

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

포스트게놈다부처유전체연구개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004021-01

유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발

2022. 4. 4.

주관연구기관 / (주)진바이오텍

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발”(개발기간 : 2018.04.25 ~ 2021.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.4.4.

주관연구기관명 : (주)진바이오텍 강 정 선



주관연구책임자 : 강 정 선

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

< 요약 문 >

사업명		포스트게놈다부처유전체			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)					연구개발과제번호		918001-4
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB	50%	LB06	30%	LB0606	20%
	농림식품 과학기술분류	AB	50%	AB02	30%	AB0203	20%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		해당 없음					
연구개발과제명		유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발					
전체 연구개발기간		2018.04.25. - 2021.12.31					
총 연구개발비		총 1,335,000천원 (정부지원연구개발비: 995,000천원, 기관부담연구개발비 : 340,000천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(3) 종료시점 목표(9)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발 및 산업화					
	전체 내용	<ol style="list-style-type: none"> 1. 축산 악취 저감능이 우수한 미생물 선발 및 Lab scale 고체발효 조건 확립 <ol style="list-style-type: none"> 1-1. 축산 악취 저감에 효과가 있는 미생물 후보균주 선발 1-2. 선발된 최종 후보 균주의 대량생산을 위한 lab scale 발효 조건 확립 2. 대량 생산 공정 확립 및 저장안정성 평가 <ol style="list-style-type: none"> 2-1. 대량생산 공정 확립 2-2. 시제품에 대한 저장안정성 평가 3. 시제품의 효능 검증 <ol style="list-style-type: none"> 3-1. 선발 균주 첨가된 급여용 기능성 사료 첨가제 (크린바이오프리미엄산) 3-2. 선발 균주 첨가된 분무용 악취저감제 (클린케어) 3-3. 퇴액비 부숙 촉진제 (그린케어) 4. 유용미생물의 유전체 분석 및 유용 미생물 급여에 따른 미생물 군집 분석 <ol style="list-style-type: none"> 4-1. 유용 미생물의 유전체 정보 해독 4-2. 선발된 균주를 함유된 크린바이오프리미엄산을 급여한 육성돈의 장내 균총 및 대사체 분석 5. 품질 관리 기준 수립 (크린바이오프리미엄산, 클린케어, 그린케어) 및 제품화 <ol style="list-style-type: none"> 5-1. 크린바이오프리미엄산 5-2. 클린케어 5-3. 그린케어 					
연구개발성과	○ 주요 연구개발 성과						

	<ul style="list-style-type: none"> - 특허출원 3건, 특허등록 2건 - 제품화 3건, 매출액 49,400,000원, 고용창출 5명 - SCI 논문 6편, 비SCI 논문 2편, 학술 발표 8건 - 인력양성 4명 - 홍보 전시 2건 - 전략 미생물 해독 5건 - 유용 유전 자원 확보 6건 - 메타 유전체 분석 3건 - NABIC/IGEM 등록 8건
--	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> - 급여용 및 분무용 약취저감제 개발 - 퇴비부숙용 제품 개발 - 효율적인 미생물 유전체 분석 프로세스 마련 - 미생물 연구 활용 가능한 데이터베이스 구축 ○ 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> - 축산 약취 저감 환경 개선제(급여용 사료첨가제, 분무용 미생물첨가제, 부숙촉진용 제품) 개발 - 맞춤형 프로그램(질병예방 및 환경관리) 구축 - 분뇨처리비 감소, 민원 해결 등을 통한 축산 경쟁력 강화 - 용도별 분리 출시를 통해 효능과 가격 면에서 타사 제품에 비해 가격 경쟁력 확보 기대
---------------------------	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	8	2	1	-	-	-	-	8	6	-	-	-
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설 ·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
국문핵심어 (5개 이내)	미생물군집		약취		균유전체학		생균제		사료첨가제			
영문핵심어 (5개 이내)	Microbiome		Odor		Metagenomic		Probiotics		Feed additives			

〈 목 차 〉

I. 연구개발과제의 개요	6
II. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	10
III. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	24
IV. 목표 미달 시 원인분석	84
V. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	84
VI. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	85
붙임. 참고 문헌	86

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

○ 축산 악취란

- 축산농가 악취(축산냄새)란 축사 및 가축분뇨 퇴·액비화 시설에서 발생된 암모니아, 황화합물류, 인도류, 페놀류, 아민, 지방산류, 그밖에 자극성이 있는 기체상 물질이 사람의 코를 자극하여 불쾌감과 혐오감을 주는 냄새를 의미한다. 이 중 암모니아 및 황화수소가 대표적인 악취 성분이다.
- 2010년 이후 22가지 악취 원인 물질에 대하여 ‘지정악취물질’로 지정하여 관리하고 있다. 지정악취물질은 측정분석 장비를 사용하는 기기분석법을 이용하여 측정하며, 복합악취물질은 ‘공기희석관능법’에 따라 사람이 직접 냄새를 측정한다. 지정악취물질 22종은 표 1에 제시하였다.

표 1. 지정악취물질 22종

번호	종	악취물질
1	암모니아류(1종)	암모니아
2	황화합물 (4종)	메틸메르캡탄
3		황화수소
4		다이메틸설파이드
5		다이메틸다이설파이드
6	트라이메틸아민류 (1종)	트라이메틸아민
7	알데하이드류 (5종)	아세트알데하이드
8		프로피온알데하이드
9		뷰틸알데하이드
10		n-발레르알데하이드
11		i-발레르알데하이드
12	VOCs (7종)	스타이렌
13		톨루엔
14		자일렌
15		메틸에틸케톤
16		메틸아이소뷰틸케톤
17		뷰틸아세테이트
18		i-뷰틸알코올
19	지방산 (4종)	프로피온산
20		n-뷰틸산
21		n-발레르산
22		i-발레르산

○ 축산 악취 발생 현황 및 문제점

- 가축 사육두수의 증가로 인해 농가가 기업화, 대규모화 되며 고농도 오염물질이 다량으로 발생되어 악취관련 문제가 과거보다 빈번히 발생하고 있다. 환경부에 따르면 축산 악취로 발생하는 민원은 2000년대 초부터 지속적으로 증가하여 2019년 전국에서 12,631건의 축사 악취 민원이 발생하였고, 이는 당해년도 전체 악취 민원의 31%에 이르는 수치이다(표 2).

표 2. 연간 축산 악취 민원 및 전체 악취 대비 비율

연도	2015	2016	2017	2018	2019
축사 악취 민원 (건)	4,323	6,398	6,112	6,705	12,631
전체 악취 민원 (건)	15,573	24,748	22,851	32,452	40,854
축산 민원 비율 (%)	27.8	25.9	26.7	20.7	30.9

* 환경부 (2020년)

- 농림축산식품부의 조사결과에 따르면, 2009년 11월~2013년 10월 사이, 돼지가 축산 악취 민원의 약 46%를 차지했고, 소가 29%, 개가 14%, 닭이 11%를 차지하고 있는 것으로 나타났다. 또한 악취 민원 주요 발생 원인으로 축사가 55%, 분뇨 및 퇴·액비 처리가 41%로, 축산 시설이 대부분을 차지한다.
- 따라서 지속가능한 축산업을 위해서는 축산농가에서는 악취저감을 통해 민원 문제를 해결하고 축사 근로자 및 가축의 건강을 지킬 필요가 있다.

○ 환경개선 기능성 미생물제제

- 양돈 분뇨에서 발생하는 악취의 원인은 미생물의 활동으로 인해 발생한다고 할 수 있다. 돈분뇨에서 자생하는 미생물로는 gram-positive cocci (39%), *Eubacterium* (27%), *Lactobacillus* (20%), gram-negative rods (8%), *Clostridium* (4%) 등이 있다. 이들은 주로 혐기성 혹은 통성혐기성 균이 주를 이루며, *Streptococcus* sp. 등은 암모니아 및 휘발성 지방산을 생성하고, *Clostridium* sp. 는 암모니아(NH₃), 황화수소(H₂S), fatty acid, indole 및 phenol의 생성에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Russell, 1979).
- 축산환경 개선을 위한 다양한 악취저감제가 있는데, 대표적으로 생균제를 이용하여 암모니아(NH₃) 및 황화수소(H₂S) 가스를 제거하는 방법이 있다. 이 외에도 효소복합체, 식물성 천연향료, 인공 식향료 등을 이용해 악취를 저감하기 위한 다양한 방법이 시도되었다. 식물성 천연향료, 유카추출물, 미생물제제 등을 이용하는 방식은 사람과 가축에게 피해를 미치지 않으며, 운용 및 관리 방법도 용이하여 상당히 실용적이라고 평가되고 있으나, 처리효율성 측면에서 검증이 미진한 실정이다.
- 처리효율성 측면에서 효율성, 경제성, 안전성 측면을 모두 만족시키는 방법은 아직까지 나오지 않은 상황이며, 지속가능한 축산을 위해서 악취 문제는 해결되어야 할 것이다.
- 생균제는 장내의 미생물 군집의 균형에 도움을 주는 미생물 및 대사산물로 가축 장내 유해 미생물을 감소시키고 장내 균총을 개선해주는 역할을 한다. 또한 장내 pH를 낮춰 유해 병원균의 발육을 억제하는 등의 작용을 통하여 가축의 생산성을 향상시키고 유해 가스의 발생을 억제하는 역할을 한다.
- 국내 축산용 생균제 시장 규모는 연간 약 1천억원으로 매년 25% 썩 성장하고 있는 추세이다. 2019년도 기준 조달청 관납 축산용 악취저감제는 약 100여 제품이 있으며(표 3), 연간 17억 원 규모로 질병 예방과 축산 악취저감제에 대한 기대감이 크다고 할 수 있다.

표 3. 일반적인 축산용 약취 저감 제품의 주요 성분

원료	조달청 관납 주요 제품의 주요 성분
미생물	바실러스속 (보증균수 : $10^{6\sim 8}/g$), 유산균속, 효모, 기타 곰팡이 및 광합성균 등
효소	단백질 분해효소 및 지방분해효소
기타 성분	식이섬유(만난올리고당 등), 천연물, 광물질, 효모 배양물, 미네랄 등

* 조달청 (2019년)

○ NGS 기반 유전자 기능예측 기술 현황

- 돼지 장관의 미생물총(microbiome)은 10^{14} 에 달하는 세균으로 구성되어 있으며 이들은 숙주의 면역기능 증대, 사료의 소화 촉진, 비타민 생성, 병원성 세균의 장내흡착 억제 (colonization resistance) 등의 역할을 하고 있다.
- 항생제, 유익균, 유해균등의 외부 인자는 돼지 장내 microbiome 변화를 유발하는 가장 큰 요인들이며, 이로 인한 장내 microbiome과 병리 생리학적 변화 기전에 대한 심도 있는 연구가 필요하다.
- 돼지의 장내균총 변화 및 조절 기작을 이해할 수 있다면, 돼지의 질병 억제 및 생산성 향상을 도모하고, 나아가 인체에 응용도 가능함으로써 막대한 부가가치를 창출할 수 있을 것이다.
- NGS 기술을 이용한 유전체 분석 방법은 현재 다양한 분야에서 응용되고 있으며, 유전체 분석을 통한 질병 진단, 유익균의 기능적 특성 및 기작 규명뿐만 아니라 유해인자 발현 조절을 통한 질병 증상 완화 등 다방면으로 사용되고 있다.
- 유전체 분석을 통해 유전자의 기능예측은 미생물이 보유한 여러 유용한 기능성을 유전자수준에서 확인 할 수 있는 첨단기술이며, 더 나아가 유용 유전자를 대량 발현시킴으로써 유용유전자 산물의 효능을 규명하는 연구를 통하여 산업화까지 응용 가능하다. 최근에는 NGS 기술을 통하여 슈퍼박테리아를 억제하는 새로운 항균물질(malacidin)을 찾아내기도 했다.
- 유전자 기능예측 및 조합을 통해 선발된 미생물의 산업화를 위해서는, 유용유전자 산물의 활성과 생산 최적화를 위한 경제성이 확보된 발효공법을 활용한 대량생산 연구가 필요하다.
- 대사체학은 작은 크기(100-1,000 dalton)의 대사물질 분석을 통하여 유전자 변이 또는 발현의 차이에 의한 대사물질의 변화를 알아낼 수 있으며, 미생물과 미생물 또는 미생물과 숙주와의 상호작용을 알아내는 수단이 될 수 있다.
- 장내균총을 이용한 연구 결과는 증가하고 있으나, 실제 호스트에게 영향을 미치는 미생물의 대사물질에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 대사체의 변화를 관찰하고 그에 따라 호스트 및 장내균총과의 상호관계에 대한 더 긴밀한 연구가 진행 될 수 있을 것으로 사료된다.
- 프로바이오틱스 급여를 통한 장내균총 변화는 acetate, propionate, butyrate 와 같은 단쇄지방산 생성에 영향을 미치는 것을 확인하였다(Sugahara et al., 2015; Hong et al., 2010).
- 프로바이오틱스(*Lactobacillus paracase*)와 쌀겨의 혼합 급여를 통하여 *Salmonella typhimurium* 저해 효과와 항균 활성 대사물이 증가함을 확인하였다(Nealon et al., 2017).
- 프로바이오틱스(*L. sakei*)의 성장주기에 따른 대사체분석을 통하여 *L. sakei*가 성장주기에 따

라 다른 영양물질(단당류, 유기산, 아미노산)을 이용함을 확인하였고, 지수성장기에서의 이러한 영양물질의 변화는 ATP와 같은 에너지원 수치와 반비례함을 확인하였다. 또한 대사체분석을 통하여 유산균의 젖산 발효를 통한 에너지 생산과 관련된 대사 경로를 확인하였다(Lee et al., 2017).

- 대장염 마우스 모델을 이용하여 프로바이오틱스 급여시, 대장염 유발에 따라 발생하는 장조직의 손상, myeloperoxidase 활성, 직장 내 malondialdehyde 수치가 유의적으로 감소하였고 직장길이가 길어지는 등, 대장염증 완화 및 치유에 대한 효과를 확인하였다. 또한, 프로바이오틱스 급여를 통한 장내균총의 변화가 대장염 방어기작과 관련된 단쇄지방산 수치를 증가시킴을 확인하였다(Hong et al., 2010).
- NGS 기반 유전자 기능 예측 기술을 이용해, 돼지에게 생균제(Synbiotics) 급여시 장내 균총 및 대사체(유기산, 당, 아미노산, 비타민 등)의 변화를 종합적으로 관찰하여 장내 세균 및 숙주의 대사에 미치는 영향을 조사하였다.
- 본 과제에서는 악취 저감에 우수한 유용 미생물 및 천연물 등을 활용하여 기능성 사료 첨가제 및 분무용 미생물 제제를 개발하였고, 국제적인 환경 이슈 대두와 정부의 분뇨 자원화 및 퇴·액비 관리가 강화됨에 따라, 축산 농가 맞춤형 환경 개선제의 일환으로 추가적인 퇴·액비 부속 촉진용 제품 개발 연구를 함께 수행하였다.

II. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. 연구개발의 목표

가. 최종목표

- 유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발 및 산업화

나. 세부목표

- 주관연구기관 ((주)진바이오텍): 악취 저감 우수 미생물 및 천연물을 활용한 기능성 사료첨가제 및 분무용 미생물제제 개발
- 제1위탁연구기관(단국대학교_강대경): 유용미생물의 유전체 분석 및 장내균총과 대사체 분석을 통한 기작 연구
- 제2위탁연구기관(단국대학교_박재홍): 악취 저감 미생물 제제의 사양 효능 평가

2-2. 연구 수행 내용

1. 축산 악취 저감능이 우수한 미생물 선발 및 Lab scale 고체발효 조건 확립

1-1. 축산 악취 저감에 효과가 있는 미생물 후보균주 선발

a. 유용미생물 균주 선발

- 본 연구에서는 축산 분뇨 내 악취 유발 물질에 대한 억제 효능이 우수한 후보 균주들을 분리하였다. 충남 지역의 양돈장 악취 제거를 목적으로 돼지의 사육단계별 (육성전기, 육성후기, 비육전기, 비육후기) 분변과 슬러리 및 퇴비장 주변 토양을 비롯한 자연계, 식품 등에서 샘플을 채취하였다. 채취한 샘플 3g을 멸균된 생리 식염수 (0.85% NaCl)에 희석 후 serial dilution을 진행하여 선별 배지(BCP 배지 (Casein Enzymic Hydrolysate 5 g/L, Yeast Extract 2.5 g/L, Dextrose 1 g/L, Agar 15 g/L), MRS 배지 (Proteose Peptone No.3 10 g/L, Beef Extract 10 g/L, Yeast Extract 5 g/L, Dextrose 20 g/L, Polysorbate80 1 g/L, Ammonium Citrate 2 g/L, Sodium Acetate 5 g/L, Magnesium Sulfate 0.1 g/L, Manganese Sulfate 0.05 g/L, Dipotassium Phosphate 2 g/L, Agar 15 g/L) 및 LB 배지 (Tryptone 10 g/L, Yeast Extract 5 g/L, Sodium Chloride 10 g/L, Agar 15 g/L))에 각각 도말하여 33°C에서 24시간 이상 배양을 진행하였다. 총 80종의 균주가 분리되었으며, 각 균주를 15% glycerol stock을 제조하여 -70°C deep freezer에 보관하면서 추가 실험에 활용하였다 (그림 1).



그림 2. 자연계, 식품, 돈분(슬러리) 및 퇴액비장 주변으로부터 유용미생물 균주 선발

b. 선발균주의 악취 유발 가스 저감 능력 평가

- 선발된 미생물들에 대하여 악취 유발 가스 저감능에 대한 실험을 수행하였다. 실험은 악취의 큰 원인물질이라고 알려진 암모니아, 아민, 황화수소 및 머캅탄 등 4종의 검지관을 활용하여 가스 측정으로 진행하였다. 가스 측정은 카운터 부착 검지관식 기체측정기 (GV-110S, GASTEC CORPORATION, JAPAN)와 Multi-RAE(PGM-6228, RAE)를 이용하여 측정하였으며, 각 가스의 측정은 암모니아(No. 3La, GASTEC), 아민(No. 70L, GASTEC), 황화수소(No. 180, GASTEC) 및 머캅탄(No. 4LK, GASTEC)의 검지관을 이용하였다(그림 3, 4). 실험 시작 전 선발 균주들을 35°C에서 24시간동안 배양하였다. 실험에 이용된 가스발생원으로는 돈분을 이용하였으며, 액상 배양한 균을 각각 2%씩 접종하고, 대조구에는 증류수를 동일한 양만큼 처리하였다. 가스 측정은 실험 개시시 (initial), 실험시작 24시간 및 48시간째에 이루어졌다 (그림 2). 가스 발생 시간을 고려하여 initial은 실험 시작 2시간 후에 측정하였다. 실험은 2반복으로 측정하였으며, 대조구의 측정값을 100점으로 상대적인 index score를 계산하였다.



그림 3. 악취 유발 가스 저감 실험

d. 선발균주의 유기물 분해능 평가

- 선발균주에 대하여 유기물 분해능을 평가하기 위하여 protease 및 amylase에 대한 효소 활성을 평가하였다. Protease 효소 활성의 경우 skim milk 배지 (skim milk 10 g/L + Agar powder 15 g/L)를 만들어서 이용하였으며, amylase 효소 활성의 경우 starch 배지 (starch 5 g/L + Agar powder 15 g/L)를 만들어 실험에 사용하였다. 실험을 위해 LB 배지에서 선발된 미생물을 LB broth에서 액상으로 24시간 배양하였으며, skim milk 배지 및 starch 배지에 paper disk를 올린 후 액상 배양액 200 μ l를 접종하였다. 각 배지는 33°C에서 24시간동안 배양한 후 paper disk를 중심으로 생기는 둥근 환의 지름을 측정하였다. Starch 배지의 경우 iodine solution을 제조하여 20초간 염색 한 후 투명 환 (clear zone)의 지름을 측정하여 각 선발균주의 유기물 분해능을 비교 평가하였다.



그림 3. 가스 측정 검지관



그림 4. 기체측정기 및 Multi-RAE

e. 악취 발생원인 균주에 대한 항균활성 보유균주 선발

- 균주 선발과정을 통해 자연계 및 돈분 샘플로부터 선발된 총 80종의 균주를 대상으로 악취 저감에 효과적인 미생물을 선발하기 위해 항균활성 평가를 실시하였다. 항균활성 평가는 가축 분뇨 내에서 암모니아, 황화수소 등 악취를 유발한다고 알려져 있는 *Streptococcus anginosus* 및 *Clostridium perfringens* 균주를 지표균주로 하여 항균활성을 가지는 후보 균주를 찾기 위하여 agar well diffusion 법을 사용하였다. 두 종의 지표균주를 nutrient 액체배지에 접종한 뒤 37°C 항온 진탕 배양기에서 200rpm으로 24시간 배양한 후 nutrient 한천 배지에 1% 첨가하여 유해균주가 포함된 한천 배지를 제조하였다. 제조된 배지에 천공기를 이용하여 배양액이 첨가될 부위를 천공한 후 각 선발균주 배양액을 첨가하여 각 균주별 지표균주에 대한 항균활성을 평가하였다. 선발 균주 배양액의 제조는 선발 균주별로 MRS 액체배지를 이용하여 37°C의 온도조건에서 24시간 배양한 후 배양액을 제조하였으며, 0.2 μ m filter로 제균한 제균액 200 μ l를 유해균이 포함된 천공배지에 첨가하여 4°C에서 12시간 동안 냉장 보관 하여 배양액이 agar에 충분히 퍼지도록 한 후 37°C 항온 배양기에서 12시간 동안 배양하여 투명환의 생성 유무를 확인하였다.

f. 선발 균주의 열안정성 조사

- 내열성 특성을 조사하기 위하여 선발된 균을 배양한 후, MRS 및 LB 액체 배지에 선발된 각 후보 균주들을 접종하여 35°C에서 200rpm으로 24시간 진탕 배양하여 배양액을 제조한 후, 60°C, 75°C, 90°C 조건에서 2분, 5분, 10분간 열처리를 통해 생균수 감소정도를 확인하였다. pH가 보정된 액체 배지에 선발된 균주 배양액을 균주별로 2%씩 접종한 후 35°C에서 200rpm으로 24시간동안 배양한 후 생균수 분석을 통해 pH별 안정성을 확인하였다.

g. 생화학적 특성 분석을 통한 선발균주의 동정

- 선발된 미생물들에 대하여 생화학적 특성을 분석하기 위해 MRS 및 BCP 배지에서 선발된 균은 API 50 CHL kit을 이용하고, LB 배지에서 선발된 균은 API 50 CHB kit를 이용하여 각 균주의 특성 평가를 실시하였다. API kit는 스트립에 있는 49가지 탄수화물의 발효 여부를 조사하여 미생물을 동정하는 방법이다. 선발된 균을 API 50 CHB medium 또는 API 50 CHL medium에 희석한 후에 희석액을 스트립의 튜브에 분주하였다. Mineral oil로 스트립의 빈 곳을 막아주고 33℃에서 24시간~48시간 배양한 후 색의 변화를 확인하였다. 색의 변화는 API 50 CHL의 경우 음성 반응은 보라색, 양성 반응은 노란색으로 나타났고, API 50 CHB의 경우 음성 반응은 붉은색, 양성 반응은 노란색으로 나타났다.

h. 16S rRNA sequencing을 통한 선발 균주의 동정 및 기탁

- 선발한 균주들의 명확한 동정을 위하여 16S rRNA sequencing을 실시하였다. 순수 분리된 균주는 (주)마크로젠 (Seoul, Korea) 에 염기서열 분석을 의뢰하여 16S rRNA full sequencing을 통해 동정하였으며, NCBI GenBank database의 염기 서열 비교를 통해 균주를 확인하였다. 선발된 균주는 KCCM(한국미생물보존센터)에 기탁하였으며 기탁 번호는 *Bacillus subtilis* GB-BS-2020(KFCC 11868P), *Bacillus amyloliquefaciens* G10 (KCCM 12354P), *Lactobacillus brevis* M10 (KCCM 12355P), *Lactobacillus reuteri* GB-LC1 (KCCM 10651P), *Bacillus licheniformis* GB-F2(KCCM 10932P) 이다.

i. 경제적인 prebiotics 소재 적용

- chicory pulp는 inulin을 추출하고 남은 부산물로 축산에서 경제적인 prebiotics 소재로 활용할 수 있기에 아래와 같이 잔여 inulin 성분을 분석하여 적용 가능성을 평가하였다.
- chicory pulp 내 inulin의 prebiotics 효과를 확인하고자 chicory pulp 내 inulin 함량 및 inulin의 유산균 생육 증진 효과를 분석하였다.
- chicory pulp 내 inulin 함량 분석은 아래 표 4의 조건으로 HPLC를 이용하여 분석하였다.
- inulin 첨가량에 따른 유산균 생육 증진 효과를 알아보기 위하여 배양 배지에 0.1 ~ 2 % 별로 inulin을 첨가한 후 선발 균주 중 두 유산균 *Lactobacillus brevis* M10, *Lactobacillus reuteri* GB-LC1의 균수를 분석하였다.

표 4. Chicory pulp 내 inulin 함량 분석의 방법

지표	조건
	Shodex® Sugar SP0810 with Pb2
Column	Guard column (50 × 9.2mm i.d.) Analytical column (300mm × 8.0mm i.d.)
Column temperature	85 °C
Flow rate ml/min	1.0 mL/min
Mobile phase	1차 증류수
Detector	RID

j. 약취 저감 천연물 후보 물질 선정

- 약취 저감에 효과가 있는 천연물질을 선정하기 위하여 분뇨 슬러리를 가지고 약취 저감 실험을 수행하였다. 천연물질은 약취 저감에 효과가 있다고 알려진 유카, 감초, 목초, 상 황버섯, 썩, 알로에 등의 추출액을 사용하였다. 실험에 사용한 추출액은 상용화된 추출 제 품을 구입하여 사용하였고, 후보 천연물질 추출액 5%를 분뇨에 처리하여 약취 저감 효과 를 암모니아, 아민, 황화수소 및 머캅탄의 4종의 약취 물질 분석을 통하여 확인하였다.

1-2. 선발된 최종 후보 균주의 대량생산을 위한 lab scale 발효 조건 확립

1) 바실러스 속

a. 최적 배지 조성

- 바실러스 속 균주를 TSB (Tryptic Soy Broth) 액체배지에서 37°C, 200rpm에서 24시간 진 탕 배양하여 고상 발효 접종용 배양액(seed culture)을 제조하였다.
- 고체발효를 위한 최적 배지 조성 확인하기 위하여 다양한 곡물 부산물을 대상으로 곡물별 탄소, 질소 함량을 고려하여 다양한 단일 원료 및 조합을 표 5와 같이 설정하여 실험을 진행하였다. 초기 가수량을 40%로 조정한 후 121°C에서 30분간 멸균하여 5가지 배지 내 부의 오염균을 완전히 제거하였으며, 실온까지 냉각하여 각 종균을 3% 접종하여 36°C의 발효온도에서 30시간 발효를 진행하였다. 발효 후 각 샘플을 60°C에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다.

표 5. 선발된 균주들의 고상발효 배지조성

배지조성 (%)	A	B	C	D	E
소맥피		40	37.5		45
대두박	100	60	57.5	95	
옥수수					50
당밀			5	5	5

b. 최적 초기 가수량

- 고체발효를 위한 최적 초기 가수량을 확인하기 위하여 앞선 실험에서 확인된 최적 배지인 B (대두박 60%, 소맥피 40%)에서 초기 가수량의 변화에 따른 시간별 균수 변화를 확인하였다. 대두박 60%와 소맥피 40%가 잘 혼합된 배지를 이용하여 초기 가수량을 40%, 50% 두 처리로 나누어서 121℃에서 30분간 멸균하였다. 그 후 실온까지 냉각하여 각 종균을 3% 접종하여 36℃의 발효온도에서 48시간 발효를 진행하였다. 발효 후 각 샘플을 60℃에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다.

c. 최적 종균 접종량

- 바실러스 속의 최적 종균 접종량을 확인하기 위하여 우선 TSB 액체배지에서 37℃, 200rpm에서 24시간 진탕 배양하여 균주 배양액을 제조하였다. 대두박 60%와 소맥피 40%가 잘 혼합된 배지를 121℃에서 30분간 멸균하여 배지 내부의 오염균을 완전히 제거하였다. 실온까지 냉각 후 각 종균을 1%, 3%, 6%의 종균을 접종하여 36℃의 발효온도에서 48시간 발효를 진행하였다. 발효 후 각 샘플을 60℃에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다.

d. 최적 발효 온도

- 바실러스 속의 최적 발효 온도를 확인하기 위하여 우선 TSB 액체배지에서 37℃, 200rpm에서 24시간 진탕 배양하여 균주 배양액을 제조하였다. 대두박 60%와 소맥피 40%가 잘 혼합된 배지를 121℃에서 30분간 멸균하여 배지 내부의 오염균을 완전히 제거하였다. 실온까지 냉각 후 각 종균을 1% 접종하여 35℃ 및 40℃에서 각각 48시간 발효를 진행하였다. 발효 후 각 샘플을 60℃에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다.

e. 최적 발효 시간

- 바실러스 속의 최적 발효 온도를 확인하기 위하여 우선 TSB 액체배지에서 37℃, 200rpm에서 24시간 진탕 배양하여 균주 배양액을 제조하였다. 대두박 60%와 소맥피 40%가 잘 혼합된 배지를 121℃에서 30분간 멸균하여 배지 내부의 오염균을 완전히 제거하였다. 실온까지 냉각 후 각 종균을 1% 접종하여 발효 시간별로 24, 36, 48시간에 샘플링을 한 후 각 샘플을 60℃에서 12시간 건조하여 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다.

2) 락토바실러스 속

a. 최적 배지 조성

- 락토바실러스 속 균주를 MRS (Lactobacilli MRS broth, Difco)배지 100mL에 접종 후 35℃, 24시간동안 정지 배양하였다. 배양 완료된 배지의 OD 및 pH를 측정하고, 400mL MRS Broth 배지에 5% 접종하여 2차 배양하였다.

b. 동결건조

- 배양액을 동결건조하기 위해 연속 원심분리 후 동결보존제로 10% skim milk 용액을 1:1로 혼합 후 초저온 냉동고(DF8517(J), Il Shin Co. Ltd., Korea)에서 -70℃로 24시간 예비 동결하였다. 그 후 동결건조기(Cleanvac 8, Il Shin Co. Ltd., Korea)에서 770mmHg, -70℃ 조건으로 72시간동안 동결건조 하였다.

2. 대량 생산 공정 확립 및 저장안정성 평가

2-1. 대량생산 공정 확립

- 선발된 바실러스 속과 락토바실러스 속 균주들의 선행 연구된 lab scale 생산조건을 기준으로 대량생산 공정을 확립하였다. 바실러스 속은 단독 고상 발효(*Bacillus subtilis* GB-BS-2020, *Bacillus amyloliquefaciens* G10, *Bacillus licheniformis* GB-F2) 및 혼합 고상 발효 (*Bacillus subtilis* GB-BS-2020, *Bacillus amyloliquefaciens* G10)를 진행하였고 락토바실러스 속은 대량 액상배양 후 외부 업체((주)케비젠)에서 동결 건조를 진행하였다.

1) 바실러스 속

a. 종균 배양

- 선발된 균주를 각 균주에 적합한 TSB 액상배지에 접종 후 37℃, 200rpm, 조건으로 24시간동안 배양하였다. 상기 배양액을 scale up 하기 위해 5L 액상 배지에 10 % 접종 후 2차 배양하고, 200L 생산용 배지에 접종 후 36℃, 100rpm 조건으로 27시간동안 배양하였다. 배양 중 시간 별 OD 및 pH를 측정하여 배양 정도를 확인하였다 (표 6).

