

| |
|-------------|
| 발 간 등 록 번 호 |
|-------------|

| |
|----------------------|
| 11-1541000-000780-01 |
|----------------------|

아스타산틴과 생균제를 함유하는 고효율 고기능성
양어사료 개발

(Development of aquatic feed for high-efficacy and
multi-function by mixing astaxanthin and probiotics)

(주) 유비티코리아

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “아스타산틴과 생균제를 함유하는 고효율 고기능성 양어사료 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 11월 30 일

주관연구기관명 : (주) 유비티코리아

주관연구책임자 : 안 경 진

세부연구책임자 : 조 만 기

연구 원 : 정창화, 최병호, 김무상

전경동, 김성미, 석영선

송은영, 송은주, 류혜경

이신규, 왕희지, 이동규

요 약 문

I. 제 목

: 아스타산틴과 생균제를 함유하는 고효율 고기능성 양어사료 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

□ 국내적으로 양어 사료 분야는 지난 80년대 초 양어용 배합사료가 개발됨에 따라 이스라엘잉어(항어)와 잉어 가두리 양식으로이 본격적으로 시작되었지만, 90년대 중반 이후 정부의 맑은 물 공급과 수질규제 강화되어 내수면 어업에 크나큰 타격을 입히게 됨. 이후 내수면 양식산업이 하강세였고, 양식장 배출수 수질기준 규제 강화 (환경부 추진)를 통해 급진적으로 퇴보하게 되었다.

□ 이에 못지않게 2000년 이후에 국외적으로 WTO 체제 출범과 개방화의 가속화로 국내 양식업의 위기감 증대되면서 수입산 어종의 국내 시장 장악하게 되는 경우가 발생하였다.

□ 그러나, 이를 타개하기 위한 국내 양어사료업계 현황은 생사료, 습사료 및 배합사료를 동시에 사용하면서, 사료급이 현황 급속도로 성장하게 되었고, 또한 양식어종 및 기조가 변화담수어종에서 해산어종으로 바뀌면서 해산어 사료의 증가와 정부 시책등과 보조를 맞추어 배합사료의 선호도 저하에 따른 새로운 양어사료 개발 필요성 대두됨.

□ 기존의 생사료를 사용하면 침강속도가 빨라 어류가 신속하게 섭이되지 않으면 그 부산물 들이 수중에 분해되어 질소, 인, 황 계열의 수질오염원을 발생시키고, 나아가 부영양화를 초래할 수도 있게 된다. 최근에 양어 사료업계에서 환경적인 규제뿐만 아니라 안전성을 대두시킨 것이 친환경 사료 개발인데, 아직 미비한 실정임.

□ 전세계적으로 곡물가의 상승으로 인한 동물성 단백질원의 확보와 공급이 원활하지 않고 있는데, 그 중에서도 여러 가지 효능을 가지는 고기능성 사료원에 대한 연구나 미비하다. 또한 여러 가지 화학적 용매를 이용한 추출성 사료원이 많기 때문에 단가면이나 기타 효능적인 부분이 사업화 단계에 까지 접근 못하게 되었다.

□ 따라서, 친환경 사료를 개발하여 사료급이시 발생할 수 있는 여러 가지 문제점을 줄이고, 안전성을 확장시켜 친환경사료의 장점을 부각시키고, 사양가에게 질 좋은 사료 공급하며, 국내외적 환경변화에 대응할 수 있는 질 좋고 고기능성인 친환경적 사료를 공급하는 것이 필요하다.

□ 이러한 친환경적인 사료를 개발 하여 사양가들에게 경영난을 해소할 수 있도록 유도함으로써 궁극적인 생산성을 제고하는 사료를 개발하여야 할 것으로 사료됨.

□ 향후 침체된 식량자원을 둘러싼 국가간 경쟁 구도속에서 경쟁력 있는 동물성 단백질원의 확보의 첨예한 국가간 대립이 예상되므로, 동물단백질원의 안정적인 공급원이며 양식 어류 산업의 기반인 사료산업의 획기적 기능개선을 통한 국가 경쟁력 제고가 필요함.

III. 연구개발 내용 및 범위

가. 양어사료용 균주 선별.

- 해수 및 담수어 환경에서 생육 가능하며 효능이 우수한 생균제를 선별.

나. 선별된 균주의 미생물학적 및 생화학적 특성 규명.

- 생화학적 특성 규명을 위한 생육 특성, indicator 탐색.
- 생화학적 특성 규명을 통한 database화.
- 어병세균에 대한 항균능 분석.

다. 산업용 생산배지의 조성 및 배양조건의 최적화 및 대량 배양생산 공정 확립.

- 선별된 생균제의 생산배지를 가격이 저렴한 산업용 배지를 사용하여 대량배양을 실시하여 가격경쟁력이 높은 균주를 생산.

라. *Haematococcus pluvialis*의 최적 성장 및 배양 조건 확립.

- Heterophic 상태에서 배지의 성분 (탄소원)의 변화에 따라 배양,
- Mixotrophic 상태에서 배지의 성분 변화와 빛의 변화를 주어 배양.

마. *Haematococcus pluvialis*의 astaxanthin 최적 생성 조건 확립.

- Lab-scale에서 최적 성장 조건을 바탕으로 7 리터 광 배양조에서의 배양

- *Haematococcus pluvialis*의 최적 성장 조건을 확립

바. *Haematococcus pluvialis*의 대량 배양생산 시스템 개발

- Lab-scale에서 최적 성장 조건을 바탕으로 100리터 광 배양조에서 배양
- *Haematococcus pluvialis*가 최적 성장 조건을 조성하여 대량배양 시도

사. Astaxanthin의 대량 생산 시스템 개발

- *H. pluvialis*의 대량배양 통한 최대 세포농도를 유지하며 2차적인 Light stress와 질소원 결핍을 통한 2step 배양이 Astaxanthin의 최대생산 확립

아. 아스타산틴과 생균제를 함유하는 양어사료 개발 및 현장실험

- Sodium alginate 코팅을 통한 내압, 내열성이 높은 E.P용 원료 개발.
- 영양원에 기초한 E.P사료 배합비 연구.
- E.P사료 시제품.
- 증체율, 사료효율, 폐사율 분석.

IV. 연구개발결과

| 연구목표 | 연구결과 | 달성도 (%) |
|---|--|---------|
| * 양어사료용 균주 선별. | * 균주 집락 성장 및 분양(1차 선별) * Amylase test (2차 선별) * 병원성세균에 대한 항균능 (3차 선별) <i>B. polyfermenticus</i> 53종 중 1종, <i>B. licheniformis</i> 11종 중 1종 선별 | 100 |
| * 선별된 균주의 미생물학적 및 생화학적 특성 규명. | * <i>B. polyfermenticus</i> 및 <i>B. licheniformis</i> 의 미생물학적 특성 (내산성, 내담즙성, 내염성, 내열성, 항생제 내성) * 생화학적 특성 조사 : 면역능 test (NO assay, Cytokine (TNF- α , IL-12)측정) | 100 |
| * 산업용 생산배지의 조성 및 배양조건의 최적화. | * 7L jar-fermentior 조건 확립 <i>B. polyfermenticus</i> BC-1 최적조건 확립, - 최대 균수 3.55×10^9 CFU/ml - 최대 포자수 4.27×10^9 CFU/ml <i>B. licheniformis</i> 최적조건 확립 - 최대 균수 3.28×10^9 CFU/ml - 최대 포자수 2.55×10^9 CFU/ml | 100 |
| <i>H. pluvialis</i> 의 최적성장 조건 확립 | - <i>H. pluvialis</i> 의 최적성장 조건 확립 → 온도 25°C, pH 7, 광도 $50 \sim 80 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. | 100 |
| <i>H. pluvialis</i> 의 astaxanthin 최적 생성 조건 확립 | - <i>H. pluvialis</i> 의 Astaxanthin 축적을 유도 → $500 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 에서 24.8mg/g의 Astaxanthin의 농도 확보 | 100 |
| <i>H. pluvialis</i> 의 대량 배양 시스템 개발 | - <i>H. pluvialis</i> 의 대량배양 시스템을 위해 7리터 광배양조에서 Batch (8.5×10^6 cells/ml)보다 Semi-continuous (1.7×10^7 cells/ml) 배양 조건 확립. | 100 |
| Astaxanthin의 대량 생산 시스템 개발 | * <i>H. pluvialis</i> 의 대량배양 통한 최대 세포농도를 유지하며 2차적인 Light stress와 질소원 결핍을 통한 2step 배양이 Astaxanthin의 최대생산 확립 : Astaxthine 농도 [mg/L(ppm)] = $7.0273 \times 0.509 \rightarrow 3.5$ [ppm] 건조 세포 당 astaxathin 함량 = $(3.5[\text{ppm}]/100[\text{ppm}])/100 \rightarrow 3.5\%$ | 100 |
| * 시제품 제작 및 현장실험 | * 시제품 5회 제작하여 현장 실험 실시 | 100 |

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과.

1) 국민보건 향상에 미치는 파급효과.

- 기존 송어사료의 시장가격보다 저렴하면서 기능성이 뛰어난 사료를 개발함으로써, 국내 경쟁력이 뛰어나다고 할 수 있음. 현재 국내외적으로 원자재값이 급등하는 시점에 있어 송어사양의 경제난을 해소 할 수 있고, 이로 인한 소비자에게 양질의 어류를 값싸게 공급 할 수 있게 됨.
- 기존의 양식사료업계의 제품가격을 소비자가 만족할 수준으로 정착시킬 수 있음..
- 병원성 세균에 의한 질환 등 각종 질병을 예방함으로써 신선한 먹거리를 통한 국민보건 향상에 기여할 수 있게 됨.

2) 기업에 미치는 (매출 및 수익성 등) 파급효과.

- 현재 본 주관기업은 양어사료용 생균제 및 고기능성 고효율 송어사료의 대량생산 기술을 확보하였고, 위탁기관인 동서대 응용생명공학부에서는 미세조류를 이용한 아스타산틴의 생산기술 확보하였음.
- 본 과제외 기술을 통해 양어사료의 생산가격을 획기적으로 낮출 수 있게 되어, 기존의 양어사료시장 진입과 추후 시장점유율을 확대시킬 수 있다고 판단되어 기업의 이익 창출에 이바지 할 것으로 사료됨.
- 국내 양어사료 배합사료 시장은 총 60,117톤으로 그 중 내수면은 41.6%인 25,024톤 정도이며, 그 중 송어사료 시장은 1,980톤임 (수산양식, 2010년 10월). 사료 개발로 인한 시장 진입을 통한 이익 창출을 시도할 것임.

3) 수출입에 미치는 영향.

- 국내 양어사료의 시장규모는 생사료 80 %이상으로 추정되며, 향후 생사료(동물성 단백질원)의 확보는 세계 어업생산량의 한계로 더욱 더 어려워질 전망이다.
- 본 과제에 의해 개발된 고효율 고기능성 배합사료는 향후 수입 생사료를 대체할 수 있을 뿐만 아니라 중국, 일본, 동남아시아 등의 국가에 대한 수출도 가능하리라고 판단.

4) 미래 산업으로서의 발전 가능성.

- 지나친 항생물질의 남용으로 내성을 지닌 미생물이 증가하고, 2011년 4월부터는 사료

에 항생제를 첨가하지 못하도록 정부에서 규제하고 있음.

- 치료이외의 항생제 사용 규제.
- 항생제의 오남용을 막기 위한 치료이전에 예방의약으로서의 대안으로 생균정장제와 면 역기능 강화 물질을 함유하는 양어사료의 사용이 꾸준히 증가할 것으로 예상.
- 보다 안전하고 품질이 우수한 제품을 요구하는 소비자의 욕구를 충족시키기 위하고 생산성을 향상시키기 위해서 우수한 양어사료의 사용은 계속 증가하리라고 판단.

2. 성과 활용 방안 및 계획.

1) 기존의 송어사료 시장의 점유율 향상 및 현장 기술지도.

- 산업용 생산을 위한 저렴한 배지 원료를 사용함으로써 생산단가를 낮추어 가격이 저렴하고 사료효율이 우수한 송어사료 개발. 내수면양식 특히, 송어양식의 산업현장을 방문 및 기술지도등을 제고

2) 적용증 증대.

- Astaxanthin의 대량 생산이 이루어지면 어류사료 사업 뿐 아니라, 축산 사료에 참가할 수 있을 뿐 아니라 더 나아가 식품 및 의약사업 등 여러 분야에 활용할 수 있음.

3) 미세조류 생산성 향상.

- 미세조류의 대량 배양 시스템으로 국내 미세조류의 생산성 향상으로 여러 분야에 사용중인 미세조류의 생산성을 향상.

4) 안전하고 저렴한 먹거리 제공.

- Astaxanthin과 생균제의 대량생산으로 인한 원료가격의 절감으로 고효율, 고기능성의 양어사료를 공급하여 양식업의 생산성 향상.

5) 양식현장의 경제적 부담을 절감.

- 환경친화형의 사료를 지속적으로 사용함으로써 수질오염율의 감소시켜 오염원의 후속적 처리비용을 감소.

6) 해외 수출 증대 및 수입 대체 효과.

- 중국 및 베트남과 같은 동남아시아 지역의 고효율, 고기능성 사료의 요구 증가 추세.
- 향후 유럽 및 일본등과 같은 선진국으로의 원료 및 완제품의 수출 기대.

SUMMARY

Since extruder pellets (EP) for aquacultural field has developed in the early 1980, carp-like fishes were bred in the domestic field. However, environmental policies of government has enforced into the aquatic field in the late 1990 and then industries of inland fisheries were gradually decreased. In the early 2000, opening of international organizations like as WTO accelerated to limits and regulations toward the domestic inland fisheries. In addition, fishes from foreign countries were gradually imported and threatened to domestic inland industries.

Feed-industries for solving of this status induced to simultaneously moist pellet (MP), semi moist pellet (SMP), assorted-feed (AF), and then were increased sharply. Besides, species and trend of fish were changed and required to feed of new paradigm for aquaculture. MP was most feed in terms of nutritional balance and breeding of fish, but MP induced to contaminations just like nitrogen, sulfur, phosphate-like products because of its shrinking speed and then eutrophications, and finally spoiled eco-systems.

Although a variety of efforts has carried out, international price of food-grains such as cereal, grain, corn were gradually increased because of policies of production and export limits. Therefore, development of eco-friendly feed has required until now and especially development of multi-functional feed become necessary.

We selected and identified to 2 beneficial *Bacillus* sp. bacteria in our microbial pools in order to apply for aquatic-fields. In advance, 53 of *Bacillus* spp. were selected in colonial phenotype way and 5 bacteria was selected via amylase test. Five bacteria were indentified to *Bacillus polyfermenticus* bc-1, *Bacillus polyfermenticus* bc-4, *Bacillus polyfermenticus* bc-9, *Bacillus licheniformis*-1 and *Bacillus licheniformis*-2 through 16s RNA analysis. Secondly, these 5 of *Bacillus* spp. was simplified via antagonistic activity against fish pathogen(*Vibrio* sp., *E. tarda* and *Streptococcus* sp.) and harmful bacteria(*E. coli* and *Salmonella* spp.) and immune test such as NO assay and cytokine production (IL-12 and TNF-alpha). Finally, 2 bacteria

(*Bacillus polyfermenticus* BC-1 and *Bacillus licheniformis*) were selected and used to set to optimal condition of incubation.

In the 7L jar-fermentior condition, optimal conditojn of *B. polyfermenticus* BC-1 was established. Then maximum cell and spores was conunted 3.55×10^9 CFU/ml and 27×10^9 CFU/ml, respectively. Maximum cell and spores of *B. licheniformis* after optimal incubation was conunted 3.28×10^9 CFU/ml and 2.55×10^9 CFU/ml, respectively.

Pilot scale incubation using microalgae (*Haematococcus pluvialis*) was set in heterotropic and mixotrophic conditions (25°C, pH 7, light 50-80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Carbon and light sources affected to optimal growth of *H. pluvialis* in the lab scale. Optimal conditions of astaxanthin production inside *Haematococcus pluvialis* using the 7L light-incubator was set (24.8 mg/g of astaxanthin at 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Optimal conditions for mass production in 7L light incubator was set in semi-continuous way and shown to 1.7×10^7 cells/ml. Then, maximal concentration of astaxanthin in mass production level was 3.5 mg/L(ppm) and astaxanthin concentration per dry cell was 3.5 %.

Rainbow trout feed pellet containing probiotics (*B. polyfermenticus* BC-1 and *B. licheniformis*) and microalgae (*H. pluvialis*) was produced and applied for field test in L trout aquarium at Gyeongbuk Province. After bleeding of 10 fishes monthly, lysozyme activity, production of total protein, serum glucose and GOT/GPT were measured and analyzed. Five times of field test gave not only rapid and healthy growth of fish but also increase of production in aquarium via decrease mortality of fish and then suggest to solve economical problem. In the project, rainbow trout feed pellets have eco-friendly high- and mutlifunction was developed to introduced and gave new paradigm to inland industries and companies.

CONTENTS

| | | |
|------------|--|-----|
| Chapter 1. | Introduction | 12 |
| Chapter 2. | State of of the Art Report | 20 |
| Chapter 3. | Methods and Results | 26 |
| Chapter 4. | Goal achievement | 96 |
| Chapter 5. | Further applications | 98 |
| Chapter 6. | Scientific technical information of the Art Report | 99 |
| Chapter 7. | References | 103 |
| * Appendix | Field test (Results of farming and serological analysis) | 105 |

목 차

| | | |
|-------|-----------------------------|-----|
| 제 1 장 | 연구개발과제의 개요 | 12 |
| 제 2 장 | 국내외 기술개발 현황 | 20 |
| 제 3 장 | 연구개발 수행 내용 및 결과 | 26 |
| 제 4 장 | 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 | 96 |
| 제 5 장 | 연구개발 성과 및 성과활용 계획 | 98 |
| 제 6 장 | 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 | 99 |
| 제 7 장 | 참고문헌 | 103 |
| * 별첨 | 현장실험 (사양결과 및 분석결과) | 105 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적, 필요성

1. 양어 사료 분야의 현황.

1) 국내 내수면양식업 현황.

① 지난 80년대 초 양어용 배합사료가 개발됨에 따라 이스라엘잉어(향어)와 잉어 가두리 양식이 본격 보급.

→ 급격한 발전을 거듭, 국내 어류양식업 선도가 됨.

② 90년대 중반 이후 정부의 맑은 물 공급과 수질규제 강화 등 정책 전환.

③ 내수면 양식산업은 크게 위축, 틸라피아(역돔)와 향어 등의 일부 품종만 겨우 명맥만 유지.

④ 내수면 양식산업이 퇴보.

- 정부의 정책전환이 가장 큰 요인으로 지적.

- 수입개방화에 따른 값싼 외국 수산물 수입 증가, 이에 따른 국제경쟁력 약화, 소비 감소 등도 문제로 인식됨.

⑤ 양식장 배출수 수질기준 규제 강화 (환경부 추진).

⑥ 송어와 뱀장어 양식장은 생산활동에 상당한 제한.

2) 국외적 측면.

① WTO 체제 출범과 개방화가 가속화로 국내 양식업의 위기감 증대.

- 일본에서 생산되는 참돔과 중국산 홍민어(점성어), 점농어 등은 이미 국내 시장 완전 장악.

- 국내생산여건이 열악해진 미꾸라지와 잉어류, 붕어 등도 중국산에 의해 시장 좌우.

② 수입산 어종의 국내 시장 장악.

- 생산시스템의 비효율성, 시설의 영세성, 기술 부족 등 국제 경쟁력이 약화 영향.

- 국내 내수면양식 대상종은 뱀장어와 무지개송어, 미꾸라지, 메기, 잉어류 등으로 한정.

- 출하가 특정시기에 집중 :

→ 과잉공급과 가격하락 현상으로 인한 경영 악화.

3) 국내 양어사료 현황.

① 생사료, 습사료 및 배합사료를 동시에 사용.

→ 그 중 80%가 생사료, 생사료의 40% 정도를 국외에서 수입.

→ 생사료가 배합사료보다 원가면에서 유리, 어류의 성장이 빠르기에 생사료를 선호.

② 사요급이 현황 급속 성장.

→ 1982년 수백 톤의 생산 실적이 보고된 이래 '84년 30,000톤, '89년 90,000톤을 상회 (대부분의 사료가 주로 담수어종).

그림 1. 연도별 배합사료 생산량

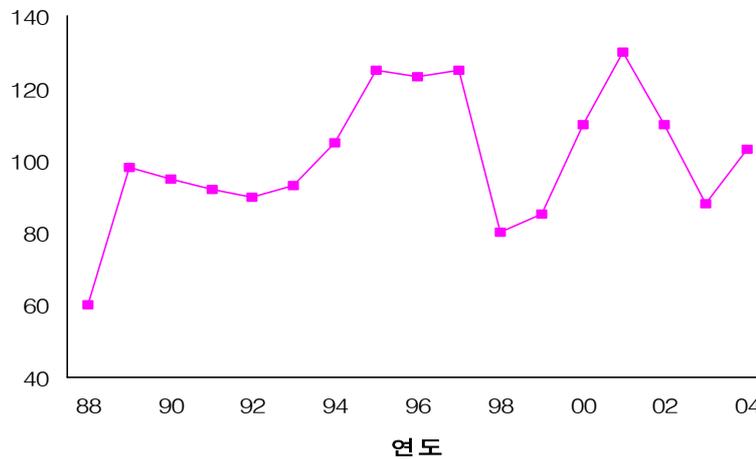
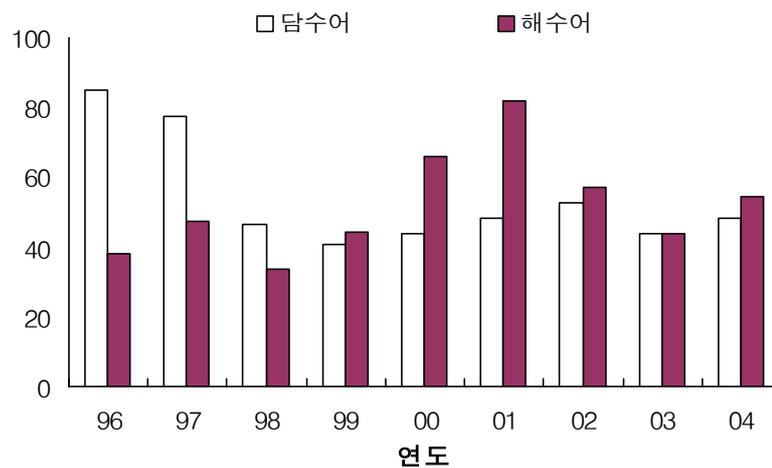


그림 2. 담수어 및 해산어 양어용 배합사료 생산 현황



4) 양식어종 및 기조 변화.

① 80년대부터 담수어종에서 넙치 및 조피볼락 중심의 해수어종으로 전환.

- ② 90년대 중반부터 해수어 사료의 증가 추세.
- ③ 해산어류 양식을 위해 2003년 24만 7천 톤의 사료 사용.
 - 이 중 78%인 18만 7천 톤을 생사료가 차지 (연근해 어류 어업생산량 65만 6천 톤에 약 30%를 차지하는 양).
 - 국내에서 생사료 전량을 확보하기는 불가능하기 때문에 중국과 러시아 등 외국에서 수입해 충당.
 - 향후 생사료의 확보는 세계 어업생산량의 한계로 더욱 더 난관 예상.
- ④ 배합사료의 선호도 저하에 따른 새로운 양어사료 개발 필요성 대두.
 - 생사료에 비해서 성장률이 저하.
 - 배합사료에 대한 나쁜 인식으로 인해 어업인들이 사용 기피.
 - 생산량이 적고, 낮은 가격으로 공급해야 하는 어려움 대두.

2. 신개념 양어 사료의 개발 방향.

1) 배합사료의 장단점.

- ① 생사료나 MP보다 보관이나 사용의 편리.
- ② 인건비 절감, 안정적인 공급이 용이.
- ③ 하지만, 성장이나 생존율, 가격면에서는 아직도 부정적인 평가.

2) 배합사료의 가장 시급한 과제는 품질 향상.

- ① 기존의 양식업계의 사료선택 기준은 여신이나 가격, 인간관계가 좌우.
- ② 경쟁업체들의 외상거래때문에 사료 품질 저하 초래.
- ③ 양어가의 질적 향상 추구.
 - 사료첨가제 개발 및 시행하여 사료의 질을 향상시키고 내병성을 추구.
 - 학·연구계 역시 많은 연구 개발 진행.

3) 최근 양어사료의 사용인식 전환 절실.

- ① 어류양식의 발달과 함께 단순히 어류의 성장을 촉진시키기 위한 것으로부터 벗어나 영양원소 확충공급에 의한 사료효율 향상 추구하기 위한 소화율 증대를 통해 체내 흡수를 목표로 하는 사료개발이 왕성하게 이루어지고 있음.
- ② 사료비를 절감하고 양식어류의 품질을 좋게 하는 한편, 환경오염을 줄이고 면역성을 가져 질병에 대항할 수 있는 우수한 사료의 개발을 절실히 요구.

③ 사료 대체제 개발 및 이용성 증대 절실.

- 광우병 등으로 문제시 되고 있는 혈분사료의 대체제 개발.
- 폐사어를 이용한 어분개발 등의 부산물을 이용성을 증대시키고자 하는 노력 절실.
- 양어사료는 영양소가 농축되어 있고, 수중오염에 더욱 쉽게 영향을 미칠 수 있음.
→ 오염물을 감소시키기 위한 노력이 다른 동물 산업 분야보다 훨씬 강하게 요구.

4) 국내 양식산업 SWOT 구조 분석에 따른 노력 대두.

- ① 노동집약적인 해조류와 패류 중심이라 후진성과 영세성을 벗어나지 못하고 있음.
- ② 주요 수산식품의 양식 생산량과 가치의 세계 순위는 계속해서 하락.
- ③ WTO 체제는 수산물 개방화를 촉구, 최근의 IMF 한파 등 국내 경제 여건 역시 국내 양식산업을 더욱 힘들게 하고 있음.
- ④ 국내 양식산업의 구조를 정비, 품종별 양어사료개발이 가장 시급한 현안임을 인식
→ 주요 품종별 배합사료 개발에 많은 투자가 요구됨.

5) 향후 개발 방향 제시.

- ① 환경친화형 사료 산업의 필요충분적 관계 지속 요구.
- ② 어류양식은 수중에서 행해지기 때문에 사료의 수질오염의 가능성도 고려되어야 함.
- ③ 저오염 사료란 궁극적으로 고효율 사료를 의미.
- ④ 사료전환효율이 우수하면 동물의 생산성이 증가, 오염원의 부하량은 정감.
→ 오염원의 후속적 처리비용 감소.

3. 양식산업에서의 문제점.

1) 기존 형태 사료 변질 우려.

- ① 생사료의 영양성분은 변화가 심하여 영양소의 불균형, 유통, 보관, 공급 과정에서 지방의 변질로 인하여 질병 발생 우려 초래.
- ② 외부로부터의 어류 질병을 전달하는 매체가 될 수 있음.

2) 수질오염 발생 가능성 시사.

- ① 생사료의 수용성 영양소들이 물속으로 용출되어 질소, 인, 황 (N, P, S) 계열로 인한 수질 오염이 발생할 가능성 있음.

3) 경영난 위험 증가 초래.

① 계획 생산이 어려워 생사료의 수급 불안정으로 사료가격 변동과 사료급이의 불안정성을 초래, 경영난의 위험을 증가시킬 수 있음.

4) 생태계의 불균형 초래.

① 생사료는 치어의 남획을 초래, 수산자원을 감소시키는 원인 초래.

② 이로 인한 먹이사슬의 파괴로 어종의 감소 요인이 됨.

5) 생산성 향상 제고 노력 절실.

① 고유가시대와 더불어 원자재비의 상승과 지구온난화 등으로 인한 질병의 만연에 의한 약제비의 상승.

→ 자금적 압박 심각함.

② 면역기능 강화 및 고효율의 사료 개발.

→ 양식산업의 생산성 향상과 경쟁력 제고되는 사료의 개발이 절실.

4. 본 연구를 통한 해결책.

1) 양식장 환경 및 새로운 친환경 사료원을 이용한 영양성 흡수의 근본적 해결.

① 생균제를 이용한 소화율 급증 및 체내 흡수를 증가시켜 사료효율 증대

② 밀도 조절 및 환경 개선 어병 발생 최소화.

- 밀도가 높은 양어장 환경을 최소화하여 어병 발생 및 양식장 환경 악화로 오는 피해를 경감시켜야 함.

③ 생리활성물질의 첨가에 의한 면역증강 유도 및 생존율 향상.

- 고기능성 생리활성물질의 첨가로 면역증강 및 2, 3차적인 자강(自強)력 및 내병력 증강유도.

④ 대체 사료원 개발 등을 통한 생산성 제고.

- 새로운 사료원 개발로 국내 양식 사료산업에 생산성 증대 및 산업화 유도.

5. 본 연구의 목적.

① 기존 배합사료의 소화율 개선 문제점을 생균제와 생리활성물질을 활용하여 근본적인 해결을 시도하여 친환경적 양어사료를 개발하는 것임.

제 2절 연구내용 및 범위

1) 생균제의 이용가치와 의미.

1) 생균제의 정의.

- ① 생균제는 여러 종류의 정상 장내 세균총에서 병원성균에 대해 증식을 억제하는 항균력이 있는 것으로 알려짐 (서와 이 등, 2007; Havenaar et al., 1992).
- ② 장내에서 세균총의 균형을 유지하고 병원성 세균의 증식을 억제하는데 중요한 역할을 담당함 (Sanders., 1999; Gill., 2003; Jayaprakasha et al., 2005)

2) 생균제의 산업적 가치 및 이용범위.

- ① 종래의 생균제의 이용 범위는 주로 사람과 가축을 대상으로 개발 및 생산됨 (Gill., 2003;).
- ② 양식어류에 생균제를 사용하기 위해서는 여러 가지 생육 및 최적 조건을 가미하여 개발되어야 하며, 특히 해수 양식어의 경우 고염에서도 잘 견딜 수 있어야 함.
- ③ 산업적 미활용 원인 및 문제 대두
 - 기존의 유산균 종류의 생균제는 사료 공정을 거칠 때 고온멸균 공정시 다 파괴되거나 사멸해 버림.
- ④ 생균제 사료에 첨가하기 위한 방법 고려 : 2 가지 방법이 있음
 - 열에 약한 유산균 제제를 코팅하여 내열성을 극대화 시킨 균주 개발 및 혼합사용
 - 열에 강한 균을 탐색하고, 직접 첨가하는 방식이 있음. 대표적으로 Bacillus의 경우 미생물학적으로 막 자체의 capsule이 두껍게 형성되어 있고, 특히 고온과 같은 악조건에서 살아남기 위해 막이 더욱 더 두껍게 형성이 되는 특성을 갖고 있음.

3) 생균제를 이용한 사료 개발의 필요성.

- ① 환경적 영향.
- ② 수질 환경 악화 심화 및 어병 발생 빈도 증가.
 - 항생제를 대체할 수 있는 생균제의 이용가능성 시사.
 - 정부의 신규 항생물질의 허가 강력히 규제하는 실정.
- ③ 항생물질의 오·남용을 억제 및 대체할 수 있는 생균제 개발이 절실.
- ④ 어류장내의 유익 세균총을 형성하게 하여 성장촉진 및 질병예방, 나아가 수질오염 억제등을 목적으로 하는 양식어류용 생균제의 개발이 반드시 필요하다고 판단됨.

4) 생균제의 기능성 범위

- ① 소화 흡수율 증대 (Perera et al., 1995)
- ② 면역증강 효과 (Jayaprakasha et al., 2005)
- ③ 신진대사 원활 유지-생리활성물질 분비 및 공급

2) 아스타산틴(Astaxanthin)의 이용가치와 의미.

① 연구적 배경.

- Carotenoid는 자연계에 널리 분포.
- 동·식물의 색소성분으로 여러 가지 다른 생물학적 기능을 가짐.
- 화학구조상으로는 산소를 함유하지 않는 carotenes와 산소를 함유하는 xanthophylls로 분류. 동물계에 존재하는 xanthrophyll은 대부분이 붉은색을 띠는 astaxanthin으로 구성.

② Astaxanthin 효능 및 기전.

- Astaxanthin은 어류에서 교배시의 착색이나 닭의 벵과 같은 조류의 장식적 효과를 주는 색상에 관여하며, 어류와 조류에서 provitamin A 활성을 가짐.
- Astaxanthin은 다른 carotenoids보다 항산화력이 훨씬 높게 나타나며, 어떤 조건에서는 astaxanthin의 지방산화 억제 작용이 β -carotene보다 10배, 비타민 E보다는 100배나 높은 것으로 나타났다. 면역 자극 효과에 대한 실험에서는 astaxanthin이 동량의 β -carotene보다 더 우수함.
- 아스타산틴(3,3-dihydroxy- β , β -carotene-4,4'-dione)은 항암효과 뿐만 아니라 면역조절 효과와 강한 항산화 효과가 있다고 보고됨.

③ Astaxanthin의 수요와 공급 현황.

- 아스타산틴은 사료사이에 연어와 송어 등 양식 어류의 색상, 향, 맛 등을 증가시키는 착색 풍미원으로 중요한 사료첨가제의 역할을 하고 있음. 그러나, 대부분이 수입에 의존하고 있음.
- 제한된 공급자와 높은 비용으로 인해 양식연어의 체색 증진을 위한 경우 이외에는 동물영양을 위한 astaxanthin 공급은 아직까지는 제한적임.
- 새로운 제조기술의 발달에 힘입어 사료산업에 이용될 수 있음.
- 녹조류(Haematococcus)의 배양을 통해 astaxanthin을 생산할 수 있으며, 이와 같은 천연의 astaxanthin을 사료에 첨가하였을 때 나타나는 효과에 대해 많은 영양학자들

이 연구중에 있음.

④ Astaxanthin의 생산기술 및 개요.

- Phytoplankton 중 아스타산틴의 가장 큰 생산원인 *Haematococcus pluvialis*로부터 생산되고 있음.

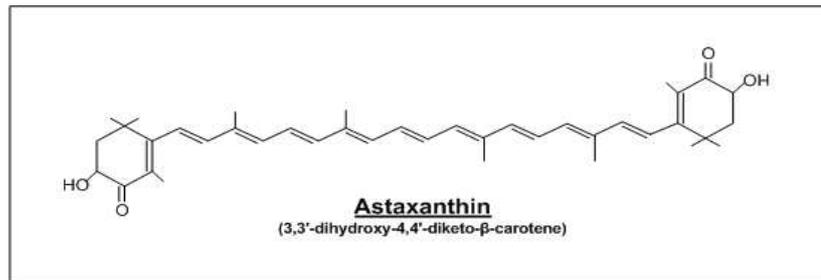


그림 3. 아스타산틴의 일반적 구조

- 아스타산틴의 생산원인 *Haematococcus pluvialis*는 운동성이 있으며 여러 가지 환경적인 스트레스 즉, 높은 빛 조사량, 높은 온도, 질소원 혹은 인원 결핍 그리고 acetate와 NaCl의 농도 조절로 인해 아스타산틴의 축적을 야기 시킬 수 있음.
- 현재까지 규명된 *Haematococcus pluvialis*의 최적성장 추이를 바탕으로 대량배양 기술과 여러 가지 환경적인 스트레스 조건을 접목하여 아스타산틴의 대량 생산 방법을 확립하여야 산업적 가치가 있음.

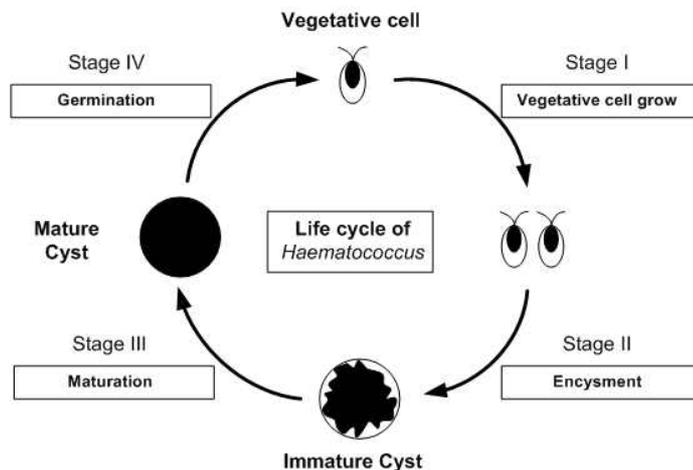


그림 4. *Haematococcus pluvialis*의 생활사

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1절 : 국내외 기술개발현황

1. 국내 현황

가. 국내 어류 양식업의 흐름.

1960년대를 무지개 송어의 국내 이식과 실뱀장어 채포 및 치어 사육 등으로 출발된 어류양식업의 초기는 먹이공급에서 매우 어려운 상황에 직면하였고, 그로 인하여 많은 시행착오를 거듭함.

- 1970년대까지 주로 수입사료 혹은 생사료에 기반을 둔 자가사료로 사육.
- 1980년대에 국내에서도 어류용 배합사료가 처음 생산 판매되기 시작.
- 1990년대에 접어들면서 공급과잉 및 어가 하락으로 생산량은 정체 상태.
- 이후 IMF 경제한파로 어류 양식업계는 위축되었다가, 현재는 해산어류의 양식산업 발전에 힘입어 재도약의 발판을 마련.

나. 사료 개발의 인식 절실과 대체 사료 개발의 움직임.

