

(옆면)

(앞면)

118051

-03

가
금
의
주
요
질
병
방
제
에
효
과
적
인
광
범
위
부
추
사
료
첨
가
제
의
상
품
화
활
성
함
유

2021.

06. 16

농
림
축
산
식
품
부
농
림
식
품
기
술
기
획
평
가
원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

농생명산업기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003566-01

가금의 주요 질병방제에 효과적인 광범위 항균/항SI 활성 함유 부추사료첨가제의 상품화

2021. 06. 16

주관연구기관 / 건국대학교 산학협력단

참여기관 / (주) 은진바이오

농림축산식품부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “가금의 주요 질병방제에 효과적인 광범위 항균/항AI 활성 함유 부추사료첨가제의 상품화”(개발기간 : 2018. 04. 26 ~ 2020. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 05. 03

주관연구기관명 : 건국대학교 산학협력단 (대표자) 송 창 선 (인)

참여기관명 : (주) 은진바이오 (대표자) 김 동 봉 (인)



주관연구책임자 : 건국대학교 동물자원과학과 김 수 기

참여기관책임자 : (주) 은진바이오 김 동 봉

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

보고서 요약서

과제고유번호	118051-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2020. 01. 01 ~ 2020. 12. 31.	단 계 구 분	3단계 / 3단계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	가금의 주요 질병방제에 효과적인 광범위 항균/항AI 활성 함유 부추사료첨가제의 상품화			
연구책임자	김 수 기	해당단계 참여연구원 수	총: 10 명 내부: 5 명 외부: 5 명	해당단계 연구개발비	정부: 105,000천원 민간: 35,000천원 계: 140,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 14 명 내부: 9 명 외부: 5 명	총 연구개발비	정부: 290,000천원 민간: 96,667천원 계: 386,667천원
연구기관명 및 소속부서명	건국대학교 산학협력단			참여기업명	(주) 은진바이오

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 연구과제 : 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 따라 보안등급의 필요가 없음
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요 약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록· 기탁 번호	2018.10.31	10-2019 -0135434	-	-	-	-	-	-	KACC 92270P	-	-
	2019.03										
	2019.11.26										
	2020.07.07	10-2021- 0012568									
	2020.09.06										
	2020.09.16										
	2020.11.09										

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

보고서 면수 126

1. 다기능성 부추발효물 생산을 위한 단기발효공정 확립

- 당밀 등 부산물 및 부추 자생 미생물을 활용하여 경제성을 고려한 배양액 조성물 조사
- 생리적 유효물질을 향상시키는 최적의 액상 및 고상 발효공정 확립
- 비발효 및 발효부추의 생리적 기능을 비교분석, 효과적인 사료첨가제 제형 결정

2. 발효에 따른 부추 내 생리적 유효물질 변화 조사 및 추출방법 확립

- UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS를 통한 발효 및 비발효 부추의 대사물질 비교
- 부추에 존재하는 항균, 항바이러스 등 생리적 유효물질들의 종류 정리 및 추출방법 조사

3. MDCK 세포, 종란, 마우스 및 산란계를 이용한 항바이러스 효능 검증

- In vitro 및 in vivo 실험을 통한 부추의 조류 인플루엔자 바이러스 효능 검증
- 비발효 및 발효 부추를 비교하여 효과적으로 조류 인플루엔자 바이러스를 억제시키는 사료첨가제의 형태 제시
- 바이러스를 억제시킬 수 있는 최소한의 사료첨가제 필요 농도 조사


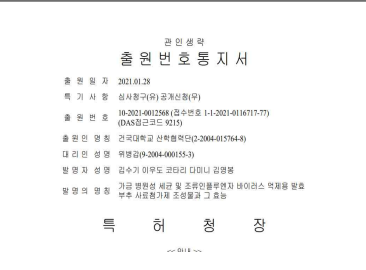
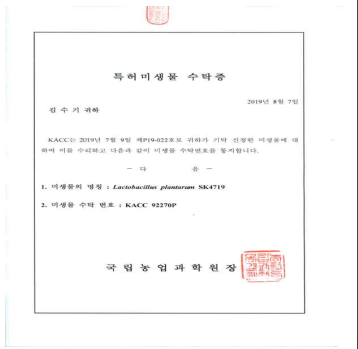

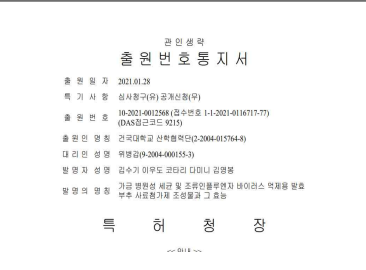
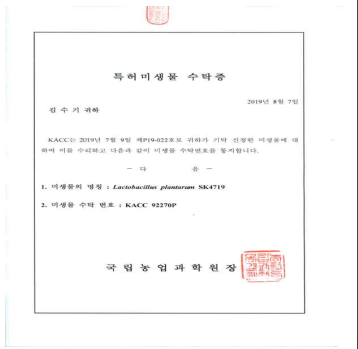

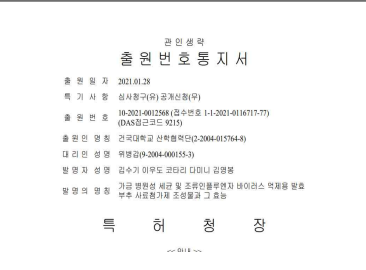
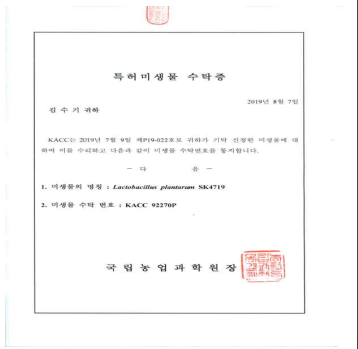
4. 가금의 사양실험을 통한 부추사료첨가제의 효능 도출

- 생산성, 폐사율 등 가금(육계, 산란계)에서의 부추사료첨가제의 효능 검증
- 비발효 및 발효부추 사료첨가제 중 효과적인 첨가제 형태 비교
- 혈액, 면역기관, 장의 특성 및 미생물 균총 등 분석을 통한 부추사료첨가제 급이 효과를 밝힘

5. 부추사료첨가제의 상품화

- 기능성 및 경제성이 고려된 부추사료첨가제의 생산공정 확립 및 제작
- 가금사양실험을 통한 부추사료첨가제의 급이 효능 검증
- 공장에서의 대량생산을 통한 시제품 제작 및 농가 보급
- 제품의 기능과 성분을 홍보할 수 있는 국문, 영문 홍보물 제작

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>목적: 가금의 주요 질병방제에 효과적인 광범위 항균/항AI 활성 함유 부추사료첨가제의 상품화</p> <p>내용: 본 연구기관은 조류인플루엔자(AI)에 대한 항바이러스 활성을 가지는 부추유래 단일물질에 대하여 국내 특허등록[1013069560000] 및 PCT출원 2011-OPA-5184]을 한 바 있음. 따라서 본 연구에서는 광범위 항균활성 및 AI활성을 가진 부추즙 및 조추출물 분획(Crude extract fraction)을 경제적으로 생산하여 사료첨가제로 상품화하여 가금의 질병을 억제하는데 기여하고자 함. 본 연구에서 제조한 시제품에 대한 가금류의 사양효과 분석 및 살모넬라 등 항균과 항AI 활성, 산란계 및 육계의 면역반응, 제품의 안전성 검증 등을 수행하여 시대적, 국가적으로 시급히 필요한 가금용 기능성사료첨가제를 생산하여 농가에 보급하고 수입대체 효과뿐만 아니라 해외수출을 반드시 달성하고자 함</p>																						
<p>연구개발성과</p>	<p>· 특허출원 : 2건</p> <table border="1" data-bbox="438 795 1428 1444"> <thead> <tr> <th>년도</th> <th>특허명</th> <th>출원번호 (출원국)</th> <th>참고자료</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2019</td> <td>부추발효물로부터 분리된 항균 활성을 갖는 락토바실러스 플라타룸 SK4719 균주 및 이를 포함하는 사료첨가제 조성물</td> <td>10-2019-0135434 (대한민국)</td> <td>  </td> </tr> <tr> <td>2021</td> <td>가금 병원성 세균 및 조류 인플루엔자 바이러스 억제용 발효부추 사료첨가제 조성물과 그 효능</td> <td>10-2021-0012568 (대한민국)</td> <td>  </td> </tr> </tbody> </table> <p>· 생명자원 등록 : 1건 (Lactobacillus plantarum SK4719, 국립농업과학원 KACC 92270)</p> <table border="1" data-bbox="438 1556 1428 1982"> <thead> <tr> <th>년도</th> <th>등록기관</th> <th>수탁 균주명</th> <th>수탁번호</th> <th>참고자료</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2019</td> <td>국립농업과학원</td> <td><i>Lactobacillus plantarum</i> SK4719</td> <td>KACC 92270P</td> <td>  </td> </tr> </tbody> </table>	년도	특허명	출원번호 (출원국)	참고자료	2019	부추발효물로부터 분리된 항균 활성을 갖는 락토바실러스 플라타룸 SK4719 균주 및 이를 포함하는 사료첨가제 조성물	10-2019-0135434 (대한민국)		2021	가금 병원성 세균 및 조류 인플루엔자 바이러스 억제용 발효부추 사료첨가제 조성물과 그 효능	10-2021-0012568 (대한민국)		년도	등록기관	수탁 균주명	수탁번호	참고자료	2019	국립농업과학원	<i>Lactobacillus plantarum</i> SK4719	KACC 92270P	
년도	특허명	출원번호 (출원국)	참고자료																				
2019	부추발효물로부터 분리된 항균 활성을 갖는 락토바실러스 플라타룸 SK4719 균주 및 이를 포함하는 사료첨가제 조성물	10-2019-0135434 (대한민국)																					
2021	가금 병원성 세균 및 조류 인플루엔자 바이러스 억제용 발효부추 사료첨가제 조성물과 그 효능	10-2021-0012568 (대한민국)																					
년도	등록기관	수탁 균주명	수탁번호	참고자료																			
2019	국립농업과학원	<i>Lactobacillus plantarum</i> SK4719	KACC 92270P																				

· 제품화 : 1건 (발효부추 사료첨가제 ‘에프씨’)



그림. 발효부추 사료첨가제 시제품 ‘에프씨’

· 논문 (SCD) : 7건 (Antioxidant 등)

연구개발성과

Open Access
 ISSN 1446-6368 (Print) 2503-5167 (Online)
 Vol. 37, No. 10, 2017 (October 2018)
<https://doi.org/10.5713/ajas.17.0803>
 pISSN 1011-2367 eISSN 1976-5517

AJAS
 Asian-Australasian Journal of Animal Sciences

Phytochemicals and antioxidant capacity of some tropical edible plants

Heek Hong¹, Jun-Hyung Lee², and Soo-Ki Kim^{1*}

Asian-Australasian journal of animal sciences (2018)

animals MDPPI

Review
The Genus *Allium* as Poultry Feed Additive: A Review

Damini Kothari¹, Woo-Do Lee², Kai-Min Niu² and Soo-Ki Kim^{1*}

¹ Department of Animal Science and Technology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea; damini149@gmail.com (D.K.); cow14@naver.com (W.-D.L.)
² Institute of Biological Resource, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330029, China; niuk@163.com
 * Correspondence: sookkim@konkuk.ac.kr; Tel.: +82-2-430-3728

Received: 4 October 2019; Accepted: 20 November 2019; Published: 26 November 2019

Animals (2019)

applied sciences MDPPI

Article
Optimization of Chinese Chive Juice as a Functional Feed Additive

Kai-Min Niu^{1,2,†}, Damini Kothari^{2,†}, Woo-Do Lee², Sangyeon Cho^{2,3}, Xin Wu^{1,4,5} and Soo-Ki Kim^{1,4,6}

Applied science (2020)

Open Access
 Anim Biosci
 Vol. 34, No. 2, 205–214 February 2021
<https://doi.org/10.5713/ab.20.0552>
 pISSN 2795-0189 eISSN 2765-0235

AB ANIMAL BIOSCIENCE

Effect of dietary supplementation of a phytogetic blend containing *Schisandra chinensis*, *Pinus densiflora*, and *Allium tuberosum* on productivity, egg quality, and health parameters in laying hens

Seung-Gyu Moon^{1,†}, Sung-Kwang Lee^{1,†}, Woo-Do Lee², Kai-Min Niu^{1,3}, Won-Uk Hwang¹, Jong-Seok Oh¹, Damini Kothari¹, and Soo-Ki Kim^{1*}

Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (2020)

Biomedicine & Pharmacotherapy 111 (2019) 537–547

Contents lists available at ScienceDirect
Biomedicine & Pharmacotherapy
 journal homepage: www.elsevier.com/locate/bp

Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review
 Damini Kothari¹, Seema Patel^{1,2}, Soo-Ki Kim^{1,3*}

¹Department of Animal Science and Technology, Konkuk University, 138 Chunggye-ro, Gwangju-si, Jeon, 61052, Republic of Korea
²Department of Medical Biopharmaceutical Science, Konkuk University, 404-1, Sejong-ro, Sejong, 30538, Korea

Biomedicine & Pharmacotherapy (2019)

antibiotics MDPPI

Article
Controlled Fermentation Using Autochthonous *Lactobacillus plantarum* Improves Antimicrobial Potential of Chinese Chives against Poultry Pathogens

Damini Kothari^{1,†}, Woo-Do Lee^{1,†}, Eun Sung Jung^{2,†}, Kai-Min Niu³, Choong Hwan Lee^{2,4*} and Soo-Ki Kim^{1,4*}

Antibiotics (2020)

antioxidants MDPPI

Review
***Allium* Flavonols: Health Benefits, Molecular Targets, and Bioavailability**

Damini Kothari, Woo-Do Lee and Soo-Ki Kim^{*}

Department of Animal Science and Technology, Konkuk University, Seoul 05029, Korea; damini149@gmail.com (D.K.); cow14@naver.com (W.-D.L.)
 * Correspondence: sookkim@konkuk.ac.kr; Tel.: +82-2-430-3728

Received: 14 August 2020; Accepted: 16 September 2020; Published: 19 September 2020

Antioxidants (2020)

연구개발성과

· 국내 · 외 학술발표 : 9건

년도	장소	학술대회명	발표명
2018	말레이시아, 쿠칭	AAAP	Effects of Supplementary Phytogenic Blend (SPA) on Productivity of Laying Hens
	한국, 중앙대학교	한국축산학회	Usage of Chicken Eggshell Powder as Probiotics Carriers
2019	한국, 경상대학교	한국축산학회	Antibacterial activity of <i>Lactobacillus plantarum</i> isolated from Chinese chives (<i>Allium tuberosum</i>) juice
	한국, 경상대학교	한국축산학회	Effects of egg shell powder on egg production, egg quality, blood composition and tibia formation as a source of calcium on laying hens
	캐나다, 퀘벡	PSA	Chinese chives (<i>Allium tuberosum</i>) fermentation using autochthonous <i>Lactobacillus plantarum</i> toward the production of antimicrobial poultry feed additive
	중국, 난징대학	The 12th Joint Rumen Metabolism and Physiology Symposium	Effect of dietary supplementation with fermented Chinese chives on the growth performance in Holstein calves
2020	한국, 경주	한국생명과학회	LC-MS/MS based metabolomic analysis of compositional changes in Chinese chives (<i>Allium tuberosum</i>) following <i>Lactobacillus plantarum</i> mediated control
	한국, e-conference	한국축산학회	Dietary supplementation of fermented Chinese chives improves the meat color and gut microbiota composition in broilers
	한국, e-conference	한국축산학회	Fermentation of Chinese chives juice using indigenous <i>Lactobacillus plantarum</i>

· 기술 및 제품홍보 : 4건 (영상, 잡지, 팸플릿 등)

http://www.bizmatch.kr/bbs/board.php?bo_table=tech&wr_id=10798&ho_id=2020ipet



그림. IPET 유망기술 영상 홍보

연구개발성과



그림. 발효부추 사료첨가제 ‘에프씨’ 홍보 팸플릿

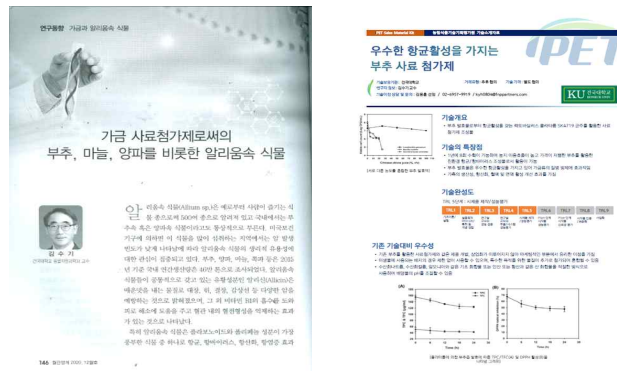


그림. 부추 첨가제 기술에 대한 잡지 원고(월간양계) 및 소개서

연구개발성과의 활용계획 (기대효과)

- 가축(가금, 양돈, 육우, 유우 등)을 위한 사료첨가제의 산업화 방향 및 기대효과
- 가축에 효과적인 발효부추 사료첨가제를 활용하여 제품 차별화에 주력
- 발효부추 사료첨가제의 효능을 증진시킬 수 있는 신소재를 계속 선택하여 차별화함
- 가축질병 예방 및 성장촉진제 등의 기술을 사용하여 차별화함
- 가축질병(호흡기, 소화기성)에 대한 탁월한 억제효과를 제품 차별화 전략으로 수립하여 상업화함
- 가축 면역력의 증진을 통하여 다양한 질병을 예방할 수 있는 다기능성 천연물질을 차별화 전략으로 수립함
- 프리미엄 기능성 사료 첨가제 제조의 독보적인 기술력 확보 및 제조공정 개발
- 신개념 발효부추의 이용 기능성 및 사료첨가제 개발로 참여기업의 매출 증대 및 국외로의 수출을 통한 국가 경쟁력 확보
- 기능성 사료첨가제 개발을 통한 국내 사료첨가제의 수입대체 효과
- 기능성 사료첨가제 개발을 통한 가축의 폐사율 저감 등 경제적인 손실 보전 기대
- 저비용 고부가가치로 효과적인 가축 사양이 가능한 새로운 사료첨가제 이용

국문핵심어 (5개 이내)	사료첨가제	부추	항균	항바이러스	가금
영문핵심어 (5개 이내)	Feed additives	Leeks(<i>Allium tuberosum</i>)	Antibacterial activity	Antiviral activity	Poultry

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

〈 목 차 〉

1장. 연구개발과제의 개요	1
1절. 연구개발 목적	1
2절. 연구개발의 필요성	1
3절. 연구개발 범위	3
가. 1차년도	3
나. 2차년도	8
다. 3차년도	12
2장. 연구수행 내용 및 결과	20
1절. 연구수행 내용	20
가. 1차년도	20
(1) 부추의 자연발효액 내 생균수 측정	20
(2) 부추의 자연발효액에서의 미생물 분리·동정	21
(3) 부추의 자연발효액에서 분리한 바실러스 균의 효소활성 측정	23
(4) 가금의 질병 유발 병원성 균에 대한 항균활성	24
(5) 부추즙의 제조형태에 따른 항균활성	27
(6) 부추즙의 비율에 따른 후보 발효 미생물의 성장	29
(7) 발효 시간에 따른 부추발효물의 TPC, TFC 및 항산화능 측정	32
(8) 열처리한 부추즙의 HPLC 분석	33
(9) Jar fermenter에서의 발효 특성	34
(10) Jar fermenter에서의 발효 시간에 따른 부추발효물의 항균활성	35
나. 2차년도	37
(1) 부추의 발효 시간에 따른 항균활성 결과	37
(2) 부추 발효, 비발효물의 저병원성 조류 인플루엔자바이러스 (H1N1)에 대한 항바이러스 활성	39
(3) 25%의 부추즙 첨가에 따른 배양액(MRS)에서의 생균수와 pH 변화 조사	43
(4) 유산균, 바실러스, 효모를 이용한 복합 사료첨가제 제조	44
(5) 물을 이용한 부추즙의 최적 혼합 비율 및 발효 시간 탐색	45
(6) 물과 15% 부추즙을 혼합한 배양액에서 생균제의 생존성 조사	46
(7) 10%의 부추즙에 첨가된 MRS 배양액 및 물에서의 유산균 성장 비교	47
(8) UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS를 이용한 부추의 발효 전후에 있어서 대사물질의 성분 비교 및 발효부추로부터의 항AI활성 유효지표물질 발굴	48
(9) 육계의 발효 및 비발효 부추 사료첨가제 급이 효과 비교	51
(10) 마우스 (SPF BALB/c)를 이용한 부추발효물의 저병원성 조류 인플루엔자바이러스 (H1N1) 사멸 효능시험	63
다. 3차년도	69
(1) 부추발효물의 생리 활성 화합물 분석	69
(2) 부추발효물의 항산화능 분석	71
(3) 부추발효물의 항균, 항바이러스 활성 분석	73
(4) LC-MS 분석을 통한 부추발효물 내 유효물질 동정	76

(5) 가금융 고상 부추사료첨가제의 최적 부추 첨가량 확립	79
(6) 산란계의 고상 부추사료첨가제 첨가급이 효과 비교	81
(7) 산란계를 이용한 발효부추의 조류 인플루엔자 바이러스 (H9N2) 억제능 평가	92
2절. 연구수행 결과	95
가. 게재 논문 (Publication)	95
나. 특허출원	96
다. 학술발표	96
라. 생명자원 등록 (미생물 기탁)	98
마. 인력양성	98
바. 고용창출	99
사. 시제품 제작	99
아. 홍보물 제작 및 홍보	99
자. 사업화성과 및 매출실적	100
3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	102
1절. 목표	102
2절. 목표 달성여부	102
3절. 목표 미달성시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)	104
4장. 연구결과의 활용 계획 등	105
붙임. 참고 문헌	107
<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서	117

〈 표 목 차 〉

표 1-2-1. 부추에서 분리한 유효 성분	2
표 1-3-1. 사용한 가금 병원균	5
표 1-3-2. 육계 사양실험 설계구 및 첨가물질	10
표 1-3-3. 마우스를 이용한 부추발효물의 조류 인플루엔자 바이러스 억제 효능시 험 설계구	11
표 1-3-4. 마우스를 이용한 고농도 부추발효물의 조류 인플루엔자 바이러스 효능시험 설계구	12
표 1-3-5. 서로 다른 배양액을 이용한 부추발효물의 명명 및 조성	13
표 1-3-6. 항균활성에 사용한 주요 가금 병원균	14
표 1-3-7. 곡물배지 조성물 및 고상 부추발효물 내 원료 혼합비율	14
표 1-3-8. 서로 다른 고상 부추발효물의 혼합원료 및 비율	15
표 1-3-9. 고상 부추사료첨가제 효능 검증을 위한 산란계 처리구 설계	15
표 1-3-10. 발효부추의 산란계 내 조류 인플루엔자 바이러스 효능 시험 설계구 ...	16
표 1-3-11. 조류 인플루엔자 바이러스의 감염에 따른 임상증상과 증상에 따른 평가	16
표 1-3-12. 사용한 primer 및 probe sequence	17
표 1-3-13. Real-time PCR master mixture 제조법	17
표 1-3-14. Real-time PCR 반응조건	18
표 2-1-1. 부추의 자연 발효물 내에 존재하는 미생물의 총균수 측정	20
표 2-1-2. 부추에서 분리한 미생물	22
표 2-1-3. 부추에서 분리한 미생물의 효소 활성능	23
표 2-1-4. 가금 병원성 균에 대한 유용 미생물의 항균 활성	26
표 2-1-5. 부추즙의 제조형태에 따른 항균활성	28
표 2-1-6. 부추의 농도별 발효 시 발효액의 pH 변화	30
표 2-1-7. 부추의 농도별과 배양 온도에 따른 <i>L. plantarum</i> 접종시 발효액의 pH 변화	31
표 2-1-8. 발효 시간에 따른 부추즙의 항균활성	36
표 2-1-9. 발효 시간에 따른 부추즙의 가금병원균에 대한 항균활성	38
표 2-1-10. MDCK 세포 및 SPF 종란을 통한 발효 부추의 조류 인플루엔자 바이러 스 H1N1 억제 검증	40
표 2-1-11. Neutral Red 방법을 이용한 발효 부추의 항 조류 인플루엔자 바이러스 효능 검증	41
표 2-1-12. Plaque 방법을 이용한 발효부추의 항 조류 인플루엔자 바이러스 억제 검증	42
표 2-1-13. UHPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS를 이용한 부추즙 내 대사물질 분석	49
표 2-1-14. 부추 사료첨가제 급여에 따른 육계 (Ross 308)의 생산성 비교	52
표 2-1-15. 부추 사료첨가제 급여에 따른 육계의 장기 및 계육의 무게	54
표 2-1-16. 부추 사료첨가제 급여에 따른 계육의 품질특성 비교	56
표 2-1-17. 부추 사료첨가제 급여에 따른 소장(십이지장, 공장, 회장) 및 맹장의 길이 변화	58
표 2-1-18. 부추 사료첨가제 급여에 따른 소장(십이지장, 공장, 회장) 및 맹장의 무게	58
표 2-1-19. 부추 사료첨가제 급여에 따른 공장 내 미생물 균총 변화	60
표 2-1-20. 부추 사료첨가제 급여에 따른 회장 내 미생물 균총 변화	60

표 2-1-21.	부추 사료첨가제 급여에 따른 맹장 내 미생물 균총 변화	60
표 2-1-22.	가금 장내 우점종 미생물	62
표 2-1-23.	마우스를 이용한 부추발효물의 항 조류 인플루엔자 바이러스 시험 설계구	63
표 2-1-24.	조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 공격접종 후 임상증상 및 폐사율 시험결과	64
표 2-1-25.	조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 공격접종에 따른 체중의 변화	65
표 2-1-26.	마우스를 이용한 고농도 부추발효물의 항 조류 인플루엔자 바이러스 시험 설 계구	66
표 2-1-27.	조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 공격접종 후 임상증상 결과	67
표 2-1-28.	조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 공격접종에 따른 체중의 변화	67
표 2-1-29.	공격접종 3일 후 폐의 무게 측정 및 조류 인플루엔자 바이러스 함량시험 결과	68
표 2-1-30.	공격접종 6일 후 폐의 무게 측정 및 조류 인플루엔자 바이러스 함량시험 결과	68
표 2-1-31.	물 및 MRS 배양액에서 부추의 <i>L. plantarum</i> 발효에 따른 생리 활성 화합물 구성 변화	70
표 2-1-32.	MDCK 세포를 사용한 발효 부추 추출물의 항 조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 활성	75
표 2-1-33.	UHPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS를 이용한 물에 부추즙 첨가시(최종 10%) 발효물 내 대사산물 분석	78
표 2-1-34.	고상 부추사료첨가제 발효공정 확립을 위한 곡물배지 조성물 및 혼합비율	79
표 2-1-35.	고상 부추사료첨가제 조사를 위한 시험군의 혼합원료 구성	79
표 2-1-36.	고상 부추사료첨가제 혼합원료의 시간의 경과에 따른 생균수 및 pH의 변화 .	80
표 2-1-37.	고상 부추사료첨가제 급여에 따른 산란계의 생산성 비교	82
표 2-1-38.	고상 부추사료첨가제 급여에 따른 계란의 품질 비교	84
표 2-1-39.	고상 부추사료첨가제 급여에 따른 계란의 품질 보존 비교	86
표 2-1-40.	고상 부추사료첨가제 급여에 따른 산란계 면역기관 특성 비교	88
표 2-1-41.	고상 부추사료첨가제 급여에 따른 산란계의 장 특성 비교	88
표 2-1-42.	고상 부추사료첨가제 급여에 따른 산란계 맹장 내 미생물 균총 분석	90
표 2-1-43.	고상 부추사료첨가제 급여에 따른 산란계 장내 미생물 동정결과	91
표 2-1-44.	산란계를 이용한 발효부추의 조류 인플루엔자 바이러스 억제 효능 시험 설계구	92
표 2-1-45.	SPF 산란계에 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 구강 내 배출 량 변화	93
표 2-1-46.	SPF 산란계에 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 총배설강 내 배출량 변화	93
표 2-1-47.	저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 임상증상 및 폐사율 관찰 ..	94
표 3-2-1.	연구개발 목표 및 결과	102
표 3-3-1.	과업의 목표, 연구개발 수행내용 및 달성도	104

〈 그림 목 차 〉

그림 1-2-1. 제품 개념도	1
그림 1-3-1. 1차년도 연구 개발 내용 모식도	3
그림 1-3-2. 각 처리 공정에 따라 생성된 부추즙	5
그림 1-3-3. HPLC (high performance liquid chromatography) 분석 조건	6
그림 1-3-4. 2차년도 연구 개발 내용 모식도	8
그림 1-3-5. 3차년도 연구 개발 내용 모식도	13
그림 1-3-6. 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 rRT-PCR 검출	17
그림 1-3-7. 액상/고상 발효부추 사료첨가제 제조시 사용원료, 투입 비중 및 비용	18
그림 1-3-8. 고상 발효부추 사료첨가제 ‘에프씨’	19
그림 1-3-9. 가금용 사료첨가제 상품화 프로세스	19
그림 2-1-1. 부추의 자연 발효물에서 배양된 다양한 미생물	20
그림 2-1-2. 가금 병원성 균에 대한 유용 미생물의 항균 활성	25
그림 2-1-3. 부추즙의 제조형태에 따른 항균활성	27
그림 2-1-4. 부추의 농도별 발효 시 접종균 <i>L. plantarum</i> , <i>B. subtilis</i> 및 <i>S. cerevisiae</i> 의 생존수	30
그림 2-1-5. 부추의 농도별과 배양 온도에 따른 <i>L. plantarum</i> 생존수의 변화	31
그림 2-1-6. <i>L. plantarum</i> 에 의한 부추즙 발효에 따른 항산화 활성	32
그림 2-1-7. 열처리에 따른 부추즙의 HPLC 분석	33
그림 2-1-8. 발효 시간에 따른 부추즙 내 <i>L. plantarum</i> 생존수 변화	34
그림 2-1-9. 발효 시간에 따른 부추즙의 pH 변화	34
그림 2-1-10. 발효 부추의 항균활성	35
그림 2-1-11. 부추발효물에 따른 가금 병원성 균의 생육 저지환 비교	37
그림 2-1-12. SPF 종란을 이용한 발효, 비발효 부추의 항인플루엔자 바이러스 (H1N1) 효능	40
그림 2-1-13. MRS배지에서 부추의 첨가 (최종 25%)에 따른 <i>Lactobacillus plantarum</i> SK4719의 성장곡선과 pH의 변화	43
그림 2-1-14. 부추 배양액 내 3종 생균제의 단계별 첨가 시 각 생균제의 성장곡선	44
그림 2-1-15. 물과 부추즙의 비율을 달리한 배양액에서 <i>Lactobacillus plantarum</i> SK4719 성장 분석	45
그림 2-1-16. 물과 15% 부추즙을 혼합한 배양액에서 <i>Lactobacillus plantarum</i> SK4719 첨가에 따른 생존수 변화	46
그림 2-1-17. 10%의 부추즙이 첨가된 MRS 배양액 및 물에서의 유산균 성장 및 pH 비교	47
그림 2-1-18. 주요 성분 분석 (PCA) 점수 도표	50
그림 2-1-19. UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS를 이용한 발효 및 비발효 부추즙의 대 사물질 비교	50
그림 2-1-20. 발효 부추 추출물의 DPPH 라디칼 소거능	72
그림 2-1-21. 가금류 병원균에 대한 발효 부추 추출물의 항균 활성	74
그림 2-1-22. 물에 부추즙 첨가시(최종 10%) 발효에 따른 HPLC 분석	77
그림 2-1-23. 고상 부추사료첨가제 혼합원료에 따른 생존수 및 pH의 변화	80
그림 2-1-24. 산란계의 고상 부추발효물 첨가급이 실험 설계구 및 첨가물 구성비	81
그림 4-1-1. 연구결과 활용을 통한 기대효과 및 계획	105

1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발 목적

가. 최종목표

- 가금의 주요 질병방제에 효과적인 광범위 항균/항AI 활성 함유 부추사료첨가제의 상품화

나. 세부목표

- 부추의 사료첨가제를 위한 착즙 및 발효공정 확립
- 부추의 항균 및 항바이러스 활성물질 추출 및 추출방법 확립
- 부추의 생리활성 물질 확인 및 그 물질의 효능 검증
- 부추 및 부추발효물을 이용한 사료첨가제 시제품 개발 및 보급
- 가금 사양실험 및 결과 분석을 통한 부추의 항균, 항바이러스에 대한 효능 제시
- 바이러스를 접종하여 실제 항바이러스 능력 조사

2절. 연구개발의 필요성

- 연구개발 개요 : 광범위 항균/항AI 활성이 있는 부추사료첨가제의 상품화를 통한 육계 및 산란계 농장의 질병억제 및 생산성 증대

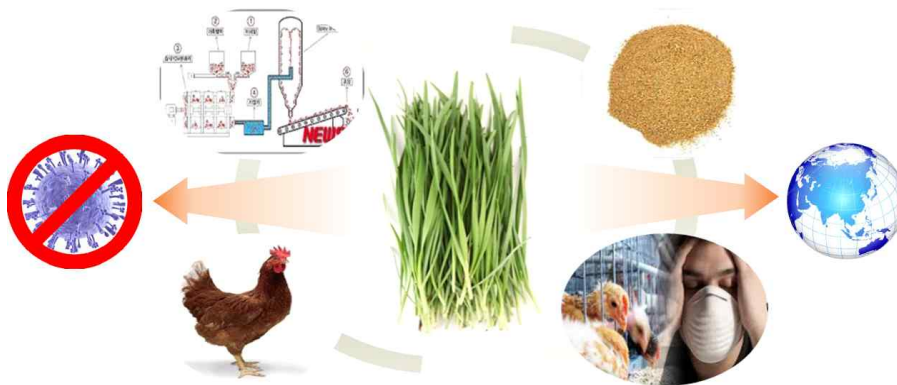


그림 1-2-1. 제품 개념도

- 부추는 마늘과 같은 *Allium*속의 식물로 생리활성물질이 풍부하여 예로부터 사람은 즐기는 야채임에도 불구하고 아직도 가축의 사료첨가제로 상품화되지 못한 실정임
- 부추는 식이섬유와 chlorophyll이 풍부할 뿐만 아니라, 항혈전 성분 (purine nucleoside인 adenosine) 등이 보고됨 (곽 등, 1998)
- 부추의 항균물질을 분리한 결과 cis-propenyl methyl disulfide 등의 황화합물로 구성된 복합

물질이 확인되었음 (홍 등 2000b; Benkeblia 등, 2007). 부추 methanol 추출물로 17종의 미생물에 대하여 항균 활성을 측정한 결과 Gram(+) 세균, Gram(-) 세균 및 효모 등 광범위 항균 활성이 나타남 (본 연구진 미발표 연구 결과; Kim 등, 1996)

- 노화와 관련된 항산화물질 중의 하나로 알려진 Kaempferol은 flavonoid로 부추에 함유되어 있으며, 이 외에 과일, 채소 및 차에서 분리되는 항산화 물질임 (Gates 등, 2007). Kaempferol은 A, B 및 C ring으로 구성되며 이들은 수산기로 공유결합 되어있어 항산화, 중금속의 해독, 항암 및 항염증 등 생리활성이 보고됨 (Jung 등, 2003; Wang 등, 2006)
- 부추는 1년에 8회 수확 가능한 다년생 식물로 농지 이용효율이 매우 높으며 값이 저렴하고 특히 친환경 항균/ 항바이러스제로서 유용한 국내 자원임. 아래의 표는 부추 내 다양한 기능성 물질을 나타냄 (안 등, 2005)