표 6. 바실러스 속의 생산용 배지 조성

원료명	Broth의 조성 (%)	200L 기준 함량 (g)
Dextrose	1.5	3,000
Yeast extract	0.4	800
Soy peptone	0.2	400
NaCl	0.1	200
K ₂ HPO ₄	0.1	200
C ₅ H ₈ NNaO ₄ ·H ₂ O	0.5	1,000
MgSO ₄	0.1	200
MnSO ₄	0.01	20

b. 고상 발효

- 바실러스 속은 대두박 60%와 소맥피 40%를 사용하였고 증자 조건은 110℃, 30분으로 설정하였다. 가수량은 배지 중량 대비 40%로 배지 수분량을 고려하여 설정하였다. 종균 접종량은 배지 대비 2%로 하였고, 발효 온도 및 시간은 36℃, 30시간으로 하였다. 발효 후 건조 조건은 60℃, 20시간으로 확립하였다. 발효과정 동안 시간 별로 샘플을 채취하여 균수 및 pH를 측정하여 배양 정도를 확인하였다.

2) 락토바실러스 속 (외부 업체 위탁 생산: (주)케비젠)

a. 액상 배양

- 락토바실러스 속을 MRS (Lactobacilli MRS broth, Difco)배지 100mL에 접종 후 35℃, 24시간동안 정지 배양하였다. 배양 완료된 배지의 OD 및 pH를 측정하고, 400mL MRS Broth 배지에 5% 접종하여 2차 배양하였다. 상기 배양액을 400L 생산배지에 4.5% 접종하여 50rpm으로 교반 배양하였다 (표 7). HCl과 NaOH를 이용하여 pH 5.5 를 유지하였다.

표 7. 락토바실러스 속의 생산용 배지 조성

원료명	Broth의 조성 (%)	400L 기준 함량 (g)
Glucose	2.5	10,000
Yeast extract	1.0	4,000
Soy peptone	1.0	4,000
Sodium acetate	0.5	2,000
K ₂ HPO ₄	0.2	800
MgSO ₄	0.01	40
MnSO ₄	0.005	20
Tween 80	0.1	400
C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O·3Na	0.2	800

b. 동결건조

- 배양액을 동결건조하기 위해 연속 원심분리 후 동결보존제로 10% skim milk 용액을 1:1로 혼합 후 동결건조 하였다.

3) 효모 (퇴액비 부숙용 제품에 활용)

a. 종균 배양

- *S. cerevisiae* GB-LC4 균주를 PDB(Potato Dextrose broth, Difco) 액상배지에 접종 후 30℃, 200rpm, 조건으로 24시간동안 배양하였다. 상기 배양액을 scale up 하기 위해 5L PDB 배지에 10 % 접종 후 2차 배양하고, 200L 생산용 배지(표 8)에 접종 후 30℃, 100rpm 조건으로 27시간동안 배양하였다. 배양 중 시간 별 OD 및 pH를 측정하여 배양 정도를 확인하였다

표 8. 효모 균주의 생산용 배지 조성

원료명	Broth의 조성 (%)	200L 기준 함량 (g)
Dextrose	3.0	6,000
Yeast extract	1.0	2,000
Dextrin	1.0	2,000
Peptone	0.5	1,000
NaOH	0.366	732

b. 고상 발효

- Lab scale과 pilot scale 생산조건을 기준으로 대량생산 공정을 확립하였다. 배지는 대두 박 60%와 소맥피 40%를 사용하였고 증자 조건은 110℃, 30분으로 설정하였다. 가수량은 배지 중량 대비 40 로 배지 수분량을 고려하여 설정하였다. 종균 접종량은 배지 대비 2%로 하였고, 발효 온도 및 시간은 30℃, 30시간으로 하였다. 발효 후 건조 조건은 60℃, 20시간으로 확립하였다. 발효공정 동안 시간 별로 샘플을 채취하여 균수 및 pH를 측정하여 배양 정도를 확인하였다. 균수는 PDB agar(Potato Dextros Broth, Difco) 배지에 멸균수를 이용, serial dilution하여 colony 수를 확인하였고, pH는 pH meter(star a211, ORION)를 이용하여 측정하였다.

2-2. 시제품에 대한 저장안정성 평가

- 시제품 배합비를 확정된 후 가혹조건인 40℃, 60℃와 상온 조건에서 6개월 동안 1 개월 단위로 균수를 확인하여 안정성 실험을 수행하였다.

3. 시제품의 효능 검증

3-1. 선발 균주 첨가된 급여용 기능성 사료 첨가제 (크린바이오프리미엄산)

- 개발 제품 급여용 약취저감 생균제 ‘크린바이오프리미엄산’는 단국대 (제2위탁기관)에서 사양실험을 진행하여 평가하였다.
- 실험을 위해 3원 교잡 육성돈([L x Y] x D, 21.3 kg) 160두를 공시하였으며, 총 6주간

실험을 진행하였다.

- 공시 동물들은 basal 사료만은 급여하거나(TRT1), 사료에 각 0.1% (TRT2), 0.2% (TRT3), 0.3% (TRT4) 첨가하여 총 4개의 처리구로 나누었으며, 분변 내 악취 물질, 생산성 및 영양소 소화율을 조사하였다.
- 분변 내 악취는 암모니아, 황화수소 및 머캅탄을 분석해 평가하였다. 실험 종료시(6주)에 각 처리구에서 동일한 시간 동안 배설된 분을 채취한 후, 신선한 분 300 g을 취하여 2,600 mL의 밀봉된 플라스틱 용기에 넣고 실온에서 7일간 발효 및 보관한 후 Gastec (Model GV-100, GASTEC, Japan)을 사용하여 분으로부터 발생하는 암모니아, 황화수소 및 머캅탄을 측정하였다.
- 육성돈의 생산성(증체량, 사료섭취량 및 사료효율)은 실험 종료 시(6주)에 평가되었다. 증체량 측정을 위해 각 개체별로 체중을 측정하였다. 체중 측정 시 급여한 사료의 양에서 잔량을 제외한 양을 사료섭취량으로 간주하였고, 사료효율은 증체량을 사료섭취량으로 나누어 계산하였다.
- 영양소 소화율은 일반성분(건물, 조단백질)과 에너지의 소화율을 측정하였다. 소화율 측정을 위해 산화크롬(Cr_2O_3)을 표시물로서 0.2% 첨가하여 7일간 급여 후 항문 마사지법으로 분을 채취하였다. 채취한 분은 60°C의 건조기에서 72시간 건조시킨 후 Willey mill로 분쇄하여 분석에 이용했다. 사료의 일반성분과 표시물로 혼합 된 산화크롬은 AOAC (2000)의 방법에 준하여 분석하였다.

3-2. 선발 균주 첨가된 분무용 악취저감제 (클린케어)

- 분무용 제품의 현장 적용 효과를 알아보기 위하여 농가(이천 지역) 축사 현장 및 단국대 (제2위탁기관)에서 사양실험을 수행하였다.
- 농가에서는 2주 또는 3주간 7일 간격으로 클린케어를 분무 후 암모니아, 아민, 황화수소 등의 가스를 측정하였다.
- 단국대에서는 2주 간격으로 클린케어를 단독 분무 후 암모니아, 머캅탄을 측정하였고, 관능평가도 실시하였다.
- 또한, 크린바이오프리미엄산과 클린케어를 혼합 적용하여 암모니아, 황화수소, 초산, 머캅탄, 이산화탄소 등을 비교 분석하였다. 처리구로 사료 내 생균제를 첨가하지 않은 돈사를 소독하기 전(TRT1)과 버콘-S를 이용해 소독 후(TRT2), 그리고 사료 내 생균제를 첨가한 돈사를 소독하기 전(TRT3)과 클린케어를 이용해 소독 후(TRT4), 총 4가지 그룹을 비교하였다.
- 분변 내 악취는 암모니아, 황화수소 및 머캅탄을 분석해 평가하였다. 실험 종료시(6주)에 각 처리구에서 동일한 시간 동안 배설된 분을 채취한 후, 신선한 분 300g을 취하여 2,600mL의 밀봉된 플라스틱 용기에 넣고 실온에서 7일간 발효 및 보관한 후 Gastec (Model GV-100, GASTEC, Japan)을 사용하여 분으로부터 발생하는 암모니아, 황화수소 및 머캅탄을 측정하였다.

3-3. 퇴액비 부숙 촉진제 (그린케어)

- 부숙제의 액비 부숙 효과를 확인하기 위하여 유용 균주들을 조합한 후보 제품을 타사 제품과의 부숙 효과를 비교하였다. 돈분 및 슬러리 혼합물에 후보 제품을 첨가한 후 주기마다 폭기하여 16주간 부숙 실험을 진행하였으며, 2주 간격으로 부숙도 및 대장균 균수 및 질소 함량 (T-N) 저감 효과를 확인하였다.
- 부숙제의 퇴비 부숙 효과를 확인하기 위하여 후보 제품을 타사 제품과의 부숙 효과를 비교하였다. 축분 혼합물에 후보 제품을 첨가한 후 (처리구당 약 10kg (축분 8.5kg 및 톱밥 1.5kg) 주기마다 혼합하여 12주간 부숙 실험을 진행하였으며, 2주 간격으로 부숙도 및 대장균 균수 및 질소 함량 (T-N) 저감 효과를 확인하였다.
- 후보 제품의 실제 효능 검증을 위해 외부 분석 공인기관에 액비 및 퇴비 부숙도 평가 실험을 의뢰하여 제품의 효능을 검증하였다.

4. 유용미생물의 유전체 분석 및 유용 미생물 급여에 따른 미생물 군집 분석 (제1위탁기관_강대경)

4-1. 유용 미생물의 유전체 정보 해독

- 보유균주 및 주관기관 선발예비균주 중 probiotic 특성이 우수한 균주 3종의 genomic DNA를 추출하여 유전체 분석을 실시했다. PacBio RS II와 Illumina Highseq을 이용하여 genome sequencing을 실시하였으며, PacBio sequencing 결과로 얻은 reads들을 RS HGAP assembly version 3.0(SMRT Portal version 2.3, Pacific Biosciences)을 사용하여 assembly하였다. Illumina 데이터를 사용하여 de novo assembly된 contig의 시퀀스 보정(sequence compensation)을 통하여 incorporation bias와 에러율을 최소화하였다. BLASTP를 기본으로 Egnog database를 이용하여 annotation하였다. 유전체 서열분석 자료를 genome data visualization software를 이용하여 분석하였다. Sequencing을 통하여 확보된 유전체 정보에서 미생물 각각 ORF의 annotation을 확인한 후에, 유전체들 간을 상호비교하고 균주별 유용유전자를 발굴하였다.

4-2. 선발된 균주를 함유된 크린바이오프리미엄산 (Synbiotics)를 급여한 육성돈의 장내 균총 및 대사체 분석

a. 분변시료의 채취

- 선발균주를 포함한 Synbiotics(40% *Bacillus subtilis*, 10^8 CFU/g; 40% *B. amyloliquefaciens*, 10^8 CFU/g; 10% *Lactobacillus brevis*, 10^{10} CFU/g; 10% *Lactobacillus reuteri*, 10^{10} CFU/g; 치커리)를 육성돈에 급여한 후에 분변 채취를 위해 비육돈의 항문을 자극하여 신선한 것으로 취하고 이동시엔 밀봉하여 4°C 상태를 유지하며 -70°C 초저온냉동고에 보관하며 실험에 사용하였다.

b. Metagenomic DNA의 분리 및 16s rRNA 분석

- 미생물 군집 분석을 위한 metagenomic DNA를 분리할 때 주의할 점은 원래의 군집 구조를 그대로 반영할 수 있는 DNA를 얻는 일이다. 장관 내에는 그람 양성균과 그람 음성균이 함께 존재하므로 그람 음성균에 비해 비교적 세포벽이 견고한 그람 양성균의 DNA도 함께 추출할 수 있는 방법이 필요하다. 이를 위해 physical disruption을 함께 이용하는 QiaAMP PowerFecal® DNA Isolation Kit (Quagen, Germany)를 이용하여 장관 내 미생물의 metagenomic DNA를 추출하였다. DNA agarose gel electrophoresis과 UV spectrophotometer를 이용하여 추출한 유전자의 순도 및 양을 확인하며, 16S rRNA 유전자의 fusion primer를 이용한 PCR실험을 통해 분리된 DNA의 PCR 유효성을 검증하였다. 이후, 준비된 metagenomic DNA로부터 16S rRNA 유전자의 hyper-variable region 중 V3-V4 영역을 선택적으로 증폭한 후에, illumina사의 MiSeq 장비를 사용하여 DNA 서열을 분석하였다.

c. 장관내 미생물 군집 분석

- DNA sequence data를 확보한 후에, sequence quality가 기준에 미달하는 시료를 우선 제거하고, quality 기준을 통과한 시료로부터 chimera 서열을 제거하였다. 다음으로, 계통 분석학적으로 미생물을 그룹화하는 미생물 군집분석 database인 EzBioCloud database를 이용하여 OTU를 검색해 분석하였다.

d. 생물정보학적 분석

- 장내균총의 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) functional pathways 예측은 EZBioCloud database를 이용해 얻은 OTU 표를 PICRUST2 온라인 사이트(<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>)에 데이터를 업로드한 뒤 picrustc 파일을 다운받아 STAMP program (Parks, et al., 2014, Bioinformatics)로 분석하였다.
- 장내균총과 분변시료의 SCFA, BCFA, 그리고 젖산 농도와의 상관관계는 Spearman's correlation coefficient를 통해 측정하였으며, R Program(v.4.0.2)를 이용해 시각화 하였다.
- Co-occurrence network analysis을 위해 Cytoscape program(v.3.8)의 CoNet plugin을 사용하였다.

e. 분변시료의 유기산(SCFA, BCFA) 및 lactate 농도의 측정

- HPLC를 위한 분변시료는 Slizewska 및 Chlebicz의 논문을 참고하여 준비하였다 (Slizewska, Chlebicz, 2019, Animals). 간략히, 0.5g 분변 시료를 1ml 증류수에 부유시킨 뒤 3분간 vortex 하였다. 이후 10,000g에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 얻은 뒤 0.22µm PTFE syringe filter를 사용하여 filtration 하였다. 젖산, SCFA, BCFA 농도

의 측정을 위해 HPLC를 사용하였다. Agilent Infinity 1260 HPLC system(Agilent, USA)로서, 칼럼은 300x7.8mm Aminex HPX-87H(Bio-Rad, USA)를 사용했으며, RI 및 UV 검출기($\lambda=210\text{nm}$)로 검출하였다. 시료를 컬럼에 주입한 후에 65°C에서 35분간 분석했으며, 0.005M H₂SO₄를 이동상으로 사용했고, flow rate는 0.6ml/min으로 유지했다.

f. 통계분석

- 실험동물의 성장률, 분변시료의 pH, 수분함량, 유기산의 통계분석에는 GraphPad Prism(v.8.4.2)를 사용했으며, ANOVA와 Tukey post hoc test를 사용해 유의차를 분석하였다. 한편, 상대적 풍부도, alpha diversity 및 beta diversity는 EZBioCloud pipeline을 이용해 분석하였다. 그룹간의 차이는 $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$ 수준으로 고려하였다.

5. 품질 관리 기준 수립 (크린바이오프리미엄산, 클린케어, 그린케어) 및 제품화

5-1. 크린바이오프리미엄산

a. 경구독성 안전성 평가

- 개발 제품의 안전성 평가를 위하여 호서대학교 바이오의과학연구센터에 위탁실험을 진행하여 랫드 *in vivo* 실험으로 개발제품의 dose dependency에 따른 생물 경구 독성평가를 실시하였다.

b. 안정성 평가

- 개발제품의 저장안정성 평가를 위하여 균주 저장안정성 실험을 6개월간 상온, 40°C, 60°C에서 각각 1개월 단위로 조건별 생균의 균수를 확인하였다.

c. 제품화

- 제품 등록 및 품질 기준 수립

5-2 크린케어

a. 효능 평가

- 분무형 악취저감제의 효과를 객관적으로 평가하기 위해 탈취 평가 공인기관인 한국화학융합시험연구원(원)에 의뢰하여 악취유발물질인 암모니아, 아민, 황화수소 및 메틸머캅탄에 대한 탈취율을 확인하였다.

b. 제품화

- 제품 등록 및 품질 기준 수립

5-3. 그린케어

a. 효능 평가

- 퇴액비 부속 실험을 진행한 샘플의 효능 검증을 위해 외부 분석 공인기관에 실험을 의뢰하여 제품의 효능을 검증하였다.

b. 제품화

- 제품 등록 및 품질 기준 수립

III. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

1. 축산 악취 저감능이 우수한 미생물 선발 및 Lab scale 고체발효 조건 확립

1-1. 축산 악취 저감에 효과가 있는 미생물 후보균주 선발

a. 유용 미생물 균주 선발

- 본 연구에서는 축산 분뇨 내 악취 유발 물질에 대한 억제능이 우수한 후보 균주들을 분리하였다. 분석 결과 BCP 배지 20여종, MRS 배지 30여종, LB 배지 30여종으로 총 80종의 균주가 분리되었으며, 각 균주를 15% glycerol stock을 제조하여 -70℃ deep freezer에 보관하면서 추가 실험에 활용하였다.

b. 선발균주의 악취 유발 가스 저감 능력 평가

- 선발된 미생물들에 대하여 악취 유발 가스 저감 능력을 실험하기 위한 실험을 수행하였다. 실험은 악취의 큰 원인물질이라고 알려진 암모니아, 아민, 황화수소, 머캅탄 등 4종의 검지관을 활용하여 가스 측정으로 진행하였다.
- 악취 유발 가스 저감 능력 실험 결과, 그림 5과 같이 *Bacillus subtilis* GB-BS-2020(A), *Bacillus amyloliquefaciens* G10 (B), *Lactobacillus brevis* M10 (D), *Lactobacillus reuteri* GB-LC1 (G), *Bacillus licheniformis* GB-F2(J) 이들 균주들이 상대적으로 악취 저감에 효과가 있는 것으로 확인되었다 (그림 5).

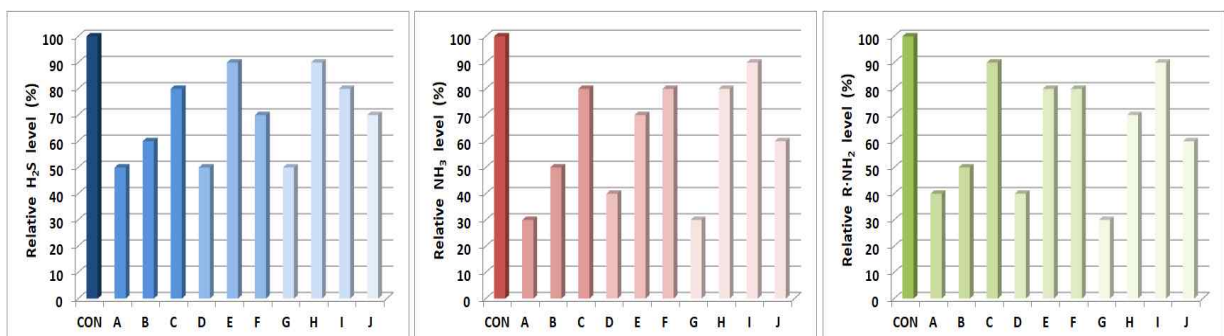


그림 5. 균주 별 악취 유발 물질 발생 비교

(좌) 황화수소 (H₂S), (중) 암모니아 (NH₃), (우) 아민(RNH₂)

(CON: untreated control A: *Bacillus subtilis* GB-BS-2020, B: *Bacillus amyloliquefaciens* G10, C: *Enterococcus faecalis*, D: *Lactobacillus brevis* M10, E: *Lactobacillus plantarum* A, F: *Lactobacillus plantarum* B, G: *Lactobacillus reuteri* GB-LC1, H: *Pediococcus pentosaceus*, I: *Saccharomyces cerevisiae*, J: *Bacillus licheniformis* GB-F2)

d. 선발균주의 유기물 분해능 평가

- 선발균주에 대하여 유기물 분해능을 평가하기 위하여 protease 및 amylase에 대한 효소활성을 평가하였다. 결과는 아래 그림 6와 같이 총 16종의 균주에서 효소 활성이 있는 것으로 나타났으며, 특히 *Bacillus subtilis* GB-BS-2020(A), *Bacillus amyloliquefaciens* G10(B), *Bacillus licheniformis* GB-F2(J) 균주의 경우 단백질 및 전분 분해능이 우수한 균주로 판명되어 축산 약취 원인물질 저감에 효과가 있을 것으로 기대된다.

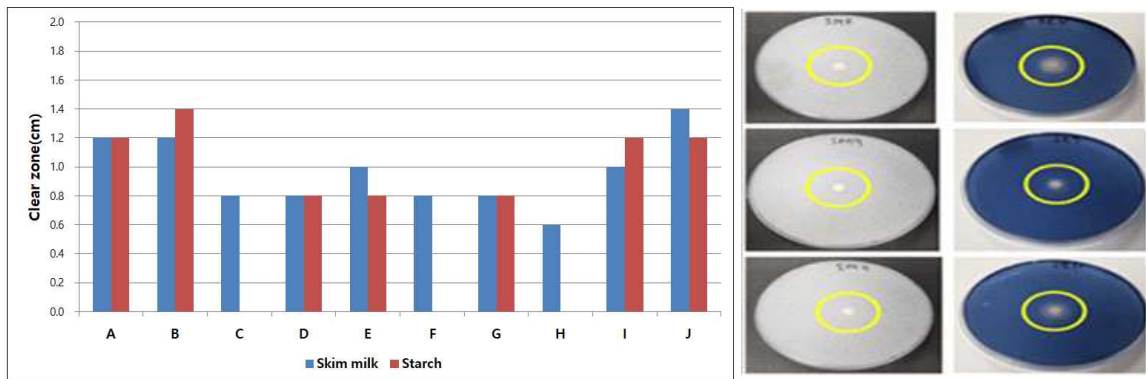


그림 6. Skim milk 및 starch를 이용한 선발균주의 유기물 분해능 평가 결과
 (A: *Bacillus subtilis* GB-BS-2020, B: *Bacillus amyloliquefaciens* G10,
 C: *Enterococcus faecalis*, D: *Lactobacillus brevis*, E: *Lactobacillus plantarum* A,
 F: *Lactobacillus plantarum* B, G: *Lactobacillus reuteri*, H: *Pediococcus pentosaceus*,
 I: *Saccharomyces cerevisiae*, J: *Bacillus licheniformis* GB-F2)

e. 약취 발생원인 균주에 대한 항균활성 보유균주 선발

- 균주 선발과정을 통해 자연계 및 돈분 샘플로부터 선발된 총 80종의 균주를 대상으로 약취 저감에 효과적인 미생물을 선발하기 위해 항균활성 평가를 실시하였다.
- 실험 결과, *Lactobacillus brevis* M10, *Lactobacillus reuteri* GB-LC1 균주 등 유산균 균주가 약취 발생 원인 균주인 *Streptococcus* 및 *Clostridium* 에 대하여 항균활성이 있는 것으로 확인되어 최종 균주 선발을 위한 기초자료로 활용하였다 (표 9).

표 9. 선발 균주의 *Streptococcus* 및 *Clostridium* 에 대한 항균활성평가

지표균주 (유해미생물)		<i>Streptococcus</i>	<i>Clostridium</i>
Strain	<i>Lactobacillus brevis</i> M10	++	+++
	<i>Bacillus subtilis</i> GB-BS-2020	-	-
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	++	++
	<i>Lactobacillus reuteri</i> GB-LC1	+++	++
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	++
	<i>Bacillus licheniformis</i> GB-F2	-	-
	<i>Lactobacillus casei</i>	+	++
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	+
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> G10	-	-

f. 선발 균주의 열안정성 조사

- 선발 균주를 활용한 사료첨가제 개발을 위해서는 펠릿 가공 및 분쇄 과정 등에서 발생하는 열에서 균주 사멸이 최소화 되는 것이 중요하기 때문에 열안정성을 조사하여 그림 7에 나타내었다.
- 선발 균주의 생존율을 90°C, 2분 열처리 시 생존률은 log 값 기준으로 계산하였으며, 전체적으로 포자를 형성하는 바실러스 속이 락토바실러스 속에 비하여 열안정성이 우수하였다. 평가 결과, 선발 균주 모두 비슷한 경향을 보였으며, 75°C까지는 대체적으로 열 안정성이 있다고 판단되었다.

g. 생화학적 특성 분석을 통한 선발균주의 동정

- 선발된 미생물들에 대하여 생화학적 특성을 분석하기 위해 MRS 및 BCP 배지에서 선발된 균은 API 50 CHL kit을 이용하고, LB 배지에서 선발된 균은 API 50 CHB kit를 이용하여 각 균주의 특성 평가를 실시하였다. 이를 이용하여 선발된 균주들 중 대표적인 균주들의 동정 결과는 다음 그림 8 및 표 10에 나타내었다.



그림 8. 선발 균주들의 API kit 분석

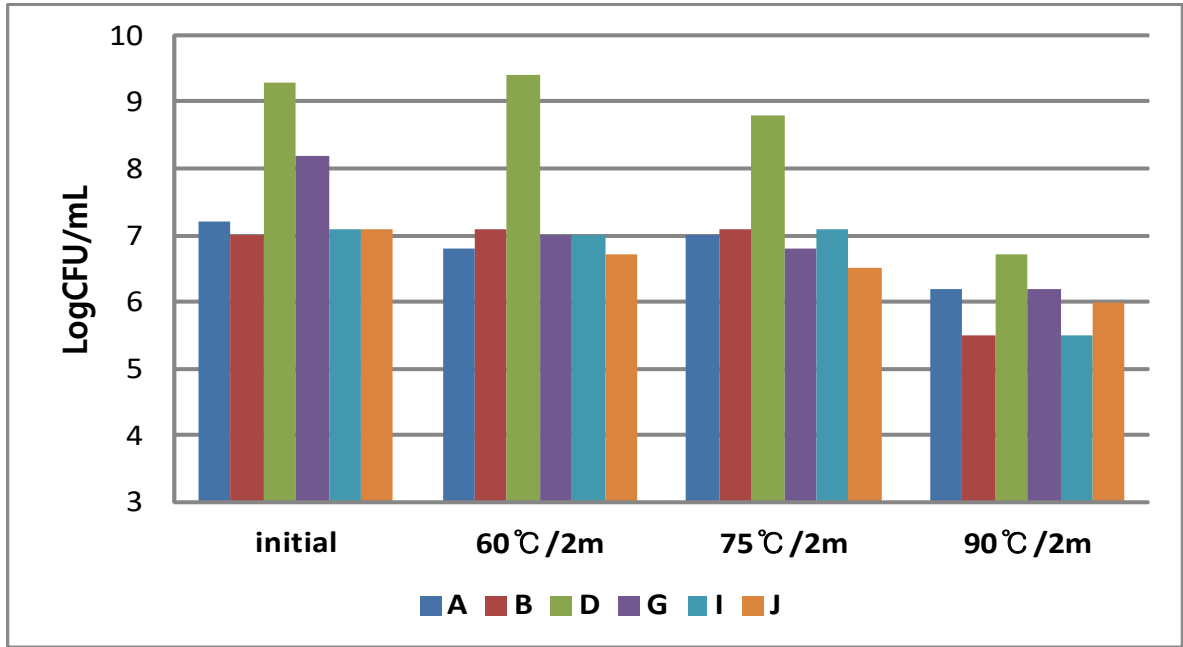


그림 7. 선발된 균주의 열처리 조건에 따른 열안정성 평가 결과 (2분)

(A: *Bacillus subtilis* GB-BS-2020, B: *Bacillus amyloliquefaciens* G10, D: *Lactobacillus brevis* M10, G: *Lactobacillus reuteri* GB-LC1, I: *Saccharomyces cerevisiae*, J: *Bacillus licheniformis* GB-F2)

표 10. 선발된 균주들 중 대표 균주의 API 50 CHL / CHB kit 동정 결과

Sample No.	Strains
1	<i>Bacillus subtilis</i> GB-BS-2020
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> G10
3	<i>Bacillus licheniformis</i> GB-F2
4	<i>Lactobacillus brevis</i> M10
5	<i>Lactobacillus reuteri</i> GB-LC1

h. 16S rRNA sequencing을 통한 선발 균주의 동정

- 선발한 균주들의 명확한 동정을 위하여 16S rRNA sequencing을 실시하였다. 균주 동정 결과는 표 11에 나타내었다.

표 11. 선발된 균주들의 16S rRNA sequencing 분석을 통한 균주동정 결과

동정 결과	Homology (%)	Sequence
<p><i>Bacillus subtilis</i> GB-BS-2020</p>	<p>99%</p>	<p>TTATCGGAGAGTTTGGATCCTGGCTCAGGACGAACGC TGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGAC AGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGAC GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACT GGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGAT GTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTG GCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGC ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCA ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGG AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA GTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT TTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA AGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACC TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA ATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTA AGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAG GGTCAATTGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAAGAAGA GGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC TCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGC GTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC CACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGT TTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA CTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGA GCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCGAAGAACCTT ACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATA GGACGTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTG CATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGGATCTTAGT TGCCAGCATTGAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCC GGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG CTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCG AGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTG GATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGA ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA CCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCGGTGAGGTA ACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGA TGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCG GAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTT</p>
<p><i>Bacillus amyloliquefaciens</i> G10</p>	<p>99%</p>	<p>TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGC AAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGAT GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC CTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG GGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTC AGACATAAAAGGTGGCTTCCGGCTACCACTTACAGAT GGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAC GGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG</p>

		<p>TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT GTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGG CACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCACGGCTA ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTC GCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG GCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAAC TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAG TGCGGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCT GAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA TACCCTGGTAGTCCACGCGGTAACCGATGAGTGCTA AGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCT AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCCG CAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGAC AATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCAGA GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAA CCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACT CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGG GCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAA TCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC TGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG CATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA CACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTTGTAACACCC GAAGTCG</p>
<p><i>Bacillus licheniformis</i> GB-F2</p>	<p>99%</p>	<p>CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTG AACCGCATGGTTCAATCATAAAAGGTGGCTTTTAGCT ACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGT AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCG TAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTC GAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAA GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC GTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGT GAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGA AACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGGA ATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGG AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTG TAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCGA ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAC GATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTA GTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGG GAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGA CGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA ATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA CATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTCCCCTT CGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGT CAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCA ACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCA GTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACC GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGC AGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCA</p>

		<p>ATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCT GCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGC CAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGGTGA AGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGT</p>
<p><i>Lactobacillus brevis</i> M10</p>	98%	<p>GCTCAGGACGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACAT GCAAGTCGAACGAGCTTCCGTTGATTGACGTGCTTG CACTGATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGT GAGTAACACGTGGGTAACCTTGCCCAGAAGCAGGGG ATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACA ACAAAAACCGCATGGTTTTTGTGAAAGGTGGTTTT GGCTATCACTTCTGGATGGACCCCGCGCGTATTAGT TAGTTGGTGAGGTAAGGCCACCAAGACAATGATA CGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGG GACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAG CAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGAT GGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTTCGGC TCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACAACCTCTGA GAGTAACTGTTCAAGGAGTTGACGGTATTTAACCAGA AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG CGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATG TGAAAGCCTTCCGGCTTAACCGGAGAAGTGATCGG AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGG AACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATG GAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCT GTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCA AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA CGATGAGTGTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTC AGTGCCGCGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCGTGG GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATT GACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT TAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTT GACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCC TTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTC GTCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC CAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT CAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAA CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG ACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCTGAGGCSAAGC TAATCTCTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGC TGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAA TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCG GGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG</p>
<p><i>Lactobacillus reuteri</i> GB-LC1</p>	98%	<p>AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCCGGCAG TGTGCCTAATACATGCAAGTCGTACGCACTGGCCCA ACTAATTGATGGTGCTTGTGAATTGACGATGGATCA CCAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGT AACCTGCCCCGAGCGGGGAATAACATTTGAAAC AGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCGCATGG TTTTTCTGGAAGATGGCTTTGGCTATCACTCTGGGA TGACCTGCGGTGCATTTAGCTAGTTGGTAAGGTAA CGGCTTACCAAGGCGATGATGCATAGCCGAGTTG AGAGACTGATCGGCCACAATGGGAACTGAGACACG GTCCATAACTTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC TTCCACAATGGGCGCAAGCTGATGGAGCAACACCG CGTTATTAAGAAAGGGTTTTCGGCCGCTTAAACTCTGT TGTTGGAGAAGAAGCTGCGTTAGAGTAACTGTTACG CAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACT</p>

		ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA GCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCA GGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGGAACTCGGCTTA ACCGAAGAAGTGCATCGGAAACCGGGCGACTTGAG TGCAGAAGAGGACAGTGGAACCCATGTGTAGCGG TGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCG AAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGC TCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCT GGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTT GGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCTGTTCTAACGCA TTAATGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGG TTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA GCGGTGAAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGA AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCTAACCTT AGAGATAAGGCGTTCCTTCGGGGACGTTAATGACA GGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAG ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG TTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGGACTCTAGTG AGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAC GACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCCTGGGCT ACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCA AACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCT CAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAA GTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCG CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC CGTCACACCATGGGAGTTTGTAAACGCCCAAAGTTG GTGGCCTAACCTTTATGGACGGGTACCCTAAGGCG GGACAGATGATCTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA
--	--	---

i. 경제적인 prebiotics 소재

- chicory pulp 내 inulin의 prebiotics 효과를 확인하고자 chicory pulp 내 inulin 함량 및 inulin의 유산균 생육 증진 효과를 분석하였다.
- chicory pulp 내 inulin 함량은 HPLC를 이용하여 분석하였다. chicory pulp를 열수로 추출한 후 inulin 함량을 분석한 결과 총 질량 대비 약 4 % inulin이 함유되어 있음을 확인하였다.
- inulin 첨가량에 따른 유산균 생육 증진 효과를 알아보기 위하여 배양 배지에 0.1 ~ 2 % 별로 inulin을 첨가한 후 선발 균주 중 두 유산균 *Lactobacillus brevis* M10, *Lactobacillus reuteri* GB-LC1의 균수를 분석하였다. 첨가 농도에 따라 두 유산균의 생육이 증가됨을 확인하였고, inulin과 유산균을 함께 급여할 시 좋은 synbiotics효과가 나타날 것으로 기대된다(그림 9).

