

사료의 안전성 확보를 위한 항생제대체제 활용방안

최윤재 교수

서울대학교 농생명공학부

연사약력

- 1973 ~ 1980 서울대학교 농과대학 축산학과 축산학 학사
- 1981 ~ 1983 서울대학교 대학원 축산학과 축산학 석사
- 1984 ~ 1987 미국 North Dakota 주립대학 축산생물공학 박사
- 1987 ~ 현재 서울대학교 농생대 동물자원과학과 교수
- 1993 ~ 1994 미국 Cornell 대학교 Visiting professor
- 1995 ~ 1998 농림기술관리센터전문위원
- 1997 ~ 1998 한국축산학회 학술위원장
- 1997 ~ 현재 농촌진흥청 축산기술연구소 겸임연구소장
- 1998 ~ 현재 한국과학기술한림원 정회원
- 2000 ~ 현재 한국동물자원과학회 상무이사
- 2001 ~ 현재 과학기술기본계획추진위원회 위원 및 산업개발진흥 위원장

사료의 안전성 확보를 위한 항생제대체제 활용방안

최 윤 재 / 서울대학교 농생명공학부 교수

I. 서 론

지난 40여년동안 사료 업계는 금세기 최고의 과학적 발견이라고 할 수 있는 항생제(antibiotics)의 사용으로 많은 생산성 향상을 기여 할 수 있었다. 항생제를 사용함으로써 이들의 1차적 사용목적인 병원균의 성장을 억제시켜 성장을 촉진시킬 수 있었으며 또한 고기, 우유, 계란 등 축산물의 생산성 향상을 기여 할 수 있었다. 그러나 최근 항생제의 사용에 대한 많은 문제점이 제기되고 있으며 특히 일부 국가에서는 항생제가 급여된 가축의 고기 수입을 규제하고 있어 항생제의 사용이 제한되고 있다. 항생제의 사용을 규제하는 이유는 첫째, 가축에게 사용한 항생물질이 우유, 고기, 계란 등의 축산물에 잔유할 수 있다는 것과 둘째, 축산물을 통하여 섭취된 항생물질이 인체내 내성증가를 야기시켜 항생물질에 대하여 저항성을 갖는 등 여러 가지 문제점을 야기시키고 있기 때문이다. 이런 이유로 해서 영양학자들은 축산물 생산에 이용할 수 있는 비항생제적 생물학적 방법(non-antibiotic biological tools)을 찾게 되었고 그 결과 몇몇 가능성이 있는 물질들을 개발하게 되었다. 여기에는 효소제(enzymes), 생균제(probiotics), antimicrobial peptides, immune regulators, essential oil 등이 있으며 이들 물질은 앞으로 가축의 영양학적 측면에서 큰 잠재력을 제공할 수 있을 것이다.

여기에서는 사료속에 첨가되어 항생제대체제로서 가능성이 있는 물질들에 대하여 기술하고 본 연구실에서 그동안 수행해온 관련 연구 내용을 기술하고자 한다.

II. 본 론

1. 항생제대체제의 종류

1) 효소제(Enzymes)

지금까지 사료 산업에서 항생제대체제로 단일 또는 복합효소제 가소화 보조제로 사료에 첨가되어 왔다. 일반적으로 효소제는 동물의 생산 능력을 개선시킬 수 있다. 특히 양돈 산업을 경영함에 있어서 효소제의 사용은 계속 증가되어 왔는데 이것은 다음과 같은 장점이 있기 때문이다.

- ① 효소는 천연화합물이며 독성이 없다.
- ② 효소는 특이성을 갖는다.
- ③ 효소는 작용온도와 pH의 범위가 넓고, 고온, 고압, 높은 산도에서도 특별한 장치 없이 작용할 수 있다.
- ④ 저농도에서도 활력이 높으며 온도, pH, 농도 등을 조절하여 활력을 조작하기가 용이하다.
- ⑤ 기질이 일정한 농도에 이르면 효소는 쉽게 불활성화시킬 수 있다.

사료 산업에서 사용이 되고있는 효소제는 cellulase, xylanase, phytase 등을 비롯 amylose, protease, lipase 등 여러 가지가 있으며, 그 중에서도 특히 소 같은 반추동물의 경우에는 반추위에 cellulase나 xylanase 등의 효소를 분비하는 미생물이 존재하기 때문에 문제가 되지 않지만, 돼지나 닭 같은 단위동물은 이러한 식물세포벽을 분해할 수 있는 효소를 가지고 있지 않아서 세포벽내에 들어있는 곡물의 전분이나 단백질 이용효율이 매우 떨어지게 된다. 특히 밀과 호밀의 세포벽에 다량 함유되어 있는 수용성 xylan은 소화관 내에서 수분을 빨아들여 끈적끈적한 상태가 만들어지면서 소화 효소가 영양소로 접근하는 것을 방해하고, 소화관내 소화물의 흐름을 늦게하여 사료섭취가 줄어들게 되고 미생물이 소화물에 부착하여 이상발효를 일으키게 된다. 또한 가축이 자주 물을 마

시게 되어 분변중 수분 함량이 높아져 결국 연변과 하리의 원인이 되기도 한다. 이러한 이유로 사료적 가치가 매우 높음에도 불구하고 다량 사용이 어려웠던 밀 원료에 xylanase를 첨가함으로써 소화관내 점도를 낮추어주고 곡물중의 영양소 이용성을 증진시켜 사료의 효율을 증진시킬 수 있게된다.

또한 효소제의 개발에 있어서 가장 중요하게 관심이 집중되고 있는 것은 사료내 인과 질소의 함량을 줄이는 것이다. 특히 인은 핵산, 조효소, 인단백질과 인지질 등의 생화합물을 형성하는 데 있어서 동물에게 없어서는 안되는 영양소이지만 단위가축의 경우 식물 사료내 존재하는 인의 20~30% 만을 이용하고 나머지는 모두 배설하기 때문에 환경오염의 주원인으로 작용하고 있으며, 낮은 인 이용을 때문에 사료내 값비싼 무기태인을 첨가해야 하는 문제점이 부각되었다. 사료내 존재하는 인의 이용이 낮은 이유는 식물체내에 존재하는 인의 대부분은 phytic acid와 결합된 phytin태인(유기태인)의 형태로 존재하며 단위 가축에는 이러한 유기태 인을 분해하는 효소인 phytase를 분비 할 수 없기 때문이다. 따라서 이렇게 배설된 유기태 인은 환경오염원으로 작용하여 토질과 수질을 오염시키게 되고 또한 이용되지 못한 유기태 인은 가축의 체내에서 칼슘, 마그네슘, 철 등의 광물질과 결합하여 protein metal ion complex의 형태로 존재하고 있기 때문에 이러한 광물질까지도 가축이 이용할 수 없게 하는 항영양인자로도 작용한다. 그러나 가축 사료내 phytase의 첨가는 동물에 의해 배설되는 유기태 인의 함량을 감소시켜 환경오염을 억제시킬 뿐만 아니라 광물질의 이용성을 증가시켜 위에서 제시했던 문제들을 해결할 수 있을 것이다.

2) 생균제(Probiotics)

생균제라 함은 미생물 자체를 가지고 만든 제제로서 동물의 장내에 정주하여 다른 병원성 미생물의 성장을 억제하고, 섭취한 사료의 소화와 흡수를 도와주며 다른 영양소의 합성에 도움을 줌으로서 동물의 성장을 촉진하고 사료효율을 개선시켜 주는 일종의 기능성 물질이다. 사료 중에 첨가했을 때 안정성이 있어야 하며 동물에 대해 해가 없고 독성이 없어야 한다. 생균제는 오래전부터 장내의 이상 발효, 설사, 소화불량, 변비 등에

효과가 인정되어 인체용으로 사용되어 왔는데 요즘에 와서는 동물의 발육촉진, 설사치료 등의 생산성 향상을 목적으로 그 사용량이 증가해가고 있는 실정이다.

생균제를 사용하는 목적은 장내 세균총을 숙주 동물에 유리하도록 유지시키는 것이다. 동물에게 있어서 항상 일정한 비율의 이로운 미생물을 가지고 있는 것은 매우 이상적인 것이지만 정상적인 사양환경에서 이를 기대하는 것은 상당히 어렵다. 따라서 생균제를 투여하여 장내 세균총의 균형유지에 도움을 준다. 생균제를 사료에 첨가하면 *E. coli*의 수를 줄여 독성물질의 생산을 억제하며, 이로운 박테리아의 수가 증가하며, 젖산생성을 촉진시켜 장내 pH의 변화를 유도하며, 항생물질 생산이 촉진될 수 있다.

생균제의 종류로는 효모, 유산균, 국균 등이 일반적으로 널리 알려져 있는데 이중 가장 대표적인 것으로 *lactobacilli*를 들 수 있으며, 이 유산균은 *salmonella*와 *E. coli*에 의한 설사를 방지하고 동물의 생산성을 향상시킬 수 있는 것으로 실험동물과 동물의 경우 그 사용효과가 뚜렷하다고 보고되었다. 생균제의 사용은 아직도 초보적인 단계에 머물고 있어서 앞으로 유전공학 등이 발달함에 따라 더욱 효과적인 종류의 생균제가 개발될 가능성이 남아 있다.

① 생균제(Probiotics)의 종류

ㄱ) 효모

효모는 단세포 동물로서 유성생식을 하는 유포자 효모와 무포자 효모로 크게 나눈다. 효모는 자연계에 널리 분포되어 있고 약한 산성에서 잘 번식하며, 발육 최적온도는 25~30℃이고, 40℃ 이상이면 죽게 된다. 동물 사료로서 가장 많이 이용되는 효모는 *Sacchromyces* 속의 건조 맥주효모이며, 최근에는 펄프제조시 생산되는 *Torulopsis*속의 *torula*효모도 사용되고 있다.

효모의 일반적인 영양소 함량은 사용하는 기질, 균주의 종류, 성장 조건 등에 따라 약간의 차이가 있다. 효모의 주성분은 단백질이고, 효모단백질은 품질도 좋아서 소화 이용율과 생물가가 높으며, 아미노산 조성은 상당히 우수하지만 *methionine*과 *cystine*의 함량이 낮다. 에너지 함량은 비교적 높아서 대두박과 비슷하고 비타민 B군의 함량이 높으

며 UGF가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 효모의 영양적 특성을 요약하여 보면 다음과 같다.

- (1) 효모는 우수한 단백질 사료(45%)이다.
- (2) 아미노산 조성이 우수하다.
- (3) 비타민 B군의 좋은 공급제이다.
- (4) UGF의 공급제로 사용된다.
- (5) 사료의 기호성을 증진시키며 소화이용율도 높다.

ㄴ) 국균

국균이라 함은 곰팡이의 일종으로서 *Aspergillus*속으로 누룩곰팡이라고 부르고 있다. 이와 같은 국균 중에서 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus digospours*, *Aspergillus niger* 등이 생균제로 사용되는 것으로 비소화성 물질이 많은 원료사료에 접종, 발효시켜 그 균체와 원료를 함께 사료로 이용된다. 이때 비소화성 물질이 소화성 물질로 변하고, 국균이 합성한 단백질, 비타민, 향생물질이 포함되므로 사료가치가 크게 향상된다.

ㄷ) 유산균

유산균은 동물의 장관내에 서식하는 미생물로서 장내에서 정상 세균총을 유지하고 병원 미생물을 억제하며 특히 어린 동물의 장염과 하리를 예방하여 줌으로써 동물의 증체율과 사료효율을 개선시켜주는 효과가 있음이 여러 학자들에 의하여 입증되었다. 지금까지 흔히 사용되어온 유산균은 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*와 최근 새로 개발된 *Streptococcus faecium* 등이다. 최근 스웨덴에서는 사람과 동물의 소화관에 존재하는 유산생성균인 *Streptococcus faecium*을 배양 농축화한 생균제인 lactic acid bacteria concentrate (LBC)를 만들어 제품화 하였으며 우리나라에서도 이를 수입하여 이용하고 있다.

ㄹ) *Bacillus toyoi*

최근에 일본에서는 토양으로부터 분리한 *Bacillus toyoi*라는 미생물을 배양 농축화한

toyocerin이라는 생균제제가 개발되었으며 우리나라에서도 유통되고 있다. 이 밖에도 몇 가지 생균제제가 단제 또는 복합제로 쓰이고 있다.