- 어류 양식의 합리적이고 안정적인 발전을 위해서는 어종별 고효율 저오염 배합사료 개발 시급.
- 해산어양식 증가에 따른 배합사료의 공급량 저하.
- 양식산업의 중요성과 가능성에 대한 인식 확산 유도.
 - 국내 양식산업의 경쟁력 제고.
- 사료영양연구를 통하여 배합사료에 의한 사육기간을 단축 경영비를 절감.
 - 수익성의 제고가능성을 입증.
 - 어업인, 사료회사, 연구기관, 대학등 관련인 모두의 관심과 노력이 절실.

2. 국외현황

가. 경제적이고 실용적인 친환경 배합사료개발을 위한 연구 수행.

: 유럽과 같은 선진국에서는 우리나라와 달리 생사료를 거의 사용하지 않고 있어 그 대체에 대한 연구는 거의 수행되어지고 있지 않고 있음.

나. 대부분이 담수산 어류를 대상으로 연구를 수행.

: 최근에 해산어에 적합한 배합사료 개발을 위한 영양요구에 관한 연구에 많은 투자를 하고 있는 실정.

다. 미국 : 환경 친화적 저오염, 고효율 배합사료 개발.

: 하와이주의 마이마이, 캘리포니아주의 철갑상어, 텍사스주의 홍민어, 북부의 송어, 북동부의 연어, 남부지방에서는 채널메기를 전락종으로 하여 배합사료만으로 양식.

4) 일본 : 참돔 양식시에 연간 10만 톤의 사료를 거의 전량 배합사료로 사용.

: 방어 양식시에는 1.5kg 전후까지 90% 이상을 배합사료로 공급하고 있음.

5) 노르웨이 : 연간 50만 톤의 연어류가 100% 배합사료로 해상가두리 양식장에서 생산.

: 연어생산에 사용되는 상업용 배합사료의 국가 전체 사료계수가 1.02 정도.

6) 중국 : 지난 93년 전체 양식생산량의 35%(6백48만 톤)을 담수양식에 의존.

: 오는 2010년 생산량 1백만 톤을 목표로 기술개발을 추진중.

지중양식은 농업과 목축업, 임업과 결합해 지역 여건에 따라 활용.

품종개발과 사료연구, 양성방법 개발을 병행.

밀폐된 못 뿐만 아니라 개방된 강이나 호수를 이용한 지중양식이 주류.

최근 고밀도 순환여과식 방법이 보급되고 있으며, 쏘가리, 자라, 담수산 계, 철갑상 어등을 대상으로 품종개발도 추진중.

3. 국내·외의 연구현황.

1) 복합 다기능성 사료 개발.

- 현재 기업의 양어사료 개발은 완전배합사료개발, 항생제 규제에 따른 면역성 증강 물질의 첨가, 양어사료에 BT기술의 접목, 가공기술의 개발에 의한 소화율 향상, 사료효율을 극대화를 위한 사양관리기술 개발 등으로 진행.

- 장기적으로는 수질오염을 저감하는 친환경사료의 개발, 어분대체원료의 개발, 어유대체 원료의 개발 등을 염두에 두고 있음.

2) 환경친화형 사료의 특징 및 개발요구 범위.

- 환경친화형 사료의 구성소는 재활용 공급원으로부터 유래.

- 영양학적으로 적절하게 균형 필요.

- 가능한 한 완전히 소비될 수 있는 형태로 제조, 급여되어야 함.
- 사료효율을 극대화하기 위한 사료관리 및 급여율에 대한 적절한 정보를 사육가에게 공급해야 함.

3) 양어사료 분야의 주요 개발 분야.

① 피틴염(phytate)이 낮은 식물성 단미사료.

- 일반적으로 사용되고 있는 식물성 단미사료에 함유된 인은 대부분 피틴염의 형태로 결합되어 어류를 포함한 단위동물에 의해 이용되지 못하므로 섭취된 인은 배설되어 환경오염원이 됨.
- 따라서 피틴염의 함량이 낮은 유지 종자작물의 개발이 진행되고 있음.

② 회분 함량이 낮은 동물성 부산물.

- 동물의 뼈내 인과 타 광물질은 동물에 의한 소화율이 낮음.
- 회분은 이러한 광물질의 함량을 반영하는 것으로 회분함량이 높을 경우 타영양소의 소화율 또한 영향을 받게 됨.
- 따라서 회분 함량이 낮은 단미사료의 사용은 영양소 이용성의 개선뿐 아니라 배설되는 인의 함량 또한 감소시키는 결과를 유도함.

③ 효소공학.

- 식물성 부산물의 경우 효소제의 사용은 섬유소와 단백질의 소화율을 개선시키며 인의 이용성을 증가.
- 동물성 부산물의 경우 효소적 소화는 단백질 소화율을 개선할 뿐 아니라 사료 섭취 유인제로 작용하는 유리아미노산의 생산에도 일조.
- 효소를 이용하여 소화기능을 향상시키는 제품으로 개발하고 있음.

④ 어분과 어유의 대체물질.

- 어분과 어유는 인류식품과 경합하지 않는 또는 사람에게 의한 소비도가 낮은 어류로부터 가공되어 사육중인 어류나 갑각류 등에게 재순환 됨.
- 이들 단미사료는 지상동물에 이용되는 것보다 양식되는 수산동물에게 더욱 효율적으로 이용될 수 있음.
- 이들 공급원은 무한한 것이 아니기 때문에 어분과 어유에 대한 양식산업의 의존도를 점차 줄여 나가야만 양식의 지속성이 실현될 수 있음.

- 이에 대한 대책으로서 양질의 동물성 부산물의 사용비율을 점차 증가시켜 합성 아미노산의 첨가로 어분에 필적할만한 아미노산 조성을 유지시키는 방법이 대두됨.
- 또한 식물육종, 아미노산 또는 지방산 조성과 유사한 식물변종을 생산하는 방법으로 단세포 미생물(조류, 박테리아, 효모)을 통한 개발도 포함됨.

⑤ 기존 사료의 영양성 밸런스 조절.

- MP(Moisture pellet, 생사료)사료에 대해 EP(Extruded pellet, 배합사료)를 사용할 경우 20~30%의 성장률 저하되어 3개월 가량 출하가 늦추어지게 됨. 이로 인해 영양적인 밸런스의 결핍에 기인하므로 성장단계별 제품의 배합비 조절이 필요.
- 출하용 사료첨가제의 개발로 비만도 개선하여 육질을 개선.
- 저수온기의 소화율 저하 문제는 EP사료로써 완전하게 해결이 되지 않았지만 유산균의 첨가에 의한 방법으로 개선가능 함.

⑥ 사료배합.

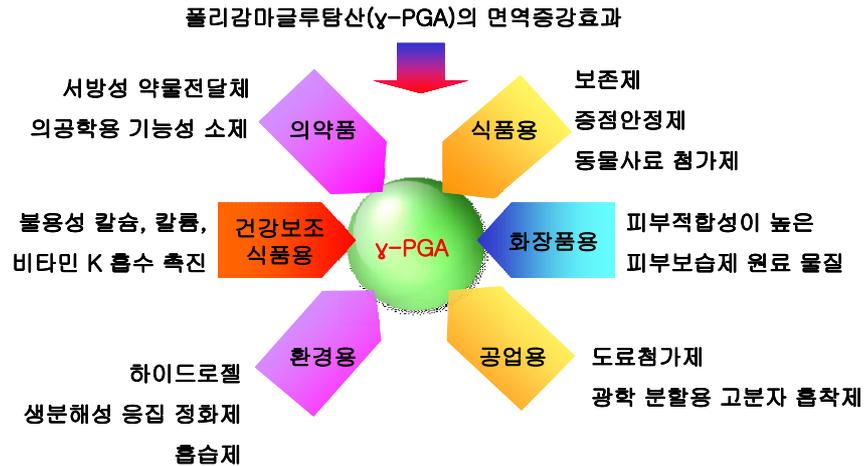
- 수중동물의 영양소 요구량을 결정하고, 배합에 이용되는 단미사료의 영양소가 각 어종에 얼마나 이용가능한가 하는 것을 파악하는 것이 사료배합 연구의 주된 분야.
- EP 사료의 문제점과 해결방안.

| EP의 문제점 | 개발목표 | 해결방안 |
|-----------------------|------------------|-----------------------|
| MP사료대비 20~30%의 성장률 저하 | 10%이내의 성장차 | 성장단계별 영양요구량 규명 |
| 비만도 및 육질 탄력 저하 | 육질 개선 | 출하용 첨가제 사용 |
| 복수증 증가 | 질병 및 복수증 저감 | EP사료 사양관리 방법의 개선 |
| 저수온기 소화율 저하 | 10~15℃에서의 소화율 향상 | 유산균 제제의 활용에 의한 소화율 향상 |

⑦ 식품안전성 문제 대두로 면역증강 첨가제 개발을 다방면으로 시도.

- β -1,3-glucan, 목초액, 다시마 추출액, 마늘, 한약재 등의 첨가.
- 폴리감마글루탐산(γ -PGA) 포함된 청국장에 관한 연구에도 관심.
- 청국장 발효 : *B. subtilis*는 폴리감마글루탐산 (γ -PGA)을 분비.
 - 폴리감마글루탐산(γ -PGA)은 체내의 항상성을 유지시켜주고 면역력을 증가.
 - 항원보조제(Adjuvant)로서의 활성이 있어 면역계의 일차적인 면역반응에 주요한 대식세포를 자극하여 cytokine 즉, 종양괴사인자(TNF- α)와 interleukin-1 β 의 유전

자발현 유도능 및 분비능과 항원에 대한 특이적 면역 증진 효과가 입증.



- 양어사료에 BT기술의 접목을 위한 시도도 이루어지고 있음.

→ 활성 유지 조건 확립 요구.

: 사료첨가제가 EP사료에 활용되기 위해서는 우선 130℃ 이상의 고온과 고압을 통과하여야 함.

→ 소화제제나 유산균 등은 온도 처리를 견디지 못하고 활성이 격감하여 EP사료에 활용되지 못하는 경우가 많음.

→ 최근 고온을 견딜 수 있는 유산균에 항바이러스를 탑재시킨 새로운 공법이 개발되면서 EP사료에의 활용도가 높아지고 있음.

→ 최근의 양어사료 기술개발은 배합율에 의한 영양성분의 조절에 머물지 않고 양식 어류의 생리적 특성에 따른 연구, BT기술의 접목, 가공기술 개발에 의한 소화율 향상 등 많은 분야에서 급속히 진전되고 있음. 아직도 축산분야에 비해 많은 개발이 이루어져야 하겠지만, 타분야의 발전을 벤치마킹하여 양식산업이 국제경쟁력을 가지고 인류의 영양과 식량을 책임지는 산업으로 발전을 도모해야 함.

| 연구수행기관 | 연구개발의 내용 | 연구개발성과의 활용현황 |
|--------|----------------------|--|
| A 기업 | 넙치후기육성사료 개발 | 성장단계별 제품의 배합비 조절 출하용 사료첨가제 개발 |
| B 기업 | 폴리감마글루탐산 포함된 양어사료 개발 | 폴리감마글루탐산 함유된 청국장의 양어사료에 적용 시도 |
| 충남대 | 유산균에 항바이러스 탑재 | 항원을 조합한 항바이러스를 유산균에 탑재하여 사료에 의한 경구투여 함으로써 비특이적 면역이 지속될 수 있게 하고 주사백신에 비해 저렴한 경구투여 사료 개발 |
| 기타 | 면역증강 첨가제 개발 | 무항생제 양식을 위한 질병 발생 예방책으로써 면역성 첨가제의 개발이 다양한 방면에서 시도 (β -1,3-Glucan, 목초액, 다시마추출액, 마늘 등) |

제 2 절 : 연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

1. 기능성 양어사료

현재 국내뿐만 아니라 해외에서도 여러 중·대형 사료회사에서 사료효율을 높이는 데 주력하고 있는 실정이다. 또한 곡물가가 오르고 수입물량을 확보하는데 어려움이 있을 뿐만 아니라, 원부자재의 단가가 계속 높아지고 있기 때문에, 저렴한 사료원료를 대체하고자 하는 시도는 하고 있다. 사료업계 시장 경쟁력의 주 타겟은 동등한 원료에서 이상적인 배합비로 사료효율을 높이는 것에 주력하고 있으나, 사료영학적인 측면에서만 치중되어 개발되어 왔기 때문에 어종마다의 고유의 특성을 잘 활용을 못하고 있는 것으로 판단되었다.

본 과제에서는 무지개송어의 대사를 활용하고, 또한 사료섭이시 소화흡수율을 높여주는 대사적인 측면을 보강하여 궁극적인 사료효율 개선을 목적으로 개발되었다는 점에서 의미가 있다. 대표적으로 아스타산틴이라는 물질은 착색역할 뿐만 아니라 다양한 생리확성물질로도 이용되고 있는데, 1차적으로 생균제가 첨가되면서 장내에서의 정상화를 형성하여 2차적으로 원활한 신진대사에 작용한 것으로 판단된다. 착색제의 양을 줄여도 신진대사가 충분히 원활하다는 점으로 보아 생균제 활용이 아주 유용하다고 할 수 있겠다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 : 양어사료용 균주 선정 및 동정

가. 연구배경

생균제는 여러 종류의 정상 장내 세균총에서 병원성 균에 대해 증식을 억제하는 항균력이 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 생균제의 특성을 이용하여 항생제를 대체할 수 있으므로 항생 물질의 오·남용을 억제 및 대처할 수 있는 생균제의 개발이 절실히 필요하다. 그리고 나아가 어류장내의 유액 세균총을 형성하게 하여 성장촉진 및 질병예방, 수질오염 억제 등을 목적으로 하는 양식어류용 생균제의 개발이 반드시 필요하다. 종래의 생균제의 이용 범위는 주로 사람과 가축을 대상으로 개발 및 생산되어 양식어류에 생균제를 사용하기 위해서는 여러 가지 생육 및 최적 조건을 가미하여 개발되어야 한다. 따라서 본 과제에서는 효과적인 생균제를 선별하여 그 특성을 연구하고 대량 배양을 위한 배지의 최적 조건을 탐색하고자 한다.

(1) 양어사료용 균주 수집 및 선정

① 균주 수집

(주)바이넥스에서 보관 중인 *B. polyfermenticus* n. sp. 원료 및 제품으로부터 1차적으로 증식능이 우수한 균주를 선별하기 위하여 0.1% 펩톤수로 희석하여 1.5% agar가 함유된 TSA에 도말하여 37°C에서 24시간 배양된 균주 집락의 성상을 기준으로 하여 53종을 선별하였다. *B. licheniformis*는 (주)바이넥스에서 보관 중인 균주 2종과 KCCM과 KCTC에서 9종을 분양받아 nutrient 배지에서 증식시켜 동정을 거쳐 실험에 사용하였다.

② 양어용 균주 선정

㉠ Amylase test

선정된 *B. polyfermenticus* 균주 53종 및 *B. licheniformis* 11종의 균주들로부터 증식능이 우수한 균주를 선별하기 위한 지표로서 amylase의 활성이 우수한 균주들을 선별하기 위하여 가용성 전분이 0.1% 함유된 1.5% TSA(Tryptic Soy Broth + Agar 1.5%)에 tooth pick하여 37°C, 24시간 배양하고 요오드용액으로 염색하여 투명환의 크기 및 균 집락의 크기를 측정하여 활성이 우수한 균주를 *B. polyfermenticus* 3종(97 BP-4, BP P-4, BP P-14), *B. licheniformis* 2종(BL 1, 2)을 선별하였다.

㉔ 병원성 세균의 대한 항균력 테스트

- 연구 방법 : 해수 병원성세균에 대한 항균력을 측정하기 위하여 한국미생물보존센터(KCCM)으로부터 분양받은 균주를 대상으로 실험을 실시하였다. TSA plate에 각 균주를 tooth pick로 점적하여 24시간 배양한 후 plate를 뒤집는다. 전배양된 대상 병원성 균주를 OD(600nm) 1.0으로 조정하여 Nutrient soft agar(agar 0.75%) 10ml에 100ul 접종하고 시험균주가 배양된 TSA plate에 overlay하여 37℃에서 24시간 배양하여 clear zone 측정하였다.

- 연구 결과 : B. polyfermenticus 균주 중에서는 97 BP-4 균주가 가장 높은 항균활성을 나타내었으며, BL 균주 중에서는 BL-1 균주가 MRSA균주에 대해서 높은 항균활성을 나타내었다.

| 대상 균주 | clear zone(mm) | | | | |
|---|----------------|--------|---------|--------|-------|
| | 97 Bp-4 | BP P-4 | BP P-14 | BL-1 | BL-2 |
| <i>Sal. typhimurium</i> 1925 | 7±1.0 | 7±1.0 | 8±1.0 | 0 | 0 |
| <i>Sal. typhi</i> 1926 | 24±2.0 | 12±2.0 | 18±0.5 | 0 | 0 |
| <i>Sal. typhi</i> 2057 | 7±2.0 | 8±1.0 | 9±1.0 | 0 | 0 |
| <i>Sal. typhi</i> 2058 | 29±0.5 | 19±2.0 | 21±0.5 | 0 | 0 |
| <i>Sal. typhi</i> 2370 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Sal. typhi</i> 2371 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Sal. typhi</i> 2514 | 12±2.0 | 7±1.0 | 7±1.0 | 7±1.0 | 7±1.0 |
| <i>Sal. typhi</i> 2525 | 8±0.5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Sal. typhi</i> 12401 | 13±1.0 | 9±1.5 | 7±2.5 | 0 | 0 |
| <i>Sta. aureus</i> KCCM 11335 | 21±1.5 | 13±2.0 | 12±0.5 | 0 | 0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> KCCM 41433 | 20±1.0 | 18±0.5 | 16±2.0 | 0 | 0 |
| MRSA* #2 | 8±1.0 | 7±1.0 | 7±1.0 | 15±1.0 | 8±1.0 |
| MRSA #5 | 12±1.0 | 9±0.5 | 10±1.5 | 17±1.5 | 9±1.5 |
| MRSA #8 | 13±1.5 | 11±1.5 | 17±0.5 | 7±1.0 | 7±1.0 |

MRSA* : Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*



Fig. 1. 병원성 세균에 대한 항균력 테스트

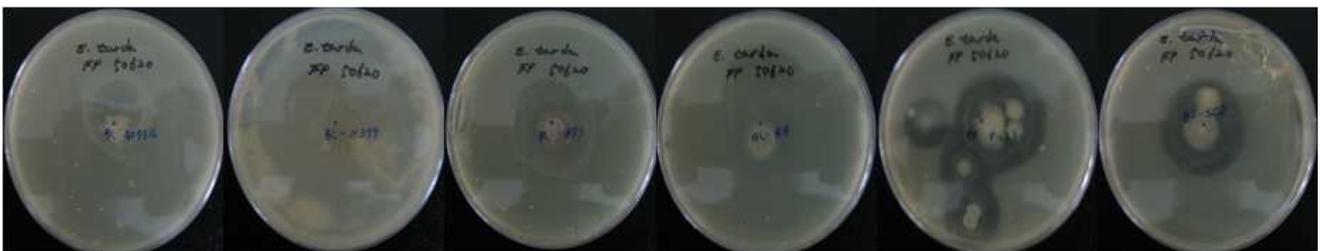
㉔ 어병세균의 길항능 조사

- 실험방법 : TSA(Tryptic Soy Agar, Agar 1.5%) plate에 선별된 균주를 각각 점적하여 37℃에서 24시간 배양하고, 배양된 plate를 무균적으로 뒤집는다. 각각 ST broth에서 배양된 대상균주를 ST broth로 희석하여 OD 1.0(600nm)로 조정된 배양액 100 μ l을 50~60℃로 가온한 soft STA(ST Broth + Agar 0.75%) 10ml에 접종하여 잘 혼합하고 선별균주가 배양되어진 plate에 overlay하여 균헌 다음 37℃에서 24시간 배양하여 투명환의 유무로서 항균능을 판단한다.

- BP, BL 균주의 항균능 실험 결과

| | <i>St. iniae</i> | <i>V. anguillarum</i> (현장균주) | <i>V. anguillarum</i> 공시균주 | <i>E. tarda</i> (현장균주 1) | <i>E. tarda</i> (현장균주 2) | <i>E. tarda</i> 공시균주 |
|---------|------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 97 BP-4 | + | + | + | - | + | + |
| BP P-4 | + | + | + | - | + | + |
| BP P-14 | - | - | - | - | - | - |
| BL-1 | - | + | + | - | - | - |
| BL-2 | + | - | - | - | - | - |

+ ; 항균력 가짐, - ; 항균력 없음.



<E. tarda 공시균주>



<E. tarda 현장균주>

⇒ 이상의 결과에서 97 BP-4이 증식능과 병원성세균 및 어병세균에 대한 항균력이 가장 우수하여 최종 선별하였다. *B. licheniformis* 균주 중에서는 BL-1이 MRSA와 어병세균에 대한 항균력이 우수하여 최종 선별하였다.

(2) 16S rRNA의 DNA 서열을 이용한 균주 종 동정

1차 선정된 후보 *B. polyfermenticus* 3종 (97-4, P-4와 P-14)과 *B. licheniformis* 2종 (BL-1과 BL-2)에 대한 16S rRNA 서열을 확인하기 위하여 조사되는 미생물 종의 total gDNA를 추출하여 그 gDNA를 template로 한 PCR 기법 및 DNA 서열 분석법을 활용하여 확인하였다.

우선, 선정된 5종의 생균제로부터 gDNA를 추출하기 위하여 10mL TSB 배지에 하루 전날 각각의 균주를 접종하여 37 °C에서 혼탕 배양한 뒤에 이들 각각의 균주들을 각 1.5mL tube로 옮겨 원심분리기를 통하여 cell들을 harvest한다. 이 다음은 Exgene Cell SV kit (GENEALL Biotechnology Co., Ltd.)를 활용하였으며, 그 방법은 그 kit내에 포함된 manual에 따라 실시하였다. 이렇게 추출된 각 균주의 gDNA는 각 균주의 16S rRNA 서열을 밝히기 위하여 PCR을 위한 template로써 사용하였다.

선정 균주의 16S rRNA 서열을 확인하기 위하여, 사용된 primer는 Forward primer를 위하여 20mer의 “5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'”를, 그리고 Reverse primer를 위하여 22mer의 “5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'”를 primer set로 하여 활용하였으며, PCR 조건은 첫 번째 denature step에서는 94 °C에서 5분, 그리고 amplification step에서 denature는 94 °C에서 30초, annealing은 60 °C에서 30초, 마지막으로 extension은 72 °C에서 1분 30초를 35 cycles로 실행했으며, 마지막 extension step을 72 °C에서 10분간을 둔 후에 이런 반응이 완료되면, 4 °C에서 Holding이 되도록 PCR 조건으로 실행하였다.

이렇게 증폭된 각 균주의 16S rRNA의 DNA들은 겔에 전기영동하여 확인된 각 band

를 Expin Gel SV kit (GENEALL Biotechnology Co., Ltd.)를 활용하여 정제하였으며, 이렇게 정제된 DNA들은 DNA 서열분석 전문회사인 지앤시바이오에 의뢰하여 그 각 균주의 16S rRNA 유전자의 DNA 서열을 확인하였다.

이렇게 확인된 각 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 확인하기 위하여 NCBI의 BLAST program을 활용하여 기존의 유전자 Database에 있는 *Bacillus*의 16S rRNA 유전자 서열과 확인하였다. 그 결과 이들 선정된 균주의 16S rRNA 유전자들 중에 *B. polyfermenticus* 97-4, P-4와 P-14는 모두 *Bacillus subtilis* strain CICC 23584 16S rRNA 유전자와 100% 일치하였으며, 이들 선정 균주들이 생화학적 특성에서는 각각의 차이를 보였으나, 이 16S rRNA 유전자 서열은 이들 *B. polyfermenticus*의 종들간에는 별 차이가 없음을 확인하였다. *B. licheniformis*에서 BL-1의 경우 *Bacillus* sp. DU156(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene와 100% 일치함을 확인하였으며, BL-2의 경우, *Bacillus licheniformis* strain NBGD49 16S ribosomal RNA gene과 100%일치함을 확인할 수 있었다.

이들 선정 균주의 16S rRNA 유전자 서열은 대표적인 *Bacillus* 종인 *Bacillus subtilis* 종의 16S rRNA 유전자 서열과 비교하기 위하여 DNA alignment를 실시하였으며, 이를 위하여 BioEdit란 프로그램에 있는 clustalW를 이용하여 실시하였다. 그 결과는 다음 그림 1과 같다. 이때 사용된 *B. subtilis*의 균주는 ATCC6051 strain이며, 이의 16S rRNA 유전자 서열의 출처는 NCBI GenBank accession number AF176351이며, 이 서열을 활용하였다.

결과처럼, 앞선 Blast 결과와 같이 *B. subtilis*와 매우 유사함을 확인할 수 있었으며, 이들 두 결과를 바탕으로 선정 균주들이 확실한 *Bacillus* 종임을 확인할 수 있었다.

| | | |
|-------------|---|-----|
| BS-AF176322 | ATGT TAGCGGCGGACGGGT GAGTAAAC CGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA | 57 |
| BP_97-4 | ATGT TAGCGGCGGACGGGT GAGTAAAC CGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA | 57 |
| BP_P-14 | ATGT TAGCGGCGGACGGGT GAGTAAAC CGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA | 57 |
| BP_P-4 | ATGT TAGCGGCGGACGGGT GAGTAAAC CGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA | 57 |
| BL-1 | ATGT CAGCGGCGGACGGGTGAG ACA CGTGGGT ACCTGCCTGTAAGACT GGATA | 58 |
| BL-2 | ATGTTAGCGGCGGACGGGT GAGTAAACACTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATA | 59 |
| <hr/> | | |
| BS-AF176322 | ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAA | 117 |
| BP_97-4 | ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAA | 117 |
| BP_P-14 | ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAA | 117 |
| BP_P-4 | ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAA | 117 |
| BL-1 | ACTCCGGGAAACCGGGGCTAAT CCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTC AATTATAAA | 118 |
| BL-2 | ACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTC AATTATAAA | 119 |
| <hr/> | | |
| BS-AF176322 | AGGTGGCTTC GGCTACCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT | 176 |
| BP_97-4 | AGGTGGCTTC GGCTACCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT | 176 |
| BP_P-14 | AGGTGGCTTC GGCTACCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT | 176 |
| BP_P-4 | AGGTGGCTTC GGCTACCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT | 176 |
| BL-1 | AGGTGGCTTTAGCTACCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT | 178 |
| BL-2 | AGGTGGCTTTAGCTACCACCTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT | 179 |
| <hr/> | | |
| BS-AF176322 | AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA | 236 |
| BP_97-4 | AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA | 236 |
| BP_P-14 | AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA | 236 |
| BP_P-4 | AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA | 236 |
| BL-1 | AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA | 238 |
| BL-2 | AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA | 239 |
| <hr/> | | |
| BS-AF176322 | CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA | 296 |
| BP_97-4 | CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA | 296 |
| BP_P-14 | CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA | 296 |
| BP_P-4 | CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA | 296 |
| BL-1 | CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA | 298 |
| BL-2 | CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA | 299 |
| <hr/> | | |
| BS-AF176322 | AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTG | 356 |
| BP_97-4 | AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTG | 356 |
| BP_P-14 | AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTG | 356 |
| BP_P-4 | AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTG | 356 |
| BL-1 | AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTG | 358 |
| BL-2 | AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAAGCTCTGTTG | 359 |
| <hr/> | | |
| BS-AF176322 | TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAG | 416 |
| BP_97-4 | TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAG | 416 |
| BP_P-14 | TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAG | 416 |
| BP_P-4 | TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAG | 416 |
| BL-1 | TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAG | 418 |
| BL-2 | TTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAAG | 419 |
| <hr/> | | |
| BS-AF176322 | CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA | 476 |
| BP_97-4 | CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA | 476 |
| BP_P-14 | CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA | 476 |
| BP_P-4 | CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA | 476 |
| BL-1 | CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA | 478 |
| BL-2 | CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAA TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA | 479 |
| <hr/> | | |
| BS-AF176322 | TTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAACTGATGTGAAAGCCCGGCTC | 536 |
| BP_97-4 | TTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAACTGATGTGAAAGCCCGGCTC | 536 |
| BP_P-14 | TTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAACTGATGTGAAAGCCCGGCTC | 536 |
| BP_P-4 | TTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAACTGATGTGAAAGCCCGGCTC | 536 |
| BL-1 | TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAACTGATGTGAAAGCCCGGCTC | 538 |
| BL-2 | TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAACTGATGTGAAAGCCCGGCTC | 539 |
| <hr/> | | |
| BS-AF176322 | AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCC | 596 |
| BP_97-4 | AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCC | 596 |
| BP_P-14 | AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCC | 596 |
| BP_P-4 | AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCC | 596 |
| BL-1 | AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCC | 598 |
| BL-2 | AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAAGAGGAGAGTGGAAATCC | 599 |
| <hr/> | | |
| BS-AF176322 | ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTCTCT | 656 |
| BP_97-4 | ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTCTCT | 656 |
| BP_P-14 | ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTCTCT | 656 |
| BP_P-4 | ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTCTCT | 656 |
| BL-1 | ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCAGCTCTCT | 658 |

| | | |
|-------------|--|------|
| BL-2 | ACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAACCAGTGGCGAAGCGACTCTCT | 659 |
| BS-AF176322 | GGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG | 716 |
| BP_97-4 | GGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG | 716 |
| BP_P-14 | GGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG | 716 |
| BP_P-4 | GGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG | 716 |
| BL-1 | GGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG | 716 |
| BL-2 | GGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGG | 719 |
| BS-AF176322 | TAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGC | 776 |
| BP_97-4 | TAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGC | 776 |
| BP_P-14 | TAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGC | 776 |
| BP_P-4 | TAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGC | 776 |
| BL-1 | TAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGC | 778 |
| BL-2 | TAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGCTGC | 779 |
| BS-AF176322 | AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA | 836 |
| BP_97-4 | AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA | 836 |
| BP_P-14 | AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA | 836 |
| BP_P-4 | AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA | 836 |
| BL-1 | AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA | 838 |
| BL-2 | AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAA | 839 |
| BS-AF176322 | TTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAAC | 896 |
| BP_97-4 | TTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAAC | 896 |
| BP_P-14 | TTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAAC | 896 |
| BP_P-4 | TTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAAC | 896 |
| BL-1 | TTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAAC | 898 |
| BL-2 | TTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAAC | 899 |
| BS-AF176322 | CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAATCCTAGAGATAGGACGTCCTCCCTTCGGGGGCGAG | 956 |
| BP_97-4 | CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAATCCTAGAGATAGGACGTCCTCCCTTCGGGGGCGAG | 956 |
| BP_P-14 | CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAATCCTAGAGATAGGACGTCCTCCCTTCGGGGGCGAG | 956 |
| BP_P-4 | CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAATCCTAGAGATAGGACGTCCTCCCTTCGGGGGCGAG | 956 |
| BL-1 | CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAATCCTAGAGATAGGACGTCCTCCCTTCGGGGGCGAG | 958 |
| BL-2 | CTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAATCCTAGAGATAGGACGTCCTCCCTTCGGGGGCGAG | 959 |
| BS-AF176322 | AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG | 1016 |
| BP_97-4 | AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG | 1016 |
| BP_P-14 | AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG | 1016 |
| BP_P-4 | AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG | 1016 |
| BL-1 | AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG | 1018 |
| BL-2 | AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG | 1019 |
| BS-AF176322 | CAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG | 1076 |
| BP_97-4 | CAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG | 1076 |
| BP_P-14 | CAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG | 1076 |
| BP_P-4 | CAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG | 1076 |
| BL-1 | CAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG | 1078 |
| BL-2 | CAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTG | 1079 |
| BS-AF176322 | CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG | 1136 |
| BP_97-4 | CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG | 1136 |
| BP_P-14 | CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG | 1136 |
| BP_P-4 | CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG | 1136 |
| BL-1 | CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG | 1138 |
| BL-2 | CCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG | 1139 |
| BS-AF176322 | GGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAA | 1196 |
| BP_97-4 | GGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAA | 1196 |
| BP_P-14 | GGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAA | 1196 |
| BP_P-4 | GGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAA | 1196 |
| BL-1 | GGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAA | 1198 |
| BL-2 | GGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAA | 1199 |
| BS-AF176322 | TCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA | 1235 |
| BP_97-4 | TCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA | 1235 |
| BP_P-14 | TCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA | 1235 |
| BP_P-4 | TCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA | 1235 |
| BL-1 | TCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA | 1237 |
| BL-2 | TCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAA | 1238 |

그림 2. 선정균주의 16S rRNA 유전자 서열과 *B. subtilis*의 16S rRNA 유전자 2. 서열간의 DNA alignment.

또한 이들 서열들 간의 Identity는 아래 표 1과 같으며, 선정 균종간의 서열 유사성이 *B. polyfermenticus*의 경우 100% 일치하였으며, *B. licheniformis*의 경우 서로 99.3%의 일치성을 보였다. 이들 선정 균은 서로가 같은 종의 다른 strain임을 암시할 수 있었다.

표 1. DNA alignment를 실시한 균종들간의 16S rRNA 유전자 사이의 identity.

| | BC-AF 176322 | BL-AB 305290 | BS-AF 176322 | BT-D1 6281 | BP_97- 4 | BP_P- 14 | BP_P-4 | BL-1 | BL-2 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|-------------|-------------|--------|-------|-------|
| BC-AF 176322 | ID | 0.938 | 0.938 | 0.998 | 0.937 | 0.937 | 0.937 | 0.932 | 0.936 |
| BL-AB 305290 | 0.938 | ID | 0.982 | 0.936 | 0.978 | 0.978 | 0.978 | 0.992 | 0.995 |
| BS-AF 176322 | 0.938 | 0.982 | ID | 0.938 | 0.995 | 0.995 | 0.995 | 0.978 | 0.981 |
| BT-D1 6281 | 0.998 | 0.936 | 0.938 | ID | 0.937 | 0.937 | 0.937 | 0.932 | 0.936 |
| BP_97- 4 | 0.937 | 0.978 | 0.995 | 0.937 | ID | 1 | 1 | 0.974 | 0.977 |
| BP_P- 14 | 0.937 | 0.978 | 0.995 | 0.937 | 1 | ID | 1 | 0.974 | 0.977 |
| BP_P-4 | 0.937 | 0.978 | 0.995 | 0.937 | 1 | 1 | ID | 0.974 | 0.977 |
| BL-1 | 0.932 | 0.992 | 0.978 | 0.932 | 0.974 | 0.974 | 0.974 | ID | 0.993 |
| BL-2 | 0.936 | 0.995 | 0.981 | 0.936 | 0.977 | 0.977 | 0.977 | 0.993 | ID |

선정균주의 16S rRNA 유전자 서열이 기타 다른 bacillus종과의 관계를 확인하기 위하여 phylogenetic tree를 작성하였으며, 이를 위하여, 대표 bacillus인 *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*와 *B. thuringiensis*와 비교하였으며, *E. coli*는 outgroup으로 설정하였다. 그리고, 이들 유전자의 출처는 다음 표 2와 같다.

표 2. phylogenetic tree에 사용된 16S rRNA 유전자 표기 설명

| Species | Strain name | Genbank Accession No. | Labelling in the phylogenetic tree |
|-------------------------|-------------|-----------------------|------------------------------------|
| <i>B. cereus</i> | ATCC 14579 | AF176322 | BC-AF176322 |
| <i>B. subtilis</i> | ATCC 6051 | AJ276351 | BS-AJ276351 |
| <i>B. licheniformis</i> | ATCC 14580 | AB305290 | BL-AB305290 |
| <i>B. thuringiensis</i> | ATCC 10792 | D16281 | BT-D16281 |
| <i>E. coli</i> | ATCC 43893 | HM194886 | E. coli |

Phylogenetic tree를 그리기 위하여, 우선 이들 서열들을 BIOEdit에 포함된 clustalW를 이용하여 DNA alignment를 실시하였으며, 이렇게 생성된 alignment 파일을 Mega 4.1 프로그램의 Open data로써 활용하였다. 그리고 tree를 그리기 위한 조건은 Neighbor-Joining 방식으로 그렸으며, 이때의 bootstrap값은 1000으로 하였으며, 또한 substitution model은 “number of differences”로 설정하여 그렸고, E. coli의 16S rRNA 유전자 서열은 outgroup로써 설정하였다. 그 결과 아래 그림 2와 같은 tree의 결과를 얻을 수 있었다. Phylogenetic tree의 결과에서 BL-1과 BL-2는 대표 B. licheniformis의 유전자 group에 포함되므로, 이들 BL-1과 BL-2는 *Bacillus licheniformis*로 확신된다. 그리고, BP 97-4, P-4와 P-14는 B. subtilis의 그룹으로 포함되지만, 아직 *B. polyfermenticus*의 경우 비교 대표 균종이 없어, 이들 균종 간의 사이를 정립하기에는 힘들다. 하지만, *B. polyfermenticus*가 *B. subtilis*의 아종으로 분류될 가능성은 남아 있는 상태이다.