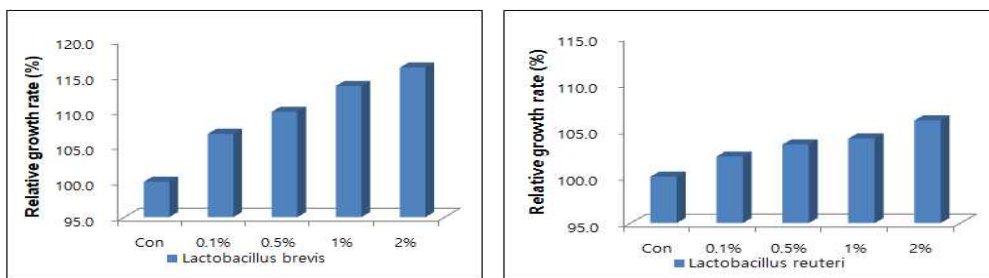


그림 9. 선발된 유산균의 inulin 첨가량에 따른 생육증진 효과 비교

j. 약취 저감 천연물 후보 물질 선정

- 약취 저감에 효과가 있는 천연물질을 선정하기 위하여 분뇨 슬러리를 가지고 약취 저감 실험을 수행하였다.
- 실험 결과 그림 10과 같이 썩과 유카의 약취 저감 능력이 좋은 것으로 나타났으며, 이들을 약취 저감 소재로 사용하였다.

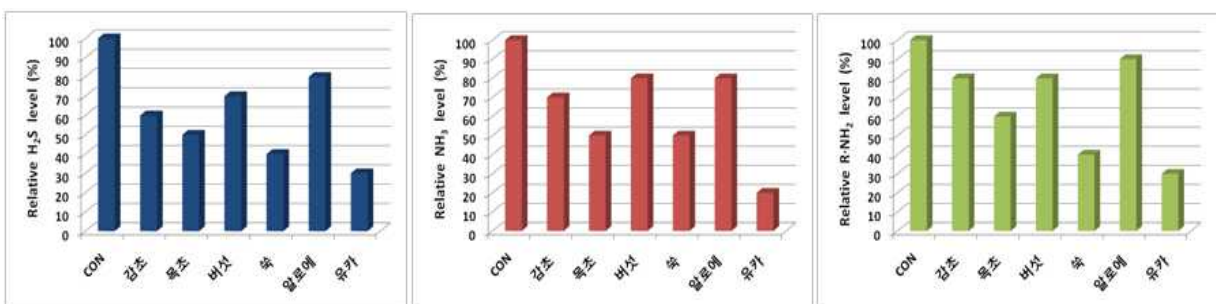


그림 10. 천연물 후보물질의 약취 유발 물질 발생 수준 비교
(좌) 황화수소 (H₂S), (중) 암모니아 (NH₃), (우) 아민(RNH₂)

1-2. 선발된 최종 후보 균주의 대량생산을 위한 lab scale 고체발효 조건 확립

- 선발된 최종 후보 균주의 lab scale 고체발효 조건 확립을 위하여 액상발효 종균을 이용하여 최적 배지 조성, 초기 가수량, 발효온도, 발효시간, 건조온도, 종균 접종량 등을 결정하고 발효 과정 중 균수 등의 변화를 조사하였다.

1) 바실러스 속

a. 최적 배지 조성

- 고체발효를 위한 최적 배지 조성 확인하기 위하여 다양한 곡물 부산물을 대상으로 곡물별 탄소, 질소 함량을 고려하여 다양한 단일 원료 및 조합을 설정 한 후 발효실험을 진행하였다. 발효 후 각 샘플을 60℃에서 12시간 건조한 후 발효물을 회수하여 균수 차이를 분석하였다. 분석 결과 바실러스 속은 모두 B처리구 (대두박 60%, 소맥피 40%)에서 가장 높은 균수(10^9 CFU/g 이상)를 나타내었다 (그림 11).

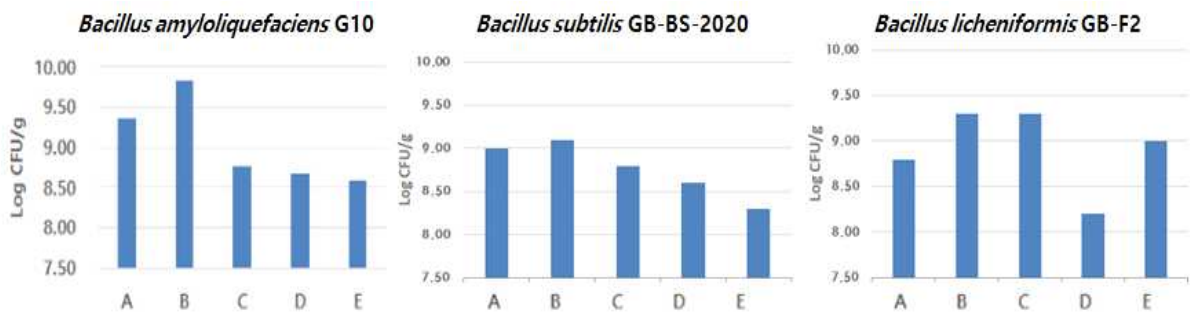


그림 11. 배지 조성에 따른 균수

(A: 대두박 100%, B: 대두박 60%, 소맥피 40%, C: 대두박 57.5%, 소맥피 37.5%, 당밀 5%, D: 대두박 95%, 당밀 5%, E: 옥수수 50%, 소맥피 45%, 당밀 5%)

b. 최적 초기 가수량

- 고체발효를 위한 최적 초기 가수량을 확인하기 위하여 앞선 실험에서 확인된 최적 배지인 대두박 60%, 소맥피 40%에서 초기 가수량의 변화에 따른 시간별 균수 변화를 확인하였다.
- 실험 결과, 바실러스 속 모두 가수량이 40%일 때 보다 50%일 때 발효가 더 잘 되는 것으로 나타났지만 큰 차이는 없었다 (그림 12).

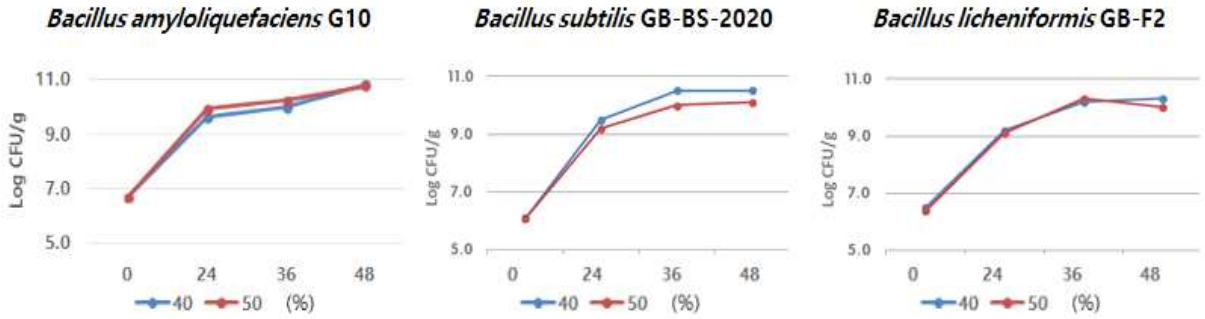


그림 12. 초기 가수량에 따른 균수의 발효시간별 변화

c. 최적 종균 접종량

- 선발된 균주의 종균 접종량을 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 바실러스 속의 경우 종균을 1,3,6% 접종하였을 때 큰 차이가 나타나지 않았으며 결론적으로 1%만 접종해도 될 것으로 판단되었다 (그림 13).

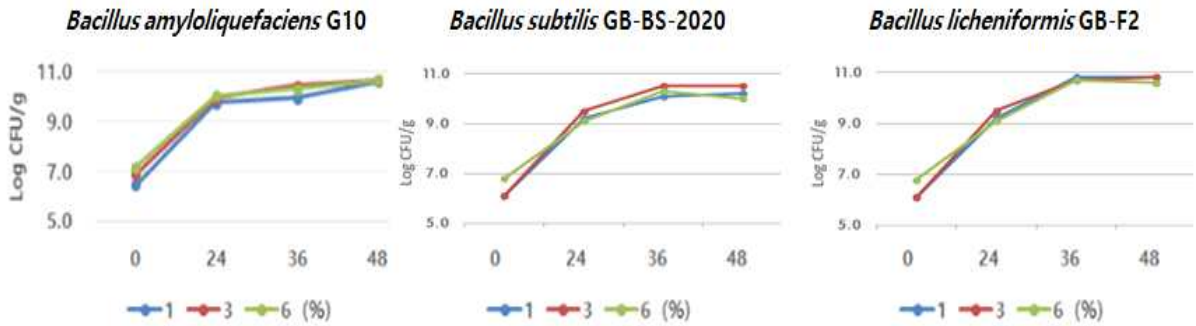


그림 13. 종균 접종량에 따른 균수의 발효시간별 변화

d. 최적 발효 온도

- 선발된 균주의 최적 발효 온도를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 바실러스 속은 모두 35°C 및 40°C에서 큰 차이를 나타내지 않았다.(그림 14). 따라서 5종의 균주 모두 35°C에서 발효하는 것이 좋을 것으로 판단된다.

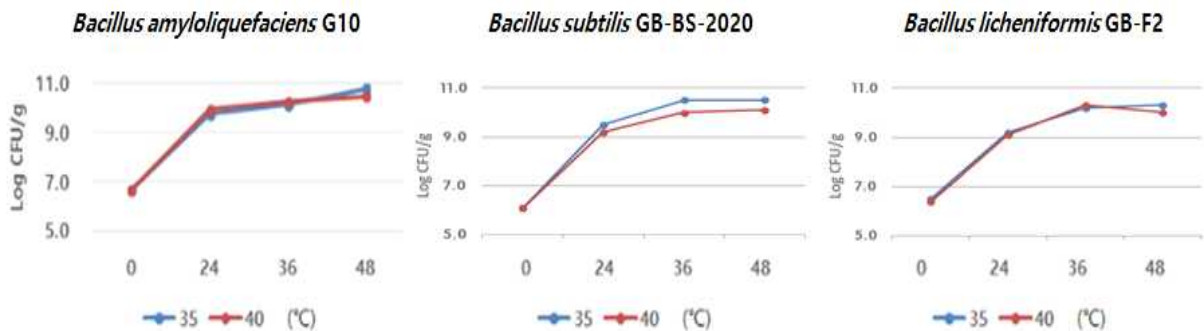


그림 14. 발효 온도에 따른 균수의 발효시간별 변화

e. 최적 발효 시간

- 선발된 균주의 최적 발효 시간을 확인하기 위한 실험결과를 표 12에 나타내었다.
- 바실러스 속 모두 발효시간이 늘어남에 따라 균수가 높아지는 결과나 나타났으며 발효 48시간이 가장 발효가 잘 되는 것으로 판단된다.

표 12. 발효 시간에 따른 선발 균주의 균수 변화

CFU/g	<i>B. amyloliquefaciens</i> G10	<i>B.subtilis</i> GB-BS-2020	<i>B.licheniformis</i> GB-F2
24hour	9.71E+09	1.55E+09	3.28E+09
36hour	2.36E+10	2.12E+10	1.05E+10
48hour	4.73E+10	3.98E+10	2.81E+10

2-1. 대량생산 공정 확립

- 선발된 5종의 균주들의 선행 연구된 lab scale 생산조건을 기준으로 대량생산 공정을 확립하였다. 락토바실러스 속 균주인 *L. reuteri* M10과 *L. brevis* GB-LC1 균주는 안정성을 확보하기 위해 동결건조로 진행하였다. 또한, 해당 연구 목표에는 설정되어있지 않지만, 축산 농가 맞춤형 환경개선제로 퇴·액비부숙제 개발을 위해 농장 분변 및 환경에서 *Saccharomyces cerevisiae* GB-LC4 균주를 추가적으로 분리하여 대량 생산 연구를 진행하였다.

1) 바실러스 속

(*B. amyloliquefaciens* G10, *B. subtilis* GB-BS-2020, *B.licheniformis* GB-F2)

- 종균 액상 배양 (표 13, 그림 15)

B. amyloliquefaciens G10, *B. subtilis* GB-BS-2020, *B.licheniformis* GB-F2 3종의 바실러스 균주를 TSB(tryptic soy broth, Difco) 액상배지에 접종 후 37℃, 200rpm, 조건으로 24시간동안 배양하였다. 상기 배양액을 scale up 하기 위해 5L TSB 배지에 10% 접종 후 2차 배양하고, 200L 생산용 배지(표 13)에 접종 후 36℃, 100rpm 조건으로 27시간동안 배양하였다. 배양 중 시간 별 OD 및 pH를 측정하여 배양 정도를 확인하였다 (그림 15).

배양 결과, *B. amyloliquefaciens* G10 균주는 OD 및 pH는 24시간 이후부터 변화가 크지 않아 24시간에 성장을 완료한 것으로 보이나, 27시간까지 균수는 다소 증가되었다. 위 결과로 대량 생산 시 최적 배양시간은 24시간으로 설정하였다.

B. subtilis GB-BS-2020 와 *B.licheniformis* GB-F2 균주 또한 OD 및 pH 변화가 24시간 이후부터 변화가 크지 않아 최적 배양시간을 24시간으로 설정하였다.

표 13. 바실러스 균주의 생산용 액상 배지 조성

원료명	Broth의 조성 (%)	200L 기준 합량 (g)
Dextrose	1.5	3,000
Yeast extract	0.4	800
Soy peptone	0.2	400
NaCl	0.1	200
K ₂ HPO ₄	0.1	200
C ₅ H ₈ NNaO ₄ ·H ₂ O	0.5	1,000
MgSO ₄	0.1	200
MnSO ₄	0.01	20

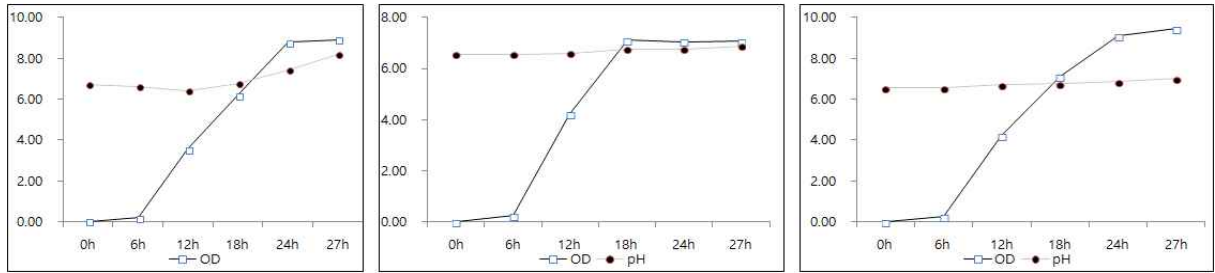


그림 15. 배양시간에 따른 바실러스 속의 OD, pH 변화

(좌: *B. amyloliquefaciens* G10, 중: *B. subtilis* GB-BS-2020 우: *B. licheniformis* GB-F2)

- 고상 발효

Lab scale과 pilot scale 생산조건을 기준으로 대량생산 공정을 확립하였다. 배지는 대두박 60%와 소맥피 40%를 사용하였고 증자 조건은 110℃, 30분으로 설정하였다. 가수량은 배지 중량 대비 40 로 배지 수분량을 고려하여 설정하였다. 종균 접종량은 배지 대비 1%로 하였고, 발효 온도 및 시간은 36℃, 30시간으로 하였다. 발효 후 건조 조건은 60℃, 20시간으로 확립하였다. 발효공정 동안 시간 별로 샘플을 채취하여 균수 및 pH를 측정하여 배양 정도를 확인하였다. 균수는 TSB agar(Tryptic Soy Broth, Difco) 배지에 멸균수를 이용, serial dilution하여 colony 수를 확인하였고, pH는 pH meter(star a211, ORION)를 이용하여 측정 하였다 (그림 16).

3종의 바실러스 균주 모두 30시간 발효 결과, 균수가 가장 높게 나타났고, 건조 후에도 10⁹ CFU/g 이상의 균수가 확인되어 생산성이 높은 것으로 판단된다.

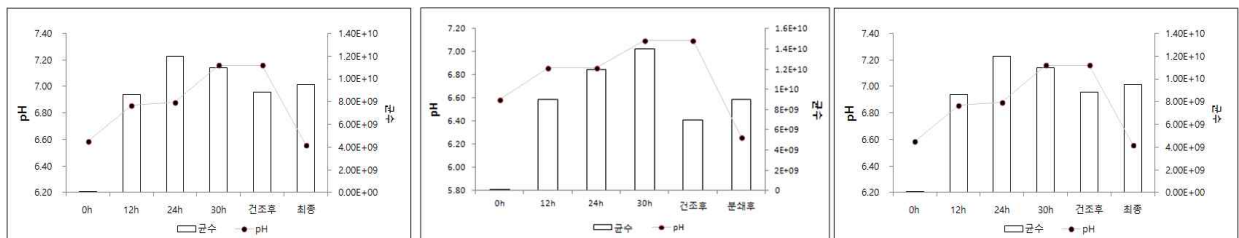


그림 16. 발효시간에 따른 바실러스 속의 균수, pH 변화

(좌: *B. amyloliquefaciens* G10, 중: *B. subtilis* GB-BS-2020 우: *B. licheniformis* GB-F2)

- 혼합 고상 발효

대량 생산 시 생산 비용을 고려하여 *B. amyloliquefaciens* G10와 *B. subtilis* GB-BS-2020 균주는 길항작용이 없는 것을 확인 후 혼합발효를 진행하였다. 배지는 대두박 60% 및 소맥 피 40%로 하였고, 증자조건 및 가수량은 110℃, 30분, 배지 중량 대비 40%로 설정하였다. 종균 접종량은 GB-BS-2020 0.5%, G10 0.5%로 접종하고 발효 시간은 30시간으로 설정하였다. 발효 시간에 따른 균수 및 pH 확인 결과, 30시간 발효 후 균수는 발효 후 G10은 3.0×10^9 CFU/g, GB-BS-2020은 8.0×10^9 CFU/g, 이었고 건조 후 각각 1.9×10^9 CFU/g, 4.5×10^9 CFU/g로 높은 균수를 나타내어 생산성이 높은 것으로 판단된다(그림 17).

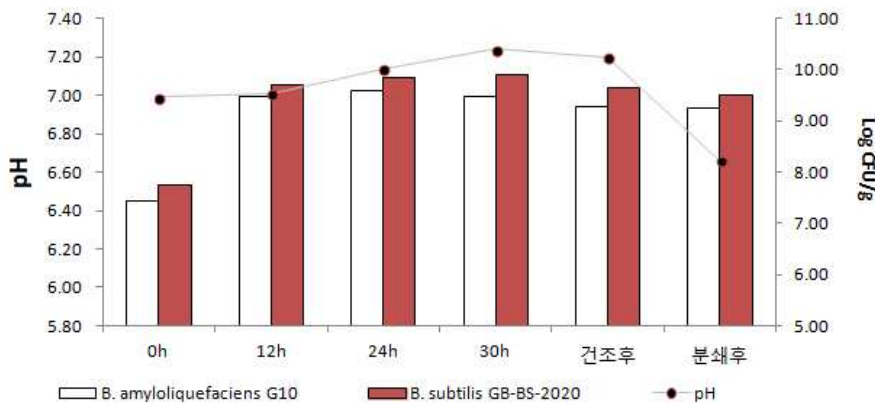


그림 17. 발효시간에 따른 균수, pH 변화

2) 락토바실러스 속

(*L. brevis* M10, *L. reuteri* GB-LC1)

- 종균 액상 배양

L. brevis M10, *L. reuteri* GB-LC1 2종의 균주를 MRS (Lactobacilli MRS broth, Difco) 배지 100mL에 접종 후 35℃, 24시간동안 정치 배양하였다. 배양 완료된 배지의 OD 및 pH를 측정하고, 400mL MRS Broth 배지에 5% 접종하여 2차 배양하여 0.9L MRS broth 배지에 5% 접종하여 scale up 하였다. 상기 배양액을 400L 생산배지에 4.5% 접종하여 50rpm으로 교반 배양하였다 (표 14). pH는 HCl과 NaOH를 이용하여 5.5 를 유지하였다. 배양 결과, *L. brevis* M10의 OD 및 pH는 18시간 이후부터 변화가 크지 않아 성장을 완료한 것으로 판단되며 최적 배양시간은 18 시간으로 설정하였다(그림 18). *L. reuteri* GB-LC1의 OD값은 30시간까지 계속적으로 증가되었으나, pH는 24시간 이후부터 변화가 크지 않았다. 위 결과로 액상 배양 시 최적 배양시간은 30시간으로 확인하였다.

최종 제품화를 위한 균주 간 혼합배양 시 *Bacillus* 속 균주들이 *Lactobacillus brevis* M10 균에 의해 생육이 저해되는 것을 확인하였으며, 최종적으로 복합균주를 포함하는 최적의 경제적인 제품을 생산하기 위해 *Lactobacillus brevis* M10은 단독 배양 후 동결 건조하여

혼합하는 방법으로 설정하였다.

배양액을 동결건조하기 위해 연속 원심분리 후 동결보존제로 10% skim milk 용액을 1:1로 혼합 후 동결건조 하였다. 건조 후 균수를 확인한 결과, 두 종의 균주 모두 건조 전, 후에서 10^9 CFU/g 이상으로 확인되었다.

표 14. 락토바실러스 균주의 생산용 배지 조성

원료명	Broth의 조성 (%)	400L 기준 함량 (g)
Glucose	2.5	10,000
Yeast extract	1.0	4,000
Soy peptone	1.0	4,000
Sodium acetate	0.5	2,000
K ₂ HPO ₄	0.2	800
MgSO ₄	0.01	40
MnSO ₄	0.005	20
Tween 80	0.1	400
C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O·3Na	0.2	800

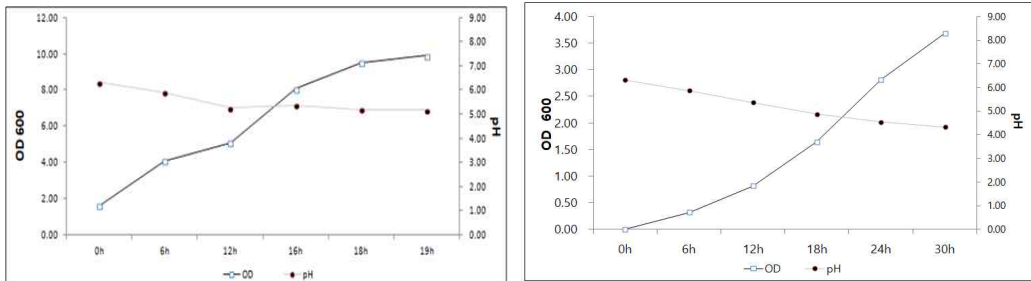


그림 18. 배양시간에 따른 *L. brevis* M10, *L. reuteri* GB-LC1 의 OD, pH 변화

3) 효모

a. *Saccharomyces cerevisiae* GB-LC4

- 종균 액상 배양 (표 15, 그림 19)

S. cerevisiae GB-LC4 균주를 PDB(Potato Dextrose broth, Difco) 액상배지에 접종 후 30℃, 200rpm, 조건으로 24시간동안 배양하였다. 상기 배양액을 scale up 하기 위해 5L PDB 배지에 10 % 접종 후 2차 배양하고, 200L 생산용 배지(표 15)에 접종 후 30℃, 100rpm 조건으로 27시간동안 배양하였다. 배양 중 시간 별 OD 및 pH를 측정하여 배양 정도를 확인하였다 (그림 19).

배양 결과, *S. cerevisiae* GB-LC4 균주의 pH는 24시간 이후 큰 변화가 없었으나, OD는 27시간까지 증가하였다. 위 결과로 대량 생산 시 최적 배양시간은 27시간으로 설정하였다.

표 15. 효모 균주의 생산용 배지 조성

원료명	Broth의 조성 (%)	200L 기준 함량 (g)
Dextrose	3.0	6,000
Yeast extract	1.0	2,000
Dextrin	1.0	2,000
Peptone	0.5	1,000
NaOH	0.366	732

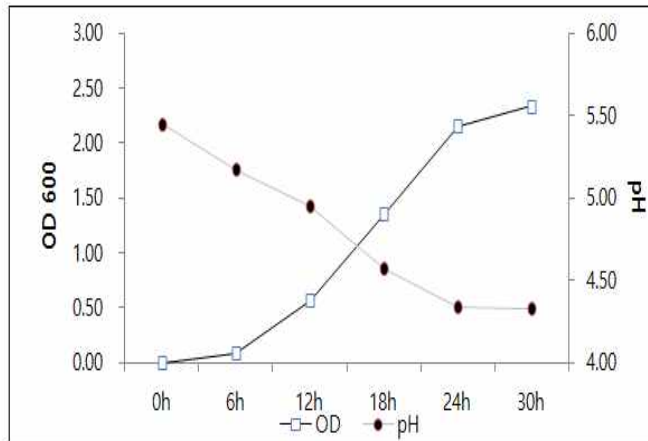


그림 19. 배양시간에 따른 *S. cerevisiae* GB-LC4 의 OD, pH 변화

- 대량 생산

Lab scale과 pilot scale 생산조건을 기준으로 대량생산 공정을 확립하였다. 배지는 대두박 60%와 소맥피 40%를 사용하였고 증자 조건은 110℃, 30분으로 설정하였다. 가수량은 배지 중량 대비 40%로 배지 수분량을 고려하여 설정하였다. 종균 접종량은 배지 대비 2%로 하였고, 발효 온도 및 시간은 30℃, 30시간으로 하였다. 발효 후 건조 조건은 60℃, 20시간으로 확립하였다. 발효과정 동안 시간 별로 샘플을 채취하여 균수 및 pH를 측정하여 배양 정도를 확인하였다. 균수는 PDB agar(Potato Dextrose Broth, Difco) 배지에 멸균수를 이용, serial dilution하여 colony 수를 확인하였고, pH는 pH meter(star a211, ORION)를 이용하여 측정하였다 (그림 20).

30시간 발효 결과, 균수가 가장 높게 나타났고, 건조 후에도 10⁸ CFU/g 이상의 균수가 확인되었다.

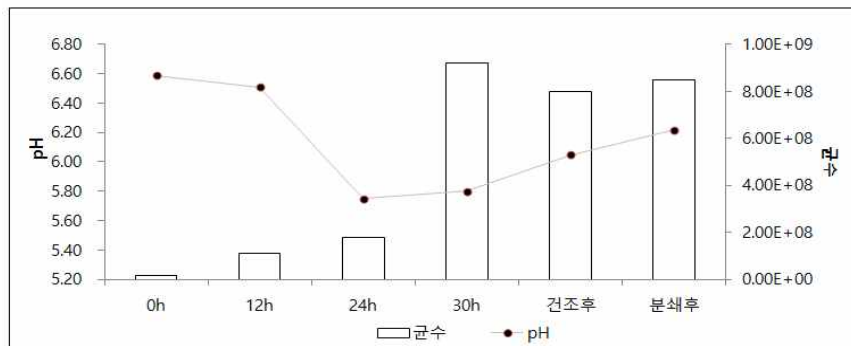


그림 20. 발효시간에 따른 *S. cerevisiae* GB-LC4 의 균수, pH 변화

3. 시제품의 효능 검증

3-1. 선발 균주 첨가된 급여용 기능성 사료 첨가제 (크린바이오프리미엄산) (제2위탁기관)

- 선발 균주가 첨가된 급여용 기능성 사료 첨가제의 급여는 육성돈의 생산성에 유의적 영향을 끼치지 못했다(표 16; $P > 0.1$). 6주간의 사양 성적을 통해 육성돈의 사료 내 첨가제의 추가 급여가 0.3% 수준까지는 성장 및 사료 효율을 변화시키지 않는다는 것을 알 수 있다. 통계적으로 유의적이진 않았지만 TRT4 처리구에서 일당증체량이 616 g/d으로, 첨가제를 첨가하지 않은 처리구(TRT1)에 비해 약 27% 높은 증체량을 보였다.

표 16. The effect of dietary probiotics supplementation on growth performance in growing pigs.

Items	TRT1	TRT2	TRT3	TRT4	SEM ²	P-value
Body weight, kg						
Initial	21.31	21.31	21.30	21.31	0.01	0.9612
Finish	42.24	43.87	42.22	47.73	1.89	0.3685
Overall						
ADG, g	484	526	490	616	56	0.3882
ADFI, g	1081	1101	959	1172	91	0.4761
G:F	0.457	0.478	0.512	0.523	0.036	0.5842

¹Abbreviation: TRT1, Basal diet; TRT2, Basal diet+0.1% 크린바이오프리미엄산;
TRT3, Basal diet+0.2% 크린바이오프리미엄산
TRT4 Basal diet+0.3% 크린바이오프리미엄산

²Standard error of means.

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

- 건물, 질소 및 에너지 소화율은 기능성 사료 첨가제의 추가 급여에 영향을 받지 않음을 확인할 수 있었다(표 17; $P > 0.1$).