〈표 1〉 경제동물에서 많이 사용되는 미생물의 종류

<i>Lactobacillus delbrueckii ss. bulgaricus</i>	
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei ss. casei</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>Streptococcus salivarius ss thermophilus</i>
<i>S. lactis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. brevis</i>
<i>B. toyoi</i>	<i>B. natto</i>
<i>B. mesentericus</i>	<i>B. licheniformis</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Candida pintolopesii</i>	

② 생균제의 작용기작

이러한 생균제의 작용기작 역시 항생제와 마찬가지로 완전히 규명되어져 있지 못하다. 그러나 지금까지의 연구 결과를 종합하여 볼 때 첨가효과의 가장 큰 이유는 병원성 미생물 특히 E. coli 등과 같은 미생물의 장내 번식과 성장을 억제시킴으로써 설사 등을 일으키지 않도록 하는 것이고, 이러한 생균제가 경구적으로 투여될 경우 소화기관내에서 세균총을 지배함으로써 다른 세균의 발육을 억제하기 때문이다. 그 외에도 장내 미

생물이 정상적인 성장과 번식을 하게 함으로써 섭취한 사료의 소화와 흡수를 도와주고 장과 혈액에서의 암모니아 수준을 적게 함으로써 암모니아에 의한 세포파괴와 이에따라 수반되는 상피세포의 교체나 질병 감염을 줄여주고, 반추 동물에 있어서는 정상 pH를 유지시켜 반추위 내에서의 휘발성 지방산 생성 및 흡수를 정상적으로 유지시켜 주는 등의 여러 가지 복합효소에 의하여 성장촉진효과가 일어난다고 볼 수 있다.

③ 생균제가 장내 미생물에 미치는 영향

동물의 장내 정상 미생물이 장의 건강생리에 도움이 된다는 사실이 쥐에게 다량의 streptomycin을 급여했을 때 *Salmonella typhimurium*에 감염율이 증가하였다는 연구에서 제시되고 있다. 오늘날까지 병원성 미생물을 억제하는 미생물을 분리하여 구명하려는 노력이 무균의 실험용 설치동물을 이용하여 연구되어 왔으며 최근에는 닭 등 경제동물을 이용하고 있다. 부화된 병아리에게 성계의 분을 급여했을 때 병아리의 직장에 *S. infantis*의 정착이 억제되었다고 했으며 이러한 효과는 성계의 분을 혐기발효시키면 유지되었지만 호기발효시키면 소실되었다고 했다. 이러한 효과를 가지는 특징의 미생물이 분리 연구되지는 않았지만 Impey 등(1982)은 Lactobacilli, Sterptococci, E. coli 및 여러 종의 혐기성 미생물 등 48종의 미생물이 효과가 있었다고 보고하였다. 일반적인 정상 생리상태에서는 이들 정상 미생물이 유해미생물에 대해 동물의 장 건강 및 정상생리를 보호해주고 영양소의 소화 공급에 기여하지만 정상미생물이 죽거나 이상이 생기면 미생물 첨가제가 정상미생물의 기능을 대신 수행할 수 있다. 예를들면, 사람이나 동물에게 다량의 항생물질을 공급하여 설사를 할 때와 같다. 닭에게 penicillin을 사료로 다량 공급하면 위에 Lactobacilli 수가 감소하고 E. coli 수가 감소한다고 한다. 한편 과도한 위생 및 소독 때문에 장내 정상 미생물이 형성되지 못할 때가 있으며 갓난 아이의 지나친 위생관리가 아이의 장내에 정상미생물의 정착을 방해해서 유해미생물에 대한 저항력이 생기지 못하는 경우가 있을 수 있다. 어미닭과 접촉하지 못하고 부화기에서 인공부화되는 병아리나, 돼지와 송아지의 조기이유와 인공유에 의한 사육 등은 역시 어미와의 접촉이 없어서 새끼들이 신속히 장내의 정상미생물을 확보하지 못하므로써 유해 미생물에 대한

저항성을 얻지 못하는 경우가 있다.

3) Antimicrobial peptides

미생물, 식물, 곤충, 양서류, 포유류에는 외부로부터의 미생물 침입에 대하여 비특이적인 면역체계로서 항균펩타이드가 방어체제로 존재하는 것으로 밝혀져 왔으며, 현재 전 세계 연구자들에 의하여 Magainin, Cecropin, Defensin, Buforin, Protegrin, Tachyplesin을 비롯한 300종 이상의 항균펩타이드가 발견되어 있다. 항균펩타이드는 아미노산 서열 내에 양전하를 갖는 아미노산을 많이 포함하며 Gram 양성균, Gram 음성균과 Fungi, Tumor cell에 이르기까지 폭넓은 항균활성을 나타내는 펩타이드이다. 진핵 다세포 생물에서 발견되는 항균펩타이드들은 α -helix, β -sheet 또는 Random coil 구조를 가지며, 이들 중에서 특히 α -helix 구조를 형성하는 항균펩타이드는 그 자체로는 특별한 구조를 갖지 않지만 미생물 세포막의 Lipopolysaccharide와 만나면 α -helix 구조가 유도된다. 이들 펩타이드가 세포막에 결합하면 세포막에 Ion channel을 형성하여 미생물의 에너지 생성을 저해하거나, 세포막에 큰 구멍을 만들게 되어 결과적으로 세포가 죽게 된다. 이와 같이 짧은 시간 내에 비특이적이면서 효과적인 물리적 방법으로 세포막을 파괴하는 작용기작을 가지고 있어서, 미생물의 세포벽이나 세포내 고분자 합성을 저해하는 기존의 항생제들과는 달리 미생물들이 항균펩타이드에 대한 내성을 갖게 되기는 매우 어려우며, 현재까지도 항균펩타이드에 의해서는 내성이 생기지 않는 것으로 보고되어 왔다. 따라서, 심각한 문제로 대두되고 있는 기존 항생제에 대한 내성 문제를 해결할 대안으로서의 차세대 항생제로서 항균펩타이드가 부각되고 있다. 또한 단백질에 비하여 크기가 작아서 화학합성이나 combinatorial chemistry 등의 방법에 의하여 아미노산 서열에 여러 가지 변이를 쉽게 줄 수 있기 때문에 원래의 펩타이드보다 우수한 다양한 활성을 가진 펩타이드의 탐색이 가능하므로, 항생제, 기존 항생제의 활성을 촉진시킬 수 있다는 점에서 새 세대 항생제로 주목받고 있다.

① 항균 펩타이드의 종류와 특성

항균펩타이드는 보조제, 항암제, 항바이러스제, 식품첨가제, 농약 등에 이르기까지 다양하게 개발될 수 있는 가능성을 지니고 있으며, Magainin Pharmaceutical Inc., Micrologix Biotech Inc., Intrabiotics, Xoma를 포함하는 많은 회사에서 항균펩타이드를 개발하고 있다.

〈표 2〉 항균펩타이드의 종류 구조 및 개발회사

항균펩타이드	구조	개발회사
Cecropin Magainin (MSI-78) Buforin Gaegurin	a-helical	Magainin Pharmaceuticals 삼양제넥스
Defensin Insect defensin Thionin Protegrin (IB-367) Polyphemusin	b-stranded	Intrabiotics, SYNT:EM
Indolicidin Bac 5	Extended coil	
Bactenecin Polymixin	Loops	
Nisin Subtilin Mutacin	Lantibiotics	Applied Microbiology, Astra, Merck
MBI 226 BPI (Mycoprex) Lactoferricin		Micrologix Biotech Xoma Morinaga

② 동물 산업에서의 항균 펩타이드의 이용

ㄱ) 박테리오신

박테리오신(bacteriocin)은 미생물이 생산하는 천연의 항균성단백질(antimicrobial polypeptide)로서 기존의 항생제가 2차 대사산물인데, 반하여 자신의 유전자로부터 직접 생합성(ribosomal translation)되는 것이 특징이며, 따라서 직접적인 유전자 조작 등에 의한 생물공학적 응용이 용이하고 그 결과 산업현장에 보다 다양하게 반응할 수 있을 뿐만 아니라 분자가 단백질로 이루어져 있는 덕분에 인체에 섭취되는 즉시 소화기관의 단백질 가수분해효소에 의해 분해됨으로써 인체에 무독성이고 잔류성이 없다는 측면에서 식품 등의 새로운 생물학적 보존제(biopreservative) 내지는 발효식품 등의 생물제어제(bioregulator)로 그 효용이 크게 기대되고 있다.

ㄴ) 박테리오신의 분류

박테리오신에 대한 연구는 대장균이 생산하는 항균성 단백질을 colicin이라 명명함으로써 시작되었으나 현재 산업계, 특히 식품 및 생물산업계에서 그 응용 및 효용이 기대되는 박테리오신은 대부분 식품으로부터 분리된 박테리아가 생산하는 것들이다. 이들 식품 관련 박테리아의 주종은 발효와 관련된 균들이며 따라서 현재 산업적으로 가장 관련된 균들이며 따라서 현재 산업적으로 가장 관심의 대상이 되고 있는 박테리오신은 주

<표 3> 대표적인 박테리오신과 분류

Class	Molecular Characteristics	Representative Bacteriocin	Gene Location / DNA Sequence
class I	lanthibiotics	nisin	chromosome/sequence known
class II	small mostly hydrophobic active on membrane very heat-stable	lactocinF lactococcin leucocinA pediocinPA-1 carnobacteriocins	episomal plasmid plasmid plasmid plasmid/chromosome(sequences all known)
class III	large and heat-labile	helveticinJ	chromosome/known
class IV	complex proteins	lactocin27	unknown/unknown

로 젖산균(lactic acid bacteria)이 생산하는 박테리오신들로서, 젖산균 그룹을 형성하고 있는 다섯 개의 주요 속(genus), 즉 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*속 모두에서 박테리오신 생산이 보고되어 있으며 각각의 속이 생산하는 박테리오신에 대해서도 종합적으로 분석되어 있는 바, 그 동안 집중 연구되어 현재 현실적으로 산업 현장에서 응용되고 있거나 응용이 가능한 대표적인 박테리오신은 표 3과 같다.

이들 젖산균이 생산하는 박테리오신은 현재 그 분자특성에 따라 4개의 class로 분류되며, *Lactococcus*가 생산하는 nisin과 같이 alanine-S-alanine의 lanthionine ring을 가지고 있는 박테리오신(lantibiotic)을 class I 박테리오신으로, helveticin과 같이 분자가 크고(more than 30Kdal) 열에 약한 (inactivated even at 60℃) 박테리오신은 class II 박테리오신으로, lactocin27처럼 주성분인 단백질 분자가 탄수화물 및 지질 분자와 결합되어 있는 복합 박테리오신을 class IV 박테리오신으로 각각 분류하고 있다. 그러나 유용 박테리오신의 대부분은 표 1에 나타나 있는 바와 같이 class II 박테리오신으로서, 분자량이 작고(거의 4 ~ 6 Kdal 분자량), 매우 소수성(hydrophobic)이어서 보통 20개 정도의 소수성 아미노산으로 이루어진 transmembrane helix를 분자내에 가지고 있으며, 따라서 그 살균(bacteriocidal), 혹은 정균(bacteriostatic)작용이 주로 상대 균주의 세포막(membrane)에 이러한 소수성 분자가 작용하여 그 생리적 기능을 파괴함으로써 이루어짐이 특징이고, 작은 분자 크기로 인하여 복잡한 3차 구조를 형성하지 않으므로 121℃의 고온에서조차 분자활성을 상실치 않는 강력한 열 안정성(thermostability)을 소유하는 등의 공통적인 분자특성을 보인다.

ㄷ) 박테리오신의 작용 기작

박테리오신의 작용기작은 주로 균체표면에 있는 특이적인 receptor에 흡착한 후 세포막을 침투하여 균체에 생화학적인 손상을 주어 사멸하게 한다. 이렇게 특이적인 receptor에 흡착하여 막을 침투한 박테리오신은 세포내 손상을 주는 것과 막에 손상을 주는 것으로 크게 나눌 수 있다. 세포내 손상을 주는 박테리오신은 막결합 효소들의 활성화에 의해, 또는 직접 세포막을 침투하여 DNase나 RNase의 작용을 하여 DNA나 ribosome에

영향을 주게 된다. 막에 손상을 주는 박테리오신에 관한 연구 결과, 종래 보고된 1)고분자 합성의 저해, 2) K^+ 나 아미노산 등의 능동적 수송의 저해, 3)ATP level의 저하 등이 사실은 박테리오신에 의한 세포막의 순일성(homogeneity) 또는 transmembrane potential의 파괴에 따른 제2차적 손상임이 규명되었다.

