

Rat에서 *Paenibacillus polymyxa* JB115의 병원성 및 β -glucan 함유 배양산물에 대한 단회 경구독성시험

정희경^{1,3} · 강은희² · 창즐치양² · 홍주현¹ · 김상달³ · 박병권⁴ · 윤효인⁵ · 박승춘^{2,*}

¹대구바이오산업지원센터, ²경북대학교 수의과대학, ³영남대학교, ⁴전진바이오팜, ⁵충남대학교 수의과대학
(게재승인: 2007년 10월 5일)

Pathogenicity of *Paenibacillus polymyxa* JB115 and single-dose toxicity of its culture broth containing β -glucan in rats

Hee-Kyoung Jung^{1,3}, Eun-Hee Kang², Zhi-Qiang Chang², Joo-Heon Hong¹, Sang-Dal Kim³,
Byung-Kwon Park⁴, Hyo-In Yun⁵, Seung-Chun Park^{2,*}

¹Bio Industry Center, Daegu New Technology Agency, Daegu 704-801, Korea

²College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

³College of Natural Resources, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

⁴Jeonjinbio, Daegu, 704-948, Korea

⁵College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Accepted: October 5, 2007)

Abstract : This study was conducted to investigate the pathogenicity of *Paenibacillus* (*P.*) *polymyxa* JB115 and single oral dose toxicity of culture broth containing β -glucan (CBG-JB115) produced from *P. polymyxa* JB115 in Sprague-Dawley rats of both sexes for 14 days. After oral administration of *P. polymyxa* JB115 into rats, we could not find any abnormal clinical signs and variation in the body weight and temperature as compared with control group. We also investigated the acute toxicity of CBG-JB115. As the results, there were no clinical signs and variance in the body weight and temperature related with CBG-JB115 in comparison with the control group. From the this experiment, we could not find out any significant pathogenicity and toxicity induced by *P. polymyxa* JB115 or by CBG-JB115. Results of this study demonstrated that consumption of *P. polymyxa* JB115 and its culture broth containing β -glucan was not associated with any obvious signs of toxicity in Sprague-Dawley rats even following consumption of large quantities.

Key words : β -glucan, *Paenibacillus polymyxa*, pathogenicity, single-dose toxicity

서 론

사료첨가제는 동물약품의 한 품목으로서 동물의 영양 및 발육을 촉진하기 위하여 배합사료에 첨가하여 부족한 결핍물을 보충하는 것이다 [19]. 사료첨가제에는 비타민, 프로바이오틱, 항생물질, 호르몬, 항산화제, 항곰팡이제, 효소제, 아미노산 그리고 미량 광물질 등이 오래전부터 사용되어 왔다. 우리나라에서는 축산경영의 형

태가 소규모 사육에서 대규모의 선진국형 축산형태로 전환됨에 따라 사료첨가제의 사용량은 꾸준히 증가하는 추세를 보이고 있다.

사료첨가제 중 항생물질은 1950년대부터 동물 질병의 치료와 생산성 증대를 위한 성장촉진제로서 사료 또는 음수에 첨가하여 사용하여 왔다 [25]. 국내에서도 조기 비육을 위하여 소·돼지에 항생제를 구분별하게 사용하였으며, 이에 따라 항생제 잔류 문제 [12]와 가축 병원

*Corresponding author: Seung-Chun Park
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
[Tel: +82-53-950-5964, Fax: +82-53-950-5964, E-mail: parksch@knu.ac.kr]

균의 항생제 내성에 대한 문제가 야기되었다 [8, 16]. 또한 사료 첨가용 항생제 사용량은 2001년과 2002년에 각각 767톤과 742톤으로 2001년에 비해 2002년에 그 사용량이 다소 감소하였으나 전체 항생제 사용량의 50% 이상을 점유하고 있어 [6] 국내에서는 식용동물의 항생제 사용량을 줄이기 위해 2005년 5월에 농림부가 28종의 항생제를 식용동물사료에 첨가하는 것을 금지시켰다 [1].