표 17. The effect of dietary probiotics supplementation on nutrient digestibility in growing pigs.

Items, %	TRT1	TRT2	TRT3	TRT4	SEM ²	P-value
Week 6						
Dry matter	74.70	74.88	75.17	75.07	0.69	0.9587
Nitrogen	71.02	71.37	74.04	72.26	1.10	0.2406
Digestible energy	73.96	74.08	75.10	74.74	0.69	0.6144

¹Abbreviation: TRT1, Basal diet; TRT2, Basal diet+0.1% 크린바이오프리미엄산;
TRT3, Basal diet+0.2% 크린바이오프리미엄산
TRT4 Basal diet+0.3% 크린바이오프리미엄산

²Standard error of means.

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

- 생산성과 소화율 결과와 동일하게, 기능성 사료 첨가제의 추가 급여는 분변 내 유해가스의 농도에도 유의적인 영향을 끼치지 않았다(표 18; $P > 0.1$). 결과적으로 기능성 사료 첨가제의 급여만으로는 육성돈의 생산성, 소화율 및 유해가스 발생량에 유의적인 변화를 줄 수 없었다.
- 대학 실험 농장의 경우, 일반 돼지 농장 대비 낮은 악취 농도로 관리되고 있어서 사양 실험에서는 유의적인 차이를 확인하기 어려웠다. 개발 제품의 효과가 극대화되기 위해서는 상대적으로 청결한 실험 환경보다는 환경적으로 불량한 요소들을 포함한 일반적인 대규모 농장에서 다양한 검증을 진행할 필요가 있다.

표 18. The effect of dietary probiotics supplementation on gas emission in growing pigs.

Items, ppm	TRT1	TRT2	TRT3	TRT4	SEM ²	P-value
Finish						
Methyl mercaptans	5.38	5.38	5.88	5.75	0.21	0.7082
NH ₃	2.50	2.25	2.50	2.25	0.58	0.7401
H ₂ S	5.28	5.08	5.33	5.63	0.24	0.9374
Acetic acid	7.25	7.13	7.13	6.75	1.01	0.9113
CO ₂	16125	15150	15025	16450	438	0.7227

¹Abbreviation: TRT1, Basal diet; TRT2, Basal diet+0.1% 크린바이오프리미엄산;
 TRT3, Basal diet+0.2% 크린바이오프리미엄산
 TRT4 Basal diet+0.3% 크린바이오프리미엄산

²Standard error of means.

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

3-2. 선발 균주 첨가된 분무용 악취저감제 (클린케어)

1) 클린케어 단독 (제2위탁기관)

- 선발 균주가 첨가된 분무용 제품을 돈사 내부에 살포했을 때 NH₃의 상대적 농도는 최대 75%p 이상 감소하였고, 메틸메캅탄의 경우 최소 40%p, 최대 60%p 감소하여 유의적인 감소 효과를 확인할 수 있었다(그림 21). 결과적으로 분무용 제품의 살포가 악취 물질(NH₃ 및 메틸메캅탄)의 농도를 약 40~70% 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 사용자의 관능 평가 결과, 분무용 제품 사용 시 악취 저감의 효과를 직관적으로 인지할 수 있고, 특유의 향이 좋다는 의견을 확인할 수 있었다.

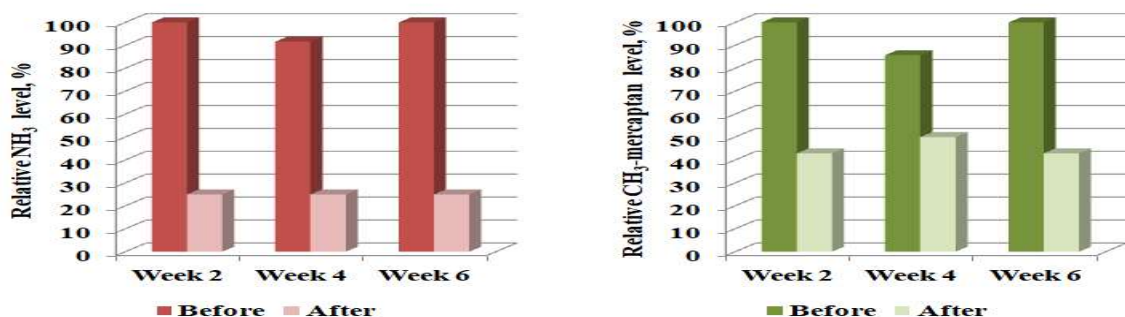


그림 21. 분무용 제품 분무 시 악취 유발 물질의 상대적 농도 변화
 (좌) 암모니아 (우) 메틸메캅탄

2) 크린바이오프리미엄산, 클린케어 혼합 적용 (제2위탁기관)

- 급여용 첨가제 및 분무용 제품을 혼합 사용시, 급여용 첨가제 추가 급이 돈사에 클린케어 제품으로 소독했을 때(TRT4) 메틸메캡탄 농도가, 첨가제 비급이 돈사의 소독전(TRT1)의 농도에 비해 유의적으로 낮게 나타나 최대 2.5 ppm 감소시켰다($P < 0.1$). 또한 클린케어 및 버콘-S로 소독한 경우 NH_3 농도를 유의적으로 감소시킴을 확인할 수 있었다($P < 0.05$). 이를 통해 급여용 첨가제 및 분무용 제품을 혼합하여 처리하는 경우 메틸메캡탄 및 NH_3 를 감소시켜, 악취 저감 효과를 보임을 확인하였다(표 19).

표 19. The effect of dietary probiotics supplementation on gas emission in growing pigs.

Items, ppm	TRT1	TRT2	TRT3	TRT4	SEM ²	P-value
Week 2						
Methyl mercaptans	4.00 ^a	2.00 ^{ab}	3.50 ^{ab}	1.50 ^b	0.62	0.0573
NH_3	4.75 ^a	0.50 ^b	3.00 ^a	0.75 ^b	0.58	0.0016
H_2S	1.33	1.10	1.58	1.10	0.26	0.5326
Acetic acid	5.00	5.00	5.25	5.00	0.54	0.9828
CO_2	3075	2725	3150	2750	260	0.5716
Week 4						
Methyl mercaptans	4.00 ^a	2.00 ^b	3.00 ^{ab}	1.75 ^b	0.57	0.0720
NH_3	3.25 ^a	0.75 ^b	2.75 ^{ab}	0.75 ^b	0.67	0.0510
H_2S	1.38	1.05	1.68	1.15	0.29	0.4830
Acetic acid	5.75	5.25	5.25	4.50	0.78	0.7343
CO_2	2950	2675	2850	2500	273	0.6734
Week 6						
Methyl mercaptans	4.25 ^a	2.50 ^b	3.50 ^{ab}	2.25 ^b	0.48	0.0544
NH_3	4.50 ^a	1.00 ^b	3.00 ^a	0.75 ^b	0.55	0.0029
H_2S	1.80	1.13	1.43	1.28	0.26	0.3630
Acetic acid	4.50	4.75	5.00	5.00	0.43	0.8148
CO_2	2650	3025	2350	2500	213	0.2071

Abbreviation: TRT1, 크린바이오프리미엄산 비첨가 돈사 기존 소독제 소독 전;
 TRT2, 크린바이오프리미엄산 비첨가 돈사 버콘-S 소독제 소독 후;
 TRT3, 크린바이오프리미엄산 첨가 돈사 클린케어 소독제 소독 전;
 TRT4, 크린바이오프리미엄산 첨가 돈사 클린케어 소독제 소독 후.

²Standard error of means.

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

3) 농가 현장 적용

A 농가 (이천 지역)

- 2주간 진행된 농가 실험에서, 분무용 악취저감제를 첨가하여 고압분무를 7일 간격으로 소독 시, 분무 전에 비해 돈사 내 악취유발물질인 암모니아 및 아민류의 상대적 농도를 지속적으로 저감시켜 약 40~70% 수준으로 낮추는 것을 확인하였다 (그림 22).

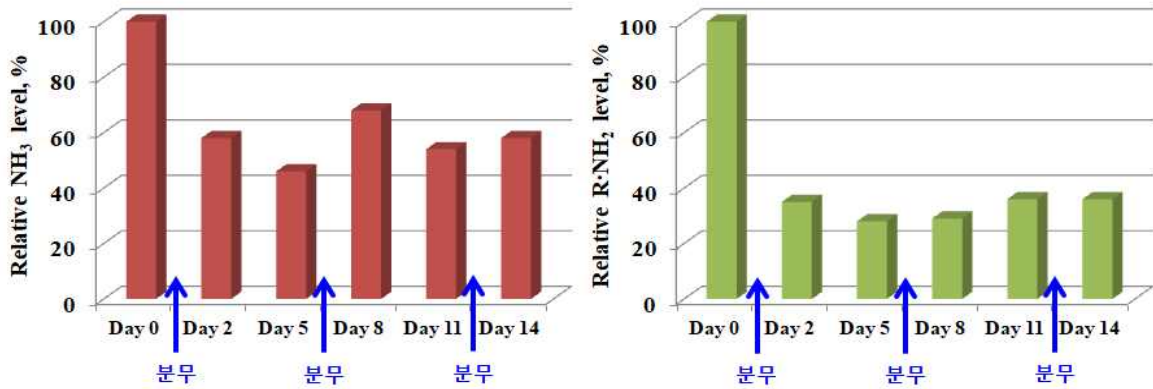


그림 22. 2주간의 분무용 약취저감제 소독 전후 약취유발물질의 상대적 농도 변화
(좌) 암모니아 (우) 아민류

B 농가 (이천지역)

- 3주간 진행된 농가 실험에서, 분무용 약취저감제를 첨가하여 고압분무를 7일 간격으로 소독 시, 분무 전에 비해 돈사 내 약취유발물질인 암모니아 및 아민류의 상대적 농도를 지속적으로 저감시켜 약 30~50% 수준으로 낮추는 것을 확인하였다 (그림 23).

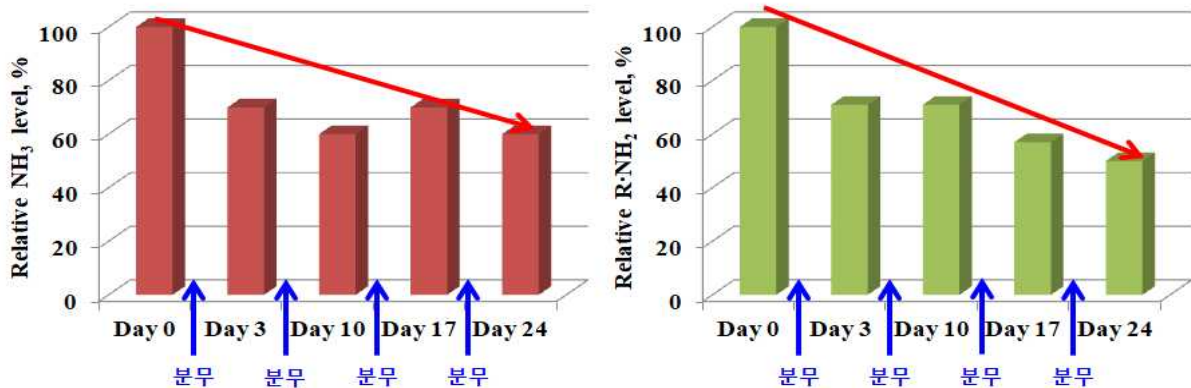


그림 23. 3주간의 분무용 약취저감제 소독 전후 약취유발물질의 상대적 농도 변화
(좌) 암모니아 (우) 아민류

- 대학과 농가에서 진행된 사양실험으로 분무용 약취저감제의 효능을 검증하였고 분무용 약취저감제의 경우 실제 사용한 사용자들로부터 약취가 줄어들음을 느꼈고 이로 인해 눈 아픔이 줄어들는 등의 효과를 확인 할 수 있었다.

3-3. 퇴액비 부숙 촉진제 (그린케어)

a. 돈분 슬러리 액비부숙실험

- 액비 부숙 촉진용 약취저감제를 개발하기 위해 유용 균주들을 조합한 후보 제품을 타사 제품과의 부숙 효과를 비교하였다. 돈분 및 슬러리 혼합물에 후보 제품을 첨가한 후 주기마다 폭기하여 16주간 부숙 실험을 진행하였다(그림 24).

- 후보 배합비별 후보 제품들의 대장균 균수 및 질소 함량 (T-N) 저감 효과를 확인하였다 (그림 25).
- 실험을 통해 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *S. cerevisiae* 3종의 균주 조합이 효능이 가장 우수해 이로 구성된 배합비를 활용하여 액비 부숙 촉진용 약취저감제를 개발했다.



그림 24. 돈분 슬러리 액비 부숙 실험

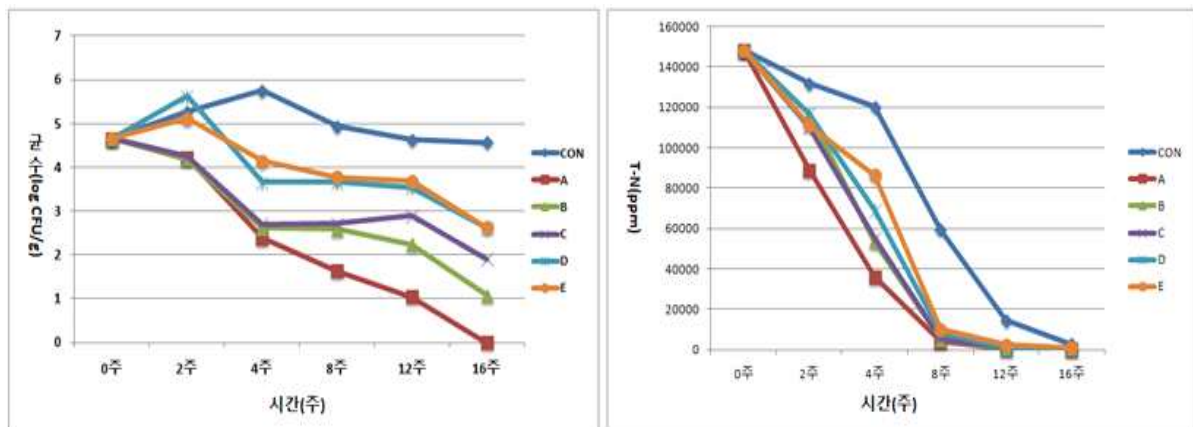


그림 25. 16주 경과시 돈분 슬러리의 처리구별 대장균 균수 및 총 질소 함량 (T-N) 변화
 (좌) 대장균 균수 (우) 총 질소 함량 (T-N)
 (A: 선정 배합비 B: 후보 배합비 #1; C: 후보 배합비 #2; D: 타사 제품 #1; E: 타사 제품 #2)

b. 축분 퇴비 부숙 실험

- 후보로 개발된 부숙 촉진용 약취저감제의 축분 퇴비 부숙 효과를 확인하기 위해 후보 제품을 타사 제품과의 부숙 효과를 비교하였다. 축분 혼합물에 후보 제품을 첨가한 후 (처리구당 약 10kg (축분 8.5kg 및 톱밥 1.5kg) 주기마다 혼합하여 12주간 부숙 실험을 진행하였다(그림 26).
- 후보 배합비별 후보 제품들의 대장균 균수 및 질소 함량 (T-N) 저감 효과를 확인하였다(그림 27).



그림 26. 축분 퇴비 부숙 실험

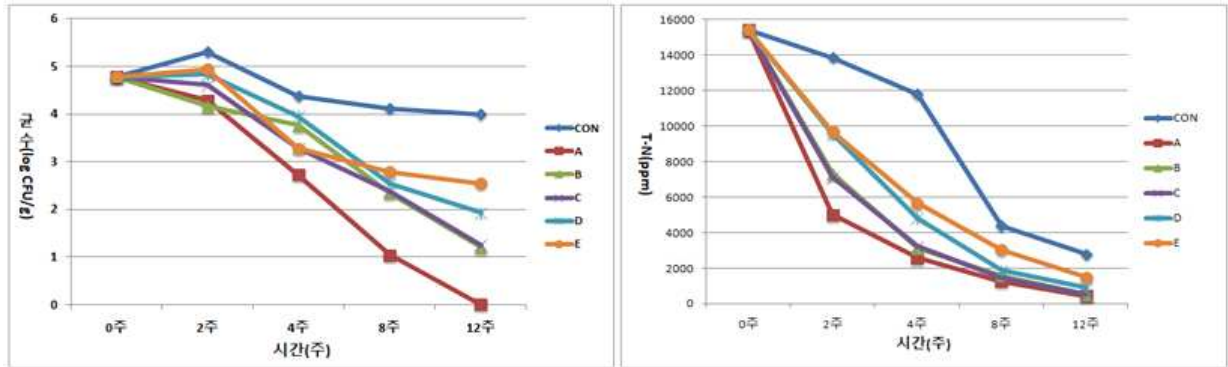


그림 27. 16주 경과시 축분의 처리구별 대장균 균수 및 총 질소 함량 (T-N) 변화

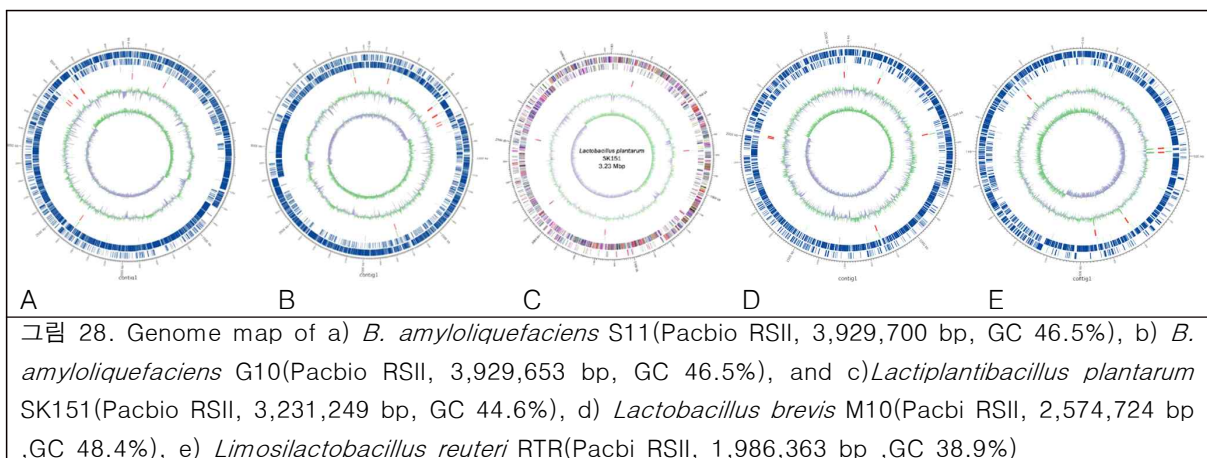
(좌) 대장균 균수 (우) 총 질소 함량 (T-N)

(A: 선정 배합비 B: 후보 배합비 #1; C: 후보 배합비 #2; D: 타사 제품 #1; E: 타사 제품 #2)

4. 유용미생물의 유전체 분석 및 유용 미생물 급여에 따른 미생물 군집 분석 (제1위탁기관_강대경)

4-1. 유용 미생물의 유전체 정보 확보 및 유전자 해독

- 위탁기관의 보유균주 및 주관기관에서 선발한 후보균주 중에서 probiotic 특성이 우수한 5종 (*Bacillus amyloliquefaciens* S11, *Bacillus amyloliquefaciens* G10, *Lactiplantibacillus plantarum* SK151, *Lactobacillus brevis* M10, *Limosilactobacillus reuteri* RTR)의 genomic DNA를 추출하여 유전체 서열을 확보한 후에 분석하였다 (그림 28).



4-2. 유용미생물의 유전체로부터 기능성 유전자의 발굴

- *Lactiplantibacillus plantarum* SK151균주의 유전체를 분석한 결과, 장관세포 흡착관련 유전자인 fibronectin/fibrinogen binding protein, LPXTG domain을 비롯하여 박테리옌 유전자, 스트레스 반응 단백질, Vitamin B2 생합성 유전자군 등 다양한 기능성 단백질을 코딩하는 유전자들을 발굴하였다.
- 예비실험을 통하여 황과 암모니아 저감효과가 있었던 *Bacillus amyloliquefaciens* S11 및 G10 유전체에서 약취 저감과 관련된 유전자를 다수 발굴하였다(표 20). 암모니아 저감과 관련해서는, *B. subtilis*가 질소원으로 주로 사용하는 glutamine이 부족할 경우에는 암모니아를 질소원으로 사용하는데, *nrgA*가 암호화하는 ammonium transporter는 암모니아 흡수과정에서 중요한 유전자로 알려져 있다(Christian detsch et al., 2003).
- 한편, sulfurtransferase, iron-sulfur cluster carrier protein, sulfite reductase, cysteine desulfurase, sulfate permease 등 다수의 황 화합물 분해와 관련된 단백질을 코딩하는 유전자가 발굴되었으며, 각 유전자의 기능을 밝히기 위해서는 전사체 및 대사체 분석과 같은 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

표 20. List of sulfur-ammonia related gene in *B. amyloliquefaciens* S11, G10 using BLASTn and BLASTp search

Gene name	Product	Locus tag
Ammonia - related genes		
<i>sugE</i>	Quaternary ammonium compound-resistance protein	S11-1_1_00023, S11-1_1_00024, G10-1_1_00152, G10-1_1_00153
<i>aspA</i>	Aspartate ammonia-lyase	S11-1_1_01611, G10-1_02429
<i>nrgA</i>	Ammonium transporter	S11-1_1_-2838, G10-1_1_01197
<i>hutH</i>	Histidine ammonia-lyase	S11-1_1_03111, G10-1_1_00924
Sulfur - related genes		
<i>tusA</i>	Sulfurtransferase	S11-1_1_03815, S11-1_1_03817, G10-1_1_00218, G10-1_1_00220
<i>moeZ</i>	putative adenylytransferase / sulfurtransferase	S11-1_1_01729, S11-1_1_03814, G10-1_1_00221, G10-1_1_02311
<i>csd</i>	putative cysteine desulfurase	S11-1_1_03576, G10-1_1_00458
<i>glpE</i>	Thiosulfate sulfurtransferase	S11-1_1_03554, G10-1_1_00480
<i>salA</i>	Iron-sulfur cluster carrier protein	S11-1_1_00526, S11-1_1_03464, G10-1_1_00571, G10-1_1_03514
<i>dmsA</i>	Dimethyl sulfoxide reductase	S11-1_1_01315, S11-1_1_03267, G10-1_1_00768, G10-1_1_02725
<i>fdhD</i>	Sulfurtransferase	S11-1_1_02859, G10-1_1_01176
<i>bdbD</i>	Disulfide bond formation protein D	S11-1_1_02525, G10-1_1_01512
<i>bdbC</i>	Disulfide bond formation protein C	S11-1_1_02520, G10-1_1_01513
<i>cysJ</i>	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein alpha-component	S11-1_1_02520, G10-1_1_01517
<i>cysI</i>	Sulfite reductase [NADPH] hemoprotein alpha-component	S11-1_1_02519, G10-1_1_01518
<i>SGL</i>	6-deoxy-6-sulfogluconolactonase	S11-1_1_02492, G10-1_1_01545
<i>sufS</i>	Cysteine desulfurase	S11-1_1_02437, G10-1_1_01600
<i>sufU</i>	Zinc-dependent sulfurtransferase	S11-1_1_02436, G10-1_1_01601

<i>erpA</i>	Iron-sulfur cluster insertion protein	S11-1_1_02384, G10-1_1_01653
<i>msrP</i>	Protein-methionine-sulfoxide reductase catalytic subunit	S11-1_1_02365, G10-1_1_01672
<i>yuaD</i>	Putative metal-sulfur cluster biosynthesis protein	S11-1_1_02267, G10-1_1_01770
<i>ssuC</i>	Putative aliphatic sulfonates transport permease protein	S11-1_1_00321, S11-1_1_02217 G10-1_1_01820, G10-1_1_03719
<i>ssuB</i>	Aliphatic sulfonates import ATP-binding protein	S11-1_1_00319, S11-1_1_02216 G10-1_1_01821, G10-1_1_03721
<i>glpE</i>	Thiosulfate sulfurtransferase	S11-1_1_02184, G10-1_1_01854
<i>msrC</i>	Free methionine-R-sulfoxide reductase	S11-1_1_02120, G10-1_1_01918
<i>IscS</i>	Cystein desulfurase	S11-1_1_01920, S11-1_1_02115 G10-1_1_01923, G10-1_1_02118
<i>thiI</i>	putative tRNA sulfurtransferase	S11-1_1_02114, G10-1_1_01924
<i>frdB</i>	Fumarate reductase iron-sulfur submit	S11-1_1_02010, G10-1_1_02028
<i>nifS</i>	Putative cysteine desulfurase	S11-1_1_01953, G10-1_1_02085
<i>resA</i>	Thiol-disulfide oxidoreductase	S11-1_1_01227, S11-1_1_01570 G10-1_1_02470, G10-1_1_02813
<i>petC</i>	Sytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	S11-1_1_01513, G10-1_1_02527
<i>msrA</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase	S11-1_1_01425, G10-1_1_02615
<i>msrB</i>	Peptide methionine sulfoxide reductase	S11-1_1_01424, G10-1_1_02616
<i>cysC</i>	putative adenylyl-sulfate kinase	S11-1_1_00985, G10-1_1_03055
<i>sat</i>	Sulfate adenylyltransferase	S11-1_1_00984, G10-1_1_03056
<i>cysP</i>	Sulfate permease	S11-1_1_00983, G10-1_1_03057
<i>cysH</i>	P h o s p h o a d e n o s i n e phosphosulfate reductase	S11-1_1_00982, G10-1_1_03058
<i>moaD</i>	Molybdopterin synthase sulfur carrier subunit	S11-1_1_00853, G10-1_1_03187
<i>thiS</i>	Sulfur carrier protein / adenylyltransferase	S11-1_1_00580, S11-1_1_00582, S11-1_1_00849, G10-1_1_03191, G10-1_1_03458, G10-1_1_03460
<i>ykuV</i>	Thiol-disulfide oxidoreductase Sporulation	S11-1_1_00845, G10-1_1_03195
<i>stoA</i>	thiol-disulfide oxidoreductase A	S11-1_1_00807, G10-1_1_03233
<i>ssuD</i>	Alkanesulfonate monooxygenase	S11-1_1_00322, G10-1_1_03718
<i>ssuA</i>	Putative aliphatic sulfonates-binding protein	S11-1_1_00320, G10-1_1_03720

4-3. 선발된 균주를 함유된 크린바이오프리미엄산(Synbiotics)를 급여한 육성돈의 장내균총 및 대사체 분석

a. Metagenomic DNA 분리 및 분석 적합도 확인

- 선발균주를 급여한 육성돈의 분변 샘플로부터 metagenomic DNA(mDNA)를 분리하여 agarose gel 전기영동을 실시함으로써 mDNA의 quality를 확인하였다. UV spectrophotometer를 이용하여 DNA의 농도/순도를 측정하였으며, DNA 농도가 20ng/ul 이상, 순도가 A280/260=1.8 이상 되는 것을 확인한 후에 NGS 분석에 사용하였다(그림 29).

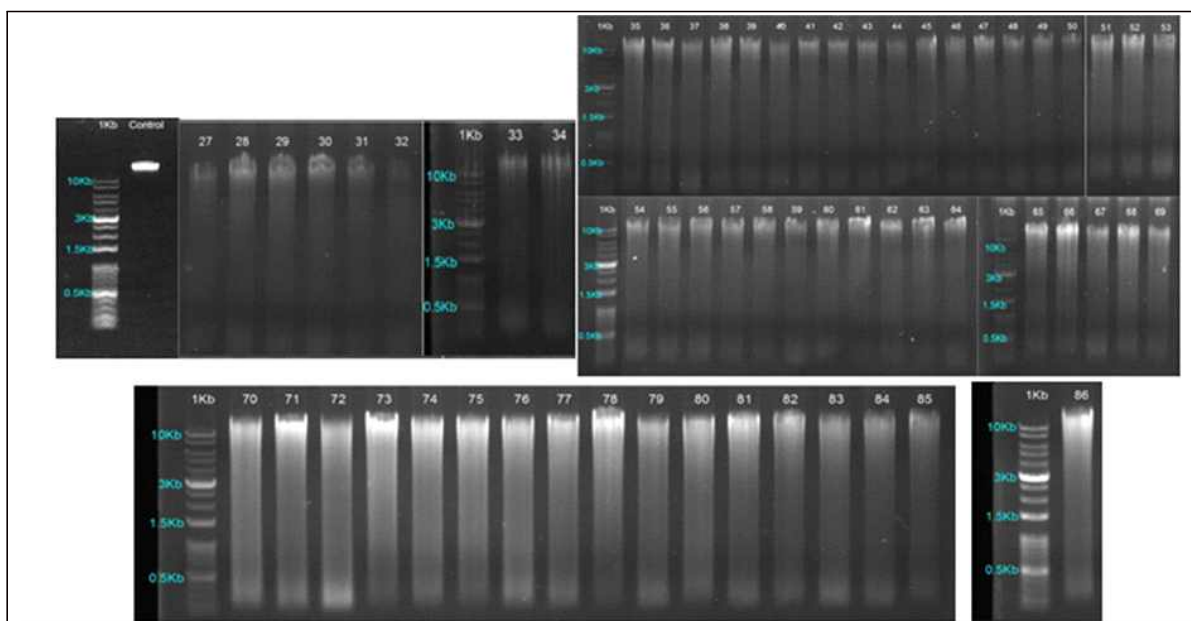


그림 29. Gel electrophoresis of genomic DNA extracted from sample. 1% agarose gel (1X TAE buffer), 100V 25min, sample 1ul loading.

b. 육성돈 분변 시료에서 분리한 DNA 시퀀싱 데이터 quality

- 그룹별로 Control (대조구, n=16), synbiotics 0.1%(w/w) 급여군 (SYN_0.1, n=14), synbiotics 0.3%(w/w) 급여군 (SYN_0.3, n=16) 등 총 46마리 육성돈의 분변을 확보한 후에 균총을 분석하였다. 분석에 사용된 시퀀싱 데이터는, 총 14,886,680의 리드(read) 수를 확보하였으며, 그룹별 평균 리드 수는 표 21에서 보는 바와 같다.
- 먼저, 미생물 군집의 다양성 지수를 비교하기 위하여 α -diversity를 분석하였다. 이는 확보한 데이터가 대조구 및 각 처리구의 균총을 대표할 수 있는지를 확인하는 방법으로서, 그래프의 완만한(plateau) 정도를 나타내는 rarefaction curve와 Good's coverage(90 이상)를 사용하였다. Rarefaction curve는 97% 상동성을 기준으로 결정된 Chao1과 observed OTU를 사용하여 나타낸 결과, 시퀀스 리드수가 증가할수록 그래프가 완만해지는 것을 볼 수 있었다(그림 30). 더불어, 그룹의 평균 Good coverage

value는 99.78%였다. 결과적으로, 실험을 통해 얻은 시퀀스를 이용하여 각 실험구의 미생물 군집을 충분히 대변할 수 있음을 확인하였다. (표 21).

표 21. Microbial diversity indices using sequencing results of pig fecal samples fed with probiotics.

Items	Control (n=16)	SYN_0.1 (n=14)	SYN_0.3 (n=16)	P-value ^a
Observed OTU's	896.88±129.45	982.00±106.66	896.75±133.62	0.21
Chao1	945.73±140.15	1048.73±104.46	956.85±135.81	0.36
ACE	994.43±133.71	1102.69±106.52	1006.81±139.87	0.36
Shannon	3.72±0.42	3.60±0.39	3.41±0.35	0.03
Simpson	0.12±0.06	0.14±0.05	0.18±0.07	0.003
Good's coverage	99.79±0.03	99.75±0.03	99.78±0.03	0.36
Valid reads	118683±17935	124609±23618	137326±31586	

The values were expressed as mean values ± standard deviation (SD).