한편 박테리오신의 작용기작과 관련하여 생산균주는 자기방어 기작, 즉 자신의 박테리오신에 의해 자신의 세포막의 생리 기능이 영향을 받지 않도록 하는 기작을 구비하고 있는데 이를 해당 박테리오신에 대한 자기면역성(immunity)이라 하며, 이는 두 가지 기작에 의해 이루어 지는 바, 생산 균주가 박테리오신을 활성이 없는 전구체(pre-bacteriocin)로 생산하여 이를 세포외로 분비하면서 활성화시킴으로써 자신의 세포막이 내부로부터 공격됨이 없도록 조치하고, 면역 단백질(immunity protein)이라고 불리우는 별도의 단백질분자를 생산하여 이것이 세포막의 취약부위에 결합토록 함으로써 외부로 분비된 박테리오신이 자신의 세포막에 재결합되어 들어 오는 것을 차단하게 한다. 이러한 면역기능의 산업적 중요성은, 박테리오신 생산균주를 포함하여 발효종균(starter culture)을 만들고자 하나 발표에 주요 역할을 하는 다른 균주가 박테리오신에 취약하여 두 균주를 같이 쓰기가 힘들 경우 면역단백질의 유전자를 이 균주에 도입함으로써 문제점을 해결할 수 있다는 점에서 확인할 수 있다.

③ 박테리오신의 산업적 개발 기술

박테리오신 생산균주의 탐색 및 동정 기술은 가장 기본적인 기술이나 동시에 가장 난이도가 높은 기술로서 그 이유는 식품환경 및 목적균종에 따른 선택배지의 선정 혹은 합성의 어려움, 피검균의 선택의 합리성, 활성의 유무 판단시의 경험적 요소, 고체배지와 액체배지에서의 생산능의 변화, 분석된 항균성 물질이 박테리오신임(bacteriocinogenicity)을 증명하는데 수반되는 실험의 설계와 구성의 어려움, 최적 생산 조건의 결정, 박테리오신 생산능력의 항상성 유지 등등 많은 변수가 존재하고 있기 때문이다. 특히 이러한 복잡한 경로를 거쳐 박테리오신 생산이 확인된 균주의 동정기술은 장시간의 조직적 접근이 요구되는 기술로써 교과서적인 Bergy manual에 의한 기초적 요소외에 각

실험실별 know-how가 종합적으로 조합되어 확증에 이르게 된다.

생산된 박테리오신의 정제 및 분자동정(molecular identification) 기술은 일반적으로 여타의 단백질에 해당되는 분별침전, ion exchange column chromatography, gel filtration column chromatography, HPLC 등의 경로를 가장 많이 사용하고 있으나 각 박테리오신의 분자성질에 따라 수 많은 변환이 적용되고 있으며 특히 최근에는 박테리오신의 hydrophobicity가 일반적 특성으로 인식됨에 따라 hydrophobic column을 이용한 one-step purification이 많이 시도되고 있다. 박테리오신의 물질 동정은 다른 항생물질과는 달리 mass spectrometry를 이용한 분자량의 물리화학적 확인과 유전자의 염기서열로부터의 아미노산서열의 추정, 그리고 이를 기초로 NMR에 의한 2, 3차 구조의 해석기술로 요약될 수 있다. 그러나 현재까지 그 기본적인 3차 구조가 밝혀진 것은 nisin과 subtilin뿐이다.

유전공학 및 단백질공학 등 분자생물공학(molecular biotechnology)적 방법의 도입은 항생제를 포함한 항균물질 가운데 박테리오신 특유의 기술적 장점으로서는 이는 박테리오신이 단백질로서 자신의 유전자가 있고 ribosome에 의해 직접 translation되기 때문이며 이에 의해 1)박테리오신 유전자의 표현(gene expression) 및 post-translational modification, 세포외 분비(secretion)에 관계되는 유전자 혹은 sequence factor를 조작함으로써 대량으로 생산하는 기술적 접근이 가능하고, 2)박테리오신의 구조유전자(structural gene)를 site-directed mutagenesis에 의해 변환시켜 그 열 안정성, 용해도, 산 안정성 등을 산업현장에서 필요한 방향으로 변환시키는 분자 변환 기술(molecular transformation)이 가능하며, 3) 생산균주 염색체의 여타 부분을 조작하여 생산균주 자체의 유전적 요소를 산업 현장에서 필요로 하는 상태로 임의 조작할 수 있는 기술이 가능하다.

물질 및 균체의 안전성 검정 기술은 기존의 여타 항생물질의 그것과 대등소이하나 목적하는 식품 또는 적용환경(application environment)에서의 최적화 기술은 박테리오신 특유의 분자소요(molecular needs) 혹은 생산균주 - 적용식품 간의 상호작용, 예를 들어 박테리오신의 소수성(hydrophobicity), 내산성, 확산성(diffusibility), 단백질성 등과 생산균주의 흡착성, 영양요구성, 최적온도 및 습도, 타 균주와의 상호작용, 특히 박테리오신 생산의 유도인자(inducible factor) 등의 제반 요소가 모두 고려되어야 하는 종합적 기술로 판단된다.

균체생산을 위한 저가의 생산배지의 개발과 발효산업에 응용가능한 스타터의 제제화 기술 개발은 아직 pilot plant 수준의 기술이기는 하나 산업화에의 장벽을 극복하기 위한 마지막 장애기술로써 생산균주의 대사에 대한 종합적 지식, 배양조건에의 통계학적 변이에 의한 박테리오신 생산의 산업적 최적점의 산출 등과 단위 용적당 생균수의 극대화, 고농도에서의 배지 구성요소 혹은 대사 산물과의 물리화학적 상호 작용에 대한 정확한 예측 등이 그 기술 요소로 작용하고 있다.

④ 박테리오신의 산업적 응용 기술

박테리오신은 active component가 단백질이고 antimicrobial spectrum이 좁은 것이 특징이며 이것을 생산하는 균주와 밀접하게 관련된 세균만을 주로 저해한다. Nisin과 같이 세균에 의해 생산되는 항균성물질인 박테리오신은 앞에서 밝힌 바와 같이 penicillin이나 streptomycin 등과 같은 항생물질과는 다른 특징을 갖는다. 박테리오신은 active component가 단백질이고 antimicrobial spectrum이 좁은 것이 특징이며 이것을 생산하는 균주와 밀접하게 관련된 세균만을 주로 저해한다. Nisin과 같이 세균에 의해 생산되는 항균성물질인 박테리오신은 penicillin이나 streptomycin 등과 같은 항생물질과는 다른 특징을 갖는다. 박테리오신은 active component가 단백질이고 antimicrobial spectrum이 좁은 것이 특징이며 이것을 생산하는 균주와 밀접하게 관련된 세균만을 주로 저해한다.

이들 박테리오신은 대부분 유제품 가공용 starter culture 상의 문제점을 확인하는 과정에서 밝혀진 것들이다. 이들 박테리오신은 균체표면에 있는 항원특이성에 따라 구분할 수 있으며 각종 미생물에 의하여 생산되는 것으로 알려져 있다. 이들중 그램 음성균에 의해 생성되는 물질은 비교적 좁은 항균범주(spectrum)를 가지며 쉽게 정제할 수 있는 단순 단백질이지만, 그램양성균이 생산하는 여러 박테리오신들은 밀접한 관계가 없는 다른 미생물에 대해서도 작용하며 정제하기가 어려운 lipid나 carbohydrate와 화합된 단백질로 구성되어 있는 경우도 있다.

박테리오신을 적절히 이용하게 되면 식품 및 사료 산업에도 획기적인 전기를 마련할 수 있을 것이며 이를 위하여는 독성의 가능성이 우선적으로 제거되어야 한다. 따라서

인류가 장기간 음용해 온 젖산균을 대상으로 관심을 두는 것이 당연하다. 예를 들어 젖산균이 생산하는 물질이 유제품에 유해한 병원균이나 미생물의 생육을 저지할 수 있다면 유익한 것이 될 것이다. 특히, nisin은 자체 독성이 없고 장내세균이나 소화효소에 의해 분해되며 생리적 pH에서는 불용성인 점 등의 안전성으로 인해 식품에 안전하게 사용할 수 있기 때문에 통조림식품에도 유용하다.

박테리오신 관련기술을 이용한 산업의 세계적 규모는, 현재 대표적 박테리오신인 nisin의 경우 치즈, 발효유, fermented alcohol beverage, canning industry 등에서 집중적으로 사용되고 있을 뿐더러 발효육, 사료산업에서의 응용시도 등을 감안할 때, 그 시장규모는 앞으로 더욱 급속히 확대될 것으로 판단된다.

4) Immune regulators

①만난올리고당(Mannanooligosaccharide)

올리고당 2-10개 정도의 단당류가 결합되어 있는 것으로 여러 가지 생리적 특성을 갖는다. 탄수화물은 당류가 그 기본 골격으로 매우 단순하게 형성되어 있으며, 원래 올리고당이라는 말은 이러한 당류가 단당류가 복합체를 구성하고 있는 구조적인 특성을 일컫는 말이다. 그 중 mannanooligosaccharide (MOS)는 효모의 세포벽에서 추출한 α -1,6 α -1,2 및 α -1,3 linkage로 연결된 oligosaccharide이다. Mannanooligosaccharides는 salmonella, E. coli 또는 bivrio와 같은 유해 미생물의 세포벽에 있는 lectin과 결합해 미생물이 장내 host cell wall과 결합하는 기회를 줄여 장내 미생물의 colonization을 예방해주고 병원균을 제거함으로써 미생물총에 변화를 준다. 일반적으로 Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Clostridium bournu, Clostridium sporogenes와 같은 병원성 박테리아는 mannaoligosaccharides를 성장을 위한 에너지원으로 이용하지 못하는 반면 Bifidobacterium longum lactosacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus delbrekii와 같은 장내에 유익한 것으로 알려져 있는 미생물들은 이와 같은 mannanooligosaccharide를 이용할 수 있는 효소 복합체가 있는 것으로 알려져 있어 장내 미생물 총을 유익한 쪽으로 변화시킬

수 있다.

② 프럭토 올리고당

Oligosaccharide는 단위동물의 사료에 포함되었을 때 특이한 생리적 효과를 촉진하는데 이것은 단위동물의 소화관에서 미생물 집단의 수용성 기질로서의 특성과 관련있으며 위 장관에서 분비되는 소화 효소에 의한 분해에 저항하는 성질과 관련이 있다. Oligosaccharide는 식물의 천연구성체이며 식물성 사료 생산물이라고 할 수 있다. 이러한 oligosaccharide는 죽순, 양파, 아스파라거스, 우엉, 뽕딴지, 밀 및 간장에 존재하며 여러 가지 종류의 유제품과 같은 동물성 식품에도 한 가지 이상의 oligosaccharide를 포함하고 있다.

Fructooligosaccharide(FOS)는 주로 fructose로 구성되어 있고 fructose 분자는 β (2-1) glucosidic bond에 의해 결합되어 있다. 효소적 분해에 의해서 inulin으로부터 생산되는 oligofructose는 주로 fractan (2-1) β -D linked fructofuranose chain을 지니며 inulin분자의 glucose 말단으로부터 유래하는 낮은 함량의 glucofractan을 가지고 있다.

포유동물의 소화관내로 분비되는 탄수화물 분해 효소의 작용은 전분을 구성하고 있는 glucose 분자간의 우세한 결합 형태인 α (1-4) glucosidic bond의 분해에 국한된다고 할 수 있다. 저분 유래 malto- dextrin은 예외이지만 대부분의 oligosaccharide는 이러한 소화 효소에 의해 분해될 수 없는 조성을 가지고 있다. 이러한 포유동물 소화 효소에 대한 저항력을 지닌 물질을 비소화성 oligosaccharide (non-digestible oligosaccharide)라고 한다. 그러나 이러한 비소화성 oligosaccharide가 장내 미생물총에 의해 생산된 효소에 의해 생산된 효소에 의해 회장 말단에서 분해된다는 증거가 있다. Fructooligosaccharide는 단위동물의 소화 효소에 의해 산가수분해 및 효소적 가수분해에 대해 저항하지만 fructooligosaccharide를 기질로 사용하는 미 Bifidobacteria에 의한 fructooligosaccharide 및 xylo-oligosaccharide를 기질로 사용하는 미생물에 의해서는 분해된다고 한다. 소장에서 Bifidobacteria에 의한 fructooligosaccharide 및 xylooligosaccharide의 선호적 이용으로 인해서 다른 미생물종을 희생하고 위장관의 이 부분에서 이로운 Bifidobacteria에 의한 이러한 이용으로 인해 특히 대장에서 휘발성 지방산의 생성이 증가하게 된다.

