

발간등록번호

11-1543000-001253-01

누에를 활용한 항생제 대체용 천연 항생펩타이드 함유
고기능성 사료첨가제 개발 및 산업화

(Development and industrialization of high-functional feed
additives by using silkworm factory producing natural
antimicrobial peptides for alternative antibiotics)

국립농업과학원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “누에를 활용한 항생제 대체용 천연 항생펩타이드 함유 고기능성 사료첨가제 개발 및 산업화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 12월 일

주관연구기관명 : 국립농업과학원

주관연구책임자 : 최 광 호

세부연구책임자 : 최 광 호

연 구 원 : 김 성 완

세부연구책임자 : 김 성 렬

협동연구기관명 : 국립축산과학원

협동연구책임자 : 김 동 욱

협동연구기관명 : 그린테크(주)

협동연구책임자 : 이 상 훈

협동연구기관명 : 대구가톨릭대학교

협동연구책임자 : 박 승 원

요 약 문

I. 제 목

누에를 활용한 항생제 대체용 천연 항생펩타이드 함유 고기능성 사료첨가제 개발 및 산업화

II. 연구성과 목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구 분		지식재산권		논문		기술실시(이전)	교육지도	상품화	홍보전시
		출원	등록	SCI	비SCI				
최종목표		11	6	6	12	5	6	2	5
1차년도	목표	2			3				
	실적	4			3				
2차년도	목표	3	1	2	3				
	실적	3		3	5		3		42
3차년도	목표	3	2	2	2				
	실적	2	3	1	-	1	4	2	
4차년도	목표	3	3	2	3				
	실적	2	3	1	5	3	2		
소 계	목표	11	6	6	12	5	6	2	5
	실적	11	6	5	13	4	9	2	42

III. 연구개발의 목적 및 필요성

동물용 항생제는 가축의 성장촉진, 장내 유해균의 억제, 질병의 사전 예방 및 사육환경 개선을 목적으로 사용된 성장촉진용 항생제와 가축의 이상증후와 질병 발생 시 치료를 목적으로 수의사가 처방하여 고수준으로 투여하는 치료용 항생제로 나눌 수 있으며, 이는 오늘날의 집약적·기업적 축산으로 규모화 하는데 주도적인 역할을 하였다. 그러나 가축사료 내 항생제의 오용 및 남용으로 인해 내성균의 출현, 축산물 내 항생제 잔류, 가축의 질병저항성 약화, 분뇨로 유출된 항생제 잔류물로 인한 생태계 오염 등 많은 문제를 야기하고 있다.

가축 사료에 항생제의 사용을 금지한 사례는 1985년 스웨덴이 가장 먼저 시작하였고, 이후 1995년 노르웨이, 99년 덴마크에서 시행되었다. 항생제 사용금지 초기에는 자돈의 설사 증가, 증체율 일부 하락의 부작용이 발생했으나 극복 가능한 수준이었다. 유럽연합(EU)에서는 2006년 모든 회원국들의 배합사료 내 항생제 첨가를 금지한 바 있다. EU의 경우 가축 성장촉진용 항생제 사용을 금지 한 후 가축 생산비 증가, 소비자의 경제적 부담감이 크게 증가하였으며, 연쇄적으로 치료용 항생제의 사용 증

가에 따른 사료효율 저하로 가축 분뇨의 N, P 배출량이 증가함으로써 경제적·사회적 비용이 크게 증가하고 있다고 보고한 바 있다.

우리나라에서도 항생제 오남용 방지, 소비자의 축산물 위생·안전성 요구 증가, 국내 축산 경쟁력 제고를 위한 항생제 사용 규제 강화 및 무항생제 축산물 인증 정책 추진('07)하고 있으나 유효한 항생제 대체물질이 없어 어려움을 겪고 있다. 성장촉진용 항생제 전면 금지 시 가축 질병 발생 및 폐사로 인해 치료용 항생제 사용량이 많아져 인수공통항생제 사용 비중이 증가할 수 있다는 위험성도 증가할 뿐 아니라 기존 항생제의 오남용으로 강력한 내성균의 발생 가능성이 커져 이를 대비한 새로운 작용기작을 가지는 천연 항생제의 개발이 시급한 실정이다.

곤충 유래 항균펩타이드들은 사람과 가축에 내성 및 부작용이 없는 새로운 개념의 차세대 항생제로서 주목을 받고 있으며, 항균펩타이드의 삼차원 구조에 기초한 구조-항생 활성 상관관계 연구 및 펩타이드 공학 기술을 이용하여 항균활성을 향상된 기능성 항균펩타이드 개발이 가능하다. 특히, 펩타이드 합성 기술과 설계에 바탕을 둔 다양한 펩타이드 공학기술은 생리적 기능성이 조절된 의약품, 백신 및 진단시약 개발에 널리 이용되고 있다.

누에를 포함한 곤충은 불량환경에서 오랜 진화의 역사를 통해 자기방어를 위한 강력한 항균물질을 보유하고 있어, 화학항생제를 대체 할 수 있는 천연항생제 개발을 위한 소재로써 매우 우수하다고 알려져 있다. 최근 많은 연구를 통해 누에를 포함한 곤충으로부터 다양한 항균펩타이드가 분리되었고, 이들 항균펩타이드를 대장균이나 곤충 배콜로바이러스 시스템 등 다양한 발현계를 이용하여 대량 생산하고자 하는 시도가 있었으나 산업화에는 성공하지 못하였다. 곤충 유래 항균펩타이드 대량생산 시스템 구축을 위해서는 대표적 산업 곤충인 누에의 선천성 면역기전을 이용한 항균펩타이드 대량 유도 기술 또는 형질전환 기술을 이용한 항균펩타이드를 대량 생산하는 누에를 개발하는 것이 가축에 내성 및 부작용이 없는 천연항생제로서 성공적인 산업화에 도달할 수 있는 방법이라 사료된다.

이에 본 연구는 누에를 천연항생제 대량 생산할 수 있는 생체공장으로 개발하기 위해, 누에 생체 면역유도 기법에 의한 항균펩타이드를 대량 발현할 수 있는 기술과 함께 항균펩타이드를 생산하는 형질전환누에를 개발하고자 하였다. 이어서 개발된 천연 항균펩타이드 누에는 사료 첨가제로서 최적의 제형화 개발, 대량 생산 시스템 개발, 항생효과 및 안전성 평가, 사료 소재로서의 사료·영양적 가치를 평가, 현장실증 시험 등을 통해 고기능성 사료소재로서 활용 가능성을 검증함으로써 천연 항생제 가축 성장촉진용 사료첨가제로서 새로운 산업 창출을 목표로 연구를 수행하였다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

- 천연항생제 생산 형질전환 누에 개발
 - 항생펩타이드 대량발현용 운반체 제작 및 곤충세포주 이용 활성검정
 - 실용품종 누에알 내 운반체 미량주입에 의한 형질전환 유도
 - 누에 형질전환체 선발 : 형광검정, 유전체, 전사체 및 단백질 발현 분석
 - 분자육종기술 이용에 의한 형질전환누에의 세대고정 및 유전형질 분석
 - 형질전환누에의 천연항생제 생산량 및 항균활성 분석
 - 형질전환누에의 지자체 도 잠업사업소 분양에 의한 지역적응 시험
 - 양잠농가 보급용 잠종생산 및 농가 보급
- 누에 면역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링
 - 누에 면역 유도물질 선발 및 최적의 면역 유도 방법 개발

- 면역 유도에 따른 누에 주요 항균펩타이드 발현량 분석 및 항균력 검정
 - 최적의 누에 면역 유도 방법의 표준화 및 대량 생산 조건 확립
 - 누에 유래 주요 항균펩타이드 재조합 발현 및 항균특성 구명
 - 구조 분석을 통한 고기능성 항생펩타이드 리모델링 및 선발
 - 선발된 고기능성 항생펩타이드 유사체의 대량 발현 및 정제
 - 고기능성 항생펩타이드 유도체의 구조 동정 및 작용기작 구명
- 천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발
- 누에 분말 사료화를 위한 사료·영양적 가치 평가
 - 일반성분, 무기물 함량, 아미노산 및 지방산 조성, 영양소 이용률, 항생 펩타이드 체내 흡수률, 경제성 분석
 - 가금(육계, 산란계, 오리)에 대한 누에 분말별 첨가효과 구명 및 적용기술 확립
 - 생산성, 조직 및 소장발달 양상, 혈액특성, 면역 및 스트레스 관련 인자 비교분석
 - 누에 유래 항생제 대체물질의 면역조절 및 스트레스 저감 기전 연구
 - 누에 분말 종류, 제형형태, 첨가수준에 따른 이용효과 비교조사
 - 누에 분말을 이용한 무항생제 가금산물 및 기능성 계란 생산기술 확립
 - 닭고기, 계란의 품질 및 저장 안정성 증진 효과 구명
 - 축산물 내 누에 유래 유효성분 이행여부 분석
- 천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발
- 면역유도 누에 이용 사료첨가제 제형화 기술 개발
 - 누에의 항생펩타이드 생산 유도를 위한 장치 개발
 - 면역유도 누에의 분말화 방법 및 조건 구명
 - 면역유도 누에 분말의 최적 제형화 조건 구명 및 제형화 기술 개발
 - 면역유도 누에 분말 이용 사료첨가제 시제품 개발
 - 항생펩타이드 생산 형질전환누에 이용 사료첨가제 제형화 기술 개발
 - 형질전환누에의 분말화 및 최적 제형화 조건 구명 및 제형화 기술 개발
 - 항생펩타이드 함유 누에고치로부터 세리신 회수 및 제형화 기술 개발
 - 항생펩타이드 함유 누에고치의 분말화 및 제형화 기술 개발
 - 항생펩타이드 함유 누에고치 이용 사료첨가제 시제품 개발
 - 항생펩타이드 생산 누에 사료첨가제 제형화 대량생산 체제 구축
 - 개발 기술 및 장치의 실용화, 산업화 확립
- 곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증
- 누에 분말로부터 추출한 시료를 이용한 안전성 검증
 - 제형화에 따른 전·후의 안전성 연구를 통한 실용화 가능성 검증
 - 형질전환 누에 대상 항생효과 및 안전성 연구
 - Caco-2 세포를 이용한 *in-vitro* 모델시스템 연구
 - 세포모델을 이용한 *in-vitro* 펩타이드 활성 연구
 - 누에 분말로부터 추출한 시료를 이용한 항생효과 검증
 - 타겟 질환균 선발 및 항생효과 분석

V. 연구개발결과

- 천연항생제 생산 형질전환 누에 개발
 - 누에 온몸에서 항균펩타이드(BmRelish1)을 생산하는 형질전환누에 개발 및 계통 확립
 - 누에 천연 실크와 항균펩타이드(Melittin)가 융합된 하이브리드 실크를 생산하는 형질전환 누에 개발 및 계통 확립
 - 누에 온몸에서 항균펩타이드(BmCecB1)을 생산하는 형질전환누에 개발 및 계통 확립
 - 수용성 세리신 단백질과 항균펩타이드(BmCecB1)가 융합된 하이브리드 실크를 생산하는 형질전환누에 개발 및 계통 확립
 - 항균펩타이드 형질전환누에 대량 생산 시스템 구축을 위한 현장 실증 실시
 - 항균펩타이드(BmRelish1, Melittin, BmCecB1) 형질전환누에의 토양환경 영향 평가 실시
- 누에 면역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링
 - 누에 면역유도 주사제 개발 및 면역유도 조건 확립
 - 누에 면역유도 기술 개발 및 면역유도 누에 생산 공정 표준화
 - 면역유도에 따른 주요 발현 항균펩타이드 동정 및 발현량 분석
 - 누에 주요 항균펩타이드 대량 정제 시스템 구축 및 항균력 검정
 - 대장균 발현 시스템이용 누에 유래 항균펩타이드 재조합 생산 및 정제 시스템 구축
 - 구조 분석을 통한 융합 항균펩타이드 PAJE 및 이의 유사체 개발
 - 융합 항균펩타이드 합성, 항균활성 검정 및 세포독성 분석 : PAJE 등 5종
 - 세포막 분비 catalase 활성 검정을 통한 항균펩타이드 작용기작 분석
 - 항균펩타이드 PAJE 재조합 대장균 발현 및 정제 시스템 구축
- 천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발
 - 누에 분말의 주요 성분(일반성분, 아미노산, 무기질 등) 분석 및 육계 대사실험을 통한 영양소 이용률을 조사로 누에 유래 사료 소재의 사료·영양적 가치 평가
 - 육계에서의 일반 누에 건조 분말과 면역 유도 누에 분말의 효능 비교 평가를 통한 항생제 대체제 및 기능성 사료 소재로의 이용 가능성 검토
 - 육계 사양실험을 통한 면역 유도 누에의 제형 형태(지방 코팅, 나노, 가수분해 등)별 효능 비교 평가를 통한 최적 제형 형태 결정
 - 가금류(육계/산란계/오리)에 대한 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 이용 효과 구명 및 적정 첨가수준(사료 내 0.01~0.05% 첨가) 확립
 - 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 농가 현장 실증 시험을 통한 실용화 및 농가 기술 보급을 위한 농가 적용 데이터 확보
 - 기능성 브랜드 가금산물의 소비자 수용도 조사를 통한 누에 유래 사료소재 활용 브랜드 가금산물 생산 전략 확립
- 천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발
 - 대량 면역유도 누에생산을 위한 면역원 자동주사장치를 개발
 - 면역유도 누에의 건조를 위해 열풍 및 마이크로웨이브를 이용한 건조 조건을 구명한 후, 안정성과 항균활성을 비교 분석
 - 건조누에 생산을 위한 마이크로웨이브 장치개발과 분말화된 건조누에의 제형화를 위한 나노, 코팅화 기술을 적용함

- 또한, 누에고치 활용을 위해 누에고치 분말화 장치와 세리신분리 장치를 개발 함
- 항생제를 대체할 사료첨가제로써의 기존 항생제와의 비교 효과분석을 통한 경제성을 분석함
- 시제품의 개발과 상표등록, 시제품의 실증시험, 시제품의 포장재질과 유통기한을 통한 제품의 유효성 및 안정성을 검정함
- 곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증
 - 누에 분말로부터 추출한 시료를 이용한 안전성 검증
 - 제형화에 따른 전·후의 안전성 연구를 통한 실용화 가능성 검증
 - 형질전환 누에 대상 항생효과 및 안전성 연구
 - Caco-2 세포를 이용한 *in-vitro* 모델시스템 연구
 - 세포모델을 이용한 *in-vitro* 펩타이드 활성 연구
 - 누에 분말로부터 추출한 시료를 이용한 항생효과 검증
 - 타겟 질환균 선발 및 항생효과 분석

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구를 통해 도출된, 누에를 이용한 효과적인 면역유도 방법, 누에 자동화 면역유도 및 건조 장치 개발, 면역누에 최적의 제형화 기술, 면역유도 누에 시제품을 사용한 현장실증 시험 및 맞춤형 항균단백질을 생산하는 형질전환누에 개발 등 일련의 연구성과는 축산현장에서 친환경적인 사료첨가제로서 즉시 활용이 가능할 뿐 아니라 타 산업 분야와 기술 융복합을 통해 새로운 산업을 창출할 수 있는 원천 기술이 구축되었다.

- 누에 생체 내 천연항생제(항균펩타이드) 대량 생산을 위한 면역유도 방법 개발
- 가금류 등 가축 적용 고기능성 천연 항균펩타이드 개발
- 천연 항생제 발현 유도 누에의 가금류 면역증강 사료첨가제로서 효능 인정(국립축산과학원) 및 사료공정서 등록(농림축산식품부 고시, '16)을 통한 양산체계 구축
- 가축 항생제 내성 균주를 제어할 수 있는 새로운 천연 항생제 개발
- 곤충 유래 천연항생제를 대량 생산하는 맞춤형 형질전환누에 제작 원천기술 확보
- 항균펩타이드 형질전환누에를 이용한 가축 맞춤형 사료첨가제 개발 가능
- 형질전환누에 기술을 통한 맞춤형 동물 의약품 생산 기반기술 확보
- 형질전환누에로부터 천연항생제 정제 및 가축 세균병 치료제로 적용 가능
- 항균펩타이드 생산 형질전환누에의 안전성 기반 확보를 통한 국가안전보급체계 구축 가능
- 인체 및 환경에 안전한 형질전환누에의 농가 보급을 통한 농가소득 증대
- 누에 유래 항생제 대체물질 및 기능성 사료자원 개발을 위한 기술 확립
- 고효율 항생제 대체물질 및 고기능성 사료소재 개발 및 산업화
- 고효율 항생제 대체물질 개발 및 적용을 통한 고품질 안전 가금 산물 생산기술 확립
- 천연항생제 생산 누에 이용 사료 제제화 및 제형화 시스템 실용화
- 면역유도 물질을 이용한 누에 생체 내 대량 천연항생제 유도 장치 개발
- 가금류 이외 중대형 가축 및 반려동물 면역력 증강 위한 사료첨가제 개발에 활용
- 타 곤충을 이용한 가축, 어류용 기능성 사료첨가제 개발에 활용
- 면역 유도 물질을 누에 생체 내 주입하는 천연항생제 대량 주사 장치 개발을 통해 면역 유도 누에의 대량생산이 가능함.

- 대량 생산된 면역 유도 누에를 이용한 사료첨가제의 제제화 및 제형화 시스템 구축
- 누에고치 유래 물질인 세리신의 추출 및 제형을 통한 시제품 개발
- 항균물질을 포함하는 기능성 누에를 이용한 사료첨가제의 개발 기술은 고부가가치 섬유 및 식·의약 소재를 포함 새로운 분야로 기술범위 확대
- 누에 유래의 기능성 검증을 통한 사료첨가제 개발은 여타의 곤충에 대한 새로운 소재화의 가능성을 증대
- 고기능성 생리활성물질의 산업적 활용을 위한 기술력 확보 및 관련 기술 제공
- 천연항생제 유도 누에의 대량 생산 체계 구축
- 항생펩타이드 생산 누에의 제제화 및 제형화 기술 확립
- 고부가가치 천연항생제 생산 누에 개발에 따른 양잠농가의 소득 증대 및 농가 수 확대
- 누에 자체의 부가가치 상승뿐 만 아니라 사료회사 및 동물약품 회사 등 관련 산업의 동반 성장으로 인한 경제적·산업적 이득이 예상됨
- 고품질 안전 가금산물 생산을 통한 농가 소득 증대, 소비자 신뢰 확보 및 국가 경쟁력 제고
- 면역증가 및 항균효과를 가지는 천연 사료첨가제 개발을 통한 고품질 안정 축산물 생산
- 수입 축산물과 차별화된 고품질 안전 축산물에 대한 소비자의 수요증가로 축산농가의 소득 증대
- 천연항생제 생산 누에의 사료첨가제로써 적용범위 확대 가능
- 누에는 각종 유용단백질을 다량 함유하고 있어 사료첨가제로 사용시 가축의 성장촉진 효과 기대
- 형질전환누에 이용 화학항생제 대체 천연항생제 대량정제 및 인·축 적용 치료제 개발
- 곤충 유래 천연항생제 사용으로 화학항생제 사용감소에 따른 인체 부작용 감소
- 천연항생제 생산 누에의 사료첨가제제형 개발기술 확립에 따른 해외 사료첨가제 수입 의존도 감소 기대

SUMMARY

In this study, we constructed transgenic silkworms producing BmRelish1, BmCecB1, and Melittin, respectively. BmRelish1 (*Bombyx mori* Relish1) is cloned from the silkworm *B. mori* and induced to express antimicrobial peptide genes by infection of gram-positive and gram-negative bacteria. BmCecB1 (*B. mori* cecropinB1) is an antimicrobial peptide from *B. mori* and belongs to the cecropin family. Melittin is the main component of Bee Venom and has antibacterial activity against several bacteria. To produce antimicrobial peptides, BmRelish1, BmCecB1, and Melittin, respectively, we constructed gene transfer vectors that expressed each antimicrobial peptide gene, respectively, under the control of the BmA3 promoter using the *piggyBac* system. The use of the 3xP3-driven EGFP cDNA as a marker allowed us to rapidly distinguish transgenic silkworms. Mixtures of the donor vector and helper vector were micro-injected into approximately 1,000 eggs of bivoltin silkworms, Baegokjam, in every event. In this study, we used a gene transfer vector system with *piggyBac* and/or Gal4/UAS. We investigated the Radical Diffusion Assay (RDA) and then demonstrated that BmRelish1, BmCecB1, and melittin possess high antibacterial activities against tested Gram-negative/positive bacteria. In addition, we have characterized three transgenic silkworm strains on a mass rearing condition, and analyzed the environmental risk assessment of them, respectively.

In silkworm larvae, innate immunity mechanisms are activated in response to various pathogens and stimulants, resulting in expression of antimicrobial peptides. We utilized this immune reaction system to develop technology for production of immune-induced silkworm larvae with a strong antibacterial activity. For this, we developed an immune stimulant containing peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* cell wall. We also measured the immune-inducing effects of this induced material by injecting it into the hemolymph of 5th instar larvae of silkworm. Further, we mass-produced immunized silkworm powder with antibacterial activity by injecting an immune stimulant containing the *Lactobacillus* peptidoglycan into the silkworm larvae. In order to develop a new antibiotic peptide, the hybrid peptide PAJE (RWKIFKKPFKISIH-NH₂) was rationally designed incorporating the N-terminal α -helical segments of papiliocin (amino acid 1-7) and jelleine (amino acid 1-8) according to the structure-activity relationship of the amphipathic and cationic peptides. The 15-residue PAJE was chemically synthesized on a solid phase, purified, and evaluated for direct antimicrobial activity. The synthetic PAJE showed good antimicrobial activity in the concentration range 1–4 μ M against a wide range of microbes from Gram-negative bacteria. In this study, we also successfully mass-produced bio-active PAJE in *E. coli* cells using a bacterial expression system. Subsequently, we purified the recombinant PAJE by FPLC chromatography. The purified PAJE displayed considerably antibacterial activity identical to chemically synthesized PAJE. Therefore, this peptide will be a significant potential for future development as an antimicrobial agent.

Recently, a considerable number of studies have been conducted to develop alternative agents to antibiotic growth promoters (AGPs) and high-functional feed additives for compromising

the health and productivity of animals. These experiments were conducted to verify dietary supplemental effects and establish application methods of high-functional feed additive using silkworms producing natural antimicrobial peptides in poultry. These experiments estimated nutritional values of silkworm larvae and produced various forms of feed additives using silkworm larvae for application of functional feed resources. The feed additives containing them were prepared and fed broilers, laying hens, ducks. The high-functional feed additive using silkworms producing natural antimicrobial peptides were improved growth performances, health states, cecal microflora, immune responses, qualities of products (meat/egg) in poultry. In addition, establishment of production and marketing strategies for functional poultry products by using silkworm larvae. These results suggested the possibility that silkworms producing natural antimicrobial peptides could serve as antibiotic growth promoters alternatives or high-functional feed additives. In additional study, for a mass product of the silkworm harboring natural antimicrobial peptides, we developed an automatic injection machine that can inoculate into silkworm larvae quickly. We continuously formulated the silkworm powder as an optimized dried powder which can help a stability of silkworm powder from the destruction of the antimicrobial peptides in during the digestion in animals.

Insect use as food also addresses the environmental sustainability challenge because traditional farming is a leading cause of pollution, while some insect species have a lower environmental impact. Insects constitute an enormous available biomass with a number of species that reach 80% of the entire animal kingdom. Their fecundity is high and their life cycle short; they reach adulthood within a matter of days compared to the months taken by fowl and the years by ruminants. In addition, the percentage of edible weight is 100% for larva and around 80% if considering adult cricket without legs and exoskeleton. Because of the high levels of meat consumption, the main goal of nutritional guidelines is to achieve a reduction and partial substitution of meat-based proteins with other protein sources such as fish and plants. Insects also have high vitamin and mineral content as indicated by many studies.

Increasing world meat consumption worsens the serious problem of feed additives security in developed countries. On the other hand in industrialized countries, where the problem of feed additives security is of major concern, health problems related to meat consumption refer to 2 main factors: feed additives safety and environmental sustainability of meat production. For these reasons, new ways must be found to increase yields while preserving feed additives quality, natural habitats, and biodiversity. Insects could be of great interest as a possible solution due to their capability to satisfy 2 different requirements: (i) they are an important source of protein and other nutrients; (ii) their use as feed additives has ecological advantages over conventional meat and, in the long run, economic benefits. However, little is known on the feed additives safety side and this can be of critical importance to meet society's approval, especially if people are not accustomed to eating insects. This report aims to collect information in order to evaluate how insects could be safely used as feed additives and to discuss microbial activities data to justify why insect feed additives sources can no longer be neglected.

CONTENTS

Application	1
Summary in Korean	2
Summary in English	8
Contents in English	10
Content in Korea	13
Chapter 1. Introduction	15
1. Purpose of research	15
2. Necessity of research	15
3. Scope of research	18
4. Objective and achievements	20
Chapter 2. Present state of the technical development	21
1. Internal stage of the technical development	21
2. International stage of the technical development	21
Chapter 3. Contents of research and results	22
1. Annual plan of research	22
1) The first year	22
2) The second year	23
3) The third year	24
4) The fourth year	25
2. Methods and results	26
1) Development of transgenic silkworm producing natural antimicrobial peptides	26
a. Development of transgenic silkworm producing an antimicrobial peptide, BmRelish1	26
b. Development of transgenic silkworm producing an antimicrobial peptide, melittin	38
c. Development of transgenic silkworm producing an antimicrobial peptide, BmCecB1	48
d. Development of transgenic silkworm producing the hybrid sericin merged with BmCecB1	65

e. Mass Rearing of the silkworm producing antimicrobial peptides	82
f. Environmental risk assesment of transgenic silkworms producing antimicrobial peptides	88
2) Development of technology for immune induced silkworm, and remodeling of peptide with high antimicrobial activity	96
a. Development of immune stimulant for immune induced silkworm	96
b. Development of technology for production of immune induced silkworm	104
c. Establishment of a bacterial expression system for silkworm antimicrobial peptide	115
d. synthesis of hybrid peptide with high antimicrobial activity	124
3) A study on nutritional value estimation and application methods development of high-fuctional feed additive using silkworms producing natural antimicrobial peptides in animals	143
a. Estimation of nutritional value of silkworm larvas for application of feed resources	143
b. Verification of dietary supplemental effects and establishment of application method of silkworm larvas in broilers	146
c. Comparison to different types of processed silkworm larvas producing antimicrobial peptides and antibiotic alternative agents on dietary supplemental effects	155
d. Effect of dietary supplementation of silkworms larvas producing antimicrobial peptides on stress reduction and immune responds regulatory in broilers	163
e. Verification of dietary supplemental effects and establishment of application method of silkworm larvas in laying hens	169
f. Verification of dietary supplemental effects and Establishment of application method of silkworm larvas in ducks	176
g. Establishment of production and marketing strategies for functional poultry products by using silkworm larvas	184
h.. Economic analysis of natural antimicrobial silkworm for feed additives	192
4) Formulation of antimicrobial silkworm powder as a feed additive	194
a. Development of an apparatus for silkworm immunization	194
b. Development of optimum formulation of the silkworm powder	215
c. Development of effective powdered method of the silkworm	217
d. Information of excipients used in this study	218
e. Development of an automatic silkworm injection system	236
f. Formulation of silkworm powder for a feed additive	250
g. Economic analysis of the immunized silkworm powder as for a feed additive	254

5) Investigation of antimicrobial and biological safety effects for natural antibiotics derived from insects	257
a. The studies of biological safety effects for natural antibiotics derived from insects ...	259
b. The studies of immunological activities for natural antibiotics derived from insects ...	278
c. The studies of antimicrobial effects for natural antibiotics derived from insects	281
Chapter 4. Achievement and contribution to related field	291
Chapter 5. Achievement and plan for practical use	298
Chapter 6. International scientific information	302
Chapter 7. References	304
<Annex>	306

목 차

제출문	1
요약문	2
SUMMARY	8
CONTENTS	10
목 차	13
제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표	15
제 1 절 연구개발의 목적	15
제 2 절 연구개발의 필요성	15
제 3 절 연구개발의 범위	18
제 4 절 연구성과 목표 대비 실적	20
제 2 장 국내외 기술개발 현황	21
제 1 절 국내 연구개발 현황	21
제 2 절 해외 연구개발 현황	21
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	22
제 1 절 연차별 연구개발의 목표 및 수행내용	22
1. 1차년도 연구개발 목표 및 수행내용	22
2. 2차년도 연구개발 목표 및 수행내용	23
3. 3차년도 연구개발 목표 및 수행내용	24
4. 4차년도 연구개발 목표 및 수행내용	25
제 2 절 연구개발수행 내용 및 결과	26
1. 천연항생제 생산 형질전환누에 개발	26
가. 누에 온몸에서 항균펩타이드(BmRelish1)를 생산하는 형질전환누에 개발	26
나. 실크에서 항균펩타이드(melittin)를 생산하는 형질전환누에 개발	38
다. 누에 온몸에서 항균펩타이드(BmCecBI)를 생산하는 형질전환누에 개발	48
라. 세리신 융합 항균펩타이드(BmCecBI)를 생산하는 형질전환누에 개발	65
마. 항균펩타이드 누에 현장실증 대량 사육	82
바. 항균펩타이드 형질전환누에 위해성평가	88
2. 누에 면역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링	96
가. 누에 면역유도 물질 선발 및 면역유도 기술 개발	96
나. 누에 면역유도에 따른 항균펩타이드 분리 및 발현 효율 분석	104
다. 누에 항균펩타이드 재조합 대장균 발현 시스템 구축	115

라. 고기능성 하이브리드 항생펩타이드 개발	124
3. 천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발	143
가. 누에 유래 사료소재의 사료·영양적 가치 평가	143
나. 육계에 대한 면역 유도 누에의 효과 구명 및 적용기술 확립	146
다. 누에 유래 항균 펩타이드의 제형형태별 이용 효과 구명 및 항생제 대체성 비교 연구	155
라. 천연 항생펩타이드 생산 누에 함유 사료소재의 스트레스 저감, 면역 조절 효과 구명	163
마. 산란기에 대한 항균펩타이드 생산 누에 함유 사료소재의 이용효과 구명 및 적용기술 확립	169
바. 오리에 대한 항균펩타이드 생산 누에 함유 사료소재의 이용효과 구명 및 적용기술 확립	176
사. 누에 유래 사료 소재 활용 기능성 가금산물 생산 및 브랜드화	184
아. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 산업화를 위한 경제성 분석	192
4. 천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발	194
가. 누에 면역유도 간이장치 개발 및 면역유도 누에 이용 최적 제형화 조건 구명	194
나. 항생펩타이드 함유 누에고치 최적 제형화 조건 구명	215
다. 면역유도 누에의 분말화 방법 구명	217
라. 부형제의 의미와 종류 등 정보수집	218
마. 누에 대량 면역유도를 위한 주사장치 최종 개발	236
바. 면역 유도 누에분말을 이용한 사료첨가제 제형화	250
사. 항생제 대체 사료첨가제 경제성 분석	254
5. 곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증	257
가. 곤충 유래 천연항생물질에 대한 안전성 연구	259
나. 곤충 유래 천연항생물질에 대한 면역 활성 연구	278
다. 곤충 유래 천연항생물질에 대한 항생효과 연구	281
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	291
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	298
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	302
제 7 장 참고문헌	304
<첨부>	306

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발의 목적

우리나라는 2007년부터 가축 항생제 오남용 방지, 소비자의 축산물 위생·안전성 요구 증가 및 국내 축산 경쟁력 제고를 위하여 사료용 항생제의 사용을 금지하고 있으나, 이를 대체할 효과적이고 안전한 천연 항생제의 개발이 시급한 실정이다.

이에 본 연구는 누에를 이용하여 천연항생제를 대량 생산할 수 있는 생체공장으로 개발하고 이의 산업화를 위한 기반 기술을 개발하는 것이 최종 목표이다. 연구과제의 목표 달성을 위해, 누에 생체면역유도 기법에 의한 항균펩타이드를 대량 발현할 수 있는 기술과 함께 항균펩타이드를 생산하는 형질전환누에를 개발하고자 하였다. 이어서 개발된 천연 항생펩타이드 누에는 사료 첨가제로서 최적의 제형화 개발, 대량 생산 시스템 개발, 항생효과 및 안전성 평가, 사료 소재로서의 사료·영양적 가치 평가를 위한 현장실증 시험 등을 통해 고기능성 사료소재로서 활용 가능성을 검증하고 가축 성장촉진용 사료첨가제로서 새로운 산업 창출을 목표로 연구과제를 수행하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 사회적 필요성

- 동물용 항생제는 성장촉진용과 치료용으로 사용되어 왔으며, 오늘날 집약적·기업적 축산으로 대규모화되는데 주도적인 역할을 하였음
 - ※ 성장촉진용 항생제 : 가축의 성장촉진, 장내 유해균 억제, 질병 예방, 사육환경 개선 등을 목적으로 저수준으로 사료 내 첨가 급여되는 항생제
 - ※ 치료용 항생제 : 가축의 이상증후 및 질병 발생시 질병 치료를 목적으로 수의사 처방 하에 고수준으로 투여되는 항생제
- 가축사료 내 항생제 오남용으로 인한 내성균 출현, 축산물 내 항생제 잔류, 가축의 질병저항성 약화, 분뇨로 유출된 항생제 잔류물로 인한 생태계 오염 등의 문제 대두
 - 우리나라 축산물 1톤 생산시 항생제 0.91kg 사용으로 뉴질랜드 0.04kg, 미국 0.15kg, 일본 0.36kg에 비해 매우 높은 편임
- 축산물 내 항생제 내성균 조사 결과, 대장균 53.6~69.3%(테트라사이클린, 암피실린), 장구균 62.4~68.9%(테트라사이클린, 엔트로마이신), 포도상구균 67%(페니실린), 3가지 계열 이상의 항생제 내성을 보인 다제내성균 비율 39% 차지(식품의약품안전청, '09)
- 항생제 오남용 방지, 소비자의 축산물 위생·안전성 요구, 국내 축산 경쟁력 제고를 위한 항생제 사용 규제 강화 및 무항생제 축산물 인증 정책 추진에 따른 대책마련 시급
 - EU, 성장촉진용 항생제 사용 감축으로 인한 경제적·환경적 부담 증가 문제 대두
 - ※ EU 성장촉진용 항생제 금지('06) 후, 가축 생산비 증가, 소비자 경제적 부담 증가(연간 1인당 US\$10→40), 치료용 항생제 사용 증가, 사료효율 저하에 따른 분뇨 N,P 배출량 증가

- 한국, 항생제 등 항균 물질 사용 절감 방안('04)에 따라 항생제 허용품목 단계적 감축
 - ※ 단계별 허용품목 감축 : (당초) 44종 → ('05.5) 16 → ('09.1) 9 → ('11.7) 0
- 한국, 무항생제 축산물 인증 정책 추진('07) 후, 무항생제 축산물 인증 오리농가수는 197호 ('11)로 급속히 증가하고 있으나 유효한 항생제 대체물질이 없어 어려움을 겪고 있음
- 성장촉진용 항생제 전면 금지시 가축 질병 발생 및 폐사로 인해 치료용 항생제 사용량이 많아져 인수공통항생제 사용 비중이 증가할 수 있음
 - 대장균, 로소니아(Lawsonia), 클로스트리디움(Clostridium)에 의한 설사, 괴사성 장염 등의 질병 발생 증가로 인수공통 항생제인 테트라사이클린, 트리메토프림/설피아미드, 린코사마이드 등의 사용 증가에 따른 내성 피해 가중 가능성 제기
- 항생제 오남용에 따른 내성균주를 퇴치할 수 있는 새로운 작용기작을 가지는 천연항생제 개발이 시급한 실정임
- 누에를 포함한 곤충은 불량환경에서 오랜 진화의 역사를 통해 자기방어를 위한 강력한 항균 물질을 보유하고 있어, 화학항생제를 대체 할 수 있는 천연항생제 개발 소재로써 매우 우수 함

2. 연구개발의 기술적 필요성

- 성장촉진용 항생제 사용 전면금지('11.07)로 인한 무항생제 사육시 발생할 수 있는 생산성 감소, 질병발생율 증가 등의 문제를 해결하기 위해 효율적인 항생제 대체물질 개발 및 적용기술 확립 필요
 - 항생제 대체물질은 축산물 내 잔류, 내성균 출현 관련 위험성이 없기 때문에 적극적인 소재 개발 및 이들의 실용적인 이용방법 확립 시급
 - 생균제, 유기산, 식물추출물, 효소제, 면역증강제 등 다양한 종류의 항생제 대체물질이 개발 사용되고 있으나, 성장촉진, 사료효율 개선 등 생산성 측면에서의 효과가 대부분임
 - 생산성 뿐만 아니라, 질병 예방 및 치료 효과를 포함하는 고효율 항생제 대체물질 개발이 필요
- 스트레스 저감을 통한 생산성 향상 및 고품질 안전 축산물 생산 기술 확립 필요
 - 농장에 산재하는 여러 스트레스 요인이 생산성 감소, 내병성 저하, 질병 발생을 및 폐사율 증가, 도체품질 저하 등 다양한 문제를 유발함
 - 사료, 육종 및 사양기술 발달로 인해 단기간에 고도성장을 하는 가금에 있어 스트레스 예방 및 체내 대사 조절 필요
- 가금산업의 질적 성장·사육기반 안정화, 소비자 신뢰 확보 및 국민 건강을 위해 가금산물의 위생·안정성 확보, 효율적인 항생제 대체물질 개발 및 기술 확립 필요
- 곤충 유래 항생펩타이드들은 새로운 개념의 차세대 항생제로서 주목을 받고 있으며 이들 펩타이드 항생제는 내성 및 부작용이 없어 천연 항생제로 개발이 용이
 - 항생펩타이드의 삼차원 구조에 기초한 구조-항생 활성 상관관계 연구 및 펩타이드 공학 기술을 이용하여 항생활성이 증가된 고기능성 항생펩타이드 개발이 가능
 - 펩타이드의 합성기술과 설계에 바탕을 둔 다양한 펩타이드 공학기술은 생리기능성이 조절된 의약품, 백신, 진단 시약 개발에 많이 이용되고 있음
- 누에를 포함한 곤충으로부터 다양한 항생펩타이드가 분리되었고, 이들 항생펩타이드를 대장균, 곤충 베쿨로바이러스 등 다양한 발현계를 이용하여 대량생산하고자 하는 많은 연구가 시도되었으나 산업화에는 성공하지 못함
- 곤충 유래 항생펩타이드 대량생산을 위해서는 누에의 선천성 면역기전을 이용한 항생펩타이드의 대량유도 기술 개발 및 항생펩타이드 대량 생산 형질전환누에 개발 연구가 필요함

3. 연구개발의 경제적 필요성

- 우리나라의 잠업은 70년대에 연간 5억 달러를 수출할 정도로 최고의 농산물을 생산하는 산업이었으나(세계 5위의 잠업 국가), '76년을 정점으로 이후 급격히 감소하였음

〈연도별 양잠산업 현황〉

	'76	'90	'95	'00	'05	'08	'09
잠업농가(천호)	488.0	32.0	5.0	3.7	2.4	1.8	1.4
평밭면적(천ha)	82.9	13.3	2.5	1.5	1.0	0.9	0.7
누에사육량(천상자)	1,296	171	32	36	26	22	16

- '95년을 기점으로 누에고치 생산은 거의 중단되고, 현재는 건조누에나 동충하초 등의 기능성 양잠산물 생산으로 전환하여 잠업을 유지하고 있음
- 양잠산업의 규모를 확대하고 새로운 부가가치 창출 산업으로 육성하기 위해서는, 현재의 소비처가 한정된 기능성 식품원료 생산 외에도 고품질 축산물 생산을 위한 기능성 물질(동물용의약품 및 사료첨가제 등) 개발 같은 새로운 누에활용도를 검토할 필요가 있음
- 국내 가금산업 규모는 급속히 성장하고 있으며, 과거 소규모 부업 형태에서 대규모 전업 형태로의 전환이 빠르게 이루어지고 있음

〈연도별 생산액 변화〉

(단위 : 10억원)

구 분	'00	'06	'09
농업생산액	31,968	35,232	42,995
축산생산액	8,082	11,676	16,484
육계	821	1,330	2,023
계란	651	867	1,359
오리	474	648	1,232

〈가금산업의 위치와 수급동향('09년 12월 기준)〉

사육수(만수)		수급량(천톤)		
축 종	마리수	계	국산	수입
산란계	6,297	551	549	1.5
육 계	6,719	473	415	58
오 리	970	120	119	0.8

- 건강식품에 대한 관심 및 요구 증가에 따라 고단백, 저콜레스테롤, 고불포화지방산 축산물로서 인식되는 가금산물에 대한 요구 및 소비 역시 지속적으로 증가하고 있음
 - 가금류 1인당 소비량 변화
 - 닭고기 : ('95) 6.0 → ('00) 6.9 → ('05) 7.6 → ('09) 9.6
 - 계란 : ('95) 10.1 → ('00) 10.3 → ('05) 11.1 → ('09) 11.9
 - 오리 : ('01) 1.02 → ('05) 0.97 → ('08) 1.75 → ('09) 2.5
- 전업화계열화로 인해 대규모, 집약적 사육을 하는 양계 및 오리 농가의 경우 항생제 전면 금지 시 타 축종에 비해 피해가 더 클 것으로 예상

- 성장촉진용 항생제 사용 제한 및 무항생제 사육으로 인한 생산성 감소, 질병발생을 및 폐사율 증가, 품질 이상 등 문제 발생 예상
 - 가금 생산성 약 10~15% 이상 감소할 것으로 예측되고 있음
- ※ 예상손실액 : 4,793억원 ~ 7,189억원(가금분야 생산액 47,928억원, 2010년 기준)
- 누에는 인·축 적용 항생펩타이드 등 천연항생제 생산을 위한 살아있는 생체공장으로 매우 적합
- 천연항생제의 저가 대량생산이 가능
 - 높은 경제성 보유(20원/마리), 짧은 세대(45일), 인공사료 및 인공부화법이 개발되어 있어 연중 집단대량사육이 가능
 - 누에는 인수 공통병원균이 없어, 누에로 부터 생산된 천연항생제는 인간·가축에 안정성이 매우 높음
- 누에는 식품의약품안전청으로부터 기능성 식품의 원료로 인정받아, 인간 및 가축에 안정성이 높음
- 누에는 각종 유용단백질을 다량 함유하고 있어 사료첨가제로 사용시 가축의 성장 촉진 효과를 나타낼 것으로 판단됨

제 3 절 연구개발의 범위

1. 천연항생제 생산 형질전환 누에 개발

- 항생펩타이드 대량발현용 운반체 제작 및 곤충세포주 이용 활성검정
- 실용품종 누에알 내 운반체 미량주입에 의한 형질전환 유도
- 누에 형질전환체 선발 : 형광검정, 유전체, 전사체 및 단백질 발현 분석
- 분자유종기술 이용에 의한 형질전환누에의 세대고정 및 유전형질 분석
- 형질전환누에의 천연항생제 생산량 및 항균활성 분석
- 형질전환누에의 지사체 도 잠엽사업소 분양에 의한 지역적용 시험
- 양잠농가 보급용 잠종생산 및 농가 보급

2. 누에 면역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링

- 누에 면역 유도물질 선발 및 최적의 면역 유도 방법 개발
- 면역 유도에 따른 누에 주요 항균펩타이드 발현량 분석 및 항균력 검정
- 최적의 누에 면역 유도 방법의 표준화 및 대량 생산 조건 확립
- 누에 유래 주요 항균펩타이드 재조합 발현 및 항균특성 구명
- 구조 분석을 통한 고기능성 항생펩타이드 리모델링 및 선발
- 선발된 고기능성 항생펩타이드 유사체의 대량 발현 및 정제

3. 천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발

- 누에 분말 사료화를 위한 사료·영양적 가치 평가
 - 일반성분, 무기물 함량, 아미노산 및 지방산 조성, 영양소 이용률, 항생 펩타이드 체내 흡수율, 경제성 분석
- 가금(육계, 산란계, 오리)에 대한 누에 분말별 첨가효과 구명 및 적용기술 확립

- 생산성, 조직 및 소장발달 양상, 혈액특성, 면역 및 스트레스 관련 인자 비교분석
- 누에 유래 항생제 대체물질의 면역조절 및 스트레스 저감 기전 연구
- 누에 분말 종류, 제형형태, 첨가수준에 따른 이용효과 비교조사
- 누에 분말을 이용한 무항생제 가금산물 및 기능성 계란 생산기술 확립
 - 닭고기, 계란의 품질 및 저장 안정성 증진 효과 구명
 - 축산물 내 누에 유래 유효성분 이행여부 분석

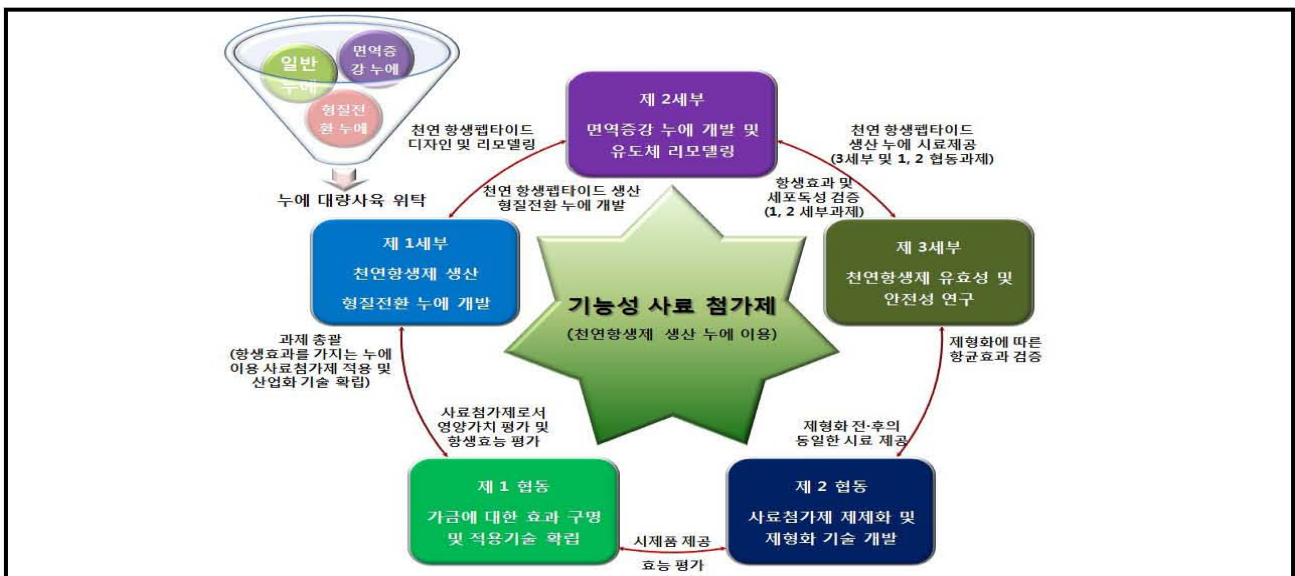
4. 천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발

- 면역유도 누에 이용 사료첨가제 제형화 기술 개발
 - 누에의 항생펩타이드 생산 유도를 위한 장치 개발
 - 면역유도 누에의 분말화 방법 및 조건 구명
 - 면역유도 누에 분말의 최적 제형화 조건 구명 및 제형화 기술 개발
 - 면역유도 누에 분말 이용 사료첨가제 시제품 개발
- 항생펩타이드 생산 형질전환누에 이용 사료첨가제 제형화 기술 개발
 - 형질전환누에의 분말화 및 최적 제형화 조건 구명 및 제형화 기술 개발
 - 항생펩타이드 함유 누에고치로부터 세리신 회수 및 제형화 기술 개발
 - 항생펩타이드 함유 누에고치의 분말화 및 제형화 기술 개발
 - 항생펩타이드 함유 누에고치 이용 사료첨가제 시제품 개발
- 항생펩타이드 생산 누에 사료첨가제 제형화 대량생산 체제 구축
- 개발 기술 및 장치의 실용화, 산업화 확립

5. 곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증

- 가금류 주요 병원균에 대한 재조합 항생펩타이드 유도체의 항생효과 검증 연구
- 동물용 사료로서 국내·외 인정·허가 및 사용현황 등에 관한 자료수집
- 제형화에 따른 항생펩타이드 안전성 비교 분석
- 후보 항생펩타이드의 항생효과 분석 및 세포독성 등 안전성 검증
- 효율적 사료첨가제 개발을 위한 최적 농도기준 설정

6. 연구개발 협력, 추진체계



제 4 절 연구성과 목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구 분		지식재산권		논문		기술실시(이전)	교육지도	상품화	홍보전시
		출원	등록	SCI	비SCI				
최종목표		11	6	6	12	5	6	2	5
1차년도	목표	2			3				
	실적	4			3				
2차년도	목표	3	1	2	3				
	실적	3		3	5		3		42
3차년도	목표	3	2	2	2				
	실적	2	3	1	-	1	4	2	
4차년도	목표	3	3	2	3				
	실적	2	3	1	5	3	2		
소 계	목표	11	6	6	12	5	6	2	5
	실적	11	6	5	13	4	9	2	42

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 연구개발 현황

- 누에를 포함한 다양한 곤충으로부터 항생펩타이드 분리 및 항균활성 분석(~'10, 농진청)
 - 누에 유래 항균펩타이드 : 누에신, 엔보신
 - 곤충 유래 항균펩타이드 : 코프리신, 파펠리오신, 갈리오마이신 등
 - 다양한 동식물 세균병 및 내성균에 대한 항세균 활성 확인
- 곤충 유래 항생펩타이드를 대장균 등 다양한 발현계를 이용하여 대량생산 연구를 추진 중이나, 경제성의 한계를 극복하지 못하고 있는 실정임
- 누에의 선천성 면역기전을 이용해 의한 누에 생체 내 항생펩타이드 유도 기초기반 기술 개발 ('10, 농진청)
- 곤충 유래 천연항생제 대량생산 형질전환누에 제작을 위한 우수한 원천기술 보유('10, 농진청)
 - 세계 최초로 누에 실용품종에서 형질전환 성공으로 농가보급 가능
 - 누에알 내 적정 미세주사 위치 구멍에 의한 형질전환 효율 대폭 향상
 - * 0.7~3.9% ('00, 일본) → 25~75% (평균 42.6 %, '10, 농진청)
 - 세계 최초로 알과 유충에서 형질전환체 동시선발 기술 개발 : 노동력 및 비용 대폭 절감
- 갈색거저리 및 동애등애를 이용한 사료첨가제 개발이 시도되고 있음

제 2 절 국외 연구개발 현황

- 핵자기공명분광법(NMR)과 CD분광법을 이용한 항균 펩타이드의 구조와 기능에 관한 연구를 바탕으로 천연형 펩타이드보다 세포독성이 낮고 항균 활성이 강한 새로운 합성 항균펩타이드 개발에 관한 연구가 빠르게 진행되고 있음.
 - 봉독에서 분리된 melittin의 세포독성을 제거하기 위해 cecropin A-melittin 하이브리드 항균 펩타이드(CEME) 개발하여 동물 임상시험에서 그 안정성이 입증됨
- 중국의 경우 누에 이용 동물의약품을 생산하여 사료첨가제로 활용하기 위한 연구가 진행 중이나 바이러스를 매개체로 하기 때문에 생산비용과 안전성에 대한 문제가 있음
- 해충류 등 다양한 곤충을 이용한 사료첨가제 개발이 시도되고 있음
- 2,000년도 일본에서 세계 최초로 누에 형질전환이 성공한 이후에, 형질전환누에를 이용한 다양한 인·축 바이오의약품 생산 및 강철 거미실크 등의 개발 추진
- 2013년 일본(농업생물과학연구소)은 빨강색, 오렌지색 및 녹색 형광실크를 만드는 GM누에를 개발함
- 2013년 7월 일본(농업생물자원연구소)은 녹색실크 GM누에(HC-EGFP)의 제1종사용에 관한 승인신청서를 일본 농림수산장관과 환경장관에게 제출함으로써, 환경방출 시험을 진행중임
- 2014년 일본 국립농업과학연구소와 신슈대학은 거미 dragline 실크 단백질과 낄줄과 누에 실크 피브로인 헤비체인 단백질이 융합된 하이브리드 실크를 생산하는 GM누에 개발함
- 2012년 미국(와이오밍대학, 노트르담대학)과 중국(저장대학)은 14회 반복하여 합성한 거미실크 dragline 유전자와 누에 실크 피브로인 유전자를 융합한 후 piggyBac 전이벡터 시스템에 도입하여 누에알에 주입함으로써 누에/거미 하이브리드 실크를 생산하는 GM누에를 개발함

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연차별 연구개발의 목표 및 수행내용

1. 1차년도 연구개발 목표 및 수행내용

세부/협동과제명	연구개발의 목표	연구개발의 내용
누에 번역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링	○ 누에 번역유도 방법 개발 및 고기능성 항생펩타이드 유사체 설계	○ 누에 번역 유도물질 개발 ○ 누에 대량 접종을 위한 번역 유도 조건 확립 ○ 누에 주요 항균펩타이드 유전자 분리 및 합성 ○ 주요 항균펩타이드 합성을 위한 대장균 발현벡터 구축 ○ 재조합 항균펩타이드 발현, 정제 및 항균 효과검정 ○ 기존 항균펩타이드들의 활성영역을 상호 융합 시킨 하이브리드 펩타이드 설계
천연항생제 생산 형질전환 누에 개발	○ 천연항생제 대량발현용 운반체 및 누에 형질전환체 제작	○ 누에 유래 항균펩타이드 유전자가 도입된 형질전환 운반체 제작 - 누에 유충 발현 운반체 제작 : 1종 - 누에 실크내 발현 운반체 제작 : 1종 ○ 형질전환 운반체의 누에알 내 미세주사 ○ 누에 형질전환체 선발 및 도입 유전자 발현특성 분석 : 2세대
곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증	○ 대상 병원균에 대한 1차 항생효과 스크리닝 (번역유도 대상)	○ 타겟 질환균 선발 및 항생효과 분석 ○ 세포독성 등 안전성 분석 ○ L929 및 Caco-2 세포를 이용한 펩타이드 세포독성 검사
천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발	○ 누에 분말 사료화를 위한 사료·영양적 가치 평가	○ 누에 유래 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 - 누에 유래 사료소재의 일반성분, 아미노산, 무기질, 항균 펩타이드 함량 비교 분석 - pH, HCl, 담즙산 처리에 따른 누에 유래 사료소재의 항균 활성 변화 비교 - 소장 유사 모델을 이용한 누에 유래 항균 펩타이드의 흡수율 비교 조사 - 대사시험을 통한 누에 유래 사료소재의 영양소 이용률 조사
	○ 육계에 대한 번역 유도 누에 분말의 사료 내 첨가효과 구명 및 적용 기술 확립	○ 육계사양시험을 통한 번역 유도 누에의 효과 구명 및 적용기술 확립 - 누에 유래 사료소재 및 첨가수준별 생산성, 생체안정성, 장내 미생물총 변화, 염증·면역스트레스 관련 인자, 경제성 비교를 통한 사료 내 첨가급여효과 및 적정 첨가수준 구명
천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발	○ 누에 번역유도 간이 장치 개발 및 번역유도 누에 이용 최적 제형화 조건 구명	○ 주사 및 열, 빛을 이용한 누에 생체내 천연항생제 유도 장치 개발 ○ 번역유도 누에의 분말화 방법 구명 ○ 열풍건조의 안정성 및 유도된 항생펩타이드 보존성 분석 ○ 항생펩타이드 생산 누에 분말의 최적화된 제형화 방법 및 조건 구명 - 분말의 안전성 및 항생펩타이드 보존성 조사

2. 2차년도 연구개발 목표 및 수행내용

세부/협동과제명	연구개발의 목표	연구개발의 내용
누에 번역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링	<ul style="list-style-type: none"> ○ 누에 번역유도에 따른 항균펩타이드 발현 효율 분석 및 고기능성 항생펩타이드 유사체 선별 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 누에 번역유도 조건에 따른 주요 항균펩타이드 발현량 분석 ○ 번역유도 조건에 따른 항균효과 검증 ○ 리모델링된 펩타이드 발현을 위한 재조합 DNA 합성 및 고효율 대장균 발현 벡터 제작 ○ 항생펩타이드 유사체 대량발현, 정제 및 항균효과 검증 (MIC 측정)
천연항생제 생산 형질전환 누에 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 분자유종에 의한 형질전환누에의 호모선발 및 특성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 우수 형질보유 형질전환체간 분자유종 - sibmating에 의한 호모선발 - 호모 형질전환체의 검정교배 ○ 유전형질 및 도입유전자 발현특성 분석 - 형질전환체 라인별 천연항생제 생산량 분석 - 항생펩타이드 과다발현에 따른 생리생태 분석
곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대상 병원균에 대한 1차적 항생효과 분석 (형질전환체 대상) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 타겟 질환균 선별 및 항생효과 분석 ○ 제형화에 따른 항생효과 변화 분석 ○ 제형화 전과 후의 펩타이드 효과 검증 ○ Caco-2 세포를 이용한 in-vitro 펩타이드 시험 모델 시스템
천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료소재의 제형형태별 이용 효과 구명 및 항생제 대체성 비교 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제형·가공 형태에 따른 누에 유래 사료소재의 생체 이용성 및 효과 비교 - 제형·가공 형태(나노, 지방코팅 등)에 따른 생산성, 생체 안정성, 장내 미생물 변화, 염증·면역·스트레스 관련 인자, 경제성 비교를 통한 최적 제형·가공 형태 구명 ○ 기존 시판 성장촉진용 항생제 및 항생제 대체제와의 이용 효과 비교 - 육계 사양시험을 통한 개발된 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제와 시판 항생제 대체제 간의 항생제 대체성 비교
천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대량 누에 번역유도 장치 개발 및 번역유도 누에 이용 제형화 방법 선별 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대량으로 누에 생체내 번역원을 주사할 수 있는 장치 개발 - 누에 마취 조건 구명 및 주입량 결정 ○ 항생펩타이드의 보존성 향상을 위한 제형화 방법 선별
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 항생펩타이드 함유 누에고치 이용 분말화 및 세리신회수 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 누에고치의 분말화를 위한 가수분해 조건 구명 ○ 음수용 사료첨가제 개발을 위한 누에고치로부터 세리신 정제법 개발

3. 3차년도 연구개발 목표 및 수행내용

세부/협동과제명	연구개발의 목표	연구개발의 내용
누에 면역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링	○ 누에 면역유도 방법에 따른 생산 효율 분석 및 항균펩타이드 유사체의 활성 검증	○ 면역유도 누에로부터 주요항균펩타이드 분리 및 동정 ○ 면역유도 누에의 항균력 비교분석을 통한 생산 효율 분석 ○ 다양한 세균성 병원균에 대한 재조합 항생펩타이드 유사체의 활성 검토 ○ 항균펩타이드 유사체 구조분석을 통한 상관관계 구명
천연항생제 생산 형질전환 누에 개발	○ 형질전환누에의 형질 고정 및 현장 실증실험	○ 분자육종에 의한 형질전환누에의 형질고정 - 항생펩타이드 최대발현 형질전환누에 선발 및 분자육종 - 누에고치 내 항균펩타이드 생산량 분석 ○ 지자체 도 잠업사업소 분양에 의한 현장실증 실험 ○ 형질전환누에의 환경위해성 평가 의뢰
곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증	○ 누에 유래 사료소재의 스트레스 저감, 면역 조절 효과 및 작용기전 구명	○ 육계 면역 유도 물질 및 스트레스에 따른 생리적 변화 비교 - 면역유도물질(LPS, SRPC), 스트레스 호르몬(ACTH) 주입 및 고온 스트레스 하에서 누에 유래 사료소재 첨가에 따른 생산성, 혈액특성, 장내 미생물총 변화, 면역·스트레스 관련 인자 변화 조사
천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발	○ 누에 유래 사료소재의 스트레스 저감, 면역 조절 효과 및 작용기전 구명	○ 육계 면역 유도 물질 및 스트레스에 따른 생리적 변화 비교 - 면역유도물질(LPS) 주입 및 고온 스트레스 하에서 누에 유래 사료소재 첨가에 따른 생산성, 혈액특성, 미생물총 변화, 면역·스트레스 관련 인자 변화 조사
	○ 산란계에 대한 누에 유래 사료소재 이용효과 및 적용기술 개발	○ 산란계사양시험을 통한 누에 유래 사료소재의 이용효과 및 적용기술 개발 - 누에 유래 사료소재 및 첨가수준별 생산성, 계란품질, 생체안정성, 장내 미생물총 변화, 염증·면역·스트레스 관련 인자, 계란 내 유효성분 이행 여부 조사를 통한 사료 내 첨가급여효과 및 적정 첨가수준 구명
천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발	○ 대량 누에 면역유도 자동화 장치 개발 및 천연항생제 생산 누에 이용 사료첨가제 제형화	○ 대량으로 누에 생체내 면역원을 주사할 수 있는 자동화 장치 개발 ○ 면역유도 및 형질전환 누에분말 이용 제형화 - 사료첨가제 대량생산 체제 구축 - 포장, 유통기한, 안정성 및 보존성 구명
	○ 천연항생제 함유 누에고치 이용 최적 제형화 조건 구명	○ 항생펩타이드 함유 누에고치의 최적화된 제형화 방법 및 조건 구명 - 안전성 및 항생펩타이드 보존성 조사

4. 4차년도 연구개발 목표 및 수행내용

세부/협동과제명	연구개발의 목표	연구개발의 내용
누에 면역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링	○ 누에 면역유도 방법의 표준화 및 고기능성 항생펩타이드 유사체의 작용 기작 구명	○ 누에 면역유도 증대를 위한 면역유도 방법 개선 ○ 최적의 누에 면역유도 조건 확립 및 대량 생산 매뉴얼 작성 ○ 가금류 주요 병원균에 대한 항생효과 검증 ○ 항생펩타이드의 세균내 작용 메카니즘 검토 ○ 고기능성 항생펩타이드 유사체의 천연 항생제로서의 가능성 검토
천연항생제 생산 형질전환 누에 개발	○ 형질전환누에의 품종화 및 농가보급용 잠종 생산	○ 형질전환누에의 품종화 - 형질전환누에 라인별 생리생태 분석 - 강건성을 기반으로 한 품종육성 ○ 양잠농가 보급용 잠종 생산 - 양잠농가 보급용 잠종의 모아 검사 - 양잠 선도농가 중심 형질전환누에 보급에 의한 농가 실증실험 - 대량사육에 따른 누에 생체 및 고치 내 항생펩타이드의 변화 특성 분석
곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증	○ 시제품을 대상으로 하는 펩타이드 유효성 및 안전성 분석	○ 보존(유통) 기간 별 펩타이드 반감기 조사 ○ 각 세부과제들과 협조를 통한 미비점 보완
천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발	○ 오리에 대한 누에 유래 사료소재의 이용효과 및 적용기술 개발	○ 오리사양시험을 통한 누에 유래 사료소재의 이용효과 및 적용기술 개발 - 누에 유래 사료소재 및 첨가수준별 생산성, 생체안정성, 장내 미생물총 변화, 염증·면역·스트레스 관련 인자, 경제성 비교를 통한 사료 내 첨가급여 효과 및 적정 첨가 수준 구명
	○ 대규모 농가 현장 실증 및 산업화 전략 구축	○ 농가 현장 실증 시험 - 육계·산란계 농장 현장 실증 시험을 통한 생산성, 환경 조사, 도체율 및 비품 발생률, 계란 품질 등 ○ 경제성 분석 및 미비점 보완 ○ 개발된 누에 유래 사료 소재의 실용화·산업화 기술 및 전략 구축
	○ 누에 유래 사료 소재 활용 기능성 가금산물 생산 및 브랜드화	○ 개발된 누에 유래 사료소재 활용 브랜드 가금산물 생산 체계 구축 - 가금산물에 대한 소비자 수용도 조사를 통한 누에 활용 기능성 가금산물 브랜드화 전략 수립 - 지역농업기술센터 연계 브랜드 가금산물 개발 방안 모색
	○ 면역유도 누에 및 누에 유래 항균펩타이드의 산업화를 위한 「사료 등의 기준 및 규격」 보조사료 등록	○ 면역유도 누에 및 누에 유래 항균펩타이드 사료공정서 내 보조사료로 등록 - 국내외 관련 자료 수집, 연구결과 정리, 분석방법 확립, 품질안전성 검증 등의 등록 필요 서류 작성 - 사료공정서 내 보조사료 등록을 위한 평가회 심의
천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발	○ 천연항생제 생산 누에·누에고치 이용 시제품 개발 및 농가 실증실험	○ 형질전환 누에고치 이용 제형화 - 분말화(세리신+피브로인), 음수용(세리신) - 사료첨가제 대량생산 체계 구축 - 포장, 유통기한, 안정성 및 보존성 구명 ○ 개발기술 및 장치의 문제점, 보완점개선 ○ 누에 및 누에고치 이용 시제품 개발

제 2 절 연구개발수행 내용 및 결과

1. 천연항생제 생산 형질전환 누에 개발 (제1세부)

가. 누에 은몸에서 항균펩타이드(BmRelish1)를 생산하는 형질전환누에 개발

(1) 누에 유래 BmRelish1 전사인자 전체 cDNA 및 활성영역 분리

누에는 병원균 침입시 체액성 면역반응으로 항균펩타이드를 생성하여 대응한다. 이들 항균 펩타이드들의 유전자 발현은 BmRelish1과 BmRelish2 전사인자(transcription factor)에 의해서 조절되며, BmRelish1는 BmRelish2에 비해 훨씬 다양한 항균펩타이드의 발현을 조절한다고 알려져 있다. BmRelish1 전사인자에 의해 발현이 조절되는 항균펩타이드로는 Cecropin A, B, C, D, E, Enbocin, Moricin, Gloverin1, 2, 3 등의 항균펩타이드들이 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 누에 유래의 항균펩타이드를 개별적으로 생산하는 형질전환누에를 개발하는 것 보다는 BmRelish1 전사인자가 과량 발현하는 형질전환누에를 제작함으로써 다양한 항균펩타이드를 생산하는 형질전환누에를 개발하고자 하였다. 누에 유래 BmRelish1 전사인자의 ORF(open reading frame)는 누에로부터 cDNA를 합성한 후 RT-PCR로 확보하였다. 그리고 Tanaka 등(2007)이 보고한 BmRelish1의 활성영역은 BmRelish1 ORF를 주형으로 하여 PCR로 확보하였다.

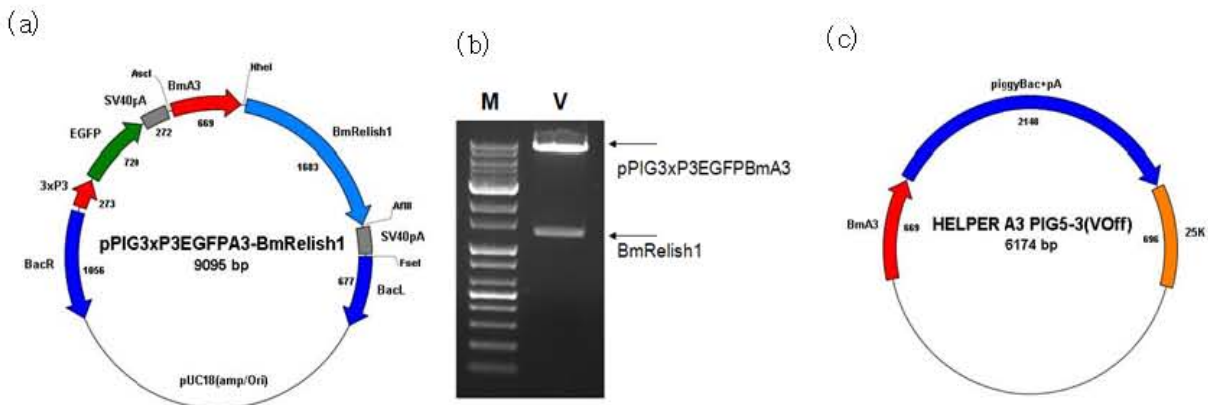
```
ATGTCTACAAC TGCCAGTGATCAGGATAGTGATTCTCCAGCAGATCCCCACAATCTTATTATAGTTATTGTTCCACCCTCTCAACAAGTACC
TCAGTTGACTCCAGATTTGAACAACCTAATATATCTAGACAATGGCTCAAAGAGAAACAGACCCTTCTTCGCATAAATTGAACAGCCACAGG
ACTACTTTAGATTTGCGTATGCTAGTGAATGGCTGGAACACATGGATGTTTGCTCGGAAAGTCATCTTCAACAACAAGAACAAGTTTCAC
CCTACAGTTGAGCTTGTAAACTACACTGGCCAGGCTGTAATAAAATGTTCAGTTGGCCCAACATAAGACACCTGAGGAGCATCCACACAAGCT
ATTCGAAGAAGAACAAGATAATGATGACAGAGAAGTCAGCTGCATTGTCTCTAAACAAGGCATTTACAAAGTCGGGTTTCGGTGAATGGGTA
TCATACACACAGCAAAAAAACGTACCAGGCTTACTGTTCCAGAAGTATGCAGAGAAGTGTAAAGAACATCAGCAACAAAGAGCTCAAAATC
CAATGCGAGAATATGGCTAAAAGCATAGATCTCAACATTGTGCGCTTGAAGTTCAGCGCTCAGCAGATCAGCACCAGATCGTGAGATATGCAA
GCCTGTTTTCTCTGAACCGATACACAGCTTAAAAAGTGTGCTTTCGAACGATCTGAAGATATGTCGCATCAGTCGTTGTTCCGGGCGTCCAG
TTGGAGGAGAAGAGCTGTACATTTTCGTCGAGAAAGTTAACAAAAAATATACAGATACGCTTCTTCGAATTGGACGAGAATGGCCACCBC
GTGTGGACGGCTAACGGGAGTTTCATGCTGGCGATGTTCAACCACAGTACGCCATAATCTTCAGGACCCCGCCCTACAAGGATACGAAGAT
ATCAAAGAACGTGAACGTGTATATAGAAGTGGCGCGCCCTCGGACGGTGCACGAGCGAACCTAAGGAGTTCAGTACATCGCCGAGCCCA
TATACTCGAACAGCAAGAAGAGAAGGATGAATGCCTCATGTTCTACTTCCCCTGCTTCGTCGTTGGGTGTTGAAGAGTATCAGCGATCTGCC
GCCCTTGTGACTCTCAATAACAATTTCAACGATGAAAACAACATTGAAATGCCGAAAAGTGTGAGCTGCCGGCCGCCGCGCCGCCGCCCTC
TCTGGGACTGTGCGACCTCGCCGACGCGCTCATGGGCTCCGAGAGCGCCGTTGACCTACACTCGGTGCGCCGGGAACGCGATGTGGAGCCCGA
GTGCGCCCGTTCGAGACGATGAGCGTTCGAGCAGTTCGCCAATCTGCAACTGAATTCGACGGAGTTCGAAAAGATAATAACGAACGCCCTTCCG
CCGGAGGAAAGGAACGACTTCACGGAATATGCCCTAAGTTCGTACGAATCGTTCGATGACATCGACGATGATCCAAATGGATGGAAGTTCAT
ACGTACGTTACAGATGATGCAAACCGACTCTGCACGCAAGTAGGCAGCAGACACCCGAGACTAGTAAACCCGACTGAAAAGTGTGAACCCC
AAGAGAGCTCAGACAGGACCGAGCTGAATGTACCGTCTGATGCGAAAGATGCAAACGAATATAGCGCTTATTACAACGCCCAAGACGGCCTC
GAAGTGAAACGACTACTAAGAGAACTGACGAGATAATACGCAACAAGAAGTTTCATAAGAAACAAGAAGTGAAGACAACTAAAGAGACT
TTTCGACATAAGACTTTTGAACGGCGACAGTACCTCCACATGATACTGTGACGAAATCAATCCAGCATAGCGAACATGGTGACGATAATTG
ACAGCGTTAAAATGACCCACCTCTTGGACTACAGGAATTTGAAACTACAGACGTTACTGCATACCGCCATAGCTAATGACTTGTCCCATTAC
GTGACATTACTAGTATCAAAAGGAAGCAGCGTGAGTTTGCAAGATGTAGCCGGCGACACCGCGTTCCTACTACGCGCCAAAAGTCAACAAGTG
CTTGGAGCCGCTACTAGCCGAGTCAAGAAGCATAACATAACCGTTTCGACTTGAACACTTATAATTACGAAAAACAAGCGCCTCTGCACCTGG
CGAGGACGGGACAGAACGCGCCATCTACTGGAGAGCGGCGCCGACCACCGCGTGCCTGACATGCACGGCCGACGCGCTCCACCTGGCC
GCCTACGACAGTCCGCTCGCGCTTGTGCGCCCTGCTGGACTACATACCTCGAAAGAAATAGATGCAACCGATGAATCAGGCAACACAGC
ACTACAGATTTTGTGGCGGGCCCTAAGACAGAACTCCGTGGAGATCGTCAAATATTACTTGGAAAAAGGCCGATCCTAACTTTCAGG
GCGCTCAGAAAGAACTGCTGCTGGAAAATGTCTGCGGATAAACCTGAACTAAGAGCCCTTCTCTTGAAGCTATCGCCTTCGAAGACGGCTTC
GAGAATAATAGTGTGAAATCTGAACTCGATGACGAAATCAAGTCTGAACCTGATGACGAGATCAAGTCTGAACCCGAGGACGATTACGATTC
AGCTGATGAAGCGGAGGAAACAAGTGGCAGCAGGCACTAGACGGCATGGTTCAGTACTTGGGCGAGGTGAGCTCGCTGCTGGACCGGTCGG
```

GCAGCTGGCAGGAGCTAGCGGGCAGGCTGCGTCTCGACTCGCTGCTCTCCTTGTACTGCGCGCAGCCCAGCCCCACGCACACGCTGCTGCTG
 CATCTCAAGGTATACCTTGTGTTTACTGTATGGCCTTGCAGCAACCCAGCCTTATAA

(그림 설명) 누에 유래 BmRelish1 전사인자 전체 cDNA 및 활성영역 염기서열. 밑줄은 각각 개시코돈(ATG)와 종결코돈(TAA)를 나타냄. 파란색 글씨는 BmRelish1 전사인자의 활성영역 서열을 나타냄. 전체 BmRelish1 전사인자의 ORF는 2,814개의 염기로 구성되어 있으며, BmRelish1 전사인자의 활성부위는 1,683개의 염기로 구성되어 있음.

(2) 누에 유래 BmRelish1 전사인자가 도입된 누에 형질전환용 전이벡터 제작

BmRelish1 전사인자의 활성영역 서열(1,683bp)을 국립농업과학원에서 제작하여 보유하고 있는 누에 형질전환용 전이벡터인 pPIG3xP3EGFPBmA3의 제한효소 site인 NheI과 AfIII에 도입하기 위하여, BmRelish1 전사인자의 활성영역의 5'의 개시코돈(ATG) 바로 앞에는 Kozak 서열인 'AAA'와 제한효소 NheI의 인식서열인 'GCTAGC' 부가하고, 3' 활성영역에는 종결코돈(TAA)과 제한효소 AfIII의 인식서열인 'CTTAAG'를 부가하여 PCR로 증폭한 후 누에 형질전환용 전이벡터인 pPIG3xP3EGFPBmA3의 누에 액틴3 프로모터(BmA3) 하류에 클로닝하였다. 완성된 형질전환용 전이벡터는 pPIG3xP3EGFPA3-BmRelish1으로 명명하였다. 제작한 전이벡터는 pUC18 벡터를 기본 벡터로 하고 있으며, 양쪽에는 HELPERA3PIG5-3(Voff) helper plasmid 내에 도입된 piggyBac 전이인자(transposon)의 인식서열인 piggyBac right arm(BacR)과 piggyBac left arm(BacL)을 도입하였다. 누에 형질전환체 선발을 위해서는 누에 홴눈(stemmata)과 신경시스템에서 특이적으로 유전자의 발현을 조절하는 초파리 유래 3xP3 프로모터 하류에 표지유전자인 EGFP를 도입하였다. 완성된 형질전환용 전이벡터는 pPIG3xP3EGFPA3-BmRelish1 전이벡터 내 도입유전자인 BmRelish1이 정확하게 삽입되었는지를 확인하기 위해 제한효소 NheI와 AfIII으로 double digestion한 결과, 1,683bp 크기의 BmRelish1 전사인자의 활성영역을 확인할 수 있었다.



(그림 설명) BmRelish1 전사인자가 도입된 누에 형질전환용 전이벡터 제작. (a), BmRelish1 전사인자 도입 전이벡터. (b), 제한효소 NheI/AfIII 처리 후 누에 전이벡터 내 BmRelish1 클로닝 확인. (c), piggyBac 전이인자가 도입된 helper plasmid. BacR, piggyBac right arm. BacL, piggyBac left arm. 3xP3, 곤충 홴눈(stemmata) 및 신경시스템 특이발현 프로모터. EGFP, 표지유전자(enhanced green fluorescent protein). SV40pA, simian virus 40 poly A.

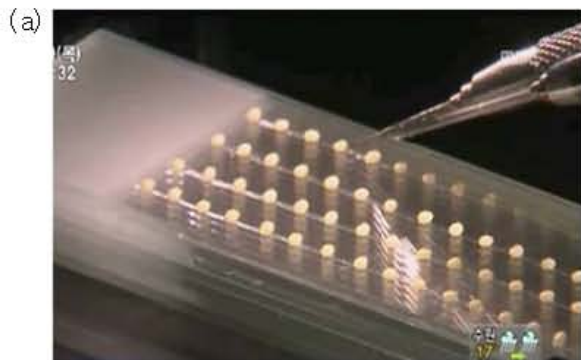
(3) 누에 초기배아 내 누에형질전환용 전이벡터 미세주입

(가) 누에 형질전환에 적합한 누에알 제조

본 실험에 사용한 누에품종은 농가보급 장려품종인 백옥잠(잠123 x 잠124)을 사용하였다. 백옥잠은 2화성(곤충이 1년간에 몇 세대를 되풀이하는 성질) 품종으로써, 1년간 2번의 세대를 거치면 휴면상태(월년)에 들어간다. 따라서, 2화성 품종인 백옥잠을 형질전환에 적합한 비휴면상태로 만들기 위하여 산란 후 4시간 이내의 수정란을 25℃에서 1시간 동안 염산 처리를 하였다. 염산 처리 후 흐르는 물에 30분간 세척한 다음, 슬라이드글라스에 누에 배아의 배면부와 복면부가 한 방향으로 일정하게 되도록 배열하였다. 이때 1장의 슬라이드글라스 내에는 4렬로 60개의 누에알을 부착하였으며, 부착된 전체 1,020개의 누에알을 대상으로 미세주입법에 의한 형질전환을 유도하였다.

(나) 누에 초기배아 내 전이벡터 미세주입

pPIG3xP3EGFPA3-BmRelish1 전이벡터와 HELPERA3PIG5-3(Voff)Helper plasmid의 농도비는 1 : 1의 비율로 사용하였고, microinjection용 완충용액 (5mM KCl, 0.5mM Phosphate buffer, pH 7.0)에 0.2 µg/µl의 농도로 희석하였다. 누에 초기배아의 microinjection 위치는 예측되는 초기배의 배면 부분에 주사하였다. 먼저 텅스텐 침으로 누에알에 작은 구멍을 뚫고, 이 구멍에 DNA 용액이 들어있는 microcapillary의 끝을 삽입 후, microinjector의 공기압을 이용하여 DNA 용액을 알 속으로 주입하였다. 이때 각 초기배에 주입된 DNA 용액의 양은 10~15nl 가 사용되었고, 난각에 생긴 구멍은 Cyanocrylate 성분이 함유된 접착제(Henkel, Germany)를 사용하여 막았다. 미세주사 후 누에알은 보습한 패트리디쉬에 넣어서 25℃에서 부화할 때까지 보호하였다.



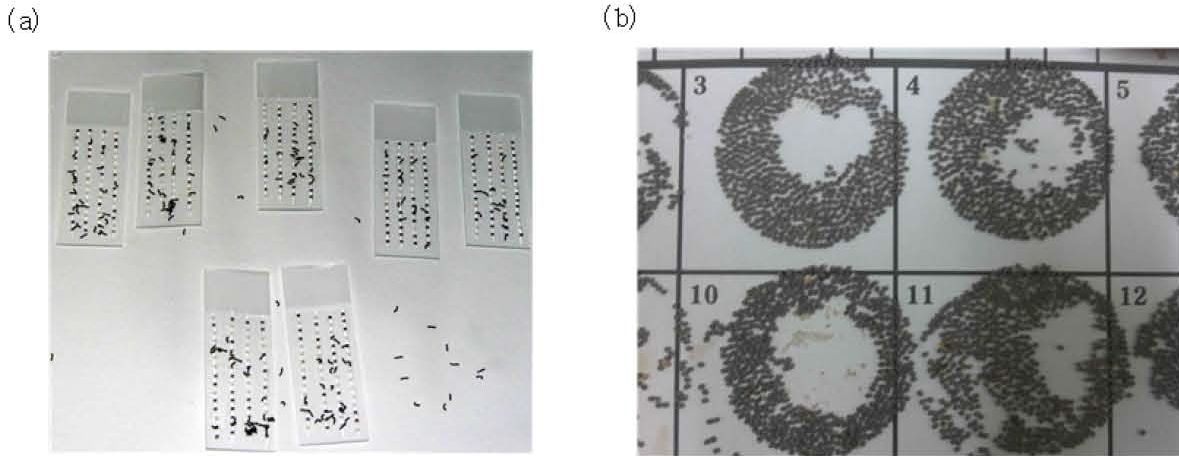
(그림 설명) 누에 초기배아 내 누에형질전환용 전이벡터 미세주입. (a), 산란 후 4시간 이내의 누에알을 슬라이드글라스 내 누에 배아의 배면부와 복면부가 한 방향으로 일정하게 되도록 4 × 15개 (=60개) 배열. 1차 텅스텐 needle로 누에알의 난각에 미세구멍을 뚫고, 이 구멍에 DNA 용액이 들어있는 microcapillary의 끝을 삽입 후, microinjector(b) 공기압을 이용하여 DNA 용액을 알 속으로 주입

(4) BmRelish1 유전자가 도입된 누에 형질전환체 선발

(가) 형질전환 유도 G0 세대 사육 및 G1 세대 잠충 생산

누에 초기배아 내 전이벡터 미세주입에 의해 형질전환을 유도한 슬라이드글라스 내 G0 세

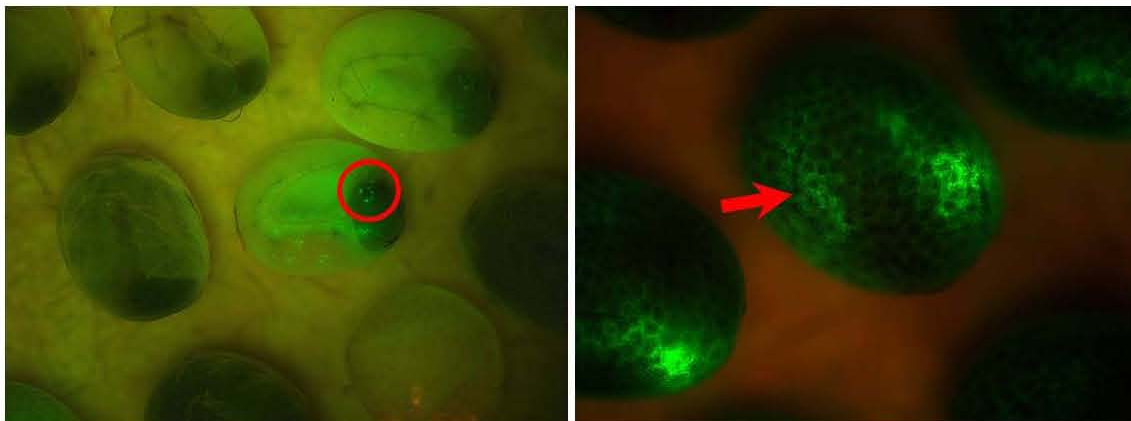
대의 누에알은 약 10일 후부터 부화를 시작한다. 슬라이드글라스 상에서 부화유충을 약 3일 간 회수하여 부화율을 조사하였다. 형질전환을 유도한 총 1,020개의 누에알로부터 23%(232마리)의 G0 세대의 부화유충을 확보할 수 있다. 확보한 부화유충은 누에사육용 잠박으로 옮겨 사육을 하였으며, 최종적으로 성충(누에나방) 121마리를 확보하였다. 확보한 G0 세대의 성충은 상호교배를 통하여 G1 세대의 잠종 54아구를 확보하였다.



(그림 설명) 형질전환 유도 G0 세대 사육 및 G1 세대 잠종 생산. (a), 형질전환을 유도한 G0 세대의 슬라이드글라스 위에서 부화하고 있는 모습을 나타냄. (b), 부화한 G0 세대의 유충을 성충(누에나방)까지 사육한 다음 상호교배를 통하여 G1 세대의 잠종을 확보함

(나) 누에 형질전환체 선발 및 사육

확보한 G1 세대의 잠종 54아구로부터 누에 형질전환체는 Leica (USA)사의 LEICA MZ16FA 현미경과 Leica (USA)사의 Microscope MZ FLIII Fluorescence Filter GFP2 형광필터를 사용하여 선발하였다. 형질전환체 선발은 산란 후 4일째부터 부화 직전까지 지속적으로 형광현미경 검경을 수행하여 선발하였다. 그 결과, 총 54아구로부터 표지유전자인 EGFP가 누에 배아의 5개의 홀눈(stemmata)과 신경시스템에서 뚜렷하게 발현되는 22개의 아구를 선발할 수 있었다.



(그림 설명) 곤충의 5개의 홀눈(stemmata)과 신경시스템에서 특이적으로 유전자를 발현하는 초파리 유래 3xP3 프로모터의 조절에 의해서 표지유전자인 EGFP가 누에의 5개의 홀눈과 신경시스템에서 뚜렷하게 발현되고 있음. 좌측 그림의 녹색 형광을 띄지 않는 누에알은 형질전환이 유도되지 않음. 화살표는 신경시스템을 원은 5개의 홀눈을 나타냄.

(표 설명) 누에알 내 전이벡터 pPIG3xP3EGFPA3-BmRelish1 미세주입 후 G0 및 G1 세대의 특성 분석

Transfer vector	No. of injected embryos(G0)	No. of hatched embryos(G0)	No. of batches examined(G1)	No. of batches with EGFP positive G1
pPIG3xP3EGFPA3-BmRelish1	1,020	232	54	22

(다) G1 세대 형질전환누에 사육 및 특성 분석

누에 형질전환체를 포함하고 있는 22개의 아구는 누에사육용 잠박에 개별로 분리하여 사육하였다. 분리 사육한 22개 아구의 누에는 비 형질전환체와 형질전환체가 혼재되어 있으므로 형질전환체 선발을 위하여 2령 1일까지 사육한 후, 전체 사육 누에를 대상으로 형광현미경 검경에 의해서 선발하였다. 형질전환체 선발은 누에 흘눈 내 표지유전자인 EGFP 발현 유무로 확인하였다. 22개 아구 내의 형질전환체 발생개체 수는 각 아구별로 차이가 있었는데 적게는 4개체부터 많게는 50개체 이상을 확인할 수 있었다. 이후 각 아구별로 선발한 누에 형질전환체는 아구별로 분리사육하여 번데기를 확보한 다음 번데기를 이용하여 형질전환 유무를 재차 확인하였다. 번데기의 형질전환 유무는 향후 성충의 눈으로 형성될 부분에 표지유전자인 EGFP 발현 유무를 형광현미경으로 검경하였다. 형광현미경 검경에 의해서 형질전환이 확인된 번데기는 성충(누에나방)까지 발생시킨 다음, 같은 아구 내 성충을 sib-mating하여 제 2세대(G2) 잠종을 확보하였다.



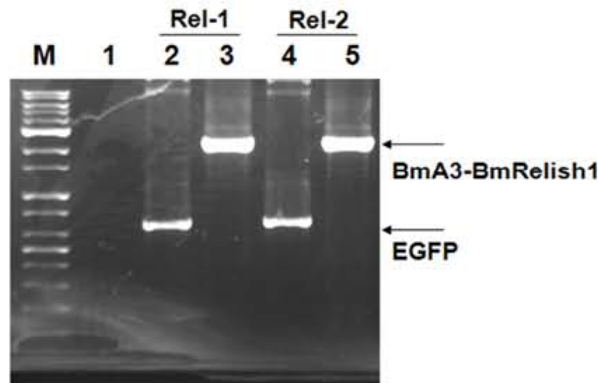
(그림 설명) 제1세대(G1) 형질전환누에의 표지유전자 EGFP 발현 특성 분석. 곤충의 눈과 신경시스템에서 특이적으로 발현하는 3xP3 프로모터의 발현 조절에 의해서 EGFP 발현이 누에의 5개 흘눈에만 특이적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었음((a). 번데기(b)와 성충(누에나방)에서는 눈에서만 특이적으로 EGFP를 발현하는 것을 확인할 수 있음.

(5) BmRelish1 유전자가 도입된 누에 형질전환체의 특성 분석

(가) 누에 개놈 내 BmRelish1 유전자 도입 확인

분리사육한 제1세대(G1) 누에 형질전환체 22개 아구의 강건성, 생존율, 우화율, 산란율 등을 고려하여 최종적 2개 아구만을 선정하였다. 선정된 2개의 아구내 누에 개체를 대상으로 BmRelish1 유전자 도입을 확인하였다. 선정된 2개의 형질전환체 아구는 Rel-1과 Rel-2로

명명하였다. 도입유전자인 EGFP와 BmRelish1의 형질전환체 게놈 내 삽입 여부는 PCR로 확인하였다. 이때, BmRelish1 유전자 도입 확인은 비 형질전환체인 정상 누에도 BmRelish1 유전자를 보유하고 있어 BmA3 프로모터(669bp)와 BmRelish1(1,683bp) 유전자를 포함하는 서열의 PCR product 생성 여부로 EGFP 확인하였다. 그 결과, 정상누에에서는 확인되지 않는 EGFP(720bp)와 BmA3-BmRelish1(2,352bp)에 해당하는 PCR product를 확인할 수 있어, 형질전환누에의 게놈 내에 도입유전자인 EGFP와 BmRelish1가 정확하게 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다.



(그림 설명) 누에 형질전환체 게놈 내 EGFP 및 BmRelish1 유전자 도입 확인. PCR에 의한 정상누에와 형질전환누에 라인(Rel-1, Rel-2)의 EGFP 및 BmA3-BmRelish1 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers. Lane 1, 정상누에. Lane 2, 3, 누에 형질전환라인 Rel-1. Lane 4, 5, 누에 형질전환라인 Rel-2.

(나) 형질전환누에 게놈 내 BmRelish1 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 결정

누에 형질전환체 게놈 내 EGFP 및 BmRelish1 유전자의 도입이 확인된 형질전환 라인 Rel-1과 Rel-2에 대하여 BmRelish1 유전자가 게놈 내 몇 copy로 존재하지와 몇 번 염색체에 도입되었는지를 확인하기 위하여 Inverse PCR를 다음과 같이 수행하였다. 먼저 형질전환 라인 Rel-1과 Rel-2으로부터 각각 genomic DNA를 분리한 다음, 제한효소 Sau3AI로 처리하였다. 제한효소 Sau3AI로 절단된 genomic DNA는 T4 DNA ligase를 사용하여 self-ligation을 유도하고, 이를 주형으로 하여 Inv-F(ATCAGTGACACTTACCGCATTGACA)와 Inv-R(TACGCATGATTATCTTTAACGTA) 프라이머로 Inverse PCR을 수행하였다. Inverse PCR 결과로 증폭된 PCR product는 pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 다음, 삽입 단편에 대하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열에서 pPIG3xP3EGFPA3-BmRelish1 전이벡터 (piggyBac) 서열을 제외한 염기서열만으로 Silkworm genome research program (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)을 이용하여 누에 염색체 내 삽입 위치를 결정하였다. 그 결과, 형질전환 라인 Rel-1과 Rel-2는 각각 1 copy로 존재하고 있었으며, 형질전환 라인 Rel-1는 전이벡터가 5번 염색체 상에 삽입되어 있었고 형질전환 라인 Rel-2는 전이벡터가 14번 염색체 상에 삽입되어 있었다.

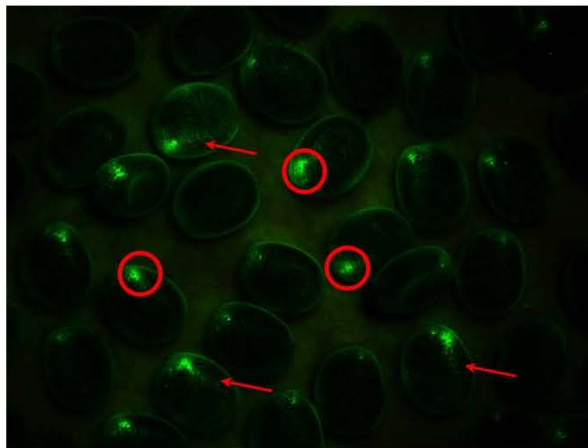
(표 설명) 형질전환누에 게놈 내 BmRelish1 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 확인

G1 lines	5' junction- <i>piggyBac</i> -3' junction	No. of chromosome position
Rel-1	TCCTATAACTCCCATTACAAGACTATTTCGAAATGTTGTGGAGCTTATCCTC GTCTGTAAGAAAGAGGAAGTAGTGGTTATCATCTTTCTGTAGGATTC- <i>piggyBac</i> <i>yBac</i> -TAACAATGACCTCATTTCATCATAAACTTAGCGATTCTGCGAAGTA CGCATTAAAGTTTCGCCTCGTGAA	5
Rel-2	CATACAGCCGAA- <i>piggyBac</i> -AGTTTTTATTTTTTTCTTGCCCTAGTAAGCA GACGAGCGTACGGCCACCTGGTGGTGAGTGGTTACCGTCGCCCATG	14

(다) G2 세대 형질전환누에의 도입유전자 발현특성분석

① G2 세대 형질전환누에 사육

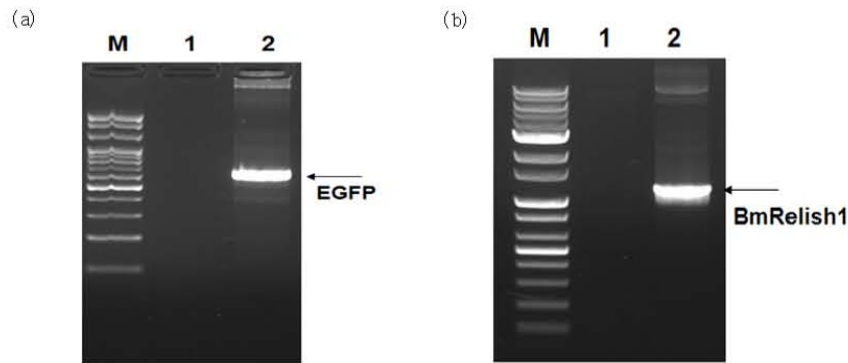
형질전환누에 게놈 내 도입유전자의 copy 수 증가시킴으로서 재조합 BmRelish1 단백질의 발현량을 향상시키기 위하여 선발한 형질전환누에 라인 Rel-1과 Rel-2를 상호교배 시켰다. 상호교배를 통하여 잡종을 확보한 다음, 형광현미경 검정으로 EGFP 발현을 확인하였다. 그 결과 일부를 제외한 거의 대부분의 누에 배아의 홀눈과 신경시스템에서 EGFP 발현을 확인할 수 있었다. 일부 비 형질전환체가 혼재된 것은 형질전환누에 라인 Rel-1과 Rel-2의 게놈 내에 외래유전자 각각 hetero로 존재하기 때문으로 사료된다.



(그림 설명) 제2세대(G0) 형질전환누에의 홀눈(원)과 신경시스템(화살표)에서 표지유전자 EGFP 발현확인.

② G2 세대 형질전환누에의 도입유전자 EGFP 및 BmRelish1 전사체 발현 분석

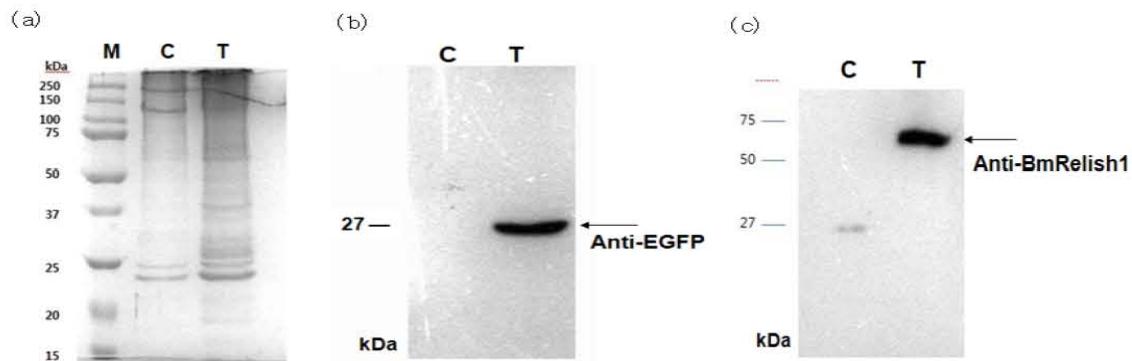
형질전환누에 라인 Rel-1과 Rel-2를 상호교배하여 5령 3일까지 사육한 후 도입유전자 EGFP 및 BmRelish1의 전사체 발현분석을 수행하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body를 각각 액체질소로 마쇄한 후 total RNA를 분리하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 합성한 1st-strand cDNA를 주형으로 EGFP와 BmRelish1 유전자에 대하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, 정상누에에서는 어떠한 PCR product도 확인할 수 없는 반면에 형질전환누에에서는 EGFP와 BmRelish1 유전자의 전사체를 뚜렷하게 확인할 수 있었다.



(그림 설명) G2 세대 형질전환누에의 도입유전자 EGFP 및 BmRelish1 전사체 발현 분석. RT-PCR에 의한 정상누에와 형질전환누에의 EGFP(a) 및 BmRelish1(b) 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers. Lane 1, 정상누에. Lane 2, 형질전환누에.

③ G2 세대 형질전환누에의 재조합단백질 EGFP 및 BmRelish1 발현 분석

5령 3일까지 사육한 정상누에와 G2 세대 형질전환누에로부터 무작위로 각각 1마리를 선발하여, 액체질소로 마쇄한 후 2장의 SDS-PAGE에 전기영동을 수행하였다. 이후 이를 각각 PVDF membrane에 transfer하여 Western blot 분석을 수행하였다. 이때 사용한 1차 항체(primary antibody)는 anti-EGFP와 anti-BmRelish1을 사용하였다. 그 결과, 정상누에에서는 EGFP와 BmRelish1 재조합단백질의 발현을 확인할 수 없었으나, 형질전환누에에서는 27kDa 크기의 EGFP와 63kDa 크기의 BmRelish1 재조합단백질의 발현을 뚜렷이 확인할 수 있었다. 이상의 결과로써 제 2세대 형질전환누에는 게놈 내 BmRelish1 유전자가 정확하게 도입되어 전사체 발현과 BmRelish1 재조합단백질을 발현하는 것으로 판단되었다.



(그림 설명) G2 세대 형질전환누에의 재조합단백질 EGFP 및 BmRelish1 발현 분석. (a), SDS-PAGE. (b), anti-EGFP 항체를 이용한 Western blot 분석. (c), anti-BmRelish1 항체를 이용한 Western blot 분석. M, 단백질 size markers. C, 정상누에. T, 형질전환 누에.

(6) BmRelish1 전사인자가 도입된 형질전환누에 세대 고정 및 특성분석

(가) 5세대 형질전환누에 선발

기존에 선발된 5세대 누에형질전환체를 Leica (USA)사의 LEICA MZ16FA 현미경 과 Leica (USA)사의 Microscope MZ FLIII Fluorescence Filter GFP2 형광필터를 사용하여 재

선발하였다. 형질전환체 선발은 산란 후 4일째부터 성충까지 지속적으로 형광현미경검경을 수행하였다. 그 결과, 모든 알에서 녹색형광을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과에서 BmRelish1 전사인자가 도입된 누에형질전환체의 계대사육이 정확하게 이루어지고 있음을 알 수 있다.



(그림 설명) 제5세대(G5) 형질전환누에의 표지유전자 EGFP 발현 특성분석. 곤충의 눈과 신경시스템에서 특이적으로 발현하는 3xP3 프로모터의 발현 조절에 의해서 EGFP 발현이 누에의 5개 출눈에만 특이적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었음 (A, B). 그리고 성충(C)에서는 누에서만 EGFP 형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었음.

(나) 형질전환누에 게놈 내 BmRelish1 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 확인

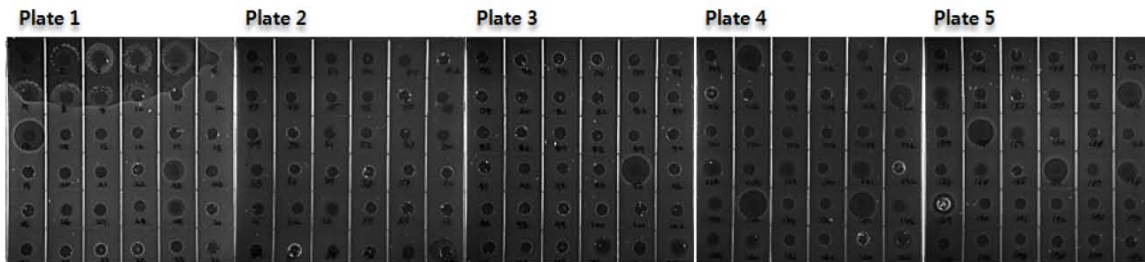
누에 형질전환체 게놈 내 BmRelish1 유전자의 도입이 확인된 형질전환체에 대하여 BmRelish1 유전자가 게놈 내 copy 수와 염색체 위치를 확인하기 위하여 Inverse PCR를 다음과 같이 수행하였다. 먼저 형질전환체로부터 genomic DNA를 분리한 다음, 제한효소 Sau3AI으로 처리하였다. 제한효소 Sau3AI로 절단된 genomic DNA는 T4 DNA ligase를 사용하여 self-ligation을 유도하고, 이를 주형으로 하여 5' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5'-ATCAGTGACACTTACCGCATTGACA-3' (25 mer) 와 antisense primer는 5'-TGACGAGCTTGTGGTGAGGATTCT-3' (25mer)을 사용하였고, 3' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5' -TACGCATGATTATCTTTAACGTA-3' (23 mer)와 antisense primer는 5' -GGGGTCCGTCAAACAAAACATC-3' (23 mer)를 사용하여 Inverse PCR를 수행하였다. Inverse PCR 결과로 증폭된 PCR product는 pGEM-T easy 벡터에 클로닝 한 다음, 삽입 단편에 대하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열에서 pPIG3xP3EGFPBmA3BmRelish1 전이벡터(piggyBac) 서열을 제외한 염기서열만으로 Silkworm genome research program(<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)을 이용하여 누에 염색체 내 삽입 위치를 결정하였다. 그 결과, pPIG3xP3EGFPBmA3BmRelish1 누에형질전환체는 1 copy로 존재하고 있었으며, 전이벡터가 5번 염색체 상에 삽입되어 있는 것을 재확인할 수 있었다.

(표 설명) 형질전환누에 계놈 내 BmRelish1 유전자의 도입 확인

5' junction- <i>piggyBac</i> -3' junction	No. of chromosome position
TCCTATAACTCCCATTACAAGACTATTCGAAATGTTGTGGAGCTTATCC TCGTCTGTAAGAAAGAGGAAGTAGTGGTTATCATCTTTCTGTAGGATTC <i>-piggyBac</i> -TAACAATGACCTCATTTCATCATAAACTTAGCGATTCTGCG AAGTACGCATTAAGTTTCGCCTCGTGAA	5

(다) 항균활성을 이용하여 항균활성이 높은 형질전환누에 선발

항균펩타이드 BmRelish1에 대한 항균활성을 측정하기 위해, 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법을 이용하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body에서 체액을 채취 한 후 90°C에서 10분간 열처리하여 열음에 10분간 반응시킨다. 이렇게 전처리가 완료된 시료는 원심분리하여 상층액만 분리한 후 항균활성 검정에 사용하였다. 항균활성검정에 사용된 균주는 그람음성 세균인 E.coli (KACC 1039)에 대하여 항균활성을 배지상에서 가시화하여 검정하였고, 검정에 사용된 총시료는 180개를 검정하였다. 그 결과, 항균활성 정도를 clear zone을 기준으로 3등급으로 나누어 분류하였고, 그 중에서 4마리의 누에를 선발 할 수 있었다. 이렇게 선발된 누에는 계대사육을 통하여 항균활성이 높은 품종으로 선별하였다.



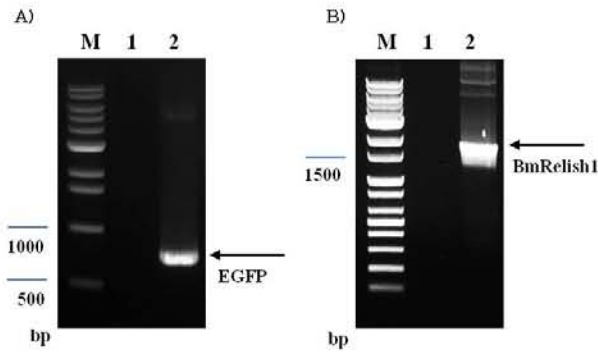
(그림 설명) 그람음성균인 E.coli에 대해 항균활성검정. 제5세대(G5) 5령3일 형질전환누에 유충에서 체액을 분리하여 항균활성검정을 검정하였다. BmRelish1, 형질전환누에의 체액(10 μ l) 사용.

(표 설명) 항균활성검정을 이용하여 5세대 형질전환체 분류

항균활성	강	중	약	없음
마리수	4	7	14	155

(라) 제6 세대 누에형질전환체의 도입유전자 EGFP 및 BmRelish1 전사체 발현 분석

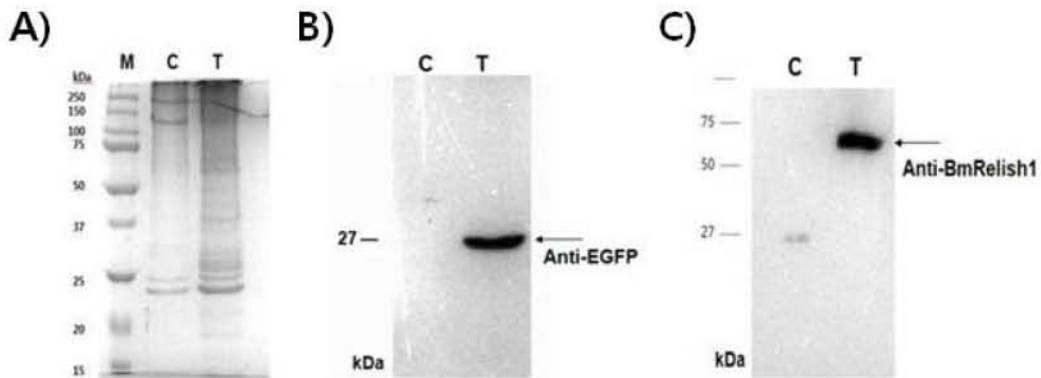
선발된 누에형질전환체들을 5령 3일까지 사육한 후 도입유전자 EGFP 및 BmRelish1의 전사체 발현분석을 수행하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body를 각각 액체질소로 마쇄한 후 total RNA를 분리하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 합성한 1st-strand cDNA를 주형으로 EGFP(720 bp)와 BmRelish1 (1,686 bp) 유전자에 대하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, EGFP와 BmRelish1 유전자의 전사체를 뚜렷하게 확인할 수 있었다.



(그림 설명) G6 세대 형질전환누에의 도입유전자 EGFP 및 BmRelish1 전사체 발현 분석. RT-PCR에 의한 정상누에와 형질전환누에의 EGFP(A) 및 BmRelish1(B) 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers. Lane 1, 정상누에. Lane 2, 형질전환누에.

(마) 제6 세대 누에형질전환체의 도입유전자 EGFP 및 BmRelish1 단백질 발현 분석

단백질 수준에서 EGFP와 BmRelish1 유전자의 단백질 발현여부를 확인하기 위해, 누에 형질전환체 G6 세대의 larvae에서 체액을 분리하여 Anti-EGFP와 Anti-His 항체를 이용하여 Western blot 분석을 하였다. 그 결과 정상 누에에서는 관찰되는 않는 단백질이 17 kDa과 62 kDa에서 각각 발현되는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서, 본 실험에서 제작한 전이 벡터에 의해 EGFP 및 BmRelish1 재조합단백질이 성공적으로 발현되는 것을 확인 할 수 있었다.

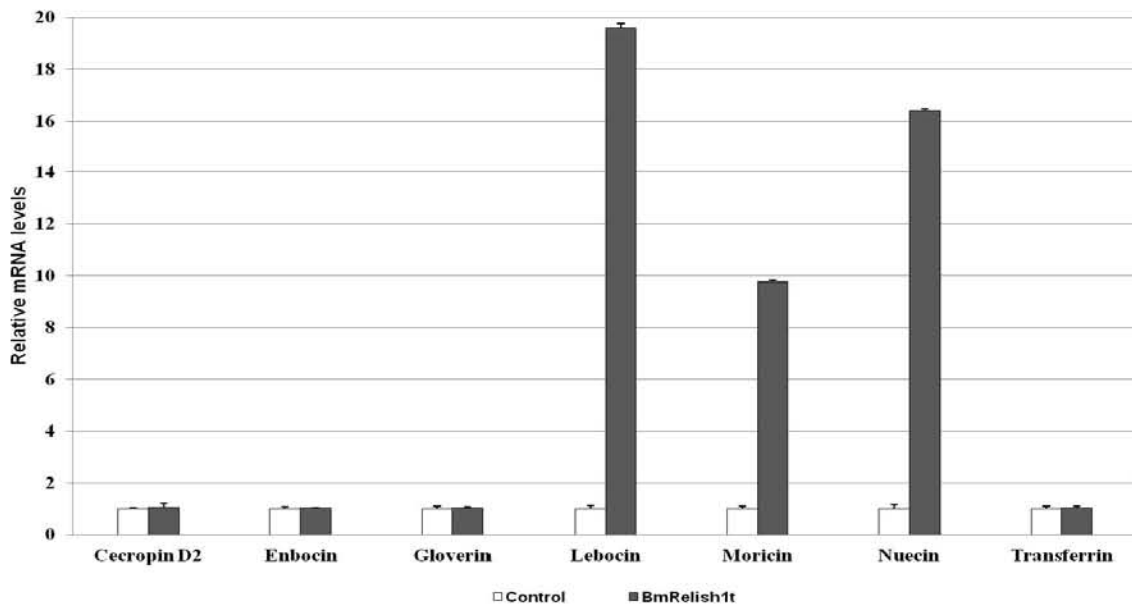


(그림 설명) G6 세대 형질전환누에의 도입유전자 EGFP 및 BmRelish1 단백질 발현 분석. A) 단백질 전기영동 결과. B) Anti-EGFP 항체를 이용하여 EGFP 단백질 발현분석. C) Anti-His 항체를 이용하여 BmRelish1 단백질 발현분석. M, Protein size markers; C, 정상누에체액; T, 형질전환누에 체액.

(바) G6 세대 형질전환누에에서 항균펩타이드 유전자의 발현특성 분석

누에형질전환체를 5령3일까지 사육 후 항균펩타이드들의 전사체 발현을 분석하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body를 각각 액체질소로 마쇄한 후 total RNA를 분리하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 합성 된 1st-strand cDNA를 주형으로 항균펩타이드 CecropinD2 (NM_001043459), Enbocin (U30289), Gloverin1 (AB289654),

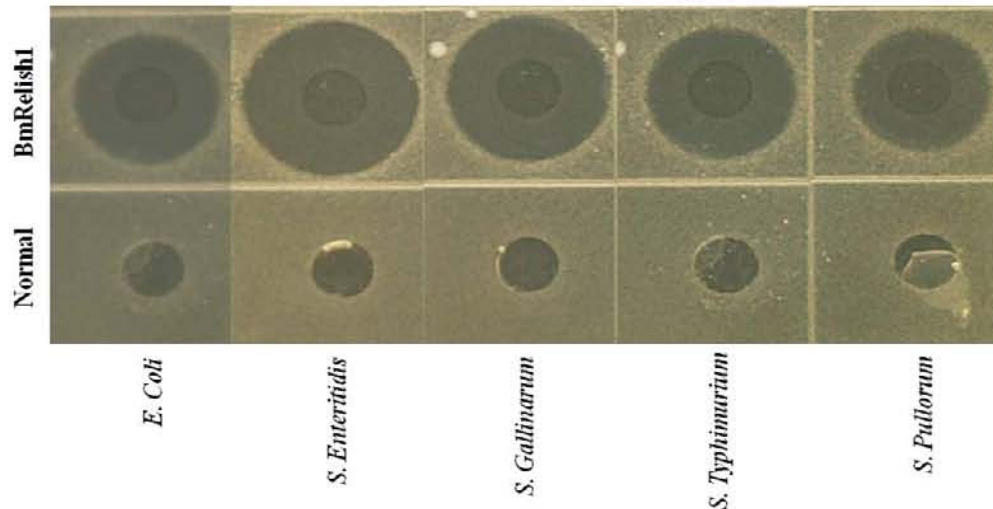
Lebocin (S79612), Moricin (NM_001043364), Nucin (AF005384), Transferrin (DQ375762) 유전자에 대하여 Relative Real-Time PCR을 수행하였다. 그 결과, 정상누에와 비교했을 때 Lebocin은 20배, Moricin은 10배, Nucin은 17배 더 높은 발현을 나타내었다.



(그림 설명) G6 세대 형질전환누에에서 항균펩타이드의 전사체 발현분석. mRNA는 누에 유래의 ribosomal protein RP49 mRNA로 표준화하였다. 항균펩타이드 유전자는 CecropinD2(NM_001043459), Enbocin (U30289), Gloverin1 (AB289654), Lebocin (S79612), Moricin (NM_001043364), Nucin (AF005384), Transferrin (DQ375762)을 사용하였다. Control, 5령 3일 정상누에. BmRelish1t, 5령 3일 BmRelish1 형질전환누에 6세대.

(사) G6 세대 형질전환누에의 항균활성 검정

G6 세대 누에형질전환체를 5령 3일까지 사육한 후 항균펩타이드 BmRelish1에 대한 항균활성을 측정하기 위해, 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법을 이용하였다. 항균활성검정에 사용된 균주는 일차적으로 그람음성 세균인 병원성 E. coli (KACC 1039) 및 Salmonella 균 (4종)에 대하여 항균활성을 배지상에서 가시화하여 검정하였다. 그 결과, 그 결과, BmRelish1은 E. coli 와 4종의 살모넬라균들에 대해서 높은 항균활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었고, 그 중에서 Salmonella Enteritidis에 대한 항균활성이 가장 높았다.



(그림 설명) 그람음성균인 *E. coli*와 4종의 살모넬라균에 대해 항균활성검정. 제6세대(G6) 5령3 일 형질전환누에 유충에서 체액을 분리하여 항균활성검정을 검정하였다. Normal, 정상누에의 체액(10 μ l); BmRelish1, 형질전환누에의 체액(10 μ l). 4종의 살모넬라균; *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*

나. 실크에서 항균펩타이드(melittin)를 생산하는 형질전환누에 개발

(1) 꿀벌 봉독의 주성분인 melittin 항균펩타이드 유전자 합성

멜리틴(Melittin)은 봉독의 주요한 성분으로 봉독 성분에서 50% 이상을 차지하고 있다. 멜리틴은 항균, 항생, 용혈, 혈압강화, 통증완화, 세포재생, 면역증강 및 혈관확장 활성을 가지고 있는 것으로 보고된 바 있으며, NF- κ B의 활성화를 저해하고 DNA 결합능을 조절하는 활성을 가지므로 NF- κ B 활성 억제제 또는 NF- κ B가 관여하는 DNA의 전사를 조절하는 전사 억제제로 사용될 수 있음이 보고된 바 있다. 멜리틴은 전체 70개의 아미노산으로 구성된 단백질로서 N 말단의 21개 아미노산이 신호서열(signal peptide sequence)을 형성하고 있으며, C 말단의 26개 아미노산이 활성영역을 이루고 있는 것으로 보고되었다. 그리고 이들을 제외한 나머지 23개의 아미노산은 비활성영역에 해당된다고 알려져 있다.

본 연구에서는 Gram 양성균과 음성균 둘 다에 강한 항세균 활성을 나타내는 멜리틴 유전자를 누에의 fibroin heavy chain 유전자 내에 도입하여 누에 실크에서 과량의 멜리틴을 생산하는 형질전환 누에를 제작하고자 하였다. 이를 위하여 먼저 활성영역을 구성하는 26개의 아미노산에 대한 유전자 서열을 5반복으로 중복 합성하여 1반복에 비하여 훨씬 과량의 재조합 멜리틴 단백질을 생산하고자 하였다. 그리고 5반복의 멜리틴이 재조합된 누에실크에서 1반복 멜리틴의 분리정제를 용이하게 하기위하여 멜리틴 유전자 사이에는 Cyanogen bromide(CNBr)의 인식 아미노산인 methionine(M)을 삽입하여 최종적으로 M-Melittin-M-Melittin-M-Melittin -M-Melittin-M-Melittin-M 을 합성하였다.

```

atgaaattcttagtcaacggtgcccttgtttttatggtogtgtacatttcttacatctat
M K F L V N V A L V F M V V Y I S Y I Y
gcgggccctgaaaccggaaccggcaccagagccagaggcggaggcagacgcggaggcagat
A A P E P E P A P E P E P E A E A D A E A D

```

ccggaagcgggaattggagcagttctgaaggtattaaccacaggattgcccgcctcata
 P E A G I G A V L K V L T T G L P A L I
 agttggattaaacgtaagaggcaacagggttag
 S W I K R K R Q Q G -

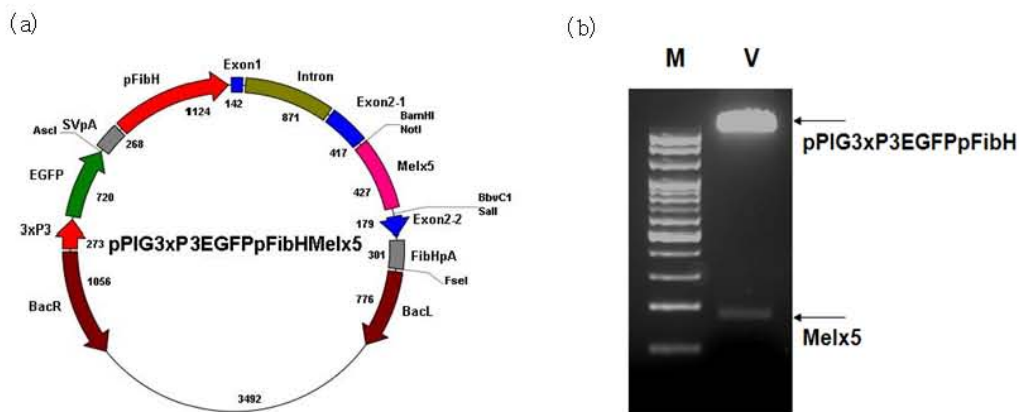
(그림 설명) 꿀벌 봉독 유래 melittin 유전자의 cDNA ORF 서열. 밑줄은 각각 개시코돈(ATG)와 종결코돈(TAA)를 나타냄. 빨간색 글씨는 melittin 유전자의 신호서열(signal peptide sequence)을 나타내며, 파란색 글씨는 melittin 유전자의 활성영역 서열을 나타냄.

agcggccgcgatgggaattggagcagttctgaaggtattaaccacaggattgcccgcctc
 M G I G A V L K V L T T G L P A L
 ataagttggattaaacgtaagaggcaacagatgggaattggagcagttctgaaggtatta
 I S W I K R K R Q Q M G I G A V L K V L
 accacaggattgcccgcctcataagttggattaaacgtaagaggcaacagatgggaatt
 T T G L P A L I S W I K R K R Q Q M G I
 ggagcagttctgaaggtattaaccacaggattgcccgcctcataagttggattaaacgt
 G A V L K V L T T G L P A L I S W I K R
 aagaggcaacagatgggaattggagcagttctgaaggtattaaccacaggattgcccgc
 K R Q Q M G I G A V L K V L T T G L P A
 ctcataagttggattaaacgtaagaggcaacagatgggaattggagcagttctgaaggt
 L I S W I K R K R Q Q M G I G A V L K V
 ttaaccacaggattgcccgcctcataagttggattaaacgtaagaggcaacagatgctt
 L T T G L P A L I S W I K R K R Q Q M
 cagcag

(그림 설명) Melittin 유전자의 활성영역 만을 5반복으로 중복 합성한 유전자 염기서열. 멜리틴 활성영역 사이에는 Cyanogen bromide(CNBr)의 인식 아미노산인 methionine(M)을 삽입함. 밑줄은 fibroin heavy chain 유전자 내 클로닝을 위한 제한효소 NotI 및 BbvCI의 인식서열을 각각 나타냄.

(2) Fibroin heavy chain 유전자 내 5반복 melittin 유전자가 융합된 형질전환용 전이벡터 제작
 누에 실크의 주성분인 fibroin에서 melittin 단백질이 발현되는 형질전환 누에를 제작하기 위해, 피브로인 프로모터와 5반복의 melittin 유전자 활성영역을 누에 형질전환용 전이벡터인 piggyBac에 도입하여 제작하였다. 먼저 fibroin heavy chain (Fib-H) 프로모터를 얻기 위해서, 1,124bp 프로모터 서열과 1,430 bp N-말단에 Fib-H 유전자(AF226688의 nt 61,312 - 63,870)의 인트론(972 bp)이 포함된 단편은 누에에서 분리된 게놈(genomic) DNA와 프라이머들(pFibHN-F: 5'-GGCGCGCCGTGCGTGATCAGGAAAAAT-3'(27mer)) 및 (pFibHN-R: 5'-TGCACCGACTGCAGCACTAGTGCTGAA-3'(27mer))을 사용하여 PCR로 증폭하였고, pGEM-T Easy Vector System(Promega, Madison WI)에 클로닝하였다. 완성된 플라스미드는 'pGEMT-pFibH-NTD'로 명명하였다. Fib-H gene ORF의 180bp 3' 말단과 Fib-H 유전자(AF226688의 nt 79,021 - 80,009)의 300bp 3' 영역이 포함된 단편은 누에에서 분리한 게놈 DNA와 프라이머들(pFibHC-F: 5'-AGCGTCAGTTACGGAGCTGGCAGGGGA-3'(27mer)) 및 pFibHC-F: 5'-TATAGTATTCTTAGTTGAGAAGGCATA-3'(27mer))을 사용하여 PCR로 증폭하

였고, pGEM-T Easy Vector System(Promega, USA)에 클로닝하였다. 완성된 플라스미드는 'pGEMT-CTD'로 명명하였다. 이어서, 'pGEMT-pFibH-NTD'는 Asc I 및 BamH I으로, 'pGEMT-CTD'는 Sal I 및 Fse I으로 각각 제한효소 처리함으로써 단편들을 준비하였다. 이들 단편들은 Apa I 및 Not I으로 제한효소 처리된 pBluescriptII SK(-) vector(Stratagene, CA)에 함께 클로닝하였고, 'pFibHNC-null'로 명명하였다. 종결코돈 없는 Melitin x 5 유전자는 유전자 합성과정(Bioneer, Korea)을 이용하여 제작하였고, pGEM-T easy벡터(Promega Co.)에 클로닝하였다. 상기 플라스미드는 Not I 및 BbvC I으로 제한효소 처리하였고, 분리된 단편은 Not I 및 BbvC I으로 제한효소 처리된 'pFibHNC-null'에 클로닝하였다. 완성된 플라스미드는 'pFibHNC-Melitin x 5'로 명명하였다. 마지막으로, 'pFibHNC-Melitin x 5'를 Asc I 및 Fse I으로 제한효소 처리하여 분리된 단편을 Asc I 및 Fse I으로 제한효소 처리된 'pPIG3xP3-EGFP'에 클로닝하였다. 이때, 형질전환체를 선별하기 위한 마커 유전자로 EGFP 유전자를 사용하였고, 상기 EGFP 유전자의 조절 프로모터로는 3xP3 프로모터를 사용하였다. 완성된 플라스미드는 'pPIG3xP3EGFPpFibHMelx5'로 명명하였다.



(그림 설명) Fibroin heavy chain 유전자 내 5반복 melittin(Melx5) 유전자가 융합된 형질전환용 전이벡터 제작. (a), 5반복 melittin(Melx5) 유전자가 도입된 누에 형질전환용 전이벡터. (b), 제한효소 NotI/BbvCI 처리 후 누에 전이벡터 내 5반복 melittin(Melx5) 클로닝 확인. BacR, piggyBac right arm. BacL, piggyBac left arm. 3xP3, 곤충 홀눈(stemmata) 및 신경시스템 특이발현 프로모터. EGFP, 표지유전자(enhanced green fluorescent protein). SV40pA, simian virus 40 poly A. pFibH, fibroin heavy chain의 프로모터. Exon, fibroin heavy chain의 엑손. FibHpA, fibroin heavy chain의 poly A.

(3) 누에 초기배아 내 누에형질전환용 전이벡터(pPIG3xP3EGFPpFibHMelx5) 미세주입

(가) 누에 형질전환에 적합한 누에알 제조

본 실험에 사용한 누에품종은 농가보급 장려품종인 금옥잠(잠125 x 잠140)을 사용하였다. 금옥잠 역시 상기에서 형질전환에 사용한 백옥잠과 같은 2화성(곤충이 1년간에 몇 세대를 되풀이하는 성질) 품종으로써, 1년간 2번의 세대를 거치면 휴면상태(월년)에 들어간다. 따라서, 2화성 품종인 금옥잠을 형질전환에 적합한 비휴면상태로 만들기 위하여 방법은 상기에서 기술한 백옥잠과 동일한 방법으로 제조하였다. 제조한 금옥잠 누에알 1,800개를 대상으로 미세주입법에 의한 형질전환을 유도하였다.

(나) 누에 초기배아 내 전이벡터 미세주입

전이벡터 pPIG3xP3EGFPpFibHMeIx5와 helper plasmid HELPERA3PIG5-3(Voff)를 1 : 1의 농도 비율로 혼합한 다음, 이를 microinjector를 이용하여 제조한 금옥잠 누에알 1,020개에 미량주입하였다. 미량주입 방법은 상기에서 기술한 BmRelish1 유전자가 도입된 형질전환 제작 방법에 준하여 실시하였다.

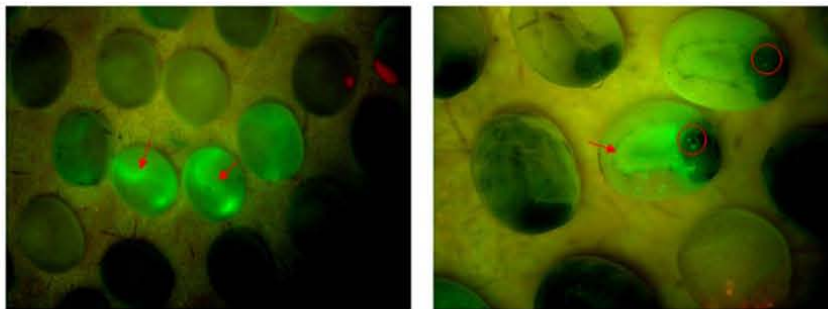
(4) Melittin 유전자가 도입된 누에 형질전환체 선발

(가) 형질전환 유도 G0 세대 사육 및 G1 세대 잠종 생산

누에 초기배아 내 전이벡터 미세주입에 의해 형질전환을 유도한 슬라이드글라스 내 G0 세대의 누에알은 약 10일 후부터 부화를 시작한다. 슬라이드글라스 상에서 부화유충을 약 3일 간 회수하여 부화율을 조사하였다. 형질전환을 유도한 총 1,800개의 누에알로부터 25%(446마리)의 G0 세대의 부화유충을 확보할 수 있다. 확보한 부화유충은 누에사육용 잠박으로 옮겨 사육을 하였으며, 최종적으로 성충(누에나방) 142마리를 확보하였다. 확보한 G0 세대의 성충은 상호교배를 통하여 G1 세대의 잠종 62아구를 확보하였다.

(나) 누에 형질전환체 선발 및 사육

확보한 G1 세대의 잠종 62아구로부터 형질전환누에 선발은 상기에서 기술한 BmRelish1 유전자가 도입된 형질전환 제작 방법에 준하여 실시하였다. 누에 형질전환체 선발 결과, 총 54아구로부터 표지유전자인 EGFP가 누에 배아의 5개의 홀눈(stemmata)과 신경시스템에서 뚜렷하게 발현되는 12개의 아구를 선발할 수 있었다.



(그림 설명) 곤충의 5개의 홀눈(stemmata)과 신경시스템에서 특이적으로 유전자를 발현하는 초파리 유래 3xP3 프로모터의 조절에 의해서 표지유전자인 EGFP가 누에의 5개의 홀눈과 신경시스템에서 뚜렷하게 발현되고 있음. 좌측 그림의 녹색 형광을 띄지 않는 누에알은 형질전환이 유도되지 않는 누에알을 나타냄. 화살표는 신경시스템을 원은 5개의 홀눈을 나타냄.