이렇게 각 선정 균종의 16S rRNA 유전자를 확인하는 것은 이후 산업화에서 이들 균주의 대량 배양등을 실행할 때 배양 공정 중에 다른 균종으로의 오염등을 확인할 수 있는 지표로도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

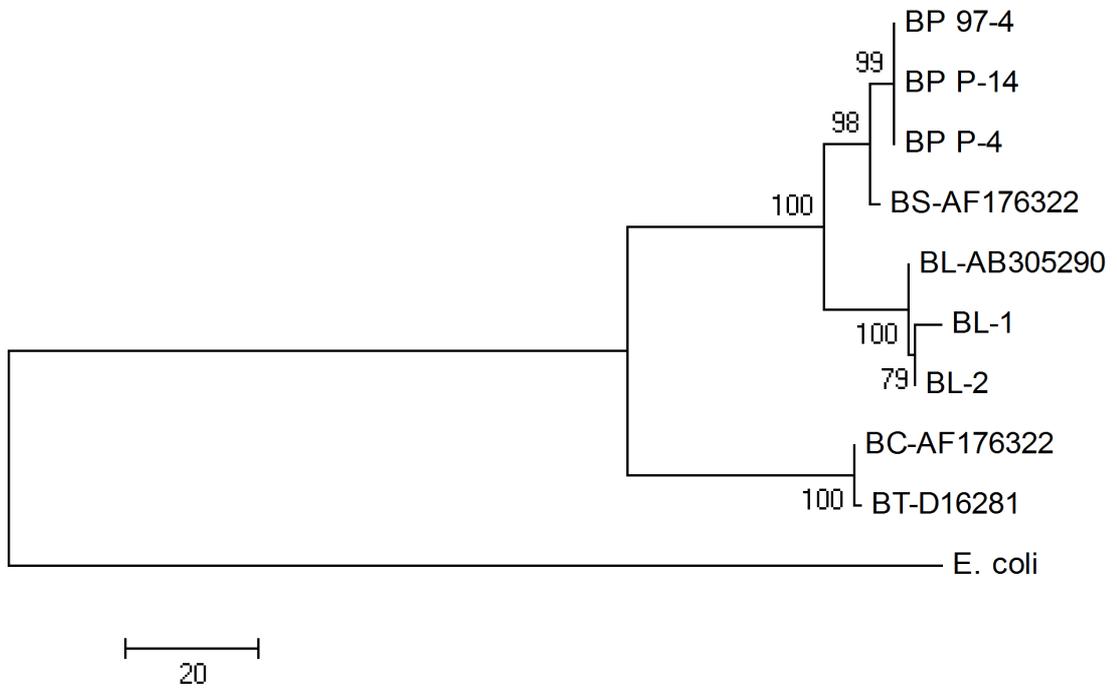


그림 3. 선정균주의 16S rRNA 유전자 서열과 여러 가지 대표 bacillus 종들간의 phylogenetic tree.

제 2 절 : 선별된 균주의 미생물학적 및 생화학적 특성 규명

1. 미생물학적 특성 연구

이상의 결과에서 97 BP-4, *B. licheniformis*-2균주가 최종균주로 선별되었으며, 97 BP-4는 *B. polyfermenticus* BC-1이라 명명하였고, *B. licheniformis*-2균주는 *B. licheniformis*로 하여 이후의 실험에 사용하였다.

㉔ 내산성

- 실험방법 ;

B. polyfermenticus BC-1, *B. licheniformis* TSB 배지에서 7일간 배양(37°C, 200 rpm)하여 충분히 포자를 형성하여 사용

↓

pepsin(Sigma) 1,000 U/ml이 함유된 0.1% 펩톤수를 1N HCl로 pH를 2.0, 4.0, 6.0으로 조절 용액

↓

각각 배양된 균을 위에 제조된 인공위액에 접종하여 4시간동안 처리하여 각 시간별로 채취하여 균 계수방법에 준하여 처리

| Strain | pH | Relative cell number (%) | | | | |
|-----------------------------------|----|--------------------------|-----------|-----------|----------|----------|
| | | 0 hr | 1 hr | 2 hr | 3 hr | 4hr |
| <i>B. polyfermenticus</i> BC-1 | 2 | 100 ± 9.4 | 94 ± 1.9 | 81 ± 9.4 | 68 ± 2.3 | 49 ± 2.1 |
| | 4 | 100 ± 2.6 | 107 ± 2.3 | 84 ± 2.6 | 77 ± 3.5 | 84 ± 4.0 |
| | 6 | 100 ± 2.4 | 87 ± 4.3 | 100 ± 1.1 | 93 ± 3.3 | 87 ± 5.4 |
| <i>B. licheniformis</i> | 2 | 100 ± 2.1 | 86 ± 1.6 | 75 ± 1.0 | 74 ± 1.3 | 61 ± 1.1 |
| | 4 | 100 ± 9.6 | 77 ± 9.6 | 85 ± 5.8 | 85 ± 5.8 | 85 ± 6.5 |
| | 6 | 100 ± 1.2 | 78 ± 7.8 | 74 ± 9.6 | 81 ± 1.8 | 89 ± 7.4 |

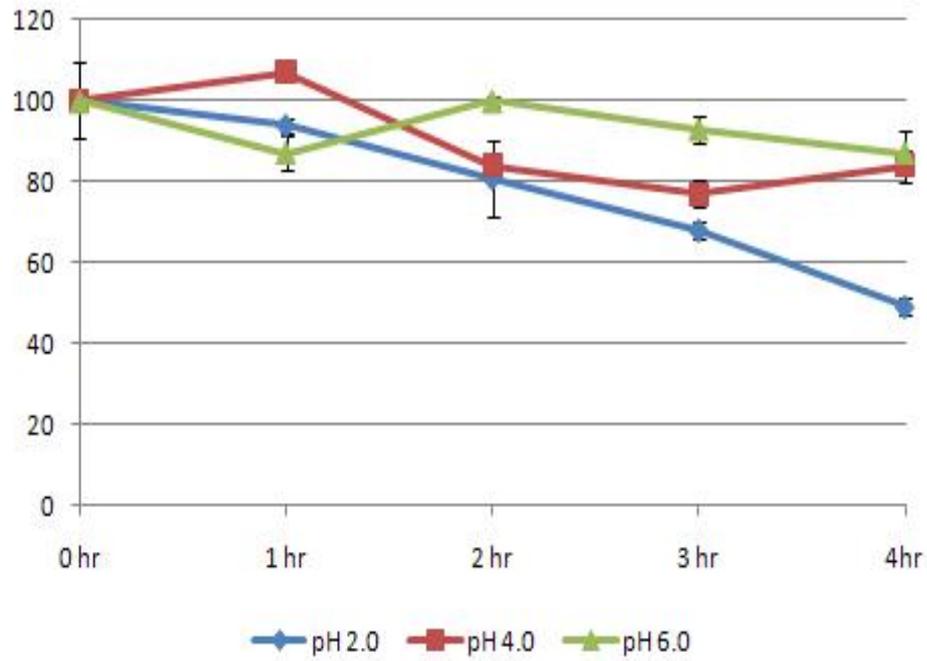


그림 4. *B. polyfermenticus* BC-1의 내산성

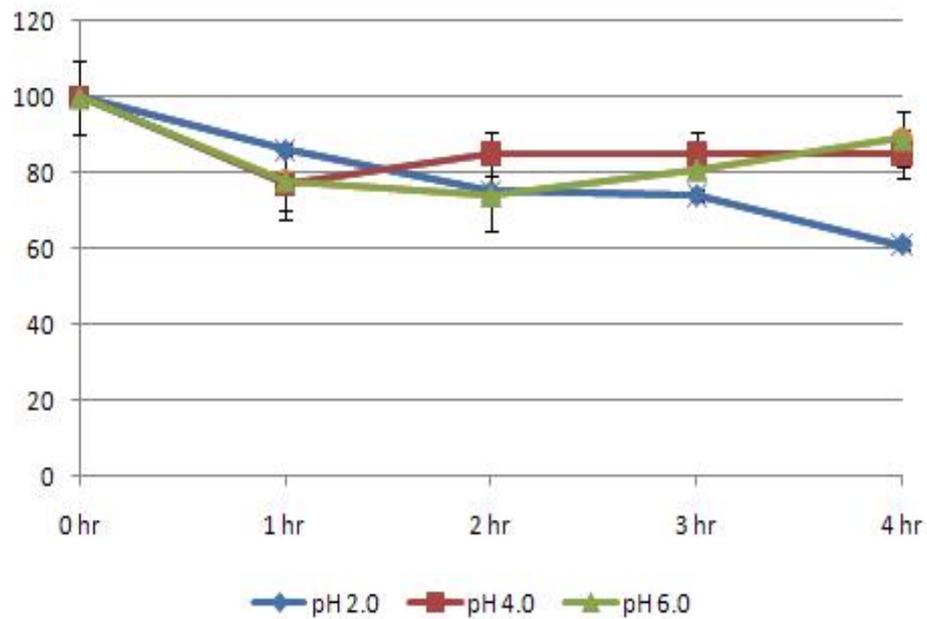


그림 5. of *B. licheniformis*의 내산성

- 상기의 결과로, *B. polyfermenticus* BC-1과 *B. licheniformis*는 pH 2, 4, 6 조건에서 4시간째에 각각 49, 84, 87 %와 61, 85, 89 %의 생존율을 나타내었다.

㉔ 내담증성

- 실험방법 : 인공위액에서 4시간 처리한 각 균주를 원심분리하여 회수된 균체를 0.1% peptone 수 100ml에 0.06g Oxygall을 첨가한 용액에 첨가하여 시간별 처리하여 멸균된 0.1% peptone수에 희석하여 TSA plate에 도말하여 생존율 확인함.

- 결과 : *B. polyfermenticus* BC-1과 *B. licheniformis*는 담즙 조건에서 각각 63.6 %와 65.2 %의 생존율을 나타내었다.

| Time (hr) | Bacterial survival rate (%) at Bile acidic condition | |
|-----------|--|-------------------------|
| | <i>B. polyfermenticus</i> BC-1 | <i>B. licheniformis</i> |
| 0 | 100±7.23 | 100±5.82 |
| 1 | 94.2±6.31 | 78.6±10.51 |
| 2 | 71.4±3.53 | 74.4±9.98 |
| 3 | 67.5±1.89 | 67.7±4.88 |
| 4 | 63.6±4.56 | 65.2±4.17 |

* Results are shown as mean ± s.d

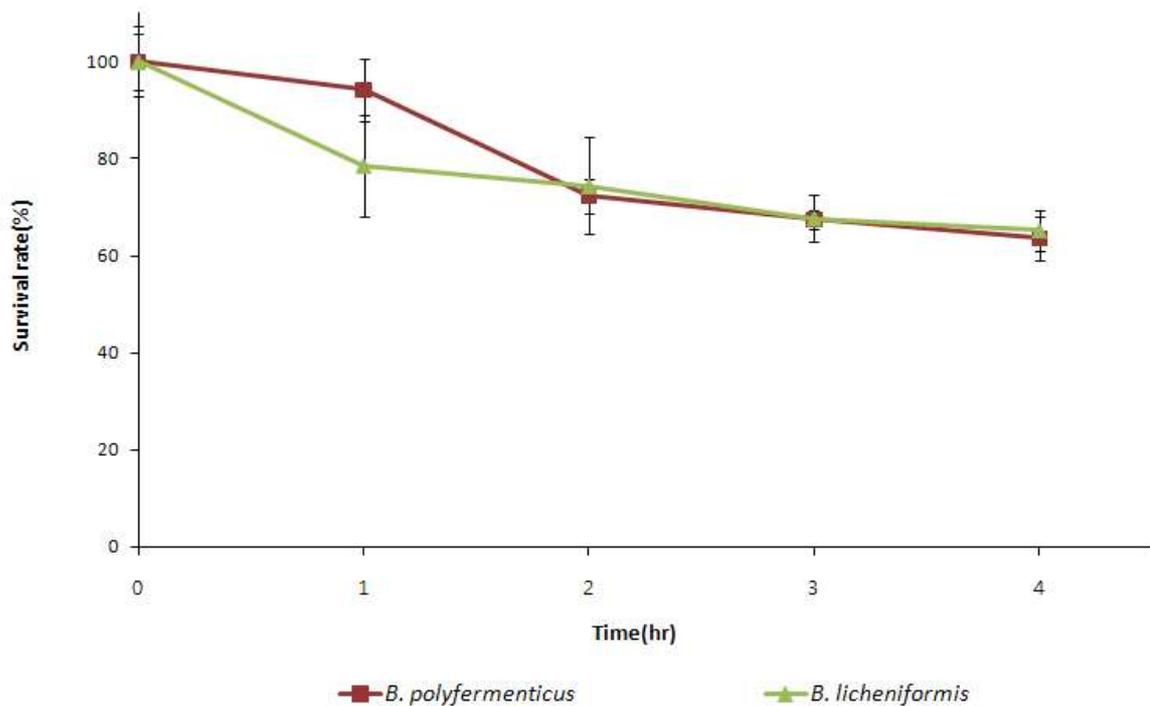


그림 6. *B. polyfermenticus*와 *B. licheniformis*의 내담증성

㉔ 내염성

- 연구 방법 : Salt가 각각의 농도로 함유되어진 99ml의 용액에 포자를 충분히 형성한 배양액 1.0ml를 접종하여 37℃ 진탕배양기에서 200rpm으로 교반하면서 시간별 처리하여 멸균된 0.1% peptone수에 희석하여 TSA plate에 도말하여 생존을 확인함.

- 연구 결과 : *B. polyfermenticus* BC-1과 *B. licheniformis*는 10, 20, 30%의 조건에서 4일 동안 각각 94, 94, 77 %와 99, 88, 86, %의 생존율을 나타내었다.

| Strain | Salt (%) | Viable cell No. (x 10 ⁵ CFU/ml) | | | | |
|-----------------------------------|----------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0 day | 1 day | 2 day | 3 day | 4 day |
| <i>B. polyfermenticus</i> BC-1 | 0 | 6.3 ± 1.5 | 6.0 ± 2.0 | 6.3 ± 0.6 | 6.6 ± 1.1 | 6.3 ± 2.1 |
| | 10 | 5.6 ± 0.5 | 5.6 ± 0.6 | 5.6 ± 0.6 | 5.6 ± 1.1 | 5.3 ± 0.6 |
| | 20 | 5.6 ± 1.6 | 5.6 ± 0.6 | 5.3 ± 0.6 | 5.3 ± 1.2 | 5.3 ± 0.6 |
| | 30 | 5.6 ± 0.6 | 4.6 ± 1.2 | 4.3 ± 0.4 | 4.6 ± 1.1 | 4.3 ± 1.6 |
| <i>B. licheniformis</i> | 0 | 28 ± 2.1 | 29 ± 7.1 | 27 ± 2.3 | 27 ± 2.0 | 28 ± 1.0 |
| | 10 | 27 ± 4.5 | 26 ± 1.1 | 28 ± 4.3 | 27 ± 6.5 | 27 ± 2.5 |
| | 20 | 26 ± 1.2 | 27 ± 1.0 | 25 ± 4.0 | 25 ± 3.0 | 23 ± 2.5 |
| | 30 | 28 ± 4.0 | 26 ± 2.6 | 27 ± 2.0 | 25 ± 1.5 | 24 ± 1.0 |

㉔ 내열성

1) 실험방법 : 0.1% peptone수 99ml의 용액에 포자를 충분히 형성한 배양액 1.0ml를 접종하여 각각의 온도에서 시간별 처리하여 멸균된 0.1% peptone수에 희석하여 TSA plate에 도말하여 생존율 확인

2) 결과 ; *B. polyfermenticus* BC-1과 *B. licheniformis*는 4, 20, 40, 60, 80, 100℃의 조건에서 2시간째에 각각 99, 94, 99, 71, 54, 43 %와 111, 93, 97, 32, 69, 60 %의 생존율을 나타내었다.

| Strain | Temperature (°C) | Viable cell No. (x 10 ⁵ CFU/ml) | | | | |
|-----------------------------------|------------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 0 hr | 0.5 hr | 1.0 hr | 1.5 hr | 2.0 hr |
| <i>B. polyfermenticus</i> BC-1 | 4 | 5.7 ± 0.6 | 5.7 ± 0.6 | 5.7 ± 2.1 | 5.7 ± 0.6 | 5.7 ± 1.2 |
| | 20 | 5.6 ± 0.5 | 5.3 ± 2.5 | 5.3 ± 1.5 | 5.6 ± 0.5 | 5.3 ± 1.5 |
| | 40 | 5.6 ± 0.5 | 5.3 ± 1.3 | 5.6 ± 0.5 | 5.3 ± 0.5 | 5.6 ± 0.6 |
| | 60 | 5.6 ± 0.5 | 5.0 ± 3.6 | 4.3 ± 1.5 | 4.3 ± 1.6 | 4.0 ± 1.0 |
| | 80 | 5.3 ± 1.5 | 4.8 ± 0.5 | 4.3 ± 1.2 | 3.3 ± 0.5 | 3.0 ± 0.6 |
| | 100 | 6.0 ± 1.0 | 4.3 ± 0.5 | 3.6 ± 1.1 | 3.3 ± 0.6 | 2.6 ± 0.5 |
| <i>B. licheniformis</i> | 4 | 27 ± 3.2 | 28 ± 2.1 | 28 ± 0.6 | 29 ± 0.6 | 30 ± 0.6 |
| | 20 | 28 ± 1.7 | 27 ± 2.5 | 28 ± 1.0 | 25 ± 3.7 | 26 ± 0.6 |
| | 40 | 27 ± 3.2 | 26 ± 3.2 | 25 ± 4.0 | 25 ± 4.9 | 26 ± 7.3 |
| | 60 | 28 ± 3.7 | 26 ± 3.0 | 25 ± 2.6 | 22 ± 2.8 | 19 ± 3.5 |
| | 80 | 29 ± 2.1 | 27 ± 2.0 | 25 ± 2.8 | 21 ± 2.0 | 20 ± 4.7 |
| | 100 | 25 ± 4.0 | 21 ± 4.3 | 19 ± 2.6 | 17 ± 3.4 | 15 ± 3.5 |

㉔ 항생제 내성

- 연구 방법 : 양식장에서 널리 사용하고 있는 시판용 항생제를 구입하여 본 실험에 사용하였다. TSA plate에 stainless hole을 이용하여 각 항생제 용액 20 μ l를 spot 하고 각 균주를 TSB에 전배양하고 멸균된 신선한 TSB로 OD(600nm) 1.0으로 조정하여, TSB soft agar 10ml에 100 μ l를 접종하여 overlay하여 37 $^{\circ}$ C에서 overnight하여 clear zone을 관찰하였다.

- 연구 결과 : 최종선별된 *B. polyfermenticus* BC-1, *B. licheniformis*의 양식장에 주로 사용되고 있는 항생제에 대한 내성을 실험한 결과 대부분의 항생제에 대해 내성을 가졌으며, 대조구로 시험되어진 타 *B. licheniformis* 공시균주도 비슷한 양상을 나타내었다. 따라서 *Bacillus* sp. 균주가 양식용 생균제로서 가능성이 있는 균주라고 할 수 있겠다.

| Strain | 항생제* | | | | | | | | |
|--------------------------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|------|------|------------|------------|
| | Amo | Amp | OTC | Ery | Cep | Flu | Chl | Cli | Oxo |
| <i>B. polyfermenticus</i> BC-1 | 200< | 200< | 10 \leq | 5 \leq | 1 \leq | 200< | 200< | 60 \leq | 100 \leq |
| <i>B. licheniformis</i> | 200< | 200< | 1 \leq | 5 \leq | 20 \leq | 200< | 200< | 40 \leq | 100 \leq |
| <i>B. licheniformis</i> -11379 | 150 \leq | 100 \leq | 200 \leq | 80 \leq | 10 \leq | 200< | 200< | 200 \leq | 200 \leq |
| <i>B. licheniformis</i> -11851 | 80 \leq | 100 \leq | 1 \leq | 10 \leq | 20 \leq | 200< | 200< | 200< | 80 \leq |
| <i>B. licheniformis</i> -40934 | 100 \leq | 80 \leq | 80 \leq | 20 \leq | 20 \leq | 200< | 200< | 200 \leq | 100 \leq |

주)항생제* : Amo(Amoxicillin), Amp(Ampicillin), OTC(Oxytetracyclin), Ery(Erythromycin), Cep(Cephalexin), Flu(Flumequin), Chl(Chloramphenicol), Cli(Clindamycin), Oxo(Oxolinic acid)

㉔ 효율 측정(면역능 test)을 위한 방법

: 본 실험은 고효율 고기능성 사료를 제조하여 현장에 투입하였을 때 고효율이 유도되는지 알아보기 위한 방법의 일환으로 혈청을 기반으로 하는 Nitric oxide(NO)을 측정하였다.

○ BPCM (*B. polyfermenticus* BC-1 conditioned media) 및 BLCM (*B. licheniformis* conditioned media) 제조

: *B. polyfermenticus* BC-1과 *B. lichemiformis*를 Tryptic Soy Broth (TSB) 배지에 16시간 배양 후 원심분리하여 상층액을 버리고 균만 취한다. 얻어진 균은 멸균 PBS로 3회 수세 후, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)에 넣어서 2시간 동안 배양하였다. 이 때 얻어진 상층액을 syringe 필터 (0.22 um)에 걸러낸 다음 실험에 이용하였다.

○ NO (Nitric oxide) assay

: 대식세포의 활성 정도를 알 수 있는 실험법의 하나로써 면역 물질의 스크리닝 단계에서 많이 사용되는 방법이다. 식세포 작용이 일어나고 대식세포가 활성화되어질수록 분비되어지는 NO의 양이 증가하므로 샘플 처리 후 대식세포에서 분비된 NO의 양을 측정하여 면역력 증강 여부를 조사할 수 있다. Raw 264.7 (mouse macrophage) 세포를 이용하였다.

- 연구 방법 : 세포를 96-well plate에 동일한 수로 분주하여 배양한 후 *B. polyfermenticus* BC-1와 BL의 배양액을 처리하였다. 48시간 동안 배양한 다음 배양액을 첨가한 상등액과 Griess reagent를 동량으로 혼합한 다음 흡광도를 측정하여 NO의 양을 측정하였다. 대조구는 LPS (Lipopolysaccharide)를 이용하였는데 LPS는 NO synthase (iNOS)의 발현에 영향을 주어 NO를 많이 합성한다.

- 연구 결과 : *B. polyfermenticus* BC-1와 배양액을 처리한 세포에서 LPS 대비 50% 정도의 NO가 분비되었다. 그러므로 *B. polyfermenticus* BC-1이 분비하는 물질이 면역체계의 어떠한 경로를 활성화시켜 대식세포를 활성화시킴으로써 면역력 증강에 영향을 주는 것을 확인하였다.

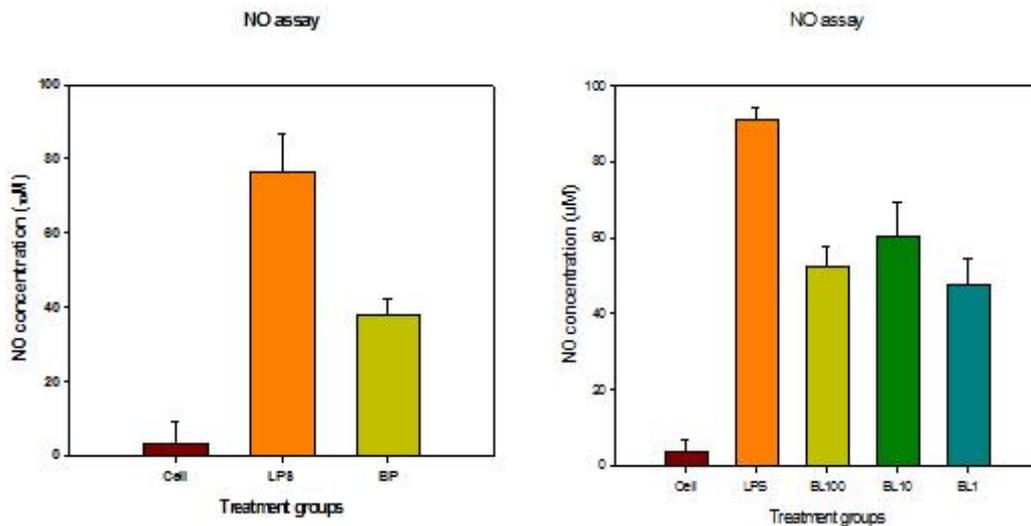


그림 7. BP BC-1 (좌)와 BL(우)의 NO 생성

○ Cytokine level 측정

- 사이토카인은 여러 가지 면역세포들에 의하여 만들어지며 여러 가지 면역 세포의 활성화, 성장, 분화 등에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 사이토카인 단백질들은 면역세포의 성숙과정에서도 중요한 작용을 나타낸다. 면역 반응 시 초기에 분비되는 cytokine 인 TNF- α 와 IL-12를 각각 R&D system의 quantitative sandwich enzyme immunoassay kit를 사용하여 측정하였다.

- 연구 방법: 항체가 coating 되어져 있는 plate에 *B.polyfermenticus* BC-1과 BL 배양액을 처리한 세포의 상등액을 처리하였다. 2시간 동안 반응 시켜 세포 상등액에 존재하는 cytokine이 plate에 고정되어 있는 항체와 결합하게 한 다음 상등액을 제거하고 세척하여 결합하지 않은 불필요한 물질들을 제거하였다. 그리고 conjugate (enzyme-linked polyclonal antibody)를 첨가하여 2시간 동안 반응 시킨 후 conjugate를 제거하고 세척하였다. 세척 후 substrate solution을 첨가하여 암실에서 20분 동안 반응시킨 후 stop solution을 넣고 흡광도를 측정하였다.

- 연구 결과 : *B. polyfermenticus* BC-1과 BL 배양액은 둘 다 TNF- α 의 분비를 촉진시켰으나 IL-12분에는 효과가 없었다 (data not shown), BL은 다. 일차적으로 분비된 TNF- α 가 이차적으로 다른 계열의 cytokine을 활성화 시켜 최종적으로 NO의 분비 촉진에 영향을 준 것으로 보이나 자극된 TNF- α 가 IL-12의 활성화에는 영향을 주지 않았고 다른 cytokine 경로를 자극시킴으로써 면역체계에 영향을 준 것으로 보인다.

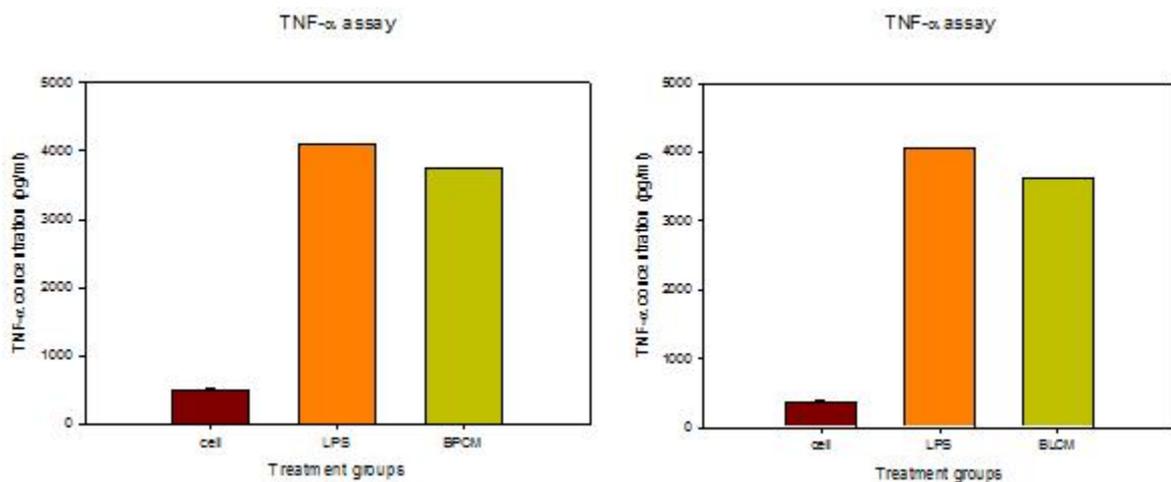


그림 8. BP BC-1 (좌)와 BL(우)의 TNF-alpha 생성

2. 생화학적 특성 연구

1. 특성분석

- 연구 방법 : 수집된 균주 중 일부를 이용하여 균 동정에 널리 사용되는 Gram staining 및 바실러스 동정을 위해 개발된 API 50CHB 테스트를 수행하여 기본적인 균주 특성분석을 하였다.

- 연구 결과 : Gram staining 결과, 바실러스의 전형적인 특성인 간균형태의 모양과 함께 gram positive 결과가 나왔다. 바실러스 동정을 위해 개발된 API 50CHB를 이용하여 분석한 결과, 정확한 바실러스 동정 및 구분이 이루어지지 않았다. 따라서 바실러스 종간 및 종내 동정을 위해서는 그에 알맞은 시스템 개발이 필요함을 알 수 있다.

표 3. Gram staining 결과

| Tentative designation | Phenotype | | Gram |
|---|---------------|----------------|------|
| <i>B.subtilis</i> . (NCIMB) | Glossy colony | Short rod | + |
| <i>B.licheniformis</i> (NCIMB) | Glossy colony | Thin, long rod | + |
| <i>B. licheniformis</i> -1 (BL-1) | Opaque colony | Short rod | + |
| <i>B. licheniformis</i> -2 (BL-2) | Glossy colony | Thin, long rod | + |
| 97 <i>B. polyfermenticus</i> -4 (97 BP-4) | Opaque colony | Short rod | + |
| <i>B. polyfermenticus</i> P-4 (BP P-4) | Opaque colony | Short rod | + |
| <i>B. polyfermenticus</i> P-14 (BP P-14) | Opaque colony | Short rod | + |

표 4. 50CHB test 결과

| Tentative designation | Significant taxa (%ID) | Next taxon |
|--|---|-------------------------------|
| <i>B. licheniformis</i> (NCIMB) | <i>B. licheniformis</i> (99.9) | <i>B. pumilus</i> (0.01) |
| <i>B. licheniformis</i> -1 (BL-1) | <i>B. licheniformis</i> (99.9) | <i>B. circulans</i> (0.01) |
| <i>B. licheniformis</i> -2 (BL-2) | <i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i> (99.5) | <i>B. licheniformis</i> (0.3) |
| 97 <i>B. polyfermenticus</i> -4 (97 BP-4) | <i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i> (99.8) | <i>B. licheniformis</i> (0.1) |
| <i>B. polyfermenticus</i> P-4 (BP P-4) | <i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i> (99.8) | <i>B. megaterium</i> (0.1) |
| <i>B. polyfermenticus</i> P-14 (BP P-14) | <i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i> (99.8) | <i>B. megaterium</i> (0.1) |
| <i>B.subtilis</i> (NCIMB) | Unacceptable profile | Unacceptable profile |



그림 9. API test

2. 최적배양조건 탐색

(1) 온도 및 배지

- 수집된 바실러스의 최적배양조건을 탐색하기 위하여 온도 및 배지조성을 달리하여 테스트하였다. 30℃ 및 37℃의 온도에서 바실러스 9종을 분석하였다.

| | | |
|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <i>B.licheniformis</i> 11378 | <i>B.licheniformis</i> 12670 | <i>B.cereus</i> |
| <i>B.subtilis</i> 11316 | <i>B.subtilis</i> 40132 | <i>B.thuringiensis</i> 11608 |
| <i>B.thuringiensis</i> 40030 | 97 <i>B.polyfermenticus</i> -4 | <i>B.polyfermenticus</i> P-4 |
| <i>B.polyfermenticus</i> P-14 | <i>B.subtilis</i> -3610 | <i>B.licheniformis</i> 9376 |

배지는 총 7가지를 사용하여 분석하였다.

| | | | |
|------------------|--------------------------|----------------|-----|
| PhP normal media | Tryptic Soy Bean (TSB) | Phytone(20g/l) | PBS |
| PhP rich media | Luria-Bertani media (LB) | Nutrient broth | |

- 연구 결과 : 배양온도 37℃에서 초기반응이 빠르며 30℃에서는 보다 서서히 배양되었다.

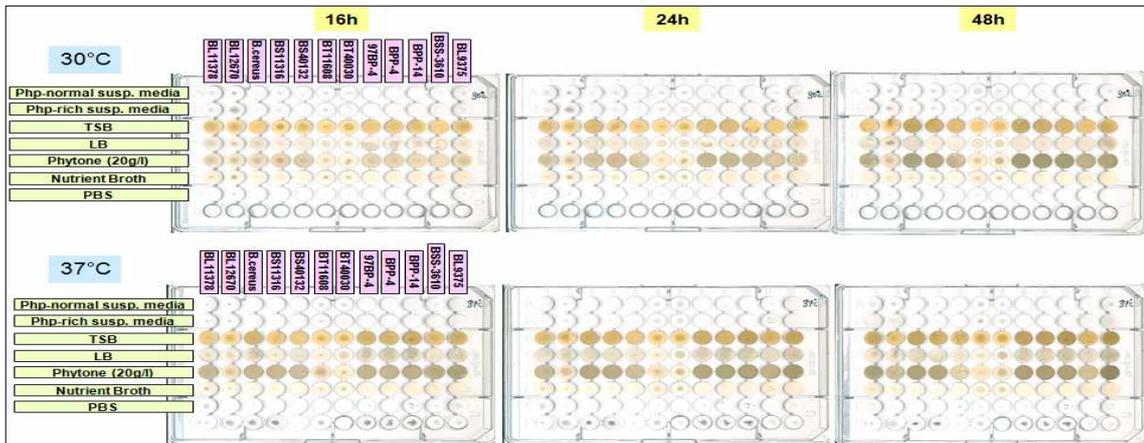


그림 10. 배지 및 온도변화에 대한 결과

(2) 배지 탐색

- 최적 배양온도를 37℃로 고정한 뒤, 배지를 달리하여 적합한 배지 탐색하였고, 바실러스 10종을 사용하였다.

| | | |
|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <i>B.licheniformis</i> 11378 | <i>B.licheniformis</i> 12670 | <i>B.cereus</i> |
| <i>B.subtilis</i> 11316 | <i>B.subtilis</i> 40132 | <i>B.thuringiensis</i> 11608 |
| <i>B.thuringiensis</i> 40030 | 97 <i>B.polyfermenticus</i> -4 | <i>B.polyfermenticus</i> P-4 |
| <i>B.polyfermenticus</i> P-14 | | |

실험 배지는 6 가지를 사용하였다.

| | | |
|------------------|--------------------------|----------------|
| PhP normal media | Phytone(20g/l) | PBS |
| PhP rich media | Luria-Bertani media (LB) | Nutrient broth |

- 연구 결과 : 6종류의 배지를 이용하여 테스트한 결과 TSB 및 Phytone 배지에서 가장 적합한 결과 나타났다. 이후 최적농도에 대한 탐색 필요하였다..

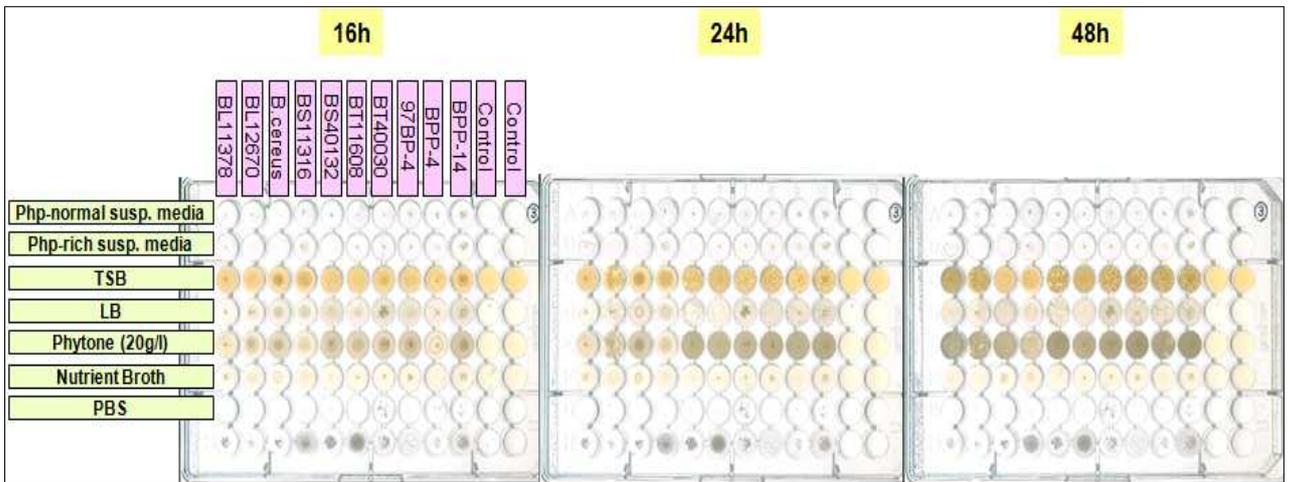


그림 11. 배지변화에 따른 PhP 결과

(3) 최적배지농도 탐색

- 배양온도를 30°C로 고정한 뒤, 총 바실러스 28종을 사용하여 Phytone 배지의 농도별 (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312g/l) 최적 배지 실험을 수행하였다.

| | | |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>B.amyloli</i> | <i>B.licheniformis 11378</i> | <i>B.licheniformis 40934</i> |
| <i>B.licheniformis 12670</i> | <i>B.cereus</i> | <i>B.thuringiensis 11428</i> |
| <i>B.subtilis 41462</i> | <i>B.subtilis 11316</i> | 94 <i>B.polyfermenticus-2</i> |
| <i>B.subtilis 40132</i> | 94 <i>B.polyfermenticus-10</i> | <i>B.thuringiensis 11608</i> |
| 94 <i>B.polyfermenticus-16</i> | <i>B.thuringiensis 40030</i> | 97 <i>B.polyfermenticus-4</i> |
| <i>B.polyfermenticus P-4</i> | 97 <i>B.polyfermenticus-10</i> | <i>B.polyfermenticus P-14</i> |
| <i>B.polyfermenticus P-9</i> | <i>B.subtilis-3610</i> | <i>B.licheniformis 9375</i> |
| <i>B.licheniformis 11560</i> | <i>B.licheniformis 11775</i> | <i>B.licheniformis 40934</i> |
| <i>B.licheniformis 11237</i> | <i>B.licheniformis 11851</i> | <i>B.licheniformis 41412</i> |
| <i>B.licheniformis 11379</i> | | |

- 연구 결과

: 28종의 바실러스를 이용하여 phytone 배지의 최적농도 테스트를 하였을 때, 20g/l 에서는 초기부터 강한 반응이 나타났으며, 10g/l phytone 배지를 이용하여 반응하

였을 때 보다 완만한 반응이 일어났다..



