

117030-3

유단백질 고함유 우유생산을 위한 젖소에서의  
필수아미노산의 이용성 증진 연구 최종보고서

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

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

농생명산업기술개발사업 최종 보고서

발간등록번호

11-1543000-003153-01

# 유단백질 고함유 우유생산을 위한 젖소에서의 필수아미노산의 이용성 증진 연구

최종보고서

2020. 2. 14.

주관연구기관 / 씨제이제일제당(주)  
협동연구기관 / 건국대학교 산학협력단  
위탁연구기관 / 경북대학교 산학협력단

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "유단백질 고품유 우유 생산을 위한 젖소에서 필수 아미노산의 이용성  
증진 연구"(개발기간 : 2017. 04. ~ 2019. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020 . 02 . 14 .

주관연구기관명 : 씨제이제일제당

강신호



협동연구기관명 : 건국대학교 산학협력단

송창선

(인)



위탁연구기관명 : 경북대학교 산학협력단

임기병

(인)



주관연구책임자 : 문준욱 (씨제이제일제당)

협동연구책임자 : 이흥구 (건국대학교)

위탁연구책임자 : 김은중 (경북대학교)

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

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117030-3	해 당 단 계 연 구 기 간	3년	단 계 구 분	1 / 1
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	유단백질 고함유 우유생산을 위한 젖소에서 필수아미노산의 이용성 증진 연구			
연구 책임자	문준욱	해당단계 참여연구원 수	총: 65 명 내부: 65 명 외부: 0 명	해당단계 연구개발비	정부: 810,000 천원 민간: 810,000 천원 계: 1,620,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 65 명 내부: 65 명 외부: 0 명	총 연구개 발비	정부: 810,000 천원 민간: 810,000 천원 계: 1,620,000 천원
연구기관명 및 소속 부서 명	씨제이제일제당(주) BIO기술연구소 건국대학교 동물생명과학대학 경북대학교 생태환경대학			참여기업명 씨제이제일제당(주)	
국제공동연구	상대국명: 해당사항 없음			상대국 연구기관명: 해당사항 없음	
위 탁 연 구	연구기관명: 경북대학교			연구책임자: 김은중 교수	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 등급				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설· 장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

<요 약>

- 본 연구의 최종목표는 유단백 고품유 우유를 생산하고자 필수아미노산의 경제적인 제형 기술을 통하여 반추위 보호효율 및 유선에서의 이용성을 증진시키고, 이들을 실제 젖소 실증 실험을 통하여 검증함으로써 국내외 실용화 가능한 유단백 증진용 아미노산 제제를 개발 하고자함

○ 주요 연구 성과

<정성 성과>

- 반추위 Bypass효율 및 유선에서의 이용성을 증진을 위한 경제적인 필수 아미노산 생산 및 제형기술 개발
- 유선상피세포에서의 단백질 합성 효율 검증을 통한 최적 아미노산 및 그 조합 혹은 유단백 대사촉진 물질과의 이상적인 조합 선정 및 검증
- 제형 된 필수아미노산의 젖소의 유선상피세포에서의 이용성 검증 및 작용 기작 연구
- 제형 된 필수아미노산과 그 대사촉진 물질의 반추위 Bypass효율 검증
- 농가 실증 시험을 통한 제형된 필수아미노산 제제의 유단백 증진 효과 검증 및 경제성 평가
- 최종 개발된 필수아미노산 제제의 효과적인 이용을 위한 농가 사양관리 체계 구축 및 대량생산에 따른 산업화 방안 구축

<정량 성과>

- 논문(국내외 전문 학술지) 게재 : SCI(SCIE) 3편 게재, 5편 투고중
- 국내 및 국제 학술대회 발표 : 14편
- 지적재산권 : 특허출원 3건
- 교육지도 : 2건 / 전문인력 양성 : 8건 / 수상실적 : 3건
- 시제품: 3건

보고서 면수 179p

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 연구개발 최종목표: 젖소에서 <b>유단백 고함유 우유 생산</b>을 위한 반추위 보호효율 및 유선에서의 이용성이 증진된 경제적인 <b>필수아미노산 제형 기술</b> 개발</p> <p>○ 과제별 연구개발 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 젖소의 유단백 증진용 고효율 아미노산 제제 개발             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 필수아미노산의 반추위 bypass 및 유선 세포 이용성 증진을 위한 제형기술 개발 및 개발된 제제의 산업화 연구</li> </ul> </li> <li>- 유단백 합성 필수아미노산 선정 및 이용성 증진을 위한 연구             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 개별 필수아미노산별 유단백질 합성이 최대화되는 농도 설정</li> <li>• 필수아미노산의 조합 혹은 필수아미노산과 생리활성 물질의 조합이 유중 단백질 합성에 미치는 영향 조사</li> <li>• 필수아미노산에 따른 유선상피세포의 단백질 합성 관련 기전 해석</li> <li>• 개발된 제제의 착유우 내 이용성 평가</li> </ul> </li> <li>- 제형된 아미노산 및 그 복합제의 반추위 안정성 및 유단백 증진 연구             <ul style="list-style-type: none"> <li>• 아미노산 제제의 반추위 bypass 효율 및 반추위 발효 안정성 평가</li> <li>• 필수아미노산의 조합이 착유우의 유중 단백질 개선 영향 검증</li> </ul> </li> </ul>
<p>연구개발성과</p>	<p>&lt;정량 성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 논문(국내외 전문 학술지) 게재 : SCI(SCIE) 4편 게재, 4편 투고중</li> <li>○ 국내 및 국제 학술대회 발표: 14편</li> <li>○ 지적재산권 : 특허출원 3건</li> <li>○ 교육지도 : 2건 / 전문인력 양성 : 8건 / 수상실적 : 3건</li> <li>○ 시제품: 3건</li> </ul> <p>&lt;정성 성과&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 반추위 Bypass 아미노산 제형 개발기술 확보</li> <li>○ 유선 상피세포에서의 유단백 합성효율을 극대화 시킬 수 있는 필수 아미노산 발굴</li> <li>○ 젖소의 유선 내 단백질합성 관련 아미노산 대사 해석</li> <li>○ 유중 단백질 합성 효율을 극대화 시킬 수 있는 아미노산 및 유단백 대사촉진 물질과의 이상적인 조합 결정</li> <li>○ 유단백 증진을 위한 아미노산 첨가제의 산업화를 기초 자료 도출</li> </ul>
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>&lt;활용계획&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 착유우 필수 아미노산요구량 결정 및 그 이용성에 대한 새로운 적용기준 설정으로 비용 절감형 유단백 증진용 사료개발에 활용</li> <li>○ 유선내 아미노산 대사 기전을 이해함으로 각종 기능성 단백질의 합성에 대한 응용이 가능해져 기능성 우유 개발에 활용</li> </ul>

	<p>○ 새로운 개념의 아미노산 반추위 Bypass 제형기술을 다른 반추동물용 Bypass 영양소첨가제 개발에 활용</p> <p>&lt;기대효과&gt;</p> <p>○ 유단백 함량 증가용 고효율 아미노산제제 개발로 유단백 유대 산정체계의 확대에 대한 유연한 대응이 가능해져 낙농가 소득에 기여</p> <p>○ 국내산 가성비 높은 반추위 Bypass 아미노산의 경제적인 생산으로 수입 대체 효과는 물론 해외 수출도 가능해져 외화획득에 기여</p> <p>○ Bypass 필수아미노산 시장 확대를 유도하고 차별화전략으로 신규사업 창출에 기여</p> <p>○ 보호 아미노산 시장 개척을 통한 신산업 창출</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	유단백	필수아미노산	유선	반추위 우회	사업화
영문핵심어 (5개 이내)	Milk Protein	Essential amino acids	Mammary Gland	Rumen Bypass	Industrialization

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

## < 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	8
제 1 절 연구개발 목적 .....	8
1. 연구개발 최종목표 .....	8
2. 기관별 연구목표 .....	8
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	9
1. 고품질 우유 생산을 위한 유중 단백질 함량 증가의 필요성 .....	9
2. 젖소에서 아미노산의 요구량과 원료의 평가 system .....	9
3. 유중 단백질 증진을 위한 필수아미노산의 중요성 .....	12
4. 유중 단백질 증진을 위한 필수아미노산 제제의 이용 한계 .....	13
5. 반추동물용 아미노산 제제의 반추위 Bypass의 필요성 .....	15
6. 유중 단백질 증진을 위한 유선상피세포에서의 단백질 합성 메커니즘 규명 .....	15
7. 에너지 원료 및 대사기전 촉진 물질의 유중 단백질 증진에의 기여 .....	16
제 3 절 연구개발 범위 .....	17
1. 1차년도 .....	17
2. 2차년도 .....	17
3. 3차년도 .....	17
제 2 장 연구수행 내용 및 결과 .....	19
제 1 절 연구개발 추진 전략 및 방법 .....	19
제 2 절 연구개발 추진 체계 및 일정 .....	21
1. 연구개발 추진 체계 .....	21
2. 연구개발 추진 일정 .....	21
제 3 절 연구 개발 성과 .....	24
1. 연구성과 목표 대비 실적 .....	24
2. 과학적 성과 .....	24
3. 기술적 성과 .....	27
4. 사회적 성과 .....	27
제 4 절 연구개발 내용 .....	28

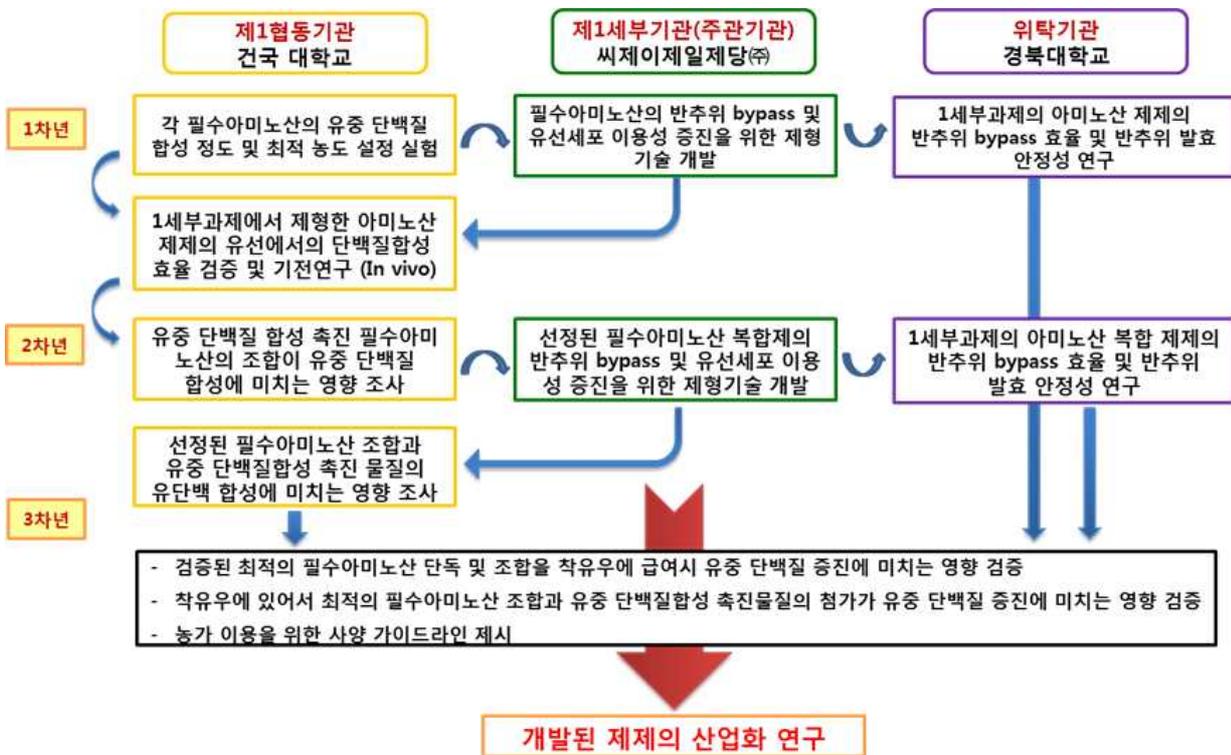
1. 젖소의 유단백 증진용 고효율 아미노산 제제 개발	
- 씨제이제일제당 (주관기관) .....	28
2. 유단백 합성 필수아미노산 선정 및 이용성 증진 연구	
- 건국대학교 (협동기관) .....	51
3. 보호 아미노산 및 그 복합체의 반추위 안정성 및 유단백 증진 연구	
- 경북대학교 (위탁기관) .....	116
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	155
제 1 절 목표 달성도 .....	155
1. 1차년도 목표 달성도 .....	155
2. 2차년도 목표 달성도 .....	155
3. 3차년도 목표 달성도 .....	156
제 2 절 관련분야 기여도 .....	157
1. 기술적 측면 .....	157
2. 경제적·산업적 측면 .....	158
제 4 장 연구결과의 활용 계획 .....	159
제 1 절 연구 성과의 활용 분야 및 활용 방안 .....	159
제 2 절 추가 연구의 필요성 .....	159
제 3 절 타 연구에의 응용 .....	159
제 4 절 사업화 추진방안 및 기술 이전 .....	160
붙임. 참고 문헌 .....	161

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 목적

### 1. 연구개발 최종목표

젖소에서 **유단백 고함유 우유 생산**을 위한 반추위 보호 효율 및 유선에서의 이용성이 증진된 경제적인 **필수아미노산 제형 기술 개발**



### 2. 기관별 연구목표

#### 가. 주관연구기관 (씨제이제일제당(주))

- (1) 반추위 보호 기능 및 가격 경쟁력을 갖는 보호 아미노산 제형 개발
- (2) 유단백 개선능이 확인된 필수아미노산의 조합에 대한 보호 아미노산 제형 개발
- (3) 보호 아미노산 후보 아이템의 대량 생산 시스템 구축 및 안정성 평가

#### 나. 제 1협동기관 (건국대학교)

- (1) 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell)를 이용한 필수아미노산의 유단백 합성능력 평가
- (2) 필수아미노산에 의한 유단백질 합성 관련 대사기전 확인
- (3) 유선상피세포주(MAC-T cell)를 이용한 필수아미노산 및 유단백 합성 촉진 물질들의 유단

백 합성효율 규명

- (4) *In vitro* 유선상피세포주(MAC-T cell)를 통해 검증된 최적 필수아미노산의 조합과 유중 단백질 합성 촉진물질들을 *In vivo* 실험을 통하여 재검증

다. 위탁 연구기관 (경북대학교)

- (1) 제형화한 아미노산 제제의 bypass 효율 및 반추위 발효 안정성 연구
- (2) 최적 필수아미노산 조합 및 유중 단백질 합성 촉진 물질의 착유우 대상 유단백질 증진 효과 검증

## 제 2절 연구개발의 필요성

### 1. 고품질 우유 생산을 위한 유중 단백질 함량 증가의 필요성

- 가. 최근 소비자들의 우유에 대한 부정적인 시각이 확대됨에 따라 우유 소비가 감소하고 있으며, 인체에 더 건강한 유제품에 대한 요구가 높아져 유중 단백질 함량 증가연구가 필요함.
- 나. 최근까지 젖소의 개량 방향은 유지방을 높이는 데 중점을 두고 있었으나, 소비자의 욕구가 양에서 질로 바뀌고 마켓 트렌드는 웰빙시대로 건강에 대한 관심이 고조됨에 따라 저지방, 무지방 및 고단백의 유제품을 선호하게 되었음.
- 다. 현재 선진 국가에서는 유중 단백질을 증가시키려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 향후 이러한 수입 유제품과 경쟁하려면 국내의 기존 유량 및 유지방 시스템으로는 불리함.
- 라. 아울러 낙농 선진국에서는 이미 유대 산정에 있어 유중 단백질의 가치를 유지방보다 2배 이상 높게 평가하고 있으며, 이에 따라 국내 유대 산정체계는 2014년 1월부터 유중 단백질을 새로 도입하는 원유가격 산정체계 개선안을 시행함. 이에 따른 유중 단백질 증가 관련 기술보급이 시급한 실정임.
- 마. 국내 젖소의 대부분을 차지하고 있는 홀스타인의 평균 유단백질은 3.2%로, 3.75%인 저지종에 비해 유전력이 낮을 뿐 아니라 산차, 비유시기, 계절에 따른 가변성도 크기 때문에 우유내 단백질 함량을 증가시키고 유성분의 항상성을 유지하기 위한 사료 급여와 사양관리를 통해 단백질을 도입한 새로운 원유가격의 체계에 대비가 필요함.
- 바. 현재 국내 우유소비동향을 분석해 보면 백색시유의 소비는 감소하는 반면에 치즈의 소비는 급증하는 추세임. 치즈의 주요 구성성분은 유중 단백질로 유중 단백질 함량이 높은 원유를 생산하는 것이 중요하나, 국내 원유의 유중 단백질 함량이 낮아 국내산 원유를 사용하여 치즈를 생산하면 수입산 치즈와의 가격 경쟁력 측면에서 불리함.

### 2. 젖소에서 아미노산의 요구량과 원료의 평가 system

- 가. 젖소 내 유단백 합성에 영향을 미치는 가장 중요한 시기는 비유 초기라는 것이 기존 선행 연구들을 통해 알려져 있음. 선행연구를 바탕으로 NRC 개정판과 한국 젖소 사양표준에 근거한 비유 초기 착유우의 아미노산 요구량은 다음의 표 1과 같음.

표 1. 비유초기 착유우(체중 650kg)의 1일 대사 아미노산 급여량  
(TDN 함량 76% 이하)

산유량 (kg)	유단백질함량 (%)	건물섭취량 (kg)	필수아미노산	대사 아미노산 급여량 (g)
20	3.0 ~ 3.5	12.5 ~ 13.2	Met	25.4 ~ 28.6
			Lys	90.2 ~ 102.0
			His	28.5 ~ 32.0
			Phe	13.2 ~ 15.0
			Trp	13.2 ~ 15.0
			Thr	44.9 ~ 50.3
			Leu	114.9 ~ 129.5
			Ile	69.5 ~ 79.3
			Val	81.5 ~ 92.4
30	3.0 ~ 3.5	14.6 ~ 15.7	Arg	95.2 ~ 106.1
			Met	35.0 ~ 39.9
			Lys	125.7 ~ 143.6
			His	39.1 ~ 44.4
			Phe	57.7 ~ 68.1
			Trp	18.8 ~ 21.6
			Thr	61.2 ~ 69.4
			Leu	158.9 ~ 181.0
			Ile	98.7 ~ 113.3
40	3.0 ~ 3.5	16.6 ~ 18.1	Val	114.3 ~ 130.7
			Arg	129.1 ~ 146.5
			Met	44.7 ~ 51.2
			Lys	161.1 ~ 184.9
			His	49.5 ~ 56.6
			Phe	73.3 ~ 83.8
			Trp	24.4 ~ 28.1
			Thr	77.4 ~ 88.4
			Leu	202.7 ~ 232.3
Ile	127.7 ~ 147.2			
Val	146.9 ~ 168.8			
Arg	163.4 ~ 186.7			

(한국젖소사양표준)

나. 아미노산 요구량을 충족시키기 위해서는 먼저 사료 원료의 평가 시스템이 필요함. 국내에서 단백질 사료 원료로 많이 이용되는 원료들의 NRC 개정판과 한국 젖소 사양표준에 근거한 조단백질량과 제한아미노산 함량은 다음의 표 2와 같음.

표 2. 단백질 사료 원료에 따른 조단백질과 제한아미노산 함량

단백질 사료 원료	조단백질(CP) 함량 (%)	필수아미노산	필수아미노산 함량 (% of CP)
Cottonseed, Whole	23.5	Met	1.71

		Lys	4.35
		His	3.11
		Phe	5.30
		Trp	1.27
		Thr	3.46
		Leu	5.88
		Ile	3.20
		Val	4.70
		Arg	11.52
		Met	1.45
		Lys	6.27
		His	2.77
		Phe	5.26
		Trp	1.27
		Thr	3.98
		Leu	7.81
		Ile	4.56
		Val	4.71
		Arg	7.40
		Met	1.59
		Lys	4.13
		His	2.82
		Phe	5.31
		Trp	1.21
		Thr	3.23
		Leu	5.89
		Ile	3.09
		Val	4.24
		Arg	11.05
		Met	2.37
		Lys	1.69
		His	2.13
		Phe	6.35
		Trp	0.53
		Thr	3.38
		Leu	16.79
		Ile	4.11
		Val	4.64
		Arg	3.20
		Met	0.81
		Lys	4.49
		His	2.38
		Phe	3.80
		Trp	0.76
		Thr	3.50
		Leu	7.23
		Ile	4.13
		Val	3.80
		Arg	10.08
		Met	1.60
with lint			
Soybean meal	46.3		
Cottonseed meal, solvent	44.9		
Corn gluten meal, dried	65.0		
Lupin seed	34.5		
Coconut meal,	21.3		

extracted		Lys	2.65
		His	1.78
		Phe	3.84
		Trp	0.87
		Thr	3.06
		Leu	6.21
		Ile	3.42
		Val	4.89
		Arg	10.87
	Rapeseed meal	38.4	Met
		Lys	5.62
		His	2.80
		Phe	4.06
		Trp	1.30
		Thr	4.42
		Leu	7.09
		Ile	3.93
		Val	5.09
		Arg	6.17

(한국젓소사양표준)

- 다. 표 2에서도 알 수 있듯이, 제한아미노산 중에서도 특히 사료 원료 함량이 적은 메티오닌 (Met), 라이신(Lys), 트립토판(Trp)에 대해 현재 많은 연구가 진행 중이고, 그 외의 다른 제한아미노산에 대해서도 지속적으로 연구되고 있음.
- 라. 하지만 유단백질 합성에 필요한 Bypass 아미노산에 대한 연구는 극히 드물어 평가 시스템이 미흡하기 때문에 앞으로 많은 연구가 필요함.

### 3. 유중 단백질 증진을 위한 필수아미노산의 중요성

- 가. 젓소에 있어서 유중 단백질 증가를 위한 기존의 연구는 극히 제한되어 행하여졌고 그중 사료에 의한 유중 단백질 증가연구는 수행되었으나 긍정적인 결과가 제한적임.
- 나. 이러한 측면에서 최근 제한아미노산에 대한 관심이 고조되고 있으며, 특히 이들 제한 아미노산을 이용한 유중 단백질 증진에 대한 긍정적인 결과가 보고되고 있으나 그 수준은 미미함.
- 다. 현재 홀스타인종의 유중 단백질 함량증가를 위하여서는 고단백 사료를 통한 유단백 합성에 필요한 아미노산 요구량을 충족해야 하는데, 현재 사료의 아미노산 요구량 충족 기준은 조단백질 함량의 기준에 의해 급여하고 있어 정밀한 아미노산 요구량 결정 및 그 이용성에 대한 검증이 필요함.
- 라. 필수아미노산은 유중 단백질 합성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 다음과 같은 연구들이 보고된 바 있음.

**필수아미노산(Essential amino acid)이란?** 체내에서 합성되지 않거나, 합성되더라도 그 양이 매우 적어 동물 체내에서 생리 기능을 달성하기에 불충분하여 반드시 음식으로부터 공급해야만 하는 아미노산

- (1) 필수아미노산은 유중 단백질 합성을 위한 공급원으로 중요함 (Bequette et al., 1998; Reynolds et al., 1994).
- (2) 젖소에서 아미노산 중에 Arg, Ile, His, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val은 중요한 필수아미노산이며 (Reynolds et al., 1994; Rius et al., 2010; Baumrucker et al. 1985), 이것들은 Krebs cycle을 통해 젖소의 유선 내에서 단백질의 합성뿐만 아니라 에너지 생산에도 관여를 함 (Bequette et al., 1998; Mephram et al., 1982).
- (3) Met과 Lys은 유단백 합성을 위해 소장 내에서 이용되는 아미노산 중 가장 결핍되기 쉬운 주요 제한 아미노산으로 알려져 사료로써 공급되어야 함 (Clark, 1975; Rulquin and Delaby, 1997; Schwab et al., 1992; Gallo et al., 2010; King et al., 1991).
- (4) 최근 연구에서 필수아미노산은 단백질 합성의 Building block의 효과뿐만 아니라 단백질 합성의 중요 pathway인 mTOR pathway에 관여하며, 단백질 합성 관련 유전자들의 발현에 영향을 나타냄 (Bionaz et al., 2012).
- (5) 각각의 필수아미노산은 mTOR pathway와 단백질 합성물에서 각각의 영향을 나타냄 (Appuhamy et al., 2012).

마. 아울러 아미노산 조합이 유중 단백질 합성에 영향을 미친다는 연구결과도 최근 보고되고 있음.

- (1) 착유우의 경우 Met, Lys, Val 등이 제한아미노산 이지만, 제한 아미노산의 보충이 항상 생산 증가로 이어지지는 않음. 즉 제한 아미노산의 공급과 함께 다른 아미노산이 동시에 공급되어야 유생산성을 증가시킬 수 있음 (반추동물영양학).
- (2) 일반적으로 Lys과 Met의 조합이 유선상피세포에서의 유중 단백질 합성이 단독보다는 더 효과적이라는 보고가 있음 (Nan et al., 2014).
- (3) 이들 Lys과 Met의 조합은 젖소 유중 단백질에서 43%의 증진효과를 나타냄 (Schwab et al., 1992; Liu et al., 2000; Trínáctý et al., 2009).
- (4) Lys, Met 및 Ile의 조합이 젖소 유중 단백질 증진효과를 나타냄 (Robinson et al., 1999).
- (5) 하지만 His, Met 및 Lys의 조합은 젖소 유중 단백질 증진효과를 나타내지 않았음 (Vanhatalo et al., 1999; Lee et al., 2012).
- (5) Ile, Leu 및 Val의 조합은 젖소 유중 단백질 증진효과를 나타내지 않으며 (Korhonen et al., 2002), 이러한 선행연구는 몇 개의 필수아미노산의 조합 수준에 제한되어있고 다양한 조합에 의한 유중 단백질 증진 연구가 필요함.

#### 4. 유중 단백질 증진을 위한 필수아미노산 제제의 이용 한계

가. 대표적인 제한아미노산인 Lys과 Met의 경우 단위 동물 사료 성분으로서 대량 생산 및 소

비가 이뤄지고 있어 다른 필수아미노산 대비 상대적으로 낮은 수준의 가격대가 형성되어 있음.

- 나. 하지만 그 외 필수아미노산의 경우 사료 사용이 제한되고 있어 시장 자체의 크기가 제한 아미노산 대비 상대적으로 작으며, 이로 인해 발생하는 높은 생산 가격은 시장 확대의 제한 요소로 알려져 있음.
- 다. 또한, 반추동물에 대한 필수아미노산의 효능 검증 연구 결과의 부족으로 인해 사료 첨가제로써의 인식이 매우 낮은 상황임.
- 라. 젖소를 포함한 반추동물의 사료 성분 적용을 위해서는 아미노산에 대한 반추위 보호 기능이 필수적으로 포함되어야 하며, 이로 인해 발생하는 추가적인 생산 비용은 bypass 아미노산의 저변 확대를 제한하는 주요 요인으로 인식되고 있음.
- 마. 반추동물의 제1 위인 반추위는 cellulose 등의 소화 분해를 돕기 위한 다양한 종류의 미생물들이 존재하기 때문에 일반적인 제형의 아미노산을 급여할 경우 반추위 미생물에 의해 대부분 소모되며, 이로 인해 실제 반추동물의 생산성 확보를 위한 에너지원 또는 단백질원으로써의 이용률이 극히 낮은 것으로 알려져 있음.
- 바. 이러한 이유로 인해 반추위 미생물이 사용할 수 없는 제형의 아미노산 (bypass 아미노산) 생산을 위한 다양한 연구가 진행되고 있음.
- 사. 반추위 bypass율이 높은 아미노산 제형은 크게 코팅을 기반으로 한 물리적 보호 방법과 아미노산 자체의 구조 변형 또는 유도체화를 통해 공급하는 화학적 보호 방법이 존재함.
- 아. 물리적 보호를 기반으로 한 코팅 보호 아미노산의 대표적인 제품으로는 Adisseo社의 Smartamine, Evonik社의 Mepron(이상 Met 코팅 제품), 그리고 Ajinomoto사의 Ajipro-L(이상 Lys 코팅 제품) 등을 들 수 있으며, 화학적 보호를 기반으로 한 보호 아미노산의 대표적인 제품은 Adisseo社의 MetaSmart를 들 수 있음. 특히 MetaSmart 제품은 Met 유사체인 MHA(Methionine Hydroxy Analogue)의 카르복실 말단에 isopropanol을 첨가하여 반추위 미생물의 이용성을 제한하는 특징을 지고 있음.
- 자. 하지만 Adisseo社 Smartamine의 경우 세계 1위 시장 점유율을 확보하고 있음에도 불구하고(약 54%) 약 \$10/kg 수준의 판가가 형성되어 있으며, Ajinomoto社의 Lys 코팅 제품인 Ajipro-L 역시 약 \$8-10/kg 수준의 가격대가 형성되어 있음 (Met의 경우 현재 판매 가격은 약 \$3/kg 수준으로 형성되어 있으며, Lys의 경우 약 \$2/kg 수준의 판가가 형성되어 있음).
- 차. 또한 각 제품의 효능 역시 평가 방법에 따라 다양하게 나타나고 있으며, Smartamine을 제외한 다른 코팅 제품의 경우 비교적 높은 수준의 반추위 bypass율을 보임에도 불구하고, 소장에서의 낮은 소화 흡수율로 인해 실제 체내 이용성은 매우 낮은 것으로 알려져 있음. 즉, 기존 보호 아미노산 제품의 낮은 체내 이용성(bioavailability)은 젖소의 생산성과 직접적으로 연관되어 있는 유선에서의 아미노산이 제한적으로 이용될 수 있음을 시사함.
- 카. 이는 단순히 제한아미노산의 판가뿐만 아니라 반추위 보호 기능을 부여하기 위해 상당 수준의 비용과 기술력이 필요함을 의미하며, 이러한 기술적 한계의 극복이 반추동물용 사료 첨가제로써 아미노산의 시장 침투력을 확대하는 중요한 요소임을 예상할 수 있음.
- 타. 앞서 언급한 것처럼 상기 두 종류의 제한아미노산을 제외한 다른 필수 아미노산의 경우 현재까지 반추동물용 사료 첨가제로써의 시장은 형성되지 않은 것으로 파악되고 있음. 특히 대량 생산 시스템이 갖춰진 Lys 및 Met과 달리 대량 생산 시스템을 갖춘 공급자가 제한되어 있기 때문에 사료 시장의 확대에 한계가 있음.

과. 하지만 각 필수아미노산의 이용성에 대한 체계적인 연구를 바탕으로 효능이 검증될 경우 시장의 성장 가능성은 매우 높을 것으로 예상되며, 특히 아미노산 관련 종합적인 제품 포트폴리오와 생산 기술 노하우를 확보하고 있는 기업이 높은 가격 경쟁력을 바탕으로 선도적인 역할을 수행한다면 본 연구를 통해 확보할 수 있는 제한아미노산 또는 필수아미노산의 시너지 효과를 통해 새로운 시장의 창출과 확대를 동시에 달성할 수 있을 것으로 판단됨.

## 5. 반추동물용 아미노산 제제의 반추위 Bypass의 필요성

**반추위 Bypass란?** 반추동물의 제1 위인 반추위는 cellulose 등의 소화 분해를 돕기 위한 다양한 종류의 미생물들이 존재하는데, 반추위에서 이들이 이용하게 하지 않고 반추위를 우회하여 하부 소화기관으로 내려가는 현상

- 가. 반추동물이 이용할 수 있는 질소원은 사료를 통해 공급되는 단백질, 반추위 벽을 통한 재순환 질소, 내인성 단백질 그리고 미생물체 단백질이 있음. 이중 사료 단백질은 반추위에 유입된 후, 반추위 박테리아에 의해 펩타이드, 아미노산을 거쳐 암모니아로 분해되어 이용되거나 미생물체 단백질로 재합성되어 일부 사료 단백질과 소장으로 bypass되어 아미노산 형태로 소화·흡수됨.
- 나. 반추동물에게 급여되는 단백질 사료의 반추위 내 분해율이 높아지게 되면 반추위 내 미생물체 단백질의 합성량은 증가하지만 결과적으로 다량 생성된 암모니아를 이용하지 못할 뿐 아니라, 사료 단백질의 이용률이 감소하게 됨.
- 다. 전술한 바와 같이 착유우에서는 우유 내 단백질 합성 요구량을 충족시키기 위한 아미노산의 공급이 필수적이기 때문에 반추위에서 미생물의 분해를 피할 수 있고, 반추동물의 소장에서 분해 및 흡수 가능한 반추위 미분해 단백질(Rumen undegradable protein, RUP) 및 보호 아미노산(Bypass amino acid)을 사료 형태로 급여하는 것이 필요함.
- 라. 이러한 값비싼 사료 단백질의 이용률을 증가시킬 뿐 아니라 착유우의 생산성 향상을 목표로, 반추위 내 미생물로부터 사료 단백질을 보호하기 위해 열처리 (Nowak et al., 2005) formaldehyde (Subuh et al., 1996) tannin 처리 (Getachew et al., 2008) ethanol 처리 (Lynch et al., 1987) 및 lignosulfonate (Neves et al., 2007) 등 여러 가지 물리·화학적 처리 방법이 지속적으로 연구됐으며, 아미노산을 보호하기 위해 지방산/pH 에 민감한 polymer 혼합물로 표면을 코팅하거나, 불포화 지방산과 광물질 혼합물로 코팅하는 방법들이 연구됨.
- 마. 반추위 bypass 아미노산 제제 생산에 관한 연구는 몇몇 필수아미노산에 제한적으로 진행됐으나 반추위 bypass 효율을 증가시키기 위한 다양한 보호 아미노산 제조기술의 연구 및 평가가 필요할 뿐 아니라, 착유우의 유중 단백질 합성량을 증진시키기 위해 사료 내 아미노산의 혼합비율에 관한 연구가 필요함.

## 6. 유중 단백질 증진을 위한 유선상피세포에서의 단백질 합성 메커니즘 규명

- 가. 일반적으로 사료로부터 공급된 필수아미노산은 유선상피세포에서 단백질 합성에 이용되거나 유단백 합성에 관여하는 유전자의 발현 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있음.
- 나. 유중 단백질 합성은 유선에서 이루어지며, 유선은 유선상피세포로 이루어짐. 그리고 이러

한 유선상피세포는 혈액을 통해 공급된 영양소를 이용하여 유중 단백질 합성을 하는 것으로 알려져짐.

- 다. 유선상피세포는 세포질, 세포핵, 소포체, 골지체, 미토콘드리아, 리보솜으로 구성되어 있으며, 소포체와 리보솜에서 유단백을 합성 및 분비함. 또한 골지체에서 카제인 및 락토오스를 합성 및 분비를 하는 것으로 알려져 있음.
- 라. 유선상피세포에서 유단백질은 다양한 요인에 의해 합성이 되며, 이 요인들은 크게 인슐린, 프로락틴, 글루코스, 아미노산, mTOR pathway로 알려져 있음.
- 마. 유선상피세포에서의 유단백 합성에 대한 메커니즘은 단백질 합성인 mTOR pathway를 중심으로 연구되어짐. 또한, 유단백 합성 연구는 mTOR pathway를 조절하는 상위 pathway 인자가 있다는 것이 밝혀지고 있으며, 몇몇 인자(AMPK, GSK3 $\beta$  등)들이 조사 됨.
- 바. 하지만 이는 유단백 합성에 대한 mTOR pathway에 대한 연구로 제한되며, 영양소와 유단백 합성과의 연관성 및 정확한 메커니즘에 대한 연구는 미미한 실정임.
- 사. 따라서 필수아미노산은 유단백 합성 전구물질 이전에 유단백 합성효율을 증가시킬 수 있는 전사 조절인자로 작용한다는 관점에서 이들에 대한 유선상피세포에서의 기전규명이 필요함.
- 아. 젖소 비유기의 유단백질 합성은 mRNA의 전사량과 번역 후 단백질 대사과정에 영향을 받음 (Bionaz et al., 2012).
- 자. 유단백질 합성은 mTOR, AMPK pathway와 연관되었다고 보고됨 (Beugnet et al., 2003; Appuhamy et al., 2014).
- 차. 아미노산은 Met-tRNAi binding step과 Aminoacyl-tRNA 과정에 의해 mRNA의 전사량에 영향을 나타냄 (Kimball and Jefferson, 2005).
- 카. Met-tRNAi binding step과 acryl-tRNA 과정은 아미노산의 합성과정인 Krebs' s cycle에 영향을 나타냄 (Kimball and Jefferson, 2005).
- 타. 이러한 연구는 필수아미노산과 단백질 합성의 대사과정에 제한되어있으며, 각각의 필수아미노산에 대한 대사과정에 대한 정보는 알 수 없음.

## 7. 에너지 원료 및 대사기전 촉진물질의 유중 단백질 증진에의 기여

- 가. 유단백 합성은 아미노산뿐만 아니라 에너지 및 대사기전 촉진물질이 관여하고 있음.
- 나. 에너지는 단백질 합성의 요인이며, 유중 단백질 합성과 대사과정에 영향을 줌 (Broster et al., 1973; Sarbassov et al., 2005; Toerien et al., 2010).
- 다. 반추동물의 경우 반추위에서 흡수되는 Acetate가 동물 체내에서 이용되는 전체 에너지의 70% 정도를 담당함. 젖소의 반추위에 acetate를 주입했을 때 유단백질, 유지방, 유당, 유량이 증진된다는 보고가 있음 (Rook and Balch, 1961). 또한 유선상피세포에 acetate를 처리하면  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein, 그리고 mTOR pathway 관련 유전자 발현이 증가하며 세포 내 ATP 양이 증가함 (Zhao et al., 2018).
- 라. Glucose는 세포가 직접적으로 이용하는 에너지원이며, 유선상피세포가 유단백질과 유당을 합성하고 분비하는 것에 필수적임 (Bionaz et al., 2012)
- 마. 생리활성물질인 CLA(t10,c12-CLA) 첨가 시 젖소의 유지방 합성은 감소하며, 유중 단백질 합성은 증가시킨다고 보도됨 (Weerasinghe et al., 2012; de Veth et al., 2006)

## 제 3 절 연구개발 범위

### 1. 1차년도

가. 주관연구기관 (씨제이제일제당(주))

- (1) 반추위 보호 기능을 갖는 보호 아미노산 제형 개발
- (2) 유단백 개선 가능성이 확인된 아미노산 대상 보호 아미노산 제형 개발

나. 제 1협동기관 (건국대학교)

- (1) 각 필수아미노산의 유단백 합성 최적 농도 조사 및 선정

다. 위탁 연구기관 (경북대학교)

- (1) 개발, 제형화 된 아미노산 제제의 bypass 효율 측정
- (2) 개발, 제형화 된 아미노산 제제의 반추위 발효특성 및 건물 소화율에 미치는 영향

### 2. 2차년도

가. 주관연구기관 (씨제이제일제당(주))

- (1) 선정된 필수아미노산의 조합에 적합한 제형 개발

나. 제 1협동기관 (건국대학교)

- (1) 각 필수아미노산 및 제형물에 대한 유단백 합성 관련 omics 해석 연구
- (2) 유중 단백질 합성 촉진 필수아미노산의 조합이 유중 단백질 합성에 미치는 영향 조사
- (3) 선정된 필수아미노산 조합과 유중 단백질 합성 촉진물질의 유단백 합성에 미치는 영향 조사

다. 위탁 연구기관 (경북대학교)

- (1) 개발, 제형화 된 아미노산 제제의 bypass 효율 측정 (계속)
- (2) 개발, 제형화 된 아미노산 제제의 반추위 발효특성 및 건물 소화율에 미치는 영향 (계속)

### 3. 3차년도

가. 주관연구기관 (씨제이제일제당(주))

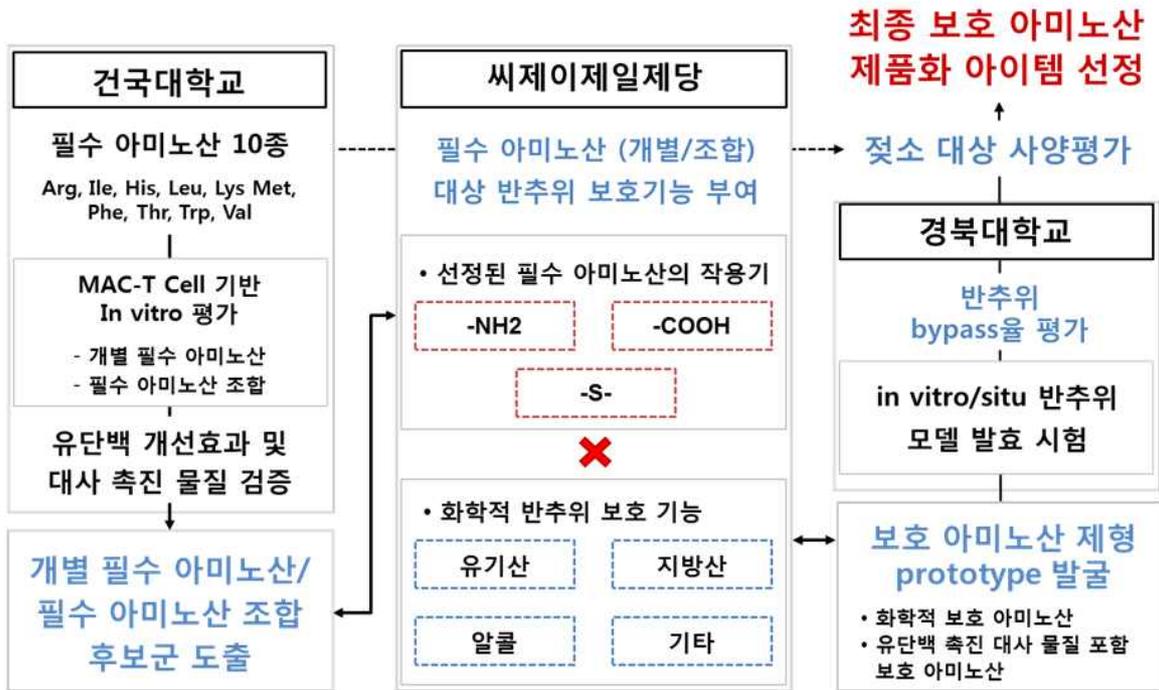
- (1) 대량 생산 가능한 보호 아미노산 제형 기술 최적화
- (2) 신규 제품 등록(사료첨가제)을 위한 안정성 데이터 확보

나. 제 1협동기관 (건국대학교)

- (1) 착유우에 있어서 최적의 반추위 보호 필수아미노산의 유선에서의 단백질 대사기전 규명
- (2) *In vitro* 실험에서 검증된 최적의 필수아미노산 조합을 착유우에 급여 시 유중 단백질 증진에 미치는 영향 검증
- (3) 착유우 대상 최적 필수아미노산 조합 및 유중 단백질 합성 촉진물질 첨가에 따른 유중 단백질 증진 영향 조사 (위탁과제와 공동진행)

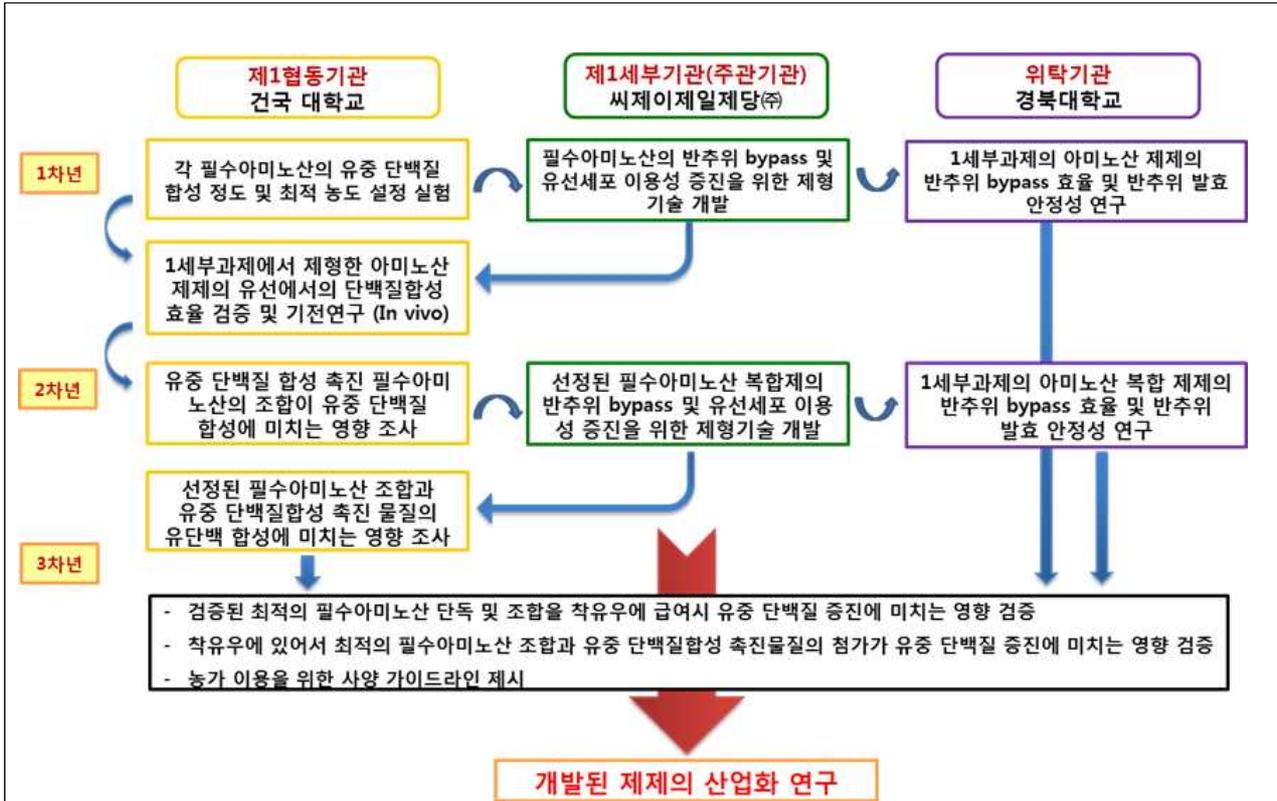
다. 위탁 연구기관 (경북대학교)

- (1) 최종 개발된 최적 조합 아미노산 제제 및 유단백 합성 촉진물질의 bypass 효율 및 반추위 발효특성 평가
- (2) 착유우를 이용한 최종 개발된 최적 조합 아미노산 제제 및 유단백질 합성 촉진 물질의 유단백질 증진 효과 검증 (1협동과제와 공동진행)



## 제 2 장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 추진 전략 및 방법



- 각 분야의 최고 전문가가 연구책임자로 구성된 세부(참여기업), 협동 및 위탁기관이 독립적 모듈을 이루어 기술을 개발하되, 모든 과제가 유기적으로 연동되어 통합적 시스템을 이루고 지속적인 피드백을 통해 사업화가 가능한 유단백 증진을 위한 가성비 높은 bypass 필수아미노산을 개발하고, 이를 산업화로 연계시키는 연구를 수행함.
- 선행연구, 문헌조사를 통해 현재 보유하고 있는 기반기술을 각 연구팀에서 구현하고, 지속적해서 과제별 연구결과를 적용, 검증하고, 이에 따라 체계적으로 목표 달성을 위하여 상호 유기적으로 협조하였음.
- 개발된 연구결과물은 각 부분별 결과도출에 따라 신속히 기술이전 및 산업화를 실시하고, 개발된 주관기관(씨제이제일제당(주)) 인프라를 통해 연구결과의 상품화, 산업화를 이루어 부가가치 창출에 노력하였음.

### 유단백질 고품유 우유생산을 위한 젖소에서 필수아미노산의 이용성 증진연구

유중 단백질 고품유 우유를 생산하고자 젖소의 **유선상피세포에서의 필수아미노산의 이용성**을 조사하고, 제형 기술을 통하여 **반추위 bypass 효율 및 유선에서의 이용성**을 증진시켜 유중 단백질 합성 효율을 극대화시킬 수 있는 **아미노산 및 단백질 대사촉진 물질과의 이상적인 조합**을 검증하고자 함

	제1세부기관(주관기관) 씨제이제일제당(주)	제1협동기관 건국 대학교	위탁기관 경북대학교
	젖소의 유단백 증진용 고효율 아미노산 제제 개발	유단백 합성 필수아미노산 선정 및 이용성 증진을 위한 연구	제형된 아미노산 및 그 복합제의 반추위 안정성 및 유단백 증진 연구
<b>1차년</b>	- 필수아미노산의 반추위 bypass 및 유선 세포 이용성 증진을 위한 제형기술 개발	- 각 필수아미노산에 따른 유중 단백질합성의 최적의 농도 설정 실험 진행 - 각 필수아미노산의 유중 단백질합성관련 omics해석 연구	- 1세부과제의 아미노산 제제의 반추위 bypass 효율 및 반추위 발효 안정성 연구
<b>2차년</b>	- 선정된 필수아미노산 복합제의 반추위 bypass 및 유선세포 이용성 증진을 위한 제형기술 개발	- 유중 단백질 합성 촉진 필수아미노산의 조합이 유중 단백질합성에 미치는 영향 조사	- 1세부과제의 아미노산 복합 제제의 반추위 bypass 효율 및 반추위 발효 안정성 연구
<b>3차년</b>	- 개발된 제제의 산업화 연구	- 선정된 필수아미노산 조합과 유중 단백질합성 촉진 물질의 연관성 조사	- <b>1협동에서</b> 검증된 최적의 필수아미노산 조합을 착유우에 급여시 유중 단백질 증진에 미치는 영향 검증 - 최적의 필수아미노산 조합과 유중 단백질합성 촉진물질의 첨가가 유중 단백질 증진에 미치는 영향 검증

- 주관기관(씨제이제일제당(주))는 bypass 효율 및 유선에서의 이용성 증진을 위한 경제적인 필수 아미노산 생산 및 제형기술 개발 담당
- 제1협동기관(건국대학교)은 각 필수아미노산에 따른 유중 단백질 합성 정도를 평가하여 가성비 높은 아미노산을 선정하여 주관기관에 제공 담당
- 아울러 제1협동기관(건국대학교)은 필수아미노산의 반추위 bypass 및 유선세포 이용성 증진을 위한 제형 기술에 따른 아미노산 제제의 유선에서의 단백질 합성 효율 검증 및 기전 연구 담당
- 위탁기관(경북대학교)은 제형 된 필수아미노산과 그 대사촉진 물질의 반추위 Bypass 효율 검증 및 제1협동기관과 *in vivo* 실험을 통하여 유단백 생산 연구 담당
- 주관기관(씨제이제일제당(주))은 아미노산 생산 관련 기술 및 가격 경쟁력을 바탕으로 한 보호아미노산 제형 개발 담당
- 주관기관(씨제이제일제당(주))은 협동연구 결과를 바탕으로 한 bypass 아미노산 제품의 상용화 담당
- 세부 및 협동과제 및 위탁과제와의 상호 유기적인 연구교류를 통하여 본과제의 목표를 달성하기 위하여 노력하였음.

## 제 2 절 연구개발 추진 체계 및 일정

### 1. 연구개발 추진 체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	유단백질 고함유 우유생산을 위한 젖소에서 필수아미노산의 이용성 증진연구	주관연구책임자 문준옥 외 총 22명

기관 별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기업	1	8명
중견기업		
중소기업		
대 학	2	14명
국공립(연)		
출 연 (연)		
기 타		

주관: 씨제이제일제당(주)
젖소의 유단백 증진용 고효율 아미노산 제제 개발
연구책임자명 문준옥 외 7명
담당기술개발내용
보호 아미노산 제형 보호 아미노산 상업화

1협동: 건국대학교
각 필수 아미노산에 따른 유중 단백질 합성의 영향 조사
연구책임자명 이흥구 외 7명
담당기술개발내용
젖소 유래 유선상피세포(MAC-T Cell)를 이용한 각 필수아미노산의 유중 단백질합성 정도를 조사하고, omics 분석을 통한 각각의 유중 단백질 합성관련 대사기전을 확인하고자 함.

위탁: 경북대학교
제형화 아미노산 제제의 반추위 안정성 및 유단백질 증진효과 검증
연구책임자명 김은중 외 5명
담당기술개발내용
1세부과제의 아미노산 복합 제제의 반추위 bypass 효율 및 반추위 발효 안정성 연구

### 2. 연구개발 추진 일정

#### 가. 1차년도 추진 일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1세부연구기관(씨제이제일제당(주))																
1	반추위 보호 기능을 갖는 보호 아미노산 제형 개발 (기반기술)														48,000	양영렬 (씨제이제일 제당(주))



6	1세부과제를 통해 개발, 제형화된 아미노산 제제의 bypass 효율 측정													30,000	김은중 (경북대학교)
7	1세부과제를 통해 개발, 제형화 된 아미노산 제제의 반추위 발효 특성 및 건물소화율에 미치는 영향													40,124	

다. 3차년도 추진 일정

3차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1세부연구기관(씨제이제일제당(주))																
1	대량 생산 가능한 보호 아미노산 제형 기술 최적화														359,500	문준욱 (씨제이제일 제당(주))
2	신규 제품 등록(사료첨가제)을 위한 안정성 데이터 확보														50,000	
1협동연구기관(건국대학교)																
3	착유우에 있어서 최적의 반추위 보호 필수아미노산의 유선에서의 단백질 대사기전 규명 연구														80,000	이홍구 (건국대학교)
4	In vitro 실험에서 검증된 최적의 필수아미노산 조합을 착유우에 급여시 유중 단백질 증진에 미치는 영향 검증														62,424	
4	착유우 대상 최적 필수아미노산 조합 및 유중 단백질 합성 촉진 물질 첨가에 따른 유중 단백질 증진 영향 조사 (위탁과제와 공동진행)														80,000	
위탁연구기관 (경북대학교)																
5	최종 개발된 최적 조합 아미노산 제제 및 유단백질 합성 촉진물질의 bypass 효율 및 반추위 발효 특성 평가														20,000	김은중 (경북대학교)
6	착유우를 이용한 최종 개발된 최적 조합 아미노산 제제 및 유단백질 합성 촉진물질의 유단백질 증진 효과 검증 (1협동과제와 공동진행)														50,076	

### 제 3 절 연구 개발 성과

#### 1. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		논문 평균 IF			학술 발표	정책 활용		홍보 전시
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	5		5	5	45	5	5					10	5		5				
최종목표	7	3		2	26	5	105,000	103,850	2				9		1.0	9		8		
연구기간 내 달성 실적	목표	5	1		1	26	3						7		1.0	7		7		
	실적	3	0		0	0	3						4*		1.0	14**	2	8		
달성율(%)	60	0		0	0	100							57		1.0	200		114		

\* 게재 완료 4건, 투고 진행 중 4건

\*\* 학술대회 수상 3건 (최우수상)

#### 2. 과학적 성과

가. 논문(국내외 전문학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	IF	SCI여부 (SCI/비SCI)
1	L-Lactate dehydrogenase B chain associated with milk protein content in dairy cows	Animals	Tao Wang	9(7)	1.832	SCI
2	Administration of encapsulated L-tryptophan improves duodenal starch digestion and increases gastrointestinal hormones secretions in beef cattle	Asian-Australian Journal of Animal Science	Sang-Bum Lee	33	1.227	SCIE
3	Effects of nitrogen gas flushing in comparison with Argon on rumen fermentation characteristics in <i>in vitro</i> studies	Journal of Animal Science and Technology	Ki Yeon Park	62(1)	-	SCIE

4	Phenylalanine and valine differentially stimulate milk protein synthetic and energy-mediated pathway in immortalized bovine mammary epithelial cells	Journal of Animal Science and Technology	Jungeun Kim	62(2)	-	SCIE
5	Advances on research in protein-enriched cow's milk: A review from omics perspective	Animals	Jay Ronel V Conejos	투고중	1.832	SCI
6	Supplementing L-isoleucine increases medium protein and alters the expression of genes and proteins involved in milk protein synthesis and energy metabolism in bovine mammary cells	Journal of Animal Science and Technology	Jay Ronel V Conejos	투고중	-	SCIE
7	Effect of L-Tryptophan on medium protein, beta casein expression, protein synthesis-related genes and proteomics profile on immortalized mammary epithelial cells	Journal of Animal Science and Technology	Jay Ronel V Conejos	투고중	-	SCIE
8	A study on improvement of productivity of acetate and L-tryptophan conjugated bypass amino acid (ACT) during dry period in dairy cattle	Asian-Australian Journal of Animal Sciences	JangHoon Jo	투고중	1.227	SCIE

나. 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	발표명	학회명	발표자	발표일시	장소/국명	비고
1	Isolation method for mammary epithelial cells from fresh milk in Holstein dairy cows	한국축산학회	김정은	2017.06.29	대한민국	
2	Supplementing ten essential amino acids alters beta-casein, mTOR-related gene expression as well as cell and medium protein synthesis in bovine mammary epithelial cells	한국축산학회	Jay Ronel V Conejos	2018.06.29	대한민국	
3	Effects of dietary supplementation of rumen-protected L-tryptophan (RPLT) on the milk yield and composition in Holstein lactating dairy cows	한국축산학회	최원태	2018.06.29	대한민국	
4	L-histidine stimulates the milk protein synthesis via mTOR pathway in bovine mammary epithelial cells	한국축산학회	김정은	2018.06.29	대한민국	

5	Improving productive performance of Holstein dry cow through supplementing rumen-protected amino acid L-Tryptophan (RPT)	IDF 2018	조장훈	2018.10.16	대한민국	최우수상
6	Effects of dietary supplementation of rumen-protected L-tryptophan (RPT) under heat stress conditions on milk yield and compositions in Holstein dairy cows	IDF 2018	최원태	2018.10.16	대한민국	
7	L-Phenylalanine and L-Valine differently stimulate the milk protein synthesis via mTOR pathway in bovine mammary epithelial cells	IDF 2018	김정은	2018.10.16	대한민국	
8	Individual and combined amino acid supplementation to bovine mammary epithelial cells increases medium protein and beta casein gene expression	한국축산학회	Jay Ronel V Conejos	2019.06.28	대한민국	
9	Isoleucine supplementation to bovine mammary epithelial cells increases medium protein and alters the expression of genes and proteins involved in milk protein synthesis and energy metabolism	한국축산학회	Jay Ronel V Conejos	2019.06.28	대한민국	최우수상
10	Effects of rumen-protected L-tryptophan (RPT) supplementation with different dose to diet on milk yield and compositions in dairy cows under heat stress conditions	한국축산학회	최원태	2019.06.28	대한민국	최우수상
11	L-Histidine and sodium acetate stimulate milk protein synthesis in nutrient-restricted bovine mammary epithelial cells	한국축산학회	김정은	2019.06.28	대한민국	
12	Supplementing L-tryptophan increases medium protein and alters the expression of genes and proteins involved in milk protein synthesis and energy metabolism in bovine mammary cells	생명학술대회	Jay Ronel V Conejos	2019.08.14	대한민국	
13	Effect of Rumen-Protected Amino Acids on In Vitro Rumen Fermentation	18 <sup>th</sup> Asian-aust ralasian animal production congress	김경진	2018.08.03	말레이시아	
14	Effects of the rumen-protected amino acids on rumen fermentation in vitro	12 <sup>th</sup> Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology	김경진	2019.10.24~26	중국	

### 3. 기술적 성과

#### 가. 지식재산권 (특허)

번호	구분	명칭	출원인	국명	소속기관	출원일	출원번호	비고
1	특허 출원	N-아세틸-L-트립토판을 유효성분으로 포함하는 젖소용 사료첨가제	씨제이 제일제당	대한민국	씨제이 제일제당	2018.11.12	10-2018-0138460	
2	특허 출원	N-아세틸 디펩티드 및 N-아세틸 아미노산의 제조 방법	씨제이 제일제당	대한민국	씨제이 제일제당	2018.11.12	10-2018-0138271	
3	특허 출원	L-히스티딘 및 아세트산을 포함하는 유단백 합성 촉진용 조성물	건국대학교 산학협력단	대한민국	건국대	2019.11.08	10-2019-0142509	

### 4. 사회적 성과

#### 가. 전문연구 인력 양성

번호	구분	국명	소속기관	일자	비고
1	조교수	대한민국	건국대	2018.04.01	
2	학사 학위	대한민국	건국대	2018.02.22	
3	학사 학위	대한민국	건국대	2018.02.22	
4	석사 학위	대한민국	건국대	2018.08.22	
5	석사 학위	대한민국	건국대	2018.08.22	
6	석사 학위	대한민국	건국대	2019.08.22	
7	박사 학위	대한민국	건국대	2020.02.21	졸업 예정
8	석사 학위	대한민국	경북대	2020.02.21	졸업 예정

#### 나. 교육 지도

번호	교육 내용	국명	소속기관	일자	비고
1	낙농 후계자 아카데미	대한민국	건국대	2019.07.28	축산업 종사자
2	스마트 낙농구현을 위한 최근 기술 동향 및 추진전략 (서울우유)	대한민국	건국대	2019.12.16	기업 종사자

다. 수상 실적

번호	수상 내역	국명	소속기관	일자	비고
1	IDF 2018 포스터 분야 최우수상	대한민국	건국대	2018.10.18	
2	한국축산학회 구두발표 동물생명공학 최우수상	대한민국	건국대	2019.06.28	
3	한국축산학회 포스터발표 반추영양분야 최우수상	대한민국	건국대	2019.06.28	

## 제 4 절 연구개발 내용

### 1. 젖소의 유단백 증진용 고효율 아미노산 제제 개발 - 씨제이제일제당 (주관기관)

#### 가. 반추위 보호 기능을 갖는 보호 아미노산 제형 개발 (1차년도)

메치오닌(L-Met)을 기반 아미노산으로 선정된 뒤, 다양한 보호기 도입을 통한 아미노산 유도체 합성을 위한 합성 플랫폼 기술 탐색함.