표 1-2-1. 부추에서 분리한 유효 성분

Compounds	Author
Flavonoids	
3-0-rhamnogalactosyl-7-0-rhamnosyl kaempferol	Kaneta, M. 등, 1980
3-0-sophorosyl-7-0-β-D-(2-0-feruloyl)glucosyl kaempferol	
3,4'-di-0-β-D-glucosyl-7-0-β-D-(2-0-feruloyl)glucosyl kaempferol	
3-0-β-D(2-0-feruloyl)-glucosyl-7,4'-di-0-β-D-glucosyl kaempferol	Yoshida, T. 등, 1987
3,4'-di-0-β-D-glucosyl kaempferol	
3,4'-di-0-β-D-glucosyl quercetin	
3-0-β-D-sophorosyl kaempferol	
kaempferol-3-0-β-D-glucoside	Starke, H. 등, 1976
kaempferol-3-xylosyl-β-D-glucoside	
Essential oil	
Sulfides	
S-alkyl-L-cysteine sulfoxides	Kameoka, H. 등, 1974
Linalool	Naito, S. 등, 1981
	Peana 등, 2002
Alkaloids	
(-)-(3S)-1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline 3-carboxylic acid	Choi 등, 1988
Amino acids	
	Park 등, 1992
Nucleosides	
Adenosine	Park 등, 1992

- 실제로 흰쥐에 부추를 투여한 결과, 전립선암에 대한 효과가 있었으며 (곽 등, 1998), 또한 GSH-Px 등과 같은 항산화 효소의 활성을 증가시켜 손상된 간을 회복시키는 효과가 나타남 (Ahn 등, 2010). 또한 n-3, n-6 계열 지방산은 혈액 응고를 도우며 혈관을 확장시키는 기능이 있음 (홍 등, 2000a)

- 본 연구진도 부추에 대한 기초적인 연구를 진행하였고 아래의 일부 연구결과들은 국내 특허 등록 (1013069560000: 부추로부터 분리된 신규 화합물 및 그 화합물의 항바이러스제로서의 용도)과 함께 PCT특허를 출원함(2011-OPA-5184). 그러나 아직도 사료첨가제로 상품화가 된 제품이 없어 본 연구진은 반드시 체계적인 연구와 경제성 분석을 통하여 육계 및 산란계의 상품화를 추진하여 가금의 고질적인 질병퇴치에 기여하고자 하였음

3절. 연구개발 범위

가. 1차년도

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(건국대학교)
 - ▷ 부추의 사료첨가제를 위한 착즙 및 발효공정 확립
 - 부추 단기발효공정의 개발을 통한 항바이러스 및 기능성에 대한 평가
 - 향산화 및 항균 및 다기능성의 부추발효물 생산을 위한 단기발효공정 확립 및 제시
 - ▷ 부추의 항균, 항바이러스 활성물질의 조추출 방법 확립 및 활성 검증
 - AI 등 항바이러스 활성물질 분획 (Crude fraction)의 추출방법 확립
 - E. coli 등 병원균에 대한 항균활성
 - 항바이러스 활성 검증
 - Target 유효 지표물질 선정

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(건국대학교) : 부추의 착즙 발효공정 확립, 항균/항바이러스 작용 In vitro 시험

1차년도 : 부추의 활성물질 탐색과 단기발효공정 확립



그림 1-3-1. 1차년도 연구 개발 내용 모식도

▷ 부추 발효용 유용 균주의 이용 및 생균수 측정

- 시중 마트에서 판매하는 부추 제품을 구매, 착즙기(Ang-7700, Angeljuicer, Busan, Republic of Korea)로 착즙하여 실험에 사용
- 부추 및 부추 발효의 추출물에 관여하는 균주를 선별하기 위하여 분리원은 자연 발효된 부추를 사용함
- 배지의 종류로는 LB, MRS, YM을 이용하며 제조한 부추즙과 배양액의 혼합물은 30°C 에서 3일간 shaking 하였음. 부추발효과정에서 배양액의 생균수를 측정함

▷ 부추 자연 발효물 유래 미생물 동정

- 부추 자연 발효물을 배지(LB/MRS/YM)에 도말한 후 나타난 우점종 미생물을 선별하였으며 선별된 미생물을 16S rRNA sequencing 방법으로 동정함
- 동정은 16S rRNA gene을 27F (forward primer: 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')를 이용하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 밝혔고 NCBI의 BLAST를 이용하여 Gene bank에서 유전자의 유사성을 분석함

▷ 후보 유용 미생물의 효소활성

- 부추에서 분리된 미생물의 amylase, cellulase, protease, xylanase, lipase을 agar plate 방법으로 확인함

- (1) Amylase: 1% soluble starch agar 배지에서 후보 미생물을 streaking하여 배양한 후 0.2% gram iodine solution로 염색한다. 균체의 주변에 나타난 clear zone을 확인하여 각 미생물의 amylase 활성을 확인
- (2) Cellulase: 1% CMC (carboxymethyl cellulose)를 첨가한 agar 배지에 후보 미생물을 streaking하여 배양한 후 0.2% gram iodine solution로 염색한다. 균체의 주변에 나타난 clear zone을 확인하여 각 미생물의 cellulase 활성을 확인
- (3) Protease: 1% Skim milk를 첨가한 agar 배지에 후보 미생물을 streaking하여 배양한 후 나타난 clear zone을 통하여 protease 활성을 확인
- (4) Xylanase: 1% Xylan을 첨가한 agar 배지에 후보 미생물을 streaking하여 배양한 후 나타난 0.2% gram iodine solution로 염색한다. 균체의 주변에 나타난 clear zone을 확인하여 각 미생물의 cellulase 활성을 확인
- (5) Lipase: 1% Spirit blue agar배지에서 후보 미생물을 streaking하여 배양한 후 나타난 clear zone을 확인하여 lipase 활성을 확인

▷ 후보 유용 미생물의 항균활성 측정

- 항균활성 평가에 사용된 병원성 균주는 가금 (육계, 산란계 등)에서 질병을 유발시키는 미생물을 대상으로 실시함
- 사용한 병원성 균주는 아래의 표와 같으며 각각의 병원성 균들은 LB broth에서 20시간 동안 배양한 후에 사용하였음. 이후 병원성균 배양액을 LB agar plate에 도말하고 멸균

Pasteur pipette의 뒷부분을 이용하여 지름 6mm의 구멍을 만들어 부추와 부추로부터 분리한 후보 유용 미생물에 대한 항균활성 측정을 실시함

- 분리한 유용 미생물은 각각 LB, MRS, YM broth에 접종하여 30°C shaking incubator에서 16시간 배양하였음. 그 후 원심분리기를 이용하여 상등액을 분리하였으며, 샘플 구멍을 포함하여 생육저지환의 크기를 3반복으로 분석하였음

표 1-3-1. 사용한 가금 병원균

Strain	Stock #	Disease	Reference
<i>Salmonella gallinarum</i>	SK3359	· 가금티푸스 (Avian typhoid), 추백리 (Pullorum) 원인균	· Nirmala et al., 2018
<i>S. pullorum</i>	SK3360		· Shoaib et al., 2017
<i>S. typhi</i>	SK795		· Barbour et al., 2015
<i>S. typhimurium</i>	SK767	· 가금파라티푸스 (Avian paratyphoid) 원인균	· Calnek et al., 1991
<i>S. paratyphi</i>	SK765		· Girmay et al., 2015
<i>S. enteritidis</i>	SK747		· Kloska et al., 2017
<i>S. anatum</i>	SK779	· 2013~2015년 주요 질병 발생균으로 보고된 <i>Salmonella</i> 균 중 하나	· Calnek et al., 1991 · Girmay et al., 2015
<i>Enterococcus faecalis</i>	SK4259 SK4540	· 가금의 심내막염 등 임상 질환을 유발하는 원인균	· Hassan et al., 2017
<i>E. coli</i>	SK2023	· 장 질환 원인균	· Jortner and Helmboldt 1971 · Fertner et al., 2011
<i>Staphylococcus aureus</i>	SK784 SK1168	· 피부염, 폐렴, 수막염 등 가금류의 질병을 유발	· Stromberg et al., 2017
<i>Clostridium perfringens</i>	SK870	· 복시름 등의 장관성 질환을 유발하는 대표적 원인균	· Ali et al., 2017 · Choi et al., 2013

▷ 부추즙의 형태에 따른 항균활성

- 가금 병원성균에 대한 항균활성을 측정한 부추즙(Chinese chives, CC)의 형태는 다음의 그림과 같으며 그에 따른 처리 공정은 다음과 같음

- (1) 부추즙 1 : 여과지(Watman filter paper NO. 1)을 이용하여 한 번 여과시킨 부추즙
- (2) 부추즙 2 : 80°C에서 살균을 실시한 부추즙
- (3) 부추즙 3 : 고압증기멸균(Autoclave)을 실시한 부추즙



그림 1-3-2. 각 처리 공정에 따라 생성된 부추즙

- ▷ 부추즙의 비율에 따른 후보 발효 미생물의 성장 및 최적의 부추즙 함량 확립
 - 부추에서 분리, 동정된 미생물 중 *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*를 대상으로 최적의 부추즙 첨가 비율을 조사
 - Yeast extract (0.5%)와 glucose (1%)를 포함한 배지액에 부추즙을 0% ~ 100%로 부추즙의 함량이 각기 다른 샘플을 제조
 - 각 배지에 발효 균주를 최종 1% 접종하여 30°C, 100 rpm으로 8시간 배양함
 - CFU 측정은 준비한 영양배지에 drop plate 방법으로 각각 수행하였으며, pH는 pH meter (iSTEK, Republic of Korea)를 사용하여 측정함

- ▷ 부추발효물의 항산화활성
 - 발효에 따른 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), TPC (Total phenolic content), TFC (Total flavonoid content) 측정을 통하여 조사
 - DPPH 유리 라디칼 흡광도는 microplate reader를 사용하여 파장 515 nm에서 측정, TPC는 파장 750 nm, TFC는 405 nm에서 측정하였음

- ▷ 열처리한 부추즙의 HPLC (high performance liquid chromatography) 분석
 - 부추즙에 열처리 (60°C, 8시간 / 80°C, 3시간)한 후 80% MeOH (v/v)으로 추출함
 - MeOH의 추출물은 회전 진공 증발기를 사용, 45°C에서 농축 및 건조시켰으며 이후 -20°C에 보관하였음
 - C18 column (4.6 mm × 250 mm, 입도 5 μm; Thermo Scientific)을 사용하여 diode array 검출기가 장착된 Agilent HPLC로 MeOH 추출물을 분석하며, 이동상은 용매 A (0.5% 아세트산을 함유하는 MiliQ water) 및 용매 B (Acetonitrile)로 구성하였음
 - 구배 프로그램(gradient program) 설정: 5% 용매 B를 초기에 3분간 유지 한 다음 25분에 걸쳐 100%로 점진적으로 증가시키고 그 후 5분간 5% 용매 B에서 유지시키는 것으로 총 33분 소요되었으며 검출 파장은 280 nm로 설정함



그림 1-3-3. HPLC (high performance liquid chromatography) 분석 조건

- ▷ 5 L jar fermenter를 이용한 발효특성 조사
 - 확립한 최적의 부추즙 첨가 (25%) 결과를 바탕으로 대량 발효시 나타나는 발효 특성과 산업으로의 적용 가능성 조사
 - 부추즙을 포함한 배지 2 L (부추즙 25%, 멸균증류수 25%, 2 X MRS 50%)에 *L.*

*plantarum*을 접종하였음

- 배양온도 30 °C, 교반 속도 100 rpm으로 설정하였으며 총 48시간 동안 발효를 진행함
- 발효 0시간부터 24시간까지 4시간마다 부추발효물을 추출, 24시간 이후로는 12시간마다 샘플을 확보한 후 pH, 생균수, 항산화 및 항균활성을 측정하여 분석함

▷ 부추 발효, 비발효물의 저병원성 인플루엔자바이러스 (H1N1) 사멸 효능시험

1) 세포를 이용한 부추 발효, 비발효물의 인플루엔자바이러스 증식 억제시험

- Mardin-Darby canine kidney (MDCK)가 부착된 96 well culture plate을 이용하여 실시
- 부추발효물 샘플을 농도별로 희석하고 저병원성 인플루엔자 바이러스 (H1N1)를 희석한 샘플과 1:1로 4°C 에서 30분 반응
- 반응 이후, 배양된 Mardin- Darby canine kidney (MDCK) 96 well culture plate에 인플루엔자 바이러스와 반응된 희석액을 각각 접종
- 7°C 인큐베이터에서 40분 반응시켰으며 유지 배지를 분주, 3 - 5일 동안 배양시킨 후, Cytopathic effect (CPE) 형성 유무를 확인

2) SPF 종란을 이용한 부추 발효, 비발효물의 인플루엔자바이러스 증식 억제시험

- 부추발효물 샘플을 멸균된 PBS를 이용하여 농도별로 희석하고 저병원성 인플루엔자 바이러스를 희석한 샘플과 1:1로 4°C 에서 30분 반응시킴
- 반응이 끝난 후, 희석 샘플당 5개의 10일란 발육란에 중화된 반응액 0.2 mL를 요막강 내로 접종하였음
- 접종 후 37°C 에서 5일 동안 배양하며, 매일 검란을 실시하고, 접종 24시간 이내에 죽은 발육란은 사고사로 간주하고 시험성적에서 제외하였음
- 접종 5일 후까지 살아남은 모든 발육란과 4°C 에 보관된 죽은 접종란으로 부터 요막강액을 각각 채취, 1% 닭적혈구를 사용한 혈구응집반응을 실시하였으며 이를 통해 바이러스의 존재 유무 및 바이러스 역가를 egg infective dose₅₀ (EID₅₀)/ml로 나타냄

3) Neutral Red Assay

- 배양한 Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 96 well culture plate에 인플루엔자 바이러스를 접종하였으며, 그 후 37°C 인큐베이터에서 40분 반응시킨 후 단계별로 희석된 부추발효물 샘플을 분주함
- 3일간 배양하며 세포 독성을 확인하였으며, 접종 4일째에 상층액을 제거하지 않은 상태에서 Neutral Red를 이용하여 염색하고 540 nm로 흡광도 측정을 이용하여 결과를 확인

4) Plaque Assay

- 저병원성 인플루엔자 바이러스 (H1N1)을 배양한 Mardin-Darby canine kidney (MDCK) 6 well culture plate에 희석 배수당 well에 100 ul 희석액을 각각 접종하였음
- 바이러스 접종 후 37°C 인큐베이터에서 40분 반응시키고 부추발효물 샘플을 농도별로 희석한 뒤 바이러스를 접종한 6 well culture plate에 희석액을 각각 접종하였음

나. 2차년도

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(건국대학교)

▷ 부추 및 부추발효물을 이용한 사료첨가제 시작품 생산공정 확립

- 농가 및 시장에서의 니즈와 유통, 보관 및 경제성을 고려하여 적합한 사료첨가제의 형태를 고안
- 액상 및 고상 등의 형태로 제작된 부추 사료첨가제의 효능(항균, 항바이러스 등) 검증
- 고안된 부추 및 부추발효물 사료첨가제를 이용한 Rat 실험을 진행
- 1차년도의 결과와 Rat를 이용한 사양실험을 통한 부추 사료첨가제의 효능 검증 및 그에 따라 부추의 제형형태를 결정
- 제품의 안정성과 보존성 등의 연구를 통한 사료첨가제의 활용성 개선
- 검증된 결과를 토대로 사료첨가제의 대량 생산을 위한 적합한 제조 공정 제시

▷ 육계 사양실험을 통한 사료첨가제로서 부추 및 부추발효물의 이용 가능성 확인

- 1차년도 연구에서 분석한 부추 및 부추발효물의 생리활성, 항균, 항바이러스 등 결과를 비교 분석함에 따라 효과적인 부추 첨가제의 형태를 결정하고 실험 진행
- 항균, 항바이러스 등 육계의 부추 및 부추발효물 급여 효과에 대한 결과를 도출
- 부추 추출물의 장내 미생물에 미치는 영향 확인 (미생물 카운팅)
- 장내 미생물에 대한 부추의 추출물 영향 확인
- 육계에서의 항균 및 항바이러스에 대한 효능 외 생산성, 체내 이용성 및 축산물 평가 등 부추의 첨가 효과에 대한 결과 도출
- 부추를 첨가한 육계 사료 개발 및 농가의 보급을 통한 부추의 활용성 증대

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(건국대학교) : 부추 사료첨가제 시작품 제작, 생산 공정 확립 및 육계 사양실험

2차년도 : 부추 사료첨가제 개발 및 육계에서의 이용



그림 1-3-4. 2차년도 연구 개발 내용 모식도

▷ 부추의 발효 시간에 따른 항균활성

- 발효 시간대별의 부추발효물을 이용하여 항균 활성을 측정
- 사용된 병원성 균주는 가금 (육계, 산란계 등)에서 질병을 유발시키는 미생물을 대상으로 실시하였으며, 각각의 병원성 균들은 LB broth에서 20시간 동안 배양한 후에 사용
- 본 실험에서는 0, 24, 48 시간 동안 발효시킨 부추발효물을 사용하였다. 30℃ 배양기에 10시간 배양한 후 나타난 생육저지환의 지름을 측정하였음

▷ 25%의 부추 첨가에 따른 배양액(MRS)의 특성 조사

- 1차년도에서 확립한 첨가량인 25%의 부추즙 내 *Lactobacillus plantarum* SK4719 발효성상을 알아보고자 수행함
- 배지는 부추를 첨가한 배지 (부추즙 25%, 멸균증류수 25%, 2 X MRS 50%) 및 부추즙을 첨가하지 않은 MRS에 *L. plantarum* SK4719를 접종하였으며, 배양온도는 30 ℃, 교반 속도 100 rpm으로 설정함
- 총 24시간 동안 발효시켰으며, 발효 0시간부터 6시간마다 샘플을 확보한 후 pH, 생균수를 측정

▷ 유산균, 바실러스, 효모를 복합 사용한 최적의 발효공정 조사

- 사용한 배지는 Yeast extract (0.5%, w/v), glucose (1%, w/v)가 포함된 25%의 부추즙을 이용하였으며, 첨가한 균주는 부추로부터 분리한 균주 3종 (*Saccharomyces cerevisiae* SK4690, *Lactobacillus plantarum* SK4719, *Bacillus subtilis* SK4730)을 사용함
- 발효균주 첨가 순서는 두 가지 (유산균 → 바실러스 → 효모 / 유산균 → 효모 → 바실러스) 방법으로 하였으며, 첨가할 때마다 0.2% glucose 동시 첨가 및 무첨가 2처리구로 설계하여 glucose 첨가에 따른 비교실험을 진행함
- 총 48시간 발효시켰으며 16시간마다 각 발효 균주를 첨가함
- 측정항목으로는 8시간마다 샘플을 확보하여 pH와 생균수를 측정하였음

▷ MRS 배양액 대체재 물을 이용한 부추 배양액에서 생균제의 생존성 조사

- 제품의 경제성을 고려하여 MRS 배양액을 대체할 수 있는 배양액 조성물 연구
- 상업에서 쉽게 사용가능한 물을 활용, 최적의 부추 혼합 비율을 확인하기 위해 수행함
- 사용된 부추즙 양은 5, 10, 15, 20, 25%까지 혼합하였으며, 18시간 배양하여 비발효시와 발효시의 pH와 생균수를 비교하였음

▷ MRS 및 물에 10%, 15% 부추즙이 혼합된 배양액에서의 발효 특성 조사

- 물 및 여과된 부추즙이 혼합된 배양액에서 *Lactobacillus plantarum* SK4719 발효성상을 조사하였으며 배양 환경은 온도 30℃ 및 교반 속도 100 rpm으로 설정함
- 총 48시간 발효하였으며 0시간부터 24시간까지 4시간마다, 그 이후에는 24시간 뒤인 48시간 부추발효물을 추출하였으며, 추출한 샘플로 pH와 생균수를 측정하였음
- 본 실험 결과를 통하여 결정된 첨가제 형태는 육계 사양 실험에 적용하였음

- ▷ UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS를 이용한 발효, 비발효 부추의 생리활성 물질 차이 비교
 - 발효부추 및 비발효 부추가 동결 건조된 상등액 1 ml을 10 ml의 80% 메탄올과 혼합, 30 분 동안 초음파 처리한 후 -20°C에 보관하였음
 - 이후, 혼합물을 2,314 x g에서 30 분 동안 원심분리 하였으며, 분리한 상등액을 40°C에서 진공 건조하였음
 - 초고성능 액체크로마토그래피 질량분석법 (UHPLC-LTQ-Orbitrap- MS/MS)을 이용하여 대사산물 프로파일링을 위해 10 mg/ml 농도로 재구성 하였으며, 5 µl의 샘플을 Vanquish binary pump H system (Thermo Fisher Scientific, MA, USA, Waltham), 오토샘플러 및 컬럼이 장착 된 UHPLC 시스템에 주입하였음
 - 이동상은 물 내 0.1% 포름산 (v / v, 용매 A) 및 아세트 니트릴 내 0.1 % 포름산 (v / v, 용매 B)으로 구성되었으며, 초기 시작조건은 5% 용매 B를 1분간, 9분에 걸쳐 100%로 선형 증가시키고 1분간 유지시켰음
 - 마지막으로 3분에 걸쳐 5% 용매 B로 점진적인 감소를 시켰으며 총 시간은 14분으로 설정하였음

▷ 가금 (육계)을 이용한 부추 사료첨가제의 효과 검증

- 생산성 실험 : 초생추부터 출하 때까지의 육계 사양실험
 - 실험 수수 : 처리구별 200수, 총 800수
 - 조사항목 : 증체량, ADFI, ADG, FCR, 계육품질, 혈액분석, 면역 장기무게 및 장내 균총
 - 처리구 : 대조구 포함 4처리구, 처리구당 5반복, 반복당 40수

표 1-3-2. 육계 사양실험 설계구 및 첨가물질

	첨가물질
음성 대조구 (NC)	대조구 (Control, 첨가 X)
양성 대조구 (PC)	항생제 (Enramycin) 첨가
비발효 부추 (NCC)	비발효 부추 (3%) 첨가
발효 부추 (FCC)	발효 부추 (3%) 첨가

- 실험사료 : 사용한 기본 실험 사료는 옥수수과 대두박 위주로 하였으며, 육계 전기 사료의 ME는 3,100 kcal/kg, 후기는 3,150 kcal/kg로 배합함. 개시일로부터 3주차까지는 전기 사료를 급여, 3 ~ 5주차에는 후기 사료를 각각 급여하였음

▷ 육계 사양 시 분석항목

- 매주 사료 급여량과 잔량을 측정하여 개체당 일당증체량, 일당사료섭취량, 사료효율, 사료전환율을 계산하고 처리구별 비교함
- 실험 기간 중 및 종료시 혈액, 장기, 가슴육 등을 채취하여 처리구별 장기길이 및 무게, 장내 균총, 도체특성, 육질과 혈액을 분석함
- 부추 추출물의 장내 미생물에 미치는 영향 확인 (미생물 카운팅)

- 장내 미생물에 대한 부추의 추출물 영향 확인
- 사양실험 중 부추의 첨가량에 대한 항균 및 항바이러스에 대한 효능 외 생산성, 체내 이용성 및 축산물 평가와 가식성 근육의 물리적 특성 및 장내 균총의 변화를 조사함

▷ 계육의 육질 평가

- 생산성 및 품질평가 : 생체중 100g 당 계육의 무게, 육색도 측정
- 화학적 평가 (pH, aW)
 - pH는 시료 2 g을 Bagmixer 400 (Interscience Co. Ltd., France)를 사용하여 60 초간 증류수 18 mL로 균질화한 뒤 그 현탁액을 pH미터를 사용하여 측정
- 물리적 평가 (가열감량)
 - 가열감량은 가열전의 시료의 무게와 가열 후 시료의 무게를 다음과 같이 계산함

$$\text{Cooking loss(\%)} = \frac{\text{Sample weight before cooking} - \text{Sample weight after cooking}}{\text{Sample weight before cooking}} \times 100$$

▷ 마우스 (SPF BALB/c)를 이용한 부추발효물의 저병원성 조류 인플루엔자바이러스 (H1N1) 사멸 효능시험

(가) 농도별 부추발효물의 마우스 내 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 억제 시험

- 마우스 내 조류 인플루엔자 바이러스(H1N1)을 접종하면서 부추발효물의 체내 항바이러스 효능을 검증하기 위해 SPF BALB/c 6주령 마우스를 48수 공시험
- 실험 설계는 아래와 같음

표 1-3-3. 마우스를 이용한 부추발효물의 조류 인플루엔자 바이러스 억제 효능시험 설계구

시험군	공시수수	그룹	투여물질	투여농도 (mg/kg)
Group 1	8	경구투여군	부추발효물	30
Group 2	8	경구투여군		150
Group 3	8	경구투여군		300
Group 4	8	경구투여군	타미플루	100
Group 5	8	대조군(공격접종)	PBS	-
Group 6	8	대조군(비공격접종)	PBS	-

- 부추발효물 및 타미플루 투여군 (200ul/마리/day)에 대하여 인플루엔자 바이러스 공격접종 전 2주부터 공격접종(104.5/90 μ l/dose) 후 2주까지 경구 투여하여 예방 및 치료 효능을 확인하고자 하였음
- 처리구별 시험물질 투여 전 및 인플루엔자 바이러스 공격접종 전 각각 체중을 측정하였으며, 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 3주간 임상증상 및 폐사율의 감소 효과를 관찰함

(나) 고농도 부추발효물의 마우스 내 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 억제 시험

- 마우스 내 조류 인플루엔자 바이러스(H1N1)을 공격 접종함에 있어서 고농도 부추발효물의 항바이러스 효능을 검증하기 위해 SPF BALB/c 마우스 7주령을 36수 공시험
- 실험 설계는 아래와 같음

표 1-3-4. 마우스를 이용한 고농도 부추발효물의 조류 인플루엔자 바이러스 효능시험 설계구

시험군	공시수수	그룹	투여물질	투여농도 (mg/kg)
Group 1	6	경구투여군	부추발효물	1,000
Group 2	6	경구투여군		2,000
Group 3	6	경구투여군		4,000
Group 4	6	경구투여군	타미플루	100
Group 5	6	대조군(비공격접종)	0.1% DMSO	-
Group 6	6	대조군(공격접종)	0.1% DMSO	-

- 부추발효물 및 타미플루 투여군 (200ul/마리/day)에 대하여 인플루엔자 바이러스 공격접종 전 2주부터 공격접종 (104.5/90 μ l/dose) 후 7일까지 각 샘플을 경구 투여하여 예방 및 치료 효능을 확인하고자 하였음
- 처리구별 시험물질 투여 전 및 인플루엔자 바이러스 공격접종 전 각각 체중을 측정하였으며, 인플루엔자 바이러스 공격접종 3일, 6일 후 시험군 및 대조군 각 3수씩 체중 측정 및 폐(Lung)에서 바이러스 역가검정을 실시

다. 3차년도

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(건국대학교)

▷ 산란계 사양실험을 통한 사료첨가제로서 부추 및 부추발효물의 이용 가능성 확인

- 산란계의 부추 및 부추발효물 급여 효과 실험
- 산란계에서의 항균 및 항바이러스에 대한 효능 외 생산성, 체내 이용성 및 축산물 평가 등 부추의 첨가 효과에 대한 결과 도출
- 부추를 첨가한 산란계 사료 개발 및 농가의 보급을 통한 부추의 활용성 증대

▷ 보조사료로 등록 추진

- 부추사료첨가제 육계 사양성적을 토대로 보조사료로 등록 추진

▷ 부추첨가제 이용 사양실험의 보고서 및 이를 이용한 가금 질병 억제 매뉴얼 작성

- 육계 및 산란계의 부추, 부추발효물 급여 효과에 대한 결과를 토대로 적합한 사료첨가제 형태 및 생산공정 제시
- 사료 제조회사 및 농가 등의 홍보를 통한 부추사료첨가제로 시장성 확보
- 가금 외의 가축에 대한 사료첨가제의 확대 이용성 제시

○ 개발 내용 및 범위

- 주관연구기관(건국대학교) : 부추 사료첨가제의 첨가급여 산란계 사양 시험

3차년도 : 부추를 이용한 가축 사료첨가제 개발 및 가치창출

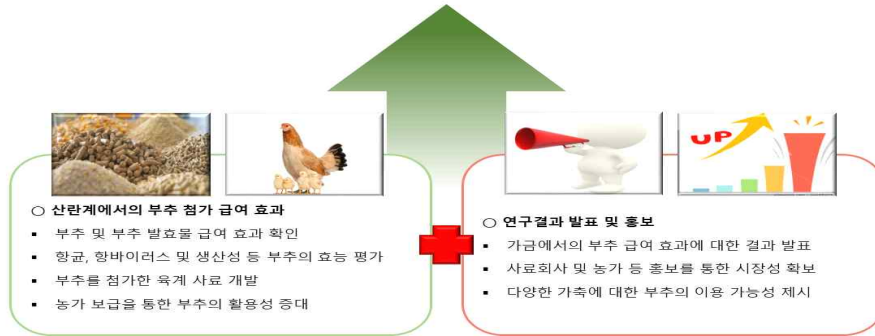


그림 1-3-5. 3차년도 연구 개발 내용 모식도

▷ 서로 다른 배양액을 이용한 부추발효물의 생리 활성 화합물 분석

- 물 및 MRS 배양액에서 10% 부추즙 첨가가 *L. plantarum* 발효에 따른 생리 활성 물질에 끼치는 영향을 조사하기 위해 수행함. 조사항목은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), TPC (Total phenolic content), TFC (Total flavonoid content), allicin 및 thiol 함량을 측정함
- 실험 설계구와 각 조성은 아래와 같음

표 1-3-5. 서로 다른 배양액을 이용한 부추발효물의 명명 및 조성

Sample	Contents
WNCC	물 90% + 부추즙 10%가 혼합된 비발효 부추
WFCC	물 90% + 부추즙 10%가 혼합된 발효 부추 (<i>L. plantarum</i> SK4719)
MNCC	MRS 90% + 부추즙 10%가 혼합된 비발효 부추
MFCC	MRS 90% + 부추즙 10%가 혼합된 발효 부추 (<i>L. plantarum</i> SK4719)

- DPPH 유리 라디칼 흡광도는 microplate reader를 사용하여 파장 515 nm에서 측정하였음

▷ 물 및 MRS 배양액에 따른 부추발효물의 항균, 항바이러스 활성 분석

- 물 (WFCC) 및 MRS 배양액 (MFCC)에서 발효시킨 부추 추출물을 사용하여 가금병원균 및 조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1)의 억제능을 검증함
- 사용한 가금 병원성균은 다음과 같음

표. 1-3-6. 항균활성에 사용한 주요 가금 병원균

Strain	Stock #	Disease
<i>S. typhi</i>	SK795	· 가금티푸스 (Avian typhoid), 추백리 (Pullorum) 원인균
<i>S. typhimurium</i>	SK767	· 가금파라티푸스 (Avian paratyphoid) 원인균
<i>S. paratyphi</i>	SK765	
<i>S. enteritidis</i>	SK747	
<i>S. anatum</i>	SK779	· 2013~2015년 주요 질병 발생균으로 보고된 <i>Salmonella</i> 균 중 하나
<i>Enterococcus fecalis</i>	SK4259 SK4540	· 가금의 심내막염 등 임상 질환을 유발하는 원인균
<i>E. coli</i>	SK2023	· 장 질환 원인균
<i>Staphylococcus aureus</i>	SK784 SK1168	· 피부염, 폐렴, 수막염 등 가금류의 질병을 유발
<i>Clostridium perfringens</i>	SK870	· 콕시듐 등의 장관성 질환을 유발하는 대표적 원인균

- 항바이러스 효능 시험은 Mardin-Darby canine kidney (MDCK)가 부착된 96 well culture plate을 이용하여 실시
- 부추발효물 샘플을 농도별로 희석하고 저병원성 인플루엔자 바이러스 (H1N1)를 희석한 샘플과 1:1로 4°C에서 30분 반응
- 각 발효물의 조류 인플루엔자 바이러스를 억제시킬 수 있는 최소 농도를 확인

▷ LC-MS 분석을 통한 부추발효물 내 유효물질 동정

- *L. plantarum* 발효 추출물에서 생물학적 활성을 담당하는 화합물을 확인하기 위해 초고 성능 액체 크로마토 그래피 (UHPLC-LTQ Orbitrap-MS/MS) 질량 분석법을 사용
- 물 발효 부추 추출물 (WFCC)의 대사산물 프로파일링을 양성 및 음성 모드로 분석

▷ 가금용 고상 부추사료첨가제의 최적 부추 첨가량 확립

- 고상 형태의 가금용 부추사료첨가제 발효공정을 확립하기 위하여 수행하였음
- 사용 원료로는 대두박, 단백질이 혼합된 곡물배지, 증류수, 부추즙, 당밀 및 *Lactobacillus plantarum* SK4719를 사용하였으며 곡물배지 및 당밀은 (주) 은진바이오에서 제공하였음
- 사용한 원료들의 혼합비율 및 곡물배지의 조성은 아래와 같음

표. 1-3-7. 곡물배지 조성물 및 고상 부추발효물 내 원료 혼합비율

곡물배지 조성물		고상 부추발효물 원료의 혼합비율	
원료	비율(%)	원료	비율(%)
옥수수	53.8	곡물배지	50
대두박	10.2	증류수	20
단백피	15.4	부추즙	20
옥수수주정박	12.8	당밀	5
미강	7.7	<i>L. plantarum</i> SK4719	5
드라이이스트	0.1		
총합	100	총합	100

- 고상 부추사료첨가제 최적의 발효공정을 확립하기 위해서 아래와 같은 처리구를 설계하여 시간 경과에 따른 생균수와 pH 변화를 조사하였음

표 1-3-8. 서로 다른 고상 부추발효물의 혼합원료 및 비율

시험군	혼합원료
W	곡물배지 (50%) + 증류수 (45%) + 당밀 (5%)
WL	곡물배지 (50%) + 증류수 (40%) + 유산균 (5%) + 당밀 (5%)
MLC	곡물배지 (50%) + MRS 배양액 (20%) + 부추즙 (20%) + 유산균 (5%) + 당밀 (5%)
WLC	곡물배지 (50%) + 증류수 (20%) + 부추즙 (20%) + 유산균 (5%) + 당밀 (5%)

- 부추즙의 농도는 1년차 연구결과를 참고하여 전체 양의 20%로 고정하였으며, 발효 조건으로는 30℃로 조절된 인큐베이터에서 3일간 정치 배양하였음
- 본 실험은 24시간마다 분석하여 처리구별 차이를 관찰, 비교하였음

▷ 사료첨가제의 산란계 사양실험

- 공시 동물 : 45주령 ISA-Brown 120수
- 실험 설계 : 대조구 포함 3처리구, 처리구별 40수 10반복, 반복당 4수

표 1-3-9. 고상 부추사료첨가제 효능 검증을 위한 산란계 처리구 설계

Group	Contents
대조구 (Control)	시판사료 급이 (발효부추 사료첨가제 첨가 X)
발효부추 첨가구 (0.1% 첨가)	시판사료 + 발효부추 사료첨가제 0.1% 첨가
발효부추 첨가구 (0.3% 첨가)	시판사료 + 발효부추 사료첨가제 0.3% 첨가

- 실험 기간 : 총 7주 (2주간 적응기간, 5주간 사양실험 수행)
- 조사 항목 : 기간별 난생산성, 난중, 난생산량, 계란 품질, ADFI, FCR, 혈액분석, 면역관련 장기무게 및 장내 균총, 혈액 일반성분 등 분석
- 사육 환경 : 점등 시간은 오전 5시에 점등, 오후 9시에 소등 (16시간동안 점등)
계사내 온도는 26℃, 습도는 60±5%로 유지, 사료와 음수는 무제한 급이

▷ 산란계를 이용한 발효부추의 조류 인플루엔자 바이러스 (H9N2) 억제능 검증

- 부추발효물의 SPF 산란계 내 조류 인플루엔자 바이러스 (H9N2)에 대한 증식억제 효능을 검증하기 위해 수행
- 공시동물은 SPF 산란계 3주령 16수를 사용, H9N2 바이러스를 접종하였음
- 실험 설계는 아래와 같으며 8수 중 3마리는 공격접종을 실시, 나머지 5수는 접촉 대조군으로 공격 접종군과 동거 사육을 실시

표 1-3-10. 발효부추의 산란계 내 조류 인플루엔자 바이러스 효능 시험 설계구

구분	공시수수	공격접종군	접촉감염군	시험물질	접종바이러스	투여경로
Group 1	8	3	5	부추발효물 20% 혼합사료	H9N2	비강
Group 2	8	3	5	시판사료	H9N2	비강