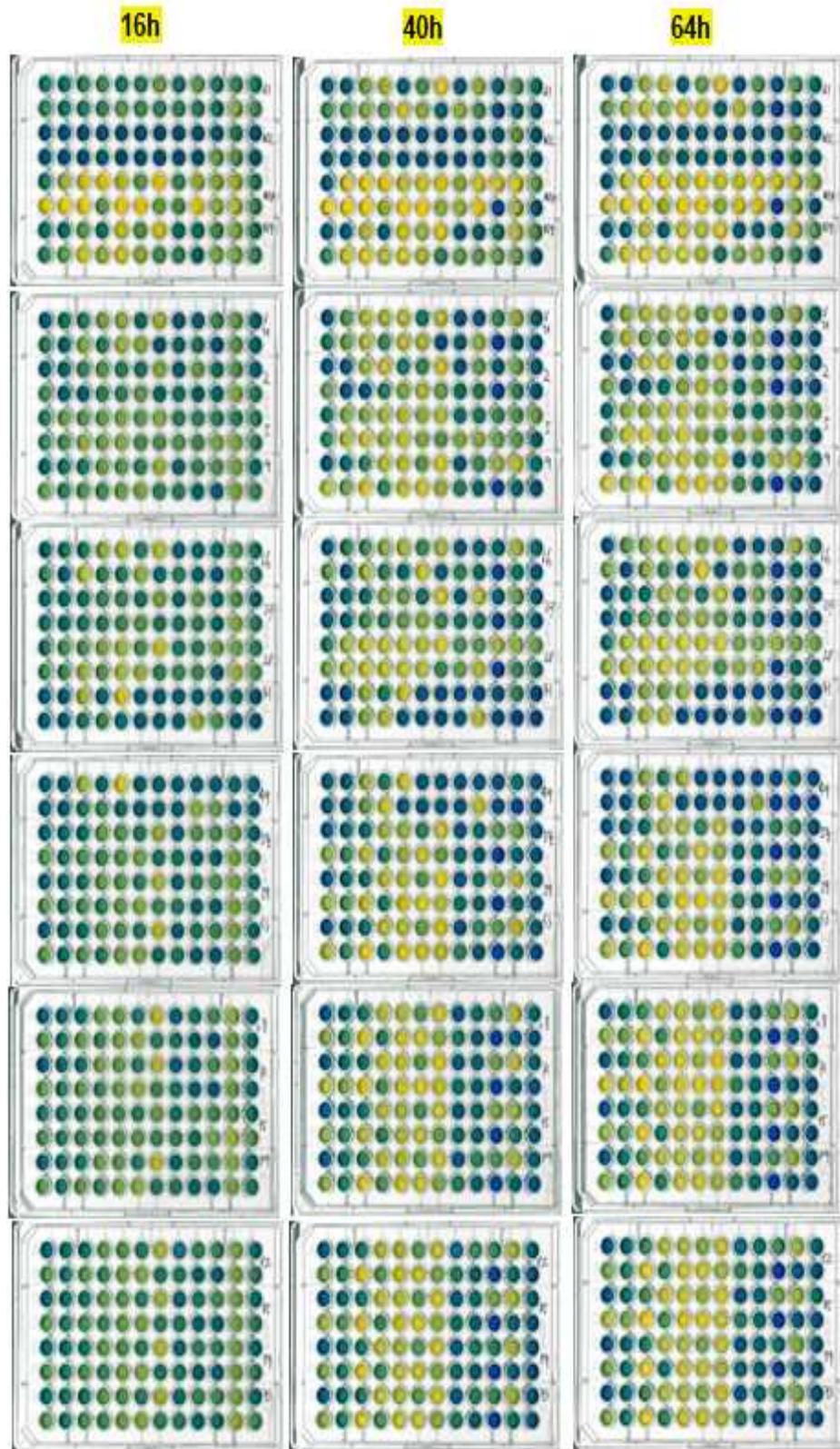
그림 12. 배지농도에 따른 PhP 결과

3. 생화학적 특성 규명을 통한 database화

(1) 1차 테스트

- 연구 방법 : Bacillus 속에 속하는 42종 strain의 PhP-BC (batch no.5)를 이용하여 특성을 규명하였다. 사용된 균주는 *Bacillus licheniformis* 4종, *Bacillus polyfermenticus* 13종, *Bacillus thuringiensis* 3종, *Bacillus subtilis* 5종, *Bacillus cereus* 3종 외 기타 14종을 이용하였다. 각 균주를 PhPlate에 접종한 뒤 16시간, 40시간 및 64시간마다 plate를 스캔한 뒤 색상의 변화를 이용하여 분석하였다.

- 연구 결과 : PhP-BC plate에 각 균주를 접종한 뒤 플레이트를 16시간, 40시간 및 64시간 쯤 각각 스캔하여 색상의 변화를 확인하였다. 시간별로 스캔 한 PhP 결과를 PhPWin-2008 프로그램을 이용하여 분석하였다.



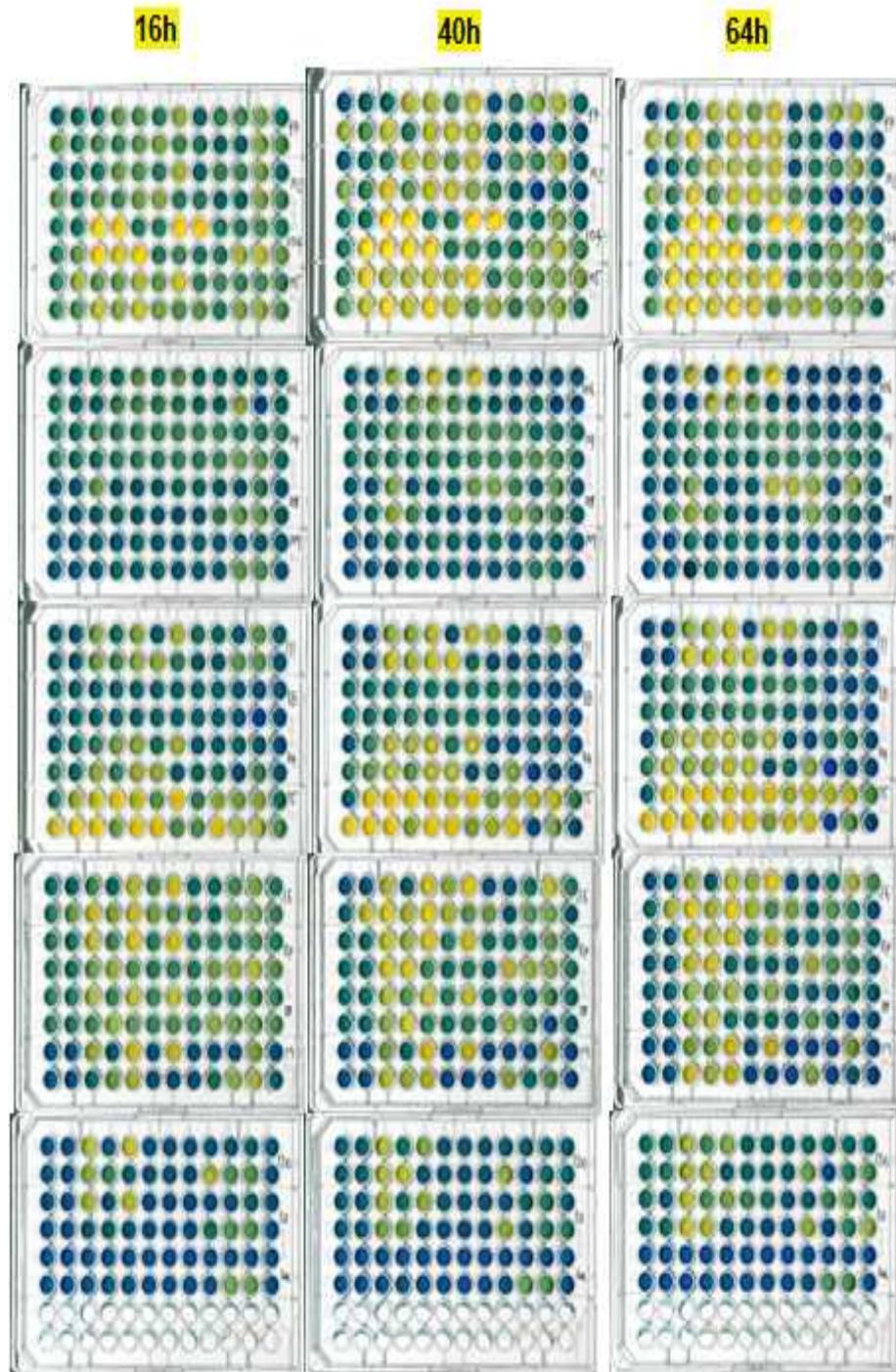


그림 13. 시간별 PhP 색상변화 결과 - 1차

- 연구 결과 : 색상을 수치로 변환한 뒤, 이러한 결과를 이용하여 분석하였다. 분석결과 실험균주 중 *Bacillus polyfermenticus*는 종내 다양성이 낮게 나타났으며, 그 외 균주에서는 종내 다양성이 높게 나왔다. 또한 종간 다양성도 높게 (Diversity: 0.955) 나타났다.

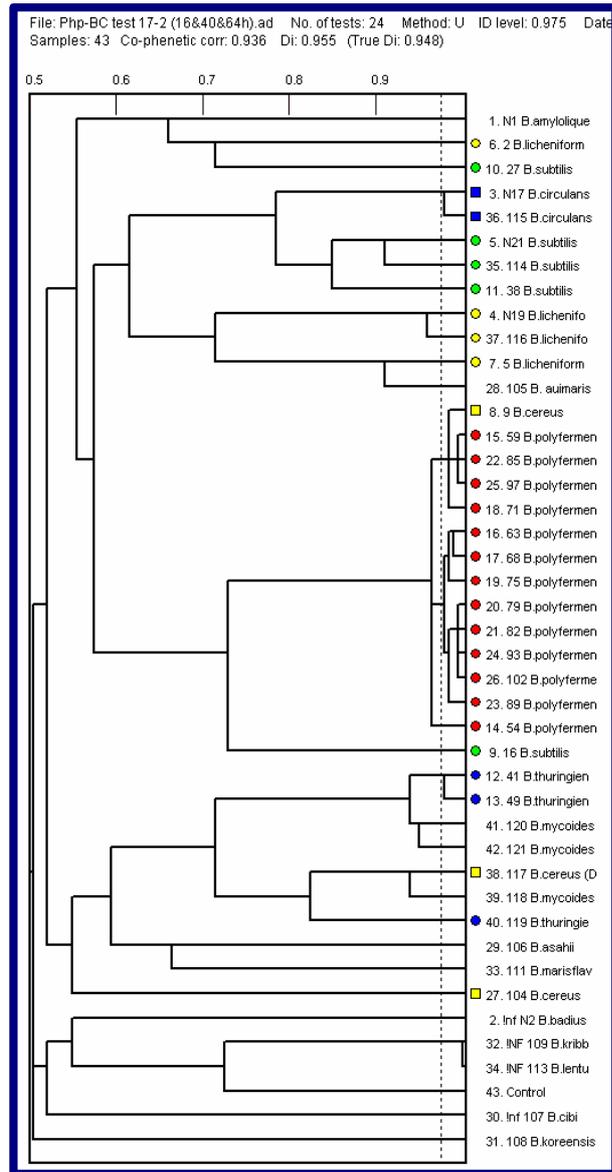


그림 14. 바실러스 균주의 PhP 테스트 결과 - 1차

(2) 2차 테스트

- 연구 방법 : 실험의 재현성을 확인하기 위하여 2반복 실험을 함과 동시에 1차 실험군 주 외에 추가군주를 포함하여 총 64종의 바실러스 균주를 이용하여 PhP테스트를 하였다. 총 64종의 바실러스가 사용되었다.

- 연구 결과 :

① *Bacillus* 속의 64개 strain으로 test : Diversity: 0.946

: 1차 실험의 결과와 비교하였을 때, 재현성이 높게 나타났으며 다양성은 0.946으로 나왔다. 또한 dendrogram 분석 결과 각 균주별로 그룹이 지어지는 경향이 있었다. 본 실험의 결과 보유균주 각각의 영양원 사용능력을 이용하여 균주별 특징을 확인할 수 있었다.

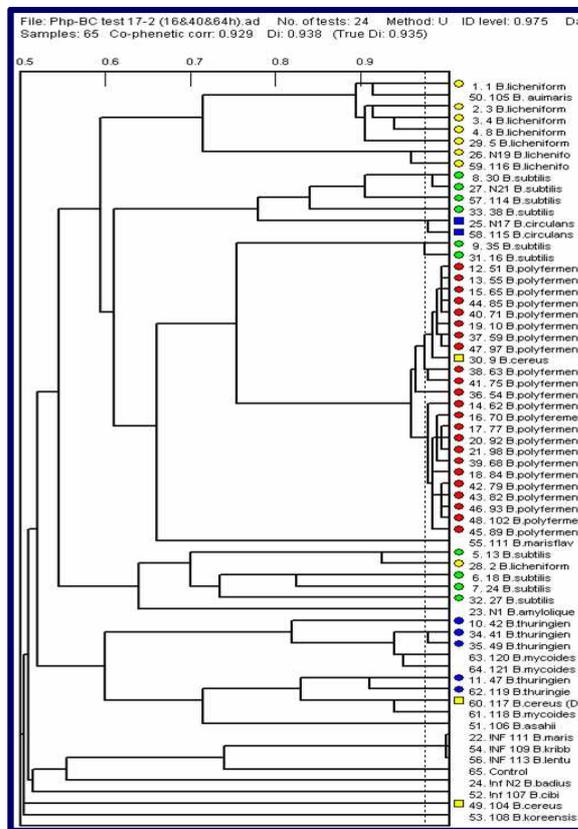


그림 15. 바실러스 균주의 PhP 테스트 결과 - 2차

② 각 종별 부분적인 dendrogram

PhP 실험결과를 종별로 각각 나누어 분석을 하여, 종내 다양성이 어떻게 이루어지는 지 확인하였다. *B. licheniformis*의 경우 다양성이 0.983로 높게 나와 보유균주의 각각의

성질이 크게 다를 것을 확인하였다. *B.polyfermenticus*의 경우 다양성이 0.598로 낮게 나타나 균주간의 특성이 크게 다르지 않음을 확인하였다.

- ① *B. licheniformis* : Diversity: 0.983
- ② *B. polyfermenticus* : Diversity: 0.598
- ③ *B. subtilis* : Diversity: 0.947
- ④ *B. thuringiensis* : Diversity: 0.972
- ⑤ 다른 *Bacillus* 종류 : Diversity: 0.983

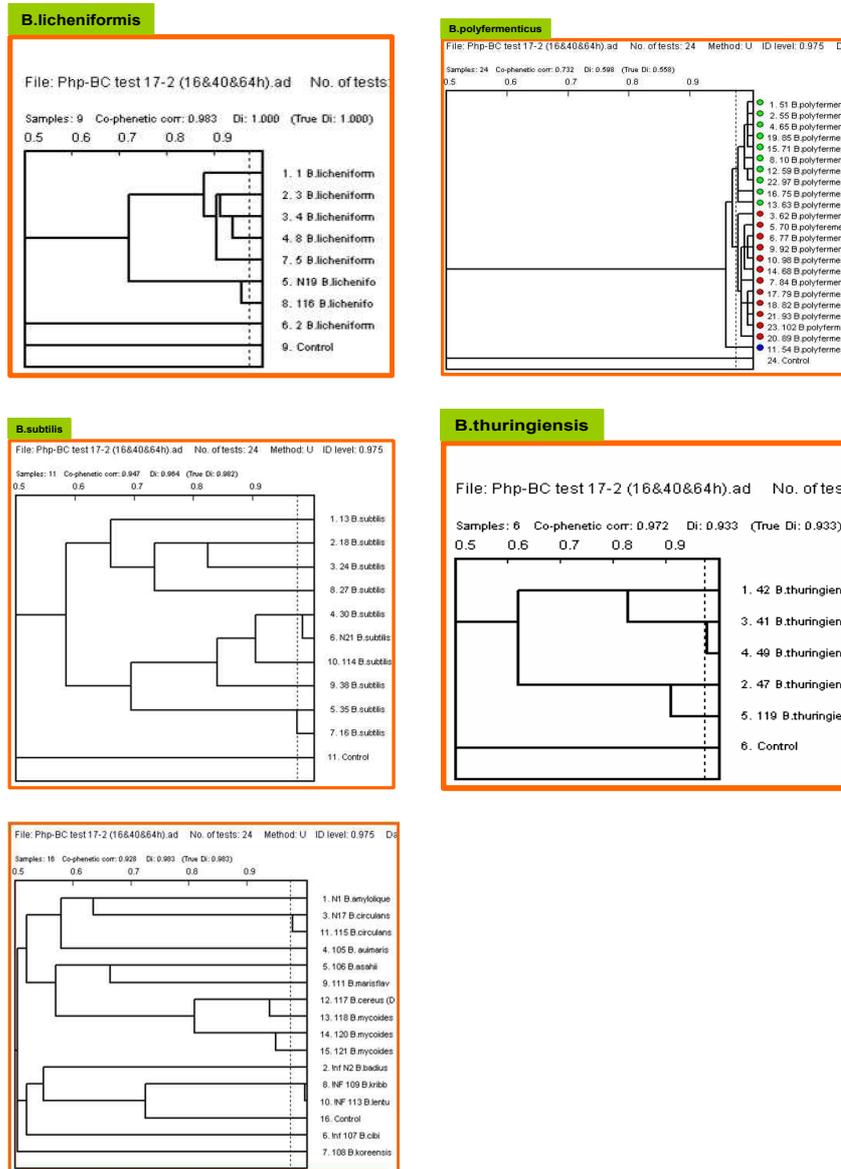


그림 16. 각 종별 dendrogram 분석

③. Representative strain (대표 종)

PhP 결과를 통하여 *B. polyfermenticus*에서 일부 균주의 결과가 거의 유사함을 확인하였고, 이를 이용하여 유사균주를 그룹화 하였다. 그룹화된 균주들 중 가장 평균적인 균주를 선택하여 대표 종으로 지정하였다.

◆ 51 *B. polyfermenticus* (94BP-1) 70 *B. polyfermenticus* (97BP-4)

4) 데이터베이스 구축 (identification purposes)

| No | Sample Name | PhP type | Quality | Denc | minimum similarity | mean similarity | max similarity | To No. | PhP type |
|----|------------------------------|----------|---------|------|--------------------|-----------------|----------------|--------|----------|
| 1 | 51 <i>B. polyfermenticus</i> | 1 | ** | 1 | 0.966 | 0.984 | * 0.986 | ? 5 | (2) |
| 2 | 55 <i>B. polyfermenticus</i> | 1 | ** | 2 | 0.967 | 0.985 | * 0.982 | ? 5 | (2) |
| 3 | 62 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | - | 11 | 0.958 | 0.972 | ? 0.963 | * 13 | (1) |
| 4 | 65 <i>B. polyfermenticus</i> | 1 | * | 3 | 0.957 | 0.982 | * 0.979 | ? 5 | (2) |
| 5 | 70 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | * | 12 | 0.959 | 0.976 | * 0.987 | ? 15 | (1) |
| 6 | 77 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | ** | 13 | 0.970 | 0.983 | * 0.981 | ? 1 | (1) |
| 7 | 84 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | ** | 17 | 0.974 | 0.983 | * 0.970 | * 16 | (1) |
| 8 | 10 <i>B. polyfermenticus</i> | 1 | ** | 6 | 0.968 | 0.984 | * 0.976 | ? 5 | (2) |
| 9 | 92 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | *** | 14 | 0.977 | 0.988 | * 0.979 | ? 19 | (1) |
| 10 | 98 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | *** | 15 | 0.981 | 0.987 | * 0.977 | ? 13 | (1) |
| 11 | 54 <i>B. polyfermenticus</i> | Si | * | 23 | | | 0.973 | * 16 | (1) |
| 12 | 59 <i>B. polyfermenticus</i> | 1 | *** | 7 | 0.983 | 0.988 | * 0.985 | ? 14 | (2) |
| 13 | 63 <i>B. polyfermenticus</i> | 1 | - | 10 | 0.957 | 0.971 | ? 0.989 | ? 14 | (2) |
| 14 | 68 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | *** | 16 | 0.980 | 0.985 | * 0.989 | ? 13 | (1) |
| 15 | 71 <i>B. polyfermenticus</i> | 1 | ** | 5 | 0.965 | 0.984 | * 0.987 | ? 5 | (2) |
| 16 | 75 <i>B. polyfermenticus</i> | 1 | * | 9 | 0.963 | 0.975 | * 0.983 | ? 14 | (2) |
| 17 | 79 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | ** | 18 | 0.966 | 0.984 | * 0.987 | ? 13 | (1) |
| 18 | 82 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | ** | 19 | 0.972 | 0.986 | * 0.985 | ? 13 | (1) |
| 19 | 85 <i>B. polyfermenticus</i> | 1 | *** | 4 | 0.978 | 0.989 | * 0.985 | ? 5 | (2) |
| 20 | 89 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | * | 22 | 0.959 | 0.979 | * 0.978 | ? 13 | (1) |
| 21 | 93 <i>B. polyfermenticus</i> | 2 | * | 20 | 0.960 | 0.983 | * 0.983 | ? 13 | (1) |
| 22 | 97 <i>B. polyfermenticus</i> | 1 | *** | 8 | 0.976 | 0.982 | * 0.976 | ? 14 | (2) |

- *B. polyfermenticus* 중 51BP (94BP-1), 70BP(97BP-4)가 대표 종으로 선택

그림 17. *B. polyfermenticus*의 대표종

제 3 절 : 산업용 생산배지의 조성 및 배양조건의 최적화

1. 플라스크규모에서 탄소원의 종류에 따른 *B. polyfermenticus* BC-1의 생육효과

- 연구 방법 : 500ml baffled flask에 배양액을 100ml로 하여 37°C에서 150rpm으로 60시간동안 배양하였다. 1차적으로 탄소원(glucose와 corn starch)에 대한 생육효과를 조사하였다.

- 연구 결과 : Glucose와 corn starch의 농도에 따른 생육효과를 검토한 결과 glucose 2% + corn starch 2%에서 최대 생균수와 최대 포자수를 얻었다.

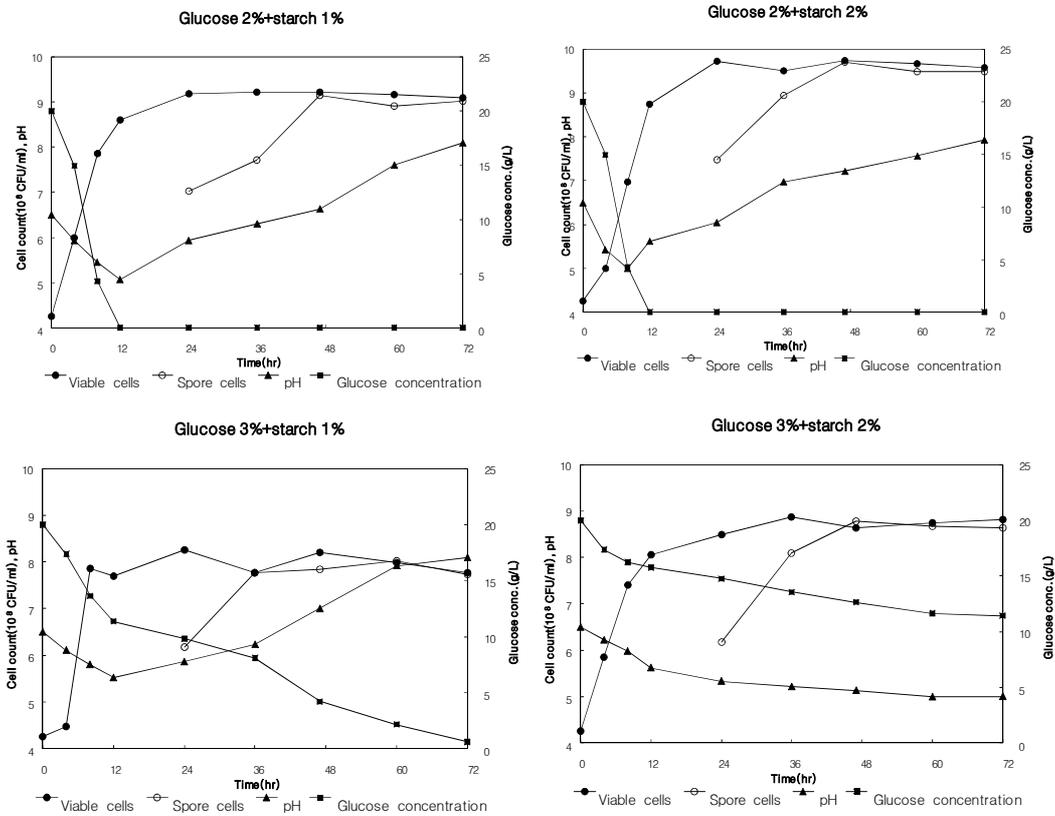


그림 18. *B. polyfermenticus* BC-1의 탄소원에 따른 성장도. Symbols : ●, viable cell; ○, spore cell; ■, glucose concentration; ▲, pH

2. 플라스크규모에서 질소원에 따른 *B. polyfermenticus* BC-1의 생육 효과

- 연구 방법 : 500ml baffled flask에 배양액을 100ml로 하여 37°C에서 150rpm으로 60시간동안 배양하였다.

- 연구 결과 : 질소원에 따른 생육효과를 검토한 결과 tryptone은 2%, yeast ex. 2%에서 각각 높은 균수를 나타내었으며, tryptone 2% + yeast ex. 2%에서 가장 높은 균수를 나타내었다.

표 5. 질소원에 따른 *B. polyfermenticus* BC-1의 성장

| Nitrogen source | Maximum number of viable cells(CFU ml ⁻¹) | Maximum number of spore cells(CFU ml ⁻¹) | Fermentation time(hr) |
|-------------------------------|---|--|-----------------------|
| Tryptone 1% | 2.7×10 ⁹ | 2.5×10 ⁹ | 60 |
| Tryptone 2% | 3.2×10 ⁹ | 3.3×10 ⁹ | 60 |
| Tryptone 3% | 2.4×10 ⁹ | 2.1×10 ⁹ | 60 |
| Yeast ex. 1% | 2.1×10 ⁹ | 1.8×10 ⁹ | 60 |
| Yeast ex. 2% | 2.5×10 ⁹ | 2.2×10 ⁹ | 60 |
| Yeast ex. 3% | 1.1×10 ⁹ | 9.7×10 ⁸ | 60 |
| Tryptone 2% + Yeast ex. 2% | 4.2×10 ⁹ | 3.9×10 ⁹ | 60 |

- 탄소원을 Glucose 2% +Corn starch 2%를 기본 배지로 하고, 질소원에 따른 생육효과를 검토한 결과 tryptone은 2%, yeast ex. 2%에서 각각 높은 균수를 나타내었으며, tryptone 2% + yeast ex. 2%에서 가장 높은 균수를 나타내었다. 따라서 최적 배지는 Glucose, Corn starch, tryptone, yeast extract를 각각 2%씩 함유하는 배지로 선정하였다.

3. 플라스크규모에서 탄소원의 종류에 따른 *B. licheniformis*의 생육효과

- 연구 방법 : 500ml baffled flask에 배양액을 100ml로 하여 37°C에서 150rpm으로 60시간동안 배양하였다. 1차적으로 탄소원(glucose와 corn starch)에 대한 생육효과를 조사하였다.

- 연구 결과 : Glucose와 corn starch의 농도에 따른 생육효과를 검토한 결과 glucose 2% + corn starch 2%에서 최대 생균수와 최대 포자수를 얻었다.

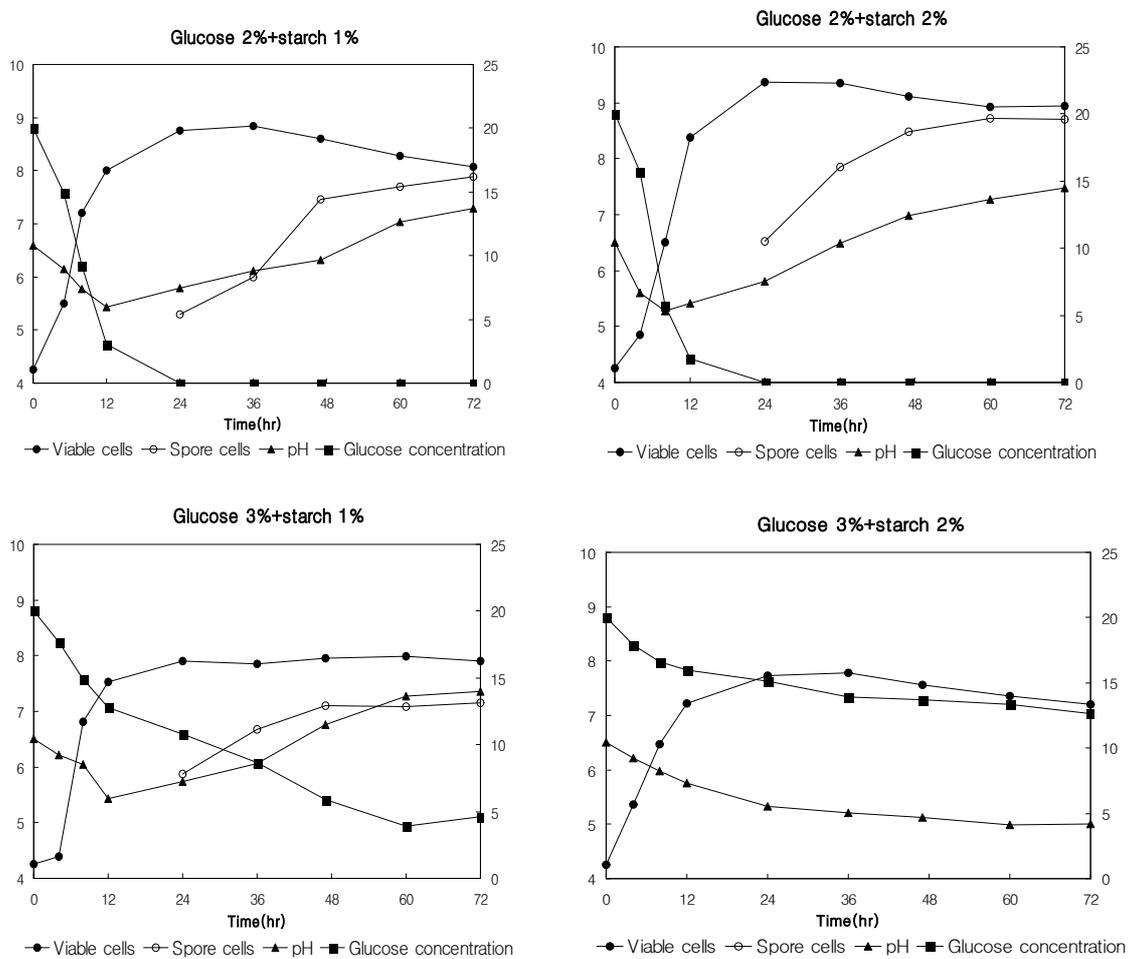


그림 19. *B. licheniformis*의 탄소원에 따른 성장도 Symbols : ●, viable cell; ○, spore cell; ■, glucose concentration; ▲, pH

4. 플라스크규모에서 질소원의 종류에 따른 *B. licheniformis*의 생육효과

- 연구 방법 : 전과 동일

- 연구 결과 : 탄소원을 Glucose 2% + Corn starch 2%를 기본 배지로 하고, 질소원에 따른 생육효과를 검토한 결과 tryptone은 2%, yeast ex. 2%에서 각각 높은 균수를 나타내었으며, tryptone 2% + yeast ex. 2%에서 가장 높은 균수를 나타내었다.

따라서 최적 배지는 Glucose, Corn starch, tryptone, yeast extract를 각각 2%씩 함유하는 배지로 선정하였다.

표 6. 질소원에 따른 *B. licheniformis*의 성장도

| Nitrogen source | Maximum number of viable cells(CFU ml ⁻¹) | Maximum number of spore cells(CFU ml ⁻¹) | Fermentation time(hr) |
|----------------------------|---|--|-----------------------|
| Tryptone 1% | 2.7×10 ⁹ | 2.5×10 ⁹ | 60 |
| Tryptone 2% | 3.2×10 ⁹ | 3.3×10 ⁹ | 60 |
| Tryptone 3% | 2.4×10 ⁹ | 2.1×10 ⁹ | 60 |
| Yeast ex. 1% | 2.1×10 ⁹ | 1.8×10 ⁹ | 60 |
| Yeast ex. 2% | 2.5×10 ⁹ | 2.2×10 ⁹ | 60 |
| Yeast ex. 3% | 1.1×10 ⁹ | 9.7×10 ⁸ | 60 |
| Tryptone 2% + Yeast ex. 2% | 4.2×10 ⁹ | 3.9×10 ⁹ | 60 |

제 4 절 : 선별된 균주의 대량 배양 공정 확립

1. 500L pilot 발효조에서 유가배양에 의한 *B. polyfermenticus* BC-1 대량배양
 5L 발효조 규모에서 확립된 배양공정을 500L pilot 규모의 대량 발효조에서 유가 배양을 실시하였다. 배양조건은 다음과 같다.

표 7. *B. polyfermenticus* BC-1 대량생산을 위한 조건

| Parameter | 조건 |
|--|---------------------------------------|
| <i>B. polyfermenticus</i> seed volume | 20 L(0.4%) |
| <i>B. polyfermenticus</i> seed age(hr) | 10 hr |
| Working volume | 250 L |
| pH | 7.0 ± 0.5 |
| Aeration | 1 vvm |
| Agitation | 300 rpm |
| Temprature | 37°C |
| Head pressure | 0.2 psi |
| Feeding time & concertration | 8hr(2%), 12hr(2%), 16hr(4%), 20hr(4%) |

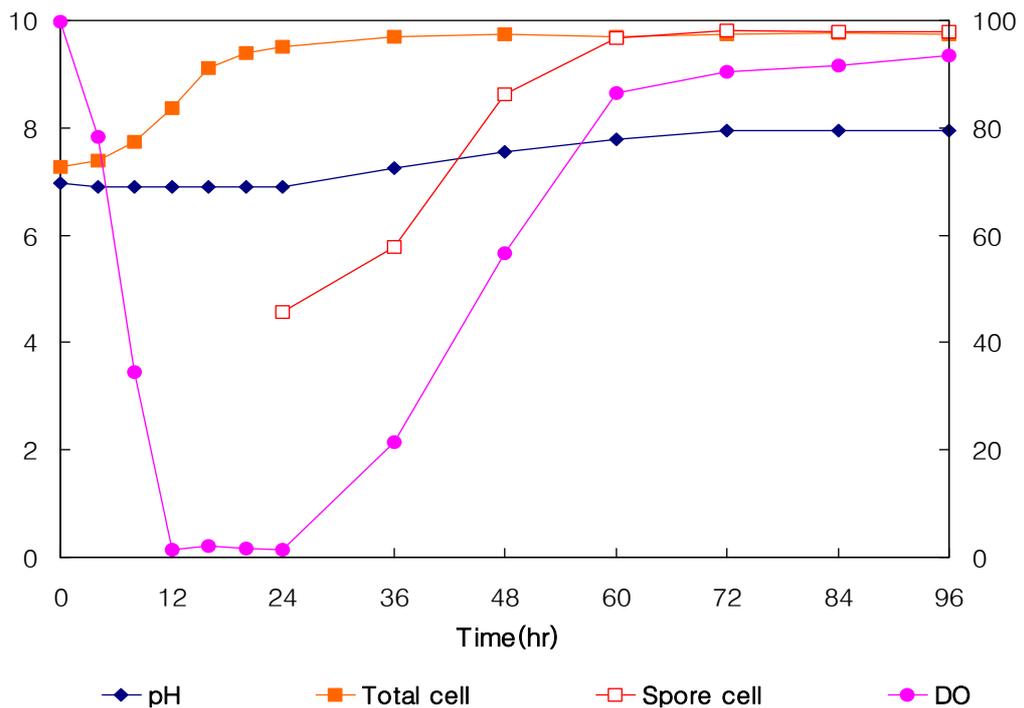


그림 20. *B. polyfermenticus* BC-1의 생육 성장도

- 상기의 결과에서 BP는 pH는 거의 7.0을 유지하였고, DO는 12시간째에 혐기적인 조건으로 진행되어 24시간까지 지속되었다. 이후 포자(sporulation)이 형성되어 60시간째에 100%에 수렴하는 포자율을 나타내었고, live cell은 18시간 이후부터 거의 최대 cell수를 나타내었다.