#### (1) Methionine ester 유도체의 합성 - 카르복실 그룹에 알콜기 도입

##### (가) Methionine ethylester 합성

① 주요 재료: 메치오닌, 에탄올, 무기산(염산 또는 황산)

##### ② 합성법

- 무기산 주입량을 기질의 당량별로 methionine + ethanol 용액에 주입
- 환류 반응(reflux) 1시간 진행
- 감압 조건에서 용매 증발시킨 뒤 methionine ethylester 결정을 수득
- GC를 통한 methionine ethylester 합성여부 평가

##### ③ 분석 결과 및 고찰

- GC 분석 결과: 합성 수율 50 mol%, 정제수율 42 mol%
- 2당량 이상의 산이 주입되어 pH가 1이하로 떨어지게 될 경우 원활한 합성 진행 확인
- 산촉매인 염산 대신 황산을 주입 하였을 경우 생성물 및 결정화 수율 감소 확인

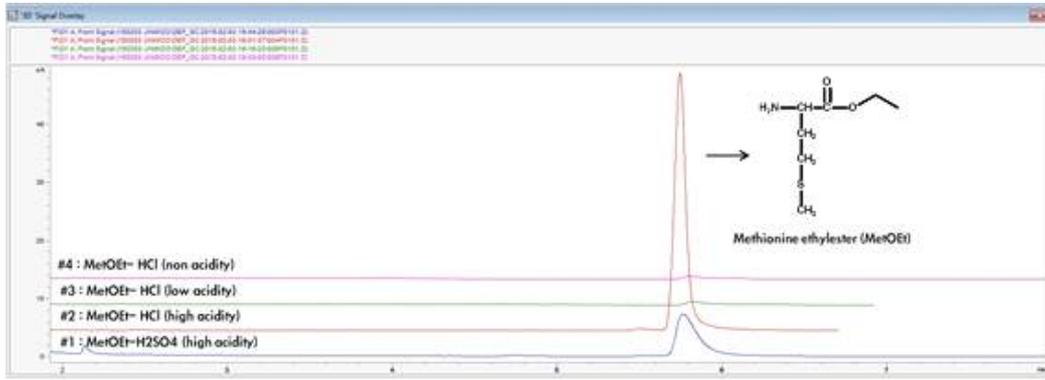


그림 1. Methionine ethylester 유도체 합성 결과

(나) Methionine methylester 및 Methionine isopropylester 합성

- ① 주요 재료: 메치오닌, 메탄올 또는 iso-propanol, 무기산(염산)
- ② 합성법: 상기 방법과 동일하게 진행
- ③ 분석 결과 및 고찰
  - L-Methionine methylester GC 분석 결과: 합성 수율 65 mol%, 정제수율 54 mol%
  - L-Methionine isopropylester GC 분석 결과: 합성 수율 38 mol%, 정제수율 29 mol%
  - 특별한 부반응 없이 esterification이 진행되었음을 GC를 통해 확인

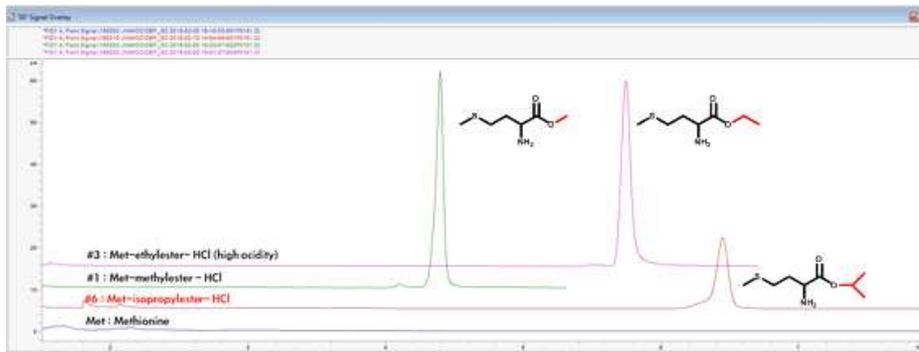


그림 2. Methionine methylester/isopropylester 유도체 합성 결과

(2) Acyl-Methionine 유도체의 합성 - 아민 그룹에 유기산 도입

(가) Acetic acid 도입 (N-Acetyl-L-Methionine의 합성)

- ① 주요 재료: 메치오닌, NaOH, 무수초산(acetic anhydride), 황산
- ② 합성법
  - DW에 methionine을 용해도 이상으로 과량 주입하여 현탁액 제조
  - NaOH를 투입하여 완전 용해 유도
  - Acetylation을 위해 무수 초산(acetic anhydride)을 methionine 대비 2당량 주입
  - 상온 조건에서 1시간 동안 교반 반응 진행
  - 반응 종료 후, 황산을 주입하여 Na<sup>+</sup> 이온은 sodium sulfate 형태로 석출 시켜 분리
  - 여과액 내 존재하는 N-acetyl-L-Methionine은 농축하여 초산 제거 후 결정화 진행

- TLC 및 GC를 통한 N-acetyl-L-Methionine 합성여부 평가

③ 분석 결과 및 고찰

- GC 분석 결과: 합성 수율 95 mol%, 정제수율 86 mol%
- 2당량 이상의 산이 주입되어 pH가 1이하로 떨어지게 될 경우 원활한 합성 진행 확인
- GC 분석 및 TLC 분석 결과 N-acetyl-L-Methionine의 합성 확인
- 부생성물로서 1당량의 acetic acid 생성  
: 부생성물 제거를 위해 NaOH 및 무기산 적용 시도했으나 전환 반응 진행 안됨

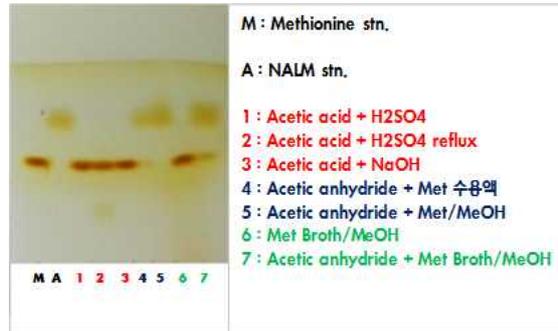


그림 3. N-acetyl-L-Methionine 합성 조건별 TLC 분석 결과

(나) Propionic acid 및 butyric acid 도입 (N-Propionyl/butyryl-L-methionine의 합성)

① 주요 재료: 메치오닌, Propionyl anhydride 또는 butyric anhydride, ethyl acetate

② 합성법

- Ethyl acetate에 methionine을 용해시킨 뒤, 각 anhydride 첨가 70° C 조건에서 반응
- 반응액을 농축하여 초산 제거 후 결정화 진행
- TLC 및 GC를 통한 N-propionyl/butyryl-L-Methionine 합성여부 평가

③ 분석 결과 및 고찰

- N-propionyl-L-Methionine GC 분석 결과: 합성 수율 80 mol%, 정제수율 41 mol%
- N-butyryl-L-Methionine GC 분석 결과: 합성 수율 66 mol%, 정제수율 35 mol%
- TLC 분석 결과 대부분의 methionine이 1시간 이내 전환 되는 것을 확인

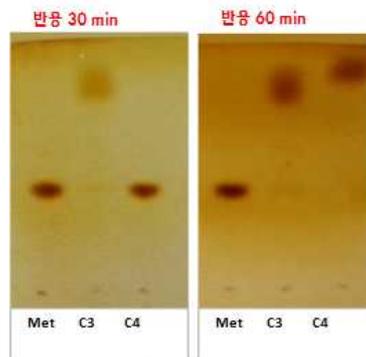


그림 4. 반응시간에 따른 Methionine 전환 결과 (C3: Propionic acid; C4: butyric acid)

(3) Acyl-Methionine 유도체의 합성 - 아민 그룹에 지방산 도입

(가) Oleic acid 및 palmitic acid 도입 (N-oleic/palmitic-L-Methionine의 합성)

① 주요 재료

- 메치오닌, Oleic acid/palmitic acid chloride, acetone, sodium carbonate, NaOH, HCl

② 합성법

- Fatty acid chloride를 아세톤 용매에 녹인 뒤, sodium carbonate와 NaOH가 포함된 Methionine 수용액과 상온에서 반응하여 합성을 진행
- HCl을 첨가 하여 pH 2.5 수준으로 유지한 뒤, 상온에서 30분간 추가 교반 진행
- 물을 과량 투입하여 용해도의 차이로 인해 발생한 침전물을 여과하여 감압건조 진행
- TLC 및 LC를 통한 N-oleic/palmitic-L-Methionine 합성여부 평가

③ 분석 결과 및 고찰

- N-oleic-L-Methionine LC 분석 결과: 합성 수율 90 mol%, 정제수율 63 mol%
- N-palmitic-L-Methionine LC 분석 결과: 합성 수율 85 mol%, 정제수율 86 mol%
- Oleic acid를 적용한 경우 생성물이 점도가 높은 emulsion 형태로 수득 (결정화 불가)



그림 5. N-Oleic-L-Methionine 정제 결과

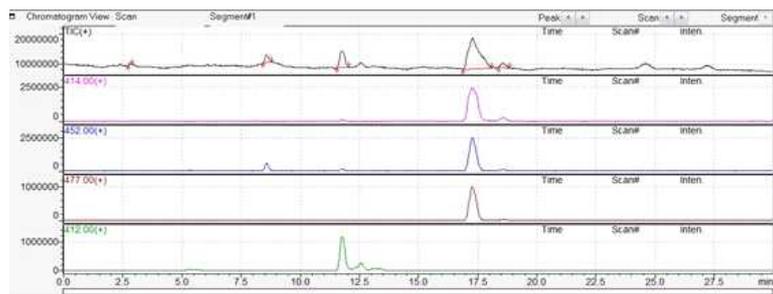


그림 6. N-Oleic-L-Methionine (MW:413) LC-MS 결과

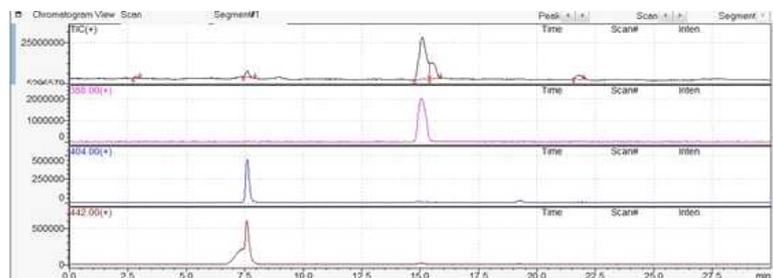


그림 7. N-palmitic-L-Methionine (MW:387) LC-MS 결과

(4) 보호 아미노산 합성을 위한 플랫폼 기술 선정

다양한 Met 기반 유도체의 합성을 추진하면서 개발 물질의 합성 및 정제 수율, 이를 바탕으로 원부재료비를 추정하여 최종 합성 플랫폼 기술을 선정하였음.

표 3. 메치오닌 기반 유도체 합성법 전환 및 정제 수율, 원부재료비

물질명	합성수율 (mol%)	정제수율(mol%)	원부재료비 (\$/kg)
L-Methionine ethylester	50	42	3.5
L-Methionine methylester	65	54	2.8
L-Methionine isopropylester	38	29	5.7
<b>N-acetyl-L-Methionine</b>	<b>95</b>	<b>86</b>	<b>2.8</b>
N-propionyl-L-Methionine	80	41	7.9
N-butyryl-L-Methionine	66	35	14.1
N-oleic-L-Methionine	90	63	6.8
N-palmitic-L-Methionine	85	86	22.4

분석 결과 아미노산의 아세틸레이션을 도입하는 유도체 합성 기술이 가장 높은 합성 수율과 정제수율을 보였으며, 더 나아가 원부재료비 역시 가장 저렴한 수준으로 합성이 가능함을 확인하였음. 이에 아미노산의 아세틸화 반응을 보호 아미노산 유도체 합성을 위한 플랫폼 기술로 선정하였음.

#### 나. 유단백 개선 가능성이 확인된 아미노산 대상 보호 아미노산 제형 개발 (1차년도)

선행 연구를 통해 확보한 아미노산 아세틸화 플랫폼 기술을 대상으로 협력 기관(건국대학교)의 연구를 통해 유단백 개선 효과가 확인된 아미노산 트립토판과 히스티딘을 대상으로 합성 가능성을 평가하였음.

##### (1) N-acetyl-L-Tryptophan의 합성

(가) 주요 재료: 트립토판, 메탄올, 무수초산(acetic anhydride)

(나) 합성법

- 메탄올에 트립토판을 첨가하여 현탁액 제조
- 40° C 승온한 뒤, 무수초산(acetic anhydride)을 트립토판 대비 2당량 주입 (3시간 반응)
- 반응 종료 후, 메탄올 제거를 위해 감압 농축 진행
- 석출된 결정을 여과 분리한 뒤, 건조 진행
- GC를 통한 N-acetyl-L-Tryptophan 합성여부 평가

(다) 분석 결과 및 고찰

- GC 분석 결과: 합성수율 94 mol%, 함량 98%
- 물 기반 아세틸화 반응 시 트립토판의 낮은 용해도로 인해 낮은 전환율 확인  
: 상기 이슈를 해결하기 위해 기존 확립된 합성법 대신 메탄올 용매로 전환
- GC 분석 및 TLC 분석 결과 N-acetyl-L-Methionine의 합성 확인

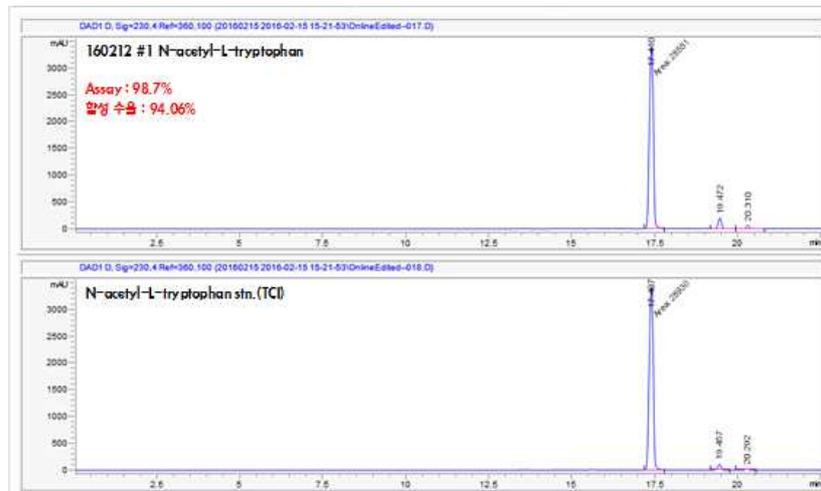


그림 8. N-acetyl-L-tryptophan 합성 결과

(2) N-acetyl-L-Histidine의 합성

(가) 주요 재료: 히스티딘, NaOH, 무수초산(acetic anhydride), 황산

(나) 합성법: 기존 평가된 아세틸화 합성법과 동일

(다) 분석 결과 및 고찰

- GC 분석 결과: 합성수율 95 mol%
- 기존 N-acetyl-L-Methionine 합성법과 동일하게 적용 가능 확인

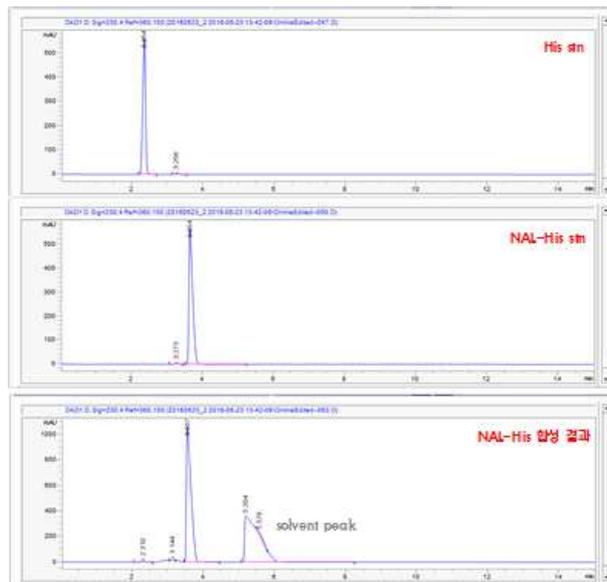


그림 9. N-acetyl-L-Histidine 합성 결과

상기 합성법 적용을 통해 유단백 개선능이 확인된 아미노산의 합성 가능성을 확인하였으며, 해당 아미노산 유도체를 대상으로 실제 반추위 내 보호 가능 여부를 in vitro bypass를 평가할 예정임 (경북대학교). 아울러 차년도 연구를 통해 해당 합성법의 최적화 공정 개발을

통해 경제성 평가를 추진할 계획이며, 추가 아미노산의 적용 및 bypass율 등의 종합적인 평가를 통해 최종 아이টে를 선정할 예정이다.

#### 다. 선정된 필수 아미노산의 조합에 적합한 제형 개발 (2차년도)

##### (1) 연구 목적

- 필수 아미노산 조합에 따른 보호 아미노산 제형 개발
- 1차년도 연구를 통해 유단백 개선 효과가 확인된 필수 아미노산 조합을 대상으로 한 반추위 보호 기능 부여 및 제형 개발

##### (2) 실험 설계

###### (가) 물리적 또는 화학적 조합을 통한 보호 아미노산 제형 개발

- 물리적 조합: 개별 보호 아미노산 혼합물 개념 (개별 보호 아미노산 先 생산, 後 혼합)
- 화학적 조합: 펩타이드 개념의 보호 아미노산 확보

###### (나) 적용 대상 아미노산

- His, Trp, Phe, Leu, Ile, Val 등 유단백 개선능이 확인된 필수 아미노산 6종

###### (다) 제형 개발 순서

- 1단계: 개별 아미노산의 화학 합성법 확보
- 2단계: 펩타이드형 보호 아미노산 합성을 위한 기반 기술 확보

##### (3) 연구 결과

###### (가) 개별 아미노산의 화학 합성법 확보

1차년도 연구 결과를 통해 확보한 아세틸레이션 합성법을 적용하여 유단백 개선 가능성이 확인된 6종의 필수 아미노산(His, Trp, Phe, Leu, Ile, Val)에 대한 반추위 보호 기능 부여를 수행하였음. 이 중 1차년도 연구를 통해 기본적인 합성 가능성을 확인한 Trp 및 His의 경우 합성 수율 및 함량을 개선하기 위한 추가 연구를 수행하였음. 이에 대한 세부 연구 결과는 다음과 같음.

###### ① N-Acetyl-L-Tryptophan (이하 NALTrp)

1차년도 연구를 통해 합성 수율 94 mol% 및 순도 98%를 갖는 기본 합성법을 확보하였으며, 이를 바탕으로 기존 공정의 개선 및 최적화를 통한 수율 및 함량 개선 연구를 수행하였음. 1차년도 연구에서는 Trp의 물에 대한 낮은 용해도로 인해 메탄올을 기본 용매로 활용하여 평가를 진행하였으나, 2차년도 연구에서는 트립토판의 용해도 이슈 해결을 통해 물을 기반으로 한 수계합성공법의 개발을 시도하였음.

㉮ 주재료: 트립토판, 무수초산(acetic anhydride), 정제수, 수산화나트륨(NaOH), 염산(HCl)

###### ㉯ 합성법

- 트립토판 50g(0.245몰)을 정제수 250g과 혼합 한 뒤 교반을 진행하여 현탁액 제조
- 수산화나트륨 19.6g을 투입을 통한 트립토판 용해 (교반 유지)

- 트립토판의 1.25당량 해당하는 무수초산 31.2g(0.306몰)을 천천히 반응액에 주입
- 상온조건에서 1시간 동안 반응액 교반 (전환 반응)
- 전환반응 이후 35%염산수용액 51g을 전환반응액에 투입  
(발열이 발생하기 때문에 내부온도 기준 30℃ 가 넘지 않도록 천천히 염산수용액 주입)
- 염산수용액 투입 완료 후, 반응액 온도를 15℃로 낮추어 교반 진행
- 결정이 석출되는 시점에서 2시간 추가 교반 후 물로 세척하면서 감압여과 진행
- 잔류 수분양 0.3% 미만이 될 때까지 열풍건조 진행

㉔ 분석 결과

- HPLC 분석 결과 총 수율 98.0 mol%, 순도 99.5% (2회 반복 평가 결과)
- 기존 메탄올 기반 공정 대비 수율 4 mol%p, 순도 1.5%p 상승 확인
- 수계합성공정 시 발생하는 트립토판 용해도 문제는 pH 제어를 통해 해결

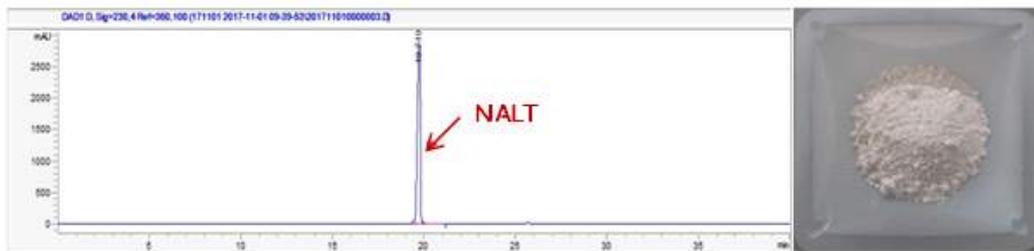


그림 10. N-acetyl-L-Tryptophan HPLC 정량 분석 결과 및 샘플 외관

② N-Acetyl-L-Histidine (이하 NALHis)

1차년도 연구에서는 메탄올을 기반으로 합성 연구를 수행하였으며, 평가 결과 95 mol%의 합성 수율을 확인하였음. 하지만 메탄올의 경우 낮은 비점으로 인해 사용 후 용매 회수가 어려울 뿐만 아니라, 무수초산에 의해 발생하는 초산과의 분리 정제 과정이 추가적으로 필요하기 때문에 용매 변경을 통한 새로운 공정 개발을 수행하였음.

㉑ 주요 재료: 히스티딘, 무수초산(acetic anhydride), 초산, 아세톤

㉒ 합성법

- 히스티딘 50g(0.32몰)을 초산 150g과 혼합한 뒤 60℃ 승온 교반(히스티딘 초산용액)
- 무수초산 34.5g(0.34몰)을 천천히 투입 (온도 60℃; 반응액이 황색 투명한 상태로 변경)
- 히스티딘이 모두 용해된 시점에서 1시간 추가 교반 (전환 반응)
- 60℃ 조건에서 감압농축을 진행하여 초산용매 분리 회수
- 농축액 내 잔류 초산을 추가 제거하기 위해, 정제수 250g을 주입하여 농축액 용해
- 동일조건에서 재농축 실시 (2회 반복; 분말 형태로 전환)
- 아세톤 500g을 이용해 상온 교반하여 재결정화 진행
- 교반 이후 생성된 결정은 감압여과를 통하여 분리한 후, 아세톤을 이용해 추가 세척
- 잔류 휘발분 0.3% 미만이 될 때까지 열풍건조 진행

㉓ 분석 결과: HPLC 분석 결과 총 수율 95.0 mol%, 순도 99.8% (2회 반복 평가 결과)

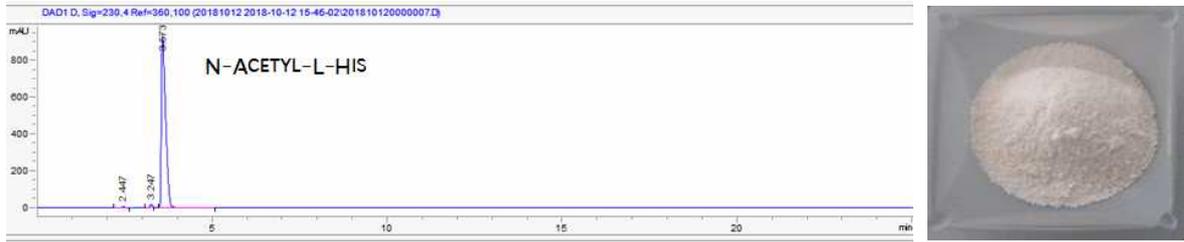


그림 11. N-acetyl-L-Histidine HPLC 정량 분석 결과 및 샘플 외관

③ N-Acetyl-L-Phenylalanine (이하 NALPhe)

㉞ 주요 재료: 페닐알라닌, 무수초산(acetic anhydride), 정제수, 수산화나트륨, 염산

㉟ 합성법

- 페닐알라닌 14.9g (0.09몰)을 정제수 200g과 혼합 및 교반
- 1N 수산화나트륨 수용액을 반응액 내 페닐알라닌이 모두 용해 될 때까지 주입
- 무수초산 15.3g (0.15몰)을 천천히 투입하여 전환 반응 진행 (3시간)  
(반응액의 pH 가 8.0 이하로 떨어지지 않도록 1N 수산화나트륨을 이용하여 pH 유지)
- 전환반응 이후 35% 염산수용액을 이용하여 반응액의 pH를 2.0으로 조정  
(내부 온도 기준 30°C가 넘지 않도록 천천히 염산수용액 주입)
- 반응액 온도를 15°C로 낮추어 교반을 진행
- 결정이 석출되는 시점에서 2시간 추가 교반 후 물로 세척하면서 감압여과 진행
- 잔류 수분양 0.3% 미만이 될 때까지 열풍건조 진행

㊱ 분석 결과: HPLC 분석 결과 총 수율 93.0 mol%, 순도 99.9% (2회 반복 평가 결과)

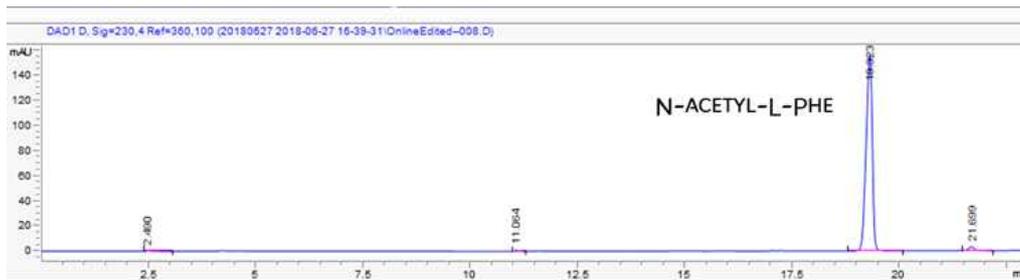


그림 12. N-acetyl-L-Phenylalanine HPLC 정량 분석 결과

④ N-Acetyl-L-Leucine (이하 NALLeu)

㉞ 주요 재료: 류신, 무수초산(acetic anhydride), 정제수, 수산화나트륨, 염산, 아세톤

㉟ 합성법

- 류신 131g (1.0몰)을 정제수 350g과 혼합 및 교반
- 8N 수산화나트륨 수용액 350ml를 반응액 내 류신이 모두 용해 될 때까지 주입
- 무수초산 204g (2.0몰)을 추가로 천천히 투입하여 전환반응 (0~5°C 유지, 2 시간 교반)
- 전환반응 완료 후, 35% 염산수용액 380ml 주입 (pH 3.0, 내부온도 5°C 유지)
- 염산수용액의 투입이 완료된 시점에서 12시간 추가 교반
- 차가운 아세톤수용액을 이용하여 습체를 세척하면서 감압여과 진행
- 잔류 수분양 0.3% 미만이 될 때까지 열풍건조 진행

㉔ 분석 결과: HPLC 분석 결과 총 수율 63.5 mol%, 순도 99.0% (2회 반복 평가 결과)

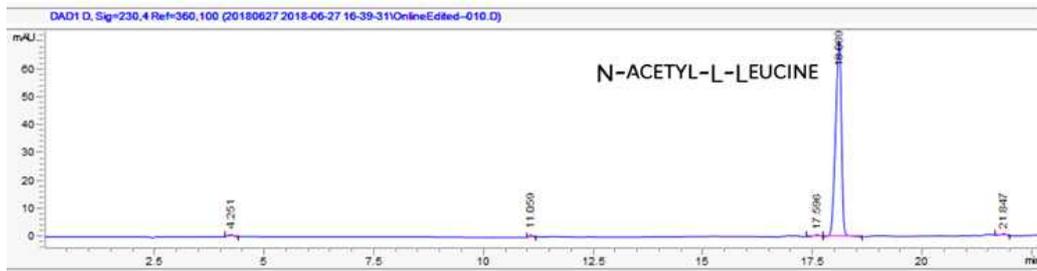


그림 13. N-acetyl-L-Leucine HPLC 정량 분석 결과

㉕ N-Acetyl-L-Isoleucine (이하 NAL Ile)

㉗ 주요 재료: 이소류신, 무수초산(acetic anhydride), 초산, 수산화나트륨, 염산

㉘ 합성법

- 이소류신 13g(0.1몰)을 초산 84g과 혼합 한 뒤, 70°C 승온 교반
- 무수초산 14.2g(0.14몰)을 천천히 투입 (반응액 온도 70°C 유지)
- 이소류신이 모두 용해된 시점에서 3시간 추가 교반 (전환 반응)
- 전환반응 이후 70°C 조건에서 감압농축 진행 (초산 용매 분리 회수)
- 반응농축액에 정제수 100ml를 투입하여 농축액을 용해 (70°C 온도 조건 유지)
- 5 °C에서 냉각시키면 결정이 석출되며, 2시간 추가 교반 후 물로 세척 및 감압여과
- 잔류 수분양 0.3% 미만이 될 때까지 열풍 건조 진행

㉔ 분석 결과: HPLC 분석 결과 총 수율 83.4 mol%, 순도 99.3% (2회 반복 평가 결과)

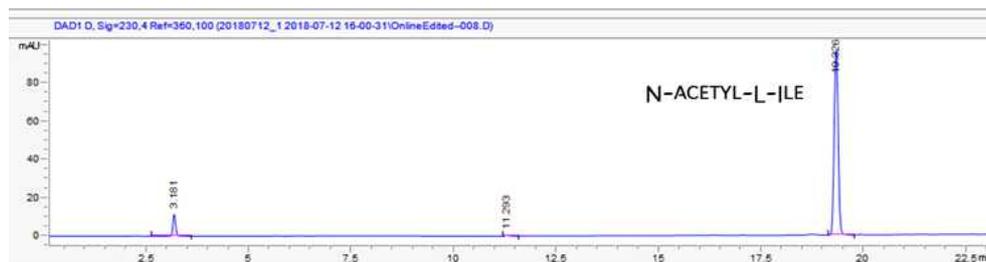


그림 14. N-acetyl-L-Isoleucine HPLC 정량 분석 결과

㉖ N-Acetyl-L-Valine (이하 NALVal)

㉗ 주요 재료: 발린, 무수초산(acetic anhydride), 정제수, 수산화나트륨, 염산

㉘ 합성법: N-Acetyl-L-Leucine 합성 공정과 동일

㉔ 분석 결과: HPLC 분석 결과 총 수율 86.0 mol%, 순도 99.6% (2회 반복 평가 결과)

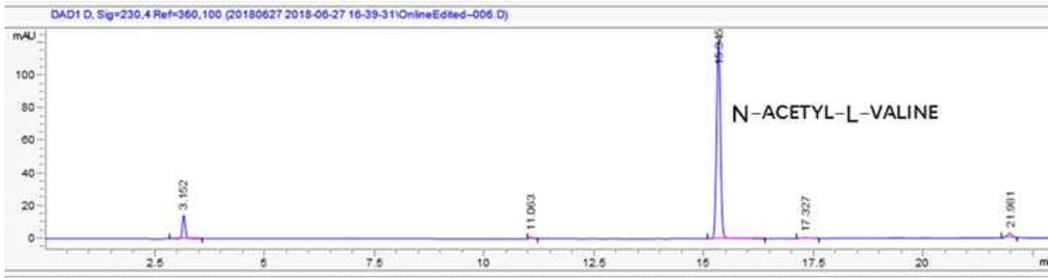


그림 15. N-acetyl-L-Valine HPLC 정량 분석 결과

⑦ 결과 고찰

- 총 6종의 아미노산을 대상으로 아세틸레이션 공법 적용 연구 수행
- 순도 99% 이상의 유도체형 보호 아미노산 합성 (총수율의 경우 아미노산 별 차이 有)
- 적용 아미노산 종류 및 최종 제형의 특성에 따른 용매, 합성 및 정제 공정 선택적 적용
- 2종 이상의 아미노산을 혼합한 뒤, 보호 기능을 부여하는 방법의 경우(先 혼합, 後 보호 기능 부여), 개별 아미노산의 합성 및 정제 수율에 따른 최종 제품의 품질 관리가 어려울 것으로 예상 → “先 보호 기능 부여, 後 혼합” 방법이 적절할 것으로 판단됨

(나) 펩타이드형 보호 아미노산 합성을 위한 기반 기술 확보

개별 보호 아미노산의 조합별 제공을 위한 방안으로 화학적 결합을 통한 펩타이드 개념을 도입하고자 함. 펩타이드는 아미노산이 화학적으로 2개 이상 결합되어 있는 상태로써, 다수의 문헌을 통해 아미노산 대비 소장에서의 흡수율이 개선되는 효과가 보고된 바 있음. 특히, 복수의 개별 보호 아미노산을 단일 공급을 통해 제공할 수 있기 때문에 사용자 편의성이 개선될 것으로 예상됨. 이를 위해 펩타이드 생산을 위한 기본 합성법 연구를 수행하였음. 특히 최종 연구 목적이 반추동물용 사료 첨가제를 개발하는 것이기 때문에 기본적인 펩타이드 합성 연구와 반추위 보호기능 동시 부여를 통한 보호 펩타이드 개발을 추진하였음.

① 펩타이드 합성 기반 기술 연구

일반적으로 펩타이드 합성은 아미노산 내 복수의 작용기(아민기, 카르복실기)로 인해 blocking agent를 사용함. 즉, 2개의 아미노산을 결합할 경우 A 아미노산의 아민기와 B 아미노산의 카르복실기를 중심으로 반응이 진행되는데, 잉여의 작용기(A 아미노산의 카르복실기 및 B 아미노산의 아민기)가 활성화 됨으로써 부생성물을 생성하게 되며, 그 결과 펩타이드 합성 수율 및 선택도의 감소 현상이 발생하게 됨. 이러한 부반응을 최소화하기 위한 방안으로 blocking agent를 도입하여 잉여의 작용기를 비활성화시키고, 이를 통해 원하는 펩타이드 합성의 효율성을 증대시킴. 하지만 blocking agent의 경우 고가의 화학물질이기 때문에 산업용 펩타이드의 생산에는 제한이 있음. 이러한 장단점을 바탕으로 본 연구에서는 blocking agent 도입 유무에 따른 펩타이드 합성법을 비교 분석하고, 이를 바탕으로 경제성 있는 방법을 탐색하고자 함. 이를 위해 메치오닌을 표준 아미노산으로 선정하여 펩타이드 합성 연구를 수행하였음. 특히 메치오닌의 경우 대표적인 반추동물 제한 아미노산으로써 향후 본 과제를 통해 개발되는 다양한 필수 아미노산 조합과 연계가 가능하기 때문에 활용 가치는 매우 클 것으로 판단됨.

㉔ Blocking agent 도입을 통한 펩타이드 합성

L-Met을 기반으로 한 다이펩타이드(Met-Met) 합성법 개발 연구를 수행하였으며, 동시에 반추위 보호 기능 부여를 위한 아세틸기 도입을 통해 최종적으로 N-Acetyl-Met-Met (이하 NALM-Met) 합성법에 대한 연구를 수행하였음. 이를 위한 기본적인 합성 개략도는 다음과 같음.

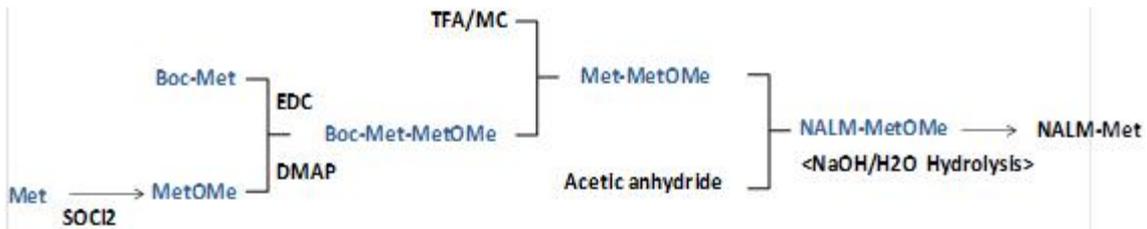


그림 16. N-Acetyl-Met-Met 합성 모식도

Step 1. N-Boc-L-Methionine과 Methionine methylester의 반응을 통한 Boc-Met-MetOMe 합성

- N-Boc-L-Methionine: 표준 시약 활용 (Sigma, Cat # 408425)
- Methionine methylester  
: L-Met과 SOCl<sub>2</sub>(thionyl chloride), 그리고 메탄올을 이용하여 별도 합성

참고사항1)

BOC, 대표적인 blocking agent (L-Met의 아민기에 결합하여 작용기 비활성화 유도)

참고사항2)

L-Met의 카르복실기에 methyl group (-CH<sub>3</sub>)가 결합되어 있는 상태

N-Boc-L-Methionine과 Methionine methylester의 반응 이후 얻어진 Methionine methylester HCl 은 methylene chloride를 이용하여 Methionine methylester로 분리 추출 하였으며, 추출 이후 methylene chloride를 농축 제거함으로써 액상상태의 생성물을 확보하였음. 이와 같이 얻어진 Methionine methylester 는 메탄올을 반응용매로 사용하여 N-Boc-L-Methionine 과 반응을 진행하였고, EDC와 DMAP를 사용하여 두 물질을 coupling 시켜 N-Boc-L-Methionine-methionine methylester (이하 Boc-Met-MetOMe)를 합성하였음.

Step 2. Blocking agent (BOC) 제거

반응을 통해 얻어진 Boc-Met-MetOMe의 BOC은 아래 그림의 TFA (Trifluoroacetic acid) 의 deprotection 반응 기작에 따라 제거 가능하며, 30°C 조건에서 TFA 투입 후 교반 진행 시 BOC 이 제거되어 Boc-Met-MetOMe 으로부터 Met-MetOMe의 형성을 확인할 수 있음.

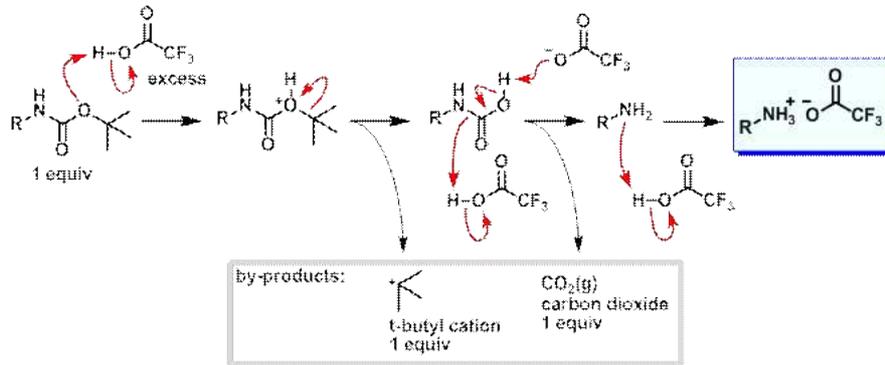


그림 17. TFA 를 이용한 Boc 의 deprotection 반응기작

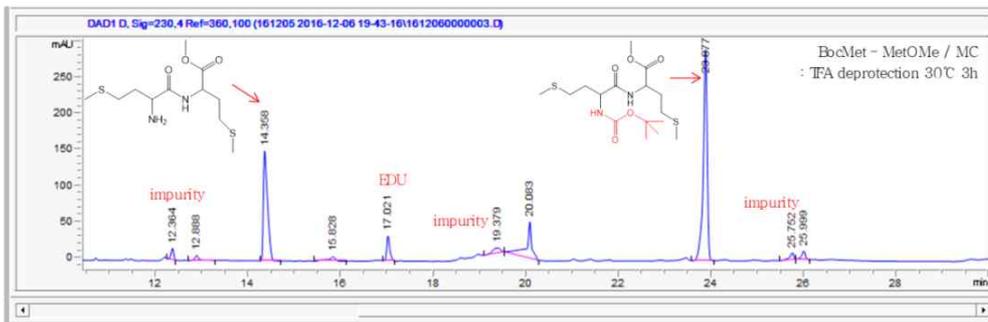


그림 18. TFA를 이용한 BOC 의 deprotection 결과

### Step 3. 아세틸기 도입 (N-Acetyl-L-Met-MetOMe, NALM-MetOMe)

반응을 통해 얻어진 Met-MetOMe은 구조상 카르복실기가 존재하지 않아 무수초산 (acetic anhydride)를 이용한 acetylation 반응이 높은 선택도로 진행이 가능함. 이를 위해 ethyl acetate 와 같은 유기용매를 이용하여 Met-MetOMe을 추출 한 이후에 무수초산을 주입하여 가열 반응하게 되면 교반 이후 1h 이내 높은 전환율로 NALM-MetOMe 가 생성되게 됨 (기존 아미노산의 아세틸레이션 과정과 동일). NALM-MetOMe 는 NaHCO<sub>3</sub> 수용액과 ethyl acetate를 이용하여 추출 가능하며, 반응 과정 중에 형성 된 EDU ((N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) hydrolyzed urea derivative)를 비롯한 수용성 잔여물(residue)은 수용액 층에 대부분 녹아 NALM-MetOMe과 분리가 가능함.

### Step 4. NALM-Met 분리 정제

Ethyl acetate 추출과정을 통해 분리 된 NALM-MetOMe는 NaOH를 이용한 가수분해 공정을 통하여 NALM-Met으로 전환 가능함. 소수성 성질이 강한 NALM-MetOMe는 최초 NaOH 수용액과 반응 과정에서 용해되지 않고 상분리 된 형태를 보이게 되지만, 점차 반응이 진행되면서 수용액에 용해되며, 별도의 가열과정 없이 pH 12조건에서 상은 교반 하게 되면 2h 이내 methylester 의 가수분해가 모두 진행되어 NALM-Met 이 생성 되게 됨.

가수분해 이후 HCl 주입을 통하여 pH = 2.0이하의 조건으로 acidification을 하게 되면 반응액 내 존재하는 Na<sup>+</sup> 이온이 NaCl로 전환 되며, 이때 NALM-Met은 free carboxylic acid 구조를 갖

게 됨. 이후 water-ethylacetate를 이용하여 추출 분리를 진행 하게 되면 Boc-Met을 사용한 경우 별도의 impurity 없이 수용액층에 NALM-Met 이 녹아 있게 됨.

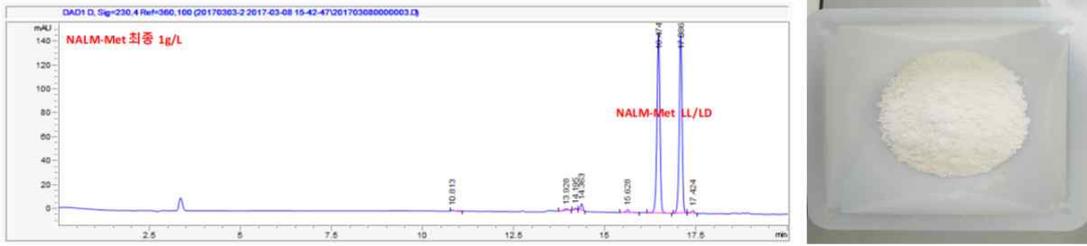


그림 19. NALM-Met 정제 결과(HPLC)

추출 정제 이후 EA를 농축하면 gel 형태의 생성물이 얻어지게 되며 diethylether를 주입 후 overnight 상온 교반을 실시하게 되면 NALM-Met 결정이 형성됨. 결정화 이후 얻어진 결정의 외관은 다음과 같으며, 각 공정에 대한 수율은 esterification 75.0mol%, NALM-MetOMe 전환공정 81.1mol%, hydrolysis 및 정제공정 76.9mol% 로 전체 총 수율은 46.8mol% 로 확인되었음.

④ Blocking agent-free 펩타이드 합성

앞서 언급한 것처럼 반응의 선택성을 높이기 위하여 아미노산 작용기를 보호 및 탈보호 하는 단계가 공정에 포함됨. 상기 공정을 통해서 높은 선택도로 펩타이드를 합성 가능하지만, 고가의 커플링화제 및 보호제 사용과 여러 단계 반응으로 인해 경제성이 낮고, 제조 시간 또한 오래 걸린다는 단점이 있음. 이러한 문제점을 보완하여 보다 경제성 있는 방법으로 보호 펩타이드 합성법을 개발하고자 blocking agent-free NALM-Met 합성 공정을 개발하였음.

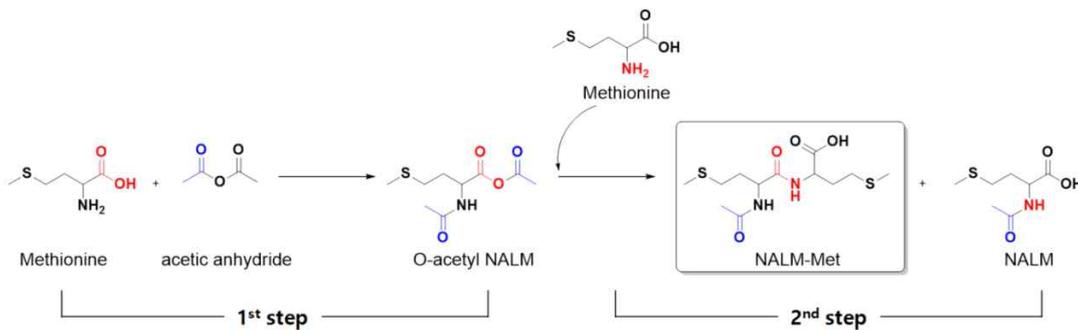


그림 20. O-acetyl NALM 이용 NALM-Met 합성경로

Blocking agent-free NALM-Met 합성공법 - 전체 공정

- 반응용기에 Met(1당량)과 무수초산(2.5당량)을 넣고, 상온에서 5시간 교반
- 5시간 후, 반응용액이 맑은 용액 상태가 되면 Met(1당량)을 추가로 투입하고 3시간 교반
- 반응 완료 후에는 정제수(Met 무게 대비 1배수) 투입
- 회전 농축관을 이용하여 최대 농축 진행
- Met 전환율 100mol%, 합성수율 88mol%

→ NALM-Met 전환수율 63mol%, NALM 전환수율 25mol%

상기 합성 공정은 과량의 무수초산 공급을 통해 L-Met을 NALM(N-Acetyl-L-Met)으로 전환시키고 NALM으로부터 O-acetyl NALM을 만드는 공정의 확보가 가능함. 상기 카르복실기에 결합된 anhydride 형태의 아세틸기는 추가로 공급된(또는 반응 후에 잔존하는) L-Met과 결합할 수 있기 때문에 비교적 간단한 방법을 통해 NALM-Met의 형성이 가능함. 즉, 기존 방법에서는 blocking agent를 통해 아미노산의 잉여 작용기를 비활성화 시킨 반면, 상기 방법은 아세틸기를 통해서 잉여 작용기를 비활성화시키고 동시에 아미노산의 반추위 보호 기능을 부여할 수 있는 장점을 지니고 있음. 하지만, O-acetyl NALM의 anhydride 작용기에는 반응성이 높은 두 개의 탄소가 존재하기 때문에 최종 목적 산물인 NALM-Met 외에도 NALM이 부 생성물로 생성된다는 단점이 있음. 따라서, NALM-Met의 선택도를 높이기 위해 원료 사용량 및 반응 조건 최적화 연구를 수행하였음.

### 무수초산 사용량 최적화

NALM-Met 합성 반응에서 무수초산은 아세틸기 공급원(acetyl group donor)로서 Met의 아민기와 카르복실기를 아세틸화하는 역할을 함. 본 반응에서 무수초산의 이론적인 사용량은 Met 대비 2당량 이지만, 무수초산 사용량에 따른 합성 수율 및 NALM 대비 NALM-Met 선택도를 확인하기 위해서 무수초산을 1.9당량에서 3당량 사이로 조절하여 평가하였음. 이때 2<sup>nd</sup> step 용매로는 아세트산을 Met 대비 1배수 사용하였으며, 반응은 상온에서 진행하였음.

표 4. 무수초산 사용량에 따른 NALM-Met 선택도 및 합성 수율

실험군	무수초산 투입량(eq)	선택도(NALM:NALM-Met)	합성수율(mol%)
실험1	1.90	1 : 1.44	74.27
실험2	2.00	1 : 1.40	78.84
실험3	2.10	1 : 1.44	81.03
실험4	2.20	1 : 1.53	80.93
실험5	2.30	1 : 1.57	82.75
실험6	2.50	1 : 1.59	87.26
실험7	2.75	1 : 1.26	84.24
실험8	3.00	1 : 1.20	84.22

\* 반응조건: Met(15g, 1당량) + 무수초산(1.9~3.0당량) → 상온, 5시간 교반 → Met(15g, 1당량) + 아세트산(15g) → 상온, 3시간 교반  
\* 합성수율(mol%): NALM 전환수율(mol%) + NALM-Met 전환수율(mol%)

평가 결과 무수초산 사용량이 증가함에 따라 NALM-Met 선택도 및 합성수율이 증가되는 것을 확인할 수 있음. 하지만 무수초산 2.5당량 이상에서는 반대의 결과가 나타났으며, 이는 미반응 무수초산이 추가로 투입되는 Met을 NALM으로 전환시켜 NALM-Met으로 합성되는 것을 방해하기 때문이라고 판단됨. 따라서, 상기 평가를 통해 무수초산은 2.5당량 사용하는 것이 NALM 생성비율을 최소화 하고 NALM-Met 전환수율을 최대화 한다고 판단하였음.

### 반응 온도 최적화

O-acetyl NALM을 이용한 NALM-Met 합성반응은 O-acetyl NALM을 만드는 1<sup>st</sup> step과 O-acetyl NALM으로부터 NALM-Met을 제조하는 2<sup>nd</sup> step으로 나눌 수 있음. 2<sup>nd</sup> step의 경우에는 상온에서도 1시간 이내 반응이 완료되지만, 1<sup>st</sup> step은 상온에서 약 5시간이 소요되는 반응임. 즉, 반응속도는 공정의 효율성에도 직결되기 때문에 1<sup>st</sup> step 반응 온도를 조절하여 반응시간을 단축시키고자 하였으며, 이를 통한 NALM-Met 선택도 및 합성수율을 확인하였음. 이때 무수초산은 상기 결과에 따라 2.5당량 사용하였으며, 2<sup>nd</sup> step 용매인 아세트산은 Met 대비 1배수 사용하였음.

표 5. 1<sup>st</sup> step 반응온도에 따른 반응시간 및 NALM-Met 선택도

실험군	반응온도	1st step 반응시간	선택도(NALM:NALM-Met)	합성수율(mol%)
실험1	상온	5H	1 : 1.59	87.26
실험2	40°C	1H	1 : 1.48	84.83

\* 반응조건: Met(15g, 1당량) + 무수초산(2.5당량) → 상온/40°C 5시간 교반 → Met(15g, 1당량) + 아세트산(1배수) → 상온 3시간 교반

\* 합성수율(mol%): NALM 전환수율(mol%) + NALM-Met 전환수율(mol%)

평가 결과 1<sup>st</sup> step의 반응온도를 상온에서 40 ° C로 승온한 경우 반응시간은 5시간에서 1시간으로 단축되었지만, NALM-Met 선택도 및 합성수율은 실험군2에서 다소 감소하였음. 이는 온도 증가에 따른 부생성물(unkown) 증가에 의한 것으로 보이며, 부생성물의 증가는 추후 정제 공정에 영향을 미치므로 1<sup>st</sup> step 반응을 상온에서 진행하는 것이 경제성 측면에서 유리하다고 판단하였음.

### 용매 사용량 최적화

유기합성 반응에서 용매는 반응물들을 용해하여 서로 충돌시켜 반응이 일어나게 하고, 용매의 극성은 반응물의 전이상태에 영향을 주어 반응속도를 결정하는 중요한 역할을 함. 하지만, 반응용매는 반응물 또는 생성물과 반응하지 않아야 한다는 조건을 가지고 있음. 따라서 본 연구의 2<sup>nd</sup> step에 사용한 용매인 아세트산은 카르복실기를 가지고 있는 분자이기 때문에 O-acetyl-NALM이 Met과 반응할 때 경쟁반응을 일으킬 수 있다는 가설을 바탕으로 아세트산 투입량을 0배수에서 3배수 사이로 조절하여 실험을 진행하였음.

표 6. 2<sup>nd</sup> step 용매(아세트산) 사용량에 따른 NALM-Met 선택도 및 합성수율

실험군	아세트산 투입량	선택도(NALM:NALM-Met)	합성수율(mol%)
실험1	0.00	1 : 2.75	89.42
실험2	0.25	1 : 2.18	89.65
실험3	0.50	1 : 1.89	91.19
실험4	1.00	1 : 1.59	87.26
실험5	2.00	1 : 1.33	91.19
실험6	3.00	1 : 1.20	89.99

\* 반응조건: Met(15g, 1당량) + 무수초산(2.5당량) → 상온, 5시간 교반 → Met(15g, 1당량) + 아세트산(0~3배수) → 상온, 3시간 교반

\* 합성수율(mol%): NALM 전환수율(mol%) + NALM-Met 전환수율(mol%)

평가 결과 아세트산 투입량 증가에 따라 NALM 생성비율이 증가하여 NALM-Met 선택도가 감소하였고, 결과적으로 아세트산을 사용하지 않은 실험군1에서 가장 높은 NALM-Met 선택도가 확인되었으며, 합성수율은 아세트산 사용량과 관계없이 실험군6에서 유사하게 나타났음. 이는 일부 아세트산이 O-acetyl NALM과 반응하여 무수초산으로 전환되고, 생성된 무수초산이 Met의 아민기와 반응하여 NALM으로 전환된 결과라고 사료됨. 따라서, 2<sup>nd</sup> step에서 용매를 사용하지 않는 것이 NALM-Met 선택도를 가장 높일 수 있다고 판단하고 NALM-Met 합성 공법을 개발하였음.

㉔ Blocking agent-free 펩타이드 정제 공정 개발

NALM-Met 정제공법 개발 연구는 NALM-Met을 선택적으로 분리할 수 있는 C1 결정화 공법 확립과 C1 모액으로부터 NALM 및 NALM-Met을 추가적으로 수득할 수 있는 C2 결정화 조건 모색에 집중하였음. 추가적으로 용매 변경 및 사용량 조절을 통해 공정을 단순화하고 원부재료를 절감하고자 하였음. 본 연구를 통해 확립된 NALM-Met 결정화 공법의 보다 상세한 연구개발 내용은 아래와 같다

NALM-Met 정제공법 - 전체 공정

- 완전 농축된 반응용액에 Ethyl acetate(Met 무게대비 1배수) 첨가 후 1시간 교반 (50 ° C)
- 5 ° C로 냉각하여 6시간을 추가로 교반
- 감압 필터를 이용해 Filter cake를 수득(C1)
  - C1 결정화 수율 46%, 함량 NALM-Met 97.3%
- C1 모액에 정제수(Met 대비 3배수) 투입
- 분별깔대기를 이용하여 물 층을 추출한 뒤 완전 농축
- 농축액에 Ethyl acetate(Met 무게대비 0.5배수) 첨가 후 C1 결정화 공정 반복
  - C2 결정화 수율 7.5%, 함량 NALM 68.2%, NALM-Met 30.6%
- 최종 정제 수율: C1결정 기준 46%, C1과 C2 결정 혼합 기준 53.5%

C1 결정화 조건 확립

합성반응을 통해 전환된 NALM-Met을 고순도의 최종 생성물로 수득하기 위해서 결정화 공법을 도입하였음. NALM-Met을 선택적으로 분리하기 위한 결정화 조건 모색을 위해 수계결정화와 Ethyl acetate 용매결정화를 검토하였음. 두 실험군 모두 Met 투입량 대비 1배수의 결정화 용매를 투입하였으며, 5 ° C로 냉각하여 6시간 교반하였음.

표 7. 수계결정화와 EA용매결정화 수율 및 함량 비교

실험군	결정화 용매	결정화 수율(%)	함량(%)
실험1	물	37.05	NALM-Met 99.2%
실험2	EA	46.01	NALM-Met 97.3%

\* 결정화 수율(%): 결정 무게/Met 총 투입량  
 \* 결정화 용매 투입량: Met 투입량 대비 1배수



그림 21. 수계결정화와 EA용매결정화 결정 외관 비교

수계결정화와 EA 용매결정화 모두 고순도의 하얀색 NALM-Met 결정을 수득할 수 있었고, EA 용매결정화를 도입한 경우 수계결정화 대비 결정화 수율이 약 6% 향상되었음. 따라서, EA를 C1 결정화 용매로 선정하였고 용매 사용량에 따른 결정화 수율을 확인하기 위한 실험을 추가로 진행하였음. EA 투입량을 Met 투입량 대비 0.5배, 1.0배, 1.5배 투입하여 동일 조건에서 결정을 수득하였을 때, 0.5배수의 EA를 투입한 경우에는 결정은 생성되었지만 유동성이 저하되어 반응용기에서 필터로 옮기는데 어려움이 확인되었으며, 필터 과정에서는 막힘 현상이 발생하였음. 반면, EA를 1.5배수 사용한 경우에는 NALM-Met 함량이 다소 증가하였지만 EA를 1.0배수 사용한 경우보다 결정화 수율이 약 11.2% 저하되었음. 이러한 결과를 바탕으로 EA를 Met 투입량 대비 1배수 투입하여 결정을 수득하는 공정을 NALM-Met C1 결정화 공법으로 선정하였음.

표 8. EA 투입량에 따른 결정화 수율 비교

실험군	EA 투입량	결정화 수율(%)	함량(%)
실험1	0.50	-	필터 막힘 현상 발생
실험2	1.00	46.01	NALM-Met 97.3%
실험3	1.50	34.85	NALM-Met 99.8%

\* EA 투입량: Met 투입 무게 대비 배수

\* 결정화 수율(%): 결정 무게/Met 총 투입량

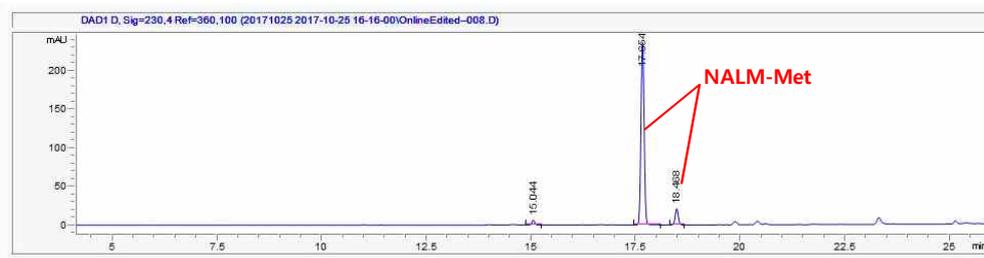


그림 22. 선정된 C1 결정화 공법으로 수득한 결정의 크로마토그램

### C2 결정화 조건 확립

EA 용매결정화로 최적화된 C1 결정화 수율은 약 46%로 모액에는 약 17%의 NALM-Met과 23%의 NALM이 존재하는 상태임. 하지만, C1 모액 회수 후 동일 방법으로 C2 결

정화를 진행하는 경우에는 결정이 생성되지 않았기 때문에 반응액 내에 존재하는 불순물에 기인한다는 가설을 바탕으로 C1 모액으로부터 불순물을 제거하여 NALM 및 NALM-Met 결정을 추가적으로 수득하기 위해 추출공정을 도입하였음. EA는 물에 일부 용해되는 특성이 있으므로 C1 모액 내 존재하는 EA를 농축하여 제거하고, DCM과 물을 투입하여 분별깔대기로 층 분리하였음. 이를 적용하여 수득한 결정 사진 및 크로마토그램은 다음과 같으며, 이때 혼합물의 함량은 98.8%, 조성은 NALM이 68.2%, NALM-Met이 30.6%로 구성되어 있음.

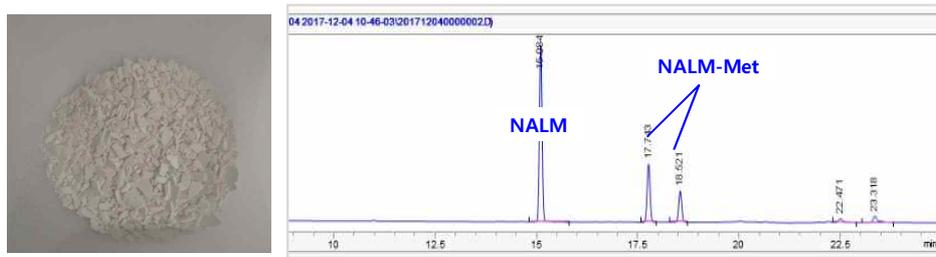


그림 23. 선정된 C2 결정화 공법으로 수득한 결정 사진 및 크로마토그램

② 펩타이드 합성 기반 기술 연구 적용 (Met-Phe dipeptide)

㉞ NALM-Phe dipeptide 합성

상기 NALM-Met 합성 공법을 기반으로 신규 보호 펩타이드 적용 가능성 평가를 수행하였음. 이를 위해 반추동물 제 1 제한 아미노산인 Met과 유단백 개선 가능성이 확인된 Phe을 대상으로 dipeptide를 합성하고, 더 나아가 반추위 보호 기능을 부여하는 평가를 수행하였음. 세부 연구 결과는 다음과 같음.