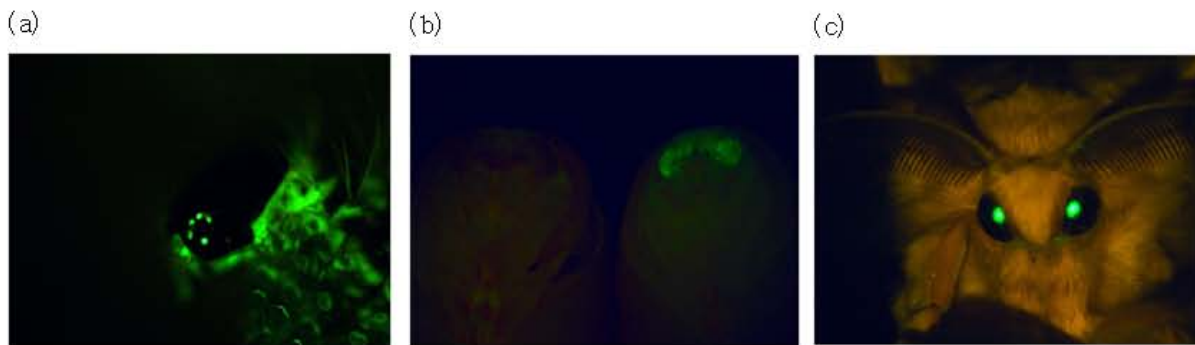
(표 설명) 누에알 내 전이벡터 pPIG3xP3EGFPpFibHMeIx5 미세주입 후 G0 및 G1 세대의 특성 분석

Transfer vector	No. of injected embryos(G0)	No. of hatched embryos(G0)	No. of batches examined(G1)	No. of batches with EGFP positive G1
pPIG3xP3EGFP-pFibHMeIx5	1,800	446	62	12

(다) 피브로인 유전자 내 5반복 Melittin 유전자 도입 G1 세대 형질전환누에 사육 및 특성 분석

① Melittin 유전자 도입 G1 세대 형질전환누에 선발 및 사육 특성

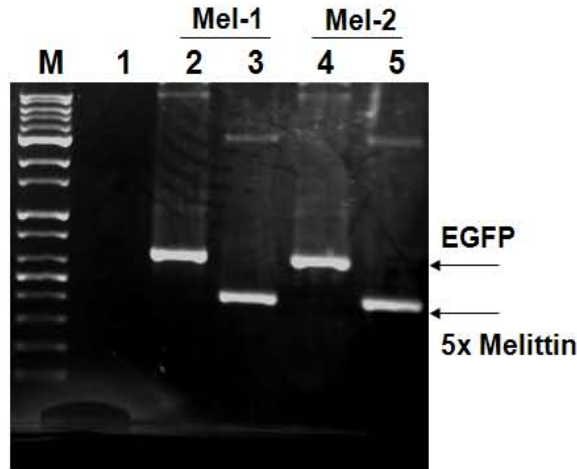
누에 형질전환체를 포함하고 있는 12개의 아구는 누에사육용 잠박에 개별로 분리하여 사육하였다. 분리 사육한 12개 아구의 누에는 비 형질전환체와 형질전환체가 혼재되어 있으므로 형질전환체 선발을 위하여 2령 2일까지 사육한 후, 전체 사육 누에를 대상으로 형광현미경 검경에 의해서 선발하였다. 형질전환체 선발은 누에 흘눈 내 표지유전자인 EGFP 발현 유무로 확인하였다. 22개 아구 내의 형질전환체 발생개체 수는 각 아구별로 차이가 있었는데 적게는 8개체부터 많게는 40여 개체 이상을 확인할 수 있었다. 이후 각 아구별로 선발한 누에 형질전환체는 아구별로 분리사육하여 번데기를 확보한 다음 번데기를 이용하여 형질전환 유무를 재차 확인하였다. 번데기의 형질전환 유무는 향후 성충의 눈으로 형성될 부분에 표지유전자인 EGFP 발현 유무를 형광현미경으로 검경하였다. 형광현미경 검경에 의해서 형질전환이 확인된 번데기는 성충(누에나방)까지 발생시킨 다음, 같은 아구 내 성충을 sib-mating하여 제 2세대(G2) 잡종을 확보하였다.



(그림 설명) 누에 피브로인 유전자 내 5반복 Melittin 유전자가 도입된 제1세대(G1) 형질전환누에의 표지유전자 EGFP 발현 특성분석. 곤충의 눈과 신경시스템에서 특이적으로 발현하는 3xP3 프로모터의 발현 조절에 의해서 EGFP 발현이 누에의 5개 흘눈에만 특이적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었음((a). 번데기(b)와 성충(누에나방)에서는 눈에서만 특이적으로 EGFP를 발현하는 것을 확인할 수 있음. (b)의 좌측은 정상누에를 우측은 형질전환누에를 나타냄. 정상누에에서는 EGFP 발현을 확인할 수 없는 반면에 우측 형질전환 누에 번데기의 눈 부분에서는 뚜렷한 EGFP 발현을 확인할 수 있음.

② 누에 게놈 내 5반복 Melittin 유전자 도입 확인

분리사육한 제1세대(G1) 누에 형질전환체 12개 아구의 강건성, 생존율, 우화율, 산란율 등을 고려하여 최종적 2개 아구만을 선정하였다. 선정된 2개의 아구 내 누에 개체를 대상으로 5반복의 Melittin 유전자 도입을 확인하였다. 최종 선정된 2개의 형질전환체 아구는 Mel-1과 -Mel-2로 명명하였다. 도입유전자인 EGFP와 5x melittin의 형질전환체 게놈 내 삽입 여부는 PCR로 확인하였다. 그 결과, 정상누에에서는 확인되지 않는 EGFP(720bp)와 5x melittin(426bp)에 해당하는 PCR product를 확인할 수 있어, 형질전환누에의 게놈 내에 도입유전자인 EGFP와 5x melittin이 정확하게 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다.



(그림 설명) 누에 형질전환체 계놈 내 EGFP 및 5x melittin 유전자 도입 확인. PCR에 의한 정상누에와 형질전환누에 라인(Mel-1, Mel-2)의 EGFP 및 5x melittin 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers. Lane 1, 정상누에. Lane 2, 3, 누에 형질전환라인 Mel-1. Lane 4, 5, 누에 형질전환라인 Mel-2.

③ 형질전환누에 계놈 내 5x melittin 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 결정

누에 형질전환체 계놈 내 EGFP 및 5x melittin 유전자의 도입이 확인된 형질전환 라인 Mel-1과 Mel-2에 대하여 5x melittin 유전자가 계놈 내 몇 copy로 존재하지와 몇 번 염색체에 도입되었는지를 확인하기 위하여 Inverse PCR를 다음과 같이 수행하였다. 먼저 형질전환 라인 Mel-1과 Mel-2으로부터 각각 genomic DNA를 분리한 다음, 제한효소 Sau3AI으로 처리하였다. 제한효소 Sau3AI로 절단된 genomic DNA는 T4 DNA ligase를 사용하여 self-ligation을 유도하고, 이를 주형으로 하여 Inv-F(ATCAGTGACACTTACCGCATTGACA)와 Inv-R(TACGCATGATTATCTTTAACGTA) 프라이머로 Inverse PCR를 수행하였다. Inverse PCR 결과로 증폭된 PCR product는 pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 다음, 삽입 단편에 대하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열에서 pPIG3xP3EGFPpFibHMelx5 전이벡터 (piggyBac) 서열을 제외한 염기서열만으로 Silkworm genome research program (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)을 이용하여 누에 염색체 내 삽입 위치를 결정하였다. 그 결과, 형질전환 라인 Rel-1과 Rel-2는 각각 1 copy로 존재하고 있었으며, 형질전환 라인 Mel-1는 전이벡터가 9번 염색체 상에 삽입되어 있었고 형질전환 라인 Mel-2는 전이벡터가 21번 염색체 상에 삽입되어 있었다.

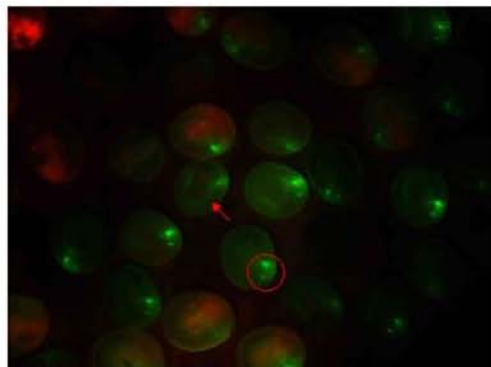
(표 설명) 형질전환누에 게놈 내 5x melittin 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 확인

G1 lines	5' junction- <i>piggyBac</i> -3' junction	No. of chromosome position
Mel-1	TCAATGTAATAAATTCTTCTTTGTGCGCTTTCTTCATTGCTGAAGGTCG TGTCCTGAAACTTGACCGTGGCCTGTCTCGTGAGCTGTTACCACTCGT CCGGTCCTCAGCTTCTCGAAAAAATATTGAAATATATTATATATAAT- <i>piggyBac</i> -TATGGAATTCATTCTGTATTATGTGATGTATATGAAAACAAACATC TTGTGCAAAGGGGTATCGTAGCTG	9
Mel-2	CGGTGAGAAACTCAGTGGGCTGTGTCTATGGG- <i>piggyBac</i> -TTTACTCGTC GAGCCCTTCGTCACAAGCGACGGGTTAGGCGAGGACGGTGACCGGTGCT TGAGGCACCTAAAAGAACCGTTAGTG	21

(라) 5x melittin 유전자 도입 G2 세대 형질전환누에의 발현 특성 분석

① 5x melittin 유전자 도입 G2 세대 형질전환누에 사육

형질전환누에 게놈 내 도입유전자의 copy 수 증가시킴으로서 재조합 melittin 단백질의 발현량을 향상시키기 위하여 선발한 형질전환누에 라인 Mel-1과 Mel-2를 상호교배 시켰다. 상호교배를 통하여 잡종을 확보한 다음, 형광현미경 검경으로 EGFP 발현을 확인하였다. 그 결과 일부를 제외한 거의 대부분의 누에 배아의 홑눈과 신경시스템에서 EGFP 발현을 확인할 수 있었다. 일부 비 형질전환체가 혼재된 것은 형질전환누에 라인 Mel-1과 Mel-2의 게놈 내에 외래유전자 각각 hetero로 존재하기 때문으로 사료된다.

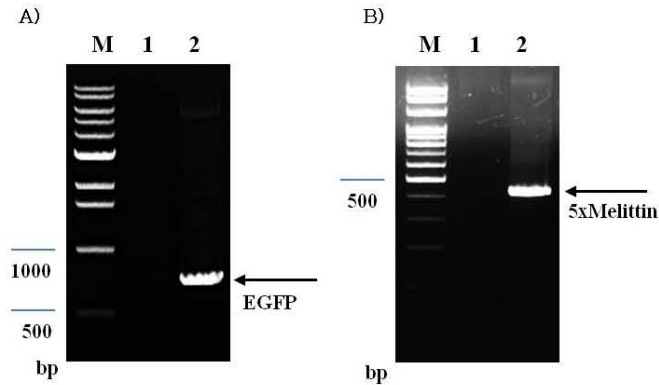


(그림 설명) 5x melittin 유전자 도입 제2세대(G0) 형질전환누에의 홑눈(원)과 신경시스템(화살표)에서 표지유전자 EGFP 발현확인.

② 5x melittin 유전자 도입 G2 세대 형질전환누에의 도입유전자 EGFP 및 5x melittin 전사체 발현 분석

형질전환누에 라인 Mel-1과 Mel-2를 상호교배하여 5령 3일까지 사육한 후 도입유전자 EGFP 및 5x melittin의 전사체 발현분석을 수행하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body를 각각 액체질소로 마쇄한 후 total RNA를 분리하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 합성한 1st-strand cDNA를 주형으로 EGFP와 5x melittin 유전자에 대하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, 정상누에에서는 어떠한 PCR product도 확

인할 수 없는 반면에 형질전환누에에서는 EGFP와 5x melittin 유전자의 전사체를 뚜렷하게 확인할 수 있었다.

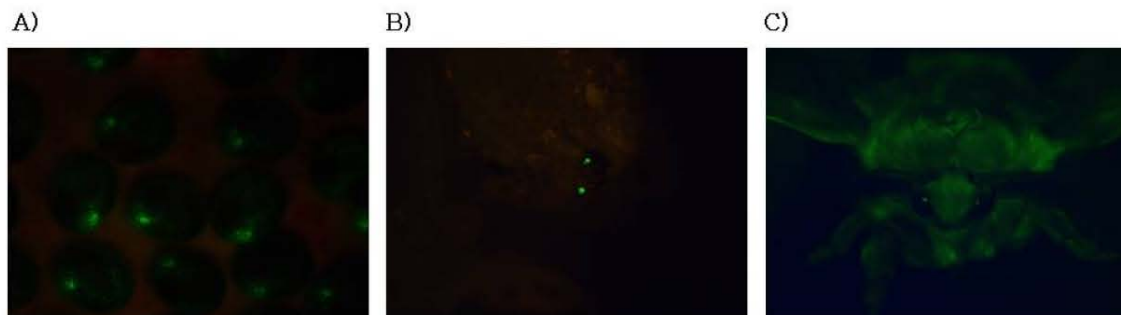


(그림 설명) G2 세대 형질전환누에의 도입유전자 EGFP 및 BmRelish1 전사체 발현 분석. RT-PCR에 의한 정상누에와 형질전환누에의 EGFP(A) 및 5x melittin(B) 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers. Lane 1, 정상누에. Lane 2, 형질전환누에.

(5) Melittin 항균펩타이드가 도입된 누에형질전환체 세대고정 및 특성분석

(가) 5세대 형질전환누에 선발

기존에 선발된 5세대 누에형질전환체를 Leica (USA)사의 LEICA MZ16FA 현미경 과 Leica (USA)사의 Microscope MZ FLIII Flourescence Filter GFP2 형광필터를 사용하여 재선발하였다. 형질전환체 선발은 산란 후 4일째부터 성충까지 지속적으로 형광현미경검경을 수행하였다. 그 결과, 모든 알에서 녹색형광을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과에서 Melittin 전사인자가 도입된 누에형질전환체의 계대사육이 정확하게 이루어지고 있음을 알 수 있다.



(그림 설명) 제5세대(G5) 형질전환누에의 표지유전자 EGFP 발현 특성분석. 곤충의 눈과 신경시스템에서 특이적으로 발현하는 3xP3 프로모터의 발현 조절에 의해서 EGFP 발현이 누에의 5개 출눈에만 특이적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었음 (A, B). 그리고 성충(C)에서는 누에서만 EGFP 형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었음.

(나) 형질전환누에 계놈 내 Melittin 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 확인

누에 형질전환체 계놈 내 Melittin 유전자의 도입이 확인된 형질전환체에 대하여 Melittin 유전자가 계놈 내 copy 수와 염색체 위치를 확인하기 위하여 Inverse PCR를 다음과 같이

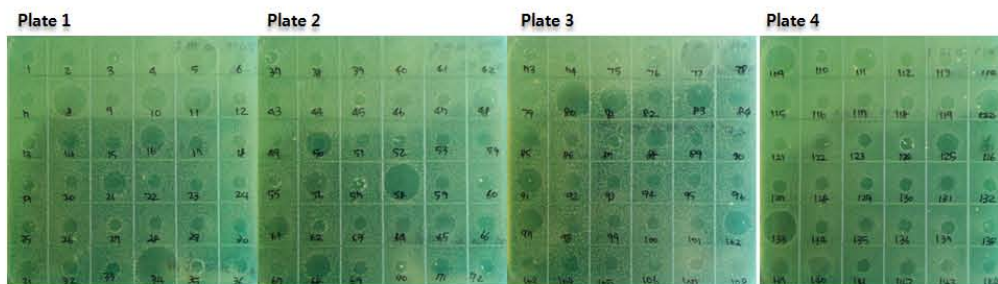
수행하였다. 먼저 형질전환체로부터 genomic DNA를 분리한 다음, 제한효소 Sau3AI으로 처리하였다. 제한효소 Sau3AI로 절단된 genomic DNA는 T4 DNA ligase를 사용하여 self-ligation을 유도하고, 이를 주형으로 하여 5' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5'-ATCAGTGACACTTACCGCATTGACA-3' (25 mer) 와 antisense primer는 5'-TGACGAGCTTGTGGGTGAGGATTCT-3' (25mer)을 사용하였고, 3' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5' -TACGCATGATTATCTTTAACGTA-3' (23 mer)와 antisense primer는 5' -GGGGTCCGTCAAAACAAAACATC-3' (23 mer)를 사용하여 Inverse PCR를 수행하였다. Inverse PCR 결과로 증폭된 PCR product는 pGEM-T easy 벡터에 클로닝 한 다음, 삽입 단편에 대하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열에서 pPIG3xP3EGFPpFibHMeIx5 전이벡터(piggyBac) 서열을 제외한 염기서열만으로 Silkworm genome research program(<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)을 이용하여 누에 염색체 내 삽입 위치를 결정하였다. 그 결과, pPIG3xP3EGFPpFibHMeIx5 형질전환체누에는 1 copy로 존재하고 있었으며, 전이벡터가 9번 염색체 상에 삽입되어 있는 것을 재확인할 수 있었다.

(표 설명) 형질전환누에 게놈 내 Melittin 유전자의 도입 확인

5' junction- <i>piggyBac</i> -3' junction	No. of chromosome position
TCAATGTA AAAAATTCTTCTTTGTGCGTTTCTTCATTGCTGAAGGTCGTGTCCTGAAACTTGACCGTGGCTGTCTCGTAGCTGTTACCACCTCGTCCGGTCTCAGCTTCTCGAAAAATA TTGAAATATATTATATAAAT- <i>piggyBac</i> -TATGGAATTCATTCCTGTATTATGTGATGTATATG AAAACAAACATCTTGTGCCAAAGGGGTATCGTAGCTG	9

(다) 항균활성을 이용하여 항균활성이 높은 형질전환누에 선발

항균펩타이드 Melittin에 대한 항균활성을 측정하기 위해, 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법을 이용하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body에서 체액을 채취 한 후 90℃에서 10분간 열처리하여 얼음에 10분간 반응시킨다. 이렇게 전처리가 완료된 시료는 원심분리하여 상층액만 분리한 후 항균활성 검정에 사용하였다. 항균활성검정에 사용된 균주는 그람음성 세균인 *E. coli* (KACC 1039)에 대하여 항균활성을 배지상에서 가시화하여 검정하였고, 검정에 사용된 총시료는 144개를 검정하였다. 그 결과, 항균활성 정도를 clear zone을 기준으로 3등급으로 나누어 분류하였고, 그 중에서 8마리의 누에를 선발 할 수 있었다. 이렇게 선발된 누에는 계대사육을 통하여 항균활성이 높은 품종으로 선별하였다.



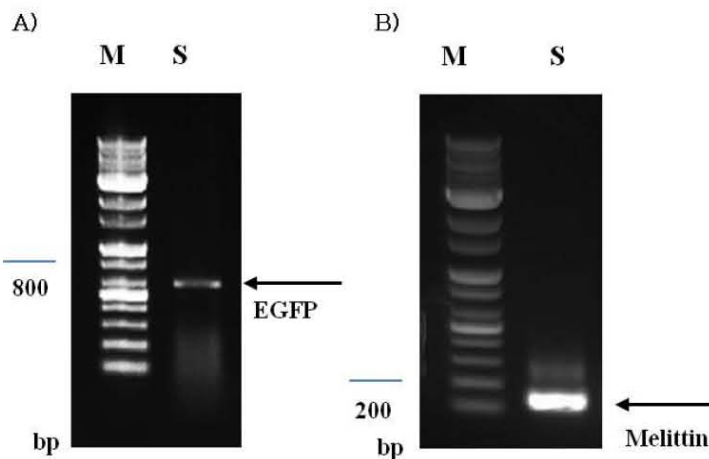
(그림 설명) 그람음성균인 E.coli에 대해 항균활성검정. 제5세대(G5) 5령3일 형질전환누에 유충에서 체액을 분리하여 항균활성검정을 검정하였다. Melittin, 형질전환누에의 체액(10μl) 사용

(표 설명) 항균활성검정을 이용하여 5세대 형질전환체 분류

항균활성	강	중	약	없음
마리수	8	14	13	109

(라) 제6 세대 누에형질전환체의 도입유전자 EGFP 및 melittin 전사체 발현 분석

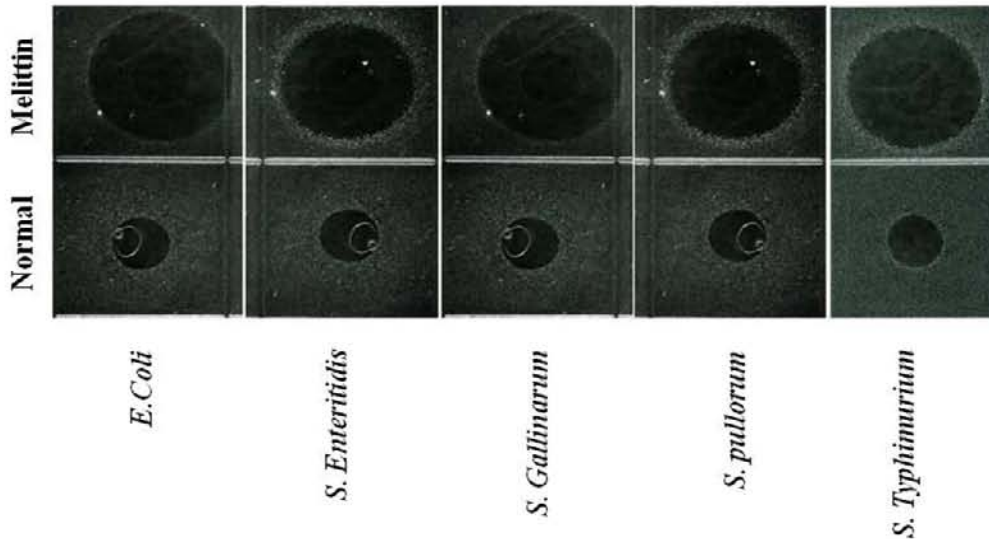
선발된 누에형질전환체들을 5령 3일까지 사육한 후 도입유전자 EGFP 및 melittin의 전사체 발현분석을 수행하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body를 각각 액체질소로 마쇄한 후 total RNA를 분리하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 합성한 1st-strand cDNA를 주형으로 EGFP (720 bp)와 melittin (135 bp) 유전자에 대하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, EGFP와 melittin 유전자의 전사체를 뚜렷하게 확인할 수 있었다.



(그림 설명) G6 세대 형질전환누에의 도입유전자 EGFP 및 melittin 전사체 발현 분석. RT-PCR에 의한 정상누에와 형질전환누에의 EGFP(A) 및 melittin(B) 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers; S, 형질전환누에.

(마) G6 세대 형질전환누에의 항균활성 검정

G6 세대 누에형질전환체를 5령 3일까지 사육한 후 항균펩타이드 melittin에 대한 항균활성을 측정하기 위해, 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법을 이용하였다. 항균활성검정에 사용된 균주는 일차적으로 그람음성 세균인 병원성 *E. coli* (KACC 1039) 및 *Salmonella* 균 (4종)에 대하여 항균활성을 배지상에서 가시화하여 검정하였다. 그 결과, 그 결과, melittin은 *E. coli* 와 4종의 살모넬라균들에 대해서 높은 항균활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.



(그림 설명) 그람음성균인 *E. coli*와 4종의 살모넬라균에 대해 항균활성검정. 제6세대(G6) 5령3 일 형질전환누에 유충에서 체액을 분리하여 항균활성검정을 검정하였다. Normal, 정상누에의 체액(10 μ l); Melittin, 형질전환누에의 체액(10 μ l). 4종의 살모넬라균; *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*.

다. 누에 은몸에서 항균펩타이드(BmCecB1)를 생산하는 형질전환누에 개발

(1) 누에 유래 BmCecropin B1 (BmCecB1) 항균펩타이드 전체 cDNA 및 활성영역 분리

곤충에서 항균 peptide는 크게 곤충 체내로 분비되는 peptide와 체외로 분비되는 peptide로 구분된다. 그 중에서 cecropin은 곤충의 체내로 분비되는 peptide로써 gram 음성균에는 강한 항균활성을 나타내지만 gram 양성균에는 다소 약한 항균활성 활성을 나타낸다. Cecropin은 1980년대에 *Hyalophora cecropia*에서 발견되어 cecropin A, B로 명명된 뒤 10여 종 이상이 다른 곤충들에서도 발견되어졌다. Cecropin은 약 30개 이상의 아미노산으로 이루어져 있고 강한 열기성을 띤 양쪽성 성질을 가진 N-terminal 부분과 소수성 성질을 가진 C-terminal 부분이 hinge 부분으로 연결되어 있다. 또한 cecropin은 폐지의 소장 상피 세포에서도 발견된 바 있어 생물계에 널리 분포되어 있는 형태의 peptide일 것으로 추정되고 있다. 따라서 본 연구에서는 1992년 Taniai 등이 누에 유충의 지방체에서 분리한 cecropin인 BmCecB1을 과량 발현하는 형질전환누에를 제작함으로써 항균펩타이드인 cecropin B1을 대량생산하는 형질전환누에를 개발하고자 하였다. 누에 유래 BmCecB1 유전자의 ORF (open reading frame)는 누에로부터 cDNA를 합성한 후 RT-PCR로 확보하였다. 그리고 Taniai 등(1992)이 보고한 BmCecB1의 활성영역은 BmCecB1 ORF를 주형으로 하고, Not I (GCGGCCGC)/Afl II (CTTAAG) 제한효소 서열을 부가하여 PCR로 확보하였다.

```

ATGAATTTTCGCAAAGATCCTATCCTTCGTCCTCGCTCTGGTGCTGGCTTTGAGCATGACC
M N F A K I L S F V F A L V L A L S M T
AGCGCTGCTCCCGAGCCCAGGTGGAAGATCTTCAAGAAAATGAAAAAATGGGCAGGAAC
S A A P E P R W K I F K K I E K M G R N
ATTGCTGAOCGCATCGTCAAAGCGGGCCCGCGATCGAGGTCCTTGGTTCGGCTAAAGCT

```

I R D G I V K A G P A I E V L G S A K A
 ATAGGAAAATGA
 I G K -

(그림 설명) 누에 유래 BmCecB1 유전자 전체 cDNA 및 활성영역 염기서열. 밑줄은 각각 개시 코돈(ATG)와 종결코돈(TAA)을 나타내며, 초록색 글씨는 BmCecB1 유전자의 signal peptide 서열을 나타낸다. 붉은색 글씨는 BmCecB1 유전자의 활성영역 서열을 나타내며, 전체 BmCecB1 cDNA의 ORF는 192개의 염기로 구성되어 있고, 이중 105개의 염기(연역 아미노산 35개)가 BmCecB1 cDNA의 활성영역을 나타낸다.

GCGGCCGCAGGTGGAAGATCTTCAAGAAAATTGAAAAATGGGCAGGAACATTCGTGACGGCATCGTC
 R W K I F K K I E K M G R N I R D G I V
 AAAGCGGGCCCGCATCGAGGTCCTTGGTTTCGGCTAAAGCTATAIAACTTAAG
 K A G P A I E V L G S A K A I

(그림 설명) 누에 유래 BmCecB1 유전자 활성영역만을 누에 형질전환용 전이벡터의 NotI과 AflII 제한효소 사이에 도입하여 위하여 5' 말단에 제한효소 Not I의 인식서열을 GCGGCCGC 부가하고, 3' 말단에는 활성영역을 종결시키기 위하여 종결코돈 TAA와 제한효소 Afl II의 인식서열을 CTTAAG 부가하여 PCR로 증폭하였다.

또한 본 연구에서는 BmCecB1 펩타이드의 활성영역을 소포체(endoplasmic reticulum, ER)로의 이동을 원활하게 하기 위하여 누에 유래의 소포체 거주 단백질(ER-resident protein)인 단백질 이황화물 이성질화효소(protein disulfide isomerase, bPDI)의 signal peptide (bPDIsp)를 사용하고 하였다. 이를 위하여 누에로부터 1st cDNA를 합성한 후에 bPDI 유전자의 ORF를 증폭하고, 다시 이를 주형으로 하여 5' 말단에는 제한효소 Nhe I의 인식서열인 GCTAGC를 부가하고, 3' 말단에는 제한효소 Not I의 인식서열인 GCGGCCGC를 부가한 다음, bPDI의 signal peptide를 PCR로 증폭하여 확보하였다.

GCTAGCATGCGTGTITTTAATTTTCACGGCTATAGCCCTGCTAGGGCTCGCTCTCGCGGCCGC
 M R V L I F T A I A L L G L A L G

(그림 설명) 누에 유래 PDI의 signal peptide 염기서열. bPDI의 signal peptide는 51개의 염기(연역 아미노산 17개)로 구성되어 있다. 파란색 글씨는 각각 Not I 과 Afl II 제한효소의 인식서열을 나타낸다.

이러한 과정으로 확보된 Nhe I-bPDI signal peptide-Not I의 PCR product와 Not I-BmCecB1 active region-Afl II의 PCR product를 순차적으로 pGEM-T-easy vector (Promega)에 클로닝 함으로서 두 유전자를 융합하였다.

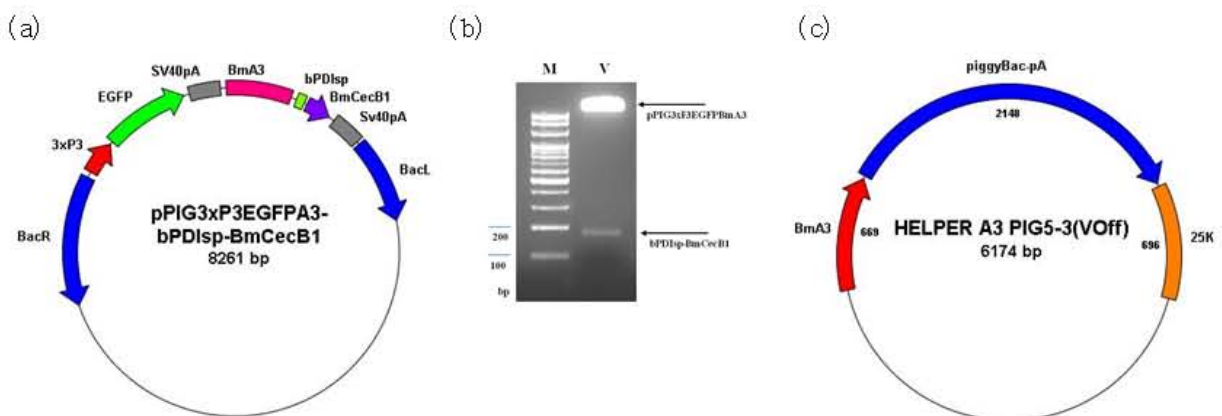
GCTAGCATGCGTGTITTTAATTTTCACGGCTATAGCCCTGCTAGGGCTCGCTCTCGCGGCCGCAGG
 M R V L I F T A I A L L G L A L G G R R
 TGGAAGATCTTCAAGAAAATTGAAAAATGGGCAGGAACATTCGTGACGGCATCGTCAAA
 W K I F K K I E K M G R N I R D G I V K
 GCGGGCCCGCATCGAGGTCCTTGGTTTCGGCTAAAGCTATAIAACTTAAG

A G P A I E V L G S A K A I -

(그림 설명) 누에 유래 PDI의 signal peptide와 BmCecB1 활성영역을 결합한 염기서열. 파란색 글씨는 각각 Afl II, Not I 및 Nhe I의 제한효소 염기서열을 나타낸다. 밑줄은 bPDI의 signal peptide 염기서열 영역을 나타내며, 붉은색 글씨는 BmCecB1 유전자의 활성영역 서열을 나타낸다.

(2) 누에 유래 bPDIsp-BmCecB1 유전자가 도입된 누에 형질전환용 전이벡터 제작

bPDIsp-BmCecB1 유전자를 국립농업과학원에서 제작하여 보유하고 있는 누에 형질전환용 전이벡터인 pPIG3xP3EGFPBmA3의 누에 액틴3 프로모터(BmA3) 하류에 클로닝하였다. 먼저, PDIsp-BmCecB1-pGEM-T vector에서 Nhe I/Afl II로 제한효소 처리하여 bPDIsp-BmCecB1 유전자를 분리 및 정제하였다. 그리고 pPIG3xP3EGFPBmA3 전이벡터도 Nhe I/Afl II로 제한효소 처리한 후 이미 준비된 bPDIsp-BmCecB1 유전자를 클로닝하였다. 완성된 형질전환용 전이벡터는 pPIG3xP3EGFPBmA3-bPDIsp-BmCecB1으로 명명하였다. 제작한 전이벡터는 pUC18 벡터를 기본 벡터로 하고 있으며, 양쪽에는 HELPERA3PIG5-3(Voff) helper plasmid 내에 도입된 piggyBac 전이인자(transposon)의 인식서열인 piggyBac right arm(BacR)과 piggyBac left arm(BacL)을 도입하였다. 누에 형질전환체 선발을 위해서는 누에 홑눈(stemmata)과 신경시스템에서 특이적으로 유전자의 발현을 조절하는 초파리 유래 3xP3 프로모터 하류에 표지유전자인 EGFP를 도입하였다. 완성된 형질전환용 전이벡터는 완성된 pPIG3xP3EGFPBmA3-bPDIsp-BmCecB1 전이벡터 네 도입유전자인 bPDIsp-BmCecB1이 정확하게 삽입되었는지를 확인하기 위해 제한효소 Nhe I과 Afl II로 double digestion한 결과, 163bp 크기의 bPDIsp-BmCecB1 유전자를 확인할 수 있었다.



(그림 설명) bPDIsp-BmCecB1 유전자가 도입된 누에 형질전환용 전이벡터 제작. (a), bPDIsp-BmCecB1 유전자가 도입된 전이벡터.(b), 제한효소 Nhe I/Afl II 처리 후 누에 전이벡터 내 bPDIsp-BmCecB1 클로닝 확인. (C) piggyBac 전이인자가 도입된 helper plasmid. BacR, piggyBac right arm. BacL, piggyBac left arm. 3xP3, 곤충 홑눈(stemmata) 및 신경시스템 특이발현 프로모터. EGFP, 표지유전자 (enhanced green fluorescent protein). SV40pA, simian virus 40 poly A.

(3) 누에 초기배아 내 누에형질전환용 전이벡터 미세주입

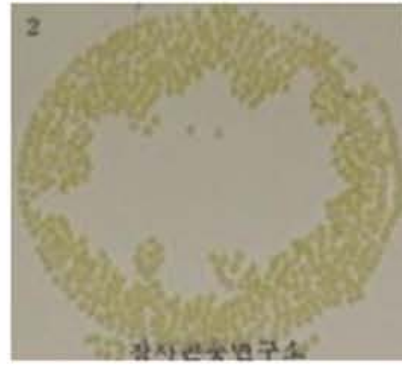
(가) 누에 형질전환에 적합한 누에알 제조

본 실험에 사용한 누에품종은 농가보급 장려품종인 백옥잠(잠123 x 잠124)을 사용하였다. 백옥잠은 2화성(곤충이 1년간에 몇 세대를 되풀이하는 성질) 품종으로써, 1년간 2번의 세대를 거치면 휴면상태(월년)에 들어간다. 따라서, 2화성 품종인 백옥잠을 형질전환에 적합한 비휴면 상태로 만들기 위하여 산란 후 4시간 이내의 수정란을 25℃에서 30분 동안 염산 처리를 하였다. 염산 처리 후 흐르는 물에 30분간 세척한 후, 슬라이드 글라스에 누에 배아의 배면부와 복면부가 한 방향으로 일정하게 되도록 배열하였다. 이때 1장의 슬라이드글라스 내에는 4열로 15개씩 60개의 알을 부착하였으며, 전체 600개의 누에알을 대상으로 미세주입법에 의한 형질전환을 유도하였다.

(a)



(b)

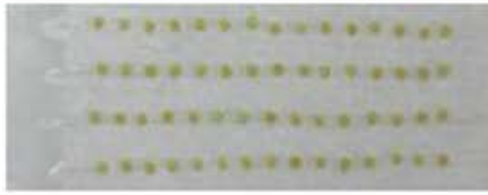


(그림 설명) 누에 형질전환에 사용되는 누에알 제조. (a) 백옥잠의 누에알을 만들기 위해 잠124의 숫나방과 잠123의 암나방을 서로 교배한다. (b) 교배 후 1시간 동안 잠123 암나방이 산란한 누에알.

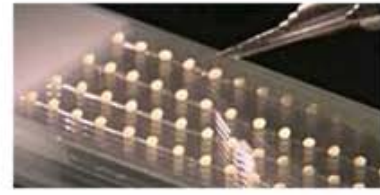
(나) 누에 초기배아 내 전이벡터 미세주입

pPIG3xP3EGFPA3-bPDIsp-BmCecB1 전이벡터와 HELPERA3PIG5-3(Voff)Helper plasmid의 농도비는 1 : 1의 비율로 사용하였고, microinjection용 완충용액 (5mM KCl, 0.5mM phosphate buffer, pH 7.0)에 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 희석하였다. 누에 초기배아의 microinjection 위치는 예측되는 초기배의 배면 부분에 주사하였다. 먼저 텅스텐 침으로 누에알에 작은 구멍을 뚫고, 이 구멍에 DNA 용액이 들어있는 microcapillary의 끝을 삽입 후, microinjector의 공기압을 이용하여 DNA 용액을 알 속으로 주입하였다. 이때 각 초기배에 주입된 DNA 용액의 양은 10~15nl가 사용되었고, 난각에 생긴 구멍은 Cyanocrylate 성분이 함유된 접착제(Henkel, Germany)를 사용하여 막았다. 미세주사 후 누에알은 보습한 패트리디쉬에 넣어서 25℃에서 부화할 때까지 보호하였다.

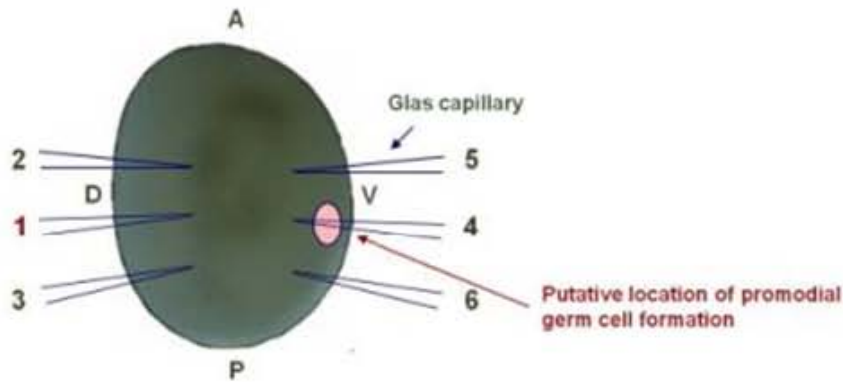
(a)



(b)



(c)



(그림 설명) 누에 초기배아 내 누에형질전환용 전이벡터 미세주입. (a), 산란 후 4시간 이내의 누에알을 슬라이드글라스 내 누에 배아의 배면부와 복면부가 한 방향으로 일정하게 되도록 4 × 15개 (=60개) 배열. (b), 1차 텅스텐 needle로 누에알의 난각에 미세구멍을 뚫고, 이 구멍에 DNA 용액이 들어있는 microcapillary의 끝을 삽입 후, microinjector의 공기압을 이용하여 DNA 용액을 알 속으로 주입. (c), 누에알의 미세주입 위치는 배면과 누에알 아래쪽의 2/3 지점으로서 생식세포가 형성되는 위치. A, 정공부. P, 알의 아래쪽 부분. D, 동쪽 부분. V, 배쪽 부분.

(4) BmCecB1 유전자가 도입된 누에 형질전환체 선발

(가) 형질전환 유도 G0 세대 사육 및 G1 세대 잡종 생산

누에 초기배아 내 전이벡터 미세주입에 의해 형질전환을 유도한 슬라이드글라스 내 G0 세대의 누에알은 약 10일 후 부터 부화를 시작한다. 슬라이드글라스 상에서 부화유충을 약 3일간 회수하여 부화율을 조사하였다. 형질전환을 유도한 총 600개의 누에알로부터 47마리(7.8%)의 G0 세대의 부화유충을 확보할 수 있다. 확보한 부화유충은 누에사육용 잡막으로 옮겨 사육을 하였으며, 최종적으로 성충(누에나방) 36마리를 확보하였다. 확보한 G0 세대의 성충은 상호교배를 통하여 G1 세대의 잡종 17아구를 확보하였다.

(a)



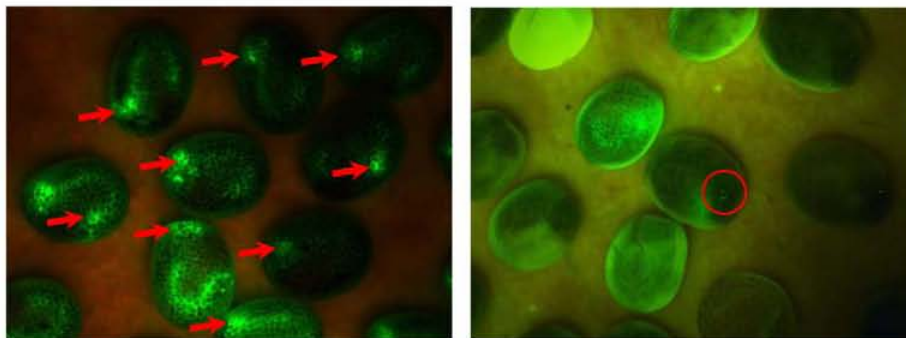
(b)



(그림 설명) 형질전환 유도 G0 세대 사육 및 G1 세대 잠충 생산. (a), 형질전환을 유도한 G0 세대의 슬라이드글라스 위에서 부화하고 있는 모습을 나타냄. (b), 부화한 G0 세대의 유충을 성충(누에나방)까지 사육한 다음 상호교배를 통하여 G1 세대의 잠충을 확보함

(나) 누에 형질전환체 선발 및 사육

확보한 G1 세대의 잠충 17아구로부터 누에 형질전환체는 Leica (USA)사의 LEICA MZ16FA 현미경과 Leica (USA)사의 Microscope MZ FLIII Flourescence Filter GFP2 형광필터를 사용하여 선발하였다. 형질전환체 선발은 산란 후 4일째부터 부화 직전까지 지속적으로 형광현미경검경을 수행하여 선발하였다. 그 결과, 총 17아구로부터 표지유전자인 EGFP가 누에 배아의 5개의 홀눈(stemmata)과 신경시스템에서 뚜렷하게 발현되는 4개의 아구를 선발할 수 있었다.



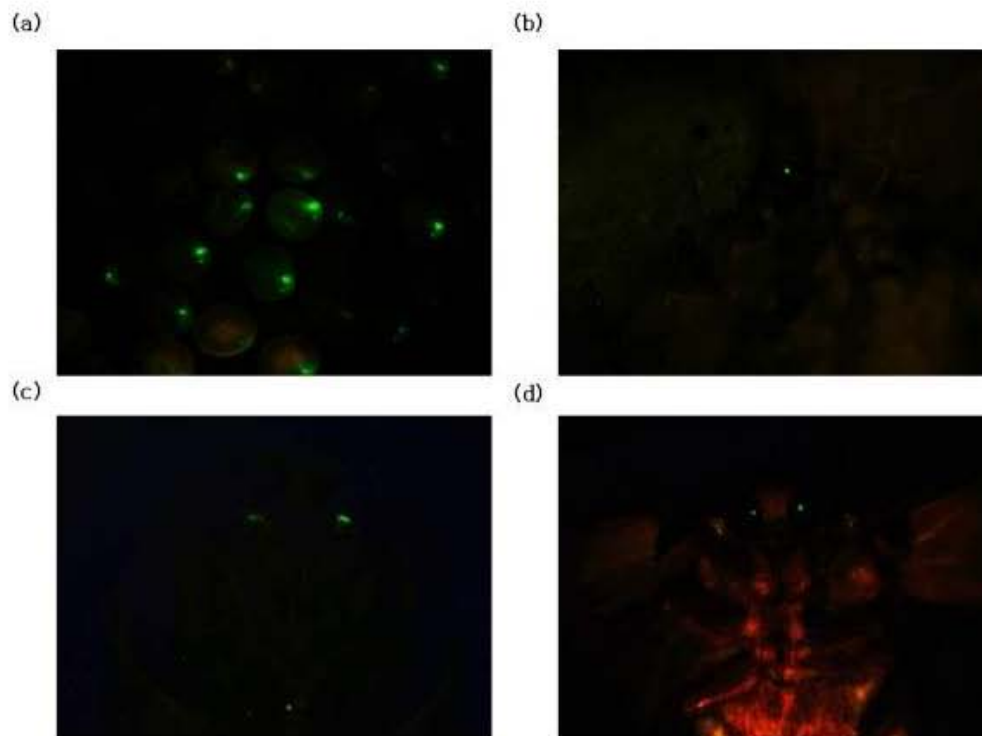
(그림 설명) 곤충의 5개의 홀눈(stemmata)과 신경시스템에서 특이적으로 유전자를 발현하는 초파리 유래 3xP3 프로모터의 조절에 의해서 표지유전자인 EGFP가 누에의 5개의 홀눈과 신경시스템에서 뚜렷하게 발현되고 있음. 좌측 그림의 녹색 형광을 띄지 않는 누에알은 형질전환이 유도되지 않음. 화살표는 신경시스템을 원은 5개의 홀눈을 나타냄.

(표 설명) 누에알 내 전이벡터 pPIG3xP3EGFPA3-bPDlsp-BmCecB1 미세주입 후 G0 및 G1 세대의 특성분석

Transfer vector	No. of injected embryos(G0)	No. of hatched embryos(G0)	No. of Broods with EGFP positive larvae	G1 broods with EGFP positive larvae
pPIG3xP3EGFP-A3-bPDlsp-BmCedB1	600	47	4	23.5

(다) G1 세대 형질전환누에 사육 및 특성 분석

누에 형질전환체를 포함하고 있는 4개의 아구는 누에사육용 잠박에 개별로 분리하여 사육하였다. 분리 사육한 4개 아구의 누에는 비 형질전환체와 형질전환체가 혼재되어 있으므로 형질전환체 선발을 위하여 2령 2일까지 사육한 후, 전체 사육 누에를 대상으로 형광현미경 검경에 의해서 선발하였다. 형질전환체 선발은 누에 흘눈 내 표지유전자인 EGFP 발현 유무로 확인하였다. 4개 아구 내의 형질전환체 발생개체 수는 각 아구별로 차이가 있었는데 적게는 4개체부터 많게는 20개체 이상을 확인할 수 있었다. 이후 각 아구별로 선발한 누에 형질전환체는 아구별로 분리사육하여 번데기를 확보한 다음 번데기를 이용하여 형질전환 유무를 재차 확인하였다. 번데기의 형질전환 유무는 향후 성충의 눈으로 형성될 부분에 표지유전자인 EGFP 발현 유무를 형광현미경으로 검경하였다. 형광현미경 검경에 의해서 형질전환이 확인된 번데기는 성충(누에나방)까지 발생시킨 다음, 같은 아구 내 성충을 sib-mating하여 제 2세대(G2) 잠종을 확보하였다.



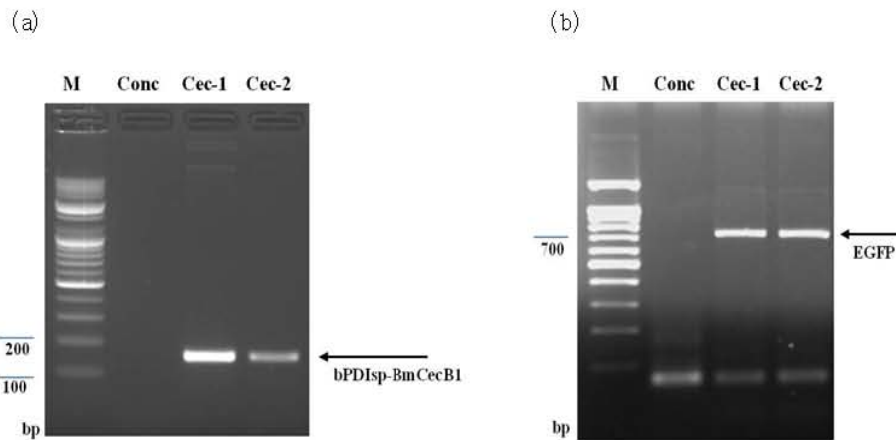
(그림 설명) 제1세대(G1) 형질전환누에의 표지유전자 EGFP 발현 특성분석. 곤충의 눈과 신경시스템에서 특이적으로 발현하는 3xP3 프로모터의 발현 조절에 의해서 EGFP 발현이 누에의 5개 흘눈에만 특이적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었음(a, b). 번데기(c)와 성충(d)에서는 눈에서만 특이적으로 EGFP를 발현하는 것을 확인할 수 있음.

(5) BmCecB1 유전자가 도입된 형질전환누에 특성 분석

(가) 누에 계놈 내 BmCecB1 유전자 도입 확인

분리사육한 제1세대(G1) 누에 형질전환체 4개 아구의 강건성, 생존율, 우화율, 산란율 등을 고려하여 최종적 2개 아구 만을 선정하였다. 선정된 2개의 아구내 누에 개체를 대

상으로 BmCecB1 유전자 도입을 확인하였다. 선정된 2개의 형질전환체 아구는 Cec1-1과 Cec1-2로 명명하였다. 도입유전자인 EGFP와 BmCecB1의 형질전환체 게놈 내 삽입 여부는 PCR로 확인하였다. 이때, BmCecB1 유전자 도입 확인은 비형질전환체인 정상 누에도 BmCecB1 유전자를 보유하고 있어 bPDIsP (49bp)와 BmCecB1 (105bp) 유전자를 포함하는 서열의 PCR product와 EGFP 유전자의 PCR product 생성 여부로 확인하였다. 그 결과, 정상누에에서는 확인되지 않는 EGFP(720bp)와 bPDIsP-BmCecB1(162bp)에 해당하는 PCR product를 확인할 수 있어, 형질전환누에의 게놈 내에 도입유전자인 EGFP와 BmCecB1가 정확하게 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다.



(그림 설명) 누에 형질전환체 게놈 내 EGFP 및 BmCecB1 유전자 도입 확인. PCR에 의한 정상 누에와 형질전환누에 라인(Cec1-1과 Cec1-2)의 EGFP 및 bPDIsP-BmCecB1 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers. Lane 1, 정상누에. Lane 2, 3, 누에 형질전환라인 Cec-1. Lane 4, 5, 누에 형질전환라인 Cec-2.

(나) 형질전환누에 게놈 내 BmCecB1 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 결정

누에 형질전환체 게놈 내 EGFP 및 BmCecB1 유전자의 도입이 확인된 형질전환 라인 Cec-1과 Cec-2에 대하여 BmCecB1 유전자가 게놈 내 몇 copy로 존재하지와 몇 번 염색체에 도입되었는지를 확인하기 위하여 Inverse PCR를 다음과 같이 수행하였다. 먼저 형질전환 라인 Cec-1과 Cec-2으로부터 각각 genomic DNA를 분리한 다음, 제한효소 Sau3AI으로 처리하였다. 제한효소 Sau3AI로 절단된 genomic DNA는 T4 DNA ligase를 사용하여 self-ligation을 유도하고, 이를 주형으로 하여 5' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5'-ATCAGTGACACTTACCGCATTGACA-3' (25mer) 와 antisense primer는 5'-TGACGAGCTTGTGGTGGAGATTCT-3' (25mer)을 사용하였고, 3' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5' -TACGCATGATTATCTTTAACGTA-3' (23mer)와 antisense primer는 5' -GGGGTCCGTCAAACAAAACATC-3' (23mer)를 사용하여 Inverse PCR를 수행하였다. Inverse PCR 결과로 증폭된 PCR product는 pGEM-T easy 벡터에 클로닝한 다음, 삽입 단편에 대하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열에서 pPIG3xP3EGFPA3-bPDIsP-BmCecB1 전이벡터(piggyBac) 서열을 제외한 염기서열만으로 Silkworm genome research program(<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)을 이용하여 누에 염색체 내

삽입 위치를 결정하였다. 그 결과, 형질전환 라인 Cec-1과 Cec-2는 각각 1 copy로 존재하고 있었으며, 형질전환 라인 Cec-1는 전이벡터가 20번 염색체 상에 삽입되어 있었고 형질전환 라인 Cec-2는 전이벡터가 17번 염색체 상에 삽입되어 있었다.

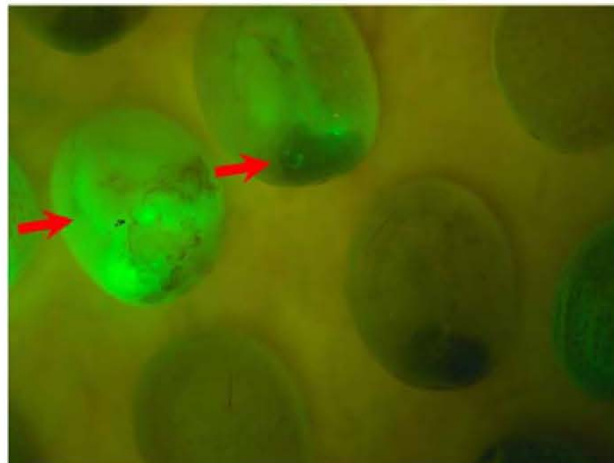
(표 설명) 형질전환누에 계놈 내 BmCecB1 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 확인

G1 lines	Chromosome	5' Genomic sequences	3' Genomic sequences
Cec-1	chr20	CTTCGACTTTGTATAGTAAAGTATAAATT - <i>piggyBac</i> - ACCGACAGCGTCGTGCTCAGTGTTG GAGTGCAACTGTCGGACGCTCG	TTAAATACTAGTTTTTGCCCGGACTT CATCCACGTGGAATAGTTACTCTGGC GAATACATTACTTACGCTATATGTATC TACATATAGCGTAAAGCTCTCAAAA
Cec-2	Chr17	...GACATACGTATAGTAAAGTATAAATT - <i>piggyBac</i> -	TTAATGCTATTGAATACGGTGCTGTG TTCGTTGAAATTCACTTCTTATTTGTG TTCATACTACTACGGTTAGGGCTCAT GATT

(다) G2 세대 형질전환누에 사육 및 특성 분석

① 형질전환누에 사육

형질전환누에 계놈 내 도입유전자의 copy 수 증가시킴으로서 재조합 BmCecB1 단백질의 발현량을 향상시키기 위하여 선발한 형질전환누에 라인 Cec-1과 Cec-2를 상호교배 시켰다. 상호교배를 통하여 잡종을 확보한 다음, 형광현미경 검경으로 EGFP 발현을 확인하였다. 그 결과 일부를 제외한 거의 대부분의 누에 배아의 홰눈과 신경시스템에서 EGFP 발현을 확인할 수 있었다. 일부 비 형질전환체가 혼재된 것은 형질전환누에 라인 Cec-1과 Cec-2의 계놈 내에 외래유전자 각각 hetero로 존재하기 때문으로 사료된다.

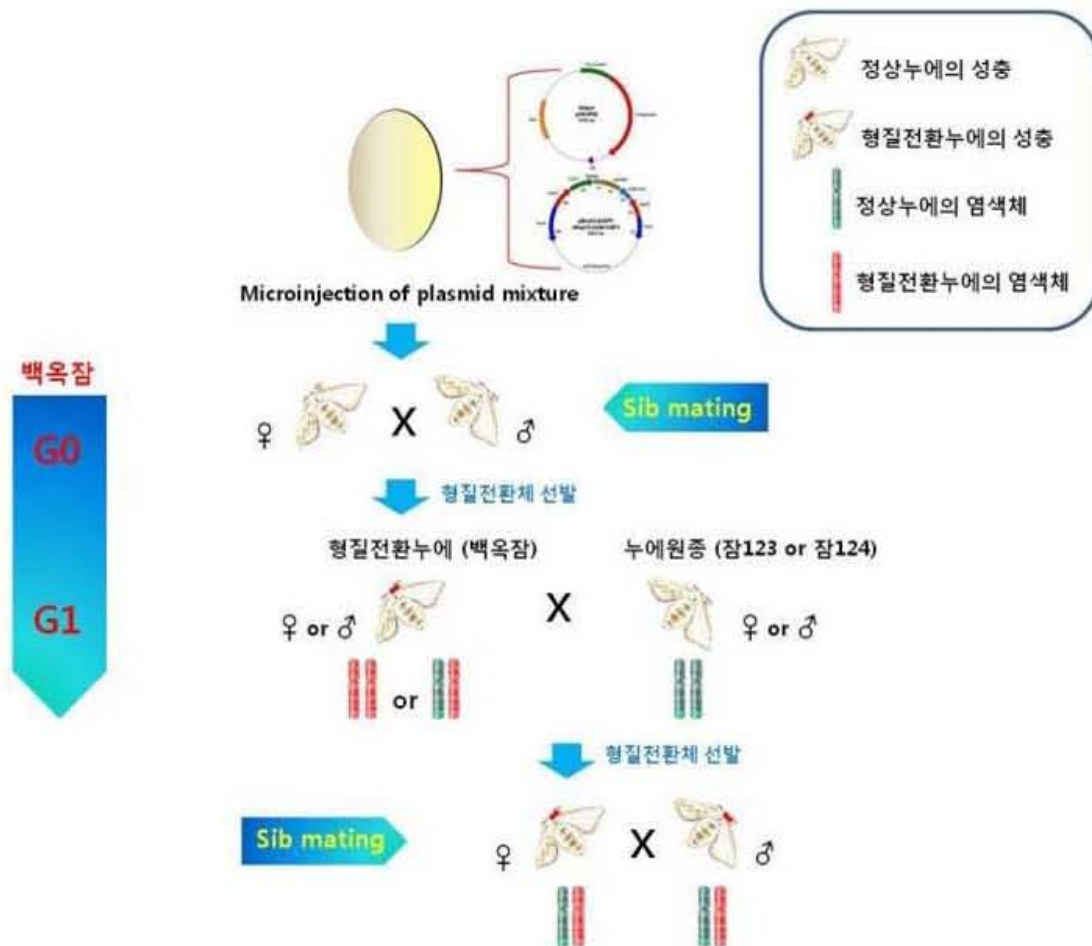


(그림 설명) 제2세대(G2) 형질전환누에의 홰눈(원)과 신경시스템(화살표)에서 표지유전자 EGFP 발현확인.

② 제2 세대 형질전환누에의 호모선발 및 호모선발체의 검정교배

형질전환누에 라인 Cec-1과 Cec-2를 상호교배하여 형광현미경 검경으로 제2세대 형질전환누에의 호모개체들을 선발하였다. 그리고 선발된 형질전환누에들은 백옥잠과 상호교배하여 제3세대 형질전환누에를 얻었고, 제3세대 형질전환체들의 알을 형광현미경으로

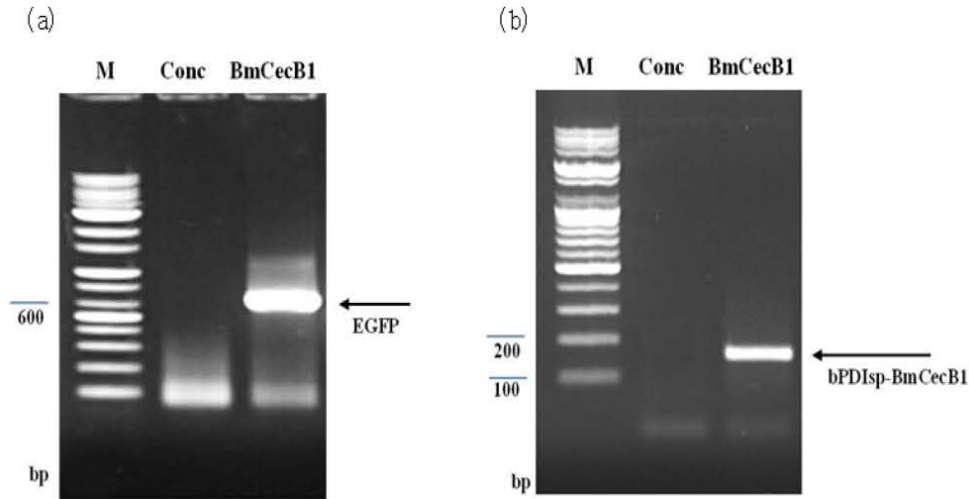
검정하여 모든 개체에서 EGFP 발현되는 이구들을 확인할 수 있었다. 이러한 선발 과정을 통해 본 실험에서 선발한 제2세대 형질전환누에들이 호모개체임을 확인할 수 있었다.



(그림 설명) 제2 세대 형질전환누에의 호모선발 및 호모선발체의 검정교배 과정 모식도

③ 제2 세대 형질전환누에의 도입유전자 EGFP 및 BmCecB1 전사체 발현 분석

형질전환누에 라인 Cec-1과 Cec-2를 상호교배하여 5령 3일까지 사육한 후 도입유전자 EGFP 및 BmCecB1 전사체 발현분석을 수행하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body를 각각 액체질소로 마쇄한 후 total RNA를 분리하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 합성한 1st-strand cDNA를 주형으로 EGFP와 BmCecB1 유전자에 대하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, 정상누에에서는 어떠한 PCR product도 확인할 수 없는 반면에 형질전환누에에서는 EGFP와 BmCecB1 유전자의 전사체를 뚜렷하게 확인할 수 있었다.



(그림 설명) G2 세대 형질전환누에의 도입유전자 EGFP 및 BmCecB1 전사체 발현 분석. RT-PCR에 의한 정상누에와 형질전환누에의 EGFP(a) 및 BmCecB1(b) 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers. Conc, 정상누에. BmCecB1, 형질전환누에.

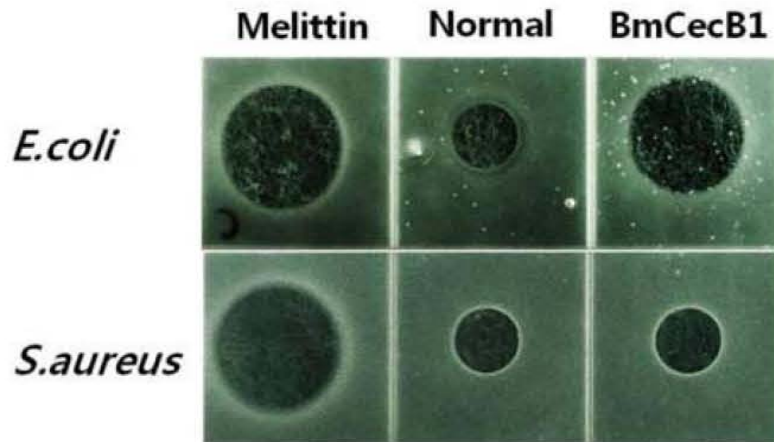
(6) 형질전환누에 항균활성 검정

(가) G3 세대 형질전환누에의 항균활성 검정

제 2세대 형질전환누에를 서로 교배하여 5령 3일까지 사육한 후 항균펩타이드 BmCecB1 에 대한 항균활성을 측정하기 위해, 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법을 이용하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body 에서 체액을 채취 한 후 90℃에서 10분간 열처리하여 열음에 10분간 반응시킨다. 이렇게 전처리가 완료된 시료는 원심분리하여 상층액만 분리한 후 항균활성검정에 사용하였다. 항균활성검정에 사용된 균주는 일차적으로 그람음성 세균인 병원성 *E. coli* (KACC 1039) 및 그람양성 세균인 *S. aureus* (KACC 10196)에 대하여 항균활성을 배지상에서 가시화하여 검정하였다. 그 결과, BmCecB1은 그람음성 세균인 병원성 *E. coli* 에서는 대조구로 사용한 멜리틴(160µg/ml)과 유사한 clear zone이 확인되어 항균활성을 갖고 있음을 확인하였지만, 그람양성 세균인 *S. aureus* 에 대하여서는 clear zone을 확인할 수 없었다. 그러므로 BmCecB1은 그람 음성균에 대해 높은 활성을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.



(그림 설명) 제3세대(G3) 형질전환누에 유충의 홀눈(원)에서 표지유전자 EGFP 발현확인.



(그림 설명) 그람음성균인 *E. coli* 와 그람양성균인 *S. aureus*에 대해 항균활성검정. 제3세대(G3) 5령3일 형질전환누에 유충에서 체액을 분리하여 항균활성검정을 검정하였다. Melitin, Melittin ($160\mu\text{g}/\text{ml}$). Normal, 정상누에의 체액($10\mu\text{l}$). BmCecB1, 형질전환누에의 체액($10\mu\text{l}$).

(나) Salmonella 균에 대한 형질전환누에의 항균활성 검정

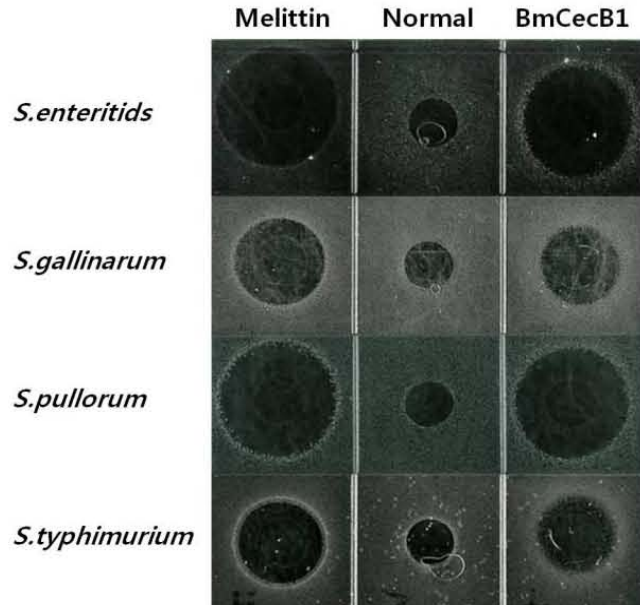
Salmonella 균은 장내세균으로 매우 중요한 감염형식중독 원인균으로 그 종류는 다양하다. 그 중에서 살모넬라 갈리나룸이 원인이 되는 가금티푸스는 경제성 상실을 초래하여 생산성에 치명적인 영향을 끼치는가 하면 엔트라이티디스 같이 닭에서는 약하게 병원성을 보이지만 주로 사람에게만 식중독을 일으키는 종류 등 문제점이 많은 질병이다. 이러한 살모넬라균에 의한 닭의 전염병은 크게 3가지로 구분되며 다음과 같다.

- 추백리 : 살모넬라 풀로룸(*S. pullorum*)
- 가금 티푸스 : 살모넬라 갈리나룸(*S. gallinarum*)
- 가금 파라티푸스 : 살모넬라균증(*S. enteritidis*)

그러므로, 형질전환누에에서 생성된 BmCecB1 항균펩타이드를 *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *S. pullorum* 에 대하여 항균활성을 검정하였다. 그 결과, BmCecB1은 그람음성 세균인 4종의 살모넬라균들에 대해서 대조구로 사용한 멜리틴 ($160\mu\text{g}/\text{ml}$)과 유사한 clear zone이 확인되어 항균활성을 갖고 있음을 확인하였다.

(표 설명) 항균활성검정에 사용된 균주

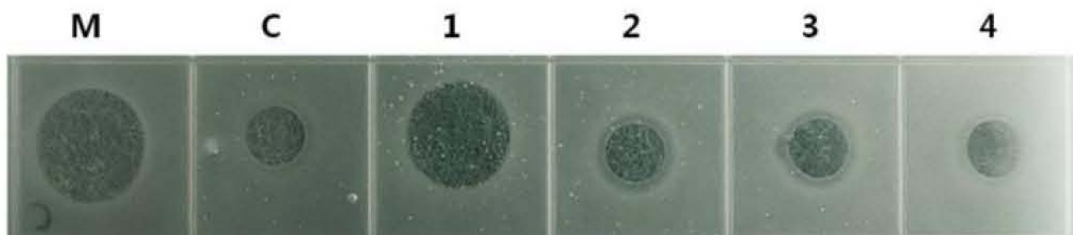
Microorgaism	
Gram negative bacteria	
	<i>E. coli</i> (KACC 1039)
	<i>S. enteritidis</i>
	<i>S. gallinarum</i>
	<i>S. typhimurium</i>
	<i>S. pullorum</i>
Gram positive bacteria	
	<i>S. aureus</i> (KACC 10196)



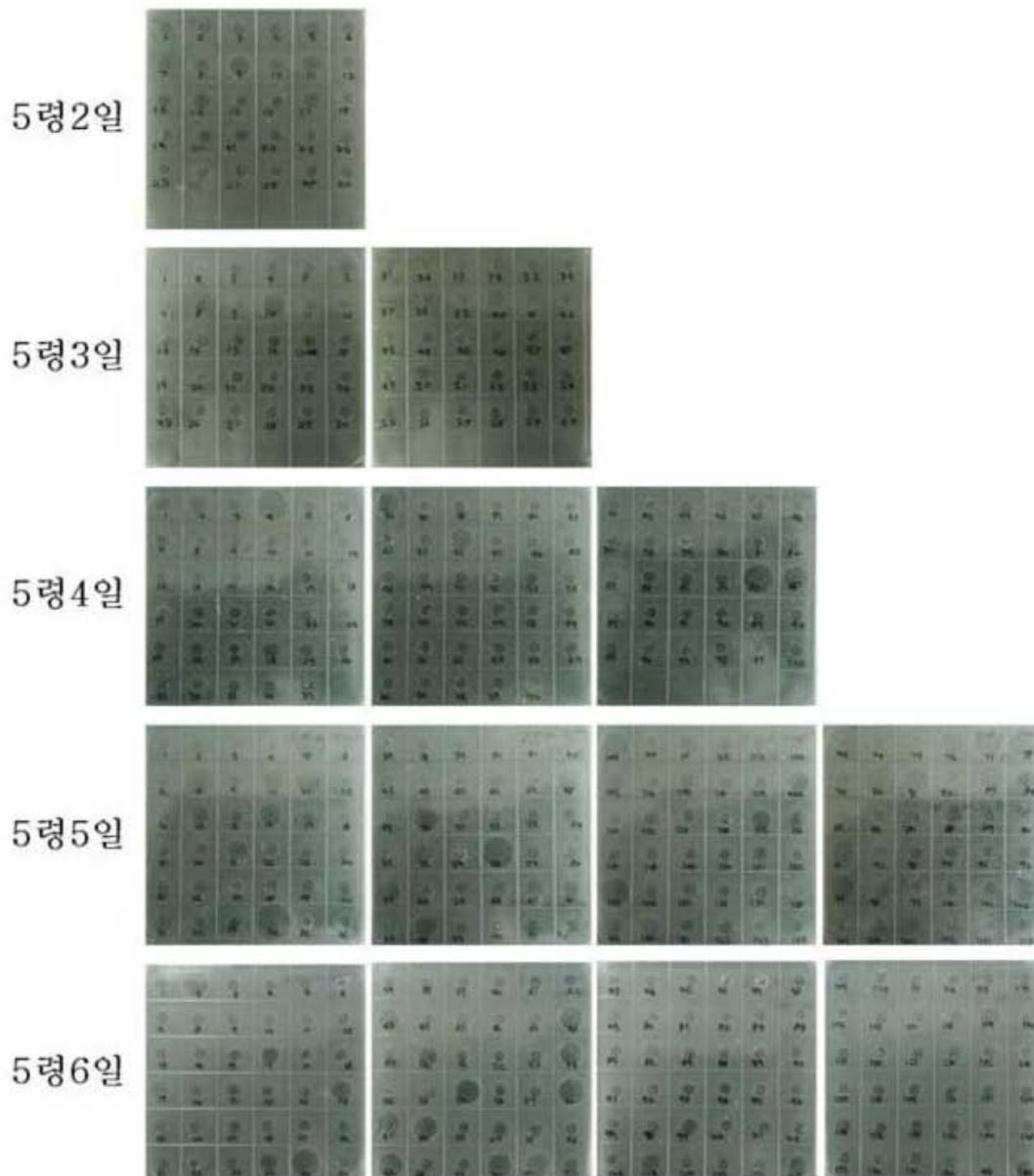
(그림 설명) 그람음성균인 4종의 살모넬라균에 대해 항균활성검정. 제3세대(G3) 5령3일 형질전환누에 유충에서 체액을 분리하여 항균활성검정을 검정하였다. Melittin, Melittin (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Normal, 정상누에의 체액(10 μl). BmCecB1, 형질전환누에의 체액(10 μl). 4종의 살모넬라균, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*.

(다) G4 세대 형질전환누에 항균활성 검정

3세대에서 선발된 형질전환누에들은 그람음성세균에 대해서 모두 일정한 항균활성을 나타내지는 않았다. 일부 형질전환누에에서는 항균활성이 없는 것도 있었고, 일부는 멜리틴 (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 기준으로 강하거나 약한 활성을 나타내는 것도 있었다. 따라서 강한 항균활성을 나타내는 형질전환누에를 선발하기 위해 G4세대에서 얻은 형질전환누에 알들 중에서 2아구를 선발하여 사육하였고, 5령2일부터 5령6일까지 형질전환누에 유충에서 약 100 μl 의 체액을 채취하여 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)을 하였다. 그 결과 총 442 마리의 형질전환누에 유충을 멜리틴 (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 기준으로 BmCecB1 항균펩타이드의 생산량을 4종류로 분류할 수 있었다. 그 중에서 멜리틴 (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$)보다 강한 항균 활성을 나타내는 17마리의 형질전환누에를 선발할 수 있었다.



(그림 설명) 그람음성균인 *E. coli*에 대한 항균활성 검정. 제4세대(G4) 5령3일 형질전환누에 유충에서 체액을 분리하여 항균활성검정을 검정하였다. M, Melittin (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$). C, 정상누에의 체액 (10 μl). 1~4, BmCecB1 형질전환누에의 체액(10 μl).



(그림 설명) 그람음성균인 *E. coli* 에 대한 항균활성 검정. 제4세대(G4) 5령2일부터 5령6일까지 형질전환누에 유충에서 약 $100\mu\text{l}$ 의 체액을 채취하여 항균활성검정을 검정하였다. M, Melittin ($160\mu\text{g}/\text{ml}$). C, 정상누에의 체액($10\mu\text{l}$). 1~4, BmCecB1 형질전환누에의 체액($10\mu\text{l}$).

(7) BmCecB1 항균펩타이드가 도입된 누에형질전환체 세대고정 및 특성분석

(가) 5세대 형질전환누에 선발

기존에 선발된 5세대 누에형질전환체를 Leica (USA)사의 LEICA MZ16FA 현미경 과 Leica (USA)사의 Microscope MZ FLIII Fluorescence Filter GFP2 형광필터를 사용하여 재선발하였다. 형질전환체 선발은 산란 후 4일째부터 성충까지 지속적으로 형광현미경검정을 수행였다. 그 결과, 모든 알에서 녹색형광을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과에서 BmCecB1 전사인자가 도입된 누에형질전환체의 세대사육이 정확하게 이루어지고 있음을 알 수 있다.



(그림 설명) 제5세대(G5) 형질전환누에의 표지유전자 EGFP 발현 특성분석. 곤충의 눈과 신경시스템에서 특이적으로 발현하는 3xP3 프로모터의 발현 조절에 의해서 EGFP 발현이 누에의 5개 흘눈에만 특이적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었음 (A, B). 그리고 성충(C)에서는 누에서만 EGFP 형광단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었음.

(나) 형질전환누에 게놈 내 BmCecB1 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 확인

누에 형질전환체 게놈 내 BmCecB1 유전자의 도입이 확인된 형질전환체에 대하여 BmCecB1 유전자가 게놈 내 copy 수와 염색체 위치를 확인하기 위하여 Inverse PCR를 다음과 같이 수행하였다. 먼저 형질전환체로부터 genomic DNA를 분리한 다음, 제한효소 Sau3AI로 처리하였다. 제한효소 Sau3AI로 절단된 genomic DNA는 T4 DNA ligase를 사용하여 self-ligation을 유도하고, 이를 주형으로 하여 5' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5'-ATCAGTGACACTTACCGCATTGACA-3' (25 mer) 와 antisense primer는 5'-TGACGAGCTTGTGGTGAGGATTCT-3' (25mer)을 사용하였고, 3' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5' -TACGCATGATTATCTTTAACGTA-3' (23 mer)와 antisense primer는 5' -GGGGTCCGTCAAAACAAAACATC-3' (23 mer)를 사용하여 Inverse PCR를 수행하였다. Inverse PCR 결과로 증폭된 PCR product는 pGEM-T easy 벡터에 클로닝 한 다음, 삽입 단편에 대하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열에서 pPIG3xP3EGFPBmA3-bPDIsp-BmCecB1 전이벡터(piggyBac) 서열을 제외한 염기서열만으로 Silkworm genome research program(<http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)을 이용하여 누에 염색체 내 삽입 위치를 결정하였다. 그 결과, pPIG3xP3EGFPBmA3-bPDIsp-BmCecB1 누에형질전환체는 1 copy로 존재하고 있었으며, 전이벡터가 20번 염색체 상에 삽입되어 있는 것을 재확인할 수 있었다.

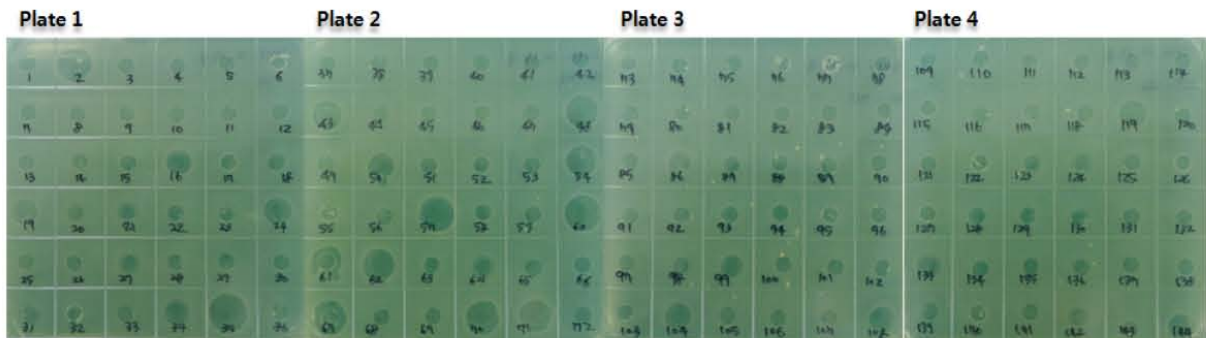
(표 설명) 형질전환누에 게놈 내 BmRelish1 유전자의 도입 확인

Chromosome	5' Genomic sequences		3' Genomic sequences
chr20	CCTCGACTTTGTATAGTAAAGTATAAATT	-piggyBac-	TTAAATACTAGTTTTTGCCCGCGACTT
	ACCGACAGCGTCGTGCTCAGTGTTG		CATCCACGTGGAATAGTTACTCTGGC
	GAGTGCAACTGTCGGACGCTCG		GAATACATTACTTACGCTATATGTATC
			TACATATAGCGTAAGCTCTCAAAA

(다) 항균활성을 이용하여 항균활성이 높은 형질전환누에 선발

항균펩타이드 BmCecB1에 대한 항균활성을 측정하기 위해, 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법을 이용하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누

에의 whole body에서 체액을 채취 한 후 90°C 에서 10분간 열처리하여 얼음에 10분간 반응시킨다. 이렇게 전처리가 완료된 시료는 원심분리하여 상층액만 분리한 후 항균활성 검정에 사용하였다. 항균활성검정에 사용된 균주는 그람음성 세균인 *E. coli* (KACC 1039)에 대하여 항균활성을 배지상에서 가시화하여 검정하였고, 검정에 사용된 총시료는 144개를 검정하였다. 그 결과, 항균활성 정도를 clear zone을 기준으로 3등급으로 나누어 분류하였고, 그 중에서 5마리의 누에를 선발 할 수 있었다. 이렇게 선발된 누에는 계대사육을 통하여 항균활성이 높은 품종으로 선별하였다.



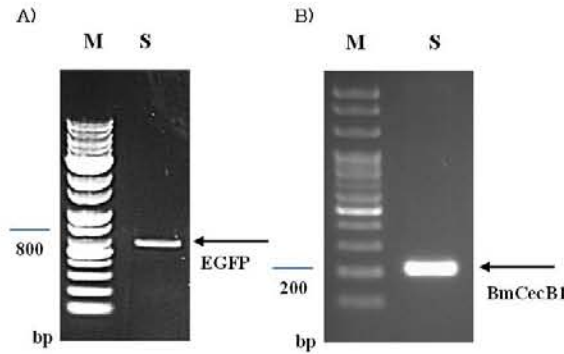
(그림 설명) 그람음성균인 *E. coli*에 대해 항균활성검정. 제5세대(G5) 5령3일 형질전환누에 유충에서 체액을 분리하여 항균활성검정을 검정하였다. BmCecB1, 형질전환누에의 체액(10 μ l) 사용

(표 설명) 항균활성검정을 이용하여 5세대 형질전환체 분류

항균활성	강	중	약	없음
마리수	5	10	14	115

(라) 제6 세대 누에형질전환체의 도입유전자 EGFP 및 BmCecB1 전사체 발현 분석

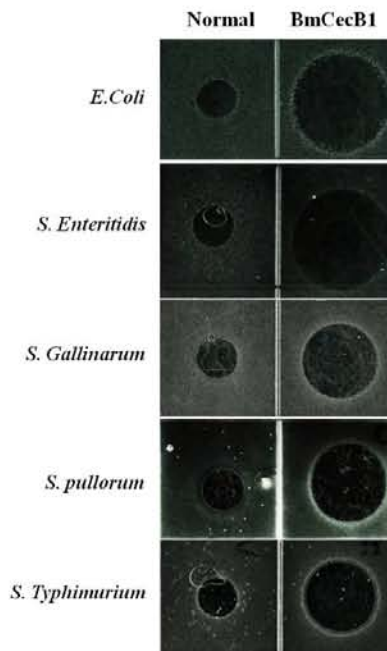
선발된 누에형질전환체들을 5령 3일까지 사육한 후 도입유전자 EGFP 및 BmCecB1의 전사체 발현분석을 수행하였다. 이를 위하여 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body를 각각 액체질소로 마쇄한 후 total RNA를 분리하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 합성한 1st-strand cDNA를 주형으로 EGFP(720 bp)와 BmCecB1(168 bp) 유전자에 대하여 RT-PCR를 수행하였다. 그 결과, EGFP와 BmCecB1 유전자의 전사체를 뚜렷하게 확인할 수 있었다.



(그림 설명) G6 세대 형질전환누에의 도입유전자 EGFP 및 BmCecB1 전사체 발현 분석. RT-PCR에 의한 정상누에와 형질전환누에의 EGFP(A) 및 BmCecB1(B) 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers; S, 형질전환누에.

(마) G6 세대 형질전환누에의 항균활성 검정

6세대 누에형질전환체를 5령 3일까지 사육한 후 항균펩타이드 BmCecB1에 대한 항균 활성을 측정하기 위해, 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법을 이용하였다. 항균활성검정에 사용된 균주는 일차적으로 그람음성 세균인 병원성 *E. coli* (KACC 1039) 및 *Salmonella* 균 (4종)에 대하여 항균활성을 배지상에서 가시화하여 검정하였다. 그 결과, 그 결과, BmRelish1은 *E. coli* 와 4종의 살모넬라균들에 대해서 높은 항균활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.



(그림 설명) 그람음성균인 *E. coli*와 4종의 살모넬라균에 대해 항균활성검정. 제6세대(G6) 5령3일 형질전환누에 유충에서 체액을 분리하여 항균활성검정을 검정하였다. Normal, 정상누에의 체액(10 μ l); BmCecB1, 형질전환누에의 체액(10 μ l). 4종의 살모넬라균; *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*..

라. 세리신 융합 항균펩타이드(BmCecB1)를 생산하는 형질전환누에 개발

(1) 누에 유래 BmCecropin B1(BmCecB1) 전사인자 cDNA 활성영역 클로닝

GAL4/upstream activating sequence(UAS) 시스템은 목적유전자의 과발현을 위한 가장 널리 사용되는 형질전환 방법 중 하나로서, 효모(Saccharomyces)의 전사인자인 GAL4와 결합 영역인 UAS를 사용하는 것으로 조직특이적으로 GAL4를 발현시키는 형질전환체와 목적유전자가 연결된 UAS 형질전환체를 후교배 함으로써 목적하는 단백질을 조직특이적으로 과발현시킬 수 있다. 본 과제에서는 GAL4/UAS 시스템을 활용하여 누에 유래 항균펩타이드인 BmCecropin B1을 과발현시키기 위하여 형질전환누에를 제작하고 그 특성을 분석하였다. 본 연구결과에서 제작된 형질전환누에로부터 생산되는 수용성 세리신과 융합된 항균펩타이드(BmCecropin B1)는 가축의 면역력 증진을 위한 음수용 급여사료로 개발할 수 있다.

곤충의 체내로 분비되는 peptide인 cecropin은 gram 음성균에는 강한 항균활성을 나타내지만 gram 양성균에는 다소 약한 항균활성 활성을 나타낸다. Cecropin은 1980년대에 세크로피어나방(Hyalophora cecropia)에서 최초로 발견되어 cecropin A, B로 명명된 후 10여종 이상이 다른 곤충들에서도 추가적으로 발견되어졌다. Cecropin은 약 30개 이상의 아미노산으로 이루어져 있고 강한 염기성을 띤 양쪽성 성질을 가진 N-terminal 부분과 소수성 성질을 가진 C-terminal 부분이 hinge 부분으로 연결되어 있다. 또한 cecropin은 돼지의 소장 상피세포에서도 발견된 바 있어 생물계에 널리 분포되어 있는 형태의 peptide일 것으로 추정되고 있다. 본 연구에서는 전년도 제작된 형질전환누에를 통해 유충 온몸에서 Cecropin B1의 발현이 검증된 BmCecB1 유전자 활성영역과 세리신 단백질을 발현을 조절하는 Ser1 유전자 프로모터 및 GAL4/UAS 시스템을 사용하여 누에에 적합한 이중벡터(binary vector) 시스템을 구축, 각각 제작된 Transactivator 및 Responder 형질전환누에 라인 간 상호교배를 통해 누에 세리신에서 cecropin이 효율적으로 발현하는 항균펩타이드 세리신 발현시스템을 개발하고자 하였다. 누에 유래 cecropin인 BmCecB1 유전자의 ORF (open reading frame)는 전년도 누에 지방체로 제작된 cDNA로 부터 RT-PCR하여 확보하였다. Taniai 등(1992)이 보고한 BmCecB1의 활성영역은 BmCecB1 ORF를 주형으로 하고, Not I (GCGGCCGC)/Sbf I (CCTGCAGG) 제한효소 염기서열을 부가하여 PCR을 수행하여 확보하였다.

```
GCGGCCGCAGGTGGAAGATCTTCAAGAAAATTGAAAAATGGGCAGGAACATTCGTGACGGCA
R W K I F K K I E K M G R N I R D G I
TCGTCAAAGCGGGCCCGGCGATCGAGGTCCTTGGTTCGGCTAAAGCTATATAACCTGCAGG
V K A G P A I E V L G S A K A I
```

(그림 설명) 누에 유래 BmCecB1 유전자 활성영역만을 누에 형질전환용 전이벡터의 NotI과 SbfI 제한효소 사이에 도입하여 위하여 5' 말단에 제한효소 Not I의 인식서열인 GCGGCCGC 부가하고, 3' 말단에는 활성영역을 종결시키기 위한 종결코돈(TAA)과 제한효소 Sbf I의 인식서열(CCTGCAGG)을 각각 부가하여 PCR로 증폭하였다.

(2) 세리신-항균펩타이드(BmCecB1) 융합형 유전자 제작

또한 본 연구에서는 BmCecB1 펩타이드의 활성영역을 세리신으로 이동을 원활하게 하기 위하여 누에 유래의 세리신 단백질의 TATA박스 (Ser1TATA)와 세리신 단백질의 signal

peptide (Ser1sp)를 사용하여 기존에 보고된 자료를 바탕으로 Ser1TATA/Ser1sp 융합유전자를 작성하였다. 계속해서 5' 말단에는 제한효소 Bgl II 인식서열인 AGATCT를 부가하고, 3' 말단에는 제한효소 Not I의 인식서열인 GCGGCCGC를 부가하여 확보하였다.

AGATCTAAAATTTACTCTCTACGTAAGCTTGATCAAACCTCGTTTTTCGTATAAAACGCGTTGGCCCAACCACTTTGGCATAGTC
GTCTTATCATCGGGTCTCTAAGGATCAAGCGATCCAAGACCGCCAACATGCGTTTCGTTCTGTGCTGCACCTTTGATTGCGTTGGCT
GCGCTCAGCGTAAAAGCTTTTCGGCGCGGCCGC

(그림 설명) 누에 유래 세리신 단백질의 TATA박스(Ser1TATA)와 세리신 단백질의 signal peptide(Ser1sp) 염기서열. 붉은색 글씨는 Ser1TATA 이고, 녹색 글씨는 Ser1sp이다. 파란색 글씨는 각각 Bgl II와 Not I 제한효소의 인식서열을 나타낸다.

이러한 과정으로 확보된 Bgl II-Ser1TATA/SP-Not I 유전자와 Not I-BmCecB1 active region-Sbf I의 PCR 증폭산물은 순차적으로 pGEM-T-easy vector(Promega)에 클로닝하여 두 유전자를 융합하였다.

AGATCTAAAATTTACTCTCTACGTAAGCTTGATCAAACCTCGTTTTTCGTATAAAACGCGTTGGCCCAACCACTTTGGCATAGTC
GTCTTATCATCGGGTCTCTAAGGATCAAGCGATCCAAGACCGCCAACATGCGTTTCGTTCTGTGCTGCACCTTTGATTGCGTTGGCT
GCGCTCAGCGTAAAAGCTTTTCGGCGCGGCCGCAGGTGGAAGATCTTCAAGAAAATTGAAAAATGGGCAGGAACATTCGTGACGGCA
TCGTCAAAGCGGGCCCGCGATCGAGGTCCTTGGTTTCGGCTAAAGCTATA**TAACTGCAGG**

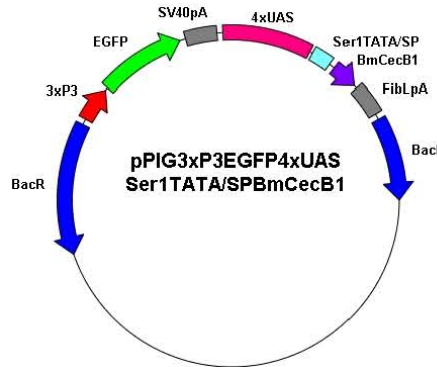
(그림 설명) 누에 유래 세리신 단백질의 TATA박스(Ser1TATA)와 세리신 단백질의 signal peptide(Ser1sp) 염기서열. 붉은색 글씨는 Ser1TATA, 녹색 글씨는 Ser1sp이며, 주황색 글씨는 BmCecB1 유전자의 활성영역을 나타낸다. 파란색 글씨는 각각 제한효소 Bgl II, Not I 및 Sbf I 을 인식하는 염기서열을 나타낸다.

(3) 누에 유래 Ser1TATA/SP-BmCecB1 유전자가 도입된 누에 형질전환용 전이벡터 제작

Ser1TATA/SP-BmCecB1 유전자를 국립농업과학원에서 제작하여 보유하고 있는 누에 형질전환용 전이벡터인 pPIG3xP3EGFP4xUAS에 클로닝 하였다. 먼저, pPIG3xP3EGFP4xUAS는 다음의 과정으로 제작되었다. 4xUAS 유전자는 UAS(ACTGCAGGTCGGAGTACTG TCCT CC GAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCAGCG GAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGACT) 염기서열을 4회 반복하여 합성하였다. 이렇게 합성된 유전자는 pGEM-T Easy Vector 에 클로닝하였고, pGEMT-4xUAS로 명명하였다. 그리고 pPIG3xP3EGFP와 pGEMT-4xUAS는 Swa I/Spe I로 각각 제한효소 처리 후 4xUAS를 pPIG3xP3EGFP에 클로닝하여 pPIG3xP3EGFP4xUAS를 제작하였다. 이렇게 제작된 전이벡터에 Ser1TATA/SP-BmCecB1-pGEM-T vector를 각각 제한효소 Bgl II/Spe I로 처리하여 Ser1TATA/SP-BmCecB1 유전자를 pPIG3xP3EGFP4xUAS 전이벡터에 클로닝 하였다. 완성된 형질전환용 전이벡터는 pPIG3xP3EGFP4xUASSer1TATA/ SPBmCecB1으로 명명하였다.

ACTGCAGGTCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGG
AGTACTGTCCTCCGAGCGGAGACTCTAGCCTAGACTGCAGGTCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACT
TGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGACTCTAGCACTGCAGGTCGGAGTACTGTCCTCCG
AGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGACTCT
AGCCTAGACTGCAGGTCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGTACTGTCCTC
CGAGCGGAGTACTGTCCTCCGAGCGGAGACT

(그림설명) 4xUAS 염기서열. 밑줄 친 염기서열은 1xUAS 염기서열을 나타낸다.



(그림 설명) pPIG3xP3EGFP4xUASer1TATA/SPBmCecB1 누에 형질전환용 전이벡터 제작. BacR, piggyBac right arm. BacL, piggyBac left arm. 3xP3는 곤충 흡눈(stemmata) 및 신경시스템 특이발현하는 프로모터이고 EGFP는 형질전환체 선발을 위한 표지유전자(Enhanced Green Fluorescent Protein), SV40pA는 simian virus 40 poly A, 4xUAS는 UAS 유전자의 4회 반복한 염기서열이며, Ser1TATA는 누에 유래 세리신 유전자의 TATA박스이다. SP는 누에 유래의 세리신 유전자의 signal peptide이며, BmCecB1는 누에 유래의 항균펩타이드 Cecropin B1 유전자의 활성영역이고, FibLpA는 누에 유래 피브로인 유전자의 Poly A 유전자 염기서열 임.

(4) 누에 유래 세리신 프로모터 확보

실크 단백질은 누에의 견사선에서 생성되는 것으로, 이 기관은 1,000개 내외의 세포로 이루어져 있으며, 뿔잎의 단백질, 아미노산, 당 등으로부터 생합성된 액상형태의 실크액으로 채워져 있다. 이러한 누에의 견사선은 크게 피브로인(fibroin)의 합성 장소인 후부견사선(posterior silk gland)과 세리신(sericin)의 합성 장소인 중부견사선(middle silk gland) 그리고 실크를 토사시키는 전부견사선(arterial silk gland)로 구성되어 있고, 실크의 합성은 후부견사선에서 피브로인이 생성된 후 중부견사선에서 피브로인을 세리신으로 코팅하고, 전부견사선을 통해 토사된다. 지금까지 보고된 실크단백질의 구성은 피브로인이 약 75%이고 세리신이 나머지 25%이고, 그 중에서 피브로인은 heavy chain, light-chain 및 P25 fibrohexamerin 3개의 subunit 복합체가 6:6:1의 분자비율로 구성되어 있다. 본 실험에서는 세리신에서 Gal4/UAS 시스템을 이용하여 제작된 형질전환누에로부터 누에 유래 항균펩타이드인 Cecropin B1을 대량 발현시키고자 한다. 따라서 세리신에서 Gal4 유전자를 발현시키기 위하여 세리신 프로모터 하류에 Gal4 유전자를 발현시키는 전이벡터를 제작하였다. 우선, 세리신 프로모터를 확보하기 위해 5령3일째 누에를 액체질소로 마쇄한 후 genomic DNA를 순수 분리하고 pSer1L-F(5' -CTTTGTATCCCTTTTACG -3')과

pSer1L-R(5' -GATCGCTTGATCCTTAGAG-3') 프라이머를 사용하여 PCR 증폭하였다. 그 결과, 707 bp의 pSer1L promoter 유전자를 확보할 수 있었다.

```

CTTTGTATCCCTTTTTACGAAAATTGCGAGGACGGAGGAGTATGAAATTTCCACACTTATAGAGAATACAGAGAAGAAGTGCACA
ATGCTAATATTTTTTAAAATAATGCATAAAAGATACTTTAAATCAATAAAGAAAACAGCACACACTACATACCATGTATTTGA
CGCACACACGCATGTATACTATTTATTGTCAAACCTTTGTTCTTGACGCTGTGTTCAAACTGAGAATAGATTAATATTTGTTGT
CTTTATTAATATTTTTAATAGTGTAGTCTTGGCGAAAATTTGTGATTATAGAAGTATAAAATACAATCATAATAGTGTACAAACTT
ACAATTTCCCAATTAATTATAGTCGAATTTGACTACTGCGGGACCTCTAGTATTAATAATCTCTTTAAAAAAAACAGAGCATCA
AATACTGTCACAAATGTCAAGCGGGTCTCAACGAGCCATGAATAAATTAGAAATCAATTAATAACATAAAAATAGGCAAAACAAAATA
AAACCATTTACATAGAGAACGTTTGTGTAACAAAACAATAACTTGTATACATTTTGCACAAATGTTTGAACCGAAAATTTATT
ACTCTCTACGTAAGCTTGATCAAACCTCGTTTTCTGATAAAAACGGTGGCCCAACCCTTTGGCATAGTCGCTTATCATCGGGTCTC
TAAGGATCAAGCGATC

```

(그림 설명) 누에 유래 세리신 프로모터(pSer1L) 유전자 염기서열.

이렇게 확보된 세리신 프로모터는 전이백터 제작을 위해 5' 말단에는 제한효소 Swa I의 인식서열인 ATTTAAAT를 부가하고, 3' 말단에는 제한효소 Nhe I의 인식서열인 GCTAGC를 부가하여 확보하였다. 이러한 과정으로 확보된 Swa I-pSer1L-Nhe I의 유전자를 pGEM-T-easy vector (Promega)에 클로닝하여 pSer1L-pGEM-T vector를 제작하였다. Gal4 유전자는 효모에서 enomic DNA를 분리하였고, Gal4-F(5' -ATGAAGCTACTGTCTTC TATC-3')과 Gal4-R (5' -T TACTCTTTTTTTGGGTTTGG-3') 프라이머를 사용하여 PCR 증폭하였다. 그 결과, 2,646 bp의 Gal4 유전자를 확보하였다.

```

TGAAGCTACTGTCTTCTATCGAACAGCATGCGATATTTGCGGACTTAAAAAGCTCAAGTGCTCCAAAGAAAACCGAAGTGCGCCA
AGTGTCTGAAGAACAACCTGGGAGTGTGCGTACTCTCCAAAACCAAAGGTCTCCGCTGACTAGGGCAGACTCTGACAGAAGTGAAT
CAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTCTACTGATTTTTCTCGAGAAGACCTTGACATGATTTTGAAAATGGATTCTTTACAGG
ATATAAAGCATTGTTAACAGGATTATTTGTACAAGATAATGTAATAAAGATGCCGTCACAGATAGATTGGCTTCAAGTGGAGACTG
ATATGCCCTTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGTGCAGATCATCATCGAAGAGAGTAGTAACAAAGTCAAAGACAGTTGACTG
TATCGATTGACTCGGCAGCTCATCATGATAACTCCACAATTCGTTGGATTTATGCCAGGGATGCTCTTCATGGATTTGATTGGT
CTGAAGAGGATGACATGTCGGATGGCTTGCCCTTCTGAAAACGGACCCCAACAATAATGGGTTCTTTGGCGACGGTTCTCTCTTAT
GTATTCTTCGATCTATTGGCTTTAAACCGAAAATTACACGAACTCTAACGTTAACAGGCTCCCGACCATGATTACGGATAGATACA
CGTTGGCTTAGATCCACAACATCCCGTTTACTTCAAAGTTATCTCAATAATTTTACCCCTACTGCCCTATCGTGCACCTACCGA
CGCTAATGATGTTGTATAATAACCAGATTGAAATCGCGTCGAAGGATCAATGGCAAATCCTTTTTAACTGCATATTAGCCATTGGAG
CCTGGTGTATAGAGGGGAATCTACTGATATAGATGTTTTTACTATCAAAATGCTAAATCTCATTGACGAGCAAGGTCTTCGAGT
CAGGTTCCATAATTTTGGTGACAGCCCTACATCTTCTGTGCGGATATACACAGTGGAGGCAGAAAACAATACTAGCTATAATTTTC
ACAGCTTTTCCATAAAGATGGCCATATCATTGGGCTTGAATAGGGACCTCCCTCGTCTTTCAGTGATAGCAGCATTCTGGAACAAA
GACGCCGAATTTGGTGGTCTGTCTACTCTTGGGAGATCCAATTTGTCCTGCTTTATGGTGCATCCATCCAGCTTTTCTCAGAATACAA
TCTCCTTCCCTTCTTCTGTGCGAGATGTGCAGCGTACCACAACAGGTCCCACCATATATCATGGCATCATTGAAACAGCAAGGCTCT
TACAAGTTTTACAAAATCTATGAACTAGACAAAACAGTAACTGCAGAAAAAAGTCTTATATGTGCAAAAAAATGCTTGATGATTT
GTAATGAGATTGAGGAGGTTTCGAGACAGGCACCAAAGTTTTTACAAATGGATATTTCCACCACCGCTTAACCAATTTGTTGAAGG
AACACCCTTGGCTATCCTTTACAAGATTGAACTGAAAGTGAACAGATTGTCTCTTATCATTATGTATTAAGAGATTTTTTACTA
ATTTTACCAGAAAAGTCACTAGAACAGGATCAAATGATCATCAAAGTTATGAAGTTAAACGATGCTCCATCATGTTAAGCG
ATGCAGCACAAAGAACTGTTATGTCTGTAAGTAGCTATATGGACAATCATAATGTCACCCCATATTTTGGCTGGAATTTGTTCTTATT
ACTTGTTCATGCAGTCTAGTACCCATAAAGACTTACTCTCAAACCTCAAATCGAATGCTGAGAATAACGAGACCCGACAAATTAT
TACAACAAATTAACACTGTTCTGATGCTATTAAAAAAAGTGGCCACTTTTAAAATCCAGACTTGTGAAAAATACATTCAAGTACTGG
AAGAGGTATGTGCGCCGTTTCTGTTATCACAGTGTGCAATCCCATACCAGCATATCAGTTATAACAATAGTAATGGTAGCGCCATTA
AAAATATTGTCGGTTCTGCAACTATCGCCCAATACCTTACTCTCCGGAGGAAAATGTCAACAATATCAGTGTAAATATGTTTCTC
CTGGCTCAGTAGGGCCTTACCTGTGCCATTGAAATCAGGAGCAAGTTTTCAGTGATCTAGTCAAGCTGTTATCTAACCGTCCACCCT
CTCGTAACTCTCCAGTGACAATACCAAGAAGCACACCTTCGCATCGCTCAGTCACGCTTTTCTAGGGCAACAGCAACAGCTGCAAT
CATTAGTGCCACTGACCCCGTCTGCTTTGTTGGTGGCGCAATTTTAAATCAAAGTGGGAATATTGCTGATAGCTCATTGTCCTTCA

```

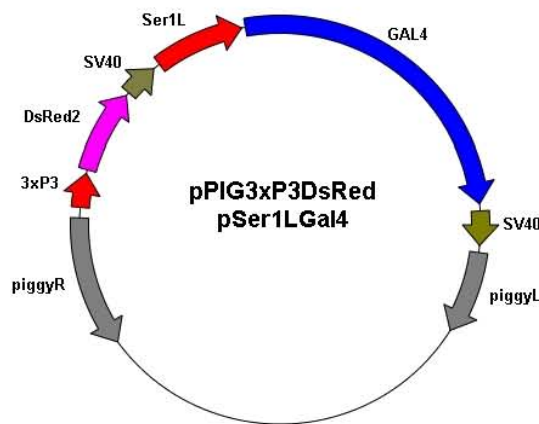
CTTTCACTAACAGTAGCAACGGTCCGAACCTCATAACAACCTCAAACAAATTCTCAAGCGCTTTCACAACCAATTGCCTCCTCTAACG
TTCATGATAACTTTCATGAATAATGAAATCACGGCTAGTAAAATTGATGATGGTAATAATTCAAACCCTGTACCTGGTTGGACGG
ACCAAACCTGCGTATAACCGGTTTTGGAATCACTACAGGGATGTTTAATACCACTACAATGGATGATGTATATACTATCTATTTCGATG
ATGAAGATACCCCAACCAACCAAAAAAAGAGTAA

(그림 설명) 효모 유래 Gal4 유전자 염기서열.

이렇게 확보된 Gal4 유전자는 누에 형질전환용 전이벡터 제작을 위해 5' 말단에는 제한 효소 Nhe I의 인식 염기서열인 GCTAGC를 부가하고, 3' 말단에는 제한효소 Afl II의 인식 염기서열인 CTTAAG를 부가하여 확보하였다. 이러한 과정으로 확보된 Nhe I-Gal4-Afl II의 유전자를 pGEM-T-easy vector(Promega)에 클로닝하여 Gal4-pGEM-T vector를 제작하였다. 이렇게 제작된 pSer1L-pGEM-T vector 와 Gal4-pGEM-T vector를 각각 Nhe I과 Afl II 제한 효소 처리 후, pSer1L-pGEM-T vector에 Gal4 유전자를 클로닝함으로써 두 vector가 융합된 pSer1L-Gal4-pGEM-T를 제작할 수 있었다.

(5) pSer1L-Gal4 유전자가 도입된 누에 형질전환용 전이벡터 제작

pSer1L-Gal4 유전자를 선행 연구를 통해 개발된 누에 형질전환용 전이벡터인 pPIG3xP3DsRed에 클로닝 하였다. 먼저, pPIG3xP3DsRed는 다음의 과정으로 제작되었다. 마커 유전자로 사용된 DsRed2 cDNA는 pDsRed2-C1(Clontech, USA)을 주형으로 NheI-DsRed2-F(5'-GCTAGCATGGCCTCCTCCGAGAAC-3')와 DsRed2-AflIII-R(5'-CTTAAGCTACAGGAACAGGTGGTGGCG-3') 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 pGEM-T Easy Vector System(Promega, USA)에 클로닝 하고 pGEMT-DsRed2로 명명하였다. 계속하여 pBac-3×P3-EGFP와 pGEMT- DsRed2 벡터를 각각 제한효소 NheI/AflIII로 처리 후 EGFP 위치에 DsRed2 cDNA를 클로닝하여 pPIG3xP3DsRed를 제작하였다. 이어서 pPIG3xP3DsRed와 pSer1L-Gal4-pGEM-T를 제한효소 Swa I/Afl II로 각각 처리 후 pSer1L-Gal4를 pPIG3xP3DsRed에 클로닝함으로써 pPIG3xP3DsRedpSer1LGal4를 제작하였다.



(그림 설명) 누에 형질전환용 전이벡터 pPIG3xP3DsRedpSer1LGal4 제작. BacR는 piggyBac right arm, BacL는 piggyBac left arm, 3xP3는 곤충 홀눈(stemmata) 및 신경시스템에 특이 발현을 조절하는 유전자 프로모터, DsRed2는 형질전환체 선발을 위한 표지유전자(Enhanced Green Fluorescent Protein), SV40pA는 simian virus 40 poly A, Gal4는 효모 유래의 Gal4 유전자.

(6) 누에알 마이크로인젝션에 의한 누에 형질전환 유도

(가) 누에 형질전환에 적합한 누에알 제조

본 실험에 사용한 누에품종은 농가보급 장려품종인 백옥잠(잠123 x 잠124)을 사용하였다. 백옥잠은 2화성(곤충이 1년간에 몇 세대를 되풀이하는 성질) 품종으로써, 1년간 2번의 세대를 거치면 휴면상태(월년)에 들어간다. 따라서, 2화성 품종인 백옥잠을 형질전환에 적합한 비휴면 상태로 만들기 위하여 산란 후 4시간 이내의 수정란을 25°C에서 30분 동안 염산 처리를 하였다. 염산 처리 후 흐르는 물에 30분간 세척한 후, 슬라이드 글라스에 누에 배아의 배면부와 복면부가 한 방향으로 일정하게 되도록 배열하였다. 이때 1장의 슬라이드글라스 내에는 4열로 15개씩 60개의 알을 부착하였으며, 전체 600개의 누에알을 대상으로 미세주입법에 의한 형질전환을 유도하였다.

(a)



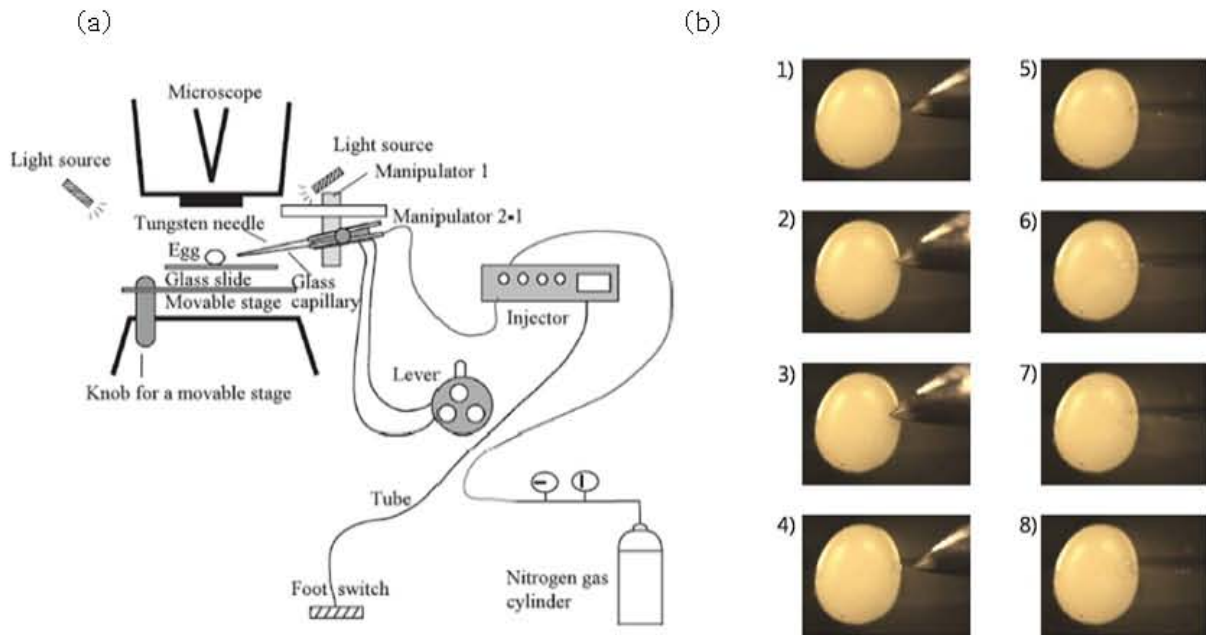
(b)



(그림 설명) 누에 형질전환에 사용되는 누에알 제조. (a) 백옥잠의 누에알을 만들기 위해 잠124 과 잠123의 누에품종 간 교배, (b) 백옥잠 누에 알의 사진.

(나) 누에 초기배아 내 전이벡터 미세주입

pPIG3xP3EGFP4xUASSer1TATA/SPBmCecB1 와 pPIG3xP3DsRedpSer1LGal4 전이벡터는 각각 HELPERA3PIG5-3(Voff) Helper plasmid와의 농도를 1:1의 비율로 하고, microinjection용 완충용액(5mM KCl, 0.5mM phosphate buffer, pH 7.0)에 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 의 농도로 희석하였다. 누에 초기배아로의 microinjection 위치는 초기배의 배면 부분에 주사하였다. 먼저 텅스텐 침으로 누에알에 작은 구멍을 뚫고, 이 구멍에 DNA 용액이 들어있는 microcapillary의 끝을 삽입 후, microinjector의 공기압을 이용하여 DNA 용액을 알 속으로 주입하였다. 이때 각 초기배에 주입된 DNA 용액의 양은 10~15nl/개 이며, 난각에 생긴 구멍은 cyanoacrylate 성분이 함유된 접착제(Henkel, Germany)를 사용하여 봉합하였다. Microinjection 후 누에알은 보습한 패트리디쉬 속에 넣어 25°C에서 부화할 때까지 보호하였다.

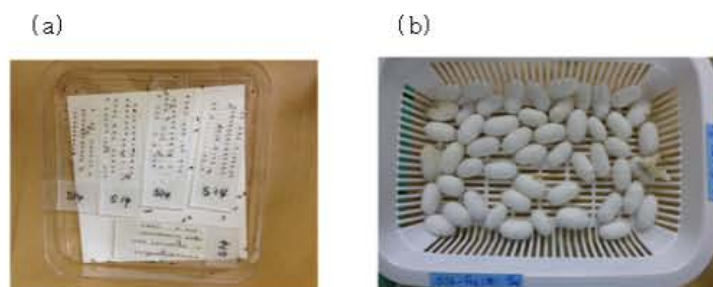


(그림 설명) 누에 초기배아 내 누에형질전환용 전이벡터 미세주입장치. a, microinjection system; b, 누에 초기배에 누에 형질전환용 전이벡터 미세주사 순서(텅스텐 침을 이용하여 누에 알의 난간에 구멍을 뚫은 후 유리 모세주사관을 이용하여 DNA 용액을 위의 구멍으로 주입한다. 그리고 접착제를 사용하여 구멍을 막는다)

(다) BmCecB1 유전자가 도입된 누에 형질전환체 선발 및 특성 분석

① BmCecB1 유전자가 도입 형질전환 유도 G0 세대 사육 및 G1 세대 잠충 생산

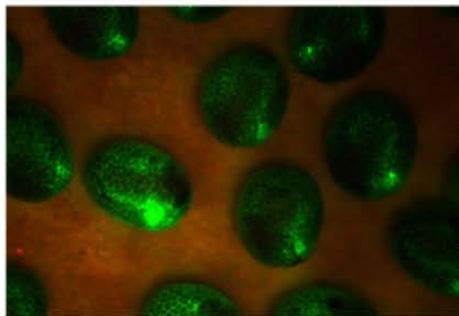
형질전환용 전이벡터를 미세주입 하여 형질전환을 유도한 G0 세대 누에알은 미세주사 후 약 10일이 경과한 때부터 부화를 시작하였다. 슬라이드글라스 위에서 부화한 유충은 3일 간 회수한 결과로 부화율을 조사하였다. 조사 결과, 전체 300개의 미세주사 한 누에알로부터 62마리의 G0 세대 부화유충을 확보할 수 있어, 본 실험에서의 G0 부화율은 20%였다. 부화한 유충은 누에사육용 용기에 옮겨져 국립농업과학원의 표준 누에사육 조건에서 실내사육을 하여 최종적으로 G0 세대 성충(누에나방) 24마리를 확보하였다. 확보한 G0 세대 누에나방은 상호교배를 통해 G1 세대 잠충 12아구를 확보하였다.



(그림 설명) BmCecB1 유전자가 도입 형질전환 유도 G0 세대 사육 및 G1 세대 잠충 생산. (a) 슬라이드글라스 위에서 형질전환을 유도한 G0 세대 어린누에가 부화하고 있는 모습. (b) 부화한 G0 세대 누에 유충을 누에고치까지 사육한 모습.

② BmCecB1 유전자가 도입 형질전환누에 개체 선발 및 사육

확보된 G1 세대 누에알 12개 아구에서 형질전환이 유도된 누에 개체 선발은 Leica(USA)사의 LEICA MZ16FA 현미경과 Leica(USA)사의 Microscope MZ FLIII Flourescence Filter GFP2 형광필터를 사용하여 현미경으로 검경하여 선발하였다. 형질 전환체 선발 과정은 G0 누에나방이 누에알을 산란한 후 4일째부터 부화 직전 시기까지 지속적으로 형광현미경검경을 수행하여 선발하였다. G1 세대 형질전환체 선발 결과, 총 17개 아구로부터 형질전환체 선발을 위한 표지유전자(EGFP)가 누에 배아의 5개의 홀눈(stemmata)과 신경시스템에서 뚜렷하게 발현되는 9개의 아구를 선발할 수 있었다.



(그림 설명) 곤충의 5개의 홀눈(stemmata)과 신경시스템에서 특이적으로 유전자 발현을 제어하는 초파리 유래 3xP3 유전자 프로모터의 조절에 의해서 표지유전자인 EGFP가 누에의 5개의 홀눈과 신경시스템에서 뚜렷하게 발현되고 있는 모습.

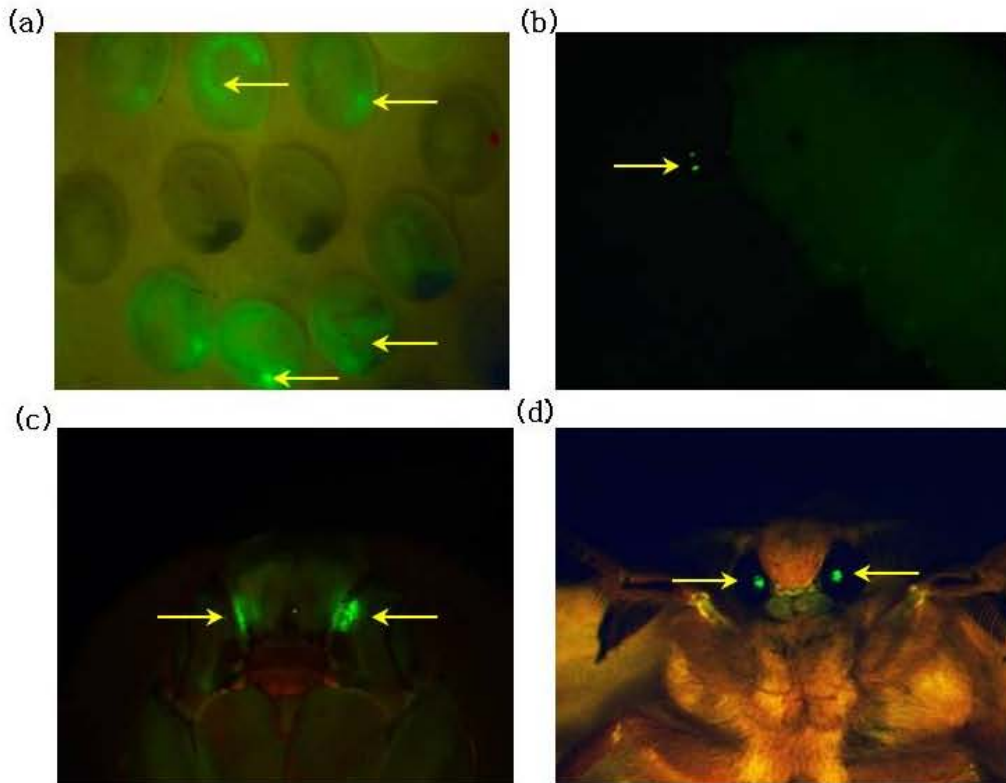
(표 설명) BmCecB1 유전자가 도입된 전이벡터 누에알 미세주입 후 G0 및 G1 세대의 특성분석

Vector	Eggs injected	Number			Percent (%)
		Hatched embryos	G1 broods	Broods with EGFP positive larvae	G1 broods with EGFP positive larvae
pPIG3xP3EGFP4xUAS Ser1TATA/SPBmCecB1	300	62	12	9	37

③ BmCecB1 유전자가 도입 형질전환누에 특성 분석

형질전환이 유도된 누에 개체를 포함하고 있는 9개의 아구는 누에 사육용 잠박에 아구별로 각각 분리하여 사육하였다. 분리 사육한 9개 아구의 누에는 형질전환 되지 못한 누에와 형질전환된 누에가 혼재되어 있기 때문에 각 아구에서의 형질전환 개체 선발을 위하여 누에 1령 2일까지 사육한 후 각각의 누에 개체를 Microscope MZ FLIII Flourescence Filter GFP2 형광필터를 부착한 현미경으로 검경하여 선발하였다. 형질전환누에 선발은 누에 홀눈 내 표지유전자인 EGFP의 발현 유무로서 선발할 수 있었다. 형질전환 개체 선발 결과, 조사한 9개 아구의 형질전환체 발생개체 수는 각 아구 간 차이가 있었는데 적게는 2개체에서 부터 많게는 10개체 이상의 형질전환 개체가 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 이후 각 아구별로 선발된 형질전환누에는 각각 서로 다른 용기에

번데기까지 분리하여 사육한 후 각 개체별 형질전환 여부를 다시 확인하였다. 번데기 때의 형질전환 여부 확인은 향후 성충의 눈으로 변화될 부분에서 선발용 표지유전자인 EGFP가 발현되는지를 형광현미경으로 조사하였다. 번데기 때의 형질전환체 조사 결과, 형질전환이 최종 확정된 번데기는 성충(누에나방)까지 발육시킨 후 같은 아구 내 선발된 성충 간 근친교배(sib-mating)를 유도하여 2세대(G2) 형질전환누에 잠종을 확보하였다.

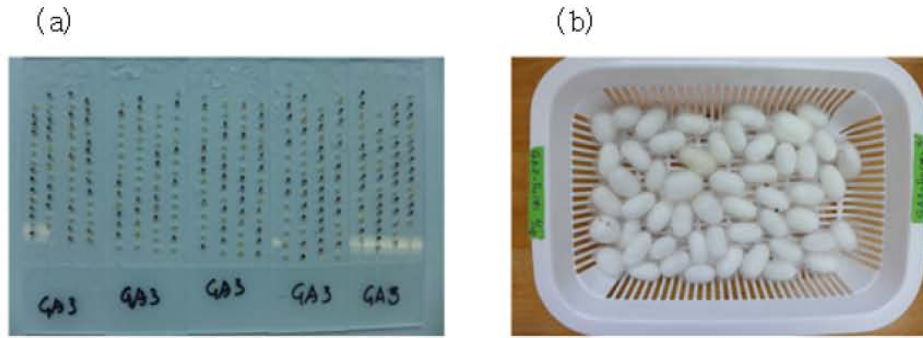


(그림 설명) BmCecB1 유전자가 도입, 선발된 제1세대(G1) 형질전환누에의 표지유전자(EGFP) 발현. 곤충의 눈과 신경시스템에서 특이적으로 발현하는 3xP3 유전자 프로모터의 발현 조절에 의해서 목적인 형질전환이 유도된 누에에서는 누에의 5개 홑눈에만 EGFP의 특이 발현을 관찰할 수 있다(a, b). 번데기(c)와 성충(d)시기에는 성충의 눈에서만 EGFP가 특이적으로 발현하는 것을 확인할 수 있음.

(라) pSer1L-Gal4 유전자가 도입된 누에 형질전환체 선발

① pSer1L-Gal4 유전자가 도입된 형질전환 유도 G0 세대 사육 및 G1 세대 잠종 생산

누에 초기배아 내 형질전환용 전이벡터를 미세주입한 G0 세대의 누에알은 약 10일 후부터 부화를 시작하였다. 슬라이드글라스 상에서 부화한 유충을 약 3일간 회수하여 부화율을 조사하였다. 부화율 조사 결과, 미세주사 한 전체 300개의 누에알로부터 106마리(35%)의 G0 세대 부화유충을 확보할 수 있다. 부화유충은 누에사육용 잠박으로 옮겨 표준 누에사육 조건으로 실내사육 하였으며, 최종적으로 누에나방 104마리를 확보하였다. 확보한 G0 세대 누에나방은 각각 아구의 근친교배하여 G1 세대 잠종 29아구를 확보하였다.



(그림 설명) pSer1L-Gal4 유전자가 도입된 형질전환 유도 G0 세대 사육 및 G1 세대 잠충 생산. (a) 형질전환을 유도한 G0 세대 최종 부화 후의 슬라이드 모습. (b) 부화한 G0 세대 누에고치.

② pSer1L-Gal4 유전자가 도입된 형질전환누에 선발 및 사육

확보한 G1 세대의 잠충 29아구로부터 Leica (USA)사의 LEICA MZ16FA 현미경과 Leica (USA)사의 Microscope MZ FLIII Fluorescence Filter Red 형광필터를 사용하여 형질전환된 개체를 선발하였다. 형질전환체 선발은 산란 후 4일째부터 부화 직전까지 지속적으로 형광현미경검경을 수행하여 선발하였다. G1 세대 형질전환 개체 선발 결과, 조사한 29아구로부터 선발용 표지유전자(DsRed)가 6개의 아구에서 누에 배아의 5개의 홑눈(stemmata)과 신경시스템에서 뚜렷이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.



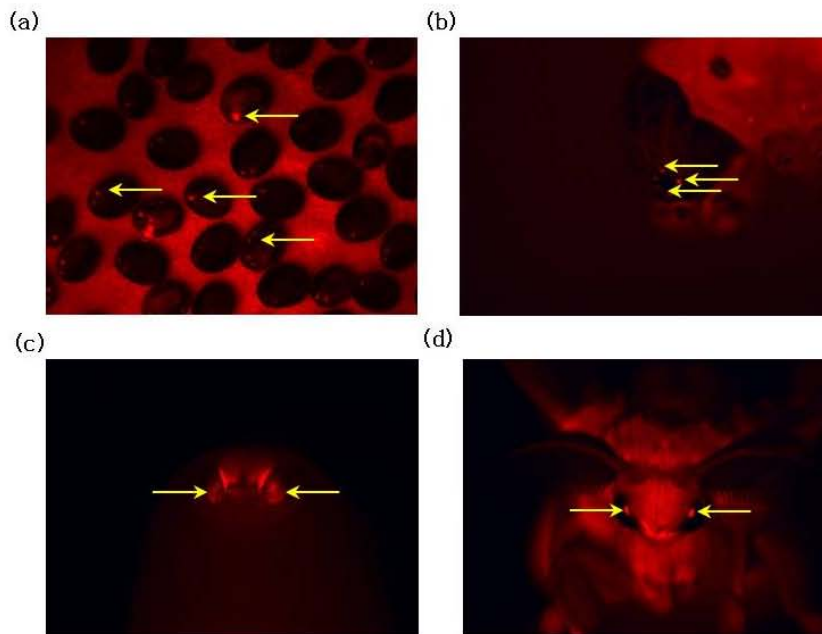
(그림 설명) 곤충의 5개의 홑눈(stemmata)과 신경시스템에서 특이적 발현을 유도하는 초파리 유래 3xP3 유전자 프로모터의 조절 하에 DsRed가 누에의 5개의 홑눈과 신경시스템에서 뚜렷하게 발현되고 있음

(표 설명) pSer1L-Gal4 유전자가 도입된 누에의 G0 및 G1 세대의 특성 분석

Vector	Eggs injected	Hatched embryos	Number		Percent (%)
			G1 broods	Broods with EGFP positive larvae	G1 broods with EGFP positive larvae
pPIG3xP3DsRed pSer1LGal4	300	106	29	6	20

③ pSer1L-Gal4 유전자가 도입된 G1 세대 형질전환누에 사육 및 특성 분석

형질전환된 누에 개체를 포함하고 있는 G1 세대 6개 아구는 누에사육용 잠박에 개별로 분리하여 사육하였다. 분리 사육한 6개 아구에서 부화한 누에는 형질전환되지 못한 누에와 형질전환된 누에가 혼재되어 있으므로 형질전환체 선발을 위하여 1령 2일까지 사육한 후, 전체 사육 누에를 대상으로 형광현미경 검경에 의해서 선발하였다. 형질전환체 선발은 누에 흘눈 내 표지유전자인 DsRed 발현 유무로 확인하였다. 전체 6개 아구에서 형질전환 발생 개체 수는 각각의 아구별로 차이가 있었는데 적게는 1개체부터 많게는 10개체 이상을 확인할 수 있었다. 이후 각 아구별로 선발한 누에 형질전환체는 아구별로 분리하여 번데기 까지 사육한 후 번데기에서 형질전환 여부를 다시 확인하였다. 번데기의 형질전환 여부는 향후 성충의 눈으로 형성될 부분에 표지유전자인 DsRed 발현 유무를 형광현미경으로 검경하였다. 형광현미경 검경에 의해서 형질전환이 확인된 번데기는 성충(누에나방)까지 발생시킨 다음, 같은 아구 내 성충을 근친교배 제 2세대(G2) 잠종을 각각 확보하였다.



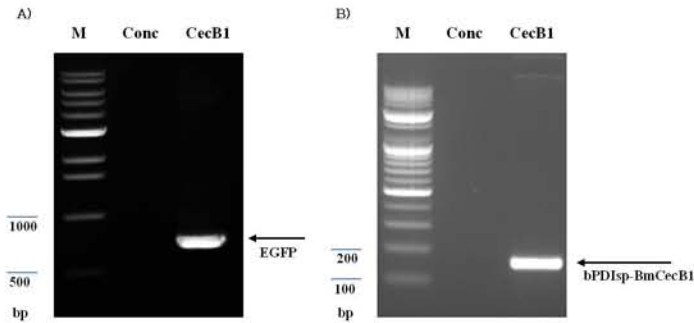
(그림 설명) pSer1L-Gal4 유전자가 도입된 제1세대(G1) 형질전환누에의 표지유전자(DsRed) 발현 특성 분석. 곤충의 눈과 신경시스템에서 특이적으로 발현을 제어하는 3xP3 유전자 프로모터의 조절에 의해서 누에의 5개 흘눈에만 DsRed 단백질이 특이적으로 발현하는 것을 확인할 수 있다(a, b). 번데기(c)와 성충(d)에서는 눈에서만 특이적으로 EGFP가 발현하는 것을 확인할 수 있음.

(마) BmCecB1 와 Gal4 유전자가 도입된 누에 형질전환체의 특성분석

① 누에 계놈 내 BmCecB1 유전자 도입 검정

BmCecB1 유전자 도입 후 분리사육한 제1세대(G1) 누에 형질전환체 9개 아구의 강건성, 생존율, 우화율 및 산란율 등을 고려하여 최종적 1개 아구만을 선정하였다. 선정한 1개의 아구에서 누에 개체를 대상으로 BmCecB1 유전자가 도입되어 있는지를 확인하였다. 선정된 1개의 형질전환체 아구는 CecB1으로 명명하였다. 도입유전자인 EGFP와 BmCecB1의

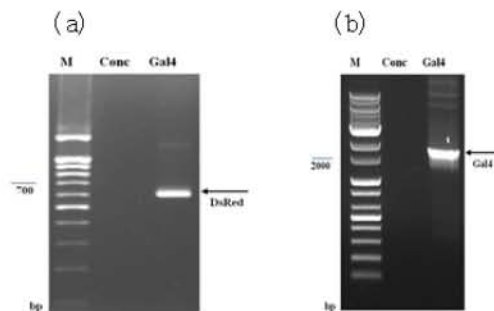
형질전환누에 게놈 내 삽입 여부는 PCR 분석법으로 확인하였다. 이때, BmCecB1 유전자 도입 확인은 비 형질전환체인 정상 누에도 BmCecB1 유전자를 보유하고 있기 때문에 bPDIs(49bp)와 BmCecB1(105bp) 유전자를 포함하는 서열의 PCR 증폭산물과 EGFP 유전자의 PCR 증폭산물을 얻을 수 있도록 PCR 프라이머를 제작하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 정상 누에에서는 확인되지 않는 EGFP(720bp)와 bPDIs-BmCecB1(162bp)에 해당하는 PCR 산물을 확인할 수 있어, 형질전환누에의 게놈 내에 EGFP와 BmCecB1 유전자가 온전히 삽입되어 있음을 확인할 수 있었다.



(그림 설명) 누에 형질전환체 게놈 내 EGFP 및 BmCecB1 유전자 도입 여부 확인. PCR 분석법에 의해 정상누에와 형질전환누에(CecB1)의 EGFP 및 bPDIs-BmCecB1 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers; Conc, 정상누에; CecB1, 형질전환누에

② 누에 게놈 내 Gal4 유전자 도입 검정

Gal4 유전자 도입 후 분리사육한 제1세대(G1) 누에 형질전환체 6개 아구의 강건성, 생존율, 우화율, 산란율 등을 고려하여 최종적 1개 아구만을 선정하였다. 선정된 1개의 아구 내 누에 개체를 대상으로 Gal4 유전자의 도입 여부를 확인하였다. 선정된 1개의 형질전환누에 아구는 Gal4로 명명하였다. 도입유전자인 DsRed와 Gal4의 형질전환누에 게놈 내 삽입 여부는 BmCecB1 유전자 도입 여부 확인방법과 마찬가지로 PCR 분석으로 확인하였다. 그 결과, 정상누에에서는 확인되지 않는 DsRed(678bp)와 Gal4(2,646bp)에 해당하는 PCR 증폭산물을 확인할 수 있어, 형질전환누에의 게놈 내에 도입유전자인 DsRed와 Gal4가 정확하게 삽입되어 있음이 검정되었다.