Xylose oligomer는 위해 pH 조건하에서는 안정하다고 할 수 있다. 체장의 외분비물은 어떠한 xylanase도 포함하지 않고 있다. 따라서 xylo-oligomer는 이를 기질로 이용할 수 있는 bacteria에 대해서는 기질로서 유용하다고 할 수 있다. Fructooligosaccharide 및 xylooligosaccharide는 bifidobacter adolescents, B. infacts 및 B. longum에 의해서는 낮은 정도로 전환되며 Eubacteriaceae, Clostridia, E. coli 및 Staphylococcus에 의해서는 전혀 이용되지 않는다. Oligosaccharide를 과도하게 섭취하면 대장에서 과도한 발효를 일으키며 분의 통과 속도를 증가시키고 연변을 생산한다고 할 수 있다. 이런 효과들은 함유량이 0.5%를 초과하거나 일당섭취량이 20 g을 초과할 경우에 나타난다.

1980년대 초에 일본에서는 비가소화 탄수화물이 인간 식품의 필수 부분이라고 인식되었다. 자연 식품 성분의 소모로 인해서 인간을 비롯한 동물의 위장 및 일반적인 건강에 미치는 이로운 효과는 발효성 oligosaccharide 및 polysaccharide의 존재와 관련있다고 할 수 있다. 이러한 이로운 효과는 이미 비소화성 oligosaccharide의 선택적 이용으로 인한 장내 미생물총의 변화로 촉진되었다고 할 수 있는데 이 비소화성 oligosaccharide가 bifidobacteria 및 lactobacilli군을 크게 증가시키는 반면 병원성 E. coli 및 Clostridium perfringens과 같은 부패성 미생물군 및 아미노산의 잠재적 독성 대사산물의 미생물 분해를 감소시킬 수 있다고 한다.

③ 베타 글루칸(β -Glucan)

효모는 단단한 세포벽을 가지는 데 이들 세포벽은 세포건물 중량(cell dry mass)의 20-30%를 차지하고 있으며, 이들 세포벽은 manno-protein과 glucan(85%-90%) 및 소량의 키틴(1~3%)과 지방으로 구성되어 있다. 효모의 세포벽은 3가지 성분으로 층 구조를 이루고 있으며, 세포내측은 주성분이 β -1,3과 1,6-glucan, 소량의 키틴과 manno-protein으로 되어 있으며, 외측은 mannan이 단백질과 연결되어 있는 manno-protein으로 되어 있다. 이러한 세포벽의 다당류는 수용성 mannan, 알칼리 용해성 glucan, 알칼리 비용해성 glucan 및 키틴으로 나누는데, Saccharomyces cerevisiae는 mannan과 glucan 함량이 거의 같고, 알칼리 용해성과 비용해성 glucan의 함량이 비슷하다고 보고되었다.

효모의 manno-protein과 glucan은 동물의 면역기능을 강화시키는 물질로 보고되고 있으며, 이로 인해 질병예방의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그 밖에도 manno-

protein과 glucan은 혈중 콜레스테롤 수준을 낮추는 물질, 항암제, 화장품, 계면활성제로 또는 식이 섬유나 식품첨가제로써 다양한 산업분야에 이용되고 있다.

Mannan이나 glucan은 동물에 급여될 때 동물의 질병 저항성을 높이게 되는데, 이러한 기작에 관해서는 아직 연구가 진행중에 있으나 다음과 같은 추정은 가능하다. 첫째, mannan과 glucan이 직접 항원으로 작용하여 면역체계를 활성화시킴으로서 병원균이 침입했을 때 이미 활성화되어 있는 면역시스템에 의해 병원성 물질이 제거된다는 것이다. 이것은 여러 가지 세균의 세포벽에 존재하는 mannan과 glucan이 동물의 면역체계에 존재하는 면역세포의 인식작용에 주요 인식 부위로 작용하기 때문에 일어나는 것으로 보고되고 있다. 둘째, 병원성 세균이 동물의 특정기관에서 군락을 형성하는 것을 방해함으로써 병원성 미생물의 병원성을 억제한다는 것이다. 즉, 한 예로서 Salmonella E. coli(병원성), Vibrio cholera 등은 mannose에 특이적인 lectin-like 물질을 세포표면에 가지고 있기 때문에 이 물질을 이용하여 소화기내에 특정 세포에 부착하여 병원성을 나타내게 되는데, 만약 mannan을 사료에 첨가하였을 경우 첨가된 mannan이 먼저 병원성 미생물의 lectin-like 물질에 결합하기 때문에 침입한 병원성 미생물이 특정 세포에 결합하는 것을 방해시켜 병원성 미생물의 병원성을 억제한다는 것이다. 또, 병원성 미생물의 경우 mannan이나 glucan을 이용할 수 있는 효소체계가 존재하지 않는데 반하여 병원성을 가지지 않는 미생물은 이를 적절히 이용할 수 있는 효소체계를 가지고 있기 때문에 이들 물질이 있는 배지에서는 비병원성 미생물들이 우점을 하게 되어 질병에 대한 저항력을 갖게 된다.

④ 싸이토카인(Cytokine)

일반적으로 면역촉진제들은 면역세포 특히 항원인지 능력이 뛰어난 세포들 (APC, antigen presenting cell - 거식세포, dendritic 세포, B 세포)을 대상으로 한다. 거식세포는 비 특이적으로 활성화되어질 수 있고 특정 cytokine의 분비도 되어진다는 장점 때문에 면역조절제를 사용할 때 이들 세포에 의한 면역현상의 증강을 유도하려는 연구가 활발하다. 특정 종양이 치료된 경우도 있지만 아직은 초기단계로서 그 효과의 차가 나타나거나 효율이 많이 떨어지는 것을 알 수 있다. 그러나 cytokine이 면역기전에 있어서 중

요한 역할을 차지한다는 것을 가정할 때 보다 많은 연구가 진행되어짐에 따라 이러한 물질들의 사용이 증가될 추세에 있다. 또한 면역반응촉진제로서 이러한 cytokine을 가축의 질병을 예방하는 항생제대체제로서 사용하려는 시도가 있어왔는데 특히 돼지에서 이 유 후 설사병의 하나인 과민성 대장염(Inflammatory bowel disease; IBD)과 만성장염(Chronic enterocolitis)의 치료목적으로 Interleukin-10을 장내 유익한 미생물인 유산균으로부터 대량 발현시켜 생산 이용하려는 시도가 최근에 보고되고 있다.

⑤ 크로미움 피콜리네이트

Chromium은 -2가로부터 +6가 사이에서 산화가 일어나는데 보통 자연상태에서는 0, +2, +3, 그리고 +6가로 존재한다. Cr^{2+} 화합물은 불안정하여 공기 중에서 쉽게 산화되므로 산화로부터 보호해야 할 뿐만 아니라, 환원력이 대단히 강해서 생리적 상태에서는 쉽사리 작용하지 않는다. 반면, Cr^{3+} 와 Cr^{6+} 은 Cr의 가장 안정한 형태로 알려져 있는데 이 중 Cr^{6+} 은 산소와 결합하여 매우 강력한 산화제로서 작용하며 산성용액에서 쉽게 Cr^{3+} 로 환원된다. 한편, picolinate는 tryptophan으로부터 niacin이 합성되는 과정에서 생성되는 대사적 유도체로서 Cr을 운반해 주는 물질이며 chromium picolinate는 한 분자의 Cr과 3 분자의 picolinate가 킬레이트 결합으로 형성된 물질이다. 생리적으로 활성인 Cr 화합물을 일반적으로 glucose tolerance factor (GTF)라 부르며, 이의 구성성분은 Cr^{3+} 뿐만 아니라 glycine, cysteine 및 glutamic acid와 같은 아미노산, 그리고 nicotinic acid 등으로 이루어져 있다. 이러한 GTF의 가장 잘 알려진 기능으로서는 insulin의 작용을 개선시켜 준다는 것이다. 돼지의 정맥내에 insulin을 주입했을 때 GTF는 저 혈당 반응을 촉진했는데 이것은 GTF가 돼지에 있어서 생물학적인 활성을 가지고 있으며 이 화합물이 insulin이 insulin receptor의 반응을 도와 그 결과로서 glucose와 아미노산이 근육세포로 운반되는 것을 도와주고 단백질의 합성을 유도하는 등 생물학적인 반응을 촉진한다는 내용을 시사하는 것이다.

Cr은 혈청 내 cholesterol의 항상성 유지에 중요한 작용을 하는데, 흰쥐의 경우 성별에 관계없이 연령이 증가함에 따라 혈청 내 cholesterol의 수준이 증가되므로 사료내 일정량의 Cr을 첨가하면 이와 같은 현상이 억제된다는 보고가 있다. 단백질과 Cr이 결합된 사

료를 쥐에게 급여했을 때 심장에서 단백질 합성이 저하하는데, 이때 insulin을 첨가하면 단백질 합성기능이 증가되며, Cr³⁺를 함께 급여할 경우 그 합성능력은 더욱 증가된다고 하였다. 한편, Li사료 내 lysine과 Cr 첨가제의 수준이 돼지의 성장률 및 육질에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였는데 그 결과 사료 내 lysine이 120%일 때에는 Cr을 첨가하여도 사료효율이 개선되지 않는 반면 lysine의 수준이 100%일 때에는 200 μg/kg의 Cr 첨가로 사료효율이 개선되었다고 하였으며 육질에 있어서는 lysine의 수준에 상관없이 사료 내에 Cr을 200 μg/kg 수준으로 첨가했을 때 등지방 두께가 감소하고 정육율이 증가되었다고 하였다. 또한, 모돈의 번식력과 자돈의 체중에 대한 CrP의 효과를 알아보기 위한 실험을 연이어 수행하였는데 모돈의 사료 내에 CrP를 첨가함으로써 복당 산자수와 체중이 대조구에 비해 개선되었으나 개체별 자돈의 이유시 체중에 있어서는 CrP 첨가구가 대조구에 비해 약간 떨어졌다고 하였다.

한편, 생리적 스트레스, 극심한 운동, 세균 감염 및 기후 변화로 인한 스트레스가 당대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있는데 그 예로서 부신피질에서 분비되는 glucocorticoid 호르몬은 지방과 단백질 분해를 촉진시켜 glucose 재합성을 촉진시키고 이러한 과정에서 조직으로부터 Cr이 분리되어 결국 뇨로 배설되게 된다고 하였다.

⑥ 유기태 광물질

체내에서의 광물질의 기능은 체기관과 조직의 구성 성분이며 골격을 형성할 뿐만 아니라 전해질, 체액의 구성성분, 효소와 호르몬에서의 촉매제로 사용되므로 동물의 건강뿐만 아니라 동물의 성장 및 번식에 중요한 기능을 한다. 그런데, 지금까지 oxide, sulphate, carbonate 형태의 무기태 광물질들이 동물의 요구량을 맞추기 위해서 사료중에 첨가되었다. 이들 염류는 소화되는 과정에 분해되어 유리이온상태에서 흡수된다. 그러나 경우에 따라서 이들 물질들이 다른 물질과 complex를 이루어서 체내에서 흡수되기 어렵거나 전혀 이용이 되지 못하는 경우도 있다. 이같은 변이 때문에 사료 중에 공급되어지는 광물질의 양은 최적 성장을 위한 요구량보다 많이 공급되어 불필요한 배설량의 증가로 환경에도 영향을 미치게 된다. 따라서 유기태로 불려지는 미량 광물질들의 chelation

에 대한 관심이 증대되고 있다.