NALM-Phe 화학 합성 공정

- Met(1당량)과 무수초산(2.5당량)을 투입한 후 상온에서 5시간 교반
- 반응 완료 후, Phe(1당량)을 첨가한 후 상온에서 3시간 반응

NALM-Phe 정제 공정

- 20~30mL의 정제수를 첨가하여 1~2회 농축 (불순물 제거; 반응물이 gel 상태로 전환)
- 반응물의 무게 대비 2배의 ethyl acetate를 첨가한 후 교반 (결정 석출)
- 필터 및 건조

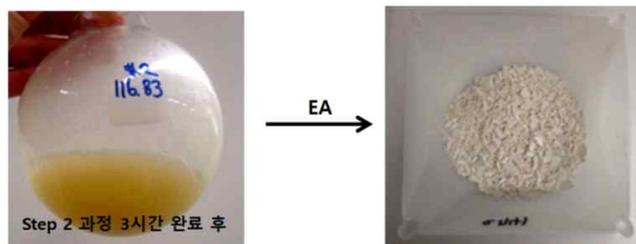


그림 24. NALM-Phe dipeptide 정제공정 후 수득물

수득한 powder의 분자량을 확인하여 NALM-Phe 합성 여부를 확인하기 위해

MC:ME=9:1 용매에 2000배 희석하여 LC-MS 분석을 진행하였음 (NALM-Phe 분자량 338.42). 분석 결과, NALM-Phe이 주요 peak으로 검출됨을 확인하였으며, 338.42 이하 및 이상의 분자량을 가지는 부산물 또는 불순물의 존재를 확인하였음.

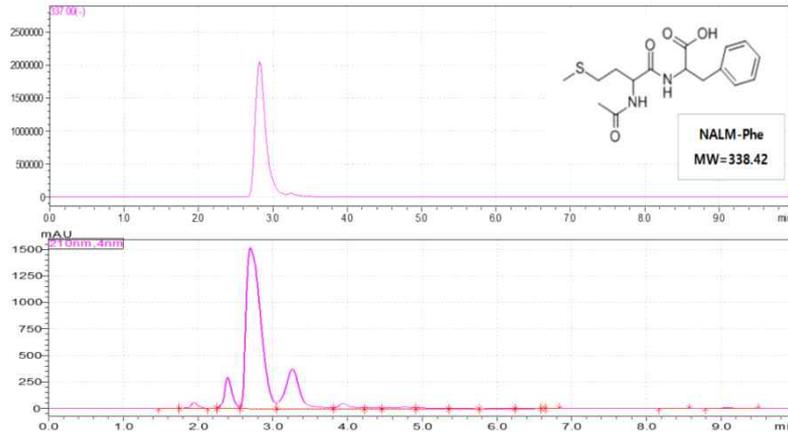


그림 25. NALM-Phe LC-MS 분석 결과

#### 라. 분말형 보호 아미노산 대량 생산시스템 구축 (3차년도)

##### (1) 연구 목적

- 최종 선정된 보호 아미노산 후보 아이템의 대량 생산 시스템 구축 및 안정성 평가

##### (2) 연구 내용

###### (가) Scale-up 이슈 평가

- 후보 아이템 합성 선택도 및 수율(Lab scale 比; 100L 반응기 기준)

###### (나) 낙농우 사양평가를 위한 샘플 대량 생산

- 필수 아미노산 기반 출시 제품 판가 및 제조원가 비교

###### (다) 제품의 안정성 평가를 통한 제품화 기반 마련

- DSC 분석을 통한 보호 아미노산 후보 아이템의 열안정성 평가 (Tm, Tg, Td)
- 입도분석기 평가를 통한 후보 아이템의 입도 분석 평가

##### (3) 연구 결과

###### (가) N-Acetyl-L-Histidine(NALH) 및 N-Acetyl-L-Tryptophan(NALT) Scale-up 생산 공정 확보

선행 연구 결과를 통해 확보한 아미노산 유도체의 합성 공정을 기반으로 대량 생산 시스템 구축을 위한 scale-up 연구를 수행하였음. 이를 위해 100 L scale의 반응기를 활용하여 평가를 수행하였으며, 세부 공정도는 다음과 같음.



그림 26. 아미노산 유도체 scale-up 공정도: (좌) NALH, (우) NALT

100L 크기의 반응기 내에 Histidine 또는 Tryptophan과 NaOH, DW를 첨가한 뒤 1차 교반을 30분간 진행하였음. 다음 단계로 아세틸 그룹 부여를 위한 목적으로 무수 초산을 첨가하여 반응을 진행하였으며, pH 제어를 통한 결정화 공정 진행을 위해 염산(HCl)을 투입하였음. 투입 후, 저온(5°C) 조건에서 2시간 동안 교반을 진행하였으며, 여과 과정을 통해 반응액으로부터 유도체 결정을 회수하였음. 다음 단계로 회수된 유도체의 순도를 개선하기 위한 목적으로 물(DW) 또는 아세톤의 첨가를 통해 수세 과정을 진행하였고, 마지막 단계로 건조 과정을 거쳐 최종 제품을 확보하였음.

이렇게 확보한 NALH 및 NALT의 최종 제품 함량 및 수율은 다음과 같음.

표 9. 대량 생산 공정 적용 아미노산 유도체 제품 함량 및 총수율: (좌) NALH, (우) NALT

Batch No.	제품 함량	총수율
1 <sup>st</sup> batch	99.7%	113.4wt%
2 <sup>nd</sup> batch	99.3%	115.6wt%
3 <sup>rd</sup> batch	99.2%	116.4wt%
평균	99.4%	115.1wt%

Batch No.	제품 함량	총수율
1 <sup>st</sup> batch	99.2%	117.6wt%
2 <sup>nd</sup> batch	98.9%	119.4wt%
평균	99.1%	118.5wt%

NALH의 이론 수율은 138.7% (Histidine 1kg을 반응하면 최대 1.387kg의 NALH 합성 가능)로써, 본 생산 공정을 통해서서는 평균 115.1%의 수율을 확인하였음. 특히 제품의 함량은 99%

를 상회하는 수준으로써, 일반적인 사료용 아미노산의 요구 함량인 98% 수준을 능가하는 결과라 할 수 있음. 또한 NALT의 경우 총 2회에 걸쳐 공정 평가를 수행하였으며, 그 결과 120.6%의 이론 수율에 근접한 수준의 118.5%의 평균 총수율과 99% 이상의 제품 함량을 확인하였음. 이렇게 생산된 NALH와 NALT는 협동 및 위탁 연구 기관에서 수행된 사양 평가용 샘플로 활용하였음.

(나) N-Acetyl-L-Histidine (NALH) 제품 물성 및 열안정성 평가

앞서 NALH를 대상으로 기본적인 물성 평가를 수행하였음. 분석 결과 NALH의 입도 분포도(Bulk density)는 0.52 g/ml 수준으로 확인되었으며, 녹는점 172.4 °C, 분해온도 217.5 °C로 확인되었음. 사료 첨가제의 열안정성은 제품의 유통 및 저장뿐만 아니라 펠렛 사료 적용 가능성을 확보하기 위해 필수적임. 일반적인 코팅 보호 아미노산의 경우 코팅층이 지방 또는 지방산으로 구성되어 있기 때문에 높은 온도 및 압력 조건에서 기능을 상실하게 됨. 하지만, 본 연구를 통해 개발된 분말형 아미노산 유도체, 대표적으로 NALH의 경우 최대 200°C 이상의 조건에서도 안정적인 구조를 갖는 것으로 확인되었음. 특히, 펠렛 사료 공정이 최대 100°C 수준의 온도 조건에서 진행되는 것을 감안하면, 다른 코팅 보호 아미노산 대비 높은 확장성 및 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 판단됨.

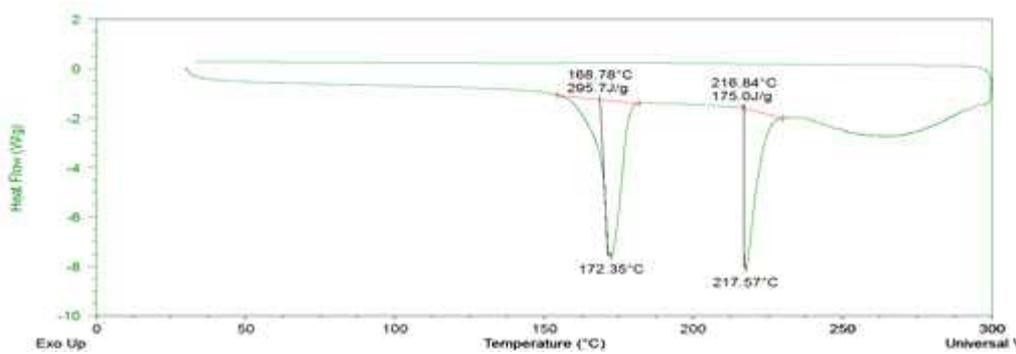


그림 27. NALH 열물성 분석 (DSC)

사료 가공 공정에서의 열안정성 뿐만 아니라 유통 및 저장 과정에서의 안정도 제품 개발에 매우 중요한 요소이기 때문에 해당 평가를 수행하였음. 상온 또는 40°C 온도 조건에서 장기간 동안 보관을 하였으며, 평가 결과 상온 조건에서는 4주가 지난 후에도 초기 NALH 함량 대비 1% 전후의 감소만 확인되었음. 특히 40°C 보관 조건에서는 최대 2% 수준의 감소만 확인되었으며, 이러한 결과를 통해서 본 아이템이 제품으로 개발될 경우 기능성의 소실 없이 안정적으로 유통 및 저장이 가능함을 확인하였음.

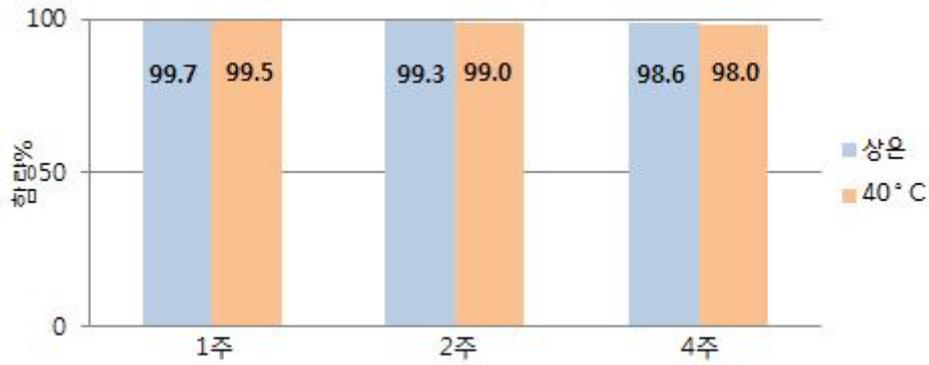


그림 28. NALH 저장 안정성 분석

**마. 분말형 보호 아미노산 시제품 생산 (3차년도)**

상기 확보된 scale-up 공정을 적용하여 3건의 보호 아미노산 시제품을 제작하였으며, 해당 제품은 협동 및 위탁기관의 사양 평가용 샘플로 활용되었음. 또한 해당 시제품을 바탕으로 Free Marketing을 통한 제품의 효능 검증을 지속할 예정임. 세부 내역은 다음과 같음.



그림 29. 보호 아미노산 시제품: (좌) 히스티딘 보호 아미노산, (중) 메치오닌 보호 아미노산, (우) 트립토판 보호 아미노산

**바. 분말형 보호 아미노산 경제성 평가 및 기술이전 계획 (3차년도)**

일반적으로 보호 아미노산 제품의 경제성 평가는 경쟁 제품과의 단순 가격 비교, 체내 이용률을 기반으로 섭취한 양 대비 실제 흡수된 아미노산의 비율, 그리고 보호 아미노산 섭취를 통해 개선된 생산성을 기반으로 한 비교 등 크게 3가지 방법이 적용됨. 하지만, 본 연구를 통해 개발된 보호 아미노산 시제품의 경우 시장에 출시되지 않은 필수 아미노산, 즉, 히스티딘과 트립토판을 주요 타겟으로 설정하였기 때문에 직접적인 가격 비교가 어려움. 또한 사양 평가를 통해 명확한 제품의 체내 이용률 및 생산성 개선(이 경우 우유 단가 개선 효과, 사료 저감 효과 등을 종합적으로 고려해야 함) 등에 대한 재현성 있는 결과를 확보하지 못했기 때문에 명확한 경제성 평가가 어려운 상황임. 다만, 현재 시판되고 있는 메치오닌 기준 제품의 판매 가격을 살펴보면 고기능성 제품의 경우 1kg당 1만5천원 수준으로 판매되고 있으며, 이보다 조

금 기능이 떨어지는 보급형 보호 아미노산의 경우 약 1만원/kg 정도의 가격대를 형성하고 있음. 한편 라이신 제품의 경우 상대적으로 제품 내 낮은 함량으로 인해 약 6천원/kg 수준으로 가격대가 형성되어 있음. 하지만 트립토판이나 히스티딘의 경우 아직 메치오닌이나 라이신 만큼 사료용 아미노산으로써 요구도가 크지 않기 때문에 시장 가격 자체가 높게 형성되어 있고, 더 나아가 유도체화 과정이 추가로 반영되기 때문에 실제 보호 아미노산으로 시판할 경우 고기능성 메치오닌 보호 아미노산 제품 대비 높은 가격대가 형성될 것으로 예상됨. 이를 해결하기 위해서는 우선적으로 해당 제품의 시장을 우선적으로 확대함으로써 규모의 경제 효과를 기대할 수 있도록 제품 생산량을 증대할 필요가 있음. 이를 위해서는 추가적인 사양 평가를 통한 재현성 있는 결과의 확보가 필요하며, 또한 사업 초기에는 범용적으로 사용되는 제품으로 마케팅 전략을 형성하기 보다는 단기간 내 특정 이슈(예를 들면 여름철 heat stress 해소)를 해결할 수 있는 스페셜티 제품 개념으로 시장에 진입하고, 점차적으로 제품에 대한 인지도 확장 및 기능성 강화를 통해 고객의 수요를 높여가는 전략적인 마케팅 전략이 필요할 것으로 판단됨.

사업화 준비를 위해서 우선 수행해야 할 부분은 본 과제를 통해 확보한 기술 및 노하우의 이전을 통해 보다 효율적인 사업화 플랜을 수립하는 것임. 이를 위해 아미노산 유도체화 기술이 적용된 보호 아미노산 생산, 평가 및 배합 기술을 이전하여 기술 실시를 진행할 계획임. 이를 위한 핵심 기술로는 당사가 개발한 아미노산 유도체화 기술 및 이를 대량 생산할 수 있는 기술, 유선상피세포 기반 필수 아미노산 영향 평가 기술, 그리고 보호 아미노산 조합별 최적 첨가량 산정 및 사료 배합 기술을 들 수 있음. 이렇게 이전된 기술과 당사가 보유하고 있는 발효 기반 아미노산 대량 생산 시스템 및 해외 유통망 등을 적극적으로 활용할 경우 필수 아미노산을 기반으로 한 보호 아미노산의 사업화 및 신규 시장의 진입/확대 가능성이 더 높아질 것으로 예상됨.

## 2. 유단백 합성 필수아미노산 선정 및 이용성 증진 연구 - 건국대학교 (협동기관)

가. 유선상피세포에서 필수아미노산 및 대사촉진 물질에 의한 단백질 합성 효율 검증 및 그 기전 연구

(1) 연구 1. 개별 필수아미노산이 유선상피세포에서 유단백질 합성에 미치는 영향 (1년차)

(가) 배양시간 및 분석항목 설정

① 실험 개요

본 연구 진행에 앞서 배양시간 및 분석항목 설정을 위한 선행 연구가 이루어짐. 배양시간은 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120시간으로 총 7 처리였으며  $\beta$ -casein 발현량을 평가하였음. 아미노산 처리에 의한 효과가 나타나는지 검증하기 위해 효과가 확실하게 알려진 Met을 처리할 아미노산으로 선정하였으며  $\beta$ -casein 발현량을 평가하였음.

② 배양 시간 선정

MAC-T cell을 여러 가지 시간으로 배양하여  $\beta$ -casein 발현량을 확인한 결과, 72시간 까지 발현량이 직선적으로 증가하였으나, 72시간 이후로는 유의적 차이를 보이지 않음 (그림

30). 따라서 MAC-T cell의 최적 배양시간을 72시간으로 결정함.

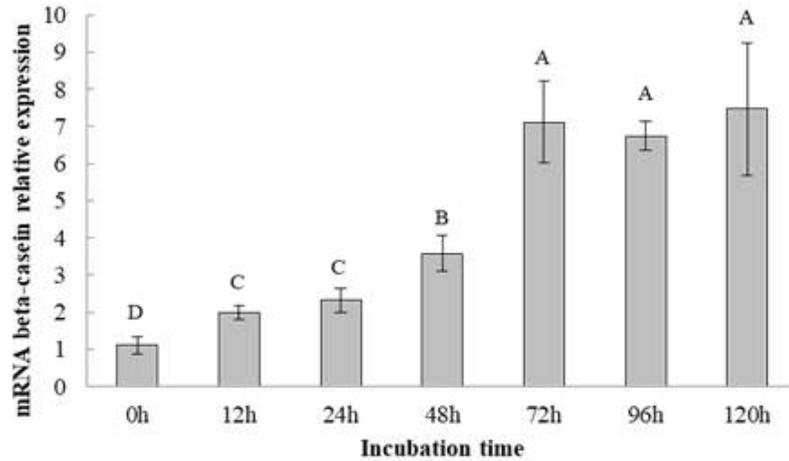


그림 30. Relative  $\beta$ -casein expression level in MAC-T cells treated with differentiation media at different time points (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 h). Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 6). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

### ③ 분석 항목 설정

MAC-T cell에 0, 0.3, 0.6, 0.9 mM의 Met을 처리하고 72시간 배양한 결과  $\beta$ -casein 발현량이 0.6 mM까지 직선적으로 증가하였고, 이후 농도 (0.9 mM)에서는 유의적 차이를 보이지 않음 (그림 31). 이는 Lu et al. (2012)의 보고와 일치하는 결과로, MAC-T cell에서  $\beta$ -casein 발현이 적절하게 이루어졌고, Met의 최적 농도는 0.6 mM이라는 결론을 도출함. 하지만  $\beta$ -casein 이외의 다른 단백질의 증가 양상도 중요하기 때문에, 추후 분석에는 세포가 분비한 (extracellular) 단백질도 함께 평가하기로 함.

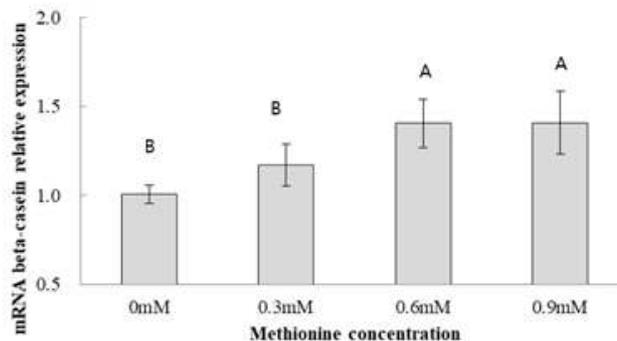


그림 31. Relative  $\beta$ -casein expression level in MAC-T cells treated with 0, 0.3, 0.6, and 0.9 mM of L-methionine at 72 h. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 6). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

### (나) 연구 목적

젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)를 이용하여 각 개별 필수아미노산을 처리했을 때, 유단백질 합성이 최대가 되는 농도를 알아보기 위하여 실시함.

(다) 재료 및 방법

- ① 세포 주 : 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)
- ② 실험 설계 : 대조구(분화 미디어), 처리구(각 필수아미노산 10종을 분화 미디어에 첨가)
  - 필수아미노산 종류 : Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val
  - 농도 : 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mM (총 6처리)
  - 배양 시간 : 72시간
  - 조사 항목 : Cell viability, Extracellular 단백질 농도,  $\beta$ -casein mRNA 발현량
  - 분화 미디어 조성 : DMEM/F12 (Gibco) + 10% Fetal bovine serum (Gibco) + 1% Penicillin/streptomycin (Hyclone) + 0.1% Gentamycin (Sigma-aldrich) + 0.1% Hydrocortisone (Sigma-aldrich) + 0.1% Insulin (Sigma-aldrich) + 0.1% Prolactin (Sigma-aldrich)
  - 분화 미디어 내 기본 필수아미노산 조성 : Arg 0.70 mM, His 0.15 mM, Ile 0.42 mM, Leu 0.45 mM, Lys 0.50 mM, Met 0.12 mM, Phe 0.22 mM, Thr 0.45 mM, Trp 0.04 mM, Val 0.45 mM
- ③ 실험 방법
  - Cell viability : Dojindo 사의 CCK-8 kit(Dojindo Laboratories, Rockville, MD, USA)의 실험방법을 이용하여 분석함. 96-well plate에 5,000 cells/well이 되도록 세포를 분주하여 24시간 배양함. 이후 대조구 및 처리구 media로 교환해준 후 다시 24시간 배양함. 배양이 끝나기 1시간 전, CCK-8 solution을 10  $\mu$ L씩 분주함. 450 nm의 파장에서 OD 값을 측정함.
  - Extracellular 단백질 추출 및 정량 분석 : 6-well plate에 MAC-T cell이 100% confluence 상태로 성장했을 때, 대조구로서 분화 미디어와 처리구로서 각 필수아미노산이 농도별 첨가된 분화 미디어를 분주 후 배양함. 72시간 배양 후 세포 외 단백질을 추출하고, BCA protein assay kit (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)를 이용하여 분석함.
  - $\beta$ -casein mRNA 발현량 : 단백질 추출 과정과 동일한 방법으로 배양 후 세포를 채취함. 채취한 세포에서 RNA를 추출 후 cDNA로 합성하여 real-time qPCR을 이용해 유전자 발현량을 확인함.
- ④ 통계 분석
  - 데이터 평균값에 따른 통계적 유의차는 SPSS 통계 소프트웨어(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 Tucky's HSD test로 실시함. 모든 실험은 3 반복으로 진행되었으며,  $p < 0.05$ 에서 유의하다고 판단함.

(라) 실험 결과 및 고찰

- ① Arginine (Arg)
  - MAC-T cell에 Arg을 여러 가지 농도로 처리했을 때, cell viability는 유의적 차이를 보였지만 처리구는 대조구와 비교하여 크게 감소하지 않음 (그림 32). 따라서 모든 처리구에서 viability에 문제가 없다고 판단하고 추후 분석을 진행함.
  - Extracellular 단백질 농도는 모든 처리구에서 대조구와 비교하여 유의적으로 같거나

낮은 결과를 보였음 (그림 32).

- Arg 처리는 MAC-T cell에서  $\beta$ -casein mRNA 발현량에 유의적 차이를 보이지 않았음 (Fig. 1-3c).
- 따라서 Arg은 단독으로 MAC-T cell에 처리하였을 때, 유단백질 합성을 증가시키지 않는다고 판단됨.

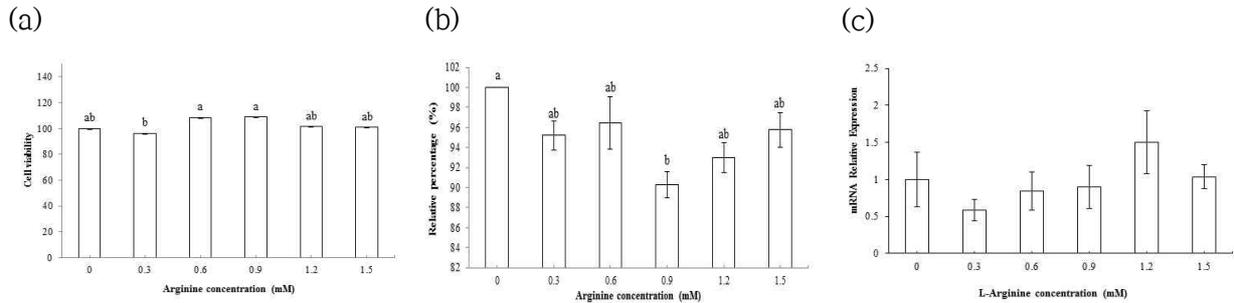


그림 32. Relative cell viability (a), extracellular protein concentrations (b),  $\beta$ -casein mRNA expression (c) in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of L-arginine. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

② Isoleucine (Ile)

- MAC-T cell에 Ile을 여러 가지 농도로 처리했을 때, cell viability는 유의적 차이를 보이지 않음 (그림 33). 따라서 모든 처리구에서 viability에 문제가 없다고 판단하고 추후 분석을 진행함.
- Extracellular 단백질 농도는 대조구와 비교하여 0.3-1.2 mM 구간에서 감소하는 것으로 보였으나, 1.5 mM 처리구에서 대조구보다 유의적으로 증가함을 보임 (그림 32).
- Ile 처리 후  $\beta$ -casein mRNA 발현량을 분석한 결과, extracellular 단백질 농도와 비슷한 패턴을 얻었음 (그림 32). 1.5 mM 처리구에서 대조구보다 유의적으로 증가하는 것으로 나타남.
- 따라서 Ile에서는 extracellular 단백질 농도와  $\beta$ -casein 발현량이 모두 증가한 1.5 mM을 최적 농도로 선정함.

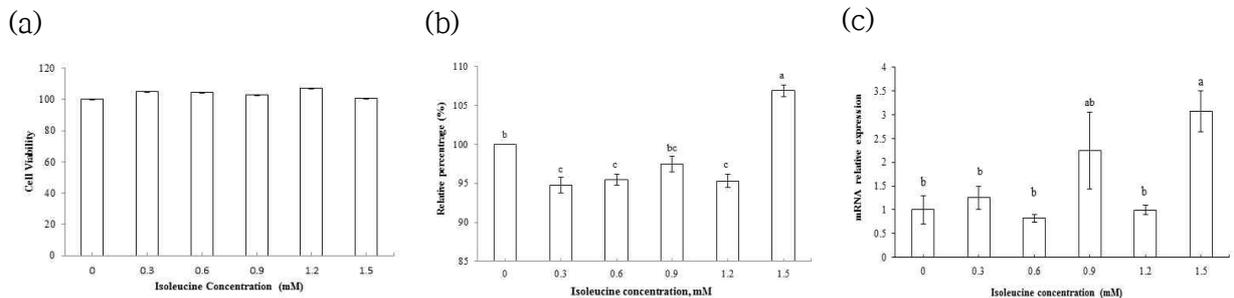


그림 33. Relative cell viability (a), extracellular protein concentrations (b),  $\beta$ -casein mRNA expression (c) in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of L-isoleucine. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

③ Leucine (Leu)

- MAC-T cell에 Leu을 여러 가지 농도로 처리했을 때, cell viability는 유의적 차이를 보이지 않음 (그림 34). 따라서 모든 처리구에서 viability에 문제가 없다고 판단하고 추후 분석을 진행함.
- Extracellular 단백질 농도는 모든 처리구에서 대조구와 비교하여 유의적으로 같거나 낮은 결과를 보였음 (그림 34).
- Leu 처리는 MAC-T cell에서  $\beta$ -casein mRNA 발현량에 유의적 차이를 보이지 않았음 (그림 32).
- 따라서 Leu은 유의적으로 큰 변화를 보이지 않았지만, 수치적으로 증가를 보인 0.6 mM 처리구를 최적 농도로 선정함.

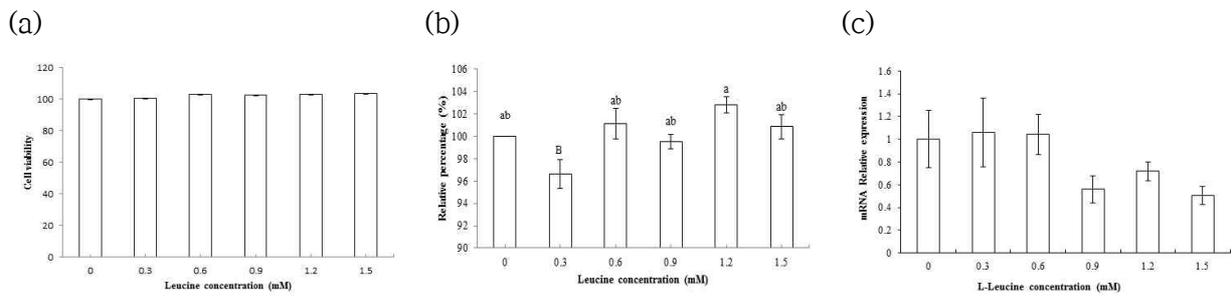


그림 34. Relative cell viability (a), extracellular protein concentrations (b),  $\beta$ -casein mRNA expression (c) in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of L-leucine. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

④ Lysine (Lys)

- MAC-T cell에 Lys을 여러 가지 농도로 처리했을 때, cell viability는 dose-dependent 하게 감소하여 1.5 mM 처리구의 경우는 대조구와 비교하여 유의적으로 감소함 (Fig. 1-6a).
- 반면에 Extracellular 단백질 농도는 dose-dependent하게 증가하여 1.5 mM 처리구는 대조구와 비교하여 유의적 증가를 보임 (그림 35).
- 0.3-0.9 mM Lys 처리구는 대조구와 비교하여 MAC-T cell에서  $\beta$ -casein mRNA 발현량에 유의적 증가를 보임 (그림 35).
- 따라서 Lys은 대조구 대비 extracellular 단백질 농도와  $\beta$ -casein 발현량이 모두 증가한 0.6 mM을 최적 농도로 선정함.

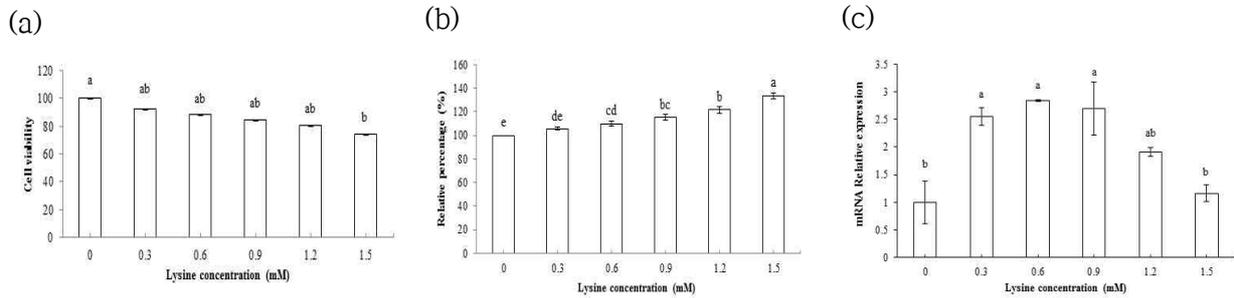


그림 35. Relative cell viability (a), extracellular protein concentrations (b),  $\beta$ -casein mRNA expression (c) in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of L-lysine. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

### ⑤ Phenylalanine (Phe)

- MAC-T cell에 Phe을 여러 가지 농도로 처리했을 때, cell viability는 유의적 차이를 보이지 않음 (그림 36). 따라서 모든 처리구에서 viability에 문제가 없다고 판단하고 추후 분석을 진행함.
- Extracellular 단백질 농도는 유의적 차이를 보이지 않았으나, 수치적으로 0.6 mM까지 증가한 이후 감소하는 패턴을 보임 (그림 36).
- 0.6 mM Phe 처리구는 대조구와 비교하여 MAC-T cell에서  $\beta$ -casein mRNA 발현량에 유의적 증가를 보임 (그림 36).
- 따라서 Phe은  $\beta$ -casein 발현량이 대조구 대비 증가한 0.6 mM을 최적 농도로 선정함.

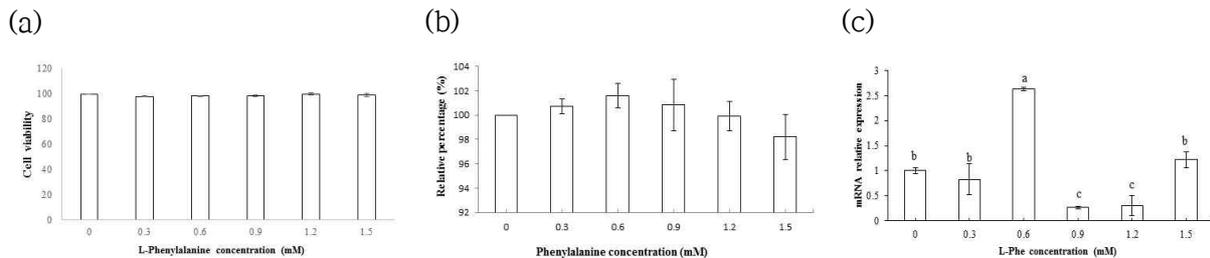


그림 36. Relative cell viability (a), extracellular protein concentrations (b),  $\beta$ -casein mRNA expression (c) in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of L-phenylalanine. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

### ⑥ Threonine (Thr)

- MAC-T cell에 Thr을 여러 가지 농도로 처리했을 때, cell viability는 유의적 차이를 보이지 않음 (그림 37). 따라서 모든 처리구에서 viability에 문제가 없다고 판단하고 추후 분석을 진행함.
- Extracellular 단백질 농도는 0.3-0.9 mM 처리구에서 대조구보다 유의적으로 감소했지만, 1.2-1.5 mM 처리구는 대조구 대비 유의적으로 증가함 (그림 37).
- 1.5 mM Thr 처리구는 대조구와 비교하여 MAC-T cell에서  $\beta$ -casein mRNA 발현량에

유의적 증가를 보임 (그림 37).

- 따라서 Phe은 extracellular 단백질 농도와  $\beta$ -casein 발현량이 대조구 대비 증가한 1.5 mM을 최적 농도로 선정함.

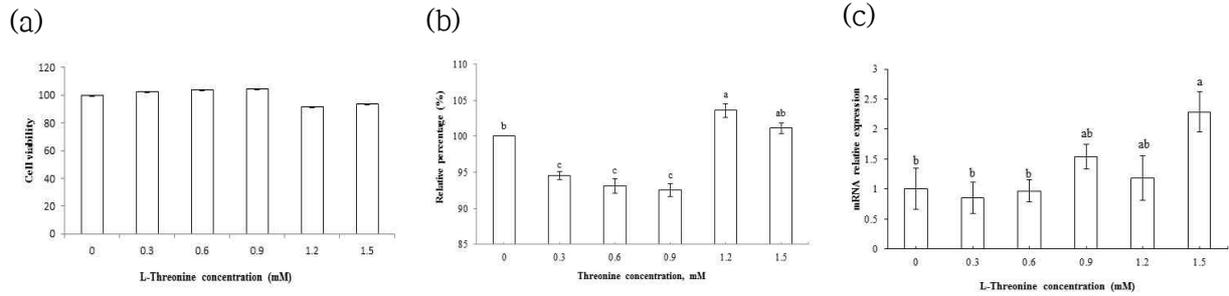


그림 37. Relative cell viability (a), extracellular protein concentrations (b),  $\beta$ -casein mRNA expression (c) in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of L-threonine. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

#### ⑦ Tryptophan (Trp)

- MAC-T cell에 Trp을 여러 가지 농도로 처리했을 때, cell viability는 유의적 차이를 보이지 않음 (그림 38). 따라서 모든 처리구에서 viability에 문제가 없다고 판단하고 추후 분석을 진행함.
- Extracellular 단백질 농도는 dose-dependent하게 증가함을 보여, 1.5 mM이 가장 유익적으로 증가함 (그림 38).
- MAC-T cell에 Trp을 처리한 결과 0.9 mM 처리구만  $\beta$ -casein mRNA 발현량에 유의적 증가를 보임 (그림 38).
- 따라서 Trp은 extracellular 단백질 농도와  $\beta$ -casein 발현량이 대조구 대비 증가한 0.9 mM을 최적 농도로 선정함.

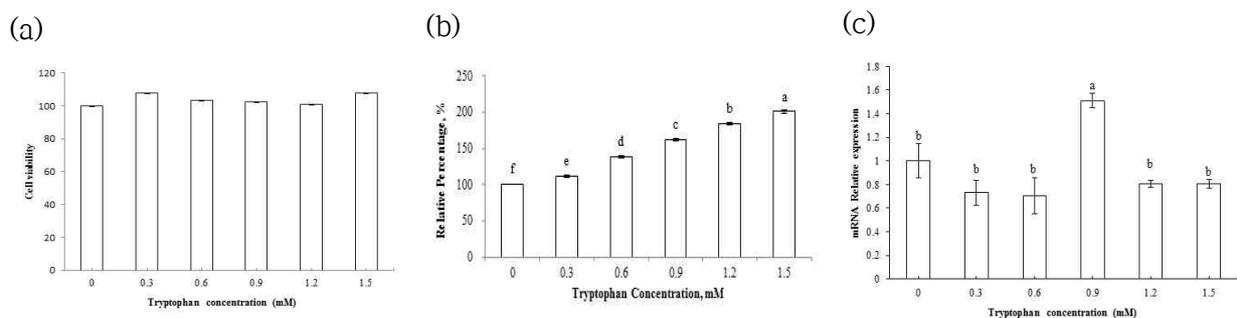


그림 38. Relative cell viability (a), extracellular protein concentrations (b),  $\beta$ -casein mRNA expression (c) in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of L-tryptophan. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

#### ⑧ Valine (Val)

- MAC-T cell에 Trp을 여러 가지 농도로 처리했을 때, cell viability는 유의적 차이를

보이지 않음 (그림 39). 따라서 모든 처리구에서 viability에 문제가 없다고 판단하고 추후 분석을 진행함.

- Extracellular 단백질 농도는 유의적 차이를 보이지 않았음. 하지만 수치적으로는 0.3 mM 처리구에서 가장 증가한 후 이후 감소하는 패턴을 보임 (그림 39).
- MAC-T cell에 Val을 처리한 결과  $\beta$ -casein mRNA 발현량에 유의적 차이를 보이지 않았음 (그림 39).
- 따라서 Val은 extracellular 단백질 농도와  $\beta$ -casein 발현량이 수치적으로 대조구 대비 증가한 0.3 mM을 최적 농도로 선정함.

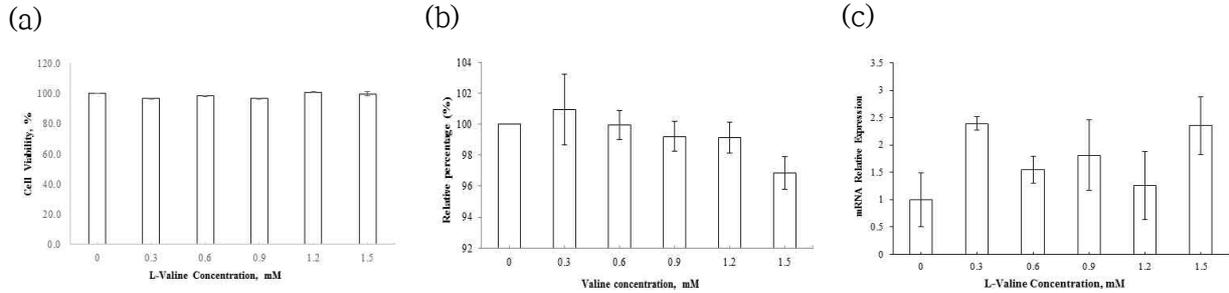


그림 39. Relative cell viability (a), extracellular protein concentrations (b),  $\beta$ -casein mRNA expression (c) in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of L-valine. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

#### (라) 결론

- MAC-T cell에 각 필수아미노산들을 단독으로 처리했을 때 cell viability, extracellular 단백질 농도 및  $\beta$ -casein 발현량에서 각기 다른 발현 양상을 보임.
- 각 필수아미노산들의 결과로부터 선정한 최적 농도는 표 10과 같음.
- Arginine과 Histidine은 대조구 미디어에 첨가할수록 오히려 단백질 농도가 감소함을 보였음. 이들 중 Histidine은 영양소가 제한된 환경에서 오히려 단백질 농도 및  $\beta$ -casein 발현량이 증가하는 모습을 보여 새로운 연구로 발전시킴 (연구 5).
- 각 아미노산의 최적 농도로 선정된 처리구에서 extracellular 단백질 농도와  $\beta$ -casein 발현량을 비교하여 순위를 정했음 (표 11). 그 결과 가장 유단백 합성 능력이 좋은 아미노산으로 Met, Lys, Ile, Trp, Phe가 선정되었으며, 다음 연구의 주요 아미노산으로 결정됨.

표 10. Summary of best dosages of each amino acid based on relative extracellular protein concentrations and  $\beta$ -casein mRNA expression

Essential Amino Acids	Best Dosage (mM)
Arginine	Not Detectable
Histidine	Not Detectable
Isoleucine	1.5
Leucine	0.6
Lysine	0.6
Methionine	0.6
Phenylalanine	0.6
Threonine	1.5
Tryptophan	0.9
Valine	0.3

표 11. Final ranking of amino acids based on relative extracellular protein concentrations and  $\beta$ -casein expression

Essential Amino Acid	Best Dosage (mM)	Relative extracellular protein concentrations		Relative $\beta$ -casein Expression		FINAL RANK	
		Relative %	Rank	Relative Expression	Rank	Total	Accumulated Rank
Arginine	Not Detectable	100.00	9	1.00	9	18	7
Isoleucine	1.5	106.89	3	3.08	2	5	1
Leucine	0.6	101.13	7	1.04	8	15	6
Lysine	0.6	110.02	2	2.84	3	5	1
Methionine	0.6	104.20	4	7.12	1	5	1
Phenylalanine	0.6	101.59	5	2.63	4	9	3
Threonine	1.5	101.14	6	2.29	6	12	5
Tryptophan	0.9	161.54	1	1.51	7	8	2
Valine	0.3	101.03	8	2.39	5	13	4

(2) 연구 2. 필수아미노산의 조합에 따른 유선상피세포에서의 이용성 연구 (2년차)

(가) 연구 목적

- 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)를 이용하여 연구 1에서 유단백질 합성 효율이 좋았던 5개 아미노산(Met, Lys, Ile, Trp, Phe)을 조합하여 처리했을 때, 유단백질 합성 능력이 가장 좋은 조합을 찾기 위해 실시함.

(나) 재료 및 방법

- 세포 주 : 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)

- ② 실험 설계 : 대조구(분화 미디어), 처리구(각 L형 필수아미노산 5종의 조합 첨가)
- 필수아미노산 종류 : Met, Lys, Ile, Trp, Phe (연구 1 결과 기반 선정)
  - 농도 : 0.6 mM (Met, Lys, Phe), 0.9 mM (Trp), 1.5 mM (Ile)



그림 40. Experimental design for 2- and 3-amino acid combination for milk protein synthesis

- 배양 시간 : 72시간
  - 조사 항목 : Extracellular 단백질 농도,  $\beta$ -casein mRNA 발현량
  - 분화 미디어 조성 : DMEM/F12 (Gibco) + 10% Fetal bovine serum (Gibco) + 1% Penicillin/streptomycin (Hyclone) + 0.1% Gentamycin (Sigma-aldrich) + 0.1% Hydrocortisone (Sigma-aldrich) + 0.1% Insulin (Sigma-aldrich) + 0.1% Prolactin (Sigma-aldrich)
  - 분화 미디어 내 기본 필수아미노산 조성 : Arg 0.70 mM, His 0.15 mM, Ile 0.42 mM, Leu 0.45 mM, Lys 0.50 mM, Met 0.12 mM, Phe 0.22 mM, Thr 0.45 mM, Trp 0.04 mM, Val 0.45 mM
- ③ 실험 방법
- Extracellular 단백질 추출 및 정량 분석 : 6-well plate에 MAC-T cell이 100% confluence 상태로 성장했을 때, 대조구로서 분화 미디어와 처리구로서 각 필수아미노산이 농도별 첨가된 분화 미디어를 분주 후 배양함. 72시간 배양 후 세포 외 단백질을 추출하고, BCA protein assay kit (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)를 이용하여 분석함.
  - $\beta$ -casein mRNA 발현량 : 단백질 추출 과정과 동일한 방법으로 배양 후 세포를 채취함. 채취한 세포에서 RNA를 추출 후 cDNA로 합성하여 real-time qPCR을 이용해 유전자 발현량을 확인함.
- ④ 통계 분석
- 데이터 평균값에 따른 통계적 유의차는 SPSS 통계 소프트웨어(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 Tucky's HSD test로 실시함. 모든 실험은 3 반복으로 진행되었으며,  $p < 0.05$ 에서 유의하다고 판단함.

(다) 실험 결과 및 고찰

① Extracellular 단백질 농도

- MAC-T cell에 여러 가지 조합의 필수아미노산을 처리 시, extracellular 단백질 농도

가 synergistic하게 증가됨이 확인됨 (그림 41).

- 특히 Met-Trp, Lys-Trp 조합은 유의적으로 가장 높은 단백질 생산을 보임.

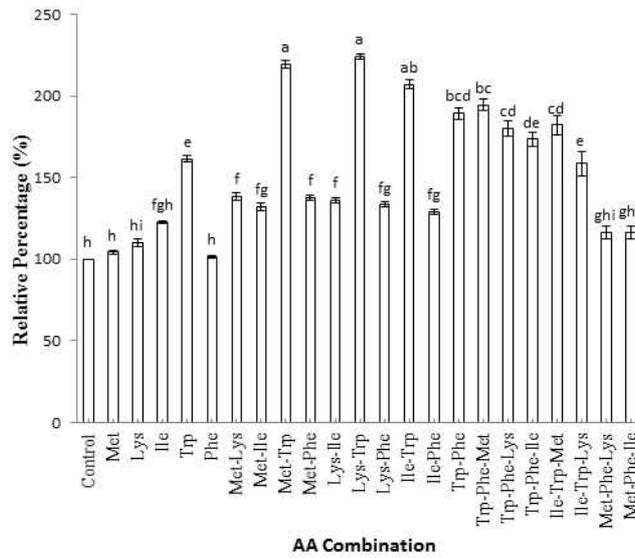


그림 41. Relative extracellular protein concentrations in comparison to control in MAC-T cells treated with various amino acid combinations for 72 h. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

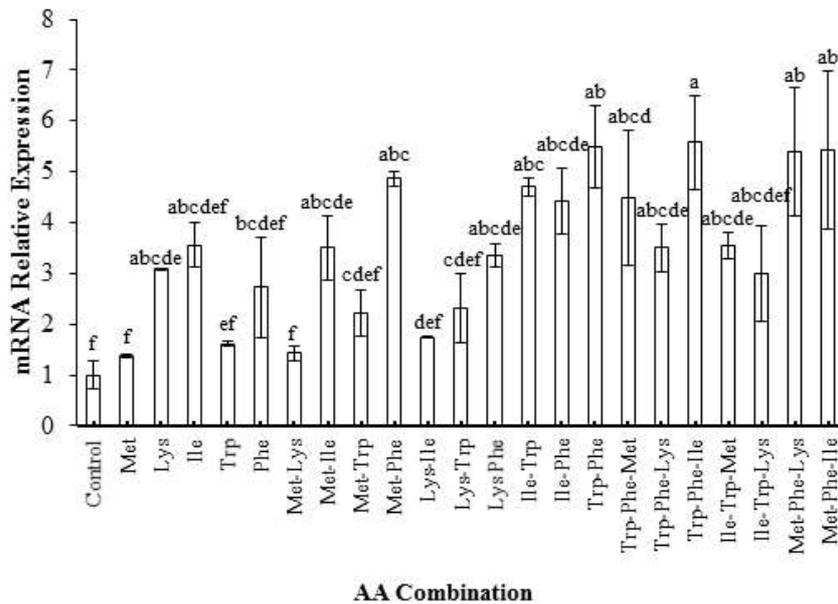


그림 42. Relative  $\beta$ -casein mRNA expression levels in comparison to control in MAC-T cells treated with various amino acid combinations for 72 h. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

②  $\beta$ -casein mRNA 발현량

- MAC-T cell에 필수아미노산을 여러 가지 조합으로 처리하여  $\beta$ -casein mRNA 발현량이 synergistic하게 증가됨이 확인됨 (그림 42).

- 특히, 이들 조합 중 Trp-Phe-Ile 조합은 유의적으로 가장 높은 발현량을 나타냄.

(라) 결론

- MAC-T cell에 각 필수아미노산들의 조합을 처리했을 때 extracellular 단백질 농도 및  $\beta$ -casein 발현량에서 각기 다른 발현 양상을 보임.
- 각 조합 처리의 결과로부터 선정된 최적 아미노산 조합은 표 12와 같음.
- Extracellular 단백질 농도는 Lys-Trp에서 가장 높았고, 이후 Met-Trp, Ile-Trp, Trp-Phe-Met, Trp-Phe, Ile-Trp-Met 순으로 나타남. Trp의 첨가가 extracellular 단백질을 증가시키는 것에 크게 기여하는 것으로 판단됨.
- MAC-T cell의  $\beta$ -casein mRNA 발현량은 Trp-Phe-Met에서 가장 높은 수준을 보였고, 이후 Trp-Phe, Met-Phe-Ile, Met-Phe-Lys, Met-Phe, Ile-Trp 순으로 발현량이 높았음. Phe, Met, Trp가  $\beta$ -casein 발현량을 증가시키는 것에 큰 영향을 끼치는 것으로 사료됨.
- 각 조합의 처리구에서 extracellular 단백질 농도와  $\beta$ -casein 발현량을 비교하여 단백질 합성 효율이 극대화된 최종 순위를 정했음. 그 결과 가장 유단백 합성 능력이 우수한 필수아미노산 조합으로 Trp-Phe, Ile-Trp, Trp-Phe-Ile, Trp-Phe-Met, Ile-Trp-Met, Lys-Trp가 선정됨.

표 12. Final ranking for relative extracellular protein concentrations and  $\beta$ -casein mRNA relative expression supplemented with different amino acid combinations

AA	Relative extracellular protein concentrations	Rank	Relative $\beta$ -casein expression	Rank	Ranking	Final Ranking
Control	100.00 <sup>h</sup>	24	1.00 <sup>f</sup>	22	46	
Met	104.27 <sup>h</sup>	22	1.38 <sup>f</sup>	21	43	
Lys	110.02 <sup>h</sup>	21	3.08 <sup>abcde</sup>	13	34	
Ile	106.89 <sup>h</sup>	18	3.55 <sup>abcdef</sup>	9	27	
Trp	161.54 <sup>de</sup>	9	1.61 <sup>ef</sup>	19	28	
Phe	101.61 <sup>h</sup>	23	2.72 <sup>bcdef</sup>	15	38	
Met-Lys	138.42 <sup>f</sup>	12	1.43 <sup>f</sup>	20	32	
Met-Ile	132.43 <sup>fg</sup>	16	3.50 <sup>abcde</sup>	11	27	
Met-Trp	219.31 <sup>a</sup>	2	2.22 <sup>cdef</sup>	17	19	
Met-Phe	137.72 <sup>f</sup>	13	4.87 <sup>abc</sup>	5	18	
Lys-Ile	135.91 <sup>f</sup>	14	1.75 <sup>def</sup>	18	32	
Lys-Trp	224.09 <sup>a</sup>	1	2.32 <sup>cdef</sup>	16	17	5
Lys-Phe	133.34 <sup>fg</sup>	15	3.35 <sup>abcde</sup>	12	27	
Ile-Trp	207.07 <sup>ab</sup>	3	4.70 <sup>abc</sup>	6	9	2
Ile-Phe	128.87 <sup>fg</sup>	17	4.42 <sup>abcde</sup>	8	25	
Trp-Phe	189.35 <sup>bcd</sup>	5	5.48 <sup>ab</sup>	2	7	1
Trp-Phe-Met	194.44 <sup>bc</sup>	4	4.48 <sup>abcd</sup>	7	11	3

Trp-Phe-Lys	180.19 <sup>cd</sup>	7	3.50 <sup>abcde</sup>	11	18
Trp-Phe-Ile	173.43 <sup>de</sup>	8	5.57 <sup>a</sup>	1	9
Ile-Trp-Met	182.11 <sup>cd</sup>	6	3.54 <sup>abcde</sup>	10	16
Ile-Trp-Lys	158.63 <sup>e</sup>	10	2.99 <sup>bcdef</sup>	14	24
Met-Phe-Lys	116.55 <sup>gh</sup>	19	5.39 <sup>ab</sup>	4	23
Met-Phe-Ile	116.11 <sup>gh</sup>	20	5.42 <sup>ab</sup>	3	23
p-value	<0.0001		p-value	0.001	

(3) 연구 3. 유단백질 합성 효율을 극대화하는 필수아미노산과 대사촉진 물질의 이상적인 조합 검증 (2년차)

(가) 유선상피세포에서 대사촉진 물질이 유단백질 합성에 미치는 영향

① 연구 목적

- 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)를 이용하여 각 대사촉진 물질을 처리했을 때, 유단백질 합성이 최대가 되는 농도를 알아보기 위하여 실시함.

② 재료 및 방법

㉠ 세포 주 : 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)

㉡ 실험 설계 : 대조구(분화 미디어), 처리구(각 대사촉진 물질을 분화 미디어에 첨가)

- 대사촉진 물질 종류 : acetate, glucose, t-10, c-12 CLA
- 농도 : 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mM (총 6처리)
- 배양 시간 : 72시간
- 조사 항목 : Cell viability, Extracellular 단백질 농도,  $\beta$ -casein mRNA 발현량
- 분화 미디어 조성 : DMEM/F12 (Gibco) + 10% Fetal bovine serum (Gibco) + 1% Penicillin/streptomycin (Hyclone) + 0.1% Gentamycin (Sigma-aldrich) + 0.1% Hydrocortisone (Sigma-aldrich) + 0.1% Insulin (Sigma-aldrich) + 0.1% Prolactin (Sigma-aldrich)
- 분화 미디어 내 기본 필수아미노산 조성 : Arg 0.70 mM, His 0.15 mM, Ile 0.42 mM, Leu 0.45 mM, Lys 0.50 mM, Met 0.12 mM, Phe 0.22 mM, Thr 0.45 mM, Trp 0.04 mM, Val 0.45 mM

㉢ 실험 방법

- Cell viability : Dojindo 사의 CCK-8 kit(Dojindo Laboratories, Rockville, MD, USA)의 실험방법을 이용하여 분석함. 96-well plate에 5,000 cells/well이 되도록 세포를 분주하여 24시간 배양함. 이후 대조구 및 처리구 media로 교환해준 후 다시 24시간 배양함. 배양이 끝나기 1시간 전, CCK-8 solution을 10  $\mu$ L씩 분주함. 450 nm의 파장에서 OD 값을 측정함.
- Extracellular 단백질 추출 및 정량 분석 : 6-well plate에 MAC-T cell이 100% confluence 상태로 성장했을 때, 대조구로서 분화 미디어와 처리구로서 각 필수아미노산이 농도별 첨가된 분화 미디어를 분주 후 배양함. 72시간 배양 후 세포 외 단백질을 추출하고, BCA protein assay kit (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)를 이용하여 분석함.
- $\beta$ -casein mRNA 발현량 : 단백질 추출 과정과 동일한 방법으로 배양 후 세포를 채취

함. 채취한 세포에서 RNA를 추출 후 cDNA로 합성하여 real-time qPCR을 이용해 유전자 발현량을 확인함.

㉔ 통계 분석 :

- 데이터 평균값에 따른 통계적 유의차는 SPSS 통계 소프트웨어(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 Tucky's HSD test로 실시함. 모든 실험은 3 반복으로 진행되었으며,  $p < 0.05$ 에서 유의하다고 판단함.

③ 실험 결과 및 고찰

㉕ Cell viability

- MAC-T cell에 acetate, glucose, t-10, c-12 CLA를 여러 가지 농도로 처리했을 때, cell viability는 다양한 양상을 보임 (그림 43).
- Acetate 첨가는 cell viability에 유의적인 영향을 미치지 못했고, glucose 첨가는 유의적인 증가를 보였음. t-10, c-12 CLA는 유의적으로 cell viability를 감소시켰지만, 95% 정도이기 때문에 큰 영향이 없을 것으로 생각하고 추후 분석을 진행함.

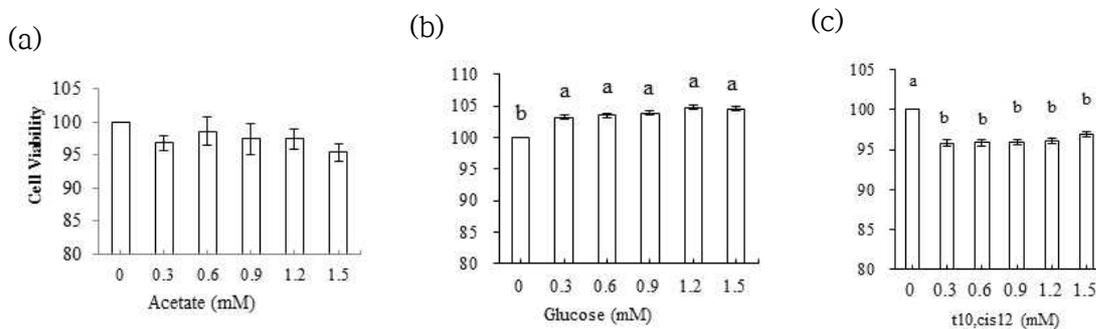


그림 43. Relative cell viability in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of acetate (a), glucose (b), and t-10, c-12 CLA (c). Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). <sup>a-b</sup>Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

㉖ Extracellular 단백질 농도

- MAC-T cell에 acetate 첨가는 dose-dependent하게 단백질 농도를 증가시켰음 (그림 44). Glucose와 t-10, c-12 CLA 첨가는 유의적으로 단백질 농도를 증가시킴.

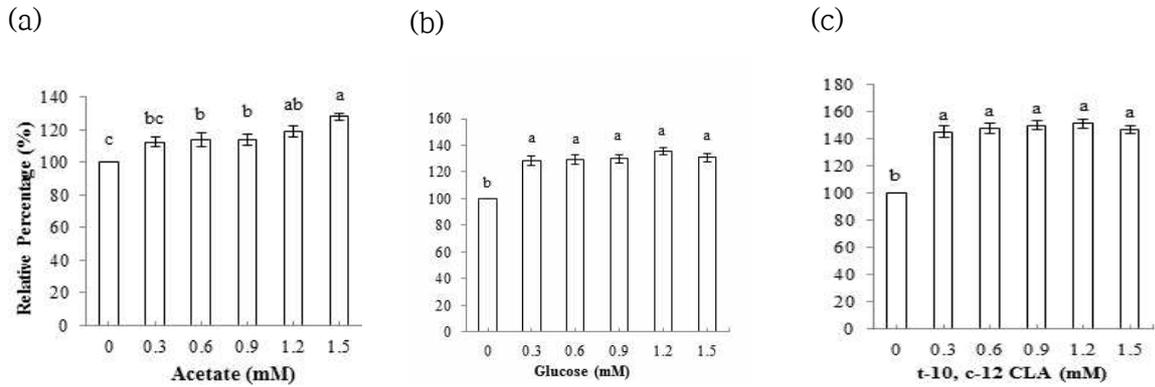


그림 44. Relative extracellular protein concentrations in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of acetate (a), glucose (b), and t-10, c-12 CLA (c). Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). <sup>a-c</sup>Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

㉔  $\beta$ -casein mRNA 발현량

- MAC-T cell에 acetate를 여러 가지 농도로 첨가했을 때, 0.3 mM에서 유의적인  $\beta$ -casein mRNA 발현량을 보였음 (그림 45). 한편, glucose 첨가는 0.9 mM에서 유의적 수준의 발현량 증가를 나타냈으며, t-10, c-12 CLA 첨가는  $\beta$ -casein mRNA 발현량을 dose-dependent하게 증가시키는 것으로 확인됨.

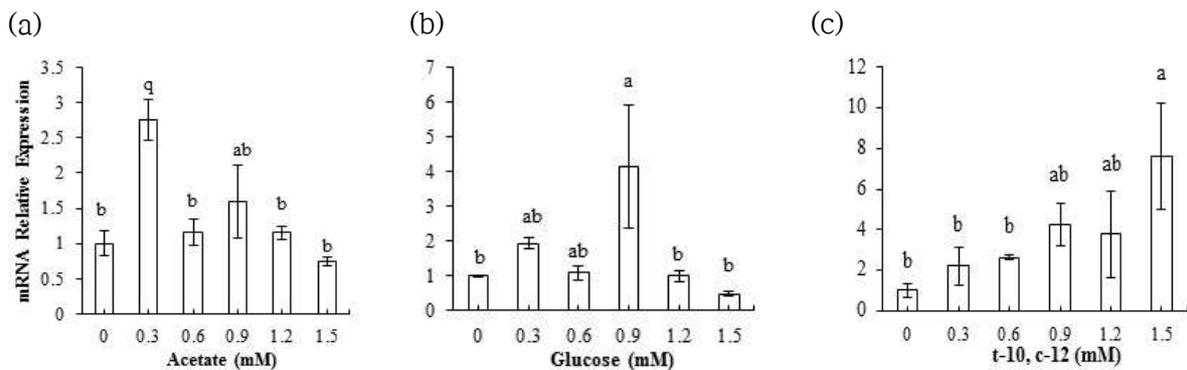


그림 45. Relative  $\beta$ -casein mRNA expression in MAC-T cells treated with various dosages (0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mM) of acetate (a), glucose (b), and t-10, c-12 CLA (c). Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). <sup>a-b</sup>Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

(4) 결론

- MAC-T cell에 세 종류의 생리활성 물질(acetate, glucose, t-10, c-12 CLA) 처리는 유단백 증가에 긍정적인 효과를 주는 것으로 판단됨.
- 아울러, 유의적 증가를 보인 glucose와 t-10, c-12 CLA는 각각 0.9, 1.5 mM을 최적 농도로 선정하여 이후 아미노산과의 조합 연구에 적용함.
- Acetate의 경우, 추후 *in vivo* 실험에서 이용될 첨가제의 일부이기 때문에 모든 농도를 아미노산과 조합하여 평가함.

(나) 유선상피세포에서 대사촉진 물질과 필수아미노산 조합이 유단백질 합성에 미치는 영향

① 연구 목적

- 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)를 이용하여 각 대사촉진 물질과 필수아미노산을 조합으로 처리했을 때, 유단백질 합성이 최대가 되는 농도를 알아보기 위하여 실시함.