따라서 대체 항생제의 개발을 위한 연구가 활발하게 진행 되고 있으며, 현재까지 국내에서 개발된 항생제 대체제로는 캡슐화된 *Lactobacillus fermentum* [13] 및 효모, 곰팡이 그리고 세균으로 구성된 복합 생균제 [11] 등이 있으며, 이들은 장내에서 유해 세균의 정착을 억제하고 장내 균총을 안정화하는 데 목적을 두었다. 또한 닭의 살모넬라감염증을 예방을 위한 한방사료 첨가제나 양돈의 대장균성 설사증을 유발시키는 대장균 항원을 이용한 난황항체도 보고되고 있다 [9, 10]. 그러나 최근에는 면역체계를 활성화시켜 항병력을 키워 항생물질의 사용을 절감하고 그 대체 효과를 얻으려는 연구를 많이 하고 있다.

면역 증강을 위한 사료 첨가용 소재로 현재 가장 각광을 받고 있는 것중 하나가 β -glucan(Fig. 1)이다. 동물에서 β -glucan의 사용 예를 보면, 한국산 폐기에 β -glucan을 투여시 *Edwardsiella ictaluri*와 *Aeromonas hydrophila* 감염에 대한 저항성이 증가되었으며 또한 β -glucan에 의한 면역증강 효과가 보고되어있다 [21]. 그러나 β -glucan을 사료첨가제로 이용하기에는 추출공정에 대한 비용이 높아 국내에서 세포외로 β -glucan을 분비할 수 있는 *Agrobacterium* sp.로부터 대량생산을 시도하기도 하였으나 [14, 23] 산업동물에서 사용한 보고는 미진한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 어류를 포함한 식용동물에 이용할 수 있는 면역 증강용 사료첨가제를 개발하고자 세포 외로 β -glucan을 생산할 수 있는 새로운 *Paenibacillus polymyxa* JB115 및 이 균주로부터 생산되는 β -glucan이 포함된 배양물(CBG-JB115)에 대하여 병원성 및 단회경구독성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사육조건

본 실험에서는 5주령의 Sprague-Dawley(SD) rat를 사용하였으며, 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 13~18회/시간, 조명시간 12시간 (오전 7시~오후 7시), 조도 150~300 Lux로 설정하여 사육하였다. 입수 후 1주간 순화를 거친 뒤 일반상태를 관찰하여 건강하다고 판정되며, 평균체중에 가까운 개체로 수컷의 경우에는 $178.2 \pm 4.7 \text{ g}$, 암컷의 경우에는 $141 \pm 5.9 \text{ g}$ 의 것을 선별하여 시험군에 따라 스테인레스제 철망사육 상자 ($220 \text{ W} \times 410 \text{ L} \times 200 \text{ H mm}$)에 각각 5마리씩 배치하여 실험하였으며, 사료는 실험동물용 고형사료(제일사료, 한국)를 자유 섭취시켰으며, 물은 일차증류수를 자유 음수시켰다. 본 시험은 대구바이오산업센터의 동물실험규정 (DBIC-FVM-P-200608880000)에 의거하여 실시하였다.

Paenibacillus polymyxa JB115 미생물의 배양 및 CBG-JB115의 준비

P. polymyxa JB115는 대구바이오산업지원센터에서 분리한 β -glucan 생성균으로 nutrient agar 배지에 계대 배양하면서 본 실험에 이용하였다. 시험을 위한 균체 배양은 nutrient broth에 백균이를 이용하여 *P. polymyxa* JB115를 접종한 후 30°C 에서 180 rpm으로 1일간 진탕 배양하여 전 배양액을 준비하고 전 배양액 1 ml를 탄소원으로 sucrose 2%를 첨가한 mineral salt medium(MSM, KH_2PO_4 1.74; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.015; K_2HPO_4 0.49; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01; $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 3.7; Citrate 0.21; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25; NH_4Cl 1.5; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.024, g/l)에 접종하여 30°C 에서 3일간 180 rpm으로 진탕배양하였다. 균체 회수는 배양액을 멸균된 원심분리관을 이용하여 5,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 균체를 회수하고 0.85% NaCl로 2회 washing한 후 nutrient agar 배지에 희석 도말하여 생균수를 측정 한 후 10^{11} cfu(colony forming units)/ml이 되도록 0.85% NaCl를 이용하여 현탁시킨 후 적절히 희석하여 균체의 독성검사 실험에 이

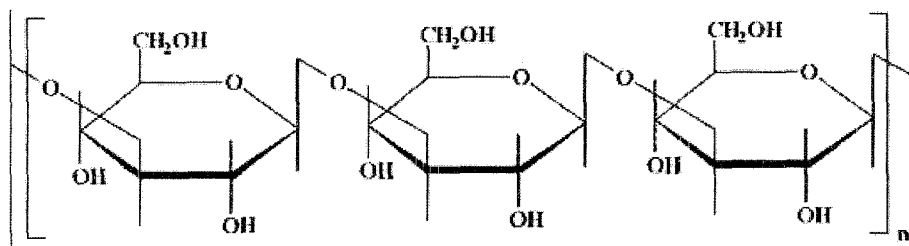


Fig. 1. Structures of (1→3)- β -D-glucan.