P values were obtained using Wilcoxon rank-sum test, against control, P<0.05.

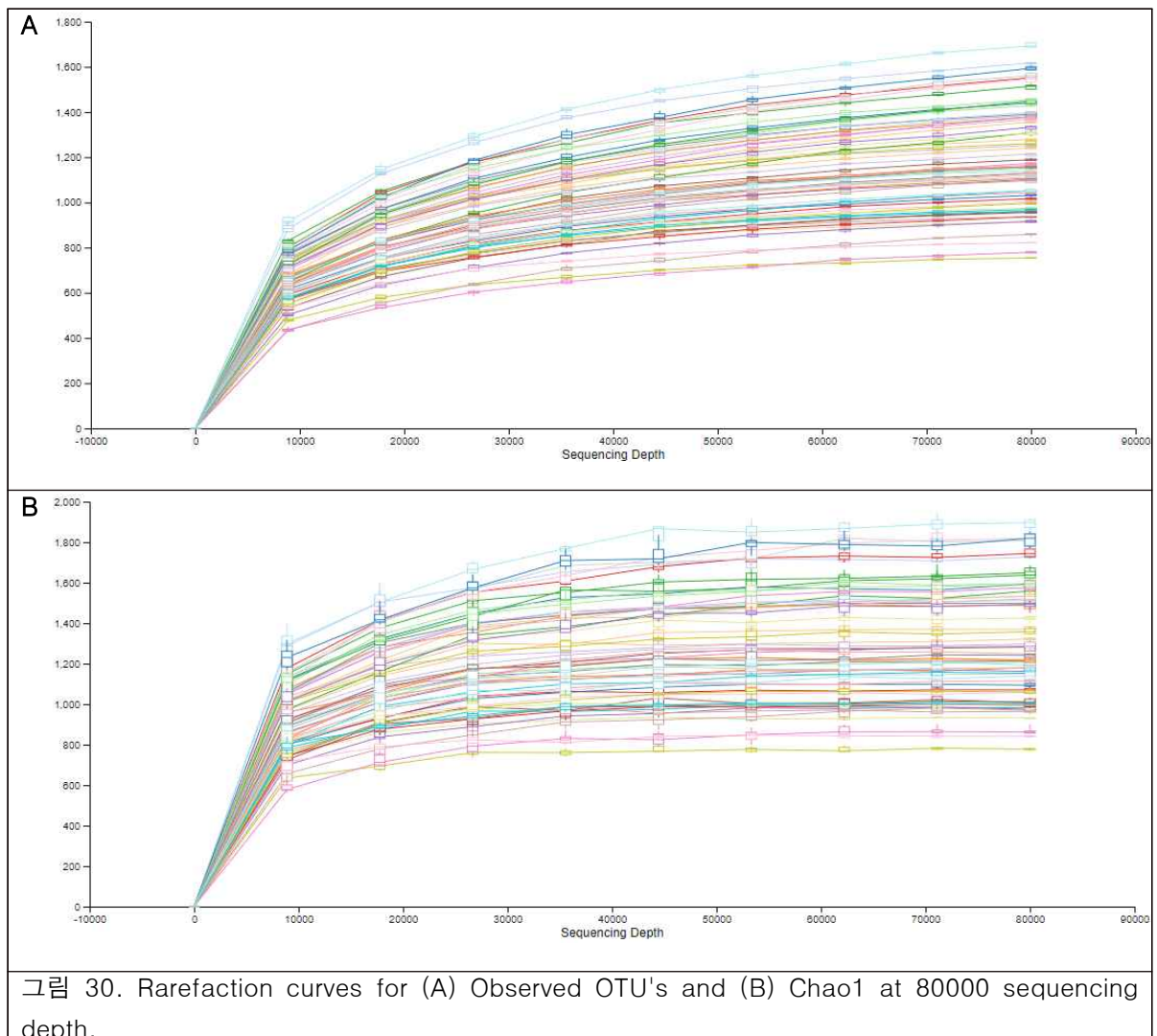


그림 30. Rarefaction curves for (A) Observed OTU's and (B) Chao1 at 80000 sequencing depth.

c. 미생물의 다양성지수 분석 결과

- 종 풍부도(species abundance)를 나타내는 abundance coverage estimate(ACE)와 Chao1 지수 및 종 다양성(species diversity)을 나타내는 지수인 Shannon과 Simpson 지수를 분석한 결과(그림 31), 대조구에 비해 SYN_0.1 처리구에서 유의적으로 높은 Chao1 및 ACE 지수를 나타내었다($P < 0.05$). 이는 synbiotics 0.1%를 급여했을 때, 육성돈의 장내균총이 더 높은 다양성을 나타낸다는 것을 의미한다. 한편, SYN_0.3 처리구는 대조구와 비교하여 낮은 Shannon 지수 및 높은 Simpson 지수를 나타내었다($P < 0.05$). 이를 통해 Synbiotics 급여가 균총의 다양성에 영향을 줄 뿐만 아니라 특정 그룹의 세균이 우점하는 형태일 수도 있다는 점을 확인하였고, Synbiotics 함량이 장내 균총에 중요하게 작용함을 확인하였다.

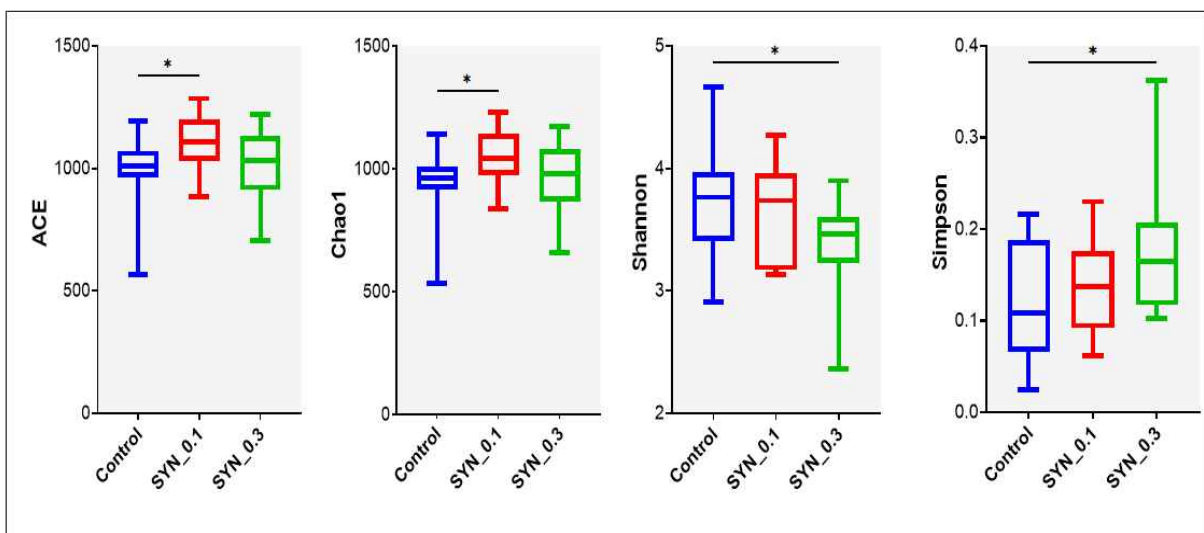


그림 31. Comparison of microbial richness (ACE, Chao1) and diversity (Shannon, Simpson) indices between groups.

d. 그룹간 균총 비교분석: taxon-independent analysis

- 각 그룹간의 미생물 조성이 얼마나 차이 나는 지를 비교하기 위해, principal coordinates analysis(PCoA) 분석을 실시하였다. 그림 32에서 보는 바와 같이, SYN_0.3 처리구는 다른 그룹들과 유의적으로 다른 균총 조성을 보여주었다($P = 0.039$). 이는 synbiotics 0.3% 급여가 육성돈의 장내균총을 변화시키는데 충분한 양임을 확인하였다.

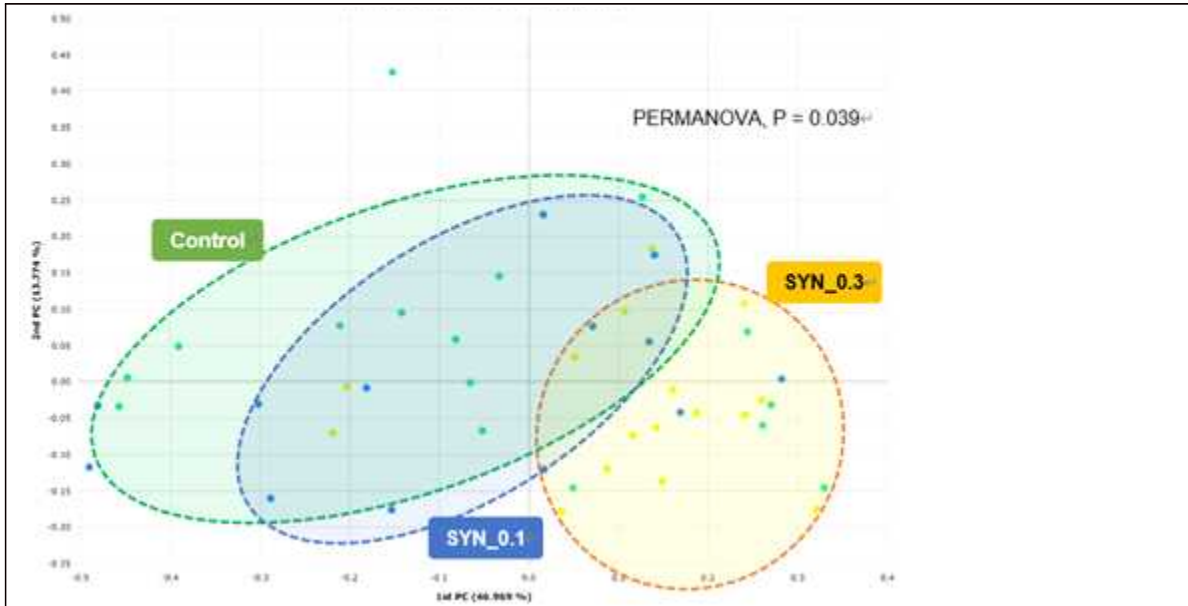


그림 32. Principal coordinate analysis (PCoA) plot based on Bray-Curtis matrix at species level showing distinct clustering group of SYN_0.3 from other treatments.

e. 그룹간의 장내균총 비교분석: taxon-dependent analysis

- 문(phylum) 수준에서 장내균총을 비교한 결과는 그림 33, A에서 보는 바와 같다. *Firmicutes*의 분포도는 SYN_0.3 처리구가 다른 실험구와 비교해서 높았으나 유의적인 차이는 없었으며, *Bacteroidetes* 문은 16.3%로 감소하였다. SYN_0.3 처리구에서의 *Firmicutes/Bacteroidetes*(F/B) 비율은 다른 실험구에 비해서 높게 나타났으나, 유의적인 차이는 없었다(그림 33, B). Ley 등(PNA, 2005)등이 F/B 비율 증가가 체중 증가와 관련이 있다고 보고한 바 있으나, 본 연구에서는 synbiotics 급여와 체중의 관계성을 확인할 수 없었다. 이를 통해 synbiotics 적용 뿐만 아니라 프로바이오틱 균주 종류, 사료급여 시간, 사양환경의 차이 등과 같은 여러 요인에 의해 영향을 받을 수 있음을 확인하였다(Lahtainen et al., 2015, Livest Sci; Jaworski et al., 2017, J Anim Sci). 한편, *Actinobacteria* 문은 처리구 SYN_0.1 및 SYN_0.3 모두에서 약간 감소하였으며, *Proteobacteria* 문은 SYN_0.1 처리구에서 약간 증가했다(1.08%).

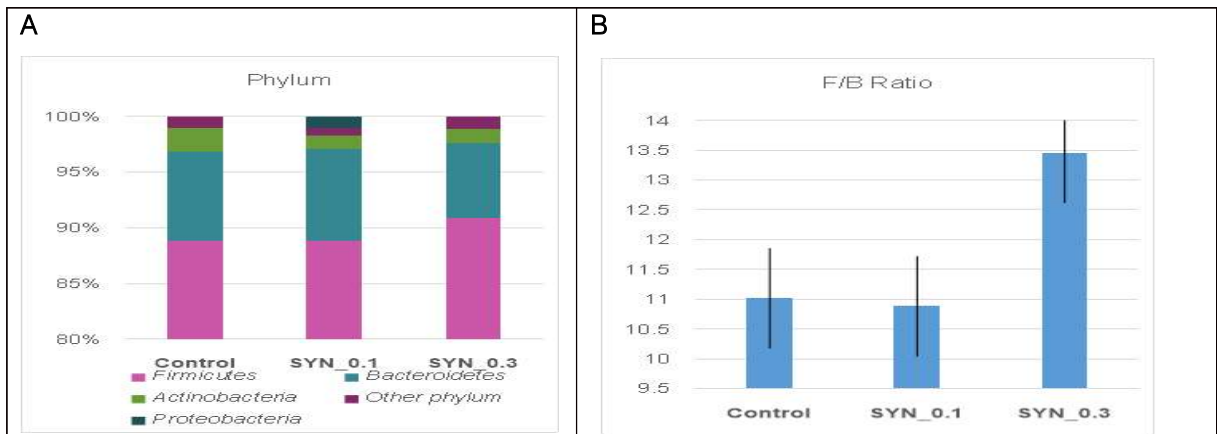


그림 33. Relative abundance at phylum level (A; cut-off: <1%) and the *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) ratio (B).

- 과(family) 수준에서 분석한 결과는 그림 34에서 보는 바와 같다. *Lactobacillaceae*의 상대적 풍부도(relative abundance)는 처리구 SYN_0.3에서 유의성 있게 증가하였다 (44.69%, $P=0.014$). 한편, *Peptostreptococcaceae*, *Muribaculaceae* 및 *Streptococcaceae*과는 처리구 SYN_0.3%에서 그 풍부도가 감소하였다. 또한, *Lachnospiraceae*는 처리구 SYN_0.1에서 감소하였으며, *Christensenellaceae*와 *Coriobacteriaceae* 과는 synbiotics를 급여한 모든 처리구에서 감소했다.

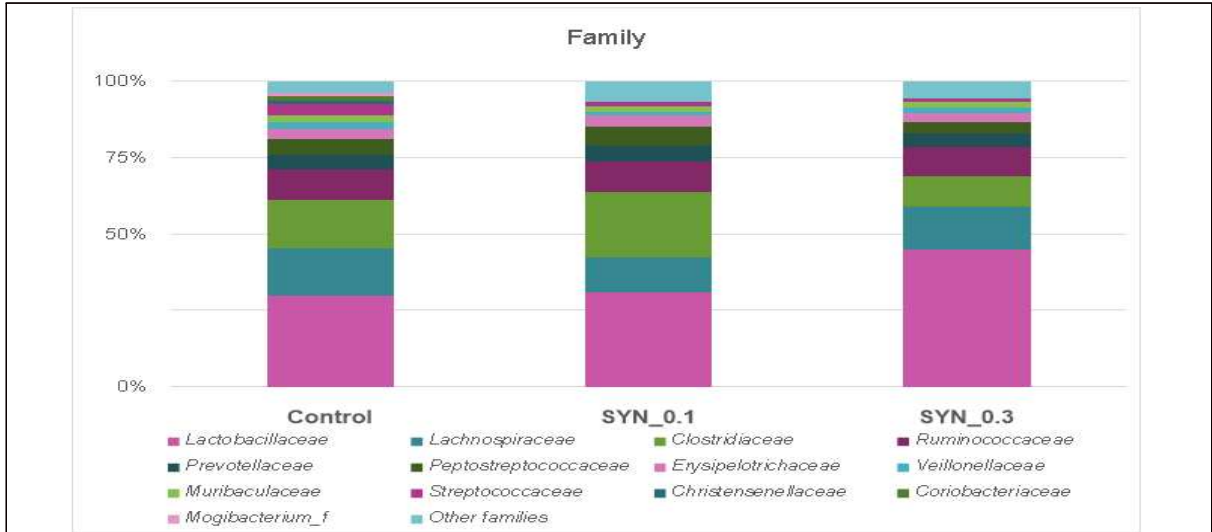


그림 34. Relative abundance at family (A) and genus (B) level (cut-off: <1%).

- 속(genus) 수준에서 분석한 결과는 그림 35에서 보는 바와 같다. *Lactobacillus* 속과 *Clostridium* 속이 모든 그룹에서 주요 속으로 나타났다. *Lactobacillus* 속의 상대적인 풍부도는 SYN_0.3 처리구가 다른 그룹에 비해 유의적으로 높게 나타났으며(44.67%, $P=0.01$), SYN_0.3 처리구에서 우점하는 속 중에 하나임을 나타내었다. *Streptococcus* 와 *Eubacterium_g23* 속은 SYN_0.3% 처리구에서 감소하였으며, *Clostridium*과 *Romboutsia*는 SYN_0.1 처리구에서 높게 나타났다.

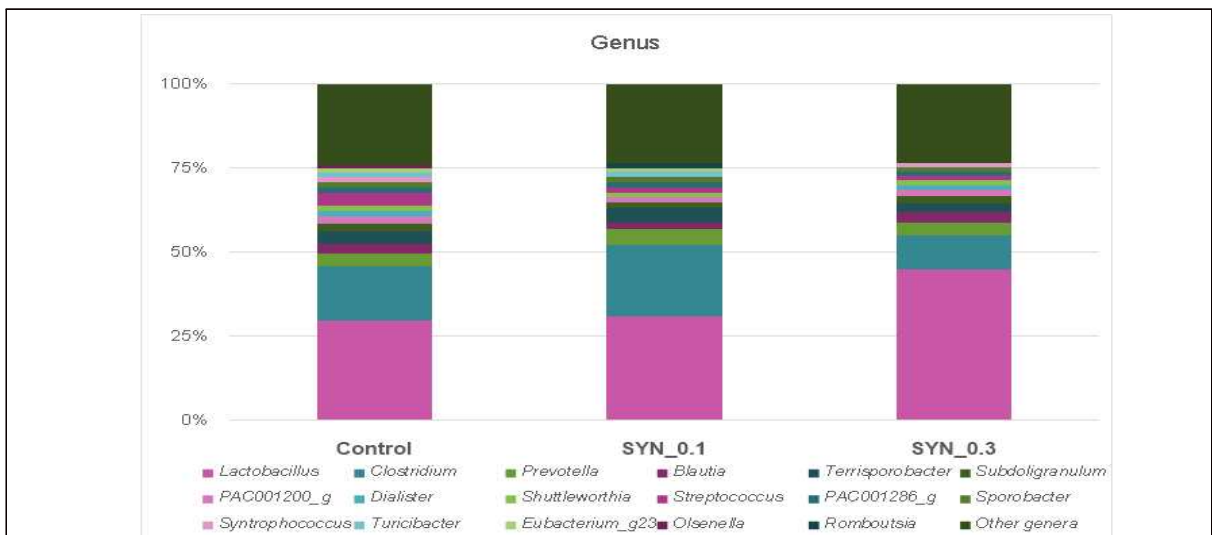


그림 35. Relative abundance at family (A) and genus (B) level (cut-off: <1%).

- 종(Species) 수준에서 분석한 결과는 그림 36에서 보는 바와 같다. 대조구에 비해 synbiotics 급여구에서 *L. heveticus*, *L. pontis*, *Enterococcus faecium*, *Lachnospiraceae* AM500849, *Ruminococcaceae* PAC001052 및 *Lachnospira pectinoschiza*와 같은 유익균의 풍부도가 유의적으로 높게 나타났다. *L. helveticus*, *L. pontis* 및 *E. faecium*은 Probiotic 균주에 속하는 것으로 알려져 있으며, *Lachnospiraceae*와 *Ruminococcaceae*에 속하는 균들은 섬유질을 분해하는 미생물로서 장에서의 SCFA 생산에 기여하는 것으로 알려져 있다. 특히, *L. pectinoschiza*는 돼지의 장에서 펙틴을 분해하는 미생물로 알려져 있다(Cornick et al., 1994, Int J Sys Evol Microbiol). 한편, *Oscillibacter spp.*, *Bacteroides* LT670820 및 *Eubacterium* LT907848은 모든 synbiotics 급여구에서 감소하였다. *Oscillibacter* 종은 돼지의 장에서 우점종으로 존재하는 종이며(Pajarillo et al., 2015, Asian-Australas J Anim Sci), *Bacteroides*는 돼지에서 낮은 사료효율과 관련된 균으로 보고된 바가 있다(Bergamachi et al., 2020, Microbiome). 또한, *Eubacterium*은 체중 및 일당증체량과 강한 상관관계를 보이고 있으며(Oh et al., 2020, Anim Sci J), 이는 본 실험에서의 일당증체량 및 체중 데이터와도 일치하였다.

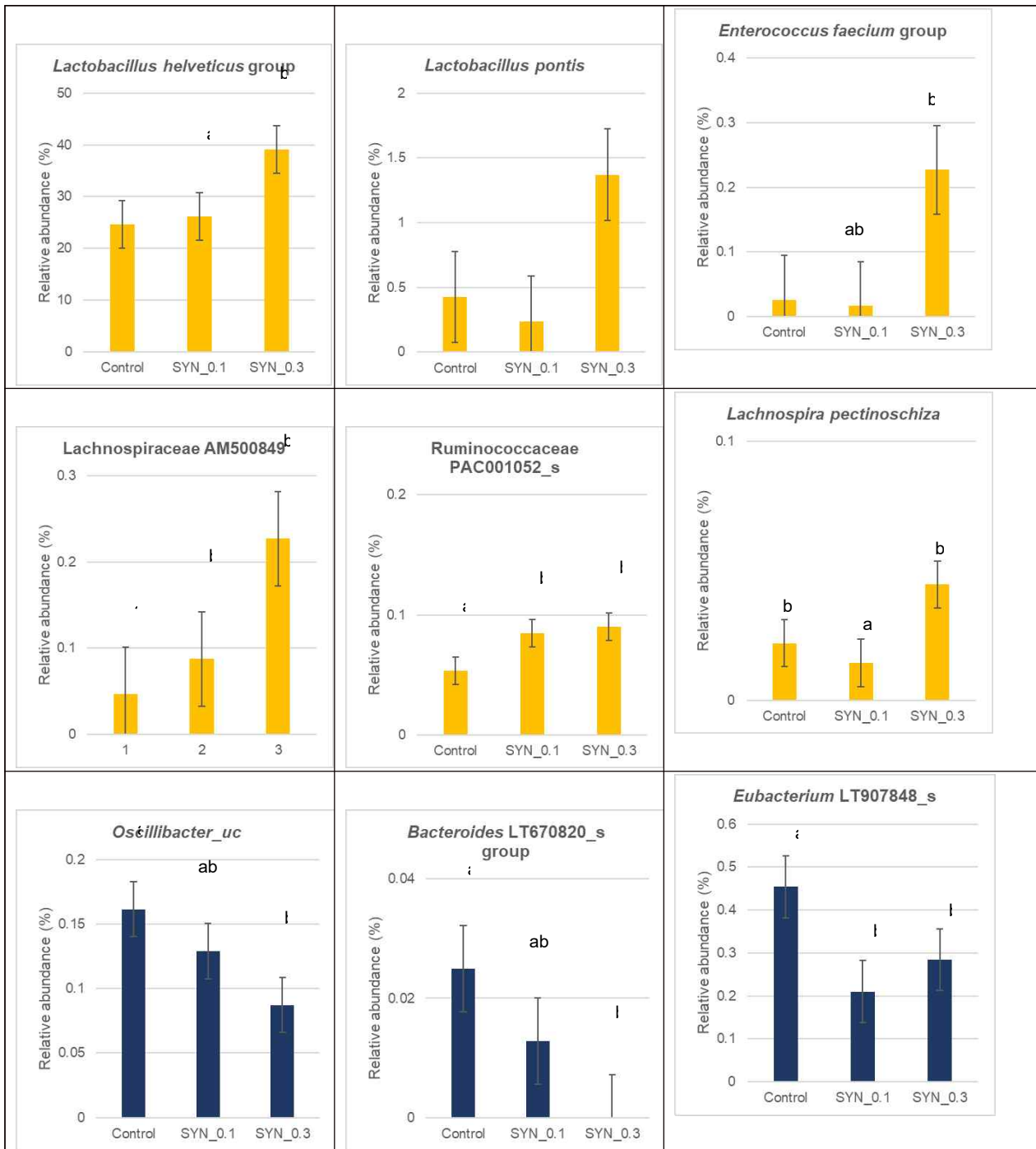


그림 36. Relative abundance of species abundant in SYN_0.1 and SYN_0.3 group compared to contol.

f. PICRUST2 tool을 이용한 function 분석

- PICRUST2를 이용한 function 분석을 진행한 결과는 그림 37, A에서 보는 바와 같다. 대조구와 비교하여 SYN_0.3 처리구에서 ‘secondary bile acid biosynthesis’, ‘taurine and hypotaurine metabolism’, ‘purine and pyrimidine metabolisms’, ‘amino sugar and nucleotide sugar metabolism’ pathway가 유의적인 차이를 보였다.
- ‘Secondary bile acid biosynthesis’ pathway는 건강한 개체에서 증가하는 것으로 보고

되어 있으며(Mullish et al., 2018, Methods), ‘taurine and hypotaurine metabolism’ 경로는 항산화 기능을 통해 숙주의 건강을 증진시킨다고 보고된 바 있다. (Liang et al., 2020, Livest Sci). 한편, ‘purine and pyrimidine metabolisms’과 ‘amino sugar and nucleotide sugar metabolism’ pathway는 돼지 장관에서의 높은 SCFA 수준과 관계가 있으며(He et al., 2021, Front Nutr), synbiotics의 급여가 lysine, D-alanine과 같은 아미노산 생합성과 관련된 경로의 발현을 높여준다고 보고된 바 있다(Ke et al., 2019, Mol Metab.).

- 한편, 그림 37, B는 대조구와 비교해 SYN_0.3% 처리구에서 유의적으로 감소한 pathway를 나타내었다. Synbiotics 0.3% 급여가 ‘biosynthesis of ansamycins’, ‘biosynthesis of vancomycin group antibiotics’ 및 ‘streptomycin biosynthesis’와 같은 항생제 관련 pathway의 발현을 감소시킬 것으로 예상되었다. 이는 synbiotics 급여가 돼지의 장에 존재하는 항생제 생합성 균주의 억제를 통해, 결과적으로 항생제 내성 유전자의 전이를 감소시킬 수 있음을 시사하였다. 이와 마찬가지로, ‘epithelial cell signaling in *H. pylori* infection’ 경로 또한 처리구 SYN_0.3에서 유의적으로 감소할 것으로 예측되었는데, 이는 *H. pylori*에 의한 돼지 설사를 synbiotics 급여가 감소시킬 수 있을 것으로 사료되었다.
- 황화수소 및 암모니아와 같은 악취 생성과 관련된 KEGG pathway는 그림 37, C에서 나보는 바와 같다. Synbiotics를 급여한 처리구 모두에서 황 대사에 관련된 pathway가 증가할 것으로 예측되었으며, 질소 대사에 관련된 pathway는 SYN_0.1 처리구에서 증가할 것으로 예측되었다. 이러한 pathway들의 증가는 황화수소 및 암모니아 수준의 감소와 함께 일어난다고 보고된 바 있다 (Xu et al, 2021, Ecotox Envi Safety).

g. Co-occurrence network 분석

- 장내균총의 Co-occurrence network 분석을 위해, CoNet, Cytoscape 프로그램을 이용해 Co-occurrence map을 작성했다(그림 38). Co-occurrence network 분석을 통해, *Lactobacillus*가 *Faecalibacterium*, *Ruminococcus torques*, *Coprococcus* 및 *E. coprostanoligenes*와 양의 상관관계를 나타내었는데, 이들 균주들은 돼지의 장에서 섬유질을 분해해 SCFA를 생산함으로써 숙주에 이로운 영향을 끼친다고 보고된 바 있다 (Oh et al., 2020, Anim Sci J; Oh et al., 2021, J Anim Sci Technol). 한편, *Escherichia shigella*는 잘 알려진 병원균으로서, *Streptococcus* 및 *Clostridium sensu stricto 6*와 양의 상관관계를 가진 것으로 나타났다. 또한, *Clostridium sensu stricto 1*은 돼지 장내균총의 우점종 중 하나이며, *Treponema*, *Subdoligranulum*, *Megasphaera*, 그리고 *Lachnospiraceae*와 함께 클러스터를 형성하였다. 이 그룹은 악취물질 생산에 관여한다고 알려져 있는데 (Zhu, 2000, Agri Ecosys Envi), synbiotics를 급여한 처리구 모두에서 이들이 감소했다.

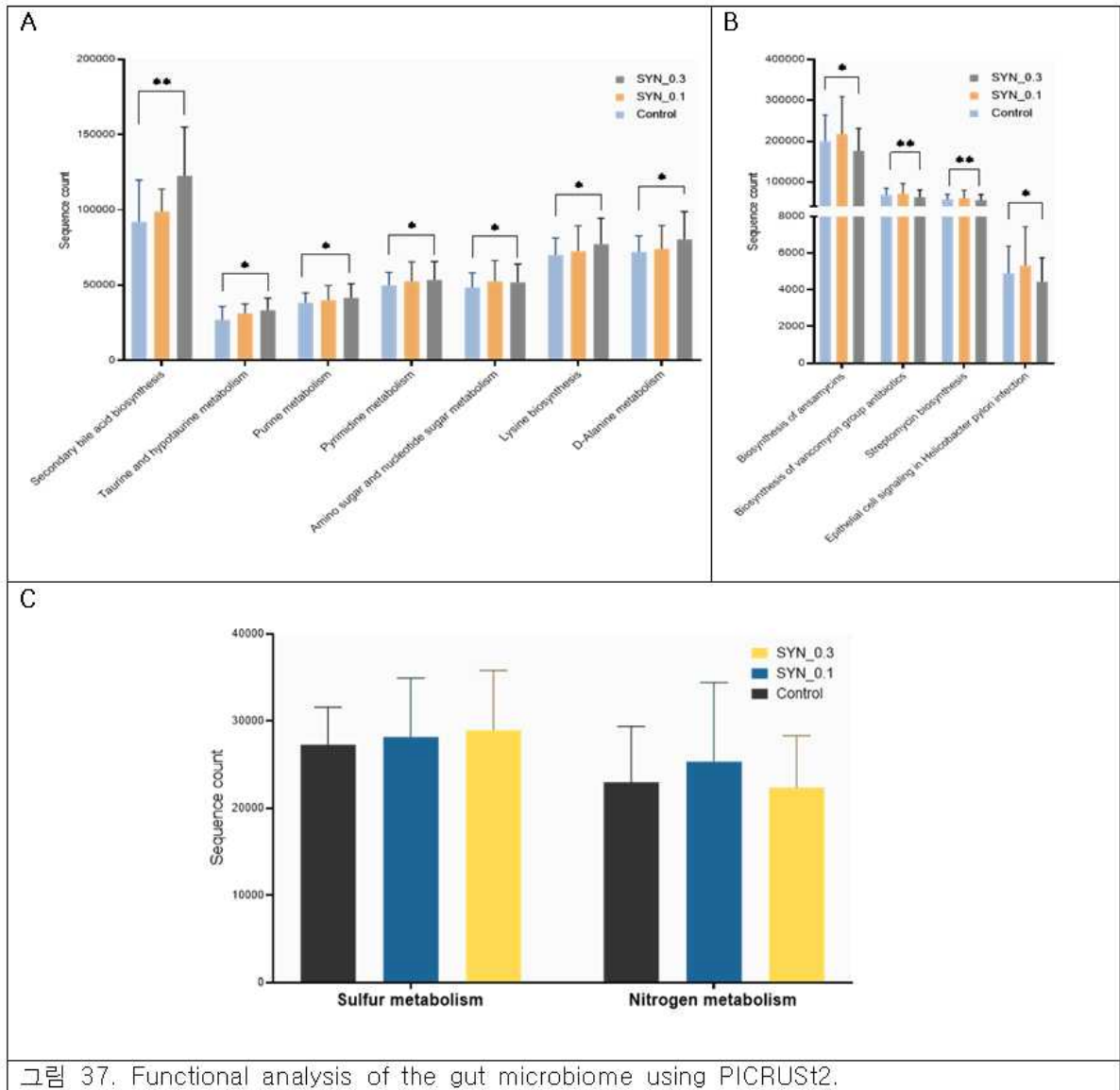


그림 37. Functional analysis of the gut microbiome using PICRUST2.

h. 분변샘플의 유기산 측정

- Synbiotics를 급여한 육성돈 분변의 유기산을 측정된 결과, formate 농도는 SYN_0.3 처리구에서 유의적으로 증가하였으며, acetate 농도는 SYN_0.1 처리구에서 유의적으로 증가하였다(그림 39). 한편, propionate와 butyrate는 SYN_0.3 처리구에서 증가하는 경향을 나타내었으며, Iso-valerate는 SYN_0.1 처리구에서 증가하는 경향을 나타내었다. SCFAs는 염증 발생을 감소시킴으로써 돼지의 장 건강을 개선하며, 대장 점막의 보편적인 대사를 돕는다고 알려져 있기 때문에(Lui, 2015, J Anim Sci Biotechnol), synbiotics 급여에 의한 SCFA의 증가는 돼지의 장 건강에 유익한 역할을 할 것으로 기대되었다.