② 재료 및 방법

㉠ 세포 주 : 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)

㉡ 실험 설계 : 대조구(분화 미디어), 처리구(각 대사촉진 물질과 필수아미노산 첨가)

- 필수아미노산 종류 : Met, Lys, Ile, Trp, Phe
- 대사촉진 물질 종류 : acetate, glucose, t-10, c-12 CLA
- 농도 : 0, 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 mM (acetate)  
0.6 mM (Met, Lys, Phe), 0.9 mM (Trp, glucose), 1.5 mM (Ile, t-10, c-12 CLA)
- 배양 시간 : 72시간
- 조사 항목 : Extracellular 단백질 농도,  $\beta$ -casein mRNA 발현량
- 분화 미디어 조성 : DMEM/F12 (Gibco) + 10% Fetal bovine serum (Gibco) + 1% Penicillin/streptomycin (Hyclone) + 0.1% Gentamycin (Sigma-aldrich) + 0.1% Hydrocortisone (Sigma-aldrich) + 0.1% Insulin (Sigma-aldrich) + 0.1% Prolactin (Sigma-aldrich)
- 분화 미디어 내 기본 필수아미노산 조성 : Arg 0.70 mM, His 0.15 mM, Ile 0.42 mM, Leu 0.45 mM, Lys 0.50 mM, Met 0.12 mM, Phe 0.22 mM, Thr 0.45 mM, Trp 0.04 mM, Val 0.45 mM

㉢ 실험 방법

- Extracellular 단백질 추출 및 정량 분석 : 6-well plate에 MAC-T cell이 100% confluence 상태로 성장했을 때, 대조구로서 분화 미디어와 처리구로서 각 필수아미노산이 농도별 첨가된 분화 미디어를 분주 후 배양함. 72시간 배양 후 세포 외 단백질을 추출하고, BCA protein assay kit (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)를 이용하여 분석함.
- $\beta$ -casein mRNA 발현량 : 단백질 추출 과정과 동일한 방법으로 배양 후 세포를 채취함. 채취한 세포에서 RNA를 추출 후 cDNA로 합성하여 real-time qPCR을 이용해 유전자 발현량을 확인함.

㉣ 통계 분석

- 데이터 평균값에 따른 통계적 유의차는 SPSS 통계 소프트웨어(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 Tucky's HSD test로 실시함. 모든 실험은 3 반복으로 진행되었으며,  $p < 0.05$ 에서 유의하다고 판단함.

③ 실험 결과 및 고찰

㉠ Acetate

- MAC-T cell에 다양한 농도의 acetate와 연구 1에서 선정된 아미노산을 함께 처리했을 때의 결과는 그림 46과 같음.
- Extracellular 단백질 농도는 0.9 mM의 Trp를 처리한 경우에만 대조구 대비 유의적 증가 결과를 보임.
- $\beta$ -casein mRNA 발현량은 0.3 mM의 acetate와 0.6 mM의 Phe를 함께 처리했을 때

대조구 대비 유의적 증가를 보였음.

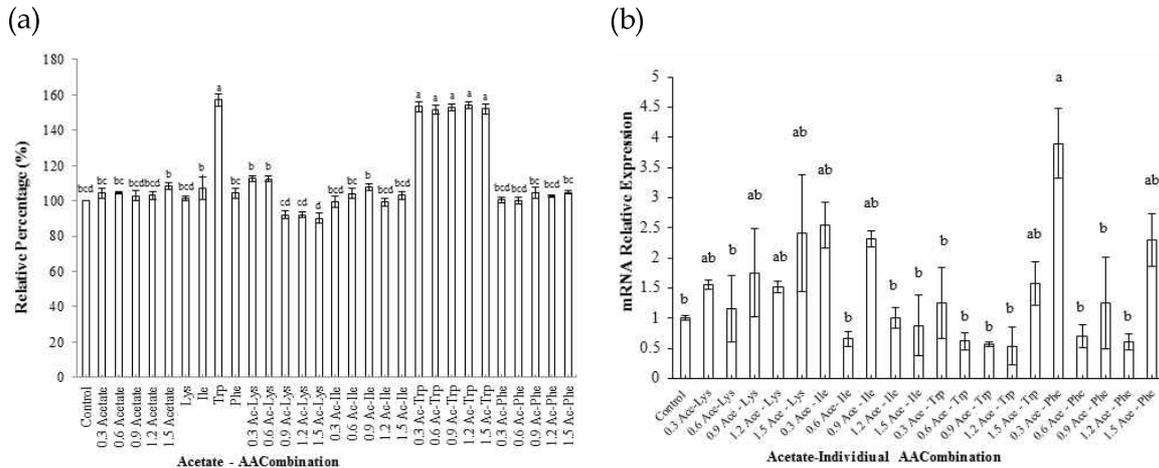


그림 46. Relative extracellular protein concentrations (a) and  $\beta$ -casein mRNA expression (b) in MAC-T cells treated with various dosages of acetate with amio acids. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

④ Glucose and t-10, c-12 CLA

- MAC-T cell에 0.9 mM의 glucose와 1.5 mM의 t-10, c-12 CLA 및 연구 1에서 선정된 아미노산을 함께 처리했을 때의 결과는 그림 47과 같음.
- Extracellular 단백질 농도는 glucose와 Trp, t-10, c-12 CLA와 Trp를 함께 처리하였을 때 대조구 및 단일 생리활성물질 처리에 대비하여 증가함.
- $\beta$ -casein mRNA 발현량은 glucose와 Met을 함께 처리하였을 때 대조구 대비 유의적인 증가를 보임. 하지만 t-10, c-12 CLA와 아미노산을 함께 처리한 경우는 대조구 대비 유의적인 증가를 보이지 않았음.

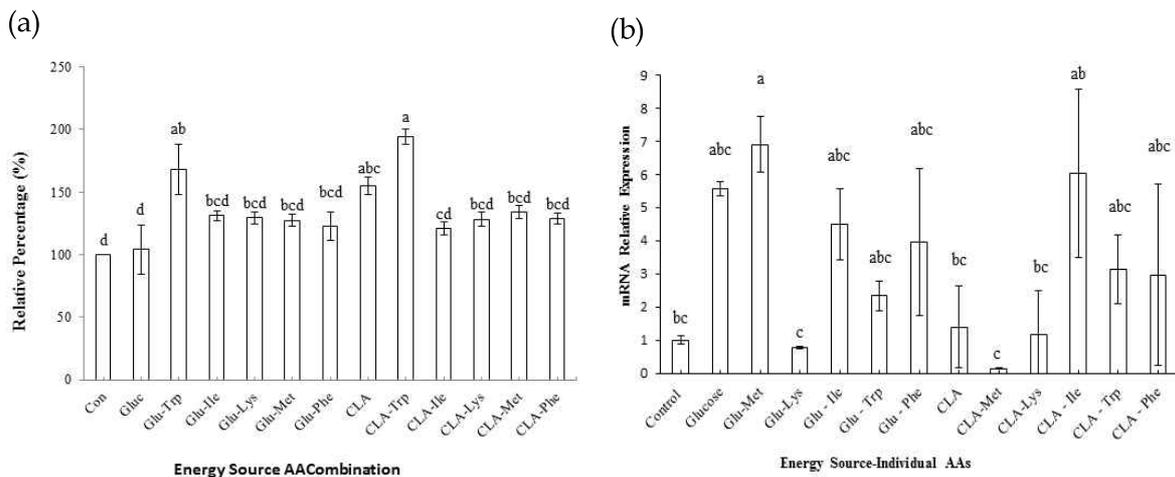
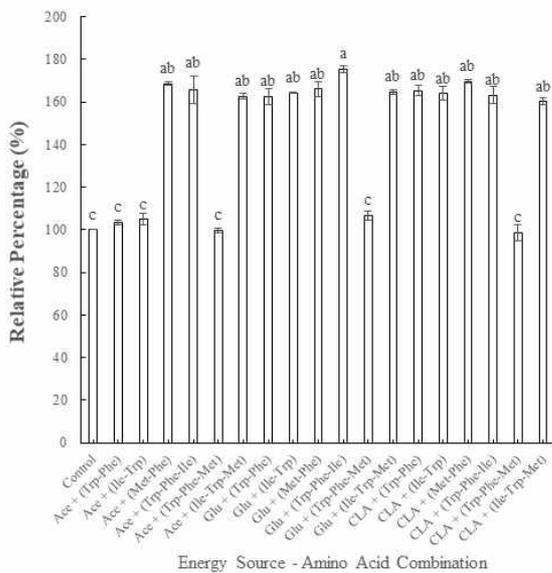


그림 47. Relative extracellular protein concentrations (a) and  $\beta$ -casein mRNA expression (b) in MAC-T cells treated with 0.9 mM of glucose and 1.5 mM of t-10, c-12 CLA with amio acids. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

㉔ 생리활성 물질과 필수아미노산 조합

- 생리활성 물질과 연구 2에서 발굴한 유단백 합성을 최대화하는 필수아미노산 조합을 함께 처리했을 때의 결과는 그림 48과 같음.
- Trp-Phe-Met의 아미노산 조합은 어떤 생리활성 물질과 함께 첨가해도 extracellular 단백질이 증가하지 않았음. acetate에 Trp-Phe, Ile-Trp를 첨가한 처리구 역시 단백질 합성을 증가시키지 못함. 그 외의 처리구는 모두 대조구 대비 유의적으로 증가함을 보임.
- 반면  $\beta$ -casein mRNA 발현량은 Acetate-Trp-Phe, Acetate-Ile-Trp 처리구에서 가장 높은 level을 나타냄.

(a)



(b)

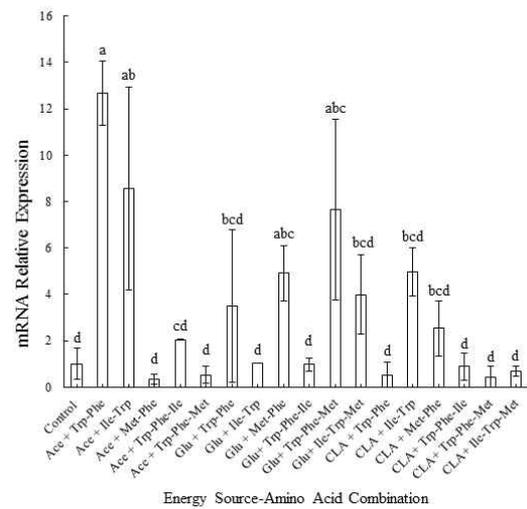


그림 48. Relative extracellular protein concentrations (a) and  $\beta$ -casein mRNA expression (b) in MAC-T cells treated with acetate, glucose and t-10, c-12 CLA with amino acid combinations. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

㉔ 결론

- 연구 결과는 그림 49 및 그림 50에 종합하여 나타내었음.
- 그림 49에서 Extracellular 단백질 농도는 모든 처리구 중 Trp-Phe 처리구에서 가장 증가하는 것으로 나타남.  $\beta$ -casein 발현량은 모든 처리구 중 Acetate-Trp-Phe 처리구에서 가장 높은 level을 보임.
- 따라서 MAC-T cell에서 가장 효율적으로 유단백질을 생산하는 조합은 Trp-Phe와 Acetate-Trp-Phe으로 이들 조합을 *in vivo* 실험을 통하여 검증함.

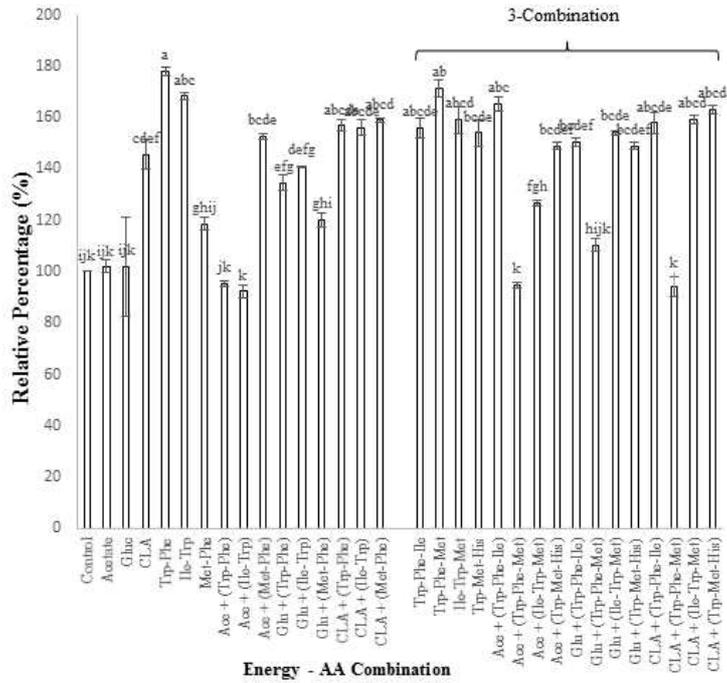


그림 49. Relative extracellular protein concentrations in MAC-T cells upon addition of different energy sources plus different amino acids for 72 h. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). <sup>a-k</sup>Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

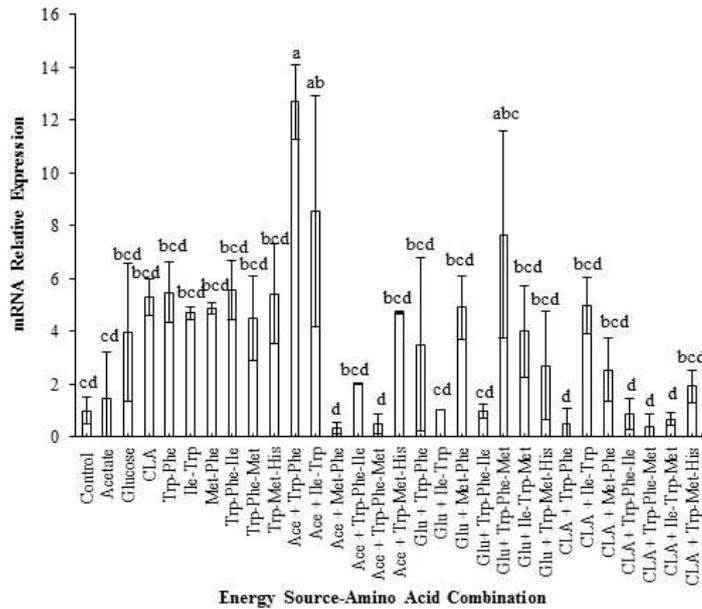


그림 50. Relative  $\beta$ -casein mRNA expression in MAC-T cells upon addition of different energy sources plus different amino acids for 72 h. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). <sup>a-d</sup>Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

(4) 연구 4. 유선상피세포에서 최적 아미노산의 이용에 따른 기전 연구 (2년차)

(가) 연구 목적

- 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)를 이용하여 연구 3을 통해 발굴한 Phe와 Trp를 처리한 후, proteomic 분석을 통해 대사 기전에 미치는 영향을 조사함.

(나) 재료 및 방법

① 세포 주 : 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)

② 실험 설계 : 대조구(분화 미디어), 처리구(Phe와 Trp을 분화 미디어에 첨가)

- 필수아미노산 종류 : Phe, Trp
- 농도 : 0.6 mM의 Phe, 0.9 mM의 Trp
- 배양 시간 : 72시간
- 조사 항목 : Intracellular 단백질 추출, Proteomics
- 분화 미디어 조성 : DMEM/F12 (Gibco) + 10% Fetal bovine serum (Gibco) + 1% Penicillin/streptomycin (Hyclone) + 0.1% Gentamycin (Sigma-aldrich) + 0.1% Hydrocortisone (Sigma-aldrich) + 0.1% Insulin (Sigma-aldrich) + 0.1% Prolactin (Sigma-aldrich)
- 분화 미디어 내 기본 필수아미노산 조성 : Arg 0.70 mM, His 0.15 mM, Ile 0.42 mM, Leu 0.45 mM, Lys 0.50 mM, Met 0.12 mM, Phe 0.22 mM, Thr 0.45 mM, Trp 0.04 mM, Val 0.45 mM

③ 실험 방법

- Intracellular 단백질 추출 : 6-well plate에 MAC-T cell이 100% confluence 상태로 성장했을 때, 대조구로서 분화 미디어와 처리구로서 각 필수아미노산이 농도별 첨가된 분화 미디어를 분주 후 배양함. 72시간 배양 후 세포 내 단백질을 추출함.
- Proteomic analysis : UPLC-MS/ESI-Q-TOF를 이용하여 추출한 intracellular 단백질 내의 단백질 종류를 식별함. MASCOT search engine의 v. 2.4 (Matrix Science, Boston, MA, USA)에서 international protein index (IPI) bovine database를 이용함.

④ 통계 분석

- 데이터 평균값에 따른 통계적 유의차는 SAS 소프트웨어 v. 9.4 (SAS Institute, Cary NC, USA)의 LSD test로 실시함.  $p < 0.05$ 에서 유의하다고 판단함. 단백질의 상향 및 하향 조절 cut-off level은  $>2$ 와  $<0.05$ 로 판별함. Pathway analysis는 PANTHER 프로그램 (<http://www.pantherdb.org>)을 이용함.

(다) 실험 결과 및 고찰

① Phenylalanine (Phe)

- MAC-T cell에 Phe를 처리하여 조절된 단백질은 49개가 발굴됨 (표 13). 그 중 상향 조절된 단백질은 25개, 하향 조절된 단백질은 24였음. 그 중 단백질 및 에너지 대사와 관련한 단백질들을 표 13에 제시함.
- 단백질 및 에너지 대사와 관련하여 발굴된 단백질들이 관여하는 기전은 표 14와 같으며, 이를 도식화 한 것은 그림 51과 같음.
- MAC-T cell에 첨가된 Phe는 해당과정, ATP 합성 과정에 이용됨. 또한 세포 생존에 관여하는 PI3K pathway에 관여하는 것으로 밝혀짐.

표 13. Differentially expressed proteins in MAC-T cells supplemented with L-phenylalanine compared to control

Detected proteins	
Increasing number	25
Decreasing number	24
Selected downregulated and upregulated proteins	
ATP synthase F1 subunit beta	ATP5B ▲

▲ : Upregulated (> 2-fold greater protein expression than in control)

▼ : Downregulated (< 0.5-fold greater protein expression than in control)

표 14. Protein and energy metabolism-related pathways stimulated by supplementation of L-phenylalanine in MAC-T cells compared to control

Detected pathway*
ATP synthesis
Cholecystokinin receptor signaling map
Glycolysis
Phosphoinositide 3-kinase pathway

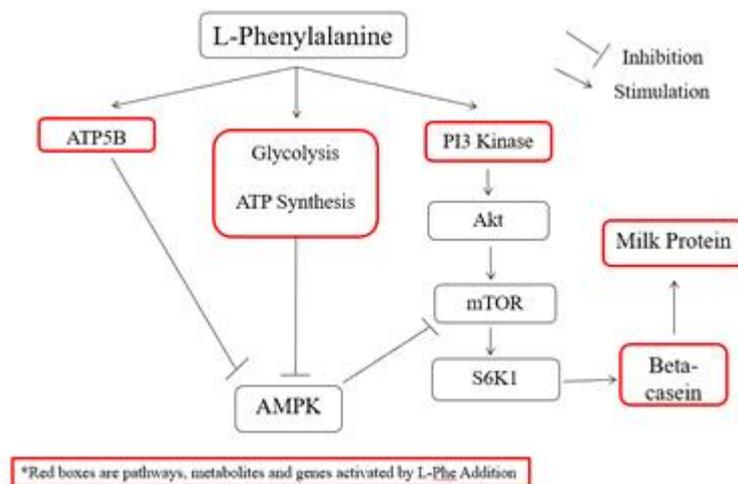


그림 51. Diagram of the effect of L-phenylalanine supplementation in

MAC-T cells on milk protein synthesis pathway

Abbreviation: ATP5B = ATP synthase F1 subunit beta ; AMPK = AMP-activated protein kinase; PI3 Kinase = Phosphoinositide 3-kinase; Akt = Protein kinase B; mTOR = mammalian target of rapamycin; S6K = S6 Kinase

## ② Tryptophan (Trp)

- MAC-T cell에 Trp를 처리하여 조절된 단백질은 110개가 발굴됨 (Table 4-3). 그 중 상향 조절된 단백질은 51개, 하향 조절된 단백질은 59였음. 그 중 단백질 및 에너지 대사와 관련한 단백질들을 Table 4-3에 제시함.
- 단백질 및 에너지 대사와 관련하여 발굴된 단백질들이 관여하는 기전은 Table 4-4와

같으며, 이를 도식화 한 것은 그림 52와 같음.

- MAC-T cell에 첨가된 Trp는 해당과정, pentose phosphate pathway, ATP 합성 과정에 이용됨 (그림 52). 또한 단백질을 합성하는 리보솜을 상향 조절하여 연구 1에서와 같이  $\beta$ -casein 발현을 촉진시켜 결국 유단백 합성에 기여하는 것으로 판단됨.

표 14. Differentially expressed proteins in MAC-T cells supplemented with L-tryptophan compared to control

Detected proteins		
Increasing number		51
Decreasing number		59
Selected downregulated and upregulated proteins		▼▲
HSPD1 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	▲
HSPA1A Heat shock 70 kDa protein 1A	HSPA1A	▲
ATP5B ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATP5B	▼
EEF1A1 Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	▼
RPSA Similar to 40S ribosomal protein SA (Fragment)	RPSA	▼
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1	▼
RPS18 40S ribosomal protein S18	RPS18	▲
EIF4A1 Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	▼
EEF2 Elongation factor 2	EEF2	▼
RPS25 40S ribosomal protein S25	RPS25	▲
EEF1G Elongation factor 1-gamma	EEF1G	▼
RPN2 Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	RPN2	▼
ATP1A2 Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	ATP1A2	▲
GPI Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	▼
RPL11 60S ribosomal protein L11	RPL11	▼
RPS2 40S ribosomal protein S2	RPS2	▼

▲ : Upregulated (> 2-fold greater protein expression than in control)

▼ : Downregulated (< 0.5-fold greater protein expression than in control)

표 15. Protein and energy metabolism-related pathways stimulated by supplementation of L-tryptophan in MAC-T cells compared to control

Detected pathway*
Apoptosis signaling pathway
p53 pathway
Glycolysis
Pentose phosphate pathway
ATP synthesis
CCKR signaling map
Endothelin signaling pathway
FGF signaling pathway
Ras Pathway
EGF receptor signaling pathway

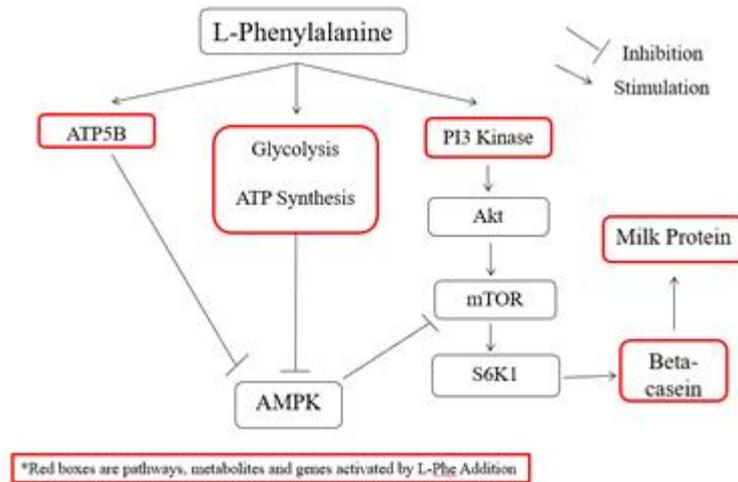


그림 52. Diagram of the effect of L-tryptophan supplementation in MAC-T cells on milk protein synthesis pathway

Abbreviation: ATP1A2 = ATP1A2 Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2; AMPK = AMP-activated protein kinase; PI3 Kinase = Phosphoinositide 3-kinase; Akt = Protein kinase B; mTOR = mammalian target of rapamycin; S6K = S6 Kinase; RPS6 = Ribosomal Protein S6; RPS18 = 40S ribosomal protein S18; RPS25 = 40S ribosomal protein S25

(5) 연구 5. 영양소 제한 환경에서의 히스티딘 첨가 연구 (2년차)

(가) 연구 목적

- 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)에 영양소가 제한된 환경에서 L-histidine 과 아세트산을 첨가했을 때 유단백질 합성에 미치는 영향을 조사함.

(나) 재료 및 방법

① 세포 주 : 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)

② 실험 설계 : 대조구(분화 미디어), 처리구(영양소 제한 미디어에 His 혹은 acetate 첨가)

- <실험 1> 영양소가 제한된 환경 설정
  - 분화 미디어 농도 : 100, 99, 98, 97, 96, 95%
  - 배양 시간 : 72시간
  - 조사 항목 : Cell viability
- <실험 2> 영양소가 제한된 환경에 His를 첨가했을 때의 영향 조사
  - 처리물 : His
  - 농도 : 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 mM
  - 배양 시간 : 72시간
  - 조사 항목 : Cell viability, Extracellular 단백질 농도,  $\beta$ -casein mRNA 발현량
- <실험 3> 영양소가 제한된 환경에 0.15 mM의 His와 acetate의 첨가가 유단백 합성에

미치는 영향 조사

- 처리물 : His, acetate
  - 농도 : 0.15 mM의 His, 0, 0.15, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 mM의 acetate
  - 배양 시간 : 72시간
  - 조사 항목 : Cell viability, Extracellular 단백질 농도,  $\beta$ -casein mRNA 발현량
- 분화 미디어 조성 : DMEM/F12 (Gibco) + 10% Fetal bovine serum (Gibco) + 1% Penicillin/streptomycin (Hyclone) + 0.1% Gentamycin (Sigma-aldrich) + 0.1% Hydrocortisone (Sigma-aldrich) + 0.1% Insulin (Sigma-aldrich) + 0.1% Prolactin (Sigma-aldrich)
  - 분화 미디어 내 기본 필수아미노산 조성 : Arg 0.70 mM, His 0.15 mM, Ile 0.42 mM, Leu 0.45 mM, Lys 0.50 mM, Met 0.12 mM, Phe 0.22 mM, Thr 0.45 mM, Trp 0.04 mM, Val 0.45 mM

### ③ 실험 방법

- Cell viability : Dojindo 사의 CCK-8 kit(Dojindo Laboratories, Rockville, MD, USA)의 실험방법을 이용하여 분석함. 96-well plate에 5,000 cells/well이 되도록 세포를 분주하여 24시간 배양함. 이후 대조구 및 처리구 media로 교환해준 후 다시 24시간 배양함. 배양이 끝나기 1시간 전, CCK-8 solution을 10  $\mu$ L씩 분주함. 450 nm의 파장에서 OD 값을 측정함.
- Extracellular 단백질 추출 및 정량 분석 : 6-well plate에 MAC-T cell이 100% confluence 상태로 성장했을 때, 대조구로서 분화 미디어와 처리구로서 각 필수아미노산이 농도별 첨가된 분화 미디어를 분주 후 배양함. 72시간 배양 후 세포 외 단백질을 추출하고, BCA protein assay kit (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)를 이용하여 분석함.
- $\beta$ -casein mRNA 발현량 : 단백질 추출 과정과 동일한 방법으로 배양 후 세포를 채취함. 채취한 세포에서 RNA를 추출 후 cDNA로 합성하여 real-time qPCR을 이용해 유전자 발현량을 확인함.

### ④ 통계 분석

- 데이터 평균값에 따른 통계적 유의차는 SAS 소프트웨어 v. 9.4 (SAS Institute, Cary NC, USA)의 Tucky HSD test로 실시함.  $p < 0.05$ 에서 유의하다고 판단함.

## (다) 실험 결과 및 고찰

### ① <실험 1> 영양소가 제한된 환경 설정

- 영양소가 제한된 환경에서 MAC-T cell을 배양시켰을 때, cell viability는 98%부터 유의차를 보이며 급격하게 감소함 ( $p < 0.0001$ ) (그림 53). 따라서 영양소 제한 환경으로 99% 분화 미디어가 선정 되었으며 추후 실험이 진행됨.

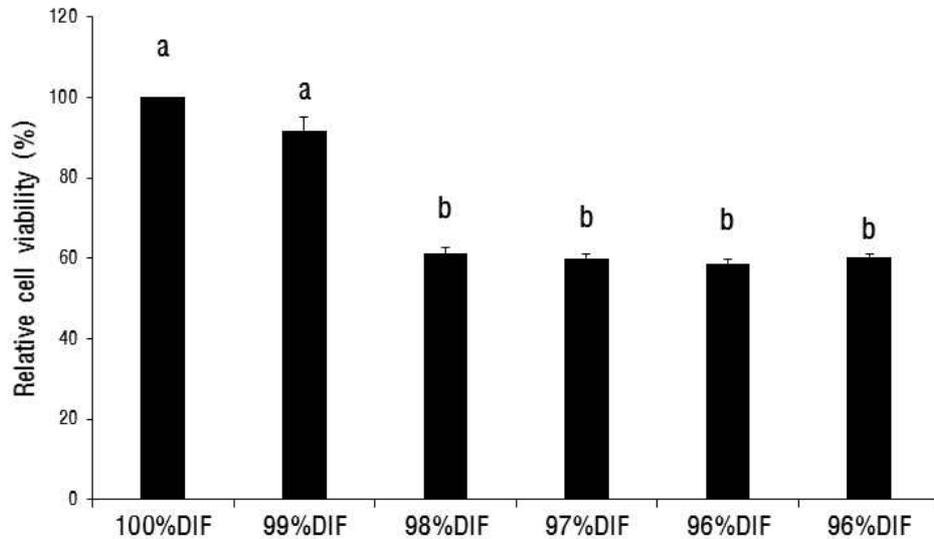
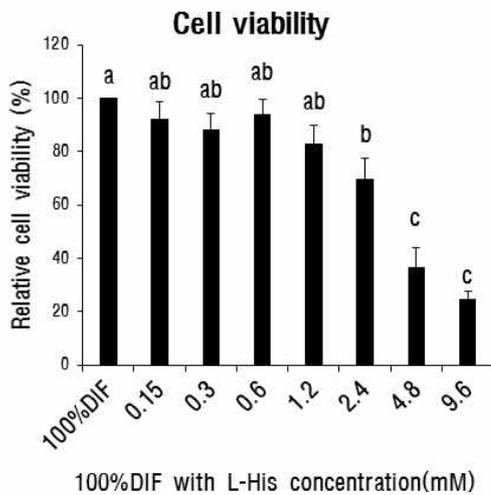


그림 53. Relative MAC-T cell viability by treating various percentages of differentiation medium (n = 3). Values are presented as means  $\pm$  SEM. Means without a superscript letter differ,  $P < 0.05$ .

② <실험 2> 영양소가 제한된 환경에 His를 첨가했을 때의 영향 조사

- 영양소가 1% 제한되거나 (99%DIF) 제한되지 않은 (100%DIF) 분화 미디어에 여러 가지 농도의 His를 처리했을 때 cell viability는 다음과 같음 (그림 54). 대조구와 비교하여 통계적 차이를 보이지 않은 0-1.2 mM 처리구 (100%DIF)와 0-0.6 mM 처리구 (99%DIF)를 추후 분석함.
- 영양소를 제한하지 않았을 때 extracellular 단백질 농도는 아무런 변화가 없었음. 하지만 99%DIF에 0.15 mM His를 처리했을 때 대조구 대비 조금 증가하는 패턴을 보임.
- 99%DIF에 여러 농도의 His를 처리한 처리구들의  $\beta$ -casein mRNA 발현량을 확인한 결과, 0.15 mM His를 첨가했을 때 유의적으로  $\beta$ -casein 발현량이 증가함을 발견함.
- 따라서 0.15 mM을 실험 3의 His 농도로 설정함.

(a)



(b)

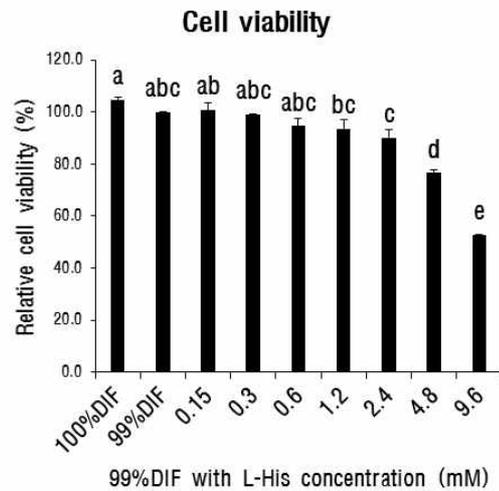
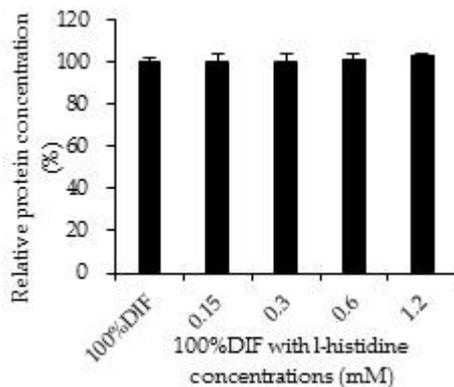


그림 54. Relative MAC-T cell viability by treating 100% (a) and 99% (b) differentiation with various concentrations of L-Histidine (n = 3). Values are presented as means  $\pm$  SEM. Means without a superscript letter differ,  $P < 0.05$ .

(a)



(b)

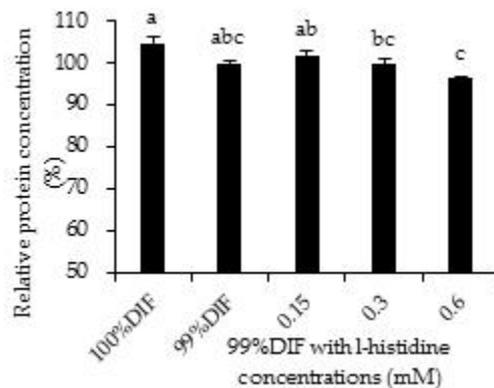


그림 55. The effect of various concentrations of l-histidine with not-restricted (a) and 1% nutrient-restricted (b) differentiation medium (DIF) on relative extracellular protein concentrations of immortalized bovine mammary epithelial cells (MAC-T). MAC-T cells were incubated with each treatment for 24 h (n = 3). Values are presented as means  $\pm$  SEM. Means without a superscript letter differ,  $p < 0.05$ .

③ <실험 3> 영양소가 제한된 환경에 0.15 mM의 His와 acetate의 첨가가 유단백 합성에 미치는 영향 조사

- 그림 56은 0.15 mM의 His를 영양소가 제한되거나(N) 제한되지 않은(P) 분화 미디어에 기본 첨가한 후, 여러 가지 농도의 acetate를 더 첨가한 실험 결과임.
- Relative cell viability는 acetate의 dose-dependent하게 감소함. 따라서 통계적 유의차가 없는 처리구를 추후 분석함.
- Extracellular 단백질 농도는 영양소가 제한되지 않은 환경에 His와 acetate를 각각 0.15 mM 처리한 그룹에서 유의적으로 증가하였으나, 그 효과는 미미했음.

- 영양소를 제한하고 His 0.15 mM 혹은 His와 acetate를 각각 0.15 mM 처리한 그룹에서  $\beta$ -casein mRNA 발현량이 유의적으로 증가했음.

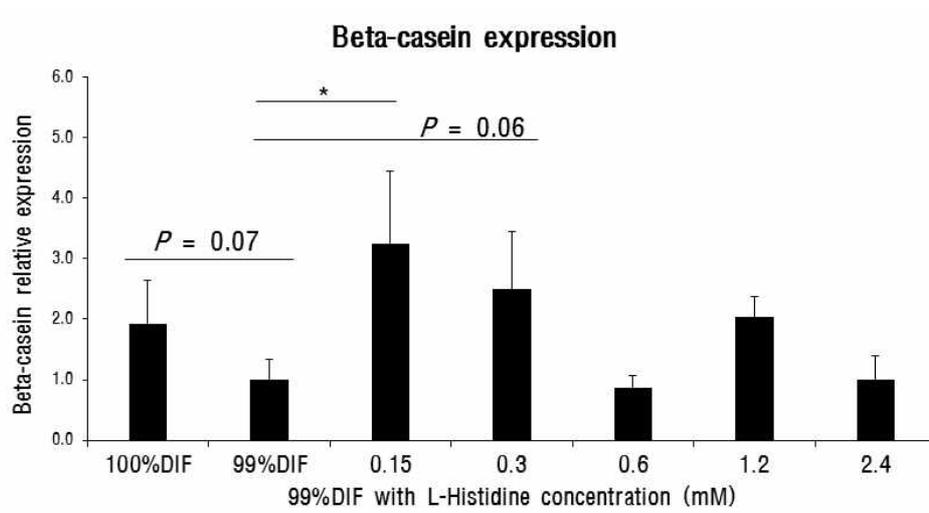
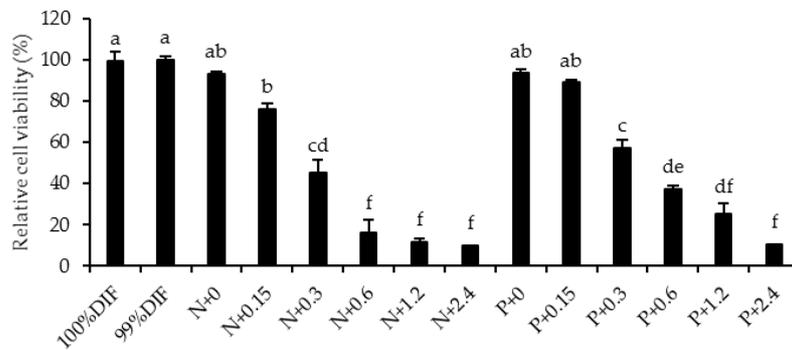
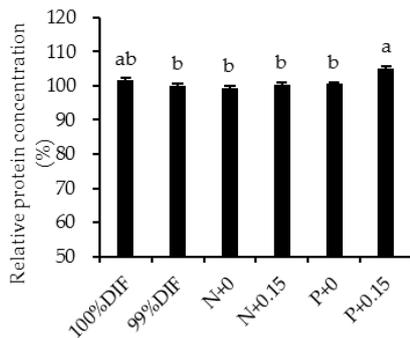


그림 56. Relative MAC-T cell viability by treating 100% and 99% differentiation with various concentrations of L-Histidine (n = 3). Values are presented as means  $\pm$  SEM.

(a)



(b)



(c)

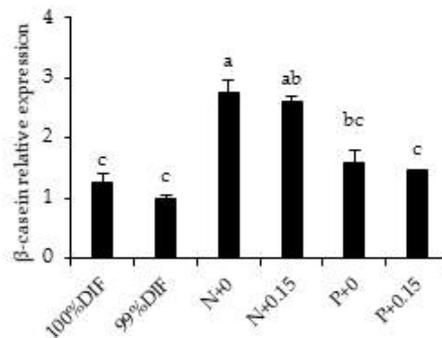


그림 57. The effect of 0.15 mM L-histidine and various concentrations of sodium acetate with 1% nutrient-restricted or not restricted differentiation medium (DIF) on cell viability (a), secreted protein concentrations, and relative  $\beta$ -casein expression of immortalized bovine mammary epithelial cells (MAC-T). MAC-T cells were incubated with each treatment for 24 h (n = 3). Values are presented as means  $\pm$  SEM. Means without a superscript letter differ,  $p < 0.05$ .

#### ④ 결론

- 영양소가 제한된 상황의 MAC-T cell에 histidine 단독 혹은 acetate의 조합을 함께 처리하면  $\beta$ -casein mRNA 발현량이 증가함.
- 따라서 제한된 상황에서 histidine의 첨가 효과를 검증하기 위한 *in vivo* 연구가 필요한 것으로 생각됨.

#### (6) 최종 결론

- 필수아미노산과 생리활성물질의 첨가는 젖소 유래 유선상피세포(MAC-T cells)에서 extracellular 단백질 및  $\beta$ -casein mRNA 발현량 증가를 유도함.
- 필수아미노산 및 생리활성물질의 다양한 조합 중, Trp-Phe와 Acetate-Trp-Phe 조합은 synergistic하게 extracellular 단백질 및  $\beta$ -casein mRNA 발현량을 증가하는 결과를 나타냄. 따라서 이들 조합을 *in vivo* 사양시험 조합으로 선정함.
- L-histidine은 영양소가 제한된 환경에서 유단백질 생산을 증가시킬 것으로 기대되며, 사료비 절감에 기여할 것으로 생각됨.

나. In vivo 실험을 통한 필수아미노산 및 대사촉진 물질의 유단백 증진 효과 검증

(1) 연구 6. 반추위 보호 트립토판이 젖소의 생산성에 미치는 영향 (3년차)

(가) 연구 목적

- 제1 세부과제에서 사업성이 인정된 tryptophan의 제형형태인 반추위 보호 L-tryptophan (RPT)을 사양실험에 적용하여 비유중기 젖소의 생산성 증가에 미치는 영향을 검증하고자 함.

(나) 실험 재료 및 방법

① 본 연구는 건국대학교 동물실험윤리위원회에 승인 하에 실시되었음

(승인번호: KU17080).

② 공시동물 및 실험 장소

- 본 사양실험은 충청북도 충주에 위치한 건국대학교 종합실습목장에 있는 홀스타인 (Holstein-Friesian) 착유우 중 비유초기부터 비유중기에 해당하는 개체를 처리구와 대조구로 각 10두씩 나누어 본 사양실험에 사용함. 추가적으로 군 분리 진행시 대조구 대비 처리구의 유량, 비유단계, 산차 및 유성분의 통계적 유의차를 보이지 않도록 고려하여 그룹화 작업을 수행함.

표 16. Similarity in dairy cow's milk yield, days in milk, parity, and milk composition

Item	Treatment		SEM	P-value
	Control	RPT		
Heads	10	10		
Parity, No.	2.8	3.1	0.73	0.688
Days in milk, d	174.7	178.6	45.77	0.933
Milk yield, kg/d	35.7	36.4	2.54	0.778
Milk fat, %	4.8	5.0	0.32	0.570
Milk protein, %	3.0	3.1	0.12	0.685

③ 기초사료

- Total Mixed Ration(TMR; Feedex Co., Ltd., Chungnam, Korea), Roughage 및 Concentrates를 이용하였음 (표 17).

표 17. Ingredients and chemical composition of TMR, roughage, concentrates used in dairy cow diets

Items	TMR <sup>1</sup>	Roughage	Concentrates
Feed, kg/d	34.3	2.9	4.4
DM of Feed, kg/d	21.3	2.6	3.9
Chemical compositions, g/d of DM			
Crude Protein	2179.0	93.3	776.9
Crude Fat	643.3	17.2	138.1
Amino acids, g/d of DM			
Aspartic acid	204.5	7.8	65.9
Threonine	83.1	4.2	29.3
Serine	98.0	4.2	35.9
Glutamic acid	347.2	9.9	141.1
Glycine	102.2	4.4	34.7
Alanine	119.3	6.0	39.4
Valine	108.6	4.9	37.4
Isoleucine	78.8	3.6	28.9
Leucine	157.6	6.2	62.0
Tyrosine	55.4	3.6	22.2
Phenylalanine	102.2	4.9	36.7
Lysine	95.9	4.4	34.7
Histidine	53.3	1.3	19.9
Arginine	153.4	3.9	50.3
Cystine	36.2	1.3	13.3
Methionine	34.0	1.3	13.3
Proline	127.8	9.9	47.2

<sup>1</sup>TMR, total mixed ration

④ RPT 급여기간 및 방법

- 실험 기간 : 실험개시일(0주)부터 실험종료일(6주)까지 총 42일
- 0주부터 RPT의 급여량을 5, 10, 15 g으로 점진적으로 증진시켜 1주일간 RPT의 적응기간을 두었으며, RPT를 TMR 3 kg과 혼합하여 매일 07시에 스탠천에 보정하여 개체별로 급여를 진행함.

⑤ 샘플링 일정 및 분석방법

- 유량 및 유성분
  - 공시동물(총 20두)의 개체별 오전(0300 h) 및 오후(1500 h)에 착유된 유량을 매일 기록하였음.
  - 공시동물(총 20두)의 실험 개시 일부터 7일 간격으로 오전(0300 h) 및 오후(1500 h)에 착유된 원유를 pooling하여 우유 내 일반성분[milk fat, milk protein, lactose, solid-not fat(SnF), somatic cell count(SCC), milk urea nitrogen(MUN), acetone, beta-hydroxybutyrate(BHB), beta-casein, Mono- and Poly-unsaturated fatty acids, Saturated fatty acid]을 분석함.
- 사료 섭취량 분석
  - 사료 섭취량 분석은 매일 아침 9시에 급여하는 사료와, 24시간 후인 다음날 아침 9시에 남은 사료의 양을 기록하여 일당 섭취량을 분석함.
- 통계 분석
  - 각 분석을 통해 얻어진 일별 성적들은 주차별로 평균값을 산출.
  - 데이터 평균값에 따른 통계적 유의차는 SPSS 통계 소프트웨어(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 Independent Student *t*-test를 사용.

-  $p$ -value < 0.05 에서 유의하고,  $0.05 < p < 0.1$ 에서 경향이 있는 것으로 판단함.

(다) 실험 결과 및 고찰

① 유량

- 주차별 및 전 실험기간에서 대조구와 비교하여 처리구는 유량에 통계적 차이를 나타내지 않았음 (표 18-1).
- 아울러 전 실험기간 동안 비유기 젖소의 유량 변화 추세에서 대조구의 유량 변화는 크게 없는 것으로 나타남 (그림 57).
- RPT 급여에 따른 공시동물의 유량 변화에 있어, 실험개시일(0주)과 비교하여 1주차에서는 점진적인 수치의 증가 추세를 보이거나, 이후 실험기간 동안 비유기 젖소의 유량 수치는 일정한 추세를 나타냄.

표 18-1. Milk yield on test days of lactating dairy cows

period	Treatment <sup>1</sup>		SEM	P-value
	Control	RPT		
0 wk	36.8	36.9	2.24	0.951
1 wk	38.9	38.2	2.40	0.766
2 wk	37.3	37.3	2.90	0.994
3 wk	36.6	37.0	2.85	0.876
4 wk	37.1	37.4	3.07	0.912
5 wk	37.1	36.3	2.93	0.783
6 wk	37.6	37.7	3.10	0.954
total AVG <sup>2</sup>	37.3	37.3	2.78	0.891

<sup>1</sup>Treatment = control, basal diet(n = 10); RPT, 15 g per kg of basal diet(n = 10).

<sup>2</sup>total AVG = average of each item with 1 to 6 weeks

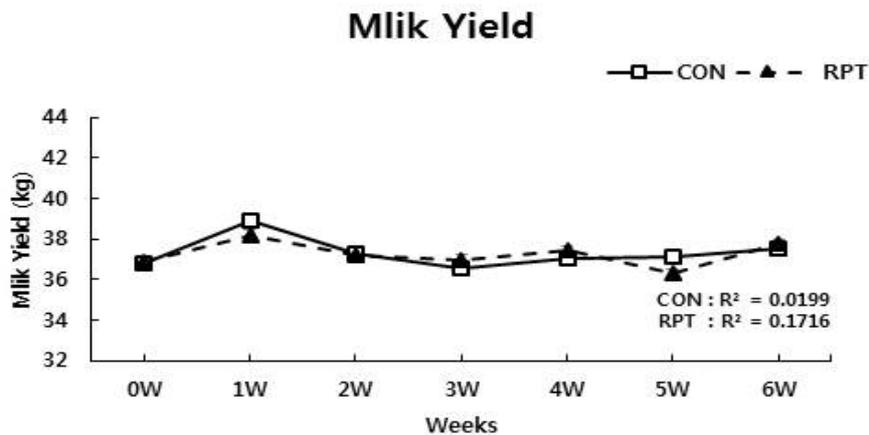


그림 58. Milk yield on test days of cows receiving RPT from 0w to 6w and cows receiving no such supplements

② 유성분

- 6주 간의 전 실험기간 동안 RPT 급여는 대조구 대비 비유기 젖소의 유질 변화에 영향을 주지 않는 것으로 확인됨 (표 18-2).
- 하지만, 각 그룹 내 실험개시일(0주)과 전 실험기간의 유지방(milk fat) 함량 변화 비교에 있어서, 대조구의 경우 0.9%(4.8% 0주 vs. 5.7% 6주간 평균)의 유지방 함량이 크

게 증가한 반면, RPT 급여는 0.1%(5.0% 0주 vs. 5.1% 6주간 평균)로 대조구와 비교하여 다소 낮은 수준의 증가를 나타냄.

- RPT 급여에 따른 주차별 젖소의 유단백(milk protein) 함량 변화 양상을 살펴보면, RPT의 급여는 0주차부터 다소 증가하여 4주차에는 대폭 증가하는 경향을 보여 대조구의 증가 경향( $R^2 = 0.7609$ )과 비교하여 RPT 급여는 보다 높은 수치의 증가율( $R^2 = 0.8938$ )를 나타냄 (그림 58).
- 또한 유단백량(milk protein yield)에서, RPT 급여에 의한 유단백량(milk protein yield)은 대조구에 비해 증가하는 경향을 확인 할 수 있으며, 대조구의 증가 경향( $R^2 = 0.7279$ )과 비교하여 RPT 급여는 보다 높은 수치의 증가율( $R^2 = 0.8022$ )를 나타냄 (그림 59).

표 18-2. Milk component on test days of lactating dairy cows

	Treatment <sup>1</sup>		SEM	p-value
	Control	RPT		
Milk protein, %				
0 wk	3.0	3.1	0.68	0.119
6 wk	3.3	3.4	0.51	0.190
total AVG <sup>2</sup>	3.2	3.2	0.71	0.163
Milk fat, %				
0 wk	4.8	5.0	0.32	0.570
6 wk	6.8	5.7	0.54	0.044
total AVG <sup>2</sup>	5.7	5.1	0.44	0.242
Somatic cells, x 10 <sup>3</sup>				
0 wk	134.9	117.1	71.84	0.807
6 wk	121.0	405.5	324.37	0.392
total AVG <sup>2</sup>	253.5	289.2	334.85	0.619
Lactose, %				
0 wk	4.6	4.7	0.08	0.202
6 wk	4.7	4.6	0.09	0.746
total AVG <sup>2</sup>	4.7	4.7	0.10	0.550
Solid-not Fat, %				
0 wk	8.3	8.5	0.11	0.297
6 wk	8.6	8.7	0.14	0.592
total AVG <sup>2</sup>	8.5	8.5	0.12	0.655
Milk urea nitrogen, mg/dL				
0 wk	12.1	11.9	1.21	0.903
6 wk	15.8	14.7	0.95	0.325
total AVG <sup>2</sup>	15.8	14.8	0.90	0.320
Aceton, mM				
0 wk	0.0	0.0	0.01	0.208
6 wk	0.0	0.0	0.01	0.558
total AVG <sup>2</sup>	0.0	0.0	0.01	0.486
Beta-hydroxybutyrate, mM				
0 wk	0.0	0.0	0.00	1.000
6 wk	0.0	0.0	0.00	1.000
total AVG <sup>2</sup>	0.0	0.0	0.01	0.624
Casein-b, %				
0 wk	2.3	2.4	0.10	0.594
6 wk	2.6	2.7	0.14	0.618
total AVG <sup>2</sup>	2.5	2.5	0.12	0.749
Mono-unsaturated fatty acid, %				

0 wk	1.4	1.4	0.09	0.706
6 wk	1.8	1.5	0.11	0.080
total AVG <sup>2</sup>	1.6	1.5	0.11	0.247
Poly-unsaturated fatty acid, %				
0 wk	0.4	0.4	0.01	0.687
6 wk	0.4	0.4	0.01	0.024
total AVG <sup>2</sup>	0.4	0.4	0.01	0.293
Saturated fatty acid, %				
0 wk	3.0	3.1	0.25	0.590
6 wk	4.6	3.8	0.40	0.045
total AVG <sup>2</sup>	3.8	3.4	0.33	0.254
Total Unsaturated fatty acid, %				
0 wk	1.7	1.8	0.11	0.581
6 wk	2.2	1.9	0.14	0.111
total AVG <sup>2</sup>	1.9	1.8	0.13	0.242

<sup>1</sup>Treatment = control, basal diet(n = 10); RPT 15 g per kg of basal diet(n = 10).

<sup>2</sup>total AVG = average of each item with 1 to 6 weeks

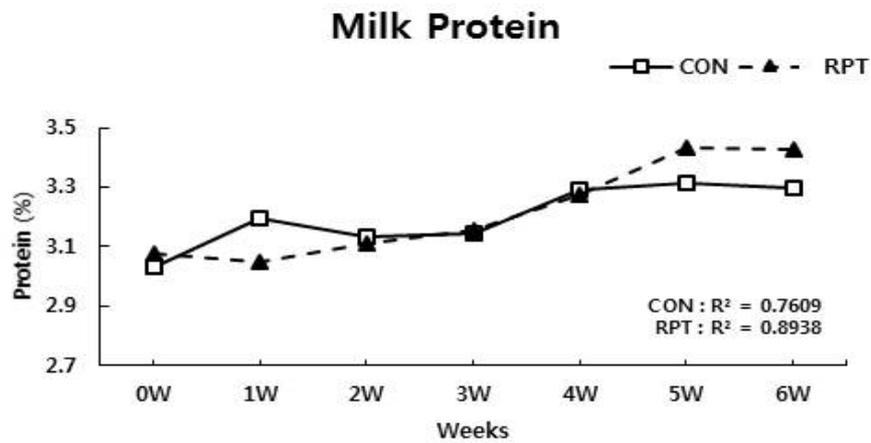


그림 59. Milk protein content on test days of cows receiving RPT from 0w to 6w and cows receiving no such supplements

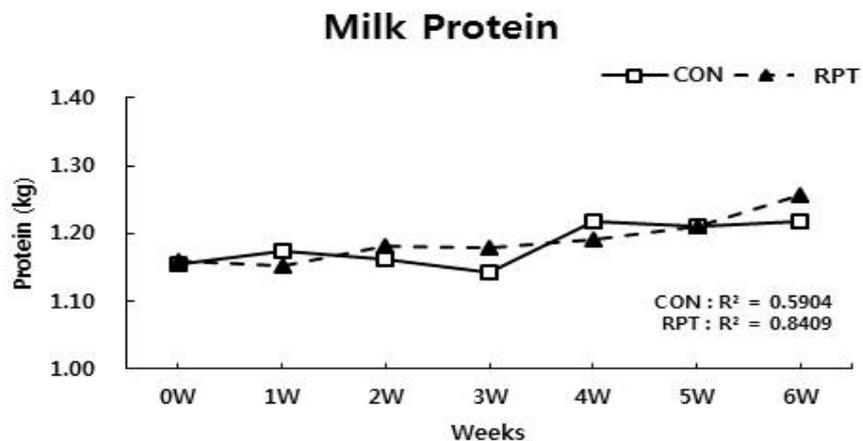


그림 60. Milk protein yield on test days of cows receiving RPT from 0w to 6w and cows receiving no such supplements

③ 결론

- 비유 중기 착유우에 RPT를 15 g 첨가 급여한 결과 긍정적인 기대 효과가 나타나지 않았음. 따라서 착유우의 생산성 증가 효과를 나타낼 수 있는 RPT의 적정 첨가량을 결정하기 위해 추후 연구를 진행함.

(2) 연구 7. 홀스타인 착유우에 있어서 반추위 보호 트립토판 첨가가 여름철 유량 및 유단백에 미치는 영향 (3년차)

(가) 연구 목적

연구 6의 결과 긍정적인 기대 효과가 나타나지 않았음. 따라서 착유우의 유단백 합성 및 유량 증가를 위한 반추위 보호 L-tryptophan (RPT)의 적정 급여량을 결정하고, RPT의 급여 효과를 극대화시키기 위하여 착유우의 생산성이 급격하게 저하되는 여름철에 RPT의 급여효과를 검증하고자 본 실험을 수행함.

(나) 실험 재료 및 방법

① 본 연구는 건국대학교 동물실험윤리위원회에 승인 하에 실시되었음

(승인번호 : KU18096).

② 공시동물 및 실험장소

- 본 사양실험은 충청북도 충주에 위치한 건국대학교 종합실습목장에 있는 홀스타인 (Holstein-Friesian) 착유우 젖소 중 비유초기에 해당하는 개체를 대조구와 3개의 처리구로 각 4두씩 나누어 본 사양실험에 사용함. 추가적으로 군 분리 진행시 대조구 대비 처리구의 유량, 비유단계, 유성분과 체중의 통계적 유의차를 보이지 않도록 고려하여 그룹화 작업을 수행함 (표 19).

표 19. Experimental grouping considering days in milk, milk yield, milk protein, and body weight

Item	CON	15 g	30 g	60 g	SEM	p-value
Days in milk, d	71	75	73	78	7	0.911
Milk yield, kg/d	32.06	34.05	32.75	35.34	3.74	0.928
Milk protein, %	2.89	2.88	2.84	2.90	0.13	0.990
Initial body weight, kg	587	629	636	576	47	0.755

Each least squares mean represents 4 observations.

TMR requirement is 155.1 kg/d for control, 154.6 kg/d for 15g, 149.4 kg/d for 30g, 150 kg/d for 60g.

③ 기초사료

- TMR (NE : 1.67 Mcal/kg; CP : 21%; L-TRP : 0.2%, DM basis)을 젖소들에게 급여함 (표 20).
- 급여량은 NRC (2001)에 제시된 착유우에게 요구되는 에너지와 조단백질을 충족함.

표 20. Ingredients and chemical composition in basal diets for dairy cows

Experimental diet

Items	Control	15 g	30 g	60 g
Diets				
TMR, kg/d of DM	24.05	23.96	23.15	23.26
Concentrate, kg/d of DM	3.48	3.48	3.48	3.48
RPT, g/d	0	15	30	60
NE <sub>L</sub> , Mcal/kg of DM	40.16	40.01	38.66	38.84
Chemical compositions, kg/d of DM				
Crude protein	3.66	3.65	3.55	3.56
Crude fat	0.64	0.63	0.62	0.62
Crude fiber	3.30	3.29	3.18	3.20
Crude ash	1.40	1.40	1.36	1.36
NDF	7.83	7.81	7.57	7.60
ADF	4.74	4.72	4.58	4.60
Ca	0.16	0.16	0.15	0.15
P	0.09	0.09	0.09	0.09
Amino acids, g/d of DM				
Threonine	35	34	33	34
Valine	144	143	139	140
Isoleucine	193	192	187	188
Leucine	138	137	133	134
Methionine	281	280	273	274
Lysine	79	78	76	76
Arginine	165	165	161	161
Histidine	263	262	255	256
Penylalanine	91	91	88	89
Tryptophan, g/d of DM				
Requirement	30	30	30	30
Dry matter	33	34	33	33

TMR was formulated to meet the requirements of energy and protein (NRC, 2001), and a cow in each treatment was fed RPT at 0, 15, 30, and 60 g/d, respectively.

#### ④ RPT 급여기간 및 방법

- 실험 기간은 실험개시일(0주)부터 실험종료일(10주)까지 총 77일이었음.
- 0주부터 RPT의 급여량을 점진적으로 증진시켜 1주일간 RPT의 적응기간을 두었으며, 이후 기초사료에 RPT를 각 처리구마다 각각 15, 30, 60 g을 급여하였음.

#### ⑤ 샘플링 일정 및 분석방법

- 유량 및 유성분
  - 공시동물(총 16두)의 개체별 오전(0300 h) 및 오후(1500 h)에 착유된 유량을 매일 기록하였음.

- 공시동물(총 16두)의 실험 개시 일부터 7일 간격으로 오전(0300 h) 및 오후(1500 h)에 착유 된 원유를 pooling하여 우유 내 일반성분[milk fat, milk protein, lactose, solid-not fat(SnF), somatic cell count(SCC), milk urea nitrogen(MUN), acetone, beta-hydroxybutyrate(BHB), beta-casein, Mono- and Poly-unsaturated fatty acids, Saturated fatty acid]을 분석함.

- 혈액 채취

- 공시동물(총 16두)의 실험 개시일 부터 7일 간격으로 새벽 2 - 3시경 경정맥을 통해 혈액을 채취하여 Serum과 plasma, EDTA tube에 담아 분석하였음.

- 사료 섭취량

- 사료 섭취량 분석은 매일 새벽 5시에 급여하는 사료와, 24시간 후인 다음날 새벽 5시에 남은 사료의 양을 기록하여 일당 섭취량을 분석함.

- 온도 및 습도

- 온습도 기계를 통해 1분마다 온도와 습도가 측정되었으며, 이 데이터의 평균을 통해 일단위의 온습도가 기록되었음.

- 기록된 일단위의 온습도는 NRC (1971)에 제시되어 있는 THI (Temperature-humidity index) 계산식을 통해 열 스트레스에 대한 지표를 확인하였음.

$$THI = (1.8 \times Tdb + 32) - [(0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times Tdb - 26.8)] \text{ (NRC, 1971)}$$

- 통계 분석

- 각 분석을 통해 얻어진 일별 성적들은 주차별로 평균값을 산출함.

- 데이터 평균 값에 따른 통계적 유의차는 SAS 통계 소프트웨어(Cary, NC, USA)를 이용함. 유량과 유질에 대한 THI 효과는 repeated measure로 분석함.

-  $p$ -value < 0.05 에서 유의하고,  $0.05 < p < 0.1$ 에서 경향이 있는 것으로 판단함.

#### (다) 실험 결과 및 고찰

##### ① 온습도와 THI의 변화

- 그림 60은 11주간의 실험에서 측정된 온도와 습도이며, 온습도를 통해 계산된 THI의 변화를 확인할 수 있음.

- 전체적으로 온도와 습도, 그리고 THI는 실험이 진행되면서 증가하고 있으며, THI 범위에 따라 heat stress를 Stress Threshold THI (68 - 71)와 Mild - Moderate stress THI (72 - 79), Moderate - Severe Stress THI (80 - 89)로 구분함.