Table 2. Clinical findings of males and females after exposure to *P. polymyxa* JB115 during 14 days

Sex	Groups	Dose (cfu/ml)	Clinical signs	Hours after treatment				Days after treatment				
				1	2	5	6	1	3	5	7	14
Male	Control	0.85% NaCl	NAD ^a	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	High	10 ¹¹	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	Middle	10 ⁹	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	Low	10 ⁷	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Female	Control	0.85% NaCl	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	High	10 ¹¹	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	Middle	10 ⁹	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	Low	10 ⁷	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

^aNAD: No abnormality detected.

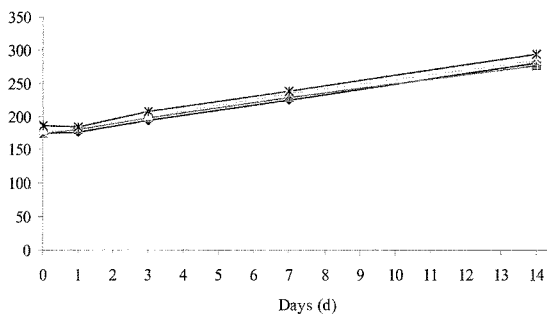


Fig. 2. Body weight changes in male rats administered orally with *P. polymyxa* JB115. -◆-, Control; -■-, 10¹¹ cfu/ml; -▲-, 10⁹ cfu/ml; -x-, 10⁷ cfu/ml.

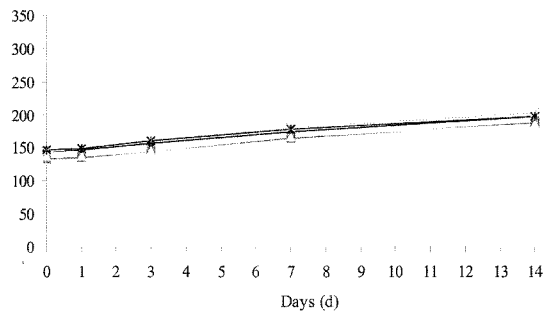


Fig. 3. Body weight changes in female rats administered orally with *P. polymyxa* JB115. -◆-, Control; -■-, 10¹¹ cfu/ml; -▲-, 10⁹ cfu/ml; -x-, 10⁷ cfu/ml.

Paenibacillus polymyxa JB115 배양액(CBG-JB115)의 단회경구독성시험

β-glucan이 함유된 *P. polymyxa* JB115의 배양액을 동결건조한 분말인 CBG-JB115가 저독성임을 고려하여 단회경구독성 투여 한계용량인 2,000 mg/kg [26]의 용량을 사용한 예비실험에서 어떠한 독성도 발견 되지 않았다. 따라서 기술적으로 투여할 수 있는 최고 용량인

5,000 mg/kg을 최고용량으로 하여 625 mg/kg, 1,250 mg/kg, 2,500 mg/kg 및 5,000 mg/kg의 농도로 경구투여한 후 14일 동안 관찰한 결과, 배양액에 의한 사망은 나타나지 않았으며, 유의할 만한 증상도 관찰되지 않았다. 따라서 *P. polymyxa* JB115 배양액의 LD₅₀은 암수 모두에서 5,000 mg/kg 이상으로 산출되었다(Table 3 & 4).

시험기간 동안 각 시험군의 사료섭취량과 음수 섭취량은 대조군과 비교시 유의한 차이가 인정될만한 증가 또는 감소가 관찰되지 않았으며, 경구 투여한 배양액의 농도에 따라라도 암수 모두 사료 섭취량과 음수섭취량의 이상은 없었다(Table 5 & 6). 체온의 변화도 대조군과 시험군에서 유의할 만한 이상체온을 나타내지 않았고 시험군들 사이에서도 유의할만한 이상체온은 나타나지 않았다(Table 7).