- 3주령의 SPF 산란계를 바이러스 공격접종 전 3일간, 공격접종 후 7일간 각 처리구의 시험물질을 급이 하였음
- 바이러스 억제효능 평가는 공격접종 0일, 1일, 3일, 7일차에 구강 및 총배설장에서 바이러스를 채취하여 Real-time RT-PCR을 이용하여 배출량을 측정함

1) 조류 인플루엔자 바이러스 (H9N2) 접종에 따른 산란계 임상증상 분석

- 조류 인플루엔자 바이러스 H9N2를 접종함에 따라 산란계에서 나타나는 임상증상을 관찰, 기준에 맞게 점수를 기록하여 비교하였음
- 나타나는 임상증상 측정 항목과 각 항목별 수치는 다음과 같음 (Arafat et al., 2017; Arafat et al., 2018; Lee 등, 2011; Shin 등, 2016)

표 1-3-11. 조류 인플루엔자 바이러스의 감염에 따른 임상증상과 증상에 따른 평가

조류 인플루엔자 바이러스 감염시 대표적 임상증상				임상 징후에 대한 점수	
1. 설사	2. 쇠약	3. 식욕부진	4. 호흡 불량	Normal	0
5. 재채기	6. 비강 및 안구 분비물	7. 결막염		Mild	1
				Moderate	2
				Severe	3

- 산란계의 임상 징후, 사망률은 실험이 끝날 때까지 매일 확인하였음
- 임상 징후에 대한 점수는 산란계에 나타나는 임상 증상에 대해 0-3 (Normal = 0, Mild = 1, Moderate = 2, Severe = 3)의 척도 평가를 하였음
- 실험 기간동안 기록된 총 임상 점수를 평가하고 각 그룹의 산란계수로 나누어 그룹당 평균 임상 점수 (CS)를 산출하였음

2) Real-time RT-PCR 분석을 통한 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 배출량 조사

- 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 배출량 검증은 바이러스의 계태아 접종 후 HA assay를 통하여 바이러스의 증식 유무를 조사하였음
- 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스를 가장 민감하게 검출할 수 있는 Real-time RT-PCR(rRT-PCR)을 이용하였음
- OIE Section 2.3. Chapter 2.3.4에 따라 primer와 probe를 준비하였음
- 사용한 kit로는 RNA 추출 kit (Qiagen RNeasy mini kit 또는 QIAamp Viral RNA mini kit), Real-time용 probe RT-PCR premix (Qiagen QuantiTect Probe RT-PCR kit)를 사용하였으며 및 사용한 rRT-PCR 장비로는 ABI 7500 (Lifetechnology)를 사용함

- 저병원성 인플루엔자 바이러스 calibration curve를 확립하였음 ($y = -0.2755x + 10.224$)

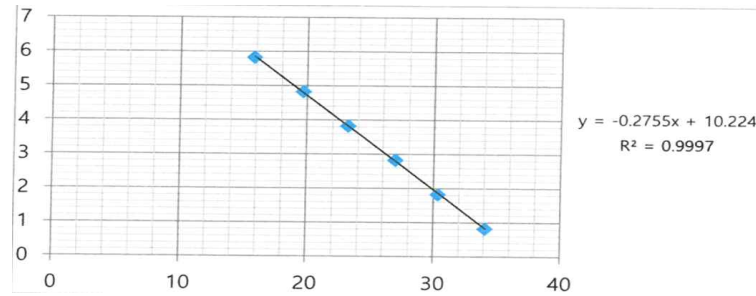


그림 1-3-6. 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 rRT-PCR 검출

3) Viral RNA로부터 probe 방식을 이용한 Real-time PCR

- RNA 추출은 로슈 사의 Magna pure 96 장비의 Viral gene extract instruction을 사용함
- Real-time PCR 기기는 Lifetechnology사 ABI7500를 사용하였으며 Real-time PCR master mixture는 Quantitect probe RT-PCR kit (Qiagen)을 사용하였음

표 1-3-12. 사용한 primer 및 probe sequence

Target region	Sequence	Nucleotide Position
Forward	5' -AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG-3'	9-32
M gene Reverse	5' -TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG-3'	86-109
Probe	5' -FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-TAMRA-3'	59-76

표 1-3-13. Real-time PCR master mixture 제조법

Foward primer (10pmol)	1 μ l
Reverse primer (10pmol)	1 μ l
Probe primer (10pmol)	1 μ l
2x Quantitect probe RT-PCR master mix	25 μ l
Quantitect probe RT mix	0.5 μ l
RNA	5 μ l
D.W.	16.5 μ l
총 반응량	50 μ l

표 1-3-14. Real-time PCR 반응조건

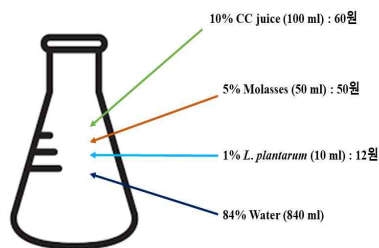
Stage 1		Stage 2	
cDNA Synthesisa		PCR reaction (40 cycles)	
Temp	time (min)	Temp	time (min)
50.0	30	94	10
95.0	15	55	30
		72	10

- 희석에 의한 detection limit은 cycle threshold(ct) 값으로 34.11 이하로 판정되었으며, 이는 Egg infection dose 50 (EID50) 값으로 환산하였을 때 0.83으로 판정됨

▷ 시작품제작 및 상품화

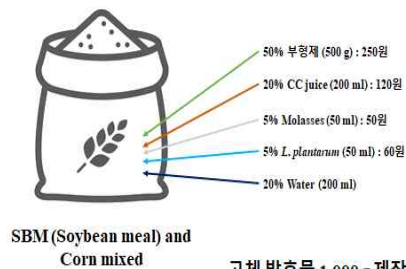
- 주관연구기관 (건국대학교)에서는 액상 및 고상 발효부추 사료첨가제 제조 방법을 확립하였으며, 그 중 고상 발효부추 사료첨가제는 참여기관 (주) 은진바이오에서 시작품을 제작하였음
- 액상 및 고상 발효부추 사료첨가제 제조시 사용되는 원료, 비중 및 투입 비용은 다음과 같음

· Liquid fermentation (1,000 ml)



· 부추 발효물 1,000 ml 제작시 : 122원

· Solid state fermentation (1,000 g)



고체 발효물 1,000 g 제작시 : 480원

그림 1-3-7. 액상/고상 발효부추 사료첨가제 제조시 사용원료, 투입 비중 및 비용

- 사용된 부추는 그린벨트 품종으로 부추 생산 농가에서 직접 구입을 하였으며, 경기도 안성에 위치하고 있는 성원시스템 기업을 통해 대량의 부추를 착즙하였음
- 착즙하고 확보한 부추즙은 (주) 은진바이오에 옮겨졌으며, 부형제, 당밀 ((주)은진바이오 제공), *L. plantarum* SK4719, 물을 혼합하여 30℃ 배양실에 2일간 정치 배양하였음
- 매일 같은 시간, 유산균의 수와 pH의 변화를 측정하여 발효상태를 확인하였으며 발효 완료 이후, 상온에서의 건조, 포장 등의 공정을 거쳐 시제품을 생산하였음
- 생산된 시제품은 아래 그림과 같으며, 국내외 홍보를 통해 현재 농가로 보급을 완료하였음



그림 1-3-8. 고상 발효부추 사료첨가제 ‘에프씨’

- ▷ 가금을 이용한 사양실험의 결과 보고서를 통한 홍보물 제작 및 국내외 홍보
- 사료 제조회사 및 대규모 농가 등의 홍보를 통한 부추의 경제성 및 시장성 확보
 - 해외수출용 영문 홍보물 제작

가금용 사료첨가제 상품화 프로세스

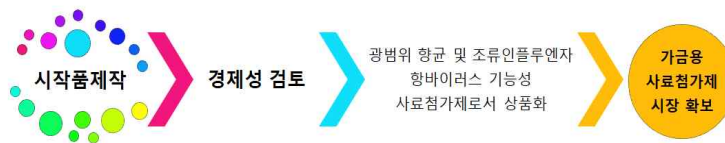


그림 1-3-9. 가금용 사료첨가제 상품화 프로세스

2장. 연구수행 내용 및 결과

1절. 연구수행 내용

가. 1차년도

(1) 부추의 자연발효액 내 생균수 측정

부추 (Chinese chives, CC)의 자연발효액 내 생균수 측정 결과는 그림과 표에 나타내었다. 부추에 다양한 미생물들이 존재하고 있는 것을 확인 할 수 있었으며, 이 중 많은 콜로니를 나타낸 우점종을 순수분리하여 미생물 동정을 하였다.

LB에서 나타난 생균수는 약 9 log CFU/ml를, MRS에서 나타난 생균수는 약 8 log CFU/ml로 나타났으나 YM의 경우 2 log CFU/ml 이하의 미생물이 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

부추즙의 비율이 높아짐에 따라 나타나는 미생물의 수는 점차 감소하였으며 30%의 부추 혼합 농도까지는 비교적 미생물이 잘 성장하였다.

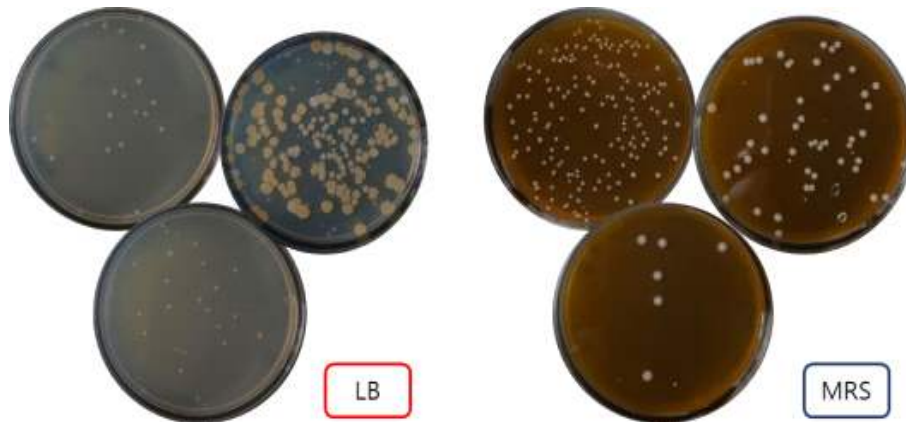


그림 2-1-1. 부추의 자연 발효물에서 배양된 다양한 미생물

표 2-1-1. 부추의 자연 발효물 내에 존재하는 미생물의 총균수 측정

Unit : log CFU/ml

Contents of chinese chives juice, %	Media		
	LB	MRS	YM
5	9.01	7.84	1.74
10	6.61	8.03	1.74
20	7.22	6.79	2.52
30	7.24	6.18	2.24
40	1.83	0.00	0.00

(2) 부추의 자연발효액에서의 미생물 분리 · 동정

부추 발효 미생물 및 후보 유용 미생물을 확보하기 위하여 부추 자연발효액을 도달한 후 나타난 우점종 미생물에 대하여 분리 및 동정하여 표에 나타내었다. MRS broth로 자연 발효시킨 샘플에서는 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Weissella cibaria*, *Weissella paramesenteroides*와 같은 유산균들이 분리, 동정되었다. *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*은 김치, 마늘, 부추, 부추 당침액, 보리, 아마씨, 감귤 등 발효 유산균으로 다양하게 보고되었다 (이 등, 2014; 이 등, 2014; 천 등, 2015; 최 등, 2015; 이 등, 2016; 박 등, 2018; 이 등, 2018). *W. cibaria*, *W. paramesenteroides* 유산균은 식물, 채소, 우유뿐만 아니라 다양한 동물의 피부에서도 분리되는 미생물로, 유럽, 아프리카 및 아시아에서 발효 미생물로써 널리 사용되고 있어 잠재적 probiotics로 주목받고 있다 (Fusco 등, 2015).

*Saccharomyces cerevisiae*는 포도주 양조, 제빵에 사용되는 효모로 셀룰로오스, 단백질 분해 및 젖산을 이용하는 미생물을 촉진시켜 식이 영양소와 에너지 가용성을 높이며 우유의 생산량도 개선시키는 연구가 보고됨에 따라 발효제 및 사료 첨가제로써 사용되고 있는 미생물이다 (Zaworski 등, 2014)

LB를 이용한 배양액에서 분리된 미생물은 *Bacillus megaterium*, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*와 같은 생균제로 사용되고 있는 유용 바실러스 균주가 분리되었으나, *Staphylococcus sciuri* 및 *Micrococcus luteus*와 같은 병원성 미생물도 분리되었다. 추후 분리된 미생물의 효소활성 측정과 부추에서의 생존능력 및 그에 따른 발효 효능을 분석하여 유용미생물을 선발하고자 하였다.

표 2-1-2. 부추에서 분리한 미생물

Stock #	Description	Query cover	Ident.	Media	Incub. Temp. (°C)	Growth ¹⁾ ability
SK4644	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%	100%	MRS	30	++
SK4645	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%	100%	MRS	30	++
SK4688	<i>Lactobacillus sakei</i>	99%	100%	MRS	30	++
SK4689	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	100%	100%	MRS	30	++
SK4690	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	100%	YM	30	+
SK4691	<i>Lactobacillus sakei</i>	100%	100%	MRS	30	+++
SK4692	<i>Lactobacillus sakei</i>	100%	100%	MRS	30	+
SK4693	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%	100%	MRS	30	++
SK4719	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95%	99%	MRS	30	+++
SK4720	<i>Weissella cibaria</i>	95%	99%	MRS	30	++
SK4721	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99%	99%	MRS	30	+
SK4722	<i>Weissella paramesenteroides</i>	99%	99%	MRS	30	+
SK4723	<i>Bacillus megaterium</i>	99%	100%	YM	30	+++
SK4724	<i>Bacillus aryabhattai</i>	99%	100%	YM	30	+++
SK4725	<i>Bacillus aryabhattai</i>	96%	99%	YM	30	+++
SK4726	<i>Bacillus pumilus</i>	100%	99%	YM	30	++
SK4727	<i>Staphylococcus sciuri</i>	100%	99%	LB	30	+
SK4728	<i>Micrococcus luteus</i>	95%	99%	LB	30	+
SK4729	<i>Bacillus aryabhattai</i>	100%	100%	LB	30	++
SK4730	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	99%	LB	30	+++

¹⁾+: Normal growth; ++: Fast growth; +++: Very fast growth

(3) 부추의 자연발효액에서 분리한 바실러스 균의 효소활성 측정

자연발효액에서 분리한 바실러스 균의 효소활성은 아래의 표와 같다. *Staphylococcus sciuri* SK4727의 경우 효소활성은 관찰할 수 없었으나 이를 제외한 다른 바실러스 균들은 높은 protease 활성을 나타내었다. *Bacillus subtilis*, *Bacillus aryabhattai*는 cellulase 및 amylase 등 모든 효소에 대하여 활성을 보였다. 이 중 활성이 높고 생균제로서 널리 이용되고 있는 *Bacillus subtilis*를 이용하여 부추의 발효 후보 균주로 사용하였다.

표 2-1-3. 부추에서 분리한 미생물의 효소 활성능

Stock #	Description	Enzymatic activity ¹⁾				
		Cellulase	Protease	Amylase	Xylanase	Lipase
SK4723	<i>Bacillus megaterium</i>	+++	+++	+++	+++	-
SK4724	<i>Bacillus aryabhattai</i>	+++	+++	+++	++	+++
SK4725	<i>Bacillus aryabhattai</i>	+++	+++	+++	++	+++
SK4726	<i>Bacillus pumilus</i>	+	+++	++	+	++
SK4727	<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-	-	-
SK4728	<i>Micrococcus luteus</i>	-	+++	-	++	+
SK4729	<i>Bacillus aryabhattai</i>	+++	+++	+++	++	+++
SK4730	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++	+++	++

¹⁾-: not detected; +: normal activity; ++: strong activity; +++: very strong activity

(4) 가금의 질병 유발 병원성 균에 대한 항균활성

자연발효액에서 분리한 유산균과 효모 및 바실러스 균의 가금의 질병 유발 병원성 균에 대한 항균능력은 다음의 그림 및 표에 나타내었다. 유산균인 *Lactobacillus sakei*와 *Leuconostoc mensecteroides*의 경우 일부 병원성 균주에 대하여 항균활성을 나타내었으나, *Lactobacillus plantarum* SK4719는 모든 가금의 주요 질병 유발균주에 대하여 항균활성을 갖는 것으로 확인되었다.

*Bacillus*는 일부 가금의 질병 유발 균주에 대한 항균력을 보였으나 그 활성은 약하게 나타났다. 본 실험의 결과, 사용한 가금의 질병 유발 균주에 대해서 항균력을 모두 보인 *Lactobacillus plantarum*을 부추의 발효 미생물로 선발하였다.

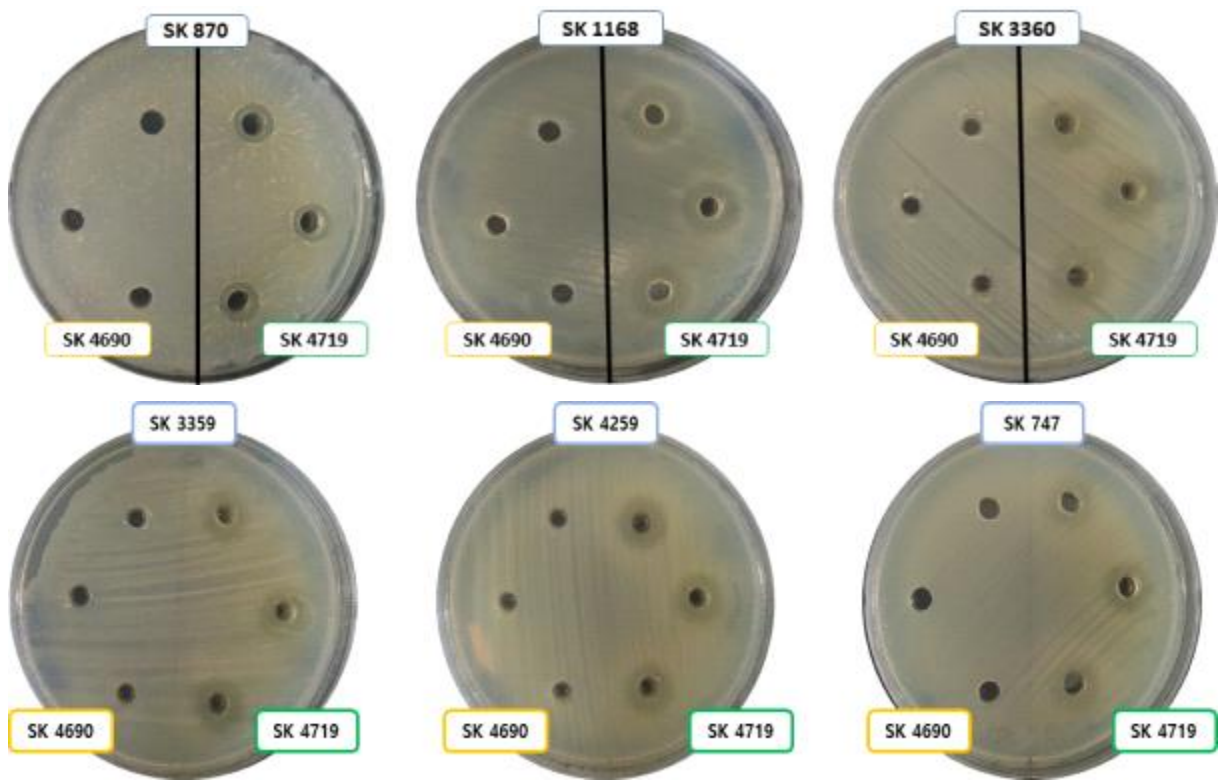


그림 2-1-2. 가금 병원성 균에 대한 유용 미생물의 항균 활성

표 2-1-4. 가금 병원성 균에 대한 유용 미생물의 항균 활성

Stock #	Description	Antibacterial activity ¹⁾												
		SK747	SK765	SK767	SK779	SK784	SK795	SK870	SK1168	SK2023	SK3359	SK3360	SK4259	SK4540
SK4688	<i>Lactobacillus sakei</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK4689	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SK4690	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
SK4691	<i>Lactobacillus sakei</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK4693	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SK4719	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SK4720	<i>Weissella cibaria</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SK4721	<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
SK4723	<i>Bacillus megaterium</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
SK4724	<i>Bacillus aryabhattai</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK4725	<i>Bacillus aryabhattai</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK4726	<i>Bacillus pumilus</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SK4727	<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
SK4728	<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK4729	<i>Bacillus aryabhattai</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SK4730	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾-: not detected; +: activity

(5) 부추즙의 제조형태에 따른 항균활성

부추즙의 제조형태에 따른 항균활성 측정 결과는 다음의 그림과 표와 같다. 가장 항균활성이 뛰어난 부추즙의 제조 형태는 착즙 후 한 번의 여과를 거쳐 확보한 ‘부추즙 1’ 인 것으로 나타났으며 모든 가금 병원성 균에 대해서 항균활성을 보였다. 살균 과정을 거친 ‘부추즙 2’ 는 ‘부추즙 1’ 보다 약한 항균활성 능력을 보였으며 일부 병원성 균에 대해서는 항균활성을 보이지 않았다.

고압증기멸균법을 거친 ‘부추즙 3’ 은 병원성 균에 대한 항균활성 능력이 전혀 보이지 않았으며, 이는 고압증기멸균법에 의하여 부추의 항균활성을 띄는 물질이 주로 단백질로 열변성이 일어난 것으로 판단되었다.



그림 2-1-3. 부추즙의 제조형태에 따른 항균활성 (SK2023: *E. coli*, SK1168: *Staphylococcus aureus*)

표 2-1-5. 부추즙의 제조형태에 따른 항균활성

	Antibacterial activity ¹⁾												
	SK747	SK765	SK767	SK779	SK784	SK795	SK870	SK1168	SK2023	SK3359	SK3360	SK4259	SK4540
부추즙 1 (Fiter No. 1)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
부추즙 2 (Filter sterilized)	++	++	-	++	++	++	-	++	++	++	++	++	-
부추즙 3 (Autoclaved)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾-: not detected; +: normal activity; ++: strong activity; +++: very strong activity

(6) 부추즙의 비율에 따른 후보 발효 미생물의 성장

아래 그림과 같이 함유량이 서로 다른 부추즙을 첨가한 배지 내 *L. plantarum*, *B. subtilis* 및 *S. cerevisiae*의 30°C, 100 rpm 배양 조건에서 성장 패턴은 서로 상이하게 나타났다. *L. plantarum*의 경우, 100%의 부추즙에서도 비교적 높은 CFU를 유지하였으나 50% 이상의 부추즙이 들어간 배양액에서는 0%의 부추즙을 넣은 배양액보다 다소 적은 경향을 보였다. *L. plantarum*의 초기 배양액 균수는 6.87 log CFU/ml였으며, 배양 결과 75%의 부추즙에서는 7.2 log CFU/ml, 100%의 부추즙은 7.0 log CFU/ml의 생균수를 보였다. 특히, *L. plantarum* 균주는 발효 식물 기질에 풍부한 식물성 화합물을 대사 할 수 있는 feruloyl esterases를 풍부하게 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.

B. subtilis (초기 생균수 7.04 log CFU/ml)와 *S. cerevisiae* (초기 생균수 6.34 log CFU/ml)는 20% 및 25% 이상의 부추즙을 사용하였을 때 그 생존력이 크게 감소하였다. 이는 부추에 높은 항균능력으로 인해 미생물 성장이 억제된 것으로 사료된다.

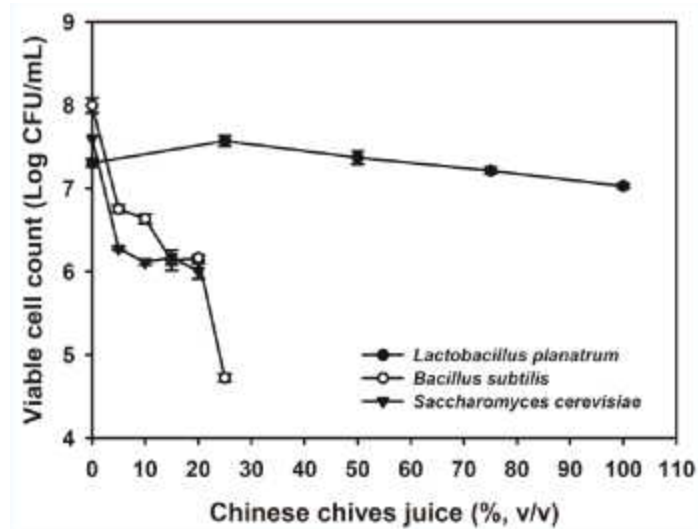


그림 2-1-4. 부추의 농도별 발효 시 접종균 *L. plantarum*, *B. subtilis* 및 *S. cerevisiae*의 생존수

표 2-1-6. 부추의 농도별 발효 시 발효액의 pH 변화

CC juice conc. (% v/v)	0 h	<i>L. plantarum</i> (8 h)	<i>B. subtilis</i> (8 h)	<i>S. cerevisiae</i> (8 h)
0	5.3	4.06	4.78	4.60
5	5.53	ND	4.23	5.44
10	5.77	ND	5.74	5.89
15	5.99	ND	6.35	6.18
20	6.25	ND	6.51	6.39
25	6.58	4.87	7.34	7.27
50	6.78	7.14	7.41	7.47
75	7.02	7.41	7.60	7.57
100	7.45	7.96	8.02	8.02

ND: not determined

*L. plantarum*에 대한 최적의 부추즙 비율과 배양 온도를 확인하기 위해 30°C 및 37°C 에서 부추즙 0-50% 범위의 다양한 배양액을 제조한 후, 미생물을 배양하였다. 그 결과, pH 는 동일하게 감소하였지만 37°C 에서 배양하였을 때보다는 30°C 에서 배양하는 것이 더 나은 성장 프로파일을 보였다. 이는 식물성 화합물의 분해에 관여하는 효소가 30°C 에서 최적으로 활성을 가지기 때문에 나타난 것으로 사료된다.

30% 이상의 부추즙을 넣은 배양액의 경우, *L. plantarum*의 생균수는 두 온도 모두 점차 감소하는 경향을 보였다. 배양액의 pH는 부추즙의 농도가 높을수록 높아졌으며, 전체적으로 보았을 때, *L. plantarum*은 25%의 부추즙, 30°C 에서 배양하는 것이 적합한 것으로 판단되었다.

표 2-1-7. 부추의 농도별과 배양 온도에 따른 *L. plantarum* 접종시 발효액의 pH 변화

CC juice conc. (%, v/v)	0 h	8 h at 30°C	8 h at 37°C
0	5.10	4.38	3.85
5	5.36	4.58	3.98
10	5.65	4.53	4.08
20	6.20	4.58	4.70
30	6.45	4.86	5.28
40	6.61	5.19	5.69
50	6.73	5.50	5.86

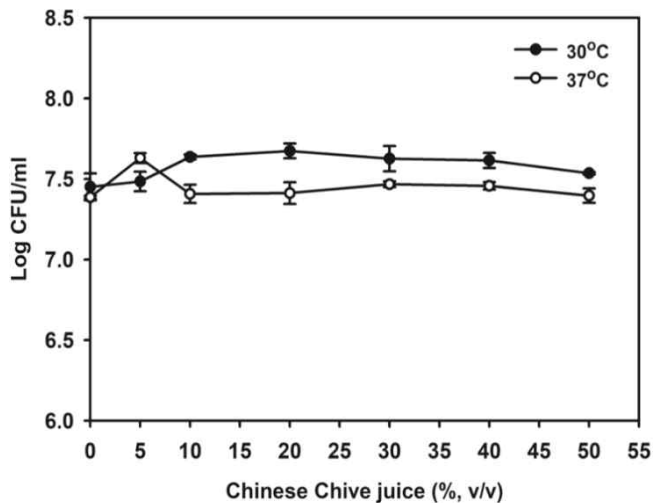


그림 2-1-5. 부추의 농도별과 배양 온도에 따른 *L. plantarum* 생균수의 변화

(7) 발효 시간에 따른 부추발효물의 TPC, TFC 및 항산화능 측정

L. plantarum SK4719로 발효가 진행되면서 부추즙 (25%, v/v) 내 TPC와 TFC 함량은 시간이 지남에 따라 점차 감소하였다. DPPH 활성도 감소하는 경향을 보였으며, 이는 TPC 함량의 감소와 관련이 있는 것으로 판단된다.

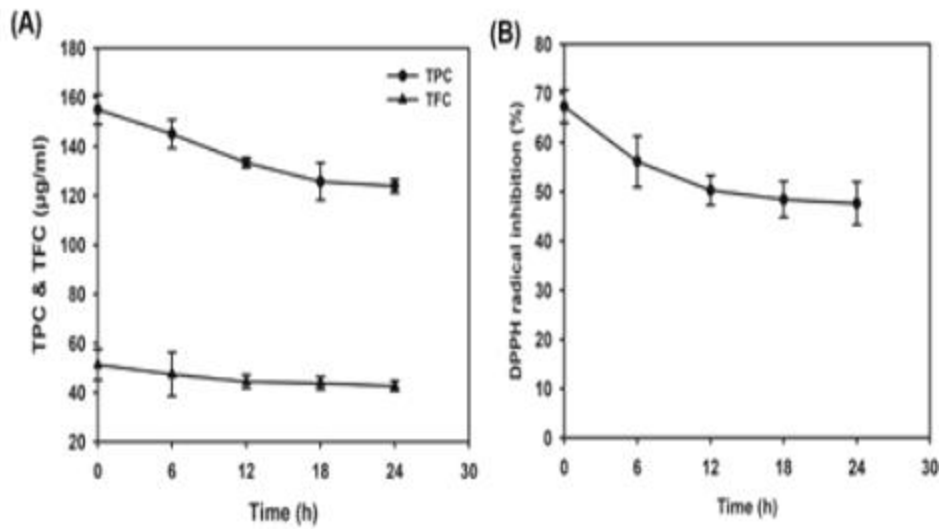


그림 2-1-6. *L. plantarum*에 의한 부추즙 발효에 따른 항산화 활성 (A) TPC/TFC, (B) DPPH 활성

(8) 열처리한 부추즙의 HPLC 분석

열처리에 따른 부추즙의 생리활성의 변화에 대하여 알아보려고 HPLC를 이용하여 유기 화합물의 성분 함유량을 분석한 결과는 아래 그림과 같다. 열처리하지 않은 부추즙과 비교하였을 때, 60°C, 8시간의 열처리는 최고점의 강도를 일부 변화시키면서 부추즙의 조성에 유의적인 영향을 미쳤다. 그 예로 11분에서의 피크가 감소한 반면 18.4분의 피크가 크게 증가하였다. 60°C에서 8시간 및 80°C에서 3시간 열처리에 따라 24.09분에서의 피크는 완전히 사라진 반면, 7.9분과 19.68분경의 피크의 변화는 거의 관찰되지 않았다. 열처리 후 일부 화합물의 변화된 피크 강도는 부추즙의 생리 활성과 관련이 있는 것으로 사료되며, 변경된 화합물에 대해서는 표준 및 LC-MS 분석을 통하여 구체적으로 알아내고자 한다.

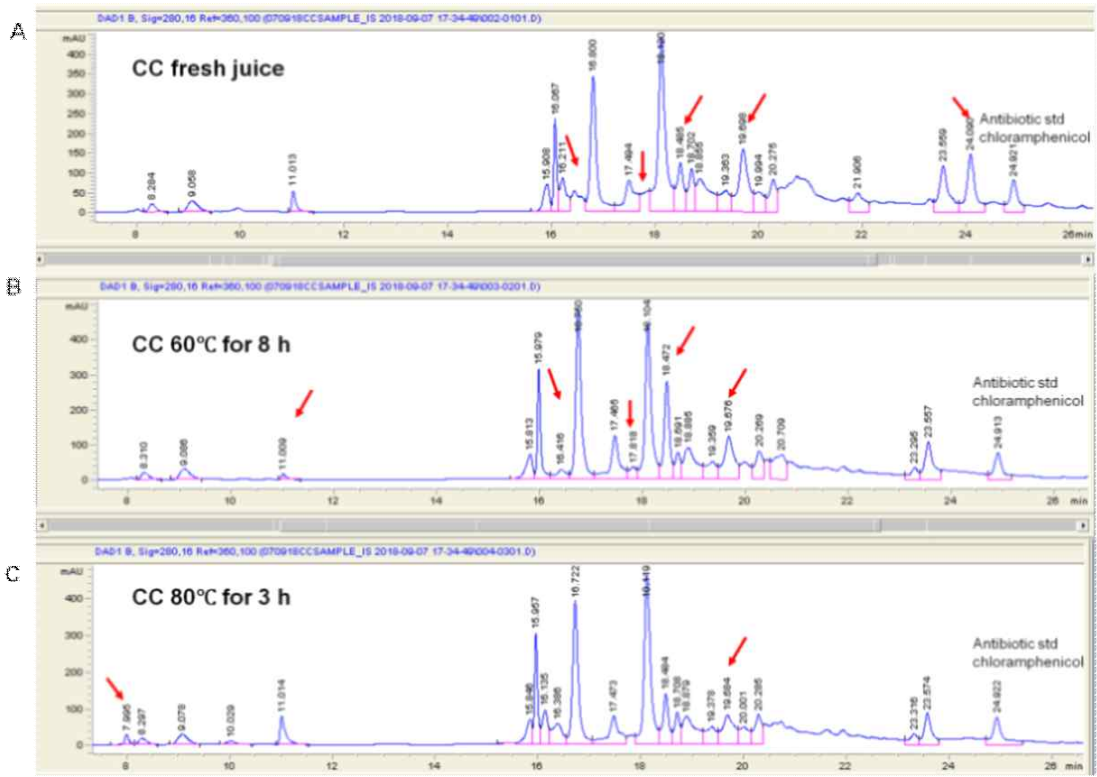


그림 2-1-7. 열처리에 따른 부추즙의 HPLC 분석. (A) 신선한 부추즙, (B) 60°C에서 8시간 가열한 부추즙, (C) 80°C에서 3시간 가열한 부추즙.

(9) Jar fermenter에서의 발효 특성

발효 시간에 따른 *Lactobacillus plantarum* SK4719의 생장곡선의 변화는 다음의 그림과 같다. 발효 0시간의 총 균수는 약 7.6 log₁₀ CFU/ml로 발효 시간이 지남에 따라 증가하였으며 발효 16시간에서 약 8.1 CFU/ml로 가장 높은 생균수를 보였다. 16시간 이후부터는 점차 감소되었으며 36시간에는 6.8 CFU/ml이었다.

pH는 0시간에서 5.96이었으나 시간이 지남에 따라 감소하여 24시간 발효시킨 배양액에서는 4.72를 보여 발효가 서서히 진행되었음을 나타내었다.