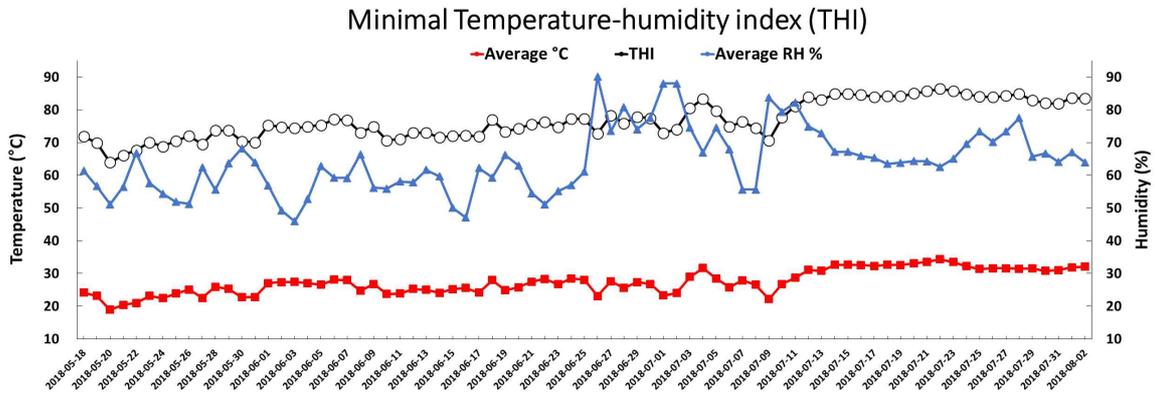


그림 61. Changes in the temperature, humidity and THI during experiment period

② 섭취량과 유량을 변화시키는 heat stress index의 상관관계

- 대조구와 60 g 처리구에서 heat stress index의 영향으로 섭취량이 감소하는 것을 알 수 있음. 특히 Moderate - Severe Stress THI (80 - 89)기간에서 15 g과 30 g 처리구는 분포도의 측면에서 heat stress index와 비교하여 섭취량에 긍정적인 효과를 보임.
- 표 21에서 대조구와 15 g, 60 g 처리구에서 R value가 -1에 근접하고 있어 음의 상관관계가 있음을 알 수 있으며, 통계적 유의차 역시 확인됨.
- 유량과 heat stress index의 상관관계는 그림 61과 표 21을 통해 확인 할 수 있음. 그래프 결과 대조구와 60 g 처리구에서 heat stress index의 영향으로 섭취량이 감소하는 것을 알 수 있음. 특히 Moderate - Severe Stress THI (80 -89)기간에서 15 g과 30 g 처리구는 분포도의 측면에서 heat stress index와 비교하여 유량에 긍정적인 효과를 보임.
- 표 22는 대조구와 15 g, 60 g 처리구에서 R value가 -1에 근접하고 있어 음의 상관관계가 있음을 알 수 있으며, 통계적 유의차 역시 확인됨.
- 측정된 습도에 따른 유량과 섭취량에 대한 상관관계는 발견되지 않았음.

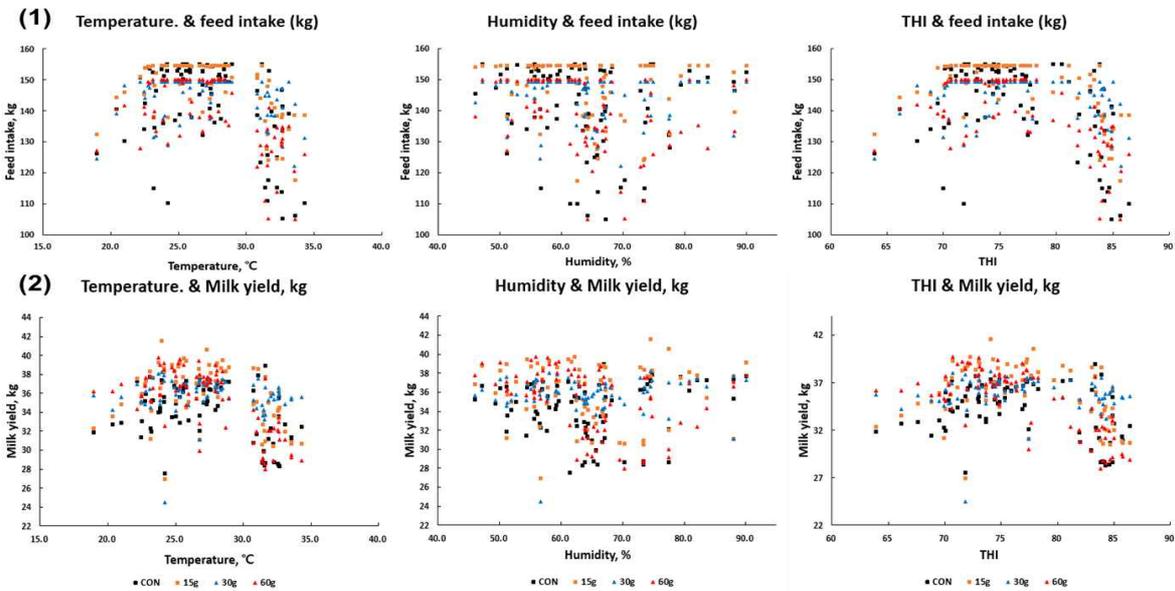


그림 62. Feed intake (1) and milk yield (2) change with heat stress index changes during the experimental period

표 21. Correlation coefficients between feed intake and heat stress index

Items	CON	15 g	30 g	60 g
Humidity	- 0.07	- 0.13	- 0.05	- 0.29**
Temperature	- 0.42***	- 0.52***	- 0.16	- 0.53***
THI	- 0.43***	- 0.54***	- 0.18	- 0.58***

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Data are  $R$  value.

표 22. Correlation coefficients between milk yield and heat stress index

Items	CON	15 g	30 g	60 g
Humidity	0.06	0.03	0.06	- 0.36**
Temperature	- 0.34**	- 0.31**	- 0.04	- 0.67***
THI	- 0.33**	- 0.31**	- 0.03	- 0.72***

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Data are  $R$  value.

### ③ THI 기간 동안의 유량과 유성분의 변화

- 실험 내의 THI는 정도에 따라 Stress Threshold THI, Mild - Moderate stress THI, Moderate - Severe Stress THI로 구분 할 경우, 표 23에 제시되어 있는 것처럼 유량은 THI에 따라 모든 실험구에서 감소하는 모습을 확인 할 수 있었음.
- 그렇지만 30 g을 급여한 처리구는 다른 처리구 비하여 Heat stress에 의한 유량 감소가 적게 나타났음. 특히 Moderate - Severe Stress THI 영역에서 통계적 유의적 차이는 없었지만, RPT가 유량에 미치는 영향을 보면 수치상으로 다른 처리구에 비하여 증가하는 경향을 보였음.
- 유성분에서 lactose는 유량과의 양의 상관관계이며, lactose content와 yield는 유량과

같은 패턴을 보임.

- 하지만 3.5% FCM, ECM, 유지방, 유단백 content와 yield에 대한 RPT의 영향은 없었음.

표 23. Effects of RPT on milk yield, milk composition pattern

Item	THI <sup>2</sup>												Significance of effect			
	Stress Threshold THI (66 - 71)				Mild - Moderate stress THI (72 - 79)				Moderate - Severe Stress THI (80 - 89)				SEM	RPT (R)	THI (T)	R x T
	0 g	15g	30g	60g	0 g	15g	30g	60g	0 g	15g	30g	60g				
Yield, kg / d																
Milk	32.45	33.61	35.05	35.66	36.46	38.99	37.01	37.83	30.71	31.89	35.49	30.13	1.037	0.185	0.010	0.358
3.5% FCM <sup>3</sup>	35.76	35.66	36.05	36.97	39.97	38.67	39.16	39.26	32.76	32.82	33.90	26.75	1.144	0.955	0.025	0.522
ECM <sup>4</sup>	40.70	40.74	40.91	41.78	45.72	44.20	44.60	44.69	37.61	37.56	38.65	32.94	1.270	0.966	0.063	0.533
Milk composition, %																
Fat	5.31	5.17	4.90	4.70	5.36	4.64	5.19	4.64	5.17	4.66	4.61	4.32	0.116	0.733	0.025	0.293
Protein	2.99	2.93	2.92	2.65	3.06	3.00	2.96	2.97	3.15	3.03	3.02	2.99	0.030	0.909	0.007	0.944
Lactose	4.84	4.94	5.02	4.76	4.76	4.80	4.63	4.71	4.71	4.90	4.91	4.76	0.023	0.007	0.000	0.004
Milk composition, kg																
Fat	1.76	1.72	1.73	1.75	1.97	1.76	1.90	1.66	1.60	1.55	1.57	1.30	0.063	0.900	0.001	0.434
Protein	0.99	1.00	1.00	1.02	1.14	1.16	1.10	1.12	0.95	0.97	1.03	0.69	0.027	0.363	0.000	0.420
Lactose	1.59	1.68	1.73	1.71	1.75	1.68	1.76	1.60	1.44	1.56	1.67	1.42	0.044	0.183	0.009	0.375

Values represent the means of 4 individual dairy cows.

TMR requirement is 155.1 kg/d for control, 154.6 kg/d for 15g, 149.4 kg/d for 30g, 150 kg/d for 60g

<sup>1</sup>RPT, rumen protected L-tryptophan

<sup>2</sup>THI, temperature-humidity index

<sup>3</sup>3.5% FCM = [0.4834 × milk yield (kg/d)] + [16.216 × fat yield (kg/d)], the value of data is average of first to last day in individual THI period

<sup>4</sup>ECM = 0.327 × milk yield (kg/d) + 12.95 × fat yield (kg/d) + 7.2 × protein yield (kg/d), the value of data is average of first to last day in individual THI period

④ Moderate - Severe Stress THI 기간의 RPT의 급여효과

- Moderate - Severe Stress THI 기간에 대조구에 비해 30g을 급여한 처리구에서 유의적으로 유량이 증가했음 (표 26, 30.71 vs. 35.49).
- Lactose content는 15 g과 30 g 처리구에서 대조구와 60 g 처리구 대비 증가하는 경향을 보임. 하지만 lactose yield는 통계적 차이를 보이지 않았음.
- 3.5% FCM, ECM, 유지방, 유단백 content와 yield에 대한 RPT의 영향은 없었음.
- RPT 60 g 첨가는 혈중 glucose level을 대조구 및 다른 처리구와 비교하여 유의적으로 감소시켰음 (표 24).
- 표 23은 유중 체세포 수와 혈중 세포 수를 나타냄. RPT 15 g, 30 g 처리구는 대조구와 60 g 처리구 대비 수치적으로 낮은 체세포 수를 보였으나, 유의적 차이는 나타나지 않았음. 이는 공시동물이 적기 때문으로 생각됨.
- 백혈구 수는 RPT 15 g, 30 g 처리구에서 감소하는 경향을 보임. 두 처리구는 정상 범위 안에 있으나, 대조구와 60 g 처리구는 높은 백혈구 수 및 정상 범위를 벗어난 것으로 보아 RPT 15 g, 30 g 처리구가 면역에 긍정적인 효과를 보인 것으로 생각됨.
- HSP 유전자는 동물이 heat stress를 받았을 때 stress를 완화하기 위해 발현량이 증가함. 본 연구에서 HSP70 유전자는 30 g, 60 g RPT 처리구에서 증가함 (그림 62).
- Moderate-severe THI 구간에서 혈중 tryptophan 농도는 변화가 없었음 (표 25). 이는 섭취된 tryptophan이 serotonin과 melatonin으로 전변되었기 때문인 것으로 생각됨 (그림 62).
- RPT 30 g 처리구는 대조구 및 다른 처리구 대비 혈중 serotonin과 melatonin 농도가 유의적으로 높았음. 또한 스트레스 증가와 함께 분비되는 호르몬인 cortisol의 농도가 낮았음.

☒ 24. Effects of RPT<sup>1</sup> on milk yield, milk composition patterns in dairy cows depending on average temperature-humidity index

Item	Moderate - Severe Stress THI (80 - 89)				SEM	Significance of effect		
	Day					RPT (R)	Day (D)	R x D
	0 g	15g	30g	60g				
Yield, kg / d								
Milk	30.71	31.89	35.49	30.13	0.036	0.004	0.358	1.000
3.5% FCM <sup>3</sup>	32.78	32.82	33.90	28.75	1.168	0.461	0.362	0.658
ECM <sup>4</sup>	37.61	37.56	38.85	32.94	1.308	0.437	0.335	0.653
Milk composition, %								
Fat	5.17	4.88	4.61	4.32	0.154	0.338	0.163	0.780
Protein	3.15	3.03	3.02	2.99	0.036	0.508	0.605	0.968
Lactose	4.71	4.90	4.91	4.76	0.032	0.074	0.477	0.793
Milk composition, kg								
Fat	1.60	1.55	1.57	1.30	0.071	0.439	0.463	0.609
Protein	0.95	0.97	1.03	0.89	0.026	0.338	0.163	0.780
Lactose	1.44	1.56	1.67	1.42	0.043	0.176	0.309	0.889

Values represent the means of 4 individual dairy cows

TMR requirement is 155.1 kg/d for control, 154.6 kg/d for 15g, 149.4 kg/d for 30g, 150 kg/d for 60g

<sup>1</sup>RPT, rumen protected L-tryptophan

<sup>2</sup>THI, temperature-humidity index

<sup>3</sup>3.5% FCM = [0.4324 × milk yield (kg/d)] + [16.216 × fat yield (kg/d)], the value of data is average of first to last day in individual THI period

<sup>4</sup>ECM = 0.327 × milk yield (kg/d) + 12.95 × fat yield (kg/d) + 7.2 × protein yield (kg/d), the value of data is average of first to last day in individual THI period

☒ 25. Effects of RPT<sup>1</sup> on metabolic profile test in dairy cows under moderate-severe stress THI<sup>2</sup> (80-89)

Item	Moderate-Severe Stress THI (80-89)				SEM <sup>3</sup>	Diet(D)	Linear	Quadratic
	Control	15g	30g	60g				
Glucose, mg/dL	30.10 <sup>a</sup>	31.27 <sup>a</sup>	32.16 <sup>a</sup>	23.75 <sup>b</sup>	1.885	0.009	0.004	0.019
Total cholesterol, mg/dL	262.63	285.73	267.10	231.28	13.594	0.061	0.039	0.101
Triglycerides, mg/dL	4.13	4.38	4.63	1.75	0.785	0.055	0.027	0.027
Total proenin, g/dL	7.16	7.45	7.24	7.22	0.098	0.212	0.843	0.235
<sup>4</sup> BUN, mg/dL	20.04	18.76	21.25	21.44	0.807	0.124	0.071	0.800
Albumin, g/dL	3.63	3.52	3.59	3.51	0.058	0.446	0.285	0.891
<sup>5</sup> NEFA, mg/dL	141.91	128.66	138.27	132.59	9.031	0.144	0.212	0.723

TMR was formulated to meet the requirements of energy and protein (NRC, 2001), and a cow in each treatment was fed RPT at 0 g/d, 15 g/d, 30 g/d, and 60 g/d, respectively.

<sup>1</sup>RPT, rumen protected L-tryptophan.

<sup>2</sup>THI, temperature-humidity index.

<sup>3</sup>SEM, value is the value for the diet.

<sup>4</sup>BUN, blood urea nitrogen.

<sup>5</sup>NEFA, non esterified fatty acid.

표 26. Effects of RPT<sup>1</sup> on somatic cells and complete blood cell(CBC) related to moderate-severe stress THI<sup>2</sup> (80-89) in dairy cows

Item <sup>3</sup>	Moderate-Severe Stress THI (80-89)				SEM <sup>4</sup>	Diet(D)	Linear	Quad
	Control	15g	30g	60g				
Somatic cells, x 10 <sup>3</sup> /mL	1313	52	36	227	525.019	0.271	0.249	0.13
WBC, 4 - 12 K/uL	13.26	11.69	10.15	13.79	1.087	0.091	0.611	0.02
Lymphocyte, 2.5-7.5 K/uL	6.78	6.33	6.68	7.06	0.950	0.965	0.729	0.76
Monocyte, 0-0.84 K/uL	0.81	0.53	0.51	0.94	0.225	0.440	0.565	0.13
Granulocyte, 0.6-6.7 K/uL	5.53	4.88	3.52	5.20	0.705	0.267	0.713	0.06
RBC, 5-10 M/uL	6.42	7.04	6.94	6.64	0.245	0.233	0.817	0.08
Hemoglobin, 8-15 g/dL	10.19	10.48	10.47	10.22	0.273	0.792	0.909	0.33
Hematocrit, 24-46%	27.89	28.39	28.65	27.58	0.672	0.660	0.656	0.24

TMR was formulated to meet the requirements of energy and protein (NRC, 2001), and a cow in each treatment was fed RPT at 0 g/d, 15 g/d, 30 g/d, and 60 g/d, respectively.

<sup>1</sup>RPT, rumen protected amino acid L-tryptophan.

<sup>2</sup>THI, temperature-humidity index.

<sup>3</sup>Item = WBC, white blood cell; RBC, red blood cell.

<sup>4</sup>SEM, value is the value for the diet.

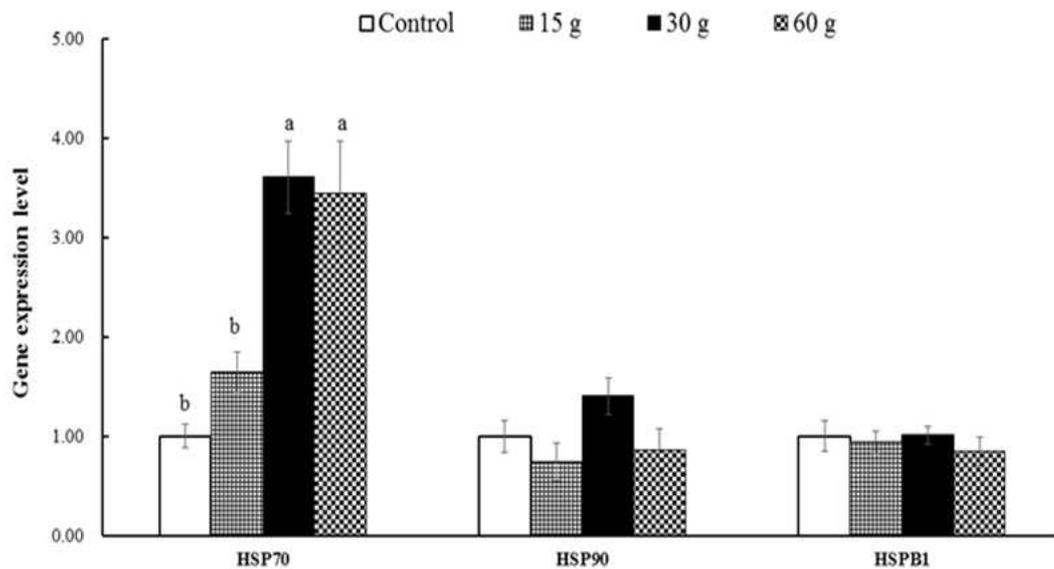


그림 63. Effects of RPT on HSP70, HSP90, and HSPB1 gene expression in peripheral blood mononuclear cells of dairy cows. RPS15A and B2M were used as a housekeeping gene for normalization. The values are expressed as mean ± SEM.

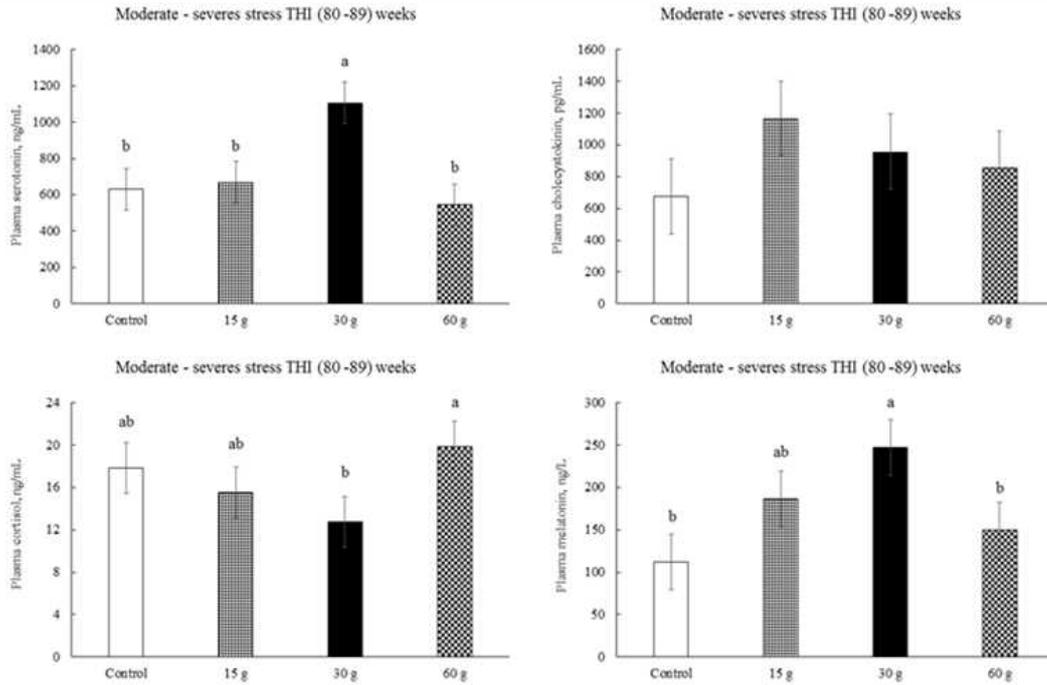


그림 64. Effects of RPT on serotonin, cholecystokinin, cortisol and melatonin in plasma of dairy cows. The values are presented as mean  $\pm$  SEM. <sup>a-b</sup>Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

표 27. Effects of RPT<sup>1</sup> on serum total tryptophan concentration in dairy cows under moderate-severe stress THI<sup>2</sup> (80-89)

Item	Moderate-Severe Stress THI (80-89)				SEM <sup>3</sup>	Diet(D)	Linear	Quadratic
	Control	15g	30g	60g				
Tryptophan, mg/L	0.715	0.782	0.763	0.650	0.138	0.908	0.653	0.575

TMR was formulated to meet the requirements of energy and protein (NRC, 2001), and a cow in each treatment was fed RPT at 0 g/d, 15 g/d, 30 g/d, and 60 g/d, respectively.

Covariance assumption structures [AR(1), UN, CS, ANTE(1), TOEPH, ARH(1)] were tested, covariance structure that resulted in the lowest values for the Akaike information criterion (AIC) was selected.

<sup>1</sup>RPT, rumen protected L-tryptophan.

<sup>2</sup>THI, temperature-humidity index.

<sup>3</sup>SEM, value is the value for the diet.

#### (라) 결론

- 고온 스트레스는 젖소의 DMI와 유량에 음의 상관관계를 가지는 것으로 알려져 있음 (Gwazdauskas, 1985; West, 2003). 본 연구의 상관관계 분석에서 RPT 30 g은 사료섭취량과 유량에 영향을 주지 않았음을 밝혀냄.
- Moderate-severe stress THI(80-89) 기간에 RPT 30 g 급여는 DMI, 유량, lactose에서 대조구 및 다른 처리구 대비 유의적인 증가를 보임.
- 같은 구간에서 RPT 30 g 처리구는 수치적으로 낮은 체세포 수를 보였고, 높은 혈중 serotonin과 melatonin 수치 및 낮은 혈중 cortisol 농도를 보임.
- 따라서 RPT의 적정 급여량은 30 g이며, RPT는 여름철의 heat stress를 완화시키는 동시에 생산성을 증가시킬 수 있는 첨가제인 것으로 사료됨.

(3) 연구 8. 홀스타인 건유우에 있어서 반추위 보호트립토판이 생산성에 미치는 영향 (3년차)

(가) 연구 목적

연구 6의 결과 여름철 동안 긍정적인 기대 효과가 나타난 RPT의 임신말기 건유우의 생산성 증진에 미치는 영향을 검증하고자 함.

(나) 실험 재료 및 방법

① 본 연구는 건국대학교 동물실험윤리위원회에 승인 하에 실시되었음

(승인번호 : KU17136).

② 공시동물 및 실험장소

- 본 사양실험은 충청북도 충주에 위치한 건국대학교 종합실습목장에 있는 임신말기 홀스타인 (Holstein-Friesian) 건유우중 분만 60일 전에 해당하는 개체를 8두 선발하여 시행됨.

③ 기초사료

- 건유 및 착유시기에 급여한 기초사료는 NRC(2001) 건유우 영양소 요구량에 맞추어 Total Mixed Ration(TMR), Roughage, Concentrates 및 RPT를 대조구 기초사료로 급여함 (표 28 및 29). 신생 송아지에게는 3일간 초유를 급여하였으며, 이 후 착유 과정 동안 나온 우유를 8주 동안 급여하였음.

표 28. Chemical composition and amino acids in basal diets for dry cows

Diets	Control	Treatment
TMR, kg/d	1.0	1.0
Roughage, kg/d	9.8	9.8
Concentrates, kg/d	5.0	5.0
RPT, g/d	0.0	15.0
Composition, % (DM basis)		
Dry matter	240.56	240.56
Crude Protein	28.24	28.24
Crude Fat	5.02	5.02
Crude Fiber	36.22	36.22
Crude Ash	15.77	15.77
Calcium	1.73	1.73
Phosphorus	0.80	0.80
Amino acids, %		
Tryptophan	0.16	0.32
Threonine	0.97	0.97
Serine	1.12	1.12
Proline	1.68	1.68
Valine	1.38	1.38
Isoleucine	0.91	0.91
Leucine	1.95	1.95
Tyrosine	0.63	0.63
Methionine	0.54	0.54
Cystine	0.79	0.79
Lysine	1.09	1.09
Glycine	1.23	1.23
Alanine	1.45	1.45
Arginine	1.73	1.73
Glutamic acid	4.09	4.09
Aspartic acid	2.35	2.35
Histidine	0.59	0.59
Phenylalanine	1.17	1.17

표 29. Chemical composition and amino acids in basal diets for dry cows

Diets	Control	Treatment
TMR, kg/d	1.0	1.0
Roughage, kg/d	9.8	9.8
Concentrates, kg/d	5.0	5.0
RPT, g/d	0.0	15.0
Chemical composition, g/day of DM basis		
Dry matter		
Crude Protein	1529.92	1529.92
Crude Fat	213.36	213.36
Crude Fiber	2558.43	2558.43
Crude Ash	1008.48	1008.48
Calcium	92.25	92.25
Phosphorus	39.48	39.48
Amino acids, g/day of DM basis		
Tryptophan	7.39	22.39
Threonine	49.76	49.76
Serine	55.29	55.29
Proline	84.34	84.34
Valine	70.60	70.60
Isoleucine	46.07	46.07
Leucine	95.49	95.49
Tyrosine	29.20	29.20
Methionine	27.89	27.89
Cystine	40.87	40.87
Lysine	56.02	56.02
Glycine	63.56	63.56
Alanine	74.71	74.71
Arginine	78.16	78.16
Glutamic acid	187.09	187.09
Aspartic acid	130.43	130.43
Histidine	27.75	27.75
Phenylalanine	57.03	57.03

④ RPT 급여기간 및 방법

- 건유우의 개체별 예상 분만일이 일치하지 않기 때문에 분만전 60일에서 분만 때까지 60±8일 동안 실험함.
- 0주부터 RPT의 급여량을 점진적으로 증진시켜 1주일간 RPT의 적응기간을 두었음.

⑤ 샘플링 일정 및 분석방법

- 유량 및 유성분
  - 공시동물(총 8두)의 개체별 오전(0300 h) 및 오후(1500 h)에 착유된 유량을 매일 기록하였음. 분만 후 2주일 간격으로 합산한 후 평균 산유량을 산출함.
  - 공시동물(총 8두)의 실험 개시일부터 14일 간격으로 오전(0300 h) 및 오후(1500 h)에 착유된 원유를 pooling하여 우유 내 일반성분[milk fat, milk protein, lactose, solid-not fat(SnF), somatic cell count(SCC), milk urea nitrogen(MUN), acetone, beta-hydroxybutyrate(BHB), beta-casein, Mono- and Poly-unsaturated fatty acids,

Saturated fatty acid]을 분석함.

- 혈액 채취
  - 공시동물(총 8두)의 실험 개시일 부터 14일 간격으로 경정맥을 통해 혈액을 채취하여 Serum과 plasma, EDTA tube에 담아 분석하였음.
- 사료 섭취량
  - 사료 섭취량 분석은 매일 아침 9시에 급여하는 사료와, 24시간 후인 다음날 아침 9시에 남은 사료의 양을 기록하여 일당 섭취량을 분석함.
- 신생 송아지 체중 측정
  - 건유우로부터 출생한 신생 송아지는 분만 후 체표면을 건조하여 초유 급여 전 체중을 측정함. 이후 14일 간격으로 우유 급여 전 체중을 측정함.

⑥ 통계 분석

- 각 분석을 통해 얻어진 일별 성적들은 주차별로 평균값을 산출함.
- 데이터 평균 값에 따른 통계적 유의차는 SPSS 통계 소프트웨어(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 GLM procedure를 이용함. 유량과 유질에 대한 THI 효과는 repeated measure로 분석함.
- $p$ -value < 0.05 에서 유의하고,  $0.05 < p < 0.1$ 에서 경향이 있는 것으로 판단함.

(다) 실험 결과 및 고찰

① 사료섭취량의 변화

- 실험 기간의 2주차에 처리구가 대조구 대비하여 유의적으로 사료 섭취량이 증가함 (표 30, 그림 65).
- 3주차부터 6주차까지는 통계적 유의차를 보이지는 않았지만, 대조구가 수치적으로 사료 섭취량이 증가함. 이는 공시동물의 수가 적어 표준편차가 증가했기 때문인 것으로 생각됨.

표 30. Daily dry matter intake in dry Holstein cows fed RPT for 6 weeks

Week	Treatment		SEM	$p$ -value
	Control	Treatment		
0	6.69	6.63	0.334	0.934
1	6.97	6.85	0.156	0.700
2	6.91	7.73	0.189	0.024
3	7.23	7.62	0.361	0.613
4	6.46	7.69	0.414	0.146
5	7.12	7.63	0.286	0.389

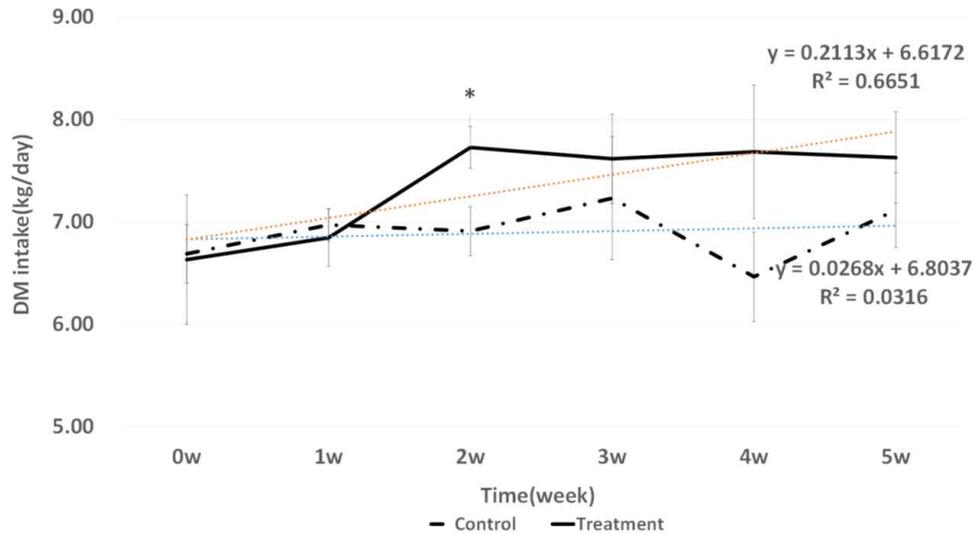


그림 65. Changes in daily dry matter intake in dry Holstein cows fed RPT for 6 weeks. \* $p < 0.05$

② 신생 송아지의 출생체중 및 체중 변화

- 실험 전 구간에서 신생 송아지 체중은 통계적 유의차를 보이지 않았음 (표 31).
- 하지만 출생 시부터 생후 8주까지의 전 구간에서 처리구에서 태어난 송아지가 대조구 대비 수치적으로 높은 체중을 보였음. 공시동물 수가 더 많았다면 충분히 유의차를 보였을 것으로 사료됨.

표 31. Changes on weight of calves from dry period cows fed RPT

	Treatment <sup>1</sup>		SEM	p-value
	Control	RPT		
Weight, Kg				
0 wk	35.90	41.43	3.063	0.409
2 wk	40.95	46.05	3.085	0.451
4 wk	48.08	52.75	3.381	0.532
6 wk	56.73	60.95	3.601	0.598
8 wk	63.80	69.70	3.609	0.457
total AVG <sup>2</sup>	49.09	54.18	3.316	0.486
Increment	27.90	28.28	1.127	0.882

<sup>1</sup>Treatment = control, basal diet (n = 4); RPT, 15 g per kg of basal diet (n = 4).

<sup>2</sup>total AVG = average of each item with 0 to 8 weeks

(다) 유량 및 유성분

- 건유우에 RPT 첨가 급여는 분만 후 유량 및 유성분에 통계적 유의차를 보이지 않았음 (표 32).
- 하지만 유량의 경우 처리구가 대조구 대비하여 수치적으로 높았음.

표 32 Effect of RPT supplementation during dry period on milk yield and milk composition in postpartum period cows

Item	Treatment <sup>1</sup>		SEM	p-value
	Control	RPT		
Milk yield, kg				
0 wk	19.83	24.03	1.894	0.301
total AVG <sup>2</sup>	31.77	35.44	2.401	0.487
Milk protein, %				
0 wk	12.20	12.81	1.219	0.826
total AVG <sup>2</sup>	4.83	4.88	0.266	0.930
Milk fat, %				
0 wk	9.64	6.25	0.985	0.080
total AVG <sup>2</sup>	6.62	6.31	0.380	0.713
Somatic cells, x 10 <sup>3</sup>				
0 wk	1299.75	4867.95	2388.421	0.473
total AVG <sup>2</sup>	383.85	1086.15	473.554	0.525
Lactose, %				
0 wk	3.36	3.48	0.108	0.634
total AVG <sup>2</sup>	4.37	4.38	0.036	0.903
Solid-not Fat, %				
0 wk	16.35	17.17	1.153	0.753
total AVG <sup>2</sup>	9.88	9.95	0.259	0.908
Milk urea nitrogen, mg/dL				
0 wk	23.80	24.43	1.735	0.873
total AVG <sup>2</sup>	16.29	16.49	0.578	0.878
Aceton, mM/L				
0 wk	0.00	0.00	0.000	
total AVG <sup>2</sup>	0.04	0.07	0.025	0.531
BHB, mM/L				
0 wk	0.00	0.00	0.000	
total AVG <sup>2</sup>	0.03	0.04	0.01	0.596
Monounsaturated fatty acid, %				
0 wk	2.50	1.35	0.505	0.287
total AVG <sup>2</sup>	1.74	1.70	0.162	0.913
Polyunsaturated fatty acid, %				
0 wk	0.39	0.34	0.042	0.596
total AVG <sup>2</sup>	0.36	0.36	0.010	0.911
Saturated Fatty acid, %				
0 wk	7.18	4.95	0.541	0.023
total AVG <sup>2</sup>	4.51	4.20	0.217	0.526
Total unsaturated fatty acid				
0 wk	2.87	1.38	0.593	0.232
total AVG <sup>2</sup>	2.20	2.16	0.211	0.933

<sup>1</sup>Treatment = control, basal diet(n = 8); RPT, 15 g per kg of basal diet(n = 4).

<sup>2</sup>total AVG = average of each item with 0 to 8 weeks

(라) 혈액성상

- 분만 전후 젖소에게서 RPT 첨가는 젖소의 건강 상태에 영향을 끼치지 않는 것으로 나타남 (표 33, 34).
- RPT 첨가구에서 태어난 신생 송아지는 monocyte의 유의적 감소, MCV와 MCH의 유의적 증가를 보임 (표 35). 하지만 전부 정상범위 내에 있기 때문에 건강상의 큰 영향은 없는 것으로 생각됨.

표 33. Complete blood cell analysis of blood in before parturition dry cows

Item	Treatment <sup>1</sup>		SEM	p-value
	Control	RPT		
WBC, 4-12K/uL				
0 wk	7.45	10.45	1.248	0.258
total AVG <sup>2</sup>	9.04	11.91	1.530	0.427
Lymphocyte, 2.5-7.5K/uL				
0 wk	3.86	7.68	1.441	0.250
total AVG <sup>2</sup>	4.52	7.88	1.453	0.342
Monocyte, 0-0.84K/uL				
0 wk	0.26	0.48	0.127	0.413
total AVG <sup>2</sup>	0.69	0.74	0.050	0.338
Granulocyte, 0.6-6.7K/uL				
0 wk	3.33	3.89	0.433	0.259
total AVG <sup>2</sup>	3.83	3.29	0.215	0.308
MCV, 40-60fL				
0 wk	47.00	46.75	0.934	0.905
total AVG <sup>2</sup>	46.85	47.54	0.794	0.638
MCH, 11-17pg				
0 wk	16.58	16.01	0.267	0.555
total AVG <sup>2</sup>	16.20	16.74	0.269	0.261
Platelet, 100-800K/ul				
0 wk	318.25	297.67	34.026	0.155
total AVG <sup>2</sup>	294.73	331.35	20.419	0.553

<sup>1</sup>Treatment = control, basal diet(n = 8); RPT, 15 g per kg of basal diet(n = 4).

<sup>2</sup>total AVG = average of each item with 0 to 6 weeks

Items = WBC, white blood cell; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin;

표 34 Complete blood cell analysis of blood in after parturition dry cows

Item	Treatment <sup>1</sup>		SEM	p-value
	Control	RPT		
WBC, 4-12K/uL				
0 wk	11.75	15.32	2.327	0.313
total AVG <sup>2</sup>	10.10	13.95	1.554	0.242
Lymphocyte, 2.5-7.5K/uL				
0 wk	5.57	7.99	1.333	0.226
total AVG <sup>2</sup>	4.98	7.86	1.438	0.356
Monocyte, 0-0.84K/uL				
0 wk	1.10	0.92	0.207	0.632
total AVG <sup>2</sup>	0.85	0.91	0.057	0.668
Granulocyte, 0.6-6.7K/uL				
0 wk	5.08	6.41	1.111	0.541
total AVG <sup>2</sup>	4.27	5.18	0.414	0.303
MCV, 40-60fL				
0 wk	46.25	47.00	6.100	0.666
total AVG <sup>2</sup>	45.20	46.55	0.869	0.480
MCH, 11-17pg				
0 wk	16.45	16.80	2.183	0.485
total AVG <sup>2</sup>	16.03	16.60	0.241	0.266
Platelet, 100-800K/ul				
0 wk	304.50	348.75	44.919	0.361
total AVG <sup>2</sup>	447.15	480.51	26.278	0.567

<sup>1</sup>Treatment = control, basal diet(n = 8); RPT, 15 g per kg of basal diet(n = 4).

<sup>2</sup>total AVG = average of each item with 0 to 8 weeks

Items = WBC, white blood cell; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin;

표 35. Complete blood cell analysis of blood in cavles

Item	Treatment <sup>1</sup>		SEM	p-value
	Control	RPT		
WBC, 4-12K/uL				
0 wk	9.48	13.72	1.298	0.103
total AVG <sup>2</sup>	11.02	12.14	0.320	0.073
Lymphocyte, 2.5-7.5K/uL				
0 wk	4.23	3.72	0.512	0.657
total AVG <sup>2</sup>	6.43	6.93	0.448	0.616
Monocyte, 0-0.84K/uL				
0 wk	0.51	0.32	0.144	0.555
total AVG <sup>2</sup>	0.82	0.53	0.074	0.031*
Granulocyte, 0.6-6.7K/uL				
0 wk	4.74	9.68	1.406	0.073
total AVG <sup>2</sup>	3.77	4.69	0.418	0.306
MCV, 40-60fL				
0 wk	36.25	39.00	0.680	0.027*
total AVG <sup>2</sup>	30.45	31.80	0.683	0.389
MCH, 11-17pg				
0 wk	12.05	12.95	0.245	0.056*
total AVG <sup>2</sup>	10.89	11.20	0.261	0.608
Platelet, 100-800K/ul				
0 wk	317.25	512.75	79.909	0.249
total AVG <sup>2</sup>	515.40	584.35	53.237	0.559

<sup>1</sup>Treatment = control, basal diet(n = 8); RPT, 15 g per kg of basal diet(n = 4).

<sup>2</sup>total AVG = average of each item with 0 to 8 weeks

Items = WBC, white blood cell; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin

### ③ 대사적 성상

- 분만 전후 젖소에게 RPT 첨가 급여는 대사적 변화를 나타내지 않았음 (표 36, 37).
- RPT 처리구에서 태어난 신생 송아지는 대조구 대비 낮은 혈중 glucose 함량을 보임 (Table 8-11). 이는 tryptophan이 소장 내 전분 소화율을 증가시켰기 때문으로 생각됨 (Lee et al., 2020).

표 36. Metabolic profile test analysis of blood in before parturition dry cows

Item	Treatment <sup>1</sup>		SEM	p-value
	Control	RPT		
Albumin (g/dL)				
0 wk	3.85	3.93	0.069	0.627
total AVG <sup>2</sup>	3.68	3.74	0.035	0.502
GOT (U/L)				
0 wk	84.25	82.50	6.905	0.910
total AVG <sup>2</sup>	68.56	80.92	3.459	0.125
BUN (mg/dL)				
0 wk	12.00	12.25	0.766	0.885
total AVG <sup>2</sup>	11.10	9.88	0.616	0.374
TG (mg/dL)				
0 wk	19.00	16.25	3.306	0.710
total AVG <sup>2</sup>	22.46	19.88	1.134	0.305
CHO (mg/dL)				
0 wk	157.25	194.00	15.660	0.271
total AVG <sup>2</sup>	129.90	143.08	6.949	0.379
GLU (mg/dL)				
0 wk	54.00	50.00	2.283	0.423
total AVG <sup>2</sup>	54.04	50.52	1.837	0.470
NEFA (mmol/L)				
0 wk	292.73	805.83	263.920	0.404
total AVG <sup>2</sup>	399.60	480.13	70.863	0.521

<sup>1</sup>Treatment = control, basal diet(n = 8); RPT, 15 g per kg of basal diet(n = 4).

<sup>2</sup>total AVG = average of each item with 0 to 6 weeks

Items = GOT, Glutamic-oxalacetic transaminase; BUN, Blood urea nitrogen; TG, Triglycerides; CHO, Cholesterol; GLU, Glucose; NEFA, Non-esterified fatty acid

표 37. Metabolic profile test analysis of blood in after parturition dry cows

Item	Treatment <sup>1</sup>		SEM	p-value
	Control	RPT		
Albumin (g/dL)				
0 wk	3.53	3.73	0.094	0.323
total AVG <sup>2</sup>	3.88	4.01	0.097	0.547
GOT (U/L)				
0 wk	68.00	87.00	9.214	0.340
total AVG <sup>2</sup>	83.55	89.55	2.388	0.234
BUN (mg/dL)				
0 wk	16.25	10.75	1.648	0.093
total AVG <sup>2</sup>	17.95	16.75	0.784	0.487
TG (mg/dL)				
0 wk	7.50	8.00	0.620	0.718
total AVG <sup>2</sup>	9.05	9.45	0.401	0.655
CHO (mg/dL)				
0 wk	88.25	101.25	8.269	0.475
total AVG <sup>2</sup>	164.10	188.45	10.093	0.256
GLU (mg/dL)				
0 wk	111.75	83.75	16.755	0.446
total AVG <sup>2</sup>	75.20	68.35	3.104	0.304
NEFA (mmol/L)				
0 wk	375.20	534.85	83.004	0.376
total AVG <sup>2</sup>	198.49	301.27	38.480	0.202

<sup>1</sup>Treatment = control, basal diet(n = 8); RPT, 15 g per kg of basal diet(n = 4).

<sup>2</sup>total AVG = average of each item with 0 to 8 weeks

Items = GOT, Glutamic-oxalacetic transaminase; BUN, Blood urea nitrogen; TG, Triglycerides; CHO, Cholesterol; GLU, Glucose; NEFA, Non-esterified fatty acid

표 38. Metabolic profile test analysis of blood in calves

Item	Treatment <sup>1</sup>		SEM	p-value
	Control	RPT		
Albumin (g/dL)				
0 wk	2.58	2.50	0.050	0.494
total AVG <sup>2</sup>	3.44	3.36	0.091	0.696
GOT (U/L)				
0 wk	67.00	47.25	9.029	0.309
total AVG <sup>2</sup>	65.00	62.55	2.623	0.676
BUN (mg/dL)				
0 wk	12.75	10.00	1.451	0.384
total AVG <sup>2</sup>	11.50	11.30	0.688	0.897
TG (mg/dL)				
0 wk	20.75	14.50	3.703	0.441
total AVG <sup>2</sup>	37.95	34.40	4.570	0.729
CHO (mg/dL)				
0 wk	26.50	33.00	2.194	0.149
total AVG <sup>2</sup>	98.35	109.30	6.935	0.473
GLU (mg/dL)				
0 wk	78.00	54.75	13.516	0.432
total AVG <sup>2</sup>	97.85	78.95	4.416	0.015
NEFA (mmol/L)				
0 wk	379.53	427.43	64.019	0.738
total AVG <sup>2</sup>	219.64	210.55	17.321	0.815

<sup>1</sup>Treatment = control, basal diet(n = 8); RPT, 15 g per kg of basal diet(n = 4).

<sup>2</sup>total AVG = average of each item with 0 to 8 weeks

Items = GOT, Glutamic-oxalacetic transaminase; BUN, Blood urea nitrogen; TG, Triglycerides; CHO, Cholesterol; GLU, Glucose; NEFA, Non-esterified fatty acid

#### ④ 결론

- 홀스타인 건유우에 있어 RPT 첨가는 다음 생산성을 결정짓는 건유우의 사료 섭취량에 긍정적 영향이 있었음. 또한 신생 송아지의 체중이 4 kg 증가하는 영향도 나타냄.
- 따라서 건유우에 RPT 첨가는 분만 후 착유 단계에 있어 고품질 우유 생산에 긍정적 영향을 미쳐 경제적 향상에 기여할 것으로 생각됨.

#### (4) 연구 9. 반추위 보호 히스티딘이 젖소의 사료 효율 및 유성분에 미치는 영향 (3년차)

##### (가) 연구 배경

- Histidine은 요구량 대비 단백질이 부족한 사료를 섭취한 젖소에게 첨가 시 사료 섭취량 및 유량을 증가시킨다는 보고가 있음 (Lapierre et al., 2014; Ouellet et al., 2014). 국내 젖소 사양 환경에서도 이런 결과를 얻을 수 있다면 사료비 절감 측면에서 경제적인 이득을 얻을 수 있음. 또한 histidine은 체내에서 histamine으로 전변되는데, histamine이 면역 세포에 관련함에 따라 유방염이 빈번한 비유기 젖소의 면역 증강 효과를 볼 수 있음 (O' Mahony et al., 2011). 따라서 본 연구에서는 반추위 보호 L-histidine (RPH) 첨가를 통해 젖소의 생산성 증진 및 면역 증강 효과를 기대 할 수 있을 것으로 판단됨.

(나) 연구 목적

- 연구 5의 in vitro 실험 결과 영양소 제한 시 L-histidine의 첨가가 유단백 증진에 효과가 있음이 확인된 바, 반추위 보호 L-histidine (RPH)을 사양실험에 적용하여 착유우의 생산성 증가에 미치는 영향을 검증하고자 함.

(다) 실험 재료 및 방법

① 본 연구는 건국대학교 동물실험윤리위원회에 승인 하에 실시되었음  
(승인번호 : KU19098).

② 공시동물 및 실험 장소

- 본 사양실험은 충청북도 충주에 위치한 건국대학교 종합실습목장에 있는 홀스타인 (Holstein-Friesian) 착유우를 처리구와 대조구로 각 17두씩 나누어 본 사양실험에 사용함. 추가적으로 군 분리 진행시 대조구 대비 처리구의 유량, 비유단계, 산차 및 유성분의 통계적 유의차를 보이지 않도록 고려하여 그룹화 작업을 수행함.

③ 기초사료

- Total Mixed Ration(TMR; Feedex Co., Ltd., Chungnam, Korea), Roughage (oats) 및 Concentrates를 이용하였음 (표 39).
- NRC (2001)에 의하면 최대 유단백질량은 22~23% CP를 젖소에게 급여했을 때 얻을 수 있으며, 유생산을 위해 CP 17.1%를 급여할 것을 권고하고 있음. 하지만 목장에서 급여하고 있는 수준은 DM 기준 CP 함량이 11.2% 정도로, 요구량보다 상당히 낮은 양을 급여하고 있음.
- 따라서 실제 실습목장의 사료 급여 형태는 젖소의 요구량보다 낮지만, 연구 5의 결과 영양소 제한 환경에서 L-histidine이 유단백 증가 효과를 나타냈기 때문에 RPH 급여가 젖소의 생산성에 긍정적인 영향을 줄 것으로 생각됨.

표 39. Nutrient and amino acids composition of dietary ingredients used in the experimental diets

Items	TMR	Concentrates	Forage (Oats)	Yeast culture
Dry matter, % of fresh matter	61.91	88.84	85.88	89.32
— % of Dry matter —				
Crude protein	9.79	20.33	11.36	13.10
Ether extract	1.79	3.10	2.60	3.08
Crude fiber	13.02	7.25	25.12	7.80
Crude ash	5.09	6.94	6.55	3.94
Calcium	0.59	0.69	0.46	0.15
Phosphorus	0.28	0.56	0.18	0.67
Starch	6.04	22.97	2.03	24.80
Acid detergent fiber	18.25	12.05	30.38	12.00
Neutral detergent fiber	34.78	24.33	49.20	26.49
Non fiber carbohydrate	10.46	34.14	16.17	42.71
Non protein nitrogen	0.02	0.01	0.05	< 0.01
Amino acids				
Tryptophan	0.10	0.21	0.12	0.13

Threonine	0.36	0.67	0.37	0.40
Serine	0.42	0.87	0.36	0.49
Proline	0.53	1.06	0.92	0.89
Valine	0.43	0.79	0.08	0.13
Isoleucine	0.27	0.57	0.24	0.28
Leucine	0.60	1.42	0.50	0.79
Tyrosine	0.16	0.44	0.17	0.30
Methionine	0.09	0.20	0.10	0.14
Cystein	0.21	0.46	0.16	0.29
Lysine	0.40	0.59	0.93	1.68
Glycine	0.39	0.80	0.36	0.51
Alanine	0.48	0.94	0.50	0.62
Arginine	0.53	1.14	0.32	0.55
Glutamic acid	1.35	3.19	0.88	1.93
Aspartic acid	0.79	1.51	0.73	0.68
Histidine	0.16	0.37	0.08	0.15
Phenylalanine	0.36	0.76	0.29	0.38

#### ④ RPH 급여기간 및 방법

- 실험 기간 : 실험개시일(1주)부터 실험종료일(7주)까지 총 49일
- 매일 아침 09시 사료 급여와 함께 top-dressing함.

#### ⑤ 샘플링 일정 및 분석방법

- 유량 및 유성분
  - 공시동물(총 34두)의 개체별 오전(0300 h) 및 오후(1500 h)에 착유된 유량을 매일 기록하였음.
  - 공시동물(총 34두)의 실험 개시 일부터 7일 간격으로 오전(0300 h) 및 오후(1500 h)에 착유된 원유를 pooling하여 우유 내 일반성분[milk fat, milk protein, lactose, solid-not fat(SnF), somatic cell count(SCC), milk urea nitrogen(MUN), acetone, beta-hydroxybutyrate(BHB), beta-casein, Mono- and Poly-unsaturated fatty acids, Saturated fatty acid]을 분석함.
- 사료 섭취량 분석
  - 사료 섭취량 분석은 매일 아침 9시에 급여하는 사료와, 24시간 후인 다음날 아침 9시에 남은 사료의 양을 기록하여 일당 섭취량을 분석함.
- 혈액 채취
  - 공시동물(총 34두)의 실험 개시일 부터 14일 간격으로 경정맥을 통해 혈액을 채취하여 Serum과 plasma, EDTA tube에 담아 분석하였음.

#### ⑥ 통계 분석

- 각 분석을 통해 얻어진 일별 성적들은 주차별로 평균값을 산출함.
- 데이터 평균값에 따른 통계적 유의차는 SAS 소프트웨어 v. 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)의 repeated measure를 사용함.
- $p$ -value < 0.05 에서 유의하고,  $0.05 < p < 0.1$ 에서 경향이 있는 것으로 판단함.

(라) 실험 결과 및 고찰

① 유량 및 유성분

- Table 9-2은 젖소에게 RPH 첨가에 따른 사료 섭취량, 유량 및 유성분을 나타냄.
- RPH 처리구는 유의적으로 사료 섭취량이 감소하였으나, 유량에는 차이가 없었음 (그림 66). 이는 기존 보고들과는 전혀 다른 결과로, 첨가제의 특성에 따른 결과인 것으로 생각됨.
- 사료 섭취량은 2주에서 5주 사이에 대조구가 처리구보다 유의적으로 증가함. ECM과 4% FCM은 3주에서 6주 사이에 대조구가 처리구보다 유의적으로 증가함. 또한 3주와 4주에서 BHBA가 대조구에서 증가함을 보임. 이는 대조구가 처리구에 비해 사료를 더 섭취했음에도 불구하고 체조직을 분해하여 에너지를 우유 생산에 사용한 것으로 생각됨.
- 유중 체세포 수는 대조구가 처리구보다 높거나 비슷함. 실험 마지막에는 대조구가 처리구에 비해 체세포 수가 높아지는 경향을 보임. 이는 histidine이 체내에서 면역 작용에 관여한 것으로 사료됨.

표 40. Effects of RPH<sup>1</sup> on dry matter intake, milk yield and composition in dairy cows

Item	Control	NALH	SEM	<i>p</i> -value
Dry matter intake, kg/d	26.87	26.19	0.22	< 0.05
Milk yield, kg/d	35.94	35.83	1.07	0.923
Feed efficiency <sup>2</sup> , kg/kg	1.45	1.36	0.02	0.359
Milk fat, %	5.14	4.87	0.13	0.051
Milk fat, kg/d	2.05	1.74	0.06	0.080
Milk protein, %	3.06	3.10	0.03	0.207
Milk protein, kg/d	1.12	1.10	0.04	0.489
Milk lactose, %	4.71	4.73	0.03	0.433
Milk lactose, kg/d	1.71	1.69	0.05	0.999
Milk Urine N, mg/dL	16.33	16.78	0.38	0.251
Solid-not fat, %	8.31	8.36	0.04	0.223
ECM, kg/d	40.17	38.97	1.02	0.269
4% FCM, kg/d	42.20	40.31	1.13	0.140
Milk NE <sub>L</sub> , Mcal/d	30.07	29.15	0.77	0.259
BHBA, mM	0.71	0.10	0.59	0.312
Somatic cell count, x 10 <sup>3</sup>	325.37	230.47	137.78	0.496

<sup>1</sup>Rumen protected L-histidine

<sup>2</sup>Milk yield/Dry matter intake

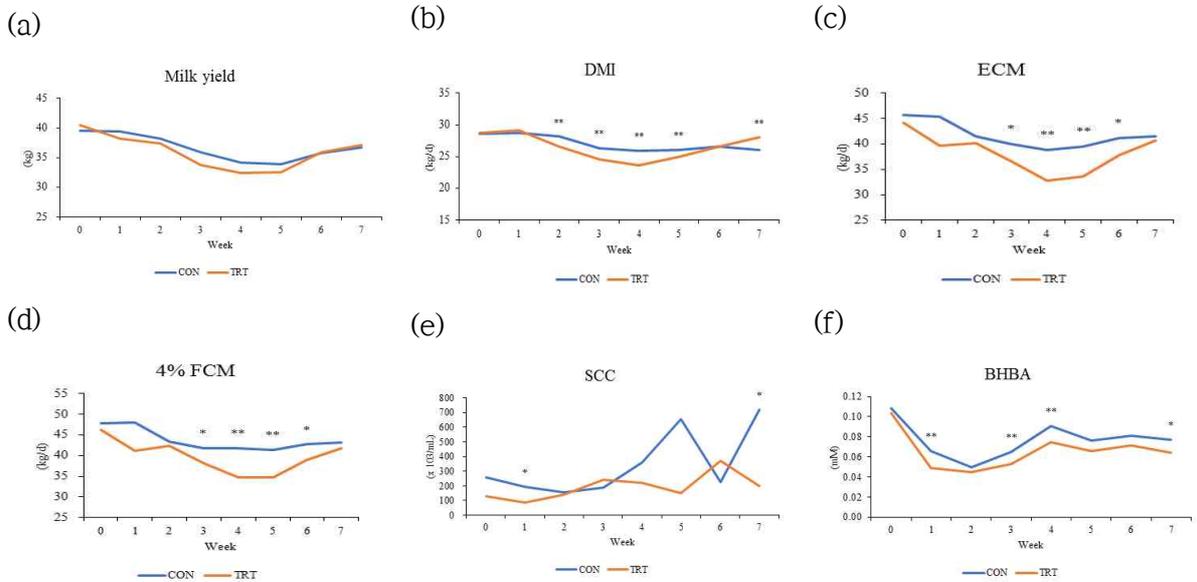


그림 66. Effects of rumen RPH on dry matter intake, milk yield and composition in dairy cows. \* $p < 0.10$ , \*\* $p < 0.05$

② 혈중성상

- 백혈구와 lymphocyte는 정상 범위에서 벗어났지만 통계적 차이를 보이지 않았음 (표 41).
- Haemoglobin과 MCH는 처리구에서 유의적으로 감소하고, haematocrit은 감소하는 경향을 보였음. 하지만 모두 정상 범위 안에 속함.

표 41. Effects of RPH<sup>1</sup> on complete blood cell count in dairy cows

Item	Control	NALH	SEM	<i>p</i> -value
White blood cell (4–12 K/mL)	12.59	12.74	0.77	0.842
Lymphocyte (2.5–7.5 K/mL)	8.33	8.62	0.97	0.765
Monocyte (0–0.84 K/mL)	0.34	0.32	0.10	0.854
Red blood cell (5–10 M/mL)	7.29	7.16	0.12	0.292
Haemoglobin (8–15 g/dL)	11.40	10.90	0.20	0.016
Haematocrit (24–46%)	32.35	31.33	0.51	0.057
MCV <sup>2</sup> (40–60fL)	44.56	44.20	0.57	0.531
MCH <sup>3</sup> (11–17pg)	15.68	15.30	0.18	0.045
MCHC <sup>4</sup> (30–36g/dL)	35.18	34.79	0.29	0.186
Platelet (100–800 K/mL)	452.13	445.42	32.92	0.840

<sup>1</sup>Rumen protected L-histidine

<sup>2</sup>Mean corpuscular volume

<sup>3</sup>Mean corpuscular haemoglobin

<sup>4</sup>MEH:MCV ratio

(라) 결론

- 젖소에게 RPH의 첨가는 사료 섭취량을 감소시키면서 유량을 유지시켰음. 유생산에 필요한 에너지를 감소시켰음. 또한 체세포 수를 유지시켰음.
- 따라서 RPH 첨가는 사료비 절감과 면역 증강 측면에서 긍정적인 효과가 있는 것으로 확인됨.

(5) 연구 10. 젖소의 경정맥으로 주입된 Tryptophan, Phenylalanine, 그리고 Acetate의 조합이 유단백질 합성에 미치는 영향 (3년차)

(가) 연구 배경

앞서 기술한 *in vitro* 연구인 연구 1 - 연구 4의 결과, Trp-Phe 및 Acetate-Trp-Phe 조합이 유단백 합성에 가장 효과적인 조합인 것으로 결정됨. 따라서 이를 실제 젖소에게 적용하여 유단백 증진에의 효과를 검증하고자 함.

(나) 연구 목적

Acetate와 L-tryptophan, L-phenylalanine을 착유우의 경정맥에 투여하여 착유우의 생산성에 미치는 영향을 평가하고자 함.

(다) 실험 재료 및 방법

- ① 본 연구는 건국대학교 동물실험윤리위원회에 승인 하에 실시되었음  
(승인번호 : KU19038).
- ② 공시동물 및 실험 장소
  - 본 사양실험은 충청북도 충주에 위치한 건국대학교 종합실습목장에 있는 홀스타인 (Holstein-Friesian) 착유우 젖소 중 5두를 사양실험에 사용함.
- ③ 기초사료
  - Total mixed ration (TMR), concentrate, hay를 NRC (2001)의 에너지 및 단백질 요구량에 맞춰 하루 두 번 (0830 and 1700 h) 급여함 (표 42).

표 42. Chemical composition in basal diets for dairy cows

Chemical compositions, g/d of DM	TMR	Concentrates	Roughage
DM (%)	61.91	88.84	85.88
	— % of DM —		
Crude protein	9.79	20.33	9.61
Ether extract	1.79	3.10	3.71
Crude fiber	13.02	7.25	15.68
Crude ash	5.09	6.94	4.86
NDF	34.78	24.33	29.52
ADF	18.25	12.05	18.08
Ca	0.59	0.69	0.52
P	0.28	0.56	0.27
NE <sub>t</sub> (Mcal/kg of DM) °	2.15	2.10	2.15
Amino acids			
Tryptophan	0.10	0.21	0.15*
Threonine	0.36	0.67	0.24*
Serine	0.42	0.87	-
Proline	0.53	1.06	-
Valine	0.43	0.79	0.26*
Isoleucine	0.27	0.57	0.30*
Leucine	0.60	1.42	0.43*
Tyrosine	0.16	0.44	-
Methionine	0.09	0.20	0.25*
Cysteine	0.21	0.46	0.06*
Lysine	0.40	0.59	0.34*
Glycine	0.39	0.80	-
Alanine	0.48	0.94	-
Arginine	0.53	1.14	0.28*
Glutamic acid	1.35	3.19	-
Aspartic acid	0.79	1.51	-
Histidine	0.16	0.37	0.21*
Phenylalanine	0.36	0.76	0.46*

\*Book Value (from NRC, 2001)

#### ④ 실험기간 및 방법

- 5 X 5 Latin square design을 이용하여 휴지기 5일과 실험 6일을 반복함.
- Control(saline), Trp, Phe, Trp-Phe, Acetate-Trp-Phe의 총 5개 시험구를 사용함.
- *In vitro* 연구에서 결정된 0.9 mM의 Trp, 0.6 mM의 Phe, 0.3 mM의 acetate를 분자량 대비 gram으로 환산함. 아미노산과 acetate powder를 삼투압 및 pH 영향을 받지 않도록 조절하여 생리식염수에 첨가함. 준비한 treatment solution은 1000 h에 경정맥 카테터를 이용하여 천천히 주입함.