면역증강용 소재인 β-glucan이 포함된 동결건조한 배양상등액 5,000 mg/kg을 경구투여한 시험군과 대조군을 비교시 이상증상이라고 할 만한 체중의 변화는 없었다(Fig. 4 & 5). 시험종료 후에 부검시 육안적으로 특별히 관심을 나타낼 만한 소견은 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 *P. polymyxa*가 β-glucan 고생산균주임을 처음으로 밝혔으며, 이 균주를 *P. polymyxa* JB115로 명명하였다. 또한 이 균주로부터 생산되는 β-glucan(Fig. 1)을 산업화시키기 위하여 *P. polymyxa* JB115의 병원성유무 및 이 균주로부터 생산되는 배양물(CBG-JB115)에 대하여 단회경구독성을 평가하였다.

*P. polymyxa*는 병원성이 없으며 *Lactobacillus acidophilus*와 같은 급에 속하는 안전한 미생물에 속한다. 또한 β-glucan은 미국 FDA의 GRAS(General Recognized As Safe)로 승인 받은 물질로 일반적으로 효모, 버섯 등의 세포벽 및 보리, 귀리와 같은 곡물의 식이 섬유로부터 얻을

Table 3. Mortality and LD₅₀ of males and females after exposure to *P. polymyxa* JB115 during 14 days

Sex	Groups (mg/kg)	Days after treatment						Final Mortality	LD ₅₀ (mg/kg)
		0	1	3	5	7	14		
Male	Control ^a	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	> 5,000
	625	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
	1,250	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
	2,500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
	5,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
Female	Control	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	> 5,000
	625	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
	1,250	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
	2,500	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	
	5,000	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5 (0%)	

^aControl: 0.85% NaCl.**Table 4.** Clinical findings of males and females after exposure to *P. polymyxa* JB115 during 14 days

Sex	Groups (mg/kg)	Clinical signs	Hours after treatment				Days after treatment						
			1	2	5	6	1	3	5	7	14		
Male	Control ^a	NAD ^b	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	625	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1,250	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	2,500	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	5,000	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Female	Control	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	625	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1,250	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	2,500	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	5,000	NAD	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

^aControl: 0.85% NaCl.^bNAD: No abnormality detected.**Table 5.** Mean daily feed intake in rats orally treated with CBG-JB115

Groups (mg/kg)	Days after treatment														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	Control	200	110	120	110	145	140	140	130	100	130	120	140	130	120
	625	200	120	110	80	140	120	120	120	80	150	100	150	140	130
	1,250	200	150	130	150	175	145	145	150	110	140	115	120	150	140
	2,500	290	180	160	160	205	165	165	180	120	190	170	200	180	180
	5,000	200	120	100	120	140	115	115	140	70	150	90	130	110	120
Female	Control	100	40	70	80	75	75	75	110	60	95	80	80	90	90
	625	130	80	60	60	80	75	75	80	70	100	60	80	80	105
	1,250	120	90	70	70	80	85	85	140	60	100	65	110	80	90
	2,500	120	60	70	70	85	75	75	80	80	90	40	80	70	100
	5,000	120	60	80	80	95	78	78	120	80	115	60	100	100	100

수 있다 [20]. 그러나 식물 혹은 버섯으로부터의 추출은 그 양이 적고 비용이 많이 들어 대량으로 소비하는 동물사료첨가제로는 사용이 어려운 단점이 있다. 그러므

로 동물의 사료첨가제로는 효모의 β -glucan이 현재 이용 중에 있으나 균체로부터 얻어지는 효모는 생산의 한계가 있으므로 세포 외로 β -glucan을 생산하는 균주를 선

Table 6. Mean daily water intake in rats orally treated with CBG-JB115

Groups (mg/kg)	Days after treatment														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	control	80	62	69	64	64	66	65	66	59	71	60	50	71	100
	625	73	70	66	63	61	64	65	75	48	74	54	57	61	100
	1,250	78	74	66	68	67	65	66	64	70	64	58	48	65	95
	2,500	118	96	86	86	82	80	81	90	72	79	68	73	74	101
	5,000	81	73	63	63	63	63	63	67	52	65	49	48	66	94
Female	control	127	110	122	120	114	112	113	117	118	108	105	106	115	125
	625	144	122	111	116	111	111	110	110	110	118	108	107	118	127
	1250	145	101	117	121	111	116	115	125	110	116	101	118	118	129
	2,500	130	108	115	117	114	110	112	148	107	109	95	102	108	128
	5,000	133	114	112	116	120	112	120	125	106	118	101	110	115	131