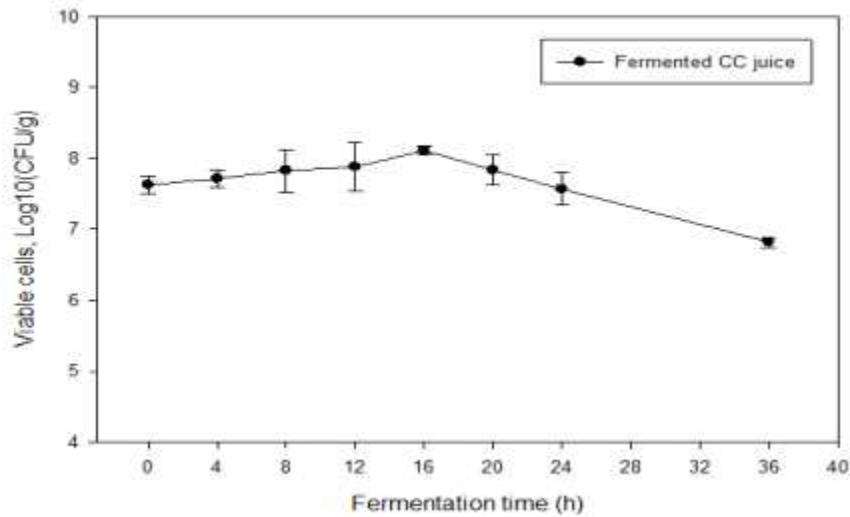


그림 2-1-8. 발효 시간에 따른 부추즙 내 *L. plantarum* 생균수 변화

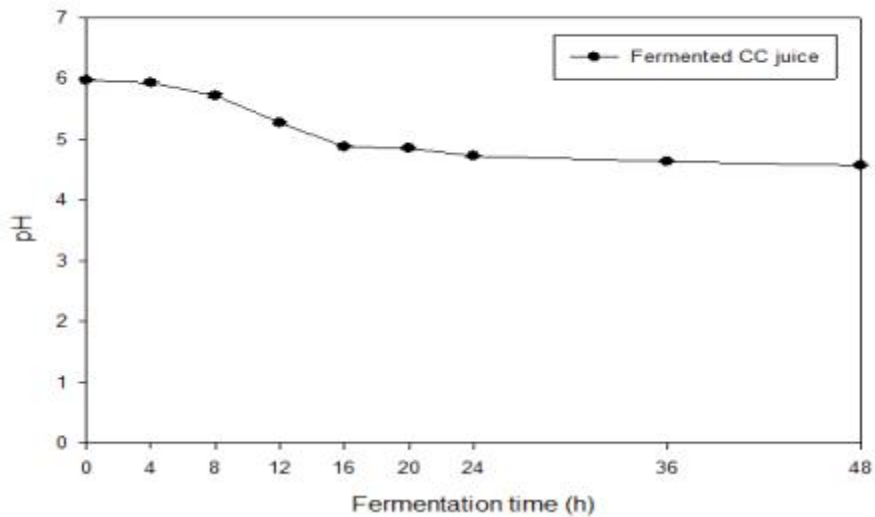


그림 2-1-9. 발효 시간에 따른 부추즙의 pH 변화

(10) Jar fermenter에서의 발효 시간에 따른 부추발효물의 항균활성

가금 질병원인균에 대한 부추발효물의 항균활성 측정 결과는 아래와 같다. 0, 24, 48 시간의 부추발효물은 모두 항균력을 보였다. 하지만 48 시간 발효물은 일부 병원균에 대하여는 생육저지환이 감소하였다. 24 시간의 발효시 비발효와 비교하였을 때 *Salmonella enteritidis* (SK747), *S. paratyphi* (SK765), *S. anatum* (SK779), *S. gallinarum* (SK3359) 및 *Escherichia coli* (SK2023)에 대하여 항균활성이 보다 강하였다. 그 이유로는 *L. plantarum* 이 발효 중에 항균물질을 생성하거나 부추의 phenolics 화합물의 변화로 생물전환된 것으로 사료된다. 따라서, 비발효 부추보다 24시간 발효시킨 부추즙이 가금 병원성균의 성장 억제능에 보다 효과적인 것으로 나타났다.

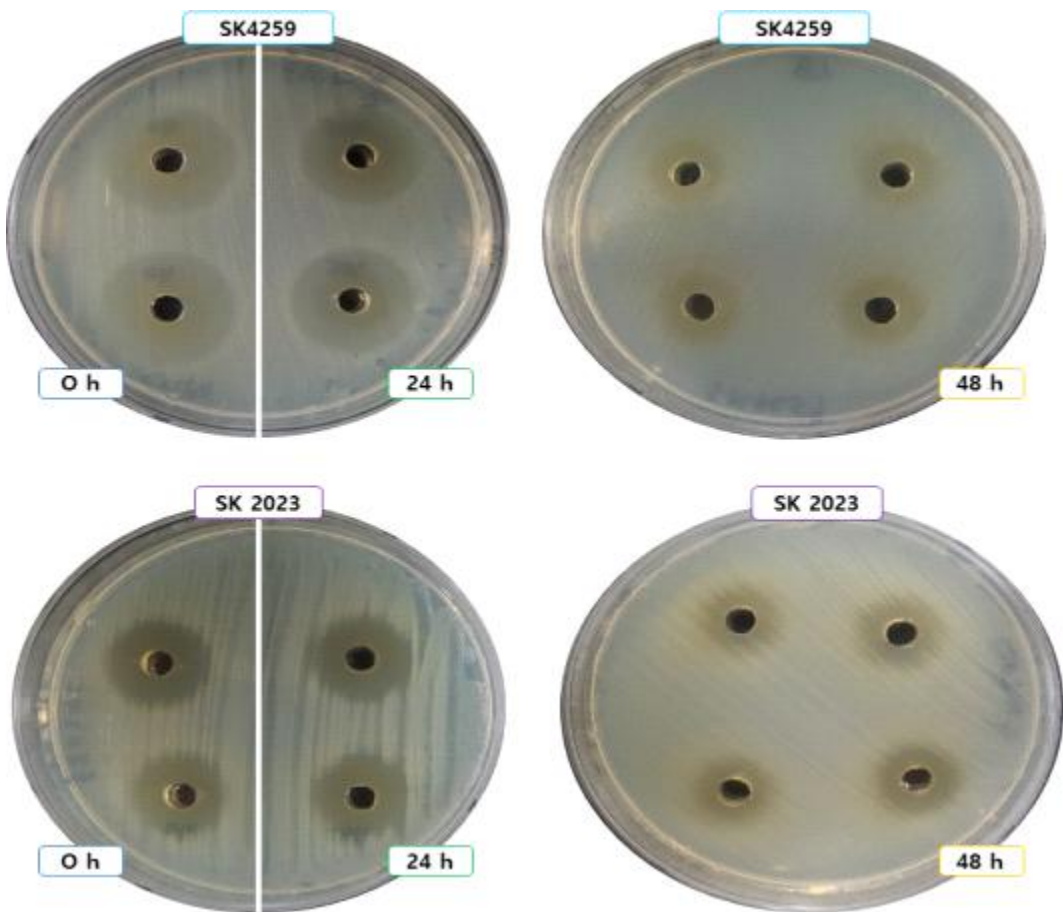


그림 2-1-10. 발효 부추의 항균활성. (SK4259: *Enterococcus faecalis*, SK2023: *E. coli*)

표 2-1-8. 발효 시간에 따른 부추즙의 항균활성

	Antibacterial activity ¹⁾										
	SK747	SK765	SK779	SK784	SK795	SK870	SK1168	SK2023	SK3359	SK3360	SK4259
비발효 부추 (0 h)	++	++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++
발효 부추 (24 h)	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
발효 부추 (48 h)	+++	++	++	++	+++	++	++	++	+	+++	++

¹⁾ -: Not detected; +: normal activity; ++: strong activity; +++: very strong activity

나. 2차년도

(1) 부추의 발효 시간에 따른 항균활성 결과

가금 질병원인균에 대한 부추발효물의 항균활성 측정 결과를 아래에 나타내었다. 0, 24 시간의 부추발효물은 모두 항균력을 보였다. 하지만 24h의 발효시 비발효와 비교하였을 때 *S. anatum* (SK779), *S. enteritidis* (SK747), *S. paratyphi* (SK765), *Staphylococcus aureus* (SK784) 등 전체적인 병원성 균에 대하여 항균활성이 보다 강하였다. 특히 24h 발효시킨 부추즙의 경우 항균력 (clear zone)이 48h 이상으로 유지가 되었으나, 비발효한 부추즙의 경우에는 서서히 생육저지환의 크기가 작아지며 항균력이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

김과 박 (1996) 보고에 따르면, 부추를 MeOH 및 용매 분획하여 HPLC, TLC, silica gel partition chromatography로 분석한 결과, 부추 내 향미생물 활성물질은 약간의 극성을 띠는 중성물질로 6종의 활성물질들이 존재하는 것을 밝혔다. Millet 등 (2012)의 연구에 따르면 같은 *Allium* 속인 양파 (*A. cepa*)를 37°C에서 자연 발효시킨 결과, 비발효 양파보다 항균력이 개선되었음을 나타냈다. 결과적으로 비발효 부추보다 24시간 발효시킨 부추즙이 가금 병원성균의 성장 억제능에 보다 효과적인 것으로 나타났다.



그림 2-1-11. 부추발효물에 따른 가금 병원성 균의 생육 저지환 비교. (SK767: *S. typhimurium*, SK779: *S. anatum*, SK2023: *E. coli*)

표 2-1-9. 발효 시간에 따른 부추즙의 가금병원균에 대한 항균활성

Poultry pathogens	Zone of inhibition (mm)	
	0 h	24 h
<i>S. anatum</i> SK779	18.7 ± 0.6 ^b	22.3 ± 0.6 ^a
<i>S. pullorum</i> SK3360	22.0 ± 1.0 ^b	25.3 ± 0.6 ^a
<i>S. typhi</i> SK795	23.3 ± 1.2	25.3 ± 0.6
<i>S. typhimurium</i> SK767	19.7 ± 0.6 ^b	25.0 ± 0.0 ^a
<i>S. paratyphi</i> SK765	23.0 ± 0.0	24.3 ± 1.2
<i>S. enteritidis</i> SK747	22.7 ± 0.6 ^b	24.3 ± 0.6 ^a
<i>S. gallinarum</i> SK3359	24.0 ± 1.0	26.0 ± 1.0
<i>E. coli</i> SK2023	22.0 ± 0.0	22.3 ± 0.6
<i>S. aureus</i> SK784	20.0 ± 0.0 ^b	23.3 ± 0.6 ^a
<i>E. fecalis</i> SK4540	22.0 ± 1.0 ^b	24.7 ± 0.6 ^a
<i>C. perferigens</i> SK870	20.67 ± 0.6 ^b	23.67 ± 0.6 ^a

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

(2) 부추 발효, 비발효물의 저병원성 조류 인플루엔자바이러스 (H1N1)에 대한 항바이러스 활성

(가) 세포 및 SPF 종란을 이용한 부추 발효, 비발효물의 조류 인플루엔자바이러스에 대한 시험관 내 증식 억제시험

MDCK 세포 및 SPF 종란을 이용한 발효, 비발효물 부추의 저병원성 인플루엔자 사멸효능을 조사하였다. 시험물질 적용 전후 해당 물질에 잔존하고 있는 바이러스를 단계별로 희석한 후 희석배수 별로 세포에 감염시켰을 때 나타나는 형태학적 변화 cytopathic effect(CPE) 유무를 통해 바이러스의 역가를 산출하였다. 이때, CPE 유무에 따른 결과를 Spearman-Kärber Method로 환산하여 TCID₅₀/ml로 나타내었으며, 시험대조군 바이러스 경우 세포변성효과를 관찰, 바이러스의 역가를 산출한 결과 10^{6.0}~10^{6.3} TCID₅₀/ml로 확인되었다. 시험관내 인플루엔자 바이러스 Endpoint dilution assay를 실시한 결과 비발효 부추 샘플의 경우 반응 최저 농도가 25 mg/ml, 24시간 발효시킨 부추 샘플의 경우 10 mg/ml의 농도로 인플루엔자 바이러스 증식을 억제시켰다.

(나) 뉴트럴 레드 비색분석 (Neutral Red assay)시험법

MDCK 세포를 이용한 뉴트럴 레드 비색분석을 실시한 결과를 아래의 표에 정리하였다. 비발효한 부추 샘플 3종 및 24시간 발효시킨 부추 샘플 3종은 인플루엔자바이러스에 대한 억제 효능을 확인할 수 없었다. 뉴트럴 레드 비색분석법을 이용한 각 샘플들의 세포 변성효과를 관찰한 결과, 비발효 부추 샘플의 경우 2090.31 ug/ml, 1985.23 ug/ml, 2446.67 ug/ml, 24시간 발효시킨 부추 샘플의 경우 2670.03 ug/ml, 2444.38 ug/ml, 2226.27 ug/ml 농도까지의 세포독성을 확인할 수 있었다.

(다) Plaque Assay

발효 및 비발효 부추 샘플의 적용 이후 바이러스를 세포에 감염시켰을 때 변성이 된 세포(Plaque)의 개수를 직접 측정하여 바이러스의 역가를 산출하였다. 이때, Plaque counting을 보다 용이하게 하기 위하여 crystal violet과 같은 vital dye로 세포를 염색하면 건강한 세포는 dye를 흡수하여 염색이 되고, 감염된 세포는 염색되지 않아 무색으로 확인할 수 있다. 이러한 무색의 plaque 수를 세어 PFU/ml로 나타냈다.

Plaque assay 시험법을 이용한 시험대조군 인플루엔자바이러스의 역가를 산출한 결과 2.7x10^{5.0} PFU/ml로 측정되었으나, 0시간 발효시간 샘플 3종 및 24시간 발효시간 샘플 3종의 인플루엔자바이러스에 대한 억제효능을 확인할 수 없었다. 이는 고농도의 시험물질로 인해 세포독성이 발생하여 해당 세포에서 바이러스 감염 여부를 확인할 수 없기 때문에 인플루엔자 바이러스 역가를 측정할 수 없는 검출 한계를 나타내었다.

표 2-1-10. MDCK 세포 및 SPF 종란을 통한 발효 부추의 조류 인플루엔자 바이러스 H1N1 억제 검증

No	Treatment	Concentration (mg/ml)	Influenza virus (TCID50/ml)		Influenza virus (EID50/ml)	
			Titer	Inhibitory concentration ¹⁾	Titer	Inhibitory concentration
1	0 h -1	50	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		25	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		10	10 ^{6.2}	10 ^{0.1}		
		5	10 ^{6.2}	10 ^{0.1}		
2	0 h -2	50	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		25	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		10	10 ^{6.2}	10 ^{0.1}		
		5	10 ^{6.0}	10 ^{0.3}		
3	0 h -3	50	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		25	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		10	10 ^{6.2}	10 ^{0.1}		
		5	10 ^{6.1}	10 ^{0.2}		
Control	-	-	10 ^{6.3}		10 ^{6.0}	
4	24 h -1	50	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		25	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		10	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		5	10 ^{5.9}	10 ^{0.1}		
5	24 h -2	50	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		25	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		10	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		5	10 ^{5.7}	10 ^{0.3}		
6	24 h -3	50	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		25	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		10	Tox	-	0	10 ^{6.0}
		5	10 ^{5.9}	10 ^{0.1}		
Control	-	-	10 ^{6.0}		10 ^{6.0}	

¹⁾Control potency - Test potency

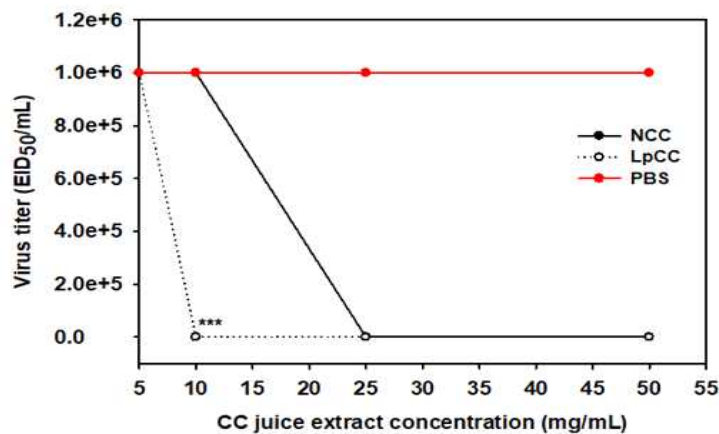


그림 2-1-12. SPF 종란을 이용한 발효, 비발효 부추의 항인플루엔자 바이러스(H1N1) 효능

표 2-1-11. Neutral Red 방법을 이용한 발효 부추의 항 조류 인플루엔자 바이러스 효능 검증

No	Treatment	CC ₅₀ (ug) ¹⁾	IC ₅₀ (ug) ²⁾	SI ³⁾
1	0 h -1	2090.311	-	-
2	0 h -2	1985.231	-	-
3	0 h -3	2446.667	-	-
4	24 h -1	2670.027	-	-
5	24 h -2	2444.377	-	-
6	24 h -3	2226.273	-	-

¹⁾ CC50: 50% cell toxicity concentration

²⁾ IC₅₀: 50% virus-inhibitory concentration

³⁾ SI: selectivity index (CC₅₀/IC₅₀)

표 2-1-12. Plaque 방법을 이용한 발효부추의 항 조류 인플루엔자 바이러스 억제 검증

No	Treatment	Concentration (mg/ml)	Virus content (PFU ₅₀ /ml)
1	0 h -1	10	Tox
		5	1.8x10 ^{5.0}
		2.5	2.5x10 ^{5.0}
2	0 h -2	10	Tox
		5	2.7x10 ^{5.0}
		2.5	2.9x10 ^{5.0}
3	0 h -3	10	Tox
		5	2.7x10 ^{5.0}
		2.5	3.2x10 ^{5.0}
4	24 h -1	10	Tox
		5	3.5x10 ^{5.0}
		2.5	3.7x10 ^{5.0}
5	24 h -2	10	Tox
		5	2.5x10 ^{5.0}
		2.5	2.9x10 ^{5.0}
6	24 h -3	10	Tox
		5	2.3x10 ^{5.0}
		2.5	3.0x10 ^{5.0}
Control	-	-	More than 2.7x10 ^{5.0}

(3) 25%의 부추즙 첨가에 따른 배양액(MRS)에서의 생균수와 pH 변화 조사

MRS 배지에 25%의 부추즙 첨가에 따른 *Lactobacillus plantarum*의 성장곡선 및 pH의 변화는 아래 그림과 같다. 부추즙을 첨가 및 미첨가한 MRS 배양액에서의 초기 CFU는 7.5 (log CFU/ml)로 동일하였으며, 시간이 지남에 따라 동일한 양상으로 생균수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 배양 18시간 때, 두 배양액에서 가장 높은 생균수를 보였으며 그 이후로는 점차 감소하는 것을 보이며 24시간 발효시 부추즙 첨가구는 약 8.6log CFU/ml, 부추즙을 첨가하지 않은 무첨가구 (MRS배지)는 약 9.3log CFU/ml로 나타났다.

pH는 두 배양액이 약 6.2에서 동일하게 배양되었으며 24시간 배양 시 약 4.0으로 두 배양액이 비슷한 수치를 나타내었다.

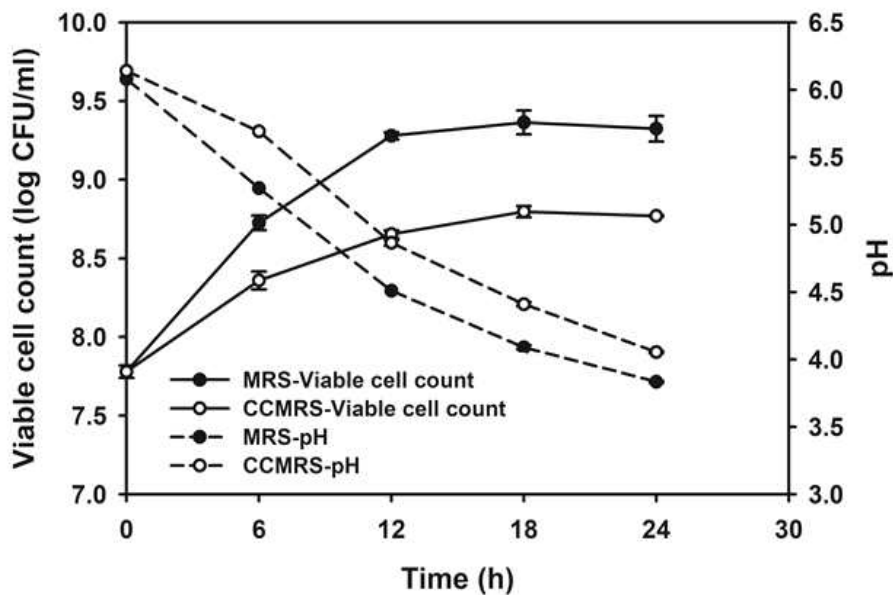


그림 2-1-13. MRS배지에서 부추의 첨가 (최종 25%)에 따른 *Lactobacillus plantarum* SK4719의 성장곡선과 pH의 변화

(4) 유산균, 바실러스, 효모를 이용한 복합 사료첨가제 제조

부추로부터 분리한 균주 3종 (*Saccharomyces cerevisiae* SK4690, *Lactobacillus plantarum* SK4719, *Bacillus subtilis* SK4730)을 이용하여 25% 부추의 복합사료첨가제 제조에 대한 결과를 나타내었다.

초기 접종은 *Lactobacillus plantarum* SK4719를 동일하게 접종하였다. 배양 16시간, 32시간에 *Bacillus subtilis* (0.2% glucose 첨가구 및 무첨가구), *Saccharomyces cerevisiae* (0.2% glucose 첨가구 및 무첨가구)를 다른 순서로 각각 첨가하였으나, pH 환경을 조절하였음에도 불구하고 바실러스, 효모는 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보였다.

본 실험을 통하여 효모와 바실러스는 첨가 순서, glucose의 첨가에 상관없이 25% 부추 배양액에서 생존하지 못하는 것으로 확인되었으며, 이후 가금에 적용할 부추사료첨가제는 *Lactobacillus plantarum* SK4719 단일 균주 사용으로 진행하였다.

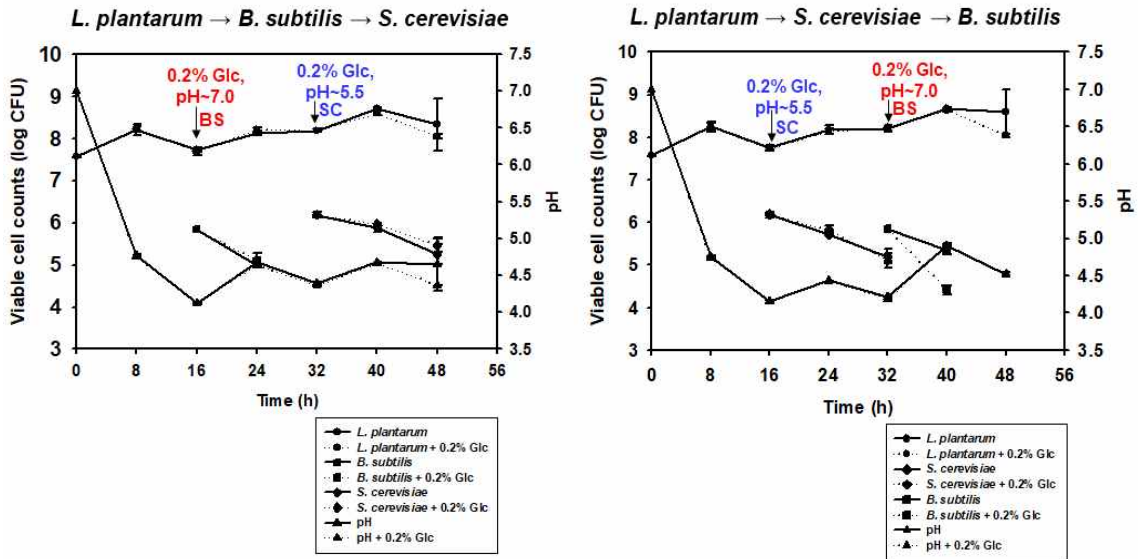


그림 2-1-14. 부추 배양액 내 3종 생균제의 단계별 첨가 시 각 생균제의 성장곡선

(5) 물을 이용한 부추즙의 최적 혼합 비율 및 발효 시간 탐색

물과 서로 다른 농도의 부추즙을 혼합한 배양액에서 1%의 *Lactobacillus plantarum* SK4719 첨가 여부에 따른 생균수 및 pH의 변화를 비교하였다.

생균수의 경우, 10% 및 15%의 부추즙을 혼합하여 발효시켰을 때 가장 많은 유산균이 성장하는 것으로 나타났으며, pH는 동일한 농도에서 낮은 수치를 보였다. 위의 결과에 따라 10% 및 15%의 부추즙이 혼합된 발효물을 가금의 병원성균 및 조류 인플루엔자 바이러스 억제능 등 분석과 육계 사양실험에 사용하였다.

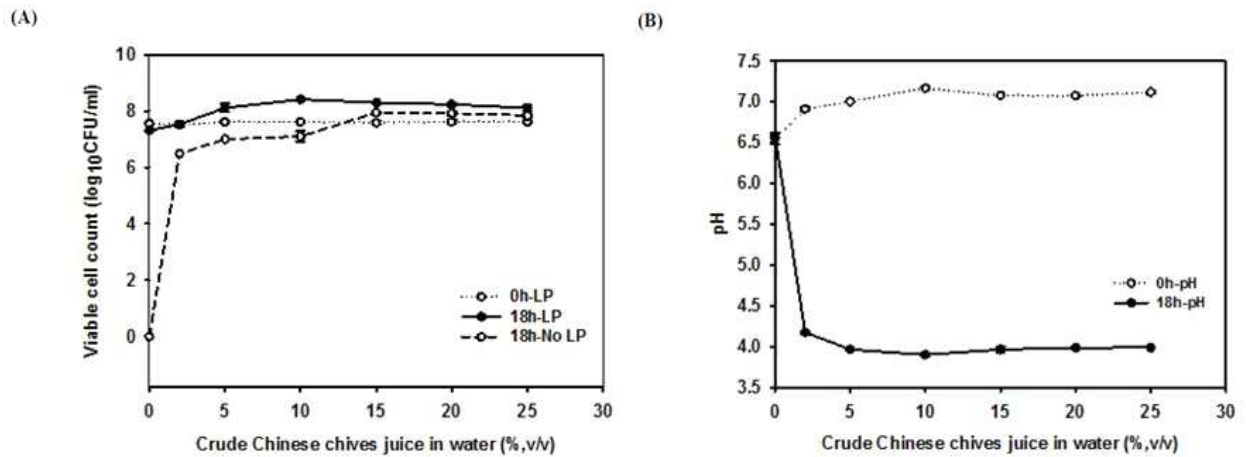


그림 2-1-15. 물과 부추즙의 비율을 달리한 배양액에서 *Lactobacillus plantarum* SK4719 성장 분석

(6) 물과 15% 부추즙을 혼합한 배양액에서 생균제의 생존성 조사

미생물 배양을 위한 배지 영양분 추가없이 단순한 물에 여과된 부추즙 (최종 15%)를 혼합한 것에 *Lactobacillus plantarum* SK4719 첨가 (최종 1%)에 따른 생균수 및 pH의 변화를 아래의 그림에 나타내었다.

초기 생균수는 1% 첨가구에서 7.6 logCFU/ml, 무첨가구에서 5.7 logCFU/ml로 시작되었으며 배양이 진행됨에 따라 두 배양액 내 유산균 수가 점차 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 배양 14시간 이후 무첨가구에서 생균수가 급격하게 감소하는 반면, 1% 첨가구에서는 지속적으로 성장하는 것을 보였다. 이는 *Lactobacillus plantarum* SK4719의 1% 첨가가 무첨가구(자연발효)보다 더 많은 유산균 수를 확보할 수 있게 되었다.

pH의 경우 시작 시점에는 7.2로 동일하게 시작되었으나, 시간이 지남에 따라 점차 감소하고 14시간 이후 점차 상승하는 경향을 보였다.

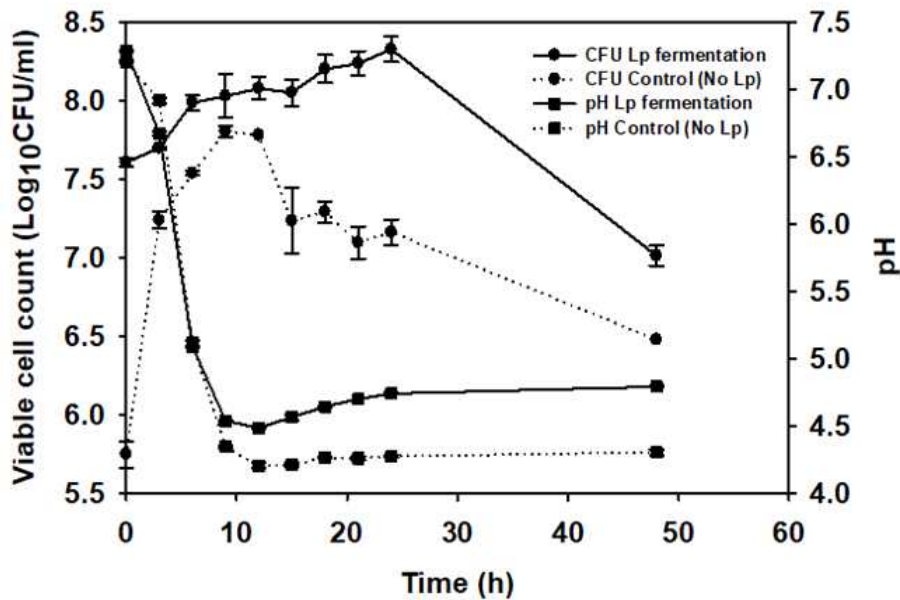


그림 2-1-16. 물과 15% 부추즙을 혼합한 배양액에서 *Lactobacillus plantarum* SK4719 첨가에 따른 생균수 변화

(7) 10%의 부추즙에 첨가된 MRS 배양액 및 물에서의 유산균 성장 비교

10%의 부추즙이 혼합된 물 또는 MRS 배양액 내 유산균의 성장 및 pH의 변화를 조사하였다. MRS의 경우, 1% *Lactobacillus plantarum* SK4719를 첨가한 배양액은 약 7.5 logCFU/ml, 무첨가한 배양액은 약 6.4 logCFU/ml의 생균수로 시작되었으며 24시간 배양시 각각 9.5 logCFU/ml, 9.0 logCFU/ml 정도의 총균수를 나타내었다.

반면, 물을 이용한 부추 배양액에서 1% *Lactobacillus plantarum* SK4719를 첨가한 배양액은 약 6.3 logCFU/ml, 무첨가한 배양액은 약 5.6 logCFU/ml의 생균수로 시작되었으며 24시간 배양시 첨가구는 약 8.2 logCFU/ml로 성장하였으나, 무첨가구는 배양 12시간 이후 점차 감소하는 추세를 보였다. 유산균 첨가구가 무첨가구보다 많은 양의 생균수를 배양하였으며, MRS 및 물을 이용했을 때, *Lactobacillus plantarum* SK4719이 정상적으로 생장이 가능한 것으로 판단되었다. 초기 pH는 MRS의 경우 약 8.5, 물의 경우 9.5로 서로 다른 pH 환경에서 실험이 시작되었으나 24시간 및 48시간 배양 이후 4~4.5까지 감소하며 비슷한 환경을 나타내었다.

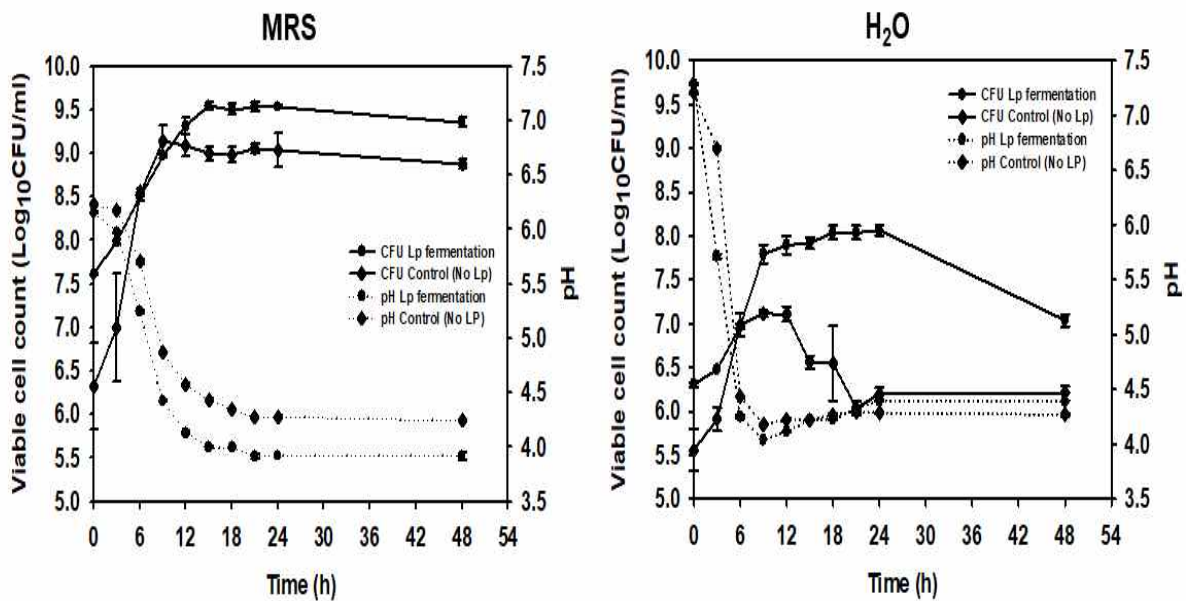


그림 2-1-17. 10%의 부추즙이 첨가된 MRS 배양액 및 물에서의 유산균 성장 및 pH 비교

(8) UPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS를 이용한 부추의 발효 전후에 있어서 대사물질의 성분 비교 및 발효부추로부터의 항AI활성 유효지표물질 발굴

발효 전후의 부추즙 내 대사산물 변화를 확인하기 위해 다변량 분석과 UHPL-LTQ-Orbitrap-MS 분석을 한 결과를 아래 그림과 표에 나타내었다. PCA score plot은 PC1 (37.3%) 및 PC2 (10%)를 따라 비발효 및 발효 내 대사물질들을 비교하였다.

비교결과 7개의 플라보노이드 대사물질과, 5개의 사포닌 (구조 미확인), 3개의 지방산 유래 화합물, 2개의 아미노산, 1개의 알칼로이드, 1개의 유기산 및 1개의 benzofuran coumarin 등 21개의 2차 대사산물이 상이함을 확인하였다. 그 중에서도 18개의 대사산물이 발효부추와 비발효 부추간의 유의한 판별 변수로 관찰되었다.

비발효 부추에서는 (1) N-(1-deoxy-1-fructosyl)phenylalanine, (3) glycyrol, (4) tryptophan, (20) tianshic acid와 같은 몇몇 대사물질들이 발효 부추보다 상대적으로 함량이 높았다.

24시간 발효시킨 부추는 (2) 3-(2,3,4-trihydroxy-5-methoxyphenyl)propanoic acid, (5, 9) benzoylmesaconine, (7) kaempferol-sophoroside, (8) isorhamnetin 3,4' -diglucoside, (10) quercetin-di-glucoside, (11) quercetin-hexoside (isoquercitrin or isoquercetin), (15) kaemperol-glucoside, (21) 12-hydroxystearic acid 및 미확인된 사포닌 (13, 14, 16, 17, 18) 이 증가하였다.