- 시간대별 cell수와 포자율은 아래와 같다.

| 배양시간 (hr) | Total Cell number of <i>B. polyfermenticus</i> (CFU/ml) | Spore number of <i>B. polyfermenticus</i> (CFU/ml) | pH | DO | 포도당 투여 |
|-----------|---|--|------|------|--------|
| 0 | 1.86×10^7 | N.C* | 6.98 | 99.8 | |
| 4 | 2.40×10^7 | N.C | 6.90 | 78.4 | |
| 8 | 5.50×10^7 | N.C | 6.91 | 34.6 | 2% |
| 12 | 2.34×10^8 | N.C | 6.91 | 1.3 | 2% |
| 16 | 1.29×10^9 | N.C | 6.91 | 2.1 | 4% |
| 20 | 2.45×10^9 | N.C | 6.91 | 1.6 | 4% |
| 24 | 3.24×10^9 | 3.63×10^4 | 6.90 | 1.5 | |
| 36 | 5.01×10^9 | 6.03×10^5 | 7.24 | 21.4 | |
| 48 | 5.62×10^8 | 4.17×10^8 | 7.56 | 56.7 | |
| 60 | 5.01×10^9 | 4.79×10^9 | 7.78 | 86.4 | |
| 72 | 5.50×10^9 | 6.46×10^9 | 7.96 | 90.4 | |
| 84 | 5.75×10^9 | 6.31×10^9 | 7.95 | 91.6 | |
| 96 | 5.62×10^9 | 6.17×10^9 | 7.96 | 93.5 | |

* N.C* : Not checked

- 상기의 실험에서 확립되어진 배양 방법에서 8시간, 12시간째에 각각 2%씩, 16시간, 20시간째에 각각 4%의 포도당을 4회 유가배양하였다. 그 결과 *B. polyfermenticus* 의 최대 균수는 5.75×10^9 CFU/ml이었으며, 내생포자의 수는 6.46×10^9 CFU/ml이었다.

2. 500L pilot 발효조에서 유가배양에 의한 *B. licheniformis* 대량배양

5L 발효조 규모에서 확립된 배양공정을 500L pilot 규모의 대량 발효조에서 유가 배양을 실시하였다. 배양조건은 다음과 같다.

표 8. *B. licheniformis* 대량생산을 위한 조건

| Parameter | 조건 |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>B. licheniformis</i> seed volume | 20 L(0.4%) |
| <i>B. licheniformis</i> seed age(hr) | 10 hr |
| Working volume | 250 L |
| pH | 7.0 ± 0.5 |
| Aeration | 1 vvm |
| Agitation | 300 rpm |
| Temprature | 37°C |
| Head pressure | 0.2 psi |
| Feeding time & concnertration | 8hr(2%), 12hr(2%), 16hr(4%), 20hr(4%) |

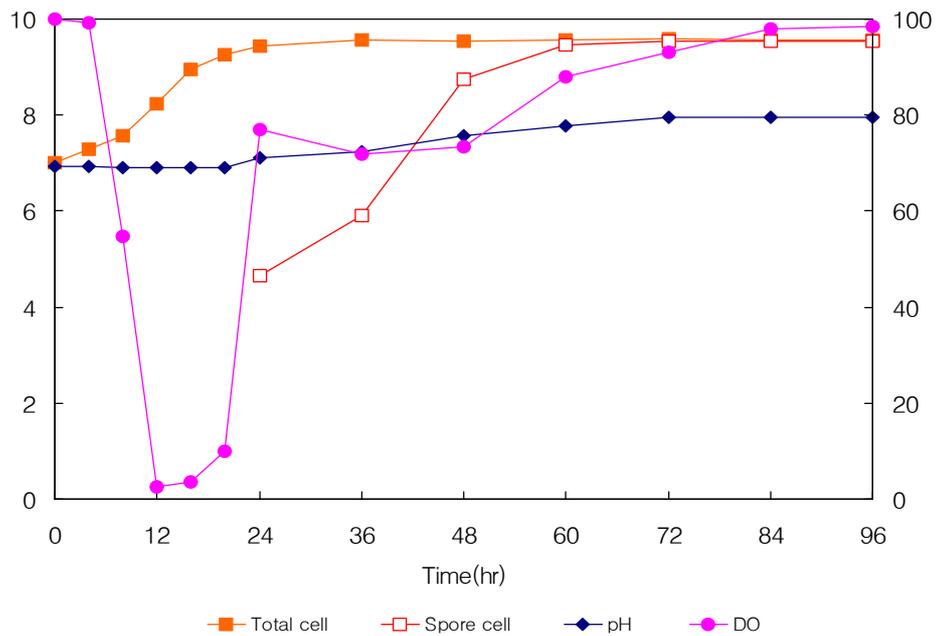


그림 21. *B. licheniformis* BC-1의 생육 성장도

- 상기의 결과에서 BL는 pH는 거의 7.0을 유지하였고, DO는 12시간째에 혐기적인 조건으로 진행되어 18시간까지 지속되었으나, 이후 점점 상승하였다. 이후

포자(sporulation)이 형성되어 48시간째에 100%에 수렴하는 포자율을 나타내었고, live cell은 18시간 이후부터 거의 최대 cell수를 나타내었다.

- 시간대별 cell 수와 포자율은 아래와 같다.

| 배양시간 (hr) | Total Cell number of <i>B. licheniformis</i> (CFU/ml) | Spore number of <i>B. licheniformis</i> (CFU/ml) | pH | DO | 포도당 투여 |
|-----------|---|--|------|------|--------|
| 0 | 1.00×10^7 | N.C* | 6.93 | 100 | |
| 4 | 1.98×10^7 | N.C | 6.92 | 99.3 | |
| 8 | 3.65×10^7 | N.C | 6.91 | 54.8 | 2% |
| 12 | 1.68×10^8 | N.C | 6.91 | 2.5 | 2% |
| 16 | 8.97×10^8 | N.C | 6.91 | 3.6 | 4% |
| 20 | 1.85×10^9 | N.C | 6.91 | 9.9 | 4% |
| 24 | 2.78×10^9 | 4.58×10^4 | 7.10 | 77.0 | |
| 36 | 3.64×10^9 | 7.89×10^5 | 7.24 | 71.8 | |
| 48 | 3.55×10^8 | 5.48×10^8 | 7.56 | 73.3 | |
| 60 | 3.63×10^9 | 2.98×10^9 | 7.78 | 87.9 | |
| 72 | 3.81×10^9 | 3.45×10^9 | 7.96 | 93.0 | |
| 84 | 3.71×10^9 | 3.51×10^9 | 7.95 | 97.9 | |
| 96 | 3.74×10^9 | 3.53×10^9 | 7.96 | 98.5 | |

* N.C* : Not checked

- 상기의 실험에서 확립되어진 배양 방법에서 8시간, 12시간째에 각각 2%씩, 16시간, 20시간째에 4%의 포도당을 4회 유가배양하였다. 그 결과 *B. licheniformis*의 최대균수는 3.81×10^9 CFU/ml이었으며, 내생포자의 수는 3.53×10^9 CFU/ml이었다.

제 5 절 : *Haematococcus pluvialis*의 최적 성장 조건 및 astaxanthin 생산 조건 확립

1. 연구배경

생태계에서 광합성에 생산되는 유기물 중 식물성 플랑크톤의 생산량이 50%이상을 차지하고 있다. 이는 수산생물 분야에 있어서 중요성을 시사한다고 볼 수 있으며 산업에 적용시키는 경우 무공해 연료, 어패류 양식, 어류 양식용 동물성 플랑크톤의 먹이 사료 및 폐수처리용으로 이용하거나 높은 항산화 효과가 있다고 밝혀진 β -carotene, 레티놀, 라이코펜, astaxanthin과 같은 carotenoid계 색소생산에 이용되고 있다. Astaxanthin은 β -carotene, 레티놀, 라이코펜과 더불어 carotenoid계 색소로써 항산화 효과가 10~500배 높기 때문에 활발한 연구가 진행되고 있다. 미세조류에 의한 astaxanthin의 생산원은 여러 가지가 있지만 그 중 *Haematococcus pluvialis*(10,000~30,000 mg/kg)가 가장 큰 생산원이다.

Astaxanthin(3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione)은 항산화 효과뿐만 아니라 면역 조절 효과와 항암 효과 등이 있다고 알려져 있으며, 현재 세계적으로 양식 및 식품 산업, 화장품, 의약품에서 자연색소로 많이 이용되고 있고 학계에서도 이미 그에 대한 효과가 증명되었다. Astaxanthin의 생산원이 *Haematococcus pluvialis*는 운동성이 있고 여러 가지 자연 환경적인 stress 즉, 높은 빛 조사량, 높은 온도, 질소원 혹은 인원 결핍 그리고 acetate와 NaCl농도 조절로 astaxanthin의 축적을 극대화 할 수 있다.

따라서, 본 과제에서는 현재까지 규명된 *Haematococcus pluvialis*의 성장 추이를 바탕으로 대량배양 기술과 여러 가지 자연 환경적인 stress를 집목하여 *Haematococcus pluvialis*의 최적 성장과 astaxanthin의 대량 생산 방법 확립과 더불어 효과적인 추출법을 규명할 것이다.

2. *H. pluvialis*의 문헌조사 및 최적 성장 조건 확립

가. Lab 규모의 *Haematococcus pluvialis* 최적 성장 조건 및 astaxanthin 생산 조건 연구

1) 균주와 전 배양

연구에 사용된 *Haematococcus pluvialis*는 독일 SAG(No.34 ln)에서 분양 받아 OHM (Optimal *Haematococcus pluvialis* medium) (표 1)에서 참고 문헌을 통해 광도 $60\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 에서 전 배양 하였다. 1 리터 삼각플라스크에 배지 500ml로 하여 빛 조건 10, 30, 60, 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, 공기공급 0.5vvm의 조건으로 배양하였다. 측정 인자는 세포농도(cell

counting)으로 최적 성장 조건을 조사 하였다.

표 9. OHM (Optimal *Haematococcus pluvialis* medium)

| Ingredient | Concentration | Ingredient | Concentration |
|---------------------------------------|---------------|--|---------------|
| KNO ₃ | 0.41 g/l | CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0.012 mg/l |
| Na ₂ HPO ₄ | 0.03 g/l | Cr ₂ O ₃ | 0.075 mg/l |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.246 g/l | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0.98 mg/l |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 0.11 g/l | Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0.12 mg/l |
| Fe(III)citrate · H ₂ O | 2.62 mg/l | SeO ₂ | 0.005 mg/l |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0.011 mg/l | Vitamin B12 | 15 µg/l |
| Thiamine | 17.5 µg/l | Biotin | 25 µg/l |

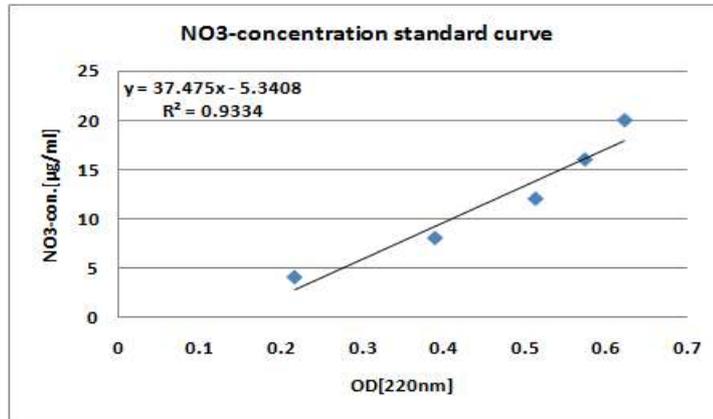
2) 각 인자 분석 방법

① 세포 건량 측정 방법

- GS-25 필터를 이용하여 세포를 필터링 한 후 80°C dry oven에서 24시간 방치 무게 측정
- (sample+filter 무게) - filter 무게 = sample 무게

② Nitrate 분석 방법 (UV-Spectrophotometer 방법)

- 샘플 1ml를 원심분리 (2000g, 5분)
- 0.5ml의 상층액을 취하여 증류수로 200배 희석
- 희석된 시료를 5ml 취하여 황산용액(16:1=증류수:황산) 1ml를 첨가
- 220nm에서 OD 값을 측정 (standard curve 식 적용) Nitrate 농도 계산



· Nitrate 농도 계산식

$$\text{Nitrate concentration } (\mu\text{g/ml}) = 37.475 \times A_{220} - 5.3408$$

③ 광합성 활성도 측정

- 배양액을 5분가 암반응 후 지경 1cm의 실린더 큐벳에 1ml 첨가
- Dual-Channel Photosynthesis Yield Analyzer Toxy-PAM(Heinz Walz GmbH, Germany) 기기로 측정
- 광합성 효율을 나타내는 최대 양자수율 F_v/F_m , 최소 형광값 F_0 측정

④ Astaxanthin 및 Chlorophyll a 함량 및 분석 방법 (UV-spectrophotometer method)

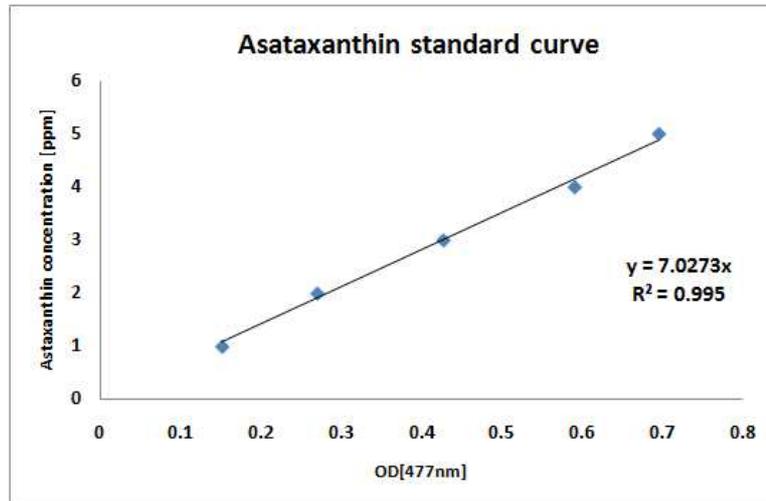
- Lab 규모의 최적 성장조건에서 세포를 최대 성장까지 배양 후 빛 조건 120, 250, 500, 900 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$, 공기공급 0.5vvm의 조건에서 스트레스를 주며 배양 하였다. 측정인자는 chlorophyll a와 astaxanthin을 측정하였다.
- Astaxanthin 및 Chlorophyll a 함량 및 분석 방법 (UV-spectrophotometer method)
 - 배양액 1ml × 5EA를 원심분리 (3000g, 10분).
 - 원심분리 후 상층 액을 제거, 각 펠렛에 1ml의 아세톤 첨가 후 균질기로 균질화 (6stock, 5분)
 - 균질화 후 20분간 4°C에 보관
 - 각 샘플을 원심분리 (3000g, 10분) 후 상층액 UV-spectrophotometer 측정
 - 표준 Astaxanthin 검량선 작성 (200ppm 이하 농도에서 각 표준용액 만들기)

※ 표준 astaxanthin의 350~550nm 범위에서 스캔 후 흡수과장 설정

· Astaxanthin과 Chlorophyll a 농도 계산식

$$\text{Astaxanthin [mg/L]} = 7.0273 \times A_{477}$$

$$\text{Chlorophyll a [mg/L]} = (12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})$$



3) 결과

삼각플라스크 규모의 *H. pluvialis*을 광 생물 Incubator 내에서(그림 22) 빛 조건 10, 30, 60, 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 4가지 조건 하에서 성장시켰다(그림). 60, 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 두 가지 조건에서 비슷하게 가장 높은 세포성장을 나타냈었다. 30 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 조건에서는 빛의 조건이 아주 낮아 성장이 잘 이루어지 못하였고, 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 에서는 성장이 전혀 이루어지지 않은 것으로 나타났다. 이에 최적 빛 조건은 60~100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 로 다음 7리터 광 생물 반응기에서의 성장 조건은 평균값인 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 로 정의 되었다.

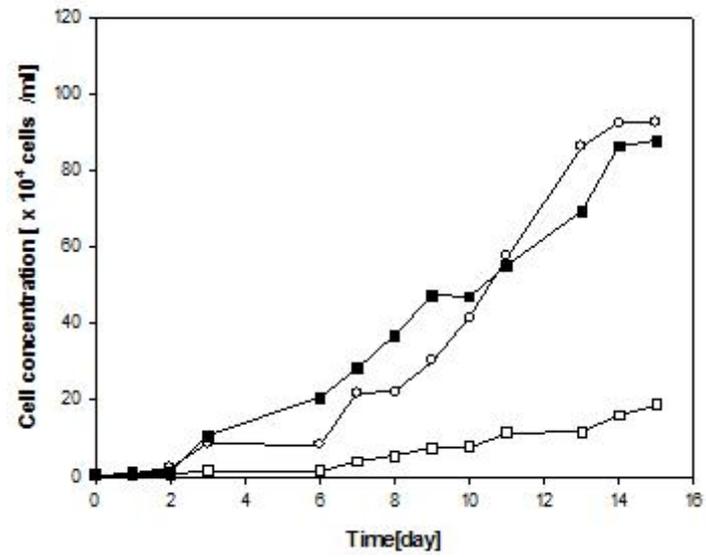


그림 22. Lab 규모 *H. pluvialis* 광도별 성장 (●: $10\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, □: $30\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, ○: $60\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, ■: $100\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)



그림 23. Photo-incubator에서 *H. pluvialis* 삼각플라스크 배양

- Lab 규모에서의 astaxanthin 생산 조건 연구

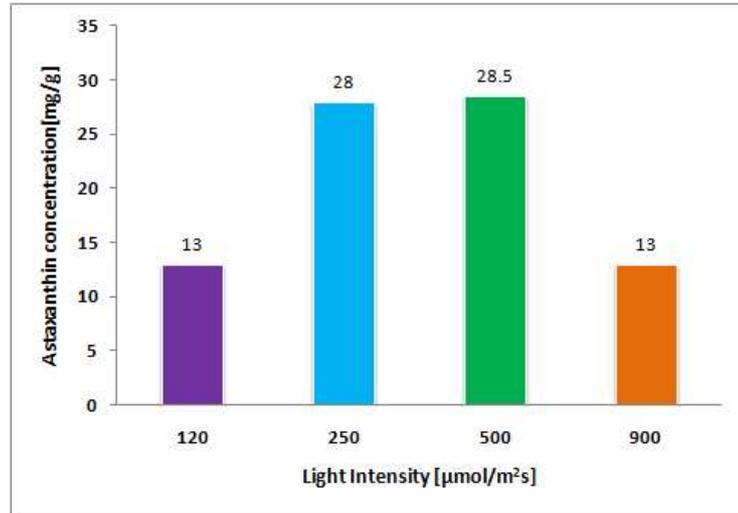


그림 24. Lab 규모 *H. pluvialis*의 광도별 astaxanthin 축적

삼각플라스크 규모의 *H. pluvialis*를 최대로 성장 시킨 후 광도 120, 250, 500, 900 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 조건으로 16일 동안 광 스트레스를 주었을 때 astaxanthin의 축적량을 측정한 결과 120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 에서는 13mg/DWCg으로 건조세포당 1.3%를 함유하였고, 250과 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 광도에서는 가장 높은 약 28mg/DWCg으로 약 2.8%의 함유하였다. 900 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 광도에서는 13mg/DWCg으로 1.3%를 함유한 것으로 보아 광도 900 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 에서는 자기 보호를 위한 astaxanthin의 생합성보다 세포 손상을 입은 것으로 낮은 astaxanthin의 축적률이 나타난 것으로 볼 수 있다. 이에 250과 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 두 광도를 비교하여 보았을 때 비슷한 astaxanthin의 함량 가지므로 경제적인 조건으로 500 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 광원보다 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 광원을 선택하는 것이 좋을 것으로 판단되어 7리터 광 생물 반응기를 이용한 최적 astaxanthin의 축적 광도는 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 로 정의 되었다.

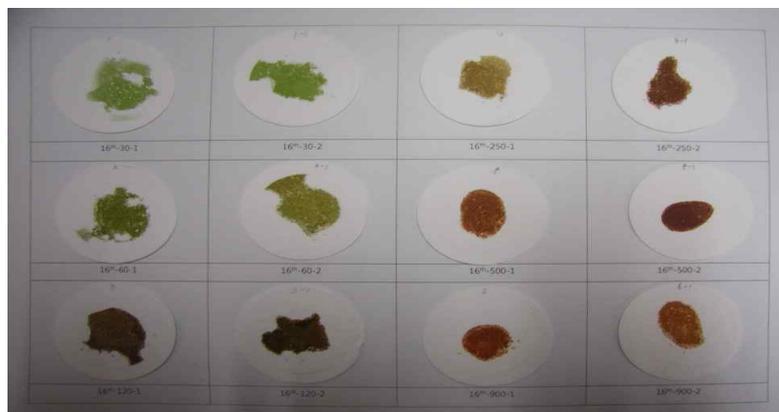


그림 25. Lab 규모의 각 빛 조건에 따른 16일째 *H. pluvialis*의 여과 후 세포의 색깔

3. 7리터 광 생물반응기에서 *Haematococcus pluvialis*의 최대 생산 조건 및 astaxanthin 생산 조건 연구

- 7리터 광 생물반응기에서 *Haematococcus pluvialis*의 최대 생산 연구

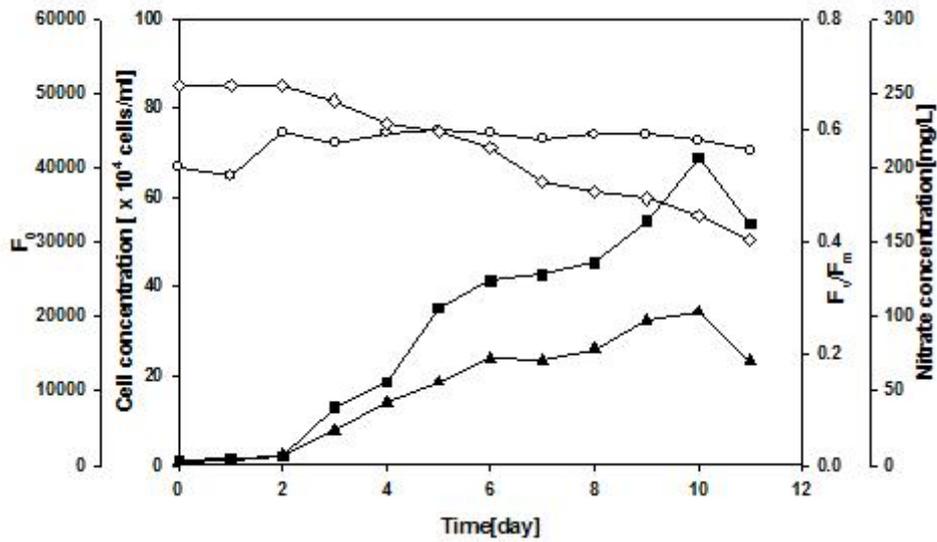


그림 26. 7리터 광 생물 반응기에서 *H. pluvialis*의 batch 배양 (광도: $60\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, ■: 세포농도, ▲: F_0 , ○: F_v/F_m , ◇: 질소원 농도)

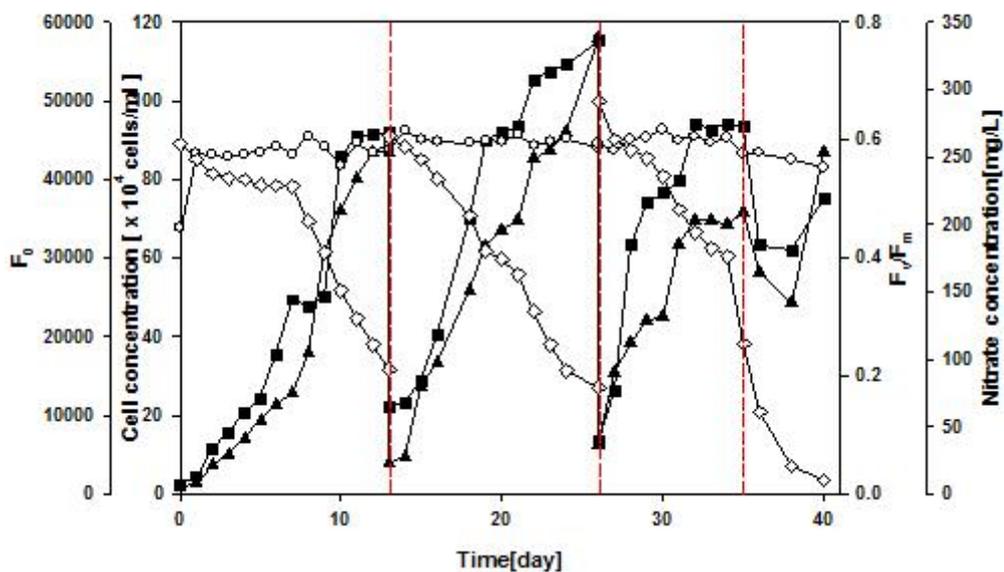


그림 27. 7리터 광 생물 반응기에서 *H. pluvialis*의 semi-continuous 배양 (광도 $60\sim 80\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, ■: 세포농도, ▲: F_0 , ○: F_v/F_m , ◇: 질소원 농도)

7리터 광 생물 반응기에서의 *H. pluvialis*의 성장을 최적 빛 조건인 $80\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 에서 batch와 Semi-continuous 두 가지 방법으로 배양하여 비교 하였을 때, batch 배양은 10 일 동안 배양하여 최대 세포농도가 $70\times 10^4\text{cells}/\text{ml}$, semi-continuous 배양은 35일 동안 배양 여 batch 배양 후 2번 실시하여 최대 세포농도가 각 구간 별로 $90\sim 115\times 10^4\text{cells}/\text{ml}$ 로 batch 배양 보다 훨씬 많은 농도를 나타내었다.

Semi-continuous 배양 각 구간 마다 광도를 $60\sim 85\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 로 증가 시켜주었을 때 세포의 성장이 계단식으로 높아진 것으로 보아 세포의 농도가 높아짐에 따라 빛의 투과율이 낮아져 세포에 고루 빛이 전달하지 못하는 상호음영 작용 때문에 $60\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 만 준 batch 배양에서 세포 농도가 낮게 나온 이유로 lumostatic 방법의 광도 조사가 *H. pluvialis* 성장에 더 좋은 방법이라고 할 수 있다.

결과적으로 Semi-continuous 방법이 더 높은 세포농도를 획득 할 수 있는 배양 방법이나, 본 연구의 목적은 높은 세포의 농도를 얻는 동시에 높은 astaxanthin의 획득하는 것이 목적으로 2step 배양 조건이 이용되어야하기에, semi-continuous 방법을 사용하게 되면, 또 다른 광 생물 반응기가 요구되며, 오래 동안 배양을 실시하기에 배양 중 오염의 문제나 세포의 돌연변이를 가지고 올수 있다. 이러한 이유로 batch배양에서도 충분한 세포농도를 얻기 위해 semi-continuous 배양 첫 번째 구간에서처럼 광도를 주는 방법을 lumostatic 방법으로 초기 접종농도를 높여 배양한다면, 7리터 광 생물 반응기에서 $90\times 10^4\text{cells}/\text{ml}$ 이상의 세포농도를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

이러한 결과로 pilot 규모의 배양에서는 광도조건을 lumostatic 방법을 이용하였다.

다음 그림은 본 연구에서 사용된 7리터 광 생물반응기에서 *H. pluvialis*를 배양하는 모습이다(그림 28).



그림 28. 7L 광 생물 반응기에서 *Haematococcus pluvialis*의 배양

- 7리터 광 생물반응기에서 astaxanthin 생산 연구

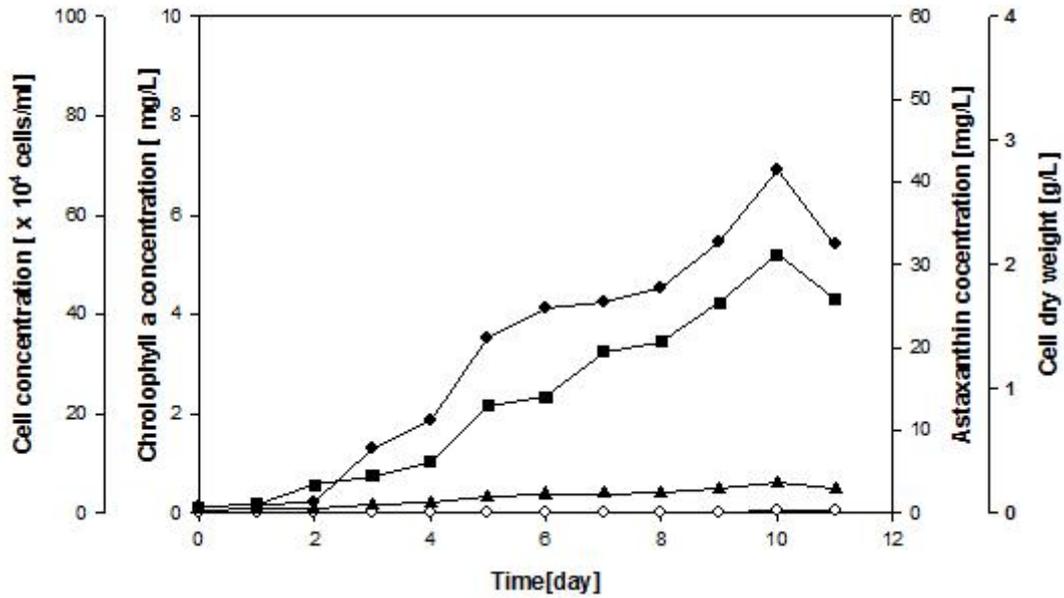


그림 29. 7리터 광 생물 반응기에서 *H. pluvialis*의 batch 배양 (광도 $60\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, ○: chlorophyll a, ●: astaxanthin, ■: 세포농도, ▲: cell dry weight)

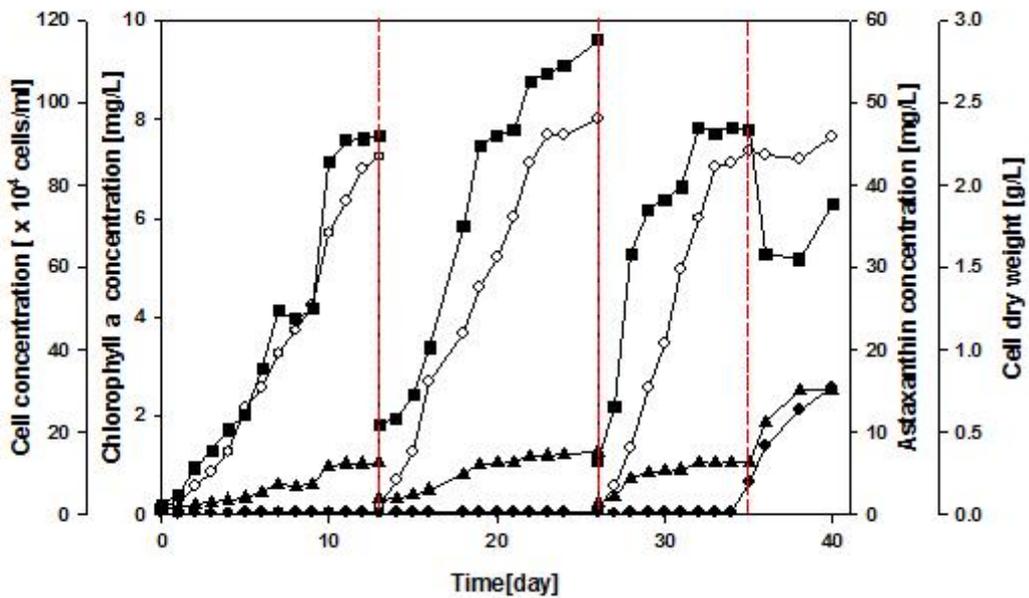


그림 30. 7리터 광 생물 반응기에서 *H. pluvialis*의 semi-continuous 배양 (광도 $60\sim 80\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, $300\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (stress), ○: chlorophyll a, ●: astaxanthin, ■: 세포농도, ▲: cell dry weight)

7리터 광 생물 반응기에서 batch 배양에서의 stress 광도 조건 없이 chlorophyll a와 astaxanthin, cell dry weight를 측정하였다. Chlorophyll a는 세포의 농도의 증가와 비례하여 증가 하여 최대 5.2mg/L, cell dry weight는 0.2g/L으로 나타났고, stress 조건 없이 astaxanthin의 축적은 0.22mg/L로 축적이 거의 되지 않았다.

Semi-continuous 배양에서는 3단계 후 빛의 광도를 300 μ mol/m²s로 stress 조건을 만들어 주었다. Stress를 주었을 때 chlorophyll a의 농도는 일정하게 7mg/L의 농도로 유지 하였으며, cell dry weight는 세포 농도와 달리 증가하여 배양 마지막에 0.75g/L의 값을 나타 내었으며, 이와 비례로 astaxanthin의 농도도 증가하여 15.3mg/L의 값을 나타내었다.

Cell dry weight 당 astaxanthin의 비율은 약 2%로 Lab 규모인 삼각플라스크상의 연구 보다 0.8% 낮게 나타내었다. 이는 stress 조건이 짧았기 때문이라 생각되며, 좀 더 길게 stress 조건을 주었다면, 충분히 삼각플라스크 상 실험 결과와 비슷한 astaxanthin 농도를 나타낼 것이다 (* 배양액의 고갈로 더 길게 stress 조건을 줄 수 없었음).

Stress 조건 후 cell dry weight의 증가는 *H. pluvialis* 특유의 세포형태 변화로 vegetative cell에서 cyst cell로 변화 할 때 세포의 크기 커지므로 cell dry weight의 무게가 증가한 것으로 볼 수 있다(그림). 이처럼 semi-continuous 배양을 통해서는 세포의 생산을 목적으로 미세조류에 적용하기에 아주 적절한 배양 방법이나, astaxanthin 같은 축적 물질 생산을 위한 2step 배양 방법으로는 적절하지 않는 것으로 판단된다.