Table 7. Body temperature changes in male and female rats orally treated with CBG-JB115

Groups(mg/kg)	Pre-treatment	day 1	day 3	day 7	day 14	
Male	Control ^a	35.6 ± 0.8	35.0 ± 0.3	36.2 ± 0.9	36.3 ± 0.5	35.9 ± 0.3
	625	36.2 ± 0.6	35.4 ± 0.5	35.2 ± 0.2	36.2 ± 0.4	36.9 ± 0.5
	1,250	36.4 ± 0.4	35.6 ± 0.1	36.3 ± 0.8	36.1 ± 0.2	36.3 ± 0.8
	2,500	36.4 ± 0.3	35.5 ± 0.4	36.5 ± 0.5	36.3 ± 0.4	35.8 ± 0.6
	5,000	36.8 ± 0.4	36.1 ± 0.6	36.0 ± 0.3	36.3 ± 0.5	36.0 ± 0.4
Female	Control	36.1 ± 0.6	36.6 ± 0.5	36.9 ± 0.8	36.8 ± 0.3	36.8 ± 0.6
	625	36.4 ± 0.5	36.0 ± 0.9	36.4 ± 0.8	37 ± 0.3	36.7 ± 0.6
	1,250	35.2 ± 0.7	36.7 ± 0.4	36.5 ± 0.2	37.1 ± 0.5	37.0 ± 0.5
	2,500	35.2 ± 1.5	36.7 ± 0.1	36.5 ± 0.3	37.1 ± 0.6	37.0 ± 0.4
	5,000	35.9 ± 0.7	36.5 ± 0.6	36.4 ± 0.2	36.2 ± 0.2	36.6 ± 0.3

^aControl: 0.85% NaCl.

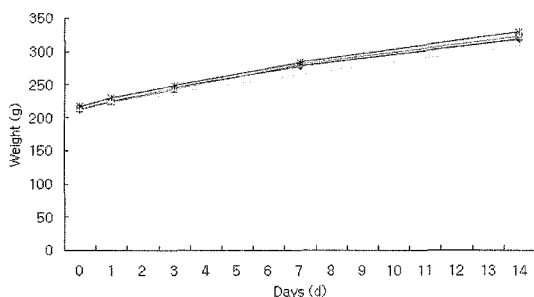


Fig. 4. Body weight changes in male rats administered orally with CBG-JB115. -◆-, Control; -■-, 625 mg/kg; -▲-, 1,250 mg/kg; -x-, 2,500 mg/kg; -*- , 5,000 mg/kg.

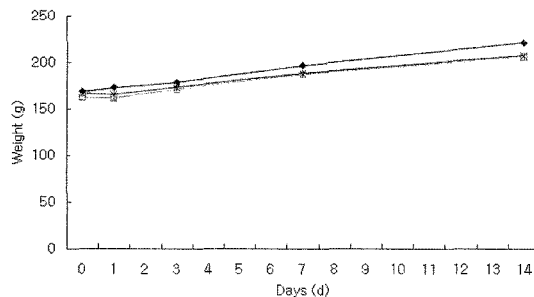


Fig. 5. Body weight changes in female rats administered orally with CBG-JB115. -◆-, Control; -■-, 625 mg/kg; -▲-, 1,250 mg/kg; -x-, 2,500 mg/kg; -*- , 5,000 mg/kg.

별하였다. 균체를 이용한 사료첨가용 생균제로 상품화하기 위해서는 균주에 의한 안전성은 필수적이다. *P. polymyxa* JB115는 경북지역 토양으로부터 분리되었으므로 유해성에 대한 차후 연구를 위한 기초적 정보를 얻고자 *P. polymyxa* JB115의 균주 자체에 대한 병원성시험을 실시하였다.

P. polymyxa JB115를 항생제 대체를 위한 면역증강용

사료첨가제로 이용 가능성을 타진하기 위하여 우선 *P. polymyxa* JB115의 균주 자체에 대한 병원성시험을 실시하였다. 식용동물에 사용하는 생균제의 통상적인 투여용량은 10^7 cfu/ml가 되어야 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 병원성세균의 경우 병원성을 보여주어 임상적으로 나타나는 균수 역시 10^7 cfu/ml 이상인 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 사용용량을 저용량

으로 설정하였다. 그 결과 경구 투여시 10^{11} cfu/ml인 고용량군을 포함한 모든 암수 시험군에서 시험기간 동안 *P. polymyxa* JB115에 기인한 사망은 관찰되지 않았다 (Table 1). 또한 *P. polymyxa* JB 115에 의한 독성증상과 특이할 만한 임상증상도 나타나지 않았다 (Table 2). 이상의 결과로 미루어 볼 때 β -glucan 생산성 *P. polymyxa* JB115는 암 수 모두에서 LD_{50} 이 10^{11} cfu/ml 이상으로 추정된다 (Table 1 & 2).