킬레이트 원리로는 주개원자의 종류와 금속이온의 종류에 따라 착화합물의 결합의 세기가 결정되면 한 리간드 안에 주개원자가 하나이면 한자리리간드(monodentate), 주개원자가 2개이면 두자리리간드(bidentate), 3개이상이면 여러자리리간드(multidentate)라 부른다. 따라서, 리간드분자 안에 주개원자가 2개이상인 경우 두 개의 주개 원자가 한 개의 금속이온과 동시에 결합하면 고리형(ring) 화합물을 만들 수 있기 때문에 이러한 리간드들을 킬레이트형 리간드라 하며 킬레이트된 금속 착화합물을 간단히 킬레이트라 부르기도 한다. 한편, 미국의 AAFCO(1996)의 Metal amino acid chelate에 대한 정의는 가용성 광물질 염으로 부터 용해된 1개의 광물질 이온과 아미노산 1-3(2가 가장 적합) 분자가 배위공유결합한 화합물질을 말한다. 아미노산의 평균 무게는 150 그리고 chelate의 무게는 800 dalton을 초과하지 않아야 하고 최소 광물질 함량과 아미노산의 종류를 명시해야 한다.

철(Iron)은 체내에서 전자전달계, 산소의 활성화 및 산소의 운반, 헤모글로빈의 구성물질, 에너지와 단백질대사, 빈혈예방을 위한 필수 물질이다. 사료에 첨가되는 철의 양과 이용성은 화학적 형태에 따라 매우 변이가 크다. Ferrous sulphate의 이용성을 100으로 할 때 ferrous chloride는 106%, ferric chloride는 78%, ferrous carbonate, ferric oxide는 10% 이하이며, chelated 철의 상대적 이용성은 125-185%로 높아서 모돈이나 자돈 사료에 이용될 수 있는 것으로 주목받고 있다.

구리(Copper)는 세포의 호흡, 심장활동, 골격형성, 결합조직의 발달, 조직의 각질화 및 착색, 척수의 형성을 위해 필요하다. 또한 세포의 호흡 및 Hb의 합성 등에 작용하는 효소반응을 위해 필요한 물질이다. 구리는 철의 흡수 및 운반에 관여하고 시상하부에서 분비되는 LH-RH의 분비촉진을 통하여 번식에도 영향을 미친다. 200 ppm의 Cu-lysine 및 Cu sulphate의 첨가효과를 비교했을 때 Cu-lysine 처리구에서 성장률이 14.3% 증가되었으나 Cu의 흡수율 및 체내 축적에는 차이가 없었다. 이는 유기태 구리가 무기태와는 다른 대사과정을 거치거나 더 잘 흡수된다는 것을 의미한다고 하였다.

아연(Zn)은 여러 가지 효소의 구성물질이며 성장, 번식, 면역과 스트레스에 관여하는 호르몬의 분비와 깊은 연관이 있다. 또한 keratin의 합성, 피부에서 핵산 및 collagen의

합성에도 관여한다. 그 외에 혈 중 비타민 A농도와 난소기능 유지 뿐 만 아니라 면역체계, 이온교환에도 반드시 필요한 물질이다. 동물 사료중에 들어있는 Zn의 함량이 낮고, 다른 영양소 또는 항대사물질에 의해 이용성이 떨어지므로 대부분의 동물사료에 Zn를 보충해주고 있다. 가금에서 화학적 형태에 따라 Zn의 이용성에 상당한 차이를 보이는데, Zn sulphate의 이용성을 100%로 봤을 때 Zn methionine은 206%, Zn oxide는 61%였다. 개와 젖소에서 Zn methionine과 무기태 Zn을 비교하였을 때 우유 중 somatic cell이 감소하였을 뿐만 아니라 털, 뿔, 발굽의 성장이 촉진되었다.

셀레늄(Selenium)은 황과 화학적 성질이 매우 비슷하며 항산화작용을 하는 glutathione peroxidase의 구성 성분이 되므로 체내 Se이 부족하면 세포가 산화되어 vit E의 요구량도 증가한다. 일반적으로 돼지사료에 Se 공급원으로 쓰이는 것은 무기태인 selenite형태이다. 그러나 유기태 Se이 무기태보다 상대적 이용성이 120-150%로 높다.

일반적으로 유기태 광물질 공급원들은 무기태보다 이용성이 높다고 알려졌다. 이들은 모돈에서 번식능력과 자돈의 건강상태를 증진시킬 뿐만 아니라 사료섭취량, 성장률, 사료이용율을 증가시킨다. 또한 이들 물질들을 사료첨가제로 쓴다면 높은 소화, 흡수율을 나타내므로 적은 양을 동물의 요구량을 공급할 수 있으므로 배설되는 양이 적어져서 환경의 측면에서도 바람직하다.

⑦ 황 토

황토란 일반적으로 황색 내지 적갈색의 흙을 일컫는다. 그러나 학술적인 용어로는 黄土(loess)는 바람에 의해 운반되어 퇴적된 담황색 내지 황회색을 띠는 실트질 퇴적물을 말한다. 황토는 60-70%의 석영을 함유하며, 그 함량은 최저 40%에서 최고 80%까지 변화한다. 장석과 운모는 10-20%, 탄산염광물은 5-35%를 함유하고 있다. 약 2-5%의 실트는 각섬석, 인회석, 흑운모, 녹니석, 남정석, 녹립석, 석류석, 휘석, 금홍석, 규선석, 십자석, 전기석, 지르콘 등과 같은 중광물들로서 구성되어 있다. 세립질(0.002mm이하)의 입자 크기에서는 몬모릴로나이트, 일라이트, 캐올리나이트 등과 같은 점토광물들이 우세하게 포함된다.

황토의 화학적 조성은 50-60%의 실리카(SiO_2), 8-12%의 알루미나(Al_2O_3), 2-4%의 산화철(III) (Fe_2O_3), 0.8-1.1%의 산화철(II) (FeO), 약0.5%의 이산화티탄 (TiO_2)과 산화망간 (MnO), 4-16%의 석회 (CaO), 2-6%의 산화마그네슘 (MgO) 등과 같은 비율로 가장 흔하게 나타난다. 황토 한 스푼에는 약 2억 마리의 미생물이 활발하게 생명력을 유지하고 있다고 한다. 이것은 바로 황토가 살아 있는 생명체라는 사실을 증명해 주는 예이다. 이러한 황토 속에는 다양한 효소들이 촘촘히 들어 있어서 순환작용을 해 주고 있다고 한다. 흙 속에서 활성이 이루어지는 효소는 약 50여 종류가 되는 바, 이들 대부분이 가수분해 효소에 속한다고 한다. 그 중 비교적 중요한 효소를 예로 들 것 같으면, 토양 산화력의 지표 중 하나로 여겨지며 생물에 대해 독소를 나타내는 과산화수소와 인체의 노화를 가져오는 과산화지질이라는 독소를 제거하는 catalase와 같은 중요한 효소들을 비롯해서 diphenol oxydase, saccharase, protease 등 많은 효소들이 들어 있다. 그 중 protease는 단백질 속의 질소가 무기화할 때 단백질을 아미노산으로 가수분해시킨다. 예를 들면 동물성 폐기물(사체)도 이 효소의 작용으로 사체속 단백질을 포함하고 있는 질소가 가수분해를 거쳐 아미노산으로 무기질화하며 일종의 흙 속 정화작용, 즉 분해하는 것을 알 수 있다. 그렇기 때문에 생명체의 항원 면역력이 숨쉬고 있는 한 면역력 밖의 불필요한 암, 종기, 기타 부패한 세포는 흙속에서 효소인 protease의 도움으로 순식간에 분해, 파괴시킬 수 있다고 한다.

황토는 예로부터 우리의 선조들에 의해서 그 의의와 중요한 역할이 인식되었고 줄곧 사용되어 왔었다. 예를 들면, 황토방에 의한 빌병 치료, 황토굴을 이용한 암종의 치료, 황토 地漿水에 의한 식용식물의 이용, 황토를 이용한 수질오염의 정화작용, 황토를 이용한 각종 독의 제거, 黄土水에 의한 漁病의 치료, 가축 사료첨가제로서의 질병의 예방 치료 및 육질 개선 등, 이 외에도 많이 사용되고 있으나 과학적인 실증 data는 그렇게 많지 못하다.

5) 키토산

키틴과 키토산은 천연에 존재하는 다당류로서 최근에 특히 주목을 받고 있는 기능성

물질의 일종이다. 키틴은 N-아세틸-글루코사민이 β -1,4-glycoside 결합으로 연결된 뮤코다당류의 일종으로서 cellulose의 glucose 잔기 중 C-2 수산기가 acetyl amino기 치환된 화학 구조식을 가지고 있으며, 키토산은 키틴에 존재하는 acetyl기가 제거된 구조식을 갖고 있다.

키틴은 게, 새우 등의 갑각류 및 연체류의 껍질과 근육에, 그리고 곤충류 버섯류 및 사상균의 세포벽 등에 함유되어 있으며, 연간 100억톤 정도로 지구상에 cellulose 다음으로 많이 생산되고 있다. 따라서 키틴은 지구상에서 현재까지 널리 이용되어지지 않은 최후의 물질이라고 할 수 있다. 키틴은 보통 용매에 불용성이기 때문에 그 용도가 매우 제한되어 대부분 키토산의 원료로 사용되고 있다. 키토산은 키틴을 강알칼리로 탈아세틸화 함으로써 제조되며, 아세트산, 젖산 및 포름산 등과 같은 유기산 그리고 염산 및 질산 등과 같은 무기산에 용해된다.

키토산은 다가 양이온(polycation)의 성질을 갖고 있으며 물처리용 금속 흡착체로서 옛부터 실용화되어 왔지만, 최근 이온 교환체, 효소 고정화 담체, 의약품 등 많은 분야에서 활용되고 있다. 그러나 10년전부터 키틴과 키토산 및 그 유도체가 항종양 (면역능 증강 및 부활작용), 항균 및 항곰팡이 활성, 콜레스테롤 감퇴 및 고혈압 억제 작용 등 여러 가지 생리적 특성을 가지고 있음이 밝혀짐으로써 현재 생리기능성 신소재로서 연구개발이 활발히 진행되고 있는데 자돈 설사를 일으키는 대장균에 대해 키토산의 항균 효과를 조사한 결과, 키토산을 처리하지 않은 대조구와 비교하여 0.00002%의 키토산을 처리한 시험구에서는 항균효과가 나타나지 않았으나, 0.001-0.1%의 농도로 처리한 시험구에서는 1-12시간동안 매우 우수한 항균효과를 나타낸다고 하였다. 또한 시간적으로는 키토산을 0.001% 수준으로 첨가했을 때 10분 이내에 E. coli 균주들의 집락수가 크게 감소되어 최초 측정시에 비해 대조구는 12시간 경과 후 무려 6.7배나 그 수가 증가하였으나 키토산 첨가구는 0.001% 및 0.0001% 처리구에서 각각 87 및 84.3%의 감소율을 나타내 대장균에 대한 항균작용이 있다고 밝혔다. 그러나 이러한 항균작용이 기작에 대한 연구는 아직 이루어지지 않았다. 이러한 반응을 일으키는 원인은 키토산 아미노기가 특이적으로 병원균의 세포벽과 결합함으로써 균증식을 방해하거나, 일반세균에 대한 키토산의 항균작용이 균체표면의 구조에 대한 영향 혹은 균의 대사과정 중 DNA 형성에 대

한 저해작용이라는 추측이 가능할 것이다.

6) Essential oils

Essential oil은 정유, 방향유, 식물성 휘발유라고도 칭한다. Essential oil은 여러 식물체로부터 주로 수증기 증류(또는 추출, 압착)에 의해 추출하며 특유한 방향을 갖는 휘발성 유상물의 총칭이다. 보통 여러 종류의 화합물이 혼합되어 있으며 유지는 아니다. 주성분은 주로 monoterpene, sesquiterpene 또는 이들의 산화환원유도체이지만, 소량의 고급테르펜, 비테르펜화합물도 들어 있다. 일반적으로 물에 녹지 않고, 알콜 등 유기용매에 녹으며 휘발성과 방향성을 지니고 있다. 약 60여과의 불규칙적으로 산재하고 있는 약 천여종의 고등식물내에서 생산되지만 조나무과, 미나리과, 도금양과 그 밖의 약간의 과에서 특히 집중적으로 분포하고 있다. 서로 다른 식물에서 추출한 Essential oil은 그 구성 성분의 차이로 생체에서 서로 다른 생리적 기능을 수행하고 있다. 즉 식욕자극, 소화효소 조절, 장내균총조절, 면역조절 등이 있다. Essential oil의 사용역사는 5000년 전 중국에서 식물성 정유(Essential Oil)를 이용한 향(Aroma)의 치료(Therapy)로 알려져 있으며, 그 실제적인 사용과 발전에 있어서는 3500년 전 이집트인에 의해서였다. 그러나 많은 작용기작은 아직 밝혀지지 않았으며 실제 응용이 먼저 진행되고 있는 상황이다.