(그림 설명) Gal4 유전자가 도입된 형질전환누에 게놈 내 DsRed 및 Gal4 유전자 확인. PCR 분석법에 의한 정상누에와 형질전환누에(Gal4)의 DsRed 및 Gal4 유전자 증폭 여부 분석. M, DNA size markers; Lane M, 정상누에; Lane Conc, 정상누에; Gal4, 형질전환누에.

③ 형질전환누에 게놈 내 BmCecB1 와 Gal4 유전자 copy 수 및 염색체 위치 결정

○ 게놈 내 EGFP 및 BmCecB1 유전자의 도입이 확인된 형질전환누에 라인 CecB1에 대하여 BmCecB1 유전자가 게놈 내에서 몇 copy로 존재하지와 몇 번 염색체에 도입되었는지를 확인하기 위하여 Inverse PCR를 다음과 같이 수행하였다. 먼저 형질전환누에 라인 CecB1으로부터 게놈 DNA를 순수 분리한 후 제한효소 Sau3AI으로 처리하였다. 제한효소 Sau3AI로 절단된 게놈 DNA는 T4 DNA ligase를 사용하여 self-ligation을 유도한 후 이를 주형으로 하여 5' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5'-ATCAGTGACACTTACCGCATTGACA-3' 와 antisense primer는 5'-TGACGAGCTTGTTGGTGAGGATTCT-3' 을 사용하였고, 3' 접합부위를 증폭하기 위해서 sense primer는 5' -TACGCATGATTATCTTTAACGTA-3' (23 mer)와 antisense primer는 5' -GGGGTCCGTCAAACAAAACATC-3' (23 mer)를 사용하여 Inverse PCR를 수행하였다. Inverse PCR 로 증폭된 PCR 산물은 각각 pGEM-T easy 벡터에 클로닝 한 다음, 삽입 단편에 대하여 염기서열을 결정하였다. 확보된 염기서열에서 pPIG3xP3EGFP4xUASSer1TATA/SPBmCecB1 전이벡터(piggyBac) 서열을 제외한 염기서열만을 추출하여 Web search engine(Silkworm genome research program; <http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)을 이용하여 누에 염색체 내 삽입 위치를 결정하였다. 분석 결과, 형질전환 라인 CecB1은 1 copy로 존재하고 있었으며, 염색체 좌위는 8번 염색체에 삽입되어 있었다.

(표 설명) 형질전환누에 게놈 내 BmCecB1 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 확인

G1 line	Chromosome	5' Genomic sequences	3' Genomic sequences
CecB1	8	TTAAACGTGGGTTCCCTAACAC CTAATAACAATCAATAATGGA ATTCTGTCAATTGTTTATTTTT CTGGATGTGAATGCACAGTCG TCA	-piggyback- TTAATAATTGCGAAAAGGCCT GGATTGCAGTTTGACATCAA TGCTCTGTCTAATTCAATATC AAAATAAACATAG

○ Gal4 유전자의 도입이 확인된 형질전환 라인 Gal4에 대하여 Gal4 유전자가 형질전환누에 게놈 내에 몇 copy로 존재하지와 몇 번 염색체에 도입되었는지를 확인하기 위하여 Inverse PCR를 다음과 같이 수행하였다. 실험 과정은 위의 형질전환누에 라인 CecB1의 방법과 동일하게 진행하였다. Inverse PCR 결과로 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하고 삽입 단편의 염기서열을 결정하였다. 분석된 염기서열에서 pPIG3xP3DsRedpSer1LGal4 전이벡터(piggyBac) 서열을 제외한 염기서열만으로 SWeb search engine(Silkworm genome research program; <http://sgp.dna.affrc.go.jp/>)을 이용하여 누에 염색체 내 삽입 위치를 결정하였다. 분석 결과, 형질전환 라인 Gal4는 게놈 내 1 copy로 존재하고 있었으며, 염색체 좌위는 1번 염색체에 삽입되어 있었다.

(표 설명) 형질전환누에 게놈 내 Gal4 유전자의 도입 copy 수 및 염색체 위치 확인

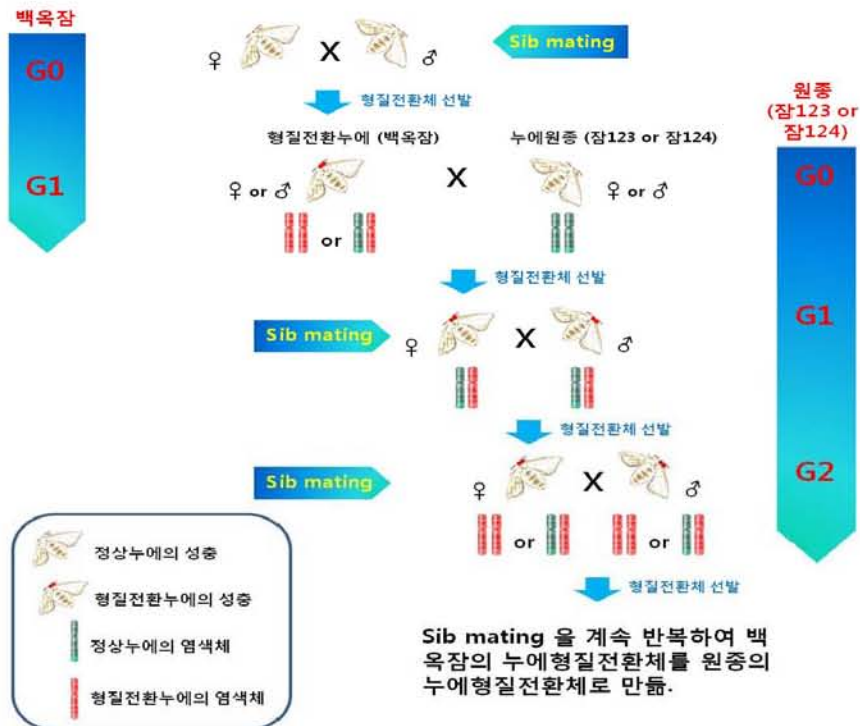
G1 line	Chromosome	5' Genomic sequences		3' Genomic sequences
Gal4	1	CTTAAGCCATCTATCCATTCCAG ATGGTCCATTTCTGAGGTTTGAT ATAATAGATCAGACTGACTATAT TTAATCTTATACCTTTAA	-piggyback-	TTAAACGAGCAATTCTTGATAT TAATATATATAATCTGAATCTC GGAAACGGCTCCAACGATTTTC ATAAAATTTAGTAGGATTTCAGG GGATT

(바) G2 세대 형질전환누에의 도입유전자 발현 특성분석

① G2 세대 형질전환누에 호모 선발 및 호모선발체의 검정교배

각각 선발된 형질전환누에 라인 CecB1과 Gal4를 형광현미경 검경으로 G2 세대 형질전환누에의 호모개체들을 선발하였다. 그리고 선발된 형질전환누에들은 백옥잠과 교배하여 G3 세대 형질전환누에를 얻었고, G3 세대 형질전환체들의 알을 형광현미경으로 검경하여 모든 개체에서 EGFP 또는 DsRed가 발현되는 아구들을 확인할 수 있었다.

이러한 선발 과정을 통해 본 실험에서 선발한 G2 세대 형질전환누에들이 호모개체임을 확인할 수 있었다. 이렇게 확인된 누에 형질전환체 개체들을 이용하여 BmCecB1 재조합단백질을 누에 세리신에서 발현시켰다.

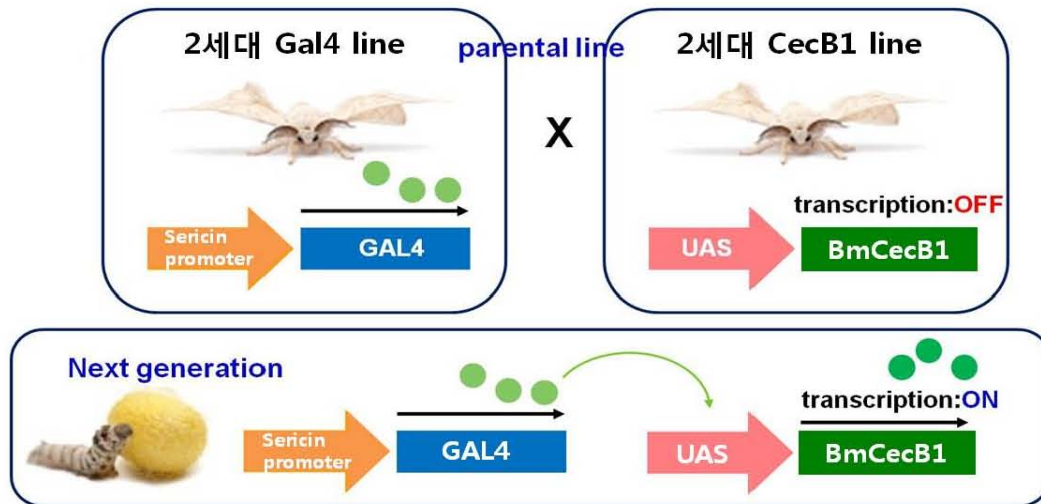


(그림 설명) G2 세대 형질전환누에의 호모선발 과정 모식도.

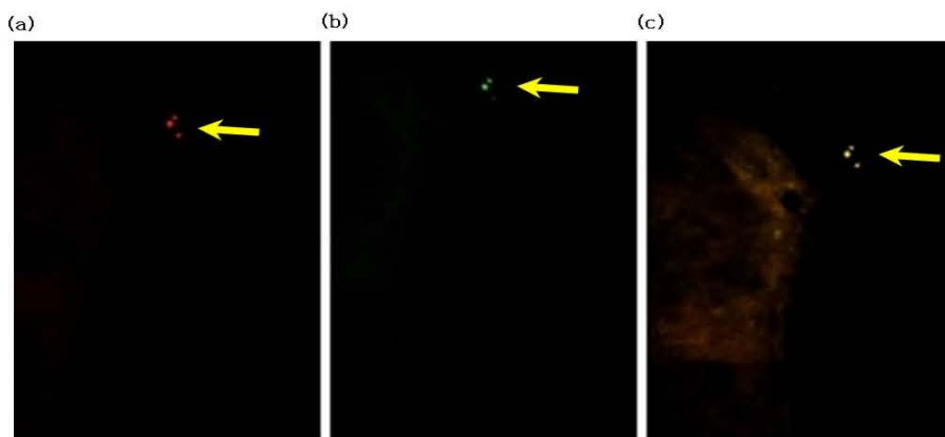
② BmCecB1 항균펩타이드 생산을 위한 누에형질전환체 교배

G2 세대에서 선발된 형질전환누에는 이후 성충까지 사육한 후 Gal4 형질전환누에와 UAS 형질전환누에를 서로 교배하여 Gal4/UAS G1 세대 형질전환누에의 알을 확보하였다. 이 때, 항균펩타이드 BmCecB1 생산을 위해 Gal4 형질전환누에 라인은 수컷을, UAS 형질

전환누에 라인은 암컷을 사용하였다. 총 10쌍을 교배하여 산란한 후 부화된 유충으로부터 형광현미경을 이용하여 교배별 아구로 부터 형질전환누에를 선발하였다. 이때 누에는 2령 기잠을 사용하였고, Gal4/UAS 가 모두 존재하는 형질전환체는 EGFP와 Red 형광필터에서 누에 눈이 두 색깔 모두 존재하는 것을 확인 할 수 있었고, 일부는 EGFP 형광필터에서 누에 눈이 노란색을 띄는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 정확하게 알 수 없지만, 노란색을 나타내는 형질전환누에 또한 두 형광필터에서 각각 녹색과 적색을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.



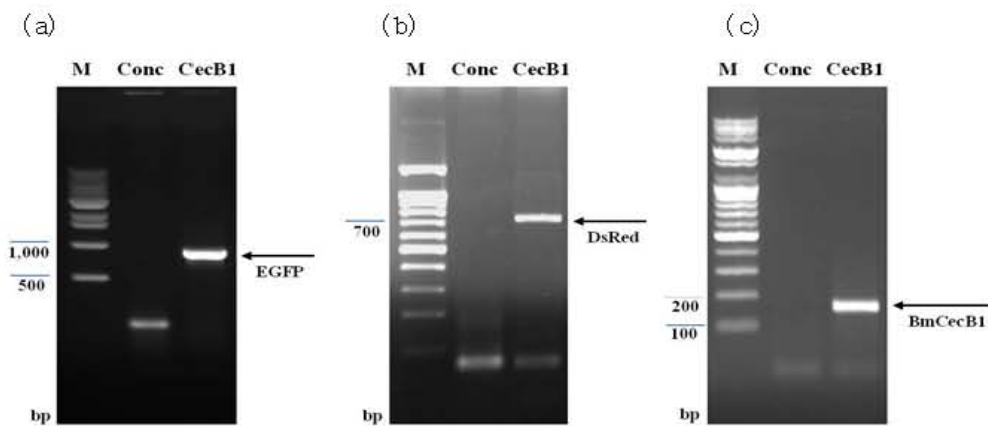
(그림 설명) G2 세대 Gal4 형질전환누에 라인과 G2 세대 UAS 형질전환누에 라인 간의 교배에 의한 항균펩타이드(BmCecropin B1) 생산. G2 세대에서 선발된 형질전환누에 pPIG3xP3DsRedpSer1LGal4와 pPIG3xP3EGFP4xUASSer1-TATA/SPBmCecB1을 각각 선발하여 서로 교배한 후 다음 세대에서 BmCecropin B1 항균펩타이드를 생산함.



(그림 설명) Gal4/UAS G1 세대 형질전환누에 형광단백질 발현 검경. 2령 기잠의 Gal4/UAS G1 세대 형질전환누에를 EGFP 와 Red 형광필터에서 관찰한 결과로서, 그림 a와 b는 같은 형질전환누에로서 서로 다른 형광필터(EGFP, DsRed)를 사용하여 관찰한 결과이고 그림 c는 다른 형질전환누에로서 GFP 형광필터에서 눈이 노란색을 나타내는 형질전환누에. a, Red 형광필터에서 형질전환누에 눈을 관찰; b, GFP 형광필터에서 형질전환체 누에 눈을 관찰한 결과.

③ G1 세대 Gal4/UAS 형질전환누에의 도입 유전자의 전사체 발현 분석

G1 세대 형질전환누에 라인 Gal4/UAS를 5령 3일까지 사육한 후 도입유전자인 EGFP, DsRed 및 BmCecB1의 전사체 발현양상 분석을 수행하였다. 이를 위하여 대조구인 5령 3일 정상누에와 형질전환누에의 whole body를 각각 액체질소로 마쇄한 후 total RNA를 분리하여 1st strand cDNA를 합성하였다. 합성한 1st-strand cDNA를 주형으로 EGFP와 DsRed 그리고 BmCecB1 유전자에 대하여 RT-PCR를 수행하였다. RT-PCR 분석 결과, 정상누에에서는 어떠한 PCR 증폭산물도 확인할 수 없는 반면, G1 세대 Gal4/UAS 형질전환누에에서는 EGFP와 DsRed 그리고 BmCecB1 유전자의 발현 전사체를 뚜렷하게 확인할 수 있었다.

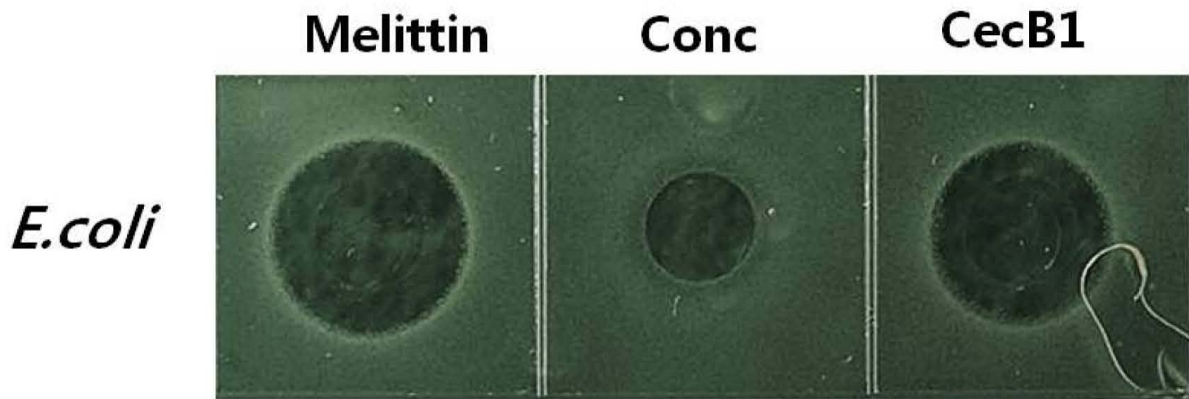


(그림 설명) G1 세대 Gal4/UAS 형질전환누에로부터 도입유전자 EGFP, DsRed, BmCecB1 전사체 발현 분석. RT-PCR에 의한 정상누에와 형질전환누에의 a, EGFP; b, DsRed; c, BmCecB1 유전자 검증 분석. M, DNA size markers; Con, 정상누에; CecB1, 형질전환누에.

(사) G1 세대 Gal4/UAS 형질전환누에 항균활성 검정

① Gal4/UAS 형질전환누에로 부터 세리신 분리 및 정제

Gal4/UAS 형질전환누에 고치로 부터 세리신을 분리하기 위하여 다음의 과정을 진행하였다. 생사로서 되는 견직물 20g을 물 1l 중에 95℃에서 2시간 처리하고 세리신 수용액을 추출하였다. 얻어진 추출액을 평균공경 0.2µm의 필터로 여과하고, 응집물을 제거한 후 여액을 역침투막에 의하여 탈염함으로써 0.2% 농도의 무색투명한 세리신 수용액을 얻었다. 이 수용액을 에바포레이터를 사용하여 세리신 농도 약 2%까지 농축하였다. 항균펩타이드 BmCecB1 에 대한 항균활성을 측정하기 위해, 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법을 이용하였다. 세리신 수용액 시료는 원심분리하여 상층액만 분리한 후 항균활성검정에 사용하였다. 항균활성검정에 사용된 균주는 일차적으로 그람음성 세균인 병원성 E. coli (KACC 1039)에 대하여 항균활성을 배지상에서 가시화하여 검정하였다. 실험 결과, BmCecB1은 그람음성 세균인 병원성 E. coli 에서는 대조구로 사용한 멜리틴(160µg/ml)과 유사한 clear zone이 확인되어 항균활성을 갖고 있음을 확인하였다. 그러므로 본 실험에서 발현시킨 BmCecB1이 그람 음성균에 대해 높은 활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.



(그림 설명) Gal4/UAS 형질전환누에로부터 추출한 항균펩타이드(BmCecB1) 수용액의 그람음성균 E.coli 항균활성검정. Melittin, Melittin (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$); Conc, 정상누에의 세리신 용액(10 μl); CecB1, 형질전환누에의 세리신 용액(10 μl).

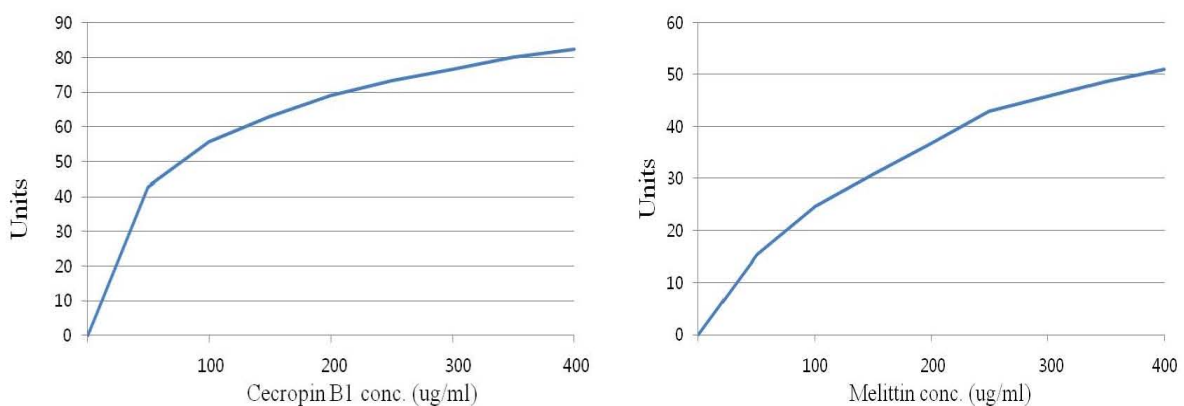
② 형질전환누에 세리신 내에 BmCecB1 발현량 상대적 비교 분석

제작된 형질전환누에 세리신에서 상기 정제된 Cecropin B1의 함량을 분석하기 위하여 본 과제의 제 2 세부과제에서 실시한 방법과 동일한 방법으로 발현량 상대분석을 실시하였다. 형질전환누에 세리신으로부터 정제된 항균펩타이드인 Cecropin B1의 함량을 측정된 결과, 누에고치 1g 당 0.12mg의 Cecropin B1이 함유되어 있는 것으로 조사되었다. 또한, 세리신에 함유된 Cecropin B1 발현량을 측정하기 위해서 Melittin(Sigma)의 농도에 따른 항균력을 기준으로 상대적 비교분석을 수행하였고, 그 결과를 수치화하여 이를 바탕으로 항균활성도 그래프 추세선 수식을 다음과 같이 작성하였다. 그래프 추세선 수식은 다음과 같다.

$$\text{Cecropin B1} : Y=18.215\ln(X)-0.7553$$

$$\text{Melittin} : Y=13.215\ln(X)-5.894$$

* Y= 항균활성도(units, 1mm inhibition zone=10U), X=펩타이드 처리농도



(그림 설명) 형질전환누에로부터 추출된 Cecropin B1의 항균활성 분석. a, Cecropin B1; b, melittin(Control)

마. 항균펩타이드 누에 현장 실증 대량 사육(위탁: 경남도농업기술원)

(1) 누에의 품종별 누에 면역유도 및 항균활성 검정(2012)

(가) 시험재료 및 방법

- ① 시험품종 : 잠123×잠124, 잠125×잠126, 잠151×잠152
- ② 사육시기 및 조건(5월~7월)

령 별	1령	2령	3령	4령	5령
온 도	26~27℃	26℃	25℃	22~23℃	22~23℃
습 도	90%	85%	80%	65~75%	65~75%

③ 면역유도조건

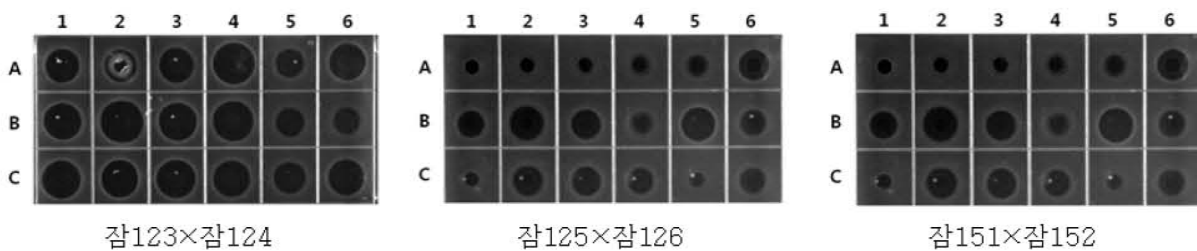
- 면역유도방법 : 주사법(면역유도제, 제2세부과제 제공받음)
- 면역유도시기 : 5령5일째
- 냉동시기 : 면역유도 후 24시간째

④ 항균활성 조사방법

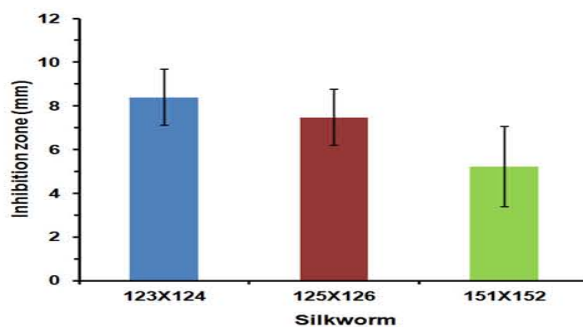
- 혈림프 채취 방사선 확산 분석법(RDA)으로 병원성 대장균 항균활성 검정
- 항균활성 검정은 병원균 생육억제를 나타내는 Inhibition Zone의 크기 측정

(나) 시험결과

누에장려품종 3개품종(잠123×잠124, 잠125×잠126, 잠151×잠152)의 면역유도에 따른 항균효과를 비교 분석한 결과, 방사선 확산 분석(RDA)에서 임의 선별한 각 품종별 누에유충 18개체에 대하여 각각의 혈림프 시료의 대장균에 대한 Inhibition zone 측정하여 면역유도에 따른 항균활성을 검정하였으며, Inhibition zone의 크기를 측정하여 평균 및 편차를 도표화하여 잠123×잠124(백옥잠)에서 주사접종에 따른 면역 유도 효율이 가장 높은 것으로 조사되었음



(그림 설명) 누에장려품종에 따른 면역유도 효과 분석(무작위 18개체 선발, 혈림프 분석).



(그림 설명) 누에 품종별 면역유도에 따른 항균활성 검정(Inhibition zone)

(2) 누에 면역유도 최적 품종 선발(2014)

(가) 시험재료 및 방법

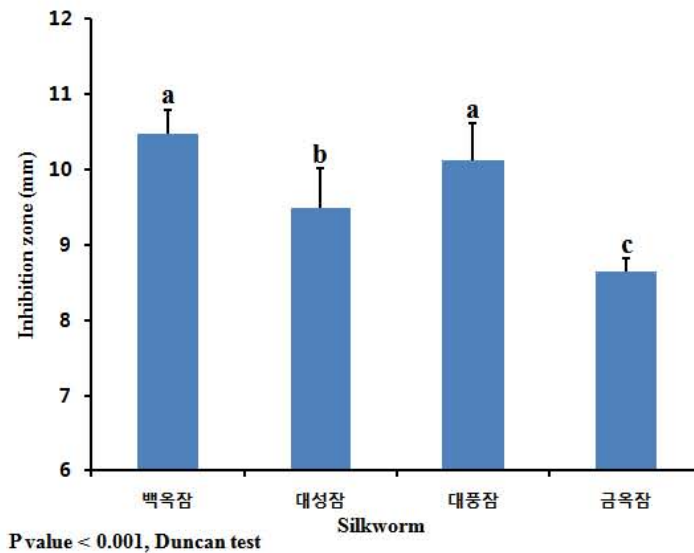
- ① 시험품종 : 백옥잠, 대성잠, 대풍잠, 금옥잠
- ② 사육시기 및 조건(5월~7월)

명 별	1명	2명	3명	4명	5명
온 도	26~27℃	26℃	25℃	22~23℃	22~23℃
습 도	90%	85%	80%	65~75%	65~75%

- ③ 면역유도방법 : 주사법
- ④ 면역유도시기 : 5령5일째
- ⑤ 냉동시기 : 면역유도 후 18시간 경과
- ⑥ 시료 채취 및 조사방법
 - 주사접종 시기(5령 5일)까지 사육 및 유충 체강에 면역유도제 주사접종
 - 18시간 면역 유도 후 각 품종별 50마리 임의 선별
 - 혈림프 채취 후 방사선 확산 분석법(RDA)으로 병원성 대장균에 대한 항균활성 검정
 - 항균활성 검정: 병원균 생육억제를 나타내는 클리어 존(Inhibition zone)의 크기 측정

(나) 시험결과

임의 선별한 각 품종별 누에 혈림프에 대한 방사선 확산 분석(RDA)결과, 백옥잠 및 대풍잠에서 주사접종에 따른 면역 유도 효율이 가장 높은 것으로 조사되었음.



(그림 설명) 면역유도제 주사에 따른 누에 품종별 항균활성 비교검정

(3) 면역유도 누에 대량 생산

(가) 2012년도 면역유도 누에 대량 생산

- ① 사육시기 : 2012년 5월, 8월, 9월(3회)
- ② 사육량 : 회별 2상자분(2만립/1상자)
- ③ 사육방법

- 어린누에 : 방견지육
- 큰누에 : 다단사육

④ 사육조건

령 별	1령	2령	3령	4령	5령
온 도	26~27℃	26℃	25℃	22~23℃	22~23℃
습 도	90%	85%	80%	65~75%	65~75%

⑤ 2013년도 편역유도 누에 생산 결과

- 누에사육은 경남농업기술원의 잠업사업장 시험잠실에서 대량사육을 위하여 누에 사육틀을 이용하여 누에를 사육하였음. 사육 시기는 5월, 8월, 9월 3회 실시하였으며 각각 2상자분(상자당 2만립)을 사육하였으며, 사육 온습도는 누에치기 기준에 의하여 실시하였다.
- 누에치기를 시작한 누에를 5령5일째에 냉수에 침지 하여 누에를 기절시킨 후 면역물질(0.5ml)을 주사한 후 누에를 다시 뽕잎을 급여하고 24시간을 사육 (면역물질 주사 후 24시간째)후 누에를 수거, 냉동 처리하였다.
- 3회에 걸쳐 실시한 편역유도누에 사육 결과 320kg을 생산하여 천연항생제 사료첨가제 시험용(효과 시험 및 재형화 시험) 시료 제공함



냉수침지



유도물질주사



뽕잎급여

(그림 설명) 누에 면역화 및 누에 대량사육

(나) 2013년도 편역유도 누에 대량 생산

- ① 사육시기 : 2013년 5월~10월(5회)
- ② 사육품종 : 백옥잠(잠123x잠124)
- ③ 사육방법
 - 어린누에 : 방견지육
 - 큰누에 : 다단사육

④ 사육조건

령 별	1령	2령	3령	4령	5령
온 도	26~27℃	26℃	25℃	22~23℃	22~23℃
습 도	90%	85%	80%	65~75%	65~75%

⑤ 2013년도 편역유도 누에 생산 결과

- 누에사육은 5월~10월 사이 실시하였으며 3상자분(상자당 2만립)을 5회에 나누어 사육하였음.

- 누에사육 온습도는 누에치기 기준에 의하여 실시하였다.
- 누에치기를 시작한 누에를 5령5일째에 냉수에 침지 하여 누에를 기절시킨 후 면역물질(0.5ml)을 주사
- 주사한 누에를 다시 뿔잎을 급여하고 18시간을 사육 (면역물질 주사 후 18시간제)후 누에를 수거, 냉동 처리
- 5회에 걸쳐 실시한 면역유도누에 사육 결과 192kg을 생산하여 천연항생제 사료첨가제 시험용 시료 제공

(표 설명) 2013년도 면역유도누에 대량 사육 성적

잠기별	품종명	부화비율	화용비율	사육경과	5령5일 유충무게
춘잠기	백옥잠	94%	91%	23.05	7.4g
추잠기	백옥잠	95%	76%	24.03	6.1g

(다) 2014년도 면역유도 누에 대량 생산

- ① 사육시기 : 2014년 5월~6월
- ② 사육품종 : 백옥잠(잠123x잠124), 대조(한생잠, 금황잠)
- ③ 사육방법
 - 어린누에 : 방견지육
 - 큰누에 : 다단사육
- ④ 사육조건

령 별	1령	2령	3령	4령	5령
온 도	26~27℃	26℃	25℃	24.0℃	23~24℃
습 도	90%	85%	75%	70%	65~75%

⑤ 사육결과

- 봄누에사육시기에는 백옥잠과 한생잠 그리고 금황잠의 사육성적이 같은 것으로 조사되었음

(표 설명) 누에경과조사(품종별 공히 동일한 성적을 보임)

령 별		1령	2령	3령	4령	5령
경과 일수	백옥잠	7.07	4.01	5.05	5.05	8.12
	한생잠	7.07	4.01	5.05	5.05	8.12
	금황잠	7.07	4.01	5.05	5.05	8.12

(표 설명) 품종별 대량 사육 화용비율

품종명	백옥잠	한생잠	금황잠
화용비율	99.2	99.2	98.0

(라) 2015년도 면역유도 누에 대량 생산

- ① 사육시기 : 2015년 5월~6월
- ② 사육품종 : 백옥잠(잠123x잠124), 대조(한생잠, 금황잠)
- ③ 사육방법
 - 어린누에 : 방견지육
 - 큰누에 : 다단사육
- ④ 사육조건

령 별	1령	2령	3령	4령	5령
온 도	26~27℃	26℃	25℃	24.0℃	23~24℃
습 도	90%	85%	75%	70%	65~75%

- ⑤ 사육결과
 - 경과조사 결과 품종별 동일한 사육 성적 확인

(표 설명) 면역유도누에 적합형 누에 품종 선발을 위한 대량사육(경과일수) 성적

령 별	1령	2령	3령	4령	5령	
경과 일수	백옥잠	7.07	4.01	5.05	5.05	8.12
	한생잠	7.07	4.01	5.05	5.05	8.12
	금황잠	7.07	4.01	5.05	5.05	8.12

(표 설명) 면역유도누에 적합형 누에 품종 선발을 위한 대량사육(화용비율) 성적

품종명	백옥잠	한생잠	금황잠
화용비율	99.2	99.2	98.0

(마) 항균펩타이드(BmRelish1, BmCecB1) 형질전환누에 대량 사육(2014, 현장실증)

- ① 사육 품종 : 항균펩타이드 생산 형질전환누에
 - Donor/Helper 시스템 이용 BmRelish1 도입 형질전환누에 알(약 1만립)
 - Gal4/UAS 시스템 이용 BmCecB1 도입 형질전환누에 알(약 1만립)
 - (대조품종) 백옥잠, 한생잠, 부황잠
- ② 현장실증 사육시기; 9월~10월 실시
- ③ 사육방법
 - 어린누에 : 방견지육
 - 큰누에 : 다단사육
- ④ 사육조건

령 별	1령	2령	3령	4령	5령
온 도	25℃	25℃	25℃	24℃	23~24℃
습 도	80%	80%	80%	75%	75%

⑤ 사육성적

- 누에사육 온습도는 누에치기 기준에 의하여 실시하였다.
- 사육 결과 192kg을 생산하여 천연항생제 사료첨가제 시험용 시료 제공

(표 설명) 항균펩타이드를 생산하는 형질전환누에 대량 사육 결과

품종명	부화비율(%)	장잠기 감잠비율(%)	화용비율(%)	사육경과(일)	5령 3일 유충무게(g)
BmRelish1	96.5	52.4	-	23.05 (5령 5일까지)	2.15
BmCecB1	96.0	29.2	-	21.11 (5령 5일까지)	2.18
한생잠(대조)	99.0	4.5	92.1	23.05	2.31
백옥잠(대조)	97.4	1.7	95.1	22.03	2.22
금황잠(대조)	99.0	2.5	89.9	23.03	2.75



(그림 설명) 항균펩타이드 생산 형질전환누에 현장실증용 누에알 생산. a, 누에알 약 2만립 생산; b, LMO누에알 안전이송 위한 밀봉 포장 및 c, 운반.



(그림 설명) 형질전환누에씨(LMO) 소잠장면(경상남도농업기술원 잠사곤충시험장)

(바) 항균펩타이드 형질전환누에 대량 사육 현장실증(2015)

- ① 사육 품종 : 항균펩타이드 생산 형질전환누에 및 일반누에
 - (형질전환누에) BmRelish1, BmCecB1, Melittin 생산 형질전환누에
 - (대조품종) 백옥잠, 한생잠, 금황잠
- ② 현장실증 사육시기; 9월~10월 실시
- ③ 사육방법
 - 어린누에 : 방견지육
 - 큰누에 : 다단사육
- ④ 사육조건 : 표준사육법 준함
- ⑤ 시험성적

형질전환누에	산란수 (립)	부화비율 (%)	화용비율 (%)	사육경과 (일)	전견중 (g)	전충중 (cg)	전충비율 (%)
BmRelish1	271	95	79.3	23.20	1.57	31	19.7
BmCecB1	298	99	80.1	23.18	1.40	30	21.4
Melittin	381	88	77.8	24.05	1.67	35	21.1

바. 항균펩타이드 형질전환누에 위해성평가

(1) 시험재료 및 방법

(가) 토양시료 채취

3종의 형질전환누에(BmRelish1, BmCecB1, Melittin)가 토양으로 유입되었을 때를 가정하여 토양 microcosm을 조성하고 누에 분말 시료를 첨가한 뒤 2주와 4주 경과 후 토양미생물의 밀도 및 군집구조의 변화를 분석하였다. 실험에 사용한 토양은 충청북도 청주시 흥덕구 옥산면 소로리 소재의 밭 (N 36° 41'5.61", E 127° 24'4.53")에서 2015년 7월 2일에 채취하였다. 밭의 재배이력을 확인한 결과 2013년까지 인삼, 2014년은 콩, 2015년 6월까지 감자를 재배한 것으로 조사되었고, 다음 농사를 위해 밭갈기를 끝낸 상태였다.

시료 채취는 거리가 10 m 이상 떨어져 있는 5개 지점을 무작위로 선정하여 0 - 20 cm 깊이의 토양을 채취하고 비닐주머니에 담아 실험실로 운반하였다. 토양은 상온에서 7일간 건조하였으며, 2 mm 체를 통과한 것을 고르게 섞어 실험에 사용하였다.



(그림 설명) 토양시료 채취 위치(붉은색 점), 청북도 청주시 흥덕구 옥산면 소로리 소재의 밭 (N 36°41'05.8100, E 127°24'04.5300)

(나) 토양 물리화학적 특성 분석

건조된 토양은 총 4개의 시험구 (WT 누에 처리구, BmRelish1 형질전환누에 처리구, BmCecB1 형질전환누에 처리구, melittin 형질전환누에 처리구)로 나누고 각각 3반복하였다. 각각의 누에 분말을 처리하기 전에 물리화학적 특성 분석을 위한 시료를 별도로 채취하여 보관하였다. Microcosm에 들어갈 토양에 대해 토성, pH, 유기물함량, 전질소, 유효인산 및 치환성 칼륨 함량을 분석하였다. 모래, 미사, 점토의 함량은 100 g의 토양을 가지고 비중계법을 이용하여 구하였다. 토양 pH는 토양 10 g에 증류수 20 ml을 추가하여 30분간 진탕한 뒤 pH meter로 측정하였다. 유기물함량은 작열감량법을 이용하여 구하였다. 토양을 105℃에 토양을 건조한 뒤 600℃ 작열로에서 6시간 동안 작열 후 손실량의 백분율로 계산하였다. 전질소, 유효인산 및 치환성 칼륨 함량은 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM)에서 분석하였다.

(다) 시험구 조성 및 토양시료 채취

토양 300 g을 500 ml의 Mason jar에 넣어 총 3반복의 4개 시험구(WT 누에 처리구, BmRelish1 형질전환누에 처리구, BmCecB1 형질전환누에 처리구, melittin 형질전환누에 처리구) microcosm을 조성하였다. 각각의 microcosm은 실험기간 동안 25℃, 12시간 광주기 조건으로 유지하였고, 수분함량은 용수량의 50% 수준으로 유지하였다. 누에는 동결건조 후 분쇄하여 분말로 만들었고, 각각의 처리구에 토양 무게의 1% 비율 (누에분말 3 g)로 혼합하였다. 토양 시료는 누에를 혼합하기 전, 토양과 혼합하고 14일 경과 후 및 28일 경과 후에 각각 microcosm 으로부터 약 30 g씩 채취하였다. 채취한 시료 중 3 g을 덜어 cfu를 측정하였으며, 나머지 27 g은 동결 건조한 뒤 DNA를 추출하여 T-RFLP 분석을 수행하였다.

(라) 토양미생물 밀도 분석

채취한 토양 3 g에 멸균생리식염수 27 ml을 첨가한 후 30분간 진탕하였고, 102~106배 까지 희석액을 제작하였다. 희석액을 이용하여 진균(사상균) 수, 세균수 및 방선균의 수를 측정하였다. 측정방법은 다음과 같다.

(진균 밀도 측정) 로즈벵갈 한천배지 (peptone 5 g, glucose 10 g, K₂HPO₄ 1g, MgSO₄•7H₂O 0.5 g, roseBengal 0.033 g, agar 20 g, streptomycin 30 mg, DW 1000 ml)에 희석액 200 ml를 도말하여 25°C 배양기에서 4일간 배양한 후 콜로니 수를 측정하였다.

(세균 밀도 측정) PTYG 한천배지 (tryptone 0.25 g, peptone 0.25 g, yeast extract 0.5 g, glucose 0.5 g, MgSO₄•7H₂O 30mg, CaCl₂•2H₂O 3.5 mg, agar 15 g, cycloheximide 50 mg, DW 1000 ml)에 희석액 200 ml 를 도말하여 25°C 배양기에서 4일간 배양한 후 콜로니 수를 측정하였다.

(방선균 밀도 측정) 전분 카제인 한천배지 (soluble starch 10 g, casein 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, agar 15 g, cycloheximide 10 mg, nystatin 25 mg, DW 1000 ml)에 희석액 200 ml 를 도말하여 28°C 배양기에서 14일간 배양한 후 콜로니 수를 측정하였다.

(마) 토양미생물 군집구조 분석

채취한 토양시료의 genomic DNA는 FastDNA SPIN Kit for soil (MP Biomedicals, USA)을 이용하여 추출하였다. 세균을 검출하기 위하여 아래의 프라이머 세트를 이용하였다.

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(8F)

5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'(1492R)

진균을 검출하기 위하여 아래의 프라이머 세트를 이용하였다.

5'-CAAACCTTGGTCAATTTAGAGGA-3' (EF3RCNL)

5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (ITS4)

이 중 8F와 EF3RCNL 프라이머의 5'에는 6-FAM 형광 dye를 표지하였다. PCR 반응물은 총량 50 ml로, 주형 DNA는 50 ng/ml의 gDNA를 사용하였으며, 양방향 primer 각 0.4 μM, 1× Ex Taq buffer, 각 0.2 mM의 dNTPs, 1.5 U/ml Ex Taq (TaKaRa, Japan) 등을 첨가하였다.

증폭 산물 절단은 polymorphism이 높은 제한효소 중 하나를 사용하였는데, 세균 PCR 산물의 경우 HaeIII, 진균 PCR 산물의 경우 Hha I 을 사용하여 절단하였다. 제한효소 처리로 생성된 단편들 가운데 형광 표지된 DNA 절편들 (Terminal-Restriction Fragments: T-RFs)는 ABI 3130XL Genetic Analyzer (36 cm capillary, Applied Biosystems, USA)로 형광을 검출하고, Peak Scanner ver. 1.0 (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 peak의 profile과 형광수치 값을 정하였다. T-RF 데이터는 T-REX 사이트를 이용하여 align하였다.

(바) 통계분석

미생물 밀도의 분석 결과는 통계프로그램 Statistica (ver. 8.0, Statsoft, USA)를 이용하여 t-test로 분석하였다. 미생물 군집구조의 변화는 PRIMER (ver. 6.0, Primer-E, UK) 프로그램을 이용하여, non-metric dimensional scaling (NMDS)으로 분석하였다.

(2) 시험 결과 및 의의

(가) 시험토양의 물리화학적 특성

본 실험에서 microcosm에 사용된 토양의 물리화학적 특성은 아래 표와 같다. 분석 결과 실험에 사용된 토양은 pH 중성의 사양토였다.

(표 설명) 실험에 사용한 토양의 물리화학적 특성. 평균±표준오차 (n=5).

특성	측정값
pH	7.31 ± 0.004
수분함량(%)	2.11 ± 0.03
유기물함량(%)	5.15 ± 0.12
전질소 (%)	0.19 ± 0.002
유효인산 (mg/kg)	416.3 ± 24.3
치환성 K (mg/kg)	62.4 ± 2.6
모래 (%)	65.3 ± 0.5
점토 (%)	12.3 ± 0.3
미사 (%)	22.5 ± 0.5

(나) BmRelish1 형질전환누에의 토양미생물 밀도 및 군집에 대한 영향

① 토양미생물 밀도

WT 누에 또는 BmRelish1 형질전환누에 분말을 처리하기 전 토양의 세균 밀도는 WT 누에 처리구에서 통계적으로 유의하게 약간 높았다. 처리하고 14일이 경과한 후 WT 누에 처리구와 형질전환누에 처리구 사이에 토양 세균 밀도의 유의한 차이는 발견되지 않았다. 28일이 경과한 뒤에도 두 처리구 간의 토양 세균 밀도 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

② BmRelish1 형질전환누에의 토양미생물 밀도 및 군집에 대한 영향

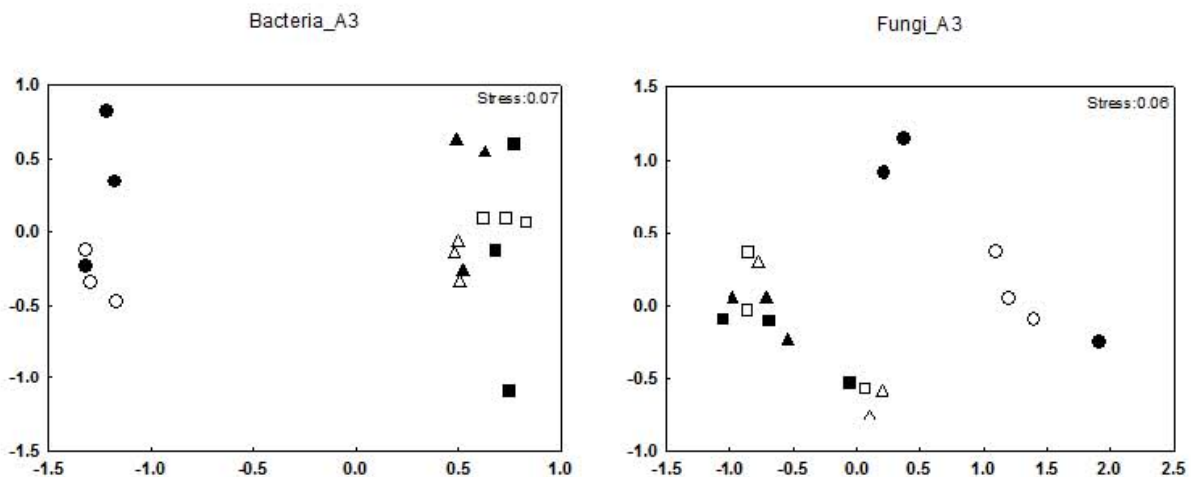
두 처리구에서 토양의 방선균 밀도의 차이는 유의하지 않았다. WT 누에 또는 BmRelish1 형질전환누에 분말을 토양에 혼합해 처리하고 14일이 경과한 후 토양 방선균의 밀도는 두 처리구에서 모두 증가하였으나, 처리한 누에 종류(WT 또는 BmRelish1 형질전환누에)에 따른 차이는 발견되지 않았다. 28일이 경과한 뒤에도 두 처리구 간의 토양 방선균 밀도 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 따라서 BmRelish1 형질전환 누에의 토양 처리가 토양미생물의 밀도 변화에 통계적으로 유의한 영향을 주지 않은 것으로 판단된다.

(표 설명) WT 누에와 BmRelish1 형질전환누에 분말을 토양에 처리하고 14일과 28일 경과 후 토양미생물 밀도의 변화 (평균±표준편차, n=3). *는 t-test 결과 p<0.05 임을 나타낸다.

토양미생물 밀도 (CFU/g dry soil)	처리 전		처리 14일 후		처리 28일 후	
	WT누에	BmRelish1	WT누에	BmRelish1	WT누에	BmRelish1
세균($\times 10^7$)	15 ± 0.1*	1.3 ± 0.0*	36.6 ± 13.0	33.4 ± 6.8	21.7 ± 6.1	19.7 ± 0.9
진균($\times 10^5$)	14 ± 0.2	1.7 ± 0.4	7.9 ± 5.4	9.1 ± 4.2	14.0 ± 4.5	14.6 ± 0.7
방선균($\times 10^7$)	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	9.8 ± 1.8	11.0 ± 1.2	14.0 ± 1.5	12.6 ± 0.7

③ 토양미생물 군집구조

T-RFLP 분석을 통하여 토양의 세균과 진균 군집의 구조를 살펴보았을 때 누에를 처리하기 전과 처리한 후에 큰 변화가 있었지만, 동일한 토양 채취 시기 안에서 누에의 유전형(WT, GM)의 차이에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 BmRelish1 형질전환누에의 토양 처리가 토양미생물의 군집 구조 변화에 큰 영향을 주지 않은 것으로 판단된다.



(그림설명) BmRelish1 형질전환누에와 WT 누에를 첨가한 토양의 세균(상)과 진균(하) 군집의 T-RFLP 프로파일에 대한 NMDS 분석 결과. ○: 누에 처리 전 토양, △: 누에 처리한 뒤 14일 경과 토양, □: 누에 처리한 뒤 28일 경과 토양. GM: 채워진 도형, WT: 빈 도형

(다) BmCecB1 형질전환누에의 토양미생물 밀도 및 군집에 대한 영향

① 토양미생물 밀도

WT 누에 또는 BmCecB1 형질전환누에 처리구에서 처리 전 토양의 세균 밀도에 차이가 없었다. 누에를 토양에 처리하고 14일이 경과하였을 때 토양 세균의 밀도는 두 처리구에서 모두 증가하였으나, WT 누에 처리구와 BmCecB1 형질전환누에 처리구 사이의 세균 밀도는 서로 다르지 않았다. 28일이 경과한 뒤에도 두 처리구 간의 토양 세균 밀도 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

WT 누에 또는 BmCecB1 형질전환누에 처리 전 토양의 진균 밀도는 두 처리구에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다. 누에 분말을 토양에 혼합해 처리하고 14일이 경과한 후

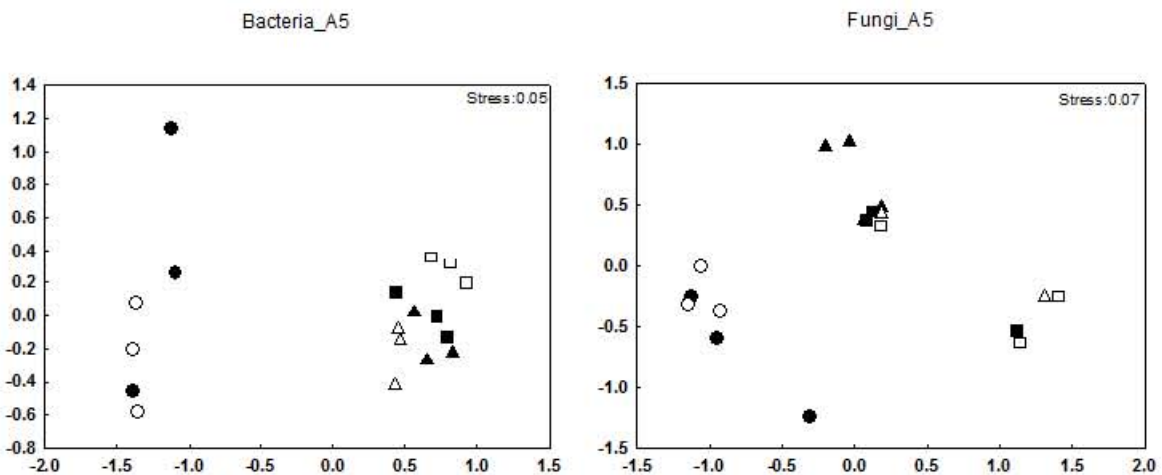
토양 진균의 밀도는 두 처리구에서 모두 증가하였으나, WT 누에 처리구와 BmCecB1 형질전환누에 처리구 사이의 진균 밀도에 유의한 차이는 발견되지 않았다. 28일이 경과한 뒤에도 두 처리구 간의 토양 진균 밀도 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. WT 누에 또는 BmCecB1 형질전환누에 처리 전 토양의 방선균 밀도는 두 처리구에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다. WT 누에 또는 BmCecB1 형질전환누에 분말을 토양에 혼합해 처리하고 14일이 경과한 후 토양 방선균의 밀도는 두 처리구에서 모두 증가하였으나, WT 누에 처리구와 BmCecB1 형질전환누에 처리구 사이의 밀도는 다르지 않았다. 28일이 경과한 뒤에도 두 처리구 간의 토양 방선균 밀도 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 따라서 BmCecB1 형질전환누에의 토양 처리가 토양미생물의 밀도 변화에 통계적으로 유의한 영향을 주지 않은 것으로 판단된다.

(표설명) WT 누에와 BmCecB1 형질전환누에 분말을 토양에 처리하고 14일과 28일 경과 후 토양미생물 밀도의 변화 (평균±표준편차, n=3). T-test 결과 모든 시점에서 두 처리구 사이에 토양 세균, 진균 및 방선균의 밀도의 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

토양미생물 밀도 (CFU/g dry soil)	처리 전		처리 14일 후		처리 28일 후	
	WT누에	BmCecB1	WT누에	BmCecB1	WT누에	BmCecB1
세균($\times 10^7$)	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	36.6 ± 13.0	55.9 ± 1.7	21.7 ± 6.1	27.7 ± 3.3
진균($\times 10^5$)	1.4 ± 0.2	1.6 ± 0.1	7.9 ± 5.4	10.6 ± 6.8	14.0 ± 4.5	13.2 ± 4.0
방선균($\times 10^7$)	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	9.8 ± 1.8	12.6 ± 2.5	14.0 ± 1.5	14.8 ± 3.7

② 토양미생물 군집구조

누에를 처리하기 전과 처리 14일이 경과했을 때 세균 T-RFLP 프로파일의 차이는 나타나지 않았다. 그러나 28일 경과하였을 때 BmCecB1 형질전환누에 처리구와 WT 누에 처리구 사이에 세균 군집 구조의 차이가 발견되었으므로 추가적인 실험이 필요할 것으로 판단된다. GM 누에 처리에 따른 토양 진균 군집의 구조의 변화는 관찰되지 않았다.



(그림설명) BmCecB1 형질전환누에와 WT 누에를 첨가한 토양의 세균(상)과 진균(하) 군집의

T-RFLP 프로파일에 대한 NMDS 분석 결과. ○: 누에 처리 전 토양, △: 누에 처리한 뒤 14일 경과 토양, □: 누에 처리한 뒤 28일 경과 토양. GM: 채워진 도형, WT: 빈 도형

(라) Melittin 형질전환누에의 토양미생물 밀도 및 군집에 대한 영향

① 토양미생물 밀도

WT 누에 또는 Melittin 형질전환누에 처리구에서 토양 세균 밀도의 차이는 나타나지 않았다. 누에를 토양에 혼합해 처리하고 14일이 경과한 후 토양 세균의 밀도는 두 처리구에서 모두 증가하였으나, WT 누에 처리구와 Melittin 형질전환누에 처리구 사이의 차이는 발견되지 않았다. 28일이 경과한 뒤에도 두 처리구 간의 토양 세균 밀도 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

WT 누에 또는 Melittin 형질전환누에 처리구에서 처리 전, 14일 경과 후 및 28일 경과 후 토양의 진균 밀도는 서로 다르지 않았다. 누에 분말을 토양에 혼합해 처리하고 14일이 경과한 후 토양 진균의 밀도는 두 처리구에서 모두 증가하였으나, WT 누에 처리구와 Melittin 형질전환누에 처리구 사이의 진균 밀도에 유의한 차이는 발견되지 않았다. 28일이 경과한 뒤에도 두 처리구 간의 토양 진균 밀도 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

WT 누에 또는 Melittin 형질전환누에 처리 전 토양의 방선균 밀도는 두 처리구에서 통계적으로 유의한 차이가 없었다. WT 누에 또는 Melittin 형질전환누에 분말을 토양에 혼합해 처리하고 14일이 경과한 후 토양 방선균의 밀도는 두 처리구에서 모두 증가하였으나, WT 누에 처리구와 Melittin 형질전환누에 처리구 사이의 방선균 밀도에 유의한 차이는 발견되지 않았다. 28일이 경과한 뒤에도 두 처리구 간의 토양 방선균 밀도 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 따라서 Melittin 형질전환누에의 토양 처리가 토양미생물의 밀도 변화에 통계적으로 유의한 영향을 주지 않은 것으로 판단된다.

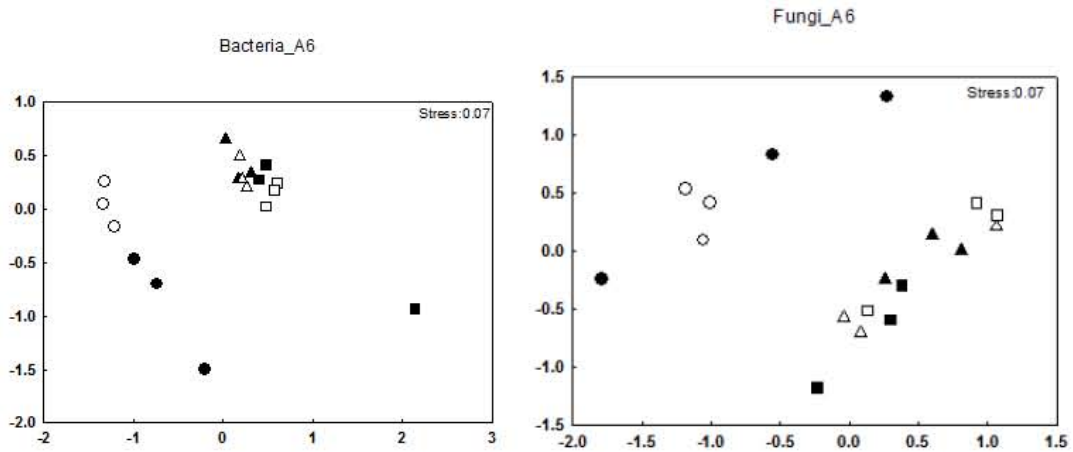
(표설명) WT 누에와 Melittin 형질전환누에 분말을 토양에 처리하고 14일과 28일 경과 후 토양 미생물 밀도의 변화 (평균±표준편차, n=3). T-test 결과 모든 시기에서 두 처리구 사이에 토양 세균, 진균 및 방선균의 밀도의 유의한 차이는 관찰되지 않았다.

토양미생물 밀도 (CFU/g dry soil)	처리 전		처리 14일 후		처리 28일 후	
	WT누에	Melittin	WT누에	Melittin	WT누에	Melittin
세균($\times 10^7$)	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.2	36.6 ± 13.0	60.2 ± 44.9	21.7 ± 6.1	24.2 ± 6.3
진균($\times 10^5$)	1.4 ± 0.2	2.1 ± 0.5	7.9 ± 5.4	13.6 ± 4.1	14.0 ± 4.5	13.0 ± 3.0
방선균($\times 10^7$)	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	9.8 ± 1.8	18.5 ± 8.6	14.0 ± 1.5	11.2 ± 2.6

② 토양미생물 군집구조

T-RFLP 분석을 통하여 토양의 세균과 진균 군집의 구조를 살펴보았을 때 누에를 처리하기 전에 세균 군집 구조의 차이가 관찰되었다. 누에 처리 전 토양이므로, 누에 처리에 의한 차이는 아니라고 판단된다. 14일과 28일 경과 후 채취한 토양에서 누에의 유전형

(WT, GM)의 차이에 따른 변화는 관찰되지 않았다. 토양 진균 군집의 구조 역시 Melittin 형질전환누에 처리에 따른 변화가 나타나지 않았다. 따라서 Melittin 형질전환누에의 토양 처리가 토양미생물의 군집 구조 변화에 큰 영향을 주지 않은 것으로 판단된다.



(그림설명) Melittin 형질전환누에와 WT 누에를 첨가한 토양의 세균(상)과 진균(하) 군집의 T-RFLP 프로파일에 대한 NMDS 분석 결과. ○: 누에 처리 전 토양, △: 누에 처리한 뒤 14일 경과 토양, □: 누에 처리한 뒤 28일 경과 토양. GM: 채워진 도형, WT: 빈 도형

2. 누에 면역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링 (제2세부)

가. 누에 면역유도 물질 선발 및 면역유도 기술 개발

(1) 누에 면역유도 주사제 개발 및 면역유도 조건 확립

(가) 누에 면역 유도물질 선발 및 제조

본 연구에서는 효율적인 누에 면역 활성화를 위해서 병원성 그람양성 세균과 유사한 세포벽 구조를 지닌 유산균(*Lactobacillus plantarum*)을 배양하여 새로운 저비용의 누에 면역 유도제 개발에 사용하였다. 즉, 누에 면역 유도를 위한 후보 물질로 *L. plantarum* 생균, *L. plantarum* cell wall 추출물(pCW) 및 세포막 성분인 lipoteichoic acid(LTA)가 포함된 *L. plantarum* n-butanol 추출물(pLTA)을 제조하여 선발하였으며 이를 이용한 유도 효율 검증 연구에 사용하였다. 누에 면역 유도 후보 물질의 제조 과정은 다음과 같다.

① *L. plantarum* cell wall(pCW) 제조

동결 건조된 균주를 살균된 증류수에 녹인 후 100°C에서 20분간 가열한 다음 1,500g에서 10분간 원심 분리하여 파괴되지 않은 균을 제거하였고, 상등액을 다시 6,500g에서 30분간 원심 분리하였음. 침전된 cell wall을 수집하여 증류수로 3회 세척한 다음 동결 건조하였고, 이 후 LTA 추출 및 누에 면역유도 시험에 사용하였다.

② *L. plantarum* LTA 추출물(pLTA) 제조

L. plantarum cell well로부터 n-butanol 추출법을 사용하여 LTA가 함유된 추출물을 제조하였음. 동결 건조된 cell well을 0.1M sodium citrate buffer(pH 4.7)에 녹인 후 초음속파쇄기로 분쇄하였고, 동일한 양의 n-butanol을 첨가한 다음 실온에서 30분간 교반을 통하여 추출하였음. 추출 후 10,000 rpm에서 30분간 원심 분리한 다음 상등액을 회수하였고, evaporate 및 살균된 증류수로 투석한 다음 동결 건조하였음. 동결 건조된 LTA가 함유된 추출물은 무게를 측정한 다음, 살균된 식염수에 녹여 누에 면역유도 효율 검증 연구에 사용하였다.

(나) 누에 주사 접종에 따른 면역유도 효율 분석

누에 면역유도 후보 물질인 유산균(*L. plantarum*) 생균, 유산균(*L. plantarum*) cell wall 추출물(pCW) 및 유산균(*L. plantarum*) LTA 추출물(pLTA)에 대하여 누에 면역유도 효율을 비교 검증하였다. 먼저 다양한 농도의 면역유도 후보 물질이 함유된 수용액(0.05mL)을 5령 5일째 누에 유충 체강에 주사 접종하여 누에 면역을 유도하였다. 면역 유도된 누에는 경과 시간(6시간, 10시간 및 22시간)에 따라 각각 체액을 채취하여 대장균에 대한 항균활성 분석으로 각 후보 면역유도 물질에 대한 누에 면역유도 효율을 비교 검증하였다(그림 1).

그림 1에서와 같이 각 시료에 대한 항균활성은 후보 유도 물질, 농도 및 유도 시간에 따라 유의한 차이를 나타냈었다. 즉 생균 주사 접종에 대한 경우 고농도($3.8\sim 7.6\times 10^6$ CFU/mL)에서 22시간 경과 후 비교적 활성이 높았지만 대체로 매우 낮은 항균활성을 나타냈었다(그림 1A). 반면, pCW 주사 면역유도에서는 생균 접종에 비해서 높은 항균활성을 나타냈었다(그림 1B). 특히, 주사농도 0.1 mg/ml, 6시간 유도에서 상대적으로 높은 활성을 보였고, 또한 접종 후 10시간에서는 모든 주사 농도에서 무처리에 비해 활성이 높음을 확인하였지만 고농도(>0.5mg/ml) 주사 접종 시 누에의 생육 저해 등 심각한 문제를 유발하였다. 따라서 pCW는 누에 면역유도제로 적당하지 않는 것으로 사료된다. 한편, pLTA 주사 접종에서는

5~10mg/ml 주사 농도에서 10시간 경과 후 다른 후보 물질에 비해 가장 높은 항균활성을 나타냈었고, 누에 생육에도 안전함을 확인하였다(그림 1C). 따라서 누에 면역유도를 위한 유도물질로 *L. plantarum* LTA 추출물(pLTA)이 가장 우수한 것으로 확인되어 유도제로 선정하였다.

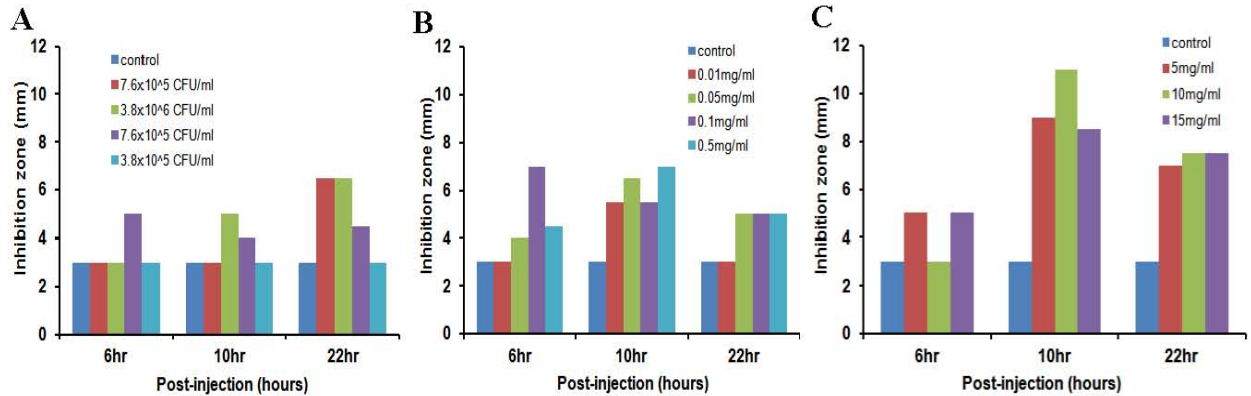


그림 1. 누에 면역유도 후보 물질 주사 접종에 따른 시간별 항균 활성 검정. A, *L. plantarum* 생균; B, *L. plantarum* cell wall 추출물(pCW); C, *L. plantarum* LTA 추출물(pLTA) 접종

(다) 누에 대량 접종을 위한 면역 유도 조건 확립

최적의 누에 면역유도 조건을 구명하기 위해서 선정된 유산균(*L. plantarum*) LTA 추출물(pLTA)의 접종농도 및 유도시간에 따른 항균활성 검정하였다. 10, 5, 1, 0.5mg/ml 농도로 누에 체강에 주사 접종하였으며 면역유도 후 6, 10, 18, 22시간 경과에 따라 누에 혈림프를 채취하여 대장균에 대한 항균활성 검정에 사용하였다(그림 2). 항균활성 분석에서 5mg/ml 와 1mg/ml 농도에서 가장 우수한 항균활성을 보였으면 주사 접종 후 18시간 면역 유도된 시료에서 가장 높은 항균활성을 나타냈었다. 따라서 누에 면역유도를 위한 주사조건으로 주사농도는 1mg/ml, 면역유도 시간은 18시간으로 결정하였다.

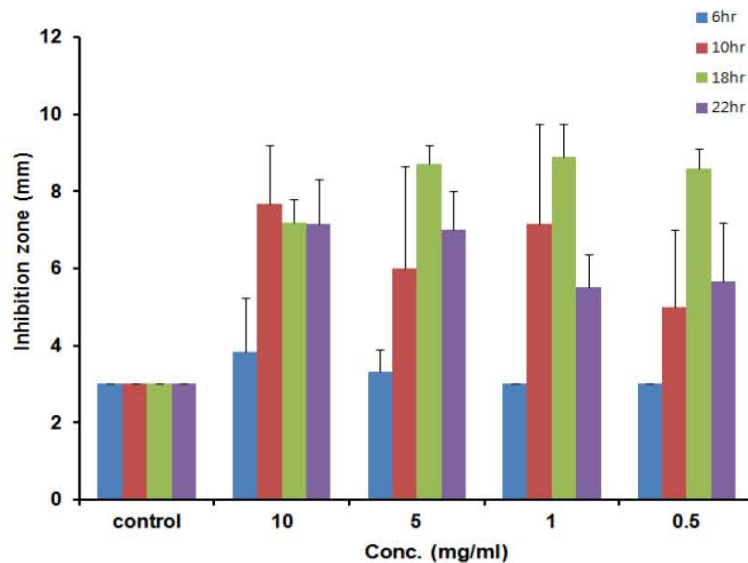


그림 2. *L. plantarum* LTA 추출물의 누에 주사접종 농도 및 면역유도 시간에 따른 항균활성 검정

(라) pLTA 주사접종을 통한 면역유도 누에 대량 생산

위탁협동 연구기관인 경상남도 농업기술원에서 사육된 5령 5일째 누에(금옥잠) 유충 약 6만 마리를 대상으로 그림 3에서 보는 바와 같이 간이 자동 주사기를 이용하여 *L. plantarum* LTA 추출물(pLTA) 1mg/ml이 함유된 수용액 0.05 ~0.06mL를 누에 체강에 주사 접종하여 면역유도 누에를 대량 생산하였다. 면역 유도 18시간 경과 후 면역 유도된 누에는 수거하여 냉동 보관하였다. 이후 누에 분말 제조 및 육계 사양실험에 제공하였다. 또한 면역유도 확인을 위하여 임의로 선별한 면역 유도된 누에 체액(혈림프)에 대한 항균활성을 검정하였다(그림 4.) 그 결과 임의로 선별한 누에 개체에서 95% 이상 면역 유도됨을 확인하였다.



그림 3. 누에 면역유도제(pLTA) 주사 접종에 의한 면역유도 누에 대량 생산.

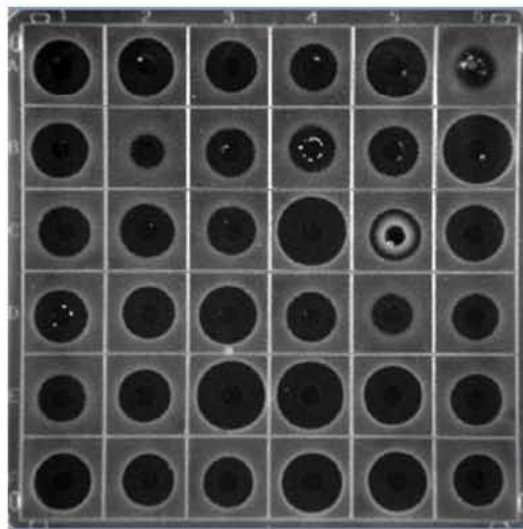


그림 4. 누에 면역유도 효율 검정. 임의 선별 누에 36개체 대상으로 대장균에 대한 항균활성 검정.

(2). 누에 면역유도 기술 개발 및 공정 표준화

(가) 누에 면역반응 활성화를 위한 면역유도제 개선 및 제조 공정 표준화

이상의 누에 면역유도 물질 탐색 및 선발 연구 결과를 바탕으로 면역유도 효율이 우수한 유산균(*L. plantarum*) LTA 추출물(pLTA)에 대해 제조공정 개선 및 표준화를 통하여 보다 면역유도 효율이 향상된 누에 면역유도 주사제를 개발하였다. 즉, 선발된 인체 및 동물에 안정하고 패혈증과 같은 질병을 유발하지 않는 유산균(*L. plantarum*)으로부터 세포막 성분인 lipoteichoic acid(LTA) 및 펩티도글리칸(PG, Peptidoglycan)이 함유된 세포막 추출물 제조 공정을 개선하여 표준화하였으며, 이를 통하여 누에 면역유도용 주사제를 대량 생산 공정을 확립하였다. 즉, *L. plantarum* 세포막 추출물이 함유된 누에 면역유도제 제작은 그림 5에서 보는바와 같이 다음의 3단계 과정으로 표준화 하였다.

- 1단계: 초음파분해(sonication) 및 부탄올 추출로 유산균 파쇄, 단백질 제거 및 세포막 추출물 제조
- 2단계: 투석 및 동결건조로 유산균 세포막 추출물 분말 제작
- 3단계: 멸균된 식염수에 녹여 수용성 누에 면역유도용 주사제 제작

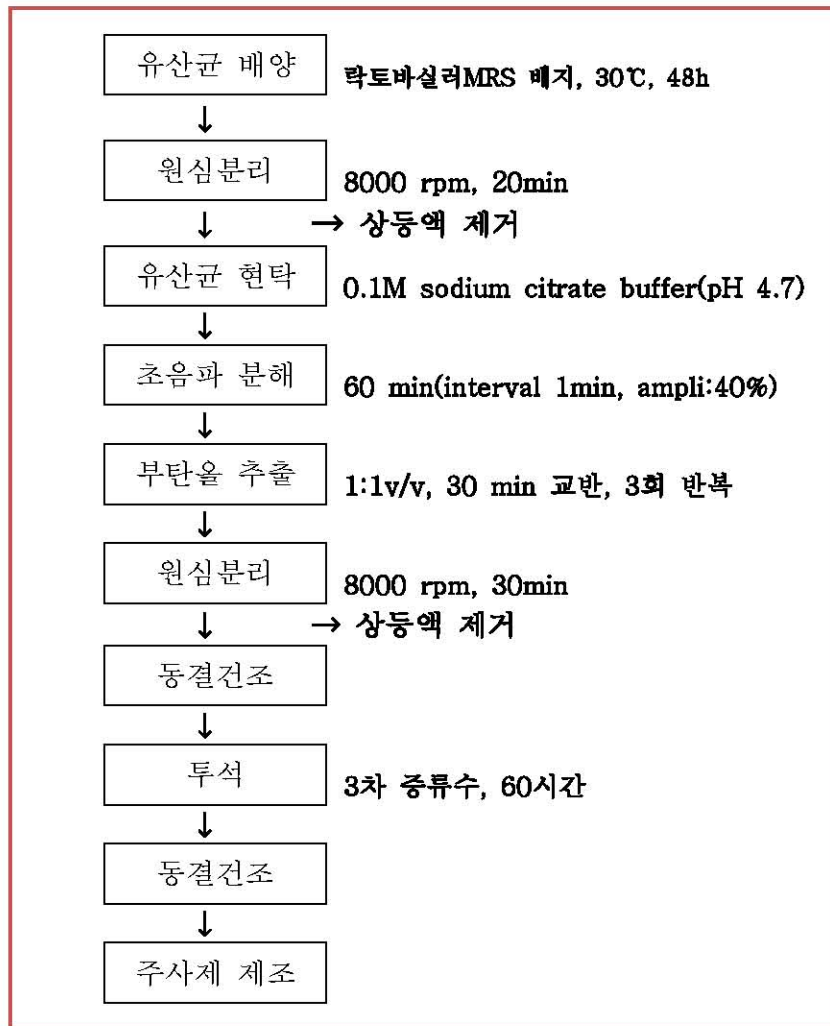


그림 5. 유산균(*L. plantarum*)세포막 추출물 함유 누에 면역유도제 제조 공정

먼저 락토바실러스 MRS 액체 배지를 이용하여 30°C에서 48시간 배양된 유산균을

8000rpm 조건에서 20분간 원심분리를 통하여 균체를 획득한 다음, 0.1M sodium citrate buffer(pH 4.7)을 넣어 현탁 한 뒤, 초음파분해(sonication)를 1시간 동안 수행하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄액에서 단백질을 제거하기 위해서 동일한 부피의 부탄올을 첨가한 후, 실온에서 30분간 교반을 통하여 추출한 다음, 8,000rpm에서 30분간 원심분리하여 분획하였다. 상등액을 버리고 하등액만 획득한 다음 완전한 단백질을 제거하기 위해 위와 같은 추출을 2회 반복하였다. 단백질이 제거된 세포 파쇄물은 동결 건조기에서 건조하였다. 이후 멸균된 증류수로 녹인 다음, 투석막(10,000MWCO Slide-A-Lyzer dialysis cassette, Thermo, USA)에 넣고 3차 증류수에서 60시간 이상 투석하였다. 투석을 마친 추출물은 동결건조를 통하여 분말화하여 유도물질을 제작하였다(그림 6). 제작된 유도물질은 무게를 측정한 후, 멸균된 PBS에 일정한 농도로 녹여 누에 면역유도를 위한 주사제를 제작하였다. 또한 1차 개발된 누에 면역유도제에 비해 부탄올 추출을 2회 이상 반복함으로써 보다 높은 순도의 세포막 추출물을 획득하여 그 효율을 개선하였다.



그림 6. 유산균(*L. plantarum*) 세포막 성분이 함유된 누에 면역유도제

(나) 누에 면역유도를 위한 최적 조건 구명

본 연구에서 개발된 누에 면역유도용 주사제는 면역유도 효율 검정을 통하여 최적의 주사제 농도 및 면역유도 시간을 결정하였다. 먼저 다양한 농도(10, 20, 50ppm)로 누에 체강에 주사 접종하여 헬름프 시료를 대상으로 대장균에 대한 항균활성 검정을 통하여 면역유도 효율을 비교 분석하였다. 그 결과 그림 7에서와 같이 누에 면역유도제 10ppm(10mg/L) 함유된 주사제에서 항균활성이 생균 주사에 비해 약 4.9배 높았으며, 또한 20ppm 및 50ppm의 높은 농도에서도 생균에 비해 높은 항균활성을 나타냈었지만 10ppm 농도와 비교에서는 유의성이 없이 비슷한 효율을 나타냈었다. 한편 기존 곤충의 면역유도에 사용되는 그람음성균의 세포벽 성분인 LPS 50ppm 농도의 주사제와 유사한 면역유도 효율을 나타냈었다. 따라서 누에 면역유도제 10ppm(10mg/L) 함유된 주사제가 적정한 것으로 사료되며, 최초 개발된 누에 면역유도제 대비 약 100배 정도의 효율이 향상된 것으로 사료된다. 이러한 결과를 바탕으로 향후 본 연구에서는 항균활성이 부가된 면역유도 누에 대량생산을 위해서 누에 면역유도제 10ppm(10mg/L)이 함유된 주사제를 제조하여 사용하였다.

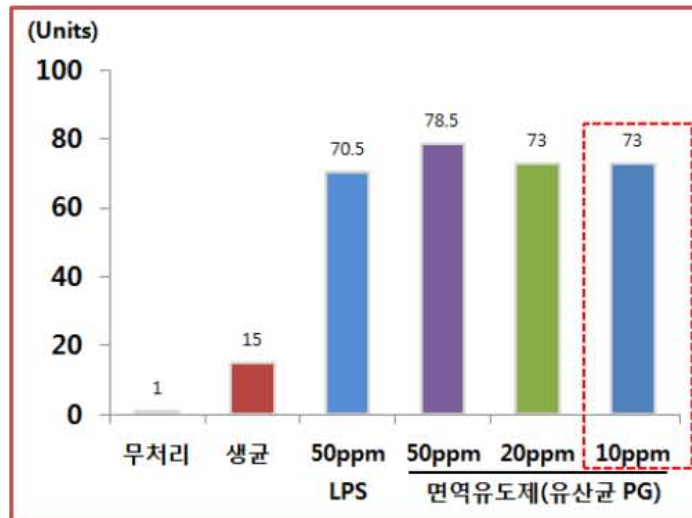


그림 7. 누에 면역유도제 농도별 항균활성 비교 검정. 항균력 검정은 대장균을 대상으로 방사선확산분석법(Radial diffusion assay, RDA)에 따라 고체상 배지에서의 균 생육이 저해된 영역의 크기를 바탕으로 항균활성도(Units)를 측정(1mm=10U) 하였음.

한편 최적의 면역유도 시간 결정을 위해서 면역유도제(10ppm)를 누에 체강에 주사 접종한 다음 6시간, 10시간, 14시간, 18시간 및 26시간 동안 사육한 후, 각각의 누에로부터 헬림프 시료를 분리하여 대장균에 대한 항균활성 검정으로 면역유도 효율을 비교 분석하였다. 그 결과, 그림 8에서와 같이 면역유도 주사접종 후 18시간 경과한 누에에서 가장 높은 항균활성을 보임을 확인하였다. 따라서 이러한 결과를 바탕으로 본 연구에서는 향후 누에 면역유도제 주사접종 후 18시간동안 면역을 활성화 시킨 다음 면역 유도된 누에분말을 대량생산하였다.

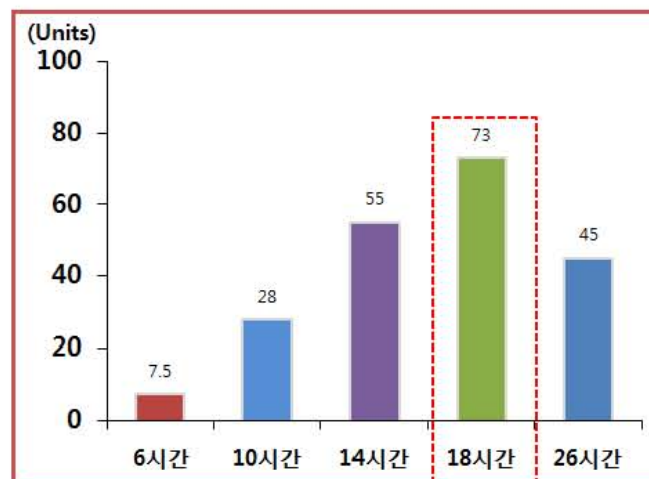


그림 8. 누에 면역유도제(10ppm) 주사접종 후 유도시간에 따른 항균활성 비교 검정. 항균력 검정은 대장균을 대상으로 방사선확산분석법(RDA)에 따라 고체상 배지에서의 균 생육이 저해된 영역의 크기를 바탕으로 항균활성도(Units)를 측정(1mm=10U) 하였음.

(다) 면역유도 누에분말 생산을 위한 표준화 공정 확립

본 연구에서 최적화된 누에 면역유도 조건을 바탕으로 항균활성이 부가된 면역유도 누에 분말 대량생산을 위해서 그 생산 공정을 그림 9에서 보는 바와 같이 표준화 하였다. 즉, 면

저 누에를 기존 사육 조건에 준하여 5령 5일째 또는 6일째 까지 사육한 다음, 사육된 누에를 대상으로 면역유도 주사제를 접종하여 면역을 유도하고 18시간 동안 다시 사육을 통하여 면역을 활성화 시킨다. 누에 면역유도 주사제 농도는 10ppm으로 유충당 약 0.05 ~0.06ml을 체강에 주사한다. 면역이 활성화된 누에 유충은 수거하여 -20℃ 냉동 보관한 다음 동결 또는 열풍으로 건조하여 누에분말을 제작한다.



그림 9. 누에 주사접종에 의한 면역유도 누에분말 생산 표준 공정

또한 생산된 면역유도 누에분말을 대상으로 항균활성을 검정하였다. 즉 면역유도 누에분말을 0.3% acetic acid 용액을 이용하여 2시간 동안 실온에서 추출한 다음, 원심분리를 이용하여 수용성 추출물을 제조하였다. 이후 추출물에서 acetic acid를 제거하기 위해서 추출물을 evaporaton 한 후 증류수에 용해시킨 다음 원심분리를 통하여 상등액을 수거하여 동결 건조하였다. 건조된 추출물은 0.2M NaCl 이 포함된 0.01% 초산을 이용하여 수용액을 제조한 다음 대장균(*E. coli*) 및 살모넬라균(*S. enteritidis*)을 대상으로 농도별 항균활성을 검정하였다(그림 10). 항균활성 검정 결과, 대장균에서는 2,000ppm 농도에서 살모넬라균에서는 4,000ppm 농도에서 대부분 세균을 치사시킴을 확인하였다.

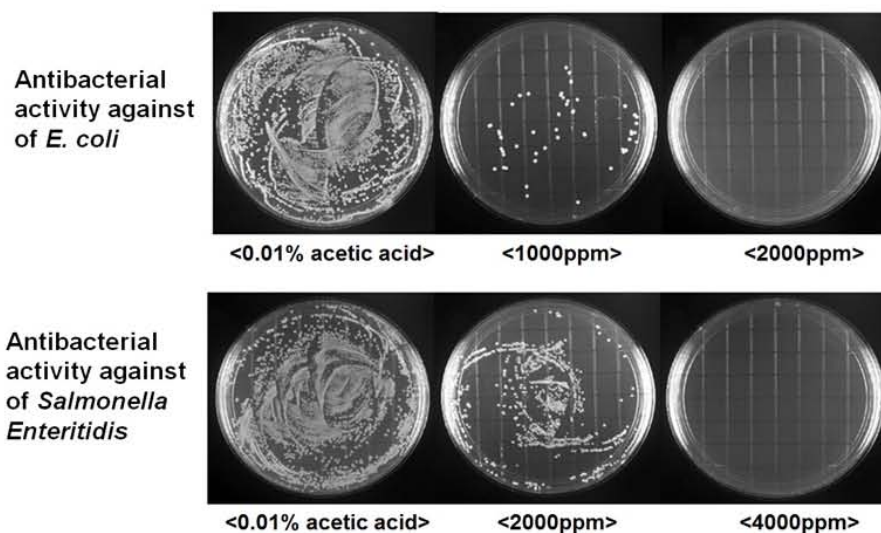


그림 10. 면역유도 누에분말 추출물 농도에 따른 대장균(*E. coli*) 및 살모넬라균(*S. enteritidis*)에 대한 항균활성 검정. 대조구: 0.01% acetic acid

(라) 면역유도 누에 표준 생산 공정에 의한 천연항생제 누에분말 대량생산

본 연구에서 확립한 면역유도 누에분말 생산 공정을 기반으로 항균활성이 부가된 면역유도 누에를 대량 생산하고 분말화 하였다. 즉, 위탁협동연구기관인 경남 농업기술원에서 사육된 5령 5일째 누에(백옥잠) 유충 약 5만 마리를 대상으로 면역유도용 주사제 0.05~0.06ml를 누에 체강에 주사 접종 및 18시간동안 면역반응을 활성화 시킨 다음 수거하여 -20℃에서 냉동 보관 하였다. 이 후 누에 분말 제조 및 가금류 사양실험을 위해서 협동연구과제에 제공하였다. 누에 면역반응 활성화 후, 면역유도 효율을 검정하기 위해서 임의로 누에를 선별하여 대장균에 대한 항균활성을 검정하였다. 임의로 선별한 누에 72개체를 대상으로 항균활성을 검정한 결과, 각 개체간 항균력의 차이는 있지만 약 95% 이상 면역이 유도됨을 확인하였다(그림 11).

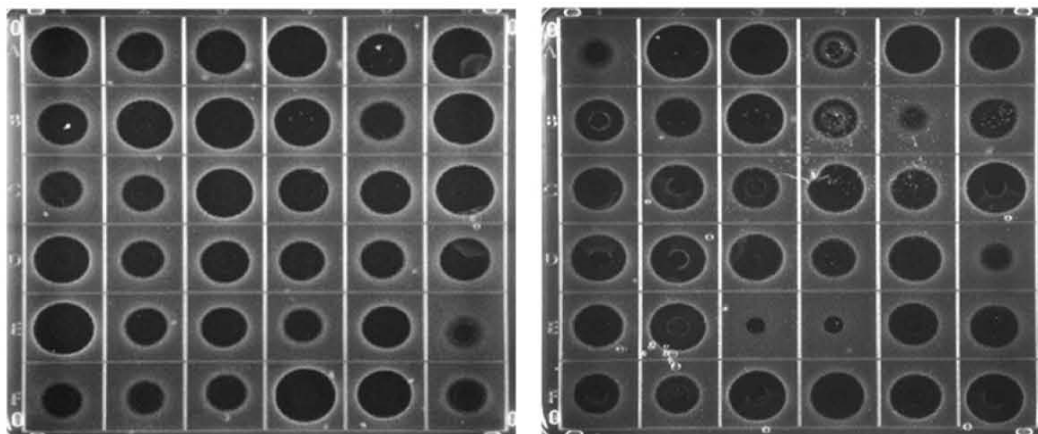


그림 11. 임의로 선별한 면역유도 누에를 대상으로 대장균에 대한 항균활성 효과 검정

(마) 누에 품종에 따른 면역유도 효율 분석

면역유도 누에분말 생산에 적합한 누에 품종을 선별하기 위해서 농가 장려품종인 백옥잠 (잠123x잠124), 대성잠(잠125x잠126), 대풍잠(잠151x잠152), 금옥잠(잠125x잠140) 등 4품종을 대상으로 면역유도 효율 분석 및 체중 감소율 조사를 실시하였다.

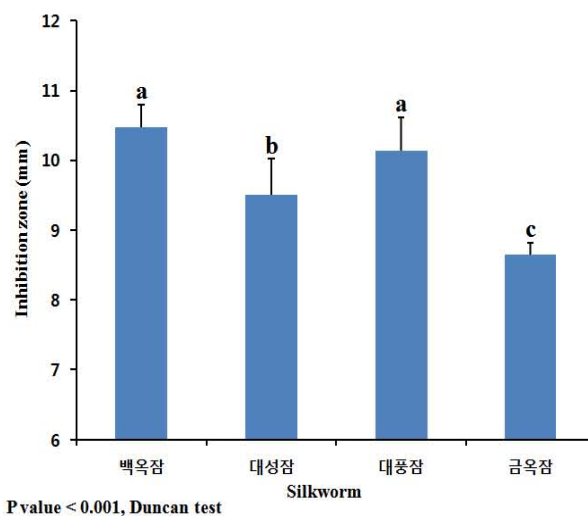


그림 12. 누에 장려 품종에 따른 면역유도 효율 검정

누에 장려 품종별 면역유도에 따른 항균효과를 비교 분석한 결과, 그림 8에서와 같이 대성잠 및 금옥잠 품종에 비해 백옥잠 및 대풍잠 품종에서 면역유도에 따른 항균활성이 유의성 있게 높은 것으로 조사되었다.

또한 체중 감소율 조사에서는 모든 품종에서 면역유도 후 체중이 약 10 ~ 15% 감소하는 경향을 나타냈었다(그림 13). 특히, 대풍잠에서 체중 감소율이 가장 높았고 나머지 품종에서는 상호간 유의성이 없었다. 이는 누에 품종 간 면역주사 접종 후 뿔잎 섭취량 및 배설량의 차이인 것으로 사료된다. 따라서 누에 품종 간 면역유도 효율 및 면역유도에 따른 체중 감소율을 상대적으로 비교 검토한 결과, 면역유도 누에분말 생산에 적합한 품종은 백옥잠인 것으로 사료된다.

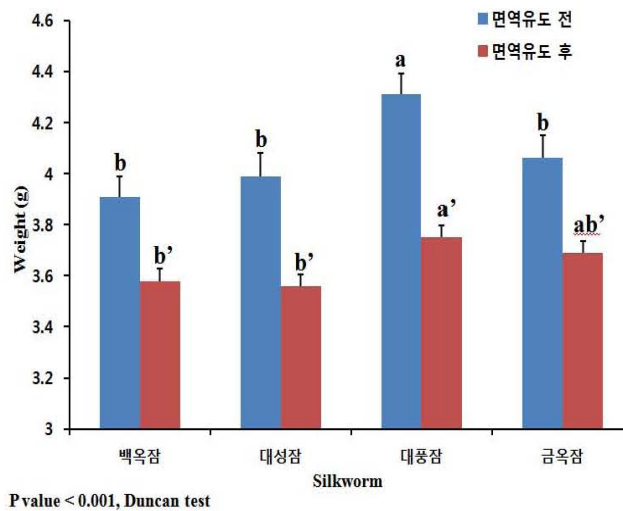


그림 13. 면역유도에 따른 누에 품종별 체중 변화

나. 누에 면역유도에 따른 항균펩타이드 분리 및 발현 효율 분석

(1) 누에 주요 항균펩타이드 분리 및 정제

누에 면역유도에 따른 항균펩타이드 발현 효율을 검정하기 위해서 먼저 누에 면역유도제 주사접종으로 생성되는 항균펩타이드를 정제하여 동정하였다. 일반적으로 누에 체강에 세균 및 LPS와 같은 세포막 성분 등을 체강에 주입하면 펩티도글루칸 인식 단백질(peptidoglycan recognition proteins, PGRPs) 등에 의해 인식되어 Toll 및 Imd pathway 활성을 통하여 cecropin, Attacin, Lebocin, Moricin, Enbocin, Gloverin, defensin 등과 같은 항균펩타이드를 생성하여 방어하는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 개발된 누에 면역 유도제를 누에 체강에 주사 접종 시 생성되는 항균성 단백질들을 정제하였다. 세크로핀을 포함한 대부분의 항균펩타이드는 양전하를 띠고 있으면 펩타이드 종류에 따라 +net charge 정도의 차이가 있다. 따라서 이러한 특성을 이용하여 본 연구에서는 일차적으로 Hitrap-sp 컬럼을 이용한 anion exchange chromatography로 펩타이드의 +net charge 정도에 따라 분획하여 정제하였다. 용출된 분획은 단백질 전기영동 및 방사선확산분석법(RDA)에 의한 항균활성 검정을 통하여 항균활성을 가지는 분획을 선별하였다. 또한 회수한 분획은 냉동건조로 농축한 다음 Superdex peptide 컬럼으로 gel filtration chromatography를 수행하여 2차 정제하였다. 이후 용출된 분획은 단백질 전기영동 분석 및

항균활성 검정을 통하여 최종적으로 확인하였다. 정제된 항균펩타이드들은 Applied Biosystem Procise Sequencer를 사용한 Edman degradation법으로 N말단 아미노산 서열을 결정한 다음 BLAST 상동성 분석을 통하여 동정하였다.

(가) 면역유도 누에 혈림프 단백질 추출

누에 주요 항균펩타이드를 정제하기 위해서 면역유도 후 18시간 경과된 누에로부터 혈림프를 채취한 다음 13,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 그 상층액을 -20℃에 보관한 다음 단백질 추출에 사용하였다. 일반적으로 항균펩타이드는 열, 염 및 산성에 안전한 특성을 가지고 있음. 이러한 특성을 이용하여 보관된 혈림프 시료를 90℃에서 10분간 열처리한 다음 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 저장단백질 등 일부 단백질을 제거하였고 상층액을 수거하여 대장균에 대한 항균활성을 검정하였다.

(나) 누에 Bm-AMP1 항균단백질 분리 및 정제

상기 면역유도 누에 혈림프 단백질 추출물은 동결건조한 다음 0.6M NaCl이 포함된 0.3% 아세트산 용액에 녹여 Hitrap-sp 컬럼의 음전하를 띠는 담체에 결합시킨 후 1.5M NaCl, 0.3% 아세트산 용출용액을 이용하여 gradient 40~85%에서 결합된 단백질을 점차적으로 용출하여 분획하였다(그림 14).

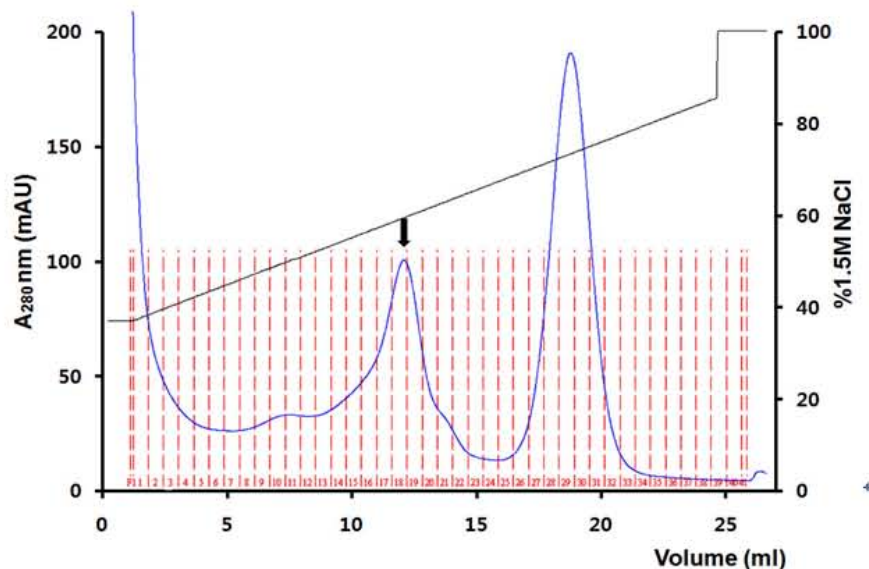


그림 14. Anion exchange chromatography에 의한 Bm-AMP1 정제. Column: HiTrap SP, Start buffer: 0.3% acetic acid, 0.6M NaCl, Elution buffer: 0.3% acetic acid, 1.5M NaCl, Gradient: 40~85% elution buffer

용출된 단백질 분획은 대장균을 대상으로 방사선확산분석법(RDA)을 통하여 항균활성을 검정하였다. 그림 15에서 보는바와 같이 fraction 14 ~ 21번에서 항균활성을 나타냈었으며 특히 fraction 18번, 19번에서 강한 항균활성을 나타냈었다. 이 항균펩타이드 함유된 분획물은 약 0.9M NaCl 농도에서 용출됨을 확인하였다.

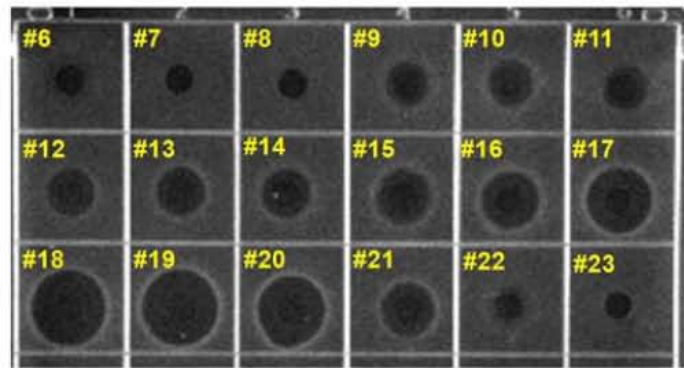


그림 15. 분획물(fraction 6~23)의 대장균에 대한 항균활성 검정.

항균활성을 나타내는 분획물에 대하여 SDS-Peptide 전기영동 분석 결과, 그림 16에서와 같이 분획 17~19에서 약 19kDa 크기의 단일 단백질 밴드를 확인하였다. 따라서 이와 같은 항균펩타이드 후보물질에 대해서 Bm-AMP1으로 명칭을 정하였다.

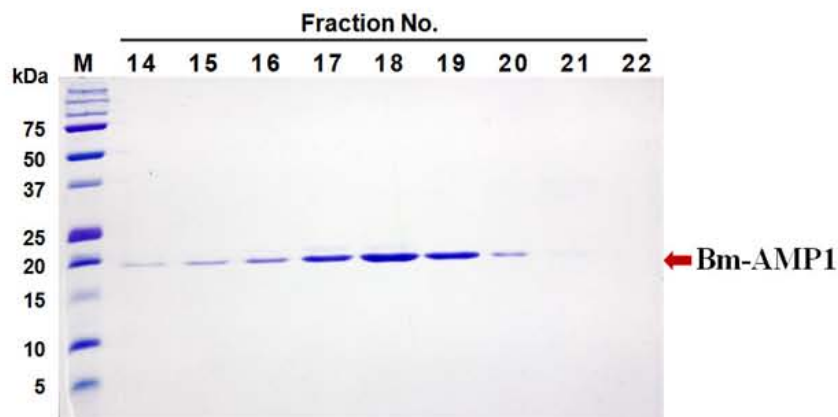


그림 16. 항균활성을 나타내는 분획물에 대한 SDS-peptide 전기영동 분석

항균활성 검정 및 SDS-Peptide 전기영동 분석을 통하여 확인된 Bm-AMP1 함유 분획물 (fraction 14~21)을 회수하여 동결건조로 농축한 다음 염 및 기타 단백질을 제거하기 위해 Superdex peptide 컬럼으로 gel filtration chromatography를 수행하여 2차 정제하였다(그림 17). gel filtration chromatography 결과, Bm-AMP1의 retention time은 20분으로 확인되었다.

용출된 분획물(fraction 18~22)을 회수하여 동결건조한 다음 SDS-Peptide 전기영동을 통하여 순수 분리 정제됨을 최종적으로 확인하였다(그림 18). 단백질 정량을 실시한 결과, 헬림프 1ml당 약 0.15mg의 Bm-AMP1이 정제됨을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 본 연구 과제에서 개발된 누에 면역유도제를 이용한 주사접종 시 발현되는 Bm-AMP1의 함량은 누에 유충 마리당 약 0.3mg 이상인 것으로 사료된다.

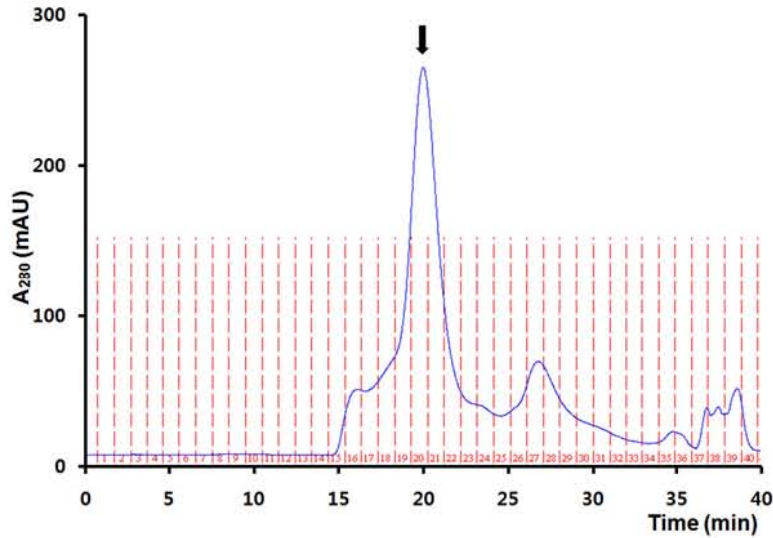


그림 17. Gel filtration chromatography에 의한 Bm-AMP1 2차 정제. Column: Superdex peptide 10/300GL, Buffer: 50mM sodium phosphate, pH7.0.

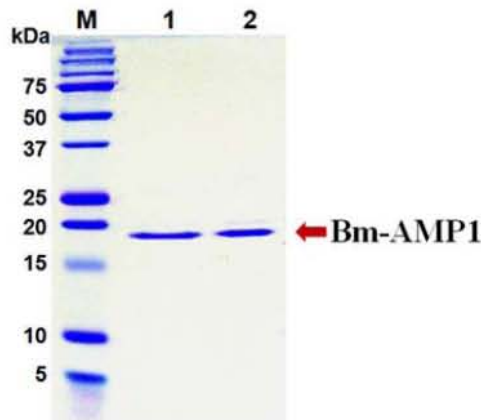


그림 18. Bm-AMP1에 대한 SDS-Peptide 전기영동 분석. 1: Anion exchange chromatography에서 용출된 분획(Fraction 14~21), 2: Gel filtration chromatography에서 용출된 분획(Fraction 18~22).

(다) 누에 주요 항균펩타이드 Bm-AMP2 및 AMP3 항균펩타이드 분리 및 정제

Bm-AMP1 정제 시 0.6M NaCl 농도에서 Hitrap-sp 컬럼의 담체에 결합되지 않은 시료를 동결건조로 농축한 후 0.3% 아세트산 용액에 용해 시킨 후 담체에 재결합 시킨 다음, 1.5M NaCl, 0.3% 아세트산 용출용액을 이용하여 gradient 0~80%에서 결합된 단백질을 점차적으로 용출하여 분획하였다(그림 19).

용출된 단백질 분획은 항균활성 검정을 통하여 항균펩타이드가 함유된 분획을 선별하였다. 그 결과, 그림 20에서 보는바와 같이 fraction 17~26번에서 항균활성을 나타냈으며, 특히 fraction 20,21,22에서 강한 항균활성을 보였다. 이들 항균활성을 나타내는 분획물들은 약 0.5~0.6M NaCl 농도에서 용출됨을 확인하였다.

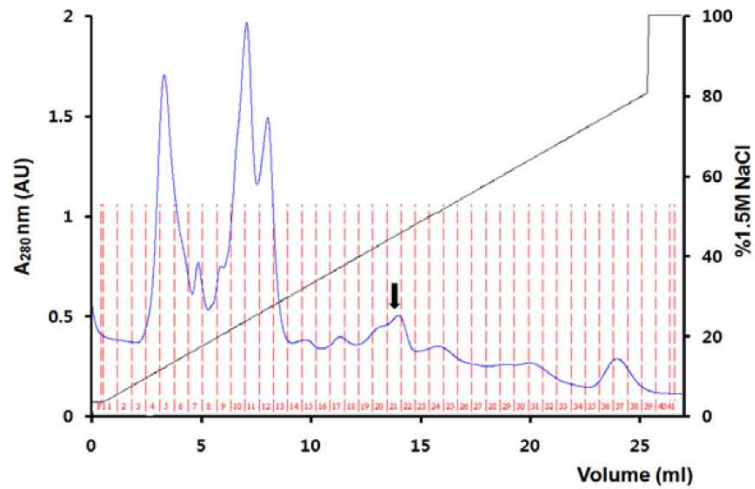


그림 19. Anion exchange chromatography에 의한 Bm-AMP2 및 Bm-AMP3 정제.
 Column: HiTrap SP, Start buffer: 0.3% acetic acid, Elution buffer: 0.3% acetic acid, 1.5M NaCl, Gradient: 0~80% elution buffer

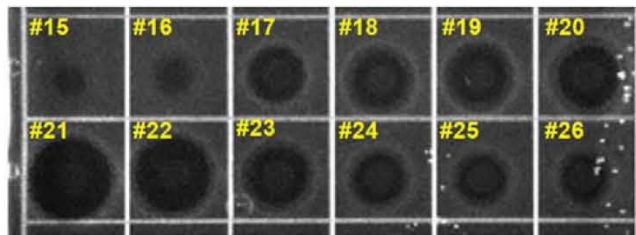


그림 20. 용출된 분획물(fraction 15~26)의 대장균에 대한 항균활성 검정.

이들 분획에 대하여 SDS-Peptide 전기영동 분석 결과, 모든 fraction에서 다양한 단백질이 함유되어 있었지만 특히 항균활성이 강한 fraction 21에서 약 5kDa 크기의 단일 단백질 밴드를 확인하였다(그림 21).

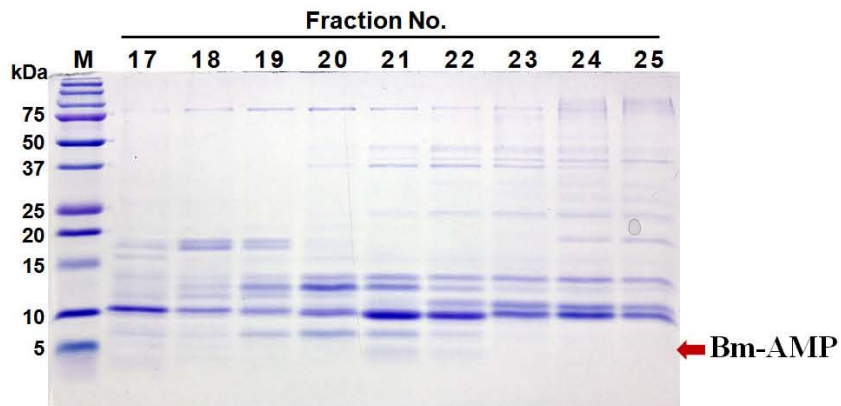


그림 21. 항균활성을 나타내는 분획물(fraction 17~25)에 대한 SDS-peptide 전기영동 분석

Anion exchange chromatography 1차 정제 과정에서 회수한 분획물(fraction 17~26)은 동결건조로 농축한 다음 Superdex peptide 컬럼을 이용한 gel filtration chromatography으로 다시 정제를 실시하였다(그림 22).

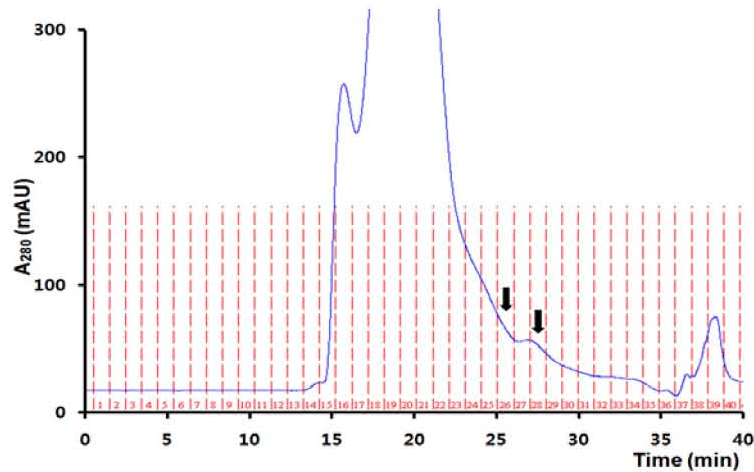


그림 22. Gel filtration chromatography에 의한 Bm-AMP2 및 AMP3의 2차 정제.
Column: Superdex peptide 10/300GL, Buffer: 50mM sodium phosphate, pH7.0.

용출된 분획에 대한 항균활성 검정한 결과, 그림 23에서 보는바와 같이 fraction 21에서 28 까지 항균활성을 나타냈었다. 특히 fraction 26 및 28에서 강한 항균활성 나타냄을 확인하였으며, 또한 fraction 27에서 항균활성이 감소하다가 28에서 다시 증가함을 확인하였다. 이는 다수의 항균펩타이드들이 혼재되어 분리된 것으로 사료된다.

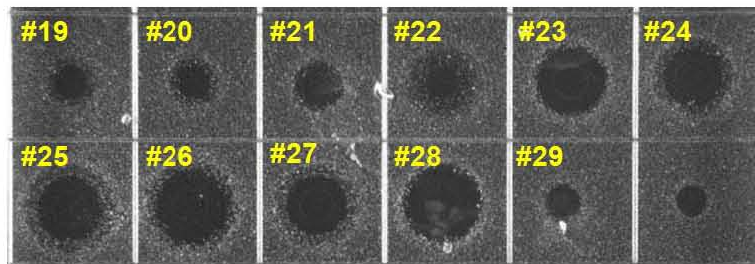


그림 23. 대장균을 대상으로 용출된 분획(fraction 19~29)에 대한 항균활성 검정.

이들 분획에 대하여 SDS-Peptide 전기영동 분석 결과, 약 4~5kDa 크기의 두 개의 항균펩타이드 밴드를 확인하였음(그림 24). 이는 그림 23의 항균활성 검정에서 확인된 것과 일치하였다. 이상의 결과를 바탕으로 용출된 순서에 따라 이들 후보 항균펩타이드들을 각각 Bm-AMP2 및 Bm-AMP3로 명명하였다. Bm-AMP2 및 Bm-AMP3의 retention time은 각각 26 분, 28분으로 확인되었다.

단백질 전기영동 분석 결과 이들 항균펩타이드의 이동도는 retention time과 일치하지 않았으며 이는 항균펩타이드가 갖는 +Net charge의 차이에 의한 것으로 사료된다.

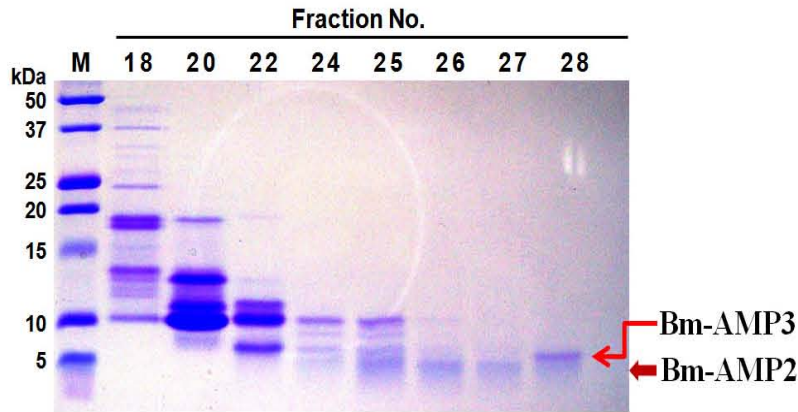


그림 24. 항균활성을 나타내는 분획(fraction 18~28)에 대한 SDS-peptide 전기영동 분석

(2) 누에 주요 항균펩타이드 동정 및 항균활성 검정

(가) N말단 아미노산 서열 분석에 의한 누에 주요 항균펩타이드 동정

정제된 누에 주요 항균펩타이드 Bm-AMP1, Bm-AMP2 및 Bm-AMP3 동정을 위해서 Applied Biosystem Procise Sequencer를 사용한 Edman degradation 방법으로 N말단 아미노산 서열을 분석하였다(표 1). 그 결과, Bm-AMP1의 N말단 아미노산 서열은 QAGSFTV로 BLAST 상동성 분석을 통하여 누에의 Attacin 항균펩타이드의 N말단 아미노산 서열과 일치하였고, Bm-AMP2의 N말단 아미노산 서열은 AKIPIKAIKT로 누에의 Moricin 항균펩타이드와 일치하였다. 또한 Bm-AMP3는 N말단 아미노산 서열이 RWKIFKKI로 누에의 cecropin 항균펩타이드로 동정되었다.

표 1. 주요 항균펩타이드 N-말단 아미노산 서열 분석 및 동정

Peptide	N-terminal seq.	Identified peptide/organism	Calc. PI	Calc. mass (Da)
Bm-AMP1	QAGSFTV	Attacin/ <i>B. mori</i>	9.44	19763.90
Bm-AMP2	AKIPIKAIKT	Mpricin/ <i>B. mori</i>	11.36	4543.52
Bm-AMP3	RWKIFKKI	Cecropin/ <i>B.mori</i>	10.64	3894.73

(나) 주요 가금 질병 유발균에 대한 최소생장억제농도(MIC) 측정

면역유도 누에로부터 분리 및 정제한 누에 주요 항균펩타이드, attacin, moricin, cecropin 3종에 대해 대장균, 살모넬라균(*S. pullorum*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*) 등 가금 주요 질병에 관련하는 병원균 5종을 대상으로 최소생장억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration)를 측정하였다(표 2). 그 결과 표 2에서 보는 바와 같이 누에 Attacin는 그람음성 장내세균인 대장균 및 4종의 살모넬라균에서 MIC 범위가 16~32mg/L로 우수한 항균활성을 나타냈었음. 또한 누에 Moricin 및 Cecropin 항균펩타이드의 경우 MIC 범위가 각각 2~4mg/L, 1~2mg/L로 이들 병원균에 강한 항균활성을 나타냈었다.

표 2. 누에 주요 항균펩타이드의 병원성 세균에 대한 항균활성 검정

Bacterial strains	Minimum Inhibitory Concentration (MIC, $\mu\text{g/ml}$)		
	Attacin	Moricin	Cecropin
<i>E. coli</i> (KACC 1039)	32	4	2
<i>Salmonella pullorum</i>	32	4	2
<i>Salmonella typhimurium</i>	32	4	2
<i>Salmonella enteritidis</i>	32	4	2
<i>Salmonella gallinarum</i>	16	2	1

(3) 누에 면역유도에 따른 항균펩타이드 발현량 상대적 비교 분석

본 연구에서 분리 및 정제한 누에 주요 항균펩타이드 3종의 함량을 측정한 결과, 혈림프 1ml당 Attacin 0.15mg, moricin 0.04mg 및 cecropin 0.05mg이 함유하는 것으로 조사되었다. 또한 본 연구에서는 면역 유도 시 누에에서 생성되는 주요 항균펩타이드 발현량 측정을 위해서 Cecropin 및 Melittin 농도에 따른 항균력을 기준으로 상대적 비교 분석을 수행하였다. 비교 분석을 위해서 그림 26에서와 같이 표준 항균펩타이드로 사용된 Cecropin 및 Melittin의 농도에 따른 항균활성을 측정하여 수치화하였으며 이를 바탕으로 항균활성도 그래프 추세선 수식을 작성하여 발현량을 예측하였다.

농도별 항균활성도 그래프 추세선 수식은 다음과 같다

- Cecropin : $Y=16.351\ln(X)-0.8889$, Melittin : $Y=13.225\ln(X)-6.111$

* Y= 항균활성도(units, 1mm inhibition zone=10U), X=펩타이드 처리농도

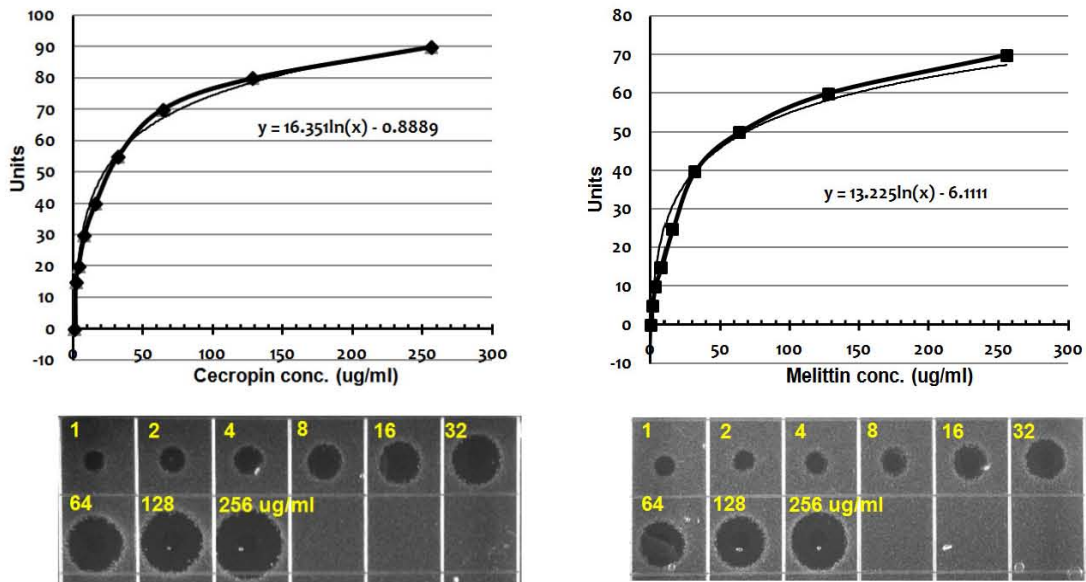


그림 25. 표준 Cecropin 및 Melittin 농도에 따른 항균활성도. 항균력 검정은 대장균을 대상으로 방사선확산분석법(Radial diffusion assay, RDA)에 따라 고체상 배지에서의 균 생육이 저해된 영역의 크기를 바탕으로 항균활성도(Units)를 측정(1mm=10U) 하였음.

그림 25에서의 표준 항균펩타이드 농도별 항균활성도 그래프 추세를 바탕으로 누에 면역유도 시간별 항균활성도에 따른 항균펩타이드 함량을 상대적 비교 분석을 통하여 측정하였다. Cecropin 항균펩타이드의 농도별 항균활성도를 바탕으로 상대적 비교 분석한 결과, 그림 26에서 보는바와 같이 누에 면역유도 주사접종 후 6시간, 10시간, 14시간, 18시간, 26시간 경과 후 누에 혈림프 시료는 각각 1.7ug/ml, 4.9ug/ml, 30.5ug/ml, 91.7ug/ml, 16.5ug/ml 농도의 Cecropin과 유사한 항균활성을 나타냈었다.

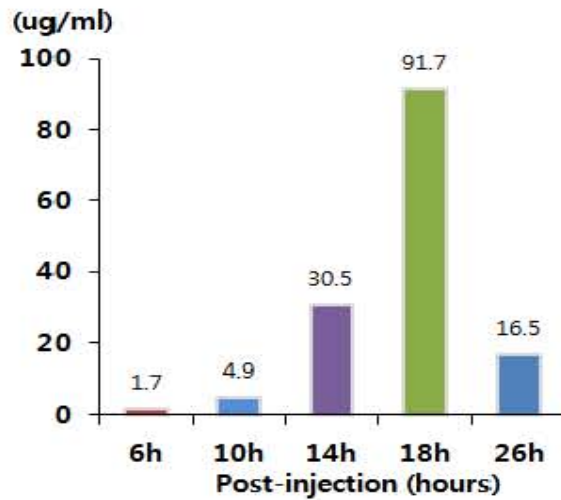


그림 26. 표준 cecropin 항균활성도를 이용한 누에 항균펩타이드 발현량 비교 분석

또한 melittin 항균펩타이드의 농도별 항균활성도를 기준으로 상대적 비교 분석한 결과, 누에 면역유도 주사접종 후 6시간경과 후 누에 혈림프 시료에서는 2.8ug/ml, 10시간에서는 12ug/ml, 14시간에서는 99ug/ml, 18시간에서는 400ug/ml, 26시간에서는 49ug/ml의 Melittin 농도와 유사한 활성을 보이고 있음을 확인하였다(그림 27).

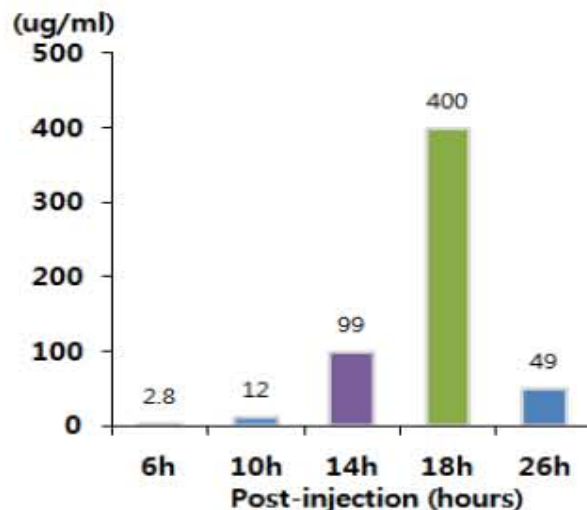


그림 27. 표준 melittin 항균활성도 이용한 누에 항균펩타이드 발현량 비교 분석

(4) 누에 주요 항균펩타이드 대량 정제 시스템 구축

(가) 면역유도 누에 대량생산 및 혈림프 단백질 추출

면역유도 누에로부터 생산되는 주요 항균펩타이드를 대량 정제 시스템 구축을 위해서 본 연구의 면역유도 누에분말 대량생산에서와 동일한 방법으로 면역 유도된 누에를 대량생산하였다. 즉, 위탁협동연구기관인 경남 농업기술원에서 대량 사육된 5령 5일 누에(백옥잠)를 제공받아 누에 면역유도용 주사제 체강 주사 접종으로 면역반응을 활성화 시킨 다음, 18시간 경과 후 수거하여 항균펩타이드 정제 시스템 구축을 위한 시료로 사용하였다. 또한 면역유도 효율을 검정하기 위해서 임의로 선별한 누에 72개체를 대상으로 대장균에 대한 항균활성을 검정하였다. 항균활성을 검정한 결과, 약 95% 이상 면역이 유도됨을 확인하였다.

누에 주요 항균펩타이드 정제 시스템을 구축하기 위해서 생산된 면역유도 누에로부터 혈액을 대량 채취하여 13,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 그 상층액을 -20°C 에 보관 한 다음 단백질 추출에 사용하였다. 일반적으로 항균펩타이드는 열, 염 및 산성에 안전한 특성을 이용하여 산화방지 및 저장단백질 등을 제거하기 위해서 보관된 혈림프 시료를 85°C 에서 10분간 열처리한 다음 14,000rpm으로 20분간 원심분리를 통하여 항균펩타이드가 포함된 수용성 단백질 분획을 수거하였다. 누에 혈림프 단백질 추출물은 동결건조하여 -20°C 에 보관하였다.

(나) 누에 주요 항균펩타이드 attacin 분리 및 대량 정제 시스템 구축

본 연구에서 수행한 항균펩타이드 정제 결과를 바탕으로 혈림프 단백질 추출물로부터 attacin을 대량 정제하는 시스템을 구축하였다. 즉, 본 연구에서는 3단계 정제과정을 통하여 누에 주요 항균펩타이드 attacin을 정제하였다. 구축된 attacin 정제 시스템은 다음과 같다.

- 1단계: 0.6M NaCl이 포함된 0.3% 아세트산 용액을 이용한 수용성 단백질 용액 제조
- 2단계: 음이온 교환 크로마토그래피를 이용한 분획
- 3단계: 투석을 통한 Desalting 및 농축

즉, 1단계에서 동결건조를 통하여 제작된 누에 혈림프 단백질 추출물 1g을 0.6M NaCl이 포함된 0.3% 아세트산 용액에 녹여 13,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 항균펩타이드를 포함하는 수용성 단백질 용액을 제작하였다. 2단계는 음이온 교환 크로마토그래피(anion exchange chromatography)에 의해 attacin 항균펩타이드를 정제 단계로 1단계 정제과정에서 제조된 단백질 용액을 Hitrap-sp 컬럼의 음전하를 띠는 담체에 결합시킨 후 1.5M NaCl, 0.3% 아세트산 용출용액을 이용하여 gradient 40~85%에서 결합된 단백질을 점차적으로 용출하여 분획하였다(그림 28). 용출된 분획들은 대장균을 대상으로 항균활성 검정을 통하여 attacin이 포함된 0.8M ~1M NaCl 농도 범위에서 용출된 fraction(13~24)을 수거하였다. 다음 단계로 attacin 분획물을 증류수에서 투석을 통하여 염을 제거하고 동결건조하여 분말화하였다.

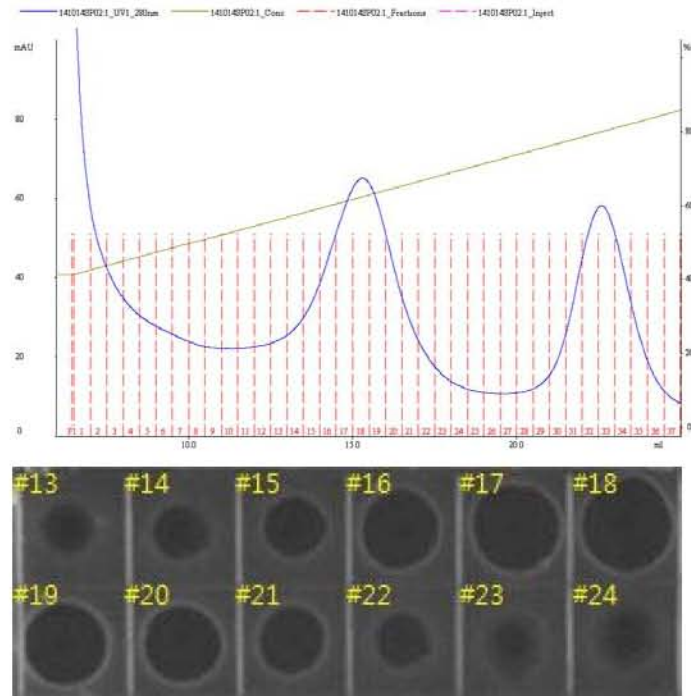


그림 28. Anion exchange chromatography에 의한 attacin 대량 정제 및 대장균을 대상으로 항균활성 검정

(다) 누에 세크로핀 및 모리신 정제 시스템 구축

누에 항균펩타이드 세크로핀 및 모리신은 면역유도된 누에 혈림프로부터 분리 및 정제하여 N말단 아미노산 서열 분석을 통하여 동정하였다. 본 연구에서는 이들 항균펩타이드 정제 결과를 바탕으로 혈림프 단백질 추출물로부터 대량 정제 시스템을 구축하였다. 즉, 동결건조를 통하여 제작된 누에 혈림프 단백질 추출물 1g을 0.2M NaCl이 포함된 0.3% 아세트산 용액에 녹여 13,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 항균펩타이드를 포함하는 수용성 단백질 용액을 제작하였다.

그림 29에서와 같이 제조된 단백질 용액을 Hitrap-sp 컬럼의 음전하를 띠는 담체에 결합시킨 후 0.9M NaCl, 0.3% 아세트산 용액 15ml를 이용하여 결합된 단백질을 점차적으로 용출하였다. 용출된 단백질 용액은 대장균을 대상으로 한 항균활성 검정으로 활성이 우수한 분획물을 수거하였으며, 이들 분획물은 ultra-filtration(3kDa cut off)을 이용한 Desalting 및 농축을 통하여 항균펩타이드 세크로핀, 모리신이 함유된 수용액을 분리하였다.

분리된 수용액은 동결건조를 통하여 분말화하였다. 상기 연구에서와 마찬가지로 세크로핀 및 모리신 항균펩타이드를 Superdex peptide 컬럼을 이용한 gel filtration chromatography 방법으로 분획 및 정제 과정이 요구되지만 정제 수율 및 천연항생제로 이용적 측면에서 항균활성이 우수한 펩타이드 수용액을 분말화하여 사용하는 것이 효율적인 것으로 사료된다.

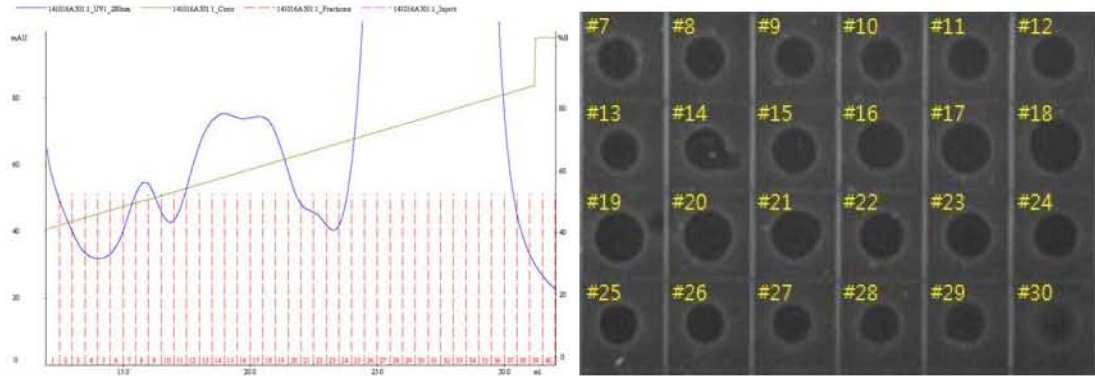


그림 29. Anion exchange chromatography에 의한 항균펩타이드 함유 분획물 대량 생산 및 항균활성 검정

다. 누에 항균펩타이드 재조합 대장균 발현 시스템 구축

(1) 누에 항균펩타이드 유전자 분리 및 재조합 대장균 발현벡터 제작

(가) 누에 항균펩타이드 선발 및 유전자 분리

누에 주요 항균펩타이드로 cecropin A, cecropin B, attacin, lebecin, moricin, enbocin, gloverin, defensin 등이 기존에 알려져 있지만, 본 연구에서는 면역 유도시 대량 발현되고 항균활성이 높은 cecropin A, cecropin B, enbocin 및 moricin 등 4종의 항균펩타이드를 선정하여 재조합 발현 연구에 사용하였다(표 3).