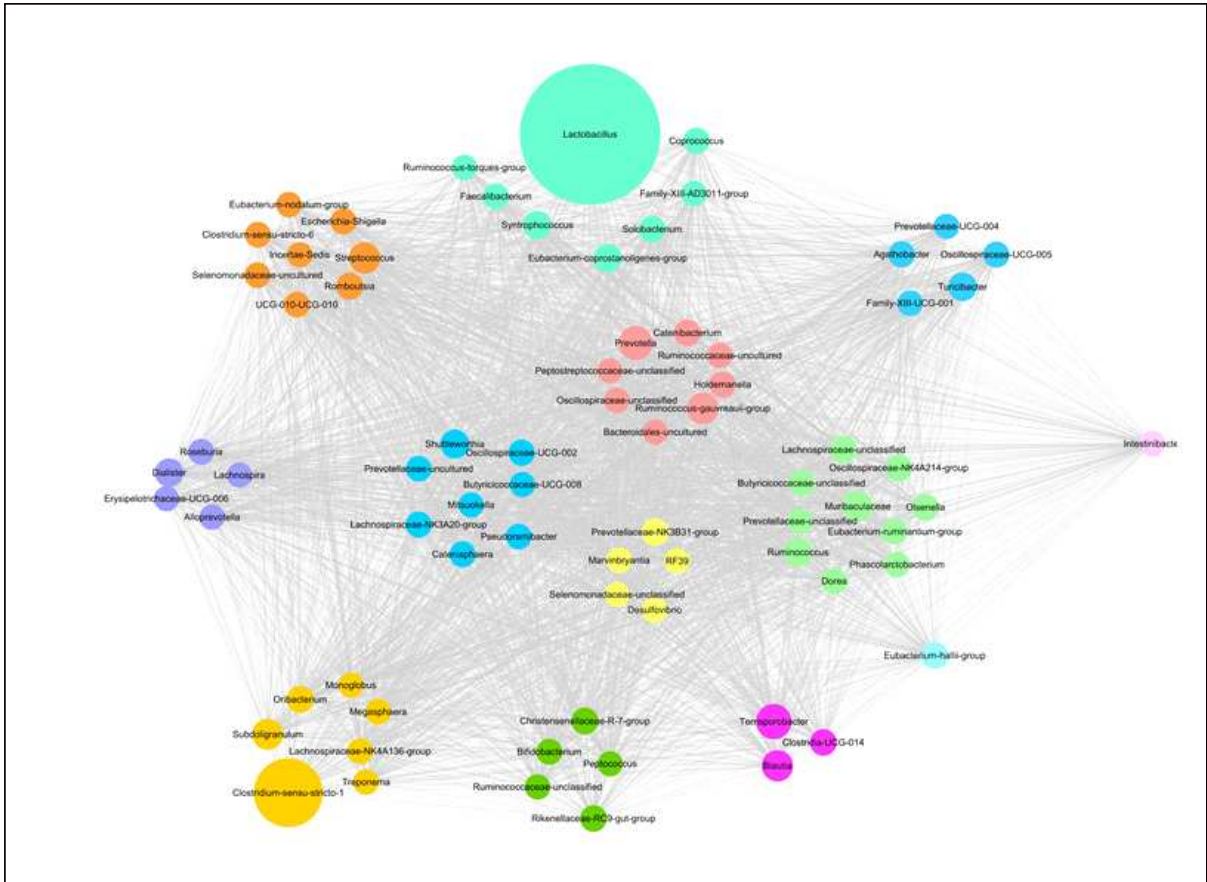


그림 38. Network analysis of the taxa present in the gut microbiome of the pigs. Colors denote grouping of the genera by which they co-occur.

i. 장내균총과 유기산 농도의 상관관계 분석

- 유기산과 분변 내 균총과의 상관관계를 Spearman's correlation 분석을 통해 조사하였다. *Lactobacillus*와 *Faecalibacterium*은 acetate 수준과 유의적으로 양의 상관관계를 나타내었으며, *Lactobacillus*는 propionate 수준과도 양의 상관관계를 나타내었다. 이는 해당 속이 장에서 acetate를 생산한다고 알려진 보고와 일치하였다(Le Blanc et al., 2017, Microb Cell Fact; Wang et al., 2021, Benef Microbes). 또한, 다수의 *Lactobacillus* 종들은 propionate를 생산한다고 보고된 바 있다(Foditsch et al., 2014, PLoS ONE). *Solobacterium*, *Holdemanella*, *Dorea*, *Oribacterium*, *Blautia*, *Subdoligranulum*, *Catenibacterium* 그리고 *Agathobacter*는 모두 acetate 및 butyrate와 양의 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, 이는 이들이 acetate와 butyrate를 생성할 수 있다는 선행 연구들과 일치한다(Zhang et al., 2019, FASEB; Oh et al., 2021, J Anim Sci Technol; Zhao et al., 2021, Carbohydr Polym). 한편, *Bifidobacterium*, *Eubacterium nodatum* 및 *ruminantium* 그룹은 valerate와 양의 상관관계가 있었다. 반면, *Clostridium*, *Treponema*, *Romboutsia* 그리고 *Turicibacter*는 acetate를 비롯한 SCFAs와 BCFAs와 음의 상관관계를 나타내었다.

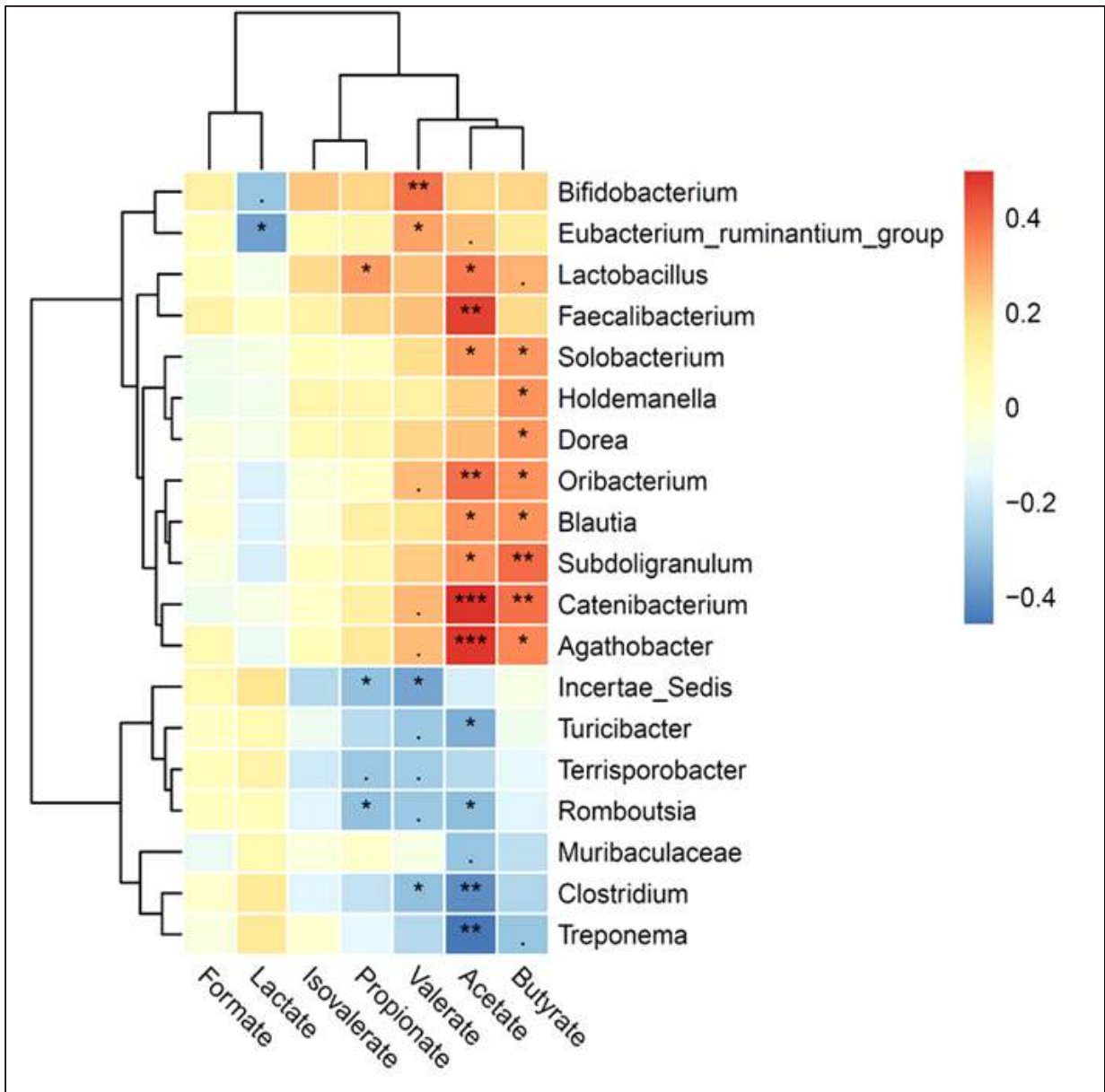


그림 39. Correlation between the gut microbiome and fecal levels of organic acids. $P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$ are denoted as *, **, and ***, respectively. $0.05 > P > 1.0$ is denoted by “.”.

5. 품질 관리 기준 수립 (크린바이오프리미엄산, 클린케어, 그린케어) 및 제품화

5-1. 크린바이오프리미엄산

a. 경구 독성 안전성 평가 (호서대 바이오의과학연구소)

○ *in vivo* 랫드 생물 경구 독성 평가 실시

- 랫드 *in vivo* 실험으로 개발제품의 dose dependency에 따른 생물 경구 독성평가를 실시하였다.

- 시험 방법

· 시험계

: 계통 및 종 - NTac:Sprague-Dawley Rat, SPF

: 생산업체 - 대한바이오링크, 충북 음성군 삼성면 덕호로 277

: 공급업체 - 하나바이오

: 동물 주령 및 수(입수시) - 7주령, 암컷 27마리, 수컷 27마리

: 동물 주령 및 수(투여시) - 8주령, 암컷 25마리, 수컷 25마리

: 시험계 선택이유 - 본 시험에 사용할 SD 랫드는 단회 및 반복투여 독성시험 등의 안전성 시험에 널리 사용되고 있으며, 본 계통에 관한 풍부한 시험 기초 자료가 있어 시험결과의 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다.

· 시험군의 구성 (표 22)

표 22. 시험군의 구성

시험군	시험물질	성	동물번호 (두수)	투여용량 (mg/kg bw ^a)	투여액량 (mL/kg bw ^b)
1군 (용매대조군)	0.5% CMC	수컷	1101 ~ 1105 (5)	0	20
		암컷	2101 ~ 2105 (5)		
2군	크린바이오프리미엄산	수컷	1201 ~ 1205 (5)	250	20
		암컷	2201 ~ 2205 (5)		
3군	크린바이오프리미엄산	수컷	1301 ~ 1305 (5)	500	20
		암컷	2301 ~ 2305 (5)		
4군	크린바이오프리미엄산	수컷	1401 ~ 1405 (5)	1,000	20
		암컷	2401 ~ 2405 (5)		
5군	크린바이오프리미엄산	수컷	1501 ~ 1505 (5)	2,000	20
		암컷	2501 ~ 2505 (5)		

· 시험 물질

: 명칭 - 크린바이오프리미엄산

: 성상 및 제형 - 갈색의 산제

: 조성 (표 23)

표 23. 시험 물질의 조성

	본제 g 중
1. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2.5 x 10 ⁸ CFU/g
2. <i>Lactobacillus brevis</i>	1.2 x 10 ⁸ CFU/g
3. <i>Bacillus subtilis</i>	3.3 x 10 ⁸ CFU/g
4. <i>Lactobacillus reuteri</i>	1.2 x 10 ⁸ CFU/g
5. 고상배지	대두박 60 %, 소맥피 40 %

- 투여량 설정: OECD 단회투여독성시험(OECD GL240, 2001.12.17.)에서 권장하는 투여량을 기초로 투여액량은 20mL/kg bw로 하고, SD 랫드 암수 모두 250, 500, 1,000, 2,000mg/kg 용량으로 시험군을 설정하고 대조군은 시험물질 투여군과 동일한 액량의 부형제(0.5% CMC)를 투여하였다.
- 투여 방법: 투여 전날 12~13시간 절식시킨(음수 제외) 동물에 조제물질을 경구 투여용 주사기(존데)를 이용하여 위내에 1회 강제 투여한 후 4시간 후부터 사료를 재공급 하였다.
- 관찰 항목:
 - 1) 일반증상 관찰 - 모든 투여동물에 대하여 투여 완료 후 30분부터 4시간까지는 집중적으로 관찰 하였으며, 투여 다음날부터 14일까지 최소 1일 1회 이상 사망여부 및 임상증상을 개체별로 관찰하였다.
 - 2) 체중측정 : 체중은 시험동물 입수 시, 군 분리 시, 투여 직전, 투여 개시 후 1, 4, 7, 10일 및 14일에 측정하였다.
 - 3) 사료 및 음수 섭취량 측정 : 투여 개시 1주일 전부터 주 1회 측정하였고, 투여 후 1, 4, 7, 10일 및 14일에 측정 하였다. 측정방법은 사료와 물을 정량 급여한 다음 날 잔량을 사육상자 단위로 측정하여 그 차이를 계산하였으며, 사료 및 음수 섭취량은 마리당 평균섭취량 (g/ rat /day)으로 산출하였다.
 - 4) 부검 : 실험 종료 시 모든 생존동물에 대하여 CO₂가스를 이용하여 흡입 마취시킨 후 회복하여 후대정맥 및 복대동맥을 절단하는 방법으로 방혈하여 안락사 시킨 후 육안으로 내부 장기를 검사하였다.
 - 5) 반수치사량(LD₅₀)산출 : 모든 시험군에서 사망개체가 관찰되지 않아 반수치사량은 산출하지 않았다.
- 통계 처리: 체중 및 사료/음수 섭취량 데이터는 평균과 표준편차로 나타내었으며, 각 군 비교는 ANOVA분석을 하였고 유의한 차이가 나타날 경우 Duncan 사후검정을 실시하였다.

- 시험 결과

- 사망률: 크린바이오프리미엄산 투여 후 시험 종료일까지 모든 시험군에서 사망개체가 관찰되지 않았다 (표 24).

표 24. 크린바이오프리미엄산 처리 후 사망률

Dose group	Sex	Number of death				
		30min~4hr	1 day	2 day	3 day	4~14 day
VC	M	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	F	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
크린바이오프리미엄산 250 mg/kg bw	M	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	F	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
크린바이오프리미엄산 500 mg/kg bw	M	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	F	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
크린바이오프리미엄산 1,000 mg/kg bw	M	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	F	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
크린바이오프리미엄산 2,000 mg/kg bw	M	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS
	F	NCS	NCS	NCS	NCS	NCS

VC: Vehicle Control (Sterilized 0.5% CMC)

- 임상 증상: 크린바이오프리미엄산 투여 후 시험 종료일까지 모든 개체에서 특이한 임상증상이 관찰되지 않았다 (표 25).

표 25. 크린바이오프리미엄산 처리로 인한 임상 증상

Dose group		Body weights (g)					
		Day 0 ^a	Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	258.07	282.53	304.75	322.15	343.33	363.25
	SD	14.64	14.83	16.91	17.21	19.90	16.57
	n	5	5	5	5	5	5
크린바이오프리미엄산 250 mg/kg bw	Mean	262.11	290.76	314.71	335.21	356.91	380.03
	SD	14.49	15.55	17.62	14.39	16.47	15.95
	n	5	5	5	5	5	5
크린바이오프리미엄산 500 mg/kg bw	Mean	271.95	295.50	320.77	341.75	366.04	386.48
	SD	7.17	15.51	9.88	9.06	12.93	11.43
	n	5	5	5	5	5	5
크린바이오프리미엄산 1,000 mg/kg bw	Mean	255.96	279.19	305.34	325.99	348.13	368.81
	SD	11.82	15.72	16.94	16.79	16.59	16.98
	n	5	5	5	5	5	5
크린바이오프리미엄산 2,000 mg/kg bw	Mean	256.72	285.76	311.09	329.42	354.83	377.18
	SD	12.89	16.87	16.22	18.17	14.27	15.02
	n	5	5	5	5	5	5

VC: Vehicle Control (Sterilized 0.5% CMC) NCS: No clinical signs

- 체중 변화: 시험기간 동안 크린바이오프리미엄산 250, 500, 1000 및 2000 mg/kg bw 투여군 수컷 및 암컷의 체중은 용매대조군과 비교 시 유의한 차이가 관찰되지 않았다 (표 26, 표 27).

표 26. 시험물질 투여 후 수컷 랫드의 체중 변화

Dose group		Body weights (g)					
		Day 0 ^a	Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	168.48	180.90	193.78	205.53	211.87	220.03
	SD	5.90	4.96	4.39	7.23	7.33	7.13
	n	5	5	5	5	5	5
크린바이오프리미엄산 250 mg/kg bw	Mean	170.53	188.59	194.99	199.37	213.63	226.26
	SD	5.54	3.21	6.65	10.46	12.15	20.18
	n	5	5	5	5	5	5
크린바이오프리미엄산 500 mg/kg bw	Mean	168.87	182.65	191.86	201.31	208.83	214.35
	SD	7.41	8.89	7.15	8.28	8.07	7.44
	n	5	5	5	5	5	5
크린바이오프리미엄산 1,000 mg/kg bw	Mean	169.71	184.59	196.68	206.97	216.01	223.85
	SD	4.02	2.85	2.12	2.73	4.82	8.37
	n	5	5	5	5	5	5
크린바이오프리미엄산 2,000 mg/kg bw	Mean	171.21	190.76	199.04	204.38	215.60	228.01
	SD	8.58	11.50	12.79	12.12	10.89	9.65
	n	5	5	5	5	5	5

^a: Data after fasting for 12~13 hrs before the treatment

VC: Vehicle control (Sterilized 0.5% CMC)

표 27. 시험물질 투여 후 암컷 랫드의 체중 변화

Dose group		Daily mean food consumption (g/animal/day)				
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	32.93	25.08	23.89	24.32	24.59
	SD	0.26	0.08	0.74	0.07	0.31
크린바이오프리미엄산 250 mg/kg bw	Mean	33.23	26.40***	26.18***	26.64***	26.97***
	SD	1.00	0.42	0.28	0.47	0.46
크린바이오프리미엄산 500 mg/kg bw	Mean	32.83	26.91***	26.22***	26.36***	27.65***
	SD	3.80	0.23	0.40	0.04	0.34
크린바이오프리미엄산1,000 mg/kg bw	Mean	32.58	26.93***	26.48***	25.80***	26.62***
	SD	0.84	0.44	0.45	0.79	0.89
크린바이오프리미엄산2,000 mg/kg bw	Mean	33.21	26.96***	25.77**	25.73***	26.67***
	SD	2.77	0.47	0.88	0.51	0.41

^a: Data after fasting for 14 hrs before the treatment

VC: Vehicle control (Sterilized 0.5% CMC)

- 사료 섭취량 측정: 4일째부터 14일째까지 크린바이오프리미엄산 투여군(250, 500, 1000 및 2000 mg/kg bw) 수컷의 사료섭취량은 용매대조군에 비하여 유의하게 높았다(표 28). 암컷의 경우 250 및 500 mg/kg bw 투여군의 사료 섭취량은 용매대조군과 차이가 없었으나, 1000 및 2000mg/kg bw 투여군 사료섭취량은 투여 후 10일째와 14일째에 용매대조군의 사료섭취량 보다 유의하게 높았다(표 29).
- 음수 섭취량 측정: 크린바이오프리미엄산 250 mg/kg bw 투여군 수컷의 음수섭취량은 투여 후 14일째에 용매대조군에 비하여 유의하게 높았으며, 500, 1000 및 2000 mg/kg bw 투여군 수컷의 음수섭취량은 투여 후 10일째부터 14일째까지 용매대조군 보다 유의하게 높았다(표 30). 암컷의 경우 250 및 500 mg/kg bw 투여군 음수섭취량은 시험기간 동안 용매대조군과 차이가 없었으나, 1000 및 2000 mg/kg bw 투여군의 음수섭취량은 투여 후 10일째부터 14일째까지 용매대조군에 비하여 유의하게 높았다(표 31).

표 28. 시험물질 투여 후 수컷 랫드의 사료섭취량 측정

Dose group		Daily mean food consumption (g/animal/day)				
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	24.22	16.60	14.83	15.43	16.16
	SD	4.68	0.23	0.96	0.31	0.86
크린바이오프리미엄산 250 mg/kg bw	Mean	24.83	16.41	15.65	15.23	16.93
	SD	2.68	0.79	1.59	0.76	0.94
크린바이오프리미엄산 500 mg/kg bw	Mean	20.82	16.22	14.84	15.60	15.65
	SD	0.88	1.31	0.76	1.40	0.92
크린바이오프리미엄산 1,000 mg/kg bw	Mean	23.93	16.75	15.85	15.99**	17.43*
	SD	0.02	0.48	0.51	0.14	0.68
크린바이오프리미엄산 2,000 mg/kg bw	Mean	23.33	16.58	15.59	16.18***	17.13*
	SD	0.38	1.36	0.02	0.09	0.12

***p<0.001, significantly different from vehicle control group

VC: Vehicle control (Sterilized 0.5% CMC)

표 29. 시험물질 투여 후 수컷 랫드의 사료섭취량 측정

Dose group		Daily mean water consumption (g/animal/day)				
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	39.33	27.84	28.73	27.29	28.44
	SD	0.84	1.61	1.80	0.55	1.29
크린바이오프리미엄산 250 mg/kg bw	Mean	40.08	28.04	29.50	28.41	32.43**
	SD	2.03	0.59	2.44	2.11	0.73
크린바이오프리미엄산 500 mg/kg bw	Mean	41.55	29.17	28.44	32.05**	33.49**
	SD	3.72	1.22	3.00	2.83	1.91
크린바이오프리미엄산 1,000 mg/kg bw	Mean	39.15	29.12	29.71	29.49***	31.82*
	SD	1.21	1.47	0.92	0.79	1.89
크린바이오프리미엄산 2,000 mg/kg bw	Mean	40.90	29.57	30.77	29.37*	31.86***
	SD	3.04	0.53	2.02	1.70	0.64

VC: Vehicle control (Sterilized 0.5% CMC)

*p<0.05 and **p<0.01, ***p<0.001, significantly different from vehicle control group

표 30. 시험물질 투여 후 수컷 랫드의 음수섭취량 측정

Dose group		Daily mean water consumption (g/animal/day)				
		Day 1	Day 4	Day 7	Day 10	Day 14
VC	Mean	25.85	20.63	20.32	19.35	20.48
	SD	2.96	1.80	1.52	1.57	0.71
크린바이오프리미엄산 250 mg/kg bw	Mean	26.91	19.32	19.22	20.52	20.94
	SD	1.72	1.84	2.03	0.61	0.57
크린바이오프리미엄산 500 mg/kg bw	Mean	26.31	19.85	18.97	20.51	21.49
	SD	0.65	0.34	1.93	2.35	3.07
크린바이오프리미엄산 1,000 mg/kg bw	Mean	27.20	21.63	21.65	22.80**	24.04**
	SD	1.94	0.54	1.28	0.79	1.99
크린바이오프리미엄산 2,000 mg/kg bw	Mean	27.94	21.15	22.79	23.08**	24.85***
	SD	1.61	2.72	3.65	1.11	1.24

VC: Vehicle control (Sterilized 0.5% CMC)

*p<0.05 and **p<0.01, ***p<0.001, significantly different from vehicle control group

표 31. 시험물질 투여 후 암컷 랫드의 음수섭취량 측정

Dose group	Sex	No. of examined at terminal kill	Gross findings (internal and external)
VC	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
크린바이오프리미엄산 250 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
크린바이오프리미엄산 500 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
크린바이오프리미엄산 1,000 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
크린바이오프리미엄산 2,000 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF

*p<0.05 and **p<0.01, ***p<0.001, significantly different from vehicle control group

VC: Vehicle control (Sterilized 0.5% CMC)

- 부검 소견: 실험종료 후 생존 한 모든 랫드에 대하여 육안적 병리 검사를 실시한 결과, 모든 개체에서 특이한 이상소견은 관찰되지 않았다(표 32).

표 32. 시험 물질 처리한 랫드의 총 부검 결과

Dose group	Sex	No. of examined at terminal kill	Gross findings (internal and external)
VC	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
크린바이오프리미엄산 250 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
크린바이오프리미엄산 500 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
크린바이오프리미엄산 1,000 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF
크린바이오프리미엄산 2,000 mg/kg bw	Male	5	NGF
	Female	5	NGF

VC: Vehicle control (Sterilized 0.5% CMC), NGF: No gross findings

- 반수치사량: 랫드에서 크린바이오프리미엄산의 급성경구 투여 시 반수치사량(LD₅₀)은 수컷과 암컷 모두 2000 mg/kg bw 이상이였다.
- 시험 결과, 크린바이오프리미엄산 투여에 따른 사망 개체, 특이적인 임상증상, 체중변화 및 부검 시 이상소견이 관찰되지 않았고, 팜크린 단회 경구투여에 의한 랫드 수컷 및 암컷의 반수치사량(LD₅₀)은 모두 2000 mg/kg bw 이상으로 크린바이오프리미엄산의 급성경구 독성은 GHS(Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) Category 5에 해당된다.

b. 안정성 평가

- 제품별로 최종 선발된 혼합물의 균주 저장안정성 실험을 6개월간 상온, 40°C, 60°C에서 각각 1개월 단위로 조건별 생균의 균수를 확인하였다.
- 고상발효를 통해 생산된 바실러스류의 경우 6개월간 상온 및 40°C에서 10⁸ CFU/g 이상을 유지하였고, 60°C에서는 생균수의 감소가 관측되나 6개월 후에도 10⁷ CFU/g를 유지하였다 (그림 40, 좌).
- 선발되어 동결건조를 통해 생산된 락토바실러스류의 경우 6개월간 상온에서는 서서히 감

소되어 10⁶ CFU/g 대로 하락하며, 40°C에서는 4개월 이후, 60°C에서는 2개월 이내 10⁵ CFU/g 이하로 하락하였다 (그림 40, 우).

- 이를 통해, 상온에서의 6개월간 보증 성분 균수는 바실러스류 10⁷ CFU/g, 락토바실러스류 10⁶ CFU/g로 확인하였다.

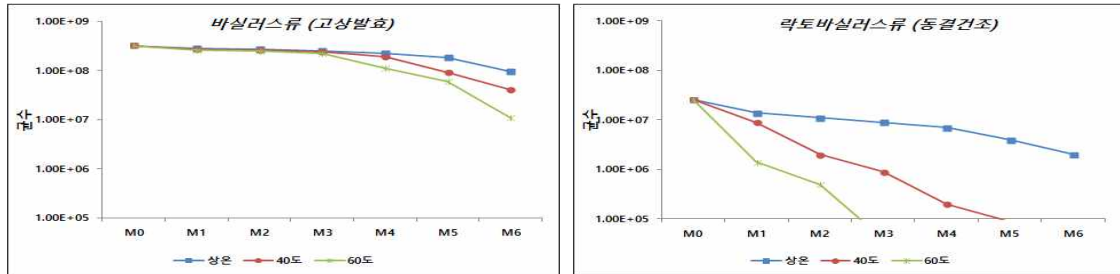


그림 40. 최종 선발 균주들의 6개월간의 저장안정성 평가
(좌) 바실러스류(고상발효) (우) 락토바실러스류(동결건조)

○ 적정 포장방법

- 제품 후보군이 바실러스류와 락토바실러스류를 함께 포함하고 있으므로 사료용 지대 또는 알루미늄 포장재에 포장한 후 직사광선을 피하고 서늘한 곳에 취급하게 한다.

c. 개발 제품의 최종 등록기준 결정 및 품질관리 항목 설정

○ 급여용 제품 ‘크린바이오프리미엄산’의 제품 최종 등록기준 및 품질관리

- 급여용 제품은 함유 성분이 유용균 바실러스 고상발효물 및 락토바실러스 동결건조물과 synbiotics 효과를 주기 위한 물질이 포함된 산제로 개발되었다. 공인인증기관인 호서대학교의 랫드경구독성 평가로 제품의 안정성을 확인하여 제품화를 진행하였다 (그림 41).
- 여러 구성 물질들에서 대표 보증성분을 바실러스류인 *Bacillus subtilis* 10⁶ CFU/g로 등록하였다.
- 현재 판매 초기 단계이므로 추가적인 성능 및 안정성 개선을 위해 구성 물질들에 따른 제품 효능 비교 분석이 진행되고 있어 제품의 등록 기준은 변경이 가능하다.

부 표	
업 세 명 :	(주) 다원케이팜
제 품 명 :	크린바이오프리미엄 산
영 율 명 :	
산 고 번 호 :	024-0081
산 고 일 자 :	2020-08-19
1. 함유성분 및 용량	
1kg 중	
Bacillus subtilis(바실러스종균 기준 및 균력)	100,000 MCFU
Bacillus licheniformis(바실러스종균 기준 및 균력)	1,000 MCFU
Streptococcus cerevisiae(사포마이세스 기준 및 균력)	500 MCFU
Vanillin(KFAC)	적량
부형제(방부제)별류	적량
부형제(방부제)별류	적량
2. 포장	
제형 :	산제
포장 :	최소량의 가루
3. 제조방법	
대한민국약전 제제총칙 중 산제 제법에 따라 제조한다.	
4. 효능 및 효과	
가. 대상축종 :	돼지, 닭, 소
나. 효능 및 효과 :	장내 세균총 균형, 장과 건강 개선, 사료효율 개선, 중체량 향상, 면역 증진, 생산성 향상, 분변 내 악취 감소
5. 용법 및 용량	
가. 돼지 :	사료 분당 분체 1-2kg를 균일하게 혼합하여 경구투여
나. 닭 :	사료 분당 분체 1-2kg를 균일하게 혼합하여 경구투여
다. 소 :	사료 분당 분체 1kg를 균일하게 혼합하여 경구투여
6. 포장단위	
1kg, 5kg, 10kg, 20kg, 25kg	
7. 저장방법 및 사용기간	
가. 저장방법 :	직사광선을 피하여 건조하고 서늘한 곳(1-30도)에 보관한다.
나. 유통기한 :	일체유통기

그림 41. 크린바이오프리미엄산 사료 성분 등록증

5-2. 클린케어

a. 효능 평가 (한국화학융합시험연구원)

- 분무형 악취저감제의 효과를 객관적으로 평가하기 위해 탈취 평가 공인기관에 의뢰하여 악취유발물질들의 탈취율을 확인하여 실험 성적서를 발급하였다 (그림 42).
- 효과적인 탈취 판정 기준은 암모니아 및 아민류가 60% 이상, 황화수소 및 메틸머캅탄 5% 이상으로 고압 분무용 및 안개 분무용 악취저감제의 악취유발물질 탈취율 세부 수치는 다음과 같다 (표 33).
- 고압 분무용 및 안개 분무용 악취저감제의 경우 암모니아, 아민류, 황화수소 및 메틸머캅탄 4종 악취유발물질의 탈취율이 기준을 모두 넘어 효과적인 탈취를 하고 있음을 증명하였다.