표 2-1-13. UHPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS를 이용한 부추즙 내 대사물질 분석

No.	Tentatively identified metabolites	RT (min)	MW	Measured mass	MS/MS fragments	Class of compounds
				Negative mode (m/z)		
1	N-(1-Deoxy-1-fructosyl)phenylalanine	1.09	327	326.1204 [M-H]-	326>308/278/236/206/164	Amino acid
2	3-(2,3,4-trihydroxy-5-methoxyphenyl)propanoic acid	1.75	228	227.1379 [M-H]-	227>183/209	Organic acid
3	Glycyrol	1.83	366	365.1305 [M-H]-	365>275/347/203/317	Coumestan
4	Tryptophan	1.92	204	203.0811 [M-H]-	203>159/116/142/186	Amino acid
5,9	Benzoylmesaconine	3.79/4.22	559	558.2698 [M-H]-	558>540/514/496/470/452/395	Alkaloid
6	Feruloyl-galactaric acid	3.97	386	385.0720 [M-H]-	385>191/209/367	Organic acid
7	Kaempferol-diglucoside or Kaempferol-sophoroside	4.00	610	609.1408 [M-H]-	609>447/285/489/581	Flavonol
8	Isorhamnetin 3,4'-diglucoside	4.21	640	639.3306 [M-H]-	639>621/579/549/519/477	Flavonol
10	Quercetin-di-glucoside	4.33	626	625.1360 [M-H]-	625>463/300/445/505/607	Flavonol
11	Quercetin-hexoside	4.76	464	463.0843 [M-H]-	463>301	Flavonol
12	Kaempferol diglucoside -(feruloylglucoside)	4.77	948	947.2372 [M-H]-	947>623/785/447/609/285	Flavonol
13	Saponins	4.92	808	807.4156 [M-H]-	807>789/763/717/645	Saponin
14	Saponins	4.99	852	851.4416 [M-H]-	851>833/807/761/689/512	Saponin
15	Kaempferol-glucoside	5.01	448	447.0897 [M-H]-	447>284/255	Flavonol
16	Saponins	5.05	896	895.4661 [M-H]-	895>877/859/763/745	Saponin
17	Saponins	5.11	940	939.4932 [M-H]-	939>921/895/848/776	Saponin
18	Saponins	5.17	984	983.5189 [M-H]-	983>789/803/771/951/821	Saponin
19	Oxo-dihydroxy-octadecenoic acid	6.25	328	327.2145 [M-H]-	327>309/291/273/247/239	Fatty acid
20	Tianshic acid	6.50	330	329.2291 [M-H]-	329>311/293/229/211/171	Fatty acid
21	12-Hydroxystearic acid	9.66	300	299.2562 [M-H]-	299>281/253	Fatty acid

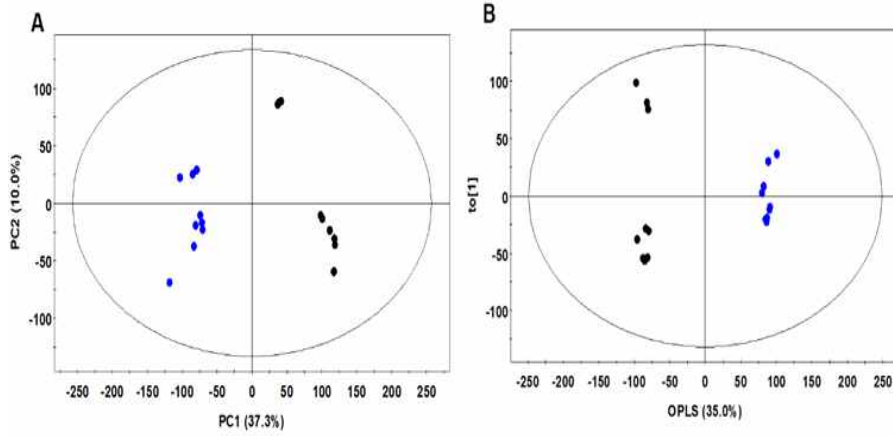


그림 2-1-18. 주요 성분 분석 (PCA) 점수 도표

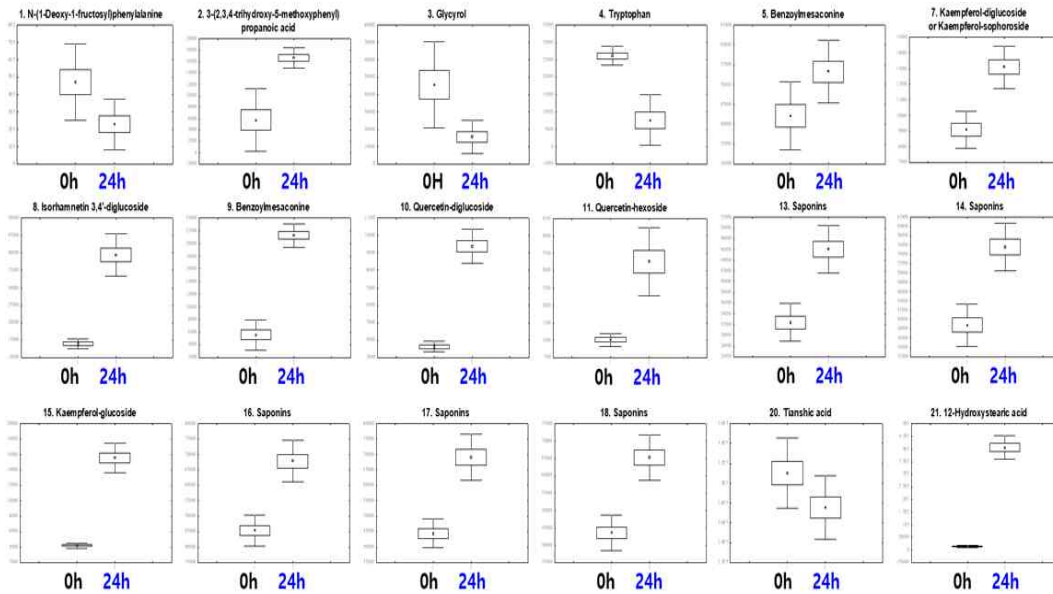


그림 2-1-19. UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS를 이용한 발효 및 비발효 부추즙의 대사물질 비교

(9) 육계의 발효 및 비발효 부추 사료첨가제 급여 효과 비교

(가) 체중, 일당증체량, 사료섭취량 및 사료효율

항생제 및 서로 다른 형태의 부추 첨가 급여에 따른 육계의 생산성 결과는 아래의 표와 같다. 실험 시작일부터 종료시 5주까지의 체중은 모든 처리구에서 통계적 유의차를 보이지 않았으며, 그 중 대조군 (C, Negative control)의 평균치가 가장 낮게 나타났다. 일당증체량 (ADG)도 모든 처리구에서 유의차를 보이지 않았다. 사료섭취량은 28일령까지 모든 처리구에서 비슷한 양의 사료를 섭취하였으나, 5주차에서 PC (Positive control) 그룹이 평균 159.74 g/day로 나타내며 다른 처리구보다 유의적으로 더 많이 섭취하였다 ($p < 0.05$). 사료효율은 실험 2주차와 4주차 때 PC 처리구가 유의적으로 낮은 FCR 수치를 나타내었다 ($p < 0.05$).

전체 기간으로 보았을 때, 항생제 및 부추 첨가급여가 육계의 생산성에 유의적인 영향을 보이지 않았다. 부추 급여 처리구가 음성대조구보다 수치적으로 더 많이 증체하였으며, 사료효율도 개선이 되는 것으로 보였다.

한 등 (2012)은 빵잎 및 잠분 추출물을 육계에 급여하였을 때 종료체중과 증체량에서 평균 값의 차이는 있었지만 통계적인 유의적 차이는 볼 수 없었다. 대숲 및 대잎을 급여한 김 등 (2011)의 연구논문에서는 첨가구의 육계가 출하 시 체중이 증가하였다. 허브의 종류인 마늘을 포함한 천연물을 육계에 급여하였을 때 대조구 대비 사료 섭취량은 증가하였지만 사료 효율에는 차이가 없다고 보고 하였다 (Ramiah 등, 2014).

본 실험 결과에서 육계의 생산성에 있어 부추의 첨가 급여는 유의적으로 영향을 주지는 않지만 부추의 미발효(NCC) 및 발효첨가제(FCC)는 음성대조구에 비하여 육계의 증체와 FCR을 개선하는 경향을 보였다.

표 2-1-14. 부추 사료첨가제 급여에 따른 육계 (Ross 308)의 생산성 비교

Item	Treatment				SEM	p-value
	C	PC	NCC	FCC		
1 week (7 days)						
Body weight, g	134.44	134.44	134.45	134.45	0.02	0.99
2 week (14 days)						
Body weight, g	321.09	338.55	323.41	333.95	4.22	0.43
ADFI, g	57.65	55.09	56.40	61.25	0.96	0.12
ADG, g	26.66	29.16	26.99	28.50	0.06	0.43
FCR	2.18 ^a	1.89 ^b	2.10 ^a	2.16 ^a	0.04	<0.05
3 week (21 days)						
Body weight, g	656.99	714.10	670.16	697.15	10.16	0.18
ADFI, g	70.08	72.96	71.70	71.76	1.10	0.86
ADG, g	47.98	53.65	49.54	51.88	0.97	0.17
FCR	1.47	1.36	1.45	1.39	0.02	0.36
4 week (28 days)						
Body weight, g	1119.28	1205.55	1155.54	1171.85	16.32	0.32
ADFI, g	108.89	107.69	110.24	111.07	1.45	0.87
ADG, g	66.04	70.21	69.34	67.82	1.02	0.52
FCR	1.65 ^a	1.53 ^b	1.59 ^{ab}	1.64 ^a	0.02	0.07
5 week (35 days)						
Body weight, g	1519.66	1653.85	1554.73	1583.67	25.99	0.33
ADFI, g	144.43 ^b	159.74 ^a	137.31 ^b	142.57 ^b	2.91	<0.05
ADG, g	57.20	64.04	57.03	58.83	2.08	0.63
FCR	2.55	2.50	2.57	2.49	0.08	0.98
Total period						
Total gain, g	1385.22	1519.41	1420.28	1449.22	25.98	0.33
ADFI, g	95.26	98.87	94.54	96.97	1.05	0.50
FCR	1.84	1.73	1.79	1.77	0.02	0.47

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

C, Negative control; PC, Positive control; NCC, Non-fermented Chinese chives; FCC, Fermented Chinese chives

(나) 장기 무게 및 육량

부추 및 항생제의 급여에 따른 육계의 장기 (간, 비장 및 F낭)와 육량에 대한 차이는 아래의 표와 같으며, 생체중 100 g당 g으로 나타내었다. 비장의 무게는 항생제 첨가구인 PC처리구와 FCC 처리구가 다른 처리구보다 유의적으로 비장이 가벼운 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). 간의 무게는 FCC 처리구가 다른 처리구보다 비교적 낮은 경향을 보였다 ($p < 0.1$). F낭 지표 및 가슴육과 다리육의 육량은 유의적 차이는 보이지 않았다.

비장은 면역세포가 밀집되어 있는 면역체계에서 가장 중요한 림프기관으로 항원이 제시되거나 면역반응이 급속하게 진행되면 이에 반응하여 크기가 증가, 비장비대증이 일어나게 된다(김 등, 2014). 간의 무게는 스트레스로 인해 급격히 증가하는 것으로 알려져 있으며 이로 인해 간세포의 염증이 유발되고 지방간 등 간질환이 일어나는 것으로 알려져 있다 (Odeleye 등, 1992).

천연물질인 매실 또는 생리활성 오일을 육계에 급여한 결과 간을 비롯한 면역 장기의 무게에는 영향이 없는 것으로 밝혀졌다 (장인석, 2015). 울금을 4주령 마우스에 급여, 비장비대증을 유발시키는 LP-BM5를 감염시킨 결과 무첨가구는 간의 무게가 증가하는 반면, 울금 첨가구는 간의 무게가 유지되는 것을 보고하였다 (김 등, 2014). Ao 등 (2011)의 연구에서 육계에 발효 홍삼 0.001%를 급여하였을 때 다른 장기들의 무게는 변화가 없었지만 F낭과 비장의 무게는 증가하였음을 보고하였고 ($p < 0.05$), 마늘 추출물을 육계에 급여하였을 때 F낭의 무게가 증가하였다고 보고하였다 (Rahimi 등, 2011).

본 연구에서 발효부추 사료첨가제를 육계에 급여하였을 때, 비장과 간의 무게가 낮아지는 결과를 보였으며, 이는 항염증 등 체내 자가면역 시스템에 있어 개선된 것으로 사료된다.

표 2-1-15. 부추 사료첨가제 급여에 따른 육계의 장기 및 계육의 무게

Item	Treatment				SEM	p-value
	C	PC	NCC	FCC		
	g/100 g body weight					
Spleen	0.12 ^a	0.09 ^b	0.11 ^{ab}	0.09 ^b	0.003	<0.05
Liver	2.20 ^{ab}	2.26 ^a	2.26 ^a	2.06 ^b	0.032	0.09
Fabricius	0.19	0.21	0.18	0.20	0.007	0.43
Breast	13.57	14.07	13.65	14.02	0.161	0.62
Thigh	12.86	12.81	13.38	13.06	0.107	0.22

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

C, Negative control; PC, Positive control; NCC, Non-fermented Chinese chives; FCC, Fermented Chinese chives

(다) 부추 사료첨가제 급여에 따른 계육의 품질 비교

부추 및 항생제의 급여에 따른 계육의 품질에 대한 비교 결과를 아래의 표에 나타내었다.

가열감량 (Cooking loss)은 가슴육, 다리육에서 유의적인 차이가 없었다. 특히 FCC 처리구는 계육 중 가슴육의 명도 (Lightness; L*) 및 노란색 (yellowness; b)의 수치가 유의적으로 높았으나 ($p < 0.05$), 적색을 나타내는 a는 모든 처리구가 비슷하였다.

다리육은 NCC 처리구에서 명도가 유의적으로 높았으나, 적색 a는 FCC 처리구가 ($p < 0.05$), 노란색 b는 PC 처리구에서 높은 수치를 나타내었다 ($p < 0.1$). 계육의 pH는 모든 처리구가 비슷하였다.

일반적으로 육색은 소비자의 기호도와 소매점의 저장 기간을 결정하는 중요한 품질 특성 중 하나이며, 주로 급여되는 사료에 영향을 받는다는 보고가 있다 (Dugan 등, 1999). 명도는 백색도를 의미하는 것으로 가슴육의 경우 지방이 매우 적어 근육섬유로만 이루어진 white meat이며, 다리육의 경우 운동을 많이 하는 부위로 육질이 단단하며 탄력있고 단백질이 조화를 이루어 근육의 색이 짙다 (Dark meat). 즉, 명도가 높으면 근육의 색이 좋아지며 신선도가 높아져 계육의 품질이 개선된다.

이를 볼 때, 부추사료첨가제 급여시 계육(가슴육 및 다리육)의 신선도를 개선시켜주어 시장성이 높아질 것으로 판단된다.

표 2-1-16. 부추 사료첨가제 급여에 따른 계육의 품질특성 비교

Item	Treatment				SEM	p-value
	C	PC	NCC	FCC		
Cooking loss, %						
Breast	68.00	69.89	69.95	68.03	0.52	0.36
Thigh	68.57	68.63	68.81	70.71	0.43	0.24
Meat quality						
L*	57.75 ^{ab}	55.45 ^b	57.46 ^{ab}	59.29 ^a	0.50	<0.05
Breast a*	2.59 ^{ab}	2.46 ^{ab}	3.24 ^a	2.00 ^b	0.19	0.14
b*	12.89 ^{ab}	12.89 ^{ab}	11.55 ^b	13.44 ^a	0.26	<0.05
L*	55.14 ^b	55.91 ^b	57.86 ^a	55.31 ^b	0.36	<0.05
Thigh a*	14.47 ^{ab}	12.20 ^c	13.29 ^{bc}	14.83 ^a	0.27	<0.05
b*	6.30 ^b	7.47 ^a	6.21 ^b	6.64 ^{ab}	0.19	0.08
pH						
Breast	5.59	5.61	5.64	5.55	0.02	0.33
Thigh	6.09	6.23	6.19	6.03	0.03	0.13

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

C, Negative control; PC, Positive control; NCC, Non-fermented Chinese chives; FCC, Fermented Chinese chives

(라) 소장(십이지장, 공장, 회장) 및 맹장의 길이와 무게

육계 사료내 부추 사료첨가제의 첨가 급여가 육계의 소장의 길이 및 무게에 미치는 영향을 아래의 표에 나타내었다. 소장 분획별 십이지장, 공장 및 회장의 길이에서는 음성 대조구(C) 및 발효부추 처리구(FCC)가 다른 처리구보다 유의적으로 긴 것으로 나타났으며 ($p < 0.05$), 맹장의 경우에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 소장 (십이지장, 공장, 회장)의 상대적 중량은 FCC 처리구에서 다른 처리구에 비해 유의적으로 무거웠고($p < 0.05$), 항생제 첨가구에서는 가장 가벼웠다. 맹장의 무게는 다른 처리구와 유의적 차이가 없었다.

소장은 단백질, 지방, 탄수화물 등 주요 영양소들의 소화가 일어나는 곳으로 Dror 등(1977)의 보고에 따르면, 소장 길이의 증가는 병아리의 생체중과 아주 밀접한 연관이 있다고 하였다. 김 등 (2000)의 연구에서, 육계사료 내 생균제를 첨가하였을 때 십이지장, 공장 및 회장의 길이와 무게가 증가하여 소장 내 영양소를 흡수할 수 있는 표면적을 늘려줌으로써 사료 효율을 개선시킴을 보고하였다. 한편, Foster (1972)와 Stutz 등 (1983)은 사료 내 항생제의 첨가급여가 소장길이와 무게, 장벽의 두께가 감소하였다고 보고하였으며, 이는 본 실험의 연구결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

전체적으로 보았을 때, 부추, 특히 발효 부추첨가제를 육계에 급여하였을 때 소장의 길이와 무게를 유의적으로 개선시켜 사료 내 영양소 소화 능력을 도와주는 것으로 나타났다.

표 2-1-17. 부추 사료첨가제 급여에 따른 소장(십이지장, 공장, 회장) 및 맹장의 길이 변화

Item	Treatment				SEM	p-value
	C	PC	NCC	FCC		
	cm/100 g body weight					
Duodenum	2.10 ^a	1.88 ^{ab}	1.80 ^b	2.00 ^{ab}	0.04	<0.05
Jejunum	5.03 ^a	4.27 ^b	4.25 ^b	4.93 ^a	0.11	<0.05
Ileum	5.57 ^a	4.48 ^b	4.75 ^b	4.94 ^{ab}	0.15	<0.05
Cecum	2.27	2.19	2.15	2.04	0.05	0.49

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

C, Negative control; PC, Positive control; NCC, Non-fermented Chinese chives; FCC, Fermented Chinese chives

표 2-1-18. 부추 사료첨가제 급여에 따른 소장(십이지장, 공장, 회장) 및 맹장의 무게

Item	Treatment				SEM	p-value
	C	PC	NCC	FCC		
	g/100 g body weight					
Duodenum	0.58 ^b	0.45 ^b	0.58 ^b	0.93 ^a	0.04	<0.01
Jejunum	0.95 ^a	0.76 ^b	0.88 ^{ab}	0.93 ^a	0.03	<0.05
Ileum	0.92 ^a	0.75 ^b	0.88 ^{ab}	0.92 ^a	0.03	0.08
Cecum	0.38	0.34	0.34	0.34	0.02	0.86

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

C, Negative control; PC, Positive control; NCC, Non-fermented Chinese chives; FCC, Fermented Chinese chives

(마) 부추 사료첨가제 급여에 따른 공장, 회장 및 맹장 내 미생물 총균수 비교

부추 사료첨가제의 급여에 따른 육계 내 소장 및 맹장 내 총균수를 분석한 결과는 아래와 같으며, 사용한 배지는 MRS, NA, Macconkey, ST(*Streptococcus thermophilus*), SS (*Salmonella shigella*) 평판배지를 사용하였다.

공장의 경우, 발효부추 첨가한 처리구(FCC)에서 *E. coli* 등 병원성 균 선택배지인 Macconkey와 SS에서 유의적으로 적은 균수를 보였으며, 그에 반하여 항생제 처리구(PC)는 모두 높은 균총수를 나타내었다 ($p < 0.05$).

유산균이 자라는 MRS 배지에서는 FCC 처리구가 PC 및 NCC 처리구에 비해 높은 균총수를 나타내었다 ($p < 0.05$). 회장, 맹장에서도 동일한 결과를 나타내었으며, 이를 보았을 때 발효 부추사료첨가제의 급여는 육계 장내 유산균이 성장할 수 있는 환경 조성과 동시에 병원균의 성장을 억제시켜 육계의 성장에 긍정적인 영향을 주는 것으로 사료된다.

표 2-1-19. 부추 사료첨가제 급여에 따른 공장 내 미생물 균총 변화

Item	Treatment (log CFU/g)				SEM	p-value
	C	PC	NCC	FCC		
MacConkey	6.51 ^b	7.36 ^a	7.45 ^a	6.16 ^b	0.15	<0.01
MRS	8.41 ^a	7.60 ^b	7.59 ^b	8.28 ^a	0.13	<0.05
NA	8.05 ^a	6.87 ^b	6.60 ^b	7.98 ^a	0.16	<0.01
ST (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	7.03	6.81	6.53	6.78	0.11	0.47
SS (<i>Salmonella shigella</i>)	6.21 ^{ab}	6.56 ^a	5.65 ^b	5.62 ^b	0.15	0.05

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

C, Negative control; PC, Positive control; NCC, Non-fermented Chinese chives; FCC, Fermented Chinese chives

표 2-1-20. 부추 사료첨가제 급여에 따른 회장 내 미생물 균총 변화

Item	Treatment (log CFU/g)				SEM	p-value
	C	PC	NCC	FCC		
MacConkey	6.47 ^b	8.26 ^a	7.32 ^b	7.16 ^b	0.18	<0.01
MRS	9.08 ^a	8.34 ^b	8.85 ^a	8.92 ^a	0.07	<0.01
NA	7.51 ^b	8.26 ^a	7.72 ^b	8.26 ^a	0.10	<0.05
ST (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	8.28	8.11	8.31	8.40	0.06	0.49
SS (<i>Salmonella shigella</i>)	5.42 ^c	7.78 ^a	6.12 ^b	5.75 ^{bc}	0.21	<0.01

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

C, Negative control; PC, Positive control; NCC, Non-fermented Chinese chives; FCC, Fermented Chinese chives

표 2-1-21. 부추 사료첨가제 급여에 따른 맹장 내 미생물 균총 변화

Item	Treatment (log CFU/g)				SEM	p-value
	C	PC	NCC	FCC		
MacConkey	7.60	7.56	6.90	7.17	0.12	0.11
MRS	9.26 ^a	8.50 ^b	9.14 ^a	9.10 ^a	0.10	<0.05
NA	7.80 ^{ab}	8.16 ^a	7.47 ^b	7.7 ^{ab}	0.11	0.16
ST (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	8.99	8.57	8.81	8.72	0.11	0.62
SS (<i>Salmonella shigella</i>)	6.84 ^b	7.22 ^a	6.44 ^c	6.40 ^c	0.09	<0.05

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

C, Negative control; PC, Positive control; NCC, Non-fermented Chinese chives; FCC, Fermented Chinese chives

(바) 가금(육계)의 장내 미생물 동정

육계의 소장(십이지장, 공장, 회장) 및 맹장에 존재하는 우점종 미생물을 선별하여 동정하였으며, 그 결과는 아래와 같다. 사용한 배지는 MRS, NA, Macconkey, ST(*Streptococcus thermophilus*), SS (*Salmonella shigella*) 평판배지를 사용하였다.

육계 내에 서식하는 우점종 중 병원성 균으로는 *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* 등으로 나타났다. 이들은 창자, 소화 기관, 위 호흡 기관, 비뇨 생식기계 등에서 서식하는 균으로 호흡기, 폐렴, 위장관 및 비뇨 생식기 등 질병을 유발하는 병원성 균주로 보고되고 있다 (Podder 등, 2014; Davidson 등, 2015).

유익균으로는 *Lactobacillus salivarius*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus alactolyticus* 등으로 나타났다. *Streptococcus alactolyticus*는 가축 내 분변 및 장에서 서식하는 균주로 알려져 있으며, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*와 같이 유산균 및 비병원성 균인 것으로 보고되었다 (Minna 등, 2004). *Lactobacillus salivarius*는 과민성 대장 증후군, 췌장 괴사 등의 질병 억제, 염증성 사이토카인 및 박테리아의 증식을 억제시키는 것으로 보고되었다 (Ridwan 등, 2008; Ortiz-Lucas 등, 2013).

표 2-1-22. 가금 장내 우점종 미생물

Stock #	Description	Query cover (%)	Ident (%)	Media	Degree (°C)	Isolation
SK4862	<i>Cronobacter sakazakii</i>	99	96	SS	30, 37°C	Caecum
SK4863	<i>Escherichia coli</i>	99	98	SS	30, 37°C	Jejunum
SK4864	<i>Klebsiella</i> sp.	99	97	SS	30, 37°C	Caecum
SK4865	<i>Escherichia coli</i>	100	98	SS	30, 37°C	Caecum
SK4866	<i>Escherichia coli</i>	100	98	SS	30, 37°C	Caecum
SK4867	<i>Proteus mirabilis</i>	89	95	SS	30, 37°C	Caecum
SK4868	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99	98	MRS	30, 37°C	Jejunum
SK4869	<i>Escherichia coli</i>	99	98	MRS	30, 37°C	Caecum
SK4870	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	99	99	ST	30, 37°C	Jejunum
SK4871	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	98	96	ST	30, 37°C	Jejunum
SK4872	<i>Enterococcus faecium</i>	99	98	ST	30, 37°C	Jejunum
SK4873	<i>Escherichia coli</i>	98	98	ST	30, 37°C	Jejunum
SK4874	<i>Escherichia coli</i>	99	99	Mac	30, 37°C	Caecum
SK4875	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	98	Mac	30, 37°C	Caecum
SK4876	<i>Escherichia coli</i>	99	97	Mac	30, 37°C	Caecum
SK4877	<i>Proteus mirabilis</i>	99	97	Mac	30, 37°C	Caecum
SK4878	<i>Escherichia coli</i>	99	98	Mac	30, 37°C	Caecum
SK4879	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	97	Mac	30, 37°C	Caecum
SK4880	<i>Escherichia coli</i>	100	97	Mac	30, 37°C	Caecum
SK4881	<i>Escherichia coli</i>	99	98	Mac	30, 37°C	Caecum
SK4882	<i>Escherichia coli</i>	99	98	NA	30, 37°C	Jejunum
SK4883	<i>Enterococcus faecium</i>	99	98	BSA	30, 37°C	Jejunum
SK4884	<i>Enterococcus faecium</i>	100	99	BSA	30, 37°C	Ileum
SK4885	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99	99	MRS	30, 37°C	Caecum

(10) 마우스 (SPF BALB/c)를 이용한 부추발효물의 저병원성 조류 인플루엔자바이러스 (H1N1) 사멸 효능시험

(가) 농도별 부추발효물의 마우스 내 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 억제 시험

마우스 내 조류 인플루엔자 바이러스(H1N1)을 공격 접종하면서 부추발효물의 항바이러스 효능을 검증하기 위해 SPF BALB/c 6주령 마우스를 48수 공시하였다. 실험 설계는 아래와 같다.

표 2-1-23. 마우스를 이용한 부추발효물의 항 조류 인플루엔자 바이러스 시험 설계구

시험군	공시수수	그룹	투여물질	투여농도 (mg/kg)
Group 1	8	경구투여군	부추발효물	30
Group 2	8	경구투여군		150
Group 3	8	경구투여군		300
Group 4	8	경구투여군	타미플루	100
Group 5	8	대조군(공격접종)	PBS	-
Group 6	8	대조군(비공격접종)	PBS	-

부추발효물 및 타미플루 투여군 (200ul/마리/day)에 대하여 인플루엔자 바이러스 공격접종 전 2주부터 공격접종($10^{4.5}/90\mu\text{l}/\text{dose}$) 후 2주까지 경구 투여하여 예방 및 치료 효능을 확인하고자 하였다. 처리구별 시험물질 투여 전 및 인플루엔자 바이러스 공격접종 전 각각 체중을 측정하였으며, 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 3주간 임상증상 및 폐사율의 감소 효과를 관찰하였다.

SPF BALB/c 마우스를 이용한 생체 내 인플루엔자 바이러스 H1N1 공격접종 후 임상증상 발현 억제효과를 시험한 결과, 양성대조군의 경우 공격 접종 후 7.9일 만에 100% 폐사하였으며, 이는 농도별 부추발효물을 투여한 처리군과 비슷하였다.

표 2-1-24. 조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 공격접종 후 임상증상 및 폐사율 시험결과

시험군	농도 ^A (mg/kg)	접종 수수	공격접종 결과				투여농도	
			임상증상		폐사			
			Sick ^B	MTO (day) ^C	Dead ^D	MDT (day) ^E		
G1	30	8	8/8	3	8/8	6.9	2.0	
G2	부추 발효물	150	8	8/8	3	8/8	7.3	2.0
G3	300	8	8/8	3	8/8	7.1	2.0	
G4	타미 플루	100	8	0/8	4	0/8	-	0.5
G5	양성 대조군	PBS	8	8/8	3	8/8	7.9	2.0
G6	음성 대조군	PBS	8	0/8	-	0/8	-	-

^A 투여량: 경구투여(200ul/day)

투여기간: 공격접종 전 2주 예방 및 공격접종 후 2주 치료

^B 임상증상 발현수수/접종수수

^C Mean time of onset of clinical signs

^D 폐사수수/접종수수

^E Mean death time

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

표 2-1-25. 조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 공격접종에 따른 체중의 변화

그룹	체중(g) (Mean ± SD)		
	시험물질 투여 전 ^{A)}	공격접종 전 ^{B)}	공격접종 3주 후 ^{C)}
G1	18.9±0.7	18.8±0.7	0±0
G2	18.3±1.4	18.8±0.8	0±0
G3	19.1±1.0	19.4±0.8	0±0
G4	18.3±0.8	18.9±0.3	18.8±0.4
G5	17.4±0.4	18.6±0.4	0±0
G6	17.8±0.8	18.8±0.6	19.4±0.6

^A 시험물질 투여 전 체중 및 표준편차

^B 공격접종 전 체중 및 표준편차

^C 공격접종 3주 후 생존개체에 대한 체중 및 표준편차

(나) 고농도 부추발효물의 마우스 내 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 억제 시험

마우스 내 조류 인플루엔자 바이러스(H1N1)을 공격 접종함에 있어서 고농도 부추발효물의 항바이러스 효능을 검증하기 위해 SPF BALB/c 마우스 7주령을 36수 공시하였다. 실험 설계는 아래와 같다.

표 2-1-26. 마우스를 이용한 고농도 부추발효물의 항 조류 인플루엔자 바이러스 시험 설계구

시험군	공시수수	그룹	투여물질	투여농도 (mg/kg)
Group 1	6	경구투여군	부추발효물	1,000
Group 2	6	경구투여군		2,000
Group 3	6	경구투여군		4,000
Group 4	6	경구투여군	타미플루	100
Group 5	6	대조군(비공격접종)	0.1% DMSO	-
Group 6	6	대조군(공격접종)	0.1% DMSO	-

부추발효물 및 타미플루 투여군 (200ul/마리/day)에 대하여 인플루엔자 바이러스 공격접종 전 2주부터 공격접종($10^{4.5}/90\mu\text{l}/\text{dose}$) 후 7일까지 각 샘플을 경구 투여하여 예방 및 치료 효능을 확인하고자 하였다. 처리구별 시험물질 투여 전 및 인플루엔자 바이러스 공격접종 전 각각 체중을 측정하였으며, 인플루엔자 바이러스 공격접종 3일, 6일 후 시험군 및 대조군 각 3수씩 체중 측정 및 폐(Lung)에서 바이러스 역가검정을 실시하였다.

시험 결과, 고농도의 부추발효물 투여군은 대조군 (공격접종)와 비슷하게 폐 내 바이러스 역가가 감소하지 않은 것으로 확인되었다.

표 2-1-27. 조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 공격접종 후 임상증상 결과

시험군	농도 ^A (mg/kg)	접종 수수	공격접종 결과	
			임상증상 Sick ^B	
G1	1,000	6	6/6	
G2	부추발효물	2,000	6	6/6
G3	4,000	6	6/6	
G4	타미플루	100	6	6/6
G5	대조군(비공격접종)	0.1% DMSO	6	6/6
G6	대조군(공격접종)	0.1% DMSO	6	6/6

^A 투여량: 경구투여(200ul/day)

투여기간: 공격접종 전 2주 예방 및 공격접종 후 2주 치료

^B 임상증상 발현수수/접종수수

표 2-1-28. 조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1) 공격접종에 따른 체중의 변화

그룹	체중(g) (Mean ± SD)			
	시험물질 투여 전 ^A	공격접종 전 ^B	3dpc ^C	6dpc ^D
G1	19.4 ± 0.5	19.7 ± 0.8	16.0 ± 0.5	13.5 ± 0.8
G2	19.3 ± 0.7	19.5 ± 0.7	15.2 ± 0.1	13.4 ± 0.3
G3	19.4 ± 0.3	20.5 ± 0.7	16.3 ± 0.2	14.2 ± 0.2
G4	18.3 ± 0.2	19.8 ± 0.8	17.7 ± 0.5	18.4 ± 0.4
G5	18.3 ± 0.4	19.7 ± 0.4	19.4 ± 0.4	19.6 ± 0.8
G6	18.2 ± 0.6	19.6 ± 0.8	15.7 ± 0.2	14.0 ± 0.3

^A 시험물질 투여 전 체중 및 표준편차

^B 공격접종 전 체중 및 표준편차

^C 공격접종 3일 후 부검개체 체중 및 표준편차

^D 공격접종 6일 후 부검개체 체중 및 표준편차

표 2-1-29. 공격접종 3일 후 폐의 무게 측정 및 조류 인플루엔자 바이러스 함량시험 결과

그룹	3dpc		
	폐 무게 (g) (Mean ± SD) ^A	Virus titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /g ± SD) ^B	양성률 ^C
G1	0.2 ± 0.0	6.4 ± 0.2	3/3
G2	0.2 ± 0.0	6.1 ± 0.1	3/3
G3	0.2 ± 0.0	6.6 ± 0.1	3/3
G4	0.2 ± 0.0	4.4 ± 0.2	3/3
G5	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0/3
G6	0.2 ± 0.0	6.3 ± 0.2	3/3

^A 공격접종 3일 후 채취한 폐 무게 평균 및 표준편차

^B 공격접종 3일 후 채취한 폐 유제액의 MDCK를 이용한 인플루엔자 바이러스 함량 시험의 평균 및 표준편차

^C 공격접종 3일 후 채취한 폐 유제액의 MDCK를 이용한 인플루엔자 바이러스 함량 시험의 양성수수/접종수수

표 2-1-30. 공격접종 6일 후 폐의 무게 측정 및 조류 인플루엔자 바이러스 함량시험 결과

그룹	6dpc		
	폐 무게 (g) (Mean ± SD) ^A	Virus titer (log ₁₀ TCID ₅₀ /g ± SD) ^B	양성률 ^C
G1	0.3 ± 0.0	5.3 ± 0.3	3/3
G2	0.3 ± 0.0	5.2 ± 0.2	3/3
G3	0.3 ± 0.1	5.2 ± 0.2	3/3
G4	0.3 ± 0.0	2.6 ± 0.0	3/3
G5	0.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0/3
G6	0.2 ± 0.0	4.7 ± 0.1	3/3

^A 공격접종 6일 후 채취한 폐 무게 평균 및 표준편차

^B 공격접종 6일 후 채취한 폐 유제액의 MDCK를 이용한 인플루엔자 바이러스 함량 시험의 평균 및 표준편차

^C 공격접종 6일 후 채취한 폐 유제액의 MDCK를 이용한 인플루엔자 바이러스 함량 시험의 양성수수/접종수수

다. 3차년도

(1) 부추발효물의 생리 활성 화합물 분석

(가) Total phenolic과 flavonoid 함량 측정

부추즙에는 폴리페놀 화합물 및 플라보노이드를 포함한 생리활성 화합물이 풍부한 것으로 보고되어 있다. 단순한 물에 부추를 첨가 (최종 10%)하여 발효시킨 후 폴리페놀 함량이 24% 증가하였으며 플라보노이드 함량은 27% 감소하였다 ($p < 0.05$). 위 결과는 플라보노이드가 미생물로부터 방출되는 효소로 인해 가수 분해되어 그 함량이 감소되는 것으로 보고되었으며 (Gebru et al., 2020), 이와 동일하게 Yang 등 (2014)의 연구에서도 부추를 *L. plantarum* LK8 으로 24시간 동안 발효시켰을 때, 폴리페놀 함량이 4% 증가, 플라보노이드 함량이 10% 감소 함을 보고하였다. 반면, 다육식물인 석연화(*Graptopetalum paraguayense* E. Walther)를 *L. plantarum* BCRC 10357로 발효시켰을 때, 플라보노이드(17.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$)와 폴리페놀 함량(92.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$)은 각각 22.9, 111 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 개선되었다 (Wu et al., 2011).

(나) Allicin과 thiol 함량 측정

Allium 속 식물에는 유기황 화합물(organosulfur compounds)이 풍부한 것으로 밝혀져 있다. 본 실험은 부추의 발효에 존재하는 유기황 화합물 함량(thiol 및 allicin) 변화를 알아보기 위해 측정하였다. 물에 부추즙 (최종 10%)를 혼합, 발효시킨 경우 발효 24 시간 후에 thiol과 allicin 함량이 각각 52% ($p < 0.05$), 17% ($p > 0.05$) 감소하였다. 알리신 함량은 발효 중 *L. plantarum*의 휘발성 등으로 인해 감소되는 것으로 Yang 등 (2014) 연구에서도 부추즙을 *L. plantarum* LK8과 함께 48시간 동안 발효 시켰을 때 allicin이 85.45% 감소하고 thiol이 39.37% 증가함을 보고하였다. 그러나 MRS 배양액에서 발효시 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

표 2-1-31. 물 및 MRS 배양액에서 부추의 *L. plantarum* 발효에 따른 생리 활성 화합물 구성 변화

Sample	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg QE/g)	Thiol (ug CE/g)	Allicin (uM CE/g)
Water				
WNCC	0.21±0.01 ^b	0.55±0.05 ^a	294.55±18.49 ^a	105.89±13.94
WFCC	0.26±0.01 ^a	0.40±0.04 ^b	141.60±2.10 ^b	88.09±2.51
MRS				
MNCC	0.28±0.02	0.20±0.01	595.06±40.94	195.89±12.22
MFCC	0.29±0.02	0.21±0.02	613.55±38.78	193.57±19.22

CE: cysteine equivalent; TPC: total poly-phenolic content; TFC: total flavonoid content; WNCC: water-non fermented CC juice extract; WFCC: water-fermented CC juice extract; MNCC: MRS-non fermented CC juice extract; MFCC: MRS-fermented CC juice extract; Values with different letter (a-b) superscripts are significantly different at p<0.05 using Students' t-test. Each value represents mean of triplicate ± SD.