누에 Cecropin A의 아미노산 서열은 RWKLFKKIEKVGRNVRDGLIKAGPAIAVIGQAKSL-NH₂으로 총 35개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며 그 분자량은 3861.68로 산출됨. Cecropin B의 경우 RWKIFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVLGSAKAI-NH₂의 아미노산 서열을 가지고 있으며 역시 35개의 아미노산 잔기로 구성되고 그 분자량은 3894.73임. Enbocin은 총 36개의 아미노산 잔기로 구성되며 아미노산 서열은 WNFFKEIERAVARTRDAVISAGPAVATVAAA SAVAS-NH₂이고 분자량은 3704.20임. 또한 moricin의 경우 AKIPIKAIKTVGKAVGKGLRAINIA STANDVFNFLKPKKRKH-NH₂ 서열을 가지는 42개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며 분자량은 4543.52로 예상됨. 이들 4종의 항균펩타이드 유전자들은 그림 30에서 보는바와 같이 면역유도된 누에 유충 cDNA로부터 PCR 반응을 통하여 합성한 후 pGEM-T easy Vector에 클로닝 하였고, 이 후 T3 와 SP6 primer를 이용한 PCR 반응 및 염기서열 분석을 통하여 유전자를 동정하였다.

표 3. 누에 주요 항균펩타이드 유전자 염기서열 분석

Peptide	Sequence	Size
Cecropin A	5'-AGGTGGAAACTCTTCAAGAAAATTGAGAAAAGTGGGACGCAACGTTTCGCGATGGATTAATCAAAGCGGGTCCAGCTATAGCCGTCATAGGGCAAGCGAAATCCTTA-3'	105bp
Cecropin B	5'-AGGTGGAAAGATCTTCAAGAAAATTGAAAAAATGGGCAGGAACATTTCGTGACGGCATCGTCAAAGCGGGCCCGGCGATCGAGGTCCCTTGTTTCGGCTAAAGCTATA-3'	105bp
Enbocin	5'-TGGAACCTTCTTCAAGGAAATCGAGCGTGCCGTGGCGAGGACACGCGACGCCGTCATCAGCGGGTCCGGCGGTGGCGACGGTGGCGGCAGCCAGCGCCGTCGCGTCT-3'	108bp
Moricin	5'-GCAAAAATACCTATCAAGGCCATTAAGACTGTAGGAAAGGCAGTCCGGTAAAGGTCTAAGAGCCATCAATATCGCCAGTACAGCCAACGATGTTTTCAATTTCTTGAAACCGAAGAAAAGAAAGCAT-3'	126bp

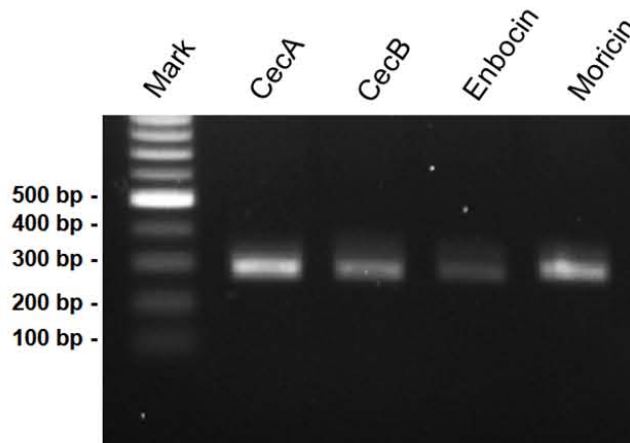


그림 30. PCR을 통한 누에 항균펩타이드 cecropin A(CecA), cecropin B(CecB), enbocin, moricin 유전자 합성

(나) 누에 항균펩타이드 합성을 위한 대장균 발현벡터 제작

4종의 누에 항균펩타이드의 안정적 재조합 합성 및 발현 기주인 *E. coli* BL21(DE3)에 대한 재조합 항균펩타이드의 독성 중화를 위해서 박테리아 유래 불용성 단백질인 ketosteroid isomerase(KSI) 단백질을 융합 파트너로 도입하여 불용성 융합단백질 발현벡터를 디자인하였음. 125개의 아미노산으로 구성된 박테리아 유래 불용성 단백질인 ketosteroid isomerase(KSI) 단백질을 융합 파트너로 도입하여 불용성 융합단백질 발현벡터를 제작하였다. 이를 위해, 토양 그람음성 세균인 *Commamonas testosteroni*에서 유래된 KSI 유전자를 PCR 반응으로 합성한 후, pGEM-T easy 벡터에 클로닝하여 염기서열을 분석하였다(그림 31). 이 후 NcoI 및 XhoI 제한효소로 절단된 KSI 유전자를 분리한 후 동일한 제한효소로 절단된 pET-21b 벡터에 삽입하여 항균펩타이드 발현을 위한 대장균 발현 벡터 (pET-KSI)를 제작하였다.

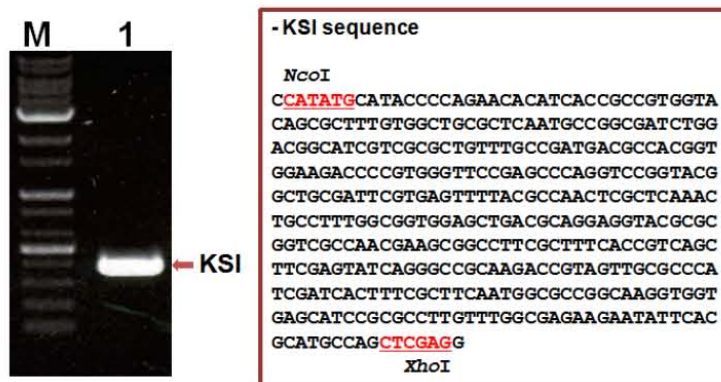


그림 31. Ketosteroid isomerase(KSI) 유전자 합성 및 염기서열 분석

그림 32에서 보는바와 같이 제작된 pET-KSI 벡터에서 KSI 유전자 위쪽에 존재하는 BglII 및 KpnI 제한효소 위치에 동일한 제한효소로 절단된 Cecropin A 등 4종의 항균펩타이드 유전자를 각각 삽입하여 pET-CecA/KSI, pET-CecB/KSI, pET-CecA/Enbo, pET-CecA/Mori 등 4종의

항균펩타이드 재조합 대장균 발현벡터를 구축하였다. 이 후 그림 33에서와 보는 바와 같이 T7 promoter-FP 와 T7 terminator-RP를 이용한 PCR 반응 및 염기서열 분석을 통하여 ORF를 확인하였다.

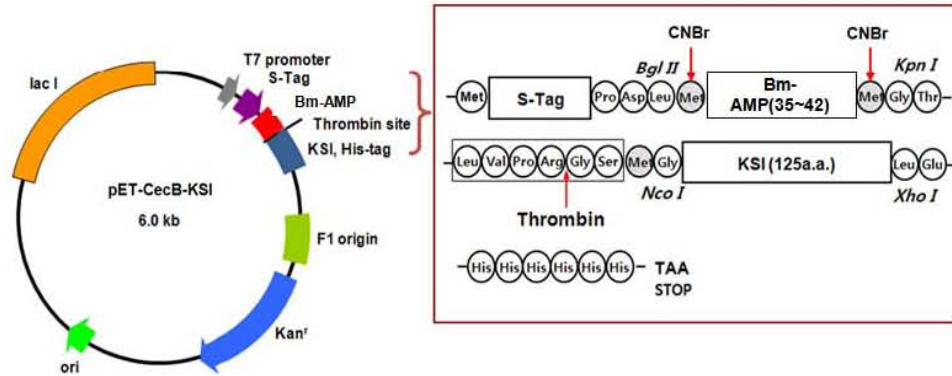


그림 32. 누에 항균펩타이드 유전자가 도입된 재조합 대장균 발현벡터 구축

구축된 대장균 발현벡터는 그림 33에서와 보는 바와 같이 T7 promoter-FP 와 T7 terminator-RP를 이용한 PCR 반응을 통하여 항균펩타이드 유전자 도입을 검정하였으며, 또한 이들 PCR 산물을 대상으로 염기서열 분석을 통하여 ORF를 확인하였다.

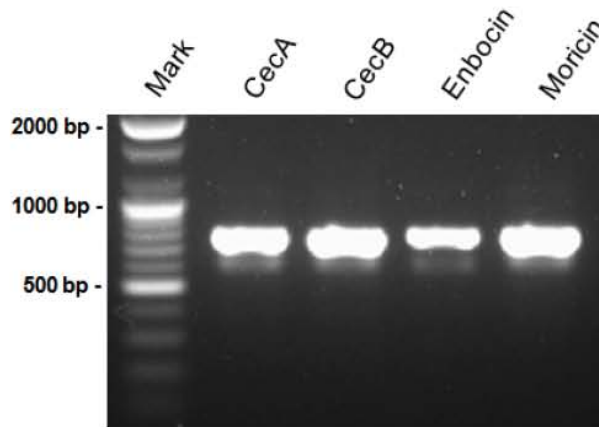


그림 33. PCR을 통한 누에 항균펩타이드 유전자 도입 검정

(2) 누에 주요 항균펩타이드 재조합 발현 및 정제

(가) 누에 cecropin A 재조합 발현 및 정제

① 재조합 cecropin A-KSI 불용성 융합단백질 발현

pET-CecA/KSI plasmid를 분리 정제한 후, 발현 균주인 *E. coli* BRL(DE3)에 Transformation 하여 CecA-KSI 융합단백질을 생산하는 재조합 대장균 BRL(DE3)-(pET-CecA/KSD)을 선발하였음. 재조합 단백질 발현은 IPTG를 통하여 유도한 후, 단백질 전기영동(SDD-PAGE)을 통하여 확인하였음(그림 34). 전기영동 분석 결과, 재조합 CecA-KSI 융합단백질은 약 23KDa 분자량으로 대부분 불용성 단백질로 발현됨을 확인하였다.

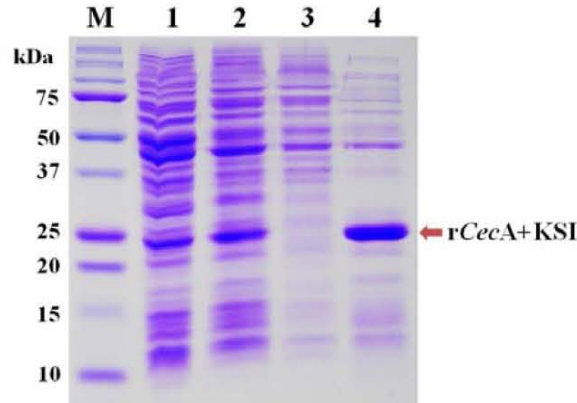


그림 34. 재조합 CecA-KSI 융합단백질 발현. 1: total cell extract without IPTG, 2: IPTG-induced total cell extract, 3: soluble fraction, 4: insoluble fraction

② 재조합 cecropin A 분리 및 정제

불용성 CecA-KSI 융합단백질로부터 cecropin A를 CNBr 절단 반응을 통하여 분리 회수하였다. 즉, 융합 단백질을 원심분리를 통하여 분리한 후 70% formic acid에 용해시키고, 1M CNBr를 처리하여 실온에서 교반을 통하여 융합단백질로부터 KSI 와 cecropin A을 절단하였음. 혼합물로부터 formic acid 및 CNBr를 제거하기 위해서 동결건조기를 이용하여 동결 건조한 후, 증류수로 용해하고 다시 동결 건조하는 과정을 2회 실시하였다. 최종적으로 동결 건조된 혼합물은 0.01% acetic acid 용액에 용해시킨 후, 14,000rpm에서 20분간 원심분리하여 soluble fraction과 insoluble fraction으로 분리하여 수거하였음. 재조합 Cecropin A은 CNBr 절단 반응 후, 대부분 수용성 단백질로 치환되어 불용성 단백질인 KSI로부터 쉽게 분리됨을 SDS-Peptide 전기영동 분석을 통하여 확인하였다. 재조합 항균펩타이드가 포함된 수용성 분획은 anion exchange chromatography 및 superdex peptide 컬럼을 이용한 액상 chromatography(FPLC)을 사용하여 Cecropin A를 순수 분리 정제하였다(그림 35, 36).

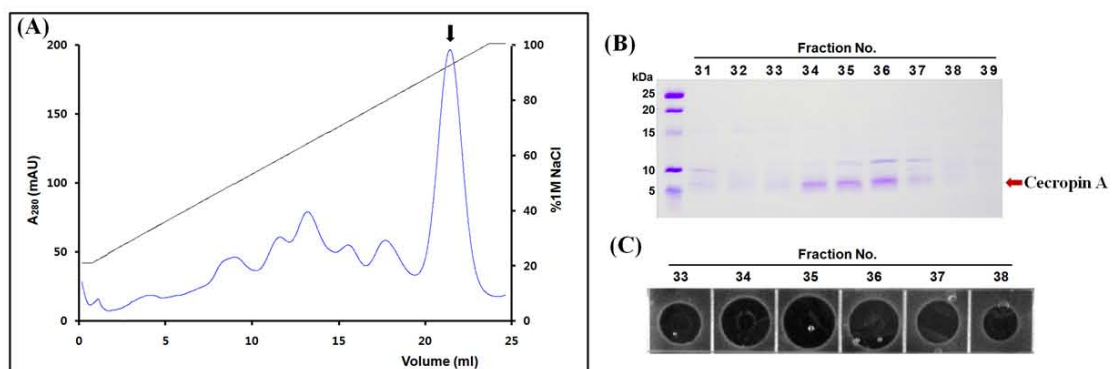


그림 35. Anion exchange chromatography에 의한 cecropin A 정제(A), 용출된 분획에 대한 전기영동 분석(B) 및 대장균에 대한 항균활성 검정(C)

일반적으로 세크로핀을 포함한 곤충 항균펩타이드 대부분은 양전하를 띠고 있어 음전하를 가지는 세포막 지질에 쉽게 결합하는 특성이 있다. 따라서 본 연구에서 cecropin A를 anion exchange chromatography으로 손쉽게 정제하였다. 즉, 0.3% 아세트산 용액에서

cecropin A을 음전하를 띠는 담체에 결합시킨 후 1M 염화나트륨을 사용하여 결합된 단백질을 점차적으로 용출하여 분획하였고, 용출된 단백질 분획은 단백질 전기영동 및 항균활성검정을 통하여 cecropin A가 포함된 분획을 선별하였다(그림 35). SDS-Peptide 전기영동 분석 결과, 분획 33 ~38에서 약 4~5kDa의 펩타이드 밴드를 확인하였으며, 또한 이들 분획은 대장균에 대한 RDA 분석에서 항균활성을 나타냈었다. 회수한 분획을 냉동건조로 농축한 다음 염 및 기타 단백질을 제거하기 위해 그림 36에서 보는바와 같이 superdex peptide 컬럼으로 gel filtration chromatography를 수행하여 2차 정제하였음. 또한 용출된 분획은 단백질 전기영동 분석 및 항균활성 검정을 통하여 최종적으로 확인하였다.

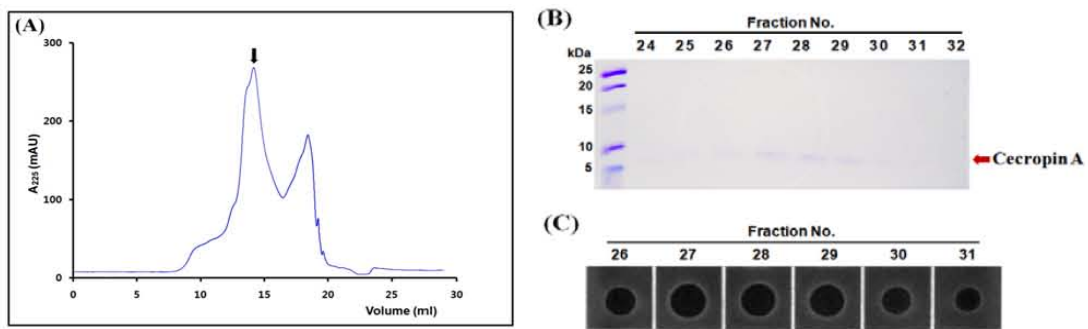


그림 36. Gel filtration chromatography에 의한 cecropin A 순수정제(A), 용출된 분획에 대한 전기영동 분석(B) 및 대장균에 대한 항균활성 검정(C)

(나) 누에 cecropin B 재조합 발현 및 정제

① 재조합 cecropin B-KSI 불용성 융합단백질 발현

누에 cecropin B 항균펩타이드 재조합 발현은 상기 cecropin A 발현 방법과 동일하게 수행하였다. 즉 pET-CecB/KSI plasmid를 분리 정제한 후, *E. coli* BRL(DE3)에 도입하여 CecB-KSI 융합단백질을 생산하는 재조합 대장균 BRL(DE3)-(pET-CecB/KSI) 선별하였고, IPTG 유도에 의한 불용성 CecB-KSI 융합단백질을 발현하여 분리하였다(그림 37). 전기영동 분석 결과, 재조합 CecB-KSI 융합단백질 역시 약 23kDa 분자량을 가지는 불용성 단백질로 발현됨을 확인하였다.

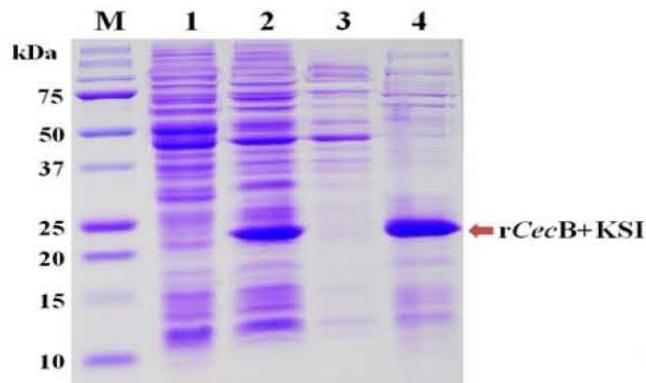


그림 37. 재조합 CecB-KSI 융합단백질 발현. 1: total cell extract without IPTG, 2: IPTG-induced total cell extract, 3: soluble fraction, 4: insoluble fraction

② 재조합 cecropin B 분리 및 정제

재조합 cecropin B 분리 및 정제 과정도 상기 cecropin A 분리 방법과 동일하게 수행하였다. 즉, 불용성 CecB-KSI 융합단백질에 CNBr 처리한 후 cecropin B 절단하여 회수하였음. 또한 혼합물로부터 formic acid 및 CNBr를 제거하기 위해서 동결 건조한 후, 증류수로 용해하고 다시 동결 건조하는 과정을 2회 실시하였음. 최종적으로 동결 건조된 혼합물은 0.01% acetic acid 용액에 용해시킨 후, 14,000rpm에서 20분간 원심분리하여 soluble fraction과 insoluble fraction으로 분리하여 수거하였다. 재조합 항균펩타이드가 포함된 수용성 분획은 anion exchange chromatography 및 Superdex peptide 컬럼을 이용한 액상 chromatography(FPLC)을 사용하여 cecropin B를 순수 분리 정제하였다(그림 38, 39). 먼저 그림 35에서 보는바와 같이 anion exchange chromatography를 통하여 cecropin B 항균펩타이드를 분리 및 정제하였으며, SDS-Peptide 전기영동 및 항균활성 검정을 통하여 cecropin B가 포함된 분획물을 확인하였다. 분석 결과, 분획 16~21에서 항균활성이 강한 약 4~5kDa 크기의 cecropin B가 용출됨을 확인하였다.

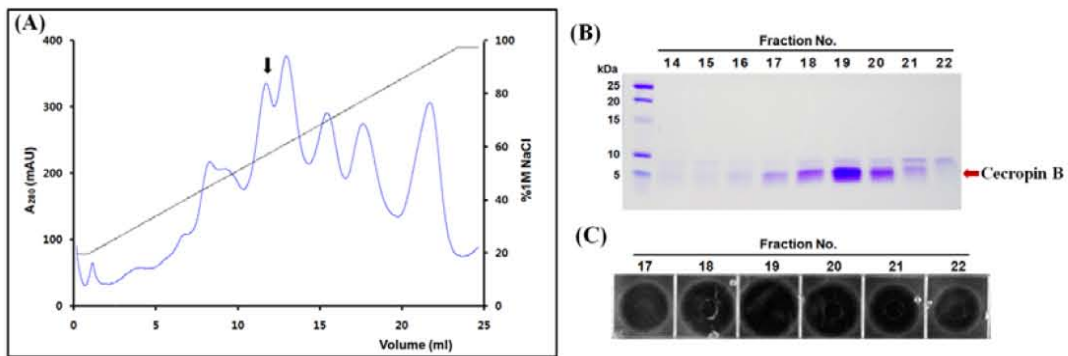


그림 38. Anion exchange chromatography에 의한 cecropin B 정제(A), 용출된 분획에 대한 전기영동 분석(B) 및 대장균에 대한 항균활성 검정(C)

cecropin B가 포함된 분획 16~21을 회수하여 동결건조로 농축한 다음, superdex peptide 컬럼을 사용한 gel filtration chromatography를 수행하여 염 및 기타 단백질을 제거하여 최종적으로 정제하였다(그림 39). 용출된 분획은 단백질 전기영동 분석 및 항균활성 검정을 통하여 최종적으로 확인하였음. 그 분석 결과, 분획 23~26에서 항균활성이 강한 cecropin B가 순수 정제됨을 확인하였다.

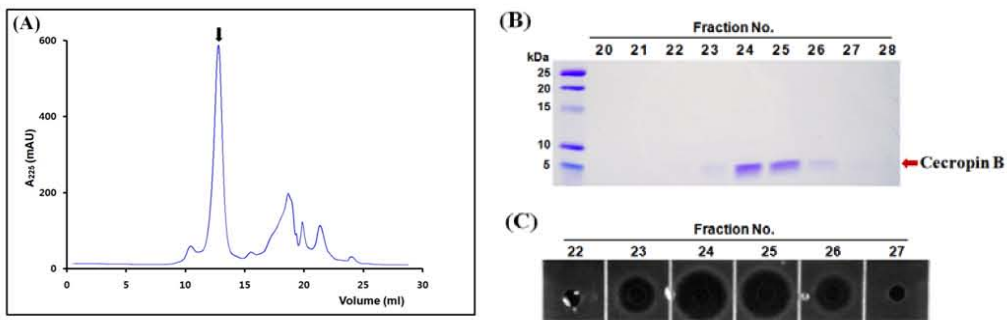


그림 39. Gel filtration chromatography에 의한 Cecropin B 순수정제(A), 용출된 분획에 대한 전기영동 분석(B) 및 대장균에 대한 항균활성 검정(C)

(다) 누에 enbocin 재조합 발현 및 정제

① 재조합 Enbo-KSI 불용성 용합단백질 발현

누에 enbocin 항균펩타이드 역시 상기 cecropin A의 대장균 발현과 동일한 방법으로 재조합 용합 단백질을 발현하였다. 먼저 Enbo-KSI 용합단백질을 생산하는 재조합 대장균 BRL(DE3)-(pET-Enbo/KSI) 선발한 다음 재조합 대장균에 IPTG 처리를 통하여 불용성 Enbo-KSI 용합단백질을 발현하여 분리하였다(그림 40). 전기영동 분석 결과, 약 24kDa 분자량을 가지는 불용성 단백질로 발현됨을 확인하였다.

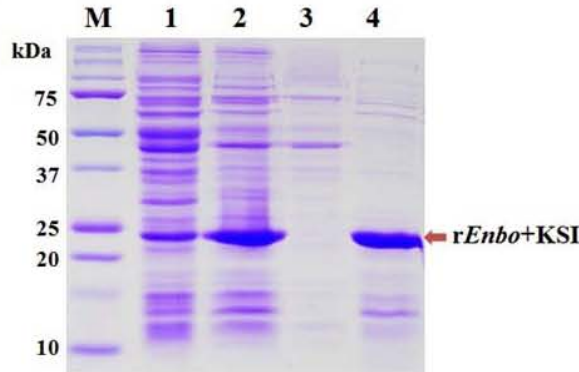


그림 40. 재조합 Enbo-KSI 용합단백질 발현. 1: total cell extract without IPTG, 2: IPTG-induced total cell extract, 3: soluble fraction, 4: insoluble fraction

② 재조합 enbocin 분리 및 정제

본 연구에서 발현된 재조합 enbocin 항균펩타이드 역시 cecropin A 및 B의 경우와 마찬가지로 동일한 방법으로 분리 및 정제하였다. 먼저 불용성 Enbo-KSI 용합단백질을 분리한 다음 CNBr 절단 반응, 산 및 CNBr를 제거하기 위한 동결 건조 과정, 수용성 분획물 회수 및 chromatography을 통하여 재조합 enbocin 순수 분리 정제하였다(그림 41, 42). 그림 41에서와 같이 anion exchange chromatography을 통하여 재조합 enbocin이 포함된 분획물(18~28)을 회수하였고, SDS-Peptide 전기영동 및 대장균에 대한 항균활성 검정으로 분리 정제됨을 확인하였다.

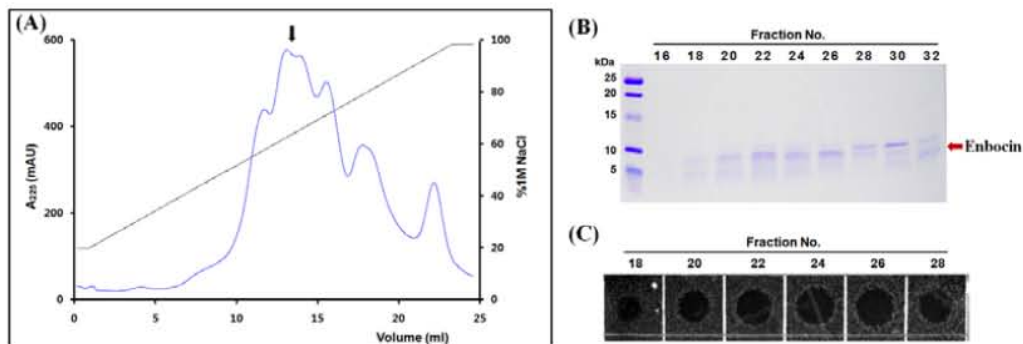


그림 41. Anion exchange chromatography에 의한 enbocin 정제(A), 용출된 분획에 대한 전기영동 분석(B) 및 대장균에 대한 항균활성 검정(C)

또한 확인된 enbocin이 포함된 분획 18~28을 회수하여 동결건조로 농축한 다음, 동일한 방법으로 gel filtration chromatography를 수행하여 최종적으로 순수 정제하였다(그림 42). 그림 42에서와 같이 용출된 분획은 단백질 전기영동 분석 및 항균활성 검정을 통하여 최종적으로 확인하였다. 그 분석 결과, 분획 23~27에서 항균활성이 우수한 재조합 enbocin 항균 펩타이드가 순수 정제됨을 확인하였다.

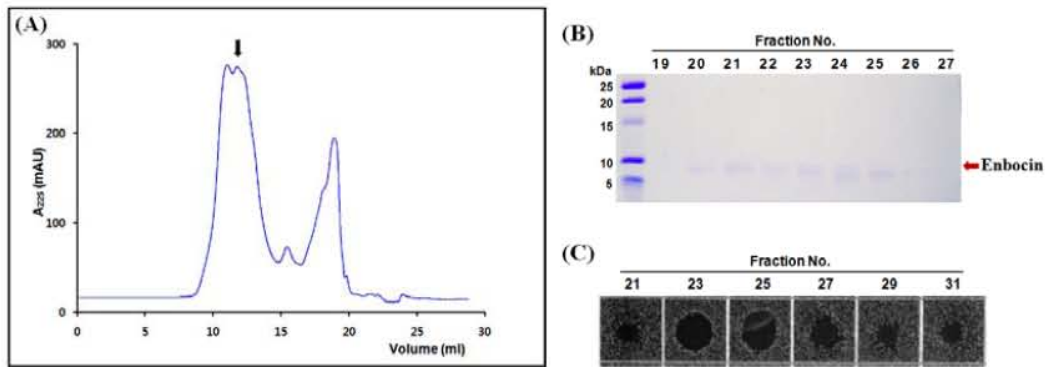


그림 42. Gel filtration chromatography에 의한 enbocin 순수정제(A), 용출된 분획에 대한 전기영동 분석(B) 및 대장균에 대한 항균활성 검정(C)

(라) 누에 moricin 항균펩타이드 재조합 발현 및 정제

① 재조합 Mori-KSI 불용성 융합단백질 발현

한편 본 연구에서는 누에 moricin 항균펩타이드를 다른 펩타이드 대장균 발현과 동일한 방법으로 재조합 융합 단백질을 생산하였다. 먼저 Mori-KSI 융합단백질을 생산하는 재조합 대장균 BRL(DE3)-(pET-Mori/KSI) 선발한 다음 재조합 대장균에 IPTG 처리를 통하여 불용성 Mori-KSI 융합단백질을 발현하여 분리하였다(그림 43). 전기영동 분석 결과, 약 25kDa 분자량을 가지는 불용성 단백질로 발현됨을 확인하였다.

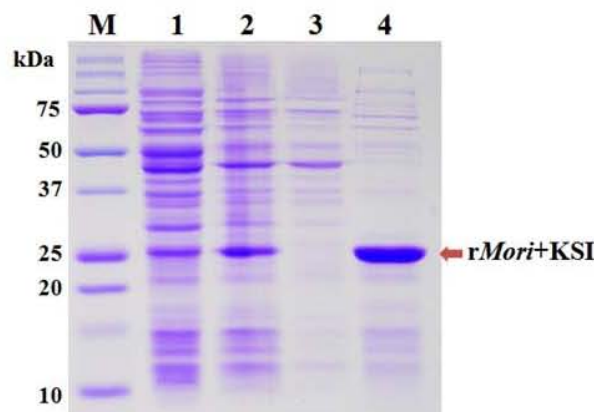


그림 43. 재조합 Mori-KSI 융합단백질 발현. 1: total cell extract without IPTG, 2: IPTG-induced total cell extract, 3: soluble fraction, 4: insoluble fraction

② 재조합 moricin 분리 및 정제

본 연구에서 발현된 재조합 moricin 항균펩타이드 역시 다른 펩타이드 정제와 동일한 과정

및 방법으로 분리 및 정제하였다. 즉, 불용성 moricin-KSI 융합단백질을 분리한 다음 CNBr 절단 반응, 동결 건조, 수용성 분획물 회수 및 chromatography을 통하여 재조합 moricin 순수 분리 정제하였다. 그림 44에서와 같이 anion exchange chromatography을 통하여 재조합 moricin이 포함된 분획물(21~31)을 분리하였으며, SDS-Peptide 전기영동 분석 및 대장균에 대한 항균활성 검정을 통하여 정제됨을 확인하였다.

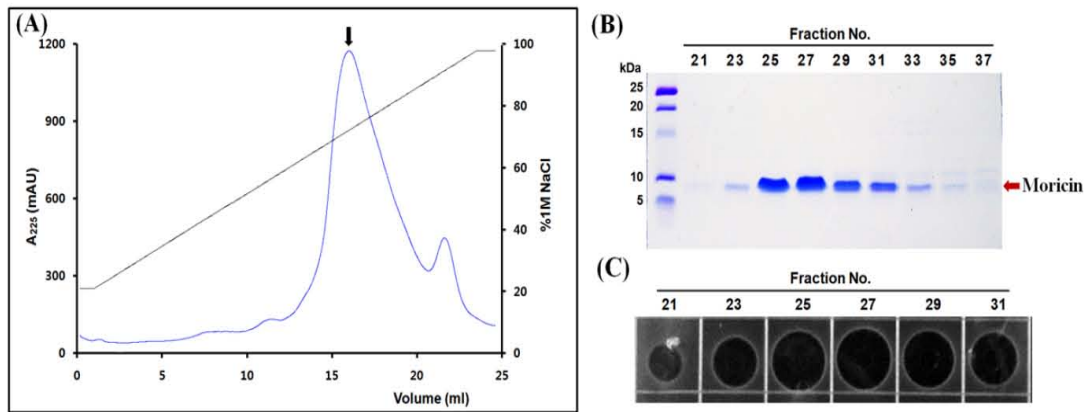


그림 44. Anion exchange chromatography에 의한 moricin 정제(A), 용출된 분획에 대한 전기영동 분석(B) 및 대장균에 대한 항균활성 검정(C)

재조합 moricin이 포함된 분획 21~31을 회수하여 동결건조로 농축한 다음, 동일한 방법으로 gel filtration chromatography를 수행하여 최종적으로 순수 정제하였다(그림 45). 그림 45에서와 같이 용출된 분획은 단백질 전기영동 분석 및 항균활성 검정을 통하여 최종적으로 확인하였다. 그 분석 결과, 분획 23~28에서 항균활성이 우수한 재조합 moricin 항균펩타이드가 순수 정제됨을 확인하였다.

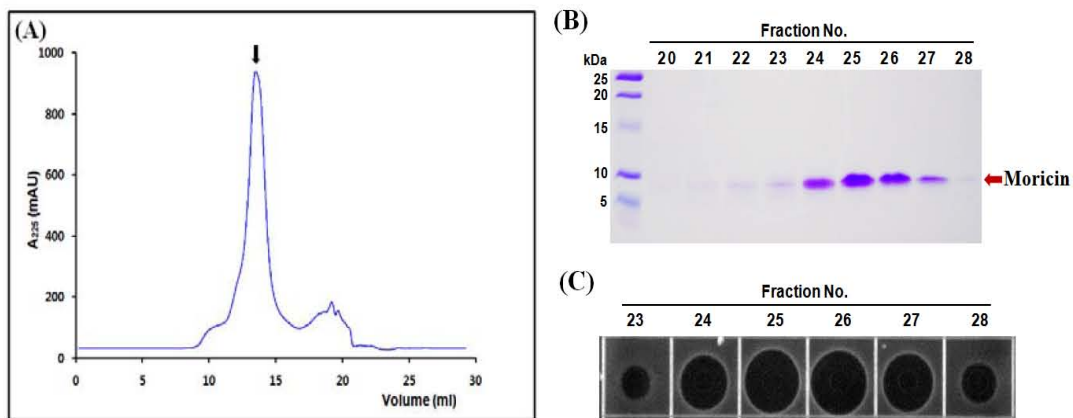


그림 45. Gel filtration chromatography에 의한 moricin 순수정제(A), 용출된 분획에 대한 전기영동 분석(B) 및 대장균에 대한 항균활성 검정(C)

(마) 재조합 항균펩타이드의 살모넬라균에 대한 최소생장억제농도(MIC) 측정

본 연구에서 대장균 발현시스템을 이용하여 생산 및 정제된 누에 cecropin A, cecropin B, enbocin, moricin 등 4종의 항균펩타이드들에 대해 대장균, 살모넬라균(*S. pullorum*, *S.*

typhimurium, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*) 등 가금 주요 질병에 관련하는 병원균 5종을 대상으로 최소생장억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration)를 측정하였다(표 4). 그 결과 표 4에서 보는 바와 같이 재조합 cecropin A 및 B 항균펩타이드의 경우 그람음성 장내세균인 대장균 및 4종의 살모넬라균에서 MIC 범위가 1~2mg/L로 가장 우수한 항균활성을 나타냈다. 또한 누에 moricin 및 enbocin 항균펩타이드의 경우 MIC 범위가 각각 2~4mg/L, 4~8mg/L로 이들 병원균들에 강한 항균활성을 보였다. 이상의 결과로 본 연구에서 생산한 재조합 항균펩타이드들은 가금류 주요 병원균인 살모넬라균에 높은 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

일반적으로 곤충에서 분리된 cecropin 항균펩타이드는 기존 보고된 carpet 모델, toroidal-hole 모델 및 barrel stave 모델로 설명되는 세포막을 직접 파괴하여 박테리아를 치사시키는 작용기작으로 병원균에 대해 보다 효과적으로 작용하며 광범위한 항균스펙을 나타낸다. 따라서 본 연구에서 생산한 재조합 항균펩타이드들은 새로운 천연 항생제 개발을 위한 소재로 그 활용 가치가 클 것으로 기대된다.

표 4. 재조합 항균펩타이드의 병원성 세균에 대한 최소생장억제농도 측정

Bacterial strains	Minimum Inhibitory Concentration (MIC, mg/L)			
	Cecropin A	Cecropin B	Moricin	Enbocin
<i>E. coli</i> (KACC 1039)	2	2	4	4
<i>Salmonella pullorum</i>	2	2	4	4
<i>Salmonella typhimurium</i>	2	2	4	8
<i>Salmonella enteritidis</i>	2	2	4	8
<i>Salmonella gallinarum</i>	1	1	2	4

라. 고기능성 하이브리드 항생펩타이드 개발

(1) 하이브리드 항생펩타이드 설계 및 합성

(가) 융합 항균펩타이드 PAJE 설계 및 구조 분석

기존에 보고된 곤충의 항균펩타이드보다 항균활성이 높으며, 천연항생제로써 인체 및 동물에 발생하는 세균성 질환을 예방하거나 동물 성장촉진용 천연항생제 개발을 위한 목적으로, 기존에 보고된 곤충 유래 항균펩타이드(파필리오신 등)를 기반으로 크기, 소수성(hydrophobicity), 회전성(helicity), 플러스 전하(net positive charge)등을 고려하여 기존의 항균펩타이드보다 항균활성이 증가된 융합 항균펩타이드 PAJE를 새로 융합하여 개발하였다(그림 46). 즉, 기존에 본 연구팀에 의해 호랑나비 유충에서 분리된 바 있는 파필리오신(Papiliocin)의 아미노산 서열을 바탕으로 N말단 나선 구조의 1-7 아미노산 영역(RWKIFKK)에 로얄제리에서 분리한 젤레인(Jelleine)의 1-8 아미노산 영역(PFKISIH)을 접합시켜 + 전극과 소수성 아미노산 잔기가 감소된 새로운 융합 펩타이드 PAJE를 디자인하였음. PAJE의 아미노산 서열은 RWKIFKKPFKISIH-NH₂로 총 15개의 아미노산 잔기로 구성되어 있다.

설계된 PAJE의 아미노산 서열은 RWKIFKKPFKISIH-NH₂으로 총 15개의 아미노산 잔기로

구성되어 있으며, R¹, S¹², K⁶, K¹⁰, K³, H¹⁴, K⁷ 등 7개의 소수성 아미노산 잔기와 I¹¹, I⁴, L¹⁵, P⁸, F⁵, F⁹, W², I¹³ 등 8개의 친수성 아미노산 잔기가 상보적으로 대치된 나선 구조 형태로 설계되어 펩타이드의 세포막 파괴에 있어 보다 용이하게 작용할 것으로 기대된다.

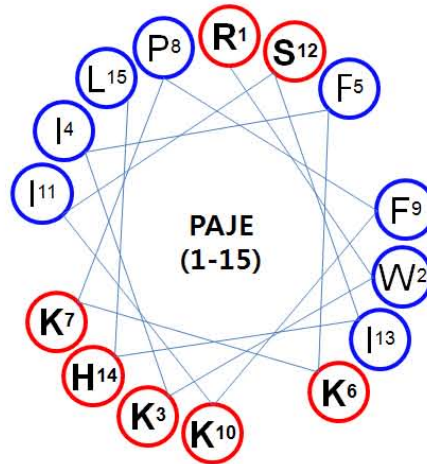


그림 46. 융합 펩타이드 PAJE의 Helical-wheel diagram. R¹, S¹², K⁶, K¹⁰, K³, H¹⁴, K⁷: 소수성 아미노산 잔기(hydrophobic residues), I¹¹, I⁴, L¹⁵, P⁸, F⁵, F⁹, W², I¹³: 친수성 아미노산 잔기 (hydrophilic residues)

(나) 융합 항균펩타이드 PAJE 합성 및 정제

설계된 융합 항균펩타이드 PAJE는 자동화된 고체상 펩타이드 합성기(Pioneer Applied Biosystems)를 이용하여 메리필드(Merrifield) 액상 고상법으로 합성하였음. 또한, 대조구로 사용된 Jellein-1 및 꿀벌 봉독 유래 항균펩타이드 melittin 들도 동일한 방법으로 합성하였다. 제조된 펩타이드들은 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 역상(reverse phase)-HPLC 칼럼을 이용하여 정제하고 그 순도를 확인하였으며, 그 결과 95% 이상의 순도를 나타냄을 확인하였다. 또한, MALDI 질량 분석법을 이용하여 펩타이드들의 아미노산 서열과 그 특성을 확인하였음. MALDI 질량 분석 결과, PAJE, Jelleine-1 및 melittin의 분자량은 각각 1939.5, 952.8 및 2845.8로 측정되었으며 이는 아미노산 서열로 계산하여 얻은 분자량과 일치함을 확인하였다. 이에 정확한 융합 항균펩타이드 PAJE가 합성되었음을 확인하였다.

표 5. 합성 항균펩타이드 아미노산 서열 및 특성

peptide	Amino acid Sequence	Net charge	Hydro-phobicity(%)	Molecular mass	
				Calculated	Observed
Jelleine-1	PFKISIHHL-NH ₂	+ 1	50	954.2	952.8
PAJE	RWKIFKKPFKISIHHL-NH ₂	+ 5	46	1941.4	1939.5
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂	+ 5	38	2847.5	2845.8

(다) 융합 펩타이드 PAJE의 항균활성 검정

합성된 융합 항균펩타이드 PAJE에 대한 항균 활성을 측정하기 위해, 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법과 최소성장억제농도(MIC, Minimum Inhibitory Concentration) 방법을 이용하였다.

① RDA분석을 통한 PAJE의 항균활성 측정

합성된 PAJE은 Agar well diffusion assay법을 사용하여 일차적으로 그람음성 세균인 병원성 *E. coli* (KACC 1039) 및 그람양성 세균인 *S. aureus* (KACC 10196)에 대하여 항균활성을 배지상에서 가시화하여 검정하였다(그림 47). 그 결과, PAJE은 대조구로 사용한 젤레인(160 µg/ml)보다 탁월한 항균활성을 나타내었고, 또한 20µg/ml의 낮은 농도에서도 *E. coli* 와 *S. aureus*의 병원균이 자라지 못해 생기는 clear zone을 확인되어 높은 항균력을 갖고 있음을 확인하였다.

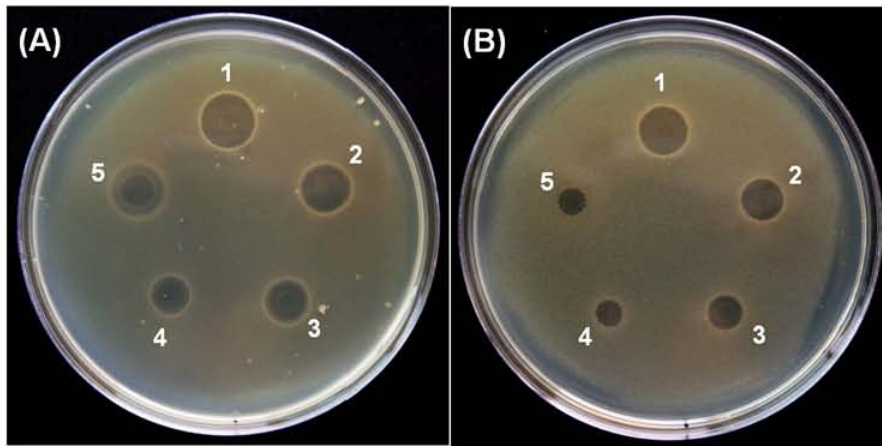


그림 47. RDA 분석을 통한 PAJE의 항세균 활성분석.(A) 대장균(*E.coli* KACC 1039),(B) 포도상구균(*S.aureus* KACC 10196).1: PAJE 160 µg/ml, 2: PAJE 80 µg/ml, 3: PAJE 40 µg/ml, 4: PAJE 20 µg/ml, 5: Jelleine-1 160 µg/ml.

② PAJE의 최소성장억제농도(MIC) 측정

PAJE 융합 펩타이드의 항균 활성을 다양한 병원균을 대상으로 최소성장억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration)를 측정하여 검정하였다. 그 결과, PAJE은 그람음성 장내세균인 대장균(*E. coli*), 폐렴막대균(*K. pneumoniae*) 및 녹농균(*P. aeruginosa*)에서 최소성장억제농도가 1µM로 젤레인에 비해 8배 이상의 높은 항균 활성을 나타냄을 확인하였다. 또한 꿀벌 봉독 유래의 항균펩타이드인 멜리틴과 비교에서도 4배 이상의 탁월한 항균 활성을 확인하였고, 한편 포도상 구균(*S. aureus*) 등 3종의 그람 양성 세균 및 칸디다증을 유발하는 진균(*Candida albicans*)에서도 젤레린에 비해 4배 이상 의 높은 항균활성을 나타냄을 확인하였다.

표 6. 다양한 세균을 대상으로 PAJE의 최소생장억제농도(MIC) 측정

Microorganism	Minimum Inhibitory Concentration (MIC, μM)		
	Jelleine-1	PAJE	Melittin
Gram negative bacteria			
<i>E. coli</i> (KACC 1039)	8	1	4
<i>K. pneumonia</i>	8	1	4
<i>P. aeruginosa</i>	8	1	4
Gram positive bacteria			
<i>S. aureus</i> (KACC 10196)	16	4	1.5
<i>B. subtilis</i>	4	1	1.5
<i>E. faecalis</i>	16	4	2
Yeast fungi			
<i>C. albicans</i>	16	4	2

③ 용합 항균펩타이드 PAJE의 처리시간 및 농도에 따른 살균력 측정

시간-살균 곡선 분석(Time-kill curve assay)을 통하여 합성 펩타이드의 *E. coli* 및 *S. aureus*에 대한 살균속도 및 펩타이드 농도에 따른 살균 활성을 측정하였다(그림 48). 즉, 각 균주들을 3%(w/v) TSB(Tryptic Soy Broth) 액체 배지에서 37°C, 200rpm 조건으로 18시간 진탕 배양한 후, 다시 동일한 조건에서 최종농도가 1×10^7 CFU/ml 농도가 되도록 2차 배양한 다음, microplate well에 90 μl 의 세균 배양액을 넣고 용합 항균펩타이드 PAJE 10 μl 를 첨가하였다. 일정한 시간이 지날 때마다 배양액을 희석한 다음 LB 고체배지에 도말하였다. 37°C에서 배양기에 18 ~ 24시간 배양시킨 후 생존된 콜로니(colony) 숫자를 파악하여 펩타이드 처리 시간별 CFU를 측정하였음. 그 결과, 항균펩타이드 PAJE는 매우 높은 살균력을 보였으며 강력한 항균 펩타이드로 알려진 멜리틴과 유사한 살균 속도를 나타냄을 확인하였다.

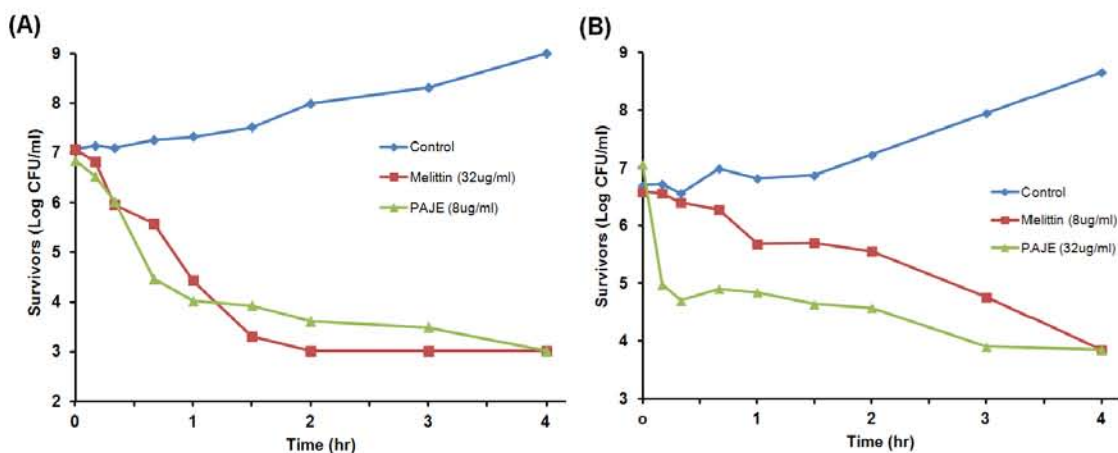


그림 48. 용합 항균펩타이드 PAJE의 처리시간에 따른 *E. coli* KACC 1039(A) and *S. aureus* KACC 10196(B)에 대한 Time-kill kinetics 측정

또한, 항균펩타이드 PAJE 농도에 따른 살균 활성을 측정하기 위해서 여러 농도로 희석된 항균펩타이드 PAJE를 세균 배양액(1×10^7 CFU/ml)에 첨가한 후 1시간 배양한 다음 LB 고체배지에 도말하여 상기와 동일한 방법으로 생존한 세균 수를 측정하였다. 농도에 따른 살균 활성을 측정한 결과, 그림 49에서 보는바와 같이 PAJE 펩타이드는 $16 \mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 대장균을 1시간내에 거의 99% 치사시킴을 확인하였고, *S. aureus*에서는 $16 \sim 32 \mu\text{g/ml}$ 처리농도에서 1시간 배양시 약 50%의 치사율을 나타낸 것이 확인됨으로써 항균펩타이드 PAJE는 높은 살균력을 갖고 있음을 확인하였다.

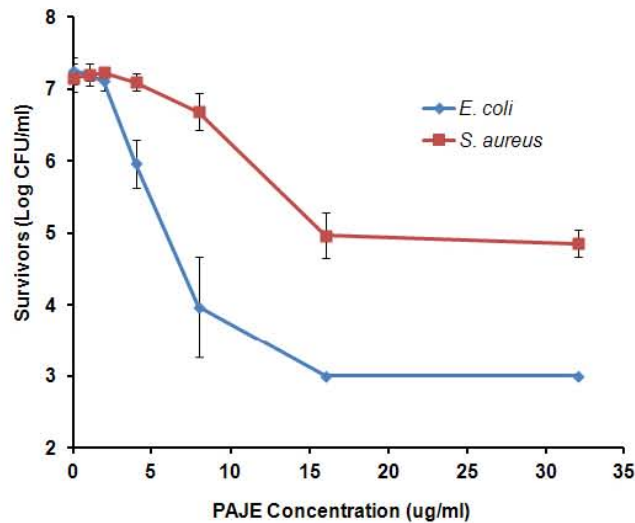


그림 49. 융합 항균펩타이드 PAJE의 농도에 따른 *E. coli* KACC 1039(A) and *S. aureus* KACC 10196(B)에 대한 살균 활성 측정. 펩타이드 1시간 배양 후 각 세균의 CFU 측정

④ 융합 항균펩타이드 PAJE의 세포 독성 측정

융합 펩타이드인 PAJE의 안전성 검정을 위하여 적혈구 파괴능(hemolytic activity)을 조사하였다. 높은 용혈 활성을 가지는 멜리틴에 비해 PAJE는 고농도에서도 용혈 활성을 나타내지 않았다. 따라서 인체에 독성이 없이 무해한 항균펩타이드로서 그 안정성이 확인되었다. 이상의 결과로 새롭게 디자인된 융합 펩타이드 PAJE는 인체 및 동물에 발생하는 세균성 질환 예방, 동물 성장촉진용 천연항생제 및 사료 첨가제로 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

표 7. 융합 항균펩타이드 PAJE의 hemolytic activity 측정

peptide	% Hemolysis (μM)					
	50	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78
PAJE	0	0	0	0	0	0
Melittin	100	100	100	95	93	31

(2) 고기능성 융합 항균펩타이드 PAJE 유사체 개발

(가) 새로운 고효성 하이브리드 항생펩타이드 PAJE 유사체 설계 및 합성

① PAJE 유사체 항균펩타이드 설계 및 구조 분석

기존 본 과제에서 개발된 융합 항균펩타이드 PAJE의 아미노산 서열을 바탕으로 크기, 소수성(hydrophobicity), 회전성(helicity), 플러스 전하(net positive charge)등을 고려하여 새로운 항균펩타이드 PAJE 유사체 4종을 디자인하였다(그림 50). 즉 PAJE2는 기존 PAJE 융합 항균펩타이드의 아미노산 서열(RWKIFKKPFKISHL-NH₂)에서 8번째 프롤린(P)을 이소루신(I)로 치환하여 디자인하였고, 그 아미노산 서열은 RWKIFKKIFKISHL-NH₂로 총 15개의 아미노산 잔기로 구성된다. PAJE3의 경우 기존 PAJE 아미노산 서열에서 첫 번째 잔기인 아르기닌(R)를 제거하고 소수성 아미노산 잔기인 트립토판(W)으로 시작하게 디자인하였다. 그 아미노산 서열은 WKIFKKIFKISHL-NH₂로 총 14개의 아미노산 잔기로 구성된다. 또한 PAJE4의 경우 PAJE3의 아미노산 서열에서 7번째 프롤린(P)을 이소루신(I)로 치환하여 그 아미노산 서열이 WKIFKKIFKISHL-NH₂로 디자인하였다. 반면에 PAJE5는 소수성(hydrophobicity) 및 회전성(helicity)을 고려하여 디자인하였다. 설계된 PAJE5의 아미노산 서열은 WKIKFKIFKISHL-NH₂으로 총 14개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, R¹, S¹², K⁶, K¹⁰, K³, H¹⁴, K⁷ 등 7개의 소수성 아미노산 잔기와 I¹¹, I⁴, L¹⁵, P⁸, F⁶, F⁹, W², I³ 등 8개의 친수성 아미노산 잔기가 상보적으로 대치된 나선 구조 형태로 설계되어 펩타이드의 세포막 파괴에 있어 보다 용이하게 작용할 것으로 기대된다.

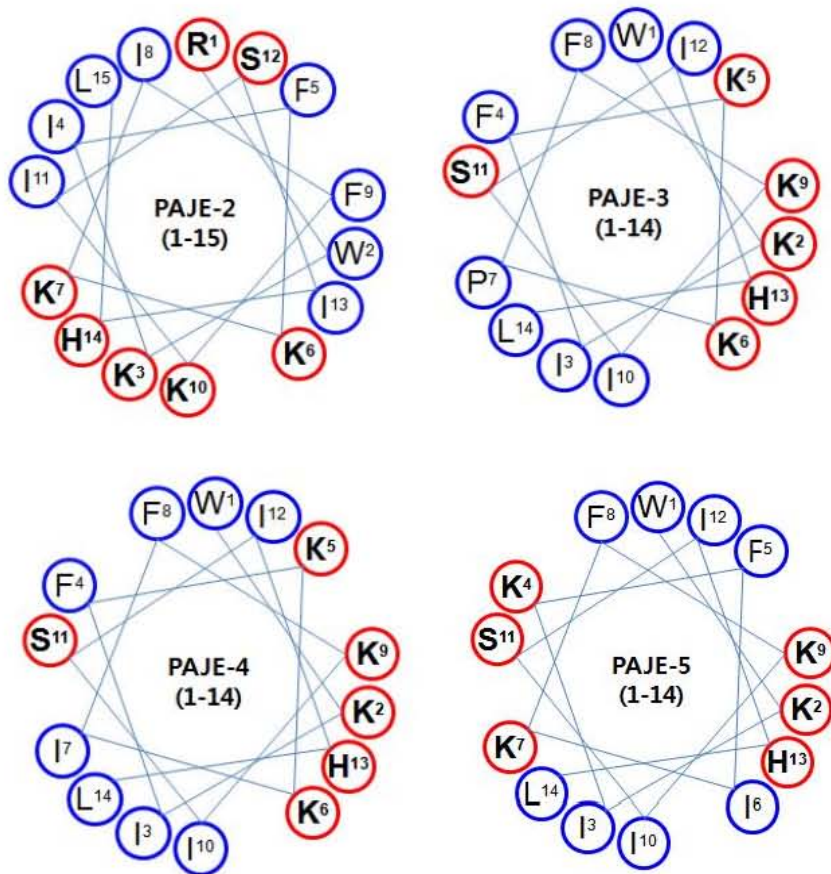


그림 50. 융합 항균펩타이드 PAJE 유사체들의 Helical-wheel diagram.

② PAJE 융합 항균펩타이드 유사체 합성

설계된 융합 항균펩타이드 PAJE 유사체 4종(PAJE2~PAJE5)들은 자동화된 고체상 펩타이드 합성기(Pioneer Applied Biosystems)를 이용하여 메리필드(Merrifield) 액상 고상법으로 합성하였다. 제조된 펩타이드들은 0.05% TFA가 포함된 아세토니트릴 농도구배(acetonitrile gradient)에서 역상(reverse phase)-HPLC 칼럼을 이용하여 정제하고 그 순도를 확인하였으며, 그 결과 95% 이상의 순도를 나타냄을 확인하였다. 또한, MALDI 질량 분석법을 이용하여 펩타이드들의 아미노산 서열과 그 특성을 확인하였다. MALDI 질량 분석 결과, PAJE2, PAJE3, PAJE4 및 PAJE5의 분자량은 각각 1956.3, 1785.1, 1799.7 및 1799.8로 측정되었으며 이는 아미노산 서열로 계산하여 얻은 분자량과 일치함을 확인하였다. 이에 정확한 융합 항균펩타이드 PAJE 유사체 4종이 합성되었음을 확인하였다.

표 8. 합성 항균펩타이드 PAJE 및 유사체들의 아미노산 서열 및 분자적 특성

Peptide	Amino acid Sequence	Net charge	Hydrophobicity(%)	Molecular mass	
				Calculated	Observed
PAJE	RWKIFKKPFKISIH ₂ L-NH ₂	+5	46%	1935.4	1939.5
PAJE2	RWKIFKKIFKISIH ₂ L-NH ₂	+5	53%	1957.4	1956.3
PAJE3	WKIFKKPFKISIH ₂ L-NH ₂	+4	50%	1779.2	1785.1
PAJE4	WKIFKKIFKISIH ₂ L-NH ₂	+4	57%	1801.2	1799.7
PAJE5	WKIKFIKFKISIH ₂ L-NH ₂	+4	57%	1801.2	1799.8

(나) 융합 항균펩타이드 PAJE 유사체들에 대한 항균활성 검정

합성된 융합 항균펩타이드 PAJE 유사체에 대한 항균 활성을 측정하기 위해, 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법과 최소성장저해농도(MIC, Minimum Inhibitory Concentration)방법을 이용하였다. PAJE 유사체들은 Agar well diffusion assay법을 사용하여 일차적으로 그람음성 세균인 병원성 *E. coli* (KACC 1039) 및 그람양성 세균인 *S. aureus* (KACC 10196)에 대하여 항균활성을 배지상에서 가시화하여 검정하였고, 또한 그람음성 장내 세균인 *E. coli*, 살모넬라균등 가급 주요 질병에 관련하는 병원균 및 그람양성 세균인 *S. aureus*들을 대상으로 최소성장억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration) 및 최소살균농도(MBC, minimal bactericide concentration)를 측정하여 그 항균활성을 비교 검정하였다.

① PAJE2의 병원균에 대한 항균활성 검정

그람음성 장내세균인 대장균(*E. coli*) 및 그람양성 세균인 포도상구균(*S. aureus*)에 대한 PAJE2의 최소성장억제농도(MIC₅₀)을 측정한 결과, 그림 51에서 보는바와 같이 *E. coli*에서 20.7mg/L, *S. aureus*에서 8.3mg/L 농도로 그람양성 세균에 보다 높은 항균활성을 나타냈었음. 한편 세균을 완전히 치사시키는 최소살균농도(MBC)은 *E. coli* 및 *S. aureus*에서 동일하게 32 mg/L로 조사되었다.

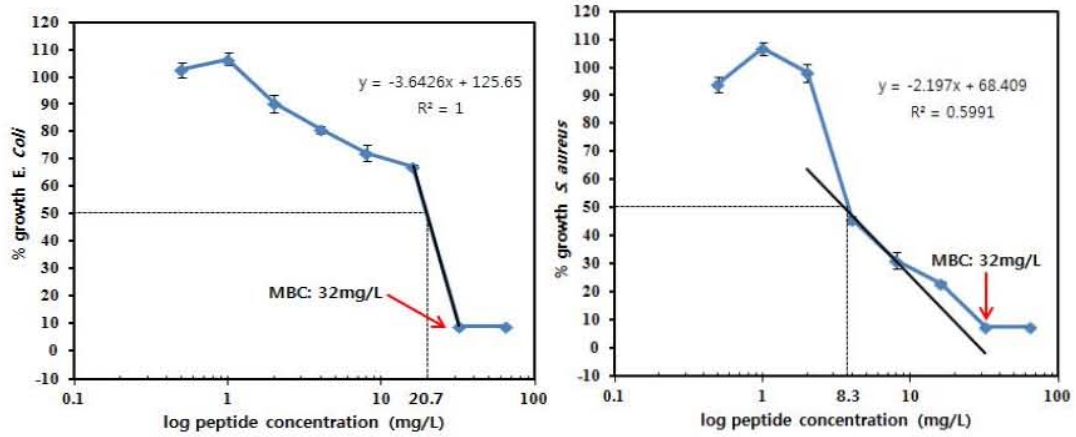


그림 51. 합성 PAJE2의 대장균(*E. coli*) 및 포도상구균(*S. aureus*)에 대한 항균활성 검정

또한 그림 52에서와 같이 4종의 살모넬라균에 대한 PAJE2의 최소생장억제농도(MIC₅₀)를 측정 한 결과, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* 및 *S. typhimurium*에서는 각각 12mg/L, 5.4mg/L, 12.2mg/L 및 18.2mg/L로 높은 항균활성을 나타냈었음. 이들 살모넬라균에 대한 최소살균농도(MBC)은 *S. enteritidis*, *S. pullorum*, *S. typhimurium*에서 동일하게 32mg/L로 측정되었으며, 한편 *S. gallinarum*에 대해서는 8mg/L로 강한 항균활성을 나타냈었다.

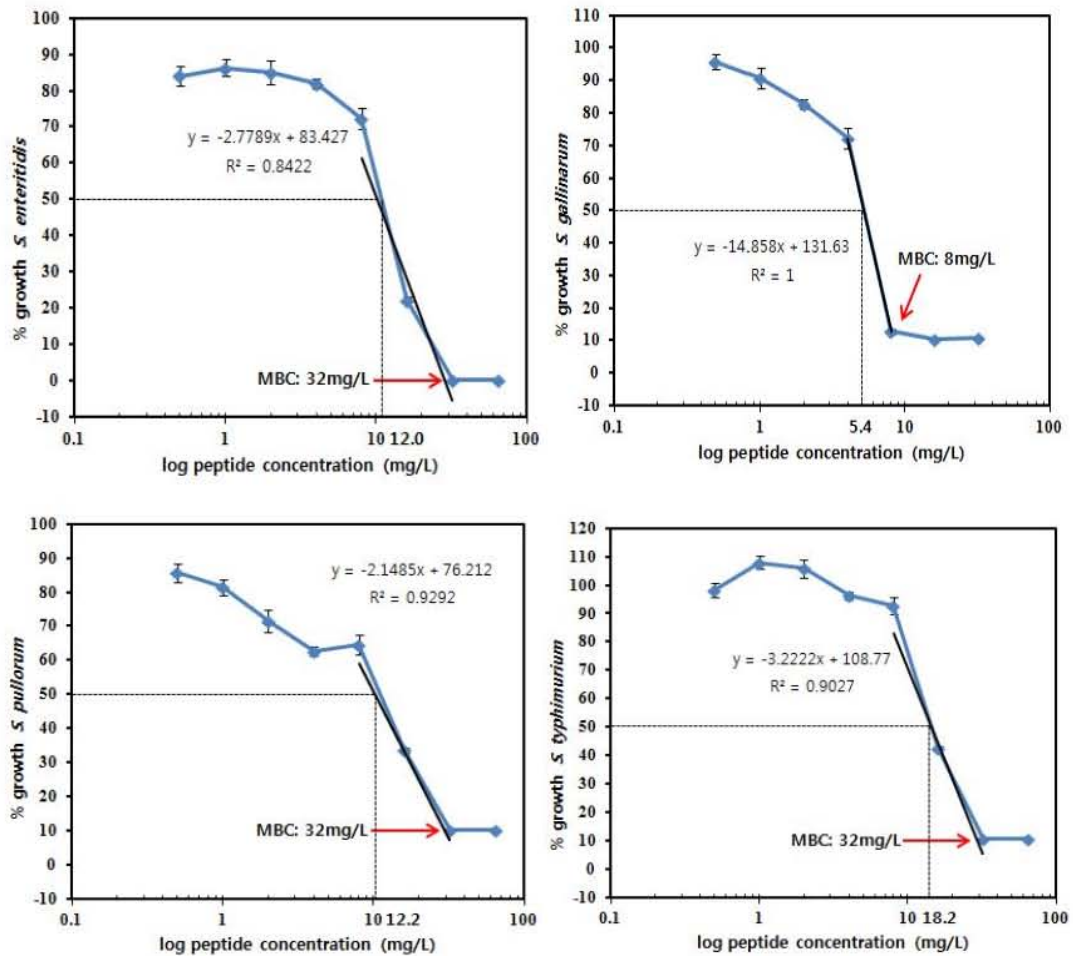


그림 52. 합성 PAJE2의 살모넬라균 4종에 대한 항균활성 검정

이상의 결과를 종합하여 비교분석한 결과, PAJE2는 그람양성 세균인 포도상 구균 및 살모넬라균 *S. gallinarum* 에서 MIC 범위가 5.4 ~ 8.3mg/L로 다른 균에 비해 다소 높은 항균활성을 가짐을 확인하였다.

② PAJE3의 병원균에 대한 항균활성 검정

합성 PAJE3의 최소생장억제농도(MIC₅₀)를 대장균(*E.coli*) 및 포도상구균(*S. aureus*)을 대상으로 측정한 결과, 그림 53에서 보는바와 같이 *E.coli*에서 3.1mg/L, *S. aureus*에서 8.9mg/L 농도로 그람음성 세균에 보다 높은 항균활성을 나타냈었다. 또한 세균을 완전히 치사시키는 최소살균농도(MBC)를 측정한 결과에서도 항균활성 범위가 *E.coli*에서 4mg/L로 16mg/L 농도의 *S. aureus*에 비해 4배 이상 항균활성이 우수한 것으로 확인되었다.

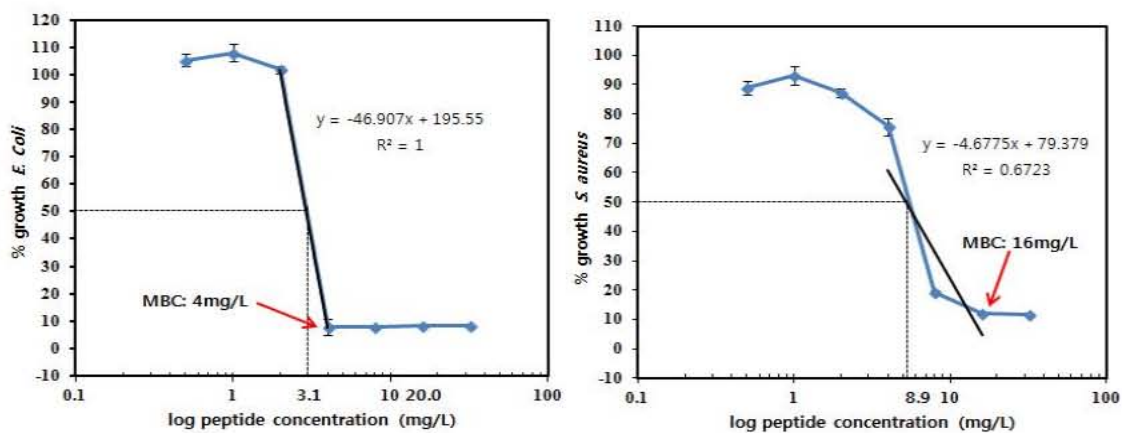
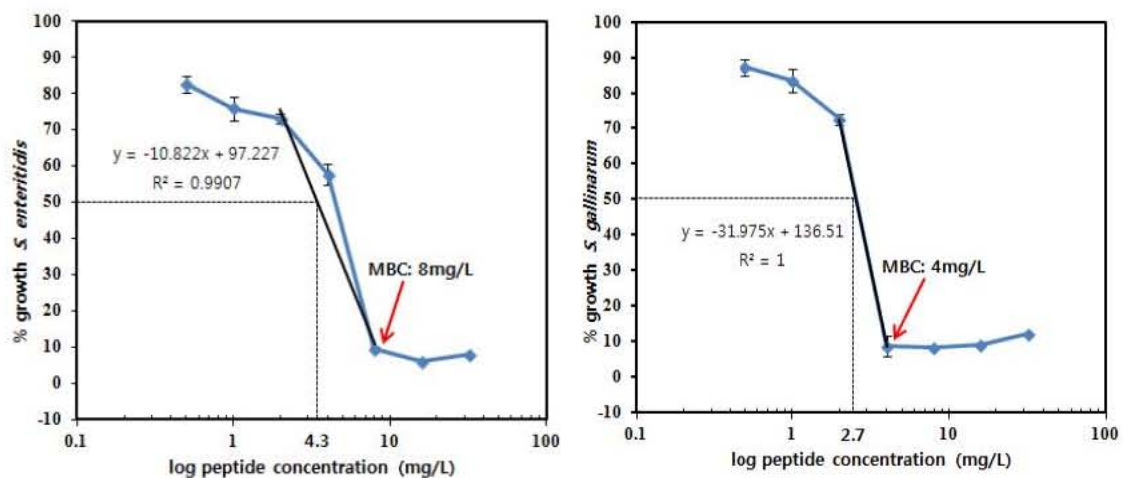


그림 53. 합성 PAJE3의 대장균(*E. coli*) 및 포도상구균(*S. aureus*)에 대한 항균활성 검정

또한 그림 54에서와 같이 4종의 살모넬라균에 대한 PAJE3의 최소생장억제농도(MIC₅₀)을 측정한 결과, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* 및 *S. typhimurium* 에서 각각 4.3, 2.7, 4.6 및 8.8mg/L로 측정되었다. 이들 살모넬라균에 대한 최소살균농도(MBC)를 측정한 결과에서도 항균활성 범위가은 4~8mg/L로 매우 강한 항균활성을 보였다.



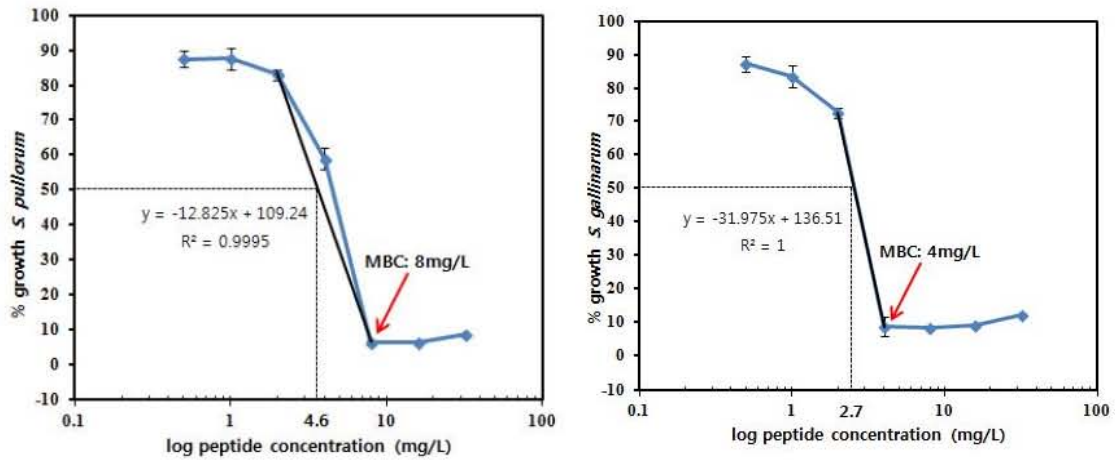


그림 54. 합성 PAJE3의 살모넬라균 4종에 대한 항균활성 검정

이상의 결과를 종합하여 비교분석한 결과, PAJE3의 경우 그람음성 세균인 대장균 및 4종의 살모넬라균과 그람양성 세균인 포도상 구균 모두에서 그 범위가 2.2 ~ 8.9mg/L로 매우 우수한 항균활성을 가짐을 확인하였다.

③ PAJE4의 병원균에 대한 항균활성 검정

합성 PAJE4의 최소생장억제농도(MIC₅₀)를 대장균(*E.coli*) 및 포도상구균(*S. aureus*)을 대상으로 측정한 결과, 그림 55에서 보듯이와 같이 *E.coli*에서 17.7mg/L, *S. aureus*에서 5mg/L 농도로 그람양성 세균에 보다 높은 항균활성을 나타냈었다. 한편 최소살균농도(MBC)는 *E. coli* 및 *S. aureus*에서 동일하게 32 mg/L로 조사되었다.

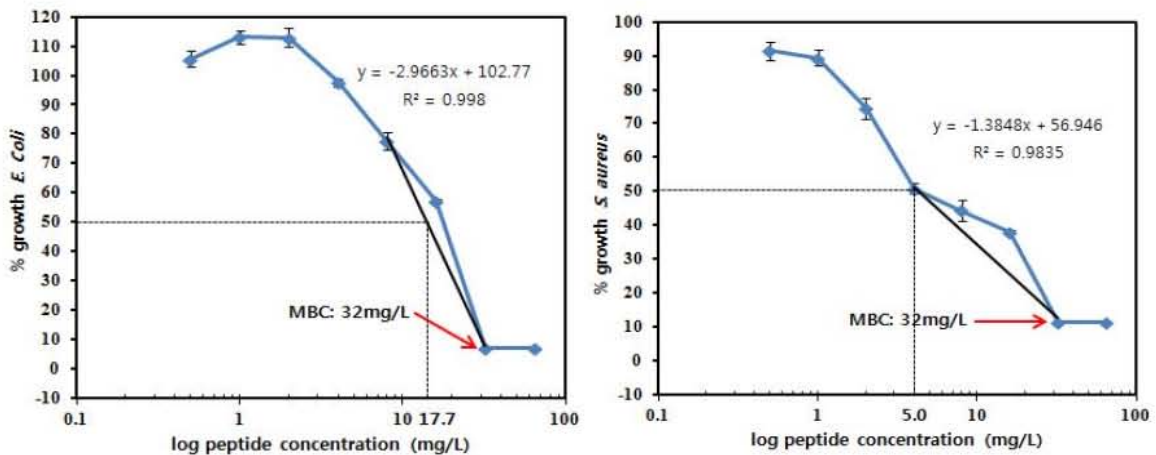


그림 55. 합성 PAJE4의 대장균(*E. coli*) 및 포도상구균(*S. aureus*)에 대한 항균활성 검정

또한 그림 56에서와 같이 4종의 살모넬라균에 대한 PAJE4의 최소생장억제농도(MIC₅₀)를 측정한 결과, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* 및 *S. typhimurium*에서 그 농도 범위가 11.6 ~ 21.6mg/L로 다소 낮은 항균활성을 나타냈었음. 또한 최소살균농도(MBC)를 측정한 결과에서도 항균활성 범위가 16 ~ 32mg/L로 다소 낮은 항균활성을 보였다.

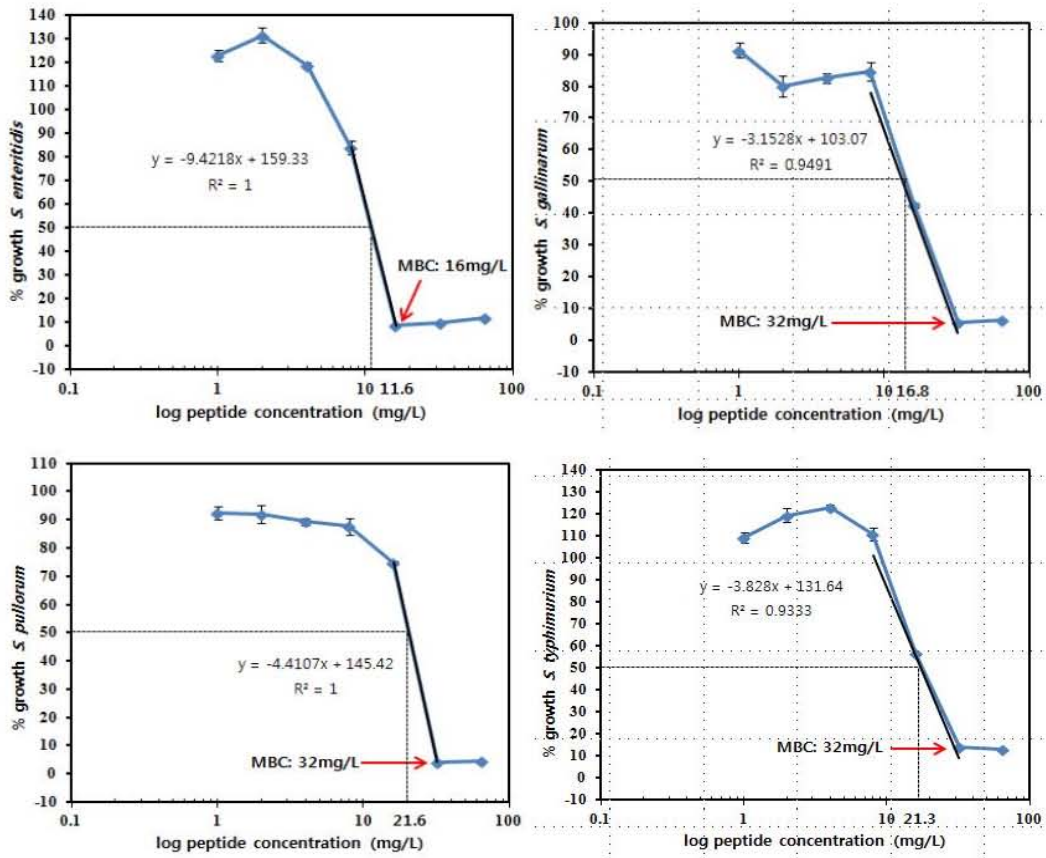


그림 56. 합성 PAJE4의 살모넬라균 4종에 대한 항균활성 검정

④ PAJE5의 병원균에 대한 항균활성 검정

그람음성 장내세균인 대장균(*E. coli*) 및 그람양성 세균인 포도상구균(*S. aureus*)에 대한 PAJE5의 최소생장억제농도(MIC₅₀)를 측정한 결과, 그림 57에서 보는바와 같이 *E. coli*에서 3.1mg/L, *S. aureus*에서 9.1mg/L 농도로 그람양성 세균에서 보다 높은 항균활성을 나타냈었다. 또한 세균을 완전히 치사시키는 최소살균농도(MBC)를 측정한 결과에서도 항균활성 범위가 *E. coli*에서 4mg/L로 16mg/L 농도의 *S. aureus*에 비해 4배 이상 항균활성이 우수한 것으로 확인되었다.

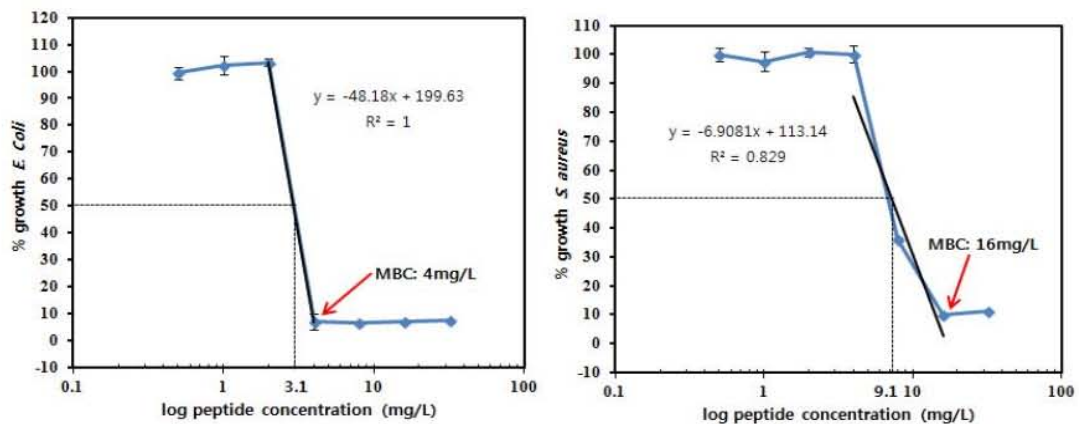


그림 57. 합성 PAJE5의 대장균(*E. coli*) 및 포도상구균(*S. aureus*)에 대한 항균활성 검정

또한 그림 58에서와 같이 4종의 살모넬라균에 대한 PAJE3의 최소생장억제농도(MIC₅₀)을 측정된 결과, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. pullorum* 및 *S. typhimurium* 에서 각각 5.3mg/L, 2.7mg/L, 12.6mg/L 및 9.1mg/L 측정되었다. 한편 이들 살모넬라균에 대한 최소살균농도(MBC)를 측정된 결과, 항균활성 범위가 *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, *S. typhimurium* 에서 4~16mg/L로 매우 높았지만, *S. pullorum*의 경우 MBC 수치가 32mg/L로 다소 낮은 경향을 보였다.

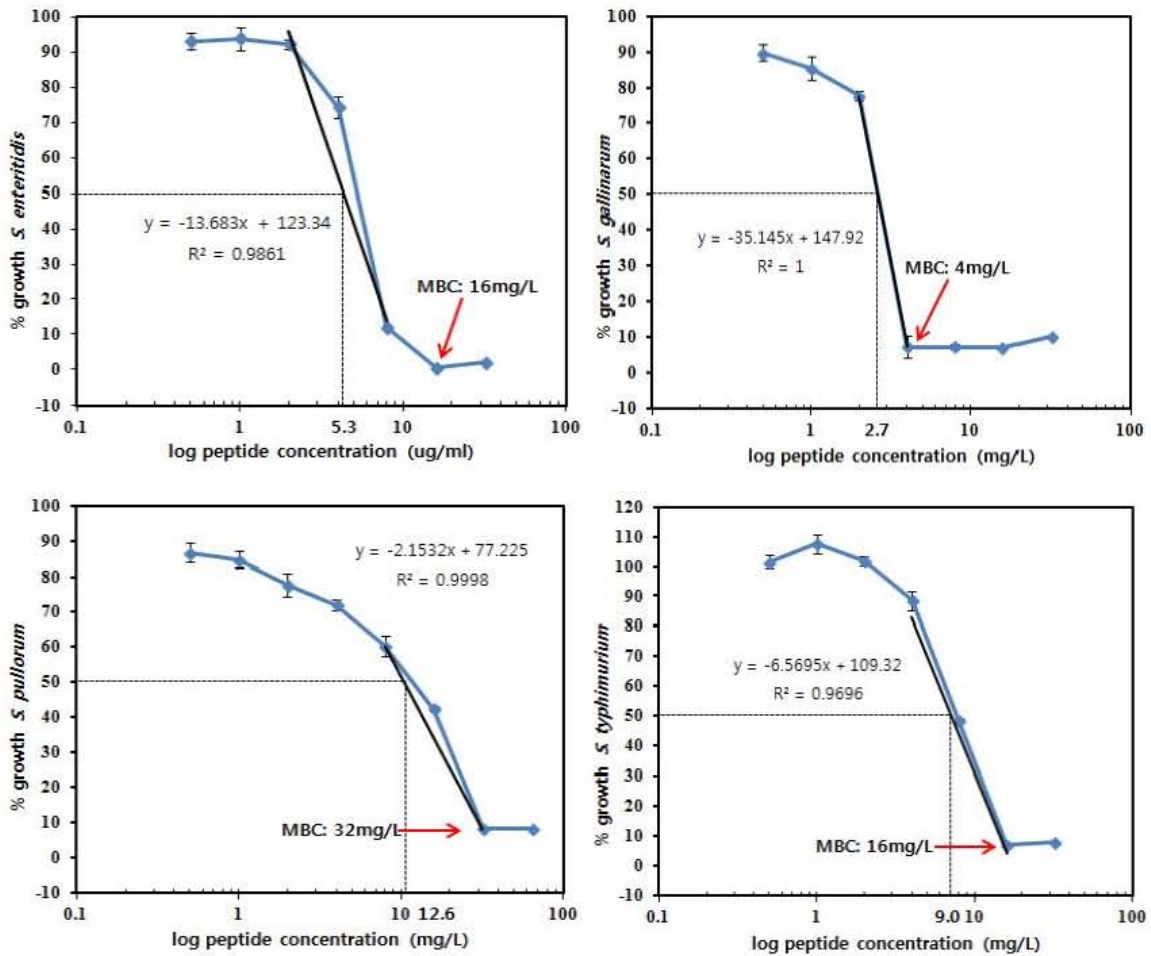


그림 58. 합성 PAJE5의 살모넬라균 4종에 대한 항균활성 검정

각 병원균에 대한 MIC₅₀을 비교분석한 결과, PAJE5의 경우 그람음성 세균인 대장균 및 *S. pullorum*을 제외한 3종의 살모넬라균과 그람양성 세균인 포도상 구균 모두에서 그 범위가 2.7 ~ 9.1mg/L로 매우 우수한 항균활성을 나타냈었다.

이상의 용합 항균펩타이드 항균활성을 비교 검토 결과, 4종의 PAJE 유사체 중 PAJE3에서 대장균, 포도상구균 및 살모넬라균에 대해 가장 우수한 활성을 가짐을 확인하였다. 한편 용합 항균펩타이드 PAJE와 항균활성을 비교 검정한 결과, PAJE3는 대장균 및 4종의 살모넬라균에서 동일한 활성을 보였지만 그람양성균인 포도상구균(*S. aureus*)에서 PAJE에 비해 2배 이상 높은 활성을 가짐을 확인하였다.

(다) 융합 항균펩타이드 PAJE 유사체의 세포독성 검정

합성된 융합 항균펩타이드 PAJE 유사체, PAJE2, PAJE3, PAJE4 및 PAJE5의 안전성 검정을 위하여 적혈구 파괴능(hemolytic activity)을 조사하였다. 높은 용혈 활성을 가지는 멜리틴에 비해 PAJE 유사체들은 고농도에서도 용혈 활성을 나타내지 않았다. 따라서 인체에 독성이 없이 무해한 항균펩타이드들로 그 안정성인 확인됨. 이상의 결과로 새롭게 디자인된 융합 펩타이드 PAJE는 인체 및 동물에 발생하는 세균성 질환 예방, 동물 성장촉진용 천연항생제 및 사료 첨가제로 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

표 9. 융합 항균펩타이드 PAJE 유사체에 대한 homolytic activity 측정

peptide	% Hemolysis (μ M)					
	50	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78
PAJE2	0	0	0	0	0	0
PAJE3	0	0	0	0	0	0
PAJE4	0	0	0	0	0	0
PAJE5	0	0	0	0	0	0
Melittin	100	100	100	95	93	31

(라) 융합항균펩타이드 처리에 따른 세포막의 catalase 활성 검정

세균의 세포막 손상시 분비되는 catalase의 활성 검정을 통하여 PAJE 및 PAJE 유사체 4종의 항균활성 작용기작을 확인하였다.

이를 위해 대장균(*E. coli*)을 3%(w/v) TSB(Tryptic Soy Broth) 액체 배지에서 37°C, 200rpm 조건으로 18시간 진탕 배양한 다음, 다시 동일한 조건에서 최종농도가 1×10^6 CFU/ml이 되도록 2차 배양하였다. 대장균 배양액 2ml에 100 μ g/ml 농도가 되도록 펩타이드, ampicillin, kanamycin 첨가한 후, 2시간 동안 37°C 180rpm 조건으로 다시 배양한 다음, 5000rpm 조건에서 10분간 원심 분리하여 그 상등액을 수거한 후, catalase assay kit(Sigma aldrich co.)를 사용하여 catalase 활성을 측정하였다.

대장균을 대상으로 PAJE, 4종의 PAJE 유사체, ampicillin, Kanamycin 및 초음파(Sonication) 처리에 의한 catalase 활성 검정 결과, PAJE 등 5종의 항균펩타이드 처리구에서 무처리에 비해 매우 높은 catalase 활성을 나타냈었다. 특히 PAJE2, PAJE3, PAJE4 처리에서는 직접적으로 세포막을 파괴하는 초음파 처리와 유사한 catalase 활성을 보였으며, 또한 기존 항생제인 ampicillin 및 Kanamycin 처리에 비해 2배 이상의 매우 높은 catalase 활성을 나타냈었다. 따라서 본 연구에서 개발된 융합 항균펩타이드 PAJE 및 4종의 유사체들은 직접적으로 세포막 파괴를 통하여 작용하는 것으로 사료된다.

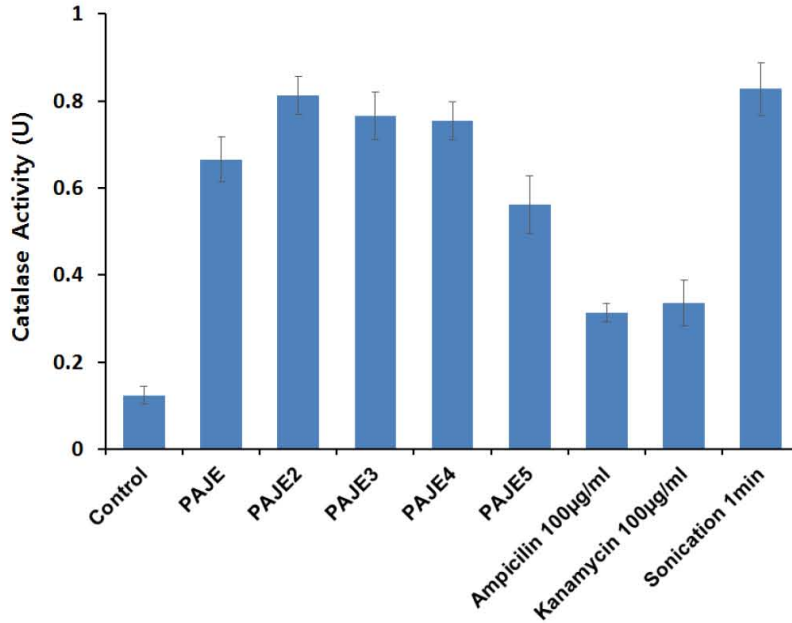


그림 59. 융합 항균펩타이드 처리에 따른 대장균 분비 catalase 활성 측정

(3) 하이브리드 항균펩타이드 PAJE 재조합 발현 및 항균효과 검증

(가) PAJE 재조합 발현을 위한 유전자 합성 및 대장균 발현벡터 구축

본 연구에서 개발한 융합 항균펩타이드 PAJE를 대량 합성을 위한 대장균 발현 시스템을 구축하기 위해서 BglIII 와 KpnI 제한효소 사이트가 함유된 PAJE를 코딩하는 유전자를 합성하였다. 합성된 PAJE 유전자는 대장균 발현벡터 제작 및 대장균에서의 발현 효율 증대를 위해서 총 15개의 아미노산으로 구성된 PAJE를 2번 반복되는 dimer 형태로 디자인하였으며 codon 최적화 프로그램을 이용하여 대장균 내에서 발현에 적합한 염기서열로 합성하였다(그림 60). 이 dimeric PAJE 유전자를 PAJE2로 명명하였으며, 합성된 PAJE2 유전자는 총 112개의 염기로 구성된다.

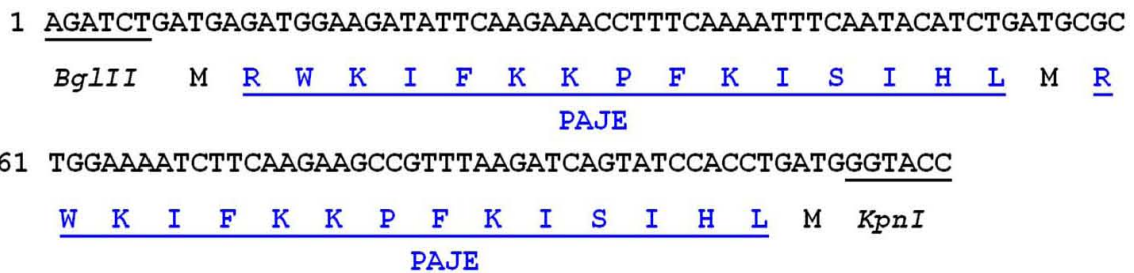


그림 60. 융합 항균펩타이드 PAJE 유전자 합성. Codon 최적화 프로그램을 이용하여 Dimeric PAJE(PAJE2) 형태로 디자인하였음.

본 연구에서는 항균펩타이드의 안정적 재조합 합성 및 발현 기주인 *E. coli* BL21(DE3)에 대한 재조합 항균펩타이드의 독성 중화를 위해서 박테리아 유래 불용성 단백질인 ketosteroid isomerase(KSI) 단백질을 융합 파트너로 도입하여 제작된 불용성 융합 단백질 발현벡터인 pET-KSI 벡터를 이용하여 PAJE 대장균 발현 벡터를 구축하였다. 즉, 그림 61에서

와 같이 pET-KSI 벡터의 KSI 유전자 위쪽에 존재하는 BglIII 및 KpnI 제한효소 위치에 동일한 제한효소로 절단된 dimeric PAJE(PAJE2) 유전자를 삽입하여 pET-PAJE2/KSI 융합 단백질 발현벡터를 제작하였고, 이 후 T7 promoter-FP 와 T7 terminator-RP를 이용한 PCR 반응 및 염기서열 분석을 통하여 ORF를 확인하였다.

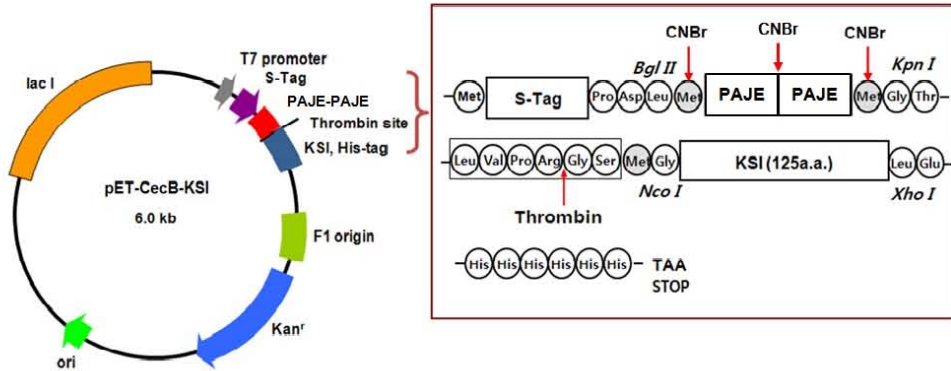


그림 61. PAJE 재조합 발현을 위한 대장균 발현벡터 구축

(나) 융합 항균펩타이드 PAJE 재조합 발현 및 정제

pET-PAJEx2/KSI plasmid를 분리 정제한 후, 발현 균주인 *E. coli* BRL(DE3)에 Transformation 하여 PAJE-KSI 융합단백질을 생산하는 재조합 대장균 BRL(DE3)-(pET-PAJEx2/KSI)을 선발하였다. 재조합 단백질 발현은 IPTG를 통하여 유도한 후, 단백질 전기영동(SDD-PAGE)을 통하여 확인하였다. 전기영동 분석 결과, PAJEx2-KSI 융합단백질은 약 23KDa 분자량으로 대부분 불용성 단백질로 발현됨을 확인하였다(그림 62).

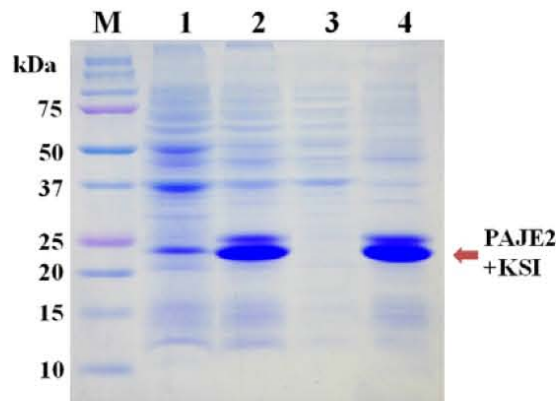


그림 62. 재조합 PAJEx2-KSI 융합 단백질 발현. 1: total cell extract without IPTG, 2: IPTG-induced total cell extract, 3: soluble fraction, 4: insoluble fraction.

PAJEx2-KSI 융합단백질의 발현 효율 최적화를 위해서 IPTG 처리시기에 따른 발현효율을 조사하였다(그림 63). 그 결과 배양된 재조합 대장균은 OD₆₀₀=0.75~1.0에서 가장 높은 단백질 발현량을 나타냄을 단백질 전기영동 분석을 통하여 확인하였다.

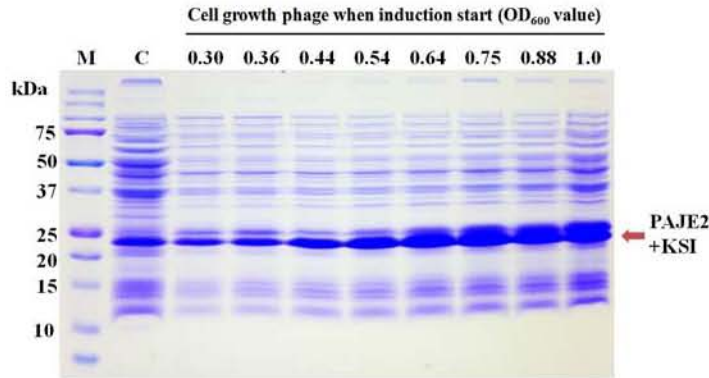


그림 63. 재조합 대장균에서 IPTG 처리시기에 따른 PAJE2-KSI 융합단백질 발현효율 검정. 다양한 Cell growth phase($OD_{600}=0.3\sim 1.0$)에 IPTG 0.4mM 처리 후 4시간 배양.

불용성 PAJE2-KSI 융합 단백질을 원심분리하여 회수한 후 70% formic acid에 용해시키고, 1M CNBr를 처리하여 실온에서 12시간 교반을 통하여 융합단백질로부터 PAJE를 절단하였다. 혼합물로부터 formic acid 및 CNBr를 제거하기 위해서 동결 건조한 후, 증류수로 용해하고 다시 동결 건조하는 과정을 2회 실시하였다. 최종적으로 동결 건조된 혼합물은 0.01% acetic acid 용액에 용해시킨 후, 14,000rpm에서 20분간 원심분리하여 soluble fraction과 insoluble fraction으로 분리하여 수거하였다. 재조합 PAJE가 포함된 수용성 분획은 HiTrap SP 컬럼을 이용한 anion exchange chromatography을 사용하여 재조합 PAJE를 정제하였고 용출된 분획은 대장균에 대한 항균활성 검정을 통하여 항균력을 확인하였다(그림 64). 0.3% 아세트산 용액에서 PAJE를 음전하를 띠는 담체에 결합시킨 후 1M 염화나트륨을 사용하여 결합된 단백질을 점차적으로 용출하여 분획하였고, 용출된 단백질 분획은 항균활성검정을 통하여 항균력을 검정하였다. 분석 결과, 분획 30 ~40에서 강한 항균활성을 나타냈었다.

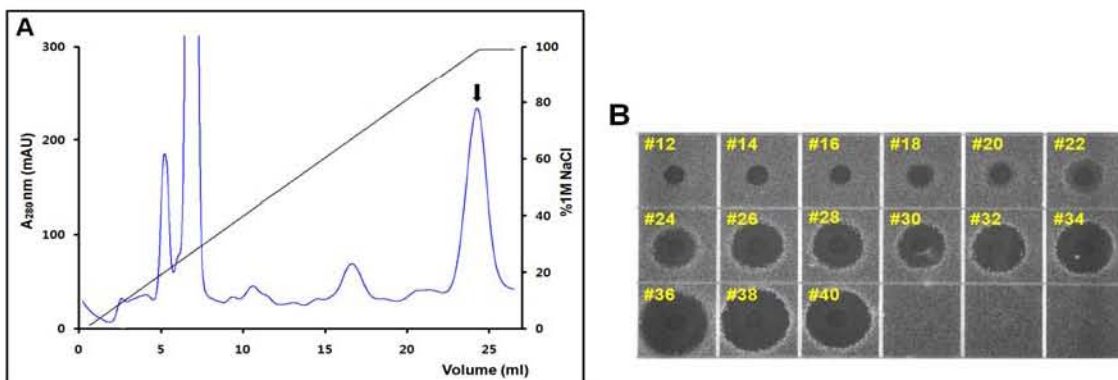


그림 64. Anion exchange chromatography에 의한 PAJE 정제 및 항균활성 검정

(다) 재조합 항균펩타이드 PAJE 항균효과 검정

상기 정제된 재조합 PAJE는 살모넬라균 등 가금 주요 질병에 관련하는 병원균을 대상으로 최소생장억제농도(MIC, minimal inhibitory concentration)를 측정하여 항균 활성을 검정하였다(표 10). 표 10에서 보는바와 같이 본 연구과제에서 발현 및 정제된 재조합 PAJE는 그

람음성 장내세균인 대장균, 4종의 살모넬라균에서 MIC가 1~2 μ M로 강한 항균 활성을 보였다. 또한 대조 펩타이드로 사용된 꿀벌 봉독 유래의 멜리틴과 비교에서도 4배 이상의 탁월한 항균 활성을 확인하였다.

표 10. 재조합 항균펩타이드 PAJE의 병원성 세균에 대한 항균 활성 검정

Peptides	Minimum Inhibitory Concentration (MIC, μ M)				
	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella pullorum</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella gallinarum</i>
rPAJE	1	2	2	2	1
Melittin	4	8	8	8	2

(4) 융합 항균펩타이드 PAJE 대량 생산 및 정제 시스템 구축

(가) 재조합 PAJE 대량 정제 시스템 구축

본 연구에서 구축한 대장균 발현 시스템을 이용하여 재조합 PAJE의 효율적인 대량생산 및 정제시스템을 구축을 위해서 생산 공정을 표준화하였다. 즉, 본 연구에서 구축된 대장균 발현 벡터 pET-PAJEx2/KSI를 발현 균주인 *E. coli* BRL(DE3)에 Transformation하여 PAJEx2-KSI 융합 단백질을 생산하는 재조합 대장균 BRL(DE3)-(pET-PAJEx2/KSI)을 제작 및 선발하고 LB 배지에 배양한 후 IPTG 0.4mM로 발현을 유도한 다음 그림 64에서 보는바와 같이 표준화된 3단계 정제과정을 통하여 재조합 항균펩타이드 PAJE를 대량 생산하였다. 융합 항균펩타이드 PAJE의 대량생산을 위한 3단계 정제과정은 그림 64에서 보는바와 같다.

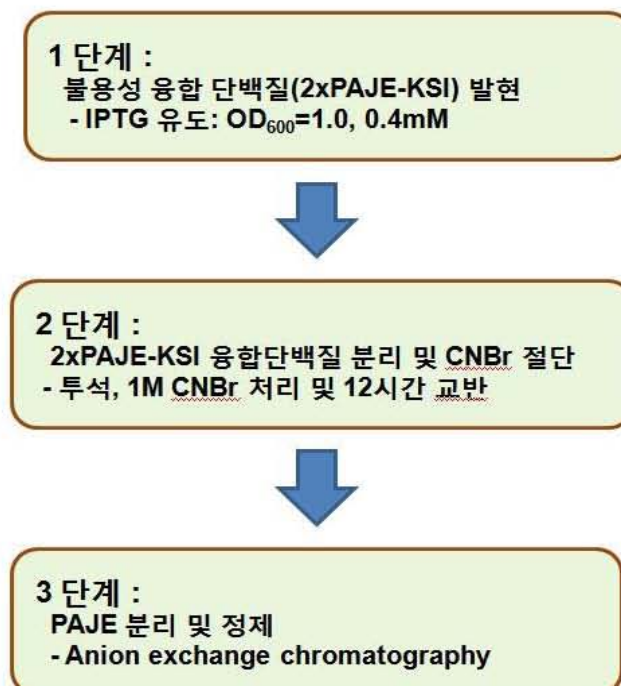


그림 64. 재조합 융합 항균펩타이드 PAJE 대량 정제 공정

즉, 1단계에서는 재조합 대장균 BRL(DE3)-(pET-PAJE2/KSD)을 LB 배지에서 OD₆₀₀=1.0에 도달할 때 까지 배양한 후 IPTG 0.4mM 농도로 처리한 다음 5시간동안 융합 단백질 발현을 유도하였다. 2단계에서는 대장균에서 추출된 불용성 융합단백질을 원심분리하여 회수한 후 70% formic acid에 용해시키고, 1M CNBr를 처리하여 실온에서 12시간 교반을 통하여 융합 단백질로부터 PAJE를 절단하였다. CNBr 절단 반응 후, 재조합 PAJE가 포함된 수용성 용액 으로부터 HiTrap SP 컬럼을 이용한 anion exchange chromatography을 사용하여 재조합 PAJE를 정제하였다.

최종적으로 구축된 대량 정제 시스템을 통하여 10L LB배지에서 배양된 재조합 대장균 으로부터 약 90% 이상의 순도를 가지는 재조합 PAJE 36.2 mg을 생산하였다(표 11).

표 11. 대장균 10L 배양에 따른 재조합 PAJE 정제 효율.

Purification step	Volume(ml)	Total protein (mg)	Yield(%)
Insoluble fraction of cell extract	200	1035.6	100
Soluble protein after CNBr cleavage	36	68.7	6.6
Anion exchange chromatography	30	36.2	3.5

(나) 재조합 PAJE의 살모넬라균에 대한 항균활성 검증

본 연구에서 구축한 대장균 발현 시스템에 의해 생산된 융합 항균펩타이드 PAJE는 그람 음성 장내세균인 살모넬라균등 가금 주요 질병에 관련하는 병원균 최소살균농도(MBC, minimal bactericide concentration)를 측정을 통하여 그 항균활성 비교 검증하였다(그림 65). 본 연구에서 신규로 개발된 융합 항균펩타이드 PAJE3와 항균활성을 비교 분석한 결과, 재조합 PAJE는 4종의 살모넬라균에 대해 최소살균농도 범위가 4 ~ 16ug/ml로 PAJE3와 유사한 항균 스펙트럼을 확인하였다. 즉 재조합 PAJE의 *S. enteritidis* 와 *S. pullorum*에서 MBC 수치는 8ug/mL로 측정되었고, 특히 *S. gallinarum*에서는 MBC 수치가 4ug/ml로 매우 높은 항균활성을 나타냈었다. 반면에 *S. typhimurium*에 대해서는 MBC 수치가 16ug/ml로 다소 낮은 활성을 보였다.

이상의 결과로 재조합 항균펩타이드 PAJE는 살모넬라균에 대해 강한 항균활성을 나타내며 합성된 PAJE3 펩타이드와 유사한 효과를 보였다. 따라서 본 연구에서 항균활성이 있는 재조합 융합 항균펩타이드 대량발현 및 정제 시스템을 구축하였다.

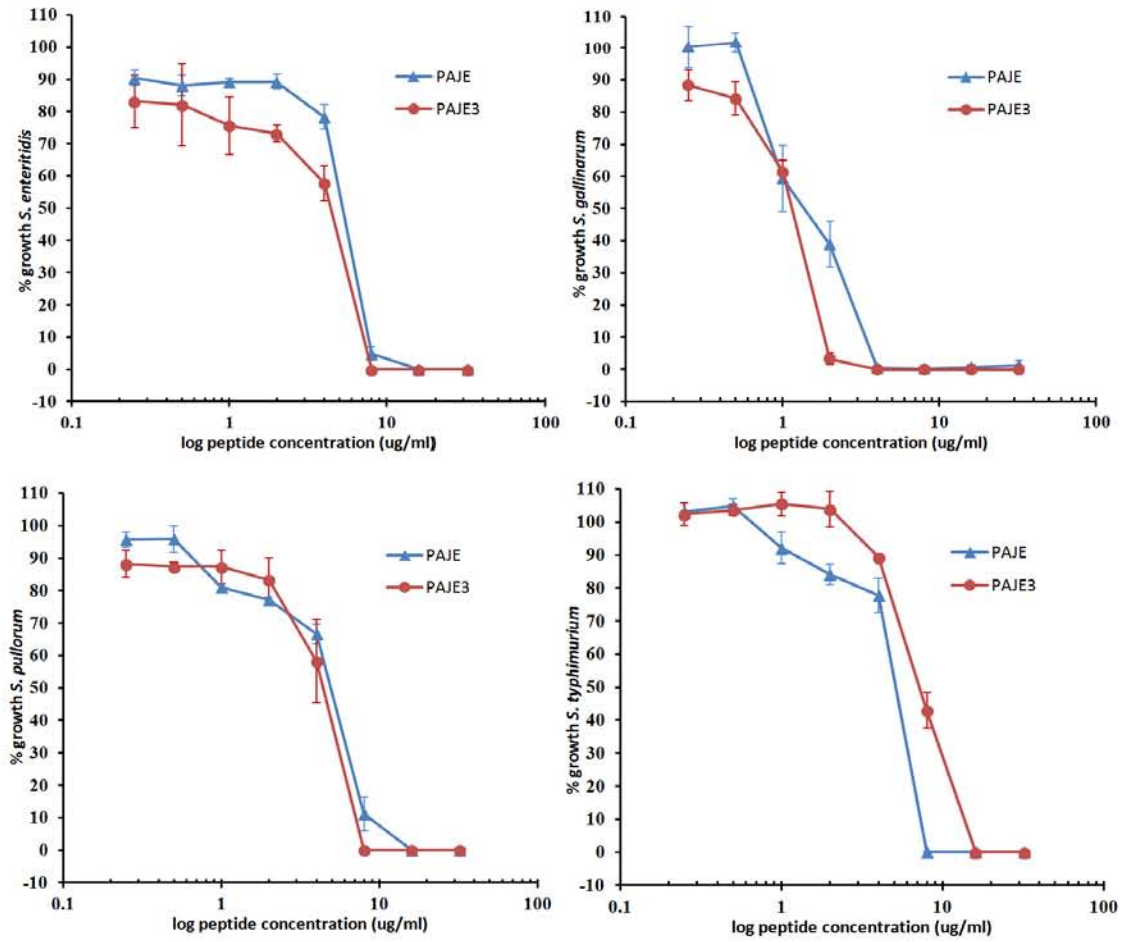


그림 65. 재조합 PAJE 및 유사체 PAJE3의 살모넬라균에 대한 항균활성 비교 검정

3. 천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발 (제1협동)

【1년차, 2011.12.26.~2012.12.25.】

가. 누에 유래 사료소재의 사료·영양적 가치 평가

(1) 연구 목적

천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 사료 소재의 사료·영양적 가치를 평가하기 위하여 수행하였다.

(2) 연구 수행 방법

천연 항생펩타이드 생산 면역 유도 누에 건조 분말의 사료·영양적 가치를 평가하기 위하여 경상남도 농업기술원에서 사육·생산된 5령 5일째 누에에 *Lactobacillus plantarum*에서 추출한 펩티도글리칸(peptidoglycan)이 함유된 면역유도제 0.05mL을 누에 배변을 통해 체장에 주사 접종하고 18시간 동안 면역을 유도하였다. 면역 유도를 하지 않은 일반 누에와 면역 유도를 한 누에를 구분하여 마이크로웨이브 건조기를 이용하여 건조하였다.

누에 건조 분말의 일반성분은 AOAC 방법(2007)을 기초로 하여 분석하였다. 수분 함량은 105℃ 상압가열 건조법, 조단백질 함량은 Kjeldahl 법으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조지방 함량은 soxhlet 추출법, 조회분 함량은 직접 회화법으로 측정하였다. 아미노산 조성은 아미노산분석기(Agilent 7683, USA)를 이용하여 분석하였으며, 무기질 함량은 ICP-OES(Thermo Scientific, UK)를 이용하여 분석하였다.

누에 건조 분말의 영양소 이용률을 조사하기 위하여 5주령 육계 20수를 공시하여 소화 시험을 수행하였다. Sibbald (1986)의 소화 시험을 일부 변형하여 대사케이지에 1수씩 배치하고 48시간 동안 절식시킨 후, 일반 누에 및 면역유도 누에 분말 30g을 강제 급이하고 48시간 동안 전분을 채취하였다. 채취한 계분을 이용하여 영양소 이용률을 산출하였다. 계분 내 일반성분, 아미노산 조성은 상기 분석법을 이용하여 측정하였다.

(3) 결과 및 고찰

(가) 누에 분말의 일반성분, 아미노산, 무기질 함량 비교 분석

일반 누에 분말과 면역 유도 누에 분말의 일반성분, 아미노산 조성, 무기질 함량을 비교 분석한 결과, 일반 누에 분말의 수분, 조단백, 조지방, 조섬유, 조회분 함량은 각각 4.10%, 67.9%, 13.29%, 4.83%, 6.85%였고, 면역유도 누에 분말은 각각 4.04%, 68.5%, 13.41%, 4.92%, 7.01%로 면역 유도 여부에 따른 일반성분의 차이가 없었다(표 3-1-1). 아미노산 조성은 표 3-1-2에 제시한 바와 같으며 옥수수, 대두박 위주 사료의 제한 아미노산인 메티오닌(2.01%, 2.14%)과 트레오닌(2.24%, 2.26%) 함량이 비교적 높은 편이었고 일반 누에 분말과 면역유도 누에 분말 간의 통계적 차이는 관찰되지 않았다. 무기질 함량은 표 3-1-3에 제시하였으며, 누에의 면역 유도 처리에 따른 통계적 차이는 관찰되지 않았다.

본 시험 결과, 누에는 고단백질에 아미노산 조성이 우수한 것으로 나타나 사료 내 단백질 공급원으로서의 이용 가능성을 확인할 수 있었으며, 면역 유도에 따른 누에의 주요 성분 변화는 나타나지 않는 것으로 판단되었다.

표 3-1-1. 누에 분말별 일반성분 비교¹

	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash
		----- % -----			
Normal silkworm powder	4.10	67.9	13.29	4.83	6.85
Hyperimmunized silkworm powder	4.04	68.5	13.41	4.92	7.01

¹ The values are presented as means of five replicates.

표 3-1-2. 누에 분말별 아미노산 조성 비교¹

	Normal silkworm powder	Hyperimmunized silkworm powder
	----- % -----	
Cystine	0.63	0.72
Methionine	2.01	2.14
Aspartic acid	0.15	0.17
Threonine	2.24	2.36
Serine	0.20	0.17
Glutamic acid	0.15	0.20
Proline	0.07	0.04
Glycine	0.04	0.06
Alanine	0.08	0.09
Valine	0.21	0.23
Isoleucine	0.12	0.15
Leucine	0.20	0.18
Tyrosine	0.15	0.17
Phenylalanine	0.23	0.20
Lysine	0.31	0.35
Histidine	0.14	0.22
Arginine	0.11	0.10
Tryptophan	0.05	0.07

¹ The values are presented as means of five replicates.

표 3-1-3. 누에 분말별 무기질 함량¹

	Ca	P	K	Na	Cl	Mg	Fe	Mn	Zn	Cu
	----- % -----					----- mg/kg -----				
Normal silkworm powder	0.27	0.91	1.23	0.03	0.41	0.02	2,269	57.82	302.99	29.76
Hyperimmunized silkworm powder	0.26	0.92	1.32	0.03	0.42	0.02	2,284	55.42	298.25	29.84

¹ The values are presented as means of five replicates.

(나) 육계 소화시험을 통한 누에 유래 사료 소재의 영양소 이용률 조사

육계 소화시험을 통한 일반 누에 분말과 면역 유도 누에 분말의 영양소 이용률을 조사한 결과, 누에 분말 간에서는 영양소 이용률 차이가 발견되지 않았다. 일반 누에 분말의 건물,

조단백, 조지방, 조섬유, 조회분 영양소 이용률은 각각 76.5%, 87.5%, 85.9%, 47.3%, 64.8%였고, 면역 유도 누에 분말은 각각 73.4%, 89.3%, 84.5%, 48.4%, 65.0%이었다. 대두박, 채종박 등의 식물성 단백질 사료원료에 비해 높은 영양소 이용률을 보였다(표 3-1-4). 아미노산 이용율은 표 3-1-5에 제시한 바와 같으며, 아미노산별로 차이는 있었으나 대부분의 아미노산이 90% 이상의 이용률을 보였다.

표 3-1-4. 누에 분말별 영양소 이용률 비교¹

	Dry matter	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash
	----- % DM basis-----				
Normal silkworm powder	76.5	87.5	85.9	47.3	64.8
Hyperimmunized silkworm powder	73.4	89.3	84.5	48.4	65.0

¹ The values are presented as means of ten replicates.

표 3-1-5. 누에 분말별 아미노산 이용률 비교¹

	Normal silkworm powder	Hyperimmunized silkworm powder
	----- % DM basis -----	
Cystine	89.8	90.2
Methionine	92.3	91.8
Aspartic acid	91.5	91.9
Threonine	93.6	94.7
Serine	85.3	87.0
Glutamic acid	92.0	91.5
Proline	90.7	91.4
Glycine	80.9	81.5
Alanine	0.08	0.09
Valine	90.3	89.7
Isoleucine	91.5	90.6
Leucine	93.4	92.8
Tyrosine	87.5	88.1
Phenylalanine	88.7	89.3
Lysine	94.7	95.0
Histidine	91.4	92.2
Arginine	95.8	95.5
Tryptophan	86.7	87.6

¹ The values are presented as means of ten replicates.

나. 육계에 대한 면역 유도 누에의 효과 구명 및 적용기술 확립

(1) 연구 목적

육계 사양시험을 통해 면역 유도 누에 분말의 사료 내 첨가 급여 효과를 구명하고 적정 첨가 수준을 결정하기 위하여 수행하였다.

(2) 연구 수행 방법

면역 유도 누에 분말의 사료 내 첨가 급여 효과 구명 및 적정 첨가수준 결정을 위하여 1일령 육계(Ross 308) 1,200수를 공시하여 10처리 4반복, 반복당 30수씩 배치하여 5주간 사양시험을 실시하였다. 시험구는 항생제 무첨가구, 항생제 첨가구(avilamycin 10ppm), 일반 누에 분말 처리구(일반 누에 분말 : 0.01, 0.05, 0.10, 0.50%) 및 면역 유도 누에 분말 처리구(면역 유도 누에 분말 : 0.01, 0.05, 0.10, 0.50%)를 시험구로 두었으며(표 3-1-6), 육계 생산성, 생체안전성(조직 중량 변화, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표 등), 장내 미생물총, 면역·스트레스 관련 인자 및 닭고기의 물리이화학적 특성 등을 조사하였다.

시험사료는 NRC(1994)와 한국가금사양표준(2012)에 근거하여 옥수수-단백질 위주의 사료를 단백질과 에너지 함량을 동일하게 배합하였으며, 전기(0~3주, CP 22%, ME 3,100kcal/kg), 후기(3~5주, CP 20%, ME 3,150kcal/kg) 사료로 나누어 공급하였다(표 3-1-7). 사료급여 및 급수기는 반복구별로 동일하게 배치하였으며, 사료와 물은 자유 채식 및 음수 시켰다. 입추 후 3일간 24시간 점등을 실시하였고 이후 시험 종료시까지 23시간 점등을 실시하였다.

육계 생산성은 전기(3주차), 후기(5주차) 반복별로 체중 및 사료잔량을 측정하여 일당증체량과 사료섭취량을 산출하였으며, 조사된 사료섭취량과 증체량을 통해 사료요구율을 산출하였다. 주요 조직 중량은 생체중의 평균 범위에 해당하는 개체를 처리구별로 10수씩 희생시킨 후 간, 비장, 췌장 및 신장을 채취하여 중량을 측정하였으며 채취한 조직들은 생체중 100g당 상대적 중량으로 환산 표기하였다. 혈구 조성, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표 및 면역·스트레스 관련 인자를 조사하기 위해 시험 종료시 처리당 10수씩 선발하여 익하정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액 내 간 및 신장 손상 지표는 자동 생화학 분석기(COBAS MIRA plus, ROCHE diagnostics)를 이용하여 blood urea nitrogen (BUN), creatinine, total protein, albumin, globulin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)를 측정하였다. 혈구 조성은 자동 혈구 분석기(Hemavet 950, Erba Diagnostics)를 사용하여 측정하였다. 혈액 내 총항산화력 및 코티졸 함량은 total antioxidant power colorimetric microplate assay kit (Oxford biomedical research Inc., UK)와 cortisol EIA kit (Oxford biomedical research Inc., UK)를 사용하여 분석하였다. 혈액 내 IgA, IgG, IgM 함량은 chicken IgA, IgG, IgM kit (BETHYL Laboratories, Inc. USA)를 사용하여 측정하였다. 맹장 내 미생물총의 변화는 시험 종료시 처리구당 6수씩 희생시켜 맹장 내용물을 채취한 후 살모넬라, 대장균 및 유산균의 수를 측정하였다. 양쪽 맹장의 내용물을 혼합하여 사용하였으며, 채취된 맹장 내용물은 생리식염수로 10^{-9} 까지 계단희석하였다. 단계적으로 희석된 내용물을 SS agar (살모넬라), MacConkey agar (대장균) 및 Rogosa agar (유산균) 평판배지에 각각 접종하였다. Lactic acid bacteria는 혐기적으로 나머지는 호기적 조건에서 24시간 배양한 후 균수를 측정하여 맹장 내용물 1g 당 cfu (colony forming unit)로 계산한 후 \log_{10} 으로 환산 표기하였다. 뉴캐슬병(ND, Newcastle Disease) 항체역가를 조사하기 위해 2주령에 ND 생독 백신을 분무 접종하고 4주령에 추가적으로 재접종했다. 백신 접종 후 7일, 14일째에 처리구별로 10수씩 혈액을 채취하여 분석에 이용하였다.

ND 항체 역가는 HI test (haemagglutination inhibition test)를 사용하여 분석하였다. 계육의 일반성분은 AOAC 방법(2007)을 기초로 하여 분석하였다. 수분 함량은 105°C 상압가열 건조법, 조단백질 함량은 Kjeldahl 법으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조지방 함량은 soxhlet 추출법, 조회분 함량은 직접 회화법으로 측정하였다. 계육품질 변화를 조사하기 위해 시험 종료시 생체중의 평균 범위에 해당하는 개체를 처리구당 6수씩 희생시킨 후, 가슴육을 채취하여 계육 pH, 육색, 전단력, 보수력, 가열감량을 측정하였다. 계육 pH는 가슴육 1g을 정량하여 증류수 9mL에 넣어 균질화한 후, pH meter (Orion 410A, USA)를 이용하여 측정하였다. 육색은 색차계(Chromameter CR-400, Minolta, Japan)를 이용하여 동일한 시료를 3회 반복하여 명도(L값), 적색도(a값), 황색도(b값)에 대한 CIE (Commision International de Leclairage) 값을 측정하였다. 이때 사용한 표준색은 Y=93.5, X=0.3132, y=0.3198인 백색 표준판을 이용하여 표준화하였다. 가열감량은 가슴육을 2.5 cm 두께로 절단하고 80°C 항온수조에서 심부온도가 70°C에 도달할 때까지 가열한 후, 가열전후 중량 차이를 백분율로 계산하였다. 전단력 분석은 Hwang 등(2004)의 방법에 따라 시료 근섬유 방향의 직각이 되게 자른 시료 심부 온도가 70°C까지 도달할 때까지 가열하고 이를 재냉각시킨 후 Instron (Model 4465, Instron Corp., USA)으로 측정하였다. 보수력은 Laakkonen 등(1970)의 방법을 이용하여 측정하였다. 분쇄 후 지방과 힘줄을 제거한 계육 0.5g을 2mL 미세원심분리관에 넣고, 80°C의 water bath에서 20분간 가열한 후 10분간 실온에서 냉각시켰다. 이를 원심분리(4°C, 2,000rpm, 10분)한 후 중량을 측정하고 다음 공식을 이용하여 보수력을 계산하였다.

$$\text{보수력(\%)} = \frac{\text{전수분(\%)} - \text{유리수분(\%)}}{\text{전수분(\%)}} \times 100$$

$$\text{유리수분(\%)} = \frac{\text{원심분리 전 중량(g)} - \text{원심분리 후 중량(g)}}{\text{시료중량(g)} - \text{지방계수}} \times 100$$

$$\text{지방계수(\%)} = \frac{\text{지방(\%)}}{100}$$

닭고기 저장 안정성 조사하기 위해 시험 종료시 생체중의 평균 범위에 해당하는 개체를 처리구당 6수씩 희생시킨 후, 가슴육을 채취하여 4°C 냉장보관을 하였다가 0일, 7일 경과 후 계육 pH, 지방산패도 및 단백질변패도를 분석하였다. 계육 pH는 가슴육 1g을 정량하여 증류수 9mL에 넣어 균질화한 후, pH meter (Orion 410A, USA)를 이용하여 측정하였다. 지방산패도는 지방 과산화시 형성되는 malondialdehyde (MDA) 함량을 측정하여 MDA mg/mL로 나타내었으며 Beuge와 Aust(1978)의 방법을 변형하여 실시하였다. 단백질변패도는 高坂(1978)의 방법을 이용하여 volatile basic nitrogen (VBN)을 측정하였다.

실험에서 얻어진 모든 자료들의 통계분석은 Statistical Analysis System (SAS release ver 9.1, 2002)의 General Linear Model procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리구간에 유의성은 Duncan's multiple range-test (Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

표 3-1-6. 시험 처리

	C-	C+	T1	T2	T3	T4	T6	T7	T8	T9
Feed additives	-	Avila -mycin	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder			
Additive levels	-	10ppm	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%

표 3-1-7. 시험 사료

Ingredients	Starter (0~3wk)		Finisher (3~5wk)	
	----- % -----			
Corn	53.44		61.64	
Soybean meal	33.65		27.88	
Corn gluten meal	4.16		4.00	
Soybean oil	4.68		3.06	
Limestone	1.02		1.23	
Tricalcium phosphate	2.01		1.31	
Salt	0.25		0.25	
DL-Methionine (50%)	0.27		0.08	
Lysin-HCl (98%)	0.02		0.05	
Vitamin-mineral mixture ¹	0.50		0.50	
Total	100.0		100.0	
Chemical composition ²				
ME (kcal/kg)	3,100		3,100	
Crude Protein (%)	22.0		20.0	
Methionine (%)	0.50		0.38	
Methionine+Cystine (%)	0.94		0.83	
Lysine (%)	1.10		1.00	
Ca (%)	1.00		0.90	
Available P (%)	0.50		0.35	

¹Vitamin-mineral mixture provided following nutrients per kg of diet: vitamin A, 15,000IU; vitamin D₃, 1,500IU; vitamin E, 20.0mg; vitamin K₃, 0.70mg; vitamin B₁₂, 0.02mg; niacin, 22.5mg; thiamin, 5.0mg; folic acid, 0.70mg; pyridoxin, 1.3mg; riboflavin, 5mg; pantothenic acid, 25mg; choline chloride, 175mg; Mn, 60mg; Zn, 45mg; I, 1.25mg; Cu, 10.0mg; Fe, 72mg; Co, 2.5mg.

(3) 결과 및 고찰

(가) 육계 생산성

누에 분말의 사료 내 첨가 급여가 육계 생산성에 미치는 영향은 표 3-1-8에 나타내었다. 육계 체중, 일당증체량, 사료섭취량은 누에 첨가 수준 및 면역 유도 여부에 따라 차이는 있었으나, 누에 분말 첨가 급여한 모든 처리구가 항생제 무첨가구에 비해 유의하게 증가하였으며 (P<0.05), 면역 유도 누에분말이 일반 누에분말에 비해 다소 높은 경향을 나타냈다. 사료요구율 역시 대조구인 항생제 무첨가구에 비해 면역유도 누에분말 처리구에서 유의하게 개선되었다 (P<0.05). 대조구인 항생제 첨가구를 제외하곤 면역유도 누에분말 0.01% 처리구가 종료체중, 증체량, 사료요구율에서 가장 우수하였으며, 면역 유도 누에분말 0.50% 처리구에서는 생산성이

다소 감소하는 경향을 보였다. 면역유도 누에분말의 사료 내 첨가 급여시 무항생제 대비 증체량 1.09~3.54% 증가하였으며, 사료요구율은 4.52~5.08% 개선되어 육계 생산성에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다. 누에에는 세크로핀(cecropin), 가바(GABA, gamma-aminobutyric acid) 데옥시노지리마이신(DNJ, deoxynojirimycin) 등의 다양한 생리활성물질을 함유하고 있어 가축의 체내 대사 조절, 산화적 스트레스 감소, 장내 미생물총 안정화 및 면역능조절 등의 효과를 발휘하여 생산성을 개선시킬 수 있다는 연구 결과가 보고된 바 있다(Rangacharyulu et al., 2003). 본 연구에서도 누에 분말은 육계 생산성에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-1-8. 사료 내 누에 분말 첨가 급여가 육계 생산성에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	
Initial BW(g)	44.4	44.0	44.1	44.1	44.1	44.5	44.3	44.4	44.4	44.1	0.20
Final BW(g)	2202 ^c	2416.4 ^a	2229.4 ^{bc}	2222.9 ^{bc}	2327.9 ^{ab}	2340.6 ^b	2280.0 ^b	2354.2 ^{ab}	2386.4 ^a	2325.9 ^{ab}	24.12
BW gain(g)											
0-21d	45.79 ^c	49.50 ^a	46.18 ^{bc}	45.90 ^c	46.28 ^{bc}	47.52 ^b	48.04 ^{ab}	48.04 ^{ab}	48.57 ^a	48.03 ^{ab}	0.84
21-35d	88.61 ^d	98.34 ^a	89.97 ^c	89.92 ^c	96.86 ^{ab}	95.90 ^b	90.80 ^c	96.10 ^b	97.85 ^a	94.09 ^b	0.49
0-35d	61.65 ^c	67.78 ^a	62.44 ^{bc}	62.25 ^{bc}	65.25 ^{ab}	65.60 ^{ab}	63.88 ^b	65.99 ^{ab}	66.91 ^a	65.19 ^{ab}	0.70
Feed intake(g)											
0-21d	66.39 ^a	68.32 ^a	56.80 ^c	57.38 ^{bc}	57.85 ^{bc}	60.36 ^b	59.09 ^b	59.09 ^b	65.08 ^a	61.48 ^b	0.96
21-35d	173.49 ^b	185.71 ^{ab}	180.84 ^b	179.14	186.63 ^{ab}	191.60 ^a	179.90 ^b	189.16 ^a	185.66 ^{ab}	182.94 ^b	3.55
0-35d	109.12 ^{ab}	115.23 ^a	106.15 ^b	105.83 ^b	109.62 ^{ab}	112.83 ^a	107.32 ^b	110.86 ^a	113.08 ^a	110.17 ^a	1.47
FCR(FI/BWG)											
0-21d	1.45 ^a	1.38 ^b	1.23 ^c	1.25 ^c	1.25 ^c	1.27 ^c	1.23 ^c	1.23 ^c	1.34 ^b	1.28 ^c	0.02
21-35d	1.96	1.89	1.96	1.99	1.93	2.00	1.98	1.97	1.90	1.94	0.05
0-35d	1.77 ^a	1.70 ^b	1.70 ^b	1.70 ^b	1.68 ^b	1.72 ^b	1.68 ^b	1.68 ^b	1.69 ^b	1.69 ^b	0.02

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(나) 생체 안전성

육계에 대한 면역유도 누에분말의 생체 안전성을 확인하기 위해 장기의 상대적 중량과 혈액 생화학 조성을 조사한 결과, 육계에 5주간 0.01-0.50% 수준으로 사료 내 첨가 급여하여도 간, 신장 등 주요 장기 발달과 혈액 내 간 및 손상 지표에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

① 조직 상대적 중량

일반 누에분말 및 면역유도 누에분말의 사료 내 첨가급여가 육계의 주요 장기 발달(간, 비장, 췌장, 신장, F낭)에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 3-1-9에 제시한 바와 같다. 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 육계에 일반 누에분말 및 면역 유도 누에분말을 사료 내 0.50% 수준으로 5주간 첨가 급여하여도 주요 장기의 발달에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-1-9. 사료 내 누에분말 첨가 급여가 조직 상대적 중량에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	
----- g/100g BW -----											
Liver	2.12	1.97	1.92	1.85	2.02	1.90	1.90	2.16	1.83	1.85	0.02
Spleen	0.14	0.10	0.10	0.12	0.11	0.10	0.11	0.12	0.12	0.11	0.01
Pancreas	0.22	0.23	0.21	0.22	0.20	0.21	0.25	0.23	0.26	0.23	0.01
Kidney	0.35	0.34	0.35	0.37	0.36	0.38	0.33	0.35	0.34	0.36	0.02
Bursa of Fabricius	0.09	0.08	0.08	0.07	0.06	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.01

② 혈액 내 간 및 신장 손상 지표

간 및 신장의 손상 여부를 나타내고 신규 사료첨가제의 독성 여부를 판단할 수 있는 지표로 이용되는 요소질소(BUN, blood urea nitrogen), 크레아티닌(creatinine), 총단백질(total protein), 알부민(albumin), 글로불린(globulin), AST(aspartate aminotransferase)를 조사한 결과는 표 3-1-10에 제시하였다. 일반 누에분말 및 면역유도 누에분말의 사료 내 첨가급여시 혈액 내 간 손상 지표인 AST, ALT가 대조구인 항생제 무첨가구에 비해 유의하게 감소하였다 (P<0.05). 그 외 요소태질소, 크레아티닌, 총단백질, 알부민, 글로불린, 알부민/글로불린에서는 처리구간 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이를 통해 누에 유래 항균 펩타이드 함유 사료조성물이 항산화, 항염증 작용을 통해 세포 및 조직의 손상을 감소시키는 한편 생체면역반응을 조절하고 가축에 독성이나 부작용 역시 나타내지 않아 사료첨가제로서 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

표 3-1-10. 사료 내 누에분말 첨가 급여가 혈액 간 및 신장 손상 지표¹에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	
BUN	1.25	1.19	1.12	1.11	1.09	1.18	1.22	1.17	1.13	1.21	0.01
Creatinine	0.27	0.26	0.28	0.27	0.27	0.26	0.28	0.26	0.26	0.29	0.01
Total protein	3.36	3.43	3.33	3.21	3.21	3.43	3.27	3.38	3.49	3.48	0.03
Albumin	1.58	1.60	1.49	1.50	1.47	1.54	1.48	1.53	1.57	1.59	0.01
Globulin	1.78	1.83	1.84	1.71	1.74	1.89	1.79	1.84	1.92	1.89	0.02
Albumin/Globulin	0.94	0.85	0.79	0.94	0.84	0.88	0.74	0.89	0.78	0.88	0.01
AST	299.7 ^a	274.3 ^b	271.2 ^b	271.3 ^b	276.2 ^b	269.9 ^{bc}	268.4 ^{bc}	273.2 ^b	265.1 ^{bc}	257.3 ^c	5.03
ALT	3.89 ^a	3.91 ^a	3.33 ^b	3.89 ^a	3.11 ^c	3.44 ^b	3.11 ^c	3.11 ^c	2.78 ^d	3.11 ^c	0.12

¹ BUN : blood urea nitrogen, AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase.

