개발비	200,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	1차년도 : 12명 2차년도 : 8명
	기업부담금	68,000		내부인원	1차년도 : 12명 2차년도 : 8명
	연구기관부담금			외부인원	5
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>- 본 연구진은 2년간의 과제참여기간 동안 국내 미생물자원으로부터 우수한 활성을 보이는 탄수화물 분해효소 및 이를 생산하는 다수의 균주를 확보하였으며 이를 바탕으로 매우 높은 학문적 성과를 달성하였음. 또한 전문기업을 통한 기술이전에도 성공함으로써 사업화 진행시 상당한 경제적 파급효과가 기대됨.</p> <p>○ 연구내용 및 결과</p> <p>- 국내토착 미생물 자원으로부터 비전분성 탄수화물분해효소인 11종을 분리 정제 하였으며(글루카네이즈 2종, 펙티네이즈 4종, 만네이즈 3종, 자일라네이즈 1건 카이티네이즈 1건), 이 중 2건의 특허 등록 및 3건의 특허 출원 달성하였고, 10건의 비전분성 탄수화물 분해효소 관련 연구 내용을 국제학술지에 보고(SCI급 9건 포함)하였으며, 1건의 생물자원 등록 및 12건의 국제학술대회발표를 실시하였음.</p> <p>- 분리한 효소는 대량생산공정 최적화를 통한 동물사양시험용 시제품 제작에 성공하였고 몇 가지의 효소를 배합하여 육계 급여시험을 진행한 결과 안전성과 안정성이 확보된 우수한 사료첨가소재임을 증명하였음. 또한 면역력 증진을 통한 동물건강증진 기능성소재로의 응용가능성을 규명하였음.</p>					

○ 연구성과 활용실적 및 계획

- 미생물 대량 발효 기술 축적 및 개선을 통한 추가적인 기술 개발 진행
- 미생물 제제 제품화 기술 및 사료첨가제 제품의 품질관리 방안 제시
- 조사료 기능성 강화 효소제제 개발기술 확보 및 수출지향형 제제 상용화
- 국내 토착 미생물자원을 바탕으로 하는 기술 이전 실시
- 항생제 대체용 농축산업 효소제제 개발 및 관련 기술 확보
- 사료소재의 해외의존도 감소에 기여
- 국내 천연 사료소재 및 개발 기술 보호
- 육계 이외의 다른 동물모델 급여실험을 도입함으로써 안전성 및 기능성 확보

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제 현황

		코드번호	D-15		
		과제번호			
사업구분	기술사업화지원사업				
연구분야			과제구분	단위	
사업명	농생명산업기술개발사업			주관	
종관과제	기재하지 않음		총관책임자	기재하지 않음	
과제명	국내 도차 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용		과제유형	(기초,응용,개발)	
연구기관	농림수산식품기술기획평가원		연구책임자		
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2015. 12. 18 ~2016. 12. 17	100,000,000	34,000	134,000,000
	2차년도	2016. 12. 18 ~ 2017. 12. 17	100,000,000	34,000	134,000,000
	3차년도	-	-	-	-
	계		200,000,000	64,000	268,000,000
참여기업	㈜대한뉴팜				
상대국			상대국연구기관		

* 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2018. 01. 31

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
조선대학교	교수	유진철

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약 

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체 평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수)

○ 국내 토착 미생물로부터 발굴한 비전분성 탄수화물 분해효소는 육계급여실험 결과를 통해 우수성이 입증되었으며 이를 바탕으로 목표치 이상의 학문적/기술적 성과를 달성하였음. 안전성이 입증된 균주를 사용함으로써 다양한 산업분야에 적극적인 활용이 가능하므로 본 연구 결과를 토대로 마련된 기술적 성과는 높은 우수성, 창의성 및 고부가가치를 지니고 있다고 평가할 수 있음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수)

○ 본 연구를 수행하며 확보한 미생물 대량 발효 및 정제기술은 SCI급 국제학술지 논문 게재 9건 및 특허출원 3건, 등록2건 등을 포함한 우수한 학문적 파급효과를 지니고 있을 뿐만 아니라 우수한 분해활성을 바탕으로 다수의 특허출원과 유망 기업으로의 기술이전 등 훌륭한 경제적, 산업적 파급효과를 지니고 있음.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수)