① 항생제대체 효과

ㄱ) 병원성미생물에 대한 직접적 효과

각종 식물에서 추출한 Essential oil은 여러 종류의 병원성미생물에 대하여 서로 다른 억제효과를 나타내는 것으로 알려지고 있다. 그 작용기작은 아직 밝혀진 것은 적지만 간단히 적어보면 다음과 같다.

Essential oil의 일부 성분들은 병원성미생물의 membrane에 영향을 주어 항균효과를 나타내는 것으로 알려지고 있다. 예를 들면 Carvacrol과 Thymol은 G 균과 Fungal의 outer membrane을 파괴하고 outer membrane-associated한 물질(예:LPS)들을 세포(병원성미생물) 밖에 배출하게 한다. 그리고 Carvacrol은 cytoplasmic membrane의 lipid bilayer에도 영향을

주어 삼투압을 변화시키는 것으로 밝혀졌다.

그러나 이러한 성분들을 단독으로 사용하여 항균력 측정(예:MIC측정)을 하면 혼합하여 사용한 효과보다 못한 것으로 보아 다른 성분들의 작용도 많을 것으로 알려지고 있으나 그 작용기작은 아직 밝혀지지 않았다.

현재 Essential oil의 직접적인 항균효과는 모종 식물에서 추출한 Essential oil이 어떠한 종의 병원성 미생물에 억제효과가 있다는 것을 밝히는 데 국한되고 있다. 그 결과들을 보면 Fungal, Bacteria, Virus류를 포함하는 광범한 병원성미생물에 대하여 억제효과를 보이고 있다. 그러나 보편적으로 MIC가 항생제보다 높은 결과를 보여주고 있었다.

나) 병원성미생물에 대한 간접적 효과

최근 Essential oil이 면역에 대한 조절효과를 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 현재까지 Terpinen-4-ol, 1,8-Cineole, Flavonoid 등과 같은 Essential oil의 구성 성분들은 Phagocytosis를 촉진한다는 결과가 많이 보도되고 있다. 그 외에도 면역에 대한 여러 가지 조절효과도 보고되고 있다.

다) 성장에 미치는 효과

성장에 미치는 영향은 여러 가지 연구를 통하여 이미 긍정적인 결과로 보여지고 있으며 주로 신경자극, 소화효소분비 촉진작용, 장내 균총조절인 것으로 알려지고 있으며 CRINA와 같은 Essential oil을 주요 작용물질로 하는 성장촉진용 첨가제가 이미 개발 되었다.

2. 서울대학교 동물세포공학연구실의 항생제대체제 주요 연구결과

1. 섬유소 분해 유전자가 형질전환된 재조합 *Lactobacillus* sp. 균주 개발 및 생균제 이용성에 관한 연구

1) 연구 목적

장내 유용세균으로 널리 알려진 *Lactobacillus* sp. 균주는 경제가축의 생균제제로 질병 예방 및 면역증진, 나아가 사료효율 및 증체량 개선에 뛰어난 효과를 가지고 있다. 본

연구는 생물공학 기법을 응용하여 장내 단백질 분해효소에 저항성이 우수한 cellulase를 선별하고 그 유전자를 *Lactobacillus* sp. 균주에서 발현 분비케 하는 재조합 벡터를 구축하고 형질전환시킴으로써 궁극적으로 단위가축 장내에서 섬유소 분해 이용능력을 향상시키는 새로운 재조합 생균제제를 개발하는 데 있다.

2) 주요 연구내용

(1) 단백질 분해효소에 저항성 있는 cellulase 선별

반추미생물 3종, 토양미생물 2종, 총 5종의 서로 다른 미생물에서 유래한 cellulase들로부터 장내 단백질분해효소인 pancreatin, trypsin, elastase에 대한 안정성을 조사한 결과 Table 5에서 보는 것 처럼 *Clostridium thermocellum*에서 유래한 endoglucanase A가 가장 단백질 분해효소에 저항성이 높은 것으로 나타나 본 연구의 유전자 조작에 이용할 cellulase 유전자로 선발하였다.

〈표 5〉 Resistance of cellulases to proteolytic inactivation

Enzymes	Half life of enzyme incubated with proteinase(min)		
	Pancreatin	Trypsin	Elastase
Endoglucanase A	> 120	> 110	> 60
Endoglucanase II	30	20	15
Endoglucanase B	60	60	60
Mixed-glucanase	10	8	8
CMC-xylanase	5	6	5

Endoglucanase A, II, and B were derived from *Clostridium thermocellum*, *Actinomyces* KNG 40 and *Clostridium josui*, respectively.

Mixed-glucanase and CMC-Xylanase were derived from *Fibrobacter succinogenes*.

(2) 생균제로 이용할 *Lactobacillus* sp. 균주 선발 및 생리학적 특성조사

가. 내산성

L. acidophilus 계통의 *L. gasseri* ATCC 33323 와 *L. johnsonii* VPI 11088 두 균주를 공

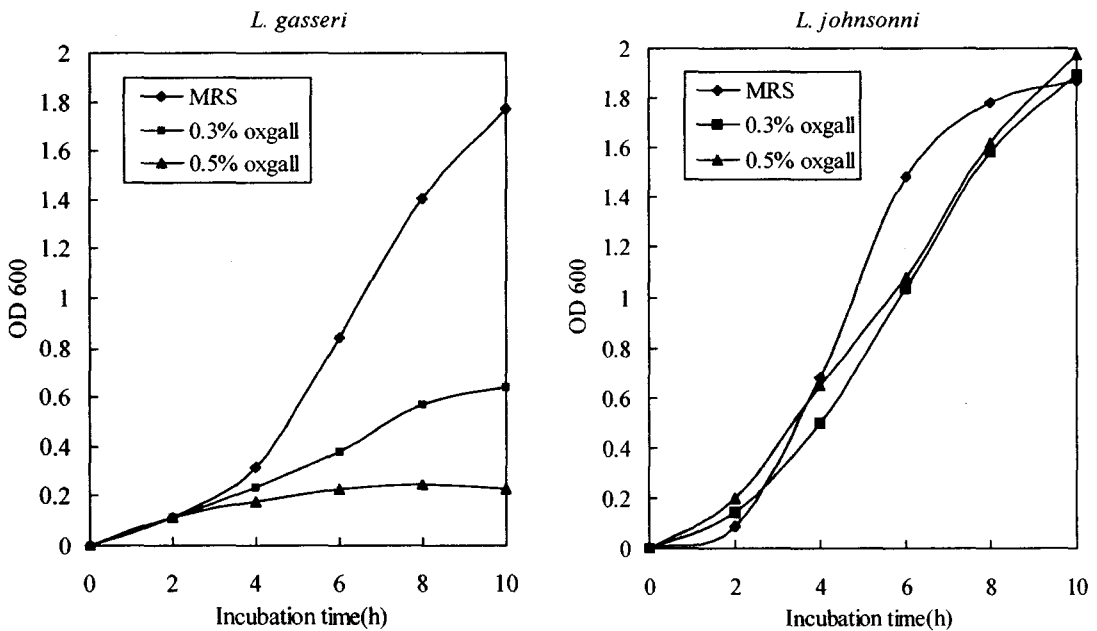
시균주로 하여 내산성을 조사한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 두 균주 모두 pH 3과 같은 산성조건에서 3시간 동안 배양하여도 급격한 생균수의 감소가 없이 안정하여 내산성이 우수한 균주로 판명되었다.

〈표 6〉 Effect of low pH on viability of *L. gasseri* and *L. johnsonii*

Strain	pH	Viable count(logCFU/ml)			
		0 min	30min	60 min	180 min
<i>L. johnsonii</i>	2	7.813(0.018)	7.806(0.012)	7.758(0.029)	7.353(0.054)***
<i>L. johnsonii</i>	3	8.087(0.009)	8.012(0.056)	7.656(0.024)***	7.577(0.014)***
<i>L. gasseri</i>	2	7.417(0.012)	7.394(0.011)	7.208(0.015)***	4.491(0.014)***
<i>L. gasseri</i>	3	7.499(0.030)	7.428(0.017)*	7.416(0.005)**	7.409(0.001)**

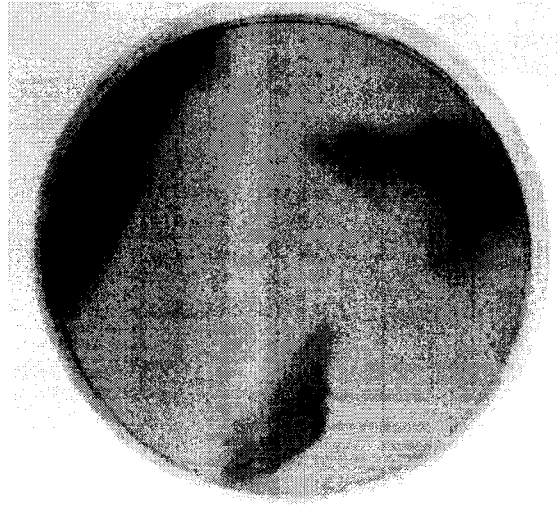
Results are shown as mean (S.D.), n=2. Paired sample, Student's *t*-test with **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001

나. 내담증성



〈그림 1〉 Growth curve of *L. gasseri* and *L. johnsonii* with and without 0.3% and 0.5% oxgall.

L. gasseri, *L. johnsonii* 균주를 oxgall이 첨가된 MRS 배지에서 10시간 동안 배양하면서 생장율을 조사한 결과 *L. johnsonii* 균주가 *L. gasseri* 균주에 비하여 담즙에 대한 저항성이 우수하였으며 <그림 1>, 특히 *L. johnsonii* 균주는 MRS 한천배지에 0.5% porcine bile extract가 첨가시 배양에서도 생존하였다 <그림 2>.



<그림 2> The survival ability of *Lactobacillus johnsonii* in the presence of 0.5% porcine bile extract.

다. 항생제 감수성 조사

Lactobacillus gasseri 균주와 *Lactobacillus johnsonii* 균주의 11종의 항생제에 대한 감수성 여부를 조사한 결과 두 균주 모두 amikacin, bacitracin, gentamycin, streptomycin, kanamycin, colistin의 항생제에 대해서 저항성을 나타내었다 <Table 7>.