(2) 부추발효물의 항산화능 분석

물 및 MRS 배양액과 혼합한 부추의 발효, 비발효에 따른 항산화능을 아래 그림에 나타내었다. 발효시킨 부추가 비발효 부추보다 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능이 낮게 나타났으며 (물: 24%, MRS: 9%; $p < 0.05$), 이는 부추의 발효가 플라보노이드와 유기황 화합물의 함량을 감소시키는 것과 관련이 있는 것으로 사료된다. 물에 부추를 첨가하여 발효시키는 것보다 MRS배지에 부추를 첨가하여 발효시키는 것이 항산화 활성이 높은 경향을 보였다.

Othman 등 (2009)의 연구에서 올리브를 발효시켰을 때, 폴리페놀의 감소로 인해 항산화 활성능이 감소된 것으로 나타났다. 그와 반대로 Simsek 등 (2014)의 연구에서 발효 및 비발효 천연물의 항산화능은 유의적 차이 없이 비슷하였으며, 발효함에 따라 항산화 활성이 개선되었다는 결과도 보고되었다 (Hur et al. 2014).

발효에 의한 항산화 활성 차이는 사용한 천연물과 발효 미생물에 의해 나타나는 것으로 발효 부추를 이용한 항산화능의 개선 방법은 추가적 연구가 필요할 것으로 판단된다.

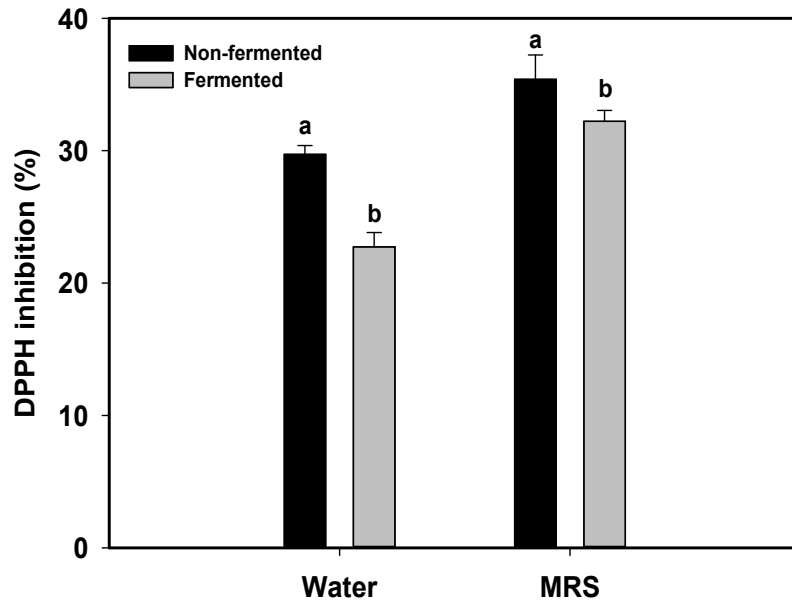


그림 2-1-20. 발효 부추 추출물의 DPPH 라디칼 소거능

(3) 부추발효물의 항균, 항바이러스 활성 분석

물 (WFCC) 및 MRS 배양액 (MFCC)에서 발효시킨 부추 추출물을 사용하여 가금병원균 및 조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1)의 억제능을 조사하였다. WFCC 및 MFCC 추출물 모두 가금 병원균에 대한 높은 항균 활성을 보였으며, 이는 LC-MS/MS 분석에서 확인된 플라보놀이 의한 것으로 사료된다.

조류 인플루엔자 바이러스 (H1N1)의 억제능 분석 결과, WFCC와 MFCC 모두 활성이 있었으나, WFCC 추출물은 1.1 mg/ml 농도에서, MFCC 추출물은 3.3 mg/ml에서 나타나 WFCC가 더욱 낮은 농도에서도 활성을 나타내었다.

최근 연구결과에 의하면, Allium 속 식물에는 항바이러스 효능을 가진 플라보노이드가 함유되어 있음이 밝혀졌으며, 그 중 항바이러스 효능을 가진 대표적 물질은 kaempferol과 그 배당체로 알려져 있다 (Rajbhandari 등, 2009; Jeong 등, 2009; Sithisarn 등, 2013; Kai 등, 2014; Shojai 등, 2016; Zakaryan 등, 2017). 본 연구를 통해 발효부추 추출물은 kaempferol과 그 배당체를 포함하고 있으며, WFCC가 MFCC에 비교하여 보다 높은 농도의 생리활성 물질을 함유하는 것으로 판단된다.

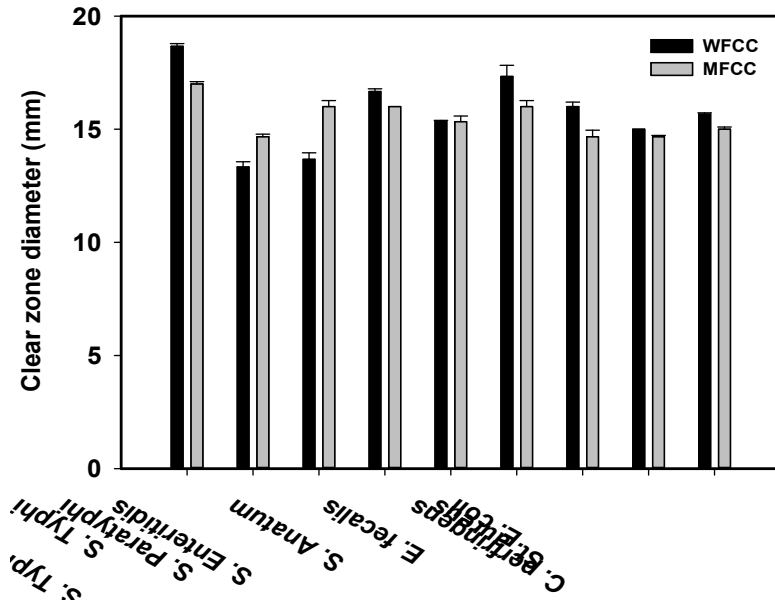


그림 2-1-21. 가금류 병원균에 대한 발효 부추 추출물의 항균 활성. (WFCC: water-fermented CC juice extract; MFCC: MRS-fermented CC juice extract)

표 2-1-32. MDCK 세포를 사용한 발효 부추 추출물의 항 조류 인플루엔자 바이러스(H1N1) 활성

Groups	Concentration (mg/ml)								
	10	3.333	1.111	0.370	0.123	0.041	0.014	0.005	0.002
WFCC	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MFCC	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Antiviral activity; -: no activity; WFCC: water-fermented CC juice extract; MFCC: MRS-fermented CC juice extract; Control: phosphate buffer saline.

(4) LC-MS 분석을 통한 부추발효물 내 유효물질 동정

*L. plantarum*에 의한 부추발효 추출물에서 생물학적 활성을 가지는 화합물을 확인하기 위해 초고성능 액체 크로마토 그래피 (UHPLC-LTQ Orbitrap-MS/MS) 질량 분석법을 사용하여 물 발효 부추 추출물 (WFCC)의 대사산물 프로파일링을 양성 및 음성 모드로 분석하였다.

전반적으로, 플라보놀과 지방산의 부류에 속하는 12개의 다른 2차 대사산물을 잠정적으로 동정하였다. 확인된 화합물은 kaempferol, kaempferol 3-*O*- β -sophoroside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, kaempferol 3-*O*-glucoside, oxodihydroxy-octadecenoic acid, (Z)-5,8,11-trihydroxyoctadec-9-enoic acid, 9(S)-HpOTrE, 지방산 유도체, 9S-HOTrE(9S-hydroxy-10E, 12Z, 15Z-octadecatrienoic acid), (6Z, 9Z, 12Z, 15Z)-octadecatetraenoate, 9-OxoOTrE (9-oxo-10e, 12z, 15z-octadecatrienoic acid), 12(13)-epoxy-9Z-octadecenoic acid로 나타났다.

최근 골과, 부추, 파 등 다양한 종류의 Allium에서 추출한 플라보놀은 Allium 속의 주요 플라보노이드로, 항암, 지질 저하, 항당뇨, 심장 보호, 신경 보호, 항균 및 항산화 물질이 있는 것으로 보고되어 있다 (Soininen et al. 2014; Kothari et al. 2020).

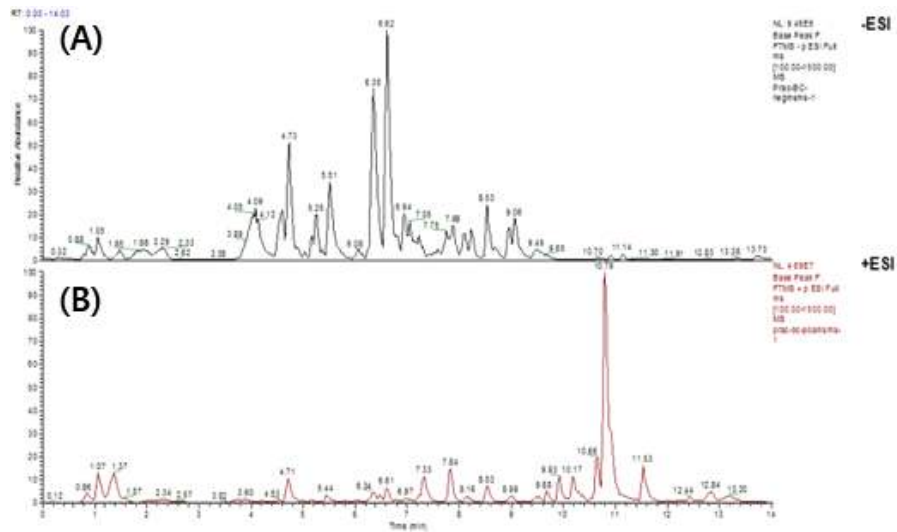


그림 2-1-22. 물에 부추즙 첨가시(최종 10%) 발효에 따른 HPLC 분석. (A) Positive mode, (B) Negative mode.

표 2-1-33. UHPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS를 이용한 물에 부추즙 첨가시(최종 10%) 발효물 내 대사산물 분석

No.	RT (min)	Tentatively identified compounds	Negative mode (m/z)	Positive mode (m/z)	MW	Mass fragments	Δ Mass (ppm)
1	4.72	Kaempferol		287.0548 [M+H]	286	(+287>269, 258, 241, 231> 213> 185, 157	-1.291
2	4.73	Kaempferol 3-O- β -sophoroside	609.1476 [M-H]	611.1604 [M+H]	610	(-609>447, 429>369, 339>311, 283, 192	2.112
3	5.03	Kaempferol-3-O-rutinoside	593.1542 [M-H]	595.1674 [M+H]	594	(-593>285>267, 257, 255, 241>239, 229	2.747
4	5.18	Kaempferol 3-O-glucoside	447.0957 [M-H]	449.1080 [M+H]	448	(-447>327, 284>255>227, 211	2.255
5	5.51	Chloramphenicol (Internal standard)	321.0063 [M-H]	344.2433 [M+Na ⁺]	322	(-321>257>221, 194>173 (+344>326, 291, 211>193>175	1.62
6	6.35	Oxo-dihydroxy-octadecenoic acid	327.2181 [M-H]		328	(-327>309, 291, 229>211>193, 183	0.743
7	6.62	(Z)-5,8,11-trihydroxyoctadec-9-enoic acid	329.2338 [M-H]	353.2295 [M+Na ⁺]	330	(-329>311, 293, 229>211>183, 167	0.473
8	7.05	9(S)-HpOTrE	309.2084 [M-H]	333.2036 [M+Na ⁺]	310	(-309>291>273, 247>255, 229	1.407
9	7.61, 7.75, 7.88	Fatty acid derivative	309.2083 [M-H]	333.2035 [M+Na ⁺]	310	(-309>291>273, 263>255, 245, 229 (+333>315>177, 165>147	1.33
10	8.53	9S-HOTrE (9S-hydroxy-10E,12Z,15Z-octadecatrienoic acid)	293.2132 [M-H]		294	(-293>275>218, 192>216, 177	0.882
11	8.53	(6Z,9Z,12Z,15Z)-Octadecatetraenoate	275.2026 [M-H]	277.2157 [M+H]	276	(-275>231>177	1.207
12	8.88	9-OxoOTrE (9-oxo-10e,12z,15z-octadecatrenoic acid)	291.1986 [M-H]	293.2109 [M+H]	292	(-291>273, 247, 185>141, 125	1.912
13	8.97	12(13)-Epoxy-9Z-octadecenoic acid	295.2287 [M-H]		296	(-295>277>259, 233>203, 191	1.022

(5) 가금용 고상 부추사료첨가제의 최적 부추 첨가량 확립

고상 부추사료첨가제 발효공정을 확립하기 위하여, 원료로는 대두박, 단백질이 혼합된 곡물 배지, 증류수, 부추즙, 당밀 및 *Lactobacillus plantarum* SK4719를 사용하였으며 곡물배지 및 당밀은 (주) 은진바이오에서 제공하였다. 사용한 원료들의 혼합비율 및 곡물배지의 조성은 아래와 같다.

표 2-1-34. 고상 부추사료첨가제 발효공정 확립을 위한 곡물배지 조성물 및 혼합비율

곡물배지 조성물		고상 부추발효물 원료의 혼합비율	
원료	비율(%)	원료	비율(%)
옥수수	53.8	곡물배지	50
대두박	10.2	증류수	20
단백피	15.4	부추즙	20
옥수수주정박	12.8	당밀	5
미강	7.7	<i>L. plantarum</i> SK4719	5
드라이리스트	0.1		
총합	100	총합	100

고상 부추사료첨가제 최적의 발효공정을 확립하기 위해서 아래와 같은 처리구를 설계하여 시간 경과에 따른 생균수와 pH 변화를 조사하였다. 부추즙의 농도는 1년차 연구결과를 참고하여 전체 양의 20%로 고정하였으며, 발효 조건으로는 30℃로 조절된 인큐베이터에서 3일간 정치 배양시켰다. 본 실험은 24시간마다 분석하여 처리구별 차이를 관찰하였다.

표 2-1-35. 고상 부추사료첨가제 조사를 위한 시험군의 혼합원료 구성

시험군	혼합원료
W	곡물배지 (50%) + 증류수 (45%) + 당밀 (5%)
WL	곡물배지 (50%) + 증류수 (40%) + 유산균 (5%) + 당밀 (5%)
MLC	곡물배지 (50%) + MRS 배양액 (20%) + 부추즙 (20%) + 유산균 (5%) + 당밀 (5%)
WLC	곡물배지 (50%) + 증류수 (20%) + 부추즙 (20%) + 유산균 (5%) + 당밀 (5%)

시간이 경과됨에 따라 WL, MLC, WLC 처리구는 생균수가 증가되었고 pH는 감소되었다. 그 중 WLC와 MLC는 1일차에서 높은 수치의 유산균 수를 보였다. 산업적으로 비용이 적게 들면서 사료첨가제로 효능이 예상되는 WLC (Carrier + Water + *Lactobacillus plantarum* SK4719 + CC juice + Molasses) 첨가제를 산란계 사양실험에 적용하였다.

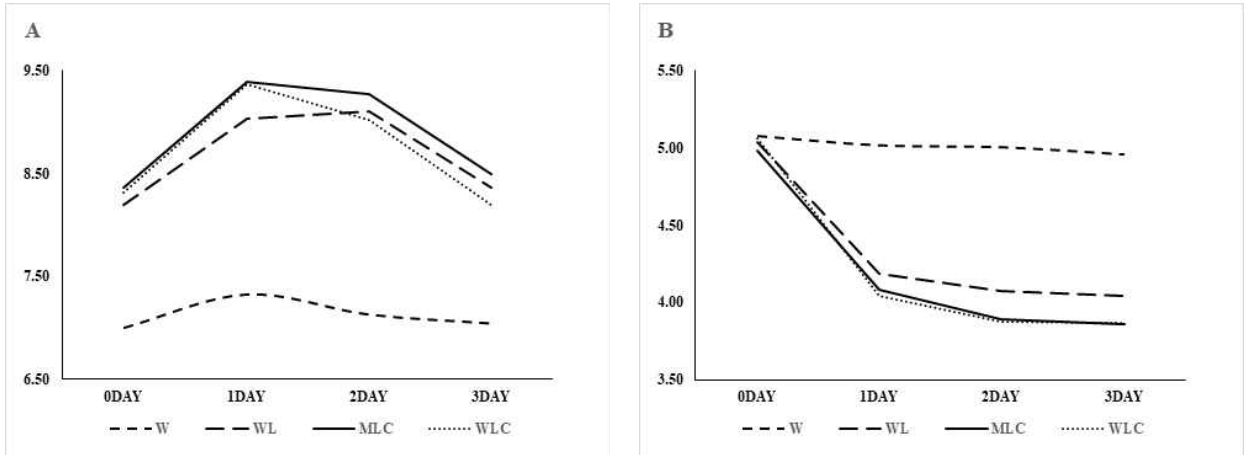


그림 2-1-23. 고상 부추사료첨가제 혼합원료에 따른 생균수 및 pH의 변화

표 2-1-36. 고상 부추사료첨가제 혼합원료의 시간의 경과에 따른 생균수 및 pH의 변화

시험군	CFU				pH			
	0Day	1Day	2Day	3Day	0Day	1Day	2Day	3Day
W	7.00	7.33	7.13	7.04	5.08	5.02	5.00	4.96
WL	8.20	9.04	9.11	8.36	5.04	4.19	4.07	4.05
MLC	8.37	9.38	9.28	8.49	4.99	4.09	3.89	3.86
WLC	8.31	9.37	9.02	8.20	5.06	4.05	3.87	3.87

(6) 산란계의 고상 부추사료첨가제 첨가급이 효과 비교

(가) 생산성

산란계에 있어 고상 발효부추사료첨가제의 첨가급이 효과를 조사하기 위하여 ISA-Brown 120수를 공시하였다. 실험 설계는 대조구 포함 3처리구로 수행하였으며, 처리구별 10반복 반복당 4수를 배치하였다.

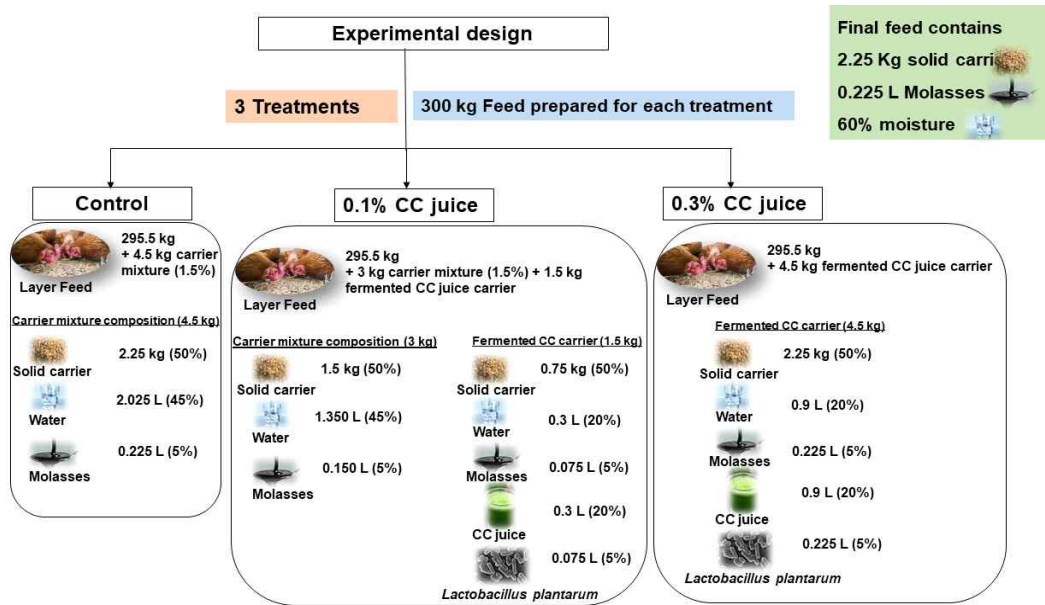


그림 2-1-24. 산란계의 고상 부추발효물 첨가급이 실험 설계구 및 첨가물 구성비

실험 기간은 총 7주로 2주간 적응기간을 준 후, 5주간 실행하여 부추첨가제의 급이 효능을 조사하였다. 점등 시간은 오전 5시에 점등, 오후 9시에 소등하여 16시간 동안 점등하였으며 계사내 온도는 26℃로 설정하였다. 사료와 음수는 무제한 급이하였으며 산란율과 난중은 매일 오전 10시에 측정하였다. 사료섭취량은 주 1회 같은 날, 시간에 사료 잔량을 측정하여 산출하였다.

5주간의 사양실험 결과, 산란율과 산란량은 FCC 0.3% 처리구에서 유의적으로 높은 수치를 보였다 (p<0,05). FCC 0,1% 처리구는 매주 높은 난중을 가진 계란을 생산하였으며 (p<0,01), 부추사료첨가제의 첨가농도에 따른 사료섭취량에는 부정적 영향은 없었다.

표 2-1-37. 고상 부추사료첨가제 급이에 따른 산란계의 생산성 비교

Item	Treatment			SEM ¹⁾	p-value
	Control	FCC 0.1%	FCC 0.3%		
0 week					
Body weight, g	1982.8	1985.0	1982.0	20.28	0.99
EPR, %	89.40	89.52	89.40	3.66	1.00
1 week					
EPR, %	91.0	90.7	92.9	3.67	0.90
Egg weight, g	59.1	60.2	58.5	0.50	0.06
Egg mass, g/hen/d	53.9	54.5	54.4	2.25	0.98
FI, g/hen/d	100.0	105.3	104.0	2.86	0.41
FCR, g feed/g egg	1.88	1.95	1.93	0.08	0.79
Mortality, %	0.00	0.00	0.00	-	-
2 week					
EPR, %	90.0	90.0	92.1	3.83	0.90
Egg weight, g	59.2 ^b	61.2 ^a	59.2 ^b	0.53	<0.05
Egg mass, g/hen/d	53.2	55.1	54.5	2.33	0.84
FI, g/hen/d	109.0	115.0	115.0	2.13	0.09
FCR, g feed/g egg	2.08	2.12	2.13	0.09	0.92
Mortality, %	0.00	0.00	0.00	-	-
3 week					
EPR, %	89.3	91.8	96.1	3.13	0.31
Egg weight, g	58.4 ^b	61.4 ^a	59.0 ^b	0.62	<0.01
Egg mass, g/hen/d	52.1	56.3	56.6	1.92	0.19
FI, g/hen/d	110.7 ^b	118.3 ^{ab}	121.3 ^a	2.90	<0.05
FCR, g feed/g egg	2.15	2.13	2.15	0.08	0.97
Mortality, %	0.00	0.00	0.00	-	-
4 week					
EPR, %	89.3	92.1	96.4	3.15	0.28
Egg weight, g	58.0 ^b	60.9 ^a	59.2 ^b	0.64	<0.01
Egg mass, g/hen/d	51.9	56.1	57.1	2.02	0.17
FI, g/hen/d	116.1	121.2	125.5	2.78	0.07
FCR, g feed/g egg	2.25	2.18	2.21	0.06	0.65
Mortality, %	0.00	0.00	0.00	-	-
5 week					
EPR, %	95.7	91.4	96.4	2.65	0.36
Egg weight, g	59.1 ^b	62.1 ^a	59.7 ^b	0.65	<0.01
Egg mass, g/hen/d	56.6	56.7	57.7	1.73	0.88
FI, g/hen/d	123.9	123.6	124.5	2.21	0.95
FCR, g feed/g egg	2.20	2.21	2.17	0.05	0.93
Mortality, %	1.11	0.00	0.00	-	-
Overall					
EPR, %	91.06 ^b	91.21 ^b	94.79 ^a	0.91	<0.05
Egg weight, g	58.74 ^b	61.17 ^a	59.13 ^b	0.25	<0.01
Egg mass, g/hen/d	53.53 ^b	55.76 ^a	56.05 ^a	0.66	<0.05
FI, g/hen/d	111.93	116.66	118.07	3.72	0.49
FCR, g feed/g egg	2.11	2.12	2.12	0.05	1.0
Mortality, %	1.11	0.00	0.00	-	-

¹⁾Means of triplicate ± standard error of mean

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

(나) 계란 품질

고상 발효부추 사료첨가제의 급이 따른 계란 품질의 비교 결과는 아래 표에 나타내었다. 매주 계란의 품질을 측정된 결과 모든 처리구에서 유의적인 차이는 없었으나, FCC 0.1% 처리구가 3주차에서 유의적으로 높은 난백고를 나타내었다 ($p < 0.05$). 난백고는 Haugh unit 수치 및 계란의 품질 등급에 영향을 주는 항목으로, 천연물인 사철쭉, 동충하초, 울금, 인진쭉을 산란계에 급이한 연구에서도 대조구보다 고품질의 계란을 생산하는 것으로 보고되었다 (Kim 등 2006; Kim 등 2010).

따라서 발효부추 사료첨가제의 급이는 계란 품질에 부정적 영향을 주지 않았으며, 특히 FCC 0.1%의 첨가급이는 계란의 품질에 긍정적인 영향을 주는 것으로 사료된다.

표 2-1-38. 고상 부추사료첨가제 급이에 따른 계란의 품질 비교

Item	Treatment			SEM ¹⁾	p-value
	Control	FCC 0.1%	FCC 0.3%		
1 week					
Haugh units	89.43	88.88	87.43	0.99	0.34
Albumen height, mm	8.00	8.09	7.72	0.16	0.24
Egg yolk color, RCF	7.98	7.73	7.81	0.12	0.34
Eggshell breaking strength, kgf	4.55	4.46	4.51	0.14	0.91
Eggshell thickness, mm	0.43	0.42	0.42	0.005	0.55
Eggshell weight, %	9.90	9.83	9.81	0.21	0.95
2 week					
Haugh units	87.08	82.97	86.86	1.81	0.20
Albumen height, mm	7.64	7.61	7.43	0.15	0.56
Egg yolk color, RCF	7.98	7.99	7.87	0.10	0.63
Eggshell breaking strength, kgf	4.39	4.68	4.58	0.32	0.14
Eggshell thickness, mm	0.42	0.43	0.42	0.006	0.31
Eggshell weight, %	9.77	9.75	9.70	0.14	0.54
3 week					
Haugh units	84.78	88.11	86.43	1.27	0.18
Albumen height, mm	7.46 ^b	7.98 ^a	7.38 ^b	0.17	<0.05
Egg yolk color, RCF	8.15	7.97	7.99	0.10	0.41
Eggshell breaking strength, kgf	4.60	4.52	4.62	0.15	0.89
Eggshell thickness, mm	0.43	0.44	0.42	0.006	0.25
Eggshell weight, %	9.94	9.82	9.70	0.15	0.54
4 week					
Haugh units	82.88	82.50	81.21	1.44	0.69
Albumen height, mm	6.84	7.17	6.74	0.17	0.19
Egg yolk color, RCF	8.22	8.13	8.07	0.08	0.44
Eggshell breaking strength, kgf	4.68	4.52	4.68	0.15	0.71
Eggshell thickness, mm	0.43	0.44	0.42	0.004	0.07
Eggshell weight, %	10.22	10.13	0.01	0.13	0.52
5 week					
Haugh units	82.22	81.10	82.69	1.12	0.59
Albumen height, mm	6.71	6.94	6.73	0.15	0.50
Egg yolk color, RCF	7.92	7.85	7.88	0.08	0.80
Eggshell breaking strength, kgf	4.71	4.33	4.49	0.13	0.10
Eggshell thickness, mm	0.43	0.43	0.43	0.004	0.83
Eggshell weight, %	10.12 ^a	9.66 ^b	10.06 ^a	0.12	<0.05
Overall					
Haugh units	85.28	84.71	84.92	1.40	0.96
Albumen height, mm	7.33	7.56	7.20	0.22	0.53
Egg yolk color, RCF	8.05	7.93	7.92	0.06	0.27
Eggshell breaking strength, kgf	4.59	4.50	4.58	0.05	0.46
Eggshell thickness, mm	0.42	0.43	0.42	0.003	0.22
Eggshell weight, %	9.99	9.84	9.86	0.08	0.36

¹⁾Means of triplicate \pm standard error of mean

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

(다) 계란의 저장성

사양실험 마지막 주차인 5주차의 계란을 수거하여 수거 당일, 2주, 4주 25℃에서 보관한 후 고상 발효부추 사료첨가제의 급이에 따른 계란 품질 보존성에 대한 결과는 아래 표와 같다.

Haugh unit, 난백고 및 난황색의 경우, 저장기간에 따른 유의적 차이는 없었다. 난황의 무게는 FCC 0.1% 처리구가 유의적으로 무거운 난황을 보였으며, 이는 보관기간에 따라서도 동일한 결과를 나타내었다($p < 0.05$). 난백 pH의 경우, 모든 FCC 처리구가 0주차에서 대조구보다 유의적으로 낮은 pH를 보였으나, 4주 보관한 결과 대조구보다 유의적으로 높은 pH를 보였다 ($p < 0.05$).

고상 부추사료첨가제의 급이는 난황의 무게에 긍정적으로 유의적인 영향을 주었으며, 난백의 pH 등 계란의 보관에 따른 품질 변화에 대해서 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

표 2-1-39. 고상 부추사료첨가제 급이에 따른 계란의 품질 보존 비교

Item	Treatment			SEM ¹⁾	p-value
	Control	FCC 0.1%	FCC 0.3%		
0 week					
Haugh units	82.66	82.69	82.75	0.92	1.00
Albumen height, mm	6.65	6.88	6.68	0.14	0.47
Egg yolk color, RCF	7.89	7.85	7.90	0.08	0.90
Egg yolk weight, g	15.93 ^b	17.40 ^a	16.11 ^b	0.25	<0.01
Albumin pH	8.97 ^a	8.90 ^b	8.89 ^b	0.02	<0.05
2 week					
Haugh units	59.93	58.28	58.86	1.14	0.58
Albumen height, mm	3.98	3.93	3.93	0.10	0.93
Egg yolk color, RCF	9.03	9.01	8.85	0.10	0.35
Egg yolk weight, g	16.43 ^b	17.37 ^a	16.77 ^a	0.25	<0.05
Albumin pH	9.86	9.80	9.81	0.03	0.22
4 week					
Haugh units	57.74	54.46	54.14	1.31	0.11
Albumen height, mm	3.58	3.38	3.25	0.10	0.07
Egg yolk color, RCF	9.76	9.52	9.68	0.08	0.10
Egg yolk weight, g	16.67 ^b	18.01 ^a	17.00 ^b	0.31	<0.01
Albumin pH	9.76 ^b	9.99 ^a	10.03 ^a	0.03	<0.01

¹⁾Means of triplicate \pm standard error of mean

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

(라) 산란계의 면역기관 및 장내 특성 비교

산란계의 5주간 사양실험 이후, 분석한 간, 비장의 무게, 소장 및 맹장의 길이를 측정, 비교한 결과를 아래의 표에 나타내었다. 생체중 100 g 기준 간과 비장의 무게를 비교한 결과, 처리구간 유의적인 차이는 보이지 않았으나, 부추사료첨가제의 농도가 높아질수록 간의 무게가 비교적 낮은 수치를 보였다. 이는 부추의 첨가 급이가 간의 염증 및 지방간 발생을 억제시켜주는 것으로 사료된다.

처리구별 소장 및 맹장의 길이를 분석한 결과 십이지장, 공장 및 맹장에서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 회장의 경우 부추첨가구(FCC 0.1%, 0.3%)가 대조구보다 유의적으로 짧은 회장의 길이를 나타내었다 ($p < 0.05$).

위의 결과를 볼 때, 산란계에 있어 고상 발효부추첨가제의 급이가 면역기관(간) 및 장내 특성에 영향을 주는 기전에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

표 2-1-40. 고상 부추사료첨가제 급이에 따른 산란계 면역기관 특성 비교

Item	Treatment			SEM	p-value
	C	FCC 0.1%	FCC 0.3%		
	g/100 g body weight				
Liver	2.48	2.20	2.18	0.10	0.07
Spleen	0.08	0.09	0.09	0.01	0.66

표 2-1-41. 고상 부추사료첨가제 급이에 따른 산란계의 장 특성 비교

Item	Treatment			SEM	p-value
	C	FCC 0.1%	FCC 0.3%		
	cm/100 g body weight				
Duodenum	1.48	1.38	1.37	0.07	0.50
Jejunum	3.06	2.76	2.90	0.12	0.21
Ileum	3.47 ^a	3.03 ^b	3.13 ^b	0.11	<0.05
Cecum	1.63	1.47	1.55	0.08	0.40

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

(마) 장내 미생물 군총 분석 및 분리 미생물의 동정

고상 부추 사료첨가제의 급여에 따른 산란계의 맹장과 장내 총균수는 아래의 표에 나타내었다. 사용한 배지는 Macconkey, SS (*Salmonella shigella*), MRS, BSA 및 NA 평판배지를 사용하였다. 분리 및 동정한 미생물은 산란계의 소장(십이지장, 공장, 회장) 및 맹장에 존재하는 우점종 미생물을 선별하였으며 선별된 미생물을 16S rRNA sequencing 방법으로 동정하였다. 동정은 16S rRNA gene을 27F (forward primer: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')를 이용하여 16S rRNA 유전자 염기서열을 밝혔다. NCBI의 BLAST를 이용하여 Gene bank에서 유전자의 유사성을 분석하였다.

맹장 내 미생물 군총의 분석결과, 고상 발효부추 첨가구가 MacConkey 배지에서 유의적으로 낮은 수치를 보였으며 ($p < 0.05$), SS 배지에서도 대조구보다 낮은 수치를 나타내었다. MacConkey 배지는 *E. coli* 등의 병원균이 SS 배지는 *Salmonella* sp. 및 *Shigella* sp. 중 등이 선택적으로 자라는 배지로 사용되었다. 부추사료첨가제의 급여는 장내 병원성균의 생장을 억제시키는 것으로 판단된다.