#### ⑤ 샘플링 일정 및 분석방법

- 유량 및 유성분
  - 공시동물(총 5두)의 개체별 오전(0300 h) 및 오후(1500 h)에 착유된 유량을 매일 기록하였음.
  - 공시동물(총 5두)의 실험 기간 매일 오전(0300 h) 및 오후(1500 h)에 착유된 원유를 pooling하여 우유 내 일반성분[milk fat, milk protein, lactose, solid-not fat(SnF), somatic cell count(SCC), milk urea nitrogen(MUN), acetone, beta-hydroxybutyrate(BHB), beta-casein, Mono- and Poly-unsaturated fatty acids, Saturated fatty acid]을 분석함.

- 사료 섭취량 분석
  - 사료 섭취량 분석은 매일 아침 사료 급이 전 남은 사료의 양을 기록하여 일당 섭취량을 분석함.
- 혈액 채취
  - 경정맥 카테터를 통해 실험 1, 3, 5, 6일째에 채취함.
  - 실험 1, 3, 5일째는 경정맥 주입 전 채취함.
  - 실험 마지막 날(6일째)은 사료 급이 1시간 전부터 사료 급여 4시간 후까지 1시간 간격으로 총 6회 채취함 (-0100, 0000, 0100, 0200, 0300, 0400).

⑥ 통계 분석

- 각 분석을 통해 얻어진 일별 성적들은 기간별로 평균값을 산출함.
- 데이터 평균값에 따른 통계적 유의차는 SAS 소프트웨어 v. 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA)의 one-way ANOVA를 사용함.
- $p$ -value < 0.05 에서 유의하고,  $0.05 < p < 0.1$ 에서 경향이 있는 것으로 판단함.

(라) 실험 결과 및 고찰

① 유량 및 유성분

- 착유우의 경정맥 카테터를 이용해 아미노산 및 아세트산을 처리한 결과 사료 섭취량과 유량에는 변화가 없었음 (표 43).
- 하지만 예상한 바와 같이 유단백질량 (milk protein yield)이 처리구에서 유의적으로 증가함을 보였음. Trp 단독 처리구가 모든 시험구를 통틀어 가장 증가했으며 이후로 Acetate-Trp-Phe, Trp-Phe, Control, Phe 순임. 이는 *in vitro* 실험 결과가 *in vivo* 결과로 이어졌다는 점에서 상당히 긍정적인 결과로 사료됨.
- 유중 체세포 수는 모든 처리구에서 대조구 대비 감소함을 보였음. 첨가물들이 동물 체내에서 염증 반응을 억제시킨 것으로 판단됨.

표 43. Effects of amin acid and energy infusion on milk yield and milk composition

Item	Control	Trp	Phe	Trp-Phe	Acetate + Trp-Phe	SEM <sup>1</sup>	Covariate (Day 0)	Treat	Day	Treat * Day	Period
DMI <sup>2</sup> , kg/d	18.95	18.95	18.95	18.95	18.95						
Milk Yield, kg / d	25.17	24.65	24.20	25.26	24.25	0.708	<0.001	0.796	0.069	0.441	0.081
3.5% FCM <sup>3</sup>	28.58	28.94	26.90	28.48	28.08	0.485	0.383	0.155	0.172	0.091	0.003
ECM <sup>4</sup>	27.71	29.02	27.12	27.89	28.13	0.531	0.850	0.226	0.028	0.514	0.527
Milk Composition Yield, kg/d											
Fat	1.08	1.11	1.03	1.08	1.06	0.028	0.898	0.301	0.205	0.061	0.013
Protein	0.80 <sup>cd</sup>	0.84 <sup>a</sup>	0.78 <sup>d</sup>	0.82 <sup>b</sup>	0.83 <sup>ab</sup>	0.010	0.040	0.003	0.002	0.007	<0.001
Lactose	1.23	1.23	1.17	1.19	1.22	0.023	<0.001	0.332	0.070	0.359	0.007
Beta-casein	0.60	0.63	0.61	0.61	0.61	0.010	0.223	0.505	0.008	0.383	<0.001
Milk Composition, %											
Fat	4.26	4.28	4.37	4.29	4.21	0.143	<0.001	0.948	0.032	0.095	0.008
Protein	3.20	3.26	3.25	3.33	3.23	0.049	0.015	0.603	0.044	0.178	0.047
Lactose	4.81	4.82	4.82	4.76	4.81	0.039	0.572	0.886	0.379	0.349	0.025
SNF <sup>5</sup>	8.53	8.60	8.63	8.72	8.58	0.059	0.606	0.379	0.025	0.705	0.024
Cells	178.41 <sup>a</sup>	111.01 <sup>b</sup>	101.00 <sup>b</sup>	84.26 <sup>b</sup>	104.01 <sup>b</sup>	18.04	0.058	0.026	0.046	0.009	0.810
MUN <sup>6</sup>	13.92	14.49	14.00	15.15	14.12	0.367	0.003	0.283	0.437	0.998	0.001
Acetone	0.04	0.03	0.04	0.05	0.04	0.008	0.830	0.474	0.503	0.912	0.027
Mono-unsaturated FA	1.34	1.33	1.35	1.40	1.37	0.037	0.264	0.793	0.064	0.963	<0.001
Poly-unsaturated FA	0.31	0.32	0.33	0.33	0.32	0.005	0.734	0.523	<0.001	0.166	0.020
Saturated FA	2.58	2.67	2.58	2.79	2.60	0.147	0.173	0.863	0.355	0.945	0.739
Total Unsaturated FA	1.68	1.67	1.68	1.71	1.68	0.046	0.965	0.990	0.099	0.830	<0.001

<sup>1</sup>SEM, standard error of means

<sup>2</sup>DMI, dry matter intake

<sup>3</sup>3.5% FCM(fat corrected milk) = [0.4324 x milk yield (kg/d) + [16.216 x fat yield (kg/d)

<sup>4</sup>ECM(energy corrected milk) = 0.327 x milk yield(kg/d) + 12.95 x fat yield(kg/d) + 7.2 x protein yield(kg/d).

<sup>5</sup>SNF, solid non-fat

<sup>6</sup>MUN, milk urea nitrogen

② 혈중성상

- 시험 기간 동안 경정맥을 통한 아미노산 및 아세트산의 첨가는 혈액 성상에 아무런 영향을 보이지 않았음 (표 44). 따라서 시험축들의 건강 상태에는 문제가 없었던 것으로 사료됨.

표 44. Effect of amino acid infusion on day 1, 3 and 5

Item <sup>1</sup>	Control	Trp	Phe	Trp-Phe	Acetate + Trp-Phe	SEM	Covariate (Day 0)	Treat	Treat * Day	Period
WBC <sup>1</sup> , 4-12 K/uL	10.47	10.73	10.83	10.55	10.91	0.615	<0.0001	0.985	0.656	0.581
Lymphocyte, 2.5-7.5 K/uL	5.97	5.76	6.53	6.12	6.68	0.454	0.0001	0.649	0.414	0.061
Monocyte, 0 - 0.84 K/uL	0.93	1.00	0.89	0.92	0.93	0.070	<0.0001	0.852	0.181	0.634
Granulocyte, 0.6-6.7 K/uL	3.38	3.92	3.36	3.31	3.61	0.330	<0.0001	0.692	0.921	0.062
RBC <sup>2</sup> , 5-10 M/uL	7.48	7.46	7.53	7.37	7.42	0.137	<0.0001	0.959	0.876	0.640
Hemoglobin, 8-15 g/dL	10.93	10.70	10.62	10.49	10.86	0.163	<0.0001	0.403	0.715	0.075
Hematocrit, 24-46%	30.62	29.87	29.89	29.09	30.20	0.468	<0.0001	0.369	0.591	0.050

<sup>1</sup>Abbreviation: WBC = White Blood Cell; RBC = Red Blood Cell

③ 혈중 아미노산

- 경정맥을 통해 아미노산과 아세트산을 주입한 24시간 후 혈중 아미노산 함량은 표 45 및 46과 같음.
- 시험 기간 동안 처리구 간 아미노산 조성에는 유의적인 변화가 없었음 (표 45). 이는 경정맥 주입 24시간 후의 결과이므로 주입된 아미노산들이 이미 단백질 합성 및 체내 대사에 이용된 것으로 사료됨.
- 각 처리구의 실험 1, 3, 5일 째의 아미노산 함량에는 큰 차이가 없었음 (표 46). 대조구에서 Ser, Trp-Phe 처리구에서 Val에 유의적 차이가 있었고, Phe 처리구에서 Asp, Acetate-Trp-Phe 처리구에서 Trp에 변화하는 경향이 보임.
- 경정맥으로의 아미노산 주입과 혈중 아미노산의 변화와 관련하여 추후 연구가 요구됨.

표 45. Blood amino acids composition in Holstein dairy cows injected with different amino acid and energy source

Amino acids	Control	Trp	Phe	Trp-Phe	Acetate + Trp-Phe	SEM	p-value
Aspartic Acid	12.46	15.14	14.73	13.65	18.15	7.92	0.990
Threonine	102.48	77.32	85.18	71.43	95.99	19.75	0.791
Serine	105.72	61.00	100.46	109.80	91.83	14.99	0.191
Asparagine	105.52	132.08	67.52	134.88	104.05	30.04	0.528
Glutamic Acid	289.54	258.28	270.92	267.23	259.85	24.85	0.904
Glycine	345.54	350.85	353.29	322.84	352.12	21.79	0.848
Alanine	289.58	279.12	277.24	266.20	280.07	19.76	0.947

Valine	14.51	14.30	17.53	22.91	13.96	3.39	0.322
Cystine	41.46	37.59	41.84	42.48	40.19	7.85	0.993
Methionine	99.20	100.70	98.21	75.32	102.24	22.66	0.910
Phenylalanine	95.79	91.08	99.35	95.67	93.65	22.23	0.999
Isoleucine	25.57	28.34	30.76	26.92	27.28	8.19	0.994
Leucine	20.64	30.73	28.12	23.60	20.08	6.43	0.718
Tyrosine	16.30	21.22	21.21	24.71	21.93	5.59	0.878
Histidine	55.65	57.74	56.35	48.17	61.93	6.34	0.653
Tryptophan	10.37	18.55	19.66	17.59	14.04	4.83	0.652
Lysine	83.12	81.35	83.81	77.47	74.78	4.11	0.491
Arginine	105.36	99.36	104.95	127.21	105.02	14.76	0.710

표 46. Blood amino acids composition in Holstein dairy cows injected with different amino acid and energy source in Day 1 to Day 5

Amino acids	Control	Trp	Phe	Trp-Phe	Acetate + Trp-Phe
Aspartic Acid					
D1	5.70	2.60	7.55	30.13	15.13
D3	26.23	36.50	28.72	4.19	43.10
D5	5.44	6.33	7.92	8.24	5.21
SEM	<b>7.13</b>	<b>8.20</b>	<b>7.36</b>	<b>8.78</b>	<b>8.09</b>
P-value	<b>0.42</b>	<b>0.19</b>	<b>0.44</b>	<b>0.45</b>	<b>0.37</b>
Threonine					
D1	83.17	63.55	84.05	65.92	80.27
D3	108.82	93.05	96.65	51.49	117.98
D5	115.46	75.35	74.84	58.58	118.47
SEM	<b>16.24</b>	<b>16.11</b>	<b>16.57</b>	<b>14.28</b>	<b>16.61</b>
P-Value	<b>0.72</b>	<b>0.78</b>	<b>0.88</b>	<b>0.93</b>	<b>0.54</b>
Serine					
D1	151.90 <sup>a</sup>	101.23	112.17	77.37	135.91
D3	61.33 <sup>b</sup>	25.47	120.32	161.99	43.37
D5	103.93 <sup>ab</sup>	56.29	68.87	75.25	106.04
SEM	<b>15.32</b>	<b>13.87</b>	<b>17.28</b>	<b>21.21</b>	<b>15.55</b>
P-Value	<b>0.04</b>	<b>0.69</b>	<b>0.46</b>	<b>0.18</b>	<b>0.19</b>
Asparagine					
D1	90.50	121.60	63.83	216.74	101.20
D3	136.33	64.93	105.24	74.75	80.71
D5	89.74	209.70	33.48	129.11	81.13
SEM	<b>27.53</b>	<b>30.07</b>	<b>13.68</b>	<b>43.12</b>	<b>23.36</b>
P-Value	<b>0.76</b>	<b>0.14</b>	<b>0.09</b>	<b>0.42</b>	<b>0.39</b>
Glutamic Acid					
D1	311.39	239.85	259.07	265.13	286.44
D3	259.50	307.62	331.16	266.91	216.60
D5	297.74	227.38	222.54	253.36	303.02
SEM	<b>12.27</b>	<b>20.58</b>	<b>28.07</b>	<b>31.90</b>	<b>23.41</b>
P-Value	<b>0.21</b>	<b>0.24</b>	<b>0.29</b>	<b>0.99</b>	<b>0.54</b>
Glycine					
D1	356.13	375.76	402.90	382.07	362.08
D3	341.44	355.66	392.27	287.92	384.06
D5	339.05	321.13	264.71	264.96	328.79
SEM	<b>16.75</b>	<b>20.19</b>	<b>30.08</b>	<b>36.35</b>	<b>19.80</b>
P-Value	<b>0.92</b>	<b>0.57</b>	<b>0.11</b>	<b>0.39</b>	<b>0.11</b>
Alanine					
D1	317.49	295.04	303.87	304.35	299.61
D3	278.16	266.32	302.66	243.53	291.13
D5	273.09	275.98	225.19	231.03	264.11

	<b>SEM</b>	<b>12.63</b>	<b>14.07</b>	<b>18.97</b>	<b>29.50</b>	<b>15.54</b>
	<b>P-Value</b>	<b>0.31</b>	<b>0.73</b>	<b>0.15</b>	<b>0.58</b>	<b>0.13</b>
Valine						
	D1	12.41	13.20	7.77	22.86 <sup>ab</sup>	8.41
	D3	13.90	11.16	19.35	8.02 <sup>b</sup>	15.34
	D5	17.22	18.52	25.45	43.04 <sup>a</sup>	12.70
	<b>SEM</b>	<b>3.17</b>	<b>2.48</b>	<b>3.62</b>	<b>5.50</b>	<b>2.28</b>
	<b>P-Value</b>	<b>0.84</b>	<b>0.49</b>	<b>0.13</b>	<b>0.02</b>	<b>0.41</b>
Cystine						
	D1	41.57	33.97	28.41	41.97	34.40
	D3	34.99	36.60	51.59	43.16	40.60
	D5	47.82	42.20	45.52	55.78	34.91
	<b>SEM</b>	<b>5.98</b>	<b>5.28</b>	<b>5.15</b>	<b>5.77</b>	<b>4.74</b>
	<b>P-Value</b>	<b>0.713</b>	<b>0.83</b>	<b>0.165</b>	<b>0.61</b>	<b>0.96</b>
Methionine						
	D1	92.14	81.03	95.65	64.68	107.12
	D3	117.37	111.96	125.20	78.66	148.86
	D5	88.09	109.12	73.79	60.92	99.86
	<b>SEM</b>	<b>14.19</b>	<b>16.46</b>	<b>15.00</b>	<b>14.40</b>	<b>15.09</b>
	<b>P-Value</b>	<b>0.69</b>	<b>0.73</b>	<b>0.40</b>	<b>0.89</b>	<b>0.65</b>
Phenylalanine						
	D1	81.86	86.61	86.00	88.45	57.22
	D3	91.93	96.14	101.19	87.00	78.15
	D5	113.59	90.50	110.86	135.83	95.98
	<b>SEM</b>	<b>14.15</b>	<b>17.30</b>	<b>11.15</b>	<b>16.72</b>	<b>12.14</b>
	<b>P-Value</b>	<b>0.68</b>	<b>0.98</b>	<b>0.79</b>	<b>0.45</b>	<b>0.78</b>
Isoleucine						
	D1	28.22	22.37	14.32	26.27	10.43
	D3	21.36	29.28	33.96	18.81	26.02
	D5	27.12	33.39	43.99	47.84	29.10
	<b>SEM</b>	<b>6.17</b>	<b>5.85</b>	<b>20.81</b>	<b>7.58</b>	<b>5.43</b>
	<b>P-Value</b>	<b>0.90</b>	<b>0.77</b>	<b>0.59</b>	<b>0.32</b>	<b>0.12</b>
Leucine						
	D1	26.34	31.38	17.05	25.40	12.37
	D3	13.19	21.28	37.70	15.02	34.49
	D5	22.40	39.52	29.62	40.07	15.07
	<b>SEM</b>	<b>5.37</b>	<b>6.30</b>	<b>5.27</b>	<b>8.21</b>	<b>4.89</b>
	<b>P-Value</b>	<b>0.11</b>	<b>0.53</b>	<b>0.29</b>	<b>0.53</b>	<b>0.21</b>
Tyrosine						
	D1	20.63	24.08	13.88	25.08	24.46
	D3	15.93	17.96	19.33	16.60	26.35
	D5	12.33	21.63	30.42	31.41	21.21
	<b>SEM</b>	<b>3.20</b>	<b>4.35</b>	<b>4.85</b>	<b>5.60</b>	<b>3.32</b>
	<b>P-Value</b>	<b>0.61</b>	<b>0.87</b>	<b>0.39</b>	<b>0.62</b>	<b>0.79</b>
Histidine						
	D1	62.76	61.64	66.45	55.22	62.06
	D3	49.21	55.68	50.11	51.17	60.48
	D5	54.99	55.90	52.51	51.84	59.09
	<b>SEM</b>	<b>4.31</b>	<b>2.65</b>	<b>5.57</b>	<b>7.68</b>	<b>6.32</b>
	<b>P-Value</b>	<b>0.47</b>	<b>0.62</b>	<b>0.47</b>	<b>0.98</b>	<b>0.26</b>
Tryptophan						
	D1	11.16	10.93	14.41	13.83	13.87
	D3	10.27	15.77	18.49	12.75	21.93
	D5	9.67	28.96	26.08	31.12	10.48
	<b>SEM</b>	<b>1.11</b>	<b>5.19</b>	<b>5.26</b>	<b>5.99</b>	<b>2.08</b>
	<b>P-Value</b>	<b>0.88</b>	<b>0.37</b>	<b>0.69</b>	<b>0.43</b>	<b>0.08</b>
Lysine						
	D1	85.47	82.95	85.03	83.19	74.80

D3	81.98	85.72	88.01	61.18	76.10
D5	81.89	75.37	78.40	83.88	76.84
<b>SEM</b>	<b>4.04</b>	<b>6.00</b>	<b>4.18</b>	<b>5.64</b>	<b>4.81</b>
<b>P-Value</b>	<b>0.93</b>	<b>0.79</b>	<b>0.66</b>	<b>0.20</b>	<b>0.56</b>
Arginine					
D1	114.88	97.15	101.01	115.58	108.10
D3	92.75	98.70	111.37	110.59	99.40
D5	108.46	102.22	102.48	105.38	123.90
<b>SEM</b>	<b>6.16</b>	<b>6.41</b>	<b>6.87</b>	<b>13.95</b>	<b>7.74</b>
<b>P-Value</b>	<b>0.34</b>	<b>0.95</b>	<b>0.82</b>	<b>0.96</b>	<b>0.94</b>

(마) 결론

- 경정맥 카테터를 통해 착유우에 주입된 아미노산 및 아세트산은 젖소의 사료 섭취량 및 유량을 변화시키지 않으면서 유단백질량을 증가시킴. 또한 대조구 대비 모든 처리구에서 체세포 수를 감소시킴.
- 혈중 아미노산 조성은 아미노산 첨가에 따라 큰 변화를 보이지 않았음.
- *In vitro* 세포 실험 결과를 *in vivo*에 적용하여 유단백질이 증가하는 같은 결과를 도출했다는 점에서 긍정적으로 평가됨.

(6) 최종 결론

- 반추위 보호 L-tryptophan (RPT)은 여름철 높은 수준의 heat stress (Moderate-Severe)를 받는 착유우들의 유생산성을 증가시켰음. 이는 tryptophan이 동물 체내에서 스트레스 완화 산물인 serotonin과 melatonin으로 전변되기 때문인 것으로 생각됨.
- 다음 생산성에 큰 영향을 미치는 건유기에 RPT를 급여한 결과, 유량과 신생 송아지 생시체중이 수치적으로 증가함.
- 따라서 RPT의 젖소 사료 내 첨가는 생산성을 증가시키는 측면에서 경제적으로 긍정적인 효과가 있을 것으로 판단됨.
- 반추위 보호 L-histidine (RPH)을 비유 중기 착유우에게 급여한 결과, 사료 섭취량은 감소하지만 생산성이 유지되는 결과를 얻었음. 이는 *in vitro* 연구에서 기대한대로 사료비 절감 측면에서 긍정적으로 생각됨.
- 경정맥 카테터를 통해 L-tryptophan, L-phenylalanine, 그리고 acetate를 첨가한 결과, 대조구와 대비하여 유단백질량이 유의적으로 증가함. 이는 세포를 재료로 한 *in vitro* 연구와 동일한 결과로, 실제 사양시험 검증에 성공했다는 점에서 중요한 기초자료로 이용될 것으로 생각됨.

다. 개발 진행된 반추위 보호 아미노산들의 조합에 따른 효과 연구

(1) 연구 11. *In vitro* 세포 모델에서 트립토판, 메티오닌, 히스티딘, 그리고 아세트산이 단백질 합성에 미치는 영향 (3년차)

(가) 연구 목적

- 제1 세부과제에서 사업성이 인정되어 제형에 성공한 아미노산들의 조합이 우유 단백질

질 합성에 미치는 효과를 알아보기 위해 실시함.

- 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)를 이용하여 Trp, Met, His, 그리고 acetate를 첨가하였을 때 유단백질 합성 양상을 평가함.

#### (나) 재료 및 방법

① 세포 주 : 젖소 유래 유선상피세포주(MAC-T cell line)

② 실험 설계 : 대조구(분화 미디어), 처리구(Trp, Met, His, Ace의 조합 처리)

- 처리구 : 대조구, Trp, Met, His, Trp-Met-His, Acetate-Trp-Met-His
- 농도 : 0.9 mM(Trp), 0.6 mM(Met), 0.3 mM(His), 각 아미노산과 1:1 비율(Acetate)  
\*His는 단일 처리 시 Extracellular 단백질 농도 및  $\beta$ -casein 발현량이 증가하지 않았음. 따라서 평가한 농도 중 가장 낮은 농도인 0.3 mM을 선택함.
- 배양 시간 : 72시간
- 조사 항목 : Extracellular 단백질 농도,  $\beta$ -casein mRNA 발현량
- 분화 미디어 조성 : DMEM/F12 (Gibco) + 10% Fetal bovine serum (Gibco) + 1% Penicillin/streptomycin (Hyclone) + 0.1% Gentamycin (Sigma-aldrich) + 0.1% Hydrocortisone (Sigma-aldrich) + 0.1% Insulin (Sigma-aldrich) + 0.1% Prolactin (Sigma-aldrich)
- 분화 미디어 내 기본 필수아미노산 조성 : Arg 0.70 mM, His 0.15 mM, Ile 0.42 mM, Leu 0.45 mM, Lys 0.50 mM, Met 0.12 mM, Phe 0.22 mM, Thr 0.45 mM, Trp 0.04 mM, Val 0.45 mM

③ 실험 방법

- Extracellular 단백질 추출 및 정량 분석 : 6-well plate에 MAC-T cell이 100% confluence 상태로 성장했을 때, 대조구로서 분화 미디어와 처리구로서 각 필수아미노산이 농도별 첨가된 분화 미디어를 분주 후 배양함. 72시간 배양 후 세포 외 단백질을 추출하고, BCA protein assay kit (Thermo Scientific, South Logan, UT, USA)를 이용하여 분석함.
- $\beta$ -casein mRNA 발현량 : 단백질 추출 과정과 동일한 방법으로 배양 후 세포를 채취함. 채취한 세포에서 RNA를 추출 후 cDNA로 합성하여 real-time qPCR을 이용해 유전자 발현량을 확인함.

④ 통계 분석

- 데이터 평균값에 따른 통계적 유의차는 SPSS 통계 소프트웨어(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)의 Tucky's HSD test로 실시함. 모든 실험은 3 반복으로 진행되었으며,  $p < 0.05$ 에서 유의하다고 판단함.

#### (다) 실험 결과 및 고찰

- MAC-T cell을 각 처리물들과 함께 배양한 결과, Trp가 포함된 모든 처리구에서 대조구 및 Trp 미처리구에 비해 extracellular 단백질 농도가 유의적으로 증가함 (그림 67).
- Trp, Met, His의 조합 및 3개 아미노산에 acetate를 함께 MAC-T cell에 처리했을 때,  $\beta$ -casein 발현량은 대조구와 아미노산 단일 처리구에 비해 유의적 증가를 보였음 (그림 68).
- 특히  $\beta$ -casein의 경우, acetate를 첨가한 아미노산 조합 처리구가 acetate를 첨가하

지 않은 처리구보다 수치적으로 높은 발현량 나타냄. 따라서 생리활성물질인 acetate와 아미노산의 조합이 실제 사양실험에서 synergistic하게 작용할 것으로 기대됨.

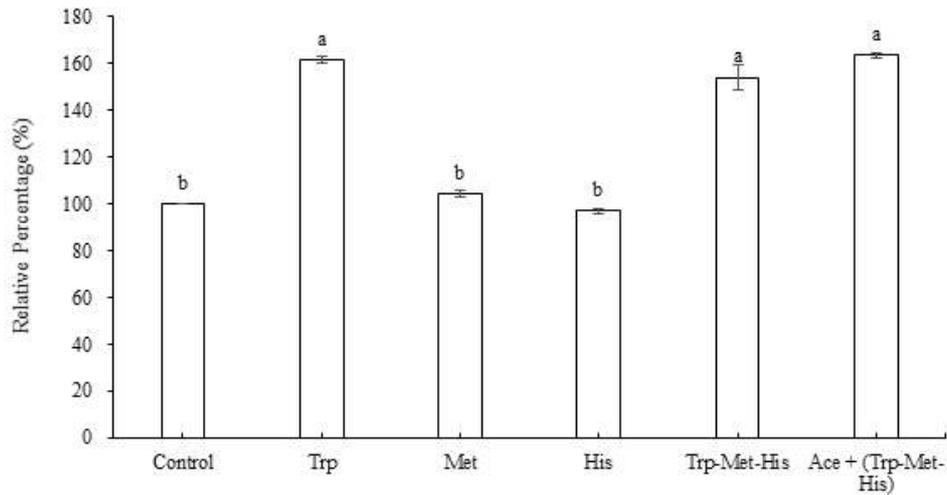


그림 67. Relative extracellular protein concentrations in MAC-T cells upon addition of tryptophan, methionine, histidine and acetate for 72 h. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). <sup>a-b</sup>Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

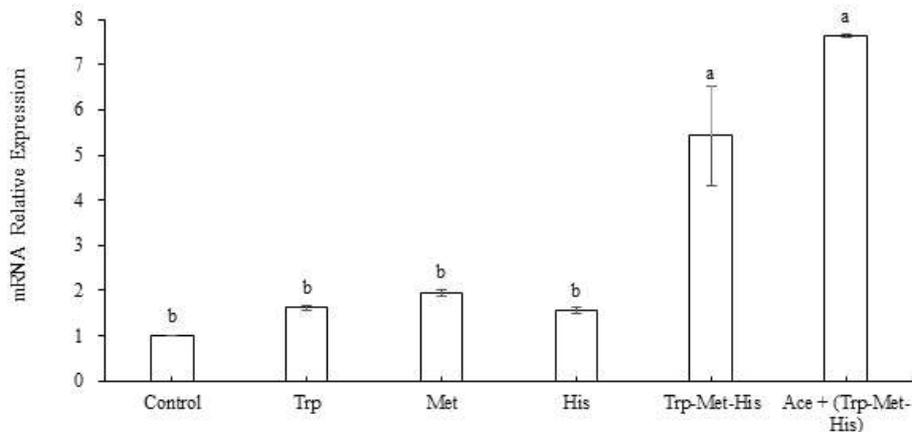


그림 68. Relative  $\beta$ -casein mRNA expression in MAC-T cells upon addition of tryptophan, methionine, histidine and acetate for 72 h. Values are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). <sup>a-b</sup>Means without a superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$

(라) 결론

- Trp, Met, His 3개 아미노산의 조합이 유단백 증진에 효과가 있었음. Trp:Met:His의 비율은 3:2:1임.
- 이러한 비율과 반추위 보호 아미노산 내 순수 아미노산의 비율을 고려하여 두당 일일 급여량이 30g이 되도록 계산함. 따라서 위탁기관과 함께 진행된 In vivo 실험에 RPT를 17.25g, RPM을 8.4g, RPH를 4.35g 급여함.

### 3. 보호 아미노산 및 그 복합제의 반추위 안정성 및 유단백 증진 연구 - 경북대학교 (위탁기관)

#### 가. 개요

과거 국내의 유대 산정은 유단백질을 제외한 유지방 위주로 결정이 되었으나, 2014년 1월부터 유지방의 상한선은 4.3%에서 4.1%로 하향 조정되고 유단백질 항목이 새로 신설됨에 따라 유대 산정 기준이 개편되었음(낙농진흥회). 따라서 유단백질을 향상할 수 있는 방안들이 고려되었음. 젖소의 경우 사료 내 조단백질(Crude protein; CP)을 섭취하였을 때 milk protein으로 전환되는 비율(N milk/N intake)은 25-28%에 불과하고(Spek et al., 2013) 남은 nitrogen (N)은 ammonia (NH<sub>3</sub>)형태로 분이나 노로 배출되어 환경오염을 야기함(Pain et al., 1998; Chase et al., 2012). 조단백질 함량을 높여 유단백질을 증대하려는 시도가 있었으나, 조단백질 함량과 milk protein yield간의 상관관계( $r=0.14$ )는 낮으며(NRC. 2001) 조단백질 함량이 높아짐에 따라 milk protein이 감소할 뿐만 아니라 혈액과 우유 내 urea 함량과 노를 통해 배출되는 N함량 증가 및 이에 따른 질소 효율이 감소하는 결과를 보였음(Colmenero and Broderick. 2006). Frank and Swensson (2002)의 연구에서는 17%에서 13.1%까지 점진적으로 조단백질 함량을 줄이는 경우 질소 효율이 높아지는 것을 관찰하였으나, 유량 및 casein, whey protein이 감소하였음. 앞선 연구결과들은 조단백질 함량을 낮춰도 유량 및 유성분을 감소시키지 않으면서 질소 효율을 높이는 것에 대한 필요성을 시사하고 있음. Metabolizable protein (MP)은 소장에서 흡수되어 실제 동물의 성장, 유지, 생산을 위해 이용되는 순수단백질로 정의되며 미생물체 단백질(microbial crude protein; MCP), 반추위 내에서 분해되지 않는 사료 내 단백질(rumen undegradable protein; RUP), 적은 양이지만 동물 체내에서 만들어지는 내인성 단백질(endogenous crude protein; ECP)의 총합으로 계산됨(NRC. 2001). 보호되지 않은 형태의 아미노산을 급여할 경우 반추위내 미생물들에 의해 빠르게 분해되고(Chalupa. 1976) MP의 영양적 가치는 필수아미노산의 조성에 따라 결정되기 때문에(NRC. 2001) 소장에서 부족하기 쉬운 제한 아미노산을 보호하기 위한 방법들이 필요함. 본 연구에서는 착유우의 제한 아미노산 및 제한 아미노산간 조합과 아미노산 보호 방법에 대한 문헌을 조사하고자 함.

#### (1) 착유우 제한 아미노산 및 제한 아미노산간 조합

- NRC (2001)에 따르면 착유우에 있어 옥수수, 대두박 및 조사료 위주의 사료로 구성될 경우 lysine (Lys)과 methionine (Met)이 제 1제한 아미노산이라 하며 다음으로 Histidine (His), Phenylalanine (Phe), isoleucine (Ile)이 제한 아미노산이라고 함.
- Haque et al. (2013)은 Holstein종의 duodenum에 필수아미노산을 주입하여 소장 내 아미노산을 모두 충족시킨 경우와 이 중 arginine (Arg), Ile, valine (Val)을 각각 제한시켰을 때 착유우 유량 및 유성분에 미치는 영향을 관찰하였음. Arg과 Ile이 제한된 경우는 유량 및 유성분에 변화가 없었으나 Val을 제한한 경우 유단백질 함량이 4.3% 감소하였고 혈장 아미노산 내 Val이 유의적으로 감소하였으며 Met과 His 또한 감소하는 경향을 보였음. 이는 Val 또한 제한 아미노산이라는 것을 시사함.
- Trínáctý et al. (2006)의 연구에서는 rumen protected (RP)-Lys, RP-Met, RP-His을 함께

첨가하였을 때 유량이 1.07 kg 증가하였으며 milk protein yield 및 casein 함량이 증가하는 등 긍정적인 영향을 보였음.

- Krizová et al. (2008)의 연구에서는 RP-Met, RP-Lys, RP-leucine (Leu)을 첨가하였을 때 유량, 건물섭취량, casein, 지방, lactose, urea의 생산량에 변화가 없었으며 혈장 내 아미노산 또한 변화가 없었음.
- Giallongo et al. (2016)의 연구에서는 RP-His을 단독 급여하였을 때 건물섭취량이 증가하였고 RP-Met, RP-Lys, RP-His을 혼합하여 급여하였을 때 유량 및 유성분이 증가하였음.
- Zhao et al. (2019)의 연구에서는 RP-Met만을 단독 급여했을 때보다 RP-Met과 RP-threonine (Thr), RP-Ile, RP-Leu 4가지의 보호 아미노산을 혼합 급여했을 때 moderate mammalian target of rapamycin을 자극하여 유단백질 생산량을 증가시켰다고 보고함.
- Robinson et al., (2010)의 연구는 착유우에게 RP-Lys 및 RP-Lys, RP-Ile, RP-His, RP-Val의 첨가 급여에 따른 반추위 내 분해율과 이에 따른 유생산량 및 혈장 내 아미노산 조성성분의 효과를 알아보기 위해 진행을 하였음. RP-Lys 단독 처리구에서 유단백이 유의적으로 증가하였고 RP-Lys 및 기타 필수아미노산 처리구가 RP-Lys 단독 처리구에 비해 유당 및 유량이 유의적으로 증가하였으며 유단백 및 에너지함량은 증가하는 경향을 보였으나 혈장분석은 유의적 차이는 없었음.

## (2) 코팅방법에 따른 in vitro 및 in vivo 효과

### (가) pH sensitive polymer (2-vinylpyridine-co-styrene)

- 제1위(pH: 5.5-7)에서는 미생물이 분해하는 소화 효소에도 코팅물질이 분해되지 않고 제4위로 넘어가며 제4위(pH: 2-3)에서 분해되어 방출된 methionine이 소장으로 넘어가 흡수됨.
- Adisseo사에서 Smartamine이라는 제품으로 시판 중이며 반추위 보호율은 90% (Robert and Williams. 1997), 생체이용성은 74.44% (Graulet et al., 2005)로 추정됨.
- Transition period (보통 분만 3주전-출산 3주전까지의 기간이며 이 시기에 젖소의 면적이 가장 취약함)의 젖소 45마리에게 Met 무처리구, Metasmart (HMBi) 처리구, Smartamine 처리구로 나눠 첨가제를 급여하였을 때 유량 및 유성분은 모든 처리구에서 증가하였으며 호중구의 식세포 작용 증가를 통해 면역 기능의 증가를 시사하였음(Osorio et al., 2013).
- Cornell Net Carbohydrate and Protein System 기준으로 methionine과 lysine 비율을 맞춰 CP 함량을 낮추었을 때(18.3%; 무처리구, 16.7%; Smartamine™ M and 12 g of Smartamine™ ML (15% DL-Met and 50% L-Lys monohydrochloride), 15.3%; 7 g of Smartamine™ M and 15 g of Smartamine™ ML) 건물섭취량 및 유량은 CP 18.3%에서 가장 높았으나 urine output은 CP 함량이 낮아질수록 감소하였으며 이는 blood urea nitrogen에서도 같은 결과를 보였음(15.9, 12.9, 10 mg/dL). 질소 효율(milk N/ intake N) 또한 CP 함량이 감소할수록 25.8%, 29.3%, 33.1%로 향상되었음(Dinn et al., 1998).
- Met은 또한 간기능과 관련된 biomarker들에 methyl donor의 역할을 하는데 Zhou et al. (2016)의 연구에서는 smartamine을 급여하여 혈장, 간, 조직의 biomarker 농도를

조사하였음. 그 결과 간기능의 척도가 되는 cholesterol and paraoxonase (PON)가 혈장에서 크게 증가하는 경향을 보였으며 항산화 역할을 하는 glutathione 수치가 높게 관찰되는 등 전체적으로 간과 혈액의 biomarker와 면역반응에 긍정적인 변화를 가져왔음.

- Ordway et al. (2009)는 Smartamine과 Metasmart를 젖소에 첨가하여 비교하였는데 유지방은 대조구(무처리구)에서 가장 높게 나왔으며 Smartamine과 Metasmart간의 차이는 없었음. 유단백질(%)은 Smartamine과 Metasmart 처리구가 대조구보다 높게 나타났음. 사료 내 질소가 우유로 전환되는 비율은 Smartamine 처리구가 Metasmart보다 높게 나타났으며(0.34 vs. 0.33 and 0.32). 혈장 아미노산은 Smartamine과 Metasmart 모두 대조구보다 메치오닌 농도가 증가하였음(4.26 and 5.96 vs. 3.34 ug/ml).
- Watanabe et al. (2003) 연구에서는 캐놀라가 달린 젖소에게 pH-sensitive polymer로 코팅한 Met을 급여하여 제4위, 소장, 분의 아미노산 회수율을 분석한 결과 polymer로 코팅한 Met이 각 68.6%, 78.2%, 0%로 높은 이용률을 보였음.
- Smartamine은 물리적인 방법으로 코팅한 제품으로 열안정성이 낮아 펠렛으로 사용하기 어려우며(Rulquin et al., 2006), 현재 국내에서는 수입되지 않는 것으로 확인됨.

#### (나) HMB (2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid) 과 HMBi (Isopropyl ester of HMB)

- HMBi 및 HMB는 아미노기(NH<sub>2</sub>)를 가지고 있지 않아 아미노산으로 분류되지 않음. 따라서 이들 자체는 Met이 아니며 카르복실기(-COOH)를 포함하고 있어 유기산으로 분류됨.
- 작용기전: 소장에서 흡수된 HMB는 Met을 합성하기 위한 중간물질인 keto-4-methylthiobutyrate로 전환된 후(이 과정에서 2가지의 효소 L- $\alpha$ -hydroxy acid oxidase (EC 1.1.3.15)와 D-hydroxy acid dehydrogenase (EC 1.1.99.6)가 작용함) 다시 L-Met으로 transaminated되어 이용됨(Firkins et al., 2015).
- Römer and Abel (1999)의 연구는 닭과 돼지에게 HMB를 급여하였을 때 DL-Met 급여와 동일한 이용률을 보였으며 돼지는 Met이 결핍된 사료에 HMB를 급여하였을 때 요로 배출되는 질소가 낮았다고 하였음.
- Knight and Dibner (1984)의 연구 또한 육계에게 HMB를 급여하였을 때 HMB 농도가 높아질수록 소장 및 혈장에서 HMB의 농도(<sup>14</sup>C)가 높아지는 것을 관찰하였음. 이처럼 단위동물에서는 HMB의 급여가 Met을 대체할 수 있을 만큼의 효과를 보였음.
- 반추동물의 경우 HMB의 반추위 보호율은 39.5% (Koenig et al., 2002), 생체 이용률은 40% (Koenig et al., 1999)로 추정되나 몇몇의 연구들에서 혈장 아미노산 및 milk protein 등 반추동물에 있어 첨가 효과는 없었음(Hutjens and Schultz. 1971; Chandler et al., 1976; Hansen et al., 1991; Johnson et al., 1999).
- Jones et al. (1988)의 연구에서도 HMB와 HMB-Ca가 반추위내에서 99%가 변형되거나 분해 되었으며 duodenum에서 1% 이하의 회수율을 보였음.
- HMBi의 반추위 보호율은 50% (St-Pierre and Sylvester. 2005)이며 생체이용률은 52.84% (Graulet et al., 2005)로 추정되며 Adisseo사에서 Metasmart라는 제품으로 시판 중에 있음.
- HMB와 HMBi는 젖소의 섭취량에는 유의적인 차이가 없었으며 혈장 내 Met함량은 HMBi가 무첨가구와 HMB보다 높은 경향을 보였음. 또한 유량 및 유단백질이 HMBi가 HMB 처리구보다 유의적으로 증가하였음(St-Pierre and Sylvester. 2005).

- HMB와 HMBi를 대두박과 같이 펠렛팅하여 젖소에게 급여하였을 때 HMB는 유단백 합성에 영향을 미치지 않은 반면 HMBi는 무첨가구보다 혈장 내 Met함량이 110%가 증가하였으며 milk protein yield는 32 g, milk protein content는 0.1%가 증가하였음(Rulquin et al., 2006).
- DL-Met를 HMBi로 대체하였을 때(0.055% HMBi, 0.11% HMBi) NH<sub>3</sub>-N의 농도는 선형적으로 증가하다가 감소하였으나(6.22, 6.80, 7.20, 5.65 mg/dL) NH<sub>3</sub>-N유래 bacteria는 선형적으로 증가하였음. VFA는 acetate와 propionate는 HMBi 함량이 증가할수록 감소하였으나 acetate:propionate 비율은 증가하였음(Fowler et al., 2015).
- Whelan et al. (2013)의 연구에서는 grass silage와 maize silage에 HMBi를 각각 첨가하였을 때 HMBi의 첨가가 in vivo 반추위 발효성상(pH, VFA, NH<sub>3</sub>-N)에 미치는 효과는 없었음.
- Alstrup et al. (2015)의 연구에서도 Holstein종과 Jersey종에서 HMBi를 첨가하였을 때 건물섭취량, 유량 및 유성분에 유의적인 차이가 없었음. urinary N 또한 Holstein종과 Jersey종에서 각각 6.11%, 11.1%로 수치적으로만 감소가 있을 뿐 유의적인 차이는 없었음.
- Chen et al. (2018)의 연구에서는 alfalfa의 일부를 옥수수사료와 HMBi로 대체하였을 때 N efficiency (milk N / N intake)가 15% 증가하였고, milk urea nitrogen (MUN) 또한 27.5% 감소하였음.

#### (다) Lipid 또는 cellulose coating

- Arambel et al. (1987)의 연구에서 lipid로 코팅된 아미노산의 반추위 보호율이 72%였으나, lipid로 코팅할 경우 반추위 보호율과 반대로 반추위를 통과하고 난 후 4위 및 소장에서 아미노산이 방출되어 체내로 흡수되는 정도는 낮다고 하였음(Wu and Papas. 1997).
- Evonik사의 mepron이 대표적이며 Met과 전분을 Ethyl-cellulose와 stearic acid로 코팅한 완효성 제품임.
- Koenig and Rode (2001); Whitehouse et al. (2016)의 연구에서는 Mepron의 반추위 보호율은 78%, 생체이용율은 22~34%로 나타났으며 Berthiaume et al. (2000); Berthiaume et al. (2001)의 연구에서는 Mepron의 반추위 보호율은 66%, 생체이용률은 54%로 나타남.
- Nursoy et al. (2018) 연구에서는 15% CP (+10 g of mepron) 처리구에서 유단백이 증가하였으며 질소는 17% CP보다 낮게 배출되었음. 질소효율 또한 DM, OM, 섬유소 소화율에 관계없이 높게 나타났음.
- Blum et al. (1999)의 연구에서는 Mepron을 급여하였을 때 MUN의 함량은 급여 전보다 감소하였으나 유량 및 유성분(유지방, 유단백, lactose, 체세포수) 뿐만 아니라 사료섭취량, 생체중, BCS에도 유의적인 차이가 없었음.
- Batistel et al. (2017)의 연구에서는 분만직전에서 착유 초기동안 젖소에서 Mepron을 건물기준 0.09-0.10%를 급여하였을 때 착유 1-30일은 유단백이 0.16% 증가하였으며 유량이 가장 많이 생성되는 31-60일에 건물섭취량과 유량이 각각 1.45 kg, 4.4 kg 증가하였음. 또한 무처리구보다 처리구에서 유지방 및 유단백질 생성량이 각각 0.19, 0.17 kg/d 증가하였음.

#### (라) 결론

착유우에 있어 제1 제한 아미노산은 Met으로, Met을 보호하여 착유우의 질소 효율,

유량 및 유성분을 높이려는 연구들이 계속해서 진행되어 왔음(Arambel et al., 1987; Nursoy et al., 2018; Zhao et al., 2019). 현재 시판 중에 있는 RP-Met은 대부분 물리적인 방법을 통해 보호하였으며 화학적인 방법을 통해 보호한 제품은 HMBi 1건으로 알려짐. 보호율 및 생체이용성이 가장 높은 것으로 나타난 pH-sensitive polymer 코팅의 경우 물리적인 방법으로 열안정성이 떨어져 펠렛으로 사용하기 어려운 단점이 있음(Rulquin et al., 2006). 또한 Met 단독 급여보다 다른 필수아미노산과 함께 급여했을 때 유량 및 유성분이 증가한 보고가 있었음(Trínáctý et al., 2006; Robinson et al., 2010; Giallongo et al., 2016; Zhao et al., 2019). 본 과제에서 개발된 보호아미노산은 n-acetyl 유도체화 방법으로 NH<sub>2</sub>기에 acyl group 중 acetyl기를 첨가하여 화학적으로 변형한 방법임. N-acetyl-L-methionine이 반추위에서 보호되어 소장으로 넘어가게 되면 소장 내 aminoacylase에 의해 Met과 acetyl group으로 분해되어 이용됨(Endo, 1980). Windschitl and Stern (1988)의 연구에서 N-acetyl-DL-Met (N-Ac-Met), D, L-Met-hydantoic acid, methyl-thio-isobutyric acid 등 여러 유도체의 in vitro 반추위 보호율을 평가하였을 때 N-Ac-Met가 67%로 가장 높은 반추위 보호율을 보여주었으며 Digenis et al. (1974)의 연구에서도 in vitro 연구에서 N-Ac-Met의 반추위 안정성이 높았다고 하였음. 현재까지 NALM 급여를 통한 착유우의 생산성에 대한 연구는 HMBi보다 많이 진행되어 있지 않으며 앞선 문헌조사에서 기술하였듯이 시판 중인 보호 아미노산은 주로 Met으로 국한되어 있음. 일부 RP-Lys 제품들이 시중에 판매되고 있으며 tablet 형태의 RP-His (Zhao et al., 2019) 이나 RP-Phe (Swanepoel et al., 2015)로 실험한 논문들이 투고되어 있으나 현재 Met과 Lys 외의 보호 아미노산은 시판 중에 있지 않은 것으로 보여짐. 따라서 본 연구는 NALM을 포함한 그 외 유도체 필수아미노산들의 in vitro 반추위 발효성상 및 보호율을 비교하기 위해 수행하였음.

#### 나. 새로 개발된 NALM과 NALT의 in vitro 반추위 발효성상 조사 (연구 1)

##### (1) 연구목적

본 실험은 1세부과제를 통해 개발, 제형화한 아미노산 제제가 in vitro 반추위 발효성상에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행하였음.

##### (2) 재료 및 방법

- 실험 방법: Modified Tilley and Terry (1963)의 방법으로 수행(그림 68)

##### (가) 주요 재료

- 보호 아미노산(NALM, NALT), TMR(1 g)
- McDougall' s buffer, Buffered rumen fluid (buffer:rumen fluid=4:1)

표 47. 섬유질배합사료(total mixed ration)의 영양성분(% of dry matter)

Item	%
Dry matter	89.06
Organic matter	91.70

Crude protein	13.83
Ether extract	6.25
Neutral detergent fiber	35.81
Acid detergent fiber	17.76

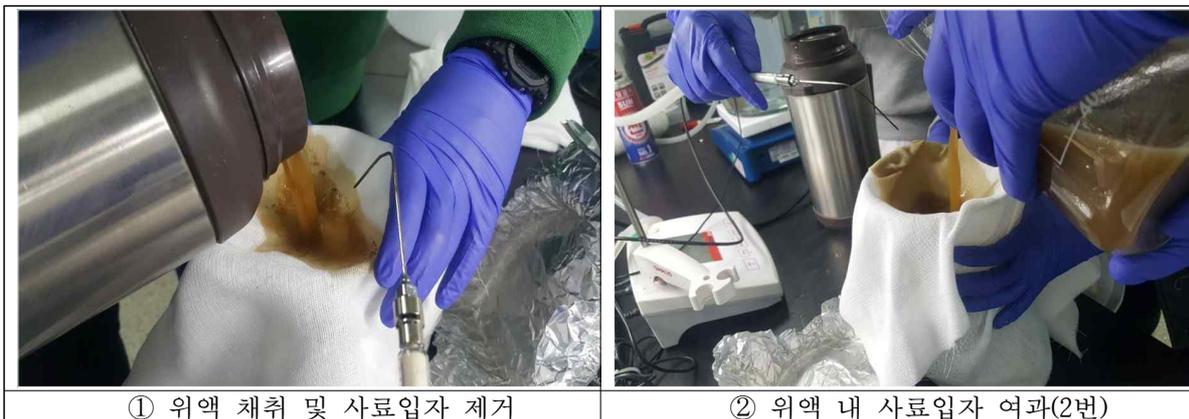
(나) 실험설계

- ① 대조구(보호 아미노산 무처리구), 처리구(보호 아미노산 처리구)
- ② 아미노산 종류와 첨가수준별(NALM 0.25%, 0.50%, NALT 0.25%, 0.50%) 비교
- ③ 배양시간: 0, 3, 6, 9, 24시간 배양
- ④ 처리구당 3반복으로 진행
- ⑤ 분석 항목
  - 가스발생량, pH, NH<sub>3</sub>-N, 휘발성 지방산(Volatile fatty acid, VFA)
  - 건물소화율(Dry matter digestibility, DMD)

표 48. McDougall' s buffer의 구성성분

Ingredients	Contents, g/L
NaHCO <sub>3</sub>	9.8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4.62 g
KCl	0.57 g
NaCl	0.47 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.12 g
CaCl <sub>2</sub> 4%	1 ml

(다) 실험 방법





③ 메스실린더로 양 측정



④ McDougall's buffer에 CO<sub>2</sub> bubbling



⑤ McDougall's buffer에 위액 첨가



⑥ 반추위액과 McDougall's buffer 혼합, pH조절



⑦ Inoculum 100 mL를 배양병에 첨가



⑧ CO<sub>2</sub>주입으로 혐기성 유지



⑨ Butyl rubber stopper로 동봉



⑩ Aluminum cap sealing

그림 69. 보호아미노산 첨가 in vitro 실험 과정

(라) 통계분석

- SPSS (version 23, IBM, USA) 프로그램을 이용하여 일반선형모형의 분산분석 진행
- Duncan의 분석방법을 통해 실험구간 평균을 비교
- 95% 유의수준으로 분석하였음

(3) 결과 및 고찰

NALM 첨가에 따른 건물소화율, NH<sub>3</sub>-N값의 결과는 표 48과 같음. 본 실험은 batch culture를 이용하였으나 batch culture를 이용한 보호아미노산 실험이 없어 continuous culture를 이용한 실험과 비교하였음. Ammonia-N은 배양 3시간부터 24시간까지 대조구와 처리구(NALM 0.25%, 0.50%)간의 유의적인 차이는 없었음. 건물소화율은 배양 24시간대에서 NALM 처리구에서 낮게(P<0.05) 나타났음. 화학적 방법으로 보호된 HMBi의 경우 OM, CP, NDF, ADF, NSC 등의 소화율에서 유의적인 차이를 보이지 않거나(Blake et al., 1986; Vazquez-Anon et al., 2001; Noftsker et al., 2003; Windschitl and Stern., 1988) 섬유소 소화율이 증가하였다고 보고되었으며(Patterson and Kung Jr. 1988) 건물소화율이 낮게 나온 보고는 없는 것으로 사료됨. Ammonia (NH<sub>3</sub>)-N의 농도는 대조구와 처리구간 유의적인 차이가 나타나지 않았는데 이는 보호 아미노산이 반추위 내에서 미생물에 의하여 분해되지 않았다는 것을 시사하는바 반추위 내 보호능력을 가지고 있다고 사료됨.

표 48. 보호 아미노산(NALM) 첨가 시 in vitro 건물소화율, ammonia-N 농도의 변화

Time	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALM 0.25%	NALM 0.50%		
Dry matter digestibility, %					
3 h	35.06	35.41	36.92	0.539	0.373
6 h	41.09	43.07	37.70	1.185	0.178
9 h	49.23	47.38	46.90	0.780	0.499
24 h	70.45 <sup>b</sup>	65.90 <sup>a</sup>	65.62 <sup>a</sup>	0.943	0.029
NH <sub>3</sub> -N, mg/100 ml					
3 h	1.91	1.97	2.01	0.033	0.501
6 h	1.05	1.02	1.28	0.095	0.544
9 h	0.76	0.82	0.76	0.020	0.408
24 h	1.95	1.91	1.74	0.086	0.621

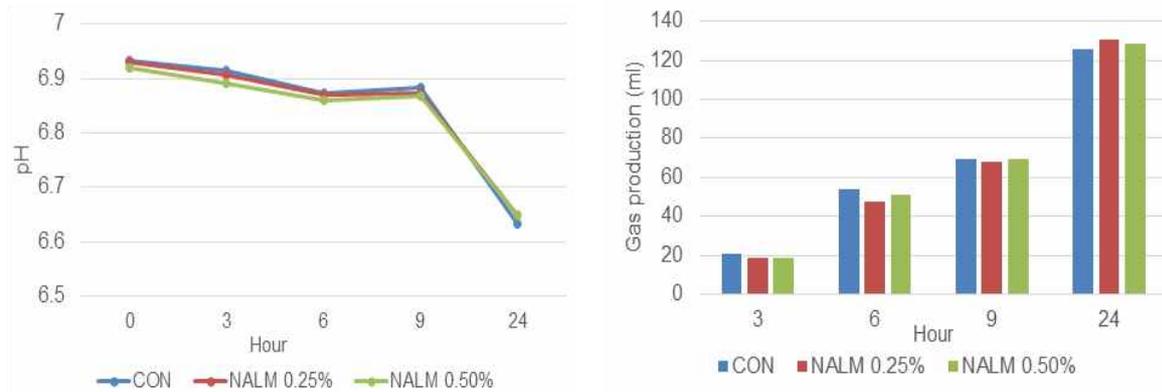


그림 70. 보호아미노산 NALM 첨가수준에 따른 in vitro 반추위 pH(좌)와 총 가스발생량(우)의 변화

반추위 발효특성에 있어서 배양시간에 따른 pH의 변화는 대조구와 처리구 간 거의 없었으며 시간이 경과함에 따라 소폭 감소하는 것으로 나타났음. 모든 실험구에서 안정적인 pH의 변화는 보호 아미노산의 첨가에도 불구하고 반추위 발효는 정상적으로 진행되었던 것으로 사료됨. In vitro 내 pH는 VFA의 생성에 의해 발효시간이 지남에 따라 감소하나 미생물의 성장에 적정 pH는 6.7-6.9라고 하였으며(Pigden et al., 1980; Ørskov, 2000) pH가 6.2 이하로 떨어지게 되면 섬유소 소화율이 감소한다고 하였음(Russell et al., 1992).

표 49는 NALM 첨가 시 in vitro 내 VFA 변화를 나타낸 표임. 총 전체 VFA 함량, acetate, propionate, butyrate, AP ratio는 모든 배양시간(3, 6, 9, 24시간)대에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며 valerate 또한 배양 3시간대에 유의적인 차이가 있었으나 3시간대를 제외한 모든 배양시간대에 유의적인 차이가 없었음. 이는 Noftsker et al. (2003)의 연구와 일치함. VFA는 단위동물과 달리 반추동물에게 70%의 에너지를 급여하는 지방산으로(Bergman, 1990) VFA 중에서도 acetate, propionate, butyrate의 함량이 대부분을 차지하는데(France and Dijkstra, 2005) 주요 VFA의 함량이 대조구와 비교해 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 보아 발효성상에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨.

표 49. 보호 아미노산(NALM) 첨가 시 in vitro 휘발성 지방산 농도의 변화

Time	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALM 0.25%	NALM 0.50%		
<b>Total VFA, mM</b>					
3 h	11.70 <sup>b</sup>	16.47 <sup>a</sup>	17.85 <sup>a</sup>	1.064	0.013
6 h	25.67	25.69	25.22	0.374	0.879
9 h	31.52	31.26	32.01	0.480	0.850
24 h	57.12	59.29	48.46	2.716	0.249
<b>Acetate, % of total VFA</b>					
3 h	74.14	74.66	75.65	0.352	0.219
6 h	72.25	72.81	71.73	0.240	0.191
9 h	68.41	67.98	68.47	0.238	0.718
24 h	61.85	62.26	62.52	0.330	0.762

Propionate, % of total VFA					
3 h	13.01	12.85	12.62	0.184	0.742
6 h	15.82	15.62	15.84	0.097	0.647
9 h	20.55	20.61	20.52	0.311	0.969
24 h	27.35	27.08	26.95	0.241	0.832
Butyrate, % of total VFA					
3 h	10.21	10.00	9.61	0.154	0.315
6 h	10.09	9.70	10.46	0.146	0.082
9 h	9.41	9.71	9.35	0.073	0.445
24 h	8.85	8.79	8.66	0.122	0.682
Valerate, % of total VFA					
3 h	1.10 <sup>a</sup>	1.03 <sup>ab</sup>	0.90 <sup>b</sup>	0.008	0.032
6 h	0.73	0.73	0.79	0.019	0.401
9 h	0.6	0.63	0.6	0.012	0.544
24 h	0.63	0.60	0.61	0.007	0.413
A/P ratio					
3 h	5.72	5.81	6.01	0.109	0.603
6 h	4.57	4.67	4.53	0.041	0.434
9 h	3.33	3.30	3.34	0.031	0.894
24 h	2.26	2.30	2.32	0.032	0.778

NALT 첨가급여에 따른 건물소화율 및 NH<sub>3</sub>-N의 결과는 표 50에 나타내었음. 건물소화율 및 NH<sub>3</sub>-N 농도 모두 실험 1과 유사한 경향을 보였는데, 실험구간 유의성이 나타나지 않았으며 이러한 결과는 보호 아미노산의 첨가 시에도 반추위 발효성상에 크게 영향을 미치지 않는다는 것을 제시하는 결과로 판단됨. Ammonia (NH<sub>3</sub>)-N 농도는 5 mg/100 ml로(Satter and Slyter, 1974) 본 실험의 결과에서 조단백질의 함량이 13%인 TMR 사료를 기질로 사용했음에도 NH<sub>3</sub>-N의 농도는 매우 낮게 나타난 것(0.76-1.95 mg/100 ml)으로 보아 반추위 내 질소사용이 제한된 것으로 사료됨.

표 50. 보호 아미노산(NALT) 첨가 시 in vitro 건물소화율, ammonia-N 농도 변화

Time	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALT 0.25%	NALT 0.50%		
Dry matter digestibility, %					
3	35.06	37.45	35.83	0.695	0.410
6	41.09	42.55	40.83	0.922	0.769
9	49.23	46.40	48.37	0.935	0.511
24	70.45	66.75	68.33	0.882	0.250
NH <sub>3</sub> -N, mg/100 ml					
3	1.91	1.95	2.19	0.074	0.278
6	1.05	1.06	1.05	0.015	0.941
9	0.76	0.74	0.71	0.015	0.411

반추위 내 대조구와 처리구 NALT 0.25%와 0.50%의 pH측정 결과 배양시간이 지남에 따라 대조구와 처리구의 pH가 비슷하게 감소하는 경향을 나타냄(그림 70).

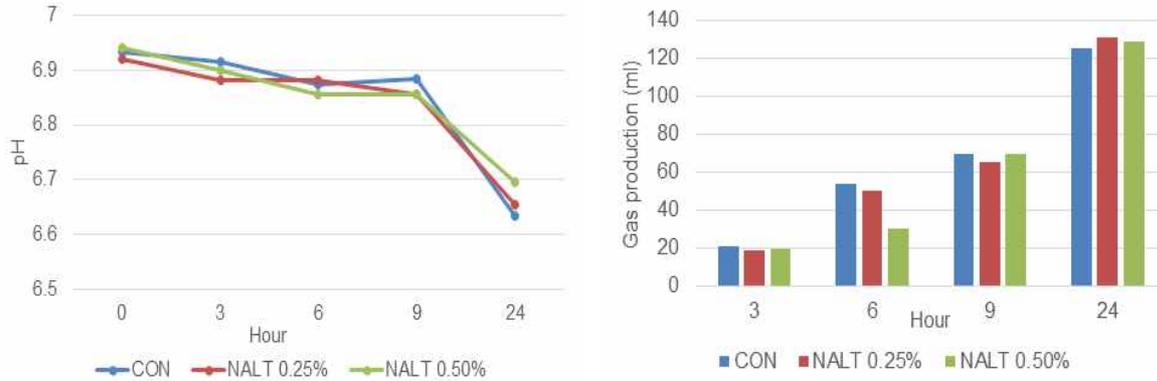


그림 71. 보호 아미노산 NALT 첨가수준에 따른 in vitro 반추위 pH(좌)와 총 가스발생량(우)의 변화

총 전체 VFA함량, butyrate, valerate, AP ratio는 모든 배양시간(3, 6, 9, 24시간)대에서 유의적인 차이를 보이지 않았음. 배양 9시간대에 acetate는 대조구에서 NALT 0.25%와 유의적인 차이가 없었으나 NALT 0.50%보다 유의적으로 높게 관찰되었음( $P < 0.05$ ). Propionate 또한 배양 9시간대에 유의적인 차이를 보였으며 NALT 0.50%에서 가장 높게 나타났음( $P < 0.05$ ). 그러나 배양 9시간대를 제외한 모든 배양시간대에 acetate와 propionate 함량 또한 유의적인 차이를 보이지 않았음. VFA는 단위동물과 달리 반추동물에게 70%의 에너지를 급여하는 지방산으로 (Bergman, 1990) VFA 중에서도 acetate, propionate, butyrate의 함량이 대부분을 차지하는데 (France and Dijkstra, 2005) 주요 VFA의 함량이 대조구와 비교해 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 보아 NALT 또한 발효성상에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨.