(3) Cellulase 발현 재조합 벡터의 구축

선별된 *Clostridium thermocellum* 균주의 endoglucanase 유전자의 3.2 kb Hind III 단편 (자체 promoter와 signal sequence 포함)을 *Lactobacillus* - *E. coli* shuttle 벡터인 pNZ123에 도입하여 크기가 6kb 인 재조합 벡터 pSD1을 1차적으로 구축하고 또한 PCR을 통해 새롭게 그 유전자의 1.4 kb Sal I 단편을 증폭시켜 발현벡터인 pNZ3004에 도입하여

<표 7> Responses of *L. gasseri* and *L. johnsonii* to antibiotics

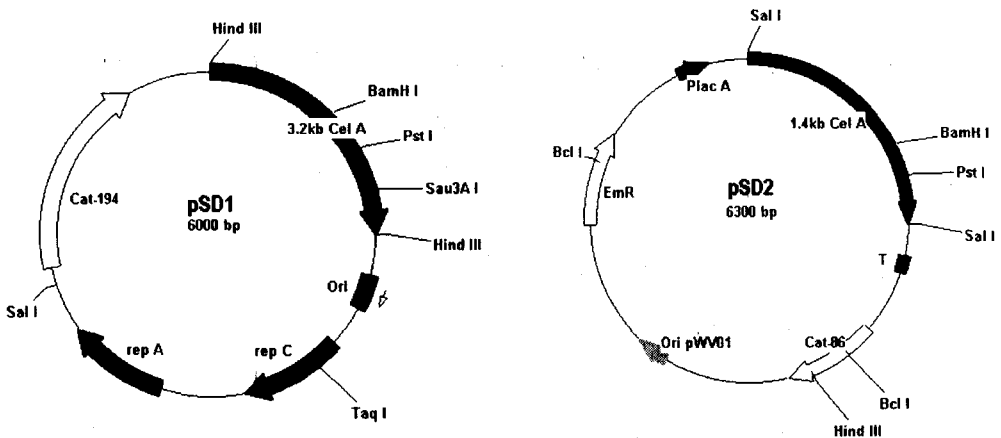
Antibiotics	Concentration paper disc	<i>L. gasseri</i>	<i>L. johnsonii</i>
Penicillin G	10 unit	S	MS
Ampicillin	10 mcg	MS	S
Kanamycin	30 mcg	R	R
Streptomycin	10 mcg	R	R
Erythromycin	15 mcg	S	S
Amikacin	30 mcg	R	R
Tetracycline	30 unit	S	S
Bacitracin	10 unit	R	R
Colistin	10 mcg	R	R
Oxytetracycline	30 mcg	S	S
Gentamicin	10 mcg	R	R

S : Susceptible

MS : Moderately susceptible

R : Resistant

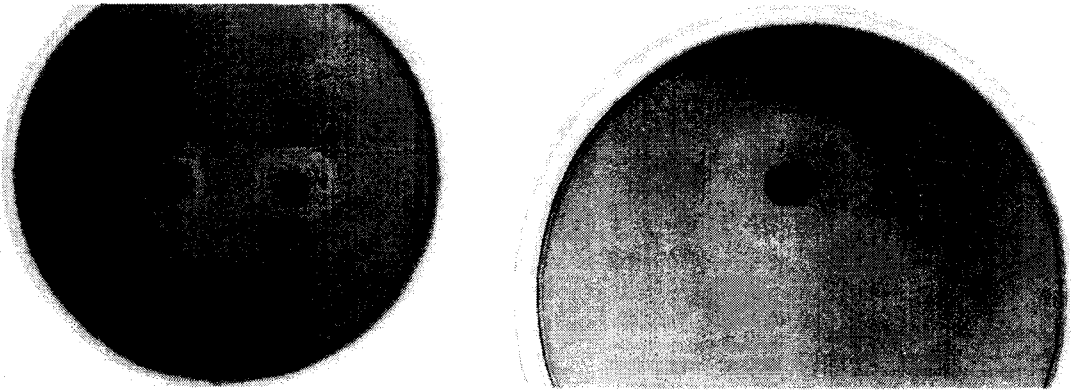
Lactococcus lactis 균주의 Lac A promoter에 의해 발현 분비되는 재조합 벡터 pSD2를 각각 구축하였다 <그림 3>.



<그림 3> Lactobacillus expression plasmids harboring the *C. thermocellum* cel A gene.

(4) 재조합 벡터의 *Lactobacillus* sp. 균주로의 형질전환

Electroporation 방법을 이용하여 먼저 재조합 Cellulase 발현벡터 pSD1, pSD2를 형질전환시켜 congo red 염색법을 통한 cellulase 활성을 보이는 형질전환체를 확인하였으며 <그림 4>, 이들 형질전환 plasmid DNA μg 당 효율은 10^3 CFU 정도로 낮게 나타났다.



<그림 4> Congo red test of *Lactobacillus* transformants indicating endoglucanase activity, A: *L. johnsonii*(pSD1), B: *L. gasseri*(pSD1), C: *L. gasseri*(pSD2).

(5) 형질전환된 *Lactobacillus* 균주의 정량적 cellulase activity 조사

형질전환된 *Lactobacillus* sp. 균주의 효소역가는 아래 Table 8에 제시되어 있으며 공통적으로 생산된 cellulase 효소의 대부분을 세포외로 분비하였다.

<표 8> The activity of endoglucanase in transformants of *L. gasseri* and *L. johnsonii*

Strain (Plasmid)	Secretion rate(%)	Endoglucanase activity(U/ml)		
		Total	Supernatent	Whole cell extract
<i>L. gasseri</i> (pSD1)	98.8	0.731	0.722	0.009
<i>L. gasseri</i> (pSD2)	87.7	0.464	0.407	0.057
<i>L. johnsonii</i> (pSD1)	95.7	0.793	0.759	0.034

2. 유산균에서 외래단백질 발현 vector system 개발과 cellulase 및 phytase의 발현

1. 연구 목적

현재까지 외래 단백질을 생산하는 유산균을 개발하기 위해 전 세계의 연구자들이 많은 노력을 기울여 왔음에도 불구하고 아직까지 효과적인 발현 vector system은 많이 보고된 것이 없는 실정이다. 최근에 gram positive bacteria의 cell wall의 구성물질인 S-layer protein의 연구가 진행되면서 이 protein 유전자의 promoter와 signal sequence를 이용하여 외래단백질을 발현시키는 연구가 진행중에 있다. 따라서 본 연구에서는 S-layer protein의 promoter와 signal sequence를 이용하여 외래 단백질을 발현 할 수 있는 유산균 발현 vector를 개발하고 cellulase와 phytase를 발현하는 새로운 유산균 제제를 개발하는데 있다.

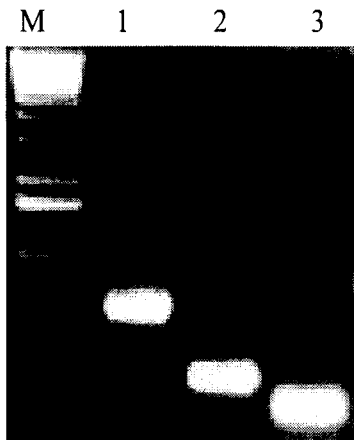
2. 주요 연구 내용

1) Cellulase와 phytase 유전자의 cloning

우리나라 재래 산양의 반추 위액으로부터 섬유소 분해 효소를 분비하는 미생물인 *Actinomyces sp4*.를 분리하고 이 균주의 genomic library를 이용하여 endoglucanase 유전자를 cloning하였다. 또한 여러 가지 효모균주로부터 phytase를 생산하는 균주인 *Hansenula polymorpha*를 선발하고 conserved sequence를 바탕으로 한 primer를 제작하고 PCR 반응을 통해 phytase 유전자를 cloning 하였다.

2) S-layer protein의 signal sequence의 cloning

S-layer protein signal sequence를 gene bank에 등록되어 있는 *Lactobacillus brevis* 균주의 S-layer protein signal sequence를 바탕으로 조금씩 서로 다른 3가지부위를 cloning하여 primer를 제작하고 PCR amplification방법으로 이 signal sequence들을 증폭하였다 <그림 5>.

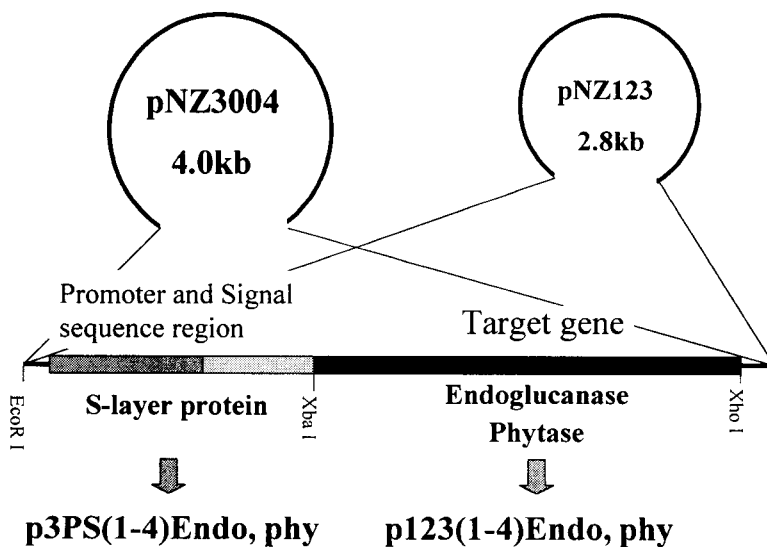


M : 1kb marker
 1 : 1-2 signal seq. promoter
 2 : 1-3 signal seq. promoter
 3 : 1-4 signal seq. promoter

〈그림 5〉 S-layer protein signal sequence와 promoter.
 ps1-2 : 640bp
 ps1-3 : 280bp
 ps1-4 : 160bp

3) 유산균 발현 vector의 구축

E. coli, Lactobacillus shuttle vector인 pNZ123, pNZ3004에 위의 S-layer protein의 promoter와 signal sequence를 장착하고 cellulase와 phytase gene을 삽입시켜 유산균 발현 vector를 개발하였다 〈그림 6〉.



〈그림 6〉 S-layer protein의 promoter와 signal sequence를 장착한 유산균 발현 vector.

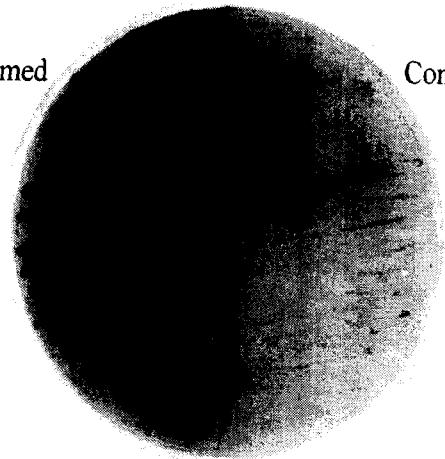
4) *E. coli* JM101 균주와 유산균에 형질전환

위의 구축된 vector를 *E. coli* JM101와 유산균인 *Lactobacillus gasseri*와 *L. reuteri* 균주에 각각 전기 천공법으로 형질전환을 실시하였다 <그림 7, 8>.



Cellulase가 형질전환된 *E. coli*
(Congo red test)

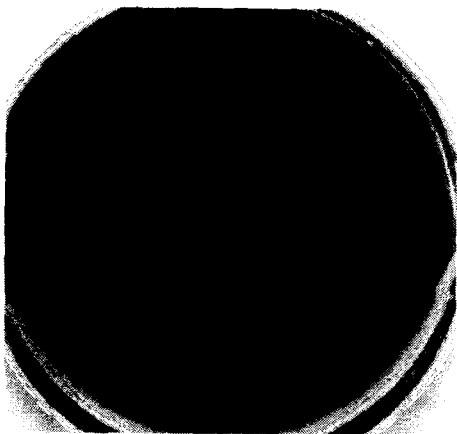
Transformed



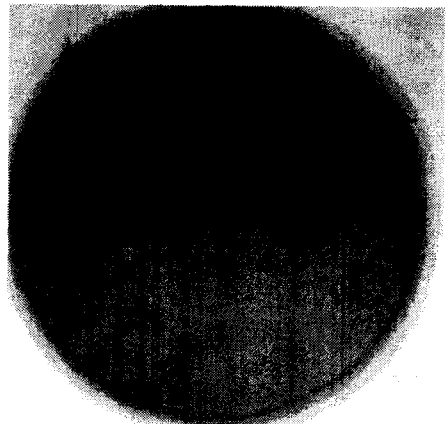
Control

Phytase가 형질전환된 *E. coli*
(PSS test)

<그림 7> Cellulase와 phytase가 각각 형질전환된 *E. coli* JM101



1. *E. coli* JM101 / p123(1-4)Endo -Supernatant
2. *L. reuteri* / p3PS(1-4)Endo
3. *L. reuteri* / p123(1-4)Endo
4. *L. gasseri* / p3PS(1-4)Endo

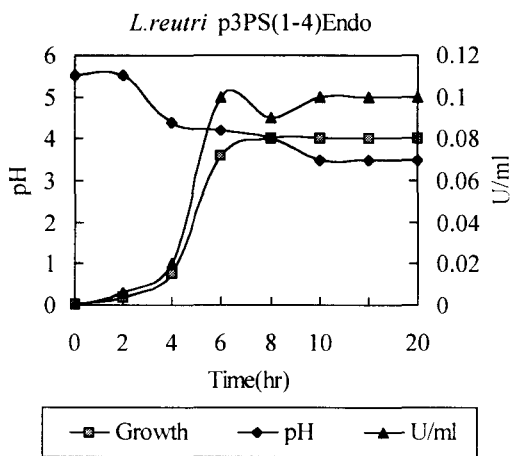


1. Control - *L. reuteri*
2. *E. coli* JM101 / p3PS(1-4)phy
3. *L. reuteri* / p3PS(1-4)phy

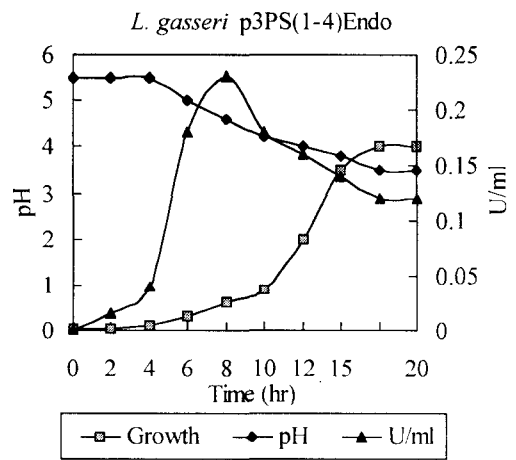
<그림 8> Cellulase와 phytase가 형질전환된 *Lactobacillus reuteri*, *L. gasseri*