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(다) 맹장 미생물 변화

표 3-1-11은 맹장 내 미생물총 변화를 비교한 결과이다. 장내 유해균인 대장균 및 살모넬라 수가 항생제 첨가구를 비롯한 누에 분말 처리구에서 항생제 무첨가구에 비해 감소하는 것을 확인하였다(P<0.05). 또한 장내 유익균인 젖산 생성균에는 영향을 미치지 않아 장내 미생물총 안정화에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-1-11. 사료 내 누에분말 첨가 급여가 맹장 미생물총에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	
----- log10 cfu/g -----											
Total microbes	8.511	8.118	8.385	8.178	8.212	8.158	8.158	8.179	8.064	8.015	0.07
Coliform bacteria	6.165 ^a	5.817 ^c	5.987 ^b	5.959 ^b	5.988 ^b	6.014 ^b	5.898 ^c	5.825 ^c	5.878 ^c	5.810 ^c	0.03
<i>Salmonella</i> spp.	4.416 ^a	3.345 ^d	4.345 ^a	4.254 ^b	4.138 ^b	4.225 ^b	3.985 ^c	3.725 ^c	3.578 ^d	3.661 ^d	0.01
Lactic acid bacteria	7.405	7.152	7.396	7.408	7.265	7.521	7.358	7.452	7.257	7.402	0.04

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(라) 백혈구 조성

누에 분말 첨가 급여가 육계 백혈구 조성에 미치는 영향을 표 3-1-12에 제시하였다. 급성 감염이나 염증 반응시 증가하는 다핵구(heterophil)는 물론 스트레스 지표로 사용되는 다핵구/림프구 비율은 일반 누에분말 및 면역 유도 누에분말을 첨가 급여한 처리구에서 대조구인 항생제 무첨가구에 비해 유의하게 감소하거나 감소하는 경향을 보였다(P<0.05). 본 연구 결과, 면역 유도 누에 분말은 장관 내 대장균, 살모넬라 등의 유해균 증식 및 이들의 독소 분비를 억제하여 이들에 대한 생체면역반응을 감소시킨 것으로 판단된다.

표 3-1-12. 사료 내 누에분말 첨가 급여가 백혈구 조성에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	
White blood cell(K/ μ L)	23.04	20.58	23.12	23.72	22.46	24.36	24.36	26.64	24.34	29.42	0.38
Heterophil(K/ μ L)	8.16	7.05	7.69	7.93	7.09	7.63	7.63	7.82	7.10	9.10	0.14
Lymphocyte(K/ μ L)	11.94	11.45	11.88	12.16	11.13	12.74	12.74	13.48	12.83	15.22	0.19
Heterophil/Lymphocyte	0.68 ^a	0.62 ^b	0.65 ^c	0.65 ^c	0.64 ^{ab}	0.60 ^b	0.60 ^b	0.58 ^{bc}	0.55 ^c	0.60 ^b	0.01

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(마) 혈액 총항산화활성 및 스트레스 호르몬

누에 분말의 사료 내 첨가 급여가 혈액 내 총항산화활성 및 스트레스 호르몬의 하나인 코티졸 함량에 미치는 영향은 표 3-1-13에 나타내었다. 혈액 총항산화 활성은 누에 분말을 첨가 급여한 모든 처리구가 대조구에 비해 높은 활성을 보였으며, 누에 분말의 첨가수준이 증가할수록 증가하는 경향을 나타냈다(P<0.05). 대표적인 스트레스 호르몬으로 알려진 코티졸 함량 역시 대조구인 항생제 무첨가구에 비해 누에 분말 처리구에서 감소하는 결과를 확인할 수 있었다(P<0.05). 스트레스, 질병 감염, 염증 반응시 다량 분비되는 코티졸은 기초 대사율, 단백질 합성 및 분해, 면역반응, 체내항상성 등에 영향을 미쳐 가축 건강은 물론 장기적으로 생산성에도 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 누에 분말은 항생제와 유사하게 혈액 내 코티졸 함량을 낮추어 가축 건강은 물론 생산성에 긍정적인 영향을 미친다는 것과 스트레스 제어 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

표 3-1-13. 사료 내 누에분말 첨가 급여가 혈액 총항산화활성 및 스트레스 호르몬에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	
Antioxidant activity (mM TEAC/mL)	48.97 ^b	50.84 ^a	50.27 ^a	49.03 ^b	50.01 ^a	50.39 ^a	49.65 ^a	49.88 ^a	50.72 ^a	51.53 ^a	0.37
Cortisol (ng/mL)	12.65 ^a	6.22 ^d	8.81 ^b	7.34 ^c	8.04 ^b	8.02 ^b	7.95 ^{bc}	7.36 ^c	6.96 ^{cd}	7.33 ^c	0.28

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(바) 혈액 ND 항체 역가

육계 4주령에 뉴캐슬병(ND, Newcastle Disease) 백신을 분무 접종하고 기간 경과(7일, 14일)에 따른 혈액 내 항체역가 변화를 비교한 결과(표 3-1-14), 백신 접종 후 ND 항체역가가 면역 유도 누에 분말 처리구에서 대조구를 비해 유의하게 증가하였다(P<0.05). 일반 누에 분말 처리구의 경우 0.10%, 0.50% 수준에서 대조구에 비해 유의하게 증가하였다(P<0.05). 본 연구 결과, 면역 유도 누에가 ND 항체 역가의 형성 및 유지에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-1-14. 사료 내 누에분말 첨가 급여가 혈액 ND 항체 역가에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	
			----- log10 -----								
0d	1.17	1.20	1.19	1.20	1.18	1.21	1.22	1.23	1.19	1.24	0.01
7d	2.45 ^c	2.50 ^c	2.64 ^{bc}	2.66 ^{bc}	2.84 ^b	2.90 ^b	2.85 ^b	3.02 ^{ab}	3.38 ^a	3.40 ^a	0.02
14d	5.50 ^c	5.52 ^c	5.60 ^c	5.75 ^c	6.40 ^b	6.50 ^b	6.50 ^b	6.70 ^b	7.10 ^a	7.50 ^a	0.04

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(사) 혈액 면역글로불린(IgA, IgG, IgM) 함량

사료 내 누에 분말 첨가 급여에 따른 혈액 내 면역글로불린 함량에 미치는 영향은 표 3-1-15에 나타낸 바와 같다. IgG 함량은 대조구에 비해 일반 누에 분말 및 면역 유도 누에 첨가 급여시 유의하게 증가하였으며, 첨가수준이 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였다 (P<0.05). 반면, IgA와 IgM에서는 처리구간 유의한 차이를 관찰할 수 없었다. 항생제 첨가구의 경우에는 항생제 무첨가구는 물론 누에 분말 처리구에 비해 면역글로불린이 감소하는 경향을 나타냈다(P<0.05).

표 3-1-15. 사료 내 누에분말 첨가 급여가 혈액 면역글로불린 함량에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	
			----- μg/dL -----								
IgA	3.14	2.25	3.20	3.19	3.28	3.50	3.26	3.33	3.45	3.57	0.12
IgG	43.04 ^c	36.78 ^d	46.48 ^c	46.62 ^c	51.84 ^b	52.90 ^b	52.85 ^b	53.07 ^b	53.36 ^b	57.40 ^a	0.19
IgM	0.84	0.62	0.90	0.86	0.94	0.95	0.94	0.97	0.98	0.97	0.04

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(아) 닭고기 물리이화학적 특성

누에 분말의 사료 내 첨가 급여에 따른 닭고기의 물리이화학적 특성 변화는 표 3-1-16과 표 3-1-17에 제시하였다. 수분, 조단백, 조지방, 조회분 등의 닭고기 일반 성분은 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 나타나지 않았다. pH, 육색(명도 : L 적색도 : a, 황색도 : b), 가열감량에서 역시 처리구간 유의적 차이가 관찰되지 않았다. 보수력, 전단력은 처리구간 차이는 있었으나, 누에 분말 첨가 급여시 유의하게 증가하거나 증가하는 경향을 보였다(P<0.05).

표 3-1-16. 사료 내 누에 분말 첨가 급여가 닭고기 일반성분에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	
----- % -----											
Moisture	74.67	74.16	73.38	73.32	73.15	72.91	73.81	73.34	73.38	73.02	0.25
Crude protein	22.30	22.65	23.69	23.44	23.88	22.78	23.09	23.57	23.70	23.00	0.15
Ether extract	1.05	1.42	1.36	1.51	1.13	1.74	1.34	1.81	1.44	1.68	0.02
Crude ash	1.06	1.03	1.06	1.06	1.06	1.03	1.04	1.03	1.02	1.03	0.01

표 3-1-17. 사료 내 누에 분말 첨가 급여가 닭고기 물리적 특성에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	
pH	5.85	5.85	5.91	6.00	5.87	5.90	5.91	5.85	5.91	5.93	0.05
CIE											
L	47.33	46.24	45.47	46.36	45.06	45.23	45.45	46.37	46.52	46.44	0.17
a	1.90	2.22	1.72	1.66	2.77	1.97	2.05	2.21	2.28	2.08	0.03
b	9.83	9.97	9.53	9.62	9.03	10.23	9.61	9.77	10.66	10.71	0.09
Water holding capacity(%)	56.70 ^c	56.76 ^c	62.57 ^a	57.28 ^{bc}	59.96 ^b	57.92 ^{bc}	60.38 ^{ab}	61.31 ^a	61.43 ^a	60.34 ^{ab}	0.38
Heating loss(%)	21.22	19.69	20.64	20.69	21.23	21.26	20.75	20.42	18.26	19.78	0.09
Shearing force(kg/0.5inch ²)	2.31 ^c	2.29 ^c	2.81 ^a	2.53 ^b	2.97 ^a	2.66 ^b	2.66 ^b	2.75 ^b	2.66 ^b	2.71 ^b	0.05

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(자) 닭고기 저장 안정성

4℃ 냉장 보관 하는 기간에 따라 닭고기의 pH, TBAR 및 VBN 변화 결과는 표 3-1-18에 나타낸 바와 같다. 저장 기간이 경과함에 따라 닭고기 pH, TBAR, VBN이 증가하였으며, 누에 분말의 첨가 수준이 증가함에 따라 대조구에 비해 저장 기간에 따른 품질 저하를 감소시키는 경향을 보였다(P<0.05). 본 연구 결과, 누에 분말은 항산화 작용을 통해 닭고기의 저장 안정성을 향상시키는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-1-18. 사료 내 누에 분말 첨가 급여가 닭고기 저장 안정성에 미치는 영향

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder				SEM	
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%		
pH												
0d	5.85	5.85	5.91	6.00	5.87	5.90	5.91	5.85	5.91	5.93	0.01	
7d	5.52	5.48	5.59	5.68	5.55	5.67	5.70	5.68	5.59	5.73	0.02	
TBA(MDA mg/L)												
0d	0.26	0.24	0.26	0.24	0.21	0.23	0.23	0.24	0.25	0.22	0.01	
7d	0.47 ^a	0.43 ^{ab}	0.41 ^b	0.40 ^b	0.38 ^b	0.35	0.43 ^{ab}	0.44 ^{ab}	0.35 ^{bc}	0.32 ^c	0.01	
VBN(mg %)												
0d	3.49	3.53	3.27	3.30	3.40	3.28	3.34	3.41	3.47	3.32	0.27	
7d	9.41 ^{ab}	9.57 ^a	9.45 ^{ab}	9.38 ^{ab}	9.25 ^b	9.18 ^{bc}	9.51 ^a	9.18 ^{bc}	9.13 ^c	9.20 ^b	0.31	

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(차) 경제성 분석

누에 분말 첨가 급여에 따른 경제성 분석은 표 3-1-19에 제시하였다. 종료체중, 사료섭취량, 사료생산비, 닭 판매 수입(산지가격 기준), 누에 분말 첨가 비용 등을 고려하여 경제성을 분석한 결과, 항생제 무첨가구를 기준으로 일반 누에 분말의 경우 0.01~0.10%에서 항균 펩타이드 강화 누에 분말의 경우 0.01~0.10% 첨가시 추가 수익이 96.9원, 17.3원, 70.2원, 183.4원, 182.4원, 102.3원이 발생하는 것으로 나타났다. 누에 분말 0.50% 처리구에서도 증체량 향상, 사료요구율 개선 등 생산성이 개선되었으나, 누에 분말 첨가 비용이 증가하여 경제적으로는 손실이였다. 다만 항생제 첨가시 항생제 무첨가구에 비해 314.7원의 추가 수익이 발생하는 것에는 미치지 못 하였다.

표 3-1-19. 사료 내 누에 분말 첨가 급여에 따른 경제성 비교 분석

	C(-)	C(+)	Normal silkworm powder				Hyperimmunized silkworm powder			
			0.01%	0.05%	0.10%	0.50%	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%
Feed intake(a, kg)	3.823	4.034	3.725	3.713	3.828	3.950	3.759	3.889	3.966	3.852
Feed product price(b, ₩)	600	602	605	625	650	850	605	625	650	850
Feed cost(a×b, ₩/kg)	2293.8	2428.4	2253.6	2320.6	2488.2	3357.5	2274.2	2430.6	2577.9	3274.2
Product cost except feed(c, ₩/kg)	700	700	700	700	700	700	700	700	700	700
Product cost(A, a×b+c, ₩/kg)	2993.8	3128.5	2953.6	3020.6	3188.2	4057.5	2974.2	3130.6	3277.9	3974.2
Final BW(d, kg)	2.202	2.416	2.229	2.223	2.328	2.341	2.280	2.354	2.386	2.326
Chicken meat price(e, ₩/kg)	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100	2,100
Meat sales income(B, d×e ₩/kg)	4624.2	5073.6	4680.9	4668.3	4888.8	4916.1	4788.0	4943.4	5010.6	4884.6
Profit(B-A, ₩)	1630.4	1945.1	1727.3	1647.7	1700.6	858.6	1813.8	1812.8	1732.7	910.4

* Cost(₩/kg) : silkworm powder, 50,000; chicken meat, 2,100; basal feed, 500.

【2년차, 2012.12.26.~2013.12.25.】

다. 누에 유래 항균 펩타이드의 제형형태별 이용 효과 구명 및 항생제 대체성 비교 연구

(1) 연구 목적

면역 유도를 통해 생산한 항균 펩타이드 강화 누에 분말의 나노 제형, 코팅 제형의 이용 효과를 비교하여 최적 제형 형태를 구명하는 한편, 기존 사용되고 있는 천연 항생제 대체제인 유기산제, 식물추출물, IgY 및 유산균제과의 항생제 대체성을 비교 검증하고자 수행하였다.

(2) 연구 수행 방법

면역 유도 누에 분말의 최적 제형 형태 구명 및 항생제 대체성 검증을 위하여 경상남도 농업기술원에서 사육된 5령 5일째 누에에 면역유도제(*Lactobacillus plantarum* 추출 펩티도글리칸 0.05mL) 주사 접종하여 면역 유도 누에를 생산하였으며, 이를 마이크로웨이브 건조, 나노화 및 지방 코팅 등의 제형 공정을 거쳐 누에 건조 분말, 나노화 누에 분말, 지방 코팅 누에 분말을 제조하여 시험에 이용하였다. 또한 국내에서 시판·사용되고 있는 대표적인 항생제 대체제인 유기산제, 식물추출물, IgY 및 유산균제를 구입하여 시험에 이용하였다.

1일령 육계(Ross 308) 840수를 공시하여 14처리 6반복, 반복당 10수씩 배치하여 5주간 사양 시험을 실시하였다. 시험구는 항생제 무첨가구, 항생제 첨가구(avilamycin 10ppm), 누에 건조 분말 처리구(누에 건조 분말 : 0.01, 0.05%), 나노 누에 분말 처리구(누에 건조 분말 : 0.01, 0.05%), 지방 코팅 누에 분말 처리구(지방 코팅 누에 분말 : 0.01, 0.05%), 나노 누에 분말과 지방 코팅 누에 분말 혼합 처리구(나노 누에 분말과 지방 코팅 누에 분말 0.01%, 0.05%), 유기산제 처리구, 식물추출물 처리구, IgY 처리구 및 유산균제 처리구를 시험구로 두었으며, 육계 생산성, 생체 안전성(조직 중량 변화, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표 등), 장내 미생물총, 면역·스트레스 관련 인자 및 닭고기의 물리·화학적 특성 등을 조사하였다.

시험사료는 NRC(1994)와 한국가금사양표준(2012)에 근거하여 옥수수-단백질 위주의 사료를 단백질과 에너지 함량을 동일하게 배합하였으며, 전기(0~3주, CP 22%, ME 3,100kcal/kg), 후기(3~5주, CP 20%, ME 3,150kcal/kg) 사료로 나누어 공급하였다(표 3-2-1). 사료급여 및 급수기는 반복구별로 동일하게 배치하였으며, 사료와 물은 자유 채식 및 음수 시켰다. 입추 후 3일간 24시간 점등을 실시하였고 이후 시험 종료시까지 23시간 점등을 실시하였다.

육계 생산성은 전기(3주차), 후기(5주차) 반복별로 체중 및 사료잔량을 측정하여 일당증체량과 사료섭취량을 산출하였으며, 조사된 사료섭취량과 증체량을 통해 사료요구율을 산출하였다. 주요 조직 중량은 생체중의 평균 범위에 해당하는 개체를 처리구별로 10수씩 희생시킨 후 간, 비장, 췌장 및 신장을 채취하여 중량을 측정하였으며 채취한 조직들은 생체중 100g당 상대적 중량으로 환산 표기하였다. 혈구 조성, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표 및 면역·스트레스 관련 인자를 조사하기 위해 시험 종료시 처리당 10수씩 선발하여 익하정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액 내 간 및 손상 지표는 자동 생화학 분석기(COBAS MIRA plus, ROCHE diagnostics)를 이용하여 blood urea nitrogen (BUN), creatinine, total protein, albumin, globulin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)를 측정하였다. 혈구 조성은 자동 혈구 분석기(Hemavet 950, Erba Diagnostics)를 사용하여 측정하였다. 혈액 내 cytokine 함량은 IL-2, 4, 6 ELISA kit (USCN Business Co., Ltd., USA)를 사용하여 측정하였다. 맹장 내 미생물총의 변화는 시험 종료시 처리구당 6수씩 희생시켜 맹장 내용물을 채취한 후 살모넬라, 대장균

및 유산균의 수를 측정하였다. 양쪽 맹장의 내용물을 혼합하여 사용하였으며, 채취된 맹장 내용물은 생리식염수로 10^{-9} 까지 계단희석하였다. 단계적으로 희석된 내용물을 SS agar (살모넬라), MacConkey agar (대장균) 및 Rogosa agar (유산균) 평판배지에 각각 접종하였다. Lactic acid bacteria는 혐기적으로 나머지는 호기적 조건에서 24시간 배양한 후 균수를 측정하여 맹장 내용물 1g 당 cfu (colony forming unit)로 계산한 후 \log_{10} 으로 환산 표기하였다. 계육의 일반성분은 AOAC 방법(2007)을 기초로 하여 분석하였다. 수분 함량은 105°C 상압가열 건조법, 조단백질 함량은 Kjeldahl 법으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조지방 함량은 soxhlet 추출법, 조회분 함량은 직접 회화법으로 측정하였다. 계육 품질 변화를 조사하기 위해 시험 종료시 생체중의 평균 범위에 해당하는 개체를 처리구당 6수씩 희생시킨 후, 가슴육을 채취하여 계육 pH, 육색, 전단력, 보수력, 가열감량을 측정하였다. 계육 pH는 가슴육 1g을 정량하여 증류수 9mL에 넣어 균질화한 후, pH meter (Orion 410A, USA)를 이용하여 측정하였다. 육색은 색차계(Chromameter CR-400, Minolta, Japan)를 이용하여 동일한 시료를 3회 반복하여 명도(L값), 적색도(a값), 황색도(b값)에 대한 CIE (Commision International de Leclairage) 값을 측정하였다. 이때 사용한 표준색은 $Y=93.5$, $X=0.3132$, $y=0.3198$ 인 백색 표준판을 이용하여 표준화하였다. 가열감량은 가슴육을 2.5 cm 두께로 절단하고 80°C 항온수조에서 심부온도가 70°C에 도달할 때까지 가열한 후, 가열전후 중량 차이를 백분율로 계산하여 나타내었다. 전단력 분석은 Hwang 등(2004)의 방법에 따라 시료 근섬유 방향의 직각이 되게 자른 시료 심부 온도가 70°C까지 도달할 때까지 가열하고 이를 채냉각시킨 후 Instron (Model 4465, Instron Corp., USA)으로 측정하였다. 보수력은 Laakkonen 등(1970)의 방법을 이용하여 측정하였다. 분쇄 후 지방과 힘줄을 제거한 계육 0.5g을 2mL 미세원심분리관에 넣고, 80°C water bath에서 20분간 가열한 후 10분간 실온에서 냉각시켰다. 이를 원심분리(4°C, 2,000rpm, 10분)한 후 중량을 측정하고 다음 공식을 이용하여 보수력을 계산하였다.

$$\text{보수력(\%)} = \frac{\text{전수분(\%)} - \text{유리수분(\%)}}{\text{전수분(\%)}} \times 100$$

$$\text{유리수분(\%)} = \frac{\text{원심분리 전 중량(g)} - \text{원심분리 후 중량(g)}}{\text{시료중량(g)} - \text{지방계수}} \times 100$$

$$\text{지방계수(\%)} = \frac{\text{지방(\%)}}{100}$$

실험에서 얻어진 모든 자료들의 통계분석은 Statistical Analysis System (SAS release ver 9.1, 2002)의 General Linear Model procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리구간에 유의성은 Duncan's multiple range-test (Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

표 3-2-1. 시험 사료

Ingredients	Starter (0~3wk)	Finisher (3~5wk)
	----- % -----	
Corn	53.44	61.64
Soybean meal	33.65	27.88
Corn gluten meal	4.16	4.00
Soybean oil	4.68	3.06
Limestone	1.02	1.23
Tricalcium phosphate	2.01	1.31
Salt	0.25	0.25
DL-Methionine (50%)	0.27	0.08
Lysin-HCl (98%)	0.02	0.05
Vitamin-mineral mixture ¹	0.50	0.50
Total	100.0	100.0
Chemical composition ²		
ME (kcal/kg)	3,100	3,100
Crude Protein (%)	22.0	20.0
Methionine (%)	0.50	0.38
Methionine+Cystine (%)	0.94	0.83
Lysine (%)	1.10	1.00
Ca (%)	1.00	0.90
Available P (%)	0.50	0.35

¹Vitamin-mineral mixture provided following nutrients per kg of diet: vitamin A, 15,000IU; vitamin D₃, 1,500IU; vitamin E, 20.0mg; vitamin K₃, 0.70mg; vitamin B₁₂, 0.02mg; niacin, 22.5mg; thiamin, 5.0mg; folic acid, 0.70mg; pyridoxin, 1.3mg; riboflavin, 5mg; pantothenic acid, 25mg; choline chloride, 175mg; Mn, 60mg; Zn, 45mg; I, 1.25mg; Cu, 10.0mg; Fe, 72mg; Co, 2.5mg.

(3) 결과 및 고찰

(가) 육계 생산성

면역 유도 누에 분말의 최적 제형 형태 구명 및 항생제 대체성 검증을 위한 육계 생산성 조사 결과는 표 3-2-2에 제시하였다. 3주 종료체중, 증체량, 사료요구율은 항생제 무첨가구에 비해 누에 유래 항균 펩타이드 및 기존 사료첨가제 첨가 급여시 수치적으로 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 이는 사육 초기이고 쾌적한 사육 환경으로 인해 처리구간 차이가 많이 나지 않은 것으로 판단되어진다. 5주차 종료체중, 일당증체량 및 사료요구율에 있어서는 대조구인 항생제 무첨가구에 비해 코팅, 나노+코팅 첨가 급여시 유의하게 증가하거나 증가하는 경향을 나타냈다(P<0.05). 누에 제형 형태에 있어서는 나노 제형이 가장 낮았으며, 코팅, 나노+코팅 제형이 우수하였으며 첨가 수준은 0.01%보다 0.05%에서 우수한 결과를 나타냈다. 또한 다른 시판 항생제 대체제인 유기산제, 식물추출물, IgY 및 미생물제와 비교하여 면역 유도 누에 함유 사료첨가제가 동일하거나 우수한 결과를 보였다(P<0.05). 본 연구 결과, 개발된 면역 유도 누에 함유 사료첨가제가 육계 생산성에 긍정적인 영향을 미치는 동시에 다른 시판 항생제 대체제도 유사하거나 우수한 결과를 보여 사료첨가제로서의 이용 가능성을 확인할 수 있었다.

표 3-2-2. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 급여가 조직 상대적 중량에 미치는 영향

	Initial BW (g)	BW(g)		BW gain(g/d)		Feed intake(g/d)		FCR	
		3wk	5wk	3wk	5wk	3wk	5wk	3wk	5wk
C(-)	235.3	1126.8	2480.0 ^b	63.7	64.1 ^c	77.5	102.6	1.22	1.60 ^a
C(+)	237.3	1144.0	2584.5 ^a	64.8	67.1 ^a	76.4	103.3	1.18	1.54 ^c
Silkworm powder 0.01%	234.9	1167.5	2510.8 ^b	66.6	65.0 ^b	80.2	102.1	1.20	1.57 ^{ab}
Silkworm powder 0.05%	239.1	1134.9	2530.4 ^{ab}	63.6	65.5 ^b	75.2	102.1	1.19	1.56 ^b
Nano silkworm 0.01%	237.7	1131.6	2491.7 ^b	63.8	64.4 ^c	76.5	101.8	1.20	1.58 ^{ab}
Nano silkworm 0.05%	237.7	1150.0	2527.5 ^{ab}	65.2	65.4 ^b	77.8	102.1	1.19	1.56 ^b
Coated silkworm 0.01%	234.8	1130.9	2515.4 ^{ab}	64.0	65.2 ^b	75.4	102.3	1.18	1.57 ^b
Coated silkworm 0.05%	237.9	1148.1	2560.6 ^a	64.3	66.4 ^a	76.7	102.9	1.18	1.55 ^b
Nano+Coated silkworm 0.01%	234.5	1155.1	2550.0 ^{ab}	65.8	66.2 ^{ab}	75.7	104.5	1.15	1.58 ^{ab}
Nano+Coated silkworm 0.05%	239.2	1151.3	2578.3 ^a	65.2	66.8 ^a	77.3	106.3	1.19	1.59 ^a
Organic acid 0.03%	237.2	1101.7	2548.3 ^{ab}	61.8	66.0 ^{ab}	75.1	102.3	1.22	1.55 ^c
Plant extracts 0.02%	236.0	1157.0	2570.3 ^a	65.8	66.7 ^a	79.2	104.7	1.20	1.55 ^c
IgY 0.02%	236.7	1128.7	2511.8 ^{ab}	63.7	65.0 ^b	72.7	102.7	1.14	1.57 ^{ab}
Lactobacillus 0.02%	237.6	1149.9	2564.3 ^a	65.2	66.5 ^a	78.4	104.4	1.20	1.56 ^b
SEM	0.53	21.98	32.80	0.21	0.22	0.28	0.32	0.02	0.01

^{a-c} Mean within the same column with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(나) 생체 안전성

주요 장기의 상대적 중량과 혈액 생화학 조성을 조사한 결과, 개발된 면역 유도 누에 함유 사료첨가제가 육계의 간, 신장 등 주요 장기 발달과 혈액 내 간 및 손상 지표에 부정적인 영향을 미치지 않았다. 본 연구를 통해 개발한 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 생체 안전성을 확인할 수 있었다.

① 조직 상대적 중량

면역유도 누에 함유 사료 첨가제 및 시판 항생제 대체제의 사료 내 첨가 급여가 육계의 주요 장기 발달(간, 비장, 췌장, 신장, F낭)에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 3-2-3에 제시한 바와 같다. 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제가 육계 주요 장기의 발달에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-2-3. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 급여가 조직 상대적 중량에 미치는 영향

	Liver	Spleen	Pancreas	Bursa of Fabricius
	----- g/100g BW -----			
C(-)	2.71	0.08	0.35	0.27
C(+)	2.88	0.07	0.39	0.24
Silkworm powder 0.01%	2.85	0.07	0.33	0.31
Silkworm powder 0.05%	2.46	0.07	0.39	0.26
Nano silkworm 0.01%	2.84	0.08	0.45	0.27
Nano silkworm 0.05%	3.09	0.09	0.38	0.28
Coated silkworm 0.01%	2.67	0.07	0.33	0.29
Coated silkworm 0.05%	2.73	0.08	0.39	0.30
Nano+Coated silkworm 0.01%	2.83	0.08	0.38	0.27
Nano+Coated silkworm 0.05%	2.67	0.07	0.42	0.26
Organic acid 0.03%	2.81	0.10	0.39	0.25
Plant extracts 0.02%	2.73	0.07	0.31	0.24
IgY 0.02%	2.93	0.08	0.42	0.31
Lactobacillus 0.02%	2.94	0.11	0.34	0.29
SEM	0.09	0.06	0.05	0.02

② 혈액 내 간 및 신장 손상 지표

간 및 신장의 손상 여부를 나타내고 신규 사료첨가제의 독성 여부를 판단할 수 있는 지표를 조사한 결과(표 3-2-4), 항생제 첨가구를 비롯한 전 처리구에서 항생제 무첨가구에 비해 AST 및 ALT가 유의하게 감소하였다(P<0.05). 그 외 요소태질소, 크레아티닌, 총단백질, 알부민, 글로불린, 알부민/글로불린에서는 처리구간 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

표 3-2-4. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 급여가 혈액 간 및 신장 손상 지표¹에 미치는 영향

	BUN (mg/dL)	CRE (mg/dL)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	GLB (g/dL)	ALB /GLB	AST (U/L)	ALT (U/L)
C(-)	1.30	0.35	3.64	1.57	2.07	0.76	287.7 ^a	6.88 ^a
C(+)	1.25	0.32	3.58	1.56	2.02	0.77	278.3 ^b	5.95 ^b
Silkworm powder 0.01%	1.23	0.33	3.56	1.54	2.02	0.76	276.4 ^b	5.81 ^c
Silkworm powder 0.05%	1.22	0.31	3.60	1.55	2.05	0.76	271.5 ^b	5.66 ^c
Nano silkworm 0.01%	1.11	0.29	3.42	1.45	1.97	0.74	275.7 ^{ab}	5.94 ^c
Nano silkworm 0.05%	1.18	0.32	3.44	1.44	2.00	0.72	273.6 ^b	5.78 ^c
Coated silkworm 0.01%	1.20	0.33	3.28	1.36	1.92	0.71	268.9 ^c	6.01 ^b
Coated silkworm 0.05%	1.21	0.30	3.39	1.40	1.99	0.70	267.4 ^c	5.58 ^d
Nano+Coated silkworm 0.01%	1.15	0.28	3.47	1.47	2.00	0.74	271.6 ^b	5.84 ^c
Nano+Coated silkworm 0.05%	1.18	0.27	3.35	1.43	1.92	0.74	265.4 ^c	5.69 ^c
Organic acid 0.03%	1.20	0.33	3.52	1.46	2.06	0.71	279.9 ^b	6.15 ^b
Plant extracts 0.02%	1.17	0.30	3.30	1.40	1.90	0.74	268.7 ^c	5.45 ^d
IgY 0.02%	1.24	0.30	3.42	1.47	1.95	0.75	273.4 ^b	6.20 ^b
Lactobacillus 0.02%	1.26	0.32	3.37	1.42	1.95	0.73	275.2 ^b	5.98 ^b
SEM	0.02	0.01	0.04	0.02	0.03	0.01	4.27	0.08

¹ BUN : blood urea nitrogen, CRE : creatinine, TP : total protein, ALB : albumin, GLB : globulin, AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase. ^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

^{a-d} Mean within the same column with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(다) 맹장 미생물 변화

육계 처리당 6수씩 희생시켜 맹장 내용물을 채취하여 총균, 대장균, 살모넬라 및 젖산 생산균을 조사한 결과(표 3-2-5), 항생제 첨가구를 비롯한 전 처리구의 맹장 내 대장균 및 살모넬라가 대조구인 항생제 무첨가구에 비해 수치적으로는 감소하였으나 통계적 유의성은 나타나지 않았으며, 제형 형태에 따른 차이 역시 관찰되지 않았다. 유산균제 처리구에서 젖산 생성균이 유의하게 증가하였다($P < 0.05$).

표 3-2-5. 사료 내 누에분말 첨가 급여가 맹장 미생물총에 미치는 영향

	Total microbes		Coliform bacteria		<i>Salmonella</i> spp.		Lactic acid bacteria	
	3wk	5wk	3wk	5wk	3wk	5wk	3wk	5wk
	----- log10 cfu/g -----							
C(-)	8.427	8.795 ^a	6.278	6.350	3.698	4.025	7.144	7.385
C(+)	8.154	8.019 ^b	5.925	5.872	3.215	3.078	7.015	7.159
Silkworm powder 0.01%	8.215	8.216 ^b	5.814	6.032	3.348	3.452	7.215	7.210
Silkworm powder 0.05%	8.145	8.345 ^{ab}	5.927	6.100	3.264	3.398	7.011	7.313
Nano silkworm 0.01%	8.226	8.452 ^{ab}	5.948	6.152	3.257	3.468	7.214	7.125
Nano silkworm 0.05%	8.214	8.313 ^b	5.879	6.078	3.213	3.752	7.302	7.211
Coated silkworm 0.01%	8.154	8.279 ^b	5.745	5.985	3.301	3.654	7.254	7.203
Coated silkworm 0.05%	8.107	8.199 ^b	5.918	6.156	3.109	3.254	7.015	7.137
Nano+Coated silkworm 0.01%	8.213	8.352 ^b	6.001	6.007	3.188	3.978	7.100	7.302
Nano+Coated silkworm 0.05%	8.117	8.359 ^b	5.798	5.987	3.213	3.775	6.987	7.375
Organic acid 0.03%	8.134	8.019 ^b	6.015	5.930	3.209	3.102	7.155	7.289
Plant extracts 0.02%	8.207	8.120 ^b	6.120	6.035	3.384	3.350	7.095	7.307
IgY 0.02%	8.318	8.458 ^{ab}	5.986	6.129	3.546	3.450	7.128	7.135
Lactobacillus 0.02%	8.425	8.752 ^a	6.013	6.245	3.422	3.557	7.351	7.607
SEM	0.08	0.05	0.03	0.04	0.01	0.02	0.05	0.09

^{a,b} Mean within the same column with no common superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

(라) 백혈구 조성 및 혈액 cytokine 함량

면역유도 누에 함유 사료 첨가제 및 시판 항생제 대체제의 사료 내 첨가 급여가 백혈구 조성 및 혈액 사이토카인에 미치는 영향은 표 3-2-6 및 표 3-2-7에 제시하였다. 총백혈구, 다핵구 및 림프구에서는 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 반면 스트레스 및 염증 지표로 사용되고 있는 다핵구/림프구 비율은 제형 형태 및 첨가 수준별로 차이는 있었으나, 대조구인 항생제 무첨가구에 비해 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 처리구에서 유의하게 감소하는 결과를 나타냈다($P < 0.05$). 혈액 내 IL-2, 4, 6를 분석한 결과, 항균 펩타이드 강화 누에 0.05% 첨가급여시 IL-2가 유의하게 증가하였으며, IL-4, IL-6에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. cytokine은 여러 면역 세포에서 분비되는 활성화된 polypeptide로 면역 반응과 염증 반응을 매개하고 조절하는 면역체계 신호전달물질로서 면역 반응에 의해 생성·분비되어 모세포 및 인근세포에 작용하여 특정 면역세포의 분화 및 증식, 기능 활성화 및 변화를 유도한다. 그러나 정상 상태에서는 생성량이 많지 않아, 면역 유도 누에 함유 사료 첨가제 및 다른 항생제 대체제들의 면역조절 여부를 조사하기에는 어려움이 있었으며, 추후 lipopolysaccharide (LPS), concanavalin A (ConA) 등의 mitogen으로 면역 반응을 유도하거나

스트레스 조건에서의 변화 양상을 비교할 필요가 있다고 판단되었다.

표 3-2-6. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 급여가 백혈구 구성에 미치는 영향

	White blood cell (K/ μ L)	Heterophil (K/ μ L)	Lymphocyte (K/ μ L)	Heterophil /Lymphocyte
C(-)	27.83	10.24	12.78	0.80 ^a
C(+)	23.55	8.89	11.46	0.78 ^a
Silkworm powder 0.01%	24.65	9.17	11.38	0.81 ^a
Silkworm powder 0.05%	23.97	8.25	11.25	0.73 ^b
Nano silkworm 0.01%	24.58	8.76	12.17	0.72 ^b
Nano silkworm 0.05%	23.99	7.68	11.85	0.65 ^c
Coated silkworm 0.01%	24.65	8.16	11.60	0.70 ^b
Coated silkworm 0.05%	23.28	7.66	10.92	0.70 ^b
Nano+Coated silkworm 0.01%	25.17	8.45	11.76	0.72 ^b
Nano+Coated silkworm 0.05%	22.18	7.63	11.25	0.68
Organic acid 0.03%	25.85	9.10	12.04	0.76 ^b
Plant extracts 0.02%	25.99	8.99	11.99	0.75 ^b
IgY 0.02%	24.65	8.78	11.58	0.76 ^b
Lactobacillus 0.02%	27.03	9.12	12.13	0.75 ^b
SEM	0.42	0.14	0.21	0.01

^{a-c} Mean within the same column with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

표 3-2-7. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 급여가 혈액 사이토카인 함량에 미치는 영향

	IL-2	IL-4 ----- na/ml -----	IL-6
C(-)	1573.41 ^d	187.94	2368.67
C(+)	1649.84 ^e	206.51	1615.23
Silkworm powder 0.01%	1445.33 ^d	162.80	1797.03
Silkworm powder 0.05%	2388.17 ^a	174.35	2275.56
Nano silkworm 0.01%	1786.24	169.57	2674.83
Nano silkworm 0.05%	2224.46 ^a	162.88	2599.37
Coated silkworm 0.01%	1610.39 ^c	144.00	1248.89
Coated silkworm 0.05%	2081.30 ^a	164.92	1947.98
Nano+Coated silkworm 0.01%	1754.94 ^b	166.37	1891.62
Nano+Coated silkworm 0.05%	1819.71 ^b	141.14	1644.87
Organic acid 0.03%	1086.05	139.62	904.35
Plant extracts 0.02%	1676.36	152.32	1928.99
IgY 0.02%	1805.30 ^b	137.56	1518.43
Lactobacillus 0.02%	1789.71 ^b	146.73	1806.00
SEM	59.80	6.77	163.25

^{a-d} Mean within the same column with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(마) 닭고기 물리이화학적 특성

면역 유도 누에 함유 사료첨가제 및 시판 항생제 대체제 첨가 급여에 따른 닭고기의 물리이화학적 특성 변화는 표 3-2-8 및 표 3-2-9에 나타내었다. 수분, 조단백, 조지방, 조회분 등의 닭고기 일반 성분은 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 닭고기 pH, 전단력, 보수력, 가열감량에서도 처리구 간 차이가 관찰되지 않았다.

표 3-2-8. 항균 펩타이드 강화 누에 분말 제형 형태별 닭고기 일반 성분 변화

	Moisture	Crude protein	Ether extract	Crude ash
		----- % -----		
C(-)	73.87	1.15	23.78	1.12
C(+)	74.87	1.04	22.18	1.13
Silkworm powder 0.01%	74.83	1.51	21.84	1.04
Silkworm powder 0.05%	74.01	1.29	23.17	1.09
Nano silkworm 0.01%	74.39	0.86	22.90	1.10
Nano silkworm 0.05%	74.66	1.40	22.57	1.07
Coated silkworm 0.01%	74.48	1.07	22.42	1.07
Coated silkworm 0.05%	73.99	1.47	23.21	1.10
Nano+Coated silkworm 0.01%	74.44	1.20	22.66	1.12
Nano+Coated silkworm 0.05%	74.02	1.12	23.30	1.12
Organic acid 0.03%	74.17	1.35	22.79	1.05
Plant extracts 0.02%	74.28	1.25	23.23	1.09
IgY 0.02%	73.92	1.72	22.55	1.07
Lactobacillus 0.02%	74.47	1.47	22.39	1.07
SEM	0.12	0.08	0.16	0.01

표 3-2-9. 사료 내 누에 분말 첨가 급여가 닭고기 물리적 특성에 미치는 영향

	CIE			pH	Cooking loss (%)	WHC (%)	Shearing force (kg/0.5in ²)
	L	a	b				
C(-)	49.39	3.62	13.73	5.91	21.12	61.67	2.62
C(+)	49.82	3.54	14.90	5.91	20.71	59.10	2.04
Silkworm powder 0.01%	51.48	4.39	14.02	5.94	20.86	61.95	2.54
Silkworm powder 0.05%	50.05	3.50	14.20	5.90	21.83	61.15	2.68
Nano silkworm 0.01%	52.75	3.73	15.52	5.88	20.40	60.87	2.16
Nano silkworm 0.05%	51.76	4.61	14.14	5.86	19.25	60.95	2.61
Coated silkworm 0.01%	51.38	3.18	14.07	5.98	20.77	60.68	2.00
Coated silkworm 0.05%	52.32	4.37	15.10	5.93	21.37	59.87	2.22
Nano+Coated silkworm 0.01%	52.32	3.74	14.30	5.95	21.50	59.40	2.18
Nano+Coated silkworm 0.05%	53.28	4.38	16.76	5.91	20.92	60.93	2.44
Organic acid 0.03%	52.74	3.09	13.71	5.86	20.69	61.98	2.48
Plant extracts 0.02%	51.89	3.16	13.33	5.98	20.91	60.35	2.06
IgY 0.02%	53.05	3.48	16.51	5.88	19.19	62.17	2.29
Lactobacillus 0.02%	53.00	3.80	15.62	5.87	21.11	59.23	2.17
SEM	0.35	0.22	0.31	0.02	0.41	0.31	0.08

【3년차, 2013.12.26.~2014.12.25.】

라. 천연 항생펩타이드 생산 누에 함유 사료소재의 스트레스 저감, 면역 조절 효과 구명

(1) 연구 목적

항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 분말의 제형 형태(가수분해, 지방코팅)별 이용 효과를 비교하여 최적 제형 형태를 결정하는 동시에, 면역유도물질인 LPS (lipopolysaccharide)를 주입하여 육계의 면역 반응 변화 추이를 분석하여 개발한 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 면역 조절 효과를 비교 검증하고자 수행하였다.

(2) 연구 수행 방법

면역 유도 누에 분말의 최적 제형 형태 결정 및 스트레스 저감, 면역 조절 효과 구명하기 위하여 경상남도 농업기술원에서 사육된 5령 5일째 누에에 면역유도제(*Lactobacillus plantarum* 추출 펩티도글리칸 0.05mL) 주사 접종하여 면역 유도 누에를 생산하였으며, 이를 마이크로웨이브 건조, 단백질 가수분해 및 지방 코팅 등의 제형 공정을 거쳐 누에 건조 분말, 가수분해 누에 분말, 지방 코팅 누에 분말, 가수분해 누에 지방코팅 분말을 제조하여 시험에 이용하였다.

시험 1에서는 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 분말의 제형 형태별 이용 효과 비교를 통한 최적 제형 형태를 구명하기 위하여 1일령 육계(Ross 308) 840수를 공시하여 14처리 6반복, 반복당 10수씩 치하여 5주간 사양시험을 실시하였다. 처리구는 항생제 무첨가구, 항생제 첨가구(avilamycin 10ppm), 누에 분말 처리구(일반 누에 분말 : 0.01, 0.03, 0.05%), 가수분해 누에 분말 처리구(가수 분해 누에 분말 : 0.01, 0.03, 0.05%), 지방코팅 누에 분말 처리구(지방코팅 누에 분말 : 0.01, 0.03, 0.05%) 및 가수분해 누에 지방코팅 분말 처리구(가수분해 누에 지방코팅 분말 처리구 : 0.01, 0.03, 0.05%)를 시험구로 두었으며(표 3-3-1), 육계 생산성, 생체안전성(조직 중량 변화, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표 등), 장내 미생물총, 면역·스트레스 관련 인자 및 닭고기의 물리·화학적 특성 등을 조사하였다.

시험 2에서는 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 분말의 스트레스 저감 및 면역 조절 효과를 구명하기 위하여 5주령 육계(Ross 308) 240수를 공시하여 LPS 주입에 따른 면역 반응 변화를 조사하였다. 대조구는 항생제 무첨가구, 항생제 첨가구(avilamycin 10ppm)로 하였으며, 처리구는 누에 분말 0.05%, 가수분해 누에 분말 0.05%, 지방코팅 누에 분말 0.05%, 가수분해 누에 지방코팅 분말 0.05%를 두었다(표 3-3-2). LPS 및 ACTH 주입 후 체중 및 면역·스트레스 관련 인자 변화를 비교 분석하였다.

시험사료는 NRC(1994)와 한국가금사양표준(2012)에 근거하여 옥수수-단백질 위주의 사료를 단백질과 에너지 함량을 동일하게 배합하였으며, 전기(0~3주, CP 22%, ME 3,100kcal/kg), 후기(3~5주, CP 20%, ME 3,150kcal/kg) 사료로 나누어 공급하였다(표 3-3-3). 사료급여 및 급수기는 반복구별로 동일하게 배치하였으며, 사료와 물은 자유 채식 및 음수 시켰다. 입추 후 3일간 24시간 점등을 실시하였고 이후 시험 종료시까지 23시간 점등을 실시하였다.

육계 생산성은 반복별로 체중 및 사료잔량을 측정하여 일당중체량과 사료섭취량을 산출하였으며, 조사된 사료섭취량과 중체량을 통해 사료요구율을 산출하였다. 주요 조직 중량은 생체중의 평균 범위에 해당하는 개체를 처리구별로 10수씩 희생시킨 후 간, 비장, 췌장 및 신장을 채취하여 중량을 측정하였으며 채취한 조직들은 생체중 100g당 상대적 중량으로 환산 표기하였다. 혈구 조성, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표 및 면역·스트레스 관련 인자를 조사하기 위해 시험 종료시 처리당 10수씩 선발하여 익하정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈액 내

간 및 손상 지표는 자동 생화학 분석기(COBAS MIRA plus, ROCHE diagnostics)를 이용하여 blood urea nitrogen (BUN), creatinine, total protein, albumin, globulin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)를 측정하였다. 혈구 조성은 자동 혈구 분석기(Hemavet 950, Erba Diagnostics)를 사용하여 측정하였다. 혈액 내 IgA, IgG, IgM 함량은 chicken IgA, IgG, IgM kit (BETHYL Laboratories, Inc. USA)를 사용하였으며, 혈액 내 cytokine 함량은 IL-1 β , 2, 4, 6, 8 ELISA kit (USCN Business Co., Ltd., USA)를 사용하여 측정하였다. 맹장 내 미생물총의 변화는 시험 종료시 처리구당 6수씩 희생시켜 맹장 내용물을 채취한 후 살모넬라, 대장균 및 유산균의 수를 측정하였다. 양쪽 맹장의 내용물을 혼합하여 사용하였으며, 채취된 맹장 내용물은 생리식염수로 10⁻⁹까지 계단희석하였다. 단계적으로 희석된 내용물을 SS agar (살모넬라), MacConkey agar (대장균) 및 Rogosa agar (유산균) 평판배지에 각각 접종하였다. Lactic acid bacteria는 혐기적으로 나머지는 호기적 조건에서 24시간 배양한 후 균수를 측정하여 맹장 내용물 1g 당 cfu (colony forming unit)로 계산한 후 log₁₀으로 환산 표기하였다. 계육의 일반성분은 AOAC 방법(2007)을 기초로 하여 분석하였다. 수분 함량은 105°C 상압가열 건조법, 조단백질 함량은 Kjeldahl 법으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조지방 함량은 soxhlet 추출법, 조회분 함량은 직접 회화법으로 측정하였다. 계육품질 변화를 조사하기 위해 시험 종료시 생체중의 평균 범위에 해당하는 개체를 처리구당 6수씩 희생시킨 후, 가슴육을 채취하여 계육 pH, 육색, 전단력, 보수력, 가열감량을 측정하였다. 계육 pH는 가슴육 1g을 정량하여 증류수 9mL에 넣어 균질화한 후, pH meter (Orion 410A, USA)를 이용하여 측정하였다. 육색은 색차계(Chromameter CR-400, Minolta, Japan)를 이용하여 동일한 시료를 3회 반복하여 명도(L값), 적색도(a값), 황색도(b값)에 대한 CIE (Commision International de Leclairage) 값을 측정하였다. 이때 사용한 표준색은 Y=93.5, X=0.3132, y=0.3198인 백색 표준판을 이용하여 표준화하였다. 가열감량은 가슴육을 2.5 cm 두께로 절단하고 80°C 항온 수조에서 심부온도가 70°C에 도달할 때까지 가열한 후, 가열전후 중량 차이를 백분율로 계산하여 나타내었다. 전단력 분석은 Hwang 등(2004)의 방법에 따라 시료 근섬유 방향의 직각이 되게 자른 시료 심부 온도가 70°C까지 도달할 때까지 가열하고 이를 재냉각시킨 후 Instron (Model 4465, Instron Corp., USA)으로 측정하였다. 보수력은 Laakkonen 등(1970)의 방법을 이용하여 측정하였다. 분쇄 후 지방과 힘줄을 제거한 계육 0.5g을 2mL 미세원심분리관에 넣고, 80°C의 water bath에서 20분간 가열한 후 10분간 실온에서 냉각시켰다. 이를 원심분리(4°C, 2,000rpm, 10분)한 후 중량을 측정하고 다음 공식을 이용하여 보수력을 계산하였다.

$$\text{보수력(\%)} = \frac{\text{전수분(\%)} - \text{유리수분(\%)}}{\text{전수분(\%)}} \times 100$$

$$\text{유리수분(\%)} = \frac{\text{원심분리 전 중량(g)} - \text{원심분리 후 중량(g)}}{\text{시료중량(g)} - \text{지방계수}} \times 100$$

$$\text{지방계수(\%)} = \frac{\text{지방(\%)}}{100}$$

실험에서 얻어진 모든 자료들의 통계분석은 Statistical Analysis System (SAS release ver 9.1, 2002)의 General Linear Model procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리구간에 유의성은 Duncan's multiple range-test (Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

표 3-3-1. 시험 처리

	C-	C+	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Feed additives	-	Avila-mycin	Silkworm powder			Hyperimmunized silkworm powder			Hyperimmunized silkworm powder			Coating hydrolyzed silkworm powder		
Additive levels	-	10ppm	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%

표 3-3-2. 시험 처리

	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Challenge	-						LPS					
Feed additives	-	Avila-mycin	SW	HSW	CSW	CHSW	-	Avila-mycin	SW	HSW	CSW	CHSW
Additive levels	-	10ppm	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%	-	10ppm	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

표 3-3-3. 시험 사료

Ingredients	Starter (0~3wk)		Finisher (3~5wk)	
	----- % -----			
Corn	53.44		61.64	
Soybean meal	33.65		27.88	
Corn gluten meal	4.16		4.00	
Soybean oil	4.68		3.06	
Limestone	1.02		1.23	
Tricalcium phosphate	2.01		1.31	
Salt	0.25		0.25	
DL-Methionine (50%)	0.27		0.08	
Lysin-HCl (98%)	0.02		0.05	
Vitamin-mineral mixture ¹	0.50		0.50	
Total	100.0		100.0	
Chemical composition ²				
ME (kcal/kg)	3,100		3,100	
Crude Protein (%)	22.0		20.0	
Methionine (%)	0.50		0.38	
Methionine+Cystine (%)	0.94		0.83	
Lysine (%)	1.10		1.00	
Ca (%)	1.00		0.90	
Available P (%)	0.50		0.35	

¹Vitamin-mineral mixture provided following nutrients per kg of diet: vitamin A, 15,000IU; vitamin D₃, 1,500IU; vitamin E, 20.0mg; vitamin K₃, 0.70mg; vitamin B₁₂, 0.02mg; niacin, 22.5mg; thiamin, 5.0mg; folic acid, 0.70mg; pyridoxin, 1.3mg; riboflavin, 5mg; pantothenic acid, 25mg; choline chloride, 175mg; Mn, 60mg; Zn, 45mg; I, 1.25mg; Cu, 10.0mg; Fe, 72mg; Co, 2.5mg.

(3) 결과 및 고찰

(가) 육계 생산성

누에 유래 항균 펩타이드 함유 사료첨가제 첨가 급여시 제형 형태 및 첨가 수준에 따라 차이는 있었으나, 대조구인 항생제 무첨가구와 비교해서, 종료체중은 2.32~6.71%, 증체량 2.36~6.83% 증가하였으며, 사료요구율은 5.49~9.15%가 유의하게 증가하였다(P<0.05). 특히 가수분해 또는 가수분해 지방코팅 제형시 단순 건조 누에 분말에 비해 육계 생산성 측면에서 효과를 나타냈으며, 특히 이들의 경우 항생제 첨가구와 유사한 성적을 보였다.

표 3-3-4. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 육계 생산성 비교¹

	C(-)	C(+)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
			0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
Initial BW(g)	44.4	44.3	44.4	44.2	44.2	44.3	44.4	44.4	44.3	44.4	44.4	44.3	44.4	44.4	0.20
Final BW(g)	2374.2 ^a	2516.4 ^a	2429.4 ^c	2432.9 ^c	2447.9 ^c	2480.0 ^b	2504.3 ^b	2513.6 ^a	2480.0 ^b	2484.2 ^b	2483.6 ^b	2490.0 ^b	2511.9 ^a	2533.6 ^a	21.51
BW gain(g)	66.57 ^d	70.63 ^a	68.14 ^c	68.25 ^c	68.68 ^c	69.59 ^b	70.28 ^{ab}	70.55 ^a	69.59 ^b	69.71 ^b	69.69 ^b	69.88 ^{ab}	70.50 ^a	71.12 ^a	1.15
Feed intake(g)	108.9	110.9	105.8	105.5	104.9	107.0	105.2	107.6	107.0	105.2	107.6	107.0	105.2	107.6	3.27
FCR(FI/BWG)	1.64 ^a	1.57 ^b	1.55 ^b	1.55 ^b	1.53 ^b	1.54 ^b	1.50 ^c	1.52 ^{bc}	1.54 ^b	1.51 ^c	1.54 ^{bc}	1.53 ^{bc}	1.49 ^c	1.51 ^c	0.02

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(나) 생체 안전성

주요 장기의 상대적 중량과 혈액 생화학 조성을 조사한 결과, 개발된 면역 유도 누에 함유 사료첨가제가 육계의 간, 신장 등 주요 장기 발달과 혈액 내 간 및 손상 지표에 부정적인 영향을 미치지 않았다. 본 연구를 통해 개발한 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 생체 안전성을 확인할 수 있었다.

① 조직 상대적 중량

면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 육계의 주요 장기 발달(간, 비장, 췌장, 신장, F낭)에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 3-3-5에 제시한 바와 같다. 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제가 육계 주요 장기의 발달에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-3-5. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 조직 상대적 중량 비교¹

	C(-)	C(+)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
			0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
----- g/100g BW -----															
Liver	2.81	2.78	2.75	2.76	2.74	2.89	2.76	2.78	2.83	2.77	2.61	2.73	2.94	2.95	0.05
Spleen	0.08	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	0.08	0.08	0.07	0.08	0.09	0.08	0.09	0.01
Pancreas	0.45	0.49	0.43	0.49	0.45	0.48	0.43	0.49	0.48	0.42	0.43	0.41	0.45	0.44	0.01
Bursa of Fabricius	0.21	0.24	0.21	0.24	0.27	0.23	0.24	0.23	0.27	0.25	0.25	0.24	0.21	0.26	0.01

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

② 혈액 내 간 및 신장 손상 지표

간 및 신장의 손상 여부를 나타내고 신규 사료첨가제의 독성 여부를 판단할 수 있는 지표를 조사한 결과(표 3-3-6), 항생제 첨가구를 비롯한 전 처리구에서 항생제 무첨가구에 비해 AST 및 ALT가 유의하게 감소하였다(P<0.05). 그 외 요소태질소, 크레아티닌, 총단백질, 알부민, 글로불린, 알부민/글로불린에서는 처리구간 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

표 3-3-6. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 혈액 생화학 조성¹ 비교²

	C(-)	C(+)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
			0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
BUN	1.28	1.29	1.25	1.19	1.25	1.21	1.19	1.28	1.22	1.27	1.22	1.27	1.23	1.21	0.01
Creatinine	0.30	0.26	0.27	0.26	0.28	0.27	0.27	0.26	0.28	0.26	0.28	0.26	0.26	0.29	0.01
Total protein	3.45	3.43	3.32	3.53	3.43	3.31	3.41	3.33	3.37	3.38	3.45	3.38	3.39	3.36	0.02
Albumin	1.56	1.52	1.54	1.65	1.49	1.50	1.51	1.44	1.48	1.43	1.38	1.43	1.47	1.49	0.01
Globulin	1.89	1.91	1.78	1.88	1.94	1.81	1.9	1.89	1.89	1.95	2.01	1.95	1.92	1.87	0.02
Albumin/Globulin	0.83	0.80	0.87	0.88	0.77	0.83	0.79	0.76	0.78	0.73	0.66	0.73	0.77	0.80	0.01
AST	289.9 ^a	274.3 ^b	279.7 ^b	274.3 ^b	271.7 ^b	281.4 ^{ab}	276.2 ^b	270.9 ^{bc}	278.4 ^b	273.2 ^b	268.5 ^c	273.2 ^b	265.1 ^c	257.7 ^d	2.15
ALT	8.44 ^a	7.51 ^b	6.89 ^c	6.91 ^c	6.33 ^d	6.89 ^c	6.31 ^d	6.44 ^d	6.65 ^c	6.25 ^d	6.31 ^d	6.25	6.78 ^c	6.15 ^d	0.04

¹ BUN : blood urea nitrogen, AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase.

² SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(다) 맹장 미생물 변화

맹장 내 총균, 대장균, 살모넬라 및 젖산 생산균을 조사한 결과는 표 3-3-7에 나타내었다. 대조구인 항생제 무첨가구와 비교하여 누에 유래 항균 펩타이드 함유 사료첨가제 첨가 급여시 맹장 내 대장균은 12.1~16.3%, 살모넬라는 12.1~17.6% 유의하게 감소하였다(P<0.05). 유산균 수에서는 유의한 차이가 나타나지 않았으며, 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태에 따른 차이 역시 관찰되지 않았다. 본 연구 결과에서도 개발한 면역 유도 누에 함유 사료첨가제는 맹장 내 유해균인 대장균 및 살모넬라를 감소시켜 장내 미생물 안정화에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-3-7. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 맹장 미생물총 비교¹

	C(-)	C(+)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
			0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
----- log10 cfu/g -----															
Total microbes	8.317	8.123	8.226	8.214	8.154	8.207	8.213	8.117	8.134	8.207	8.118	8.125	8.111	8.024	0.07
Coliform bacteria	6.116 ^a	5.352 ^b	5.326 ^b	5.378 ^b	5.177 ^b	5.334 ^b	5.320 ^b	5.215 ^b	5.418 ^b	5.252 ^b	5.123 ^b	5.121 ^b	5.109 ^b	5.241 ^b	0.04
<i>Salmonella</i> spp.	3.788 ^a	3.114 ^b	3.328 ^b	3.164 ^b	3.259 ^b	3.214 ^b	3.321 ^b	3.108 ^b	3.188 ^b	3.219 ^b	3.109 ^b	3.284 ^b	3.146 ^b	3.122 ^b	0.02
Lactic acid bacteria	7.385	7.015	7.211	7.214	7.302	7.254	7.215	7.200	7.312	7.387	7.355	7.257	7.455	7.395	0.06

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

^{a,b} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(라) 백혈구 조성

항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료 첨가제의 제형 형태 및 첨가 수준에 따른

육계 백혈구 구성에 미치는 영향은 표 3-3-8에 제시한 바와 같다. 총백혈구수, 다핵구, 림프구 등 혈구 구성은 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

표 3-3-8. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 백혈구 조성 비교¹

	C(-)	C(+)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
			0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
White blood cell(K/ μ L)	23.21	21.29	21.26	22.17	22.20	23.21	22.19	25.28	23.21	23.27	22.25	22.29	23.23	22.21	0.41
Heterophil(K/ μ L)	9.30	8.26	8.25	8.28	8.14	8.57	8.23	8.66	8.48	8.34	8.28	8.20	8.36	8.44	0.11
Lymphocyte(K/ μ L)	14.40	13.43	14.32	14.51	12.43	13.36	13.41	14.33	13.37	13.83	14.47	13.18	14.09	13.96	0.22
Heterophil/Lymphocyte	0.65	0.62	0.58	0.57	0.65	0.64	0.61	0.60	0.63	0.60	0.57	0.62	0.59	0.59	0.01

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

(마) 닭고기 물리이화학적 특성

항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 제형 형태 및 첨가 수준에 따른 닭고기의 물리이화학적 특성 변화는 표 3-3-9과 표 3-3-10에 제시하였다. 수분, 조단백, 조지방, 조회분 등의 닭고기 일반 성분 및 pH는 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 육색 중 황색도(b)가 대조구에 비해 누에 처리구에서 유의하게 증가하였으며 (P<0.05), 명도(L) 및 적색도(a)에서는 차이가 없었다. 또한 제형 형태 및 첨가 수준에 따라 차이는 있었으나 누에 함유 사료첨가제 첨가 급여시 대조구에 비해 보수력은 증가하고 가열 감량은 감소하거나 감소하는 경향을 보였다(P<0.05). 전단력에 있어서는 처리구 간 유의한 차이가 나타나지 않았다.

표 3-3-9. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 닭고기 일반 성분 비교¹

	C(-)	C(+)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
			0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
Moisture	73.21	73.29	72.26	72.37	73.20	73.21	72.20	73.29	72.12	73.26	72.30	73.11	73.23	72.21	0.41
Crude protein	23.30	23.86	23.95	24.18	24.14	23.57	23.44	23.66	23.48	23.39	23.82	23.90	23.96	24.04	0.14
Ether extract	1.45	1.33	1.32	1.41	1.33	1.26	1.34	1.33	1.37	1.38	1.37	1.38	1.40	1.36	0.01
Crude ash	1.06	1.02	1.05	1.11	1.06	1.04	1.01	1.12	1.13	1.06	1.07	1.09	1.05	1.05	0.01

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

표 3-3-10. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 닭고기 물리적 특성 비교¹

	C(-)	C(+)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
			0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
pH	5.32	5.29	5.24	5.37	5.20	5.32	5.26	5.32	5.28	5.26	5.33	5.29	5.23	5.27	0.05
CIE															
L	45.35	46.71	43.98	44.12	43.41	43.57	43.48	45.15	46.34	44.12	43.28	45.16	46.44	43.87	0.22
a	2.10	2.16	1.98	2.05	2.14	2.18	2.22	1.90	1.84	2.15	2.09	2.18	2.31	2.14	0.08
b	9.52 ^c	9.48 ^c	9.56 ^c	9.64 ^b	9.72 ^{bc}	9.87 ^b	9.84 ^b	9.90 ^b	9.61 ^{bc}	9.68 ^{bc}	9.70 ^b	9.63 ^{bc}	9.87 ^b	10.63 ^a	0.09
Water holding capacity(%)	55.12 ^d	53.96 ^e	57.33 ^c	59.98 ^a	62.12 ^a	56.25 ^c	58.44 ^b	60.36 ^a	58.19 ^b	60.12 ^a	61.31 ^a	59.24 ^a	61.40 ^a	62.39 ^a	0.24
Heating loss(%)	23.17 ^a	22.65 ^a	22.78 ^a	21.92 ^b	21.23	22.46 ^a	21.75 ^b	21.36 ^b	21.58 ^b	20.64 ^c	19.85 ^c	20.15 ^c	19.98 ^c	18.62 ^d	0.10
Shearing force(kg/0.5inch ²)	2.53	2.39	2.44	2.79	2.55	2.64	2.40	2.47	2.33	2.71	2.74	2.54	2.68	2.59	0.07

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

^{a-e} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

다. 산란계에 대한 항균펩타이드 생산 누에 함유 사료소재의 이용효과 구명 및 적용 기술 확립

(1) 연구 목적

산란계에 개발한 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제를 사료 내 첨가 급여하여 계란 생산성 및 품질, 혈액/면역 생리적 변화, 계란 저장 안전성 및 누에 유효성분의 이행률 등을 조사하여 이용 효과 및 적정 첨가수준을 구명하고, 개발한 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제를 이용한 고품질 기능성 계란 생산 가능성을 확인하고자 수행하였다.

(2) 연구 수행 방법

경상남도 농업기술원에서 사육된 5령 5일째 누에에 면역유도제(*Lactobacillus plantarum* 추출 펩티도글리칸 0.05mL) 주사 접종하여 면역 유도 누에를 생산하였으며, 이를 마이크로웨이브 건조, 단백질 가수분해 및 지방 코팅 등의 제형 공정을 거쳐 누에 건조 분말, 가수분해 누에 분말, 지방 코팅 누에 분말, 가수분해 누에 지방코팅 분말을 제조하여 시험에 이용하였다.

산란계에서의 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 이용 효과 및 적정 첨가 수준을 구명하기 위하여 45주령 산란계(Hy-line brown) 600수를 공시하여 10처리 6반복 반복당 10수씩 배치하여 12주간 사양시험을 실시하였다. 처리구는 대조구(무첨가), 누에 분말 처리구(일반 누에 분말 : 0.01, 0.03, 0.05%), 가수분해 누에 분말 처리구(가수 분해 누에 분말 : 0.01, 0.03, 0.05%), 지방코팅 누에 분말 처리구(지방코팅 누에 분말 : 0.01, 0.03, 0.05%) 및 가수분해 누에 지방코팅 분말 처리구(가수분해 누에 지방코팅 분말 처리구 : 0.01, 0.03, 0.05%)를 시험구로 두었으며(표 3-3-11), 난 생산성, 계란 품질, 혈액 특성, 면역·스트레스 관련 인자 및 계란 저장 안전성 등을 조사하였다.

시험사료는 NRC(1994)와 한국가금사양표준(2012)에 근거하여 옥수수-단백질 위주의 사료로 조단백질 15.5%, 대사에너지 2,650kg/kg이 되도록 배합하였으며, 배합비 및 화학적 조성은 표 3-3-12에 나타내었다. A자형 2단 첼제케이지에서 케이지당 1수씩 사육하였으며, 사료 급이기와 니플의 숫자는 반복구별로 동일하게 배치하였다. 사료와 물은 자유 채식 및 음수 시켰으며, 점등은 시험 종료시까지 17L:7D를 유지하였다.

계란은 매일 15시에 채란하여 난중 및 산란수를 조사하였고, 산란수를 사육수수로 나누어 산란율을 구하였다. 사료 섭취량은 2주 간격으로 반복별로 사료잔량을 측정하여 구하였다. 조사된 사료섭취량과 일산란량을 통하여 사료요구율을 산출하였다. 시험개시 후 2주 간격으로 처리당 30개씩 계란을 수집하여 난질 및 난각질을 조사하였다. 계란품질자동분석기(QCM+, Technical services & supplies Ltd., England)를 이용하여 난황색, Haugh unit 및 난각색을 측정하였으며, 난각강도계(Fujihara industry Co., Ltd., Japan)와 난각두께 측정기(Fujihara industry Co., Ltd., Japan)를 이용하여 난각강도 및 난각두께를 측정하였다. 혈구 조성, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표 및 면역·스트레스 관련 인자를 조사하기 위해 시험 종료시 처리당 10수씩 선발하여 익하정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈구 조성은 자동 혈구 분석기(Hemavet 950, Erba Diagnostics)를 사용하여 측정하였고, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표는 자동 생화학 분석기(COBAS MIRA plus, ROCHE diagnostics)를 이용하여 blood urea nitrogen (BUN), creatinine, total protein, albumin, globulin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)를 측정하였다. 혈액 내 면역·스트레스 관련 인자로는 immunoglobulin (IgA, IgG, IgM), cytokines (IL-2, 4, 6), 총항산화력 및 cortisol을 분석하였다.chicken IgA, IgG, IgM kit (BETHYL Laboratories, Inc. USA), IL-1 β , 2, 4, 6, 8 ELISA kit (USCN Business Co., Ltd., USA), total

antioxidant power colorimetric microplate assay kit (Oxford biomedical research Inc., UK) 및 cortisol EIA kit (Oxford biomedical research Inc., UK)를 사용하여 측정하였다. 계란 저장 안정성 조사하기 위해 시험 종료시 생산된 계란을 수집하여 실온(28°C ~ 32°C)에서 보관하였다가 0일, 7일, 14일 및 21일 경과 후 처리구별로 10개씩 Haugh unit 및 난황 내 지방과산화물가를 측정하였다. 난황 내 지방과산화물가는 지방 과산화시 형성되는 malondialdehyde (MDA) 함량을 측정하여 MDA mg/mL로 나타내었으며 Beuge와 Aust (1978)의 방법을 변형하여 실시하였다. 1회용 주사기로 난황 1ml을 채취하여 증류수 9ml과 butylated hydroxyanisol (BHA) 50µl을 넣고 균질화시킨 후, 균질액 2mL을 시험관으로 옮겨 thiobarbituric acid (TBA)/ trichloroacetic acid (TCA) 혼합 용액 4mL을 넣어 혼합하였다. 이를 90°C 항온수조에 넣어 15분간 반응시키고 냉각한 후, 원심분리(3,000rpm×10min) 하고 상층액을 회수하여 531nm에서 흡광도를 측정하였다. 형성된 난황 내 malondialdehyde (MDA)는 흡광도에 계수 5.88을 곱하여 계산하였다.

실험에서 얻어진 모든 자료들의 통계분석은 Statistical Analysis System (SAS release ver 9.1, 2002)의 General Linear Model procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리구간에 유의성은 Duncan's multiple range-test (Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

표 3-3-11. 시험 처리

	C-	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
Feed additives	-	Silkworm powder			Hyperimmunized silkworm powder			Hyperimmunized silkworm powder			Coating hydrolyzed silkworm powder		
Additive levels	-	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%

표 3-3-12. 시험 사료

Ingredients	Diets composition
	----- % -----
Corn	56.50
Soybean meal	18.90
Corn gluten meal	4.00
Wheat bran	7.60
Soybean oil	1.00
Limestone	10.00
Tricalcium phosphate	1.00
Salt	0.35
DL-Methionine (50%)	0.05
Vitamin-mineral mixture ¹	0.60
Total	100.0
Chemical composition ²	
ME (kcal/kg)	2,650
Crude Protein (%)	15.5
Methionine (%)	0.31
Methionine+Cystine (%)	0.64
Lysine (%)	0.71
Ca (%)	4.00
Available P (%)	0.30

¹Vitamin-mineral mixture provided following nutrients per kg of diet: vitamin A, 15,000IU; vitamin D₃, 1,500IU; vitamin E, 20.0mg; vitamin K₃, 0.70mg; vitamin B₁₂, 0.02mg; niacin, 22.5mg; thiamin, 5.0mg; folic acid, 0.70mg; pyridoxin, 1.3mg; riboflavin, 5mg; pantothenic acid, 25mg; choline chloride, 175mg; Mn, 60mg; Zn, 45mg; I, 1.25mg; Cu, 10.0mg; Fe, 72mg; Co, 2.5mg.

(3) 결과 및 고찰

(가) 계란 생산성

제형 형태가 다른 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제를 사료 내 첨가 급여하였을 때 계란 생산성에 미치는 영향은 표 3-3-13에 나타내었다. 대조구에 비해 모든 처리구에 산란율, 일산란량 및 사료요구율이 유의하게 개선되었으며($P<0.05$), 제형 형태에 따른 유의한 차이는 나타나지 않았으나 첨가 수준이 증가함에 따라 개선되는 경향을 보였다. 평균 난중 및 사료 섭취량에서는 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 누에를 어분 등의 단백질 사료원으로 대체한 연구는 일부 수행되었으나, 고기능성 사료첨가제로 이용한 연구는 드물어 직접적인 비교는 어려우나, 누에 또는 뽕잎에 풍부한 유용물질들이 항균, 항산화, 체내 대사 조절을 통해 산란계의 건강성 증진 및 에너지 분배 등에 긍정적인 영향을 미쳐 계란 생산성에 긍정적인 영향을 미친 것으로 사료된다.

표 3-3-13. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 계란 생산성 비교¹

	C	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
		0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
Egg production(%)														
4wks	92.2	92.5	92.8	92.7	92.6	92.9	92.7	92.2	93.4	93.6	92.8	93.9	93.0	0.35
8wks	91.5	92.3	93.6	92.9	93.1	94.1	92.9	91.2	92.6	93.0	93.6	93.8	92.8	0.41
12wks	90.4	91.0	92.4	92.2	92.6	93.4	93.0	92.4	92.6	92.3	92.4	92.4	92.6	0.43
Total	91.4 ^b	91.9 ^b	92.9 ^a	92.6 ^a	92.8 ^a	93.5 ^a	92.8 ^a	91.9 ^b	92.9 ^a	93.0 ^a	92.9 ^a	93.4 ^a	92.8 ^a	0.39
Egg weight(g)														
4wks	64.5	64.1	64.0	65.9	65.8	63.3	63.0	64.3	64.9	64.0	63.9	63.8	64.1	0.11
8wks	64.8	65.2	64.7	66.3	66.5	64.8	63.6	65.8	64.2	64.9	65.3	64.4	65.2	0.09
12wks	65.4	65.2	65.4	65.6	66.8	65.0	65.6	66.8	64.8	65.6	65.8	64.7	65.6	0.10
Total	64.9	64.8	64.7	65.9	66.4	64.4	64.1	65.6	64.6	64.8	65.0	64.3	65.0	0.10
Egg mass(g/d)														
4wks	59.4	59.3	59.3	61.1	60.9	58.8	58.4	59.2	60.6	59.9	59.3	59.9	59.6	0.13
8wks	59.3	60.2	60.5	61.6	61.9	61.0	59.0	59.9	59.4	60.4	61.1	60.4	60.5	0.14
12wks	59.1	59.3	60.4	60.5	61.9	60.7	61.0	61.7	60.0	60.5	60.8	59.8	60.7	0.11
Total	59.3 ^c	59.6 ^c	60.1 ^b	61.1 ^a	61.6 ^a	60.1 ^b	59.5 ^c	60.3 ^b	60.0 ^b	60.3 ^b	60.4 ^b	60.0 ^b	60.3 ^b	0.13
Feed intake(%)														
4wks	105.2	103.6	105.6	104.0	101.7	102.5	106.6	103.5	102.3	105.7	102.8	103.8	103.0	0.55
8wks	110.1	107.0	106.5	108.0	106.0	101.9	107.9	105.5	105.5	109.9	104.1	107.4	105.2	0.67
12wks	111.8	109.9	106.0	109.6	108.9	102.9	108.0	106.9	110.7	110.0	104.7	108.6	105.4	0.63
Total	109.0	106.8	106.0	107.2	105.5	102.4	107.5	105.3	106.1	108.5	103.9	106.6	104.5	0.61
Feed conversion ratio														
4wks	1.77	1.75	1.78	1.70	1.67	1.74	1.83	1.75	1.69	1.76	1.73	1.73	1.73	0.02
8wks	1.86	1.78	1.76	1.75	1.71	1.67	1.83	1.76	1.77	1.82	1.70	1.78	1.74	0.01
12wks	1.89	1.85	1.75	1.81	1.76	1.69	1.77	1.73	1.84	1.82	1.72	1.82	1.74	0.01
Total	1.84 ^a	1.79 ^{ab}	1.76 ^b	1.76 ^b	1.71 ^c	1.70 ^c	1.81 ^a	1.75 ^b	1.77 ^b	1.80 ^{ab}	1.72	1.78 ^{ab}	1.73 ^{bc}	0.01

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly ($P<0.05$).

(나) 계란 품질

항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제의 제형 형태 및 첨가 수준에 따른 계란 품질의 변화는 3-3-14에 나타내었다. 4주 간격으로 처리구당 계란 30개씩을 수집하여 계란 품질 분석기로 계란의 내외부 품질을 분석한 결과, 제형 형태 및 첨가 수준에 따라 차이는 있었으나 계란의 신선도를 나타내는 지표인 Haugh unit이 대조구에 비해 모든 처리구에서 유의하게 증가하였다

(P<0.05). 난황색 역시 대조구에 비해 통계적으로 증가하거나 증가하는 경향을 보였으나(P<0.05), 그 차이는 크지 않았으며, 난각두께 및 난각강도에 있어서는 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 누에의 첨가 급여에 따른 계란 품질에 대한 연구가 많지 않으나, 뽕잎 등의 식물체 내 존재하는 다양한 생리활성물질이 계란의 내외부 품질에 긍정적인 영향을 미칠 수 있다는 결과들이 보고되어 왔다(Botsoglou et al., 2005; Windisch et al., 2008). 본 연구에서는 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제가 계란 내부 품질인 Haught unit 및 난황색에 긍정적인 영향을 미치는 한편, 난각강도 및 난각두께 등의 계란 외부 품질에는 부정적인 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-3-14. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 계란 품질 비교¹

	C	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
		0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
Haugh unit														
4wks	95.4	95.9	97.4	96.5	95.2	96.3	96.2	95.3	95.8	94.6	95.9	95.6	95.9	0.33
8wks	94.0	94.9	95.4	95.0	94.2	94.6	95.2	95.4	95.1	94.6	94.8	95.8	95.8	0.31
12wks	92.8 ^c	94.2 ^b	94.4 ^b	94.6 ^b	94.5 ^b	93.2 ^c	95.0 ^a	95.5 ^a	94.4 ^b	95.6 ^a	94.2 ^b	95.5 ^a	96.2 ^a	0.33
Total	94.1 ^b	95.0 ^a	95.7 ^a	95.4 ^a	94.6 ^b	94.7 ^b	95.5 ^a	95.4 ^a	95.1 ^a	94.9 ^b	95.0 ^a	95.6 ^a	96.0 ^a	0.32
Egg yolk color(R.C.F)														
4wks	9.1	9.3	9.5	9.3	9.3	9.6	9.6	9.2	9.5	9.5	9.5	9.3	9.4	0.08
8wks	9.2 ^b	9.4 ^a	9.4 ^a	9.5 ^a	9.2 ^b	9.5 ^a	9.5 ^a	9.3 ^{ab}	9.4 ^a	9.5 ^a	9.5 ^a	9.3 ^{ab}	9.2 ^b	0.10
12wks	9.2 ^b	9.5 ^a	9.2 ^b	9.4 ^a	9.4 ^a	9.4 ^a	9.2 ^b	9.4 ^a	9.3 ^{ab}	9.4 ^a	9.1 ^b	9.3 ^{ab}	9.4 ^a	0.07
Total	9.1 ^b	9.4 ^a	9.3 ^a	9.4 ^a	9.3 ^a	9.5 ^a	9.4 ^a	9.3 ^a	9.4 ^a	9.5 ^a	9.4 ^a	9.3 ^a	9.4 ^a	0.08
Eggshell strength(kg/cm ²)														
4wks	3.80	3.81	3.81	3.80	3.90	3.81	3.90	3.78	3.85	3.87	3.86	3.83	3.80	0.02
8wks	3.78	3.78	3.84	3.83	3.84	3.86	3.80	3.79	3.82	3.82	3.82	3.83	3.77	0.01
12wks	3.80	3.76	3.90	3.84	3.78	3.92	3.74	3.77	3.82	3.76	3.84	3.85	3.85	0.02
Total	3.79	3.78	3.85	3.82	3.84	3.86	3.81	3.78	3.83	3.82	3.84	3.84	3.81	0.02
Eggshell thickness(mm)														
4wks	0.39	0.38	0.38	0.40	0.39	0.39	0.38	0.38	0.38	0.39	0.38	0.38	0.39	0.01
8wks	0.38	0.37	0.38	0.40	0.38	0.39	0.37	0.36	0.38	0.38	0.37	0.36	0.37	0.01
12wks	0.36	0.35	0.36	0.38	0.36	0.37	0.35	0.34	0.36	0.36	0.35	0.34	0.35	0.01
Total	0.38	0.37	0.37	0.39	0.38	0.38	0.37	0.36	0.37	0.38	0.37	0.36	0.37	0.01

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(다) 백혈구 조성

항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료 첨가제의 제형 형태 및 첨가 수준에 따른 산란계의 백혈구 조성에 미치는 영향은 표 3-3-16에 제시한 바와 같다. 총백혈구, 다핵구, 림프구 등 혈구 조성은 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

표 3-3-15. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 백혈구 조성 비교¹

	C(-)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
		0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
White blood cell(K/ μ L)	25.36	23.41	24.32	24.35	25.36	24.34	27.43	25.36	25.42	24.4	24.44	25.38	24.36	0.57
Heterophil(K/ μ L)	10.07	9.65	9.68	9.54	9.97	9.63	10.06	9.88	9.74	9.68	9.6	9.76	9.84	0.13
Lymphocyte(K/ μ L)	15.6	15.52	15.71	13.63	14.56	14.61	15.53	14.57	15.03	15.67	14.38	15.29	15.16	0.22
Heterophil/Lymphocyte	0.69	0.62	0.62	0.70	0.68	0.66	0.65	0.68	0.65	0.62	0.67	0.64	0.65	0.02

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

(라) 혈액 내 간 및 신장 손상 지표

항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제의 제형 형태 및 첨가 수준에 따른 혈액 내 간 및 신장 손상 지표인 요소태질소, 크레아티닌, 총단백질, 알부민, 글로불린, 알부민/글로불린, AST 및 ALT를 조사한 결과는 표 3-3-15에 제시한 바와 같다. 혈액 내 간 및 신장 손상 지표는 대조구에 비해 누에 함유 사료첨가제 첨가 급여시 수치적으로 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다.

표 3-3-16. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 혈액 생화학 조성¹ 비교²

	C(-)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
		0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
BUN	1.81	1.78	1.72	1.78	1.74	1.72	1.81	1.75	1.8	1.75	1.80	1.76	1.74	0.03
Creatinine	0.38	0.35	0.34	0.36	0.35	0.35	0.34	0.36	0.34	0.36	0.34	0.34	0.37	0.01
Total protein	3.98	3.85	4.06	3.96	3.84	3.94	3.86	3.90	3.91	3.98	3.91	3.92	3.89	0.05
Albumin	1.87	1.85	1.96	1.80	1.81	1.82	1.75	1.79	1.74	1.69	1.74	1.78	1.80	0.02
Globulin	2.11	2.00	2.10	2.16	2.03	2.12	2.11	2.11	2.17	2.29	2.17	2.14	2.09	0.02
Albumin/Globulin	0.89	0.93	0.93	0.83	0.89	0.86	0.83	0.85	0.80	0.74	0.80	0.83	0.86	0.01
AST	300.3	290.1	284.7	282.1	291.8	286.6	281.3	288.8	283.6	278.9	283.6	275.5	268.1	4.27
ALT	9.76	8.21	8.23	7.65	8.21	7.63	7.76	7.97	7.57	7.63	7.57	8.10	7.47	0.09

¹ BUN : blood urea nitrogen, AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase.

² SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

(마) 혈액 내 면역·스트레스 관련 인자

항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료 첨가제의 제형 형태 및 첨가 수준에 따른 혈액 내 면역·스트레스 관련 인자를 조사한 결과는 표 3-3-17에 제시하였다. 혈액 총항산화 활성은 모든 처리구가 대조구에 비해 높은 활성을 보였으며, 누에 분말의 첨가수준이 증가할수록 증가하는 경향을 나타냈다(P<0.05). 스트레스 호르몬인 코티졸 역시 대조구에 비해 처리구에서 감소하는 결과를 확인할 수 있었다(P<0.05). 혈액 내 면역글로불린 및 cytokine 함량에 있어서는 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이를 관찰할 수 없었다.

표 3-3-17. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 백혈구 조성 비교¹

	C(-)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
		0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
Antioxidant activity (mM TEAC/mL)	41.64 ^d	46.71 ^c	51.13 ^b	57.77 ^a	43.24 ^c	47.72 ^b	51.84 ^b	43.74 ^c	48.18 ^b	53.74 ^b	45.16 ^c	51.16 ^b	51.72 ^b	0.21
Cortisol (ng/mL)	22.15 ^a	19.75 ^a	20.14 ^a	13.36 ^c	17.35 ^b	14.35 ^c	14.11 ^c	19.16 ^a	16.74 ^b	12.36 ^c	20.34 ^a	15.16 ^b	11.39 ^d	0.01
IgA (μg/dL)	4.31	4.18	4.39	4.29	4.17	4.27	4.19	4.23	4.24	4.31	4.24	4.25	4.22	0.05
IgG (μg/dL)	52.89	52.87	52.98	52.82	52.83	52.84	52.77	52.81	52.76	52.71	52.76	52.80	52.82	0.02
IgM (μg/dL)	1.83	1.7	1.91	1.81	1.69	1.79	1.71	1.75	1.76	1.83	1.76	1.77	1.74	0.02
IL-2 (na/mL)	1632.6	1722.5	1717.2	1814.4	1524.1	1618.9	1913.6	1721.1	1715.9	2011.2	1615.9	1807.8	1900.4	51.23
IL-4 (na/mL)	351.3	344.5	388.5	405.5	350.3	377.9	373.5	361.5	363.5	390.9	360.3	356.3	375.8	11.35
IL-6 (na/mL)	1945.3	2035.2	2029.9	2127.1	1836.8	1931.6	2226.3	2033.8	2028.6	2323.9	1928.6	2120.5	2213.1	98.77

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(바) 난황 지방산 조성

항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료 첨가제의 제형 형태 및 첨가 수준에 따른 난황 내 지방산 조성 변화는 표 3-3-18에 나타난 바와 같다. 대조구를 비롯한 전 처리구에서 통계적 유의성은 관찰되지 않았으나, 불포화지방산/포화지방산 비율에 있어서 대조구에 비해 수치적으로 증가하는 경향을 보였다. 비타민 E, 식물 추출물 등의 항산화물질의 첨가 급여에 따른 축산물 내 불포화지방산 증가 가능성이 일부 연구에서 시사된 바 있다. 이는 항산화물질의 지방산 산화 및 수소 첨가 방지 효과에 기인한 것으로 본 연구에서는 사료 내 대두유 사용량이 1.0%에 불과하여 가시적으로 나타나지 않은 것으로 사료된다.

표 3-3-18. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 난황 지방산 조성 비교¹

C(-)	SW			HSW			CSW			CHSW			
	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
	----- % -----												
Myristic acid (C14:0)	0.31	0.34	0.32	0.34	0.31	0.33	0.33	0.31	0.33	0.29	0.30	0.32	0.32
Palmitic acid (C16:0)	26.01	26.72	26.54	26.85	26.24	26.77	25.53	25.17	25.53	25.26	25.97	26.18	25.51
Palmitoleic acid (C16:1n7)	2.56	2.69	2.47	3.26	2.73	2.86	2.64	2.64	2.64	2.32	2.48	2.44	2.56
Stearic acid (C18:0)	12.37	11.73	11.81	10.27	11.55	11.44	11.68	11.77	11.86	11.23	11.55	11.93	10.99
Oleic acid (C18:1n9)	37.96	37.64	37.12	37.49	37.41	37.71	38.22	38.62	38.34	37.70	38.11	38.67	39.68
Vaccenic acid (C18:1n7)	1.77	1.89	1.77	1.70	1.85	1.85	1.87	1.42	1.29	1.18	1.42	1.22	1.80
Linoleic acid (C18:2n6)	12.56	12.74	13.02	12.70	13.10	12.65	13.23	13.80	13.43	13.80	13.95	13.19	13.55
α -linolenic acid (C18:3n3)	0.33	0.20	0.33	0.30	0.37	0.34	0.32	0.36	0.40	0.38	0.31	0.40	0.40
Eicosenoic acid (C20:1n9)	0.11	0.13	0.12	0.97	0.21	0.23	0.18	0.19	0.18	0.18	0.19	0.12	0.14
Arachidonic acid (C20:4n6)	3.83	3.54	3.94	3.69	3.73	3.43	3.60	3.31	3.60	3.86	3.34	2.73	2.52
Eicosapentaenoic acid (C20:5n3)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	1.10	0.00	0.08	0.00
Docosatetraenoic acid (C22:4n6)	1.09	1.27	1.27	1.13	1.02	1.05	0.83	0.70	0.83	0.94	0.79	1.09	1.02
Docosahexaenoic acid (C22:6n3)	1.09	1.12	1.30	1.29	1.48	1.33	1.57	1.71	1.57	1.76	1.59	1.62	1.50
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.01	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
SFA	38.68	38.79	38.67	37.46	38.10	38.54	37.54	37.25	37.72	36.78	37.82	38.43	36.82
USFA	61.31	61.21	61.34	62.54	61.90	61.47	62.46	62.75	62.28	63.22	62.18	61.57	63.18
MUFA	42.41	42.34	41.47	43.43	42.20	42.65	42.91	42.87	42.45	41.38	42.20	42.45	44.19
PUFA	18.90	18.87	19.86	19.11	19.70	18.82	19.55	19.88	19.83	21.85	19.99	19.12	19.00
UFA/SFA	1.58	1.58	1.59	1.67	1.62	1.59	1.66	1.68	1.65	1.72	1.64	1.60	1.72
n3	1.42	1.32	1.63	1.59	1.85	1.68	1.89	2.07	1.97	3.24	1.90	2.10	1.90
n6	17.48	17.55	18.24	17.52	17.85	17.13	17.66	17.81	17.86	18.60	18.09	17.02	17.09
n6/n3	12.32	13.28	11.20	11.04	9.65	10.18	9.32	8.62	9.04	5.73	9.52	8.12	8.99

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

(사) 계란 저장 안전성

제형 형태가 다른 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제를 사료 내 첨가 급여하였을 때 저장 기간에 따른 Haugh unit 및 지질과산화물가 변화에 미치는 영향은 표 3-3-19에 제시한 바와 같다. 저장기간이 경과함에 따라 Haugh unit이 감소하였으며, 계란 보관 14일, 21일째에 대조구에 비해 누에 처리구에서 유의하게 높았다(P<0.05). 지질과산화물가 역시 저장 기간이 경과함에 따라 증가하였으며, 제형 형태 및 첨가 수준에 따라 차이는 있었으나 누에 처리구에서 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다(P<0.05). Haugh unit은 저장 기간의 경과와 역의 상관 관계가 있어 계란의 신선도 및 내부 품질을 평가하는 주요 지표로서 이용되고 있다(Williams, 1992). 항산화성분들이 계란 Haugh unit을 향상시켰다는 결과들이 보고되었으며(Sahin et al., 2003; Kim et al., 2006), 계육 또는 계란의 보존성을 개선시킬 수 있다고 알려져 있다(Cherian et al, 1996; Park and Kim, 2008). 식물체에 존재하는 항산화물질인 flavonoid, phenolic compounds 등의 빵잎 유래 성분들의 항산화 효과에 기인하여 보존성이 개선된 것으로 여겨지며, 본 연구를 통해 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제가 장기간 저장에 따른 계란 품질 저하 감소 효과를 확인할 수 있었다.

표 3-1-19. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 제형 형태별 계란 저장 안전성 비교¹

	C(-)	SW			HSW			CSW			CHSW			SEM
		0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	0.01%	0.03%	0.05%	
Haugh unit														
0d	94.5	95.3	95.2	95.8	95.2	95.4	95.9	94.8	95.5	95.8	94.9	96.0	96.4	2.45
7d	83.8	84.7	85.2	84.8	84.0	84.4	85.0	85.2	84.9	84.4	84.6	85.6	85.6	1.66
14d	72.5	76.8	79.3	79.5	75.4	78.1	79.9	76.6	79.3	80.5	75.8	78.1	80.9	1.79
21d	57.2	64.6	66.8	67.1	64.5	64.7	65.2	64.1	64.8	65.1	65.4	65.9	66.7	2.02
TBARS (MDA mg/L)														
0d	0.91	0.95	0.95	0.85	0.91	0.88	0.85	0.87	0.82	0.76	0.82	0.85	0.88	0.09
7d	1.92	1.89	1.83	1.89	1.85	1.83	1.92	1.86	1.91	1.86	1.91	1.87	1.85	0.07
14d	2.62	0.51	2.41	2.47	2.24	2.33	2.12	2.42	2.48	2.30	2.48	2.45	2.36	0.06
21d	4.11	3.93	3.84	3.77	3.92	4.02	3.74	3.98	3.99	3.86	3.99	3.84	3.75	0.07

¹ SW : silkworm powder, HSW : hydrolyzed silkworm powder, CSW : coating silkworm powder; CHSW : coating hydrolyzed silkworm powder.

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

【4년차, 2014.12.26.~2015.12.25.】

바. 오리에 대한 항균펩타이드 생산 누에 함유 사료소재의 이용효과 구명 및 적용 기술 확립

(1) 연구 목적

육용오리 사양시험을 통해 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 사료 내 첨가 급여 효과를 구명하고 적정 첨가 수준을 결정하기 위하여 수행하였다.

(2) 연구 수행 방법

경상남도 농업기술원에서 사육된 5령 5일제 누에에 면역유도제(*Lactobacillus plantarum* 추출 펩티도글리칸 0.05mL) 주사 접종하여 면역 유도 누에를 생산하였으며, 단백질 가수분해 효소 처리 및 지방 코팅 처리 공정을 거쳐 가수분해 누에 지방코팅 분말을 제조하여 시험에 이용하였다.

육용오리에서의 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 이용 효과 및 적정 첨가 수준을 구명하기 위하여 1일령 육용오리(SM3) 360수를 공시하여 6처리 6반복 반복당 10수씩 배치하여 6주간 사양시험을 실시하였다. 시험처리구는 대조구를 비롯해 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 및 0.10% 처리구를 두었으며(표 3-4-1), 생산성, 조직 상대적 중량, 장내 미생물총, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표, 혈구 조성 및 오리고기의 물리이화학적 특성 등을 조사하였다.

시험사료는 NRC(1994)와 한국가금사양표준(2012)에 근거하여 옥수수-단백질 위주의 사료를 단백질과 에너지 함량을 동일하게 배합하였으며, 전기(0~3주, CP 22%, ME 2,900kcal/kg), 후기(3~6주, CP 18%, ME 3,000kcal/kg) 사료로 나누어 공급하였다(표 3-4-2). 사료급여 및 급수기는 반복구별로 동일하게 배치하였으며, 사료와 물은 자유 채식 및 음수 시켰다. 입추 후 3일간 24시간 점등을 실시하였고 이후 시험 종료시까지 23시간 점등을 실시하였다.

육용오리 생산성은 전기(3주차), 후기(5주차) 반복별로 체중 및 사료잔량을 측정하여 일당 증체량과 사료섭취량을 산출하였으며, 조사된 사료섭취량과 증체량을 통해 사료요구율을 산출하였다. 주요 조직 중량은 생체중의 평균 범위에 해당하는 개체를 처리구별로 10수씩 희생시킨 후 간, 비장, 췌장 및 신장을 채취하여 중량을 측정하였으며 채취한 조직들은 생체중 100g당 상대적 중량으로 환산 표기하였다. 혈구 조성, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표, 면역·염증스트레스 관련 인자 등 혈액 특성을 조사하기 위해 시험 종료시 처리당 10수씩 선발하여 익하정맥에서 혈액을 채취하였다. 혈구 조성은 자동 혈구 분석기(Hemavet 950, Erba Diagnostics)를 사용하여 측정하였고, 혈액 내 간 및 신장 손상 지표는 자동 생화학 분석기(COBAS MIRA plus, ROCHE diagnostics)를 이용하여 blood urea nitrogen (BUN), creatinine, total protein, albumin, globulin, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT)를 측정하였다. 혈액 내 총항산화력, nitric oxide 및 코티졸 함량은 total antioxidant power colorimetric microplate assay kit (Oxford biomedical research Inc., UK), total nitric oxide and nitrate parameter assay kit (R&D systems, USA) 및 cortisol EIA kit (Oxford biomedical research Inc., UK)를 사용하여 분석하였다. 맹장 내 미생물총의 변화는 시험 종료시 처리구당 6수씩 희생시켜 맹장 내용물을 채취한 후 살모넬라, 대장균 및 유산균의 수를 측정하였다. 양쪽 맹장의 내용물을 혼합하여 사용하였으며, 채취된 맹장 내용물은 생리식염수로 10⁻⁹까지 계단희석하였다. 단계적으로 희석된 내용물을 SS agar (살모넬라), MacConkey agar

(대장균) 및 Rogosa agar (유산균) 평판배지에 각각 접종하였다. Lactic acid bacteria는 혐기적으로 나머지는 호기적 조건에서 24시간 배양한 후 균수를 측정하여 맹장 내용물 1g 당 cfu (colony forming unit)로 계산한 후 \log_{10} 으로 환산 표기하였다. 오리고기의 일반성분은 AOAC 방법(2007)을 기초로 하여 분석하였다. 수분 함량은 105°C 상압가열 건조법, 조단백질 함량은 Kjeldahl 법으로 측정된 질소량에 질소계수 6.25를 곱하여 산출하였으며, 조지방 함량은 soxhlet 추출법, 조회분 함량은 직접 회화법으로 측정하였다. 오리고기 품질 변화를 조사하기 위해 시험 종료시 생체중의 평균 범위에 해당하는 개체를 처리구당 6수씩 희생시킨 후, 가슴육을 채취하여 오리고기 pH, 육색, 전단력, 보수력, 가열감량을 측정하였다. pH는 가슴육 1g을 정량하여 증류수 9mL에 넣어 균질화한 후, pH meter (Orion 410A, USA)를 이용하여 측정하였다. 육색은 색차계(Chromameter CR-400, Minolta, Japan)를 이용하여 동일한 시료를 3회 반복하여 명도(L값), 적색도(a값), 황색도(b값)에 대한 CIE (Commision International de Leclairage) 값을 측정하였다. 이때 사용한 표준색은 $Y=93.5$, $X=0.3132$, $y=0.3198$ 인 백색 표준판을 이용하여 표준화하였다. 가열감량은 가슴육을 2.5 cm 두께로 절단하고 80°C 항온수조에서 심부온도가 70°C에 도달할 때까지 가열한 후, 가열전후 중량 차이를 백분율로 계산하여 나타내었다. 전단력 분석은 Hwang 등(2004)의 방법에 따라 시료 근섬유 방향의 직각이 되게 자른 시료 심부 온도가 70°C까지 도달할 때까지 가열하고 이를 재냉각시킨 후 Instron (Model 4465, Instron Corp., USA)으로 측정하였다. 보수력은 Laakkonen 등(1970)의 방법을 이용하여 측정하였다. 분쇄 후 지방과 힘줄을 제거한 계육 0.5g을 2mL 미세원심분리관에 넣고, 80°C water bath에서 20분간 가열한 후 10분간 실온에서 냉각시켰다. 이를 원심분리(4°C, 2,000rpm, 10분)한 후 중량을 측정하고 다음 공식을 이용하여 보수력을 계산하였다.

$$\text{보수력(\%)} = \frac{\text{전수분(\%)} - \text{유리수분(\%)}}{\text{전수분(\%)}} \times 100$$

$$\text{유리수분(\%)} = \frac{\text{원심분리 전 중량(g)} - \text{원심분리 후 중량(g)}}{\text{시료중량(g)} - \text{지방계수}} \times 100$$

$$\text{지방계수(\%)} = \frac{\text{지방(\%)}}{100}$$

오리고기 저장 안정성 조사하기 위해 시험 종료시 생체중의 평균 범위에 해당하는 개체를 처리구당 6수씩 희생시킨 후, 가슴육을 채취하여 4°C 냉장보관을 하였다가 0일, 7일 경과 후 계육 pH, 지방산패도 및 단백질변패도를 분석하였다. 계육 pH는 가슴육 1g을 정량하여 증류수 9mL에 넣어 균질화한 후, pH meter (Orion 410A, USA)를 이용하여 측정하였다. 지방산패도는 지방 과산화시 형성되는 malondialdehyde (MDA) 함량을 측정하여 MDA mg/mL로 나타내었으며 Beuge와 Aust(1978)의 방법을 변형하여 실시하였다. 단백질변패도는 高坂(1978)의 방법의 이용하여 volatile basic nitrogen (VBN)을 측정하였다.

실험에서 얻어진 모든 자료들의 통계분석은 Statistical Analysis System (SAS release ver 9.1, 2002)의 General Linear Model procedure를 이용하여 분산분석을 실시하였고, 처리구 간에 유의성은 Duncan's multiple range-test (Duncan, 1955)를 이용하여 5% 수준에서 검정하였다.

표 3-4-1. 시험 처리

	C	T1	T2	T3	T4	T5
Feed additives	-	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate				
Additive levels	-	0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%

표 3-4-2. 시험 사료

Ingredients	Starter (0~3wk)	Finisher (3~5wk)
	----- % -----	
Corn	42.90	49.70
Wheat	12.00	10.00
Soybean meal	22.60	18.50
Corn gluten meal	8.30	6.50
Wheat bran	9.50	9.00
Soybean oil	2.00	3.50
Limestone	0.50	0.90
Tricalcium phosphate	1.55	1.30
Salt	0.30	0.30
DL-Methionine (50%)	0.05	0.05
Lysin-HCl (98%)	0.10	0.05
Vitamin-mineral mixture ¹	0.20	0.20
Total	100.0	100.0
Chemical composition ²		
ME (kcal/kg)	2,900	3,100
Crude Protein (%)	22.0	20.0
Methionine (%)	0.40	0.33
Methionine+Cystine (%)	0.70	0.60
Lysine (%)	0.90	0.73
Ca (%)	0.65	0.62
Available P (%)	0.40	0.33

¹Vitamin-mineral mixture provided following nutrients per kg of diet:

vitamin A, 15,000IU; vitamin D₃, 1,500IU; vitamin E, 20.0mg; vitamin K₃, 0.70mg; vitamin B₁₂, 0.02mg; niacin, 22.5mg; thiamin, 5.0mg; folic acid, 0.70mg; pyridoxin, 1.3mg; riboflavin, 5mg; pantothenic acid, 25mg; choline chloride, 175mg; Mn, 60mg; Zn, 45mg; I, 1.25mg; Cu, 10.0mg; Fe, 72mg; Co, 2.5mg.

(3) 결과 및 고찰

(가) 오리 생산성

항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제의 사료 내 첨가 급여가 오리 생산성에 미치는 영향은 표 3-4-3에 나타내었다. 육용오리의 체중, 일당증체량은 첨가 수준에 따라 차이는 있었으나, 모든 처리구가 대조구에 비해 유의하게 증가하거나 증가하는 경향을 보였으며 (P<0.05), 사료요구율 역시 대조구에 비해 모든 처리구에서 유의하게 개선되었다(P<0.05). 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제의 사료 내 첨가 수준별로는 사료요구율 측면에서 0.06%가 가장 우수하였다. 누에 풍부한 세크로핀(cecropin), 가바(GABA, gamma-aminobutyric acid) 데옥시노지리마이신(DNJ, deoxynojirimycin) 등의 다양한 생리활성물질이 체내 대사 조절, 산화적 스트레스 감소, 장내 미생물총 안정화 및 면역능조절 등의 효과를 발휘하여 생산성을

개선시킨 것으로 사료되며, 본 연구를 통해서 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제가 육용오리 생산성에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-4-3. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 수준별 육계 생산성 비교

	C	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate					SEM
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	
Initial BW(g)	54.5	54.4	54.6	54.4	54.5	54.3	0.09
Final BW(g)	3498.0 ^c	3509.4 ^{bc}	3512.9 ^{bc}	3537.9 ^b	3525.4 ^b	3580.8 ^a	28.50
BW gain(g/d)							
0-21d	62.99 ^c	64.53 ^b	65.71 ^b	67.03 ^a	66.69 ^a	67.17 ^a	0.61
21-42d	103.59	102.58	101.57	101.44	101.66	103.35	0.98
0-42d	81.99 ^c	82.26 ^b	82.34 ^b	82.94 ^b	82.88 ^b	83.96 ^a	0.73
Feed intake(g/d)							
0-21d	87.56	88.41	90.68	91.16	91.37	92.69	0.87
21-42d	261.05	257.48	251.89	246.50	251.10	257.34	1.29
0-42d	174.30	172.94	171.29	168.83	171.23	175.02	1.04
FCR(FI/BWG)							
0-21d	1.39	1.37	1.38	1.36	1.37	1.38	0.02
21-42d	2.52	2.51	2.48	2.43	2.47	2.49	0.05
0-42d	2.13 ^a	2.10 ^{ab}	2.08 ^b	2.04 ^b	2.07 ^b	2.08 ^b	0.02

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(나) 생체 안전성

육용오리에 대한 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제의 생체 안전성을 확인하기 위해 장기의 상대적 중량과 혈액 생화학 조성을 조사한 결과, 육용오리에 6주간 0.02~0.10% 수준으로 사료 내 첨가 급여하여도 간, 신장 등 주요 장기 발달과 혈액 내 간 및 손상 지표에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

① 조직 상대적 중량

항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제의 사료 내 첨가 급여가 주요 장기 발달에 미치는 영향은 표 3-4-4에 제시한 바와 같다. 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 육용오리에 항균 펩타이드 강화 누에 사료첨가제를 사료 내 0.10% 수준으로 6주간 첨가 급여하여도 주요 장기의 발달에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-4-4. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 수준별 조직 상대적 중량 비교

	C	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate					SEM
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	
----- g/100g BW -----							
Liver	2.05	2.02	1.99	1.98	2.04	2.03	0.02
Spleen	0.13	0.12	0.13	0.12	0.12	0.12	0.01
Pancreas	0.23	0.22	0.23	0.25	0.23	0.26	0.01
Kidney	0.37	0.36	0.38	0.37	0.35	0.36	0.02
Bursa of Fabricius	0.08	0.09	0.08	0.08	0.09	0.08	0.01

② 혈액 내 간 및 신장 손상 지표

간 및 신장의 손상 여부를 나타내고 신규 사료첨가제의 독성 여부를 판단할 수 있는 지표로 이용되는 요소질소(BUN, blood urea nitrogen), 크레아티닌(creatinine), 총단백질(total protein), 알부민(albumin), 글로불린(globulin), AST(aspartate aminotransferase)를 조사한 결과는 표 3-4-5에 제시하였다. 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제의 사료 내 첨가 급여시 혈액 내 간 손상 지표인 총단백질, 알부민, AST, ALT가 대조구인 항생제 무첨가구에 비해 유의하게 감소하였다(P<0.05). 영양소 결핍 및 염증 여부를 판단할 수 있는 알부민/글로불린 비율 역시 감소하거나 감소하는 경향을 보였다. 그 외 요소태질소, 크레아티닌 수치에서는 처리구간 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이를 통해 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제가 항산화, 항염증 작용을 통해 세포 및 조직의 손상을 감소시키는 한편 독성이나 부작용이 나타나지 않아 사료첨가제로서 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

표 3-4-5. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 수준별 혈액 간 및 신장 손상 지표¹ 비교

	C	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate					SEM
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	
BUN (mg/dL)	3.40	3.32	3.15	3.16	2.95	2.87	0.01
Creatinine (mg/dL)	0.18	0.17	0.17	0.16	0.18	0.16	0.01
Total protein (g/dL)	3.55 ^a	3.41 ^b	3.33 ^c	3.24 ^c	3.27 ^c	3.25 ^c	0.03
Albumin (g/dL)	1.79 ^c	1.70 ^b	1.64 ^b	1.56 ^c	1.58 ^c	1.53 ^c	0.01
Globulin (g/dL)	1.76	1.71	1.69	1.68	1.69	1.72	0.02
Albumin/Globulin	1.02 ^a	0.99 ^a	0.97 ^{ab}	0.93 ^b	0.93 ^b	0.89 ^b	0.01
AST (U/L)	171.2 ^a	167.6 ^a	168.4 ^a	162.8 ^b	154.3 ^c	154.6 ^c	3.01
ALT (U/L)	17.1 ^a	16.8 ^a	15.4 ^b	14.4 ^c	14.7 ^c	14.6 ^c	0.11

¹ BUN : blood urea nitrogen, AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase.

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(다) 맹장 미생물 변화

표 3-4-6은 항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제의 사료 내 첨가 급여에 따른 육용 오리 맹장 내 미생물총 변화를 비교한 결과이다. 장내 유해균인 대장균 및 살모넬라 수가 항생제 첨가구를 비롯한 일반 누에 분말 및 면역 유도 누에 분말을 첨가 급여한 모든 처리구에서 항생제 무첨가구에 비해 감소하는 것을 확인하였다(P<0.05). 또한 장내 유익균인 젖산 생성균에는 영향을 미치지 않아 장내 미생물총 안정화에 긍정적인 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다.

표 3-4-6. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 수준별 맹장 미생물총 비교

	C	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate					SEM
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	
		----- log10 cfu/g -----					
Total microbes	8.788	8.617	8.587	8.479	8.608	8.584	0.05
Coliform bacteria	6.287 ^a	6.013 ^a	5.664 ^b	5.646 ^b	5.228 ^c	5.065 ^c	0.01
<i>Salmonella</i> spp.	3.834 ^a	3.801 ^a	3.643 ^b	3.643 ^b	3.527 ^c	3.498 ^c	0.03
Lactic acid bacteria	8.494	8.502	8.454	8.328	8.480	8.531	0.01

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(라) 백혈구 조성

항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제의 사료 내 첨가 급여가 주요 장기 발달에 미치는 영향은 표 3-4-7에 제시하였다. 급성 감염이나 염증 반응시 증가하는 다핵구(heterophil) 및 단핵구(monocyte)는 물론 스트레스 지표로 사용되는 다핵구/림프구 비율이 대조구에 비해 모든 처리구에서 비해 유의하게 감소하거나 감소하는 경향을 보였으며, 림프구는 0.02% 처리구를 제외한 모든 처리구에서 대조구에 비해 유의하게 증가하였다(P<0.05).

표 3-4-7. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 수준별 백혈구 조성 비교

	C	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate					SEM
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	
White blood cell(K/ μ L)	22.14	21.20	20.30	21.81	21.79	21.86	0.28
Heterophil(K/ μ L)	7.93	7.55	7.46	7.62	7.36	7.48	0.16
Lymphocyte(K/ μ L)	9.34 ^b	9.36 ^b	9.54 ^a	9.81 ^a	9.84 ^a	9.96 ^a	0.06
Monocyte(K/ μ L)	2.24	2.05	2.05	2.17	2.21	2.16	0.04
Eosinophil(K/ μ L)	1.57	1.49	1.49	1.50	1.55	1.48	0.03
Basophil(K/ μ L)	0.90	0.81	0.76	0.71	0.83	0.78	0.02
Heterophil/Lymphocyte	0.87 ^a	0.81 ^b	0.78 ^b	0.78 ^b	0.75 ^b	0.75 ^b	0.01

^{a,b} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(마) 혈액 총항산화활성 및 스트레스 호르몬

항균 펩타이드 강화 누에 함유 사료첨가제의 사료 내 첨가 급여에 따른 혈액 내 총항산화활성 및 스트레스 호르몬의 하나인 코티졸 함량에 미치는 영향은 표 3-4-8에 나타내었다. 혈액 총항산화활성은 누에 분말을 첨가 급여한 모든 처리구가 대조구에 비해 높은 활성을 보였으며, 누에 분말의 첨가수준이 증가할수록 증가하는 경향을 나타냈다(P<0.05). 대표적인 스트레스 호르몬으로 알려진 코티졸 함량 역시 대조구인 항생제 무첨가구에 비해 누에 분말 처리구에서 감소하는 결과를 확인할 수 있었다(P<0.05). 스트레스, 질병 감염, 염증 반응시 다량 분비되는 코티졸은 기초 대사율, 단백질 합성 및 분해, 면역반응, 체내항상성 등에 영향을 미쳐 가축 건강은 물론 장기적으로 생산성에도 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 누에 분말은 항생제와 유사하게 혈액 내 코티졸 함량을 낮추어 가축 건강은 물론 생산성에 긍정적인 영향을 미친다는 것과 스트레스 제어 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

표 3-4-8. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 수준별 혈액 내 면역·염증·스트레스 관련 인자 비교

	C	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate					SEM
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	
Antioxidant activity mM TEAC/mL)	49.47 ^b	51.24 ^{ab}	53.39 ^a	54.65 ^a	54.84 ^a	54.90 ^a	0.23
Nitric oxide (μ mol/L)	91.07 ^a	90.15 ^a	87.87 ^b	84.56 ^c	84.30 ^c	81.37 ^c	0.35
Cortisol (ng/mL)	14.69 ^a	12.34 ^b	12.04 ^b	12.02 ^b	11.95 ^b	11.36 ^b	0.19

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(바) 오리고기 물리이화학적 특성

오리고기의 물리이화학적 특성 변화는 표 3-4-9와 표 3-4-10에 나타내었다. 수분, 조단백, 조지방, 조회분 등의 닭고기 일반 성분은 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 나타나지 않았다. pH, 육색(명도 : L 적색도 : a, 황색도 : b), 전단력에서는 대조구를 비롯한 전 처리구에서 유의한 차이가 나타나지 않았다. 보수력은 대조구에 비해 모든 처리구에서 보수력이 유의적으로 증가였으며, 가열감량은 감소하거나 감소하는 경향을 보였다(P<0.05).

표 3-4-9. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 수준별 오리고기 일반성분 비교

	C	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate					SEM
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	
		----- % -----					
Moisture	74.43	74.37	74.86	74.39	74.43	74.07	0.29
Crude protein	23.35	23.70	24.74	24.05	24.93	23.83	0.13
Ether extract	2.10	2.47	2.41	2.73	2.18	2.79	0.05
Crude ash	1.06	1.03	1.06	1.03	1.06	1.03	0.04

^{a-d} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

표 3-4-10. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 수준별 오리고기 물리적 특성 비교

	C	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate					SEM
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	
pH	5.91	5.98	5.92	5.84	5.85	5.87	0.05
CIE							
L	45.47	47.57	46.29	47.22	46.48	48.19	0.19
a	4.32	4.21	4.29	4.22	4.19	4.23	0.03
b	8.54	8.48	8.41	8.59	8.49	8.43	0.05
Water holding capacity(%)	56.57 ^b	57.63 ^b	57.17 ^b	60.39 ^a	61.53 ^a	61.47 ^a	0.23
Heating loss(%)	25.64 ^a	25.35 ^a	25.23 ^a	24.25 ^b	23.19 ^b	21.81 ^c	0.08
Shearing force(kg/0.5inch ²)	2.31	2.32	2.27	2.20	2.19	2.17	0.05

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(바) 오리육 내 지방산 조성

항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료 첨가제의 제형 형태 및 첨가 수준에 따른 오리 가슴육 내 지방산 조성 변화는 표 3-4-11에 나타낸 바와 같다. 불포화지방산 함량 및 불포화지방산/포화지방산 비율이 대조구에 비해 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가구가 유의하게 증가하거나 증가하는 경향을 보였으며(P<0.05), 특히 다가불포화 지방산 및 n6 계열 지방산이 유의하게 증가하였다(P<0.05). 비타민 E, 식물 추출물 등의 항산화물질의 첨가 급여시 지방산의 산화 및 수소 첨가 반응 감소로 축산물 내 불포화지방산 함량을 증가시킨다는 결과가 일부 연구에서 보고된 바 있다. 본 연구에서도 이와 유사한 결과를 나타냈으며, 누에 함유 사료첨가제가 사료 및 오리육 내 지방산의 산화를 방지한 것으로 사료된다.

표 3-4-11. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 수준별 오리(가슴육) 지방산 조성 비교¹

	C(-)	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate				
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%
		----- % -----				
Myristic acid (C14:0)	0.43	0.38	0.34	0.45	0.41	0.46
Palmitic acid (C16:0)	17.82	17.51	16.62	18.05	18.20	18.29
Palmitoleic acid (C16:1n7)	2.73	2.23	2.81	2.66	2.77	2.76
Stearic acid (C18:0)	12.95	12.72	12.18	11.23	11.67	11.00
Oleic acid (C18:1n9)	36.20	36.21	36.45	35.63	35.13	35.69
Vaccenic acid (C18:1n7)	1.80	1.79	1.84	1.75	1.85	1.90
Linoleic acid (C18:2n6)	17.15	17.84	18.05	18.12	17.95	18.16
α -linolenic acid (C18:3n3)	0.16	0.17	0.18	0.17	0.16	0.18
Eicosenoic acid (C20:1n9)	0.48	0.46	0.47	0.51	0.44	0.54
Arachidonic acid (C20:4n6)	0.36	0.37	0.49	0.40	0.33	0.37
Eicosapentaenoic acid (C20:5n3)	1.14	1.16	1.19	1.23	1.22	1.24
Docosatetraenoic acid (C22:4n6)	8.69	9.06	9.27	9.68	9.77	9.29
Docosahexaenoic acid (C22:6n3)	0.09	0.10	0.11	0.12	0.10	0.12
Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
SFA	31.20 ^a	30.61 ^a	29.14 ^b	29.73 ^{ab}	30.28 ^a	29.75 ^{ab}
USFA	68.80 ^c	69.39 ^b	70.86 ^a	70.27 ^a	69.72 ^{ab}	70.25 ^a
MUFA	41.21	40.69	41.57	40.55	40.19	40.89
PUFA	27.59 ^c	28.70 ^b	29.29 ^a	29.72 ^a	29.53 ^a	29.36 ^a
UFA/SFA	2.21 ^b	2.27 ^b	2.43 ^a	2.36 ^a	2.30 ^{ab}	2.36 ^a
n3	1.39	1.43	1.48	1.52	1.48	1.54
n6	26.20 ^b	27.27 ^a	27.81 ^a	28.20 ^a	28.05 ^a	27.82 ^a
n6/n3	18.85	19.07	18.79	18.55	18.95	18.06

^{a-c} Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

(자) 닭고기 저장 안정성

4°C 냉장 보관 하는 기간에 따라 오리고기의 pH, TBAR 및 VBN 변화 결과는 표 3-4-11에 제시하였다. 7일 경과 후 오리고기의 pH, TBAR, VBN이 증가하였으며, 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 첨가 급여 및 첨가 수준이 증가함에 따라 대조구에 비해 저장 기간에 따른 품질 저하를 감소시키는 경향을 보였다(P<0.05). 본 연구에서 사용한 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 내 함유되어 있는 항산화물질이 항산화 작용을 통해 오리고기의 저장 안정성을 향상시키는 것으로 사료된다.

표 3-4-11. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 첨가 수준별 닭고기 저장 안정성 비교

	C	Coating Hyperimmunized silkworm hydrolysate					SEM
		0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.10%	
pH							
0d	5.91	5.98	5.92	5.84	5.85	5.87	0.01
7d	5.59	5.71	5.74	5.72	5.63	5.77	0.02
TBA(MDA mg/L)							
0d	0.32	0.34	0.32	0.29	0.31	0.31	0.01
7d	0.51	0.49	0.48	0.46	0.43	0.41	0.01
VBN(mg %)							
0d	4.64	4.38	4.41	4.51	4.39	4.45	0.27
7d	11.68	10.56	10.49	10.36	10.29	10.32	0.31

^{a-c}Mean within the same row with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

사. 누에 유래 사료 소재 활용 기능성 가금산물 생산 및 브랜드화

(1) 연구 목적

본 연구는 전국 25세 이상 여성을 대상으로 닭·오리고기 및 계란의 소비 행태를 조사하고 누에 활용 기능성 브랜드 가금산물에 대한 소비자 반응과 의견을 수렴하여 제품 개발 및 마케팅 전략 수립을 위해 수행하였다.

(2) 연구 수행 방법

전국에 거주하는 만 25~59세의 여성 중 최근 3개월 이내에 닭고기와 계란 구입 또는 취식한 900명을 조사 대상으로 선정하였고, 표본의 대표성을 확보하기 위하여 연령·지역별로 표 3-4-12과 같이 임의 할당하고, 분석 과정에서 연령·지역별로 인구 비율을 고려하여 가중치를 적용하여 설문 응답자를 재조정하였다(표 3-4-13). 조사 기간은 2015년 11월 27일~12월 4일(7일)로 정형화된 설문에 의한 온라인 리서치를 실시하였으며, 주요 조사 내용은 표 3-4-14에 요약 제시하였다. 누에 활용 기능성 브랜드 가금산물의 향후 구입·이용 가능성이 높은 주요 소비대상을 찾기 위해 5차례의 분석을 실시하여 3개 그룹으로 세분화하였다(그림 3-4-1). 브랜드 가금산물 상품화 전략 수립을 위해 브랜드(대형업체/지역특화/중소업체), 제품 특성(친환경 무항생제/HACCP·ISO 인증/영양성분 강화), 기능성 제품 특성(녹차인삼/누에/비타민 E·DHA) 등 속성별 중요도에 대한 컨조인트 분석을 실시하였다.

- ① 기능성 제품에 대한 구입 경험과 구입의향 문항을 비교하여 기능성 제품에 대한 고관여 예상자 분석
- ② 누에 제품에 대한 호감도 및 구입의향 관련 문항을 비교하여 누에 제품에 대한 고관여 예상자 분석
- ③ 기능성 제품과 누에 제품에 대한 고관여 예상자를 비교하여 응답자를 세분화
- ④ 제시된 제품 컨셉에 대한 호감도, 구입의향을 비교하여 컨셉에 대한 고관여 예상자 분석
- ⑤ 1차로 세분화한 응답자와 컨셉에 대한 고관여 예상자를 비교 분석하여, 최종 핵심타겟 선정

상기 설문 조사를 통해 수집된 자료를 기반으로 누에 활용 기능성 브랜드 가금산물의 예상 시장 규모, 핵심고객, 수용 가격 등을 결정하였으며, 상품화·판매·유통·마케팅 전략을 수립하였다.

표 3-4-12. 소비자 수용도 조사를 위한 표본 구성

구분	25~59세 비혼	25~34세 기혼	35~39세 기혼	40~44세 기혼	45~49세 기혼	50~54세 기혼	55~59세 기혼	합계
서울	30	30	30	30	30	30	30	210
인천/경기	30	30	30	30	30	30	30	210
대전/충청	30	15	15	15	15	15	15	120
광주/전라	30	15	15	15	15	15	15	120
부산/대구/울산/경상	30	15	15	15	15	15	15	120
강원	30	15	15	15	15	15	15	120
합계	180	120	120	120	120	120	120	900

표 3-4-13. 설문 응답자 개요(가중치 적용 후)

구 분		응답자수(명)	구성 비율(%)
전 체		(900)	100.0
연령대	25-29세	(98)	10.9
	30-34세	(119)	13.2
	35-39세	(127)	14.1
	40-44세	(142)	15.8
	45-49세	(144)	16.0
	50-54세	(139)	15.4
	55-59세	(131)	14.6
거주지	서울	(190)	21.1
	인천/경기	(277)	30.8
	대전/충청	(90)	10.0
	광주/전라	(82)	9.1
	부산/대구/울산/경상	(225)	25.0
	강원	(36)	4.0
결혼여부	미혼	(152)	16.8
	기혼	(748)	83.2
학력	고졸 이하	(210)	23.3
	대졸이상	(690)	76.7
취업여부	전업주부	(329)	36.6
	파트타임 취업 주부	(96)	10.7
	풀타임 취업 주부	(323)	35.9
	기타 미혼자	(152)	16.8
월 평균 가구소득	200만원 미만	(51)	5.7
	200-300만원 미만	(101)	11.2
	300-400만원 미만	(152)	16.8
	400-500만원 미만	(192)	21.3
	500-600만원 미만	(153)	16.9
	600-700만원 미만	(85)	9.5
	700-800만원 미만	(79)	8.7
	800-900만원 미만	(38)	4.2
	900-1,000만원 미만	(22)	2.5
1,000만원 이상	(28)	3.1	

표 3-4-14. 주요 조사 내용

조사 분야	조사 항목
응답자 정보	- 연령, 결혼여부, 거주지, 학력, 취업여부, 월평균 가구수입
닭고기 구입 행태	- 닭고기 브랜드 인지도 - 닭고기 취식빈도, 구입빈도 - 브랜드 영향력, 닭고기 요리 종류 - 닭고기 구입 크기, 가격 - 닭고기 구입처, 구매 고려 요인 - 향후 소비 경향 변화
오리고기 구입 행태	- 오리고기 브랜드 인지도 - 오리고기 취식빈도, 구입빈도 - 오리고기 요리 종류 - 오리고기 구입 가격 - 오리고기 구입처, 구매 고려 요인 - 향후 소비 경향 변화
계란 구입 행태	- 계란 취식 빈도, 구입 빈도 - 계란 구입량, 가격 - 계란구입처, 구매 고려 요인 - 향후 소비 경향 변화
기능성 제품 관련 U&A	- 기능성 제품 인지도, 구입경험, 만족도 - 기능성 제품 구입의향, 추가 가격 지불 의향 - 누에에 대한 이미지, 제품인지, 구입경험 - 누에 첨가 가공산물에 대한 호감도, 구입 의향
컨셉 제품 평가	- 컨셉 제품 호감도, 구입의향, 추가가격 지불의향 - 컨셉 제품 속성에 대한 비교 평가



그림 3-4-1. 누에 활용 기능성 브랜드 가공산물 그룹 세분화 방법

(3) 결과 및 고찰

(가) 가급산물 구입 행태

닭-오리고기 및 계란의 취식주기는 각각 2-3회/월, 1회/월, 4.4회/주로 나타났으며, 구입 주기는 닭오리고기 1-2회/월, 계란은 1회/2주 정도였다. 평균 구입 가격은 닭고기가 8,120원/kg, 오리고기가 16,075원/개, 계란은 302원/개이었다. 주요 구입 장소는 대형할인점의 비율이 가장 높았다.

표 3-4-15. 소비자의 가급산물 구입 행태

	닭고기	오리고기	계란
취식 주기	2-3회/월	1회/월	4.4회 주
구입 주기	1-2회/월	1-2회/2개월	1회/2주
구입 크기 용량		-	
구입 가격 평균	8,120원	16,075원	5,663원
구입 장소	<ul style="list-style-type: none"> · 대형할인점 · 농축협마트 · 전통시장 · 기업형 슈퍼마켓 · 동네 일반 슈퍼 	<ul style="list-style-type: none"> · 대형할인점 · 농축협마트 · 기업형슈퍼 · 인터넷 · 동네 일반 슈퍼 	<ul style="list-style-type: none"> · 대형할인점 · 동네 일반 슈퍼 · 기업형 슈퍼
향후 소비 예상			

(나) 소비자의 가급산물 구입 고려 요인

닭-오리고기 및 계란을 구입 고려 요인은 표 3-4-6에 나타낸 바와 같다. 닭고기는 신선도 > 원산지 > 위생/안전 > 맛/육질 > 가격 순이었으며, 오리고기는 원산지 > 신선도 > 위생/안전 > 맛/육질 > 가격, 계란은 신선도 > 가격 > 계란 크기 > 위생/안전 > 항생제 사용 여부 순이었다. 신선도, 원산지, 위생/안전 등이 주요 구입 고려 요인으로 결국 가급산물의 품질과 안전 측면이 가장 중요한 구입 고려 요인임을 확인할 수 있었다. 반면 유명업체/브랜드 및 기능성은 비교적 낮은 고려 요인으로 나타났다. 그러나 구입시 유명업체/브랜드 고려 여부를 조사한 결과에서는 닭고기의 경우 62.6%가 유명업체/브랜드가 있는 닭고기를 구입한다고 나타나 원산지/신선도 등이 동일하다고 판단되는 조건에서는 유명업체에서 생산된 닭고기를 구입한다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 닭고기에 비해 유명업체 또는 브랜드 인지도 및 영향력이 상대적으로 낮은 오리고기와 계란에서는 큰 영향을 미치지 않는 것이 확인되었다.