○ 본 연구를 통하여 발굴한 국내 미생물자원 및 그 유래 효소는 가축에 적용하여 사료효율성 뿐만 아니라 동물건강증진 소재로서 매우 활용성이 높다고 하겠음. 또한 사양시험 결과 면역력이 높아짐을 확인하였고 이를 추후 연구와 산업에 적용함으로써 농가의 생산량 증대, 비용절감, 및 신규 식의약 소재로서의 기술이전 가능성이 기대됨.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수)

○ 본 연구진은 연구과제를 성실히 진행하여 우수한 국내 토착 균주를 확보하였고 각 균주가 만들어내는 효소들의 특성분석, 분리정제 등을 순차적으로 진행한 결과 독특한 특성을 지니면서도 우수한 효소활성을 나타내는 다양한 비전분성 탄수화물 분해효소를 확보하였으며 이에 대한 급여시험을 통하여 정성적 정량적으로 당초 계획을 웃도는 우수한 성과목표를 달성하였음.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수)

○ 연구과제 수행기간동안 SCI급 국제학술지 9편, 비SC급 학술지 1편의 성과를 거두었으며 12건의 국제학술대회발표를 완료하였음. 또한 높은 분해효소 활성을 보이는 균주 1건에 대하여 특허균주기탁 및 2건의 특허등록, 3건의 특허 출원을 달성하였으며 이를 바탕으로 1건의 기술이전 및 박사급 연구인력 3명, 석사급 연구인력 3명 이상의 전문인력을 양성함.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
국내 토착 미생물 자원에서 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 발굴	25	25	본 연구팀이 확보한 800여종의 토착 미생물을 분석하여 우수한 활성의 비전분성 탄수화물 분해효소 발굴 성공
바실러스 속 유래 비전분성 탄수화물 분해효소 포함 효소제제 개발	25	25	스크리닝한 바실러스 균주를 바탕으로 우수한 활성의 비전분성 탄수화물 분해효소 효소제제 개발 성공
산업동물실험을 통한 효소제제의 안전성 확인 및 기능성 규명	25	25	육계 급여시험을 통한 효소제제의 안전성 및 기능성 규명 완료
고기능성 효소제제 기술이전	25	25	비전분성 탄수화물 분해능이 우수한 균주를 바탕으로 고기능성 효소제제 기술이전 실시 완료
합계	100점	100점	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

○ 본 연구진은 2년간의 과제참여기간 동안 국내 미생물자원으로부터 우수한 활성을 보이는 탄수화물 분해효소 및 이를 생산하는 다수의 균주를 확보하였으며 이를 바탕으로 매우 높은 학문적 성과를 달성하였음. 또한 전문기업을 통한 기술이전에도 성공함으로써 사업화 진행시 경제적 파급효과도 상당하며 연구결과를 이용한 추가연구 진행시 향후 다양한 분야의 산업적용에도 용이한 상황임. 따라서 매우 성공적이라 평가할 수 있음.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 국내 미생물자원 기반의 우수한 비전분성 탄수화물 분해효소를 확보하였으며 육계급여실험 결과를 통해 우수성이 입증되었고 이를 바탕으로 목표치 이상의 학문적/기술적 성과를 달성하였음.
- 또한 우수한 동물시험결과를 토대로 기술이전에 성공하였으며 이는 사업화 실시 시에 매우 높은 경제적 파급효과가 기대되므로 우수한 내용으로 연구 과제를 수행하였다고 볼 수 있음.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 연구과제를 수행하면서 확보한 기술은 추후 미생물 기반 효소 연구 및 실용화, 상용화에 필수적인 기반 기술임. 이를 이용하여 다양한 비전분성 탄수화물 분해효소 특성연구를 통한 고부가가치 식의약소재를 발굴하고 상용화하는 연구를 진행할 예정임.
- 또한 미생물제제 제품화 기술 및 사료첨가제품의 품질관리 방안을 마련할 예정이며 친환경 소재를 이용한 동물의학, 사료산업의 선진화 및 농축산 산업의 발전 활용 및 기여할 예정임.
- 동물시험결과 보다 다양한 배합을 통한 제제 개발이 가능하다고 판단되며 후속연구를 통하여 세계 최고 수준의 사료 첨가용 미생물소재를 연구개발 할 예정임.
- 또한 연구과제를 수행하면서 사료효율성 뿐만 아니라 동물 면역력이 높아짐을 확인하였고 이를 추후 연구와 산업에 적용함으로써 농가의 생산량 증대, 비용절감, 및 신규 식의약 소재로서의 기술이전 가능성이 기대됨.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