표 33. 분무형 악취저감제 후보의 악취유발물질 탈취율

탈취율 (%)	고압 분무용	안개 분무용
암모니아	92.6	70.6
아민류	99.0	89.0
황화수소	12.0	14.0
메틸머캅탄	7.5	7.5

* 암모니아 및 아민류 60% 이상, 황화수소 및 메틸머캅탄 5% 이상일 경우 탈취로 판정

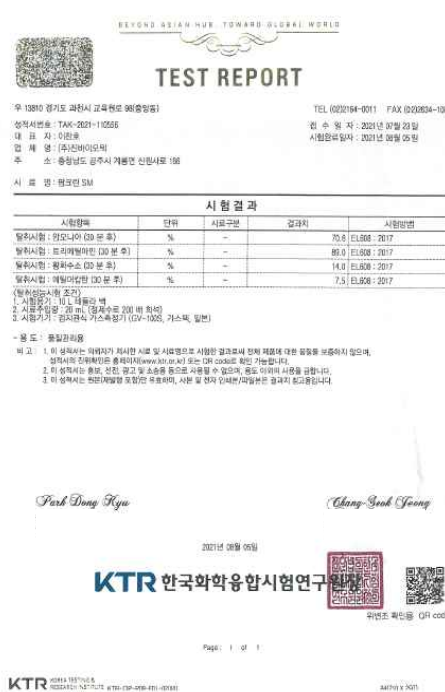
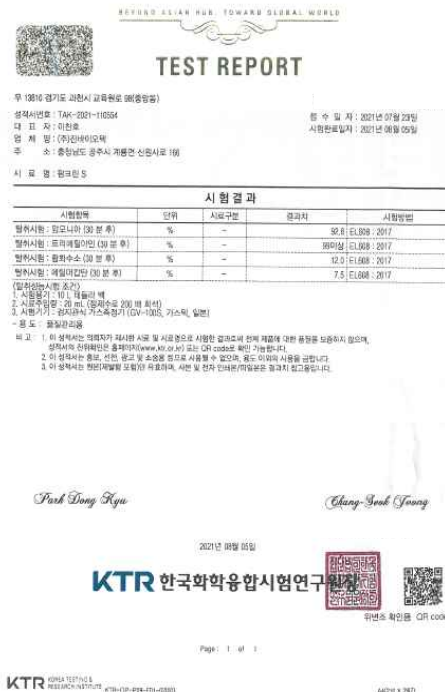


그림 42. 한국화학융합시험연구원에서 발급한 분무용 악취저감제의 탈취 실험 성적서
(좌) 고압분무용 (우) 안개분무용

○ 액비 부숙도 평가 (판코리아)

- 액비 부숙도 평가를 위하여 공인 기관에 무씨 발아 비교 실험을 의뢰했다. 무씨 발아 비교 실험은 액비 부숙도가 높을수록 무씨 발아율이 높아지게 되고 이를 통해 간접적으로 액비 부숙도를 측정하는 방식이다. 16주 경과 시 선정 배합비 처리구의 발아율 증진 효과가 약 160%로 우수함을 확인했다(그림 44).

○ 퇴비 부숙도 평가 (충남대학교 농업과학연구소)

- 퇴비 부숙도 평가를 위하여 공인 기관에 축분 퇴비 Solvita 부숙도 실험을 의뢰했다. 미부숙인 1단계부터 초기/중기/후기를 지나 부숙 완료인 7~8단계까지 퇴비 부숙도를 판정하는 방식이다. 8주 경과 시 선정 배합비 처리구는 부숙 후기에 돌입하며 12주 경과 시 7단계로 부숙이 완료됨을 확인했다(그림 45).



액비 부숙 16주 경과시
후보 제품 처리구 발아 무씨

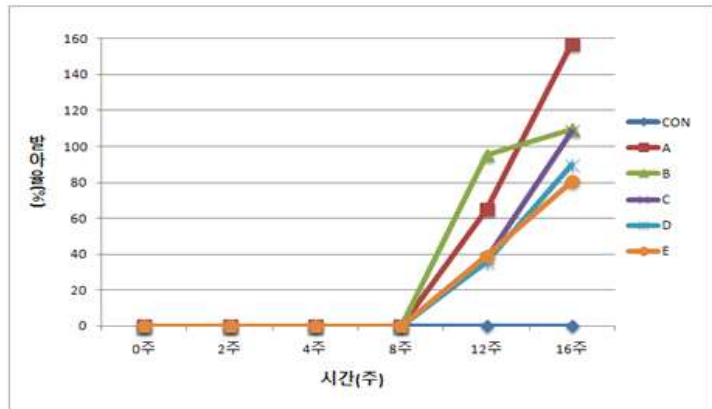


그림 44. 16주 액비 부숙 경과시 무씨 발아율 증가 추이

(A: 선정 배합비 B: 후보 배합비 #1; C: 후보 배합비 #2; D: 타사 제품 #1; E: 타사 제품 #2)

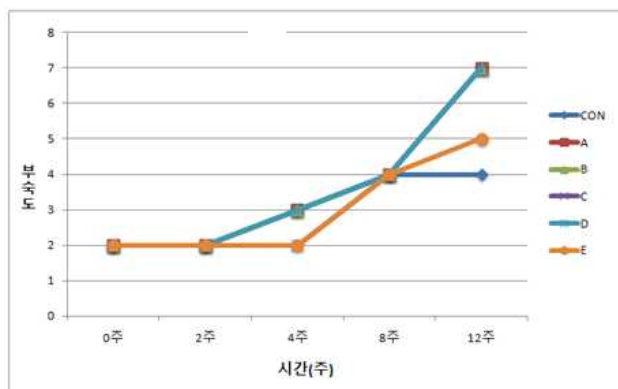


그림 45. 12주 퇴비 부숙 경과시 퇴비 부숙도 추이

(A: 선정 배합비 B: 후보 배합비 #1; C: 후보 배합비 #2; D: 타사 제품 #1; E: 타사 제품 #2)

1: 미부숙; 2: 초기; 3: 중기; 4~6: 후기; 7~8: 부숙 완료

(주)판코리아 농업환경과학연구소
관리번호 제 2021-0340(8)호

검사 성적서

위탁자	사업자번호 307-01-14921 기관명 (주)진바이오텍 주소 충청남도 공주시 계룡면 신원사로 166	성명 이찬호	
시료명	에비 B4		
부속기간	2021. 09. 06 ~ 2021. 09. 30		
검사 성적			
시료명	항목	성적	비고
에비 B4	부속도(중사말아범,헝가리수)	157.04	

농촌진흥청 고시 「비료의 품질검사방법 및 시료채취기준」에 관하여 발행된 성적서이며, 비료의 이
외의 목적을 위한 것은 영표1에 따른 검사성적입니다.
이 성적서는 위탁자가 일회로 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 소송 및 광고 기타 구
속력이 있는 자료로 사용할 수 없으며, 재검토 및 동등기준 제출용으로도 사용이 가능합니다.

2021. 09. 30

(주)판코리아 농업환경과학연구소

농촌진흥청 지정 대표 시험연구기관 (국 2008-012) : 인문학분야-시험시험시험시험 TEL : 042304-6734

관리번호 제2021-26-9호

검사 성적서

위탁자	성명 김진승 업체명 ㈜진바이오텍
주소	충청남도 공주시 계룡면 신원사로 166
명칭	에비
형태	고상
제조기관	㈜진바이오텍
검사항목	항목 분석항목 부속도 평가
용도	시차용 개발용
시험방법	기계적 부속도측정 - 슬비타법
	분석결과
결과	성적
평가	부속도(7)

위 검사결과에 위탁자가 제공한 시료에 한하여, 용도이외의 상업적인 광고 및
발표 수단으로 사용할 수 없습니다.

2021년 10월 25일

시험 책임자: 윤인호 (8)

농촌진흥청 지정 대표 시험연구기관
시험기관: 충남대학교 농업과학연구소 (직인)

그림 46. 공인인증기관으로부터 발급 받은 퇴액비 부속도 성적서
(좌) 액비 부속도 (우) 퇴비 부속도

b. 제품화

- 부속용 제품은 바실러스 및 효모 고상발효물과 기타 부형제가 포함된 산제로 액비 및 퇴비 부속용으로 개발되었다. 공인인증기관인 판코리아 및 충남대학교 농업과학기술원에 서 퇴액비 부속도 실험으로 제품의 효과를 확인하여 제품화를 진행하였다.
- 여러 구성 물질들에서 대표 보증성분을 바실러스류인 *Bacillus subtilis* 10⁷ CFU/g로 등록하였다. (그림 47).
- 현재, 제품 출시 전 단계이므로 등록기준은 소비자들의 필요에 따라 추가 비교 분석 후 변경될 수 있다.

[별지 제8호서식]
등록번호 제 CCBGW0053 호

사료 성분 등록증

대표자 : 이찬호 생년월일 : 1964년 4월 5일
업체명 : (주)진바이오텍 제조(수입)업등록번호 : 6440000-502-2002-0015
소재지 : 충청남도 공주시 계룡면 신원사로 166

사료의 종류 : 보조사료/미생물제-유익균 사료의 명칭 : 바실러스 서브틸리스 (그린케어)
사료의 형태 : 가루 사료의 용도 : 사료첨가용, 양육농가용
제조국가 : 국내산
제품명(영문명) : 그린케어 부형제 : 포도당, 설탕, 탄산칼슘

사료의 성분명

성분명	바실러스 서브틸리스								
성분량	1.0 x 10 ⁷ CFU/g 이상								

*사료관리법 제12조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제3항에 따라 위와 같이 사료의 성분등록을 하였음을 증명합니다.

2021년 11월 10일

충청남도지사

210**x297** (인방용지 18) 120g*H

그림 47. 그린케어 사료성분 등록증

6. 최종 제품 구성

- 이상 기술한 4개년간의 연구개발로 *Bacillus subtilis* GB-BS-2020, *Bacillus amyloliquefaciens* G10, *Bacillus licheniformis* GB-F2, *Lactobacillus brevis* M10, *Lactobacillus reuteri* GB-LC1, *Saccharomyces cerevisiae* GB-LC4 등 6종의 약취 저감 및 유기물 분해 능력이 우수한 균주와 치커리, 썩, 유카 등 3종의 약취 저감 및 prebiotics 효과를 가진 천연물질을 선별하였다. 이들 선별 물질을 조합하여 급여용 제품인 크린바이오프리미엄산, 분무용 제품인 클린케어, 부숙용 제품인 그린케어 3개의 제품화가 진행되어 축산 농가별 맞춤형 약취저감 솔루션을 구성하였다(그림 48).

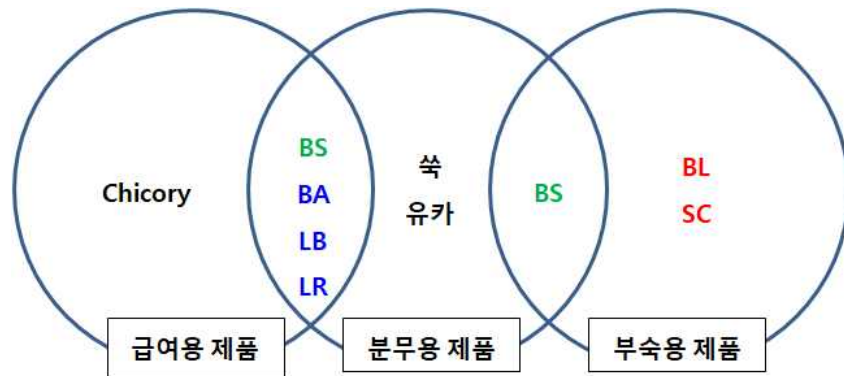


그림 48. 축산 농가별 맞춤형 약취저감 솔루션

7. 개발 제품의 사업화 성과

- 이상 기술한 4개년간의 연구개발로 급여용 제품인 크린바이오프리미엄산, 분무용 제품인 클린케어, 부숙용 제품인 그린케어 3개의 제품화가 진행되어 축산 농가별 맞춤형 약취저감 솔루션을 구성하였다 (그림 49).



그림 49. 출시되거나 출시를 앞둔 제품

(좌) 급여용 크린바이오프리미엄산(중) 분무용 클린케어(우) 부숙용 그린케어

- 급여용 크린바이오프리미엄산의 경우 출시되어 21년 12월 기준 49.365 백만원의 매출액을 달성하였고, 출시를 앞두고 있는 클린케어와 그린케어는 여러 매체를 통해 홍보를 진행하고 있다. (그림 50)

제품 성분 및 함량

구분	주요 성분	함량
말근인	식물성 단백질 분말 (비타민 B12 강화)	100%
	식물성 단백질 분말 (비타민 B12 강화)	100%
말근피드	식물성 단백질 분말 (비타민 B12 강화)	100%
	식물성 단백질 분말 (비타민 B12 강화)	100%

축산 약화제 개발을 위한 말근인 시리즈의 Two-track 전략

급여용 말근인 핵심 전략 Point

- 동물미생물균제를 활용한 BIOC 기술 적용
- Gut microflora를 조절하여 장내의 세균 균형을 증가 및 분변 내 영양성분을 증가시켜 소화율(배변)을 향상
- 포화지방산 함량을 낮추어 동물미생물균제를 활용한 장내 환경 조성

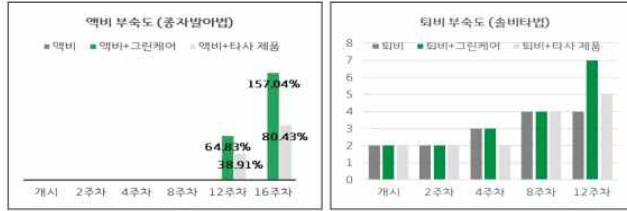
분무용 말근인 핵심 전략 Point

- 동물미생물균제를 활용한 BIOC 기술 적용
- 장내 미생물 균형을 조절하여 장내의 세균 균형을 증가 및 분변 내 영양성분을 증가시켜 소화율(배변)을 향상
- 포화지방산 함량을 낮추어 동물미생물균제를 활용한 장내 환경 조성

원산지: 국내 제조
 제조사: (주)진바이오텍 (02-955-3000)
 연락처: 02-955-3000

축산농가 맞춤형 환경개선을 위한 분무형 약취저감제 '클린케어'와 퇴·액비 부숙촉진제 '그린케어' 출시

- (주)진바이오텍이 선발한 유용 미생물을 활용하여 약취저감제와 퇴·액비 부숙촉진제 개발



▲ 시간의 경과에 따른 '그린케어'의 퇴·액비 부숙도

그림 50. 제품 출시를 위한 홍보자료

(좌) 홍보 리플릿 (급여용 크린바이오프리미엄산, 분무용 클린케어)

(우) 피그엔포크 기사 (분무용 클린케어, 부숙용 그린케어, 22년 2월)

- 해당 제품들의 경우 개발 과정에서 출원한 특허가 등록 및 출원 되었다(그림 51; 급여용: 10-2350434-00-00; 분무용: 10-2350413-00-00, 부숙촉진제[출원]: 10-2021-0172737).

특허증
 CERTIFICATE OF PATENT
 특허 제 10-2350434 호
 발명자: (주)진바이오텍
 발명자명: 김용래

특허증
 CERTIFICATE OF PATENT
 특허 제 10-2350413 호
 발명자: (주)진바이오텍
 발명자명: 김용래

출원번호통지서
 출원일: 2019.10.31
 특허사: 심사청구(우) 공개신청(우)
 출원번호: 10-2019-0137839 (출원번호 1-1-2019-1118242-14)
 출원명: (주)진바이오텍(1-2000-033878-4)
 대리인명: 프렌즈(9-2013-000681-1)
 발명자명: 이찬호 김성진 조원석 조원석 조원석
 발명자명: 이찬호 김성진 조원석 조원석 조원석

출원번호통지서
 출원일: 2020.10.22
 특허사: 심사청구(우) 공개신청(우)
 출원번호: 10-2020-0137902 (출원번호 1-1-2020-1123619-54)
 출원명: (주)진바이오텍(1-2000-033878-4)
 대리인명: 프렌즈(9-2013-000681-1)
 발명자명: 이찬호 김성진 조원석 조원석 조원석
 발명자명: 이찬호 김성진 조원석 조원석 조원석

출원번호통지서
 출원일: 2021.12.06
 특허사: 심사청구(우) 공개신청(우)
 출원번호: 10-2021-0172737 (출원번호 1-1-2021-1409732-70)
 출원명: (주)진바이오텍(1-2000-033878-4)
 대리인명: 프렌즈(9-2013-000681-1)
 발명자명: 이찬호 김성진 조원석 조원석 조원석
 발명자명: 이찬호 김성진 조원석 조원석 조원석

그림 51. 특허 출원 및 등록증

(좌) 급여용 약취저감제 (중) 분무용 약취저감제 (우) 분뇨 부숙 촉진제

- 표 34. 개발 제품의 경제성 평가

	권장 용법	판가 (원/kg)	비고
급여용 제품			
"클린바이오프리미엄산"	1t당 1kg 혼합	3,000	t당 3,000원
"S" 사 "C" 제품	1t당 200g 혼합	18,000	t당 3,600원
"H" 사 "A" 제품	1t당 250g 혼합	18,700	t당 4,675원
분무용 제품			
"클린케어"	200L당 1kg 희석	15,000	L당 75원
"E" 사 "B" 제품	200L당 1kg 희석	20,000	L당 100원
부숙용 제품			
"그린케어"	1t당 100g 혼합	7,000	t당 700원
"S" 사 "C" 제품	1t당 100g 혼합	18,000	t당 1,800원
"H" 사 "A" 제품	1t당 200g 혼합	18,700	t당 1,870원

출처: 나라장터 종합쇼핑몰시스템의 상품상세정보

SDG (Sustainable development goals) 실현을 위한 축산 농가별 맞춤형 약취저감 솔루션



- 기존 계획에 포함되어 있던 급여용 및 분무용 약취 저감제에 이어 퇴액비 부숙 촉진용 약취저감제를 개발함으로써 환경을 위해 전산업에서 지향하고 있는 SDG (sustainable development goals) 실현에 일조할 수 있을 것으로 기대된다.

(2) 정량적 연구개발성과

○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전 자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마 커개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		3	4		3		5			
1차 년도	목표	3	2				2			
	실적	3	3				3			
2차 년도	목표		2		1		1			
	실적	2	2		1		3			
3차 년도	목표				1		1			
	실적		1		1		1			
4차 년도	목표				1		1			
	실적				1		1			
계	목표	3	4		3		5			
	실적	5	6		3		8			

○ 나. 기타 성과목표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 1재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인 력양 성	정책 활용홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치																				
최종 목표	3	3				3	1,3 37	12 5	1			5	1	1.5	5	2	2			
1차 년도									1						1					
2차 년도	1					1						1		1.5	2					
3차 년도	1					1						2		1.5	1			1		
4차 년도	1	1				1	46					2		1.5	2	1		1		
소 계	3	1				3	46		1			5	1	1.5	5	2		2		
종 료 1년		1					184	0												
종 료 2년		1					277	21												
종 료 3년							369	52												
종 료 4년							461	52												
소 계 합 계	3	3				3	1,3 91	12 5	1			5	1	1.5	5	2		2		

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[미생물유전체사업 성과]

□ 전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S11	주관기관에서 선발한 약취저감 능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함.	18.11.05	IGEM:185	0.004
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> G10	주관기관에서 선발한 약취저감 능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함.	18.11.05	IGEM:186	0.004
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> SK151	김치에서 분리한 유용 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 통한 세포흡착과 관련된 유전자 및 비타민 생합성관련 유전자군이 존재함을 확인함	18.06.28	NCBI: CP030105.1 NABIC:NG-107 6 IGEM:183	0.003
4	<i>Lactobacillus brevis</i> M10	주관기관에서 선발한 약취저감 능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함	19.10.14	IGEM:511	0.003
5	<i>Lactobacillus reuteri</i> RTR	주관기관에서 선발한 약취저감 능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함	19.10.14	IGEM:516	0.002

□ 유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GB-601	약취저감능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함	18.10.30	KCCM 12353P	0.004
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GB-602	약취저감능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함	18.10.30	KCCM 12354P	0.004
3	<i>Lactobacillus Brevis</i> GB-603	약취저감능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함	18.10.30	KCCM 12355P	0.003
4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> GB-V04	약취저감능이 우수한 미생물의 기탁	19.10.24	KCCM1261 2P	0.002
5	<i>Bacillus velezensis</i> GB-V07	약취저감능이 우수한 미생물의 기탁	19.10.24	KCCM1261 3P	0.003
6	<i>Bacillus subtilis</i> GB-BS-2020	약취저감능이 우수한 미생물의 기탁	20.09.23	KFCC1186 8P	

□ 표준유전체 해독

- 해당사항 없음

□ 메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	예비선발균주를 급여한 돼지 분변유래의 16S rRNA gene을 타겟으로 한 미생물군집 분석	주관기관에서 선발한 기능성 균주를 급여한 돼지의 분변으로부터 gDNA를 추출하여, 16S rRNA gene을 타겟으로 하여 미생물 군집 분석을 실시함	19.10.14	IGEM:518	2.5
2	예비선발균주를 급여한 육성돈 분변유래의 16S rRNA gene을 타겟으로 한 미생물군집 분석	주관기관에서 선발한 기능성 균주를 급여한 육성돈의 분변으로부터 gDNA를 추출하여, 16S rRNA gene을 타겟으로 하여 미생물 군집 분석을 실시함	20.07.16	IGEM:1507	5.6
3	선발균주를 급여한 육성돈 분변유래의 16S rRNA gene을 타겟으로 한 미생물군집 분석	주관기관에서 선발한 균주를 급여한 육성돈 분변으로부터 gDNA를 추출하여, 16S rRNA gene을 타겟으로 하여 미생물 군집 분석을 실시함	21.10.25	KBRS20211229_0000001~KBRS20211229_0000060	5.5

□ 유전체 분석기술 개발

- 해당사항 없음

□ NABIC 등록

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S11	주관기관에서 선발한 약취저감 능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함.	18.11.05	IGEM:185	0.004
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> G10	주관기관에서 선발한 약취저감 능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함.	18.11.05	IGEM:186	0.004
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> SK151	김치에서 분리한 유용 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 통한 세포흡착과 관련된 유전자 및 비타민 생합성관련 유전자군이 존재함을 확인함	18.06.28	NCBI: CP030105.1 NABIC:NG-1076 IGEM:183	0.003
4	<i>Lactobacillus brevis</i> M10	주관기관에서 선발한 약취저감 능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함	19.10.14	IGEM:511	0.003
5	<i>Lactobacillus reuteri</i> RTR	주관기관에서 선발한 약취저감 능이 우수한 미생물의 유전체 분석(PacBio RSII)을 완료함	19.10.14	IGEM:516	0.002
6	예비선발균주를 급여한 돼지 분변유래의 16S rRNA gene을 타겟으로 한 미생물군집 분석	주관기관에서 선발한 기능성 균주를 급여한 돼지의 분변으로부터 gDNA를 추출하여, 16S rRNA gene을 타겟으로 하여 미생물 군집 분석을 실시함	19.10.14	IGEM:518	2.5
7	예비선발균주를 급여한 육성돈 분변유래의 16S rRNA gene을 타겟으로 한 미생물군집 분석	주관기관에서 선발한 기능성 균주를 급여한 육성돈의 분변으로부터 gDNA를 추출하여, 16S rRNA gene을 타겟으로 하여 미생물 군집 분석을 실시함	20.07.16	IGEM:1507	5.6
8	선발균주를 급여한 육성돈 분변유래의 16S rRNA gene을 타겟으로 한 미생물군집 분석	주관기관에서 선발한 균주를 급여한 육성돈 분변으로부터 gDNA를 추출하여, 16S rRNA gene을 타겟으로 하여 미생물 군집 분석을 실시함	21.10.25	KBRS20211229_0000001~KBRS20211229_0000060	5.5

□ 병원성미생물진단마커 개발

- 해당사항 없음

병원성미생물 정보 완성

- 해당사항 없음

미생물 병발생 기작 규명

- 해당사항 없음

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	권수	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Complete genome sequence of <i>Lactobacillus plantarum</i> SK151 isolated from kimchi	Korean Journal of Microbiology	아모란 토미아	54	대한민국	The Microbiological Society of Korea	비SCIE	18.07.23	0440-2413	100
2	동결건조한 <i>Lactobacillus fermentum</i> SK152 균주의 생존율에 미치는 동결보호제의 효과	Journal of Milk Science and Biotechnology	김상훈	37	대한민국	한국유가공학회	비SCIE	19.09.30	2384-0269	100
3	Effect of probiotics containing <i>Lactobacillus planetarium</i> on growth performance, nutrient digestibility, fecal microbiota in weaning pigs	Canadian Journal of Animal Science	양이	100	캐나다	Canadian science publishing	SCI	20.03.01	0008-3984	100
4	Association between the body weight of growing pigs and the functional capacity of their gut microbiota	Animal Science Journal	오주경	91	일본	Japanese Society of Animal Science	SCI	20.05.26	1344-3941	50
5	Effects of probiotics containing (<i>Lactobacillus planetarium</i>) and chlortetracycline on growth performance, nutrient digestibility, fecal microflora, diarrhea score and fecal gas emission in weaning pigs	Livestock Science	양이	241	네덜란드	ELSEVIER	SCI	20.08.02	1871-1413	100
6	<i>Cudrania tricuspidata</i> Combined with <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Modulate Gut Microbiota and Alleviate Obesity-Associated Metabolic Parameters in Obese Mice	Microorganisms	오주경	9	스위스	MDPI journals	SCI	21.09.03	2076-2607	100
7	Multispecies probiotics alter fecal short-chain fatty acids and lactate levels in weaned pigs by modulating gut microbiota	Journal of Animal Science and Technology	오주경	63	대한민국	Korean Society Animal Science & Technology	SCI	21.07.27	2055-0391	50
8	Inclusion of probiotic (<i>Lactobacillus plantarum</i>) in high- and low-nutrient-density diets reveals a positive result	Canadian Journal of Animal Science	베트리 셸비 삼 파스	101	캐나다	Canadian science publishing	SCI	21.05.22	0008-3984	100

on the growth performance, nutrient digestibility, gas emission, and blood profile in growing pigs									
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국유가공학회 정기 학술대회 및 심포지엄	아모란토 미아	18.05.11	숙명여자대학교 삼성 컨벤션센터	대한민국
2	제10회 아시아유산균 학회 (ACLAB10)	오주경	19.08.29	Universitas Gadjah Mada	인도네시아
3	The 17 th Australasian pig science association(APSA) 2019 conference	후징	19.11.19	Hilton Adelaide, Australia	오스트레일리아
4	2020년 한국미생물·생명공학회 정기학술대회	아모란토 미아	20.09.23	e-Conference	대한민국
5	2020년 한국축산학회 종합 심포지엄 및 학술대회	송준호	20.08.28	e-Conference	대한민국
6	2021 한국미생물생명공학회 정기학술대회	로비 바스케즈	21.06.23	부산	대한민국
7	2021 엠바이옴 학회 iMAF 성과 구두 발표	강정선	21.12.10	연세대학교	대한민국
8	2021 엠바이옴 학회 iMAF 성과 포스터	강정선	21.12.10	연세대학교	대한민국

□ 기술 요약 정보

- 해당사항 없음

□ 보고서 원문

- 해당사항 없음

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> S11	IGEM:185	NABIC	18.11.05
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> G10	IGEM:186	NABIC	18.11.05
3	<i>Lactobacillus brevis</i> M10	IGEM:511	NABIC	19.10.14
4	<i>Lactobacillus reuteri</i> RTR	IGEM:516	NABIC	19.10.14
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> SK151	NCBI: CP030105.1 NABIC:NG-1076 IGEM:183	NABIC	18.06.28
6	예비선발균주를 급여한 돼지 분변유래의 16S rRNA gene을 타겟으로 한 미생물군집 분석	IGEM:518	NABIC	19.10.14
7	예비선발균주를 급여한 육성돈 분변유래의 16S rRNA gene을 타겟으로 한 미생물군집 분석	IGEM:1507	NABIC	20.07.16
8	선발균주를 급여한 육성돈 분변유래의 16S rRNA gene을 타겟으로 한 미생물군집 분석	KBRS20211229_0000001~KBRS20211229_0000060	KOBIC	21.10.25

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	축산 약취 저감용 조성물	대한민국	㈜진바이 오텍	19.10.3 1	10-2019- 0137839	-	㈜진바이 오텍	22.01.07	10-2350 434	100	√
2	축산 약취 저감 분무용 조성물	대한민국	㈜진바이 오텍	20.10.2 2	10-2020- 0137902	-	㈜진바이 오텍	22.01.07	10-2350 413	100	√
3	가축 분뇨 부숙 촉진용 조성물	대한민국	㈜진바이 오텍	21.12.0 6	10-2021- 0172737	-	-	-	-	100	√

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									√

저작권(소프트웨어, 서적 등)

- 해당사항 없음

신기술 지정

- 해당사항 없음

기술 및 제품 인증

- 해당사항 없음

표준화

- 해당사항 없음

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	크린바이오프리미엄산	2019년	㈜진바이오텍	㈜진바이오텍	급여용 약취저감제	3년		
2	클린케어	2020년	㈜진바이오텍	㈜진바이오텍	분무용 약취저감제	3년	한국화학융합시험연구원	21.08.05
3	그린케어	2021년	㈜진바이오텍	㈜진바이오텍	부숙용 약취저감제	3년	판코리아 충남대 농업과학연구소	21.09.10, 21.10.25

기술 실시(이전)

- 해당사항 없음

사업화 투자실적

- 해당사항 없음

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품 개발	국내	급여용 약취저감제 '크린바이오프리미엄산' 제품화	급여용 약취저감제 신제품 개발 및 제품화에 따른 매출액 발생	(주)진바이오텍	49,365	-	2021	5
2	자기실시	특허 출원 및 신제품 개발	국내	약취 저감 및 분뇨 부속용 제품 개발	약취 저감 분뇨 부속용 제품 개발을 위한 특허 출원 하에 해당 기술을 자가 실시함	(주)진바이오텍	-	-	2022	5

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
급여용 약취저감제 '크린바이오프리미엄산' 제품화	2021	49,365	-	49,365	매출에 따른 금액
합계		49,365	-	49,365	매출에 따른 금액