표 3-4-16. 소비자의 가금산물 구입 고려 요인

	닭고기	오리고기	계란
구매고려요인 (Top5)	<p>신선도 56.8, 원산지 42.9, 위생/안전 34.6, 맛, 육질 34.2, 저렴한 가격 32.2</p> <p>유명업체/브랜드(7순위) 항생제 사용여부 (8순위) 기능성 (10순위)</p>	<p>원산지 44.6, 신선도 42.7, 맛/육질 38.7, 위생/안전 37.3, 저렴한 가격 31.8</p> <p>항생제 사용여부 (6순위) 유명업체/브랜드(8순위) 기능성 (10순위)</p>	<p>신선도/유통기간 69.2, 저렴한 가격 42.6, 계란 크기 38.5, 위생/안전 30.4, 항생제 사용 여부 28.9</p> <p>유명업체/브랜드(9순위) 기능성 (10순위)</p>
업체/브랜드 영향 정도	<p>브랜드 제품 (62.6%) > 일반 제품 (10.4%)</p>	-	<p>브랜드 제품 (27.2%) < 일반 제품 (42.4%)</p>

(다) 누에 활용 기능성 가금산물에 대한 소비자 수용도

특정 영양 성분 및 유용물질을 이용한 기능성 제품, 누에 함유 건강 보조제, 기능성 가금산물 및 누에 활용 기능성 가금산물(누에 덕인 닭·오리고기 및 계란)에 대한 소비자 수용도를 조사한 결과는 표 3-4-17에 제시하였다. 대체적으로 기능성 제품에 대해 알고 있으나 구입한 경험은 높지 않으며, 만족도도 높지 않은 수준이었다. 기능성분 첨가 제품에 대한 비구입 이유는 가격적 요인이 48.9%, 제품에 대한 신뢰도 요인이 35.8%에 달하였다. 그러나 향후 10% 수준의 조금 비싼 값을 지불하더라도 구입할 의향은 있는 것으로 나타났다. 누에에 대한 이미지는 부정적인 느낌은 많지 않았으나, 누에에 대한 효능에 대한 인지도는 46.9%로 절반에 조금 못 미치는 수준이었다. 누에 이용 제품의 취식 여부를 조사한 결과 응답자의 22.2%만이 취식을 해보았으며, 77.8%가 취식을 해보지 않은 것으로 나타났다. 누에 이용 제품에 대한 호감도는 35.1%였고, 비호감도는 26.5%였으며, 50세 이상 주부(50.6%), 서울/인천/경기를 제외한 지방에서 호감도(37.4%)가 높은 것으로 나타났다. 누에를 이용한 기능성/건강보조식품을 선호하는 이유는 건강에 좋고 효과를 입증 받아서였으나, 비선호 이유는 곤충에 대한 거부감 38.7%로 높았다. 향후 누에 이용 제품의 구입 의향은 38.8%으로 50대 이상 주부, 수도권 외 > 인천/경기 > 서울 순이었다. 누에 활용 기능성 가금산물에 대한 호감도는 58.7%(닭·오리고기), 56.5%(계란)이었고 구입 의향은 52.8%(닭·오리고기), 52.3%(계란)로 일반적인 누에 이용 기능성/건강보조식품 보다 높은 호감도와 구입의향을 보였다. 구입하고 싶은 이유는 건강에 좋아서가 57.3%로 가장 높았으며, 효과가 좋다고 해서(9.4%), 맛이 좋을 것 같아서(6.8%) 순이었다. 구입하고 싶은 않은 이유는 효능/효과를 모르거나 검증이 되지 않아서가 19.2%로 가장 높았으며, 가격이 비싸거나 비쌀 것 같아서가 14.3%, 제품을 신뢰할 수 없어서가 10.9%, 누에에 대한 호감이 없거나 선호하지 않아서가 10.8%로 높은 비율을 차지하였다. 가격 수용도에 있어서는 닭고기는 16.5%, 오리고기는 12.5%, 계란은 19.2%가 더 비싸도 구입할 수 있다고 조사되었다. 본 조사를 통해 기능성 축산물 및 누에에 대한 소비자 신뢰도 확보가 중요시 여겨졌으며, 일반 기능성 축산물에 비해 누에 활용 기능성 가금산물에 대한 호감도/구입 의향 등이 높아 프리미엄 제품으로 상품화 가능성이 높은 것으로 판단되었다.

표 3-4-17. 기능성 가금산물에 대한 소비자 수용도

	기능성 축산물	누에 건강 식품	누에 활용 기능성 가금산물		
			닭고기	오리고기	계란
인지	89.3%	중립 51.3% 긍정 37.3% 효능인지 46.9%			
구입여부	40.9%	취식경험 22.2%			
호감도	38.5% (구입자 만족도)	35.1%	58.7%		56.5%
향후 구입의향	42.9%	38.8%	52.8%		52.3%
추가금 지불의향	43.1%		53.9%	49.8%	52.8%
가격 수용도	10.8%		5,707원 (16.5%) 1kg 4,900원 기준	14,620원 (12.5%) 600g 13,000원 기준	3,100원 (19.2%) 특란 10개, 2,600원 기준

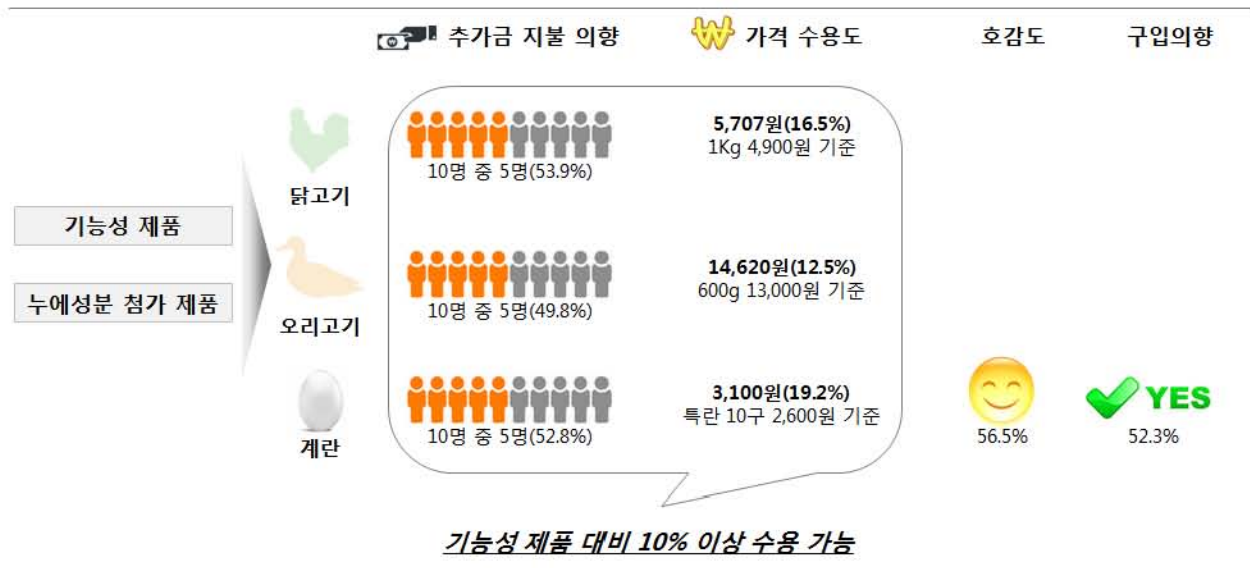


그림 3-4-2 누에 활용 기능성 가금산물에 대한 소비자 수용도

(라) 누에 활용 기능성 가금산물의 예상 시장 규모 및 소비층

누에 활용 기능성 브랜드 가금산물의 예상 시장 규모 및 주요 소비층을 구분하기 위하여 기능성 제품에 대한 구입 경험과 구입 의향, 누에 제품에 대한 호감도와 구입 의향, 누에 활용 기능성 가금산물에 대한 호감도 및 구입 의향 등의 기준으로 응답자를 구분하고 최종적으로 기능성 제품, 누에 제품, 누에 활용 기능성 가금산물에 대한 호감도 및 구입 의향에 대한 교차 분석을 하여 핵심 고객, 잠재 고객, 무관심 고객으로 분류하였다(표 3-4-18). 누에 이용 기능성 가금산물에 대한 핵심 고객은 127명(14.1%), 잠재 고객은 232명(25.8%), 무관심 고객은 541명(60.1%)명으로 분석되었다. 주요 소비층은 연령은 50세 이상, 거주지는 수도권 외 지역, 취업 여부는 전업주부 및 풀타임 취업, 월 평균 가구소득은 600만원 이상인 것으로 나타났다.

표 3-4-18. 누에 활용 기능성 가금산물의 소비층 분류

구분	전체		핵심고객			잠재고객			무관심 고객			
	사례수 (명)	비율 (%)	사례수 (명)	비율 (%)	전체 대비	사례수 (명)	비율 (%)	전체 대비	사례수 (명)	비율 (%)	전체 대비	
구분	900	100	127	14.1		232	25.8		541	60.1		
결혼여부 × 연령대	미혼 여성	152	16.8	20	15.5	-1.3	34	14.8	-2.1	98	18.1	-1.3
	25-39세 주부	204	22.7	16	12.7	-10	31	13.4	-9.3	157	29.0	-6.3
	40-49세 주부	274	30.4	33	25.8	-4.6	62	26.6	-3.9	179	33.1	-2.7
	50세 이상	270	30	58	46.0	16	105	45.2	15.2	107	19.8	10.2
거주지	서울	190	21.1	28	21.7	0.6	45	19.3	-1.8	117	21.6	-0.5
	인천, 경기	277	30.8	36	28.1	-2.7	70	29.9	-0.8	171	31.6	-0.8
	수도권 외	433	48.1	64	50.2	2.1	118	50.8	2.7	251	46.4	1.7
학력	고졸 이하	210	23.3	30	23.7	0.4	63	27.2	3.9	117	21.6	1.7
	대졸 이상	690	76.7	97	76.3	-0.4	169	72.8	-3.9	424	78.4	-1.7
취업여부	전업주부	329	36.6	43	33.9	-2.7	86	36.9	0.3	200	37.0	-0.4
	파트타임 취업	96	10.6	15	11.4	0.8	24	10.4	-0.4	57	10.5	0.1
	풀타임 취업	323	35.9	50	39.2	3.3	88	38	2.1	185	34.2	1.7
	기타 미혼자	152	16.9	20	15.5	-1.4	34	14.8	-2.1	98	18.1	-1.2
월 평균 가구소득	400만원 미만	304	33.8	41	31.9	-1.9	74	31.8	-1.9	189	34.9	-1.1
	4-600만원 미만	345	38.3	41	32.4	-5.9	88	37.7	-0.5	216	39.9	-1.6
	600만원 이상	252	27.9	45	35.7	7.8	70	30.4	2.4	137	25.3	2.6



그림 3-4-3. 누에 활용 기능성 가금산물의 예상 시장 규모 및 소비층

(마) 컨조인트 분석을 통한 가금산물 속성별 중요도

누에 활용 기능성 가금산물의 상품화 전략 수립을 위해 판매업체 브랜드 특성(대형업체/지역특화/중소업체), 인증제품 특성(친환경 무항생제/HACCP·ISO 인증/영양성분 강화), 기능성 성분 특성(녹차·인삼/누에/비타민EDHA) 등 속성별 중요도에 대한 컨조인트 분석을 실시한 결과는 그림 3-4-4 및 그림 3-4-5에 제시한 바와 같다. 3개의 속성을 조합하여 11가지의 제품에 대한 평가한 결과, 제품 6(7.35, 대형업체+HACCP·ISO 인증+녹차/인삼), 제품 4(7.28, 대형업체+친환경 무항생제+누에), 제품 9(7.20, 대형업체+영양성분 강화+비타민EDHA)에 대한 평가가 가장 높았다. 3가지 속성 중 판매업체 브랜드 특성이 69.7%로 가장 중요한 것으로 나타났으며, 인증제품 특성(19.6%), 기능성 성분 특성(10.7%) 순이었다. 속성 수준별 효용에 있어서는 판매업체 브랜드 중 대형업체 효용이 0.229로 가장 높았으며, 지역 특화, 중소기업체는 각각 -

0.044, -0.185로 낮은 효용도를 보였다. 소비자의 구입 고려 요인으로 유명업체(7~9위로) 낮은 순위를 보였으나, 가공산물을 구입시 가공산물의 신선도, 위생/안전 등의 여부를 정확히 판단하기 어렵기 때문에 생산판매업체에 대한 인지도가 실제적으로 작용한 것으로 판단되었다. 인증 및 제품 특성에 있어서는 친환경 무항생제 > 축산물 HACCP/ISO인증 > 영양성분 강화 순이었으며, 기능성 성분 특성은 녹차/인삼 > 비타민E/DHA > 누에으로 선호하는 것으로 나타났다. 또한 대표적인 기능성 식품 또는 성분으로 알려진 녹차, 인삼, 비타민, DHA에 비해 누에에 대한 선호도 및 인지도가 아직까지 낮은 것으로 조사되었다. 평균 펩타이드 강화 면역 유도 누에를 활용하여 친환경 무항생제의 이미지와 결부하여 상품화하는 것이 가장 효과적일 것으로 예상되었다.

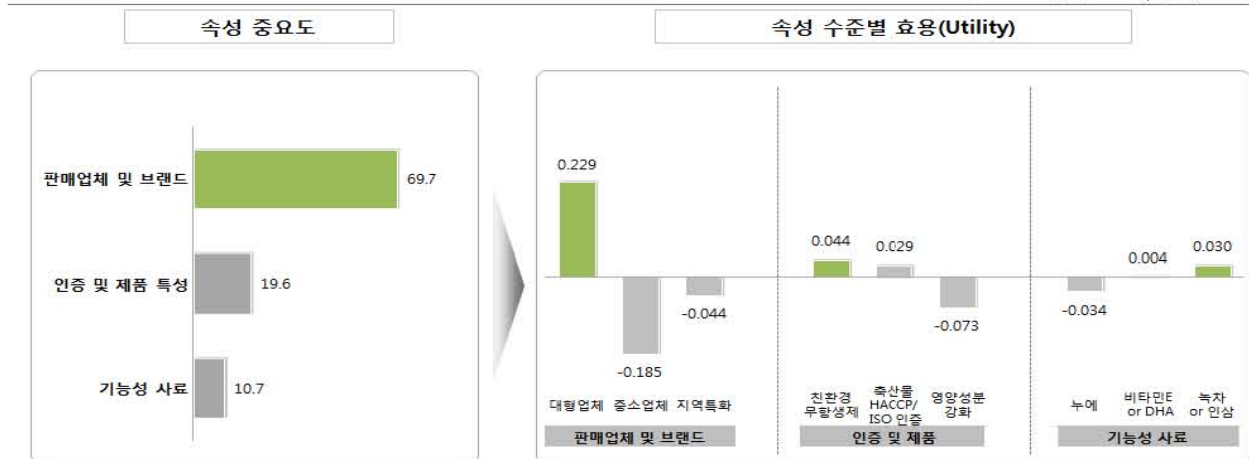
[Base : 전체 n=900, 단위 : %]



※ 컨조인트 분석의 효용 수준의 값은 평가 점수의 평균과 다름

그림 3-4-4. 컨조인트 분석을 통한 가공산물 제품별 선호도

[Base : 전체 n=900, 단위 : %]



* 컨조인트 모형 결정결과는 Pearson' s R 0.994(p<0.000), Kendall' s tau 1.000(p<0.000)으로 직교계획으로 추출된 프로파일 속성들이 적합한 것으로 나타남
 * Pearson' s R은 개별모형의 적합성을 나타내며, 추정된 모형으로부터 얻은 효용값에 의한 프로파일 서열과 응답자가 실제로 답변한 프로파일 점수와의 상관관계 값으로서, 이 값이 클수록 설명력이 높음

그림 3-4-5. 컨조인트 분석을 통한 가공산물 속성 중요도 및 효용 수준

(바) 누에 활용 기능성 가공산물 생산 및 브랜드화 전략

일반적으로 닭고기나 계란 구입 시 브랜드나 무항생제, 기능성에 대한 소비자들의 중요도는 상대적으로 낮은 수준이나, 건강, 환경문제 등의 이유로 고품질 기능성 가공산물에 대한 요구가

지속적으로 나타나고 있다. 반면 기능성 성분 강화, 친환경 무항생제 및 축산물 인증에 대한 소비자 인지도 및 신뢰도가 낮은 이유로 확고하게 시장을 확보한 제품은 적은 실정이다. 기존에 생산·판매되고 있는 기능성 축산물 및 누에 이용 건강보조식품에 비해 누에 이용 기능성 가금산물에 대한 높은 호감도와 구입 의향을 고려한다면, 누에의 효과 및 효능에 대한 정확한 정보를 전달하는 한편 소비자 신뢰를 확보한다면 시장에서 성공할 수 있는 요인은 충분히 있다고 판단되었다.

상품화 (Product) 전략

기본적으로 제품에 대한 신선도, 국(내)산 원산지, 위생/안전에 대한 믿음은 제공해야함
유명한 대형 브랜드 제품 (ex : 하림, 마니커, 농협 등) + 항생제를 사용하지 않은(무항생제) 친환경 제품을 사용

판매/유통 (Place) 전략

좋은 제품, 믿을 수 있는 제품을 판다는 인식이 있는 농축협마트에서 우선적으로 판매하는 것이 효과적이고, 이후 대형할인점, 기업형 슈퍼마켓으로 판매범위 확장 필요
백화점은 프리미엄 제품으로 인식시키기 위한 반드시 확보가 필요한 판매 채널임
'홍보효과'와 '매출상승'을 동시에 노릴 수 있는 홈쇼핑도 좋은 판매채널임

가격 (Price) 전략

프리미엄 제품이라는 인식 심어 준다면 10%정도의 수준에서 소비자들은 수용 가능성이 있음
백화점의 경우 15~20% 수준의 프리미엄 고가 전략을 사용하더라도 무난할 것으로 판단됨

홍보 (Promotion) 전략

프리미엄 제품으로 소비자에게 어필할 수 있는 전략적 접근이 필요함
누에에 대한 이미지, 인식 개선/전환을 위한 다각적인 마케팅 활동이 필요함
누에 및 기능성 가금산물에 대한 인식 전환을 위한 적극적 홍보 및 효능·효과의 과학적 입증

아. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제 산업화를 위한 경제성 분석

(1) 연구 목적

본 연구는 최종 개발된 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 실용화 및 산업화를 위해 육계, 산란계, 육용오리에 대한 경제성을 종합적으로 분석하였다.

(2) 연구 수행 방법

4년간의 육계, 산란계, 육용오리에 대한 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 사료 내 첨가 급여를 통해 얻어진 생산성 결과에 기초하여 생체중 및 사료소요량을 산출하였으며, 축산유통 종합정보센터, 한국농촌경제연구원, 한국물가협회, 한국오리협회 등에서 얻은 통계 자료를 기반으로 사료단가, 닭고기, 계란, 오리고기에 대한 산지·도매·소비자 가격을 산출하였다. 이외 기능성 브랜드 가금산물의 가격은 앞서 수행한 누에 활용 기능성 브랜드 가금산물에 대한 소비자 조사를 통해 얻어진 소비자 가격 수용도(닭고기 16.5%, 계란 19.2%, 오리고기 12.5%)로 산출하였다.

(3) 결과 및 고찰

누에 함유 사료첨가제 가격을 kg당 150,000만원을 적용하였을 때, 사료비 및 판매수익 증감은 표 3-4-19에 제시한 바와 같다. 사료 내 0.01% 첨가시 사료 kg당 15원, 0.05% 첨가시 75원이 추가되는 것으로 나타났다. 실제 가금용 배합사료 생산시 사료첨가제로 적용하기에 어려운 가격이었다. 그러나 경제적 수익 창출 주체를 ‘사료 생산 단가’가 아닌 ‘가금산물 판매 수익’으로 전환하거나, 누에 함유 사료첨가제를 일반 가금 산물보다 고가에 판매가 가능한 기능성 브랜드 가금산물 생산을 위해 이용한다면 산업적 적용이 가능할 것으로 판단되었다. 또한 현재 누에 생산 목적이 혈당 치료 등의 목적으로 기능성 건강식품 생산이 주를 이루고 있고, 안정적인 소비 시장이 확보되지 않아 누에 원물 구입 가격이 높은 측면이 있어, 사료 시장으로의 확대에 안정적인 소비처가 확보된다면 누에 생산 단가는 50~70% 이상 낮출 수 있을 것으로 분석되어 추후 실용화·산업화가 용이해질 것으로 사료되었다.

표 3-4-19. 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 경제성 분석

	육계			산란계			육용오리		
	무첨가	0.01%	0.05%	무첨가	0.01%	0.05%	무첨가	0.02%	0.06%
사료섭취량 ¹ (A, g)	1605.4	1504.0	1486.4	1192.6	1118.4	1118.8	4026.3	4211.8	4537.3
가금산물 생산									
사료단가 ² (B, 원/kg)	586.0	601.0	661.0	496.9	511.9	571.9	600.0	630.0	690.0
사료비 ³ (A x B, 원)	940.8	903.9	982.5	592.6	572.5	639.9	1255.7	1303.6	1382.7
사료비 증감	-	36.9↓	41.7↑	-	20.1↓	47.3↑	-	47.9↑	127.0↑
산지가격 적용 ⁴ (원)	-	191.1↑	263.0↑	-	-	-	-	26.0↑	90.0↑
가금산물 판매수익									
도매가격 적용 ⁵ (원)	-	234.0↑	322.1↑	-	-	-	-	29.0↑	101.0↑
소비자가격 적용 ⁶ (원)	-	534.4↑	735.6↑	-	19.8↓	46.4↓	-	89.0↑	311.0↑
기능성 브랜드 적용⁷(원)	-	2430.5↑	2664.9↑	-	322↑	322↑	-	3511.0↑	3761.0↑

¹ 사료섭취량 : 육계/오리 생체중 1kg 생산을 위해 필요한 사료량; 산란계, 계란 10개(60g 기준) 1kg 생산을 위해 필요한 사료량.
² 사료단가 : 배합사료가격(축산유통종합정보센터/한국오리협회) + 누에 함유 사료첨가제 첨가 비용(kg당 150,000원 적용).
³ 사료비 : 육계/오리 생체중 1kg 생산을 위해 필요한 사료비; 계란 10개(60g 기준) 1kg 생산을 위해 필요한 사료비.
⁴ 산지가격 : 육계/오리 생체중 1kg 기준, 산란계 계란 10개 기준(한국농촌경제연구원, 2015년 기준).
⁵ 도매가격 : 육계/오리 지육량 1kg 기준, 산란계 계란 10개 기준(한국물가협회/축산유통종합정보센터/한국오리협회, 2015년 기준).
⁶ 소비자가격 : 육계/오리 지육량 1kg 기준, 산란계 계란 10개 기준(한국물가협회/축산유통종합정보센터/한국오리협회, 2015년 기준).
⁷ 기능성 브랜드 : 소비자가격 x 설문조사를 통해 얻은 소비자 가격 수용도(닭 16.5%, 계란 19.2%, 오리고기 12.5%).

4. 천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발(제2협동)

가. 누에 면역유도 간이장치 개발 및 면역유도 누에 이용 최적 제형화 조건 구명

(1) 누에의 항생펩타이드 생산 유도를 위한 장치 개발(누에 비활성화)

(가) 누에 주사액 주입 시 편리장치(고전압)

본 연구는 살아있는 누에에 주사액을 주입하기 위한 전처리 과정으로서 누에를 비활성화시킨다. 누에의 비활성화는 누에에게 주사액을 주입시키기 편리하도록 누에의 움직임을 둔화시키는 과정이다.

이에 시간과 생산성을 높이기 위하여 순간 미소전류와 고전압을 누에에 가하여 비활성화될 수 있는지 시험(그림 1-3)을 하였다. 일반적으로 약 1kv 이상의 고전압이 필요한 경우 코일로 된 변압기를 사용하였다.

○ High-Volt 변환장치(SPEC)

- Size : 158(가로)*92(세로)*87(높이)mm
- 입력 전원 : AC 220V, 60Hz, 0.5A
- 출력 사양 : AC 고전압 출력형
- 전압 : AC 1V-8 KV±10%(변화 가능)
- 주파수 : 60Hz
- 파형 : Sine-wave
- 전류 : (최대) 10mA
- 출력선 : 고압 출력용 Wire(2개), 흑색 각각 25±2cm
Alarm signal용 Wire(2개), 녹색 각각 25±2cm
- VR1 : Alarm 신호 반응시간 조절(0.5초~10초 범위내 조절 가능)

○ 회로 구성

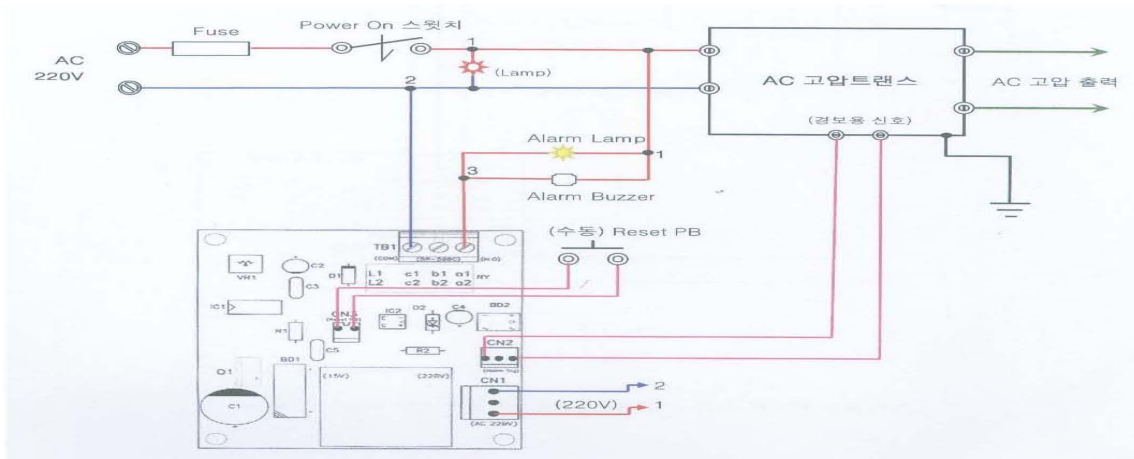


그림 1-1.

AC 고압출력(최대 8KV) 발생함으로 시험 시 주의가 요구되므로 고압출력측에서 단선, 과전류 등 문제가 발생할시 Alam lamp on과 동시에 Buzzer 울리도록 설계되었다. 입력 전원 (AC 220V, 60Hz, 0.5A)따라 비례적으로 AC 고압 출력이 변화(AC 1V-8 KV±10%) 하고 출력 부하측에 흐르는 전류는 미소 전류(최대 10mA미만)만 흐리게 설계(그림1-1)하였다.

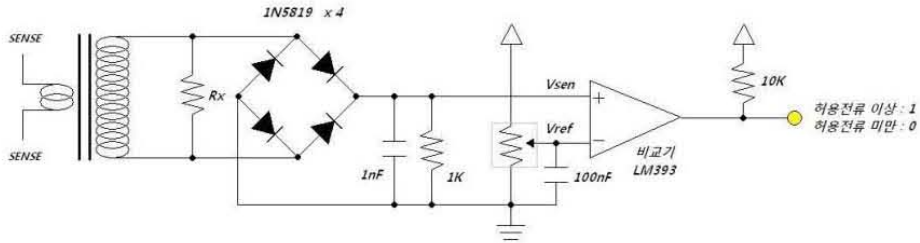


그림 1-2.

위와(그림1-2)같이 CT(링코일)에 의해 sense에 흐르는 전류는 권선비에 따라 변류가 된다. 그리고 변류된 전류는 저항 Rx에 의해 전압으로 바뀌고, 교류신호임으로 브릿지다이오드를 통과하여 직류로 바꾸어주고 비교기를 통하여 그 직류로 변화된 전압을 기준전압과 비교하여 과전류를 검출한다.

sense에 흐르는 전류를 I_x 라 하면 $V_{sen} = (I_x / X_{Tun}) * R_x * \sqrt{2} - 0.4$, (0.4는 다이오드드롭전압), 즉 $(I_x / X_{Tun}) * R_x * \sqrt{2} - 0.4 \geq V_{ref}$ 일때 비교기에서 1을 출력하고 이를 회로에 연결하여 1일 때 회로가 멈추도록 설계되었다.

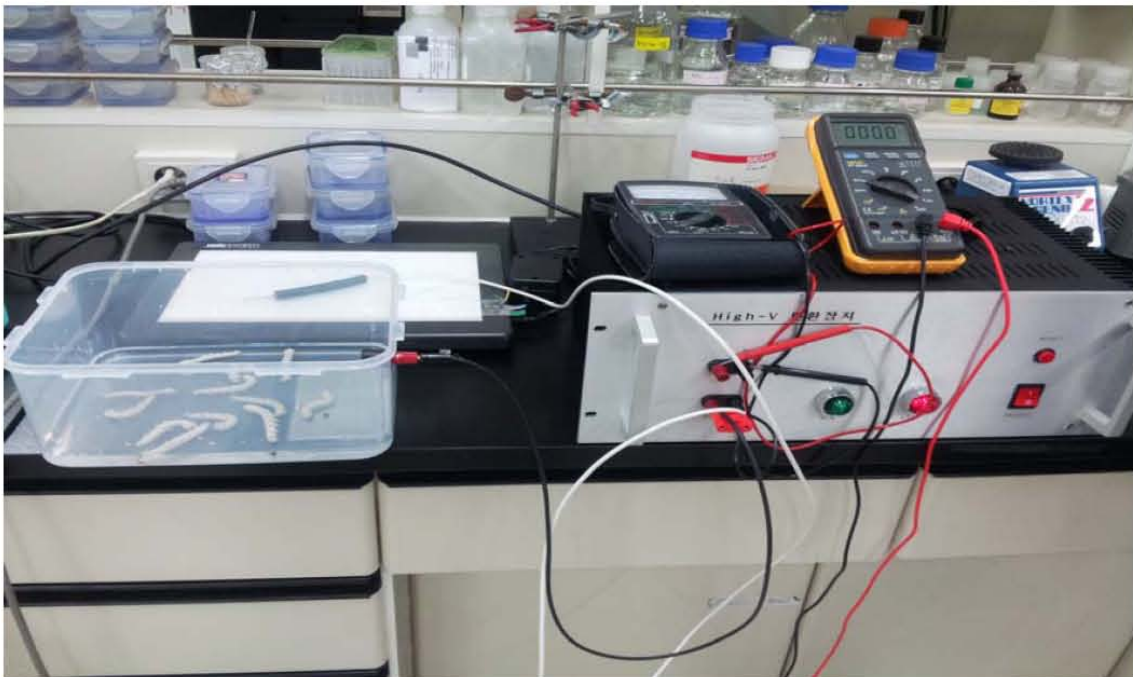


그림 1-3. 전기를 이용한 누에 비활성화(Knock down)

○ 누에 비활성화 test 결과 (표 1-1)

번호	간격별(극과극)		누에 변화상태	이유
	공급전압(V) 전류10mA 미만	극과의거리 (Cm)		
1	100	5	없음	1. 누에에 전압 공급 시 누에양단에 전위차가 있어 미소의 전류와 고압이 필요한데 물속 양단의 경우는 전위차 미소하므로 누에는 전기반응을 얻을 수 없었다. 2. 누에 양 끝에 전기를 직접 공급할시 과전류 과전압으로 인하여 누에는 터짐 현상이 발생 했다. 참고 : 공급전압별 및 극과의 거리 설정기준은 전류와 전압 그리고 거리를 다양하게 설정하여 시험을 하였다.
		15		
		25		
2	500	5		
		15		
		25		
3	1,000	5		
		15		
		25		
4	3,000	5		
		15		
		25		
5	5,000	5		
		15		
		25		
6	7,000	5		
		15		
		25		

표 1-1.

(나) 누에 주사액 주입 시 편리 방법(물)

살아있는 누에에 주사액을 주입하기 위한 전처리 과정(그림 1-4, 표 1-2)으로서 누에를 비활성화 시킨다. 누에의 비활성화는 누에에게 주사액을 주입시키기 편리하도록 누에의 움직임을 둔화시키는 과정이다. 누에의 비활성화 수단은 누에의 움직임을 둔화시키는데 사용되는 차가운 물, 얼음, 냉장고 등이 될 수 있다. 그러나 이러한 방법은 누에의 움직임이 둔화되는 상태까지 상당한 시간이 소요되는 단점이 있다.



그림 1-4. (전 처리과정)

온도	잠수시간 (비활성화에 걸리는 시간)	누에 (마리)	비고
0℃(얼음포함)	1분	20	비활성화 용액(물)의 온도가 낮을수록 비활성화 시간이 단축되는 경향을 나타내었으며, 20℃이상의 온도에서는 유의차가 나타내지 않았다.
5℃	1분 12초	20	
10℃	1분 30초	20	
15℃	1분 47초	20	
20℃	2분 28초	20	
25℃	2분 34초	20	

표 1-2.

(2) 누에 생체 내 천연항생제 유도장치 개발

누에의 체강에 유도액을 투입하는 자동화장치를 개발하기 전에 유도액 투입을 위한 간이장치(1차)를 설계(그림2-1), 제작(그림2-2, 2-3)하였다. 간이장치는 누에의 몸체를 고정하는 방법 및 유도액의 주입부의 위치설정을 미리 설정하고 이를 자동화장치에 적용하기 위하여 제작하였으며, 제작 후 그 효율성 여부를 시험하였다.

(가) 1차 유도장치 개발

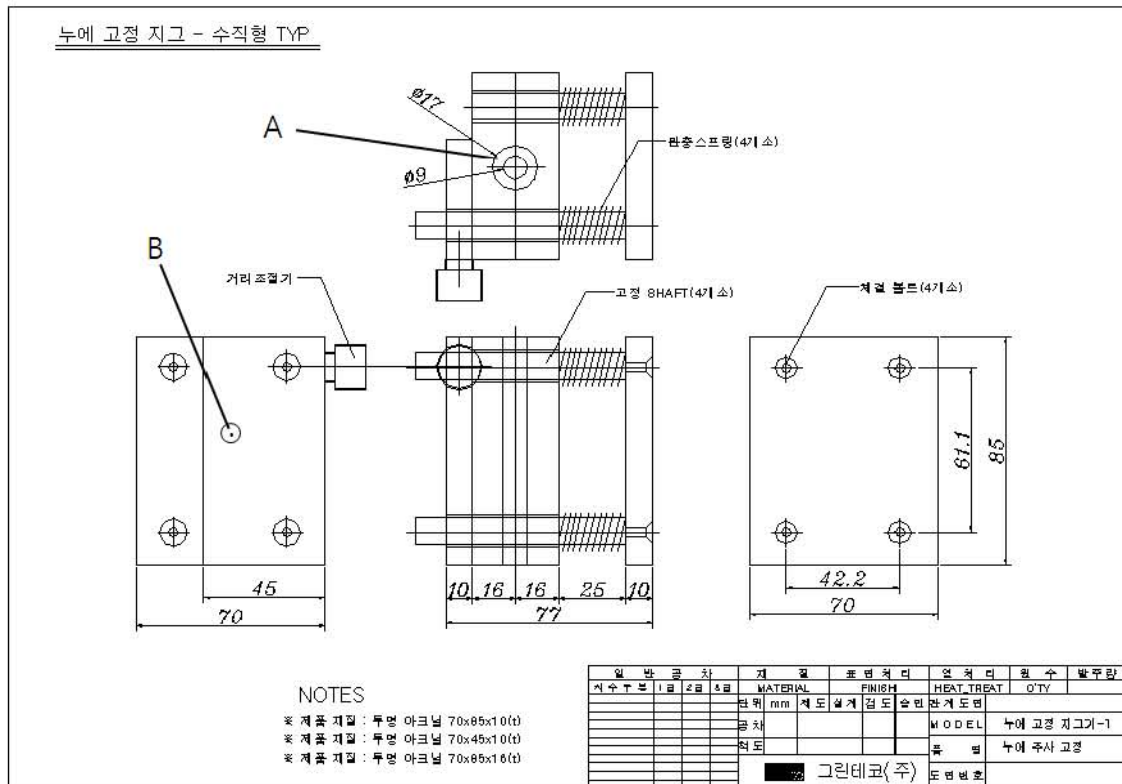


그림 2-1.



그림 2-2. 1차 간이장치 모델 누에 투입

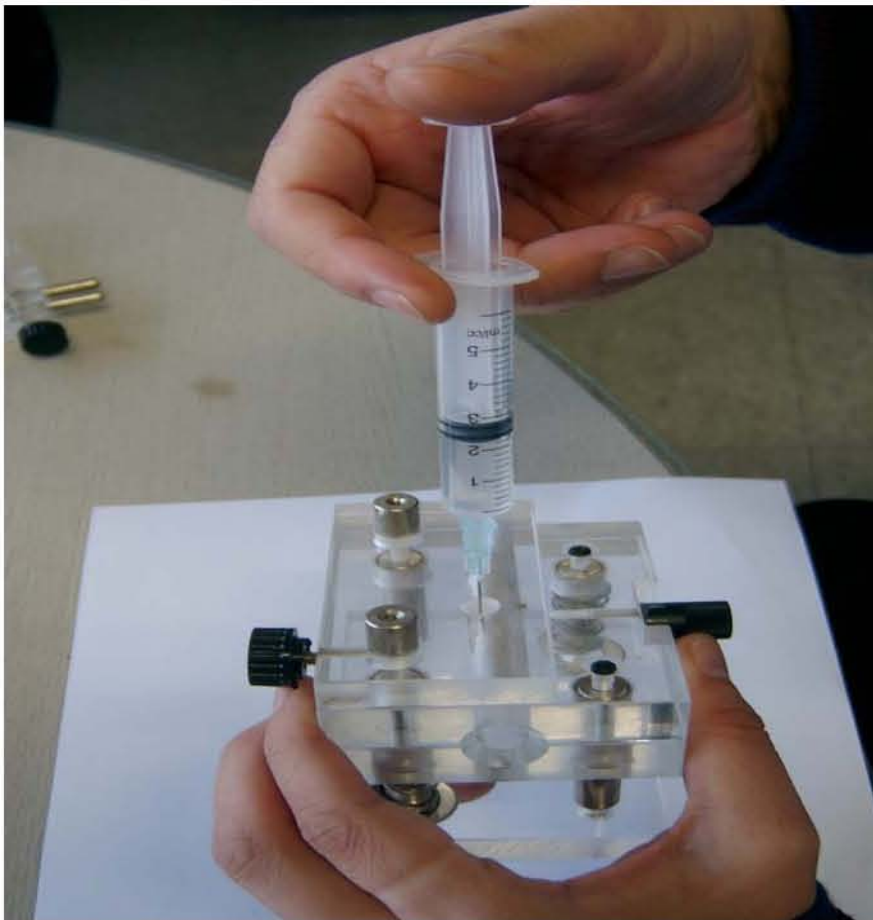


그림 2-3. 1차 간이장치 모델 누에 체강 내 유도액 투입

○ 장치 재질 : 투명 아크릴 70*85*10(t)

○ 유도장치 사용 방법

- 누에 고정부(A)에 유도액 주입을 위한 비활성화 된 누에를 투입한 후, 완충스프링 (스프링 2개, 지지대 2개)으로 누에의 몸체를 고정한 후, 유도액 주입구(B)를 통해 유도액을 주입시킨다.

○ 문제점

- 고정 프레스 안에 누에를 고정하는 과정이 너무 번거로움
- 누에 몸체 크기별 고정압력의 조절이 어려운 문제점 발생
- 유도액 주사주입을 마친 누에의 교체가 용이하지 않은 문제 발생

(나) 2차 유도장치 개발

유도액 투입을 위한 간이장치(2차)로써 1차 간이장치로부터 발생된 문제점을 보완하고자, 누에의 몸체를 고정하는 방법 및 유도액의 주입부의 위치를 변경하여 유도액 주사의 시간을 단축하고, 용이성을 높여 이를 자동화장치에 적용코자 간이장치(2차)를 설계(그림2-4)하고 이를 제작(그림2-5, 2-6)하여 그 효율성 여부를 시험하였다.

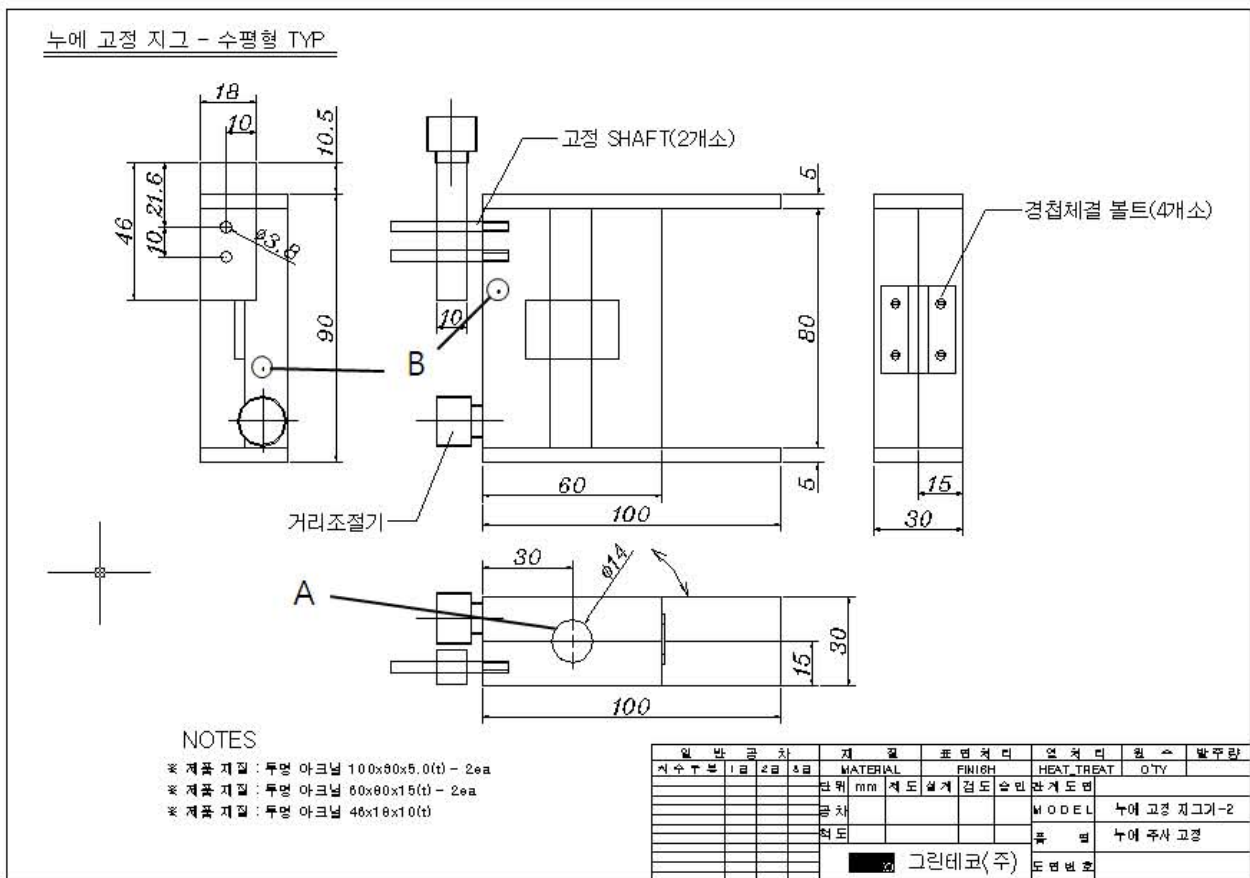


그림 2-4.



그림 2-5. 2차 간이장치 모델 누에 투입



그림 2-6. 2차 간이장치 모델 누에 체강 내 유도액 투입

○ 장치 재질 : 투명 아크릴 100*85*10(t)

- 유도장치 사용 방법
 - 누에 고정부(A)에 유도액 주입을 위한 비활성화 된 누에를 투입한 후, 고정프레스부로 누에의 몸체를 고정한 후, 유도액 주입구(B)를 통해 유도액을 주입시킨다.
- 1차 간이모델 개선점
 - 고정 프레스 안에 누에를 고정하는 과정이 용이해짐
 - 유도액 주사주입을 마친 누에의 교체가 용이해짐
- 문제점
 - 누에 몸체 크기별 고정압력의 조절이 어려움

(다) 3차 유도장치 개발

- 누에 함생웬타이드 유도장치 설계 및 디자인(그림2-7, 표2-1)

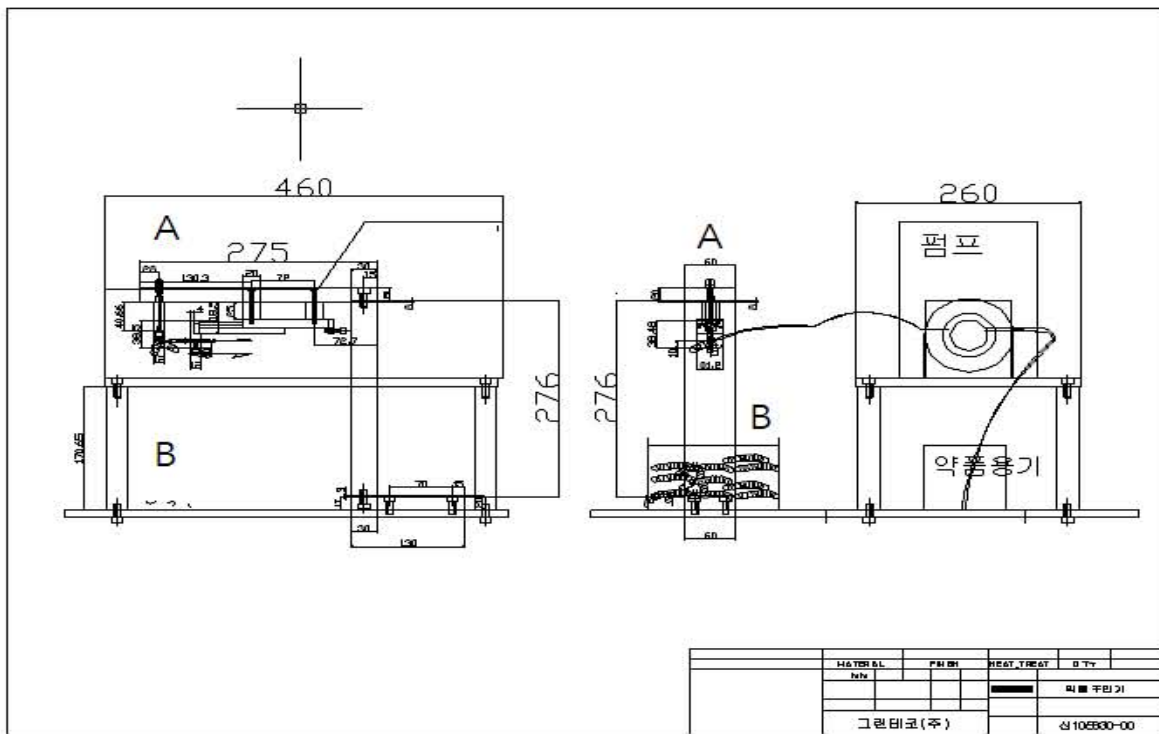


그림 2-7.

내 용	규 격
Volume	0.01~9.99L
Speed	0.1~100rpm
Copy number	0~9999
Pause time	0.1s~99.9min
Back suction time	0~99.9s
External control	0-10V, 0-5V, 4-20mA
Communication	RS485
Power	AC90-260V
dimensions(펌프)	292*185*180
Flow rate	0.25 μ l~48ml/min(per channel)

표 2-1.

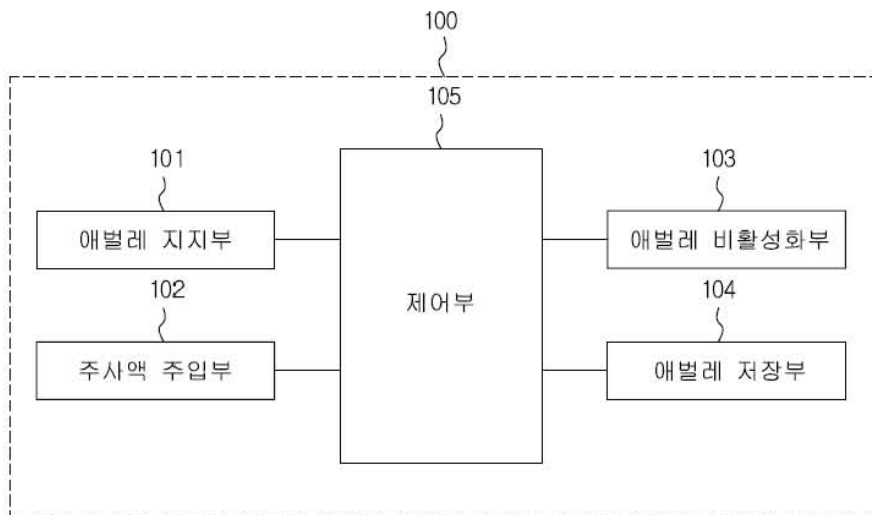


그림 2-8.

○ 누에 항생펩타이드 유도장치의 구성은 누에 지지부, 유도액 주입부, 누에비활성화부, 누에 저장부, 제어부(그림2-8)로 구성되어 있다.

○ 누에 지지부는 유도액이 주입될 누에가 부착되는 부분이다. 누에 지지부는 유도액 주입부가 누에의 체강에 유도액을 주입하기 위해서 누에를 특정 위치에 고정시킨다.

○ 누에 지지부는 누에의 몸체를 지지할 수 있는 구조로서, 유도액 주입부가 위치한 반대 방향에 유도액 주입부의 푸쉬에 의한 누에의 이동을 차단하는 차단 수단이 마련되어 누에를

고정시키거나 또는 진공 펌프로 누에를 흡착하여 결합함으로써 누에를 특정 위치에 고정시킬 수도 있다.

○ 유도액 주입부는 누에 지지부에 놓인 누에의 체강에 유도액을 주입하는 수단으로서, 유도액을 내부에 수용하는 주사기가 될 수 있으며, 이 경우 누에 지지부에 놓인 누에의 체강에 유도액을 주입할 수 있다.

○ 누에 비활성화부는 누에에게 유도액을 주입시키기 편리하도록 누에를 비활성화하는 수단이다(Knock down). 차가운 물을 담은 수조가 설치되며, 누에 비활성화부에서 움직임이 둔화된 누에는 누에지지부에 수월하게 지지될 수 있다.

○ 누에 저장부는 유도액 주입부에 의해 체강에 유도액의 주입처리가 완료된 누에를 보관하는 장소이다. 누에는 주입이 완료되면 진공펌프의 공기압이 차단되어 이 누에 저장부로 낙하하여 보관된다.

○ 제어부는 누에 지지부, 유도액 주입부, 누에 비활성화부, 누에 저장부가 연동하면서 자신의 고유한 기능을 수행하도록 각 기능부를 제어한다.

○ 누에 항생펩타이드 유도장치 모식도

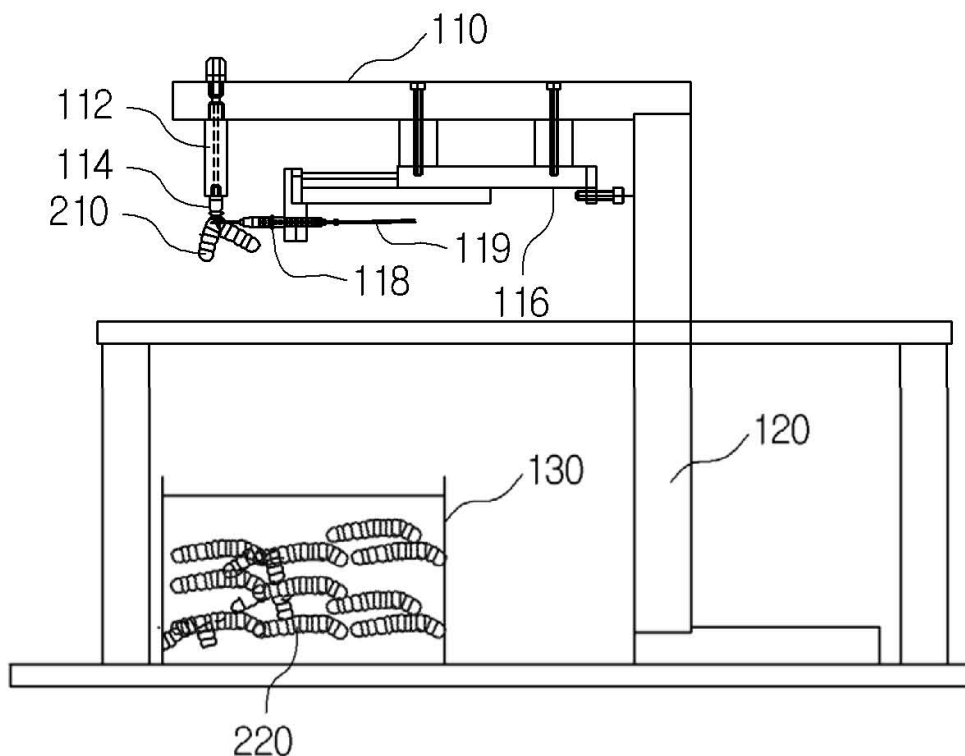


그림 2-9.

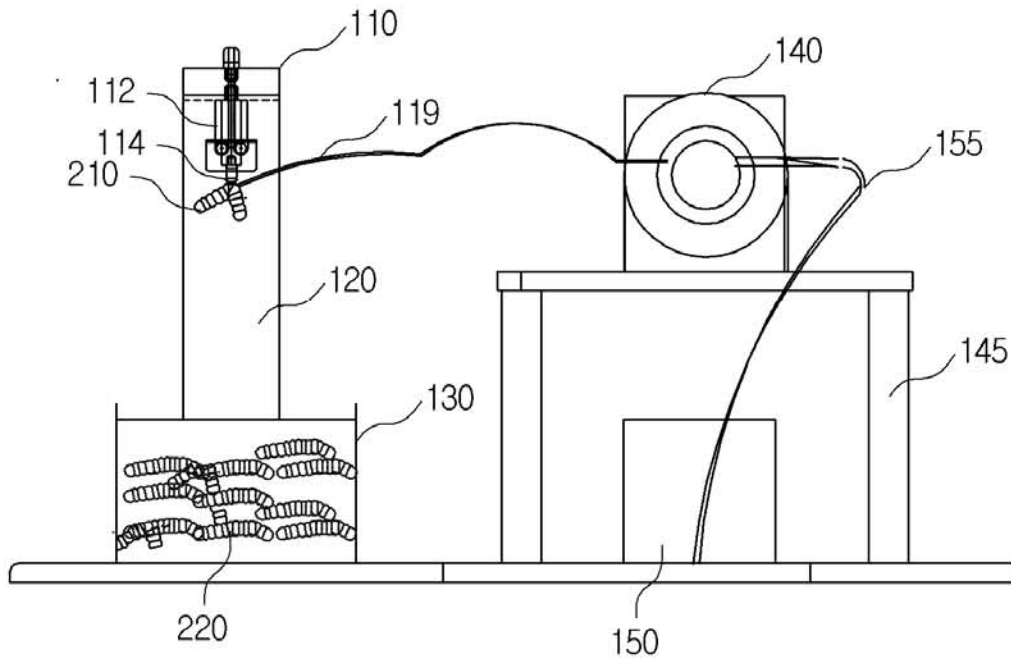


그림 2-10.

○ 그림 2-9과 그림 2-10는 각각 본 연구개발의 누에의 체강에 유도액을 주입하는 장치의 측면도와 정면도이다. 그림 2-9과 그림 2-10를 참조하면, 상부프레임(110), 흡착부 지지대(112), 누에 흡착부(114), 실린더부(116), 시린지부(118), 유도액 유입관(119), 하부 프레임(120), 누에 저장부(130), 유도액 펌핑부(140), 펌핑부 지지대(145), 유도액 저장부(150), 유도액 유출관(155), 처리 중 누에(210), 처리 후 누에(220)가 도시된다.

○ 본 연구는 공기를 펌핑하여 누에를 지지하고, 실린더 형상에 주사기를 결합하여 누에의 체강에 자동으로 유도액을 주입하는 장치를 개발하였다.

○ 그림 3-8을 참조하면, 유도액 주입 장치(100)는 프레임으로 몸체가 형성되며, 구체적으로, 지면과 평행한 상부 프레임(110), 상부 프레임(110)을 지지하는 하부 프레임(120)이 몸체를 형성한다.

○ 흡착부 지지대(112)는 상부 프레임(110)의 일측에 결합하여 흡착 펌핑부(미도시)와 기능적으로 결합한다.

○ 흡착 펌핑부는 누에가 누에 흡착부(114)에 흡착되도록 누에 흡착부(114)의 공기를 펌핑한다. 즉, 흡착 펌핑부는 공기를 누에 흡착부(114) 내부로 빨아들여서 누에가 누에 흡착부(114)에 결합한다.

○ 누에 흡착부(114)는 일단이 흡착부 지지대(112)와 결합하고, 타단이 누에와 결합하며 공기 흡입이 가능하도록 내부에 통공이 형성된다.

○ 실린더부(116)는 일단에 시린지부(118)와 결합하는 내부 피스톤이 왕복 운동하여 누에흡착부(114)에 결합된 누에 배면부체강(2-11)에 유도액이 주입되도록 한다.



그림 2-11. 누에 해부사진

○ 실린더부(116)의 작동 방식은 수동 또는 자동으로 정해질 수 있다. 전자의 경우, 시린지부(118)를 누에 방향으로 밀어내는 푸쉬 버튼을 구비하여 사용자가 해당 푸쉬 버튼을 누르는 경우 실린더부(116)가 작동하여 시린지부(118)가 미리 정해진 길이만큼 누에에게 이동하고 유도액을 주입한 후 다시 뒤로 돌아와서 초기 상태로 정지할 수 있다.

○ 누에 저장부(130)는 누에 흡착부(114)의 하방에 위치하며, 누에 흡착부(114)에 결합한 처리 중 누에(210)는 유도액 주입 처리가 완료된 후 누에 저장부(130)로 낙하하여 처리 후 누에(220)로서 보관된다.

○ 흡착 펌핑부는 시린지부(118)의 주사 바늘이 누에에서 나올 때 공기의 펌핑이 중단된다. 즉, 누에에 유도액 주입이 완료된 경우 해당 누에를 누에 흡착부(114)에서 떼어 내어 누에 저장부(130)에 넣기 위해서 흡착 펌핑부는 누에 흡착이 중단된다. 이 경우 제어부(105)는 실린더부(116)의 초기 상태로 회복하는 시점에 흡착 펌핑부를 제어하여 펌핑 동작을 정지시킨다. 또한, 흡착 펌핑부는 펌핑동작 정지 후 바로 다시 펌핑 동작을 재개한다.

○ 그림 3-9를 참조하면, 누에에게 유도액을 주입하기 위해서 유도액 펌핑부(140)가 사용된다. 예를들면, 유도액 펌핑부(140)는 시린지부(118)와 유도액 유입관(119)으로 연결되며, 시린지부(118)가 누에에 주사 바늘을 꽂을 때 주사액이 시린지부(118)에 펌핑된다. 이 경우 유도액 펌핑부(140)는 펌핑부 지지대(145)에 의해 지지되며, 유도액 저장부(150)와 유도액 유출관(155)에 의해 연결되어 유도액 저장부(150)에 저장된 유도액을 시린지부(118)에 펌핑할 수 있다. 시린지부(118)에 한 번에 펌핑되는 유도액의 양 및 시린지부(118)가 누에에 한번에 주입하는 유도액의 양은 최적의 양으로 미리 제어부를 통해 설정된다.

○ 유도액 펌핑부(140)와 흡착 펌핑부는 동일한 펌프로 구현되며, 펌핑 시 연결되는 연결관, 예를 들면, 유도액 유입관(119) 또는 누에 흡착부(114)에 연결되는 흡착 펌핑관에 의해 그 기능이 세분화되어 구현될 수도 있다.

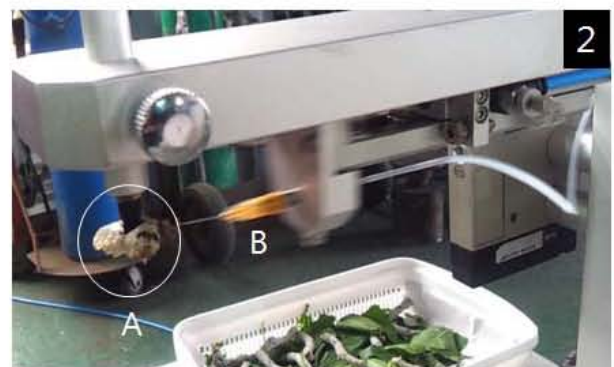
○ 항생펩타이드 유도장치는 유도액이 주입될 누에가 놓이는 누에 지지부 및 지지부에 놓인 누에의 체강에 유도액(유도액)을 주입하는 유도액 주입부(주사장치)가 제공된다.

○ 누에 지지부는, 누에의 표피와 결합하는 누에의 흡착부 및 누에가 흡착부에 흡착 되도록 공기를 펌핑하는 흡착 펌핑부로 이루어져 있다. 또한, 흡착 펌핑부는 실린더부의 주사 바늘이 누에의 체강에서 나오는 경우 공기의 펌핑을 중단할 수 있도록 설계되었다.

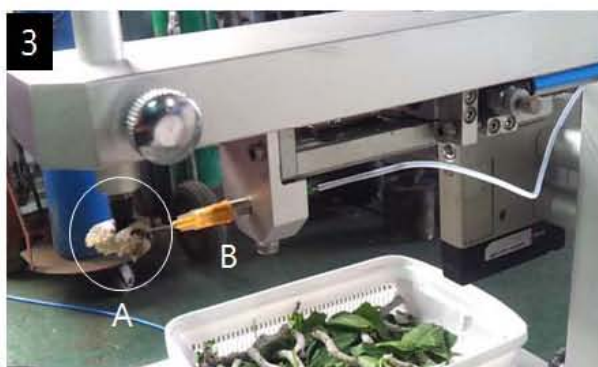
○ 유도액 주입부는, 내부 피스톤이 왕복 운동을 하는 실린더부 및 실린더부에 결합하며, 누에에 주사 바늘이 결합하고 체강내에 유도액이 수용되어 유도액을 주입하는 실린더부로 이루어져 있다.



1. 누에 흡착부(A)에 부착된 누에와 투입 전 주사부(B)



2. 유도액 주입을 위해 이동하는 주사부



3. 흡착부(A)에 부착된 누에에 유도액을 주입하는 주사부(B)



4. 유도액 주입 후 흡착부에서 낙하되는 누에(C)와 주입을 끝낸 주사부(B)

그림 2-12.

○ 비활성화된 누에를 흡착부(A)에 수동으로 부착한 후, 제어부에 있는 주사작동버튼을 사용하여 초당 10~100mm/sec의 속도로 이동(속도 조절가능)시켜 배면부제강 내 유도액을 주입하고, 흡입펌프가 자동으로 공기압을 떨어뜨려 유도액이 주입된 누에를 낙하시킨다.(그림2-12)

○ 누에의 소화관은 후장부분으로 갈수로 가늘어짐으로 흡착부에 누에를 결합할 시, 누에의 후장부분의 체벽을 결합시켜 배면부 제강에 유도액을 주입하여 소화관내에 유도액이 투입되는 것을 방지할 수 있다.

○ 향후 기술 개발 방향은 면역유도누에의 대량 생산을 위해 흡착부와 주사부를 여러 개(다채널)로 설치하고, 수동으로 이루어진 누에흡착작업은 흡착부를 비활성누에 보관 장소로 이송시켜 누에를 흡착시키는 등의 방법이 장치에 적용 될 수 있다.

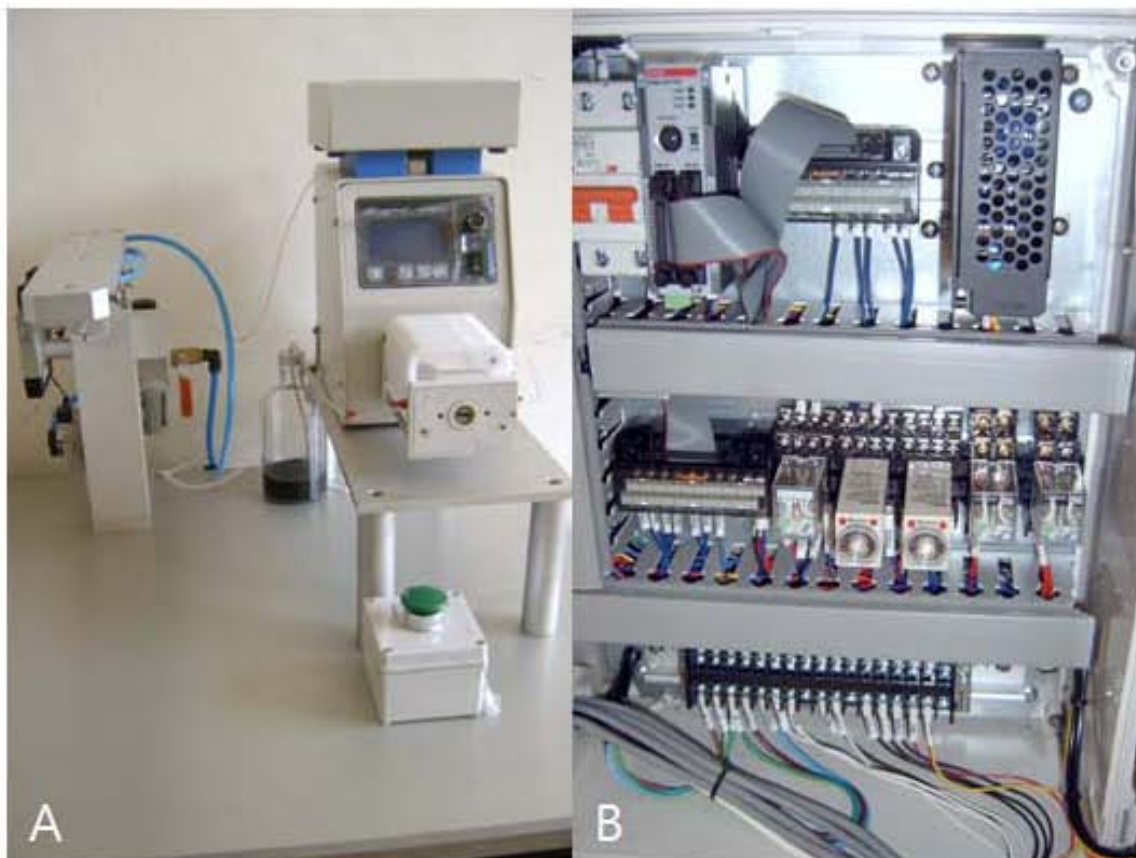


그림 2-13. 방생젼타이드 유도장치 제어부 및 주사부(A)와 제어부 내부(B)

(3) 대량 유도장치 개발내용

○ 그림3-1은 누에 애벌레에 주사액을 주입하는 장치의 블록 구성도이다. 이 구성도에서는 주사액 주입 장치(100)는 애벌레 지지부(101), 애벌레 이동부(102), 주사액 주입부(103), 애벌레 분리부(104), 애벌레 비활성화부(105), 애벌레 저장부(106), 제어부(107)로 구성되었다.

○ 이 장치는 천연 항생제를 대량으로 생산하기 위하여 항생제로 사용될 수 있는 애벌레에 면역유도 물질을 주입하는 특징을 가지고 있으며, 항균물질을 포함하는 기능성 애벌레, 예를 들면, 누에를 사료 첨가제로 활용하기 위하여, 누에 애벌레에 면역유도 물질을 주입하는 기능을 제공했다.

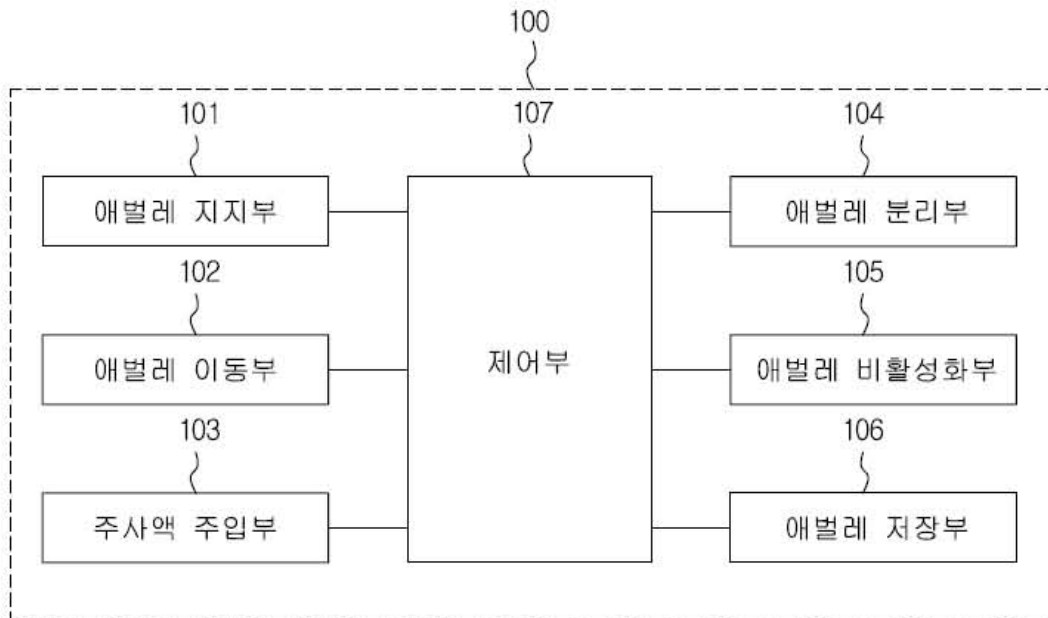


그림 3-1. 누에 면역유도장치 구성도

○ 애벌레 지지부(101)는 주사액이 주입될 애벌레가 놓이는 부분이다. 애벌레 지지부(101)는 후술할 주사액 주입부(103)가 애벌레에 주사액을 주입하기 위해서 애벌레를 특정 위치에 고정시켰다.

애벌레 지지부(101)는 애벌레를 평면 형상의 지지대 위에 놓고, 주사액 주입부(103)가 위치한 반대 방향에 주사액 주입부(102)의 푸쉬에 의한 애벌레의 이동을 차단하는 차단 수단이 마련되어 애벌레를 고정시킨다.

○ 애벌레 지지부(101)에는 애벌레가 삽입되는 소정의 홈이 형성된다. 이 경우 애벌레 지지부(101)의 개수는 복수가 되며, 각각의 애벌레 지지부(101)에 애벌레가 한 마리씩 삽입하였다. 애벌레 이동부(102)는 애벌레 지지부(101)를 소정의 방향으로 이동시킨다. 예를 들면, 애벌레 지지부(101)는 상술한 바와같이 각각의 유닛에 홈이 형성되고, 각 유닛이 형성하는 전체형상은 체인 또는 캐터필러 형상이 되며, 애벌레 이동부(102)는 애벌레 지지부(101)를 회전시킨다.

주사액 주입부(103)는 애벌레 지지부(101)에 놓인 애벌레에 주사액을 주입하였다. 주사액 주입부(103)는 주사액을 내부에 수용하는 주사기를 포함한다. 주사액 주입부(103)는 애벌레 지지부(101)에 놓인 애벌레의 특정 부분에 주사액을 주입하였다. 예를 들면, 주사액 주입부(103)는 애벌레의 배면부 체강에 주사액을 주입하였다.

그림3-2를 참조하면, 표피를 벗긴 누에 애벌레가 핀에 꽂힌 상태이다. 아래 그림의 (a)는 소화기관인 내장(410)이 애벌레 체강(420)의 등 부위에 위치한 상태를 나타내며, (b)는 내장(410)을 애벌레 체강(420)의 등 부위에서 벗겨낸 상태를 도시한다. 정상적인 상태에서 내장(410)은 애벌레의 등 부위에 위치하므로, 주사 바늘은 애벌레의 배면부에서 내장(410) 위치의 아래 부분, 즉, 애벌레의 밑면인 배면부와 그로부터 전체 몸통 두께의 80%가 되는 체강(420)에 삽입되어 주사액을 주입한다.

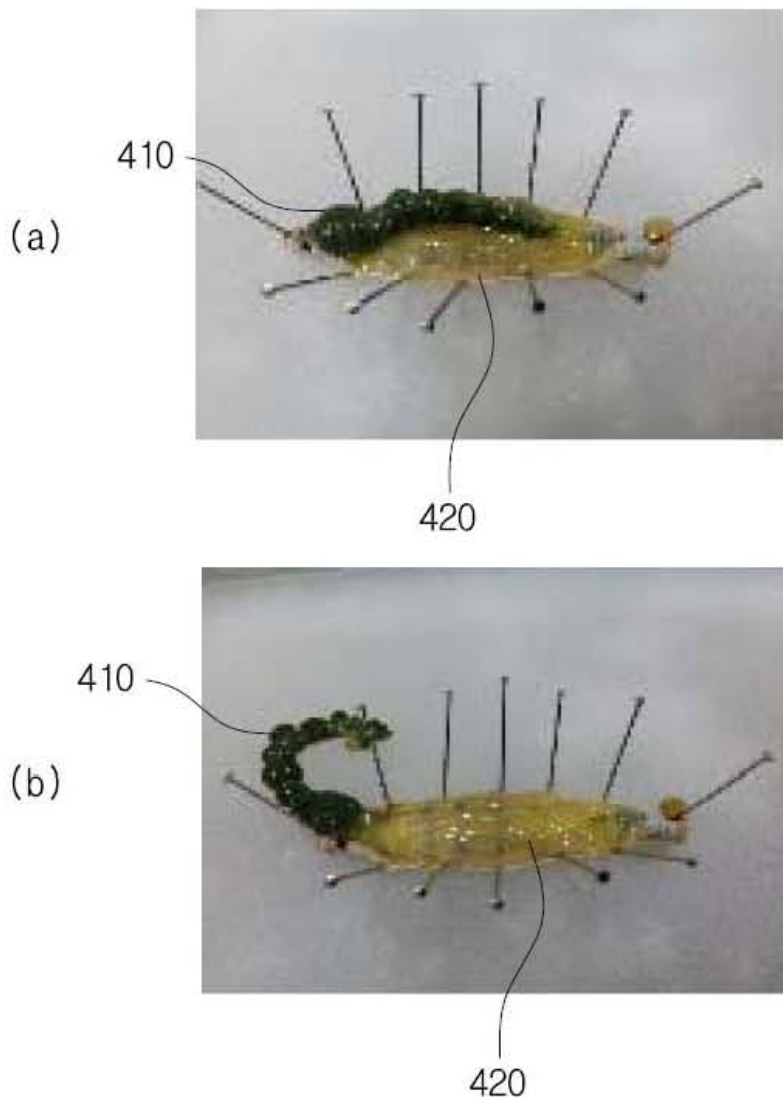


그림 3-2. 누에 해부사진

○ 주사액은 면역 유도 물질을 포함한다. 면역 유도 물질은 생체에 독성이 없으면서 면역 능력을 조절하는 효과를 가지는 물질이 될 수 있다. 예를 들면, 면역 유도 물질은 생체반응조절물질(BRM : Biological Response Modifier)이 되며, 구체적으로, AHCC(Active Hexose Correlated Compound), Polysaccharides, Polysaccharide peptides, Nucleosides, Triterpenoids 등이었고, 이외에도 다양한 물질이 면역 유도 물질로서 본 장치에 적용되었다.

○ 애벌레 분리부(104)는 주사액이 주입된 애벌레를 애벌레 지지부(101)로부터 분리시킨다. 애벌레 분리부(104)는 애벌레를 상기 흡의 연장 방향으로 밀어서 애벌레 지지부(101)로부터 분리시키거나, 상기 흡의 상면을 중력이 향하는 방향으로 변경하여 애벌레를 중력방향으로 떨어뜨림으로써 애벌레 지지부(101)로부터 분리시키는 등 다양한 방식을 이용하였다.

○ 예를 들면, 애벌레 분리부(104)는 애벌레와 결합하는 애벌레 흡착부 및 애벌레가 애벌레 흡착부에 흡착되도록 애벌레 흡착부의 공기를 펌핑하는 흡착 펌핑부를 포함했다. 이것은 공기 펌핑에 의한 흡착력을 이용함으로써, 다양한 위치 및 방향에서 애벌레를 애벌레 지지부(101)로부터 분리시킨다.

여기서, 흡착 펌핑부는 애벌레 흡착부가 애벌레와 결합되어 애벌레를 애벌레 지지부(101)로부터 분리시키는 경우 공기의 펌핑을 중단하여 애벌레를 애벌레 흡착부로부터 이탈시킨다. 이후 애벌레는 후술할 애벌레 저장부(106)에 낙하하여 저장된다.

○ 애벌레 비활성화부(105)는 애벌레를 애벌레 지지부(101)에 놓기 전에 애벌레에게 주사액을 주입시키기 편리하도록 애벌레를 비활성화하는 수단이다. 예를 들면, 애벌레 비활성화부(105)는 차가운 물을 담은 수조 또는 얼음, 냉장고, 마취제 등이 되었고, 애벌레는 차가운 물에 담기는 경우 비활성화되므로, 애벌레 지지부(101)는 움직임이 둔한 애벌레를 수월하게 지지 하였다.

○ 애벌레 저장부(106)는 주사액 주입부(103)에 의해 주사액이 주입되어, 주입 처리가 완료된 애벌레를 보관하는 수단이다. 예를 들면, 애벌레 저장부(106)는 애벌레를 담은 용기가 되었으며, 애벌레 지지부(101)로부터 이탈한 애벌레가 애벌레 저장부(106)로 이동하여 보관된다.

○ 여기서, 애벌레가 애벌레 저장부(106)로 이동하는 방법은 다양하게 구현될 수 있으며, 예를 들면, 애벌레 지지부(101)가 상술한 바와 같이 애벌레를 평면 형상의 지지대 위에 놓는 구조로 형성된 경우 해당 평면이 기울어지거나 측면으로 이동하여 애벌레가 아래 방향으로 떨어지게 함으로서 애벌레를 애벌레 저장부(106)로 이동시키거나 애벌레 지지부(101)가 진공 펌프로 애벌레를 흡착하여 지지하는 경우 진공 펌프의 작동이 정지하여 애벌레를 직하 방향으로 낙하시킴으로써 애벌레 저장부(106)로 이동시켰다.

○ 애벌레 저장부(106)는 애벌레 분리부(104)의 하방에 위치할 수 있으며, 애벌레는 주사액 주입 처리가 완료된 후 애벌레 저장부(130)로 낙하하여 처리 후 애벌레로서 보관되었다.

○ 여기서, 애벌레 비활성화부(103)에 놓인 애벌레는 특정 푸쉬 수단에 의해 하나씩 상술한

에벌레 지지부(101)에 놓인다. 예를 들면, 푸쉬 수단은 관 형상에 에벌레가 일렬로 수용된 상태에서 에벌레 지지부(101) 방향으로 에벌레를 한 마리씩 밀어서 이동시켰다.

○ 제어부(107)는 상술한 에벌레 지지부(101), 에벌레 이동부(102), 주사액 주입부(103), 에벌레 분리부(104), 에벌레 비활성화부(105), 에벌레 저장부(106)가 서로 연동하면서 자신의 고유한 기능을 수행하도록 각 기능부를 제어했다.

○ 측면도와 평면도를 참조하면, 에벌레 지지부(111), 에벌레 이동부(112), 주사액 주입부(113), 에벌레 분리부(114), 장치 지지부(121), 에벌레(220)가 도시된다. 복수의 에벌레 지지부(111)가 캐터펄러 형상으로 결합하며, 에벌레 이동부(112)에 의해 회전함으로써, 에벌레 지지부(111)에 결합한 에벌레(220)를 소정의 방향으로 이동시킨다. 장치 지지부(121)는 에벌레 지지부(111) 및 에벌레 이동부(112)를 포함한 전체 장치를 지지한다.

○ 주사액 주입부(113)는 에벌레 지지부(111)의 상측면에 위치하며, 주사액 주입부(113)의 전방에 위치한 에벌레에 주사액을 주입하였다.

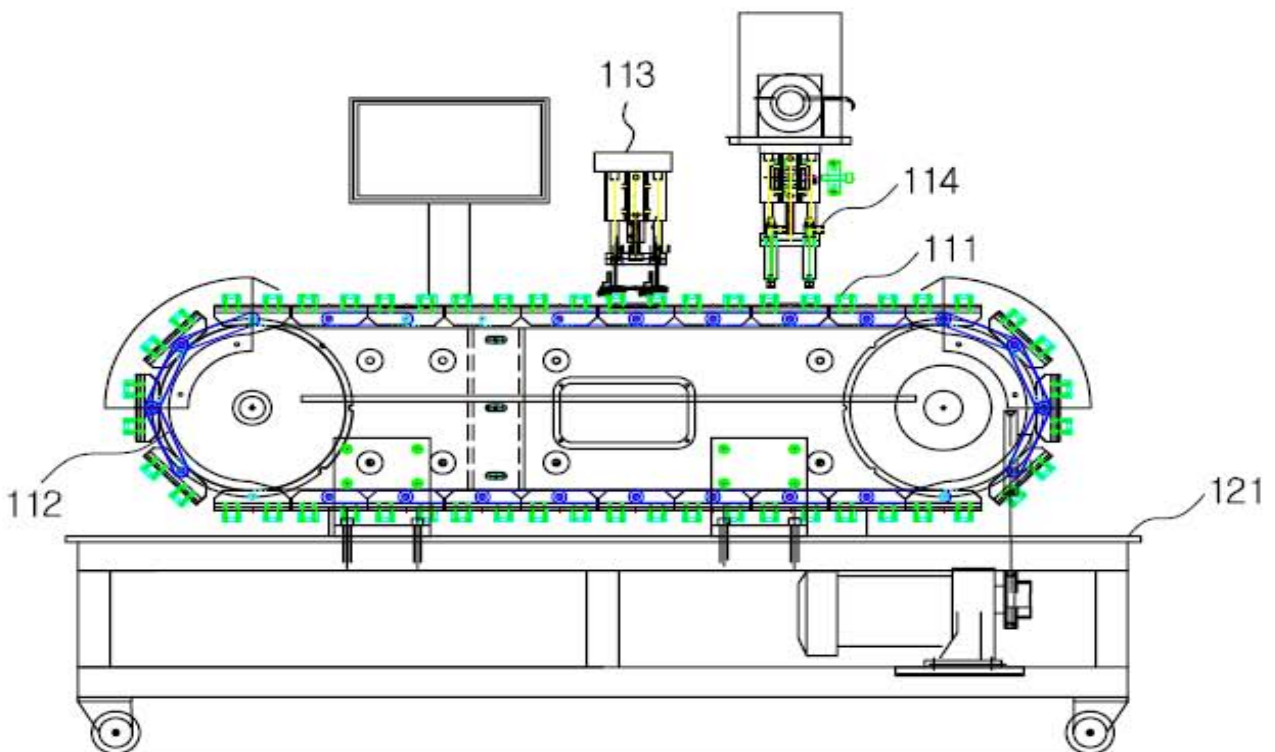


그림 3-3. 누에 번역유도장치 측면도

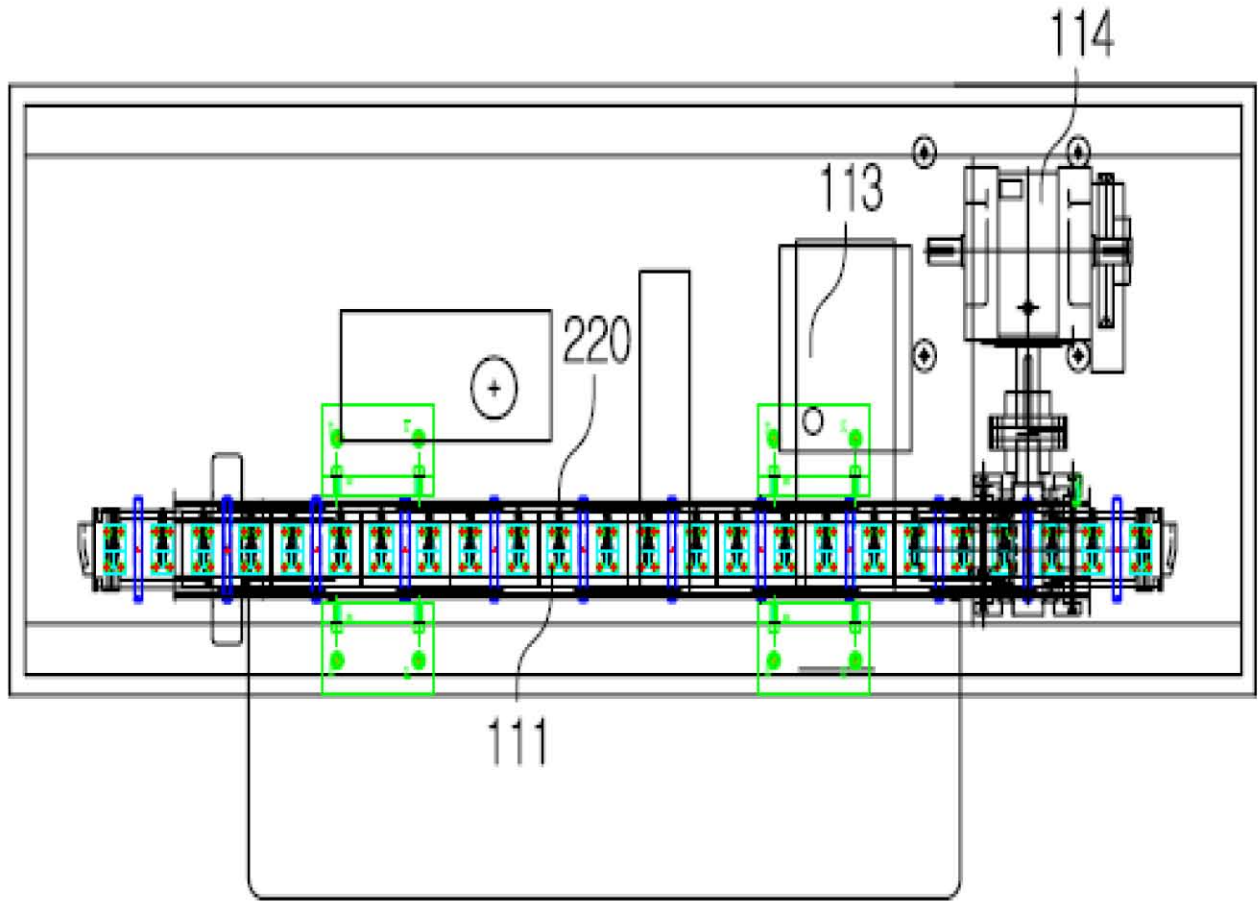


그림 3-4. 누에 면역유도장치 평면도

○ 여기서, 애벌레 이동부(112)가 이동하는 방향과 주사액 주입부(113)가 애벌레에 주사액을 주입하는 방향은 서로 다른 방향이 된다. 예를 들면, 애벌레는 애벌레 지지부(111)에 병렬로 지지되어 측방향으로 이동되며, 주사액 주입부(113)는 애벌레가 연장 방향을 향하여 주사액을 주입하였다.

○ 애벌레 분리부(114)는 주사액이 주입된 애벌레를 애벌레 지지부(111)로부터 이탈시켜서 상술한 바와 같이 애벌레 저장부(106)에 저장시켰다.

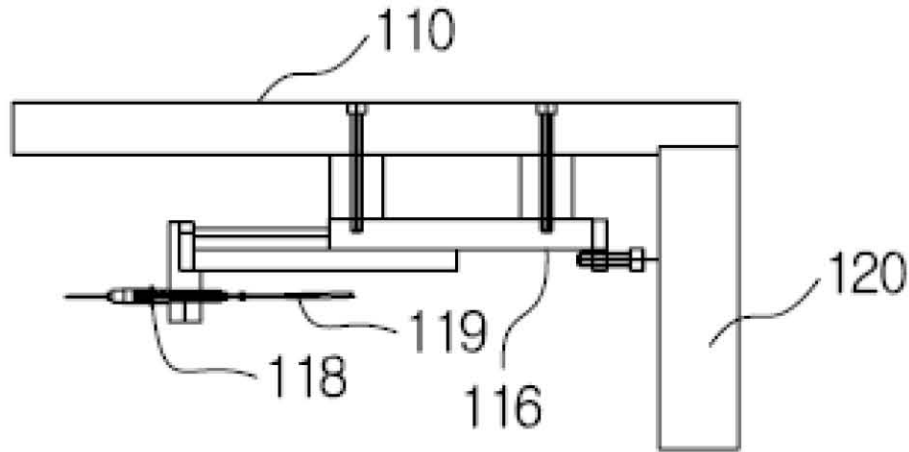


그림 3-5. 눈에 면역유도장치 유도액 주입부

○ 그림 3-5는 눈에 애벌레에 주사액을 주입하는 장치 중 주사액 주입부의 측면도이다. 이에 따라 상부 프레임(110), 실린더부(116), 시린지부(118), 주사액 유입관(119), 하부 프레임(120)이다.

○ 주사액 주입부(113)는 프레임으로 몸체가 형성되며, 구체적으로 지면과 평행한 상부 프레임(110), 상부 프레임(110)을 지지하는 하부 프레임(120)이 몸체를 형성한다.

○ 애벌레는 상술한 배면부가 애벌레 지지부(111)에 견고하게 결합한다. 이 경우 주사 바늘은 애벌레의 체강 부분을 찢어서 상술한 바와 같이 배면부 체강에 주사액이 주입되도록 하였다.

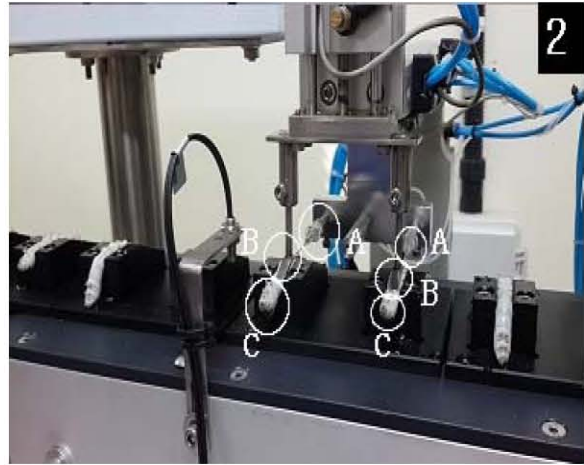
○ 실린더부(116)는 일단에 시린지부(118)와 결합하는 내부 피스톤이 왕복 운동하여 애벌레 흡착부(114)에 결합된 애벌레에 주사액이 주입되도록 한다. 실린더부(116)의 길이 및 시린지부(118)의 푸쉬 길이 등은 애벌레에 주사액이 주입될 수 있는 정도로 되어있다.

○ 실린더부(116)의 작동 방식은 수동 또는 자동으로 정해진다. 예를 들면, 시린지부(118)를 애벌레 방향으로 밀어내는 푸쉬 버튼을 구비하여 사용자가 해당 푸쉬 버튼을 누르는 경우 실린더부(116)가 작동하여 시린지부(118)가 미리 정해진 길이만큼 애벌레에게 이동하고 주사액을 주입한 후 다시 뒤로 돌아와서 초기 상태로 정지한다.

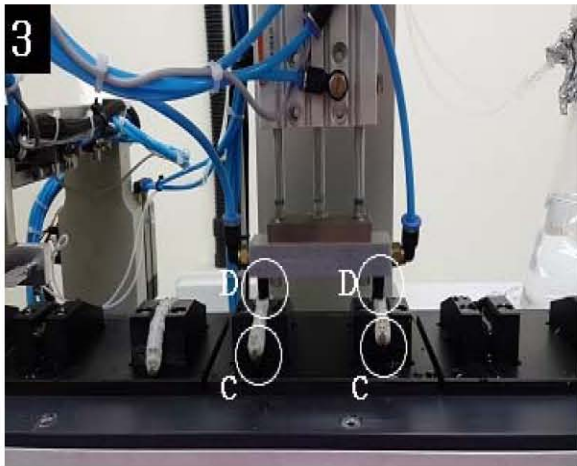
○ 시린지부(118)는 실린더부(116)의 일측에 결합하며, 일단에 주사 바늘이 결합하고 몸체에 주사액이 수용되어 애벌레에 주사액을 주입한다. 이때, 체강 내에 주입되는 면역유도액의 양은 50~60 μ l를 주입하며, 그 양의 조절이 가능하다.



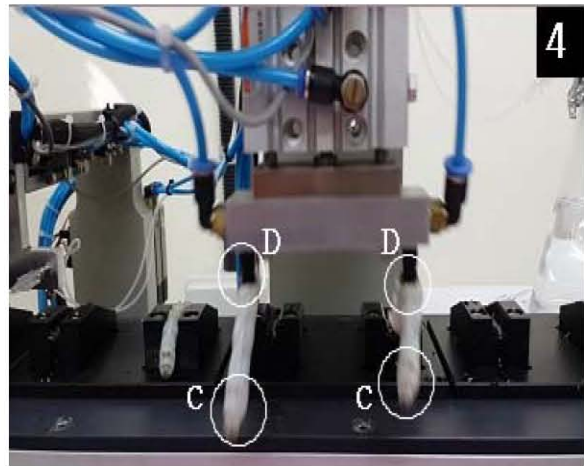
1 유도액 주입 시린지부(A), 누에 고정을 위한 고정부(B) 및 지지부에 부착된 누에(C)에 면역유도액 주입을 준비하는 단계



2 시린지(A)가 고정된 누에(C) 체강 내에 면역유도액을 주입하는 단계



3 유도액이 주입된 누에(C)를 흡착부(D)를 이용해 저장부로의 이동을 준비하는 단계



4 흡착된 누에(C)를 저장부로 낙하하는 단계

그림 3-6. 면역유도장치 유도액 주입 및 저장부 이동



그림 3-7. 대량 누에 자동 면역유도 장치

나. 항생펩타이드 함유 누에고치 최적 제형화 조건 구명

(1) 누에고치의 분말화를 위한 가수분해 조건 규명

(가) 실크 피브로인의 분리 및 정제

○ 본 연구에 사용한 실크 피브로인은 가잠(*Bombyx mori*)을 상업으로 사육하여 얻은 누에고치를 정련하여 사용하였으며, 실크 피브로인의 분리는 다음의 방법을 이용하였다. 먼저, 세리신을 제거하기 위하여 고치 내에 남아있는 번데기를 제거하였고 물 1ℓ와 탄산나트륨 0.5g을 혼합한 용액에 누에고치 40g을 넣어 100℃에서 1시간 동안 처리 하였다. 그 후, 적당량의 물로 3회 정도 수세를 하여 건조를 하면 수용성의 세리신이 용해되어 나간다. 이때의 감소 무게는 30.6g (약 25% 감소)이었다. 수세 후 자연 건조시켜 순수한 피브로인 단백질을 얻었다.

(나) 실크 펩타이드의 제조

○ 상기 과정에서 얻은 피브로인 30.6g을 기준으로 하여, 25%의 염산 수용액 820ml를 첨가하여 110℃에서 12시간 가수분해를 실시하였다. 여기에 4M 가성소다 수용액으로 pH 5.0-5.5로 조절하였다. 이어, 종이 여과에 의한 잔유물을 제거한 후 활성탄으로 충전된 필터를 통과시킨 다음 전기 투석 장치 내의 샘플조에 1,000 ml를 넣어 15 V, 20 mA의 전압 및 전류가 자동으로 조절되는 장치를 이용하여 전기 탈염을 실시하였다. 그런 다음, 스프레이 드라이어에 의하여 분말을 제조하였다.

(2) 누에고치로부터 세리신 정제법 개발

○ 본 발명에 관계되는 비가수분해물로서의 세리신은 누에고치 또는 생사에서 일반적으로 행하여지는 추출방법으로 얻을 수 있다. 예를 들면 이와 같이 순도 90% 이상의 고정제도(高情制度)의 단일 단백질의 상태에서 추출된다. 즉 누에고치 또는 생사에 포함되는 세리신을 물로서 추출하고, 예를 들면 후술하는 ①, ② 또는 ③과 같은 방법으로 세리신을 얻는다. 또한 본 발명에 관계되는 세리신의 가수분해 물은 누에고치 또는 생사에서 일반적으로 행하여지는 추출방법으로 얻을 수 있다. 예를 들면 다음과 같이하여 순도 90% 이상의 고정제도의 단백질(펩티드)의 상태로 추출될 수 있다.

즉 누에고치 또는 생사에 포함되는 세리신을 산, 알칼리 또는 효소에 의하여 가수분해하여 추출하여서, 예를 들면 ①, ② 또는 ③과 같은 방법으로 세리신의 가수분해 물을 얻는다.

- ① 세리신 수용액을 유기산 또는 무기산에 의하여 pH 3~5로 조정한 후 유기응집제 또는 무기응집제를 첨가하여 세리신을 석출시켜, 여과 건조하여 고체의 세리신을 얻는다.
- ② 세리신 수용액을 메탄올, 에탄올, 디옥산 등의 수용액 용매와 혼합하여 세리신을 석출시킨 후, 여과, 건조하여 고체의 세리신을 얻는다.
- ③ 세리신 수용액 중 투석막을 투과한 물질을 제거한 후 투석막(透析膜)을 투과하지 않은 물질을 건조하는 것에 의하여 세리신 고체를 얻는다.

상술과 같이 얻어진 비가수분해물 또는 가수분해물로서의 세리신은 항산화제 또는 티로시나제 활성 저해제로서의 사용 의도에 따라서 그대로 고체, 또는 용매에 용해하

여, 가장 적합하기로는 물에 적당량을 용해하여 수용액 등으로 적당한 형태로 사용할 수가 있다.

용도로서는 화장품, 식품, 식품첨가물, 외용약, 의약 부외품, 의약품등에 종래의 항산화제로서 티로시나제 활성 저해제와 같이 이용 가능하다.

예를 들면 화장품, 식품첨가물, 외용약, 의약 부외품등에 있어서 세리신의 첨가량은 통상 0.1~50중량% 에서 0.5~5중량% 정도가 적당하다.

식품에 있어서 세리신의 첨가량은 통상 0.1~100중량%, 종기로서는 0.5~50중량% 정도이다. 세리신은 독성이 없고 또한 수용성에도 우수하므로 다량첨가 내지 섭취하여도 특별한 문제는 일어나지 않는다. 화장품이나 외용약에 있어서 제형(劑型)으로서는 크림, 유액, 파운데이션, 팩, 로션, 겔상, 용액상, 스틱상등이 있다. 또한 이들은 적이의 성분, 예를 들면 유제(油劑), 보습제, 증점제, 방부제, 유화제, 안료, pH 조정제, 다른 약효성분, 자외선흡수제, 향료 등을 배합할 수 있다. 또한 의약품으로서 경구 투여할 수도 있다. 이 경우의 투여량도 특히 제한되지 않으며 예를 들면 10mg~100g/일 정도가 투여된다.

(가) 세리신의 분리 및 정제-방법1

○ 생사로서 되는 견직물 1kg를 물 50ℓ 중에 95℃에서 2시간 처리하고 세리신을 추출하였다. 얻어진 추출액을 평균공경 0.2μm의 필터로 여과하고, 응집물을 제거한 후 여액을 역침투막에 의하여 탈염하고, 농도 0.2%의 무색투명한 세리신 수용액을 얻었다. 이 수용액을 에바포레이터를 사용하여 세리신 농도 약 2%까지 농축한 후, 동결 건조를 행하여 순도 95% 이상 평균분자량 100,000의 세리신 분체(이하 세리신H) 100g를 얻었다.

(나) 세리신의 분리 및 정제-방법2

○ 생사로서 되는 견직물 1kg를 0.2% 탄산나트륨수(pH 11~12) 50ℓ 중에서 95℃에서 2시간 처리하고, 세리신 가수분해물을 추출하였다. 얻어진 추출액을 평균공경 0.2μm의 필터로 여과하여, 응집물을 제거한 후 여액을 역침투막에 의하여 탈염하고, 농도 0.2%의 무색투명한 세리신 가수분해물 추출액을 얻었다. 이 추출액을 에바포레이터를 사용하여 세리신 농도 약 2%까지 농축한 후 동결건조를 행하여 순도 90%이상, 평균분자량 20,000의 세리신 가수분해물 분체(이하 세리신L) 100g를 얻었다.

(표 설명) 실험에 사용된 다양한 protease

Enzyme	Source	Opt. Temp. (°C)	Opt. pH
Protamax	<i>Bacillus</i> sp.	35~60	5.5~7.5
Flavouzyme	<i>Aspillus</i> sp.	45~50	5.0~7.0
Acalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	50	8.3
Neutrase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	45~55	5.5~7.5
Collupulin	<i>Carica papaya</i>	50~70	5.0~7.0
Ficin	<i>Ficus carica</i>	45~55	5.0~8.0
Pancreatin	Porcine pancreas	35~40	6.0~8.0

(3) 추출물의 항균활성 검정

- 방사선 확산 분석법(RDA)을 통하여 병원성 대장균(E. coli ML35)에 대한 항균활성 분석
- 항균활성 비교 분석: 병원균 생육억제를 나타내는 Inhibition zone의 크기로 비교 분석

다. 면역유도 누에의 분말화 방법 구명

(1) 1차분말로 축과원 시험으로 자료조사 및 유도누에시험조건 구축

- 항생펩타이드 생산누에 및 일반 누에 건조하여 축과원(제1협동) 및 농진청 잠사과(제2세부) 제공
- 농진청 잠사과와 그린테크(주) 연구개발팀이 경남 농업기술원 잠업시험장을 방문하여 누에(금옥잠) 체강에 직접 유도액(그림4-1)을 주사하는 작업을 시행하였다. 냉동보관(경남 잠업시험장)된 유도누에와 일반누에를 그린테크(주)에서 수거하여, 공주잠업협동조합과 협의하여 80℃의 온도로 24시간동안 열풍 건조하여 농진청과 축과원(1차 협동)에 누에분말을 제공하였다.



그림 4-1. 누에 체강 내 유도액 투입

○ 정상누에

- 열풍건조 5kg(공주 건조)→건조분말500g (축과원 제1협동 측에 제공)
- 동결건조 5kg(진홍청 건조)→건조분말500g

○ 유도누에

- 열풍건조 전체누에(공주 건조)→건조분말500g(축과원 제1협동 측에 제공)
- 동결건조 5kg(진홍청 건조)→건조분말500g

(2) 2차분말로 자료조사 및 유도누에시험조건 구축

○ 유도누에

- 온도별(60℃, 70℃, 80℃, 90℃) 열풍건조 및 마이크로웨이브를 이용한 유도누에 건조분말(그린테코 건조) 각각 200g 축과원(제1협동, 김동욱 박사)제공
- 제공한 건조분말 일반성분 분석
- 온도별(60℃, 70℃, 80℃, 90℃) 열풍건조 및 마이크로웨이브를 이용한 유도누에 건조분말(그린테코 건조) 각각 10g 농과원(제2세부, 김성렬 박사)제공
- 제공한 건조분말은 항균펩타이드 성분 분석

라. 부형제의 의미와 종류 등 정보수집

(1) 부형제(carrier, 浮衡劑)의 정의

어떤 미량원료를 사료에 균일하게 첨가하기 위하여 예비 배합하는데 쓰이는 물질. 미량원료 입자는 부형제에 흡착 또는 피복되어 이동하게 됨. 따라서 이상적인 부형제는 미량원료 분말을 잘 흡착할 수 있어야 하며 입도는 20~80 mesh(590~177 micron)가 이상적임. 많이 쓰이는 부형제로는 말분, 석회석, 분쇄옥수수속대, 옥수수글루텐피드, 대두 mill run 등이 있음.

유형	부형물질
전분류	옥수수전분, 소맥전분, 전분, 변성식용전분, α-전분, 텍스트린
박류	주정박, 대두박, 대두분말, 대두유박, 볶은 콩가루, 주정박용액
글루텐류	소맥글루텐, 활성글루텐, 글루텐밀
곡류가공품류	밀가루, 말분
강피류	미강, 탈지강, 밀기울, 대두피
섬유질류	옥수수대분말, 옥수수열매속대분말, 사탕무우박, 사탕수수박, 콘킴필
당류	포도당, 유당, 백당, 유청류, 말토스
지방류	식물유, 동물유, 경화유, 고급불포화지방산, 지방산, 글리세린, 유동 파라핀
어분류	탈지어분, 백육어분
효모류	맥주효모, 토블라효모, 빵효모, 효모배양물
규산 및 규소류	무수규산 및 그 염류, 경질무수규산, 규산칼슘, 함수2산화규소, 함수무결정산화규소, 규산
광물질류	인산1수소칼슘, 제2인산칼슘, 인산3칼슘, 인산칼슘, 인산2수소칼슘, 탄산칼슘, 스테아린산칼슘
광석류	버미큘라이트, 규조토, 탈크, 카오린, 멘토나이트, 제오라이트, 세피오라이트, 맥반석, 에타폴자이트, 몬모릴로나이트
기타	레시틴, 설탕, 카라멜, 탈지분유, 백단, 감자펄프, 표고버섯성장목분말, 정제수

표 3-1.

(2) 부형제의 선택 기준

- 용해도가 높을수록 고품질
- 흡습성이 크면 저장 안정성에 부정적인 영향을 미침

종류	적용 회수
탄산칼슘	3
말분	4
왕겨분	1
이산화규소	2
제오라이트	2
유당	4
포도당	3
실리카	1
황산제일철	1
탈지강	1
바이오세라믹	1

표 3-2.

- 부형제의 실제(표3-1, 3-2) 사용례 : 10 case // 모두 양계용 동물약품임

(가) 누에 분말시 적용

- 광물질류 : 탄산칼슘
- 곡류가공품류 : 말분
- 당류 : 유당 or 포도당
- 광석류 : 제오라이트 or 세피오라이트의 4종류 정도 선정하여 용해, 흡습실험을 진행하고 이후 실험자료 상 고품질 부형제를 적용

(3) 열풍건조의 안정성 및 유도된 항생펩타이드 보존성 분석

(가) 열풍을 이용한 누에 건조 온도별 시험

열풍기(표3-3, 그림5-1)의 온도별(60℃, 70℃, 80℃, 90℃)과 마이크로웨이브오븐을 이용하여 누에(1.8kg)를 투입하여 매시간 질량을 측정하여 더 이상 중량의 변화가 없는 상태(평형점)의 최종 시간과 중량을 측정한 후, 온도별 일반성분의 차이 분석(분석항목 : 수분, 회분, 조지방, 조단백, 조섬유)과 항균력시험(제2세부 김성렬박사, 농진청)을 시행하였다.

① 재료 및 방법

- 항생펩타이드 유도 누에 2kg(진주 잠업시험장, 8월)
- 열풍기

내용	규격
Electrical Requirements	220V 60HZ
Temperature Range	RT+10~300℃
Temperature Stability	±1℃
Display Resolution	0.1℃
Ambient Temperature	+5~40℃
Input Power	850W
Chamber Volume	30L
Internal Dimension (mm)W×D×H	340×280×320
External Dimension (mm)W×D×H	620×530×490
Shelves per Chamber(Normal)	2(pcs)
Timing Range	1~9999min

표 3-3.



그림 5-1. 열풍을 이용한 누에 건조

○ 마이크로웨이브 오븐

소비전력	1100W
고주파 출력	700W
정격 전압	220V/60Hz
치수	489*275*393
발전주파수	2,450MHZ
중량	NET:12.5KG, GROSS:14.5KG
용량	23L

표 3-4. Microwave 규격

② 결과

· 열풍건조 온도별(60℃, 70℃, 80℃, 90℃) 누에 상태비교

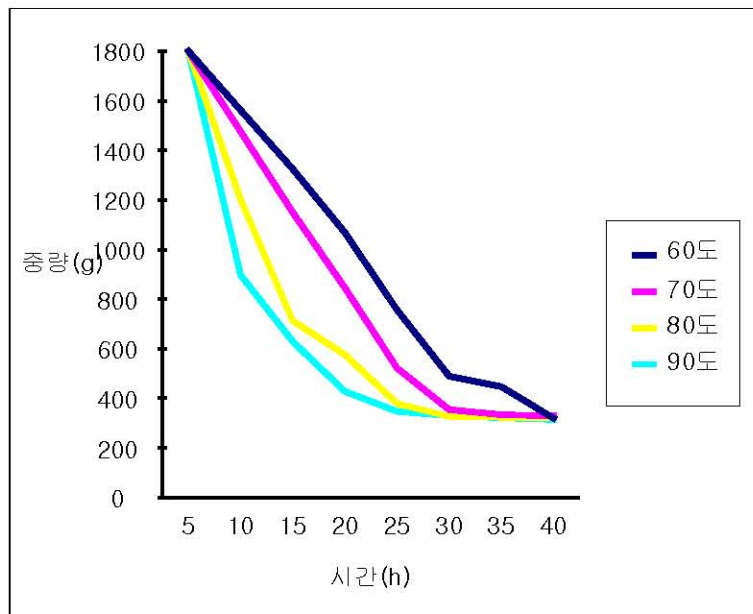


그림 5-2. 온도별(60℃, 70℃, 80℃, 90℃) 시간별 중량변화

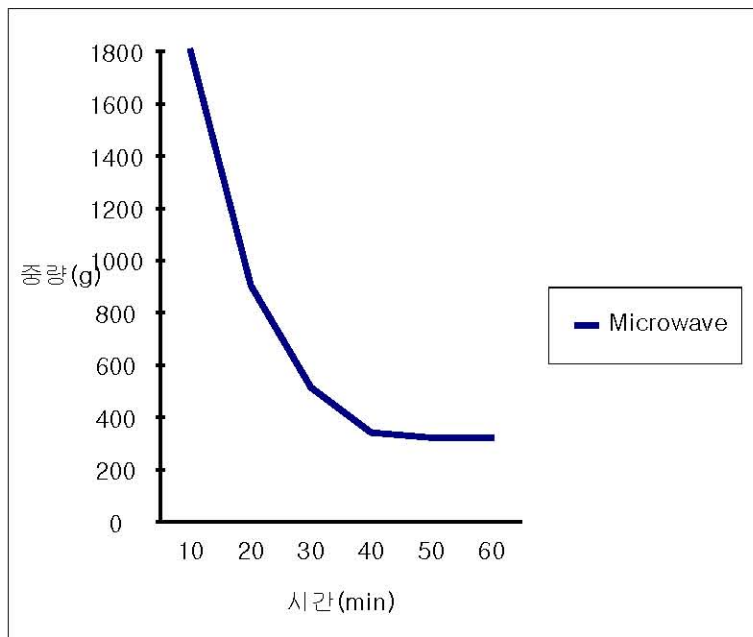


그림 5-3. Microwave 시간별 중량변화

○ 초기 중량 1800g의 누에를 열풍건조 하였을 시, 평형점이 나타난 시점은 60℃에서 대략 34시간의 시간이 소요되었으며, 70℃에서 26시간, 80℃ 25시간, 90℃에서는 24시간이 소요된 것으로 나타났다. 또한, 평형점에 도달하였을 시, 그 중량은 60℃에서 319.9g, 70℃에서 329g, 80℃에서 323g, 90℃에서 315g인 것으로 나타났다. 이는 총중량 1800g에서 평형점에 도달하였을 시, 평균 중량이 17%인 것으로 나타났다.(그림 5-2)

○ 온도별 열풍건조와 마이크로웨이브오븐을 이용한 건조누에의 일반성분을 분석해본 결과 그 유의차가 나타나지 않는 결과로 미루어볼 때, 단기간에 가장 효율적인 건조방법은 마이크로웨이브를 활용한 방법인 것으로 나타났다. (그림5-3, 그림5-4)



그림 5-4.

③ 항생펩타이드 유도 누에 온도별(60℃, 70℃, 80℃, 90℃) 및 마이크로웨이브 일반성분 분석(측과원 제1협동과 협외)

○ 일정시간이 지난 후, 건조누에의 일반성분을 분석한 결과(유의차검정), 조성 비율 간 유의차가 없는 것으로 나타났다. 이는 누에의 열풍 건조 시 시간과 건조비용을 고려할 시 60℃의 낮은 온도보다 90℃에 시행되는 누에건조가 경제성이 높은 것으로 나타난 것임을 알 수 있고, 종합적으로는 열풍보다 마이크로웨이브를 활용한 건조가 더 효율적이라는 것을 알 수 있었다.(표 3-5) 수분보정 후의 성분분석에서도 비슷한 결과를 나타내었다.(표 3-6)

시료명	수분 함량(%)	회분 함량(%)	조지방 함량(%)	조단백 함량(%)	조성유 함량(%)
마이크로웨이브	5.02	5.67	14.71	68.02	4.85
60도-건조	4.67	5.70	14.58	68.99	4.12
70도-건조	7.54	5.80	14.19	66.20	4.32
80도-건조	4.01	6.12	14.08	69.96	4.38
90도-건조	2.53	6.20	14.43	70.07	4.52

표 3-5.

시료명	수분 함량(%)	회분 함량(%)	조지방 함량(%)	조단백 함량(%)	조섬유 함량(%)
마이크로 웨이브	-	5.97	15.64	71.62	5.11
60도-건조	-	5.98	15.29	72.37	4.32
70도-건조	-	6.27	15.14	71.60	4.67
80도-건조	-	6.38	15.04	72.88	4.56
90도-건조	-	6.36	15.41	71.89	4.64

표 3-6. 함성펩타이드 일반성분 수분보정

④ 누에 열풍건조 온도에 따른 항균효과 분석

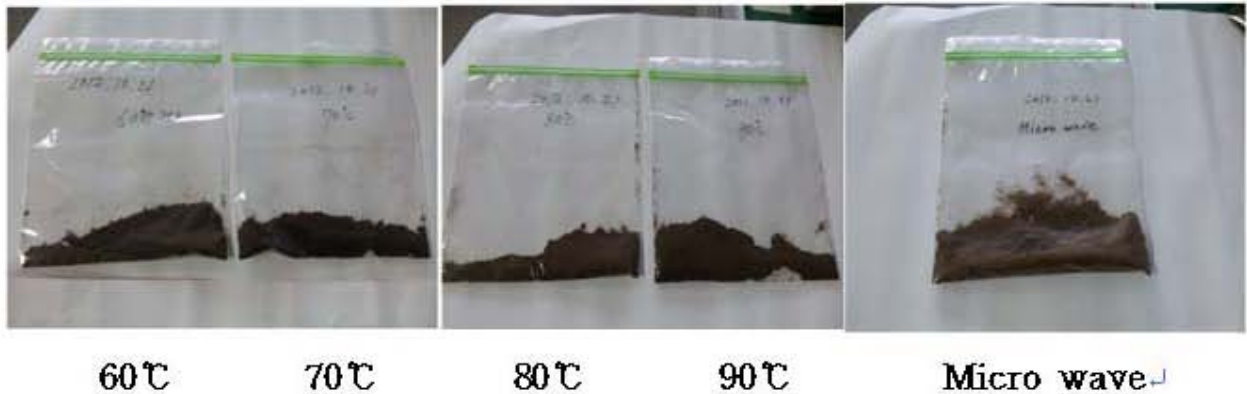


그림 5-5.

○ 누에 분말 추출물 제조

- 각 분말(그림5-5) 시료 0.5g에 0.3% 아세트산 5ml을 첨가
- 실온에서 1시간동안 교반을 통하여 추출
- 10,000rpm, 4℃ 조건에서 20분간 원심분리 후 상등액 분리
- 상등액을 1ml로 농축한 다음 항균활성검정

○ 항균활성검정

- 방사선 확산 분석법(RDA)을 통하여 병원성 대장균(*E. coli* ML35)에 대한 항균활성 분석함
- 항균활성 비교 분석: 병원균 생육억제를 나타내는 Inhibition zone의 크기로 비교 분석함

○ 결과 분석

- Zone 크기를 비교 분석한 결과(그림5-6) 마이크로웨이브로 건조한 시료에서 항균활성이 가장 높고 열풍건조 온도에 따라 감소하였다.

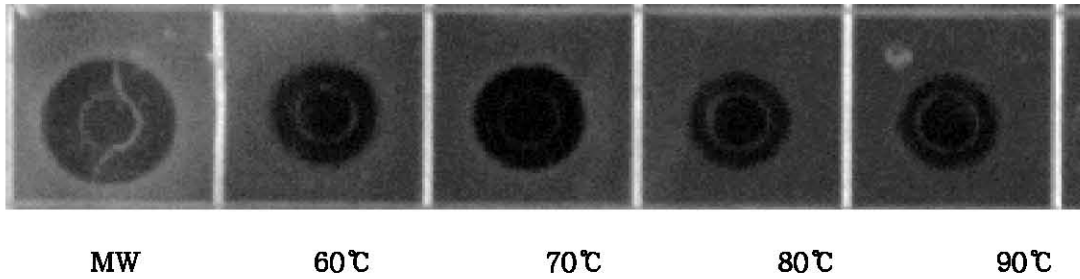


그림 5-6.

- 종합적인 시험결과에 따르면, 누에의 건조에 열풍을 활용할 경우, 누에 분말의 항균활성을 높이려면 낮은 온도로 적용을 해야 하지만, 건조시간이 길어져 건조비용의 증가를 초래할 수 있다. 하지만, 마이크로웨이브를 활용할 경우, 누에분말의 항균활성이 높게 나타나고, 건조시간도 열풍과 비교하여 크게 감소하는 바, 열풍건조보다 마이크로웨이브를 이용한 누에건조가 더 효율적이라는 시험결과가 나왔다.

(4) 분말화 누에의 제형화 방법

(가) 부형제 선발(용해도 및 흡습성 고려)

누에 건조분말의 용해도를 높이고, 저장기간을 늘리기 위하여 흡습성이 낮은 부형제를 선택/선발하였다.

종류	적용회수
탄산칼슘	3
말분	4
왕겨분	1
이산화규소	2
제오라이트	2
유당	4
포도당	3
실리카	1
황산제일철	1
탈지강	1
바이오세라믹	1

표 4-1. 부형제의 종류 및 적용

- 현재 양계용 동물약품에 적용되는 부형제를 기준으로 선발하였으며, 누에분말에 대한 적용은 광물질류는 탄산칼슘, 곡류 가공품류는 말분, 당류는 유당과 포도당을 적용하였으며, 광석류에는 제오라이트와 세피오라이트를 선정하여 용해, 흡습시험이 진행되었으며, 부형제를 선발하였다.

(나) 항균펩타이드 강화 누에 분말의 체내 이용효율 증진을 위한 제형화 기법 구축

① 나노화 : 체내 흡수 증진

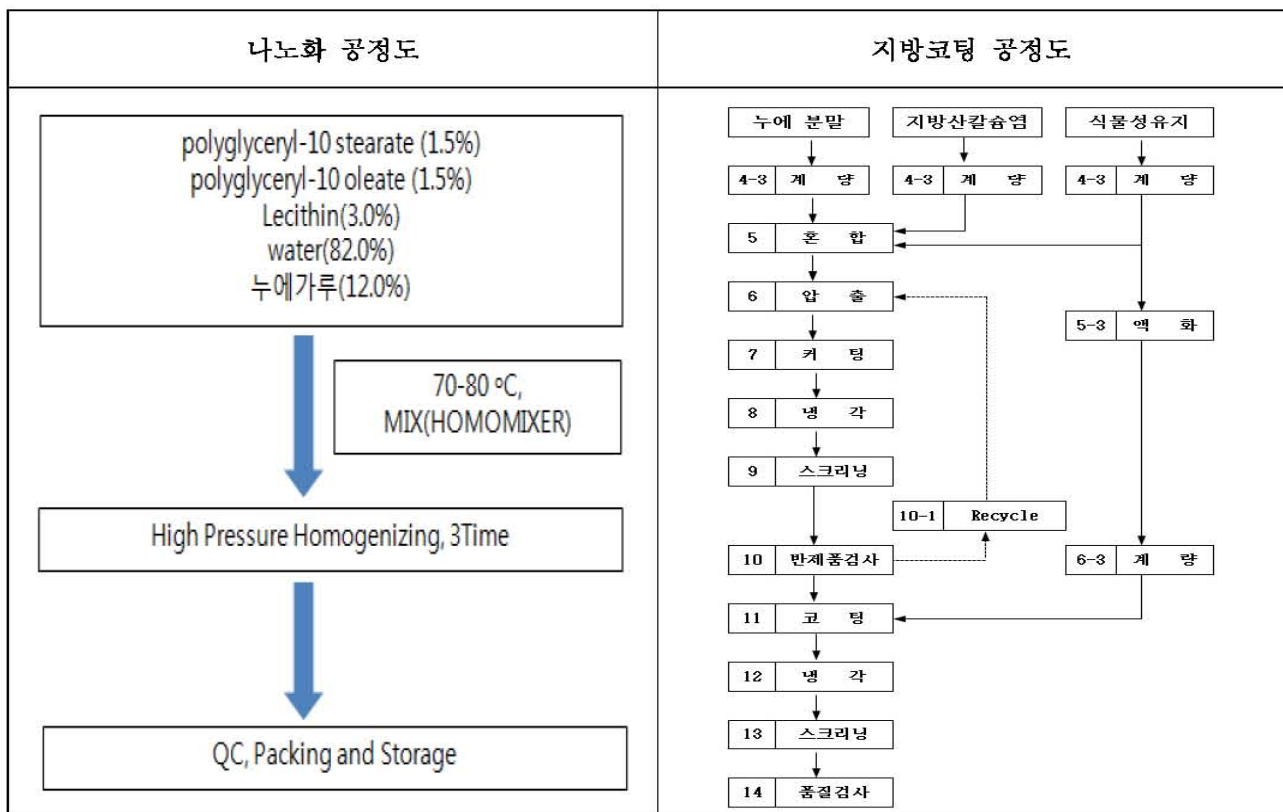
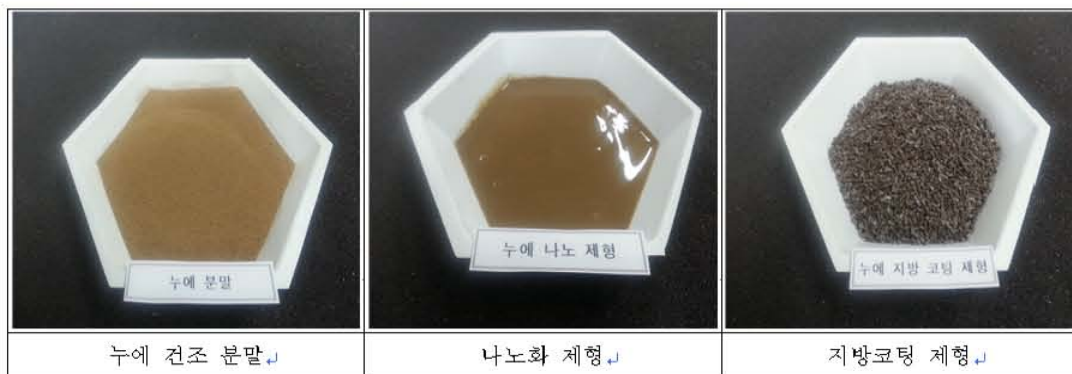
- 대표적인 누에 유래 항균펩타이드인 cecropin 등은 31-37 아미노산 잔기가 결합된 고분자 화합물로서 체내 소화효소에 의해 분해되거나, 펩타이드 형태로 소장을 통과할 수 없기

때문에 일반적인 단백질, 펩타이드의 흡수기전이 아닌 별도의 기전으로 체내 흡수를 가능하게 하기 위해 나노화 제형을 제조하였다.

- 항균펩타이드의 체내 흡수 증진을 위해 누에 분말을 수용액화한 후, polyglyceryl-10 stearate, polyglyceryl-10 oleate 및 lecithin과 일정 비율로 혼합하여 나노화시켰다(도면 1).

② 지방 코팅 : 소장 항균 활성 강화

- 동물의 위에서 분비되는 위산과 펩신에 의해 단백질 및 일부 펩타이드가 분해되기 때문에 누에 유래 항균 펩타이드가 타깃 부위인 소/대장까지 안정적으로 도달시켜 항균 활성을 발휘하도록 하기 위하여 지방 코팅 제형을 제조하였다.
- 지방칼슘염, 식물성 유지와 혼합한 후 압출, 커팅, 냉각, 코팅 등의 공정을 통해 고체 형상의 지방 코팅 제형을 제조하였다(도면 1).



도면 1. 누에 분말 제형화 공정

(다) 누에 건조용 Microwave 건조장치 개발

○ 분자 내의 쌍극자에 회전과 진동에너지를 가함으로서 그 내부의 마찰로부터 열이 발생된다. 마이크로웨이브 가열은 에너지 전달이 재료의 겉과 속을 포함한 전체에 균일하고 빠른 가열효과를 얻을 수 있으며 피건체 내부에서 열에너지가 생성되는 방식으로 빠르게 바뀌는 전자기장 방향은 쌍극자 또는 극성 유체에서 분자 위치의 변환을 유도하게 되며, 위치변환은 분자 위치를 가져와 결국 마찰에너지에 의한 가열이 이루어진다.

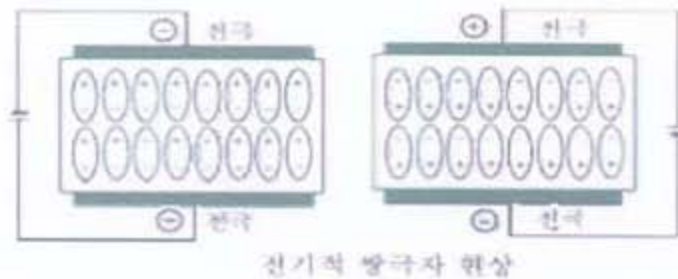


그림 6-1.

○ 유전가열의 특징은 피가열물 자체가 발열체가 되므로 유전체에 가까이 없는 것은 가열되지 않는다.

비유전율 ϵ_r 과 유전 손실각 $\tan\delta$, 전계의 강도와 유전체로 흡수된 전력의 관계는 다음 식과 같다.

$$P = \frac{1}{1.8} \cdot f E^2 \cdot \epsilon_r \cdot \tan\delta \times 10^{-14} \quad (w/cm^3) \quad P : \text{소비전력}$$

f : 교류전계의 주파수, (Hz) E : 전계의 강도,

ϵ_r : 피가열물질의 비유전율, $\tan\delta$: 피가열물질의 유전 손실각

○ 위 식에서 $\epsilon_r \cdot \tan\delta$ 은 유전체 손실(Loss factor)과 예비 유전체의 온도와 주파수에 의해서 변화한 값이다. 위의 식에서 알 수 있듯이 유전체에 흡수된 전력은 주파수에 비례하고 있다. 그러므로 전계의 주파수가 높을수록 진동이 심하여 마찰열의 발생도 많아지게 되는 것이다. 즉, 주파수가 높고, 전계의 강도가 높을수록 가열효율이 좋다(그림6-1).

○ 콘덴서는 고압트랜스에서 단상220V의 약10배를 승압 시킨 후 다시 2배로 승압시켜 AC용으로 사용 했다.

○ 다이오드는 12,000V 350mA의 사양으로 선택하여 콘덴서와 마그네트론 사이에 설치하여 마그네트론에서 최고 올라오는 역류 전류 방지 및 방전시키는 역할을 한다.

○ MAGNETRON TYPICAL PERFORMANCE

- Frequency(matched load) ----- 2460MHz
- Peak anode voltage ----- 4.40kVp
- Average output power(matched load) 1150W
- Average output power(in a typical oven) 1000W*
- *In accordance with IEC Pub. 705 measurement method.

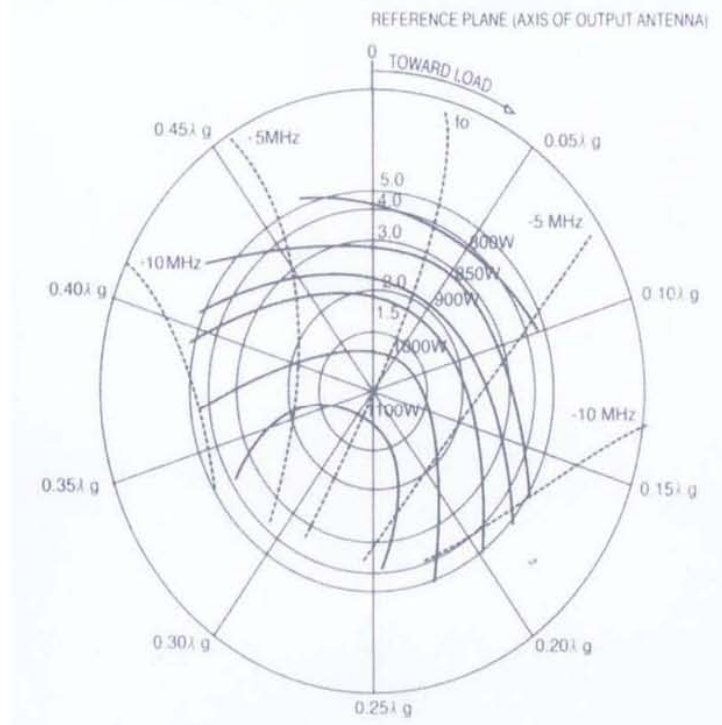


그림 6-2.