10^{11} cfu/ml, 10^9 cfu/ml 그리고 10^7 cfu/ml의 *P. polymyxa* JB115를 실험동물에 각각 경구투여한 후 투여일로부터 시험기간인 14일 동안 체중 변화를 관찰한 결과, 모든 시험군의 암수 동물에서 *P. polymyxa* JB115의 투여에 의해 정상적으로 체중이 증가되었다. 또한 대조군과 비교 시 유의성 있는 체중 변화는 관찰되지 않았으며, *P. polymyxa* JB115의 균체 농도에 따른 체중의 차이 또한 나타나지 않았다 (Fig. 2 & 3). 또한 생존동물을 부검한 결과 투여군과 대조군 모두 내부 장기의 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

Paenibacillus polymyxa JB115 배양액(CBG-JB115)을 산업적으로 이용하기 위하여 단회경구독성시험을 실시하였다. 예비시험에서 시험물질인 CBG-JB115에 포함된 순수 β -glucan에 대한 단회경구독성 2,000 mg/kg을 암컷과 수컷의 랫드에 경구투여시 치사한 동물을 관찰할 수가 없었다. 따라서 분리정제된 β -glucan의 LD_{50} 은 2,000 mg/kg 이상으로 생각되었다. 하지만 동물사료첨가제로 사용시 분리 정제된 β -glucan을 이용하는 것은 분리 공정에 있어서 많은 생산비가 요구된다. 따라서 분리 정제된 β -glucan보다는 배양산물을 동결건조 하여 이용하는 것이 산업화 측면에서는 유리하다. 또한 He et al. [7]은 *P. polymyxa*는 새로운 bacteriocin의 하나인 lantibiotics을 생산하고 펩타이드 항균제인 polymixin E1을 생산하는 균주로 알려져 있어 β -glucan을 정제하여 이용하는 것보다 배양산물을 이용하는 것이 매우 유용할 것으로 생각되었다.

β -glucan이 함유된 *P. polymyxa* JB115의 배양액을 동결건조한 분말인 CBG-JB115가 저독성임을 고려하여 단회경구독성 투여 한계용량인 2,000 mg/kg의 용량을 사용한 예비시험에서 어떠한 독성도 발견 되지 않았다. 따라서 식품의약품안전청의 의약품 독성기준(1999)에 의하면 치사량을 구하기 어려운 경우에는 기술적으로 투여하는 최고용량을 상한선으로 하는 것을 권장하고 있다. 따라서 본 시험에서는 기술적으로 투여할 수 있는 최고 용량인 5,000 mg/kg을 최고용량으로 하여 625 mg/kg, 1,250 mg/kg, 2,500 mg/kg 및 5,000 mg/kg의 농도로 각각 경구투여하여 실험동물을 14일 동안 관찰한 결과, 배양액에 의한 사망은 나타나지 않았으며, 유의할 만한

증상도 관찰되지 않았다. 따라서 상기 결과로 β -glucan을 함유하고 있는 *P. polymyxa* JB115 배양액의 LD_{50} 은 암수 모두에서 5,000 mg/kg 이상으로 산출되었다 (Table 3과 4).

시험기간 동안 각 시험군의 사료섭취량과 음수 섭취량은 대조군과 비교시 유의한 차이가 인정될만한 증가 또는 감소가 관찰되지 않았으며, 경구 투여한 배양액의 농도에 따라서도 암수 모두 사료 섭취량과 음수섭취량의 이상은 없었다 (Table 5 & 6). 체온의 변화도 대조군과 시험군에서 유의할 만한 이상체온을 나타내지 않았고 시험군들 사이에서도 유의할만한 한 이상체온은 나타나지 않았다 (Table 7). 통상적으로 발열시험은 발열인자에 민감한 토끼를 대상으로 이루어진다. 그러나 본 실험에서는 세균과 세균의 대사산물을 이용한 실험이며 염증과 면역에 관련된 시험으로 급성독성시험시 동시에 발열인자를 고려하고자 체온 변화를 측정하였다.