표 2-1-42. 고상 부추사료첨가제 급이에 따른 산란계 맹장 내 미생물 균총 분석

Item	Treatment (log CFU/g)			SEM	p-value
	C	FCC 0.1%	FCC 0.3%		
MacConkey	6.57 ^a	5.63 ^b	5.80 ^b	0.25	<0.05
SS (<i>Salmonella shigella</i>)	6.17	5.81	5.77	0.33	0.68
MRS	9.00 ^a	8.39 ^b	8.68 ^b	0.12	<0.01
BSA	7.10	7.19	7.19	0.18	0.92
NA	8.97 ^a	8.39 ^b	8.46 ^b	0.13	<0.01

^{a-b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

표 2-1-43. 고상 부추사료첨가제 급이에 따른 산란계 장내 미생물 동정결과

Stock #	Description	Query cover (%)	Ident (%)	Media	Degree (°C)	Isolation
SK5064	<i>Escherichia marmotae</i>	100%	99.36%	SS	37	Cecum
SK5065	<i>Escherichia coli</i>	100	99.52	SS	37	Cecum
SK5066	<i>Escherichia fergusonii</i>	100	99.21	SS	37	Cecum
SK5067	<i>Pseudomonas putida</i>	100	99.84	SS	37	Cecum
SK5068	<i>Escherichia fergusonii</i>	100	100	SS	37	Cecum
SK5069	<i>Escherichia fergusonii</i>	100	100	SS	37	Cecum
SK5070	<i>Escherichia fergusonii</i>	95	99	MAC	37	Cecum
SK5071	<i>Attlantibacter hermannii</i>	100	99.36	MAC	37	Cecum
SK5072	<i>Attlantibacter hermannii</i>	100	99.53	MAC	37	Cecum
SK5073	<i>Escherichia fergusonii</i>	100	99.84	MAC	37	Cecum
SK5074	<i>Escherichia fergusonii</i>	100	99.21	MAC	37	Cecum
SK5075	<i>Attlantibacter hermannii</i>	100	99.68	MAC	37	Cecum
SK5076	<i>Escherichia fergusonii</i>	100	100	MAC	37	Cecum
SK5079	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99	99	BSA	37	Cecum
SK5080	<i>Lactobacillus salivarius</i>	97	99	BSA	37	Cecum
SK5081	<i>Streptococcus sanguinis</i>	99	99	BSA	37	Cecum
SK5083	<i>Lactococcus lactis</i>	98	99	YM	37	Cecum
SK5084	<i>Escherichia fergusonii</i>	100	100	YM	37	Cecum
SK5085	<i>Klebsiella oxytoca</i>	98	99	YM	37	Cecum
SK5086	<i>Shigella flexneri</i>	98	99	YM	37	Cecum
SK5087	<i>Shigella flexneri</i>	99	99	YM	37	Cecum
SK5088	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i>	100	100	SS	37	Jejunum
SK5089	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	96	99	SS	37	Jejunum
SK5090	<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	99	SS	37	Jejunum
SK5091	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	96	99	MAC	37	Jejunum
SK5092	<i>Serratia fonticola</i>	100	100	MAC	37	Jejunum
SK5093	<i>Klebsiella oxytoca</i>	97	99	MAC	37	Jejunum
SK5094	<i>Lactobacillus reuteri</i>	95	99	MRS	37	Jejunum
SK5095	<i>Lactobacillus salivarius</i>	97	99	MRS	37	Jejunum
SK5096	<i>Lactobacillus salivarius</i>	96	99	MRS	37	Jejunum
SK5098	<i>Lactococcus lactis</i>	99	100	YM	37	Jejunum
SK5099	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	96	99	SS	37	Ileum
SK5100	<i>Pseudomonas wadenswilerensis</i>	100	100	SS	37	Ileum
SK5101	<i>Lactobacillus oris</i>	99	99	MRS	37	Ileum
SK5103	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98	99	MRS	37	Ileum
SK5104	<i>Lactobacillus salivarius</i>	100	100	BSA	37	Ileum
SK5105	<i>Lactobacillus salivarius</i>	100	100	BSA	37	Ileum
SK5106	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	99	BSA	37	Ileum
SK5107	<i>Enterococcus faecalis</i>	99	99	YM	37	Ileum

(7) 산란계를 이용한 발효부추의 조류 인플루엔자 바이러스 (H9N2) 억제능 평가

본 시험은 부추발효물의 SPF 산란계 내 조류 인플루엔자 바이러스 (H9N2)에 대한 증식억제 효능을 검증하기 위해 수행하였다.

공시동물은 SPF 산란계 3주령 16수를 사용하였으며, H9N2 바이러스를 접종하여 시험을 진행하였다. 실험 설계는 아래와 같으며 8수 중 3마리는 공격접종을 실시, 나머지 5수는 접촉 대조군으로 공격 접종군과 동거 사육을 실시하였다.

표 2-1-44. 산란계를 이용한 발효부추의 조류 인플루엔자 바이러스 억제 효능 시험 설계구

구분	공시수수	공격접종군	접촉감염군	시험물질	접종 바이러스	투여경로
Group 1	8	3	5	부추발효물 20% 혼합사료	H9N2	비강
Group 2	8	3	5	시판사료	H9N2	비강

3주령의 SPF 산란계를 바이러스 공격접종 전 3일간, 공격접종 후 7일간 각 처리구의 시험 물질을 급이 하였다. 바이러스 억제효능 평가는 공격접종 0일, 1일, 3일, 7일차에 구강 및 총 배설장에서 바이러스를 채취하여 Real-time RT-PCR을 이용하여 배출량을 측정하였다.

부추발효물의 조류 인플루엔자 바이러스 억제 검증 결과는 아래의 표와 같다. 대조구 및 부추발효물 급이구에서 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 산란계의 폐사는 나타나지 않았다. 공격 접종 당일 산란계의 구강과 총배설장에서는 바이러스 검출이 되지 않았으나, 1일 후 구강에서는 부추발효물 급이구에서 1수, 대조구에서 3수 감염된 것을 확인하였다. 이후 3일, 5일이 경과함에 따라 두 처리구 모두 8수의 산란계가 바이러스에 감염되었으며, 각 측정일에 분석된 바이러스 배출량은 아래의 표 안에 기재하였다.

전체적으로 볼 때, 부추발효물이 혼합된 사료는 산란계 체내의 H9N2 바이러스를 유의적으로 억제하지는 못하였으나, 1일차에 나타난 산란계 감염수를 고려하였을 때, 부추 사료첨가제의 항바이러스 효능이 있는 것으로 사료되며 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

표 2-1-45. SPF 산란계에 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 구강 내 배출량 변화

구분	Virus replication				
	0 dpc	1 dpc	3 dpc	7 dpc	
부추첨가군	공격접종군	0/3 ^A (0.00±0.00) ^B (0.00±0.00) ^C	1/3 (30.26±0.00) (1.89±0.00)	3/3 (24.97±0.34) (3.34±0.10)	3/3 (29.89±1.22) (1.99±0.34)
	접촉감염군	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	5/5 (28.25±1.72) (2.44±0.47)
	대조군	0/3 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	3/3 (31.17±0.73) (1.64±0.20)	3/3 (27.50±0.67) (2.65±0.18)	3/3 (30.12±1.89) (1.93±0.52)
	접촉감염군	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	5/5 (26.60±1.57) (2.90±0.43)

^A감염수수/공격접종수수

^B구강에서의 real-time RT-PCR(rRT-PCR)을 이용하여 cycle threshold (Ct) value 평균 ± 표준편차

^Creal-time RT-PCR의 ct value를 EID₅₀/ml로 환산한 뒤 log10을 취한 값의 평균 ± 표준편차

표 2-1-46. SPF 산란계에 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 총배설장 내 배출량 변화

구분	Virus replication				
	0 dpc	1 dpc	3 dpc	7 dpc	
부추첨가군	공격접종군	0/3 ^A (0.00±0.00) ^B (0.00±0.00) ^C	0/3 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	1/3 (30.06±0.00) (1.94±0.00)	2/3 (28.14±2.20) (2.47±0.60)
	접촉감염군	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	1/5 (31.01±0.00) (1.68±0.00)
	대조군	0/3 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	0/3 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	1/3 (27.50±0.67) (2.65±0.18)	2/3 (22.11±0.95) (4.13±0.26)
	접촉감염군	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)	0/5 (0.00±0.00) (0.00±0.00)

^A감염수수/공격접종수수

^B구강에서의 real-time RT-PCR(rRT-PCR)을 이용하여 cycle threshold (Ct) value 평균 ± 표준편차

^Creal-time RT-PCR의 ct value를 EID₅₀/ml로 환산한 뒤 log10을 취한 값의 평균 ± 표준편차

표 2-1-47. 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 공격접종 후 임상증상 및 폐사율 관찰








구분		1 dpc	2dpc	3dpc	4dpc	5dpc	6dpc	7dpc	
부추 첨가군	공격접종군	임상 증상	0/3 ^A	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
		폐사율	0/3 ^B	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
	접촉감염군	임상 증상	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		폐사율	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	대조군	공격접종군	임상 증상	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
			폐사율	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
접촉감염군		임상 증상	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
		폐사율	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	

^A공격접종 후 임상증상을 나타낸 수수/총 수수

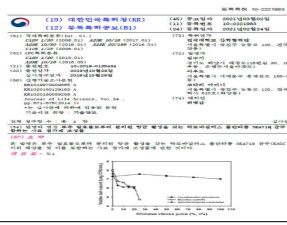
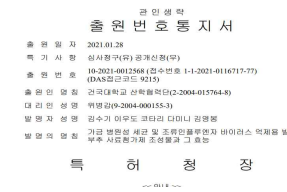
^B공격접종 후 폐사 수수/총 수수

2절 연구수행 결과


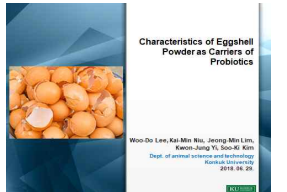
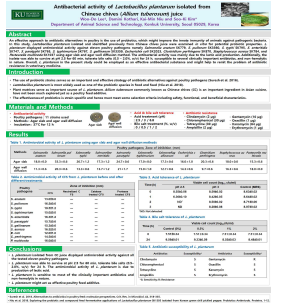
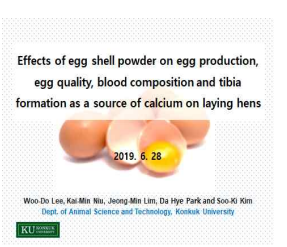
가. 게재 논문 (Publication)


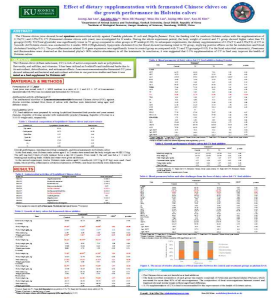
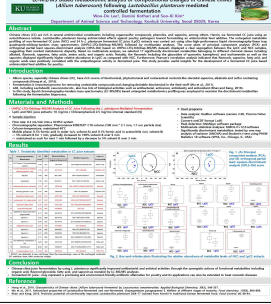
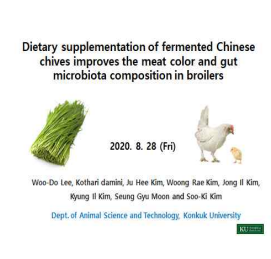
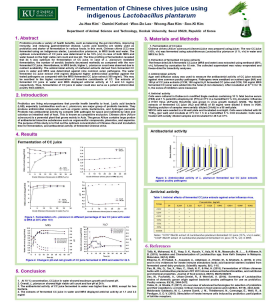
게재년도	국내외 (SCI)	논문정보	참고자료
2018	국외 (SCI)	Hong, H., Lee, J. H., & Kim, S. K. (2018). Phytochemicals and antioxidant capacity of some tropical edible plants. <i>Asian-Australasian journal of animal sciences</i> , 31(10), 1677.	 <p>Open Access Asian-Australasian Journal of Animal Sciences ISSN 1075-2875 (Print) / ISSN 2288-2318 (Online) http://dx.doi.org/10.5713/ajas pISSN 1075-2875 eISSN 2288-2318</p> <p>Phytochemicals and antioxidant capacity of some tropical edible plants Heonk Hong¹, Jun-Hyung Lee¹, and Soek-Ki Kim^{2*}</p>
2019	국외 (SCI)	Kothari, D., Patel, S., & Kim, S. K. (2019). Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. <i>Biomedicine & Pharmacotherapy</i> , 111, 537-547.	 <p>Biomedicine & Pharmacotherapy Journal homepage: www.elsevier.com/locate/biomed Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review Dimitri Kothari¹, Suresh Patel², Soek-Ki Kim^{3*}</p>
		Kothari, D., Lee, W. D., Niu, K. M., & Kim, S. K. (2019). The Genus <i>Allium</i> as Poultry Feed Additive: A Review. <i>Animals</i> , 9(12), 1032.	 <p>Review The Genus <i>Allium</i> as Poultry Feed Additive: A Review Dimitri Kothari¹, Woo-Dee Lee¹, Kai-Min Niu¹ and Soek-Ki Kim^{1*}</p>
2020	국외 (SCI)	Kothari, D., Lee, W. D., Jung, E. S., Niu, K. M., Lee, C. H., & Kim, S. K. (2020). Controlled fermentation using autochthonous <i>Lactobacillus plantarum</i> improves antimicrobial potential of Chinese chives against poultry pathogens. <i>Antibiotics</i> , 9(7), 386.	 <p>Article Controlled Fermentation Using Autochthonous <i>Lactobacillus plantarum</i> Improves Antimicrobial Potential of Chinese Chives against Poultry Pathogens Dimitri Kothari^{1,2}, Woo-Dee Lee^{1,3}, Eun-Sang Jung^{2,4}, Kai-Min Niu¹, Cheong-Hwan Lee^{1,4} and Soek-Ki Kim^{1,4}</p>
		Niu, K. M., Kothari, D., Lee, W. D., Cho, S., Wu, X., & Kim, S. K. (2020). Optimization of Chinese Chive Juice as a Functional Feed Additive. <i>Applied Sciences</i> , 10(18), 6194.	 <p>Article Optimization of Chinese Chive Juice as a Functional Feed Additive Kai-Min Niu^{1,2}, Dimitri Kothari^{2,3}, Woo-Dee Lee², Sangheun Cho^{2,3}, Xia He^{1,4} and Soek-Ki Kim^{1,4}</p>
		Kothari, D., Lee, W. D., & Kim, S. K. (2020). Allium Flavonols: Health Benefits, Molecular Targets, and Bioavailability. <i>Antioxidants</i> , 9(9), 888.	 <p>Review Allium Flavonols: Health Benefits, Molecular Targets, and Bioavailability Dimitri Kothari¹, Woo-Dee Lee and Soek-Ki Kim^{1*}</p>
		Moon, S. G., Lee, S. K., Lee, W. D., Niu, K. M., Hwang, W. U., Oh, J. S., ... & Kim, S. K. (2020). Effect of dietary supplementation of a phytogetic blend containing <i>Schisandra chinensis</i> , <i>Pinus densiflora</i> , and <i>Allium tuberosum</i> on productivity, egg quality, and health parameters in laying hens. <i>Asian-Australasian Journal of Animal Sciences</i> .	 <p>Open Access Asian-Australasian Journal of Animal Sciences ISSN 1075-2875 (Print) / ISSN 2288-2318 (Online) http://dx.doi.org/10.5713/ajas pISSN 1075-2875 eISSN 2288-2318</p> <p>Effect of dietary supplementation of a phytogetic blend containing <i>Schisandra chinensis</i>, <i>Pinus densiflora</i>, and <i>Allium tuberosum</i> on productivity, egg quality, and health parameters in laying hens Seung-Gyu Moon¹, Sang-Kyung Lee¹, Woo-Dee Lee¹, Kai-Min Niu², Won-Oh Hwang¹, Jong-Seok Oh¹, Dimitri Kothari¹, and Soek-Ki Kim^{1*}</p>

나. 특허 등록·출원

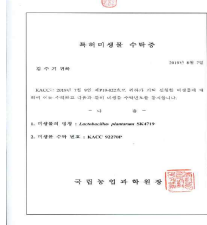
년도	국내·외	특허명	등록·출원번호	참고자료
2021	국내	부추 발효물로부터 분리된 항균 활성을 갖는 락토바실러스 플라타룸 SK4719 균주 및 이를 포함하는 사료 첨가제 조성물	10-2221983 (등록)	
2021	국내	가금 병원성 세균 및 조류 인플루엔자 바이러스 억제용 발효부추 사료첨가제 조성물과 그 효능	10-2021-0012568 (출원)	

다. 학술발표

년도	장소	발표자	발표명	참고자료
2018	말레이시아, 쿠칭	Sung-Kwang Lee, Woo Do, Lee, Kai-Min Niu, Won-Uk Hwang, Jong-Seok Oh, Tae-Hyung Kim and Soo-Ki Kim	Effects of Supplementary Phytogenic Blend (SPA) on Productivity of Laying Hens	
	한국, 중앙대학교	Woo Do, Lee, Kai-Min Niu, Jeong-Min Lim, Kwon-Jung Yi and Soo-Ki Kim	Usage of Chicken Eggshell Powder as Probiotics Carriers	
2019	한국, 경상대학교	Woo Do, Lee, Damini Kothari, Kai-Min Niu and Soo-Ki Kim	Antibacterial activity of <i>Lactobacillus plantarum</i> isolated from Chinese chives (<i>Allium tuberosum</i>) juice	
	한국, 경상대학교	Woo-Do Lee, Kai-Min Niu, Jeong-Min Lim, Da Hye Park and Soo-Ki Kim	Effects of egg shell powder on egg production, egg quality, blood composition and tibia formation as a source of calcium on laying hens	

2019	캐나다, 퀘벡	Woo-Do Lee, Damini Kothari, Kai-Min Niu and Soo-Ki Kim	Chinese chives (<i>Allium tuberosum</i>) fermentation using autochthonous <i>Lactobacillus plantarum</i> toward the production of antimicrobial poultry feed additive	
	중국, 난징대학	Joong-Jae Lee, Won-Uk Hwang, Woo-Do Lee, Jeong-Min Lim and Soo-Ki Kim	Effect of dietary supplementation with fermented Chinese chives on the growth performance in Holstein calves	
2020	한국, 경주	Woo-Do Lee, Damini Kothari and Soo-Ki Kim	LC-MS/MS based metabolomic analysis of compositional changes in Chinese chives (<i>Allium tuberosum</i>) following <i>Lactobacillus plantarum</i> mediated control	
	한국, e-conference	Woo-Do Lee, Kothari damini, Ju Hee Kim, Woong Rae Kim, Jong Il Kim, Kyung Il Kim, Seung Gyu Moon and Soo-Ki Kim	Dietary supplementation of fermented Chinese chives improves the meat color and gut microbiota composition in broilers	
	한국, e-conference	Ju-Hee Kim, Damini Kothari, Woo-Do Lee, Woong-Rae Kim and Soo-Ki Kim	Fermentation of Chinese chives juice using indigenous <i>Lactobacillus plantarum</i>	

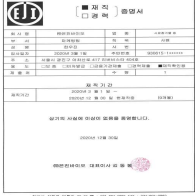
라. 생명자원 등록 (미생물 기탁)

년도	등록기관	특허명	수탁번호	참고자료
2019	국립농업 과학원	<i>Lactobacillus plantarum</i> SK4719	KACC 92270P	

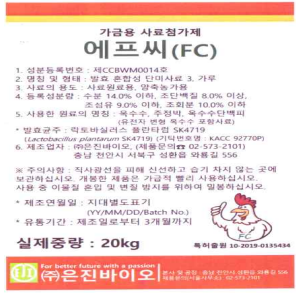

마. 인력양성

년도	인력양성명	발생년월	취업 및 진로	참고자료
2018	참여연구원 '이우도' 석사학위 취득	2018. 08. 22	건국대학교 대학원 박사학위 진학	
2019	참여연구원 '황원욱' 박사학위 취득	2019. 02. 22	축산과학원 연구사	
	참여연구원 '임정민' 석사학위 취득	2019. 08. 22	(주) 대상	
2020	참여연구원 '권소희' 석사학위 취득	2020. 02. 22	건국대학교 석사 졸업생 청년 TLO 진행 (2021. 02월 종료)	
2021	참여연구원 '김응래' 석사학위 취득	2021. 02. 22	(주) 우성사료	
	참여연구원 '김주희' 석사학위 취득	2021. 02. 22	한동대학교내 벤처기업 연구원	




바. 고용창출



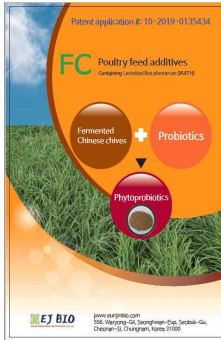
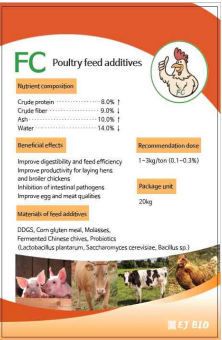
발생년도	취업자명	취업기관	증빙자료
			재직증명서
2020	한우진	(주) 은진바이오	

사. 시제품 제작

발생년도	제품명	제품용도	증빙사진	
			‘에프씨’ 라벨지	‘에프씨’ 제품
2020	에프씨	사료원료용/ 양축농가용		

아. 홍보물 제작 및 홍보

발생년도	매체명	제목	증빙사진
2020	농림식품기술기 획평가원 유망기술발표회 기술소개서	우수한 항균활성을 가지는 부추 사료 첨가제	
	농림식품기술기 획평가원 유망기술발표회 발표영상	가금의 주요 질병 방제에 효과가 좋은 부추 사료첨가제 제조 기술	
	월간양계 (축산 잡지)	가금 사료첨가제로써의 부추, 마늘, 양파를 비롯한 알리움속 식물	

	<p>팜플렛 (국문)</p>	<p><i>Lactobacillus plantarum</i> SK4719가 포함된 부추 발효사료첨가제 FC</p>		
	<p>팜플렛 (영문)</p>	<p>FC Poultry feed additives containing <i>Lactobacillus plantarum</i> SK4719</p>		

자. 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.25 억원
			향후 3년간 매출	30 억원
		관련제품	개발후 현재까지	- 억원
			향후 3년간 매출	20 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0.025 % 국외 : 0.00025 %
			향후 3년간 매출	국내 : 3 % 국외 : 0.0025%
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %
			향후 3년간 매출	국내 : 2 % 국외 : 0.0017 %
세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			300 위
	3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			200 위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	현재 매출 중이지만 본격적 생산과 내수 시장 확대 및 수출을 위해 앞으로 3년 집중 투자 필요		
	소요예산(백만원)	500		
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후
		0.25	30	100

	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0.025%	3%	4%
		국외	0.0025%	0.0025%	0.001%
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	<ul style="list-style-type: none"> - 개발된 부추 사료첨가제의 경제적 및 기능적 측면을 더욱 개선시켜 전 세계적으로 널리 사용할 수 있는 제품의 개발을 계획함 - 부추 외 솔잎추출물, 오미자박 등 국내 부존자원인 천연식물을 이용, 기존 제품과 차별화된 다기능성 천연 사료첨가제 개발을 계획 			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0.25	50	100	
	수출	-	20	50	

3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1절. 목표

1. 최종목표

- 가금의 주요 질병방제에 효과적인 광범위 항균/항AI 활성 함유 부추사료첨가제의 상품화

2. 세부목표

- 부추의 사료첨가제를 위한 착즙 및 발효공정 확립
- 부추의 항균 및 항바이러스 활성물질 추출 및 추출방법 확립
- 부추의 생리활성 물질 확인 및 그 물질의 효능 검증
- 부추 및 부추발효물을 이용한 사료첨가제 시작품 개발 및 보급
- 가금 사양실험 및 결과 분석을 통한 부추의 항균, 항바이러스에 대한 효능 제시
- 바이러스를 접종하여 실제 항바이러스 능력 조사

2절. 목표 달성여부

- 본 연구의 세부 목표와 연구결과 및 달성은 아래의 표와 같다.

표 3-2-1. 연구개발 목표 및 결과

구분 (연도)	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과 및 목표
1차 년도 (2018)	부추의 사료첨가제를 위한 착즙 및 발효공정 확립	부추 단기발효공정의 개발을 통한 항바이러스 및 기능성에 대한 평가	부추로부터의 발효 미생물 확보 및 발효공정 확립
		항산화 및 항균 및 다기능성의 부추발효물 생산을 위한 단기발효공정 확립 및 제시	부추발효물의 항균 / 항산화 활성 검증 및 단기발효공정 확립
		5 L jar fermenter를 이용한 발효성상의 조사	5 L jar fermenter를 이용하여 시간대별 부추발효물 확보 및 이를 이용한 총균수, pH, 항균, 항산화능 측정
	부추의 항균, 항바이러스 활성물질의 조추출 방법 확립 및 활성 검증	AI 등 항바이러스 활성물질 분획 (Crude fraction)의 추출방법 확립	HPLC를 이용한 target 유효 지표물질 선정
		<i>E. coli</i> 등 병원균에 대한 항균활성	부추의 제조 형태에 따른 병원성균에 대한 항균능력 검증 완료
		항바이러스 활성 검증	발효한 부추물을 이용하여 항바이러스 활성 능력 검증 완료
		Target 유효 지표물질 선정	HPLC를 이용한 target 유효지표물질 선정

2차 년도 (2019)	부추 및 부추발효물을 이용한 사료첨가제 시작품 생산공정 확립	적합한 사료첨가제의 형태를 고안	부추를 이용, 적합한 발효 사료첨가제 제조공정 확립 및 형태 결정
		액상 및 고상 등의 형태로 제작된 부추 사료첨가제의 효능(항균, 항바이러스 등) 검증	제작된 발효부추 사료첨가제의 항균, 항바이러스 효능 검증 완료
		고안된 부추 및 부추발효물 사료첨가제를 이용한 Rat 실험을 진행	기능이 검증된 발효부추 사료첨가제를 이용한 mouse 실험 수행 및 결과 도출
	육계 사양실험을 통한 사료첨가제로서 부추 및 부추발효물의 이용 가능성 확인	육계에서의 생산성, 체내 이용성 및 축산물 평가 등 부추의 첨가 효과에 대한 결과 도출	발효부추 사료첨가제의 육계 생산성, 체내 이용성 축산물 품질 등 급여 효과 검증 완료
3차 년도 (2020)	산란계 사양실험을 통한 사료첨가제로서 부추 및 부추발효물의 이용 가능성 확인	부추 추출물의 장내 미생물에 미치는 영향 확인	육계의 장내 미생물 분리 및 장내 균총에 미치는 영향 조사 완료
		산란계에서의 생산성, 계란의 품질, 저장성 등 부추의 첨가 효과에 대한 조사	발효부추의 첨가농도에 따른 산란계 생산성, 계란의 품질 및 저장성 등에 미치는 영향 분석
	부추첨가제 이용 사양실험의 보고서 및 이를 이용한 가금 질병 억제 매뉴얼 작성	부추 추출물의 장내 미생물에 미치는 영향 확인	대조구 및 발효부추 처리구별 산란계의 장내 미생물 균총 확인, 우점종 미생물의 분리 및 동정 완료
		가금용 발효부추 사료첨가제를 제조하기 위한 최적의 발효공정 제시 및 그 첨가제의 생리적 기능 검증	액상 및 고상형태의 가금용 발효부추 사료첨가제의 제조 및 발효공정 확립
		가금(육계, 산란계)에 있어 발효부추 사료첨가제의 첨가효과 확인	사료첨가제의 형태에 따른 생리적 효능 검증
		가금용 부추사료첨가제에 대한 보고서 작성	가금(육계, 산란계)을 이용한 발효부추 사료첨가제(액상 및 고상)의 첨가 효과 정리 및 관련 홍보물 제작 완료
		가금용 부추사료첨가제의 in vitro 및 in vivo의 연구결과를 바탕으로 한 최종 보고서, 홍보물 작성 및 국외 논문으로의 게재 완료	

3절. 목표 미달성시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

표 3-3-1. 과업의 목표, 연구개발 수행내용 및 달성도

구분 (연도)	세부연구목표	가중치 (%)	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차 년도 (2018)	부추의 사료첨가제를 위한 착즙 및 발효공정 확립	10	부추 단기발효공정의 개발을 통한 항바이러스 및 기능성에 대한 평가	100
			항산화 및 항균 및 다기능성의 부추발효물 생산을 위한 단기발효공정 확립 및 제시	100
			5 L jar fermenter를 이용한 발효성상의 조사	100
	부추의 항균, 항바이러스 활성물질의 조추출 방법 확립 및 활성 검증	15	AI 등 항바이러스 활성물질 분획 (Crude fraction)의 추출방법 확립	100
			<i>E. coli</i> 등 병원균에 대한 항균활성	100
			항바이러스 활성 검증	100
			Target 유효 지표물질 선정	100
2차 년도 (2019)	부추 및 부추발효물을 이용한 사료첨가제 시작품 생산공정 확립	15	적합한 사료첨가제의 형태를 고안	100
			액상 및 고상 등의 형태로 제작된 부추 사료첨가제의 효능(항균, 항바이러스 등) 검증	100
			고안된 부추 및 부추발효물 사료첨가제를 이용한 Rat 실험을 진행	100
	육계 사양실험을 통한 사료첨가제로서 부추 및 부추발효물의 이용 가능성 확인	20	육계에서의 생산성, 체내 이용성 및 축산물 평가 등 부추의 첨가 효과에 대한 결과 도출	100
			부추 추출물의 장내 미생물에 미치는 영향 확인	100
3차 년도 (2020)	산란계 사양실험을 통한 사료첨가제로서 부추 및 부추발효물의 이용 가능성 확인	20	산란계에서의 생산성, 계란의 품질, 저장성 등 부추의 첨가 효과에 대한 조사	100
			부추 추출물의 장내 미생물에 미치는 영향 확인	100
	부추첨가제 이용 사양실험의 보고서 및 이를 이용한 가금 질병 억제 매뉴얼 작성	20	가금용 발효부추 사료첨가제를 제조하기 위한 최적의 발효공정 제시 및 그 첨가제의 생리적 기능 검증	100
			가금(육계, 산란계)에 있어 발효부추 사료첨가제의 첨가효과 확인	100
			가금용 부추사료첨가제에 대한 보고서 작성	100
합계		100	-	100

○ 차후대책(후속연구의 필요성):

- 부추 사료첨가제는 본 연구에서 국내외에서 처음으로 시도된 것으로 AI방제 효과를 기대할 수 있고 부추 재배농가에도 소득증대에 이바지가 가능
- 조류인플루엔자 바이러스 체린지 실험 규모의 확대 및 장기간 실험을 위해 후속 연구비 지원이 절실히 필요함
- 농축산소득증대 및 제품의 해외수출을 위하여 광범위 항바이러스, 항균 효과를 가지고 있는 부추 사료첨가제의 국내외 사업 확장을 위해 지속적인 기획연구 및 생산을 위한 투자 지원이 필요할 것으로 사료됨

4장. 연구결과의 활용 계획 등

- 축산(가금, 양돈, 육우, 유우 등)농가로의 보급 및 폐사 등으로 인한 경제적 손실 방지
 - 가축(호흡기, 소화기성)질병 방제에 효과적인 사료첨가제의 적용
 - 기능성 사료첨가제 개발을 통한 가축의 폐사율 저감 등 경제적인 손실 보전 기대
 - 가금 외 유·육우, 돼지 등 주요 축종으로의 적용 가능 및 안전한 사양시스템 구축
 - 저비용 고부가가치로 효과적인 가축 사양이 가능한 새로운 사료첨가제 이용
- 친환경 신소재의 산업화 및 다양한 산업으로의 적용
 - 국내 천연소재인 부추와 부추에서 자생하는 유용 미생물을 복합적으로 활용한 천연 사료첨가제의 개발
 - 가축에 효과적인 발효부추 사료첨가제를 활용하여 제품 차별화에 주력
 - 프리미엄 기능성 사료 첨가제 제조의 독보적인 기술력 확보 및 제조공정 개발
 - 가축 면역력의 증진을 통하여 다양한 질병을 예방할 수 있는 다기능성 천연물질을 차별화 전략으로 수립함
 - 부추 외 사료첨가제의 효능을 증진시킬 수 있는 신소재 선별 가능
 - 부추 및 발효부추 함유 기능성 물질을 이용한 의약품 등 다양한 산업으로의 적용
- 축산 전문인력의 양성 및 수출을 통한 국가 경쟁력 확보
 - 천연 신소재를 이용한 사료첨가제 산업화에 의한 전문인력의 양성
 - 부추 외 천연 신소재를 이용, 다양한 연구의 추진
 - 신개념 발효부추의 이용 기능성 및 사료첨가제 개발로 관련 산업의 매출 증대 및 국외로의 수출을 통한 국가 경쟁력 확보
 - 기능성 사료첨가제 개발을 통한 국내 사료첨가제의 수입대체 효과



그림 4-1-1. 연구결과 활용을 통한 기대효과 및 계획

○ 예상되는 연구 성과의 활용분야 및 활용방안

- 연구 결과에 대한 지속적인 홍보로 가금 사료첨가제에 이어 양돈, 대가축에도 활용 기대

○ 추가 연구의 필요성

- 부추 사료첨가제에 대한 축산에 범용적 적용을 위하여 부추의 경제적 대량생산이 필요하고 이를 가장 경제적인 방법으로 제형화하여 중소가축과 대가축에 활용하는 in vivo 실험의 확대가 필요

○ 타 연구에의 응용

- 다른 식물추출물 혹은 유용미생물과 혼합한 신규의 사료첨가제 제품의 창출 및 적용이 가능

○ 기업화 추진방안

- 제품의 국내외 수요 확대를 위한 전시회참가, 전문 축산 잡지와 신문 등에 홍보를 통하여 기업화 추진

○ 기술이전

- 개발한 발효부추 사료첨가제의 유통을 원활히 할 수 있는 회사들과 면담을 계속 진행 중이며, 기술이전을 통하여 국내외 판매 확대를 추진하고자 함

붙임. 참고문헌

- 김상호, 박수영, 유동조, 이상진, 강보석, 최철환, & 류경선. (2000). 유산균의 첨가 급여가 산란 생산성, 소화기관 미생물 변화 및 계란 품질에 미치는 영향. 한국가금학회지, 27(3), 235-242.
- 곽연주, 전희정, and 김정상. “부추의 수확시기에 따른 클로로필, 무기질 및 superoxide dismutase 유사활성의 변화.” 한국식품조리과학회지 14.5 (1998): 513-515.
- 박예은, 김병혁, 윤여초, 김중규, 이준형, 권기석, ... & 이중복. (2018). 유산균 발효에 따른 볶은 아마씨 추출물의 폴리페놀, 플라보노이드 함량 및 항산화 활성. 생명과학회지, 28(5), 547-554.
- 안명수, 김현정, & 서미숙. (2005). 품종별 부추 추출물의 항산화성 및 항균성. 한국식생활문화학회지, 20(2), 186-193.
- 이준형, 윤여초, 김중규, 박예은, 황학수, 권기석, & 이중복. (2018). 유산균을 이용한 보리의 발효를 통한 항산화 및 미백 효과. 생명과학회지, 28(4), 444-453.
- 이중복, 배정식, 손일권, 전준표, 이은호, 주우홍, & 권기석. (2014). 부추 당침액의 유산균 발효에 따른 항산화 및 ACE 저해활성. 생명과학회지, 24(6), 671-676.
- 장인석, 문양수, & 손시환. (2015). 육계에서 가시오갈피 급여에 따른 생산성, 혈액 생화학적 성상 및 면역 사이토카인 발현에 미치는 영향. 한국가금학회지, 42(3), 197-204.
- 천선화, 김수지, 이상일, 정영배, 조정은, & 서혜영. (2015). 젓산균이 김치 발효 중 아플라톡신 함량 변화에 미치는 영향. 한국식품저장유통학회지, 22(5), 758-767.
- 최소연, 김시경, 윤은영, 강대욱, 최낙식, 문미선, & 이승철. (2015). 감귤 유산균 발효물의 항균 활성과 ACE 저해능. 한국식품영양과학회지, 44(7), 1084-1089.
- 한상훈, 김동욱, 지상윤, 홍성구, 김상호, & 이희삼. (2012). 빵잎과 잠분 추출물 급여가 육계의 생산성, 혈액 성상 및 맹장 내 미생물군에 미치는 영향. 한국잡사곤충학회지 (구 한국잡사학회지), 50(2), 150-160.
- 홍서아, & 왕수경. (2000). 부추와 식이지방이 고지혈증 환주의 혈액성상 및 혈소판 응집에 미치는 영향.
- 홍정화, 이미형, 강민철, & 허성호. (2000). 부추의 항균활성 물질의 분리. 한국식품위생안전

성학회지, 15(3), 235-240.

- Ahn, B. S., Kim, J. W., Kim, H. T., Lee, S. D., & Lee, K. W. (2010). Antioxidant effects of *Hovenia dulcis* in the streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Veterinary Clinics*, 27(4), 366-373.
- Ali, R. A., Wuescher, L. M., Dona, K. R., & Worth, R. G. (2017). Platelets mediate host defense against *Staphylococcus aureus* through direct bactericidal activity and by enhancing macrophage activities. *The Journal of Immunology*, 198(1), 344-351.
- Ao, T., Pierce, J. L., Pescatore, A. J., Cantor, A. H., Dawson, K. A., Ford, M. J., & Paul, M. (2011). Effects of feeding different concentration and forms of zinc on the performance and tissue mineral status of broiler chicks. *British Poultry Science*, 52(4), 466-471.
- Barbour, E. K., Ayyash, D. B., Alturkistni, W., Alyahiby, A., Yaghmoor, S., Iyer, A., ... & Harakeh, S. (2015). Impact of sporadic reporting of poultry *Salmonella* serovars from selected developing countries. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(01), 001-007.
- Benkeblia, N., & Lanzotti, V. (2007). *Allium thiosulfinates*: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. *Food*, 1(2), 193-201.
- Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Reid, W.M. & Yoder, H.W. Jr., (1991). *Diseases of poultry*. 9th Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 99-120.
- Choi, I. K., Strauss, R., Richter, M., Yun, C. O., & Lieber, A. (2013). Strategies to increase drug penetration in solid tumors. *Frontiers in oncology*, 3, 193.
- Choi, J. S., Kim, J. Y., Woo, W. S., & Young, H. S. (1988). Isolation of a β -carboline alkaloid from the leaves of *Allium tuberosum*. *Archives of Pharmacal Research*, 11(4), 270-272.
- Davidson, F. W., Whitney, H. G., & Tahlan, K. (2015). Genome sequences of *Klebsiella variicola* isolates from dairy animals with bovine mastitis from Newfoundland, Canada. *Genome announcements*, 3(5).
- Dugan, M. E. R., Aalhus, J. L., Jeremiah, L. E., Kramer, J. K. G., & Schaefer, A. L. (1999). The effects of feeding conjugated linoleic acid on subsequent pork quality. *Canadian Journal of Animal Science*, 79(1), 45-51.