- OPERATING CONDITIONS:

- Power supply: single phase full - wave
- Rectifier without filter.
- Average anode current 3300mA
- Wave guide: Lg Standard Lanuncher
- Output Power(W)
- Frequency($f_0=2460\text{Mhz}$)

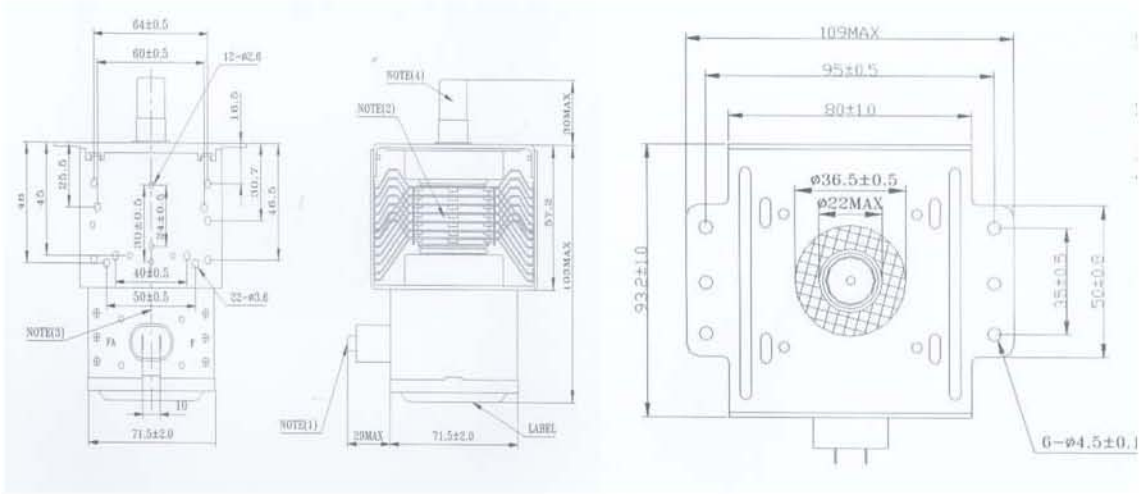


그림 6-3. Magnetron 설계도

○ 고전압 출력 트랜스

일단 교류 220V를 고압트랜스를 사용해 2,100V-2,200V로 승압시킨 후(그림6-4) 이것을 고압정류기를 통해 직류로 바꾸며 ac-dc 전원장치로 변경하였다.

이직류를 마그네트론이란 마이크로웨이브 발진자에 공급해주면 강한 2540Mhz라는 전자기 파가 발생되고 이것을 이용해 가열하였다.

여기서 ac-ac~ dc-dc라는 것은 어디까지나 전원장치에 국한해서 분리하였다.

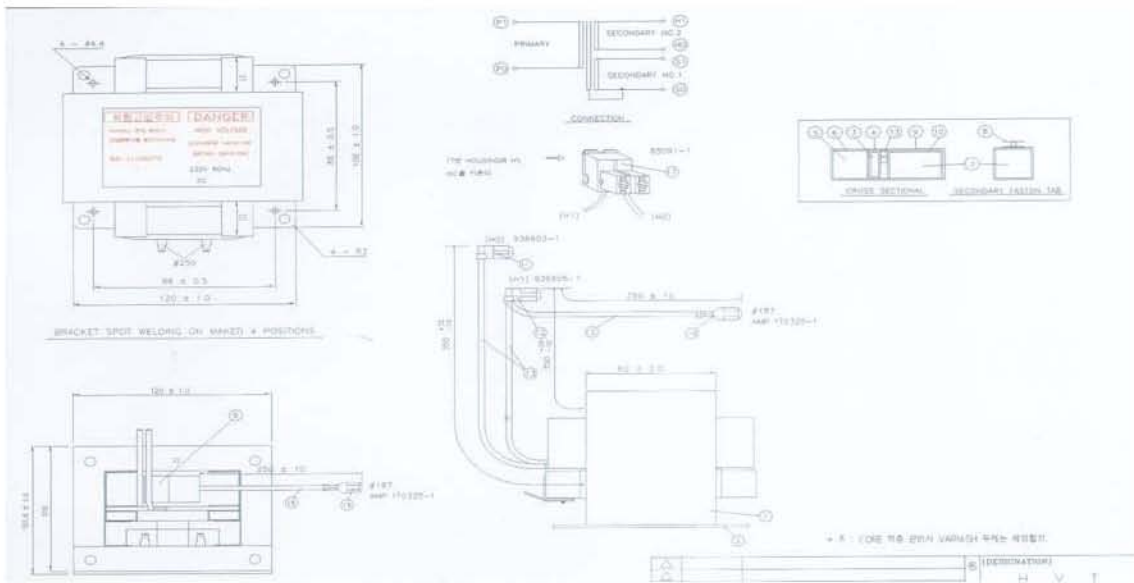


그림 6-4.

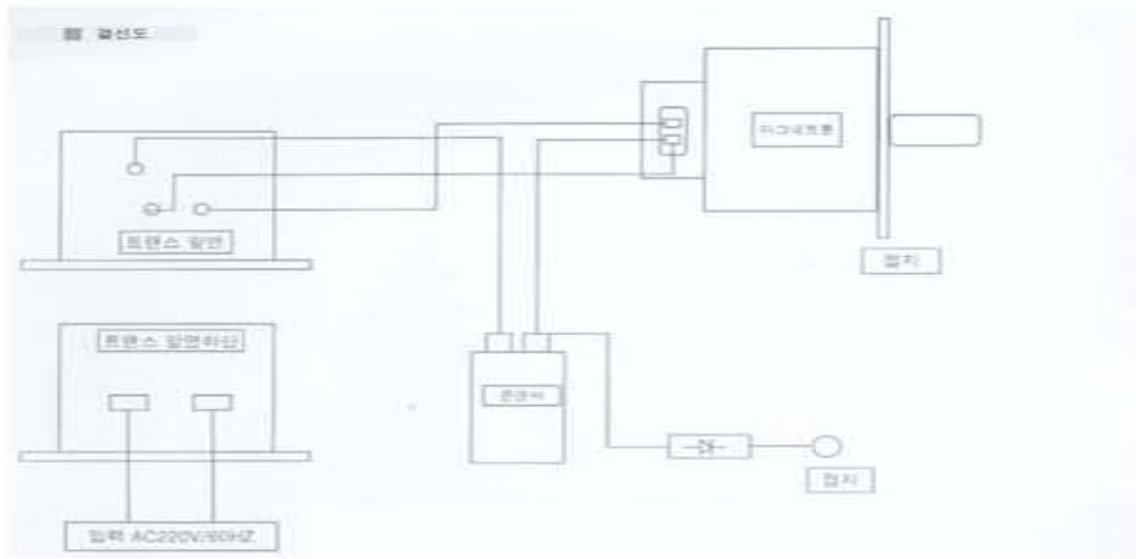


그림 6-5. 결선도

- 콘덴서에 전압을 인가한 후에는 반드시 방전 후 단자 접촉할 것.
- 마그네트론과 트랜스는 개별냉각을 요함.
- 모든 단자채결은 유격이 없도록 채결할 것.
- 다이오드와 콘덴서 연결선에는 수축튜브를 씌울 것.
- 부품에 먼지 등의 이물질이 없도록 관리.
- 콘덴서의 **CASE**가 부풀어 오르면 즉시 전원을 차단하고 이상원인 제거 후 교체할 것.

○ 설계도

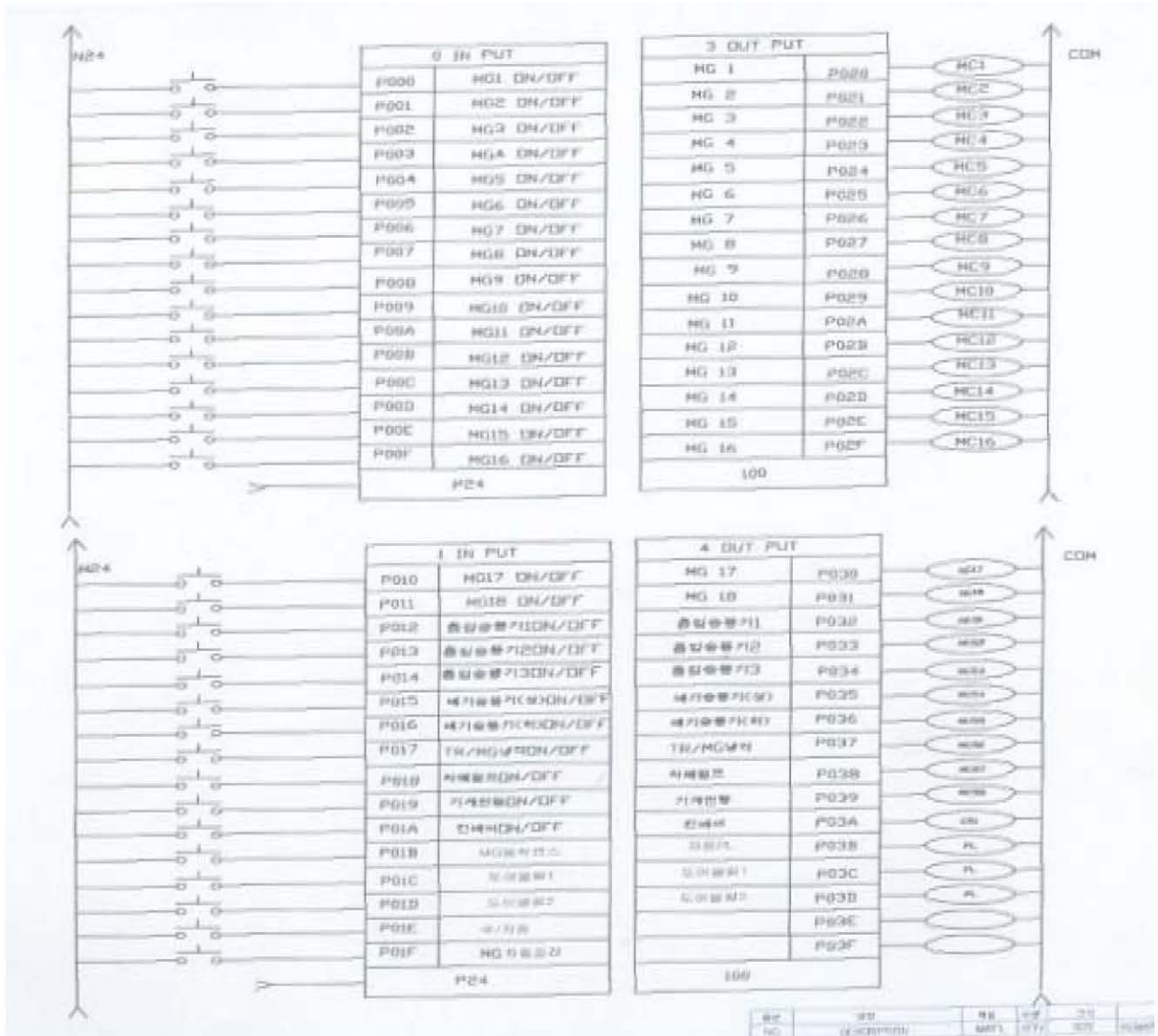


그림 6-6. 송풍기 및 마그네트론 LAY_OUT

○ 마그네트론에 전력이 투입 시 분자 내의 쌍극자에 회전과 진동에너지를 가함으로서 그 내부의 마찰로부터 열이 발생되었다(그림6-6).

송풍장치를 설치하여 내부에서 발생하는 기화된 물질을 외부로 환기시킴으로서 건조가 단축되었다.

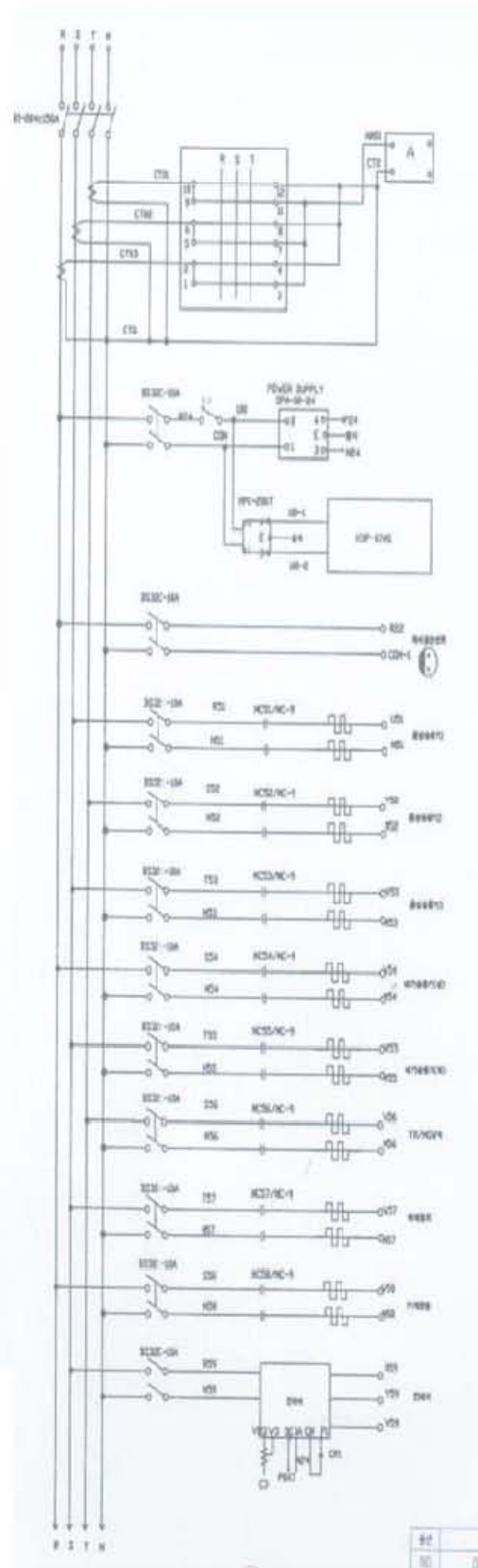
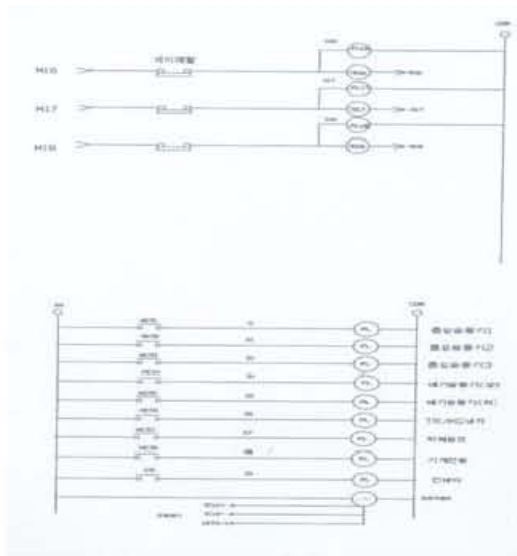
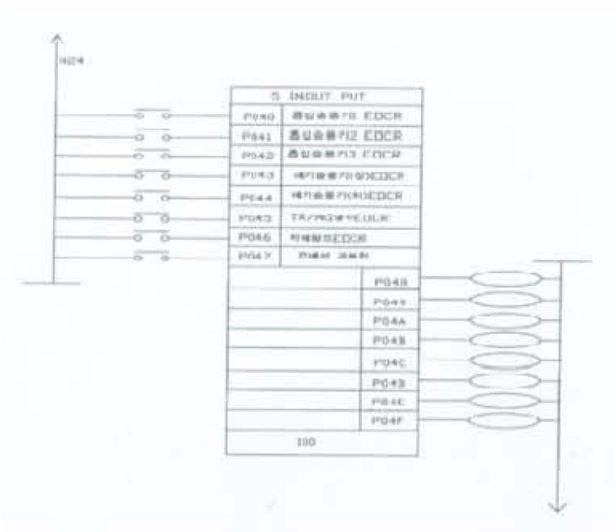


그림 6-7. 마그네트론 회로도

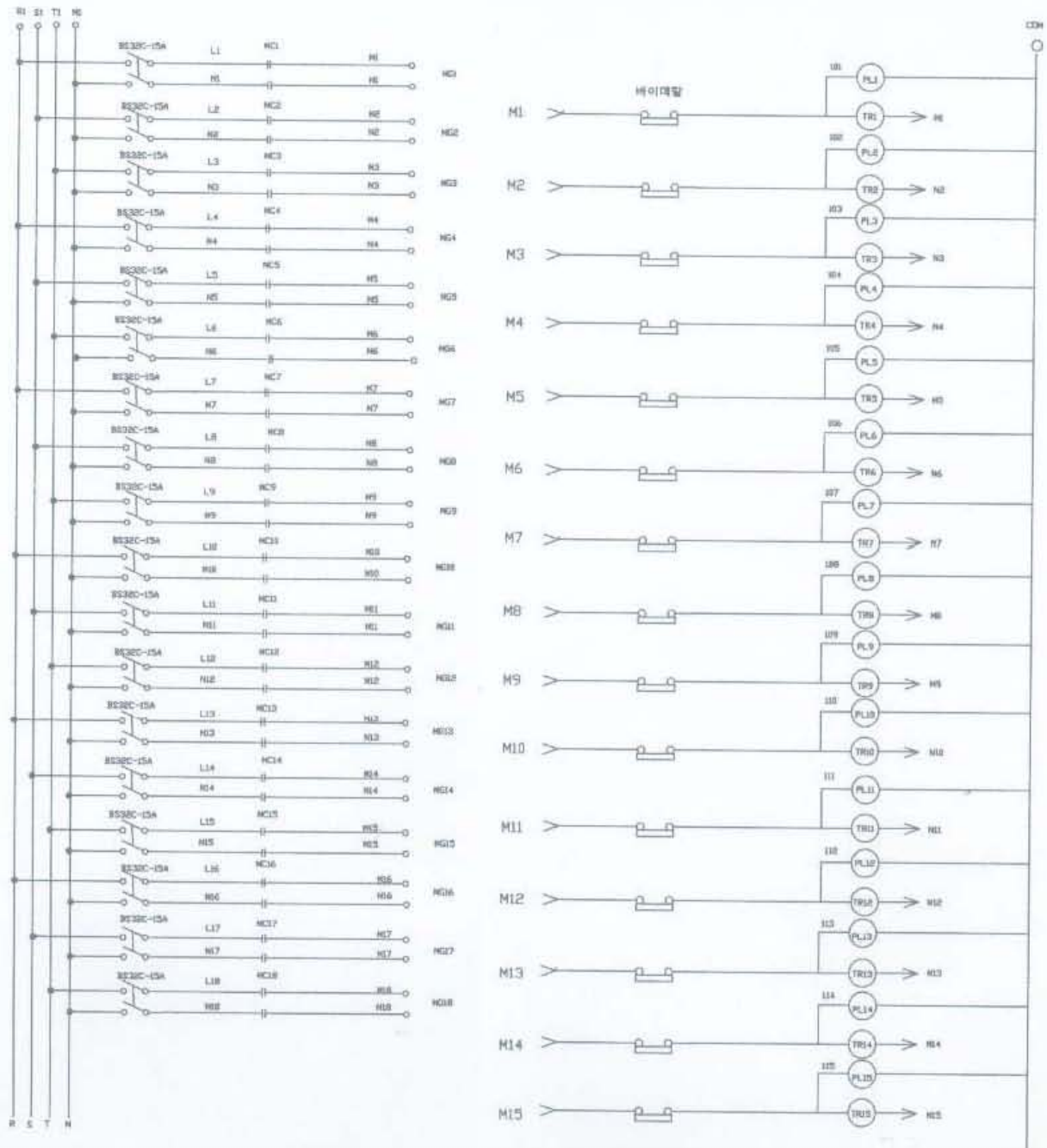


그림 6-8.마그네트론 및 표시등

○ 전체 회로 동작 유, 무를 표시하여 문제가 발생 시 신호와 함께 발생 부분에 Lamp가 순차적으로 on/off를 함으로서 발생 원인을 체크할 수 있다(그림6-8).

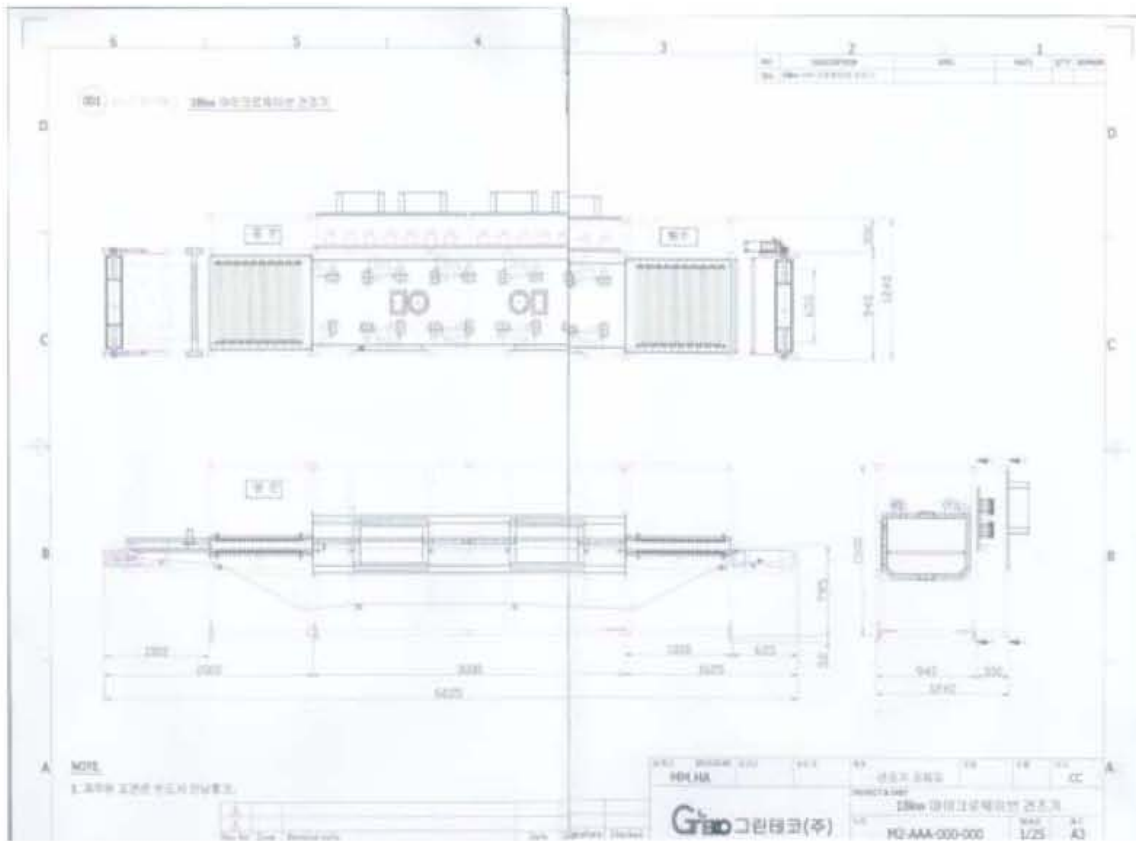


그림 6-9. 전체외형도

- 건조 시 컨베어 벨트 속도를 자동으로 조절할 수 있도록 설계하였으며 과부하 및 과전압 등 발생 시 자동으로 컨베어 벨트가 정지토록 설계됐다.
- 각 MAGNETRON마다 보호 장치가 되어 있고 문제발생시 확인할 수 있도록 비상등 또는 소리로 확인할 수 있도록 설계되었다(그림6-10, 그림6-11).



(A) ↓

Microwave 건조기 제어부 설치 ↓



(B) ↓

Microwave 건조기 내부 ↓



(C) ↓

Magnetron 설치 ↓



그림 6-10.



그림 6-11. 건조잠치쿨 이용한 누에건조(부엌)

○ Microwave를 이용한 면역유도 건조누에 성분 분석

수분 함량(%)	회분 함량(%)	조지방 함량(%)	조단백 함량(%)	조섬유 함량(%)
5.02	5.67	14.71	68.02	4.85

표 5-1. 건조누에 성분 분석

○ Microwave 건조셀트의 속도를 제어하는 볼러부의 벨트 회전속도는 최소 100mm/min에서 최대 10m/min까지의 조절이 가능하며, 건조기 내부 천장에는 총 16개의 Magnetron(2개의 Magnetron이 한쌍)이 240mm간격으로 설치되어 전자파를 방사하도록 설계되었다.

○ 시료(건조 전 누에)가 투입되면 1번과 2번 Magnetron부터 순차적으로 작동을 시켜 16번까지 총 8쌍의 Magnetron을 제어부를 통해 작동시킨다. 현재 Magnetron은 순차적인 수동 작동만이 가능한 상태이며, 추후 시료의 이동과 양을 감지하여 Magnetron의 On/Off가 자동으로 작동할 수 있는 시스템을 계획, 제작 단계에 있다.

○ 100kg의 시료(유도누에)를 Microwave 건조기 투입구를 통해 10회(최당 10kg)분할 투입하였을 시, 약 20분의 소요시간을 나타내었다(함수율 10%미만 기준). 10%미만의 함수율을 가진 건조누에는 바로 분말화가 가능하며, 건조누에의 주성분은 위 표 5-2와 같다.

(라) 황생펩타이드의 보존성 향상을 위한 제형화 방법 선별

① 누에 분말 추출물 제조

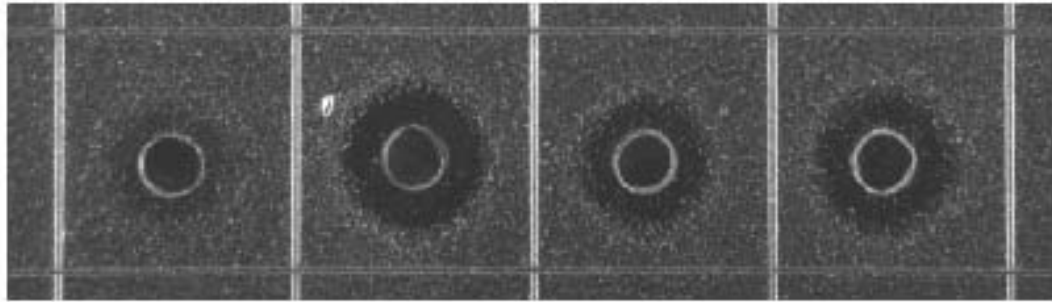
- 각 분말(그림 7-1) 시료 0.5g에 0.3% 아세트산 5ml을 첨가
- 실온에서 1시간동안 교반을 통하여 추출
- 10,000rpm, 4℃ 조건에서 20분간 원심분리 후 상등액 분리
- 상등액을 1ml로 농축한 다음 항균활성검정

② 항균활성 검정

- 방사선 확산 분석법(RDA)을 통하여 병원성 대장균(*E. coli* ML35)에 대한 항균활성 분석
- 항균활성 비교 분석: 병원균 생육억제를 나타내는 Inhibition zone의 크기로 비교 분석



그림 7-1. Microwave 건조장치를 이용하여 건조된 누에 분말



A. 12시간

B. 18시간

C. 24시간

D. 36시간

그림 7-2. 시간별 평균활성 점검 결과

다. 누에 대량 면역유도를 위한 주사장치 최종 개발

- 본 개발은 천연 항생제를 대량으로 생산하기 위하여 항생제로 사용될 수 있는 메틸렌에 면역 유도 물질을 주입하기 위한 누에 주사 장치이다. 누에의 크기에 상관없이 항상 배면 부로부터 일정 깊이의 채강에 주사액을 주입할 수 있어 자동화 과정에서 주사의 주입 실패율을 현저히 낮춘 누에 주사 장치이다.
- 주사액이 주입된 누에가 적재되는 누에 지지부, 누에 지지부를 소정 방향으로 이동시키는 누에 이동부, 누에 지지부에 적재된 누에 채강 내에 주사액을 주입하는 주사액 주입부 및 주사액이 주입된 누에를 지지부로부터 분리시키는 분리부로 구성되며, 지지부는, 누에가 놓여지는 수평면과 경사면을 가지는 지지틀이 형성된 지지틀체로 구성된다. 경사면에는 수평 방향으로 상기 지지틀체를 관통하며, 상기 주사액 주입부의 일단이 진입 가능한 관통홀이 형성되어 있다.
- 주사액 주입부는, 내부 피스톤이 왕복 운동하는 실린더부 및 실린더부에 결합하며, 일단에 주사 바늘이 결합하고 몸체에 상기 주사액이 수용되어 누에 채강 내에 주사액을 주입하는 시린지부를 포함하고, 주사액 주입 시에 상기 주사 바늘이 상기 관통홀을 통해 진입한다. 주사액이 주입된 누에가 분리된 이후 지지틀 내에 에어를 분사하여 남아 있는 잔여물 및 수분을 제거하는 잔여물 제거부를 설치하였다.
- 지지틀은 주사액 주입부의 일단이 진입하는 일측의 반대측으로 개방되어 있으며, 잔여물 제거부는 상기 지지틀의 반대측에서 상기 관통홀을 향해 에어를 분사한다. 누에는 지지부에 놓기 전에 비활성화시키는 비활성화부에서 선람되어 지지부에 투입한다.
- 분리부는, 누에를 흡착하는 흡착부와 흡착부에 흡착되도록 흡착부의 진공 상태를 제어하는 흡착 제어부로 구성되어 있다.
- 누에 주사 장치(100)는 지지부(110), 이동부(120), 주사액 주입부(130), 분리부(140), 비활성화부(150), 저장부(160), 잔여물 제거부(170), 제어부(180)로 구성되어 있다.
- 본 개발은 천연 항생제로 사용될 수 있는 누에 채강 내에 주사장치를 이용하여 면역 유도 물질을 주입함으로써 천연 항생제의 대량 생산이 가능하도록 하는 것이 특징이다.
- 면역유도액 주사장치는 누에 채강 내에 면역 유도 물질을 주입하는 장치이며, 일반적인

에벌레(밀업, 동에등에, 누에, 굽쟁이 등)에 적용가능하며, 본 개발에서는 누에로부터 천연 항생제를 생성하기 위해 개발되었다.

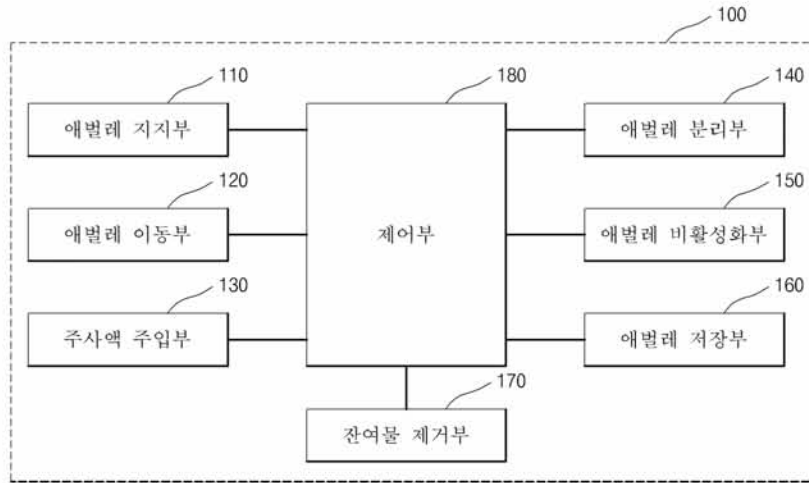


그림 8-1. 면역 유도액 주사장치 모식도

- 지지부(110)는 주사액이 주입될 누에가 놓이는 부분이다. 지지부(110)는 후술할 주사액 주입부(130)가 누에 체강 내에 주사액을 주입할 수 있도록 누에를 특정 위치에 고정시킨다.
- 지지부(110)는 누에를 지지할 수 있는 구조라면, 특정한 형태에 한정되지 않고 본 개발에 적용가능하다. 지지부(110)는 누에를 평면 형상의 지지대 위에 놓고, 주사액 주입부(130)가 위치한 반대 방향에 주사액 주입부(102)의 주사 바늘 뿌취에 의한 누에 몸체의 움직임을 차단하는 차단 수단이 마련되어 누에를 고정시킨다. 지지부(110)에는 누에가 삽입, 고정되는 소정의 홈이 형성되어 있으며, 지지부(110)에 누에가 한 마리씩 삽입, 고정된다.
- 이동부(120)는 지지부(110)를 소정의 방향으로 이동시킨다. 예를 들면, 지지부(110)는 상술한 바와 같이 각각의 유닛에 홈이 형성되고, 각 유닛이 결합하여 형성되는 전체 형상은 체인 또는 캐터필러 형상이 된다. 이 경우 이동부(120)는 체인 또는 캐터필러 형상의 지지부(110)를 무한궤도 운동시킴으로써 지지부(110) 상에 적재된 누에가 이동된다. 이 때의 이동부(120)는 지지부(110)에 동력을 제공하는 구동수단이 된다.
- 주사액 주입부(130)는 지지부(110)에 놓인 누에에 주사액을 주입한다. 주사액 주입부(130)는 주사액을 내부에 수용하고 끝단에 주사 바늘이 마련된 주사기를 포함한다.
- 주사액 주입부(130)는 주사 바늘이 지지부(110)에 형성된 관통홀을 관통하여 지지부(110)에 놓인 누에의 특정 부분(체강)에 주사액을 주입한다. 주사액이 주입되는 부분은 누에의 배면부에서, 전체 높이의 80% 부위까지의 부분이 된다.

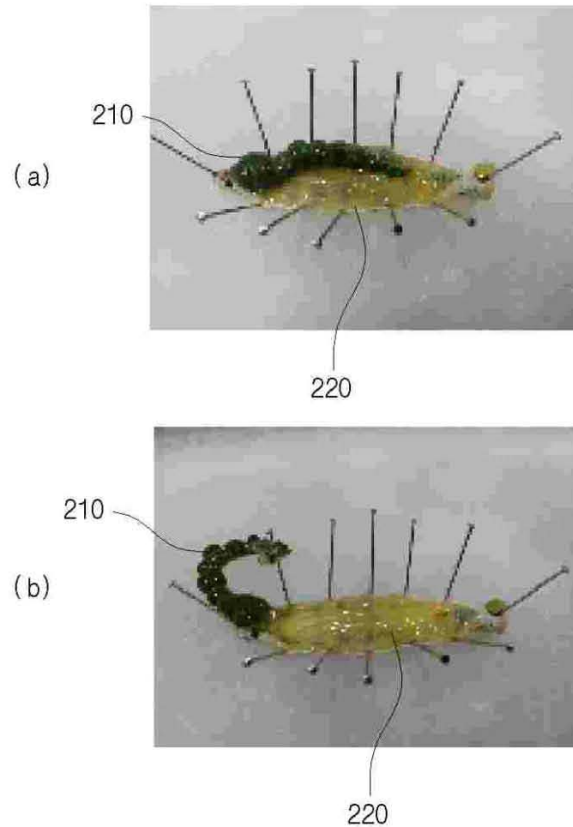


그림 8-2. 누에 내부 모습

- 그림 8-2는 표피를 벗긴 누에가 편에 꽂힌 상태가 도시된다. (a)는 소화기관인 내장(210)이 누에 체강(220)의 등 부위에 위치한 상태를 도시하며, (b)는 내장(210)을 누에 체강(220)의 등 부위에서 벗겨낸 상태를 도시한다. 정상적인 상태에서 내장(210)은 누에의 등 부위에 위치하므로, 주사 바늘은 누에의 배면부에서 내장(210) 위치의 아래 부분, 즉, 누에의 밑면인 배면부와 그로부터 전체 몸통 두께의 80%가 되는 체강(220)에 삽입되어 주사액을 주입한다.
- 주사액은 면역 유도 물질을 사용한다. 면역 유도 물질은 생체에 독성이 없으면서 면역 능력을 조절하는 효과를 가지는 물질이 된다. 예를 들면, 면역 유도 물질은 생체반응조절 물질(BRM : Biological Response Modifier)이 될 수 있으며, 구체적으로, AHCC(Active Hexose Correlated Compound), Polysaccharides, Polysaccharide peptides, Nucleosides, Triterpenoids 등이 될 수 있고, 이외에도 다양한 물질이 면역 유도 물질로서 본 개발에 적용될 수 있음은 물론이다.
- 주사액 주입부(130)는 누에에 주사액을 주입할 때 지지부(110)의 상측에서 하방향으로 누에를 가압하는 가압 모듈(미도시)을 포함한다. 가압 모듈을 이용하여 누에를 가압한 이후 주사 바늘을 푸쉬해 줌으로써 누에가 주사 바늘의 푸쉬에 의한 힘에 의해서 움직이는 것을 방지한다. 분리부(140)는 주사액이 주입된 누에를 지지부(110)로부터 분리시킨다. 분리부(140)는 누에를 지지부(110)에 형성된 홈의 수평 외측 방향으로 밀어서 지지부(110)로부터

- 분리시키거나, 흡의 상면을 중력이 향하는 방향으로 변경하여 누에를 중력방향으로 떨어뜨림으로써 지지부(110)로부터 분리시키는 등 다양한 방식을 이용한다.
- 또는, 분리부(140)는 누에를 흡착하는 흡착부(미도시) 및 흡착부의 진공 상태를 제어하는 흡착 제어부(미도시)를 포함한다. 이러한 실시예에 따르면, 진공에 의한 흡착력을 이용함으로써, 다양한 위치 및 방향에서 누에를 지지부(110)로부터 분리된다.
 - 여기서, 흡착 제어부는 흡착부가 누에를 흡착하여 누에를 지지부(110)로부터 분리시킨 이후 진공 상태를 해제하여 흡착부로부터 이탈시킬 수 있다. 이후 후술할 저장부(160)에 낙하하여 저장된다.
 - 비활성화부(150)는 누에를 지지부(110)에 적재하기 전에 누에에게 주사액을 주입시키기 편리하도록 누에를 비활성화시켜 누에의 움직임을 제한하는 수단이다. 예를 들면, 비활성화부(150)는 차가운 물을 담은 수조가 될 수 있으며, 애벌레는 차가운 물에 일정 시간(예를 들면, 20-30분 정도) 담겨 있는 경우 기절하여 비활성화되므로, 지지부(110)는 움직임을 둔한 누에를 수월하게 지지할 수 있다.
 - 저장부(160)는 주사액 주입부(130)에 의해 주사액이 주입된 '처리 후 누에'를 보관한다. 예를 들면, 저장부(160)는 누에를 담은 용기가 될 수 있으며, 지지부(110)로부터 분리된 누에가 저장부(160)로 이송되어 보관된다.
 - 여기서, 누에가 저장부(160)로 이송되는 방법은 다양하게 구현된다. 일 예를 들면, 지지부(110)가 경사면 및 수평면으로 이루어진 흡 내에 놓는 구조로 형성된 경우, 수평면이 기울어지도록 하여 외측 아래 방향으로 떨어지게 함으로써 누에를 저장부(160)로 이동시킨다.
 - 또한, 지지부(110)에서 분리부(140)에 의해 분리된 누에가 분리부(140)에 의해 진공 흡착되어 있는 경우, 분리부(140)가 저장부(160)의 상부로 이동한 후 진공 상태를 해제함으로써 직하 방향의 저장부(160) 내로 낙하시키는 방법으로 누에를 이송시킨다.
 - 저장부(160)는 분리부(140)의 하방에 위치할 수 있으며, 누에는 주사액 주입 처리가 완료된 후 저장부(160)로 낙하하여 처리 후 보관된다.
 - 여기서, 비활성화부(103)를 거친 누에는 소정의 그립 수단 혹은 푸쉬 수단에 의해 하나씩 상술한 지지부(110)에 적재된다. 예를 들면, 그립 수단은 비활성화부(150)에 놓여진 누에를 하나씩 잡아 올려 누에가 놓여있지 않은 지지부(110)에 올려 놓을 수 있다. 또는 푸쉬 수단은 파이프 모듈에 누에가 일렬로 수용된 상태에서 지지부(110)의 이동 속도에 상응하여 지지부(110) 방향으로 누에를 한 마리씩 밀어 줌으로써 지지부(110)에 누에가 한 마리씩 적재되도록 할 수 있다.
 - 잔여물 제거부(170)는 분리부(140)에 의해 분리된 지지부(110)에 대해 비활성화 과정에서 누에 몸체에 묻어 있다가 지지부(110)로 옮겨진 잔여물(예를 들면, 물(water))을 제거하여, 이동부(120)에 의한 무한 궤도 운동 이후 재차 누에를 적재하기 이전에 클린(clean) 상태가 된다.
 - 잔여물 제거부(170)는 에어 분사 모듈을 포함하며, 지지부(110)의 흡을 향해 소정 압력의 에어(air)를 분사해 주어 흡 내에 남아있던 잔여물이 제거되도록 한다.
 - 여기서, 에어 분사 방향은 앞서 설명한 주사 바늘의 푸쉬 방향과는 반대 방향이며, 이 때 잔여물은 공기 압력에 의해 관통홀을 통과하여 지지부(110)로부터 이탈된다.
 - 제어부(180)는 상술한 지지부(110), 이동부(120), 주사액 주입부(130), 분리부(140), 비활성화부(150), 저장부(160), 잔여물 제거부(170)가 서로 연동하면서 자신의 고유한 기능을 수행

하도록 각 기능부를 제어한다. 제어부(180)의 구체적인 기능은 특정 실시예에 따라 달라질 수 있다.

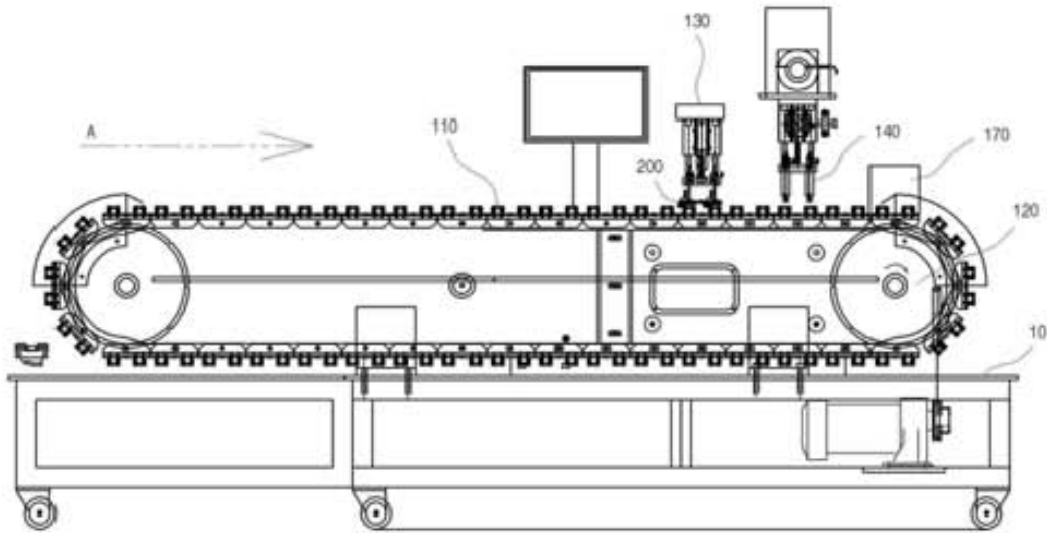


그림 8-3. 변속유도 주사장치 모식도

- 그림 8-3은 본 개발의 일 실시예에 따른 누에에 주사액을 주입하는 장치의 측면도이다. 지지부(110), 이동부(120), 주입부(130), 분리부(140), 잔여물 제거부(170), 장치 지지부(10), 누에(200)가 도시된다. 이하에서는, 상술한 바와의 차이점을 위주로 설명한다.
- 복수의 지지부(110)가 케터필러 형상으로 결합하며, 이동부(120)에 의해 무한궤도 운동함으로써, 지지부(110)에 결합한 누에(200)를 소정의 방향으로 이동시킨다. 장치 지지부(10)는 지지부(110) 및 이동부(120)를 포함한 전체 장치를 지지한다.
- 주사액 주입부(130)는 지지부(110)의 상측면에 위치하며, 주사액 주입부(130)의 전방에 위치한 애벌레에 주사액을 주입한다.
- 여기서, 이동부(120)가 이동하는 방향과 주사액 주입부(130)가 주사액을 주입하는 방향은 서로 교차하는 방향일 수 있다. 예를 들면, 지지부(110)에 병렬로 지지되어 A방향으로 이동되며, 주사액 주입부(130)는 지지된 누에의 길이 방향(그림의 전면을 향하는 방향)으로 주사액을 주입한다.
- 분리부(140)는 주사액이 주입된 누에를 지지부(110)로부터 분리시켜 상술한 바와 같이 저장부(160)에 저장시킨다.
- 잔여물 제거부(170)는 누에가 분리된 지지부(110)에 대해 에어를 분사해 주어 누에가 놓여져 있던 자리에 남겨진 잔여물을 제거한다.
- 그림 3에서는 하나의 유닛 상에 한 쌍의 지지부(110)가 마련되어 있는 형상이 예시되어 있다. 이 경우 주사액 주입부(130) 역시 하나의 유닛 상에 병렬 설치된 한 쌍의 지지부(110)의 간격에 상응하는 간격을 가지는 한 쌍의 주사기를 구비하여 두 마리씩 주사액 주입이 가능하도록 함으로써 보다 빠른 처리가 가능하다.
- 또한, 분리부(140) 역시 병렬 설치된 한 쌍의 지지부(110)의 간격에 상응하는 간격을 가지는 한 쌍의 누에 흡착부를 구비하고 있음으로써 누에 두 마리씩 동시에 분리가 이루어진다.

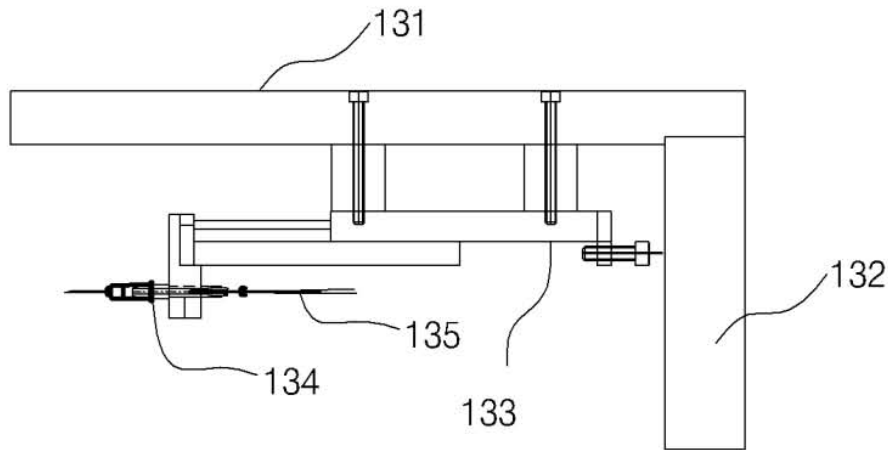


그림 8-4. 주사액 주입부

- 그림 8-4는 본 개발의 실시예에 따른 누에 주사 장치 중 주사액 주입부의 측면도이다. 상부 프레임(131), 하부 프레임(132), 실린더부(133), 시린지부(134), 주사액 유입관(135)으로 구성된다.
- 주사액 주입부(130)는 프레임으로 몸체가 형성되며, 구체적으로, 지면과 평행한 상부 프레임(131), 상부 프레임(131)을 지지하는 하부 프레임(132)이 몸체를 형성한다.
- 누에는 상술한 배면부가 지지부(131)에 접촉되어 견고하게 지지된다. 이 경우 주사 바늘은 누에의 체강 부분을 찢어서 그림 2를 참조하여 설명한 것과 같이 배면부 체강에 주사액이 주입된다.
- 여기서, 주사 바늘은 통상적으로 내부에 관통홀이 형성된 주사 바늘이거나 또는 외부에 홈이 형성되어 주사액이 수용되는 바늘로 이루어져있다. 후자의 경우, 주사 바늘의 외면에 나선형의 홈이 형성되거나, 주사 바늘의 연장된 방향과 다른 방향으로 연장되며 서로 소정의 간격을 가지는 복수의 홈이 형성되거나, 주사 바늘의 연장된 방향과 같은 방향으로 연장되며 서로 소정의 간격을 가지는 복수의 홈이 형성되거나, 이 외에도 주사 바늘의 외면에 오목한 볼 형상의 홈이 형성되는 등 다양한 형태의 홈이 형성된다. 이 경우 상술한 홈에 주사액이 수용되어 통상의 주사 바늘이 삽입될 수 없는 누에에도 홈에 수용된 주사액을 누에의 체강 내에 주입한다.
- 또한, 주사액 주입부(130)가 누에에 주사액을 정확하게 주입하도록 누에를 고정시키는 고정부(미도시)를 설치하였다. 고정부는 지지부(131)가 주사액 주입부(130)의 전방 등에 위치하는 경우 누에가 지지부(131)에 의해 지지된 상태에서 누에를 가압하여 움직이지 못하도록 함으로써, 주사 바늘이 정확하게 삽입되도록 한다. 고정부는 주사액 주입부(130)와 연동하여 작동될 수 있으며, 상하 운동이 가능한 구조로 형성된다.
- 실린더부(133)는 일단에 시린지부(134)와 결합하는 내부 피스톤이 왕복 운동하여 흡착부(114)에 결합된 누에에 주사액이 주입되도록 한다. 실린더부(133)의 길이 및 시린지부(134)의 푸쉬 길이 등은 누에에 주사액이 주입될 수 있는 것이 특징이다.

- 실린더부(133)의 작동 방식은 수동 또는 자동으로 정해진다. 예를 들면, 시린지부(134)를 누에 방향으로 밀어내는 푸쉬 버튼을 구비하여 사용자가 해당 푸쉬 버튼을 누르는 경우 실린더부(133)가 작동하여 시린지부(134)가 미리 정해진 길이만큼 누에에게 이동하고 주사액을 주입한 후 다시 뒤로 돌아와서 초기 상태로 정지한다.
- 또한, 지지부(131)의 움직임에 연동하여 실린더부(133)가 작동하여 주사액을 주입한다. 이 경우 누에에 안정적으로 주사액을 주입하기 위해서, 상술한 제어부(180)는 주사액이 주입될 누에가 결합한 지지부(131)가 시린지부(134)의 전방에 위치하는 경우, 즉시 또는 소정 시간, 예를 들면, 1 내지 2초 후에 시린지부(134)가 누에를 향해 푸쉬되도록 제어한다.
- 시린지부(134)는 실린더부(133)의 일측에 결합하며, 일단에 주사 바늘이 결합하고 몸체에 주사액이 수용되어 누에에 주사액을 주입한다.
- 또한, 시린지부(134)와 주사액 유입관(135)으로 연결되며, 시린지부(134)가 누에에 주사 바늘을 꽂을 때 주사액을 시린지부(134)에 펌핑하는 주사액 펌핑부(미도시)가 더 포함된다.

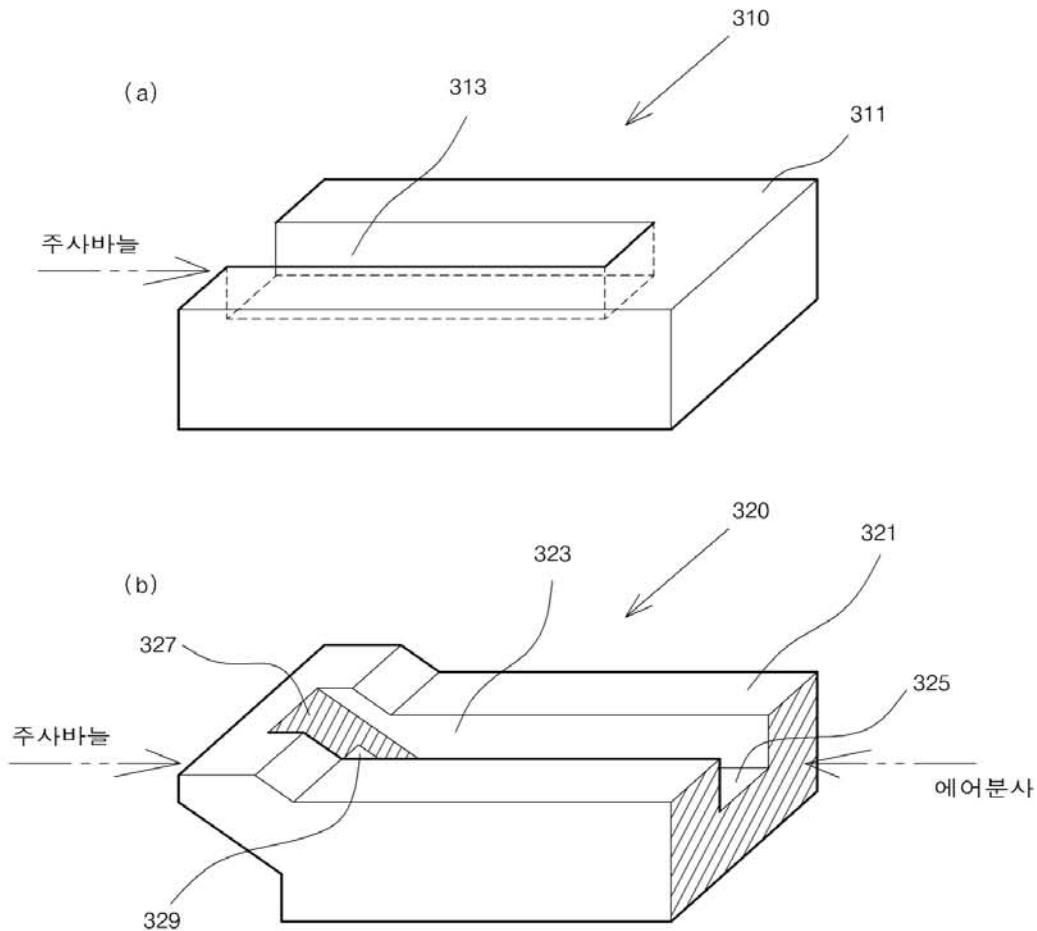


그림 8-5. 누에 지지부

- 그림 8-5의 (a)를 참조하면, 기존 지지부(310)는 지지몸체(311)에 지지홈(313)이 형성되어 있어, 지지홈(313) 내에 누에가 지지되며, 주사 바늘이 푸쉬되어 지지홈(313) 내의 누에에게 주사액을 주입하는 구조를 가지고 있다.
- 이 때 지지홈(313) 내에 누에가 뒤집힌 상태(즉, 배면부가 위를 바라보는 형상)로 적제되

는데, 누에의 크기가 균일하지 않아 누에가 작은 경우에는 주사 바늘이 제대로 채강에 절리지 않는 경우도 발생하는 문제점이 있었다.

- 이를 해결하고자 그림 5의 (b)에 도시된 것과 같이 지지몸체(321)에서 주사 바늘이 진입하는 측면에 경사부를 두고, 지지홈(323) 역시 주사 바늘의 진입측 반대편으로 개방된 구조를 가진다.
- 지지홈(323)은 수평면(325)과 경사면(327)을 가지며, 경사면(327)에는 수평 방향으로 지지몸체(321)의 경사부를 관통하는 관통홀(329)이 형성되어 있다.
- 지지홈(323) 내에는 누에(200)의 배면부가 아래를 향한 상태, 즉 뒤집혀지 않은 상태로 놓여지되 경사면(327)에 의해 누에(200)의 일단이 소정 경사를 가지고 꺾인 상태로 적재된다.
- 이 때 누에(200)의 배면부가 관통홀(329)에 의해 노출되며, 관통홀(329)을 통해 시린지부(134)의 주사 바늘이 진입하여 누에(200) 채강에 주사액을 주입한다. 이 경우 항상 누에(200)의 배면부가 관통홀(329)에 의해 주사 바늘에 노출되므로, 누에(200)의 크기에는 상관 없이 배면부로부터 일정한 높이의 채강에 대해 주사 바늘이 삽입된다.
- 또한, 지지홈(323)의 수평면(325)과 관통홀(329)의 하면이 동일 평면 상에 놓여 있어, 상술한 잔여물 제거부(170)에 의해 분사되는 에어가 지지홈(323)을 향해 진행하여 관통홀(329)을 통과하거나 경사면(327)을 따라 올라가도록 함으로써 누에(200)의 분리 후 지지홈(323) 내에 남아있는 잔여물이 효과적으로 제거된다.

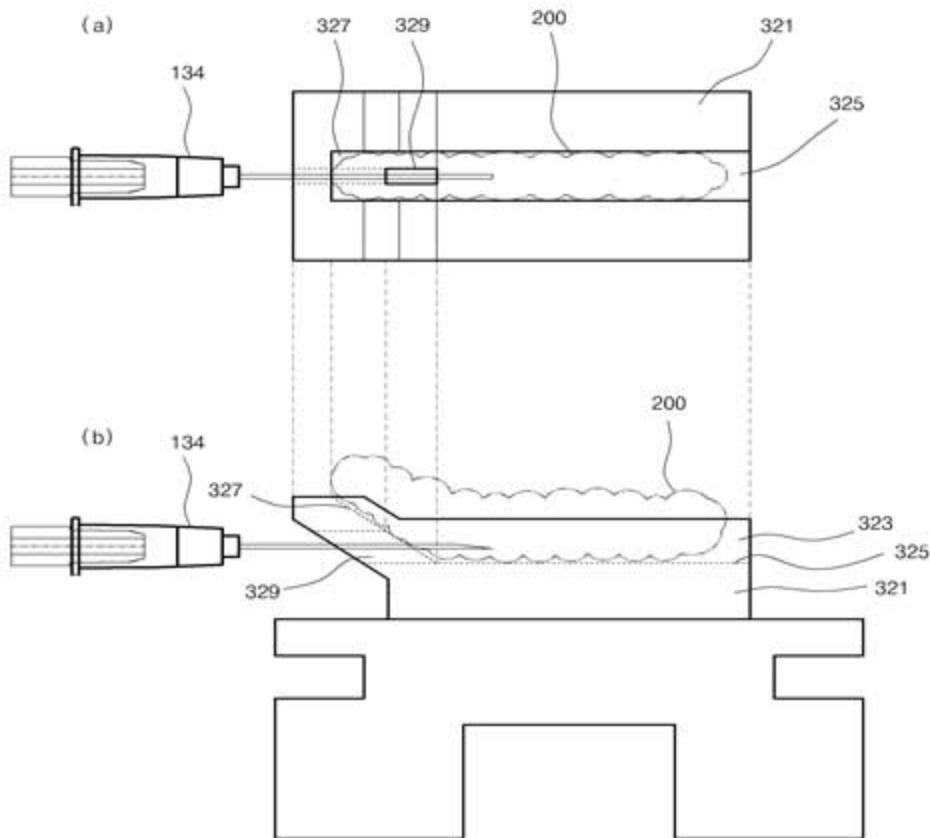


그림 8-6. 지지부에 고정된 누에 채강 내 유도액 주사 모식도

(1) 누에 유충 지지부 및 고정부 보완

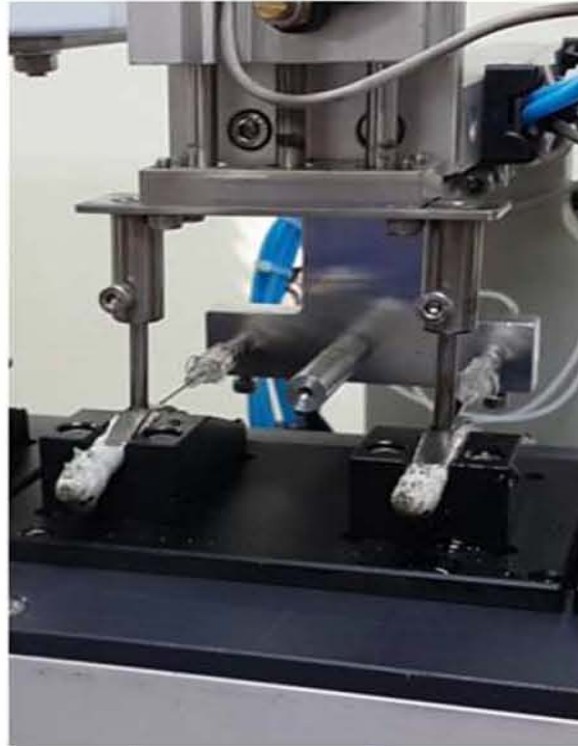


그림 9-1. 2차년도 면역유도 주사장치

- 2차년도 지지부의 구조는 누에 유충의 후장부분을 고정시켜 유도액을 주사하는 방식으로 제작되었으나, 이는 주사액 주입 시 주사바늘이 체강을 지나쳐 후장안으로 주사액을 주입하는 경우가 빈번히 발생되었는 바, 이를 개선하고자 누에 유충의 외피 전체를 압박하여 유충 지지부에 고정시킨 후, 압박된 후장부분의 체강내로 주사액을 주입 시킨다.



그림 9-2. 유충 지지부



그림 9-3. 지지부에 고정된 누에

- 이는 누에의 몸체가 위를 향하도록(그림 9-2.) 지지부에 고정되어 체강내 주사액 주입이 시행되는 것과 달리 3차년도에는 누에의 몸체를 정방향으로 지지부에 고정하여(그림 9-3.) 2차년도 지

지부에서 발생되었던 증장 또는 후장내로의 유도액 주입률을 낮출 수 있는 성과를 가져왔다.(2차년도 체강주입률 : 85%이상, 3차년도 : 96%이상)

- 또한, 유도액 주사속도는 면역유도 주사장치의 속도 조절에 따라 최고 1초에 2마리 누에가 가능하며, 1시간에 약 7,000여 마리의 면역유도 누에를 생산 할 수 있다.

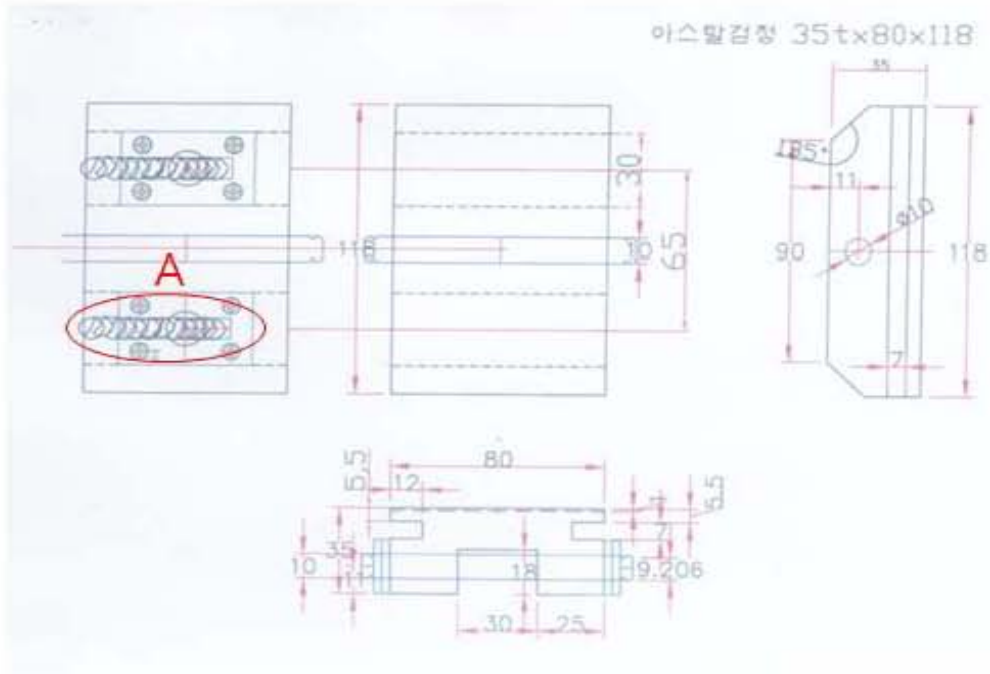


그림 9-4. 유충 지지부 모식도

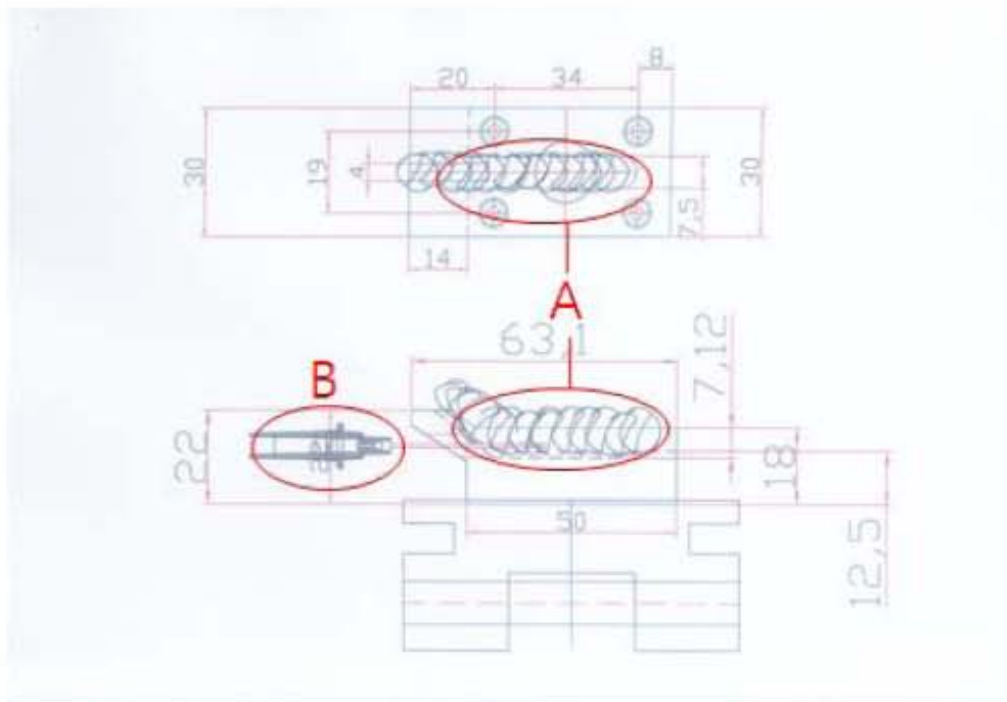


그림 9-5. 유충 지지부 누에 고정 및 주사액 투입 모식도

○ 누에가 유충의 그림 9-4, 9-5 에서 지지부(A)에 있는 소정의 흡에 고정되어 주사액 주입부로 이동되면 주사액 주입부(B)가 전진하여 누에 체강내 주사액을 주입시킨다.

(2) 누에 유충 지지부 벨트 확장

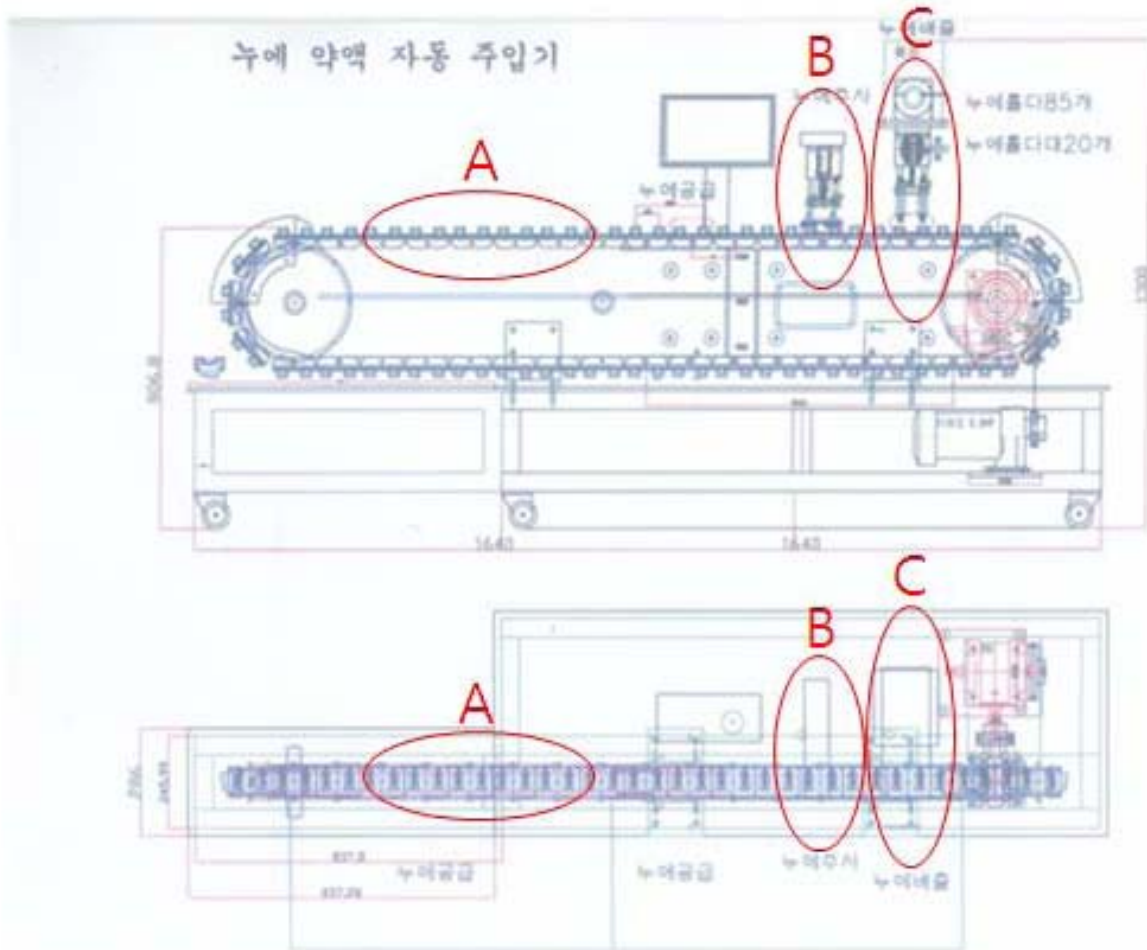


그림 9-6. 누에 번역 유도장치 모식도

○ 위에 설명한 바와 같이, 그림 9-6는 상기 지지부(A)에 고정된 누에가 주사액 주입부(B)로 이동하여 주사액이 주입된 누에를 지지부(A)로부터 분리하여 수집할 수 있는 누에 분리부(C)의 모식도 이다.

○ 누에 분리부(C)는 누에 유충과 결합하는 유충 흡착부 및 유충이 흡착부에 흡착되도록 유충 흡착부의 공기를 펌핑하는 흡착 펌핑부를 포함한다. 이것은 공기 펌핑에 의한 흡착력을 이용하여, 다양한 위치 및 방향에서 유충을 유충 지지부(A)로부터 분리시킨다.

○ 여기서, 흡착 펌핑부는 유충 흡착부가 유충과 결합되어 유충을 유충 지지부(A)로부터 분리시키는 경우 공기의 펌핑을 중단하여 유충을 유충 흡착부로부터 이탈시킨다. 이후 유충은 건조할 유충 저장부에 낙하하여 저장된다.



그림 9-7. 누에 면역 유도장치

- 2차년도 벨트에 결합된 지지부 개수는 1쌍이 1조를 이뤄 총 26쌍, 즉52개의 지지부가 벨트에 고정되어주사액 주입이 이루어 졌다.
- 당해년도에는 면역 유도 누에의 대량 생산을 원활히 하기 위해 벨트의 길이를 확장하여 40쌍, 총 지지부의 개수는 80개까지 확장을 하였다. 이는 누에지지부로의 누에 고정 시 작업 공간확보를 함으로써 최대 두 명이었던 2차년도의 장치 구조와 달리 최대 4명까지의 공간을 확보함으로써 주사액 주입의 속도를 가속화 하였다.

(3) 면역 유도 누에의 분말제형을 위한 누에생산, 유도주사 및 건조



그림 10-1. 잠입장

○ 살아 있는 누에(5령5일자) 250kg를 생산하였다(그림 10-1)



그림 10-2. 유도액 주사를 위한 누에 비활성화

- 누에 체강 내 유도액 주사를 위해 누에를 비활성화 할 필요가 있다.
- 차가운 물(그림 10-2, 15내지 20℃)에 15분 이상 담가 줄 경우 누에는 잠시 움직임이 비활성화 됨으로써 유도 주사를 손쉽게 할 수 있었다.



그림 10-3. 유도장치를 통한 먼역누에 생산



그림 10-4. 유도액 주사를 마친 유도누에

- 이렇게 유도액이 주입된 누에유충은 통풍이 잘되고 기온이 20내지 25℃가 유지되는 공간에서 약 18시간동안 유도하는 하는 동안 비활성된 누에 유충이 다시 활성화가 이루어지며, 누에 체내에서 유도액의 영향으로 인한 면역유도가 진행되어 진다.
- 마이크로 웨이브를 이용한 건조기에 투입될 시 약 2kg의 누에를 1개의 용기에 담아 연속적으로 투입되어지며, 완벽한 건조를 위해 건조과정을 2회 실시하였다.



그림 10-5. 마이크로웨이브를 이용한 유도누에 건조

- Microwave 건조벨트의 속도를 제어하는 플러부의 벨트 회전속도는 최소 100mm/min에서 최대 10m/min까지의 조절이 가능하며, 건조기 내부 천장에는 총 18개의 Magnetron(2개의 Magnetron이 한 쌍)이 240mm간격으로 설치되어 전자파를 발산하도록 설계되었다.
- 시료(건조 전 누에)가 투입되면 1번과 2번 Magnetron부터 순차적으로 작동을 시켜 16번 까지 총 8쌍의 Magnetron을 제어부를 통해 작동시킨다.
- 100kg의 시료(유도누에)를 Microwave 건조기 투입구를 통해 10회(회당 10kg)분할 투입하였을 시, 약 20분의 소요시간을 나타내었다 건조된 누에는 바로 분말화가 가능하다.
- 개발된 주사 자동화 장치를 활용하여 면역 누에를 생산하기 위해 4월 29 일, 5월 7일, 8일 총 두 차례에 걸쳐 진흥청의 협조를 통한 주사 유도장치의 test를 실시하였으며, 6월 4일, 5일과 11일과 12일, 네 차례에 걸쳐 총 250kg 분량의 누에에 대하여 유도액 주사를 실시하였다. 이를 통해 현재 25kg의 건조누에를 확보하였다.



그림 10-6. 마이크로웨이브를 통해 건조된 면역 유도 누에

바. 면역 유도 누에분말을 이용한 사료첨가제 제형화

(1) 분말샘플 제작

- 유도 면역 누에가루 25kg 생산 : 누에 250kg(4상자 분)생산
- 실험재료(3종): 가수분해물, 지방코팅물, 가수분해지방코팅물
 - * 각각 제 형화 하여 육계 및 산란계 사양시험, 제1협동(농진청:김동욱)기관에



그림 11-1. 누에분말 가수분해, 지방코팅물 및 첨가제

- 면역 유도누에의 분말형태를 가수분해하여 얻은 가수분해물은 누에분말 : 첨가제를 99 : 1의 비율로 혼합하여 얻어졌으며, 지방코팅물과 가수분해 지방코팅물은 71 : 29의 조합비로 제작하였다.

(2) 포장디자인 및 상표출원

- 누에관련 자료 수집(포장디자인, 유통기한 참고용)

제품	생산업체	제품형태 (kg당가격)	유통기한
	(주)산마을	동결건조분말 (30만원)	제조일로부터 24개월
	상상팜랜드(주)	동결건조분말 (14만원)	제조일로부터 12개월
	블랙플러	동결건조분말 (15만원)	제조일로부터 12개월

제품	생산업체	제품형태 (kg당가격)	유통기한
	(주)유기농플러스	동결건조분말 (12만원)	제조일로부터 12개월
	산청군 양잠농협	동결건조분말 (13만원)	제조일로부터 12개월
	친호식품	동결건조누에환 (28만원)	제조일로부터 24개월
	상주양잠협동조합	동결건조분말 (13만원)	제조일로부터 12개월
	영천양잠협동조합	동결건조분말 (13만원)	제조일로부터 12개월
	정읍양잠협동조합	동결건조분말 (9만원)	제조일로부터 12개월
	주식회사 금잔화 커뮤니케이션	동결건조누에환 (16만6천원)	생산일로부터 36개월
	초원한방플러스	백강삼환 (15만원)	제조일로부터 12개월
	영천양잠 농업협동조합	동결건조분말 (16만4천원)	제조일로부터 12개월
	함양농업협동조합	동결건조분말 (22만원)	제조일로부터 12개월
	미소원	실크누에분말 (70만원)	제조일로부터 12개월
	정우당	동결건조분말 (20만원)	제조일로부터 24개월

표 6-1.

(3) 시제품 개발



누에플러스(전면)



누에플러스(뒷면)

그림 11-2. 누에플러스(전면, 후면)

○ 누에플러스 뒷면 내용

- + 천연항생제 : 누에
- + 원산지 : 국산(충남 공주)
- + 내용량 : 500g
- + 원재료명 및 함량 : 유산균
유도및 마이크로 건조100%
- + 반품 및 교환처 : 구입처
또는 판매처
- + 보관방법 : 직사광선을 피하고,
서늘한 곳
- + 내포장재질 : 폴리프로필렌
- + 소비자상담실 : 031-264-7600
- + 유통기한 : 포장일로부터
24개월까지
- + 제조·판매원 : 그린테코(주)

○ 상표 : 특허청 키프리스 검색 (중복 및 유사 상표 미포함)
(상표안)

상표명	비고	상표명	비고
플러스누에(plus)	플러스	누에내추럴(natural)	자연의, 천연의, 타고난
<u>누에플러스(plus)</u>	<u>플러스</u>	누에오가닉(organic)	유기적인;유기농의, 천연의, 자생적인
누에폼은		누에퍼펙트(perfect)	완전한, 완벽한, 최적의, 완성하다
누에파워	유사거절사례.	누에그레인(grain)	알갱이, 곡식, 곡물
누에튼튼		누에초이스(choicе)	선택
누에첨가제		누에골드(gold)	골드
누에스타(star)	스타	누에슈프림(supreme)	최고의, 최대의
누에사랑	기등록	누에후레쉬(fresh)	신선한, 새로운, 산뜻한
누에로	유사포기사례(가나안누에로 silk)	누에프리미엄(premium)	상급의, 고급의
누에랑	기등록	누에밸런스(balance)	(밸런스) 균형, 안정, 조화
누에드림(dream)	꿈꾸다, 상상하다	누에프라임(prime)	가장, 한창, 전성기, 주요한
누에그린	거절사례.	누에릴리프(relief)	탁월함, 강조, 안도, 편안함
내추럴플러스	웨스탈 제품 기등록	누에파인(fine)	좋은, 고급의, 품질이 좋은, 양질의
내추럴플러스		누에릴렉스(relax)	편안, 쉬게하다
누에퓨어(pure)	순수한, 순전한, 완전한	누에브리드(breathe)	숨쉬다, 호흡하다, 불어넣다, 살아있다
누에프로(pro)	프로	누에밀타임(mealtime)	식사 시간
갈아만든누에		누에시니어(senior)	연장의, 상위의, 최상급의
누에에너지(energy)	에너지, 힘	누에아이딜(ideal)	이상적인
누에액츄얼리(actually)	사실은, 실제로, 정말로	누에맥시멈(maximum)	최대, 최고, 극대

표 6-2.

○ 시제품 상표 결정 : 누에플러스

사. 항생제 대체 사료첨가제 경제성 분석

(1) 판매 되는 분말 누에 시장 조사

번호	내용	시장 파악 상담자		
		경남농업기술원 잠사시험장	충남농업기술원 잠사시험장	농진청 잠사양봉소재과
1	지역 이름 연락처	경남하계장 055-254-1333	충남 서계장 041-635-6328	농진청지상덕 010-9358-3183
2	농가 규모	가. 양잠협회(조합장동) 나. 상묘협회(뽕나무) 다. 잠중협회(업자)	조합(공주,서산)	
3	기관에서 하는일	가. 원종생산(기술원)→ 농가보급(잠중업자/1상자42 ,000원.누에알20,000개)	가. 3령까지 키운 후 농가에 분양 - 먹이는 인공+화확	조합에 의뢰
4	기관에서 하는일(일량)	원종 생산	잠중생산	
5	농가에서 신청 시기	5령3일자		
6	살아있는 누에 (농가) 매입 가격 및 누에크기	1kg 9,000-12,000원	가.공주협회 1kg당 9,000원 구매 나.일반업자 1kg당 13,000-14,000원 구매 (불규칙) -1상자 평균 35kg	1kg당 10,000원
7	가공후 판매형태 (분말,당뇨등)	인터넷,자체포장,환(500g)		파쇄 : 매쉬는 100-130
8	가공후 판매형태 (포장 kg 등)	1kg당 120,000-130,000원	가.조합 판매가격(환) 1kg당 130,000원 나.일반업자 1kg당 100,000원	가. 500g나.누에 찌어서 건조 : 급식기계(100도 4시간 실파쇄 해결)누보(주)
9	농가에서 5령3일 가져와 5일까지/무게증가)	40-50% 상승	40% 상승	
10	건조가격		익산 봉동 생강조합 동결 건조 1kg당 14,000원(건조기준)	가. 예천양잠 (냉동건조) 나. 액체 냉동 가능
11	수분			6.9-4%, 평균 6%, 건조냉동:5%
12	기타 가격		동성계약 1상자 100만원 : 5령8일(30kg 살아 있는것)	5령5일 1kg:14,000원

표 6-2.

(2) 무게 대비 건조수율

내용	5령3일	4일	5일	6일첫밥	7일	
무게	3g	3.9g	4.5g	5.4	4.5	
건조 수율	13.5%	16.7%	17.7%	19.8%	23.6%	수분+자체무게

표 6-3.

(3) 시판되고 있는 사료첨가제(양계제품)

제품명	생산업체	효능 · 효과	첨가율(%)
베타포스플러스	(주)에스에프	고온 및 저온스트레스 사료섭취량 개선	0.1~0.2
티아피드	(주)에스에프	CRD 예방 및 치료 성장촉진	0.25~1
세라토	(주)에스에프	면역증강 분뇨악취감소	0.1~0.2
린스믹스	(주)동방	CRD, CCRD 예방 및 치료	0.5
펜콜골드	우진 비앤지	마이코플라즈마 헤모필러스 등	0.1
우진 콜리스틴-10	우진 비앤지	대장균증, 비브리오성	육계전기 0.1 육계후기 0.02~0.05
옵티맥스	(주)이글벳	중체율, 분만시간단축	0.05~0.1
월로벳 린팩	유한양행	마이코플라즈마	0.3~0.5
셀멜 가용산	유한양행	세균성장염 폭시듬증 예방	0.3~0.6
월로벳 린코마이신	유한양행	괴사성 장염예방 중체율 개선	0.002~0.004
유한 티마믹스	유한양행	성장촉진 사료효율 개선	0.025~0.1
록시푸러스수용산	(주)신일바이오젠	CRD, CCRD 예방 및 치료	음수투여 0.1
골든리버큐	우성양행	식욕증진 지방간 예방	음수투여 0.1~0.2
파워믹스플러스	우성양행	산란율증가 수정율 및 부화율개선	0.1~0.2
파워레이	우성양행	성장촉진 사료효율 개선	0.2~0.4
파워모스	우성양행	폐사율감소 중체율 증가	0.1~0.3
씨티씨100	(주)제일바이오	면역력증진 항병력 향상	0.05~0.2
제일 콜리스틴	(주)제일바이오	설사병 예방 사료효율 개선	0.025~0.2
노스파이스 에그웰	(주)대호	소화흡수 산란기간 연장	0.1~0.2

표 6-4.

(4) 면역유도 누에 사료첨가제로써의 경제성 분석 : 시장동향 경제성 분석

번호	내 용	1kg 분말기준 가격(단위:원)	10kg 분말 기준 가격(단위:원)	기 타
1	살아 있는 누에 구입가격(5월5일자)	5.9kg=88,500	59kg=880,000	- 누에분말 1kg 생산시 살아있는 누에 5령5일자 필요량 5.9kg - 살아있는 누에 1kg : 15,000원
2	유산균 유도시 비용	25,000	250,000	- 유산균및 자동 주사
3	건조비	10,000	100,000	-마이크로 웨이브 건조
4	- 제형화비(코팅)	3,000	30,000	- 1kg 코팅비 3,000원 (원료71%,코팅29%) - 코팅으로 무게 상승 29%
5	-기타 (전기료,포장비등)	10,000	100,000	
	①--소 계	136,000	1,360,000	
	②--loss(10%)	13,600	136,000	
	③--영업비 및 관리비(①+②)*35%	179,520	1,795,200	
4	합 계(①+②+③)	179,520	1,795,200	
	이윤(11%)	19,747	197,747	
5	예상 판매가	200,000	2,000,000	

표 6-5.

5. 곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증(제3형등)

□ 항생효과 및 안전성 검증을 위한 시료제조

○ 사료첨가제 사업화를 위한 곤충 유래 천연항생물질의 안전성 검사를 위한 시료제조

- 안전성 검사와 항생효과 검사를 위한 시료제조는 서로 독립된 방법을 사용
- 시료제조 방법을 간략히 설명하면 아래와 같음
 - 1) 1 g의 각 누에 분말에 10 ml의 70% 에탄올 용액을 첨가
 - 2) 72시간 동안 실온에서 교반
 - 3) 원심분리 후 상등액을 새로운 tube로 이동
 - 4) 85℃ 이상에서 5분간 가열하고 다시 원심분리하여 상등액을 분리
 - 5) syringe filter를 사용하여 filtering 하고
 - 6) speed vac.을 사용하여 건조 및 사용 때 까지 -70℃에서 보관
 - 7) 1×의 PBS 용액을 사용하여 용해 후 일정한 양을 안전성 연구에 사용



그림 1. 누에 분말 시료로부터 안전성 연구를 위한 시료제조 과정

○ 사료첨가제 사업화를 위한 곤충 유래 천연항생물질의 항생효과 검사를 위한 시료제조

- 세포독성 검사와 항생효과 검사를 위한 시료제조는 서로 독립된 방법 사용
- 시료제조 방법을 간략히 설명하면 아래와 같음
 - 1) 1 g의 각 누에 분말에 10 ml의 0.3% Acetic acid 용액 첨가
 - 2) 1시간 동안 실온에서 교반
 - 3) 원심분리 후 상등액을 새로운 tube로 옮김
 - 4) 85℃ 이상에서 5분간 가열하고 다시 원심분리하여 상등액을 분리
 - 5) speed vac.을 사용하여 건조 및 사용 때 까지 -70℃에서 보관
 - 6) 1×의 PBS 용액을 사용하여 용해 후 일정한 양을 항생효과 검증에 사용

가. 곤충 유래 천연항생물질에 대한 안전성 연구

(1) 누에 분말로부터 추출한 시료를 이용한 안전성 검증

(가) 곤충 유래의 항생펩타이드를 사용한 세포독성 예비실험

- ① 본 연구과제의 재료인 항생물질유도 누에 분말을 이용한 사료첨가제 개발에 대한 효과를 확인하기 이전에 현재 비슷하게 연구되어 지고 있는 재료에 대한 독성을 예비적으로 확인 할 필요가 있음
- ② 봉독은 꿀벌유래의 항생물질로서 항균효과가 우수한 것으로 알려져 있음
- ③ 이러한 특징으로 현재 항생제 대체물질로 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 봉독의 항균효과를 나타내는 주요 성분은 melittin 임
- ④ melittin의 경우 순수한 단일물질의 항생펩타이드로써 단일 항생펩타이드가 가지는 세포 독성에 대한 예비 데이터를 확보하여 향후 본 연구에서 확인하게 될 천연의 누에 유래의 항생펩타이드에 대한 세포독성 연구 시 비교 데이터로 활용이 가능함
- ⑤ 또한 제1세부과제의 경우 단일 항생펩타이드(예를 들어, melittin과 PLJE1)를 과 발현하는 형질전환 누에 제작을 통하여 항생효과를 가지는 사료첨가제 개발에 대한 계획을 가지고 있음으로 이에 대한 선행연구 및 예비시험결과를 확보하기 위해서 단일의 항생펩타이드에 대한 세포독성 예비실험은 반드시 필요함
- ⑥ 각 섬유도세포인 L929 세포주와 소장 유래의 세포 Caco-2 세포 등 2 종류의 세포주를 이용하여 세포독성에 대한 예비 연구를 실행

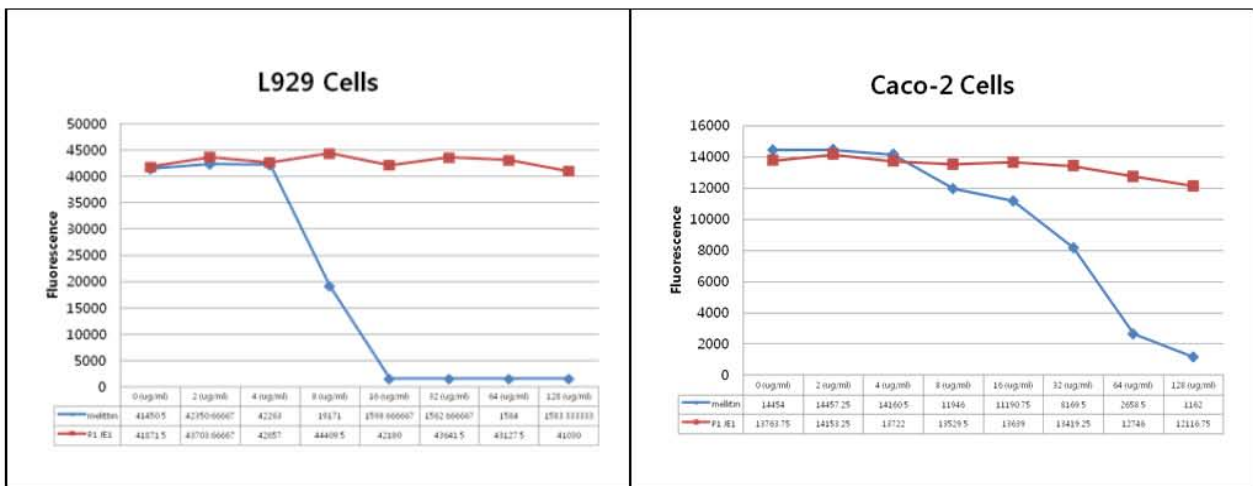


그림 2. 단일 항생펩타이드 melittin과 PLJE1의 각 두 종류의 세포주에 대한 세포독성을 나타낸 그림

- ⑦ 방법을 간략히 설명하면,
 - A. 24시간 전에 일정한 수의 각 세포를 96-well의 black plate에 접종
 - B. 37°C CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하고 아래의 표와 같이 일정한 양의 항생펩타이드를 첨가하여 증
 - C. 37°C CO₂ 배양기에서 72시간 동안 배양하고 세포의 증식력 측정을 위한 시약 (CellQuantiBlue)을 첨가
 - D. 37°C CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양하고 plate reader를 사용하여 세포증식력 측정
- ⑧ 위의 그림에서 보여 준 바와 같이 L929 및 Caco-2 세포주에 대한 melittin의 LD₅₀은 32µg/ml과 8µg/ml의 농도임을 확인


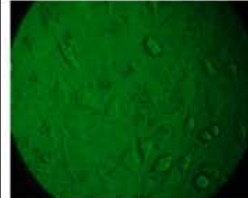
	무처리, 정상세포, 17 hrs, 400×		mellitin peptide, 8 ug, 17 hrs, 400×		P1JE1 peptide, 128 ug, 17 hrs, 400×
-----------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------

그림 3. 단일 항생펩타이드 melittin과 P1JE1의 L929 세포주에 대한 각 항생펩타이드 처리 후 17시간 동안 배양한 세포사진(항생펩타이드, 처리농도, 배양시간, 현미경 촬영배율의 순서로 표기)

- ㉑ 특이적으로 P1JE1의 경우 melittin에 비하여 안전성 측면에서 훨씬 우수한 결과를 보임
- ㉒ 본 1차년도 보고서의 항생효과 검증 부분에서 기술한 내용과 같이 P1JE1이 melittin에 비해 항생효과 역시 우수한 것으로 나타남
- ㉓ 따라서, 본 연구과제의 최종결과물인 천연항생물질의 경우 P1JE1이 안전성 측면에서 우수할 것으로 확인됨

(나) 정상 및 유도 누에 유래의 추출물을 이용한 세포독성 예비 실험

- ① 항생물질 유도 누에 분말을 이용한 사료첨가제 개발에 대한 효과를 확인하기 위하여 두 단계로 나누어 세포독성 연구를 진행
- ② 우선 누에분말의 질량 비율(=%weight/vol.)로 두 개의 서로 다른 세포에 처리하여 안정성 검증
- ③ 아래의 그림에서와 같이 추출물의 경우 24시간 배양 조건에서 0.5% (weight/vol.)의 농도 이하에서 좀 더 안전성을 보이는 것으로 나타남











				
무처리	정상누에 0.125	정상누에 0.25	정상누에 0.5	정상누에 1.0
				
무처리	유도누에 0.125	유도누에 0.25	유도누에 0.5	유도누에 1.0

그림 4. 정상 및 항생물질 유도 누에 추출물의 L929 세포주에 대한 처리 후 24시간 동안 배양한 세포사진(=%weight/vol.)

- ④ 72시간 배양, 0.5% (weight/vol.)의 농도 이상처리 조건에서 세포배양을 통해 안전성 확인

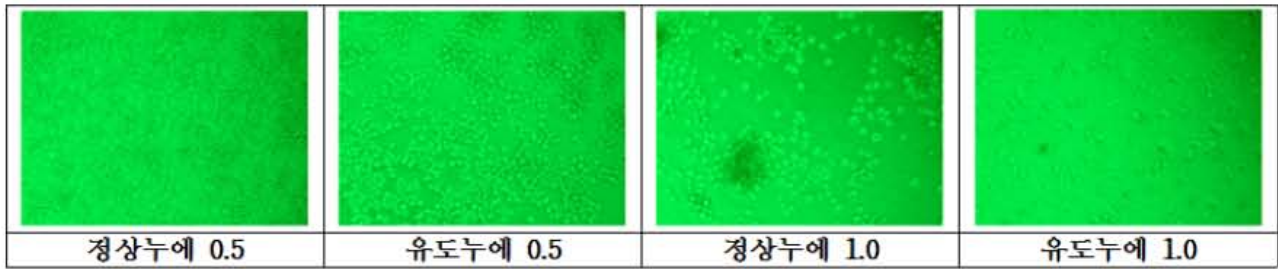


그림 5. 정상 및 항생물질 유도 누에 추출물의 L929 세포주에 대한 처리 후 72시간 동안 배양한 세포사진 (%=weight/vol.)

⑤ 세포증식력 측정

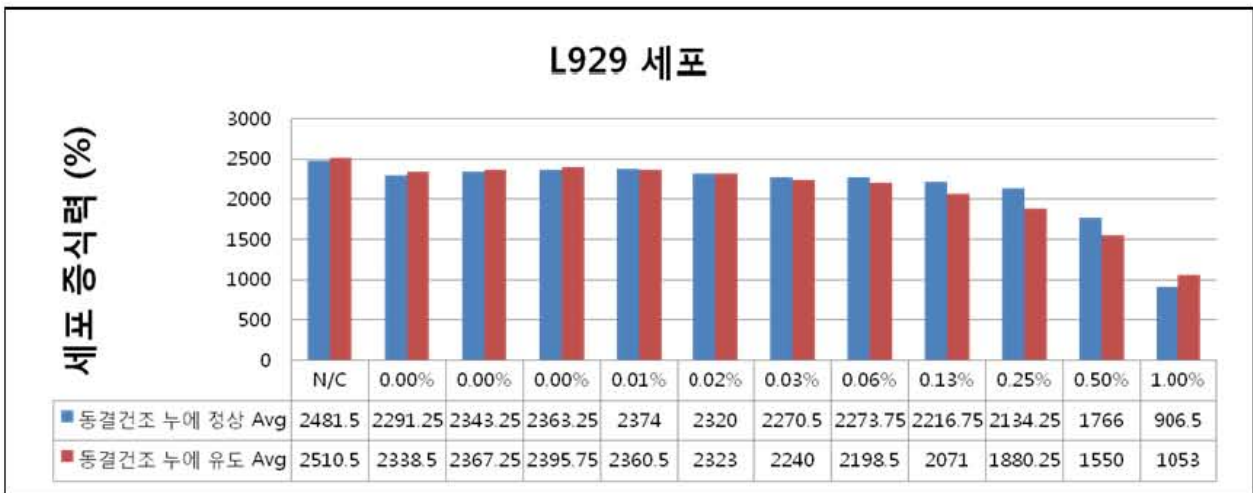


그림 6. 정상 및 항생물질 유도 누에 추출물의 L929 세포주에 대한 처리 후 72시간 동안 배양한 세포의 증식을 (CellQuantiBlue 이용)

(다) 정상 및 유도 누에 유래의 추출물을 이용한 세포독성 연구

- ① 이상의 결과는 해당 세포에 대한 누에 추출물의 안전성 검사를 위한 예비실험으로서 용매에 대한 누에분말의 질량 비율(%=weight/vol.)로서 시험을 진행
- ② 따라서 위의 예비실험 결과를 바탕으로 좀 더 정확한 안전성 검증을 위하여 미량 함유 물질의 농도 단위 중에서 가장 널리 사용되는 것으로 중량 100만분율 (ppm)의 농도로 연구를 진행
- ③ 정상 및 항생물질 유도 누에는 두 개의 서로 다른 방식(동결 및 열풍)으로 건조를 진행

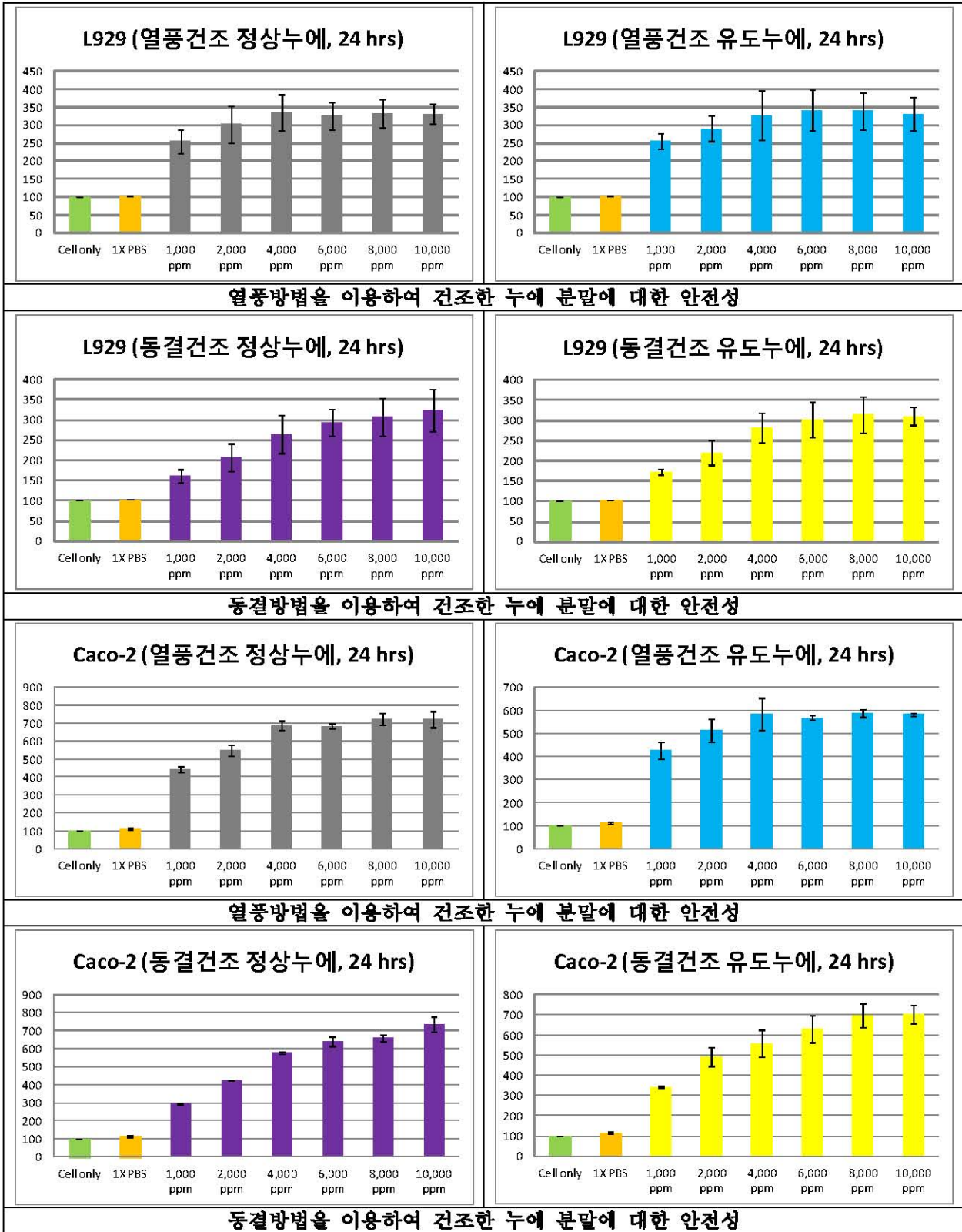


그림 7. 정상 및 항생물질 유도 누에 추출물의 L929와 Caco-2 세포주에 대한 처리 후 24시간 동안 배양한 세포의 증식율, 중량 100만분율(ppm)의 농도 (현재 표시된 농도는 처리 전 농도로써 실제로는 1/10의 농도임)

- ④ 본 연구에서는 두 개의 서로 다른 방식으로 제조된 누에 분말에 대해 각각 안전성을 검사하여 그 효과를 연구
- ⑤ 위의 그림에서와 같이 일정한 농도 이상에서 세포증식력은 거의 유사한 수준의 효과를 나타냄
- ⑥ 각 세포주에 대한 처리농도 별 효과는 아래의 그림과 같이 최고 농도 이하에서는 열풍 건조 방식에 의해 제조된 누에 분말이 동결건조 방식에 의해 제조된 누에 분말에 비해서 더 높은 세포 증식력을 보임
- ⑦ 실제 최고 농도에서는 동결건조 및 열풍건조 등 방법에 차이 없이 거의 일정한 수준의 세포 증식의 효과는 나타냄
- ⑧ 그러나 가장 중요한 효과는 농도에 관계없이 일정하게 무처리군에 비해 월등하게 세포 증식력이 높게 나타남이 특징

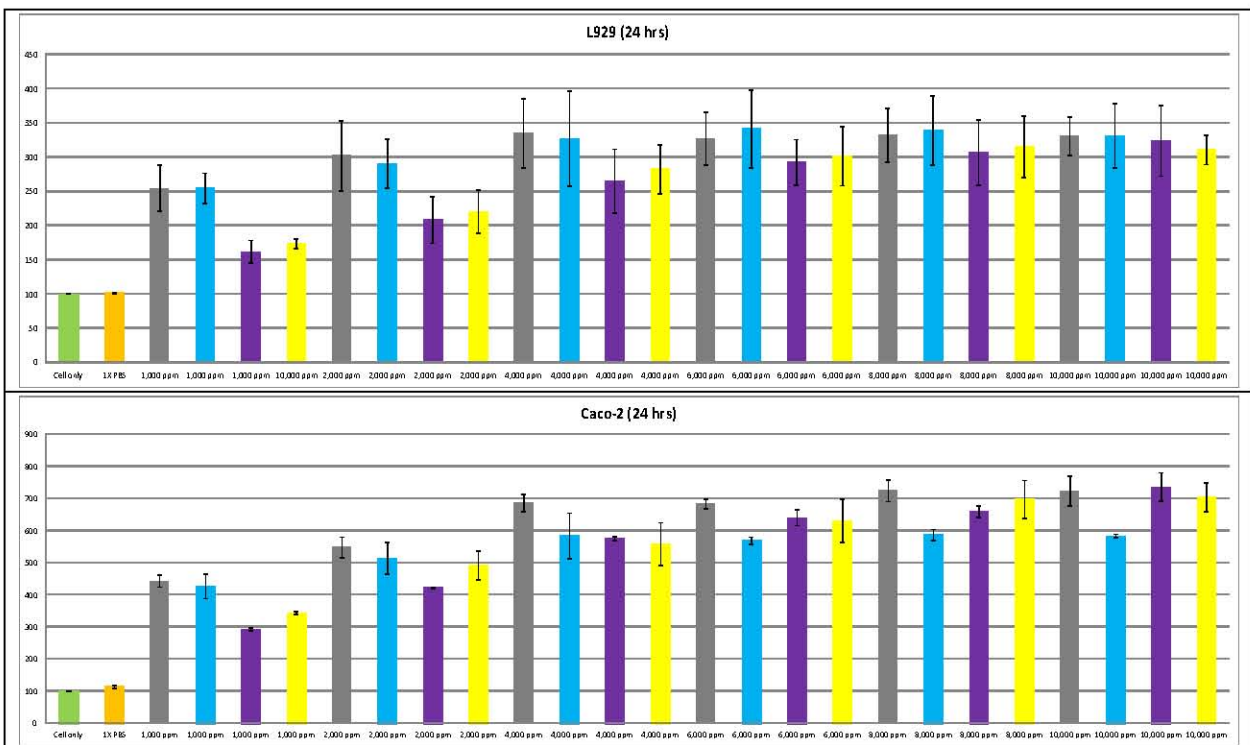
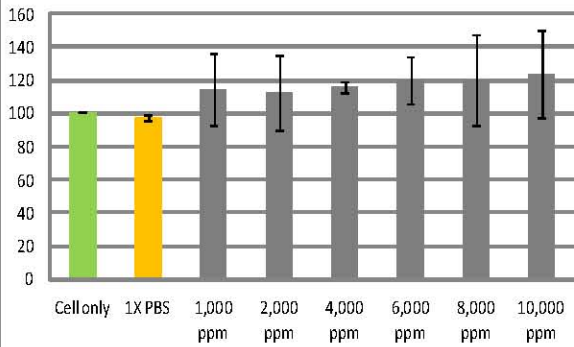


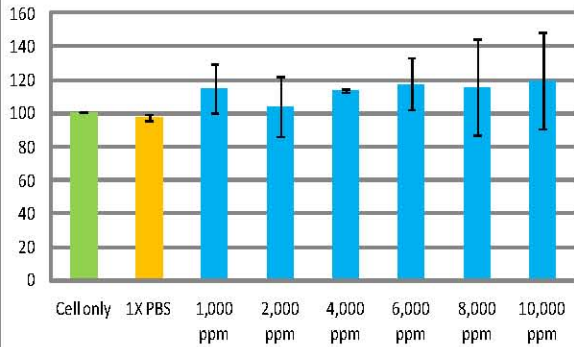
그림 8. 정상 및 항생물질 유도 누에 추출물의 L929 및 Caco-2 세포주에 대한 처리 후 24시간 동안 배양한 세포의 증식율, 중량 100만분율(ppm)의 농도 (현재 표시된 농도는 처리 전 농도로써 실제로는 1/10의 농도임)

- ⑨ 72시간 배양을 통한 세포 증식력 확인

L929 (열풍건조 정상누에, 24 hrs)

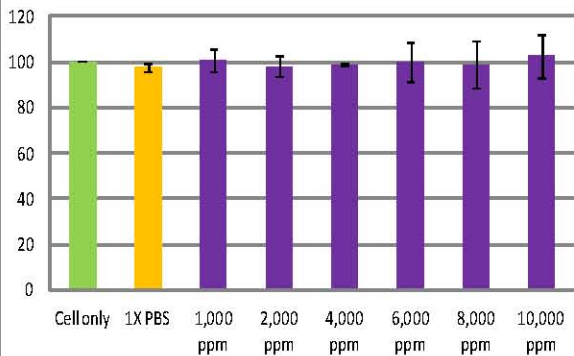


L929 (열풍건조 유도누에, 24 hrs)

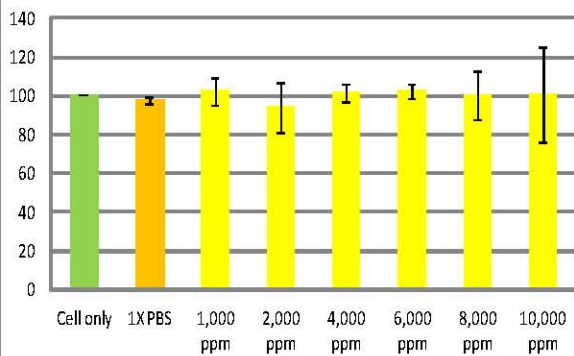


열풍방법을 이용하여 건조한 누에 분말에 대한 안전성

L929 (동결건조 정상누에, 24 hrs)

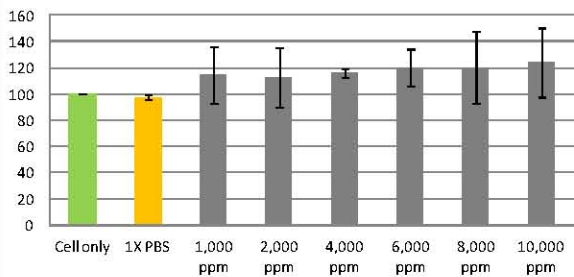


L929 (동결건조 유도누에, 24 hrs)

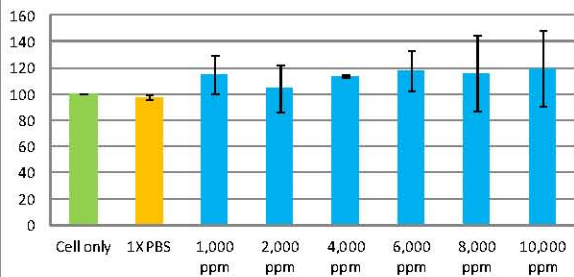


동결방법을 이용하여 건조한 누에 분말에 대한 안전성

L929 (열풍건조 정상누에, 72 hrs)

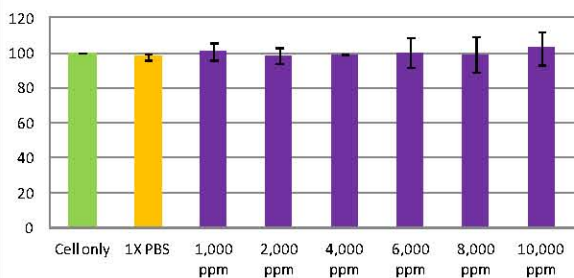


L929 (열풍건조 유도누에, 72 hrs)

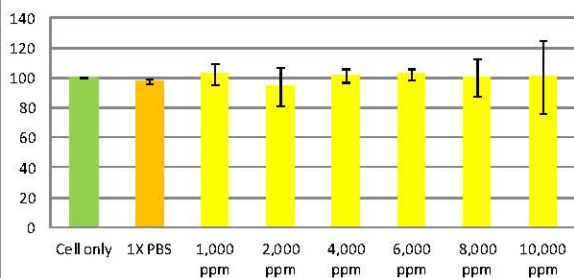


열풍방법을 이용하여 건조한 누에 분말에 대한 안전성

L929 (동결건조 정상누에, 72 hrs)



L929 (동결건조 유도누에, 72 hrs)



동결방법을 이용하여 건조한 누에 분말에 대한 안전성

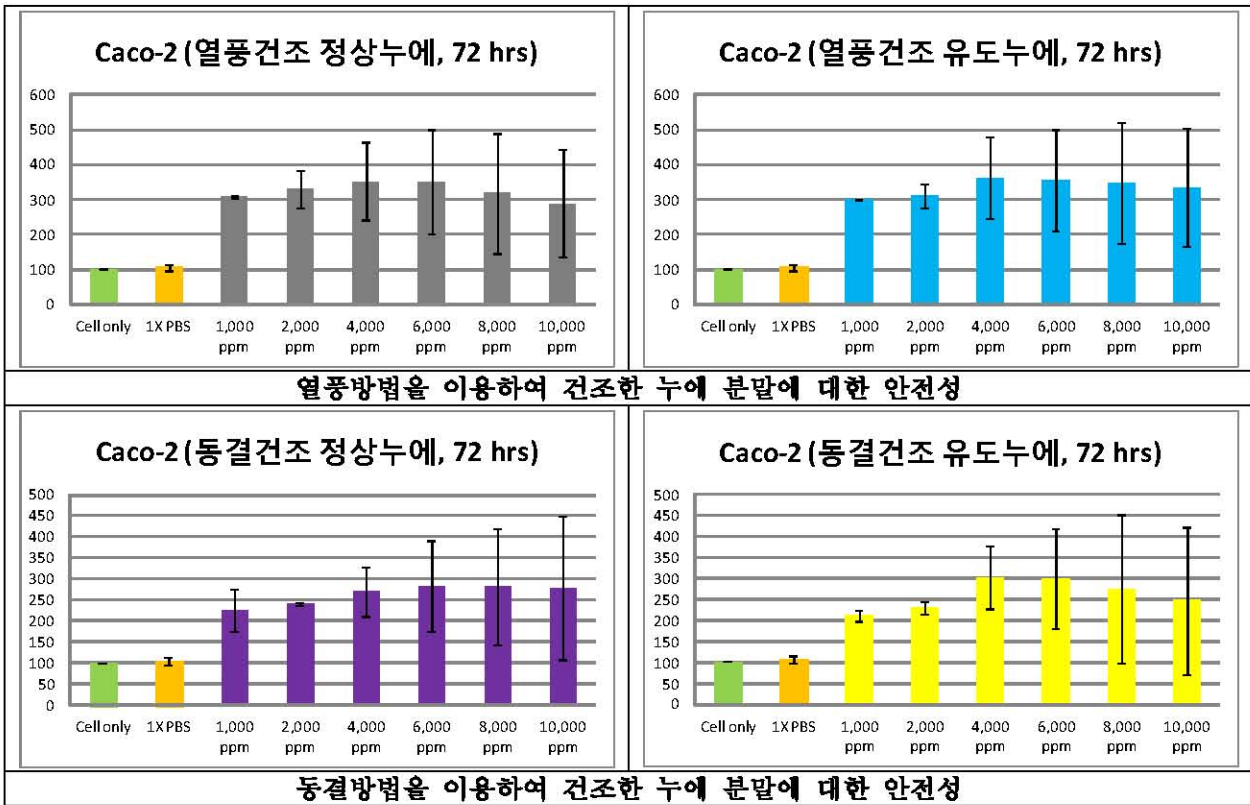


그림 9. 정상 및 항생물질 유도 누에 추출물의 L929 및 Caco-2 세포주에 대한 처리 후 24-72시간 동안 배양한 세포의 증식율, 중량 100만분율(ppm)의 농도 (현재 표시된 농도는 처리 전 농도로써 실제로는 1/10의 농도임)

- ⑩ 위 그림과 같이 L929세포를 대상으로 하는 연구의 경우 72시간 배양의 경우 농도와 관계없이 추출물의 영향력 감소가 예상됨
- ⑪ 그러나 Caco-2 세포를 대상으로 하는 연구의 경우 72시간 배양의 경우 L929 세포에 비해 좀 더 높은 활성을 보임
- ⑫ 이상의 결과로 누에 추출물의 경우 해당 세포에서 안전성은 확인이 되었으며 오히려 세포의 증식을 유도하는 것으로 확인

(라) 정상 및 유도 누에 추출물의 세포독성 연구를 위한 처리 시간 결정

- ① 향후 누에 추출물에 대한 안전성 검사를 위해 누에 추출물이 세포에 영향을 미치는 시간을 정확하게 확인할 필요가 있음
- ② 이를 위하여 위에서 실시한 방법과 동일한 방법을 사용하여 시간대별 효과를 검증하고 가장 합리적인 검사 시간을 결정
- ③ 아래의 그림과 같이 일반적으로 처리 후 24시간에서 가장 효과적이며 이후 감소하는 경향을 나타냄
- ④ 앞선 결과와 동일하게 Caco-2 세포의 경우 L929 세포에 비해 좀 더 효과가 지속되는 경향을 나타냄
- ⑤ 이러한 결과에 따라 최적 처리시간은 24시간이 가장 효율적일 것으로 판단

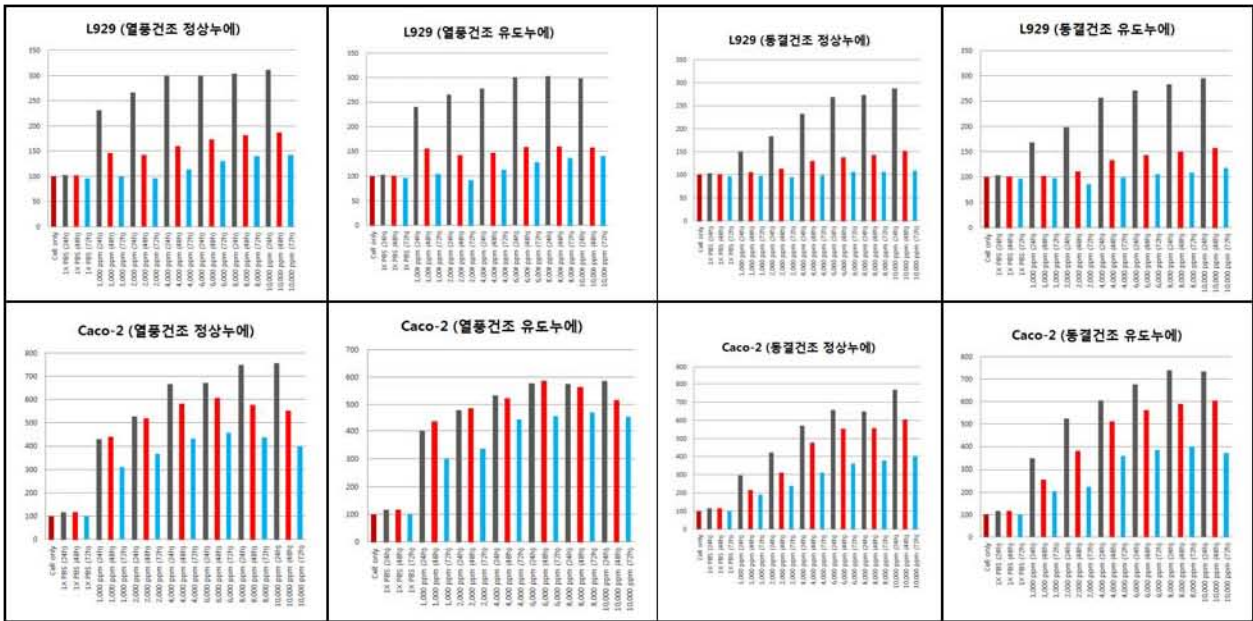


그림 10. 정상 및 항생물질 유도 누에 추출물의 L929 및 Caco-2 세포주에 대한 처리 후 72시간 동안 배양한 세포의 증식율, 증량 100만분율(ppm)의 농도 (현재 표시된 농도는 처리 전 농도로서 실제로는 1/10의 농도임)

(마) 누에 추출물의 세포독성 연구를 위한 최대 처리 농도 확인

- ① 지금까지 세포를 대상으로 하는 안전성 검사는 최대 1,000 ppm/well의 농도로 진행하였음
- ② 제1협동과제의 경우 가금을 대상으로 정상 또는 항생물질 유도 누에 분말을 사료첨가제로 사용 시 최대 5,000 ppm의 농도를 사용한 사양실험을 실시함
- ③ 따라서 본 세부과제에서 시행하는 연구 역시 비슷한 농도에서 효과를 검사할 필요성은 있음
- ④ 하지만 제1협동과제에서 사용하는 누에 분말의 경우는 본 세부과제와는 달리 분말 전체에 대한 농도 ppm을 나타내는 반면 본 세부과제의 경우 분말을 이용한 추출물을 사용함으로써 1,000 ppm/well의 농도는 훨씬 농축된 농도로서 제1협동과제의 5,000 ppm 농도 이상에 해당함
- ⑤ 다만 본 세부과제에서 1,000 ppm/well의 농도 이상의 농도를 확인하여 최대 처리 가능 농도를 확인할 필요성은 있음

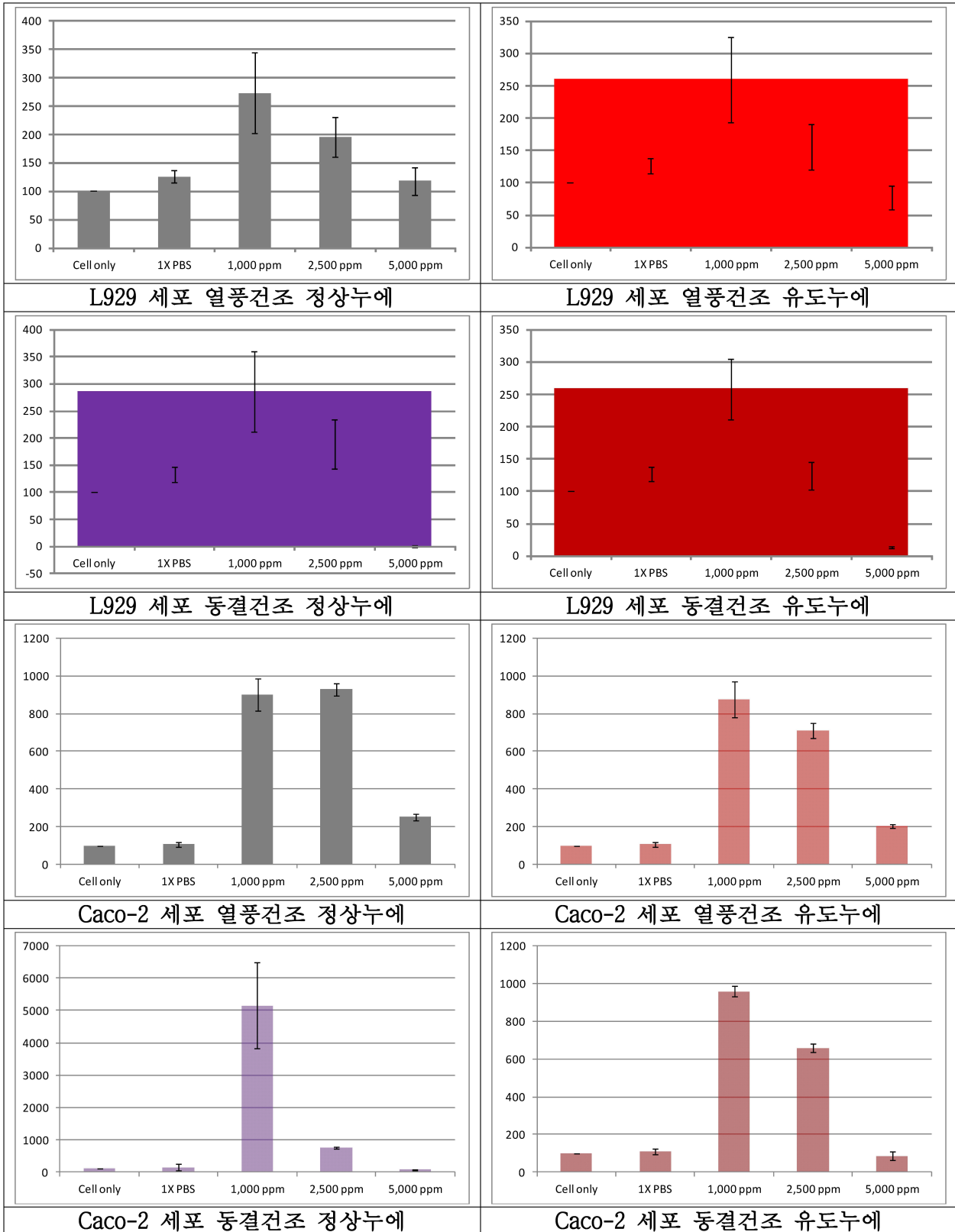


그림 11. 정상 및 항생물질 유도 누에 추출물의 L929 및 Caco-2 세포주에 대한 처리 후 24시간 동안 배양한 세포의 증식율, 중량 100만분율(ppm)의 농도

⑥ 상기의 방법과 동일한 방법을 사용하여 처리 농도는 최대 5,000 ppm/well의 농도가 될 수 있도록 처리

- ⑦ 위의 그림에서와 같이 L929 세포를 대상으로 하는 세포 안전성연구의 경우 최대 2,500 ppm 농도까지는 최소한 무처리 군과 유사한 효과를 나타내는 것으로 확인
- ⑧ 1,000 ppm의 농도까지는 세포의 증식력 증가를 보이며 이후 그 효과가 감소하는 것으로 생각됨
- ⑨ 지금까지의 결과를 종합하면 농도대비 최대의 효과는 600 ppm/well이 가장 우수
- ⑩ Caco-2 세포를 대상으로 하는 세포 안전성연구의 경우 최대 2,500 ppm 농도까지는 최소한 무처리 군과 유사한 효과를 나타내는 것으로 확인
- ⑪ 특히, 열풍건조 방식으로 제조된 누에 분말의 경우 최대 5,000 ppm 농도까지는 최소한 무처리 군과 유사한 효과를 나타냄

(바) 단일의 항생펩타이드를 사용한 항생효과 및 안전성 연구

- ① 형질전환 누에 제작을 통하여 항생효과를 가지는 사료첨가제 개발에 대한 단일의 항생 펩타이드에 대한 안전성 연구
- ② 세포증식력 측정 시약 (CellQuantiBlue)을 이용한 측정
- ③ 정본 연구에서는 두 개의 서로 다른 방식으로 제조된 누에 분말에 대해 각각 안전성을 검사하여 그 효과를 연구

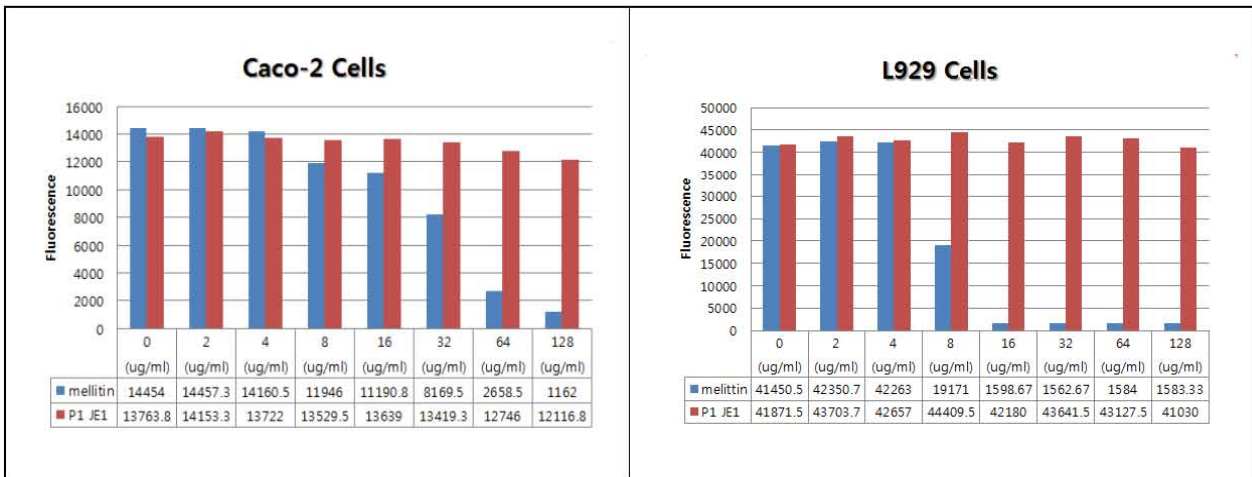


그림 12. 단일 항생펩타이드에 대한 안전성 연구

- ④ 위의 그림에서와 같이 일정한 농도 이상에서 세포증식력은 거의 유사한 수준의 효과를 나타냄
- ⑤ 각 세포주에 대한 처리농도 별 효과는 아래의 그림과 같이 최고 농도 이하에서는 열풍 건조 방식에 의해 제조된 누에 분말이 동결건조 방식에 의해 제조된 누에 분말에 비해서 더 높은 세포 증식력을 보임
- ⑥ 실제 최고 농도에서는 동결건조 및 열풍건조 등 방법에 차이 없이 거의 일정한 수준의 세포 증식의 효과는 나타냄
- ⑦ 그러나 가장 중요한 효과는 농도에 관계없이 일정하게 무처리군에 비해 세포증식력이 높게 나타남이 특징
- ⑧ 각 섬유모세포인 L929 세포주를 이용하여 분말제조방법에 따른 세포독성에 대한 안전성 연구를 수행함

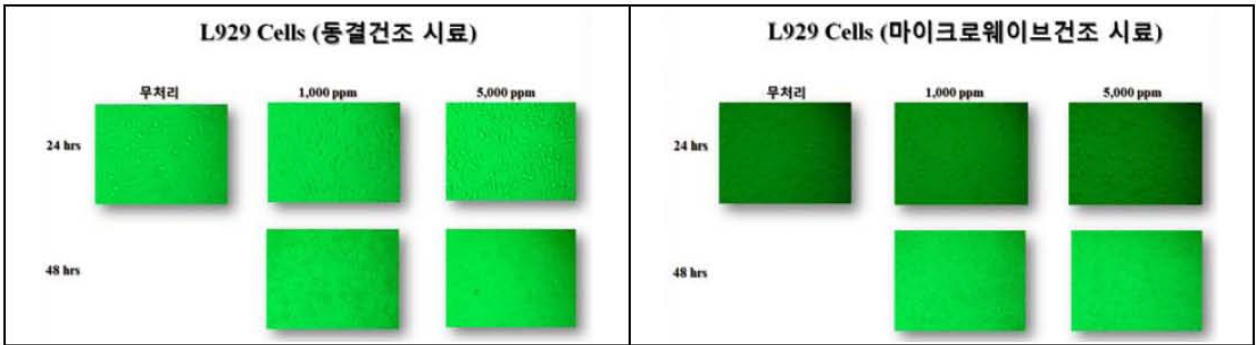


그림 13. 섬유모세포인 L929 세포주를 이용한 안전성 연구

- ⑨ 1차 년도의 연구결과에 따르면 L929세포를 대상으로 하는 연구의 경우 72시간 배양의 경우 농도와 관계없이 추출물의 영향력 감소가 예상됨
- ⑩ 당해 연도의 경우 농도를 달리하여 L929 세포를 대상으로 최대 48시간 배양을 통하여 효과를 관찰 함



그림 14. 시간별, 농도별, 건조 조건별 세포독성연구 (L929세포주 대상)