면역증강용 소재인 β -glucan이 포함된 동결건조한 배양상등액 5,000 mg/kg을 경구투여한 시험군에서도 대조군과 비교시 이상증상이라고 할 만한 체중의 변화는 없었다 (Fig. 4 & 5). 또한 배양상등액의 투여 농도나 암컷과 수컷의 시험군에 따라서 유의할 만한 체중변화는 관찰되지 않았으며, 배양상등액을 1회 강제 경구투여 후 암컷과 수컷의 시험군을 부검시에 육안적으로 특별히 관심을 나타낼 만한 소견은 관찰되지 않았다. β -glucan은 아주 미량인 2 mg/kg으로도 면역증강을 시킬 수 있다고 보고되어 있다 [21]. 따라서 *P. polymyxa* JB115가 면역증강을 일으킬 수 있는 적정농도 이상의 β -glucan을 생산할 경우 배양 상등액을 제형화하여 돼지에서 사료 첨가제로 저렴한 가격으로 공급이 가능할 것으로 생각된다. 부가적으로 세균성 exopolysaccharide는 van der Waals' forces 및 electrostatic attraction 등 다양한 기전에 의해 금속이온과 결합하는 것으로 알려져 있다 [5, 22]. 특히 돼지에서 적절한 농도의 구리의 공급은 사료효율을 높이는 것으로 보고되고 있다 [4]. 따라서 향후 연구는 *P. polymyxa* JB115가 생산한 exopolysaccharide인 β -glucan에 구리 이온을 결합하여 제형화한 후 돼지에서 사료 첨가제로서 개발을 위하여 면역시험과 사료 효율 개선시험을 실시할 예정이다.

결 론

이 연구는 *P. polymyxa* JB115가 생산하는 β -glucan을 산업화시키기 위하여 생산 균주에 대한 병원성의 유무와 이 균주로부터 생산되는 β -glucan 함유 배양물(CBG-JB115)에 대하여 단회경구독성을 실시하였다. 그 결과 SD 랫트에서 *P. polymyxa* JB115에 대한 균주 자체에 대

한 병원성이 없음을 확인하였으며, 또한 β -glucan을 함유하고 있는 *P. polymyxa* JB115 배양액에 대한 반수치사량(LD₅₀)이 투여받은 암·수 모두에서 5,000 mg/kg 이상으로 산출되어 사료 첨가제 개발을 위한 안전성에 관한 기초자료를 확보하였다.

감사의 글

본 연구는 2007년도 산업자원부 지역산업기술개발사업(과제번호:70000464)의 지원과 창즐치양은 2007년도 BK21 사업에 의하여 지원으로 수행되었으며 감사드립니다.