- Dror, Y., Nir, I., & Nitsan, Z. (1977). The relative growth of internal organs in light and heavy breeds. *British Poultry Science*, 18(4), 493-496.
- Fertner, M. E., Olsen, R. H., Bisgaard, M., & Christensen, H. (2011). Transmission and genetic diversity of *Enterococcus faecalis* among layer chickens during hatch. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53(1), 1-6.
- Foster, W. H. (1972). A practical evaluation of five food additives likely to be used as growth promoters in broiler rations. *British poultry science*, 13(2), 123-131.
- Fusco, V., Quero, G. M., Cho, G. S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., ... & Franz, C. M. (2015). The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in microbiology*, 6, 155.
- Gates, M. A., Tworoger, S. S., Hecht, J. L., De Vivo, I., Rosner, B., & Hankinson, S. E. (2007). A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *International journal of cancer*, 121(10), 2225-2232.
- Girmay, G., Pal, M., Dessie, T., Sissay, T., & Wubete, A. (2015). Evaluating the relative resistance of different poultry breeds to *Salmonella Typhimurium*. *African Journal of Agricultural Research*, 10(30), 2928-2939.
- Hassan, R., Rounds, J., Sorenson, A., Leos, G., Concepción-Acevedo, J., Griswold, T., ... & Basler, C. (2017). Multistate outbreak of *Salmonella anatum* infections linked to imported hot peppers—United States, May–July 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 66(25), 663.
- Jortner, B. S., & Helmboldt, C. F. (1971). Streptococcal bacterial endocarditis in chickens: associated lesions of the central nervous system. *Veterinary pathology*, 8(1), 54-62.
- Jung, H. A., Kim, J. E., Chung, H. Y., & Choi, J. S. (2003). Antioxidant principles of *Nelumbo nucifera* stamens. *Archives of pharmacal research*, 26(4), 279-285.
- Kameoka, H., & Miyake, A. (1974). constituents of the steam volatile oil from *Allium tuberosum* Rottler. *J Agric Chem Soc Jap*.
- Kaneta, M., Hkichi, H., Endo, S., & Sugiyama, N. (1980). Identification of flavones in sixteen Leguminosae species. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(6), 1407-1408.
- Kim, S. J., & Park, K. H. (1996). Antimicrobial substances in leek (*Allium tuberosum*).

Korean Journal of Food Science and Technology, 28(3), 604-608.

- Kim, S. H., Lee, I. C., Kang, S. S., Moon, C. J., Kim, S. H., Shin, D. H., ... & Kim, J. C. (2011). Effects of bamboo charcoal and bamboo leaf supplementation on performance and meat quality in chickens. *Journal of Life Science*, 21(6), 805-810.
- Kim, O. K., Yoo, S. A., Nam, D. E., Kim, Y., Kim, E., Jun, W., ... & Lee, J. (2014). Immunomodulatory effects of *Curcuma longa* L. extract in LP-BM5 murine leukemia viruses-induced murine acquired immune deficiency syndrome. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 43(9), 1317-1324.
- Kloska, F., Casteel, M., Kump, F. W. S., & Klein, G. (2017). Implementation of a risk-orientated hygiene analysis for the control of *Salmonella* JAVA in the broiler production. *Current microbiology*, 74(3), 356-364.
- Lee, G. Y., Kim, S. I., Jung, M. G., Seong, J. H., Lee, Y. G., Kim, H. S., ... & Kim, D. S. (2014). Characteristics of Chungkookjang that enhance the flavor and GABA content in a mixed culture of *Bacillus subtilis* MC31 and *Lactobacillus sakei* 383. *Journal of Life Science*, 24(10), 1102-1109.
- Lee, K. H., Bong, Y. J., Lee, H. A., Kim, H. Y., & Park, K. Y. (2016). Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from kimchi. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 45(1), 12-19.
- Lee, Y. N., Lee, D. H., Park, J. K., Lim, T. H., Youn, H. N., Yuk, S. S., ... & Song, C. S. (2011). Isolation and characterization of a novel H9N2 influenza virus in Korean native chicken farm. *Avian diseases*, 55(4), 724-727.
- Millet, A., Lamy, E., Jonas, D., Stintzing, F., Mersch-Sundermann, V., & Merfort, I. (2012). Fermentation enhances the biological activity of *Allium cepa* bulb extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(9), 2148-2156.
- NAITO, S., YAMAGUCHI, N., & YOKOO, Y. (1981). Fractionation of Antioxidant Extracted from Garlic Studies on natural antioxidant Part III. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 28(9), 465-470.
- Nirmala, C., Bisht, M. S., Bajwa, H. K., & Santosh, O. (2018). Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 91-99.

- Odeleye, O. E., Eskelson, C. D., & Watson, R. R. (1992). Changes in hepatic lipid composition after infection by LP-BM5 murine leukemia virus causing murine AIDS. *Life sciences*, 51(2), 129-134.
- Ortiz-Lucas, M., Tobias, A., Sebastián, J. J., & Saz, P. (2013). Effect of probiotic species on irritable bowel syndrome symptoms: A bring up to date meta-analysis (No. ART-2013-100050).
- Park, J. S., Kim, J. Y., Lee, J. H., Young, H. S., & Lee, T. W. (1992). Isolation of adenosine and free amino acid composition from the leaves of *Allium tuberosum*. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 21(3), 286-290.
- Peana, A. T., D'Aquila, P. S., Panin, F., Serra, G., Pippia, P., & Moretti, M. D. L. (2002). Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomedicine*, 9(8), 721-726.
- Podder, M. P., Rogers, L., Daley, P. K., Keefe, G. P., Whitney, H. G., & Tahlan, K. (2014). *Klebsiella* species associated with bovine mastitis in Newfoundland. *PLoS one*, 9(9), e106518.
- Ramiah, S. K., Zulkifli, I., Rahim, N. A. A., Ebrahimi, M., & Meng, G. Y. (2014). Effects of two herbal extracts and virginiamycin supplementation on growth performance, intestinal microflora population and fatty acid composition in broiler chickens. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 27(3), 375.
- Ridwan, B. U., Koning, C. J. M., Besselink, M. G. H., Timmerman, H. M., Brouwer, E. C., Verhoef, J., ... & Akkermans, L. M. A. (2008). Antimicrobial activity of a multispecies probiotic (Ecologic 641) against pathogens isolated from infected pancreatic necrosis. *Letters in applied microbiology*, 46(1), 61-67.
- Shin, J. H., Mo, J. S., Kim, J. N., Mo, I. P., & Ha, B. D. (2016). Assessment of the safety and efficacy of low pathogenic avian influenza (H9N2) virus in inactivated oil emulsion vaccine in laying hens. *Journal of veterinary science*, 17(1), 27.
- Shoaib, M., Xiaokai, S., Ul-Hassan, M., Zafar, A., Riaz, A., Umar, S., ... & Xiangrui, L. (2017). RETRACTED ARTICLE: Role of dendritic cells in immunity against avian coccidiosis. *World's Poultry Science Journal*, 73(4), 737-746.
- Starke, H., & Herrmann, K. (1976). Flavonols and flavones of vegetables. VII. Flavonols of leek, chive and garlic (author's transl). *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung*, 161(1), 25-30.

- Stromberg, Z. R., Johnson, J. R., Fairbrother, J. M., Kilbourne, J., Van Goor, A., Curtiss 3rd, R., & Mellata, M. (2017). Evaluation of *Escherichia coli* isolates from healthy chickens to determine their potential risk to poultry and human health. *PloS one*, 12(7), e0180599.

- Stutz, M. W., Johnson, S. L., Judith, F. R., & Muir, L. A. (1983). Effect of the antibiotic thiopeptin on *Clostridium perfringens* and growth and feed efficiency of broiler chicks. *Poultry science*, 62(8), 1633-1638.

- Wang, L., Tu, Y. C., Lian, T. W., Hung, J. T., Yen, J. H., & Wu, M. J. (2006). Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 9798-9804.

- YOSHIDA, T., SAITO, T., & KADOYA, S. (1987). New acylated flavonol glucosides in *Allium tuberosum* Rottler. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 35(1), 97-107.

- Zaworski, E. M., Shriver-Munsch, C. M., Fadden, N. A., Sanchez, W. K., Yoon, I., & Bobe, G. (2014). Effects of feeding various dosages of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in transition dairy cows. *Journal of dairy science*, 97(5), 3081-3098.

연구개발보고서 초록



과 제 명	(국문) 가금의 주요 질병방제에 효과적인 광범위 항균/항AI 활성 함유 부추사료첨가제의 상품화				
	(영문) Commercialization of leek feed additive containing a broad-range antimicrobial, anti-AI activities for controlling major diseases of poultry				
주관연구기관	건국대학교 산학협력단	주 관 연 구 책 임 자	(소속) 건국대학교 상허생명과학대학		
참여기업	(주) 은진바이오		(성명) 김 수 기		
총연구개발비 (386,667 천원)	계	386,667 천원	총 연구 기간	2018. 04. ~ 2020. 12. (2년 8개월)	
	정부출연 연구개발비	290,000 천원	총 참 여 연 구 원 수	총 인원	14 명
	기업부담금	96,667 천원		내부인원	9 명
	연구기관부담금	-		외부인원	5 명

○ 연구개발 목표 및 성과

• 연구개발 목표: 가금의 주요 질병방제에 효과적인 광범위 항균/항AI 활성 함유 부추사료첨가제의 상품화

- 본 연구기관은 조류인플루엔자(AI)에 대한 항바이러스 활성을 가지는 부추유래 단일물질에 대하여 국내 특허등록[1013069560000] 및 PCT출원 2011-OPA-5184]을 한 바 있음. 따라서 본 연구에서는 광범위 항균활성 및 AI활성을 가진 부추즙 및 조추출물 분획(Crude extract fraction)을 경제적으로 생산하여 사료첨가제로 상품화하여 가금의 질병을 억제하는데 기여하고자 하였음. 본 연구에서 제조한 시제품에 대한 가금류의 사양효과 분석 및 살모넬라 등 항균과 항AI 활성, 산란계 및 육계의 면역반응, 제품의 안전성 검증 등을 수행하여 시대적, 국가적으로 시급히 필요한 가금용 기능성사료첨가제를 생산하여 농가에 보급하고 수입대체 효과뿐만 아니라 해외수출을 반드시 달성하고자 함

• 연구개발 대표성과:

대 표 성 과	· 특허출원 : 2건 (출원번호: 10-2019-0135434/10-2021-0012568)	 <p style="text-align: center;">그림. 특허출원통지서</p>	 <p style="text-align: center;">그림. 게재 논문 (Antibiotics, 2020)</p>
	· 생명자원 등록 : 1건 (<i>Lactobacillus plantarum</i> SK4719, 국립농업과학원 KACC 92270)		
	· 제품화 : 1건 (발효부추 사료첨가제 '에프씨')		
	· 논문 (SCI) : 7건 (Antioxidant 등)		
	· 국내·외 학술발표 : 9건		
· 기술 및 제품홍보 : 4건 (영상, 잡지, 팸플릿 등)			

○ 연구내용 및 결과

1. 부추 발효를 위한 유용 균주(*Lactobacillus plantarum* SK4719)의 확보 및 발효 특성 확인

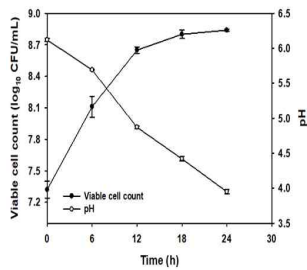


그림. 유산균의 발효특성

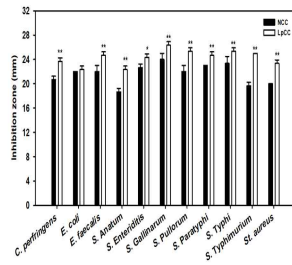


그림. 발효부추의 병원성균 억제

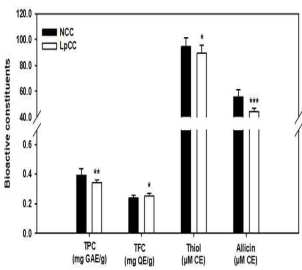


그림. 발효부추의 항산화능 분석

2. 발효부추 및 비발효 부추의 생리적 유효물질 변화 분석

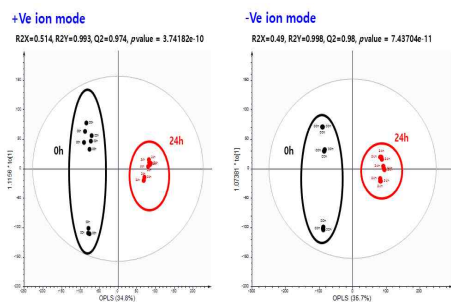


그림. 부추의 발효에 따른 유효성분 변화

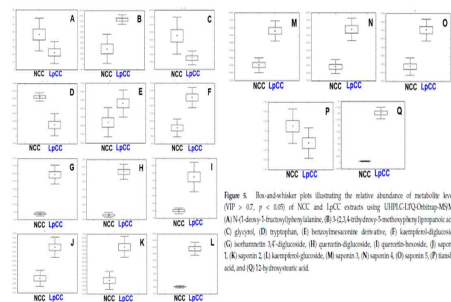


Figure 5. Box-and-whisker plots illustrating the relative abundance of metabolite levels (VIP > 0.7, p < 0.05) of NCC and LpCC extracts using UHPLC-ESI/MS/MS. (A) N-(3-dimethylbutyl)phthalate, (B) 3,2,1-trimethyl-5-norbornene-2-propanoic acid, (C) glyoxal, (D) isopyridine, (E) benzoylacetone derivative, (F) kaempferol-3-glucoside, (G) neochlorogenic 3,4-diglucoside, (H) quercetin-3-glucoside, (I) quercetin-3-β-D-glucopyranoside, (J) apigenin, (K) apigenin-2-O-glucuronide, (L) kaempferol-3-O-glucuronide, (M) apigenin, (N) apigenin-4-O-glucuronide, (O) luteolin, (P) luteolin-7-O-glucuronide, (Q) luteolin-7-O-glucuronide, (R) luteolin-7-O-glucuronide.

그림. 부추 내 유효성분 및 발효에 따른 성분함량 비교

3. 발효부추의 조류 인플루엔자 바이러스 억제능 검증

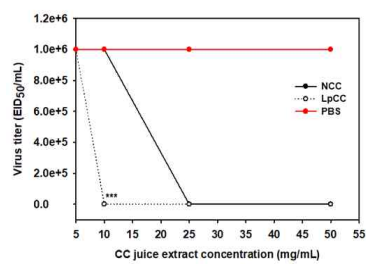


그림. 발효 및 비발효 부추의 조류 인플루엔자 (H1N1) 억제능 분석

4. 부추의 최적 액상 및 고상 발효공정 확립, 발효 특성 분석

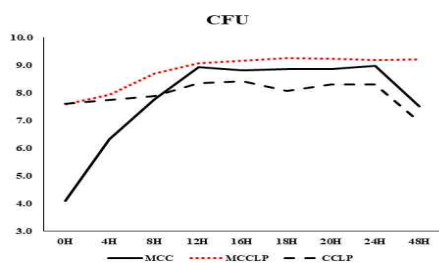


그림. 부추즙의 최적 액상발효 조건 확립

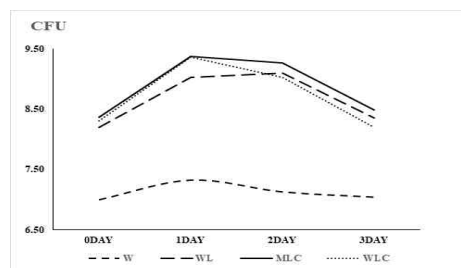


그림. 부추즙의 고상발효 조건 확립

5. 육계의 발효부추 급여효과 검증

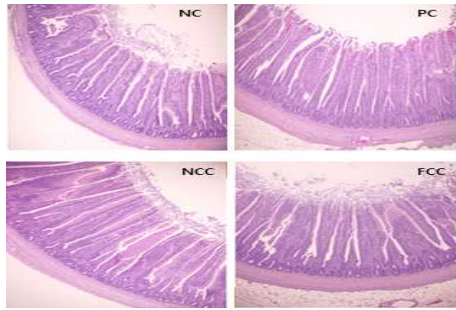


그림. 발효부추 급여에 따른 장의 변화

표. 발효부추 급여에 따른 장내 미생물 균총 변화

Item	Treatment ¹⁾				SEM	p-value
	C	PC	NCC	FCC		
Jejunum						
MacConkey*	7.42 ^a	7.40 ^a	6.63 ^b	6.07 ^b	0.17	<0.01
SS* (Salmonella shigella)	6.11 ^{ab}	6.61 ^a	5.56 ^b	5.35 ^b	0.16	<0.05
Ileum						
MacConkey	7.48 ^b	8.26 ^a	7.12 ^{bc}	6.76 ^c	0.15	<0.01
SS (Salmonella shigella)	6.22 ^b	7.58 ^a	6.33 ^b	5.75 ^c	0.17	<0.01
Cecum						
MacConkey	7.84 ^a	8.07 ^a	6.73 ^b	6.98 ^b	0.15	<0.01
SS (Salmonella shigella)	6.89 ^{ab}	7.16 ^a	6.43 ^c	6.40 ^c	0.11	<0.05

6. 산란계의 발효부추 급여효과 검증

표. 발효부추 사료첨가제 급여에 따른 산란계 생산성 및 계란품질

Item	Treatment			SEM ¹⁾	p-value
	Control	FCC 0.1%	FCC 0.3%		
EPR, %	91.06 ^b	91.21 ^b	94.79 ^a	0.91	<0.05
Egg weight, g	58.74 ^b	61.17 ^a	59.13 ^b	0.25	<0.01
Egg mass, g/hen/d	53.53 ^b	55.76 ^a	56.05 ^a	0.66	<0.05
FI, g/hen/d	111.93	116.66	118.07	3.72	0.49
FCR, g feed/g egg	2.11	2.12	2.12	0.05	1.0
Mortality, %	1.11	0.00	0.00	-	-
Haugh units	85.28	84.71	84.92	1.40	0.96
Albumen height, mm	7.33	7.56	7.20	0.22	0.53
Egg yolk color, RCF	8.05	7.93	7.92	0.06	0.27
Eggshell breaking strength, kgf	4.59	4.50	4.58	0.05	0.46
Eggshell thickness, mm	0.42	0.43	0.42	0.003	0.22
Eggshell weight, %	9.99	9.84	9.86	0.08	0.36

¹⁾Means of triplicate ± standard error of mean

^{a,b}Mean in the same column with different superscript differ significantly (p<0.05)

7. 시제품 제작 및 제품 홍보



그림. 발효부추 사료첨가제 시제품 '에프씨'



그림. 발효부추 사료첨가제 '에프씨' 홍보 팜플렛

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 축산(가금, 양돈, 육우, 유우 등)농가로의 보급 및 폐사 등으로 인한 경제적 손실 방지

- 가축(호흡기, 소화기성)질병 방지에 효과적인 사료첨가제의 적용
- 기능성 사료첨가제 개발을 통한 가축의 폐사율 저감 등 경제적인 손실 보전 기대
- 가금 외 유·육우, 돼지 등 주요 축종으로의 적용 가능 및 안전한 사양시스템 구축
- 저비용 고효가가치로 효과적인 가축 사양이 가능한 새로운 사료첨가제 이용

2. 친환경 신소재의 산업화 및 다양한 산업으로의 적용

- 국내 천연소재인 부추와 부추에서 자생하는 유용 미생물을 복합적으로 활용한 천연 사료첨가제의 개발
- 가축에 효과적인 발효부추 사료첨가제를 활용하여 제품 차별화에 주력
- 프리미엄 기능성 사료 첨가제 제조의 독보적인 기술력 확보 및 제조공정 개발
- 가축 면역력의 증진을 통하여 다양한 질병을 예방할 수 있는 다기능성 천연물질을 차별화 전략으로 수립함
- 부추 외 사료첨가제의 효능을 증진시킬 수 있는 신소재 선별 가능
- 부추 및 발효부추 함유 기능성 물질을 이용한 의약품 등 다양한 산업으로의 적용

3. 축산 전문인력의 양성 및 수출을 통한 국가 경쟁력 확보

- 천연 신소재를 이용한 사료첨가제 산업화에 의한 전문인력의 양성
- 부추 외 천연 신소재를 이용, 다양한 연구의 추진
- 신개념 발효부추의 이용 기능성 및 사료첨가제 개발로 관련 산업의 매출 증대 및 국외로의 수출을 통한 국가 경쟁력 확보
- 기능성 사료첨가제 개발을 통한 국내 사료첨가제의 수입대체 효과

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		118051-03	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	농생명산업기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	가금의 주요 질병방제에 효과적인 광범위 항균/항AI 활성 함유 부추사료첨가제의 상품화			과제유형	응용
연구기관	건국대학교 산학협력단			연구책임자	김수기
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	18.04.26~18.12.31	80,000	26,667	106,667
	2차연도	19.01.01~19.12.31	105,000	35,000	140,000
	3차연도	20.01.01~20.12.31	105,000	35,000	140,000
	계		290,000	96,667	386,667
참여기업	(주) 은진바이오				
상대국	-	상대국연구기관	-		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2021. 01. 31

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
건국대학교	교수	김수기

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약



I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 기존 연구되지 않은 국내 자생식물 부추와 부추에서 분리한 유용미생물을 복합적으로 활용하고 최적의 액상, 고상 발효 공정을 제시하여 창의적인 친환경 가축 사료첨가제 제품을 개발하였음
- 매년 발생하는 조류 인플루엔자 바이러스와 가금에 있어 주요 질병 원인인 병원균의 생장 억제를 목표로 연구를 수행하였으며, 최종적으로 효능을 가진 부추사료첨가제를 국내외에서 처음으로 개발하여 본 연구의 결과는 매우 우수한 것으로 판단됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구는 국내에서 흔히 볼 수 있는 부추를 활용하여 제품화한 연구로써, 부추는 조류 인플루엔자 바이러스의 억제와 부추에서 분리한 유산균은 가금의 대부분의 병원균 생장을 억제시키는 효능을 가지고 있음
- 본 연구결과를 통한 발효 부추 외에도 국내 양파, 솔잎, 오미자박, 녹차 등 천연 식물과 혼합을 이용한 제품화, 사업화가 앞으로 가능할 것으로 판단되며 추후 수행될 연구의 범위 또한 다양화될 것으로 사료됨
- 개발된 다기능성 사료첨가제는 현재 수입하고 있는 사료첨가제를 대체할 수 있으며, 국외로의 수출이 기대됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 부추를 활용하여 생산된 제품은 가금을 타겟으로한 제품으로써 그 외 가축 질병인 구제역, 아프리카 돼지열병 등을 방제하기 위한 제품개발 연구에도 활용이 가능할 것으로 판단됨
- 부추에서 분리된 항바이러스, 항산화 등 생리적 유효물질들은 축산업뿐만 아니라 식품, 소독제 및 의약품 등에도 적용이 활용이 가능할 것으로 보임
- 천연 신소재 활용 사료첨가제의 산업화를 통해 양성된 전문인력은 국내외 가축질병의 억제, 축산의 지속적인 발전 및 기술력 향상에 이바지할 것으로 사료됨

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 본 연구진은 가금산업에 막대한 영향을 끼치는 조류 인플루엔자 바이러스 및 병원균의 생장을 억제시키는 부추사료첨가제를 개발하고자 하였음
- 3년의 연구기간을 통해 다양한 제형의 부추사료첨가제를 개발하였으며, 그 중 경제성과 기능성이 검토된 최적의 사료첨가제 생산공정을 제시하면서 시제품 생산
- 현재 참여기업에서 성공적으로 시판하고 있으며 축산농장 및 사료회사에서 각광을 받을 것으로 예상
- 과업을 통해 발생된 연구결과는 다수의 SCI 논문게재, 특허출원 및 홍보물 제작을 하였음
- 본 연구진은 원래의 목표를 훨씬 초과한 연구성과 달성으로 3년간 성실히 연구를 수행하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 연구결과를 바탕으로 연평균 2편 이상의 국외 SCI 논문을 게재하였으며, 국내 및 국외 학술발표회 9회 수행하여 부추의 기능성을 전 세계적으로 홍보하였음
- 또한 국내 월간잡지와 농림식품기술기획평가원 주관 기술발표회의 참여, 국내·외 제품 홍보를 위한 팸플릿 제작 등을 통해 개발된 부추사료첨가제를 널리 홍보시키고자 노력하였음
- 개발된 제품의 국내 유통 및 수출에 힘쓸 계획이며, 산업체에 기술이전을 통해 시장성을 확대시킬 예정임

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
부추의 사료첨가제를 위한 착즙 및 발효공정 확립	10	100	- 부추 착즙액을 이용한 최적의 액상 및 고상 발효공정의 확립
부추의 항균 및 항바이러스 활성물질 추출 및 추출방법 확립	15	100	- 유기용매(메탄올)을 이용, 부추 내 항균, 항바이러스 등 생리적 기능을 가진 유효물질 추출 완료
부추의 생리활성 물질 확인 및 그 물질의 효능 검증	15	100	- 부추 내 존재하는 생리활성 물질 종류 확인 - 추출된 유효물질들의 생리활성 기능 조사
부추 및 부추발효물을 이용한 사료첨가제 시작품 개발 및 보급	20	100	- 가금(육계, 산란계)용 부추사료첨가제 ‘에프씨’ 제품 개발 완료 및 제품 판매를 통한 농가 보급
가금 사양실험 및 결과 분석을 통한 부추의 항균, 항바이러스에 대한 효능 제시	20	100	- 가금(육계, 산란계)을 이용한 발효 부추사료첨가제 급이효과 검증 완료 - 생산성, 축산물 품질, 혈액특성, 면역기관 및 장의 특성, 미생물 군총 등 부추사료첨가제의 급이에 따른 차이 비교 - MDCK 세포, SPF 종란을 이용한 부추의 조류 인플루엔자 바이러스 억제 효능 분석 완료 (in vitro) - SPF 마우스 및 산란계를 이용한 부추의 조류 인플루엔자 바이러스 억제 효능 검증 완료 (in vivo)
바이러스를 접종하여 실제 항바이러스 능력 조사	20	100	- in vitro(MDCK 세포, SPF 종란) 및 in vivo(SPF 마우스 및 산란계) 실험을 통한 부추의 항바이러스 효능 검증 완료
합계	100점	100	종합적 자체평가: 매우 우수

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 연구는 그동안 연구되지 않은 국내 자생식물 부추를 활용하여 가금 산업의 고질적인 문제인 병원균과 조류 인플루엔자 바이러스를 억제시키기 위하여 연구를 수행하였음
- 부추 내에는 kaempferol과 많은 황화합물이 함유되어 항균, 항바이러스, 항산화, 항염증 등 다양한 생리적 기능을 갖고 있으며, 특히 본 연구에서 확보한 *Lactobacillus plantarum* SK4719를 복합적으로 사용하여 그 유효물질들의 함량을 더욱 개선시켰음
- 부추사료첨가제를 가금에 적용하였을 때 나타나는 생산성, 축산물 품질, 혈액성상, 장내 특성 및 미생물 군총 등의 본 연구결과는 가금 사육 농가의 질병억제 및 생산성 증대에 크게 기여할 것으로 판단됨
- 발효부추가 조류독감인플루엔자 바이러스의 증식을 억제시키는 결과를 통하여 사료첨가제 뿐만 아니라 동물약품 (천연소독제), 의약품 및 식품 등 다양한 산업의 분야에도 적용이 될 것으로 예상됨
- 현재 판매 중이며 유통확대를 위하여 기술이전을 추진 중임

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 3년의 연구과제 수행간 본 연구진은 국제저명학술지 논문 7편 게재, 특허출원 2건, 국내외 학술발표 9건, 생명자원 등록 1건 (*Lactobacillus plantarum* SK4719), 인력양성 6건, 고용창출 1건, 홍보물 제작 5건 등 도출된 연구결과를 국내외로 적용과 홍보를 하기 위하여 과업을 성실히 수행하였음
- 특히, 참여기관인 (주) 은진바이오에서 발효부추사료첨가제를 대량으로 생산하였으며, 생산된 제품은 농가에 보급, 판매하였음
- 연구과제 종료 이후에도 더욱 활발한 판매, 수출이 이뤄질 수 있도록 노력하고 있음
- 그 결과, 연구를 제안했을 당시의 성과목표를 100% 이상으로 달성하였으며, 발생한 성과를 통하여 부추사료첨가제 제품의 국내외 시장 확대를 위하여 지속적인 노력을 추진할 계획임

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- * 연구결과의 활용방안**
 - 아직 미발표된 연구결과를 토대로 국제저명학술지에 논문을 추후 게재하여 부추의 우수성을 세계적으로 알릴 계획이며, 연구결과 및 제작된 홍보물을 통하여 개발된 제품의 시장성을 점차 넓힐 계획임
- * 향후조치에 대한 의견**
 - 부추 및 발효부추에는 항균, 항염증, 항 조류 인플루엔자 바이러스 성분이 함유되어 있는 것을 확인하였음
 - 실제로 In vitro 실험 (MDCK, SPF 종란)에서 그 효능을 검증하였음
 - 마우스 및 가금에서 조류 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 체린지 실험을 부추사료첨가제로 국내외에서 처음으로 시도한 결과 완전하지는 않으나 일부 긍정적 결과가 있었음
 - 그러나 부추사료첨가제의 급이 효능은 완전히 검증되지 않아 추후 조류 인플루엔자 바이러스를 확실하게 억제시킬 수 있는 부추의 제형, 농도 등을 확립시킬 후속 연구가 반드시 필요할 것으로 사료됨
 - 부추재배농가에도 사료첨가제로 활용이 가능하여 고소득 창출이 가능함
 - 항바이러스 체린지 실험 확대와 타 축종의 적용 확대 연구가 보다 필요하므로 추후 새로운 연구기획이 필요하며 우수연구 100선으로 진입 가능할 수 있도록 희망하고 있음

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

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	농생명산업기술개발사업	
연구과제명	가금의 주요 질병방제에 효과적인 광범위 항균/항AI 활성 함유 부추사료첨가제의 상품화			
주관연구기관	건국대학교 산학협력단		주관연구책임자	김 수 기
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	290,000,000 원	96,667,000 원	- 원	386,667,000 원
연구개발기간	2018. 04. 26. ~ 2020. 12. 31.			
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
① 부추의 사료첨가제를 위한 착즙 및 발효공정 확립	- 부추 착즙액을 이용한 최적의 액상 및 고상 발효공정의 확립
② 부추의 항균 및 항바이러스 활성물질 추출 및 추출방법 확립	- 유기용매(메탄올)을 이용, 부추 내 항균, 항바이러스 등 생리적 기능을 가진 유효물질 추출 완료
③ 부추의 생리활성 물질 확인 및 그 물질의 효능 검증	- 부추 내 존재하는 생리활성 물질 종류 확인 - 추출된 유효물질들의 생리활성 기능 조사
④ 부추 및 부추발효물을 이용한 사료첨가제 시제품 개발 및 보급	- 가금(육계, 산란계)용 부추사료첨가제 ‘에프씨’ 제품 개발 완료 및 제품 판매를 통한 농가 보급
⑤ 가금 사양실험 및 결과 분석을 통한 부추의 항균, 항바이러스에 대한 효능 제시	- 가금(육계, 산란계)을 이용한 발효 부추사료첨가제 급이효과 검증 완료 - 생산성, 축산물 품질, 혈액특성, 면역기관 및 장의 특성, 미생물 균총 등 부추사료첨가제의 급이에 따른 차이 비교 - MDCK 세포, SPF 종란을 이용한 부추의 조류 인플루엔자 바이러스 억제 효능 분석 완료 (in vitro) - SPF 마우스 및 산란계를 이용한 부추의 조류 인플루엔자 바이러스 억제 효능 검증 완료 (in vivo)
⑥ 바이러스를 접종하여 실제 항바이러스 능력 조사	- in vitro(MDCK 세포, SPF 종란) 및 in vivo(SPF 마우스 및 산란계) 실험을 통한 부추의 항바이러스 효능 검증 완료

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기술 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		
												SCI	비 SCI						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	30					20	10		10				10	10		10				
최종목표	1					1	20		1		3		3.0	4		2				
연구기간내 달성실적	2		1			1	24.6 4		1		7		3.08	9		4		5		
달성율(%)	200		추가			100	123		100		233		103	225		200		추가		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	- 부추발효물로부터 분리된 항균 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸 SK4719 균주 및 이를 포함하는 사료 첨가제 조성물(특허출원 10-2019-0135434)
②	- 가금 병원성 세균 및 조류 인플루엔자 바이러스 억제용 발효부추 사료첨가제 조성물과 그 효능(특허출원 10-2021-0012568)

5. 연구결과별 기술적 수준

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

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 자생식물인 부추와 부추에서 자생하는 유용미생물의 복합적인 활용을 통하여 가금의 주요 질병 원인균 증식을 억제시키는 사료첨가제를 개발함 - 가금 사료에 적용함에 따라 농가에서 발생하는 피해 최소화가 가능함 - 가금 외 축우, 양돈 등 기타 가축산업에도 적용이 가능할 것으로 예상됨 - 천연물을 복합적으로 사용한 첨가제로써 부추 외에 다른 천연물에도 활용될 것으로 사료되며 그 연구의 범위는 더욱 넓어질 것으로 판단됨
②의 기술	<ul style="list-style-type: none"> - 부추와 부추 자생 미생물을 복합적으로 사용하여 개발된 사료첨가제를 육계에 적용한 연구임. 나타난 부추의 급이 효능결과를 농가 및 관련 기업으로 적극적인 홍보와 기술이전을 통하여 상업화가 확대되도록 추진 - 그 외 발효시킨 부추는 조류 인플루엔자 바이러스의 생장을 억제시키는데 탁월한 효능을 가지고 있어 본 연구결과를 통하여 사료산업, 의약품 산업에 적용, 매년 발생되고 있는 AI 바이러스의 피해를 최소화할 수 있음

7. 연구종료 후 성과창출 계획

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)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	30					20	10		10				10	10		10			
최종목표	1					1	20		1			3		3.0	4	2			
연구기간 내 달성실적	2		1			1	24.64		1			7		3.08	9	4		5	
연구종료 후 성과창출 계획		1		1	20		3,400	1,900	25						5				

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	부추발효물로부터 분리된 항균 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸 SK4719 균주 및 이를 포함하는 사료 첨가제 조성물		
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input checked="" type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	20,000 천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input checked="" type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	1년	실용화예상시기 ³⁾	2021
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	부추사료첨가제를 제조하기 위한 생산공정 기술 지도 발효부추 사료첨가제를 생산하기 위한 발효공정, 첨가제 생산라인 등 설비와 장비를 보유하고 있는 기업		

- 1) 핵심기술이 2개 이상일 경우에는 각 핵심기술별로 위의 표를 별도로 작성
- 2) 전용실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 다른 1인에게 독점적으로 허락한 권리
통상실시 : 특허권자가 그 발명에 대해 기간·장소 및 내용을 제한하여 제3자에게 중복적으로 허락한 권리
- 3) 실용화예상시기 : 상품화인 경우 상품의 최초 출시 시기, 공정개선인 경우 공정개선 완료시기 등
- 4) 기술 이전 시 선행요건 : 기술실시계약을 체결하기 위한 제반 사전협의사항(기술지도, 설비 및 장비 등 기술이전 전에 실시기업에서 갖추어야 할 조건을 기재)

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.