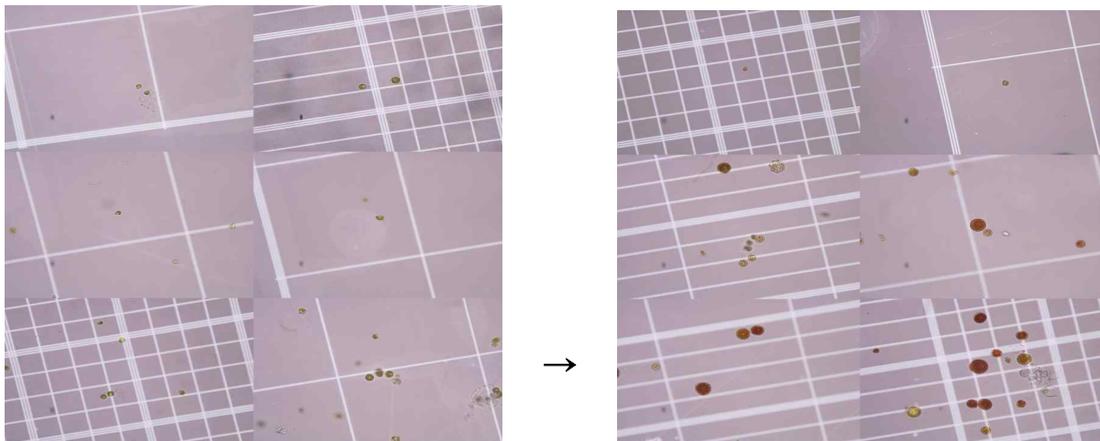


그림 31. Light stress를 받은 후의 *H. pluvialis*의 세포 형태

제 6 절 : *H. pluvialis* 및 astaxanthin의 대량 배양 시스템 개발

Pilot 규모의 광 생물 반응기에서 *Haematococcus pluvialis*의 배양을 통한 astaxanthin 생산 조건 확립

- Pilot 광 생물반응기에서 astaxanthin 생산 연구

· Lumostatic 방법: $40\sim 150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$

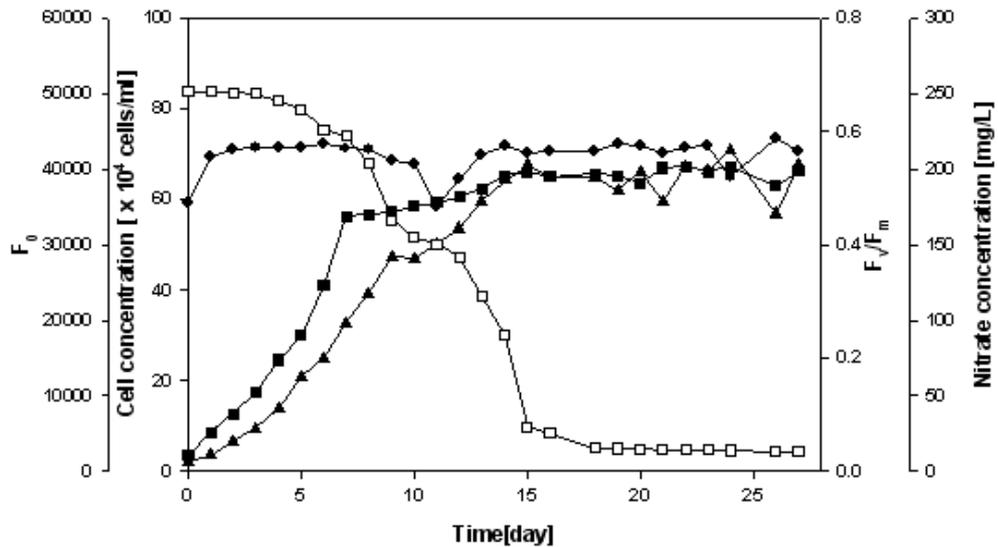


그림 32. Pilot 광 생물 반응기에서의 *H. pluvialis*의 성장(Lumostatic 방법: $40\sim 150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, ■: 세포농도, ▲: F_0 , ●: F_v/F_m , □: 질소원 농도)

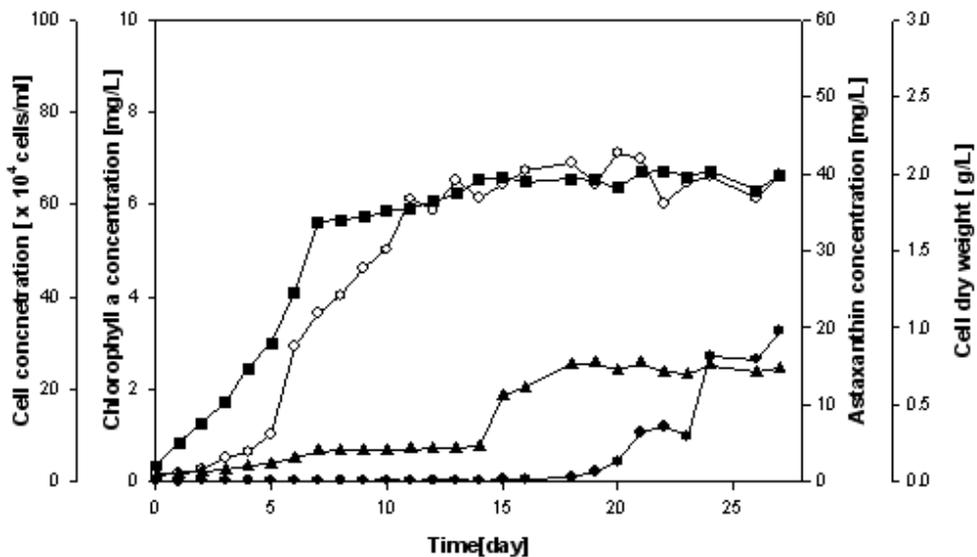


그림 33. Pilot 광 생물 반응기에서의 *H. pluvialis*의 성장(Lumostatic 방법: $40\sim 150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, ■: 세포농도, ○: Chlorophyll a, ●: astaxanthin, ▲: cell dryweight)

· Lumostatic 방법: $60\sim 250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$

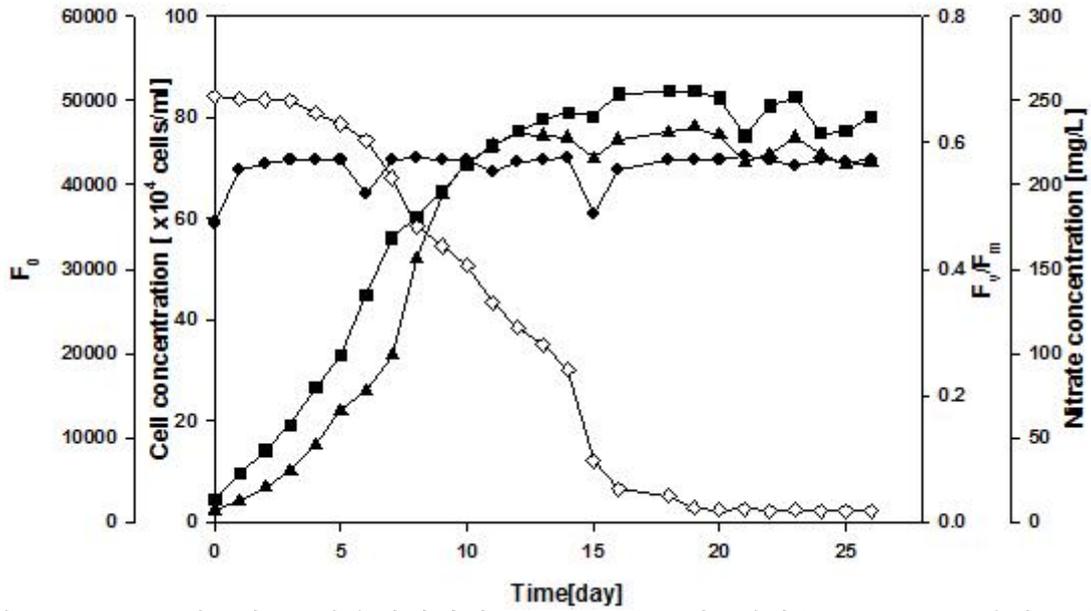


그림 34. Pilot 광 생물 반응기에서의 *H. pluvialis*의 성장(Lumostatic 방법: $60\sim 250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, ■: 세포농도, ▲: F_0 , ●: F_v/F_m , □: 질소원 농도)

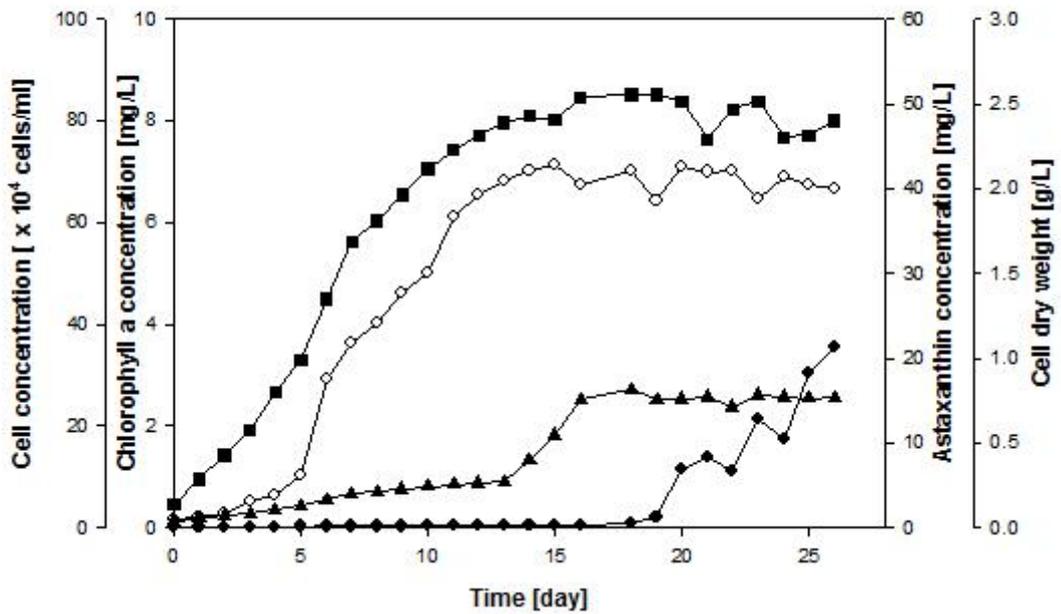


그림 35. Pilot 광 생물 반응기에서의 *H. pluvialis*의 성장(Lumostatic 방법: $60\sim 250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, ■: 세포농도, ○: Chlorophyll a, ●: astaxanthin, ▲: cell dryweight)

Pilot 광 생물 반응기를 이용한 배양은 두 가지 lumostatic 방법으로 광도를 조절하여 *H. pluvialis*의 성장과 astaxanthin의 축적을 유도하였다.

제 1방법은 광도를 $40\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 로 시작하여 점점 광도를 높여주며, 세포농도가 최대 되었을 때 $150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 로 광도 맞추어 astaxanthin의 축적을 유도하였다. 그 결과 세포의 최대 농도는 $65\times 10^4\text{cells}/\text{ml}$ 로 7리터 광 생물 반응기에서의 batch 배양 수준과 비슷하게 낮은 세포농도를 나타내었고, 최소 형광 값인 F_0 의 값은 세포의 성장과 동일한 형태로 나타나며, 광합성 효율을 나타내는 최대 양자수율 F_v/F_m 는 거의 변화 없이 광도를 올려주었을 때만 아주 미비하게 떨어졌다 바로 수복되는 것을 볼 수 있다. 질소원의 소비는 초기 농도 약 $250\text{mg}/\text{L}$ 에서 최대 세포농도가 되기까지 단지 약 $150\text{mg}/\text{L}$ 의 소비만 하였다. Chlorophyll a의 경우 세포농도와 비례하게 증가하는 동일한 형태로 나타났다. astaxanthin의 경우 질소원이 급격히 소비는 시점에서 증가하는 형태로 최대 농도는 $19.6\text{mg}/\text{L}$ 로 나타났고, cell dry weight의 경우 $0.73\text{g}/\text{L}$ 의 농도를 나타냈다. Cell dry weight 당 astaxanthin인 2.17%을 함량 하고 있다.

제 2 방법은 광도의 시작을 $60\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 로 하여 점점 광도를 증가 시켜주며, 최대 세포농도에 도달하였을 때 $250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 로 광도의 변화를 주어 astaxanthin의 축적을 유도 하였다. 세포의 최대 농도는 $85\times 10^4\text{cells}/\text{ml}$ 로 제 1 방법보다 높은 세포의 농도를 나타내었다. 최소 형광값 F_0 , 광합성 효율을 나타내는 최대 양자수율 F_v/F_m 는 제 1방법과 동일한 경향을 나타냈으며, 질소원의 소비 또한 최대 세포농도가 되기까지 약 $150\text{mg}/\text{L}$ 만 소비되었다. Chlorophyll a 농도와 astaxanthin의 축적도 제 1 방법과 비슷한 경향으로 최대 astaxanthin 축적 농도는 $21.3\text{mg}/\text{L}$ 이며, 이때 cell dry weight는 $0.76\text{g}/\text{L}$ 로 cell dry weight 당 astaxanthin의 함량은 2.8% 수준으로 $250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 광도의 삼각플라스크 상의 astaxanthin 축적율과 동일한 값을 나타내고 있다.

이 2가지 배양 방법은 동일하게 질소원이 급격히 소비되어 질소원의 잔존량이 거의 없을 때 astaxanthin의 축적이 이루어지고, stress 광도가 $250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 일 때가 $150\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 일 때보다 더 높고 더 빨리 astaxanthin이 축적되는 것으로 나타났다. 결과적으로 세포의 최대 농도가 되기까지 광도를 $60\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 로 시작하여 점점 증가하는 lumostatic 방법으로 세포의 최대성장을 유도하고 사용되는 배지 성분 중 질소원의 량을 세포의 최대 성장까지 이용되는 량만 첨가하는 배지의 변화와 $250\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 의 수준정도의 광도를 주면 더 빨리 astaxanthin을 축적 할 수 있을 것이다.

4. Pilot 규모에서 생산된 astaxanthin 추출 및 분석 연구

총 120L배양 중 cell dry weight의 총량은 0.73 g/L로 세포를 전 처리하여 순수 astaxanthin 농도 측정을 UV-spectrophotometer 방법과 HPLC 방법을 이용하여 기존 제품과 비교분석하였다.

가. UV-spectrophotometer 방법 연구

Pilot 규모에서 생산된 astaxanthin이 포함된 건조 *Haematococcus pluvialis*의 astaxanthin을 UV-spectrophotometer 방법으로 측정된 astaxanthin의 함량의 농도는 건조 세포 100ppm 중 3.5ppm으로 건조 세포에 약 3.5%의 량을 포함되어있다.

$$\text{Astaxathin [mg/L]} = 7.0273 \times A_{477}$$

표 10. UV-spectrophotometer 방병으로 측정된 건조세포 100ppm 중 astaxanthin 측정 OD 값

| | 1 | 2 | 3 | 평균 |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|
| O.D 값 (세포 100 ppm 중) | 0.510 | 0.510 | 0.509 | 0.509 |

· Astaxthin 농도 [mg/L(ppm)] = $7.0273 \times 0.509 \rightarrow 3.5$ [ppm]

· 건조 세포 당 astaxathin 함량 = $(3.5[\text{ppm}]/100[\text{ppm}])/100 \rightarrow 3.5\%$

제품으로 판매되고 있는 astaxanthin 제품은 CO₂ 농축 추출법을 이용한 것으로 ester-astaxanthin을 포함 10% 함량으로 본 연구과제에서 생산된 astaxanthin은 ester-astaxanthin 포함 3.5%로 생산 제품과 같은 CO₂ 농축 법을 이용한다면 판매 제품과 같은 수준으로 충분 할 것이다.

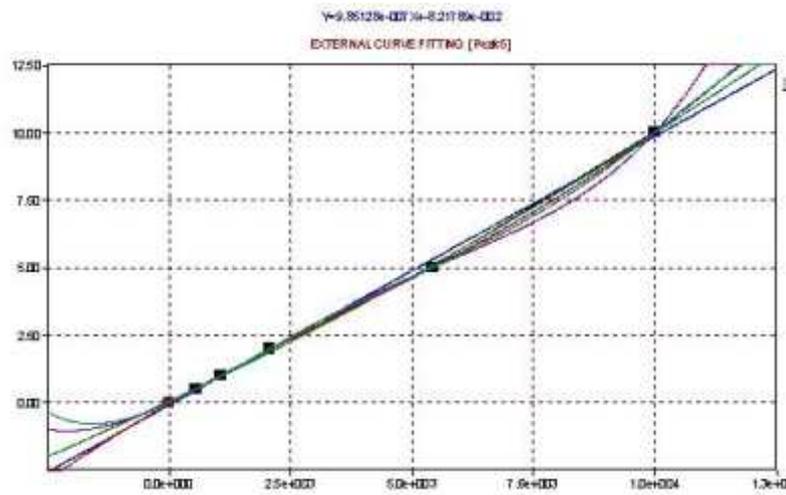
나. HPLC 분석 방법

Pilot 규모에서 생산된 astaxanthin이 포함된 건조 *Haematococcus pluvialis*의 astaxanthin을 HPLC 방법으로 측정된 astaxanthin의 함량 농도는 건조 세포 100ppm 중 순수 astaxnahtin의 량은 약 0.5ppm으로 건조 세포당 약 0.5%순수 astaxanthin을 포함 되어있다.

· Astaxanthin HPLC 검량선 및 검량식

표 11. HPLC 분석으로 나타난 Standard astaxanthin 농도별 Retention Time과 Area

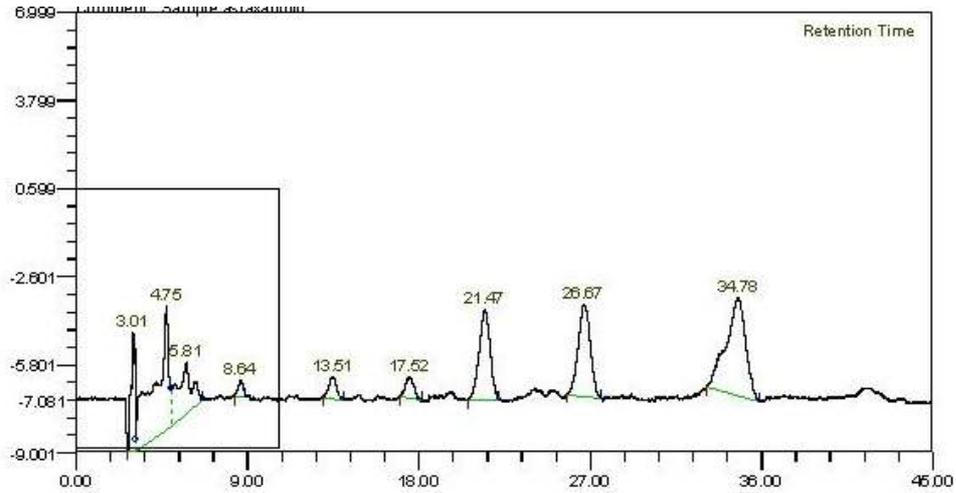
| Standard astaxanthin 농도[ppm] | RT[min] | Area |
|------------------------------|---------|----------|
| 0.5 | 4.763 | 565177 |
| 1 | 4.751 | 1083162 |
| 2 | 4.766 | 2088116 |
| 5 | 4.753 | 5468812 |
| 10 | 4.752 | 10074540 |



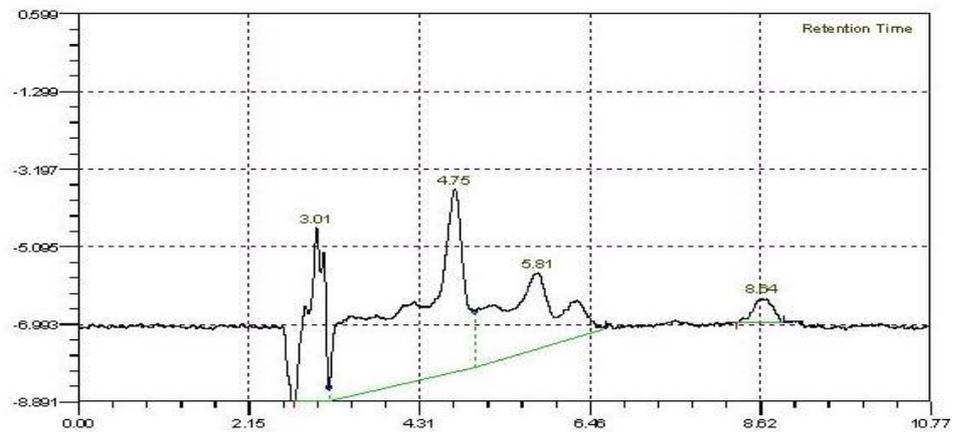
검량곡선 식: $y = 9.85128e-007x - 8.2179e-002$

그림 36. HPLC 분석을 통한 농도별 astaxanthin 검량선 그래프 및 검량선 식

· Pilot 규모에서 생산된 astaxanthin의 함량 분석 결과



(a)



(b)

그림 37. HPLC 분석을 통한 Pilot 규모에서 생산된 astaxanthin 크로마토그래프 (a) 총 분석 시간 45분 크로마토그래프, (b) 총 분석 시간 중 10분 동안 분석 크로마토그래프

HPLC 분석은 총 45분 분석으로 크로마토그래프에서 보았을 때 RT 값이 4.75분 일 때 standard astaxanthin과 같은 시간 때 이므로 이 peak 값을 검량선식에 대입하였을 때 0.5ppm의 값을 나타내었다. UV-spectrophotometer 방법으로 astaxanthin 함량은 3.5% 높은 값을 나타나고 있으나 이는 ester-astaxanthin이 포함된 값으로 HPLC 분석은 순수한 astaxanthin의 량은 0.5ppm으로 그 함량이 낮게 나타난 것으로 보이나 이는 ester-astaxanthin이 다른 RT에서 나타난 것으로 saponification를 정밀하게 한다면 충분히 astaxanthin의 함량은 3% 가까울 것으로 기대 할 수 있다.

제 7 절 : Astaxanthin과 생균제를 함유하는 양어사료 개발 및 현장실험

1. 시제품 제작 및 현장실험

가. 예비 실험을 위한 시제품 제작 및 실험

- 연구 방법

1) 개발중인 사료의 시장진입을 위해 현장 실험을 통한 시장진입 가능성을 확인하였다. 우선 C사 사료에서 제작되는 저가의 사료 배합비를 선정하여 착색제 없는 사료에 생균제(BP 함유)와 아스타산틴을 첨가하여 45일간 섭이하였다. 배합비는 다음과 같다 (표 참조)

표 12. 예비실험에 사용된 C사의 저가용 사료 배합비

| 사료 시제품 제작 | 함유율 (%) |
|-----------|---------|
| - 조단백 | 44.0% |
| - 조지방 | 14.0% |
| - Ca | 1.2% |
| - P | 2.7% |
| - 조섬유 | 5.0% |
| - 조회분 | 15.0% |
| - 기 타 | 18.1% |

2) 치어때부터 착색제가 없는 일반 사료를 급이하다가, 일정 체중 (300g 정도)에 도달하면 착색제가 함유되어 있는 사료를 45일간 급이하여 착색을 유도한 후, 출하하는 기존 사육 방식을 채택하였다.

* 실험의 조건 (1차 실험)

대상어류 : 무지개 송어, 치어 5000 미 (체중 200-250 g)

실험 기간 : 총 6주 (2009. 4.1 ~ 2009. 5.12)

측정 기간 : 2주씩 sampling

측정 방법 : 비특이적 면역 (lysozyme activity)

- 연구 결과

① 사양 비교 (체장, 체중, 비색도 분석)

: 상기의 결과에서 기본 사료구와 실험 사료구 (바이넥스 사료: 착색제 없는 사료 + AST 첨가)간의 사양 비교는 그다지 차이가 나지 않았다. 무지개 송어는 실험기간(6주간) 중 체장 22~35 cm 가량 증가하였고, 체중은 100g ~ 300g 정도로 성장하였다 (Fig 25). 그러나, 비색도(목 뒷덜미의 색)의 차이는 20~30까지의 고루 측정되었는데, 특히 실험 2주때부터 실험사료구 구간이 기본 사료구 구간보다 비색차이가 나기 시작하여 실험종류인 6주까지 진행되는 동안 유의성 있는 ($P<0.01$) 비색의 차이를 나타내었다 (Fig 26). 실험초기부터 비색의 반응이 나타난다는 것은 출하때 비색에 의한 애로사항을 궁극적으로 해결하게 되는 것을 의미하며, 사육방법의 해결에도 도움이 될 것으로 사료된다.

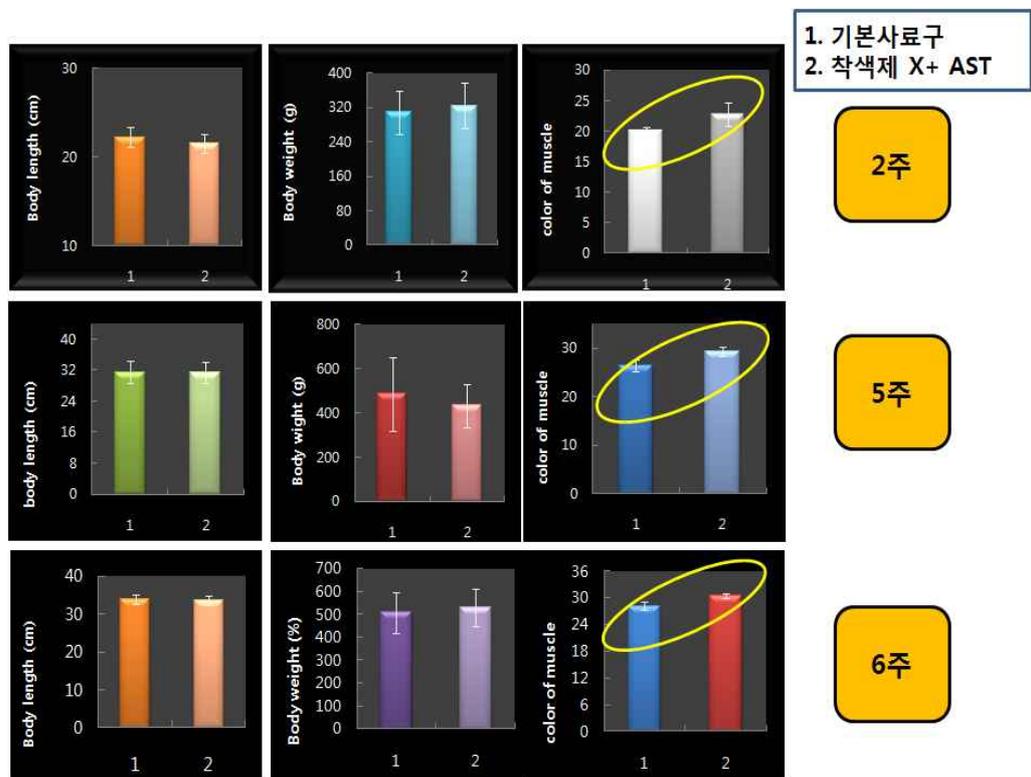
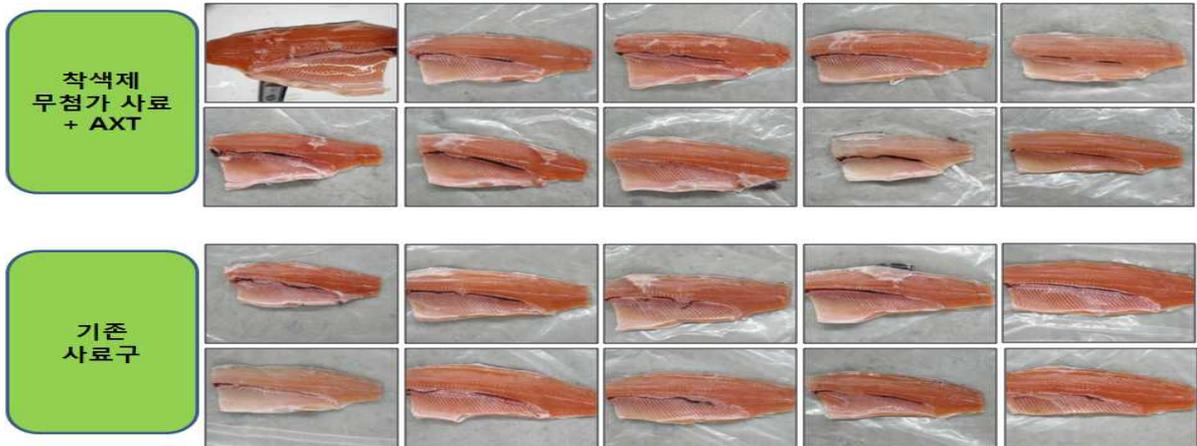
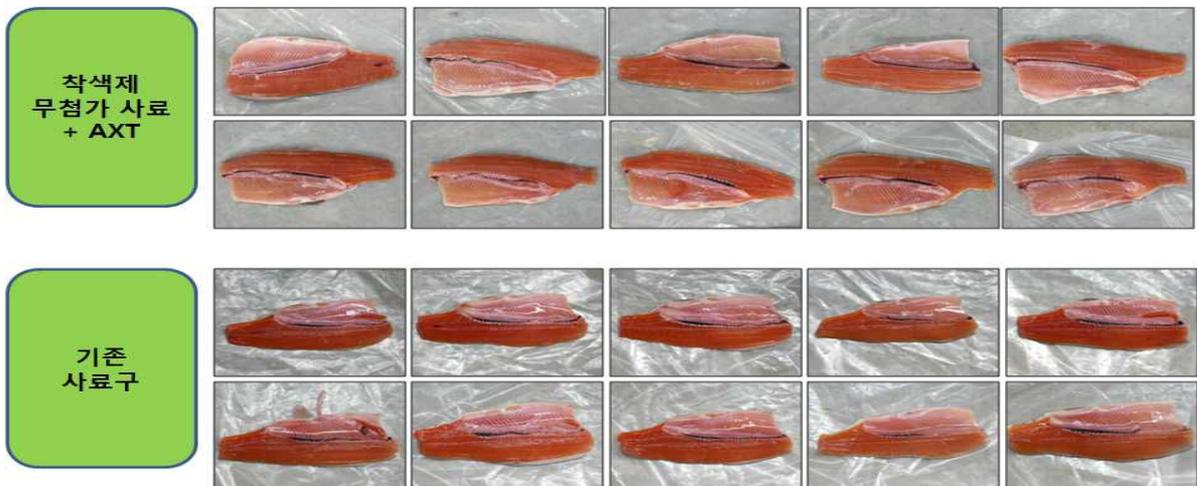


그림 38. 현장 예비실험을 통한 사료간 사양분석

(2주차 비색도)



(5주차 비색도)



(6주차 비색도)

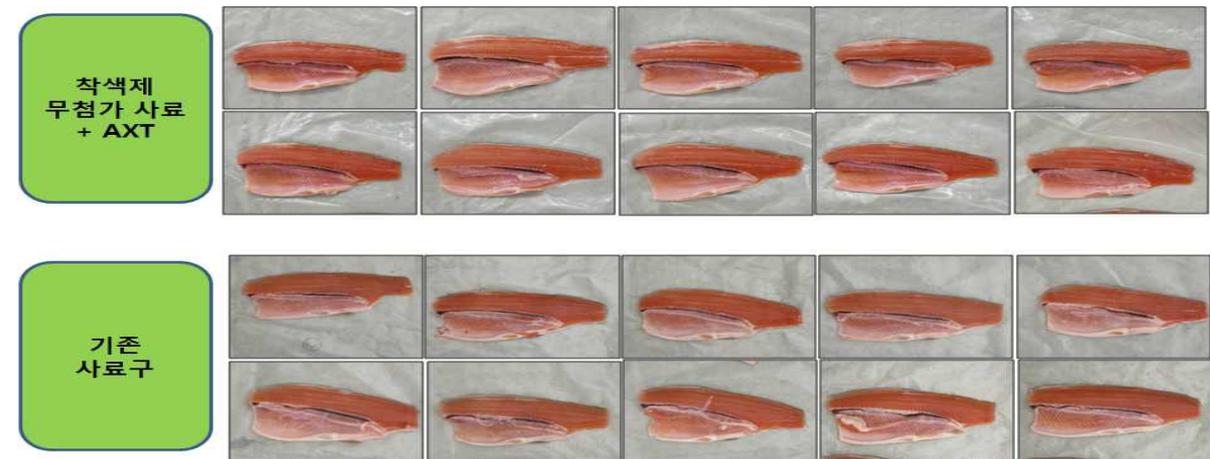


그림 39. 사료실험에 따른 비색도의 변화

② 면역학적 분석 (Lysozyme activity)

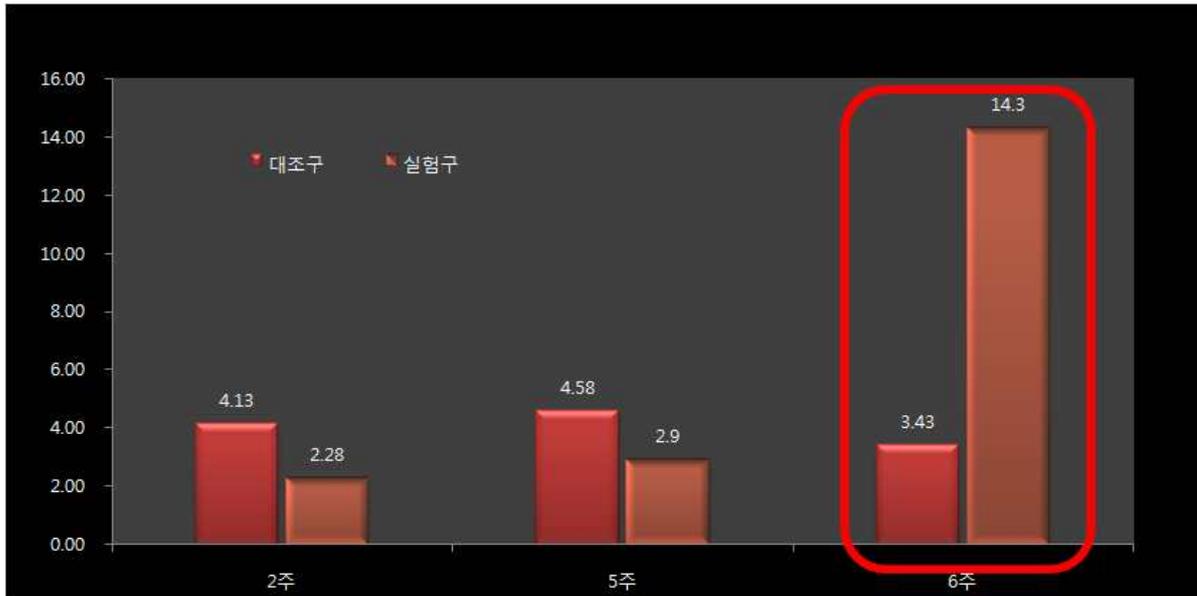


그림 40. 사료구간에 따른 lysozyme 활성 분석

: 상기의 결과에서 비특이적 면역의 일종인 lysozyme 활성을 조사하였다. 총 6주간 실험에서 각각 10마리씩 채혈하여 혈청을 분리한 후, lysozyme 활성을 분석하였다. Lysozyme은 체내에 이물질(병원체 포함) 들어오면 제거하기 위해서 분해하는 효소로서 비특이적으로 외부 물질을 차단하는 면역시스템의 일종이다. 따라서, 이 활성으로 간단한 면역적인 분석이 가능하다.

실험 초기에 기본 사료구의 lysozyme 활성이 실험 사료구에 비해 약간은 높은 경향을 나타냈고 5주차까지 지속되었으나, 6주차에는 실험사료구의 lysozyme의 활성이 아주 높게 나타났다. 이러한 경향은 체중이 400g 이상의 체중부터 사료 섭취량의 증가와 대사율의 증가로 성장이 급속도로 이루어진 것을 의미한다. 이에 반해 6주차에 기본 대조구가 lysozyme 활성 저하된 것은 현장에서 기본사료의 일부 대체가 있어 어류의 입질등의 문제로 인한 사료의 급이가 현저하게 떨어진 것으로 추정된다.

상기의 결과로 일반적인 사양실험으로 사료간 예비실험을 수행하였을 때, 바이넥스가 제조한 사료에 생균제와 아스카산틴의 적절한 배합구성이 잘 되어 있어서 기본의 시판되어 사용되는 사료보다 아스타산틴의 근육 내 침착정도가 좋아 흡수가 잘 되었다. 이로 인한 신진대사가 잘 일어나서 궁극적으로 사료효율 측면에서에 아주 좋은 결과를 유도한 것으로 사료되며, 또한 lysozyme 활성으로 인한 면역능의 증강을 유도하는 것으로 나타나 질병에 대한 내병성을 높여주었다. 따라서, 바이넥스가 제조한 사

료는 기존 사료보다 고기능 고효율사료로서의 좋은 구성비를 가진다는 것을 알게 되었으며, 성장뿐만 아니라 면역능 증강에 따른 폐사율 감소를 유도하는 고기능 고효율 사료가 될 수 있을 것이라는 기대감을 갖게 되었다. 그리고, 송어를 출하할 때 체색(비색 포함)의 성상이 아주 중요하게 작용하는데, 바이넥스 제조 사료가 사육 초기(4주이내)에 비색이 좋아지게 한다면, 출하 size가 아니더라도 출하가 가능하며, 정기(定期)에 출하된다고 하더라도 더 좋은 색상으로 소비를 유도하는 될 가능성을 보여주었다. 마지막으로 사료성분의 적절한 변화로 인한 효능대비 사료 단가의 인하를 기대할 수 있게 되었다.

- 상기의 6주간 현장실험 결과로 저가용 사료 배합비에 생균제와 아스타산틴을 첨가하여도 충분히 사료 제작 가능성이 있음을 알 수 있었다. 따라서, 차기 실험부터 배합비와 여러 조건등을 변화시켜 사료 제작과 현장실험을 수행하였다.

나. 현장 실험을 위한 시제품 제작

1) 제조회사별 사료 성분 분석

- 현재 국내에서 송어사료를 시판하고 있는 3개 제조회사를 물색하여 가능성 있는 회사를 사료 조성비를 참고하여 선정하고자 하였다.

| 제조 사료 | Moist | CP | Fat | Fib | Ash | Ca | P |
|----------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|
| 송어(C) | 8.24 | 47.58 | 14.82 | 1.00 | 12.11 | 2.11 | 1.59 |
| 송어(A) | 6.26 | 43.19 | 20.89 | 1.07 | 10.68 | 2.34 | 1.55 |
| 송어(B) | 6.20 | 46.03 | 14.80 | 1.99 | 9.40 | 1.89 | 1.57 |
| 송어(바이넥스) | 6.23 | 47.80 | 14.74 | 1.00 | 12.11 | 2.31 | 1.60 |

상기의 결과에서 C사를 의뢰하여 사료 성분을 분석한 결과 C사와 바이넥스의 사료 성분은 거의 동일하고 (C사에서 의뢰제작), A사는 타사에 비해 조단백(CP)이 43.19%로 좀 적은 대신 지방 (Fat)함량이 20.89%로 높았다. B사는 CP는 46.03%이며, 섬유소(Fib)가 1.99%로 높고, 조회분(Ash)이 9.40으로 낮았으며, 칼슘(Ca)이 각각 1.89로 낮은 함량을 나타내었다. 기타 다른 성분은 거의 일정한 것으로 나타났다.

2) 사료 내 균수 분석

| | A | B | C | 바이넥스 |
|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 총 균수 | 8.0 x 10 ² | 2.0 x 10 ³ | 7.0 x 10 ² | 7.0 x 10 ² |

사료 내 균수를 알아보기 위하여 각 제조회사별 사료를 믹서기에서 갈아서 1g씩 일정한량을 취하여 0.1 % peptone 수에 희석하여 영양배지 (nutrient media)와 BCP (bromocresol purple)배지에서 총 균수/g 를 측정하였다. 상기의 결과에서 B사가 타사보다 가장 높은 2.0 x 10³이 검출됨을 알 수 있었다. 따라서, C사를 선정하기로 하였다.

- 예비실험에서 생균제와 asthaxanthin의 투입가능성을 확인하였다. 이를 바탕으로 본격적인 현장 실험에 적용하기 위해 C사와 협의하여 생균제와 astaxanthin이 함유된 송어사료 시제품을 제작하였다. 시제품은 6주 분량으로 C사 의뢰하여 2회 제작하여 실험하였다.

표 12. 현장실험용 제작사료의 성분별 조성

| 사료 시제품 제작비 | 조성비 |
|------------|-------|
| - 조단백 | 44.0% |
| - 조지방 | 14.0% |
| - Ca | 1.2% |
| - P | 2.7% |
| - 조섬유 | 5.0% |
| - 조회분 | 15.0% |
| - 기 타 | 18.1% |

다. 2차 현장실험

- 2차 실험은 C사에서 의뢰 제작하고, 예비실험(1차)에서 얻어진 결과를 활용하여 경북 지역의 서로 다른 두 양어장(L과 C 송어양식장)에서 재현성 실험을 수행하였다.

1) 기초 사양 실험

- 예비실험을 통해 얻어진 결과로 바이넥스 사료조건을 보완하여 다시 제작하였다. 이

번 실험에서는 현재 시판되고 있는 송어사료와 비교하여 사양결과도 함께 분석하기로 하였다.

2) 제조사별 사료 제형 분석

A, B, C 사와 바이넥스 사료 급이에 따른 기초 사양실험을 실시하기 위해 사료의 색상과 형태를 관찰하였다 (Fig. 27). A사와 B사는 바이넥스 사료에 비해 크기가 다소 좀 크고, 착색제의 강도 또한 강하였고, C사는 바이넥스와 비슷 한 색상과 형태를 나타내었다.