참고문헌

1. **농림부 축산국.** 항생제 등 항균물질 사용절감 대책. 2005.
2. **식품의약품안전청.** 의약품등의 독성시험기준, 식품의약품안전청고시 제 1999-61호, 식품의약품안전청, 서울, 1999.
3. **Bae KH, Ko TG, Kim JH, Cho WT, Han YK, Han IK.** Use of metabolically active substances to substitute for antibiotics in finishing pigs. *Korean J Anim Sci* 1999, **41**, 23-30.
4. **Edmonds MA, Izquierdo OA, Baker DH.** Feed additive studies with newly weaned pigs; Efficacy of supplemental copper, antibiotics and organic acids. *J Anim Sci* 1985, **60**, 462-469.
5. **Gutnick DL, Bach H.** Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals: new products and novel formulations. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, **54**, 451-460.
6. **Ha JI, Hong KS, Song SW, Jung SC, Min YS, Shin HC, Lee GO, Lim KJ, Park JM.** Survey of antimicrobial agents used in livestock and fishes. *Kor J Vet Publ Hlth* 2003, **27**, 205-217.
7. **He Z, Kisla D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB, Yousef AE.** Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**, 168-178.
8. **Hur J, Kim JM, Kwon NH, Park KT, Lim JY, Jung WK, Hong SK, Park YH.** Antimicrobial resistance patterns of *Listeria* species and *Staphylococcus aureus* isolated from poultry carcasses in Korea. *Kor J Vet Res* 2004, **44**, 217-224.
9. **Hong JK, Kim IH, Kwon OS, Lee SH, Kim JW.** Effects of egg yolk antibodies to replace antibiotic in segregated early-weaned pigs. *J Anim Sci & Technol* 2001, **43**, 177-184.
10. **Kang HJ, Kim YH, Lee HJ, Kim JS, Kim CS, Kim TG, Kim EH, Park MR, Kim GS.** Preventive effect of oriental herbal medicine feed additives on infection of *Salmonella enteritidis* in broiler chicken: antimicrobial activity and colonization inhibition. *Koran J Vet Res* 2003, **43**, 41-47.
11. **Kim JH, Kim CH, Ko YD.** Effects of dietary supplementation of probiotics (economix) on milk production and economic characteristics in lactating dairy cattle. *J Anim Sci & Technol* 2001, **43**, 369-380.
12. **Kim JS, Choi MC, Kim GS, Kang HJ, Han DS, Son SG, Lee JM, Park IG, Heo JH, Lee JH, An DW.** Development of a model for a national animal health monitoring system 1. Epidemiological evaluation of factors influencing drug residues of milk in Gyeongnam area. *Korean J Vet Res* 1998, **38**, 544-552.
13. **Kim K, Jang KI, Kim CH, Kim KY.** Optimization of culture conditions and encapsulation of *Lactobacillus fermentum* YL-3 for probiotics. *Korean J Food Sci Technol* 2002, **34**, 255-262.
14. **Kim MY, Ryu KE, Choi WA, Rhee YH, Lee IY.** Enhanced production of (1→3)- β -D-glucan by a mutant strain of *Agrobacterium* species. *Biochem Eng J* 2003, **16**, 163-168.
15. **Lapsha V, Bocharova V, Lukashenko T, Utkina L, Gurin V.** Probable neurophysiological and neurochemical mechanisms of the pyrogenic reaction evoked by introduction of a bacterial toxin into rats. *Neuro-physiology* 2006, **38**, 246-252.
16. **Lee YJ, Kim AR, Jung SC, Song SW, Kim JH.** Antibiotic resistance pattern of *Enterococcus* spp. And *Staphylococcus aureus* isolated from chicken feces. *Korean J Vet Res* 2005, **45**, 163-168.
17. **Lim JH, Park BK, Kim MS, Rhee MH, Park SC, Yun HI.** Acute oral toxicity and pathogenicity of a potential probiotic *Bacillus* sp. A9184 isolated from soybean paste. *J Toxicol Pub Health* 2004, **20**, 359-363.
18. **Luheshi GN, Stefferl A, Turnbull AV, Dascombe MJ, Brouwer S, Hopkins SJ, Rothwell NJ.** Febrile response to tissue inflammation involves both peripheral and brain IL-1 and TNF-alpha in the rat. *Am J Physiol* 1997, **272**, R862-868.
19. **Mantovani A, Maranghi F, Purificato I, MacrA.** Assessment of feed additives and contaminants: an essential component of food safety. *Ann Ist Super*

- Sanita 2006, **42**, 427-432.
20. **Park JH, Kang MS, Kim HI, Chung BH, Lee KH, Moon WK.** Study on immuno-stimulation activity of β -glucan isolated from the cell wall of yeast mutant *Saccharomyces cerevisiae* IS2. Korean J Food Sci Technol 2003, **35**, 488-492
 21. **Park SW, Kim YG.** Enhancement of the resistance of Korean catfish (*Silurus asotus*) to experimental *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila* infection by β -glucan administration. J Fish Pathol 1996, **9**, 79-85.
 22. **Partra P, Natarajan KA.** Surface chemical studies on selective separation of pyrite and galena in the presence of bacterial cells and metabolic products of *Paenibacillus polymyxa*. J Colloid Interface Sci 2006, **298**, 720-729.
 23. **Seo HP, Kim JM, Shin HD, Kim TK, Chang HJ, Park BR, Lee JW.** Production of β -1,3/1,6-glucan by *Aureobasidium pullulans* SM-2001. Korean J Biotechnol Bioeng 2002, **17**, 376-380.
 24. **Shin MS, Kim HM, Baek YJ, Kim GT, Huh CS.** Selection and Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean Feces. Korean J Food Sci Technol 1999, **31**, 495-501.
 25. **Witte W, Klare I, Werner G.** Selective pressure by antibiotics as feed additives. Infection 1999, **27**, S35-38.
 26. **Yamanaka S, Hashimoto M, Tobe M, Kobayashi K, Sekizawa J, Nishimura M.** A simple method for screening assessment of acute toxicity of chemicals. Arch Toxicol 1990, **64**, 262-268.