- 해당사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

- 해당사항 없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	기술사업화지원사업	
연구과제명	국내 토착 미생물 유래 신규 비전분성 탄수화물 분해효소 개발 및 응용			
주관연구기관	조선대학교 산학협력단		주관연구책임자	유진철
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	200,000천원	68,000천원		268,000천원
연구개발기간	2015. 12. 18 ~ 2017. 12. 17			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input type="checkbox"/> 기타() <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과	달성도 (%)
① 보유 미생물 자원으로부터 후보 효소 도출, 정제 및 효소학적 특성 연구	보유한 미생물 라이브러리에서 탄수화물분해효소 생산 후보균주를 선정하고 이중 11종 이상의 고활성 특이적 효소 생산균주를 확보함.	100
	침전법 및 크로마토그래피법을 비롯한 단백질 분리정제 방법을 수행하여 효소 분리정제를 완료함.	100
	16s rDNA 염기서열 분석 및 효소의 pH, 온도에 대한 생화학적 특성을 파악함.	100
② 기능성 효소제제의 대량생산공정 최적화 연구 및 복합효소제제 개발	중소형 발효기를 통한 최적배양조건을 확립함.	100
	최적배양조건에 따른 대량 생산을 통하여 효소제제 단독, 복합 사용을 위한 기능성 효소제제 시제품을 개발함.	100
③ 육계 급여시험을 통한 기능성 효소제제의 기능성 평가 및 안전성 확인	기능성효소제제 3종(xylanase, mannanase, glucanase)의 혼합 급여시 사료효율성 및 생산성 향상됨을 확인	100
	투여기간 동안의 임상증상, 폐사율, 체중변화, 사료 섭취량, 혈액 검사를 수행하여 평가함	100
④ 고기능성 효소제제 기술 이전 및 제품출시	우수한 활성을 가지는 미생물 유래 비전분성 탄수화물 분해효소를 바탕으로 1건의 특허출원 및 유망기업으로의 기술이전을 완료함.	100

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	15	15		30							20	5		10		5				
최종목표	3			1	5						5			6						
연구기간 내 달성실적	3	2	1	1	5						9	1		12		6				
달성율(%)	100	초과	초과	100	100						180	초과		200		초과				

4. 핵심기술

구분	핵심 기술 명
①	국내 미생물자원 기반 유용 효소 분리정제기술 및 대량배양기술
②	분리정제한 효소의 독특하고 우수한 기능성 및 건강증진효과
③	분리정제한 각 비전분성 탄수화물 분해효소들의 최적 배합을 통한 기능성 발현

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용-유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술					v			v		
②의 기술	v					v	v	v		
③의 기술	v					v	v	v		

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	국내 미생물자원 기반의 다양한 미생물 대사체에 대한 생물자원 국가경쟁력 제고 다양한 효소에 대한 분리정제기술 활용 및 보다 저비용 고효율의 대량배양공정 확립가능
②의 기술	육계 건강기능성 뿐만 아니라 돼지나 소에 적용하여 우수한 기능성을 확보할 수 있음 분리한 다양한 효소들은 우수한 pH, 온도 안정성을 바탕으로 산업적으로 활용가능
③의 기술	각 미생물 분해효소의 배합 사용으로 단독사용보다 우수한 시너지 효과를 확인하였고 심화연구를 통하여 이전한 기술의 효과적 사업화에 활용이 기대됨

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치	15	15		30							20	5		10		5			
최종목표	3			1							5		6	6					
연구기간 내 달성실적	3	2	1	1	5						9	1	2.5	12		6			
연구종료 후 성과창출 계획		1				1	200				2			2		1		2	

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명	②난분해성 탄수화물 분해효소제제(자일라네이즈)의 우수한 기능성 및 건강증진효과		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	5,000천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	완료	실용화예상시기 ³⁾	1년 이후
기술이전시 선행조건	기술지도		

핵심기술명	③분리정제한 각 비전분성 탄수화물 분해효소들의 최적 배합을 통한 기능성 발현		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	10,000천원
이전방식	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	10개월	실용화예상시기 ³⁾	2년 이후
기술이전시 선행조건	추가연구를 통한 기술지도, 제반설비 마련 및 생산공정 확립		