그림 41. 사료 회사별 사료 색상 및 형태

3) 결과

- 본 실험에서의 12주간의 사양결과는 3개사와 비교하여 등 근육의 침착정도와 평균증체의 사료 효율에 역점을 두어 진행하였다. 3개사와 비교하였을 때 바이넥스 제조 사료가 증체가 가장 좋았고, 착색 역시 가장 높은 수준을 나타내었다 (표 xx). 이로한 C사의 공정에 바이넥스의 생균제와 아스타산틴의 양을 조절하는 것으로 차기 실험을 설계하였다.

표 13. 2차 실험 사양결과

| | A사 | | B사 | | C사 | | 바이넥스 | |
|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|
| | 착색도 | 체중 | 착색도 | 체중 | 착색도 | 체중 | 착색도 | 체중 |
| 12주 | 27.1 | 420 | 27.5 | 436 | 28.3 | 411 | 28.4 | 430 |

라. 3차 실험

1) 조건

: 상기의 1~2차 실험결과 증체와 착색의 활성 정도가 우월함을 나타내었다. 따라서, 착색제의 절감(50% 삭감)에 따른 제조비 절감효과와 증체를 보장하기 위한 성분을 보완하여 실험하기로 하고, 3차 실험부터는 사료효율과 증체에 역점을 두어 현장실험 진행하였다. 전수조사를 수행하였다.

2) 사료 제작 조성비

: 아래 표와 같다.

표 14 . 현장실험용 제작사료의 성분별 조성

| 사료 시제품 제작비 | 함량 (%) |
|------------|--------|
| - 조단백 | 45.0% |
| - 조지방 | 8.0% |
| - Ca | 1.2% |
| - P | 2.7% |
| - 조섬유 | 4.0% |
| - 조회분 | 17.0% |
| - 기 타 | 22.1% |

2) 실험방법

- 8,500 마리씩 두 그룹으로 진행 (W 사료 / 바이넥스 사료)
- 실험기간 : 2009. 11.24 ~ 2010. 02. 20 (총 3개월)
- 실험장소 : 경북 소재 L 양어장

3) 결과

- 타사의 사료급이 구간과 비교한 결과, 아래 표와 같이 평균증체율이 거의 차이가 나지 않았지만, 착색도 역시 거의 차이가 나지 않았다. 그러나, 12주간의 실험 종료후 분석한 결과 지방성분이 2차에 비해 약간 저하되었고, 조섬유나, 조회분이 증가된 것이

증체율을 약간 저하시키는 것으로 판단되었다. 현장관계자의 말을 따르면 기호성이 좀 저하된다는 의견을 수렴하여 차기 실험에는 지방성분을 증가시키고, 기호도를 보완하는 실험을 수행하기로 하였다.

표 15. 3차 실험 사양결과

| | 바이넥스 | | 타사 사료 | |
|-----|--------|------|--------|------|
| | 평균 증체량 | 착색도 | 평균 증체량 | 착색도 |
| 12주 | 441 | 27.8 | 453 | 27.3 |

- 특히, 아스타산틴의 양을 1~2차 사료 배합비의 50%까지 조절하였지만, 착색에는 전혀 문제가 되지 않았다. 또한 아스타산틴의 활성기능인 면역기능 저하에 의한 폐사율도 나타나지 않아 거의 문제가 되지 않는다고 판단하였다 (별첨자료 참고).

마. 4차 실험을 위한 시제품 제작 및 실험

1) 사료 제작 조건

: 3차 실험결과를 바탕으로 4차에서는 아스타산틴의 양을 30% 수준까지 절감시키면서 사료급이에 대한 증체율을 높이기 위한 지방 함량 조절과 기호도를 높이기 위한 성분을 첨가하여 사료를 제작하였다(표 xx). 정확한 사료효율 및 증체효과를 조사하기 위해 실험 기간(3개월)동안 매월 1회 측정하였고, 2개월 째 전수조사를 수행하였다.

표 16 . 현장실험용 제작사료의 성분별 조성

| 무지개송어5호 | 조성 |
|---------|------|
| - 조 단 백 | 44.0 |
| - 조 지 방 | 18.0 |
| - Ca | 1.2 |
| - P | 1.8 |
| - 조 섬 유 | 5.0 |
| - 조 회 분 | 15.0 |
| - 기 타 | 15.0 |

2) 실험방법

- 5000 마리씩 두 그룹으로 진행 (W 사료 / 바이넥스 사료)
- 실험기간 : 2010. 03. 30 ~ 2010. 06. 25 (총 3개월)
- 실험장소 : 경북 소재 L 양어장
- 사료 급이 방법 : 매일 동량을 급이

3) 결과

- 총 12주간의 실험에서 사료를 동량으로 급이하었을 때, 타사 사료보다 바이넥스 사료가 사료효율이 좋은 것으로 나타났다 (표 xx). 폐사율은 거의 차이가 나지 않았고, 평균 체중은 는 바이넥스가 타사 사료급이 구간보다 훨씬 증체 비율이 높았다. 현장 관계자의 소견에 따르면, 타사 사료와 바이넥스 사료와의 사료 비중 차이가 있다고 하였다. 이러한 사실은 감안하여 검토한 결과 비중의 차이가 있음을 확인하고, 차기 실험에서는 급이 방식을 동일 횟수로 급이하는 방식으로 변경하기로 하였다.

- 또한 아스타산틴의 양을 초기 첨가량에 비해 50%를 절감 시켰음에도 불구하고, 실험 두 그룹간의 착색여부라던 지 면역능 저하에 따른 폐사율의 증가는 없었다. 사료 기호도의 문제를 확인하였으나, 송어의 사료섭이에는 그다지 차이가 없었다고 한다. 따라서, 첨가량을 더 줄일 수 있는 제조 배합비 설계를 다시 조정하였다.

표 17. 4차 실험 사양결과

| | 바이넥스 | | | 타사 사료 | | |
|-----|-----------|-----|-------|-----------|-----|-------|
| | 사료 급이량 | 폐사율 | 평균 증체 | 사료 급이량 | 폐사율 | 평균 증체 |
| 12주 | 700 kg | 30 | 858 g | 700 kg | 35 | 778 g |

바. 5차 실험을 위한 시제품 제작 및 실험

1) 조건

: 4차 실험결과를 바탕으로 5차에서터는 아스카산틴의 양을 30% 수준까지 절감시키면서 본격적인 사료효율과 증체에 관한 배합비를 적용하여 실험을 진행하였으며 (표 18), 제조사별 사료의 비중이 다르다는 점을 착안하여 실제 동등한 횡수로 급이하는 방식을 채택하여 실제 사료효율을 측정하기로 하였고, 2개월 째 전수조사를 수행하였다.

표 18 . 현장실험용 제작사료의 성분별 조성

| | |
|----------|------|
| 무지개송어 4호 | 조성 |
| 조 단 백 | 45.0 |
| 조 지 방 | 12.0 |
| Ca | 1.2 |
| P | 1.8 |
| 조 섬 유 | 5.0 |
| 조 회 분 | 15.0 |
| 기 타 | 20.0 |

2) 실험방법

- 8000 마리씩 두 그룹으로 진행 (W 사료 / 바이넥스 사료)
- 실험기간 : 2010. 06. 25 ~ 2010. 9. 17 (총 3개월)
- 실험장소 : 경북 소재 L 양어장
- 사료 급이 방식 : 매일 동일한 횡수로 급이

3) 결과

- 총 12주간의 실험에서 사료를 동이 횡수로 급이하었을 때, 타사와 거의 차이가 나지 않았다. 이러한 결과는 지난 4차 결과에서 문제시 되었던 사료 비중의 문제 추정 소재를 재차 확인하는 결과가 되었다. 동일한 횡수로 급이를 하다보니 바이넥스 사료가 가벼워 사료량이 적에 들어갔음을 알 수 있었는데, 결과를 보면 증체에 그다지 차이가 없었으므로, 사료를 적게 섞이하어 많은 증체를 유도하였으니 사료효율이 좋아졌다고 판단되었다. 비중 차이는 약 10% 정도가 차이가 났고, 실제로 동일한 횡수로 급이하었을 때 거의 110%에 해당하는 사료량이 급이된 것이다.
- 아스타산틴의 양을 초기 첨가량에 비해 30% 수준까지 절감시켰음에도 불구하고, 실험 두 그룹간의 착색여부라던 지 면역능 저하에 따른 폐사율의 증가는 없었다. 따라서, 기존의 아스타산틴의 양을 조절하여 착색을 내는 방식보다는, 오히려 생균제등을 첨가하여 대사의 기능을 높이고, 소화흡수를 높이는 기능성 강조한 것이 실제 어류 양식에 많은 도움이 된다는 것을 알 수 있었다.

표 19. 5차 실험시 사양 현황 결과

| | 티-포르테 | | | 타사 사료 | | |
|-----|--------|-----|-------|--------|-----|-------|
| | 사료 급이량 | 폐사율 | 평균 증체 | 사료 급이량 | 폐사율 | 평균 증체 |
| 12주 | 720 kg | 55 | 361.3 | 786 kg | 51 | 335 g |

2. 현장 실험을 통한 총 결과분석

가. 생균제가 어류 체내의 대사에 미치는 영향

- 생균제는 기존의 잘 알려진 Lactobacillus 계열과 Streptococcus 계열, Bifidobacterium 계열이 많이 알려져 있으며 이들 미생물은 lactic acid를 생성하여 장내 위해 미생물의 사멸 및 증식억제 효과가 있다고 알려져 있어 소화력 증진 및 면역력 증대 등의 목적으로 널리 사용되고 있다. 그러나 사료 공정에 적용하는 데 있어서 100℃ 이상의 공정을 거쳐야 하는데, 일반적으로 상기의 미생물들은 공정을 거칠 때에 대부분이 사멸된다. 이를 위해 유산균을 코팅하는 방법이 해결방안으로 알려져 있으나 공정상 설비비 및 제품의 제

조단가가 높아지기 때문에 고유의 기능성을 많이 보유하지 못해 실효성이 저하되는 것이 일반적이다.

- 이러한 공정을 해결할 수 있는 생균제는 Bacillus 계열인데, 미생물학적으로 막 자체의 capsule이 두껍게 형성되어 있고, 특히 고온과 같은 악조건에서 살아남기 위해 막이 더욱 더 두껍게 형성이 되는 특성을 갖고 있기 때문에, Bacillus 균이 사료에 적용하기 아주 좋은 균류라 판단된다.

- 이러한 생균제의 장 내 기전은 유해균의 증식을 억제시키고, 유익균을 증식시켜 장내의 환경을 정상화하거나 좋게 만들어줘서 (그림. 42) 장내에서 2차적으로 발생할 수 있는 다양한 기능을 직·간접적으로 수행한다는 것이다.

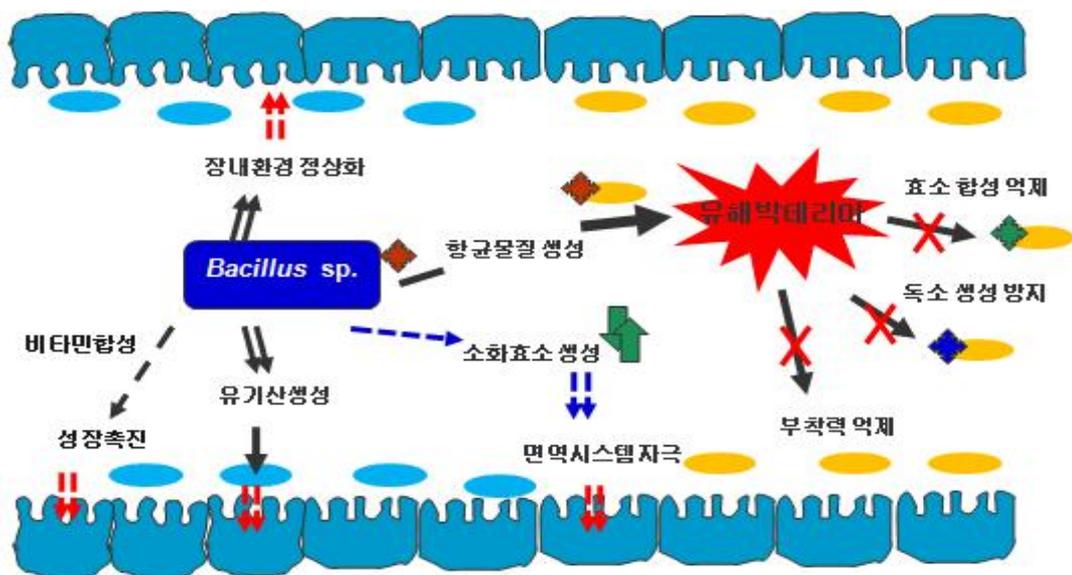


그림 42. Bacillus 계열의 장내의 활성 기전

나. *Haematococcus pluvialis*와 astaxanthin의 첨가 의미

Haematococcus pluvialis algal meal은 단백질, 지방, astaxanthin 및 미세영양원으로 서 좋은 원료이다. *H.pluvialis*는 환경적인 변화에 의해 스트레스를 받게 되고 astaxanthin을 생성하게 된다[Grung et al., 1992]. Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β -carotene-4,4'-dione, CAS 471-53-4)은 연어, 랍스터, 송어 새우와 같은 여러 생물에서 자연적으로 발생하는 카로테노이드이다 [Maher et al., 2000]. 또한 효모종인 *Phaffia rhodozyma*와미세조류종인*H. pluvialis*에서도발견된다 [Grung et al., 1992].

Astaxanthin은 주로 녹색 조류인 *H. pluvialis*에서 에스테르형태의 astaxanthin으로 존재한다 [Johnson and An et al., 1991; Jian-Peng Yuan et al., 2000]. Astaxanthin은 카로테노이드계 중의 하나이며 여러 입체화학적 형태(입체이성체)로 존재한다 (그림 43). 이러한 광학적 형태는 표 1에서 나타낸 바와 같이 여러 종에서 다양한 형태로 자연에 존재한다.

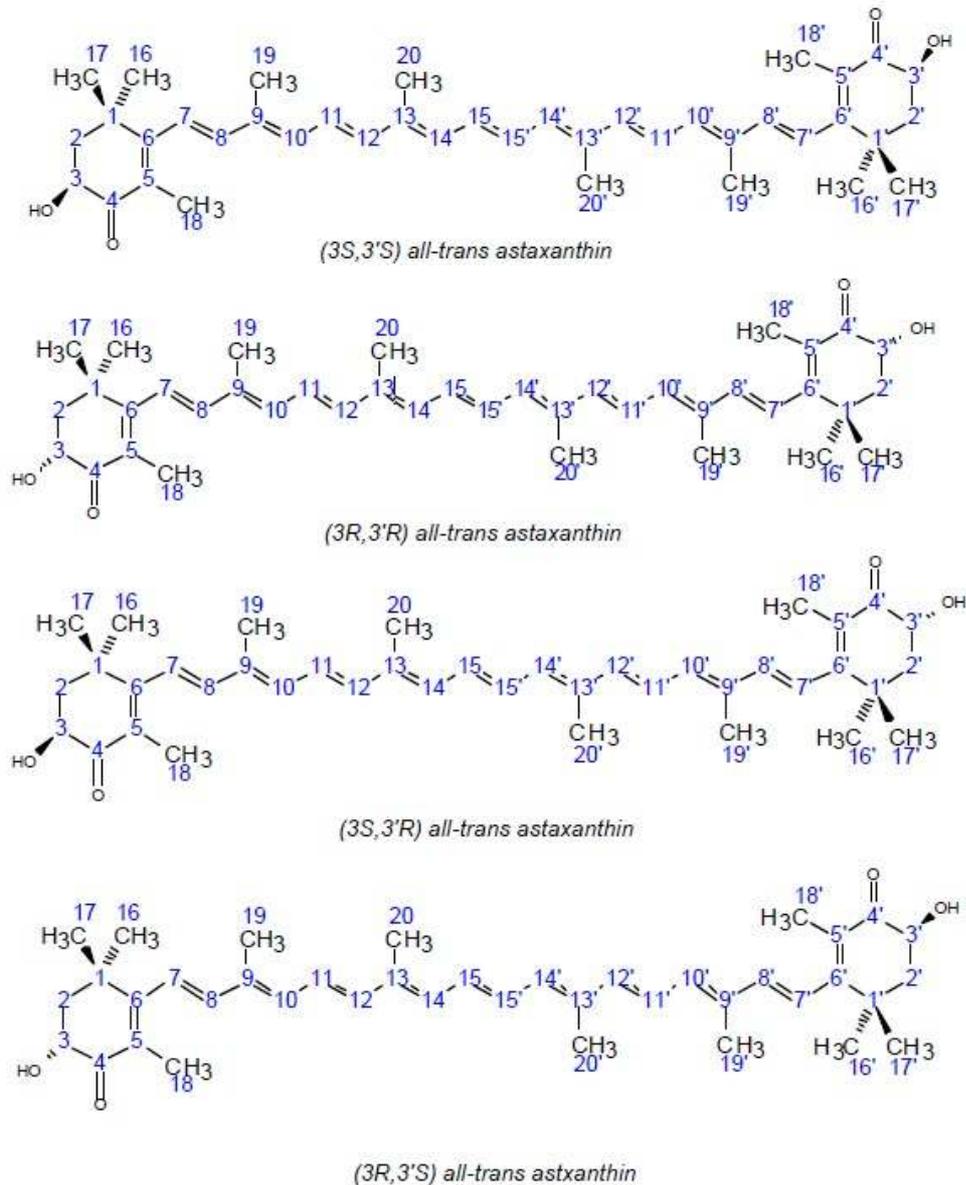


그림 43. Astaxanthin stereoisomers [<http://www.food.gov.uk>]

표 20. Astaxanthin 입체이성체 분포 [Bjerkeng et al., 1997]

| SPECIES | (3S,3'S) | (3R,3'R) and (3R,3'S) | (3R,3'R) |
|---|----------|-----------------------|--|
| Yeast (<i>Phaffia sp.</i>) | --- | <2% | >98% |
| Micro algae (<i>Haematococcus</i>) | 100% | --- | --- |
| Synthetic Astaxanthin (Carophyll Pink La Roche) | 25% | 50% | 25% |
| Atlantic Salmon | 78-85% | 2-6% | 12-17% (Schiedt et al 1981) cited in Foss 1984 |

Astaxanthin 생산의 조류원료는 실제적으로 3S, 3'S 형태로 카로테노이드를 생합성한다. *H. pluvialis*에서 3S, 3'S 형태는 연어에서 발견되는 우선성의 이성질체와 동일한 양상을 보인다 [Schiedt et al.,1981]. Free astaxanthin은 자연상에서 아주 소량이 발견되고 mono-, diester 형태의 astaxanthin 또한 trans-/cis- 이성질 형태로 미량 발견된다 [Bjerkeng et al.,1997; Renstrom et al.,1981]. 여러 연구자들에 의해 분석된 결과에 의하면 총 카로테노이드의 85% 이상의 astaxanthin 함량을 보여주었다. 그 외에 *Haematococcus*에서는 소량의 또다른 카로테노이드 색소가 검출이 된다 - 베타카로틴 (β -carotene) 0~5%, 루테인 (lutein) 1~11%, 칸타잔틴 (cantaxanthin) 2~5% (표 21). 전형적으로 *H. pluvialis*에 축적되는 astaxanthin의 형태는 에스테로화된 형태이다: monoester는 총 astaxanthin의 80% 이상이고 반면에 diester는 10~15% 정도 차지한다 (표 22).

표 21. *Haematococcuspluvialis*세포에서 카로테노이드 함량과 분포 (<http://www.fda.org>)

| Sources: | Individual carotenoid pigments measured as % of total carotenoids | | | | | | | | | |
|----------------------------|---|------|-------|-------|------|------|------|------|------|---------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H* | K* | Range |
| Carotenoid pigments | | | | | | | | | | |
| Astaxanthin (total) | 89.0 | 84.7 | >79.2 | 84-89 | 81.0 | 81.5 | 85.0 | 95.4 | 83.8 | 81 - 95 |
| Free astaxanthin | 1.0 | n.a. | n.a. | | 1.0 | n.a. | 5.0 | 2.4 | 2.06 | 1-5 |
| Astaxanthin monoesters | 49.0 | n.a. | 79.2 | 69-74 | 46.0 | n.a. | 70.0 | 83.2 | 68.6 | 46-79 |
| Astaxanthin diesters | 39.0 | n.a. | n.a. | 10-20 | 34.0 | n.a. | 10.0 | 9.8 | 12.2 | 10-39 |
| Beta-carotene | 3.0 | <1.3 | n.a. | | 5.0 | | n.a. | | n.a. | 0-5 |
| Lutein | 1.0 | 9.8 | n.a. | 1-9 | 6.0 | 10.6 | n.a. | 3.6 | n.a. | 1-11 |
| Cantaxanthin | 2.0 | 5.5 | n.a. | | 4.0 | | n.a. | | n.a. | 0-5.5 |
| Other carotenoids | 5.0 | <1.3 | n.a. | 6-9 | 4.0 | | n.a. | 0.9 | n.a. | 1-9 |

Sources: A = Harker & Young (1995), B = Fan et al. (1995), C = Yuan et al. (1996), D = Koyabashi et al. (1991), E = Grung et al. (1992), F = Zlotnik et al. (1993), G = Lorenz (1998), H = Latasa (1995), I = Akvaforsk (1999)
 * = Aquasearch's *Haematococcus* algal meal. N.a. = not analyzed.

그러나, 현장실험에서는 일반적으로 추출하였던 순도높은 아스타산틴을 첨가한 것이 아니고, 미세조류를 이용한 아스타산틴을 첨가하였는데, 본 과제에서 얻어진 결과로는 면역능 증가와 착색효과 및 다양한 생리활성 효능적인 면에서 전혀 손색이 없었다. 게다가 사료회사에서도 전량 수입하고 있기 때문에 함량 대비 엄청난 단가를 고민하고 있는 실정이다.

게다가 본 과제의 주 목적인 친환경적인 양어사료 개발에 초점을 두었을 때 남아있을 위해용매 추출성분이 어떠한 유해작용이 있는 지 알 수 없지만, 미세조를 이용하여 안전한 상태의 사료원으로서 미세조류 유래 아스타산틴을 첨가하면 제조단가도 줄일 수 있고, 안전한 먹거리로서의 부가기치도 만들어 낼 수 있을 것으로 사료된다.

본 과제의 아스타산틴의 구조를 정확히 알 수는 없지만, *H. pluvialis*에서 3S, 3'S 형태는 연어에서 발견되는 우선성의 이성질체와 동일한 양상을 보인다 [Schiedt et al.,1981]는 보고에 견주어 볼 때 3S, 3'S 형태일 것이라는 추정하고 있다.

표 22. Typical composition of Aquasearch 사의 건조 *Haematococcus pluvialis* algal meal의 전형적 구성표 [<http://www.fda.org>]

| | | | | | |
|---------------------------|----------|-----------|---|---------------|----------|
| Proximate analysis | | | Carotenoids | | |
| Crude protein | 18.08 | % | Total carotenoids | 2.6 | % |
| Crude fat | 19.43 | % | Total astaxanthin | 2.18 | % |
| Ash | 3.28 | % | <i>Free astaxanthin</i> | 3.6 | % |
| Crude fiber | 4.30 | % | <i>Astaxanthin monoester</i> | 81.8 | % |
| Moisture | 3.54 | % | <i>Astaxanthin diester</i> | 14.6 | % |
| Energy | | | Fatty acids | | |
| Calories | 470 | per 100 g | Caprylic acid | C-8:0 | <0.01 % |
| Calories from fat | 175 | per 100 g | Capric acid | C-10:0 | <0.01 % |
| Calories from | | | Lauric | C-12:0 | <0.01 % |
| Saturated fat | 28 | per 100 g | Myristic | C-14:0 | 0.09 % |
| Carbohydrates | | | | C-14:1 | <0.01 % |
| Dietary fiber | 26.5 | % | Palmitic | C-16:0 | 2.82 % |
| <i>Insoluble fiber</i> | 25.2 | % | Palmitoleic | C-16:1 | 0.11 % |
| <i>Soluble fiber</i> | 1.3 | % | Stearic | C-18:0 | 0.17 % |
| Sugars | 0.77 | % | Oleic | C-18:1 | 3.28 % |
| Cholesterol | 0 | % | Linoleic | C-18:2 | 3.11 % |
| Amino acids | | | γ linolenic ω-6 | C-18:3 | 1.89 % |
| Alanine | 7.48 | % | Octadecatetraenoic | C-20:0 | 0.04 % |
| Arginine | 5.54 | % | Gadoleic | C-20:1 | 0.03 % |
| Aspartic acid | 7.62 | % | Total saturated fat: | 3.12 % | |
| Cystine/Cysteine | 0.90 | % | Tot.monosaturated fat: | 3.42 % | |
| Glutamic acid | 9.60 | % | Tot.polyunsaturated fat: | 5.00 % | |
| Glycine | 5.01 | % | Vitamins | | |
| Histidine | 1.52 | % | Vitamin A | 22000 | IU/100 g |
| Isoleucine | 3.55 | % | Alpha tocopherol | 412 | mcg/g* |
| Leucine | 7.73 | % | Vitamin B6 | 0.14 | mg/100 g |
| Lysine | 4.33 | % | Vitamin B12 | 0.04 | mg/100 g |
| Methionine | 1.5 | % | Thiamine (B1) | 0.09 | mg/100 g |
| Phenylalanine | 3.56 | % | Riboflavin (B2) | 0.26 | mg/100 g |
| Proline | 4.83 | % | Niacin | 0.45 | mg/100 g |
| Serine | 4.77 | % | Folic acid | 0.39 | mg/100 g |
| Threonine | 4.99 | % | Pantothenic acid | 2.47 | mg/100 g |
| Tryptophan | 1.60 | % | Vitamin C | 0 | mg/100 g |
| Tyrosine | 2.92 | % | <i>(* before addition of any antioxidant)</i> | | |
| Valine | 5.28 | % | Minerals | | |
| Met + Cys | 2.39 | % | Calcium | 890 | ppm |
| Met + tyr | 6.48 | % | Phosphorous | 3900 | ppm |
| Micro-organisms | | | Potassium | 2300 | ppm |
| Aerobic plate count | < 1000 | CFU/g | Sodium | 2400 | ppm |
| E. coli | < 10 | CFU/g | Magnesium | 1500 | ppm |
| Salmonella | Negative | /25 g | Iron | 880 | ppm |
| Heavy metals | | | Cobalt | 0.58 | ppm |
| Lead | <0.5 | ppm | Nickel | 5.7 | ppm |
| Mercury | <0.1 | ppm | Selenium | <0.5 | ppm |
| Cadmium | <0.5 | ppm | Molybdenum | <0.5 | ppm |
| Arsenic | <0.5 | ppm | Zinc | 49 | ppm |
| | | | Chromium | 5.1 | ppm |

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표달성도

| 연구목표 | 연구결과 | 달성도 (%) |
|---|--|---------|
| * 양어사료용 균주 선별. | * 균주 집락 성장 및 분양(1차 선별) * Amylase test (2차 선별) * 병원성세균에 대한 항균능 (3차 선별) <i>B. polyfermenticus</i> 53종 중 1종, <i>B. licheniformis</i> 11종 중 1종 선별 | 100 |
| * 선별된 균주의 미생물학적 및 생화학적 특성 규명. | * <i>B. polyfermenticus</i> 및 <i>B. licheniformis</i> 의 미생물학적 특성 (내산성, 내담즙성, 내염성, 내열성, 항생제 내성) * 생화학적 특성 조사 : 면역능 test (NO assay, Cytokine (TNF-a, IL-12)측정) | 100 |
| * 산업용 생산배지의 조성 및 배양조건 최적화. | * 7L jar-fermentior 조건 확립 <i>B. polyfermenticus</i> BC-1 최적조건 확립, - 최대 균수 3.55×10^9 CFU/ml - 최대 포자수 4.27×10^9 CFU/ml <i>B. licheniformis</i> 최적조건 확립 - 최대 균수 3.28×10^9 CFU/ml - 최대 포자수 2.55×10^9 CFU/ml | 100 |
| <i>H. pluvialis</i> 의 최적성장 조건 확립 | - <i>H. pluvialis</i> 의 최적성장 조건 확립 → 온도 25°C, pH 7, 광도 $50 \sim 80 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. | 100 |
| <i>H. pluvialis</i> 의 astaxanthin 최적 생성 조건 확립 | - <i>H. pluvialis</i> 의 Astaxanthin 축적을 유도 → $500 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 에서 24.8mg/g의 Astaxanthin의 농도 확보 | 100 |
| <i>H. pluvialis</i> 의 대량 배양 시스템 개발 | - <i>H. pluvialis</i> 의 대량배양 시스템을 위해 7리터 광배양조에서 Batch (8.5×10^6 cells/ml)보다 Semi-continuous (1.7×10^7 cells/ml) 배양 조건 확립. | 100 |
| Astaxanthin의 대량 생산 시스템 개발 | * <i>H. pluvialis</i> 의 대량배양 통한 최대 세포농도를 유지하며 2차적인 Light stress와 질소원 결핍을 통한 2step 배양이 Astaxanthin의 최대생산 확립 : Astaxthine 농도 [mg/L(ppm)] = $7.0273 \times 0.509 \rightarrow 3.5$ [ppm] 건조 세포 당 astaxathin 함량 = $(3.5[\text{ppm}]/100[\text{ppm}])/100 \rightarrow 3.5\%$ | 100 |
| * 시제품 제작 및 현장시험 | * 시제품 5회 제작하여 현장 실험 실시 | 100 |

2. 사료업계의 기술발전예의 기여도

- 본 과제의 목적은 소비자에 안정한 먹걸;를 공급시터 주고, 또한 어류 사양가들에게 안정적이면서도 질 좋은 저가의 양어사료를 공급함으로써 공급자와 소비자간의 원활한 시장구조를 형성케 하는 것이다. 현재 국제 곡물가가 천정부지로 치솟고 있는 현실에서 대체할 수 있는 동물성 단백질원을 확보하는데 주력을 다하고 있는 사료업계에 저렴하면서도 사료효율이 높고 다양한 기능을 가진 사료의 개발은 현실적으로 여러 가지 현실 대안 법이라 사료된다.

- 본 과제의 수행으로 얻어진 산물로는 먼저 수산용으로 사용할 수 있는 생균제를 탐색하여 대량생산까지 그 시스템을 확보했던 것으로, 기존의 축산용 생균제나 토양성 유래 유용 균주를 근거없이 사용하여 왔던 업계에 확실한 자료와 근거를 만들어 생균제의 사용 기반을 마련했다고 할 수 있겠다.

- 또한 연구진들의 노력으로 유용 미생물의 종 분석을 다양하게 수행함으로써 미생물 탐색 기술의 다양화와 데이터베이스를 확립하는 데 일임하였다고 판단된다.

- 또한 위탁기관이 동서대학교에서 미세조류를 이용하여 최대 배양생산기술 확립과 아스타산틴의 최대 축적방법을 확립함으로써 아직은 미진하지만, 향후 기반 시설을 이용한 시스템개발에 초석을 다진 것이라 사료되며, 기존의 수입에 의존하였던 아스타산틴을 국내에서 생산하도록 기반을 마련한 것이라 사료된다.

- 또한 실제 양어 현장에서 총 5회에 걸쳐 현장실험을 완료하여, 기존의 사료 제품의 출시와는 달게 면밀히 분석하고 진행하였다는 점이 우수한 점이라 사료되며, 결과로 협회를 통한 대량 구매가 이루어지도록 진행되었으며, 또한 시장성적인 면에서도 아주 경쟁력이 있어 시장진입 및 판매전략을 세워 곧 시판할 예정이다.

- 현재는 본 과제의 결과로 모 사료업체와 해산어쪽인 넙치의 기능성 사료개발에 역점을 두어 현장실험을 타진중에 있으며, 또한 전북 배합사료에도 접촉되어 전남 지역의 전북 협회를 대상으로 실험을 결과를 얻고 있어 빠른 시일안에 여러 가지 결과물이 도출될 것으로 사료된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- 사료회사와 제휴하여 OEM 방식으로 진행할 예정이며, 자세한 업체 섭외 및 기술 방식은 좀 더 조사중에 있음.

2. 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

- 현장실험을 통해 얻어진 결과를 활용하여 홍보 및 사료업계의 기술 확산이 되도록 관련업계를 모색하고 접촉할 예정에 있음.

3. 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

- 특허 1건 출원 (*Bacillus polyfermenticus* n sp.를 함유한 사료 효율 향상 및 체색 강화 무지개송어 사료) 예정중이며 논문과 지식재산권은 추후 좀 더 보완하여 진행할 예정임.

4. 추가연구, 타연구에 활용 계획

가. 넙치의 소화성을 증대시키는 전문 육성 배합사료 개발

- 현재는 모 사료업체와 타진중에 있으며, 곧 현장실험을 착수할 예정임.

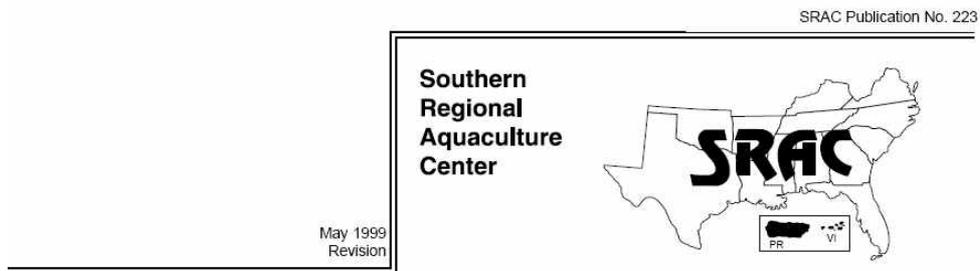
나. 전복의 기능성 배합사료의 개발

- 전복의 분말 사료 및 배합사료의 개발을 통해 소화성을 높이고 폐사율을 줄여 생산성을 높일 수 있는 사료 개발로 종묘단계에서 치패단계에 이르기까지 시장에서 경쟁적 우위를 점할 수 있는 기능성 전복 사료 개발이 진행중이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 송어의 효율적 생산을 위한 먹이 급이 방식 제시

→ 사료급이의 낭비를 줄이고 적당한 양의 공급을 송어자체의 먹이 요구량에 맞춰 공급하자는 방식인데, 다소 국내 상황에는 맞지 않으나, 실현 가능한 원리로는 좋은 정보임.



Trout Production Feeds and Feeding Methods

Jeffrey M. Hinshaw*

◆ Demand feeder를 이용한 방법 제시 (외해 양식)

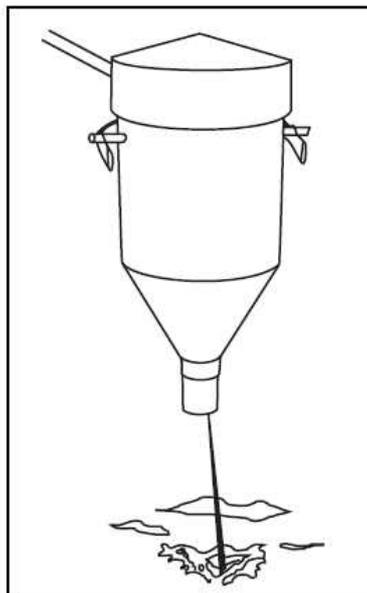


Figure 1. Demand feeder used in trout production.

2. 세균의 단백질을 위한 사료 효율과 성장 촉진 효과에 대한 논문

Feed consumption, growth and growth efficiency of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)) fed on diets containing a bacterial single-cell protein

BY W. M. K. PERERA¹, C. G. CARTER^{1,2} AND D. F. HOULIHAN¹

¹ Department of Zoology, University of Aberdeen, Tillydrone Avenue, Aberdeen AB9 2TN

² Department of Aquaculture, University of Tasmania, PO Box 1214, Launceston, Tasmania 7250, Australia

◆ 사료 조성비

| | Diets | | | | | | | |
|----------------------------|--------|----|---------|----|-----------|----|----------|----|
| | BSCP-0 | | BSCP-25 | | BSCP-62.5 | | BSCP-100 | |
| Ingredients | | | | | | | | |
| Fishmeal | 695 | | 521 | | 260 | | — | |
| BSCP | — | | 174 | | 435 | | 695 | |
| Fish oil | 110 | | 100 | | 85 | | 70 | |
| α -Cellulose | 104.5 | | 114.5 | | 129.5 | | 144.5 | |
| CMC | 50 | | 50 | | 50 | | 50 | |
| Vitamin mix* | 10 | | 10 | | 10 | | 10 | |
| Mineral mix† | 30 | | 30 | | 30 | | 30 | |
| BHA‡ | 0.5 | | 0.5 | | 0.5 | | 0.5 | |
| Composition | | | | | | | | |
| | Mean | SE | Mean | SE | Mean | SE | Mean | SE |
| Nitrogen | 79 | 2 | 77 | 1 | 79 | 2 | 78 | 1 |
| Carbon | 468 | 4 | 462 | 3 | 479 | 4 | 496 | 1 |
| Ash | 162 | 1 | 139 | 1 | 100 | 1 | 67 | 1 |
| AIA | 112 | 2 | 103 | 1 | 76 | 1 | 38 | 1 |
| Gross energy (kJ/g dry wt) | 208 | 1 | 213 | 1 | 221 | 1 | 216 | 1 |

BSCP, bacterial single-cell protein; CMC, carboxymethylcellulose; AIA, acid-insoluble ash.

* Composition of mix (g/kg): retinal 0.5, cholecalciferol 0.48, α -tocopherol 25.0, menadione 1.0, ascorbic acid 100.0, thiamin HCL 1.0, riboflavin 2.0, pyridoxine HCL 1.2, pantothenic acid 4.4, nicotinic acid 15.0, biotin 0.1, pteroylglutamic acid 0.5, cyanocobalamin 4.0, myoinositol 40.0, cellulose 804.82, choline chloride 10 ml (400 g/l).