표 51. 보호아미노산(NALT) 첨가 시 in vitro 휘발성 지방산 농도 변화

Time	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALT 0.25%	NALT 0.50%		
Total VFA, mM					
3 h	11.70	14.31	14.72	1.056	0.512
6 h	25.67	21.26	19.79	1.823	0.448
9 h	31.52	33.04	32.14	0.701	0.733
24 h	57.12	55.66	49.83	1.472	0.078
Acetate, % of total VFA					
3 h	74.14	74.35	75.26	0.287	0.259
6 h	72.25	73.00	74.03	0.534	0.451
9 h	68.41 <sup>a</sup>	67.94 <sup>a</sup>	66.71 <sup>b</sup>	0.294	0.016
24 h	61.85	61.40	62.18	0.228	0.431
Propionate, % of total VFA					

3 h	13.01	12.89	12.68	0.151	0.725
6 h	15.82	15.45	15.05	0.266	0.563
9 h	20.55 <sup>b</sup>	20.94 <sup>b</sup>	21.72 <sup>a</sup>	0.204	0.025
24 h	27.35	27.49	26.93	0.167	0.421
Butyrate, % of total VFA					
3 h	10.21	10.18	9.99	0.124	0.776
6 h	10.09	9.75	9.26	0.215	0.323
9 h	9.41	9.52	9.86	0.098	0.159
24 h	8.85	9.08	8.91	0.061	0.338
Valerate, % of total VFA					
3 h	1.10	1.08	0.97	0.038	0.376
6 h	0.73	0.71	0.70	0.018	0.791
9 h	0.60	0.58	0.61	0.012	0.570
24 h	0.63	0.65	0.63	0.008	0.480
A/P ratio					
3 h	5.72	5.77	5.93	0.087	0.636
6 h	4.57	4.74	4.94	0.122	0.522
9 h	3.33 <sup>a</sup>	3.24 <sup>a</sup>	3.07 <sup>b</sup>	0.044	0.016
24 h	2.26	2.23	2.31	0.022	0.408

#### 다. 시판 중인 보호 아미노산과의 발효성상 및 보호율 비교 (연구 2)

##### (1) 연구목적

본 실험은 주관기관에서 개발된 보호 아미노산과 시판 중인 보호 아미노산의 보호율 및 in vitro 반추위 발효성상을 비교하기 위해 수행하였음. 시판 중인 보호 아미노산의 경우 2018년 10월경에 시판 중인 제품을 조사하였을 때, B사에서 개발된 보호 라이신은 국내에 수입이 되지 않았고, 2020년 1월경에 C사에 연락을 하였을 때 pH sensitive polymer로 코팅된 제품 또한 현재 국내에서 수요가 많지 않아 수입되지 않은 것으로 확인되었음. 본 과제의 보호 아미노산과 같이 화학적 방법으로 개발된 HMBi는 실험을 위한 시료로 구매할 때, 실험에 관한 결과들을 모두 제공해야 한다고 하였으나, 본 과제에서 개발된 보호 아미노산은 시제품 단계이기 때문에 실험에 대한 정보를 제공하기에 어려움이 있어서, A사의 보호 아미노산만을 이용하여 실험을 수행하였음.

##### (2) 재료 및 방법 (Tilley and Terry (1963)의 방법을 기본으로 수행)

###### (가) 주요 재료

- NALM, A사 RP-Met (lipid 코팅), L-Met, Timothy, 착유우용 농후사료
- rumen inoculum (rumen fluid:McDougall' s buffer=1:4)

표 52. 실험사료의 영양성분(% of dry matter)

Item	Concentrate	Timothy	NALM	A사 RP-Met
Dry matter, %	92.53	93.60	99.97	99.51

Organic matter	92.14	93.19	99.71	99.40
Crude protein	20.38	7.99	76.17	54.82
Ether extract	4.03	4.00	-	-
Neutral detergent fiber	38.67	65.01	-	-
Acid detergent fiber	19.35	38.18	-	-

(나) 실험설계

- ① 대조구: 보호 아미노산 무첨가구, 처리구1: NALM 첨가, 처리구2: 시판중인 RP-Met 첨가, 처리구3: L-Met 첨가
- ② 첨가제는 기질사료의 0.25% 첨가
- ③ 배양시간: 0, 6, 24시간
- ④ 처리구당 3반복으로 진행하였으며 5 ml씩 syringe로 채취하여 pH 측정 후 NH<sub>3</sub>-N, VFA 측정을 위해 1 ml씩 eppendorf tube에 옮겨 담음.
- ⑤ 채취가 끝난 즉시 냉동하여 발효정지 시킨 후 구성아미노산 분석용 동결건조 진행
- ⑥ 분석항목: 가스발생량, pH, NH<sub>3</sub>-N, VFA, 구성아미노산

(다) 실험 방법:

- ① Timothy와 농후사료를 각각 0.6 g과 0.4 g 총 1g을 125 ml serum bottle에 담음
- ② 경북대학교 부속목장에서 한우 암소 2두의 위액을 stomach tube를 이용하여 채취 후, 즉시 보온병에 담아 실험실로 운반
- ③ 미리 준비된 buffer의 pH 및 온도를 맞춘 후 채취한 위액을 4점의 muslin으로 2번 여과
- ④ Rumen fluid와 McDougall' s buffer 1:4로 혼합한 후 처리구별 배양병에 100 ml 주입
- ⑤ Rubber stopper와 aluminium cap으로 밀봉 후 0, 6, 24시간 동안 39°C에서 배양
- ⑥ 가스발생량은 glass syringe와 gas transition을 이용하여 6, 12, 24시간에 측정함
- ⑦ pH 측정: 배양이 끝난 serum bottle를 개봉한 후 syringe로 5 ml 채취하여 pH meter (SevenCompact, METTLER TOLEDO, USA)로 측정
- ⑧ NH<sub>3</sub>-N 분석: Chaney and Marbach (1962) 방법으로 분석
  - Rumen inoculum 1 ml에 0.2 N HCl 1 ml를 혼합 후 다음 분석까지 -20°C에서 냉동
  - 해동 후 원심분리기로 10,000 rpm으로 10분간 원심분리
  - 상층액 20 µl를 15 ml assay tube에 옮긴 후 phenol color reagent (phenol 50 g, sodium nitroferricyanide dehydrate 0.25 g/L) 1 ml와 alkali-hypochlorite reagent (NaOH 25 g, Sodium hypochlorite 16.8 ml/L) 1 ml를 혼합한 후 30분간 실온에 정치함
  - Spectrophotometer (Optizen pop, Korea)를 이용하여 630 nm 파장으로 분석
- ⑨ 휘발성 지방산 분석: Erwin et al (1961) 방법으로 분석
  - Rumen inoculum 1 ml에 25% metaphosphoric acid (Wako, Japan) 0.2 ml 혼합하여 4°C에서 30분간 정치한 후 다음 분석까지 -20°C에서 냉동
  - 해동한 배양액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 syringe로 상층액을 분리

- 분석용 vial에 0.45 µm syringe filter (RjN1345NH, Reophile, China)로 여과
- Gas Chromatography 컬럼: BR-Wax fame (BR87503, Germany)
- 표준 용액: volatile fatty acid standard solution (Sigma-Aldrich, 46975-U, USA)
- Injector 및 detector (FID, Flame Ionization Detector) 온도: 250°C, 오븐 온도: 100°C
- 질소, 수소, 고순도 에어의 유속: 각각 29 ml/min, 30 ml/min, 300 ml/min

(라) 통계분석: SPSS (version 25, IBM, USA) 프로그램을 이용하여 일반선형모형의 분산분석을 통해 가설검정을 수행하였으며 Duncan의 분석방법을 통해 95% 유의수준으로 분석하였음

### (3) 결과 및 고찰

본 비교 실험은 현재 개발 중인 보호 아미노산의 보안 문제로 시판 중인 보호 아미노산을 구하는데 어려움이 있어 보호아미노산 1제품만 비교하였음. A사의 RP-Met은 lipid matrix 즉, 물리적인 방법으로 보호한 아미노산 제품임. CP 함량이 NALM과 비교하여 타사 RP-Met은 54.82%와 NALM 76.17%로 현저하게 차이를 보임. 이처럼 Lipid matrix의 경우 지방함량 때문에 유효적재량이 낮은 단점이 있음(Casper et al., 1987).

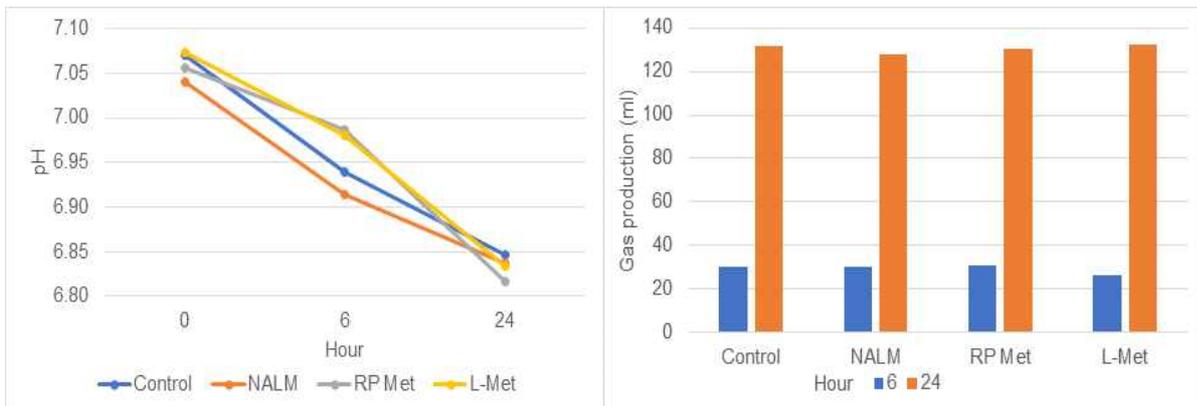


그림 72. 시판 중인 보호 아미노산과 in vitro 반추위내 발효성상 비교 (pH(좌)와 총 가스발생량(우)); RP-Met은 시판 중인 A사의 보호 아미노산

대조구와 NALM, 그리고 시판 중인 A사 보호 아미노산(RP-Met), L-Met을 비교하였을 때 시간대별 실험구간 pH와 가스발생량에는 유의적인 차이는 없었음.

Ammonia (NH<sub>3</sub>)-N의 농도는 6시간과 24시간 모든 배양시간대에 유의적인 차이를 보이지 않았음(표 53). 본 실험은 L-Met 처리구에서 보호Met 처리구들보다 NH<sub>3</sub>-N의 농도가 더 높을 것이라고 예상했었으나 유의적인 차이를 보이지 않았음. Noftsker et al. (2003)의 연구에서도 HMBi를 0%, 0.055%, 0.110%, dl-Met 처리구로 나눠 in vitro 실험 결과의 발효성상을 관찰하였을 때 NH<sub>3</sub>-N의 농도는 실험구간 유의적인 차이를 보이지 않았으며 본 실험의 결과와 일치하였음. 표 53의 데이터만으로는 분해정도를 판단하기가 어려우며

구성아미노산 분석을 통해 보호율을 확인해야 할 것으로 사료됨.

표 53. 시판 중인 보호 아미노산과 ammonia-N의 비교

Time (h)	Treatment				SEM	P-value
	Control	NALM 0.25%	RP-Met 0.25%	L-Met		
NH <sub>3</sub> -N, mg/100 ml						
6	3.06	2.90	3.03	2.72	0.065	0.242
24	1.89	1.93	1.97	1.90	0.039	0.906

RP-Met은 시판 중인 A사의 보호 아미노산

총 휘발성 지방산 생성량은 시간대별 유의적인 차이를 보이지 않았으며 acetate, butyrate, valerate, A/P ratio에서도 유의적인 차이를 보이지 않았음(표 54). Propionate의 경우 배양 6시간대에 L-Met과 NALM 0.25% 처리구에서 가장 높게 나타났으나 A/P ratio는 유의적인 차이는 없었음. Noftsgger et al. (2003)의 연구에서는 본 실험과 반대로 acetate 함량은 L-Met이 유의적으로 높았으나 propionate가 유의적인 차이를 보이지 않았음. VFA 중 acetate의 증가는 유량 및 유지방을 증가시키고 butyrate의 증가는 유지방에 긍정적인 영향을 미치며 propionate의 경우 유지방보다 유단백에 긍정적인 영향을 준다고 하였음(Dijkstra, 1994).

표 54. 시판 중인 보호 아미노산과 휘발성 지방산 비교

Time	Treatment				SEM	P-value
	Control	NALM 0.25%	RP-Met 0.25%	L-Met 0.25%		
Total VFA, mM						
6 h	27.60	28.83	27.65	29.30	0.437	0.470
24 h	55.88	54.43	53.01	53.05	0.736	0.521
Acetate, % of total VFA						
6 h	71.32	71.32	71.78	71.45	0.105	0.388
24 h	66.36	66.56	66.71	66.46	0.153	0.900
Propionate, % of total VFA						
6 h	18.33 <sup>b</sup>	18.55 <sup>ab</sup>	18.26 <sup>b</sup>	18.66 <sup>a</sup>	0.063	0.050
24 h	24.02	23.75	23.48	23.92	0.111	0.366
Butyrate, % of total VFA						
6 h	7.78	7.73	7.71	7.70	0.027	0.791
24 h	7.24	7.32	7.37	7.25	0.059	0.892
Valerate, % of total VFA						
6 h	1.02 <sup>a</sup>	0.95 <sup>ab</sup>	0.90 <sup>b</sup>	0.87 <sup>b</sup>	0.020	0.013
24 h	0.82	0.82	0.84	0.81	0.011	0.886
A/P ratio						
6 h	3.89	3.85	3.93	3.83	0.018	0.142
24 h	2.76	2.80	2.84	2.78	0.019	0.542

RP-Met은 시판 중인 A사의 보호 아미노산

라. 보호 아미노산 첨가가 반추위 발효성상에 미치는 영향 (연구 3)

(1) 연구목적

본 실험은 NALM 및 NALT가 in vitro 반추위 발효성상에 미치는 영향과 반추위 내 보호율을 평가하기 위해 수행하였음.

(2) 재료 및 방법

- 실험방법은 Tilley and Terry, (1963)의 방법을 기본으로 하여 수행

(가) 주요 재료: 보호 아미노산 2종(NALT, NALM), rumen inoculum (rumen fluid:McDougall's buffer=1:4), timothy 0.6 g과 착유우용 농후사료 0.4 g

표 55. 실험사료의 영양성분(% of dry matter)

Item	Concentrate	Timothy
Dry matter, %	92.53	92.98
Organic matter	92.14	90.13
Crude protein	20.38	9.76
Ether extract	4.03	0.93
Neutral detergent fiber	38.67	71.14
Acid detergent fiber	19.35	42.59

(나) 실험 설계

- ① 대조구(보호 아미노산 무첨가구), 처리구(보호 아미노산 2종)
- ② NALM 0.25%, 0.50%, NALM 0.25%, 0.50%로 첨가하여 비교
- ③ 배양시간: 0, 3, 6, 12, 24시간
- ④ 처리구당 5반복으로 진행하였으며, 5반복 중 2반복은 구성아미노산 분석 및 미생물 군집 분석을 위해 발효가 종료됨과 동시에 냉동한 후 동결건조 처리
- ⑤ 5반복 중 3반복은 in vitro 발효성상(가스발생량, 건물소화율, NH<sub>3</sub>-N, VFA등) 분석
- ⑥ 분석항목
  - 가스발생량, pH, NH<sub>3</sub>-N, VFA, 건물소화율(Dry matter digestibility), 아미노산

(다) 실험 방법:

- ① Rumen inoculum 제조: rumen fluid와 McDougall' s buffer 1:4로 혼합
  - 처리구별 serum bottle에 rumen inoculum 100 ml 주입 후 동봉하여 배양
- ② 가스발생량 측정: 3시간마다 gas transition 및 glass syringe로 측정
- ③ 건물소화율 계산: 배양이 끝난 serum bottle의 시료를 nylon bag에 모두 옮겨 담은 후 증류수로 세척하여 105℃의 온도로 24시간 건조, 건조가 끝난 시료는 30분 이상 방랭하여 무게 측정 후 건물소화율 계산

$$\text{건물소화율(\%)} = 100 - \left( \frac{\text{건조 후 무게 } DM, g - \text{nylon bag 무게 } DM, g}{\text{시료 무게 } DM, g} \right) \times 100$$

- ④ pH 측정: pH meter (Thermo Sci, Korea)로 nylon bag (Nylon bag ANKOM Technology, USA, pore size 50 μm)에 거른 후 nylon bag의 pore로 빠져나온 배양액의 pH 측정
- ⑤ NH<sub>3</sub>-N 분석: Chaney and Marbach (1962) 방법으로 분석
  - 배양액을 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액만 분리
  - 분리한 상층액 20 μl, phenol color reagent (phenol 50 g, sodium nitroferricyanide dehydrate 0.25 g/L) 1 ml, alkali-hypochlorite reagent (NaOH 25 g, Sodium hypochlorite 16.8 ml/L) 1 ml를 혼합 후 30분간 정치

- 정치가 끝난 배양액은 일회용 큐벳(Ratiolab cuvette, Germany)에 옮겨 담은 후 분광광도계(Optizen pop, Korea)를 이용해 630 nm 파장으로 NH<sub>3</sub>-N분석
- ⑥ 휘발성 지방산 분석: Erwin et al (1961) 방법으로 분석
  - 25% metaphosphoric acid (Wako, Japan) 0.2 ml가 첨가된 배양액에 10000 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액만 분리
  - 1 ml syringe로 상층액을 옮긴 후 분석용 vial에 0.45 μm syringe filter (Rephile, RjN1345NH, China)로 여과
  - Gas Chromatography 컬럼: BR-Wax fame (BR87503, Germany)
  - 표준 용액: volatile fatty acid standard solution (Sigma-Aldrich, 46975-U, USA)
  - Injector 및 detector (FID, Flame Ionization Detector) 온도: 250°C, 오븐 온도: 100°C
  - 질소, 수소, 고순도 에어의 유속: 각각 29 ml/min, 30 ml/min, 300 ml/min
- ⑦ 유리아미노산 분석
  - 유리아미노산 분석은 경북대학교 대구캠퍼스 공동실험실습관에서 분석 의뢰함
  - 배양액을 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 상층액만 분리
  - 상층액 1 ml에 0.2M lithium citrate loading buffer 5 ml 혼합 후 분석용 vial에 0.45 μm syringe filter (Rephile, RjN1345NH, China)로 여과(전처리)
  - High Performance Liquid Chromatography 컬럼: Ion exchange
  - 표준 용액: Type ANII, Type B (Wako, Japan) 혼합사용
  - Pump: 기압 0~19.6 Mpa, Flow Rate 0.05~0.99 ml/min
  - Injector volume: 20 μl, Detector 파장: 570 nm, 440 nm

(라) 통계분석: SPSS (version 25, IBM, USA) 프로그램을 이용하여 일반선형모형의 분산분석을 통해 가설검정을 수행하였으며 Duncan의 분석방법을 통해 평균간의 비교를 수행하였음.

### (3) 결과 및 고찰

NALT 첨가수준에 따른 배양 시간대별 pH와 가스발생량의 변화는 그림 73과 같음. pH는 배양 3시간대를 제외한 모든 시간대에서 대조구보다 NALT 처리구에서 높게 나왔으며(P<0.05), 특히 NALT 0.25%보다 0.50%의 처리구의 pH가 더 높은 경향을 나타내었음. 가스발생량은 배양 12시간대에 NALT 0.50% 처리구보다 대조구와 NALT 0.25% 처리구에서 더 높게 나왔으나(P<0.05), 배양 3, 6, 24시간대의 가스발생량은 실험구간 유의적인 차이는 없었음.

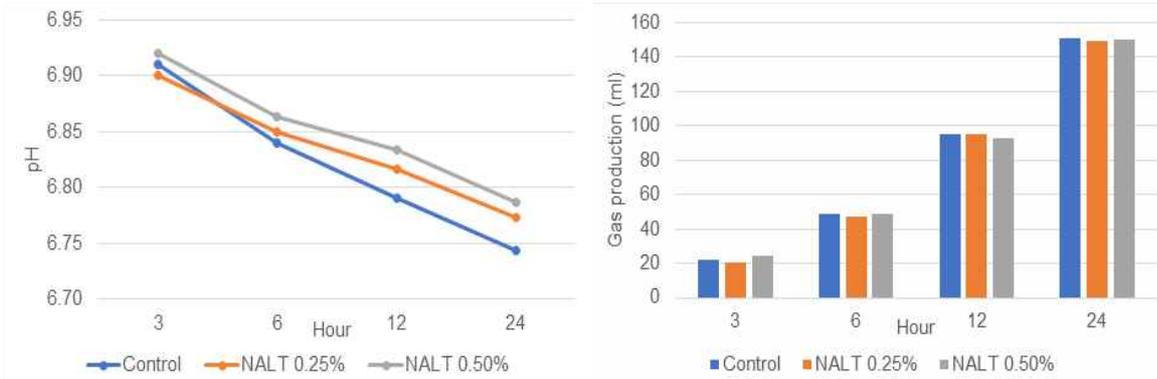


그림 73. NALT 첨가 수준에 따른 pH 및 가스발생량 변화

NALT 첨가수준에 따른  $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 결과 및 건물소화율은 표 56과 같음. 전체 배양시간대에서 6시간과 12시간에 유의적 차이를 보였음( $P < 0.05$ ). 두 시간대 모두 대조구와 NALT 0.25%에서 유의적 차이는 없었으나, NALT의 농도가 높아진 0.50%대에서 유의적인 차이를 보였음. Abbasi et al., (2018)에 따르면,  $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 농도는 4.45~5.78 mg/100 ml로, 본 실험의  $\text{NH}_3\text{-N}$ 보다 높은 값을 나타내었는데 이는 McDougall buffer 내 반추위 미생물들이 이용할 수 있는 질소원이 부족하여  $\text{NH}_3\text{-N}$ 이 낮게 나타난 것으로 사료됨(Russell, 2006).

건물소화율은 모든 배양시간대에 유의적인 차이는 없었음. Tryptophan은 serotonin과 melatonin을 합성하는 아미노산임. 동물 체내에서 melatonin은 주로 pineal gland와 내장 조직에서 합성되며(Zhao et al., 2019) 위, 내장, 이자에서 melatonin 수용체가 존재함(Peschke et al., 2000). tryptophan과 melatonin은 cholecystokinin (CCK) 방출을 자극하여 췌장 내  $\alpha$ -amylase 분비가 촉진되어(Leja-Szpak et al., 2004) 전분소화율이 증가한다고 보고됨(Lee et al., 2020). 6시간대를 제외한 모든 시간대에서는 실험구간 유의적인 차이는 없었으며 NALT가 in vitro 건물소화율에 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨.

표 56. NALT 첨가수준에 따른  $\text{NH}_3\text{-N}$ 와 건물소화율(dry matter digestibility)에 미치는 영향

Time	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALT 0.25%	NALT 0.50%		
<b><math>\text{NH}_3\text{-N}</math>, mg/100 ml</b>					
3 h	1.80	1.77	1.91	0.034	0.203
6 h	1.83 <sup>b</sup>	1.92 <sup>b</sup>	2.19 <sup>a</sup>	0.058	0.003
12 h	2.52	2.49	2.43	0.089	0.930
24 h	3.76 <sup>b</sup>	3.56 <sup>b</sup>	4.31 <sup>a</sup>	0.124	0.007
<b>Dry matter digestibility, %</b>					
3 h	34.99	33.54	34.14	1.127	0.899
6 h	32.21	35.22	33.01	0.879	0.402

12 h	49.41	53.47	51.55	0.793	0.093
24 h	66.78	66.01	65.72	0.428	0.645

총 휘발성 지방산 농도는 모든 실험구에서 배양시간이 지날수록 증가하였으며, 실험구간 유의적인 차이는 없었음. Propionate는 3시간대에 유의적인 차이를 보였으나(P<0.05), 3시간대를 제외한 모든 시간대에서는 유의적인 차이는 없었음. Acetate 또한 모든 배양시간대에 유의적인 차이는 없었음. France and Dijkstra (2005)에 따르면, 휘발성 지방산의 적정 농도는 70-130 mM이며, acetate, propionate, butyrate 비율이 각각 70%, 20%, 10%라고 하였음. 배양 24시간대에 실험구의 전체 휘발성 지방산의 농도는 73.46~83.62 mM, 전체 휘발성 지방산 중 acetate가 차지하는 비율은 약 65%~75%, propionate가 차지하는 비율은 약 15%~20%, butyrate가 차지하는 비율은 약 9%~11%정도로 France and Dijkstra (2005)의 적정범위 내에서 생성되었음.

표 57. NALT 첨가 수준에 따른 휘발성 지방산에 미치는 영향

Time	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALT 0.25%	NALT 0.50%		
Total VFA, mM					
3 h	36.51	39.30	34.66	1.097	0.239
6 h	64.24	65.76	65.81	1.139	0.855
12 h	42.79	40.98	41.02	3.026	0.971
24 h	73.46	83.62	76.74	3.285	0.497
Acetate, % of total VFA					
3 h	74.41	81.48	73.74	2.230	0.331
6 h	66.13	68.19	68.37	1.279	0.780
12 h	57.86	55.45	55.40	4.307	0.974
24 h	60.19	69.17	63.91	2.906	0.510
Propionate, % of total VFA					
3 h	15.19 <sup>ab</sup>	16.08 <sup>a</sup>	13.06 <sup>b</sup>	0.617	0.047
6 h	18.00	18.30	18.32	0.913	0.913
12 h	14.25	13.59	13.82	0.971	0.971
24 h	17.96	20.71	18.27	0.802	0.353
Butyrate, % of total VFA					
3 h	11.29	11.27	9.50	0.448	0.178
6 h	11.78	11.81	11.66	0.156	0.938
12 h	9.10	8.83	8.64	0.545	0.957
24 h	10.60	11.47	10.95	0.356	0.671
Valerate, % of total VFA					
3 h	0.68	0.63	0.52	0.029	0.157
6 h	0.71	0.69	0.69	0.672	0.672
12 h	0.58	0.52	0.53	0.033	0.805
24 h	0.88	0.89	0.84	0.023	0.760

A/P ratio					
3 h	4.89 <sup>b</sup>	5.07 <sup>b</sup>	5.67 <sup>a</sup>	0.144	0.038
6 h	3.67	3.72	3.73	0.018	0.468
12 h	4.05	4.10	3.99	0.097	0.922
24 h	3.35	3.33	3.50	0.043	0.236

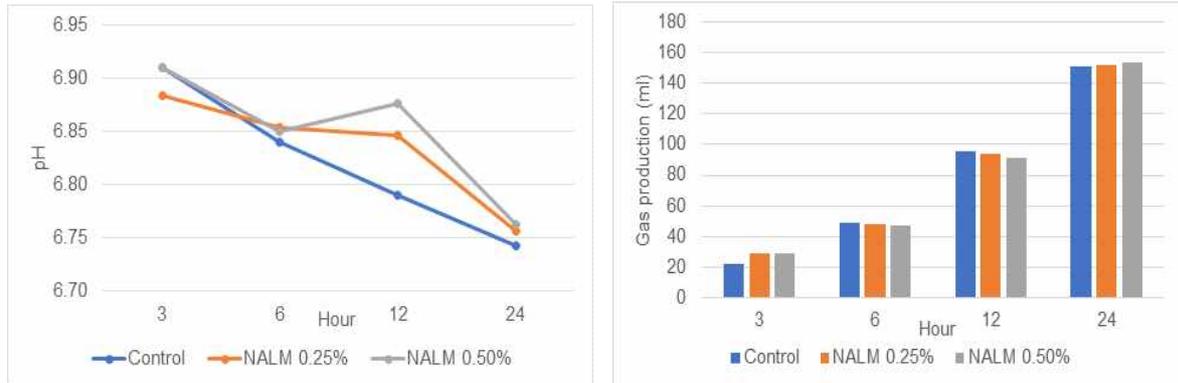


그림 74. NALM 첨가 수준에 따른 pH 및 가스발생량 변화

NALM 첨가 수준에 따른 배양시간대별 pH와 가스발생량의 변화는 그림 74와 같음. 배양 12시간대의 pH는 NALM을 첨가한 처리구가 대조구보다 유의적으로 높게 나왔음( $P < 0.05$ ). 배양 12시간대를 제외한 모든 배양시간대(3, 6, 24시간)에서는 실험구별 유의적인 차이는 없었음. 가스발생량은 배양 12시간대에 대조구에서 가스발생량이 NALM처리구보다 유의적으로 높게 나왔으며( $P < 0.05$ ), 배양 12시간대를 제외한 모든 배양시간대(3, 6, 24시간)의 가스발생량은 유의적인 차이는 없었음. 배양 12시간대 결과를 비교하면, 가스발생량이 가장 높게 나왔던 대조구의 pH는 가장 낮게 측정되었으며 건물소화율 또한 NALM 처리구에서 증가하는 경향을 보임. 반추위 발효성상에서 pH와 가스발생량, 건물소화율 간에는 상관관계가 존재하는 데 배양 12시간대 pH와 가스발생량, 건물소화율의 결과가 일치하였음(Pigden et al., 1980; Blu and Ørskov, 1993; Doane et al., 1997).

NALM 첨가 수준에 따른  $\text{NH}_3\text{-N}$ 의 결과 및 건물 소화율은 표 58과 같음.  $\text{NH}_3\text{-N}$  결과는 배양 12시간대를 제외한 모든 배양시간대(3, 6, 24시간)에서 NALM 처리구가 대조구보다 높게 나타났음( $P < 0.05$ ). Methionine의 경우 황(Sulfur)을 함유한 아미노산으로 반추위 내에서 황은 섬유소 소화율을 향상시킨다고 하였으며(Kahlon et al., 1975) 건물소화율 또한 향상시킨다는 보고가 있음(Morrison et al., 1990; Supapong et al., 2019). 이와 유사하게 본 실험 결과에서는 건물소화율의 경우 배양 12시간대에 대조구보다 NALM의 처리구에서 높은 경향을 나타내었으며 12시간대를 제외한 모든 배양시간대에서 실험구간 유의적인 차이를 보이지 않았음. 이는 미생물체 단백질 합성을 높이기 위해서는 N:S ratio가 18.5:1로 충족되어야 하는데(Harrison and McAllan, 1980) 이를 충족하지 못하는 것으로 사료됨. 대조구와 비교하여 유의적인 차이는 없는 것으로 보아 NALM 또한 in vitro 반추위 발효성상에 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨.

표 58. NALM 첨가 수준에 따른  $\text{NH}_3\text{-N}$ 와 건물소화율(dry matter digestibility)에 미치는 영향

Time	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALM 0.25%	NALM 0.50%		
NH <sub>3</sub> -N, mg/100 ml					
3 h	1.80 <sup>b</sup>	2.06 <sup>a</sup>	2.18 <sup>a</sup>	0.045	0.001
6 h	1.83 <sup>c</sup>	2.27 <sup>a</sup>	2.18 <sup>b</sup>	0.068	0.000
12 h	2.52	2.40	2.58	0.094	0.771
24 h	3.76 <sup>b</sup>	4.28 <sup>b</sup>	4.96 <sup>a</sup>	0.190	0.004
Dry matter digestibility, %					
3 h	34.99	33.54	34.14	1.127	0.899
6 h	32.21	35.22	33.01	0.879	0.402
12 h	49.41	53.47	51.55	0.793	0.093
24 h	66.78	66.01	65.72	0.428	0.645

NALM 첨가 수준에 따른 전체 휘발성 지방산 농도는 NALT와 같이 모든 실험구에서 배양시간이 지날수록 증가하였으며, 실험구간 유의적인 차이는 없었음. 또한 실험구간 acetate, propionate, butyrate 농도에서 유의적인 차이는 없었음. 배양 24시간대에 실험구의 전체 휘발성 지방산의 농도는 73.46~86.51 mM으로 적정 농도(70-130 mM)로 생성되었으며, 전체 휘발성 지방산 중 acetate가 차지하는 비율은 약 65%~75%, propionate가 차지하는 비율은 약13%~19%, butyrate가 차지하는 비율은 약 9%~11% 정도로 적정범위에서 생성되었음.

표 59. NALM 첨가 수준에 따른 휘발성 지방산에 미치는 영향

Time	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALM 0.25%	NALM 0.50%		
Total VFA, mM					
3 h	36.51	39.68	37.86	1.564	0.764
6 h	64.24	63.78	69.82	1.897	0.403
12 h	42.79	49.28	43.83	2.214	0.500
24 h	73.46	83.62	76.74	3.285	0.497
Acetate, % of total VFA					
3 h	74.41	83.70	81.66	3.504	0.590
6 h	66.13	66.16	72.71	2.150	0.407
12 h	57.86	67.10	61.38	2.981	0.504
24 h	60.19	69.17	63.91	2.906	0.510
Propionate, % of total VFA					
3 h	15.19	15.18	14.19	0.617	0.799
6 h	18.00	17.89	19.55	0.435	0.236
12 h	14.25	16.43	13.77	0.817	0.421
24 h	17.96	20.71	18.27	0.802	0.353
Butyrate, % of total VFA					
3 h	11.29	11.03	9.49	0.476	0.279

6 h	11.78	11.32	12.13	0.292	0.587
12 h	9.10	10.20	8.37	0.513	0.390
24 h	10.60	11.47	10.95	0.356	0.671
<hr/>					
Valerate, % of total VFA					
3 h	0.68 <sup>a</sup>	0.63 <sup>ab</sup>	0.52 <sup>b</sup>	0.029	0.026
6 h	0.71	0.65	0.71	0.019	0.401
12 h	0.58	0.56	0.46	0.003	0.349
24 h	0.88	0.89	0.84	0.010	0.760
<hr/>					
A/P ratio					
3 h	4.89 <sup>b</sup>	5.53 <sup>a</sup>	5.75 <sup>a</sup>	0.135	0.001
6 h	3.67	3.69	3.71	0.292	0.919
12 h	4.05	4.12	4.46	0.080	0.059
24 h	3.35	3.33	3.50	0.043	0.236

NALT 및 NALM 첨가 수준에 따른 유리 아미노산의 배양 0, 3, 24시간대별 농도는 표 60, 61, 62와 같음. 전체 유리 아미노산 농도는 실험구별로 유의적인 차이는 없었으며, 배양시간이 지남에 따라 모든 실험구에서 감소하였음. Met 농도는 배양 0시간대에 대조구 0.38 ng/ml, NALT 0.50% 첨가구 0.43 ng/ml, NALM 0.50% 첨가구 1.47 ng/ml로 NALM 0.50% 첨가구에서 가장 높게 나왔으며(P<0.05) Met 외 다른 필수아미노산은 실험구간 유의적인 차이가 없었음. 배양 3시간대 또한 대조구 0.53 ng/ml, NALT 0.50% 첨가구 0.17 ng/ml, NALM 0.50% 첨가구 1.64 ng/ml로 NALM 0.50% 첨가구에서 가장 높게 나왔으며(P<0.05) total amino acid도 높은 경향을 보였으나, 배양 24시간대에는 대조구와 NALT 및 NALM 첨가구 모두 methionine이 검출되지 않았음. 배양시간대별 대조구 내 유리아미노산 농도를 보면 3시간대부터 Arg, Leu, Phe 함량이 검출되지 않았는데 반추위 내에서 Arg과 Thr이 가장 빨리 분해가 되며 그 다음으로 Phe, Leu, Ile, Val, Met 순으로 분해가 일어난다고 하였음(Chalupa. 1976). Russell (2006)의 연구에서는 McDougall buffer를 이용했을 때 반추위액을 25% 이하로 접종하게 되면 lysine 분해율이 급격히 높아진다고 하였음. 반대로 위액량이 증가할수록 lysine에서 ammonia로 분해되는 비율이 감소한다고 보고함. 또한 Elwakeel et al. (2012)은 Russell (2006)의 연구를 토대로 McDougall buffer와 위액을 1:4의 비율로 혼합하여 rumen inoculum을 사용하는 경우 lysine이 반추위 내에서 완전히 분해된다고 하였음. 본 실험에서는 McDougall buffer와 반추위액을 4:1의 비율로 사용하였음. McDougall buffer는 질소원으로 이용할 수 있는 기질이 없는 순수 saliva의 구성성분으로 이루어져 있으며 이 때문에 반추위내 분해가 일어난 것으로 사료됨. Elwakeel et al. (2012)은 lysine을 한정하여 실험을 하였지만 lysine외 다른 아미노산들의 분해 및 buffer의 종류와 비율에 따른 분해는 추가적인 실험을 통하여 밝혀야 할 것으로 사료됨.

표 60. 0시간대 보호 아미노산(NALM, ANALT) 첨가 수준에 따른 유리아미노산 농도

Item, ng/ml	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALT 0.50%	NALM 0.50%		
Threonine	0.79	0.83	0.69	0.036	0.294
Valine	2.09	2.13	2.18	0.085	0.927
Methionine	0.38 <sup>b</sup>	0.43 <sup>b</sup>	1.47 <sup>a</sup>	0.202	0.010

Isoleucine	0.66	0.66	0.91	0.082	0.414
Leucine	1.25	1.20	1.66	0.113	0.213
Phenylalanine	1.63	1.24	1.93	0.161	0.236
Lysine	0.52	0.47	0.68	0.046	0.177
Histidine	0.14	0.15	0.16	0.271	0.128
Arginine	0.62	0.59	0.50	0.035	0.338
Taurine	0.32 <sup>b</sup>	0.30 <sup>b</sup>	0.40 <sup>a</sup>	0.019	0.023
Phosphoserine	0.75	-	1.39	0.195	0.106
Aspartic acid	5.59	5.82	5.97	0.196	0.775
Serine	1.20 <sup>ab</sup>	1.29 <sup>a</sup>	1.02 <sup>b</sup>	0.054	0.099
Glutamic acid	1.99	2.11	2.26	0.067	0.309
Glycine	0.53 <sup>b</sup>	0.52 <sup>b</sup>	0.66 <sup>a</sup>	0.028	0.040
Cystine	ND	ND	ND	-	-
Tyrosine	0.93	ND	1.24	0.110	0.233
$\beta$ -alanine	0.09 <sup>a</sup>	0.10 <sup>a</sup>	0.07 <sup>b</sup>	0.006	0.028
$\gamma$ -amino-n-butyric acid	0.75	0.79	0.75	0.021	0.716
Ornithine	0.07	0.07	0.15	0.022	0.234
Proline	3.59	3.86	3.89	0.189	0.820
Total free amino acid	26.00	24.52	29.47	1.142	0.204

표 61. 3시간대 보호 아미노산(NALM, ANALT) 첨가 수준에 따른 유리아미노산 농도

Item, ng/ml	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALT 0.50%	NALM 0.50%		
Threonine	0.26 <sup>b</sup>	0.33 <sup>a</sup>	0.20 <sup>c</sup>	0.020	0.001
Valine	2.46	2.27	2.56	0.091	0.476
Methionine	0.53 <sup>ab</sup>	0.17 <sup>b</sup>	1.64 <sup>a</sup>	0.277	0.048
Isoleucine	0.65	0.52	1.11	0.152	0.274
Leucine	ND	1.03	1.49	0.120	0.169
Phenylalanine	ND	0.89	1.78	0.193	0.078
Lysine	0.58	0.59	0.57	0.018	0.951
Histidine	0.17	0.16	0.16	0.008	0.877
Arginine	ND	ND	ND	-	-
Taurine	0.29	0.25	0.26	0.016	0.727
Phosphoserine	0.65	0.65	0.69	0.058	0.966
Aspartic acid	1.21	1.26	1.22	0.021	0.621
Serine	0.15	0.14	0.12	0.007	0.149
Glutamic acid	1.41	1.28	1.33	0.028	0.135
Glycine	1.02	1.00	0.94	0.027	0.472
Cystine	0.22	ND	0.95	0.328	0.444
Tyrosine	0.58	0.46	1.02	0.154	0.314
$\beta$ -alanine	0.10	0.09	0.10	0.003	0.346
$\gamma$ -amino-n-butyric acid	0.80	0.85	0.80	0.016	0.358

Ornithine	0.90	0.86	0.90	0.027	0.796
Proline	4.77	5.42	4.99	0.133	0.118
Total free amino acid	22.03	21.83	27.15	1.144	0.075

표 62. 24시간대 보호 아미노산(NALM, ANALT) 첨가 수준에 따른 유리아미노산 농도

Item, ng/ml	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALT 0.50%	NALM 0.50%		
Threonine	ND	0.04	0.04	0.002	0.368
Valine	0.80	0.80	0.78	0.017	0.901
Methionine	ND	ND	ND	-	-
Isoleucine	ND	ND	ND	-	-
Leucine	ND	ND	ND	-	-
Phenylalanine	ND	ND	ND	-	-
Lysine	0.19	0.22	0.24	0.011	0.302
Histidine	ND	ND	ND	-	-
Arginine	ND	ND	ND	-	-
Taurine	ND	ND	ND	-	-
Phosphoserine	0.66	0.58	0.63	0.020	0.308
Aspartic acid	0.20	0.21	0.20	0.007	0.858
Serine	0.03	0.04	0.03	0.001	0.418
Glutamic acid	1.41	1.28	1.33	0.028	0.135
Glycine	0.32	0.35	0.30	0.020	0.644
Cystine	0.60	0.61	0.63	0.026	0.932
Tyrosine	ND	ND	ND	-	-
$\beta$ -alanine	0.03	0.02	ND	0.006	0.573
$\gamma$ -amino-n-butyric acid	ND	ND	ND	-	-
Ornithine	ND	ND	ND	-	-
Proline	ND	ND	ND	-	-
Total free amino acid	5.33	4.90	5.19	0.185	0.687

마. 새로 개발된 보호 아미노산이 반추위 발효성상에 미치는 영향 (연구 4)

(1) 연구목적

본 실험은 주관기관에서 개발된 여러 보호 아미노산이 in vitro 반추위 발효성상에 미치는 영향과 반추위 내 보호율을 평가하기 위해 수행하였음.

(2) 재료 및 방법

- 실험방법은 Tilley and Terry, (1963)의 방법을 기본으로 하였음.

(가) 주요 재료: 보호 아미노산 7종(NALM, NALT, NALP, NALV, NALH, NALI, NALL), rumen inoculum (rumen fluid:McDougall's buffer=1:4), timothy 0.24 g, 착유우용 농후사료 0.16

표 63. 실험사료의 영양성분(% of dry matter)

Item	Timothy	Concentrate	NALM	NALT	NALV	NALP	NALL	NALI	NALH
DM	92.98	90.46	99.97	99.77	99.36	99.97	99.95	99.45	99.48
OM	90.13	91.69	99.71	99.28	99.77	99.68	99.91	99.85	99.94
CP	9.76	23.95	76.17	78.44	72.27	79.12	74.66	74.79	70.70
NDF	71.14	21.33	-	-	-	-	-	-	-
ADF	42.59	9.82	-	-	-	-	-	-	-
EE	0.93	5.12	-	-	-	-	-	-	-

DM: Dry matter, OM: Organic matter, CP: crude protein, NDF: Neutral detergent fiber, ADF: Acid detergent fiber, EE: Ether extract, NALV: N-acetyl-valine, NALP: N-acetyl-phenylalanine, NALL: N-acetyl-leucine, NALI: N-acetyl-isoleucine, NALH: N-acetyl-histidine

표 64. 실험사료의 아미노산 구성성분

Item	Timothy	Concentrate
EAA, mg/g		
Arginine	1.51	8.93
Histidine	0.74	4.07
Isoleucine	1.62	5.88
Leucine	2.95	12.80
Lysine	2.28	7.83
Methionine	0.27	1.56
Phenylalanine	2.03	7.22
Threonine	1.82	5.53
Valine	2.52	6.99
NEAA (mg/g)		
Alanine	2.97	8.23
Aspartic acid	5.38	12.99
Cystine	0.35	1.98
Glycine	1.74	6.48
Glutamic acid	4.33	26.75
Proline	3.17	17.51
Serine	1.76	6.32
Tyrosine	0.85	3.78
Total amino acid (mg/g)	36.29	144.84

(나) 실험 설계

① 대조구(보호아미노산 무첨가구)

② 처리구

- NALT, NALM, NALV, NALP, NALL, NALI, NALH 0.50%와 NALT, NALM 20% 첨가

③ 배양시간: 0, 6, 24시간

④ 처리구당 4반복으로 진행하였으며, 4반복 중 1반복은 구성아미노산 분석 및 미생물 군집 분석을 위해 발효가 종료됨과 동시에 냉동한 후 동결건조 처리

⑤ 4반복 중 3반복은 in vitro 발효성상을 위해 분석

⑥ 분석항목

- 가스발생량, pH, NH<sub>3</sub>-N, VFA, 건물소화율(Dry matter digestibility), 유리아미노산

표 65. McDougall' s buffer의 구성성분

Ingredients	Contents, g/L
NaHCO <sub>3</sub>	9.8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	4.62 g
KCl	0.57 g
NaCl	0.47 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.12 g

(다) 실험 방법:

① 반추위액 채취: 경북대학교 부속목장에서 암소 한우 2두에서 stomach tube를 이용, 채취 즉시 보온병에 담아 실험실로 운반

② 혐기상태 유지를 위해 CO<sub>2</sub>를 주입해가면서 4겹의 Muslin으로 반추위액 2번 여과

③ Rumen inoculum 제조: rumen fluid와 McDougall' s buffer 1:4로 혼합 후 50 ml 주입

④ 주입 후 rubber stopper와 aluminum cap으로 밀봉한 후 0, 6, 24시간, 39℃ 배양

(라) 통계분석

- SPSS (version 25, IBM, USA) 프로그램을 이용하여 일반선형모형의 분산분석을 통해 가설검정을 수행하였으며 Duncan의 분석방법을 통해 사후검정을 진행하였음.

(3) 결과 및 고찰

표 66은 보호 아미노산이 반추위 발효성상에 미치는 영향에 관한 표임. in vitro 실험 결과, 모든 배양시간에서(6, 24시간) 대조구에 비해 처리구들에서 pH값이 유의적으로 높게 나타났음. 가스발생량은 6시간대에서 대조구와 NALM, NALT, NALP 처리구에서 가장 높게 나타났음. 24시간대에서는 모든 처리구가 대조구에 비해 유의적으로 높게 나타났음. 건물소화율은 모든 배양시간대 및 처리구에서 유의적인 차이는 없었음. 아래와 같이 pH 변화와 가스발생량

은 유의적 차이가 있어도 반추위내 상태 변화가 발생할 만큼 크진 않은데, 일반적으로 보호 아미노산 급여 시 반추위 내 pH에는 큰 변화가 없다는 보고와 일치하였음(Wright et al., 1988).

표 66. 보호 아미노산 첨가가 in vitro pH, 가스발생량, 건물소화율에 미치는 영향

Time (h)	Treatment								SEM	P-value
	Control	NALM	NALT	NALV	NALP	NALL	NALI	NALH		
pH										
6	6.88 <sup>d</sup>	6.92 <sup>c</sup>	6.94 <sup>bc</sup>	6.96 <sup>ab</sup>	6.96 <sup>ab</sup>	6.98 <sup>a</sup>	6.97 <sup>a</sup>	6.97 <sup>ab</sup>	0.007	0.000
24	6.79 <sup>c</sup>	6.81 <sup>b</sup>	6.85 <sup>a</sup>	6.86 <sup>a</sup>	6.86 <sup>a</sup>	6.87 <sup>a</sup>	6.87 <sup>a</sup>	6.87 <sup>a</sup>	0.006	0.000
Gas production, ml										
6	18.75 <sup>a</sup>	18.00 <sup>ab</sup>	17.75 <sup>abc</sup>	17.38 <sup>bc</sup>	17.63 <sup>bc</sup>	17.48 <sup>bc</sup>	17.25 <sup>bc</sup>	16.75 <sup>c</sup>	0.151	0.041
24	58.50 <sup>b</sup>	61.75 <sup>a</sup>	62.25 <sup>a</sup>	62.38 <sup>a</sup>	62.75 <sup>a</sup>	63.75 <sup>a</sup>	61.50 <sup>a</sup>	62.13 <sup>a</sup>	0.376	0.022
Dry matter digestibility, %										
6	44.90	43.78	46.10	44.63	44.95	44.91	45.65	44.68	0.301	0.768
24	71.02	71.06	70.29	71.54	72.39	71.92	71.43	71.93	0.320	0.864

반추위액 내 보호 아미노산을 보충하여 6시간 발효한 실험구 7종 모두 대조구에 비해 유의적으로 NH<sub>3</sub>-N의 농도를 상승시킨 것으로 확인되었음(P<0.05). 실험구 중 NALT, NALV를 NALH에서 낮은 NH<sub>3</sub>-N의 농도를 보였으며(P<0.05) NALM, NALP, NALL, NALI 간에는 유의적인 차이는 없었음. 24시간 발효하여 NH<sub>3</sub>-N의 농도를 측정된 결과 대조구와 NALM, NALT, NALV, NALP 처리구간에는 유의적인 차이는 없었으며 NALL, NALI, NALH는 대조구보다 높게 관찰되었음(P<0.05).

암모니아는 반추위 내 미생물 합성에 사용되는 주요 질소원임(Srinivas and Gupta, 1997). NH<sub>3</sub>-N의 농도는 미생물에 의한 질소원의 분해 및 이용에 관한 총괄적인 지표로 볼 수 있으며 반추위 암모니아 농도는 미생물 성장에 제한이 될 수 있는 시기를 결정하므로 사료의 조단백질 함량보다 더 나은 기준이 될 수 있음(Slyter et al., 1979). 이와 같은 결과는 NH<sub>3</sub>-N가 인공 반추위 내에서 지속적으로 생성되어 정상적인 상태로 유지되는 경우 그 농도는 2-5 mg/100 ml로 알려져 있기에 정상적인 범위 내라는 사실을 유추해 볼 수 있음(Satter and Slyter, 1974).

선행 연구에 따르면 아미노산의 분해율은 반추위 미생물군(Prins et al., 1979)과 5 종의 주요 속(genus)의 영향을 받음(Scheifinger et al., 1976).

해당 실험에서는 His 및 Leu, Ile가 암모니아 농도에 미치는 영향이 큰 것으로 나타났으나 Wang et al. (2008)은 Met의 제한 급여가 암모니아의 농도에 가장 큰 영향을 미친다고 하였음. 이는 제한 급여와 추가 급여와 같은 실험방법에 따른 차이와 실험에 사용된 미생물의 종류에 따른 차이로 판단됨. 반추위 아미노산 분해에 관한 연구 결과를 살펴보면 반추위 박테리아가 His를 분해하여 urocanic acid (URA), N-formiminoglutamic acid, formamide 및 Glu를 생성하는 것을 밝혀냈지만(Van den Hende et al., 1963), His의 이화작용에 관여하는 프로토조아와 박테리아의 관한 선행연구는 미비한 편임. 다만 *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*와 같은 미생물들이 His의 분해에 관여하는 것으로 알려졌으며 (Brevet et al., 1968) 반추위 미생물체 단백질이 소장에 흡수되는 단백질의 대부분을 차지하는 경우, 알팔파 건초와 옥수수 사일리지를 급여하는 착유우에서 His의 부족으로 인한 우유생산의 제한이 생길 수 있다고 보고된바 있음(Lee et al., 2012).

표 67. 보호 아미노산 첨가가 in vitro ammonia-N에 미치는 영향

Time (h)	Treatment								SEM	P-value
	Control	NALM	NALT	NALV	NALP	NALL	NALI	NALH		
NH <sub>3</sub> -N, mg / 100 ml										
6	3.44 <sup>c</sup>	4.01 <sup>ab</sup>	3.90 <sup>b</sup>	3.83 <sup>b</sup>	4.19 <sup>ab</sup>	4.03 <sup>ab</sup>	4.02 <sup>ab</sup>	4.35 <sup>a</sup>	0.062	0.001
24	1.96 <sup>c</sup>	2.03 <sup>c</sup>	2.35 <sup>bc</sup>	2.06 <sup>c</sup>	2.30 <sup>bc</sup>	3.05 <sup>ab</sup>	3.32 <sup>a</sup>	3.43 <sup>a</sup>	0.138	0.001

In vitro 반추위 발효 실험에 대한 배양병 내 휘발성지방산 함량은 표 68과 같음. 배양 6시간차에서 valerate를 제외한 모든 항목에서 유의적인 차이를 나타내지 않았음. 배양 24시간차에서 총 휘발성지방산 함량은 NALI 실험구가 36.47 mM로 전 실험구에서 가장 낮았으며, NALM 실험구가 55.95 mM로 모든 실험구에서 가장 높았음(P<0.05). Acetate는 배양 6시간과 마찬가지로 배양 24시간에서도 전 실험구에서 유의적인 차이는 없었음. Propionate는 배양 24시간에서 NALM이 23.33%로 가장 높은 함량을 나타내었고, NALH 첨가구는 21.8%로 가장 낮은 함량을 나타내었음(P<0.05). Butyrate는 배양 24시간에서 실험구간 유의적인 차이는 나타나지 않았음. A:P ratio는 배양 24시간에서도 실험구간 유의적인 차이는 나타나지 않았음. Acetate, propionate, butyrate는 우유의 형성과 밀접한 관련이 있는 휘발성지방산이며, acetate와 butyrate는 lipogenic과 관련이 있고, propionate는 glucogenic과 관련이 있는 지방산임. 이 glucogenic과 lipogenic의 비율의 감소는 유당 및 우유합성을 감소시킬 수 있다고 함(Miettinen and Huhtanen, 1996). 본 실험의 경우 acetate와 butyrate는 배양 24시간에서 모든 실험구에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, propionate는 NALM에서 23.33%로 NALL 22.22%, NALI 22.42%, NALH 21.87%보다 더 높은 수치를 나타내었음(P<0.05).

표 68. 보호 아미노산 첨가가 in vitro VFA에 미치는 영향

Time (h)	Treatment								SEM	P-value
	Control	NALM	NALT	NALV	NALP	NALL	NALI	NALH		
Total VFA, mM										
6	24.87	25.91	25.01	24.03	24.19	22.89	28.39	26.04	0.471	0.113
24	49.11 <sup>abc</sup>	55.95 <sup>a</sup>	41.67 <sup>bc</sup>	51.81 <sup>ab</sup>	53.81 <sup>ab</sup>	47.02 <sup>abc</sup>	36.47 <sup>c</sup>	43.30 <sup>abc</sup>	1.736	0.041
Acetate, % of total VFA										
6	69.36	69.75	69.74	70.49	69.83	70.35	68.99	70.16	0.154	0.223
24	66.59	67.11	67.17	67.24	67.02	67.43	66.88	67.87	0.158	0.725
Propionate, % of total VFA										
6	19.73	19.66	19.49	19.06	19.22	19.22	20.04	19.62	0.100	0.234
24	23.29 <sup>a</sup>	23.33 <sup>a</sup>	23.02 <sup>ab</sup>	23.02 <sup>ab</sup>	22.70 <sup>ab</sup>	22.22 <sup>bc</sup>	22.42 <sup>bc</sup>	21.87 <sup>c</sup>	0.127	0.008
Butyrate, % of total VFA										
6	8.50	8.31	8.45	8.24	8.53	8.15	8.46	8.03	0.053	0.166
24	7.46	7.19	7.29	7.25	7.71	7.64	7.89	7.75	0.074	0.099
Valerate, % of total VFA										
6	1.05 <sup>ab</sup>	0.99 <sup>b</sup>	1.02 <sup>b</sup>	0.96 <sup>b</sup>	1.16 <sup>a</sup>	0.99 <sup>b</sup>	1.08 <sup>ab</sup>	0.96 <sup>b</sup>	0.017	0.024
24	0.88 <sup>bc</sup>	0.78 <sup>c</sup>	0.85 <sup>c</sup>	0.79 <sup>c</sup>	0.89 <sup>bc</sup>	0.97 <sup>ab</sup>	1.04 <sup>a</sup>	0.85 <sup>c</sup>	0.020	0.001
Acetate:Propionate ratio										
6	3.52	3.55	3.58	3.70	3.63	3.67	3.44	3.58	0.026	0.245
24	2.86	2.88	2.92	2.92	2.95	3.03	2.99	3.10	0.022	0.065

NALM 및 NALT를 첨가 후 6시간 뒤 pH를 측정한 결과 실험구에 비해 유의적으로 증가하였으며(P<0.05), 24시간 뒤 pH는 아미노산 첨가급여를 한 실험구에서 증가하는 경향을 보임. 6시간 및 24시간의 가스 발생량은 NALT, NALM 첨가급여 시 유의적으로 증가하였으며 건물소화율 또한 6시간 및 24시간 대 모두 NALM, NALT 첨가구가 유의적으로 증가하였음(P<0.05). 본 실험에서는 건물소화율을 측정하기 위해 pore size가 50 µm인 nylon bag을 이용하였는데 주관기관에서 개발된 보호 아미노산들은 수용성이 높거나 입자의 크기가 작음. 이 때문에 보호 아미노산 비율이 높은 처리구의 경우 입자들이 위액에 녹거나 nylon bag에서 유실되어 건물소화율이 과대평가된 것으로 판단됨. 그러나 Bach et al. (2005)는 수용성이 높다고 해서 분해율이 높은 것은 아니며 분자구조에 따라 반추위내에서 분해되는 정도가 다르다고 하였음. 실제로 Liang et al. (2019)의 실험에서는 NALM의 반추위내 보호율은 58.9%로 측정되었으며 이는 수용성이 높다 해서 반추위 분해율이 높다는 것을 의미하지 않음을 나타냄.

반추동물의 제1 제한 아미노산은 품종, 급여사료에 따라 달라질 수 있지만, Seymour et

al. (1990) 및 Rulquin (1987)의 연구에 따르면 옥수수를 기반으로 한 사료에 단백질을 추가적으로 보충하지 않는다면 Lys이 제 1제한아미노산으로 나타나며, 두과작물을 기반으로 하여 반추위 비분해 단백질을 다량 섭취한 경우 Met가 제1 제한 아미노산으로 나타남.

상기 필수 아미노산들의 경우 그 중요성이 이미 많이 알려져 있으므로 본 실험에서는 상기 아미노산 중 Met 및 Trp를 보호 급여하여 반추위 발효성상에 미치는 영향을 비교하였음. Lewis and Emery (1962)의 실험을 통해 반추위액에서 24시간 발효된 Trp 및 Met의 분해율이 각각 37%, 32%로 나타났으나 본 실험에서는 분해율에 따른 차이가 없는 것으로 보이는데 이는 보호 아미노산으로 처리한 영향으로 보임.

표 69. 보호 아미노산 첨가(NALM 20%, NALT 20%)가 in vitro pH, 가스발생량, 건물소화율에 미치는 영향

Time (h)	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALM 20%	NALT 20%		
pH					
6	6.88 <sup>b</sup>	6.93 <sup>a</sup>	6.94 <sup>a</sup>	0.010	0.000
24	6.79 <sup>b</sup>	6.83 <sup>a</sup>	6.83 <sup>a</sup>	0.009	0.057
Gas production, ml					
6	18.75 <sup>c</sup>	19.63 <sup>b</sup>	21.00 <sup>a</sup>	0.304	0.000
24	58.50 <sup>b</sup>	70.25 <sup>a</sup>	69.13 <sup>a</sup>	1.631	0.000
Dry matter digestibility, %					
6	44.90 <sup>b</sup>	54.33 <sup>a</sup>	54.10 <sup>a</sup>	1.622	0.001
24	71.02 <sup>c</sup>	77.53 <sup>a</sup>	75.66 <sup>b</sup>	0.997	0.000

Ammonia-N은 6시간에서 NALT 처리구가 유의적으로 가장 높았고, 대조구, NALM 처리구순으로 유의적으로 높았음. 24시간에서도 NALT, NALM, 대조구 순으로 높게 나타났음. Tetsuo et al. (2018)에 따르면 보호 아미노산 처리가 된 처리구의 암모니아 함량은 대조구에 비해 유의적으로 증가한다고 하였지만, 해당 실험의 결과는 선행 연구과 유사한 결과를 따르지 않는데 NALM 처리구의 처리량이 이전 연구에 비해 많아 미생물의 단백질 분해율에 영향을 미쳤을 것으로 판단됨.