⑩ 이상의 결과로 누에 추출물의 경우 해당 세포에서 안전성은 확인이 되었으며 48시간까지 세포의 증식을 유도하는 것으로 확인

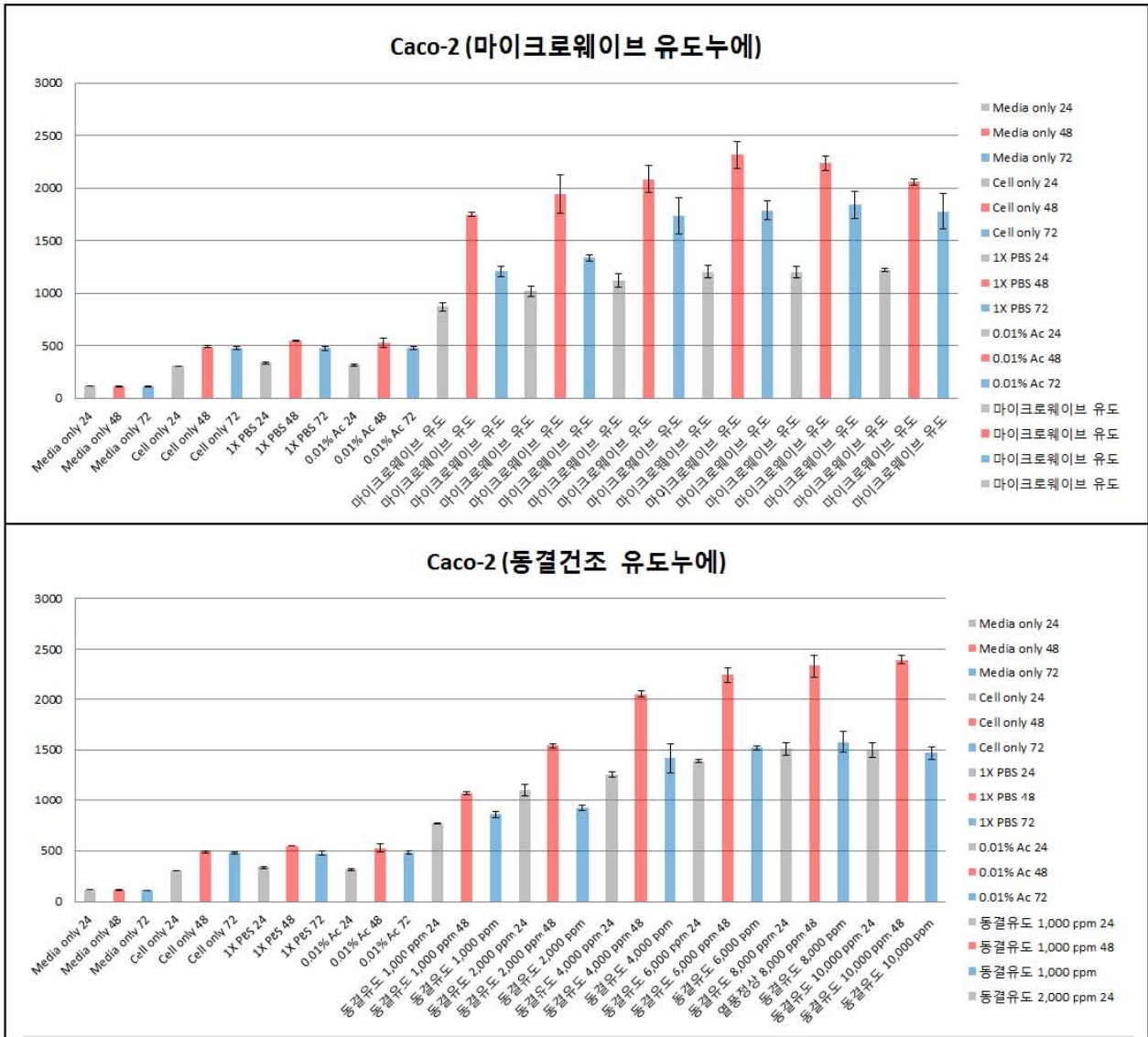


그림 15. 시간별, 농도별, 건조 조건별 세포독성연구 (Caco-2세포주 대상)

⑫ 이상의 결과로 누에 추출물의 경우 해당 세포에서 안전성은 확인이 되었으며 48시간까지 세포의 증식을 유도하는 것으로 확인

(사) 항생펩타이드를 발현하는 형질전환 누에를 대상으로 한 안전성 연구

- ① 지금까지 세포를 대상으로 하는 안전성 검사는 최대 1,000 ppm/well의 농도로 진행하였음
- ② 제1협동과제의 경우 가금을 대상으로 정상 또는 항생물질 유도 누에 분말을 사료첨가제로 사용 시 최대 5,000 ppm의 농도를 사용한 사양실험을 실시함
- ③ 따라서 본 세부과제에서 시행하는 연구 역시 비슷한 농도에서 효과를 검사 할 필요성

은 있음

- ④ 하지만 제1협동과제에서 사용하는 누에 분말의 경우는 본 세부과제와는 달리 분말 전체에 대한 농도 ppm을 나타내는 반면 본 세부과제의 경우 분말을 이용한 추출물을 사용함으로써 1,000 ppm/well의 농도는 훨씬 농축된 농도로써 제1협동과제의 5,000 ppm 농도 이상에 해당함
- ⑤ 다만 본 세부과제에서 1,000 ppm/well의 농도 이상의 농도를 확인하여 최대 처리 가능 농도를 확인 할 필요는 있음
- ⑥ 상기의 방법과 동일한 방법을 사용하여 처리 농도는 최대 5,000 ppm/well의 농도가 될 수 있도록 처리
- ⑦ 위의 그림에서와 같이 L929와 Caco-2 세포를 대상으로 하는 세포 안전성연구의 경우 최대 2,500 ppm 농도까지는 최소한 무처리 군과 유사한 효과를 나타내는 것으로 확인
- ⑧ 1,000 ppm의 농도까지는 세포의 증식력 증가를 보이며 이후 그 효과가 감소하는 것으로 생각됨
- ⑨ 1,000 ppm의 농도까지는 세포의 증식력 증가를 보이며 이후 그 효과가 감소하는 것으로 생각됨
- ⑩ 지금까지의 결과를 종합하면 안전성을 가지는 농도는 최대 2,500 ppm/well 까지 인 것으로 확인됨

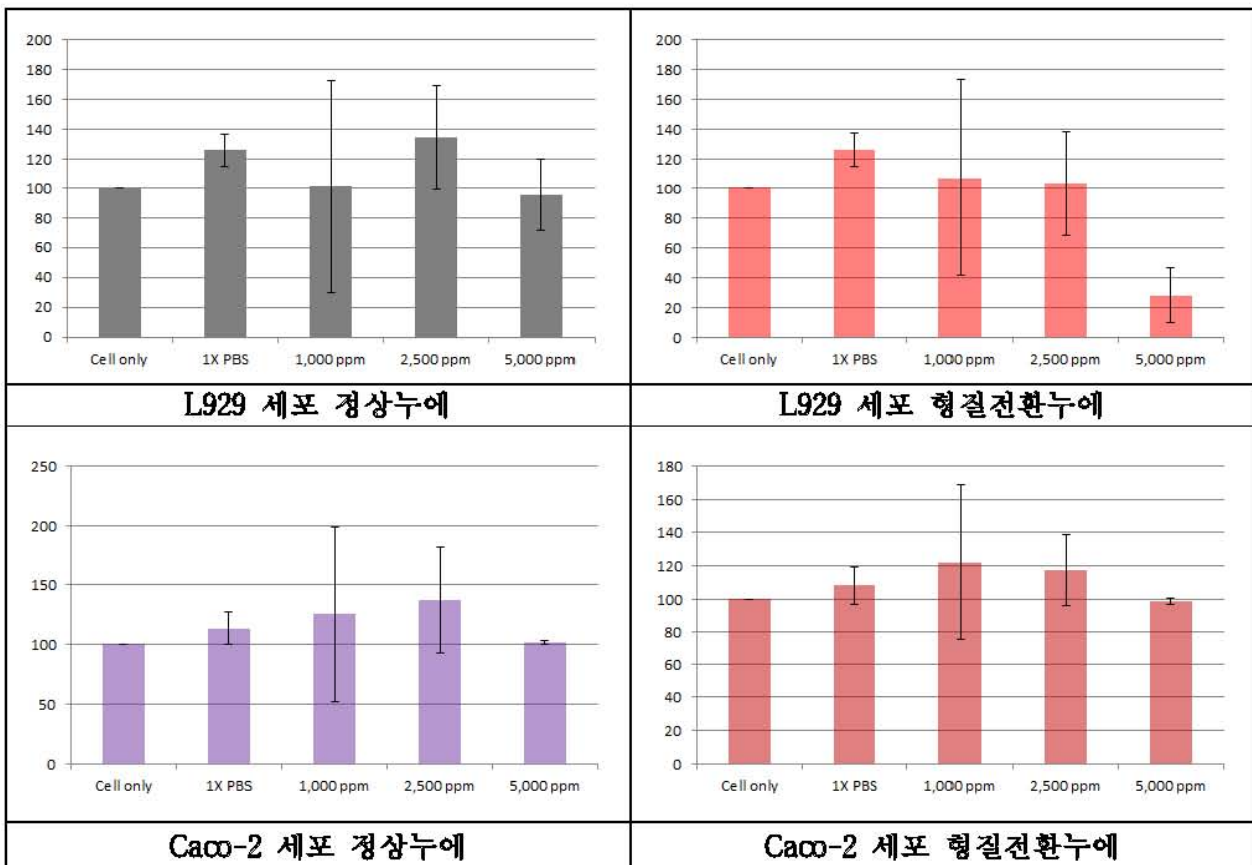


그림 16. L929와 Caco-2 세포를 대상으로 하는 세포 안전성연구

- ⑩ 위의 그림에서와 같이 L929와 Caco-2 세포를 대상으로 하는 세포 안전성연구의 경우 최대 2,500 ppm 농도까지는 최소한 무처리군과 유사한 효과를 나타내는 것으로 확인

(2) 제형화에 따른 전·후의 안전성 연구

(가) 제형화 과정에 따른 세포활성변화 등 사료첨가제로서 안전성 연구

- ① 1차 년도의 경우 제형화의 과정 없이 누에분말을 직접적으로 사용함
- ② 당해 연도의 경우 “나노 입자화” 또는 “지방산 코팅” 과 같은 방법을 통하여 사료 첨가제로서 누에분말의 제형화 과정을 거침
- ③ 따라서 제형화 후 누에분말이 가지는 세포의 활성변화 등 사료첨가제로서의 안전성에 대한 연구를 실시함

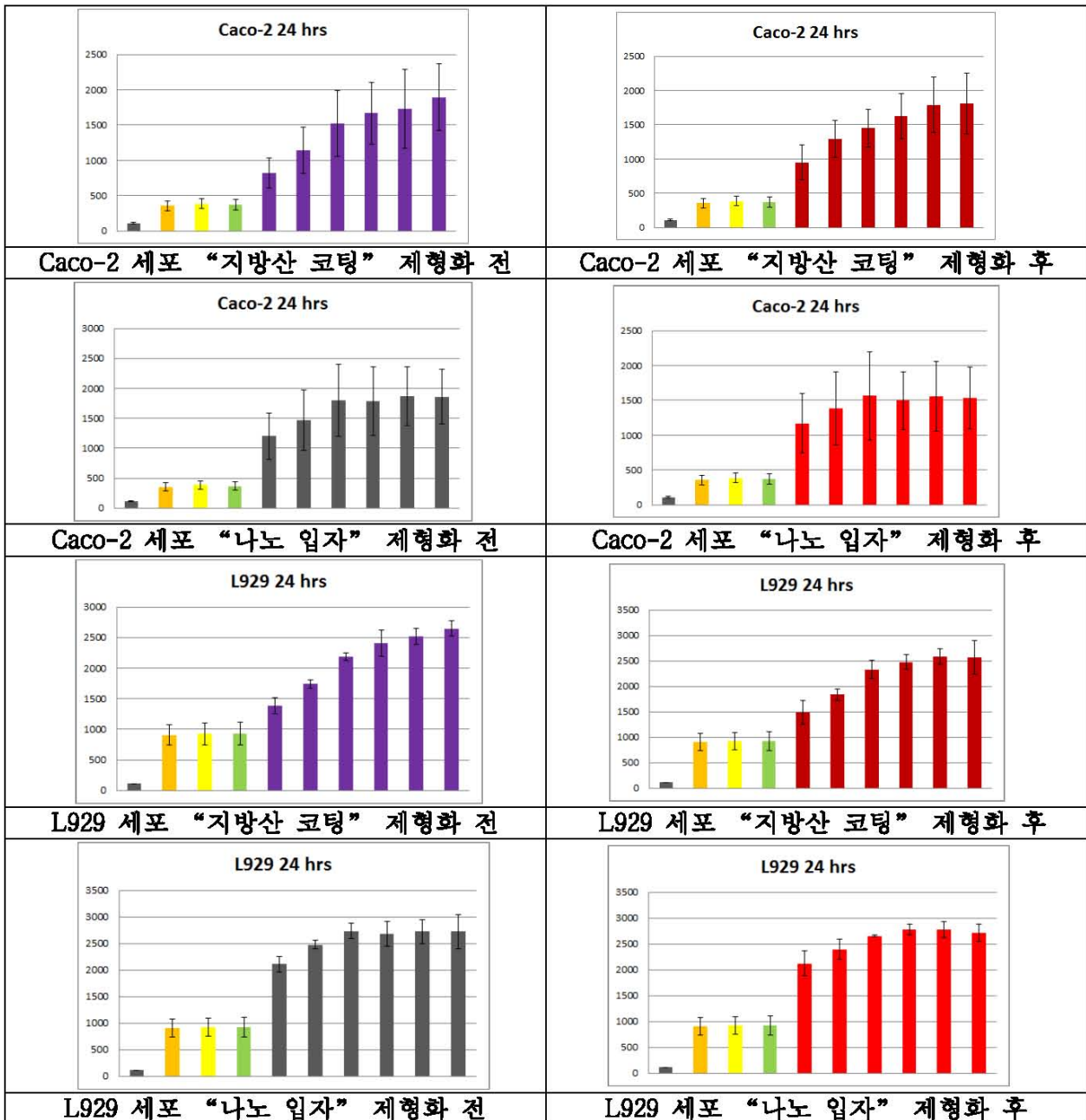


그림 17. 제형화 과정에 따른 세포활성변화 등 사료첨가제로서 안전성 연구

- ④ L929에 처리 후 48시간이 지난 다음 Neutral red로 염색하여 세포에 대한 각각의 안전

성을 확인함

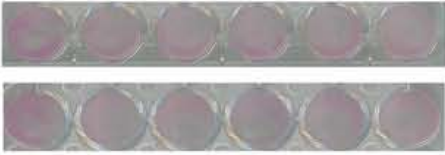



<p>0 250 500 1,000 2,500 5,000 ppm</p> <p>정상 누에</p>  <p>형질전환 누에</p> 	<p>250 500 1,000 2,500 5,000 ppm</p> <p>나노 입자화</p>  <p>지방산 코팅</p> 
<p>“정상누에” 또는 “형질전환 누에” 분말</p>	<p>“나노 입자화” 또는 “지방산 코팅” 누에 분말</p>

그림 18. L929에 처리 후 48시간이 지난 다음 Neutral red로 염색하여 세포에 대한 각각의 안전성 검정

(3) 제형화의 과정에 따른 항생효과 및 안전성 분석

(가) 누에 분말, 부형제 및 이들 모두를 포함하는 제품화 이전 시료를 이용한 안정성 분석

- ① 항생물질 유도 누에 분말의 경우 2차 년도의 연구결과에 따르면 두 개의 서로 다른 제조방법(마이크로웨이브, 동결건조)에 차이 없이 세포에 대한 중식효과가 있는 것으로 나타났다
- ② 시간별 차이로 48시간까지는 오히려 세포의 중식에 효과를 보였음
- ③ 농도별로 보았을 때 최대 5,000 ppm의 농도까지 세포의 독성 등 영향은 없는 것으로 보고되었음
- ④ 당해 연도 부터 해당 연구는 마이크로웨이브를 이용한 건조방법의 시료만을 사용함
- ⑤ 마이크로웨이브 방법에 의해 건조된 유도누에 분말의 경우 3차 년도 연구에 동일한 농도 및 방법을 사용함으로써 제품화를 위한 부형제 및 완제품으로 개발 될 경우와 비교 실험이 용이함
- ⑥ 따라서 본 연구에서는 동일한 농도의 세 개의 서로 다른 실험군 가운데 유도누에 분말과 비교함으로써 그 차이를 쉽게 짐작 할 수 있도록 연구하였음

		
<p>유도누에 분말 (마이크로웨이브건조)</p>	<p>사료첨가용 부형제</p>	<p>사료첨가제 완제품 (사양실험 사용)</p>

그림 19. 제품화 제형별 시료를 이용한 안정성 분석

(나) 누에분말, 부형제, 완제품에 대한 검사용 시료제조

- ① 시료의 제조 방법에 대한 변화는 결과에 영향을 줄 수 있으므로 더 이상 변경하지 않고 이전의 년도와 동일한 방법을 사용하여 제조하였음(단, 실온에서 에탄올 추출은 4시간 정도로 제한하였음)

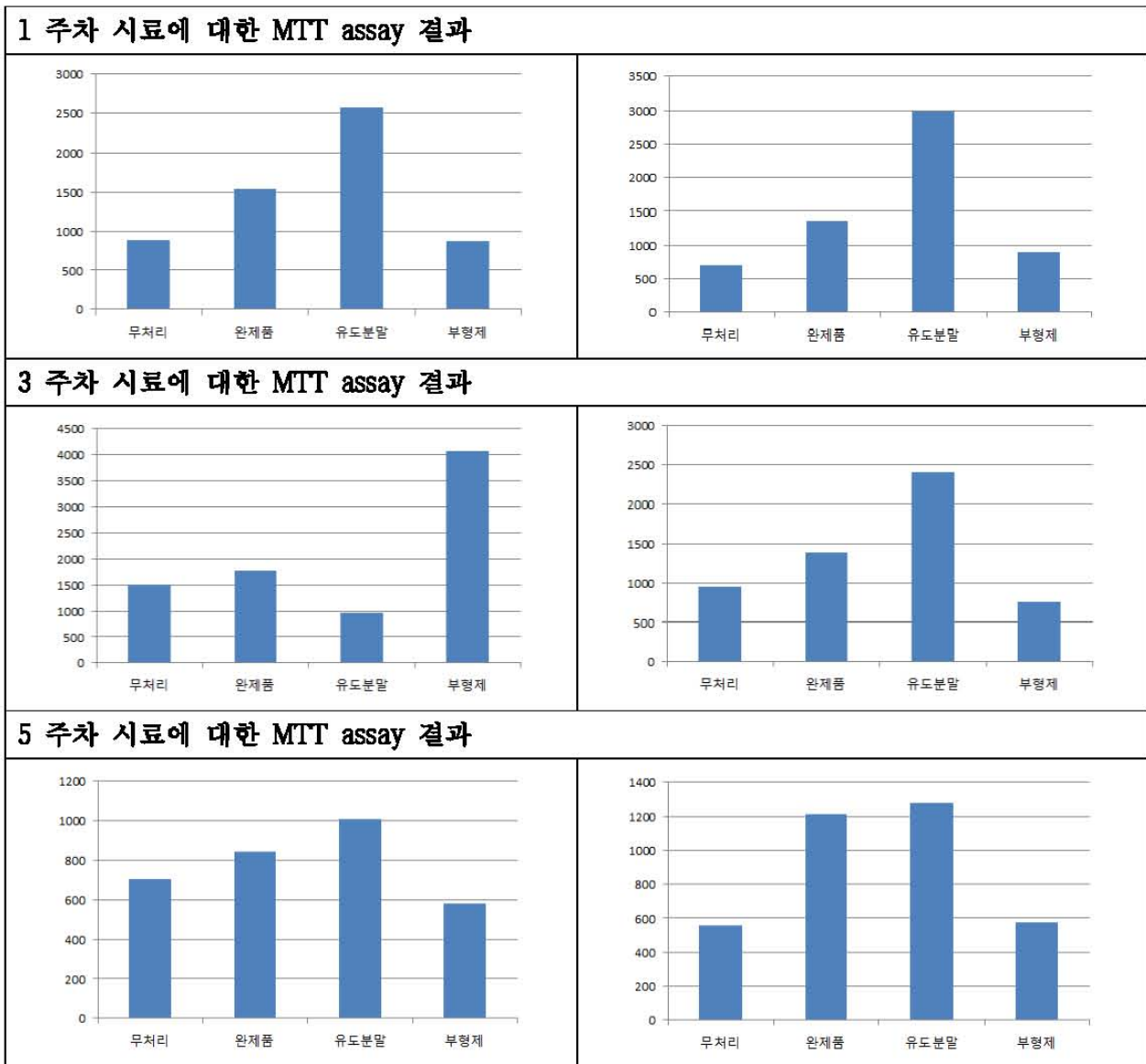
② 다만, 부형제의 경우 지방 성분이 우세하여 최종 제조 시 50℃ 정도의 건조기에서 20분 간 가열하여 사용하였음

③ 이전의 방법에 따른 시료제조 방법을 간략히 설명하면 아래와 같음

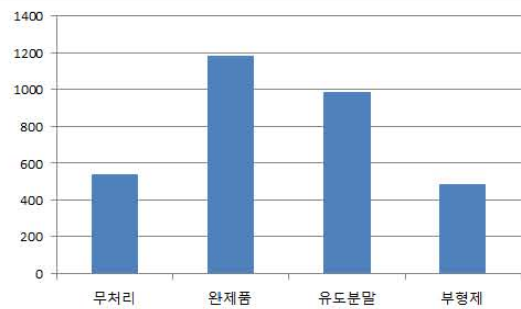
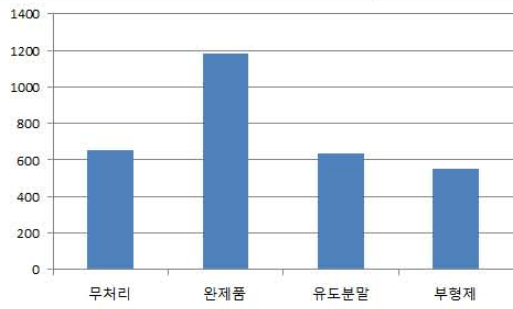
- A. 1 g의 각 누에 분말에 10 ml의 70% 에탄올 용액을 첨가
- B. 4시간 동안 실온에서 교반
- C. 원심분리 후 상등액을 새로운 tube로 이동
- D. 85℃ 이상에서 5분간 가열하고 다시 원심분리하여 상등액을 분리
- E. syringe filter를 사용하여 filtering 하고
- F. Dry oven을 사용하여 건조 및 사용 때 까지 -70℃에서 보관
- G. 1×의 PBS 용액을 사용하여 용해 후 일정한 양을 안전성 연구에 사용

(다) 누에분말 시기별 세포활성 효과 분석(시간별)

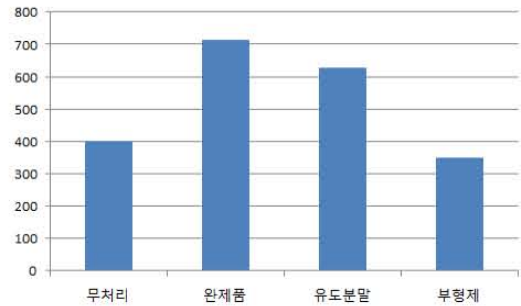
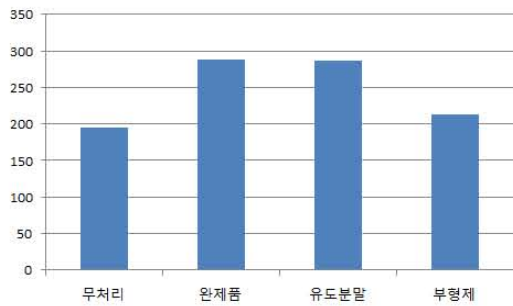
- ① 제형화에 따른 시료의 효과반감기 조사 및 시기별 활성화 검증
- ② 전체 17주(약 4.5개월 이상) 동안 시료에 대한 세포활성 측정을 실시함



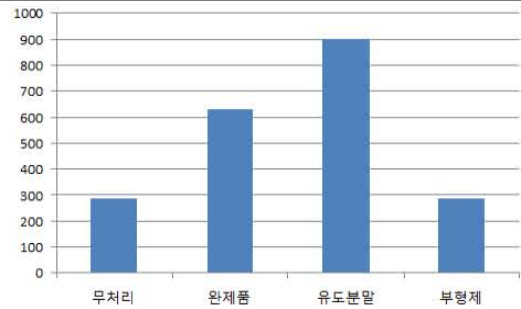
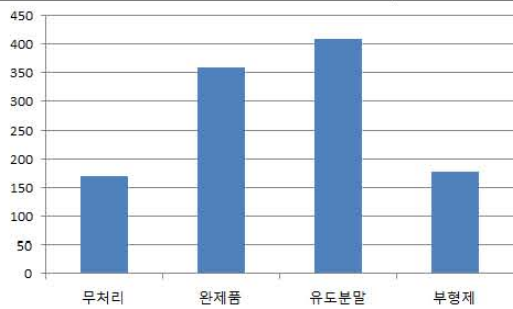
7 주차 시료에 대한 MTT assay 결과



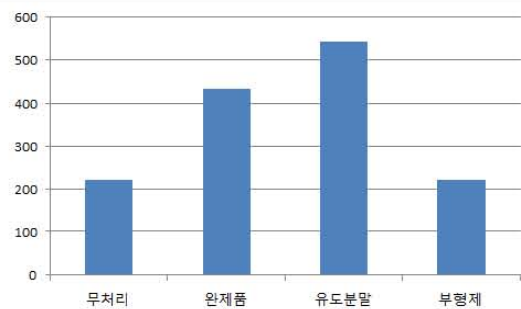
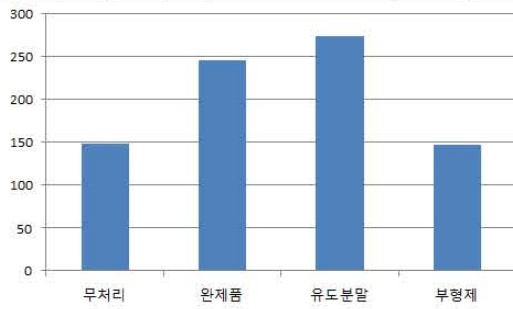
9 주차 시료에 대한 MTT assay 결과



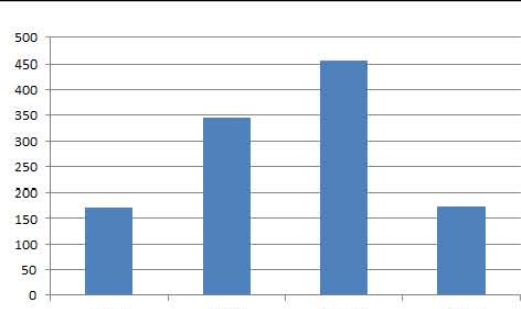
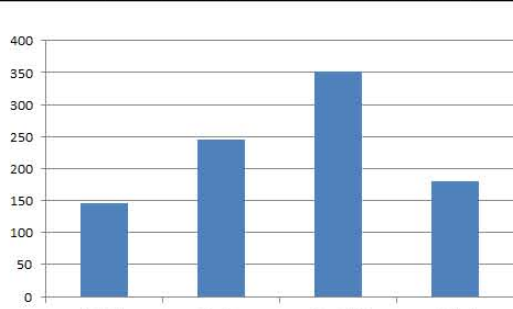
11 주차 시료에 대한 MTT assay 결과



13 주차 시료에 대한 MTT assay 결과



15 주차 시료에 대한 MTT assay 결과



17 주차 시료에 대한 MTT assay 결과

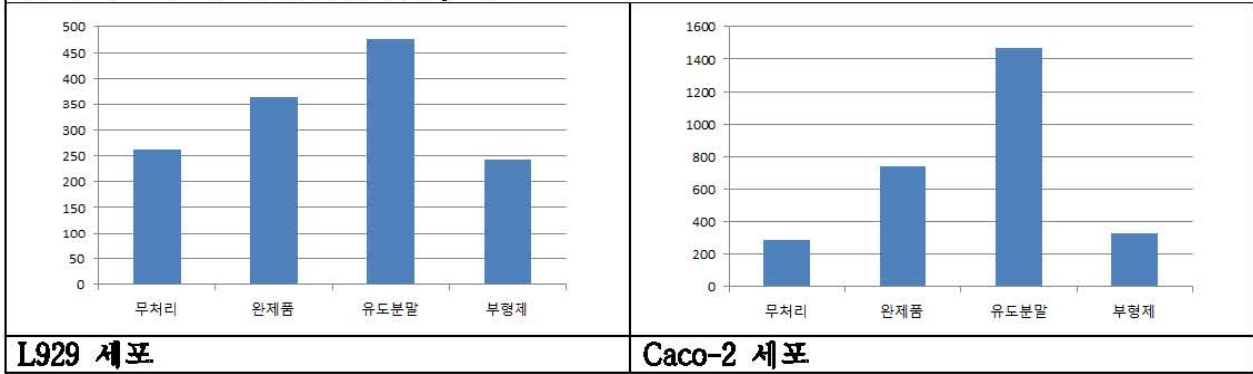


그림 20. 누에분말 시기별 세포활성 효과 분석(시간별)

- ③ 현재 4.5개월 동안의 검증 결과 세포활성에 대한 차이는 없는 것으로 확인됨
- ④ 향후 연구기간 종료까지 계속적으로 2주 또는 4주 단위로 활성을 측정함으로써 내년도 실용화에 대비한 사료유통기한 설정에 중요한 자료가 될 수 있을 것으로 사료됨
- ⑤ 일반적으로 사람을 대상으로 하는 누에 유래의 건강기능식품의 첨가제로서 인·허가와 관련한 기초 자료 확보
- ⑥ 또한 경우 짧게는 1년부터 최대 2년까지 유통이 가능한 것으로 알려져 있음

(라) 누에분말 제형별 세포활성 효과 분석(총3종)

- ① 제형화 방법에 따른 시료의 효과 조사 및 활성도 검증
- ② 3종(지방코팅, 가수분해, 가수분해 및 지방코팅)에 대한 시료를 위와 동일한 방법을 사용하여 추출함
- ③ 지방코팅의 경우 시기별 세포활성의 분석과정을 통하여 이미 효과를 검증함
- ④ 그러나, 시제품으로 새롭게 두 종류의 제형화 방법을 첨가함으로써 향후 이들에 대한 비교실험을 통해 우수한 효과를 보이는 방법을 선택할 예정임

(4) 형질전환 누에 대상 항생효과 및 안전성 연구

(가) 항생펩타이드를 발현하는 형질전환 누에를 대상으로 한 안전성 연구

- ① 2차 년도의 경우 형질전환 누에를 대상으로 이미 안전성 연구는 실시하였음
- ② 이상의 경우, 제1협동과제에서 실시하는 가금을 대상으로 유도누에 분말과 동일한 조건에서 시험을 실시할 계획임
- ③ 2차 년도의 결과에 따라서 정리된 농도의 설정 이유는 아래와 같음
- ④ 농도별 실험에서 정상 또는 항생물질 유도 누에 분말을 사료첨가제로 사용 시 최대 5,000 ppm의 농도를 사용한 사양실험을 실시함
- ⑤ 따라서 본 세부과제에서 시행하는 연구 역시 비슷한 농도에서 효과를 검사 할 필요성은 있으나 제1협동과제에서 사용하는 누에 분말의 경우는 본 세부과제와는 달리 분말 전체에 대한 농도 ppm을 나타내는 반면 본 세부과제의 경우 분말을 이용한 추출물을 사용함으로써 1,000 ppm/well의 농도는 훨씬 농축된 농도로서 제1협동과제의 5,000 ppm 농도 이상에 해당함

- ⑥ 따라서 본 세부과제에서 1,000 ppm/well의 농도 이상의 농도를 확인하여 최대 처리 가능 농도를 확인 할 필요는 있음
- ⑦ 상기의 방법과 동일한 방법을 사용하여 처리 농도는 최대 5,000 ppm/well의 농도가 될 수 있도록 처리
- ⑧ 3차 년도에 실시한 형질전환 누에를 대상으로 하는 안전성 연구의 경우 2차 년도와 차별화 한 내용은 아래와 같음

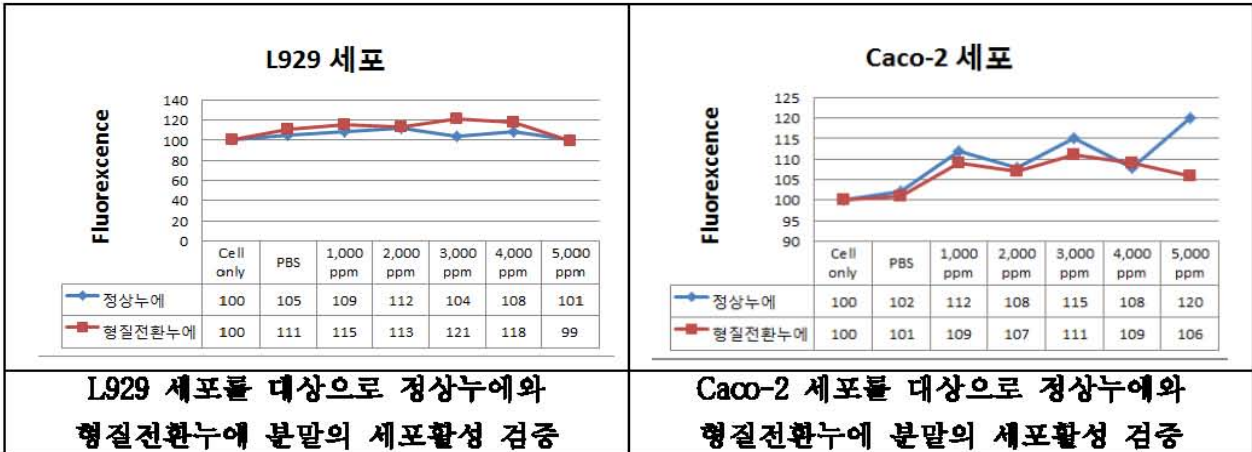


그림 22. 항생펩타이드를 발현하는 형질전환 누에를 대상으로 한 안전성 연구

- ⑨ 우선, 형질전환 누에의 경우 세대고정이 무엇보다 중요함
- ⑩ 이유는 세대고정이 되지 않은 경우 시험연구에 사용한 누에 분말 시료가 안정적이지 못하며 일정한 양의 추출물에 비하여 정확한 비율의 항생펩타이드를 포함하고 있지 않을 확률이 높음
- ⑪ 이러한 이유에서 3차 년도인 당해 연도의 경우 세대고정이 이루어진 형질전환 누에를 대상으로 분말의 안전성 연구를 다시 실시함으로써 좀 더 정확한 결과를 얻고자 함
- ⑫ 다만, 처리시간별 활성에 대한 연구는 향후 당해 연도의 남은 기간 동안 꾸준히 실시할 계획임
- ⑬ 이유는, 현재 세대고정을 위해 선발된 누에가 최근에 완료되었기 때문
- ⑭ 누에는 사육시기가 정해져 있어 연중사육이 어렵기 때문에 봄부터 가을까지 주로 사육이 이루어 짐
- ⑮ 세대고정을 위한 선발 후 전체 연구결과를 검증하기 위한 결과만 실시되었음

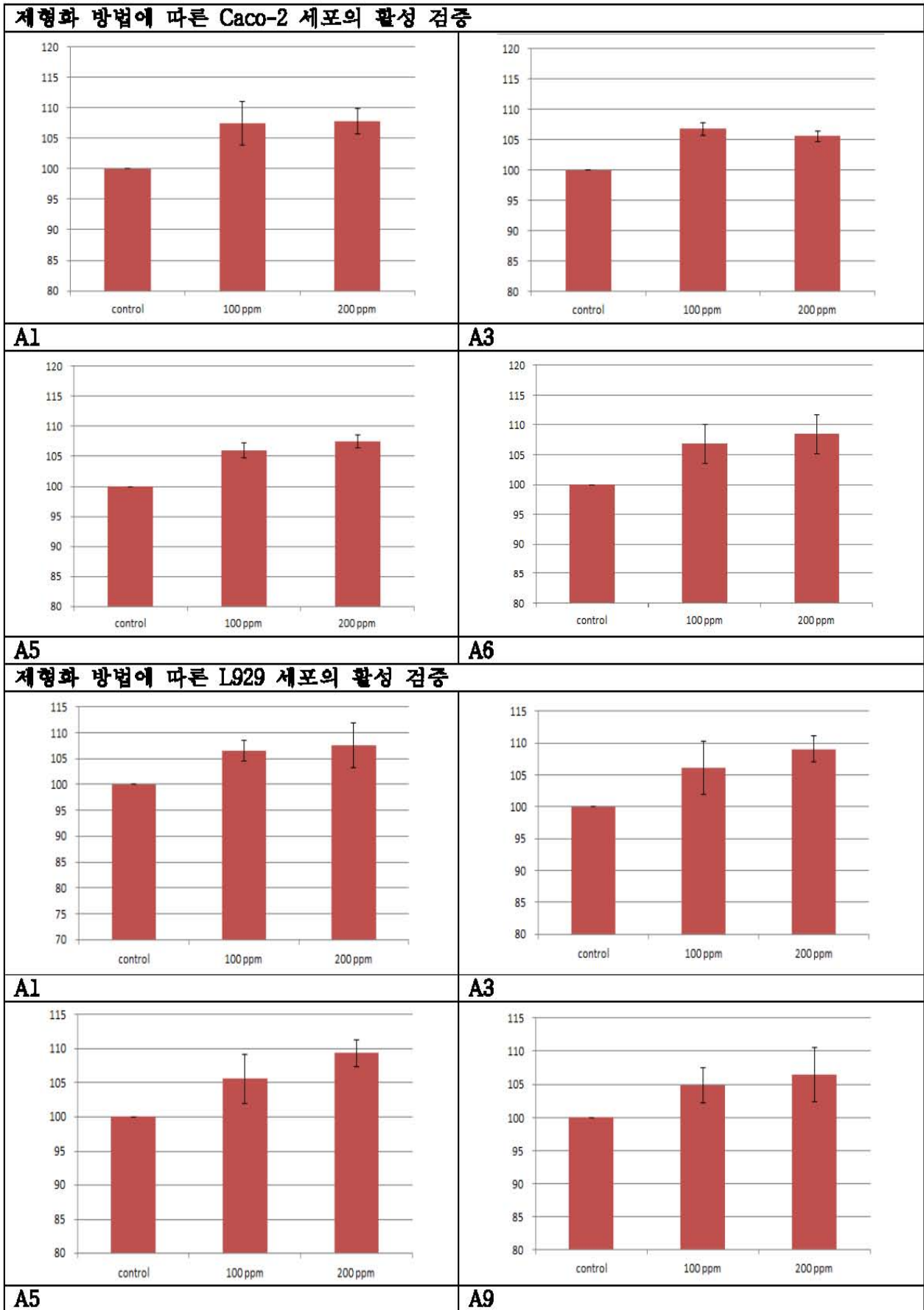


그림 23. 제형화 방법에 따른 세포활성 연구

나. 곤충 유래 천연항생물질에 대한 면역 활성화 연구

(1) Caco-2 세포를 이용한 *in-vitro* 모델시스템 연구

(가) 인간 소장세포 (Caco-2)를 이용한 *in-vitro* 모델시스템

① 인간 소장상피세포에서 장내세균의 면역 cytokines (IL, TRP, IFN 등) 형성과 유도 효과를 RT-PCR 방법을 사용하여 분석함

표 1. 각 RT-PCR primer 및 반응 조건

Target gene	Oligonucleotide sequence 5'-3'	Product size (bp)	Annealing temperature (°C)	GenBank accession number
IL-4	F: TCA TTT TCC CTC GGT TTC AG	160	61.5	NM000589
	R: AGA ACA GAG GG GGA AGC AGT			
IL-10	F: TCA GGG TGG CGA CTC TAT	198	65.5	NM000572
	R: TGG GCT TCT TC TAA ATC GTT C			
TGF-b1	F: GCT GCT GTG GCT ACT GGT GC	322	67	NM000660
	R: CAT AGA TTT CGT TGT GGG TTT C			
TGF-b2	F: CCC CAC ATC TCC TGC TAA	175	61.5	M19154
	R: GTG TAT CCA TTT CCA CCC TA			
TGF-b3	F: CTG AGA ATC ACG GTG GTA AA	128	61.5	X14149
	R: CAT CTC AAC TTA CCA TCC CT			
IL-1a	F: ATG GCC AAA GTT CCA GAC ATG	635	55	M28983
	R: TTG GTC TTC ATC TTG GGC AGT CAC			
IL-6	F: CAT CCT CGA CGG CAT CTC AG	497	62	M54894
	R: GCT CTG TTG CCT GGT CCT C			
IL-18	F: TGA TGT CTG GGT CTT GGT TCT C	299	70	NM001562
	R: GTC CGG GGT GCA TTA TCT CTA AG			
TNF-a	F: TCT CGA ACC CCG AGT GAC AA	124	65	NM000594
	R: TAT CTC TCA GCT CCA CGC CA			
GAPDH*	F: GGA AGG TGA AGG TCG GAG TC	185	56	NM002046
	R: TCA GCC TTG ACG GTG CCA TG			
hBD1	F: CTCTGTCAGCTCAGCCTC	279	65.5	NM005218
	R: CTTGCAGCACTTGGCCTTCCC			
F, forward; R, reverse; bp, base pairs; hBD1, Human beta defensin 1.				
*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.				

- ② 장내 면역 반응과 관련이 있는 유전자의 경우 9개의 후보유전자를 대상으로 cytokine의 발현을 확인
- ③ Caco-2 세포에서 누에분말처리 후 세포의 성장률 관찰을 통하여 정확한 농도를 확인함

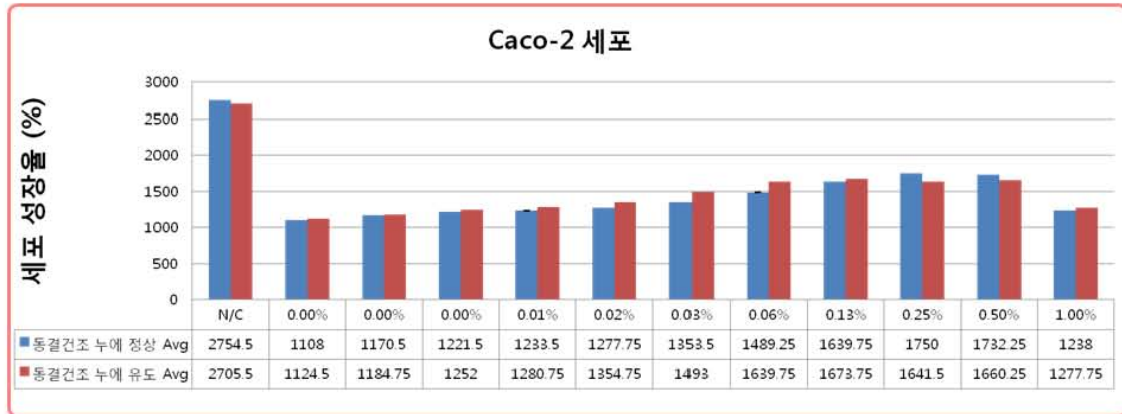


그림 24. 인간 소장세포 (Caco-2)를 이용한 세포 성장률 조사

- ④ 이 결과를 활용하여, 아래의 그림과 같이 3차원 세포배양을 실시하고 적당한 농도의 누에분말을 처리한 다음 Caco-2 세포에서 발현하는 인간 소장상피세포에서 장내세균의 면역 cytokines (IL, TRP, IFN 등) 형성과 유도 효과를 RT-PCR 방법을 사용하여 분석 함

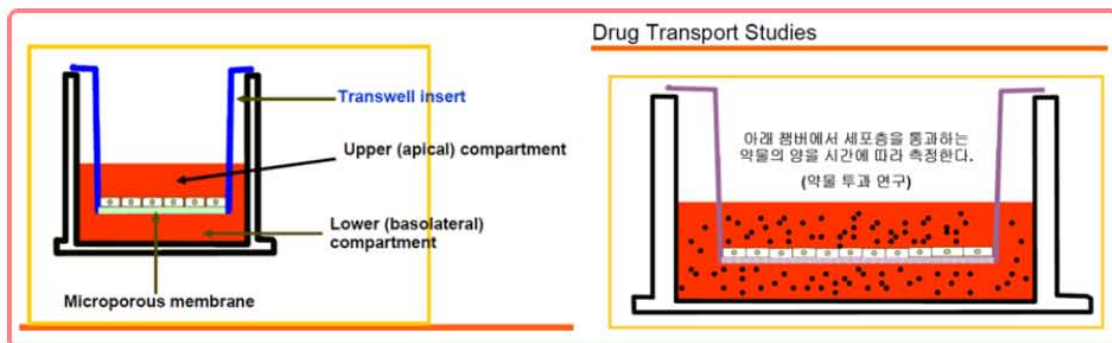


그림 25. 인간 소장세포 (Caco-2)를 이용한 *in-vitro* 모델시스템

(2) 세포모델을 이용한 *in-vitro* 펩타이드 활성 연구

(가) 인간 소장세포 (Caco-2)를 이용한 *in-vitro* 모델시스템

- ① 인간 소장상피세포에서 장내세균의 면역 cytokines (IL, TRP, IFN 등) 형성과 유도 효과를 RT-PCR 방법을 사용하여 분석하였으며, 총 9개의 장내 면역 반응과 관련 유전자의 발현을 확인
- ② 인간 소장상피세포에 소화모델 시스템을 적용하여 최종적으로 소장에 도달하였을 때를 재현하였으며 이를 대상으로 인간 소장상피세포에서 면역과 관련한 cytokine 후보군을 확인함

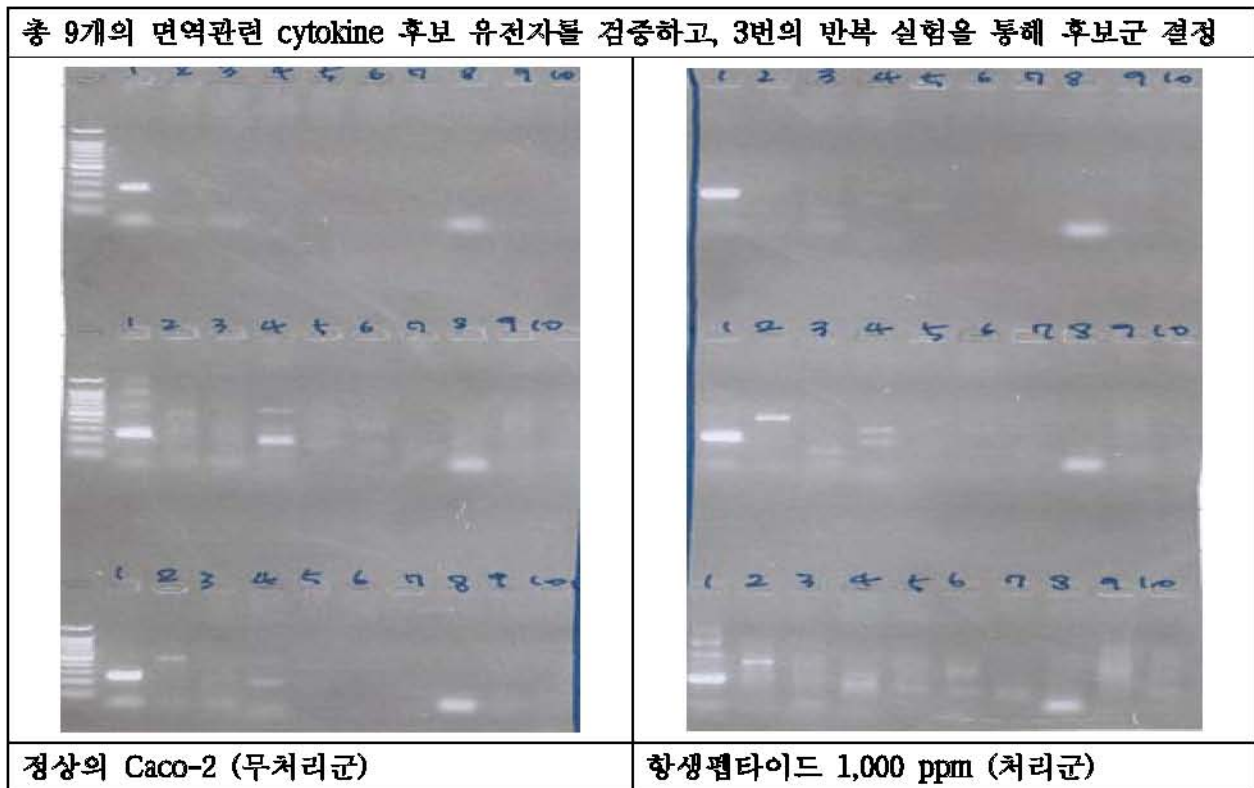


그림 26. 인간 소장상피세포에서 장내세균의 면역 cytokines (IL, TRP, IFN 등) 형성과 유도 효과를 RT-PCR 방법을 사용하여 분석

- ③ 이 결과를 활용하여, 일단 두 종류의 inflammatory cytokine으로서 A와 B를 후보군을 결정함(향후, 특허출원 등 예정이 되어 있으며 이와 관련하여 정확한 cytokine의 명을 표기하지 않음)
- ④ 이상의 두 후보군에 대해 정확한 발현율의 차이 및 항생펩타이드에 의한 장내상피세포의 면역과 관련한 효과를 정량 PCR (Real-Time RT-PCR) 방법을 사용하여 확인함

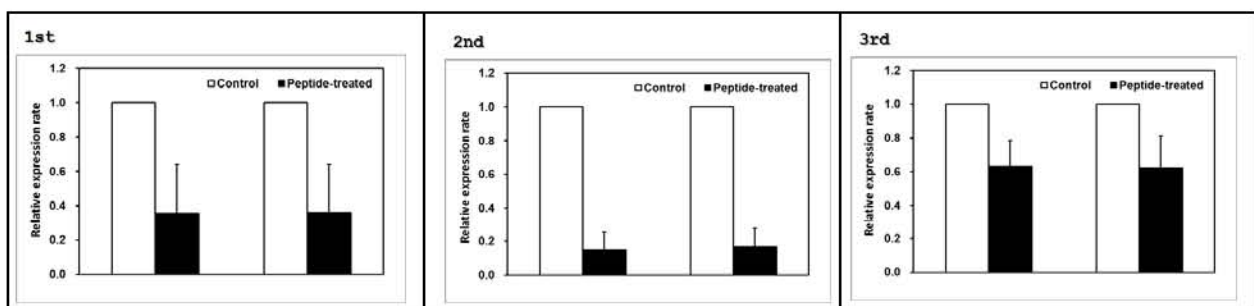


그림 27. 총 2개의 면역관련 cytokine 후보 유전자를 Real-Time RT-PCR 방법을 사용하여 검증(3번의 반복 실험 실시)

- ⑤ 상기의 두 후보군에 대한 항생펩타이드의 장내상피세포의 면역과 관련한 효과를 Real-Time RT-PCR 방법을 사용하여 검증한 결과 항생펩타이드가 장내면역에서 중요한 역할을 하고 있음을 확인 할 수 있었음

다. 곤충 유래 천연항생물질에 대한 항생효과 연구

(1) 누에 분말로부터 추출한 시료를 이용한 항생효과 검증

(가) 곤충 유래의 항생펩타이드를 사용한 항생효과 예비실험

- ① 본 연구과제의 재료인 항생물질유도 누에 분말을 이용한 사료첨가제 개발에 대한 효과를 확인하기 이전에 현재 비슷하게 연구되어 지고 있는 재료에 대한 항생효과를 예비적으로 확인 할 필요가 있음
- ② 봉독은 꿀벌유래의 항생물질로서 항균효과가 우수한 것으로 알려져 있음
- ③ 이러한 특징으로 현재 항생제 대체물질로 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있으며 봉독의 항균효과를 나타내는 주요 성분은 melittin 임
- ④ melittin의 경우 순수한 단일물질의 항생펩타이드로써 단일 항생펩타이드가 가지는 세포 독성에 대한 예비 데이터를 확보하여 향후 본 연구에서 확인하게 될 천연의 누에 유래의 항생펩타이드에 대한 항생효과 연구 시 비교 데이터로 활용이 가능함
- ⑤ 또한 제1세부과제의 경우 단일 항생펩타이드(예를 들어, melittin과 P1JE1)를 과 발현하는 형질전환 누에 제작을 통하여 항생효과를 가지는 사료첨가제 개발에 대한 계획을 가지고 있음으로 이에 대한 선행연구 및 예비시험결과를 확보하기 위해서 단일의 항균펩타이드에 대한 항생효과 예비실험은 반드시 필요함
- ⑥ 우선적으로 항생효과 연구를 위한 방법을 결정하기 위한 예비 연구를 실행

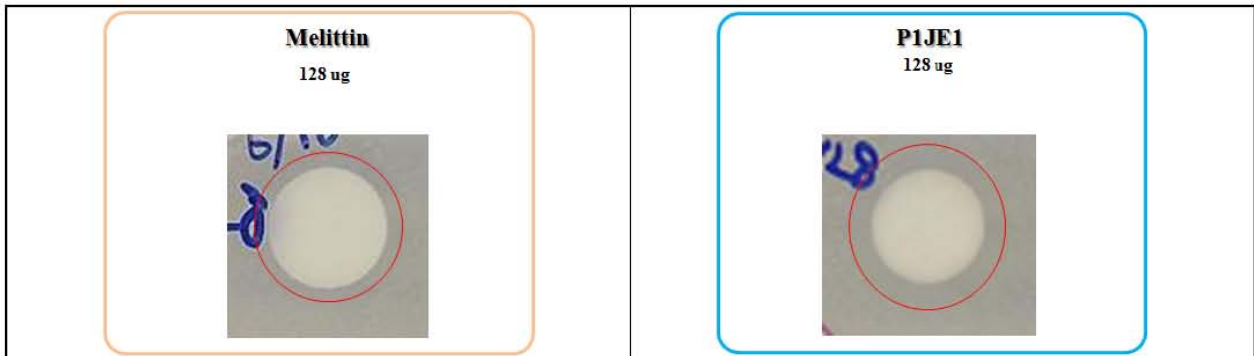


그림 28. 단일 항생펩타이드 melittin과 P1JE1의 각 두 종류의 항생펩타이드를 이용한 antimicrobial test (paper disc방법), 대상 균주; *E.coli*

- ⑦ 위의 그림에서 나타난 바와 같이 melittin의 경우 기존에 알려진 항생효과 보다 훨씬 낮은 것으로 나타남
- ⑧ 이는 paper disc 방법이 적당하지 않음을 나타냄
- ⑨ 기존의 항생제인 Ampicillin에 비하여 두 항생펩타이드는 paper disc에 의한 확산력이 현저하게 떨어짐을 확인

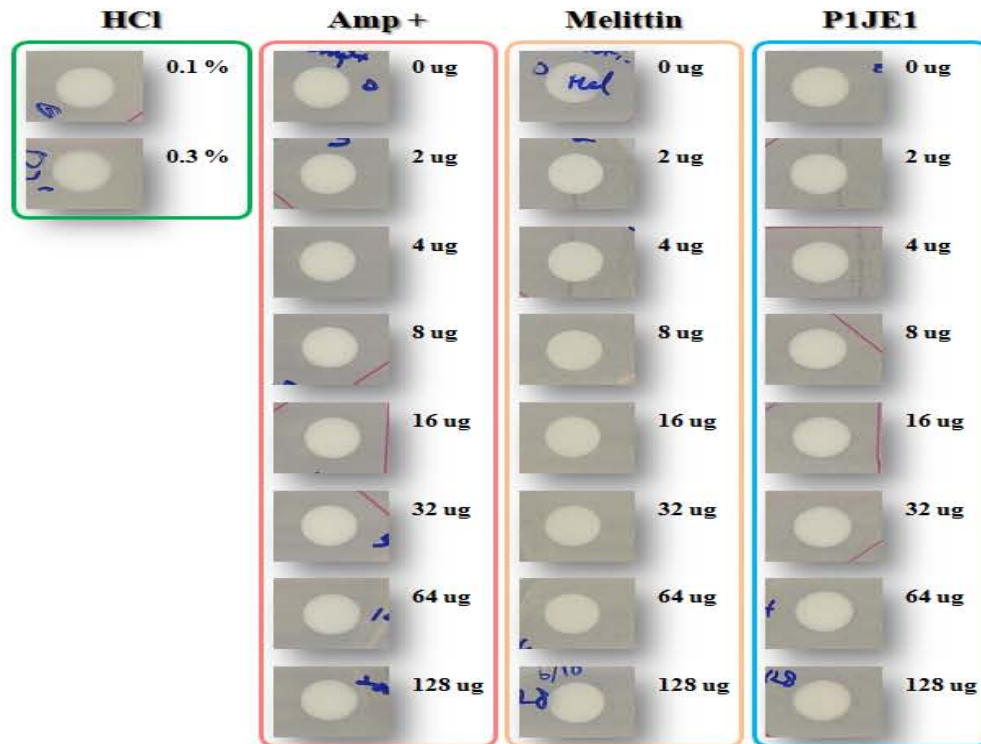


그림 29. 단일 항생펩타이드를 이용한 농도별 항생효과 비교 (paper disc방법), 대상 균주; *E.coli*

- ㉞ 이상의 결과를 통하여 paper disc 방법과 다른 radial diffusion assay 방법으로 대체 할 필요 있음
- ㉞ radial diffusion assay 방법을 이용한 항생효과 비교연구

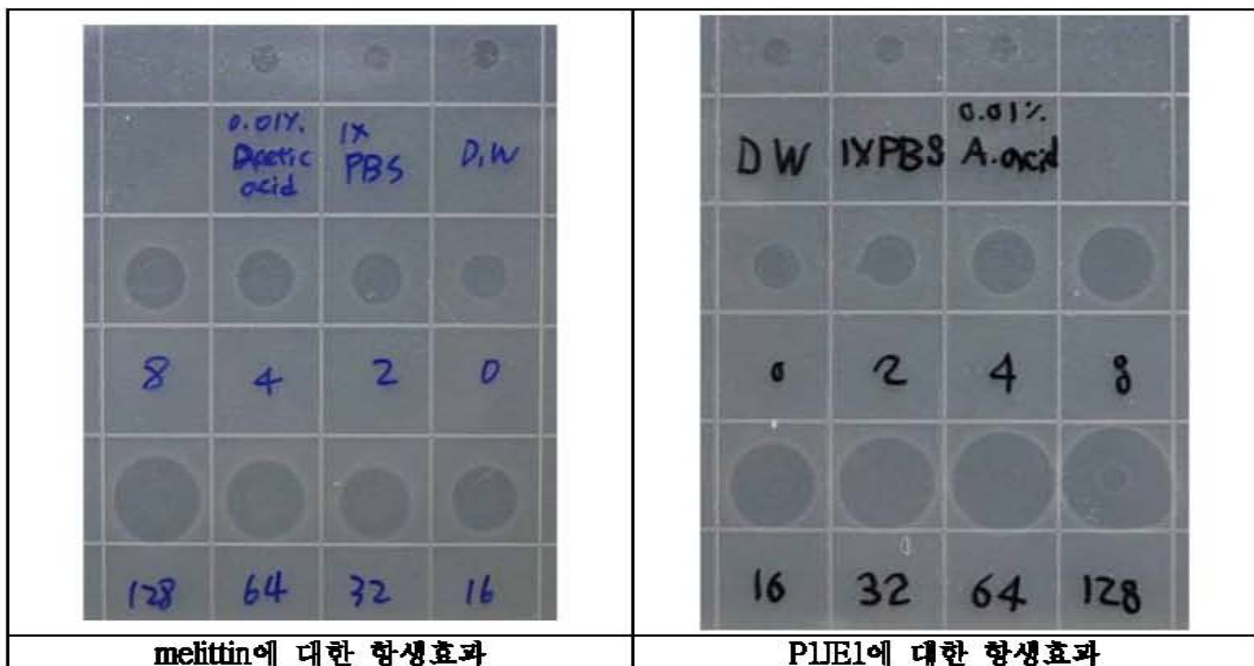


그림 30. 단일 항생펩타이드를 이용한 농도별(1 μ g - 128 μ g 까지) 항생효과 비교 (radial diffusion assay 방법), 대상 균주; *E.coli*

- ⑫ 이상의 결과 paper disc 방법 보다 radial diffusion assay 방법이 누에를 대상으로 하는 추출물의 항생효과 시험에 더 적합함을 확인
- ⑬ 또한 향후 제1세부과제 및 제2세부과제의 연구로 진행될 항생펩타이드가 과 발현 형질 전환 누에를 대상으로 하는 항생효과 연구의 중요한 기초 자료로 활용이 가능

(나) 항생효과 연구를 위한 누에 추출물의 처리 방법 연구

- ① 각 시료에 대한 추출방법에 따라 항생효과는 다르게 나타날 수 있음
- ② 제2세부과제에서 선행된 예비연구의 결과 추출방법에 따라 항생펩타이드의 용해 정도 및 radial diffusion assay 방법에 대한 확산의 정도가 다른 것으로 확인됨
- ③ 따라서 적당한 용매의 선정을 위한 추출방법 확인이 요구됨
- ④ 첫 번째, 0.3% Acetic acid 용액으로 추출한 추출물은 건조 후 0.01% Acetic acid 용액을 용매로 사용

<p>그림 31. 0.01% Acetic acid 용액을 용매로 사용한 경우 그림과 같이 추출물이 가지는 색소의 경우 확산이 이루어진 것으로 보이나 항생효과는 보이지 않음. radial diffusion assay 방법, 대상 균주; <i>E.coli</i></p>	<p>그림 32. DMSO 용액을 용매로 사용한 경우 일부 항생 효과는 나타나지만 별 차이는 구별 할 수 없음. radial diffusion assay 방법, 대상 균주; <i>E.coli</i></p>	<p>그림 33. 항생효과에 대한 시료별 차이 구별 가능. radial diffusion assay 방법, 대상 균주; <i>E.coli</i></p>

- ⑤ 두 번째, 0.3% Acetic acid 용액으로 추출한 추출물은 건조 후 DMSO 용액을 용매로 사용
- ⑥ 세 번째, 0.3% Acetic acid 용액으로 추출한 추출물은 건조 후 1 M NaCl을 포함하는 0.3% Acetic acid 용액을 용매로 사용

(2) 타겟 질환균 선발 및 항생효과 분석

(가) 항생효과 연구용 누에 추출물 처리 방법

- ① 각 시료에 대한 추출방법에 따라 항생효과는 다르게 나타날 수 있음
- ② 제2세부과제에서 선행된 예비연구의 결과 추출방법에 따라 항생펩타이드의 용해 정도 및 radial diffusion assay 방법에 대한 확산의 정도가 다른 것으로 확인됨
- ③ 따라서 적당한 용매의 선정을 위한 추출방법 확인이 요구됨
- ④ 0.3% Acetic acid 용액으로 추출한 추출물은 건조 후 0.01% Acetic acid 용액을 용매로 사용
- ⑤ 연구결과에 따르면 (radial diffusion assay 방법, 대상 균주; *E.coli*),
 - A. 0.01% Acetic acid 용액을 용매로 사용한 경우 그림과 같이 추출물이 가지는 색소의 경우 확산이 이루어진 것으로 보이나 항생효과는 보이지 않음
 - B. DMSO 용액을 용매로 사용한 경우 일부 항생효과는 나타나지만 시료별 차이는 구별할 수 없음
 - C. 항생효과에 대한 시료별 차이 구별 가능




(나) 누에 추출물에 대한 각 균주의 항생효과 연구

표 2. 본 연구에서 사용한 균주 목록

균주명	Gram staining	장내 유익 또는 유해균 분류
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	×
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	×
<i>Salmonella gallinarum</i>	-	×
<i>Salmonella pullorum</i>	-	×
<i>Escherichia coli</i>	-	×
<i>Bifidobacterium stercoris</i>	+	○
<i>Lactobacillus plantarium</i>	+	○
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	×

- ① 대상균주 (그람음성 세균) : 가금 질병 및 위장관 손상과 관련한 미생물
대장균 (1종) 및 살모넬라균 (4종)을 대상으로 하는 항생효과 검사
- ② 대상균주 (그람양성 세균) : 그람음성의 균주는 1차년도 연구에서 면역유도 누에를 대상으로 하는 연구를 통하여 사용한 균주임
이에 더하여, 2차년도에는 그람양성의 균주에 대한 항생효과를 검증하고자 함
Staphylococcus aureus 를 대상으로 하는 항생효과 검사
- ③ 대상균주 (유익균) : 그람음성과 양성의 균주는 장내에 유익한 균주와 경쟁할 수 있는 세균으로서 면역유도 누에를 대상으로 하는 연구를 통하여 유익균에 항생펩타이드가 미치는 영향을 보고자 함
Bifidobacterium(1종)과 *Lactobacillus*(1종)을 대상으로 항생 효과 연구
- ④ 대상균주별 항생효과 검증(radial diffusion assay 방법 사용)





표 3. 3 개의 균주(그람양성균과 유익균)를 대상으로 항생효과 비교 연구







Radial Diffusion Assay 결과		균주명	Gram staining	항생효과
		<i>Bifodobacterium stercoris</i>	+	-
		<i>Lactobacillus plantarium</i>	+	-
		<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-

(다) 누에 분말 제조방법에 따른 각 균주의 항생효과 연구

- ① 제1 협동과제의 연구수행 결과물인 정상 및 유도누에 분말 이용
- ② 1차 년도의 경우 열풍건조의 방법과 동결건조의 방법을 사용하여 누에 분말 제조함
- ③ 당해 연도의 경우 위의 방법과 더불어 마이크로웨이브 방법을 더하여 누에 분말을 제조함
- ④ 세포독성 검사와 항생효과 검사를 위한 시료제조는 서로 독립된 방법(1차 년도와 동일)을 사용

표 4. 5 개의 서로 다른 균주를 대상으로 누에분말의 제조방법에 따른 항생효과 비교 연구를 통하여 누에로부터 유도된 항생물질이 효과를 나타내는 대상균주 선별

Radial Diffusion Assay 결과		균주명	Gram staining	항생효과
동결건조	마이크로웨이브			
		<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
		<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-

Radial Diffusion Assay 결과		균주명	Gram staining	항생효과
동결건조	마이크로웨이브			
		<i>Salmonella gallinarum</i>	-	+++
		<i>Salmonella pullorum</i>	-	+
		<i>Escherichia coli</i>	-	++

(라) 단일의 항생펩타이드를 사용한 항생효과 및 안전성 연구

- ① 현재 단일 항생펩타이드로 연구되어 지고 있는 재료에 대한 항생효과 분석 실시
- ② melittin은 항생효과가 입증된 항생펩타이드로서 우수한 항균력을 나타냄

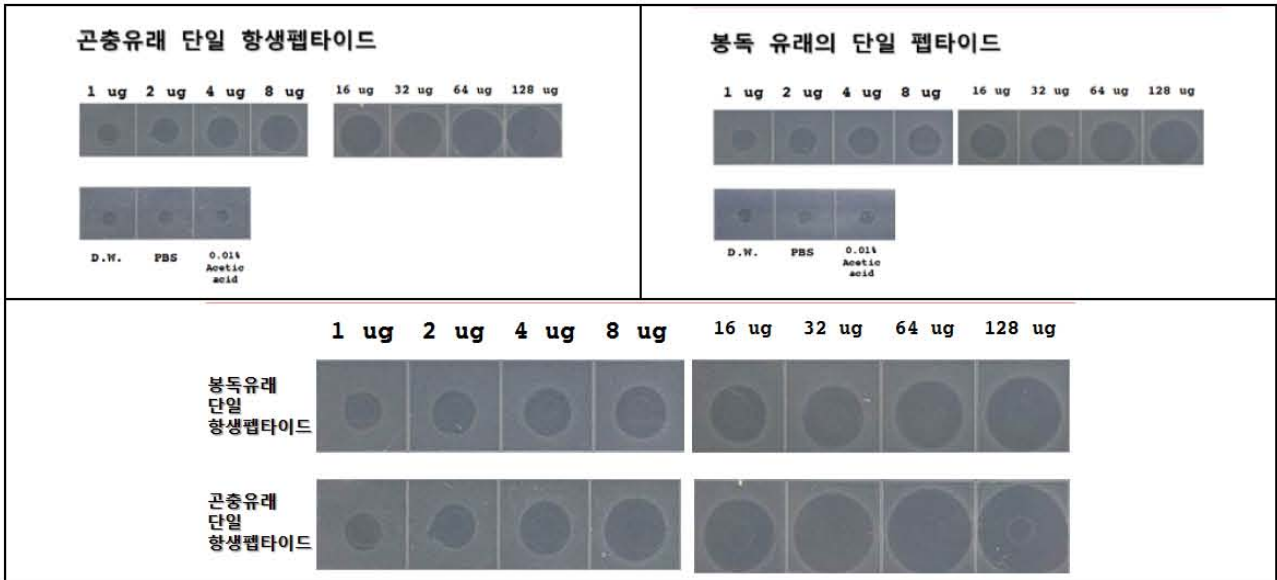


그림 34. 단일의 항생펩타이드를 사용한 항생효과 및 안전성 연구

(마) 항생펩타이드를 발현하는 형질전환 누에를 이용한 항생효과 연구

- ① 동결 건조시킨 누에 분말 0.5g을 0.3% acetic acid+100mM NaCl 용액 5ml에 용해 (1:100)
- ② 1시간 동안 교반
- ③ Centrifuge (10,000 rpm, 30 min, 4℃)
- ④ 상층액을 분리 후, 85 ℃에서 30분간 incubation
- ⑤ Centrifuge (10,000 rpm, 30 min, 4℃)
- ⑥ 상층액을 분리 후, 동결 건조하여 농축
- ⑦ 0.3% acetic acid (500μl/0.5g) 에 녹인 후, 90℃에서 10분 간 incubation
- ⑧ Ice 에서 10분 간 incubation
- ⑨ Centrifuge (13,000 rpm, 10 min, 4℃)
- ⑩ 상층액을 이용하여 항균 활성 Test
- ⑪ 사용한 형질전환 누에는 BmCecB1을 생산하는 누에로서 각 3구를 선발하였음
- ⑫ 선발한 아구별로 항균활성을 검정함
- ⑬ 대조군은 Melittin (300 ng)을 점적하여 비교하였음
- ⑭ 결과로 BmCecB1을 발현하는 형질전환누에와 비교하였을 때 하나의 아구(line 1)에서 높은 활성을 보이는 아구를 확인 할 수 있었음
- ⑮ 사용한 균주는 5개의 서로 다른 그람음성세균을 대상으로 하였음
- ⑯ Melittin 및 Normal에 대한 효과는 5가지의 서로 다른 균주들에서 동일한 항생효과를 나타내었음

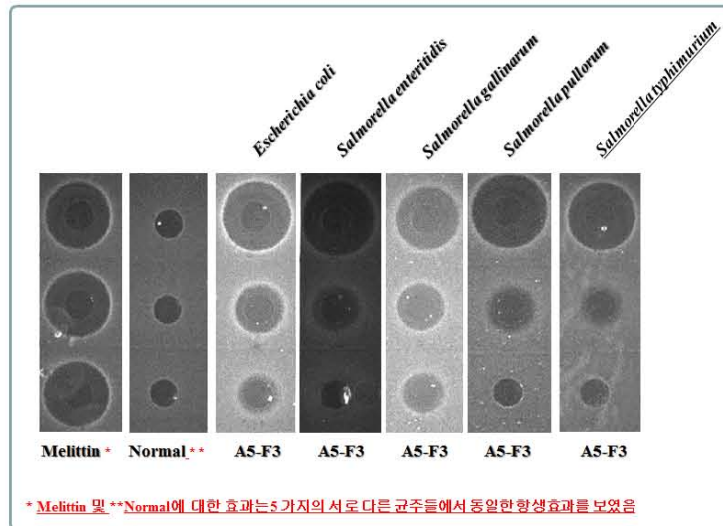


그림 35. 항생펩타이드를 발현하는 형질전환 누에를 이용한 항생효과 연구

(바) 항생펩타이드를 발현하는 형질전환 누에를 대상으로 한 항생효과 연구

- ① 형질전환 누에 혈액을 사용하여 항생효과를 탐색함
- ② 형질전환 누에의 경우 혈액에 다량의 항생펩타이드를 분비하고 있으므로 가장 간단한 방법 가운데 하나인 혈액을 직접 항생효과 검증에 사용함
- ③ 우선 형질전환 누에로부터 분리한 혈액은 열처리를 통하여 heat inactivation을 실시함
- ④ 이후 원심분리하여 상등액을 항생효과 검증을 위한 시료로 사용함

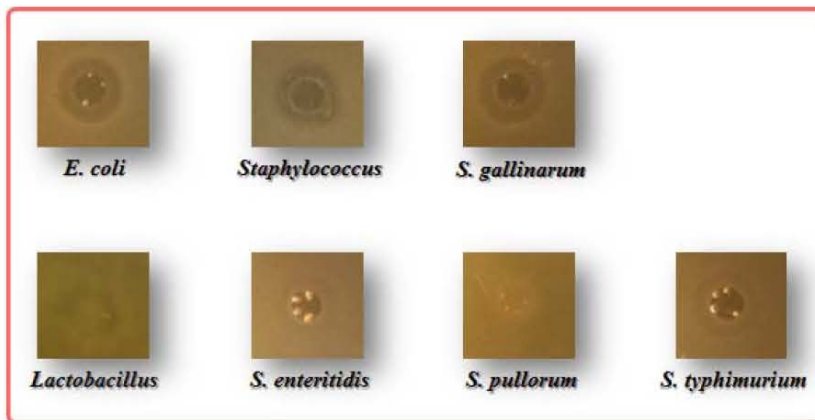


그림 36. 형질전환 누에의 혈액으로부터 항생효과 검증

(사) 곤충 유래 천연항생물질의 제품화 방법 대한 각 균주의 항생 효과 연구

- ① 각 시료는 70% ethanol 용액으로 추출하여 건조 후 PBS 용액을 용매로 사용
- ② 사용 균주는 1차, 2차 및 3차 년도 연구에서 사용한 균주 7종의 서로 다른 그람 양성 및 음성세균을 대상으로 하였음
- ③ 일반누에, 가수분해, 지방코팅, 가수분해 및 지방코팅은 200 ppm의 농도로 처리하여 항생효과 확인

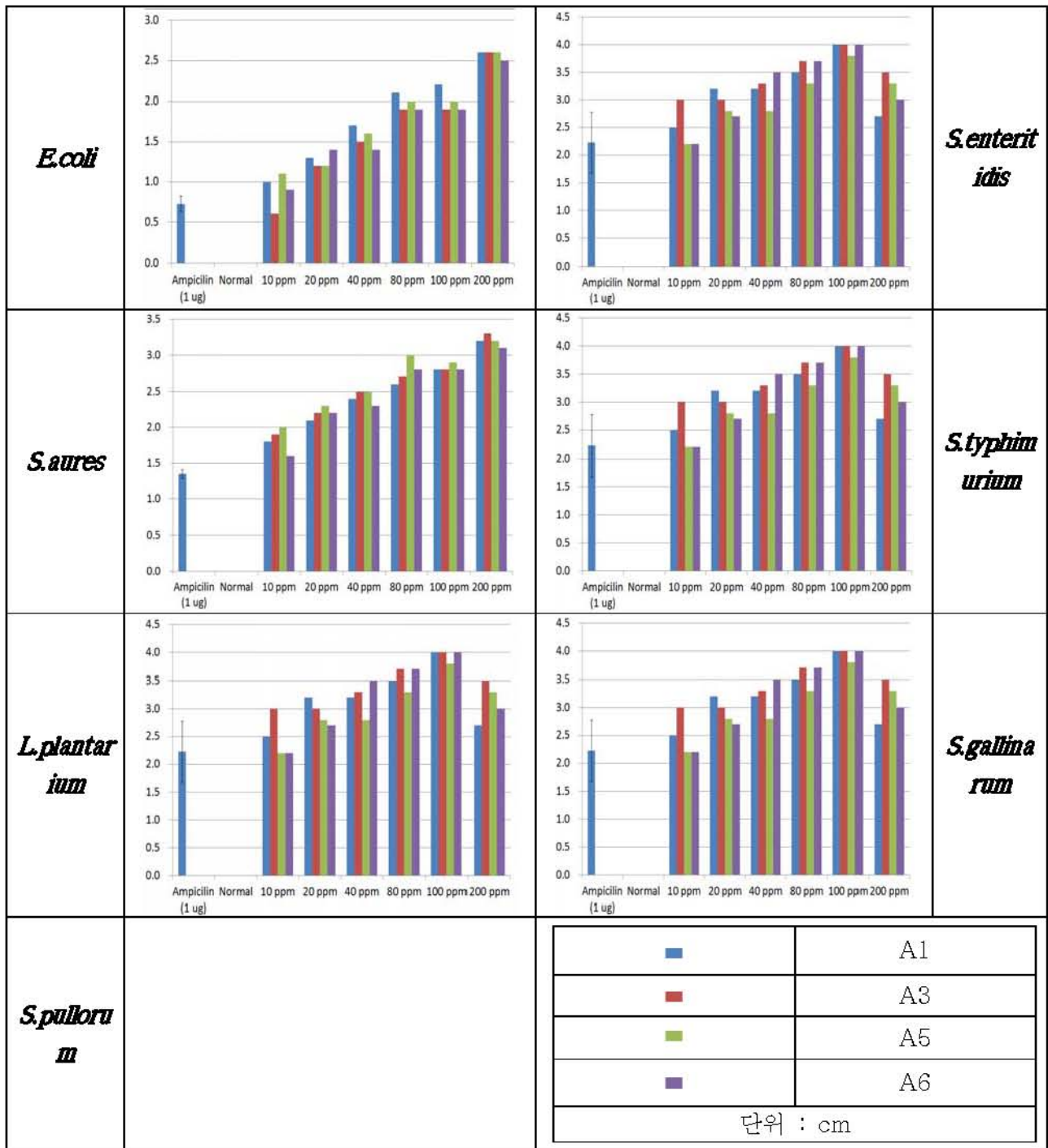








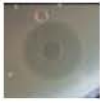






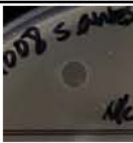
























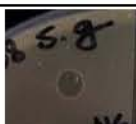
그림 37. 형질전환 유도 누에에 따른 균주의 항생능력 검증

(아) 곤충 유래 천연항생물질 생산 형질전환 누에에 대한 각 균주의 항생 효과 연구

- ① A1, A3, A5 및 A6은 항생효과를 육안 및 수치로 측정할 수 있는 농도 10, 20, 30, 40, 50 ppm으로 처리하여 항생효과를 확인

	A1	A3	A5	A6	Melittin (10 ppm)
Control	 -	 -	 -	 -	















<i>E.coli</i>		1.4		1.3		1.4		1.4		1.3	
									Normal		
										-	
<i>S.aures</i>		2.4		2.3		2.4		2.4	Melittin (10 ppm)	1.1	
									Normal		
											-
<i>L.plantarum</i>		2.3		2.2		2.3		2.3	Melittin (10 ppm)	1	
									Normal		
											-
<i>S.typhimurium</i>		2.4		2.3		2.3		2.3		1.2	
									Normal		
										-	
<i>S.enteritidis</i>		2.4		2.4		2.2		2.2	Melittin (10 ppm)	1.1	
									Normal		
											-

										-
<i>S.gallinarum</i>		2.3		2.2		2.3		2.3	Melittin (10 ppm)	
										1
									Normal	
										-

(단위 : cm)

그림 38. 곤충 유래 천연항생물질 생산 형질전환 누에에 대한 각 균주의 항생 효과 연구

② 특히, 장내 유해균인 살모넬라 1종 (*Salmonella pullorum*)은 매우 낮은 항생효과를 나타내었음

	A1	A3	A5	A6					
<i>S.pullorum</i>		-		-		-		-	
		-		-		0.6		-	
		0.6		-		0.7		0.6	Melittin (10 ppm)
									
								Normal	
									-

(단위 : cm)

그림 39. 살모넬라 1종 (*Salmonella pullorum*)의 항생 효과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2012)	천연항생제 생산 형질전환 누에 개발	○ 누에 유래 항균펩타이드 유전자가 도입된 형질전환 운반체 제작 - 누에 유충 발현 운반체 제작 : 1종 - 누에 실크내 발현 운반체 제작 : 1종	100	- 누에 유충 은뿔 발현용 형질전환용 전이 벡터 제작 · 누에 항균펩타이드의 전사제어인자 BmRelish1 유전자 분리 · 누에 형질전환용 전이벡터(piggyBac)의 BmA3 프로모터 하류에 BmRelish1 유전자 도입에 의한 전이벡터 제작 - 누에 실크단백질과 항균펩타이드가 융합 발현되는 형질전환 운반체 제작 · 꿀벌 봉독의 주성분인 melittin 항균펩타이드의 5반복 합성 후 fibroin heavy chain 유전자 내 융합 · 누에 실크 내 melittin 발현 전이벡터 제작
		○ 형질전환 운반체의 누에알 내 미세주입에 의한 형질전환 유도	100	- 제작 형질전환 전이벡터의 누에알 내 미량주입에 의한 형질전환 유도 · 대상품종 : 백옥잠, 금옥잠 · 운반체와 helper plasmid를 1:1로 혼합 후 누에알 내 미량주입에 의한 형질전환 유도
		○ 누에 형질전환체 선발 및 도입 유전자 발현특성 분석 : 2세대	100	- 누에 형질전환체 선발 및 도입 유전자 발현 특성 분석 · 형질전환누에로부터 표지유전자 EGFP 및 도입유전자 (BmRelish2, 5xmellitin)의 계능 내 도입, 전사체, 제조합단백질 발현 확인
	누에 면역유도 기술 개발 및 고 기능성 항생펩타이드 리모델링	○ 누에 면역 유도물질 개발 및 유도 조건 확립	100	- 유산균 <i>L. plantarum</i> LTA 추출물(pLTA) 등 누에 면역유도 후보 물질 제조 - 누에 주사접종 후 항균활성 분석을 통한 면역유도 효율 평가 - <i>L. plantarum</i> LTA 추출물(pLTA)의 주사 농도 및 유도시간에 따른 누에 면역유도 효율 평가 - 주사 접종을 통한 면역 유도 누에 대량 생산
		○ 누에 주요 항균펩타이드 제조합 발현 및 정제	100	- 누에 Cecropin A 등 4종의 항균펩타이드 유전자 분리 및 클로닝 - 누에 항균펩타이드 발현을 위한 대장균 발현벡터 구축 - 4종의 누에 항균펩타이드 제조합 발현 및 정제 · 대장균에서 불용성 융합 단백질로 발현

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
				<ul style="list-style-type: none"> · 융합단백질 절단 및 항균펩타이드 함유 수용성 분획 분리 · chromatography(FPLC)로 정제 · 항균활성 검정(RDA)
		○ 고기능성 하이브리드 항균펩타이드 설계 및 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - PAJE 융합 항균펩타이드 디자인 및 합성 - 융합 펩타이드 PAJE의 항균활성 검정 · RDA 항균활성 검정 · 최소성장억제농도(MIC) 측정 - PAJE의 처리시간 및 농도에 따른 살균력 측정 - PAJE의 세포 독성 측정
	곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증	○ 면역유도 누에를 대상으로 병원균에 대한 1차 항생효과 스크리닝	100	- 세포독성 등 안전성 분석
100			- L929 및 Caco-2 세포를 이용한 펩타이드 세포독성 검사	
100			- 타겟 질환균 선발 및 항생효과 분석	
	천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발	○ 누에 유래 사료소재의 사료·영양적 가치 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> - 누에 유래 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 · 누에 유래 사료소재의 일반성분, 아미노산, 지방산, 무기질, 항균 펩타이드 함량 비교 분석 · pH, HCl, 담즙산 처리에 따른 누에 유래 사료소재의 항균활성 변화 비교 · 소장 유사 모델을 이용한 누에 유래 항균 펩타이드의 흡수율 비교 조사 · 대사시험을 통한 누에 유래 사료소재의 영양소 이용률 조사
			○ 육계에 대한 면역유도 누에의 효과 구명 및 적용기술 확립	100
	천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화기술 개발	○ 항생펩타이드 유도 장치개발	100	<ul style="list-style-type: none"> - 간이유도장치 1차, 2차 초기모델 제작 - 간이유도장치 보완사항, 자동화모델 적용 및 장치개발
		○ 누에 건조조건 구명	100	<ul style="list-style-type: none"> - 온도별 누에건조 (60℃, 70℃, 80℃, 90℃) - 마이크로웨이브를 이용한 건조

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
		○ 건조누에 열풍건조 온도별 및 마이크로웨이브 건조 안전성 검사	100	- 온도별 열풍건조누에 항균력검사 - 마이크로웨이브 건조누에 항균력 검사
2차 년도 (2013)	천연항생제 생산 형질전환 누에 개발	○ 우수 형질보유 형질전환체간 분자육종 - sibmating에 의한 호모선발 - 호모 형질전환체의 검정교배	100	- 우수 형질보유 형질전환체간 분자육종 · 방사상 확산 분석(RDA, Radial Diffusion Assay)방법으로 우수형질 선발 · 선발된 형질전환체들 sibmating, 우수형질 선발 및 검정교배에 의해 호모개체 확인
		○ 유전형질 및 도입 유전자 발현특성 분석 - 형질전환체 라인별 천연항생제 생산량 분석 - 항생펩타이드 과다발현에 따른 생리생태 분석	100	- 유전형질 및 도입유전자 발현특성 분석 · RDA 방법을 사용하여 상품화된(Sigma) melittin 과의 비교로 생산량 확인 · 항생제 생산량이 높은 형질전환누에들을 서로 교배하여 4세대까지 계대사육하고 정상누에와 생리, 생태 비교.
	○ 누에 면역유도제 제조 공정 표준화 및 면역유도에 따른 항균펩타이드 발현 효율 분석	100	- Lactobacillus plantarum 세포막 추출물 이용 누에 면역유도제 제조 공정 표준화 - 면역유도용 주사제 누에 접종에 따른 면역유도 효율 분석 - 면역유도제 이용 항균활성이 부가된 누에 대량 생산 - 누에 품종에 따른 면역유도 효율 분석 - 누에 주요 항균펩타이드 정제 및 동정 - 누에 면역유도에 따른 항균펩타이드 발현 효율 분석	
	○ 융합 항균펩타이드 발현 및 항균효과 검정	100	- PAJE 재조합 발현을 위한 유전자 디자인 및 합성 - PAJE2 유전자가 삽입된 대장균 발현벡터를 제작 - 융합 항균펩타이드 PAJE 재조합 발현 및 정제 · IPTG 유도에 의한 불용성 융합 단백질로 발현 · 이온 교환 chromatography 이용 재조합 PAJE 정제 · 항균활성 검정(RDA) - 재조합 항균펩타이드 PAJE 항균효과 검정 · 최소생장억제농도(MIC) 측정	
	누에 면역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링			

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
	천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발	○ 누에 유래 사료소재의 최적 제형·가공 형태 구명	100	- 누에 유래 항균 펩티드의 제형 · 가공 형태별 안정성 및 흡수율 구명
			100	- 육계에 대한 누에 분말 제형 형태별 이용 효과 비교를 통한 최적 제형 형태 구명
			100	- 육계에서의 누에 유래 항균 펩타이드와 기존 항생제 대체제와의 항생제 대체성 비교 연구
	대량 누에 면역유도장치개발 및 면역유도누에이용 제형화 방법 선 발	○대량 누에 면역유도 ○면역유도 누에 제형화 ○누에 분말화를 위한 건조장치 개발 ○항생펩타이드의 보존성 향상을 위한 제형화 방법 선발	100	- 대량으로 누에 생체 내 면역원을 주사할 수 있는 장치개발
			100	- 나노, 코팅기술 구축
			100	- 대량 누에 분말화를 위한 건조 장치
			100	- 시간별 항균활성 검정 (12, 18, 24, 36시간)
	항생펩타이드함유 누에고치 이용 분말화 및 세리신회수 방법 개발	○누에고치 분말화 ○누에고치로부터 세리신 정제법	100	- 누에고치 분말화를 위한 가수 분해 조건 구명
			100	- 누에고치로부터 세리신 정제법 개발
	곤충 유래 천연항생 물질 항생효과 및 안전성 검증	○ 면역유도 누에를 대상으로 병원균에 대한 항생효과 스크리닝	100	- 타겟 질환균 선발 및 항생효과 분석
			100	- 제형화에 따른 항생효과 변화 분석
			100	- 펩타이드 시험모델 시스템
3차 년도 (2014)	천연항생제 생산 형질전환 누에 개발	○형질전환 누에의 형질고정 및 현장 실증실험	100	- 세리신 천연항생제 특이발현 위한 GALA /UAS 시스템 구축 - 세리신 특이 BmCecB1 발현 형질전환 누에 제작, 선발 및 순종화 분자육종 - 선발 형질전환누에 고치(세리신) 항균펩타이드 정제 및 생산량 분석 - 현장실증용 항균펩타이드 생산 형질전환누에(2중) 잠종 대량생산 및 공급 - 형질전환누에의 생존율 등 대량사육환경 특성분석
	누에 면역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링	○융합 항균펩타이드 유사체 합성 및 항균효과 검증	100	- 융합 항균펩타이드 구조분석을 통한 유사체 디자인 및 합성 - 세균성 병원균에 대한 융합 항생펩타이드 유사체의 항균활성 검토 - 융합 항균펩타이드 대량 생산을 위한 효율적인 대장균 발현 시스템 구축

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
		○천연항생제 생산 누에로부터 항균펩타이드 정제 시스템 구축	100	- 면역유도 누에로부터 주요항균펩타이드 대량 정제 시스템 구축 - 형질전환 누에로부터 항균펩타이드 정제 및 동정
	천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발	○누에 유래 사료소재의 스트레스 저감, 면역 조절 효과 및 작용기전 구명	100	- 면역유도물질(LPS), 스트레스 호르몬(ACTH) 주입시 누에 유래 사료소재 첨가에 따른 육계 면역·생리적 변화 구명
		○산란기에 대한 누에 유래 사료소재의 이용효과 및 적용기술 개발	100	- 산란계 사양시험을 통한 항균 펩타이드 강화 면역유도 누에 함유 사료첨가제의 제형형태별 이용 효과 비교 및 적정 첨가수준 구명
	천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발	○대량 누에 생체 내 면역성분 주입 주사 자동화 장치 개발	100	- 2년차 개발 유도장치 대량화 (보완사항 적용)
		○항생제 대체 사료첨가제 경제성 분석	100	- 기존 항생제와의 비용 효과 분석 - 누에유래 천연항생물질 항균효과 우수성 비교 분석 - 면역유도 누에의 대량생산에 따른 천연항생제 생산/판매 비용 경쟁력 비교
		○면역유도 및 형질전환 누에 분말을 이용한 제형화	100	- 사료첨가제 대량생산체제 구축 - 포장, 유통기한, 안정성 및 보존성 구축
		○항생펩타이드 함유 누에고치의 최적화 제형화 방법 및 조건 구명	100	- 안정성 및 항생펩타이드 보존성 조사
	곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증	○안전성 및 보존성 조사	100	- 형질전환 누에 대상 항생 효과 및 안전성 연구
			100	- 제형화의 과정에 따른 항생효과 및 안전성 분석
			100	- 세포모델을 이용한 in-vitro 펩타이드 활성 연구
4차 년도 (2015)	천연항생제 생산 형질전환 누에 개발	○누에 형질전환용 운반체 제작 및 누에 형질전환체 선발	100	- BmRelish1, BmCecB1, melittin 생산 형질전환누에별 계통 고정(5세대 이상) - 수용성 세리신 융합 발현 항생펩타이드 생산 형질전환누에 개발

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
		○ 형질전환누에 현장 실증 및 위해성 평가	100	- 형질전환누에(3종) 현장 대량 사육 검증 - 형질전환누에(3종) 토양환경위해성 평가
	누에 면역유도 기술 개발 및 고기능성 항생펩타이드 리모델링	○ 누에 면역유도 기술의 표준화	100	- 면역유도 누에 대량생산 및 시료 제공 - 누에 면역유도 증대를 위한 면역유도 조건 확립 - 면역유도 누에 대량생산 공정 체계화 - 누에 생산 항균펩타이드 특성 분석 및 살모넬라균에 대한 항균활성 검증 - 제조합 항균펩타이드 항균활성 비교 검증
		○ 고기능성 항생펩타이드 개발 및 작용기작 연구	100	- 고효성 융합 항균펩타이드 개발: PAJE 및 유사체 펩타이드 등 총 5종 - 가금류 주요 병원균에 대한 항생효과 검증 - 융합 항균펩타이드 세포막 작용기작 검증: 대장균 분비 Catalase 활성 검증 - 융합 항균펩타이드의 천연항생제 개발 가능성 검토
	천연 항생 펩타이드 생산 누에 유래 고기능성 사료소재의 사료·영양적 가치 평가 및 동물 적용 기술 개발	○ 오리에 대한 누에 유래 사료소재의 이용효과 및 적용기술 개발	100	- 육용오리 사양시험을 통한 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 사료 내 첨가 급여 효과 구명 및 적정 첨가수준 결정
		○ 대규모 농가 현장 실증 및 산업화 전략 구축	100	- 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 육계 농가 현장 실증 시험을 통한 이용 효과 검증 - 항균 펩타이드 강화 면역 유도 누에 함유 사료첨가제의 산란계 농가 현장 실증 시험을 통한 이용 효과 검증
		○ 누에 유래 사료소재 활용 기능성 가금산물 생산 및 브랜드화	100	- 누에 이용 기능성 가금산물의 상품화 및 브랜드 전략 수립을 위한 소비자 수용도 설문 조사
	천연항생제 생산 누에를 이용한 사료첨가제 제형화 기술 개발	○ 대규모 농가 현장 실증 및 산업화 전략 구축	100	○ 시제품 현장 적용 및 산업화 전략 구축
		○ 천연항생제 생산 누에, 누에고치 이용 시제품 개발 및 농가 실증 실험	100	○ 시제품 개발

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
	곤충 유래 천연항생물질 항생효과 및 안전성 검증	○ 제형화의 과정에 따른 항생효과 및 안전성 분석	100	- 시제품을 대상으로 하는 유효성 및 안전성 분석 - 제품 및 포장에 따른 안전성 분석 - 제품 등록 및 허가기준에 따른 세포활성변화 등 안정성 기준 확보
		○ 형질전환 누에 대상 항생효과 및 안전성 연구	100	- 품종화 형질전환누에를 대상으로한 세포활성 차이 검정 - 사료첨가제 활용 산물생산체계구축(실용화)을 위한 협조
		○ 세포모델을 이용한 <i>in-vitro</i> 펩타이드 활성 연구	100	- 세포모델을 이용한 <i>in-vitro</i> 펩타이드 활성 연구 - 상업화(실용화)의 문제점 및 보완점 개선

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과 목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전 자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종 명칭 등록	품종 수입 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	2						3		
	달성	4						3		
2차년도	목표	3	1				2	3		
	달성	3					3	5		
3차년도	목표	3	2				2	2		
	달성	2	3				1	-		
4차년도	목표	3	3				2	3		
	달성	2	3				1	5		
계	목표	11	6				6	12		
	달성	11	6				5	13		

2. 연구성과 활용 목표 및 실적

구분		기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	5	2		6	5	
	달성	4	2		9	42	

3. 논문게재 성과

게재연도	제 목	게재지명	권(호)	비고
2012	Establishment of a Stable Cell Line Expressing Human BMP2/7-PTD for Efficient Osteogenic Induction	생명과학회지	22(4)	
2012	A Strong Transcription Activity of the Bombyx mori Elongation Factor 1 α Promoter	International Journal of Industrial Entomology	21(1)	
2012	Development of a Porous Scaffold-Manufacturing Method by Blending Silk Fibroin and -Agarose Polymer Solutions	International Journal of Industrial Entomology	25(1)	
2013	Functional analysis of Bombyx mori Decapentaplegic gene for bone differentiation in a mammalian cell	International Journal of Industrial Entomology	27(1)	
2013	피브로인 H-chain 재조합 단백질 발현시스템을 이용한 녹색형광실크 생산	한국잠사곤충학회지	51(2)	
2013	저온감압 자건법에 의한 재조합 형광누에고치의 조사	한국잠사곤충학회지	51(2)	
2013	누에 형질전환에 적합한 실용품종 누에알의 제조	한국잠사곤충학회지	51(1)	
2013	Effect of a Bombyx mori protein disulfide isomerase on Production of Recombinant Antibacterial Peptides	International Journal of Industrial Entomology	26(2)	
2013	15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 down-regulates activin-induced activin receptor, Smad, and cytokine expression via suppression of NF- κ B and MAPK signaling in HepG2 cells	PPAR RESEARCH	2013 (online)	SCI
2013	Triptolide induces apoptosis of PMA-treated THP-1 cells through activation of caspases, inhibition of NF- κ B and activation of MAPKs	INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY	43(1)	SCI
2013	Utilization of the Bombyx mori heat shock protein 70 promoter for screening transgenic silkworms	Entomological Research	43(1)	SCI
2014	Chelidonium majus L. extract induces apoptosis through caspase activity via MAPK-independent NF- κ B signaling in human epidermoid carcinoma A431 cells	ONCOLOGY REPORTS	2014.356	SCI
2015	누에 형질전환에 의한 건사선에서의 적색형광단백질 발현	한국잠사곤충학회지	50(2)	
2015	피브로인 H-chain 재조합 단백질 발현시스템을 이용한 청색형광단백질의 발현	한국잠사곤충학회지	52(1)	
2015	천잠 세크로핀 항균펩타이드 분리 및 정제	한국잠사곤충학회지	50(2)	
2015	Production of the BmCecB1 antimicrobial peptide in transgenic silkworm	International Journal of Industrial Entomology	31(2)	
2015	멜리틴 항균펩타이드를 생산하는 형질전환누에	한국잠사곤충학회지	53(1)	
2016	Effects of dietary supplementation of hyperimmunized silkworm larvae on growth performance, cecal microflora, and immune response in broilers	Asian-Australian Journal of Animal Sciences	Accepted	SCI

4. 특허 성과

출원연도 (등록연도)	발명의 명칭	출원번호 (등록번호)	비고
2012	h S C F 재조합 단백질을 갖는 누에 형질전환체	10-2012-0065118	
2012 (2015)	융합 항균펩타이드 PAJE 및 이를 합성하는 방법	10-2012-0085187 (10-1465098)	
2012 (2014)	에벌레에 주사액을 주입하는 장치	10-2012-0123665 (10-1471558)	
2012 (2015)	멜리틴 항생펩타이드를 함유한 누에고치를 생산하는 형질전환 누에	10-2012-0123980 (10-1480153)	
2013 (2015)	항균 펩타이드를 함유하는 형질전환 누에	10-2013-0072200 (10-1570783)	
2013 (2014)	누에 면역반응 유도용 조성물 및 이에 의해 면역이 유도되어 항균활성이 부가된 누에	10-2013-0072203 (10-1533602)	
2013 (2014)	에벌레에 주사액을 주입하는 장치	10-2013-0119745 (10-1532251)	
2014	재조합 항균펩타이드를 생산하는 형질전환 누에	10-2014-0003852	
2014	에벌레 자동 주사 장치	10-2014-0145042	
2015	항균 펩타이드가 강화된 누에를 포함하는 면역 증진용 사료첨가제 및 이의 제조방법	10-2015-0093749	
2015	멜리틴 항생펩타이드를 생산하는 형질전환 누에	10-2015-0129052	

5. 기술실시 성과

기술명 (특허명)	실시기관	체결일	기술료
융합 항균펩타이드를 이용한 화장품 조성물 및 화장품 (융합 항균펩타이드 PAJE 및 이를 합성하는 방법)	차메디텍	2014.8.5.	4,500,000
누에플러스 (융합 항균펩타이드 PAJE 및 이를 합성하는 방법)	그린테크(주)	2015.12.15.	420,000
누에플러스 (누에 면역반응 유도용 조성물 및 이에 의해 면역이 유도되어 항균활성이 부가된 누에)	그린테크(주)	2015.12.15.	630,000
누에플러스 (항균펩타이드를 함유하는 형질전환누에)	그린테크(주)	2015.12.15.	420,000

6. 상품화 성과

사업화명	제품명	업체명	상표출원일
동물사료용 영양보충제 (상품명 0500138)	누에플러스	그린테크(주)	2014.12.4
동물용 사료 (상품명 3100132)	누에플러스	그린테크(주)	2014.12.4

7. 관련분야 기여도

- 누에는 각종 유용단백질을 다량 함유하고 있어 사료첨가제로 사용 시 가축의 성장촉진 효과 기대할 수 있음
- 항생물질을 포함하는 기능성 누에를 이용한 사료첨가제 개발은 기존의 실크 섬유 및 식·의약 소재에 한정된 누에 활용 분야를 가축 및 양식어류를 대상의 기능성 사료 첨가제로 활용할 수 있는 기술의 적용 범위를 확대 함
- 누에의 고유 기능을 이용한 사료첨가제 개발은 최근 새롭게 성장하고 있는 곤충산업의 소재화 적용 범위 확대를 통하여 새로운 산업 영역 창출이 가능 함
- 고기능성 생리활성물질의 산업적 활용을 위한 기술력 확보 및 관련 기술 제공
- 유용 곤충을 활용한 천연항생물질의 유도, 곤충 천연항생제의 제제화 및 제형화를 통한 사업적 활용을 위한 기반기술 제공
- 누에 자체의 부가가치 상승뿐 만 아니라 사료회사 및 동물의약품 회사 등 관련 산업의 동반성장으로 인한 경제적·산업적 이득이 예상됨
- 효과적인 누에 형질전환 기술을 통한 인·축 유용 재조합단백질 대량 생산 가능
- 곤충 유래 천연항생제 사용으로 화학항생제 사용감소에 따른 인체 부작용 감소
- 천연항생제 생산 누에의 사료첨가제제형 개발기술 확립에 따른 해외 사료첨가제 수입 의존도 감소
- 형질전환누에의 환경위해성 연구 결과는, 형질전환곤충 개발 및 산업적 활용을 위한 국가 차원의 안전관리시스템 구축에 활용될 예정임
- 사료첨가제로 즉시 활용이 가능한 형질전환누에 및 금후 인·축 적용이 가능한 고부가가치의약품·백신을 생산하는 형질전환누에 개발은 우리나라의 새로운 농산업 창출과 함께 양잠농가의 소득 증대에도 기여할 수 있음
- 형질전환누에 이용 화학항생제 대체 천연항생제 대량정제 및 인·축 적용 치료제 개발
- 고품질 안전 가금산물 생산을 통한 농가 소득 증대, 소비자 신뢰 확보 및 국가 경쟁력 제고
- 면역증가 및 항균효과를 가지는 천연 사료첨가제 개발을 통한 고품질 안정 축산물 생산
- 고품질 가금 산물의 고급 브랜드화 개발은 안전한 축산물 생산 체계 구축으로 국내 축산업 경쟁력 강화와 함께 국민 건강 향상에 기여할 수 있음
- 수입 축산물과 차별화된 고품질 안전 축산물에 대한 소비자 수요에 대응한 안전한 축산물 생산 기반 구축과 축산농가의 소득증대에 기여할 수 있음
- 천연항생제 생산 누에의 사료첨가제로써 적용범위 확대 검증 및 산업화 개발 가능
 - 가금류(육계, 산란계, 오리) → 돼지·소 → 애완동물, 양어

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 핵자기공명분광법(NMR)과 CD분광법을 이용한 항균 펩타이드의 구조와 기능에 관한 연구를 바탕으로 천연형 펩타이드보다 세포독성이 낮고 항균 활성이 강한 새로운 합성 항균 펩타이드 개발에 관한 연구가 빠르게 진행되고 있음.
 - 봉독에서 분리된 melittin의 세포독성을 제거하기 위해 cecropin A-melittin 하이브리드 항균 펩타이드(CEME) 개발하여 동물 임상시험에서 그 안정성이 입증됨
- 중국의 경우 누에 이용 동물의약품을 생산하여 사료첨가제로 활용하기 위한 연구가 진행 중이나 바이러스를 매개체로 하기 때문에 생산비용과 안전성에 대한 문제가 있음
- 해충류 등 다양한 곤충을 이용한 사료첨가제 개발이 시도되고 있음
- 2,000년도 일본에서 세계 최초로 누에 형질전환이 성공한 이후에, 형질전환누에를 이용한 다양한 인·축 바이오의약품 생산 및 강철 거미실크 등의 개발 추진
- 2013년 일본(농업생물과학연구소)은 빨강색, 오렌지색 및 녹색 형광실크를 만드는 GM누에를 개발했다고 발표함
 - 2종의 산호에서 발현하는 형광 단백질 유전자 및 해파리의 녹색 형광 단백질 유전자를 누에에 이식한 후 교배과정을 거쳐 최종 GM누에를 개발함
 - 그러나, GM누에의 형광 단백질들이 열에 민감하여 기존의 명주실 제작 방식보다는 좀 더 섬세한 과정을 거쳐야 한다는 단점이 있어 이를 보완해야 한다고 평가하고 있음
 - 새로운 고성능 실크 개발을 통해 누에 실크를 통해 유전자 기능을 확인하는 약물과 의약품 등의 시험에 적용할 수 있는 새로운 유용 재조합 단백질을 생산하는 기술을 개발함으로써 기초 연구와 응용 연구를 촉진하는 한편 새로운 산업을 창출한다는 목표를 제시 함
- 2013년 7월 일본(농업생물자원연구소)는 녹색실크 GM누에(HC-EGFP)의 제1종사용에 관한 승인신청서를 일본 농림수산장관과 환경장관에게 제출한데 이어, 2014년 6월에 시행될 녹색형광단백질 융합 실크 생산 GM누에의 사육에 관한 실험계획서에 대하여 설명회를 개최함
 - GM누에 사육실험은 GM누에를 양잠농가의 사육시설에 준하는 환경과 방법으로 사육하여 GM누에고치의 품질, 누에의 생육특성 및 행동특성을 평가하여 생물다양성 영향평가 등의 데이터 수집을 목표로 함
 - GM누에를 사육해야하는 일정한 격리구획 조건과 사육 시 발생하는 폐기물 처리를 위한 냉동고와 건조기 등 유전자변형생물 등 사용 등 규제에 따른 생물다양성 확보에 관한 법률(카르타헤나 의정서)에 근거한 제2종사용 등에 있어 취해야 할 확산방지조치가 강구된 구획으로 규정하고 있음
 - 또한, 격리구역으로 멧누에 성충이 접근하여 교잡이 발생할 경우를 모니터링 하기 위해 GM누에 사육기간 중 격리사육구획의 주변에서 GM누에 암컷나방 또는 합성 페로몬 트랩을 제작하여 멧누에 수컷을 유인한 후 GM누에 표지유전자인 EGFP나 DsRed2 유전자를 공여하는 지 여부를 PCR법 등으로 검정하여 보고서에 수록할 계획을 갖고 있음
- 2014년 일본 국립농업과학연구소와 신슈대학은 거미 dragline 실크 단백질과 날줄과 누에 실크 피브로인 헤비체인 단백질이 융합된 하이브리드 실크를 생산하는 GM누에 개발에 성공함
 - 거미줄은 동일 중량일 때 강철보다 5배 이상의 강도가 높고 탄성력은 방탄조끼 재료로 사

용되고 있는 최고의 인공섬유인 케블라보다도 뛰어나며 생체적합성이 우수한 것으로 알려져 있음

- 개발된 GM누에는 일반 누에가 생산하는 실크보다 53% 강도가 향상된 것으로 조사됨
- 더 높은 강도 및 기능성을 지닌 거미줄 실크를 개발하여 수술용 봉합사와 같은 의료용 소재나 방재 로프, 방호복 등의 특수 소재 개발 연구를 지속할 계획을 가지고 있음
- 2012년 미국 와이오밍대학, 노트르담대학과 중국 저장대학은 공동연구를 통해 14회 반복하여 합성한 거미실크 dragline 유전자와 누에 실크 피브로인 유전자를 융합한 후 piggyBac 전이벡터 시스템에 도입하여 누에알에 주입함으로써 누에/거미 하이브리드 실크를 생산하는 GM누에를 개발함
- 2011년, 미시건주 KBL(Kraig Biocraft Laboratory)사에서 맞춤형 zinc finger구조를 이용해 7개 이상의 GM누에 계통이 개발된 바 있음
- GM누에 키페라 실크는 매우 안정적인 상태이며 강도 등 기계적 특성이 크게 개선되었다고 주장 함
- 2014년, KBL사는 노트르담 대학과 협력하여 GM누에를 통해 거미줄(몬스터 실크)을 대량생산 하고 군사용 의류 소재에 적용함으로써 상업화 단계에 진입했다고 발표함
- 1969년 영국 Swann위원회에서는 가축에서 항생제 사용이 사람의 건강에 위해를 줄 수 있기 때문에 가축에서 신중사용을 권장함
- 특히 사람에서 중요하게 사용되거나 사람에서 사용하는 항생제와 교차내성(cross-resistance)을 일으키는 항생제는 배합사료에 첨가하여 사용하는 것을 엄격하게 제한할 것을 권장함
- 이를 계기로 영국에서는 가축에서 사용하는 항생제를 치료용과 배합사료에 첨가하여 사용할 수 있는 두 가지 그룹으로 분류하여 치료용 항생제는 질병예방목적으로 사용하지 않도록 함
- 다른 유럽 국가들에서도 성장촉진 목적으로 배합사료에 첨가하여 사용하는 항생제에 대해 제한적으로 사용해야 한다는 움직임이 시작됨
- 유럽 국가 중 축산 선진국인 덴마크의 성장 촉진용 항생제(antimicrobial growth promoter, AGP) 사용 금지 현황을 살펴보면,
- 사람에서 사용하는 vancomycin과 교차내성이 있는 것으로 알려진 glycopeptide계 항생제인 avoparcin을 1995년 5월에 금지한 이후,
- 1998년 1월, streptogramin계 항생제인 virginiamycin을 금지함.
- 1998년 2월, 소, 육계, 그리고 35kg이상의 돼지에서 AGP를 금지하였으며,
- 1999년 12월, 35kg이하의 돼지를 포함하여 모든 가축에서 농장 자발적으로 배합 사료에 성장촉진용 항생제를 금지함
- 2006년 1월, 항콕시듐제제를 금지하여 현재는 모든 항생제와 항콕시듐제제를 배합사료에 첨가하여 사용하는 것을 금지함
- 가축과 인체의 항생제 사용을 규제하는 미국 식품의약품안전청(FDA)은 2013년 12월에 향후 3년 이내에 가축을 대상으로 하는 항생제 사용을 점진적으로 금지할 것이라 발표함
- 제시된 법안에 의하면 향후 약물 사용을 단계적으로 중단하거나, 특정 용도로만 제한하는 계획을 포함하고 있다.
- 다만, 인체용으로는 사용하지 않는 항생제, 가령 이오노포어(ionophore) 같은 종류들은 성장 촉진용으로 허용할 것임 시사함

제 7 장 참고문헌

1. Tanaka, H., Yamakawa, M. Regulation of the innate immune responses in the silkworm, *Bombyx mori*. *Isj-Invert Surviv J* **2011**, *8*, 59-69.
2. Silverman, N.; Zhou, R.; Stoven, S.; Pandey, N.; Hultmark, D.; Maniatis, T. A *Drosophila* I κ B kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes Dev* **2000**, *14*, 2461-2471.
3. Tanaka, H.; Matsuki, H.; Furukawa, S.; Sagisaka, A.; Kotani, E.; Mori, H.; Yamakawa, M. Identification and functional analysis of Relish homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1769*, 559-568.
4. Tamura, T.; Thibert, C.; Royer, C.; Kanda, T.; Abraham, E.; Kamba, M.; Komoto, N.; Thomas, J.L.; Mauchamp, B.; Chavancy, G.; Shirk, P.; Fraser, M.; Prudhomme, J.C.; Couble, P. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 81-84.
5. Berghammer, A.J.; Klingler, M.; and Wimmer, E.A. A universal marker for transgenic insects. *Nature* **1999**, *402*, 370-371.
6. Goo, T.W.; Yun, E.Y.; Kim, S.W.; Choi, K.H.; Kang, S.W.; Yu, K.; Kwon, K.; Kwon, O.Y. *Bombyx mori* protein disulfide isomerase enhances the production of nuecin, an antibacterial protein. *Bmb Rep* **2008**, *41*, 400-403.
7. Horn, C.; Schmid, B. G.; Pogoda, F. S.; Wimmer, E. A. Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem Mol Biol* **2002**, *32*, 1221-1235
8. Thomas, J.L.; Da Rocha, M.; Besse, A., Mauchamp, B.; Chavancy, G. 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **2002**, *32*, 247-253.
9. Kim, J.K.; Lee, E.; Shin, S.; Jeong, K.W.; Lee, J.Y.; Bae, S.Y.; Kim, S.H.; Lee, J.; Kim, S.R.; Lee, D.G.; Hwang, J.S.; Kim, Y. Structure and function of papiliocin with antimicrobial and anti-inflammatory activities isolated from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *J Biol Chem* **2011**, *286*, 41296-41311.
10. Barton, M.D. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutr Res Rev*, **2000**, *13*, 279-299.
11. Baltzer, S.A.; Brown, M.H. Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* **2011**, *20*, 228-235.
12. Andreu, D.; Rivas, L. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* **1998**, *47*, 415-433.
13. Steiner, H.; Hultmark, D.; Engstrom, A.; Bennich, H.; Boman, H.G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **1981**, *292*, 246-248.
14. Sugiyama, M.; Kuniyoshi, H.; Kotani, E.; Taniai, K.; Kadono-Okuda, K.; Kato, Y.; Yamamoto, M.; Shimabukuro, M.; Chowdhury, S.; Xu, J. Characterization of a *Bombyx mori* cDNA encoding a novel member of the attacin family of insect antibacterial proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **1995**, *25*: 385-392.
15. Tanaka, H.; Ishibashi, J.; Fujita, K.; Nakajima, Y.; Sagisaka, A.; Tomimoto, K.; Suzuki, N.;

- Yoshiyama, M.; Kaneko, Y.; Iwasaki, T.; Sunagawa, T.; Yamaji, K.; Asaoka, A.; Mita, K.; Yamakawa, M. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **2008**, *38*, 1087–1110.
16. Hara, S.; Yamakawa, M. Moricin, a novel type of antibacterial peptide isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* **1995**, *270*, 29923–29927.
 17. Kaneko, Y.; Tanaka, H.; Ishibashi, J.; Iwasaki, T.; Yamakawa, M. Gene expression of a novel defensin antimicrobial peptide in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci Biotechnol Biochem* **2008**, *72*, 2353–2361.
 18. Tanaka, H.; Sagisaka, A.; Nakajima, Y.; Fujita, K.; Imanishi, S.; and Yamakawa, M. Correlation of differential expression of silkworm antimicrobial peptide genes with different amounts of rel family proteins and their gene transcriptional activity. *Biosci Biotechnol Biochem* **2009**, *73*: 599–606.
 19. Belluco, S.; Losasso, C.; Maggioletti, M.; Alonzi, CC.; Paoletti, MG.; Ricci, A. Edible Insects in a Food Safety and Nutritional Perspective: A Critical Review *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2013**, *12*: 296–313
 20. Balit, CR.; Geary, MJ.; Russell, RC.; Isbister, GK. Prospective study of definite caterpillar exposures. *Toxicon* 2003. *42(6)*:657–62.
 21. Beckett, JL.; Oltjen, JW. Estimation of the water requirement for beef production in the United States. *J Anim Sci* **1993**, *71(4)*:818–26.
 22. Bukkens, S. Insects in the human diet: nutritional aspects. In: Paoletti MG, editor. Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails. **Enfield, N.H.: Science Publisher. 2005**, p 545–77.
 23. Christensen, DL.; Orech, FO.; Mungai, MN.; Larsen, T; Friis, H.; Aagaard-Hansen, J. Entomophagy among the Luo of Kenya: a potential mineral source? *Int J Food Sci Nutr* **2006**, *57(3-4)*:198–203.
 24. DeFoliart, GR. Insects as human food: gene DeFoliart discusses some nutritional and economic aspects. *Crop Prot* **1992**, *11(5)*:395–9.
 25. Kim S.R., Hong M.Y., Park S.W., Choi K.H., Yun E.Y., Goo T.W., *et al.* Characterization and cDNA cloning of cecropin-like antimicrobial peptide, Papiliocin from the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus*. *Mol Cells* **2010**, *29*: 419–423.
 26. Morishima I., Suginaka S., Ueno T., Hirano H. Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides, from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B* **1990**, *95*: 551–554.
 27. Bulet P., Hetru C., Dimarcq J., Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Dev Comp Immunol* **1999**, *23*, 329–344.
 28. Boman H.G. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* **1995**, *13*, 61–92.
 29. A review of innate immunity of silkworm, *Bombyx mori*. *Afr j Agric Res* **2013**, *8(20)*, 2319–2325.

<첨부>

〈 특허, 논문 및 시장분석 〉

1. 본 연구와 관련된 기술의 국내의 수준 비교

기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라 관련기술수준	연구사업단 보유기술수준		
누에 형질전환 기술	미국, 일본	80	80	100	유효특허 및 논문기준
누에를 이용한 기능성 가축 사료첨가제 개발 기술	대한민국, 중국	80	100	100	유효특허 및 논문기준

2. 특허조사분석

가. 특허조사분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 중국)
특허DB	국제특허청(www.wipo.int), 국제특허청(www.wipo.int)
검색기간	20050101 ~ 20151231
검색범위	제목 및 초록

※ 특허조사분석시 활용하였던 특허정보이용과 관련된 내용을 기재

나. 특허 조사·분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

기술명		누에 형질전환 기술	기능성 가축 사료첨가제
Keyword		형질전환누에, transgenic silkworm	사료첨가제, feed additive, 곤충, insect, 천연물, natural materials, 면역, immune
검색건수		618	1,714
유효특허건수		104	48
핵심특허 및 관련성	특허명	어류 경구백신 및 사료첨가제로 사용하기 위한 이리도 바이러스 캡시드 단백질을 발현하는 형질전환누에 및 그 제조방법과 벡터	갈색거저리를 함유한 사료첨가제 및 이를 이용한 기능성 사료
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2013	2009
	관련성(%)	80	50
	유사점	누에 대상 형질전환 유도를 위한 유전자운반체 및 형질전환누에 선별을 위한 동일 마커 유전자 이	갈색거저리 유충 또는 배설물을 유효성분으로 포함하는 가축 사료첨가제인 것을 특징으로 곤충 유래 고단백질 및 영양성분을 이용함
차이점	목적 재조합단백질 산물이 상이하며, 누에 형질전환을 위한 전이벡터의 생체 도입방식(전기천공법에 의한 발현벡터의 변태기 정소 또는 난소주입)이 상이함	사료첨가제 구성성분이 상이하며, 특허본 연구과제의 대상기술에서 천연항생제인 항균성 펩타이드가 포함된 항생제 대체 사료첨가제 개발 기술과 차이가 있음	
핵심특허 및 관련성	특허명	Transgenic Silkworms Capable of Producing Chimeric Spider Silk Polypeptides and Fibers	Animal feed additive and its preparation
	보유국	미국	중국
	등록년도	2015	1999
	관련성(%)	80%	50
	유사점	누에 대상 형질전환 유도를 위한 유전자운반체 및 형질전환누에 선별을 위한 동일 마커 유전자 이용	집파리 유충을 이용하였으나, 곤충이용 가축 면역증진의 기능성 부여 측면에서 본 과제 기술과 유사
차이점	목적 재조합단백질 산물이 상이(거미실크 용합 실크 생산) 함	사료첨가제 곤충 종류 및 이들을 통해 생산되는 기능성 물질 유효성분, 효과에서 상이함	
핵심특허 및 관련성	특허명	Method for producing proteins utilizing silkworm middle silk gland-specific gene expression system	잠상부산물의 추출물이 함유된 육계용 사료조성물과 제조방법
	보유국	일본	대한민국
	등록년도	2012	2010
	관련성(%)	90	40
	유사점	누에 sericin 유전자 프로모터를 사용함으로써 중부실샘에서 특이 발현하도록 형질전환 전이벡터 시스템 설계	누에, 뽕잎, 잠분 등 누에사육 후 남은 잠상부산물 추출물을 함유하는 육계용 사료조성물으로써 대상 곤충 및 적용 가축에서 유사함
차이점	바이너리 벡터 시스템(UAS/GAL4) 기반 활용	사료첨가제의 핵심 유효성분에서 잠상부산물 추출물을 사용. 본 과제의 대상 기술은 천연항생물질인 항균성 펩타이드를 대량생산하는 누에를 분말화하여 사료첨가제로 사용한다는 점에서 상이함	

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	한국, 미국, 일본, 유럽
논문 DB	Pubmed(www.pubmed.gov) 논문 DB
검색기간	20050101 ~ 20151231
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

기술명	누에 형질전환 기술	기능성 가축 사료첨가제	
Keyword	형질전환누에, transgenic silkworm	곤충사료첨가제, insect feed additive, 면역, immune, 항생제, antibiotics	
검색건수	235	33	
유효논문건수	141	9	
핵심 논문 및 관련성	논문명	TAL effectors mediate high-efficiency transposition of the piggyBac transposon in silkworm <i>Bombyx mori</i> L.	산란계에서 파리유충의 급여가 계란 품질에 미치는 영향
	학술지명	Sci Rep.	한국가금학회지
	저자	Lupeng Ye 등	황보종 등
	게재년도	2015	2005
	관련성(%)	80	40
	유사점	PiggyBac 기반 전이백터 활용	가금류(산란계) 대상 곤충(집파리유충)의 사료첨가 급여 효과 검정
차이점	전사촉진인자(TALE) 융합으로 형질전환효율 향상(최고 5.7배)	곤충을 이용한 일반적인 사료첨가제 개발 연구로 본 연구에서의 면역증강 및 항균 효과 등 가축 항생제 대체용 기능성 사료첨가제 개발과 차이가 있음	
핵심 논문 및 관련성	논문명	An efficient strategy for producing a stable, replaceable, highly efficient transgene expression system in silkworm, <i>Bombyx mori</i> .	Expression of porcine lactoferrin by using recombinant baculovirus in silkworm, <i>Bombyx mori</i> L., and its purification and characterization
	학술지명	Sci Rep.	Applied Microbiology and Biotechnology
	저자	Long D 등	Yizhen Want 등
	게재년도	2015	2005
	관련성(%)	70	50
	유사점	PiggyBac 기반 전이백터 활용	누에로부터 돼지 lactoferrin을 재조합 생산, 정제하여 사료첨가제로서 기능성 연구
차이점	transposase의 heat-shock-induced expression로 안전성 향상	재조합 베칼로바이러스를 이용하여 누에에서 유용단백질 생산에 관한 연구로 본 과제에서의 항균펩타이드를 생산하는 누에를 직접 사료첨가제로 활용한 점에서 차이가 있음	
핵심 논문 및 관련성	논문명	CRISPR/Cas9-mediated knockout of factors in non-homologous end joining pathway enhances gene targeting in silkworm cells	Nutritive value of house fly (<i>Musca domestica</i>) larvae as a feed supplement for turkey poults
	학술지명	Sci Rep.	Animal Feed Science and Technology
	저자	Li Zhu 등	Zuidhof M.J. 등
	게재년도	2015	2003
	관련성(%)	80	40
	유사점	누에 형질전환 유도 위한 기술적 측면에서 유사	가금류(질면조) 대상 곤충(집파리유충)의 사료첨가 급여 효과 검정
차이점	유전자표적(Gene-targeting) 기술 활용	곤충을 이용한 일반적인 사료첨가제 개발 연구로 본 연구에서의 면역증강 및 항균 효과 등 가축 항생제 대체용 기능성 사료첨가제 개발과 차이가 있음	

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

○ 누에, 뽕잎, 오디, 공예, 복식 등의 고부가가치 상품개발 확대

- 가공 상품화 : (09'까지) 5종 , (12')13종, (15')19종

○ 주요 양잠산물

- 누에제품 : 누에가루(95'), 누에환, 동충하초(97'), 누에그라(01')

- 뽕잎제품 : 뽕잎가루, 뽕잎차, 뽕칸국수 등

- 오디제품 : 생과, 오디주스, 잼, 오디제리, 술 원료 등

- 실크제품 : 화장품(02'), 황금수의, 실크비누 및 치약(05'), 실크분말, BF-7(07')

* 출처 농림축산식품부(2010)

○ 13'년 양잠산물의 생산액은 약 125억원으로 추정(전년대비 12억감소)

(단위 : kg, 원/kg당, 백만원)

구분	2012년			2013년			증감(%)
	생산량	단가(원)	생산액(a)	생산량	단가(원)	생산액(b)	
누에고치	9,994	45,000	450	7,698	60,000	462	102.7
건조누에	80,483	111,048	8,937	69,888	117,200	8,190	91.6
생누에	125,365	14,000	2,189	173,534	13,143	2,281	104.2
동충하초	5,661	223,333	1,264	2,436	300,000	730	57.7
수번데기	6,034	130,000	784	4,063	151,667	616	78.6
잠분	10,860	24,000	261	11,202	22,800	255	97.7
총계	296,897		13,885	268,821		12,534	88.7

*단가는 양잠조합의 평균 수매가 또는 판매가격용, 출처 : 농림축산식품부(2013)

○ 제품현황

제품	연도	효능/시장규모 (08'추정)	기술이전업체
누에분말	1995	혈당강하 (95억원)	(사)대한잠사회 일본봄비스계약
누에 동충하초	1997	면역증강/피로회복(4억원)	(사)대한잠사회 (주)남양유업
뽕잎차	1999	콜레스테롤 저하 혈당 상승억제(3억원)	(사)대한잠사회 동훈후드(주)
누에그라	2001	강정효과(1억원)	근화계약(주) 대화계약(10')
오디와인 오디즙 오디잼	2004	항노화/항산화(200억원)	한주양조
BF-7	2007	기억력/집중력 향상(50억원)	브레인가드

*자료 : 농진청 잠사양봉소재과

2) 국외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- 과거 한, 중, 일 3개국이 잠사업을 주도
- 기능성 양잠산업은 한국, 일본이 주도하나 초기단계
 - 한국 : 95년 누에가루 혈당강화 기능성 구멍 및 상품화를 계기로 기능성 양잠 산업의 선진국 입지 확보(진흥청 R&D산업 / 90억)
 - 중국 : 최근 급격한 산업화 추진으로 인해 생산량 감소, 한의약 소재이용
 - 인도 : 중국에 이어 15% 생산하나, 최대 수입국으로 전략
 - 일본 : 잠업기술 보유국, 80년대 이후로 감소 추세, 90년대 접어들어 기능성 구멍 및 상품화 추진
- 주요국의 잠사업 생산동향

	95'		00'		07'		08'	
	누에고치	생사	누에고치	생사	누에고치	생사	누에고치	생사
계	981,021	92,519	686,408	65,829	983,059	132,457	879,179	123,233
중국	790,000	67,113	501,000	45,090	779,261	108,420	683,387	98,620
인도	128,349	15,045	124,663	14,432	150,000	18,320	133,316	18,370
베트남	12,000	1,550	10,000	1,000	21,000	2,250	21,000	2,250
우즈베크	20,000	1,300	20,000	1,100	20,000	1,100	25,760	1,417
브라질	16,260	2,468	8,473	1,389	8,617	1,220	6,266	1,177
태국 등	14,412	5,043	21,426	2,818	4,181	1,147	9,450	1,399

*출처 : 농림축산식품부(2010)

나. 연구사업단 보유(활용)기술의 산업화 계획 및 기대효과

1) 산업화-제품화 계획(제품의 특징, 대상 등)

- 특징
 - 누에를 이용한 효과적인 면역유도로 고기능성 천연 항균펩타이드 생산
 - 누에 자동화 면역유도 및 건조 장치 구축
 - 면역누에 최적의 제형화 기술 확립
- 대상
 - 가금류 등 가축 적용

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	100	500	5,000	10,000	20,000	35,600
경제적 파급효과	30	150	1,500	3,000	6,000	10,680
부가가치 창출액	200	1,000	10,000	20,000	40,000	71,200
합계	330	1,650	16,500	33,000	66,000	117,480

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

5. 3P(특허,논문,제품)분석결과 및 연구사업단 사업내에서의 활용

가. 특허분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 기존 특허는 해충을 포집하고 이를 이용한 사료첨가제를 개발하거나, 갈색거저리, 집파리 및 동에 등애와 같이 유용 곤충 자체가 가지는 일차적인 영양성분을 사료화 하는 기술이 주류를 이루고 있음
- 누에 또는 양잠산물을 이용한 사료조성물 특허의 경우, 누에 사육 시 발생하는 잠상부산물의 이용 방안을 위한 목표가 우선됨
- 현재까지 누에를 대상으로 하는 형질전환 기술은 고부가가치의 의료용 유용 단백질 생산 또는 융합형 거미실크와 같은 산업적 및 군사용으로 유용한 기능성 섬유 소재를 개발하기 위한 방향의 연구 개발이 주를 이루고 있음
- 따라서 기존 특허는 곤충 자체를 이용한 사료 첨가제 개발과 누에에서 유용단백질을 생산하는 분야로 서로 다르게 집중되어 왔으므로, 본 연구과제를 통해 달성한 특허기술은 기존의 연구·개발과 달리 새로운 틈새 분야로서 이 두 분야인 곤충 자체가 가지는 기능성 부분과 동물의약품의 소재화 기술을 접목한 새로운 산업영역 창출을 유도할 수 있음

나. 논문분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 기존 논문은 곤충이 기본적으로 보유하고 있는 영양성분을 이용한 기능성 축산물의 생산이나, 곤충 재조합바이러스를 이용한 의약품 생산에 관련 기술 연구가 주류를 이루고 있음
- 곤충을 이용한 사료첨가제에 대한 연구개발의 논문분석측면에서 볼 때, 논문의 양적 수준에서 누에를 활용한 고기능성 사료첨가제 연구 개발은 시작단계 임
- 누에 형질전환 연구는 대체적으로 전이인자(piggybac) 기반의 운반체를 활용하고 있으며, Zinc finger, TALEN과 같은 유전자편집기술을 활용한 사례가 보고되고 있음
- 최근 대표적인 형질전환누에 기술로서 미국과 일본에서 보고한 거미실크가 융합된 하이브리드 실크를 생산하는 형질전환누에가 2015년 보고되었으며, 산업적 활용을 위한 후속연구가 진행되고 있음
- 누에를 대상으로 하는 형질전환 기술은 최근 일본을 선두로, 최근에는 형광실크 형질전환누에의 환경방출시험이 진행('13~)되고 있어 산업화 단계에 도달한 것으로 사료됨
- 우리나라도 형질전환누에의 위해성평가를 위한 일련의 연구가 국립농업과학원에서 시작되었으며 ('13~), 누에 형질전환 기술 고도화 및 생산물의 산업적 활용을 위한 국가차원의 제도 마련을 위해서는 추가적 연구가 필요하다고 판단됨
- 따라서 기존 논문은 누에에서 동물 면역관련 단백질을 생산하고 이를 분리·정제하여 이용하는 기술로 발달해 왔으므로, 본 연구과제를 통해 발표한 논문 성과는 기존의 연구·개발과 달리 기능성 식품으로 인정받은 누에 자체의 기능성에 더하여 고유한 면역성질을 확대하거나 새로운 항생 기능을 추가하여 작용할 수 있는 고효율 사료첨가제의 우수성을 과학적으로 증명한 결과임

다. 제품·시장분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

- 국내 및 국외시장 분석결과, 누에 및 실크를 재료로 사용한 제품은 화장품 또는 기능성 보조식품이 주류를 이루고 있으며, 이들 제품은 제한된 소비자층과 타 기술분야의 기능성 소재와의 경쟁속에 소비자 확대에 한계에 직면해 있다고 판단됨
- 천연항생제 생산을 유도하는 체계적인 장치나 시스템의 개발이 국내뿐만 아니라 국외에서도 미미한 것으로 나타나고 있어 효율적인 제품개발을 시도하여 다양한 제품과 시스템을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임

- 천연 면역 누에의 제제화나 제형화의 장치 및 시스템 개발 시도가 전무한 바, 사료 첨가제로써의 누에의 활용가치를 높이고, 농가의 소득증대와 관련기업체의 활성화를 위해 개발 시스템의 적극적 홍보를 진행할 계획임

주 의

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