5) 발현 vector별, 유산균 host별 발현량의 차이

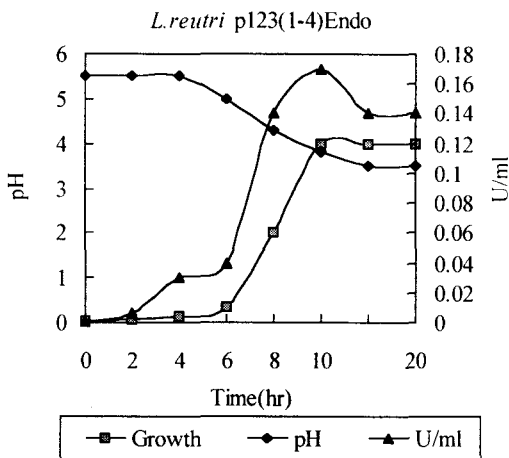
발현 벡터인 p123(1-4)Endo와 p3PS(1-4)Endo 간에 외래단백질의 발현 양상을 조사하기 위해 그리고 유산균 host별 발현 양상을 조사하기 위해 각각 형질전환된 유산균을 시간별로 키운 후 각각의 시간대 별 배지내 pH, growth rate, enzyme activity를 조사하였다. 이 실험의 결과에서 p3PS(1-4)Endo 보다는 p123(1-4)Endo에서 조금 더 높은 activity를 나타냈으며 *L. gasseri*보다는 *L. reutri*에서 약 2배이상 activity가 높았다. <그림 9>



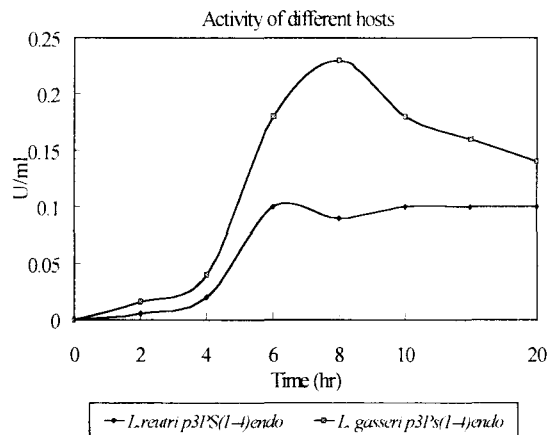
①



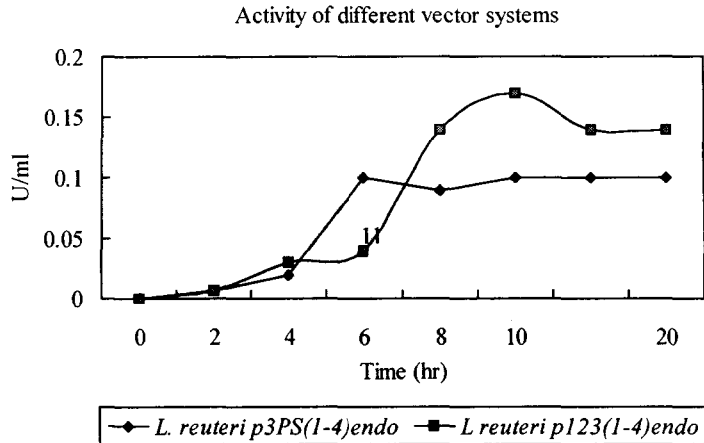
②



③



④



⑤

〈그림 9〉 유산균별, 발현 vector별 enzyme activity.

Ⅲ. 결 론

이상에서 살펴본 바와 같이 최근 가축 사료 첨가제로 사용되고 있는 enzymes, probiotics, antimicrobial peptides 등의 이용은 가축에 대하여 성장촉진 또는 치료의 목적으로 사용하는 항생물질이나 기타 항균제제가 투여되고 있는 현실에서 축산식품에 잔류나 내성균의 출현 등 여러 가지의 문제점을 줄일 수 있는 열쇠가 될 수 있을 것이다. 이러한 현실에서 장내에 서식하면서 유용한 효소제와 이를 생산할 수 있는 생균제는 그 가치가 더욱 크고 이러한 새로운 생균제제의 개발은 국내 사료산업 뿐만 아니라 외국과의 경쟁에서도 큰 의미를 갖는다. 또한 항생제 대체제로서 antimicrobial peptide나 immune regulators의 개발 및 essential oil 같은 천연 화합물의 개발도 사료 산업에서 앞으로 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다. 새로운 생균제나 화합물의 개발을 위해서는 생균제로 가치가 있는 host 균주의 선발도 중요하지만 더욱더 중요한 것은 우리나라의 고유한 유전자원을 바탕으로 한 각종 유용한 효소의 선발을 통한 유전자원의 확보도 앞으로의 중요한 과제라고 할 수 있을 것이다.

IV. 참고 문헌

1. Annemieke Ultee, Edwin P. W. Kets. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. Arch Microbiol. 17: 233-238.
2. Blumberger W. and H. Glatzel. 1963. Dtsch.z. verdau. Stoffwechselkr. 23, 97.
3. Boot, H. J., CPAM Kolen, F. J. Andreadaki, R. J. Leer, P. H. Pouwels, "The *Lactobacillus acidophilus* S-layer protein gene expression site comprises two consensus promoter sequence, one of which directs transcription of stable mRNA. J. Bacteriol. 178 : 5388-5394.
4. Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius. 1997. The capsaicin receptor: a heat activated ion channel in the pain pathway. Nature 389, 816-824.
5. Cho, J. S., D. K. Chung and Y. J. Choi. 2000. Expression of Colstridium thermocellum endoglucanase gene in *Lac. gasseri* and *Lact. johnsonii* and characterization of probiotic Lactobacilli, Current Microbiology, 40:257-263.
6. Cho, K. K., S. C. Kim, J. H. Woo, J. D. Bok and Y. J. Choi. 2000. Molecular cloning and expression of a novel family A endoglucanase gene from *Fibrobacter succinogenes* S85 in *Escherichia coli*. Enzyme and Microbiol Technology, 27:475-481.
7. Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev.12(4):564-82.
8. Helander, I. M., H- L. Alakomi, K. Latva-Kala, T. Mattila-Sandholm, I. Pol, E. J. Smid, L. G. M. Gorris and von A. Wright. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gramnegative bacteria. J. Agric. Food Chem. 46(9), 3590-3595.
9. McKay, L. L. and K. A. Baldwin. "Applications for biotechnology : present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS. Microbiol. Rev. 87. 3-14.
10. Messner, P. and V. B. Sleytr. 1992. "Crystalline bacterial cell-surface layers" Adv. microb. Physiol. 33 : 213-275.
11. Min, H. K., Y. J. Choi, J. K. Ha, K. K. Cho, Y. M. Kwon, Y. H. Chang and S. S. Lee. 1994. Isolation and Identification of Anaerobic Rumen Bacterium, *Actinomyces* sp. 40 and Enzymatic Properties of β -1,4-Endo-glucanase. Asian- Australasian Journal of

- Animal Sciences 7(3):373-382.
12. Min, H. K., Y. J. Choi, K. K. Cho, J. K. Ha and J. H. Woo. 1994. Cloning of the endoglucanase gene from *Actinomyces* sp. 40 in *Escherichia coli* and some properties of the gene products. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 4(2):102-107.
 13. Newbold C. J. and F. M. McIntosh. 1999. Effects of the essential oil in ammonia production by rumen fluid *in vitro*. Aberdeen, UK, 63.
 14. Hart, P. H. and C. Brand. 2000. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*(tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflamm.res.* 49,619-626.
 15. Santos, F. A. and V. S. Rao. 1997. Mast cell involvement in the rat paw oed response to 1,8-cineole, the main constituent of eucalyptus and rosemary oils. *Eur J Pharmacol*. 23;331(2-3):253-8.
 16. Woo, J. H., K. K. Cho, H. K. Min and Y. J. Choi. 1995. Cloning of gene for β -glucosidase from *Ruminococcus albus* 7. *Molecules and Cells*. 5 : 448~451.
 17. Yoon, S. J., Y. J. Choi, H. K. Min, K. K. Cho, J. W. Kim, S. C. Lee and Y. H. Jung. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme and Microbial Technology* 18:449-454.
 18. You, K. M., K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang and H. P. Kim. 1998. Vitexicarpin, a flavonoid from the fruits of *vitex rotundifolia*, inhibits mouse lymphocyte proliferation and growth of cell lines *in vitro*. *Planta Med* Aug;64(6):546-50.
 19. Zhiyun Meng, Yingjun Zhou, Jincal Lu, Kazunori Sugahara, Suixu Xu, Hiroyuki Kodama. 2001. Effect of five flavonoid compounds isolated from *Quercus dentata* Thunb on superoxide generation in human neutrophils and phosphorylation of neutrophil proteins. *Clinica Chimica Acta* 306, 97-102

V. 발표된 논문 및 특허 현황

1) 발표된 논문

1. Cho, J. S., D. K. Chung and Y. J. Choi. 2000. Expression of *Colstridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lac. gasserii* and *Lact. johnsonii* and characterization of probiotic

- Lactobacilli, Current Microbiology, 40:257-263.
2. Cho, K. K., S. C. Kim, J. H. Woo, J. D. Bok and Y. J. Choi. 2000. Molecular cloning and expression of a novel family A endoglucanase gene from Fibrobacter succinogenes S85 in Escherichia coli. Enzyme and Microbiol Technology, 27:475-481.
 3. Min, H. K., Y. J. Choi, J. K. Ha, K. K. Cho, Y. M. Kwon, Y. H. Chang and S. S. Lee. 1994. Isolation and Identification of Anaerobic Rumen Bacterium, Actinomyces sp. 40 and Enzymatic Properties of β -1,4-Endo-glucanase. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 7(3):373-382.
 4. Min, H. K., Y. J. Choi, K. K. Cho, J. K. Ha and J. H. Woo. 1994. Cloning of the endoglucanase gene from Actinomyces sp. 40 in Escherichia coli and some properties of the gene products. Journal of Microbiology and Biotechnology. 4(2):102-107.
 5. Woo, J. H., K. K. Cho, H. K. Min and Y. J. Choi. 1995. Cloning of gene for β -glucosidase from Ruminococcus albus 7. Molecules and Cells. 5 : 448~451
 6. Yoon, S. J., Y. J. Choi, H. K. Min, K. K. Cho, J. W. Kim, S. C. Lee and Y. H. Jung. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, Enterobacter sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. Enzyme and Microbial Technology 18:449-454.

2) 특허

- 국내특허 : 출원번호 - 제 94-39673호, 등록일 - 1994. 12. 30
(엔테로박터 sp. 4의 파이테이즈 유전자 및 파이테이즈유전자 발현 벡터)
- 국내특허 : 출원번호 - 제 94-22649, 등록일 - 1994. 9. 8.
(Ruminococcus albus의 β -glucanase 유전자 및 발현벡터)
- 국내특허 : 출원번호 : 96-27444, 등록일 : 1996. 7. 8.
(셀룰로스 분해능을 갖는 트리코더마 속 미생물)
- 국내특허 : 출원번호 : 97-47870, 등록일 : 1997. 9. 20.
(Fibrobacter succinogenes S85의 CMC-xylanase 유전자의 염기서열 및 그 유전자의 발현)
- 국내특허 : 출원번호 : 98-47373, 등록일 : 1998. 11. 12
(루미노코쿠스 알부스의 베타-글루코시다제 유전자를 함유한 발현벡터 및 그 형질전환체)

· 국내특허 : 출원번호 : 2000-4429, 등록일 : 2000. 1. 10

(Enterobacter sp4 유래 phytase 유전자를 함유하는 재조합 vector 및 이를 함유하는 형질전환체)