† Composition of mix (g/kg): CaCO₃ 17.75, CaH₄(PO₄)₂·H₂O 416.6, K₂HPO₄ 206.0, NaH₂PO₄·2H₂O 130.0, NaCl 66.4, KCl 50.0, MgCO₃ 91.0, FeSO₄·7H₂O 30.0, ZnSO₄·7H₂O 4.0, CuSO₄·5H₂O 1.0, MnSO₄·4H₂O 3.6, KI 0.2, CoSO₄·7H₂O 1.0.

‡ 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole.

◆ BSCP의 성장률에 관한 표

| Variables | Diet | | | | | | | |
|----------------------|----------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|-------|----------------------|-------|
| | BSCP-0 | | BSCP-25 | | BSCP-62.5 | | BSCP-100 | |
| | Mean | SE | Mean | SE | Mean | SE | Mean | SE |
| Number of fish | | | | | | | | |
| Initial | 50 | | 50 | | 50 | | 50 | |
| Final | 37 | | 43 | | 43 | | 40 | |
| Wet weight | | | | | | | | |
| Initial | 8.85 ^a | 0.31 | 8.23 ^a | 0.22 | 8.12 ^a | 0.23 | 9.02 ^a | 0.27 |
| (CV) | (21.1) | | (17.6) | | (18.7) | | (18.6) | |
| Final | 50.21 ^a | 1.39 | 44.14 ^b | 1.14 | 33.43 ^c | 1.10 | 17.23 ^d | 0.89 |
| (CV) | (16.8) | | (16.9) | | (21.6) | | (32.6) | |
| Feed consumption | 13.24 ^c | 0.45 | 14.90 ^{eb} | 0.61 | 17.38 ^a | 0.59 | 16.75 ^{ab} | 0.69 |
| (CV) | (40.1 ^b) | (2.4) | (42.3 ^b) | (2.9) | (42.8 ^b) | (3.5) | (55.1 ^a) | (3.0) |
| Specific growth rate | | | | | | | | |
| Wet weight | 1.32 ^a | 0.02 | 1.27 ^a | 0.02 | 1.06 ^b | 0.02 | 0.51 ^c | 0.03 |
| Nitrogen | 1.41 ^a | 0.04 | 1.26 ^a | 0.05 | 1.06 ^b | 0.05 | 0.48 ^c | 0.05 |
| Carcass nitrogen | 89.37 ^a | 1.53 | 86.97 ^a | 0.86 | 86.26 ^a | 1.36 | 90.22 ^a | 1.88 |

CV, coefficient of variation; BSCP, bacterial single-cell protein.

^{a, b, c, d} Mean values within a row with unlike superscript letters were significantly different ($P < 0.05$).

* For details of diets and procedures, see Table 1 and pp. 592-594.

3. 최소경비로 최대 효과를 얻을 수 있는 무지개송어 사료 배합

The effect of feed ration on growth performance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*

Kok Onn Kwong and Siau Hoi Lim

KQA319 Nutrition of Aquatic Organisms
School of Aquaculture

◆ 최적 배합비

| | | Initial | Final | |
|---------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | | Stock tank | Tank 1 | Tank 2 |
| Initial weight (g) | Mean ± SD | 117.64 ± 16.97 | 173.05 ± 26.45 | 195.39 ± 28.92 |
| | CV | 14.42 | 15.29 | 14.80 |
| Final weight (g) | Mean ± SD | | 173.05 ± 26.45 | 195.39 ± 28.92 |
| | CV | | 15.29 | 14.80 |
| Initial length (cm) | Mean ± SD | | 21.12 ± 1.25 | 20.80 ± 1.17 |
| | CV | | 5.91 | 5.64 |
| Final length (cm) | Mean ± SD | | 23.16 ± 1.28 | 23.25 ± 1.07 |
| | CV | | 5.52 | 4.60 |
| Initial K (%) | Mean ± SD | | 1.28 ± 0.11 | 1.27 ± 0.11 |
| | CV | | 8.73 | 8.53 |
| Final K (%) | Mean ± SD | | 1.40 ± 0.19 | 1.55 ± 0.11 |
| | CV | | 13.48 | 7.26 |
| Carcass OSI (%) | Mean ± SD | 85.55 ± 9.02 | 84.47 ± 1.12 | 82.81 ± 1.60 |
| | CV | 10.54 | 1.33 | 1.96 |
| Liver OSI (%) | Mean ± SD | 0.87 ± 0.19 | 1.94 ± 0.29 | 2.23 ± 0.20 |
| | CV | 22.3 | 15.18 | 21.73 |
| Pylorus OSI (%) | Mean ± SD | 3.29 ± 0.93 | 4.49 ± 1.21 | 4.65 ± 1.26 |
| | CV | 28.33 | 26.97 | 36.37 |
| Stomach OSI (%) | Mean ± SD | N/A | 2.75 ± 0.89 | 3.50 ± 0.63 |
| | CV | | 32.19 | 36.17 |

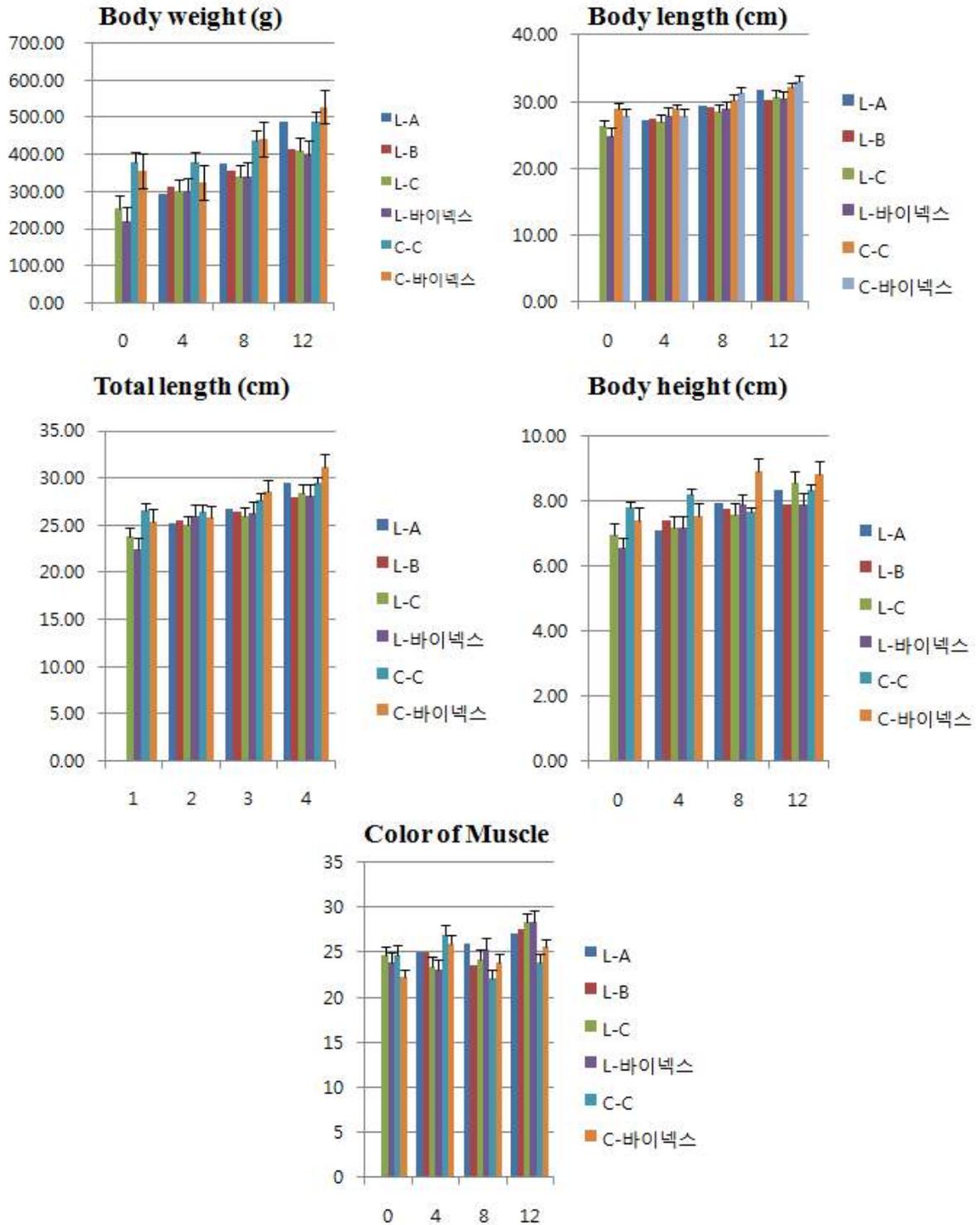
제 7 장 참고문헌

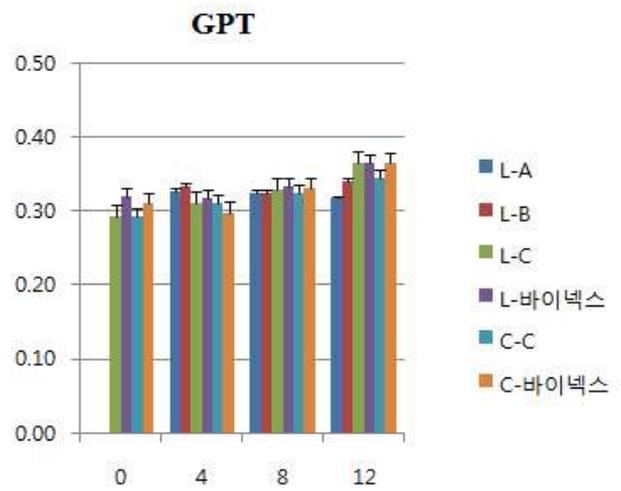
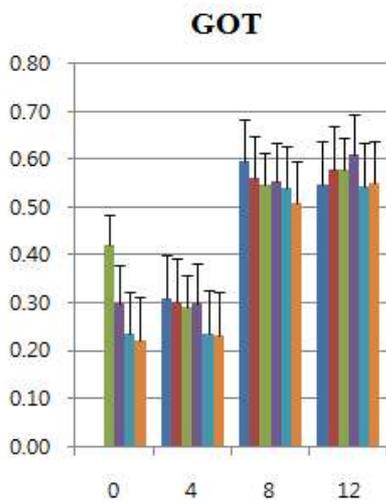
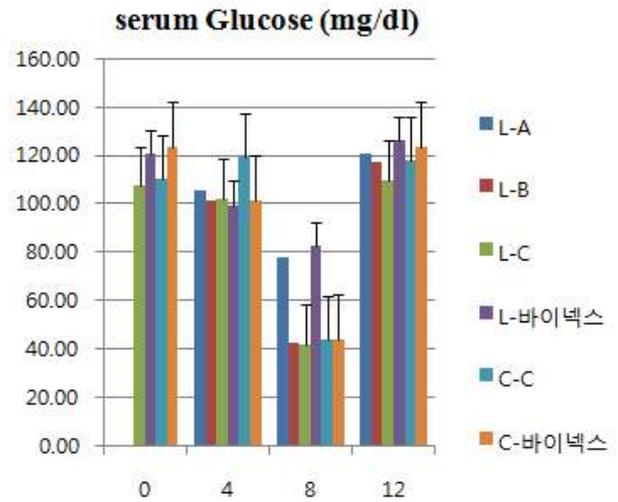
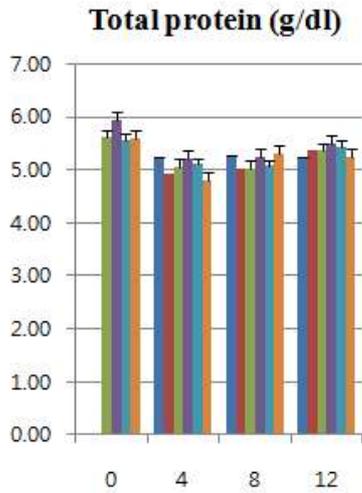
1. 서재훈 and 이 호 (2007). 젓산균주의 특성 및 면역활성. *J. Food. Sci. Technol.*, 39 (6), 681-687
2. Havenaar R., Huis in't Veld JHJ. (1992) Probiotics : A general view. Vol 1, pp 151-170. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Wood BJB. Elsevier, New York, NY, USA.
3. Sanders ME (1999) Probiotics. *Food Technol.-Chicago* 53 : 67-77.
4. Gill HS (2005). Probiotics to enhance anti-infective defenses in the gastrointestinal tract. *Best. Prac. Res. Cl. E.*, 17 :755-773.
5. Jayaprakasha HM, Yoon YC, Paik HF (2005). Probiotic functional dairy foods and health claims : An overvie. *Food. Sci. Biotechnol.*, 13: 523-528.
6. Perera BY WMK, Carter CG and Houlihan DF (2005). Feed consumption, growth and growth dfficiency of rainbow trout (*Oncorhynchus mukiss* (Walbaum)) fed on diets containing a bacterial single-cell protein. *Britich Journal of nutrition*, 73, 591-603.
7. Tacon AGJ and Jackson AJ (1985). Utilization of conventional and unconventional protein sources in practical fish feeds in *Nutrition and Feeding in Fish*, pp 119-145 [CB Cowey, Mackie AM and Bell JG, editors]. London: Academic Press.
8. Bjerheng. B., Folling. M., Lagocki. S., Storebakken. T., Olli. J. J. Alsted. (1997), Bioavailability of all-E-astaxanthin and Z-astaxanthin isomers in rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*), *Aquaculture*, 157, 63-82.
9. Grung, M. (1992), 3S,3'S Astaxanthin sources from *H. pluvialis*, *J. Applied. phycol.* 4: 165 - 171.
10. Jian-Ping Yuan, Feng Chen. (2000), Purification of trans-astaxanthin form a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*, *Food Chemistry*. 68,443-448.
11. Johnson e. A. and An. G. H. (1991), Astaxanthin from microbial sources. *Critical Reviews in Biotechnology*, 11, 297-326.
12. Maher. T. J. (2000), Astaxnathin: A Versatile Carotenoid Antioxidant. *International Journal of Intergrative Medicine*-Vol 2. No. 4, July/August. Maher. T.

- J. (2000). Astaxanthin-Continuing Education Module. Natural Healing Track, New Hope Institute of Retailing August.
13. Renstrom. B., Borch. G., Skulberg. O. M. and Liaaen-Jessen. S. (1981), Optical purity of (3S,3'S) - Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*, *Phytochemistry*, 20, 2561 - 2564.
 14. Schiedt. K., Leuenberger. F. J., Vecchi. M., (1981), Analysis of astaxanthin in found in wild salmon and synthetic astaxanthin. *Helv. Chim. Acta*, 64, 449-457.
 15. <http://www.food.gov.uk>
 16. <http://www.fda.org>

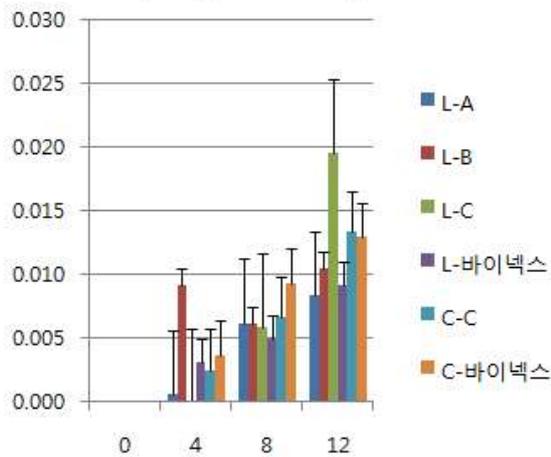
별첨. 1. 현장 실험 사양 및 혈청학적 분석 결과(1차 ~ 5차)

1. 2차실험



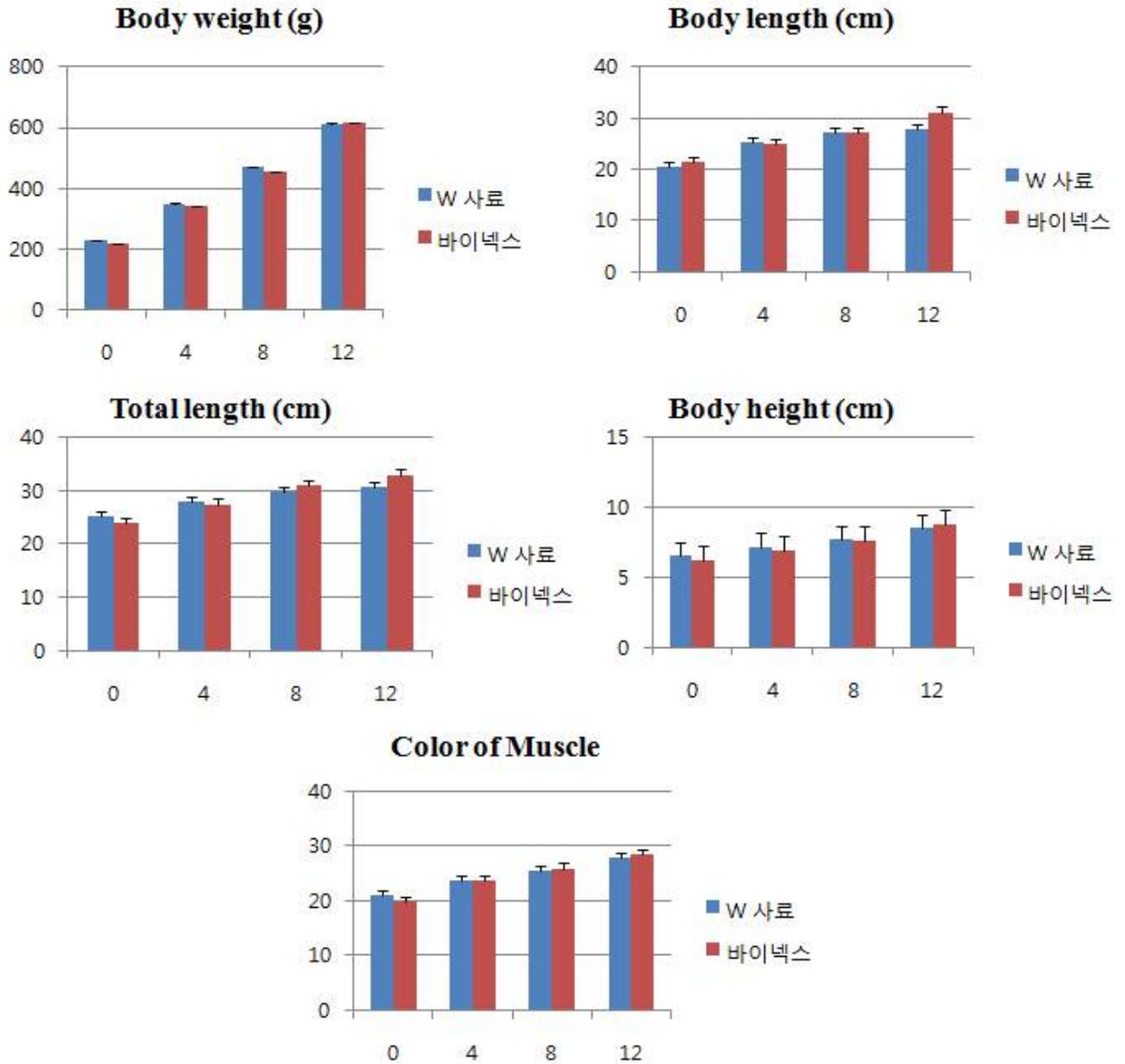


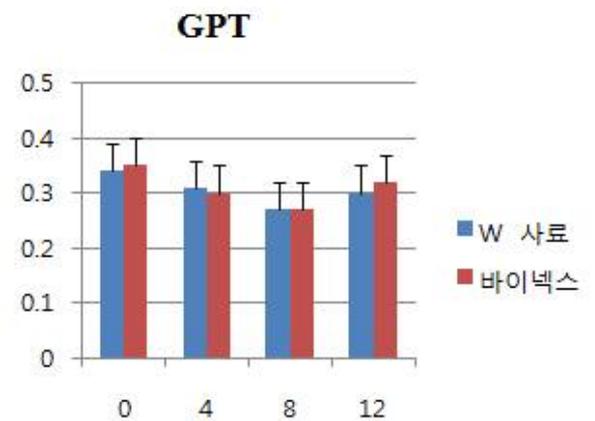
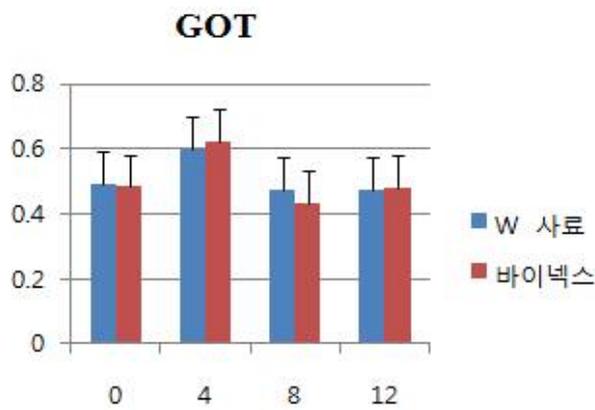
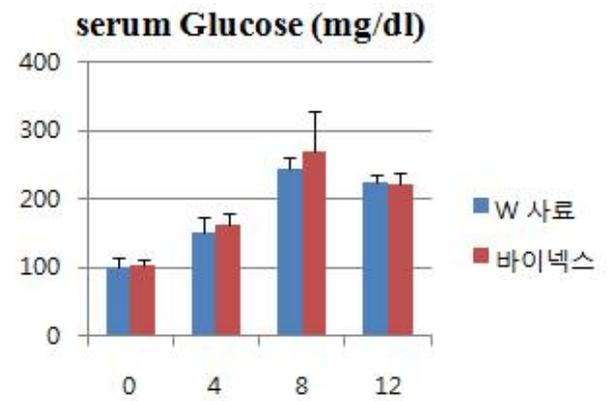
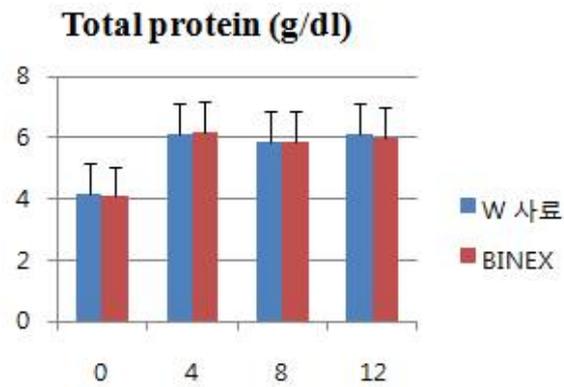
Lysozyme activity



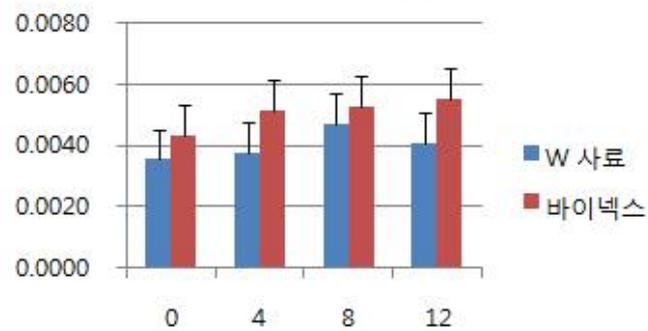
*. L은 L 양어장, A, B, C는 사료회사 업체명임.

2. 3차 실험

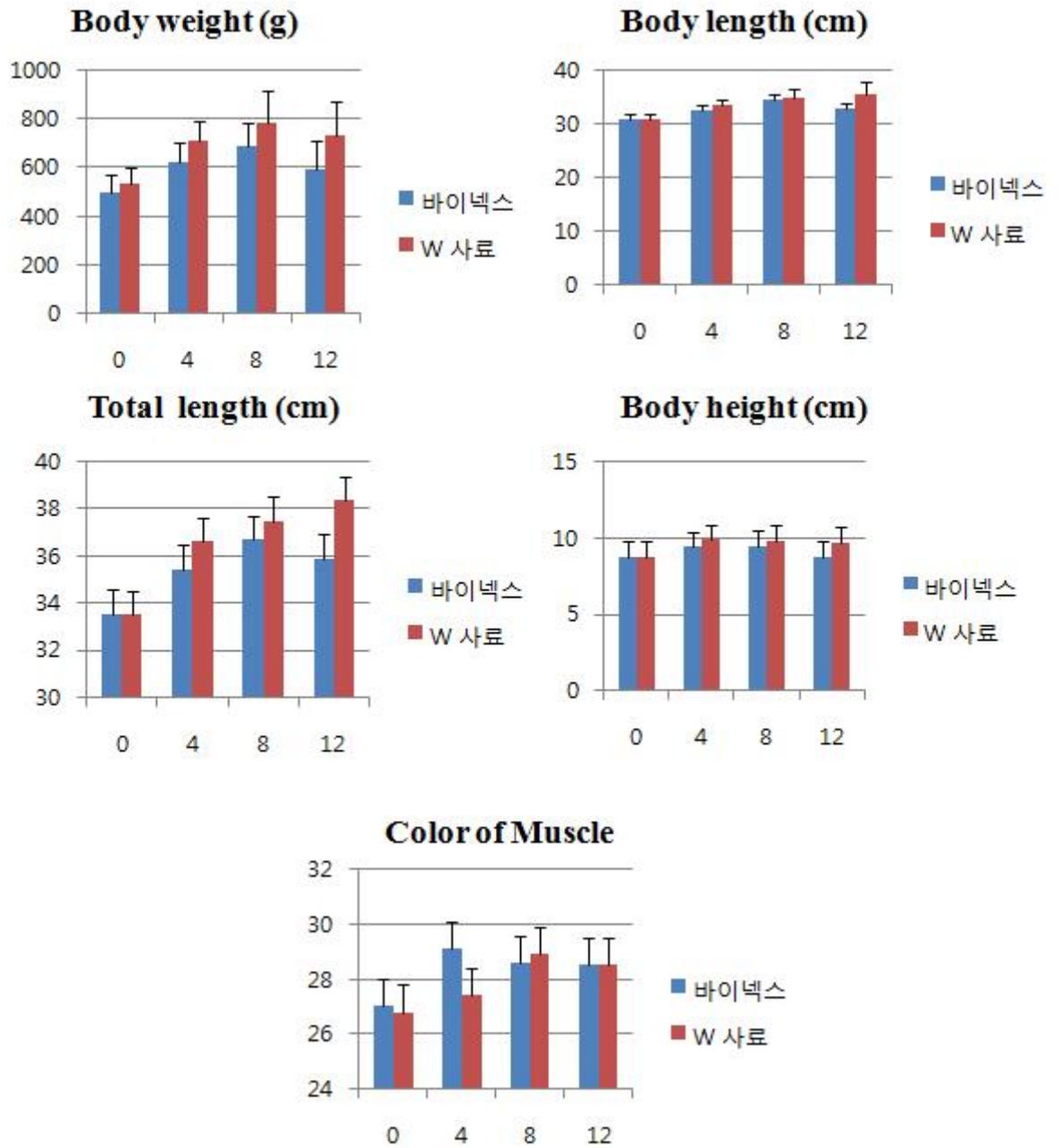




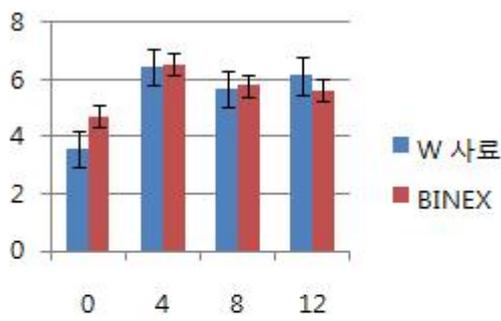
Lysozyme activity



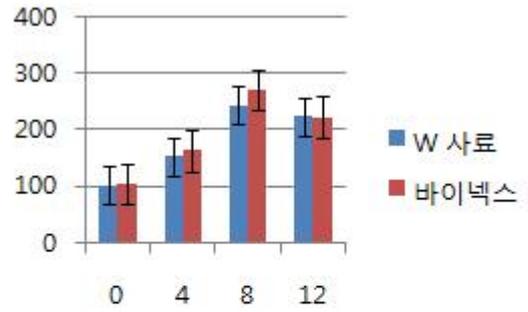
3. 4차 실험



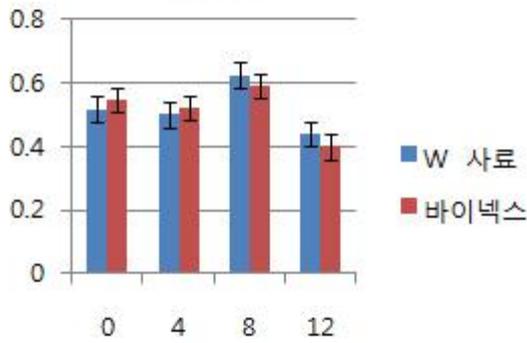
Total protein (g/dl)



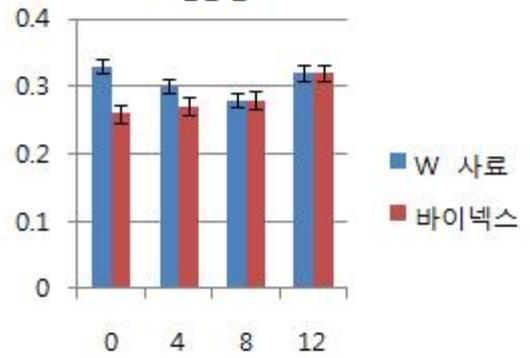
serum Glucose (mg/dl)



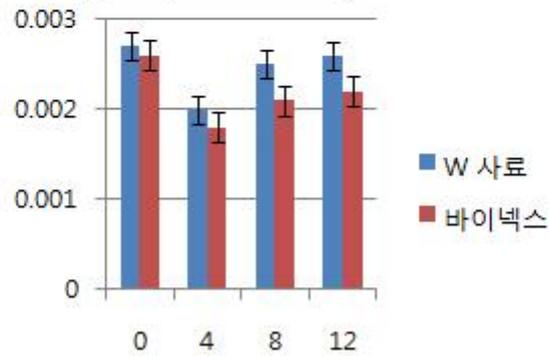
GOT



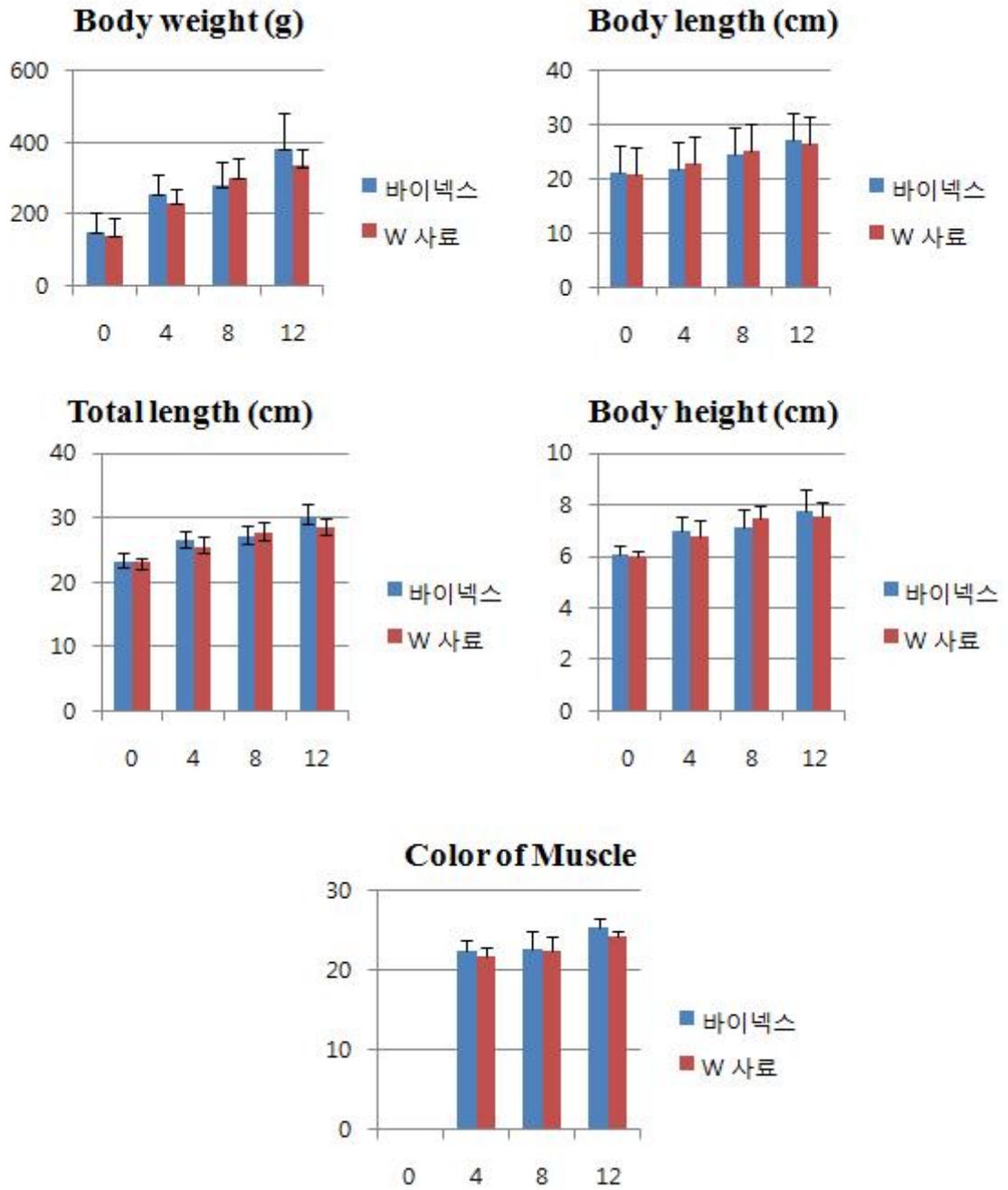
GPT



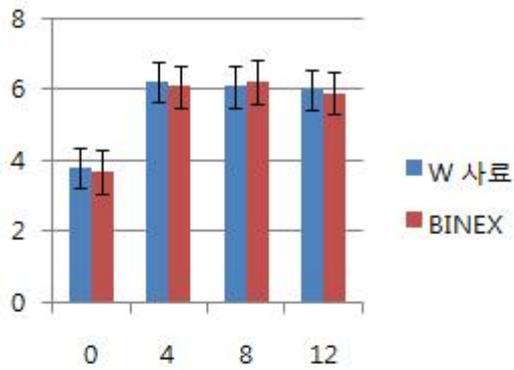
Lysozyme activity



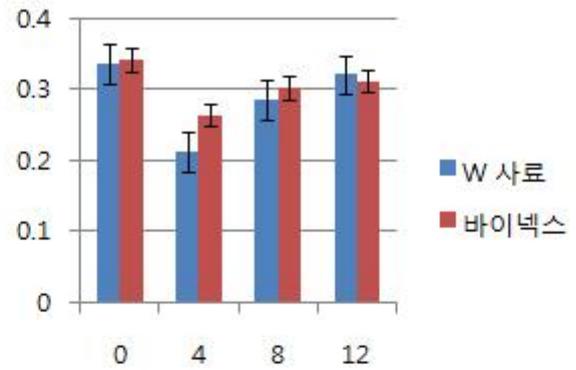
4. 5차 실험



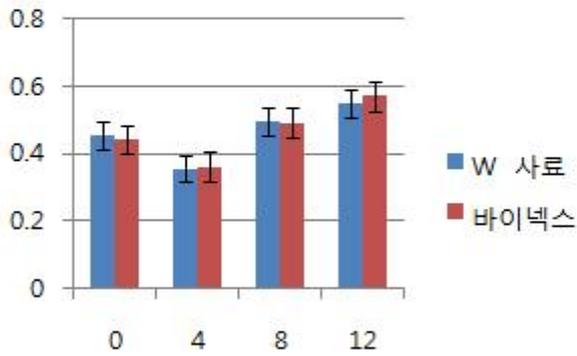
Total protein (g/dl)



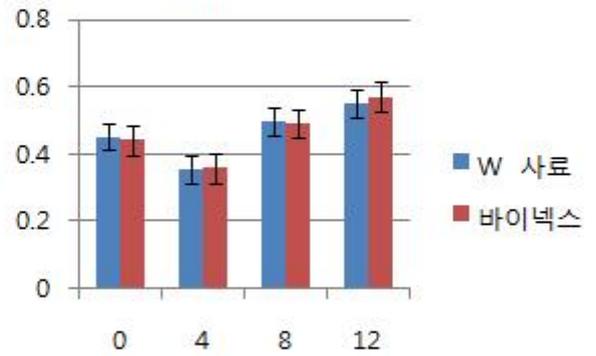
serum Glucose (mg/dl)



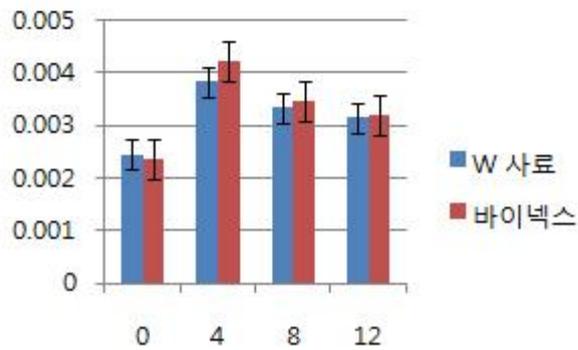
GOT



GPT



Lysozyme activity



주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림수산식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.