표 70. 보호 아미노산 첨가(NALM 20%, NALT 20%)가 in vitro ammonia-N에 미치는 영향

Time (h)	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALM 20%	NALT 20%		
NH <sub>3</sub> -N, mg / 100 ml					
6	3.44 <sup>b</sup>	2.32 <sup>c</sup>	3.92 <sup>a</sup>	0.239	0.000
24	1.96 <sup>b</sup>	2.66 <sup>a</sup>	2.78 <sup>a</sup>	0.139	0.003

NALM과 NALT를 20%로 하여 실험을 한 결과 배양 6시간에서 NALM 20% 실험구에서 총 휘발성지방산 생성량이 36.60 mM로 대조구 24.8 mM에 비해 유의적으로 높게 관찰됨 (P<0.05). 배양 24시간에서는 각 실험구간 유의적인 차이는 없었고 acetate 생성량은 배양 6시간 대조구 69.36%, NALM 20% 77.22%, NALT 20% 71.99%로 NALM 처리구가 가장 높았으며 (P<0.05), 배양 24시간 역시 NALM 20% 실험구가 72.33%로 가장 높은 비율을 나타내었음 (P<0.05). Propionate는 배양 6, 24시간에서 대조구가 19.73%, 23.29%로 가장 높은 비율을 나타내었고(P<0.05), butyrate는 배양 24시간에서 대조구 7.40%, NALM 20% 6.44%, NALT 20% 7.40%로 나타났음(P<0.05). A:P ratio는 배양 24시간에서 NALM 20%가 3.77로 가장 높은 수치를 나타냈음(P<0.05). 소의 경우 에너지 요구량의 70% 정도가 휘발성 지방산을 통해 충족되며 그 중 acetate는 휘발성지방산 대사 중 발생하는 에너지의 45%를 차지함. 또한 착유우에 있어 유 지방 합성에 중요한 역할을 담당함(Urrutia and Harvatine, 2017). 실험의 결과에 따르면 배양 24시간 대조구에 비해 배양 24시간의 NALM 20% 실험구와 NALT 20% 실험구에서 acetate 함량이 72.33%와 68.69%로 나타났음(P<0.05).

표 71. 보호 아미노산 첨가(NALM 20%, NALT 20%)가 in vitro VFA에 미치는 영향

Time (h)	Treatment			SEM	P-value
	Control	NALM 20%	NALT 20%		
Total VFA, mM					
6	24.87 <sup>b</sup>	36.60 <sup>a</sup>	27.19 <sup>b</sup>	2.142	0.027
24	49.11	52.56	49.37	1.138	0.443
Acetate, % of total VFA					
6	69.36 <sup>c</sup>	77.22 <sup>a</sup>	71.99 <sup>b</sup>	1.157	0.000
24	66.59 <sup>c</sup>	72.33 <sup>a</sup>	68.69 <sup>b</sup>	0.854	0.000
Propionate, % of total VFA					
6	19.73 <sup>a</sup>	15.02 <sup>c</sup>	18.34 <sup>b</sup>	0.700	0.000
24	23.29 <sup>a</sup>	19.17 <sup>c</sup>	21.55 <sup>b</sup>	0.604	0.000
Butyrate, % of total VFA					
6	8.50 <sup>a</sup>	6.07 <sup>b</sup>	7.64 <sup>c</sup>	0.357	0.000

24	7.46 <sup>a</sup>	6.44 <sup>b</sup>	7.40 <sup>a</sup>	0.174	0.001
Valerate, % of total VFA					
6	1.05 <sup>a</sup>	0.73 <sup>c</sup>	0.91 <sup>b</sup>	0.046	0.000
24	0.88 <sup>a</sup>	0.69 <sup>c</sup>	0.76 <sup>b</sup>	0.030	0.002
Acetate:Propionate ratio					
6	3.52 <sup>c</sup>	5.14 <sup>a</sup>	3.93 <sup>b</sup>	0.245	0.000
24	2.86 <sup>c</sup>	3.77 <sup>a</sup>	3.19 <sup>b</sup>	0.136	0.000

바. 반추위 보호 아미노산 복합제가 착유우의 유량 및 유성분에 미치는 영향 (연구 5)

(1) 연구목적

본 실험은 제1협동기관의 실험으로 도출된 NALM-NALT-NALH 복합제제가 착유우의 유량 및 유성분에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행하였으며 제1협동기관에서 NALM-NALT-NALH 복합제를 일정 비율대로 혼합한 샘플을 받아 본 실험을 수행하였음

(2) 재료 및 방법

(가) 실험장소: 착유우 실험은 충청북도 충주시에 위치한 건국대학교 실습농장에서 수행

(나) 실험기간: 첨가제 급여 전 우유 및 혈액채취 후 3주간 첨가제를 급여하여 30일 수행

(다) 공시동물: Holstein 착유우 61두를 실험동물로 공시하였으며 이 중 산차, 산유량, 체중, 착유일수를 기준으로 대조구 20두, 처리구 20두 총 40두를 선발하였음

(라) 실험설계: Randomized block design을 사용하여 산차, 착유일수, 유량, 체중을 기준으로 선발하여 첨가제를 급여하지 않는 대조구와 두당 NALM-NALT-NALH 30 g/d을 첨가하는 처리구로 20두씩 선발함

(마) 실험방법

① 실험사료는 매일 아침 9시에 사료급여기준 TMR 1,200 kg과 효모제 5 kg (top-dressing)을 급여하였으며 농후사료는 개별급여하였음. 처리구에는 매일 두당 NALM-NALT-NALH 30 g을 기질사료에 top-dressing하였음

- NALM-NALT-NALH 비율: 8.4 g : 17.25 g : 4.35 g (총 30 g)

② 건물섭취량은 매일 아침사료 급여 전 잔량을 측정하여 계산하였음

③ 착유시간은 하루 2번(새벽 3시와 오후 3시) 착유하였음

④ 유량은 매일 기록하였으며 매주 급여사료를 채취하여 성분 분석하였음.

⑤ 첨가제 급여 전 2일(-d 2, -d 1), 급여 2주 후 3일(d 14-16), 급여 3주 후 3일간(d 21-23) 우유를 채취하여 유성분(유지방, 유단백, 유당, MUN, Solid not fat, 체세포수 등)을 분석하였음

⑥ 혈액은 첨가제 급여 3주 후(d 25) 채취하였으며 Holstein을 보정하여 경정맥에서 주사기로 10 ml 채취하였으며 채취 즉시 heparin이 들어있는 10 ml 진공채혈관(BD

Vacuiner. Becton Drive, Franklin Lad)에 담아 4℃에서 32,000 rpm으로 2,000초간 원심분리하여 혈장을 분리하였음.

㉦ 조사항목: 유량, 유성분, 건물섭취량, 혈장아미노산(분석 중), 사료기호성 평가

(바) 통계분석: SPSS (version 25, IBM, USA) 프로그램을 이용하여 독립표본 T-test를 통해 유의수준 95%로 가설검정을 수행하였음.

표 72. 실험사료의 영양성분(% of dry matter)

Item	TMR	Concentrate	Roughage	Yeast culture
DM	64.37	90.24	24.65	92.75
OM	91.23	91.52	95.37	86.11
CP	16.13	21.74	10.41	15.58
NDF	43.32	27.37	63.08	30.86
ADF	25.47	12.85	42.27	9.90
EE	5.16	4.00	4.71	1.43
Amino acid, % of DM				
Arginine	1.17	1.53	0.94	0.30
Histidine	0.27	0.40	0.26	0.08
Isoleucine	0.51	0.70	0.49	0.25
Leucine	1.18	1.76	1.23	0.56
Lysine	0.64	0.88	0.57	0.37
Methionine	0.18	0.28	0.19	0.08
Phenylalanine	0.53	0.87	0.65	0.29
Threonine	0.64	0.84	0.61	0.34
Valine	0.67	0.86	0.63	0.32
Tryptophan	0.16	0.22	0.17	0.10
Alanine	0.84	1.11	0.83	0.61
Aspartic acid	1.40	1.80	1.19	0.72
Cystine	0.36	0.51	0.40	0.12
Glycine	0.71	0.93	0.74	0.40
Glutamic acid	2.35	3.52	2.54	1.03
Proline	1.13	1.99	1.44	0.48
Serine	0.68	0.94	0.68	0.32
Tyrosine	0.47	0.53	0.54	0.19

표 73. 착유우 급여전 유량 및 유성분

Item	Control	Treatment	SEM	P-value
------	---------	-----------	-----	---------

Milk yield, kg/d	32.48	32.21	1.189	0.910
Milk composition				
Fat, %	5.08	5.08	0.099	0.986
Protein, %	3.49	3.52	0.048	0.748
Lactose, %	4.80	4.74	0.030	0.360
Solid not fat, %	8.77	8.76	0.041	0.869
MUN, mg/dL	16.12	15.93	0.282	0.750
Cells, 10 <sup>3</sup>	413.85	210.98	142.330	0.523
Acetone, mM	0.00 <sup>b</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.002	0.014
Beta-hydroxybutyrate, mM	0.03	0.03	0.004	0.629
Cas.B, %	2.66	2.68	0.034	0.807
Mono unsaturated fatty acid, %	1.55	1.59	0.025	0.398
Poly unsaturated fatty acid, %	0.34	0.34	0.004	0.892
Saturated fatty acid, %	3.24	3.21	0.075	0.818
Total unsaturated fatty acid, %	1.83	1.87	0.026	0.472

### (3) 결과 및 고찰

건물섭취량은 처리구가 대조구보다 유의적으로 높았음(P<0.05). Lee et al. (2015); Giallongo et al. (2016)의 연구에서는 MP 함량을 충족시키면서 RP-Lys, RP-Met, RP-His을 함께 급여하였을 때 건물섭취량이 증가하였음. 유량 및 유성분은 대조구와 처리구간의 유의적인 차이는 없었으나 수치적으로는 유지방은 대조구가, 유단백은 처리구에서 높게 나타났음.

표 74. NALM-NALT-NALH 복합제가 Holstein의 유량 및 유성분에 미치는 영향

Item	Control	Treatment	SEM	P-value
Dry Matter Intake, kg/d	25.99 <sup>b</sup>	26.78 <sup>a</sup>	0.250	0.040
Milk yield, kg/d	31.92	31.21	1.658	0.301
Milk composition				
Fat, %	4.86	4.59	0.106	0.225
Protein, %	3.45	3.50	0.044	0.566
Lactose, %	4.76	4.66	0.027	0.085

Solid not fat, %	8.84	8.80	0.042	0.616
MUN, mg/dL	15.19	15.26	0.278	0.894
Cells, 10 <sup>3</sup>	274.54	204.51	70.599	0.644
Acetone, mM	0.02	0.03	0.004	0.372
Beta-hydroxybutyrate, mM	1.34	1.36	0.018	0.551
Cas.B, %	2.09	2.09	0.026	0.955
Mono unsaturated fatty acid, %	0.92	0.91	0.013	0.516
Poly unsaturated fatty acid, %	1.72	1.62	0.038	0.218
Saturated fatty acid, %	2.44	2.32	0.052	0.229
Total unsaturated fatty acid, %	1.78	1.73	0.024	0.320

혈장 아미노산 분석은 표75와 같음. NALM-NALT-NALH 복합제를 급여했을 때 혈장 아미노산 중 비필수 아미노산은 처리구에서 유의적으로 높게 나타났음(P<0.05). 필수아미노산 및 총 혈장 아미노산은 처리구와 대조구간의 유의적인 차이 없이 His (45.37 vs 50.27  $\mu$ M)과 Met (15.47 vs 19.39  $\mu$ M)에서 처리구가 대조구보다 유의적으로 높게 나타났음(P<0.05). 보호 아미노산의 보호율 및 이용률 평가는 in vitro 실험 결과를 평가하는 것보다 혈장 내 아미노산을 측정하는 것이 더 정확하다는 점에서(Rulquin and Kowalczyk, 2003) 혈장 내 Met과 His 농도의 증가는 보호 아미노산이 반추위에서 보호되어 소장의 흡수를 증가시켰다는 것을 시사함.

표75. NALM-NALT-NALH 복합제 급여 시, Holstein 혈장 아미노산의 변화

Items	Control	Treatment	SEM	P-value
Essential amino acid				
Arginine	85.94	83.77	5.848	0.714
Histidine	45.37 <sup>b</sup>	50.27 <sup>a</sup>	2.071	0.023
Iso-leucine	94.55	86.72	4.124	0.065
Leucine	117.27	112.40	5.417	0.374
Lysine	70.37	61.79	4.352	0.056
Methionine	15.47 <sup>b</sup>	19.39 <sup>a</sup>	1.746	0.031
Phenylalanine	32.38	32.03	1.414	0.802
Threonine	62.66	59.91	4.269	0.525
Valine	276.04	273.89	18.271	0.907
Total EAA	800.04	780.17	35.654	0.581

Nonessential amino acid

Alanine	91.76	97.72	5.401	0.277
Aspartic acid	6.76	5.48	0.996	0.207
Glutamic acid	51.15	52.53	2.666	0.607
Glycine	217.15	238.60	12.786	0.102
Proline	63.20 <sup>b</sup>	114.57 <sup>a</sup>	4.359	0.000
Serine	228.45	238.91	10.816	0.339
Tyrosine	40.56	31.50	5.875	0.131
Total NEAA	699.02 <sup>b</sup>	779.31 <sup>a</sup>	29.757	0.010
Total AA	1499.06	1559.49	57.079	0.296



그림 75. 사료첨가제 기호성 평가(좌: 대조구, 우: 처리구)

그림 75는 첨가제 기호성 평가를 나타냄. 첨가제를 top-dressing 직후 빠져나가는 개체들이 있었기 때문에 첨가제 급여 후 30분간은 stanchion을 고정하여 첨가제를 급여하였으며 건물섭취량이 대조구보다 높은 것으로 보아 기호성은 양호한 것으로 판단됨.

사. 반추위 보호 아미노산 복합제가 in vitro 발효성상에 미치는 영향 (연구 6)

(1) 연구목적

본 실험은 주관기관에서 최종 개발된 보호 아미노산 중 NALM-NALT-NALH 복합제제의 보호율 및 in vitro 반추위 발효성상에 미치는 영향을 조사하기 위해 수행하였음. 본 실험에서는 positive control로 NALT, NALM, NALH, Met, Trp, His 등 개별 아미노산을 배치하였음.

(2) 재료 및 방법

(가) 본 실험은 Tilley and Terry (1963) 방법을 기본으로 수행

(나) 실험설계

- ① 실험구(기질사료: TMR 0.85 g, 착유우용 농후사료 0.15 g)
  - 대조구: 무첨가구
  - 처리구1: NALM 3% (w/w feed 이하 동일)
  - 처리구2: NALT 3%
  - 처리구3: NALH 3%
  - 처리구4: Met 3%
  - 처리구5: Trp 3%
  - 처리구6: His 3%
  - 처리구7: NALM+NALT+NALH 1%
  - 처리구8: NALM+NALT+NALH 10%
  - 처리구9: 보호되지 않은 Met +Trp +His 1%
  - 처리구10: 보호되지 않은 Met +Trp +His 10%
- ② 배양시간 및 반복: 0, 6, 24시간으로 총 3시간대를 관찰하며 3 반복씩 수행
- ③ 분석항목: pH, NH<sub>3</sub>-N, VFA, 구성아미노산

(다) 실험 방법

- ① McDougall buffer의 pH 및 온도가 각각 6.91, 37.3°C로 유지되었을 때 시작함
- ② 기질사료가 담긴 배양병에 CO<sub>2</sub>를 주입한 후 buffer 80 ml 분주함.
- ③ CO<sub>2</sub>를 주입한 후 rubber stopper와 aluminum cap으로 동봉함.
- ④ 아침사료 급여 전 한우 암소 2두의 위액을 채취함.
- ⑤ CO<sub>2</sub>를 주입해가며 위액을 5겹의 muslin으로 2번 여과
- ⑥ 반추위액 20 ml를 syringe를 이용하여 buffer가 담긴 배양병에 분주
- ⑦ 사료입자가 반추위액에 잘 섞이도록 조금씩 흔들어준 후 39°C incubator에 배양
- ⑧ 배양 종료 후 syringe로 배양액 5 ml 채취하여 conical tube에 담아 pH 측정
- ⑨ Ammonia-N 분석: Chaney and Marbach (1962), 0.2 N HCl 500 µl 첨가
- ⑩ VFA 분석: Erwin et al. (1961), 20% metaphosphoric acid 200 µl 첨가 \

보호된 개별 아미노산 및 복합제와 보호되지 않은 개별 아미노산 및 복합제의 pH 결과는 표76과 같음. 배양 6시간의 경우 대조구와 NALM에서 가장 낮게 ( $P < 0.05$ ) 나타났으며 NALM-NALT-NALH 복합제와 Met-Trp-His 복합제를 비교하였을 때 첨가비율과 관계없이 유의적인 차이는 없었음. 그러나 배양 24시간대에 NALM-NALT-NALH 복합제와 Met-Trp-His 복합제를 비교하였을 때 Met-Trp-His 복합제에서 유의적으로 가장 높게 나타났음.

표 76. NALM-NALT-NALH와 Met-Trp-His의 pH 비교

Time (h)	Treatment											SEM	P-value
	Con	NALM	NALT	NALH	Met	Trp	His	NALM-NALT-NALH 1%	NALM-NALT-NALH 10%	Met-Trp-His 1%	Met-Trp-His 10%		
6	6.74 <sup>d</sup>	6.78 <sup>cd</sup>	6.81 <sup>bc</sup>	6.86 <sup>ab</sup>	6.86 <sup>ab</sup>	6.92 <sup>a</sup>	6.88 <sup>ab</sup>	6.92 <sup>a</sup>	6.89 <sup>a</sup>	6.90 <sup>a</sup>	6.93 <sup>a</sup>	0.021	0.000
24	6.49 <sup>d</sup>	6.54 <sup>b</sup>	6.58 <sup>bc</sup>	6.59 <sup>bc</sup>	6.56 <sup>bc</sup>	6.54 <sup>c</sup>	6.59 <sup>bc</sup>	6.59 <sup>b</sup>	6.58 <sup>bc</sup>	6.64 <sup>a</sup>	6.89 <sup>a</sup>	0.014	0.000

보호된 개별 아미노산 및 복합제와 보호되지 않은 개별 아미노산 및 복합제의 ammonia-N 결과는 표77과 같음. Ammonia-N 농도는 반추위 내 미생물들이 단백질, peptide, 아미노산 등을 ammonia로 분해하기 때문에(Bach et al., 2005) 반추위 발효의 간접적인 지표로 이용되는데 특히, 배양 24시간대에 NALM-Met (1.71 VS 2.12), NALT-Trp (1.54 vs 2.02), NALH-His (1.56 vs 4.71)로 보호되지 않은 아미노산 처리구에서 유의적으로 높게 나타났으며 복합제 간의 비교 또한 Met-Trp-His 10% 처리구에서 4.86 mg/100 ml로 NALM-NALT-NALH 10% 처리구의 1.56 mg/100 ml보다 유의적으로 높게 나타났음

표77. NALM-NALT-NALH와 Met-Trp-His의 ammonia-N (mg / 100 ml) 비교

Time (h)	Treatment											SEM	P-value
	Con	NALM	NALT	NALH	Met	Trp	His	NALM-NALT-NALH 1%	NALM-NALT-NALH 10%	Met-Trp-His 1%	Met-Trp-His 10%		
6	1.72 <sup>a</sup>	1.32 <sup>bcde</sup>	1.50 <sup>ab</sup>	1.27 <sup>bcde</sup>	1.06 <sup>e</sup>	1.30 <sup>bced</sup>	1.13 <sup>de</sup>	1.32 <sup>bcde</sup>	1.39 <sup>bcd</sup>	1.46 <sup>abc</sup>	1.2 <sup>cde</sup>	0.087	0.002
24	1.33 <sup>d</sup>	1.71 <sup>bcd</sup>	1.54 <sup>cd</sup>	1.56 <sup>cd</sup>	2.12 <sup>b</sup>	2.02 <sup>b</sup>	4.71 <sup>a</sup>	1.54 <sup>cd</sup>	1.56 <sup>cd</sup>	1.96 <sup>bcd</sup>	4.86 <sup>a</sup>	0.127	0.000

# 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

## 제 1 절 목표 달성도

### 1. 1차년도 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구결과
1차 년도 (2017)	주관기관 (CJ제일제당)	반추위 보호 기능을 갖는 보호 아미노산 제형 개발	100	Met 유도체 합성법 확립 (알콜 3종, 유기산 3종, 지방산 2종)
		유단백 개선 가능성이 확인된 아미노산 대상 보호 아미노산 제형 개발	100	아미노산 아세틸화 기반 Trp 및 His 유 도체 확보
	제1협동연구기관 (건국대학교)	유선상피세포(MAC-T)를 이용 한 10개의 필수아미노산에 대 한 유단백합성의 최적 시간 및 농도 선정	100	Arg(48h, 1.5mM), His(96h, 1.2mM), Ile(48h,0.6mM), Lys(24h,1.2mM), Leu(96h, 1.5mM), Met(72h, 0.6mM), Phe(24h, 0.9mM), Thr(96h, 1.5mM), Trp(48h, 0.9mM), Val(24h, 0.6mM) 설정
		유선에서 유단백 합성관련 단 백질 발굴 (추가연구)	100	8개(HSPB1, GRP-78, LDH-B, MDH1, ANXA1, CK-7, GAPDH, PHB)의 유단백 관련 후보단백질 발굴
	위탁연구기관 (경북대학교)	1세부과제를 통해 개발, 제형 화된 아미노산 제제의 bypass 효율 측정	100	발효산물의 아미노산 조성 분석 진행 중
		1세부과제를 통해 개발, 제형 화된 아미노산 제제의 반추위 발효 특성 및 건물소화율에 미치는 영향	100	보호아미노산 제제 첨가 시 반추위 발효 특성에 변화없음(건물소화율, pH, 암모니아태 질소 농도 및 가스 발생량)

### 2. 2차년도 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구결과
2차 년도 (2018)	주관기관 (CJ제일제당)	선정된 필수 아미노산의 조합에 적합한 제형 개발	100	플랫폼 합성 기술 확보 : 아세틸레이션
				아세틸레이션 도입 아세틸 아미노산 합성 결과 (총수율 / 순도) 1. His: 95.0 mol% / 99.8% 2. Trp: 98.0 mol% / 99.5% 3. Phe: 93.0 mol% / 99.9% 4. Leu: 63.5 mol% / 99.0% 5. Ile: 83.4 mol% / 99.3% 6. Val: 86.0 mol% / 99.6%
	보호 펩타이드 합성 기반 기술 확보 1. Blocking agent-free 합성 2. 펩타이드 합성 및 반추위 보호 기능 동시 부여 합성법 확보			
제1협동연구기관	유단백 합성에 가장 효과적인	100	Met (0.6 mM, 72 h), Ile (0.6 mM, 48	

(건국대학교)	필수아미노산 선정 (1차년도 연구 계속)		h)이 유단백 합성능력이 가장 우수한 것으로 나타남
	각 필수아미노산에 대한 유단백 합성 관련 omics 해석	100	세포배양실험을 통해 extra-cellular 단백질이 증가된 10개 아미노산을 처리한 후 세포 내 단백질 정량 분석 완료
	유중 단백질 합성 촉진 필수아미노산의 조합이 유중 단백질 합성에 미치는 영향	100	Extra-cellular 단백질 분비 결과로 단백질 합성 효율이 가장 좋은 조합은 Ile-Leu (96 h), Ile-Met(72 h), Met-Leu (72 h), Met-Leu (96 h), Met-Phe (72 h), 그리고 Met-Val (72 h)인 것으로 확인됨
	필수아미노산 조합과 유중 단백질 합성 촉진 물질의 유단백 합성에 미치는 영향	100	현재 아미노산 조합과 생리활성물질 세 가지를 조합 평가 진행 (초산 첨가시 일부 개선 효과 확인)
	반추위 보호 L-tryptophan (RPT)이 홀스타인 젖소의 생산성에 미치는 영향 (추가연구)	100	반추위보호 L-Tryptophan (RPT) 30 g이 Moderate-Severe Heat Stress THI (80-89) 기간에서의 사료 섭취량 증가효과가 있었으며, 유량과 lactose의 함량을 증가시킴 RPT의 첨가가 건유시기의 사료섭취량 억제효과를 개선하였으며, 송아지 출생체중의 증가 경향을 보임
위탁연구기관 (경북대학교)	1세부과제를 통해 개발, 제형화된 아미노산 제제의 bypass 효율 측정	100	발효산물의 아미노산 조성을 분석 하였으나, n-acetyl기 기준으로 재분석이 필요하다고 판단되어 현재 분석 진행 중
	1세부과제를 통해 개발, 제형화된 아미노산 제제의 반추위 발효 특성 및 건물 소화율에 미치는 영향 평가	100	보호아미노산 제제 첨가 시 반추위 발효특성에 변화없음(건물소화율,pH, 가스발생량, 암모니아태 질소 농도 및 휘발성지방산), 시판중인 보호아미노산 제제와 비교하여 분석 중

### 3. 3차년도 목표 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구결과
3차년도 (2019)	주관기관 (CJ제일제당)	대량 생산 가능한 보호 아미노산 제형 기술 최적화	100	100L scale 아미노산 유도체 합성 공정 확보 (함량 99% 이상)
		신규 제품 등록(사료첨가제)을 위한 안정성 데이터 확보	100	열물성 데이터 (Tg, Tm), 저장 안정성 및 입도 분포도 데이터 확보

제1협동연구 기관 (건국대학교)	착유우에 있어서 최적의 반추위 보호 필수아미노산의 유선에서의 단백질 대사기전 규명 연구	100	In vitro 유선상피 세포 대상 Trp, Met, His 3개 아미노산 조합 이 유단백 증진에 효과 확인 (Trp:Met:His 비율 3:2:1) 사양 평가 첨가량 반영 (17.25g, RPM을 8.4g, RPH를 4.35g)
	In vitro 실험에서 검증된 최적의 필수아미노산 조합을 착유우에 급여시 유중 단백질 증진에 미치는 영향 검증	100	반추위 보호 Trp 대상 건유우 첨가시, 사료 섭취량 개선 및 송아지 체중 증가 경향(+4kg) 확인 경정맥 카테터 기반 히스티딘 및 아세트산 동시 주입 시, 젖소의 유단백질 생산량 증가 및 체세포수 감소 효과 확인 (in vitro 평가 결과와 동일)
	착유우 대상 최적 필수아미노산 조합 및 유중 단백질 합성 촉진 물질 첨가에 따른 유중 단백질 증진 영향 조사 (위탁 과제와 공동진행)	90	제1 협동기관에서 조합된 보호아미노산 3종 (Trp, His, Met)을 착유우에게 급여하여 유단백질 증진효과 검증 (수치적 증가)
	최종 개발된 최적 조합 아미노산 제제 및 유단백질 합성 촉진물질의 bypass 효율 및 반추위 발효 특성 평가	100	NALH 및 NALT 포함 총 7종의 후보아이템 대상 VFA 등 반추위액 발효성상 데이터 확보 (반추위 미생물 발효 영향 미미)
위탁연구기관 (경북대학교)	최적 조합 아미노산 및 유단백 합성 촉진물질의 착유우 대상 유단백질 증진효과 검증	90	제1 협동기관에서 조합된 보호아미노산 3종 (Trp, His, Met)을 착유우에게 급여하여 유단백질 증진효과 검증 (수치적 증가) 혈액 성상 등 추가 분석 진행 중

## 제 2 절 관련분야 기여도

### 1. 기술적 측면

가. 아미노산 유도체 합성 기술을 확보하고, 이를 기반으로 한 분말 제형의 보호 아미노산 개발이 성공적으로 이뤄질 경우 코팅 제품 위주로 형성되어 있는 시장에서 차별화된 제형의 제품 공급이 가능할 것으로 예상되며, 고객의 선호도에 따른 맞춤형 제품을 제공할 수 있을 것으로 예상됨.

나. 다양한 필수 아미노산의 공급을 통한 젖소의 유단백 생산능 개선 효과를 검증하고, 해당 아미노산의 작용 기작을 체계적으로 분석하는 과정에서 확보된 기술적 노하우는 향후 아미노산 이외의 다른 사료 첨가제 개발을 위한 기반 기술로 활용할 수 있으며, 동시에 specialty 사료 첨가제 개발을 선도할 수 있는 핵심 기술로 적용 가능함.

- 다. 젓소의 유선 내 유중 단백질합성 signalling map 제공.
- 라. 젓소의 유중 단백질 향상을 위한 아미노산 생리지표 제공.
- 마. 젓소의 사료개발에 대한 아미노산 조성 패러다임 제공.

## 2. 경제적·산업적 측면

- 가. 현재의 보호 아미노산 시장은 Lys과 Met으로 대표되는 제한 아미노산에 국한되어 있음. 하지만 본 연구를 통해 제한 아미노산을 넘어서 필수 아미노산으로 보호 아미노산의 영역을 확장할 경우 새로운 시장의 창출이 가능함.
- 나. 또한 본 연구를 통해 개발된 보호 아미노산을 바탕으로 국내 젓소 농가의 생산성을 우선적으로 증대시킬 경우 국내 낙농 산업의 획기적인 발전을 기대할 수 있음.
- 다. 더 나아가 높은 가격으로 인해 저변 확대가 제한되고 있는 보호 아미노산 시장에 우수한 가성비로 기반으로 다양한 제품을 생산 및 판매할 경우 글로벌 보호 아미노산 시장의 확대 뿐만 아니라 낙농 산업의 전반적인 생산성 증대를 기대할 수 있음.
- 라. 씨제이제일제당(주)은 본 과제를 통해 확보한 산학 네트워크를 기반으로 종합적인 아미노산 사료첨가제 솔루션을 제공함으로써 Cargil, ADM, Evonik과 같은 경쟁력 있는 글로벌 종합 사료 기업으로 성장할 수 있을 것으로 예상되며, 사업보국이라는 핵심 가치를 바탕으로 국가의 성장과 국가 이미지 제고에 기여할 수 있을 것으로 판단됨. 또한 관련 산업 분야의 전반적인 확대를 통해 낙농을 포함한 축산 관련 전문 인력을 양성하고, 이들의 역량을 바탕으로 새로운 제품 또는 기술을 개발할 경우 축산 업계의 전반적인 산업구조를 개편할 수 있을 것으로 예상됨.
- 마. 우유 내 건강 기능성 단백질 향상 및 알레르기 유도 물질 저감 생산 제공으로 인한 유제품 제조업계는 물론 침체된 낙농 산업에 발전에 기여.
- 바. 우유 내 각종 기능성 단백질의 개발에 대한 기초자료 제공에 따른 기능성 우유 개발 촉진
- 사. 유단백 합성에 영향을 미치는 다양한 요소의 최적 조합을 제공하고, 이에 따른 유단백을 개선하고 제품을 생산하는 젓소에 있어 새로운 전략을 제공함.
- 아. 개발 보호아미노산 제제의 산업화(씨제이제일제당(주))에 따른 신제품 출시 및 매출 증대 효과.

## 제 4 장 연구결과의 활용 계획

### 제 1 절 연구 성과의 활용분야 및 활용 방안

- 본 연구 성과는 반추동물, 특히 낙농우를 대상으로 우유 내 유단백 생산량 증대를 통한 농가 이익 개선을 목표로 함. 이를 위해 본 연구 성과에서 확보한 보호 아미노산의 제품화를 추진하고, 실제 낙농우용 사료 배합비의 개선에 활용할 예정임.
- 본 연구를 통해 확보한 아미노산 유도체화 기반 기술은 아미노산 외 다른 사료 첨가제, 예를 들어 유기산 및 지방산 등에 활용 가능하기 때문에 아미노산 사료 첨가제 분야 뿐만 아니라 전반적인 사료 첨가제의 반추위 보호 기능 부여가 가능할 것으로 판단됨. 이를 통해 농가 이익을 극대화할 수 있는 사료 소재 개발로 확대 적용이 가능할 것으로 예상됨.
- 또한, 보호 아미노산 첨가를 위해 새롭게 제안하는 사료 배합비의 확산을 통해서 농가의 사료비 절감 및 생산성 증대를 유도함으로써 농가의 이익을 개선할 수 있을 것으로 판단됨.

### 제 2 절 추가 연구의 필요성

- 본 연구에서 검증한 반추위 보호 아미노산 외의 다른 개별 아미노산 및 아미노산들의 조합을 실제 검증하는 사양 실험이 필요할 것으로 판단됨.
- 또한, 아미노산 첨가에 따른 유증 단백질합성 signaling map의 이해를 위한 metabolomics 연구를 추가적으로 수행할 경우, 단순히 효능 개선 측면의 결과 확보뿐만 아니라 낙농우 체내에서 진행되는 분자 수준에서의 작용 기작의 검증이 가능하고, 이를 바탕으로 해당 소재의 기능적 특성을 보다 심도 있게 확인이 가능함. 이러한 기술 자료는 추후 제품의 기술 마케팅을 위해서 효율적으로 활용될 수 있을 것으로 예상됨.
- 아울러, 각 사료별 영양소 함량에 맞는 아미노산 조성 첨가 사양실험을 통해서 최적의 아미노산 배합 비율을 확보하고, 이를 바탕으로 비용 효율적인 사료 배합비를 제공함으로써 농가의 이익을 개선할 수 있는 방안의 확보가 필요함.

### 제 3 절 타 연구에의 응용

- 국내 사양 체계에 적합한 사료 첨가용 아미노산 조성 제공이 가능함.
- 본 연구를 통해 개발된 반추위 보호 아미노산의 sub-effect로 발견된 다양한 지표들을 활용하여 아미노산 첨가로 인한 동물 체내 다양한 효과 검증에 기여가 가능함.

#### 제 4 절 사업화 추진방안 및 기술 이전

- 본 연구를 통해 확보한 연구 성과들을 보다 면밀히 검토하고, 국내 및 전세계적으로 요구되는 낙농우용 아미노산 사료 첨가제의 시장을 심도있게 분석하여 새로운 개념의 보호 아미노산 시장 진입을 추진하고자 함.
- 이를 위해, 앞서 “추가 연구의 필요성”에서 언급한 것처럼 아미노산 조합별, 첨가량별, 사료 배합비별 효능 검증을 우선적으로 수행하고, 이를 바탕으로 종합적인 사업 계획을 설계할 예정임.
- 또한 기술 이전을 통해 확보하게 될 연구 성과와 더불어 현재 확보한 아미노산 유도체 합성 기술을 보다 면밀히 분석하고, 이를 생산하기 위해 필요한 원자재의 확보, 생산 설비의 비용, 제조 원가의 경쟁력 등에 대해 전반적으로 분석함으로써 경제성 있는 제품을 생산하기 위한 접근을 추진할 예정임.

## 붙임. 참고문헌

- Abbasi, I. H. R., Abbasi, F., El-Hack, M. E. A., Swelum, A. A., Yao, J., and Cao, Y. 2018. Post-ruminal effects of rumen-protected methionine supplementation with low protein diet using long-term simulation and in vitro digestibility technique. *AMB Express*. 8:36.
- Alstrup, L., Nielsen, M. O., Lund, P., Sehested, J., Larsen, M. K., and Weisbjerg, M. R. 2015. Milk yield, feed efficiency and metabolic profiles in Jersey and Holstein cows assigned to different fat supplementation strategies. *Livestock Science*. 178:165-176.
- Appuhamy JA, Knoebel NA, Nayananjali WA, Escobar J, Hanigan MD (2012) Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices *J Nutr* 142:484-491 doi:10.3945/jn.111.152595
- Appuhamy JA, Nayananjali WA, England EM, Gerrard DE, Akers RM, Hanigan MD (2014) Effects of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling and essential amino acids on mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling and protein synthesis rates in mammary cells *J Dairy Sci* 97:419-429 doi:10.3168/jds.2013-7189
- Arambel, M., Bartley, E., Camac, J., Dennis, S., Nagaraja, T., and Dayton, A. 1987. Rumen degradability and intestinal availability of a protected methionine product and its effects on rumen fermentation, and passage rate of nutrients. *Nutrition reports international (USA)*.
- Atasoglu, C., Newbold, C. J., and Wallace, R. J. 2001. Incorporation of [15N] Ammonia by the Cellulolytic Ruminal Bacteria *Fibrobacter succinogenes*BL2, *Ruminococcus albus* SY3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2819-2822.
- Bach, A., Calsamiglia, S., and Stern, M. D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of dairy science*. 88:E9-E21.
- Batistel, F., Arroyo, J. M., Bellingeri, A., Wang, L., Saremi, B., Parys, C., Trevisi, E., Cardoso, F. C., and Loor, J. J. 2017. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances performance during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*. 100:7455-7467.
- Baumrucker CR (1985) Amino acid transport systems in bovine mammary tissue *J Dairy Sci* 68:2436-2451 doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)81119-X
- Bequette BJ, Backwell FR, Crompton LA (1998) Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant *J Dairy Sci* 81:2540-2559 doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)70147-X
- Bergman, E. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological reviews*. 70:567-590.
- Berthiaume, R., Dubreuil, P., Stevenson, M., McBride, B., and Lapierre, H. 2001. Intestinal disappearance and mesenteric and portal appearance of amino acids in dairy cows fed ruminally protected methionine. *Journal of dairy science*. 84:194-203.
- Berthiaume, R., Lapierre, H., Stevenson, M., Cote, N., and McBride, B. W. 2000. Comparison of the in situ and in vivo intestinal disappearance of ruminally protected methionine. *Journal of dairy science*. 83:2049-2056.
- Beugnet A, Tee AR, Taylor PM, Proud CG (2003) Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability

- Bionaz M, Hurley W, Loores J (2012) Milk protein synthesis in the lactating mammary gland: Insights from transcriptomics analyses Milk protein:285-324
- Blake, W. L., Stern, M. D., and Hannah, S. M. 1986. Effect of supplementing methionine in various forms on bacterial degradation of methionine in continuous culture. *Nutrition reports international*. 33:729-738.
- Blu, M., and Ørskov, E. R. 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 40:109-119.
- Blum, J. W., Bruckmaier, R. M., and Jans, F. 1999. Rumen-protected methionine fed to dairy cows: Bioavailability and effects on plasma amino acid pattern and plasma metabolite and insulin concentrations. *Journal of dairy science*. 82:1991-1998.
- Brevet, A., Hoffmeyer, J., Roche, J., and Hedegaard, J. 1968. On the reversibility of the degradation of L-histidine in imidazolelactic acid in different microorganisms. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*. 162:1054-1058.
- Broster WH (1973) Protein-energy interrelationships in growth and lactation of cattle and sheep *Proc Nutr Soc* 32:115-122 doi:10.1079/pns19730024
- Casper, D., Schingoethe, D., Yang, C.-M., and Mueller, C. 1987. Protected methionine supplementation with extruded blend of soybeans and soybean meal for dairy cows. *Journal of dairy science*. 70:321-330.
- Chalupa, W. 1976. Degradation of amino acids by the mixed rumen microbial population. *Journal of Animal Science*. 43:828-834.
- Chandler, P. T., Brown, C. A., Johnston Jr, R. P., Macleod, G. K., McCarthy, R. D., Moss, B. R., Rakes, A. H., and Slatter, L. D. 1976. Protein and methionine hydroxy analog for lactating cows. *Journal of dairy science*. 59:1897-1909.
- Chaney, A. L., and Marbach, E. P. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical chemistry*. 8:130-132.
- Chase, L. E., Higgs, R. J., and Van Amburgh, M. E. 2012. Feeding low crude protein rations to dairy cows-What have we learned. In: *Proceedings of the 23rd Ruminant Nutrition Symposium*. University of Florida, Gainesville, FL. p 32-42.
- Chen, Y., Harrison, J., and Bunting, L. 2018. Effects of replacement of alfalfa silage with corn silage and supplementation of methionine analog and lysine-HCl on milk production and nitrogen feed efficiency in early lactating cows. *Animal Feed Science and Technology*.
- Chung, Y. H., Bateman II, H. G., Williams, C. C., Stanley, C. C., Gantt, D. T., Braud, T. W., Southern, L. L., Ward, J. D., Hoyt, P. G., and Sod, G. A. 2006. Effects of methionine and lysine on fermentation in vitro and in vivo, nutrient flow to the intestine, and milk production. *Journal of dairy science*. 89:1613-1620.
- Clark JH (1975) Lactational responses to postruminal administration of proteins and amino acids *J Dairy Sci* 58:1178-1197 doi:10.3168/jds.S0022-0302(75)84696-0
- Colmenero, J. J. O., and Broderick, G. A. 2006. Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*. 89:1704-1712.

- de Veth MJ, Castaneda-Gutierrez E, Dwyer DA, Pfeiffer AM, Putnam DE, Bauman DE (2006) Response to conjugated linoleic acid in dairy cows differing in energy and protein status *J Dairy Sci* 89:4620-4631 doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72512-7
- Digenis, G. A., Amos, H. E., Yang, K., Mitchell, G. E., Little, C. O., Swintosky, J. V., Parish, R. C., Schelling, G. T., Dietz, E. M., and Tucker, R. E. 1974. Methionine substitutes in ruminant nutrition I: Stability of nitrogenous compounds related to methionine during in vitro incubation with rumen microorganisms. *Journal of pharmaceutical sciences*. 63:745-751.
- Dijkstra, J. 1994. Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livestock Production Science*. 39:61-69.
- Dinn, N. E., Shelford, J. A., and Fisher, L. J. 1998. Use of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System and rumen-protected lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows. *Journal of dairy science*. 81:229-237.
- Doane, P. H., Schofield, P., and Pell, A. N. 1997. Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the in vitro fermentation of six forages. *Journal of Animal Science*. 75:3342-3352.
- Elwakeel, E. A., Titgemeyer, E. C., Faris, B. R., Brake, D. W., Nour, A. M., and Nasser, M. E. A. 2012. Hydroxymethyl lysine is a source of bioavailable lysine for ruminants. *Journal of Animal Science*. 90:3898-3904.
- Endo, Y. 1980. In vivo deacetylations of n-acetyl amino acids by kidney acylases in mice and rats a possible role of acylase system in mammalian kidneys. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 628:13-18.
- Erwin, E. S., Marco, G. J., and Emery, E. M. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of dairy science*. 44:1768-1771.
- Firkins, J. L., Fowler, C. M., Devillard, E., and Bequette, B. J. 2015. Kinetics of microbial methionine metabolism in continuous cultures administered different methionine sources. *Journal of dairy science*. 98:1178-1194.
- Fowler, C. M., Plank, J. E., Devillard, E., Bequette, B. J., and Firkins, J. L. 2015. Assessing the ruminal action of the isopropyl ester of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid in continuous and batch cultures of mixed ruminal microbes. *Journal of dairy science*. 98:1167-1177.
- France, J., and Dijkstra, J. 2005. Volatile fatty acid production. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. 2:157-175.
- Frank, B., and Swensson, C. 2002. Relationship between content of crude protein in rations for dairy cows and milk yield, concentration of urea in milk and ammonia emissions. *Journal of dairy science*. 85:1829-1838.
- Gallo A, Fusconi G, Fiorentini L, Grilli E, Fantinati P, Masoero F, Cuore S (2010) Blood methionine and lysine concentration in lactating dairy cows supplemented with commercial rumen-protected methionine and lysine products *Energy and protein metabolism and nutrition*:349
- Getachew G, Pittroff W, Putnam D, Dandekar A, Goyal S, DePeters E (2008) The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis *Animal feed science and technology* 140:444-461

- Giallongo, F., Harper, M. T., Oh, J., Lopes, J. C., Lapierre, H., Patton, R. A., Parys, C., Shinzato, I., and Hristov, A. N. 2016. Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. *Journal of dairy science*. 99:4437-4452.
- Graulet, B., Richard, C., and Robert, J. 2005. Methionine availability in plasma of dairy cows supplemented with methionine hydroxy analog isopropyl ester. *Journal of dairy science*. 88:3640-3649.
- Gwazdauskas FC (1985) Effects of climate on reproduction in cattle *J Dairy Sci* 68:1568-1578 doi:10.3168/jds.S0022-0302(85)80995-4
- Hansen, W. P., Otterby, D. E., Linn, J. G., and Donker, J. D. 1991. Influence of forage type, ratio of forage to concentrate, and methionine hydroxy analog on performance of dairy cows. *Journal of dairy science*. 74:1361-1369.
- Haque, M. N., Rulquin, H., and Lemosquet, S. 2013. Milk protein responses in dairy cows to changes in postruminal supplies of arginine, isoleucine, and valine. *Journal of dairy science*. 96:420-430.
- Harrison, D. G., and McAllan, A. B. 1980. Factors affecting microbial growth yields in the reticulo-rumen, *Digestive physiology and metabolism in ruminants*. Springer. p. 205-226.
- Hutjens, M. F., and Schultz, L. H. 1971. Addition of soybeans or methionine analog to high-concentrate rations for dairy cows. *Journal of dairy science*. 54:1637-1644.
- Johnson, H. E., Whitehouse, N. L., Garthwaite, B. D., Piepenbrink, M. S., and Schwab, C. G. 1999. Supplementation of corn and barley-based diets of late gestation and early lactation cows with liquid methionine hydroxy analog (HMB). *J. Dairy Sci*. 82:65.
- Jones, B. A., Mohamed, O. E., Prange, R. W., and Satter, L. D. 1988. Degradation of Methionine Hydroxy Analog in the Rumen of Lactating Cows. *Journal of dairy science*. 71:525-529.
- Kahlon, T. S., Meiske, J. C., and Goodrich, R. D. 1975. Sulfur Metabolism In Ruminants: I. In Vitro Availability of Various Chemical Forms of Sulfur. *Journal of Animal Science*. 41:1147-1153.
- Kimball SR, Jefferson LS (2005) Role of amino acids in the translational control of protein synthesis in mammals *Semin Cell Dev Biol* 16:21-27 doi:10.1016/j.semcdb.2004.11.009
- King KJ, Bergen WG, Sniffen CJ, Grant AL, Grieve DB, King VL, Ames NK (1991) An assessment of absorbable lysine requirements in lactating cows *J Dairy Sci* 74:2530-2539 doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78430-0
- Knight, C. D., and Dibner, J. J. 1984. Comparative absorption of 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid and L-methionine in the broiler chick. *The Journal of nutrition*. 114:2179-2186.
- Koenig, K. M., and Rode, L. M. 2001. Ruminal degradability, intestinal disappearance, and plasma methionine response of rumen-protected methionine in dairy cows. *Journal of dairy science*. 84:1480-1487.
- Koenig, K. M., Rode, L. M., Knight, C. D., and McCullough, P. R. 1999. Ruminal escape, gastrointestinal absorption, and response of serum methionine to supplementation of liquid methionine hydroxy analog in dairy cows. *Journal of dairy science*. 82:355-361.
- Koenig, K. M., Rode, L. M., Knight, C. D., and Vázquez-Añón, M. 2002. Ruminal Degradation and Availability of Various Amounts of Liquid Methionine Hydroxy Analog in Lactating Dairy

Cows]. *Journal of dairy science*. 85:930–938.

Kollmann, M. T., Locher, M., Hirche, F., Eder, K., Meyer, H. H. D., and Bruckmaier, R. M. 2008. Effects of tryptophan supplementation on plasma tryptophan and related hormone levels in heifers and dairy cows. *Domestic animal endocrinology*. 34:14–24.

Korhonen M, Vanhatalo A, Huhtanen P (2002) Evaluation of isoleucine, leucine, and valine as a second-limiting amino acid for milk production in dairy cows fed grass silage diet *Journal of dairy science* 85:1533–1545

Krízová, L., Trináctý, J., Richter, M., Hadrová, S., and Pozdísek, J. 2008. Effect of ruminally-protected leucine supplement on milk yield and plasma amino acids in dairy cows.

Lagunes, F. I. J., Fox, D. G., Blake, R. W., and Pell, A. N. 1999. Evaluation of tropical grasses for milk production by dual-purpose cows in tropical Mexico. *Journal of dairy science*. 82:2136–2145.

Lapierre H, Ouellet D, Lobley G (2014) Estimation of histidine requirement in lactating dairy cows *J Dairy Sci* 97:757

Lee C et al. (2012) Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet *J Dairy Sci* 95:6042–6056 doi:10.3168/jds.2012–5581

Lee, C., Giallongo, F., Hristov, A. N., Lapierre, H., Cassidy, T. W., Heyler, K. S., Varga, G. A., and Parys, C. 2015. Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*. 98:1885–1902.

Lee, C., Hristov, A. N., Heyler, K. S., Cassidy, T. W., Lapierre, H., Varga, G. A., and Parys, C. 2012. Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows. *Journal of dairy science*. 95:5253–5268.

Lee SB et al. (2020) Administration of encapsulated L-tryptophan improves duodenal starch digestion and increases gastrointestinal hormones secretions in beef cattle *Asian–Australas J Anim Sci* 33:91–99 doi:10.5713/ajas.19.0498

Leja-Szpak, A., Jaworek, J., Nawrot-Porąbka, K., Palonek, M., Mitis-Musioł, M., Dembiński, A., Konturek, S., and Pawlik, W. W. 2004. MODULATION OF PANCREATIC ENZYME SECRETION BY. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 55:33–46.

Lewis, T. R., and Emery, R. S. 1962. Relative deamination rates of amino acids by rumen microorganisms. *Journal of dairy science*. 45:765–768.

Liang, S. L., Wei, Z. H., Wu, J. J., Dong, X. L., Liu, J. X., and Wang, D. M. 2019. Effect of N-acetyl-l-methionine supplementation on lactation performance and plasma variables in mid-lactating dairy cows. *Journal of dairy science*. 102:5182–5190.

Lu L, Gao X, Li Q, Huang J, Liu R, Li H (2012) Comparative phosphoproteomics analysis of the effects of L-methionine on dairy cow mammary epithelial cells *Canadian Journal of Animal Science* 92:433–442

Lynch G, Berger L, Merchen NR, Fahey Jr G, Baker E (1987) Effects of ethanol and heat treatments of soybean meal and infusion of sodium chloride into the rumen on

ruminal degradation and escape of soluble and total soybean meal protein in steers  
Journal of animal science 65:1617-1625

McDougall, E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. Biochemical journal. 43:99.

Mepham TB (1982) Amino acid utilization by lactating mammary gland J Dairy Sci 65:287-298 doi:10.3168/jds.S0022-0302(82)82191-7

Miettinen, H., and Huhtanen, P. 1996. Effects of the ratio of ruminal propionate to butyrate on milk yield and blood metabolites in dairy cows. Journal of dairy science. 79:851-861.

Morrison, M., Murray, R. M., and Boniface, A. N. 1990. Nutrient metabolism and rumen micro-organisms in sheep fed a poor-quality tropical grass hay supplemented with sulphate. The Journal of Agricultural Science. 115:269-275.

Munk BG (1966) Amino acid transport by the small intestine of the rat The existence and specificity of the transport mechanism of imino acids and its relation to the transport of glycine Biochim Biophys Acta doi: 10.1016/0926-6585(66)90281-0

Nan X et al. (2014) Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells Physiol Genomics 46:268-275 doi:10.1152/physiolgenomics.00119.2013

National Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle: 2001. National Academies Press

Neves CA et al. (2007) Intake, whole tract digestibility, milk production, and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfonate Animal Feed Science and Technology 134:32-44

Noftsger, S. M., St-Pierre, N. R., Karnati, S. K. R., and Firkins, J. L. 2003. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) on microbial growth in continuous culture. Journal of dairy science. 86:2629-2636.

Nowak W, Michalak S, Wylegala S (2005) In situ evaluation of ruminal degradability and intestinal digestibility of extruded soybeans Czech Journal of Animal Science 50:281-287

Nursoy, H., Ronquillo, M. G., Faciola, A. P., and Broderick, G. A. 2018. Lactation response to soybean meal and rumen-protected methionine supplementation of corn silage-based diets. Journal of dairy science. 101:2084-2095.

O' Mahony L, Akdis M, Akdis CA (2011) Regulation of the immune response and inflammation by histamine and histamine receptors Journal of Allergy and Clinical Immunology 128:1153-1162

Nursoy, H., Ronquillo, M. G., Faciola, A. P., and Broderick, G. A. 2018. Lactation response to soybean meal and rumen-protected methionine supplementation of corn silage-based diets. Journal of dairy science. 101:2084-2095.

Ouellet D, Lobley G, Lapierre H (2014) Histidine requirement of dairy cows determined by the indicator amino acid oxidation (AAO) technique J Dairy Sci 97:757

Pain, B. F., Van der Weerden, T. J., Chambers, B. J., Phillips, V. R., and Jarvis, S. C. 1998. A new inventory for ammonia emissions from UK agriculture. Atmospheric Environment.

32:309-313.

- Patterson, J. A., and Kung Jr, L. 1988. Metabolism of DL-methionine and methionine analogs by rumen microorganisms. *Journal of dairy science*. 71:3292-3301.
- Peschke, E., Fauteck, J. D., Mußhoff, U., Schmidt, F., Beckmann, A., and Peschke, D. 2000. Evidence for a melatonin receptor within pancreatic islets of neonate rats: functional, autoradiographic, and molecular investigations. *Journal of pineal research*. 28:156-164.
- Pigden, W. J., Balch, C. C., and Graham, M. 1980. Standardization of analytical methodology for feeds: proceedings. IDRC, Ottawa, ON, CA
- Prins, R. A., Van Hal-Van Gestel, J. C., and Counotte, G. H. M. 1979. Degradation of amino acids and peptides by mixed rumen micro-organisms. *Zeitschrift für Tierphysiologie Tierernährung und Futtermittelkunde*. 42:333-339.
- Reynolds CK, Harmon DL, Cecava MJ (1994) Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera *J Dairy Sci* 77:2787-2808  
doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77220-9
- Rius AG et al. (2010) Regulation of protein synthesis in mammary glands of lactating dairy cows by starch and amino acids *J Dairy Sci* 93:3114-3127  
doi:10.3168/jds.2009-2743
- Robert, J. C., and Williams, P. E. V. 1997. Influence of forage type on the intestinal availability of methionine from a rumen protected form. *Journal of dairy science*. 80:248.
- Robinson P et al. (1999) Influence of postruminal supplementation of methionine and lysine, isoleucine, or all three amino acids on intake and chewing behavior, ruminal fermentation, and milk and milk component production *Journal of animal science* 77:2781-2792
- Robinson, P. H., Swanepoel, N., and Evans, E. 2010. Effects of feeding a ruminally protected lysine product, with or without isoleucine, valine and histidine, to lactating dairy cows on their productive performance and plasma amino acid profiles. *Animal Feed Science and Technology*. 161:75-84.
- Rook JAF, Balch CC (1961) The effects of intraruminal infusions of acetic, propionic, and butyric acids on the yield and composition of the milk fo the cow *British J of Nutr* 15(3):361-369
- Römer, A., and Abel, H. 1999. Effects of DL-methionine hydroxylanalogue (MHA) or DL-methionine (DL-Met) on N-retention in broiler chickens and pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 81:193-203.
- Rulquin, H. 1987. Détermination de certains acides aminés limitants chez la vache laitière par la méthode des administrations post-ruminales. *Reproduction Nutrition Développement*. 27:299-300.
- Rulquin H, Delaby L (1997) Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rumen-protected methionine *J Dairy Sci* 80:2513-2522  
doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76204-0
- Rulquin, H., and Kowalczyk, J. 2003. Development of a method for measuring lysine and methionine bioavailability in rumen-protected products for cattle. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 12:465-474.

- Russell, J. B. 2006. Factors affecting lysine degradation by ruminal fusobacteria. *FEMS microbiology ecology*. 56:18-24.
- Russell, J. B., O'connor, J., Fox, D., Van Soest, P., and Sniffen, C. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*. 70:3551-3561.
- Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM (2005) Growing roles for the mTOR pathway *Curr Opin Cell Biol* 17:596-603 doi:10.1016/j.ceb.2005.09.009
- Satter, L. D., and Slyter, L. L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British journal of nutrition*. 32:199-208.
- Schwab C, Bozak C, Whitehouse N, Olson V (1992) Amino acid limitation and flow to the duodenum at four stages of lactation. 2. Extent of lysine limitation<sup>1, 2</sup> *Journal of dairy science* 75:3503-3518
- Schwab, C. G., and Ordway, R. S. 2003. Methionine supplementation options. In: *Proc. Four-State Applied Nutrition and Management Conf.*, July. p 9-10.
- Seymour, W. M., Polan, C. E., and Herbein, J. H. 1990. Effects of dietary protein degradability and casein or amino acid infusions on production and plasma amino acids in dairy cows. *Journal of dairy science*. 73:735-748.
- Slyter, L. L., Satter, L. D., and Dinius, D. A. 1979. Effect of ruminal ammonia concentration on nitrogen utilization by steers. *Journal of Animal Science*. 48:906-912.
- Spek, J. W., Dijkstra, J., van Duinkerken, G., Hendriks, W. H., and Bannink, A. 2013. Prediction of urinary nitrogen and urinary urea nitrogen excretion by lactating dairy cattle in northwestern Europe and North America: A meta-analysis. *Journal of dairy science*. 96:4310-4322.
- St-Pierre, N. R., and Sylvester, J. T. 2005. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) and its isopropyl ester on milk production and composition by Holstein cows. *Journal of dairy science*. 88:2487-2497.
- Subuh A, Rowan T, Lawrence T (1996) Effect of heat or formaldehyde treatment on the rumen degradability and intestinal tract apparent digestibility of protein in soya-bean meal and in rapeseed meals of different glucosinolate content *Animal feed science and technology* 57:257-265
- Supapong, C., Cherdthong, A., Wanapat, M., Chanjula, P., and Uriyapongson, S. 2019. Effects of Sulfur Levels in Fermented Total Mixed Ration Containing Fresh Cassava Root on Feed Utilization, Rumen Characteristics, Microbial Protein Synthesis, and Blood Metabolites in Thai Native Beef Cattle. *Animals*. 9:261.
- Tilley, J. M. A., and Terry, R. A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass and forage science*. 18:104-111.
- Trínáctý, J., Křížová, L., Hadrová, S., Hanuš, O., Janštová, B., Vorlová, L., and Dračková, M. 2006. Effect of rumen-protected protein supplemented with three amino acids on milk yield, composition and fatty acid profile in dairy cows. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 15:3-15.
- Toerien CA, Trout DR, Cant JP (2010) Nutritional stimulation of milk protein yield of cows is associated with changes in phosphorylation of mammary eukaryotic initiation

- factor 2 and ribosomal s6 kinase 1 *The Journal of nutrition* 140:285-292
- Trínáctý J, Křížová L, Schulzová V, Hajšlová J, Hanuš O (2009) The effect of feeding soybean-derived phytoestrogens on their concentration in plasma and milk of lactating dairy cows *Archives of Animal Nutrition* 63:219-229
- Urrutia, N. L., and Harvatine, K. J. 2017. Acetate dose-dependently stimulates milk fat synthesis in lactating dairy cows. *The Journal of nutrition*. 147:763-769.
- Van den Hende, C., Oyaert, W., and Bouckajert, J. H. 1963. Fermentation of histidine by rumen bacteria. *Research in Veterinary Science*. 4:77-88.
- Vanhatalo A, Huhtanen P, Toivonen V, Varvikko T (1999) Response of dairy cows fed grass silage diets to abomasal infusions of histidine alone or in combinations with methionine and lysine *J Dairy Sci* 82:2674-2685 doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75524-4
- Vazquez-Anon, M., Cassidy, T., McCullough, P., and Varga, G. 2001. Effects of Alimet on nutrient digestibility, bacterial protein synthesis, and ruminal disappearance during continuous culture. *Journal of dairy science*. 84:159-166.
- Wang L, Magliery TJ, Liu DR, Schultz PG (2000) A new functional suppressor tRNA/aminoacyl– tRNA synthetase pair for the in vivo incorporation of unnatural amino acids into proteins *Journal of the American Chemical Society* 122:5010-5011
- Weerasinghe WM, Wilkinson RG, Lock AL, de Veth MJ, Bauman DE, Sinclair LA (2012)
- Wang, M.-Z., Wang, H.-R., Cao, H.-C., Li, G.-X., and Zhang, J. 2008. Effects of limiting amino acids on rumen fermentation and microbial community in vitro. *Agricultural Sciences in China*. 7:1524-1531.
- Watanabe, K., Sato, H., Kobayashi, T., Katoh, K., and Obara, Y. 2003. Determination of intestinal disappearance of lysine and methionine derived from ruminally protected lysine and methionine in Holstein heifers. *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 16:549-554.
- Effect of a supplement containing trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on the performance of dairy ewes fed 2 levels of metabolizable protein and at a restricted energy intake *J Dairy Sci* 95:109-116 doi:10.3168/jds.2011-4165
- West JW (2003) Effects of heat-stress on production in dairy cattle *J Dairy Sci* 86:2131-2144 doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73803-X
- Whelan, S. J., Mulligan, F. J., Callan, J. J., Flynn, B., and Pierce, K. M. 2013. Effect of forage source and a supplementary methionine hydroxyl analogue on rumen fermentation
- Yao K, Fang J, Yin YL, Feng ZM, Tang ZR, Wu G (2011) Tryptophan metabolism in animals: important roles in nutrition and health *Front Biosci (Schol Ed)* 3:286-297 doi:10.2741/s152
- Whitehouse, N. L., Schwab, C. G., Fredin, S. M., and Brito, A. F. 2016. 1597 Determination of relative methionine bioavailability in lactating cows fed Smartamine M, Mepron, and AminoShure M using the plasma-free AA dose-response method. *Journal of Animal Science*. 94:776-777.
- Windschitl, P. M., and Stern, M. D. 1988. Influence of methionine derivatives on effluent flow of methionine from continuous culture of ruminal bacteria. *Journal of Animal Science*. 66:2937-2947.

- Wu, S. H. W., and Papas, A. 1997. Rumen-stable delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*. 28:323-334.
- Zhao, F., Ma, C., Zhao, G., Wang, G., Li, X., and Yang, K. 2019a. Rumen-protected 5-hydroxytryptophan improves sheep melatonin synthesis in the pineal gland and intestinal tract. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 25:3605.
- Zhao, K., Liu, W., Lin, X. Y., Hu, Z. Y., Yan, Z. G., Wang, Y., Shi, K. R., Liu, G. M., and Wang, Z. H. 2019b. Effects of rumen-protected methionine and other essential amino acid supplementation on milk and milk component yields in lactating Holstein cows. *Journal of dairy science*.
- Zhao Y, Yan S, Chen L, Shi B, Guo X (2018) Effect of interaction between leucine and acetate on the milk protein synthesis in bovine mammary epithelial cells *Anim Sci J* doi:10.1111/asj.13125
- Zhou, Z., Bulgari, O., Vailati-Riboni, M., Trevisi, E., Ballou, M. A., Cardoso, F. C., Luchini, D. N., and Loor, J. J. 2016. Rumen-protected methionine compared with rumen-protected choline improves immunometabolic status in dairy cows during the peripartal period. *Journal of dairy science*. 99:8956-8969.

#### 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.