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		급여용 약취저감제 '크린바이오프리미엄산' 매출 분무용 약취저감제 '클린케어' 매출 퇴액비 부속 촉진제 '그린케어' 매출			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	5			
	소요예산(천원)	1,335,000			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		49,365	1,291,000	-	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
			국내	5	10
국외			-	1	1
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		분무용 약취저감제 '클린케어' 및 부속용 약취저감제 '그린케어' 개발 등에 따른 매출			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
		-	-	-	
	수출	-	-	-	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2017년	2020년	
1	유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 약취개선 기능성 미생물 제제 개발	(주)진바이오텍	1 (직접 고용)	4 (간접 고용)	5
합계			1	4	5

고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	5
		생산인력	15
	개발 후	연구인력	10
		생산인력	15

비용 절감(누적)

- 해당사항 없음

경제적 파급 효과

- 해당사항 없음

산업 지원(기술지도)

- 해당사항 없음

기술 무역

- 해당사항 없음

[사회적 성과]

법령 반영

- 해당사항 없음

정책활용 내용

- 해당사항 없음

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

- 해당사항 없음

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	인력양성	2018		1				1		1				
2	인력양성	2019												
3	인력양성	2020	1	1			1	1		2				
4	인력양성	2021	1					1		1				

산업 기술 인력 양성

- 해당사항 없음

다른 국가연구개발사업에의 활용

- 해당사항 없음

국제화 협력성과

- 해당사항 없음

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	제품 홍보	대외	축산 농가 환경개선을 위한 악취저감 솔루션	20.09.30
2	제품 홍보	피그앤포크	축산 농가 맞춤형 환경개선제 2종 출시	22.01.12

포상 및 수상 실적

- 해당사항 없음

[인프라 성과]

연구시설·장비

- 해당사항 없음

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항

3장 1) 연구수행 결과의 주관연구기관 라. 4차년도

‘**■** 퇴액비 부속 촉진용 악취저감제 ‘그린케어’ 개발’ 참조 (63쪽)

- 최근 전세계적으로 환경에 대한 이슈가 떠오르면서 정부는 가축분뇨 자원화 정책을 추진하고 있으며, 본 과제가 수행되고 있던 시점에서 퇴액비 관리를 강화하는 법령을 시행하여 분뇨 배출시설에 대한 검사 및 퇴비 부속도 검사 의무화 등이 진행됨
 - 이에, 기존 4년간의 연구에서 계획하지 않았으나 축산 농가 맞춤형 환경개선제의 일환으로 퇴액비 부속 촉진용 악취저감제 개발 연구를 수행함
 - 기존 계획에 포함되어 있던 급여용 및 분무용 악취 저감제에 이어 퇴액비 부속 촉진용 악취저감제를 개발함으로써 환경을 위해 전산업에서 지향하고 있는 SDG (sustainable development goals) 실현에 일조할 수 있을 것으로 기대됨
-

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 약취 저감 우수 미생물 및 천연물을 활용한 기능성 사료첨가제 및 분무용 미생물제제 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 축산 약취 저감 미생물 및 천연물 소재를 선별하여 이를 검증함 ○ 축산 약취 저감 최적 기능성 사료첨가제를 개발함 ○ 기능성 사료첨가제를 제품화하여 대량생산하였고 분무용 미생물제제를 개발함 ○ 시제품의 대량생산 기술을 확립하고 이를 제품화하여 저장안정성 등의 품질을 평가함 	100
○ 유용미생물의 유전체 분석 및 장내균총과 대사체 분석을 통한 기작 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용미생물의 유전체를 확보하였고 유용유전자를 발굴함 ○ 선발균주를 급여한 돼지의 장내균총을 분석함 ○ 선발균주를 급여한 돼지의 대사체를 분석함 ○ 복합미생물제제를 급여한 돼지의 장내균총 및 대사체를 분석함 	100
○ 약취 저감 미생물 제제의 사양효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유용미생물 급여 돼지 사양평가를 수행함 ○ 선발 균주를 이용한 복합 균주의 사양평가를 수행함 ○ 사료 내 단백질 수준에 따른 기능성 사료첨가제의 효과를 규명함 ○ 사료첨가제 및 분무형 미생물제제 복합사용을 통한 사양평가를 수행함 	100

IV. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 해당사항 없음

2) 자체 보완활동

- 해당사항 없음

3) 연구개발 과정의 성실성

-
- COVID-19로 인하여 제한된 이동과 교류에도 성실히 연구개발을 수행하여 연차별로 설정한 목표를 모두 달성함
 - 설정한 목표에 더하여 축산 농가 맞춤형 환경개선제의 일환으로 퇴액비 부속 축진용 악취저감제 개발 연구 또한 수행함
-

V. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

-
- 미생물 유전체 분석 프로세스 및 대사체 분석을 통한 유전체 분석 기반 환경개선용 미생물 제품 개발 원천 기술 확보
 - 유전체 분석 기반 양돈장 환경개선 미생물 제품 개발 기술의 전축종 확대 실현으로 축산 악취저감 환경개선 및 지속가능한 축산 실현
 - 질병 예방 및 환경 관리 등의 맞춤형 프로그램 구축을 통한 축산 환경관리 시스템 구현
 - 분뇨처리비 감소 및 민원 문제 해결, 생산성 개선으로 국내 축산 경쟁력 강화
 - 향후 미생물 연구 활용 가능 데이터베이스 구축 기반 데이터 확보
 - 우수 균주를 이용한 기능성 사료첨가제 및 축산환경개선용 미생물제제 개발을 통해 악취저감 및 가축분뇨 처리 효율 개선에 기여
 - 천연물을 활용한 환경개선제 개발을 통해 축산악취를 제거함으로써 친환경 축산을 실현하고 환경개선 효과 및 삶의 질 향상
 - 악취저감 미생물 제제를 급여한 돼지의 대사체 변화 분석결과, 돼지의 장건강에 기여하는 유기산의 함량이 증가하며 Proteobacteria를 비롯한 병원성 세균이 유기산과 음의 상관관계를 나타냄에 따라 돼지 장내의 유해균을 억제하고 장건강을 개선시킬 것으로 기대됨
 - 장내균총 분석결과 선발한 균주 급여구에서 유산균을 비롯해 유익균으로 알려진 균의 풍부도가 증가하며, 잠재적 유해균의 풍부도가 감소함에 따라 선발균주가 돼지의 건강 및 생산성에 긍정적인 영향을 끼칠 것으로 기대됨
 - PICRUSt를 이용한 function 분석결과 지정악취물질에 속하는 암모니아, 황화수소를 비롯하여 skatole과 benzoate 같은 악취 물질을 감소시키는 유전자의 발현증가를 통해 악취관련 민원해결, 축사의 근로자 및 가축의 건강을 지키는데 기여할 것으로 기대됨
-

VI. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 유전체 분석을 통해 확보한 악취저감 유용유전자의 발현 증가 및 이종발현을 통한 응용이 가능할 것으로 사료됨
 - 본 연구를 통해 악취억제기작이 유추된 선발균주를 다른 성장시기의 돼지 및 축종에 급여하는 추가연구를 통해 적용범위의 확대가 기대됨
 - 황화수소 억제능을 가진 것으로 확인된 균주의 유전자 발현 분석 결과, 황 화합물의 감소가 균주간의 상호작용을 통한 복합적인 기작에 의해 이루어지고 있으며, 2022년 7월부터 탄소 중립을 위한 사료 내 질소원 저감 정책 (CP 1~3% 저감)에 따라 생체 내 질소 이용률 증대를 위한 추가 연구가 필요함
 - 종료 후 급여용, 분무용 악취 저감제와 퇴·액비 부숙 촉진제 제품에 대한 매출 확대 및 출원 특허의 등록을 위해 노력 할 예정
-

붙임. 참고문헌

1. Yoshida, N & Yoshida, Shosei & Koishi, K & Masuda, K & Nabeshima, Y.-I. (1998). Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: Down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'. *Journal of cell science*. 111 (Pt 6). 769-79.
2. Peter S. Zammit, Frederic Relaix, Yosuke Nagata, Ana Pérez Ruiz, Charlotte A. Collins, Terence A. Partridge and Jonathan R. Beauchamp. (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science* 119, 1824-1832
3. Littlejohn M, Grala T, Sanders K, Walker C, Waghorn G, Macdonald K, Coppieters W, Georges M, Spelman R, Hillerton E, Davis S, Snell R. Genetic variation in PLAG1 associates with early life body weight and peripubertal weight and growth in *Bos taurus*. *Anim Genet*. 2012 Oct;43(5):591-4.
4. Kim, Sang-Wook & Lee, Jun-Heon & Kim, Jin-Ho & Won, You-Seog & Kim, Nae-Soo & Kim, Kwan Suk. (2010). Effect of the Fatty Acid Synthase Gene for Beef Quantity Traits in Hanwoo Breeding Stock. *Journal of Animal Science and Technology*. 52. 9-16.
5. Wells, L., Edwards, K. A., & Bernstein, S. I. (1996). Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *The EMBO journal*, 15(17), 4454-4459.
6. Lex B. Verdijk, Tim Snijders, Maarten Drost, Tammo Delhaas, Fawzi Kadi & Luc J. C. van Loon. (2014). Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *AGE* 36, 545-557
7. Yamakawa H, Kusumoto D, Hashimoto H, Yuasa S. (2020). Stem Cell Aging in Skeletal Muscle Regeneration and Disease. *Int J Mol Sci*. 21(5):1830
8. Peter S. Zammit, Frederic Relaix, Yosuke Nagata, Ana Pérez Ruiz, Charlotte A. Collins, Terence A. Partridge, Jonathan R. Beauchamp. (2006). Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *Journal of Cell Science* 2006, 119: 1824-1832
9. M. Lotfi, M. Nejib and M. Naceur. (2012). Cell Adhesion to Biomaterials: Concept of Biocompatibility
10. Eibes, G., dos Santos, F., Andrade, P. Z., Boura, J. S., Abecasis, M. M., da Silva, C. L., & Cabral, J. M. (2010). Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *Journal of Biotechnology*, 146(4), 194-197
11. Xu-Bo Wu, Cheng-Hong Peng, Fang Huang, Jie Kuang, Song-Lin Yu, Ya-Dong Dong, Bao-San Han, Preparation and characterization of chitosan porous microcarriers for hepatocyte culture, *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, Volume 10, Issue 5, 2011, Pages 509-515, ISSN 1499-3872
12. Choi KH, Lee DK, Kim SW, Woo SH, Kim DY, Lee CK. Chemically Defined Media Can

- Maintain Pig Pluripotency Network In Vitro. *Stem Cell Reports*. 2019 Jul 9;13(1):221–234.
13. Choi KH, Lee CK. Pig Pluripotent Stem Cells as a Candidate for Biomedical Application. *J Anim Reprod Biotechnol*. 2019 Sep;34(3):139–147.
 14. Choi KH, Lee DK, Oh JN, Kim SH, Lee M, Kim SW, Lee CK. Transcriptome profiling of pluripotent pig embryonic stem cells originating from uni- and biparental embryos. *BMC Res Notes*. 2020 Mar 11;13(1):144.
 15. Choi KH, Lee DK, Oh JN, Kim SH, Lee M, Woo SH, Kim DY, Lee CK. Pluripotent pig embryonic stem cell lines originating from in vitro-fertilized and parthenogenetic embryos. *Stem Cell Res*. 2020 Nov 19;49:102093.
 16. Chal J, Pourquie O. Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development*. 2017 Jun 15;144(12):2104–2122.
 17. Friedrichs M, Wirsdoerfer F, Flohe SB, Schneider S, Wuelling M, Vortkamp A. BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. *PLoS One*. 2010 Jan 1;5(1):e8523.
 18. Choi KH, Yoon JW, Kim M, Lee HJ, Jeong J, Ryu M, Jo C, Lee CK. Muscle stem cell isolation and in vitro culture for meat production: A methodological review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2021 Jan;20(1):429–457.
 19. Jeong J, Choi KH, Kim SH, Lee DK, Oh JN, Lee M, Lee CK. Myogenic Transdifferentiation of Pig Fibroblasts Using the Porcine MYOD1 Inducible Vector. 2020. DOI: 10.21203/rs.3.rs-102478/v1
 20. AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis AOAC International*. 20th ed. AOAC International. Washington DC, USA
 21. Folch J, Lees M, Stanley GHS. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *J Biol Chem*. 226(1): 497
 22. Choi KH, Yoon JW, Kim M, Jeong J, Ryu M, Park S, Lee CK. (2020). Optimization of Culture Conditions for Maintaining Pig Muscle Stem Cells in Vitro. *Food Sci Anim Resour*. 40(4): 659
 23. Choi KH, Kim M, Yoon JW, Jeong J, Ryu M, Jo C, Lee CK (2020). Purification of Pig Muscle Stem Cells Using Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS) Based on the Expression of Cluster of Differentiation 29 (CD29). *Food Sci Anim Resour*. 40(5): 852
 24. C Detsch, J Stülke (2003). Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology*. 149(Pt 11): 3289–3297.
 25. RE Ley, F Bäckhed, P Turnbaugh, CA. Lozupone, RD. Knight, JI Gordon (2005). Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(31): 11070–11075.
 26. T Läheteinen, T Rinttilä, JMK Koort, R Kant, K Levonen, MJ Viljanen, J Björkroth, Airi (2015). Effect of a multispecies lactobacillus formulation as a feeding supplement on the performance and immune function of piglets. *Livestock Science* 180: 164–171.
 27. NW Jaworski, HH Stein (2017). Disappearance of nutrients and energy in the stomach and small intestine, cecum, and colon of pigs fed corn-soybean meal diets containing

- distillers dried grains with solubles, wheat middlings, or soybean hulls. *J Anim Sci.* 95(2) 727–739
28. NA Cornick, NS Jensen, DA Stahl, PA Hartman, MJ Allison (1994). *Lachnospira pectinoschiza* sp. nov., an Anaerobic Pectinophile from the Pig Intestine. *Int J Syst Bacteriol.* 44(1): 87–93
 29. EAB Pajarillo, Chae JP, MP Balolong, Kim HB, Seo KS, Kang D–K (2015). Characterization of the Fecal Microbial Communities of Duroc Pigs Using 16S rRNA Gene Pyrosequencing. *Asian–Australas J Anim Sci.* 28(4): 584–91.
 30. M Bergamaschi, F Tiezzi, J Howard, YJ Huang, KA Gray, C Schillebeeckx, NP McNulty, C Maltecca (2020). Gut microbiome composition differences among breeds impact feed efficiency in swine. *Microbiome.* 8(1):110.
 31. Oh JK, Chae JP, E Alain, Kim SH, Kwak MJ, Eun JS, Chee SW, Whang KY, Kim SH, Kang D–K (2020). Association between the body weight of growing pigs and the functional capacity of their gut microbiota. *Ani Sci J.* 91(1): e13418
 32. H Mullish, A Pechlivanis, F Barker, R Thursz, R Marchesi, AK McDonald (2018). Functional microbiomics: Evaluation of gut microbiota–bile acid metabolism interactions in health and disease. *Methods.* 149(1): 49–58
 33. L Jing, SHA Raza, K Shasha, C Cheng, Y Min, W Yanyan, W Sihu, M Xi, Z Wen–ju, N Cunxi (2020). Effect of *Clostridium butyricum* on Plasma Immune Function, Antioxidant Activity and Metabolomics of Weaned Piglets. *Livest Sci.* 241:104267
 34. H Qin, Z Tiande, C Jun, H Jia, J Li, X Fei, Y Jinming, W Zirui (2021). Methyl–Donor Micronutrient for Gestating Sows: Effects on Gut Microbiota and Metabolome in Offspring Piglets. *Front Nutr.* 8:675640
 35. X Ke, A Walker, S–B Haange, I Lagkouvardos, Y Liu, P Schmitt–Kopplin, MV Bergen, N Jehmlich, X He, T Clavel, PCK Cheung (2019). Multi–Omics Profiling of Gut Microbiome under Synbiotic Treatment in High–Fat Diet–Induced Obese Mice. *Mol Metab.* 22:96–109
 36. X Jiaojiao, X Gaomiao, L Xinhua, W Xin, C Zhen, M Baohua, Z Yongde, N Zhang, M Jiandui, W Yan, L Xindi, W Yinbao (2021). Sodium butyrate reduce ammonia and hydrogen sulfide emissions by regulating bacterial community balance in swine cecal content in vitro. *Ecotox Envi Safety.* 226(15):112827
 37. Oh JK, MBC amoranto, Oh NS, Kim S, Lee JY, Oh YN, Shin YK, Yoon Y, Kang D–K (2020). Synergistic effect of *Lactobacillus gasseri* and *Cudrania tricuspidata* on the modulation of body weight and gut microbiota structure in diet–induced obese mice. *Appl Microbiol Biotechnol.* 104(14):6273
 38. Oh JK, V Robie, Hwang IC, Park JH, Kang D–K (2021). Multispecies probiotics alter fecal short–chain fatty acids and lactate levels in weaned pigs by modulating gut microbiota. *J Anim Sci Technol.* 63(5):1142
 39. Jun Z (2000) A review of microbiology in swine manure odor control. *Agri Ecosys Envi.* 78(2):93

40. Y Liu (2015) Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. *J Anim Sci Biotechnol.* 6(1):41
41. JG LeBlanc, F Chain, R Martin, LG Bermudez-Humaran, S Courau, P Langella (2017) Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb Cell Fact.* 16(1):79
42. G Wang, G Zhu, C Chen, Y Zheng, F Ma, J Zhao, Lee Y-K, H Zhang, W Chen (2021) Lactobacillus strains derived from human gut ameliorate metabolic disorders via modulation of gut microbiota composition and short-chain fatty acids metabolism. *Benef Microbes.* 12(3):267
43. C Foditsch, TMA Santos, AGV Teixeira, RVV Pereira, JM Dias, N Gaeta, RC Bicalho (2014) Isolation and Characterization of *Faecalibacterium prausnitzii* from Calves and Piglets. 9(12):e116465
44. L Zhang, M Shi, J Ji, X Hu, F Chen (2019) Gut microbiota determines the prevention effects of *Luffa cylindrica* (L.) Roem supplementation against obesity and associated metabolic disorders induced by high-fat diet. *FASEB J.* 33(9):10339
45. D Zhao, M Feng, L Zhang, B He, X Chen, J Sun (2021) Facile synthesis of self-healing and layered sodium alginate/polyacrylamide hydrogel promoted by dynamic hydrogen bond. *Carbohydr Polym.* 256:117580

< 별첨 자료 >

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발 (영문) Development of microbial product to improve swine farm odor using genomic information of the useful microorganisms		
주관연구기관	(주)진바이오텍		(소속) (주)진바이오텍
참여기업	(주)진바이오텍		주 관 연 구 자 (성명) 강 정 선 총 연 구 기 간 18.04.25 ~ 21.12.31 (45개월)
총연구개발비 (1,335,000천원)	계	1,335,000천원	
	정부출연 연구개발비	995,000천원	
	기업부담금	340,000천원	
	연구기관부담금	0	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <p>“유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발 및 산업화”</p> <ul style="list-style-type: none"> - 악취 저감 우수 미생물 및 천연물을 활용한 기능성 사료첨가제 및 분무용 미생물제제 개발 - 유용미생물의 유전체 분석 및 장내 균총과 대사체 분석을 통한 기작 연구 - 악취 저감 미생물 제제의 사양 효능 평가 <p>[미생물 유전체사업 성과]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전략미생물해독 5건 및 유용유전자원확보 6건 - 메타유전체분석 3건 및 NABIC 등록 8건 <p>[정량적 성과]</p> <ul style="list-style-type: none"> - 특허 출원 3건 및 등록 2건 - 제품화 3건 및 매출액 49,4백만원 - 고용 창출 5건 - SCI 논문 6건 및 비SCI 논문 2건 - 학술발표 8건 - 인력 양성 4건 - 홍보 전시 2건 <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 축산 악취 저감능이 우수한 미생물 선발 및 lab scale 조건 확립 - 대량 생산 공정 확립 및 저장 안정성 평가 - 시제품의 효능 검증 - 유용 미생물의 유전체 분석 및 유용 미생물 급여에 따른 미생물 군집 분석 - 품질 관리 기준 수립(크린바이오프리미엄산, 클린케어, 그린케어) 및 제품화 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - 미생물 유전체 분석 프로세스 및 대사체 분석을 통한 유전체 분석 기반 기술 확보 - 유전체 분석 기반 양돈장 환경개선 미생물 제품 (급여용, 분무용, 퇴·액비 부숙용) 개발 기술의 전출증 확대 실현으로 축산 악취 저감 환경개선 및 지속가능한 축산 실현 - 질병 예방 및 환경 관리 등의 맞춤형 프로그램 구축을 통한 축산 환경관리 시스템 구현 - 분뇨처리비 감소 및 민원 문제 해결, 생산성 개선으로 국내 축산 경쟁력 강화 - 향후 미생물 연구 활용 가능 데이터베이스 구축 기반 데이터 확보 			

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	918001-4		
사업구분	포스트게놈다부처유전체사업				
연구분야	축산 동물사료·사료		과제구분	단위	
사업명	포스트게놈다부처유전체사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발		과제유형	개발	
연구기관	(주)진바이오텍, 단국대학교		연구책임자	강 정 선	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	18.04.25~18.12.31	220,000	76,000	296,000
	2차연도	19.01.01~19.12.31	287,000	100,000	387,000
	3차연도	20.01.01~20.12.31	244,000	82,000	326,000
	4차연도	20.01.01~21.12.31	244,000	82,000	326,000
	계	18.04.25~21.12.31	995,000	340,000	1,335,000
참여기업	(주)진바이오텍				
상대국	해당 없음	상대국연구기관	해당 없음		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022년 02월 10일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)진바이오텍	연구소장	강 정 선

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확 약	
-----	---

I. 연구개발실적

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

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : 매우 우수

본 연구는 유용 미생물 및 유전체 정보를 활용하여 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제를 개발하고 산업화하기 위해 수행됨. 본 연구를 통해 악취 저감능이 우수한 미생물 및 천연물들을 선발하였고 이에 대해 동물과 돈사에 적용하는 사양실험을 수행함. 또한, 유전체, 장내균총, 대사체 등을 분석하여 미생물제의 효능을 평가함. 이들을 접목시키는 기술로 기존의 단기간 일회성에 그치는 악취저감제가 아닌 미생물 제어 기술을 활용한 농가별 맞춤형 환경 개선 솔루션 제품들을 생산하였으므로 연구개발결과가 매우 우수하다 사료됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수

해당 연구를 통해 우수 균주를 이용한 기능성 사료첨가제 및 축산환경개선용 미생물제제를 개발하였고 악취 저감과 가축 분뇨 처리의 효율을 개선할 수 있을 것으로 기대됨. 천연물을 활용한 환경개선제 개발을 통해 축산악취를 제거함으로써 친환경 축산을 실현하고 환경개선 효과 및 삶의 질을 향상시킬 수 있을 것으로 기대됨. 또한, 악취 저감 미생물 제제의 사양 효능을 평가하여 실제 양돈농가에 적용하였으므로 악취로 인한 민원을 감소시킬 수 있을 것임

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : 우수

미생물 유전체 분석 프로세스 및 대사체 분석을 통한 유전체 분석 기반 환경개선용 미생물 제품 개발 원천 기술 확보했고, 유전체 분석 기반 양돈장 환경개선 미생물 제품 개발 기술의 전축종 확대 실현으로 축산 악취 저감 환경개선 및 지속가능한 축산 실현이 가능함. 또한, 질병 예방 및 환경 관리 등의 맞춤형 프로그램 구축을 통한 축산 환경관리 시스템 구현을 기대할 수 있고, 분뇨처리비 감소 및 민원 문제 해결, 생산성 개선으로 국내 축산 경쟁력 강화시킬 수 있음

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : 매우 우수

기존 계획했던 연구계획서 상의 정성적 및 정량적 연구개발 성과 지표를 모두 만족시켰고, 계획에 없던 부속 촉진용 악취저감제를 추가 연구하여 제품화를 이루어냄

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 매우 우수

논문 (SCI 및 비SCI)을 비롯해 국내외 학술 발표 등의 성과에서 총 연구년도의 목표치를 초과하는 성과를 달성했음. 또한, 제품 관련 특허 출원 및 등록을 진행하였고 제품화를 통해 실제 매출액을 발생시키는 등 다양한 우수 성과를 도출하였음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
○ 축산 약취 저감 미생물 및 천연물 소재 선발 및 검증	10	100	- 축산 약취 저감 미생물 및 천연물 소재를 선발하여 이를 검증함
○ 축산 약취 저감용 최적 기능성 사료첨가제 개발	10	100	- 축산 약취 저감 최적 기능성 사료첨가제를 개발함
○ 기능성 사료첨가제 대량생산 및 분무용 미생물제제 개발	10	100	- 기능성 사료첨가제를 제품화하여 대량생산하였고 분무용 미생물제제를 개발함 - 계획하지 않았으나 부속 촉진용 미생물제제를 추가 개발함
○ 시제품의 대량생산 기술 확립, 품질 모니터링 기술 확보	10	100	- 시제품의 대량생산 기술을 확립하고 이를 제품화하여 저장안정성 등의 품질을 평가함
○ 유용미생물의 유전체 확보 및 유용유전자 발굴	10	100	- 유용미생물의 유전체를 확보하였고 유용유전자를 발굴함
○ 선발균주를 급여한 돼지의 장내균총 및 대사체 분석	10	100	- 선발균주를 급여한 돼지의 장내균총 및 대사체를 분석함
○ 복합미생물제제를 급여한 돼지의 장내균총 및 대사체 분석	10	100	- 복합미생물제제를 급여한 돼지의 장내균총 및 대사체를 분석함
○ 선발 미생물을 이용한 복합 미생물제제(2종)의 첨가수준별 사양평가	10	100	- 선발 미생물을 이용한 복합 미생물제제의 첨가수준별 사양평가를 수행함
○ 사료 내 단백질 수준에 따른 기능성 사료첨가제의 효과 규명	10	100	- 사료 내 단백질 수준에 따른 기능성 사료첨가제의 효과를 규명함
○ 사료첨가제 및 분무형 미생물제제 복합사용을 통한 사양평가	10	100	- 사료첨가제 및 분무형 미생물제제 복합사용을 통한 사양평가를 수행함
합계	100	100	

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구는 유용 미생물 및 유전체 정보를 활용하여 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제를 개발하고 산업화하기 위해 수행되었다. 본 연구를 통해 악취 저감능이 우수한 미생물 및 천연물들을 선별하였고 이에 대해 동물과 돈사에 적용하는 사양실험을 수행하였다. 또한, 유전체, 장내균총, 대사체 등을 분석하여 미생물제의 효능을 평가하는 기술을 접목시켜 기존의 단기간 일회성에 그치는 악취저감제가 아닌 미생물 제어 기술을 활용한 농가별 맞춤형 환경 개선 솔루션 제품들을 생산하였으므로 연구개발결과가 매우 우수하다고 사료된다. 본 기술을 활용하여 축산업이 해결해야 하는 악취 저감 및 분뇨 처리 문제 해결에 일조할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

본 연구를 통해 연구기간 내 계획하였던 정성 및 정량성 성과를 모두 달성하였다. 정성적으로는 기존 계획에 없던 부속 축진용 악취저감제를 추가 연구하여 제품화를 이뤄냈다. 정량적으로는 논문을 비롯해 국내외 학술발표 등의 성과는 목표치를 초과 달성하였고, 제품 관련 핵심 기술 출원 특허들을 등록하였으며, 제품화를 통해 실제 매출액을 발생시켰다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구로 우수 균주를 활용한 기능성 사료첨가제 및 축산환경개선용 미생물제제를 개발하였다. 미생물 유전체 분석 프로세스 및 대사체 분석을 통한 제품 개발 원천 기술을 확보하여 개발된 미생물제제를 제품화 후 실제 농가와 대학 농장에 적용했고 공인인증기관으로부터 효능을 검증 받았다. 본 연구개발기술을 양돈 분야에 국한한 것이 아닌 여러 축종으로 확대 적용하여 축산업의 악취 저감 및 가축 분뇨 처리 효율을 개선하는 데 사용할 수 있도록 할 예정이다. 또한, 2022년 7월부터 탄소 중립을 위한 사료 내 질소원 저감 정책 (CP 1~3% 저감)에 따라 생체 내 질소 이용률 증대를 위한 추가적인 연구가 필요하다고 판단되며 후속 연구를 통해 보유 기술을 업그레이드하여 농가별 맞춤형 환경 개선 솔루션 제품들을 출시하고 매출액을 발생시킬 예정이다.

IV. 보안성 검토

- 해당사항 없음

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

- 해당사항 없음

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

- 해당사항 없음

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	축산 동물사료 · 사육	
연구과제명	유용 미생물 및 유전체 정보를 활용한 양돈장 악취개선 기능성 미생물제제 개발			
주관연구개발기관	(주)진바이오텍		주관연구책임자	강정선
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	995,000	340,000	0	1,335,000
연구개발기간	2018.04-2021.12			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(제품화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 악취 저감 우수 미생물 및 천연물을 활용한 기능성 사료첨가제 및 분무용 미생물제제 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 축산 악취 저감 미생물 및 천연물 소재를 선 발하여 이를 검증함 - 축산 악취 저감 최적 기능성 사료첨가제를 개발함 - 기능성 사료첨가제를 제품화하여 대량생산하 였고 분무용 미생물제제를 개발함 - 계획하지 않았으나 부속 촉진용 미생물제제 를 추가 개발함 - 시제품의 대량생산 기술을 확립하고 이를 제 품화하여 저장안정성 등의 품질을 평가함
② 유용미생물의 유전체 분석 및 장내균총과 대 사체 분석을 통한 기작 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 유용미생물의 유전체를 확보하였고 유용유전 자를 발굴함 - 선발균주를 급여한 돼지의 장내균총 및 대사 체를 분석함 - 복합미생물제제를 급여한 돼지의 장내균총 및 대사체를 분석함
③ 악취 저감 미생물 제제의 사양 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 선발 미생물을 이용한 복합 미생물제제의 첨 가수준별 사양평가를 수행함 - 사료 내 단백질 수준에 따른 기능성 사료첨 가제의 효과를 규명함 - 사료첨가제 및 분무형 미생물제제 복합사용 을 통한 사양평가를 수행함

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용액) (명)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논 문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	명	건				
가중치																				
최종 목표	3	3				3	1,337	125	1			5	1	1.5	5		2	2		
1차 년도	목표								1							1				
	실적								1				1		1					
2차 년도	목표	1				1						1	1	1.5	2					
	실적	1				1						1	1	0.85	2					
3차 년도	목표	1				1						2		1.5	1			1		
	실적	1				1			4			2		1.42	2	2		1		
4차 년도	목표	1	1			1	46					2		1.5	2	1		1		
	실적	1	2			1	49.4					3		2.28	3	1		1		
소계	3	2				3	49.4		5			6	2	1.75	8		4	2		
달성률 (%)	100	100				100	100		100			100	100	100	100		100	100		

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	유용 균주 스크리닝 및 균주 대량 배양 기술
②	돈사 분무용 약취 저감 및 분뇨 부숙용 복합 미생물 제제 개발 기술

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		V		V		V	V			
②의 기술		V				V	V			

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	유용 균주 스크리닝 및 균주 대량 배양 기술을 활용한 심화 연구
②의 기술	돈사 분부용 약취 저감 및 분뇨 부숙용 복합 미생물 제제 개발 기술을 활용한 제품 출시 및 판매

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표										
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)		
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시	
											SCI		비 SCI	논 문 평 균 I F							
단위	건	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건				
가중치			-	-	-	-				-	-				-		-	-			
최종목표	3	3	-	-	-	-	3	1,337	125	1	-	-	5	1	1.5	5	-	2	-	2	-
연구기간내 달성실적	3	2	-	-	-	-	3	49.4	-	5	-	-	6	2	1.75	8	-	4	-	2	-
연구종료후 성과창출 계획	0	1	-	-	-	-	0	1,291	125	0	-	-	0	0	0	0	-	0	-	0	-

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 포스트게놈다부처유전체 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.